



HAL
open science

Étude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue

Paul Coulerie

► **To cite this version:**

Paul Coulerie. Étude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue. Chimie thérapeutique. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2012. Français. NNT : 2012NCAL0038 . tel-02967468

HAL Id: tel-02967468

<https://unc.hal.science/tel-02967468>

Submitted on 15 Oct 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE
ÉCOLE DOCTORALE DU PACIFIQUE, ED 469

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES

par
M. Paul COULERIE

Étude phytochimique et pharmacologique
de plantes de Nouvelle-Calédonie à
potentialités anti-dengue

Soutenue le 25 avril 2012 devant un jury composé de :

Madame G. Dijoux-Franca	Professeur, Faculté de pharmacie, Université Lyon 1	Rapporteur
Madame P. Raharivelomanana	Professeur, Université de la Polynésie Française	Rapporteur
Madame M. Dupont-Rouzeyrol	Docteur, Institut Pasteur de Nouvelle- Calédonie	Examineur
Monsieur Y. Asakawa	Professeur, Faculty of pharmaceutical sciences, Tokushima, Japon	Examineur
Monsieur B. Figadère	Docteur, Faculté de pharmacie, Université Paris-Sud XI	Examineur
Monsieur M. Nour	Professeur, Université de la Nouvelle- Calédonie	Examineur
Monsieur E. Hnawia	Docteur, Université de la Nouvelle- Calédonie	Examineur
Monsieur N. Lebouvier	Docteur, Université de la Nouvelle- Calédonie	Examineur

Résumé

La flore de Nouvelle-Calédonie, de par sa richesse et son originalité, est une source potentielle de nouveaux médicaments. En portant une attention particulière aux plantes de la médecine traditionnelle, 48 plantes ont été récoltées et 91 extraits bruts testés pour différentes activités biologiques. 10 plantes nous ont fourni des extraits inhibant la croissance de microorganismes pathogènes de l'homme et 15 plantes sont à l'origine d'extraits cytotoxiques. Ces plantes pourraient respectivement renfermer de nouveaux antibiotiques et anticancéreux. 17 plantes présentent de fortes potentialités pour la recherche de composés antiviraux, actifs contre le virus de la dengue.

Le virus de la dengue (DV), contre lequel il n'existe aucun traitement aujourd'hui, touche plus de 50 millions de personnes chaque année. Afin de trouver des inhibiteurs de ce virus nous avons ciblé la protéine DV-NS5, une enzyme essentielle à la réplication et spécifique du DV. Le fractionnement bioguidé des extraits actifs de trois plantes (*Myrtopsis corymbosa* Guill., *Dacrydium balansae* Brongn. & Gris., et *Carpolepis laurifolia* J.W. Dawson) nous a alors permis d'isoler divers composés appartenant aux familles des alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes, stéroïdes et terpènes. Parmi ceux-ci, les flavonoïdes sont les plus puissants inhibiteurs de la DV-NS5 : Certains biflavonoïdes, tels que la podocarpusflavone A (**40**), ont ainsi montré une concentration inhibant 50% de l'activité de la polymérase virale (CI₅₀) inférieure à 1 µM, sans montrer de cytotoxicité. L'activité de ces composés devra désormais être évaluée contre des cellules infectées par le virus de la dengue.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Insulaire du Vivant et de l'Environnement de l'Université de la Nouvelle-Calédonie (LIVE-UNC), sous la direction de M. Nour et la codirection d'E. Hnawia que je remercie de m'avoir accepté dans leur équipe et permis de réaliser cette thèse. Je remercie également le gouvernement de la Nouvelle-Calédonie pour m'avoir accordé une bourse de recherche pour effectuer ces travaux.

Je tiens à remercier chacun des membres du jury, Madame G. Dijoux-Franca, Madame P. Raharivelomanana, Madame M. Dupont-Rouzeyrol, Monsieur Y. Asakawa et Monsieur B. Figadère de me faire bénéficier de leur expertise en acceptant de juger ce travail et de consacrer du temps à l'examen de ce manuscrit.

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe du LIVE et particulièrement A. Hamir son directeur, B. Fogliani, N. Lebouvier et S. Mengant. Le laboratoire de chimie des substances naturelles du LIVE étant hébergé dans les locaux du centre IRD de Nouméa, notre travail a bénéficié de nombreuses collaborations. A ce titre je tiens à remercier tout le personnel de l'IRD et notamment V. Guillemard, A. Vidault et C. Poullain pour toute l'aide technique fournie. Merci aussi aux thésards du LIVE et de l'IRD de Nouméa pour les bons et mauvais moments sincèrement partagés.

Les études phytochimiques ont été réalisées en partie au sein du laboratoire BioCIS de la faculté de pharmacie de l'université Paris-Sud. Je remercie B. Figadère de

m'avoir accueilli à deux reprises au sein de son laboratoire. Je remercie très chaleureusement K. Leblanc, A. Berton, A. Maciuk, B. Akagah, A. Lormier, mais aussi ceux du 4^{ème} et notamment B. Seon-Meniel, P. Champi, E. Poupon, G. Lewin, F. Roblot, C. Fourneau, et toute l'équipe des thésards parisiens. Je remercie aussi J-C Jullian, C. Troufflard et E. Morvant du service RMN, et A. Solgadi du SAMM.

L'évaluation biologique contre la dengue est le fruit d'une collaboration active avec le laboratoire AFMB de l'Université Aix-Marseille. Pour cela je remercie C. Eydoux, J-C. Guillemot et B. Cannard.

La mise en plaque des extraits pour la préparation du criblage biologique, ainsi que les tests de cytotoxicité ont été réalisés à l'ICSN de Gif sur Yvette. Je remercie pour cela, F. Guéritte, M. Litaudon et V. Dumontet.

Les plantes récoltées en Nouvelle-Calédonie ont été sélectionnées pour la plupart sur des critères ethnopharmacologiques. Ce travail n'aurait pas été possible sans la collaboration de P. Cabalion, que je remercie pour avoir partagé une partie de son savoir avec moi. Je souhaite aussi remercier tout le personnel de l'herbier du centre IRD de Nouméa d'avoir accepté de conserver un échantillon de référence des plantes récoltées pour nos travaux. Je remercie également J. Munzinger pour toute l'aide apportée en matière de botanique.

Je remercie ma famille et mes proches pour leur soutien pendant ces trois années. Et, à toutes celles et ceux que j'ai malencontreusement oubliés, j'adresse mes plus plates excuses et vous remercie également.

Table des matières

Résumé.....	
Remerciements	1
Table des matières	3
Liste des figures.....	11
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations.....	17
Introduction générale	21
Première partie : Généralités & contexte de l'étude	20
1. Le virus de la dengue (DV).....	25
1.1. Vecteurs de la maladie.....	26
1.2. Symptomatologie et pathogénèse.....	27
1.2.1. Symptômes classiques de la dengue.....	27
1.2.2. Formes graves de la dengue.....	28
1.2.3. Nouvelle classification des symptômes.....	30
1.3. Epidémiologie	31
1.4. Notions de virologie et d'enzymologie appliquées au DV.....	34
1.4.1. Réplication du DV dans les cellules de l'hôte	34
1.4.2. NS3 et NS5 : deux enzymes clés dans la réplication de l'ARN du DV	37
1.4.3. Structure et fonctionnement de la DV-NS5 RdRp.....	38

2.	Stratégies de lutte contre le DV	40
2.1.	Moyens disponibles	40
2.2.	Nouvelle stratégie de lutte anti-vectorielle	40
2.3.	Recherche d'un vaccin	42
2.4.	Recherche d'antiviraux.....	44
3.	La nature comme source de nouveaux composés bioactifs	48
3.1.	Naissance, apogée, déclin et renaissance de la pharmacognosie	49
3.1.1.	La « pré-histoire » de la pharmacognosie.....	49
3.1.2.	Les grandes étapes de l'histoire de la pharmacognosie.....	51
3.1.3.	Quel avenir pour la pharmacognosie ?.....	52
3.2.	Spécificités des composés bioactifs d'origine naturelle.....	53
3.3.	Le choix des plantes pour la recherche de composés bioactifs.....	54
3.4.	Le criblage aléatoire	55
3.5.	La chimiotaxonomie.....	56
3.6.	L'ethnopharmacologie.....	57
3.6.1.	Historique	58
3.6.2.	Difficultés d'interprétation des informations de la médecine traditionnelle ..	59
3.6.3.	Enjeux modernes de l'ethnopharmacologie.....	60
3.7.	Valorisation et sauvegarde de la biodiversité	61
4.	La Nouvelle-Calédonie : notre terrain d'étude	63
4.1.	Situation géographique de la Nouvelle-Calédonie.....	63
4.2.	Biotopes et biodiversités calédoniens.....	66
4.2.1.	La forêt sèche	66
4.2.2.	La forêt humide.....	68
4.2.3.	Le maquis minier	69
4.2.4.	Le littoral Calédonien.....	69
4.3.	Potentiel pharmacologique de la flore calédonienne.....	71

Seconde partie : Sélection des plantes & criblage des extraits bruts	72
Introduction	73
1. Sélection des plantes.....	73
1.1. Sélection des plantes fébrifuges de la médecine traditionnelle	74
1.1.1. Concepts traditionnels et modernes de la médecine	74
1.1.2. Sélection des plantes fébrifuges	76
1.2. Sélection des plantes sur des critères chimiotaxonomiques	77
2. Récolte des espèces sélectionnées.....	79
3. Préparation des extraits bruts	83
4. Criblage biologique des extraits bruts	83
4.1. Evaluation des potentialités antidengue	84
4.2. Evaluation de l'activité antibiotique contre quatre microorganismes	86
4.3. Evaluation de la cytotoxicité contre deux souches cellulaires humaines	88
4.4. Criblage phytochimique des plantes d'intérêt	91
Conclusions et discussion.....	95
Troisième partie : Alcaloïdes & coumarines de <i>Myrtopsis corymbosa</i>	102
Introduction	103
1. Notions de botanique du genre <i>Myrtopsis</i>	103
1.1. La famille des Rutaceae.....	104
1.2. Le Genre <i>Myrtopsis</i>	105
2. Chimiotaxonomie des Rutaceae.....	106
2.1. Huile essentielle	106
2.2. Alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines et limonoïdes	107
2.3. Travaux précédent sur le genre <i>Myrtopsis</i>	108
3. Comparaison de la composition chimique et de l'activité biologique de trois <i>Myrtopsis</i> <i>spp.</i> 110	
3.1. Criblage phytochimique	110

3.2.	Tests biologiques préliminaires	111
3.3.	La famille des coumarines responsable de l'activité.....	113
4.	Fractionnement bioguidé de l'extrait DCM des écorces de <i>M. corymbosa</i>	115
5.	Isolement et évaluation biologique des coumarines majoritaires de <i>M. corymbosa</i> ..	116
5.1.	Composition de l'extrait DCM	116
5.2.	Détermination structurale du composé 23	120
5.3.	Détermination structurale des composés 24 et 25.....	122
5.4.	Une coumarine non isolée	124
5.5.	Activité des coumarines isolées contre la DV-NS5 RdRp	125
6.	Isolement et évaluation biologique des alcaloïdes majoritaires de <i>M. corymbosa</i>	126
6.1.	Détermination structurale du composé 26	127
6.2.	Détermination structurale du composé 27	128
6.3.	Détermination structurale du composé 28.....	129
6.4.	Activité des alcaloïdes isolés contre la DV-NS5 RdRp	131
7.	Comparaison de la composition en alcaloïdes des feuilles et des écorces de <i>M. corymbosa</i>	132
	Conclusion.....	133
Quatrième partie : Biflavonoïdes des <i>Dacrydium spp.</i>		135
	Introduction	136
1.	Notions de botanique du genre <i>Dacrydium</i>	137
2.	Chimiotaxonomie	139
2.1.	Huile essentielle	139
2.2.	Diterpènes oxygénés.....	141
2.3.	Etude des flavonoïdes.....	142
3.	Isolement des principes actifs de <i>D. balansae</i>	143
3.1.	Fractionnement bioguidé de l'extrait des feuilles de <i>D. balansae</i>	143
3.2.	Fractionnement de la partie DCM.....	144

3.3.	Fractionnement de la partie ACN	144
3.4.	Fractionnement de la partie hexanique	145
4.	Analyse structurale des biflavonoïdes 39, 40 et 41	145
4.1.	Détermination structurale du composé 39	147
4.2.	Détermination structurale des composés 40 et 41	148
5.	Analyse structurale des phénols 42 et 43	152
5.1.	Analyse des spectres UV et MS	152
5.2.	Détermination structurale du composé 42	152
5.3.	Détermination structurale du composé 43	153
6.	Analyse structurale des stérols 44, 45 et 46	156
6.1.	Analyse des spectres UV et MS	156
6.2.	Détermination structurale du composé 44	157
6.3.	Détermination structurale du composé 45	158
6.4.	Détermination structurale du composé 46	158
7.	Activité biologique des composés isolés	161
7.1.	Potentialités antivirales	161
7.1.1.	Activité contre la DV-NS5	161
7.1.2.	Activité contre d'autres polymérase virales	161
7.1.3.	Inhibition de l'activité de la DV-NS5 dans deux réplicons	163
7.2.	Cytotoxicité	164
8.	Etude des biflavonoïdes des feuilles de <i>D. araucarioides</i>	166
8.1.	Détermination structurale des biflavones isolées de <i>D. araucarioides</i>	167
9.	Etude des relations structure-activité des biflavonoïdes contre la DV-NS5 RdRp	171
9.1.	Comparaison de l'activité biologique de quatre biflavonoïdes simples	172
9.2.	Modulation de l'activité contre la DV-NS5 RdRp par les groupements méthyles sur l'amentoflavone	173
9.3.	Etude SAR de dérivés de l'apigénine sur la DV-NS5 RdRp	174
10.	Composition en biflavonoïdes des quatre <i>Dacrydium</i> calédoniens	177

Conclusion et discussion	180
Cinquième partie : Flavonoïdes de <i>Carpolepis laurifolia</i>	182
Introduction	183
1. Description botanique.....	183
2. Chimiotaxonomie.....	186
2.1. Huile essentielle	186
2.2. Flavonoïdes.....	187
3. Rappel des résultats préliminaires.....	189
3.1. Activités biologiques des feuilles de <i>C. laurifolia</i>	189
3.2. Les flavonoïdes révélés par le criblage phytochimique	190
4. Fractionnement bioguidé d'un extrait des feuilles de <i>C. laurifolia</i>	190
4.1. Extrait total des flavonoïdes	190
4.2. Séparation liquide/liquide de l'extrait méthanolique	191
4.3. Fractionnement bioguidé de B.2	191
5. Analyse structurale des principes actifs de <i>C. laurifolia</i>	193
5.1. Détermination structurale des composés 65 et 77.....	194
5.2. Analyse structurale des composés 78 et 79	195
5.2.1. Détermination structurale du composé 78	196
5.2.2. Détermination structurale du composé 79	198
5.3. Détermination structurale du composé 80	200
5.4. Détermination structurale du composé 81	203
6. Activité biologique des flavonoïdes contre la DV-NS5	206
6.1. Potentiel antidengue des composés isolés de <i>C. laurifolia</i>	206
6.1.1. Inhibition de la DV-NS5 par deux flavonoïdes non glycosylés (65 et 82). 206	
6.1.2. Inhibition de la DV-NS5 par trois flavonols glycosylés (77, 78 et 79)	207
6.1.3. Inhibition de la DV-NS5 par l'acide bétulinique (81)	208

6.2. Autres flavonols glycosylés testés contre la DV-NS5 RdRp.....	209
Conclusion et Discussion	210
Partie expérimentale.....	212
1. Récoltes des plantes sélectionnées	213
2. Préparation des extraits bruts.....	217
3. Tests biologiques.....	218
3.1. Test enzymatique contre la DV-NS5.....	218
3.1.1. Production et purification de l'enzyme	218
3.1.2. Mesure de l'activité d'inhibition de la DV2 NS5	219
3.1.3. Test contre un réplicon	222
3.2. Inhibition de l'ARN polymérase d'autres virus	223
3.3. Mesure de cytotoxicité	223
3.3.1. Evaluation de la cytotoxicité contre les cellules KB et MRC5	223
3.3.2. Evaluation de la cytotoxicité contre les cellules COS et BHK.....	225
3.4. Tests antibiotiques.....	225
4. Chimie analytique	227
4.1. Criblage phytochimique	227
4.2. Recherche des principes actifs	229
4.2.1. Préparation des extraits.....	229
4.2.2. Extraction totale des coumarines	229
4.2.3. Extraction totale des alcaloïdes.....	230
4.2.4. Extraction totale des flavonoïdes	230
4.3. Fractionnement bioguidé	231
4.3.1. Matériel utilisé	231
4.3.2. Méthodes employées	233
5. Elucidation structurale.....	234

5.1. Matériel utilisé	234
5.1.1. Chromatographie.....	234
5.1.2. Méthodes employées	235
5.2. Spectrométrie et spectroscopie	235
5.2.1. Spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS)	235
5.2.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	236
6. Composés commerciaux et hémi-synthétiques	236
6.1. Composés commerciaux.....	237
6.2. Composés hémi-synthétiques.....	237
Conclusion générale.....	238
Bibliographie	245
Annexes.....	256

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénétique des Flavivirus d'après la séquence codant pour la protéine NS5 de ces virus	25
Figure 2. Nouvelle classification proposée par l'OMS des symptômes de la dengue	30
Figure 3. Nombre de cas de dengue recensés par l'OMS depuis 1955.....	32
Figure 4. Population mondiale exposée au DV selon les estimations de l'OMS en 2010	32
Figure 5. Cycle de réplication du DV dans la cellule hôte.....	35
Figure 6. Structure 3D de la DV-NS5-RdRp	38
Figure 7. Principaux composés antiviraux non-nucléosidiques décrits contre le DV.	47
Figure 8. A : Extrait du Papyrus de Ebers. B : la mandragore dans une reproduction du manuscrit de Dioscoride datée VII ^{ème} siècle.	50
Figure 9. Portrait de F.W.A. Serturmer (1783-1841) à gauche et de F.A. Kékulé (1829-1896) à droite.	52
Figure 10. Structure chimique de la vinblastine (5) et de la vincristine (6) isolées à partir de <i>Catharanthus roseus</i>	55
Figure 11. Situation géographique de la Nouvelle-Calédonie.....	64
Figure 12. Exemples de plantes hyper-accumulatrices de nickel : <i>Pycnanandra acuminata</i> (arbre à sève bleue) à gauche et <i>Psychotria douarrei</i> , à droite	65
Figure 13. Variété des écosystèmes calédoniens.....	67
Figure 14. Photo du maquis minier dégradé par les mines et les incendies dans la région de la coulée.	71
Figure 15. Carte de la Nouvelle-Calédonie représentant les différents biotopes et les lieux de récolte des différentes plantes criblées au cours de cette étude.....	82
Figure 16. Exemples de diterpénoïdes isolés à partir de <i>E. agalocha</i>	100
Figure 17. Photographies des différentes espèces de <i>Myrtopsis</i> récoltées pour notre étude..	105
Figure 18. Stérol et triterpène décrits dans le genre <i>Myrtopsis</i>	108
Figure 19. Coumarines décrites dans le genre <i>Myrtopsis</i>	109
Figure 20. Alcaloïdes décrits dans le genre <i>Myrtopsis</i>	110
Figure 21. Schéma du fractionnement bioguidé de l'extrait DCM de l'écorce de <i>M. corymbosa</i>	115

Figure 22. Chromatogramme HPLC-UV/MS de l'extrait DCM des écorces de <i>M. corymbosa</i> à 330 nm.....	117
Figure 23. Spectre UV des coumarines identifiées dans l'extrait DCM de <i>M. corymbosa</i> (A) comparé au spectre UV de la 5,7-dihydroxycoumarine et de la 6,7-dihydroxycoumarine analysées par Goodwin & Pollock (B).....	118
Figure 24. Spectres de masse des coumarines majoritaires de l'extrait DCM de <i>M. corymbosa</i>	119
Figure 25. Stabilisation de la 7-hydroxy-8-diméthylallylcoumarine ($[M+H]^+=231$) sous la forme 3',4'-dihydroséséline.	120
Figure 26. Schéma récapitulatif des données RMN et MS utilisés pour la détermination structurale de la ramosine (23).	122
Figure 27. Hypothèse concernant la structure d'une quatrième coumarine observée par HPLC-UV/MS dans l'extrait DCM de <i>M. corymbosa</i>	124
Figure 28. Chromatogramme HPLC-UV/MS de l'extrait alcaloïdique total des feuilles de <i>M. corymbosa</i> à 254 nm.	126
Figure 29. Spectre UV des alcaloïdes identifiés dans les feuilles de <i>M. corymbosa</i>	127
Figure 30. Chromatogramme HPLC-UV/MS de l'extrait alcaloïdique des écorces de <i>M. corymbosa</i>	132
Figure 31. Schéma de deux alcaloïdes supposés présents dans <i>M. corymbosa</i> : la myrtopisine (21) et la N-méthylflindersine (29).	133
Figure 32. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par les extraits bruts des feuilles et des écorces de <i>D. araucarioides</i> (Cou 11) et de <i>D. balansae</i> (Cou 14) à 50, 10 and 1 µg/mL.	136
Figure 33. Photographies des quatre <i>Dacrydium</i> rencontrés en Nouvelle-Calédonie.	138
Figure 34. Structure des terpènes majoritaires dans l'huile essentielle des quatres <i>Dacrydium</i> calédoniens.	140
Figure 35. Exemples de diterpènes oxydés présents chez les Podocarpaceae.	142
Figure 36. Séparation liquide-liquide de l'extrait MeOH des feuilles de <i>D. balansae</i>	143
Figure 37. Structure générale des composés de la famille des flavones.	146
Figure 38. Structure de l'amentoflavone et données RMN obtenues par l'analyse du composé 39	147
Figure 39. Structure de la podocarpusflavone A (40) et de l'isoginkgétine (41).	149
Figure 40. Structure de la trans-3,5,4'-triméthoxystilbène (42) et de la cis-3,5,4'-triméthoxystilbène (43).	154

Figure 41. Structure du stérol (47).....	157
Figure 42. Structure de la 6-hydroxystigmast-4-èn-3-one (44), de la 3-hydroxystigmast-5-èn-7-one (45) et du β -Sitostérol (46).	159
Figure 43. Structure des dérivés de l'amentoflavone isolés de <i>D. balansae</i> et <i>D. araucarioides</i>	168
Figure 44. Structure de l'hinokiflavone (50) et de la robustaflavone (54).....	168
Figure 45. Concentration inhibant 50% de l'activité de la DV2-NS5 RdRp (μ M) de quatre biapigénines distinguées par la liaison entre les deux monomères.....	172
Figure 46. Concentration inhibant 50% de l'activité de la DV2-NS5 RdRp (μ M) de 8 dérivés de l'amentoflavone.....	174
Figure 47. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par l'apigénine (57) et quatre dérivés méthylés de l'apigénine ainsi que six flavonoïdes structurellement proches.....	175
Figure 48. Comparaison de la composition en biflavonoïdes des feuilles de <i>D. araucarioides</i> (A), <i>D. balansae</i> (B), <i>D. guillauminii</i> (C) et <i>D. lycopodioides</i> (D).....	177
Figure 49. Structure de la 7,4',7'',4'''-tetramethoxyamentoflavone (68).	178
Figure 50. Schéma floral d'une plante à hypanthium et détail de la fleur de <i>C. laurifolia</i> var. <i>laurifolia</i>	184
Figure 51. Photos des deux variétés de <i>C. laurifolia</i> : var. <i>laurifolia</i> à gauche et var. <i>demonstrans</i> à droite.	185
Figure 52. Exemples de flavonoïdes isolés de <i>M. excelsa</i>	187
Figure 53. Génine des anthocyanines isolés dans les <i>Metrosideros spp.</i>	188
Figure 54. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par les extraits des feuilles et des écorces de <i>C. laurifolia</i> à 50, 10 et 1 μ g/mL.	189
Figure 55. Schéma du fractionnement bioguidé effectué sur l'extrait FB.2.	192
Figure 56. Analyse HPLC-UVMS de la partie B.2 de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>C. laurifolia</i>	194
Figure 57. Schéma de la quercétine (65) et de l'hyperoside (77).....	195
Figure 58. Spectres UV des composés 78 (λ_{max} = 257, 350) et 79 (λ_{max} = 257, 355).	196
Figure 59. Spectres MS des composés 78 et 79	196
Figure 60. Schéma de la structure de l'avicularine (78) et de la quercitrine (79).	197
Figure 61. Spectre UV du composé 80	200
Figure 62. Schéma de la 6-C-méthyl-7-O-méthylapigénine (80) montrant les données issues des analyses RMN.....	201

Figure 63. Attribution des signaux observés sur le spectre RMN ¹ H pour le composé 81 aux différents protons de l'acide bétulinique par l'analyse des spectres RMN 1D et 2D.....	204
Figure 64. Schéma de la quercétine (65) et de la 6-méthyl-7-méthoxyapigénine (80) et pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp de ces composés à 10 µg/mL.....	206
Figure 65. Schéma de l'hyperoside (77), de l'avicularine (78) et de la quercitrine (79) et pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp de ces composés à 10 µg/mL.....	207
Figure 66. Schéma de l'acide bétulinique (81) et pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp de ces composés à 10 µg/mL.....	208
Figure 67. Structures et inhibition de la DV-NS5 RdRp (%) à 10 µM des dérivés commerciaux de la quercétine	209
Figure 68. Evaporation sous pression réduite et filtration sur gel de polyamide.	217
Figure 69. Schéma réactionnel de la méthylation de l'apigénine et de l'amentoflavone.	237

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales cibles et antiviraux proposés contre la dengue.	45
Tableau 2. Pourcentage d'inhibition de la DV2-NS5 RdRp pour les extraits bruts considérés comme « hits » à 50, 10 et 1 µg/mL.	85
Tableau 3. Extraits des différents organes des plantes présentant une activité antimicrobienne <i>in vitro</i>	87
Tableau 4. Extraits cytotoxiques contre les cellules KB et/ou MRC5.	90
Tableau 5. Résultats du criblage phytochimique mené sur les poudres des plantes ayant montré un fort potentiel antiviral, antimicrobien ou anticancéreux.	92
Tableau 6. Analyse statistique des résultats du criblage biologique.	96
Tableau 7. Résultats du criblage phytochimique mené sur les trois espèces de <i>Myrtopsis</i> récoltées.	111
Tableau 8. Pourcentage d'inhibition de la DENV-NS5 RdRp à 10 µg/mL par les extraits AcOEt obtenus à partir de trois espèces de <i>Myrtopsis</i>	112
Tableau 9. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par différents extraits des feuilles et des écorces de <i>M. corymbosa</i> (Cou 39) à 10 µg/mL.	114
Tableau 10. Données RMN obtenues pour les composés 23 , 24 et 25	123
Tableau 11. Résultats d'inhibition de la DV2-NS5 RdRp obtenus avec les trois coumarines isolées à partir des écorces des <i>M. corymbosa</i>	125
Tableau 12. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenues pour les composés 26 , 27 et 28	130
Tableau 13. Pourcentage d'inhibition de la DV2-NS5 RdRp mesuré avec les trois alcaloïdes isolés à partir des feuilles de <i>M. corymbosa</i> , à 50, 10 et 1 µM.	131
Tableau 14. Données HRMS et masse molaire des flavonoïdes (39 , 40 et 41) isolés à partir des feuilles de <i>D. balansae</i>	146
Tableau 15. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenues pour les biflavonoïdes 39 , 40 et 41	151
Tableau 16. Données HRMS et masse molaire des stilbénoloïdes (42 et 43) isolés à partir des feuilles de <i>D. balansae</i>	152
Tableau 17. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenues pour les composés 42 et 43	155

Tableau 18. Données de spectrométrie de masse (MS) obtenues par l'analyse des composés 44 , 45 et 46 .	156
Tableau 19. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenues pour les composés 44 , 45 et 46 .	160
Tableau 20. Activité inhibitrice des composés isolés des feuilles de <i>D. balansae</i> contre la DV-NS5 et contre d'autres NS5 issus de trois autres Flaviviridæ.	163
Tableau 21. Concentration létale pour 50 % (CL ₅₀) des cellules COS et BHK des composés isolés de <i>D. balansae</i> .	164
Tableau 22. Données HRMS et masse molaire des flavonoïdes isolées à partir des feuilles de <i>D. araucarioides</i> .	167
Tableau 23. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenues pour les dérivés de l'amentoflavone 48 , 49 , 51 , 52 et 53 et pour la perméthylamentoflavone 55 .	169
Tableau 24. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenus par l'analyse de l'hinokiflavone (50) et de la robustaflavone (54).	170
Tableau 25. Comparaison des biflavonoïdes dans les quatre espèces de <i>Dacrydium</i> de Nouvelle-Calédonie.	178
Tableau 26. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenus par l'analyse de la 7,4',7'',4'''-tetraméthoxyamentoflavone (68) d.	179
Tableau 27. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par les extraits à l'éther de pétrole (A), au méthanol à 80% (B) et de la partie AcOEt (B.2) à 10, 1 et 0,1 µg/mL.	191
Tableau 28. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenues pour les composés 77 et 78 et 79 .	199
Tableau 29. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenues pour le composé 80 .	202
Tableau 30. Données RMN ¹ H et ¹³ C obtenues avec le composé 81 .	205
Tableau 31. Liste et localisation des espèces végétales récoltées pour notre étude.	213
Tableau 32. Caractéristiques de différentes souches microbiennes ciblées.	226
Tableau 33. Mise en évidence de différents métabolites secondaires d'intérêt pharmacologique dans les plantes bioactives.	228
Tableau 34. Systèmes d'élutions utilisés pour le fractionnement bioguidé des extraits de plantes sélectionnés.	233
Tableau 35. Systèmes d'élutions utilisés pour la réalisation des analyses HPLC-UV/MS des extraits de plantes sélectionnés.	235

Liste des abréviations

AA : Acide Aminé	COSY : Corrélation spectroscopique ^1H - ^1H
AcOEt : Acétate d'éthyle	CPS : Communauté du Pacifique Sud
ACN : Acétonitrile	DCM : Dichlorométhane
AFMB : Laboratoire d'étude de l'Architecture et Fonctionnement des Macromolécules Biologiques	DCS : Syndrome de Choc de la Dengue
APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique	DH : Dengue hémorragique
ARN : Acide Ribo-Nucléique	DMSO : Diméthylsulfoxyde
ARNss : ARN simple brin	DMSO- d_6 : Diméthylsulfoxyde deutéré
ARNds: ARN double brin	DV : Virus de la Dengue
ASP: Asparagine	DV-NS5 : Protéine Non-Structurale 5 du DV
BHK-DV : Réplicon du virus de la dengue dans des cellules BHK	DV-NS5 RdRp : Domaine ARN polymérase ARN dépendant de la DV-NS5
CDCl_3 : Chloroforme deutéré	DMEM : milieu de culture de Dulbecco modifié
CH : Cyclohexane	EIP : Période d'Incubation Extrinsic
CI_{50} : Concentration Inhibant 50% de l'activité biologique d'une cible	Ec : Ecorces
CL_{50} : Concentration entraînant la mort de 50% de cellules	ESI : Ionisation par électrospray
CCM : Chromatographie sur Couche Mince	Fe : Feuilles
CNRS : Centre National pour la Recherche Scientifique	Fl : Fleurs
COS-DV : Réplicon du Virus de la Dengue dans des cellules COS	Fr : Fruits
COS-DV EGFP : COS-DV possédant une protéine de fluorescence	GTP : Guanosine triphosphate
	$[^3\text{H}]$ -GTP : GTP tritié
	HE : Huile essentielle
	HEX : Hexane
	HCl : Acide chloridrique
	HIS : Histidine

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
HRMS : Spectrométrie de Masse à Haute Résolution
HSQC : Corrélacion hétéronucléaire directe
HMBC:Corrélacion hétéronucléaire à longue distance
IPNC : Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
IRD : Institut pour la Recherche et le Développement
JEV : Virus de l'encéphalite Japonaise
LIV : Forme atténuée d'un Virus
MeOH : Méthanol
MeOD : Méthanol deutéré
MH : Mueller-Hinton
Poly(rC) : homopolymère nucléotidique de cytosine
MS : Spectrométrie de Masse
MSⁿ : Spectrométrie de Masse à n dimensions

MTase : Méthyl-Transférase
NC : Nouvelle-Calédonie
NP : Produit Naturel
NTP : Nucléotides
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PA : Partie Aérienne
RE : Réticulum endoplasmique
RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire
Rt : Temps de Rétention
SAMM : Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites
SAR : Relations Structure/Activité
SDS : Sodium dodécylsulfate
TBEV : Virus de l'encéphalite à tique
TRP : Tryptophane
UV : Ultra Violet
WNV : Virus du Nil occidental
YFV : Virus de la fièvre jaune

Introduction générale

Depuis la nuit des temps l'homme utilise la nature comme source de nourriture et de médicaments. A cet effet, les plantes ont été privilégiées par toutes les civilisations du monde pour développer une pharmacopée traditionnelle en réponse aux maladies qui les touchaient. Depuis les deux derniers siècles environ, l'essor industriel des pays occidentaux a donné naissance à la chimie de synthèse et à la chimie combinatoire qui ont aujourd'hui supplanté la nature pour fournir des médicaments à l'industrie pharmaceutique. Cependant, l'étude des composés d'origine naturelle est toujours porteuse de beaucoup d'espérance pour la recherche de nouveaux médicaments. En effet, depuis quelques décennies, les qualités intrinsèques des produits naturels sont mises en avant (biodisponibilité, biodégradabilité, *etc.*). La nature produit une grande variété de structures chimiques. Les composés naturels sont souvent, grâce au travail de l'évolution, adaptés à des cibles biologiques spécifiques. Comme nous le verrons, les composés d'origine naturelle se distinguent par de nombreux points des composés de synthèse. Pourtant, le réveil des consciences vis-à-vis de la nature se heurte au développement industriel qui menace un peu plus chaque jour la biodiversité. Le développement industriel et la mondialisation, en bousculant leurs coutumes, déstabilisent aussi de nombreuses sociétés traditionnelles. La rapidité de ces bouleversements engendre une perte importante des savoirs traditionnels. S'appuyant sur la richesse floristique extraordinaire de la Nouvelle-Calédonie et sur les connaissances empiriques des kanaks concernant les plantes médicinales, les recherches entreprises ici participent à leur valorisation et à leur protection. 48 plantes, dont 30 utilisées en médecine traditionnelles ont été récoltées pour notre étude dans les provinces Nord et Sud de la Nouvelle-Calédonie. 91 extraits bruts, préparés à partir des différents organes de ces plantes, ont ensuite été testés contre différentes cibles biologiques pour évaluer leur potentiel antiviral, antibiotique et anticancéreux. Comme nous le verrons, les plantes sélectionnées sur des critères ethnopharmacologiques sont plus souvent

actives et moins cytotoxiques que les plantes sélectionnées sur des critères chimiotaxonomiques. De plus, l'activité biologique mesurée est en lien direct avec leur utilisation traditionnelle.

Notre travail de criblage visait dans un second temps à sélectionner des plantes à fort potentiel antidengue. La dengue est une maladie virale affectant toutes les régions tropicales et subtropicales de la planète et contre laquelle il n'existe aucun vaccin ni aucune thérapie spécifique disponible. Afin de proposer des candidats médicaments contre la dengue, nos travaux ont porté sur la recherche d'inhibiteurs de la réplication du virus de la dengue (DV) dans les cellules humaines en ciblant l'ARN polymérase du virus (la DV-NS5 RdRp). Cette enzyme est absolument essentielle à la réplication de l'ARN viral, spécifique du DV et bien conservée dans les quatre sérotypes du virus. Ce type d'enzyme est par ailleurs absent dans les cellules humaines ce qui limite les possibles effets secondaires d'un médicament élaboré selon ce protocole. Pour toutes ces raisons, la DV-NS5 RdRp est considérée comme une des cibles de choix pour la recherche de nouveaux antiviraux contre le DV. La stratégie mise en place ici a déjà montré de bons résultats par le passé en permettant l'identification d'inhibiteurs des virus tels que le HIV, HBV et HCV^{1,2}.

Nous nous sommes alors intéressés aux extraits non cytotoxiques ayant démontré une forte inhibition de la DV-NS5 RdRp. Un fractionnement bioguidé fut mené sur trois plantes endémiques de Nouvelle-Calédonie : *Myrtopsis corymbosa*, une Rutaceae du maquis minier, *Dacrydium balansae*, une Podocarpaceae récoltée dans la chaîne centrale et *Carpolepis laurifolia*, une Myrtaceae récoltée en forêt humide. Ces recherches nous ont amené à purifier 29 composés appartenant à diverses familles chimiques : alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes, stilbènes, stéroïdes et

triterpènes. Les premiers résultats obtenus avec certains composés, notamment des flavonoïdes glycosylés, un triterpène mais surtout avec les biflavonoïdes sont, comme nous le verrons, très encourageants pour le développement d'une thérapie antivirale spécifique du DV.

Première partie :
Généralités &
contexte de l'étude

"La variété très riche des ressources biologiques et les interactions entre ces ressources ne sont point un luxe, bien au contraire, elles sont essentielles pour la croissance et le développement des sociétés humaines et pour l'existence même de la vie sur Terre. La diversité biologique est le socle, le soubassement de nos ressources alimentaires et c'est la source de médecine dont dépend la santé"

*Hamdallah Zedan, Secrétaire exécutif de
la Convention sur la Diversité Biologique, lors de son
discours d'ouverture de la conférence internationale
"Biodiversité, Science et Gouvernance", à Paris, en Janvier
2005.*

1. Le virus de la dengue (DV)

Le virus de la dengue (DV) est responsable d'une fièvre virale ancienne : les premières mentions de cette maladie apparaissent dans la littérature médicale occidentale dès la fin du XVIII^{ème} siècle. Aujourd'hui répandu dans toutes les régions tropicales et sub-tropicales du globe, le DV est responsable d'une maladie dont la sévérité dépend de plusieurs facteurs liés à l'hôte et au virus comme nous le verrons plus loin.

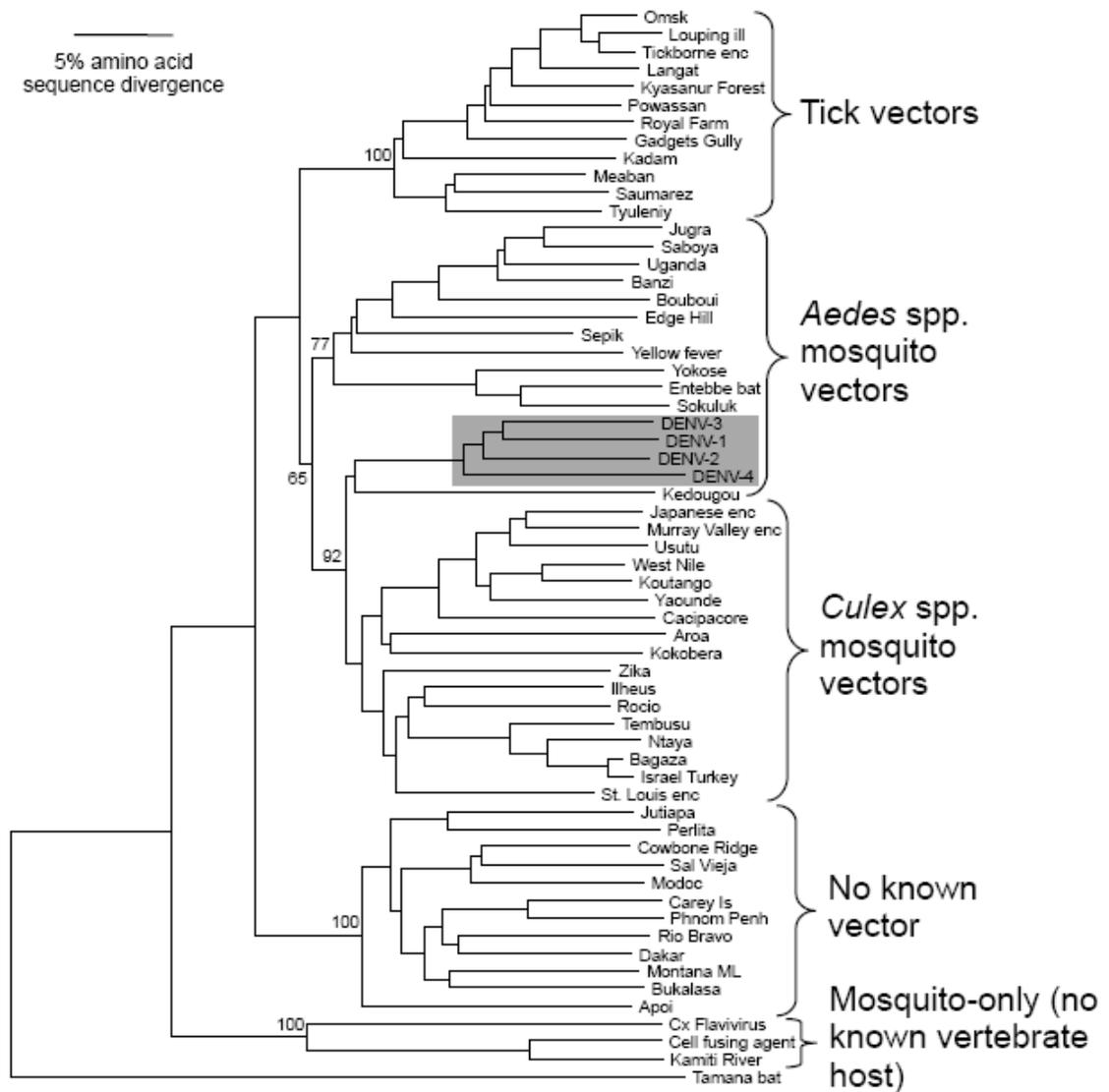


Figure 1. Arbre phylogénétique des Flavivirus d'après la séquence codant pour la protéine NS5 de ces virus³

Causant le plus souvent une fièvre légère à forte, parfois même un état asymptomatique, le DV peut toutefois être beaucoup plus virulent, voire mortel. Le DV fait partie de la famille des Flaviviridæ et appartient plus précisément au genre des *Flavivirus*.

Le genre *Flavivirus*, dont la phylogénie est présentée dans la figure 1, comprend plus de 70 virus dont plus de 40 sont connus pour être pathogènes de l'homme : les virus du Nil occidental (WNV), de l'encéphalite Japonaise (JEV), de l'encéphalite à tique (TBEV) et de la fièvre jaune (YFV) sont parmi les plus tristement célèbres de par les pathologies humaines dont ils sont responsables^{4,5}. Le nom du genre et de la famille provient du grec « flavus » qui signifie jaune, en référence à la jaunisse provoquée par le virus de la fièvre jaune (YFV). L'étude des Flaviviridæ a marqué l'histoire de la virologie, notamment car le YFV fut le premier virus isolé⁶. Le DV fut pour sa part, isolé pour la première fois en 1944 par un médecin et chercheur américain, Albert Bruce Sabin⁷, à partir de prélèvements effectués sur des patients de Nouvelle-Guinée.

1.1. Vecteurs de la maladie

Qualifié d'arbovirus, le DV est transmis à l'homme par les moustiques du genre *Aedes*. *Ae. aegyptii* est reconnu comme le vecteur principal de la maladie bien que d'autres espèces, tel que *Ae. albopictus*, véhiculent également la maladie⁸. L'infection de la femelle moustique se produit au cours d'un repas sanguin sur un individu en phase virémique, par la consommation de sang contaminé. Après avoir passé les barrières digestives de l'insecte, soit approximativement six jours après son ingestion, le DV apparaît dans différents tissus et organes, tels que les tissus adipeux, les ovarioles, les hémocytes, le système nerveux, les ganglions thoraciques

et abdominaux⁹. Quatre jours plus tard environ, le virus apparait dans les glandes salivaires du moustique. Ce dernier devient alors « infectant » et peut transmettre le DV lors d'un nouveau repas sanguin. La période d'incubation extrinsèque (EIP) désigne le temps qui sépare l'infection du vecteur par un repas sanguin et l'infection de ses glandes salivaires ; elle dure en moyenne une dizaine de jours dans le cas du DV. Seules les femelles moustiques dont l'âge est supérieur à l'EIP seront en réalité capables de transmettre le DV à l'homme¹⁰. La transmission verticale du virus, capacité des femelles moustiques infectées à transmettre le virus à leur descendance, a également été observée chez ces moustiques^{11,12,13}. D'après les études menées, le moustique ne manifeste aucun symptôme particulier lié à l'infection par le virus et ne serait donc pas affecté par le DV.

1.2. Symptomatologie et pathogénèse

Il existe quatre sérotypes du DV (DV-1 à DV-4) caractérisés par la présence d'antigènes spécifiques. Les quatre sérotypes du DV possèdent la même morphologie, un génome très proche avec près de 70% d'homologie¹⁴ et sont responsables des mêmes symptômes. L'infection par l'un des quatre sérotypes du DV induit pour le patient une immunité spécifique prolongée mais pas d'immunité croisée entre les sérotypes. Cela signifie qu'une personne peut être atteinte par la maladie plusieurs fois dans sa vie en étant infectée par plusieurs sérotypes¹⁵.

1.2.1. Symptômes classiques de la dengue

Une fois le DV transmis à l'homme et après une période d'incubation de 5-6

jours en moyenne, les symptômes débutent par une fièvre supérieure à 39°C qui durera entre 2 et 7 jours. Le début brutal de l'infection s'accompagne de céphalées frontales et rétro-orbitaires importantes, de myalgies (courbatures), d'arthralgies (douleurs articulaires) d'une asthénie générale (fatigue physique) et fréquemment de vomissements. Certains patients présentent des éruptions de type morbilliformes (macules érythémateuses punctiformes, non confluentes) épargnant le plus souvent le visage et les extrémités¹⁶. D'autres symptômes plus rares sont également associés à l'infection par le DV^{16,17}: myosites (inflammations musculaires), myélite (inflammation de la moelle épinière), encéphalomyélite aigue ou encéphalite post-infectieuse (inflammation démyélinisante du système nerveux central). Il faut aussi noter que l'infection par le virus de la dengue peut entraîner de graves complications chez les femmes enceintes (avortement, accouchement prématuré et complications hémorragiques de l'accouchement) et que la possibilité d'une transmission verticale de la mère au nouveau né pouvant entraîner son décès a été constatée¹⁵.

1.2.2. Formes graves de la dengue

La dengue peut évoluer vers des symptômes plus graves appelés dengue hémorragique (DH) et syndrome de choc (DCS), qui sont les principales causes de décès liés au DV¹⁸. DH et DSC sont le plus fréquemment observés chez les enfants de moins de 15 ans, mais de manière générale résulteraient de la conjonction de plusieurs facteurs liés à l'hôte et au virus. Une seconde infection par un sérotype différent, notamment dans le cas d'une infection primaire par le DV-1 ou DV-3¹⁹, et surtout si les deux infections successives sont proches dans le temps, augmenterait la possibilité d'apparition des symptômes aggravés de la maladie. D'après les

études épidémiologiques, le DV-2 est aussi associé plus fréquemment aux formes sévères de la dengue²⁰. Ainsi, la première infection par le DV est le plus souvent asymptomatique alors que les infections suivantes seront souvent plus graves²¹. Etant avéré que plusieurs sérotypes peuvent cohabiter dans des régions où le DV est endémique²², les cas de DH et de DSC soulèvent de réelles inquiétudes. L'âge comme nous l'avons dit mais aussi l'origine ethnique de l'hôte auraient également une influence sur l'évolution de la maladie, ce qui laisse supposer une prédisposition génétique de certains individus à ces complications. D'après certaines études épidémiologiques, les populations d'origine africaine présenteraient ainsi moins de risque de développer la DH ou le DCS que les populations caucasiennes²³.

DH et DCS évoluent en général en deux temps : après une amélioration transitoire, des signes hémorragiques liés à l'augmentation de la perméabilité vasculaire apparaissent (purpura en nappe, saignements digestifs, le plus souvent une hématomèse et des épistaxis). Parfois le syndrome hémorragique est accompagné d'un état de choc en relation avec une altération de la perméabilité capillaire entraînant l'apparition de défaillances circulatoires (pouls rapide et faible, hypotension). La gravité des cas de dengue hémorragique (DH) est classée en grade de 1 à 4. L'augmentation de l'aire de répartition du vecteur et du DV pourrait induire, dans l'avenir, une augmentation des syndromes aggravés et du taux de mortalité de la maladie²⁴. Des observations récentes tendent aussi à montrer que les symptômes liés à l'infection par le virus de la dengue sont en train d'évoluer vers des complications neurologiques (encéphalopathies, encéphalites, congestions cérébrales) de plus en plus fréquentes. Ces symptômes neurologiques peuvent être imputés aux effets neurotrophiques du virus et aux effets systémiques liés à l'infection²⁵.

1.2.3. Nouvelle classification des symptômes

La distinction entre les cas de dengue classique et de dengue hémorragique est remise en question par des études de l'OMS publiées en 2009, qui introduisent une classification plus simple, en distinguant les cas de dengue plus ou moins alarmants des cas sévères de la maladie (voire la figure 2).

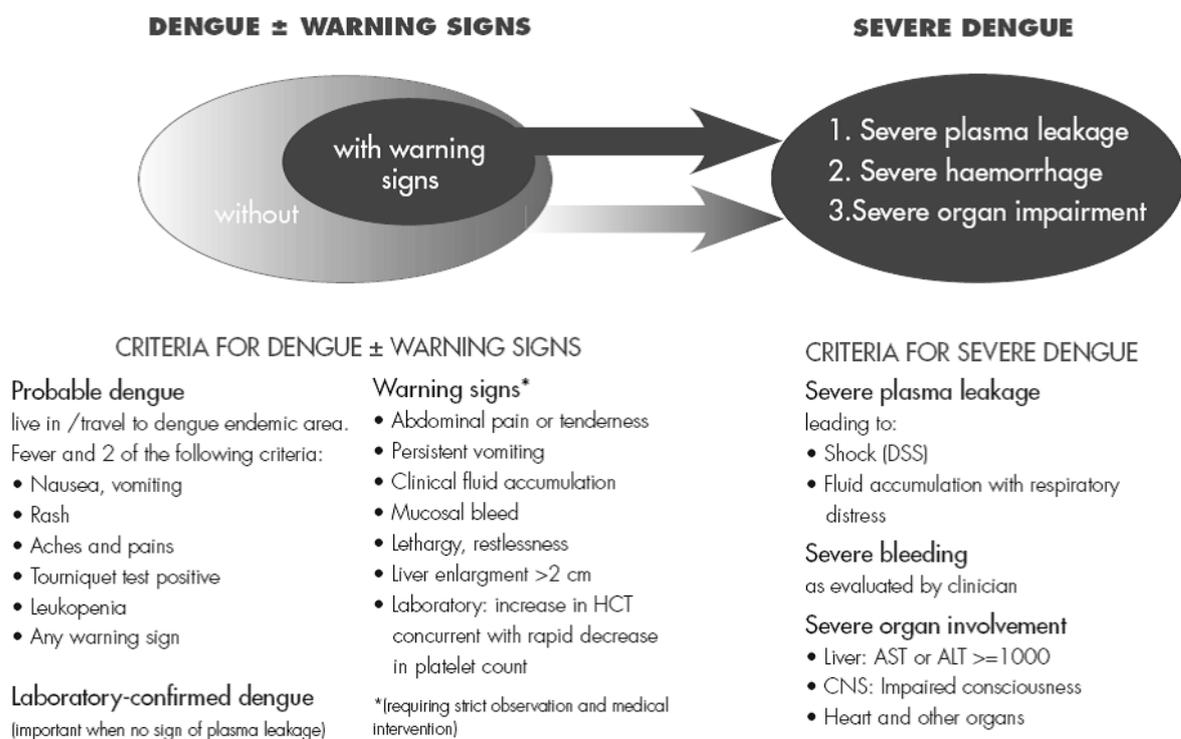


Figure 2. Nouvelle classification proposée par l'OMS des symptômes de la dengue²⁶

La nouvelle classification semble plus précise et mieux adaptée à la reconnaissance des cas sévères lors d'épidémies. Elle serait aussi plus efficace pour la classification rétrospective des cas de dengue, réalisée pour les études épidémiologiques et qui permettent notamment d'élaborer des modèles prédictifs de l'évolution des épidémies dans le monde²⁷.

Cette classification, plus simple, permet de palier aux problèmes rencontrés avec le système classique (chevauchement des formes classiques et

hémorragiques, difficulté d'obtenir les renseignements permettant de conclure à une DH, *etc.*) et porte moins l'attention sur l'hémorragie (observés aussi dans certains cas de dengue classique) du fait que les cas sévères sont plutôt liés à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, déclenchant alors une fuite plasmatique.

1.3. Epidémiologie

Le foyer de développement et de propagation du DV se situe en Asie du Sud-Est. Au cours du XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles, des moustiques infectés par le DV auraient profité du développement de la marine à voile pour se répandre progressivement dans toutes les régions tropicales du globe. Les épidémies de dengue restaient alors peu fréquentes, apparaissant tous les 10 à 40 ans. Cette dynamique fut dans un second temps modifiée, notamment en Asie du Sud-Est, au cours de la seconde guerre mondiale. Les perturbations écologiques et démographiques pendant cette période ont induit une forte augmentation de l'aire de répartition et de la densité de population de moustiques, notamment *Ae. aegypti*^{28,29}. A la fin de la guerre, le DV est devenu endémique dans la plupart des pays d'Asie du Sud-Est et des épidémies de dengue hémorragique y sont apparues quelques années plus tard. L'urbanisation et le développement des moyens de transport modernes ont depuis fortement accéléré la circulation du virus dans le monde qui voit le nombre et l'importance des épidémies de dengue, et l'incidence des cas de DH et de DCS augmenter de manière exponentielle^{24,30}. Comme le montre la figure 3, le nombre de cas de dengue rapportés a été multiplié par 30 au cours des 50 dernières années³¹.

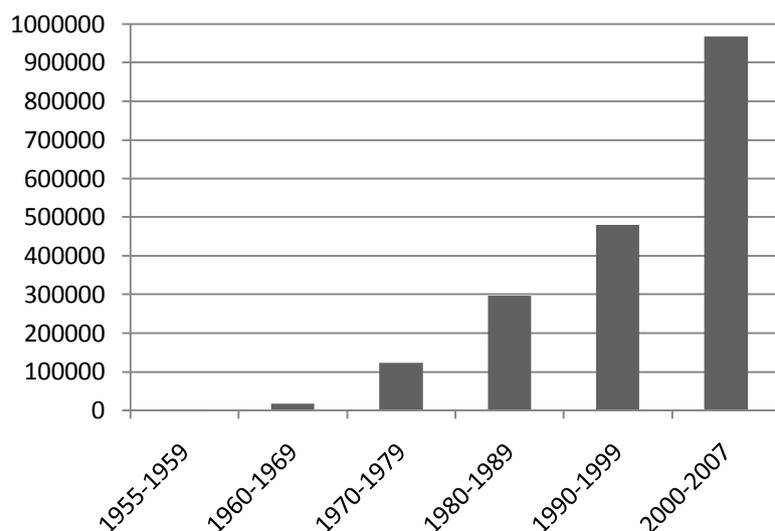


Figure 3. Nombre de cas de dengue recensés par l'OMS depuis 1955²⁶.

L'augmentation des épidémies s'accompagne d'un accroissement des taux de modifications génétiques du virus et par voie de conséquences d'une augmentation des probabilités de voir apparaître de nouvelles souches plus virulentes ou ayant un potentiel épidémique plus important.



Figure 4. Population mondiale exposée au DV selon les estimations de l'OMS en 2010

En ce début de XXI^{ème} siècle, le DV est considéré comme l'arbovirus pathogène de l'homme le plus répandu sur la planète. La dengue touche entre 50 et 100 millions de personnes chaque année selon les estimations de l'OMS. 2/5^{ème} de la population mondiale est exposée au virus qui est désormais endémique dans plus de 100 pays et des cas de DH sont décrits dans plus de 60 d'entre eux (figure 4). La morbidité des épidémies de dengue est en général assez faible : inférieure à 1% dans certaines régions, elle peut en revanche dépasser 20% dans des pays où l'accès au soin est insuffisant^{24,32}. La maladie a également un impact socio-économique considérable dans les pays touchés par des épidémies récurrentes^{33,34}.

La situation est particulièrement préoccupante en Asie du Sud-est et dans le Pacifique Ouest³⁵. *Ae. aegyptii* se rencontre désormais dans la plupart des îles du Pacifique jusque là préservées du fait de leur isolement géographique. Le DV est devenu par voie de conséquence, endémique dans ces îles, où la dengue se manifeste périodiquement par des épidémies. La Nouvelle-Calédonie n'est pas épargnée par ce fléau.

Depuis 1883, date du premier document officiel notifiant en Nouvelle-Calédonie une maladie infectieuse correspondant vraisemblablement à la dengue, les épidémies se sont succédées selon une périodicité irrégulière suivies ou non de périodes d'endémisation et conduisant à l'introduction progressive des 4 sérotypes viraux. En 2002-2003, puis en 2008-2009, la Nouvelle-Calédonie est touchée par deux épidémies de dengue de large ampleur, la dernière touchant près de 7 300 personnes d'après les chiffres de l'IPNC (Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie). Enfin, la persistance du sérotype DV-1 pendant plus de 2 ans, avec des cas diagnostiqués même en saison fraîche, suggère qu'une situation endémo-

épidémique est en train de s'installer sur le territoire.

1.4. Notions de virologie et d'enzymologie appliquées au DV

Les Flavivirus présentent tous la même organisation structurale et génomique : le génome encapsulé est composé d'un ARN simple brin positif d'environ 11Kb⁵, protégé de la dégradation par une coiffe de type 1 ($7^{\text{Me}}\text{GpppA}_{2'}\text{OMe}$) en son extrémité 5'³⁶ et par une queue poly(rA) à l'extrémité 3'³⁷. Ne codant que pour 10 protéines (E, C, prM, NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5), le génome des Flavivirus ne leur permet pas d'assumer leur réplication de façon autonome et ces organismes sont pour cela, dépendants de la machinerie cellulaire de leur hôte³⁸.

1.4.1. Réplication du DV dans les cellules de l'hôte

Le DV pénètre dans les cellules par endocytose, *via* une interaction de la protéine E avec des récepteurs membranaires, et se retrouvent alors dans des endosomes cellulaires. Il s'agit de l'étape 1 dans le schéma de la réplication du DV proposé dans la figure 5. L'acidité de ces endosomes induit des changements conformationnels majeurs des glycoprotéines (E), entraînant la fusion du virus avec la membrane de l'endosome et la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme^{39,40}. Il s'agit de la seconde phase dans le schéma de la figure 5. Ainsi, lorsque le virus arrive dans le sang, suite à la piqure d'un moustique infecté, la protéine E reconnaît le récepteur Fc des monocytes et fusionne avec eux. Un premier cycle de réplication et d'amplification a lieu au sein de ces monocytes, induisant l'arrivée des macrophages qui reconnaissent les anticorps liés à l'intrusion d'un virus. Cependant, au lieu d'être détruit par les macrophages qui l'engloutissent, le DV peut encore une fois se répliquer. Et c'est par le biais des macrophages que le DV se transporte dans

l'organisme, pouvant pénétrer dans d'autres cellules au sein desquelles il peut traduire et répliquer son génome.

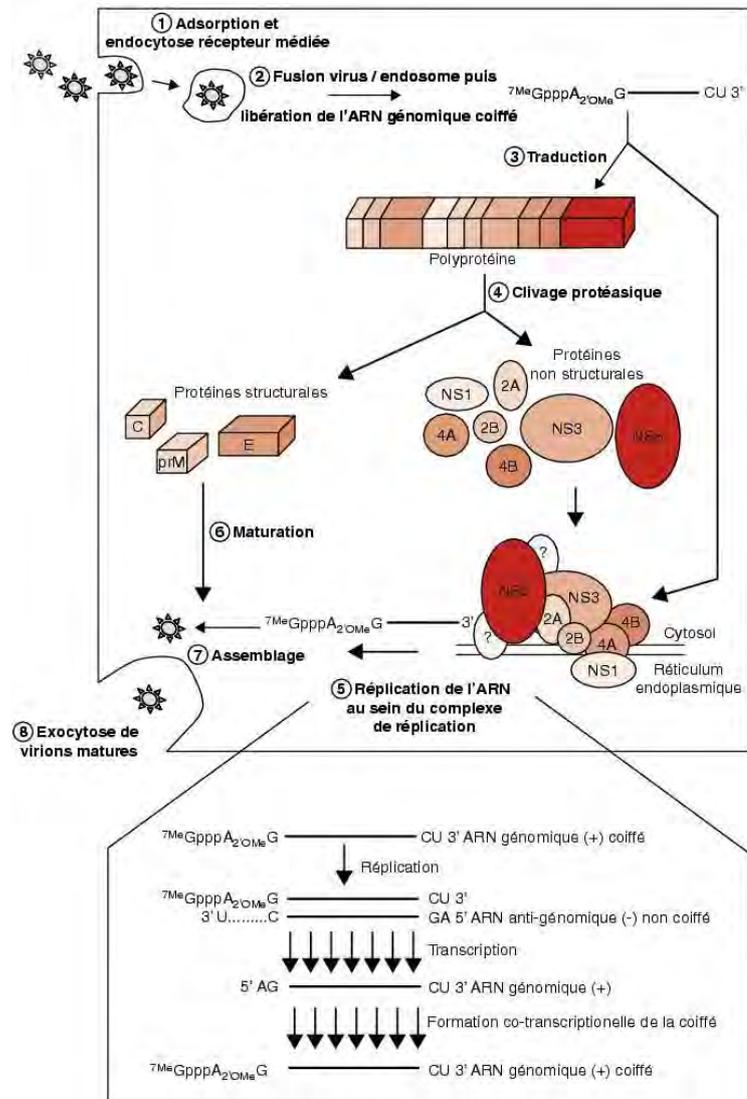


Figure 5. Cycle de réplication du DV dans la cellule hôte⁴¹

Le génome du DV se compose d'un seul brin d'ARN qui ne présente qu'un seul cadre ouvert de lecture et sera pour cela, transcrit en une unique polyprotéine (phase n°3 dans le schéma de la figure 5). La polyprotéine est alors clivée (phase n°4) par des protéases de l'hôte (protéases de type furine et autres protéases de l'appareil de Golgi) et par la sérine-protéase virale NS3-pro (partie N-terminale de la

protéine NS3) en collaboration avec NS2B, cofacteur de l'enzyme⁴², pour donner les 3 protéines structurales qui formeront le virion (C, prM et E) et 7 protéines non-structurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5) impliquées dans la réplication de l'ARN, l'assemblage des virions, et la modulation des réponses cellulaires de l'hôte⁴³.

Suite à la traduction, les protéines NS sont assemblées en un complexe de réplication. Ces enzymes coordonnent leur(s) fonction(s), ARN-synthase, ARN-capping, hélicase, protéase, lors de la réplication de l'ARN viral⁴⁴. A partir de l'ARN génomique (ARN⁺), ce complexe enzymatique va effectuer la synthèse d'ARN⁻ (phase n°5) servant à son tour de matrice pour la synthèse de nouveaux brins d'ARN⁻ qui serviront pour la synthèse de la polyprotéine virale (la traduction correspond à la phase n°6), à la synthèse une matrice ARN (amplification), ou seront encapsulés pour former de nouvelles particules virales⁴⁵.

La réplication du DV, dite *de novo* car elle ne nécessite pas l'intervention d'une amorce, débute par l'extrémité 3' de l'ARN⁴⁴. Cette réplication se produit sur les membranes de structures cellulaires de l'hôte induites par le virus lui-même³⁸. Les particules virales, encore non-infectieuses sont alors assemblées dans le réticulum endoplasmique (RE) de l'hôte (phase n°7 de la figure 5), où l'ARN viral complexé à la protéine C est empaqueté dans une bicouche lipidique issue du RE avec des hétérodimères de prM et E^{46,47}. La maturation du virion a lieu au cours de son transport dans l'appareil de Golgi dans lequel prM est clivée pour donner M^{48,49}. La particule virale est alors libérée dans le milieu extracellulaire par exocytose (phase n°8). Ce mécanisme de réplication, commun à tous les Flavivirus, nous permet de comprendre les mécanismes d'action des antiviraux. Il nous permet également d'élaborer une stratégie de recherche de composés antidengue en ciblant spécifiquement une phase de la réplication virale.

1.4.2. NS3 et NS5 : deux enzymes clés dans la réplication de l'ARN du DV

Lors de ce cycle de réplication cellulaire du DV, deux des sept protéines NS jouent un rôle central dans la réplication de l'ARN⁵⁰ : NS3 et NS5 possèdent en effet la plupart, si ce n'est toutes les compétences catalytiques pour la réplication de l'ARN viral et la synthèse de la coiffe⁴².

- La NS3 est une enzyme à domaines multiples : la partie N-term (NS3-pro) intervient comme nous l'avons dit plus haut dans la maturation des protéines virales au cours de l'infection. La partie C-terminale de la NS3 possède quant à elle les fonctions d'hélicase et d'ARN-triphosphatase⁵¹. Ces fonctions interviennent respectivement dans la synthèse de l'ARN et de la coiffe. Rappelons que la coiffe joue pour le virus un rôle équivalent à celles rencontrées dans les cellules eucaryotes : c'est un élément capital qui protège l'ARN de la dégradation par des exonucléases, et intervient dans l'adressage de l'ARN synthétisé.
- La NS5 présente quant à elle deux domaines distincts. La partie N-terminale de la protéine agit comme une méthyl-transférase (MTase), impliquée notamment dans la synthèse de la coiffe en 5' de l'ARN génomique^{52,53,54,55}. La partie C-terminale de NS5 agit comme ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) et prend en charge la réplication du génome viral à proprement parlé^{56,57,58,59,60}. Certaines études tendent à montrer que le domaine MTase de la NS5 n'influence pas significativement l'activité polymérase de l'enzyme⁴⁴ et bien que cette hypothèse ne soit pas unanimement partagée⁶¹, il est possible d'étudier ces deux domaines séparément.

1.4.3. Structure et fonctionnement de la DV-NS5 RdRp

La NS5, schématisée dans la figure 6, est la plus grosse enzyme du DV et des Flavivirus en général. Elle se compose de 900 acides aminés (AA). Cette enzyme spécifique du DV est de plus très conservée dans les quatre sérotypes du virus⁶².

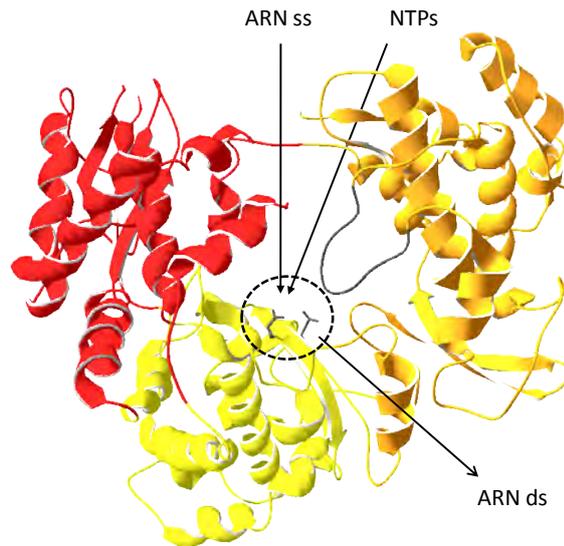


Figure 6. Structure 3D de la DV-NS5-RdRp (code PDB : 2J7U) réalisée à l'aide du logiciel Swiss-Pdb viewer. Les sous-domaines doigts, pouce et paume sont indiqués respectivement en rouge, orange et jaune. La boucle d'initiation, qui ferme en partie le tunnel de sortie de l'ARN, est indiquée en gris. La position du site actif, à l'intersection des tunnels d'entrée de l'ARN simple brin (ss), des nucléotides (NTPs) et de sortie de l'ARN double brin (ds) est indiquée par un cercle en pointillés et les chaînes latérales de deux acides aminés ASP533 et ASP663 essentiels du sites actif, sont indiqués en gris.

Le domaine RdRp de la DV-NS5 débute à partir de la méthionine 273 et comprend donc 628 AA. D'après les études menées par cristallographie⁶¹, la DV-NS5 RdRp adopte une conformation dans l'espace caractéristique de ce type d'enzyme, rappelant celle d'une main droite. Trois sous-domaines y sont distingués et sont respectivement appelés les doigts, la paume et le pouce. Trois tunnels traversent l'enzyme et servent d'une part, à l'accès aux NTPs et à l'ARNss (matrice de la réplication) et d'autre part, à la sortie de l'ARNds (fruit de la réplication). Le site actif de l'enzyme se trouve au croisement de ces trois tunnels et correspond à deux

asparagines ASP533 et ASP566. La séquence des acides aminés entre 320 et 405 est une séquence très conservée chez tous les Flavivirus. Cette séquence est appelée NLS, pour « nuclear localization sequence ». Essentielle au bon fonctionnement de l'enzyme, la NLS serait reconnue spécifiquement par la NS3 lors de la constitution du complexe de réplication. Indépendamment de cela, et bien que la réplication soit effectuée dans le cytoplasme de la cellule hôte, cette séquence pourrait interagir dans une phase ultérieure, avec des transporteurs nucléaires de la cellule hôte et permettre ainsi à la NS5 de pénétrer dans le noyau de la cellule hôte dans un but encore inconnu^{63,64}. Une boucle est également caractéristique de la structure de DV-NS5 RdRp : située sur « le pouce », entre les résidus 792 et 801 et pointant vers le site catalytique de la « paume ». Cette boucle, en particulier grâce aux résidus TRP795 et HIS798, agit comme une plateforme d'initiation pour les premières étapes de la synthèse de l'ARN. La pénétration de l'ARNs à répliquer et des premiers NTPs dans la DV-NS5 seraient alors guidés vers le site actif de l'enzyme par la boucle d'initiation. Il semble que la protéine adopte alors une conformation rigide et fermée autour de la partie 3' de l'ARN à répliquer (formant ainsi le complexe d'initiation), induite selon certains auteurs par le GTP⁶⁵. Il est d'ailleurs important de noter que le GTP est présent comme second nucléotide chez tous les flavivirus, ce qui souligne son importance probable dans ce processus d'initiation⁴⁴. La DV-NS5 s'ouvre ensuite en une conformation plus souple pour la phase d'élongation de la réplication⁶⁶.

2. Stratégies de lutte contre le DV

2.1. Moyens disponibles

Il n'existe à l'heure actuelle ni vaccin ni traitement antiviral contre le DV^{15,67} et l'épandage d'insecticides pour contrôler les populations de moustiques dans les zones infectées, est souvent le seul moyen de lutte utilisé pour contenir les épidémies de dengue. Cette méthode a fourni de bon résultats dans un premier temps : en Asie par exemple⁶⁸ mais surtout en Amérique du Sud où le vecteur de la dengue était considéré comme éradiqué dans les années 1970^{69,70}. Mais l'épandage d'insecticide est une méthode onéreuse ayant un impact environnemental non-négligeable et l'on a vu resurgir les moustiques et les maladies qu'ils véhiculent dès que les épandages se sont arrêtés^{69,70}. L'utilisation d'insecticides (deltaméthrine, fénitrothion, malathion, *etc.*) dans les zones urbaines qu'affectionne particulièrement *Ae. aegypti*, soulève aussi des inquiétudes pour la santé humaine⁶⁷. L'exposition répétée aux insecticides engendre qui plus est, l'apparition de phénomènes de résistance chez les moustiques limitant aussi leur application⁷¹. L'épandage d'insecticides dans les zones touchées par le virus s'est donc montré impuissant face à l'augmentation de l'incidence de la maladie dans le monde, encourageant la recherche de nouvelles solutions de lutte⁷².

2.2. Nouvelle stratégie de lutte anti-vectorielle

Depuis quelques années, une nouvelle stratégie de lutte contre le DV a vu le jour suite à l'observation en laboratoire de l'inhibition de la réplication du virus chez

le moustique lorsque celui-ci est infecté par une bactérie du genre *Wolbachia*⁷³. Cette bactérie, *W. pipientis*, isolée pour la première fois à partir des ovaires d'un moustique du genre *Culex* en 1924⁷⁴ est considérée par certains auteurs comme le microorganisme le plus communément rencontré sur la planète : on estime qu'elle infecte plus de 76% des quelques 2 à 5 millions d'espèces d'insectes peuplant la Terre⁷⁵. Cette occurrence dans la nature permet de supposer son innocuité et de la non dangerosité de son utilisation dans de nouvelles espèces⁷³. Récemment, deux lignées de *Ae. aegypti* ayant intégré *W. pipientis* et présentant un taux de transmission maternel à leur descendance de 100% ont été obtenues en laboratoire⁷⁶. L'introduction de la bactérie dans le moustique engendre divers effets, dont la réduction de la durée de vie du moustique⁷⁶ et l'inhibition de la maturation ou multiplication de divers pathogènes tels que les filaires de nématode (responsable de la filariose), le *Plasmodium* (agent du paludisme) ou le DV^{73,77}. Les recherches portent désormais sur l'étude de la dissémination de la bactérie dans les populations de moustiques. Les premières études montrent que si l'on place en cage 2 moustiques infectés par la bactérie pour chaque individu de phénotype sauvage, 100% des descendants seront infectés au bout de 3 mois⁷³. Ces résultats démontrent la capacité de *Wolbachia* à infecter des populations sauvages de moustiques ce qui serait lié à divers avantages octroyés par la bactérie (notamment en termes de reproduction). Une étude en conditions semi-contrôlée, débutée en 2011 en Australie, dans le Nord du Queensland, devra confirmer ces résultats préliminaires⁷³. Cette approche originale est porteuse d'espoir pour contenir les épidémies de dengue mais également, à plus long terme, pour lutter contre d'autres pathogènes de l'homme transmis par des insectes, tel que le paludisme.

2.3. Recherche d'un vaccin

Depuis 60 ans de nombreux laboratoires tentent de mettre au point un vaccin contre le DV mais rencontrent pour cela de nombreux obstacles. Comme nous l'avons vu, l'infection successive par deux sérotypes distincts entraîne une augmentation des probabilités d'apparition de formes graves de la maladie. Des mécanismes « anticorps dépendants » sont même considérés comme les premiers responsables des pathologies induites par le DV⁷⁸. La maladie est pour cela considérée comme immunopathologique, signifiant par cela que la réponse immunitaire induite par le pathogène entraîne une aggravation de l'état du patient^{79,80} mais les mécanismes immunitaires impliqués ne sont aujourd'hui pas totalement élucidés⁸¹. Une des prérogatives imposée au potentiel vaccin est de ce fait d'être tétravalent, ou efficace contre les 4 sérotypes du virus⁸². Le vaccin potentiel devra aussi répondre à deux attentes contradictoires : induire une réponse immunitaire chez l'hôte sans toutefois être pathogène pour celui-ci, alors que la pathogénèse est étroitement liée à la réponse immunitaire induite⁸⁰. La mise au point d'un tel vaccin s'est heurtée ensuite aux problèmes liés à l'utilisation de modèles animaux, car les souris utilisées pour les tests biologiques se sont avérées peu sensibles aux effets induits par le DV et sont jugées peu appropriées pour évaluer la toxicité potentielle d'un vaccin sur l'homme⁸³. Ce problème n'a pu être contourné que récemment par l'utilisation de macaques indiens, sensibles au DV, et qui peuvent, comme l'homme, développer les symptômes de la DH⁸⁴. Enfin, du fait que la maladie affecte majoritairement les pays « en voie de développement », le vaccin se doit d'être économique autant qu'efficace. Ceci implique que la vaccination doit être totale avec un minimum d'injections du vaccin ; idéalement avec une seule injection⁸⁰.

Malgré ces obstacles, différents vaccins potentiels ont été obtenus avec différents protocoles :

- Des formes atténuées du virus (Live Attenuated Vaccines, LIV) sont utilisées pour produire un vaccin tétravalent. Cette technique s'est montrée efficace par le passé contre d'autres Flaviviridæ tels que le virus de la fièvre jaune (YFV) ou de l'encéphalite japonaise (JEV) et a permis de proposer le premier vaccin tétravalent contre le DV^{85,86}. Malgré les difficultés rencontrées avec ce type de vaccin, notamment liées au degré d'atténuation du virus, ce protocole est utilisé pour produire la plus grande partie des vaccins contre la dengue arrivés aujourd'hui en phase de tests cliniques⁸¹.
- Une autre approche, utilisant la génétique moléculaire, permet d'obtenir des virus chimères : un virus proche du DV, tel que le virus de la fièvre jaune (YFV), dans lequel le gène codant pour la PrE du DV remplace celle du YFV. Par ce moyen, Sanofi Pasteur propose le ChimeriVax DEN1-4, actuellement en phase III des essais cliniques et qui pourrait être disponible sur le marché d'ici 5 ans si les résultats des prochains tests s'avèrent positifs⁸⁰. Un autre vaccin potentiel (DENVax), élaboré selon ce principe, est également proposé par Inviragen⁸⁷.
- Pour finir, d'autres vaccins potentiels ont été élaborés en utilisant de l'ADN recombinant. Certains d'entre eux sont en phases précliniques et le candidat le plus avancé est évalué en phase I des essais cliniques⁸¹. Ces vaccins semblent stables, faciles à produire mais induisent le plus

souvent une faible immunité⁸⁸.

Comme nous le voyons au travers de ces exemples, les travaux de nombreux laboratoires permettent d'espérer l'arrivée prochaine sur le marché d'un vaccin tétravalent contre le DV. Le candidat le plus avancé étant désormais en phase III des essais cliniques et pourrait être commercialisé rapidement. Cependant, des doutes persistent quant à l'utilisation de ces vaccins du fait notamment des interférences immunitaires entre les différents sérotypes du DV⁸¹.

2.4. Recherche d'antiviraux

Les soins apportés aux patients hospitalisés suite à l'infection par le DV sont aujourd'hui uniquement symptomatiques : repos, hydratation, traitement de la douleur et de la fièvre à l'aide d'antalgiques et d'antipyrétiques à base de paracétamol (la transfusion de plaquettes étant parfois nécessaire dans les cas les plus graves). Cependant, plusieurs axes de recherches suscitent l'espoir de disposer de composés efficaces s'attaquant spécifiquement au virus et à sa réplication dans les cellules humaines. Les recherches menées dans ce domaine ont déjà mis en évidence l'activité antivirale de plusieurs composés contre le DV (tableau 1).

Tableau 1. Principales cibles et antiviraux proposés contre la dengue (le numéro des phases indiqué dans la première colonne fait référence au schéma de la réplication du DV présenté dans la figure 5).

Phase de la réplication inhibée	Inhibiteurs potentiels du DV
Pénétration dans la cellule hôte (phase 1)	Dérivés de polysaccharides (ex : héparine) ^{89,90,91, 92, 93, 94,95,96} Dérivés quinazoliques ⁹⁷
Clivage de la polyprotéine virale (phase 4)	Dérivés nucléotidiques ^{98,99} Dérivés chalconiques et anthraquinoniques ^{100,101,102,103}
Réplication de l'ARN viral (phase 5)	Dérivés nucléotidiques ^{104,105,106,107} Dérivés anthraniliques ¹⁰⁸
Modification post-transcriptionnelles (phase 5)	Hétérocycles azotés ^{109,110,111}
Maturation protéique (Phase 6)	Dérivés de la castanospermine et de sucres aminés ^{89,112,113,114}

Plusieurs étapes du cycle de réplication du DV dans les cellules hôtes sont ciblées par les composés antiviraux présentés dans la littérature. Ces composés ciblent pour la plupart les protéines non structurales du DV.

- Plusieurs composés inhibent l'entrée dans la cellule du DV (phase n°1 dans le schéma de la figure 5) en ciblant la protéine de l'enveloppe du DV (Pr E) : la structure des glycosylaminoglycanes, tels que l'héparine ou la suramine (4),

imitent les récepteurs cellulaires auxquels se fixent normalement la PrE⁹⁶. D'autre part, un dérivé de la quinazoline (**1**) a montré une forte activité d'inhibition du DV2 (CI₅₀= 119 nM) dans des cellules humaines en ciblant la PrE⁹⁷.

