

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE – LILLE 1
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE, DU RAYONNEMENT ET DE
L'ENVIRONNEMENT**

Doctorat
Chimie Organique et Macromoléculaire

Thierry HENNEBELLE

**INVESTIGATION CHIMIQUE, CHIMIOTAXONOMIQUE ET
PHARMACOLOGIQUE DE LAMIALES PRODUCTRICES D'ANTIOXYDANTS :**
*Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota pseudodictamnus (Lamiacées) et
Lippia alba (Verbénacées)*

Thèse dirigée par le Pr. François BAILLEUL et Mme le Dr. Sevser SAHPAZ
Equipe d'Accueil 1043
Soutenue le 24 novembre 2006

Jury :

M. François BAILLEUL	Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille 2
M. Joël BOUSTIE	Professeur à la Faculté de Pharmacie de Rennes 1
M. Jean-Louis HILBERT	Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille 1)
M. Guy LEWIN	Professeur à la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry (Paris-Sud 11)
Mme Sevser SAHPAZ	Maître de Conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille 2
M. Gaston VERMEERSCH	Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille 2

*This wandering race, sever'd from other men,
Boast yet their intercourse with human arts;
The seas, the woods, the deserts, which they haunt,
Find them acquainted with their secret treasures:
And unregarded herbs, and flowers, and blossoms,
Display undreamt-of powers when gather'd by them.*

The Jew (cité par Sir Walter Scott dans "Ivanhoe")

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, Monsieur le Professeur François Bailleul et Madame le docteur Sevser Sahpaz pour leur attention, leur réactivité et leur optimisme tout au long de ces trois années... et des précédentes !

Mes remerciements vont également aux autres membres du jury, qui ont bien voulu trouver un peu de temps pour évaluer mon travail : Monsieur le Professeur Jean-Louis Hilbert, Messieurs les Professeurs Joël Boustie et Guy Lewin, qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail et Monsieur le Professeur Gaston Vermeersch.

De nombreuses personnes m'ont apporté leur aide tout au long de cette thèse. La mise à disposition de moyens techniques, les formations et certaines discussions se sont révélées fondamentales pour l'existence de résultats et leur valorisation. Je veux exprimer ma plus profonde gratitude à tout le Laboratoire d'Application de RMN de l'Université de Lille 2 : Madame le Professeur Nathalie Azaroual, Monsieur le Professeur Gaston Vermeersch, Madame le Docteur Stéphanie Delbaere, Messieurs les Docteurs Christophe Bochu et Jérôme Berthet, Messieurs Vincent Ulte, Frédéric Bonhomme et Pierre Larzillière. Je remercie également Messieurs Paul Bourgeois (Université des Antilles et de Guyane), Charles Dermont (Institut Supérieur d'Agriculture de Lille), Henry Joseph (APLAMEDAROM), Emmanuel Nossin (AVPMC), Bernard Weniger (Université de Strasbourg) pour leur aide dans l'étude de *Lippia alba* ; Monsieur le Professeur François Tillequin (Paris V) et Madame le Prof. Dr. Nurten Ezer (Hacettepe Üniversitesi, Ankara) pour les collectes d'échantillons d'autres plantes. Enfin, j'exprime ma gratitude envers Monsieur le Professeur Bernard Gressier et Madame le Docteur Françoise Martin-Nizard et Mademoiselle Adeline Darchy pour la réalisation des tests biologiques.

Merci également à toutes les personnes avec qui j'ai partagé paillasse, matériel, conseils techniques et/ou discussions triviales pendant des durées variables : Monsieur le bientôt Docteur Alexis Zamblé (Zamblé bi Tah), Marie Carpentier, Ahlam Azarouk, Patricia Cleenewerck, Claire Delattre, Fabienne Delebarre, Maryline Drouet, Marie Landrieux, QiaoWen Yang. Mustafa Gavdar sağ olsun. Dr. Irem Tatlı Çankaya'ya *Ballota larendana* üzerinde ki bilgilerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Merci à tout le monde au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille : Monsieur le Professeur Francis Trotin, Mesdemoiselles Monique Torck et Nicole Didry, Mesdames Malika Moreira Da Costa, Jennifer Rivière, Michèle Leterme ainsi que l'inénarrable Marie-Agnès Carlier.

Merci à ma famille.

Céline, je t'aime. Merci.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	4
Abréviations, symboles et conventions	9
Introduction	12
I. Oxydation et antioxydants	14
1.1. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques	16
1.1.1. Lipides	16
1.1.2. Protéines	19
1.1.3. Acides nucléiques	19
1.2. Mécanismes physiologiques de l'inactivation des ERO	20
1.3. Les antioxydants, sources et intérêt	22
1.3.1. Enzymes et cofacteurs	22
1.3.2. Conservateurs alimentaires	22
1.3.3. Autres utilisations industrielles	24
1.3.4. Principaux antioxydants présents naturellement dans notre alimentation	27
1.3.5. Médicaments antioxydants	28
1.3.6. Métabolites secondaires des végétaux : avancées et potentiels	28
1.3.6.1. Polyphénols	29
1.3.6.2. Terpènes	31
1.3.6.2.1. Monoterpènes	32
Monoterpènes volatils et autres constituants des huiles essentielles	32
Monoterpènes iridoïdiques	34
1.3.6.2.2. Diterpènes	35
II. Etude de plantes potentiellement productrices d'antioxydants	37
2.1. Les Lamiales	37
2.1.1. Place dans la classification systématique botanique	37
2.1.2. La famille des Lamiacées	38
A. Le genre <i>Marrubium</i> et l'espèce <i>Marrubium peregrinum</i> L.	39
1. Aspects botaniques	39
1.1. Caractéristiques du genre <i>Marrubium</i>	39
1.2. <i>Marrubium peregrinum</i>	40
Caractères morphologiques	40
Répartition géographique	40
Synonymie	41
2. Travaux antérieurs sur <i>Marrubium peregrinum</i>	41
2.1. Composition chimique	41
2.1.1. Huile essentielle	41
2.1.2. Diterpènes	42
2.1.3. Stérols	43
2.1.4. Flavonoïdes	44
2.1.5. Phénylpropanoïdes	45
2.2. Essais pharmacologiques	45
3. Travaux personnels	46
3.1. Isolement des composés	46
3.2. Identification des composés	47
Diterpènes	47
Composé 1	47
Composé 2	51

Flavonoïdes	56
Composé 3	56
Composé 4	59
Composé 5	62
Composé 6	65
Phénylpropanoïdes	70
Composé 7	70
Composé 8	74
Composé 9	78
B. Le genre <i>Ballota</i>.....	82
1. Caractéristiques botaniques du genre	82
2. <i>Ballota larendana</i> Boiss. & Heldr.....	83
2.1. Aspects botaniques	83
2.2. Travaux antérieurs sur <i>Ballota larendana</i>	84
2.3. Travaux personnels	85
2.3.1. Isolement des composés	85
2.3.2. Identification des composés	86
Composé 6.....	86
Composé 10.....	87
Composé 11	90
3. <i>Ballota pseudodictamnus</i> (L.) Benth.....	94
3.1. Aspects botaniques	94
3.2. Travaux antérieurs sur <i>Ballota pseudodictamnus</i>	95
3.2.1. Investigations phytochimiques	95
3.2.1.1. Huile essentielle	95
3.2.1.2. Diterpènes.....	95
3.2.1.3. Polyphénols	96
3.2.2. Essais biologiques	96
3.2.2.1. Activité antimicrobienne	96
3.2.2.2. Activité antioxydante	97
3.3. Travaux personnels	98
3.3.1. Isolement des composés	98
3.3.2. Identification des composés	99
Composé 12.....	99
Composé 13	101
Composé 7.....	105
Composé 14.....	106
C. Activité antioxydante de composés isolés des genres <i>Marrubium</i> et <i>Ballota</i>	109
D. Discussion sur les genres <i>Ballota</i> et <i>Marrubium</i>.....	111
1. Intérêt chimiotaxonomique	111
2. Intérêt pharmacologique.....	113
2.1.3. La famille des Verbénacées et l'espèce <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	115
2.1.3.1. Aspects botaniques	115
2.1.3.1.1. Morphologie des Verbénacées	115
2.1.3.1.2. Le genre <i>Lippia</i>	116
2.1.3.1.3. <i>Lippia alba</i> : données botaniques et usages	116
a) Caractères morphologiques	116
b) Répartition géographique.....	118
c) Synonymie.....	118
d) Variétés signalées.....	119

e) Noms vernaculaires	120
f) Usages traditionnels.....	121
2.1.3.1.4. Travaux antérieurs sur <i>Lippia alba</i>	122
a) Composition en minéraux	122
b) Investigations phytochimiques.....	123
α) Huile essentielle	123
En Argentine	123
Au Brésil	126
En Colombie.....	129
Au Costa Rica.....	129
A Cuba.....	129
Au Perou.....	129
Aux Etats-Unis d'Amérique.....	129
A Curaçao.....	130
En Uruguay	130
Au Guatemala.....	131
En Inde	133
Tentative de synthèse bibliographique sur la composition de l'huile essentielle de <i>Lippia alba</i>	134
β) Polyphénols.....	139
γ) Iridoïdes.....	140
δ) Divers	140
c) Essais biologiques et pharmacologiques	142
α) Activité de l'huile essentielle.....	142
Activité antibactérienne et antifongique	142
Effets sur le système nerveux	142
Activité antioxydante	143
β) Activité d'extraits de feuilles	143
Activité antibactérienne et antifongique	143
Activité antivirale.....	144
Effets sur le système nerveux.....	145
Effets sur le système cardiovasculaire.....	145
Effets sur le tube digestif.....	146
Activité antioxydante	146
d) Evaluation ethnopharmacologique.....	146
2.1.3.1.5. Travaux personnels	148
a) Essais des drogues végétales	148
α) Perte à la dessiccation	148
β) Teneur en eau	148
γ) Teneur en huile essentielle	149
δ) Cendres totales	149
ε) Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique	149
b) Etude des constituants chimiques de <i>Lippia alba</i>	150
α) Isolement de métabolites secondaires non volatils d'extraits de <i>Lippia</i> <i>alba</i>	150
Lot de Gourbeyre	151
Lot de Martinique.....	152
β) Détermination structurale des métabolites secondaires non volatils ...	153
Iridoïdes.....	153
Composé 15.....	153

Composé 16.....	157
Composé 17.....	161
Composé 18.....	165
Composé 19.....	169
Composé 20.....	172
Composé 21.....	178
Phénylpropanoïdes	180
Composé 13.....	180
Composé 22.....	181
Composé 23.....	185
Composé 7.....	189
Composé 24.....	190
Composé 25.....	193
Flavonoïdes	197
Composé 26.....	197
Composé 27.....	200
Composé 28.....	203
Composé 29.....	209
Composé 30.....	214
Composé 31.....	220
Récapitulation sur les composés polaires présents dans les feuilles de <i>Lippia alba</i>	224
γ) Composition des huiles essentielles de lots de <i>Lippia alba</i>	229
Récapitulation sur les constituants de l'huile essentielle de <i>Lippia alba</i> et l'existence de chimiotypes	232
c) Activité pharmacologique de métabolites secondaires de <i>Lippia alba</i>	235
α) Activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH.....	235
β) Activité inhibitrice vis-à-vis du radical-anion superoxyde.....	237
γ) Inhibition de la peroxydation des LDL	240
δ) Recherche d'activité neurosédative : caractère agoniste vis-à-vis du récepteur GABA _A ou du récepteur aux benzodiazépines.....	242
ε) Conclusion sur l'intérêt des molécules isolées de <i>Lippia alba</i>	244
III. Conclusion.....	245
IV. Partie expérimentale.....	247
4.1. Matériel végétal et extraction	247
4.2. Essais des drogues végétales	248
4.2.1. Hydrodistillation.....	248
4.2.2. Détermination de l'eau par entraînement	250
4.2.3. Perte à la dessiccation	251
4.2.4. Teneur en cendres totales	251
4.2.5. Teneur en cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique.....	252
4.3. Techniques analytiques de séparation	252
4.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	252
4.3.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	254
4.3.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	255
4.4. Techniques préparatives de séparation.....	257
4.4.1. Chromatographie liquide à basse pression	257
4.4.2. Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP)	258
4.4.3. Filtration sur gel	258
4.5. Méthodes physico-chimiques.....	259

4.5.1. Spectrophotométrie UV-visible.....	259
4.5.2. Spectrométrie de masse	260
4.5.2.1. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM)	263
4.5.2.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)	263
4.5.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	264
4.5.3.1. RMN du ¹ H.....	265
4.5.3.2. RMN du ¹³ C	266
4.5.3.3. RMN bidimensionnelle	267
4.5.4. Spectrométrie infrarouge.....	268
4.6. Méthodes chimiques de criblage	269
4.6.1. Réactifs de révélation chimique sur CCM	269
4.6.2. Mise en évidence sur CCM de l'activité antiradicalaire sur le DPPH	271
4.7. Réactions chimiques simples	273
4.7.1. Acétylation	273
4.7.2. Hydrolyse acide.....	273
4.8. Mesure d'activité des composés isolés.....	273
4.8.1. Détermination de l'activité inhibitrice vis-à-vis du DPPH	273
4.8.2. Détermination de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'anion-radical superoxyde..	274
4.8.2.1. Dosage de l'anion-radical superoxyde (O ₂ ^{•-}) : principe général	274
4.8.2.2. Modèle acellulaire	274
4.8.2.3. Modèle cellulaire.....	275
Préparation des granulocytes neutrophiles	275
Détermination de l'inhibition de la production de superoxyde.....	276
4.8.3. Test d'inhibition de l'oxydation des LDL	277
4.8.3.1. Principe.....	277
4.8.3.2. Mode opératoire	277
4.8.4. Approche de l'activité neurosédatrice par détermination de l'activité sur les récepteurs aux benzodiazépines et GABA _A	278
4.8.4.1. Récepteur central aux benzodiazépines.....	278
4.8.4.2. Récepteur humain GABA _A	279
Bibliographie	281

Abréviations, symboles et conventions

- AAPH : dihydrochlorure de 2,2'-azobis-2-amidinopropane
- ABTS : acide 2,2'-azino-(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique
- AcOEt : acétate d'éthyle
- AcOH : acide acétique
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AIBN : azoisobutyronitrile
- APCI : *atmospheric pressure chemical ionisation* (ionisation chimique sous pression atmosphérique)
- APG : *Angiosperm Phylogeny Group*
- APLAMEDAROM : Association pour la promotion des PLAntes MEDicinales et AROMatiques
- APT : *attached proton test* ("test du proton attaché")
- AVPMC : Association pour la Valorisation des Plantes Médicinales de la Caraïbe
- BAEC : *bovine aortic endothelial cells* (cellules endothéliales aortiques bovines)
- BHA : butylhydroxyanisole
- BHT : butylhydroxytoluène
- BZD : benzodiazépines
- CCM : chromatographie sur couche mince
- CCR-5 : *Cytokine chemoreceptor 5* (chimiorécepteur de cytokines 5)
- CI₅₀ : concentration inhibitrice 50
- CIMAP : *Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants* (Institut central des plantes médicinales et aromatiques, Lucknow, Inde)
- CLHP : chromatographie liquide haute performance/pression
- CLMP : chromatographie liquide moyenne pression
- CMI : concentration minimale inhibitrice
- COSY : *CORrelation SpectroscopY* (spectroscopie de corrélation)
- CPE : *CytoPathic Effect* (effet cytopathique)
- CPG : chromatographie en phase gazeuse
- d : doublet
- DEPT : *distortionless enhancement by polarisation transfer* (augmentation sans distorsion par transfert de polarisation)

DMSO : diméthylsulfoxyde
DMSO-*d6* : diméthylsulfoxyde hexadeutééré
DO : Densité Optique
DOPA : 3,4-dihydroxy-phénylalanine
DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
EDRF : *endothelium-derived relaxing factor* (facteur relaxant dérivé de l'endothélium)
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
EP : éther de pétrole
ERO : espèces réactives de l'oxygène
EUFIC : *EUropean Food Information Council* (Conseil européen d'information sur la nourriture)
FDA : *Food and Drug Administration* (Administration de la nourriture et des médicaments, aux Etats-Unis d'Amérique)
GABA : acide γ -aminobutyrique
GN : granulocytes neutrophiles
GPX : glutathion peroxydase
GSH : glutathion
HMBC : *heteronuclear multiple bond coherence* (correlation hétéronucléaire à travers plusieurs liaisons)
HSQC : *heteronuclear single quantum coherence* (corrélation hétéronucléaire à simple quantum)
HSV : *Herpes simplex virus*
INRA : Institut National de Recherche Agronomique
IR : infrarouge
IRD : Institut de Recherche pour le Développement
J : constante de couplage
jmod : expérience de RMN du ^{13}C « *J*-modulée », de type APT
LDL : *low density lipoproteins* (lipoprotéines de basse densité)
m : multiplet
m/z : rapport masse/charge électronique
NADPH : nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (sous sa forme réduite)
PBS : *Phosphate buffer saline* (tampon phosphate-sodium)
PEG : polyoxyéthylène glycol
PEI : polyéthylèneimine

PMA : 4 β -phorbol-12-myristate-13-acétate
ppm : partie(s) par million
PTZ: pentylènetétrazole
PV : *Poliovirus*
Rf : rapport frontal, *rate factor*
RMN : résonance magnétique nucléaire
ROESY : *Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
s : singulet
SHR : *spontaneously hypertensive rat* (rat spontanément hypertensif)
SM : spectrométrie de masse
SM-ESI : spectrométrie de masse en mode *electrospray-ionspray*
SM-IC : spectrométrie de masse par ionisation chimique
SM-IE : spectrométrie de masse par impact électronique
SOD : superoxyde dismutase
t : triplet
TAA : *total antioxidant activity* (activité antioxydante totale mesurée dans le TEAC)
TBARS : *thiobarbituric acid reactive substances* (substances réactives à l'acide thiobarbiturique)
TBH : *ter-butyl hydroperoxyde*
TEAC : *Trolox-equivalent antioxidant capacity assay* (essai de capacité antioxydante en équivalent-Trolox)
tr : temps de rétention
TOCSY : *TOTAL Correlation Spectroscopy* (spectroscopie de corrélation totale)
UV : ultraviolet
VIH : virus d'immunodéficience humaine
VSV : *vesicular stomatitis virus*
ZDDP : zinc dialkyldithiophosphates

Introduction

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles pour l'industrie agroalimentaire, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie ou le traitement de nombreuses pathologies.

En effet, on met actuellement en évidence le rôle néfaste de processus oxydatifs incontrôlés et de réactions de type radicalaire dans la genèse, l'entretien ou les séquelles d'un nombre croissant de maladies, généralement liées au vieillissement, que leur mécanisme soit bien connu (athérosclérose) ou encore à l'étude (maladies neurodégénératives).

Dans le cadre d'un programme de longue haleine visant à découvrir de nouveaux antioxydants, notamment d'intérêt cardiovasculaire, ou de nouvelles sources pour l'extraction de ceux-ci, plusieurs espèces des genres *Ballota* et *Marrubium*, appartenant à la famille des Lamiacées, font actuellement l'objet d'études phytochimiques au sein du laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille 2 (EA 1043).

Initialement, ces plantes ont été étudiées en raison des propriétés thérapeutiques que leur attribuait la médecine traditionnelle dans plusieurs pays. En plus de la justification d'une partie de ces effets, des tests pharmacologiques ont pu mettre en évidence une activité antioxydante intéressante de la part de molécules dont l'étude plus approfondie semble justifiée par les vastes possibilités qu'elles offrent en terme de variété structurale. Cette grande diversité pourrait en outre être d'un grand intérêt pour affiner la classification botanique des espèces concernées.

L'intérêt porté aux composés de ces espèces nous a conduit à élargir nos recherches à une espèce de l'ordre des Lamiales, *Lippia alba* (Verbénacées), parce qu'elle était susceptible de contenir des molécules proches de celles qui étaient étudiées au laboratoire, et dont l'étude avait elle aussi un intérêt double : chercher de nouveaux antioxydants et établir si son utilisation traditionnelle comme sédatif pouvait être expliquée par sa composition chimique. Au fil du travail sur cette plante, il s'est progressivement imposé qu'elle méritait une attention particulière à cause de la grande variété chimique intraspécifique qui a été observée.

Le présent travail rapporte donc une contribution à la connaissance des espèces *Marrubium peregrinum* L., *Ballota larendana* Boiss. & Heldr. , *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth. et *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, à travers l'isolement et l'étude de l'activité antioxydante de molécules, mais aussi, dans le cas cette dernière espèce, de données sur la composition de son huile essentielle, d'essais classiques tels que ceux proposés dans les monographies de la Pharmacopée et de tests pharmacologiques sur son activité sédative.

I. Oxydation et antioxydants

L'oxygène, indispensable à la vie, est un radical libre : il possède deux électrons non appariés. Ceci explique sa grande réactivité. Cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes. Il est donc peu toxique par lui-même.

Mais sous l'action de radiations ionisantes, de rayons UV, de métaux de transition ou au cours de réactions enzymatiques, plusieurs espèces beaucoup plus réactives sont produites (fig.1). L'appellation « espèces réactives de l'oxygène » (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (Cohen 2002, Novelli 1997) :

- **L'anion-radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)** est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale (l'électron est alors transféré par l'intermédiaire d'un radical semi-ubiquinone) ou au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus.
- **Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)** provient d'une réaction entre deux anions superoxyde qui met fin au processus radicalaire. Il s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant, mais on considère qu'il joue avec ce dernier un rôle important dans le stress oxydatif car ils diffusent facilement à travers les membranes vers des organites vulnérables des cellules comme le noyau ou la mitochondrie.
- **L'anion hypochlorite (ClO^-)** est produit à partir du peroxyde d'hydrogène par la myéloperoxydase (MPO). Il n'est présent que lors d'infections et peut participer au stress oxydatif lié à celles-ci.
- **Le radical hydroxyle (HO^{\cdot})** est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques comme par exemple Fe^{2+} (réaction de Fenton). C'est l'espèce chimique la plus réactive et elle joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique.
- **L'oxygène singulet (1O_2)** est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau.
- **L'oxyde nitrique (NO^{\cdot})**, produit par la NO synthétase, est un vasodilatateur physiologique (on l'appelle parfois EDRF : *endothelium derived relaxing factor*) et joue aussi un rôle de messenger interneuronal. Il peut avoir un rôle néfaste.

- **Le peroxynitrite (ONOO⁻)** est issu de la réaction entre O₂⁻ et NO[•]. Très néfaste pour les protéines et les gènes, il est impliqué dans l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires chroniques intestinales comme la maladie de Crohn.

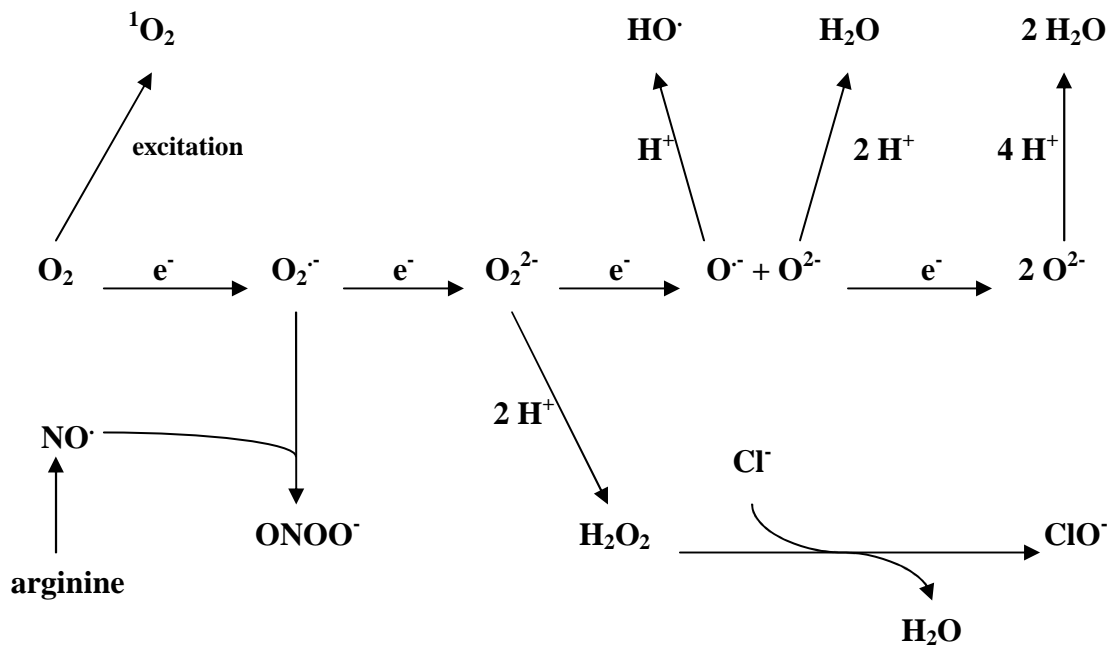


Fig.1. Réactions de base de la synthèse et de la dégradation des ERO

En l'absence d'agression extérieure particulière d'origine chimique ou radiative, les ERO sont produites physiologiquement à cause d'imperfections au niveau de la gestion de l'oxygène dans des processus comme la respiration mitochondriale, la phagocytose (au cours de laquelle survient une « flambée respiratoire », qui entraîne la production d'anions superoxyde, peroxyde et hypochlorite, toxiques pour les agents infectieux mais aussi pour les cellules humaines), les réactions de détoxification mettant en jeu les cytochromes P450 ou des oxydases, et le métabolisme des prostanoides. La production d'ERO et de radicaux libres est donc normale. Elle joue un rôle et ne devient problématique que si elle est excessive ou survient au mauvais endroit.

En plus de cette production « basale », l'activation de systèmes enzymatiques, lors de situations de stress de l'organisme, peut entraîner une formation accrue d'ERO, dont l'effet sera particulièrement délétère. On considère généralement que, si aucune pathologie n'est directement et uniquement causée par les ERO, la production excessive de radicaux libres

peut entrer en jeu dans l'aggravation de diverses maladies. Un exemple classique est le phénomène d'ischémie-reperfusion observé lors des infarctus du myocarde : la privation d'oxygène entraîne une augmentation de la libération d'enzymes comme la xanthine oxydase qui, une fois l'approvisionnement des cellules rétabli et en présence d'une grande quantité d'oxygène arrivé brutalement, vont synthétiser beaucoup d'ERO, sources de lésions supplémentaires pour l'endothélium cardiovasculaire et responsables d'une partie des séquelles de l'infarctus (ou de toute autre situation d'ischémie).

1.1. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques

Les dérivés de l'oxygène produits étant hautement réactifs, ils sont susceptibles de jouer un rôle d'oxydants ou d'initiateurs de réactions radicalaires vis-à-vis de nombreuses biomolécules. Ils peuvent ainsi entraîner le dysfonctionnement ou l'inactivation de protéines et de systèmes enzymatiques, altérer la structure des cellules, de leurs organites ou des acides nucléiques (cassure de brin). Les effets en sont observables à l'échelle de l'organisme, les exemples les plus évidents étant ceux faisant intervenir des agents chimiques (la toxicité des anthracyclines sur le cœur, de la bléomycine sur les poumons ou encore du paraquat font intervenir la production d'ERO).

1.1.1. Lipides

Les matières grasses constituent une part importante de l'alimentation humaine, et sont d'ailleurs consommées de manière excessive dans la plupart des pays développés industriellement. Plusieurs types de molécules sont consommés, qui ne sont guère rassemblés sous le terme générique de « graisses » ou « lipides » que par un caractère commun : leur solubilité dans les solvants organiques et une solubilité restreinte dans l'eau. En plus des mono-, di- et triglycérides, on englobe dans ces vocables les acides gras libres, les stérols, terpènes, cires, phospholipides (ou lécithines, phosphatides) et vitamines liposolubles (A, D, E, K). Comme toutes les molécules organiques, les lipides sont sensibles à un ensemble de réactions de dégradation, notamment oxydatives, et ce d'autant plus qu'ils contiennent beaucoup de liaisons doubles. Dans le cas précis des acides gras (et donc des molécules dans la structure desquelles ils peuvent intervenir : glycérides, phospholipides...), il est important

de noter que les acides gras polyinsaturés, s'ils sont aujourd'hui unanimement considérés comme meilleurs pour la santé (cas des $\omega 3$, intervention de l'acide arachidonique dans la biosynthèse des eicosanoïdes) et comptent parmi leurs représentants les seuls acides gras « essentiels » (acides linoléique et linoléique, les seuls à ne pouvoir être synthétisés par le corps humain et qui doivent donc nécessairement être fournis par l'alimentation), sont également les plus sensibles à l'oxydation. Par exemple, les taux relatifs d'oxydation des acides arachidonique, linoléique, linoléique et oléique, caractérisés par la présence respective de quatre, trois, deux et une insaturation(s), sont approximativement 40:20:10:1. En outre, les isomères (*Z*) (*cis*) s'oxydent plus facilement que les (*E*) (*trans*); les double-liaisons conjuguées sont également plus réactives (Scott 1993).

En ce qui concerne les dégradations oxydatives des acides gras, il en existe deux types : la rancidité cétonique et la rancidité oxydative. La première ne sera pas détaillée ici car elle est due à l'action de certaines moisissures (par exemple *Eurotium amstelodani*) sur des graisses saturées et constitue essentiellement un problème d'ordre microbiologique pour l'industrie agroalimentaire. La rancidité oxydative résulte, elle, de l'action directe de l'oxygène sur les acides gras et survient dans les huiles alimentaires comme dans les tissus biologiques, *in vivo*. La réaction expliquant le phénomène de rancidité oxydative a pour nom peroxydation lipidique. Cette réaction radicalaire se déroule en trois phases que nous rappelons ici (fig.2) :

- **L'initiation**, qui consiste en la rupture homolytique, occasionnée par un initiateur radicalaire, d'une liaison C-H de la chaîne d'un acide gras, ce qui en fait un composé radicalaire très réactif vis-à-vis de l'oxygène et qui va donc se transformer en radical peroxy.
- **La propagation**, au cours de laquelle le radical peroxy va arracher un hydrogène à un autre acide gras, créant un nouveau radical et entretenant ainsi une réaction en chaîne, pour se transformer en hydroperoxyde. Ce dernier finira par se dégrader en aldéhydes volatils, expliquant l'odeur nauséabonde produite lors du rancissement, et potentiellement toxiques.
- **La terminaison**, entraînée par la réaction de deux radicaux pour donner une espèce moléculaire ou par intervention d'un composé antioxydant, dit « briseur de chaîne ».

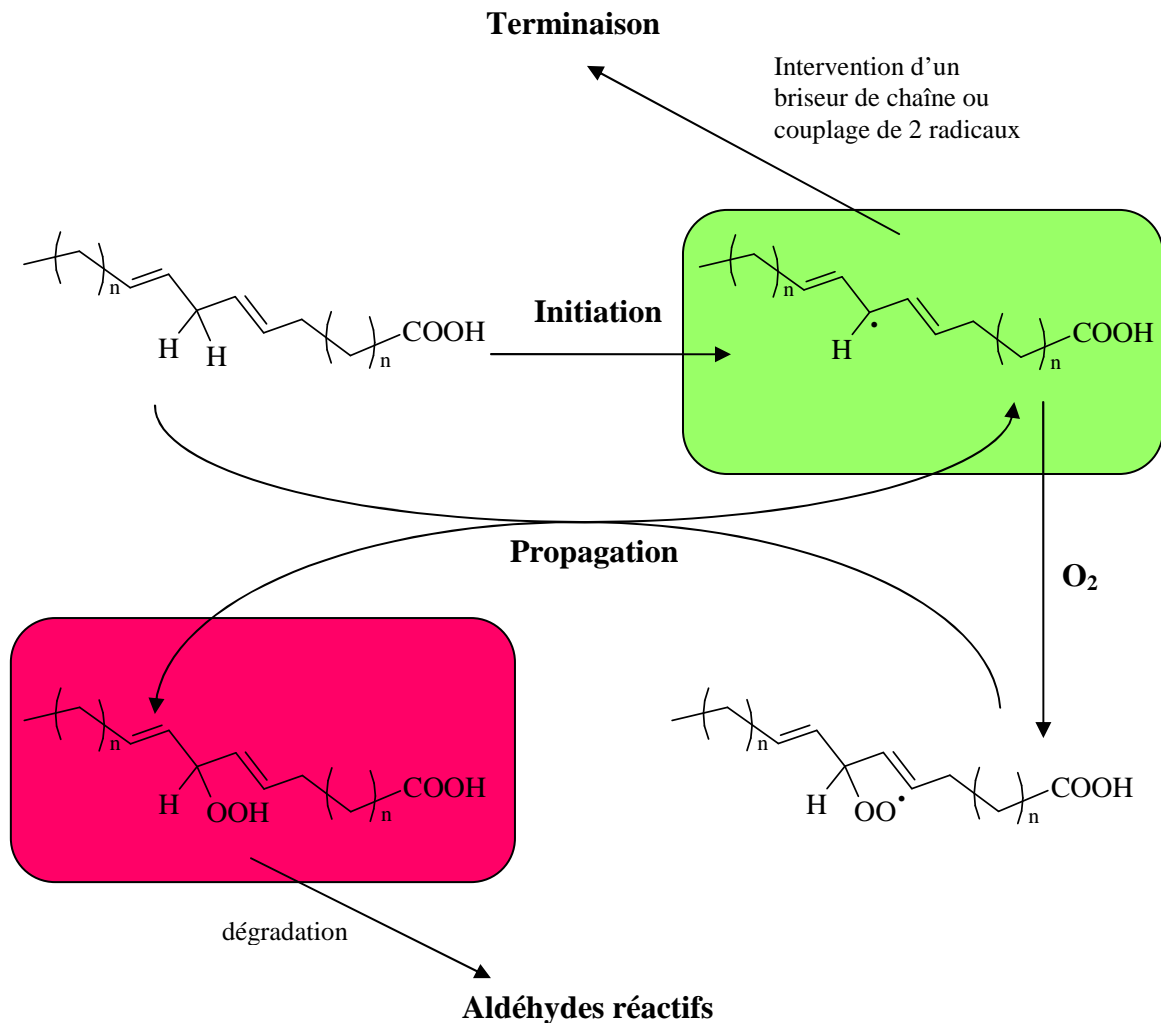


Fig.2. Schéma de la réaction de peroxydation lipidique. Les étapes encadrées sont celles où la réaction radicalaire peut être interrompue :

En vert : la réaction s'arrête par couplage de deux radicaux ou par intervention d'un antioxydant briseur de chaîne sans conséquence néfaste.

En rouge : l'hydroperoxyde formé, instable, se dégrade en aldéhydes responsables de l'odeur liée au rancissement, qui, *in vivo*, peuvent provoquer des lésions sur d'autres molécules.

Ce phénomène a, comme nous l'avons dit, une grande importance pour l'industrie agroalimentaire (par exemple, deux milligrammes de 2-*trans*,6-*cis*-nonadiène peut rendre inutilisables deux tonnes de graisse en provoquant l'apparition d'une saveur évoquant le concombre), mais aussi dans le domaine de la santé humaine. Il intervient, par exemple, dans la toxicité hépatique du tétrachlorure de carbone et de l'éthanol. Il joue également un rôle dans la pathogénèse de l'infarctus du myocarde (Luc 1991, Halliwell 1996): en effet, chez les hypercholestérolémiques (sujets présentant une teneur élevée en « mauvais cholestérol »

véhiculé par les *Low Density Lipoproteins* ou LDL), il se forme sur la paroi des vaisseaux (artères coronaires en particulier), une plaque d'athérome riche en lipides. Les LDL accumulées s'oxydent par le biais de réactions radicalaires ayant pour initiateurs des ERO. Les modifications et la dégradation survenant en particulier sur une protéine, l'apo B₁₀₀, empêchent la reconnaissance des LDL par leur récepteur naturel et favorisent plutôt leur élimination par les récepteurs « éboueurs » (*scavengers*) des macrophages et des cellules musculaires lisses de la plaque. Ceux-ci étant incapables de dégrader les LDL, ils se gorgent de graisse et se transforment en cellules spumeuses (*foam cells*), s'endommagent et meurent. Ainsi, la plaque d'athérome grossit jusqu'à obturer l'artère ou finit par se rompre, entraînant la formation d'un thrombus dans le vaisseau. Ces deux phénomènes ont pour conséquence finale l'infarctus. De plus, le phénomène est aggravé par la libération d'endothéline, peptide vasoconstricteur, par les cellules endothéliales en contact avec les LDL oxydées.

1.1.2. Protéines

Les dommages oxydatifs induits sur les protéines par les radicaux libres peuvent conduire à des modifications structurales (dimérisation, fragmentation, modification des acides aminés) et fonctionnelles (perte d'activité enzymatique, altération du processus de protéolyse). Ces modifications étaient autrefois considérées comme chimiquement inertes. Cependant la formation d'espèces réactives telles que les hydroperoxydes et la DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) peut engendrer un flux de radicaux et endommager d'autres structures biologiques (Luxford 1999). La modification de certains acides aminés (valine, leucine, lysine) peut par ailleurs servir de marqueur d'oxydation (Morin 1998).

La modification de protéines par l'oxydation est un agent causal possible ou un facteur de risque de plusieurs maladies liées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer (Inoue 2006), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Gritz 2006), la cataracte (Vinson 2006) et la maladie de Parkinson (Ahmad 2006).

1.1.3. Acides nucléiques

Les modifications induites par des processus oxydatifs dans le matériel génétique appartiennent à quatre catégories: modifications des bases (possibilité de dimérisation), cassures simples et doubles de la chaîne d'ADN, sites abasiques et pontages avec des protéines. Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (léthalité

cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et dans le vieillissement cellulaire. Dans la cellule, l'ADN est en interaction avec de nombreuses protéines. Ces interactions sont non covalentes et réversibles. La formation de pontages covalents entre l'ADN et les protéines peut modifier l'expression des gènes et avoir ainsi de lourdes conséquences biologiques pour la cellule (fig.3) (Hochberg 2006).

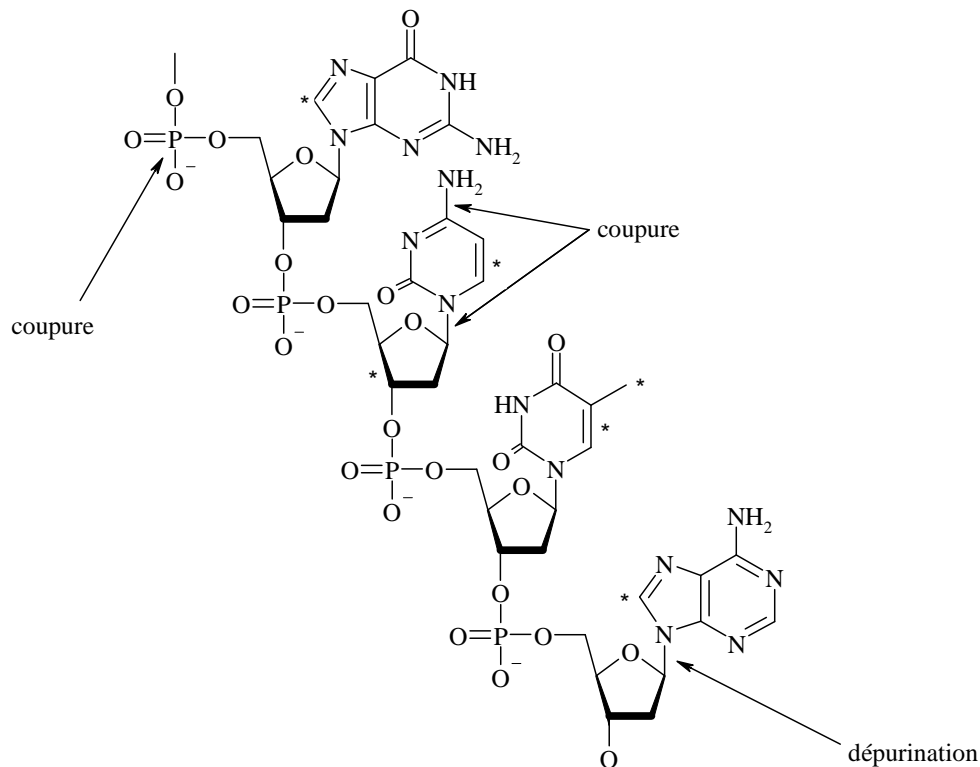


Fig.3. Exemples de transformations d'origine oxydative subies par l'ADN (* : sites d'oxydation)

1.2. Mécanismes physiologiques de l'inactivation des ERO

L'organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense développés au cours de l'évolution (Cuendet 1999). Tout d'abord, les métaux susceptibles de catalyser la formation du radical hydroxyle (fer, cuivre) sont physiologiquement séquestrés et transportés grâce à des protéines comme la ferritine, la transférine et la céruléoplasmine, qui agissent donc en tant qu'antioxydants primaires. L'albumine et l'haptoglobine peuvent également chélater ces ions.

Certaines enzymes ont également un rôle de détoxification des ERO les plus courantes (et susceptibles d'engendrer les autres) (fig.4). La superoxyde dismutase (SOD) convertit le radical-anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, moins toxique. Ce dernier est secondairement soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase, soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion (GSH), catalysée par la glutathion peroxydase (GPX). Le glutathion oxydé est atoxique et peut, en outre, être réduit par la glutathion réductase, qui a pour coenzyme le NADPH (nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate sous sa forme réduite).

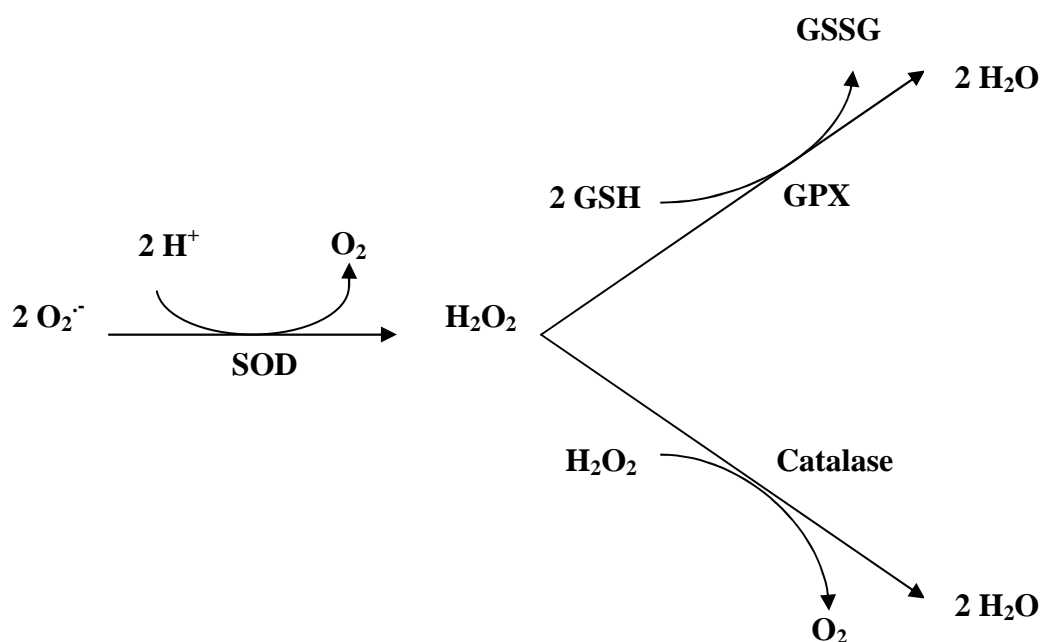


Fig.4. Réactions de détoxification du radical-anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène

Les différentes isoformes de SOD contiennent soit du manganèse (SOD mitochondriale), soit du cuivre et du zinc (SOD cytosolique), tandis que la GPX contient du sélénium. Ce n'est donc qu'indirectement que ces métaux possèdent une activité antioxydante (le cuivre est pro-oxydant sous forme libre).

Précisons qu'aucun de ces systèmes ne permet d'éliminer le très puissant radical hydroxyle et qu'ils ne font que limiter sa formation.

Des antioxydants liposolubles (estrogènes) et hydrosolubles (acide urique, glutathion et acides aminés à fonction thiol comme la taurine ou la cystéine) permettent l'inhibition de réactions radicalaires telles que la peroxydation lipidique (Michiels 1994).

Outre les mécanismes précédemment décrits, véritablement antioxydants, on peut évoquer brièvement les systèmes de protection contre les conséquences de l'oxydation des biomolécules, comme la dégradation des protéines dénaturées par le protéasome, l'intervention des ligases et endonucléases au niveau de l'ADN et, dernier rempart contre la cancérisation de la cellule, l'apoptose.

1.3. Les antioxydants, sources et intérêt

Les antioxydants peuvent être définis comme les substances qui, présentes à faible concentration par rapport à un substrat oxydable, sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Nous nous proposons ici de faire un bref rappel sur les principales substances utilisables pour lutter contre toute forme d'oxydation.

1.3.1. Enzymes et cofacteurs

Une SOD peut être extraite du melon et vectorisée par des polymères. Une étude a montré l'intérêt d'une complémentation alimentaire en SOD lors d'un stress oxydatif, pour faciliter l'élimination des ions superoxyde. La supplémentation en sélénium, indispensable au fonctionnement de la métallo-enzyme GPX, permet de diminuer la mortalité cardiovasculaire (Cohen 2002).

1.3.2. Conservateurs alimentaires

Les antioxydants sont très utilisés par l'industrie agroalimentaire, pour la prévention du rancissement des matières grasses. Quelques-uns d'entre eux sont représentés dans la figure 5. Ces antioxydants (au sens large) appartiennent à trois catégories principales, en terme de mécanisme d'action (certaines molécules cumulent plusieurs activités) :

- Les antioxydants briseurs de chaîne, des substances phénoliques qui inhibent la réaction en chaîne radicalaire de la peroxydation lipidique. Ce sont des donneurs

d'électrons (en fait, de H[•] : briseurs de chaîne « donneurs »). On trouve dans ce groupe les tocophérols naturels et synthétiques (E306-309), les gallates (E310-312), le butylhydroxyanisole (BHA) (E320), le butylhydroxytoluène (BHT) (E321)

- Les capteurs d'oxygène, qui réagissent avec l'oxygène et permettent son élimination en système fermé. On y retrouve l'acide ascorbique et ses dérivés (palmitate, isomère D appelé acide érythorbique, sels...) (E300-304, E315-316). Sont classés dans cette catégorie les désactivateurs de l'oxygène singulet comme le β -carotène et l' α -tocophérol.
- Les antioxydants préventifs, parmi lesquels on retrouve des agents chélatants ou séquestrants de cations métalliques pro-oxydants comme Fe²⁺ ou Cu²⁺ (acides citrique, phosphorique et tartrique, acides aminés ; une partie de l'activité de l'acide ascorbique est également expliquée par ce phénomène), qui sont utilisés en synergie des dérivés phénoliques, ainsi que l'acide thiodipropionique et ses dérivés, qui décomposent les hydroperoxydes lipidiques en dérivés stables.

Notons que parmi les molécules citées ci-dessus, seules celles qui sont codées sous la forme E3xx sont utilisables en tant qu'antioxydants dans l'Union Européenne. Certains produits ont une activité antioxydante, mais sont classés dans d'autres catégories : les caroténoïdes (E160-161, colorants), la curcumine (E100, colorant)...

Il existe de nombreuses molécules commercialisées comme antioxydants, notamment en dehors de l'Union Européenne. Par exemple, l'acide thiodipropionique et ses dérivés, mentionnés plus haut, sont approuvés par la *Food and Drug Administration* aux Etats Unis (FDA 2003). Dans la gamme des substances actives, on trouve aussi les amines aromatiques (par exemple la diphénylamine), certains stéroïdes et les composés sélénio-organiques. Certains diterpènes antioxydants du romarin, tels que le rosmarinol, sont également disponibles (Scott 1993, EUFIC 2002).

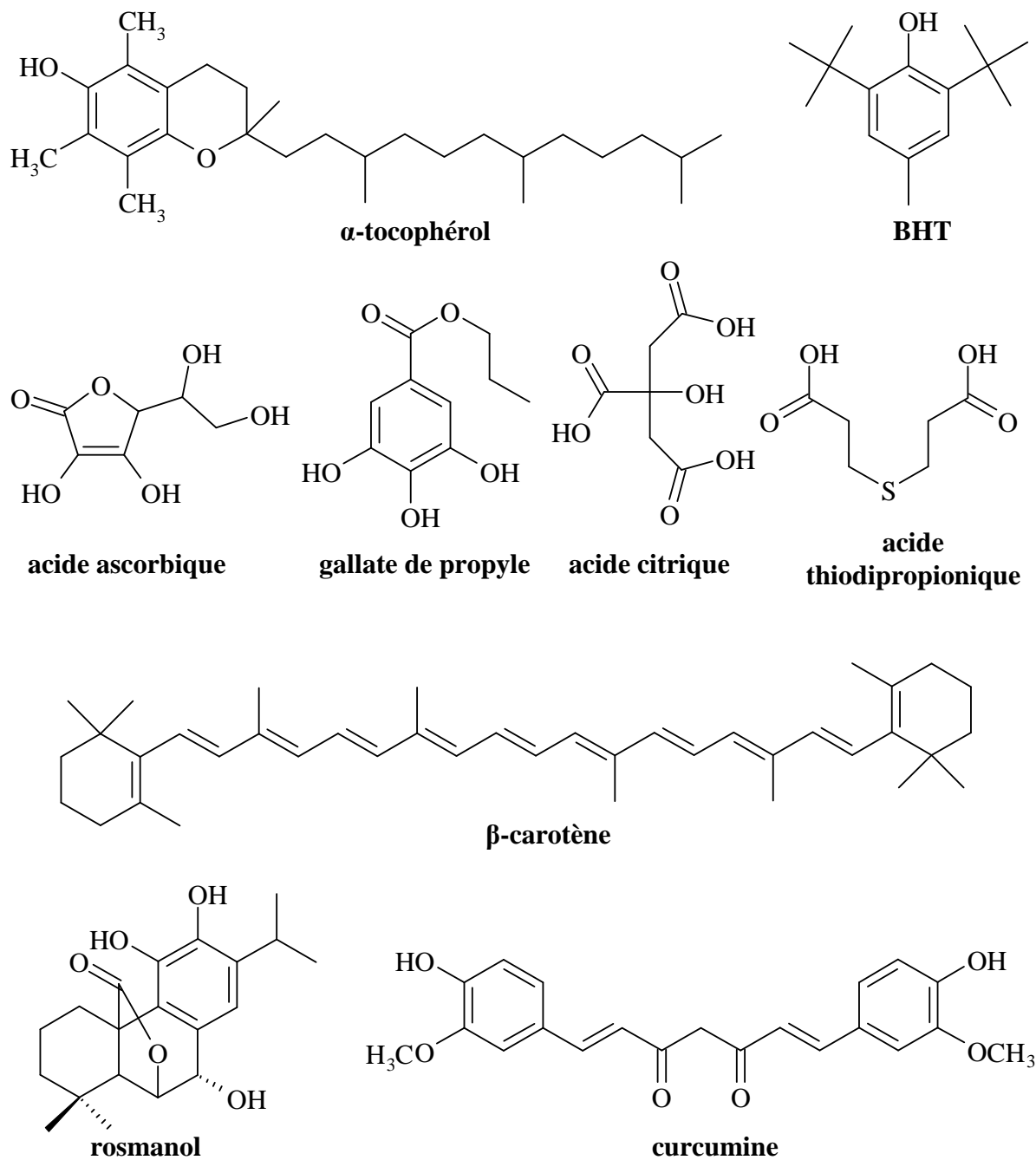


Fig.5. Quelques molécules antioxydantes utilisées dans l'industrie alimentaire

1.3.3. Autres utilisations industrielles

Des industries très différentes sont concernées par l'utilisation d'antioxydants. Elles seront moins détaillées que ne l'a été l'industrie alimentaire, pour certaines parce qu'elles sortent du cadre de la santé humaine, pour d'autres parce que les molécules utilisées et les principes d'utilisation sont très proches de ceux déjà décrits.

- Industrie des lubrifiants : elle produit notamment les huiles pour moteurs et transmissions automobiles. Les premiers antioxydants utilisés furent des zinc dialkyldithiophosphates (ZDDP), qui se raréfient aujourd'hui du fait de leur nature de « poisons catalytiques ». La problématique ici est logiquement moins liée à la santé humaine, mais davantage à la compatibilité avec l'environnement mécanique et aux impératifs techniques et écologiques des fabricants. On trouve parmi les molécules utilisées des aryl- et alkylamines et des phénols stériquement encombrés (tous inhibiteurs de réaction en chaîne de peroxydation), les ZDDP, des zinc dialkyldithiocarbamates et d'autres composés soufrés ou non, qui agissent souvent à plusieurs niveaux (chélation de métaux et désactivation des peroxydes notamment) et des complexes du cuivre (Scott 1993). Quelques exemples de molécules utilisées sont donnés dans la figure 6.

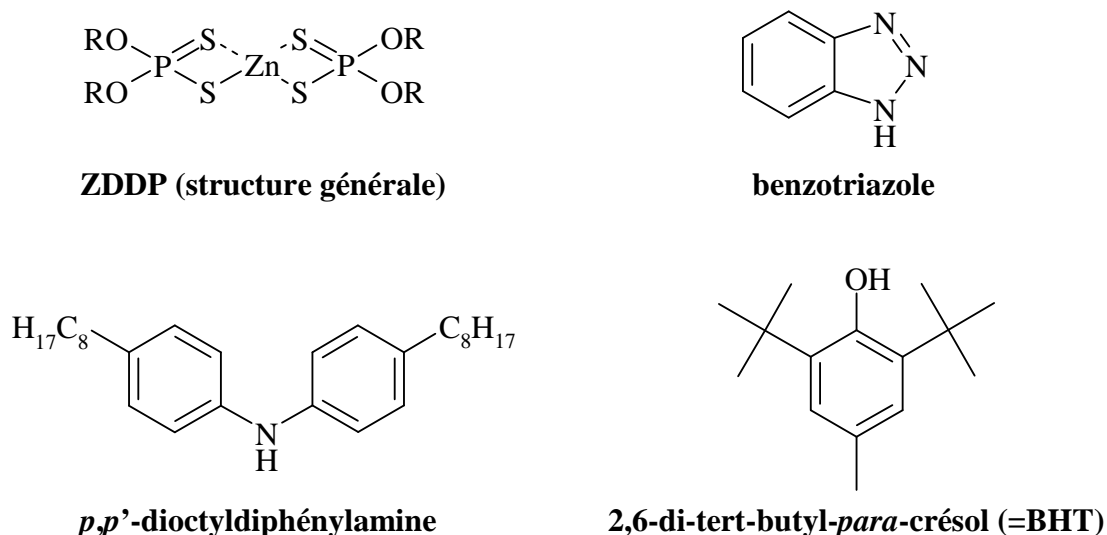


Fig.6. Exemples d'antioxydants utilisables pour des lubrifiants

- Industrie des matières plastiques : des additifs sont utilisés pour protéger les polymères de l'oxygène de l'air (que ce soit au moment de la fabrication - un traitement à haute température facilitant l'oxydation - ou pour prolonger la durée de vie des matériaux, qui perdent leurs caractéristiques de plasticité ou d'élasticité, deviennent cassants en vieillissant), des rayonnements (UV principalement), de l'ozone. Quelques exemples de molécules utilisées sont donnés dans la figure 7.

Concernant la protection des polymères pendant les phases de fabrication, il faut remarquer l'utilisation de composés comme le galvinoxyl, qui sont de nature radicalaire et potentiellement pro-oxydants, mais qui dans des conditions particulières deviennent des briseurs de chaîne dits « accepteurs » : au lieu de restituer un H[•] à une molécule lésée (cas des briseurs de chaîne classiques, « donneurs », décrits précédemment), ils en arrachent un deuxième, ce qui est un pis-aller, mais se révèle parfois très efficace (Scott 1993).

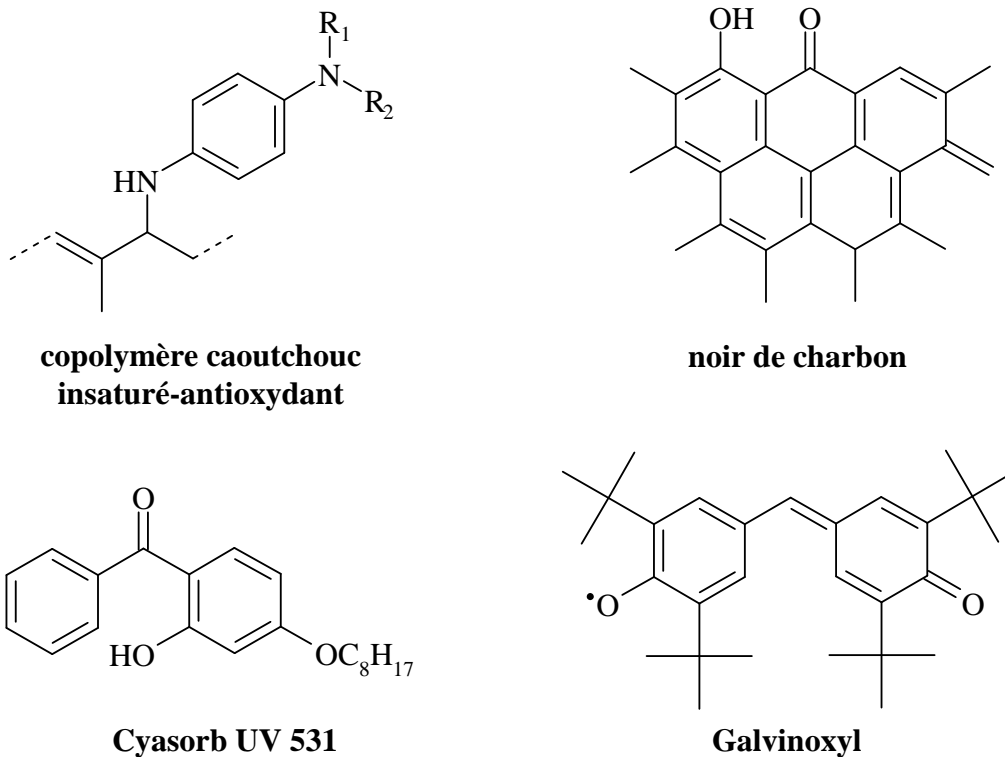


Fig.7. Exemples de molécules utilisées pour la protection des polymères vis-à-vis de l'oxydation : un exemple de copolymère caoutchouc-amine aromatique (briseuse de chaîne) non commercialisé ; le noir de charbon, un pigment très efficace pour la protection contre les UV ; le Cyasorb UV 531, un « absorbant UV » classique ; le galvinoxyl, un briseur de chaîne - accepteur.

- Industrie cosmétique : les molécules utilisées sont plus ou moins les mêmes que dans l'industrie alimentaire (tocophérols, ascorbates, caroténoïdes...). Le BHA, le BHT sont utilisés comme partout, étant donné leur faible coût, mais la légère coloration jaune qu'ils peuvent occasionner dérange. De la même manière, on utilisera plus

volontiers des extraits végétaux divers (thym, romarin, sauge, sésame...), qui sont plus à même d'attirer la confiance du consommateur (Martini 1999).

1.3.4. Principaux antioxydants présents naturellement dans notre alimentation

L'organisme peut quant-à-lui tirer profit de nombreux antioxydants présents dans son alimentation. Ces molécules et leurs équivalents synthétiques sont d'ailleurs largement exploités dans les industries où le produit est en contact avec l'homme (cosmétique, alimentation), puisqu'elles offrent des garanties d'innocuité indiscutables. Nous allons en effet voir que la plupart des antioxydants décrits dans les parties consacrées à ces deux industries sont en fait des vitamines ou des pigments végétaux !

Le premier d'entre eux est la vitamine E : cette molécule liposoluble protège les graisses circulantes contre l'oxydation, ce qui constitue la première défense contre l'athérosclérose et en fait un protecteur cardiovasculaire majeur. Elle limite également la formation d'aldéhydes génotoxiques. Le terme général de vitamine E rassemble les α , β , γ et δ tocophérols qui présentent des intérêts variés : le γ -tocophérol est notamment capable de piéger les peroxy-nitrites (Cohen 2002). On considère souvent que $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ en terme de pouvoir antioxydant *in vitro*, alors que l'inverse est observé *in vivo*. Les tocophérols sont trouvés par exemple dans le beurre et l'huile de colza.

La vitamine C (acide ascorbique) est le principal antioxydant hydrosoluble. C'est un réducteur puissant qui est notamment impliqué dans les mécanismes de lutte contre la méthémoglobinémie et joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (Sies 1995). La vitamine C est présente en grande quantité dans les agrumes, le kiwi, le persil et tire son nom de la maladie que provoque sa carence : le scorbut.

Les caroténoïdes, pigments rouges (lycopène de la tomate), oranges (β -carotène des carottes) ou jaunes (lutéine et zéaxanthine du maïs) d'origine végétale, sont particulièrement efficaces dans la neutralisation de l'oxygène singulet et jouent le rôle de boucliers contre la photoinitiation de réactions radicalaires par les rayonnements UV. Le β -carotène (provitamine A), diffusant mieux que les tocophérols dans les lipides, protège les graisses profondes. Les suppléments en β -carotène ou en lycopène diminuent l'oxydation des LDL par rapport au placebo (Cohen 2002).

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. On trouve parmi leurs nombreux intérêts

potentiels la chélation de certains métaux (dont le fer et le cuivre) et la captation de radicaux libres. De plus, une synergie peut être observée entre leur action et celle de la vitamine C. Les polyphénols du thé, du cacao et du vin rouge sont particulièrement étudiés pour leur potentiel de protection vis-à-vis des maladies cardiovasculaires et de certains cancers (Cheng 2005, Engler 2004, Schoonen 2005).

1.3.5. Médicaments antioxydants

Depuis que les recherches sur les radicaux libres se sont développées, on s'est intéressé à l'activité éventuelle de molécules médicamenteuses déjà connues (Cuendet 1999, Wiseman 1995), qui présentent les avantages d'une biodisponibilité et de paramètres pharmacocinétiques et toxicologiques déjà bien connus. Ainsi, le probucol, un hypocholestérolémiant, prévient l'athérogénèse en agissant comme antioxydant et en supprimant la modification des LDL. Les mêmes observations ont été faites sur deux autres médicaments utilisés en cardiologie : un antiagrégant plaquettaire, le dipyridamole (Persantine®) et un antagoniste des récepteurs β adrénergiques, le carvedilol (Krédex®), ainsi que pour un modulateur sélectif des récepteurs aux estrogènes, le tamoxifène (Nolvadex®). La N-acétyl-cystéine favorise quant-à-elle la régénération du GSH et a l'avantage d'être peu toxique.

1.3.6. Métabolites secondaires des végétaux : avancées et potentiels

Le nombre de substances d'origine naturelle présentant des propriétés antioxydantes avérées est en perpétuelle augmentation et cette catégorie de molécules compte aujourd'hui des représentants dans la plupart des classes chimiques du règne végétal : terpènes (rosmarinol, glycyrrhizine), alcaloïdes (boldine), coumarines, lignanes, méthylxanthines (caféine), polyphénols et même mélatonine (trouvée dans certaines algues et plantes) (Cuendet 1999). Ceci peut être expliqué par le fait que les plantes ont du développer une réponse face au stress oxydatif résultant des processus photodynamiques prenant place dans les chloroplastes. Tous les compartiments devant être protégés, les molécules antioxydantes ont des polarités variables. Les mécanismes d'action sont multiples, incluant la réduction de radicaux ou de

peroxydes, la désactivation des radicaux par addition covalente, la complexation d'ions de métaux de transition et le captage de l'oxygène singulet.

Tous les groupes chimiques potentiellement antioxydants ne peuvent être développés ici. Nous nous focaliserons donc sur les cas précis des terpènes et des polyphénols, puisque toutes les molécules isolées dans le cadre de ce mémoire appartiennent à ces deux catégories. Cette partie aura donc le double intérêt de donner des exemples de molécules intéressantes par leur activité antioxydante et de présenter succinctement les types de molécules qui seront évoqués plus loin.

1.3.6.1. Polyphénols

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH).

Il existe de nombreuses classes de polyphénols : phloroglucinols, quinones, stilbénoides, coumarines, acides-phénols, flavonoïdes, anthocyanes, tanins... Ces structures peuvent également être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités. Leur origine biosynthétique est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (fig.8).

Les structures qui seront rencontrées dans ce mémoire sont des flavonoïdes particuliers, les flavones, qui pourront être glycosylées, acylées ou non), des phénylpropanoïdes (acide caféique, coumarique) et des phényléthanoïdes (hydroxytyrosol). On pourra constater que la présence d'un de ces trois types de génine n'est pas exclusive : l'acide caféique et l'hydroxytyrosol feront presque toujours partie d'une même molécule, que l'on qualifiera ici de « phénylpropanoïde » et l'on verra deux cas de glucosides de flavones coumarylées.

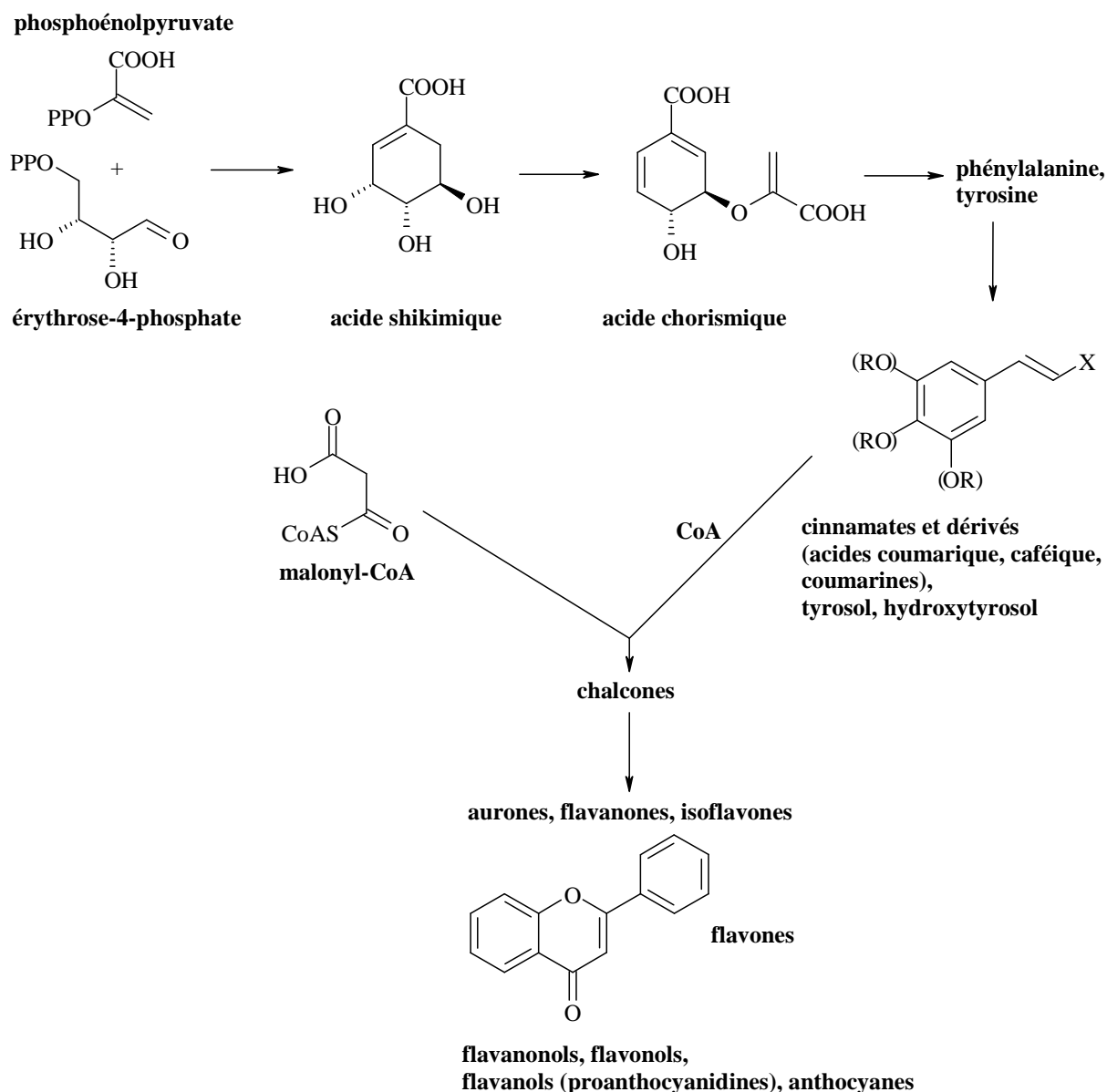


Fig.8. Aperçu de la biosynthèse de plusieurs familles de polyphénols, dont les phénylpropanoïdes et les flavones

Les composés phénoliques sont une famille thérapeutiquement et économiquement intéressante. Ils sont exploités en phytothérapie et dans des spécialités pour des propriétés vasculoprotectrices (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), antispasmodiques (phloroglucinols) et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant. Plusieurs molécules (fig.9) font actuellement l'objet d'études poussées car elles ont démontré des propriétés antioxydantes dans des systèmes biologiques pertinents : on peut évoquer le resvératrol, un stilbène isolé du raisin (Delmas 2005, Ulrich 2005) et la silymarine, mélange d'isomères de nature flavonoïdique présents dans le chardon-marie (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) dont

l'utilisation traditionnelle en tant que protecteur hépatique a été confirmée par une inhibition puissante des processus oxydatifs d'origine exogène dans cet organe (Zhao 2000).

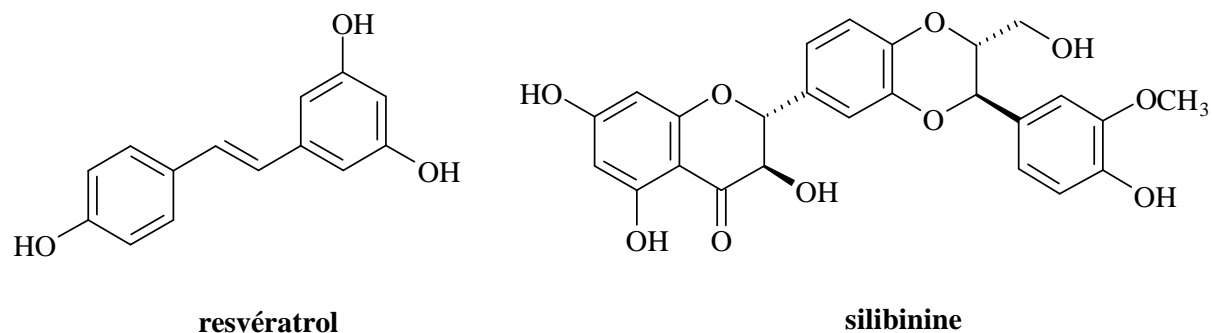


Fig.9. Structures de la silibinine (un constituant de la silymarine) et du resvératrol

1.3.6.2. Terpènes

Les terpènes sont des molécules dont le point commun est d'être formées par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène. Selon le nombre de ces unités se forment plusieurs groupes de composés : les monoterpènes (2 unités, soit 10 carbones), sesquiterpènes (15 carbones), diterpènes (20 carbones), triterpènes et stéroïdes (30 carbones) et carotènes (40 carbones). Parmi ceux-ci, on rencontrera principalement à la lecture de ce mémoire :

- des monoterpènes, issus de la condensation des résidus isopenténylpyrophosphate et diméthylallyle pyrophosphate (fig.10)
- des diterpènes, qui résultent de l'intégration de deux isopenténylpyrophosphates supplémentaires au précurseur des monoterpènes.

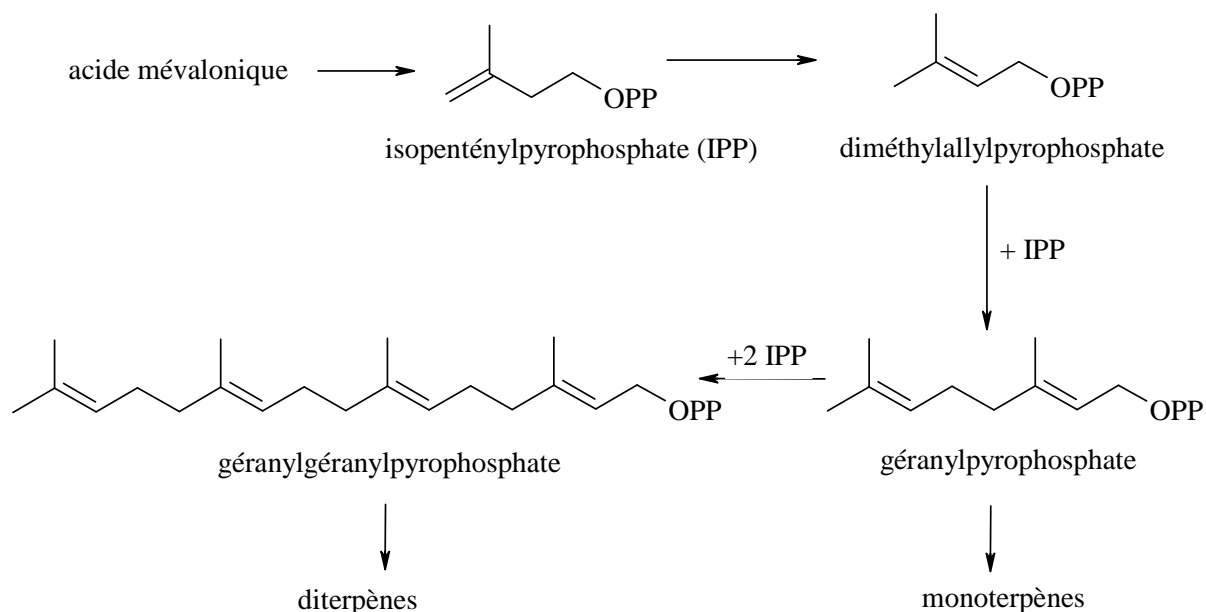


Fig.10. Biosynthèse des précurseurs métaboliques des monoterpènes et diterpènes

1.3.6.2.1. Monoterpènes

Les monoterpènes dérivent tous du géranylpyrophosphate. Des représentants de cette classe seront rencontrés lors de l'étude de l'huile essentielle de l'une des plantes étudiées, *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown : une grande partie des constituants des huiles essentielles est de nature monoterpénique. Des monoterpènes différents sont également présents chez *Lippia alba* : les iridoïdes.

Monoterpènes volatils et autres constituants des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont très courantes dans certains ordres, tels que les Lamiales, Astéales, Laurales et sont aisément remarquables par leur odeur qui peut être très agréable (lavande, romarin...) ou repoussante (ballote dite « fétide »). Elles sont liquides à température ambiante, volatiles, apolaires et de densité généralement bien inférieure à l'eau, ce qui permet leur obtention par hydrodistillation. Les structures de leurs constituants sont extrêmement variées pour plusieurs raisons :

- plusieurs groupes de constituants sont rencontrés : monoterpènes (limonène), sesquiterpènes (carotol), composés aromatiques dérivés du phénylpropane (anéthole), molécules issues de la dégradation d'acides gras ou de terpènes (fig.11).

- monoterpènes et sesquiterpènes présentent une grande variété de squelettes (une quarantaine chez les monoterpènes)
- de nombreuses réactions interviennent pour introduire des fonctions alcool, aldéhyde, cétone, époxyde...