- La protéase du virus (NS2B/NS3) est également la cible de dérivés nucléotidiques, ou non nucléotidiques tels que le composé BP2109 (CI₅₀= 0,17 µM dans un réplicon) ou le composé ARDP0006 (**2**) dérivé de l'antracène (CI₅₀= 4 µM *in cellulo*), qui pourraient être à l'origine du développement d'antiviraux contre la dengue^{102,103}.
- La NS5 RdRp est considérée dans la littérature comme l'une des meilleures cibles pour rechercher de nouveaux antiviraux contre le DV et contre les Flavivirus en général¹¹⁵. Absolument essentielle à la réplication de l'ARN viral, l'activité de cette enzyme est spécifique du DV. Peu d'effets secondaires sont attendus avec ces inhibiteurs car ce type d'enzyme est absent des cellules humaines¹¹⁶. Plusieurs dérivés nucléotidiques inhibent la fonction ARN polymérase de la DV-NS5. Parmi ceux-ci, le composé NITD008 (**3**) mis au point par Novartis présente une CI₅₀= 0,64 µM contre des cellules infectées par le DV-2. Ce composé administré deux fois par jour à une dose de 10 mg/kg chez la souris induit une protection complète contre l'injection d'une dose létale de DV-2. L'activité de ce composé fut vérifiée sur les quatre sérotypes avant d'être protégée par un brevet¹⁰⁷. Un dérivé anthranilique se liant à un résidu du tunnel d'accès de l'AN dans la polymérase a également montré une forte activité d'inhibition de la DV-2 RdRp (CI₅₀= 0,17 µM) mais cette activité n'est pas conservée *in cellulo*¹⁰⁸.

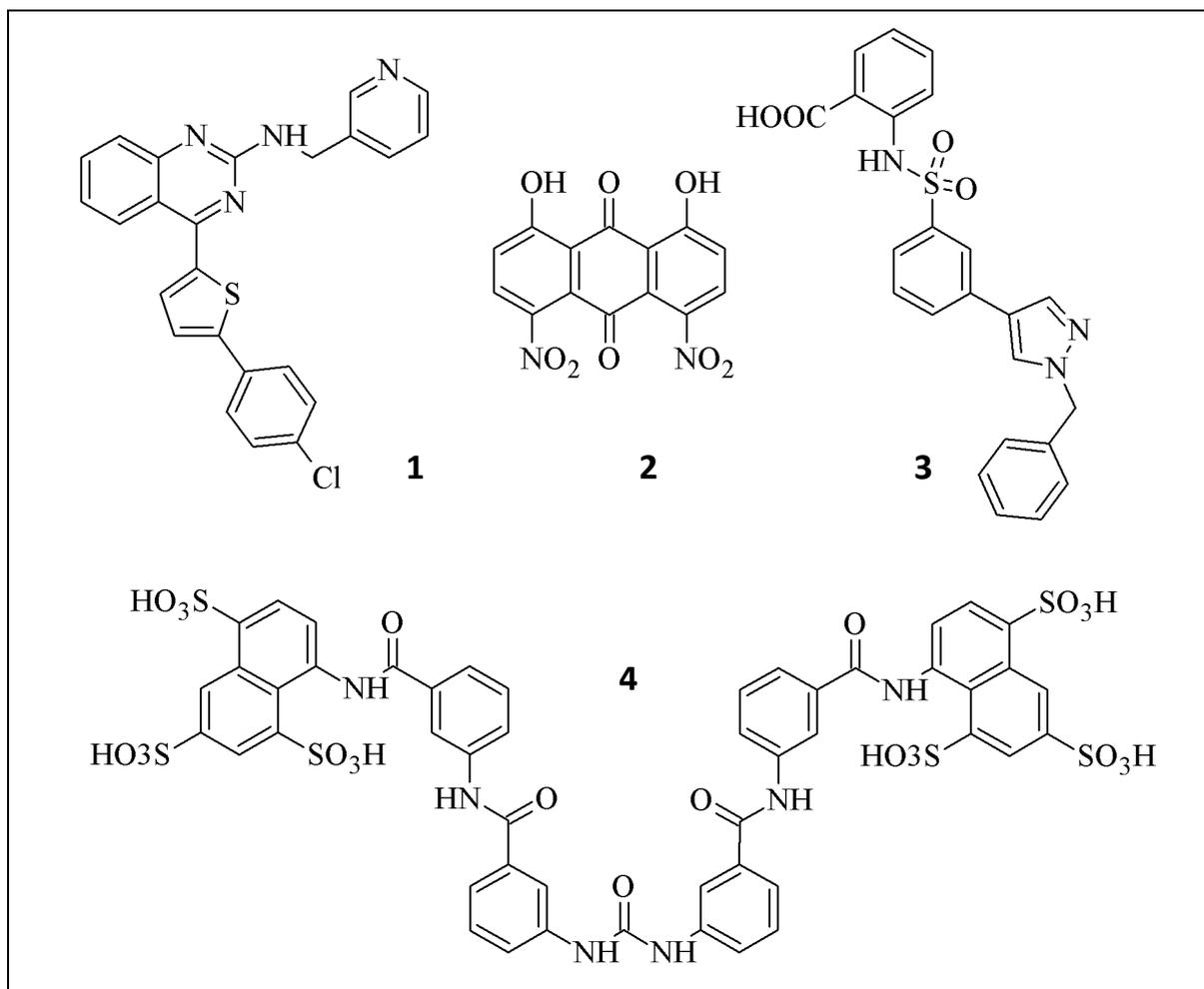


Figure 7. Principaux composés antiviraux non-nucléosidiques décrits contre le DV. **1** : dérivé de quinazoline (Hit novartis contre PrE) ; **2** : dérivé anthraquinonique (ARDP006, hit contre la NS2B/NS3), **3** : ecide N-sulfonylanthranilique (Hit novartis contre la DV-2 NS5), **4** : suramine (glycosylaminoglycane ciblant la PrE).

Pour finir, certaines des fonctions cellulaires de l'hôte détournées par le DV peuvent être la cible d'antiviraux. Des dérivés de la castanospermine inhibent ainsi la α -L-glucosidase qui agit pour la maturation des protéines virales^{117,118,119}.

3. La nature comme source de nouveaux composés bioactifs

Les composés d'origine naturelle sont la source historique et traditionnelle pour découvrir de nouveaux composés bioactifs. Le monopole de la Nature est cependant contesté depuis la fin du XX^{ème} siècle dans le domaine pharmaceutique par la naissance de la chimie de synthèse. Depuis 30 ans, la recherche de médicaments passe par le criblage à haut débit de milliers de composés. Les chimiothèques nécessaires ont alors été en grande partie fournies par les composés de synthèse, en particulier grâce aux progrès de la chimie combinatoire. Ces techniques, très efficaces pour produire un grand nombre de composés purs, ont permis de palier aux nombreux inconvénients rencontrés avec les composés naturels : l'élaboration d'une chimiothèque de composés naturels est onéreuse et longue du fait des multiples étapes nécessaires à l'isolement et à la détermination structurale d'un principe actif. De plus, l'isolement d'un composé précédemment décrit limite la possibilité de protéger la découverte de son activité biologique par un brevet, unique manière d'assurer la rentabilité de ces recherches par les industriels. Les composés bioactifs recherchés, agissant par définition à faible concentration, sont souvent minoritaires dans un organisme vivant, ce qui rend difficile la production de quantités nécessaires à l'étude de son activité ou à sa commercialisation. Enfin, de nombreux pays protègent leur biodiversité, et la bioprospection, tout comme la commercialisation de médicaments sur la base de ces collectes, soulève des problèmes de propriété intellectuelle¹²⁰. Ces différents aspects expliquent en grande partie le recul d'intérêt pour les produits d'origine naturelle par des grands groupes industriels. Pourtant, les espoirs fondés sur la synthèse chimique ou la chimie combinatoire se heurtent depuis un peu plus de dix ans aux résultats en baisse de la productivité de l'industrie pharmaceutique. Ainsi, depuis 2002, le nombre de molécules nouvelles mises sur le marché est en

constante diminution, ce que de nombreux auteurs expliquent par l'arrêt des programmes de criblage des composés naturels. Ainsi, sans remettre en cause l'intérêt des nouvelles technologies, notamment dans la phase d'amélioration des performances des molécules actives, de nombreux auteurs suggèrent de revenir vers le criblage des composés naturels pour identifier de nouveaux « leaders », les composés phares fortement bioactifs qui sont les chefs de file à la base du développement d'un médicament¹²¹. La longue histoire de la pharmacognosie ne semble donc pas achevée.

3.1. Naissance, apogée, déclin et renaissance de la pharmacognosie

L'étude des composés naturels à visée thérapeutique s'inscrit dans le domaine de la pharmacognosie. Pharmacognosie vient du grec « pharmakon » qui signifie « drogue, venin, poison » et de « gnosis » signifiant « connaissance ». Cette science peut être définie comme une science appliquée traitant des matières premières et des substances à potentialité médicamenteuse d'origine biologique. Ces substances sont issues de végétaux, d'animaux ou encore de la fermentation de microorganismes.

3.1.1. La « pré-histoire » de la pharmacognosie

L'intérêt des composés naturels pour la santé humaine est bien antérieur à la naissance de la pharmacognosie. Leur utilisation en pharmacie remonte aux temps les plus anciens et a toujours attiré de nos jours. Malgré l'intérêt récent porté sur les composés issus du monde marin ou des microorganismes, les plantes sont depuis tout temps, la source de la plupart des drogues ou des composés bioactifs.



Figure 8. A : Extrait du Papyrus de Ebers. Source: Leipzig Univ. B : la mandragore dans une reproduction du manuscrit de Dioscoride datée VII^{ème} siècle (Bibliothèque nationale de Naples).

Certaines études suggèrent ainsi que l'homme de Neandertal possédait déjà, il y a 6 000 ans une pharmacopée primitive¹²². De nombreux documents historiques attestent aussi de l'utilisation des plantes pour la préparation de remèdes traditionnels. Le plus important d'entre eux est peut-être le papyrus de Ebers (figure 8A), materia medica de l'ancienne Egypte daté de 1555 ans av J-C qui débute par la phrase sans équivoque : « Ici commence le livre des préparations médicales pour toutes les parties du corps humain ». Parmi les nombreuses plantes décrites dans ce document, 160 ont pu être identifiées, nombreuses étant celles encore utilisées aujourd'hui à des fins médicinales. Il apparaît ainsi que les égyptiens, depuis des millénaires, utilisaient le pavot (*Papaver somniferum*), le séné (*Senna alexandrina*), la gomme arabique (*Acacia arabica*), les bulbes de scille (*Drimia maritima*), la menthe (*Mentha spp*), le thym (*Thymus spp*), ou encore le chanvre indien (*Cannabis sativa*). Tout comme en Egypte, chaque civilisation a développé sa propre

pharmacopée. Les indiens, dans le cadre de la médecine Âyurvédique, utilisaient de nombreuses plantes et préparations à base de plantes telles que l'opium (contenant des alcaloïdes utilisés comme sédatifs ou analgésiques), *Rauwolfia* (une apocynacée renfermant des alcaloïdes antihypertenseurs), le vomiquier (*Strychnos nux-vomica* dont on extrait la strychnine), l'aconite (*Aconitum spp.* contenant des alcaloïdes cardioatoniques), le haschisch (préparé à partir de *Cannabis sativa*), etc. Des centaines d'exemple de plantes utilisées depuis des millénaires sur tous les continents. En Europe, nous connaissons certaines plantes utilisées depuis des centaines d'années par les descriptions de Dioscoride, dans le très célèbre « De materia medica » daté du VI^{ème} siècle (figure 8B).

3.1.2. Les grandes étapes de l'histoire de la pharmacognosie

Dès la fin du XVIII^{ème} siècle, de nombreux scientifiques s'attachent à isoler le(s) principe(s) actif(s) des plantes. Ces recherches, et notamment l'isolement de la morphine à partir du pavot (*Papaver somniferum*) par Friedrich Wilhelm Adam Sertürner (figure 9), marque la naissance de la phytochimie, un terme apparu en 1815 dans la littérature et qui se propage rapidement avec l'essor de la discipline¹²³. Par la suite, l'isolement de nombreux principes actifs tels que la quinine ou plus récemment de l'artémisinine (un sesquiterpène antipaludéen isolé à partir d'*Artemisia vulgaris*) pour ne citer qu'eux, fut en grande partie responsable des progrès de la médecine au XX^{ème} siècle.



Figure 9. Portrait de F.W.A. Serturmer (1783-1841) à gauche, source: Science photo library; Portrait de F.A. Kékulé (1829-1896) à droite, Source : Popular Science Monthly Volume 54.

Par la découverte en 1858 de la liaison carbone-carbone dans la molécule de benzène¹²⁴, Friedrich August Kékulé (figure 9) ouvre la voie de l'étude structurale des composés bioactifs¹²⁵. La chimie analytique, avec l'aide des avancées technologiques, et la naissance de techniques de spectrométrie performantes (UV, IR, RX, MS, RMN, *etc.*), permet désormais d'identifier avec précision et certitude les composés même minoritaires des plantes.

3.1.3. Quel avenir pour la pharmacognosie ?

Malgré les progrès de la chimie et l'avènement des molécules de synthèse précédemment évoquées, la pharmacognosie reste à la base de découvertes importantes pour la pharmacie. La Nature fournit toujours à l'industrie pharmaceutique plus de 50% des composés à l'origine des médicaments commercialisés. Ce pourcentage atteint même 80% lorsque l'on s'intéresse aux composés antiviraux¹²⁶. De plus, les progrès récents de la biologie moléculaire ont

permis d'identifier de nouvelles protéines essentielles à la survie de différents pathogènes qui sont autant de cibles potentielles pour découvrir de nouveaux médicaments. Ces nouvelles cibles, telles que la protéine NS5 des Flaviviridae, renforcent la nouvelle vague d'intérêt portée aux produits naturels¹²⁶. De nos jours, de nombreux chimistes médicaux tentent donc de mêler la diversité des structures observées dans la nature avec les possibilités offertes par la chimie combinatoire^{127,128,129,130,131}. Pour ces recherches, les composés naturels sont toujours une source importante de composés actifs « leaders », à la base du développement de nouveaux médicaments.

3.2. Spécificités des composés bioactifs d'origine naturelle

L'intérêt des composés naturels pour la recherche de composés bioactifs, repose sur plusieurs caractéristiques :

- D'une part, les composés naturels bioactifs possèdent une incroyable diversité structurale. Ceci peut sans doute expliquer que 28% des nouvelles molécules décrites entre les années 1981 et 2002 sont des composés naturels auxquels nous pouvons ajouter 20% de ces nouveaux composés qui sont des molécules dérivées de composés naturels¹²⁶. La nature élabore ainsi une grande diversité de structures souvent difficiles à reproduire par la synthèse^{129,132,133,134}.
- Comparées aux structures conçues par les chimistes médicaux, les composés naturels bioactifs présentent aussi une plus grande complexité de structure. Ils possèdent en général un plus grand nombre de centres

stéréogènes ou centres d'asymétrie, un plus grand nombre de cycles qui sont par ailleurs, moins souvent aromatiques. Ils contiennent également un plus grand nombre d'atome de carbone et d'oxygène et moins d'azote, d'halogènes ou de soufre.

- Les composés naturels sont souvent plus polaires et possèdent plus de groupement donneur de liaisons hydrogènes que les composés synthétiques.
- Pour finir, les composés naturels sont statistiquement plus gros que les composés de synthèse, présentant souvent une masse moléculaire supérieure à 500 daltons. Ils violent ainsi une des règles de Linpinsky^{120,129} qui énonce 5 critères physiques sur lesquels s'appuie la sélection ou la conception d'une structure à visée pharmacologique¹³⁵.

3.3. Le choix des plantes pour la recherche de composés bioactifs

De nombreuses sources naturelles sont à l'origine de découvertes de nouveaux principes actifs (microorganismes, plantes, organismes marins, *etc.*) mais les plantes comme nous l'avons vu jusque là sont historiquement les plus utilisées dans toutes les pharmacopées du monde. Or on estime que parmi les 250 000 à 500 000 espèces de plantes existantes, seules 1% d'entre elles ont fait l'objet d'études pharmacologiques¹³⁶. Il reste donc potentiellement de nombreux principes actifs à découvrir. Les recherches des composés bioactifs dans une plante sont, comme nous l'avons évoqué plus haut, des recherches longues et onéreuses. Pour cela, la sélection initiale des plantes à récolter pour mener ce genre d'étude est une

étape cruciale qui peut s'appuyer sur différentes stratégies. Celles-ci reposent le plus souvent sur le criblage aléatoire, la chimiotaxonomie ou l'ethnopharmacologie.

3.4. Le criblage aléatoire

Le criblage aléatoire est une méthode qui consiste à évaluer les potentialités pharmacologiques de plantes récoltées au hasard dans une région donnée.

De bons résultats ont été obtenus par cette méthode, permettant par exemple l'isolement de la vinblastine (5) et de la vincristine (6), deux puissants antitumoraux isolés de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) par Gordon Svoboda et Robert Noble en 1958^{137,138}. En s'affranchissant de toute présélection, cette méthode permet de découvrir des potentialités insoupçonnées, mais implique en revanche d'avoir beaucoup de temps et de moyens pour effectuer un large échantillonnage de la flore d'une région. En effet, le taux de « Hit » est souvent inférieur à 1% avec cette méthode.

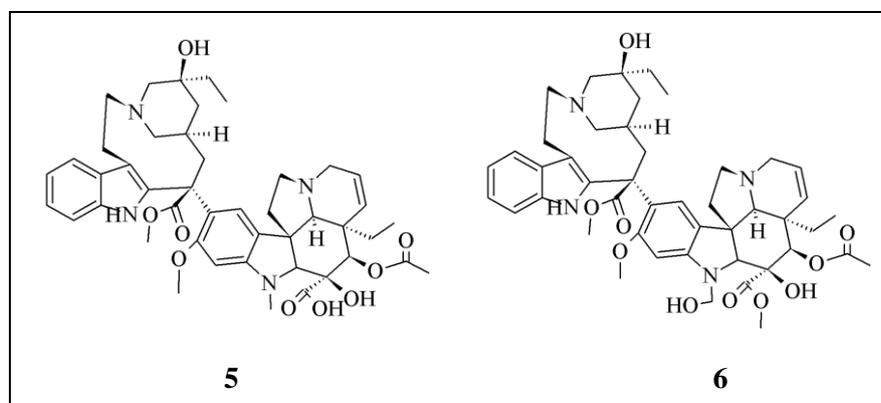


Figure 10. Structure chimique de la vinblastine (5) et de la vincristine (6) isolées à partir de *Catharanthus roseus*¹³⁹.

Ces recherches, qui se focalisent souvent sur des plantes rares et jamais étudiées, mènent assez fréquemment à la découverte de nouvelles structures chimiques et dans certains cas, à de nouveaux composés bioactifs. Cependant, se pose ensuite, dans l'éventualité d'une valorisation pharmaceutique, le problème de l'accès à la ressource. Car nous savons que la mise en culture de plantes rares est un défi pour chaque espèce. La découverte des potentialités anticancéreuses du taxol isolé de l'If de l'ouest (*Taxus brevifolia*), un arbre qui met 200 ans à arriver à maturité, déclencha ainsi une polémique autour de la surexploitation de l'arbre en Amérique du Nord avant la mise au point d'un procédé de production par hémisynthèse du docétaxel (Taxotère®).

3.5. La chimiotaxonomie

La chimiotaxonomie est la science, principalement appliquée aux végétaux, qui tente de classifier les êtres vivants en fonction de leur composition chimique^{140,141}. Comme la composition en métabolites secondaires de différents membres d'un même clade est souvent proche, la présence ou l'absence de composés spécifiques peut être perçue comme l'indication d'un ancêtre commun et donc d'un lien de parenté¹⁴². L'identification des analogies et des différences de la composition chimique permet alors de réunir différentes plantes au sein d'un même groupe. Alors que la valeur potentielle des métabolites secondaires pour établir la taxonomie des plantes est reconnue depuis plus de 200 ans^{143,144}, la chimiotaxonomie n'a vu le jour que tardivement dans la pratique, au XX^{ème} siècle avec le développement des techniques analytiques¹⁴¹. Les études de chimiotaxonomie complètent dès lors les études botaniques et ont eu un impact

considérable sur la systématique des plantes^{142,145,146}. Elles se heurtent tout de même à des problèmes liés à la forte variabilité intraspécifique des métabolites secondaires, d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Ainsi des facteurs tels que l'âge de l'individu étudié, la zone géographique ou le substrat sur lequel il se développe, influencent la composition chimique des plantes¹⁴⁶. Depuis le développement de la biologie moléculaire, l'utilisation de la chimiotaxonomie pour établir la classification d'un groupe végétal est devenue quelque peu obsolète¹⁴⁷. En effet, le séquençage du génome s'avère plus rapide, plus fiable et plus précis que d'étudier la composition chimique des plantes. Il faut tout de même noter que, le plus souvent, les informations obtenues par les études chimiotaxonomiques sont cohérentes avec les résultats apportés par la biologie moléculaire¹⁴⁸. La chimiotaxonomie conserve aussi un grand intérêt pour la prospection de nouveaux composés naturels¹⁴⁷. Si l'on connaît le type de structure recherchée, les données de la chimiotaxonomie pourront nous renseigner sur les familles, les genres ou les espèces au sein desquels il est possible de trouver ce type de composés. A titre d'exemple, cette démarche est à l'origine des nombreuses études des Apocynacées, une famille botanique connue pour renfermer fréquemment des alcaloïdes^{149,150}. Inversement, la chimiotaxonomie présente un intérêt prédictif lorsque l'on étudie une espèce nouvelle.

3.6. L'ethnopharmacologie

L'ethnopharmacologie peut être définie comme une science interdisciplinaire étudiant les composés bioactifs dans les préparations ou d'après les connaissances traditionnelles des Hommes^{151,152,153}. Dans ce domaine, les recherches débutent classiquement auprès des tradipraticiens, tentant par le biais d'enquêtes, de décrire

avec un maximum de précision les espèces botaniques employées et leur utilisation pharmacologique (organe prélevé, caractéristiques du lieu de récolte, méthode de préparation du remède, posologie, maladie ciblée, *etc.*). Puis, les plantes identifiées sont récoltées et extraites pour subir une étape de criblage biologique afin d'évaluer leur potentiel pharmacologique (tests guidés par l'utilisation traditionnelle des plantes) et leur éventuelle toxicité même si les remèdes traditionnels sont rarement toxiques. Les extraits particulièrement actifs font ensuite l'objet d'une étude phytochimique visant à isoler et caractériser les composés actifs de ces plantes.

3.6.1. Historique

Les plantes sont depuis toujours utilisées par l'Homme pour se soigner. Ainsi, les pharmacopées traditionnelles représentent un savoir empirique, acquis par les Hommes au cours de centaines d'années d'expérimentation, dont la valeur est aujourd'hui reconnue par la communauté scientifique. L'étude des plantes médicinales s'avère efficace pour isoler des composés bioactifs qui sont rarement toxiques pour l'homme¹⁵⁴ et ces recherches ont déjà fourni de nombreuses molécules prescrites en pharmacie¹⁵⁵. Les principes actifs isolés des plantes médicinales sont de plus utilisés dans la plupart des cas en pharmacie pour traiter des symptômes identiques ou liés aux prescriptions traditionnelles¹⁵⁴. Ceci montre bien la valeur des données ethnopharmacologiques. Il nous serait impossible de lister l'ensemble des composés bioactifs isolés de plantes utilisées en médecine traditionnelle mais le tableau proposé par Fabricant et Farnsworth en 2001¹⁵⁴, présente l'exemple de 122 composés issus d'études ethnopharmacologiques (annexe 1). On y retrouve de nombreuses molécules connues de tous pour leur efficacité thérapeutique telles que l'atropine (anticholinergique), la codéine et la

morphine (analgésiques), la colchicine (anticancéreux), la digitoxine (cardiotonique), la khelline (bronchodilatateur), la quinine (antimalarique), la réserpine (antihypertenseur), *etc.*

3.6.2. Difficultés d'interprétation des informations de la médecine traditionnelle

Dans le cadre actuel de la pharmacie, le criblage d'extraits de plantes médicinales est porteur de nouveaux espoirs pour découvrir de nouveaux médicaments¹⁵⁶. Cependant, si l'efficacité des recherches en ethnopharmacologie n'est plus à démontrer, il n'en reste pas moins que la discipline cumule les difficultés de la botanique (identification certaine de l'espèce), de la phytochimie (accès à la ressource, purification, *etc.*) et celles propres à l'ethnopharmacologie. Ces dernières sont en grandes parties liées aux données issues des enquêtes auprès des guérisseurs traditionnels et du fossé qui existe entre les conceptions modernes et traditionnelles de la médecine¹⁵⁷.

Les médecines traditionnelles et occidentales visent toutes deux à l'amélioration du bien-être et de la santé d'une personne atteinte par une maladie. Cependant, elles diffèrent radicalement quant au concept même de la maladie et à l'approche utilisée pour y remédier. La médecine traditionnelle est inséparable dans sa pratique, de la structure sociale, de la psychologie et des concepts religieux du peuple qui la conçoit. Elle regroupe un ensemble de connaissances et de pratiques, explicables ou non, utilisés pour le diagnostic, la prévention ou la lutte contre une maladie et mêle dans sa pratique magie, chamanisme et médecine¹⁵⁴. La médecine occidentale s'appuie sur des résultats expérimentaux et associe le plus souvent une

maladie à un agent pathologique précis. Par opposition, la notion d'agent pathogène (virus, bactéries, *etc.*) est très rare dans les systèmes de santé traditionnels. En médecine traditionnelle la maladie est perçue comme la rupture d'un équilibre entre le corps, l'esprit et la société. Le médecin traditionnel tente donc de rétablir cet équilibre pour ramener la santé du patient. Pour cela le travail de l'ethnopharmacologue passera par l'identification la plus précise possible des symptômes ciblés par le tradipraticien. Puis ce dernier tentera de corrélérer ces symptômes avec les maladies qui y sont liés, grâce notamment aux données épidémiologiques disponibles concernant la région étudiée¹⁵⁸.

3.6.3. Enjeux modernes de l'ethnopharmacologie

Les enjeux modernes de l'ethnopharmacologie sont multiples. Ils sont liés d'une part à la sauvegarde des savoirs traditionnels. Ceci s'inscrit dans une démarche de santé publique car la médecine traditionnelle représente bien plus qu'un folklore à conserver : 80% de la population des pays en voie de développement est toujours dépendante de la nature pour se soigner¹⁵⁹ et 65% de la population mondiale utilise encore, selon l'OMS, des remèdes traditionnels¹⁵⁴. De plus, on observe partout dans le monde un regain d'intérêt pour la phytomédecine¹⁶⁰. Les recherches en ethnopharmacologie peuvent servir dans ce contexte à développer ou valider l'utilisation de remèdes traditionnels¹⁶¹.

D'autre part, l'étude des plantes médicinales est toujours porteuse de beaucoup d'espoir pour identifier des composés bioactifs, notamment antiviraux^{162,163}, et même si elle ne permet pas toujours d'isoler de nouvelles structures, la découverte d'une activité nouvelle pour des composés connus peut

aussi mener vers l'élaboration de médicaments¹⁵⁵. Ainsi, plusieurs dérivés de la cucurbitacine I, un stérol fréquemment rencontré chez les Cucurbitaceae, tout comme l'acide bétulinique, un stérol commun des espèces du genre *Betula* (tel que le bouleau) présentent un fort potentiel anticancéreux^{155,164,165,166}.

Pourtant, alors qu'à peine 5% des plantes connues pour leur utilisation en médecine traditionnelle ont été étudiées, la biodiversité et les savoirs traditionnels sont aujourd'hui menacés de disparaître¹⁶⁷. Selon Paul Alan Cox la question de savoir si les savoirs tribaux seront sauvegardés au cours des prochains siècles est prédominante, et d'après lui, si ce n'est pas le cas, malgré les avancées technologiques modernes spectaculaires, l'humanité en serait appauvrie¹⁶⁸. Cette interrogation révèle tout à fait la double importance des travaux qui consistent à la fois à découvrir de nouveaux composés bioactifs en utilisant les outils d'évaluation biologique modernes, et d'un autre côté, à valoriser les connaissances traditionnelles, tentant ainsi d'assurer leur pérennité. La stabilité sociale de nos sociétés et la santé de ses habitants passera, d'après Cordell et Colvard, par la sauvegarde de notre environnement et des savoirs traditionnels, peut-être en partie grâce aux recherches ethnopharmacologiques¹⁶⁷.

3.7. Valorisation et sauvegarde de la biodiversité

A notre époque, l'étude des composés naturels (NP) est indissociable des notions liées à l'écologie et à la protection de la biodiversité. Les scénarios envisagés pour l'avenir par les Nations Unis, basés notamment sur l'augmentation de la population mondiale, la gestion des terres et les changements climatiques annoncés, laissent présager d'une perte significative de surface habitable, de

l'extinction de 10 à 15% des espèces végétales, d'un ralentissement de l'économie et d'une augmentation générale des maladies infectieuses telles que le paludisme, la dengue, la maladie de Chagas, la leishmaniose, *etc.*^{167,169}. Pour lutter contre la détérioration de notre environnement, il est capital aujourd'hui d'œuvrer pour la préservation de la biodiversité, et pour cela, de reconnaître à la Nature sa valeur tant pour notre économie que pour notre santé¹⁷⁰. Le fragile écosystème qui nous protège et permet notre survie sur Terre est le moins apprécié des miracles de notre vie. D'après Geoffrey Cordell, un ethnopharmacologue américain reconnu, continuer de détruire ce « cadeau » avant même de pouvoir l'apprécier à sa juste valeur et d'en comprendre toute l'utilité est la plus impardonnable des folies¹⁶⁷. Dans ce contexte, l'étude des composés naturels s'inscrit dans une démarche de valorisation de la biodiversité, visant à encourager sa conservation. Alors que la capacité des écosystèmes naturels à subvenir aux besoins des générations futures n'est plus garantie¹⁷¹, il nous a donc semblé important de situer nos recherches d'un point de vue éthique et politique.

Notre système politico-économique basé sur la croissance économique, tout comme le style de vie basé sur la consommation pour assurer la croissance, ont un impact très important sur la nature et la biodiversité, et mettent en péril le cadre de vie des générations futures. Paradoxalement, notre économie repose en grande partie sur les ressources naturelles (pétrole, gaz, uranium pour l'énergie, écosystèmes et biodiversité pour la pêche, l'agriculture, la pharmacie, *etc.*) sans leur accorder de valeur réelle^{172,173}. L'industrie du pétrole est un exemple frappant puisqu'il génère des revenus colossaux, et mis à part les moyens mis en œuvre pour son extraction, le pétrole est presque gratuit pour celui qui l'extrait. Or, s'agissant d'une ressource finie, son exploitation irraisonnée hypothèque sérieusement les

chances des générations futures de bénéficier du même confort et de la sécurité que nous connaissons¹⁷⁴. L'industrie pharmaceutique, à qui l'on doit reconnaître sa part de gloire pour l'amélioration de la santé humaine au cours des derniers siècles, s'appuie elle aussi en grande partie sur les ressources « offertes » par la Nature¹⁷⁵. Ainsi dans de nombreux cas, l'exploitation et/ou la destruction de la biodiversité est réalisée par les industriels sans contrepartie financière ou presque. Dans ce cadre, de nombreux économistes suggèrent d'accorder à la biodiversité une valeur financière dans le but de pérenniser les ressources de la planète. Il est nécessaire pour cela de mieux comprendre et de mieux décrire les potentialités offertes par les ressources naturelles^{171,176,177,178,179}. Les travaux de bio-prospections participent à cette dynamique de valorisation de la biodiversité comme ressource pérenne de composés bioactifs.

4. La Nouvelle-Calédonie : notre terrain d'étude

4.1. Situation géographique de la Nouvelle-Calédonie

Au sein de la large étendue géographique formée par l'océan Pacifique, trois régions sont distinguées :

- la Polynésie au centre-Ouest (Polynésie Française, Hawaï, Samoa, Cook)
- la Micronésie au Nord-Est (Archipel des Mariannes et Marshall)
- la Mélanésie au Sud-Ouest (Papouasie Nouvelle-Guinée, îles Salomon, Vanuatu, Fidji et Nouvelle-Calédonie).

La Nouvelle-Calédonie est un archipel isolé d'une superficie de 19 103 km², situé à 1700 km au Nord d'Auckland (Nouvelle Zélande), à 1500 km à l'Est de Brisbane (Australie) et à 540 km au Sud-Ouest du Vanuatu, la terre la plus proche. Le territoire calédonien est organisé en trois provinces : la province des îles Loyauté (Ouvéa, Lifou, Maré, Tiga), la province Nord et la province Sud dans laquelle se trouve Nouméa, la capitale.

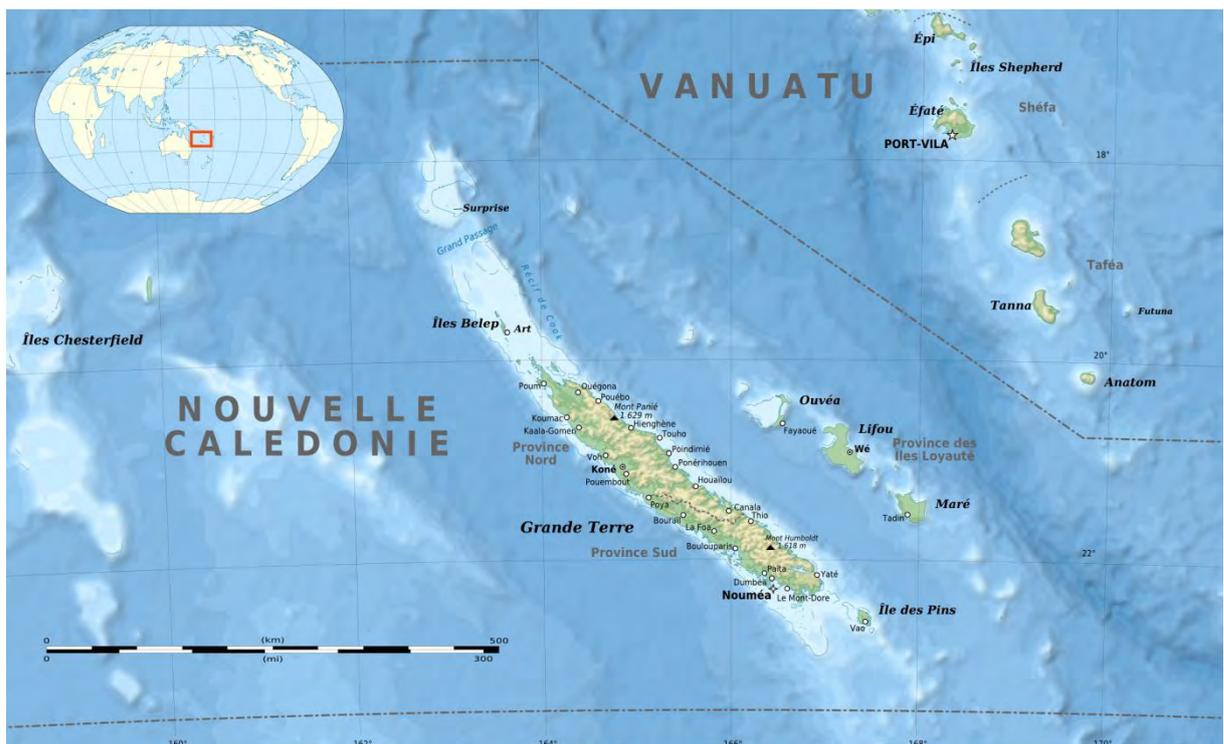


Figure 11. Situation géographique de la Nouvelle-Calédonie (carte réalisée à partir de cartes disponibles sur www.wikipedia.org).

Située directement au dessus du tropique du capricorne, entre 19 et 23° Sud, la Nouvelle-Calédonie est soumise aux vents d'alizés venant du Sud-Est influant largement sur le climat et la répartition des espèces végétales terrestres. Le climat calédonien, qualifié de tropical océanique, est caractérisé par deux saisons principales: une saison chaude et humide de mi-novembre à mi-avril, et une saison sèche les sept mois restants. Le climat humide de la côte Est se distingue également de celui plus sec de la côte Ouest. La différence de pluviométrie entre ces deux régions est liée à la barrière formée par la chaîne montagneuse centrale

qui s'étend du Nord au Sud de la Grande Terre et qui stoppe les nuages venant de l'Est, forçant ainsi les précipitations sur cette partie de l'île. La nature des sols est une autre spécificité de la Nouvelle-Calédonie, qui influence fortement la nature et l'originalité de la flore néo-calédonienne. Ainsi, la présence de très fortes concentrations de métaux lourds dans les sols dits ultramafiques (Fer, Nickel, *etc.*), a engendré le développement d'une flore adaptée et spécifique. L'existence de diverses plantes hyper-accumulatrices de nickel, telles que *Pycnantha acuminata*, une plante de la famille des Sapotaceae dont le latex bleu contient jusqu'à 20% de nickel, illustre parfaitement ce propos (figure 12).



Figure 12. Exemples de plantes hyper-accumulatrices de nickel : *Pycnantha acuminata* (arbre à sève bleue) à gauche et *Psychotria douarrei*, à droite ; source : B. Fogliani (LIVE-UNC).

Il existe en réalité une grande diversité de roches mères en Nouvelle-Calédonie : roches ultrabasiqes (péridotites et serpentinites), roches basiques (basalte et calcaire) et roches acides (schistes, micaschistes, phtanites et granites). A cette diversité de roches mères, il faut ajouter une dynamique d'érosion très variable du fait des forts contrastes climatiques existant en Nouvelle-Calédonie. A titre d'exemple, les péridotites soumises à l'érosion de l'eau se décomposent et libèrent de la silice, de la magnésie, du fer, du manganèse, du chrome et du cobalt. Le fer alors oxydé n'est pas soluble dans l'eau et forme une cuirasse ou des gravillons ferrugineux fréquemment observés dans l'extrême sud de la grande terre.

4.2. Biotopes et biodiversités calédoniens

Les combinaisons très variées de climats et de substrats ont fait émerger divers biotopes caractéristiques de la Nouvelle-Calédonie (forêt sèche, forêt humide, maquis minier, mangrove, *etc.*). Ces différents biotopes calédoniens représentent des intérêts variés pour les études floristiques et la recherche de composés bioactifs. Nous présentons ci-dessous quatre biotopes particulièrement intéressants en Nouvelle-Calédonie au sein desquels les plantes étudiées au cours de ces travaux ont été récoltées.

4.2.1. La forêt sèche

La forêt sèche (ou sclérophylle) est l'écosystème le plus menacé en Nouvelle-Calédonie. Ces forêts, aujourd'hui réduites à quelques dizaines de km², se trouvent de manière parsemée sur les terrains de basse altitude de la côte Ouest de la Grande Terre sur un substrat sédimentaire ou volcanique. Localisées principalement sur les côtes qui séparent Nouméa de Païta et Bourail de Népoui, plusieurs parcelles de forêt sèche sont également visibles à Nouméa (Ouen Toro, Nouville, au parc forestier ou autour du centre Tjibaou). Les études botaniques dans ces forêts ont mis en évidence la présence de 435 espèces de plantes vasculaires dont 57% sont endémiques à la Nouvelle-Calédonie. Quelques grands arbres (notamment *Terminalia spp.*, *Diospyros spp.*, *Dysoxylum spp.*, *Ficus spp.*) dominent un sous-bois arbustif plus dense majoritairement composé de dicotylédones (dont des *Syzygium*, *Glochidion*, *Diospyros*, *Guioa*, *Phyllanthus* ou *Psychotria spp.*). La destruction et la fragilité de la forêt sèche provoquant la mise en péril de sa biodiversité ont incité les autorités à lancer en 2001 le Programme de Conservation de la Forêt Sèche (PCFS),

visant à sa protection et à sa régénération¹⁸⁰. Dans le cadre de ce programme, diverses plantes de la forêt sèche sont à l'étude au sein de notre laboratoire, dans le but de valoriser la biodiversité de ce milieu et encourager sa sauvegarde.



Figure 13. Variété des écosystèmes calédoniens. A : photographie d'une forêt sèche (www.foretseche.nc); B : maquis minier (www.maisonnouvellecaledonieparis.nc); C : forêt humide (www.biodiversite.nc); D : forêt de mousse (photo personnelle) ; E : forêt de bord de mer (www.biodiversite.nc); F : mangrove (www.maisonnouvellecaledonieparis.nc).

4.2.2. La forêt humide

La forêt dense sempervirente humide représente une surface approximative de 3 900 km², localisée le long de la chaîne de montagne centrale et sur la côte Est de la Grande Terre. Ces forêts se développent sur trois types de substrats distincts (roches acides, ultramafiques et calcaires) et présentent de ce fait une grande variété floristique¹⁸⁰. Les études botaniques portant sur ces régions ont mis en évidence 2012 espèces de plantes avec un extraordinaire taux d'endémisme de 82,2%. A proximité de Nouméa, les monts Koghis offrent un bon aperçu d'une forêt humide sur substrat calcaire alors que le parc de la rivière bleue (région de Yaté) renferme les dernières parcelles existantes de forêt humide primaire sur substrat ultramafique. De nombreuses formes végétales sont observées dans ces forêts (arbres, arbustes, épiphytes, lianes, parasites, *etc.*) mais plusieurs grands arbres sont caractéristiques de ces régions ; il s'agit des Kaori (*Agathis spp*), du Houp (*Montrouziera cauliflora*), du Kohu (*Intsia bijuga*), et des *Araucaria spp*. Ces forêts renferment également une grande diversité de palmiers et parmi les fougères arborescentes les plus grandes du monde. Les forêts humides d'altitude au-delà de 1 000 mètres (observées notamment au mont Humboldt et au mont Panié, les deux sommets de la Nouvelle-Calédonie qui culminent respectivement à 1 618 et 1 628 m ou au mont Mou, plus proche de Nouméa) sont appelées communément « forêts de mousses ». Ces forêts très originales sont constituées de grands arbres et d'un sous-bois caractérisé par l'enchevêtrement de racines recouvertes de « mousses », qui sont en réalité des fougères de la famille des Hymenophyllaceae.

4.2.3. Le maquis minier

Le "maquis minier" désigne en Nouvelle-Calédonie l'ensemble des formations végétales sur roches ultramafiques n'appartenant pas à la forêt¹⁸⁰. Considéré comme l'un des écosystèmes les plus originaux de la planète, le maquis minier recouvre 24% du territoire calédonien et se développe dans des climats variés (bord de mer, altitude, *etc.*) principalement dans la partie sud de la grande terre. Cette région est étroitement associée à l'exploitation du bois et du nickel qui débuta au début du XX^{ème} siècle. Ne présentant pas de physionomie homogène (on y observe en effet une grande variation de la composition floristique et de l'aspect général de la formation végétale), le maquis minier se développe toujours sur un substrat issu de roches ultramafiques non nutritives et extrêmement riches en métaux lourds. Le taux d'endémisme y est exceptionnel : plus de 88% de plantes vasculaires ne sont présentes que dans ces formations et uniquement en Nouvelle-Calédonie¹⁸⁰. Quelques grands arbres se distinguent dans ces régions, tels que des *Araucaria spp.*, *Agathis ovata* ou *Arillastrum gummiferum*, mais la majorité des espèces représentées dans ce milieu sont des arbustes appartenant notamment aux familles des Myrtaceae, Rubiaceae, Apocynaceae, Cunoniaceae et Proteaceae. D'autres familles moins représentées contribuent néanmoins assez largement au faciès du maquis minier du fait de la large aire de répartition des espèces présentes (*ex : Alphitonia caledonica*).

4.2.4. Le littoral Calédonien

Le littoral calédonien ne présente pas un fort taux d'endémicité en ce qui concerne la flore mais il s'agit en revanche du milieu le plus fréquenté par les

calédoniens. On y retrouve l'essentiel des habitats traditionnels et post-coloniaux et des activités économiques du territoire. Les plantes du bord de mer sont donc les mieux connues et les plus fréquemment utilisées par les Kanaks, notamment pour la confection de remèdes traditionnels. Les zones sableuses proches de la mer sont habitées par une végétation rampante (*ex : Ipomoea pescaprae*) alors que sur les sols coralliens se développent plutôt des arbustes ou des arbres océaniques pantropicales à l'image de *Scaevola sericea*, du Bourao (*Hibiscus tiliaceus*), du bois de fer (*Casuarina equisetifolia*), le faux tabac (*Argusia argentea*), des *Pandanus spp.*, sans omettre l'indispensable cocotier (*Cocos nucifera*). Le pin colonnaire (*Araucaria columnaris*), caractéristique du littoral calédonien (figure 13E), est toutefois un exemple des espèces endémiques à la Nouvelle-Calédonie qui peuplent ces habitats. Plus loin du rivage s'est développé une végétation arborée dans laquelle on retrouve fréquemment des espèces telles que *Terminalia catappa*, *Acacia spirorbis*, *Melochia odorata* ou le niaouli (*Melaleuca quinquenervia*). Ces formations arborées offrent une transition avec le maquis ou la forêt.

Le littoral calédonien, notamment sur la côte Ouest de la Grande Terre, présente aussi de larges étendues de mangroves, un écosystème complexe fortement menacé par l'industrialisation et l'urbanisation des zones côtières. Cet écosystème revêt pourtant une grande importance écologique car de nombreuses espèces, tel le crabe des palétuviers, en sont dépendantes pour leur survie ou leur reproduction. Les mangroves renferment une flore relativement pauvre (une vingtaine d'espèces et un faible taux d'endémisme) mais très spécialisée. Cet écosystème est structuré par la présence de diverses espèces de palétuviers (*Bruguiera*, *Rhizophora* et *Avicennia spp*).

4.3. Potentiel pharmacologique de la flore calédonienne

La flore calédonienne offre donc une extraordinaire diversité et originalité qui s'explique notamment par le fort isolement de l'île, par les caractéristiques climatiques et pédologiques de l'archipel. La Nouvelle-Calédonie est ainsi considérée comme un hot spot au niveau de la biodiversité marine¹⁸¹ autant que terrestre¹⁸². Ce qualificatif flatteur pour la Nouvelle-Calédonie, implique néanmoins que certaines menaces pèsent sur la biodiversité. La végétation primaire de NC a été largement modifiée, exploitée et altérée par l'action de l'homme (exploitation du bois, du nickel, agriculture, feux de forêts, *etc.*) et occupent un espace de plus en plus réduit à côté d'une végétation dite secondaire et présentant une plus faible diversité.



Figure 14. Photo du maquis minier dégradé par les mines et les incendies dans la région de la coulée (source : J. Maura).

Notre étude participe à montrer l'importance des plans de conservation de la biodiversité calédonienne. Cette richesse floristique offre de grandes opportunités de trouver des structures chimiques originales et/ou bioactives¹⁸³ alors que paradoxalement, la composition chimique des plantes calédonienne est encore largement inexplorée : parmi les 2551 plantes endémiques recensées en Nouvelle-Calédonie, la composition phytochimique d'à peine 1% d'entre elles à fait l'objet

d'une étude scientifique. 218 espèces ont fait l'objet d'une étude phytochimique et/ou de leur potentiel pharmacologique selon une étude bibliographique menée à partir des différentes bases de données documentaires de l'IRD et du CNRS.

Seconde partie :
Sélection des plantes
& criblage des
extraits bruts

Introduction

Au cours de cette étude, nous nous sommes attachés à caractériser les potentialités pharmacologiques de 48 espèces de plantes calédoniennes. Ces plantes, sélectionnées selon des critères ethnopharmacologiques et chimiotaxonomiques, ont été récoltées dans les provinces Nord et Sud de la Grande Terre. Une fois séchés et broyés, les différents organes de ces plantes ont été extraits par l'acétate d'éthyle et filtrés sur gel de polyamide avant d'être testés contre différentes cibles biologiques. Nous avons ainsi évalué le potentiel antibiotique, anticancéreux et antidengue de 91 extraits bruts. Plusieurs extraits tels que ceux obtenus avec deux Myrtaceae (*Melaleuca quinquenervia* et *Carpolepis laurifolia*) et *Soulamea tomentosa* présentent ainsi une forte activité antibiotique ou cytotoxique. Les résultats de ce criblage révèlent aussi le fort pouvoir antiviral contre le DV de différents extraits obtenus avec les plantes de quatre familles (Euphorbiaceae, Myrtaceae, Podocarpaceae et Rutaceae) qui ont pour cela été sélectionnées pour de plus amples études visant à isoler les principes actifs qu'elles contiennent.

1. Sélection des plantes

Comme nous l'avons évoqué dans la première partie de ce manuscrit, plusieurs stratégies peuvent être employées pour la recherche de principes actifs à visée thérapeutique. Nous avons choisi pour cette étude de présélectionner des plantes sur des critères ethnopharmacologiques et chimiotaxonomiques. Cette présélection vise à augmenter le taux de « hits » lors du criblage biologique.

1.1. Sélection des plantes fébrifuges de la médecine traditionnelle

Les données apportées par l'ethnopharmacologie mènent souvent à l'étude de plantes à fort potentiel pharmacologique. D'après la littérature, nous aurions ainsi plus de chances de trouver des molécules bioactives et non-toxiques dans les plantes de la médecine traditionnelle que par le biais d'un criblage aléatoire¹⁸⁴. Ceci est lié à la qualité des connaissances empiriques des populations autochtones qui ont sélectionné de générations en générations des plantes peu ou pas toxiques, actives contre les maux dont elles souffraient. La valeur de ces connaissances, longtemps ignorées par les scientifiques, est aujourd'hui unanimement reconnue. Toutefois, du fait des concepts radicalement différents entre la médecine occidentale et les médecines traditionnelles, il est souvent difficile de corroborer les utilisations empiriques avec les potentialités pharmacologiques des remèdes traditionnels¹⁵⁴.

1.1.1. Concepts traditionnels et modernes de la médecine

Pour la médecine moderne occidentale, une maladie est associée à un agent pathogène spécifique (conception pastoriennne) ou à des dérangements physiologiques (conception biologique, psychologique ou même psychiatrique) qui seront la cible des médicaments administrés. La santé n'est en aucune façon liée à la spiritualité d'un individu pour la médecine occidentale. En médecine traditionnelle en revanche, le somatique et le spirituel constituent une entité globale et ne peuvent être séparés. La maladie est attribuée à la rupture d'un équilibre entre le corps, l'âme et la société, que les traitements traditionnels ont pour but de rétablir. Les guérisseurs Kanaks définissent par exemple la santé comme le bien-être de

l'individu dans son milieu social et naturel. Au contraire, les excès, les manques ou les conflits peuvent menacer cet équilibre et être causes de malheurs : catastrophes naturelles, guerres ou maladies. Dans la culture traditionnelle kanake, comme pour beaucoup de sociétés traditionnelles, peu de maladies sont naturelles. Ainsi, aucune notion de microorganisme ni de leur rôle dans les infections ou autre maladie n'est mentionnée dans la tradition kanake¹⁸⁵ et les mélanésien se contentent d'en soigner les symptômes. Trois types de maladies sont distingués par les guérisseurs Kanaks : les vraies maladies, les maladies envoyées par les ancêtres et les maladies fabriquées¹⁸⁶.

- Les maladies vraies sont dues essentiellement aux accidents climatiques (refroidissement ou exposition au soleil), à la nutrition (maladies de l'excès ou du manque, de la rétention ou de l'évacuation, ou intoxication par le poisson), et aux rapports sexuels.
- Les maladies envoyées, le sont par des forces ancestrales, garantes du respect des règles sociales. Ces maladies constituent une réponse à la transgression de normes dictées par la coutume : punition ou simple avertissement incitant à réparer son erreur. A défaut de réparation, ces maladies se transmettront à la descendance et pourront causer des maladies totémiques.
- Les maladies fabriquées sont le plus souvent liées à des conflits individuels dominés par la jalousie. Dans cette classe se rangent diverses maladies désignées du nom des forces maléfiques dont elles sont le résultat : " malédiction ", " Dooki ", " sagaie ", " boucan ", *etc.* Ce

sont des maladies provoquées par des maléfices proférées par une personne agissant pour son propre compte ou pour le compte d'autrui.

1.1.2. Sélection des plantes fébrifuges

Afin de pouvoir utiliser les données rapportées par les enquêtes ethnopharmacologiques qui recensent l'utilisation des plantes contre les maux évoqués ci-dessus, il est nécessaire de remonter à la source de la maladie décrite par le guérisseur, comprendre les symptômes traités et développer des hypothèses quant à son utilisation possible en médecine moderne (ou occidentale). La fièvre est un symptôme souvent évoqué au cours des enquêtes ethnopharmacologiques ; or la fièvre est également un symptôme reconnu dans les cas d'infections virales, bactériennes ou d'autres maladies telles que les cancers. En recoupant avec les données épidémiologiques relatives au lieu d'utilisation de la plante décrite, nous pouvons alors émettre des hypothèses plausibles quant aux potentialités des plantes réputées fébrifuges dans la médecine traditionnelle. Dans les pays développés, 40% des cas de fièvres prolongées sont associées à une infection (virale, fongique ou bactérienne), 20% à des maladies néoplasiques (tumeurs), et 10% à des « collagénoses » (inflammations) d'après le Dr. François Boccaccio¹⁵⁸. Dans les pays en voie de développement, ces fréquences seraient différentes : la plus faible espérance de vie serait responsable d'une plus faible proportion de cancers dans la population où les maladies infectieuses seraient responsables de 75% des fièvres prolongées. Ce symptôme ayant plusieurs étiologies possibles, nous en déduisons qu'une plante réputée fébrifuge peut agir contre différents pathogènes ou maladies et pourrait contenir des composés antibiotiques ou anticancéreux. Elle

pourrait aussi posséder une activité antivirale et agir contre la dengue, une maladie présumée endémique en Nouvelle-Calédonie. Autrement dit, puisque l'infection par le DV se caractérise par des accès de fièvres prolongées, nous pouvons penser que parmi les remèdes antipyrétiques, certains seront efficaces contre le virus de la dengue. Cette hypothèse a servi de base à d'autres recherches de molécules actives contre les maladies infectieuses affectant la Mélanésie^{187,188,189}.

Au cours de la première partie de nos recherches, une étude bibliographique menée en collaboration avec Pierre Cabalion et s'appuyant notamment sur le travail mené au cours d'un stage de master 2 par Véronique Ledroit en 1997¹⁹⁰, nous a permis de sélectionner 70 plantes réputées fébrifuges dans la médecine traditionnelle en Nouvelle-Calédonie. L'utilisation de ces plantes, pour la majeure partie d'entre elles natives de Nouvelle-Calédonie, fut mise en lumière par des enquêtes ethnopharmacologiques en Nouvelle-Calédonie, dans d'autres îles du Pacifique, voire en Asie du Sud-Est. Leur(s) indication(s) thérapeutique(s) est (sont), pour chacune d'entre elles, résumée(s) dans un tableau présenté en annexe 2, accompagné par une présentation des aires coutumières et langues kanakes en annexe 3. 30 plantes parmi les 70 sélectionnées, ont été récoltées au cours de la première phase de nos travaux. Les plantes utilisées en médecine traditionnelle sont indiquées dans les lignes grisées des tableaux 2, 3 et 4.

1.2. Sélection des plantes sur des critères chimiotaxonomiques

Comme nous l'avons dit plus haut, d'autres méthodes de sélection des plantes peuvent être utilisées pour la recherche de molécules bioactives. Ainsi, 18 plantes appartenant à une famille connue pour ses potentialités pharmacologiques

ont également été sélectionnées, récoltées et testées contre divers pathogènes de l'homme. L'intérêt chimiotaxonomique des familles des plantes récoltées selon les données de la bibliographie est détaillé dans un tableau présenté en annexe 4.

Parmi ces plantes, 12 espèces appartiennent à une famille botanique connue pour contenir fréquemment des métabolites secondaires potentiellement antiviraux. Il s'agit de *M. tiebaghiensis*, *G. tricholepis*, *S. elliptica*, *D. araucarioides*, *D. balansae*, *E. pancherianum*, *M. corymbosa*, *P. acuminate*, *S. tomentosa*, *S. mauritianum*, *S. tetrandrum* et *S. cf. calophylla*. A titre d'exemple, citons l'exemple de *Gymnema tricholepis* et de *Secamone elliptica* qui, appartenant à la famille des Apocynaceae, contiennent probablement des alcaloïdes¹⁹¹.

5 espèces ont été quant à elles sélectionnées pour leur appartenance à une famille ou un genre utilisé en médecine traditionnelle, selon des critères que nous pourrions donc qualifier de chimio-ethnopharmacologiques :

- *Meryta balansae* fut sélectionné car plusieurs membres de ce genre sont utilisés pour la préparation de remèdes antipyrétiques en Nouvelle-Calédonie (annexe 2). La famille des Araliaceae a également la réputation de contenir des saponines ayant de nombreuses activités biologiques notamment antivirales, antimicrobiennes ou anticancéreuses¹⁹².
- *Gymnostoma deplancheanum* fut sélectionné pour comparer ses potentialités pharmacologiques avec celles de *G. chaemacyparis* utilisés comme fébrifuge en médecine traditionnelle.

- *Homalanthus repandus* appartient à la famille des Euphorbiaceae dont de nombreuses espèces, telle *H. nutans* en Mélanésie, sont utilisées en médecine traditionnelle. Par ailleurs, les Euphorbiaceae renferment fréquemment des diterpènes oxydés (esters de phorbols notamment) ayant montré de fortes potentialités antivirales¹⁹³.
- *Scaevola beckii* fut sélectionné du fait que trois autres espèces du genre sont utilisées en médecine traditionnelle. Par ailleurs, la famille des Goodeniaceae a la réputation de contenir de nombreux métabolites secondaires bioactifs, tels que des iridoïdes¹⁹⁴.
- *Ptisana attenuata* est une fougère de la famille des Marattiaceae dont divers membres sont utilisés en Mélanésie contre la fièvre^{195,196,197}.

Enfin, *Amborella trichopoda*, une espèce endémique à la Nouvelle-Calédonie et considérée comme le taxon le plus basal de l'arbre phylogénétique des angiospermes, fut récoltée du fait de sa grande originalité et en vu de combler un manque de connaissances scientifiques concernant sa phytochimie et ses potentialités biologiques.

2. Récolte des espèces sélectionnées

Comme les cartes de nos récoltes le montrent dans les figures 15, les plantes ont été prélevées sur la Grande Terre, dans divers biotopes caractéristiques de la Nouvelle-Calédonie. Chaque plante fut identifiée sur la base de son étude

botanique, en collaboration avec Jérôme Munzinger. Un spécimen d'herbier, dont la référence est donnée dans le tableau 30 de la partie expérimentale, est conservé à l'herbier du centre IRD de Nouméa.

- 19 espèces ont été récoltées dans les forêts humides du plateau de Dogny, du plateau de Tango, des Monts Do, du Mont Mou et des Monts Koghis : *A. moorei* (Ad 13), *A. trichopoda* (Cou 27), *M. tiebaghiensis* (Cou 25), *M. balansae* (Cou 19), *E. pinnatum* (Cou 22), *H. repandus* (Cou 08), *C. occidentalis* (Cou 23), *E. phaseoloides* (Ad 12), *A. evecata* (Ad 14), *P. attenuata* (Cou 21), *D. roseum* (Cou 26), *C. laurifolia* (Ad 27), *C. grandiflora* (Cou 30), *P. poissoniana* (Cou 20), *S. tomentosa* (Ad 24), *S. mauritanum* (Cou 18), *S. tetrandrum* (Cou 13), *S. torvum* (Cou 17), et *P. argenteus* (Cou 16).
- 13 espèces ont été récoltées dans le maquis minier du grand sud : *A. ovata* (Ad 08), *G. chamaecyparis* (Ad 17), *G. deplancheanum* (Ad 06), *S. balansae* (Cou 33), *S. beckii* (Cou 10), *S. montana* (Ad 21), *C. filiformis* (Ad 18), *L. cernua* (Cou 15), *D. araucarioides* (Cou 11), *D. balansae* (Cou 14), *M. corymbosa* (Cou 12), *P. acuminata* (Ad 28), *S. purpurata* (Ad 11), et *S. cf. calophylla* (Ad 29).
- 6 espèces ont été récoltées dans les forêts sèches de la presqu'île de Pindaï et de Nouville : *G. tricholepis* (Cou 04), *S. elliptica* (Cou 05), *G. chamaecyparis* (Ad 17), *D. macrocarpa* (Ad 26), *G. billardierei* (Ad 10), et *E. pancherianum* (Cou 03).

- 10 espèces ont été récoltées en bord de mer à Nouméa, dans la baie de Prony et près de la tribu de Borendy : *T. catappa* (Ad 01), *C. variegatum* (Ad 02), *E. agallocha* (Ad 05), *S. sericea* (Cou 02), *M. odorata* (Cou 01), *T. populnea* (Cou 06), *M. quinquenervia* (Ad 04), *B. gymnorhiza* (Cou 07), *G. speciosa* (Ad 25), et *W. indica* (Cou 09).



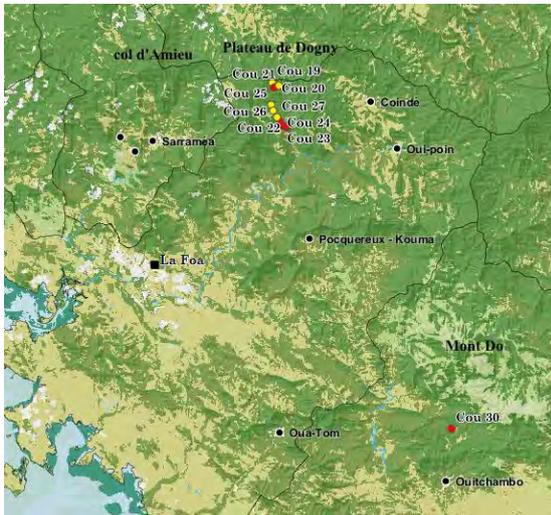
Figure 15. Carte de la Nouvelle-Calédonie représentant les différents biotopes et les lieux de récolte des différentes plantes criblées au cours de cette étude.



A. détail des récoltes effectuées dans la commune de Nouméa et sur le mont Mou



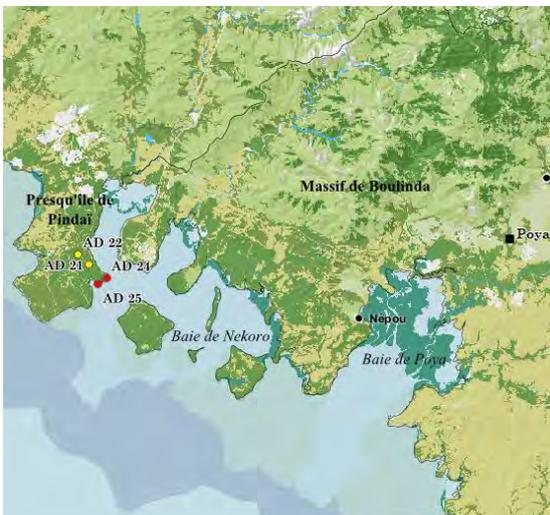
B. détail des récoltes effectuées dans le grand Sud



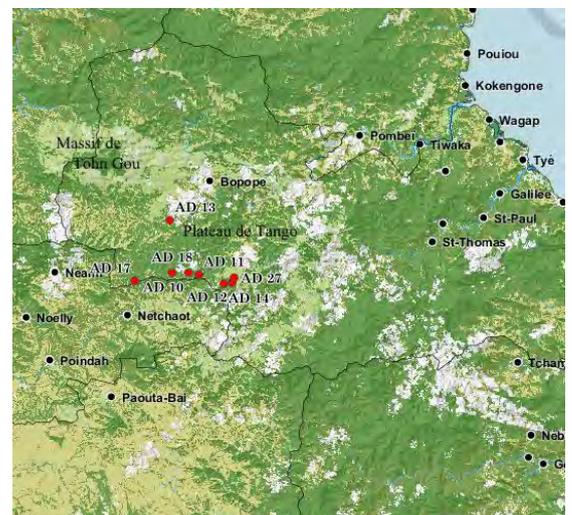
C. détail des récoltes effectuées dans la commune de La Foa sur le plateau de Dogny



D. détail des récoltes effectuées dans la région du mont Humboldt et de Grand Borendy



E. détail des récoltes effectuées dans la commune de Poya, sur la presqu'île de Pindai



F. détail des récoltes effectuées dans la commune de Poindimié, sur le plateau de Tango

3. Préparation des extraits bruts

Les différents organes des espèces collectées, feuilles (Fe), écorces (Ec), fruits (Fr) et fleurs (Fl) sont séchés et broyés séparément. Un extrait brut à l'acétate d'éthyle (AcOEt) est alors préparé avec 50 g de poudre. Le choix du solvant d'extraction est guidé par plusieurs objectifs et impératifs liés au test enzymatique contre la dengue : l'acétate d'éthyle (d'une polarité intermédiaire) permet l'extraction d'une grande variété de métabolites secondaires suffisamment polaires pour être solubilisés dans du DMSO 5% lors du test enzymatique, et limite l'extraction des polyphénols. Avant son évaluation biologique, l'extrait brut est de plus filtré sur gel de polyamide afin d'éliminer au maximum les polyphénols souvent considérés dans la littérature comme responsables de faux-positifs lors des tests biologiques¹⁹⁸.

4. Criblage biologique des extraits bruts

Le criblage biologique repose sur trois tests biologiques permettant d'évaluer les potentialités antivirales contre le DV, la cytotoxicité et l'activité antimicrobienne des extraits réalisés. L'ensemble des résultats de ce criblage est présenté en annexe

5. Par ce criblage biologique nous poursuivons deux objectifs principaux :

- Réaliser une évaluation préliminaire des potentialités biologiques des extraits des plantes récoltées, notamment celles utilisées en médecine traditionnelle. Nous cherchions pour ces dernières à corrélérer leur utilisation traditionnelle avec une activité biologique.

- Sélectionner des extraits non-toxiques pour les cellules humaines et inhibant fortement la polymérase du DV pour la recherche de composés antiviraux contre la dengue. Le résultat des tests antibactériens donne une idée de la spécificité de l'activité antivirale des extraits d'intérêt. Ainsi, un extrait très actif contre la DV NS5 et ne présentant que peu ou pas d'activité antibiotique sera privilégié par rapport à un extrait actif sur une variété trop large de cible.

4.1. Evaluation des potentialités antidengue

La Nouvelle-Calédonie est touchée par des épidémies de dengue de plus en plus fréquentes. Le virus de la dengue (DV) est même considéré comme endémique sur ce territoire par certains organismes scientifiques (CPS, IPNC, OMS, *etc.*). Afin d'évaluer les potentialités d'inhibition de la réplication du DV des extraits de plantes sélectionnées, nous avons mesuré l'inhibition de l'activité de l'enzyme DV2-NS5 RdRp, essentielle à la réplication du virus. Le test contre cette enzyme du DV est le test principal de notre étude, autour duquel s'articule l'ensemble de nos travaux. Ce test est réalisé à Marseille, dans le laboratoire AFMB (Architecture et Fonctionnement des Macromolécules Biologiques) dirigé par Bruno Canard. Il s'agit d'un test enzymatique sur une fraction de la protéine non-structurale NS5 impliquée dans la réplication du virus. Ce test permet de cibler les quatre sérotypes puisque l'enzyme est fortement conservée dans les quatre sérotypes du DV.

Le criblage des extraits bruts est réalisé à 50 et à 10 µg/mL puis à 1 µg/mL pour les extraits les plus actifs. L'ensemble des résultats du criblage à 10 µg/mL est présenté en annexe 5. Le criblage à 50 µg/mL est moins discriminant mais permet de vérifier l'effet dose réponse de nos extraits. Les extraits bruts à 10 µg/mL inhibant

80% ou plus de l'activité de la DV-NS5 sont retenus comme « Hits » contre cette enzyme et sont donc considérés comme potentiellement actifs contre la réplication du DV chez l'homme.

Parmi les 91 extraits testés, 24 sont considérés comme « hits » contre la DV2-NS5 RdRp. Les résultats obtenus contre la réplicase virale avec ces extraits sont présentés en détails dans le tableau 2.

Tableau 2. Pourcentage d'inhibition de la DV2-NS5 RdRp pour les extraits bruts considérés comme « hits » à 50, 10 et 1 µg/mL.

Famille	Espèce	Organe	Activité sur la DV2-NS5 RdRp		
			à 50 µg/mL	à 10 µg/mL	à 1 µg/mL
Casuarinaceae	<i>G. deplancheanum</i>	Ec	99 ±0	97 ±1	nd
Ebenaceae	<i>D. macrocarpa</i>	Fe	89 ±7	87 ±6	nd
		Ec	97 ±1	97 ±4	nd
Euphorbiaceae	<i>E. agallocha</i>	Ec	88 ±3	84 ±6	nd
	<i>G. billardierei</i>	Ec	93 ±3	91 ±6	nd
	<i>H. repandus</i>	Ec	100 ±1	99 ±1	96 ±2
Goodeniaceae	<i>S. balansae</i>	Ec	nd	89 ±4	47 ±17
		Fe	96 ±3	95 ±2	93 ±0
		Ec	93 ±5	86 ±12	89 ±4
Malvaceae	<i>S. montana</i>	Fe	88 ±1	86 ±4	nd
		Ec	90 ±3	86 ±4	nd
		Fe	97 ±2	99 ±6	84 ±0
Meliaceae	<i>T. populnea</i>	Ec	99 ±0	99 ±0	99 ±0
		Fr	98 ±3	97 ±1	93 ±1
		Ec	98 ±2	94 ±6	92 ±5
Myrtaceae	<i>D. roseum</i>	Fe	91 ±2	91 ±3	68 ±3
		Fe	86 ±6	89 ±3	nd
		Ec	93 ±0	87 ±4	nd
Podocarpaceae	<i>D. araucarioides</i>	Fe	94 ±6	94 ±5	91 ±5
	<i>D. balansae</i>	Fe	96 ±3	94 ±6	75 ±5
Rubiaceae	<i>P. poissoniana</i>	Ec	99 ±0	96 ±3	92 ±4
Rutaceae	<i>M. corymbosa</i>	Ec	96 ±2	92 ±5	87 ±4
Thymelaeaceae	<i>W. indica</i>	Fe	80 ±9	81 ±11	65 ±4
		Ec	96 ±2	88 ±10	64 ±3

Nous remarquons fréquemment une corrélation entre la famille botanique de la plante et l'activité biologique : ainsi, trois des quatre Euphorbiaceae récoltées

nous ont donné des extraits d'écorces fortement actifs contre la DV-NS5 RdRp et trois des quatre Goodéniaceae récoltées nous ont fourni des extraits actifs. De la même manière, les extraits de feuilles des deux Myrtaceae et des deux Podocarpaceae testés sont actifs contre la réplicase virale. Ceci nous confirme l'intérêt de la chimiotaxonomie pour la recherche de composés bioactifs et nous suggère de récolter d'autres plantes appartenant aux familles des plantes actives. Pour certaines plantes, telles que les Podocarpaceae, l'activité semble liée à des composés retrouvés dans un organe spécifique de la plante (ici les feuilles) alors que pour d'autres, telle que *Thespesia populnea*, tous les extraits réalisés s'avèrent actifs contre la cible protéique du DV. Pour cela, le criblage phytochimique des plantes d'intérêt nous aidera à élaborer une hypothèse concernant les composés actifs des extraits testés.

Considérant que 17 espèces végétales parmi les 48 testés, peuvent renfermer des inhibiteurs puissants de l'ARN polymérase du DV, une analyse plus fine est nécessaire pour sélectionner les extraits à étudier plus en détail au cours de nos travaux. Ainsi, d'autres tests biologiques ont été réalisés pour évaluer la toxicité et la spécificité d'action des extraits bruts des plantes récoltées.

4.2. Evaluation de l'activité antibiotique contre quatre microorganismes

L'activité antibiotique des extraits est évaluée *in vivo* contre trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) et une levure (*Candida albicans*), toutes associées à de nombreux cas d'infections chez l'homme. Ces tests sont réalisés suivant la méthode des disques de diffusion, en mesurant le diamètre d'inhibition de la croissance microbienne dans un milieu gélosé par des disques imprégnés par 1 mg de chaque extrait brut. Tous

les résultats du criblage antibiotique sont présentés en annexe 5. Les extraits sont considérés actifs lorsque le diamètre d'inhibition est supérieur ou égal à 8 mm. 25 extraits obtenus à partir de 20 espèces et de 15 familles de plantes ont démontré une activité contre au moins un des quatre microorganismes ciblés. Ces résultats sont détaillés dans le tableau 3.

Tableau 3. Extraits des différents organes des plantes présentant une activité antimicrobienne *in vitro*. Fe : feuilles ; Ec : écorces ; Fr : fruits ; Ti : tiges ; PA : parties aériennes.

Famille	Espèce	Organe	Inhibition de la croissance (mm) de			
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>C. albicans</i>
Annonaceae	<i>M. tiebaghiensis</i>	Ec	-	10	-	12
Apocynaceae	<i>G. tricholepis</i>	Ti	-	-	11	-
Araliaceae	<i>M. balansae</i>	Fe	-	-	8	-
Araucariaceae	<i>A. moorei</i>	Fe	8,5	7	9	-
	<i>A. ovata</i>	Ec	8	-	-	-
Casuarinaceae	<i>G. deplancheanum</i>	Ec	-	9	7,5	10
Ebenaceae	<i>D. macrocarpa</i>	Ec	-	11	-	12
Euphorbiaceae	<i>G. billardierei</i>	Ec	-	-	-	10
Goodeniaceae	<i>S. beckii</i>	Fe	-	8	-	-
	<i>S. sericea</i>	PA	-	-	-	13
Leguminosae	<i>E. phaseolides</i>	Ec	-	-	-	8
Malvaceae	<i>M. odorata</i>	PA	-	11	-	-
		Fe	-	9	-	-
	<i>T. populnea</i>	Ec	-	12	6,5	9
		Fr	10	12	9	9
Meliaceae	<i>D. roseum</i>	Ec	-	10	7	-
Myrtaceae	<i>C. laurifolia</i>	Fe	7	8	-	8
		Ec	9	8	8	13,5
	<i>M. quinquenervia</i>	Fe	7	10	7	-
		Ec	-	-	7	8
Podocarpaceae	<i>D. araucarioides</i>	Ec	-	8	-	9
	<i>D. balansae</i>	Fe	-	-	-	9
Rubiaceae	<i>P. poissoniana</i>	Ec	-	-	-	9
Thymelaeaceae	<i>W. indica</i>	Fe	-	10	-	-
		Ec	-	10	-	8

Parmi les plantes présentant une activité antimicrobienne, les plus actives sont celles à privilégier pour rechercher de nouveaux composés antibiotiques. Ainsi, il semble intéressant de rechercher des composés antibiotiques à large spectre d'action dans les fruits de *T. populnea* et les écorces de *C. laurifolia* puisque ces deux extraits sont actifs sur les quatre souches microbiennes testées. Ces deux

extraits sont les deux plus actifs testés contre *E. coli* ce qui est également vrai pour les écorces de *C. laurifolia* contre *C. albicans* et des écorces de *T. populnea* contre *S. aureus*. Il semble par ailleurs intéressant de rechercher des composés spécifiquement actifs contre *S. aureus* dans l'extrait des parties aériennes de *M. odorata* et des feuilles de *W. indica*. En effet ces extraits inhibent fortement et spécifiquement le développement de cette souche bactérienne d'après les résultats obtenus ici. De la même manière, il semble prometteur de rechercher des composés spécifiquement actifs contre *S. epidermidis* dans les tiges de *G. tricholepis* et des composés antifongiques actifs contre *C. albicans* dans les parties aériennes de *S. sericea* ou dans les écorces de *G. billardierei*. Pour finir, les extraits des écorces de *M. tiebaghiensis*, de *D. macrocarpa* et de *D. roseum* ont montré une forte activité contre *S. aureus* et *C. albicans* au cours de ce criblage.

4.3. Evaluation de la cytotoxicité contre deux souches cellulaires humaines

La toxicité des extraits est mesurée *in vitro* contre deux souches cellulaires :

- Les cellules MRC5 qui sont des cellules embryonnaires humaines non cancéreuses.
- Les cellules KB, issues de carcinome buccal.

Ce test vise d'une part à évaluer la toxicité potentielle des plantes et des extraits inhibiteurs de la polymérase du DV et/ou de la croissance microbienne, et d'autre part à évaluer le potentiel anticancéreux des extraits testés. En ce qui concerne les plantes sélectionnées sur des critères ethnopharmacologiques, une activité anticancéreuse pourrait comme nous l'avons dit plus haut, justifier son

utilisation contre la fièvre en médecine traditionnelle¹⁵⁸.

Les extraits entraînant une mortalité cellulaire supérieure à 30% pour une concentration de 10 µg/mL sont considérés comme cytotoxiques. Les extraits actifs sont alors testés à 1 µg/mL. L'ensemble des résultats du criblage à 10 µg/mL est présenté en annexe 5 et les résultats obtenus pour les extraits considérés comme cytotoxiques sont détaillés dans le tableau 4.

20 extraits, obtenus à partir de 16 espèces végétales, ont ainsi démontré une activité cytotoxique contre au moins une des deux lignées cellulaires testées. Cinq extraits s'avèrent particulièrement toxiques pour les deux lignées cellulaires KB et MRC5. En effet, l'extrait des écorces de *M. tiebaghiensis*, de *D. macrocarpa*, de *T. populnea* ainsi que les extraits des feuilles et des écorces de *S. tomentosa* ont entraîné la mort de plus de 75% des cellules KB et MRC5 à 10 µg/mL. Trois extraits ont par ailleurs démontré une forte activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses : ainsi les extraits des feuilles de *D. macrocarpa*, des écorces de *S. montana* et de *D. balansae* ont entraîné la mort de plus de 65% des cellules KB sans nuire au développement des cellules MRC5 pour une concentration de 10 µg/mL. Ces trois extraits pourraient quant à eux renfermer des composés ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses.

Tableau 4. Extraits cytotoxiques contre les cellules KB et/ou MRC5 à 10 et à 1 µg/mL (les extraits bruts proviennent de divers organes de plantes : les feuilles (Fe), les écorces (Ec) et les fruits (Fr).

Famille	Espèce	Organe	Cytotoxicité (%) sur les cellules KB à		Cytotoxicité (%) sur les cellules MRC5	
			10 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
Annonaceae	<i>M. tiebaghiensis</i>	Ec	94	0	82	0
Apocynaceae	<i>S. elliptica</i>	Fr	43	0	0	0
Araucariaceae	<i>A. ovata</i>	Ec	27	0	40	0
Casuarinaceae	<i>G. deplancheanum</i>	Ec	36	0	0	0
Ebenaceae	<i>D. macrocarpa</i>	Fe	70	9	0	0
		Ec	98	0	98	51
Euphorbiaceae	<i>C. variegatum</i>	Fe	39	21	24	0
		Ec	62	0	42	0
	<i>E. agallocha</i>	Ec	48	26	24	8
		<i>G. billardierei</i>	Ec	47	4	0
Goodeniaceae	<i>S. beckii</i>	Ec	97	0	40	0
	<i>S. montana</i>	Ec	66	0	0	0
Malvaceae	<i>T. populnea</i>	Ec	93	0	95	0
Myrtaceae	<i>M. quinquenervia</i>	Ec	37	0	8	0
Podocarpaceae	<i>D. balansae</i>	Ec	85	0	0	0
Sapotaceae	<i>P. acuminata</i>	Fe	36	0	0	4
		Ec	88	0	75	0
Simaroubaceae	<i>S. tomentosa</i>	Ec	100	8	100	5
		Fe	35	8	23	0
Thymelaeaceae	<i>W. indica</i>	Ec	31	6	6	10

4.4. Criblage phytochimique des plantes d'intérêt

Le criblage phytochimique des plantes ayant démontré une activité biologique remarquable est ensuite réalisé par CCM, d'après la méthode décrite pour l'analyse de drogue inconnue par Wagner et Bladt¹⁹⁹. Cette étude nous permet d'estimer la nature et, dans une moindre mesure, l'abondance des métabolites secondaires dans les poudres des plantes à l'origine des extraits bioactifs.

Les résultats de ce criblage, présentés dans le tableau 5, permettent d'élaborer des hypothèses pour expliquer l'activité biologique d'un extrait par la présence d'une famille chimique particulière.

Tableau 5. Résultats du criblage phytochimique mené sur les poudres des plantes ayant montré un fort potentiel antiviral, antimicrobien ou anticancéreux. (Fe : feuilles, Ec : écorces, AP : parties aériennes, Fr : fruits).

Famille	Espèce	Organe	Alcaloïdes	Coumarines	Flavonoïdes	Phénols	Saponines	Stérols et terpènes	Tannins
Annonaceae	<i>M. tiebaghiensis</i>	Fe	+	+	+	-	-	++	-
		Ec	++	++	-	+	-	+	+
Apocynaceae	<i>G. tricholepis</i>	AP	+	-	+	+	-	-	-
Araucariaceae	<i>A. moorei</i>	Fe	+	-	++	-	-	++	+
		Ec	+	-	-	-	-	+	+
	<i>A. ovara</i>	Fe	-	-	+	-	-	+	+
		Ec	-	+	-	-	-	++	++
Casuarinaceae	<i>G. deplancheanum</i>	Fe	-	-	+	-	+	-	++
		Ec	-	-	-	-	-	+	++
Ebenaceae	<i>D. macrocarpa</i>	Fe	-	+	++	+	-	+	+
		Ec	-	++	-	-	-	++	+
Euphorbiaceae	<i>E. agallocha</i>	Fe	-	-	++	+	-	+	-
		Ec	-	-	-	-	+	++	+
	<i>G. billardierei</i>	Fe	-	-	-	-	-	+	+
		Ec	-	-	-	+	+	+	+
	<i>H. repandus</i>	Fe	-	-	-	-	-	+	-
		Ec	+	-	-	-	-	++	-
Goodeniaceae	<i>S. balansae</i>	Fe	++	-	+	+	-	++	-
		Ec	-	+	+	++	-	++	-
	<i>S. beckii</i>	Fe	++	-	++	++	-	+	-
		Ec	+	+	+	+	-	+	-
	<i>S. montana</i>	Fe	++	-	++	+	-	++	-

		Ec	+	+	+	++	-	++	-
	<i>S. sericea</i>	PA	-	-	+	+	-	-	-
Malvaceae	<i>M. odorata</i>	PA	+	-	+	+	-	+	+
	<i>T. populnea</i>	Fe	+	-	++	-	++	++	+
		Ec	-	-	+	-	+	++	+
		Fr	++	-	+	-	-	+	-
Meliaceae	<i>D. roseum</i>	Fe	-	-	-	-	-	++	-
		Ec	-	-	-	-	++	+	+
Myrtaceae	<i>C. laurifolia</i>	Fe	-	-	++	+	-	+	+
		Ec	-	-	+	-	-	++	+
	<i>M. quinquenervia</i>	Fe	-	-	+	++	-	-	-
		Ec	-	-	++	++	-	+	+
Podocarpaceae	<i>D. araucarioides</i>	Fe	-	-	++	-	-	++	+
			-	-	-	-	-	++	++
	<i>D. balansae</i>	Fe	-	-	++	-	-	++	+
		Ec	-	-	-	-	-	++	++
Simaroubaceae	<i>S. tomentosa</i>	Fe	++	-	++	+	-	++	-
		Ec	+	+	+	+	-	+	-
Rubiaceae	<i>P. poissoniana</i>	Fe	-	-	+	-	+	-	-
		Ec	-	-	-	-	+	-	-
Rutaceae	<i>M. corymbosa</i>	Fe	+	+	+	-	-	-	+
		Ec	-	++	-	-	-	-	++
Thymelaeaceae	<i>W. indica</i>	Fe	+	-	++	+	-	+	-
		Ec	-	-	+	-	+	+	+

Les différents organes des 23 plantes à l'origine des extraits ayant présenté une forte activité biologique dans le criblage préliminaire ont fait l'objet d'une analyse phytochimique révélant la présence d'alcaloïdes, de coumarines, de flavonoïdes, de phénols, de saponines, de stérols, de terpènes et de tannins (voire le tableau 5). Ce criblage phytochimique nous permet donc de regrouper les extraits en fonction de leur composition chimique :

17 extraits, obtenus à partir de 11 plantes, semblent contenir des alcaloïdes. Ces composés sont souvent retrouvés en plus grande abondance dans les feuilles, notamment chez les Goodeniaceae (*Scaevola spp*) et *S. tomentosa* même si chez *T. populnea* et *M. tiebaghiensis* les plus fortes concentrations d'alcaloïdes sont observées respectivement dans les fruits et les écorces.

8 plantes et 11 extraits renfermeraient des coumarines. Les extraits les plus riches en coumarines proviennent des écorces de *M. tiebaghiensis*, de *D. macrocarpa* et de *M. corymbosa*.

28 extraits, issus de 20 plantes, renfermeraient des flavonoïdes. Ces composés sont en majorité retrouvés dans les feuilles, notamment celles de *D. macrocarpa*, *E. agallocha*, *S. beckii*, *S. montana*, *T. populnea*, *S. tomentosa*, *W. indica* et de trois gymnospermes : *A. moorei*, *D. araucarioides* et *D. balansae*. Les écorces de deux Myrtaceae, *C. laurifolia* et *M. quinquenervia*, semblent également riches en flavonoïdes.

13 plantes et 18 extraits semblent également contenir des phénols. Ces composés semblent particulièrement abondants chez les quatre espèces de Goodéniaceae récoltées ainsi que chez *M. quinquenervia*.

Des saponines ont été mises en évidence dans 10 extraits issus de 8 espèces végétales et semblent particulièrement abondantes dans les feuilles de *T. populnea*

et les écorces de *D. roseum*.

20 plantes et 38 extraits semblent contenir des dérivés terpéniques ou stéroliques. Ces composés seraient particulièrement abondants dans les feuilles de *M. tiebaghiensis*, de *A. Moorei*, de *D. roseum*, de *S. tomentosa* et dans les écorces de *A. ovara*, de *D. macrocarpa*, de *E. agallocha*, de *O. repandus* et de *C. laurifolia*. Tous les organes récoltés des Goodéniaceae (*Scaevola spp.*), des Podocarpaceae (*Dacrydium spp.*) et de *T. populnea* semblent également riches en dérivés terpéniques et stéroliques.

Pour finir, 16 plantes et 26 extraits renfermeraient des polyphénols (tannins). Ces composés sont le plus souvent retrouvés dans les écorces, notamment chez *A. ovata*, *D. araucarioides*, *D. balansae*, *M. corymbosa* et de *G. deplancheanum*, mais semblent également abondant dans les feuilles de cette dernière.

Conclusions et discussion

Par le criblage biologique exposé ici, nous mesurons une nouvelle fois l'intérêt des connaissances empiriques des tradipraticiens pour la sélection de plantes d'intérêt pharmacologique. Les résultats du criblage des 90 extraits bruts provenant des plantes réputées fébrifuges ou sélectionnées sur les bases de la chimiotaxonomie mettent en évidence 28 extraits actifs à 10 µg/mL contre la DV2-NS5 RdRp. 68% de ces extraits proviennent des plantes utilisées en médecine traditionnelle. Ces extraits sont en effet plus fréquemment actifs sur la réplicase virale puisque 35% d'entre eux inhibent plus de 80% de l'activité de cette enzyme, contre 25% des extraits de plantes issues de la sélection chimiotaxonomique. Les résultats du criblage valident également l'hypothèse selon laquelle moins d'extraits cytotoxiques seraient obtenus avec les plantes utilisées en médecine

traditionnelle¹⁸⁴ : 9% des plantes fébrifuges sont cytotoxiques d'après nos résultats contre 14% des extraits des plantes issues de la sélection chimiotaxonomique. Au total, nous distinguons 22 extraits bruts actifs contre la DV2-NS5 RdRp et non cytotoxiques. Parmi ceux-ci, 13 proviennent des écorces (60%), 8 proviennent des feuilles et 1 extrait provient des fruits des plantes récoltées. Nous constatons de nouveau que ces extraits sont plus fréquemment obtenus à partir de plantes utilisées en médecine traditionnelle. 28% d'entre eux, contre 19% des extraits de plantes issues de la sélection chimiotaxonomique sont ainsi considérés comme actifs sur la réplicase du DV et non cytotoxique.

Tableau 6. Analyse statistique des résultats du criblage biologique.

Bioactivité des extraits bruts	Nombre d'extraits issus de plantes fébrifuges	Nombre d'extraits issus de la sélection chimiotaxonomique	Nombre d'extraits totaux
-	54	36	90
Inhibiteurs de la DV NS5	19	9	28
Cytotoxiques (MRC5)	5	5	10
Inhibiteurs de la DV NS5 non cytotoxiques	15	7	22
Antimicrobiens	22	7	29
Inhibiteurs non cytotoxiques spécifique de la DV NS5	3	5	8

Les extraits des plantes réputées fébrifuges présentent également plus souvent une activité antibiotique. 41% des extraits de plantes utilisées en médecine traditionnelle, contre 19% seulement des extraits de plantes issues de la sélection chimiotaxonomique, sont actifs contre au moins un des microorganismes testés. En revanche, il semble que les plantes de la médecine traditionnelle aient une action

moins spécifique. Seuls 6% d'entre eux, contre 14% des extraits de plantes issues de la sélection chimiotaxonomique, inhibent ainsi spécifiquement la DV2-NS5 RdRp. En effet, 8 extraits, dont 5 issus de la sélection chimiotaxonomique, inhibent plus de 80% de l'activité de la RNA polymérase du DV à 10 µg/mL, ne présentent pas de cytotoxicité significative contre les deux souches cellulaires testées et n'inhibent la croissance d'aucun des quatre microorganismes testés. C'est une nouvelle fois les écorces qui nous fournissent le plus grand nombre de ces extraits (75%).

Par l'analyse croisée des résultats du criblage biologique et phytochimique, nous distinguons également plusieurs plantes présentant de fortes potentialités pharmacologiques et pouvons émettre des hypothèses quant à la nature chimique des composés bioactifs. Avant tout, *G. deplancheanum* qui semble particulièrement riche en polyphénols d'après le criblage phytochimique, n'a pas été sélectionné pour des études supplémentaires car nous pensons que les activités biologiques de cette plante sont liées à ces composés considérés comme « faux positifs ». Ces composés sont en effet actifs contre de très nombreuses enzymes mais pénètrent très difficilement les barrières biologiques, telles que les membranes cellulaires, que doivent franchir les médicaments¹⁹⁸.

Les écorces de *M. tiebaghiensis*, une Annonaceae endémique de Nouvelle-Calédonie, sont fortement toxiques contre les deux lignées cellulaires testées. Cet extrait a également montré une forte activité antibiotique contre *S. aureus* et *C. albicans*. Ces activités biologiques pourraient être liées à la présence d'alcaloïdes et/ou de coumarines mises en évidence par le criblage phytochimique. 13 alcaloïdes isoquinoliniques ont été isolés précédemment de cette plante²⁰⁰ et pourraient faire l'objet d'une étude de leurs potentialités anticancéreuses et

antimicrobiennes.

L'extrait des feuilles de *D. macrocarpa* inhibe fortement la DV-NS5 RdRp et n'est pas cytotoxique. Il pourrait donc renfermer des composés spécifiquement actifs contre la réplication du DV. Le criblage phytochimique de cette plante endémique à la Nouvelle-Calédonie nous oriente vers l'étude des flavonoïdes et des phénols. L'extrait des écorces est quant à lui actif contre la réplicase du DV, contre *S. aureus* et *C. albicans*, et présente une forte toxicité cellulaire contre les cellules KB et MRC5. Ceci est en accord avec le potentiel anticancéreux décrit pour d'autres espèces du genre et serait lié à la présence de naphthoquinones d'après la littérature^{201,202}.

T. populnea est un arbre pantropical de la famille des Malvaceae dont le potentiel anticancéreux des écorces, mesuré ici contre les cellules KB et MRC5, est déjà décrit dans la littérature et attribué à la présence de gossypol et de sesquiterpènes oxydés tels que la thespesone ou la mansonone^{203,204}. Les extraits de feuilles mais surtout des fruits de cette espèce ne sont en revanche pas cytotoxiques et ont démontré une activité antibiotique notable et de fortes potentialités antidengue. L'extrait de fruits qui n'a jamais été étudié en détail à notre connaissance, semble particulièrement attractif pour la recherche de composés antiviraux et antibiotiques. Par ailleurs, le criblage phytochimique de cette plante a révélé la présence d'alcaloïdes dans la plante : présents dans les feuilles, absents dans les écorces et particulièrement concentrés dans les fruits.

Les extraits de feuilles et d'écorces de *S. tomentosa*, une Simaroubaceae

endémique de Nouvelle-Calédonie, sont fortement cytotoxiques d'après les résultats de cette étude. Cette toxicité est associée dans la littérature à la présence de quassinoïdes, des diterpènes oxydés ayant démontré une activité contre des cellules cancéreuses de souris^{205,206}. Le criblage phytochimique nous indique que la plante est également riche en alcaloïdes dont il serait intéressant d'étudier l'activité biologique si leur présence est avérée. Il faut noter que différents alcaloïdes de type harmane ont été isolés dans d'autres Simaroubaceae.

Les Goodéniaceae récoltées ont également démontré des potentialités pharmacologiques intéressantes. *S. balansae*, *S. beckii* et *S. montana* renferment probablement des inhibiteurs puissants de la DV-NS5 RdRp. Les écorces de *S. beckii* et de *S. montana* présentent également un intérêt certain pour la recherche de composés anticancéreux. Le criblage phytochimique mené sur ces plantes suggère de s'intéresser aux flavonoïdes, aux coumarines, ainsi qu'aux stérols et terpènes qui semblent très abondants dans les écorces de ces plantes. Les alcaloïdes et iridoïdes également présents dans ces plantes^{191,207} pourraient également avoir une activité biologique intéressante. Finalement, l'extrait des parties aériennes de *S. sericea* a démontré une forte activité antibiotique contre *C. albicans* qui pourrait être lié à la présence de flavonoïdes ou de phénols d'après le criblage phytochimique. Il est intéressant de noter que cette espèce qui ne présente pas de potentialité antidengue ou anticancéreuse, ne contient ni alcaloïdes ni coumarines d'après le criblage phytochimique.

Parmi les quatre Euphorbiaceae récoltées pour ces travaux, trois espèces présentent des potentialités biologiques remarquables. Il s'agit de *E. agallocha*, *G. billardierei* et *H. nutans*. Les extraits des écorces de ces trois plantes inhibent

fortement la réplicase du DV. Seule *E. agallocha* a fait l'objet d'études phytochimiques et pharmacologiques d'après la littérature : cette Euphorbiaceae pantropicale connue pour contenir un latex irritant et dangereux pour les yeux, est considéré comme cytotoxique à la fois par nos travaux et dans la bibliographie²⁰⁸. La cytotoxicité de cette plante est attribuée à la présence d'une grande variété de diterpènes oxydés de type tiglianes, seco-labdanes, excoagallochaols ou phorbols (figure 16)²⁰⁹.

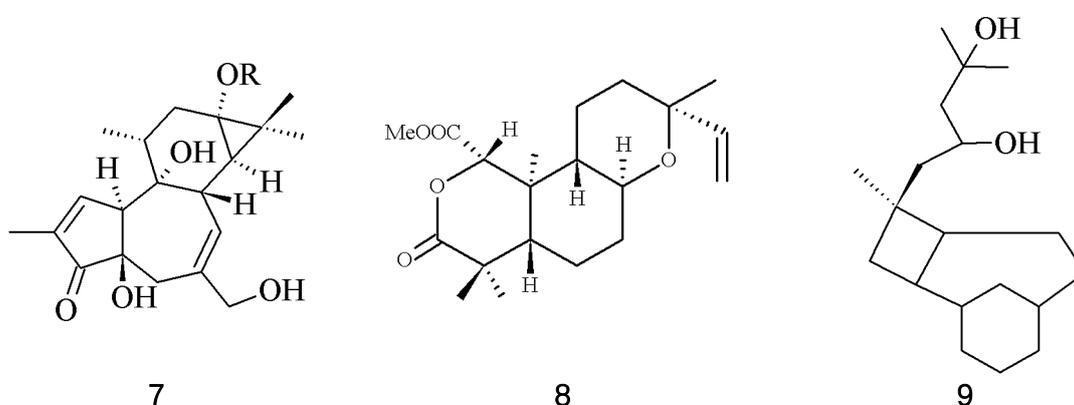


Figure 16. Exemples de diterpénoïdes isolés à partir de *E. agallocha* ; 7 : Un diterpène de type tigliane ou ester de phorbol (R : $C_8H_{15}O$) anti- HIV²¹⁰ ; 8 : diterpénoïde de type labdane²¹¹ ; 9 : excoagallochaol²⁰⁹.

Les écorces de *G. billardieryi*, riches en phénols et en saponines d'après le criblage phytochimique, sont également considérées comme cytotoxiques contre les cellules KB et présentent une activité antibiotique contre *C. albicans*. Enfin, l'extrait des écorces de *H. nutans* qui n'est pas cytotoxique, inhibe 96% de l'activité de la DV-NS5 RdRp à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le criblage phytochimique et les travaux préalables sur d'autres espèces du genre *Homalanthus*, laissent penser que des terpènes oxydés de type phorbol pourraient être responsables des potentialités biologiques de la plante^{212,213}. Un travail de fractionnement bioguidé contre la DV-NS5 RdRp a débuté sur cet extrait.

Les extraits des feuilles des *Dacrydium spp.* et des écorces de *M. corymbosa* qui ne sont pas cytotoxiques et inhibent spécifiquement la réplication du DV ont fait l'objet d'un fractionnement bioguidé qui sera présenté dans les parties III et IV de ce manuscrit. L'extrait des écorces de *P. poissoniana* qui présente les mêmes caractéristiques pourrait faire l'objet d'une étude similaire.

Pour finir, deux plantes utilisées en médecine traditionnelle et appartenant à la famille des Myrtaceae nous semblent intéressantes pour la phytomédecine : *M. quinquenervia* et *C. laurifolia* ont ainsi démontré un fort potentiel antiviral contre la dengue ainsi qu'une activité antibiotique à large spectre et n'ont pas montré de cytotoxicité significative. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de flavanones dans *M. quinquenervia*²¹⁴ qui pourraient être à l'origine de l'activité biologique de cette plante. *C. laurifolia* dont la phytochimie était jusque là inexplorée, a fait l'objet d'un fractionnement bioguidé contre la DV-NS5 RdRp en vue d'identifier les composés responsables de l'activité biologique. Les résultats obtenus sont présentés dans la cinquième partie de ce manuscrit.

Troisième partie :
Alcaloïdes &
coumarines de
Myrtopsis corymbosa

Introduction

Les extraits bruts de *M. corymbosa* Labill. et particulièrement l'extrait obtenu à partir des écorces présentent un fort potentiel antidengue qui s'exprime par une inhibition forte et spécifique de la DV-NS5 RdRP (78 et 92% d'inhibition pour l'extrait des feuilles et des racines à 10 µg/mL) et une très faible cytotoxicité uniquement détectée contre les cellules cancéreuses KB (<10% de mortalité cellulaire). Les données de la chimiotaxonomie et le criblage phytochimique concernant les Rutaceae ont orienté notre étude vers l'analyse des coumarines des écorces et des alcaloïdes de cette plante. Le contenu phytochimique et le potentiel antidengue des écorces et des feuilles de *M. corymbosa* ont ensuite été comparés avec ceux de deux autres espèces de *Myrtopsis*. Une nouvelle campagne de récolte fut pour cela organisée dans le sud de la Grande Terre pour récolter à nouveau *M. corymbosa* (Cou 39) ainsi que *M. cf. macrocarpa* (Cou 32) et *M. cf. sellingii* (Cou 38).

1. Notions de botanique du genre *Myrtopsis*

Myrtopsis est un genre endémique à la Nouvelle-Calédonie appartenant à la famille des Rutaceae. Cette famille largement répandue dans toutes les zones tropicales et tempérées de la planète, renferme 190 genres et 900 espèces. En Nouvelle-Calédonie, cette famille est représentée par 21 genres, dont 8 endémiques et 94 espèces dont 84 endémiques. La botanique des Rutaceae est peu étudiée en Nouvelle-Calédonie et la famille n'est toujours pas détaillée dans la flore. L'identification des trois espèces de *Myrtopsis* prélevées pour cette étude fut réalisée par comparaison avec les échantillons conservés à l'herbier du centre IRD de Nouméa. La mention « cf » précédent le nom de l'espèce signifie que l'identification

doit être validée. Dans ce but, un échantillon d'herbier a été envoyé auprès de spécialistes des Rutaceae. Malgré le manque de documentation spécifique des Rutaceae de Nouvelle-Calédonie, qui fait d'autant plus défaut vu le fort taux d'endémicité des espèces calédoniennes, des informations plus générales nous aident néanmoins pour une première identification.

1.1. La famille des Rutaceae

Les Rutaceae sont, d'après la littérature, en majorité représentées par des espèces arbustives. Leurs feuilles sont simples ou composées, extipulées et possèdent des glandes à huile essentielle sur leur face inférieure. Ces glandes odoriférantes, appelées poches schizolysigènes, sont responsables du parfum caractéristique des feuilles des Rutaceae. Elles sont notamment observées chez les *Myrtopsis spp.* Les fleurs sont bisexuées, régulières, à ovaire supère. Le calice et la corolle présentent une symétrie à 4 ou à 5, les sépales et pétales étant libres, unis ou imbriqués^{215,216,217,218}. Les Rutaceae sont divisées en cinq sous-familles dont le principal objet de distinction est le fruit :

- Aurantioideae : le fruit est une baie (ex : *Citrus, Feronia, Murraya*)
- Flindersioideae : le fruit est une capsule (ex : *Flindersia*)
- Rutoideae : fruit à carpels distincts, (ex : *Boronia, Correa, Cusparia, Fagara, Ruta* ou *Myrtopsis*)
- Spathelioideae : le fruit est une drupe ailée (ex : *Spathelia*)
- Toddalioideae : le fruit est une drupe ou un fruit sec ailé (ex : *Ptelea, Skimmia, Toddalia*).

1.2. Le Genre *Myrtopsis*

Comme nous l'avons vu, le genre *Myrtopsis* est endémique à la Nouvelle-Calédonie et fait partie du groupe des Rutoideae. Il renferme huit espèces (*M. paniculata*, *M. calophylla*, *M. corymbosa*, *M. deplanchei*, *M. macrocarpa*, *M. myrtoidea*, *M. novaecaledoniae*, *M. pomaderridifolia* et *M. sellिंगii*), toutes associées au maquis minier^{180,219}. Aucune clé de détermination qui permettrait une identification précise et certaine n'existe à l'heure actuelle.



A : *M. corymbosa* (Cou 39) : plante entière caractérisée par son port sinueux et son écorce subérifiée



B : *M. corymbosa* (Cou 39) : détails des fruits



C : *M. cf sellिंगii* (Cou 38) : détails des fruits



D : *M. cf macrocarpa* (Cou 32) : détails des fruits

Figure 17. Photographies des différentes espèces de *Myrtopsis* récoltées pour notre étude.

D'après nos observations de terrain et les comparaisons effectuées avec les échantillons référencés à l'herbier du centre IRD de Nouméa, *M. corymbosa* est caractérisée par un port sinueux et une écorce épaisse et fortement subérifiée (figure 17.A). Ses fruits sont petits (≤ 8 mm), rouges vifs à maturité et rassemblés par groupe de trois ou plus comme le montre la photo B de la figure 17. *M. cf. macrocarpa* est quant à elle caractérisée par la taille de ses fruits, rouge bordeaux à maturité et pouvant dépasser 15 mm de diamètre (figure 17.C). *M. cf. sellingii* qui se présente sous la forme d'un arbuste élancé avec des feuilles fines et moins cireuses que les précédentes espèces décrites, présente quant à elle des fruits d'un diamètre inférieur à 15 mm et souvent proche de 10 mm, jaune citron à maturité (figure 17.D).

2. Chimiotaxonomie des Rutaceae

Comme nous allons le voir, les espèces appartenant à la famille des Rutaceae présentent *a priori* un fort intérêt pharmacologique du fait de leur contenu phytochimique.

2.1. Huile essentielle

La plupart des Rutaceae élaborent de l'huile essentielle (HE) dans les poches schizolysigènes situées sur la face inférieure des feuilles²²⁰. Ces HE contiennent en général des mono-, sesqui- et diterpènes volatiles²²¹. De nombreuses publications décrivent l'activité biologique des huiles essentielles, avec par exemple 4 600 références concernant leur activité antivirale (données de Science direct). Nous pouvons relever les résultats obtenus par Sen-Sung Cheng²²² sur l'activité larvicide

de certaines huiles sur les larves du moustique vecteur du DV, *Aedes aegypti*. Cependant, les huiles essentielles du fait de leur volatilité sont extraites des végétaux frais par des protocoles spécifiques (hydrodistillation, entraînement à la vapeur, CO₂ supercritique, *etc.*) et ne sont vraisemblablement pas extraites par le protocole d'extraction de poudres sèches établi pour le criblage biologique mis en place ici. L'activité d'inhibition de la DV2-NS5 RdRp est donc probablement liée à d'autres molécules présentes dans les écorces de *M. corymbosa*.

2.2. Alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines et limonoïdes

Les Rutaceae contiennent également fréquemment des alcaloïdes, des coumarines, des flavonoïdes, des lignanes et des limonoïdes^{220,223}, des composés par ailleurs très souvent cités dans la littérature pour leurs activités biologiques. La présence de dérivés terpéniques fortement oxygénés de la famille des limonoïdes est souvent corrélée chez les plantes avec une activité biologique, et notamment antivirales dans la littérature²²⁴. De même, de nombreux alcaloïdes, flavonoïdes et coumarines présentent une activité antivirale. A titre d'exemple la castanospermine inhibe le DV²²⁵ (tableau 1), tout comme plusieurs flavonoïdes^{226,227}. Enfin, certaines coumarines sont décrites pour leur activité contre d'autres Flaviviridae^{228,229}.

D'après la chimiotaxonomie des Rutaceae établie par Maria Fatima das Graças Fernandes Da Silva²²³, le genre *Myrtopsis* appartient à la sous-famille des Rutoideae et plus précisément à la tribu des *Boronia* qui renferme également les genres *Boronia*, *Boronella*, *Acradenia*, *Zieria*, *Eriostemon*, *Phebalium*, *Geleznovia*, *Philotheca* et *Chorilaena*. Ce groupe se caractérise par la présence d'alcaloïdes de

type alkylquinolines, alkylarylquinolines et quinolones, de coumarines et de flavonols. En revanche, il est peu probable de rencontrer des terpènes appartenant au groupe des limonoïdes dans cette sous-famille.

2.3. Travaux précédent sur le genre *Myrtopsis*

Deux études portant sur la phytochimie de quatre *Myrtopsis* (*M. sellिंगii*, *M. macrocarpa*, *M. myrtoidea* et *M. novae-caledoniae*) ont mis en évidence la présence de lupéol (**10**) et de β -sitostérol (**11**) dans les quatre espèces étudiées (figure 18)^{230,231}.

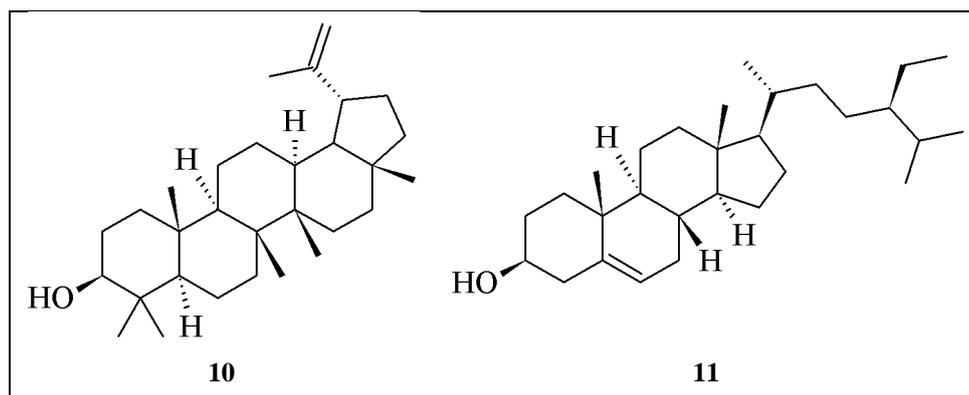


Figure 18. Stérol et triterpène décrits dans le genre *Myrtopsis* ; **10** : structure du lupéol (M= 426) et **11** : structure du β -sitostérol (M= 414).

Deux furanocoumarines ont été mises en évidence dans ce genre : le bergaptène (**13**) présent dans trois des espèces étudiées et absent chez *M. macrocarpa* et la phelloptérine (**12**) détectée dans *M. novae-caledoniae* et *M. sellिंगii* (figure 19). Quatre autres coumarines présentées dans la figure 19, sont également décrites dans le genre : la séséline (**14**) et l'osthol (**15**) observés dans *M. macrocarpa*, *M. myrtoidea* et *M. novae-caledoniae* alors que la myrséline (**17**) et le myrsélinol (**16**) semblent caractéristiques de *M. sellिंगii*^{230,231}.

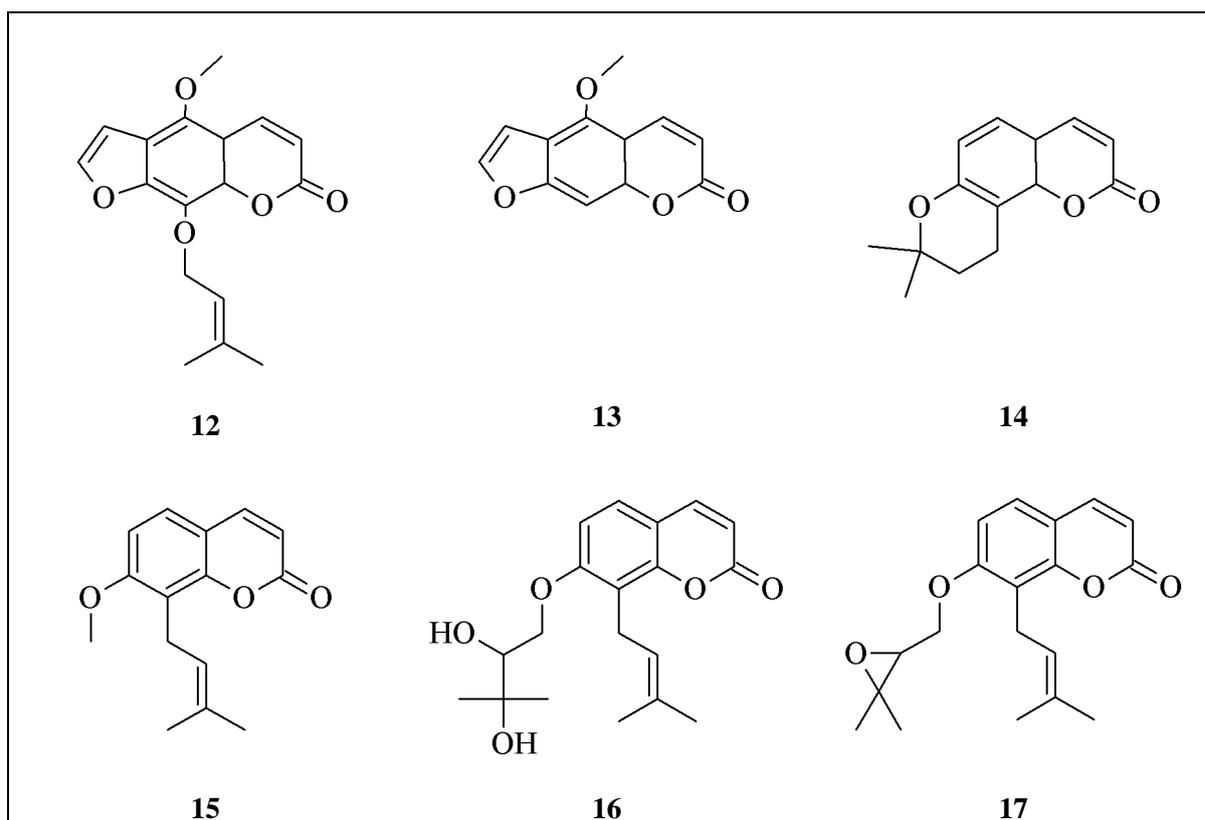


Figure 19. Coumarines décrites dans le genre *Myrtopsis*. **12** : phelloptérine (M= 302) ; **13** : bergaptène (M=218) ; **14** : séséline (M= 232) ; **15** : osthol (M= 244) ; **16** : myrsélinol (M= 332) ; **17** : myrséline (M= 314).

Pour finir, six alcaloïdes ont été identifiés dans les *Myrtopsis* étudiées (figure 20). Les furoquinoléines isolées, la dictamine, la γ -fagarine, la skimmianine et la myrtopsine) sont réparties de manière uniforme dans les espèces étudiées à l'exception de la myrtopsine (**21**) qui semble caractéristique de *M. sellingii*. Les deux quinolones identifiées, la 8-méthoxyflindersine (**22**) et la 4-hydroxy-N-méthylflindersine (**23**), sont à l'inverse caractéristiques d'une seule espèce, respectivement *M. macrocarpa* et *M. novae-caledoniae*^{230;231}.

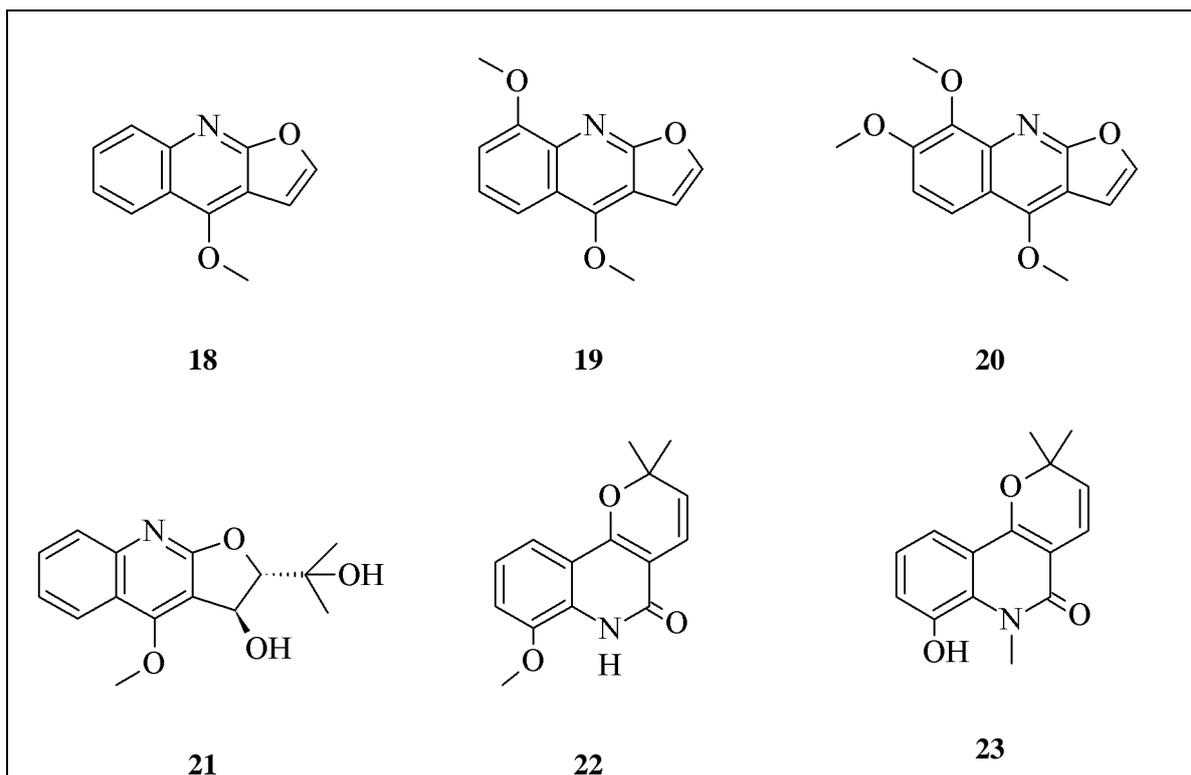


Figure 20. Alcaloïdes décrits dans le genre *Myrtopsis*. **18** : dictamine ($M= 199$) ; **19** : γ -fagarine ($M= 229$) ; **20** : skimmianine ($M= 259$) ; **21** : myrtopisine ($M= 275$) ; **22** : 8-méthoxyflindersine ($M= 257$) ; **23** : 4-hydroxy,N-méthylflindersine ($M= 257$).

Les résultats de cette étude, sont comme nous pouvons le remarquer, en accord avec les données de la chimiotaxonomie des Rutaceae. Ce travail bibliographique a orienté nos travaux de phytochimie et de fractionnement vers la recherche de coumarines, de flavonoïdes et d'alcaloïdes chez *M. corymbosa* qui n'a fait jusqu'à présent l'objet d'aucune étude phytochimique.

3. Comparaison de la composition chimique et de l'activité biologique de trois *Myrtopsis* spp.

3.1. Criblage phytochimique

Un criblage phytochimique mené en CCM en adaptant les protocoles

d'analyse de drogues végétales développées par Wagner et Bladt¹⁹⁹, nous a permis de vérifier les informations apportées par l'étude chimiotaxonomique.

Tableau 7. Résultats du criblage phytochimique mené sur les trois espèces de *Myrtopsis* récoltées (*M. corymbosa*, *M. cf. macrocarpa* et *M. cf. selligii*).

	<i>M. corymbosa</i>		<i>M. cf. macrocarpa</i>			<i>M. cf. selligii</i>	
	Fe	Ec	Fe	Ec	Fr	Fe	Ec
Alcaloïdes	+	-	++	-	-	+	-
Coumarines	+	++	+	++	-	++	+
Flavonoïdes	+++	-	+++	-	+++	+++	-
Saponines	-	-	-	-	-	-	-
Stérols/ terpènes	-	+	++	+	++	+	++
Polyphénols	+	-	+	-	+	+	-

Ce criblage phytochimique, dont les résultats sont présentés dans le tableau 7, confirme la présence de coumarines dans les feuilles et les écorces des trois espèces de *Myrtopsis* récoltées comme le suggérait la bibliographie. Des flavonoïdes sont également observés dans les feuilles des trois espèces ainsi que dans les fruits de *M. cf. macrocarpa*. Les flavonoïdes ne sont en revanche détectés dans aucune des écorces de ces espèces. La présence d'alcaloïdes est avérée dans les feuilles des trois espèces et semblent particulièrement abondants dans les feuilles de *M. cf. macrocarpa* d'après le criblage phytochimique.

3.2. Tests biologiques préliminaires

Afin de confirmer le fort potentiel antiviral des écorces de *M. corymbosa* (Cou 14) et de comparer cette activité biologique avec celle d'autres *Myrtopsis* (Cou 32, Cou 38), une nouvelle série de tests enzymatiques contre la DV2 NS5 RdRp des

extraits bruts à l'AcOEt filtrés sur gel de polyamide a été réalisée. Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau ci-dessous, pour une concentration de chaque extrait de 10 µg/mL (tableau 8).

Tableau 8. Pourcentage d'inhibition de la DENV-NS5 RdRp à 10 µg/mL par les extraits AcOEt obtenus à partir de trois espèces de *Myrtopsis*.

Espèces	Organe	Inhibition de la DENV-NS5 RdRp
<i>M. corymbosa</i> (Cou 14)	Fe	78 ± 4
	Ec	92 ± 5
<i>M. corymbosa</i> (Cou 39)	Fe	55 ± 7
	Ec	76 ± 5
<i>M. macrocarpa</i> (Cou 32)	Fe	33 ± 9
	Ec	33 ± 5
	Fr	28 ± 5
<i>M. selligii</i> (Cou 38)	Fe	46 ± 7
	Ec	45 ± 2

Le second extrait à l'AcOEt des écorces de *M. corymbosa* (Cou 39) inhibe toujours fortement l'activité de la polymérase du DV (76%), même si l'activité est moins forte que celle mesurée pour l'extrait réalisé suite à la première récolte de la même espèce (Cou 14) qui inhibait 92% de l'activité de la DV-NS5 RdRp. Ces résultats confirment donc les fortes potentialités antidengue de l'extrait des écorces de *M. corymbosa*. L'activité d'inhibition de la DV-NS5 des extraits des feuilles de *M. corymbosa* est moins forte que celle des écorces, qu'il s'agisse de Cou 14 ou de Cou 39. Par ailleurs les extraits réalisés à partir de *M. corymbosa* sont, de manière significative, plus actifs que ceux réalisés à partir de *M. cf macrocarpa* ou de *M. cf selligii*. Les extraits des écorces de ces dernières inhibent moins de 50% de l'activité de l'enzyme dans les deux cas. La comparaison de l'activité contre l'enzyme DENV-NS5 RdRp des différents extraits des *Myrtopsis* récoltées révèle donc que la

forte activité d'inhibition de cette enzyme est spécifique de l'extrait des écorces de *M. corymbosa*.

3.3. La famille des coumarines responsable de l'activité

La différence entre l'activité des feuilles et des écorces des *Myrtopsis spp.* testées peut être corrélée avec les résultats du criblage phytochimique présentés plus haut. Ainsi les alcaloïdes et flavonoïdes plus abondants dans les feuilles ne seraient pas responsables de cette activité biologique. A l'inverse, la forte abondance des coumarines dans les extraits des écorces pourrait expliquer cette activité. Les coumarines apparaissent en effet dans chaque extrait des écorces des trois espèces analysées comme des composés majoritaires des écorces. L'activité biologique spécifique de l'extrait des écorces de *M. corymbosa* pourrait alors être liée à la présence de coumarine(s) spécifique(s) de *M. corymbosa*.

Afin de valider cette hypothèse, trois échantillons de 2 g de poudre sèche de l'écorce de *M. corymbosa* ont été extraits respectivement au méthanol (MeOH), au dichlorométhane (DCM) et au MeOH après humidification à l'ammoniaque à 20% (extrait spécifique des alcaloïdes) et testés contre la DV-NS5 RdRp (tableau 9). Par ce criblage, nous souhaitons comparer l'activité des différents composés des écorces de cette plante puisque le dichlorométhane va extraire de manière optimale les coumarines, l'extraction au méthanol après humidification à l'ammoniaque à 20% permet l'extraction des alcaloïdes des écorces et l'extrait méthanolique permet l'extraction optimale des composés plus polaires tels que les flavonoïdes.

Tableau 9. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par différents extraits des feuilles et des écorces de *M. corymbosa* (Cou 39) à 10 µg/mL.

Organe	Extrait	Inhibition de la DENV-NS5 RdRp
Fe	MeOH	96 ± 1
	MeOH+amoniaque	19 ± 3
	DCM	20 ± 7
Ec	MeOH	68 ± 3
	MeOH+amoniaque	62 ± 3
	DCM	76 ± 2

Nous remarquons tout d'abord une forte activité d'inhibition de la polymérase du DV par l'extrait au méthanol des feuilles qui n'avait pas été observée jusqu'à présent. Cependant, s'agissant d'un extrait non filtré sur gel de polyamide, ces résultats sont jugés peu fiables. Il est en effet probable que les polyphénols, mis en évidence par le criblage phytochimique, soient responsables de « faux positifs ».

Ce criblage montre également que pour une concentration de 10 µg/mL l'extrait DCM inhibe 76% de l'activité de la polymérase du DV alors que les extraits alcaloïdique et méthanolique inhibent respectivement 62 et 68% de l'activité de l'enzyme. Bien que la différence d'activité soit peu importante entre ces trois extraits, ces résultats tendent encore une fois à montrer que les coumarines sont responsables des potentialités antidengue de l'extrait des écorces de *M. corymbosa*. L'extrait DCM fut donc sélectionné pour la recherche de composés potentiellement antidengue.

4. Fractionnement bioguidé de l'extrait DCM des écorces de *M. corymbosa*

Sur la base des résultats obtenus jusque là, le fractionnement bioguidé visant à isoler des composés actifs contre la DV-NS5 a été réalisé à partir de l'extrait DCM des écorces de *M. corymbosa*. Le protocole de fractionnement est alors orienté vers la purification des coumarines, majoritaires dans les extraits des écorces des *Myrtopsis spp.* et que nous supposons responsables du potentiel antidengue de la plante. Toutefois, s'agissant d'un fractionnement bioguidé, chaque extrait et fraction réalisée fut testée contre la DV-NS5 (figure 21).



Figure 21. Schéma du fractionnement bioguidé de l'extrait DCM de l'écorce de *M. corymbosa*. Les pourcentages d'inhibition de la DV-NS5 Rdrp sont mentionnés sous chaque fraction pour une concentration de 10 µg/mL.

L'extrait DCM (9,5 g) obtenu par macération de 500 g de poudre d'écorces broyées, a fait l'objet d'un premier fractionnement sur gel de silice en utilisant le système d'élution S1 (tableau 33 dans la partie expérimentale). Après regroupement

des fractions similaires sur la base de leur analyse par CCM, 10 fractions sont distinguées dont 8 ont été testées contre la DV-NS5 RdRp. FA qui contient majoritairement des graisses d'après l'analyse CCM et RMN, n'a pas été testée car n'étant pas soluble dans le DMSO. FJ n'a pas été testée non plus en raison de la présence d'une forte quantité de polyphénols, d'après l'analyse par CCM. Trois fractions, FD, FE et FF ont été sélectionnées pour leur forte activité d'inhibition de la polymérase virale et par l'étude de leur profil CCM. L'analyse HPLC-UV de la fraction FD nous a montré l'existence d'une coumarine très majoritaire dans cette fraction. Ce composé (**23**) fut alors purifié par HPLC préparative à l'aide du système d'élution S2. Le composé majoritaire de FE (**24**), a été purifié en deux étapes, par fractionnement sur gel de silice (S3) suivi d'une HPLC préparative (S2). Enfin, le composé majoritaire de FF (**25**) fut isolé par HPLC préparative (S2).

5. Isolement et évaluation biologique des coumarines majoritaires de *M. corymbosa*

5.1. Composition de l'extrait DCM

Dans l'extrait initial au DCM, 4 composés présentant un spectre UV identique et caractéristique des coumarines (λ_{\max} = 210, 322 nm) peuvent être distingués sur le chromatogramme HPLC (figure 22). Le composé **25** semble être le composé majoritaire de l'extrait d'après le chromatogramme HPLC à 330 nm et peut être considéré comme la coumarine majoritaire des écorces de *M. corymbosa*.

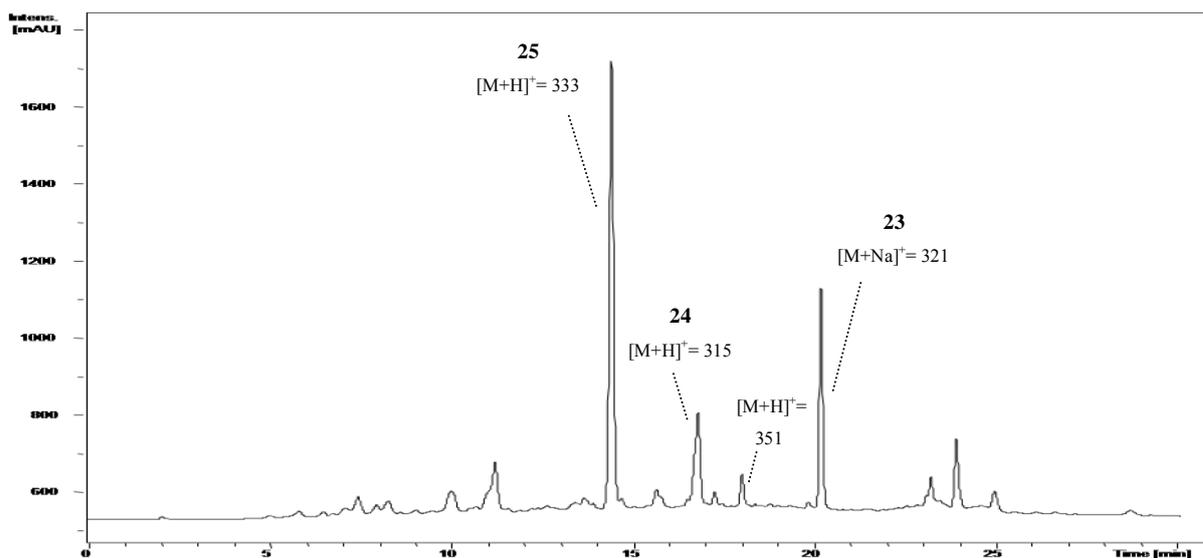


Figure 22. Chromatogramme HPLC-UV/MS de l'extrait DCM des écorces de *M. corymbosa* (Cou 39) à 330 nm (méthode HPLC-1).

Avec des maxima d'absorption à 210 et 322 nm, le spectre UV des coumarines de *M. corymbosa* (Cou 39) correspond d'après la littérature à des coumarines substituées en position 7, 5 et 7 ou 7 et 8²³². Il semble même plus probable sur la base de la comparaison du spectre UV avec ceux présentés dans la littérature, comme le montre la figure 23, qu'il s'agisse de coumarines substituées en 7 et 8 car nous observons un petit pic avec un épaulement à 268 nm et non un singulet de plus forte intensité à 260 nm comme cela est montré pour la 5,7-dihydroxycoumarine par Goodwin & Pollock²³².

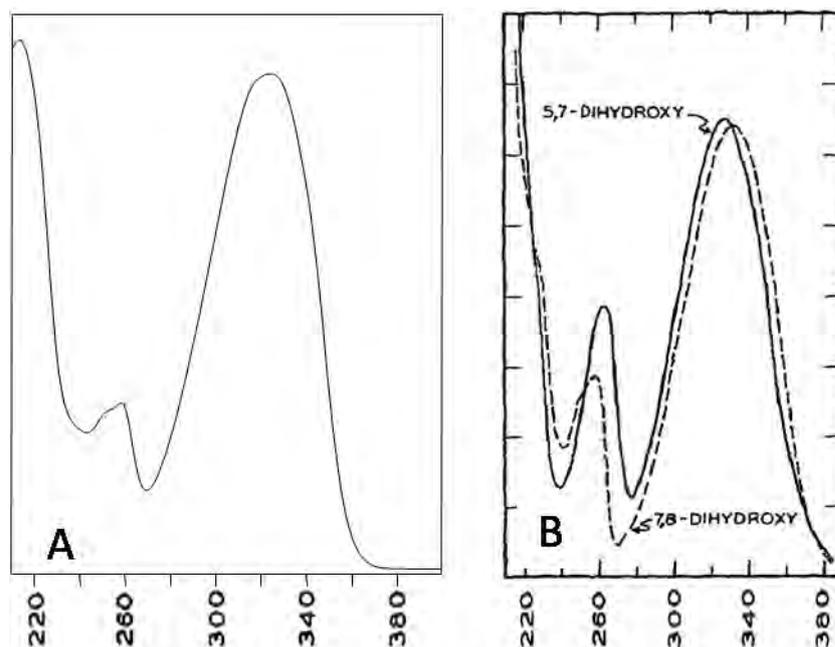


Figure 23. Spectre UV des coumarines identifiées dans l'extrait DCM de *M. corymbosa* (A) comparé au spectre UV de la 5,7-dihydroxycoumarine et de la 6,7-dihydroxycoumarine analysées par Goodwin & Pollock²³² (B).

La détermination structurale de ces composés est ensuite affinée par l'analyse des spectres de masse. Les spectres de masse des coumarines observées en HPLC sont présentés dans la figure 24.

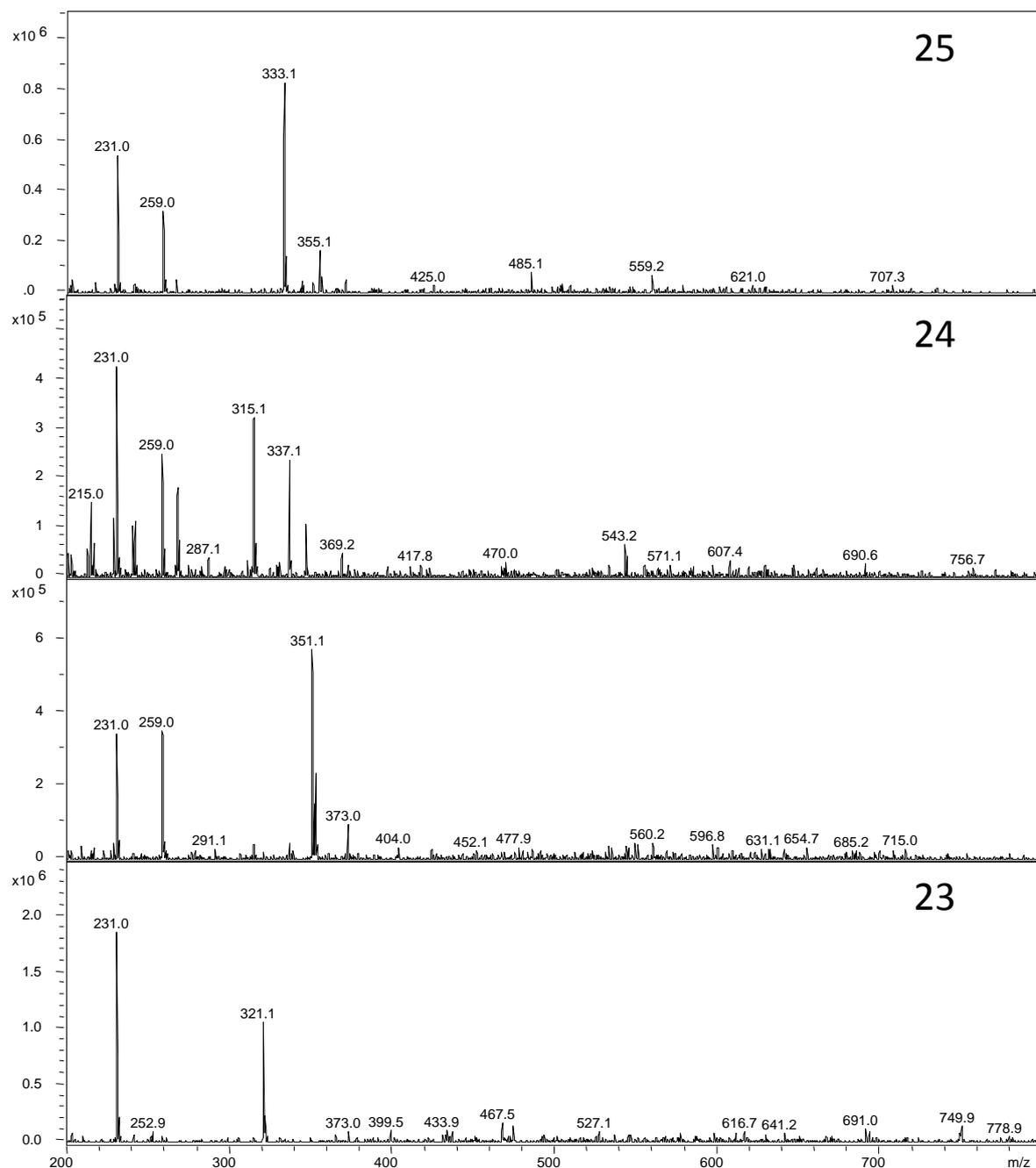


Figure 24. Spectres de masse des coumarines majoritaires de l'extrait DCM de *M. corymbosa*.

Comme l'illustre la figure 24, les coumarines identifiées sont également caractérisées par un fragment de masse 230 ($[M+H]^+ = 231$). La forte intensité de ce pic de masse 231 nous indique qu'il s'agit d'un composé intermédiaire stabilisé. Or, l'étude bibliographique et chimiotaxonomique nous a montré que les Rutaceae et

notamment les *Myrtopsis* renferment fréquemment des coumarines substituées par une ou plusieurs chaînes diméthylallyles en position 8 sur le squelette de la coumarine, ce qui confirme notre analyse du spectre UV des composés. Etant donné qu'une masse de 230 correspond à la formule brute $C_{14}H_{13}O_3$ et que nous attendons à rencontrer une substitution en position 7, il nous semble probable que le fragment à 231 corresponde à la 7-hydroxy-8-diméthylallylcoumarine. Cette hypothèse est par ailleurs renforcée par le fait que cet ion peut se stabiliser sous la forme d'une 3',4'-dihydroséséline comme le montre la figure 25.

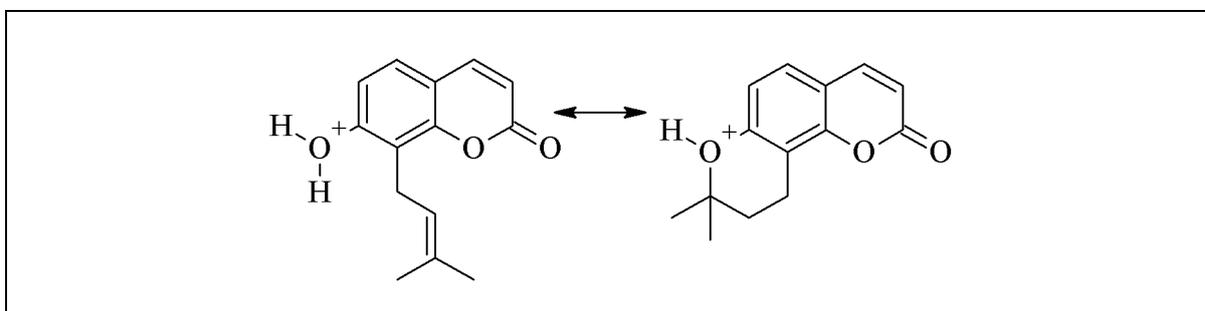


Figure 25. Stabilisation de la 7-hydroxy-8-diméthylallylcoumarine ($[M+H]^+=231$) sous la forme 3',4'-dihydroséséline.

Ainsi, chacune des 4 coumarines identifiées seraient d'après notre hypothèse des dérivés de la 7-hydroxy-8-diméthylallylcoumarine. La différence de masse entre l'ion moléculaire de chacun des composés et cet ion intermédiaire nous renseigne comme nous le verrons avec l'exemple du composé **23**, sur la structure des substituants de cette 7-hydroxy-8-diméthylallylcoumarine. La détermination est finalisée par l'analyse des spectres RMN 1H , ^{13}C , HSQC et HMBC (Annexe 6)

5.2. Détermination structurale du composé 23

Le spectre de masse haute résolution du composé **23** avec un ion

pseudomoléculaire $[M+H]^+ = 299,1649$ correspond à un composé de formule brute $C_{19}H_{22}O_3$ ($[M+H]^+_{\text{théorique}} = 299,1647$). Le spectre de masse de **23** présente quant à lui un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+ = 321$ cohérent avec la formule brute et un fragment à 231 qui nous indique le départ d'un groupement de masse 69, correspondant à un C_5H_9 . L'examen du spectre RMN 1H montre la présence de deux systèmes A et B de deux protons en ortho, correspondant aux protons 3 et 4 (doublets à 6,20 et 7,59 ppm, $J=9,0$ Hz) et aux protons 5 et 6 (doublets à 7,24 et 6,80 ppm, $J=9,0$ Hz). Le spectre RMN 1H nous indique également la présence de deux chaînes allyliques. La première est formée par un signal de deux protons dédoublés à 3,53 ppm, un triplet intégrant pour un proton à 5,23 ppm et deux groupements CH_3 à 1,67 et 1,83 ppm. La seconde chaîne diméthylallyle est représentée sur le spectre par un signal de deux protons dédoublés à 4,60 ppm, un triplet correspondant à un proton à 5,48 ppm et deux signaux correspondant à deux CH_3 à 1,75 et 1,80 ppm. Le fait que les signaux correspondant à la seconde chaîne allylique subissent un effet de blindage suggère que cette chaîne est substituée à un oxygène sur la coumarine. L'analyse des spectres RMN ^{13}C , RMN 2D HSQC et HMBC (figure 26) nous permet de placer avec certitude les chaînes allyliques en position 7 et 8 sur le squelette de la coumarine, ce qui confirme les hypothèses émises plus tôt d'après les spectres UV et MS^n . Cette analyse nous permet également d'attribuer à chaque atome de carbone et d'hydrogène de **23** un signal RMN et de déterminer la structure de ce composé. L'ensemble des données spectrales analysées pour ce composé, présentées dans le tableau 10, sont identiques à celles présentées dans la littérature pour la ramosine^{233,234,235}. Cette coumarine, déjà isolée dans d'autres Rutaceae, est mise en évidence pour la première fois dans le genre *Myrtopsis*.

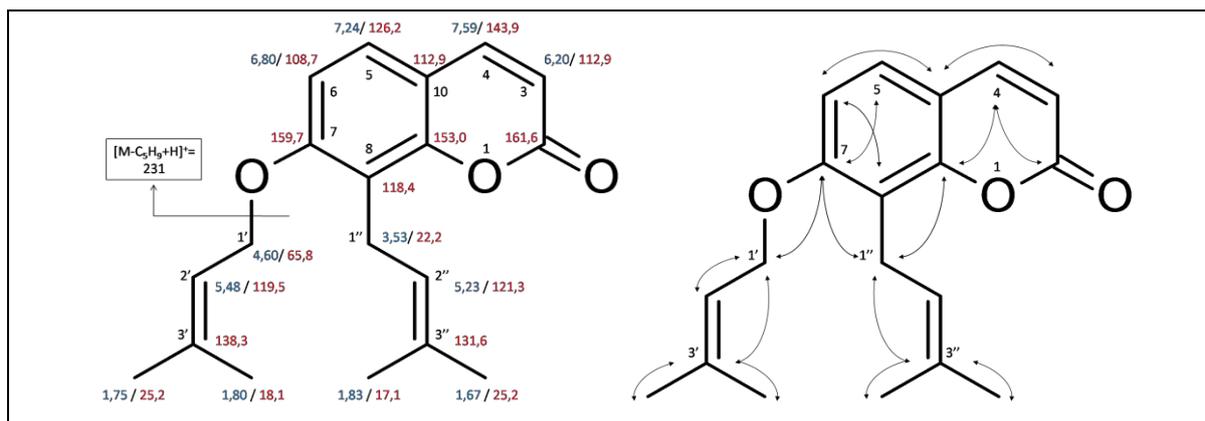


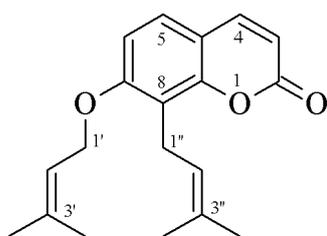
Figure 26. Schéma récapitulatif des données RMN 2D (HSQC et HMBC) et MS utilisés pour la détermination structurale de la ramosine (**23**).

5.3. Détermination structurale des composés 24 et 25

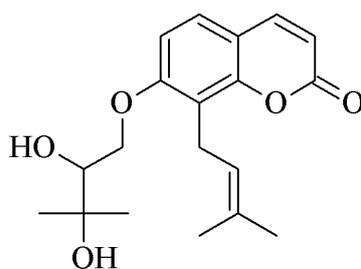
La démarche suivie pour l'analyse structurale des deux autres coumarines isolées est identique à celle développée ci-dessus pour **23**. Le spectre de masse haute résolution de **24**, avec un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+ = 315,1600$ correspond à un composé de formule brute $C_{19}H_{22}O_4$ ($[M+H]^+_{\text{théorique}} = 315,1596$). Le spectre de masse haute résolution de **25**, avec un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+ = 333,1705$, correspond à un composé de formule brute $C_{19}H_{24}O_5$ ($[M+H]^+_{\text{théorique}} = 333,1702$). Ces spectres de masses, tout comme les spectres UV, sont identiques à ceux de deux composés déjà isolés chez d'autres *Myrtopsis*. L'analyse des spectres RMN 1H , ^{13}C et RMN 2D HSQC et HMBC nous a permis de valider ces structures comme étant celles du myrsélinol (**24**) et de la myrséline (**25**). Ces données, résumées dans le tableau 10, sont en tous points identiques à celles décrites dans la littérature²³¹.

Tableau 10. Données RMN obtenues pour les composés **23**, **24** et **25** dans le CDCl₃ (δ ppm, J (Hz)).

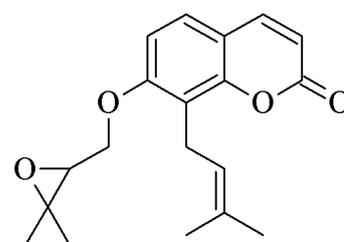
Position		23		24		25	
		¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	O	-	-	-	-	-	-
2	C=O	-	161,6	-	161,5	-	161,5
3	CH	6,20 d (9,0)	112,9	6,22 d (9,0)	113,3	6,24 d (9,0)	113,4
4	CH	7,59 d (9,0)	143,9	7,58 d (9,0)	143,8	7,62 d (9,0)	143,9
5	CH	7,24 d (9,0)	126,2	7,28 d (9,0)	126,5	7,29 d (9,0)	126,5
6	CH	6,80 d (9,0)	108,7	6,83 d (9,0)	108,5	6,84 d (9,0)	108,5
7	C ^{IV}	-	159,7	-	159,5	-	159,4
8	C ^{IV}	-	118,4	-	118,2	-	118,2
9	C ^{IV}	-	153,0	-	153,0	-	152,9
10	C ^{IV}	-	112,9	-	113,0	-	113,1
1'	CH ₂	4,60 d (8,0)	65,8	4,24 d (8,0)	68,6	4,24 d (2,0 ; 8,0); 3,85 d (2,0 ; 8,0)	70,1
2'	CH	5,48 t (8,0)	121,3	3,22 m	73,3	4,08 t (8,0)	75,9
3'	C ^{IV}	-	138,3	-	71,3	-	71,5
4'	CH ₃	1,80 s	25,8	1,38 s	26,5	1,33 s	26,7
5'	CH ₃	1,75 s	18,1	1,36 s	24,8	1,28 s	25,1
1''	CH ₂	3,53 d (8,0)	22, 2	3,63 dd (3,0 ; 8,0)	22,2	3,55 m	22,2
2''	CH	5,23 t (8,0)	121,3	5,24 t (8,0)	121,6	5,14 t (8,0)	121,6
3''	C ^{IV}	-	131,6	-	133,1	-	133,3
4''	CH ₃	1,83 s	25,8	1,83 s	25,8	1,82 s	25,7
5''	CH ₃	1,67 s	17,1	1,68 s	17,9	1,68 s	18,1



23



24



25

5.4. Une coumarine non isolée

Comme nous l'avons vu dans la figure 22, une quatrième coumarine fut observée en HPLC-UV/MS. Celle-ci n'ayant pas été isolée, nous ne pouvons donner sa structure avec certitude. Toutefois, les données acquises en HPLC-MSⁿ nous permettent d'élaborer une hypothèse crédible quant à sa structure. Possédant le même spectre UV et le même fragment de masse 230 que les coumarines isolées (figure 24), nous pouvons en déduire que ce composé est également un dérivé de la 7-hydroxy-8-diméthylallylcoumarine. L'ion moléculaire correspondant à cette coumarine, $[M+H]^+ = 351$ et $[M+Na]^+ = 373$, nous indique qu'il s'agit d'un composé de formule brute $C_{22}H_{22}O_4$. La présence du pic à 231 nous indique une substitution en position 7 par un groupement de masse 120 équivalent à la formule brute C_8H_8O . Enfin, la présence d'un pic à 259 nous indique le départ d'un groupement de masse 93, caractéristique du départ d'un groupement phénol de formule brute C_6H_5O . Il pourrait donc s'agir de la coumarine présentée dans la figure 27.

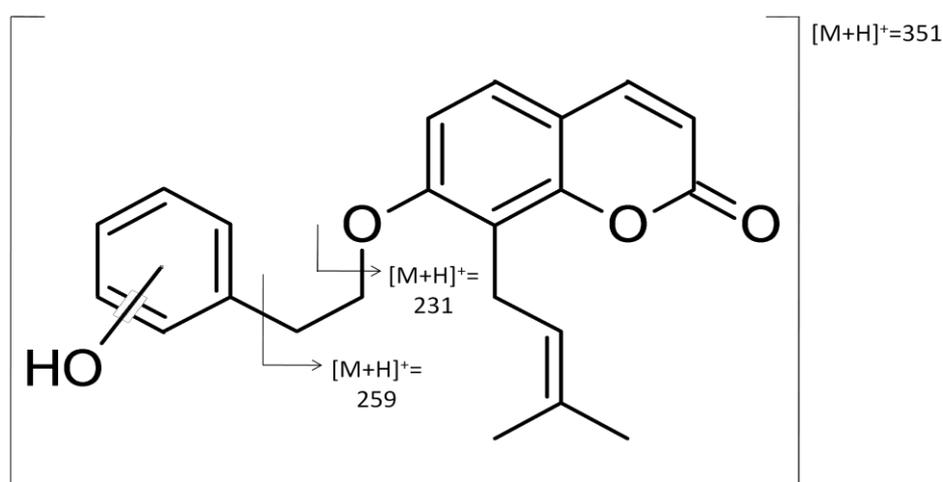


Figure 27. Hypothèse concernant la structure d'une quatrième coumarine observée par HPLC-UV/MS dans l'extrait DCM de *M. corymbosa*.

La structure proposée ci-dessus reste incertaine mais aucun composé

ressemblant à cette structure n'a été trouvé dans la littérature. Ceci laisse à penser qu'il est possible de trouver des coumarines originales dans les écorces de *M. corymbosa*. Pour cela il serait nécessaire de s'intéresser aux composés minoritaires de cette plante.

5.5. Activité des coumarines isolées contre la DV-NS5 RdRp

L'objectif de nos travaux étant de trouver des molécules inhibitrices de la DV-NS5 afin de proposer des candidats médicaments contre la dengue, chacune des trois coumarines fut testée séparément contre la réplicase virale RdRp à différentes concentrations. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11. Résultats d'inhibition de la DV2-NS5 RdRp obtenus avec les trois coumarines isolées à partir des écorces des *M. corymbosa*, à 50, 10 et 1 μ M.

Coumarines isolées	Inhibition de la DV2-NS5 RdRp (%)		
	à 50 μ M	à 10 μ M	à 1 μ M
23	49 \pm 6	44 \pm 6	23 \pm 3
24	75 \pm 2	56 \pm 2	17 \pm 9
25	26 \pm 4	19 \pm 5	0 \pm 0

A 50 μ M, les composés **23**, **24** et **25** inhibent respectivement 49, 75 et 26% de l'activité de la réplicase virale. D'après ces travaux, seul **24** présente donc à 50 μ M un potentiel antiviral contre la dengue. A 10 μ M, **24** inhibe 56% de l'enzyme alors qu'à 1 μ M, ce pourcentage d'inhibition n'est plus que de 17%. La CI_{50} de **24** se trouve donc entre 1 et 10 μ M. Cette concentration est jugée trop élevée pour poursuivre les travaux sur l'étude des potentialités pharmacologiques de ces composés pour le développement d'antiviraux spécifiques de la dengue.

6. Isolement et évaluation biologique des alcaloïdes majoritaires de *M. corymbosa*

Etant donné l'importance des alcaloïdes dans le domaine pharmaceutique, notamment pour leurs activités antivirales comme nous avons pu le voir précédemment, nous avons cherché à isoler les alcaloïdes de cette plante. Les extraits totaux des alcaloïdes sont réalisés à partir des feuilles et des écorces de *M. corymbosa*. La comparaison des rendements d'extraction nous confirme que les alcaloïdes sont majoritairement concentrés dans les feuilles (0,035% contre 0,02% dans les écorces) de cette Rutaceae, comme le montrait le criblage phytochimique présenté plus haut (partie II). Le chromatogramme HPLC-UV/MS (figure 28) montre deux alcaloïdes majoritaires, les composés **26** et **27**, et plusieurs alcaloïdes minoritaires dont le composé **28**. Ces trois alcaloïdes (**26** (Rt=7,5') : 65,1 mg, **27** (Rt= 5,1') : 8,8 mg et **28** (Rt=11,9') : 5,5 mg) ont été purifiés par HPLC semi-préparative (S4).

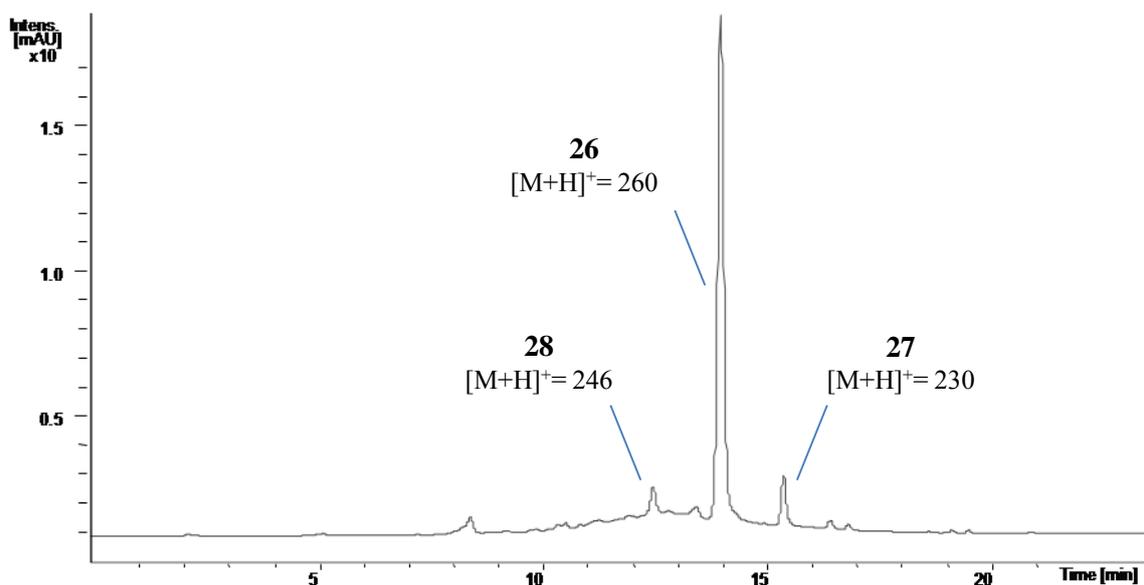


Figure 28. Chromatogramme HPLC-UV/MS de l'extrait alcaloïdique total des feuilles de *M. corymbosa* (Cou 39) à 254 nm (méthode HPLC-2).

Le spectre UV, identique pour les trois alcaloïdes isolés (**26-28**), présente un maximum d'absorption à 246 nm (figure 29) ce qui nous permet de supposer que ces composés sont des furoquinoléines²³⁶. Ces composés, comme nous l'avons vu plus haut, sont par ailleurs caractéristiques des Rutaceae.

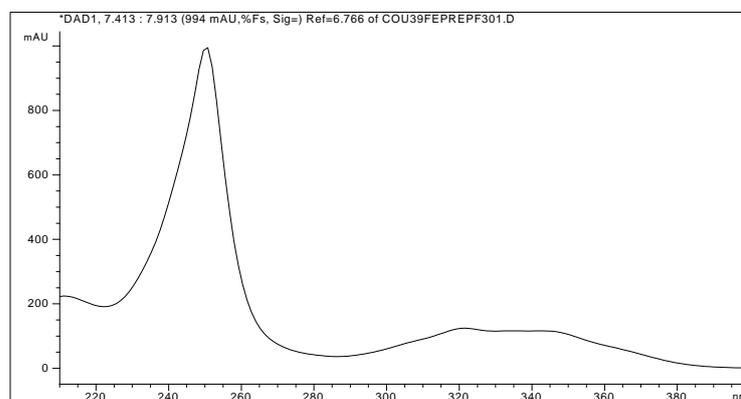


Figure 29. Spectre UV des alcaloïdes identifiés dans les feuilles de *M. corymbosa*.

6.1. Détermination structurale du composé 26

L'analyse du spectre de masse haute résolution obtenu pour **26**, avec un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+ = 260,0976$, nous a permis de déterminer la masse molaire de ce composé ($M=259$) de formule brute $C_{14}H_{13}NO_4$ ($[M+H]^+_{théorique}=260,0917$). L'analyse des spectres RMN 1D et 2D (annexe 7) nous indique la présence de deux systèmes A/B de deux protons chacun, portés par des groupements aromatiques. Le premier est formé par les signaux intégrant pour un proton chacun à 8,04 et 7,33 ppm. La constante de couplage identique pour ces deux signaux et égale à 9,2 Hz nous indique que ces protons sont en position ortho l'un de l'autre. Le second système AB est formé quant à lui par les signaux intégrant pour un proton chacun à 7,28 et 7,65 ppm. Le déplacement chimique ainsi que la constante de couplage de ces signaux, égale à 2,5 Hz, correspondent aux signaux positionnés sur le cycle furane de ces composés. Enfin, trois groupements méthoxy correspondent aux trois

singulets intégrant chacun pour trois protons) à 4,01, 4,04 et 4,49 ppm. L'analyse des spectres RMN ^{13}C et RMN 2D HSQC et HMBC nous a permis d'attribuer les signaux des protons et carbones aux atomes correspondants à la skimmianine. Les données des spectres ^1H et ^{13}C , présentées dans le tableau 12, sont identiques à celles retrouvées dans la littérature^{237,238}. Ce composé, déjà décrit comme nous l'avons vu plus haut dans le genre *Myrtopsis*, fut en effet isolé à partir des feuilles de *M. sellingii*

231.

6.2. Détermination structurale du composé 27

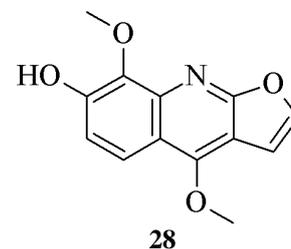
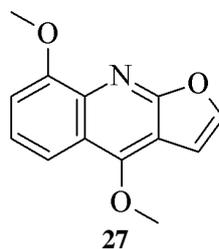
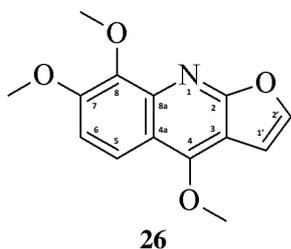
Les données spectrales relatives au composé **27** montrent de grandes ressemblances avec celles du composé **26**. Leur spectre UV est parfaitement superposable ($\lambda_{\text{max}} = 246$ nm). La formule brute de **27**, $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$, est déduite de l'analyse du spectre de masse haute résolution qui montre un pic correspondant à l'ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+ = 230,1881$ (pour une masse théorique de 230,2387). Cette masse correspond à celle de la skimmianine (**26**) privée d'un groupement méthoxy. Le spectre RMN ^1H de **27** met en évidence la présence de deux systèmes A/B de deux protons chacun, identiques à ceux observés pour **26**, ainsi que deux groupement méthoxy (contre 3 pour le composé **26**) correspondant aux singulets intégrant pour 3 protons à 4,42 et 3,36 ppm. L'analyse des spectres RMN ^{13}C et RMN 2D HSQC et HMBC nous a permis d'attribuer les signaux des protons carbones aux atomes correspondants à la γ -fagarine. Les données analysées des spectres ^1H et ^{13}C , présentées dans le tableau 12, sont en tous points identiques à celles décrites dans la littérature^{237,239}. Déjà décrites dans le genre *Myrtopsis*, la γ -fagarine serait également présente chez *M. myrtoidea*, *M. novae-caledoniae* et *M. sellingii* d'après la littérature²³¹.

6.3. Détermination structurale du composé 28

Le spectre UV du composé **28** nous indique qu'il s'agit encore une fois d'un dérivé de la skimmianine (**26**). L'analyse HRMS de **28**, avec un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+ = 246,0808$ permet de déduire la formule brute de cet alcaloïde comme étant $C_{13}H_{11}NO_4$ ($[M+H]^+_{\text{théorique}} = 246,0761$). Cette masse correspond à celle du composé **26** privé d'un groupement méthyle. Le spectre RMN 1H de **28** met encore en évidence la présence des deux systèmes A/B de deux protons chacun identiques à ceux observés pour **26** et confirme la présence, comme pour **27**, de deux méthoxy correspondant respectivement aux singulets à 3,88 et 4,47 ppm. L'analyse des spectres RMN ^{13}C et RMN 2D HSQC et HMBC nous a permis d'attribuer les signaux des protons et des carbones aux atomes correspondants à l'haplopine. Ce composé, bien connu des Rutaceae, est isolé pour la première fois dans une espèce du genre *Myrtopsis* à notre connaissance. L'ensemble des données spectrales présentées dans le tableau 12 sont en accord avec les données de la littérature^{240,241}.

Tableau 12. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenues pour les composés **26**, **27** et **28** dans le CDCl_3 (δ ppm, J (Hz)).

Position	26		27		28	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	N	-	-	-	-	-
2	C^{IV}	160,7	-	160,7	-	160,7
3	C^{IV}	103,2	-	104,4	-	103,3
4	C^{IV}	163,6	-	159,8	-	163,6
4a	C^{IV}	113,3	-	117,8	-	113,6
4b	O- CH_3	4,49 (s) 60,8	4,42 (s) 59,2	4,47 (s) 60,6		
5	CH	8,04 (d, $J=9,2\text{Hz}$) 119,7	7,73 (d, $J=8,0\text{Hz}$) 114,7	7,82 (d, $J=9,2\text{ Hz}$) 119,9		
6	CH	7,33 (d, $J=9,2\text{Hz}$) 114,0	7,33 (t, $J=8,0\text{Hz}$) 124,2	7,26 (d, $J=9,2\text{ Hz}$) 115,7		
7	C_x	- 155,0	7,05 (d, $J=8,0\text{Hz}$) 109,7	- 151,2		
7b	O- CH_3	4,04 (s) 56,9	- -	- -		
8	C^{IV}	- 137,8	- 152,3	- 139,1		
8a	C^{IV}	- 133,3	- 133,6	- 133,5		
8b	O- CH_3	4,01 (s) 61,5	3,36 (s) 56,7	3,88 (s) 61,6		
1'	CH	7,28 (d, $J=2,5\text{Hz}$) 106,2	7,09 (d, $J=2,5\text{Hz}$) 105,8	7,13 (d, $J=2,5\text{Hz}$) 106,1		
2'	CH	7,65 (d, $J=2,5\text{Hz}$) 144,0	7,59 (d, $J=2,5\text{Hz}$) 143,4	7,60 (d, $J=2,5\text{Hz}$) 143,9		



6.4. Activité des alcaloïdes isolés contre la DV-NS5 RdRp

Les alcaloïdes purifiés sont alors testés individuellement contre la DV-NS5 RdRp. Les résultats préliminaires obtenus avec ces composés à 50, 10 et 1 μM sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13. Pourcentage d'inhibition de la DV2-NS5 RdRp mesuré avec les trois alcaloïdes isolés à partir des feuilles de *M. corymbosa*, à 50, 10 et 1 μM .