Les utilisations principales des huiles essentielles sont en parfumerie. En pharmacie, leur principal intérêt est leur pouvoir antiseptique, qui peut être exploité par voie externe. D'autres propriétés (spasmolytiques, sédatives) nécessitent, pour être utilisées, des précautions car les huiles essentielles peuvent créer des irritations, voire être causes de toxicité (sauge, absinthe). En ce qui concerne l'action antioxydante, les huiles essentielles peuvent avoir une action antiradicalaire directe, par exemple par la présence de certains composés présentant des doubles liaisons conjuguées (chamazulène) ou des fonctions phénoliques (thymol, carvacrol) (fig.11) (McKay 2006, Bozin 2006).

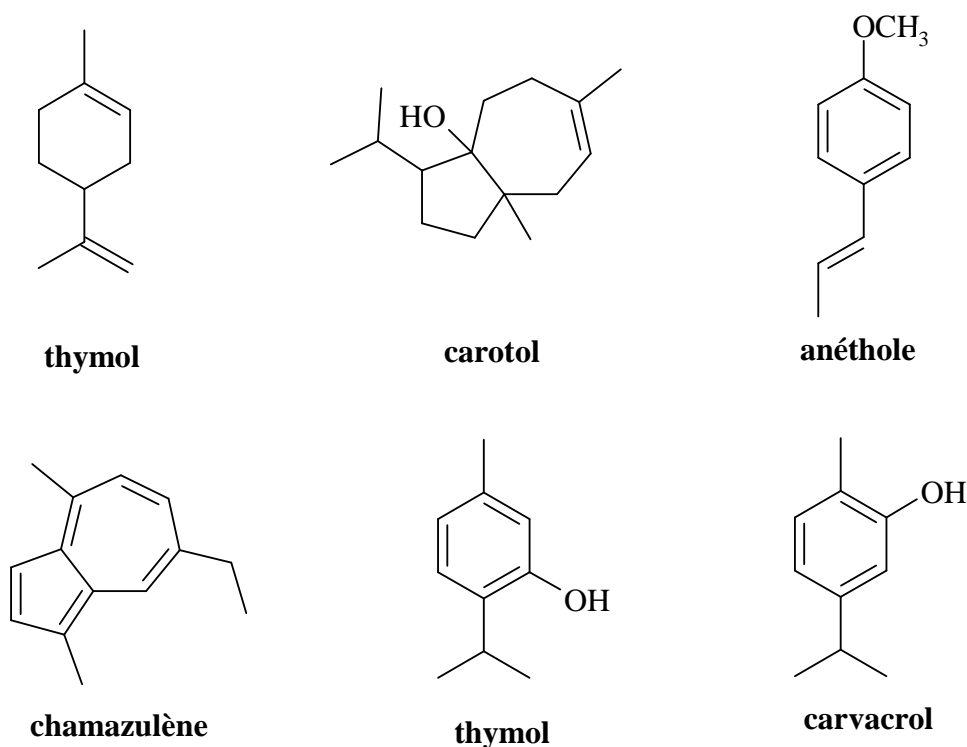


Fig.11. Quelques exemples de constituants des huiles essentielles

Monoterpènes iridoïdiques

Le groupe des iridoïdes est initialement défini par une structure commune, le noyau iridane (cis-2-oxabicyclo[4,3,0]-nonane, de nature cyclopentapyranique), mais un certain nombre de structures dérivant de ce noyau (séco-iridoïdes, par exemple, par ouverture du cycle cyclopentanique) y sont incluses. Les iridoïdes doivent leur nom à un genre de fourmis, *Iridomirmex*, d'où furent isolés les premiers représentants du groupe, dont l'iridodial. Dans le règne végétal, ces composés sont spécifiques des angiospermes dicotylédones.

Biogénétiquement, ils dérivent des monoterpènes précédents puisqu'il a été démontré qu'une série de réactions conduisait du 8-hydroxygéranol au loganoside, lui-même précurseur de nombreux autres iridoïdes. Les iridoïdes sont très fréquemment glycosylés, donc polaires et non-volatils.

Les iridoïdes sont principalement connus pour être les principes actifs possibles de plantes très utilisées en phytothérapie, la valériane (*Valeriana officinalis* L., Valérianacées, sédative) et l'harpagophyton (*Harpagophytum procumbens* (Burch.) DC. ex Meissn., Pédaliacées, antiinflammatoire) et pour leurs propriétés apéritives. Le loganoside est également un précurseur biosynthétique de nombreux alcaloïdes très connus et utiles (camptothécine, quinine, strychnine, vincristine, yohimbine...).

Les iridoïdes ne sont pas antiradicalaires. Leurs propriétés antioxydantes peuvent venir de leur acylation par un acide-phénol (cas de l'oleuropéoside [Franconi 2006]) et/ou être la conséquence d'une action indirecte, c'est-à-dire de l'induction d'une enzyme antioxydante telle que la glutathion-S-transférase, par le géniposide (Kuo 2004) ou l'hème oxygénase-1, par le catalposide (Moon 2003). Les informations concernant les iridoïdes sont résumées dans la figure 12.

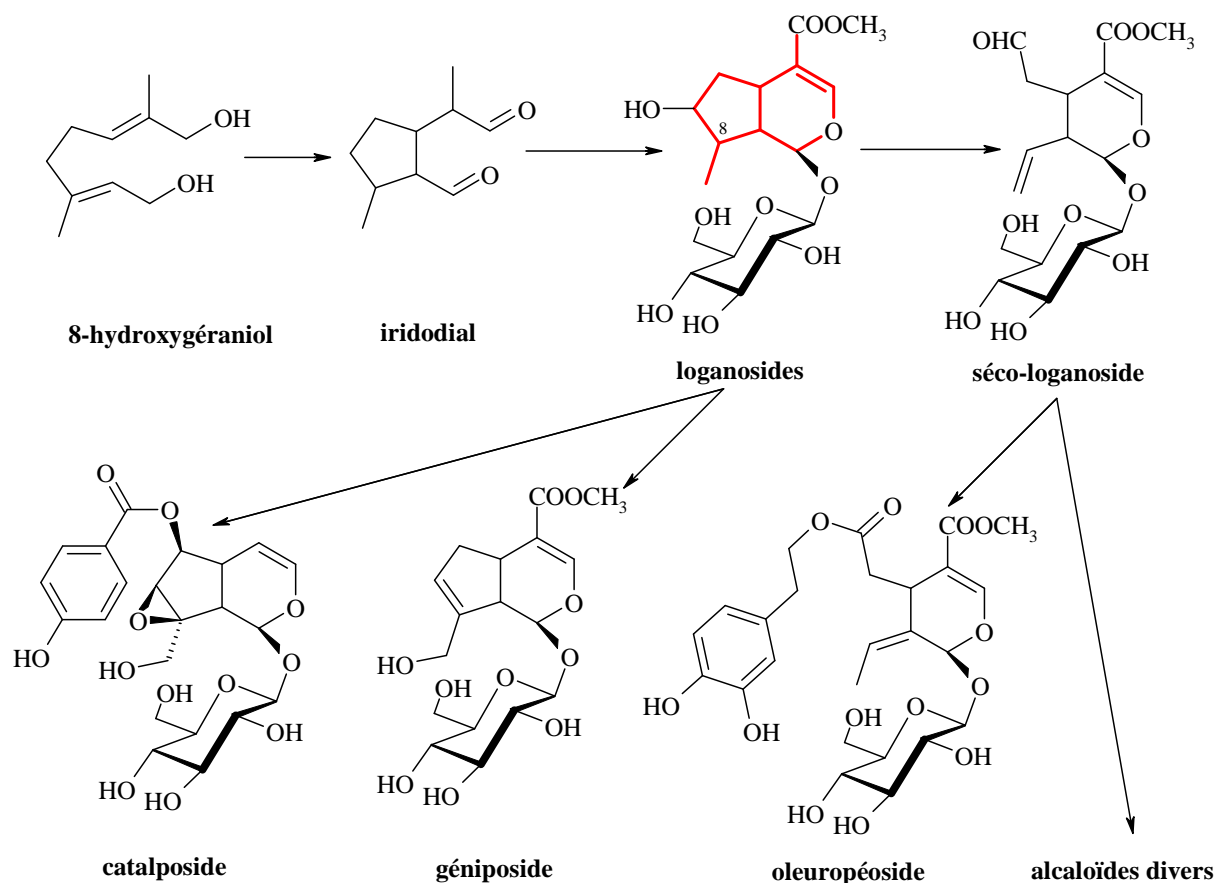


Fig.12. Quelques iridoïdes antioxydants et leurs précurseurs : le 8-hydroxygéraniol est oxydé et cyclisé en iridodial et en son épimère en 8, qui donneront le loganoside et le 8-*epi*-loganoside, précurseurs de nombreux iridoïdes *stricto sensu* (catalposide, géniposide), mais également du séco-loganoside, qui est à l'origine des séco-iridoïdes (oleuroposide) et de nombreux alcaloïdes d'intérêt. Le squelette iridane apparaît en **rouge dans la structure du loganoside.**

1.3.6.2.2. Diterpènes

Les diterpènes forment une classe très vaste de molécules issues du géranylgeranyl-pyrophosphate. Ils sont rencontrés essentiellement chez les végétaux, préférentiellement dans certaines familles comme les Astéracées, même si quelques uns sont ubiquitaires, comme les gibberellines, qui jouent le rôle d'hormones végétales. Leurs structures sont très variables, ils peuvent être linéaires ou contenir un ou plusieurs cycles. Ils sont apolaires. Parmi les intérêts des diterpènes on notera la forte toxicité de certains d'entre eux, qui en fait parfois des pistes intéressantes pour la recherche d'agents anticancéreux, comme ce fut le cas pour le taxol (fig.13) de l'if américain (*Taxus brevifolia* Nutt., Taxacées). Le stévioside (fig.13), un diterpène de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteracées), présente des propriétés édulcorantes

(Bruneton 1999), qui ont quelque peu refait parler d'elles à causes de nouvelles suspicions sur la toxicité de l'aspartame (Soffriti 2006).

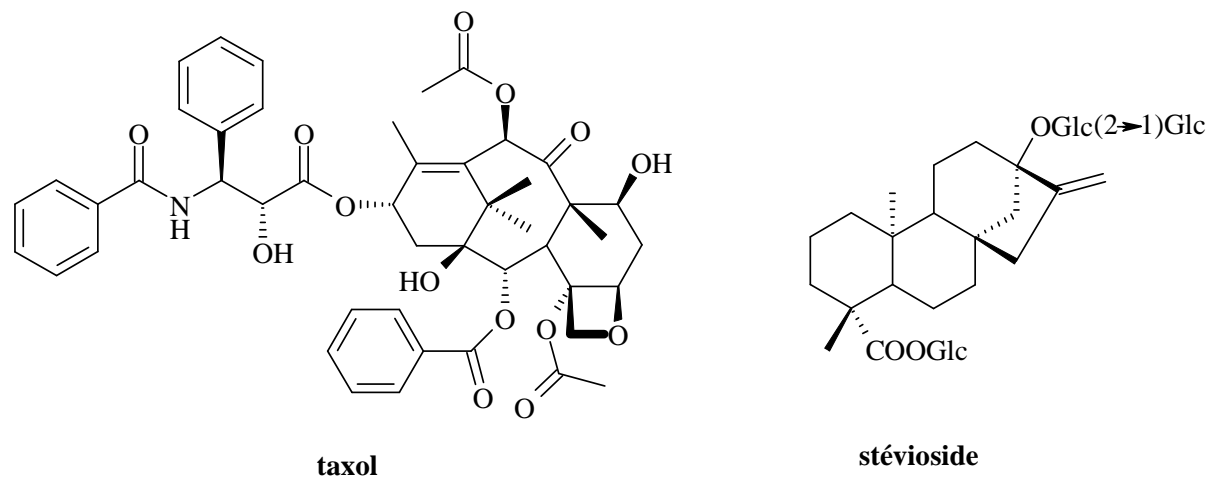


Fig.13. Structure du taxol et du stéviolside

Enfin, si les diterpènes ne sont pas, par nature, antioxydants, la présence de groupements phénoliques explique l'efficacité de certains diterpènes du romarin comme le rosmanol (fig.5), qui sont utilisés comme conservateurs dans l'industrie agroalimentaire.

II. Etude de plantes potentiellement productrices d'antioxydants

Nous avons été amenés à identifier plusieurs composés chez diverses plantes, assez proches dans la classification systématique botanique, appartenant à la famille des Lamiacées (et en l'occurrence à la sous famille des Lamioïdées : genres *Ballota*, *Marrubium*) et à celle des Verbénacées (genre *Lippia*). Ces deux familles font partie de l'ordre des Lamiales. La recherche de composés antioxydants a été le premier critère pour la recherche de molécules dans ces plantes, et un test sur CCM utilisant le radical libre DPPH (cf. partie expérimentale) a été pour cela la méthode de choix. Cependant, nous verrons que des composés ne détruisant pas le DPPH ont été isolés, afin de compléter la connaissance des plantes étudiées. Par la suite, plusieurs tests ont été réalisés afin de quantifier l'activité des produits purs : dosage de l'inhibition vis-à-vis du radical DPPH en solution, captage du radical-anion superoxyde en modèles acellulaire et cellulaire et inhibition de la peroxydation des LDL induite par le cuivre. L'espèce *Lippia alba* a fait l'objet d'investigations particulières, qui seront détaillés plus loin.

2.1. Les Lamiales

2.1.1. Place dans la classification systématique botanique

La place des Lamiales dans la classification systématique botanique APG II (*Angiosperm Phylogeny Group*) est la suivante (APG II 2002, Guignard 2001, Bray 2005) :

- Embranchement des Spermaphytes (plantes à graines), encore appelés Phanérogames
- Sous-embranchement des Angiospermes (graines protégées) ou plantes à fleurs
- Clade des Eudicotylédones (*Eudicots*) ou dicotylédones vraies : plantes à grains de pollen tri-apertirés ou d'un type dérivé, toujours dicotylédonées, toujours sans cellule à essence dans les tissus parenchymateux.
- Clade des Eudicotylédones centrales (*Core Eudicots*) : plantes ne combinant pas à la fois la production d'alcaloïdes et une placentation marginale (contrairement aux Eudicotylédones basales), à fleurs ayant des caractères apomorphiques (évolués) : périanthe souvent hétérochlamydé (c'est-à-dire composé d'une corolle et d'un calice différenciés), soudure des pièces, disposition verticillée, pentamérie, parfois apétalie. Les étamines ne sont jamais laminées, le filet des anthères est généralement bien différencié. La placentation est rarement marginale, souvent axile ou pariétale, moins

souvent basale ou apicale. Elles sont très souvent productrices de tanins, de bétalaïnes, d'huiles sinapiques ou de composés iridoïdiques.

- Classe des Asteropsida ou grade des Asterideae : plantes à ovules ordinairement tenuinucellés et à fleurs gamopétales, moins fréquemment dialypétales ; étamines généralement isomères des lobes de la corolle ou moins nombreuses, verticille d'étamines le plus externe toujours alterne des pétales ; ovaire supère ou infère, ovules fréquemment unitéguminés, parfois bitéguminés, ovules crassinucellés et bitéguminés extrêmement rares, placentation axile ou pariétale ; semences albuminées ou fréquemment exalbuminées ; composés iridoïdiques ou d'autres sortes de répulsifs fréquents, tanins rares, bétalaïnes et huiles sinapiques absentes.
- Groupe des Euastéridées I, caractérisé par une sympétalie tardive et des fleurs assez régulières à préfloraison tordue ou valvaire éventuellement tétracycliques.
- Super-ordre des Lamianeae, qui regroupe Gentianales, Lamiales, Solanales et des familles telles que les Borraginacées.

L'ordre des Lamiales est homogène, nettement monophylétique. Au niveau chimique, il est caractérisé par la présence d'oligosaccharides, tels que le plantéose, qui constituent les réserves de la plante à la place de l'amidon, ainsi que de flavones oxygénés en 6. L'ovaire supère contient une forte proportion d'arabinose dans sa paroi. D'un point de vue morphologique, on note la présence fréquente de stomates diacytiques (entourés d'une ou de plusieurs paires de cellules subsidiaires dont les parois communes forment un angle droit avec les cellules de garde), des embryons de type « onagre » (variante *Veronica*), un albumen muni de suçoirs apparents à chaque extrémité. Les analyses génomiques ont, elles, pu montrer une cohérence dans les sites de restriction de l'ADN chloroplastique et dans les séquences *rbcL* et *atpB*. La fleur peut être actinomorphe (Oléacées, Tétrachondracées, probablement à la base de l'ordre ; Buddlejacées secondairement actinomorphes) ou le plus souvent zygomorphe. Dans ce dernier cas, elle est généralement de type 2/3 (deux lobes supérieurs, trois lobes inférieurs). L'ordre comprend environ 17800 espèces, regroupées en vingt familles (Judd 2002, Guignard 2001).

2.1.2. La famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées est composée de 258 genres et 6970 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres, à tige quadrangulaire et à inflorescences verticillées. Les feuilles sont généralement

opposées ou verticillées, simples ou très rarement pennatiséquées; il n'y a pas de stipule. Les fleurs sont bisexuées et zygomorphes, les inflorescences sont en cymes bipares puis unipares (par manque de place). Le calice est synsépale, typiquement 5-mère, parfois bilabié et porte 5 à 15 nervures protubérantes. La corolle est sympétale et typiquement bilabée, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant la lèvre inférieure. L'androcée peut consister soit en quatre étamines didynames, soit en seulement deux étamines soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes. Le gynécée consiste en un ovaire composé de deux carpelles soudés avec fausse cloison et style terminal à gynobasique ; à l'extrémité des styles, les stigmates sont petits et peu apparents. Un disque nectarifère hypogyne et souvent asymétrique est généralement présent entre les étamines et l'ovaire. Le fruit est une drupe avec 1 à 4 noyaux, une gousse indéhiscente à quatre graines ou un schizocarpe (tétrakène lisse) pouvant rarement avoir un aspect charnu ou drupacé. On note le caractère aromatique des plantes de cette famille, la plupart étant riches en huile essentielle (Carr 2004, Guignard 2001). La sous-famille des Lamioïdées est un groupe monophylétique, établi par la constatation de similitudes dans les caractères de l'ADN de différents genres tels que *Lamium*, *Stachys*, *Galeopsis* (Jude 2002). Les genres *Ballota* et *Marrubium* appartiennent tous deux à cette sous-famille.

A. Le genre *Marrubium* et l'espèce *Marrubium peregrinum* L.

1. Aspects botaniques

1.1. Caractéristiques du genre *Marrubium*

Le genre *Marrubium* représente 35 espèces de plantes vivaces répandues dans une grande partie du globe.

Le calice est tubuleux, à dix stries et cinq à douze dents dressées ou recourbées, non spinescentes. La corolle comprend un tube inclus, une lèvre supérieure dressée, bilobée et presque plane et une lèvre inférieure à trois lobes étalés (le médian étant plus grand). Ici les quatre étamines sont toutes de même longueur (courtes) et sont incluses dans le tube de la corolle. Leurs anthères sont à loges complètement divariquées et opposées bout à bout et toutes fertiles. Le style est également inclus, à lobes courts, égaux, obtus. Comme dans le genre *Ballota*, les carpelles sont arrondis.

Les fleurs sont blanches, petites, disposées en verticilles axillaires, munies de bractéoles. Les feuilles sont crénelées-dentées, rugueuses-réticulées. L'aspect général de la plante est tomenteux, laineux (Coste 1998).

1.2. *Marrubium peregrinum*

Caractères morphologiques

Marrubium peregrinum L. est une plante vivace de trente à quatre-vingts centimètres de haut, odorante et d'aspect tomenteux, à tiges épaisses et rameuses, à feuilles oblongues et dentées, sillonnées-ridées, brièvement tomenteuses-blanchâtres (photo 1).

Ses fleurs blanches sont rapprochées du sommet des rameaux, rassemblées en verticilles peu nombreux, pauciflores. On remarque des bractéoles linéaires, velues (contrairement à *Marrubium vulgare*), appliquées, plus courtes que le calice. Celui-ci a cinq dents égales, lancéolées en alène, tomenteuses, dressées, trois fois plus courtes que le tube (Coste 1998).

D'un point de vue microscopique, on a décrit des poils dont la paroi est constituée de deux rangées de cellules, entourés d'un anneau de poils plus petits (Baher Nik 2004).

Répartition géographique

M. peregrinum est une plante des décombres et des bords de chemins. Elle croît en Europe centrale et orientale, en Asie occidentale et en Afrique du Nord. En France, on peut la trouver dans le département des Bouches-du-Rhône, de juillet à septembre (Coste 1998).



Photo 1. *Marrubium peregrinum* L.

Synonymie

A notre connaissance, deux synonymes existent : *Marrubium creticum* Mill. (Coste 1998) et *Marrubium praecox* Janka.

2. Travaux antérieurs sur *Marrubium peregrinum*

2.1. Composition chimique

2.1.1. Huile essentielle

L'espèce *Marrubium peregrinum* semble, comme toutes les autres espèces du genre *Marrubium*, assez pauvre en huile essentielle.

En Grèce, la teneur en huile essentielle de *M. peregrinum* a été évaluée à 0,07 % sur deux échantillons. L'huile essentielle était majoritairement composée d'hydrocarbures sesquiterpéniques (73 et 65%). Les constituants majoritaires sont le (*Z*)- β -farnésène (16,5 et 12,0%) et le (*E*)- β -farnésène (24,2 et 21,5%). Deux autres composés étaient présents en quantités plus variables selon l'échantillon : l'épi-bicyclosoequiphellandrène (3,5 à 12,3%) et le bicyclogermacrène (4,8 à 11,0%) (Lazari 1999).

On rapporte également l'étude de l'huile essentielle d'un échantillon originaire d'Europe centrale, qui avait pour constituants majoritaires le β -caryophyllène et son oxyde, le bicyclogermacrène et le germacrène D (Nagy 1998, cité par Lazari 1999 et Baher Nik 2004) (fig.14).

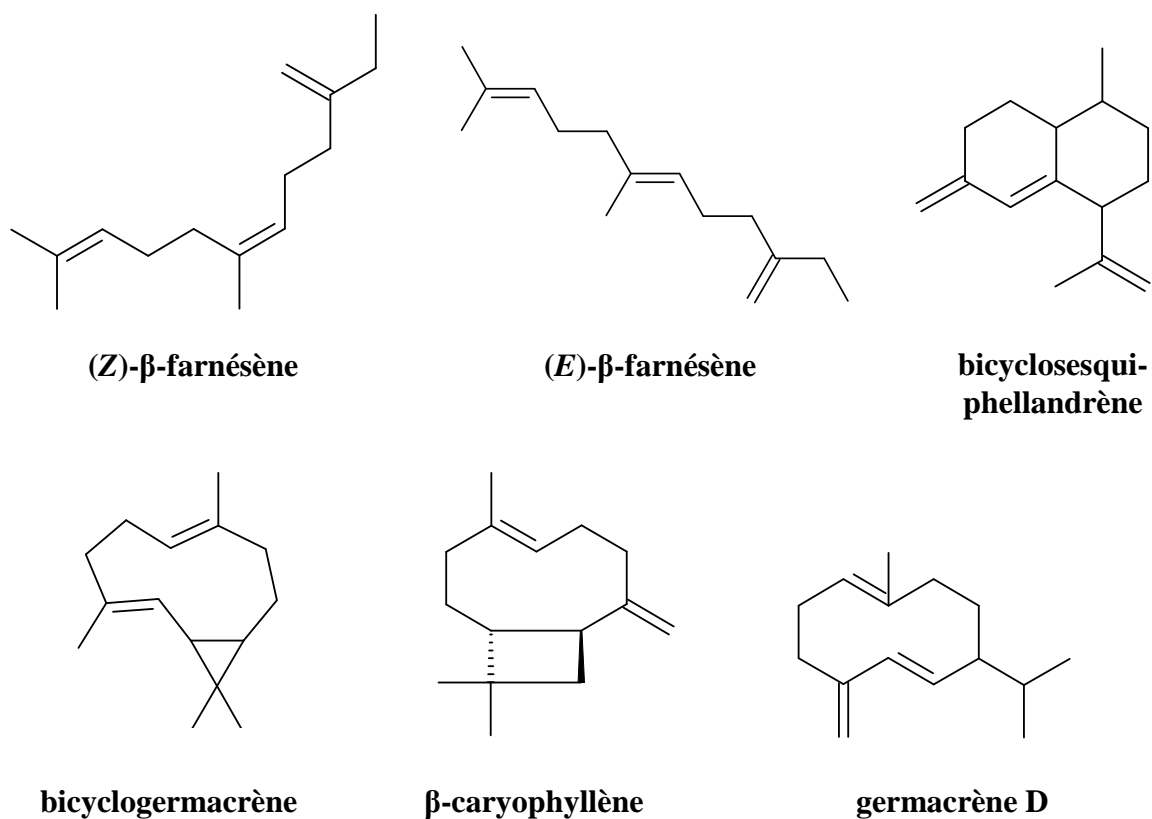


Fig.14. Principaux composés rencontrés dans l'huile essentielle de *Marrubium peregrinum*

2.1.2. Diterpènes

Deux diterpènes majoritaires sont rapportés dans la littérature : la pérégrinine et le pérégrinol (Salei 1967, 1968, 1970). Plus récemment, en Hongrie, on a plutôt déterminé comme constituants principaux la marrubiine et la prémarrubiine (Telek 1997) (fig.15). On sait que la prémarrubiine est le précurseur biologique de la marrubiine (Knöss 1997) et que l'obtention de l'un ou de l'autre de ces composés peut dépendre des conditions d'extraction (Laonigro 1979).

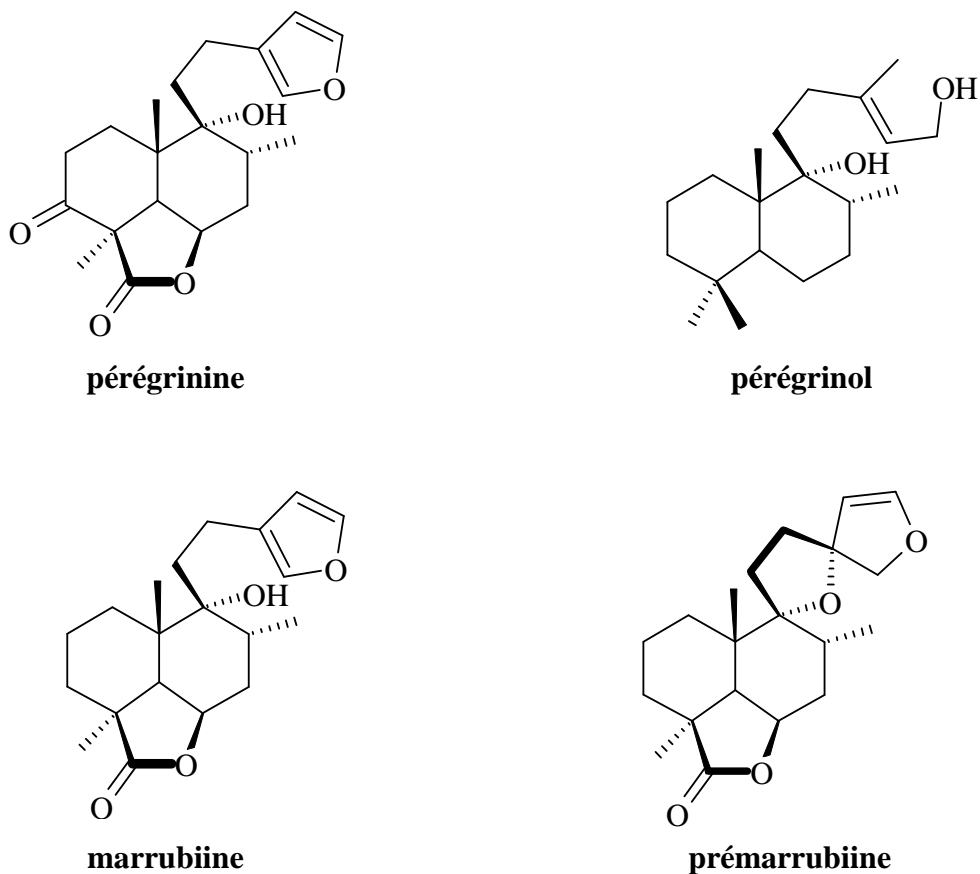


Fig.15. Structures des quatre diterpènes isolés de *Marrubium peregrinum*

2.1.3. Stérols

Un stérol courant a été isolé. Il s'agit du β -sitostérol (fig.16) (Salei 1967)

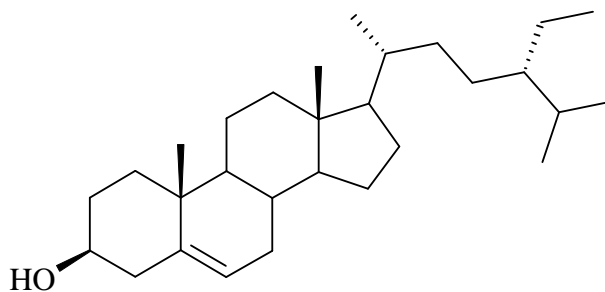


Fig.16. Structure du β -sitostérol

2.1.4. Flavonoïdes

Sept composés ont été isolés jusqu'à aujourd'hui :

- Trois génines : l'apigénine, le kaempférol (Nagy 1996) et la 5,6,7,4'-tétraméthoxyflavone (fig.17) (Salei 1972)

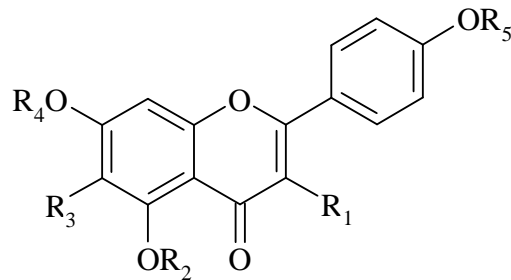


Fig.17. Structure chimique des génines de flavonoïdes isolées de *Marrubium peregrinum* : apigénine (R₁=R₂=R₃=R₄=R₅=H), kaempférol (R₁=OH, R₂=R₃=R₄=R₅=H) et 5,6,7,4'-tétraméthoxyflavone (R₁=H, R₃=OCH₃, R₂=R₄=R₅=CH₃)

- deux hétérosides : l'apigénine-7-glucoside et le lutéolol-7-glucoside (fig.18) (Nagy 1996).

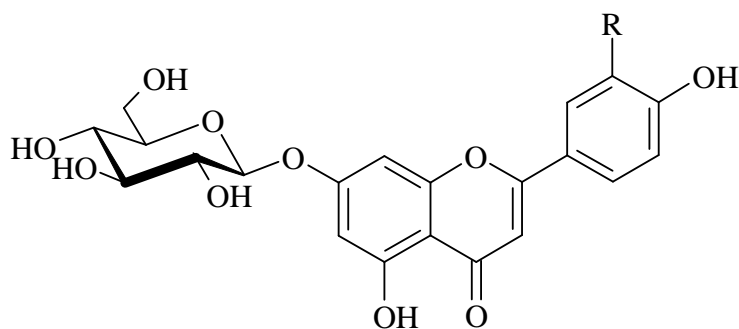


Fig.18. Structure chimique des deux hétérosides flavoniques isolés de *Marrubium peregrinum* : apigénine-7-glucoside (R=H) et lutéolol-7-glucoside (R=OH)

2.1.5. Phénylpropanoïdes

Un seul phénylpropanoïde a été isolé : l'actéoside ou verbascoside (Nagy 1996) (fig.19).

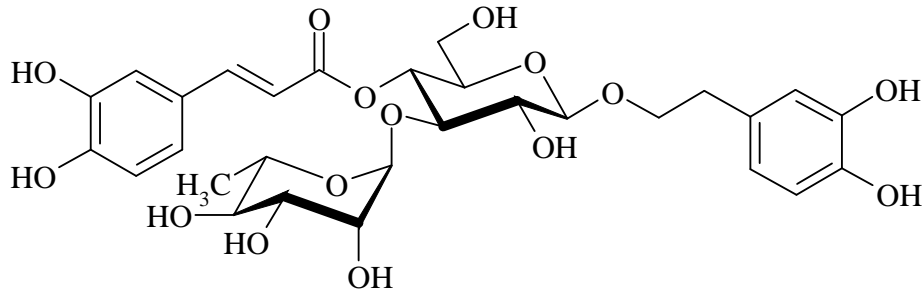


Fig.19. Structure de l'actéoside

2.2. Essais pharmacologiques

Les activités antilipopéroxydatives du kaempférol, de l'apigénine, de l'apigénin-7-glucoside, du lutéolol-7-glucoside et du verbascoside isolés de *M. peregrinum* ont été testées *in vitro* sur des liposomes de cerveau de rat et comparés à celle de la stobadine (Nagy 1996). Nous n'avons malheureusement pas pu nous procurer les résultats exacts de ces essais.

3. Travaux personnels

Les travaux personnels présentés ici ont consisté en l'isolement et l'identification de neuf composés des extraits dichlorométhanique, méthanolique et hydrométhanolique de *Marrubium peregrinum*. Ces composés présentent tous des structures apparentées à ceux déjà isolés de l'espèce et deux d'entre eux (les composés **1** et **5**) avaient déjà été obtenus à partir de *M. peregrinum* (Salei 1972, Telek 1997).

3.1. Isolement des composés

Le schéma 1 présente la démarche suivie pour l'isolement des composés **1-9**.

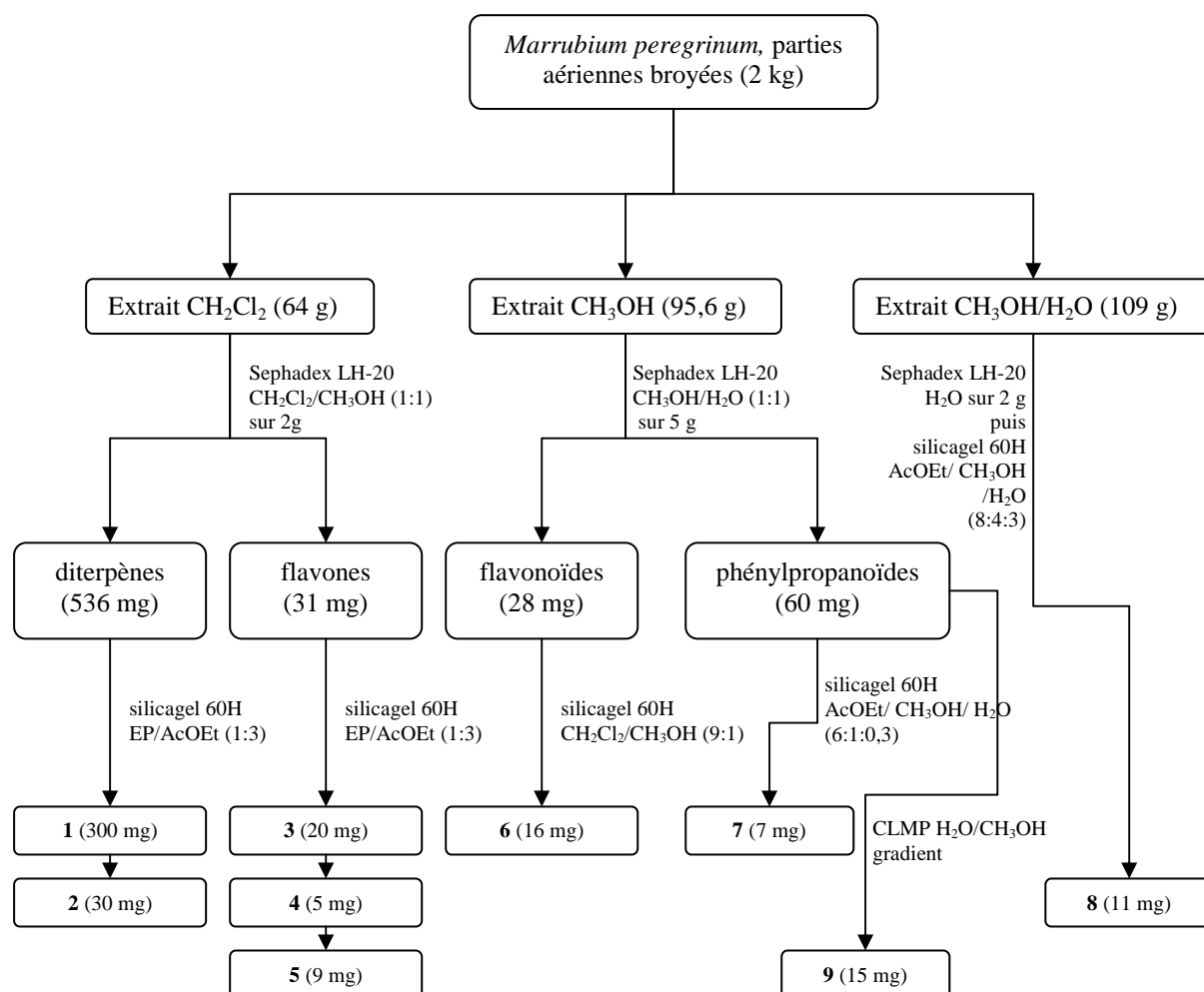


Schéma 1. Isolement des quatre composés obtenus à partir des parties aériennes de *Marrubium peregrinum*

3.2. Identification des composés

Diterpènes

Composé 1

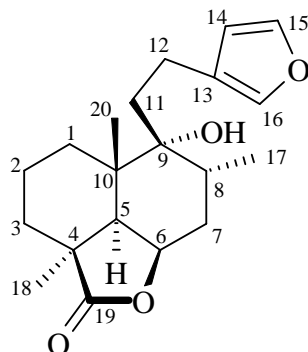


Fig.20. Composé 1

L'analyse du composé **1** (fig.20) par impact électronique en spectrométrie de masse (SM-IE) montre un ion moléculaire ayant un m/z de 332, ce qui est compatible avec la formule brute $C_{20}H_{28}O_4$. Ceci est confirmé par l'analyse élémentaire d'un échantillon (C=72,29% ; H=8,82% ; O=18,59%).

Le spectre RMN du ^{13}C J -modulé confirme la présence de 20 carbones. Les informations supplémentaires fournies par l'expérience de corrélation directe 1H - ^{13}C , HSQC, permettent de distinguer six carbones secondaires et cinq quaternaires.

Neuf signaux peuvent quant à eux provenir de carbones primaires ou tertiaires. Parmi eux, trois ont des déplacements chimiques caractéristiques indiquant qu'il s'agit de méthyles (δ 16,7 ; δ 22,3 ; δ 23,0) et deux correspondent à des carbones tertiaires aliphatiques (δ 32,4 ; δ 44,9).

La présence d'un cycle γ -lactonique, visualisée sur CCM par la vanilline sulfurique se traduit, au niveau du spectre RMN du ^{13}C , par la présence d'un signal très déblindé (δ 183,9) correspondant au CO de la lactone (C19). La présence d'un tel cycle permet également d'expliquer le déplacement chimique du carbone tertiaire à δ 76,3 : ce signal est attribué au carbone 6, lié à l'oxygène alcoolique de la lactone.

Le déplacement vers les champs faibles de quatre signaux (un quaternaire et trois tertiaires) indique la présence d'un système aromatique, qu'on détermine comme étant un furane par comparaison avec les déplacements chimiques des carbones correspondant à ce noyau dans le 3-méthylfurane (tableau 1) (SDBS) et dans plusieurs diterpènes labdaniques, dont la pérégrinine, trouvés dans la littérature (Dellagrecia 2000, Khalil 1996). Les signaux des carbones 13, 14, 15 et 16 sont ainsi attribués. La présence d'un cycle aromatique (furanique) est également visible au niveau du spectre de RMN du ^1H (fig.21) au-delà de 6 ppm.

Tableau 1. Comparaison des déplacements chimiques en RMN du ^1H et du ^{13}C (CDCl_3) du cycle furanique du composé **1** (300 et 75 MHz) avec le 3-méthylfurane (90 et 50 MHz).

Atomes composé 1/ 3-méthylfurane		13/3	14/4	15/5	16/2
Type de carbone		quaternaire	primaire	primaire	primaire
^1H	composé 1	-	6,30	7,36	7,21
	3-méthylfurane	-	6,21	7,30	7,17
^{13}C	composé 1	125,1	110,8	143,2	138,7
	3-méthylfurane	119,8	112,2	142,7	139,3

Les signaux de plusieurs carbones peuvent également être attribués sur la base de la comparaison avec les données de la pérégrinine : C5 (δ 44,9), C7 (δ 31,6), C8 (δ 32,4), C9 (δ 75,8 ; déblindé par un hydroxyle), C10 (δ 39,8), ainsi qu'un groupe méthyle (C17, δ 16,7).

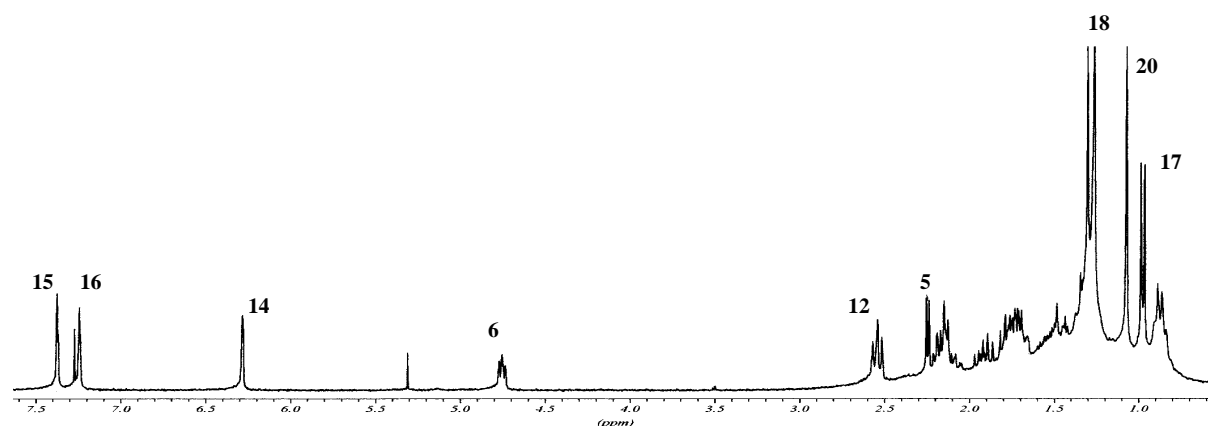


Fig.21. Spectre de RMN du ^1H du composé **1** à 300 MHz dans CDCl_3

L'expérience HMBC s'avère d'une grande utilité pour reconstituer le squelette de la molécule. En prenant comme points de départ le cycle lactonique et le cycle furanique, on peut déterminer une grande partie de la structure du composé **1** (fig.22). L'enchaînement des groupes méthylènes 1, 2 et 3 est déterminé par COSY.

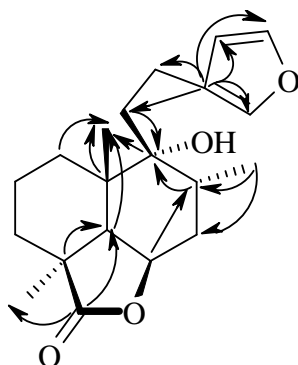


Fig.22. Corrélations HMBC choisies du composé 1 (C→H)

La structure du composé **1** peut ainsi être établie comme celle du 9 α -hydroxy-15,16-époxyabda-13(16),14-diène-6 β ,19-olide ou marrubiine, principe amer historiquement issu de *Marrubium vulgare*, progressivement identifié et dont la structure a été définitivement établie par Cocker (1953). Elle avait déjà été isolée de *M. peregrinum* (Telek 1997). Les attributions de tous les signaux des spectres du proton et du carbone sont présentées dans le tableau 2, avec ceux de la marrubiine de référence (Knöss 1998).

De nombreux travaux ont déjà porté sur la stéréochimie de la marrubiine (Stephens 1970). Elle a été déterminée comme représenté sur la figure 20. Elle appartient à la série normale des diterpènes labdaniques, par opposition à la série *ent* (énantio) dans laquelle la configuration des carbones 4, 5, 6, 9 et 10 est inversée. Son pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D = +35,5^\circ$ à 20°C.

Tableau 2. RMN du ^{13}C et du ^1H du composé **1** et de la marrubiine dans CDCl_3 .

	RMN du ^{13}C (δ)		RMN du ^1H (δ , J en Hz)	
	marrubiine (125 MHz)	composé 1 (75 MHz)	marrubiine (500 MHz)	composé 1 (300 MHz)
1	28,7	28,7	1,29 m et 1,68 m	1,29 m et 1,68 m
2	18,2	18,2	1,50 m et 1,72 m	1,50 m et 1,74 m
3	28,4	28,4	1,43 m et 2,11 m	1,45 m et 2,11 m
4	43,8	43,8	-	-
5	44,9	44,9	2,21 d (5Hz)	2,22 d (5Hz)
6	76,2	76,3	4,72 t (5Hz)	4,75 t (5Hz)
7	31,6	31,6	1,68 m et 2,13 m	1,68 m et 2,13 m
8	32,4	32,4	2,12 m	2,12 m
9	75,8	75,8	-	-
10	39,8	39,8	-	-
11	35,2	35,2	1,74 m et 1,88 m	1,75 m et 1,90 m
12	21,0	21,1	2,51 m	2,55 t
13	125,0	125,1	-	-
14	110,7	110,8	6,25 s	6,30 s
15	143,1	143,2	7,34 s	7,36 s
16	138,6	138,7	7,21 s	7,21 s
17	16,6	16,7	0,95 d (6,5Hz)	0,96 d (6,5Hz)
18	23,0	23,0	1,27 s	1,27 s
19	183,8	183,9	-	-
20	22,3	22,3	1,04 s	1,08 s

Composé 2

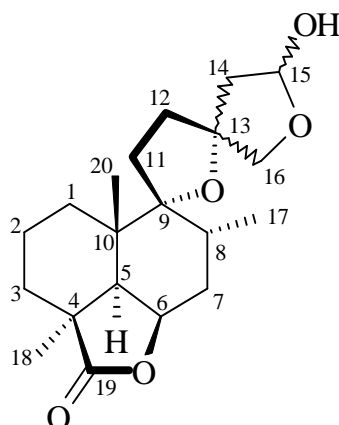


Fig.23. Composé 2

L'analyse du composé **2** (fig.23) par SM-IE montre un ion moléculaire de rapport m/z de 350, ce qui est compatible avec la formule brute $C_{20}H_{30}O_5$.

Au niveau du spectre RMN du ^{13}C J -modulé, on peut observer que certains pics apparaissent dédoublés, ce qui rend difficile la confirmation du nombre de carbones présents dans la molécule. Le même phénomène est observable dans le spectre RMN du 1H , au niveau des deux doublets situés à δ 3,72 et δ 4,23 : on peut voir un doublet plus petit, plus blindé de 0,1 ppm à côté de chaque signal. Ces phénomènes permettent d'envisager la présence de plusieurs stéréo-isomères en quantités inégales, non séparables par les méthodes chromatographiques les plus couramment utilisées et apparaissant donc sous la forme d'une seule tache sur CCM.

En RMN du ^{13}C , la concordance de nombreux signaux avec ceux du composé **1** (les carbones 1 à 8, ainsi que 10, 17, 18 et 19 ont des déplacements chimiques différents de moins d'un ppm dans les deux molécules) montre que la structure du composé **2** est très proche de celle de la marrubiine, avec deux cycles saturés à six sommets accolés et le même cycle lactonique à cinq sommets.

La différence la plus notable par rapport à la marrubiine est l'absence complète de signaux aromatiques ou oléfiniques dans le composé **2**, ce qui exclut toute possibilité de présence d'un furane ou même d'un composé préfuranique porteur d'un noyau dihydrofuranique de type prémarrubiine ou prépérégrinine. En revanche, certains autres précurseurs labdaniques

hémiacétaliques, de structure de type spiro-éther, trouvés dans la littérature (Taşdemir 1997), semblent présenter des déplacements chimiques proches de ceux du composé **2**, au niveau des carbones 11 à 16 (cf. tableau 3 pour une confrontation des déplacements chimiques de ces carbones pour le composé **2** et pour un mélange léopersine O/15- *epi*-léopersine O).

Tableau 3. Comparaison des déplacements chimiques en RMN du ^1H (300 MHz, δ) et du ^{13}C (75 MHz, δ , J en Hz) de la partie non élucidée du composé **2** avec la même partie dans le mélange léopersine O/15-*epi*-léopersine O dans CDCl_3 .

	RMN du ^1H		RMN du ^{13}C	
	léopersine O et 15- <i>epi</i> -léopersine O	composé 2	léopersine O et 15- <i>epi</i> -léopersine O	composé 2
11	1,15-1,25 et 1,85-2,14	1,17 et 1,85-2,12	29,1 et 29,5	29,7/30,0
12	2,02-2,24 et 2,30	1,79-1,94 m	36,5 et 38,3	35,8
		1,95-2,15 m		35,0
		2,20 m		38,1
13	-	-	91,0 et 91,0	90,0 et 90,4
14	2,19-2,41 et 1,89-2,07	2,00-2,35 m	46,5 et 47,8	48,5
		2,02-2,34 m		46,5
15	5,67 dd (1Hz, 4Hz) et 5,19 m	5,65 d (4Hz)	98,9 et 99,0	98,7
		5,45 d (4Hz)		99,0
16	3,74 d (9Hz) et 4,27 d (9Hz)	3,72 d (9Hz), 4,23 d (9Hz)	76,7 et 78,1	77,0
		3,65 d (9Hz), 4,14 (9Hz)		77,6
		3,72 m, 3,99 s		77,9

L'attribution de tous les signaux en RMN du ^{13}C peut donc être réalisée par comparaison avec les valeurs trouvées pour la marrubiine et différents diterpènes hémiacétaliques dans la littérature. L'expérience HSQC permet la détermination du déplacement chimique correspondant à chaque atome d'hydrogène de la molécule en RMN du ^1H . L'expérience HMBC permet de confirmer toutes les attributions réalisées (fig.24).

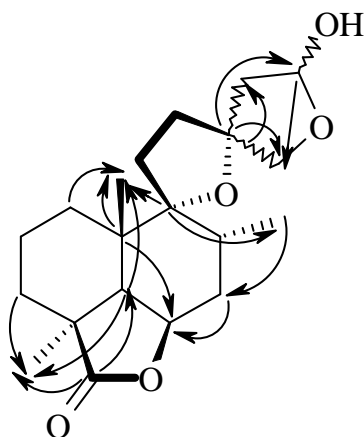


Fig.24. Corrélations HMBC choisies du composé 2 (C→H)

La structure du composé **2** peut ainsi être établie comme le 9,13 ; 15,16-diépoxy-labda-15-hydroxy-6,19-olide. Ce diterpène n'avait à la date de l'obtention de ce produit par nous été isolé que de *Marrubium vulgare* (Fulke 1968). Les auteurs avaient alors estimé que le produit était un mélange des deux stéréoisomères dus à la chiralité du carbone 13, justifiant leur raisonnement par le fait qu'une telle isomérisation avait été démontrée pour la prémarrubiine, qui appartient vraisemblablement à la même voie biosynthétique. Ils n'avaient pas pour autant complètement écarté la possibilité qu'une épimérie puisse exister en plus au niveau du carbone 15.

Ce diterpène hémiacétalique avait également été préparé par hémisynthèse à partir de la marrubiine (Laonigro 1979). La méthode utilisée avait alors permis d'obtenir séparément les deux stéréoisomères en C13 de la molécule. Les auteurs ont eux aussi considéré que chaque produit devait être un mélange de deux épimères en C15.

Plus récemment, cette molécule a été isolée de *Marrubium cylleneum*. A l'aide de l'expérience ROESY, les auteurs de la publication ont établi pour leur part une isomérisation en C15 mais pas en C13. Les auteurs de la publication concernée ont donné les noms de cyllénine A et 15-*epi*-cyllénine A aux deux isomères en mélange (Karioti 2005).

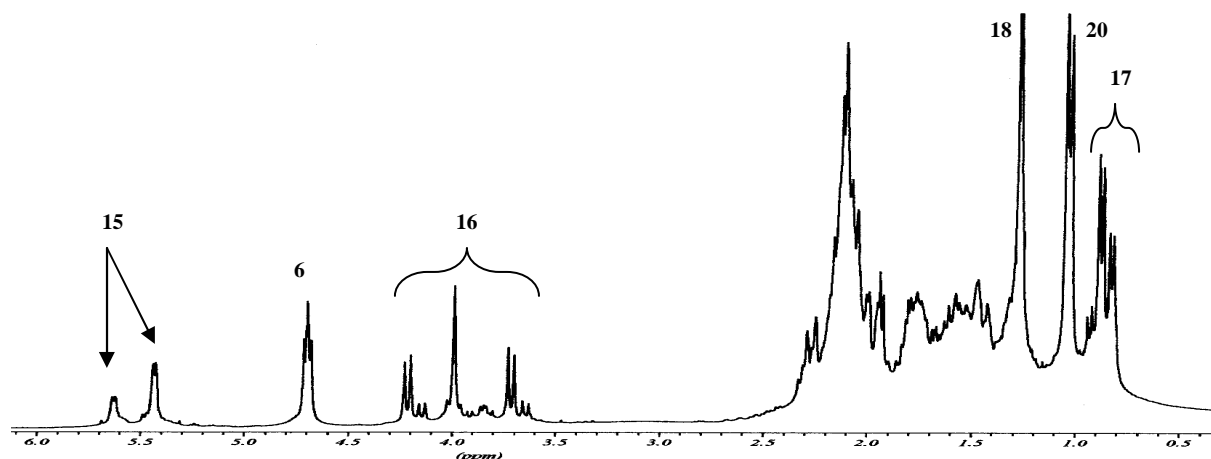


Fig.25. Spectre de RMN du ^1H du composé **2** à 300 MHz dans CDCl_3

Nous n'avons malheureusement pas pu réaliser l'expérience ROESY sur le composé **2** avant dégradation. Dans le cas de ce travail, aucune certitude n'est possible concernant les configurations des carbones 13 et 15. Néanmoins, on peut affirmer :

- que les dédoublements de signaux dans les spectres du ^1H (fig. 25) et du ^{13}C montrent qu'on n'a pas ici un diastéréoisomère pur.
- que certains signaux proches des centres d'asymétrie semblent plus complexes encore que ne pourrait l'expliquer une seule paire d'énantiomères. Les signaux attribués aux hydrogènes en 16 et 17 sont nombreux et correspondent à la somme de tous ceux décrits pour les deux couples d'énantiomères, en 13 et en 15. Par exemple pour le méthyle en 17 on observe trois doublets de taille inégale à δ 0,82, 0,89 et 0,93, tous de même constante de couplage (6 Hz). Pour le couple d'énantiomères en 15, on a deux doublets : à δ 0,81 ($J=6,1$ Hz) et δ 0,86, ($J=6,2$ Hz) (Karioti 2005), pour les deux énantiomères en 13 les mêmes doublets sont décrits à δ 0,89 et δ 0,95 ($J=6$ Hz) (Laonigro 1979). On peut également noter que le signal observable à δ 3,99, dont il était difficile jusque là de déterminer avec certitude l'attribution semble, par comparaison avec le mélange d'isomères en C15, correspondre au proton 16, de même que les quatre signaux décrits plus haut.

Il est donc probable que la molécule isolée de *Marrubium peregrinum*, dont les déplacements chimiques sont présentés dans le tableau 4, soit composée de quatre diastéréoisomères : (13*R*, 15*R*), (13*R*, 15*S*), (13*S*, 15*R*) et (13*S*, 15*S*).

Tableau 4. RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) du composé **2** dans CDCl_3 .

	^1H	^{13}C
1	1,36 et 1,60 m	28,4/29,0*
2	1,53 et 1,78 m	17,6/18,2*
3	1,48 et 2,16 m	27,6/27,7*
4	-	43,8
5	2,18 m	46,5
6	4,72 t (6Hz)	75,5, 76,0
7	1,70 m	32,2
8	2,10 m	31,6
9	-	91,3
10	-	38,2/39,0*
11	1,17 et 1,85-2,12 m	29,7/30,0*
12	1,79-1,94 m	35,8
	1,95-2,15 m	35,0
	2,20 m	38,1
13	-	90,0 et 90,4
14	2,00-2,35 m	48,5
	2,02-2,34 m	46,5
15	5,65 d (4Hz)	98,7
	5,45 d (4Hz)	99,0
16	3,72 d (9Hz), 4,23 d (9Hz)	77,0
	3,65 d (9Hz), 4,14 (9Hz)	77,6
	3,72 m, 3,99 s	77,9
17	0,82 d (6Hz), 0,89 d (6Hz) et 0,93 d (6Hz)	16,8
18	1,27 sl	23,2/23,5*
19	-	183,1, 183,5
20	1,02 s	24,0
	1,05 s	22,6

* : attribution incomplète des correspondances exactes ^1H - ^{13}C (superposition)

Flavonoïdes

Composé 3

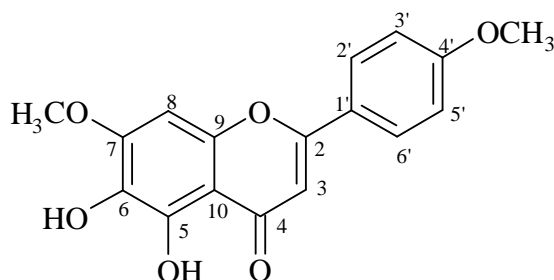


Fig.26. Composé 3

L'analyse par spectrométrie de masse *electrospray-ionspray* (SM-ESI) du composé **3** (fig.26) montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ ayant un rapport masse/charge (m/z) de 315 en ionisation positive, compatible avec la formule brute $C_{17}H_{14}O_6$. La fragmentométrie SM-SM permet de mettre en évidence la perte successive de deux fragments de 15 unités de masse atomique, ce qui laisse présager de la présence de deux méthyles dans la structure. Deux singulets intégrant chacun pour trois protons à δ 3,87 et 3,92 dans le spectre RMN du 1H ainsi que deux signaux à δ 56,05 et 56,78 correspondant à des carbones primaires dans celui du ^{13}C J -modulé indiquent que ces méthyles appartiennent en fait à deux groupements méthoxyles.

Dans le spectre RMN du 1H (fig.27), dans la région des aromatiques, les signaux à δ 7,12 (2H, d, $J=9$ Hz) et δ 8,06 (2H, d, $J=9$ Hz), formant un système AA'BB', montrent la présence d'un seul substituant sur le cycle B, en *para*, c'est-à-dire en position C4'. De plus, dans cette même région, seuls deux singulets sont visibles, à δ 6,90 (1H) et 6,94 (1H), ce qui suggère la trisubstitution du noyau benzo- γ -pyrone.

L'ensemble de ces données, ainsi que la comparaison des déplacements chimiques des signaux observés sur le spectre de RMN du ^{13}C du composé **3** avec ceux fournis par la littérature pour un flavonoïde déjà isolé de la plante, la 5,6,7,4'-tétraméthoxyflavone (5,6,7,4'-TMF), laisse présager une structure de type flavone tétrasubstituée par deux méthoxyles et deux hydroxyles (Agrawal 1989).

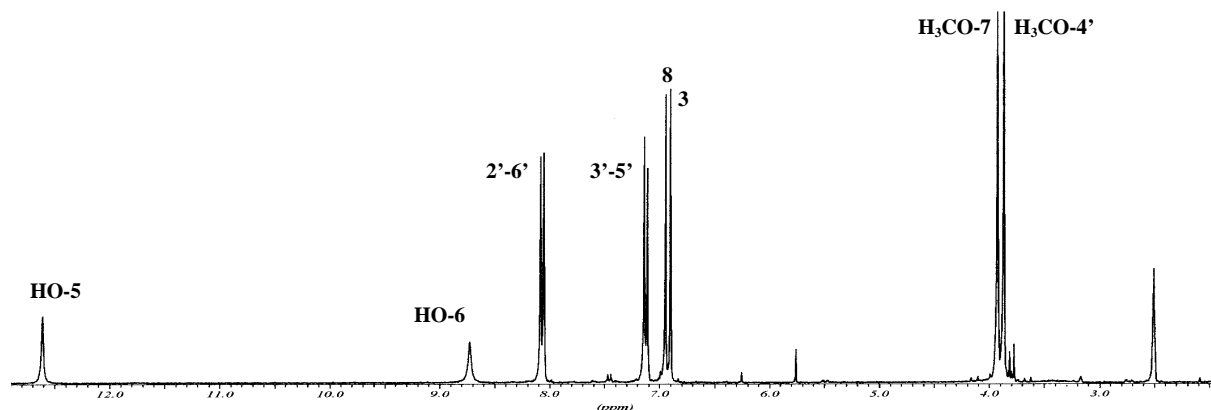


Fig.27. Spectre de RMN du ^1H du composé 3 à 300 MHz dans le DMSO- d_6

Cette hypothèse est confirmée par les spectres de RMN mono- et bidimensionnels (HSQC, HMBC). En particulier, l'expérience de corrélation ^1H - ^{13}C à distance, HMBC, montre la présence de groupements méthoxyles en 4' et en 7 et l'absence de substituants en 3 et en 8 (fig.28). Il est d'ailleurs important de préciser que les signaux observés ne suffisent pas à eux seuls pour affirmer si la position libre est en 6 ou en 8 : c'est plutôt l'absence de corrélation entre le carbone 5 et un proton qui nous indique que la position 6 est occupée. Les deux hydroxyles semblent donc positionnés en 5 et en 6. La présence d'un OH en 5 est confirmée par le déplacement chimique du carbone 4 (δ 182,69) : en effet, en l'absence d'un groupement OH en 5, le signal du C-4 est plus blindé d'environ 5 ppm par l'établissement d'une liaison hydrogène entre le groupement céto et un hydroxyle. De plus, le singulet observé à δ 12,6 en RMN du ^1H est assez typique d'un hydroxyle en 5, pour une flavone. Le deuxième hydroxyle est donc substitué en position 6 ; son signal est observable à δ 8,74 en RMN du ^1H .

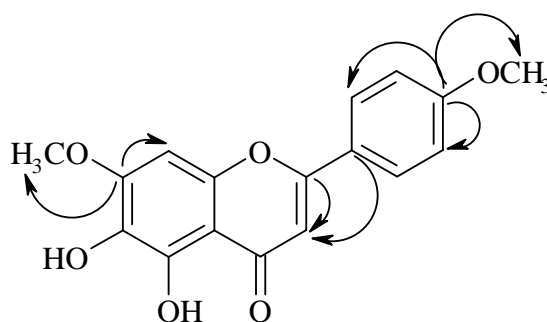


Fig.28. Corrélations HMBC choisies du composé 3 (C→H)

La position de tous les substituants sur la molécule et la structure définitive sont confirmées grâce à l'analyse des spectres de RMN bidimensionnelle.

La structure du composé **3** a été établie comme la 5,6-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone. C'est un composé connu, appelé ladanéine, qui a été synthétisé par Sastri dès 1946 et isolé pour la première fois dans le monde végétal de *Galeopsis ladanum* L. (Lamiacées) (Gritsenko 1969). Les attributions de tous ses signaux sont reportées dans le tableau 5 et confrontées à celles trouvées dans la littérature (Yang 1996).

Tableau 5. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **3** (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ) et de la ladanéine (400 MHz, δ , J en Hz ; 100 MHz, δ) dans le $\text{DMSO}-d_6$

	composé 3		ladanéine	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	-	163,8	-	163,6
3	6,90 s	103,6	6,91 s	103,4
4	-	182,7	-	182,4
5	-	146,6	-	149,9
6	-	130,4	-	130,3
7	-	154,9	-	154,7
8	6,94 s	91,7	6,87 s	91,4
9	-	150,1	-	146,5
10	-	105,6	-	105,6
1'	-	123,4	-	123,2
2'-6'	8,06 d (9Hz)	128,7	8,03 d (9,2Hz)	128,4
3'-5'	7,12 d (9 Hz)	115,0	7,10 d (9,2Hz)	114,8
4'	-	162,7	-	162,5
HO-5	12,60 s	-	12,59 s	-
HO-6	8,74 s	-	8,74 s	-
H₃CO-7	3,92 s	56,8	3,90 s	55,8 et 56,7
H₃CO-4'	3,87 s	56,1	3,84 s	

La confrontation de nos résultats avec ceux trouvés pour la ladanéine dans la littérature s'est avérée cohérente, mais l'attribution des protons 3 et 8 ainsi que celle des carbones 5 et 9 est inversée. Les cartes HSQC et HMBC, qui n'avaient pas été réalisées pour la détermination structurale de la ladanéine, semblent montrer que nos conclusions sont correctes.

Composé 4

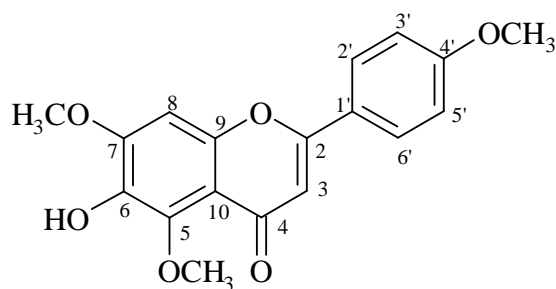


Fig.29. Composé 4

L'analyse du composé **4** (fig.29) par SM-ESI montre un ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ ayant un rapport m/z de 329 avec ionisation positive, ce qui est compatible avec la formule brute $C_{18}H_{16}O_6$. En fragmentométrie SM-SM, on observe clairement la perte de trois fragments de 15 unités de masse atomique chacun, ce qui traduit la présence de trois méthyles. Dans le spectre de RMN du 1H (fig.30), un singulet à δ 3,90 intégrant pour trois protons et un autre à δ 4,05 intégrant pour six protons montrent la présence de trois méthoxyles sur la molécule.

Comme pour le composé **3**, le spectre RMN du 1H (fig.30) montre deux doublets à δ 7,02 et δ 7,85 avec la même constante de couplage, 9 Hz (système AA'BB'), ce qui témoigne de la présence d'un seul substituant sur le cycle phényle en position *para*. Deux autres singlets à δ 6,60 et δ 6,85 correspondant aux hydrogènes aromatiques suggèrent la trisubstitution du noyau benzo- γ -pyrone.

Les fortes similitudes observées entre les spectres du composé **4** et du composé **3** (5,6-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavone) nous conduisent à envisager une structure de type flavone tétrasubstituée par trois méthoxyles et un hydroxyle.

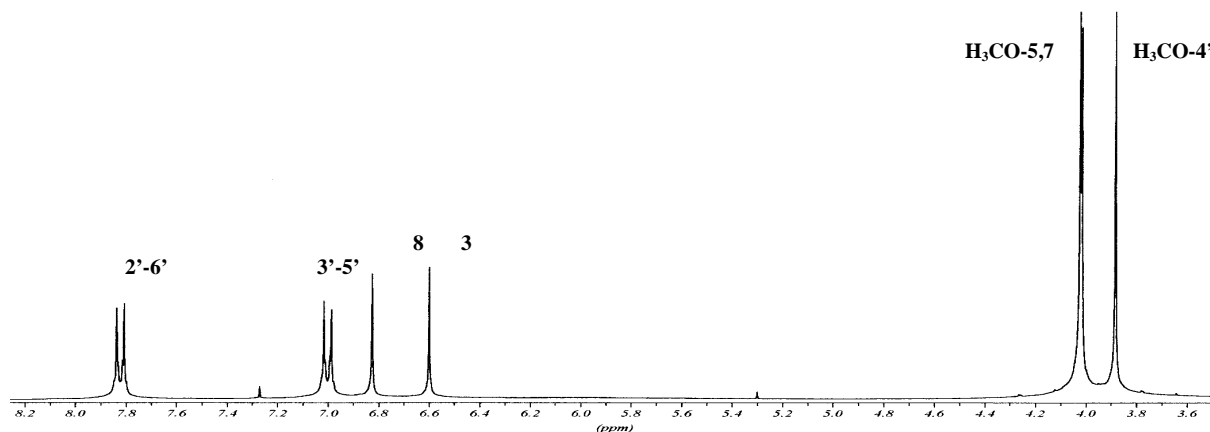


Fig.30. Spectre de RMN du ^1H du composé 4 à 300 MHz dans CDCl_3

Cette hypothèse est confirmée par les spectres de RMN mono- et bidimensionnels (HSQC, HMBC, ROESY). L'expérience HMBC montre la présence de groupements méthoxyles en 4' et en 7 et l'absence de substituants en 3 et en 8 (fig.31). Comme pour le composé précédent, c'est l'absence de corrélation d'un proton avec le carbone 5, plutôt qu'une corrélation particulière, qui nous montre que c'est la position 6 (et non pas 8) qui est substituée. La position du troisième méthoxyle en 5 est déduite du déplacement chimique du signal du carbone 4 (δ 177,1) ; en effet un hydroxyle en 5 entrainerait un déplacement vers les champs faibles du carbone 4 d'environ 5 ppm, comme c'était le cas pour le composé 3. Le groupement hydroxyle est donc substitué en C-6 ; son signal n'est pas observé dans le solvant utilisé (CDCl_3).

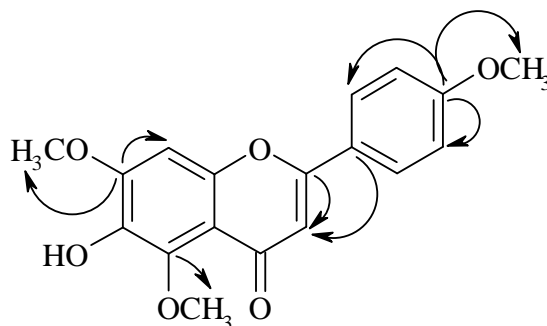


Fig.31. Corrélations HMBC choisies du composé 4 (C→H)

La structure du composé **4** a été ainsi établie comme la 6-hydroxy-5,7,4'-triméthoxyflavone. C'est un composé connu, synthétisé par Stout en 1964 et, à notre connaissance, rencontré pour la première fois en tant que composé naturel de *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. (Lamiacées) (Sumaryono 1991). Les attributions de tous les signaux des spectres du proton et du carbone du composé **4** sont présentées dans le tableau 6 avec les valeurs des déplacements chimiques trouvées dans la littérature pour le ^{13}C (Horie 1998).

Tableau 6. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **4** (CDCl_3 ; 300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ), RMN du ^{13}C de la 6-hydroxy-5,7,4'-triméthoxyflavone de référence ($\text{DMSO}-d_6$; 100 MHz, δ)

	composé 4		6-hydroxy-5,7,4'- triméthoxyflavone (^{13}C)
	^1H	^{13}C	
2	-	161,4	160,0
3	6,60 s	106,8	105,9
4	-	177,1	175,7
5	-	144,0	144,2
6	-	136,7	137,5
7	-	152,2	153,2
8	6,85 s	96,2	96,6
9	-	151,9	150,7
10	-	112,3	111,9
1'	-	123,9	123,2
2'-6'	7,85 d (9Hz)	127,6	127,6
3'-5'	7,02 d (9Hz)	114,4	114,4
4'	-	162,1	161,7
H₃CO-5	4,05 s	62,6	56,2 et 61,2
H₃CO-7	4,05 s	56,5	
H₃CO-4'	3,90 s	55,5	55,4

Composé 5

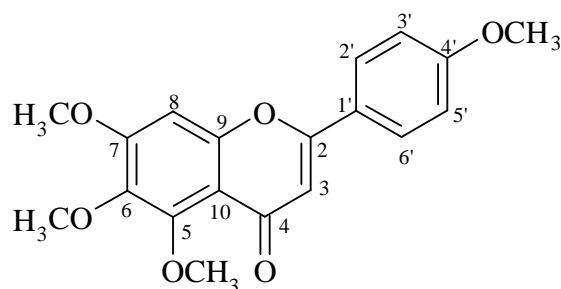


Fig.32. Composé 5

Pour le composé **5** (fig.32), le spectre de RMN du ^1H (fig.33) présente une parenté évidente avec les deux génines flavoniques (composés **3-4**). La région aromatique du spectre correspond bien au schéma de substitution des deux molécules citées : on observe deux doublets à δ 7,84 (2H, $J=8,9$ Hz) et δ 7,02 (2H, $J=8,9$ Hz) formant un système AA'BB' et démontrant la présence d'un seul substituant, orienté en *para* sur le cycle B ; les deux singulets (δ 6,62, 1H et δ 6,81, 1H) suggèrent non seulement la trisubstitution du noyau benzo- γ -pyrone, mais aussi que ces substitutions sont sur les mêmes positions de ce noyau, étant données les valeurs de déplacements chimiques très proches de celles mesurées pour la 6-hydroxy-5,7,4'-triméthoxyflavone (δ 6,60 et δ 6,83) (les valeurs pour la ladanéine sont un peu différente, mais son spectre avait été enregistré dans le DMSO- d_6 , alors que ceux des deux autres composés ont été réalisés dans le même solvant, à savoir CDCl_3).

Comme pour les deux molécules déjà isolées, les seuls autres signaux observables en RMN du ^1H sont d'importants pics situés à champ plus fort. La valeur de leur déplacement chimique (entre δ 3,9 et δ 4,0) et celle de leur intégration (12 protons en tout) tendent à prouver la présence de quatre groupements méthoxyle dans la molécule : seuls trois singulets sont vus (δ 3,90, 3H ; δ 3,92, 3H ; δ 3,99, 6H), mais le plus déblindé est logiquement issu de la superposition de deux pics intégrant chacun pour trois protons.

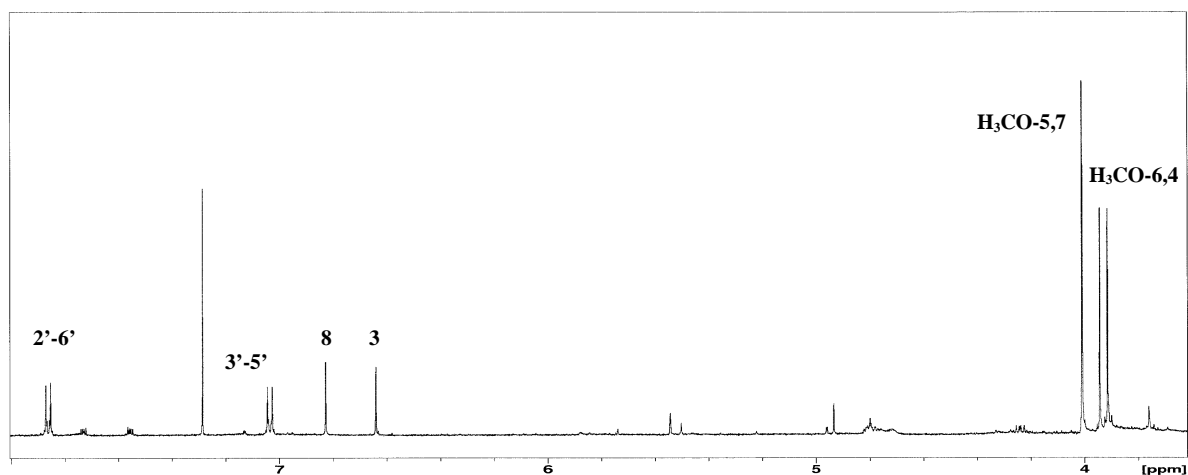


Fig.33. Spectre de RMN du ^1H du composé **5 (300 MHz, CDCl_3)**

Les quatre points de substitution (5, 6, 7 et 4') seraient donc tous occupés par des groupements méthoxyle. L'absence de fonction hydroxyle libre paraît d'autant plus probable que le composé **5** ne présentait sur CCM qu'une faible fluorescence blanchâtre en lumière UV à 365 nm après pulvérisation du réactif de Neu (qui réagit essentiellement avec les fonctions phénoliques libres, le diphénylborate étant complexé par celles-ci) et qu'il n'avait pas pu être détecté par le test au DPPH (la substitution des groupes OH empêchant une bonne action antiradicalaire).

La structure du composé **5** a donc été établie comme étant la 5,6,7,4'-tétraméthoxyflavone (ou tétra-*O*-méthylscutellaréine) qui avait déjà été isolée (et ce, pour la première fois) de *Marrubium peregrinum* L. (Salei 1972). Il est intéressant de constater que celle-ci est ici en quantité plus faible que ses analogues structuraux, ladanéine en tête, alors que ceux-ci n'avaient apparemment pas été détectés dans les travaux passés. Cette variation de composition peut être due aux différents lieux et périodes de récoltes. La différence apparente de concentration relative des trois molécules peut aussi bien résulter de l'expression plus ou moins importante des enzymes impliquées dans leur synthèse (pour les réactions de méthylation) que de niveaux de maturation différents des échantillons récoltés.

Les données des signaux observés dans le spectre de RMN du ^1H du composé **5** sont consignées dans le tableau 7. Sont également données les attributions pour le spectre de RMN du ^{13}C et les valeurs trouvées dans la littérature pour la 5,6,7,4'-tétraméthoxyflavone en RMN du ^1H (Miyazawa 1999) et du ^{13}C (Horie 1998).

Tableau 7. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **5** (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ) et de la 5,6,7,4'-tétraméthoxyflavone (270 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ) (CDCl_3).

	composé 5		5,6,7,4'-tétraméthoxyflavone	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2	-	160,5	-	160,2
3	6,62 s	106,2	6,60 s	106,1
4	-	175,8	-	175,6
5	-	152,0	-	151,6
6	-	140,1	-	139,7
7	-	157,7	-	157,4
8	6,81 s	97,4	6,82 s	97,3
9	-	154,0	-	153,9
10	-	112,0	-	112,0
1'	-	123,1	-	123,0
2'-6'	7,84 d (8,9Hz)	127,9	7,82 dt (9Hz, 2Hz)	127,8
3'-5'	7,02 d (8,9Hz)	114,5	7,00 dt (9Hz, 2Hz)	114,4
4'	-	162,1	-	161,8
H₃CO-5	3,99 s*	61,8	3,88 s, 3,98 s, 3,92 s, 4,00 s	61,8
H₃CO-6	3,92 s	61,1		61,0
H₃CO-7	3,99 s*	56,5		56,4
H₃CO-4'	3,90 s	55,5		55,5

*: signaux superposés

Composé 6

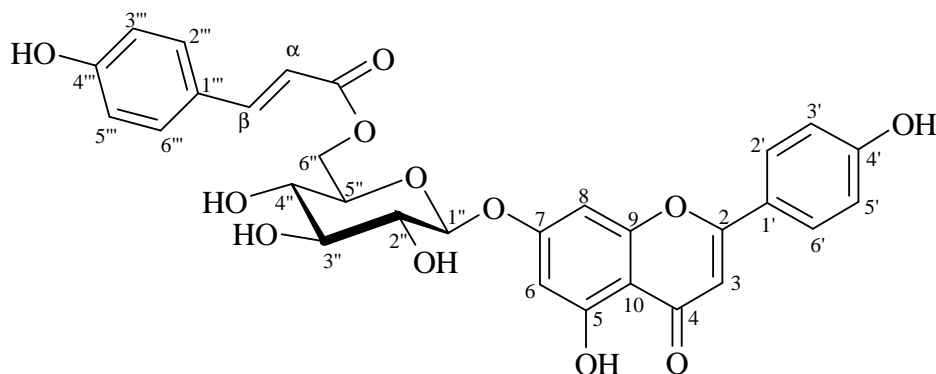


Fig.34. Composé 6

Dans le spectre RMN du ^1H du composé **6** (fig. 34-35), on observe d'assez nombreux pics entre δ 6,3 et δ 8,0, ce qui laisse présager de la présence de plusieurs structures aromatiques dans la molécule. Entre δ 3,0 et δ 5,2, la simplicité du spectre - notamment la présence d'un seul signal susceptible de correspondre à un proton anomérique entre δ 4,5 et δ 5,5 (δ 5,17 d, $J=7,1$ Hz) - semble indiquer qu'un seul ose est présent.

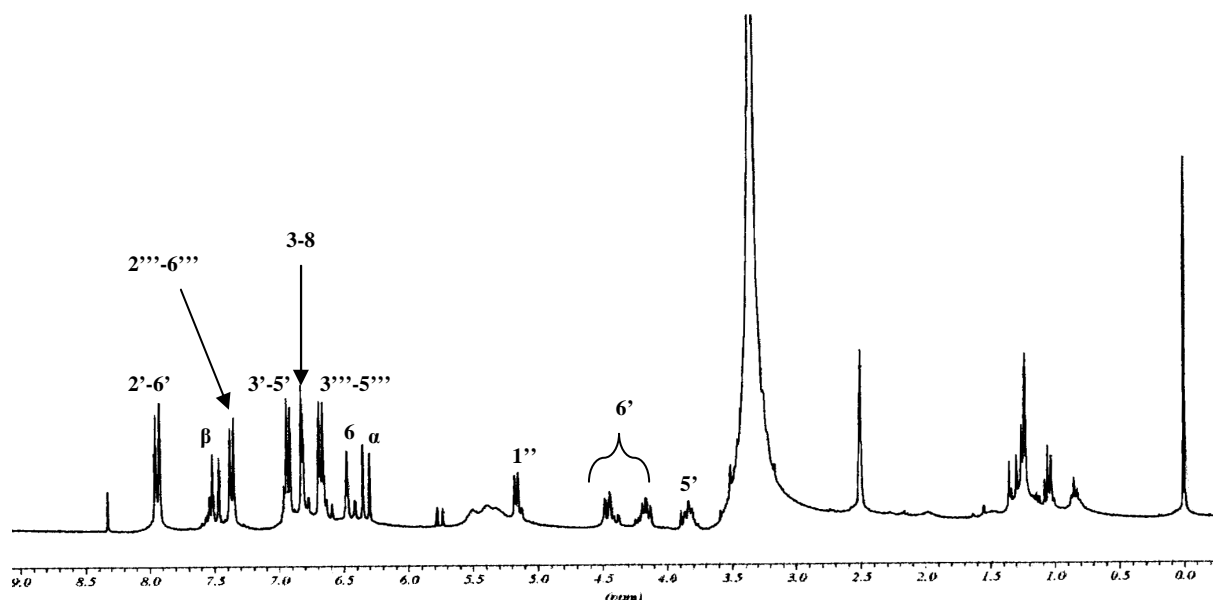


Fig.35. Spectre de RMN du ^1H du composé 6 à 300MHz dans le DMSO- d_6

L'analyse plus approfondie de la zone des signaux aromatiques dans le spectre de RMN du ^1H et dans celui du ^{13}C *J*-modulé (la correspondance des pics des deux spectres étant établie par corrélation hétéronucléaire proton-carbone HSQC), ainsi que la confrontation avec les données de composés polyphénoliques variés dans la littérature, permet de déterminer les deux parties dont les pics se superposent. Il s'agit de l'apigénine et de l'acide *p*-(*E*)-coumarique. Les déplacements chimiques trouvés dans la littérature correspondant à ces deux résidus sont présentés dans le tableau 8 (acide coumarique : Sahpaz 2002 ; apigénine ^1H : Harborne 1994 ; apigénine ^{13}C : Agrawal 1989) avec la zone aromatique du composé **6**.

Tableau 8. Comparaison des déplacements chimiques des signaux des groupements polyphénoliques du composé **6** en RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) avec ceux trouvés dans la littérature pour les mêmes groupements dans le chrysoéryol-7- β -D-(3''-*E*-*p*-coumaryl)-glucopyranoside et l'apigénine-7- β -D-glucopyranuronide.

	Composé 6 (DMSO- <i>d</i> 6)		Chrysoéryol-7- β -D-(3''- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaryl)- glucopyranoside (DMSO- <i>d</i> 6)		Apigénine-7- β -D- glucopyranuronide	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H (DMSO- <i>d</i> 6)	^{13}C (D ₂ O)
génine						
2	-	164,7	-	-	-	164,7
3	6,84 s	103,5	-	-	6,85 s	102,7
4	-	182,4	-	-	-	182,5
5	-	161,9*	-	-	-	160,4
6	6,48 d (2Hz)	99,9	-	-	6,48 d (2,1Hz)	-
7	-	163,1	-	-	-	162,8
8	6,82 d (2Hz)	95,1	-	-	6,86 d (2,1Hz)	96,0
9	-	157,4	-	-	-	156,9
10	-	105,8	-	-	-	106,0
1'	-	121,3	-	-	-	121,1
2'-6'	7,94 d (8,8Hz)	129,0	-	-	7,96 d (8,8Hz)	128,4
3'-5'	6,93 d (8,8Hz)	116,1**	-	-	6,96 d (8,8Hz)	116,1
4'	-	161,6*	-	-	-	160,4
<i>p</i>-(<i>E</i>)- coumaryle						
α	6,33 d (16Hz)	114,1	6,45 d (16Hz)	114,7	-	-
β	7,49 d (16Hz)	145,4	7,60 d (16Hz)	144,4	-	-
1'''	-	125,3	-	125,2	-	-
2'''-6'''	7,37 d (8,5Hz)	130,6	7,60 d (9Hz)	130,1	-	-
3'''-5'''	6,68 d (8,5Hz)	116,2**	6,96 d (8,7Hz)	115,7	-	-
4'''	-	160,3	-	159,6	-	-
CO	-	166,9	-	-	-	-

*, **: attributions interchangeables (superposition des signaux)

Le déplacement chimique et la constante de couplage du doublet du proton anomérique de l'ose (δ 5,17 d, $J=7,1$ Hz) semblent indiquer qu'il s'agit d'un β -D-glucose substituant l'apigénine au niveau de l'hydroxyle en 7. La réalisation d'une expérience de corrélation

hétéronucléaire ^1H - ^{13}C à longue distance (HMBC) (fig.36) permet effectivement d'observer une tâche de corrélation entre le doublet du proton anomérique et le pic du carbone 7, ce qui confirme l'hypothèse formulée.

La dernière information nécessaire à l'établissement de la structure complète du composé **6** est la position de substitution du groupement coumaryle sur le glucose. La carte de l'expérience HSQC apporte une donnée intéressante à ce niveau, puisque le pic correspondant au carbone 6 de l'ose (δ 63,9), identifié par le fait qu'il est le seul signal de carbone secondaire dans cette région du spectre, est corrélé avec deux massifs (δ 4,44 et δ 4,17) du spectre de RMN du ^1H , qui se trouvent être les deux plus déblindés parmi les protons de l'ose, en dehors de l'hydrogène acétalique anomérique. Ainsi, la nature non équivalente des deux protons et leur caractère déblindé semblent tous deux indiquer une acylation au niveau de la fonction alcoolique secondaire en 6 du glucose. Encore une fois, l'expérience HMBC permet de confirmer ceci par l'observation de tâches de corrélation entre les signaux des deux protons en 6 du glucose et le carbone de la fonction ester du coumaryle (δ 166,9).

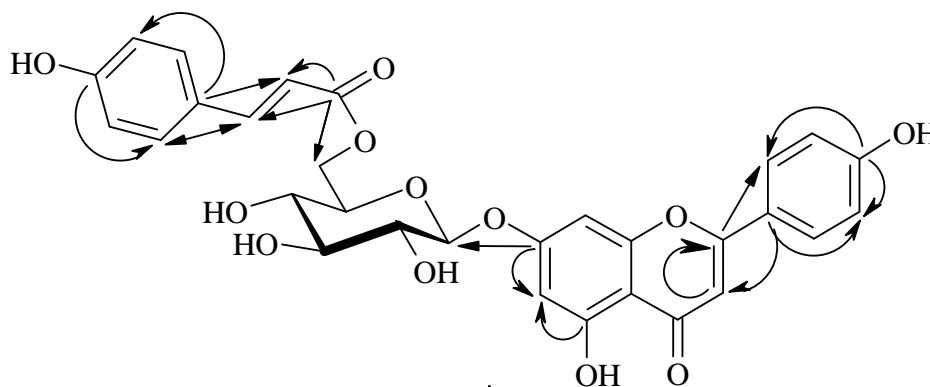


Fig.36. Corrélations HMBC choisies du composé 6 (C→H)

La spectrométrie de masse en mode *electrospray* donne une masse $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 579, ce qui est compatible avec la structure proposée grâce à la RMN (de formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$).

La structure du composé **6** est donc établie comme étant l'apigénine-7-β-D-O-(6''-O-E-p-coumaryl)glucopyranoside. Ce composé est connu. Il a été isolé pour la première fois de *Clematis terniflora* DC. var. *robusta* (Carrière) Tamura (Renonculacées) sous le nom de

terniflorine (Aritomi 1963). Les déplacements chimiques observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 5 et confrontés avec des données de RMN du ^{13}C trouvées dans la littérature (Agrawal 1989).

Tableau 9. RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) du composé **6**, RMN du ^{13}C de l'apigénine-7- β -D-(6''-*E*-p-coumaryl)glucopyranoside dans le DMSO-*d*₆.

	composé 6		apigénine-7- β -D-(6''- <i>E</i> -p-coumaryl)glucopyranoside	
	^1H	^{13}C	^{13}C	
apigénine				
2	-	164,7	162,7	163,3
3	6,84 s	103,5	103,0	104,3
4	-	182,4	181,9	182,4
5	-	161,9*	156,8	157,5
6	6,48 d (2Hz)	99,9	99,5	100,9
7	-	163,1	164,3	164,4
8	6,82 d (2Hz)	95,1	94,7	95,0
9	-	157,4	161,3	161,5
10	-	105,8	105,3	105,9
1'	-	121,3	121,0	123,1
2'-6'	7,94 d (8,8Hz)	129,0	128,5	128,7
3'-5'	6,93 d (8,8Hz)	116,1**	116,0	114,9
4'	-	161,6*	161,1	162,8
HO-5	12,98	-	-	-
glucose				
1''	5,17 d (7,1Hz)	99,9	99,5	-
2''	3,32 m	73,4	73,0	-
3''	3,36 m	76,7	76,3	-
4''	3,25 m	70,4	70,0	-
5''	3,84 m	74,2	73,8	-
6''	4,17 m et 4,44 m	63,9	63,4	-
coumaryle				
α	6,33 d (16Hz)	114,1	113,7	-
β	7,49 d (16Hz)	145,4	144,9	-
1'''	-	125,3	124,9	-
2'''-6'''	7,37 d (8,5Hz)	130,6	131,7	-
3'''-5'''	6,68 d (8,5Hz)	116,2**	115,7	-
4'''	-	160,3	159,7	-
CO	-	166,9	166,4	-

*, **: attributions interchangeables (superposition des signaux)

Phénylpropanoïdes

Composé 7

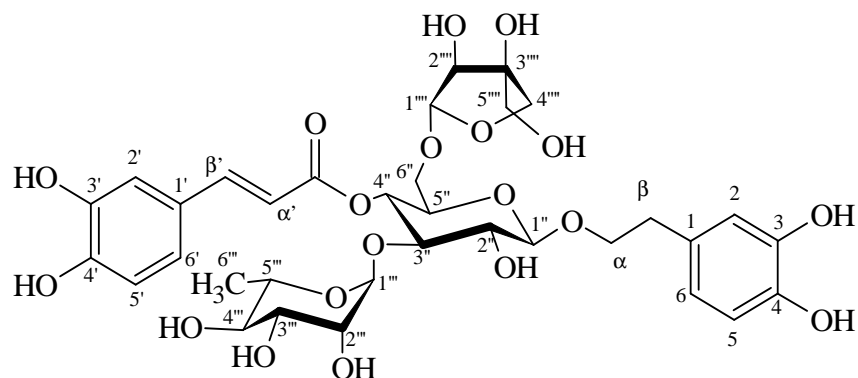


Fig.37. Composé 7

L'analyse du composé 7 (fig.37) par SM-ESI donne un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à 779, ce qui est compatible avec la formule $C_{34}H_{44}O_{19}$.

Le spectre RMN du 1H (fig.38) montre des signaux caractéristiques correspondant à des groupements *E*-caféyl (trois protons aromatiques à δ 6,80, 7,00 et 7,10 formant un système ABX et deux protons trans-oléfiniques à δ 6,30 et 7,65 caractérisés par une constante de couplage de 16 Hz des deux doublets) et 3,4-dihydroxyphényléthanol (trois protons aromatiques à δ 6,60, 6,70 et 6,72 formant également un système ABX et deux signaux méthyléniques), ce qui confirme qu'il s'agit d'un phénylpropanoïde.

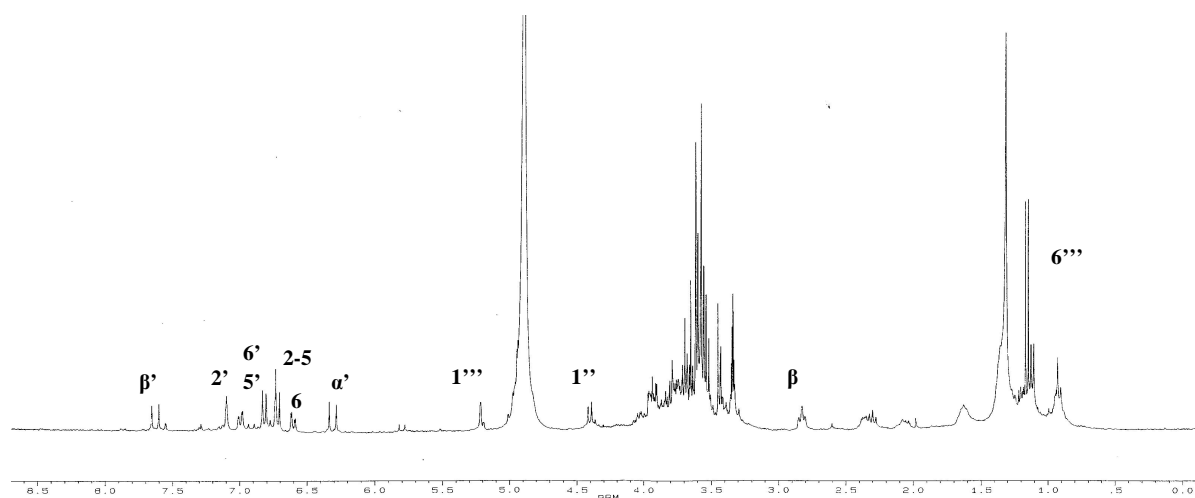


Fig.38. Spectre de RMN du 1H du composé 7 à 300 MHz dans CD_3OD

Après hydrolyse acide du composé **7** par l'acide sulfurique N, on met en évidence les trois oses constitutifs de la molécule (glucose, rhamnose et apiose) sur CCM par comparaison avec des témoins authentiques. La structure du composé est donc en faveur d'une molécule formée de cinq éléments constitutifs : l'acide *E*-caféique, le 3,4-dihydroxyphényléthanol (ou hydroxytyrosol), le glucose, le rhamnose et l'apiose.

La conformation adoptée par les oses et la configuration de leur hydrogène anomérique est établi par le déplacement chimique de celui-ci en RMN du ^1H : les signaux se situent à δ 4,39 (d, $J=9$ Hz ; H1'' du β -D-glucose), à δ 4,90 (d, $J=2$ Hz ; H1'''' de l' α ou du β -D-aposie) et à δ 5,20 (d, $J=2$ Hz ; H1''' de l' α -L-rhamnose). La configuration β de l'apiose est établie par le déplacement chimique du C1'''' (δ 111,0) en RMN du ^{13}C (tableau 10) (Gafner 1997).

Tableau 10. RMN du ^{13}C du méthyl- α -apiofuranoside et du méthyl- β -apiofuranoside (125 MHz, δ) dans la pyridine- d_5 .

	C1	C2	C3	C4	C5
Méthyl-α-apiofuranoside	104,5	75,2	77,7	73,4	65,5
Méthyl-β-apiofuranoside	111,5	77,7	80,3	74,9	65,5

Le composé **7** est peracétylé (composé **7a**), ce qui permet à la fois d'avoir de meilleures garanties de pureté pour des produits de masse moléculaire importante présentant des spectres RMN complexes (les phénylpropanoïdes, très polaires, sont difficiles à isoler sur phase normale), et de déterminer ou de confirmer le nombre de groupements hydroxyles de la substance. Ainsi, dans le cas du composé **7a**, le pic de l'ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ est présent à m/z 1242 en SM-ESI, ce qui correspond à l'acétylation de onze fonctions hydroxyles. Onze signaux correspondant aux méthyles des fonctions acétyles sont également observables en RMN du ^1H et du ^{13}C .

Après peracétylation, les signaux correspondant aux protons 1'', 3'', 4'', 6'', 1''' et 1'''' sont les seuls à ne pas être nettement déblindés par des groupements acétyles, ce qui signifie que les groupements hydroxyles présents sur les mêmes carbones que ces protons sont déjà impliqués dans une liaison et ne peuvent être acétylés. Il s'agit donc des positions de substitution des différents constituants de la molécule. Le glucose est donc en position centrale : le rhamnose, l'apiose, le dihydroxyphényléthanol et l'acide caféique sont substitués

sur quatre de ses hydroxyles. Le caractère très déblindé du proton 4'' montre qu'il s'agit du site d'acylation par l'acide caféique. L'expérience de corrélation scalaire ^1H - ^1H COSY permet de déterminer les positions exactes des signaux appartenant aux cinq éléments de la molécule. Les attributions des signaux en RMN du ^{13}C sont réalisées grâce à un HSQC. Les enchaînements et les positions relatives des différents éléments sont confirmés par corrélation ^1H - ^{13}C à longue distance (HMBC) (fig.39). Les résultats sont reportés dans le tableau 11.

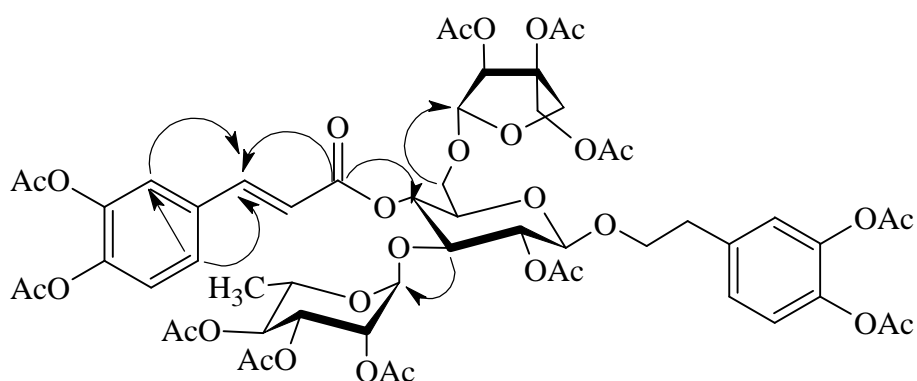


Fig.39. Corrélations HMBC choisies du composé 7 peracétylé (7a) (C→H)

Les attributions des signaux RMN du ^1H et du ^{13}C sont réalisées à l'aide des expériences COSY et HMBC.

La structure du composé **7** est ainsi déterminée comme le 3,4-dihydroxy- β -phényléthoxy- O -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- O -[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)]-4- O -(E)-caféyl- β -D-glucopyranoside ou forsythoside B. Cette molécule connue a été isolée pour la première fois de *Forsythia koreana* Nakai (Oléacées) (Endo 1982). Les attributions que nous avons faites sont identiques à celles proposées dans la littérature (Endo 1982, Çaliş 1992).

Tableau 11. RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) du composé **7** (CD_3OD) et du composé **7a** (CDCl_3).

	composé 7		composé 7a	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
hydroxytyrosol				
1	-	131,5	-	137,7
2	6,73 d (2Hz)	117,1	7,04 d (1Hz)	123,8
3	-	146,2	-	139,1
4	-	144,5	-	140,5
5	6,70 d (8Hz)	116,6	7,09 d (5Hz)	123,7
6	6,61 (dd, 2Hz, 8Hz)	121,3	7,09 dd (5Hz, 1Hz)	127,2
α	3,55 m - 3,90 m	72,3	3,64 m - 4,15 m	69,5
β	2,81 t (7Hz)	36,8	2,85 m	35,2
acide caféique				
1'	-	127,7	-	132,5
2'	7,10 d (2Hz)	115,5	7,38 d (2Hz)	123,0
3'	-	146,8	-	142,3
4'	-	149,8	-	143,8
5'	6,82 d (8Hz)	116,5	7,23 d (8Hz)	124,0
6'	7,00 dd (2Hz, 8Hz)	123,2	7,44 dd (2Hz, 8Hz)	126,4
α'	6,30 d (16Hz)	114,6	6,37 d (16Hz)	118,0
β'	7,64 d (16Hz)	148,0	7,71 d (16Hz)	144,3
CO	-	168,4	-	167,9
glucose				
1''	4,39 d (9Hz)	104,3	4,38 d (8Hz)	100,4
2''	3,42 m	76,1	5,00 m - 5,10 m	72,5
3''	3,75 m	81,7	3,88 m	80,4
4''	4,90 m	70,4	4,95 m - 5,05 m	69,9
5''	3,66 m	74,5	3,60 m - 3,75 m	73,8
6'' (a et b)	3,55 m - 3,90 m	68,5	3,60 m - 3,75 m	68,0
rhamnose				
1'''	5,21 d (2Hz)	103,0	4,93 d (1Hz)	99,1
2'''	3,87 m	72,5	5,00 m - 5,10 m	70,6
3'''	3,51 m	72,1	5,00 m - 5,10 m	70,0
4'''	3,30 m	73,8	4,95 t (10Hz)	72,1
5'''	3,47 m	70,5	3,80 m	67,2
6'''	1,16 d (6Hz)	18,4	1,04 d (7Hz)	17,4
apiose				
1''''	4,90 d (2Hz)	111,4	4,98 d (3Hz)	106,1
2''''	3,90 m	78,2	5,34 d (1,5Hz)	76,1
3''''	-	80,6	-	84,2
4'''' (a et b)	3,70 m - 3,90 m	75,3	4,12 d (11Hz) 4,20 d (11Hz)	72,4
5''''	3,55 m	65,6	4,55 - 4,70	63,1

Composé 8

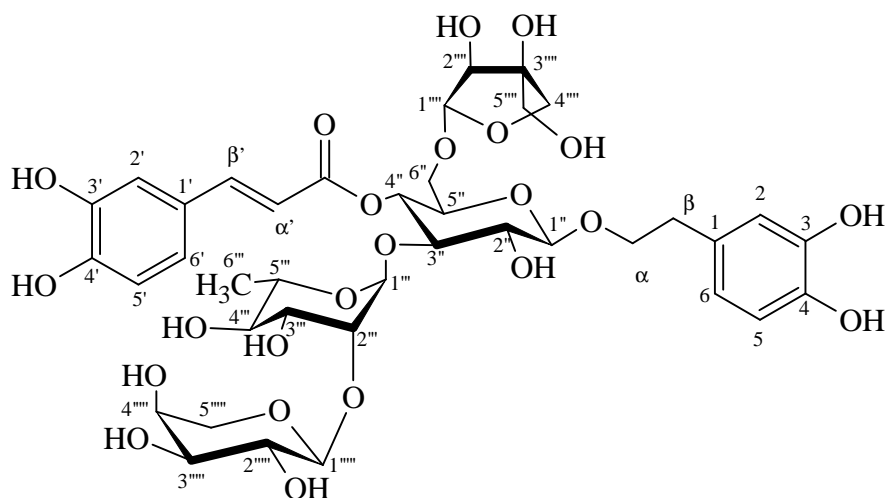


Fig.40. Composé 8

L'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ correspondant au composé **8** (fig.40) présente un rapport m/z de 911 en SM-ESI, ce qui est compatible avec la formule moléculaire $C_{39}H_{52}O_{23}$.

L'hydrolyse acide permet de mettre en évidence de l'arabinose, en plus du glucose, du rhamnose et de l'apiose, sur CCM, par comparaison avec des témoins authentiques. L'observation du spectre RMN du 1H (fig.41) confirme que la structure est très proche de celle du forsythoside B : les signaux caractéristiques de l'acide caféique et du dihydroxyphényléthanol sont présents, mais il y a quatre signaux pouvant correspondre à des protons anomériques : δ 4,37 (H1'' du β -D-glucopyranose), δ 5,45 (H1''' de l' α -L-rhamnopyranose), δ 4,92 (H1'''' du β -D-apiofuranose) et δ 4,32 (H1''''' de l' α -L-arabinopyranose).

L'acétylation du composé **8** en composé **8a** permet de montrer que l'arabinose est substitué par son hydroxyde héli-acétalique en 2''' du rhamnose : en effet, on remarque d'une part que le déplacement chimique du H2''' est peu affecté par l'acétylation (δ 3,96 pour le composé **8** et δ 3,90 pour le composé **8a**) alors qu'il était très déblindé par cette opération chez le forsythoside B (δ 3,85 pour le composé **7** et δ 5,00-5,12 pour le composé **7a**) et d'autre part que le H1''''' a le même déplacement chimique dans les composés **8** et **8a** (δ 3,92).

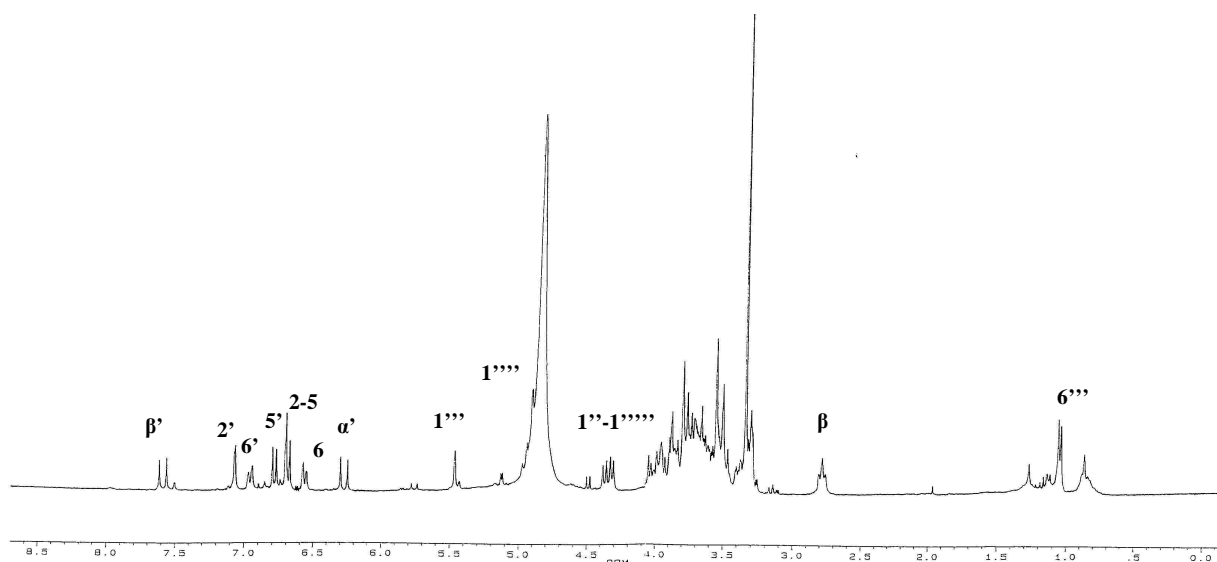


Fig.41. Spectre de RMN du ^1H du composé **8 à 300 MHz dans CD_3OD**

Les autres substitutions sont identiques à celles du forsythoside B. Les techniques HSQC et HMBC (fig.42) permettent l'attribution de tous les signaux de RMN du ^1H et du ^{13}C pour le produit naturel **8** et son dérivé acétylé **8a** (tableau 12).

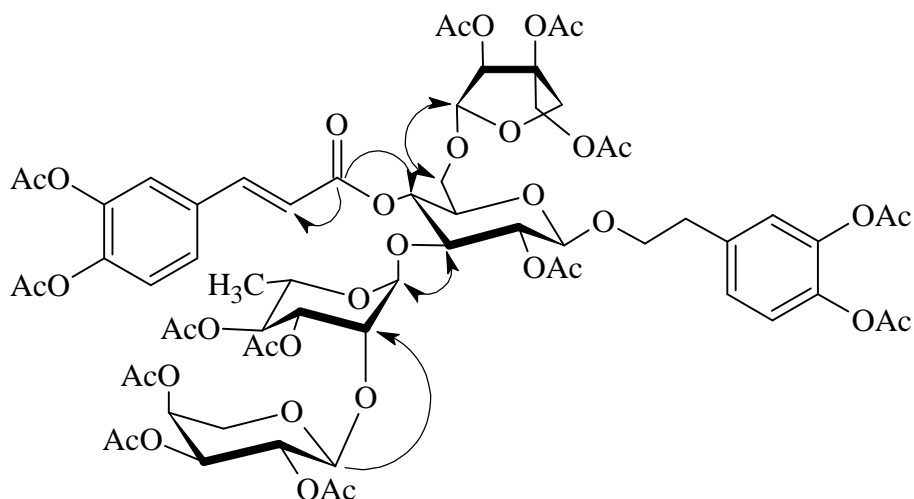


Fig.42. Corrélations HMBC choisies du composé **8 peracétylé (**8a**) (C→H)**

La structure du composé **8** est déterminée comme le 3,4-dihydroxy- β -phényléthoxy-*O*-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-*O*-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)]-4-*O*-(*E*)-caféyl- β -D-glucopyranoside ou ballotétroside, composé qui a été isolé pour la première fois de *Ballota nigra* L. (Lamiacées) (Seidel 1997).

Tableau 12. RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) du composé **8** (CD_3OD) et du composé **8** peracétylé (**8a**) (CDCl_3)

	composé 8		composé 8a	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
hydroxytyrosol				
1	-	131,4	-	137,7
2	6,71 d (2Hz)	117,4	7,01 d (1Hz)	123,7
3	-	146,0	-	141,7
4	-	144,4	-	140,5
5	6,68 d (8Hz)	116,5	7,07 d (5Hz)	123,1
6	6,59 dd (8Hz, 2Hz)	121,3	7,07 dd (5Hz, 1Hz)	127,5
α	3,75 m - 4,00 m	72,3	3,60 m et 4,15 m	69,3
β	2,77 t (7Hz)	36,5	2,84 m	35,1
acide caféique				
1'	-	127,6	-	132,8
2'	7,07 d (2Hz)	114,9	7,36 d (2Hz)	122,8
3'	-	146,8	-	142,6
4'	-	149,7	-	143,7
5'	6,76 d (8Hz)	116,5	7,21 d (8Hz)	124,0
6'	6,95 dd (8Hz, 2Hz)	123,2	7,39 dd (8Hz, 2Hz)	126,6
α	6,27 d (16Hz)	115,2	6,35 d (16Hz)	117,7
β	7,59 d (16Hz)	148,0	7,69 d (16Hz)	144,5
CO	-	168,5	-	165,1
glucose				
1''	4,38 d (7Hz)	104,2	4,35 d (8Hz)	100,4
2''	3,37 m	76,1	4,95 - 5,04	73,3
3''	3,77 m	82,0	3,97 t (9Hz)	76,7
4''	4,94 t (8Hz)	70,8	4,95-5,04	69,4
5''	3,69 m	74,3	3,58 m - 3,67 m	73,6
6''	3,54 m et 3,78 m	68,3	3,58 m - 3,67 m	66,9
rhamnose				
1'''	5,45 d (1Hz)	101,9	4,98 d (2Hz)	99,4
2'''	3,96 m	82,6	3,90 m	76,5
3'''	3,66 m	71,7	4,88 dd (10 Hz, 4Hz)	70,6
4'''	3,31 m	74,0	4,78 t (10Hz)	70,7
5'''	3,52 m	70,3	3,67 m - 3,75 m	66,6
6'''	1,04 d (7Hz)	18,4	1,03 d (7Hz)	17,3
apiose				
1''''	4,88 d (2Hz)	111,1	5,00 d (3Hz)	106,3
2''''	3,90 m	78,1	5,30 d (3Hz)	76,1
3''''	-	80,6	-	84,0
4''''	3,74 m et 3,92 m	75,1	4,09 et 4,18 d (11Hz)	72,5
5''''	3,55 m	65,6	4,54 et 4,69 d (13Hz)	63,1
arabinose				
1'''''	4,32 d (6Hz)	107,3	4,30 d (7Hz)	102,3
2'''''	3,58 m	72,7	5,13 dd (10Hz, 7Hz)	68,8
3'''''	3,53 m	74,2	4,95 m - 5,04 m	69,5
4'''''	3,78 m	69,8	5,17 m - 5,22 m	67,6
5'''''	3,80 m	67,3	3,52 et 3,92 dd (12Hz, 3Hz)	62,4

Composé 9

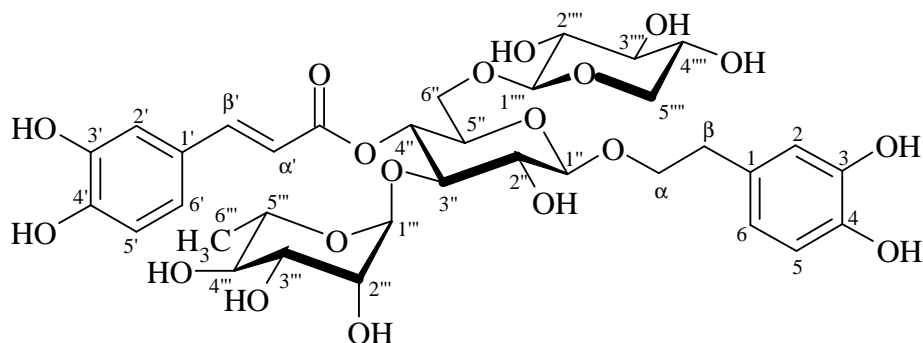


Fig.43. Composé 9

L'analyse par spectrométrie de masse *electrospray-ionspray* (SM-ESI) du composé **9** (fig.43) montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ ayant un rapport m/z de 779 en ionisation positive, compatible avec la formule brute $C_{34}H_{44}O_{19}$.

Sur le spectre de RMN du 1H (fig.44), l'observation de la région des aromatiques nous montre que ce composé appartient à la même série que le précédent. En effet, les déplacements chimiques et couplages des signaux observés dans cette région sont très proches de ceux que nous avons donnés pour le forsythoside B. On retrouve ici les deux doublets alcéniques (δ 6,31 et δ 7,60, $J=15,9$ Hz) et le système ABX (δ 7,07, d, $J=1,9$ Hz ; δ 6,98, dd, $J=8,2$ Hz, 1,9 Hz ; δ 6,80, d, $J=8,2$ Hz) correspondant à l'acide (*E*)-caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique) d'une part ; le système ABX (δ 6,70, d, $J=1,6$ Hz ; δ 6,68, d, $J=8,2$ Hz ; δ 6,59, dd, $J=8,1$ Hz, 1,6 Hz) caractéristique de l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphényléthanol) d'autre part. Le triplet observé à δ 2,81 est un autre signal révélateur de la présence de l'hydroxytyrosol. Il correspond aux deux protons situés en β de l'oxygène.

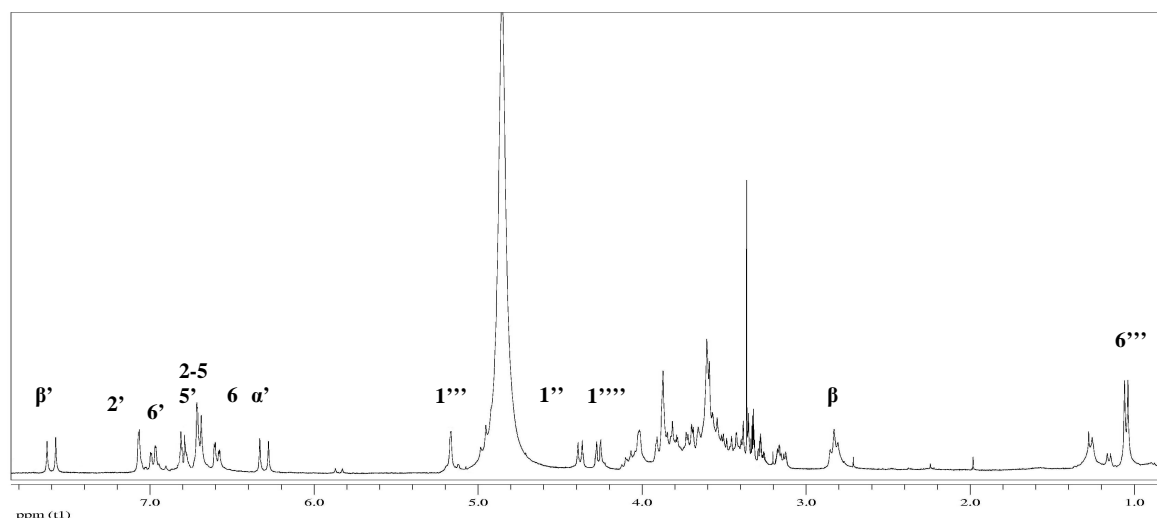


Fig.44. Spectre de RMN du ^1H du composé 9 à 300 MHz dans CD_3OD

Entre δ 3,0 et δ 4,2, on a un ensemble de signaux correspondant probablement à l'ensemble des protons adjacents aux fonctions alcooliques (secondaires ou primaires) des oses, certains pouvant d'ailleurs se superposer.

La partie du spectre allant de δ 4,2 à δ 5,2 est plus informative. Par simple comparaison avec les signaux du forsythoside B et du ballotétroside, on peut dire que les doublets observés à δ 4,38 ($J=8$ Hz) et à δ 5,19 ($J=2$ Hz) correspondent respectivement aux protons anomériques du β -D-glucose et de l' α -L-rhamnose. La présence de ce dernier est par ailleurs confirmée par la présence d'un doublet très caractéristique du méthyl (position 6''') de cet ose (δ 1,06, 3H, $J=6$ Hz). Le signal émergeant partiellement du pic du solvant à δ 4,96 correspond au proton 4 du glucose, dont la fonction hydroxyle est esterifiée par l'acide caféique. Les déplacements chimiques, très proches de ceux observés pour les composés de ce type que nous avons déjà isolés, suggèrent un schéma de substitution identique. Quant au doublet situé à δ 4,24, une recherche bibliographique sur des composés de la même série nous invite à penser qu'il pourrait s'agir du β -D-xylose (Seidel 1999). Ceci est confirmé par hydrolyse acide et comparaison de R_f sur CCM avec un témoin authentique de xylose.

Il est tout à fait probable, étant donné la masse moléculaire du composé 9 et les informations obtenues par le spectre de RMN du ^1H , que le composé isolé est constitué de deux génines (acide (*E*)-caféique et hydroxytyrosol) et de trois oses (β -D-glucose, α -L-rhamnose et β -D-xylose). Ceci correspond à un composé connu, l'arénarioside, dont les déplacements

chimiques, à la fois en RMN du ^1H et du ^{13}C , apparaissent tout à fait comparables à ceux du composé **9**.

La structure du composé **9** a donc pu être établie comme étant le 3,4-dihydroxy- β -phényléthoxy-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-*O*-[β -D-xylopyranoside-(1 \rightarrow 6)]-4-*O*-(*E*)-caféyl- β -D-glucopyranoside, couramment appelé arénarioside. Cette molécule a été isolée pour la première fois de *Orobanche arenaria* (Orobanchaceae) (Andary 1985). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 13 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Kırmızıbekmez 2002).

Tableau 13. RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) de **9** et de l'arénarioside

	composé 9		arénarioside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
hydroxytyrosol				
1	-	131,4	-	131,4
2	6,70 d (2Hz)	117,3	6,70 d (1,9Hz)	117,1
3	-	146,2	-	146,1
4	-	144,7	-	144,7
5	6,68 d (8Hz)	116,5	6,68 d (8Hz)	116,3
6	6,59 (dd, 2Hz, 8Hz)	121,1	6,57 (dd, 1,9Hz, 8Hz)	121,3
α	3,72-4,06 m	72,2	3,70-4,03 m	72,4
β	2,81 t (7Hz)	36,1	2,79 t (7,3Hz)	36,6
acide caféique				
1'	-	127,7	-	127,5
2'	7,07 d (1,8Hz)	115,5	7,06 d (1,9Hz)	115,2
3'	-	146,9	-	146,9
4'	-	150,1	-	150,0
5'	6,80 d (8,3Hz)	116,7	6,78 d (8,2Hz)	116,5
6'	6,98 dd (1,8Hz, 8,3Hz)	123,3	6,96 dd (1,9Hz, 8,2Hz)	123,3
α'	6,31 d (15,9Hz)	114,8	6,28 d (15,9Hz)	114,5
β'	7,60 d (15,9Hz)	148,5	7,60 d (15,9Hz)	148,3
CO	-	168,9	-	168,4
glucose				
1''	4,38 d (8Hz)	104,3	4,38 d (7,9Hz)	104,2
2''	3,40 m	75,8	3,39 dd (7,9Hz, 9Hz)	76,1
3''	3,75 m	82,1	3,80	81,6
4''	4,96 m	70,5	4,97 t (9,5Hz)	70,5
5''	3,65 m	75,0	3,72	74,8
6'' (a et b)	3,55 m -3,90 m	69,5	3,56-3,84	69,3
rhamnose				
1'''	5,19 d (2 Hz)	103,5	5,18 d (1,7 Hz)	103,1
2'''	3,85 m	72,4	3,91 dd (1,7Hz, 3,2Hz)	72,3
3'''	3,60 m	72,0	3,70	72,0
4'''	3,30 m	73,6	3,29	73,7
5'''	3,49 m	70,5	3,55	70,5
6'''	1,06 d (6 Hz)	18,3	1,09 d (6,3 Hz)	18,5
xylose				
1''''	4,24 d (7,7Hz)	105,5	4,24 d (7,5Hz)	105,3
2''''	3,21 m	74,8	3,19 dd (7,5Hz, 9Hz)	74,8
3''''	3,29 m	77,6	3,29	77,5
4''''	3,44 m	70,9	3,43 m	71,1
5''''	3,18 m	67,2	3,15 dd (10,3Hz, 11,3Hz)-3,82	66,9

B. Le genre *Ballota*

1. Caractéristiques botaniques du genre

Le genre *Ballota* est caractérisé par un calice tubuleux en entonnoir, à dix nervures, à cinq dents presque égales (parfois dix dont cinq plus petites), élargies à la base, pliées en long, mucronées. La corolle est bilabiée, à tube ne dépassant pas le calice, muni en dedans vers la base d'un anneau de poils ; la lèvre supérieure est dressée, un peu concave, émarginée, velue en dehors, la lèvre inférieure a trois lobes obtus, le lobe inférieur étant le plus grand, émarginé. Les quatre étamines (les deux extérieures étant les plus longues) sont rapprochées et parallèles ; les anthères glabres, à loges très divergentes, sont rapprochées deux à deux. Les carpelles sont arrondis au sommet. Les fleurs sont purpurines ou blanches, courtement pédicellées, en verticilles axillaires écartés.

Les feuilles sont pétiolées, fortement crénelées. Les espèces du genre *Ballota* sont des plantes vivaces, poilues, à tiges rameuses et feuillées. Ce genre compte environ vingt-cinq espèces habitant l'Europe et l'Asie tempérées, l'Afrique boréale et australe (Coste 1998).

2. *Ballota larendana* Boiss. & Heldr.

2.1. Aspects botaniques

Cette plante (photo 2) de la tribu *Microselidae* (Citoğlu 2005) possède des tiges de 30 à 60 cm (ponctuées de glandes et porteuses de poils non glanduleux) rigides, érigées à partir d'une base ligneuse. Les feuilles caulinaires, cordées-réniformes (25-45 mm x 25-45 mm), à bord crénelé ont une face supérieure légèrement apprimée pileuse à sub-tomenteuze ; la face inférieure est très tomenteuse, avec des poils simples, en forme d'étoile et non glanduleux. Les inflorescences verticillées sont denses, composées d'environ 9 fleurs plus courtes que les feuilles florales (dont le pétiole est lui-même court). Les bractéoles sont linéaires-filiformes, émucronées, plus courte ou de même longueur que le tube du calice, larges de 0,2 à 0,4 mm. Le calice mesure 6 à 7 mm, est fortement nervuré, légèrement pubescent (sans glandes), brièvement évasé (6-7 mm de diamètre) et porte 10 dents plutôt inégales. La corolle est de couleur rose à pourpre (12-16 mm), sa lèvre supérieure est en forme de crête.



Photo 2 : *Ballota larendana*

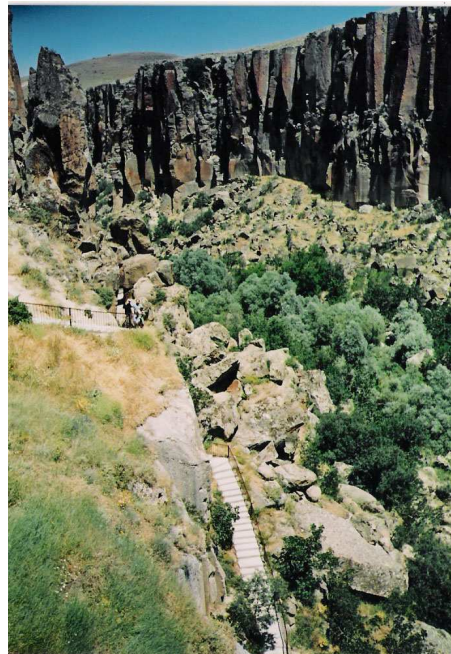


Photo 3 : Lieu de récolte de
B. larendana
(Aksaray İhlara vâdisi)

Elle est rencontrée dans des zones rocailleuses (terrains calcaires, basaltiques), zones d'éboulis, steppes montagneuses, ruines et tallus, entre 950 et 2000 m en Anatolie centrale et australe (photo 3).

Le seul synonyme rencontré est *Ballota simonii* Hub.-Mor. (Davis 1978).

2.2. Travaux antérieurs sur *Ballota larendana*

Nous n'avons trouvé que deux publications relatives à *Ballota larendana* dans la littérature. Peu de données existent à notre connaissance sur la composition chimique de cette plante ; deux diterpènes, la ballonigrine et la déhydrohispanolone ont été identifiés (fig. 45) (Citoğlu 2005). On s'est également intéressé à l'activité antioxydante d'un extrait éthanol/eau (3:1) (Citoğlu 2004). Les auteurs de l'article rapportent :

- une inhibition intéressante de la formation de l'anion-radical superoxyde par le système xanthine/xanthine oxydase, mesurée spectrophotométriquement à travers l'inhibition de la réduction du cytochrome *c* (CI₅₀ : 0,67 mg/ml),
- une étude sur l'inhibition de la peroxydation des LDL par le système acide ascorbique/FeCl₂ (mesurée par la méthode des substances réactives à l'acide thiobarbiturique ou TBARS), où l'extrait s'est révélé inactif.

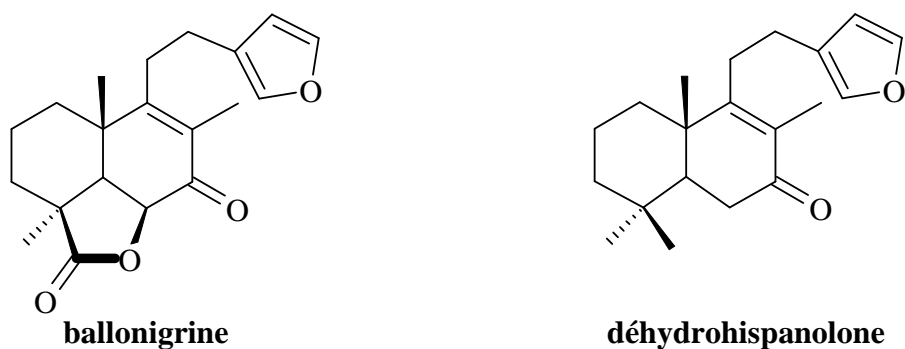


Fig.45. Diterpènes identifiés dans *Ballota larendana*

2.3. Travaux personnels

2.3.1. Isolement des composés

Le schéma 2 présente la méthode d'obtention des composés **6**, **10** et **11** de l'extrait méthanolique de *Ballota larendana*.

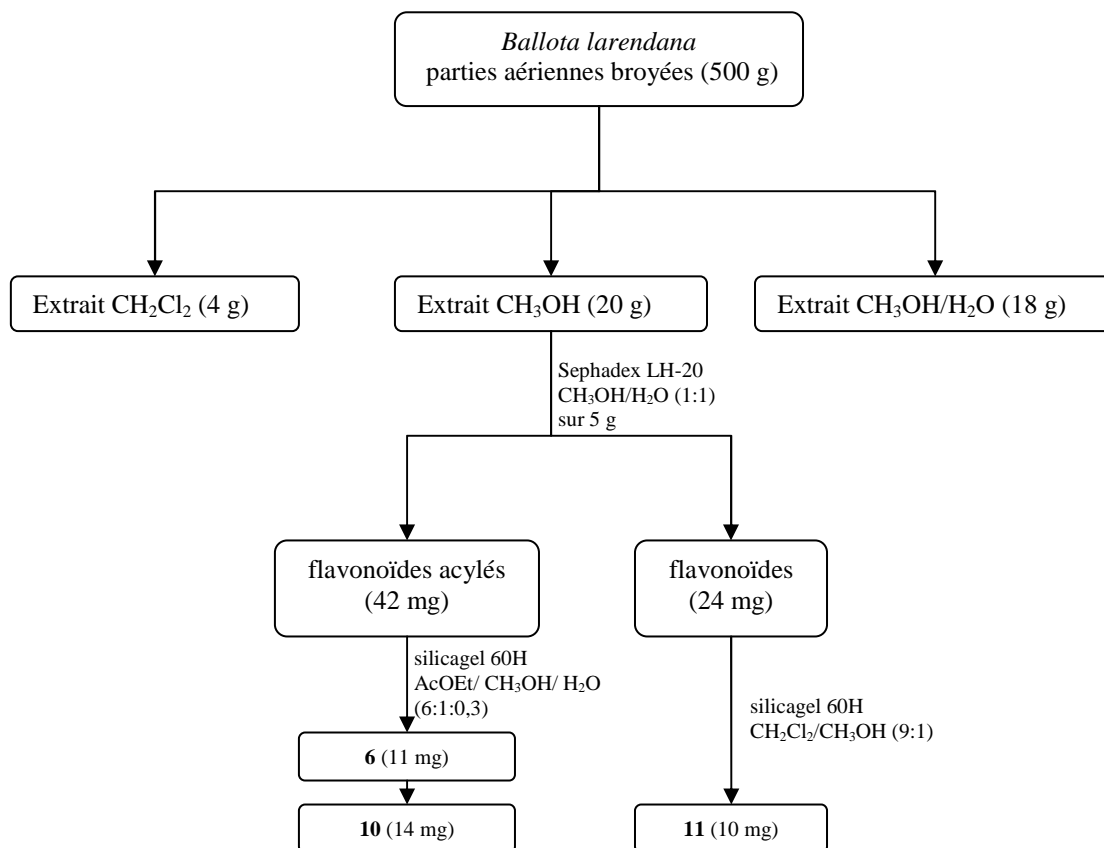


Schéma 2. Méthode utilisée pour l'isolement des trois composés obtenus à partir des parties aériennes de *Ballota larendana*

2.3.2. Identification des composés

Composé 6

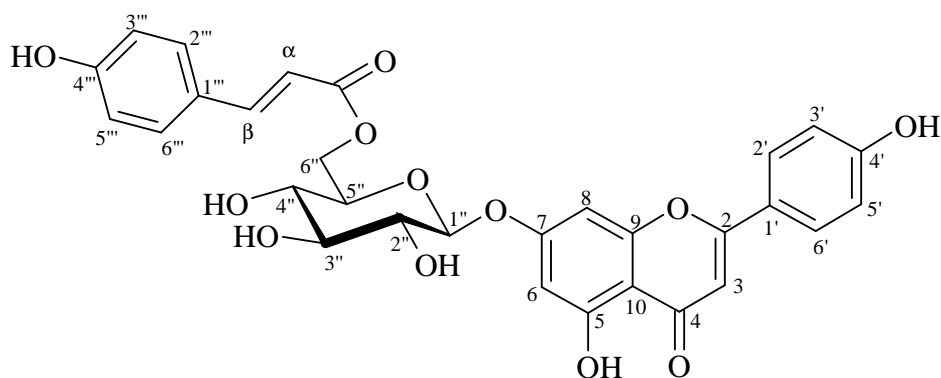


Fig.46. Composé 6

La structure de ce composé (fig.46) a été établie comme étant l'apigénine-7- β -D-O-(6'''-O-E-p-coumaryl)glucopyranoside. Ce composé étant strictement identique au produit **6** déjà décrit (voir page 65), sa détermination structurale n'est pas redétaillée ici. De même, pour les données de RMN du ^1H et du ^{13}C , on pourra se reporter au tableau 9, page 69.

Composé 10

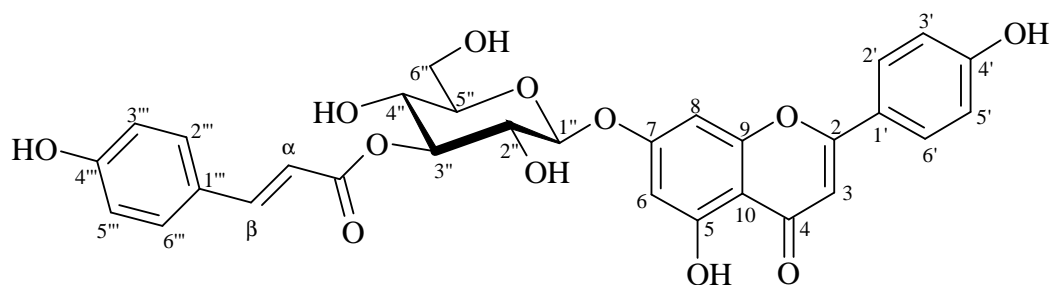


Fig.47. Composé 10

La spectrométrie de masse du composé **10** (fig.47) en mode *electrospray* donne une masse $[M+H]^+$ de 579, compatible avec la formule brute $C_{30}H_{26}O_{12}$.

Au niveau du spectre de RMN du 1H (fig.48), on retrouve les mêmes caractéristiques majeures que pour le composé **6** qui avait d'ailleurs la même masse : on observe des signaux correspondant à l'apigénine et à l'acide (*Z*)-*p*-coumarique. On constate également la présence d'un doublet à δ 5,24 ($J=7,7$ Hz) pouvant correspondre au proton anomérique d'un ose, mais la présence d'un triplet à δ 5,05 ($J=9,4$ Hz) et l'absence des signaux à δ 5,17 et δ 5,44, qui témoignaient de l'acylation en 6'' du glucose, nous suggère un profil de substitution différent à partir des mêmes éléments de base. Ce triplet pourrait correspondre à une coumarylation en 2'', 3'' ou 4''.

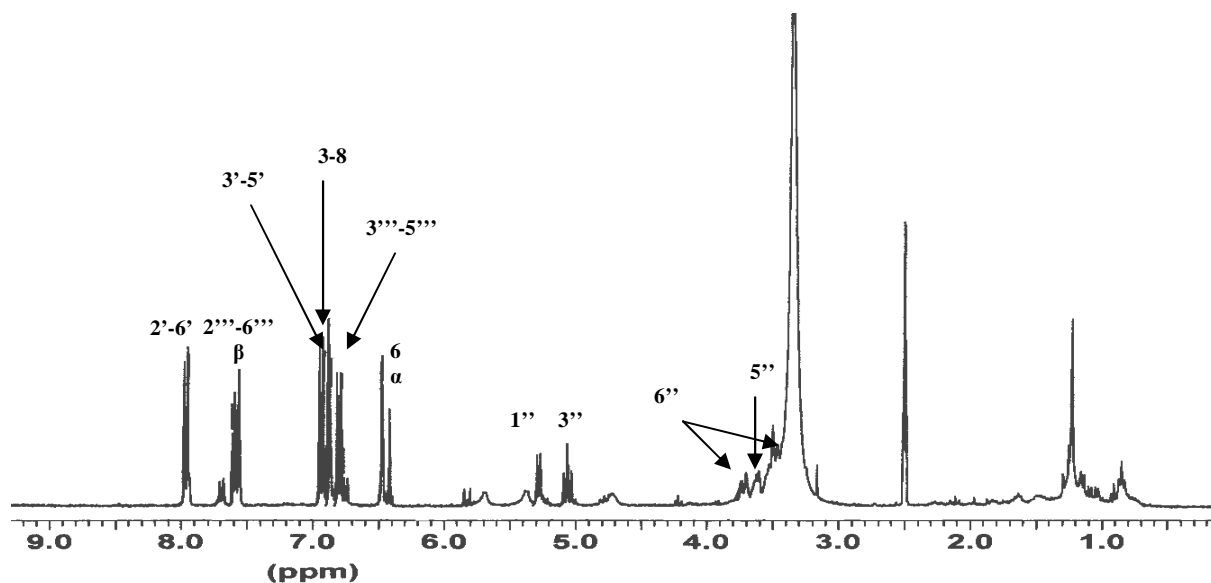


Fig.48. Spectre de RMN du 1H du composé 10 à 300 MHz dans le DMSO-*d*6

La réalisation de l'expérience COSY (fig.49) permet d'obtenir la réponse à cette interrogation : le triplet correspondant au point d'acylation de la molécule ne présente pas de corrélation avec le proton anomérique du glucose, mais tous deux sont corrélés avec un même signal à δ 3,50, qui correspond vraisemblablement au proton 2''. Le point d'acylation ne peut donc logiquement être que l'hydroxyle en 3'' du glucose. Ce produit est donc un isomère de position du composé précédent : l'apigénine-7-glucoside est ici coumarylée en 3'' de l'ose, et non en 6''.

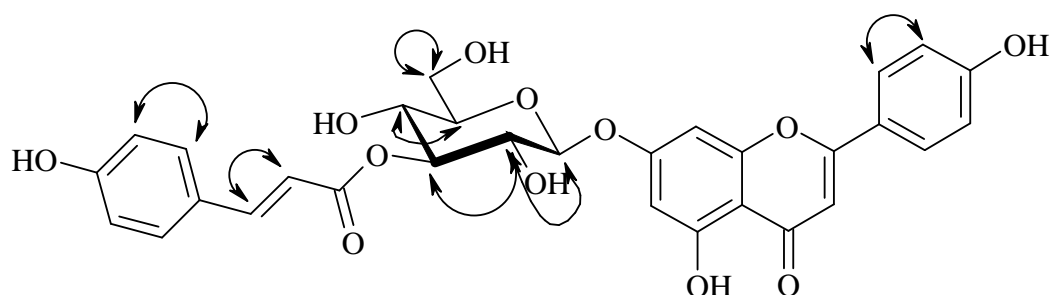


Fig.49. Corrélations COSY du composé 10 (H↔H)

La structure du composé **10** (fig.47) a été établie comme étant l'apigénine-7- β -D-O-(3''-O-p-coumaryl)glucopyranoside, molécule connue qui a été isolée pour la première fois de *Stachys aegyptiaca* Pers. (Lamiacées) (El-Ansari 1995). Les données de RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentées dans le tableau 14 avec celles trouvées dans la littérature (RMN du ^1H). Pour la RMN du ^{13}C , on donne comme référence un composé ayant une génine légèrement différente, mais de profil de substitution identique, le chrysoériol-7- β -D-(3''-E-p-coumaryl) glucopyranoside (Skaltsa 2000).

Tableau 14. Données de RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) du composé **10** dans le DMSO- d_6 . RMN du ^1H de l'apigénine-7-(3''-coumaryl)glucoside et RMN du ^{13}C du chrysoériol-7-(3''-coumaryl)glucoside (100 MHz, δ)

	composé 10		apigénine-7- β -D-(3''-E-p- coumaryl) glucopyranoside	chrysoériol-7- β -D-(3''-E-p- coumaryl) glucopyranoside
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
génine				
2	-	162,7	-	163,2
3	6,88 s	103,1	6,72 s	103,1
4	-	182,2	-	182,6
5	-	157,0	-	157,5
6	6,48 d (2,2Hz)	99,5	6,48 d (2,5Hz)	100,0
7	-	164,8	-	165,3
8	6,87 d (2,2Hz)	94,7	6,78 d (8Hz)	94,7
9	-	161,2	-	159,9
10	-	105,3	-	105,7
1'	-	121,0	-	122,0
2'	7,96 d (9Hz)	128,4	7,97 d (8Hz)	109,3
3'	6,93 d (9Hz)	116,1	6,95 d (8Hz)	150,9
4'	-	159,9	-	148,1
5'	6,93 d (9Hz)	116,1	6,95 d (8Hz)	114,0
6'	7,96 d (9Hz)	128,4	7,97 d (8Hz)	120,5
HO-5	13,00 s	-	-	-
H₃CO	-	-	-	55,2
glucose				
1''	5,28 d (7,7Hz)	99,5	5,28 d (8Hz)	99,8
2''	3,50 m	72,0	3,50 t (8Hz)	71,7
3''	5,05 t (9,4Hz)	76,9	5,10 t (8Hz)	77,2
4''	3,48 m	68,3	3,55 m	68,0
5''	3,63 m	76,7	3,6-3,8 m	76,8
6''	3,47 m et 3,72 m	61,1	3,6-3,8 m	60,7
coumaryle				
α	6,44 d (15,9Hz)	114,7	6,43 d (16Hz)	115,4
β	7,59 d (15,9Hz)	144,9	7,60 d (16Hz)	145,3
1'''	-	125,2	-	125,8
2'''-6'''	7,58 d (8,8Hz)	131,1	7,55 d (8,8Hz)	129,7
3'''-5'''	6,80 d (8,8Hz)	115,7	6,80 d (8Hz)	115,4
4'''	-	159,9	-	161,5
CO	-	167,5	-	167,3

Composé 11

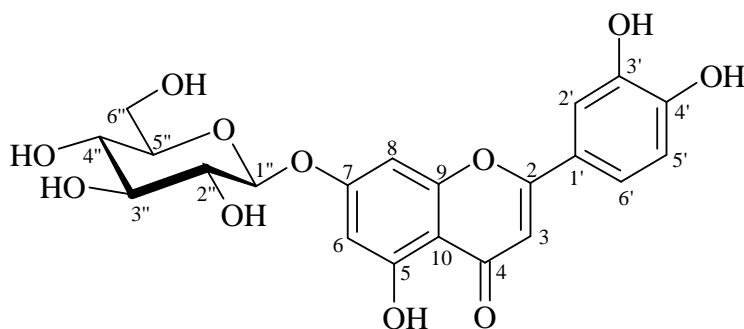


Fig.50. Composé 11

La spectrométrie de masse en mode *electrospray* du composé **11** (fig.50) donne un rapport m/z pour l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de 449, compatible avec la formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$. Le spectre *jmod* présente effectivement 21 signaux.

Ce produit présente également un aspect plus simple que les deux précédents en RMN du 1H (fig.51), permettant d'envisager la substitution d'un noyau 2-phénylchromone par un seul hexose. Dans la région des aromatiques, six signaux sont observables. Trois d'entre eux sont très comparables à ceux des protons 3, 6 et 8 des flavones précédemment isolées et présentées plus haut (composés **6** et **10**), ce qui pourrait indiquer un profil de substitution identique au niveau du noyau A et des carbones 2, 3 et 4. En revanche, on n'observe pas ici les deux doublets couplés ($J=9$ Hz) caractéristiques d'une substitution en *para* du cycle B, mais un système ABX : δ 6,91 d ($J=8,4$ Hz) ; δ 7,43 d ($J=2,2$ Hz) ; δ 7,46 dd ($J=2,2$ Hz, 8,3 Hz). Ceci indique un disubstitution du cycle B en 3' et 4'. La génine serait donc le lutéolol (ou lutéoline), qui n'est autre que la 3'-hydroxyapigénine.

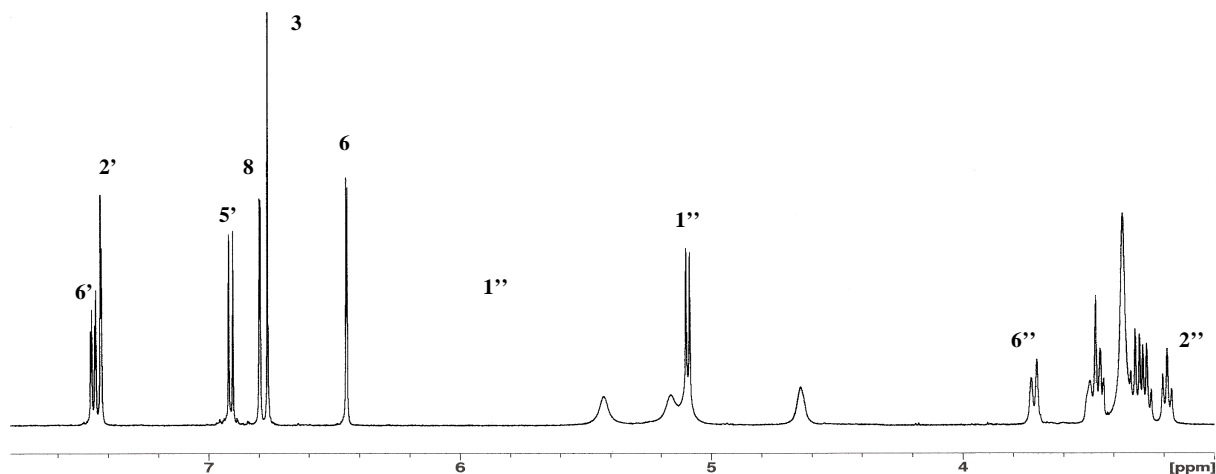


Fig.51. Spectre de RMN du ^1H du composé 11 à 500 MHz dans le $\text{DMSO-}d_6$

Concernant la nature et la position de l'ose substituant le lutéolol, la comparaison des déplacements chimiques (en RMN du ^1H et du ^{13}C) et de la constante de couplage de la fonction hémiacétalique avec les données recueillies dans la littérature tend à indiquer qu'il s'agirait d'un glucose branché sur la fonction hydroxyle en 7 de la génine. Ceci est confirmé par la corrélation du carbone 7 (δ 165,0) avec le proton 1'' (δ 5,09) lors de l'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (fig.52).

Les attributions réalisées sont également confirmées par les expériences de résonance magnétique nucléaire bidimensionnelles classiques (COSY, HSQC, HMBC).

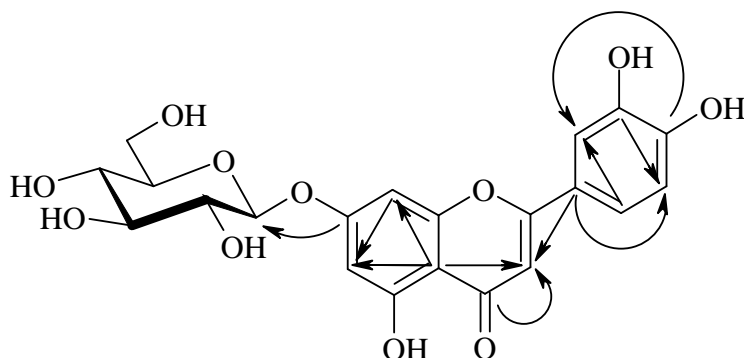


Fig.52. Corrélations HMBC choisies du composé 11 (C→H)

La structure du composé **11** a donc pu être établie comme étant le 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside, généralement appelé lutéolol-7-glucoside, mais pour lequel on peut trouver les noms glucolutéoline, lutéoloside, cynaroside ou digitoflavonoside. Ce composé est anciennement connu. La plus ancienne référence que nous ayons pu trouver le mentionnant remonte à 1943 (Sevin). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 15 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Harborne 1994, Agrawal 1989).

Tableau 15. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **11** (500 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ) et du lutéolol-7-glucoside dans le DMSO- d_6

	composé 11		lutéolol-7-glucoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
lutéolol				
2	-	163,4	-	163,2
3	6,77 s	103,6	6,75 s	103,5
4	-	182,4	-	182,2
5	-	161,6	-	161,0
6	6,45 d (2,1Hz)	100,0	6,45 d (2,1Hz)	99,9
7	-	165,0	-	164,8
8	6,80 d (2,1Hz)	95,2	6,79 d (2,1Hz)	95,3
9	-	157,4	-	157,3
10	-	105,8	-	105,7
1'	-	121,8	-	121,7
2'	7,43 d (2,2Hz)	114,0	7,43 d (2,1Hz)	113,7
3'	-	146,2	-	145,9
4'	-	150,4	-	150,0
5'	6,91 d (8,4Hz)	116,4	6,92 d (8,2Hz)	116,4
6'	7,46 d (8,3Hz, 2,2Hz)	119,6	7,45 dd (8,1Hz, 2,1Hz)	119,6
HO-5	13,00 s	-	12,95 sl	-
glucose				
1''	5,09 d (7,4Hz)	100,3	5,05 d (7,2Hz)	100,3
2''	3,18 t (8,9Hz)	73,6	3,1-3,5 m	73,3
3''	3,45 m	76,8		76,4
4''	3,27 m	69,9		69,9
5''	3,31 m	77,6		77,3
6''	3,72 d	61,0		3,71 dl

3. *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth.

3.1. Aspects botaniques

Cette plante appartient à la tribu *Pseudodictamnus* du genre *Ballota* (Citoğlu 2005).

C'est un arbuste persistant à feuilles et tiges tomenteuses blanchâtres, à fleurs blanches ou roses, haut de trente à soixante centimètres. *B. pseudodictamnus* tolère très bien chaleur et sécheresse, elle nécessite un bon ensoleillement et supporte mal l'humidité. C'est une plante à intérêt uniquement ornemental (photo 4).

Il existe une forme naine, dite « *nana* », dont les feuilles sont deux fois plus petites.

Le nom d'espèce, *pseudodictamnus*, c'est-à-dire « faux dictame », fait référence à la ressemblance de la plante avec le vrai dictame ou dictame de Crête, *Origanum dictamnus* L. (Ducourthial 2005).

Elle est rencontrée en Grèce, Crête et Libye. Une sous-espèce, *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth. subsp. *lycia* Hub.-Mor., est rencontrée en Turquie (Citoğlu 2004). Le seul synonyme à notre connaissance est *Marrubium pseudodictamnus* L.



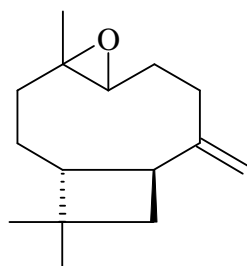
Photo 4. *Ballota pseudodictamnus* (source : Giardinaggio.it)

3.2. Travaux antérieurs sur *Ballota pseudodictamnus*

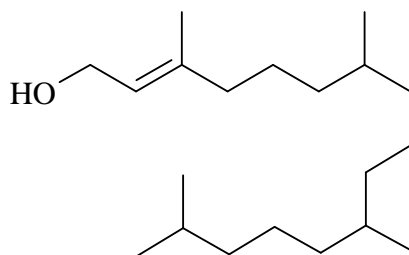
3.2.1. Investigations phytochimiques

3.2.1.1. Huile essentielle

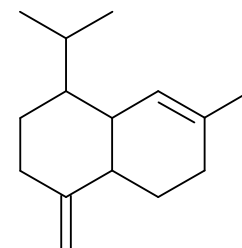
La composition de l'huile essentielle d'un échantillon crêtois a déterminée. Les constituants majoritaires étaient l'oxyde de caryophyllène (22%), phytol (12%), γ -muurolène (11%), β -caryophyllène (11%), α -copaène (6%), β -cubébène (5%) (fig.53) (Couladis 2002).