Alcaloïdes isolés	Inhibition de la DV2-NS5 RdRp		
	à 50 μM	à 10 μM	à 1 μM
26	46 \pm 2	12 \pm 4	1 \pm 1
27	37 \pm 6	29 \pm 4	16 \pm 5
28	33 \pm 5	28 \pm 6	21 \pm 4

Nous remarquons tout d'abord que les alcaloïdes isolés sont responsables d'une activité dose dépendante contre la DV-NS5 RdRp. **26**, qui inhibe 46% de l'enzyme à 50 μM , est l'alcaloïde testé le plus efficace contre la DV-NS5 RdRp. La CI_{50} de chacun des alcaloïdes testés est donc supérieure à 50 μM . Les alcaloïdes isolés ne sont donc pas retenus pour approfondir leur évaluation biologique visant à développer un agent antiviral contre la dengue. Ces résultats sont en accord avec la faible activité contre la réplicase du DV observée avec l'extrait alcaloïdique total des feuilles de *M. corymbosa* (tableau 9).

7. Comparaison de la composition en alcaloïdes des feuilles et des écorces de *M. corymbosa*

Afin d'évaluer la composition alcaloïdique des écorces de *M. corymbosa* (Cou 39) qui n'a jamais été étudié jusqu'ici, nous avons comparé les chromatogrammes HPLC-MS obtenus avec les extraits alcaloïdiques des feuilles et des écorces de cette plante (figure 30).

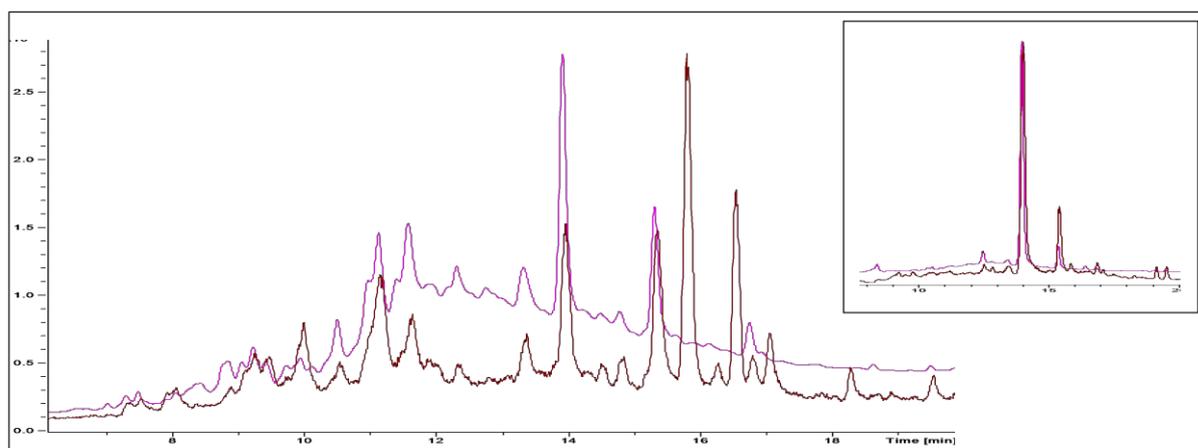


Figure 30. Chromatogramme HPLC-UV/MS de l'extrait alcaloïdique des écorces de *M. corymbosa* (méthode HPLC-2). Dans la fenêtre en haut à droite : rappel du chromatogramme obtenu avec l'extrait alcaloïdique des feuilles de la même plante.

Malgré une plus faible teneur observée dans les écorces, il semble y avoir une plus grande variété d'alcaloïdes dans les écorces de *M. corymbosa*. Etant donné ces résultats, il semble intéressant d'un point de vue phytochimique et chimiotaxonomique, de s'intéresser aux alcaloïdes des écorces de *M. corymbosa* et d'une manière générale, aux alcaloïdes des écorces des *Myrtopsis spp.* Dans cet extrait alcaloïdique des écorces, nous retrouvons les composés **26** (Rt= 14,1'), **27** (Rt= 15,4') et **28** (Rt= 12,7'). Deux alcaloïdes détectés à Rt= 9,6' et 14,8' présentent un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+ = 276,1$ et $[M+H]^+ = 274,1$ identiques à ceux de la myrtopsine et d'un dérivé C-méthylé de la skimmianine (**22**) déjà décrits dans le

genre *Myrtopsis* (figure 20). L'extrait alcaloïdique des feuilles semble pour finir contenir des dérivés de quinolinone, tel que le composé à Rt= 12,8' sur le chromatogramme de la figure 30, dont l'ion pseudomoléculaire détecté ($[M+H]^+$ = 242,0) correspond à celui de la N-méthylflindersine (**29**). Il est probable à la vue de ces résultats préliminaires de découvrir des alcaloïdes originaux par une étude approfondie des alcaloïdes de cette plante. Il faudrait pour cela réaliser une nouvelle récolte et réaliser un extrait alcaloïdique en quantité suffisante pour permettre leur purification.

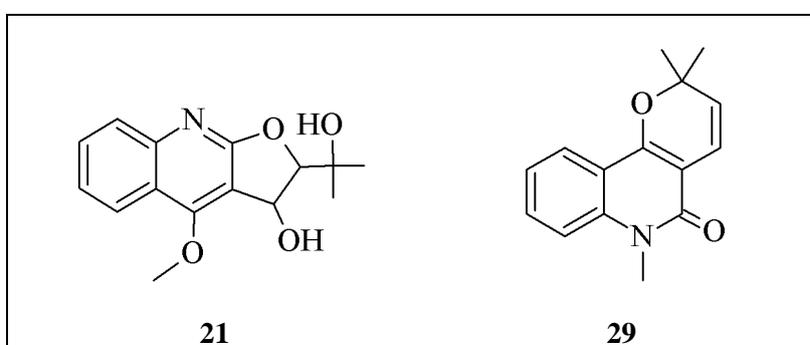


Figure 31. Schéma de deux alcaloïdes supposés présents dans *M. corymbosa* : myrtopsine (**21**) et la N-méthylflindersine (**29**).

Conclusion

L'étude phytochimique de *M. corymbosa* qui n'avait jamais été réalisée à notre connaissance nous a permis d'isoler trois coumarines prénylées (**23-25**) et trois alcaloïdes (**26-28**). Parmi les trois coumarines isolées deux (**24** et **25**) sont déjà décrites dans d'autres espèces du genre *Myrtopsis*²³¹. La ramosine (**23**), déjà décrite chez les Rutaceae²⁴², est isolée pour la première fois dans une espèce du genre *Myrtopsis*. Ce composé est un composé majoritaire des écorces de *M. corymbosa* et peut être considéré comme un marqueur taxonomique de l'espèce étudiée. Trois alcaloïdes ont été isolés à partir des feuilles mais sont également retrouvés, en plus

petite quantité dans les écorces de *M. corymbosa*. Parmi ces composés, deux sont déjà décrits dans d'autres espèces du genre (**26** et **28**) alors que le troisième (**27**) est nouvellement décrit dans le genre *Myrtospis*²⁴³. Les structures de tous les composés isolés sont en accord avec les données de la chimiotaxonomie et du criblage phytochimique mené au début de nos travaux.

Tous ces composés ont été testés contre la DV-NS5 afin d'évaluer leur potentiel antidengue. Les résultats des tests enzymatiques menés montrent que les coumarines et les alcaloïdes isolés ne présentent qu'un intérêt modeste pour le développement d'antiviraux ciblant spécifiquement la réplication du DV. La forte activité contre la réplicase virale avec l'extrait brut des écorces pourrait donc s'expliquer par la présence d'autres composés ou par l'action en synergie de plusieurs d'entre eux. Pour cela, nous suggérons d'étudier en détail les coumarines et alcaloïdes minoritaires de cette plante, pensant de plus qu'il est probable de rencontrer des structures originales parmi ces composés. Les composés isolés pourraient également être testés contre d'autres cibles biologiques.

Quatrième partie :
Biflavonoïdes des
Dacrydium spp.

Introduction

Au cours du criblage préliminaire présenté dans la première partie des résultats de ce manuscrit, nous avons remarqué la forte activité inhibitrice dose dépendante de la réplicase du DV (figure 32) des extraits bruts des feuilles de deux *Dacrydium*: *D. araucarioides* Brongn. & Gris et *D. balansae* Brongn. & Gris. Ne montrant pas d'activité significative contre aucun des quatre microorganismes testés, ni de cytotoxicité, les extraits de ces deux *Dacrydium* sont considérés comme ayant un fort potentiel pour la découverte de molécules spécifiquement antivirales et actives contre le DV. Pour cela, nous nous sommes intéressés de plus près à ce genre botanique, à la composition de ces extraits et aux potentialités antidengue des molécules qu'ils contiennent.

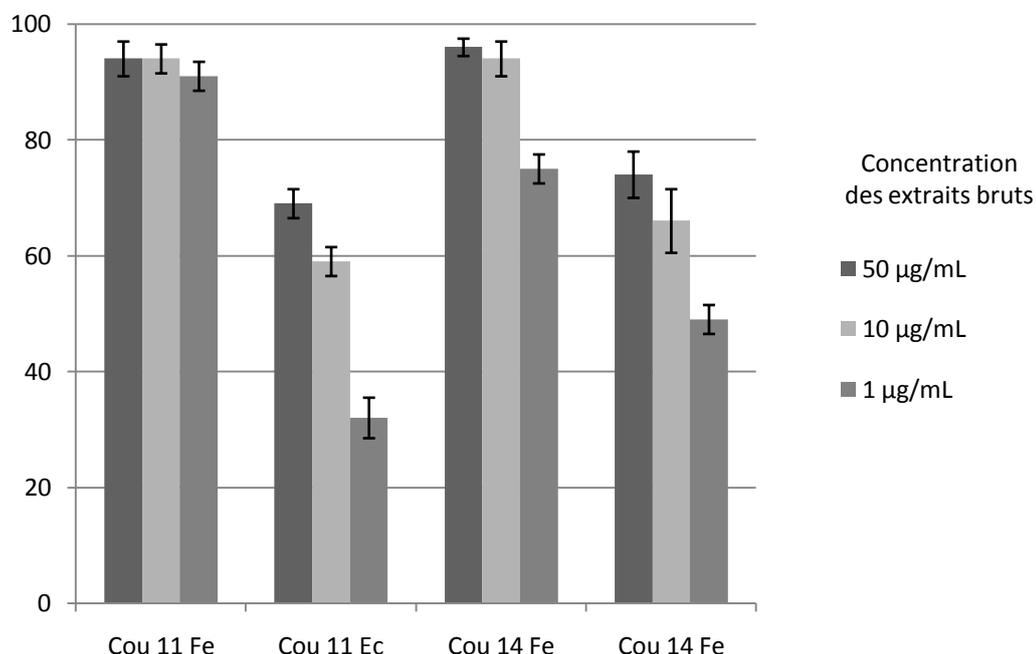


Figure 32. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par les extraits bruts des feuilles et des écorces de *D. araucarioides* (Cou 11) et de *D. balansae* (Cou 14) à 50, 10 and 1 µg/mL.

1. Notions de botanique du genre *Dacrydium*

Les *Dacrydium* sont des gymnospermes appartenant à la famille des Podocarpaceae. Ce genre comprend vingt et une espèces dans le monde dont la plus grande partie est retrouvée dans le Pacifique Sud-ouest (Asie du Sud-est, Nouvelle-Zélande, Fidji et Nouvelle-Calédonie). Les gymnospermes sont d'une manière générale très représentés sur le territoire calédonien : sur les douze familles existantes dans le monde, cinq sont retrouvées en Nouvelle-Calédonie : trois parmi les coniférales, une parmi les cycadales et une parmi les taxales. Les gymnospermes tropicales sont plus généralement fortement représentées dans la région du Sud-ouest Pacifique (Mélanésie, Australie, Nouvelle-Zélande, *etc.*). En Nouvelle-Calédonie, treize genres et quarante deux espèces sont présents et toutes sont endémiques. Les conifères, l'ordre le plus diversifié des gymnospermes est représenté en Nouvelle-Calédonie par la famille des Araucariaceae, des Cupressaceae, de cycadaceae, des Podocarpaceae et des Taxaceae. Ces derniers sont caractérisés par la présence d'une seule graine aptère à chaque écaille fertile (à la différence de celles des Araucariaceae et des Cupressaceae qui sont ailées) et de deux sacs polliniques à chaque sporophylle (alors qu'il en porte au moins trois dans le cas des Cupressaceae). Les huit genres de Podocarpaceae rencontrés Nouvelle-Calédonie sont caractérisés par leurs cônes à graines réduits au moins à ce que l'on appelle réceptacle, avec la graine renversée et l'écaille fertile non complètement recouverte par la bractée qui les porte à son aisselle. Le genre *Dacrydium*, dont le nom provient du grec « DAKRA » qui signifie larmes, en référence à la résine exsudé par de nombreuses espèces du genre, est caractérisé par la présence d'une graine libre, faisant saillie au dessus de l'écaille fertile. Les organes à graines sont terminaux sur des rameaux feuillés ordinaires où les feuilles en alène (en forme de poinçon) sont insérées densément²⁴⁴.



Figure 33. Photographies des quatre *Dacrydium* rencontrés en Nouvelle-Calédonie. A : *D. araucarioides* et son port caractéristique en candélabre. B : *D. balansae*. C : *D. guillauminii*. D : *D. lycopodioides*.

Quatre espèces de *Dacrydium* sont retrouvées en Nouvelle-Calédonie : *D. araucarioides*, *D. balansae*, *D. guillauminii* et *D. lycopodioides*²⁴⁵. Ces espèces sont différenciées par l'analyse des bractées et des cônes à pollens. Ces quatre espèces sont exclusivement retrouvées sur la Grande Terre. *D. araucarioides*, *D. balansae* et *D. guillauminii* sont associées au maquis minier : le premier est fréquent dans le maquis minier du grand Sud alors que *D. balansae* se développe principalement dans les zones forestières et para-forestières de la chaîne centrale en dessous de 900 mètres d'altitude. *D. guillauminii* est quant à lui restreint à la Plaine des lacs alors

que *D. lycopodioides* se rencontre dans les forêts humides entre 900 et 1 400 mètres d'altitude²⁴⁴.

2. Chimiotaxonomie

Les études chimiotaxonomiques portant sur les Podocarpaceae et sur les gymnospermes d'une manière générale, se sont focalisées essentiellement sur l'analyse des huiles essentielles et des dérivés terpéniques. La famille des biflavonoïdes est également fortement représentée chez les gymnospermes²²⁰. Les *Dacrydium* de Nouvelle-Calédonie ont été peu étudiées pour leur phytochimie ou leurs propriétés pharmacologiques. Ailleurs, des études de ce genre ont porté sur les diterpènes des résines, l'huile essentielle ou les flavonoïdes.

2.1. Huile essentielle

Les huiles essentielles des quatre *Dacrydium* calédoniens ont été analysées par Nicolas Lebouvier (LIVE-UNC) par GC-MS. Il ressort de cette étude que les huiles de *D. araucarioides* et de *D. balansae* contiennent en majorité des sesquiterpènes. Les composés majoritaires de ces deux huiles étant respectivement le germacrène D (**30**, 34,6%) et le β -caryophyllène (**31**, 32,5%) pour *D. araucarioides* et le β -caryophyllène (**31**, 38,7%) et le δ -élémente (**32**, 12,3%) pour *D. balansae*. Les huiles des deux autres *Dacrydium* calédoniens se distinguent par la présence de diterpènes. Les composés majoritaires de *D. guillauminii* sont le bicyclogermacrène (**33**, 38,7%) et l' α -pinène (**34**, 16,0%) alors que les composés majoritaires de *D. lycopodioides* sont le rimuène (**35**, 41,6%) et le germacrène D (**30**, 20,8%). Les

structures des composés majoritaires de ces huiles sont présentées dans la figure 34.

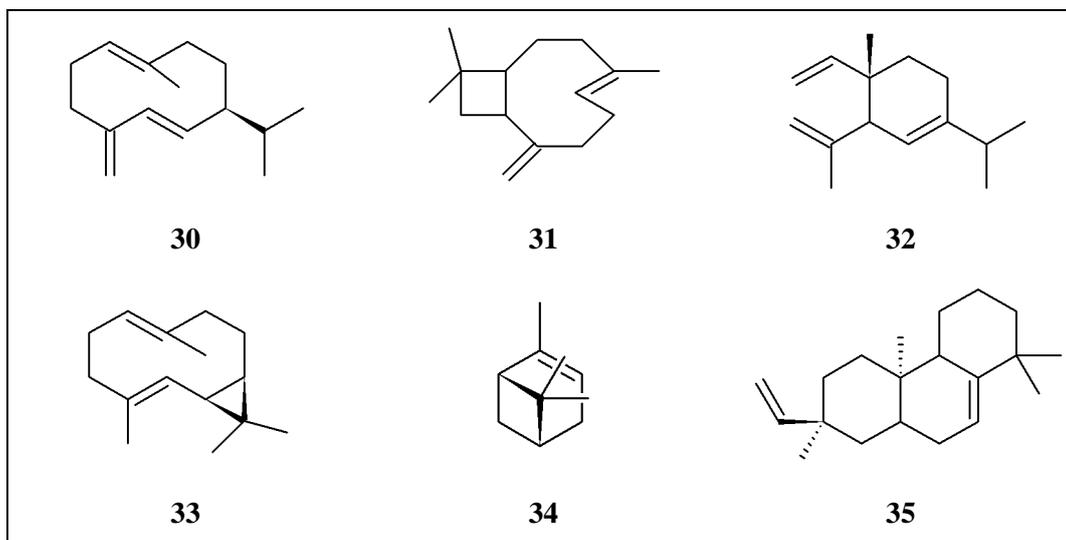


Figure 34. Structure des terpènes majoritaires dans l'huile essentielle des quatre *Dacrydium* calédoniens. **30** : germacrène D ; **31** : β -caryophyllène ; **32** : δ -élémyène ; **33** : bicyclogermacrène ; **34** : α -pinène ; **35** : rimuène.

L'huile essentielle des feuilles de *D. cupressinum* (Nouvelle-Zélande) et les diterpènes de l'HE des feuilles de *D. nidulum* et *D. nosoriense*, originaires des îles Fidji ont également été étudiées²⁴⁶. L'étude de l'HE des feuilles de *D. cupressinum*, a montré la présence de nombreux monoterpènes, de sesquiterpène et de diterpènes. Parmi ceux-ci, le rimuène serait le composé majoritaire de l'HE, alors que le laurène, le β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène et le longifolène sont les autres composés majoritaires de cette HE^{247,248,249}. L'étude des HE des deux *Dacrydium* endémiques des îles Fidji a également mis en lumière la présence d'une grande variété de mono et sesquiterpènes²⁴⁶. Le rimuène est le seul diterpène identifié et le composé majoritaire dans ces deux HE de *Dacrydium*. D'une manière générale les HE des *Dacrydium* Fidjiens contiennent peu de terpènes oxydés. Les huiles essentielles n'ont pas été extraites par le protocole mis en place pour notre criblage préliminaire.

Bien que ces dérivés terpéniques aient montré de nombreuses activités

biologiques, ils ne sont probablement pas extraits par l'AcOEt et ne sont pas responsables de l'activité d'inhibition de la DV-NS5 RdRp. Les connaissances sur la composition des huiles essentielles des *Dacrydium* est cependant intéressante pour l'éclairage qu'elles apportent sur la chimiotaxonomie du genre *Dacrydium*²⁵⁰. Ainsi, la composition des huiles essentielles de *D. araucarioides* et *D. balansae* est assez proche et diffère nettement de la composition des HE deux autres *Dacrydium* (*D. guillauminii* et *D. lycopodioides*). Ceci pourrait être comparé à la composition chimique des extraits bruts à l'AcOEt des *Dacrydium* étudiés.

2.2. Diterpènes oxygénés

Dans une étude des diterpénoïdes oxygénés di- et tri-cycliques des conifères de l'hémisphère sud, il apparaît que les Podocarpaceae sont caractérisées par l'oxygénation préférentielle en C-19 des diterpènes qu'ils contiennent (beaucoup plus qu'en C-18) tout comme dans la famille des Cupressaceae²⁵¹. Il apparaît également que certains ferruginols oxygénés sont caractéristiques de ces deux familles tandis que l'acide podocarpique (**36**) n'est trouvé que chez les Podocarpaceae (*Dacrydium cupressinum*, *Lagorastrobus franklinii*, *Microcachrys tetragona* ainsi que 8 *Podocarpus*). Les diterpènes du bois de *D. cupressinum* ont été étudiés de façon exhaustive^{252,253}.

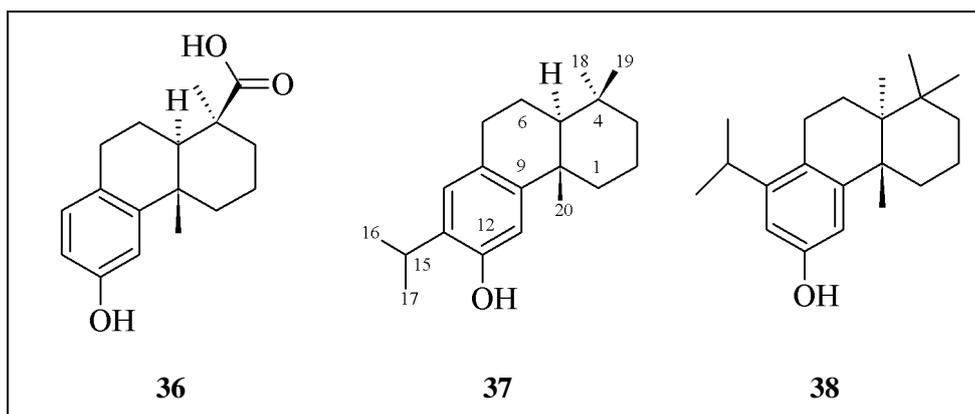


Figure 35. Exemples de diterpènes oxydés présents chez les Podocarpaceae. **36** : acide podocarpique ; **37** : ferruginol ; **38** : totarol.

Parmi ces composés, le ferruginol (**37**) serait le composé majoritaire de cette espèce qui renfermerait également du totarol (**38**) de l'acide podocarpique (**36**) ainsi que de l'acide podocarpique (figure 35). Les diterpènes ont également été étudiés dans *D. comosum* et *D. nidulum*. L'acide podocarpique a été isolés dans ces deux espèces et *D. comosum* renferme également du totarol²⁵⁴. Ces composés sont extraits à partir de la résine ou du bois des *Dacrydium spp.* et ne peuvent donc pas être reliés directement à l'activité biologique observées contre la réplicase du DV.

2.3. Etude des flavonoïdes

Les flavonoïdes présents dans les espèces du genre *Dacrydium* ont été peu étudiés jusqu'à présent. Seuls les biflavonoïdes de trois espèces (*D. balansae*, *D. cupressinum* et *D. nidulum*) ont été analysés par CCM^{255,256}. Ces études ont montré la présence d'amentoflavone et de plusieurs dérivés méthoxylés dans les feuilles des trois *Dacrydium* étudiés. Ces composés caractéristiques des feuilles de gymnospermes²²⁰, pourraient être responsables du fort potentiel antidengue des extraits bruts des feuilles de *D. araucarioides* et de *D. balansae*.

3. Isolement des principes actifs de *D. balansae*

Le criblage phytochimique mené sur les poudres des différents organes de *D. araucarioides* et de *D. balansae* révèle une composition chimique très proche entre les deux espèces (tableau 5, première partie du manuscrit) : comme le suggère également la bibliographie, les écorces semblent riches en stérols et terpènes alors que les feuilles seraient caractérisées par la présence de flavonoïdes. L'activité biologique observée contre la DV-NS5 RdRp est également spécifique des extraits des feuilles des *Dacrydium spp.* ce qui a orienté les stratégies de séparations utilisées lors du fractionnement bioguidé vers la purification des flavonoïdes.

3.1. Fractionnement bioguidé de l'extrait des feuilles de *D. balansae*

Afin d'isoler les principes actifs contre la DV-NS5 RdRp de *D. balansae*, un extrait est réalisé par macération de 600 g de poudre sèche des feuilles dans du méthanol.

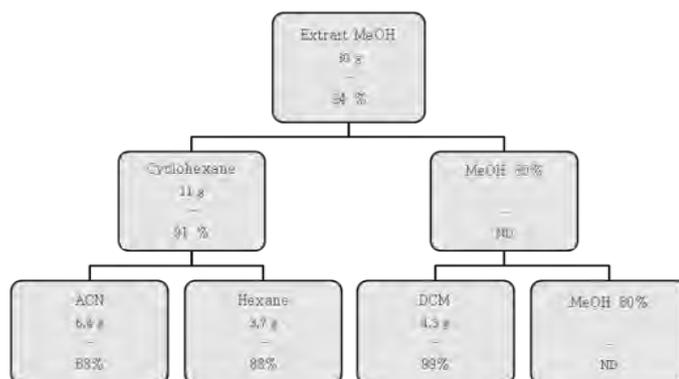


Figure 36. Séparation liquide-liquide de l'extrait MeOH des feuilles de *D. balansae*. Les résultats du test enzymatique contre la DV-NS5 RdRp sont donnés pour une concentration de chaque fraction de 10 µg/mL.

L'extrait MeOH (30 g) conserve une forte activité inhibitrice de la DV-NS5, présente un profil phytochimique comparable à celui de l'extrait AcOEt et un rendement d'extraction plus élevé. Cet extrait renferme cependant des polyphénols qui n'étaient pas retrouvés dans l'extrait AcOEt filtré sur polyamide et que nous avons éliminés lors des premières étapes de séparation. Le fractionnement de l'extrait méthanolique débute pour cela par une séparation liquide-liquide dans une ampoule à décanter qui nous permet de distinguer quatre fractions.

3.2. Fractionnement de la partie DCM

La fraction la plus active est obtenue avec le dichlorométhane (DCM) et inhibe 99% de l'activité de la polymérase du DV à 10 µg/mL. Cette fraction (4,3 g) est fractionnée sur colonne de silice à l'aide du système d'élution S5 (tableau 33 de la partie expérimentale) pour donner sept fractions (F1-F7). La fraction 6 (550 mg) est ensuite soumise à une séparation sur une colonne de Séphadex LH-20 avec le système d'élution S6 pour donner cinq fractions (F6.1-F6.5). F6.3 (58 mg) est finalement séparée par HPLC-préparative avec S7 pour donner les composés **39** (12 mg), **40** (19 mg) et **41** (19 mg).

3.3. Fractionnement de la partie ACN

Par ailleurs, étant donné le peu de données concernant la phytochimie de cette espèce dans la littérature, il nous a semblé intéressant d'étudier les fractions moins actives obtenues lors du fractionnement liquide-liquide à l'aide de

l'acétonitrile (ACN) et de l'hexane malgré leur plus faible activité d'inhibition de l'ARN polymérase virale (respectivement 63 et 88% à 10 µg/mL). La partie ACN (6,4 g) est soumise à une séparation sur colonne de silice avec le système d'élution S8 pour donner sept fractions (F1-F7). F5 (360 mg) est ensuite séparée sur une seconde colonne de silice à l'aide de S9 pour donner le composé **42**. F3 est déposée sur une plaque de silice préparative et éluée par le système S10 pour donner **43** (20 mg).

3.4. Fractionnement de la partie hexanique

Trois composés plus apolaires ont été isolés dans la partie hexanique. Une fois réduits sous pression réduite, la partie hexanique (3,7 g) est soumise à une séparation sur colonne de silice à l'aide du système S11 pour donner huit fractions (F1-F8). F4 (90 mg) est fractionnée de nouveau sur une colonne de silice à l'aide du système S12 pour obtenir les composés **44** (3 mg) et **45** (3.5 mg). Le fractionnement de F5 (700 mg) sur une colonne Séphadex LH-20 à l'aide du système S6 nous a conduit à isoler le composé **46** (55 mg). Chacun de ces composés a fait l'objet d'une étude structurale avant l'évaluation de leurs potentialités pharmacologiques contre la réplication du DV (voir la partie expérimentale pour les détails des purifications).

4. Analyse structurale des biflavonoïdes 39, 40 et 41

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet de ces composés est identique et montre un maximum d'absorption à 269 nm et à 338 nm. Ce spectre d'absorption correspond à celui de la famille des flavones²⁵⁷. Nous pouvons donc en conclure que les composés **39**, **40** et **41** possèdent tous les trois le squelette d'une flavone

schématisé dans la figure 37. Les maxima d'absorptions observés avec les composés isolés de *D. balansae* sont proches de ceux de l'apigénine ($\lambda_{\text{max}} = 265, 336$)²⁵⁸.

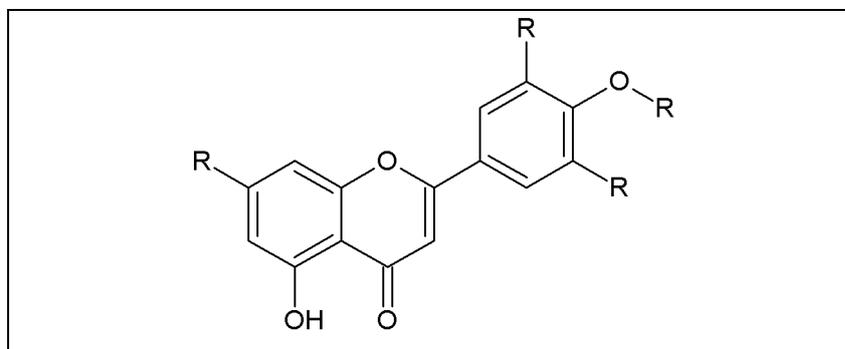


Figure 37. Structure générale des composés de la famille des flavones.

L'analyse des spectres HRESIMS nous a permis de déterminer la masse molaire et la formule brute des flavonoïdes isolés. Il apparaît alors que ces composés, ayant tous des masses molaires (MM) supérieures ou égales à 538 g/mol, seraient probablement des dimères de flavonoïdes ($2 \times M(\text{apigénine}) = 540$). L'analyse des spectres RMN 1D et 2D, obtenus dans le DMSO deutéré, présentée dans le tableau 14, nous a ensuite permis de déterminer la nature exacte de ces trois composés.

Tableau 14. Données HRMS et masse molaire des flavonoïdes (**39**, **40** et **41**) isolés à partir des feuilles de *D. balansae*.

Composé isolé	Formule brute de l'ion observé	Données HRMS	Valeurs théoriques	Formule brute et MM (g/mol)
39	$\text{C}_{30}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+ = 539.0959$	539.0973	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$
	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}\text{Na}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+ = 561.0778$	561.0792	538
40	$\text{C}_{31}\text{H}_{19}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^- = 551.099$	551.0984	$\text{C}_{31}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$
	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^- = 537.0836$	537.0827	552
41	$\text{C}_{32}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+ = 567.1278$	567.1286	$\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$
	$\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{NaO}_{10}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+ = 589.1097$	589.1105	566

4.1. Détermination structurale du composé 39

Le composé **39**, de formule brute $C_{30}H_{18}O_{10}$, présente donc un spectre UV caractéristique des flavones. Le spectre RMN 1H présente 8 signaux appartenant à 4 systèmes A, B, A' et B' de deux monomères de flavone. Ainsi les signaux intégrant chacun pour un proton à 6,21 et à 6,46 ppm peuvent être placés sur le cycle A car ils se présentent tous les deux sous forme d'un doublet avec une constante de couplage identique. La valeur de cette constante de couplage (2,0 Hz) suggère que ces protons sont situés en position méta sur un cycle benzène.

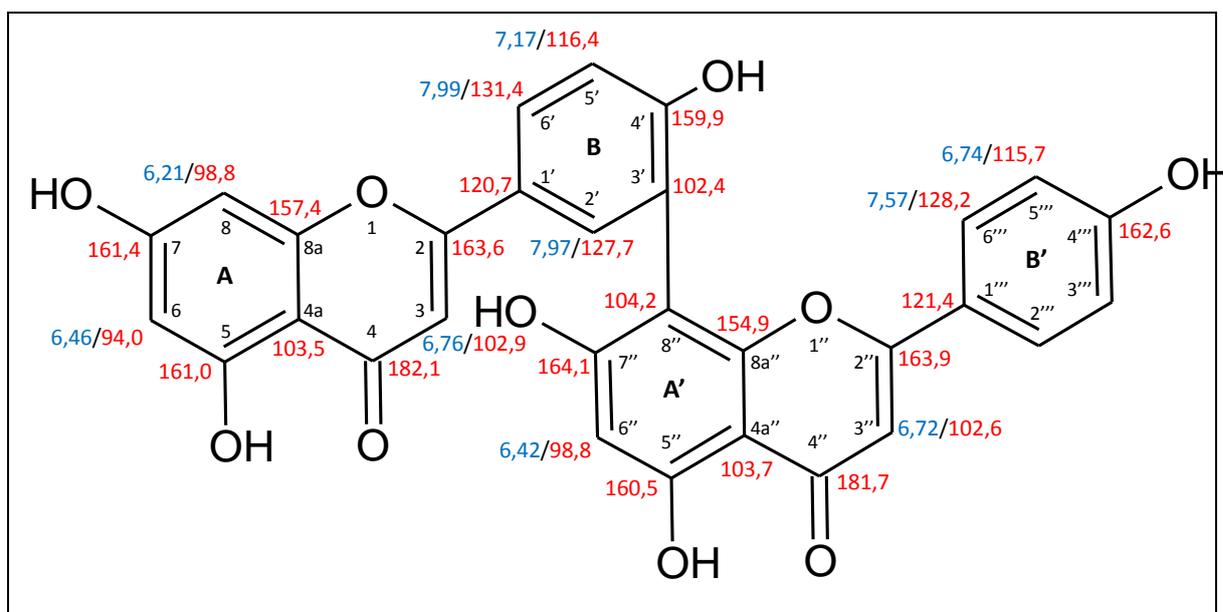


Figure 38. Structure de l'amentoflavone et données RMN 1H en bleu et ^{13}C en rouge obtenues par l'analyse du composé **39**.

De même les signaux correspondant aux protons $H_{5'}$ (7,17 ppm), $H_{6'}$ (7,97 ppm) et $H_{2'}$ (7,99 ppm) sont caractéristiques d'un système ABX et peuvent être placés sur un système aromatique B. L'analyse des constantes de couplage et des corrélations COSY observées nous ont permis de placer $H_{5'}$ et $H_{6'}$ en position ortho alors que $H_{2'}$ est en méta de $H_{6'}$ et en méta de $H_{5'}$, car aucune corrélation n'est

observée entre ces deux protons. H_{6''} (6,42 ppm) est seul sur le cycle A'. Ce signal apparaît comme un singulet et ne corrèle avec aucun autre proton en COSY. Enfin, les signaux H_{2'''}/H_{6'''} (7,57 ppm) et H_{3'''}/H_{5'''} (6,74 ppm) sont placés sur le système aromatique B'. Ces deux couples de deux protons identiques représentés chacun par un doublet intégrant pour deux protons avec une constante de couplage identique, égale à 8,8 Hz sont impérativement placés en position 2, 3, 5, 6 sur un cycle aromatique. Le spectre RMN ¹H présente enfin deux singulets correspondant à deux protons ne corrélant avec aucun signal en COSY. D'après leur déplacement chimique (6,76 et 6,72 ppm), ces signaux correspondraient à deux protons en position 3 et 3'' des deux monomères de flavones. Le spectre RMN ¹H correspond donc à celui d'un dimère de flavone. Le groupement OH en position 5 et 5'' est par ailleurs visible sur ce spectre dans le DMSO-d₆ respectivement à 12,92 et 13,05 ppm. L'analyse des spectres RMN ¹³C et 2D HSQC et HMBC nous a montré au travers des corrélations HMBC observées entre H_{6'} et C_{8''} d'une part et entre H_{2'} et C_{8''} d'autre part que la liaison entre les deux monomères est assurée par une liaison C_{3'}-C_{8''}. Ce composé a donc été identifié comme étant l'amentoflavone. Les données issues de l'analyse des spectres RMN 1D et 2D obtenues avec le composé **39** (annexe 8), présentées dans le tableau 15, sont en tous points conformes à celles présentées dans la littérature.

4.2. Détermination structurale des composés **40** et **41**

Les composés **40** et **41**, de formule brute C₃₁H₁₉O₁₀ et C₃₂H₂₂O₁₀, présentent des spectres RMN ¹H et ¹³C très proches de ceux obtenus pour **39** (tableau 15).

Pour le composé **40**, nous observons la perte d'un signal correspondant à un proton aromatique, et l'addition d'un singulet à 3,73 ppm correspondant à un groupement méthoxy. L'analyse des corrélations HSQC et HMBC qui mettent en avant la proximité du $^{13}\text{C}_{4''}$ avec les protons $\text{H}_{3''}$ et $\text{H}_{5''}$ à 6,88 ppm et avec le groupement méthoxy à 3,73 ppm nous a permis de placer avec certitude ce groupement en position $\text{C}_{4''}$. La structure de **40** a ainsi été déterminée comme celle de la podocarpusflavone A (figure 39).

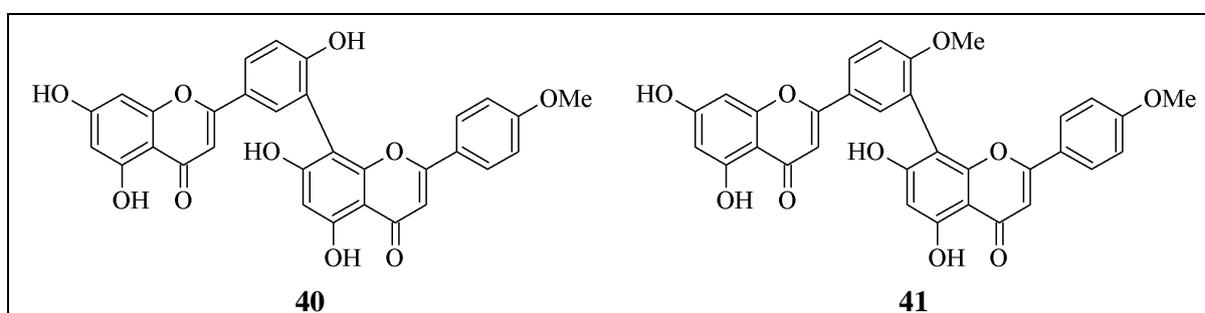


Figure 39. Structure de la podocarpusflavone A (**40**) et de l'isoginkgétine (**41**).

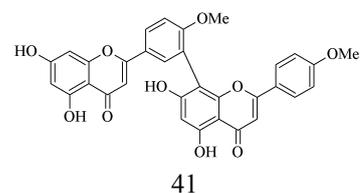
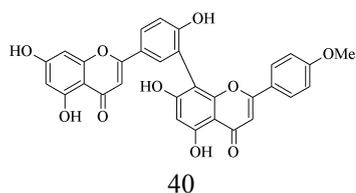
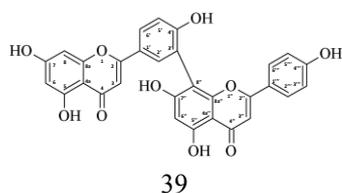
De même nous remarquons l'absence de deux signaux aromatiques manquant sur le spectre RMN ^1H de **41** par rapport à celui de l'amentoflavone (**39**) et la présence de deux signaux supplémentaires à 3,76 et 3,79 correspondant à deux méthoxy. L'analyse des corrélations HSQC et HMBC observées nous a permis de placer avec certitude ces groupements en position 4' et 4'' et la structure de **41** a ainsi été déterminée comme étant celle de l'isoginkgétine (figure 39).

Cette étude permet de confirmer la présence de l'amentoflavone (**39**) précédemment observée en CCM dans un extrait des feuilles de *D. balansae*²⁵⁶. L'isoginkgétine (**41**) avait été décrite au cours des mêmes travaux chez *D. nidulum* et *D. cupressinum* mais semblait absente chez *D. balansae*. La podocarpusflavone A

(40) est quant à elle décrite pour la première fois chez *D. balansae*. L'assignation de sa structure permet sans doute de préciser l'étude préalable qui décrivait la présence d'un dérivé de l'amentoflavone monométhoxylé. L'ensemble des données spectrales obtenues pour ces trois composés sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature^{259,260,261,262}.

Tableau 15. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenues pour les biflavonoïdes **39**, **40** et **41** dans le DMSO- d_6 (δ ppm, J (Hz)).

39			40			41		
H/C	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	163,6	-	163,2	-	164,2	-	163,1	-
3	103,6	6,76 s	103,5	6,78 s	103,2	6,84 s	103,2	6,84 s
4	182,1	-	182,1	-	182,0	-	182,0	-
4a	102,9	-	103,2	-	103,6	-	103,6	-
5	161,0	12,92 s	161,4	12,92 s	161,4	12,86 s	161,4	12,86 s
6	98,8	6,21 d (2,0)	98,7	6,19 s	98,9	6,21 s	98,9	6,21 s
7	161,4	-	161,4	-	161,8	-	161,8	-
8	94,0	6,46 d (2,0)	93,7	6,41 s	94,1	6,47 s	94,1	6,47 s
8a	157,4	-	157,5	-	157,4	-	157,4	-
1'	120,7	-	121,8	-	122,5	-	122,5	-
2'	127,7	7,99 d (2,0)	131,2	8,01 s	130,9	8,02 d (2,0 Hz)	130,9	8,02 d (2,0 Hz)
3'	121,0	-	122,4	-	121,5	-	121,5	-
4'	159,9	-	160,0	-	55,9/ 159,9	3,79 s	55,9/ 159,9	3,79 s
5'	116,4	7,17 d (8,8)	116,3	7,15 d (8,0)	111,8	7,35 d (8,4)	111,8	7,35 d (8,4)
6'	131,4	7,97 dd (2,0; 8,8)	127,5	7,97 m	128,4	8,15 d (8,4)	128,4	8,15 d (8,4)
1''	-	-	-	-	-	-	-	-
2''	163,9	-	163,5	-	163,1	-	163,1	-
3''	102,6	6,72 s	102,9	6,74 s	103,2	6,82 s	103,2	6,82 s
4''	181,7	-	181,7	-	181,7	-	181,7	-
4a''	104,0	-	104,1	-	103,6	-	103,6	-
5''	160,5	13,05 s	160,0	13,02	160,6	13,00 s	160,6	13,00 s
6''	98,8	6,42 s	99,2	6,39 s	98,7	6,44 s	98,7	6,44 s
7''	164,1	-	164,1	-	164,2	-	164,2	-
8''	103,7	-	103,8	-	103,6	-	103,6	-
8a''	154,9	-	154,9	-	154,4	-	154,4	-
1'''	121,4	-	122,6	-	122,8	-	122,8	-
2'''	128,2	7,57 d (8,8)	127,8	7,67 d (8,8)	128,2	7,59 d (8,4)	128,2	7,59 d (8,4)
3'''	115,7	6,74 d (8,8)	114,3	6,88 d (8,8)	114,5	6,91 d (8,4)	114,5	6,91 d (8,4)
4'''	162,6	-	55,4/ 161,1	3,73 s	55,5/ 162,2	3,76 s	55,5/ 162,2	3,76 s
5'''	115,7	6,74 d (8,8)	114,3	6,88 d (8,8)	114,5	6,91 d (8,4)	114,5	6,91 d (8,4)
6'''	128,2	7,57 d (8,8)	127,8	7,67 d (8,8)	128,2	7,59 d (8,4)	128,2	7,59 d (8,4)



5. Analyse structurale des phénols 42 et 43

5.1. Analyse des spectres UV et MS

Les composés **42** et **43**, isolés à partir de la partie ACN de l'extrait méthanolique des feuilles de *D. balansae*, présentent un spectre UV similaire avec un maximum d'absorption égal à 305 nm et possèdent la même formule brute ($C_{17}H_{18}O_3$) d'après les données fournies par la spectrométrie de masse (tableau 16).

Tableau 16. Données HRMS et masse molaire des stilbenoïdes (**42** et **43**) isolés à partir des feuilles de *D. balansae*.

Composé isolé	Formule brut de l'ion observé	Données HRMS	Valeurs théoriques	Formule brute et MM (g/mol)
42	$C_{17}H_{19}O_3$	$[M+H]^+ = 271,1332$	271,1329	$C_{17}H_{18}O_3$ 270
	$C_{17}H_{18}NaO_3$	$[M+Na]^+ = 293,1149$	293,1148	
43	$C_{17}H_{19}O_3$	$[M+H]^+ = 271,1329$	271,1329	

5.2. Détermination structurale du composé 42

Les dix huit protons attendus d'après l'analyse des spectres de masse de **42** sont retrouvés sur le spectre RMN 1H , tout comme les 17 carbones sur le spectre RMN ^{13}C . Neuf protons se trouvent dans la zone caractéristique des protons aromatiques (6-9 ppm) ou éthyléniques (4,5-7,6 ppm). Trois systèmes peuvent ensuite être distingués par l'analyse des constantes de couplages sur le spectre 1H et des corrélations COSY observées en RMN 2D (annexe 9). Le système A serait formé par trois signaux H_2 (6,73 ppm), H_4 (6,47 ppm) et H_6 (6,73 ppm) qui se présentent sous forme de doublet ou de triplet avec une constante de couplage de

2,0 Hz ce qui les placent respectivement en méta les uns par rapport aux autres sur un cycle aromatique. Le système B est formé par deux signaux correspondant à deux couples de protons identiques H_{2',6'} (6,94 ppm) et H_{3',5'} (7,48 ppm) se présentant tout deux sous forme d'un doublet avec une constante de couplage égale à 8,8 Hz. La valeur de cette constante de couplage et les corrélations visibles entre ces protons sur les spectres COSY nous permettent de placer ces protons en position 2, 3, 4 et 6 sur un cycle aromatique. Le troisième système est formé par les protons H_{1a} (6,93 ppm) et H_{2a} (7,11 ppm). Les signaux correspondant à ces deux protons se présentent sous la forme de deux doublets avec une constante de couplage égale à 16,0 Hz, une valeur caractéristique des protons *trans*-éthyléniques. Trois autres signaux se trouvent dans la région caractéristique des groupements méthoxy (3-4 ppm). L'analyse des spectres RMN 2D HSQC et HMBC met en évidence l'union des deux cycles A et B par une liaison *trans*-éthylénique comprenant les protons H_{1a} et H_{2a}, et de placer les trois groupements méthoxy en position C₃, C₅ et C₄. L'analyse des données spectrales de **42** (tableaux 16 et 17) nous a alors permis d'identifier la structure de ce composé comme étant celle de la *trans*-3,5,4'-triméthoxystilbène (figure 40).

5.3. Détermination structurale du composé 43

Les spectres RMN ¹H et ¹³C obtenu avec **43** varient très peu de ceux obtenus avec **42**. Seule la valeur de la constante de couplage entre H_{1a} et H_{2a} (12,4 Hz) est plus faible. Or cette valeur est caractéristique des protons engagés dans une liaison *cis*-éthylénique. Ainsi la structure de **43** fut identifiée comme celle de la *cis*-3,5,4'-triméthoxystilbène (figure 40).

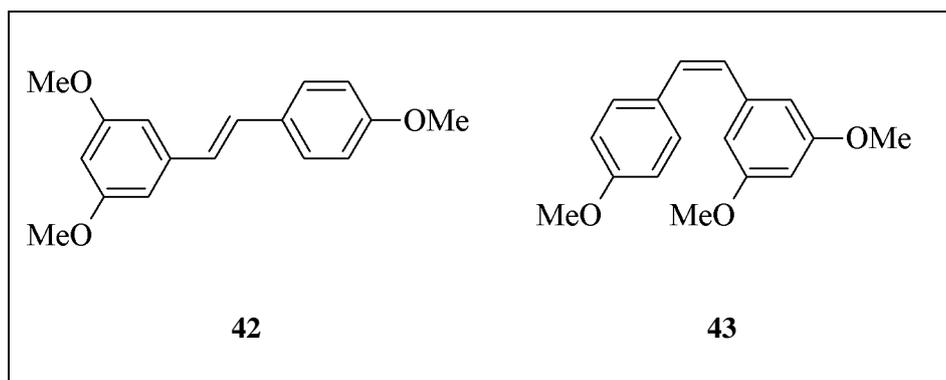
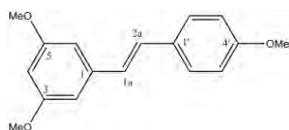


Figure 40. Structure de la *trans*-3,5,4'-triméthoxystilbène (**42**) et de la *cis*-3,5,4'-triméthoxystilbène (**43**).

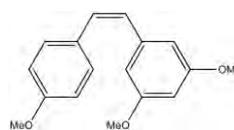
Ces deux dérivés de stilbènes, déjà décrits dans d'autres gymnospermes²⁶³, sont décrits pour la première fois dans une espèce de la famille des Podocarpaceae. L'ensemble des données spectrales décrites ici sont en accord avec celles retrouvées dans la littérature²⁶⁴.

Tableau 17. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenues pour les composés **42** et **43** dans le CDCl_3 (δ ppm, J (Hz)).

42			43	
H/C	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	139,8	-	139,6	-
2	104,5	6,73 d (2,0)	106,9	6,57 d (2,0)
3	161,1	-	160,9	-
$\text{C}_3\text{-O-CH}_3$	55,4	3,86 s	55,2	3,75 s
4	99,7	6,47 t (2,0)	100,0	6,45 t (2,0)
5	161,1	-	160,9	-
$\text{C}_5\text{-O-CH}_3$	55,4	3,86 s	55,2	3,75 s
6	104,5	6,73 d (2,0)	106,9	6,57 d (2,0)
1a	126,7	6,93 d (16,0)	126,7	6,53 d (12,4)
2a	128,8	7,11 d (16,0)	128,8	6,63 d (12,4)
1'	130,0	-	139,6	-
2'	114,2	6,94 d (8,8)	113,7	6,87 d (8,8)
3'	127,9	7,48 d (8,8)	130,3	7,32 d (8,8)
4'	159,5	-	158,9	-
$\text{C}_{4'}\text{-O-CH}_3$	55,3	3,83 s	55,2	3,83 s
5'	127,9	7,48 d (8,8)	130,3	7,32 d (8,8)
6'	114,2	6,94 d (8,8)	113,7	6,87 d (8,8)



42



43

6. Analyse structurale des stérols 44, 45 et 46

Trois stérols (**44**, **45** et **46**) ont été isolés à partir de la partie hexanique de l'extrait brut méthanolique des feuilles de *D. balansae*.

6.1. Analyse des spectres UV et MS

Alors que le spectre UV des composés **44**, **45** et **46** nous apportent peu d'information structurale ($\lambda_{\max} = 200$ nm), l'analyse des spectres de masse obtenus avec ces composés nous a permis de déterminer leur formule brute (tableau 18). Ces informations nous indiquent qu'il s'agit probablement de trois dérivés du stérol (**47**).

Tableau 18. Données de spectrométrie de masse (MS) obtenues par l'analyse des composés **44**, **45** et **46**.

Composé isolé	Formule brute de l'ion observé	Données SM	Formule brute et MM (g/mol)
44	$C_{29}H_{49}O_2$	$[M+H]^+ = 429.7$	
	$C_{29}H_{48}O_2Na$	$[M+Na]^+ = 451.6$	$C_{29}H_{48}O_2$
45	$C_{29}H_{49}O_2$	$[M+H]^+ = 429.7$	428
	$C_{29}H_{48}O_2Na$	$[M+Na]^+ = 451.6$	
46	$C_{29}H_{51}O$	$[M+H]^+ = 415.6$	$C_{29}H_{50}O$
			414

La structure de ces composés est basée sur celle du stérane sur lequel est incéré un groupement hydroxyle en position 3 (figure 41). Le noyau stérol, de formule brute $C_{17}H_{28}O$ possède quatre cycles (A, B, C et D) comptabilisés dans le

calcul du nombre d'insaturations des stérols.

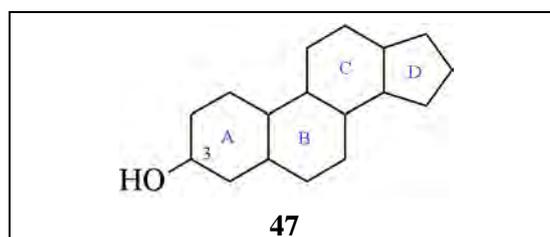


Figure 41. Structure du stérol (47).

Les composés **44** et **45** présentent la même formule brute ($C_{29}H_{48}O_2$) impliquant la présence de six insaturations dans la molécule. **46**, de formule brute $C_{29}H_{50}O$ possède quant à lui cinq insaturations. La structure finale de ces trois stérols fut déterminée par l'analyse des spectres RMN 1H et ^{13}C , dont les données sont présentées dans le tableau 19, et des spectres RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC).

6.2. Détermination structurale du composé 44

Le spectre RMN 1H obtenu pour le composé **44** présente un singulet à 5,81 ppm, caractéristique d'un proton éthylénique isolé. Les corrélations HSQC et HMBC nous permettent de placer ce proton directement à côté du C_3 , qui forme un signal à 200,6 ppm, caractéristique d'une cétone. Le spectre RMN 1H de ce composé présente aussi un triplet ($j = 2,6$ Hz) à 4,34 ppm, caractéristique d'un CH-OH. Les corrélations HMBC entre le signal d'un ^{13}C dans la zone des carbones éthyléniques à 168,6 ppm avec le triplet à 4,34 ppm d'une part et le singulet à 5,81 ppm d'autre part, nous permet d'assigner au proton 4,34 ppm la position 6 sur le noyau stérol. Les autres signaux correspondant aux protons de **44** se trouvent dans la région des protons aliphatiques (0-2 ppm). Parmi ces signaux, six groupements méthyles ont

été placés sur la structure par l'analyse des corrélations observées en RMN 2D. L'ensemble des données structurales de **44** a permis de déterminer la structure de ce composé comme étant celle de la 6-hydroxystigmast-4-èn-3-one (figure 42).

6.3. Détermination structurale du composé 45

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C obtenus pour **45** mettent en évidence la présence d'un proton éthylénique caractérisé par un doublet à 5,68, placé en position 6, à proximité d'un ^{13}C à 207,1 portant une cétone et placé en position 7 suite à l'analyse des corrélations HMBC. Pour les stérols, le triplet observé à 3,80 ppm est caractéristique du proton placé sur le C_3 portant un groupement hydroxyle^{265,266}. L'ensemble des données structurales de **45**, très proches de celles obtenues avec **44** (tableau 19), a rendu possible l'identification de ce composé comme étant la 3-hydroxystigmast-5-èn-7-one (figure 42).

6.4. Détermination structurale du composé 46

Pour finir, le composé **46** est différencié de **45** par le signal correspondant au H_3 , qui dans cette molécule se présente sous la forme d'un multiplet entre 3,46 et 3,56 ppm. Ceci traduit l'absence de double liaison en position 4. L'ensemble des données structurales relatives à **46** nous a permis d'identifier ce produit comme étant le β -sitostérol (figure 42).

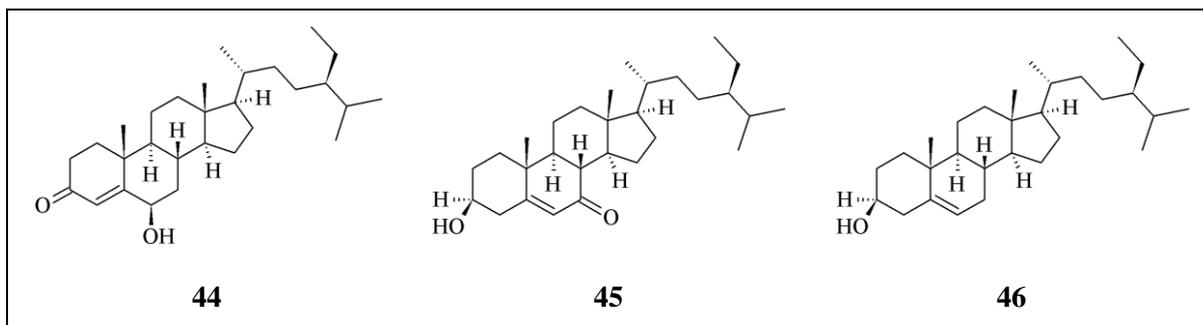
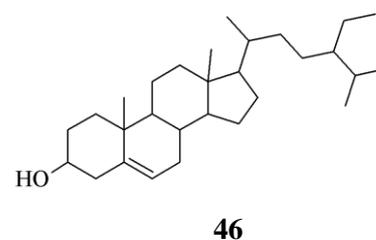
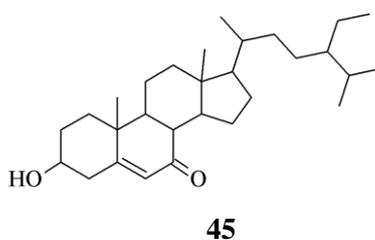
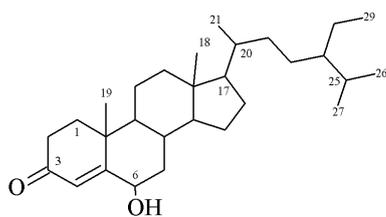


Figure 42. Structure de la 6-hydroxystigmast-4-èn-3-one (**44**), de la 3-hydroxystigmast-5-èn-7-one (**45**) et du β -Sitostérol (**46**).

Ces trois stérols, décrits précédemment dans le règne végétal, sont isolés pour la première fois dans le genre *Dacrydium*. Les données issues de l'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C , ayant permis l'identification des composés **44**, **45** et **46**, présentées dans le tableau 19, sont en accord avec les données de la littérature^{267,268,269}.

Tableau 19. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenues pour les composés **44**, **45** et **46** dans le CDCl_3 (δ ppm, J (Hz)).

44			45		46	
H/C	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	37,2		36,5		37,2	
2	34,4	2,33-2,57 m	31,3	2,33-2,53 m	31,6	2,24-2,35 m
3	200,6		70,7	3,80 t (11,3)	71,7	3,46-3,56 m
4	126,5	5,81 s	41,9		42,3	
5	168,6		165,2		140,8	
6	73,4	4,34 t (2,6)	126,2	5,68 d (1,3)	121,6	5,38 d (5,2)
7	38,7		207,1		32,0	
8	29,9		45,5		32,0	
9	53,7		50,1		50,1	
10	38,1		38,4		36,1	
11	21,1		21,3		21,1	
12	39,7		38,9		39,8	
13	42,6		43,3		42,3	
14	56,0		50,0		56,7	
15	24,3		26,4		24,3	
16	28,3		28,6		28,2	
17	56,2		54,9		56,0	
18	12,2	0,69 s	12,1	0,68 s	12,0	0,68 s
19	20,0	1,37 s	17,4	1,19 s	19,4	1,04 s
20	36,3	-	36,2	-	36,2	-
21	18,9	0,92 d (6,5)	18,9	0,92 d (6,5)	18,7	0,92 d (6,5)
22	34,0	-	-	-	33,9	-
23	26,2	-	-	-	26,1	-
24	46,0	-	-	-	45,8	-
25	29,3	-	-	-	29,1	-
26	19,7	0,83 d (7,0)	20,0	0,83 d (7,0)	19,8	0,83 d (6,5)
27	19,2	0,81 d (7,0)	19,1	0,81 d (7,0)	19,0	0,80 (d (6,6)
28	23,2	-	23,3	-	23,0	-
29	12,1	0,85 t (8,0)	12,1	0,85 d (4,5)	11,9	0,84 t (7,2)



7. Activité biologique des composés isolés

Suite à leur identification structurale, nous avons cherché à caractériser le potentiel pharmacologique de chaque composé isolé de *D. balansae* en vue de sélectionner parmi ces composés les meilleurs candidats médicaments spécifiquement actifs contre le DV.

7.1. Potentialités antivirales

7.1.1. Activité contre la DV-NS5

Les résultats obtenus lors de cette étude sont présentés dans le tableau 20. Les molécules isolées ont été dans un premier temps testées en triplicata contre la DV-NS5 RdRp à 10 µg/mL, puis les CI_{50} sur la DV-NS5 RdRp et sur la DV-NS5 totale (constituée par les domaines N-terminal, RdRp, et C-terminal, méthyltransférase) ont été déterminées pour chaque composé. Comme le montre le tableau 20, les trois biflavonoïdes testées (**39**, **40** et **41**) sont les inhibiteurs les plus puissants, à la fois contre la DV-NS5 RdRp et la DV-NS5 totale, avec une CI_{50} inférieure ou égale à 3.1 et 5.3 µM respectivement.

7.1.2. Activité contre d'autres polymérases virales

Afin d'évaluer la spécificité d'action des inhibiteurs potentiels du DV, l'activité inhibitrice des composés isolés à partir des feuilles de *D. balansae* a été évaluée contre les polymérases de trois autres virus plus ou moins distant du DV dans la

taxonomie. Les CI_{50} des produits purs sur la NS5 du virus de West Nile (WNV-NS5), un autre virus du genre Flavivirus, sont proches de celles mesurées sur la DV-NS5 totale. Ici encore, les biflavonoïdes sont les meilleurs inhibiteurs testés (tableau 20). Par opposition, les composés testés ne présentent qu'une faible inhibition de l'activité de la BVDV-NS5 ($CI_{50} > 50 \mu M$) et ne présentent pas d'inhibition significative de la réplication du virus de l'hépatite C (HCV). Le test d'activité contre les polymérases issues de différents Flaviviridæ nous montre que l'activité inhibitrice des composés isolés par le fractionnement bioguidé contre la DV-NS5 de *D. balansae* décroît significativement lorsque le test est effectué contre des virus de plus en plus distant du DV dans la phylogénie. Comme la littérature a montré que la phylogénie de cette famille de virus peut être directement reliée à la séquence génomique codant pour la NS5²⁷⁰, les résultats obtenus ici nous indiquent une bonne spécificité d'action des biflavonoïdes contre l'ARN polymérase du DV.

Tableau 20. Activité inhibitrice des composés isolés des feuilles de *D. balansae* contre la DV-NS5 et contre d'autre NS5 issus de trios autres Flaviviridæ.

Composés	Inhibition (%) de la DV NS5 RdRp à 10 µg/mL	CI ₅₀ (µM) de la DV NS5 RdRp ^b	CI ₅₀ (µM) de la DV NS5 ^c	CI ₅₀ (µM) de la WNV NS5 ^d	CI ₅₀ (µM) de la BVDV NS5
39	100 ±3	1,40 ±0,09	3.10 ±0,09	4,3 ±0,4	>50
40	92 ±13	0,75 ±0,03	1,40 ±0,14	3,0 ±0,5	>50
41	93 ±10	3,12 ±0,09	5,30 ±0,25	4,4 ±0,3	>50
42	75 ±1	14,4 ±2,2	>50	>120	>50
43	48 ±8	18,5 ±3,7	>50	>120	>50
44	60 ±13	28,0 ±8,6	ND	>120	>50
45	95 ±3	7,9 ±0,9	ND	57,7 ±9,3	>50
46	32 ±18	ND	ND	ND	ND

Légende : ND: non déterminé ; ^aPourcentage d'inhibition de la Dengue-2 NS5 RNA dépendante RNA polymérase par les composés isolés de *D. balansae* à 10 µg/mL ; ^bCI₅₀ de la Dengue 2 NS5 RNA dépendante RNA polymérase ; ^cCI₅₀ de la Dengue 2-NS5 (domaines RdRp et méthyl-transférase) ; ^dCI₅₀ de la NS5 du virus de West Nile ; ^eCI₅₀ de la NS5 du virus de la diarrhée virale du bovin).

7.1.3. Inhibition de l'activité de la DV-NS5 dans deux réplicons

L'activité d'inhibition de la DV-NS5 fut également mesurée dans un contexte cellulaire, sur des réplicons COS-DV et BHK-DV. L'amentoflavone (**39**) et la podocarpusflavone A (**40**) sont les seuls composés testés ayant montré une inhibition significative de la polymérase virale de 24% pour des concentrations respectives comprises entre 18 et 45 µM pour **39** et entre 1,8 et 18 µM pour **40**. Le manque de réponse dose dépendante observée avec ces deux molécules est attribué aux problèmes de solubilités rencontrés avec les flavonoïdes dans les solvants aqueux. Des modifications structurales par hémisynthèse, précédemment

décrites pour d'autres flavonoïdes, pourraient être tentées pour remédier à ce problème²⁷¹. Par ailleurs, d'autres études portant sur l'activité biologique des biflavonoïdes ont montré que ces composés peuvent traverser les barrières cellulaires²⁶⁰ ce qui devra être évalué sur des cellules infectées par le DV.

7.2. Cytotoxicité

Afin de compléter l'évaluation des potentialités antivirales des composés isolés, la cytotoxicité de ces 8 molécules a été évaluée contre deux lignées cellulaires saines utilisées pour la préparation des réplicons : des cellules COS (Cellules rénales de hamster) et des cellules BHK (Cellules rénales de hamster). Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 21.

Tableau 21. Concentration létale pour 50 % (CL₅₀) des cellules COS et BHK des composés isolés de *D. balansae* (ND: non déterminé).

Composés	CL ₅₀ (µM) contre les cellules COS	CL ₅₀ (µM) contre les cellules BHK
39	46,5	46,5
40	22,6	22,6
41	8,8	3,5
44	5,8	2,9
42	18,5	7,4
43	18,5	7,4
45	5,8	9,3
46	ND	ND

Les biflavonoïdes **39** et **40** ne présentent pas de cytotoxicité significative ($CL_{50} > 20 \mu\text{M}$). En revanche, **41** est considéré cytotoxique au cours de nos travaux ($CL_{50} = 8,8$ et $3,5 \mu\text{M}$ sur les cellules COS et BHK). Les deux dérivés de stilbènes **42** et **43** sont également cytotoxiques contre les cellules BHK ($CL_{50} = 7,4 \mu\text{M}$). Les deux stérols testés présentent également un caractère cytotoxique : **44** présente une CL_{50} égale à $5,8$ et $2,9 \mu\text{M}$ sur les cellules COS et BHK) alors que **45** présente une CL_{50} égale à $5,8$ et $9,3 \mu\text{M}$ sur ces mêmes lignées cellulaires.

L'ensemble des résultats obtenus avec les composés isolés des feuilles de *D. balansae* nous a permis de révéler le fort potentiel antidengue des biflavonoïdes dérivés de l'amentoflavone, et particulièrement celui de la podocarpusflavone A (**40**).

8. Etude des biflavonoïdes des feuilles de *D. araucarioïdes*

Suite à la caractérisation du fort potentiel antidengue des biflavonoïdes majoritaires de *D. balansae*, nous nous sommes intéressés à ces composés présents dans les feuilles de *D. araucarioïdes*. L'extrait brut des feuilles de *D. araucarioïdes* avait montré, tout comme celui de *D. balansae*, une forte inhibition de l'activité de la DV-NS5 RdRp lors du criblage préliminaire (cf. partie 2). Un extrait total des biflavonoïdes a donc été préparé en suivant le même protocole que pour l'étude des feuilles de *D. balansae*: l'extrait méthanolique obtenu par macération de la poudre de 1200 g de feuilles séchées et broyées de *D. araucarioïdes* fut donc soumis à un fractionnement liquide-liquide à l'issue duquel, les biflavonoïdes sont concentrés dans la partie DCM (20 g). Cet extrait est séparé sur colonne de silice à l'aide du système S13 pour donner dix fractions. F3 (300 mg), est refractionnée sur une colonne de Séphadex LH-20 à l'aide du système d'élution S6 pour donner cinq fractions. F3.3 (m= 40 mg) est alors fractionnée par HPLC préparative à l'aide du système d'élution S14 pour obtenir les composés **48** (14,9 mg) et **49** (3,7 mg). F5 (1,8 g) est fractionnée sur une colonne de silice éluee par S15 pour donner huit fractions (F5.1-F5.8). La séparation de F5.2 (45 mg) par HPLC-préparative en utilisant le système S16 nous amène alors à isoler les composé **50** (22,2 mg) et **51** (3,8 mg). F5.6 (m= 28 mg) est également séparée par HPLC préparative en utilisant le système S16 pour donner les composés **52** (3,1 mg) et **53** (0,7 mg). Un échantillon de 500 mg de F7 (2,0 g) est séparé sur une colonne de séphadex LH-20 pour donner cinq fractions (F7.1-F7.5). F7.3 (70 mg) est alors fractionnée par HPLC préparative à l'aide du système d'élution S17 pour donner le composé **39** (35,6 mg), précédemment isolé des feuilles de *D. balansae*, et **54** (6,4 mg). Chaque composé fut alors purifié par HPLC préparative et leur structure déterminée par l'analyse des spectres UV, SM et RMN comme cela est présenté ci-dessous.

8.1. Détermination structurale des biflavones isolées de *D. araucarioides*

Sept nouveaux biflavonoïdes dérivés de l'amentoflavone ont été isolés à partir des feuilles de *D. araucarioides* et identifiés par l'analyse de leurs spectres UV/MS et RMN. Leur spectre UV est identique à celui des dérivés de l'amentoflavone isolés de *D. balansae* et les données de la spectroscopie de masse, résumées dans le tableau 22, nous confirme qu'il s'agit de 7 bi-apigénines.

Tableau 22. Données HRMS et masse molaire des flavonoïdes isolées à partir des feuilles de *D. araucarioides*.

Composé isolé	Formule brute de l'ion observé	Données HRMS	Valeurs théoriques	Masse moléculaire (g/mol)
48	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀	[M-H] ⁻ = 537.0831	537,0827	566
49	C ₃₃ H ₂₃ O ₁₀	[M-H] ⁻ = 579.1295	579,1297	580
50	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀	[M-H] ⁻ = 537.0831	537,0827	538
51	C ₃₁ H ₁₉ O ₁₀	[M-H] ⁻ = 551.0978	551,0984	552
52	C ₃₁ H ₁₉ O ₁₀	[M-H] ⁻ = 551.0980	551,0984	552
53	C ₃₁ H ₁₉ O ₁₀	[M-H] ⁻ = 551.0981	551,0984	552
54	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀	[M-H] ⁻ = 537.0823	537,0827	538

L'amentoflavone (**39**) avait déjà été isolé à partir des feuilles de *D. balansae*. L'ensemble des données spectrales relatives à ce composé sont en tous points identiques aux données présentées dans le tableau 15. Cinq autres dérivés de l'amentoflavone, dont la structure est présentée dans la figure 43, ont été identifiés comme étant respectivement la ginkgétine (**48**), la sciadopitysine (**49**), la séquoiaflavone (**51**), la bilobétine (**52**) et la sotetsuflavone (**53**) sur la base des

données spectrales présentées ci-dessous. L'analyse des corrélations HSQC et HMBC a permis, comme précédemment pour les composés **40** et **41** de placer avec certitude les substituants de ces dérivés ici encore constitués par des groupements méthyle. Les données RMN ^1H et ^{13}C présentées dans le tableau 23 sont en accord avec les valeurs présentées dans la littérature^{255,259,272}.

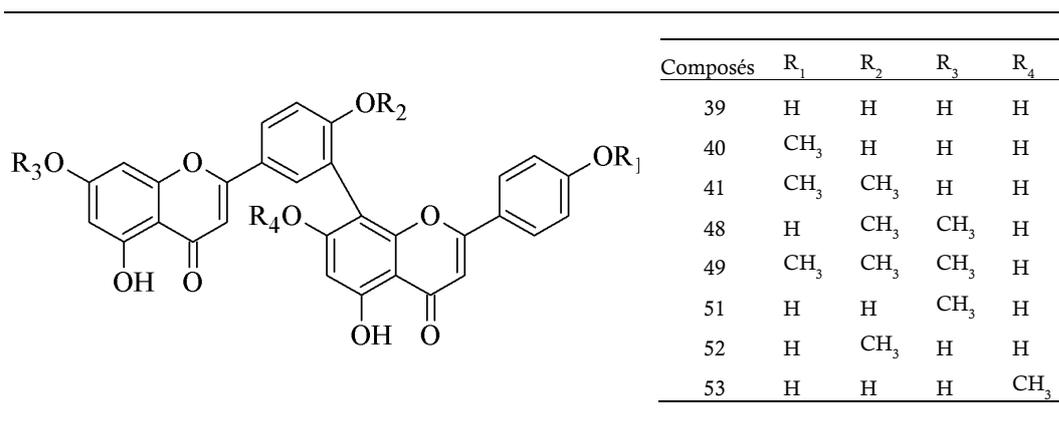


Figure 43. Structure des dérivés de l'amentoflavone isolés de *D. balansae* et *D. araucarioides*.

Deux biflavonoïdes (**50** et **54**) présentent un squelette différent. La structure de ces composés, présentée dans la figure 44, fut comme précédemment, déterminée par l'analyse des spectres de masse et RMN 1D et 2D. Ces données, présentées dans le tableau 24, sont en tous points conformes à celles présentées dans la littérature pour l'hinokiflavone (**50**) et la robustaflavone (**54**)²⁵⁹.

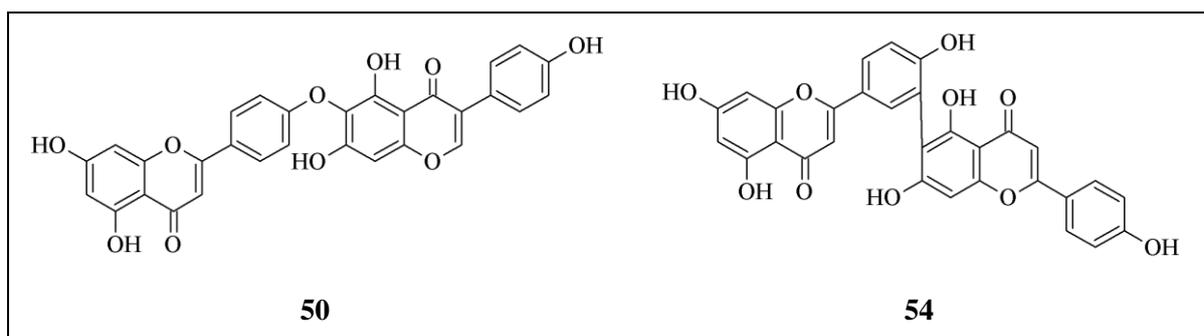


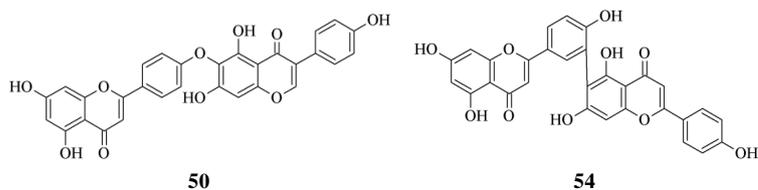
Figure 44. Structure de l'hinokiflavone (**50**) et de la robustaflavone (**54**).

Tableau 23. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenues pour les dérivés de l'amentoflavone **48**, **49**, **51**, **52** et **53**, dans le DMSO-D_6 et pour la perméthylamentoflavone **55** dans le CDCl_3 (δ ppm, J (Hz)).

	48		49		51		52		53		55	
H/C	^{13}C	^1H										
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	163,5	-	163,7	-	164,0	-	163,8	-	164,7	-	162,2	-
3	103,8	6,93 s	103,9	6,93 s	103,1	6,87 s	103,7	6,91 s	102,5	6,82 s	Ø	6,91 s
4	182,0	-	182,0	-	182,1	-	181,6	-	181,7	-	179,2	-
4a	104,8	-	104,8	-	104,6	-	103,9	-	104,0	-	108,2	-
5	161,2	12,89 s	161,1	12,89 s	161,0	12,93 s	161,2	12,92 s	161,4	12,92 s	160,5	-
5-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56,2	4,03 s
6	98,2	6,31 s	98,2	6,32 s	98,1	6,32 s	99,1	6,20 s	98,5	6,18 s	96,6	6,38 d (2,0)
7	165,2	-	165,2	-	165,1	-	164,5	-	161,4	-	164,8	-
7-OMe	56,0	3,78 s	56,1	3,79 s	56,1	3,80 s	-	-	-	-	55,4	3,86 s
8	92,8	6,71 s	92,8	6,72 s	92,6	6,75 s	94,2	6,49 s	93,5	6,46 s	91,9	6,54 d (2,0)
8a	157,4	-	157,4	-	157,3	-	157,2	-	157,3	-	156,2	-
1'	122,0	-	119,9	-	120,8	-	124,0	-	121,0	-	122,9	-
2'	131,0	8,07 d (1,8)	131,0	8,05 d (1,8)	131,4	8,02 s	130,9	8,06 s	127,9	7,99 m	128,1	7,89 d (1,9)
3'	122,4	-	122,4	-	121,3	-	123,8	-	121,0	-	122,0	-
4'	160,7	-	160,6	s	159,6	-	160,5	-	159,4	-	161,1	-
4'-OMe	56,1	3,79 s	56,0	3,79 s	-	-	56,0	3,76 s	-	-	55,9	3,78 s
5'	111,8	7,32 d (8,8)	111,8	7,33 d (8,6)	116,1	7,17 d (8,0)	111,8	7,35 d (8,5)	115,9	7,15 d (8,6)	111,2	7,16 d (8,8)
6'	128,3	8,15 d (8,8)	128,3	8,16 d (8,6)	127,9	8,03 m	128,3	8,18 d (8,5)	130,9	7,99 m	130,8	8,00 dd (1,9; 8,8)
1''	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2''	163,7	-	163,0	-	163,6	-	164,2	-	164,6	-	162,5	-
3''	102,5	6,75 s	103,2	6,83 s	102,5	6,77 s	102,7	6,79 s	102,5	6,82 s	Ø	6,88 s
4''	182,0	-	182,0	-	181,9	-	181,9	-	181,7	-	179,3	-
4a''	103,3	-	103,4	-	103,9	-	103,6	-	104,0	-	108,2	-
5''	160,7	13,08 s	161,1	13,03 s	160,5	13,08 s	160,4	13,09 s	161,3	13,08 s	160,5	-
5''-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56,2	4,03 s
6''	98,8	6,39 s	98,8	6,40 s	98,5	6,42 s	98,7	6,41 (s)	94,8	6,65 s	92,8	6,57 s
7''	162,6	-	162,5	-	164,0	-	161,6	-	162,7	-	160,8	-
7''-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	56,2	3,84 s	56,2	4,06 s
8''	103,7	-	103,9	-	103,6	-	103,8	-	105,1	-	107,5	-
8a''	154,4	-	154,4	-	154,4	-	154,3	-	Ø	-	Ø	-
1'''	121,2	-	122,9	-	119,9	-	121,6	-	121,3	-	123,1	-
2'''	128,0	7,48 d (8,6)	127,8	7,57 d (8,8)	128,1	7,55 d (8,6)	127,9	7,50 d (8,8)	127,2	7,56 d (8,0)	127,7	7,41 d (9,0)
3'''	115,9	6,73 d (8,6)	114,6	6,90 d (8,8)	115,7	6,73 d (8,6)	115,8	6,72 d (8,8)	115,6	6,71 d (8,0)	114,5	6,81
4'''	161,2	-	162,2	-	161,8	-	159,6	-	162,4	-	161,9	-
4'''-OMe	-	-	55,5	3,76 s	-	-	-	-	-	-	55,9	3,78 s
5'''	115,9	6,73 d (8,6)	114,6	6,90 d (8,8)	128,1	7,55 d (8,6)	115,8	6,72 d (8,8)	115,6	6,71 d (8,0)	114,5	6,81 d (9,0)
6'''	128,0	7,48 d (8,6)	127,8	7,57 d (8,8)	115,7	6,73 d (8,6)	127,9	7,50 d (8,8)	127,2	7,56 d (8,0)	127,7	7,41 (d (9,0))

Tableau 24. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenus par l'analyse de l'hinokiflavone (**50**) et de la robustaflavone (**54**) dans le $\text{DMSO}-d_6$ (δ ppm, J (Hz)).