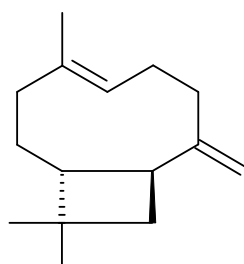
**oxyde de
caryophyllène**



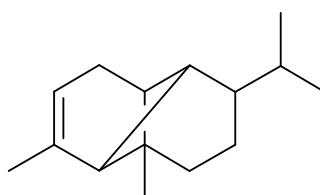
phytol



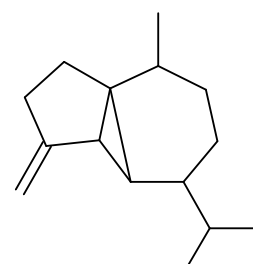
γ -muurolène



β -caryophyllène



α -copaène



β -cubébène

Fig.53. Constituants majoritaires dans l'huile essentielle de l'échantillon étudié de *Ballota pseudodictamnus*

3.2.1.2. Diterpènes

Trois diterpènes, la ballonigrine, la 18-hydroxyballonigrine et le marrubénol (fig.54), ont été isolés des parties aériennes de *Ballota pseudodictamnus* (Savona 1982). Le phytol, extrait par hydrodistillation (voir ci-dessus), est par ailleurs un diterpène. Deux diterpènes ont également été identifiés dans *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth. subsp. *lycia* Hub.-Mor. Il s'agit de l'hispanolone et de la déhydrohispanolone (fig.54) (Citoğlu 2005).

3.2.1.3. Polyphénols

Une flavone, la 5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone (fig.54), a été isolée des parties aériennes de *Ballota pseudodictamnus* (Savona 1982).

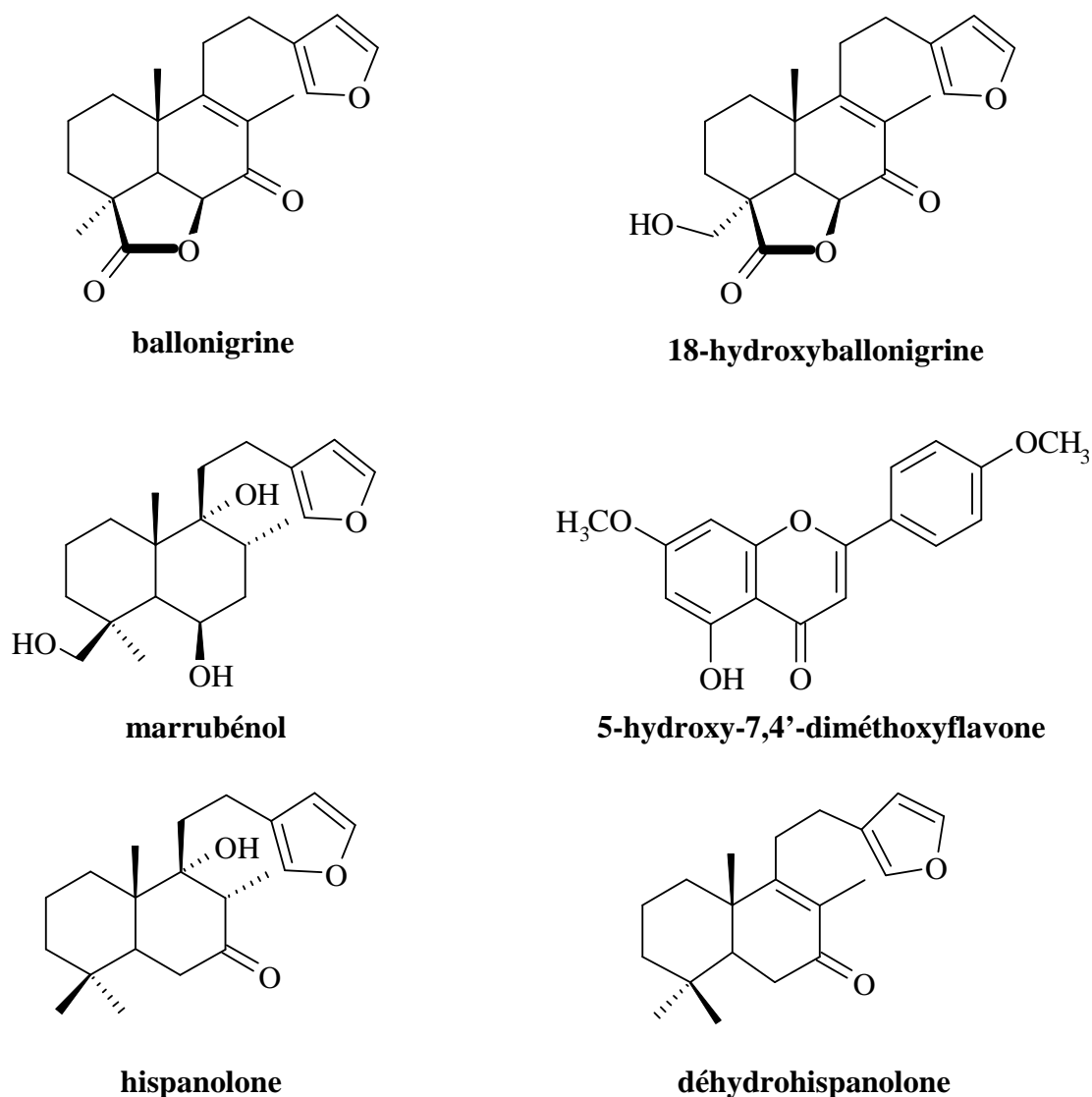


Fig.54. Structures des composés isolés de *Ballota pseudodictamnus*

3.2.2. Essais biologiques

3.2.2.1. Activité antimicrobienne

L'activité de l'huile essentielle de *Ballota pseudodictamnus* a été testée contre divers microorganismes. Elle s'est avérée forte à modérée contre les bactéries testées (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*

cloacae, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*), notamment Gram +, cette activité étant attribuée principalement à l'oxyde de caryophyllène. On note une CMI de 0,45 mg/ml contre *Streptococcus aureus*. En revanche, l'huile essentielle était inefficace contre les champignons (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida glabrata*) (Couladis 2002).

3.2.2.2. Activité antioxydante

- Un extrait éthanol/eau (3:1) de *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth. subsp. *lycia* Hub.-Mor. a été soumis aux mêmes tests que ceux évoqués précédemment pour *Ballota larendana*, avec des résultats très proches, à savoir une CI₅₀ de 70 mg/ml pour l'inhibition de la formation de O₂⁻ et peu ou pas d'inhibition de la peroxydation des LDL (Citoğlu 2004).
- Un extrait méthanolique de *Ballota pseudodictamnus* a en revanche montré une activité antioxydante égale à 99% de celle de l' α -tocophérol dans le test d'inhibition de la peroxydation de l'acide arachidonique par le système bléomycine-FeSO₄, mesurée spectrophotométriquement par l'absorption des TBARS (Couladis 2003).

3.3. Travaux personnels

Quatre composés ont été isolés et identifiés de *Ballota pseudodictamnus*.

3.3.1. Isolement des composés

Le schéma 3 présente le mode opératoire suivi pour l'isolement des quatre polyphénols obtenus des parties aériennes de *B. pseudodictamnus*.

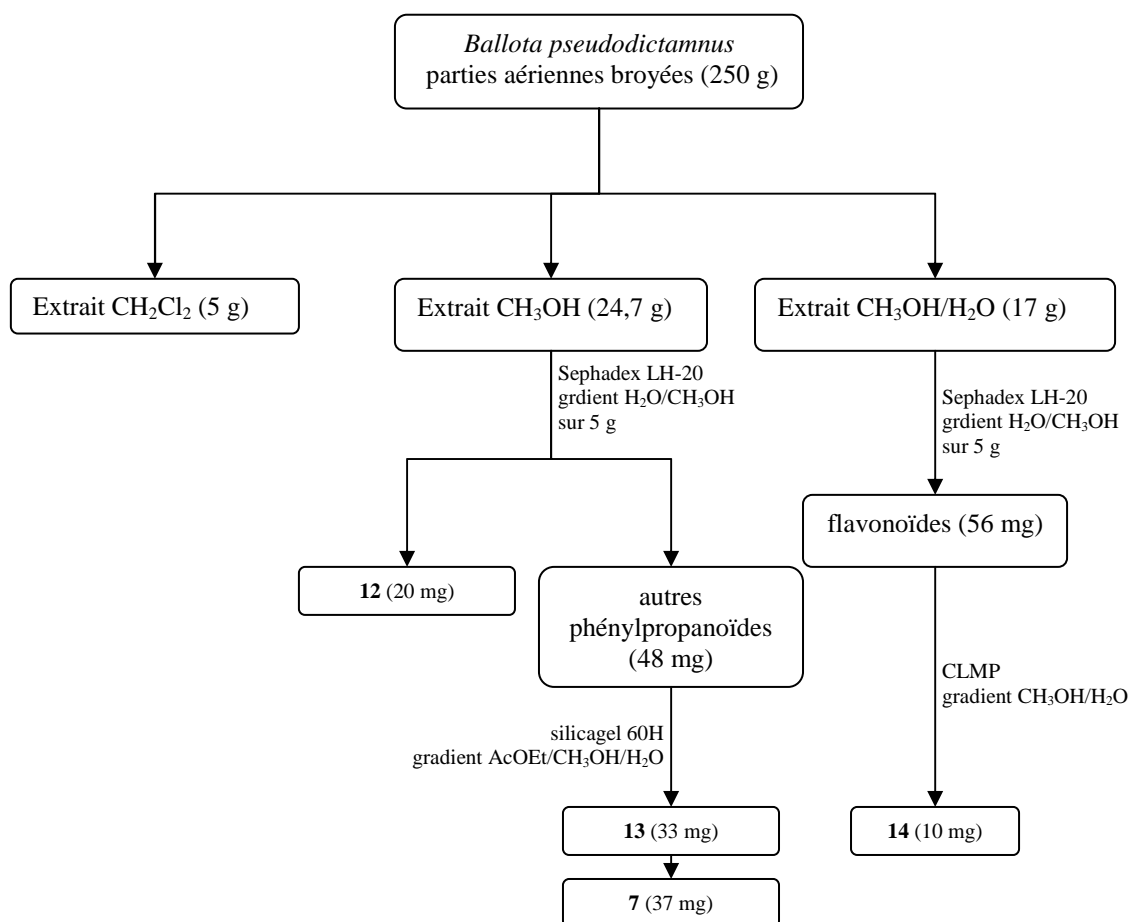


Schéma 3. Etapes de l'isolement des cinq molécules obtenues des parties aériennes de *Ballota pseudodictamnus*

3.3.2. Identification des composés

Composé 12

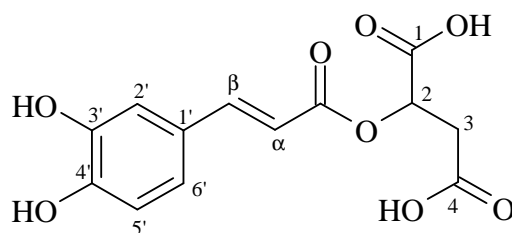


Fig.55. Composé 12

L'observation du spectre de RMN du ^1H du composé **12** (fig.55-56) montre cinq signaux dans la région des aromatiques. Les deux doublets à δ 7,55 et δ 6,33 ($J=15,9$ Hz) sont en faveur d'une double liaison en position *trans*. Les trois autres signaux situés à δ 7,05 (d, $J=2$ Hz), δ 6,93 (dd, $J=8,2$ Hz, 2 Hz) et δ 6,76 (d, $J=8,2$ Hz) forment un signal ABX correspondant à un noyau phényl 1,3,4-trisubstitué. L'ensemble de ces cinq signaux correspond à un résidu *E*-cafféyl. L'analyse par impact électronique en spectrométrie de masse (SM-IE) montre le pic de base à un rapport m/z de 180, ce qui vient confirmer la présence d'un acide caféique dans la structure de la molécule.

Les autres signaux du spectre de RMN du ^1H sont plus difficilement interprétables. Les deux signaux observés à δ 5,37 et δ 2,81 sont expliqués par l'estérification de l'acide caféique par l'hydroxyle en 2 d'un acide malique. Dans le spectre SM-IE, un pic à m/z 134 vient confirmer la possibilité d'une telle substitution.

Le produit est identifié comme étant l'acide (*E*)-cafféylmalique (ou acide phasélique) par comparaison à un témoin pur d'acide cafféylmalique et par confrontation des déplacements chimiques en RMN du ^1H à ceux rapportés dans la littérature (Wang 1998, Housti 2002) (tableau 16). Ce composé connu a été isolé pour la première fois de *Phaseolus vulgaris* L. (Fabacées) (Scarpati 1960). Dans le spectre SM-IE, l'ion moléculaire, bien que faible, est observable au rapport m/z 296.

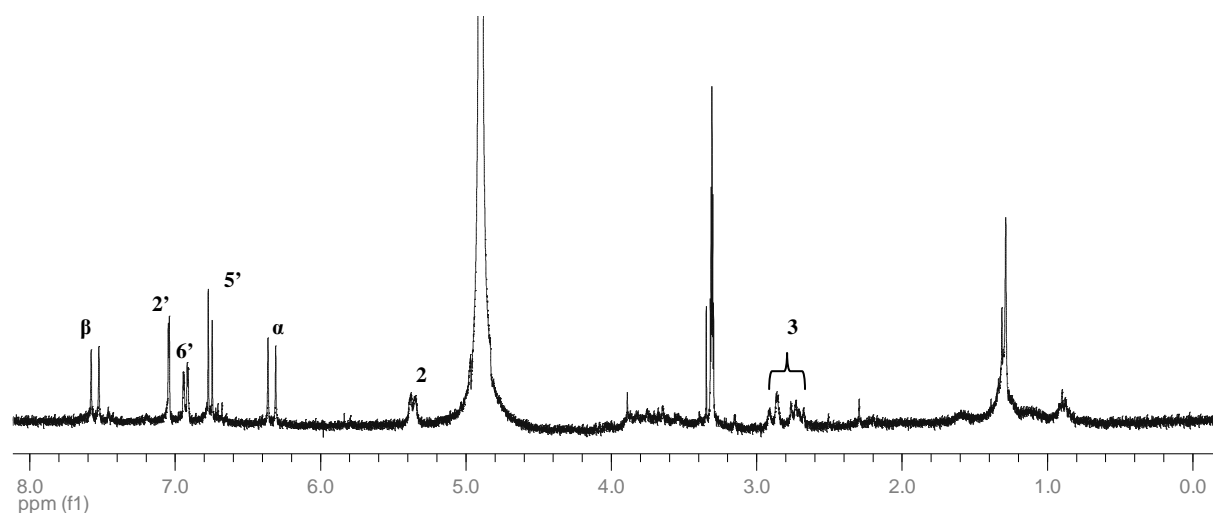


Fig.56. Spectre de RMN du ^1H du composé **12** à 300 MHz dans CD_3OD

Tableau 16. RMN du ^1H et du ^{13}C de **12** (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ ; CD_3OD) et de l'acide caféylmalique (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ ; D_2O)

	composé 12		acide caféylmalique	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
acide malique				
1	-	169,2	-	178,4
2	5,37 d (9,9Hz)	71,0	5,12 dd (11,3Hz, 2,7Hz)	73,9
3-α	2,81 m	37,9	2,61 dd (11,4Hz, 15,4Hz)	39,7
3-β			2,77 dd (15,4Hz, 2,8Hz)	
4	-	169,1	-	177,5
acide caféique				
1'	-	127,5	-	127,3
2'	7,05 d (2Hz)	116,1	7,17 sl	114,7
3'	-	147,5	-	147,2
4'	-	150,5	-	144,4
5'	6,76 d (8,1Hz)	117,4	6,90 d (8,2Hz)	115,3
6'	6,93 dd (8,1Hz)	124,3	7,10	122,9
α	6,33 d (15,9Hz)	114,9	6,38 d (16Hz)	116,4
β	7,55 d (15,9Hz)	148,7	7,62 d (16Hz)	146,3
CO	-	174,3	-	-

Composé 13

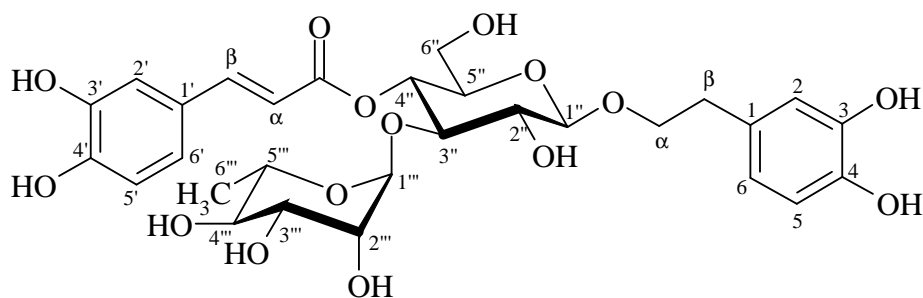


Fig.57. Composé 13

L'analyse par spectrométrie de masse *electrospray-ionspray* (SM-ESI) du composé **13** (fig.57) montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ ayant un rapport m/z de 647 en ionisation positive, compatible avec la formule brute $C_{29}H_{36}O_{15}$.

Sur le spectre de RMN du 1H (fig.58), l'observation de la région des aromatiques nous montre que ce composé appartient à la même série que certains composés isolés de *Marrubium peregrinum*. En effet, les déplacements chimiques et couplages des signaux observés dans cette région sont très proches de ceux que nous avons donnés pour les composés **7** à **9**. On retrouve ici les deux doublets alcéniques (δ 6,28 et δ 7,60, $J=15,9$ Hz) et le système ABX (δ 7,07, d, $J=1,9$ Hz ; δ 6,95, dd, $J=8,2$ Hz, 1,9Hz ; δ 6,79, d, $J=8,2$ Hz) correspondant à l'acide (*E*)-caféïque (acide 3,4-dihydroxycinnamique) d'une part ; le système ABX (δ 6,69, d, $J=1,6$ Hz ; δ 6,68, d, $J=8,2$ Hz ; δ 6,56, dd, $J=8,1$ Hz, 1,6 Hz) caractéristique de l'hydroxytyrosol (3,4-dihydroxyphényléthanol) d'autre part. Le triplet observé à δ 2,78 est un autre signal révélateur de la présence de l'hydroxytyrosol. Il correspond aux deux protons situés en β de l'oxygène.

Entre δ 3,2 et δ 4,2, on a un ensemble de signaux correspondant probablement à l'ensemble des protons adjacents aux fonctions alcooliques (secondaires ou primaires) des oses, certains pouvant d'ailleurs se superposer.

La partie du spectre allant de δ 4,2 à δ 5,2 est plus informative. Par simple comparaison avec les signaux du forsythoside B et du ballotétroside, on peut dire que les doublets observés à δ 4,37 ($J=7,7$ Hz) et à δ 5,20 ($J=1,7$ Hz) correspondent respectivement aux protons anomériques du β -D-glucose et de l' α -L-rhamnose. La présence de ce dernier est par ailleurs confirmée par la présence d'un doublet très caractéristique du méthyl (position 6''') de cet ose

(δ 1,10, 3H, $J=6,1$ Hz). Le signal observé à δ 4,94 correspond au proton 4 du glucose, dont la fonction hydroxyle est esterifiée par l'acide caféique. Les déplacements chimiques, très proches de ceux observés pour les composés de ce type que nous avons déjà isolés, suggèrent un schéma de substitution identique.

Il est tout à fait probable, étant donné la masse moléculaire du composé **13** et les informations obtenues par le spectre de RMN du ^1H , que le composé isolé soit constitué de deux génines (acide (*E*)-caféique et hydroxytyrosol) et de deux oses (β -D-glucose et α -L-rhamnose ; par rapport au forsythoside B, un apiose manque) et que ces unités soient assemblées de la même manière, c'est-à-dire que le glucose est substitué en 1 par l'hydroxytyrosol, en 3 par le rhamnose et en 4 par l'acide caféique.

La structure de cette molécule correspondrait donc à l'actéoside, composé assez couramment rencontré. Les identités de R_f sur CCM et de temps de rétention en CLHP par rapport à un échantillon authentique ont été déterminées dans différents systèmes de solvants. Par ailleurs, les déplacements chimiques de tous les signaux en RMN du ^1H sont identiques à ceux donnés dans la littérature (Kırmızıbekmez 2002, Owen 2003). Les signaux des protons des oses sont attribués précisément par comparaison avec un spectre très détaillé réalisé à 500 MHz (Owen 2003).

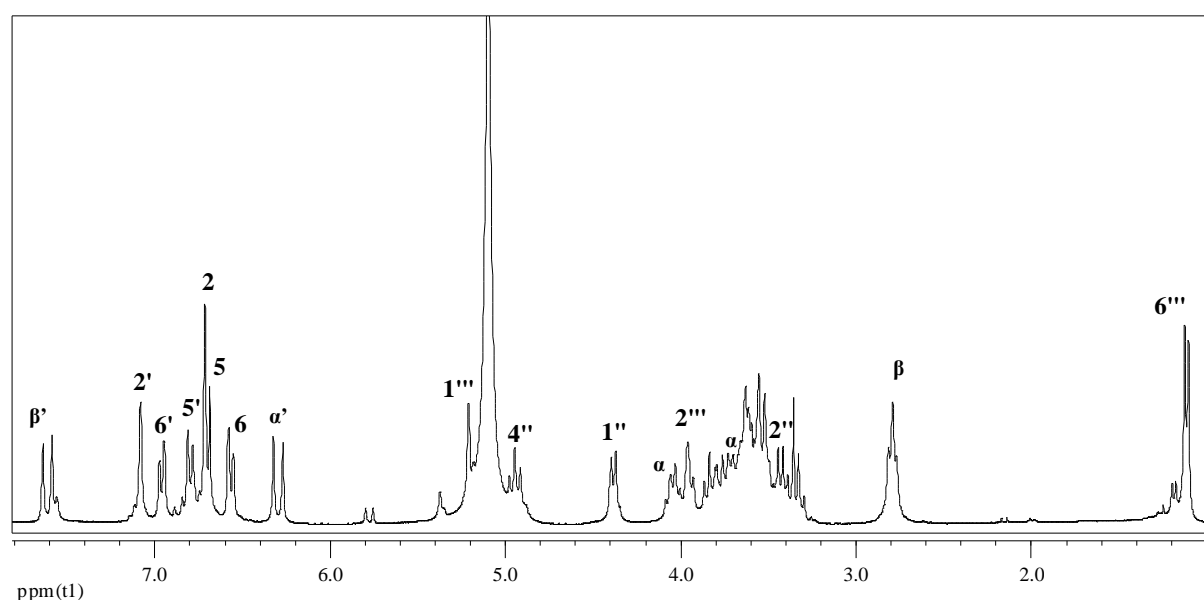


Fig.58. Spectre de RMN du ^1H du composé 13 (300 MHz, CD_3OD)

La structure du composé **13** a donc pu être établie comme étant le 3,4-dihydroxy- β -phényléthoxy-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4-*O*-(*E*)-caféyl- β -D-glucopyranoside, couramment appelé actéoside, verbascoside ou kusaginine, qui a été identifié pour la première fois dans l'espèce *Verbascum sinuatum* L. (Scrophulariacées) (Scarpati 1963). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 17 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Kırmızıbekmez 2002).

Tableau 17. RMN du ^1H (δ , J en Hz) du composé **13** et de l'actéoside à 300 MHz dans CD_3OD . RMN du ^{13}C (δ) de l'actéoside à 75 MHz.

	composé 13		actéoside	
	^1H	^1H	^1H	^{13}C
hydroxytyrosol				
1	-	-	-	131,4
2	6,69 d (1,6Hz)	6,69 d (1,8Hz)	6,69 d (1,8Hz)	117,1
3	-	-	-	146,1
4	-	-	-	144,7
5	6,68 d (8,2Hz)	6,68 d (8Hz)	6,68 d (8Hz)	116,3
6	6,56 dd (1,6Hz, 8,1Hz)	6,56 dd (1,8Hz, 8Hz)	6,56 dd (1,8Hz, 8Hz)	121,2
α	3,75 m	3,72-4,04 m	3,72-4,04 m	72,3
	4,04 dd (7,8Hz, 16,3Hz)			
β	2,78 t (7,4Hz)	2,80 t (7,6Hz)	2,80 t (7,6Hz)	36,3
acide caféique				
1'	-	-	-	127,6
2'	7,07 d (1,9Hz)	7,05 d (1,8Hz)	7,05 d (1,8Hz)	115,2
3'	-	-	-	146,8
4'	-	-	-	149,8
5'	6,79 d (8,2Hz)	6,78 d (8,2Hz)	6,78 d (8,2Hz)	116,5
6'	6,95 dd (1,9Hz, 8,2Hz)	6,96 dd (1,8Hz, 8,2Hz)	6,96 dd (1,8Hz, 8,2Hz)	123,2
α'	6,28 d (15,9Hz)	6,27 d (15,9Hz)	6,27 d (15,9Hz)	114,7
β'	7,60 d (15,9Hz)	7,59 d (15,9Hz)	7,59 d (15,9Hz)	148,0
CO	-	-	-	168,3
glucose				
1''	4,37 d (7,7Hz)	4,37 d (7,8Hz)	4,37 d (7,8Hz)	104,2
2''	3,41 t (8,5Hz)	3,39 dd (7,8Hz, 9Hz)	3,39 dd (7,8Hz, 9Hz)	76,2
3''	3,82 t (9,2Hz)	3,81 t (9Hz)	3,81 t (9Hz)	81,6
4''	4,94 t (9,3Hz)	4,95 t (9Hz)	4,95 t (9Hz)	70,4
5''	3,52 m	3,50 m	3,50 m	76,0
6'' (a et b)	3,51-3,62 m	3,64 m	3,64 m	62,3
rhamnose				
1'''	5,20 d (1,7Hz)	5,16 d (1,7Hz)	5,16 d (1,7Hz)	103,0
2'''	3,93 m	3,91 dd (1,7Hz et 3,4Hz)	3,91 dd (1,7Hz et 3,4Hz)	72,3
3'''	3,58 m	3,58 dd (3,4Hz, 9,4Hz)	3,58 dd (3,4Hz, 9,4Hz)	72,0
4'''	3,30 t (9,4Hz)	3,29 t (9,4Hz)	3,29 t (9,4Hz)	73,8
5'''	3,60 m	3,65 m	3,65 m	70,5
6'''	1,10 d (6,1Hz)	1,09 d (6,8Hz)	1,09 d (6,8Hz)	18,5

Composé 7

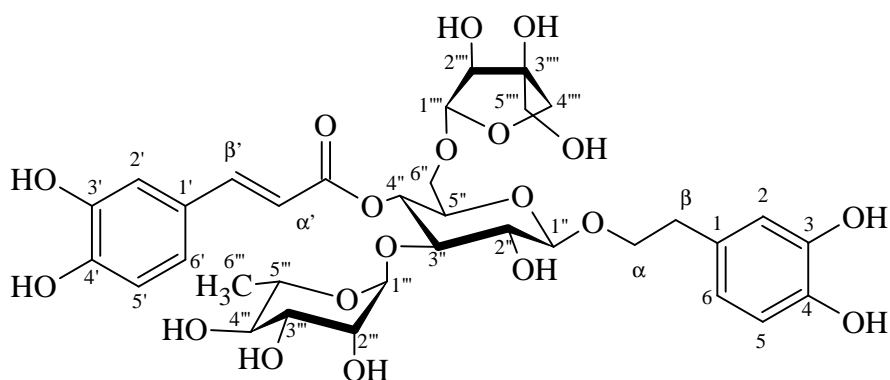


Fig.59. Composé 7

La structure de ce composé (fig.59) a été établie comme étant celle du forsythoside B. Ce composé étant strictement identique au produit **7** déjà décrit (page 70), sa détermination structurale n'est pas redétailée ici. De même, pour les données de RMN du ^1H et du ^{13}C , on pourra se reporter au tableau 11, page 73.

Composé 14

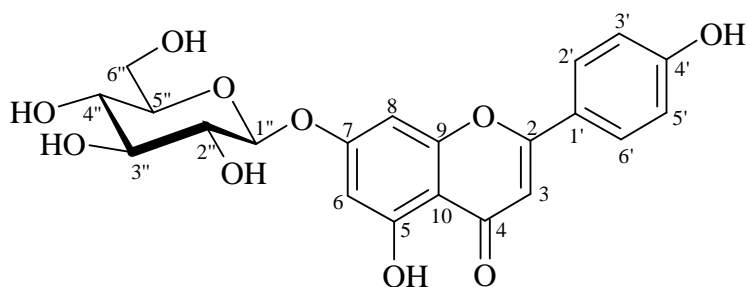


Fig.60. Composé 14

La spectrométrie de masse en mode *electrospray* du composé **14** (fig.60) donne une masse $[M+H]^+$ de 433, compatible avec la formule brute $C_{21}H_{20}O_{10}$.

Le spectre de RMN du 1H , tout d'abord réalisé dans CD_3OD (fig.61), rappelle celui des hétérosides de flavonoïdes dont la structure est déterminée plus haut. On observe des signaux compatibles avec la structure d'une flavone dans la région des aromatiques, et un doublet susceptible de correspondre au proton anomérique d'un ose. Même si les déplacements chimiques dans la région des aromatiques ne correspondent pas exactement à ceux trouvés dans la littérature pour l'apigénine, puisque nous n'avons pas trouvé de données dans CD_3OD , la nature des massifs et la constante de couplage nous incitent à penser qu'il s'agit bien d'un hétéroside de ce composé : on observe un singulet (δ 6,63, s, H-3), deux doublets couplés avec une faible constante correspondant aux protons du cycle A (δ 6,49, d, $J=2,1$ Hz, H6 ; δ 6,79, d, $J=2,2$ Hz, H8) et deux doublets couplés plus fortement, typiques de la substitution en *para* du cycle B (δ 6,93, d, $J=8,9$ Hz, H3'-5' ; δ 7,86, d, $J=8,9$ Hz, H2'-6').

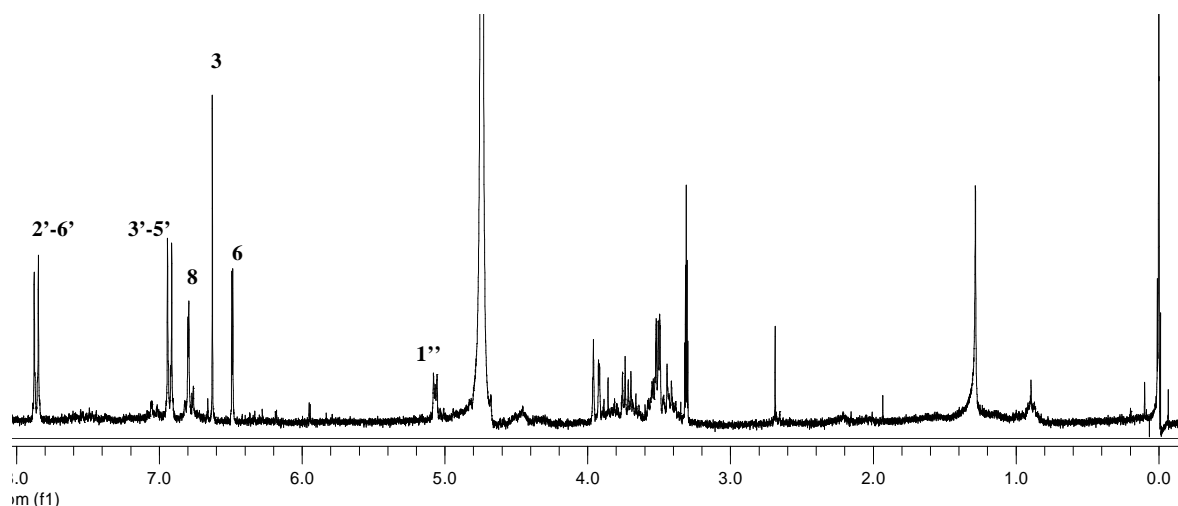


Fig.61. Spectre de RMN du ^1H du composé **14 à 300 MHz dans CD_3OD**

Le spectre de RMN du ^1H enregistré dans le $\text{DMSO-}d_6$ présente effectivement toutes les caractéristiques de l'apigénine-7-glucoside. Ceci est également confirmé par la RMN du ^{13}C .

La structure du composé **14** a donc pu être établie comme étant le 5,7,4'-trihydroxyflavone-7-O- β -D-glucopyranoside, généralement appelé apigénine-7-glucoside ou cosmosiine, qui a été isolé pour la première fois de *Cosmos bipinnatus* Cav. (Asteracées) (Nakaoki 1935). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 18 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Oyama 2004, Agrawal 1989).

Tableau 18. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **14** (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) et de l'apigénine-7-glucoside dans le DMSO- d_6 . RMN du ^1H du composé **14** dans CD_3OD (300 MHz, δ , J en Hz).

	composé 14			apigénine-7-glucoside	
	^1H (CD_3OD)	^1H (DMSO- d_6)	^{13}C	^1H	^{13}C
apigénine					
2	-	-	164,1	-	164,2
3	6,63 s	6,89 s	103,0	6,86 s	103,0
4	-	-	181,6	-	181,6
5	-	-	161,0	-	161,0
6	6,49 d (2,1Hz)	6,46 d (2,1Hz)	99,4	6,44 d (2,2Hz)	99,6
7	-	-	162,7	-	162,8
8	6,79 d (2,2Hz)	6,84 d (2,1Hz)	94,8	6,82 d (2,2Hz)	94,9
9	-	-	156,7	-	156,8
10	-	-	105,1	-	105,3
1'	-	-	121,1	-	121,1
2'-6'	7,86 d (8,9Hz)	7,99 d (8,9Hz)	128,0	7,95 d (8,8Hz)	128,1
3'-5'	6,93 d (8,9Hz)	6,96 d (8,9Hz)	115,7	6,93 d (8,8Hz)	115,8
4'	-	-	160,8	-	160,9
HO-5	-	13,00 s	-	12,95 s	-
glucose					
1''	5,07 d (7,4Hz)	5,09 d (7,4Hz)	100,3	5,05 d (7,3Hz)	100,3
2''	3,4-4,0 m	3,19 t (8,9Hz)	73,6	3,1-3,2 m ; 3,4-3,5 m	73,1
3''		3,48 m	76,8		77,0
4''		3,27 m	69,9		69,9
5''		3,31 m	77,6		76,4
6''		3,73 d (11Hz)	61,0	3,6-3,7 m	60,8

C. Activité antioxydante de composés isolés des genres *Marrubium* et *Ballota*

L'activité antiradicalaire de composés isolés a dans un premier temps été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique de DPPH, mesurée à 517 nm. La substance de référence était le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-chroman-2-carboxylique) (fig.62), qui a montré une CI_{50} (concentration inhibant 50% du radical DPPH) de 12,5 μ M (cf. fig.63).

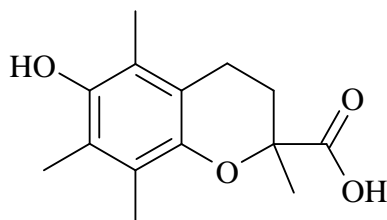


Fig.62. Structure du Trolox

Les composés qui ont été testés sont :

- un diterpène (la marrubiine **1**),
- quatre flavonoïdes : la ladanéine **3**, la 6-hydroxy-5,7,4'-triméthoxyflavone **4**, la terniflorine **6** (qui possède un groupement coumaryle potentiellement antioxydant) et l'apigénine-7-glucoside **14**
- quatre phénylpropanoïdes : le forsythoside B **7**, le ballotétroside **8**, l'acide phasélique **12** et le verbascoside **13** (dont nous verrons qu'il a été également isolé de *Lippia alba*).

Les résultats sont présentés dans la figure 63.

On notera dans un premier temps que la marrubiine (**1**) n'a aucune activité vis-à-vis du radical DPPH aux concentrations testées, ce qui est logique étant donnée sa structure dénuée de groupement phénolique ou de tout autre groupement connu pour être antioxydant.

Les flavones testées montrent une certaine activité, mais aucune d'entre elles n'est suffisamment active pour qu'une CI_{50} puisse être établie.

En revanche, tous les phénylpropanoïdes testés se sont révélés très actifs. L'acide phasélique (**12**), seul de ces composés à ne posséder qu'une seule génine phénolique, possède la CI_{50} la

plus élevée (26,4 μM), c'est-à-dire l'activité la plus faible. Les autres produits présentent des profils de réduction du radical DPPH très similaires entre eux, avec des CI_{50} respectives de 11,1 μM , 9,1 μM et 8,3 μM pour les composés **13**, **7** et **8**.

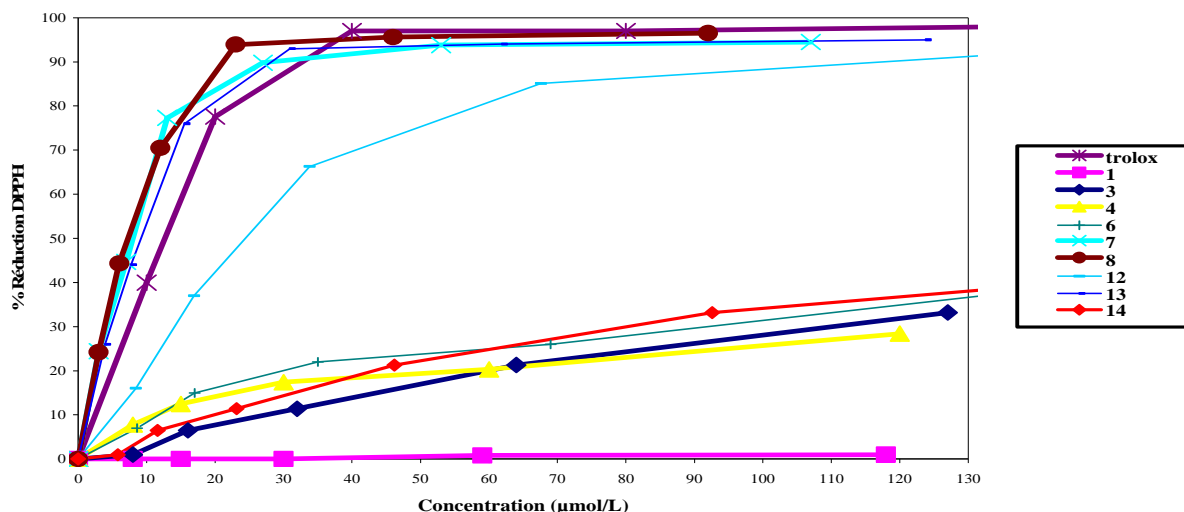


Fig.63. Activité captatrice du radical DPPH de composés isolés des genres *Marrubium* et *Ballota*

On peut conclure de cet essai que les groupements *ortho*-diphénoliques des phénylpropanoïdes leur confèrent une activité antioxydante bien supérieure à celle des flavones testées. Ceci peut être dû à un transfert de radical entre les deux OH, de façon intramoléculaire, qui permet une stabilisation et évite un transfert intermoléculaire. Trois cas sont à souligner :

- Le composé **12** (acide phasélique) est moins actif que les autres phénylpropanoïdes car il possède un nombre inférieur de fonctions *ortho*-diphénol.
- Le composé **6** est peu antioxydant malgré la présence d'un groupement phénylpropanoïque car celui-ci ne comporte qu'une fonction phénolique.
- le composé **3** n'est guère plus actif que **4**. Pourtant il possède bien une fonction *ortho*-diphénol en 5 et 6. Ceci s'explique probablement par le fait que l'OH en 5 est impliqué dans une liaison hydrogène avec la cétone en 4 et n'est donc pas disponible pour l'action antiradicalaire.

D. Discussion sur les genres *Ballota* et *Marrubium*

1. Intérêt chimiotaxonomique

La présente étude a permis l'isolement de neuf composés de *Marrubium peregrinum*. Deux avaient déjà été rapportés dans cette espèce. Les sept autres étaient connus, mais nouveaux dans cette espèce. Aucun des produits isolés de *Ballota larendana* (trois) ni de *Ballota pseudodictamnus* (quatre) n'avaient non plus été rapportés dans ces espèces. Ces informations peuvent constituer à long terme un intérêt chimiotaxonomique.

Parmi les produits déjà signalés dans la littérature comme présents chez *M. peregrinum*, peu ont été retrouvés au cours de nos travaux : seuls la marrubiine et la 5,6,7,4'-tétraméthoxyflavone ont été ré-isolés. L'apigénine, l'actéoside et le β -sitostérol ont été détectés mais non isolés. Ils semblaient présents en quantités assez faibles. Néanmoins, la composition de l'échantillon étudié est cohérente par rapport aux travaux antérieurs, les mêmes groupes de molécules étant présents : diterpènes labdaniques de type marrubiine, phénylpropanoïdes de structures proches de celle de l'actéoside et flavones dont les positions d'hydroxylation communes sont en 5, 7 et 4', ce qui est courant, mais pouvant être également hydroxylées en 6 et plus ou moins méthoxylées. Ceci pourrait être expliqué par l'existence de sous-espèces de localisation géographique et de composition chimique différentes ou par d'autres dates de récoltes. Quant à *Ballota larendana* et *Ballota pseudodictamnus*, leurs polyphénols avaient été trop peu étudiés pour qu'une comparaison des résultats soit pertinente.

Parmi l'ensemble des molécules isolées des trois espèces (dans ce mémoire ou auparavant) aucune n'est spécifique. La plupart des composés avaient déjà été isolés des deux genres. On peut cependant souligner :

- que le ballotétroside a été isolé ici seulement pour la troisième fois du règne végétal et n'a pour l'instant été rencontré que dans les genres *Ballota* et *Marrubium*. Pour autant, il ne constitue pas un marqueur de ces genres puisqu'il n'a pas été rencontré dans l'espèce *Ballota acetabulosa* (L.) Benth., qui a été étudiée dans notre laboratoire (Sahpaz 1997).
- que la marrubiine et les diterpènes voisins (prémarrubiine, pérégrinine, préprérégrinine, cyllénines A, pérégrinol...) sont des marqueurs privilégiés du genre *Marrubium* mais

qu'aucun n'est spécifique d'une espèce en particulier. Par exemple, parmi les composés les plus rares, la pérégrinine a été isolée de *Marrubium peregrinum* et *M. velutinum* Sibth. & Sm. (Salei 1967, Karioti 2005) et les cyllénines A de *Marrubium vulgare*, *M. cylleneum* Boiss. & Heldr., *M. peregrinum* (Fulke 1968, Karioti 2005 et ce mémoire) et très récemment de *Marrubium globosum* Montbr. et Auch. ex Benth. ssp. *libanoticum* Boiss. (Rigano 2006)

- que si les flavones 5,6,7,4'- tétra-*O*-substitués ne sont ni spécifiques du genre *Marrubium* ni distinctives de celui-ci par rapport à *Ballota* (la ladanéine ayant été rapportée chez *Ballota hirsuta* Benth., *B. acetabulosa* et *B. saxatilis* sbsp. *saxatilis* Sieber ex J & C Presl. (Ferrerres 1986, Mericli 1988, Citoğlu 1999), les tri- et tétraméthoxyflavones (composés **4** et **5**) n'ont à notre connaissance jamais été isolées du genre *Ballota* et l'ont été une seule autre fois du genre *Marrubium*, de l'espèce *M. velutinum* (Karioti 2005).
- que la 5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone n'a pas, à notre connaissance été détectée dans le genre *Marrubium*. Ce n'est pas une molécule très fréquemment rencontrée, pas même dans le genre *Ballota* où elle n'a été identifiée que dans trois espèces : *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth. (tribu *Pseudodictamnus*), *B. inaequidens* Hub.-Mor & Patzak et *B. rotundifolia* C. Koch (tribu *Microselidae*), sur treize testées (Citoğlu 2005).

On peut donc conclure que, si aucune des molécules isolées de *M. peregrinum* n'est spécifique, la présence exclusive de diterpènes apparentés à la marrubiine confirme indubitablement son appartenance au genre *Marrubium* et que la présence simultanée de certains composés marquent son originalité : sa composition chimique semble assez proche d'une seule espèce, *Marrubium velutinum*, dont elle se distingue par la présence de ballotétroside et l'absence d'autres phénylpropanoïdes tétrasaccharidiques, les vélutinosides I et II (Karioti 2003). L'étude de *Ballota larendana* et *B. pseudodictamnus* a été moins approfondie et aucun composé particulièrement intéressant du point de vue taxonomique n'a été identifié. La 5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone avait précédemment été isolée de *B. pseudodictamnus* ; cette molécule est assez rare et peut être considérée comme intéressante pour l'identification de l'espèce. D'une manière générale, il semble que l'identification de génines flavoniques méthoxylées puisse présenter un intérêt chimiotaxonomique dans les genres *Ballota* et *Marrubium*.

2. Intérêt pharmacologique

Nous avons pu montrer l'activité antiradicalaire de molécules polyphénoliques issues des espèces *Ballota larendana*, *B. pseudodictamnus* et *Marrubium peregrinum* grâce à un test en solution utilisant le radical DPPH. L'utilisation du DPPH en tant que révélateur pour CCM a également facilité la détection de certains composés (3, 4), qui étaient difficilement visualisables au moyen de révélateurs classiques comme le diphénylborate d'éthanolamine, en raison de leur méthylation (qui limite leur fluorescence) et de la superposition sur les plaques de CCM.

Les composés les plus intéressants du point de vue de l'activité antiradicalaire sont les phénylpropanoïdes en raison de leur(s) noyau(x) *ortho*-dihydroxylé(s). Certaines de ces molécules ayant déjà été isolées dans notre laboratoire des espèces *Ballota nigra* L. et *Marrubium vulgare* L., on peut souligner que l'intérêt de ces molécules antioxydantes a déjà été étudié de façon plus approfondie (Daels-Rakotoarison 2000, Seidel 2000, Martin-Nizard 2003). Voici les activités qui ont été démontrées :

- Activité inhibitrice vis-à-vis d'espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène, acide hypochloreux, superoxyde, hydroxyle) en modèle acellulaire et cellulaire
- Test d'inhibition *in vitro* de l'oxydation des LDL par le cuivre ou un azoinitiateur, le dichlorhydrate de la 2,2'-azobis-2-méthylpropionamide (AAPH) : CI_{50} respectives de 9,5 μ M (acide caféylmalique), 1,0 μ M (actéoside), 1,0 μ M (forsythoside B), 1,8 μ M (arénarioside) et 7,5 μ M (ballotétroside)
- Effet cytoprotecteur vis-à-vis de cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) mises en contact avec des LDL oxydées à l'air : baisse de la fuite extracellulaire de la lactate déshydrogénase, maintien de l'activité réductrice des mitochondries et réduction de l'accumulation d'hydroperoxydes.
- Diminution de 25 à 40% de la libération, par les BAEC, d'endothéline-1 (ET-1), peptide à effet vasoconstricteur relargué par les cellules endothéliales, ce qui apparaît comme un avantage non négligeable pour l'utilisation des phénylpropanoïdes dans la prévention de l'infarctus du myocarde.

Le potentiel des plantes, extraits ou substances pures issus des genres *Ballota* et *Marrubium* en tant qu'antioxydant pourrait s'avérer particulièrement intéressant dans la prévention de l'infarctus du myocarde en raison de l'effet vasorelaxant de la marrubiine et d'un autre

diterpène rencontré dans ces genres, le marrubénol (El-Bardai 2003). Ceci pourrait constituer un atout supplémentaire dans la lutte contre l'angor à composante spastique.

2.1.3. La famille des Verbénacées et l'espèce *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown

Lippia alba (Mill.) N.E. Brown (Verbénacées) est une plante médicinale et alimentaire très répandue en Amérique du Sud et en Amérique Centrale. Elle est présente sur le territoire français, dans les Antilles, et c'est justement la raison pour laquelle nous avons entrepris ce travail. En effet, une association, l'APLAMEDAROM (Association pour la promotion des PLAntes MEDicinales et AROMatiques de Guadeloupe) a entrepris la réhabilitation de plantes utilisées, mais privées de reconnaissance et de statut officiel depuis longtemps. En suivant une double approche, scientifique et juridique, les représentants de cette association ont fait valoir l'appartenance de ces plantes au patrimoine culturel français et l'existence de bases solides pour l'utilisation de certaines d'entre elles aujourd'hui et leur inscription à la Pharmacopée (Robard 2004).

Il faut savoir que la première Pharmacopée officielle française a été établie en 1803, un an après le rétablissement de l'esclavage par Napoléon I^{er} et que dans ce contexte, il était hors de question de laisser les esclaves noirs utiliser leurs propres remèdes, de peur qu'ils empoisonnent les colons blancs. La vente de plantes avait du reste été interdite aux Noirs dès 1794. Et ce n'est pas au moment de l'abolition de l'esclavage (1848), mais bien 150 ans plus tard qu'on a entrepris de corriger cette injustice (Payot 2003) !

C'est dans cette démarche que nous avons entrepris l'étude phytochimique de *Lippia alba*, qui s'intégrait par ailleurs dans le sujet de recherche du laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, la famille des Verbénacées étant proche de celle des Lamiacées à laquelle appartiennent les genres *Ballota* et *Marrubium*, dont certaines espèces sont étudiées dans ce mémoire.

2.1.3.1. Aspects botaniques

2.1.3.1.1. Morphologie des Verbénacées

Les Verbénacées sont une famille regroupant une centaine de genres et 2600 espèces d'herbacées, de buissons et d'arbres. Comme pour les Lamiacées, on observe très communément des tiges à section quadrangulaire et un caractère aromatique du à la présence d'huile essentielle. Les feuilles sont presque toujours opposées ou verticillées et simples ; là encore, il n'y a pas de stipules. Les fleurs sont presque toujours bisexuées et zygomorphes. Le

calice est synsépale et majoritairement pentamère. La corolle est sympétale et présente généralement cinq lobes inégaux qui peuvent parfois donner un aspect fortement bilabié évoquant celui des Lamiacées. L'androcée consiste en quatre étamines didyames soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes. Le gynécée (dont la structure constitue le principal outil de discrimination vis-à-vis des Lamiacées) consiste en un seul pistil, presque toujours composé de deux carpelles, un seul style terminal ou subterminal et un ovaire pas ou très légèrement lobé, comprenant généralement quatre locules (séparés par une fausse cloison), avec chacun un seul ovule axillaire. Un disque nectarifère peu développé, hypogyne et symétrique est présent chez de nombreuses espèces. Le fruit est une drupe ou est composé de plusieurs nucules (Carr 2005).

2.1.3.1.2. Le genre *Lippia*

Le genre *Lippia* appartient à la sous-espèce des Verbénoïdées (tribu Lantanées). Il inclut environ 200 espèces d'herbes, buissons et arbustes, qui sont principalement rencontrées en Amérique du Sud, en Amérique Centrale et en Afrique tropicale (Terblanché 1996). La classification la plus couramment utilisée est celle établie par Moldenke, sur la base d'une comparaison des descriptions données de ce genre dans la littérature entre 1849 et 1969. Néanmoins, certains auteurs dénombrent jusqu'à deux fois plus d'espèces, ce qui peut être expliqué par l'existence de plusieurs taxons ayant des caractères en commun avec le genre *Lippia* : il s'agit essentiellement des genres *Acantholippia*, *Aloysia*, *Lantana* et *Phyla* (ISB). De nombreuses confusions sont donc possibles. L'exemple le plus connu est bien entendu la verveine officinale, *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton S., qui est parfois désignée sous le nom de *Lippia citriodora* H.B.K. On peut également évoquer la plante connue en Australie sous le nom de « lippia », mauvaise herbe notoire, qui, s'il elle est parfois appelée *Lippia canescens* Kunth., est aujourd'hui plutôt rattachée au genre *Phyla* (*Phyla nodiflora* var. *canescens* (H.B.K.) Moldenke) (Leigh 2004). Pour la présentation du genre *Lippia* en général et de l'espèce *Lippia alba* en particulier, c'est la classification proposée par Moldenke qui est ici suivie.

2.1.3.1.3. *Lippia alba* : données botaniques et usages

a) Caractères morphologiques

C'est un arbrisseau à longue tige grêle pubescente quadrangulaire, atteignant 1,7 m de hauteur. Les feuilles opposées ou ternées, membraneuses, à pétiole court (3-8 cm), présentent

une pubescence tomenteuse grise cendrée sur les deux faces et possèdent un arôme intense. Le limbe est elliptique, oblong et peut prendre des formes variées avec un apex obtu, aigu ou arrondi, une base cunéiforme ou décurrente et des bords dentés ou crénelés. Les nervures sont fines, saillantes en-dessous.

La corolle des fleurs (floraison toute l'année) est blanche, rose ou d'un mauve bleuâtre. Le tube, mesurant 3 à 5 mm, est rose pourpre, violet ou blanc (photo 5).

Le fruit est composé de deux nucules indéhiscentes avec chacun une graine brune (Adams 1972, Castro 2002, Fournet 2002, Howard 1989).



Photo 5. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown

Au Guatemala, trois caractères morphologiques ont été corrélés au chimiotype de seize échantillons. Il s'agit de la largeur de la feuille, de la forme de son extrémité (aiguë ou arrondie), et de la longueur de la tige florale. Le chimiotype myrcénone est caractérisé par des feuilles plus larges, à extrémité aiguë, et des tiges florales plus courtes que le chimiotype citral. Les auteurs ont donc supposé l'existence de deux sous-espèces de *Lippia alba* au Guatemala (Fischer 2004).

b) Répartition géographique

Lippia alba est assez largement répandue en Amérique Centrale et en Amérique du Sud, principalement au Brésil et au nord de l'Argentine. Elle croît sur des sols sablonneux, au bord des rivières, dans les zones tropicales et subtropicales. Sa présence est également rapportée en Afrique tropicale, en Inde et en Australie.

c) Synonymie

De nombreux synonymes sont rapportés (Pascual 2001a, Terblanché 1996, Lawrence 1984, ISB) :

- *Camara alba* (Mill.) Kuntze
- *Lippia alba* (N.E.) Brown ex. Britton & Wilson
- *Lippia asperifolia* A. Rich./*Lippia asperifolia* Poepp./*Lippia asperifolia* Marthe
- *Lippia balsamea* Mart.*
- *Lippia capensis* (Thunb.) Spreng.
- *Lippia citrata* Cham. Et Schlecht*/*Lippia citrata* Willd.*/*Lippia citrata* Cham.
- *Lippia crenata* Sessé & Moc.
- *Lippia geminata microphylla* Griseb.
- *Lippia geminata* H.B.K.*/*Lippia geminata* Kunth* et var. *microphylla* Griseb.
- *Lippia glabriflora* Kuntze
- *Lippia globiflora* Kuntze*/ *Lippia globiflora* (L'Hér.) Kuntze et var. *normalis* Kuntze, *glabriuscula* Kuntze, *microphylla* (Griseb.) Kuntze, *geminata* (Kunth) Kuntze
- *Lippia havanensis* Turcz
- *Lippia involucrata* L.
- *Lippia lantanoides* Coult. / *Lippia lantanoides* (Lam.) Herter

* Synonymes de la variété *Lippia alba* var. *globiflora* (L'Hér.) Moldenke (Pascual 2001a).

- *Lippia panamensis* Turcz.
- *Lippia trifolia* Sessé & Moc.
- *Lippia virgata* Sessé et Moc.
- *Lantana alba* Mill.
- *Lantana canescens* Hort.
- *Lantana geminata* (H.B.K.) Spreng./*L. geminata* Spreng./*L. geminata* (Kunth)Spreng.
- *Lantana lavandulacea* Milld.
- *Lantana lippoides* Hook & Arn.
- *Lantana mollissima* Desf.
- *Phyla geminata* H.B.K.
- *Verbena globiflora* L'Hér.
- *Verbena lantanoides* Willd.
- *Verbena odorata* Steud.
- *Zapania globiflora* (L'Hér.) Willd.
- *Zapania lantanoides* Lam.
- *Zapania odorata* Pers.
- *Zapania odoratissima* Scop.

Cette abondance de noms peut témoigner à la fois de la possible variabilité morphologique de cette espèce et des subtiles distinctions taxonomiques entre plusieurs genres de la famille des Verbénacées (ce thème a été évoqué plus haut).

d) Variétés signalées

Nous avons pu relever plusieurs taxons infraspécifiques (Oliveira 2006) :

- *Lippia alba* f. *alba* Moldenke
- *Lippia alba* f. *intermedia* Moldenke, dont le nom vernaculaire au Brésil serait « carmelitana »
- *Lippia alba* f. *macrophylla* Moldenke
- *Lippia alba* f. *scabra* Moldenke
- *Lippia alba* var. *globiflora* (L'Hér.) Moldenke, pour laquelle l'appellation « Oaxaca lemon verbena » est rencontrée
- *Lippia alba* var. *carterae* Moldenke, appelée « licorice verbena », caractérisée par des fleurs jaunes et une odeur particulière (huile essentielle à teneur élevée en estragole)

En outre, des cultivars sont mentionnés, au Brésil et en Inde (Gupta 2001, Kumar 2002) :

- *Lippia alba* cv. LAC-1
- *Lippia alba* cv. LAC-2 (stérile)
- *Lippia alba* cv. Kavach (stérile, issu de l'accession LAC-2)
- *Lippia alba* cv. CIMAP/L-601 (mutant obtenu par irradiation de LAC-2)
- *Lippia alba* cv. Bhurakshak (CIMAP/L-640) (mutant breveté obtenu par irradiation de LAC-2)

e) Noms vernaculaires

De nombreux pays étant concernés, les noms vernaculaires abondent :

- Antilles françaises : mélisse, brisée, brizé, lanmériq, dité lanmériq, thé d'Amérique, thé karayib, chin, thé de Chine, sauge du Brésil, soj, verveine blanche, quintonine, kentonin, vévenn blan, mélisse de calme, milis dé kanm, piepiepao, twa tass (Grenand 2004).
- Argentine : salvia morada, salvia del campo, salvia, salvia maestra, salvia de jardín, salvia de la casa, kaguetá iché itaá (Schroeder 2004, Vitto 1997)
- Bolivie : ivirakati (Bourdy 2004)
- Brésil : erva-cidreira (Zoghbi 1998), cidreira (Vale 1999), falsa melissa (Zetola 2002), carmelitana, erva cidreira do campo, salva do Brasil, cedrilha, chá do tabuleiro, cidreira brava, cidreira da terra, cidró, alecrim do campo, cidrão, cidrilha, salsa brava, salsa limão, salva brava, sálvia, sálvia da gripe, além de cidra, lípia, malmequer do mato, malva, salva, salva limão, salva do mato, tomilho silvestre (Corrêa 1992)
- Colombie : pronto alivio (Antioquia), curatodo, orégano de cerro (Magdalena) (Stashenko 2003)
- Cuba : quitadolor, anís de España (Pino Alea 1996)
- Etats-Unis d'Amérique: white lippia, hierba del negro, hierba negra, bushy lippia, bushy matgrass, alfombrillia, cidrilla, hierba buena, oregano de burro, salva do Brasil, salva Colorado, te de Castilla, toronjil de España
- Guatemala : salvia morada, salvia azul (Senatore 2001), salvia santa, salvia sija, junaislama (Fischer 2004), juanilama (Girón 1991)
- Honduras : juanilama, oregan de monte
- Jamaïque : guinea mint

- Mexique : tarete (Altschul 1973), hierba maestra (Zamora-Martinez 1992), mirto (Alanís 2005)
- Sainte-Lucie : douvan tout
- Trinidad : colic mint, guinea mint, Santa Maria, teasan
- Venezuela : toronjil mulato

Au Brésil, où elle est rencontrée dans tout le pays, et où elle est cultivée en tant que matière première pour des produits médicinaux, différentes variétés naturelles sont évoquées, notamment au nord-ouest du pays. Dans la forêt amazonienne brésilienne, la population connaît deux « ethnovariétés », toutes deux employées pour soigner des maladies différentes. L'une est appelée « cidreira » et est utilisée comme antalgique et sédatif. L'autre variété, « carmelitana », est utilisée contre les maux d'estomac et les troubles digestifs (Castro 1998). Cette distinction sera développée dans la partie consacrée aux études ethnopharmacologiques de *Lippia alba*. Il faut également signaler que le terme « cidreira » peut désigner plusieurs plantes aromatiques à odeur citronnée et utilisées dans les troubles digestifs pour des propriétés carminatives et spasmolytiques : *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, mais aussi, entre autres, *Melissa officinalis* L. (Lamiacées) et *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (Poacées) (Gazola 2004). Le risque de confusion est cependant faible, ces plantes étant morphologiquement très différentes.

f) Usages traditionnels

De par sa large distribution géographique et son abondance dans certaines contrées, *Lippia alba* a trouvé de nombreuses utilisations dans la médecine traditionnelle d'une vaste partie sud du continent américain et des îles alentour.

On l'utilise comme :

- analgésique / antiinflammatoire / antipyrétique (diaphorétique)
- stimulant
- sédatif
- antidiarrhéique / antidysentérique
- antispasmodique

Elle sert également de remède pour :

- les maladies de la peau
- les troubles gastrointestinaux
- les maladies hépatiques et douleurs vésiculaires (cholérétique)

- les désordres menstruels (emménagogue)
- les maladies respiratoires (expectorant)
- la syphilis et la blennorragie

C'est également un élément important d'assaisonnement pour toutes sortes de plats (Pascual 2001a, Pino Alea 1996, Schroeder 2004, Vitto 1997).

2.1.3.1.4. Travaux antérieurs sur *Lippia alba*

a) Composition en minéraux

La composition de plusieurs macro- (azote, phosphore, potassium, calcium, magnésium) et micronutriments (cuivre, zinc, manganèse, fer) a été mesurée, en Argentine, dans les feuilles sur dix échantillons cultivés de la plante n'ayant reçu aucun traitement fertilisant, pendant les mois de septembre et novembre (période végétative). Les résultats sont consignés dans le tableau 19 (Schroeder 2004).

Tableau 19. Moyennes des quantités d'azote (N), phosphore (P), potassium (K), calcium (Ca), magnésium (Mg), cuivre (Cu), manganèse (Mn), fer (Fe) et zinc (Zn) présentes dans la feuille de *Lippia alba* pendant le période végétative en Argentine.

	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Mn	Fe	Zn
	%				mg.kg ⁻¹				
Septembre	1,52	0,70	0,22	1,40	0,36	54,10	91,05	231,20	53,25
	±0,08	±0,05	±0,02	±0,04	±0,04	±1,73	±0,83	±0,76	±0,84
Novembre	1,02	0,20	0,10	1,00	0,18	17,80	74,50	129,50	22,55
	±0,03	±0,06	±0,007	±0,08	±0,02	±1,31	±2,09	±0,81	±0,63

Le même type d'analyse réalisé au Brésil, fournit des résultats comparables pour les trois minéraux communs, Ca (1,38%), K (0,25%) et Mg (0,17%); en revanche, pour les oligoéléments testés, les résultats semblent fort différents : Fe (1,32 mg.kg⁻¹), Mn (3,05 mg.kg⁻¹), Zn (3,41 mg.kg⁻¹). Ont été testés également le sodium Na (0,04%) et l'aluminium

Al (479 mg.kg⁻¹). Les auteurs concluaient à un intérêt en tant que source de calcium, modéré par une teneur non négligeable en aluminium (Almeida 2002).

b) Investigations phytochimiques

α) Huile essentielle

La littérature est particulièrement abondante sur l'huile essentielle de *Lippia alba*. Il semblerait qu'il existe de nombreux chimiotypes et qu'à la fois la teneur en huile essentielle et sa composition soient très variables. Les molécules pouvant être rencontrées en quantité non négligeable (c'est-à-dire supérieure ou égale à 5% du total de l'huile essentielle ; toutes les molécules mentionnées sont reprises dans le cas d'articles anciens sans quantification) (quand plusieurs méthodes ont été utilisées, nous avons retenu ici les pourcentages obtenus par hydrodistillation, pour que des comparaisons soient possibles entre un maximum de publications) sont :

En Argentine

- Dipentène (limonène ?), D-limonène, L-pipéritone (Fester 1954a, région de Santa Fe)
- Limonène, pipéritone, dihydrocarvone (Fester 1954b, région de Santa Fe)
- Limonène, lippione, pipéritone (Fester 1955, région Entre Rios)
- α-pinène, dihydrocarvone, citral, camphre (Fester 1955, région de Santa Fe)
- Dihydrocarvone, 1,8-cinéole, camphre, linalol, citral (Fester 1961a, échantillon de Isla Puente, région de Santa Fe)
- Citral (Fester 1961a, échantillon de Villa Ana dans le Chaco santafesino)
- Citral, 1,8-cinéole (Fester 1961b, région de Corrientes)
- Limonène (34-47%), pipéritone (37-24%), 1,8-cinéole (10-13%) (Catalán 1977, province de Tucumán)
- Deux chimiotypes, déterminés en fonction de leur localisation géographique :
 - Chimiotype de la région de Chaco : Citral (néral + géranial) majoritaire en automne (60%), valeur la plus basse observée en été (16%). Méthylhepténone qui subit dans un degré moindre les mêmes variations. Parallèlement, le taux de linalol diminue de l'automne (0,6-1%) à l'été (60%). Le β-caryophyllène garde un taux constant toute l'année, mais dépendant du lieu de récolte (5 à 16%).

- Chimiotype de la région de Corrientes : Tagéténone (myrcénone + ocyménone), myrcène (jusqu'à 5%). Un autre échantillon de la région de Corrientes contenait néanmoins principalement du myrcène (42%) et du camphène (30%), sans que des quantités appréciables de tagéténone aient pu être détectées.

(Ricciardi 1999)

Les différents lieux de récolte sont, pour plus de clarté, indiqués sur la carte 1. Pour cette carte comme pour les suivantes, une homologie de couleur des différents points indique une homologie de composition chimique de l'huile essentielle. Les constituants évoqués ci-dessus sont représentés dans la figure 64.



Carte 1. Carte du nord de l'Argentine comportant une localisation approximative des différents sites de récolte des échantillons argentins de *Lippia alba* dont l'huile essentielle a été analysée dans la littérature : Santa Fe (● Fester 1954, 1955, 1961a), Chaco (● Ricciardi 1999, ● Fester 1961a), Entre Rios (● Fester 1955), Corrientes, (● Fester 1961b, ● Ricciardi 1999), Tucumán (● Catalán 1977)

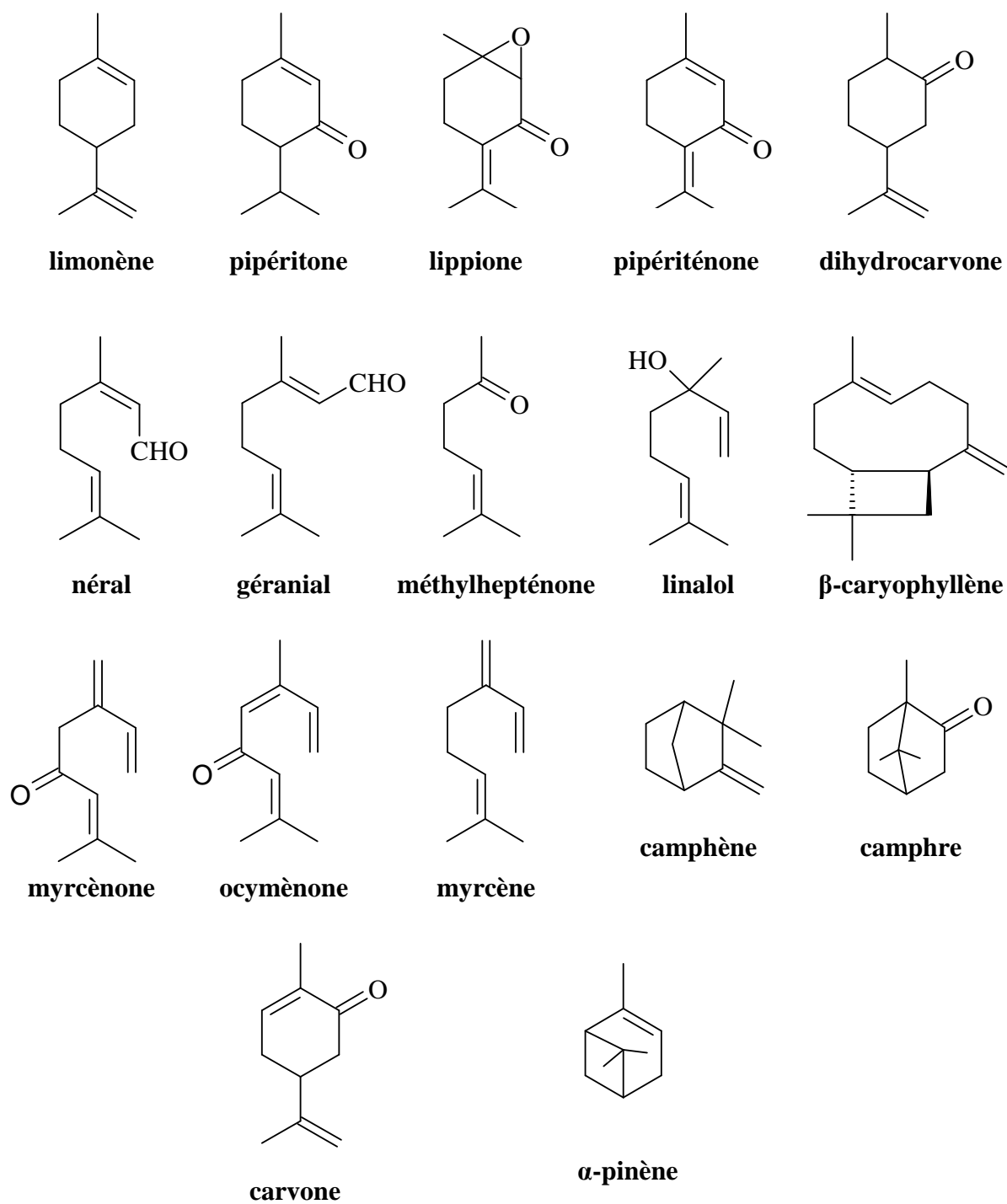


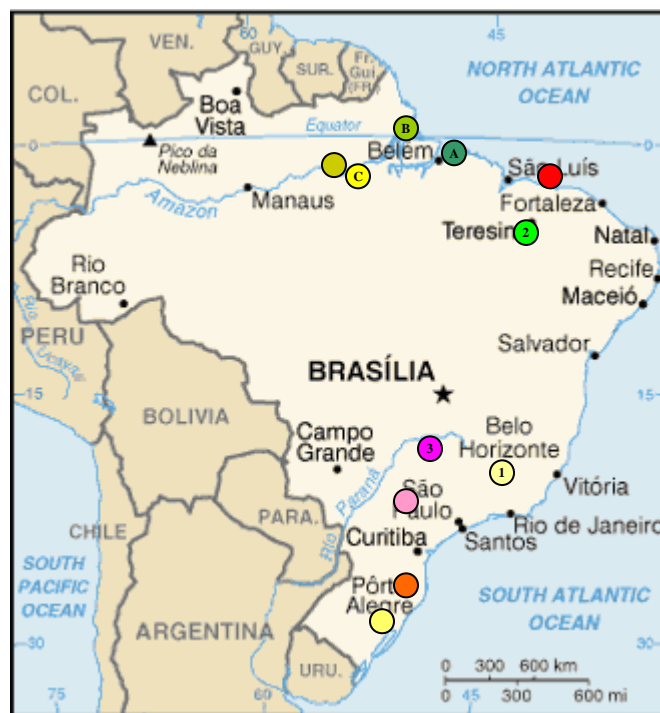
Fig.64. Principaux constituants dans l'huile essentielle des différents échantillons de *Lippia alba* étudiés en Argentine

Au Brésil

- β -caryophyllène (24%), néral (10%), géraniol (13%), 2-undécane (9%), (Craveiro 1981)
- Citral (65% = 28% néral et 37% géraniol), β -caryophyllène + oxyde de β -caryophyllène (9%) (Fun 1990)
- γ -terpinène (47%), *p*-cymène (9%), β -caryophyllène (7%) (Gomes 1993)
- Trois chimiotypes désignés comme suit :
 - EO_I : citral (55%), myrcène (10%), *p*-cymène (9%), β -caryophyllène + oxyde (8%)
 - EO_{II} : citral (63-71%), limonène (23,2%)
 - EO_{III} : carvone (42-55%), limonène (23-30%)(Matos 1996)
- Linalol (79%), 1,8-cinéole (6%) (Frighetto 1998)
- Trois chimiotypes différents, collectés dans trois municipalités différentes du Brésil :
 - Chimiotype A (Santa Maria) : 1,8-cinéole (35%), limonène (18%), carvone (9%), sabinène (8%)
 - Chimiotype B (Belterra) : limonène (32%), carvone (32%), germacrène D (21%), myrcène (11%)
 - Chimiotype C (Chaves) : germacrène D (25%), géraniol (22%), néral (14%), β -caryophyllène (10%)(Zoghbi 1998)
- Néral, géraniol et β -caryophyllène (Castro 2002)
- Linalol (50 à 79%), 1,8-cinéole (7 à 14%), avec un rendement et un taux de linalol supérieurs entre décembre et mars (Atti-Serafini 2002)
- β -caryophyllène (34%), oxyde de β -caryophyllène (18%), citral (néral 5% + géraniol 7%), curcumène (7%) (Zétola 2002)
- Linalol (76%) (Duarte 2005)
- Limonène (27%), carvone (49%) (Braga 2005)
- Trois chimiotypes (Tavares 2005) :
 - Chimiotype 1 : citral (60-72%), géraniol (8-9%), myrcène (jusqu'à 5%)
 - Chimiotype 2 : carvone (53-62%), limonène (15-17%), germacrène D (max. 6%), élémol (max. 5%)

- Chimiotype 3 : linalol (60-74%), 1,8-cinéole (max. 6%), germacrène D (max. 5%)
- Deux échantillons (Oliveira 2006) :
 - *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. : citral (37%), myrcène (15%), (*E*)-géraniol (5%), germacrène D (5%).
 - *Lippia alba* f. *intermedia* : citral (22%), nérol (10%), (*E*)-géraniol (6%)

Les différents lieux de récolte sont, pour plus de clarté, indiqués sur la carte 2. Les constituants évoqués ci-dessus sont représentés dans la figure 65.



Carte 2. Carte du Brésil comportant une localisation approximative des différents sites de récolte des échantillons brésiliens de *Lippia alba* dont l'huile essentielle a été analysée dans la littérature : ● Craveiro 1981 ; chimiotypes A (●), B (●), C (●) Zoghbi 1998 ; ● Frighetto 1998 ; ● Zétola 2002 ; ● Atti-Serafini 2002 ; chimiotypes 1 (●), 2 (●), 3 (●) Tavares 2005 ; ● Oliveira 2006. Seuls les échantillons sauvage ou d'origine indiquée sont présentés.

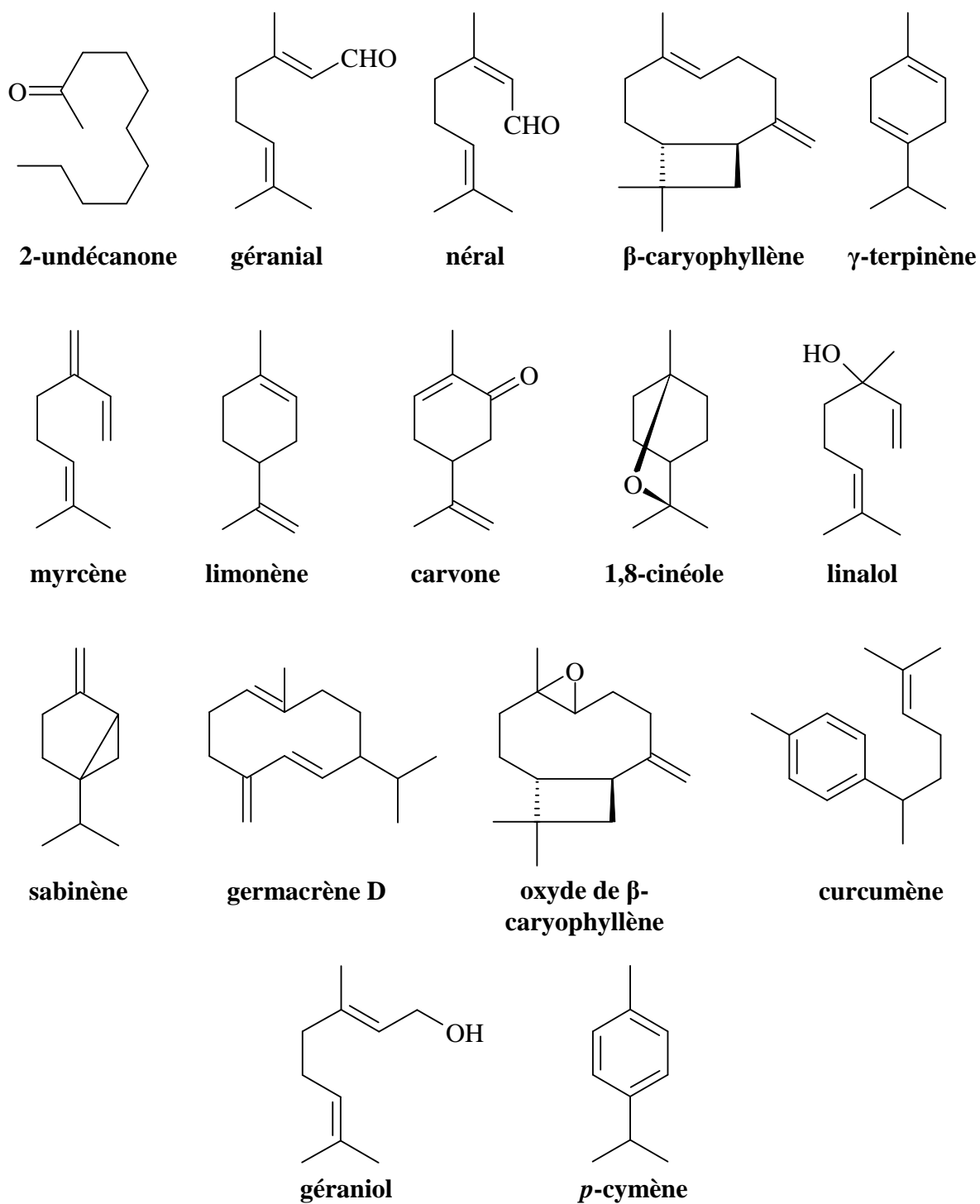


Fig.65. Principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle des différents échantillons de *Lippia alba* étudiés au Brésil

En Colombie

Bicyclosesquiphellandrène (7%), limonène (33%), carvone (51%) (Stashenko 2003 et 2004) (fig.66)

Au Costa Rica

Carvone (69%), limonène (23%) (Ciccio 2004) (fig.66)

A Cuba

Limonène (6-7%), pipéritènone (6-8%), β -guaiène (10-12%), carvone (29-40%) (Pino Alea 1996) (fig.66)

Au Pérou

Carvone (63%), germacrène D (6%), limonène (5%) (Leclercq 1999) (fig.66)

Aux Etats-Unis d'Amérique

Lippia alba var. *carterae* : estragole (56%), 1,8-cinéole (13%), camphène (7%) (fig.66) (Tucker 1999)

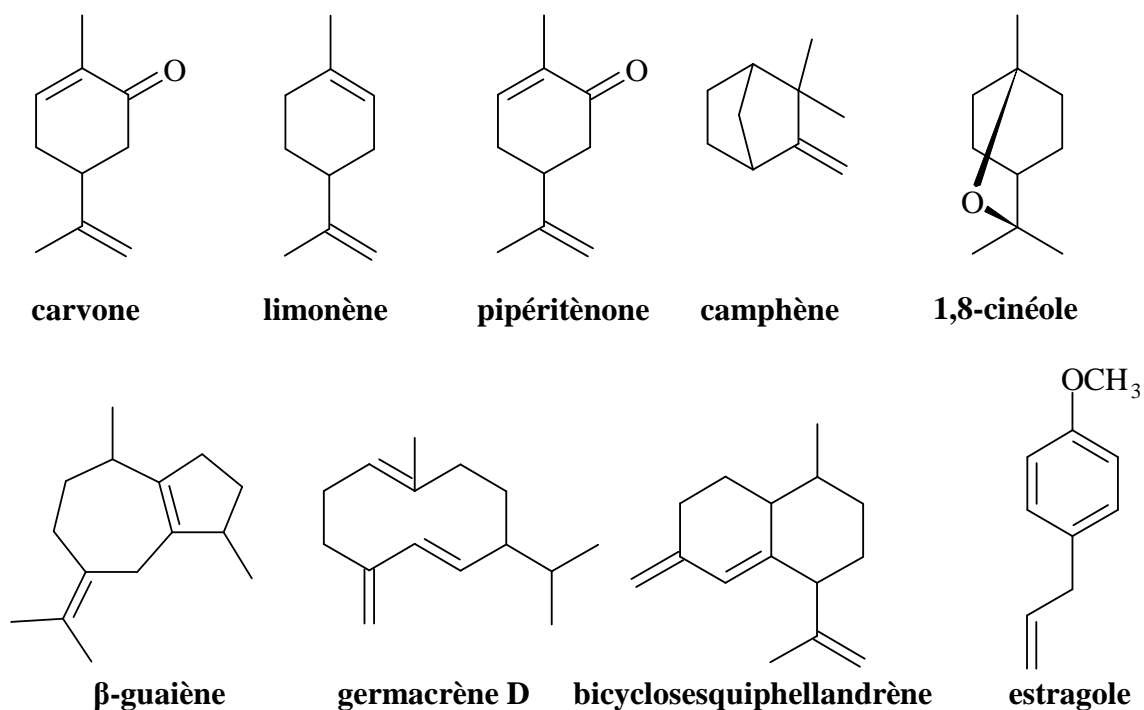


Fig.66. Principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle de différents échantillons de *Lippia alba* récoltés en Colombie, à Cuba, au Pérou et aux Etats-Unis

A Curaçao

Citral (57%), β -caryophyllène (6%), méthylhepténone (6%), citronellol (5%) (fig.67)

(Lawrence 1984).

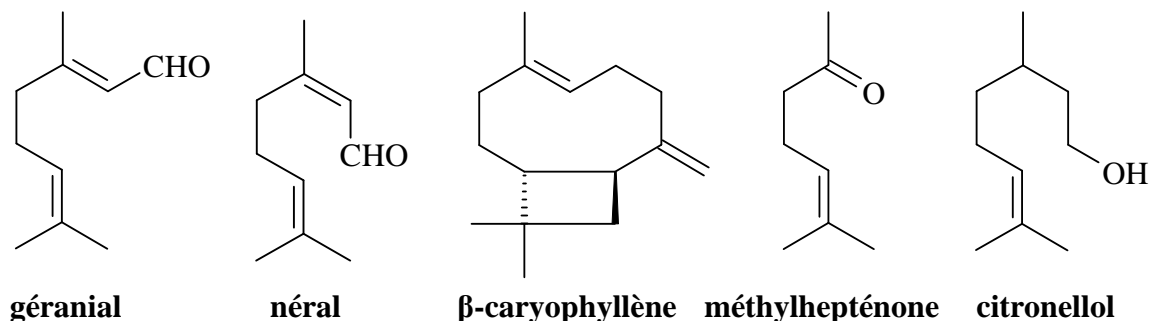


Fig.67. Principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle de *Lippia alba* à Curaçao

En Uruguay

- Camphre (18%), 1,8-cinéole (16%), β -cubébène (6%), β -caryophyllène (5%) (Dellacassa 1990)
- linalol (55%), β -caryophyllène (9%), germacrène D (6%) (Lorenzo 2001) (fig.68)

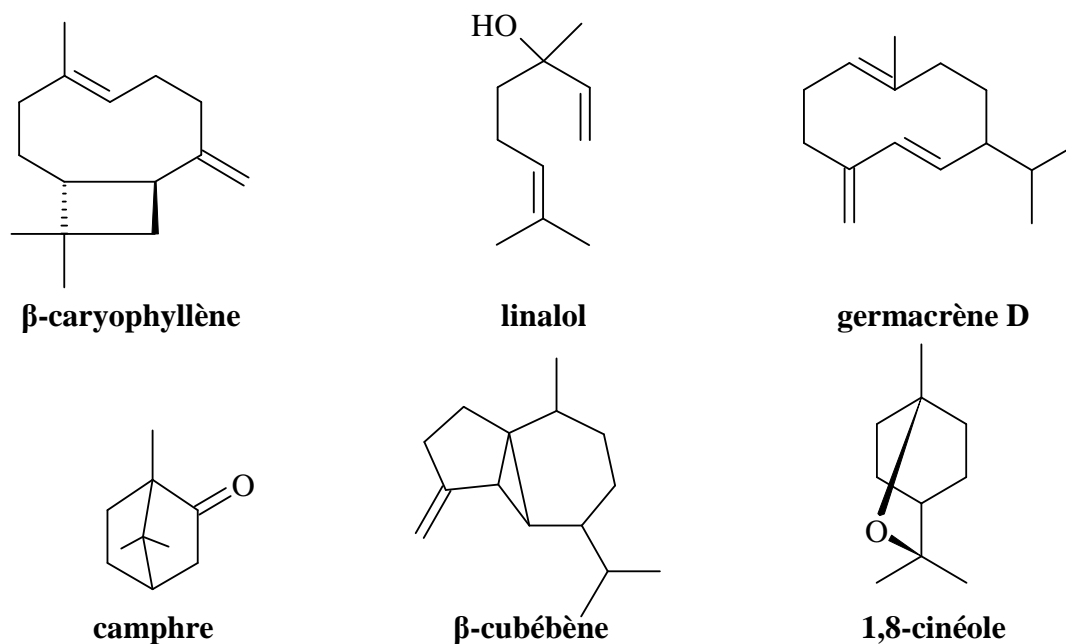


Fig.68. Principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle des échantillons de *Lippia alba* en Uruguay

Au Guatemala

- Limonène (44%), pipéritone (31%), 1,8-cinéole (14%) (Senatore 2001). Ursula Fischer et Rolando Lopez affirment qu'ils n'ont trouvé aucun représentant de l'espèce *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown au lieu de récolte indiqué (Chimaltenango). Ils ajoutent que d'après leurs expérimentations, le climat de cette région est inapproprié à cette espèce (Fischer 2004).
- Deux chimiotypes établis à partir de seize échantillons récoltés dans tout le Guatemala (Fischer 2004):
 - Le plus rencontré, à odeur de moisi : myrcénone (54%), (Z)-ocyménone (13%), myrcène (7%), (E)-ocyménone (5%), germacrène D (5%)
 - l'autre (2 échantillons), à odeur de citron : géraniol (26%), 1,8-cinéole (23%), néral (18%)

Les différents lieux de récolte sont visibles sur la carte 3. Les principales molécules identifiées dans l'huile essentielle de *Lippia alba* du Guatemala sont présentées dans la figure 69.



Carte 3. Carte du Guatemala comportant une localisation approximative des différents sites de récolte des échantillons guatémaltèques de *Lippia alba* dont l'huile essentielle a été analysée dans la littérature : ● Senatore 2001, ● chimiotype « citron », ● chimiotype « moisi ».

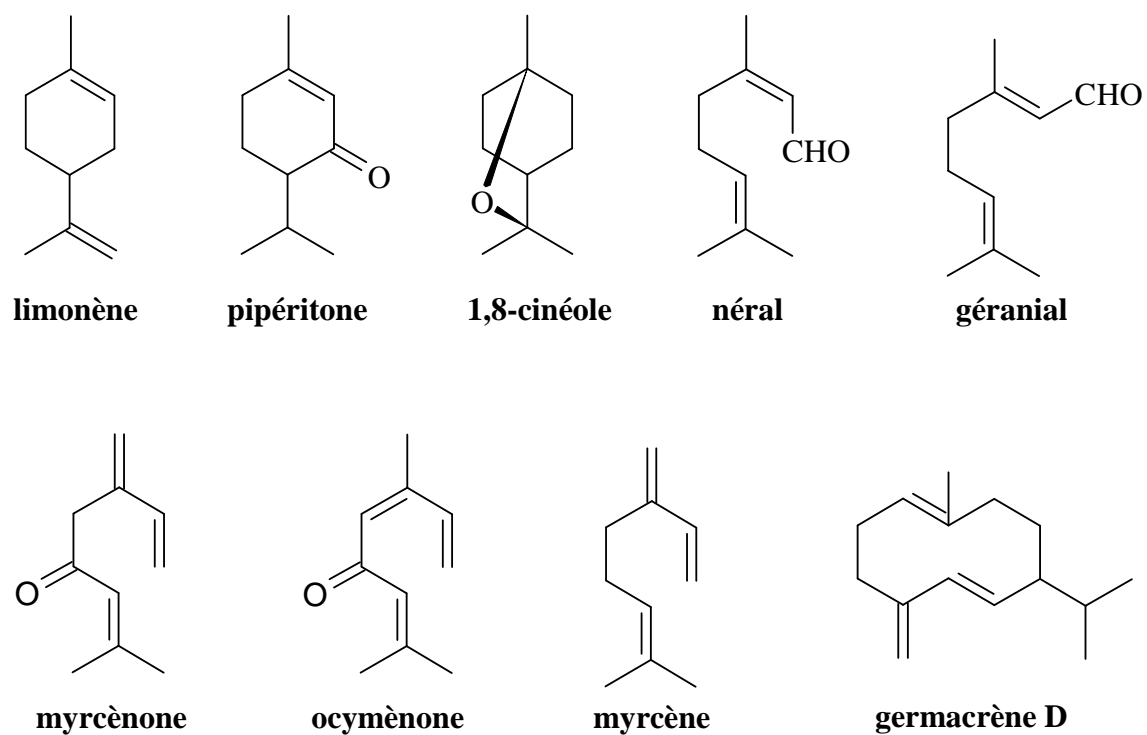


Fig.69. Principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle des échantillons de *Lippia alba* étudiés au Guatemala

En Inde

- Myrcène (26%), citral (16%) (Singh 1999)
- Géraniol (16%), myrthénal + myrthénol (10%), néral (9%), géraniol (7%), β -caryophyllène + oxyde (8%), acétate de néryle (7%) (Singh 2000)
- Linalol (65%), 1,8-cinéole (7%) (Bahl 2000, cultivar LAC-2)
- Linalol (69), 1,8-cinéole + limonène (5) (Mallavarapu 2000, cultivar "Kavach")
- Linalol (69-72%), acétate de géranyle (6%) (Gupta 2001, cultivar "Kavach")
- Linalol (65%), citral (5%) (Bahl 2002, cultivar LAC-2)
- Linalol (81%) (Bahl 2002, cultivar CIMAP/L-601)
- Citral (49%) (Kumar 2002, cultivar LAC-1)
- Linalol (42%), citral (27-29%), 1,8-cinéole (27-29%) (Kumar 2002, cultivar breveté CIMAP/L-640, dit "Bhurakshak")

Les principales molécules rencontrées dans les huiles essentielles indiennes de *Lippia alba* sont présentées dans la figure 70.

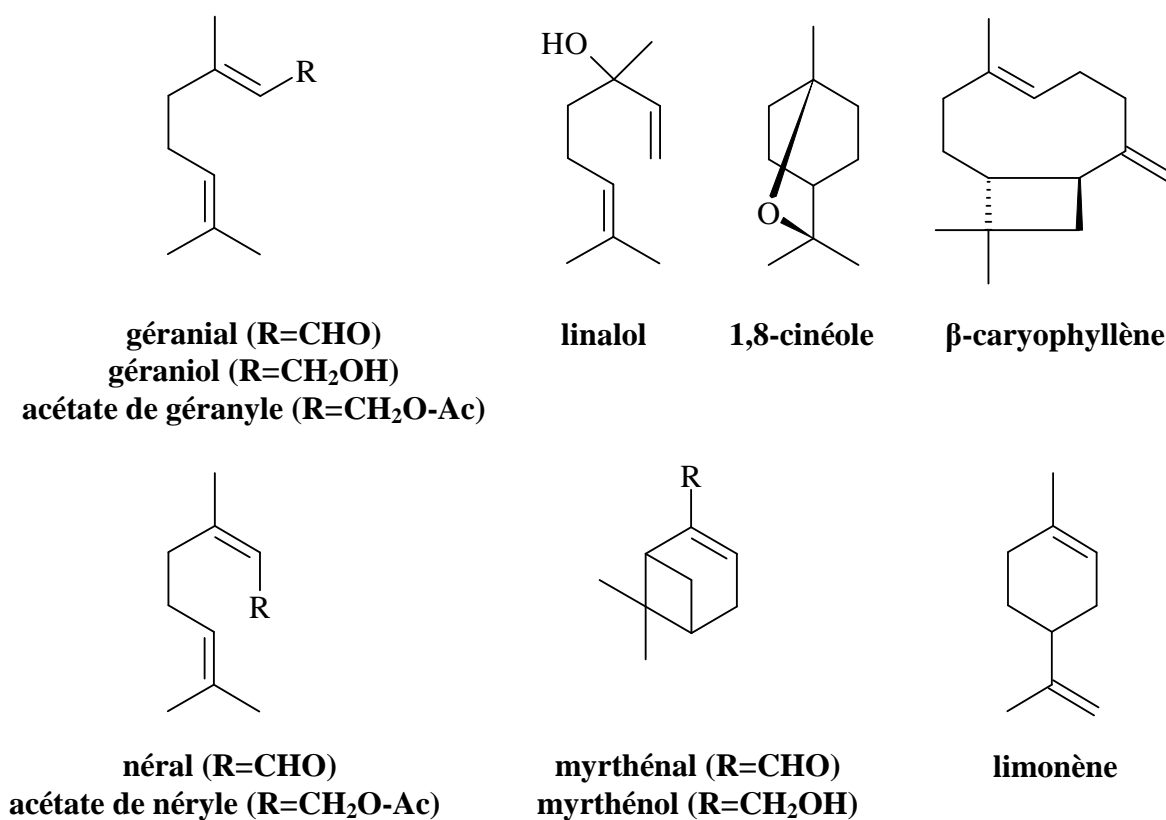


Fig.70. Principaux constituants identifiés dans l'huile essentielle des différents échantillons de *Lippia alba* étudiés en Inde

Tentative de synthèse bibliographique sur la composition de l'huile essentielle de *Lippia alba*

Nous avons essayé de regrouper l'ensemble des publications disponibles sur la composition de l'huile essentielle de *Lippia alba* et d'établir une classification qui n'a pour vocation que de simplifier la compréhension de ce problème délicat en évitant la multiplication de chimiotypes aux différences infimes. Une telle synthèse est forcément imparfaite, aussi ne peut-elle être donnée qu'accompagnée des critères ayant guidé les choix de regroupement des différentes publications et d'une mise en garde invitant le lecteur à un certain recul vis-à-vis d'elle.

Nous avons donc choisi comme base pour l'établissement de notre classification :

- La nature du ou des constituants majoritaires
- La recherche de composés secondaires dont la présence, si elle n'est pas systématique, semble assez spécifique d'un groupe d'essences
- La prise en compte d'une parenté entre des molécules différentes, mais présentant des structures proches ou une origine biosynthétique analogue (rapport de précurseur à dérivé ou de différents dérivés d'un précurseur commun)
- La recherche d'une éventuelle explication géographique ou pédoclimatique à l'existence de différents chimiotypes
- La prise en compte, dans la mesure du possible et des informations disponibles dans les publications, de l'éventualité d'une variation saisonnière dans la composition de l'huile essentielle

Les différents groupes proposés sont présentés dans le schéma 4.

Le type **I** regroupe les échantillons où le citral et/ou le linalol sont présents en quantité importante et, presque toujours, majoritaire. Le rapprochement est fait sur la base de la parenté structurale et de l'origine biosynthétique proche des deux composés (Samuelsson 1999 ; pour une illustration de la parenté biosynthétique des différents chimiotypes, voir figure 71). Le type **Ia** regroupe les échantillons où le citral est majoritaire toute l'année, le type **Ib** ceux où c'est le linalol qui domine. Dans certains cas, les deux sont détectés, mais l'un des deux est toujours largement plus important que l'autre. Il semble que certains individus de la région de Chaco, en Argentine, produisent alternativement du citral (automne) et du linalol (été) (**Ic**), ce qui viendrait confirmer l'unité du groupe **I** ; cependant, les analyses ont apparemment été faites sur des échantillons différents, ayant simplement la même origine géographique (Ricciardi 1999). Le β -caryophyllène n'est pas systématiquement présent, mais

il est fréquent, alors qu'il est rare dans les autres types. Dans deux cas (sous-type **Id**), il est très majoritaire (Craveiro 1981, Zetola 2002). Le sous-type **Id** semble d'ailleurs davantage à rapprocher du sous-type **Ia** car le β -caryophyllène est essentiellement retrouvé dans les échantillons classés dans ce sous-type et car les deux échantillons du sous-type **Id** contiennent des quantités notables de citral (12 et 23%), ce qui n'est pas vrai pour le linalol.

On pourra également noter que la fréquence du sous-type **Ib** dans la nature est probablement bien plus faible que ne le laisse penser le nombre de cas décrits, cultivars et mutants ayant été développés pour augmenter la teneur en linalol.

Le type **II** est le plus homogène des chimiotypes majeurs (17 échantillons). On y trouve majoritairement de la tagéténone, qui est un mélange de deux isomères, la myrcénone et l'ocyménone, la première étant toujours la plus abondante (Ricciardi 1999, Fischer 2004).

Le type **III**, dit « limonène-carvone » comprend comme composés majoritaires le limonène et :

- la carvone (celle-ci étant souvent prépondérante) (type **IIIa**)
- une ou plusieurs autres cétones monoterpéniques de structure voisine et d'origine biosynthétique probablement proche (dihydrocarvone, lippione, pipériténone, pipéritone) (Bruneton 1999) (type **IIIb**)

Dans un cas, on a mis à la fois en évidence la carvone (40%), la pipériténone (10%) et le limonène (6%) (Pino Alea 1996), ce qui semble confirmer la parenté des deux sous-types.

Par ailleurs, il faut préciser qu'il existe un spécimen mixte **I/III**, qui contient 63% de citral et 23% de limonène (Abreu-Matos 1996).

Les types mineurs **IV** (Ricciardi 1999, Singh 1999), **V** (Gomes 1993), **VI** (Dellacassa 1990) et **VII** (Tucker 1999) correspondent aux trois seuls cas où il est impossible de relier l'échantillon à un des trois chimiotypes majeurs. Les sept chimiotypes constitués sont rappelés dans le schéma 4.

Récemment, il a été démontré que les différences de composition de l'huile essentielle de *L. alba* n'étaient pas dues aux conditions pédoclimatiques, environnementales : trois chimiotypes (citral, linalol et carvone) ont été cultivés dans des conditions identiques contrôlées et ont conservé leurs différences (Tavares 2005). Cette expérience démontre l'existence de variations génétiques infraspécifiques importantes dans la population de cette espèce.

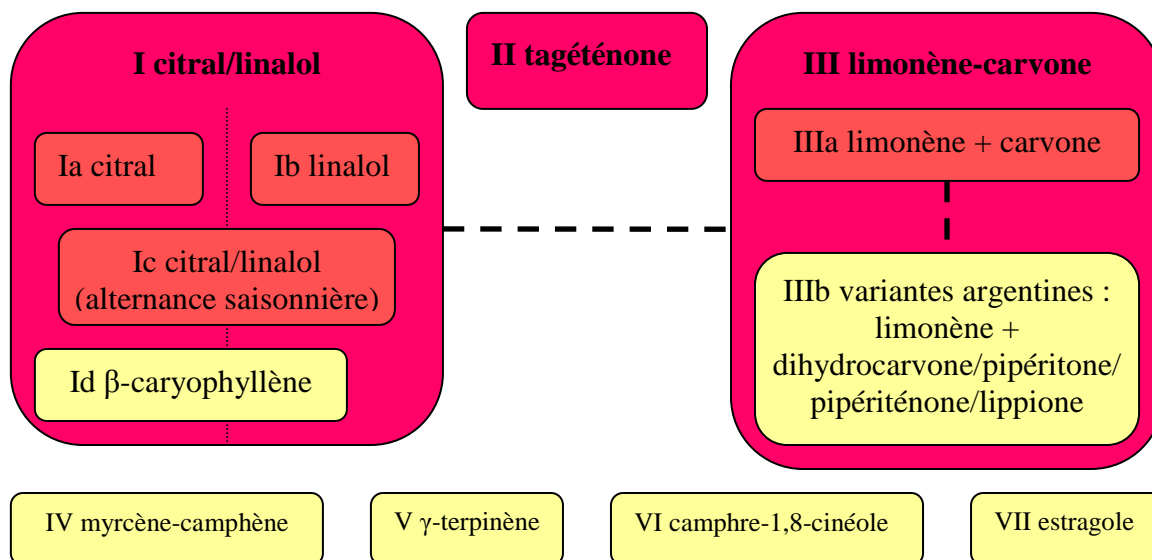


Schéma 4. Proposition de regroupement des échantillons étudiés de l'huile essentielle de *Lippia alba* (3 chimiotypes majeurs comportant des sous-types, 3 chimiotypes mineurs décrits une seule fois chacun). ■ types fréquents, ■ types rares, ---- existence d'individus présentant des caractères des deux types

Il est également intéressant de s'interroger sur l'éventuelle corrélation entre certaines variations morphologiques évoquées chez *Lippia alba* et la grande diversité de composition de l'huile essentielle que nous venons de présenter. Parmi les sous-espèces proposées par Moldenke (cf. variétés signalées), quelques-unes semblent en effet aujourd'hui pouvoir être rattachées à des compositions chimiques. *Lippia alba* var. *carterae* semble avoir à la fois une composition chimique d'huile essentielle et des caractères morphologiques distincts (les fleurs en sont jaunes, alors qu'elles sont classiquement blanches à rose) (Tucker 1999). Cette sous-espèce a été proposée dans ce travail en tant que chimiotype **VII** (« estragole »). En revanche, l'huile de *Lippia alba* f. *intermedia* avait pour composé majoritaire le citral et ne différait donc pas significativement d'échantillons du type **Ia** (Oliveira 2006). La composition des huiles essentielles d'autres sous-espèces n'est pas directement mentionnée dans la littérature, mais la composition de l'huile de *Lippia geminata* H.B.K. est connue : on évoque une odeur de carvone (Corrêa 1992) et, comme constituants majoritaires, l'oxyde de pipéritone et l'oxyde de pipériténone (Velasco-Negueruela 1993).

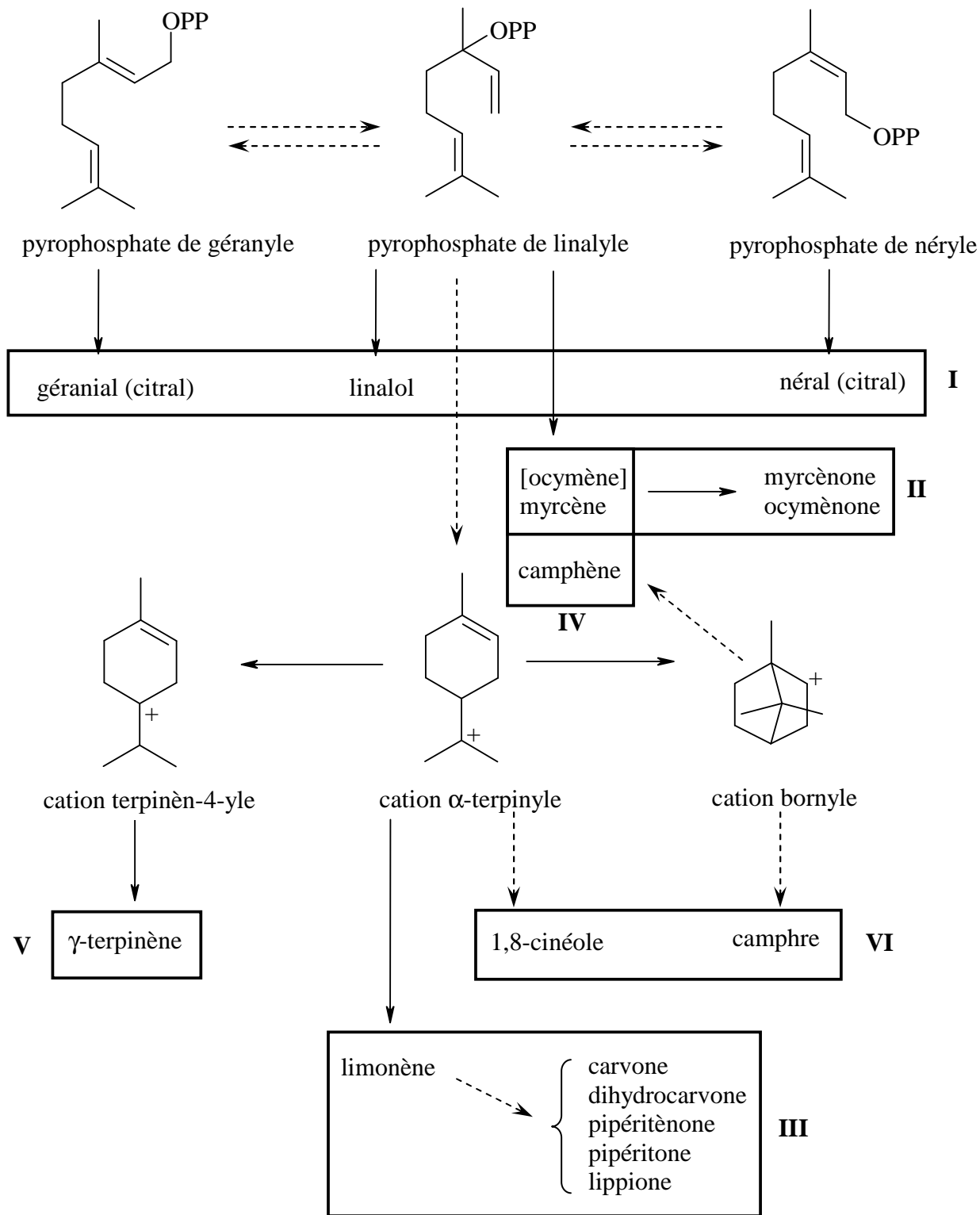


Fig.71. Relations biosynthétiques entre les composants majoritaires monoterpéniques des chimiotypes I-VI de *L. alba* (les flèches en pointillées indiquent que plus d'une étape est requise; l'[ocymène], isomère du myrcène, est indiqué en tant que précurseur de l'ocyménone, mais ce n'est pas un constituant majeur des chimiotypes II et IV (inspiré de Dewick 2002)

De plus, les cas décrits dans certains articles semblent sortir du contexte des sous-espèces déjà décrites. Par exemple, les deux chimiotypes décrits par Fischer (2004) au Guatemala (« citral » et « myrcénone ») diffèrent par la forme et la largeur des feuilles et la longueur de la tige. Le type « myrcénone » est caractérisé par des feuilles angulaires, significativement plus larges et une tige florale plus courte que le chimiotype « citral ». Cette observation pourrait justifier l'existence d'un morphotype, correspondant à l'ancienne espèce *Lippia asperifolia* Rich., rejetée par Moldenke (Pascual 2001a) et aujourd'hui considérée comme synonyme de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: son huile essentielle était en effet composée essentiellement de tagéténone (Velasco-Negueruela 1993)!

β) Polyphénols

Deux nouvelles biflavones ont été isolées de l'extrait dichlorométhanique réalisé à partir des feuilles d'un chimiotype « limonène-carvone » de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. Il s'agit de la 5,5''-dihydroxy-6,4',6'',3''',4''''-pentaméthoxy-[C7-O-C7'']-biflavone et de la 4',4''',5,5''-tétrahydroxy-6,6'',3''''-triméthoxy-[C7-O-C7'']-biflavone (fig.72) (Barbosa 2005). Au moment d'imprimer ce mémoire, une publication est pré-publiée en ligne, rapportant l'isolement de deux phényléthanoïdes d'un chimiotype myrcène-citral de *Lippia alba* : l'isonuomioside et le décaféylverbascoside (fig.72) (Barbosa 2006).

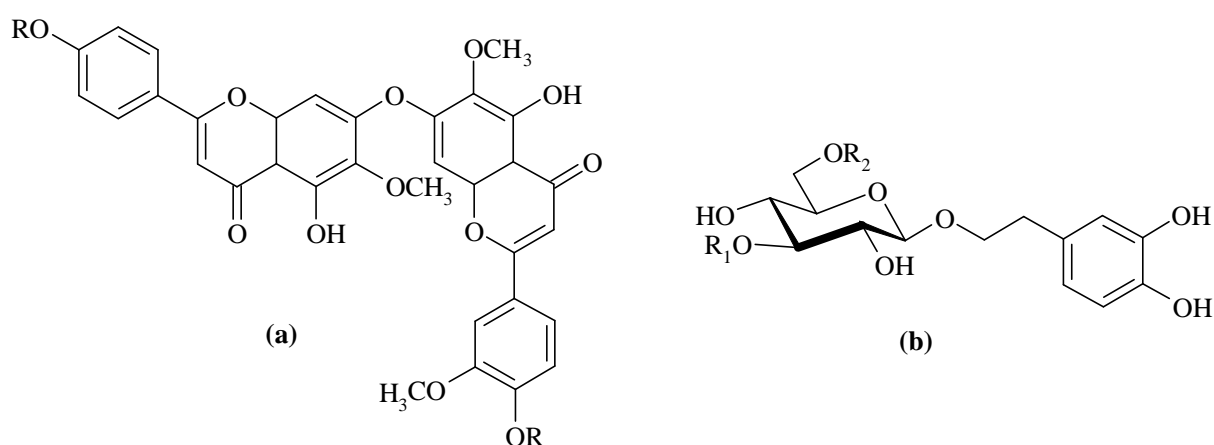


Fig.72. Structure des polyphénols isolés de *Lippia alba*. (a) Biflavonoïdes d'un chimiotype limonène-carvone ($R=H$ ou CH_3). (b) Phényléthanoïdes d'un chimiotype myrcène-citral : isonuomioside ($R_1=\beta$ -D-apiose, $R_2=(E)$ -caféyl) et décaféylverbascoside ($R_1=\alpha$ -L-rhamnose, $R_2=H$)

Trois composés originaux (fig.73), dont l'isolement a été guidé par le suivi de l'activité inhibitrice du *chemokine receptor 5* (CCR5), ont été signalées dans une plante péruvienne que les auteurs appellent « *Lippia alva* ». Il pourrait s'agir de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, mais le nom d'auteur de la plante n'est pas précisé et son nom d'espèce même est écorché ! De plus, aucune mention n'est faite d'un éventuel spécimen témoin, conservé pour vérification, ce qui laisse un certain nombre de doutes sur l'identité exacte de l'échantillon étudié (Hegde 2004).

Par ailleurs, la quantité de flavonoïdes présents dans trois extraits hydroalcooliques issus d'un échantillon brésilien a été évaluée à 45 (extrait éthanol 40%), 61 (éthanol 60%) et 66mg/100g (éthanol 80%) (Zétola 2002).

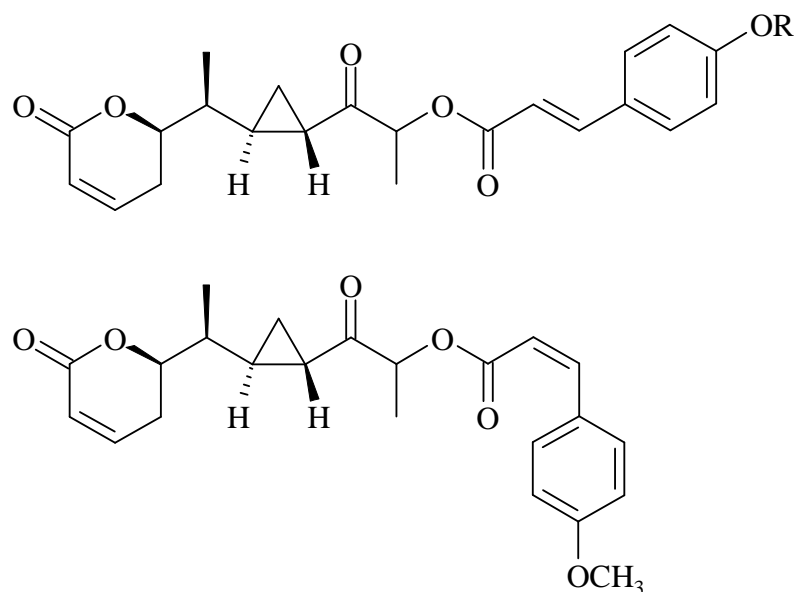


Fig.73. Structure des composés isolés de « *Lippia alva* ». R=H ou CH₃.

γ) Iridoïdes

La présence d'un seul iridoïde était rapportée : le géniposide (cf. fig.12) (Heinrich 1992). Au moment où nous imprimons ce rapport, nous découvrons l'isolement très récent d'un iridoïde à partir de feuilles d'un chimiotype myrcène-citral de *Lippia alba*. Il s'agit du shanzhiside méthyl ester, dont l'isolement est également rapporté ici (cf. composé **18**, fig.86) (Barbosa 2006).

δ) Divers

Plusieurs groupes chimiques auraient été plus ou moins identifiés. Un article de revue mentionne, pour cette espèce, la présence de tanins (faible pourcentage), de saponines triterpéniques, d'une résine, de mucilages, ainsi que de « flavonoid 4-sulphates ». En ce qui concerne les saponines, l'identité de la plante serait en fait incertaine. Il s'agit de « *Lippia*

alba (Mill.) N.E. Brown et/ou *Lippia geminata* H.B.K. », ce dernier nom étant un synonyme de *Lippia alba* var. *globiflora* (L'Hér.) Moldenke (Pascual 2001a).

c) Essais biologiques et pharmacologiques

Lippia alba est une des plantes les plus étudiées du genre *Lippia*, d'un point de vue pharmacologique. Nous avons choisi de séparer ici les études portant sur son huile essentielle de celles concernant des extraits, et où l'activité de substances non volatiles a été évoquée.

α) Activité de l'huile essentielle

Activité antibactérienne et antifongique

- L'huile essentielle cubaine a montré une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus faecalis*. *Pseudomonas aeruginosa* était résistant. Les bactéries les plus sensibles étaient les Gram positives (CMI de 0,3 à 0,6 mg/ml) (Pino Alea 1996)
- Une huile essentielle brésilienne a une CMI de 0,6mg/ml sur *Candida albicans* (« inhibition modérée ») (Duarte 2005) ; une inhibition importante a également été démontrée sur la germination de *Colletotrichum falcatum*, *Curvularia lunata* et *Ustilago scitaminea* (Singh 2000)
- Les huiles essentielles de *Lippia alba* et *Lippia alba* f. *intermedia* ont été testées contre diverses bactéries et champignons pathogènes, par mesure du diamètre d'inhibition et comparaison avec l'activité de l'amphotéricine B, la vancomycine et la méthicilline. Elles ont montré une activité intéressante contre les souches testées de *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trychophyton rubrum*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus mutans* (Oliveira 2006).

Effets sur le système nerveux

- Les trois chimiotypes brésiliens décrits par Matos (1996) (« citral » ; « citral-limonène » ; « carvone-limonène ») ont montré une action anxiolytique (*elevated-plus maze*, *openfield test*) (Vale 1999).
- Les mêmes chimiotypes présentent une activité anticonvulsivante (inhibition des convulsions provoquées par le pentylènetétrazole chez la souris). Des constituants importants (citral, limonène, myrcène) sont actifs pour des doses moindres et les auteurs les considèrent comme les composés actifs de l'huile essentielle (Viana 2000).

- Les chimiotypes « citral » et « citral-limonène » ont montré des activités analgésiques chez la souris, matérialisées par l'inhibition des contorsions provoquées par l'acide acétique (*writhing test*), le chimiotype « citral-limonène » étant plus actif. L'effet était moins important dans le test à la formaline, et seul le chimiotype « citral » augmentait le temps de réaction dans le test de la plaque chaude (*hot plate test*). Concernant l'activité antiinflammatoire, l'œdème de la patte de rat provoquée par le dextran est inhibé par les deux huiles essentielles, alors que seul le chimiotype « citral » est actif sur celui induit par le carrhagénane (Viana 1998).
- Les constituants majoritaires de ces chimiotypes (citral, limonène, myrcène) ont été testés sur le comportement des rats. Ils se sont révélés anxiolytiques (*openfield test*), myorelaxants (*rotarod test*). Le citral s'est révélé le plus efficace des trois dans l'allongement du sommeil provoqué par le pentobarbital (Vale 2002).

Activité antioxydante

- Les activités antioxydantes d'huiles essentielles issues d'échantillons colombiens ont été évaluées par le test au DPPH (CE₅₀ : 0,28 kg d'huile/mmol de DPPH), le TEAC (TAA : 14,4mmol de Trolox/kg d'huile) (Puertas-Mejia 2002), et par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique par FeSO₄ (effet comparable à celui de la vitamine E sur l'inhibition de la production d'hexanal et de la dégradation de l'acide linoléique) (Stashenko 2004).

β) Activité d'extraits de feuilles

Les modes opératoires pour la réalisation des extraits utilisés dans les tests pharmacologiques étant variés, la nature de l'extrait est présentée pour chaque essai.

Activité antibactérienne et antifongique

- Ethanol 90% : pas d'activité sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *C. parapsilosis*. Activité faible sur *C. tropicalis*. Activité modérée sur *C. krusei*. Technique microdilution + bioautographie (Holetz 2002).
- Ethanol 88% : Inhibition importante de *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*, activité modérée sur *Streptococcus pyogenes*. La technique utilisée est ici

celle de l'antibiogramme, avec utilisation de disques imprégnés d'extrait. Par rapport au test précédent, où l'extrait était inactif sur *Staphylococcus aureus*, on notera ici un procédé d'extraction beaucoup plus drastique (extraction au soxhlet à 70°C pendant 5 jours contre macération à 25°C pendant 24 heures) (Caceres 1991).

- Ethanol 70%: inactif sur *Candida albicans* (Duarte 2005).
- Des extraits méthanolique (macération) et aqueux (décoction) ont été testés sur *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* et des *Salmonella*. Les résultats, meilleurs avec l'extrait méthanolique, n'étaient toutefois jamais exceptionnels (Alanís 2005).

Activité antivirale

- CH₂Cl₂ : toxique, « suggérant la présence de composés antiprolifératifs très actifs ». Ethanol : actif contre HSV-1 (évaluation : effet cytopathique (CPE) et synthèse protéique (incorporation de ³⁵S-méthionine), mais assez toxique contre les cellules HeLa aux concentrations les plus importantes testées. Pas d'activité contre le *Poliovirus I*, ni contre VSV (*vesicular stomatitis virus*) (Abad 1997).
- Extrait méthanolique de feuilles et de tiges inactif sur BVDV-1 (*bovine viral diarrhoea virus* type 1, modèle pour l'étude d'activité contre le virus de l'hépatite C, HCV), HSV-1, HSV-2, influenza de type A et HIV-1 (évaluation par la réduction du CPE et de l'antigène p24 de HIV-1).
Infusion des parties souterraines (« *ground material* ») présentant un indice de sélectivité (rapport concentration cytotoxique/concentration antivirale efficace) jugé très intéressant vis-à-vis du *virus influenzae* de type A (souche H3N2) (Ruffa 2004).
- Ethanol, composés extractibles par le butanol : actif contre la souche 29-R, résistante à l'aciclovir, de HSV-1 (évalué par essai d'inhibition de cytopathogénicité).
Ethanol, composés extractibles par l'acétate d'éthyle : action modérée sur PV-2 (*poliovirus 2*).
Aucun des extraits testés (dichlorométhane, acétate d'éthyle, butanol, obtenus successivement par extraction liquide-liquide à partir d'un même extrait éthanolique) n'a montré d'activité sur la souche KOS du virus HSV-1 (Andrighetti-Fröhner 2005).

Effets sur le système nerveux

- Maladie d'Alzheimer. Hexane : inactif.
Ethanol actif (inhibition des cholinestérases sur microplaque en CCM) (Trevisan 2003).
- Ethanol 50% : Effets significatifs analgésiques dans deux tests chez le rat : inhibition des contorsions abdominales provoquées par le benzoate de benzyle (n=4) et augmentation du délai de retrait de la queue immergée dans l'eau chaude (n=7) (Costa 1991).
- Une série de tests concernant l'activité sédatrice de *Lippia alba* a été menée sur différents extraits alcooliques de feuilles (éthanol à 40% : ES_{40%}, 60% : ES_{60%}, 80% : ES_{80%}) où l'absence des principaux constituants de l'huile essentielle a été montrée. Les résultats sont les suivants (Zétola 2002) :
 - absence, pour ES_{40%} et ES_{60%} de potentialisation de l'endormissement par le pentobarbital. ES_{80%} diminue le temps d'endormissement et augmente la durée du sommeil.
 - ES_{40%} augmente significativement le temps de latence avant déclenchement des convulsions induites par le pentylènetétrazole (PTZ). Cependant, les diminutions observées sur le nombre de convulsions et le taux de mortalité ne sont, elles, pas statistiquement significatives.
 - ES_{80%} augmente significativement le nombre de chute et diminue le temps passé sur la barre rotatoire dans *rota-rod* test, ce qui témoigne d'un effet myorelaxant et/ou sédatif.
 - La température colique des rats n'est modifiée pour aucun des extraits par rapport au contrôle.

Les auteurs remarquent la corrélation entre le taux de flavonoïdes dans l'extrait et l'importance de l'action (ES_{80%} est l'extrait le plus riche).

Effets sur le système cardiovasculaire

- Ethanol 95% : Pas d'activité vasodilatatrice (inhibition des contractions induites par KCl et phényléphrine sur rats SHR et Wistar) (Guerrero 2002).
- Extrait aqueux : effet chronotrope négatif sans modification de la force de contraction cardiaque sur cœur isolé de rat (Gazola 2004).

Effets sur le tube digestif

- Une infusion a montré une action anti-ulcère intéressante chez le rat Wistar, en réduisant à court et à long termes les lésions provoquées par l'indométhacine. Les paramètres biologiques (pH gastrique, protéines totales et groupements thiol du mucus) n'étaient pas modifiés, le mécanisme d'action reste donc à déterminer (Pascual 2001b)

Activité antioxydante

- Extrait « hydroalcoolique » : activité antioxydante (inhibition du DPPH, de la peroxydation lipidique) (l'une des cinq espèces parmi 45 testées). Activité médiocre en tant que capteur de radical hydroxyle et pour l'inhibition de la mutagénèse oxydative d'*Escherichia coli* par le *ter*-butyl hydroperoxyde (TBH). De plus, une certaine toxicité aurait été observée (Ramos 2003).

d) Evaluation ethnopharmacologique

- Argentine : Les Criollos du nord-ouest du Chaco argentin utilisent *Lippia alba* (appelée « salvia de Castilla ») comme antitussif, décongestionnant, pour traiter les maux de gorge et de tête et l'« empacho » (décrit comme une indigestion sévère suivie par une diarrhée importante). Le remède est préparé par décoction des feuilles et adjonction de « quemadillo » (petits morceaux de charbon issus du genre d'arbres *Prosopis* saupoudrés de sucre). Il est, selon les cas, bu, inhalé ou utilisé en gargarisme (Scarpa 2004).
- Bolivie : dans la communauté Izocéño-Guaraní, société shamanique du Chaco bolivien appartenant au groupe Chiriguano (ou Guaraní), *Lippia alba* est connue sous le nom «*ivirakati*». Feuilles et tiges sont utilisées, après expression dans l'eau, contre les troubles respiratoires (Bourdy 2004).
- Brésil : Une vaste enquête réalisée dans et autour de trois villes de l'état de São Paulo (Forêt Atlantique Tropicale), auprès de 200 guérisseurs, a montré une large utilisation de *Lippia alba*. On utilise les feuilles (en infusion contre les états d'excitation, l'hypertension, , troubles digestifs, nausées et rhumes ; contre les blessures en usage

externe ; contre la toux en sirop) et les racines (en infusion contre rhumes et toux) (Di Stasi 2002).

Près d'Oriximiná (Pará), la population utilise à la fois une plante appelée « erva-cidreira » (*Lippia alba*) et une autre appelée « carmelitana » (*Lippia alba* f. *intermedia*) en infusion ou décoction contre diverses affectations. L'usage le plus unanimement cité pour la première plante est la sédation. La deuxième est davantage utilisée contre les maux d'estomac, les coliques du bébé et les flatulences (ces usages sont en accord avec les informations données par Castro, 1998, cf. « noms vernaculaires ») Les auteurs de l'enquête expliquent que les deux plantes se ressemblent énormément, mais que les gens de la région arrivent à les distinguer sur la base d'un savoir traditionnel. Seule l'« erva-cidreira » est cultivée (Oliveira 2006).

- Guatemala : dans la communauté afro-caribbéenne de Livingston (appelée *morenos* ou *caribes* en Espagnol, *garifuna* ou *garinagu* dans leur propre langue) sur la côte orientale, les feuilles de *Lippia alba* sont utilisées sous différentes formes contre plusieurs affections : toux (boire la décoction), maladies de la peau (se laver avec le macérat), flatulences (boire l'infusion), nausées et vomissements (fumer), maux de tête (en cataplasme) (Girón 1991).
- Mexique : dans une communauté Mixe, *Lippia alba* a été fréquemment citée comme plante médicinale, indiquée dans les douleurs gastrointestinales (partie utilisée : feuilles). Les auteurs l'ont estimée probablement active, sur la base d'une connaissance phytochimique partielle (huile essentielle et géniposide) pouvant expliquer l'utilisation traditionnelle (action carminative douce) (Heinrich 1992).

De plus, la comparaison avec une autre communauté mexicaine Macro-Maya, les Zoque-Popoluca vivant dans le même type d'environnement naturel (les deux ethnies ayant un langage différent, peu de contacts et des noms différents pour désigner *Lippia alba*) a montré que deux usages leur étaient communs : soin des troubles gynécologiques et gastrointestinaux (Leonti 2003).

Un troisième article évoque la plante sous le nom *Lippia alba* (Mill) Bir. Une enquête auprès de populations rurales mexicaines, appartenant probablement à des communautés Huastec (c'est-à-dire appartenant elles aussi au groupe Maya) révèle que l'infusion des feuilles est utilisée pour calmer les douleurs vésiculaires et les gastrites (Zamora-Martinez 1992).

2.1.3.1.5. Travaux personnels

Nous avons pu travailler sur plusieurs échantillons de *Lippia alba*, qui se sont révélés assez différents, tant par leurs caractères organoleptiques (morphologie, odeur...) que par leur composition chimique.

a) Essais des drogues végétales

Dans le cadre de la réalisation d'une monographie pour la Pharmacopée Française, il était nécessaire de réaliser certains essais, couramment utilisés pour fixer des normes de qualité des plantes vendues en officine. Tous ces essais ont été effectués conformément aux protocoles figurant à la Pharmacopée Européenne (voir partie expérimentale). Nous présentons donc les résultats obtenus pour les lots de *Lippia alba* que nous avons reçus de Martinique. Malheureusement, il nous restait trop peu du lot originel guadeloupéen (Gourbeyre) pour pouvoir les soumettre à ces essais.

α) Perte à la dessiccation

Ce test permet d'estimer la teneur en eau d'une plante. Cette information est utile car une plante ayant un taux d'humidité trop important risque de moisir facilement et peut témoigner d'un mauvais séchage ou de mauvaises conditions de stockage.

Résultats obtenus :

Lot Martinique1 (M1) : 10,53 % (n=1)

Lot Martinique 2 (M2) : 7,98 % (n=3)

β) Teneur en eau

En pratique, la perte à la dessiccation est surtout valable pour les plantes contenant peu ou pas d'huile essentielle. En effet, les conditions dans lesquelles est réalisé ce test permettent l'évaporation aussi bien des substances organiques volatiles que de l'eau contenue dans la plante. Afin de mesurer uniquement la teneur en eau d'une drogue végétale potentiellement riche en huile essentielle comme l'est *Lippia alba*, on peut réaliser l'essai dit de « détermination de l'eau par entraînement ». Un appareillage référencé à la Pharmacopée Européenne permet de séparer l'eau des substances hydrophobes par dissolution de ceux-ci dans le toluène (non miscible à l'eau) et de mesurer le volume d'eau dégagé par chauffage, après condensation.

Résultats obtenus :

Lot M1 : 104,2 ml/kg (n=2)

Lot M2 : 85 ml/kg (n=2)

γ) Teneur en huile essentielle

Les huiles essentielles, substances volatiles, sont d'excellents témoins de l'état de conservation d'une drogue végétale. Une teneur trop faible peut trahir, par exemple, un stockage trop long ou dans de mauvaises conditions. La mesure du volume d'huile essentielle dégagé par hydrodistillation fait donc partie des essais classiques pratiqués sur les plantes à essence.

Résultats obtenus :

Lot M1 : 1,6 % (n=2)

Lot M2 : 1,6 % (n=1)

δ) Cendres totales

L'essai des cendres totales permet d'informer sur la teneur en minéraux de la plante (ces derniers n'étant pas transformés en substances volatiles à haute température, contrairement aux matières organiques).

Résultats obtenus :

Lot M1 : 13,0 % (n=4)

Lot M2 : 11,75 % (n=4)

ε) Cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique

Ce test met particulièrement en évidence les conditions de récolte de la plante. Le résidu est surtout constitué par de la silice. Sauf exception (comme dans le cas des prêles), il représente surtout le sable qui peut souiller les drogues mal lavées ou mal triées.

Résultats obtenus :

Lot M1 : 0,90 % (n=2)

Lot M2 : 2,51 % (n=3)

b) Etude des constituants chimiques de *Lippia alba*

La composition chimique de plusieurs échantillons de *Lippia alba* a pu être étudiée. Des méthodes appropriées ont été utilisées pour l'identification des molécules, qu'elles soient volatiles et présentes dans l'huile essentielle (obtention par hydrodistillation et identification par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) ou polaires (extraction, isolement par chromatographie liquide et détermination structurale par résonance magnétique nucléaire et spectrométrie de masse). Si ce travail a essentiellement porté sur un lot guadeloupéen de la plante, certains essais ont néanmoins été réalisés sur d'autres lots : quelques molécules ont pu être isolées ou identifiées dans un lot martiniquais et des huiles essentielles originaires à la fois de Guadeloupe, de Martinique et de Guyane ont été analysées. Dans cette partie, les molécules sont traitées par famille chimique (qui correspond plus ou moins à l'ordre chronologique de réalisation des travaux). A la fin, une récapitulation et une comparaison des différents échantillons seront proposées.

α) Isolement de métabolites secondaires non volatils d'extraits de *Lippia alba*

Les schémas 5 et 6 présentent les étapes qui ont mené à l'isolement de composés polaires des extraits méthanoliques et hydrométhanoliques des lots guadeloupéen (principalement) et martiniquais de *Lippia alba*. Pour les explications techniques concernant les méthodes utilisées, on pourra se reporter à la section expérimentale. L'échantillon martiniquais utilisé pour la purification de produits est le lot 2, l'identité de composition des lots 1 et 2 ayant été constatée par CLHP et ce dernier paraissant un peu plus abondant en composés.

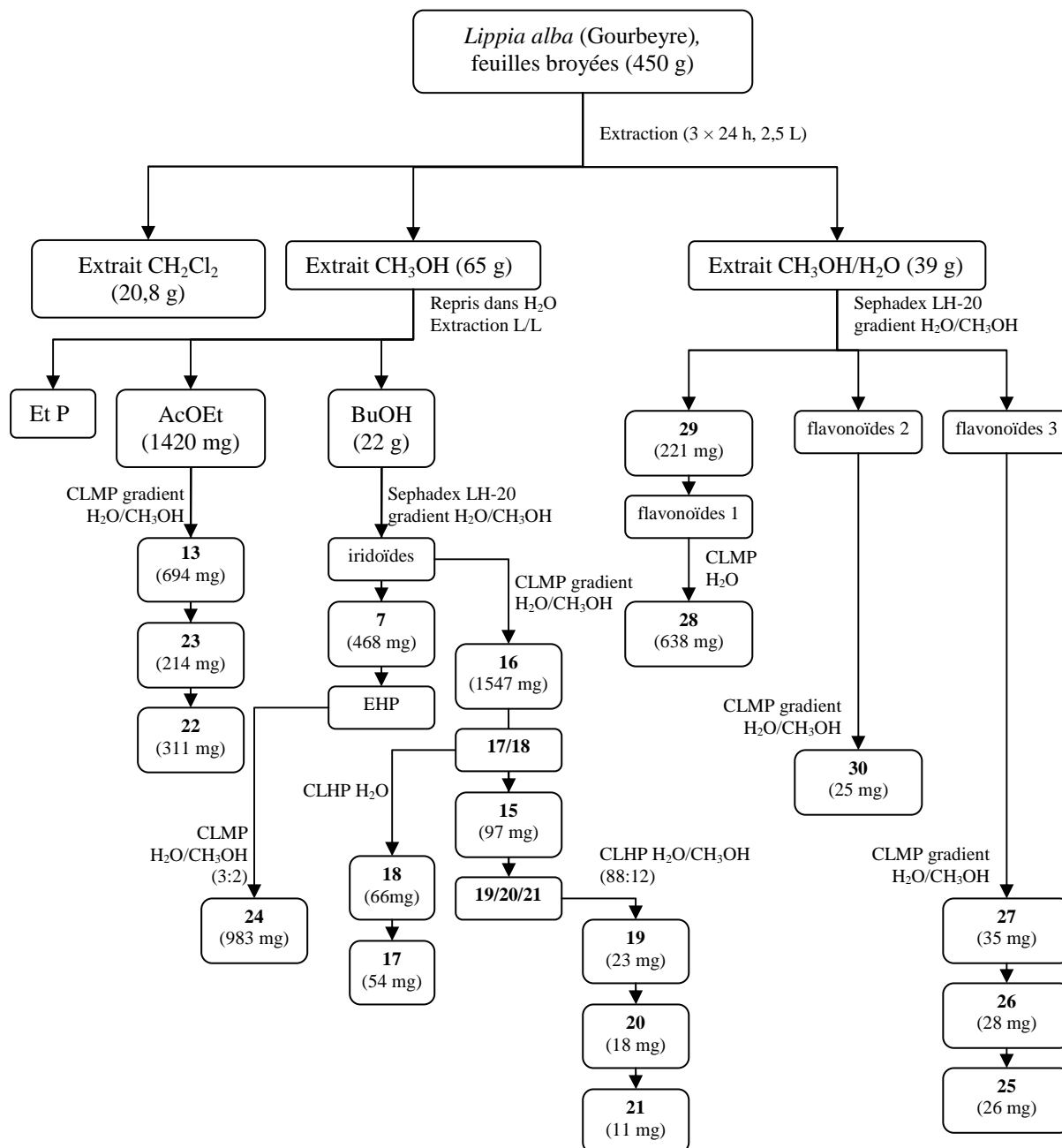


Schéma 5. Extraction et isolement de molécules des feuilles de *Lippia alba* (Gourbeyre, Guadeloupe)

Lot de Martinique

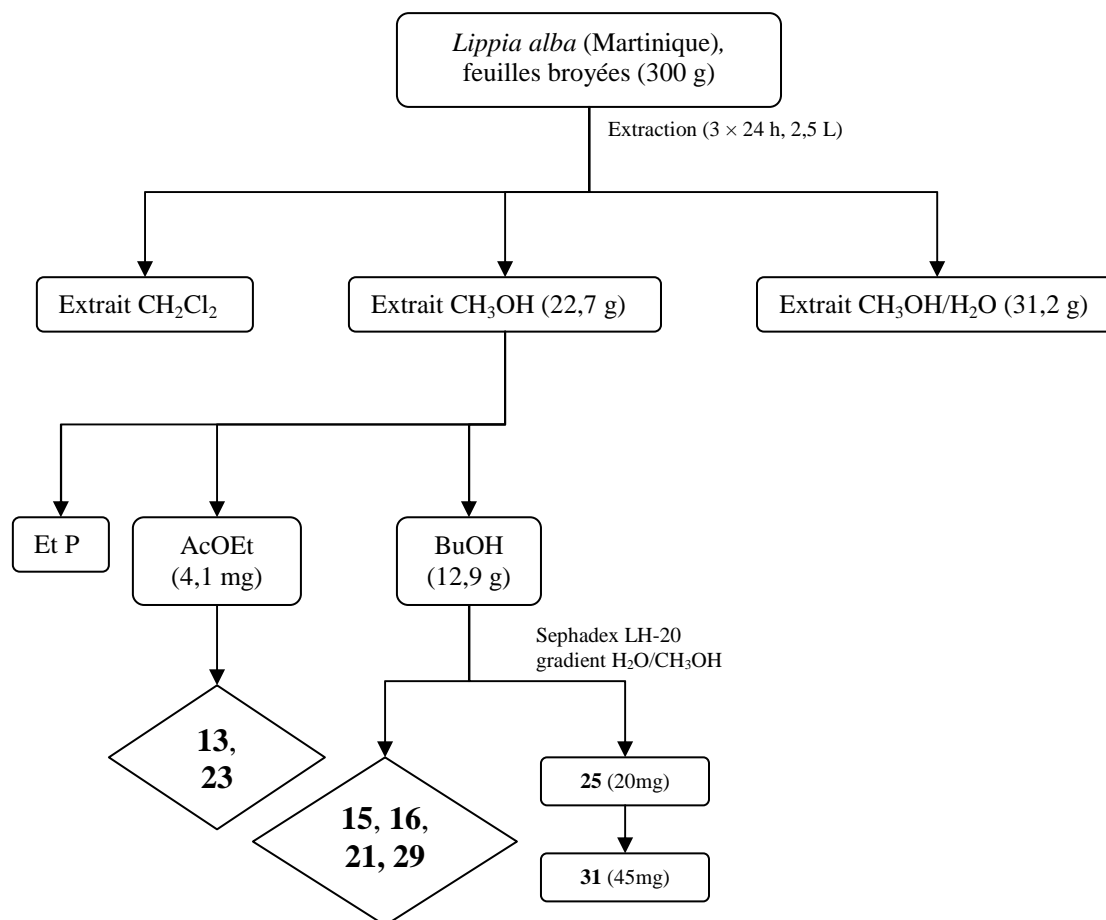


Schéma 6. Extraction et isolement de *Lippia alba* (Martinique). \diamond : composés identifiés par comparaison des *tr* avec ceux des produits isolés de l'échantillon guadeloupéen et co-élution en CLHP.

β) Détermination structurale des métabolites secondaires non volatils

Iridoïdes

Composé 15

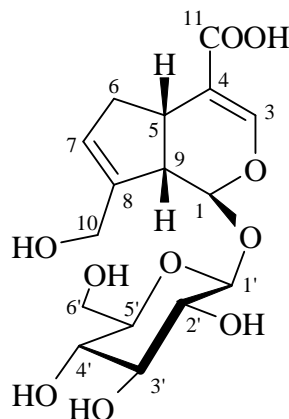


Fig.74. Composé 15

L'observation du spectre de RMN du ^1H du composé **15** (fig.74, fig.75) permet de confirmer la nature iridoïdique de celui-ci par la présence de certains signaux caractéristiques des iridoïdes les plus couramment rencontrés. En effet la présence de deux doublets à δ 4,71 ($J=7,6$ Hz) et δ 5,08 ($J=7,8$ Hz), indique l'existence dans la structure d'un ose (le β -D-glucose), substituant la génine au niveau de la fonction hémiacétalique en position 1. De plus, on peut dénombrer 16 pics dans le spectre de RMN du ^{13}C *jmod* (deux d'entre eux, à δ 171,6 et à δ 113,5, étant néanmoins plus difficilement observables), ce qui tend à confirmer la substitution d'une génine à squelette monoterpénique (10 carbones) par un hexose (6 carbones).

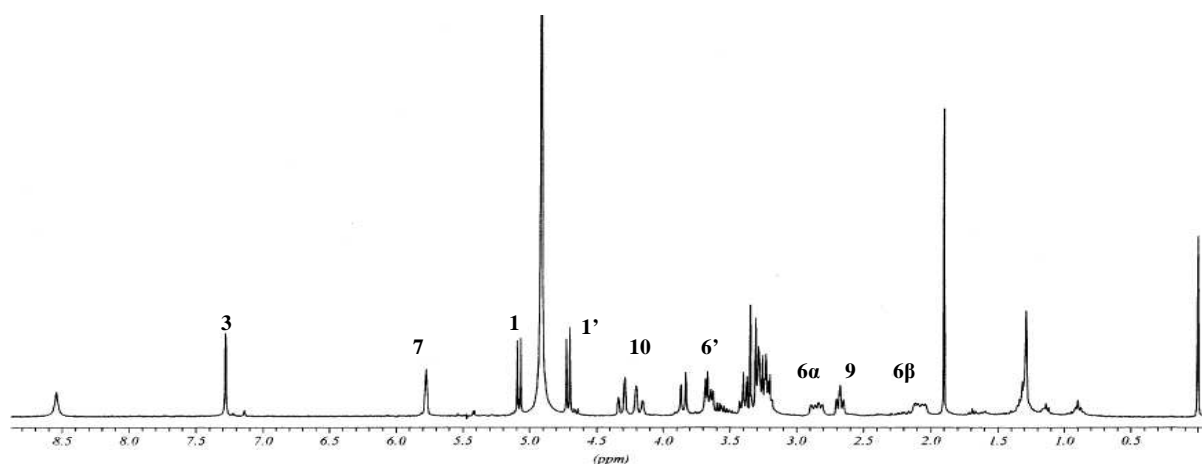


Fig.75. Spectre de RMN du ^1H du composé 15 (300 MHz, CD_3OD)

Les signaux les plus aisément identifiables dans le spectre de RMN du ^1H sont les deux singulets alcéniques à δ 5,77 et δ 7,28, qui correspondent respectivement aux protons 7 et 3 de la génine et qui témoignent de la présence de deux doubles liaisons dans celle-ci, chacune étant porteuse d'un seul atome d'hydrogène. L'hydrogène en 3 est le plus déblindé à cause du voisinage de l'atome d'oxygène et de celui de la fonction carboxylique en 4 (signal du carboxyle observable en RMN du ^{13}C à δ 171,6). On peut observer un triplet à δ 2,67, qui est assez caractéristique du proton 9 de ce type de génine. Les deux protons 10- α et 10- β ont des déplacements chimiques singulièrement élevés pour des signaux méthyléniques, ce qui témoigne de leur position en α à la fois d'un groupement hydroxy et d'une insaturation. Quant au spectre de RMN du ^{13}C *J*-modulé, il permet de distinguer les signaux correspondant au glucose de ceux de la génine.

A partir de ces points de départ assez aisément identifiables, les atomes avoisinants sont progressivement identifiés par expériences bidimensionnelles de corrélation ^1H - ^1H (COSY, fig.76) et ^1H - ^{13}C (HMBC, fig.77). Le COSY indique parfaitement le profil de substitution des carbones 5 et 6 par des taches de corrélations successives H9-H5 (δ 2,67 \leftrightarrow δ 3,21), H5-H6 (δ 3,21 \leftrightarrow 2,08-2,85) et H6-H7 (δ 2,08-2,85 \leftrightarrow 5,77).

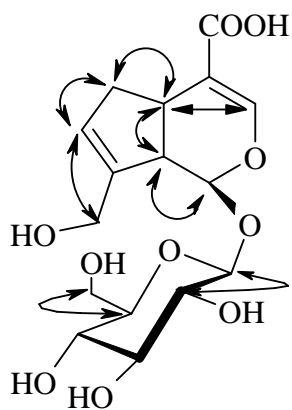


Fig.76. Corrélations COSY choisies du composé 15 (H↔H)

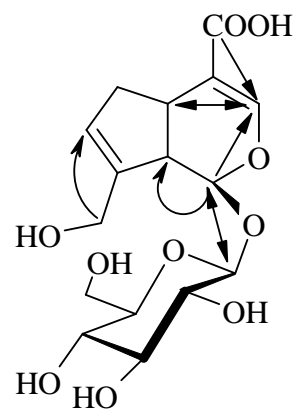


Fig.77. Corrélations HMBC choisies du composé 15 (C→H)

La structure du composé **15** a donc pu être établie comme étant l'acide géniposidique. Cette molécule est connue et a été isolée pour la première fois de *Genipa americana* L. (Rubiacees) (Guarnaccia 1972). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 20 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Kırmızıbekmez 2002).

Tableau 20. RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) dans CD_3OD du composé **15** et de l'acide géniposidique.

	composé 15		acide géniposidique	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
génine				
1	5,08 d (7,5Hz)	98,1	5,15 d (7,6Hz)	98,2
3	7,28 s	149,8	7,48 s	152,9
4	-	113,5	-	113,3
5	3,21 m	37,9	3,17	36,8
6-α	2,85 dd (16,3Hz, 8Hz)	40,2	2,84 dd (16,3Hz, 8Hz)	39,8
6-β	2,08 dd (16,3Hz, 8Hz)		2,10 dd (16,3Hz, 8Hz)	
7	5,77 s	128,7	5,79 s	128,4
8	-	145,2	-	144,9
9	2,67 t (7,6Hz)	47,6	2,71 dd (t) (7,6Hz)	47,0
10-α	4,31 d (14,2Hz)	61,9	4,31 d (14,5Hz)	61,5
10-β	4,18 d (14,2Hz)		4,19 d (14,5Hz)	
11	-	171,6	-	171,4
glucose				
1'	4,71 d (7,8Hz)	100,5	4,71 d (7,8Hz)	100,3
2'	3,23 m	75,2	3,22 dd (7,8Hz, 9Hz)	74,9
3'	3,39 m	78,1	3,38 t (9Hz)	77,8
4'	3,31 m	71,8	3,19-3,32	71,5
5'	3,29 m	78,6	3,19-3,32	78,4
6'-α	3,85 d (12,3Hz)	62,9	3,86 d (11,6Hz)	62,6
6'-β	3,65 dd (11,3Hz, 4,5Hz)		3,64 dd (11,6Hz, 5,1 Hz)	

Composé 16

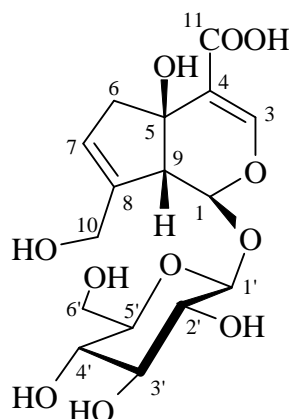


Fig.78. Composé 16

Le spectre de RMN du ^1H du composé **16** (fig.78-79) présente de fortes similitudes avec celui du composé précédent, l'acide géniposidique.

On retrouve deux singulets, à δ 7,23 et δ 5,71, qui, comme pour le composé **15**, semblent correspondre respectivement aux protons 3 et 7 d'une génine iridoïdique portant deux insaturations, en 3-4 et 7-8.

On observe également deux doublets entre 4,5 et 5,5 ppm qui peuvent logiquement correspondre au proton 1 de la génine et au proton anomérique de l'ose. Cependant, il existe ici une différence notable avec le composé **15** : si le signal du proton anomérique a un déplacement chimique très proche de celui de l'acide géniposidique (δ 4,71 pour **15** ; δ 4,65 pour **16**), ce qui semble indiquer que l'ose présent est encore une fois le β -D-glucose, l'écart est beaucoup plus marqué dans le cas de l'hydrogène 1 de la génine (δ 5,08 pour **15** ; δ 5,33 pour **16**), ce qui témoigne d'une modification structurale de nature à provoquer ce déblindage sur un carbone proche.

Les deux doublets observables à δ 4,27 ($J=14,8$ Hz) et δ 4,14 ($J=14,7$ Hz) présentent une parenté évidente avec ceux des protons 10- α et 10- β dans le composé **15**. De même, à δ 3,84 (d, $J=11,8$ Hz) et 3,64 (dd, $J=12,0$ Hz et 5,0 Hz), deux massifs sont attribués respectivement aux hydrogènes 6'- α et 6'- β du glucose, par analogie avec le spectre de RMN du ^1H du

composé **15**, où l'on observait des signaux comparables à δ 3,85 (d, $J=12,3$ Hz) et δ 3,65 (d, $J=11,3$ Hz et 4,5 Hz).

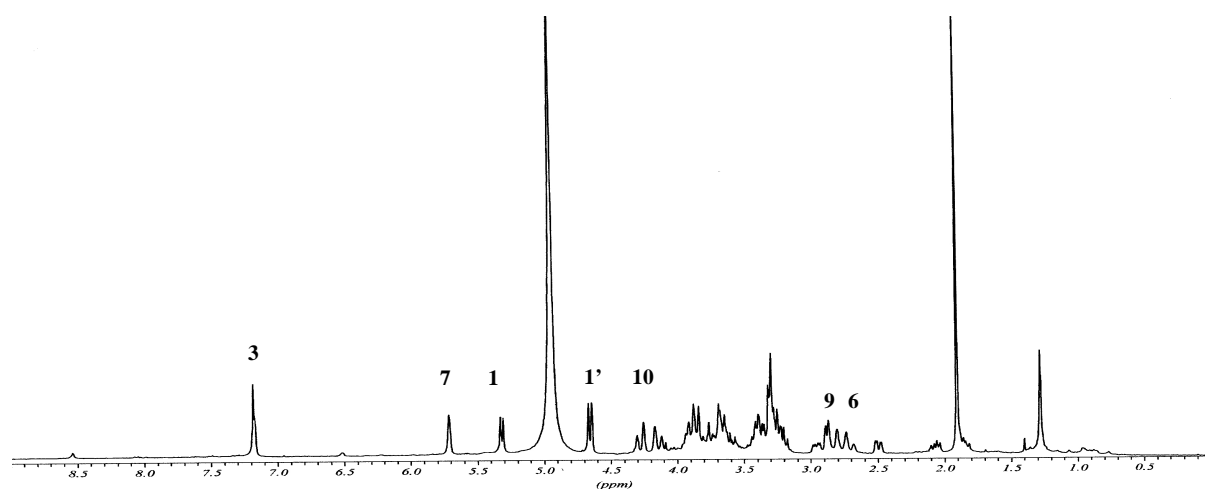


Fig.79. Spectre de RMN du ^1H du composé 16 (300 MHz, CD_3OD)

La principale différence entre les spectres de RMN du ^1H des deux iridoïdes se trouve en fait entre 2 et 3 ppm. En effet, si l'on peut supposer que les deux signaux observables correspondent toujours aux protons 6 et 9, la multiplicité des massifs a été modifiée. Ainsi le signal à δ 2,87, intégrant pour un proton, pourrait correspondre au proton 9. Il ne s'agit plus comme dans le composé **15** d'un triplet, mais d'un doublet dont on peut tirer deux renseignements : premièrement, sa constante de couplage est de 6,4 Hz, ce qui indique qu'il est bien couplé avec le proton 1 de la génine (δ 5,33, d, $J=6,5$ Hz), ce qui confirme son attribution ; deuxièmement sa multiplicité indique qu'il n'a qu'un seul voisin, ce qui induit à penser que le carbone 5 serait cette fois substitué, par exemple par un groupement hydroxyle. Dans le cas du massif voisin, qui ressemble à un gros quadruplet centré sur δ 2,78 intégrant pour deux protons, il s'agit en fait de deux doublets couplés (δ 2,82 et δ 2,73) avec une constante de couplage de 17,0 Hz, valeur se rapprochant de la plus grande constante de couplage mesurée entre les signaux des protons 6- α et 6- β du composé **15** (16,3 Hz). L'absence, dans le cas présent, de re-dédoublé de chaque doublet penche là aussi en faveur de l'absence d'atome d'hydrogène sur le carbone 5 voisin.