50			54	
H/C	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	-	-	-	-
2	163,1	-	163,7	-
3	103,9	6,86 s	102,9	6,77 s
4	181,7	-	181,8	-
4a	103,8	-	103,7	-
5	161,4	12,89 s	161,5	12,99 s
6	98,9	6,20 d (1,9)	98,8	6,19 d (1,8)
7	164,2	-	164,1	-
8	94,0	6,49 d (1,9)	94,4	6,48 d (1,8)
8a	157,3	-	157,4	-
1'	124,1	-	120,9	-
2'	128,4	8,01 d (9,0)	130,9	7,79 d (1,8)
3'	115,3	7,04 d (9,0)	121,2	-
4'	160,6	-	159,6	-
5'	115,3	7,04 d (9,0)	116,0	7,05 d (8,6)
6'	128,4	8,01 d (9,0)	127,6	7,91 dd (1,8; 8,6)
1''	-	-	-	-
2''	165,5	-	163,9	-
3''	102,6	6,86 s	102,9	6,80 s
4''	182,1	-	181,9	-
4a''	104,2	-	103,6	-
5''	153,1	13,21 s	159,1	13,22 s
6''	124,6	-	108,9	-
7''	157,1	-	162,1	-
8''	94,6	6,74 s	94,1	6,65 s
8a''	153,7	-	154,4	-
1'''	121,1	-	121,2	-
2'''	128,6	7,97 d (9,0)	128,6	7,95 d (8,8)
3'''	116,0	6,94 d (9,0)	116,0	6,95 d (8,8)
4'''	161,3	-	161,2	-
5'''	116,0	6,94 d (9,0)	116,0	6,95 d (8,8)
6'''	128,6	7,97 d (9,0)	128,6	7,95 d (8,8)



9. Etude des relations structure-activité des biflavonoïdes contre la DV-NS5 RdRp

Le fractionnement bioguidé de l'extrait des feuilles de *D. balansae* nous a mené à l'isolement de trois biflavonoïdes ayant montré une forte activité inhibitrice spécifique de la réplicase virale du DV. Ces biflavonoïdes sont l'amentoflavone (**39**) et deux dérivés mono- et di-méthylés de l'amentoflavone (**40** et **41**). Les variations de l'activité biologique corrélées aux variations structurales de ces trois composés suggèrent l'importance du nombre et de la position des groupements méthyles sur l'amentoflavone. **40**, le dérivé mono-méthylé en position 4'' de l'amentoflavone est jusqu'ici le composé le plus actif contre la DV-NS5 RdRp. Afin de mieux comprendre les relations structure-activité des biflavonoïdes contre la DV-NS5 RdRp, nous avons comparé l'activité biologique des différents dérivés de l'amentoflavone ainsi que deux biflavonoïdes présentant un squelette différent, l'hinokiflavone (**50**) et la robustaflavone (**54**) nouvellement isolés des feuilles de *D. araucarioïdes*. Nous avons complété cette étude par l'évaluation biologique de l'amentoflavone perméthylée (**55**), préparée par hémisynthèse et de la cupressuflavone (**56**). Enfin nous avons mesuré l'activité d'inhibition de la DV-NS5 RdRp de l'apigénine (**57**), monomère constitutif des biflavonoïdes, et de quatre dérivés mono-, di- et perméthylés (**58-61**) de ce composé ainsi que six autres flavonoïdes structurellement proches de l'apigénine (**62-67**). Les figures 45, 46 et 47 présentent les structures des différents flavonoïdes testées ainsi que l' IC_{50} ou le pourcentage d'inhibition à 50 μ M (pour les composés moins actifs) de la DV2-NS5 RdRp mesurée pour ces composés.

9.1. Comparaison de l'activité biologique de quatre biflavonoïdes simples

Les trois biflavonoïdes non méthoxylés (**39**, **50** et **54**) isolés des *Dacydium spp.* présentent, comme le montre la figure 45, une forte activité d'inhibition de la DV-NS5 RdRp (CI_{50} comprises entre 0,26 et 1,3 μM). En revanche, la cupressuflavone commerciale présente une activité significativement moindre ($CI_{50} > 5\mu\text{M}$). L'hinokiflavone est le plus puissant inhibiteur de la réplicase virale mais ce composé est cytotoxique contre les cellules COS et BHK ce qui confirme les résultats précédemment obtenus sur d'autres lignées cellulaires^{273,274}. La robustaflavone (**54**) ne semble pas avoir une activité spécifique contre la réplicase du DV étant donné qu'une étude précédente a déjà mis en évidence l'inhibition de la réplication de l'ADN du virus de l'hépatite B et des virus de la grippe A et B par ce composé^{275,276,277}. En revanche, l'amentoflavone semble avoir, comme nous l'avons vu plus haut, une activité spécifique contre la DV-NS5.

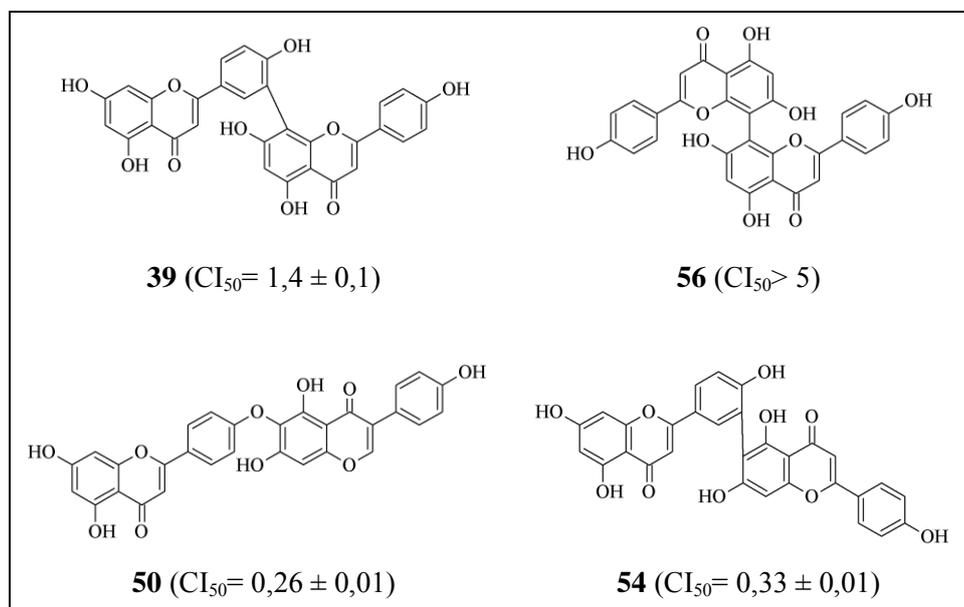


Figure 45. Concentration inhibant 50% de l'activité de la DV2-NS5 RdRp (μM) des quatre biapigénines distinguées par la liaison entre les deux monomères : amentoflavone (**39** : C3'-C8''), Cupressuflavone (**56** : C8-C8''), hinokiflavone (**50** : C4'-O-C6'') et robustaflavone (**54** : C3'-C6'').

9.2. Modulation de l'activité contre la DV-NS5 RdRp par les groupements méthyles sur l'amentoflavone

La concentration inhibant 50% de l'activité de la DV-NS5 RdRp par les sept dérivés de l'amentoflavone isolés des *Dacydium spp* ainsi que l'hexaméthylamentoflavone préparé par hémisynthèse fut ensuite comparée. Les résultats de cette étude présentés dans la figure 46 nous confirment que le nombre et la position des méthylations sur l'amentoflavone modifient significativement l'activité de celle-ci. Ainsi, les composés monométhylés (**40**, **51**, **52** et **53**), présentent tous une inhibition supérieure à celle de l'amentoflavone. La méthylation des OH en positions 7 et 7" sont les plus favorables à l'inhibition de la DV-NS5 RdRp d'après les résultats observés pour **53** ($CI_{50} = 0,16 \mu M$) et **51** ($CI_{50} = 0,46$). L'effet de l'addition de groupements méthyles supplémentaires, qui modifie certainement les capacités de ces composés à établir des liaisons hydrogènes avec la polymérase virale ainsi que leur polarité, a été évaluée par le test des composés **41**, **48**, **49** et **55**. Une baisse de l'activité est alors observée pour tous ces composés en comparaison avec les dérivés monométhylés.

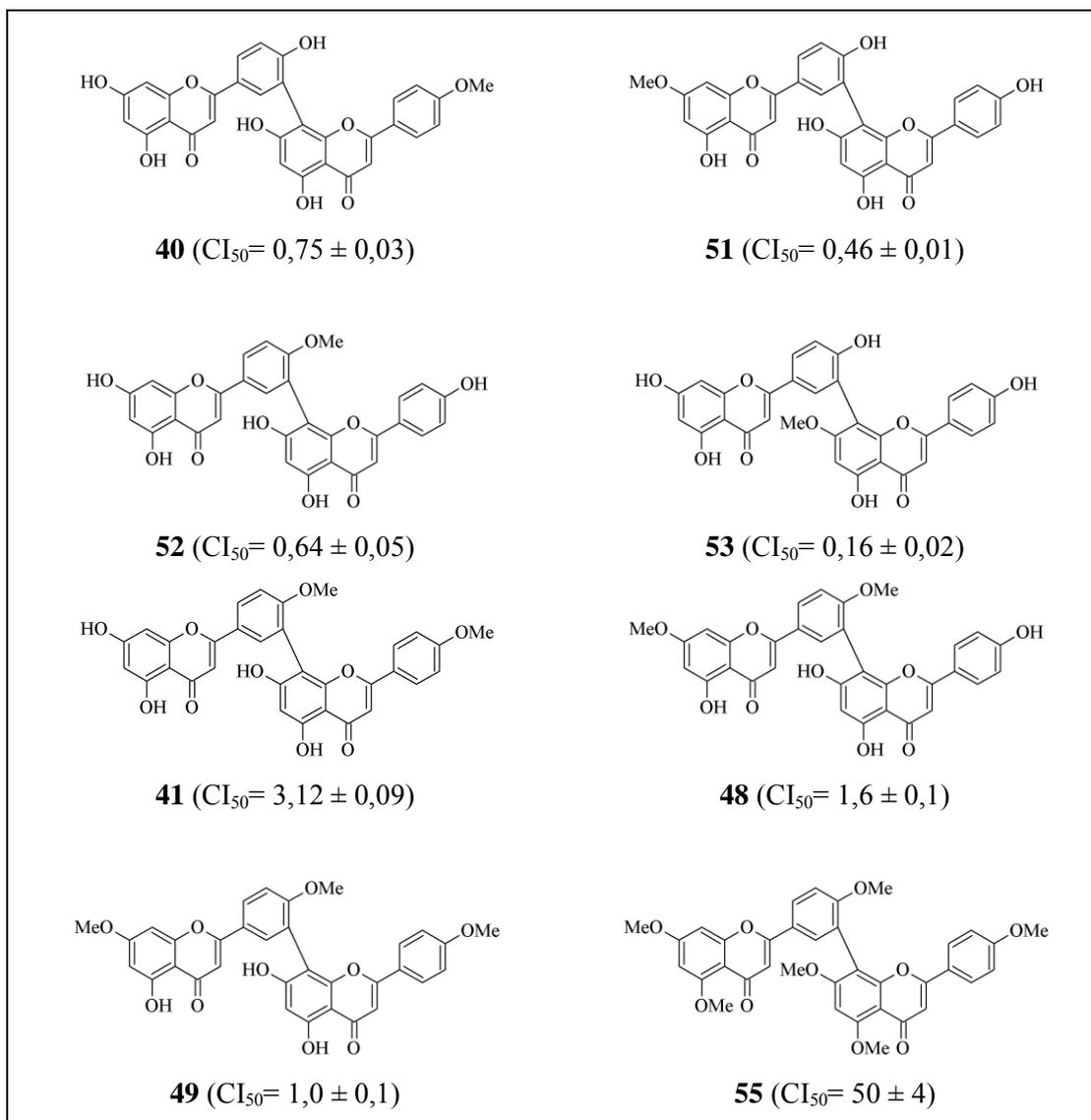


Figure 46. Concentration inhibant 50% de l'activité de la DV2-NS5 RdRp (μM) de 8 dérivés de l'amentoflavone. 4 dérivés mono-méthylés (**40** : podocarpusflavone A ; **51** : sequoiaflavone ; **52** : bilobétine ; **53** : sotetsuflavone), de deux dérivés diméthylés (**41** : isoginkgetine ; **48** : ginkgétine), un dérivé triméthylé (**49** : sciadopitysine) et le dérivé perméthylé de l'amentoflavone (**55** : hexaméthylamentoflavone).

9.3. Etude SAR de dérivés de l'apigénine sur la DV-NS5 RdRp

Afin de mieux comprendre les relations structure-activité de ces biflavonoïdes sur la DV-NS5, nous avons testé l'apigénine (**57**), le monomère constitutif des biflavonoïdes et différents dérivés méthylés de cette molécule (**58-61**). Six

flavonoïdes proches structurellement de l'apigénine (**62-67**) ont également été testés pour cette étude. Ces flavonoïdes ont été testés à 50, 10 et 1 μ M et ne présentent pour la plupart d'entre eux qu'une faible inhibition. Les résultats présentés dans la figure 47 permettent d'appréhender les relations structure-activité de ces flavonoïdes contre la DV-NS5 RdRp à 50 μ M.

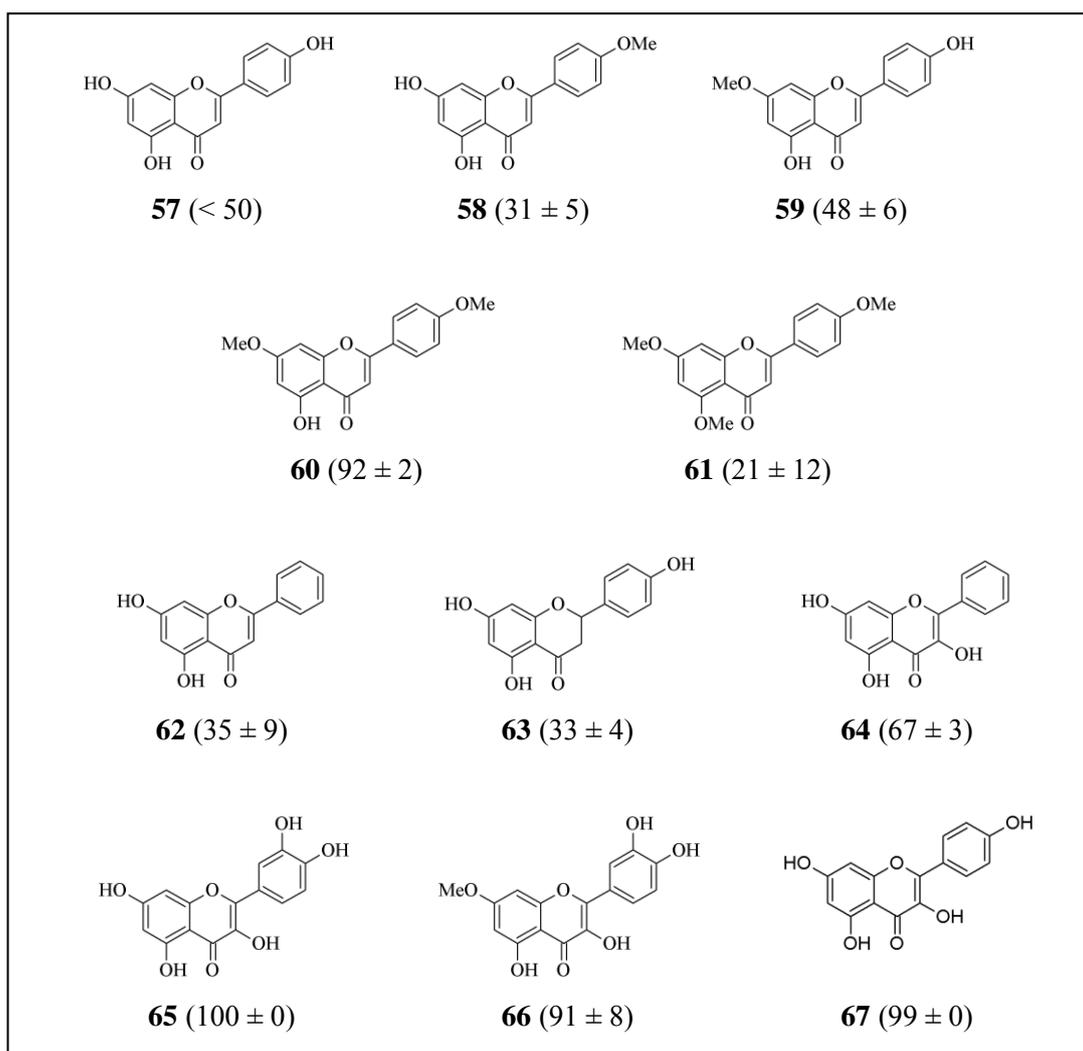


Figure 47. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par l'apigénine (**57**) et quatre dérivés méthylés de l'apigénine (**58** : acétine ; **59** : genkwaine ; **60** : 7,4'-diméthylapigénine ; **61** : 5,7,4'-triméthylapigénine) ainsi que six flavonoïdes structurellement proches (**62** : pinocembrine ; **63** : naringénine ; **64** : galangine ; **65** : quercétin ; **66** : rhamnétin ; **67** : kaempferol). Les pourcentages d'inhibition présentés entre parenthèses ont été obtenus par le test des composés en triplicata à 50 μ M contre la DV2-NS5 RdRp.

Au regard des résultats obtenus avec les dérivés de l'apigénine testés contre la DV-NS5 RdRp, nous remarquons une nouvelle fois que le nombre et la position des groupements méthoxy modulent l'activité d'inhibition de ces composés. Les dérivés monométhylés (**58** et **59**) sont ici peu actifs, à la différence des résultats obtenus avec les dérivés de l'amentoflavone. La position 7 demeure la plus favorable à l'inhibition de la polymérase du DV alors que la méthylation en 5 semble annihiler l'activité de l'apigénine comme de l'amentoflavone d'après les résultats obtenus avec **55** et **61**. La diméthylapigénine (**60**) est ici la plus active contre la DV-NS5RdRp.

Parmi les six autres flavonoïdes testés, nous observons une forte activité d'inhibition de la polymérase du DV par les dérivés de la quercétine (**65**, **66** et **67**). La rhamnétine (**66**), dérivé méthylé en position 7 est ici encore le plus actifs contre la DV-NS5 RdRp puisqu'elle présente une $CI_{50} = 2,2 \mu M (\pm 0,2)$ alors que les CI_{50} obtenues pour **65** et **66** sont respectivement égales à $3,1 \mu M (\pm 0,4)$ et $5,5 \mu M (\pm 1,9)$. Les résultats obtenus avec les dérivés de la quercétine nous suggèrent de tester des dérivés plus oxygénés des biflavonoïdes, et notamment des composés possédant des groupements hydroxyles en position 3 et/ou 3'' que l'on retrouve dans d'autre plantes telles que les *Aristolochia*²⁷⁸. Il est à noter que de nombreux biflavonoïdes hydroxylés sont retrouvés dans les bryophytes²⁷⁹.

10. Composition en biflavonoïdes des quatre *Dacrydium* calédoniens

En vue d'estimer la valeur des biflavonoïdes en tant que marqueurs chimiotaxonomiques pour les *Dacrydium*, nous avons comparé leur composition dans les feuilles des quatre espèces endémiques à la Nouvelle-Calédonie par HPLC-UV/MS. Le chromatogramme obtenu avec les extraits totaux des biflavonoïdes, en utilisant le système d'élution HPLC-3, est présenté dans la figure 48.

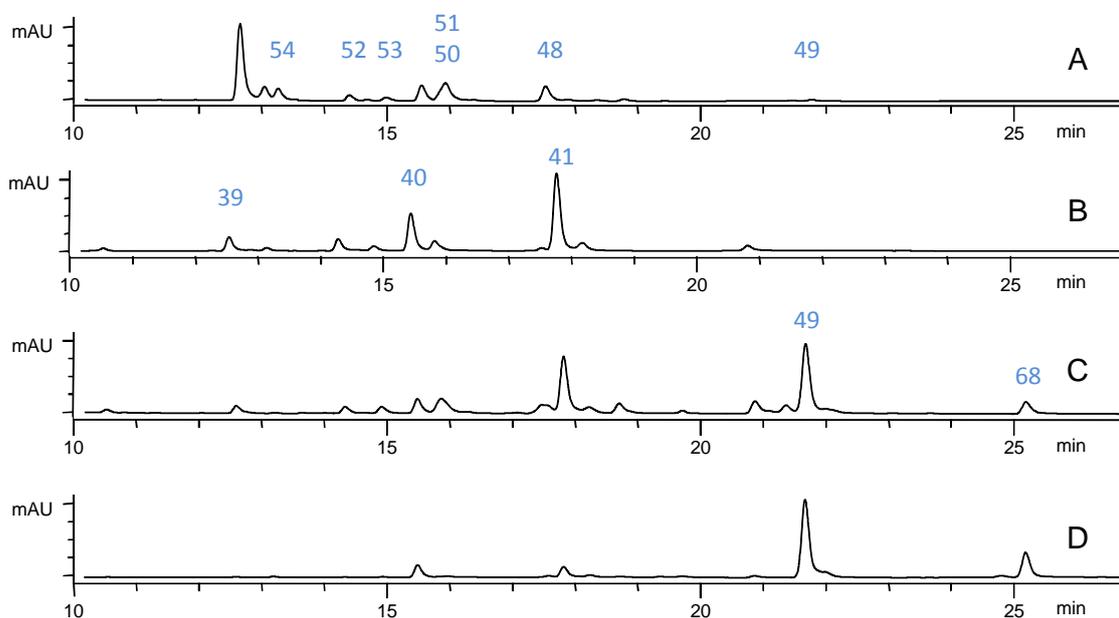


Figure 48. Comparaison de la composition en biflavonoïdes des feuilles de *D. araucarioides* (A), *D. balansae* (B), *D. guillauminii* (C) et *D. lycopodioides* (D) avec le système d'élution HPLC-3. Les biflavonoïdes sont indiqués par leur numéro sur les chromatogrammes correspondants aux extraits dont ils sont issus.

Cette comparaison nous permet de distinguer deux groupes de *Dacrydium* en Nouvelle-Calédonie : d'une part les *D. araucarioides* et *D. balansae* caractérisés par la présence majoritaire d'amentoflavone et de dérivés mono ou diméthylés de l'amentoflavone (figure 48 et tableau 25).

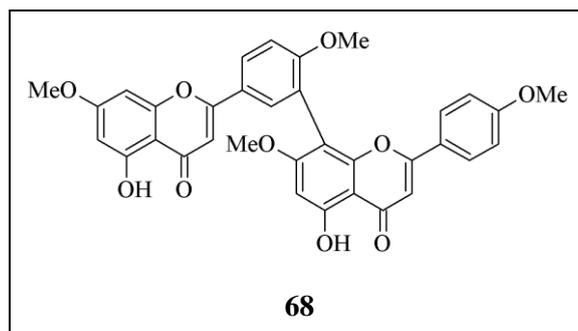


Figure 49. Structure de la 7,4',7'',4'''-tetraméthoxyamentoflavone (**68**).

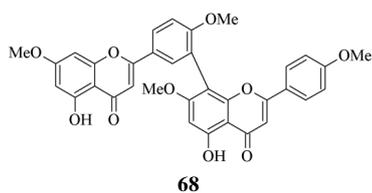
D'autre part, les *D. guillauminii* et *D. lycopodioides* sont caractérisés par des dérivés de l'amentoflavones fortement méthoxylés (**49**, **68**). Cette différenciation en deux groupes concorde avec la phylogénie des *Dacrydium* proposée par Gunnar Keppel en 2011²⁸⁰. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'analyse des huiles essentielles de ces plantes.

Tableau 25. Comparaison des biflavonoïdes dans les quatre espèces de *Dacrydium* de Nouvelle-Calédonie.

Composés	<i>D. araucarioides</i>	<i>D. balansae</i>	<i>D. guillauminii</i>	<i>D. lycopodioides</i>
39	+++	+	+	-
54	+	+	-	-
52	+	+	+	-
53	+	+	+	-
40	+	++	+	+
50	+	+	+	-
51	+	-	+	-
48	+	-	+	-
41	-	+	++	+
49	+	-	+++	+++
68	-	-	+	++

Tableau 26. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenus par l'analyse de la 7,4',7'',4'''-tetraméthoxyamentoflavone (**68**) dans le CDCl_3 (δ ppm, J (Hz)).

			68	
H/C		^{13}C	^1H	
1	O	-	-	
2	$^{\text{IV}}\text{C}$	163,8	-	
3	CH	104,6	6,63 s	
4	$^{\text{IV}}\text{C}=\text{O}$	182,4	-	
4a	$^{\text{IV}}\text{C}$	114,5	-	
5	$^{\text{IV}}\text{C}-\text{OH}$	162,2	12,78 s	
6	CH	98,1	6,36 d (2,0)	
7	C-O- CH_3	165,4/55,8	3,84 s	
8	CH	92,6	6,43 d (2,0)	
8a	$^{\text{IV}}\text{C}$	157,7	-	
1'	$^{\text{IV}}\text{C}$	123,4	-	
2'	CH	131,1	7,88 d (2,4)	
3'	$^{\text{IV}}\text{C}$	122,1	-	
4'	$^{\text{IV}}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$	160,7/55,9	3,80 s	
5'	CH	111,2	7,15 d (8,8)	
6'	CH	127,9	7,97 dd (2,4; 8,8)	
1''	O	-	-	
2''	$^{\text{IV}}\text{C}$	164,0	-	
3''	CH	103,6	6,60 s	
4''	$^{\text{IV}}\text{C}=\text{O}$	182,8	-	
4a''	$^{\text{IV}}\text{C}$	111,2	-	
5''	$^{\text{IV}}\text{C}-\text{OH}$	162,5	13,10 s	
6''	CH	95,4	6,53 s	
7''	$^{\text{IV}}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$	162,7/56,3	3,86 s	
8''	$^{\text{IV}}\text{C}$	Ø	-	
8a''	$^{\text{IV}}\text{C}$	Ø	-	
1'''	$^{\text{IV}}\text{C}$	123,4	-	
2'''	CH	127,7	7,47 d (8,8)	
3'''	CH	114,5	6,83 d (8,8)	
4'''	$^{\text{IV}}\text{C}-\text{O}-\text{CH}_3$	162,4/55,5	3,79 s	
5'''	CH	114,5	6,83 d (8,8)	
6'''	CH	127,7	7,47 d (8,8)	



Conclusion et discussion

Huit composés ont été isolés à partir des feuilles de *D. balansae* par fractionnement bioguidé. Parmi ceux-ci, trois stérols et deux stilbènes sont isolés pour la première fois dans le genre *Dacrydium*. Ces composés ne présentent qu'un intérêt modéré pour le développement d'un composé antiviral contre la dengue. Trois biflavonoïdes dérivés de l'amentoflavone, également isolés à partir des feuilles de *D. balansae* présentent en revanche un fort potentiel antidengue (inhibition forte et spécifique de la NS5 du DV et cytotoxicité faible à nulle). Par la suite 7 nouveaux biflavonoïdes ont été isolés dans les feuilles de *D. araucarioides* et testés contre la DV-NS5 RdRp. Les tests enzymatiques effectués avec la cupressuflavone commerciale et la perméthylamentoflavone préparée par hémisynthèse, sont venus compléter une première étude SAR de cette famille chimique contre l'ARN polymérase du DV.

Plusieurs biflavonoïdes isolés des *Dacrydium spp.* ainsi que plusieurs dérivés de la quercétine ont montré une forte activité d'inhibition de la DV-NS5 RdRp. Le mécanisme d'action de ces composés reste à déterminer (par co-cristallographie ou par des expériences de modélisation moléculaire) mais nous pouvons d'ores et déjà émettre des hypothèses au regard du fonctionnement du site actif de la polymérase du DV et des caractéristiques structurales des flavonoïdes testées positivement. Ainsi, le site catalytique de la NS5 RdRp possède deux cations (Mg^{2+}) et représente pour cela un lieu de fixation privilégié pour les flavonoïdes²⁸¹.

L'étude phytochimique d'autres gymnospermes de Nouvelle-Calédonie, tels que les *Agathis spp.*, ou de bryophytes pourrait permettre d'isoler d'autres biflavonoïdes afin de compléter l'étude SAR entreprise ici. Cependant, il nous semble important avant tout de tester l'efficacité de cette famille chimique contre le DV dans des cellules infectées.

Cinquième partie :

Flavonoïdes de

Carpolepis laurifolia

Introduction

Au cours du criblage préliminaire les extraits de deux Myrtaceae (*Melaleuca quinquenervia* S.T. Blake et *Carpolepis laurifolia* var. *laurifolia* J.W.Dawson) utilisées dans la médecine traditionnelle kanake ont démontré un fort potentiel antiviral contre le DV. Ces plantes ont également montré des propriétés antibiotiques remarquables (voir la seconde partie de ce manuscrit). Des travaux antérieurs sur le Niaouli, nom usuel donné au *M. quinquenervia*, laissent entendre que les flavonoïdes sont responsables de son potentiel pharmacologique²¹⁴, ce qui est en accord avec les résultats du criblage phytochimique présenté dans le tableau 5. *A contrario*, les espèces du genre *Carpolepis*, endémique de Nouvelle-Calédonie, n'ont jamais fait l'objet d'une étude phytochimique. Nous présentons dans cette partie, le fractionnement bioguidé d'un extrait des feuilles de *C. laurifolia* var. *laurifolia* suivi par l'activité d'inhibition de la DV-NS5 RdRp, dans le but d'isoler d'éventuels candidats pour une thérapie contre le DV.

1. Description botanique

Carpolepis laurifolia J.W.Dawson est une espèce appartenant à la famille des Myrtaceae. Dans le monde, cette famille renferme 133 genres et plus de 3 800 espèces majoritairement représentées dans les zones tropicales et subtropicales de la planète (notamment en Australie et dans les zones équatoriales du continent américain)²⁸². Le nom de « Myrti » fut attribué à ce taxon en 1789 par Antoine-Laurent de Jussieu, un botaniste Français qui fut le premier directeur du Muséum National d'Histoire Naturelle.

En Nouvelle-Calédonie, cette famille comprend 21 genres dont 6 endémiques, et 236 espèces dont 234 sont endémiques¹⁸⁰.

Les Myrtaceae sont le plus souvent des arbres ou arbustes à feuilles généralement opposées, simples, entières, pourvues de nervures marginales et de glandes à huile essentielle. Les fleurs des Myrtaceae sont actinomorphes, le calice et la corolle présentent 4 ou 5 unités et les étamines sont généralement nombreuses. Les différentes pièces florales que sont les sépales, pétales et étamines, sont très souvent supportées par un hypanthium (figure 50).

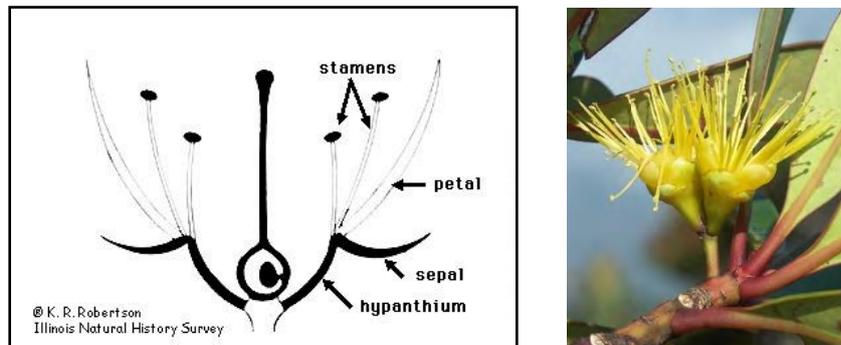


Figure 50. Schéma floral d'une plante à hypanthium (www.life.illinois.edu), et détail de la fleur de *C. laurifolia* var. *laurifolia* (photo de G. Gateblé, endemia.nc).

La plupart des fruits de Myrtaceae sont issus d'ovaires infères. Ce sont des baies, des capsules ou des fruits secs indéhiscents. La nature des fruits est par ailleurs retenu depuis 1828 (d'après les observations de De Candolle) pour différencier trois tribus, devenues sous-familles dans la classification de Endlicher en 1840 :

- Sous-famille des Myrtae caractérisée par des fruits sous forme de baies.

- Sous-famille des Leptospermae dont les fruits sont généralement des capsules (fruits secs déhiscent).
- Sous-famille des Chamaelaucieae qui élaborent des fruits secs indéhiscent.

Chez les Leptospermae, sous-famille à laquelle appartient le genre *Carpolepis*, l'observation de l'insertion des feuilles et de la structure des fleurs (et particulièrement des étamines) permet souvent de déterminer le genre d'un individu. Ainsi les espèces du genre *Carpolepis* sont caractérisées par des feuilles opposées ou verticillées par trois, des étamines qui sont, pour les plus longues, au moins égales à la longueur des pétales, et des fruits ailés²⁸³.



Figure 51. Photos des deux variétés de *C. laurifolia* : var. *laurifolia* à gauche (ref. herbier ADF 27 ; récolté sur le plateau de Tango, en forêt humide sur schiste) ; var. *demonstrans* à droite : photo prise au Mont Mou dans le maquis minier).

C. laurifolia est un arbuste ou arbre pouvant atteindre 18 à 20 mètres. Cette espèce est caractérisée par ses feuilles verticillées par trois et de façon moins flagrante par la taille de ses étamines (20-35 mm). Cette espèce est largement

répandue sur la Grande Terre, dans les forêts et maquis, sur sol ultramafique et sédimentaire, et avec une large amplitude altitudinale (de 5 à 1600 mètres). Deux variétés, présentées dans la figure 51, sont distinguées d'après la taille des fleurs et des fruits. Les deux variétés se distinguent également par leur habitat puisque la variété *laurifolia* affectionne plutôt la forêt humide alors que la variété *demonstrans* se rencontre dans le maquis minier²⁸³.

2. Chimiotaxonomie

Les Myrtaceae sont réputées pour contenir de l'huile essentielle, riche en terpénoïdes, et des flavonoïdes²²⁰. D'après Wilson et al., 2005²⁸⁴, *Carpolepis* est un genre de la famille des Myrtaceae appartenant au groupe des Myrtoideae et plus précisément au clade des Metrosidereae, comprenant les genre *Carpolepis*, *Mearnsia*, *Metrosideros* et *Tepualia*. La chimie de plusieurs plantes appartenant au genre *Metrosideros* a déjà été étudiée (les autres genres n'ayant pas été étudiés d'un point de vue chimique). En accord avec les données chimiotaxonomiques évoquées ci-dessus, ces études ont mis en évidence la présence d'huile essentielle, de terpène dans ces huiles et de flavonoïdes dans les *Metrosideros spp.*²⁸⁴.

2.1. Huile essentielle

L'étude de l'huile essentielle de *Metrosideros umbellata* a mis en évidence douze composés dont l' α -pinène, le β -pinène, le myrcène, le limonène, le dipentène, le terpinéol, l'acétate de myrtenyle, l'acétate de géranyle, l'aromadendrène, le cadinène, et d'autres dérivés estérifiés de sesquiterpènes²⁸⁵. Une étude comparative

portant sur sept espèces (*M. carminea*, *M. diffusa*, *M. excelsa*, *M. fulgens*, *M. perforata*, *M. robusta* et *M. umbellata*) a montré que l'huile essentielle des *Metrosideros* renferme généralement une grande proportion de sesquiterpènes²⁸⁶. Comme nous l'avons vu pour les Rutaceae dans la troisième partie de ce manuscrit, bien que les huiles essentielles soient souvent responsables d'une activité biologique, il est probable que le protocole utilisé lors du criblage biologique ne permette pas leur extraction.

2.2. Flavonoïdes

D'autres études ont mis en évidence des dérivés phénoliques et des flavonoïdes originaux, souvent C-méthylés et parfois sans oxydation du cycle B²⁸⁷ dont quelques exemples (**69-71**) sont présentés dans la figure 52. Par ailleurs, les extraits bruts de plusieurs *Metrosideros* ont montré des activités biologiques intéressantes en inhibant certaines enzymes telles que la trypsine ou la α -glucosidase²⁸⁸.

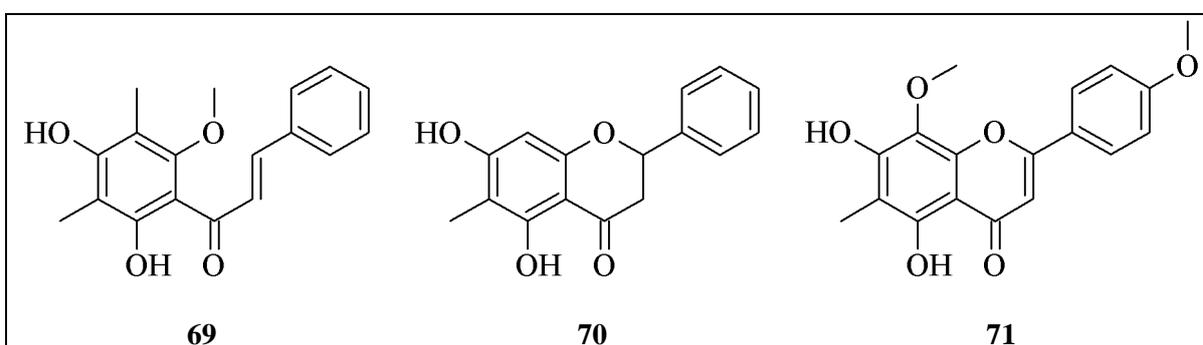


Figure 52. Exemples de flavonoïdes isolés de *M. excelsa*²⁸⁷. **69** : une C-méthyl chalcone sans oxygénation du cycle ; **70** : C-méthylflavanone sans oxydation du cycle B ; **71** : C-méthyl-flavone.

De nombreuses anthocyanines, tels que des dérivés glycosylés de la péonidine (**72**), de la cyanidine (**73**), de la delphinidine (**74**), de la petunidine (**75**) ou de la malvidine (**76**) présentées dans la figure 53, ont également été isolés dans le genre *Metrosideros*²⁸⁹.

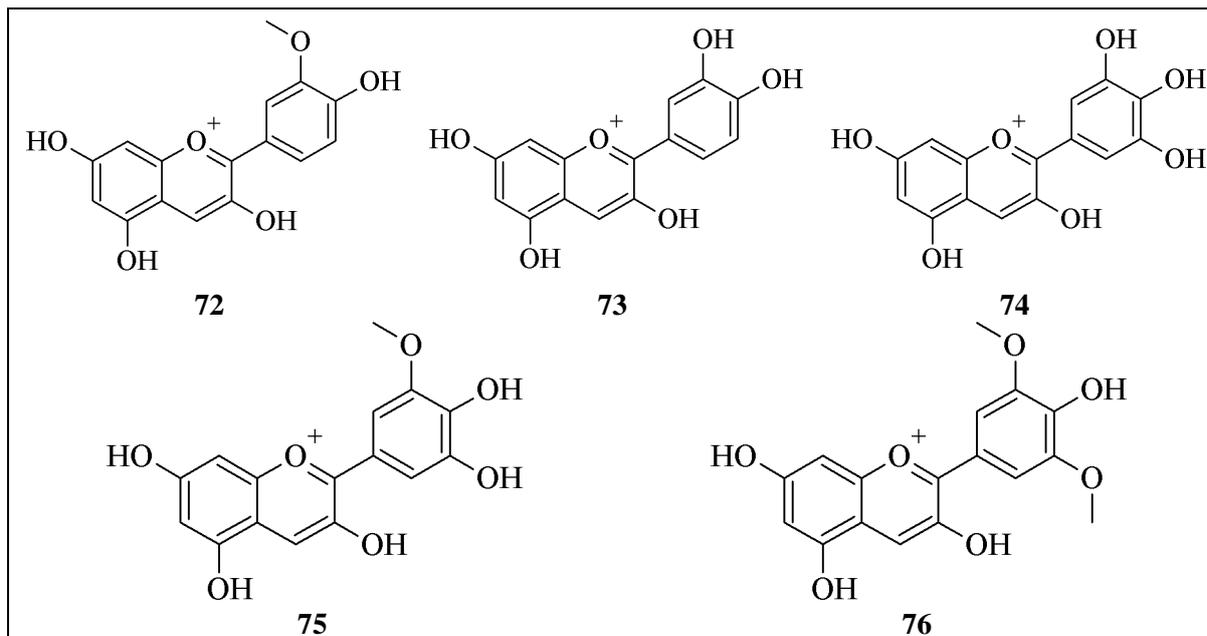


Figure 53. Génine des anthocyanines isolés dans les *Metrosideros* spp. **72** : péonidine ; **73** : cyanidine ; **74** : delphinidine ; **75** : petunidine ; **76** : malvidine.

Ces composés, et plus généralement les membres de la famille des anthocyanines, sont décrits dans la littérature pour de nombreuses activités biologiques, telles que anti-inflammatoire, anti-oxydante ou anti-tumorale²⁹⁰. Cependant les anthocyanines, qui ont un rôle clé dans la pollinisation de nombreuses espèces végétales pour la couleur qu'elles donnent aux fleurs, sont surtout utilisées dans l'industrie pour leur pouvoir de coloration²²⁰.

3. Rappel des résultats préliminaires

3.1. Activités biologiques des feuilles de *C. laurifolia*

Lors du criblage préliminaire, les extraits bruts à l'AcOEt filtrés sur gel de polyamide de *C. laurifolia*, ont montré une forte inhibition de l'activité de l'enzyme DV-NS5 RdRp. Les extraits bruts de feuilles et d'écorces présentant une inhibition de l'enzyme supérieure à 80% à 50 puis à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ont été testés contre l'enzyme à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Il apparaît alors que l'extrait de feuilles est significativement plus actif que celui d'écorces. Cet extrait inhibe près de 70% de l'activité de la polymérase du DV alors que l'extrait des écorces inhibe à peine plus de 20% de l'activité de l'enzyme pour la même concentration (figure 54).

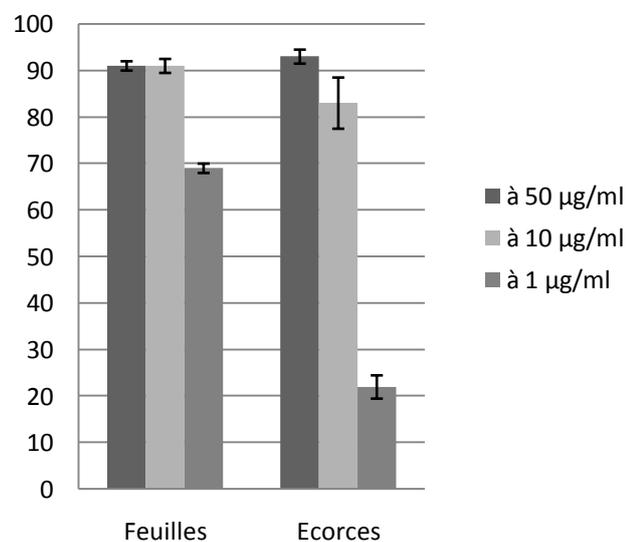


Figure 54. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par les extraits des feuilles et des écorces de *C. laurifolia* à 50, 10 et 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

L'extrait des feuilles n'ayant pas montré de cytotoxicité contre les cellules KB ou les cellules MRC5 (tableau 4), est considéré comme un extrait à fort potentiel médicamenteux contre le DV.

3.2. Les flavonoïdes révélés par le criblage phytochimique

Le criblage phytochimique mené sur les poudres des feuilles et des écorces de *C. laurifolia* a mis en évidence l'abondance de phénols, de flavonoïdes, de stérols et de terpènes dans cette espèce (tableau 5). Ces résultats sont en accord avec les données de la chimiotaxonomie décrites plus haut. Le criblage phytochimique montre aussi que les feuilles sont, par rapport aux écorces, particulièrement riches en phénols et en flavonoïdes. Ces composés pourraient donc être responsables de l'inhibition de la DV-NS5 RdRp plus forte avec l'extrait des feuilles qu'avec celui des écorces. Pour cette raison, le fractionnement bioguidé s'est orienté vers la séparation des flavonoïdes des feuilles de *C. laurifolia*. Bien que ceci ait orienté le choix des techniques et des protocoles de fractionnement utilisés, chaque étape de séparation fut suivie d'un test d'activité contre la DV-NS5 RdRp à 10 µg/mL dans le but de déterminer les fractions à travailler dans l'étape suivante.

4. Fractionnement bioguidé d'un extrait des feuilles de *C. laurifolia*

4.1. Extrait total des flavonoïdes

La poudre des feuilles (m= 340 g) a tout d'abord été extraite à l'éther de pétrole (A, m= 8,5 g) afin d'extraire les composés les plus apolaires. La poudre des feuilles ainsi dégraissée fut ensuite extraite par du méthanol à 80% en vue d'extraire les flavonoïdes (B, m = 23,5 g).

4.2. Séparation liquide/liquide de l'extrait méthanolique

Comme le montrent les résultats présentés dans le tableau 26, l'activité d'inhibition de la DV-NS5 RdRp est conservée dans l'extrait méthanolique (B) alors qu'elle est beaucoup plus faible avec l'extrait à l'éther de pétrole (A).

Tableau 27. Pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp par les extraits à l'éther de pétrole (A), au méthanol à 80% (B) et de la partie AcOEt (B.2) à 10, 1 et 0,1 µg/mL.

Extraits	Inhibition de la DV-NS5 RdRp		
	à 10 µg/mL	à 1 µg/mL	à 0,1 µg/mL
Ether de pétrole (A)	51 +/- 5	36 +/- 12	31 +/- 14
Méthanol 80% (B)	97 +/- 0	94 +/- 3	91 +/- 2
Acétate d'éthyle (B.2)	98 +/- 0	95 +/- 2	93 +/- 2

L'extrait total des biflavonoïdes (B) remis en solution dans du méthanol à 80% a ensuite été extrait à l'acétate d'éthyle (B.2). Comme le montrent les résultats présentés dans le tableau 26, l'extrait B.2 conserve l'activité inhibitrice de la réplicase virale. La phase méthanolique 80% (B.1) contient une majorité de polyphénols et n'a pas fait pour cela l'objet d'analyses supplémentaires.

4.3. Fractionnement bioguidé de B.2

La partie AcOEt de l'extrait total des flavonoïdes des feuilles de *C. laurifolia* (B.2, 20 g) fut ensuite fractionnée sur colonne de silice à l'aide du système d'élution S19 (tableau 33 de la partie expérimentale) pour obtenir six fractions (FA-FF). Le test contre la polymérase virale montre que les composés les plus polaires conservent l'activité d'inhibition de la réplicase virale. Ainsi, FA (2,8 g) qui inhibe 30% de l'activité

de la DV-NS5 RdRp à 10 µg/mL, n'a pas été retenue pour plus d'analyse du fait du faible potentiel antidengue des composés apolaires. Les fractions FB (2 g), FC (2,3 g) et FD (3,3 g) inhibent en revanche plus de 95 % de l'activité de la DV-NS5 RdRp à 10 µg/mL et peuvent donc contenir de puissants inhibiteurs de la réplication du DV. Les fractions les plus polaires (FE et FF) renferment en majorité des polyphénols et n'ont pas été retenus pour la suite de nos travaux (figure 55).

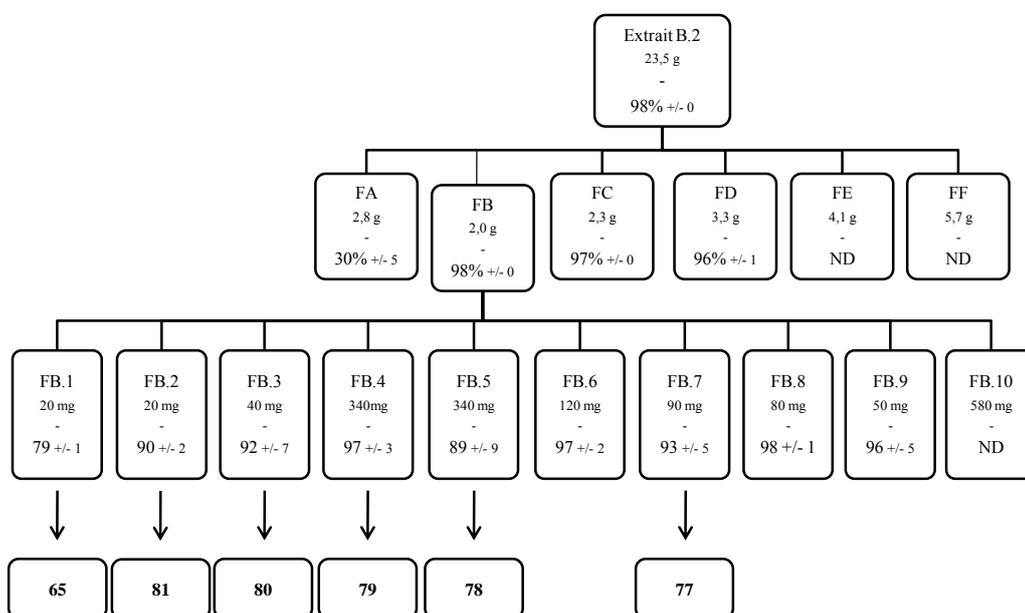


Figure 55. Schéma du fractionnement bioguidé effectué sur l'extrait FB.2.

FB, qui semble renfermer tous les flavonoïdes majoritaires de l'extrait B.2 d'après l'analyse par CCM, et dont la masse nous semblait suffisante pour les phases ultérieures de purification a fait l'objet d'une seconde étape de fractionnement, comme le montre le schéma de la figure 55. Le fractionnement de FB fut réalisé sur colonne de silice en utilisant le système d'élution S20 et permet de distinguer dix fractions (FB.1-FB.10). Les sous-fractions de FB conservent toutes une forte activité d'inhibition de la DV-NS5 RdRp. Nous avons donc cherché à isoler le composé majoritaire de ces fractions en vue d'évaluer plus précisément leur

potentiel antiviral pour un traitement de la dengue. Ce travail nous a permis d'identifier le composé majoritaire de FB.1 par co-chromatographie et d'isoler cinq molécules à partir des fractions FB.2, FB.3, FB.4, FB.5 et FB.7.

Pour cela, FB.7 (90 mg) a été fractionnée sur une colonne de séphadex LH-20 à l'aide du système d'élution S24 pour donner huit fractions dont le composé **77** (6,1 mg).

FB.5 (340 mg) a été fractionnée sur une colonne de séphadex LH-20 avec le système S6 pour donner six fractions (FB.4a-FB.4f). Le fractionnement de FB.4e (20 mg) par HPLC préparative à l'aide du système S23, nous a alors mené à isoler le composé **78** (4,1 mg).

FB.4 (340 mg) fut fractionnée sur une colonne de séphadex LH-20 avec le système S6 pour donner neuf fractions (FB.4a-FB.4i). Le composé **79** (2,2 mg) a alors été purifié par HPLC préparative à partir de FB.4g (40 mg), à l'aide du système d'élution S23.

FB.3 (40 mg) a été fractionnée sur une colonne de silice et séparée à l'aide du système S21 pour donner obtenir neuf fractions (FB.3a- FB.3i). Le composé **80** (1,3 mg) a alors été purifié par HPLC préparative à l'aide du système S22 à partir de FB.3f (15 mg).

Enfin, le fractionnement de FB.2 (20 mg) sur une colonne de silice à l'aide du système d'élution S21, nous a mené à l'isolement du composé **81** (m= 4,5 mg)

5. Analyse structurale des principes actifs de *C. laurifolia*

La détermination structurale des molécules isolées à partir des fractions actives de B.2 est réalisée avant d'évaluer individuellement leur potentiel

pharmacologique contre le DV.

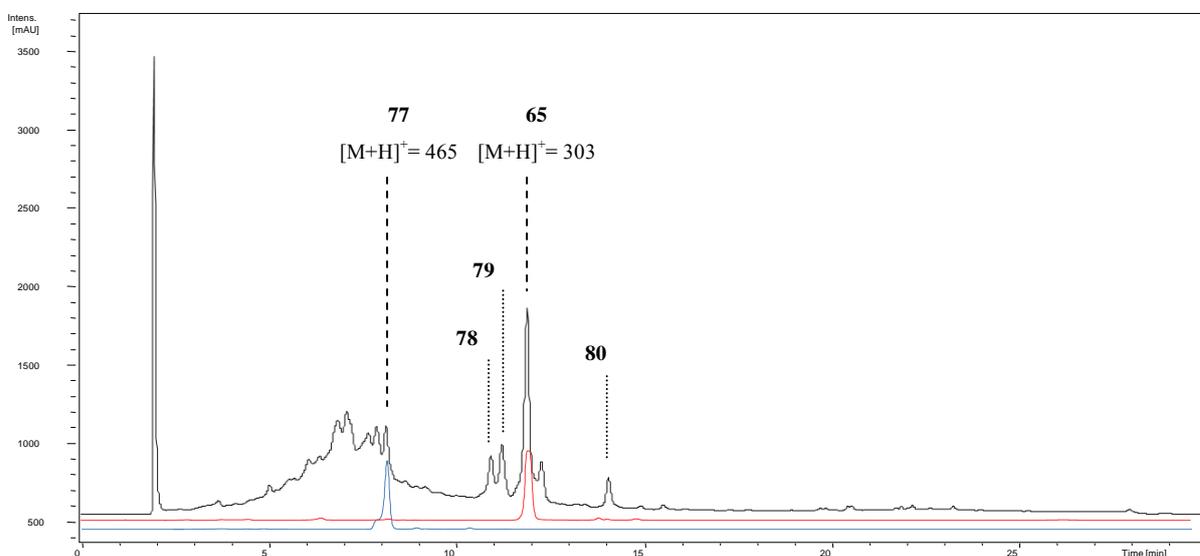


Figure 56. Analyse HPLC-UVMS de la partie B.2 de l'extrait méthanolique des feuilles de *C. laurifolia*, selon la méthode HPLC-4. En bleu et en rouge sont représentés les Chromatogrammes obtenus respectivement avec la quercétine (65) et l'hyperoside (77).

5.1. Détermination structurale des composés 65 et 77

La quercétine (65) et l'hyperoside (77) ont été identifiés par co-chromatographie en CCM puis en HPLC-MS avec des témoins commerciaux (voire le chromatogramme de la figure 56). La structure de 77 a par ailleurs été validée par l'étude du spectre RMN ^1H obtenu avec le composé isolé de *C. laurifolia* (tableau 27).

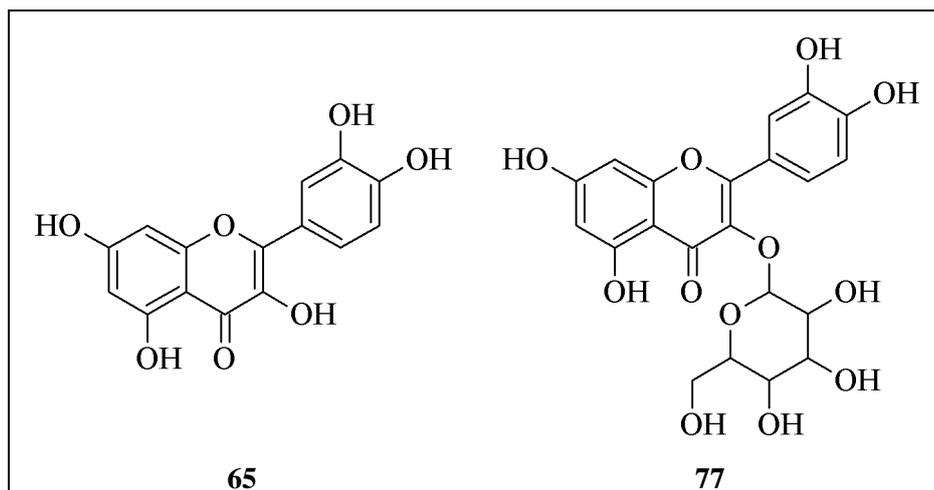


Figure 57. Schéma de la quercétine (65) et de l'hyperoside (77).

Comme le montre la figure 55, la quercétine (65) semble être le flavonoïde majoritaire de l'extrait. La plante semble renfermer d'autres dérivés glycosylés de la quercétine tel que l'hypéroside (77), que l'on devine par l'analyse des spectres UV et MSⁿ des différents pics du chromatogramme obtenu avec B.2. Ces composés présentent un spectres UV proche de celui de 65 ($\lambda_{\text{max}} = 260, 375 \text{ nm}$) et un spectre de masse caractérisé par la présence d'un ion fragment $[M-X+H]^+ = 303$.

5.2. Analyse structurale des composés 78 et 79

Les structures des composés 78 et 79 ont été déterminées par l'analyse des spectres UV, MS et HRMS ainsi que par l'analyse des spectres RMN (1D et 2D) dans le DMSO deutéré (tableau 27). Le spectre UV de ces deux composés présente des maxima d'absorption autour de 255 et 350 nm (figure 58), caractéristiques des flavonols²⁵⁷.

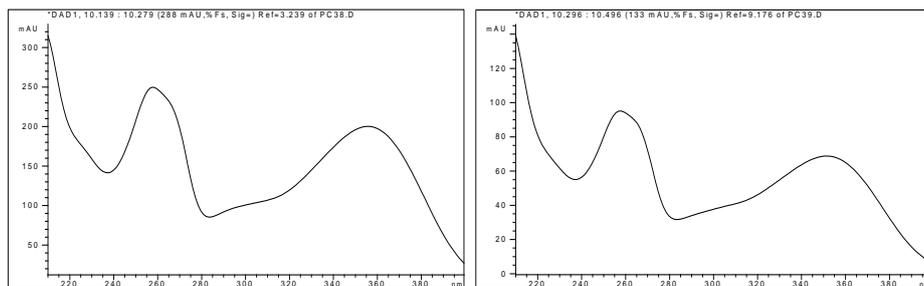


Figure 58. Spectres UV des composés **78** (λ_{max} = 257, 350) et **79** (λ_{max} = 257, 355).

Comme nous le voyons plus haut, le spectre de masse présente un ion fragment à M/Z = 303 (figure 59) signifiant que ces composés sont probablement des dérivés de la quercétine (**65**).

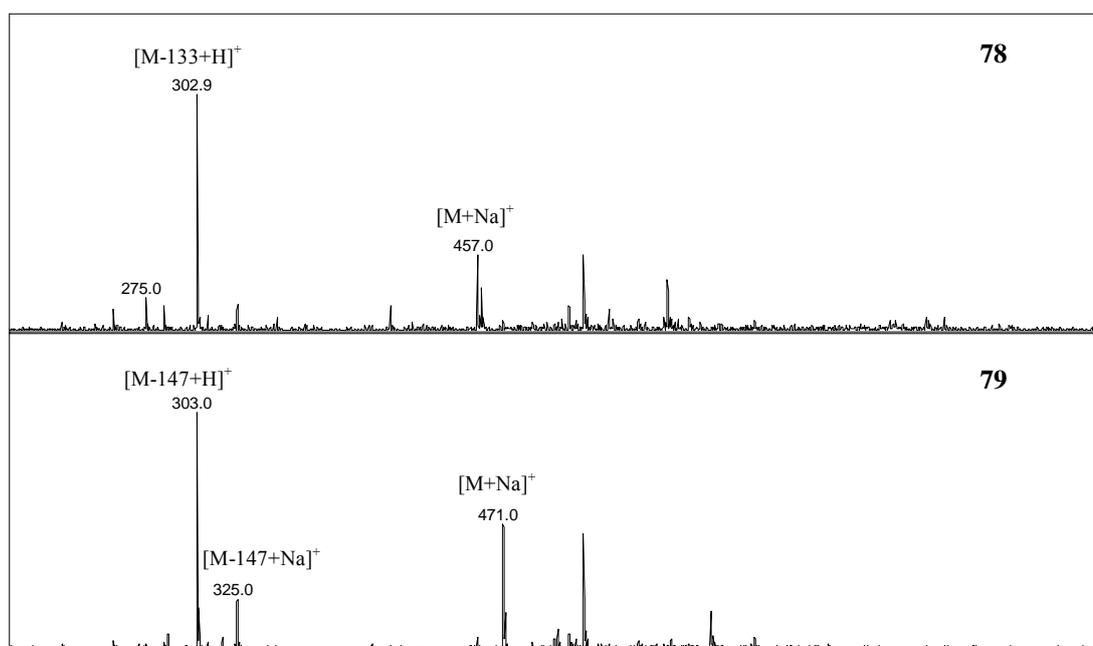


Figure 59. Spectres MS des composés **78** et **79**.

5.2.1. Détermination structurale du composé **78**

Le spectre de masse haute résolution obtenu avec **78**, avec un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ = 433.0766, nous permet de déduire la formule brute de ce composé : $C_{20}H_{18}O_{11}$ ($[M-H]^-_{théorique}$ = 433.0771). Ceci correspond à la masse d'un

flavonol substitué par un pentose.

Comme nous le suggéraient les données UV et MS relatives à ce composé (figures 58 et 59), le spectre RMN ^1H nous confirme qu'il s'agit d'un dérivé de la quercétine : 1 proton extrêmement déblindé à 12,61 ppm du fait de sa chélation avec l'oxygène en position 4, correspond au H_5 . Deux protons à 6,20 et 6,41 ppm correspondant aux protons H_6 et H_8 du cycle A et trois signaux à 7,55, 6,85 et 7,48 ppm correspondent aux protons H_2 , $\text{H}_{5'}$ et H_6 du cycle B. Les constantes de couplages observées sur le spectre RMN ^1H tout comme les corrélations observées en RMN 2D COSY confirment ces informations (annexe 11). La structure du sucre fut également déterminée par l'analyse des spectres RMN 1D et 2D en comparaison avec les données de la littérature²⁶¹. Le déplacement chimique des protons des sucres, et en particulier ceux du proton anomériques $\text{H}_{1''}$ à 5,58 ppm est caractéristique d'un arabinofuranose. Les corrélations HMBC nous permettent enfin d'affirmer que ce sucre est relié par une liaison éther au C_3 de la génine. La structure du composé **78**, présentée dans la figure 60, a ainsi été déterminée comme celle de l'avicularine, en accord avec les données de la littérature²⁶¹.

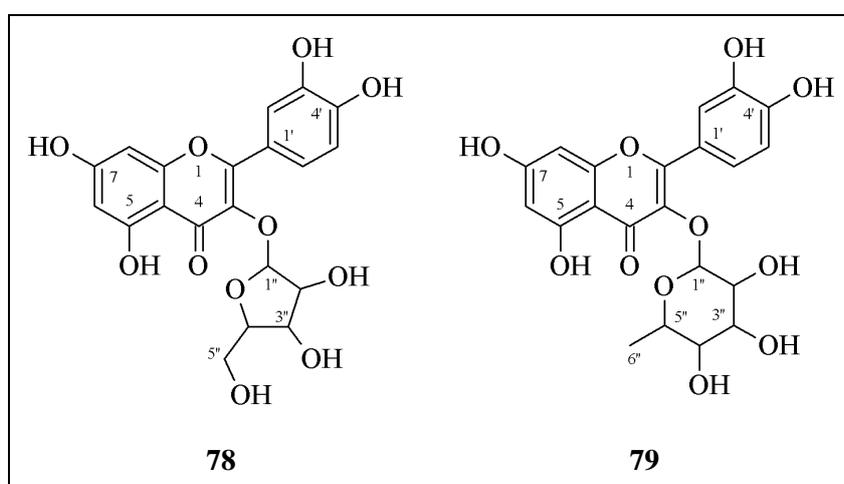


Figure 60. Schéma de la structure de l'avicularine (78) et de la quercitrine (79).

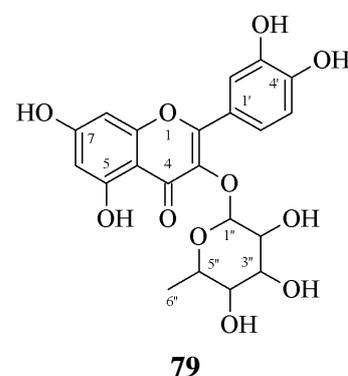
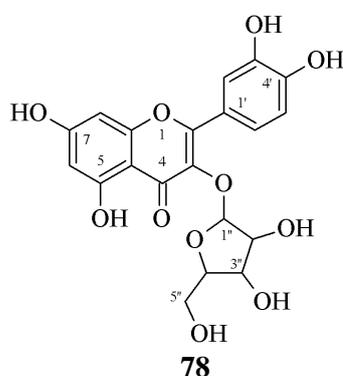
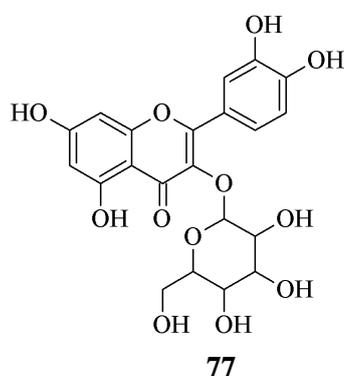
5.2.2. Détermination structurale du composé **79**

Le spectre de masse haute résolution obtenu avec **79** indique la présence d'un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+ = 471,0876$, et nous permet d'affirmer que ce composé présente la formule brute suivante : $C_{21}H_{20}O_{11}$ ($[M-Na]^+_{\text{théorique}} = 471,0903$). Ceci correspond à la structure d'un dérivé de flavonol substitué par un désoxyhexose.

Les analyses RMN 1D et 2D confirment encore une fois que **79** est un dérivé de la quercétine. Nous retrouvons en effet sur le spectre RMN 1H un signal à 12,61 ppm correspondant au H_5 , deux signaux à 6,21 et 6,40 ppm correspondant aux H_6 et H_8 et trois signaux à 7,25, 6,85 et 7,30 ppm correspondant aux H_2 , H_5' et H_6' . L'étude des données RMN nous a aussi permis, en accord avec les données de la littérature²⁶¹, d'élucider la structure du sucre : les déplacements chimiques des protons de ce sucre, avec notamment un proton anomérique $H_{1''}$ à 5,25 ppm, sont caractéristiques du rhamnose. L'analyse des corrélations HMBC nous permet aussi de conclure que le sucre est ici aussi fixé sur l'oxygène en position 3 de la génine. Tout ceci nous permettant de déterminer la structure de **79** présentées dans la figure 60, comme étant celle de la quercitrine. L'ensemble des données structurales obtenues avec **79** sont en accord avec les données présentes dans la littérature²⁶¹.

Tableau 28. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenues pour les composés **77** et **78** dans le $\text{DMSO-}d_6$ et pour le composé **79** dans le MeOD (δ ppm, J (Hz)).

Position	77		78		79	
	^1H	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	
1	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	
5	-	12,63 s	-	12,61 s	-	
6	CH 6,21 d (1,9 Hz)	6,20 s	98,6	6,21 s	98,3	
7	C^{IV}	-	-	-	-	
8	CH 6,40 d (1,9 Hz)	6,41 s	93,8	6,40 s	93,0	
9	C^{IV}	-	-	-	-	
10	C^{IV}	-	-	-	-	
1'	C^{IV}	-	-	-	-	
2'	CH 7,94 d (2,0 Hz)	7,55 d (8,0 Hz)	121,6	7,25 d (8,0 Hz)	121,3	
3'	CH 6,86 d (8,5 Hz)	6,85 d (8,0 Hz)	115,0	6,85 d (8,0 Hz)	114,9	
4'	C^{IV}	-	-	-	-	
5'	C^{IV}	-	-	-	-	
6'	CH 7,52 dd (2,0;8,5 Hz)	7,48 s	115,8	7,30 s	115,6	
1''	CH 5,33 d (8,0Hz)	5,58 s	107,7	5,25 s	101,6	
2''	CH 3,48-3,68 m	ND	ND	3,98 s	70,7	
3''	CH 3,48-3,68 m	ND	ND	3,51 m	70,5	
4''	CH 3,48-3,68 m	ND	ND	3,21-3,36 m	71,7	
5''	CR 3,33 m	ND	ND	3,21-3,36 m	71,7	
6''	CR 3,33 m	-	-	0,82 d (5,8Hz)	15,8	



5.3. Détermination structurale du composé 80

La 6-C-méthyl-7-O-méthylapigénine (**80**) a été identifiée par l'analyse des spectres UV, MS et RMN. Comme le montre la figure 61, le spectre UV ($\lambda_{\text{max}} = 276, 334 \text{ nm}$) nous indique que **80** appartient à la famille des flavones²⁵⁷.

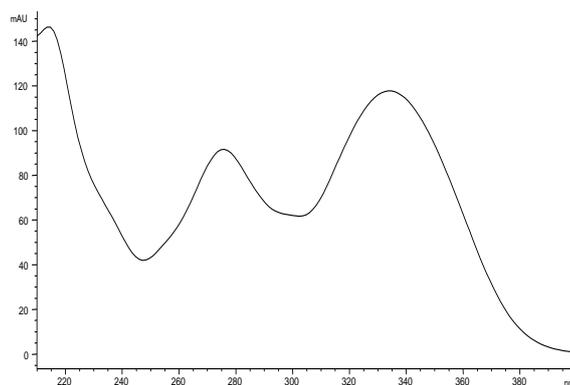


Figure 61. Spectre UV du composé **80**.

Le spectre de masse haute résolution de la molécule en mode d'ionisation positif, présentant un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+ = 299,0915$, nous informe que le formule brute de ce composé est $C_{17}H_{15}O_5$ ($[M+H]^+_{\text{théorique}} = 299,0919$). L'analyse des spectres RMN à une dimension et à deux dimensions nous a permis de déterminer la structure de ce composé.

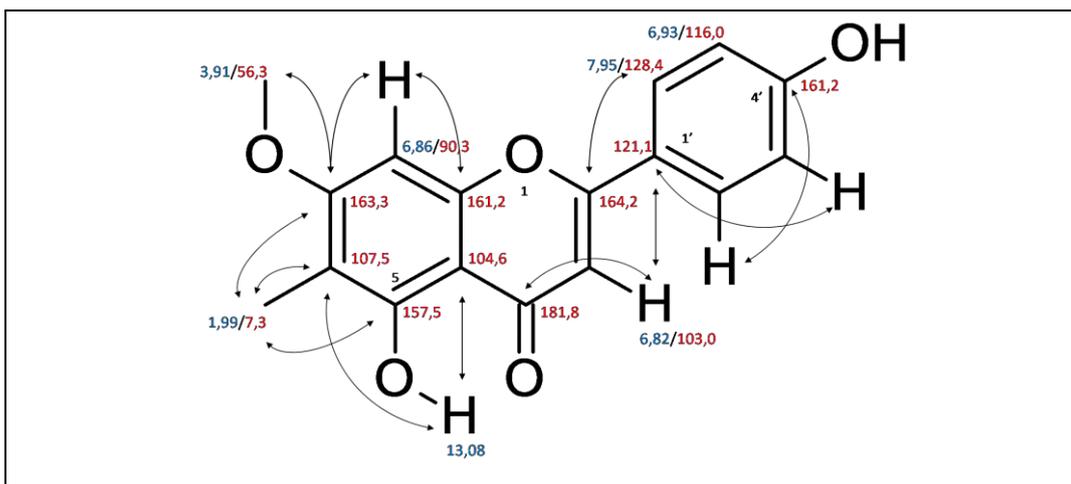
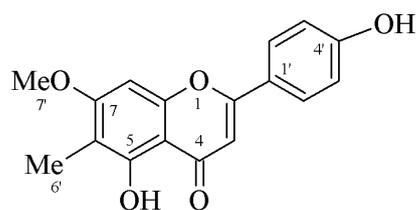


Figure 62. Schéma de la 6-C-méthyl-7-O-méthylapigénine (**80**) montrant les données issues des analyses RMN ¹H (chiffres en bleu) et ¹³C (chiffres en rouge) ainsi que les principales corrélations observées en HMBC (flèches noires).

Le spectre RMN ¹H est proche de celui obtenu lors de l'analyse de l'apigénine, avec un proton proche de 13 ppm correspondant au groupement hydroxyle « chélaté » en position 5. La présence de deux signaux intégrant pour deux protons chacun à 7,95 et 6,93 ppm présentant la même constante de couplage ($J = 8,0$ Hz) est caractéristique de la présence de quatre protons en position 2, 3, 5 et 6 sur un cycle aromatique. Enfin, un proton aromatique à 6,86 ppm correspond au H₈. Cette information est confirmée par les corrélations observées lors des analyses COSY (figure 62). A la différence de l'apigénine (**57**), **80** ne présente donc qu'un proton sur le cycle B et possède un groupement méthyle (singulet intégrant pour 3H à 1,39 ppm) et un groupement méthoxy (singulet intégrant pour 3H à 3,91 ppm) localisés grâce aux analyses HSQC et HMBC respectivement en position 6 et 7.

Tableau 29. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenues dans le DMSO- d_6 pour le composé **80** (δ ppm, J (Hz)).

80			
Position		^1H	^{13}C
1	O	-	-
2	C ^{IV}	-	-
3	C ^{IV}	6,82 s	103,0
4	C=O	-	181,9
5	C-OH	13,08 s	157,5
6	C ^{IV}	-	107,5
6'	CH ₃	1,99 s	7,3
7	C ^{IV}	-	163,4
7'	CH ₃	3,91 s	56,3
8	CH	6,86 s	90,3
9	C ^{IV}	-	161,2
10	C ^{IV}	-	104,6
1'	C ^{IV}	-	121,1
2'	CH	7,95 d (8,0 Hz)	128,4
3'	CH	6,93 d (8,0 Hz)	116,0
4'	C ^{IV}	-	161,2
5'	C ^{IV}	6,93 d (8,0 Hz)	116,0
6'	CH	7,95 d (8,0 Hz)	128,4



80

5.4. Détermination structurale du composé 81

L'analyse du spectre de masse avec un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+ = 457$, nous indique que la masse molaire de **81** est de 456, ce qui correspond à la masse classique d'un triterpène et probablement à la formule brute suivante : $C_{30}H_{48}O_3$. Ceci nous est confirmé par l'analyse du spectre de masse haute résolution qui présente un ion pseudomoléculaire en mode d'ionisation négatif $[M-H]^- = 455,3517$ ($[M-H]^-_{théorique} = 455,3353$). De plus la présence d'un pic majoritaire sur le spectre de masse à 439, correspondant à un ion $[M-H_2O+H]^+$ nous indique la présence d'un groupement COOH alors que le pic à 411, correspondant à un ion $[M-H_2O-OH+H]^+$, nous indique la présence d'un OH libre dans ce composé.

Pour les triterpènes, les deux signaux à 4,61 et 4,75 ppm dans le spectre RMN 1H (figure 63), intégrant chacun pour un proton, sont caractéristiques des protons oléfiniques portés par le C_{29} . Le signal à 3,19 ppm intégrant pour un proton (signal dédoublé par deux protons voisins) est quant à lui caractéristique du proton porté par le C_3 alors que le signal à 2,99 ppm intégrant pour un proton peut être attribué au H_{19} du fait de la proximité de la double liaison entre les C_{20} et C_{29} . Les autres protons aliphatiques ne peuvent être assignés sans l'analyse des spectres RMN 2D (seul le groupement méthyle à 1,69 ppm peut être hypothétiquement attribué au C_{30} du fait de la proximité une nouvelle fois de la double liaison entre C_{20} et C_{29}). Des indications similaires peuvent être tirées de l'analyse du spectre ^{13}C , d'autant plus par l'analyse des spectres obtenus par J-modulation où la nature des carbones primaire, secondaire, tertiaire ou quaternaire est différenciée.

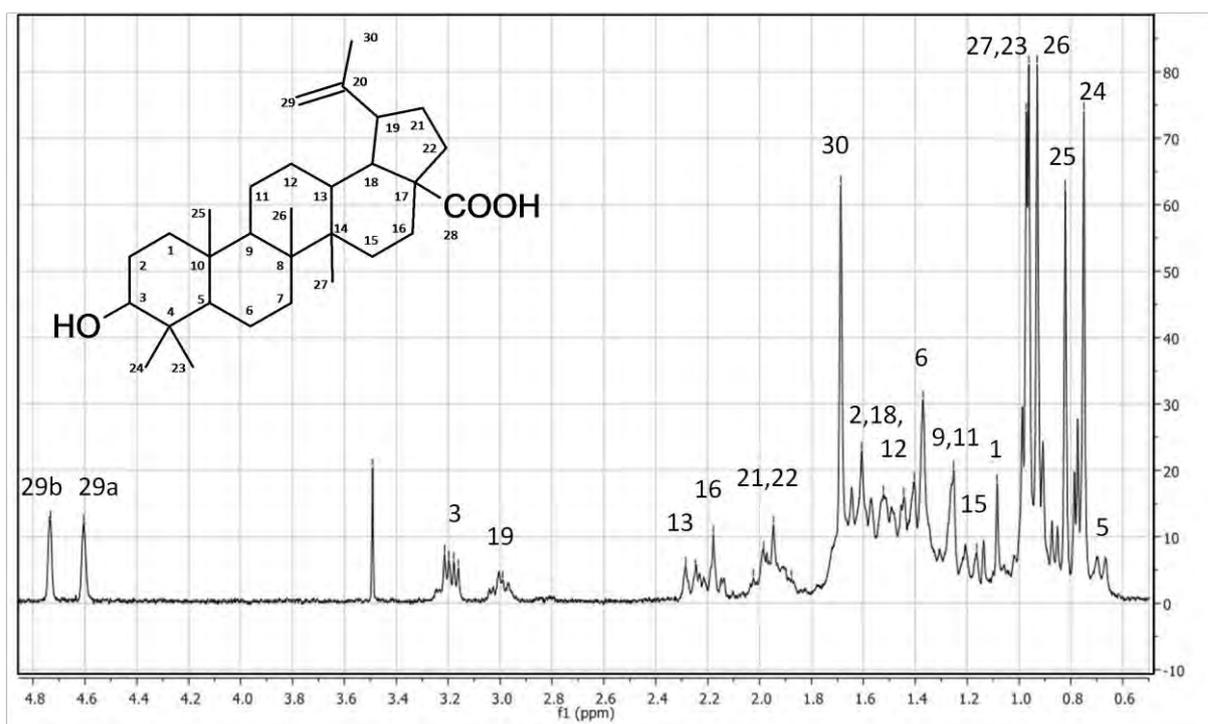
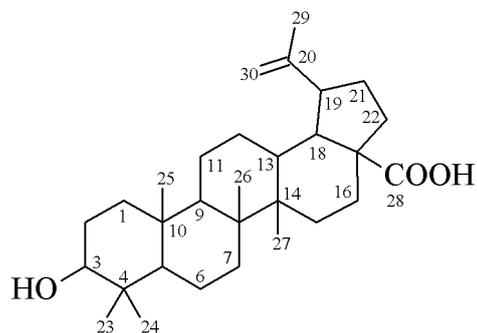


Figure 63. Attribution des signaux observés sur le spectre RMN ^1H pour le composé **81** aux différents protons de l'acide bétulinique par l'analyse des spectres RMN 1D et 2D.

L'analyse du spectre RMN 2D HSQC nous permet d'attribuer avec précision les signaux observés sur les spectres ^1H et ^{13}C obtenus avec **81** aux différents carbones et protons de l'acide bétulinique (figure 63). L'analyse structurale de ce composé est donc finalisée par l'analyse des spectres RMN 2D HSQC et HMBC. L'ensemble des données spectrales obtenues pour **81** (tableau 29) sont identiques à celles présentées dans la littérature pour l'acide bétulinique²⁹¹.

Tableau 30. Données RMN ^1H et ^{13}C obtenues avec le composé **81** dans le CDCl_3 (δ ppm, J (Hz)).

81			
Position		^1H	^{13}C
1	CH_2	1,16 m	38,5
2	CH_2	1,52-1,61 m	27,5
3	CH	3,19 dd (12,0; 4,5 Hz)	79,2
4	^{13}C	-	-
5	CH	0,66 m	55,5
6	CH_2	1,40 s	18,44
7	CH_2	2,11-2,28 m	34,5
8	^{13}C	-	40,5
9	CH	1,25 s	50,7
10	^{13}C	-	-
11	CH	1,25 m	21,0
12	CH_2	1,52-1,61 m	25,7
13	CH	2,11-2,28 m	38,4
14	^{13}C	-	42,6
15	CH_2	1,23 m	30,7
16	CH_2	2,11-2,28 m	32,3
17	^{13}C	-	-
18	CH	1,52-1,61 m	49,4
19	CH	2,99 td (9,0; 5,1 Hz)	47,1
20	^{13}C	-	150,0
21	CH_2	1,88-2,02 m	29,8
22	CH_2	1,88-2,02 m	37,2
23	CH_3	0,96 s	28,1
24	CH_3	0,75 s	15,5
25	CH_3	0,82 s	16,3
26	CH_3	0,93 s	16,3
27	CH_3	0,97 s	15,5
28	COOH	-	-
29	CH_2	1,69 s	19,6
30	CH_3	4,73 d (2,0); 4,61 d (2,0)	109,8



6. Activité biologique des flavonoïdes contre la DV-NS5

6.1. Potentiel antidengue des composés isolés de *C. laurifolia*

Afin d'initier l'étude de leurs potentialités antidengue, chacune des molécules identifiées dans les feuilles de *C. laurifolia* fut testée individuellement contre la polymérase du DV à 10 μM .