La correspondance des signaux de RMN du ^1H et du ^{13}C est établie par expérience de corrélation hétéronucléaire sur courte distance en mode inverse (HSQC). Le voisinage des atomes de carbone et d'hydrogène est étudié par expériences bidimensionnelles de corrélation

^1H - ^1H (COSY, fig.80) et ^1H - ^{13}C (HMBC, fig.81), et l'hypothèse formulée grâce au spectre de RMN du ^1H se voit confirmée. En particulier, on remarque l'absence de tâches de corrélation entre les protons 6, 9 et un quelconque signal pouvant correspondre à un proton situé en 5 (notamment recherché entre δ 3,0 et δ 3,5) sur la carte du COSY, alors qu'ils étaient nettement visibles pour le composé **15**. Le proton 9 est couplé sur la carte HMBC avec le carbone 1, mais aussi avec un carbone quaternaire (δ 78,9) qui ne peut être que le carbone 5.

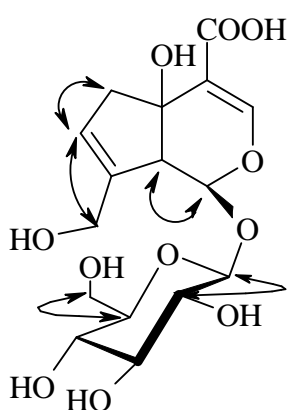


Fig.80. Corrélations COSY choisies du composé 16 (H→H)

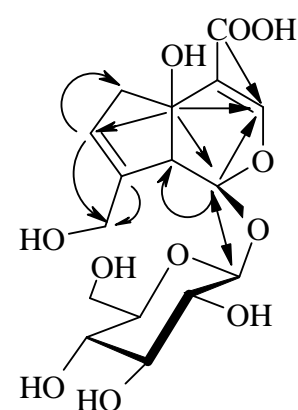


Fig.81. Corrélations HMBC choisies du composé 16 (C→H)

La structure du composé **16** a donc pu être établie comme étant l'acide 5-hydroxygéniposidique ou thévéside. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 21 avec leurs attributions. Ils ont été comparés avec ceux, très partiels, rapportés dans la littérature lors du premier isolement de la molécule de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Apocynacées) (Sticher 1970).

Tableau 21. RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) dans CD_3OD du composé **16**.

	composé 16	
	^1H	^{13}C
génine		
1	5,33 d (6,5Hz)	97,5
3	7,23 s	148,8
4	-	105,3
5	-	78,9
6-α	2,82 d (17Hz)	48,7
6-β	2,73 d (17Hz)	
7	5,71 s	126,5
8	-	142,7
9	2,87 d (6,4Hz)	55,2
10-α	4,27 d (14,8Hz)	61,3
10-β	4,14 d (14,7Hz)	
11	-	175,0
glucose		
1'	4,65 d (7,9Hz)	99,9
2'	3,25 m	74,6
3'	3,41 m	77,5*
4'	3,31 m	71,4
5'	3,30 m	78,3*
6'-α	3,84 d (11,8Hz)	62,5
6'-β	3,64 dd (12Hz, 5Hz)	

* : inversion possible des attributions

Composé 17

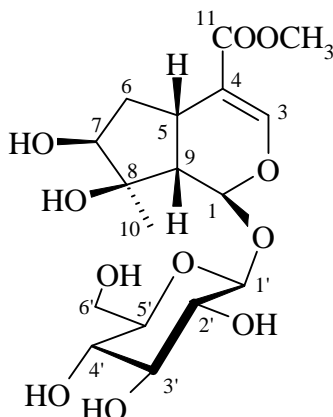


Fig.82. Composé 17

Dans le cas de cette molécule (fig.82), s'il est évident qu'il s'agit également d'un iridoïde, on comprend assez rapidement que sa structure est assez différente des deux premiers isolés.

Au niveau du spectre de RMN du ^1H enregistré à 500 MHz (fig.83), on observe un singulet à δ 7,42 qui peut logiquement correspondre au proton alcénique H3. Dans cette hypothèse, on peut considérer, comme pour les deux composés précédents, que la position 4 est substituée, probablement une fois encore par une fonction carboxylique. Par contre, l'interprétation du signal observé à δ 5,60 est plus délicate. Son déplacement chimique est assez voisin de celui du H7 des deux composés précédents (δ 5,77 et δ 5,71), mais on peut observer une très faible constante de couplage ($J=1$ Hz), ce qui n'était pas le cas précédemment. On peut émettre l'hypothèse qu'il ne s'agit pas du proton 7, et donc que la génine monoterpénique ne serait insaturée qu'au niveau de la liaison 3-4.

Vient étayer cette hypothèse l'observation des signaux pouvant correspondre aux protons hémiacétaliques de la génine et de l'ose. Dans la région habituelle, on ne distingue que deux signaux pouvant leur correspondre : l'un est situé à δ 4,70 (d, $J=8$ Hz) et correspond vraisemblablement, par analogie avec les signaux des composés **15** (δ 4,71, d, $J=7,8$ Hz) et **16** (δ 4,65, d, 7,9 Hz) au proton anomérique du glucose ; le deuxième n'est autre que le doublet décrit précédemment à δ 5,60, qui correspondrait donc à H1.

Un autre aspect du spectre de RMN du ^1H est très informatif. De grands singulets sont observés à δ 1,21 et à δ 3,73. Intégrant chacun pour trois protons, leurs déplacements

chimiques respectifs laissent fort à penser qu'il s'agit d'un méthyle (pour le premier) et d'un groupement O-CH₃, méthoxyle ou ester méthylique (pour le deuxième).

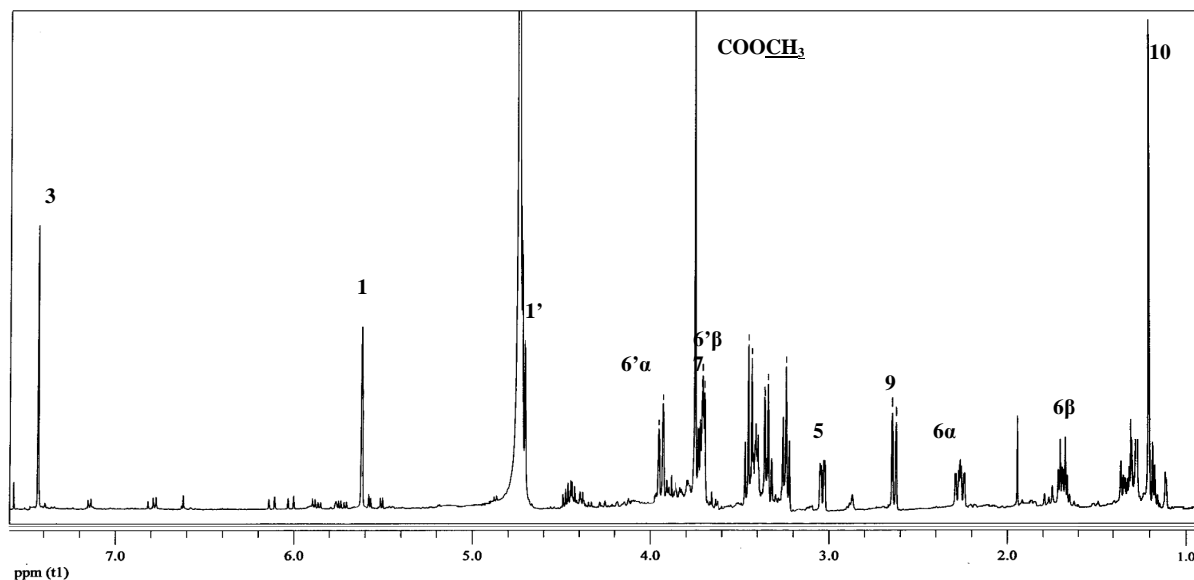


Fig.83. Spectre de RMN du ¹H du composé 17 à 500 MHz dans CD₃OD/D₂O

Dans le spectre du *jmod*, l'attribution des pics du β-D-glucose est aisée, étant connus les spectres de **15** et **16**. Elle est cohérente avec l'enchaînement des hydrogènes déterminé par COSY.

Les spectres de corrélation bidimensionnelle COSY (fig.84), TOCSY (TOTAL Correlation SpectroscopY) et HMBC (fig.85) sont très utiles pour déterminer la position des différents groupements découverts. Ainsi, dans la carte COSY, le proton H9 est corrélé avec H1, ainsi qu'avec un autre atome d'hydrogène (δ 3,12), dont le *jmod* et l'HSQC nous révèlent qu'il se trouve sur un carbone tertiaire. Il ne peut s'agir que du signal du proton en 5 ou de celui en 8. Cet atome est corrélé sur la carte HMBC avec un signal de carbone quaternaire correspondant sans doute au C4. Il s'agit donc plus vraisemblablement de H5 que de H8, qui ne possède donc aucun proton libre, malgré l'absence d'insaturation à ce niveau.

Le signal du méthyle (δ 1,21) en RMN du ¹H est corrélé sur la carte HMBC avec le carbone 9 ce qui indique qu'il substitue le carbone 8. On émet alors l'hypothèse qu'une deuxième substitution de ce dernier par un groupement hydroxy justifierait son caractère quaternaire. La deuxième corrélation des protons du méthyle est faite avec un carbone tertiaire, dont les

déplacements chimiques (^1H δ 3,68 ; ^{13}C δ 78,9) évoquent ceux d'un alcool secondaire. Le carbone 7 serait donc substitué par un groupement hydroxyle.

La carte TOCSY montre parfaitement l'enchaînement du proton 7, des deux protons non équivalents en 6 et du proton 5.

Quant au signal situé à δ 3,73 en RMN du ^1H , sa corrélation avec la fonction carboxylique en 11 (^{13}C δ 169,7) prouve qu'elle fait partie d'une fonction ester méthylique.

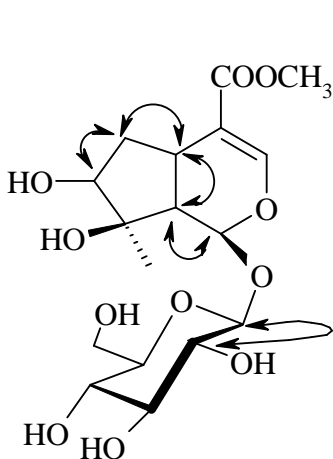


Fig.84. Corrélations COSY choisies du composé 17 (H→H)

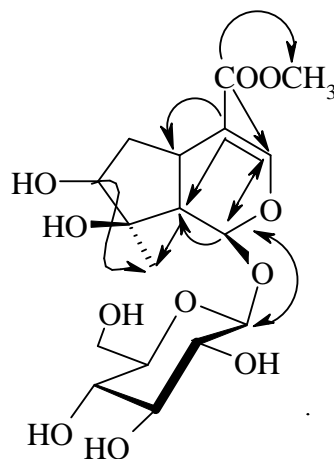


Fig.85. Corrélations HMBC choisies du composé 17 (C→H)

La structure du composé **17** a donc pu être établie comme étant le caryoptoside, qui a été isolé pour la première fois de *Caryopteris odorata* (Hamilt.) B.L. Robinson (Verbenacées) (Rimpler, cité par Damtoft 1992). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 22 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Damtoft 1992). Sont présentées également les données de l'acide caryoptosidique, où le carboxyle n'est pas esterifié (Rastrelli 1998).

Tableau 22. RMN du ^1H (δ , J en Hz) et du ^{13}C (δ) du composé **17** ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$; 500 MHz, 125 MHz), du caryoptoside (D_2O , 500 MHz, 63 MHz) et de l'acide caryoptosidique (CD_3OD , 600 MHz, 150 MHz).

	composé 17		caryoptoside		acide caryoptosidique	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
génine						
1	5,60 d (1Hz)	95,1	5,64 d (1,2Hz)	95,0	5,51 d (4Hz)	94,4
3	7,42 s	151,7	7,45 s	151,3	7,39 s	152,0
4	-	114,0	-	113,8	-	112,4
5	3,12 td (9,8Hz, 6Hz)	27,1	3,12 ddd (11Hz, 9,5Hz, 5,5Hz)	26,2	3,20 ddd (10,5Hz, 9,5Hz, 5Hz)	27,1
6-α	2,25 ddd (14,5Hz, 9,4Hz, 2,8Hz)	38,4	2,23 ddd (14,8Hz, 9,5Hz, 3Hz)	37,2	2,26 ddd (15,5Hz, 9,5Hz, 5Hz)	38,5
6-β	1,67 dt (14,6Hz, 5,7Hz)		1,78 dt (14,8Hz, 5,5Hz)		1,75 dt (15,5Hz, 5Hz)	
7	3,68 d (5Hz)	78,9	3,7-3,8 m	78,6	3,66 dd (5Hz, 2,5Hz)	78,9
8	-	80,0	-	79,8	-	78,9
9	2,63 dd (10,7Hz, 1,2Hz)	48,3	2,65 d (11Hz)	47,5	2,59 dd (10,5Hz, 4Hz)	49,0
10	1,21 s	21,7	1,21 s	21,2	1,25 s	21,9
11	-	169,7	-	170,5	-	171,5
COOCH₃	3,73 s	52,1	3,75 s	52,6	-	-
glucose						
1'	4,70 d (8Hz)	99,6	4,81 d (8,1Hz)	99,0	4,69 d (7,8Hz)	99,5
2'	3,22 dd (11Hz, 6,2Hz)	74,3	-	73,4	3,26 dd (9,5Hz, 7,8Hz)	74,8
3'	3,43 t (9Hz)	77,5	-	76,4	3,44 t (9,5Hz)	78,7
4'	3,32 t (9,3Hz)	71,2	-	70,4	3,33 t (9,5Hz)	71,3
5'	3,38 m	77,9	-	77,1	3,36 m	77,9
6'-α	3,91 d (11,9Hz)	62,4	-	61,5	3,92 dd (12Hz, 4,5Hz)	62,4
6'-β	3,69 dd (11,8Hz, 6,1Hz)		-		3,72 dd (12Hz, 2,5Hz)	

Composé 18

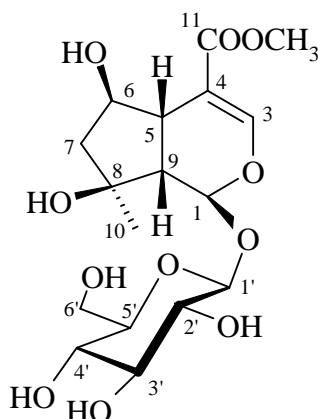


Fig.86. Composé 18

L'aspect marquant du spectre de RMN du ^1H de ce composé (fig.86-87) est sa très forte ressemblance avec celui du composé précédent. On observe :

- un singulet à δ 7,45, correspondant au proton en position 3
- un doublet de faible constante de couplage (2,1 Hz) à δ 5,60 correspondant à l'hydrogène hémiacétalique de la génine monoterpénique
- le doublet correspondant à l'hydrogène anomérique du β -D-glucose à δ 4,70 ($J=8$ Hz)
- les signaux correspondant aux autres protons non alcooliques du glucose, aux mêmes déplacements chimiques que dans le composé **17** : H2' (δ 3,22), H3' (δ 3,43), H4' (δ 3,32), H5' (δ 3,38), H6'- α (δ 3,91), H6'- β (δ 3,69)
- deux singulets, à δ 3,77 et δ 1,28, intégrant chacun pour trois protons, témoignant là encore de la très grande parenté structurale entre les composés **18** et **17** et correspondant respectivement au groupement méthyle estérifiant le carboxyle en 11 et au méthyle 10.

Le signal du méthyle (δ 1,28) en RMN du ^1H est, comme pour le composé **17**, corrélé sur la carte HMBC (fig.89) avec le carbone 9 ce qui confirme qu'il substitue le carbone 8. Là encore, la preuve de la nature quaternaire de ce carbone huit et donc de sa substitution par un groupement hydroxyle est apportée par la RMN du ^{13}C J -modulée. La deuxième corrélation des protons du méthyle est cependant faite cette fois avec un carbone secondaire (δ 49,2), mis en relation par HSQC avec les deux massifs observés à δ 2,07 et δ 1,88 (intégrant chacun pour

un hydrogène), ce qui indique qu'il n'y a pas, contrairement au caryoptoside, de fonction alcoolique en 7.

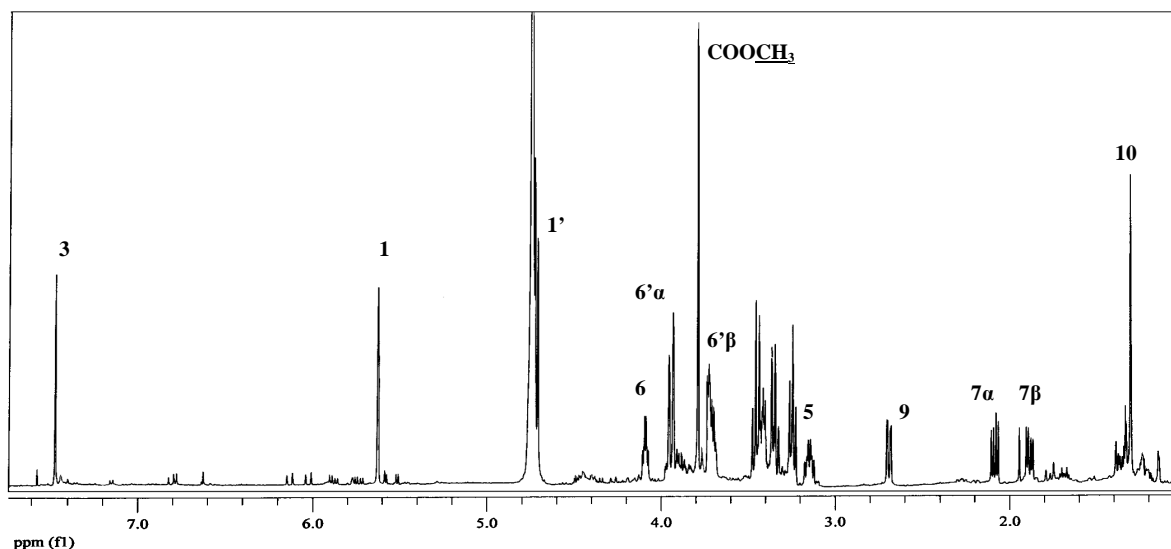


Fig.87. Spectre de RMN du ^1H du composé **18 dans $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ (500 MHz)**

Par contre, le proton 7 est corrélé sur la carte COSY (fig.88) avec le massif situé à δ 4,07 (intégrant pour un proton). Ceci semble indiquer la présence d'une fonction alcool secondaire en 6. Les composés **17** et **18** seraient donc des isomères de position. De même formule brute ($\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$), ils ne diffèrent que par la position d'une fonction alcool secondaire, située respectivement en 7 et en 6.

A la lumière de la structure proposée, il est possible d'expliquer les différentes constantes de couplage des signaux de la génine. Ainsi, H1 est couplé avec H9 (d, $J=2,1$ Hz) ; H9 avec H1 et H5 (dd, $J=2,3$ Hz, 10,2Hz) ; H5 avec H9 et H6 (dd, $J=10,1$ Hz, 3,1 Hz) ; H6 avec H5 et H7 (td, $J=3,6$ Hz, 6,2 Hz) ; H7- α avec H6 et H7- β (dd, $J=6,4$ Hz, 13,3 Hz) ; H7- β avec H6 et H7- α (dd, $J=6,0$ Hz, 13,3 Hz). La cohérence des couplages vient confirmer la structure proposée.

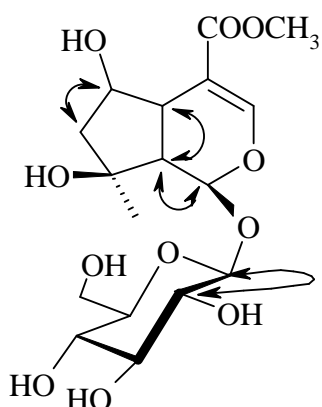


Fig.88. Corrélations COSY choisies du composé 18 (H→H)

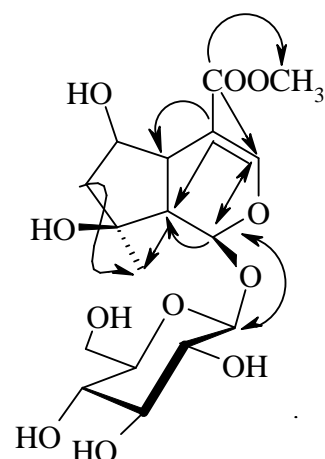


Fig.89. Corrélations HMBC choisies du composé 18 (C→H)

La structure du composé **18** a donc pu être établie comme étant le shanzhiside méthyl ester, qui a été signalé pour la première fois à la fois dans *Mussaenda parviflora* Miq. et *Mussaenda shikokiana* Makino. (Rubiacees) (Takeda 1977). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 23 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Achenbach 1981). Cette molécule n'avait jamais été isolée de *Lippia alba* quand nous l'avons identifiée, mais elle a été rapportée très récemment dans un chimiotype myrcène-citral (pré-publication électronique au moment de l'impression de cette thèse) (Barbosa 2006).

Tableau 23. RMN du ^1H (δ , J en Hz) et du ^{13}C (δ) du composé **18** ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$, 500 MHz, 125 MHz) et du shanzhiside méthyl ester (CD_3OD , 250 MHz, 63 MHz).

	composé 18		shanzhiside méthyl ester	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
génine				
1	5,60 d (2,1Hz)	94,8	5,57 d (3Hz)	94,9
3	7,45 s	153,0	7,41 d (1Hz)	152,9
4	-	111,1	-	111,4
5	3,03 dd (10,1Hz, 3,1Hz)	40,9	2,99 m (10Hz, 3,5Hz, 1Hz)	41,5
6	4,07 td (6,2Hz, 3,6Hz)	77,1	4,03 m (6,5Hz, 6Hz, 3,5Hz)	78,0
7-α	2,07 dd (13,3Hz, 6,4Hz)	49,2	2,01 dd (13Hz, 6,5Hz)	51,9
7-β	1,88 dd (13,3Hz, 6,0Hz)		1,83 dd (13Hz, 6Hz)	
8	-	79,0	-	79,1
9	2,68 dd (10,2Hz, 2,3Hz)	51,3	2,61 dd (10Hz, 3Hz)	51,7
10	1,28 s	24,6	1,26 s	24,7
11	-	170,0	-	169,8
COOCH₃	3,77 s	52,3	3,72 s	49,1
glucose				
1'	4,70 d (8Hz)	99,6	4,61 d (8Hz)	99,9
2'	3,22 dd (11Hz, 6,2Hz)	74,3	NP	74,6
3'	3,43 t (9Hz)	77,5	NP	78,3
4'	3,32 td (9,3Hz, 1,3Hz)	71,2	NP	71,6
5'	3,38 m	77,9	NP	77,5
6'-α	3,91 d (11,9Hz)	62,4	3,91 dd (12Hz, 2Hz)	62,9
6'-β	3,69 dd (11,8Hz, 6,1Hz)		3,64 dd (12Hz, 6Hz)	

Composé 19

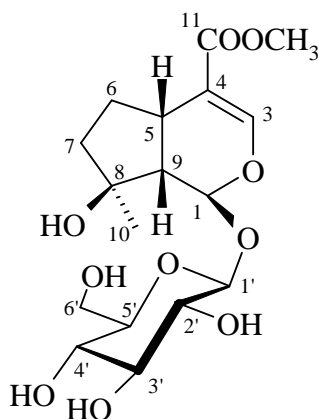


Fig.90. Composé 19

Le spectre de RMN du ^1H du composé **19** (fig.90-91) présente de nombreux points communs avec ceux des iridoïdes précédemment isolés. Le signal le plus déblindé est un singlet (δ 7,42) correspondant vraisemblablement au proton 3 de la génine monoterpénique qui serait, comme dans tous les produits précédents sans voisin (insaturation en 3-4 et position 4 substituée).

On observe également deux doublets autour de δ 5, qui correspondent probablement aux deux protons acétaliques : H-1 de la génine (δ 5,51 ; $J=3,6$ Hz) et H-1' de l'ose (δ 4,74). En revanche, aucun pic n'est visible entre les signaux H-3 et H-1, ce qui prouve qu'il n'existe pas d'insaturation sur le cyclopentane comme c'était le cas pour l'acide géniposidique ou le thévéside.

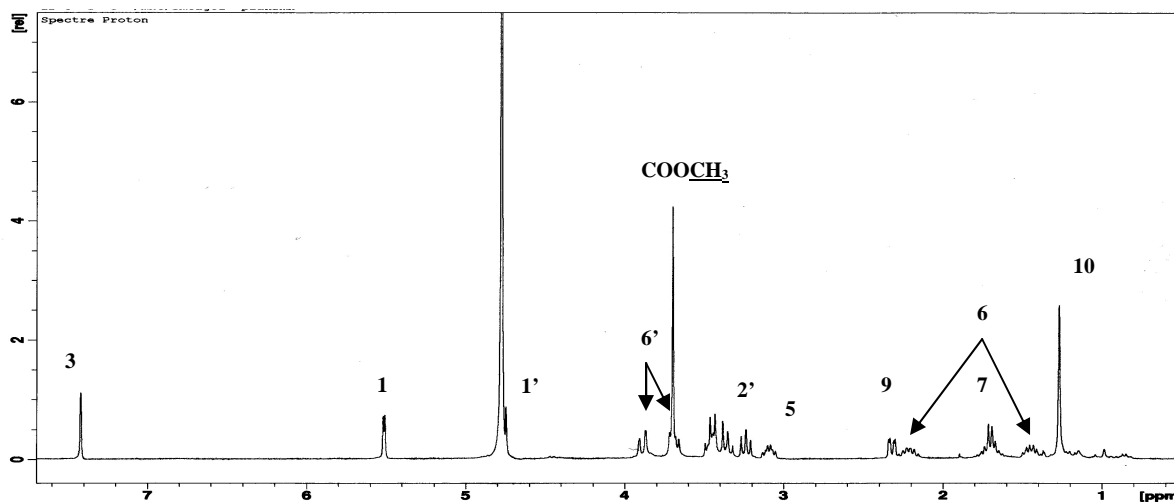


Fig.91. Spectre de RMN du ^1H du composé 19 (300 MHz, D_2O)

La présence d'un très grand singulet à δ 3,69 nous permet d'émettre l'hypothèse que la position 4 est substituée non pas par un acide carboxylique (cas de **15** et **16**) mais par un ester méthylique (comme dans **17** et **18**).

L'expérience COSY (fig.92) se montre, comme dans les autres iridoïdes, d'une grande utilité, permettant quasiment à elle seule la détermination structurale de la molécule. Elle permet en fait de montrer l'enchaînement des protons 1, 9, 5, 6 et 7. L'absence de corrélation entre H7 et un signal pouvant correspondre à un proton en 8 nous conduit à penser que cette position ne présente pas de proton libre. Ceci pourrait être expliqué par la présence d'un groupement méthyle (δ 1,27, s, 3H) et d'un groupement hydroxyle (non visible sur le spectre).

L'expérience HMBC (fig.93) permet de confirmer la structure proposée par l'observation – entre autres – des corrélations C9→H10, C7→H10, C8→H9 et C8→H6. Le déplacement chimique du carbone (quaternaire) 8 en *jmod* est compatible avec sa substitution par un groupement alcoolique.

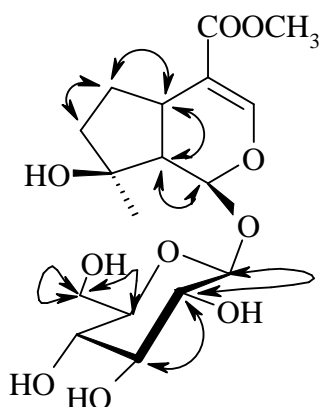


Fig.92. Corrélations COSY choisies du composé 19 (H→H)

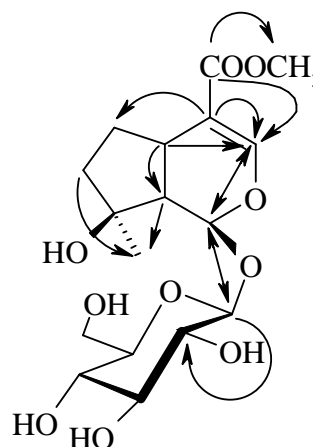


Fig.93. Corrélations HMBC choisies du composé 19 (C→H)

La structure du composé **19** a donc pu être établie comme étant le mussaenoside (fig.90). Cette molécule est connue et a été isolée pour la première fois de *Mussaenda parviflora* Miq. (Rubiaceae). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 24 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Boros 1990).

Tableau 24. RMN du ^1H (δ , J en Hz) et du ^{13}C (δ) du composé **19** (300 MHz, 75 MHz) et du mussaenoside (360 MHz) dans D_2O .

	composé 19		mussaenoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
génine				
1	5,51 d (3,6Hz)	95,2	5,51 d (2,8Hz)	95,2
3	7,42 s	151,8	7,41 s	151,9
4	-	113,3	-	113,3
5	3,09 dt (5,5Hz, 9Hz)	30,4	3,08 m	30,3
6-α	1,56 m	29,7	1,69 m	29,6
6-β	2,21 m		2,20 m	
7-α	1,70 m	40,3	1,44 m	40,4
7-β			1,69 m	
8	-	80,3	-	80,4
9	2,32 dd (9,7Hz, 2,7Hz)	51,5	2,32 dd (9,7Hz, 2,7Hz)	51,4
10	1,27 s	23,8	1,26 s	23,7
11	-	170,7	-	170,6
COOCH₃	3,69 s	52,5	3,69 s	52,6
glucose				
1'	4,74 m	99,0	4,75 d (8,1Hz)	99,1
2'	3,24 t (8,6Hz)	73,4	3,22 dd (9,3Hz, 8,1Hz)	73,4
3'	3,45 m	76,5	3,30-3,45	76,5
4'	3,36 m	70,4		70,4
5'	3,43 m	77,2		77,1
6'-α	3,67 d (12,4Hz)	61,4	3,69 dd (12,4Hz, 5,8Hz)	61,5
6'-β	3,89 dd (12,3Hz, 2,3Hz)		3,87 dd (12,4Hz, 2,1Hz)	

Composé 20

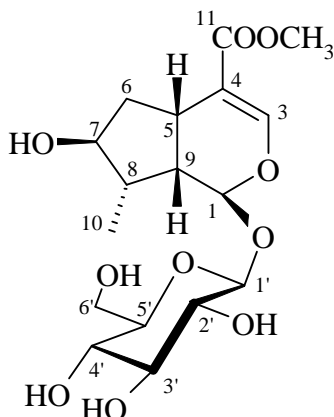


Fig.94. Composé 20

Pour ce composé (fig.94) le spectre de RMN du ^1H (fig.95) montre une parenté évidente de cette molécule avec le mussaenoside (composé **19**), tout au moins au niveau de la partie osidique et du cycle dihydropyranique. En effet, on observe :

- un singulet à δ 7,46 correspondant au proton 3, sans voisin et avec la présence d'une insaturation en 3-4 ;
- un doublet à δ 5,58 de déplacement chimique et de constante de couplage ($J=3,7$ Hz) voisins de ceux du proton 1 dans le composé **19** ;
- un très grand singulet à δ 3,75 indiquant la présence vraisemblable d'une fonction ester méthylique en 4, comme dans le mussaenoside, le caryoptoside et le shanzhiside méthyl ester;
- des signaux osidiques quasi-identiques à ceux visibles dans le spectre du mussaenoside (δ 4,78, d, $J=7,3$ Hz, H1' ; δ 3,28, t, $J=8,2$ Hz, H2' ; δ 3,39, m, H4' ; δ 3,30-3,45 m, H3'-5' ; δ 3,74, d, $J=11,8$ Hz, H6'- α ; δ 3,93, d, $J=11,8$ Hz, H6'- β).

On observe néanmoins deux signaux d'importance, qui différencient ce composé du précédent:

- un signal de déplacement chimique (δ 0,98) et d'intégration compatible (3H) avec un groupement méthyle, comme dans le mussaenoside, mais qui est ici un doublet ($J=7,8$ Hz), ce qui signifie que ce groupe méthyle a un proton voisin, donc qu'il est le seul substituant d'un des carbones 6, 7 ou 8 ;

- un massif à δ 3,87, très déblindé, qui indique qu'un autre de ces carbones (6, 7, 8) est probablement substitué par un groupement alcoolique et par lui seul.

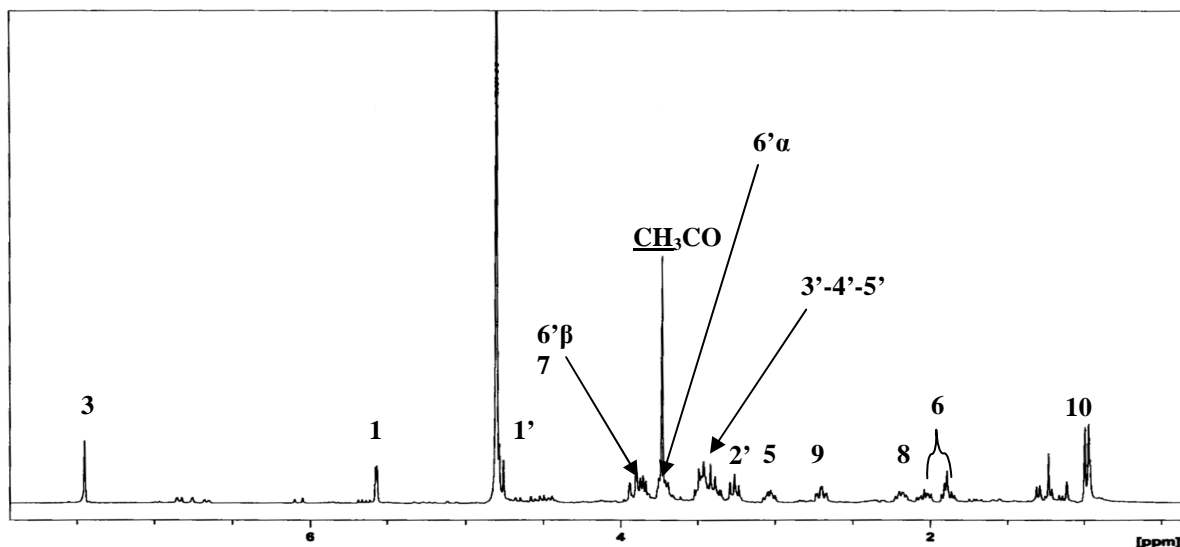


Fig.95. Spectre de RMN du ^1H du composé 20 à 300 MHz dans D_2O

L'expérience COSY (fig.96) se montre encore une fois très efficace pour déterminer la plus grande partie de la structure de l'iridoïde isolé. On établit que le groupement méthyle est branché en position 8 comme dans le mussaenoside, mais que le groupement hydroxyle est en position 7.

La carte HMBC (fig.97) corrobore les informations obtenues dans le COSY, mais permet également de visualiser la corrélation scalaire entre les protons 1 et 1' et est surtout intéressante pour la partie dihydropyrannique, où on observe plus facilement des corrélations proton-carbone que des voisinages proton-proton. On confirme donc les hypothèses émises à partir du spectre de RMN du ^1H , notamment l'existence et la position de substitution de l'ester méthylique.

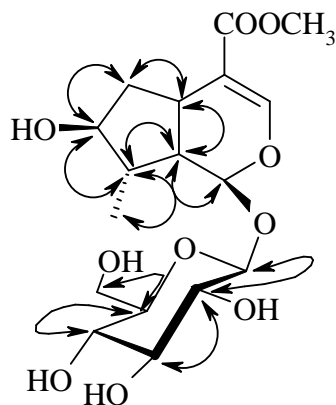


Fig.96. Corrélations COSY choisies du composé 20 (H→H)

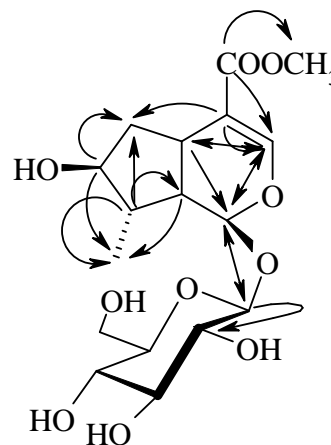


Fig.97. Corrélations HMBC choisies du composé 20 (C→H)

La formule développée du composé **20** est donc établie, mais nous constatons dans la littérature que celle-ci est valable pour plusieurs composés, selon la configuration des carbones 7 et 8 (loganine, 7-*epi*-loganine, 8-*epi*-loganine) (Boros 1990). Pour être certain de la nature exacte de la molécule isolée, nous avons recours à l'expérience ROESY (fig.98). On remarque :

- que les interactions dipolaires constatées entre les protons non alcooliques de l'ose sont conformes à celles attendues pour le β -D-glucose (corrélations de H1' avec H3' et H5' d'une part, corrélation de H2' avec H4' d'autre part) ;
- que la corrélation entre H1 et H1' est observable ;
- des interactions dipolaires entre H1 et les protons H10 et H7, ce qui montre que le groupement méthyle (10) est orienté du même côté du plan de la molécule que H1 et que le proton en 7 l'est aussi (donc l'hydroxyle est de l'autre côté). Ce cas de figure n'est compatible qu'avec la structure de la 8-*epi*-loganine.

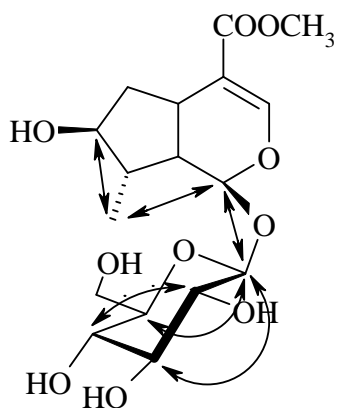


Fig.98. Corrélations ROESY du composé 20 (H↔H)

L'expérience ROESY permet également d'attribuer précisément les signaux correspondant aux deux protons non équivalents portés par le carbone 6. Un seul des deux étant corrélé avec le proton 7 et l'autre l'étant avec le proton 5, on conclue que signal situé à δ 2,04 correspond au proton orienté au dessus du plan de la molécule telle que nous l'avons représentée et que celui situé à δ 1,89 est en-dessous. Ceci est expliqué dans la figure 99, où les autres interactions dipolaires rapportées sont également représentées.

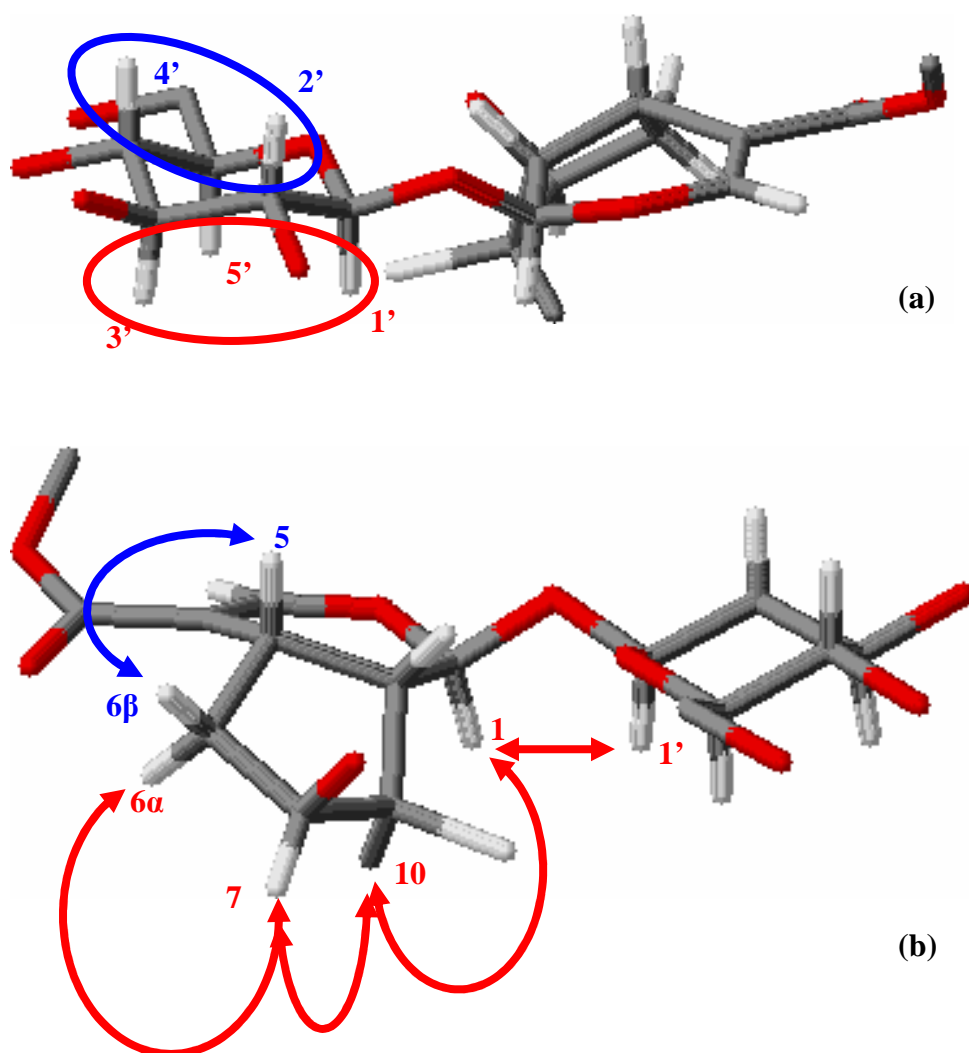


Fig.99. Interactions dipolaires vues dans l'expérience ROESY, sur une représentation tridimensionnelle de la 8-*epi*-loganine (composé 20). Le squelette carboné est représenté en gris, les atomes d'hydrogène en blanc et l'oxygène en rouge. → : corrélations entre hydrogènes situés en-dessous du plan de représentation habituelle de la molécule ; → au dessus du plan. (a) : corrélations observées pour le glucose. (b) : corrélations observées pour la génine.

La structure du composé **20** a donc pu être établie comme étant la 8-*epi*-loganine (ou 8-*epi*-loganoside). Ce composé a été isolé pour la première fois de *Odontites verna* (Bellardi) Dumort. f. *serotina* (Dumort.) Corb. (Scrophulariacées) (Bianco 1981). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 25 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Boros 1990).

Tableau 25. RMN du ^1H (δ , J en Hz) et du ^{13}C (δ) du composé **20** (300 MHz, 75 MHz) et de la 8-*epi*-loganine (90 MHz) dans D_2O .

	composé 20		8- <i>epi</i> -loganine	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
génine				
1	5,58 d (3,7Hz)	96,2	5,59 d (3Hz)	96,5
3	7,46 s	152,0	7,45 s	152,2
4	-	113,7	-	114,0
5	3,08 dt (6,3Hz, 8,3Hz)	29,1	3,11 m	29,4
6-α (\downarrow)	1,92 m	39,3	1,7-2,4 m	39,6
6-β (\uparrow)	2,04 m			
7	3,87 m	79,0	3,7-4,1 m	79,0
8	2,21 m	43,4	2,30	43,5
9	2,71 td (9,1Hz, 2,5Hz)	41,5	2,73 dt (8,5Hz, 8,5Hz, 3Hz)	41,8
10	0,98 d (7,8Hz)	13,6	1,05 d (7Hz)	14,0
11	-	170,5	-	170,7
COOCH₃	3,75 s	52,5	3,76 s	52,6
glucose				
1'	4,78 d (7,3Hz)	99,2	-	99,1
2'	3,28 t (8,2Hz)	73,5		73,5
3'	3,49 m	76,7		76,6
4'	3,39 m	70,4		70,5
5'	3,47 m	76,9		77,1
6'-α	3,74 d (11,8Hz)	61,4		61,6
6'-β	3,93 d (11,8Hz)			

$\uparrow\downarrow$: indique l'orientation des protons en 6 (au dessus / en dessous du plan de la molécule)

Composé 21

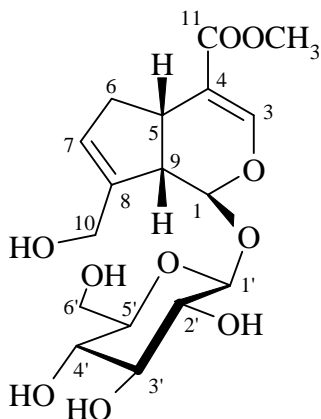


Fig.100. Composé 21

Par son spectre de RMN du ^1H (fig.101), cette molécule (fig.100) apparaît très similaire au composé **15** (acide géniposidique). On observe des signaux de déplacements chimiques très proches (en dépit de quelques différences dues au fait qu'on n'a pas ici employé le méthanol seul mais un mélange méthanol/eau). Outre le fait qu'un des signaux correspondant aux protons 6 de la génine soit ici quasiment occulté par le triplet correspondant au proton 9, la différence principale entre les deux spectres réside en la présence d'un grand singulet à δ 3,68, qui recouvre en partie le signal H6' du glucose.

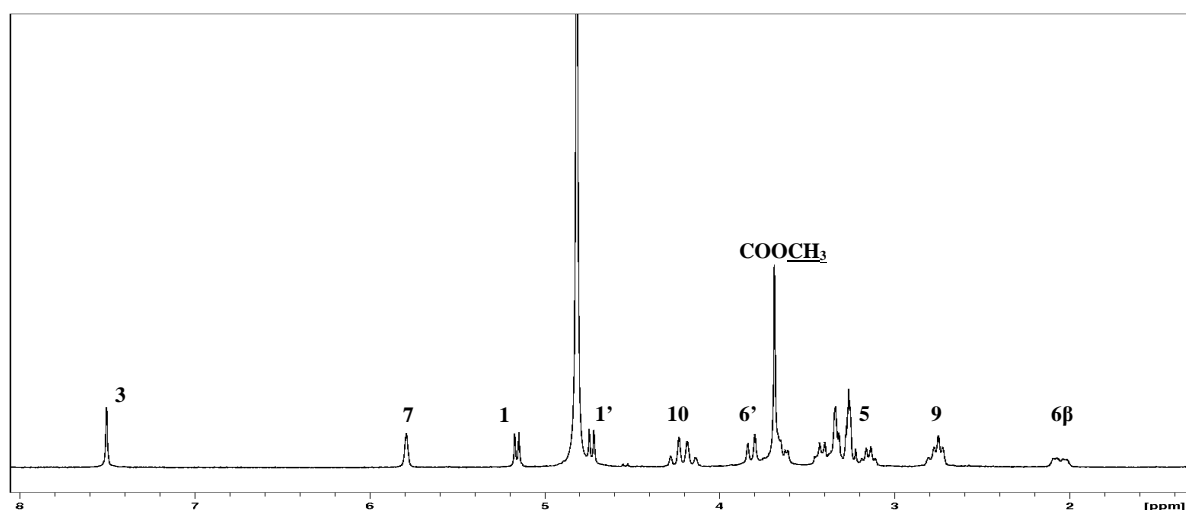


Fig.101. Spectre de RMN du ^1H du composé 21 (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$)

La structure du composé **21** a été établie comme étant le géniposide, qui a été isolé pour la première fois de l'espèce *Gardenia jasminoides* Ellis f. *grandiflora* (Rubiaceae) (Inouye 1969). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 26 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Kırmızıbekmez 2002). Le géniposide était le seul iridoïde déjà rapporté comme faisant partie des constituants chimiques de *Lippia alba*, mais les méthodes de détermination n'étaient apparemment pas précisément rapportées (Heinrich 1992). Il est, dans notre échantillon, très minoritaire parmi les iridoïdes.

Tableau 26. RMN du ^1H (δ , J en Hz) du composé **21** (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$) et du géniposide (400 MHz, CD_3OD).

	composé 21	géniposide
génine		
1	5,18 d (7,4Hz)	5,17 d (7,6Hz)
3	7,51 s	7,51 s
4	-	-
5	3,18 dt (6,9Hz, 7,9Hz)	3,17 m
6-α	2,81 m	2,82 dd (16,3Hz, 8Hz)
6-β	2,05 dd (16,3Hz, 7,4Hz)	2,09 dd (16,3Hz, 8Hz)
7	5,80 s	5,79 sl
8	-	-
9	2,76 t (7,8Hz)	2,72 dd (t) (7,6Hz)
10-α	4,25 d (14,8Hz)	4,31 d (15,1Hz)
10-β	4,16 d (13,8Hz)	4,18 d (15,1Hz)
11	-	-
COOCH₃	3,68 s	3,70 s
glucose		
1'	4,72 d (8,4Hz)	4,71 d (7,8Hz)
2'	3,23 m	3,22 dd (7,8Hz, 9,0Hz)
3'	3,41 m	3,38 t (9,0Hz)
4'	3,31 m	3,28
5'	3,35 m	3,30 m
6'-α	3,85 (11,9Hz)	3,85 dl (11,9Hz)
6'-β	3,65 dd (12,3Hz, 4,9Hz)	3,63 dd (11,9Hz, 5,1Hz)

Phénylpropanoïdes

Composé 13

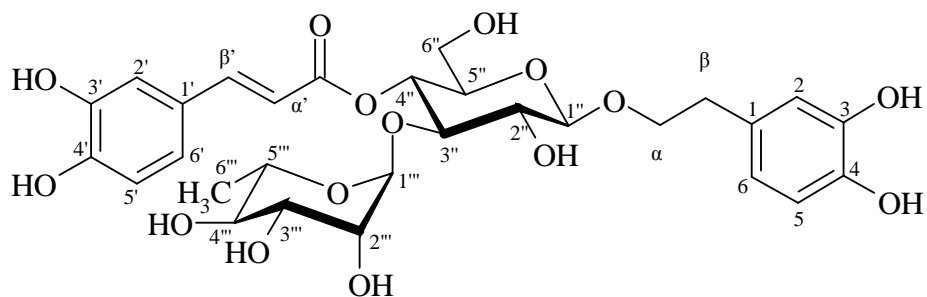


Fig.102. Composé 13

La structure de ce composé (fig. 102) a été établie comme étant l'actéoside (ou verbascoside ou kusaginine). Ce composé étant strictement identique au produit **13** déjà décrit (voir page 101), sa détermination structurale n'est pas redétaillée ici. De même, pour les données de RMN du ^1H et du ^{13}C , on pourra se reporter au tableau 17, page 104.

Composé 22

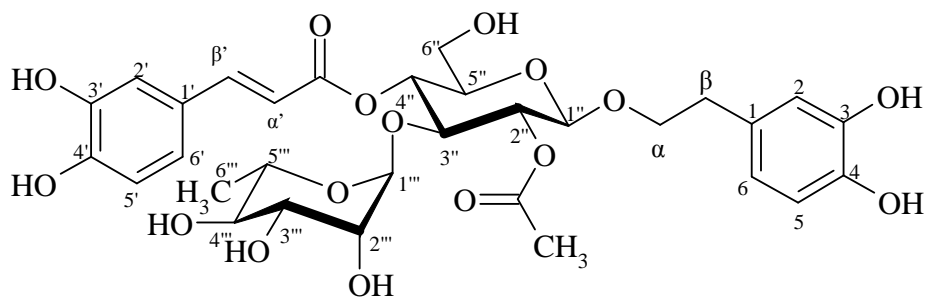


Fig.103. Composé 22

L'analyse par spectrométrie de masse *electrospray-ionspray* (SM-ESI) du composé **22** (fig.103) montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ ayant un rapport m/z de 689 en ionisation positive, compatible avec la formule brute $C_{31}H_{38}O_{16}$.

Au niveau du spectre de RMN du 1H (fig.104), l'observation de la région des aromatiques indique une grande parenté structurale avec le composé **13**: on observe à nouveau deux systèmes ABX correspondant très vraisemblablement aux deux noyaux phényle de l'acide caféique (δ 7,04, d, $J=1,8$ Hz ; δ 6,95, dd, $J=8,3$ Hz, 1,8 Hz ; δ 6,77, d, $J=8,2$ Hz) et de l'hydroxytyrosol (δ 6,66, d, $J=8,1$ Hz ; δ 6,63, d, $J=1,8$ Hz ; δ 6,52, dd, $J=8$ Hz, 1,8 Hz). L'acide caféique est, là encore, en configuration *trans*, d'après le déplacement chimique et les constantes de couplage (16 Hz) des deux doublets oléfiniques.

Néanmoins, un premier élément est révélateur de l'introduction d'une modification structurale: alors que le système ABX correspondant à l'acide caféique est très semblable à celui observé dans l'actéoside, les signaux de l'hydroxytyrosol diffèrent davantage entre les deux composés. En particulier, l'ordre des signaux des protons 2 et 5 de cette génine (2 est plus blindé que 5) est modifié par rapport à l'actéoside, mais aussi par rapport à de nombreux autres esters hétérosidiques phénylpropanoïques trouvés dans la littérature (forsythoside B, arénarioside, ballotétroside, alyssonoside, lavandulifolioside, angoroside A, calcéolarioside A, descaféylactéoside, leucoseptoside A, rossicaside A, trichosantosides A et B, crénatoside, isocrénatoside) (Kırmızıbekmez 2002, Seidel 1999).

Cette observation n'est pas spécifique d'une unique modification structurale: elle est retrouvée pour des molécules plus ou moins méthoxylées, comme le martinoside

(Kırmızıbekmez 2002), ou acétylées, telles que le 2,6-diacétyllactéoside (Munkombwe 2003) ou les verbascoside, forsythoside B, arénarioside, ballotétroside, alyssonoside, lavandulifolioside, angoroside A peracétylés (Seidel 1999). Or il se trouve justement qu'un singulet intégrant pour trois protons est observable à δ 1,98, ce qui démontre la présence d'un groupement acétyle.

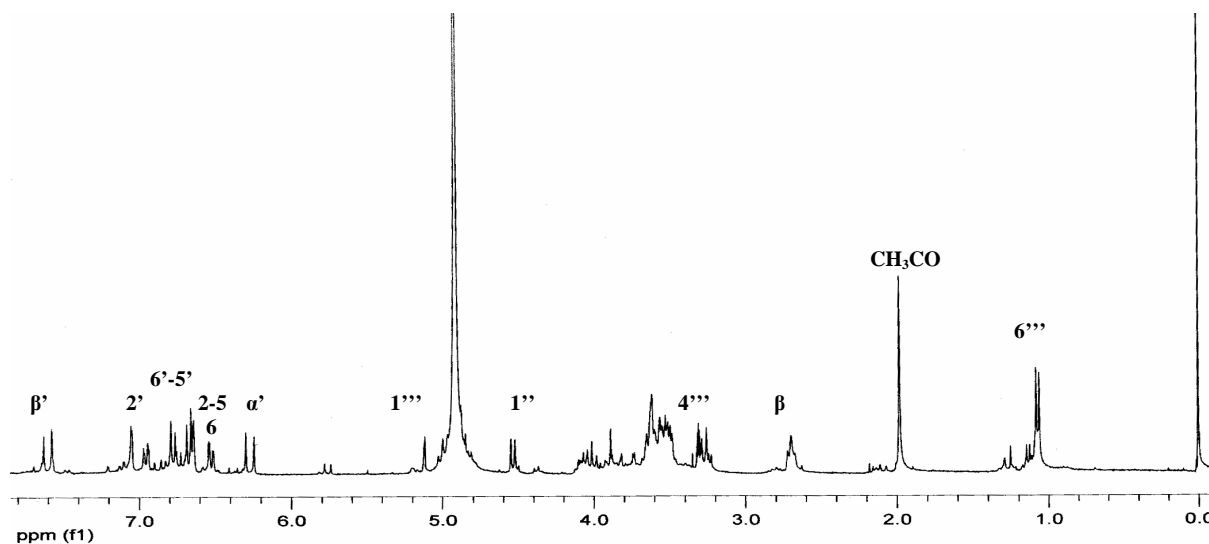


Fig.104. Spectre de RMN du ^1H du composé 22 à 300 MHz dans le CD_3OD

L'utilisation de la RMN du ^1H semble également indiquer que la nature des oses présents ne diffère pas de celle de l'actéoside (doublet susceptible de correspondre au proton anomérique du glucose à δ 4,53, doublet caractéristique du méthyle 6 du rhamnose à δ 1,07 en RMN du ^1H). La spectrométrie de masse confirme que la masse de la molécule est supérieure d'exactly 42 u.m.a à celle de l'actéoside (correspondant à la substitution de celui-ci par un acétyle, un fragment correspondant à ce groupement étant par ailleurs observable). Il s'agirait donc d'un acétyllactéoside. Reste à déterminer la position de substitution.

Les modifications des déplacements chimiques, par rapport à ceux de l'actéoside, semblent concerner principalement une région bien particulière de la molécule : hydroxytyrosol (ordre des protons 2 et 5, comme mentionné plus haut, mais aussi proton β), et protons anomériques du glucose et du rhamnose, ce qui fait de l'hydroxyle en 2 du glucose une hypothèse de choix pour la localisation de l'acétyle. Ceci est confirmé par l'expérience de corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (fig.105), puisqu'on observe une tache de

corrélation entre le carbone quaternaire de la fonction acétyle à δ 171,5 et le proton 2 du glucose à δ 3,41. Cette technique permet également de vérifier que les branchements des différents éléments de la molécule sont bien identiques à ceux de l'actéoside.

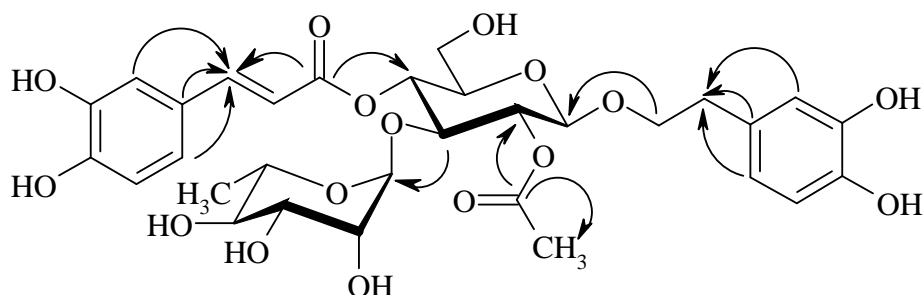


Fig.105. Corrélations HMBC choisies du composé 22 (C→H)

La structure du composé **22** a donc pu être établie comme étant le 3,4-dihydroxy- β -phényléthoxy-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-2-*O*-acétyl-4-*O*-(*E*)-caféyl- β -D-glucopyranoside, couramment appelé 2-acétylactéoside. Le premier isolement publié de cette molécule a été réalisé sur l'espèce *Cistanche salsa* (C.A. Mey) G. Beck (Orobanchacées) (Kobayashi 1984). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 27 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Kobayashi 1987).

Tableau 27. RMN du ^1H (δ , J en Hz) et du ^{13}C (δ) du composé **22** et du 2-acétylactéoside dans CD_3OD (300 MHz, 75 MHz).

	composé 22		2-acétylactéoside	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
hydroxytyrosol				
1	-	131,7	6,5-7,2	131,9
2	6,63 d (1,8Hz)	117,2		117,2
3	-	145,9		145,9
4	-	144,5		144,4
5	6,66 d (8,1Hz)	116,3		116,4
6	6,52 dd (1,8Hz, 8Hz)	121,3		121,4
α	3,75 m-4,04 dd (7,8Hz, 16,3Hz)	72,5	-	72,5
β	2,69 t (6,9Hz)	36,2	2,69 t (7Hz)	36,2
acide caféique				
1'	-	127,5	6,5-7,2	127,7
2'	7,04 d (1,8Hz)	115,3		115,5
3'	-	146,8		146,6
4'	-	149,8		149,6
5'	6,77 d (8,2Hz)	116,5		116,6
6'	6,95 dd (1,8Hz, 8,3Hz)	123,3		123,2
α'	6,26 d (15,9Hz)	114,5	6,25 d (16Hz)	114,7
β'	7,59 d (16Hz)	148,2	7,59 d (16Hz)	148,1
CO	-	168,1	-	168,1
glucose				
1''	4,53 d (8,1Hz)	101,6	4,50 d (8Hz)	101,6
2''	4,87 dd (8,2Hz, 9,3Hz)	75,1	-	75,1
3''	4,00 t (9,3Hz)	80,5	-	80,3
4''	5,01 t (9,4Hz)	70,6	-	70,7
5''	3,52 m	75,9	-	76,0
6'' (a et b)	3,54-3,65 m	62,2	-	62,2
rhamnose				
1'''	5,13 d (1,1Hz)	103,2	5,16 s	103,1
2'''	3,65 m	72,0	-	72,0
3'''	4,06 m	71,7	-	71,7
4'''	3,25 t (9,5Hz)	73,6	-	73,6
5'''	3,54 m	70,7	-	70,7
6'''	1,07 d (6,2Hz)	18,5	1,07 d (6Hz)	18,4
CH₃CO	1,98 s	20,9	1,99 s	20,9
CH₃CO	-	171,5	-	171,5

Composé 23

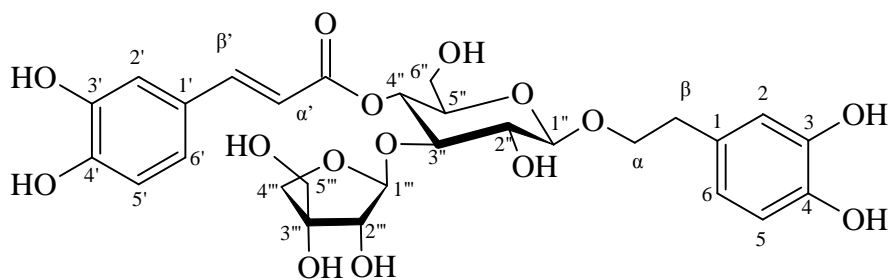


Fig.106. Composé 23

L'analyse par spectrométrie de masse *electrospray-ionspray* (SM-ESI) du composé **23** (fig.106) montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ ayant un rapport m/z de 633 en ionisation positive, compatible avec la formule brute $C_{28}H_{34}O_{15}$.

Sur le spectre de RMN du 1H (fig.107), l'observation de la région des aromatiques nous montre que ce composé appartient à la même série que les deux composés précédents. En effet, les déplacements chimiques et couplages des signaux observés dans cette région sont très proches de ceux de l'actéoside et du 2-acétylactéoside. On retrouve ici les deux doublets alcéniques (δ 6,32 et δ 7,62, $J=15,8$ Hz) et le système ABX (δ 7,08, d, $J=1,8$ Hz ; δ 6,98, dd, $J=8,1$ Hz, 1,8 Hz ; δ 6,80, d, $J=8,1$ Hz) correspondant à l'acide (*E*)-caféique d'une part ; le système ABX (δ 6,73, d, $J=1,8$ Hz ; δ 6,71, d, $J=8,1$ Hz ; δ 6,58, dd, $J=8,1$ Hz, 1,8 Hz) caractéristique de l'hydroxytyrosol d'autre part. Le triplet observé à δ 2,81 est lui aussi révélateur de la présence de l'hydroxytyrosol. Il correspond aux deux protons situés en β de l'oxygène.

De toute évidence, le glucose semble présent. En effet, on retrouve un doublet δ 4,40 ($J=7,9$ Hz), qui est très semblable à celui correspondant au proton anomérique du glucose dans l'actéoside (δ 4,37, $J=7,7$ Hz). L'expérience permet de déterminer l'enchaînement des autres protons présent dans cet ose ; leurs déplacements chimiques sont là encore conformes à ceux observés pour le glucose de l'actéoside. La détermination des carbones auxquels sont rattachés ces protons par HSQC permet de dire que les déplacements chimiques en RMN du ^{13}C correspondent eux aussi. On peut donc conclure que trois des quatre éléments présents dans l'actéoside sont également dans cette molécule, et avec les mêmes branchements (l'acide

caféique estérifiée le glucose en 4, l'hydroxytyrosol est engagé dans une liaison de type acétalique avec la fonction OH en 1 de ce même ose).

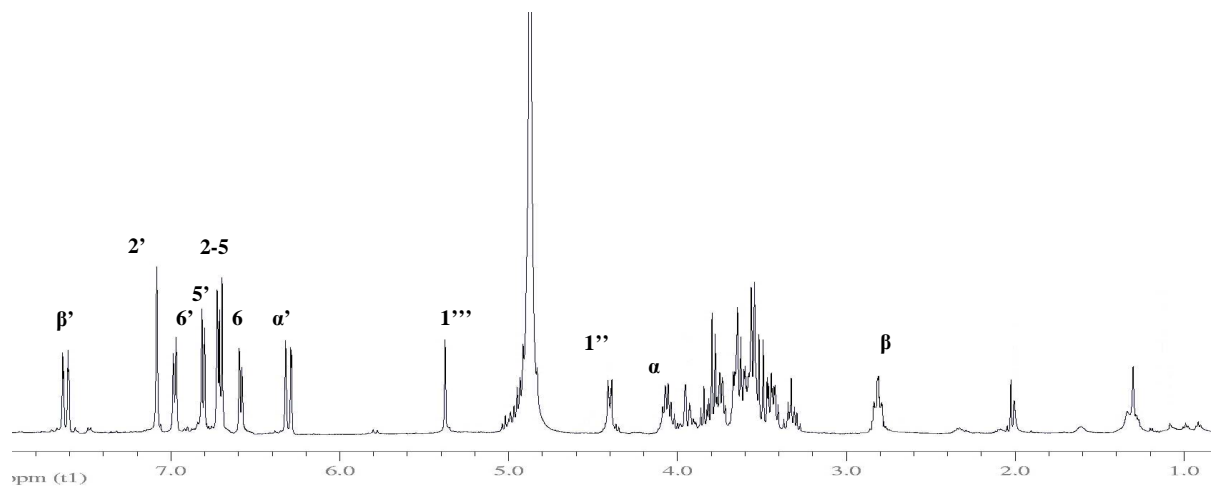


Fig.107. Spectre de RMN du ^1H du composé **23 à 300 MHz dans CD_3OD**

Cependant la masse moléculaire est différente. On n'observe d'ailleurs pas le doublet caractéristique de la présence du rhamnose. La masse observée pour l'ion pseudomoléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de cette molécule en SM-ESI est de 633. Sa masse exacte M est donc $([\text{M}+\text{Na}]^+ - \text{Na}^+)$ 610, soit 132 u.m.a. de plus que ne peuvent l'expliquer les trois seuls éléments déjà identifiés. L'ose qui substitue le glucose en 3 a donc logiquement une masse de 150 (c'est-à-dire $132 + 18$, la masse de la molécule d'eau qui a été perdue lors de l'établissement de la liaison osidique). C'est donc un pentose.

Son identification est établie par comparaison avec les données de divers oses dans la littérature. Il s'agit de l'apiose. Sa configuration β est établie par le déplacement chimique du $\text{C1}''''$ (δ 111,5) en RMN du ^{13}C , comme pour composé **7** (cf. tableau 10).

La structure du composé **23** a donc pu être établie comme étant le 3,4-dihydroxy- β -phényléthoxy- O - $[\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 3)]-4- O -(E)-caféyl- β -D-glucopyranoside, généralement appelé calcéolarioside E ou nuomioside A. Cette molécule a été isolée pour la première fois de *Calceolaria ascendens* Lind. (Scrophulariacées) (Nicoletti 1988). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le

tableau 28 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Damtoft 1993, Kasai 1991).

Nos spectres ont été enregistrés dans CD₃OD. C'est également le cas pour les données de RMN du ¹³C reprises dans la littérature (Damtoft 1993). Par contre, les données de RMN du ¹H citées ici ont été enregistrées dans le DMSO-*d*₆, ce qui explique les écarts observés par rapport à nos résultats (Kasai 1991). Des données sont disponibles dans un mélange CD₃OD/CDCl₃ (2:8), qui sont beaucoup plus proches de nos résultats (écart maximal : 0,04 ppm), mais moins complètes et moins précises (Nicoletti 1988). Nous n'avons pas fait figurer ces données dans leur intégralité, mais on peut signaler les déplacements chimiques respectifs des protons anomériques du glucose (δ 4,39) et de l'apiose (δ 5,35), qui sont très proches de ceux que nous avons observés.

Tableau 28. RMN du ^1H (300 MHz, δ , J en Hz) et du ^{13}C (75 MHz, δ) du composé **23** (CD_3OD) et du calcéolarioside E ($\text{DMSO-}d_6$).

	composé 23		calcéolarioside E	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
hydroxytyrosol				
1	-	131,4	-	131,6
2	6,73 d (1,8Hz)	117,1	6,69 d (1,9Hz)	115,6
3	-	146,1	-	145,8
4	-	144,6	-	144,3
5	6,71 d (8,1Hz)	116,5	6,70 d (8,1Hz)	116,8
6	6,58 dd (1,8Hz, 8Hz)	121,3	6,57 dd (1,9Hz, 8,1Hz)	121,6
α (a et b)	3,73 dd (8Hz, 16Hz)	72,3	3,71 ddd (7,2Hz, 8,8Hz, 8,8Hz)	72,2
	4,06 dd (8Hz, 16Hz)		3,95 ddd (7,2Hz, 8,8Hz, 8,8Hz)	
β (a et b)	2,81 t (7,4Hz)	36,5	2,75 ddd (7,2Hz, 8,8Hz, 9Hz)	36,5
			2,77 ddd (7,2Hz, 8,8Hz, 9Hz)	
acide caféique				
1'	-	127,6	-	127,7
2'	7,08 d (1,8Hz)	115,2	7,10 d (1,4Hz)	115,0
3'	-	146,8	-	146,5
4'	-	149,7	-	149,4
5'	6,80 d (8,1Hz)	116,3	6,83 d (8,2Hz)	116,6
6'	6,98 dd (1,8Hz, 8,1Hz)	123,3	7,05 dd (1,4Hz, 8,2Hz)	123,4
α'	6,32 d (15,8Hz)	114,9	6,29 d (15,8Hz)	116,6
β'	7,62 d (15,8Hz)	147,7	7,53 d (15,8Hz)	148,0
CO	-	168,4	-	168,7
glucose				
1''	4,40 d (7,9Hz)	104,1	4,36 d (7,8Hz)	103,9
2''	3,43 m	75,7	3,27 dd (7,8Hz, 9,3Hz)	75,5
3''	3,79 d (9,7Hz)	81,4	3,74 dd (9,3Hz, 9,5Hz)	81,6
4''	4,92 t (9,3Hz)	70,5	4,68 dd (9,5Hz, 9,6Hz)	70,6
5''	3,55 m	75,9	3,53 ddd (1,7Hz, 6Hz, 9,6Hz)	75,8
6'' (a et b)	3,55 m	62,3	3,42 dd (6Hz, 10,7Hz)	62,5
	3,65 m		3,47 dd (1,7Hz, 10,7Hz)	
apiose				
1'''	5,38 d (1,8Hz)	111,5	5,26 d (1,7Hz)	111,4
2'''	3,92 d (1,7Hz)	78,2	3,77 d (1,7Hz)	78,4
3'''	-	80,6	-	80,6
4''' (a et b)	3,62 d (9Hz)	75,2	3,49 d (9Hz)	75,2
	3,77 d (9Hz)		3,70 d (9Hz)	
5'''	3,49 m	65,6	3,25 d (10,8Hz)	66,0
			3,28 d (10,8Hz)	

Composé 7

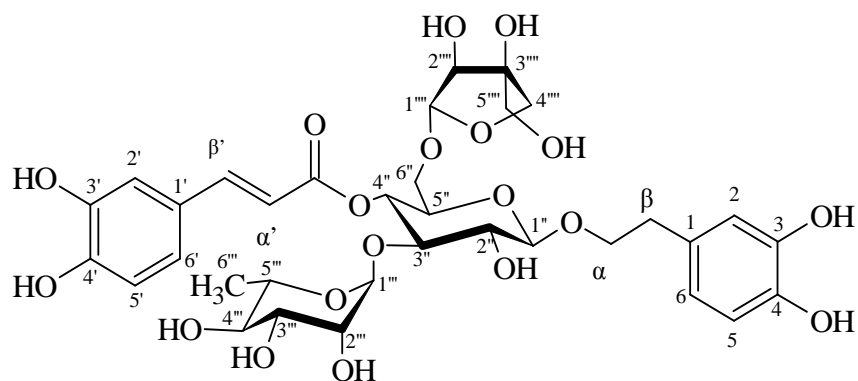


Fig.108. Composé 7

La structure de ce composé (fig.108) a été établie comme étant le forsythoside B. Son spectre de RMN du ^1H est présenté dans la figure 109. Ce composé étant strictement identique au produit 7 déjà décrit (page 70), sa détermination structurale n'est pas redétaillée ici. De même, pour les données de RMN du ^1H et du ^{13}C , on pourra se reporter au tableau 11, page 73.

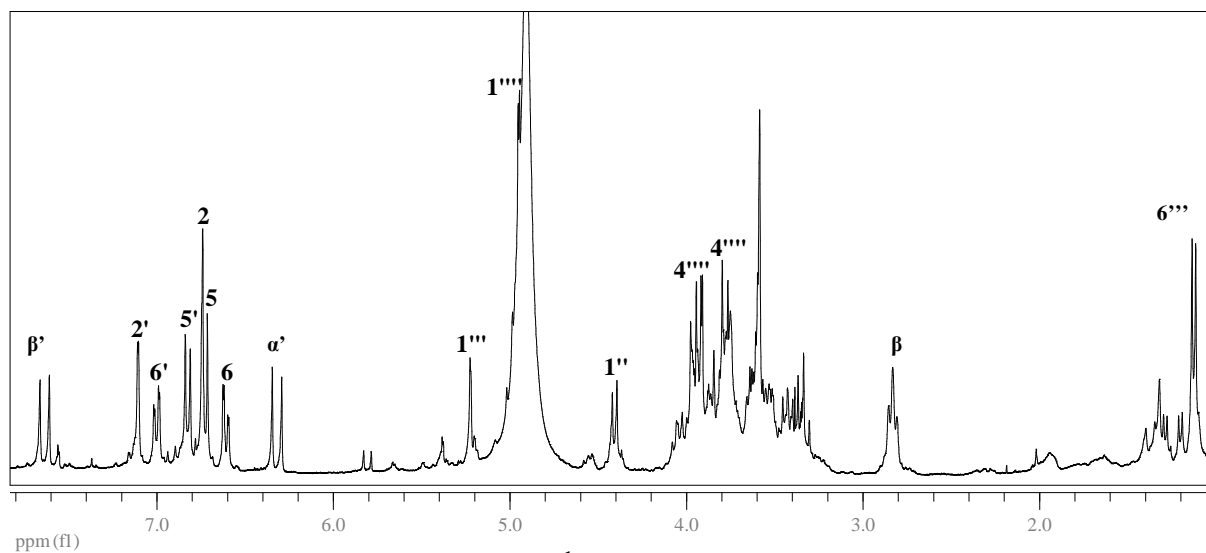


Fig. 109. Spectre de RMN du ^1H du composé 7 (300 MHz, CD_3OD)

Composé 24

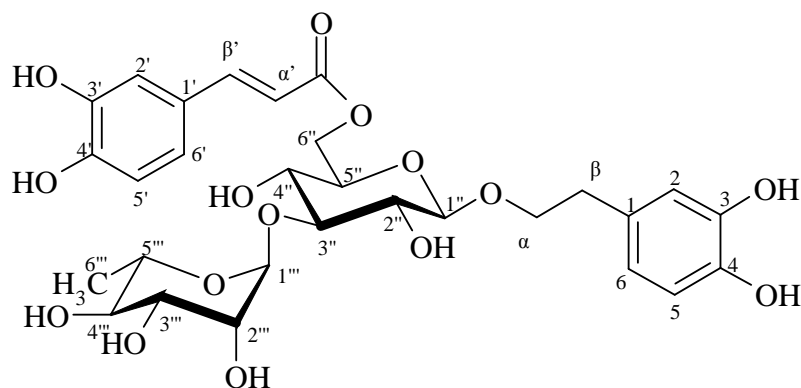


Fig.110. Composé 24

L'analyse par spectrométrie de masse *electrospray-ionspray* (SM-ESI) du composé **24** (fig.110) montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ ayant un rapport m/z de 647 (identique à celui de l'actéoside) en ionisation positive, compatible avec la formule brute $C_{29}H_{36}O_{15}$.

L'observation du spectre de RMN du 1H (fig.111) révèle immédiatement une très grande parenté avec la molécule d'actéoside. En effet, tous les éléments constitutifs de celui-ci sont apparemment observables : un acide caféique (un système ABX à δ 7,04, δ 6,89, δ 6,77 pour le noyau aromatique et deux doublets alcéniques de type *trans* à δ 7,56 et δ 6,29), un hydroxytyrosol (système ABX à δ 6,68, δ 6,65 et δ 6,53 et triplet caractéristique des protons β de cette génine, à δ 2,78), un glucose (doublet du proton anomérique à δ 4,34, $J=7,9$ Hz, partiellement recouvert, il est vrai par un autre signal dont nous discuterons l'importance) et un rhamnose (doublet du proton anomérique à δ 5,19, $J=1,4$ Hz, doublet caractéristique du méthyle 6 de ce 6-désoxyose à δ 1,26, $J=6,2$ Hz).

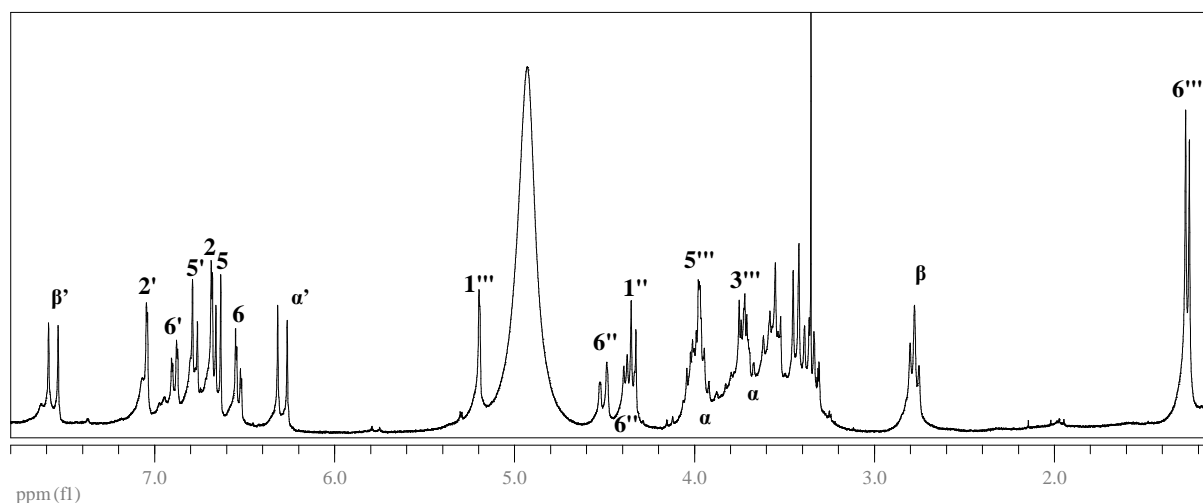


Fig.111. Spectre de RMN du ^1H du composé **24 (300 MHz, CD_3OD)**

Dans la zone du proton anomérique du glucose, et chevauchant d'ailleurs en partie ce dernier, on observe deux doublets dédoublés, à δ 4,50 ($J=12$ Hz, 1,5 Hz) et δ 4,36 ($J=12$ Hz, 5,7 Hz). Ces deux signaux semblent couplés l'un avec l'autre avec une constante de couplage de 12 Hz. Cette information, et le fait qu'à eux deux ces deux massifs ont une intégration correspondant à deux protons (en fait trois avec le proton anomérique du glucose), permettent d'émettre l'hypothèse que leur origine serait l'acylation d'un groupement alcoolique primaire, en l'occurrence le carbone 6 du glucose (c'est bien la seule possibilité), par l'acide caféique. On aurait donc un isomère de l'actéoside, qui pourrait ne différer de celui-ci que par la position de substitution du résidu (*E*)-caféyle sur le glucose : l'acylation ne serait plus en position 4, mais en position 6 de cet ose.

La structure du composé **24** a donc pu être établie comme étant le 3,4-dihydroxy- β -phényléthoxy-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-*O*-(*E*)-caféyl- β -D-glucopyranoside, couramment appelé isoactéoside ou isoverbascoside. Il été isolé pour la première fois, en même temps que le verbascoside, de *Verbascum sinuatum* L. (Scrophulariacées) (Scarpati 1963). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 29 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Kırmızıbekmez 2002).

Tableau 29. RMN du ^1H du composé **24** (300 MHz, δ , J en Hz) et de l'isoactéoside (500 MHz, δ , J en Hz). RMN du ^{13}C de l'isoactéoside (100 MHz, δ).

	composé 24	isoactéoside	
	^1H	^1H	^{13}C
hydroxytyrosol			
1	-	-	131,3
2	6,68 d (2Hz)	6,67 d (2Hz)	117,0
3	-	-	146,1
4	-	-	144,7
5	6,65 d (8Hz)	6,63 d (8Hz)	116,3
6	6,53 dd (2Hz, 8Hz)	6,53 dd (2Hz, 8Hz)	121,3
α	3,72-3,99 m	3,70-3,98 m	72,5
β	2,78 t (7,4Hz)	2,78 t (7,5Hz)	36,7
acide caféique			
1'	-	-	127,6
2'	7,04 d (1,9Hz)	7,04 d (2Hz)	115,0
3'	-	-	146,8
4'	-	-	149,7
5'	6,77 d (8,1Hz)	6,77 d (8,2Hz)	116,5
6'	6,89 dd (1,9Hz, 8,1Hz)	6,89 dd (2Hz, 8,2Hz)	123,2
α'	6,29 d (15,9 Hz)	6,29 d (15,9Hz)	114,8
β'	7,56 d (15,9 Hz)	7,56 d (15,9Hz)	147,3
CO	-	-	169,1
glucose			
1''	4,34 d (7,9Hz)	4,33 d (7,9Hz)	104,4
2''	3,31 m	3,31 dd (7,9Hz, 9Hz)	75,7
3''	3,55 t (9Hz)	3,53 t (9Hz)	83,8
4''	3,37 m	3,40 m	70,4
5''	3,57 m	3,55 m	75,4
6'' (a et b)	4,36 dd (5,7Hz, 12Hz) et 4,50 dd (1,5Hz, 12Hz)	4,35 dd (5,7Hz, 11,9Hz) et 4,49 dd (2Hz, 11,9Hz)	64,6
rhamnose			
1'''	5,19 d (1,4Hz)	5,18 d (1,7Hz)	102,7
2'''	3,93 m	3,94 dd (1,7Hz et 3,4Hz)	72,4
3'''	3,73 dd (3,3Hz, 9,6Hz)	3,70 dd (3,4Hz, 9,5Hz)	72,2
4'''	3,42 t (9,5Hz)	3,41 t (9,5Hz)	74,0
5'''	3,97 m	3,98 m	70,0
6'''	1,26 d (6,2Hz)	1,24 d (6,3Hz)	17,9

Composé 25

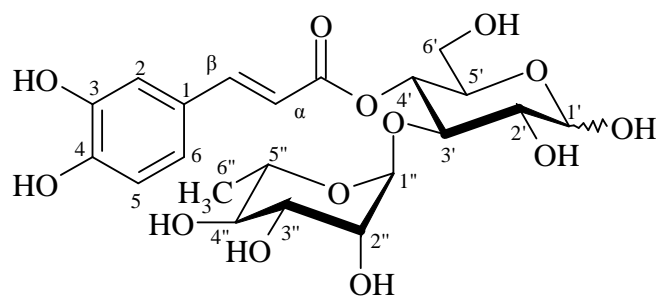


Fig.112. Composé 25

Le spectre de RMN du ^1H du composé **25** (fig.112-113) rappelle sans ambiguïté celui des phénylpropanoïdes précédemment isolés. On conclut assez rapidement à la présence du groupement (*E*)-caféyle (deux doublets à δ 7,73 et δ 6,41, $J=16$ Hz ; le système ABX typique du noyau 3,4-dihydroxylé : δ 7,22, d, $J=2$ Hz ; δ 7,15, dd, $J=8$ Hz, 2 Hz ; δ 6,93, d, $J=8$ Hz). En revanche, on n'observe pas les signaux habituels du résidu hydroxytyrosol.

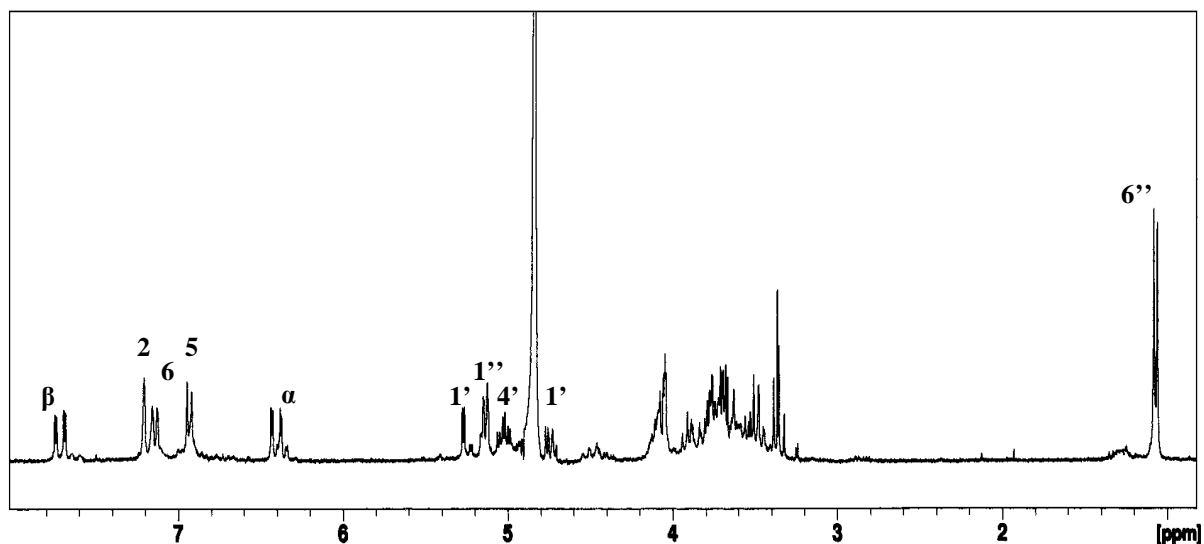


Fig.113. Spectre de RMN du ^1H du composé 25 à 300 MHz dans D_2O

Si on se réfère à la structure de la plupart des phénylpropanoïdes décrits plus haut (rhamnose et acide caféique substituant respectivement 3 et 4 un glucose), on explique la démultiplication des signaux anomériques par la non-substitution de l'hydroxyle en 1', qui

permet un équilibre entre deux conformations au niveau de la fonction hémiacétalique (anomérie α/β), ce qui peut entraîner la duplication de nombreux signaux dans la molécule.

Le COSY permet effectivement de déterminer un double enchaînement de protons, se confondant au fur-et-à-mesure qu'on s'éloigne de H1' (H1', 2', 3', 1'' sont clairement dupliqués) (fig.114).

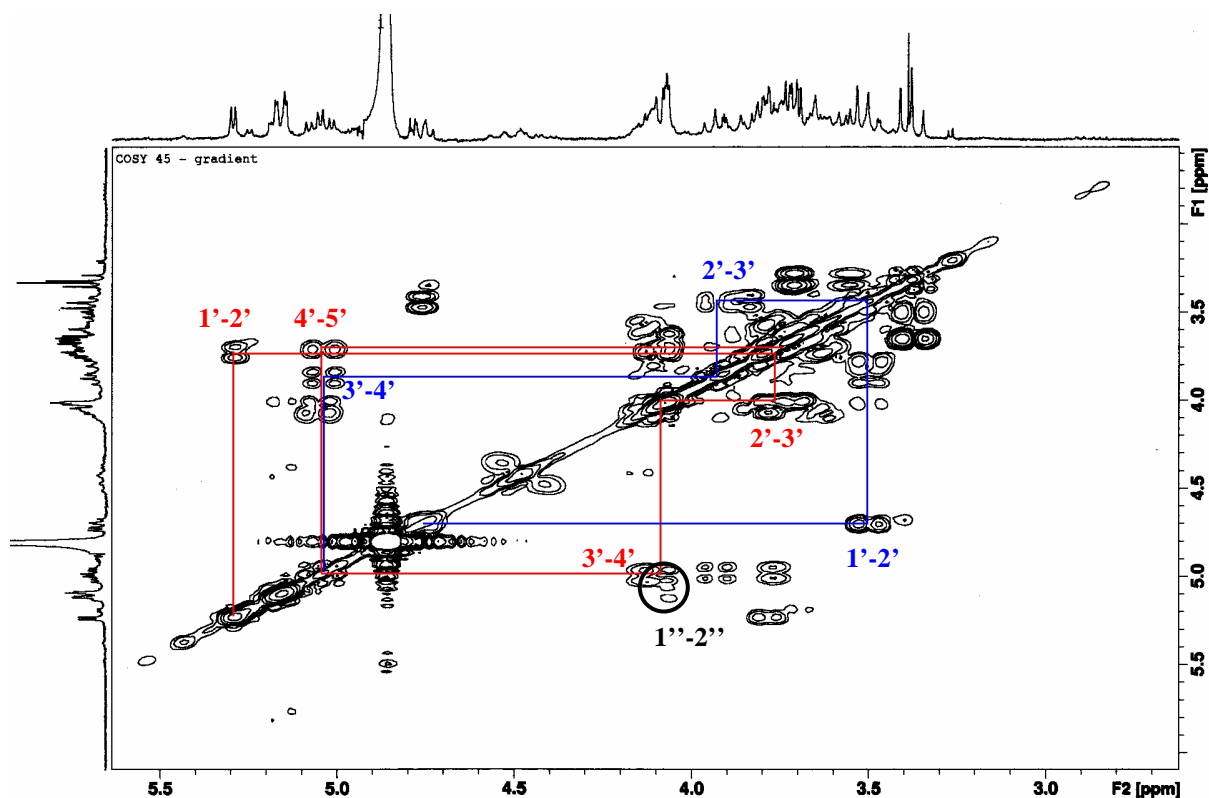


Fig.114. Carte COSY (^1H - ^1H) du composé 25 à 300 MHz dans D_2O . Les deux couleurs (rouge et bleu) figurent les deux enchaînements de corrélations différents observés, dus à l'anomérie du glucose. En noir : corrélation des deux signaux H1'' du rhamnose avec un seul signal H2''

HSQC et HMBC (fig.115) permettent l'attribution des signaux des carbones et confirment les positions relatives des différents éléments de la molécule, qui sont bien celles rencontrées habituellement. Le résultat de l'expérience ROESY (fig.115) est bien en accord avec ces substitutions.

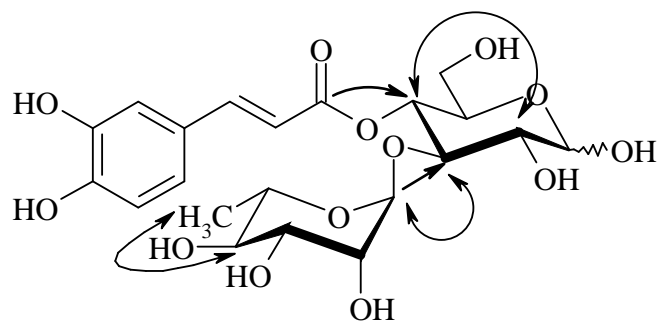


Fig.115. Corrélations HMBC (→ ; C→H) et ROESY (↔ ; H↔H)) choisies du composé 25

La structure du composé **25** a donc pu être établie comme étant l' [α-L-rhamnopyranosyl-(1→3)]-4-*O*-(*E*)-cafféyl-D-glucopyranoside, encore appelé cistanoside F (Wu 2004). Il a été isolé pour la première fois de *Cistanche salsa* (C.A. Mey) G. Beck (Orobanchacées) (Kobayashi 1985). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 30 avec leurs attributions.

Tableau 30. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **25** dans D_2O (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ).

	composé 25	
	^1H	^{13}C
acide caféique		
1	-	126,6
2	7,22 d (1,9Hz)	115,0
3	-	144,6
4	-	149,7
5	6,93 d (8,1Hz)	116,3
6	7,15 dd (1,9Hz, 8,1Hz)	123,1
α	6,41 d (15,9Hz) / 6,40 d (15,9Hz)	113,5
β	7,73 d (15,9Hz) / 7,72 d (15,9Hz)	148,0
CO	-	168,5
glucose		
1'	4,75 d (7,9Hz) / 5,27 d (1,9Hz)	95,9/92,4
2'	3,50 m / 3,71 m	75,7/74,8
3'	3,92 m / 4,10 m	77,6/80,8
4'	4,99 t (9,6Hz) / 4,98 t (9,6Hz)	70,4
5'	3,69 m	75,4
6' (a et b)	3,59 m / 3,75 m	60,3
rhamnose		
1''	5.12 sl / 5,15 s	101,8
2''	4,05 m	70,4
3''	3,67 m	69,0
4''	3,36 t (9,5Hz)	71,8
5''	3,52 m	68,0
6''	1,08 d (6,2Hz)	17,1

Flavonoïdes

Composé 26

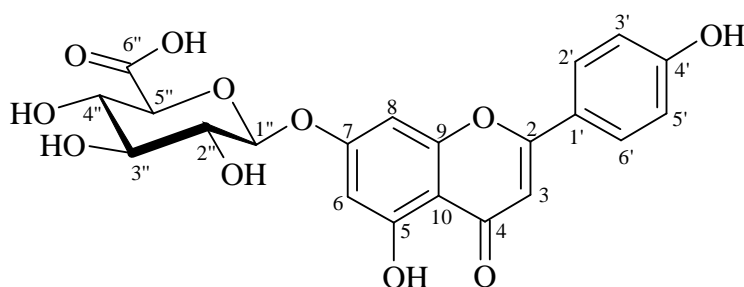


Fig.116. Composé 26

Le spectre de RMN du ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ du composé **26** (fig.116-117) évoque celui des hétérosides de flavonoïdes présentés plus haut. En particulier, les signaux entre δ 6,00 et δ 8,00 sont quasiment identiques à ceux du composé **14** dans la même région du spectre (voir page 107). On observe un singulet (δ 6,82, s, H3), deux doublets couplés avec une faible constante correspondant aux protons du cycle A (δ 6,41, d, $J=2,1$ Hz, H-6 ; δ 6,79, d, $J=2,1$ Hz, H8) et deux doublets couplés plus fortement, typiques de la substitution en *para* du cycle B (δ 6,88, d, $J=8,9$ Hz, H3'-5' ; δ 7,89, d, $J=8,9$ Hz, H2'-6'). Le spectre UV confirme que l'apigénine est bien présente dans la structure de la molécule.

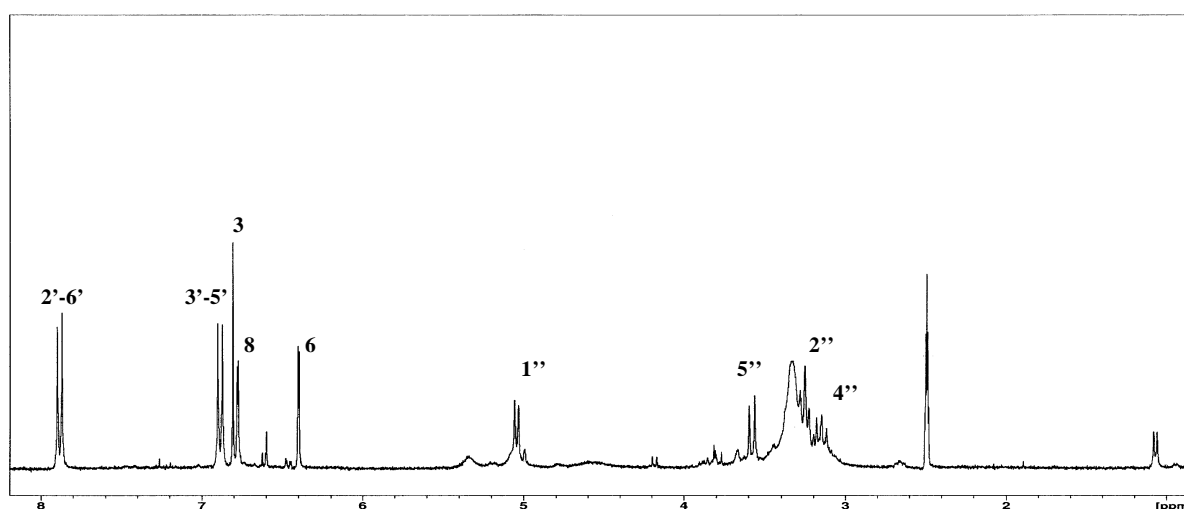


Fig.117. Spectre de RMN du ^1H du composé 26 (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

Au niveau du spectre de RMN du ^{13}C (*jmod*), les signaux correspondant à la partie osidique de la molécule sont un peu différents de ceux observés pour le composé **14** : cinq signaux correspondant à des protons tertiaires sont présents, ce qui est le cas pour le glucose, mais on ne peut pas identifier de pic susceptible de justifier l'existence d'une fonction alcoolique secondaire en 6'' aux alentours de δ 60,0. Ce qui est bientôt expliqué par l'observation d'un signal de carbone quaternaire non expliqué par la structure de la génine à δ 182,3 : il montre la présence d'une fonction carboxylique. L'ose substituant l'apigénine n'est donc pas ici un hexose classique, mais un acide uronique (ose dont la fonction alcoolique secondaire terminale a été oxydée en acide carboxylique).

A partir de ce point, c'est l'expérience bidimensionnelle ROESY qui permet l'obtention simultanée de deux informations essentielles : la position de substitution de l'apigénine par l'acide uronique et la nature exacte de cet acide uronique. On détermine ainsi (fig.118) que l'apigénine est ici substituée au niveau de sa fonction hydroxyle en 7 par l'acide glucuronique.

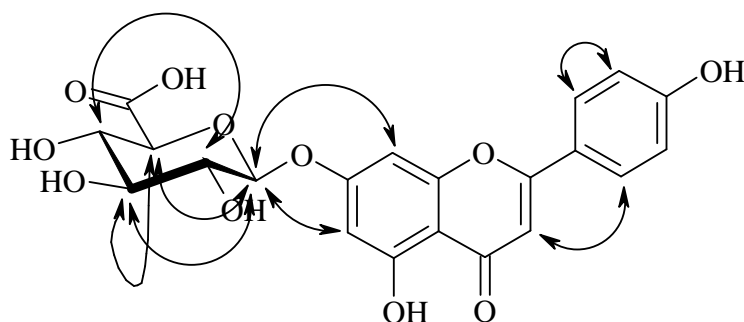


Fig.118. Corrélations ROESY choisies du composé 26 (H↔H)

La structure du composé **26** a donc pu être établie comme étant le 5,7,4'-trihydroxyflavone-7-O- β -D-glucopyranuronide, composé connu généralement appelé apigénine-7-glucuronide et isolé pour la première fois de *Erigeron annuus* (L.) Desf. (Asteracées) (Imai 1953). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 31 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Gafner 1997).

Tableau 31. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **26** (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ) et de l'apigénine-7-glucuronide (500 MHz, δ , J en Hz ; 50 MHz) dans le DMSO- d_6 .

	composé 26		apigénine-7-glucuronide	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
apigénine				
2	-	164,4	-	164,3
3	6,82 s	103,2	6,82 s	102,8
4	-	182,3	-	182,0
5	-	157,3	-	161,0
6	6,41 d (2,1Hz)	99,8	6,44 d (2,0Hz)	99,6
7	-	163,4	-	163,1
8	6,79 d (2,1Hz)	94,9	6,84 d (2,0Hz)	94,6
9	-	157,3	-	156,9
10	-	105,7	-	105,2
1'	-	121,1	-	120,7
2'-6'	7,89 d (8,9Hz)	128,9	7,94 d (9,1Hz)	128,5
3'-5'	6,88 d (8,9Hz)	116,5	6,94 d (9,1Hz)	116,0
4'	-	162,0	-	161,8
HO-5	12,95 s	-	-	-
acide glucuronique				
1''	5,02 d (7,5Hz)	99,8	5,02 d (7,6Hz)	99,6
2''	3,25 t (8,5Hz)	73,9	3,25 dd (8,6Hz, 7,6Hz)	73,0
3''	3,29 m	76,8	3,29 t (8,6Hz)	76,6
4''	3,15 t (9,9Hz)	72,4	3,16 dd (9,9Hz, 8,6Hz)	72,0
5''	3,60 d (9,9Hz)	74,1	3,53 d (9,9Hz)	73,6
6''	-	172,2	-	171,6

Composé 27

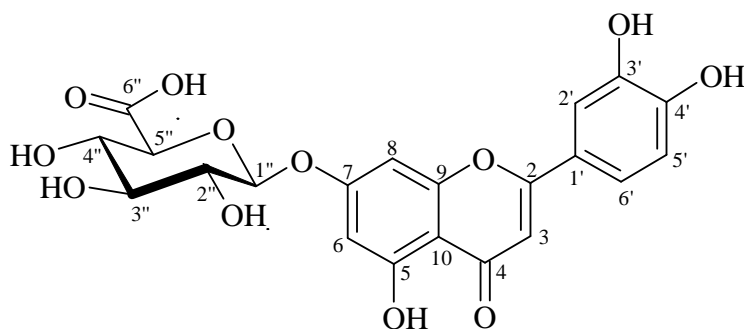


Fig.119. Composé 27

L'analyse par spectrométrie de masse en mode *electrospray* du composé **27** (fig.119) montre un ion moléculaire $[M+H]^+$ de rapport $m/z = 463$ compatible avec la formule brute $C_{21}H_{18}O_{12}$. Un pic est également observé au rapport $m/z 925$, corespondant probablement à la formation du dimère $[2M+H]^+$ dans le spectromère de masse.

Au niveau du spectre de RMN du 1H (fig.120), on observe comme pour le composé précédent un doublet à $\delta 5,03$ correspondant probablement au proton anomérique d'un ose et un ensemble de massifs à champ plus fort ($\delta 3-4$), qui correspondent vraisemblablement aux hydroxyles dudit ose mais dont l'observation est gênée par la présence du pic de l'eau dissoute dans le DMSO-*d6* et un ensemble de signaux dans la région des aromatiques ($\delta 6,5-7,5$).

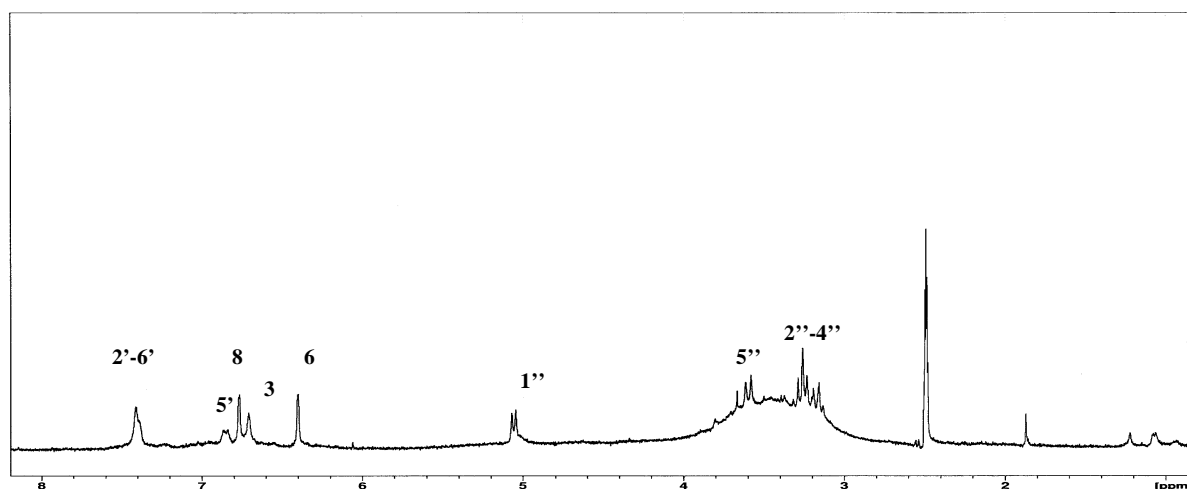


Fig.120. Spectre de RMN du composé 27 (300 MHz, DMSO-*d6*)

Les pics observés sont moins fins que pour le composé précédent, mais le spectre de masse indique une différence de m/z de 16 entre les deux produits, suggérant la présence d'un hydroxyle supplémentaire dans la structure de **27**. L'ensemble des spectres de RMN mono- et bidimensionnelle semble confirmer une grande parenté structurale entre les deux produits. Il se confirme assez rapidement que l'ose est identique et que les deux métabolites diffèrent par leur génine, celle de **27** n'étant pas l'apigénine, mais le lutéolol, comme pour le produit **11** déjà décrit (voir page 90).

La structure du composé **27** a donc pu être établie comme étant le 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavone-7-O- β -D-gluco-pyranuronide, généralement appelé lutéolol-7-glucuronide, molécule connue dont la mention la plus ancienne que nous ayons trouvée date de 1963 (Harborne). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 32 avec leurs attributions et ceux trouvés dans la littérature (Gafner 1997).

Tableau 32. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **27** (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ) et du lutéolol-7-glucuronide (200 MHz, δ , J en Hz ; 50 MHz, δ) dans le DMSO- d_6 .

	composé 27		lutéolol-7-glucuronide	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
apigénine				
2	-	164,4	-	164,6
3	6,70 s	103,0	6,68 s	102,8
4	-	181,9	-	181,8
5	-	160,1	-	161,0
6	6,40 d (2,0Hz)	99,8	6,39 d (1,9Hz)	99,5
7	-	163,3	-	163,0
8	6,78 d (2,0Hz)	94,8	6,75 d (1,9Hz)	94,5
9	-	157,3	-	156,9
10	-	105,4	-	105,2
1'	-	121,1	-	120,7
2'	7,41 m	113,8	7,41 d (1,9Hz)	113,4
3'	-	146,5	-	146,1
4'	-	151,0	-	150,7
5'	6,82 d (9,1Hz)	116,4	6,84 d (8,3Hz)	116,1
6'	7,39 m	119,3	7,36 dd (8,3Hz, 1,9Hz)	119,0
HO-5	12,95 s	-	12,94 s	-
acide glucuronique				
1''	5,02 d (7,5Hz)	99,8	5,07 d (6,4Hz)	99,5
2''	3,26 t (8,5Hz)	73,9	-	72,9
3''	3,30 m	76,7	-	76,5
4''	3,15 t (9,9Hz)	72,2	-	72,0
5''	3,60 (9,9Hz)	74,1	3,63 d (9,6Hz)	73,9
6''	-	172,2	-	172,2

Composé 28

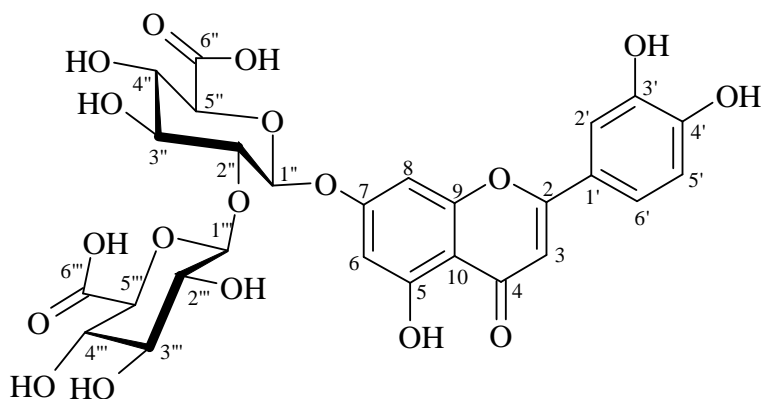


Fig.121. Composé 28

La spectrométrie de masse du composé **28** (fig.121) en mode *electrospray* donne une masse $[M+H]^+$ de rapport $m/z = 639$, suggérant une masse moléculaire de 638. Cette masse est compatible avec la formule brute $C_{27}H_{26}O_{18}$.

Les expériences de RMN sur ce composé et le suivant (très proche structuralement) ont été assez difficiles à mener pour les raisons suivantes :

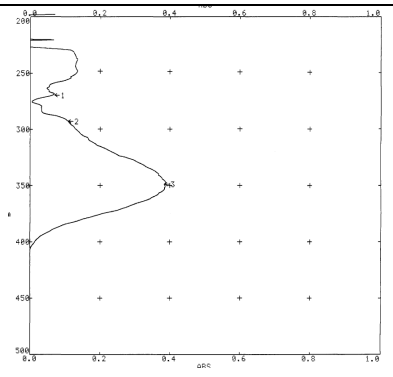
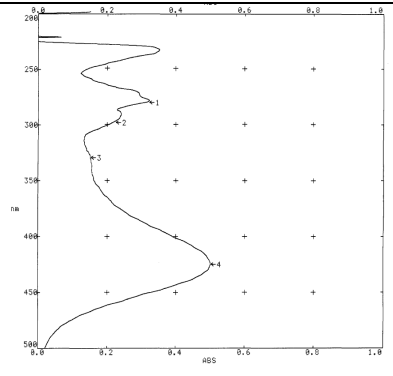
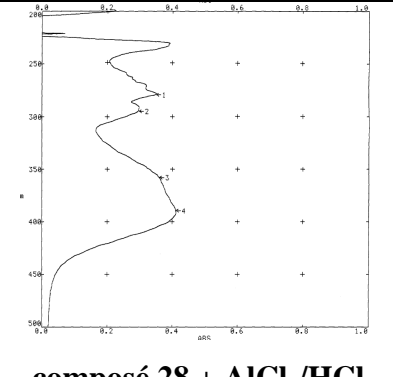
- leur solubilité médiocre dans la plupart des solvants. Des spectres ont été enregistrés dans le DMSO-*d*₆, mais les faibles quantités dissoutes n'autorisaient que des expériences très longues.
- Dans le cas du composé **28**, il est soluble dans D₂O, mais ce solvant est rarement utilisé pour la publication de résultats de RMN des flavonoïdes, ce qui a rendu difficiles les comparaisons de résultats avec la littérature.

Le spectre de RMN du ¹H enregistré dans le DMSO-*d*₆ suggère la présence d'une génine flavonique semblable à celles des composés **11** ou **27** : on observe un système ABX (δ 7,72, d, $J=2$ Hz ; δ 7,36, dd, $J=2$ Hz, 9 Hz ; δ 6,80, d, $J=9$ Hz) témoignant de la substitution en 3'-4' du cycle B, deux doublets faiblement couplés (δ 7,10, d, $J=1,8$ Hz ; δ 6,58, d, $J=1,8$ Hz) correspondant aux protons 6 et 8 et un singulet (δ 6,70 s) qui est le signal du proton 3. Cette génine est probablement comme dans les deux cas cités le lutéolol, car on ne peut identifier de signal correspondant à un groupe méthyle, méthoxyle ou autre substituant classique des génines flavoniques. Cette identification semble d'ailleurs confirmée par une série de spectres ultraviolets du composé **28** seul ou avec certains réactifs précis (cf. tableau 33).

En effet, le spectre UV du composé **28** dans le CH₃OH présente des maxima d'absorption ($\lambda_{\text{max}} = 241, 251, 270, 293, 349 \text{ nm}$) très semblables à ceux du lutéolol ($\lambda_{\text{max}} = 242, 253, 267, 291, 349$) (Mabry 1970). La spectroscopie UV permet également de déterminer la position de substitution du lutéolol par la partie osidique de la molécule :

- En ajoutant AlCl₃ au composé **28**, on observe un décalage des deux bandes (I et II) du spectre d'absorption de la molécule. Pour la bande I, cela confirme la présence de la nature *ortho*-dihydroxylée du cycle C (compatible avec la structure du lutéolol) et indique également que ces deux fonctions OH sont toutes deux libres. En ce qui concerne la bande II, le décalage est expliqué soit par deux hydroxyles en *ortho*, soit par la formation d'un complexe hydroxycétonique avec l'aluminium. Etant donné les résultats de RMN du ¹H et le spectre UV sans AlCl₃, l'hypothèse d'un complexe entre la fonction cétonique en 4, une fonction phénolique en 5 et l'aluminium est privilégiée. Ceci signifierait que la fonction OH en 5 est libre, ce qui ne laisserait que l'OH en 7 comme position de substitution possible par un ose.
- En ajoutant HCl dans le mélange précédant, les observations précédentes sont confirmées : la bande I retourne vers sa λ_{max} initiale car le complexe Al-*ortho*-dihydroxyle est acidolabile, tandis que la bande II n'est pas affectée car le complexe hydroxycétonique est typiquement acidorésistant. La substitution osidique en 7 du lutéolol semble donc confirmée.

Tableau 33. Spectres UV du composé **28** seul, avec AlCl_3 et AlCl_3/HCl dans CH_3OH , observations et interprétations.

Spectre UV	Observations	interprétation
 <p style="text-align: center;">composé 28</p>	$\lambda_{\text{max}} = \underline{270}, \underline{293}, \underline{349}$	Caractéristiques du lutéolol ou d'un glycoside de celui-ci
 <p style="text-align: center;">composé 28 + AlCl_3</p>	$\lambda_{\text{max}} = \underline{280}, \underline{298}, \underline{330}, \underline{425}$ Décalage important de la bande I (+ 76 nm). Petit décalage de la bande II (+ 10 nm)	Présence flagrante d'un groupement orthodihydroxyle libre sur le cycle B \rightarrow OH en 3' et 4' libres Formation d'un complexe phénylchromone (logiquement OH-5-cétone-4)- AlCl_3 .
 <p style="text-align: center;">composé 28 + AlCl_3/HCl</p>	$\lambda_{\text{max}} = \underline{280}, \underline{295}, \underline{358}, \underline{390}$ Retour vers des longueurs d'onde plus faibles de la bande I (- 35 nm). La bande II reste à la même λ (280 nm)	Suppression des complexes acidolabiles orthodihydroxyle- AlCl_3 . Le complexe est acidorésistant donc de nature hydroxycétonique \rightarrow OH en 5 libre

Pour plus de commodité dans la réalisation des spectres de RMN et la minimisation des temps d'expérience, ceux-ci sont réalisés dans l'eau deutérée.

Dans le spectre de RMN du ^1H (fig.122), on observe deux signaux correspondant à des protons anomériques à δ 5,28 et δ 4,85, ainsi qu'un ensemble de signaux entre 3,2 et 4,2 ppm qui correspond aux protons des oses. La partie aromatique est moins claire, les signaux apparaissant arrondis et mal résolus : Les protons 2' et 6' se confondent en un singulet très large. Une augmentation de température à 300 K affinera très légèrement les pics et modifiera légèrement quelques déplacements chimiques. Ce sont ces valeurs qui sont présentés dans le tableau 34.

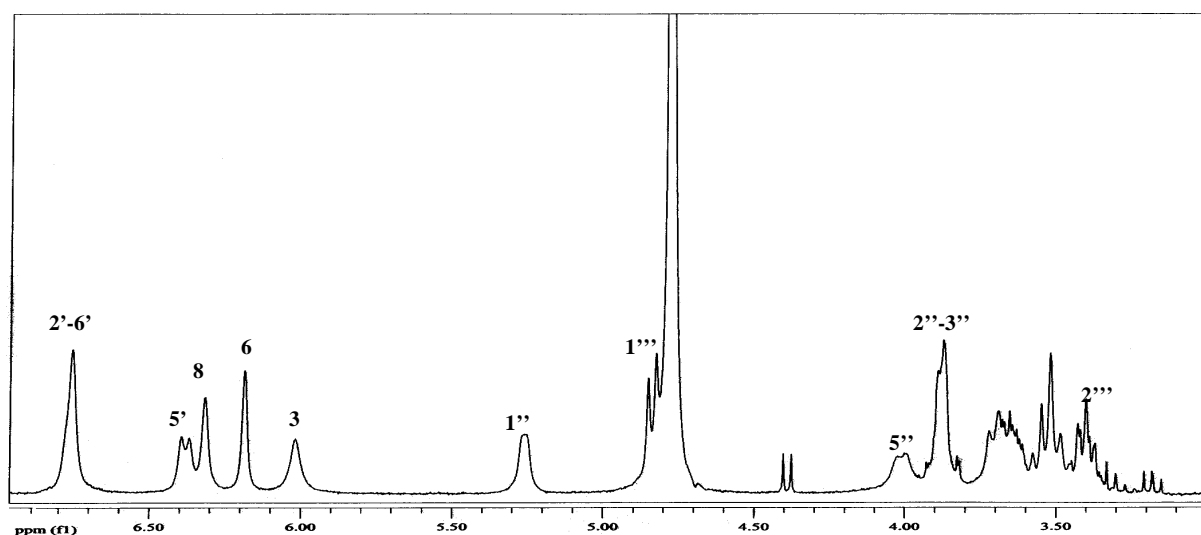


Fig.122. Spectre de RMN du ^1H du composé 28 à 500 MHz dans D_2O , à 293 K.

Le spectre du ^{13}C (*jmod*) est heureusement mieux résolu. Il permet notamment par l'observation des signaux quaternaires à δ 172,0 et δ 175,6 (et l'absence de signaux secondaires vers 60 ppm) de déterminer que les deux oses sont des acides uroniques. La masse proposée de 638 correspond parfaitement à la présence dans la molécule d'une génine lutéolol et de deux acides glucuroniques. L'expérience HMBC (fig.123) permet de déterminer les positions respectives des trois constituants de la molécule. Elle confirme également la nature de la génine.

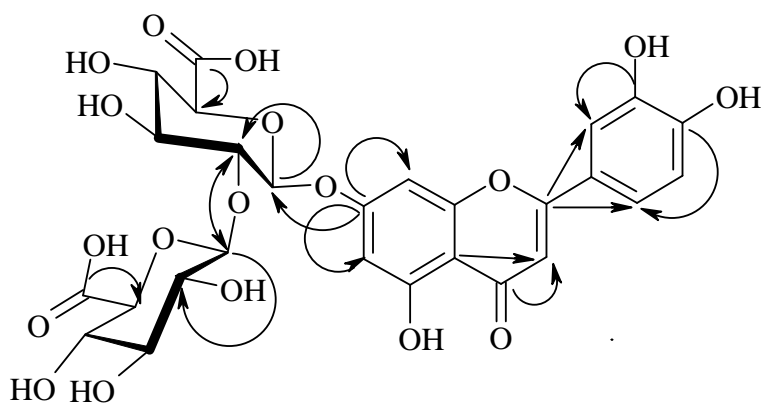


Fig.123. Corrélations HMBC choisies du composé 28 (C→H)

C'est ensuite l'expérience COSY (fig.124) qui permet le plus efficacement l'attribution précise des signaux correspondant à chacun des atomes dans les deux acides uroniques.

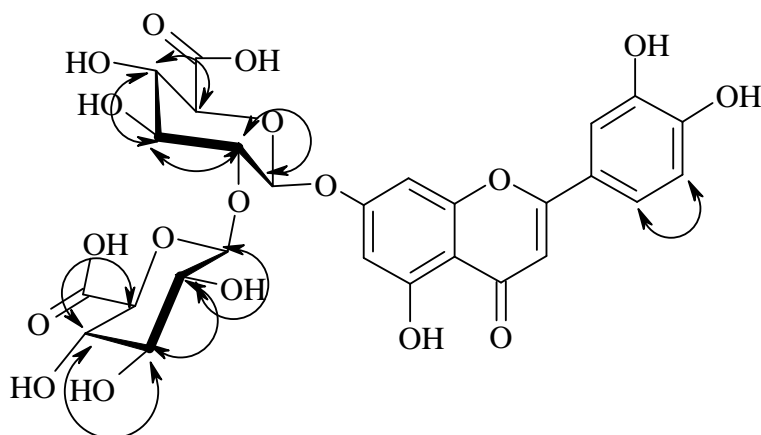


Fig.124. Corrélations COSY observées pour le composé 28 (H↔H)

La structure du composé **28** a donc pu être établie comme étant le 5,7,3',4'-tétrahydroxyflavone-7-*O*-[β-D-glucopyranuronyl(1→2)]-β-D-glucopyranuronide, généralement appelé lutéolol-7-diglucuronide. Cette molécule a été isolée pour la première fois de *Secale cereale* L. (Poacées) (Schulz 1985, Yoshida 1993). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C dans D_2O sont présentés dans le tableau 34. Les déplacements chimiques observés en RMN du ^1H dans le $\text{DMSO-}d_6$ sont également rapportés.

Tableau 34. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **28** (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) dans D_2O (300K) et le $\text{DMSO-}d_6$ (proton uniquement, 293K).

	composé 28		
	^{13}C	^1H	
		D_2O	$\text{DMSO-}d_6$
lutéolol			
2	164,0	-	-
3	102,2	6,07 s	6,70 s
4	182,0	-	-
5	156,6	-	-
6	99,8	6,23 s	6,58 d (2Hz)
7	161,6	-	-
8	94,6	6,37 s	7,10 d (2Hz)
9	159,2	-	-
10	105,4	-	-
1'	121,0	-	-
2'	112,6	6,82 s*	7,72 d (2Hz)
3'	143,8	-	-
4'	148,0	-	-
5'	115,3	6,44 d (9Hz)	6,80 d (8,5Hz)
6'	119,4	6,82 s*	7,38 d (8,5Hz, 2Hz)
acides glucuroniques			
1''	97,2	5,28 d (5Hz)	5,10 d (7Hz)
2''	80,2	3,89 m	-
3''	75,1	3,89 m	-
4''	71,6	3,66 m	-
5''	75,8	4,02 d	
6''	172,0	-	-
1'''	102,4	4,85 d (7,9Hz)	4,48 d (7,8Hz)
2'''	73,4	3,42 t (8,4Hz)	-
3'''	75,4	3,55 m	-
4'''	71,8	3,51 m	-
5'''	76,3	3,71 m	-
6'''	175,6	-	-

* signaux superposés

Composé 29

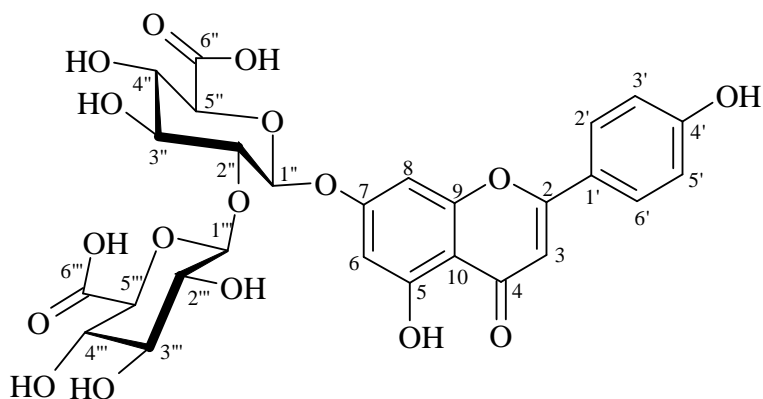


Fig.125. Composé 29

La spectrométrie de masse en mode *electrospray* du composé **29** (fig.125) donne une masse $[M+H]^+$ de rapport $m/z = 623$, suggérant une masse moléculaire de 622. Cette masse est compatible avec la formule brute $C_{27}H_{26}O_{17}$.

Comme mentionné précédemment, ce composé fut assez difficile à étudier car il était peu soluble dans tous les solvants et mélanges de solvants que nous avons essayés. Des spectres ont néanmoins été réalisés dans le $DMSO-d_6$. Les temps d'analyse furent longs et les spectres parfois difficiles d'interprétation (voir la résolution du spectre de RMN du 1H), d'autant plus que le chauffage des tubes de RMN n'a pas apporté d'améliorations significatives. La structure aurait été difficile à établir pour nous sans l'existence de composés apparentés dans la plante (composés **28**, **30**).

Le spectre de RMN du 1H (fig.126) présente des déplacements chimiques compatibles avec ceux parfois observés pour l'apigénine, en revanche la résolution est très mauvaise. Les constantes de couplage sont très difficiles à observer.

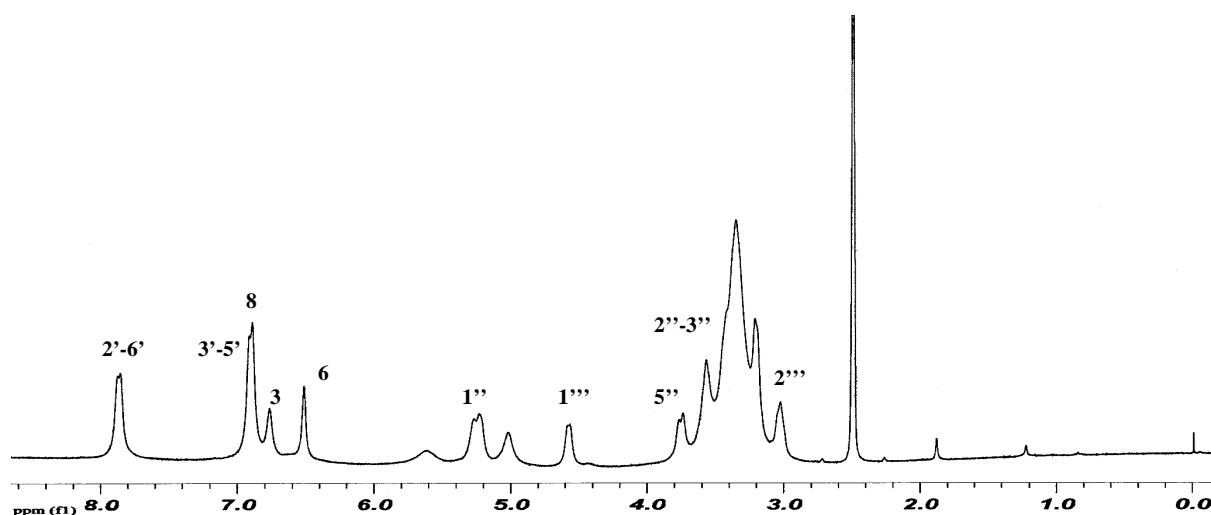


Fig.126. Spectre de RMN du ^1H du composé **29** à 500 MHz dans le $\text{DMSO-}d_6$

La spectrométrie UV permet de déterminer, selon le même procédé que pour **28**, qu'il s'agit d'un glycoside en 7 de l'apigénine.

La quasi-identité des déplacements chimiques correspondant à la partie osidique observée entre les composés **28** et **29** (^1H , ^{13}C , HSQC) permettent l'établissement de la structure de ce dernier. L'HMBC (fig.127) confirme les positions des différents éléments de la molécule.

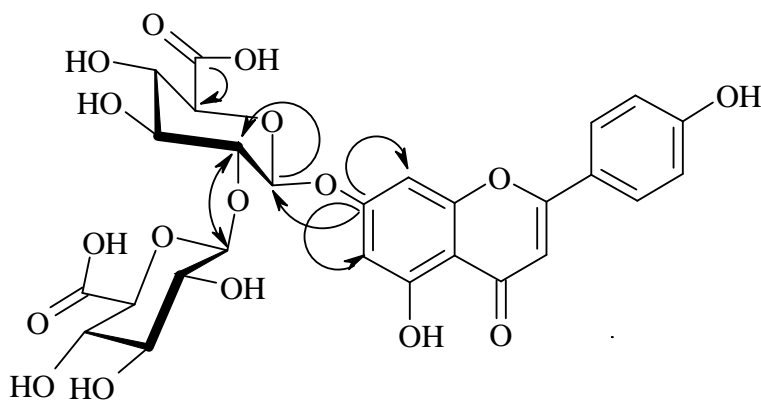


Fig.127. Corrélations HMBC choisies du composé **29** (C→H)

La structure du composé **29** a donc pu être établie comme étant le 5,7,4'-trihydroxyflavone-7-O-[β -D-glucopyranuronyl(1→2)]- β -D-glucopyranuronide, généralement appelé apigénine-7-diglucuronide. Cette molécule a été isolée pour la première fois de *Clerodendron trichotomum* Thunb. (Verbénacées) et le nom de clérodendrine peut être employé pour la désigner (Chen

1988). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 35.

Il est intéressant de constater que la comparaison des chromatogrammes des produits **28** et **29** en CLHP avec le chromatogramme d'un extrait hydrométhanolique ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation) d'un échantillon de verveine odorante (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Brit.) réalisé dans les mêmes conditions semble montrer que les deux molécules sont présentes dans cet extrait (identité des temps de rétention et introduction de **28** et **29** dans l'extrait en tant que témoins internes) (fig.128). Or si le lutéolol-7-diglucuronide est un constituant connu de la verveine odorante (de même que l'actéoside, visualisé sur le chromatogramme de l'extrait à un temps de rétention voisin de 30 minutes) (Teuscher 2005), la présence d'apigénine-7-diglucuronide n'avait jamais été rapportée à notre connaissance.

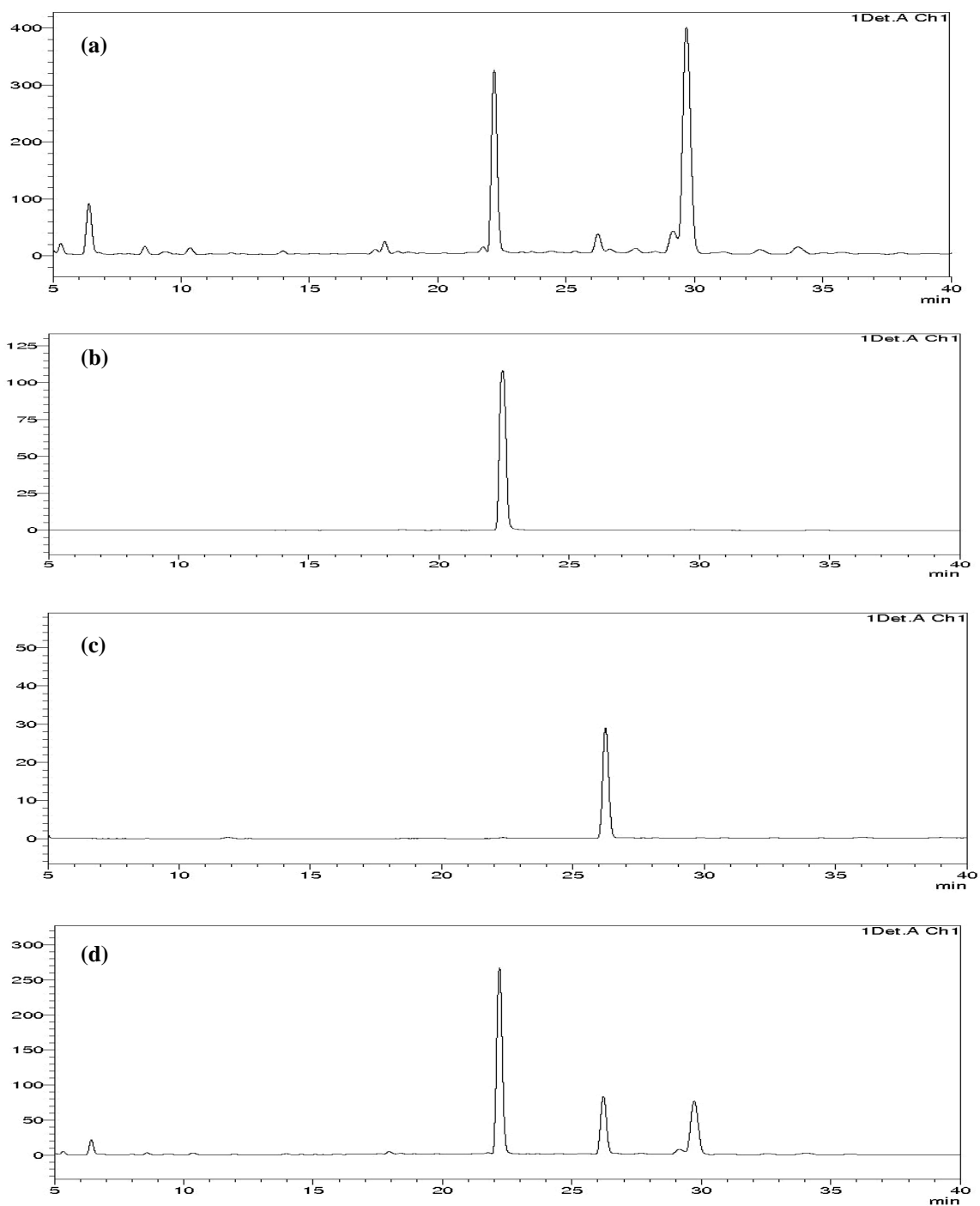


Fig.128. Comparaison de chromatogrammes des produits isolés 28 et 29 avec un extrait hydrométhanolique de verveine odorante. (a) extrait de verveine ; (b) composé 28 ; (c) composé 29 ; (d) co-injection de l'extrait de verveine et des composés 28 et 29.

Tableau 35. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **29** (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) dans le DMSO- d_6 .

	composé 29	
	^1H	^{13}C
apigénine		
2	-	164,7
3	6,77 s	103,2
4	-	182,5
5	-	157,3
6	6,52 s	100,7
7	-	163,5
8	6,89 s	96,4
9	-	157,3
10	-	106,0
1'	-	121,3
2'-6'	7,86 d (7,8Hz)	129,1
3'-5'	6,90 d (7,8Hz)	116,7
4'	-	162,0
HO-5	13,00 s	-
acides glucuroniques		
1''	5,23 d (7,5Hz)	99,7
2''	3,57 m	82,2
3''	3,57 m	74,1
4''	3,21 m	71,5
5''	3,74 d	72,2
6''	-	172,2
1'''	4,57 d (5Hz)	104,1
2'''	3,02 s	74,8
3'''	-	-
4'''	3,03 m	72,0
5'''	-	-
6'''	-	175,5

Composé 30

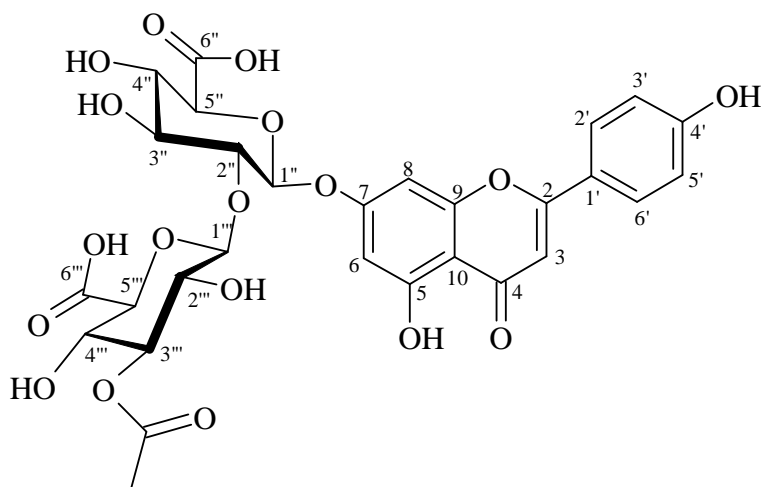


Fig.129. Composé 30

Le spectre de RMN du ^1H du composé **30** (fig.129-130) présente au premier abord trois caractéristiques importantes :

- Entre δ 6 et δ 8 : des signaux aromatiques correspondant au profil de substitution de l'apigénine, c'est-à-dire une paire de doublets (δ 7,93 et δ 6,93 ; $J=9$ Hz) qui témoigne de la substitution en *para* du cycle C et trois singulets correspondant aux protons 3 (δ 6,85), 6 (δ 6,60) et 8 (δ 7,03).
- Entre δ 4,5 et δ 5,5 : deux doublets (δ 5,20 ; $J=5,8$ Hz et δ 4,68 ; $J=9,1$ Hz) susceptibles de correspondre aux protons anomériques de deux oses, ainsi qu'un triplet (δ 4,80 ; $J=9,9$ Hz) qui pourrait être expliqué par la substitution d'une fonction alcoolique osidique par un groupement entraînant un fort déblindage. Le reste des signaux des oses n'est guère plus observable que dans le composé précédent.
- A δ 2,00 : un très grand singulet, typique du CH_3 d'une fonction acétyle et nous renseignant donc sur la nature de la fonction ayant entraîné le déblindage d'un proton osidique.

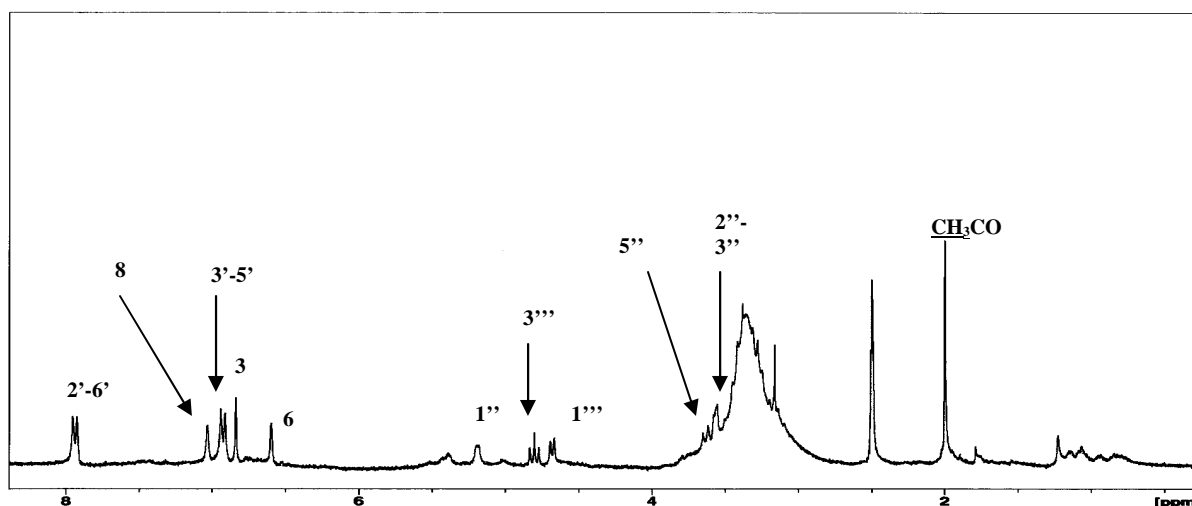


Fig.130. Spectre de RMN du ^1H du composé **30** à 300 MHz dans le $\text{DMSO-}d_6$

Au niveau du spectre du ^{13}C (*jmod*), on constate la présence d'un pic à δ 170,1 qui est corrélé par l'expérience HMBC (fig.131) avec le signal de RMN du ^1H du groupement acétyle (δ 2,00) et qui correspond donc logiquement au carboxyle de ce même groupement. Mais on observe également deux autres pics à δ 172,2 et δ 172,3, corrélés respectivement avec des signaux de RMN du ^1H à δ 3,63 et δ 3,49. Il est très probable que, comme dans les deux molécules précédentes, les deux oses soient des acides uroniques. Les deux corrélations présentées seraient donc $\text{C6}'' \rightarrow \text{H5}''$ et $\text{C6}''' \rightarrow \text{H5}'''$. La molécule **30** serait donc constituée des éléments suivants : une génine (l'apigénine), deux acides uroniques et un groupement acétyle.

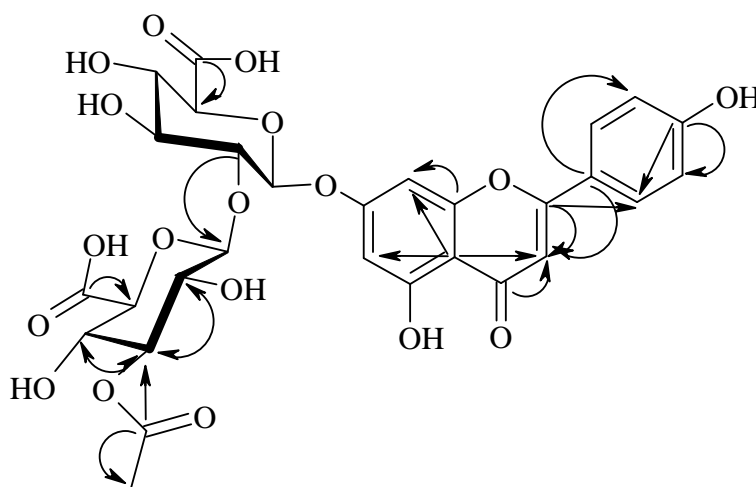


Fig.131. Corrélations HMBC du composé **30** (C \rightarrow H)

La spectrométrie de masse en mode *electrospray* donne un pic $[M+H]^+$ de rapport m/z 665, suggérant une masse moléculaire de 664 compatible avec la formule brute $C_{29}H_{28}O_{18}$, c'est-à-dire avec la présence de tous les éléments cités ci-dessus. Reste donc à préciser les points de jonction de ces différents éléments.

L'expérience de corrélation bidimensionnelle 1H - 1H COSY (fig.132) permet de déterminer l'enchaînement de protons dans les deux oses (elle confirme au passage, par l'absence de corrélation H5-H6 qu'il s'agit d'acides uroniques). On peut également former deux hypothèses à partir des déplacements chimiques en 1H et ^{13}C précisément attribués des signaux des deux oses :

- L'un des deux présente des déplacements chimiques très proches du premier acide glucuronique des composés **28** et **29** et est probablement branché de la même façon, sur la génine, le deuxième ose formant un acétal par son proton anomérique sur son hydroxyle en position 2.
- L'autre ose est probablement acétylé en position 3, le signal correspondant dans l'enchaînement des corrélations COSY étant très déblindé (il s'agit du triplet mentionné plus haut, à δ 4,80).

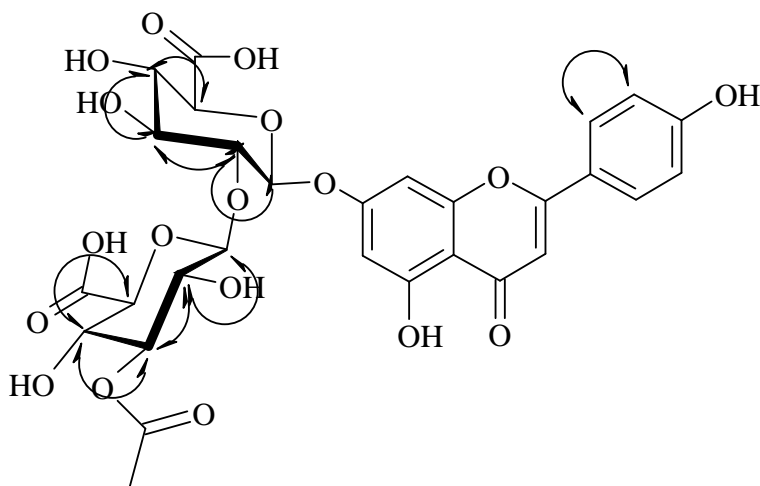


Fig.132. Corrélations COSY du composé 30 (H↔H)

Les expériences HMBC (fig.131) et ROESY (fig.133) viennent confirmer la structure envisagée précédemment. On observe dans les deux cas qu'un acide uronique substitue l'apigénine en 7, qu'il est lui-même substitué en 2 par un autre acide uronique qui est acétylé en 3.

Le ROESY permet en outre de confirmer que les deux oses sont des acides glucuroniques par l'observation des corrélations H1-H3-H5 d'une part, H2-H4 d'autre part.

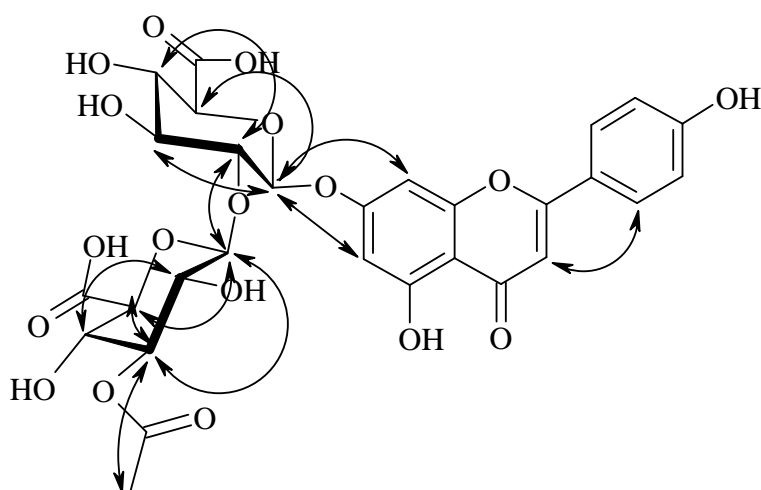


Fig.133. Corrélations ROESY du composé 30 (H↔H)

La réalisation d'un spectre infrarouge (fig.134) permet de confirmer la présence de certains groupements importants dans la molécule. On remarque la présence de signaux correspondant aux fonctions alcooliques (3426 cm^{-1}), carboxyliques (1715 cm^{-1}) et à la cétone (1654 cm^{-1}). Le signal observé à 1606 cm^{-1} est expliqué par la structure aromatique de l'apigénine. La présence de groupements carboxyliques dans la molécule est également confirmée par l'observation de la bande large et intense entre 3500 et 2500 cm^{-1} (élongation de liens O-H carboxyliques).

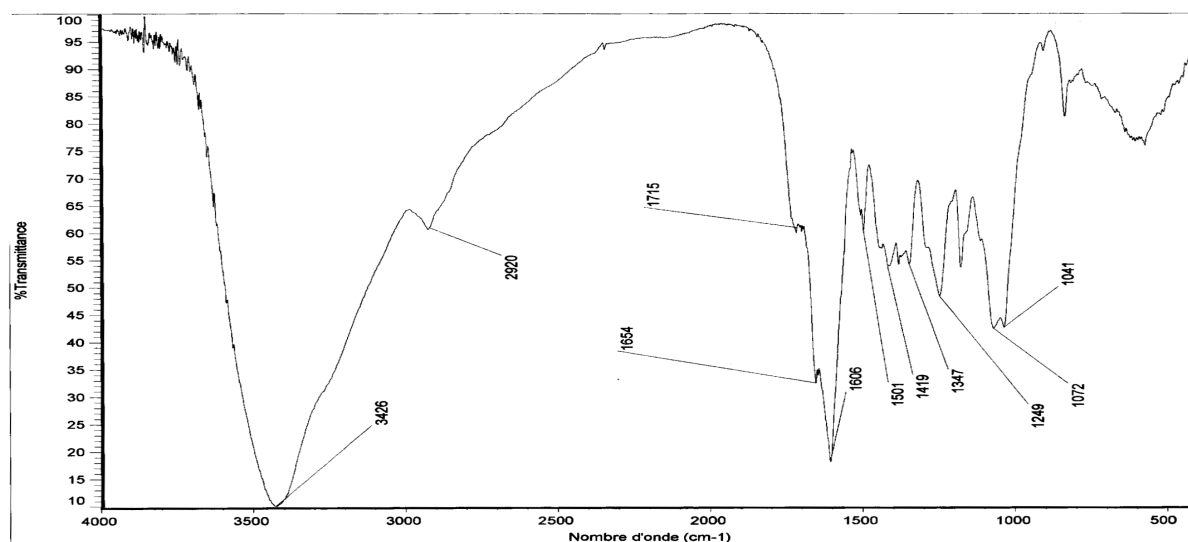


Fig.134. Spectre infrarouge du composé 30 (KBr)

La structure du composé **30** a donc pu être établie comme étant le 5,7,4'-trihydroxyflavone-7-*O*-[(3-*O*-acétyl) β -D-glucopyranuronyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranuronide. Il peut, pour simplifier, être qualifié de 3'''-acétylclérodendrine. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 36. A notre connaissance, ce composé n'avait jamais été identifié dans le règne végétal.

Tableau 36. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **30** (500 MHz, δ , J en Hz ; 125 MHz, δ) dans le DMSO- d_6 .

	composé 30	
	^1H	^{13}C
apigénine		
2	-	164,8
3	6,85 s	103,2
4	-	182,6
5	-	161,8
6	6,60 s	100,2
7	-	163,7
8	7,03 s	96,1
9	-	157,4
10	-	106,1
1'	-	121,5
2'-6'	7,93 d (9Hz)	129,1
3'-5'	6,93 d (9Hz)	116,7
4'	-	162,1
acides glucuroniques		
1''	5,20 d (5,8Hz)	98,7
2''	3,56 m	82,5
3''	3,56 m	73,9
4''	3,22 m	70,4
5''	3,63 d (9,9Hz)	72,2
6''	-	172,3
1'''	4,68 d (9,1Hz)	103,2
2'''	3,16 t (9,9Hz)	70,4
3'''	4,80 t (9,9Hz)	77,8
4'''	3,26 m	69,3
5'''	3,42 m	72,2
6'''	-	172,3
CH3-CO	2,00 s	21,7
CH3-CO	-	170,1

Composé 31

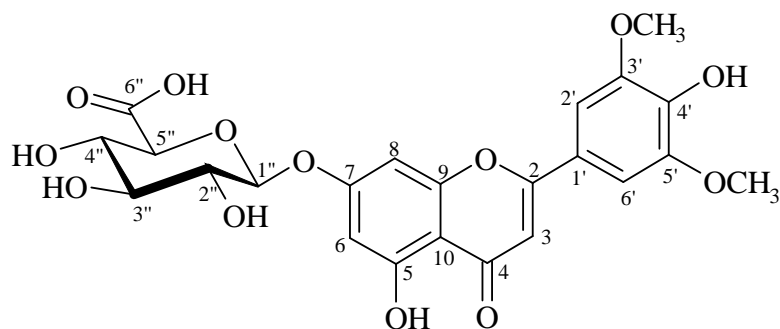


Fig.135. Composé 31

La spectrométrie de masse du composé **31** (fig.135) en mode *electrospray* donne un pic $[M+H]^+$ de rapport m/z 507, suggérant une masse moléculaire de 506 compatible avec la formule brute $C_{23}H_{22}O_{13}$.

Le spectre de RMN du 1H du composé **31** (fig.136) diffère, au niveau de la région des signaux aromatiques, de tous ceux des flavones déjà décrites dans ce mémoire, en dépit de colorations semblables en lumière UV à 365 nm, avec ou sans pulvérisation de réactif de Neu. On n'observe ici aucun couplage entre les signaux susceptibles d'appartenir à la génine de la molécule.