6.1.1. Inhibition de la DV-NS5 par deux flavonoïdes non glycosylés (65 et 82)

La quercétine (**65**) avait été testée lors de l'étude SAR portant sur les flavonoïdes identifiés chez les *Dacrydium spp* (quatrième partie) et présente une forte activité d'inhibition de la DV-NS5 RdRp ($\text{CI}_{50} = 3,1 \mu\text{M}$). La 6-méthyl-7-méthoxyapigénine (**80**) ne présente quant à elle qu'un faible potentiel antidengue au vu de son inhibition de la polymérase virale ($\text{CI}_{50} \pm 50 \mu\text{M}$). Cette forte baisse d'activité observée pour **80** pourrait être liée à la forte baisse de sa polarité liée notamment aux deux groupements méthyles.

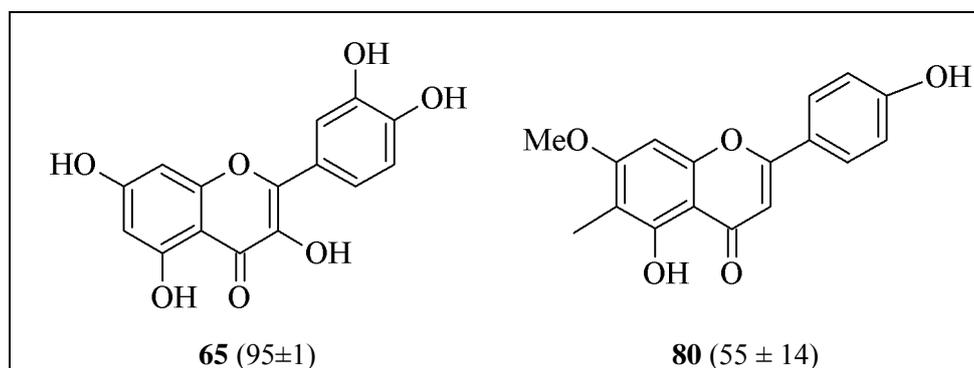


Figure 64. Schéma de la quercétine (**65**) et de la 6-méthyl-7-méthoxyapigénine (**80**) et pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp de ces composés à 10 $\mu\text{g/mL}$.

6.1.2. Inhibition de la DV-NS5 par trois flavonols glycosylés (77, 78 et 79)

Trois dérivés de la quercétine isolés de *C. laurifolia* (**77**, **78** et **79**) ont également été testés contre la DV-NS5 RdRp. Parmi ceux-ci, **78** et **79** présentent une CI_{50} inférieure à 10 μ M et présentent pour cela un fort potentiel antidengue.

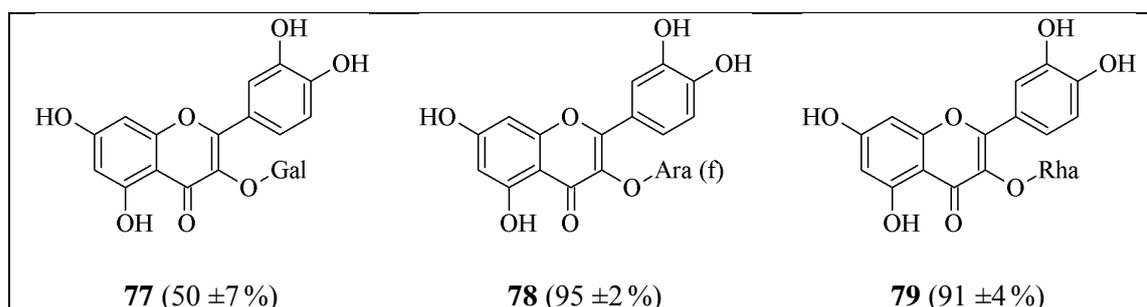


Figure 65. Schéma de l'hyperoside (**77**), de l'avicularine (**78**) et de la quercitrine (**79**) et pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp de ces composés à 10 μ g/mL.

Nous voyons dès à présent que la nature du substituant influence l'activité de ces flavonoïdes puisque la quercétine substituée par l'arabinose (**78**) ou le rhamnose (**79**) sont plus actifs que la quercétine substituée par un galactose (**77**). Les travaux portant sur la caractérisation de l'activité biologique de ces composés doivent être poursuivis (mesure de la CI_{50} contre la DV-NS5 puis de l'activité *in vitro*) mais permettent dès à présent de conclure au fort intérêt des dérivés de flavonols pour la recherche de composés antiviraux inhibant la réplication du DV. Il semblerait intéressant à la vue de ces résultats de tester des dérivés de la quercétine possédant un plus large panel de substituants.

6.1.3. Inhibition de la DV-NS5 par l'acide bétulinique (81)

Pour finir, l'acide bétulinique (**81**) également isolé à partir des feuilles de *C. laurifolia* présente aussi un fort potentiel antidengue du fait de la forte inhibition de la DV-NS5 RdRp qu'il provoque ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$).

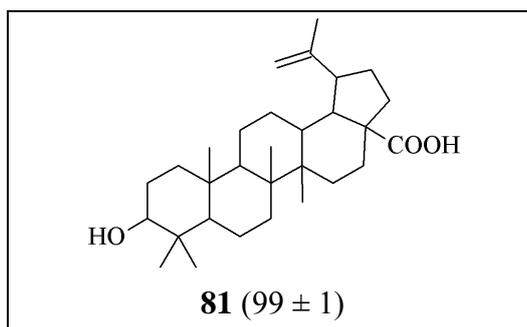


Figure 66. Schéma de l'acide bétulinique (**81**) et pourcentage d'inhibition de la DV-NS5 RdRp de ces composés à 10 $\mu\text{g/mL}$.

Les résultats obtenus avec l'acide bétulinique sont très enthousiasmants pour la recherche d'un composé antiviral actif contre la dengue. Pour cela, les travaux de caractérisation de l'activité biologique de ce composé doivent se poursuivre comme pour les flavonoïdes. Si, comme nous l'attendons, la CI_{50} de l'acide bétulinique contre la DV-NS5 est inférieure ou proche de 1 μM , une évaluation plus large de l'activité des triterpènes nous semblerait intéressante. Alors que nous avons désormais connaissance du potentiel antidengue de l'acide bétulinique, un triterpène de la famille des lupanes, d'autres squelettes et degrés d'oxydation pourraient être testés contre la DV-NS5 et *in vitro*, contre des cellules infectées.

6.2. Autres flavonols glycosylés testés contre la DV-NS5 RdRp

Sur la base des résultats obtenus avec les différents flavonoïdes isolés de *C. laurifolia*, une étude des relations structure-activité (SAR) a été initiée contre la DV-NS5 RdRp. Pour cela, différents flavonoïdes de nature proche de ceux présentant un fort potentiel antidengue ont été testés. Pour cette étude nous bénéficions des résultats obtenus avec les différents flavonoïdes non glycosylés présentés dans la figure 47. Ces derniers avaient souligné l'activité particulièrement forte de la quercétine (**82**). Nous nous sommes alors intéressés à l'effet de variations des substituants des groupements hydroxyles en positions 3, 7 et 3'.

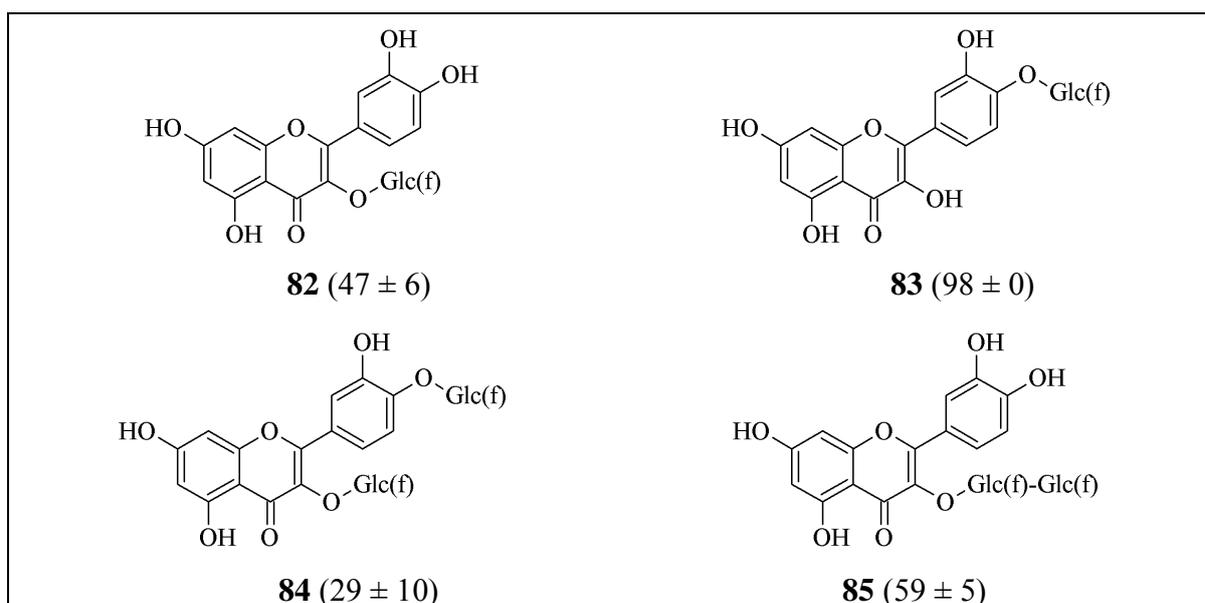


Figure 67. Structures et inhibition de la DV-NS5 RdRp (%) à 10 μ M des dérivés commerciaux de la quercétine : **82** : isoquercitrine ; **83** : spiraéoside ; **84** : quercétine-3,4'-di-O-glucoside ; **85** : rutine.

Comme le montraient les résultats d'inhibition de la DV-NS5 par les composés **77**, **78** et **79**, la structure sucre module l'activité de l'enzyme. Il apparaît

ainsi que la substitution en position 3 par un glucose ou un galactose dans **83** et **797** réduit considérablement le potentiel antidengue de la quercétine alors que la substitution par l'arabinose ou le rhamnose respectivement pour **78** et **79** augmente l'activité. D'autre part, la substitution par un glucose en position 4' dans **83** augmente significativement l'activité par rapport à celle mesurée pour **82**. Pour finir, aucune augmentation significative de l'activité n'est observée pour les composés diglycosylés (**84** et **85**).

Conclusion et Discussion

Cette étude de *C. laurifolia* est la première étude phytochimique d'une espèce du genre *Carpolepis*. Cinq flavonoïdes et un triterpène, l'acide bétulinique ont ainsi été identifiés dans l'extrait méthanolique des feuilles de cette plante endémique de Nouvelle-Calédonie. Cette plante semble riche en dérivés glycosylés de la quercétine (**77**, **78** et **79**), des composés fréquemment observés chez les Myrtaceae^{292,293,294,295}. La présence de la 6-C-méthyl-7-méthoxyapigénine (**80**) est quant à elle plus rare et, bien que décrit précédemment dans d'autres Myrtaceae²⁹⁶, ce composé est isolé pour la première fois dans le groupe des Metrosideroideae. Parmi les composés majoritaires de l'extrait total des flavonoïdes des feuilles de *C. laurifolia*, **78** et **79**, ainsi qu'un autre dérivé commercial de la quercétine (**83**) ont montré une forte inhibition de la DV NS5 RdRp confirmant ainsi le fort intérêt des flavonoïdes pour la recherche d'antiviraux en général²⁷¹ et particulièrement pour la recherche de composés antidengue. Cette conclusion est par ailleurs à mettre en parallèle avec les résultats obtenus avec les biflavonoïdes des *Dacrydium spp.* Le potentiel antidengue de ces composés se poursuit actuellement par la mesure de la CI₅₀ contre la DV-NS5 RdRp et l'évaluation de leur cytotoxicité.

D'autre part l'acide bétulinique (**81**), un triterpène de la famille des lupanes largement distribué dans le monde végétal a été isolé à partir des feuilles de *C. laurifolia* et présente également un fort potentiel pour la lutte contre le DV. Il est intéressant de noter que cette molécule est déjà décrite dans la littérature pour ses potentialités pharmacologiques et notamment antivirales²⁹⁷. Des résultats supplémentaires sont attendus quant au potentiel antidengue de ce composé qui devrait être évalué prochainement contre des cellules infectées par le virus. Une étude SAR des triterpènes contre la DV-NS5 pourrait être menée à la suite de ces travaux.

Beaucoup de travail reste à faire sur la phytochimie de cette plante et la caractérisation du potentiel biologique des composés mis en évidence ici, cependant, les résultats obtenus sont très encourageants et confirment l'intérêt de cette plante et des flavonoïdes pour le développement d'une thérapie contre le DV.

Partie expérimentale

1. Récoltes des plantes sélectionnées

Les récoltes ont été effectuées dans les provinces Nord et Sud de la Nouvelle-Calédonie au cours d'une période s'étendant de février 2009 à août 2011. Pour chaque récolte, un échantillon d'herbier de référence est stocké à l'herbier du centre IRD de Nouméa sous la référence indiquée dans le tableau 30. L'identification des plantes a été confirmée par le Dr. Jérôme Munzinger, responsable de l'herbier de Nouvelle Calédonie.

Tableau 31. Liste et localisation des espèces végétales récoltées pour notre étude.

Famille	Espèce	Numéro de récolte	Coordonnées GPS	Localité
Amborellaceae	<i>Amborella tricopoda</i> Baill.	Cou 27	165°54'44" E 21°37'53" S	Plateau de Dogny
Annonaceae	<i>Meiogyne tiebaghiensis</i> Heusden	Cou 25	165°54'56" E 21°37'29" S	Plateau de Dogny
Apocynaceae	<i>Gymnema tricholepis</i> Schltr.	Cou 04	166°23'21" E 22°15'11" S	Nouvelle
	<i>Secamone elliptica</i> R.Br.	Cou 05	166°23'21" E 22°15'11" S	Nouvelle
Araceae	<i>Epipremnum pinnatum</i> Engl.	Cou 22	165°54'00" E 21°38'10" S	Plateau de Dogny
Araliaceae	<i>Meryta balansae</i> Baill.	Cou 19	165°54'07" E 21°36'05" S	Plateau de Dogny
Araucariaceae	<i>Agathis moorei</i> Masters	Ad 13	165°02'00" E 20°56'33" S	Plateau de Tango
	<i>Agathis ovata</i> Warb.	Ad 08	166°54'20" E 22°10'01" S	Col de Yaté

Casuarinaceae	<i>Gymnostoma</i>	Ad 17	165°01'01" E	Rivière confiance
	<i>chamaecypris</i> L. Johnson		20°58'58" S	
	<i>Gymnostoma</i>	Ad 06	166°50'11" E	Creek Pernod
	<i>deplancheanum</i> L. Johnson		22°10'52" S	
Combretaceae	<i>Terminalia catappa</i> L.	Ad 01	166°26'30" E 22°18'05" S	Nouméa
Ebenaceae	<i>Dyospiros</i> <i>macrocarpa</i> Hiern	Ad 26	165°01'11" E 20°57'43" S	Plateau de Tango
Euphorbiaceae	<i>Codiaeum variegatum</i> A.Juss.	Ad 02	166°26'30" E 22°18'05" S	Nouméa
	<i>Excoecaria agallocha</i> L.	Ad 05	166°23'18" E 22°15'18" S	Nouvelle
	<i>Glochidion</i> <i>billardierei</i> Baill.	Ad 10	165°03'05" E 20°58'39" S	Nouvelle
	<i>Homalanthus</i> <i>repandus</i> Schltr.	Cou 08	166°30'43" E 22°10'30" S	Mont Koghis
Goodeniaceae	<i>Scaevola balansae</i> Guillaumin	Cou 33	166°47'34" E 22°11'45" S	Forêt cachée
	<i>Scaevola beckii</i> Zahlbr.	Cou 10	166°48'10" E 22°17'4" S	Route de Prony
	<i>Scaevola montana</i> Labill.	Ad 21	164°58'28" E 21°19'06" S	Route de Prony
	<i>Scaevola sericea</i> G.Forst.	Cou 02	166°28'21" E 21°46'0" S	Grand Borendy
Lauraceae	<i>Cassytha filiformis</i> L.	Ad 18	165°02'05" E 20°58'38" S	Rivière confiance
Leguminosae	<i>Cassia occidentalis</i> L.	Cou 23	165°54'32" E 21°38'06" S	Plateau de Dogny
	<i>Entada phaseoloides</i> Merr.	Ad 12	165°05'05" E 20°59'04" S	Plateau de Tango

Lycopodiaceae	<i>Lycopodiella cernua</i> L.	Cou 15	166°21'38" E 21°54'15" S	Mont Vulcain
Malvaceae	<i>Melochia odorata</i> L.f.	Cou 01	166°28'21" E 21°46'07" S	Grand Borendy
	<i>Thespesia populnea</i> Sol. ex Correa	Cou 06	166°49'09" E 22°19'31" S	Baie de Prony
Marattiaceae	<i>Angiopteris evecta</i> Hofm.	Ad 14	165°05'03" E 20°59'01" S	Plateau de Tango
	<i>Ptisana attenuata</i> Labill.	Cou 21	165°54'24" E 21°36'53" S	Plateau de Dogny
Meliaceae	<i>Dysoxylum roseum</i> C.DC.	Cou 26	165°54'09" E 21°37'04" S	Plateau de Dogny
Myrtaceae	<i>Carpolepis laurifolia</i> J.W.Dawson	Ad 27	165°05'05" E 20°59'04" S	Plateau de Tango
	<i>Melaleuca</i> <i>quinquenervia</i> S.T. Blake	Ad 04	166°23'54" E 22°15'02" S	Nouméa
Podocarpaceae	<i>Dacrydium</i> <i>araucarioides</i> Brongn. & Gris	Cou 11	166°50'7" E 22°16'02" S	Route de Prony
	<i>Dacrydium balansae</i> Brongn. & Gris	Cou 14	166°21'48" E 21°54'30" S	Mont Vulcain
	<i>Dacrydium</i> <i>guillauminii</i> J. Buchholz	Cou 41	166°53'49" E 22°16'00" S	Plaine de lacs
	<i>Dacrydium</i> <i>lycopodioides</i> Brongn. & Gris	DUM 005	166°20'00" E 22°03'05" S	Mont Mou
Rhamnaceae	<i>Emmenospermum</i> <i>pancherianum</i> Baill.	Cou 03	166°23'21" E 22°15'11" S	Nouvelle
Rhizophoraceae	<i>Bruguiera</i> <i>gymnorhiza</i> L.	Cou 07	166°49'09" E 22°19'31" S	Baie de Prony

	<i>Crossostylis grandiflora</i> Pancher	Cou 30	166°00'00" E 21°47'30" S	Pic Ouitchambo
Rubiaceae	<i>Guettarda speciosa</i> L.	Ad 25	164°58'30" E 21°20'29" S	Presqu'île de Pindaï
	<i>Psychotria poissoniana</i> Baill	Cou 20	165°54'56" E 21°36'56" S	Plateau de Dogny
Rutaceae	<i>Myrtopsis corymbosa</i> Labill.	Cou 12	166°50'18" E 22°16'43" S	Route de Goro
	<i>Myrtopsis corymbosa</i> Labill.	Cou 39	166°49'07" E 22°16'73" S	Route de Goro
	<i>Myrtopsis macrocarpa</i> Schltr.	Cou 32	166°47'34" E 22°11'45" S	Forêt caché
	<i>Myrtopsis selingii</i> Guill.	Cou 38	166°43'09" E 22°18'24" S	Plaine du champ de bataille
Sapotaceae	<i>Pycnandra acuminata</i> Pierre	Ad 28	22°16'17" S 166°56'54" E	Plaine des lacs
Simaroubiaceae	<i>Soulamea tomentosa</i> Brongn. & Gris	Ad 24	164°58'42" E 21°20'19" S	Presqu'île de Pindaï
Smilacaceae	<i>Smilax purpurata</i> Forster & G. Forster	Ad 11	165°04'05" E 20°58'44" S	Rivière Confiance
Solanaceae	<i>Solanum mauritianum</i> Scop.	Cou 18	166°30'30" E 22°10'41" S	Mont Koghis
	<i>Solanum tetrandrum</i> R. Br.	Cou 13	164°57'57" E 21°19'04" S	presqu'île de Pindaï
	<i>Solanum torvum</i> Sw.	Cou 17	166°30'28" E 22°10'04" S	Mont Koghis
Thymelaeaceae	<i>Solmsia cf. calophylla</i> . Baill.	Ad 29	166°36'32" E 22°15'11" S	col de Plum
	<i>Wickstroemia indica</i> Meyer	Cou 09	166°49'22" E 22°19'41" S	Baie de Prony
Urticaceae	<i>Pipturus argenteus</i> Wedd.	Cou 16	166°30'18" E 22°10'30" S	Mont Koghis

Les différents organes des plantes récoltées, le plus souvent feuilles (Fe) et écorces (Ec) mais parfois fruits (Fr) et fleurs (Fl) lorsque les ressources étaient suffisantes, ont été séchés séparément à 37°C dans un séchoir adapté. Les différents organes ont alors été broyés à l'aide d'un broyeur FORPLEX F1 et les poudres sont stockées à l'abri de la lumière dans une chambre froide.

2. Préparation des extraits bruts

50 g de poudre alors obtenus ont été extraits par l'acétate d'éthyle (AcOEt) à l'aide d'un système d'extraction par solvant automatisé (ASE 300 Dionex ®). Cet appareil permet une extraction des poudres sous pression (105 bars) et température standardisée (40°C), rapide et automatisée de 12 cartouches. L'extraction a été effectuée par 5 cycles de percolation par l'AcOEt. Le solvant a ensuite été évaporé sous pression réduite et à faible température ($\leq 40^\circ\text{C}$) pour ne pas dénaturer les composés du mélange, à l'aide d'un évaporateur rotatif (figure 68). L'extrait brut obtenu est stocké dans un pilulier référencé, conservé au froid et à l'abri de la lumière.



Figure 68. Evaporation sous pression réduite et filtration sur gel de polyamide.

80 à 100 mg de chaque extrait brut, destinés à la réalisation des tests biologiques, ont été finalement filtrés sur une cartouche de polyamide (Chromabond® PA) afin d'enlever les polyphénols, jugés responsables de nombreux résultats faux-positifs (figure 68)¹⁹⁸.

3. Tests biologiques

3.1. Test enzymatique contre la DV-NS5

Au cours de ce test, nous avons mesuré l'activité d'inhibition des extraits bruts de plantes calédoniennes sur la DV2 NS5-RdRp, domaine C-terminale de la protéine NS5 du DV, provenant de la souche C de Nouvelle-Guinée du virus. Ce test a aussi été utilisé pour réaliser le fractionnement bioguidé et évaluer le potentiel antidengue des composés isolés de plantes sélectionnées. Les composés actifs ont ensuite été testés selon le même protocole contre la DV-NS5 totale^{44,115}.

3.1.1. Production et purification de l'enzyme

La région codant pour la partie RdRp du gène de la NS5 peut être purifiée en suivant le protocole mis au point par l'AFMB⁴⁴. Marqué par 6 histidines en position N-terminale, le gène codant pour la NS5 RdRp est exprimé grâce au vecteur pQE30 (Quiagen) par les cellules *E. coli* Rosetta pLacI (Novagen). La transcription protéique se déroule pendant une nuit à 17°C et est induite par l'ajout de 50 µM d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), avec 2% d'EtOH et par un choc thermique à 4°C pendant 30 min. La protéine NS5 RdRp est alors extraite par sonication dans un

tampon de lyse, une solution à 50 mM de phosphate de sodium (Na_3PO_4), à pH= 7,5 avec 300 mM de NaCl, 10% de glycérol et 5 mM de chlorure de magnésium (MgCl_2), en présence de DNase I, de phénylméthylsulfonyle fluoré (PMSF), d'un mélange d'inhibiteurs des protéases (SIGMA) et de lysozyme. La purification de l'enzyme est effectuée en plusieurs étapes : après centrifugation, la fraction soluble est mise à incuber dans un bain en présence d'une résine TALON « metal-affinity » (Clontech). Cette résine est rincée à deux reprises à l'aide d'un tapon de fixation et une troisième fois avec ce même tampon additionné de 20 mM d'imidazole. Les protéines sont ensuite éluées à l'aide du tampon additionné de 500 mM d'imidazole. Après une étape de filtration de la solution par dialyse dans un tampon Tris à 10 mM (pH= 7,5, 300 mM de NaCl, 5 mM de MgCl_2 , 20% de glycérol), les protéines sont solubilisées dans cette même solution tampon sans NaCl et chromatographiées sur une matrice Héparine-sépharose 6 fast flow (Amersham-Biosciences), en utilisant le tampon de fixation précédemment cité et additionné de 600 mM de NaCl. Une dernière étape de filtration sur gel, à l'aide d'une superdex 200 HR 30/11 (Amersham-Biosciences) permet d'obtenir la DV2 NS5 RdRp avec une pureté de 98%. L'enzyme purifiée est alors stockée à -20°C dans un tampon Tris à 10 mM, (pH= 7,5, 300 mM de NaCl, 40% de glycérol) ce qui permet une longue conservation sans perte d'activité.

3.1.2. Mesure de l'activité d'inhibition de la DV2 NS5

Pour mesurer l'activité ARN polymérase de la NS5, l'enzyme est mise en solution avec une matrice ARN homopolymérique poly(rC) et des $[^3\text{H}]$ -GTP. L'enzyme va alors synthétiser un brin d'ARN complémentaire du poly(rC) en intégrant de la guanine radioactive. La radioactivité, détectée après un temps déterminé, sera d'autant moins forte que l'enzyme sera inhibée. Ce criblage *in vitro*

consiste donc à mesurer l'incorporation des nucléotides marqués dans l'ARN synthétisé par l'enzyme. La matrice poly(rC) et la solution de [³H]-GTP (5,1 Ci/mmol) utilisées pour ce test sont commercialisées par Amersham Biosciences. Le criblage est effectué dans des plaques 96 puits contenant 80 extraits chacune. La réaction se déroule dans un volume de 20 µL (1 µM de matrice poly(rC), DV2 NS5 RdRp 10 µM, [³H]-GTP entre 0,01 et 0,05 µCi/µL). Les témoins, placés dans la première et la dernière colonne, sont constitués par le mélange réactionnel (50 mM HEPES pH 8,0, 10 mM KCl, 2 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 nM fr poly(rC), 20 nM de NS5 RdRp) additionné de 10 µM [³H]-GTP (0,25 µCi) et de 5 % DMSO pour le témoin positif ou de 20 mM EDTA pour le témoin négatif. Pour chaque test, le mélange enzymatique est réparti dans les puits à l'aide d'un robot BioMek 3000 automate (Beckman). Les 80 extraits bruts sont alors ajoutés à l'aide d'un robot BioMek NX automate (Beckman) pour une concentration finale de nos extraits de 10 µg/mL et 5% de DMSO. La réaction est alors initiée par l'ajout d'un mélange contenant 10 µM [³H]-GTP (0,25 µCi), Mn²⁺ et Mg²⁺ et la plaque est incubée à 37°C pendant 20 min. La réaction est finalement stoppée par l'ajout d'EDTA (concentration finale de 100 mM). La répartition de la solution de [³H]-GTP ainsi que de l'EDTA est effectuée à l'aide du robot Biomek 3000 automate. Les produits réactionnels sont alors transférés à l'aide d'un appareil Packard Filtermate® Harvester sur une membrane DE-81 (Whatman International Ltd.) prétraitée par une solution à 50 mM d'EDTA. Le filtre est rincé trois fois par une solution à 0,3 M de formate d'ammonium, pH 8,0, puis deux fois à l'éthanol, et finalement séché dans un four à micro-ondes pendant 2 minutes. Ces étapes de rinçages successifs nous permettent de conserver sur le filtre les polymères d'ARN et d'éliminer les monomères [³H]-GTP. La radioactivité liée aux polymères d'ARN fixés sur le filtre, est déterminée en utilisant un liquide de scintillation à l'aide d'un conteur de scintillation en milieu liquide (Wallac Microbeta® Trilux). Les extraits présentant une inhibition de la DV2 NS5 RdRp supérieure ou

égale à 80 % sont qualifiés de très actifs contre l'enzyme.

Un traitement statistique permet, grâce aux trois répétitions, de moyenniser les mesures d'inhibition, en nous donnant un écart-type pour chaque valeur. Les valeurs de scintillation obtenues avec les tests avec du DMSO seul nous donnent l'activité 100% de l'enzyme, alors que les mesures de scintillation du mélange sans enzyme nous donne la valeur de bruit de fond que l'on retranche à la moyenne des blanc avant de calculer les pourcentages d'inhibition des témoins positifs (EDTA et dGTP) et de nos inhibiteurs potentiels (Extraits bruts ou fractions purifiées). La qualité des mesures est validée pour chaque plaque par le calcul du facteur Z'. $Z' = 1 - ((3SD(neg) + 3SD(pos)) / (avg(neg) - avg(pos)))$, où SD(neg) et SD(pos) représentent la déviation standard observée avec les témoins positifs et négatifs, et avg(neg) et avg(pos) sont les valeurs moyennées pour ces témoins. Z' présentant pour les différentes plaques, une valeur moyenne de 0,834 avec une valeur de 0,058 pour la déviation standard, nous indique une bonne séparation entre les données relatives à la ligne de base et les signaux positifs. Pour chaque extrait, le pourcentage d'inhibition de l'enzyme est calculé comme suit : $Inhibition (\%) = 100 (moyenne des valeurs pour l'extrait - avg(pos) / (avg(neg) - avg(pos)))$.

3.1.3. Test contre un réplicon

Les réplicons sont des cellules dont le génome est modifié pour exprimer les protéines non-structurales du DV, dont la NS5. L'utilisation de ces réplicons nous permet d'avoir une idée de l'inhibition des composés testés contre la DV-NS5 dans un contexte cellulaire sans avoir à manipuler de virus pathogène. La mesure de l'inhibition de la DV-NS5 RdRp dans un réplicon est réalisée selon un protocole mis au point par l'AFMB⁵⁰. Brièvement, les cellules réplicons COS-DV EGFP sont placées dans des plaques 96 puits avec une densité de 10^4 cellules par puits dans un milieu de culture incolore et complété avec 0,5% de DMSO. Après 24h, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont mises à incubées dans 100 μ L du même milieu additionné des composés à tester. Ces composés sont testés en triplicata à différentes concentrations. La ribavirine est utilisée comme témoin positif à 10 μ M alors que le témoin négatif est réalisé par addition de DMSO 5%. Après une autre période d'incubation de 24h à 37°C, le milieu de culture est renouvelé. Les cellules sont mises en présence des potentiels inhibiteurs pendant 48h. Le facteur de fluorescence EGFP est alors détecté dans chaque puits à l'aide d'un fluorimètre Tecan Safirell® à 490 nm et 510 nm. Après cela, la viabilité cellulaire est évaluée en utilisant le réactif Celltiterblue® (Promega) d'après le protocole décrit par le fabricant. Finalement, l'inhibition de la DV-NS5 dans le réplicon est définie comme le ratio entre l'absorbance à 510 nm et le nombre moyen de cellules pour chaque composé et chaque concentration. Les résultats présentés sont alors exprimés en pourcentage de la moyenne des valeurs obtenues pour les témoins négatifs.

3.2. Inhibition de l'ARN polymérase d'autres virus

La spécificité d'action des composés actifs contre la DV-NS5 RdRp est évaluée en testant ces composés contre la polymérase d'autres virus. Certains composés particulièrement prometteurs pour le développement d'une thérapie contre la dengue ont ainsi été testés contre la NS5 du virus de Nil occidental (WNV-NS5) et du virus de la diarrhée viral du bovin (BVDV-NS5) selon un protocole proche de celui décrit plus haut contre la DV-NS5 et détaillé dans la littérature^{44,298}. De même que pour la DV-NS5, la CI_{50} de chaque composé a pu être déterminée par l'analyse des résultats obtenus à différentes concentrations (0, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50 et 100 μ M).

3.3. Mesure de cytotoxicité

3.3.1. Evaluation de la cytotoxicité contre les cellules KB et MRC5

Ces tests de cytotoxicité consistent à mesurer la viabilité des cellules en culture lorsqu'elles sont mises en présence de nos extraits. La réalisation de ces tests a deux objectifs : d'une part évaluer la toxicité des extraits bruts des plantes actifs contre la DV2 NS5 RdRp et d'autre part de faire une première évaluation des potentialités anticancéreuses de nos extraits bruts. Pour cela deux souches cellulaires sont utilisées, des cellules de tissus sains MRC5 (cellules embryonnaires de poumon humain) et des cellules cancéreuses KB (cellules de carcinome du nasopharynx). La cytotoxicité (ou le potentiel anticancéreux) de nos extraits est jugée d'autant plus forte que l'inhibition de la croissance cellulaire est importante.

Le test utilisé au cours de nos travaux est basé sur la mesure de l'activité des déshydrogénases mitochondriales, enzymes fonctionnelles uniquement dans les cellules vivantes. Le principe de ce test est basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium XTT (acide benzo-3,3-(1(1-phénylaminocarboxyl)-3-4-tétrazolium bis(4-méthoxy-6-nitro)) sulfonique de sodium hydraté) par les déshydrogénases mitochondriales en présence d'un agent couplant d'enzymes (le coenzyme Q). La réduction du sel de tétrazolium XTT libère des cristaux de formazan, un composé hydrosoluble jaune orangé. Une altération de la viabilité cellulaire entraîne alors une modification de la quantité de formazan produite et la densité optique (DO à 490 nm) est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes. Ce test est réalisé sur des cellules MRC5 et KB réparties dans des plaques de 96 puits à raison de 500 à 800 cellules par puits (200 μ L). Les cellules sont mises en culture dans un milieu « Dulbecco's modified Eagle » additionné de 25 mM de glucose, 10% (v/v) de sérum de veau fœtal, 100 UI de pénicilline, 100 μ g/mL de streptomycine, et 1,5 μ g/mL d'amphotéricine B. Les cultures cellulaires sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Après 24h de culture, les extraits bruts sont ajoutés pour une concentration finale de 50 μ g/mL et moins de 1% de DMSO. Chaque mesure est réalisée en triplicata. Les cellulesensemencées dans les puits témoins de la plaque ne sont pas exposées aux extraits (témoins de viabilité). Après 72h d'incubation, le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire lavé deux fois avec du PBS (Sigma, France) pour éliminer le sérum de veau fœtal et le rouge de phénol, car ces deux substances interfèrent dans la réaction de transformation du XTT. 50 μ L d'une solution préparée extemporanément à 0,5 mg/mL de XTT (Sigma, France) et 40 μ g/mL de coenzyme Q (Sigma) dans du DMEM (milieu de culture modifié de Dulbecco) sans rouge de phénol sont déposés sur le tapis cellulaire et la plaque est incubée pendant 3 heures à 37°C. La réaction est arrêtée avec 100 μ L de sodium dodécylsulfate (SDS) 10% (Sigma, France).

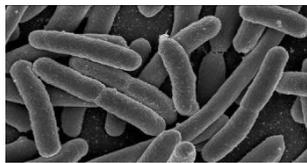
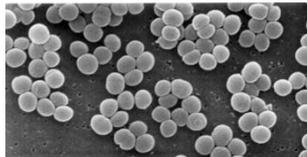
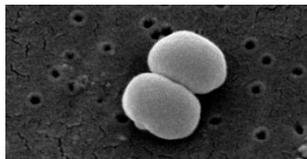
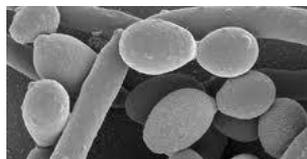
3.3.2. Evaluation de la cytotoxicité contre les cellules COS et BHK

Les cellules COS et BHK sont cultivées dans un milieu incolore et mises à incuber dans une plaque 96 puits (10^4 cellules par puits). Après 24h à 37°C, le milieu de culture est vidé et les cellules sont mises à incuber dans 100 μ L du même milieu de culture additionné des différents composés à testés à différentes concentrations. Le milieu de culture est renouvelé au bout de 24h d'incubation et la mesure de cytotoxicité est réalisée après 48h de mise en présence des composés à tester. Une gamme étalon de cellules fraîchement mises en culture (incubées pendant 6 à 8h) est réalisée entre 1×10^4 et 6×10^4 cellules par puits. Les mesures de cytotoxicité sont alors réalisées en utilisant le réactif Celltiterblue® (Promega) d'après le protocole décrit par le fabricant. Ce test repose sur la capacité des cellules vivantes de convertir la résazurine en un composé fluorescent, la résorufine par une réaction redox. Le taux de survie cellulaire est donc évalué à l'aide d'un fluorimètre.

3.4. Tests antibiotiques

L'activité antibiotique a été évaluée sur trois souches bactériennes (*E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis*) et sur une levure (*C. albicans*) responsables de nombreuses pathologies humaines comme le montre le tableau 31. Ces tests sont réalisés par la méthode des disques de diffusion qui est une méthode semi-quantitative, simple à mettre en place et peu onéreuse pour étudier les activités antibactériennes et antifongiques de souches à croissance rapide²⁹⁹.

Tableau 32. Caractéristiques de différentes souches microbiennes ciblées.

Espèce	Caractéristiques	Pathologies induites	Illustration
<i>Escherichia coli</i> Migula	Bacille Gram négatif	Bactérie fréquente du tube digestif, toxique selon la souche : responsables d'infections intestinales ou extra intestinales	 wikipedia.org
<i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach	Coque Gram positif	Infections cutanéomuqueuses (possibilité de septicémie), infections nosocomiales et intoxications alimentaires. Fréquemment multirésistante aux antibiotiques.	 http://www.sorbonnard.com
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Rosenbach	Coque Gram positif	Bactérie commensale opportuniste, responsable d'infections nosocomiales. Fréquemment multirésistantes aux antibiotiques.	 wikipedia.org
<i>Candida albicans</i> Berkhout	Levure	Responsables de nombreuses infections nosocomiales, infections de la peau et des muqueuses	 http://www.graphicshunt.com

Ces tests sont réalisés dans des boîtes de Pétri dans lesquelles les microorganismes sont mis en culture sur du milieu Mueller-Hinton (MH), après stérilisation à l'autoclave à 120°C durant 20 minutes. 2 à 3 colonies isolées par la technique des stries à partir de souches fraîchement repiquées sont utilisées pour ensemercer par inondation chaque boîte de Pétri. 20 µL de chaque extrait brut filtré à 50 mg/mL dans du MeOH sont déposés sur un disque stérile de 6 mm de diamètre pour une masse finale d'extrait égale à 1 mg. Les témoins utilisés pour notre étude sont la gentamicine (10 µg par pastille) pour les *Staphylococcus spp.* et le chloramphénicol (30 µg par pastille) pour *E. coli* de BBL™ Sensi-Disc™. Des

disques imprégnés par 25 µg d'amphotéricine B (PAN biotech) sont utilisés comme témoin contre *C. albicans*. Le diamètre d'inhibition (en mm) du témoin ainsi que ceux des extraits sont mesurés après 48h d'incubation dans une étuve à 37°C. Chaque test est réalisé en triplicata et les résultats présentés dans ce manuscrit (Seconde partie) sont la moyenne des diamètres d'inhibition observés.

4. Chimie analytique

4.1. Criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est réalisé selon un protocole adapté de l'analyse de drogues végétales inconnues décrite par Wagner et Bladt¹⁹⁹. 2 g de poudre de chaque organe des plantes sélectionnées sont extraits respectivement par macération dans 10 mL de DCM, de MeOH et de MeOH après imprégnation pendant une nuit par de l'ammoniaque à 20%. Deux systèmes sont ensuite utilisés pour éluer les composants de ces extraits sur des plaques CCM de silice. Le système A est un mélange d'AcOEt, de MeOH et d'eau dans les proportions 100:13,5:10 et le système B est un mélange de toluène et d'AcOEt dans les proportions 93:7. Une fois éluées, les plaques sont visualisées à 254 et à 365 nm et sont révélées avec le révélateur de Neu, de la vanilline sulfurique ou avec le réactif de Dragendorff. Le réactif de Mayer est également utilisé pour la détection d'alcaloïdes en milieu liquide. Ce protocole nous permet de détecter sept grandes familles de métabolites secondaires : les alcaloïdes, les coumarines, les flavonoïdes, les phénols, les saponines, les stérols, les terpènes et les tannins.

Tableau 33. Mise en évidence de différents métabolites secondaires d'intérêt pharmacologique dans les plantes bioactives.

Famille chimique recherchée	Extrait	Elution et révélation	Analyse des résultats
Alcaloïdes	Ammoniaque + MeOH	élution A & révélation au réactif de Dragendorff 3 gouttes de réactif de Mayer ajoutées à 1mL d'extrait	Coloration brune (bien observer la ligne de base). Souvent à la base de la CCM. trouble la solution ou forme un précipité si les composés sont abondants
Coumarines	DCM	élution B & visualisation à l'UV	Absorbent à 254 nm et sont bleues à 365 nm (voire bleue-vert pour les furanocoumarines)
Flavonoïdes	MeOH	élution A & révélation au réactif de Neu	Coloration jaune, orange ou vert intense à 365 nm après révélation
Phénols	MeOH	élution A & révélation au réactif de Neu	Coloration bleue à 365 nm avant et après révélation
Saponines	MeOH	élution A & révélation à la Vanilline sulfurique	Non détectées à l'UV puis bleue-violet après révélation
Stérols et terpènes	DCM	élution B & révélation à la Vanilline sulfurique	Parfois visible à 254 nm, puis bleue-violet après révélation
Tannins	MeOH	élution A & révélation à la Vanilline sulfurique	Rouge vif après révélation (forme souvent des trainées dans la partie basse de la CCM)

4.2. Recherche des principes actifs

4.2.1. Préparation des extraits

Suite au criblage biologique, plusieurs plantes ont été sélectionnées en vue d'isoler des composés actifs contre la DV-NS5 RdRp pour proposer des candidats médicament contre la dengue. Le criblage phytochimique ainsi que les données chimiotaxonomiques relatives au taxon des espèces sélectionnées ont alors permis de déterminer les familles chimiques supposées responsables de l'activité biologique mesurée pour les extraits bruts. Au cours de notre étude, nous nous sommes alors intéressés aux coumarines et alcaloïdes présents dans les *Myrtopsis spp* (Rutaceae) ainsi qu'aux flavonoïdes des *Dacrydium spp* (Podocarpaceae) et de *Carpolepis laurifolia* (Myrtaceae).

4.2.2. Extraction totale des coumarines

Les coumarines de *M. corymbosa* sont obtenues à partir de 500 g de poudre sèche des écorces de la plante. L'extraction est alors réalisée par épuisement de la poudre par macération et sonication dans le dichlorométhane (3× 1,5 L) à température ambiante. L'extrait est alors filtré sur Büchner et le solvant est évaporé sous pression réduite à température ambiante.

4.2.3. Extraction totale des alcaloïdes

L'extraction des alcaloïdes de *M. corymbosa* est réalisée à partir de 1 200 g de poudre des feuilles de la plante (Cou 39). Après imprégnation de la poudre par de l'ammoniaque à 20 % pendant 24h, la poudre est extraite par macération et sonication par 3 L de DCM à température ambiante pendant 3h. Après filtration sur Büchner, 2 L de solvant sont évaporés sous pression réduite à température ambiante. La solution est alors placée dans une ampoule à décanter et extraite par 1 L d'acide chlorhydrique (HCl) à 5%. La solution aqueuse est alors neutralisée par l'ajout d'ammoniaque à 20% et extraite par 1 L de DCM. Le pH de la solution est suivi au cours des différentes étapes d'extraction à l'aide de papier pH. La solution organique finale est évaporée sous pression réduite à température ambiante.

4.2.4. Extraction totale des flavonoïdes

Les flavonoïdes de *C. laurifolia* sont extraits à partir de 340 g de poudre sèche des feuilles de la plante (AD 27). Après un dégraissage par macération et sonication à température ambiante dans l'éther de pétrole (3× 1L), l'extrait total des flavonoïdes (B) est obtenu par macération et sonication à température ambiante pendant 3 h de la poudre dans 1 L de méthanol à 80%. Cette opération est réalisée trois fois consécutives. L'extrait total des flavonoïdes (B) est filtré et évaporé sous pression réduite puis remis en solution dans du méthanol à 80% et placé dans une ampoule à décanter. Les flavonoïdes sont alors extraits par 3 fois 1L d'acétate d'éthyle (B.2) alors que les composés plus polaires tels que les tannins sont éliminés dans la partie aqueuse (B.1).

Les flavonoïdes des *Dacrydium spp.* sont obtenus par macération de la poudre des feuilles dans le MeOH (1 L pour 300 g de poudre). Après sonication à température ambiante pendant 3H, l'extrait est filtré sur Büchner et évaporé sous pression réduite. L'extrait méthanolique est alors repris par 1 L de MeOH à 80% et extrait successivement par 3 × 500 mL de cyclohexane puis 3 × 500 mL (CH) de dichlorométhane (DCM). La phase organique (DCM) renferme alors les flavonoïdes des feuilles de la plante étudiée. La partie CH renferme les composés les plus apolaires. Pour étudier plus en détails ces composés, la partie CH obtenue avec *D. balansae* est évaporée sous pression réduite puis fractionnée dans une ampoule à décantée entre 1 L d'hexane (HEX) et 1 L d'acétonitrile (ACN).

4.3. Fractionnement bioguidé

Après avoir vérifié que l'activité biologique mesurée au cours du criblage préliminaire des extraits bruts est bien retrouvé dans l'extrait des métabolites ciblés dans les plantes sélectionnées, plusieurs étapes de fractionnement sont nécessaires pour isoler les principes actifs de ces extraits. Chaque étape de fractionnement est suivi par un test biologique contre la DV-NS5 RdRp (voire chapitre 3.1) permettant de sélectionner les fractions d'intérêt pour les étapes suivantes.

4.3.1. Matériel utilisé

Deux types de gels sont utilisés pour réaliser un fractionnement sur colonne ouverte : le gel de silice et le gel de séphadex LH-20. Dans le premier cas, deux types de granulométrie de silice sont utilisés en fonction de la masse des

échantillons à fractionner. Ainsi, les extraits bruts sont fractionnés sur des gels de silice préparés avec de la silice de granulométrie 0,063-0,200 mm (Merk) alors que les fractions de plus petite masse sont fractionnées sur des gels de silice préparés avec de la silice de granulométrie 0,040-0,063 mm (Merk). Les colonnes sont préparées avec une masse de silice équivalente à 30 fois la masse de l'échantillon à fractionner. Le fractionnement sur gel de séphadex LH-20 (Sigma-Aldrich) est réalisé en seconde intention afin de séparer des composés de masses distinctes ayant un comportement similaire sur gel de silice. Les systèmes d'élutions utilisées pour les différentes étapes de séparations sur colonne ouvertes sont mis au point sur CCM (Merk). Ces dernières sont également utilisées pour analyser les résultats des fractionnements. La purification des composés est finalisée lorsque cela est nécessaire à l'aide d'une HPLC-préparative Waters Deltaprep équipée d'un détecteur UV 2996 en utilisant une colonne Sunfire RP-18 (19x250 mm, 10 µm, Waters). Pour cela, le débit est fixé à 17 mL/min et la méthode utilisée (élution et détection UV) est déterminée à l'aide d'une HPLC analytique.

4.3.2. Méthodes employées

Tableau 34. Systèmes d'élutions utilisés pour le fractionnement bioguidé des extraits de plantes sélectionnés.

Systèmes d'élutions	Mélanges utilisés successivement			
S1	DCM 100% (1,5 L)	DCM/MeOH 95 :5 (1,5 L)	DCM/MeOH 70 :30 (1 L)	MeOH 100% (1 L)
S2	Isocratique : MeOH/ TFA 0,1% 45:55			
S3	DCM + HCOOH 0,1% (1 L)	DCM/Acétone 95:5 + HCOOH 0,1% (1 L)	DCM/Acétone 80:20 (500 mL)	MeOH 100% (500 mL)
S4	Isocratique : MeOH/ H ₂ O + TFA 0,1% 50:50			
S5	Isocratique : DCM/ACN/ CycloHEX 35:20:50			
S6	Isocratique : DCM /MeOH 3:1			
S7	Isocratique : TFA(0.5%)/MeOH 35:65			
S8	Toluene/Acétone/Diethylether/HE X 0:0:0:100 (500 mL)	Toluene/Acétone/Diethylether/HE X 2.5:1.25:1.25:95 (500 mL)	Toluene/Acétone/Diethylether/HE X 5:2.5:2.5:90 (500 mL)	
S9	Isocratique : Acétone/Toluene/HEX 2:28:70			
S10	Isocratique : HEX/Diethylether 8:2			
S11	Acétone/ CycloHEX 1:99 (400 mL)	Acétone/ CycloHEX 2:98 (400 mL)	Acétone/ CycloHEX 4:96 (400 mL)	Acétone/ CycloHEX 6:94 (400 mL)
S12	Isocratique : acétone/cyclohexane 3:97			
S13	DCM/MeOH 90:10	DCM/MeOH 75:25	DCM/MeOH 0:100	
S14	Isocratique : MeOH/H ₂ O 22:78			
S15	DCM/MeOH 92:8	DCM/MeOH 75:25	DCM/MeOH 0:100	
S16	Isocratique : MeOH/H ₂ O 30:70			
S17	Isocratique : MeOH/H ₂ O 28:72			
S18	Isocratique : CHCl ₃ /AcOEt/Ac. acétique 60:35:5			
S19	AcOEt/MeOH/HCOOH 100:0:2 2 L	AcOEt/MeOH/HCOOH 80:20:2 2 L	AcOEt/MeOH/HCOOH 60:40:2 2 L	AcOEt/MeOH/HCOOH 0:100:0 2 L
S20	AcOEt/MeOH 100:0 1 L	AcOEt/MeOH 60:40 1 L	AcOEt/MeOH 40:60 1 L	AcOEt/MeOH 0:100 1 L
S22	Isocratique : CHCl ₃ /Acétone/HCOOH 95:5:2			
S23	Isocratique : MeOH/TFA 0,1% 70:30			
S23	Isocratique : MeOH/TFA 0,1% 60:30			
S24	Isocratique : DCM/MeOH 50:50			

5. Elucidation structurale

Avant d'être évalués individuellement pour leurs potentialités pharmacologiques, la structure des composés isolés à partir des plantes sélectionnées pour nos travaux doit être déterminée par différentes techniques de spectrométrie et de spectroscopie.

5.1. Matériel utilisé

5.1.1. Chromatographie

Une HPLC analytique Agilent 1260 infinity series, équipée d'un détecteur à barrette de diode, est utilisée pour la mise au point des conditions d'élutions utilisées avec l'HPLC préparative.

Une HPLC-MS HP 1100 series équipé avec un détecteur à barrette de diode placé en série avec un spectromètre de masse, est utilisé pour l'étude générale des extraits sélectionnés. En effet, les spectres UV et MS des différents pics des chromatogrammes permettent de préciser les informations apportées par le criblage phytochimique. Cet appareil est également utilisé pour réaliser l'identification de composés par co-chromatographie. Cette technique a été utilisée pour la détection de quercétine (**65**) et de l'hyperoside (**77**) dans l'extrait total des flavonoïdes de *C. laurifolia* (Cinquième partie)

Une HPLC Brüker Esquire-LC permet quant à elle de réaliser les analyses LC-MSⁿ et d'obtenir ainsi le spectre de masse des composés appartenant aux extraits

bruts sélectionnés. Pour cela, un spectromètre de masse à trappe ionique équipé de deux sources d'ionisation, ESI (electrospray) et APCI (Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique), est couplé à une HPLC HP 1100 series. Cet appareil est utilisé dans le cadre d'une collaboration avec le Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites (SAMM) de la faculté de pharmacie de l'université Paris-Sud.

Toutes les analyses menées en HPLC analytiques sont réalisées avec une colonne Sunfire C18 (4.6x150 mm, 5 µm, Waters) et un débit de 1 mL/min.

5.1.2. Méthodes employées

Tableau 35. Systèmes d'élutions utilisés pour la réalisation des analyses HPLC-UV/MS des extraits de plantes sélectionnés.

Nom de la méthode	Elution utilisée
HPLC-1	gradient de MeOH/H ₂ O de 30:70 à 100:0 en 20 min détection UV : 330 nm
HPLC-2	gradient de MeOH/H ₂ O de 10:70 à 100:0 en 20 min détection UV : 254 nm
HPLC-3	gradient de ACN/TFA 0,1% de 20:80 à 100:0 en 30 min détection UV : 370 nm
HPLC-4	gradient de MeOH/ TFA 0,1% de 30:70 à 100:0 en 30 min détection UV : 260 nm

5.2. Spectrométrie et spectroscopie

5.2.1. Spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS)

Les données HRMS permettant la détermination précise de la formule brute des composés isolés, sont obtenues à l'aide d'un spectromètre de masse Brüker micrOTOF-Q II utilisée avec une source d'ionisation ESI ou APCI. Ces données nous sont fournies par le service SM de l'ICSN (UPR 231 CNR à Gif sur Yvette.

5.2.2. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)

L'élucidation structurale des composés isolés au cours de nos travaux s'appuie largement sur les données RMN obtenues à l'aide de deux appareils. Un spectromètre Avance 300 Brüker (300 MHz) équipé d'une sonde H et C et d'un passeur de 60 échantillons avec lequel sont obtenus les spectres RMN à une dimension ^1H et ^{13}C des composés pour lesquels nous disposons de plus de 2 mg. Les spectres RMN sont le plus souvent réalisés par J-modulation afin de distinguer la nature des carbones correspondants aux signaux (^{13}C , CH, CH₂ ou CH₃).

Un second spectromètre Avance 400 Brüker (400 MHz) équipé d'une sonde inverse multi-noyaux avec gradients, d'une sonde H-F, d'une microsonde 1,7mm (utilisée pour les échantillons dont nous disposons de moins de 2 mg) et d'un passeur de 6 échantillons. Cet appareil est utilisé pour les analyses RMN à deux dimensions COSY, HSQC et HMBC.

Selon la solubilité des molécules isolées, trois solvants deutérés ont été utilisés pour ces analyses : MeOD, CDCl₃, DMSO-d₆.

6. Composés commerciaux et hémi-synthétiques

En vue d'initier une étude SAR des biflavonoïdes et des flavonols isolés respectivement des *Dacrydium spp.* et de *C. laurifolia*, plusieurs composés commerciaux et hémi-synthétiques ont également été testés contre la DV-NS5.

6.1. Composés commerciaux

L'apigénine (57), la cupressuflavone (56), la pinocembrine (62), la naringénine (63), la galangine (64), la quercétine (65), la rhamnétine (66), le kaempférol (67), l'hyperoside (77), l'isoquercitrine (83), la spiraoésoside (83), la quercétine-3,4'-diO-glycoside (84) et la rutine (85) sont commercialisées par extrasynthèse®

6.2. Composés hémi-synthétiques

L'amentoflavone perméthylée (55) est préparée à partir de l'amentoflavone (39) mis en solution avec du DMF, de l'iodure de méthyle et du K_2CO_3 selon le protocole décrit dans la littérature (figure 69)³⁰⁰.

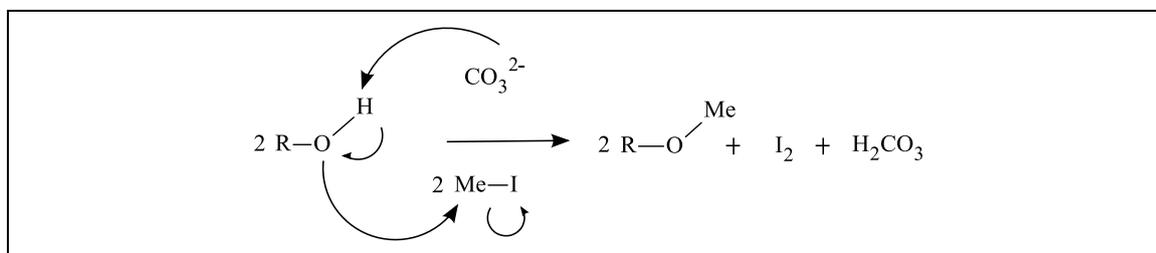


Figure 69. Schéma réactionnel de la méthylation de l'apigénine et de l'amentoflavone.

55 est ensuite purifié par HPLC-préparative à l'aide du système d'élution S16. Les dérivés de l'apigénine (58, 59, 60 et 61) ont également été préparés selon ce protocole et séparés sur une colonne de silice à l'aide du système d'élution S18 avant d'être recristallisés dans le méthanol.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité des recherches pharmacologiques effectuées en Nouvelle-Calédonie notamment menées à l'IRD et à l'UNC. Ces travaux visent d'une part à valoriser les ressources liées à la biodiversité végétale de la Nouvelle Calédonie et les connaissances empiriques associées à cette flore. D'autre part, ces travaux tendent à découvrir des composés bioactifs. Mes travaux de thèse ont eut pour principal objectif la découverte d'inhibiteurs du virus de la dengue, un virus affectant toute les régions tropicales du globe et contre lequel il n'existe aucun remède spécifique.

Dans la première partie de notre travail, 48 espèces végétales ont été récoltées dans les provinces Nord et Sud de la Grande Terre, en Nouvelle-Calédonie. Parmi celles-ci, 18 ont été sélectionnées sur des critères chimiotaxonomiques et 30 du fait de leur utilisation comme fébrifuge en médecine traditionnelle. 91 extraits bruts ont alors été préparés à partir des différents organes de chaque plante. Le potentiel pharmacologique de chaque extrait a ensuite été évalué en mesurant leur cytotoxicité, leur activité antibiotique et leur potentiel antidengue. Lors de ce criblage biologique, plusieurs plantes utilisées dans la médecine traditionnelle kanak, telles que *Agathis spp.*, les fruits de *Thespesia populnea*, *Carpolepis laurifolia* ou *Melaleuca quinquenervia*, ont démontré une activité sur plusieurs cibles microbiennes et ne sont pas cytotoxiques. Ces résultats confirment la valeur scientifique des connaissances empiriques de la médecine traditionnelle kanake et indiquent également une utilisation possible de ces plantes en phytothérapie.

Ce criblage a par ailleurs mis en évidence des plantes actives contre une cible spécifique. Ainsi, plusieurs plantes telles que *Gymnostoma deplancheanum*,

Scaevola sericea ou *Gymnema tricholepis* pourraient renfermer des composés à forte activité antibiotique. *Diospyros macrocarpa*, *Soulamea tomentosa*, *Scaevola montana* et *Scaevola beckii* semblent quant à elles renfermer des composés fortement cytotoxiques et pour cela, potentiellement anticancéreuses. 17 plantes présentent par ailleurs un fort potentiel antidengue. 20 extraits inhibent ainsi plus de 80% de l'activité de la DV-NS5 RdRp à 10 µg/mL et ne présentent aucune cytotoxicité significative contre les cellules humaines MRC5. Il s'agit des extraits des écorces de *Gymnostoma deplancheanum*, de trois Euphorbiaceae (*Excoecaria agallocha*, *Glochition billardierei* et *Homalanthus repandus*), de *Dysoxylum roseum*, de *Psychotria poissoniana*, de *Myrtopsis corymbosa* et de *Wickstroemia indica*, des feuilles de *Diospyros macrocarpa* et de deux Podocarpaceae (*Dacrydium araucarioides* et *Dacrydium balansae*), des parties aériennes de trois Goodeniaceae (*Scaevola balansae*, *Scaevola beckii* et *Scaevola montana*) et de deux Myrtaceae (*Carpolepis laurifolia* et *Melaleuca quinquenervia*) et des extraits des feuilles et des fruits de *Thespesia populnea*.

Nous nous sommes particulièrement intéressés dans la suite de nos travaux, aux extraits à fort potentiel antidengue. Une étude phytochimique fut alors menée sur trois espèces sélectionnées pour leur originalité et sur la base d'un criblage phytochimique mené par CCM. Ainsi, le fractionnement bioguidé des extraits des écorces de *M. corymbosa*, des feuilles de *D. balansae*, et des feuilles de *C. laurifolia* nous a mené à étudier le potentiel antidengue de différents métabolites secondaires appartenant à la famille des alcaloïdes, des coumarines, des stérols, des terpènes, des flavonoïdes et des stilbènes issus de ces plantes.

Trois coumarines, la ramosine (23), le myrsélinol (24) et la myrséline (25), ont

été isolées à partir des fractions actives de l'extrait DCM des écorces de *Myrtopsis corymbosa* et trois alcaloïdes, la skimmianine (**26**), la γ -fagarine (**27**) et l'haplopine (**28**), ont été isolés à partir des feuilles de cette plante. Parmi ces composés, les composés **23** et **28** sont décrits pour la première fois dans le genre *Myrtopsis*. Ces composés ont été évalués individuellement contre la DV-NS5 RdRp mais ne présentent qu'un faible potentiel antidengue ($CI_{50} \geq 10 \mu M$). Il se peut que la forte activité mesurée pour les extraits bruts et les fractions de cette plante soit liée à des composés minoritaires ou l'action synergique de plusieurs molécules. Il est par ailleurs intéressant de remarquer que certaines coumarines ont montrés, au cours des travaux précédents, une activité antivirale contre le BVDV et le HCV, deux membres de la famille des Flaviviridae²²⁸.

Le fractionnement bioguidé d'un extrait des feuilles de *Dacrydium balansae* a permis d'isoler et d'identifier trois biflavonoïdes, l'amentoflavone (**39**), la podocarpusflavone A (**40**) et l'isoginkgétine (**41**), trois stéroïls, la 6-hydroxystigmast-4-èn-3-one (**44**), la 3-hydroxystigmast-5-èn-7-one (**45**), le β -sitostérol (**46**) ainsi que deux stilbènes, les *trans*- et *cis*-3,5,4'-triméthoxystilbènes (**42** et **43**). La mesure de l'inhibition de l'activité de la DV-NS5 RdRp et de la cytotoxicité de ces composés nous permet de conclure aux faibles potentialités des composés **42-46** pour le développement d'un composé antiviral contre la dengue. En revanche, les trois biflavonoïdes (**39-41**) dérivés de l'amentoflavone, présentent un fort potentiel antidengue : ces composés, peu cytotoxiques d'après les tests effectués sur les cellules COS et BHK, inhibent fortement la DV-NS5 RdRp (CI_{50} comprise entre 0,75 et 3,12 μM). Une étude plus approfondie nous a montré que cette inhibition décroît lorsque le test porte sur des polymérasés de virus s'éloignant du DV dans la taxonomie (tableau 20), ce qui nous permet de conclure à une forte spécificité

d'action de ces composés. L'isoginkgétine (**40**) présente ainsi une CI_{50} égale à 1,40 μM contre la DV-NS5, égale à 3,0 μM contre la WNV-NS5 et supérieure à 50 μM contre la BVDV-NS5. Le composé **40** a finalement démontré une activité inhibitrice de la DV-NS5 dans un contexte cellulaire contre deux réplicons (COS-DV et BHK-DV). Ces résultats nous ont entraînés vers une étude approfondie des biflavonoïdes des quatre *Dacrydium* calédoniens. Six nouveaux dérivés de l'amentoflavone (**48**, **49**, **51**, **52**, **53** et **69**) ont été isolés à partir des feuilles de *D. araucarioides* et de *D. lycopodioides* et l'hexaméthylamentoflavone (**55**) a été préparée par la perméthylation du composé **39**. Enfin, l'hinokiflavone (**50**) et la robustaflavone (**54**) ont été isolés des feuilles de *D. araucarioides*, alors qu'un dérivé de la robustaflavone (**68**) isolé à partir des feuilles de *D. lycopodioides* reste à identifier. Une étude des relations structure activité (SAR) a pu être réalisée avec ces composés contre la DV-NS5 RdRp, et complétée par l'analyse de l'activité de la cupressuflavone commerciale (**56**), de cinq dérivés méthylés de l'apigénine (**57-61**) et de six flavonoïdes structurellement proches de cette dernière (**62-67**). Ce travail a mis en évidence plusieurs critères affectant l'activité des biflavonoïdes contre la polymérase du DV. Ainsi, le fait que les monomères testés (**57-67**) soient moins actifs que les bi-apignénines, nous révèle l'importance de la structure dimérique des biflavonoïdes. La nature de la liaison unissant les deux monomères, qui varie entre les composés **39**, **50**, **54** et **56**, semble aussi jouer un rôle important dans l'activité de ces composés : il semble qu'un encombrement de cette région (important pour le composé **56**), qui limite la libre rotation autour de cette liaison, diminue de façon significative l'activité des biflavonoïdes. Ainsi, l'hinokiflavone (**50**) qui présente une liaison C4'-O-C6" est le composé le plus actifs contre la DV-NS5 RdRp (CI_{50} = 0,26). Le nombre et la position des groupements méthyles sur les biflavonoïdes, ont également un fort impact sur leur activité contre la DV-NS5. Ceci fut évalué en comparant l'activité de huit dérivés de l'amentoflavone (**39**, **40**, **41**, **48**, **49**, **51**, **52**, **53** et

55). Il apparaît alors que les dérivés monométhylés (40, 51, 52 et 53) sont les plus actifs et que les méthylations en position 7 et 7" (51 et 53) sont les plus favorables pour maximiser l'activité de l'amentoflavone. Par ce travail nous avons démontré le fort intérêt des biflavonoïdes pour le développement d'un composé inhibant fortement et spécifiquement la polymérase du DV. Ce travail pourrait être poursuivi par l'évaluation de l'activité de nouveaux dérivés de biflavonoïdes naturels ou obtenus par hémisynthèse.

Carpolepis laurifolia, une Myrtaceae endémique de Nouvelle-Calédonie utilisée comme fébrifuge dans la médecine traditionnelle kanake a également été sélectionnée pour une étude phytochimique. Le fractionnement bioguidé d'un extrait méthanolique des feuilles de cette plante, première étude phytochimique de cette espèce, nous a permis d'identifier cinq flavonoïdes (65, 77, 78, 79 et 80) et un triterpène, l'acide bétulinique (81). Ces composés ont été testés individuellement contre la DV-NS5 RdRp. Deux flavonoïdes glycosylés, l'avicularine (78) et la quercitrine (79), présentent un fort potentiel antidengue (plus de 90% d'inhibition de la DV-NS5 RdRp à 10 µg/mL) tout comme l'acide bétulinique (99% d'inhibition de la DV-NS5 RdRp à 10 µg/mL). Ces résultats devront être complétés par la mesure de l'IC₅₀ contre la polymérase virale et par l'évaluation de leur cytotoxicité. Ce travail pourrait également être mené avec d'autres flavonoïdes et triterpènes si l'intérêt de ces composés est confirmé.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont permis de caractériser le potentiel pharmacologique de plusieurs plantes qui pourraient être proposées pour intégrer la pharmacopée Française. Pour nombre d'entre elles, il s'agit d'une première étude phytochimique et/ou pharmacologique. Nos résultats confirment

l'intérêt scientifique des données ethnopharmacologiques et, de ce fait, il nous semblerait intéressant de développer une pharmacopée kanake officielle. La constitution d'une telle base de données servirait de socle pour de nouvelles études pharmacologiques et pourrait être à l'origine d'une filière d'herboristerie en Nouvelle-Calédonie. D'autre part, le fractionnement bioguidé de trois plantes actives contre la RNA polymérase du DV nous a conduit à isoler divers composés chimiques dont les plus actifs appartiennent à la famille des flavonoïdes. Ces résultats sont cohérents avec les travaux portant sur l'évaluation des activités biologiques des flavonoïdes puisque certains d'entre eux ont montré précédemment une forte activité antivirale en inhibant le fonctionnement d'enzymes impliquées dans la réplication du pathogène²⁷¹. Ces composés doivent maintenant être évalués contre des cellules infectées avant d'envisager des tests *in vivo*. Un travail similaire a débuté récemment à partir des écorces de *Homalanthus repandus*, une Euphorbiaceae spécifiquement et fortement actives contre la DV-NS5, et pourrait être conduit dans l'avenir à partir de plantes ayant montré de fortes potentialités antibiotiques ou anticancéreuses.

Bibliographie

1. De Clercq, E. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005, 8, 552–560.
2. De Francesco, R.; Carfi, A. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 1242–1262.
3. Endy, T.P.; Weaver, S.C.; Hanley, K.A. *Frontiers in Dengue Virus Research; Horizon Scientific Press: Norkolk, UK, 2010; p. 3–9.*
4. De Madrid, A.T.; Porterfield, J.S. *J. Gen. Virol.* 1974, 23, 91–96.
5. Mukhopadhyay, S.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G. *Nat. Rev. Micro.* 2005, 3, 13–22.
6. Theiler, M. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 1930, 24, 249–272.
7. Sabin, A.B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1952, 1, 30–50.
8. Lambrechts, L.; Scott, T.W.; Gubler, D.J. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010, 4, e646.
9. Gubler, D.J.P.R. *Health Sci. J.* 1987, 6, 107–111.
10. Salazar, M.I.; Richardson, J.H.; Sánchez-Vargas, I.; Olson, K.E.; Beaty, B.J. *BMC Microbiol.* 2007, 7, 7–9.
11. Khin, M.M.; Than, K.A. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983, 32, 590–594.
12. Hull, B.; Tikasingh, E.; de Souza, M.; Martinez, R. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1984, 33, 1248–1250.
13. Joshi, V.; Mourya, D.T.; Sharma, R.C.T. *J. Trop. Med. Hyg.* 2002, 67, 158–161.
14. Rico-Hesse, R. *Virology.* 1990, 174, 479–493.
15. Dellamonica, P. *Arch. Fr. Pediatr.* 2009, 16, S80–S84.
16. Murthy, J.M.K. *Neurol. India.* 2010, 58, 581–584.
17. Garg, R.K.; Paliwal, V.K. *J. Neurol. Sci.* 2011, 307, 180–181.
18. Halstead, S. B. *Bull. WHO Organ.* 1980, 58, 1–21.
19. Vaughn, D.W.; Green, S.; Kalayanarooj, S.; Innis, B.L.; Nimmannitya, S.; Suntayakorn, S.; Endy, T.P.; Raengsakulrach, B.; Rothman, A.L.; Ennis, F.A.; Nisalak, A. *J. Infect. Dis.* 2000, 181, 2–9.
20. Fried, J.R.; Gibbons, R.V.; Kalayanarooj, S.; Thomas, S.J.; Srikiatkachorn, A.; Yoon, I.K.; Jarman, R.G.; Green, S.; Rothman, A.L.; Cummings, D.A.T. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010, 4, e617.
21. Bravo, J.R.; Guzmán, M.G.; Kouri, G.P. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987, 81, 816–820.
22. Halstead, S.B. *Lancet.* 2007, 370, 1644–1652.
23. Leong, A.S.Y.; Wong, K.T.; Leong, T.Y.M.; Tan, P.H.; Wannakrairot, P. *Semin. Diagn. Pathol.* 2007, 24, 227–236.
24. Gubler, D.J. *TIM.* 2002, 10, 100–103.
25. McBride, W.J.; Bielefeldt-Ohmann, H. *Microbes Infect.* 2000, 2, 1041–1050.
26. WHO; Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition; *WHO press: Geneva, Switzerland, 2009.*
27. Barniol, J.; Gaczkowski, R.; Barbato, E. V.; da Cunha, R.V.; Salgado, D.; Martínez, E.; Segarra, C.S.; Pleites Sandoval, E.B.; Mishra, A.; Laksono, I.S.; Lum, L.C.; Martínez, J.G.; Núñez, A.; Balsameda, A.; Allende, I.; Ramírez, G.; Dimaano, E.; Thomacheck, K.; Akbar, N.A.; Ooi, E.E.; Villegas, E.; Hien, T.T.; Farrar, J.; Horstick, O.; Kroeger, A.; Jaenisch, T. *BMC Infect. Dis.* 2011, 11, 1–12.
28. Gubler, D.J.; Clark, G.G. *Emerg. Infect. Dis.* 1995, 1, 55–57.
29. Guzman, A.; Istúriz, R.E. *Int. J. Antimicro. Ag.* 2010, 36, 40–42.
30. Guzmán, M.G.; Kouri, G. *Lancet Infect. Dis.* 2002, 2, 33–42.
31. Kyle, J.L.; Harris, E. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008, 62, 71–92.
32. OMS; Dengue et dengue hémorragique. *WHO, 2009.*
33. Suaya, J.A.; Shepard, D.S.; Siqueira, J.B.; Martelli, C.T.; Lum, L.C.S.; Tan, L.H.; Kongsin, S.; Jiamton, S.; Garrido, F.; Montoya, R.; Armien, B.; Huy, R.; Castillo, L.; Caram, M.; Sah, B.K.; Sughayyar, R.; Tyo, K.R.; Halstead, S.B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009, 80, 846–855.

34. Shepard, D.S.; Coudeville, L.; Halasa, Y.A.; Zambrano, B.; Dayan, G.H. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011, 84, 200–207.
35. Gubler, D.J.; Meltzer, M. *Academic Press*, 1999; Vol. Volume 53, p. 35–70.
36. Egloff, M.P.; Decroly, E.; Malet, H.; Selisko, B.; Benarroch, D.; Ferron, F.; Canard, B. *J Mol Biol.* 2007, 372, 723–736.
37. Mandl, C.W.; Kunz, C.; Heinz, F.X. *J Virol.* 1991, 65, 4070–4077.
38. Fernandez-Garcia, M.D.; Mazzon, M.; Jacobs, M.; Amara, A. *Cell Host Microb.* 2009, 5, 318–328.
39. Bressanelli, S.; Stiasny, K.; Allison, S. L.; Stura, E. A.; Duquerroy, S.; Lescar, J.; Heinz, F. X.; Rey, F. A. *EMBO J.* 2004, 23, 728–738.
40. Modis, Y.; Ogata, S.; Clements, D.; Harrison, S. C. *Nature* 2004, 427, 313–319.
41. Massé, N.; Selisko, B.; Malet, H.; Peyrane, F.; Debarnot, C.; Decroly, E.; Benarroch, D.; Egloff, M.P.; Guillemot, J.-C.; Alvarez, K.; Canard, B. *Virology.* 2007, 11, 121–133.
42. Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S.; Coutard, B.; Decroly, E.; de Lamballerie, X.; Gould, E. A.; Grard, G.; Grimes, J. M.; Hilgenfeld, R.; Jansson, A.M.; Malet, H.; Mancini, E. J.; Mastrangelo, E.; Mattevi, A.; Milani, M.; Moureau, G.; Neyts, J.; Owens, R.J.; Ren, J.; Selisko, B.; Speroni, S.; Steuber, H.; Stuart, D.I.; Unge, T.; Bolognesi, M. *Antiviral Res.* 2010, 87, 125–148.
43. Brett, D.L.; Thiel, H.J.; Rice, C.M. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication; Fields Virology; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia*, 2007.
44. Selisko, B.; Dutartre, H.; Guillemot, J.-C.; Debarnot, C.; Benarroch, D.; Khromykh, A.; Desprès, P.; Egloff, M.P.; Canard, B. *Virology.* 2006, 351, 145–158.
45. Brinton, M.A. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002, 56, 371–402.
46. Lorenz, I.C.; Kartenbeck, J.; Mezzacasa, A.; Allison, S.L.; Heinz, F.X.; Helenius, A. *J. Virol.* 2003, 77, 4370–4382.
47. Mackenzie, J.M.; Westaway, E.G. *J. Virol.* 2001, 75, 10787–10799.
48. Li, L.; Lok, S.M.; Yu, I.M.; Zhang, Y.; Kuhn, R.J.; Chen, J.; Rossmann, M.G. *Science.* 2008, 319, 1830–1834.
49. Yu, I.M.; Zhang, W.; Holdaway, H.A.; Li, L.; Kostyuchenko, V.A.; Chipman, P. R.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G.; Chen, J. *Science.* 2008, 319, 1834–1837.
50. Massé, N.; Davidson, A.; Ferron, F.; Alvarez, K.; Jacobs, M.; Romette, J.-L.; Canard, B.; Guillemot, J.C. *Antiviral Res.* 2010, 86, 296–305.
51. Lescar, J.; Luo, D.; Xu, T.; Sampath, A.; Lim, S.P.; Canard, B.; Vasudevan, S. G. *Antiviral Res.* 2008, 80, 94–101.
52. Dong, H.; Zhang, B.; Shi, P.Y. *Antiviral Res.* 2008, 80, 1–10.
53. Egloff, M.P.; Benarroch, D.; Selisko, B.; Romette, J.-L.; Canard, B. *EMBO J.* 2002, 21, 2757–2768.
54. Ray, D.; Shah, A.; Tilgner, M.; Guo, Y.; Zhao, Y.; Dong, H.; Deas, T.S.; Zhou, Y.; Li, H.; Shi, P.Y. *J. Virol.* 2006, 80, 8362–8370.
55. Zhou, Y.; Ray, D.; Zhao, Y.; Dong, H.; Ren, S.; Li, Z.; Guo, Y.; Bernard, K.A.; Shi, P.Y.; Li, H. *J. Virol.* 2007, 81, 3891–3903.
56. Rice, C.M.; Lenches, E.M.; Eddy, S.R.; Shin, S.J.; Sheets, R.L.; Strauss, J.H. *Science.* 1985, 229, 726–733.
57. Poch, O.; Sauvaget, I.; Delarue, M.; Tordo, N. *EMBO J.* 1989, 8, 3867–3874.
58. Bruenn, J.A. *NAR.* 1991, 19, 217–226.
59. Bartholomeusz, A.I.; Wright, P.J. *Arch. Virol.* 1993, 128, 111–121.
60. Tan, B.H.; Fu, J.; Sugrue, R.J.; Yap, E.H.; Chan, Y.C.; Tan, Y.H. *Virology.* 1996, 216, 317–325.

61. Yap, T.L.; Xu, T.; Chen, Y.L.; Malet, H.; Egloff, M.-P.; Canard, B.; Vasudevan, S.G.; Lescar, J. *J. Virol.* 2007, 81, 4753–4765.
62. Perera, R.; Kuhn, R.J. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, 11, 369–377.
63. Pryor, M.J.; Rawlinson, S.M.; Butcher, R.E.; Barton, C.L.; Waterhouse, T.A.; Vasudevan, S.G.; Bardin, P.G.; Wright, P.J.; Jans, D.A.; Davidson, A.D. *Traffic.* 2007, 8, 795–807.
64. Brooks, A J. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 36399–36407.
65. Nomaguchi, M.; Ackermann, M.; Yon, C.; You, S.; Padmanabhan, R.; Padmanabhan, R. *J. Virol.* 2003, 77, 8831–8842.
66. Ackermann, M.; Padmanabhan, R. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 39926–39937.
67. Wilder-Smith, A.; Gubler, D. *J. Med. Clin. North. Am.* 2008, 92, 1377–1390.
68. Ooi, E.E.; Goh, K.T.; Gubler, D. *J. Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 887–893.
69. Phillips, M.L. *Environ Health Perspect.* 2008, 116, A382–A388.
70. Gubler, D.J. *Emerg. Infect. Dis.* 1998, 4, 442–450.
71. Zaim, M.; Guillet, P. *Trends Parasitol.* 2002, 18, 161–163.
72. Morrison, A.C.; Zielinski-Gutierrez, E.; Scott, T.W.; Rosenberg, R. *PLoS Med.* 2008, 5, e68.
73. Iturbe-Ormaetxe, I.; Walker, T.; O’Neill, S.L. *EMBO Rep.* 2011, 12, 508–518.
74. Hertig, M.; Wolbach, S.B. *J. Med. Res.* 1924, 44, 329–374.7.
75. Hilgenboecker, K.; Hammerstein, P.; Schlattmann, P.; Telschow, A.; Werren, J. H. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008, 281, 215–220.
76. McMeniman, C.J.; Lane, R.V.; Cass, B.N.; Fong, A.W.C.; Sidhu, M.; Wang, Y.F.; O’Neill, S.L. *Science.* 2009, 323, 141–144.
77. Bian, G.; Xu, Y.; Lu, P.; Xie, Y.; Xi, Z. *PLoS Pathog.* 2010, 6, e1000833.
78. Swaminathan, S.; Batra, G.; Khanna, N. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 2010, 20, 819–835.
79. Whitehorn, J.; Farrar, J. *Br. Med. Bull.* 2010, 95, 161–173.
80. Murrell, S.; Wu, S.C.; Butler, M. *Biotechnol. Adv.* 2011, 29, 239–247.
81. Schmitz, J.; Roehrig, J.; Barrett, A.; Hombach, J. *Vaccine.* 2011, In Press.
82. Morens, D.M. *Clin. Infect. Dis.* 1994, 19, 500–512.
83. Yauch, L.E.; Shresta, S. *Antiviral Res.* 2008, 80, 87–93.
84. Onlamoon, N.; Noisakran, S.; Hsiao, H.M.; Duncan, A.; Villinger, F.; Ansari, A. A.; Perng, G.C. *Blood.* 2010, 115, 1823–1834.
85. Xie, H.; Cass, A.R.; Barrett, A.D. *Virus Res.* 1998, 55, 93–99.
86. Bhamarapavati, N.; Sutee, Y. *Vaccine.* 2000, 18, 44–47.
87. Osorio, J.E.; Huang, C.Y.H.; Kinney, R.M.; Stinchcomb, D.T. *Vaccine.* 2011.
88. Raviprakash, K.; Wang, D.; Ewing, D.; Holman, D.H.; Block, K.; Woraratanadharm, J.; Chen, L.; Hayes, C.; Dong, J.Y.; Porter, K. *J. Virol.* 2008, 82, 6927–6934.
89. Ghosh, D.; Basu, A. *Drug Discov. Today.* 2008, 13, 619–624.
90. Talarico, L. B.; Pujol, C.A.; Zibetti, R.G. M.; Faria, P.C.S.; Nosedá, M.D.; Duarte, M.E.R.; Damonte, E.B. *Antiviral Res.* 2005, 66, 103–110.
91. Pujol, C.A.; Estevez, J.M.; Carlucci, M.J.; Ciancia, M.; Cerezo, A.S.; Damonte, E.B. *Antivir. Chem. Chemother.* 2002, 13, 83–89.
92. Ono, L.; Wollinger, W.; Rocco, I.M.; Coimbra, T.L.M.; Gorin, P.A.J.; Sierakowski, M.R. *Antiviral Res.* 2003, 60, 201–208.
93. Qiu, H.; Tang, W.; Tong, X.; Ding, K.; Zuo, J. *Carbohydr. Res.* 2007, 342, 2230–2236.
94. Lee, E.; Pavy, M.; Young, N.; Freeman, C.; Lobigs, M. *Antiviral Res.* 2006, 69, 31–38.

95. Chen, Y.; Maguire, T.; Hileman, R.E.; Fromm, J.R.; Esko, J.D.; Linhardt, R.J.; Marks, R.M. *Nat. Med.* 1997, 3, 866–871.
96. Kato, D.; Era, S.; Watanabe, I.; Arihara, M.; Sugiura, N.; Kimata, K.; Suzuki, Y.; Morita, K.; Hidari, K.I.P.J.; Suzuki, T. *Antiviral Res.* 2010, 88, 236–243.
97. Wang, Q.Y.; Patel, S.J.; Vangrevelinghe, E.; Xu, H.Y.; Rao, R.; Jaber, D.; Schul, W.; Gu, F.; Heudi, O.; Ma, N.L.; Poh, M.K.; Phong, W.Y.; Keller, T.H.; Jacoby, E.; Vasudevan, S.G. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, 1823–1831.
98. Ganesh, V.K.; Muller, N.; Judge, K.; Luan, C.H.; Padmanabhan, R.; Murthy, K. H.M. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 257–264.
99. Yin, Z.; Patel, S.J.; Wang, W.L.; Chan, W.L.; Ranga Rao, K.R.; Wang, G.; Ngew, X.; Patel, V.; Beer, D.; Knox, J.E.; Ma, N.L.; Ehrhardt, C.; Lim, S.P.; Vasudevan, S.G.; Keller, T.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 40–43.
100. Kiat, T.S.; Phippen, R.; Yusof, R.; Ibrahim, H.; Khalid, N.; Rahman, N.A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 3337–3340.
101. Tomlinson, S.M.; Malmstrom, R.D.; Russo, A.; Mueller, N.; Pang, Y.P.; Watowich, S.J. *Antiviral Res.* 2009, 82, 110–114.
102. Tomlinson, S.M.; Watowich, S.J. *Antiviral Res.* 2011, 89, 127–135.
103. Yang, C.C.; Hsieh, Y.C.; Lee, S.J.; Wu, S.H.; Liao, C.L.; Tsao, C.H.; Chao, Y.S.; Chern, J.H.; Wu, C.P.; Yueh, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, 55, 229–238.
104. Olsen, D.B.; Eldrup, A.B.; Bartholomew, L.; Bhat, B.; Bosserman, M.R.; Ceccacci, A.; Colwell, L.F.; Fay, J.F.; Flores, O.A.; Getty, K.L.; Grobler, J.A.; LaFemina, R.L.; Markel, E.J.; Migliaccio, G.; Prhavc, M.; Stahlhut, M.W.; Tomassini, J.E.; MacCoss, M.; Hazuda, D.J.; Carroll, S.S. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 3944–3953.
105. Ojwang, J. O.; Ali, S.; Smee, D.F.; Morrey, J.D.; Shimasaki, C.D.; Sidwell, R. W. *Antiviral Res.* 2005, 68, 49–55.
106. Latour, D. R.; Jekle, A.; Javanbakht, H.; Henningsen, R.; Gee, P.; Lee, I.; Tran, P.; Ren, S.; Kutach, A.K.; Harris, S.F.; Wang, S.M.; Lok, S.J.; Shaw, D.; Li, J.; Heilek, G.; Klumpp, K.; Swinney, D.C.; Deval, J. *Antiviral Res.* 2010, 87, 213–222.
107. Yin, Z.; Chen, Y.L.; Schul, W.; Wang, Q.Y.; Gu, F.; Duraiswamy, J.; Kondreddi, R.R.; Niyomrattanakit, P.; Lakshminarayana, S.B.; Goh, A.; Xu, H.Y.; Liu, W.; Liu, B.; Lim, J.Y.H.; Ng, C.Y.; Qing, M.; Lim, C.C.; Yip, A.; Wang, G.; Chan, W.L.; Tan, H.P.; Lin, K.; Zhang, B.; Zou, G.; Bernard, K.A.; Garrett, C.; Beltz, K.; Dong, M.; Weaver, M.; He, H.; Pichota, A.; Dartois, V.; Keller, T.H.; Shi, P.Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009, 106, 20435–20439.
108. Niyomrattanakit, P.; Chen, Y.L.; Dong, H.; Yin, Z.; Qing, M.; Glickman, J.F.; Lin, K.; Mueller, D.; Voshol, H.; Lim, J.Y.H.; Nilar, S.; Keller, T.H.; Shi, P.Y. *J. Virol.* 2010, 84, 5678–5686.
109. Luzhkov, V.B.; Selisko, B.; Nordqvist, A.; Peyrane, F.; Decroly, E.; Alvarez, K.; Karlen, A.; Canard, B.; Qvist, J. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 7795–7802.
110. Podvinec, M.; Lim, S.P.; Schmidt, T.; Scarsi, M.; Wen, D.; Sonntag, L.S.; Sanschagrin, P.; Shenkin, P.S.; Schwede, T. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 1483–1495.
111. Milani, M.; Mastrangelo, E.; Bollati, M.; Selisko, B.; Decroly, E.; Bouvet, M.; Canard, B.; Bolognesi, M. *Antiviral Res.* 2009, 83, 28–34.
112. Whitby, K.; Pierson, T.C.; Geiss, B.; Lane, K.; Engle, M.; Zhou, Y.; Doms, R.W.; Diamond, M.S. *J. Virol.* 2005, 79, 8698–8706.
113. Courageot, M.P.; Frenkiel, M.P.; Duarte Dos Santos, C.; Deubel, V.; Despres, P. *J. Virol.* 2000, 74, 564–572.
114. Chang, J.; Wang, L.; Ma, D.; Qu, X.; Guo, H.; Xu, X.; Mason, P.M.; Bourne, N.;

- Moriarty, R.; Gu, B.; Guo, J.T.; Block, T.M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, 1501–1508.
115. Malet, H.; Massé, N.; Selisko, B.; Romette, J.L.; Alvarez, K.; Guillemot, J.C.; Tolou, H.; Yap, T.L.; Vasudevan, S.; Lescar, J.; Canard, B. *Antiviral Res.* 2008, 80, 23–35.
116. Cerutti, H.; Casas-Mollano, J.A. *Curr. Genet.* 2006, 50, 81–99.
117. Noble, C.G.; Chen, Y.L.; Dong, H.; Gu, F.; Lim, S.P.; Schul, W.; Wang, Q.Y.; Shi, P.Y. *Antiviral Res.* 2010, 85, 450–462.
118. Nair, V.; Chi, G.; Shu, Q.; Julander, J.; Smee, D. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 1425–1427.
119. Martin, J.H.J.; Crotty, S.; Warren, P.; Nelson, P.N. *Phytochemistry.* 2007, 68, 266–274.
120. Ortholand, J.Y.; Ganesan, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, 8, 271–280.
121. Borris, R.P. *J. Ethnopharmacol.* 1996, 51, 29–38.
122. de Pasquale, A. *J Ethnopharmacol.* 1984, 11, 1–16.
123. Hartmann, T. *Phytochemistry.* 2007, 68, 2831–2846.
124. Kekulé, F.A. *Bull. Soc. Chim. Paris.* 1865, 3, 98–110.
125. Cordell, G.A. *Phytochemistry Lett.* 2011, 4, 391–398.
126. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 1022–1037.
127. Lee, M.L.; Schneider, G. *J Comb. Chem.* 2001, 3, 284–289.
128. Feher, M.; Schmidt, J.M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003, 43, 218–227.
129. Clardy, J.; Walsh, C. *Nature.* 2004, 432, 829–837.
130. Piggott, A.M.; Karuso, P. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2004, 7, 607–630.
131. Koehn, F.E.; Carter, G.T. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2005, 4, 206–220.
132. Nicolaou, K.C.; Snyder, S.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101, 11929–11936.
133. Koehn, F.E.; Carter, G.T. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, 4, 206–220.
134. Peterson, E.A.; Overman, L.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, 101, 11943–11948.
135. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001, 46, 3–26.
136. Rates, S.M. *Toxicol.* 2001, 39, 603–613.
137. Svoboda, G.H. *J. Pharm. Sci.* 1958, 47, 834.
138. Noble, R.L.; Beer, C.T.; Cutts, J.H. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1958, 76, 882–894.
139. Dong, J.G.; Bornmann, W.; Nakanishi, K.; Berova, N. *Phytochemistry.* 1995, 40, 1821–1824.
140. Gibbs, R.D. *Chemotaxonomy of Flowering Plants*; McGill; *Queen's University Press*, 1974.
141. Harborne, J.B.; Turner, B.L. *Plant chemosystematics*; Academic Press, 1984.
142. Wink, M. *Phytochemistry.* 2003, 64, 3–19.
143. De Candolle, A. *Essai sur les propriétés médicales des plantes*; 2^{nde} éd.; *Crochard*, 1816.
144. Abbott, H.C.D.S. *Bot. Gaz.* 1886, 11, 270–272.
145. Dahlgren, R.M.T. *Bot. J. Linear Soc.* 1980, 80, 91–124.
146. Hegnauer, R. *Phytochemistry.* 1986, 25, 1519–1535.
147. Reynolds, T. *Phytochemistry.* 2007, 68, 2887–2895.
148. Waterman, P.G. *Phytochemistry.* 2007, 68, 2896–2903.
149. Raffauf, R.F.; Flagler, M.B. *Eco. Botany.* 1960, 14, 37–55.
150. Cordell, G.A.; Quinn-Beattie, M.L.; Farnsworth, N.R. *Phytother. Res.* 2001, 15, 183–205.

151. Beal, J.L.; Reinhard, E.; Research for Natural products as medicinal agents: plenary lectures of the International Research Congress on Medicinal Plant Research, Strasbourg, July 1980.
152. Fleurentin, J. Ethnopharmacologie: sources, méthodes, objectifs : actes du 1er Colloque européen d'ethnopharmacologie, Metz, Centre Internationale des Congrès, 23-25 mars 1990; *IRD Ed.*, 1991.
153. Heinrich, M.; Gibbons, S.J. *Pharm. Pharmacol.* 2001, 53, 425–432.
154. Fabricant, D.S.; Farnsworth, N.R. *Environ Health Perspect.* 2001, 109, 69–75.
155. Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D. *Life Sci.* 2005, 78, 431–441.
156. Patwardhan, B. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 100, 50–52.
157. Cox, P.A. Ciba Found. Symp. 1990, 154, 40–47; discussion 47–55.
158. Boccaccio, F. Symptômes et syndromes en pratique médicale courante; *La Gazette médicale*, 1989.
159. Farnsworth, N.R.; Akerele, O.; Bingel, A.S.; Soejarto, D.D.; Guo, Z. *Bull. World Health Organ.* 1985, 63, 965–981.
160. Gilani, A.H. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 100, 43–49.
161. Waller, D.P. *J. Ethnopharmacol.* 1993, 38, 181–188.
162. Jassim, S.A.; Naji, M.A. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 412–427.
163. Mukhtar, M.; Arshad, M.; Ahmad, M.; Pomerantz, R.J.; Wigdahl, B.; Parveen, Z. *Virus Res.* 2008, 131, 111–120.
164. Blaskovich, M.A.; Sun, J.; Cantor, A.; Turkson, J.; Jove, R.; Sebti, S.M. *Cancer Res.* 2003, 63, 1270–9.
165. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.S.; Chagwedera, T.E.; Farnsworth, N.R.; Cordell, G.A.; Beecher, C.W.; Fong, H.H.; Kinghorn, A.D.; Brown, D.M. *Nat. Med.* 1995, 1, 1046–1051.
166. Cichewicz, R.H.; Kouzi, S.A. *Med. Res. Rev.* 2004, 24, 90–114.
167. Cordell, G.A.; Colvard, M.D. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 100, 5–14.
168. Cox, P.A. *Science.* 2000, 287, 44–45.
169. Perrings, C.; Mäler, K.G. Biodiversity loss: economic and ecological issues; *Cambridge University Press*, 1997.
170. Gual, M.A.; Norgaard, R.B. *Ecol.Econ.* 2010, 69, 707–717.
171. United Nations Millennium Ecosystem Assessment 2005.
172. Helliwell, D.R. *Reg. Stud.* 1969, 3, 41–47.
173. Odum, E.P.; Odum, H.T. *Trans. N. Am. Wild. Nat. Res. Conf.* 1972, 37, 178–189.
174. Jancovici, J.M. Energie et climat: la fin de l'âge d'or. 2008, Conférence; Paris.
175. Wood, P.M. *Environ. Val.* 1997, 6, 251–268.
176. Dixon, J.A.; Hufschmidt, M.M. Economic valuation techniques for the environment: a case study workbook; Johns Hopkins University Press, 1986.
177. Pearce, D.W.; Turner, R.K. Economics of natural resources and the environment; *Harvester Wheatsheaf*, 1990.
178. Freeman, A.M. The measurement of environmental and resource values: theory and methods; *Resources for the Future*, 2003.
179. Pearce, D.W.; Atkinson, G.; Mourato, S.; Development and Cost-benefit analysis and the environment: recent developments; OECD Publishing, 2006.
180. Jaffré, T.; Morat, P.; Veillon, J.M.; Rigault, F.; Dagostini, G. Composition et caractérisation de la flore indigène de Nouvelle-Calédonie; 2nde éd.; *IRD Editions: Nouméa*, 2004.
181. Roberts, C.M.; McClean, C.J.; Veron, J.E.N.; Hawkins, J.P.; Allen, G.R.; McAllister, D.E.; Mittermeier, C.G.; Schueler, F.W.; Spalding, M.; Wells, F.; Vynne, C.; Werner, T.B. *Science.* 2002, 295, 1280–1284.

182. Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; da Fonseca, G.A.B.; Kent, J. *Nature*. 2000, 403, 853–858.
183. Sevenet, T.; Pusset, J. *Chemistry and Pharmacology*; Academic Press: San Diego, California, 1996; 48, 1–66.
184. Balunas, M.J.; Kinghorn, A.D. *Life Sci.* 2005, 78, 431–441.
185. Hnawia, E. *Etude d'Euphorbiaceae utilisées en médecine empirique en Nouvelle-Calédonie; Thèse de doctorat*, 1990.
186. Salomon-Nekiriai, C. *Savoirs, savoir-faire et pouvoirs thérapeutiques : Guérisseurs Kanaks et relation de guérissage dans la région Centre Nord de la Grande Terre*; s.n., 1993.
187. Billo, M.; Cabalion, P.; Waikedre, J.; Fourneau, C.; Bouttier, S.; Hocquemiller, R.; Fournet, A. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 96, 195–200.
188. Desrivot, J.; Waikedre, J.; Cabalion, P.; Herrenknecht, C.; Bories, C.; Hocquemiller, R.; Fournet, A. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 112, 7–12.
189. Hnawia, E.; Hassani, L.; Deharo, E.; Maurel, S.; Waikedre, J.; Cabalion, P.; Bourdy, G.; Valentin, A.; Jullian, V.; Fogliani, B. *Pharm. Biol.* 2011, 49, 369–376.
190. Ledroit, V. *Les plantes de Nouvelle-Calédonie et du Vanuatu réputées fébrifuges. Rapport de stage*, 1997.
191. Sevenet, T.; Pusset, J. *Academic Press*. 1996; 48, 1–73.
192. Sparg, S.G.; Light, M.E.; van Staden, J. *Ethnopharmacol.* 2004, 94, 219–243.
193. Beutler, J.A.; Lindner, A.B.A.; McCloud, T.G. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1996, 83, 530–533.
194. Ghisalberti, E.L. *Fitoterapia*. 2004, 75, 429–446.
195. Bradacs, G.; Heilmann, J.; Weckerle, C.S. *J. Ethnopharmacol.* 2011, 137, 434–448.
196. Prescott, T.A.K.; Kiapranis, R.; Maciver, S.K. *J. Ethnopharmacol.* 2012, *in press*.
197. Waruruai, J.; Sipana, B.; Koch, M.; Barrows, L.R.; Matainaho, T.K.; Rai, P.P. *J. Ethnopharmacol.* 2011, 138, 564–577.
198. Santos-Buelga, C.; Escribano-Bailon, M.T.; Lattanzio, V. *Recent Advances in Polyphenol Research*; Wiley-Blackwell, 2010.
199. Wagner, H.; Blatt, S.; Rickl, V. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*; Springer, 2009.
200. Sevenet, T.; Pusset, J. *Academic Press*, 1996; Vol. 48, p. 1–73.
201. Mallavadhani, U. V.; Panda, A. K.; Rao, Y. R. *Phytochemistry*. 1998, 49, 901–951.
202. Hazra, B.; Das Sarma, M.; Sanyal, U. *J. Chromatogr.* 2004, 812, 259–275.
203. Johnson, J.; Gandhidasan, I.; Murugesan, R. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 1072–1078.
204. Boonsri, S.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, S.; Kanjana-Opas, A. *J. Nat. Prod.* 2008, 71, 1173–1177.
205. Polonsky, J.; Baskevitch-Varon, Z.; Sévenet, T. *Experientia*. 1975, 31, 1113–1114.
206. Van Tri, M.; Polonsky, J.; Merienne, C.; Sevenet, T. *J. Nat. Prod.* 1981, 44, 279–284.
207. Ghisalberti, E. L. *Fitoterapia*. 2004, 75, 429–446.
208. Subhan, N.; Alam, M.A.; Ahmed, F.; Shahid, I.J.; Nahar, L.; Sarker, S.D. *Rev. Brasil. Farm.* 2008, 18, 521–526.
209. Wang, J.D.; Zhang, W.; Li, Z.Y.; Xiang, W.S.; Guo, Y.W.; Krohn, K. *Phytochemistry*. 2007, 68, 2426–2431.
210. Erickson, K.L.; Beutler, J.A.; Cardellina, J.H.; McMahan, J.B.; Newman, D.J.; Boyd, M.R. *J. Nat. Prod.* 1995, 58, 769–772.
211. Konoshima, T.; Konishi, T.; Takasaki, M.; Yamazoe, K.; Tokuda, H. *Biol. Pharm. Bull.* 2001, 24, 1440–1442.

212. Beutler, J.A.; Alvarado, A.B.; McCloud, T.G.; Cragg, G.M. *Phytother. Res.* 1989, 3, 188–192.
213. Beutler, J.A.; Lindner, A.B.A.; McCloud, T.G. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1996, 83, 530–533.
214. el-Toumy, S.A.; Marzouk, M.S.; Moharram, F.A.; Aboutabl, E.A. *Pharmazie.* 2001, 56, 94–95.
215. Chase, M.W.; Morton, C.M.; Kallunki, J.A. *Am. J. Botany.* 1999, 86, 1191–1199.
216. Datta, S.C. *Systematic Botany; New Age International*, 1988.
217. Singh; Pandle; Jain *Text Book of Botany: Angiosperms; IIIrd.; Rastogi Publications*, 2008.
218. Takhtajan, A. *Flowering plants; Springer*, 2009.
219. Jaffré, T. *Candollea* .1974, 29, 427–456.
220. Bruneton, J. *Pharmacognosie: Phytochimie, plantes médicinales; Tech.& Doc./Lavoisier*, 1999.
221. Edris, A.E. *Phytother. Res.* 2007, 21, 308–323.
222. Cheng, S.S.; Chang, H.T.; Chang, S.T.; Tsai, K.H.; Chen, W.J. *Biores. Techn.* 2003, 89, 99–102.
223. Silva, M.F. das G.F.; Gottlieb, O.R.; Ehrendorfer, F. *Pl. Syst. Evol.* 1988, 161, 97–134.
224. Champagne, D.E.; Koul, O.; Isman, M.B.; Scudder, G.G.E.; Neil Towers, G.H. *Phytochemistry.* 1992, 31, 377–394.
225. Whitby, K.; Pierson, T.C.; Geiss, B.; Lane, K.; Engle, M.; Zhou, Y.; Doms, R. W.; Diamond, M.S. *J. Virol.* 2005, 79, 8698–8706.
226. Kiat, T.S.; Pippen, R.; Yusof, R.; Ibrahim, H.; Khalid, N.; Rahman, N.A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16, 3337–3340.
227. Allard, P.M.; Dau, E.T.H.; Eydoux, C.; Guillemot, J.C.; Dumontet, V.; Poullain, C.; Canard, B.; Guéritte, F.; Litaudon, M. *J. Nat. Prod.* 2012, *in press*.
228. Mazzei, M.; Nieddu, E.; Miele, M.; Balbi, A.; Ferrone, M.; Fermeglia, M.; Mazzei, M.T.; Pricl, S.; La Colla, P.; Marongiu, F.; Ibba, C.; Loddo, R. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 2591–2605.
229. Giampieri, M.; Balbi, A.; Mazzei, M.; La Colla, P.; Ibba, C.; Loddo, R. *Antiviral Res.* 2009, 83, 179–185.
230. Hifnawy, M.; Vaquette, J.; Pousset, J.; Cave, A. *Planta Med.* 1977, 31, 156–162.
231. Hifnawy, M.S.; Vaquette, J.; Sévenet, T.; Pousset, J.L.; Cavé, A. *Phytochemistry.* 1977, 16, 1035–1039.
232. Goodwin, R.H.; Pollock, B.M. *Arch. Biochem. Biophys.* 1954, 49, 1–6.
233. Dreyer, D.L.; Pickering, M.V.; Cohan, P. *Phytochemistry.* 1972, 11, 705–713.
234. Gashimov, N.F.; Ayshev, A.Z.; Kagramanov, A.A.; Bozhkova, L.I. *Chem. Nat. Comp.* 1979, 15, 11–13.
235. Soedin, P. *Chem. Nat. Comp.* 1998, 34, 517–548.
236. Sangster, A.W.; Stuart, K.L. *Chem. Rev.* 1965, 65, 69–130.
237. Robertson, A. *Aust. J. Chem.* 1963, 16, 451–458.
238. de Moura, N.F.; Ribeiro, H.B.; Machado, E.C.S.; Ethur, E.M.; Zanatta, N.; Morel, A.F. *Phytochemistry.* 1997, 46, 1443–1446.
239. Tillequin, F.; Koch, M.; Sevenet, T. *Planta Med.* 2008, 39, 383–387.
240. Moulis, C.; Gleye, J.; Fourasté, I.; Stanislas, E. *Planta Med.* 1981, 42, 400–402.
241. Rasulova, K.A.; Bessonova, I.A.; Yagudaev, M.R.; Yunusov, S. *Chem. Nat. Comp.* 1987, 23, 731–734.
242. Quader, A.; Gray, A.I.; Hartley, T.G.; Waterman, P.G. *Biochem. Syst. Ecol.* 1991, 19, 91.

243. Hifnawy, M. S.; Vaquette, J.; Sévenet, T.; Pousset, J.; Cavé, A. *Planta Med.* 1976, 29, 346–350.
244. Laubenfels, D. J. de Flore de la Nouvelle-Calédonie et dépendances: Gymnospermes; *Muséum national d'histoire naturelle*, 1972.
245. Jaffré; Morat, P.; Veillon, J.M.; Rigault, F.; Dagostini, G. Composition et caractérisation de la flore indigène de Nouvelle Calédonie; *IRD ed*, 2001.
246. Brophy, J.J.; Jogia, M.K. *J. Nat. Prod.* 1986, 49, 730–732.
247. Berry, K.M.; Perry, N.B.; Weavers, R.T. *Phytochemistry*. 1985, 24, 2893–2898.
248. Briggs, L.H.; Kingsford, M. *NZ J. sciences.* 1974, 17, 3–8.
249. Perry, N.B.; Weavers, R.T. *Phytochemistry*. 1985, 24, 2233–2237.
250. Otto, A.; Wilde, V. *Bot. Rev.* 2001, 67, 141–238.
251. Cox, R.E.; Yamamoto, S.; Otto, A.; Simoneit, B.R.T. *Biochem. Sys. Ecol.* 2007, 35, 342–362.
252. Cambie, R.C.; Cain, B.F. *NZ J. sci.* 1960, 3, 121–126.
253. Cambie, R.; Hayward, R. *Aust. J. Chem.* 1974, 27, 2001–2016.
254. Cambie, R.C.; Cox, R.E.; Croft D.; Sidwell, K.D. *Phytochemistry*. 1983, 22, 1163–1166.
255. Hodges, R. *Aust. J. Chem.* 1965, 18, 1491–1492.
256. Quinn, C.J.; Gadek, P. *Phytochemistry*. 1981, 20, 677–681.
257. de Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A.T. *J Chromatogr A.* 2006, 1112, 31–63.
258. Romanova, D.; Vachalkova, A. *Arch. Pharm. Res.* 1999, 22, 173–178.
259. Markham, R.K.; Sheppard, C.; Geiger, H. *Phytochemistry*. 1987, 26, 3335–3337.
260. Ryu, Y.B.; Jeong, H.J.; Kim, J.H.; Kim, Y.M.; Park, J.Y.; Kim, D.; Nguyen, T. T.H.; Park, S.J.; Chang, J.S.; Park, K.H.; Rho, M.C.; Lee, W.S. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 7940–7947.
261. Harborne, J. B. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986; *CRC Press Inc*, 1993.
262. Carbonezi, C.A.; Hamerski, L.; Gunatilaka, A.L.; Cavalheiro, A.; Castro-Gamboa, I.; Silva, D.H.S.; Furlan, M.; Young, M.C.M.; Lopes, M.N.; Bolzani, V. *Rev. bras. farmacogn.* 2007, 17, 319–324.
263. Chong, J.; Poutaraud, A.; Huguency, P. *Plant Sc.* 2009, 177, 143–155.
264. Koh, D.; Park, K.H.; Jung, J.; Yang, H.; Mok, K.H.; Lim, Y. *Magn. Res. Chem.* 2001, 39, 768–770.
265. Dais, P. *Lipid Tech.* 2010, 22, 274–276.
266. Makin, H.L.J. Steroid Analysis; *Springer*, 2010.
267. Della Greca, M.; Monaco, P.; Previtera, L. *J. Nat. Prod.* 1990, 53, 1430–1435.
268. McCarthy, F.O.; Chopra, J.; Ford, A.; Hogan, S.A.; Kerry, J.P.; O'Brien, N.M.; Ryan, E.; Maguire, A.R. *Org. Biomol. Chem.* 2005, 3, 3059–3065.
269. Georges, P.; Sylvestre, M.; Ruegger, H.; Bourgeois, P. *Steroids.* 2006, 71, 647–652.
270. Koonin, E.V. *J. Gen. Vir.* 1991, 72, 2197–2206.
271. Havsteen, B.H. *Pharmacol. Ther.* 2002, 96, 67–202.
272. Ilyas, N.; Ilyas, M.; Rahman, W.; Okigawa, M.; Kawano, N. *Phytochemistry*. 1978, 17, 987–990.
273. Cao, Y.; Tan, N.H.; Chen, J.J.; Zeng, G.Z.; Ma, Y.B.; Wu, Y.P.; Yan, H.; Yang, J.; Lu, L.F.; Wang, Q. *Fitoterapia.* 2010, 81, 253–258.
274. Kunert, O.; Swamy, R. C.; Kaiser, M.; Presser, A.; Buzzi, S.; Appa Rao, A. V. N.; Schühly, W. *Phytochemistry Lett.* 2008, 1, 171–174.
275. Lin, Y.M.; Zembower, D.E.; Flavin, M.T.; Schure, R.M.; Anderson, H.M.; Korba, B.E.; Chen, F.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 2325–2328.

276. Lin, Y.M.; Flavin, M.T.; Schure, R.; Chen, F.C.; Sidwell, R.; Barnard, D.L.; Huffman, J.H.; Kern, E.R. *Planta Med.* 1999, 65, 120–125.
277. Zembower, D.E.; Lin, Y.M.; Flavin, M.T.; Chen, F.C.; Korba, B.E. *Antiviral Res.* 1998, 39, 81–88.
278. Chen, Y.G.; Yu, L.L.; Huang, R.; Liu, J.C.; Lv, Y.P.; Zhao, Y. *Arch. Pharm. Res.* 2005, 28, 1233–1235.
279. Xiaowei, G. *Chemistry of bryophytes; Thèse de doctorat*, 2007.
280. Keppel, G.; Prentis, P.; Biffin, E.; Hodgskiss, P.; Tuisese, S.; Tuiwawa, M.V.; Lowe, A. *J. Aust. J. Botany.* 2011, 59, 262.
281. Boonrod, K.; Krczal, G. *Curr. Enz. Inhib.* 2009, 5, 234–244.
282. Wilson, P.G.; O'Brien, M.M.; Gadek, P.A.; Quinn, C.J. *Am. J. Botany.* 2001, 88, 2013–2025.
283. Dawson, J.W. *Flore de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances; Association de botanique tropicale; Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, 1992; Vol. 18.*
284. Wilson, P.G.; O'Brien, M.M.; Heslewood, M.M.; Quinn, C.J. *Plant Syst. Evol.* 2004, 251, 3–19.
285. Corbett, R.E.; Hanger, W.G. *J. Sc. Food Agri.* 1953, 4, 508–511.
286. Weston, R.J. *J. Essential Oil Res.* 2001, 13, 280–285.
287. Mustafa, K.; Perry, N.B.; Weavers, R.T. *Bioch.Syst. Ecol.* 2005, 33, 1049–1059.
288. Kellam, S.J.; Tisch, M.H.; Walker, J.R.L. *NZ. J. Botany.* 1992, 30, 199–203.
289. Anderson, Ø.M. *Bioch.Syst. Ecol.* 1988, 16, 535–539.
290. Kong, J.M.; Chia, L.S.; Goh, N.K.; Chia, T.F.; Brouillard, R. *Phytochemistry.* 2003, 64, 923–933.
291. Peng, C.; Bodenhausen, G.; Qiu, S.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R.; Yuan, S.; Zheng, C. *Magn. Res. Chem.* 1998, 36, 267–278.
292. Hillis, W.E.; Isoi, K. *Phytochemistry.* 1965, 4, 905–918.
293. Abd-Alla, M.F.; El-Negoumy, S.I.; Hosny El-Lakany, M.; Saleh, N.A.M. *Phytochemistry.* 1980, 19, 2629–2632.
294. Okamura, H.; Mimura, A.; Yakou, Y.; Niwano, M.; Takahara, Y. *Phytochemistry.* 1993, 33, 557–561.
295. Simirgiotis, M.J.; Adachi, S.; To, S.; Yang, H.; Reynertson, K.A.; Basile, M.J.; Gil, R.R.; Weinstein, I.B.; Kennelly, E. *J. Food Chemistry.* 2008, 107, 813–819.
296. Wollenweber, E.; Wehde, R.; Dörr, M.; Lang, G.; Stevens, J.F. *Phytochemistry.* 2000, 55, 965–970.
297. Cichewicz, R.H.; Kouzi, S.A. *Med. Res. Rev.* 2004, 24, 90–114.
298. Paeshuyse, J.; Letellier, C.; Froeyen, M.; Dutartre, H.; Vrancken, R.; Canard, B.; De Clercq, E.; Gueiffier, A.; Teulade, J.C.; Herdewijn, P.; Puerstinger, G.; Koenen, F.; Kerkhofs, P.; Baraldi, P.G.; Neyts, J. *Antiviral Res.* 2009, 82, 141–147.
299. Rios, J.L.; Recio, M.C.; Villar, A. *J. Ethnopharmacol.* 1988, 23, 127–149.
300. Kim, J.; Park, K.; Lee, C.; Chong, Y. *Chem. Inform.* 2008, 39, 2527–2530.

Annexes

Annexe 1 Médicaments issus de plantes utilisées en médecine traditionnelle proposé par Fabricant et Farnsworth en 2001¹⁵²

Table 1. Drugs derived from plants, with their ethnomedical correlations and sources.

Drug	Action or clinical use	Plant source
Acetyldigoxin	Cardiotonic	<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.
Adoniside	Cardiotonic	<i>Adonis vernalis</i> L.
Aescin	Anti-inflammatory	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.
Aesculetin	Antidysentery	<i>Fraxinus rhynchophylla</i> Hance
Agrimophol	Anthelmintic	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.
Ajmalicine	Circulatory disorders	<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth ex. Kurz
Allyl isothiocyanate	Rubefacient	<i>Brassica nigra</i> (L.) Koch
Andrographolide	Bacillary dysentery	<i>Andrographis paniculata</i> Nees
Anisodamine	Anticholinergic	<i>Anisodus tanguticus</i> (Maxim.) Pascher
Anisodine	Anticholinergic	<i>Anisodus tanguticus</i> (Maxim.) Pascher
Arecoline	Anthelmintic	<i>Areca catechu</i> L.
Asiaticoside	Vulnerary	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urban
Atropine	Anticholinergic	<i>Atropa belladonna</i> L.
Berberine	Bacillary dysentery	<i>Berberis vulgaris</i> L.
Bergenin	Antitussive	<i>Ardisia japonica</i> Bl.
Bromelain	Anti-inflammatory; proteolytic agent	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill
Caffeine	CNS stimulant	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze
(+)-Catechin	Haemostatic	<i>Potentilla fragaroides</i> L.
Chymopapain	Proteolytic; mucolytic	<i>Carica papaya</i> L.
Cocaine	Local anaesthetic	<i>Erythroxylum coca</i> Lamk.
Codeine	Analgesic; antitussive	<i>Papaver somniferum</i> L.
Colchicine	Antitumor agent; antigout	<i>Colchicum autumnale</i> L.
Convallotoxin	Cardiotonic	<i>Convallaria majalis</i> L.
Curcumin	Choleretic	<i>Curcuma longa</i> L.
Cynarin	Choleretic	<i>Cynara scolymus</i> L.
Danthron	Laxative	<i>Cassia</i> spp.
Deserpidine	Antihypertensive; tranquilizer	<i>Rauwolfia canescens</i> L.
Deslanoside	Cardiotonic	<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.
Digitalin	Cardiotonic	<i>Digitalis purpurea</i> L.
Digitoxin	Cardiotonic	<i>Digitalis purpurea</i> L.
Digoxin	Cardiotonic	<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.
Emetine	Amoebicide; emetic	<i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Brotero) A. Richard
Ephedrine	Sympathomimetic	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.
Etoposide	Antitumor agent	<i>Podophyllum peltatum</i> L.
Gitalin	Cardiotonic	<i>Digitalis purpurea</i> L.
Glaucarubin	Amoebicide	<i>Simarouba glauca</i> DC.
Glycyrrhizin	Sweetener	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.
Gossypol	Male contraceptive	<i>Gossypium</i> spp.
Hemsleyadin	Bacillary dysentery	<i>Helmsleya amabilis</i> Diels
Hydrastine	Hemostatic; astringent	<i>Hydrastis canadensis</i> L.
Hyoscamine	Anticholinergic	<i>Hyoscamus niger</i> L.
Kainic Acid	Ascaricide	<i>Digenea simplex</i> (Wulf.) Agardh
Kawain	Tranquilizer	<i>Piper methysicum</i> Forst. f.
Khellin	Bronchodilator	<i>Ammi visnaga</i> (L.) Lamk.
Lanatosides A, B, C	Cardiotonic	<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.
Lobeline	Smoking deterrent; respiratory stimulant	<i>Lobelia inflata</i> L.
Monocrotaline	Antitumor agent	<i>Crotalaria sessiliflora</i> L.
Morphine	Analgesic	<i>Papaver somniferum</i> L.
Neoandrographolide	Bacillary dysentery	<i>Andrographis paniculata</i> Nees

Noscapine	Antitussive	<i>Papaver somniferum</i> L.
Ouabain	Cardiotonic	<i>Strophanthus gratus</i> Baill.
Papain	Proteolytic; mucolytic	<i>Carica papaya</i> L.
Phyllodulcin	Sweetener	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb.) DC
Physostigmine	Cholinesterase inhibitor	<i>Physostigma venenosum</i> Balf.
Picrotoxin	Analeptic	<i>Anamirta cocculus</i> (L.) W.&A.
Pilocarpine	Parasympathomimetic	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes
Podophyllotoxin	Condylomata acuminata	<i>Podophyllum peltatum</i> L.
Protoveratrine A & B	Antihypertensive	<i>Veratrum album</i> L.
Pseudoephedrine	Sympathomimetic	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.
Pseudoephedrine, nor-	Sympathomimetic	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.
Quinine	Antimalarial	<i>Cinchona ledgeriana</i> Moens ex. Trimen
Quisqualic Acid	Anthelmintic	<i>Quisqualis indica</i> L.
Rescinnamine	Antihypertensive; tranquilizer	<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth ex. Kurz
Reserpine	Antihypertensive; tranquilizer	<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth ex. Kurz
Rhomitoxin	Antihypertensive	<i>Rhododendron molle</i> G. Don
Rorifone	Antitussive	<i>Rorippa indica</i> (L.) Hochr.
Rotenone	Piscicide	<i>Lonchocarpus nicou</i> (Aubl.) DC.
Rotundine	Analgesic; sedative	<i>Stephania sinica</i> Diels
Salicin	Analgesic	<i>Salix alba</i> L.
Santonin	Ascaricide	<i>Artemisia maritima</i> L.
Scillarin A	Cardiotonic	<i>Urginea maritima</i> (L.) Baker
Scopolamine	Sedative	<i>Datura metel</i> L.
Sennosides A & B	Laxative	<i>Cassia</i> spp.
Silymarin	Antihepatotoxic	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
Stevioside	Sweetener	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni
Strychnine	CNS stimulant	<i>Strychnos nux-vomica</i> L.
Teniposide	Antitumor agent	<i>Podophyllum peltatum</i> L.
Tetrahydropalmatine	Analgesic; sedative	<i>Corydalis ambigua</i> (Pallas) Cham. & Schltal.
Theobromine	Diuretic; bronchodilator	<i>Theobroma cacao</i> L.
Theophylline	Diuretic; bronchodilator	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze
Trichosanthin	Abortifacient	<i>Thymus vulgaris</i> L.
Tubocurarine	Skeletal muscle relaxant	<i>Chondodendron tomentosum</i> R. & P.
Valepotriates	Sedative	<i>Valeriana officinalis</i> L.
Vincamine	Cerebral stimulant	<i>Vinca minor</i> L.
Xanthotoxin	Leukoderma; vitiligo	<i>Ammi majus</i> L.
Yohimbine	Aphrodisiac	<i>Pausinystalia yohimbe</i> (K.Schum.) Pierre
Yuanhuacine	Abortifacient	<i>Daphne genkwa</i> Seib. & Zucc.
Yuanhuadine	Abortifacient	<i>Daphne genkwa</i> Seib. & Zucc.

Annexe 2. Synthèse des données ethnopharmacologiques et phytochimiques relatives aux plantes fébrifuges sélectionnées initialement pour cette étude. En grisées apparaissent les plantes récoltées au cours de ces travaux. (Boucans : maladies totémiques en Nouvelle-Calédonie. Ex : « Paraawa », mauvais soi, mal partout ; « Lézard » traduit pas des affections cutanées, « dooki » traduit par une impression de chaud et froid, de fièvre et de sueure) ; Weny : infraction à un tabou dressé par un chef

Famille	Espèce	Noms vernaculaires	Utilisations et réputations traditionnelles	Connaissances phytochimiques
Adiantaceae	<i>Cheilanthes distans</i>	-	contre le « dooki », les contusions, et toutes les maladies	flavonoïdes, stérols de type ecdyzone, terpènes parfois glycosylés isolés dans d'autres espèces du genre
Anacardiaceae	<i>Semecarpus sp.</i>	Goudronier (Fr), kwârî (Xârâcùù)	fébrifuge	flavonoïdes ; biflavonoïdes dérivés phénoliques
Apocynaceae	<i>Alstonia coriacea</i>	-	fébrifuge	alcaloïdes
	<i>Ochrosia elliptica</i>	Faux quinquina (Fr), rhö ou ziö (Ajië), pint aéré (Drubea)	infusion des écorces fébrifuge, diurétique, dépurative, purgative ; plante utilisée comme anti-venin, contre les contusions, coupures et les bronchites	alcaloïdes
Araceae	<i>Epipremnum pinnatum</i>	Wa yalu, alu, naca, yalu (Fidji)	décoction des feuilles et des racines fébrifuge à Fidji ; plante utilisée contre les enflures, abcès et foulures, les rhumatismes, l'herpès et la gale	un alcaloïde : la tongine
Araliaceae	<i>Meryta coriacea</i>	-	écorces bouillies fébrifuges ("chaleur", fièvre "froide", fièvre avec frissons) ; plante utilisée comme purgative et contre une adénite	saponines
	<i>Meryta macrocarpa</i>	-	fébrifuge	
	<i>Agathis ovata</i>	Kaori des montagnes ou Kaori nain (Fr)	tonique, antiseptique, vulnéraire et pour la cicatrisation	
	<i>Agathis moorei</i>	Kaori blanc (Fr), gèri (Xârâcùù)	fébrifuge et utilisée contre le « lézard »	diterpènes, flavonoïdes et biflavonoïdes
Araucariaceae	<i>Agathis spp.</i>	Kaori (Fr), béréuru, gèri, mûgè (Xârâcùù)	décoction du bois ou des écorces à laquelle sont ajoutée 2 feuilles fébrifuge ; plante utilisée contre les « boucans »	

	<i>Bidens pilosa</i>	Xapopö (Xârâgurè), batimadramadra (Fidji)	fébrifuge, antigrippale, antipaludique ; le jus des jeunes feuilles bouillies est donné contre la fièvre des jeunes enfants en NC	phénylhéptatriyne (majoritaire) et autres polyacétylènes, stérols (sitostérols et stigmastérols), flavonoïdes, diterpènes
Asteraceae	<i>Wedelia biflora</i>	Marguerite sauvage, faux topinambour, herbe à cochon (Fr), niamēi (Xârâcùù), nyô moe (Xârâgurè) ; kheejak (Nelemwa, Nixumwak), khâgee (Yuanga) thagac (Nyelayu), kaket, ujo (Haveke); segue (Nengone); hiök, hiëk, pace (Iaai)	fébrifuge et antipaludique, contre la filaire, les ictères, les diarrhées, la toux, la dysenterie, les maux d'estomac, de tête et de ventre, et contre les blessures	terpènes, stérols, flavonoïdes, coumarines, dérivés de l'acide caféique
Casuarinaceae	<i>Gymnostoma chamaecyparis</i>	Bois de fer des montagnes (Fr), wayu (Xârâcùù)	fébrifuge, "redonne du sang aux jeunes qui ont l'air vieux"	tanins, flavonoïdes, alcaloïdes et huile essentielle dans d'autres Casuarinaceae
Clusiaceae	<i>Calophyllum inophyllum</i>	Tamanou du bord de mer (Fr), dilo (Fidji)	feuilles fébrifuges ; plante utilisée contre les rhumatismes et la tuberculose	coumarines, lactones, triterpènes, xanthones, saponines et flavonoïdes,
	<i>Garcinia puat</i>	Taaveu (Xârâcùù)	contre le « Paraawa »	xanthones, terpènes dans d'autres
	<i>Garcinia hennecartii</i>	-	macération des feuilles et du latex utilisée contre la toux	<i>Garcinia</i>
	<i>Garcinia vieillardii</i>	-	feuilles rouges encore collées sont mâchées et avalées contre la fièvre	xanthones et polyphénols
Combretaceae	<i>Terminalia catappa</i>	Badamier (Fr), tavola, tivi, badami (Hindi)	écorces et feuilles fébrifuges, antipaludiques, astringents, sudorifiques, antidiarrhéiques, et antirhumatismal ; plante utilisée contre les infections, coupures et inflammations, les cancers et la dysenterie	écorces riches en tannin, composés phénoliques, flavonoïdes et triterpènes

Convolvulaceae	<i>Ipomea cairica</i>	Mwârië (Xârâcùù), Wasovivi (Fidji)	parties aériennes bouillies fébrifuges et purgatives ; plante utilisée contre les diarrhées et la dysenterie	alcaloïdes dérivés de l'ergoline
Davalliaceae	<i>Davallia solida</i>	cf. nèmëchwa (Xârâcùù), balabalsala (Fidji)	fébrifuge et fortifiante ; contre la dysenterie, l'asthme, les infections, les démangeaisons, maux de dents, la ciguatera et des maladies totémiques (« Léopard »)	composés cyanogéniques, triterpènes, xanthones
Ebenaceae	<i>Diospyros lecardii.</i>	-	bourgeons fébrifuges, utilisés contre les « coups de chaleurs »	terpènes, stérols, quinones, flavonoïdes, tanins, isolés d'autres <i>Diospyros</i>
	<i>Acalypha grandis</i>	-	fébrifuge	composés cyanogéniques, anthocyanines
	<i>Claoxylon insulanum</i>	-	rameaux feuillés chauffés à la flamme : fébrifuges et utilisés pour chasser les cauchemars	-
Euphorbiaceae	<i>Codiaeum variegatum</i>	Croton (Fr), aruk (Xârâcùù), sacasaca (Fidji)	feuilles écrasées ou bouillies fébrifuges au Vanuatu et contre le « Dooki » en NC ; plante utilisées contre des infections, la grippe, la gratte et certains cancers, comme purgative et ocytocique	terpènes, polyphénols et leucoanthocyanidines, cyanoglucosides
	<i>Excoecaria agallocha</i>	Palétuvier aveuglant (Fr), dôtô (Xârâgure), dötö (Xârâcùù), sinugaga (Fidji)	jus des écorces fébrifuge et anti-inflammatoire à Fidji. Plante toxique en NC ou le latex des feuilles est utilisé pour apaiser la douleur contre les piqures de poissons pierre	tannins, alcaloïdes, chalcones et nombreux diterpénoïdes oxydés
	<i>Glochidion billardierei</i>	Kwanda (Xârâcùù)	fébrifuge, utilisée contre les douleurs dos, reins et de tête, les blessures infectées contre certaines maladies totémiques, voire "toutes les maladies"	nombreux triterpènes et saponines, parfois des flavonoïdes, isolés dans le genre
	<i>Homalanthus nutans</i>	Xapu (Xârâcùù), kadica (Nengone)	fébrifuge ; écorces broyées et lixiviées à froid par de l'eau utilisé comme « remède au mal qui	terpènes oxydés dans le genre

ronge l'homme »

Goodeniaceae	<i>Scaevola montana</i>	Mara, ndë mara, nâ dë mara (Xârâcùù , Xârâgurè), jörâdevio (Ajië), Cipara (Païci), darrâdeveo (Orròè),shegei na hiwari (Tîrî), tanamieù (Weru Pimè), mwhèt (Témala)	fortifiant, purgatif, emménagogue, fertilisant, diurétique, et contre la fatigue et l'arthrite	iridoïdes, (notamment chez <i>S. montana</i>), alcaloïdes, coumarines et terpènes (notamment chez <i>S. sericea</i>)
	<i>Scaevola sericea</i>	Chapwio (Xârâgurè)	décoction des feuilles fébrifuge, antigrippale ; plante utilisée contre les maux de tête, les toux grasses, la ciguatera, les coupures de corail, les maux d'oreille, et les ophtalmies	
	<i>Scaevola balansae</i>	Emuet (Nemi), mualandio (Nyelayu), jara de veo (Ajië); darandaveo (Neku)	extrémités des feuilles : fortifiant pour les enfants	
Hymenophyllaceae	<i>Trichomanes maximum</i>	-	parties aériennes contre la fièvre et les frissons	flavonoïde, notamment flavones C- ou O-glycosylés dans le genre
Lauraceae	<i>Cassytha filiformis</i>	Fausse cuscute (Fr), ango sen xuireka, kumè (Xârâgurè), aköösë wileka, aköösë xurèka (Xârâcùù), walutumailagi, amarbeli (Hindi)	parties aériennes (Macération, décoction, ou broyées) fébrifuges, antigrippales ; plante utilisée comme purgatif, contre les coups de soleil, les hémorroïdes et comme shampoing antipelliculaire	alcaloïdes dans cette espèce ; flavonoïdes dans le genre
Lecythidaceae	<i>Barringtonia integrifolia</i>	Mârâga (Xârâcùù)	bois râpé et lixivié, bu contre la fièvre, les maux de tête et les rhumatismes ; plante utilisée pour faire descendre le placenta	saponines et triterpènes dans le genre
	<i>Acacia simplicifolia</i>	Acacia des plages (Fr), hnaa (Nouméé), jâgan (Caac), Piyë (Xârâgurè), Meu (Tîrî), Muixetè	écorces râpées et lixivées à l'eau de mer : purgatif naturel ou en infusion comme tonique	alcaloïdes isolé dans cette espèce ; glucosides cyanogéniques, terpènes, gommés, tannins et flavonoïdes dans le genre

(Drehu)				
	<i>Cassia occidentalis</i>	Kèmbu (Xârâcùù), kaumoce, kasunda (Hindi)	contre la fièvre jaune et l'herpès, expectorante, antirhumatismale et utilisée contre les brûlures et les infections	anthraquinones, xanthones et alcaloïdes
Leguminosae	<i>Erythrina variegata</i>	Peuplier Kanak (Fr), kopwa (Xârâgurè)	écorces macérées fébrifuge et utilisées contre la dengue, la grippe et la ciguatera ; jus des feuilles et des écorces macéré bu contre la fièvre, la filariose et le paludisme ; plante utilisée contre les maux de tête, la ciguatera et les courbatures et douleurs articulaires, les « Boucans », ulcères et comme sédatif, hypnotique et fortifiant	acides hydroxycinnamiques, alcaloïdes et isoflavones
	<i>Entada phaseoloides</i>	Walai, cibi, wataqiri (Fidji)	fébrifuge ; utilisée contre les courbatures, la filariose, la tuberculose et l'éléphantiasis ; graines toxiques et utilisées contre la gale et les douleurs abdominales	saponines, stérols, triterpènes, quercétine, acide gallique, chalcones glycosylées
Loganiaceae	<i>Fagraea bertoana</i>	Bois Tabou, bois pétrole (Fr), potr (Drehu), buè (Xârâcùù)	fruits fébrifuges ; plante toxique	alcaloïdes, terpènes, flavone et flavononols glycosylés et saponines ont été isolées dans la famille
	<i>Geniostoma vitiense</i>	Kauda, boiboida, kandrakandra vili (Fidji)	écorces fébrifuges et contre la dengue à Fidji ; feuilles utilisées comme sédatif et pour traiter la tuberculose, les abcès et la syphilis	alcaloïdes, saponines, anthocyanines et un acide benzoïque glycosylé dans le genre
Lycopodiaceae	<i>Lycopodiella cernua</i>	Dja (Xârâcùù), lewanini, suinigata, alewa nini (Fidji)	fébrifuge et antigrippale, contre les inflammations, ulcères et infections de peau	Alcaloïdes, triterpènes, stérols, flavonoïdes, et dérivés phénoliques
Malvaceae	<i>Melochia odorata</i>	Tilleul rose (Fr), sombwè (Xârâgurè), sôbwè (Xârâcùù)	décoction ou macéra des feuilles fébrifuge, antigrippale, hémostatique, désinfectante, cicatrisante et anti-inflammatoires, contre la colique, la toux, les hernies et pour les purges	Alcaloïdes
	<i>Thespesia populnea</i>	Bois de rose (Fr), po kârro (Xârâgurè), pèkârû	écorces et feuilles fébrifuges, utilisées contre les maux de tête et la grippe ; plante virucide	dérivés du kaempférol, de la quercétine et du gossipol

		(Xârâcùù), mulomulo (Fidji)	(verrues et herpès) ; feuilles, écorces et fruits utilisés contre la ciguatera, la dysenterie, les hémorroïdes, les rhumatismes, les blessures, les inflammations, infections, problèmes urinaires et sinusites	
Marattiaceae	<i>Angiopteris evecta</i>	Basovi, bawalu (Fidji)	fébrifuge	flavonoïdes C-glycosylées, lactones, coumarines et stéroïdes dans le genre
Melicaeae	<i>Dysoxylum roseum</i>	-	<i>Dysoxylum sp</i> fébrifuge	nombreux terpènes et un biflavonoïde
Moraceae	<i>Ficus microcarpa</i>	Banian, figuier étrangleur (Fr), duru (Xârâcùù)	macération des écorces fébrifuge, abortive, utilisée contre la dengue, la grippe, la ciguatera et les maladies du cœur	nombreux terpènes isolés, notamment dans <i>F. microcarpa</i> , alcaloïdes notamment dans <i>F. septica</i> , stéroïdes, flavonoïdes dans le genre
	<i>Ficus obliqua</i>	Baka, baka ni vitri (Fidji)	macération des écorces fébrifuge, actif contre la dengue, la grippe, redonne du sang, soigne le « Boucan », et remet les os et jointures	
	<i>Ficus septica</i>	-	fébrifuge et utilisée contre la tuberculose	
Myrtaceae	<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Niaouli (Fr), pichö (Xârâcùù), xande (Xârâgurè)	feuilles (tisane ou fumigation) fébrifuges ; plante utilisée à la fin de règles féminines, contre le « boucan », la grippe, la lèpre, la gale, ou des irritations	terpènes volatiles
	<i>Carpolepis laurifolia</i>	Faux teck (Fr), magna ou magnaxa (Xârâcùù)	fébrifuge ; plante utilisée pour purifier le sang, refermer les plaies et contre le « Weny »	-
Rhamnaceae	<i>Colubrina asiatica</i>	Seureushoà (Xârâgurè)	fébrifuge	alcaloïdes et saponines
Rhizophoraceae	<i>Bruguiera gymnorhiza</i> Lam.	Palétuvier rouge (Fr), nè (Xârâgurè), dogo (Fidji)	fébrifuge, tannique, hémostatique et astringente ; plante utilisée contre la dysenterie, une ophtalmie et la lèpre, la syphilis et pour traiter certains cancers	tannins, tropines sulfoxides (bruguierol, isobruguierol), stéroïdes, terpènes pentacycliques
Rhizophoraceae	<i>Crossostylis grandiflora</i>	Palétuvier des montagnes (Fr)	fébrifuge et astringente	alcaloïdes dans le genre

Rubiaceae	<i>Guettarda speciosa</i>	Buabua (Fidji)	écorces fébrifuges, amères, toniques, astringentes et vulnéraires ; plante utilisée contre les coupures, blessures et abcès	iridoïdes glycosylés, alcaloïdes et triterpènes dans le genre
	<i>Psychotria poissoniana</i>	-	<i>Psychotria sp</i> utilisée contre "Toutes les maladies", contre la dysenterie et la sensation de corps douloureux	alcaloïdes dans le genre
	<i>Psychotria collina</i>	Kumiketoo (Nengone), hmelexeci (Drehu), hùmo (Iaaï)	utilisée contre les maux de tête, la constipation, comme purgatif et hémostatique ; plante abortive et fait revenir les règles	
Rutaceae	<i>Acronychia laevis</i>	Bui (xârâgurè), mbwi (xârâcùù)	utilisée contre le « lézard »	alcaloïdes, coumarines dans le genre
	<i>Euodia wagapensis</i>	-	fébrifuge et tonique	flavonoïdes, terpènes glycosylés, coumarines dans le genre
	<i>Micromelum minutum</i>	Thé de Lifou (Fr), niadamia (Xârâcùù), qiqila, tavolali, sawaqa (Fidji)	écorces râpées dans l'eau ou décoction de feuilles fébrifuges, fortifiantes ; plante utilisée contre les tendinites, insomnies, maux de tête, l'épilepsie et pour un avortement	coumarines, flavonoïdes et alcaloïdes
	<i>Picrella trifoliata</i>	N'daên (Xârâgurè)	bois fébrifuge, anticonceptionnel, actif contre les conjonctivites, les contusions et les fractures	alcaloïdes et flavonoïdes dans le genre
	<i>Zanthoxylum sp.</i>	-	fébrifuge, amère, aromatique, diaphorétique et emménagogue	alcaloïdes, triterpènes, lignanes, flavonoïdes, coumarines dans le genre
Sapindaceae	<i>Cupaniopsis sp.</i>	Chêne tigré (Fr), mandxo (Xârâcùù),	bois râpé, pressé avec de l'eau et bu en petite quantité fébrifuge	triterpènes linéaires
	<i>Dodonea viscosa</i>	Kâdâ (Xârâgurè), mèèkō (Xârâcùù), wase, wase wase, usi (Fidji)	infusion ou décoction des feuille ou des écorces sont fébrifuges, antipaludiques, antirhumatismales, actives contre les maux de gorges et les hémorroïdes ; plante toxique et ichtyotoxique	saponines, diterpènes, flavonoïdes, dérivés phénoliques, tannins, dérivés cyanogéniques , alcaloïdes, stéroïdes
	<i>Elattostachys apetala</i>	Faux chêne blanc (Fr), kumôto, mâdō (Xârâcùù)	toutes les maladies ; Ecorce ichtyotoxique	saponines

Simaroubaceae	<i>Soulamea tomentosa</i>	Buisson d'argent (Fr)	fébrifuge, tonique et anti-diarrhéique	triterpènes dans cette espèce, alcaloïdes dans le genre
Smilacaceae	<i>Smilax purpurata</i>	Nyi (Xârâcùù)	<i>Smilax spp.</i> fébrifuges et utilisées comme purgatif, pour apaiser les démangeaisons, purifier le sang, soigner le foie et contre une paralysie	flavonoïdes, dérivés phénoliques, saponines dans le genre
Solanaceae	<i>Solanum torvum</i>	Soni, katai (Fidji)	tiges feuillées utilisées contre la fièvre due à la dengue et la tuberculose	-
	<i>Solanum repandum</i>	Boro sou (Fidji)	fébrifuge ; utilisée contre l'asthme, les bronchites, pour apaiser les maux de gorges et maux de tête	triterpènes, saponines, alcaloïdes, dérivés phénoliques notamment dans <i>S. torvuum</i>
Thymeliaceae	<i>Wikstroemia indica</i>	Simêgi (Xârâgurè),	toxique ; peau de l'écorce bouillie pour tuer les rats. feuilles toniques et une décoction de racine apaise les maux de dents	flavonoïdes, coumarines et lignanes
Urticaceae	<i>Pipturus argenteus</i>	Anumi (Nengone), de (Xârâcùù), mwândè (Xârâgurè), roga, roqa, tandeu (Fidji)	feuilles fébrifuge, fortifiantes et utilisées contre les courbatures ; plante utilisée sur des plaies, contre la toux et des douleurs d'estomac, contre la tuberculose, la dysenterie et les furoncles ; écorces vulnéraires ; suc des bourgeons utilisé contre les otites	-

Annexe 4. Intérêt chimiotaxonomique des familles auxquelles appartiennent les plantes récoltées selon ce critère

Famille	Intérêts chimiotaxonomique
Annonaceae	Alcaloïdes isoquinoléïques et acétogénines sont les composés les plus caractéristiques de la famille même si de nombreux dérivés phénoliques, flavonoïdes et terpènes et glucosides cyanogènes ont été isolés dans cette famille.
Amborellaceae	Très peu d'études concernent la phytochimie ou des potentialités pharmacologiques de cette plante, mettant en évidence la présence de flavonoïdes dans les feuilles. Considérée comme la plus vieille plante à fleur connue sur Terre, la caractérisation de sa phytochimie serait d'un grand intérêt pour la recherche fondamentale et notamment pour la chimiotaxonomie.
Apocynaceae	Hétérosides cardiotoniques, alcaloïdes indolo-monoterpéniques et stéroïdiques sont les composés les plus caractéristiques.
Araliaceae	Des saponines, polyacétylènes sont fréquemment retrouvés dans les Araliaceae. De plus certaines <i>Méryta</i> sont décrites comme fébrifuges dans la médecine traditionnelle.
Casuarinaceae	Des flavonoïdes et dérivés phénoliques ont été étudiés dans cette famille. Il est possible de retrouver des alcaloïdes et des terpènes d'intérêt pharmacologique dans cette famille. De plus certaines <i>Gymnostoma</i> sont décrites comme fébrifuges dans la médecine traditionnelle.
Ebenaceae	La famille des Ebenaceae est souvent considérée avec intérêt pour ses propriétés pharmacologiques. Le genre <i>Diospyros</i> est caractérisé par la présence de nombreux triterpènes pentacyclique et des dérivés de la 1,4-naphtoquinone. D'autres composés sont habituellement retrouvés dans ce genre, tels que des tannins, des stérols, coumarines et flavonoïdes. De nombreuses études se sont attachées à étudier les potentialités pharmacologiques, en montrant notamment une activité antivirale et antibactérienne de différentes espèces. Différents <i>Diospyros</i> sont par ailleurs utilisés en médecine traditionnelle.

Euphorbiaceae	Les Euphorbiaceae sont réputées contenir de nombreux triterpènes et saponines ainsi que des terpènes oxydés, de type phorboles, et qui sont très souvent décrits dans la littérature pour leurs potentialités biologiques. D'autres composés sont parfois retrouvés dans les Euphorbiaceae, tel que des dérivés phénoliques, flavonoïdes, composés cyanogènes réputés toxiques.
Goodeniaceae	Trois Scaevola sont utilisés dans la médecine traditionnelle Kanak. De plus, les Scaevola sont réputées contenir des iridoïdes et des coumarines ainsi que des terpènes potentiellement bioactifs.
Marattiaceae	Les Marattiaceae sont relativement peu étudiées pour leur phytochimie ou leur intérêt pharmacologique. Pourtant différents membres de ce groupe sont utilisés en médecine traditionnelle. Ces fougères sont caractérisés par la présence de flavonoïdes C-glycosylés potentiellement bioactifs et l'on observe également la présence de lactones, coumarines et stérols isolées dans une autre espèce du genre.
Podocarpaceae	Les Podocarpaceae peuvent renfermer des terpènes, notamment des diterpènes labdanes comme le phyllocladène et l'isophyllocladène, ainsi que de l'acide podocarpique. Par ailleurs, les Podocarpaceae, et les Gymnospermes en général renferment des flavonoïdes. On retrouve ainsi fréquemment des glycosylflavones comme dans les Pinaceae ou des biflavonoïdes. Les biflavones présentes dans beaucoup de Gymnospermes, sont ainsi décrites dans quelques espèces du genre <i>Podocarpus</i> , <i>Retrophyllum</i> et <i>Dacrydium</i> .
Rhamnaceae	La famille des Rhamnaceae comprend 900 espèces dont de nombreuses sont décrites pour leurs potentialités biologiques. Les Rhamnaceae sont par ailleurs réputées contenir des métabolites secondaires potentiellement intéressants pour la pharmacie : quinones, saponosides et alcaloïdes, notamment stéroïdiques.
Rubiaceae	Les Rubiaceae sont connus pour renfermer fréquemment des acides phénols, des coumarines, des tannins, des quinones, des terpènes et des alcaloïdes. De nombreuses Rubiaceae sont utilisées en médecine traditionnelle et décrites dans la Pharmacopée Française et d'autres pays.

Rutaceae	Les Rutaceae sont réputés contenir fréquemment des alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes, lignanes et limonoïdes. Par ailleurs de nombreuses espèces de Rutacées sont utilisées en médecine traditionnelle.
Sapotaceae	Les Sapotaceae sont réputés pour contenir fréquemment des stérols, terpènes et saponines. Certaines espèces contiennent également des alcaloïdes. L'espèce récoltée dans la présente étude, <i>Sebertia acuminata</i> est une espèce hyperaccumulatrice de Nickel et peut pour cela présenter une composition chimique originale.
Solanaceae	Les Solanaceae sont fréquemment utilisées en médecine traditionnelle. Cette famille est réputée contenir souvent des alcaloïdes, notamment tropaniques, nicotiniques, tryptaminique et stéroïdiques. De nombreux autres métabolites secondaires bioactifs, notamment des saponosides, terpènes ou anthraquinones, ont été décrits dans cette famille.
Thymelaeaceae	Réputées contenir des diterpènes bioactifs parfois toxiques. Le genre <i>Solmsia</i> , endémique de Nouvelle-Calédonie, n'a jamais fait l'objet d'une étude phytochimique à notre connaissance.

Annexe 5. Résultats du criblage des extraits à l'AcOEt filtrés sur polyamide des différents organes des plantes sélectionnées et récoltées au cours de notre étude. En grisée apparaissent les plantes sélectionnées sur les bases de l'ethnopharmacologie, en blanc sont mentionnées les plantes sélectionnées selon des critères chimiotaxonomiques. (Fe : feuilles ; Ec : écorces ; Fr : fruits ; Fl : fleurs ; PA : parties aériennes).

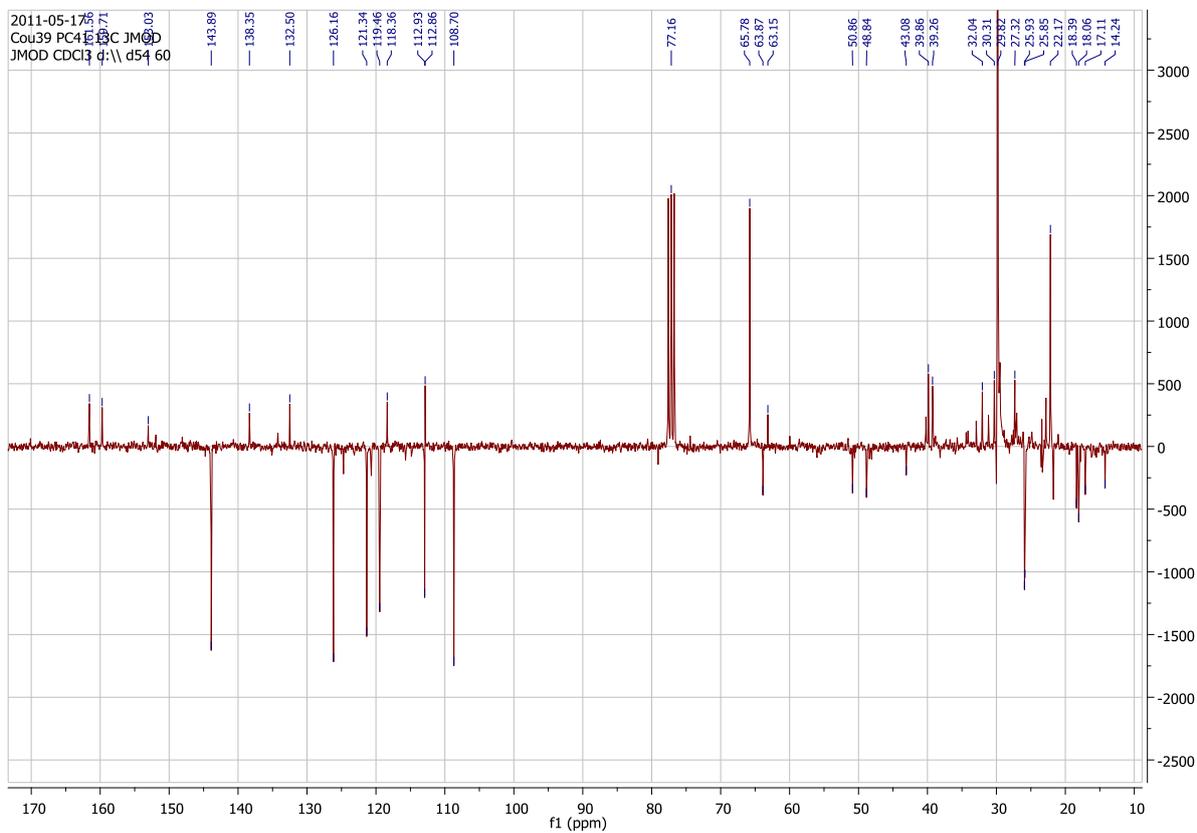
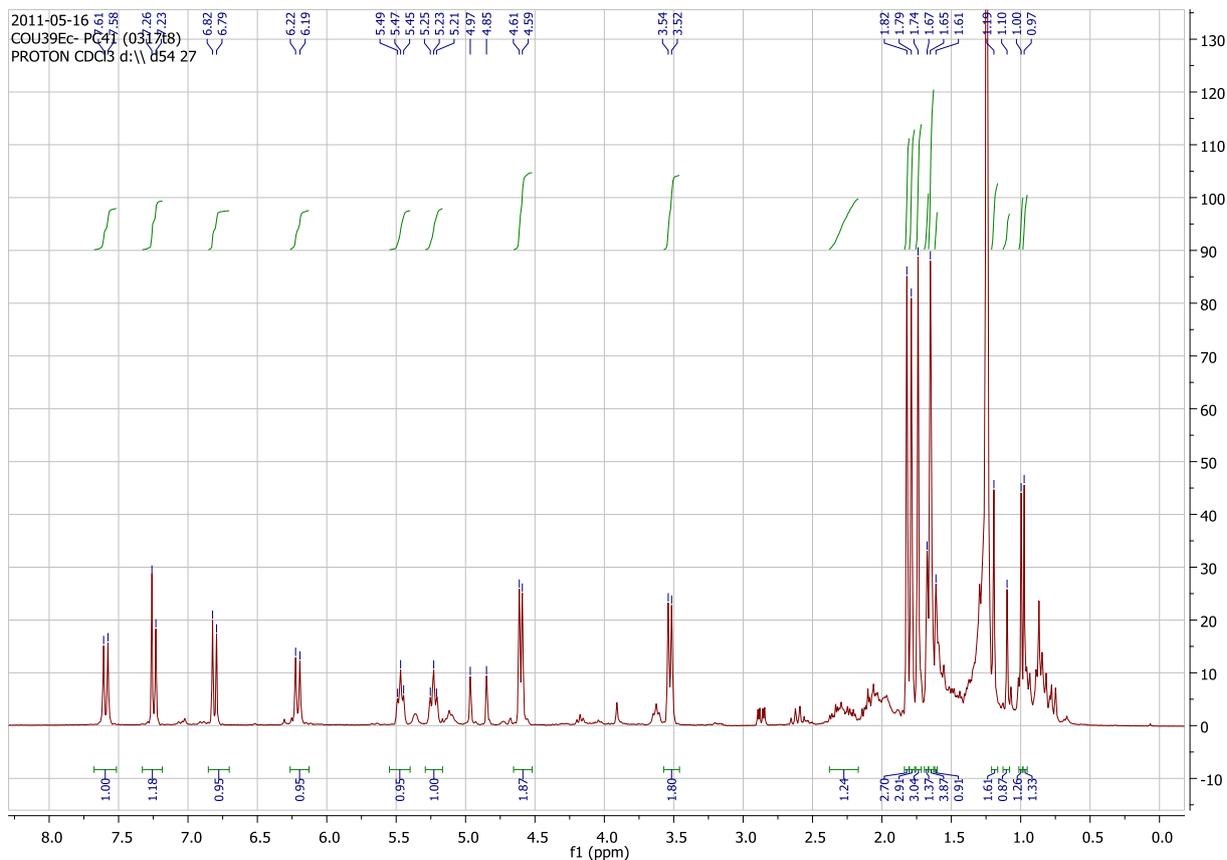
Famille	Espèce	Organe	Inhibition (%) de la DV2-NS5B à 10 µg/mL	Cytotoxicité (%) contre les cellules		Ø d'inhibition de la croissance de (cm)			
				KB à 10 µg/mL	MRC5 à 10 µg/mL	sur <i>E.</i> <i>coli</i>	sur <i>C.</i> <i>albicans</i>	sur <i>S.</i> <i>aureus</i>	sur <i>S.</i> <i>epidermidis</i>
Amborellaceae	<i>A. tricopoda</i>	Fe	40 ± 7	0	0	-	-	-	-
		Ec	45 ± 17	0	0	-	-	-	-
		Fr	31 ± 14	0	0	-	-	-	-
Annonaceae	<i>M. tiebaghiensis</i>	Fe	43 ± 19	11	0	-	-	-	-
		Ec	66 ± 14	94	82	-	12	10	-
Apocynaceae	<i>G. tricholepis</i>	Fe	24 ± 12	20	0	-	-	-	-
		Ti	19 ± 9	11	0	-	-	-	11
	<i>S. elliptica</i>	Fe	55 ± 5	6	0	-	-	-	-
		Ti	61 ± 13	19	0	-	-	-	-
		Fr	79 ± 15	43	0	-	-	-	-
Araceae	<i>E. pinnatum</i>	Fe	49 ± 6	3	0	-	-	-	-
Araliaceae	<i>M. balansae</i>	Fe	52 ± 18	9	0	-	-	-	8
		Ec	69 ± 10	0	0	-	-	-	-
		Fr	63 ± 4	0	0	-	-	-	-
Araucariaceae	<i>A. moorei</i>	Fe	41 +/-16	21	0	8.5	-	7	9

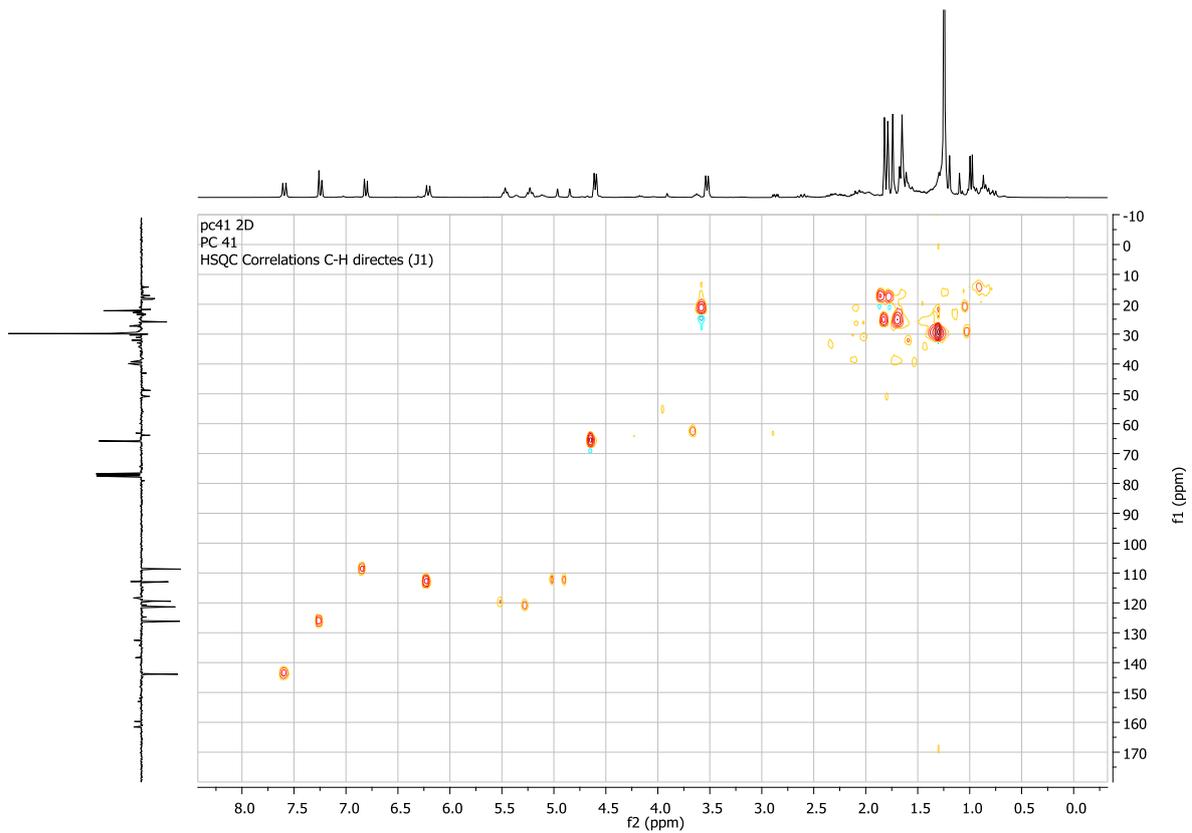
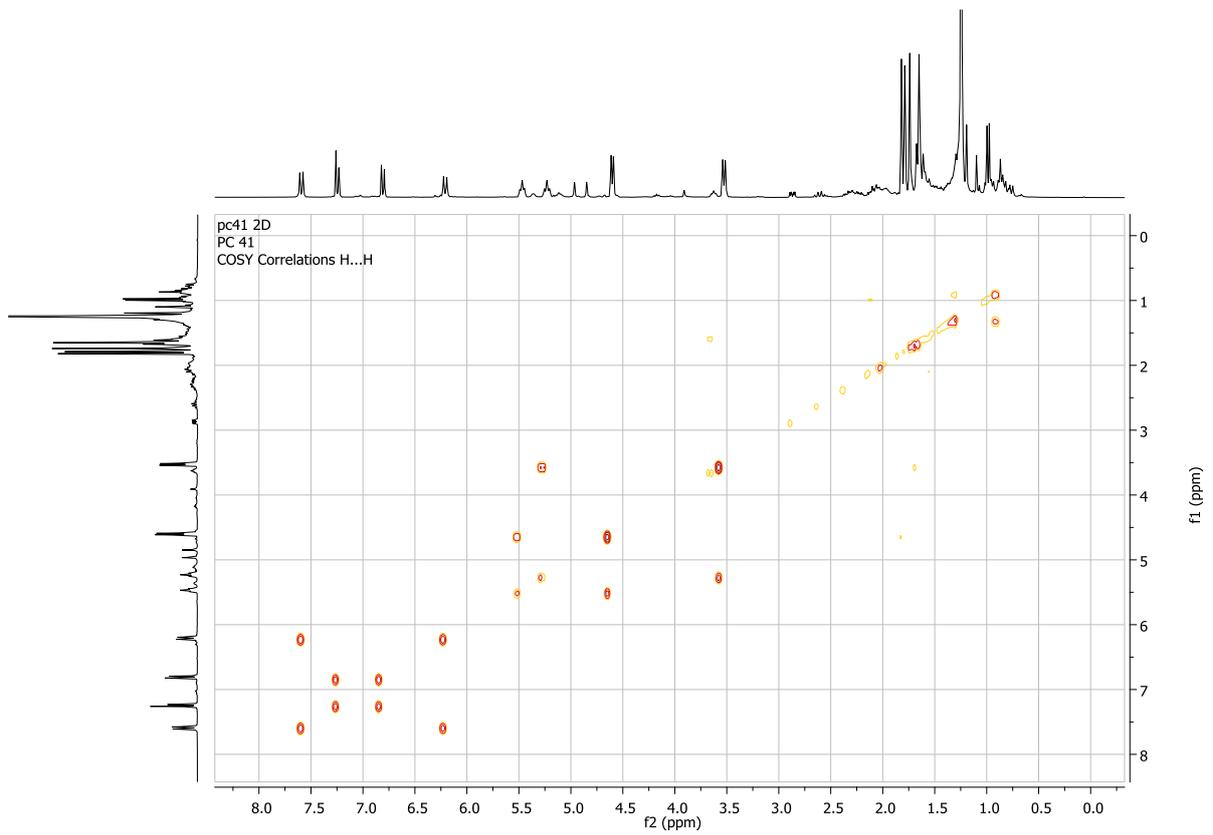
		Ec	56 +/-10	21	0	7	-	-	7
	<i>A. ovata</i>	Fe	45 +/-9	13	0		-	-	-
		Ec	78 +/-5	27	40	8	-	-	-
Casuarinaceae	<i>G. chamaecyparis</i>	Fe	57 +/-5	9	0	-	-	-	-
		Ec	65 +/-7	11	0	-	-	-	-
	<i>G. deplancheanum</i>	Fe	80 +/-6	16	0	-	-	-	-
		Ec	97 +/-1	36	0	-	10	9	7,5
Combretaceae	<i>T. catappa</i>	Fe	54 +/-8	17	0	-	-	-	-
		Ec	58 +/-4	13	0	-	-	-	-
Ebenaceae	<i>D. macrocarpa</i>	Fe	87 +/-6	70	0	-	-	-	-
		Ec	94 +/-4	98	98	-	12	11	-
Euphorbiaceae	<i>C. variegatum</i>	Fe	45 +/-11	39	24	-	-	-	-
		Ec	52 +/-6	28	23	-	-	-	-
	<i>E. agallocha</i>	Fe	58 +/-2	62	42	-	-	-	-
		Ec	84 +/-6	48	24	-	-	-	-
	<i>G. billardieri</i>	Fe	54 +/-5	19	12	-	-	-	-
		Ec	91 +/-6	47	0	-	10	-	-
	<i>H. repandus</i>	Fe	54 ± 12	22	0	-	-	-	-
		Ec	99 ± 1	8	0	-	-	-	-
Goodeniaceae	<i>S. balansae</i>	Fe	57 +/- 5	-	-	-	-	-	-
		Ec	89 +/- 4	-	-	-	-	-	-
	<i>S. beckii</i>	Fe	95 ± 2	3	0	-	-	8	-
		Ec	86 ± 12	97	40	-	-	-	-
	<i>S. montana</i>	Fe	86 +/-6	17	0	-	-	-	-
		Ec	86 +/-4	66	0	-	-	-	-
<i>S. sericea</i>	PA	39 ± 16	9	0	-	13	-	-	

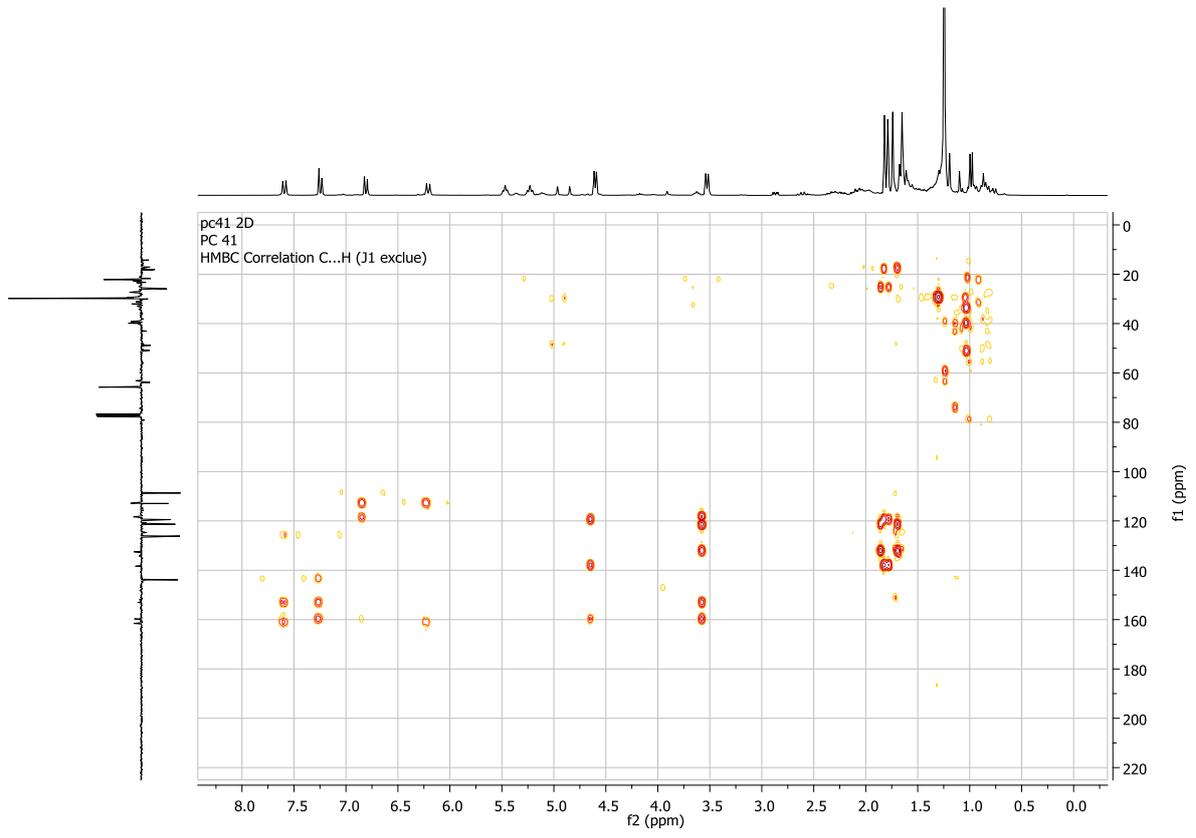
Lauraceae	<i>C. filiformis</i>	PA	46 +/-13	12	12	-	-	-	-
Leguminosae	<i>C. occidentalis</i>	PA	59 ± 13	10	6	-	-	-	-
		Fr	67 ± 8	0	0	-	-	-	-
	<i>E. phaseoloides</i>	Ec	64 +/-9	6	0		8	-	-
Lycopodiaceae	<i>L. cernua</i>	PA	77 ± 3	0	0	-	-	-	-
Malvaceae	<i>M. odorata</i>	PA	41 ± 10	0	0	-	-	11	-
		Fe	90 ± 6	6	0	-	-	9	-
	<i>T. populnea</i>	Ec	99 ± 0	93	95	-	9	12	6.5
		Fr	97 ± 1	3	0	10	9	12	9
Marattiaceae	<i>A. evecata</i>	PA	42 +/-13	13	0	-	-	-	-
	<i>M. attenuata</i>	PA	35 ± 13	7	0	-	-	-	-
Meliaceae	<i>D. roseum</i>	Fe	73 ± 5	13	0	-	-	-	7
		Ec	94 ± 6	25	0	-	-	10	7
Myrtaceae	<i>C.s laurifolia</i>	Fe	91 +/-3	28	0	7	8	8	-
		Ec	83 +/-11	21	0	9	13.5	8	8
	<i>M. quinquenervia</i>	Fe	89 +/-3	13	0	7	-	10	7
		Ec	87 +/-4	37	8	-	8	-	7
Podocarpaceae	<i>D. araucarioides</i>	Fe	94 ± 5	7	0	-	-	-	-
		Ec	59 ± 5	27	0	-	9	8	-
	<i>D. balansae</i>	Fe	94 ± 6	3	0	-	9	-	-
		Ec	66 ± 11	85	0	-	-	-	-
Rhamnaceae	<i>E. pancherianum</i>	Fe	62 ± 5	14	0	-	-	-	-
		Ec	35 ± 3	11	0	-	-	-	-
Rhizophoraceae	<i>B. gymnorhiza</i>	Fe	67 ± 10	15	0	-	-	-	7
		Ec	80 ± 11	5	5	-	-	-	7
	<i>C. grandiflora</i>	Fe	69 +/-9	1	0	-	-	-	-

		Ec	39 +/-15	16	0	-	-	-	-
Rubiaceae	<i>G. speciosa</i>	Fe	45 +/-5	3	5	-	-	-	-
		Ec	52 +/-9	0	0	-	-	-	-
	<i>P. poissoniana</i>	Fe	1 ± 1	3	0	-	-	-	-
		Ec	96 ± 3	5	0	-	9	-	+
		Fr	33 ± 14	6	0	-	-	-	-
Rutaceae	<i>M. corymbosa</i>	Fe	78 ± 4	3	0	-	-	-	-
		Ec	92 ± 5	9	0	-	-	-	-
Sapotaceae	<i>P.a acuminate</i>	Fe	44 +/-7	36	0	-	-	-	-
		Ec	54 +/-7	7	18	-	-	-	-
Simaroubiaceae	<i>S. tomentosa</i>	Fe	55 +/-6	88	75	-	-	-	-
		Ec	56 +/-5	100	102	-	-	-	-
Smilacaceae	<i>S. purpurata</i>	PA	64 +/-4	16	0	-	-	-	-
Solanaceae	<i>S. mauritanum</i>	PA	62 ± 10	7	0	-	-	-	-
		Fe	31 +/-3	18	0	-	-	-	-
	<i>S. tetrandrum</i>	Ti	40 +/-8	19	10	-	-	-	-
	<i>S. torvum</i>	PA	47 ± 18	18	0	-	-	-	-
Thymelaeaceae	<i>S. cf. calophylla</i>	Fe	50 +/-8	12	0	-	-	-	-
		Ec	80 +/-12	28	0	-	-	-	-
	<i>W. indica</i>	Fe	81 ± 11	35	23	-	-	10	-
		Ec	88 ± 10	31	6	-	8	10	-
Urticaceae	<i>P. argenteus</i>	Fe	75 ± 7	1	0	-	-	-	-
		Ec	66 ± 11	20	11	-	-	-	-
		Fl	45 ± 19	1	0	-	-	-	-

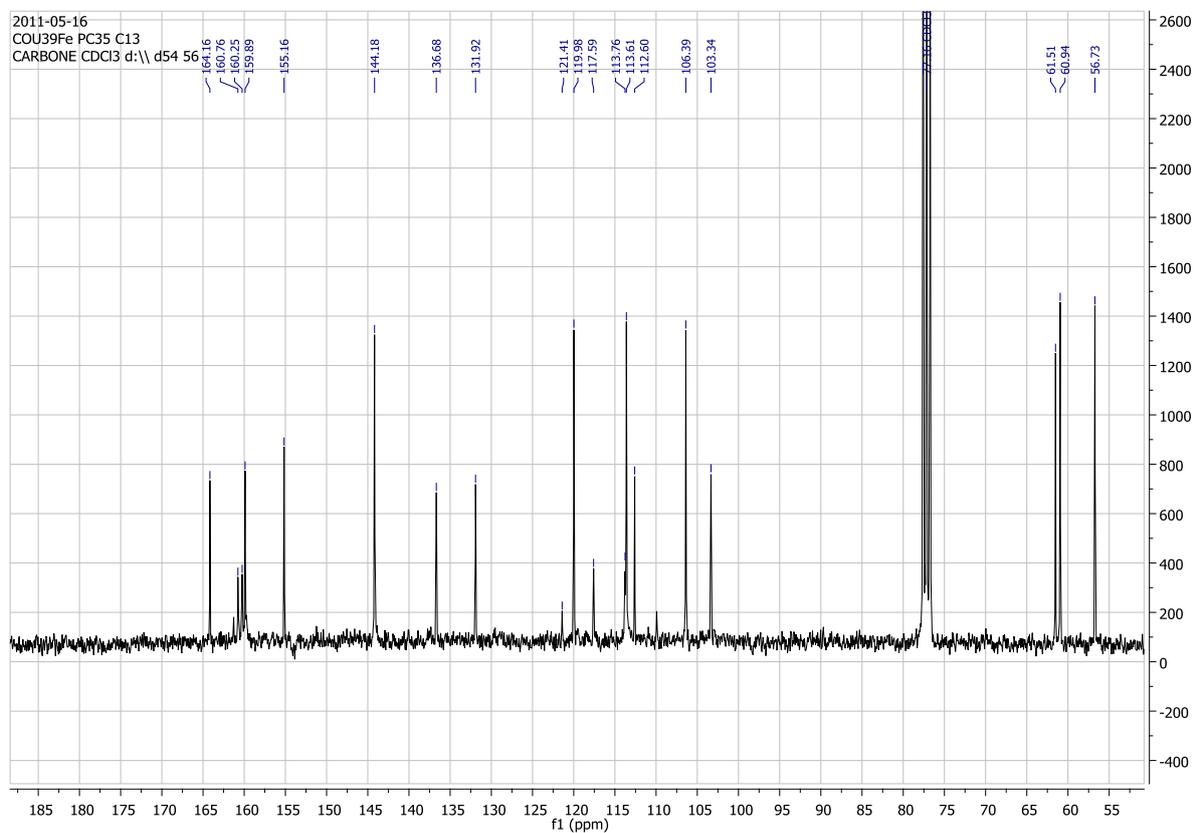
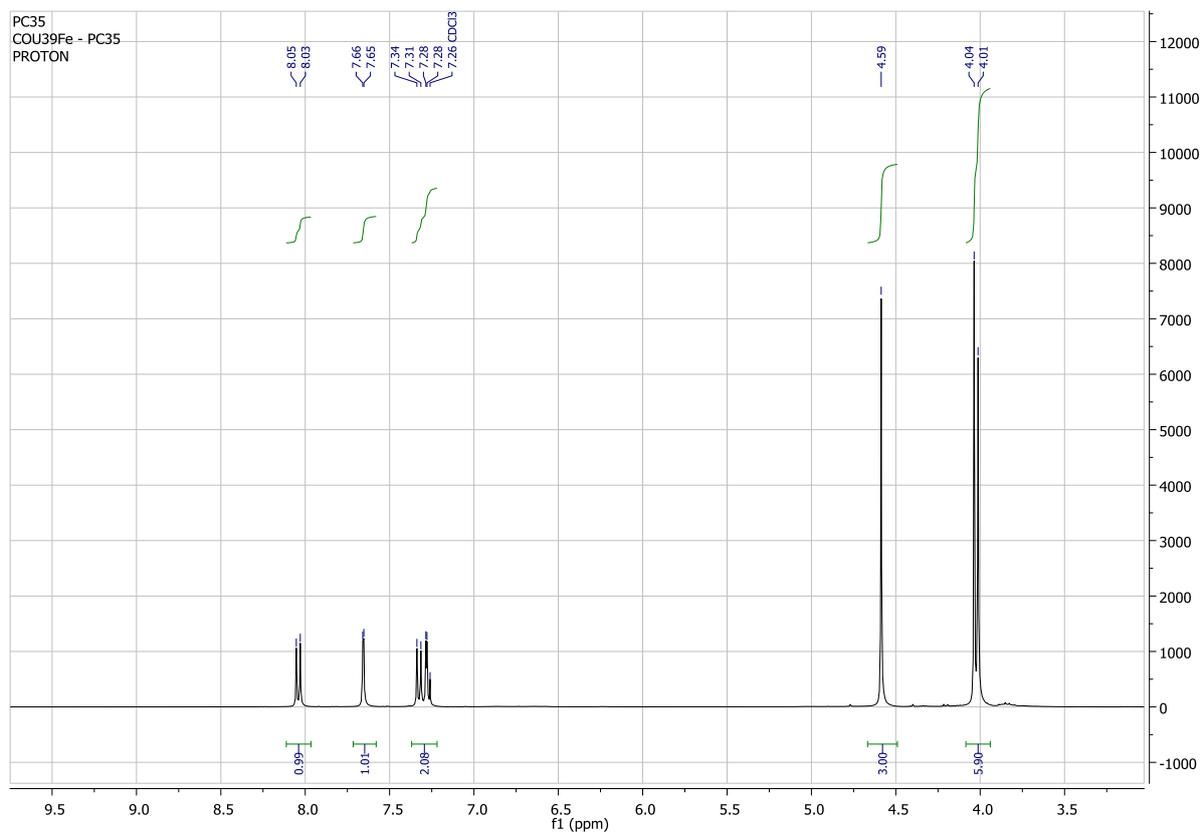
Annexe 6. Spectres RMN obtenus par l'analyse du composé 23.

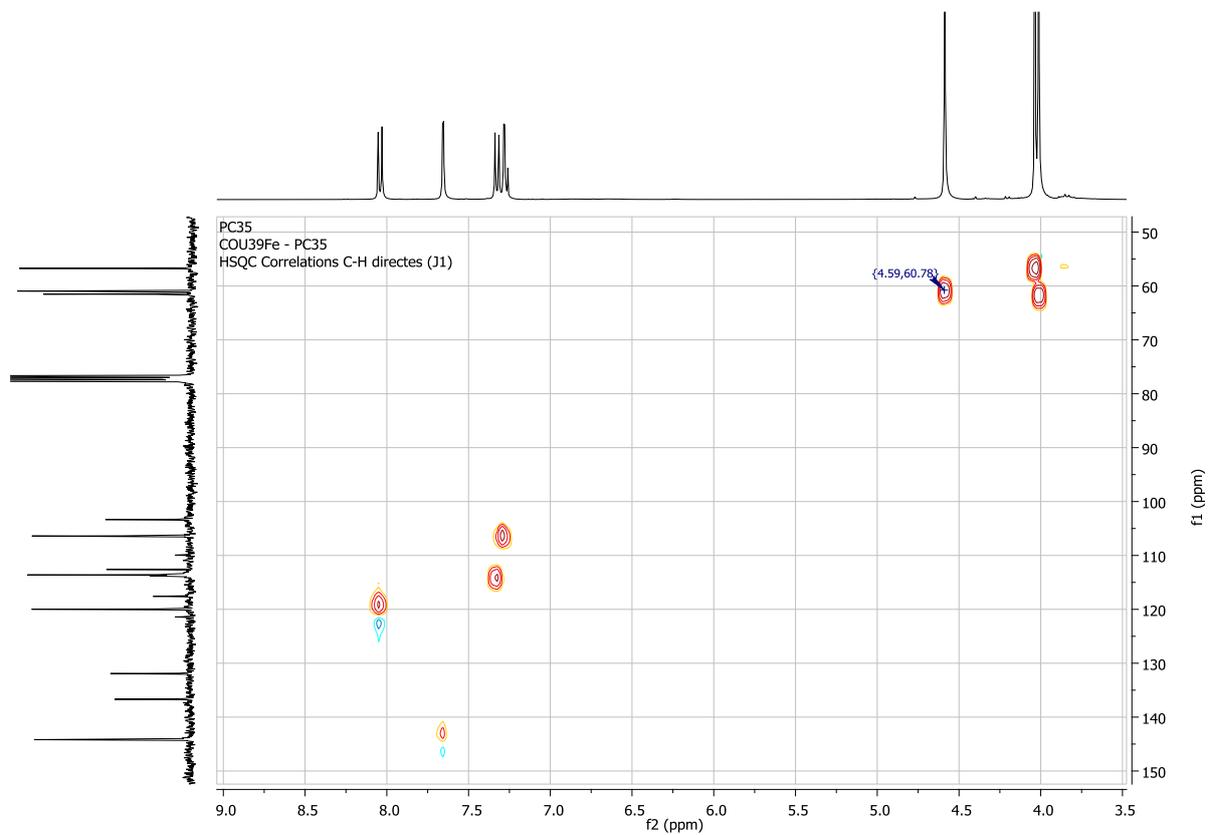
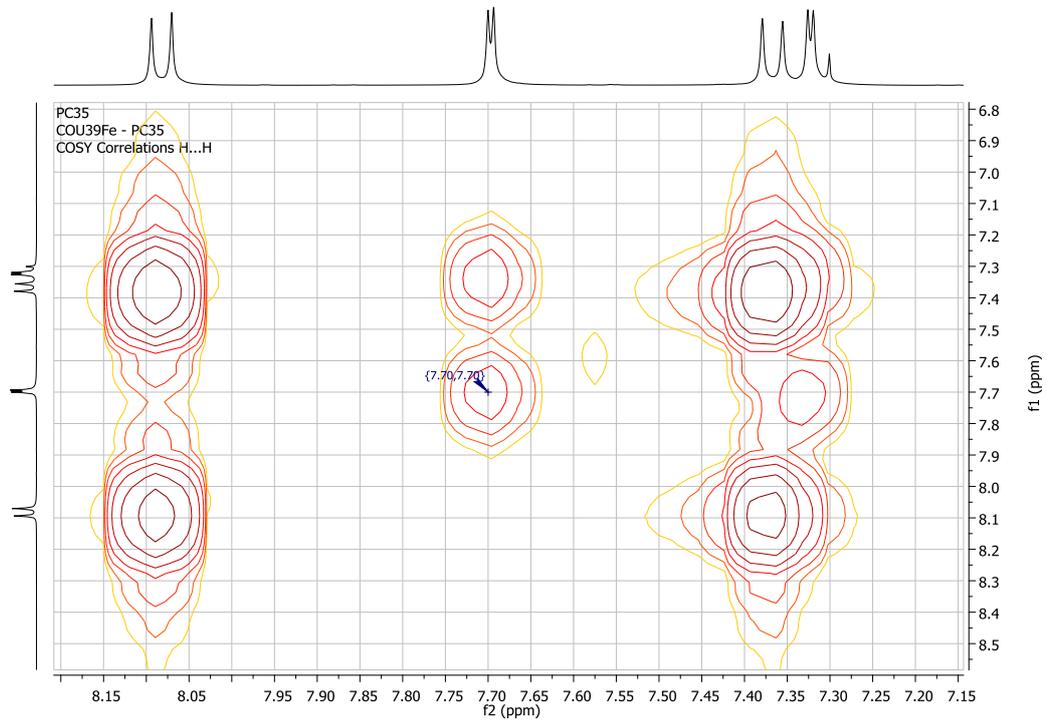


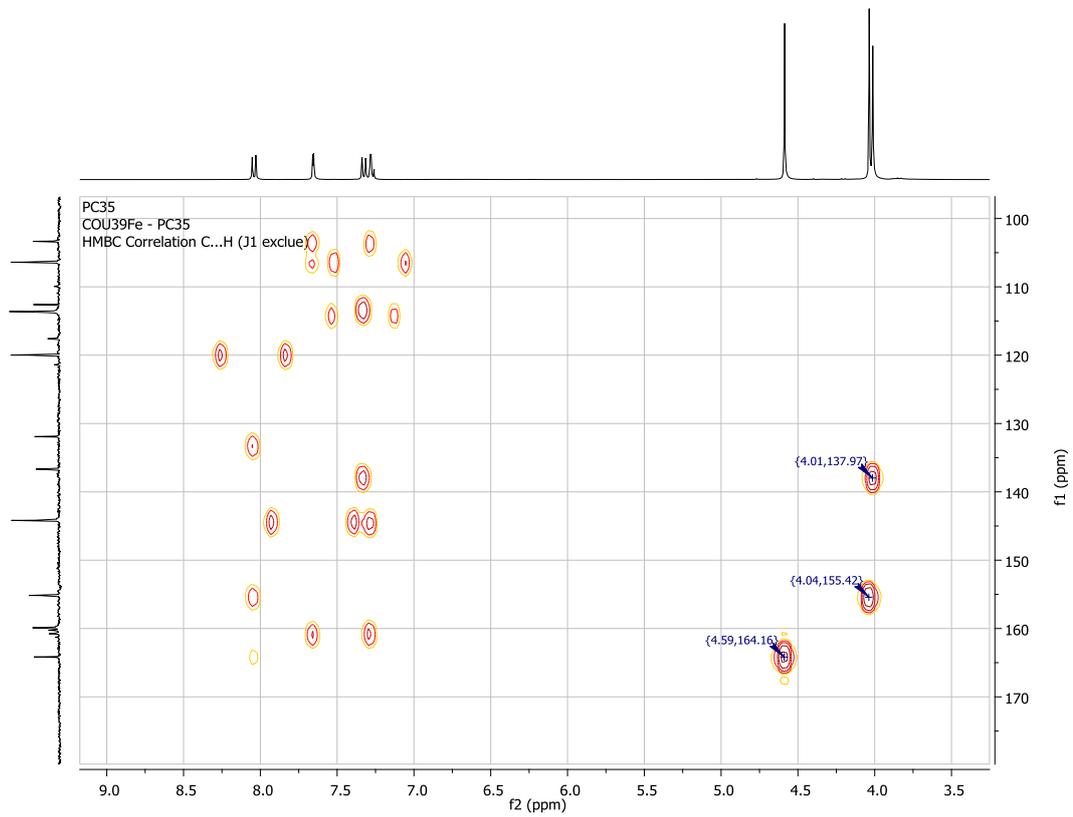




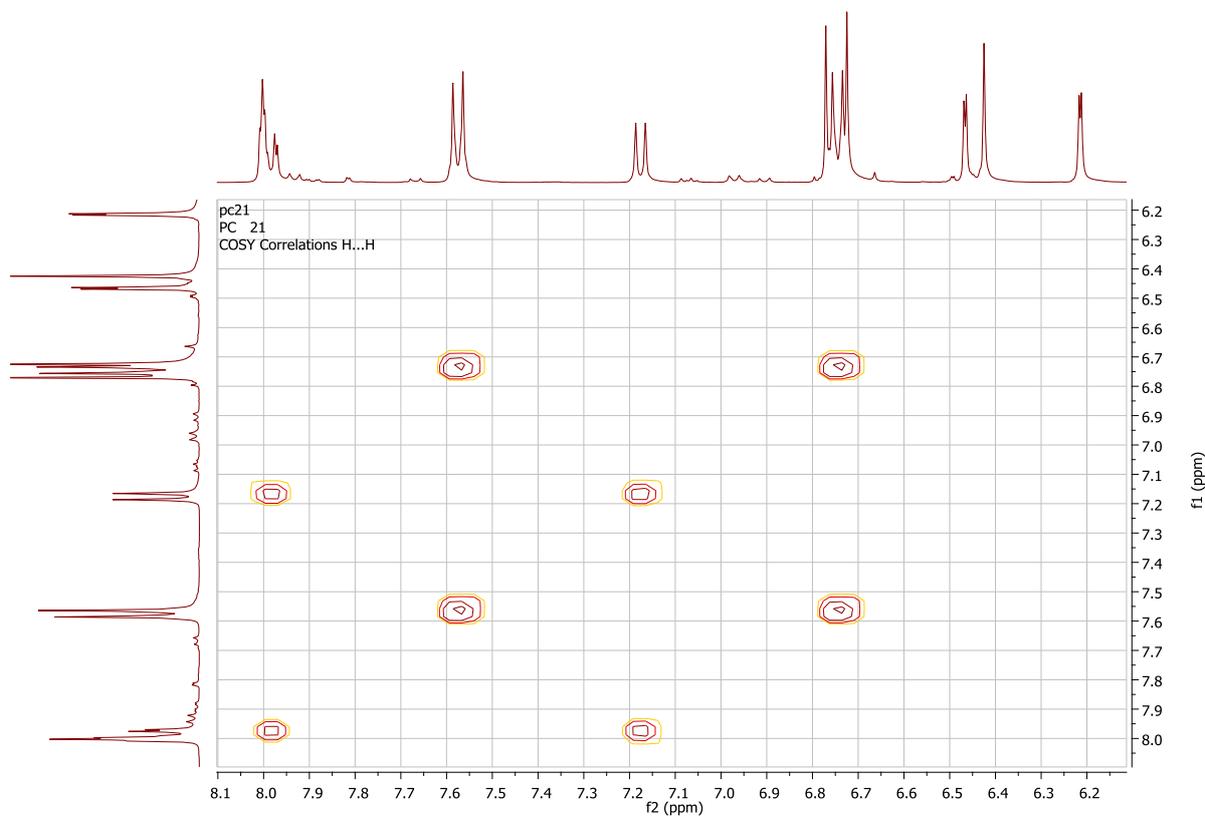
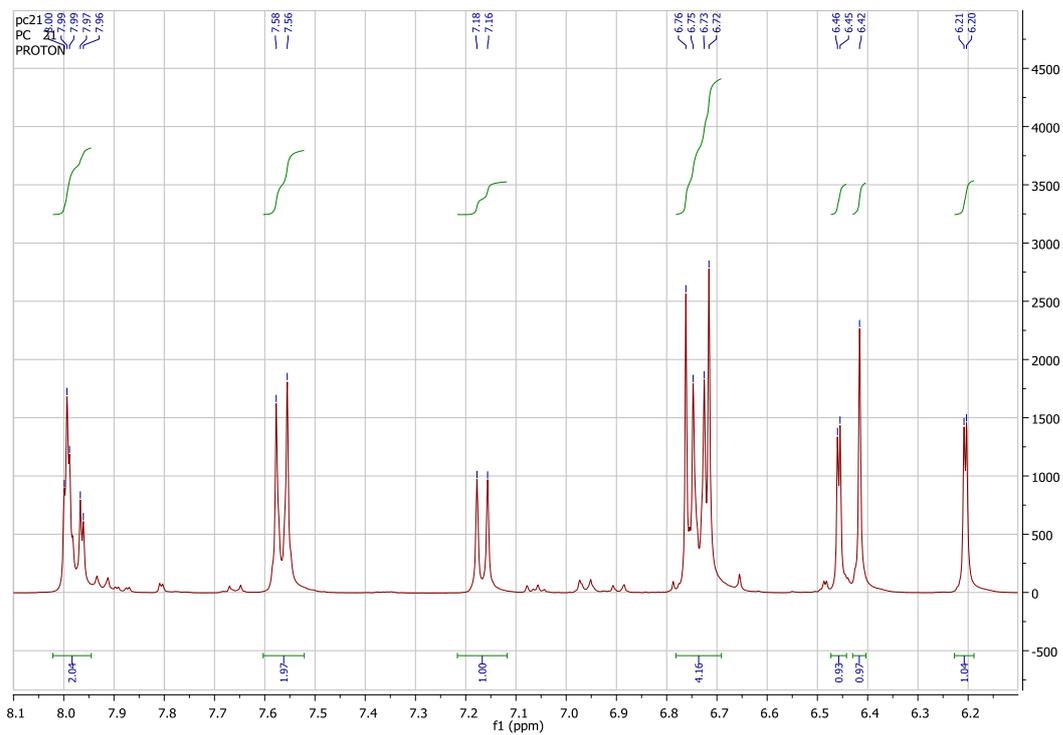
Annexe 7. Spectres RMN obtenus par l'analyse du composé 26.

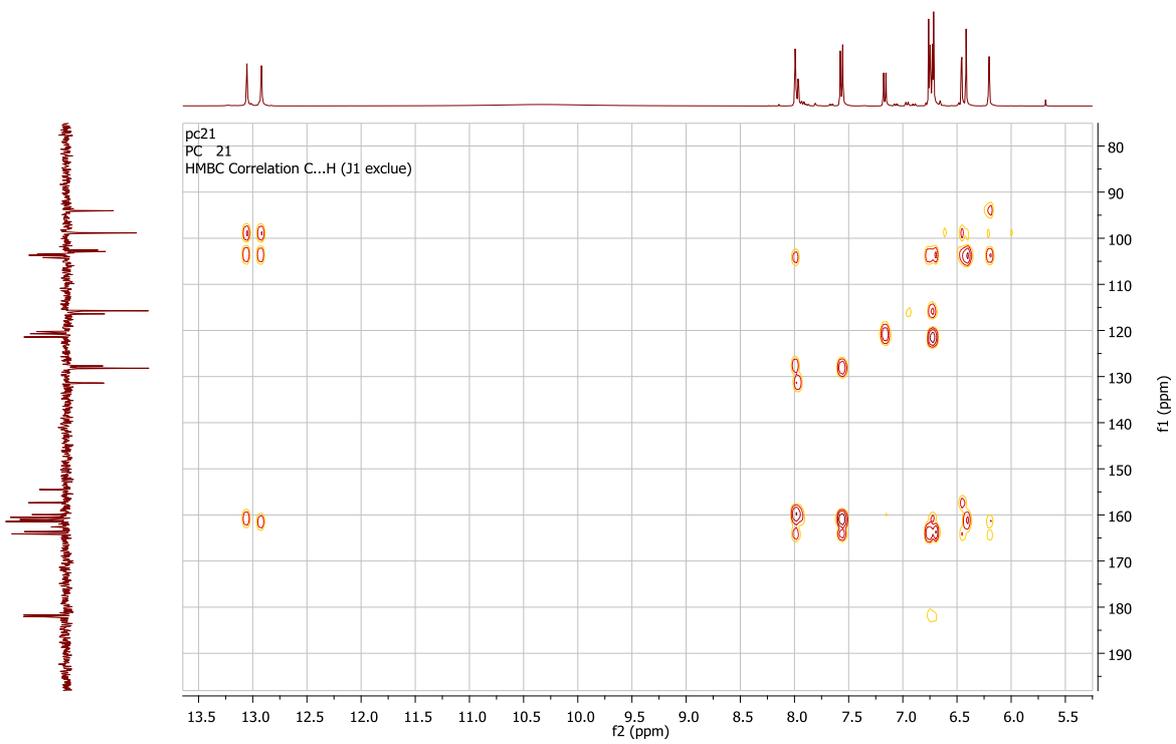
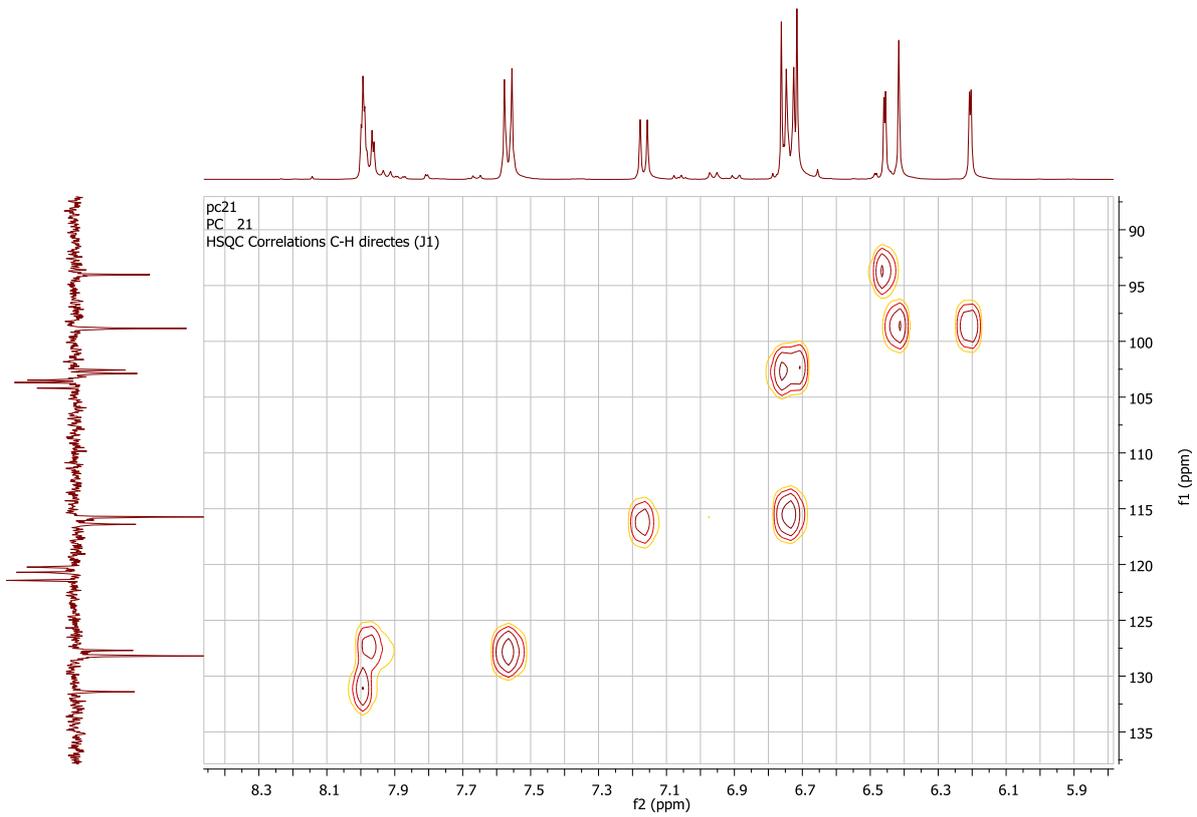




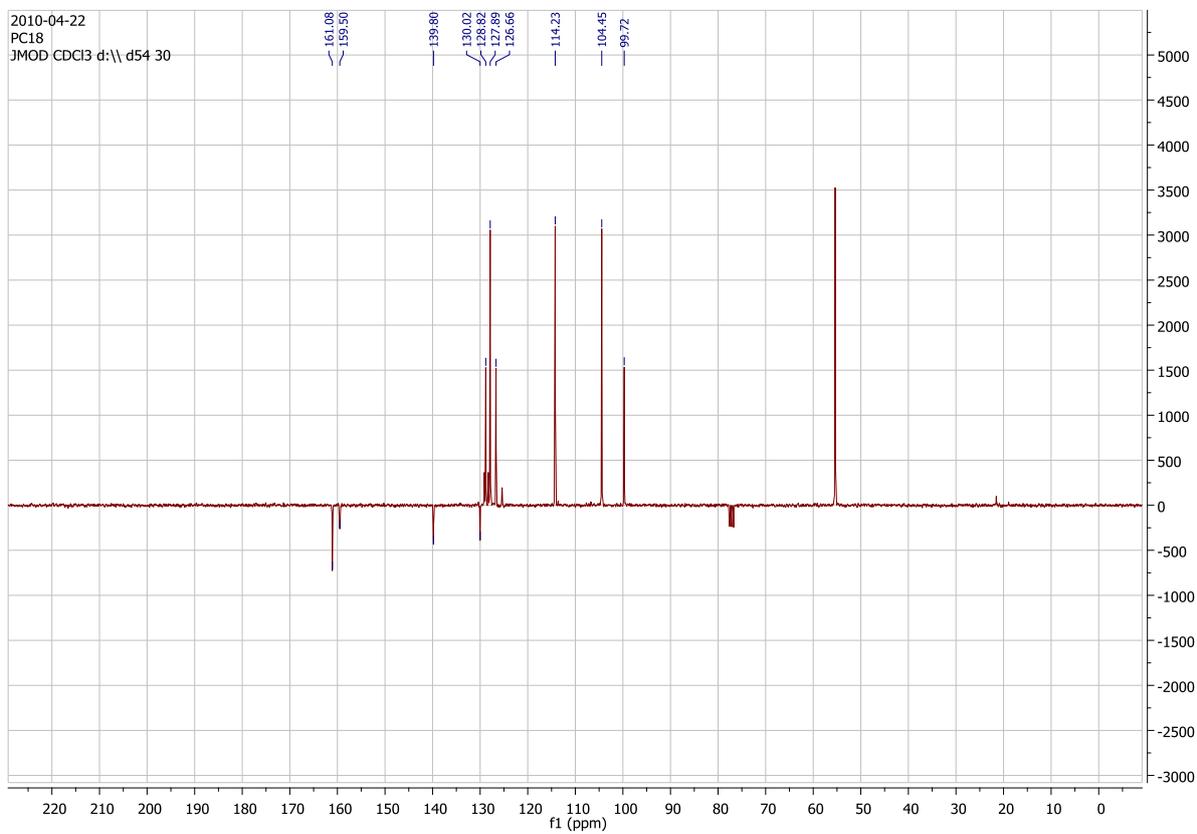
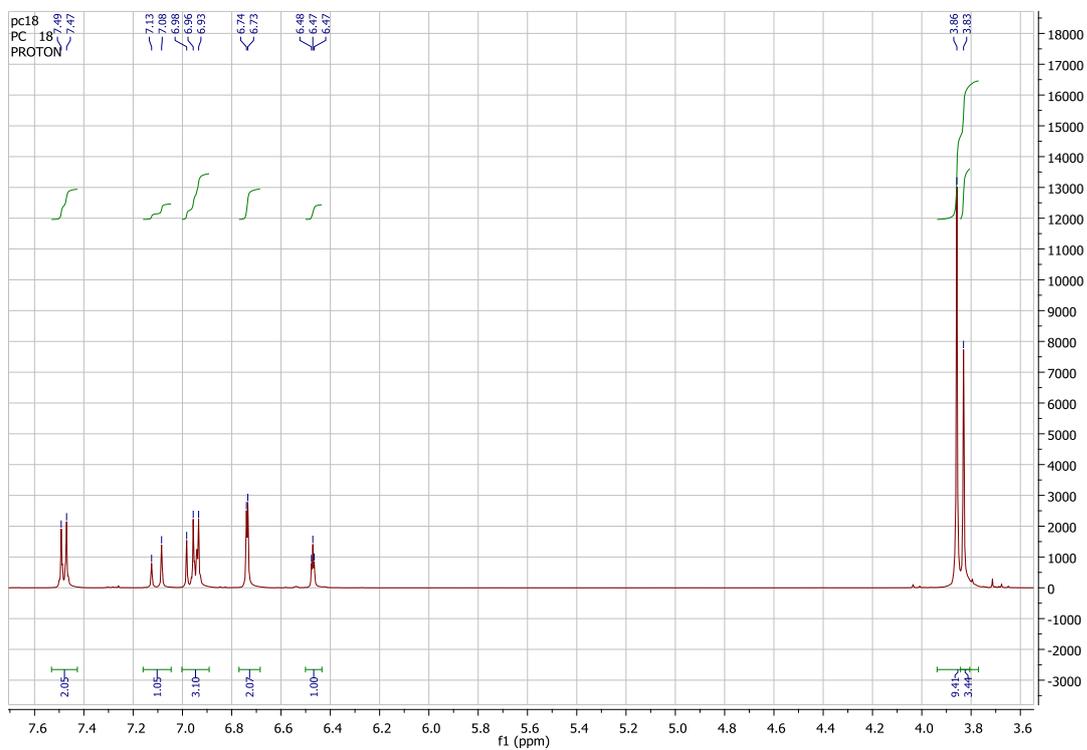


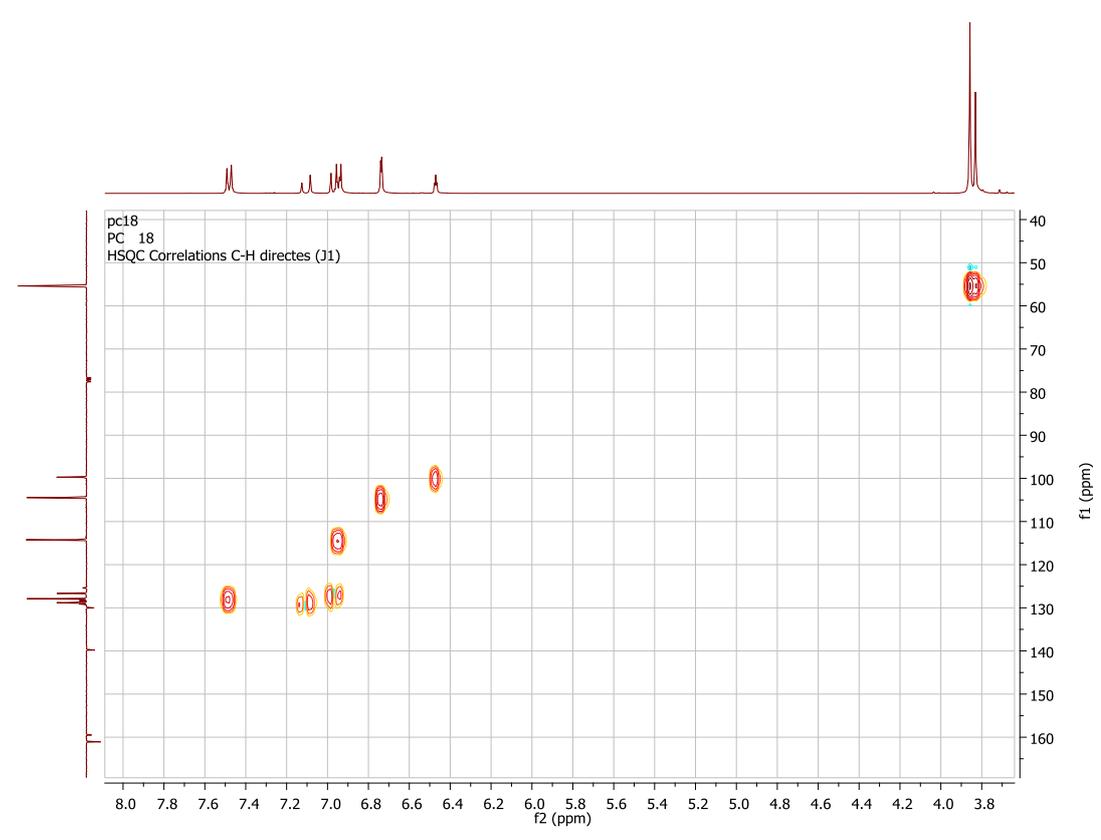
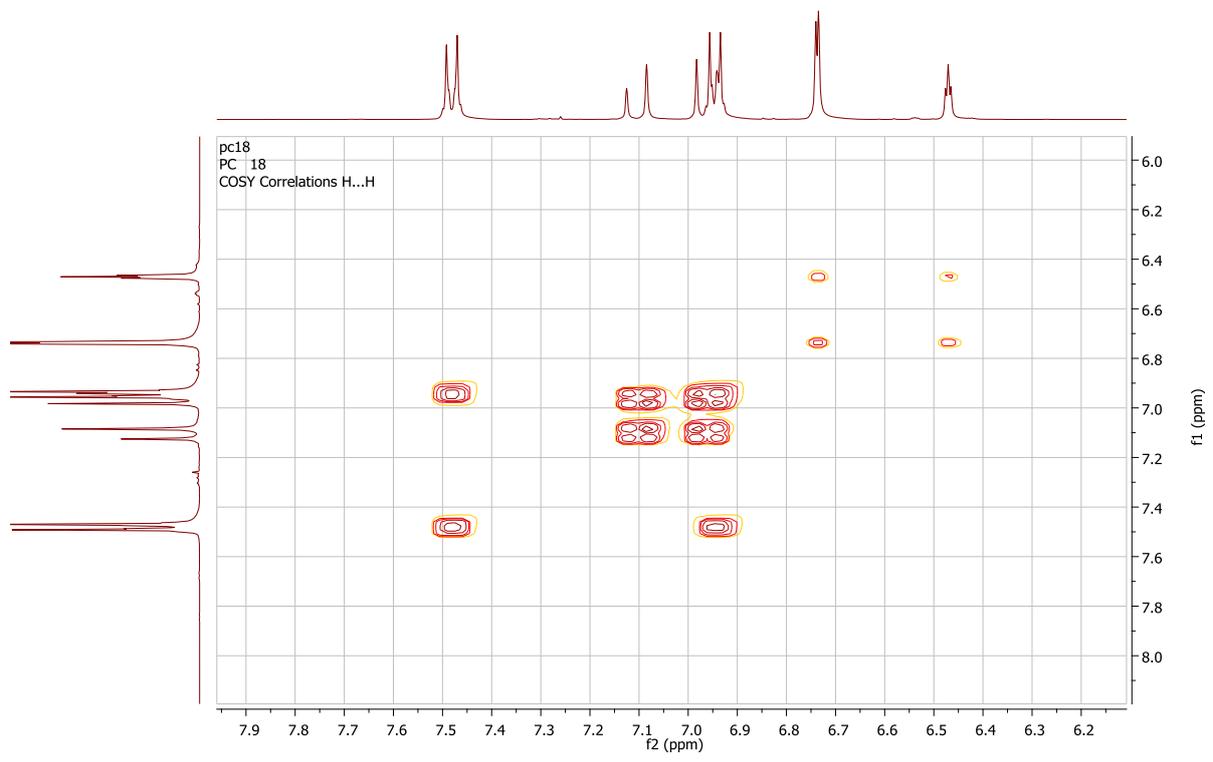
Annexe 8. Spectres RMN obtenus par l'analyse du composé 39.

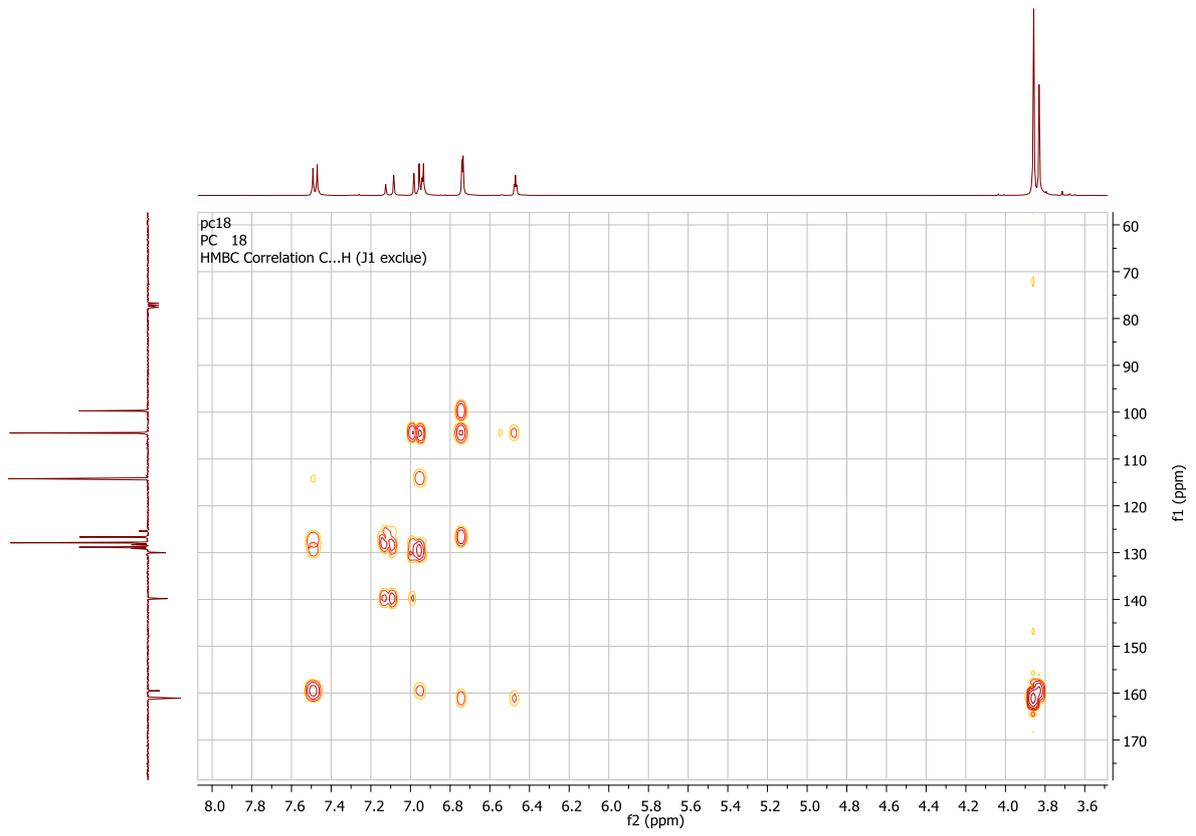




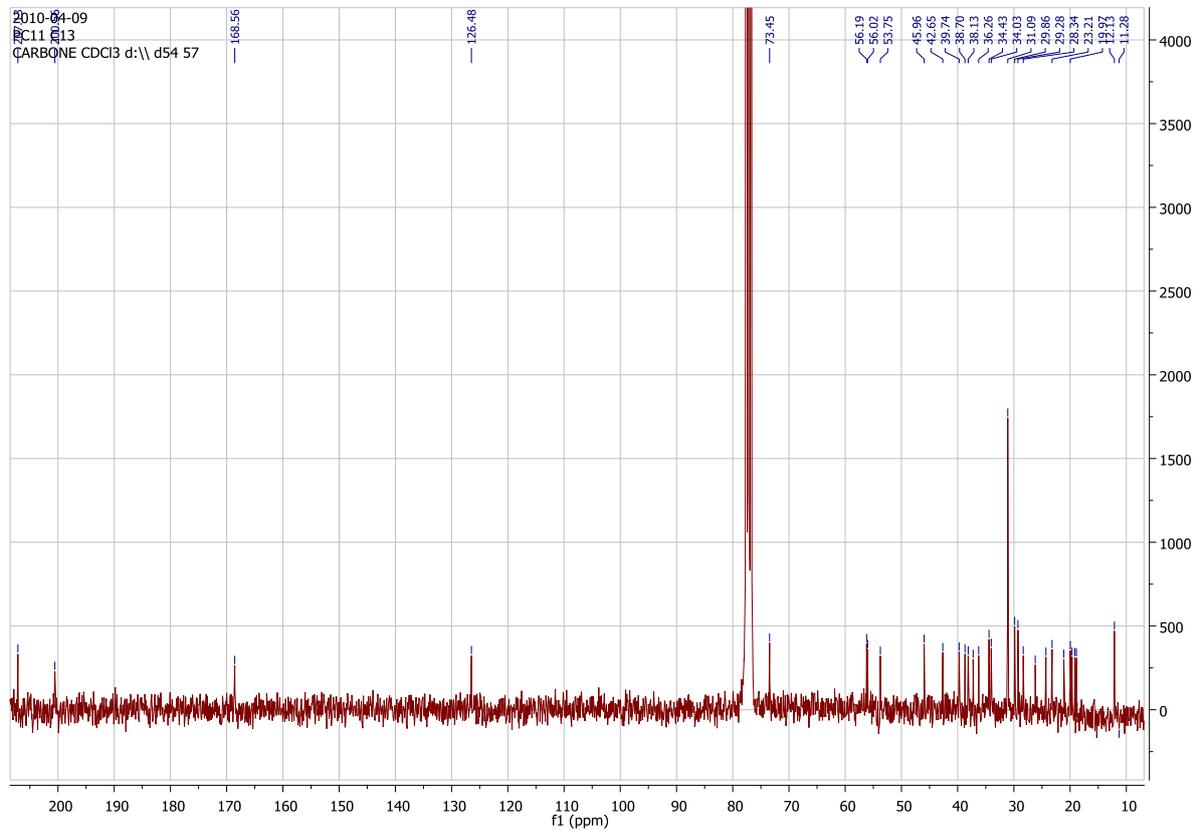
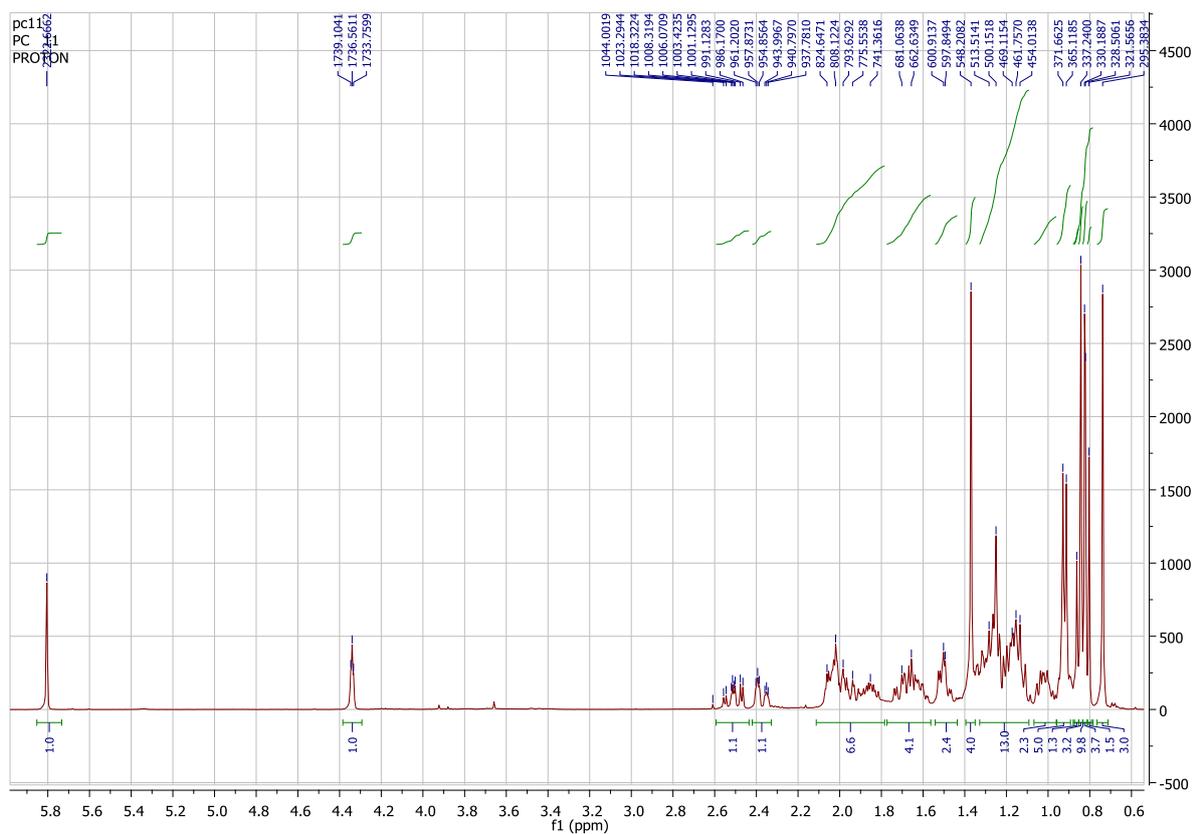
Annexe 9 Spectres RMN obtenus par l'analyse du composé 42.

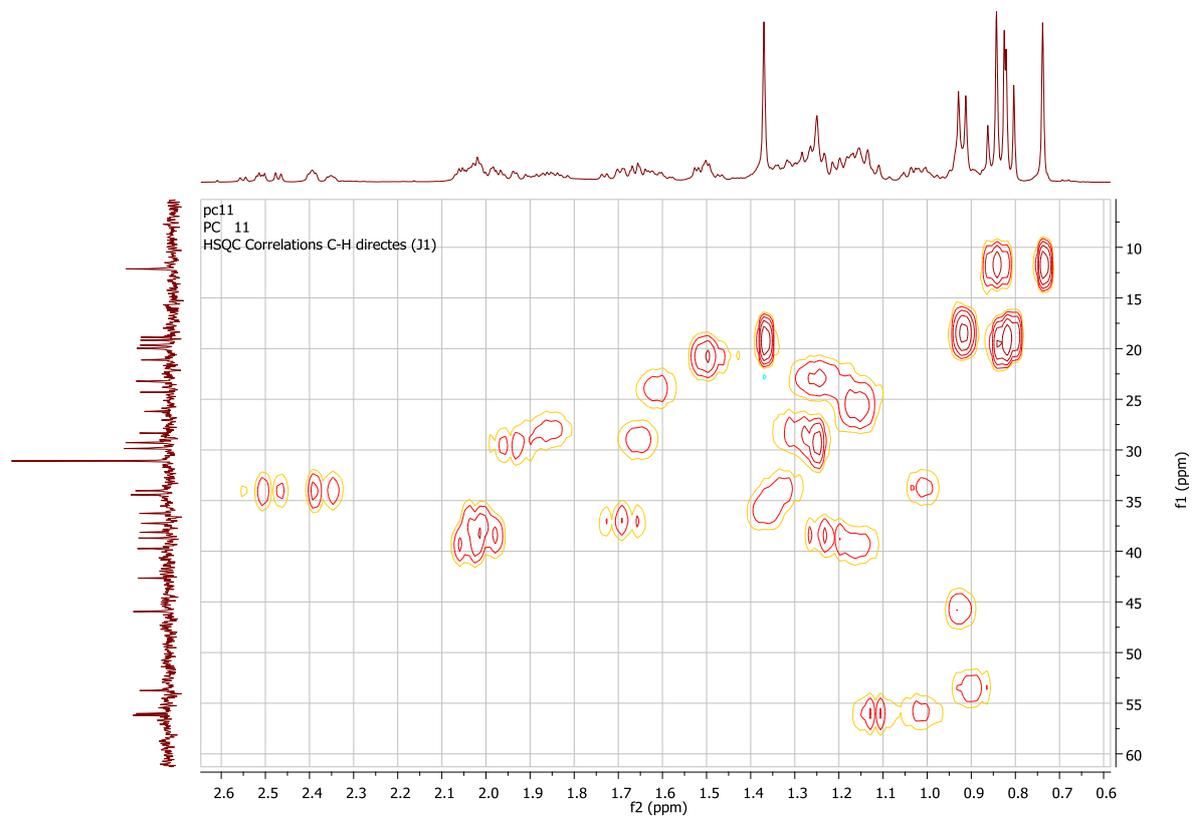
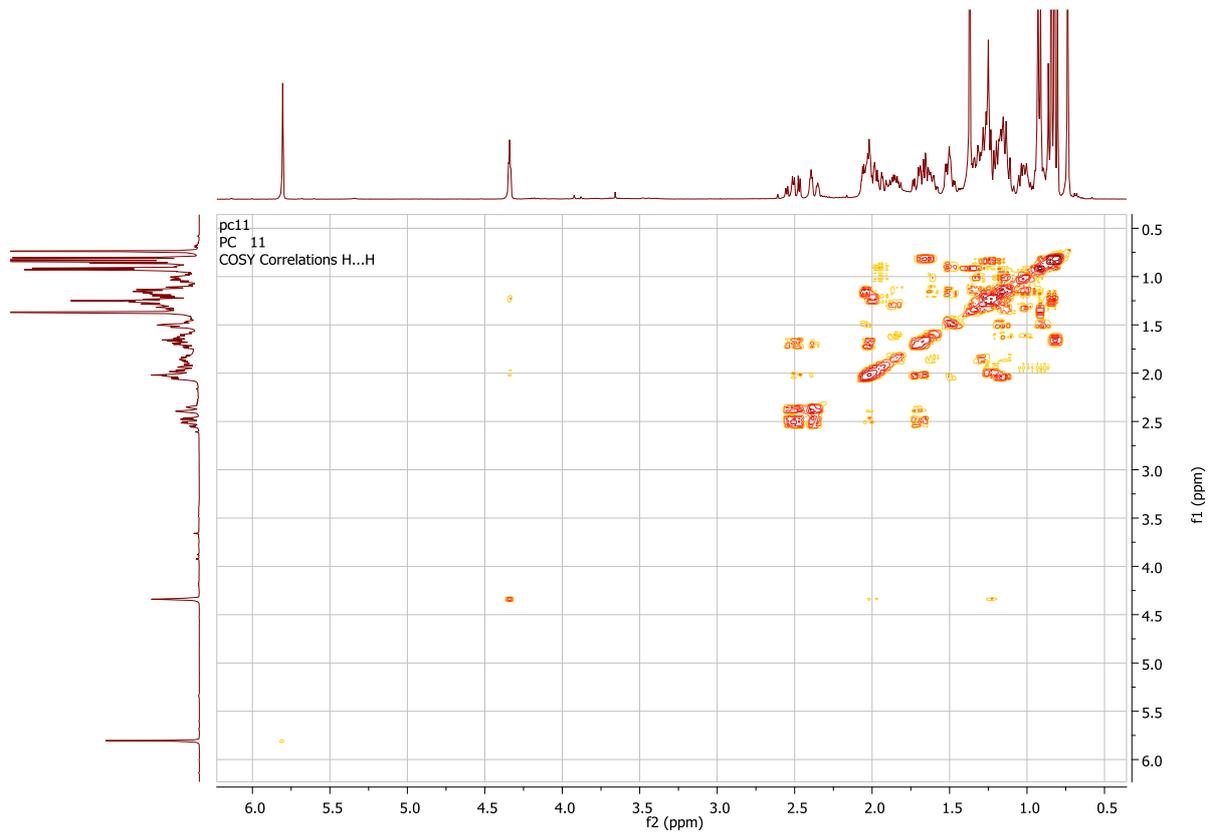


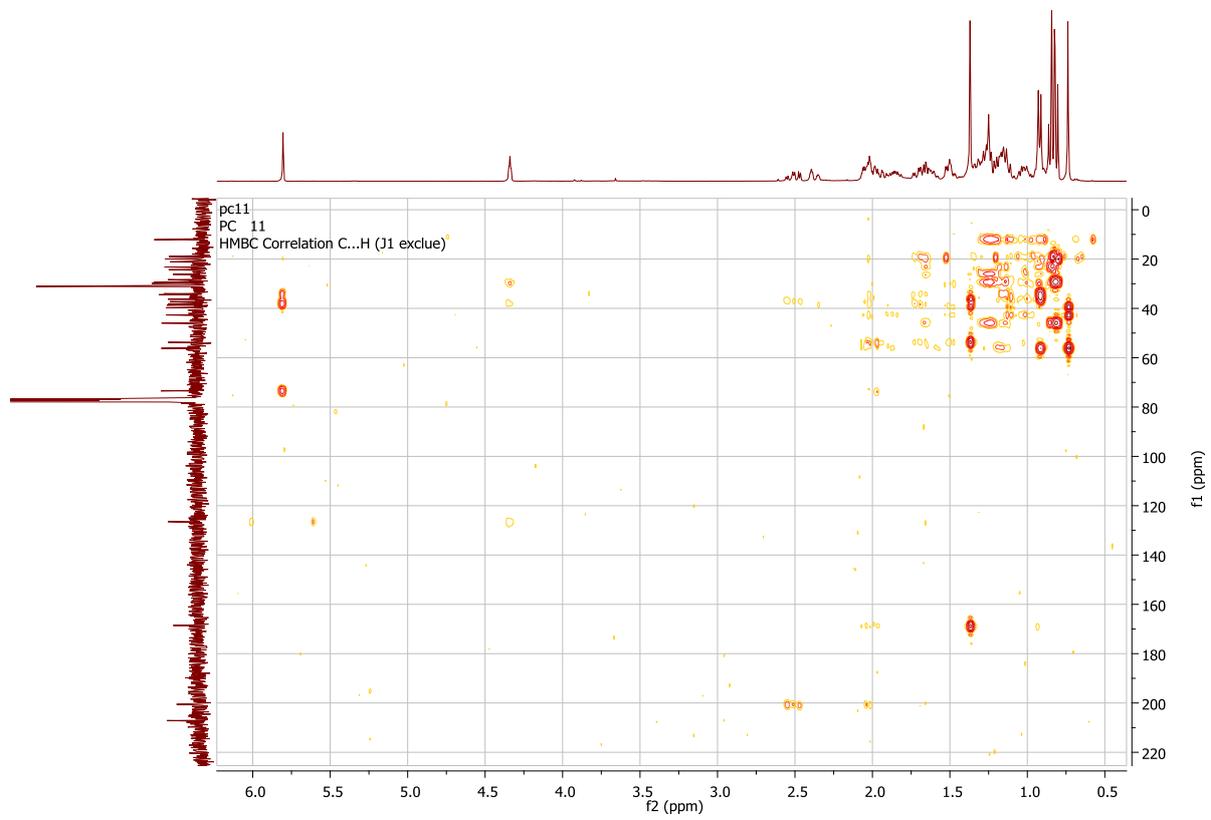
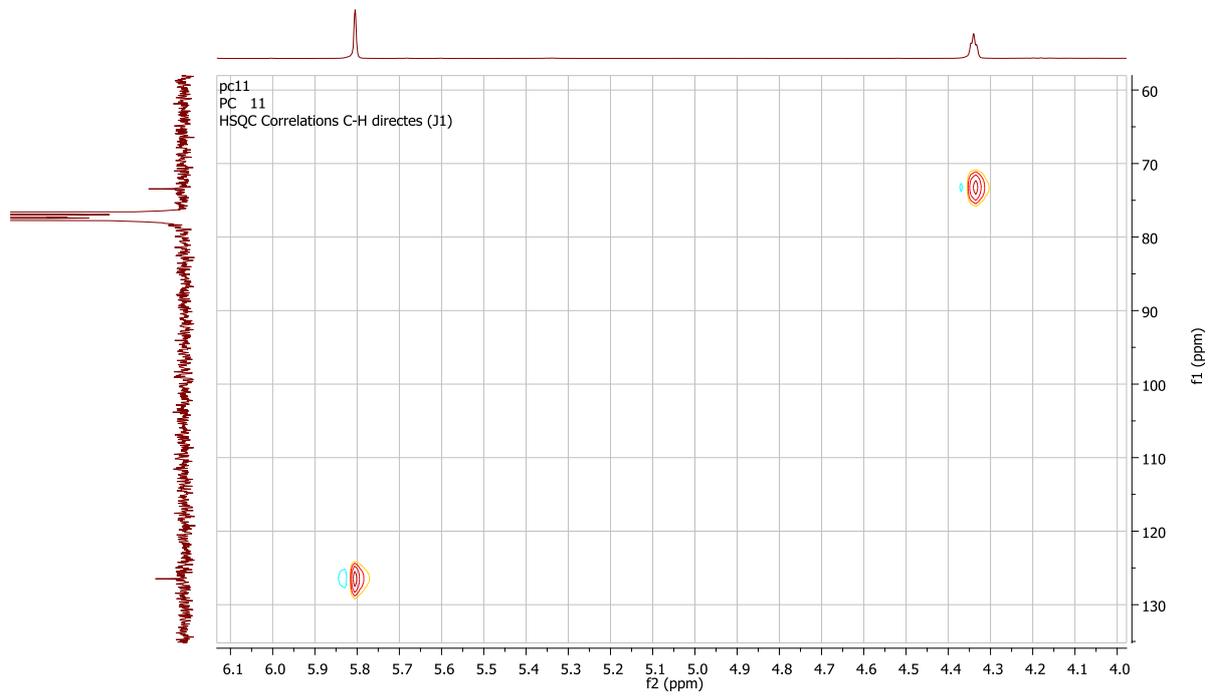




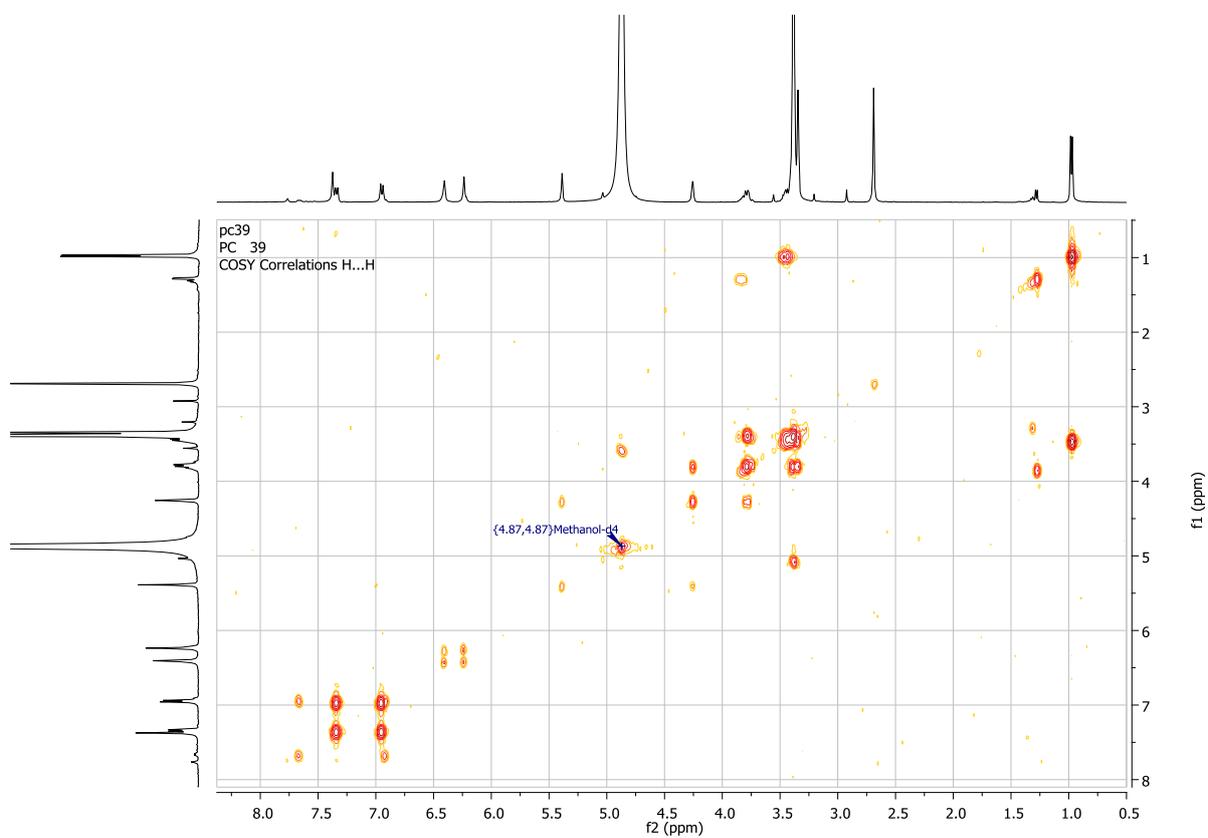
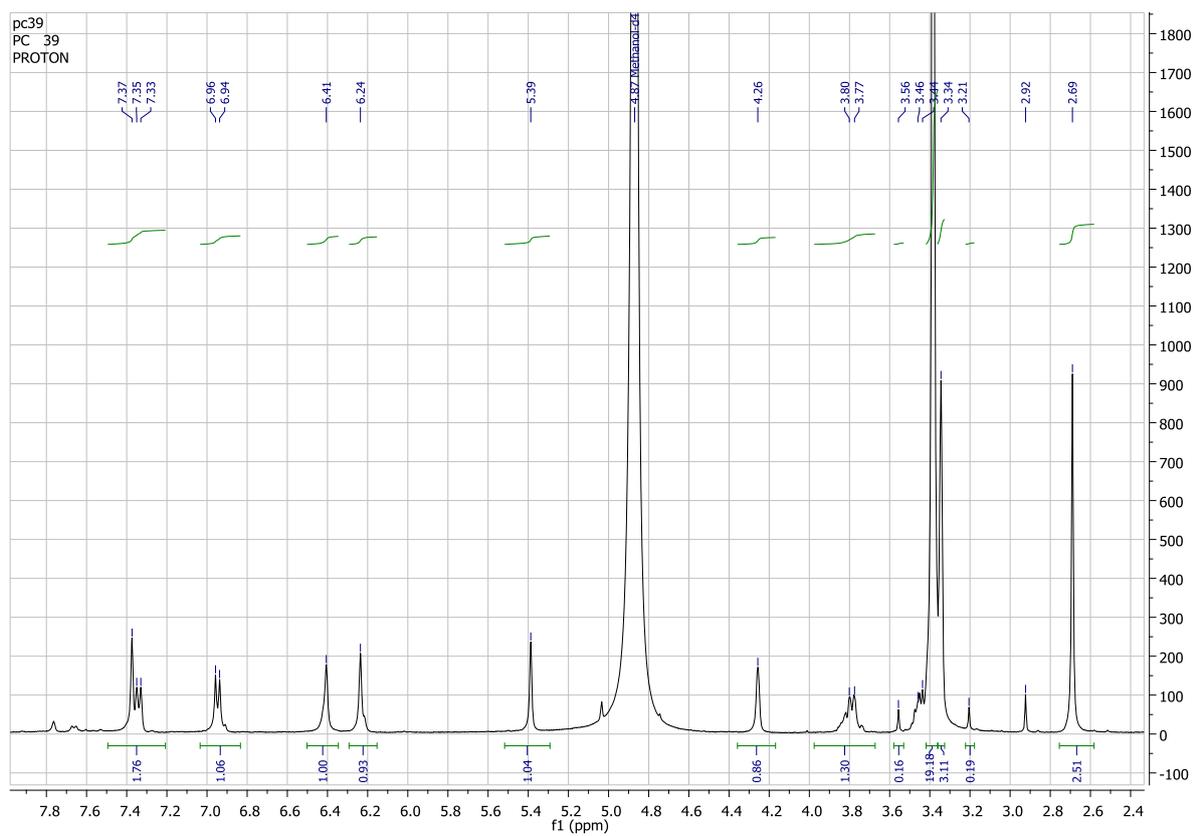
Annexe 10. Spectres RMN obtenus par l'analyse du composé 44.

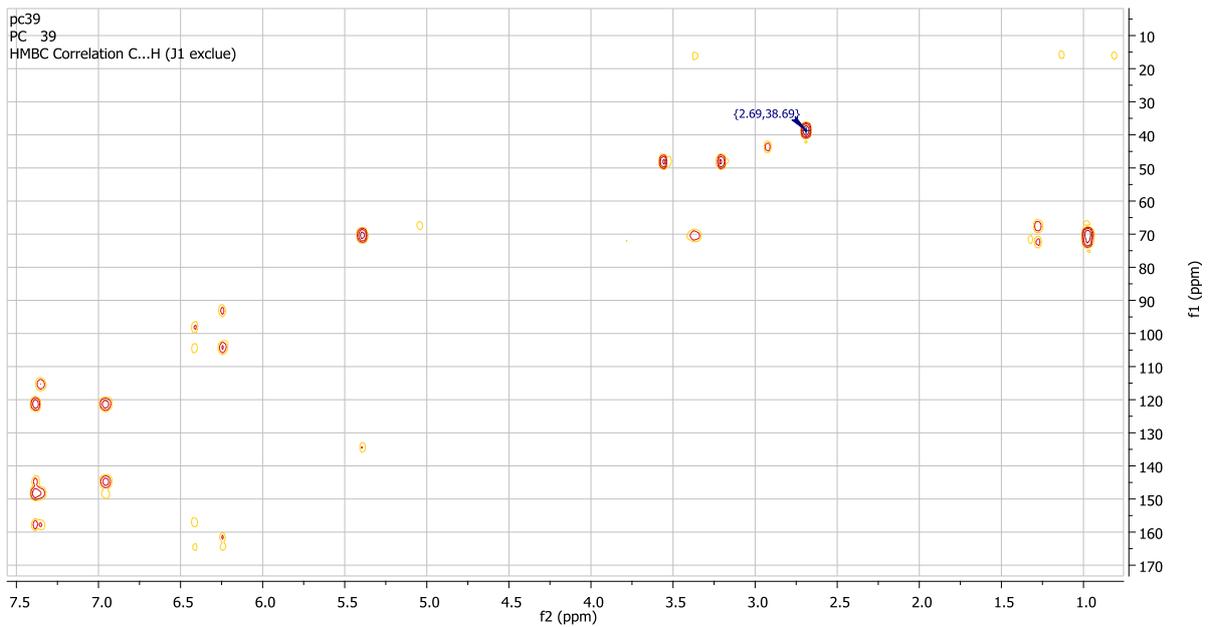
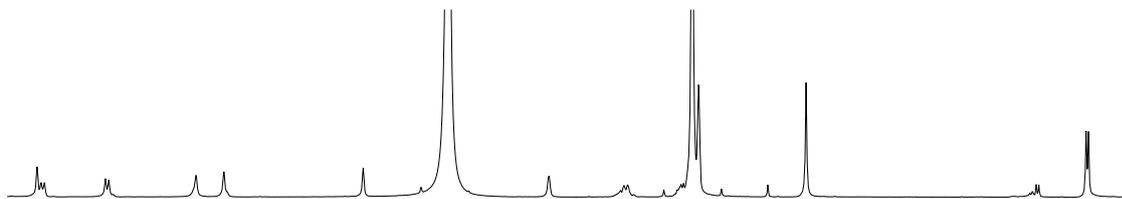
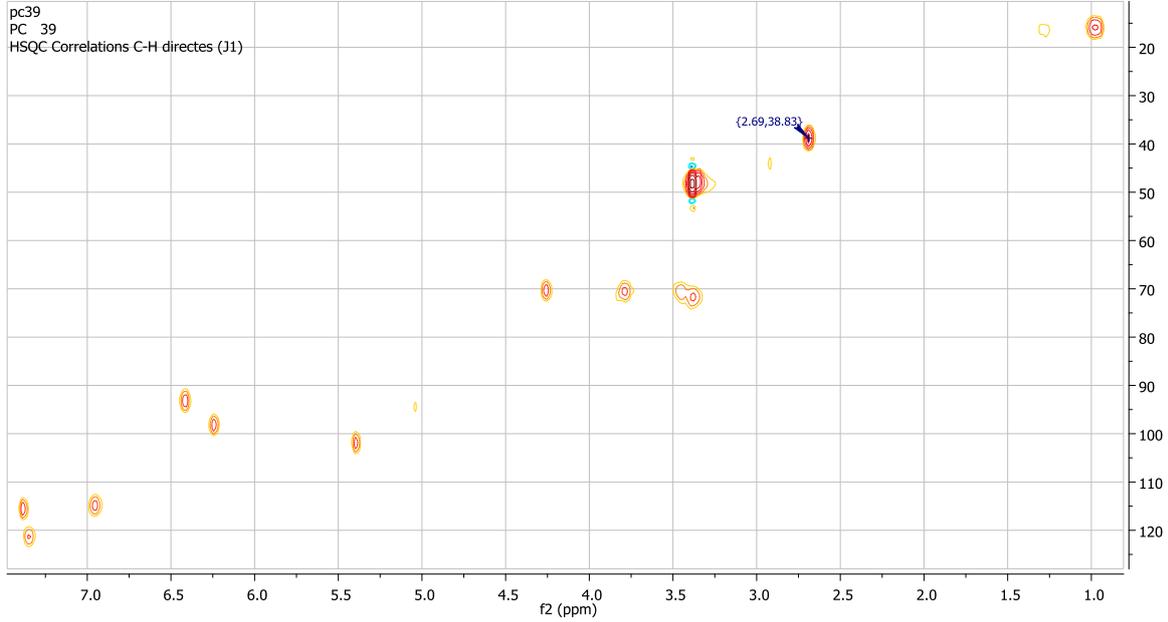






Annexe 11. Spectres RMN obtenus par l'analyse du composé 80.





Annexe 12. Spectres RMN obtenus par l'analyse du composé 82.