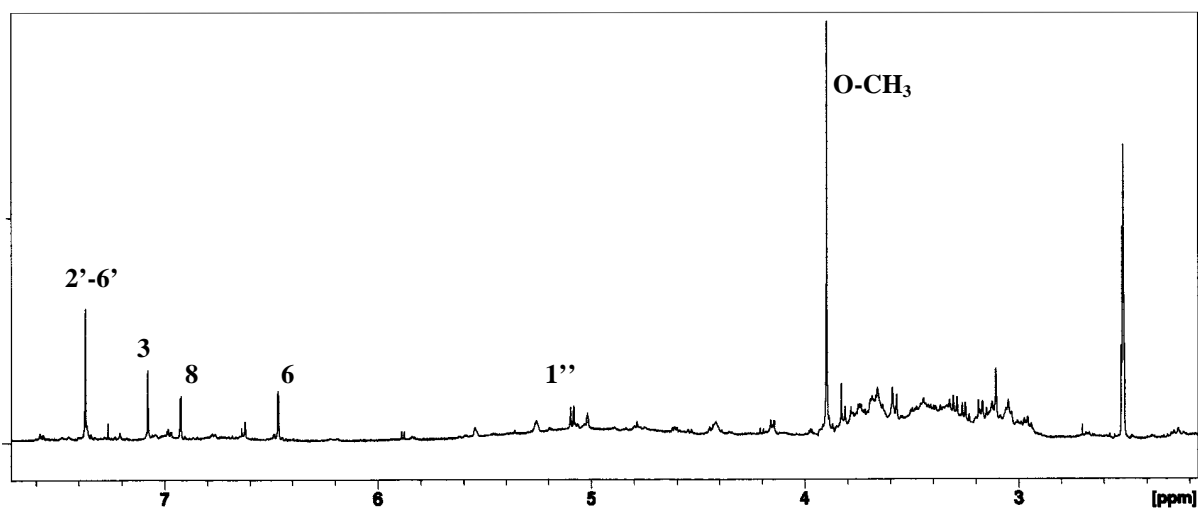


Fig.136. Spectre de RMN du 1H du composé 31 à 300 MHz dans le DMSO- d_6

Par comparaison avec les spectres des molécules déjà isolées, on peut émettre l'hypothèse que l'un des singulets (δ 7,08) correspond au proton 3 d'une flavone, tandis que les deux doublets de faible couplage (δ 6,48 et δ 6,92, $J=2,1$ Hz) sont respectivement attribuables à H6 et H8. Dans cette optique, on aurait une génine flavonique 5,7-dihydroxylée, tout comme l'étaient l'apigénine et le lutéolol, ce qui ne laisse qu'un singulet (δ 7,37, 2H) pour expliquer le schéma de substitution du cycle B. La présence d'un très grand singulet à δ 3,91, intégrant pour six protons s'explique de la manière la plus probable par la substitution en 4' dudit cycle B par une fonction hydroxyle et une double substitution, symétrique, par deux groupes méthoxyles, en 2'-6' ou 3'-5'. On n'observe également sur le spectre qu'un seul signal susceptible de correspondre au proton anomérique d'un ose (δ 5,02 d, $J=7,5$ Hz).

Le spectre *jmod* permet de penser que cet ose est un acide uronique, comme pour tous les hétérosides flavoniques isolés de *Lippia alba* pour l'instant. En effet on n'observe pas de pic de carbone secondaire aux environs de δ 60 (C6 d'un ose classique), tandis qu'un pic de carbone quaternaire est présent à δ 172,5 (C6 d'un acide uronique).

Le spectre ROESY (fig.137) permet à la fois d'affirmer que l'acide uronique est un acide glucuronique (corrélations 1''-3'', 1''-5'' mais aucune corrélation d'un ces trois hydrogènes avec 2'' ou 4'') et renseigne sur sa position de substitution sur la génine (en 7 : existence de corrélations 1''-6 et 1''-8). En outre, il permet non seulement de confirmer les hypothèses émises sur la nature du cycle B par l'observation d'une corrélation entre le singulet à δ 7,37 et le singulet des méthoxyles, indiquant qu'ils sont bien proches dans l'espace, mais aussi de déterminer que les -OCH₃ sont en 3'-5' (on observe une corrélation entre le singulet à δ 7,37 et le signal de H3).

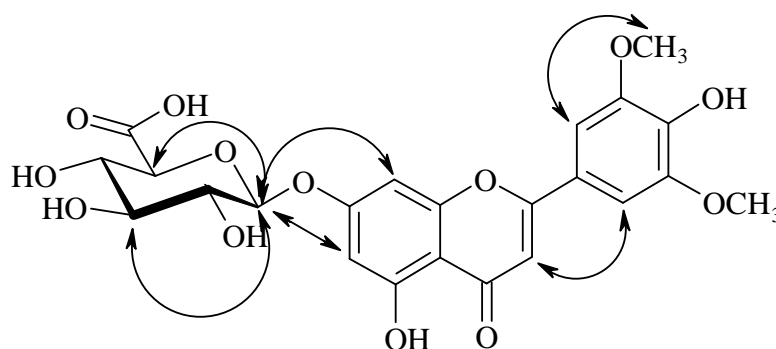


Fig.137. Corrélation ROESY observables du composé 31 (H↔H)

Les expériences COSY, HSQC et HMBC sont cohérentes avec la structure déterminée et permettent l'attribution complète des signaux observés.

La structure du composé **31** a donc pu être établie comme étant le 5,7,4'-trihydroxy-3',5'-diméthoxyflavone-7-*O*- β -D-glucopyranuronide, encore appelé tricine-7-glucuronide. Ce composé a été signalé pour la première fois dans l'espèce *Medicago sativa* L. (Fabacées) (Harborne 1964). Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau 37.

Tableau 37. RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **31** (300 MHz, δ , J en Hz ; 75 MHz, δ) dans le DMSO- d_6 .

	composé 31	
	^1H	^{13}C
tricine		
2	-	164,9
3	7,08 s	103,9
4	-	182,5
5	-	161,6
6	6,48 d (2,1Hz)	100,1
7	-	163,4
8	6,92 d (2,1Hz)	95,6
9	-	157,5
10	-	105,8
1'	-	120,8
2'-6'	7,37 s	104,9
3'-5'	-	148,9
4'	-	140,9
O-CH₃	3,91 s	57,0
acide glucuronique		
1''	5,02 d (7,5Hz)	100,1
2''	3,25 m	74,2
3''	3,29 m	77,1
4''	3,15 m	72,6
5''	3,60 m	77,1
6''	-	172,5

Récapitulation sur les composés polaires présents dans les feuilles de *Lippia alba*

Nous proposons ici une récapitulation des composés identifiés dans les différents lots de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown que nous avons pu nous procurer, à travers les chromatogrammes obtenus en CLHP à partir d'extraits hydrométhanoliques. Les figures 138, 139 et 140 présentent respectivement les chromatogrammes des extraits issus des lots de Gourbeyre (Guadeloupe), Capesterre (Guadeloupe) et Saint Pierre (Martinique, lot 2). Ces extraits ont tous été réalisés dans les mêmes conditions, afin de permettre une bonne comparaison (cf. partie expérimentale). La présence en quantité significative (c'est-à-dire suffisante pour une détection par CLHP dans ces extraits) des composés isolés est également reprise pour tous les lots dans le tableau 38.

La plupart des produits isolés présentés dans ce mémoire l'ont été d'un lot de *Lippia alba* originaire de Gourbeyre (Guadeloupe). Malheureusement, la réception d'autres lots d'origines différentes nous a amené à découvrir que la composition des extraits de *Lippia alba* était éminemment variable, comme le démontrent les chromatogrammes ci-dessous. Le lot de Capesterre ne contient aucun produit majeur différent de ceux de Gourbeyre. Les métabolites secondaires sont simplement moins abondant, de telle sorte que seuls les produits très majoritaires sont visibles (essentiellement les diglucuronides de lutéolol et d'apigénine, voir fig.139). Les lots martiniquais (fig.140) avaient des compositions identiques entre elles, mais assez différentes des lots guadeloupéens. Si certains produits étaient identiques (actéoside, calcéolarioside E), plusieurs produits isolés du lot de Gourbeyre étaient absents ou en quantité beaucoup plus faible (lutéolol-7-diglucuronide) et surtout des produits présentaient des temps de rétention ne correspondant à aucun composé déjà identifié dans *Lippia alba*. Un seul de ces produits a été isolé à l'heure actuelle : la tricine-7-glucuronide (**31**). Il apparaît donc intéressant de poursuivre les travaux d'isolement de composés des lots martiniquais de *Lippia alba*, tout comme il est nécessaire de d'effectuer sur le lot de Gourbeyre les tests classiques de la Pharmacopée (teneur en eau...) dès que possible, afin de les comparer à ceux déjà obtenus sur les lots martiniquais.

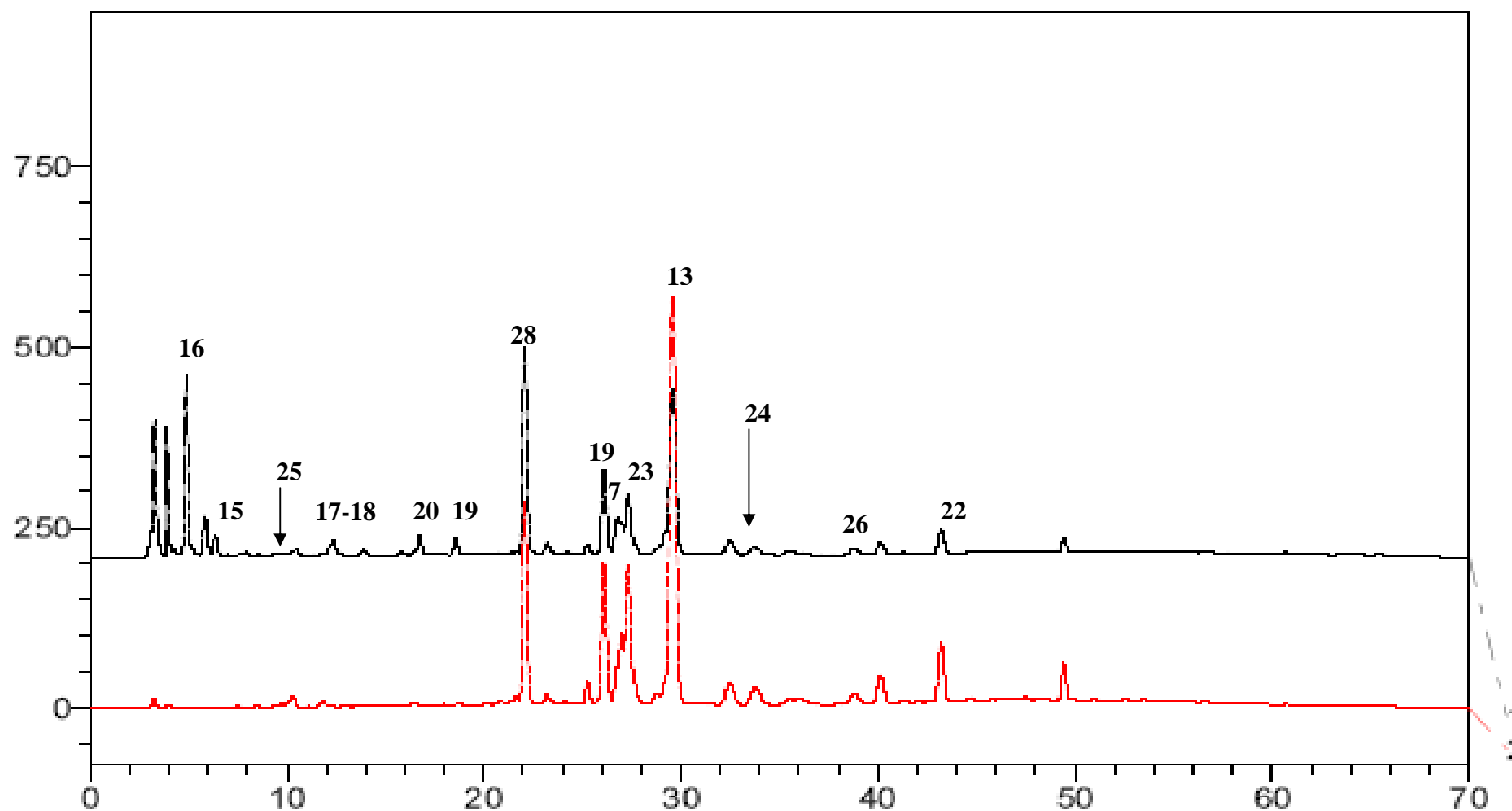


Fig.138. Profil d'extrait hydrométhanolique de l'échantillon de Gourbeyre (Guadeloupe) de *Lippia alba* en CLHP. En noir : absorption à 254 nm. En rouge : absorption à 330 nm.

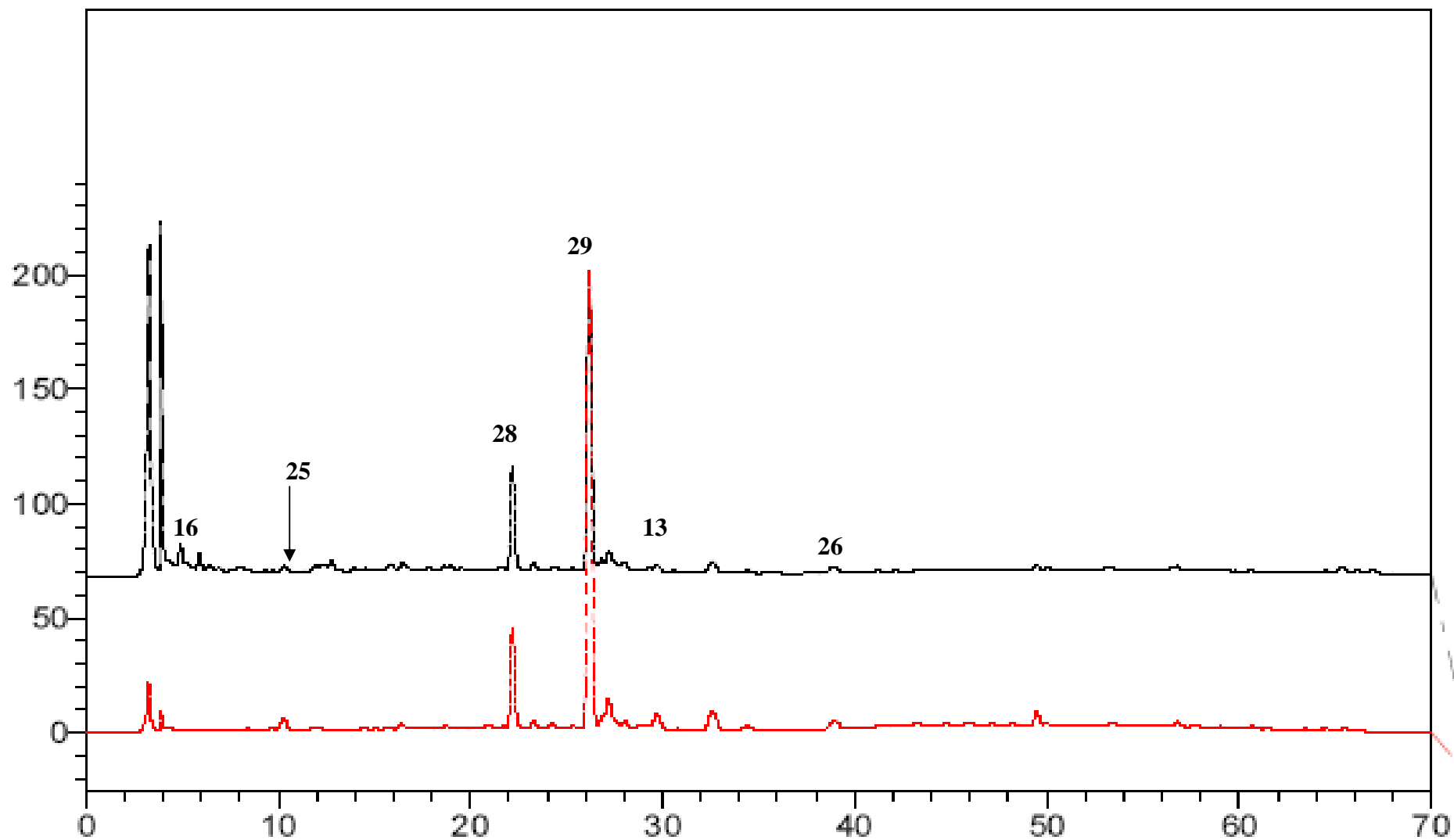


Fig.139. Profil d'extrait hydrométhanolique de l'échantillon de Capesterre (Guadeloupe) de *Lippia alba* en CLHP. En noir : absorption à 254 nm. En rouge : absorption à 330 nm.

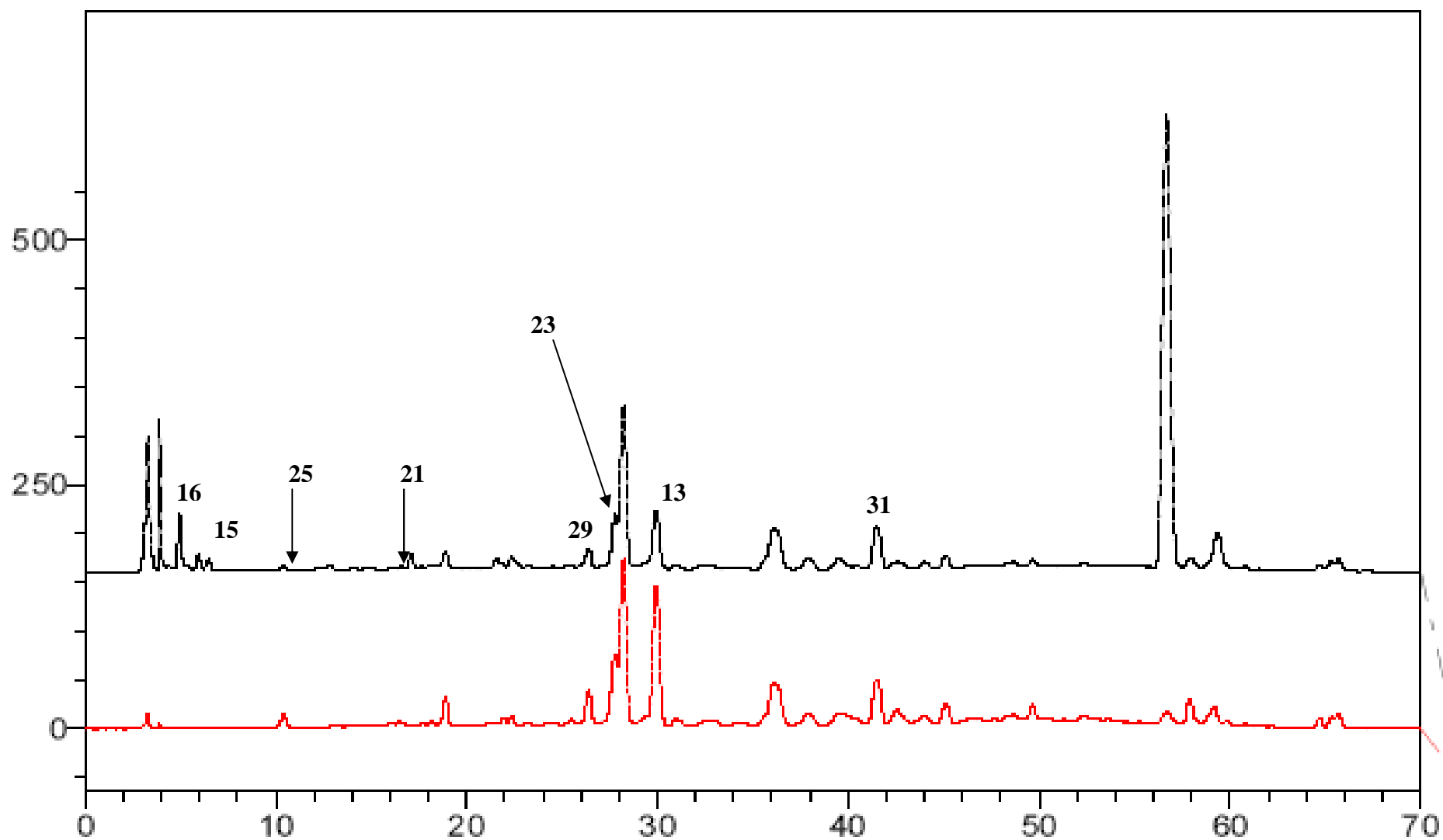


Fig.140. Profil d'extrait hydrométhanolique de l'échantillon de Saint Pierre (Martinique) (lot 2) de *Lippia alba* en CLHP. En noir : absorption à 254 nm. En rouge : absorption à 330 nm.

Tableau 38. Principaux composés détectés en CLHP dans des extraits hydrométhanoliques réalisés dans les mêmes conditions sur différents lots de *Lippia alba* et temps de rétention (*tr*) de ces composés dans le gradient utilisé (x : constituant majeur ; x : constituant détectable).

Composés	noms usuels	<i>tr</i> (minutes)	Gourbeyre (Guadeloupe)	Capesterre (Guadeloupe)	Saint Pierre (Martinique)
15	acide géniposidique	6,35	x	-	x
16	thévéside	4,88	x	x	x
17	caryoptoside	12,39	x	-	-
18	shanzhiside méthyl ester	12,12	x	-	-
19	mussaenoside	18,58	x	-	-
20	8- <i>epi</i> -loganine	16,74	x	-	-
21	géniposide	17,06	-	-	x
13	actéoside	29,88	x	x	x
22	2-acétylactéoside	43,10	x	-	-
23	calcéolarioside E	27,30	x	-	x
7	forsythoside B	27,00	x	x	-
24	isoactéoside	33,72	x	-	-
25	cistanoside F	10,37	x	x	x
26	apigénine-7- glucuronide	38,98	x	x	-
27	lutéolol-7- glucuronide	29,48	-	-	-
28	lutéolol-7- diglucuronide	22,45	x	x	-
29	apigénine-7- diglucuronide	26,24	x	x	x
30	apigénine-7- acétyldiglucuronide	34,61	-	-	-
31	tricine-7- glucuronide	41,48	-	-	x

γ) Composition des huiles essentielles de lots de *Lippia alba*

Des lots d'huile essentielle de *Lippia alba* de trois origines géographiques différentes (Guadeloupe, Martinique et Guyane) ont été obtenus par hydrodistillation et analysés par CPG-SM. Les résultats détaillés sont présentés dans le tableau 39. L'analyse de l'huile essentielle découle à la fois de l'analyse des spectres de masse des différents composés, de leur comparaison avec ceux disponibles dans les bibliothèques consultées (NIST MAINLIB et replib), de la comparaison des temps de rétention avec ceux de témoins authentiques, de la détermination des indices de Kovats de tous les composés identifiés dans l'huile essentielle et de leur comparaison avec ceux disponibles dans la littérature pour le même type de colonne (Leclercq 1999, Fischer 2004, Stashenko 2004, Tavares 2005, Flavornet, Pherobase).

Tableau 39. Composition (%) des quatre huiles essentielles analysées par CPG/SM.
En gras : > 5%.

Composé	IK	Guadeloupe (Gourbeyre)	Guadeloupe (Capesterre)	Martinique (Saint Pierre)	Guyane (Cayenne)	identification
3-hexèn-2-one	n.d.	0,2	0,2	-	traces	SM
4-hydroxy-4-méthylpentèn-2-one	n.d.	0,6	0,5	traces	0,6	SM
thujène	915	0,4	0,8	-	-	SM, IKb
camphène	946	-	-	1,4	-	SM, IKb
sabinène	970	traces	0,3	-	-	SM, IKb
1-octèn-3-ol	982	0,2	0,2	-	traces	SM, IKb
6-méthyl-5-heptèn-2-one	987	0,6	5,0	-	-	SM, IKb
β-myrcène	990	4,0	6,5	traces	3,0	SM, IKb, T
α-terpinène	1017	0,2	0,1	-	-	SM, IKb
p-cymène	1026	2,6	5,6	-	-	SM, IKb, T
limonène	1031	-	-	51,1	18,4	SM, IKb, T
(Z)-β-ocymène	1041	0,4	0,6	-	-	SM, IKb, T
(E)-β-ocymène	1051	6,3	13,3	traces	-	SM, IKb, T
γ-terpinène	1061	2,1	8,5	-	-	SM, IKb
α-terpinolène	1085	-	-	traces	-	SM, IKb
linalol	1100	1,6	1,4	2,1	1,3	SM, IKb, T
ipsdiénol	1146	-	-	traces	-	SM, IKb
oxyde de limonène	1147	0,2	-	-	-	SM, IKb
(E)-verbénol	1151	0,3	-	-	-	SM, IKb
bornéol	1173	-	-	1,4	-	SM, IKb
dihydrocarvéol	1194	0,6	0,2	-	-	SM, IKb
α-terpinéol	1194	-	-	traces	-	SM, IKb
(E)-dihydrocarvone	1202	-	-	-	traces	SM, IKb, T
carvéol	1220	-	-	0,6	-	SM, IKb
nérol	1226	traces	-	-	traces	SM, IKb, T

Composé	IK	Guadeloupe (Gourbeyre)	Guadeloupe (Capesterre)	Martinique (Saint Pierre)	Guyane (Cayenne)	identification
citronellol	1235	0,1	0,1	-	-	SM, IKb
néral	1240	33,1	7,8	-	-	SM, IKb, T
carvone	1241	-	-	t	67,6	SM, IKb, T
géraniol	1255	0,2	0,6	-	-	SM, IKb, T
pipéritone	1249	-	-	traces	0,6	SM, IKb
chavicol	1259	1,1	traces	-	-	SM, IKb
oxyde de carvone	1262	-	-	1,3	-	SM, IKb
géranial	1274	20,8	9,1	-	-	SM, IKb, T
acétate d'(E)-carvyle	1327	-	-	3,9	0,9	SM, IKb
eugénol	1353	2,3	1,3	traces	-	SM, IKb, T
α -copaène	1372	0,7	1,6	-	-	SM, IKb
β -bourbonène	1379	0,2	0,3	-	-	SM, IKb
β -cubébène	1384	0,2	0,5	traces	traces	SM, IKb
β -élémiène	1386	1,5	2,9	1,3	traces	SM, IKb
cinérolone	1393	-	-	2,3	-	SM, IKb
β -caryophyllène	1414	3,7	9,2	4,3	0,8	SM, IKb
α -guaiène	1439	6,3	15,4	-	-	SM, IKb
α -humulène	1450	1,7	2,3	traces	-	SM, IKb
allo-aromadendrène	1455	0,2	0,3	traces	-	SM, IKb
γ -muuroène	1471	0,3	0,4	traces	-	SM, IKb
germacrène D	1476	1,0	0,8	18,1	1,2	SM, IKb
α -séliène	1483	0,3	0,4	-	-	SM, IKb
γ -cadinène	1510	0,2	0,1	0,4	-	SM, IKb
δ -cadinène	1513	0,5	0,5	traces	-	SM, IKb
α -copaèn-11-ol	1536	0,1	-	-	-	SM, IKb
γ -bisabolène	1537	-	-	1,8	-	SM, IKb
germacrène D-4-ol	1563	0,1	0,1	-	-	SM, IKb
oxyde de β -caryophyllène	1571	0,1	0,1	0,6	traces	SM, IKb
oxyde d'humulène	1595	0,2	0,2	-	-	SM, IKb
isoélémicine	1660	-	-	0,5	-	SM, IKb

IK : indice de Kovats, déterminé par comparaison des temps de rétention avec ceux d'une gamme d'alcane linéaires.

Identification ; SM : spectrométrie de masse (mode de fragmentation et comparaison avec des bibliothèques ; IKb : comparaison d'indice de Kovats avec ceux donnés dans la littérature ; T : identité de temps de rétention avec un témoin authentique.

On note donc qu'à partir d'échantillons d'origine géographique différente, on obtient des profils différents en CPG. On remarque que :

- Les deux échantillons guadeloupéens présentent principalement des différences de teneur en leurs constituants, qui sont qualitativement les mêmes. L'odeur de ces deux huiles est très proche (odeur de citron prédominante, avec un fond plus désagréable). Les composés majoritaires sont le citral (52%), l'ocymène (7%) et l' α -guaiène (6%) pour le lot de Gourbeyre ; le citral (48%), le myrcène (20%), le β -caryophyllène (7%),

l' α -guaiène (11%) et le δ -guaiène (5%) pour le lot de Capesterre. Nous pouvons les classer dans le chimiotype **Ia** de notre classification : le composé principal est le citral ($50,2 \pm 2,2\%$), le β -caryophyllène est présent à un teneur moyenne $> 5\%$ ($5,3 \pm 1,6\%$).

- L'échantillon guyanais présente un profil beaucoup plus simple, avec pour composants majoritaires la carvone (71%) et le limonène (20%). C'est donc un cas typique du fameux chimiotype « limonène-carvone » mentionné dans la littérature. Il correspond au chimiotype **IIIa** de notre classification. Pour exemple, la pipéritone est détectée mais représente seulement 0,7% de l'huile essentielle.
- L'échantillon martiniquais contient 54% de limonène et 20% de germacrène D et environ 5% de β -caryophyllène. C'est un cas original car, à notre connaissance, il n'existe pas d'autre exemple d'échantillon d'huile essentielle de *Lippia alba* où la teneur en limonène soit aussi élevée sans qu'une quantité remarquable de carvone (chimiotype **IIIa**) ou d'une cétone monoterpénique apparentée (pipéritone, pipériténone, dihydrocarvone, lippione : chimiotype **IIIb**) soit détectée. Ici, on note plutôt une teneur élevée en dérivés sesquiterpéniques non-oxygénés (germacrène D, β -caryophyllène). Néanmoins, il faut remarquer deux choses :
 - On détecte, en quantités certes modestes, certaines de ces cétones ou des dérivés proches : carvone, oxyde de carvone, pipéritone, oxyde de pipéritone, isopipériténone, carvéol, chrysanthénone. Aucun de ces composés n'est détecté dans l'huile guadeloupéenne, alors que la pipéritone et la chrysanthénone sont présents dans l'huile guyanaise, ce qui soutient tout de même à la fois l'idée d'une certaine proximité entre lots guyanais et martiniquais et l'homogénéité du chimiotype **III** dans notre classification ;
 - Sur les six articles que nous avons inclus dans notre chimiotype **IIIb**, seuls deux proposent une quantification des constituants de l'huile essentielle. Nous ignorons donc les teneurs exactes en ces cétones monoterpéniques dans les publications les plus anciennes. En d'autres termes, le groupe **IIIb** est certainement moins solidement établi que d'autres groupes de cette classification qui est de toute façon perfectible.

A la lumière de ces nouvelles analyses, la classification basée sur la bibliographie nous permet pour l'instant d'avoir répondu correctement à notre souci de simplification des chimiotypes de *Lippia alba*. Les échantillons guadeloupéens que nous avons pu analyser appartiennent au sous-type **Ia**, l'échantillon guyanais au sous-type **IIIa**. Il nous paraît

raisonnable de classer l'échantillon martiniquais dans le chimiotype **III**. On peut s'interroger sur une classification plus précise de cet échantillon :

- Il pourrait être classé dans le sous-type **IIIb** car le limonène y est nettement majoritaire, ce qui est rencontré dans ce sous-type (Catalán 1977, Senatore 2001), jamais dans le groupe **IIIa**,
- on préfère cependant l'insérer dans le sous-type **IIIa** car l'huile essentielle contient un taux élevé de germacrène D (18,1%), ce qui est assez caractéristique du groupe **IIIa**, en général (Zoghbi 1998, Leclercq 1999, Tavares 2005), et plus particulièrement par rapport au groupe **IIIb** où ses concentrations sont toujours négligeables.

Récapitulation sur les constituants de l'huile essentielle de Lippia alba et l'existence de chimiotypes

Les tableaux 40 et 41 présentent tous les échantillons de *Lippia alba* dont l'analyse est rapportée dans la littérature (seules les molécules représentant 5% ou plus de l'huile essentielle totale sont indiquées), classés selon les sept chimiotypes proposés plus haut dans ce mémoire. Les quatre échantillons que nous avons analysés y sont également reportés.

Tableau 40. Chimiotype I et sous-types (huile essentielle obtenue par hydrodistillation).

Chimiotype	Sous-type	Composés majoritaires (%)	Origine	Saison ^{a)}	Rdt	Partie utilisée	nombre échantillons	Référence		
I	Ia	citral	Argentine	NC	NC	feuilles	1	Fester 1961a		
		citral, 1,8-cinéole	Argentine	automne, été	0,2-1,5%	feuilles	4	Fester 1961b		
		citral (65), β -caryophyllène + oxyde (8)	Brésil	NC	1,0%	NC	1	Fun 1990		
		citral (55), myrcène (10), p-cymène (9), β -caryophyllène + oxyde (7)	Brésil	NC	NC	NC	feuilles	1	Matos 1996 ^b	
		citral (63-71), limonène (9-13)	Brésil	NC	1,1-1,6%	1,1-1,6%	feuilles	3	Matos 1996 ^b	
		citral (36), germacrène D (25), β -caryophyllène (10)	Brésil	NC	NC	0,2%	parties aériennes fleuries	1	Zoghbi 1998	
		citral + β -caryophyllène (50)	Brésil	toute l'année	0,1-0,6%	0,1-0,6%	feuilles	15	Castro 2002 ^b	
		citral (72), géraniol (8)	Brésil	hiver	0,1%	0,1%	feuilles	3	Tavares 2005 ^b	
		citral (60), géraniol (9), myrcène (5)		été	0,3%	0,3%	feuilles	3		
		citral (37), myrcène (15), géraniol (5), germacrène D (5)	Brésil	printemps	0,2%	0,2%	feuilles	1	Oliveira 2006 ^b	
		citral (22), nérol (10), géraniol (6)	Brésil	printemps	0,2%	0,2%	feuilles	1	Oliveira 2006	
		citral (57), β -caryophyllène (6), méthylhepténone (6), citronellol (5)	Curaçao	NC	NC	NC	NC	1	Lawrence 1984	
		citral (44), 1,8-cinéole (23)	Guatemala	NC	NC	0,2-0,3%	feuilles, fleurs	2	Fischer 2004 ^b	
		citral (49)	Inde	NC	NC	NC	NC	NC	Kumar 2002 ^c	
		citral (25), myrthénol + myrthénol (10), géraniol (7), β -caryophyllène + oxyde (8), néryl acétate (7)	Inde	NC	NC	1,0%	feuilles	1	Singh 2000	
	citral (54), ocimène (7), α -guaïène (6)	Guadeloupe	citral (17), α -guaïène (15), ocymène (14), β -caryophyllène (9), γ -terpinène (8), β -myrcène (6), p-cymène (6), méthylhepténone (5)	été	0,6%	0,6%	feuilles	1	ce mémoire	
					0,2%			1		
	Ib		linalol (67-83), 1,8-cinéole (6)	Brésil	toute l'année	0,8-1,2%	feuilles	10	Frighetto 1998	
			linalol (50-79), 1,8-cinéole (7-14)	Brésil	toute l'année	0,2%	plantes	ND	Atti-Serafini 2002	
			linalol (76)	Brésil	NC	0,1%	0,1%	feuilles	1	Duarte 2005 ^b
			linalol (74)		hiver	0,4%	0,4%	feuilles	3	
			linalol (60), 1,8-cinéole (6), germacrène D (5)	Brésil	été	0,6%	0,6%	feuilles	3	Tavares 2005 ^b
			linalol (65), 1,8-cinéole (7)		Inde	toute l'année	0,6-0,8%	0,6-0,8%	feuilles	
			linalol (69), 1,8-cinéole+limonène (5),	Inde	NC	NC	NC	« herbe »	1	Mallavarapu 2000 ^e
			linalol (69-72), géranyl acétate (6)	Inde	NC	NC	NC	pousse	10	Gupta 2001 ^e
			linalol (65), citral (5)	Inde	toute l'année	0,8%	0,8%	feuilles	51	Bahl 2002 ^e
			linalol (81)	Inde	toute l'année	NC	NC	« plante »	4	Bahl 2002 ^f
			linalol (42), citral (27-29), 1,8 cinéole (7-10)	Inde	automne, hiver	NC	NC	« herbe »	6	Kumar 2002 ^g
			linalol (55), β -caryophyllène (9), germacrène D (6)	Uruguay	été	0,2-0,4%	0,2-0,4%	feuilles, tiges	1	Lorenzo 2001 ^b
			Ic		citral (60)	Argentine	automne	0,3%	parties aériennes	1
	citral (maj), linalol	printemps			0,6%		2			
	linalol (70)	été			0,8%		1			
	Id		β -caryophyllène (24), citral (23)	Brésil	printemps	0,1%	feuilles	1	Craveiro 1981	
β -caryophyllène (34) + oxyde (18), citral (12), ar-curcumène (7)			Brésil	automne hiver	0,1%	0,1%	parties aériennes fleuries	1	Zetola 2002	

^a les saisons sont données en fonction du calendrier de chaque pays; NC: non communiqué; ND: non disponible

^b plante cultivée (tout ou partie des échantillons), ^c cultivar LAC-1, ^d cultivar LAC-2 (stérile), ^e cultivar Kavach, ^f cultivar L-601 (par irradiation, stérile), ^g cultivar L-640 ("Bhurakshak") (par irradiation, stérile, breveté)

Tableau 41. Chimiotypes **II-VII** et sous-types (huile essentielle obtenue par hydrodistillation).

Chimiotype	Sous-type	Composés majoritaires (%)	Origine	Saison ^{a)}	Rdt	Partie utilisée	nombre échantillons	Référence
II		tagétène	Argentine	été	1,6-2,2%	parties aériennes	3	Ricciardi et al. 1999
		tagétène (71), myrcène (7), germacrène D (5)	Guatemala	NC	0,2-0,4%	feuilles, fleurs	14	Fischer et al. 2004 ^b
III	IIIa	carvone (42-55), limonène (23-30)	Brésil	NC	1,2-1,5%	feuilles	3	Matos 1996 ^b
		limonène (32), carvone (32), germacrène D (21), myrcène (11)	Brésil	NC	0,1%	parties aériennes fleuries	1	Zoghbi 1998
		1,8-cinéole (35), limonène (18), carvone (9), sabinène (8)			0,3%		1	
		carvone (49), limonène (27)	Brésil	NC	0,5%	feuilles	1	Braga 2005 ^a
		carvone (62), limonène (15)	Brésil	hiver (floraison)	0,4%	feuilles	3	Tavares 2005 ^b
		carvone (53), limonène (17), germacrène D (6), élémol (5)			été (période végétative)	0,5%	feuilles	
		carvone (51), limonène (33), bicyclosquiphellandrène (7)	Colombie	été	0,7%	feuilles, tiges	1	Stashenko 2004 ^b
		carvone (69), limonène (23)	Costa Rica	ND	ND	feuilles	1	Ciccio 2004
		carvone (29-40), β -guaiène (10-12), pipéritène (6-8), limonène (6-7)	Cuba	été	2,1-2,2%	feuilles, tiges	2	Pino 1996a-b ^b
		carvone (63), germacrène D (6), limonène (5)	Perou	NC	0,3%	feuilles	1	Leclercq 1999 ^b
	carvone (68), limonène (18)	Guyane	été	0,8%	feuilles	1	ce mémoire	
	limonène (51), germacrène D (18)	Martinique	automne	1,6%	feuilles	1	ce mémoire	
	IIIb	limonène, pipéritone	Argentine	ND	ND	feuilles	1	Fester 1954a
		limonène, pipéritone, dihydrocarvone	Argentine	ND	ND	feuilles	1	Fester 1954b
		limonène, lippione, pipéritone	Argentine	ND	0,5-1,4%	feuilles	ND	Fester 1955
		α -pinène, dihydrocarvone (maj), citral, camphor	Argentine	ND	ND	feuilles	ND	Fester 1955
dihydrocarvone, 1,8-cinéole (maj), camphor, linalol, citral		Argentine	été	0,5-1,2%	feuilles	2	Fester 1961a	
limonène (34-47), pipéritone (37-24), 1,8-cinéole (10-13)		Argentine	été, automne	0,6%	feuilles	2	Catalán 1977	
limonène (44), pipéritone (31), 1,8-cinéole (14)	Guatemala	été	0,2%	parties aériennes	1	Senatore 2001		
IV		myrcène (42), camphène (30)	Argentine	été	1,2%	parties aériennes	1	Ricciardi 1999
		myrcène (26), citral (16)	Inde	NC	1,2%	feuilles	1	Singh 1999
V		γ -terpinène (46), p-cymène (9), β -caryophyllène (7)	Brésil	automne	0,3%	feuilles	1	Gomes 1993 ^b
VI		camphor (18), 1,8-cinéole (16), β -cubébène (6), β -caryophyllène (5)	Uruguay	NC	0,8%	feuilles	1	Dellacassa 1990
VII (var. <i>carterae</i> : "licorice verbena")		estragole (56), 1,8-cinéole (13), camphène (7)	USA	printemps	0,9%	feuilles terminales et tiges	3	Tucker 1999 ^b

^{a)} les saisons sont données en fonction du calendrier de chaque pays; NC: non communiqué; ND: non disponible

^{b)} plante cultivée (tout ou partie des échantillons)

c) Activité pharmacologique de métabolites secondaires de *Lippia alba*

α) Activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH

L'activité antiradicalaire de composés isolés a dans un premier temps été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique de DPPH, mesurée à 517 nm. La substance de référence était le Trolox (fig.62), qui a montré une CI₅₀ de 12,5 μM (cf. fig.141).

Le profil d'activité antiradicalaire de chaque substance testée vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans la figure 141. Des représentants de chaque type de molécules isolées ont été testés : un iridoïde (le thévéside, **16**), deux flavonoïdes (le lutéolol-7-diglucuronide **28** et la tricicine-7-glucuronide **31**) et quatre phénylpropanoïdes (le 2-acétylactéoside **22**, l'isoverbascoside **24**, le calcéolarioside E **23** et le cistanoside F **25**).

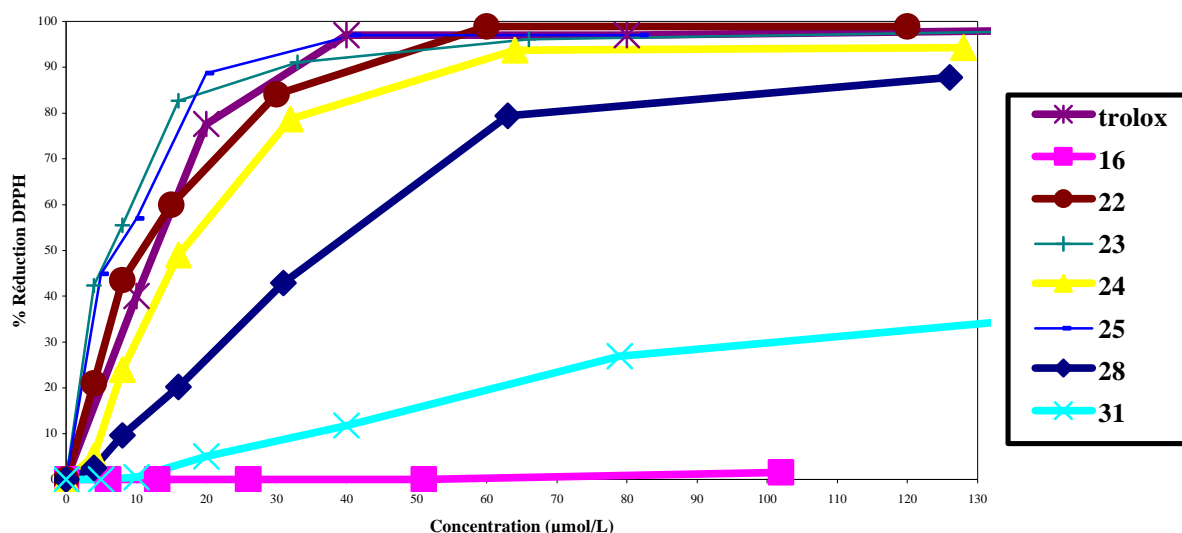


Fig.141. Activité de capteurs de radicaux libres d'un iridoïde et de composés phénoliques isolés de *Lippia alba* ainsi que du Trolox sur le radical DPPH

On ne constate aucune activité antiradicalaire exercée par le thévéside (**16**) sur le DPPH. Ceci n'est pas vraiment surprenant dans la mesure où la structure chimique de la molécule ne comporte aucun groupement typiquement antioxydant (phénol, amine aromatique...) ni de double liaisons conjuguées.

Les flavonoïdes testés ont, eux, montré une certaine activité inhibitrice. Celle du composé **31** n'a pas pu être réellement quantifiée car aux concentrations maximales testées, il ne capte pas

plus de 50% du DPPH. On détermine en revanche un CI_{50} de 38,2 μM pour le composé **28**. On peut expliquer cette différence notable d'activité entre deux glycuronides de flavone par le profil de substitution du cycle B pour les deux produits : dans le premier cas la génine est la tricine qui ne possède qu'un seul groupement OH libre sur le cycle B (en 4', entouré par deux méthoxyles en 3' et 5'), tandis que dans le second cas où la génine est le lutéolol, le cycle B est un noyau *ortho*-dihydroxylé, ce qui permet une meilleure délocalisation de l'électron non apparié sur l'ensemble du cycle et une plus grande stabilité du radical formé.

En ce qui concerne les phényléthanoïdes testés, on observe des activités voisines pour tous les composés : 11,1 μM (**22**), 16,1 μM (**24**), 8,2 μM (**23**), 9,3 μM (**25**). Curieusement, le composé **25**, qui ne possède dans sa structure qu'un résidu caféyle et n'est pas substitué en 1 du glucose par un hydroxytyrosol, ne semble pas présenter d'activité inférieure aux autres produits, qui contiennent deux noyaux *ortho*-dihydroxylés.

Rappelons également que les composés **7** (forsythoside B) et **13** (verbascoside) ont été testé (fig.63, page 110) et ont présenté respectivement des CI_{50} de 9,1 et 11,1 μM .

β) Activité inhibitrice vis-à-vis du radical-anion superoxyde

L'activité antioxydante de certains composés a également été déterminée dans un système permettant de mesurer l'effet des molécules sur l'anion-radical superoxyde. Les quantités disponibles n'étant pas importantes pour tous les composés, on s'est limité à quelques produits abondants dans les extraits.

Dans le système acellulaire, on a testé l'iridoïde majoritaire **16** (thévéside), le flavonoïde majoritaire **28** (lutéolol-7-diglucuronide) et trois phénylpropanoïdes dont deux sont en quantité importante dans la plante (le verbascoside **13** et le calcéolarioside E **23**) et un se distingue par sa structure (absence de résidu hydroxytyrosol en 1 du glucose : cistanoside F **25**). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 142.

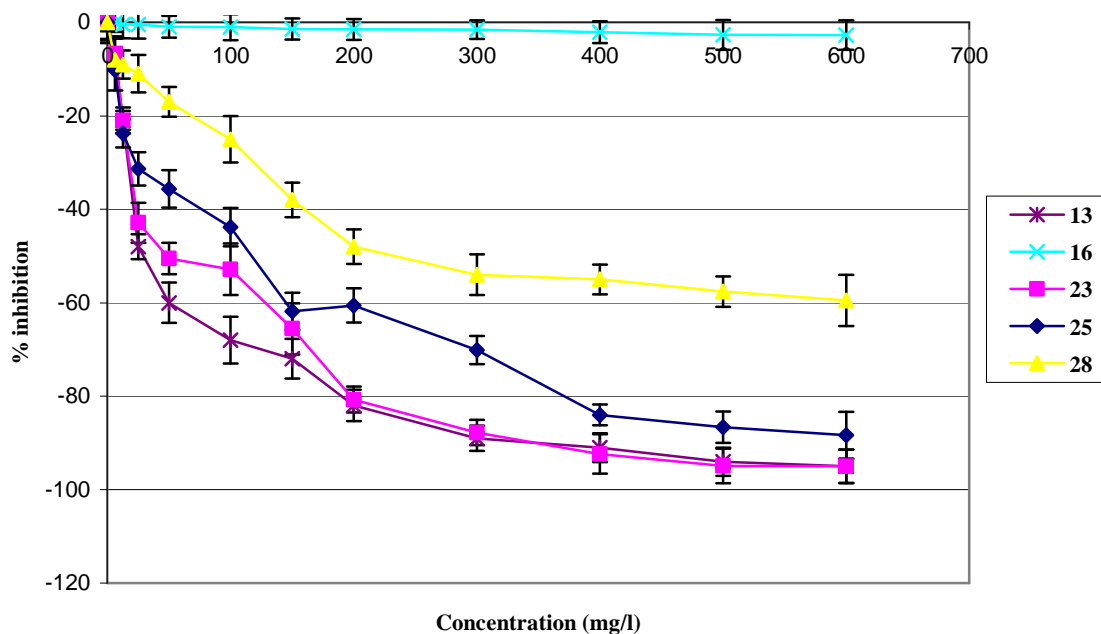


Fig.142. Activité inhibitrice de composés isolés de *Lippia alba* (Gourbeyre) sur le radical-anion superoxyde en modèle acellulaire

Comme dans le test du DPPH, le composé **16** s'est révélé inactif. Aucune concentration inhibitrice 50 (CI₅₀, concentration diminuant de 50% l'absorption à 550 nm du cytochrome *c* provoquée par O₂^{•-}) n'a pu être déterminée.

Le composé **28** présente une CI₅₀ de 231,2 mg/l.

Les trois phénylpropanoïdes testés sont plus efficaces que le flavonoïde, avec des CI_{50} inférieures. Le composé **25** a une CI_{50} de 118,7 mg/l, le composé **23** de 49,9 mg/l et le produit le plus actif est l'actéoside (**13**) avec une CI_{50} de 31,2 mg/l.

En modèle cellulaire, on cherche à prendre en compte le fait que la destruction du superoxyde par une action antioxydante directe n'est pas forcément le seul mécanisme possible pour une activité antioxydante. On stimule, à l'aide d'un ester de phorbol (le PMA), une protéine kinase C qui est à l'origine de la production de superoxyde des granulocytes neutrophiles. L'inhibition du radical libre par une molécule peut donc dans ce modèle être expliquée non seulement par la destruction directe du superoxyde, mais aussi par une action inhibitrice sur les voies de production d' $O_2^{\cdot-}$. Les composés testés ici sont le thévéside (**16**), un iridoïde qui n'a pas montré d'activité antioxydante directe, le flavonoïde **28** et deux phénylpropanoïdes, **23** et **13**. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 143.

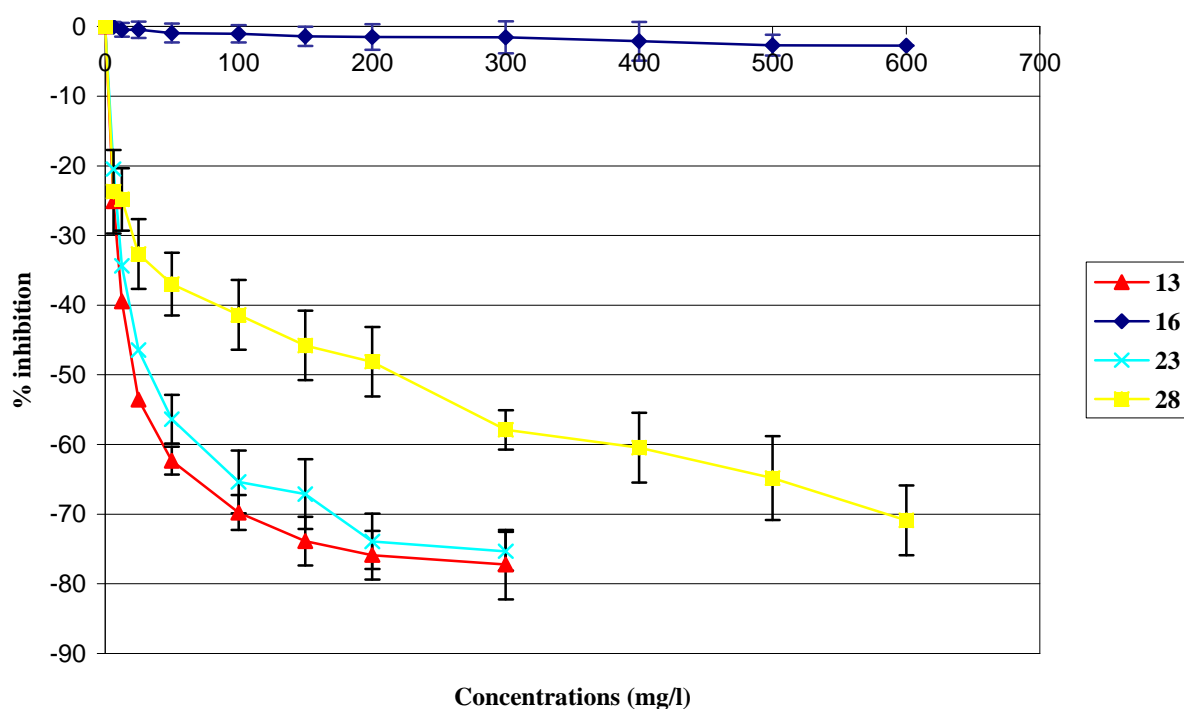


Fig.143. Activités inhibitrices de l'iridoïde, du flavonoïde et des deux phénylpropanoïdes majoritaires isolés de *Lippia alba* (Gourbeyre) sur la production de l'anion-radical superoxyde par les granulocytes neutrophiles

Le composé **16** ne montre presque aucune activité antioxydante aux concentrations testées, comme pour les tests précédents, ce qui démontre qu'il n'a non seulement pas d'activité antioxydante directe - antiradicalaire contre le DPPH ou inhibitrice du superoxyde - mais qu'il n'a pas non plus d'action inhibitrice sur la production de ce dernier.

Pour les autres composés testés, on peut déterminer une concentration inhibant 50% de la production d' O_2^- (CI_{50}). Le lutéolol-7-diglucuronide **28** a une CI_{50} de 217,6 mg/l. Comme dans les tests précédents, il a une activité largement inférieure aux phénylpropanoïdes testés, l'actéoside (**13**) et le calcéolarioside E (**23**) ayant des CI_{50} respectives de 23,5 mg/l et 35,3 mg/l.

On peut donc établir que :

- les résultats des tests (modèles cellulaire et acellulaire) sont cohérents entre eux et avec ceux du test de pouvoir capteur de radicaux libres (DPPH). On constate une activité intéressante des phénylpropanoïdes, une activité inférieure des flavonoïdes testés et une inactivité de l'iridoïde **16**,
- les CI_{50} obtenues pour les trois polyphénols en modèle cellulaire sont plus ou moins diminuées par rapport à celles obtenues en modèle acellulaire. Un mécanisme autre que direct (transfert d'hydrogène) pourrait donc être impliqué dans l'activité antioxydante des phénylpropanoïdes, en particulier. L'iridoïde testé ne présente d'intérêt en tant qu'antioxydant dans aucun des systèmes envisagés.

γ) Inhibition de la peroxydation des LDL

Des essais pour la détermination de l'activité antioxydante de produits isolés sur la réaction de peroxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) initiée par l'ion Cu^{2+} ont également été entrepris. Ces tests ont concerné deux iridoïdes (thévéside **16** et shanzhiside méthyl ester **18**), quatre flavonoïdes (lutéolol-7-glucuronide **27**, lutéolol-7-diglucuronide **28**, 3'''-acétylclérodendrine **30** et tricine-7-glucuronide **31**) et cinq phénylpropanoïdes (actéoside **13**, 2-acétylactéoside **22**, calcéolarioside E **23**, isoactéoside **22**, cistanoside F **25**). Ils n'ont malheureusement pas pu être menés à leur terme, faute de quantités suffisantes de produits. Les CI_{50} n'ont donc pas pu être déterminées précisément. L'aspect des courbes obtenues permet néanmoins une évaluation qualitative de l'activité antioxydante des composés.

Les deux iridoïdes se sont révélés totalement inactifs aux concentrations testées, ce qui se traduit par des courbes d'allure voisine de la courbe « LDL+Cu » (courbe observée sans ajout d'antioxydant dans le milieu, où l'oxydation des LDL par le cuivre n'est pas empêchée), observables dans la figure 144. Ceci est cohérent avec les résultats des tests précédents.

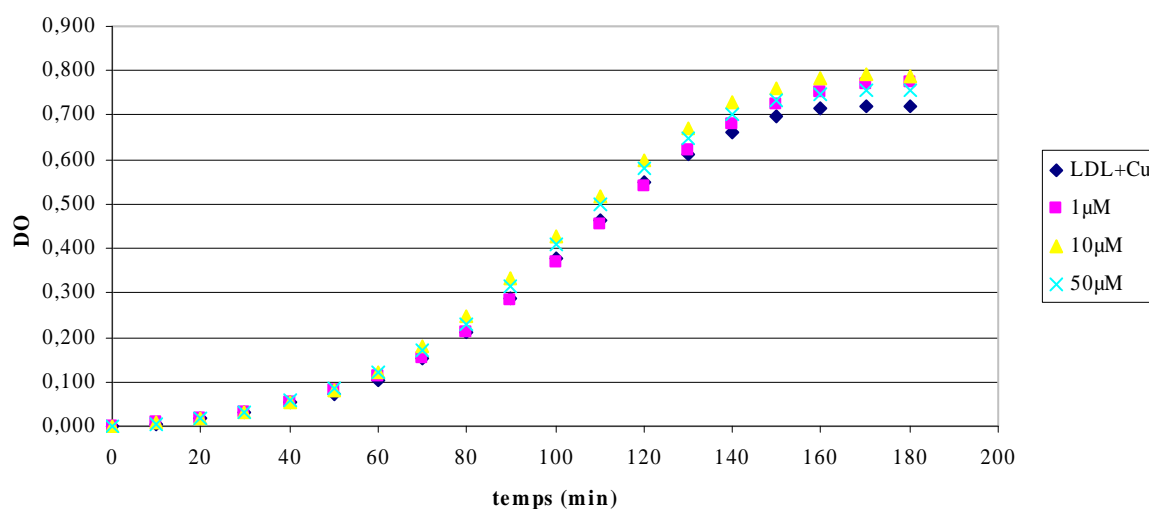


Fig.144. Profil de formation des diènes conjugués lors de la peroxydation des LDL par le cuivre, sans ou avec différentes concentrations du composé 18 (shanzhiside méthyl ester)

Pour les quatre flavones testées, par contre, l'ajout de composé dans le système n'est pas sans effet. Aux plus faibles concentrations testées, on n'observe pas d'effet ou un effet pro-oxydant. Ceci est observable dans la figure 145 pour la courbe correspondant à 1 μM du composé **28**, où la phase de latence est pour ainsi dire absente. La phase de latence est la

première partie de la courbe, de faible pente, où la cinétique de formation de diènes conjugués est toujours limitée par la présence d'antioxydants endogènes dans la lipoprotéine (cf. matériel et méthodes) ; son raccourcissement est donc révélateur d'une activité pro-oxydante, accélératrice de l'épuisement des réserves d'antioxydants endogènes. Ce même phénomène est observable jusqu'à 10 μM pour le composé **31**. Pour des concentrations plus élevées, la phase de latence est prolongée par les flavones testées, ce qui démontre une activité antioxydante. Ainsi, pour des concentrations respectivement de 10, 10, 50 et 100 μM des produits **27**, **28**, **30** et **31**, la CI_{50} est clairement dépassée. Elle n'a pas pu être établie précisément car cela nécessite de trouver, par répétition de l'expérience (à des concentrations encadrant progressivement celle recherchée), la concentration pour laquelle la phase de latence est prolongée de 50 %. Dans ce test comme dans les précédents, les composés possédant une génine à groupement *ortho*-dihydroxylés (lutéoline) sont apparemment plus actifs que ceux ayant des groupements phénoliques isolés (apigénine, tricine).

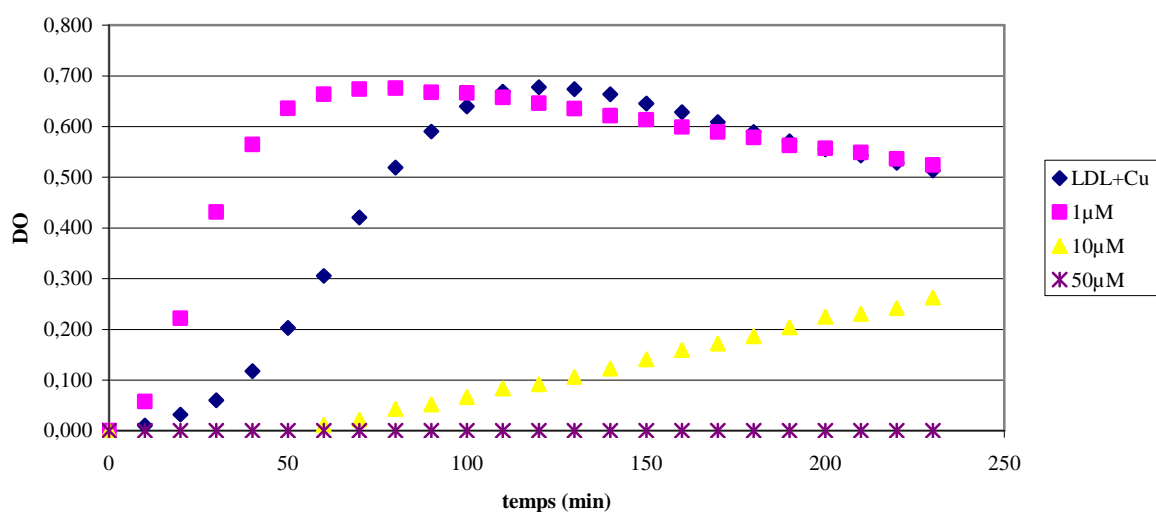


Fig.145. Profil de formation des diènes conjugués lors de la peroxydation des LDL par le cuivre, sans ou avec différentes concentrations du composé 28 (lutéolol-7-diglucuronide)

En ce qui concerne les phénylpropanoïdes testés, on observe également un effet nul ou pro-oxydant à la plus faible concentration testée (1 μM) et une activité très antioxydante pour des concentrations supérieures (fig.146). L'établissement d'une CI_{50} précise nécessiterait la réalisation des essais avec une gamme de concentrations très fines, mais elle se situe apparemment pour tous les composés (**13**, **22**, **23**, **24**, **25**) en-dessous de 10 μM .

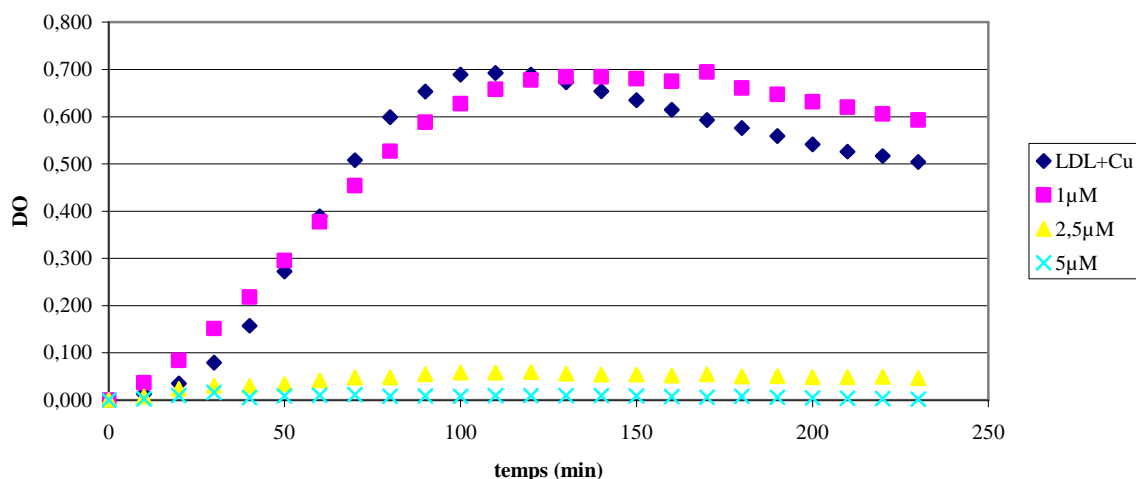


Fig.146. Profil de formation des diènes conjugués lors de la peroxydation des LDL par le cuivre, sans ou avec différentes concentrations du composé 23 (calcéolarioside E)

δ) Recherche d'activité neurosédative : caractère agoniste vis-à-vis du récepteur GABA_A ou du récepteur aux benzodiazépines

En plus de l'activité antioxydante, on a cherché à déterminer si l'activité sédatrice de *Lippia alba*, attribuée par la tradition et vérifiée par l'étude pharmacologique d'extraits (cf. travaux antérieurs) pouvait être expliquée par une activité spécifique de certains composés majoritaires. On a choisi de tester l'activité agoniste de cinq produits, quatre parmi les plus abondants dans la plante (thévéside **16**, lutéolol-7-diglucuronide **28**, calcéolarioside E **23** et isoactéoside **24**) et le seul produit nouveau (3''-acétylcélérodendrine **30**), vis-à-vis de deux récepteurs connus pour jouer un rôle inhibiteur au niveau du système nerveux central : le récepteur aux benzodiazépines (BZD) et le récepteur GABA_A.

Dans les deux tests, les concentrations du composé **30** étaient insuffisantes pour déterminer une CI₅₀. Malheureusement, les conditions opératoires, la solubilité du composé et la quantité de produit disponible ne permettaient pas de tester des concentrations supérieures. A la concentration la plus élevée testée (50 μM), **30** déplaçait 26,8% du flunitrazépam du récepteur aux BZD et 18% du muscimol du récepteur GABA_A.

Dans le test du récepteur aux benzodiazépines, les quatres autres composés testés ont montré des CI_{50} de 52 mM (**16**), 1,4 mM (**23**), 490 μ M (**24**) et 101 μ M (**28**). Le type de courbes obtenues est présenté dans la figure 147, à travers l'exemple du composé **24**.

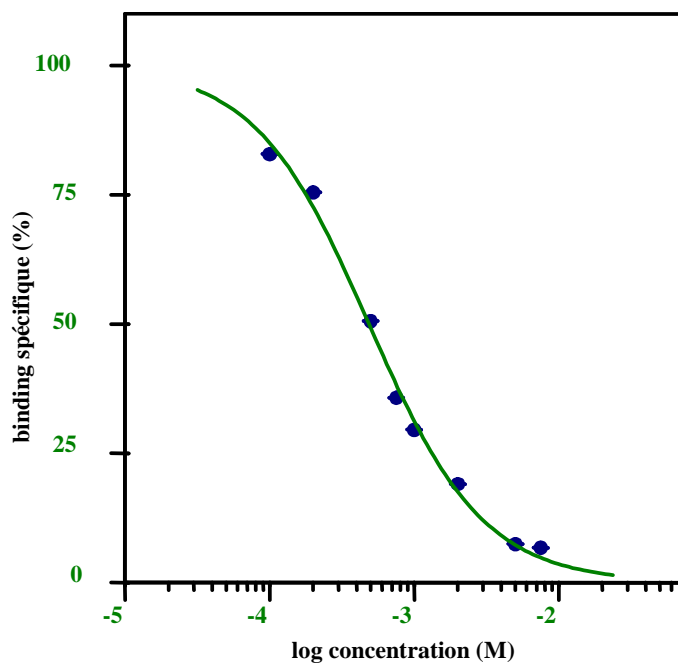


Fig.147. Courbe de binding du composé 24 (isoactéoside) pour le récepteur aux benzodiazépines

Pour le récepteur $GABA_A$, les résultats étaient assez cohérents avec le test précédent : **16** et **23** étaient les composés les moins actifs (1,4 et 1,5 mM) et **24** agissait à concentration un peu plus faible (790 μ M) (fig.148). Le composé **28** s'est révélé une fois de plus le composé le plus actif avec une CI_{50} de 40 μ M.

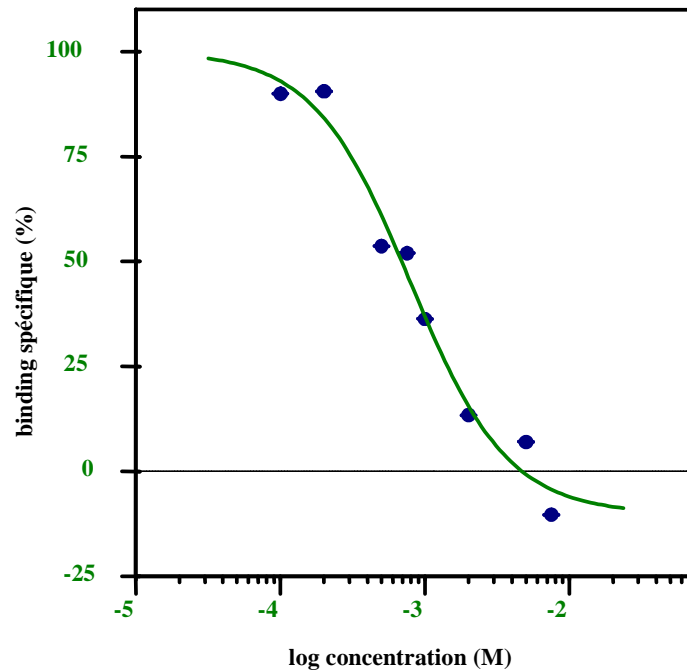


Fig.148. Courbe de binding du composé 24 (isoactéoside) pour le récepteur GABA_A

ε) Conclusion sur l'intérêt des molécules isolées de *Lippia alba*

Les polyphénols de *Lippia alba* semblent présenter un réel intérêt au niveau de leur activité antioxydante, qui a été établie sur la base de quatre essais : pouvoir antiradicalaire contre le DPPH, destruction de l'anion-radical superoxyde (à la fois en modèle acellulaire et cellulaire) et inhibition de la peroxydation des acides gras polyinsaturés présents dans des LDL humaines (même si ce dernier test n'a pas pu être mené à son terme). Ces produits semblent actifs de façon directe et, pour certains, indirecte.

Nous n'avons par contre pas pu mettre en évidence d'intérêt pour les iridoïdes ou les diterpènes isolés au niveau de l'activité antioxydante.

En ce qui concerne l'usage traditionnel de la plante, les activités constatées sur les récepteurs aux benzodiazépines et GABA_A semblent insuffisantes pour expliquer à elles seules une action sédatrice. Mais rappelons que cette action a bel et bien été constatée sur un extrait. D'autres essais pourraient donc être menés à l'avenir.

III. Conclusion

Dans ce mémoire sont rapportés les isollements de trente-et-une molécules de quatre espèces appartenant toutes à l'ordre des Lamiales : *Marrubium peregrinum* L., *Ballota larendana* Boiss. & Heldr., *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth. (Lamiacées) et *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbénacées). Certaines de ces molécules ont été isolées de plusieurs de ces espèces.

L'objectif commun à l'étude de ces quatre plantes était l'évaluation de l'activité antioxydante. Des molécules de chacune d'entre elles ont été testées pour leur action antiradicalaire contre le radical DPPH. Certains composés de *Lippia alba* ont en outre été testés pour leur activité antioxydante dans trois autres essais : l'inhibition du radical-anion superoxyde en modèles acellulaire (système hypoxanthine/xanthine oxydase) et cellulaire (granulocytes neutrophiles activés par un ester de phorbol), ainsi que l'inhibition de la peroxydation lipidique induite par le cuivre. L'ensemble de ces tests a permis de conclure à l'inactivité (même indirecte) des molécules testées ne possédant pas de fonctions phénoliques et à l'activité des polyphénols isolés. Les molécules les plus intéressantes étaient les molécules qui possédaient des fonctions *ortho*-dihydroxylées (phénylpropanoïdes et flavonoïdes).

En dehors de la « colonne vertébrale » de ce mémoire, l'étude de l'activité antioxydante, *Lippia alba* a fait l'objet d'investigations supplémentaires. Cette plante doit prochainement faire l'objet d'une monographie à la Pharmacopée Française en raison de sa réputation de plante sédative en médecine traditionnelle antillaise et guyanaise (*twa tass*). Au cours des travaux d'isolement de composés, on s'est rendu compte que la composition chimique de cette espèce (polyphénols, iridoïdes) variait d'un lot à l'autre, en fonction de l'origine géographique. Parallèlement, l'étude de la bibliographie consacrée à cette plante a révélé une grande diversité de composition de l'huile essentielle. On a alors entrepris l'étude des métabolites non-volatils et de l'huile essentielle de plusieurs échantillons disponibles. Les échantillons guadeloupéens (qui ont été étudiés de façon plus approfondie) semblaient avoir des compositions voisines qualitativement, mais différentes quantitativement, tant au niveau des extraits que de l'huile essentielle. Ils différaient qualitativement des lots martiniquais (huile essentielle d'odeur différente, composition partiellement différente des extraits). Dans un lot guyanais, seule l'huile essentielle a pu être étudiée : elle différait à la fois de celle de Martinique et de celle de Guadeloupe. Une classification des chimiotypes existant de *Lippia alba* a été proposée, établissant sept chimiotypes principaux (**I-VII**) et des sous-types.

Enfin, on a cherché à établir si les constituants majoritaires des extraits polaires d'un lot guadeloupéen pouvaient expliquer par leur activité sur les récepteurs aux benzodiazépines et GABA_A l'utilisation traditionnelle de la tisane en tant que remède neurosédatif. Ces activités n'ont eu lieu qu'à des concentrations élevées ne permettant pas d'expliquer à elles seules l'efficacité de la plante.

L'étude de *Lippia alba* pourrait encore faire l'objet de nombreux travaux, une grande variabilité intraspécifique semblant exister chez cette plante.

IV. Partie expérimentale

4.1. Matériel végétal et extraction

La réalisation de ce travail a nécessité la récolte de plusieurs plantes d'origines géographiques variées. Dans le cas précis de *Lippia alba*, plusieurs échantillons différents ont été utilisés. Le tableau 42 présente l'origine et la date de récolte des différents échantillons étudiés.

Tableau 42. Matériel végétal étudié.

Nom botanique	Lieu et date de récolte		Organe	Poids	Récolté et identifié par
<i>Marrubium peregrinum</i> L.	Grèce (Villia, Attique)	06/2002	Parties aériennes	2 kg	Dr. Sevser Sahpaz
<i>Ballota larendana</i> Boiss. & Heldr.	Turquie (Aksaray İhlara vâdisi)	06/1996	Parties aériennes	500 g	Prof. Dr. Nurten Ezer
<i>Ballota pseudodictamnus</i> (L.) Benth.	Crête (Heraklion)	06/2000	Parties aériennes	250 g	Pr. François Tillequin
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	Guadeloupe (Gourbeyre, Basse-Terre)	12/2003	Feuilles et tiges	450 g	Pr. Joseph Fournet
	Guadeloupe (Capesterre, Basse-Terre)	02/2005	Feuilles et tiges	800 g	
	Martinique (Saint-Pierre)	10/2005	Feuilles et tiges	450 g	Emmanuel Nossin
10/2005		350 g			

Après la récolte, le matériel végétal est séché à basse température afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, en minimisant les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents au caractère organique de ces matières premières. Ensuite, il est conditionné sous forme de drogue séchée avant d'être envoyé au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille 2.

La plante est ensuite broyée, de manière à ce que la surface de contact avec le solvant soit la plus grande possible et donc que les rendements d'extraction soient les meilleurs possibles, sans que le temps d'extraction soit trop long.

La méthode d'extraction de routine que nous employons est la macération successive par trois solvants de polarité croissante. Il s'agit toujours pour les deux premiers de dichlorométhane et de méthanol. Quant à l'extrait le plus polaire, on a généralement recours à un mélange à parts égales de méthanol et d'eau ; cependant, dans le cas de *Marrubium peregrinum*, on a utilisé l'eau seule. La drogue sèche broyée est d'abord mise en contact avec le dichlorométhane à raison de 1,5 l de solvant pour 250 g de drogue. Après vingt-quatre heures d'agitation mécanique à température ambiante, le mélange hétérogène est filtré sur filtre de papier plissé et le résidu est à nouveau extrait deux fois vingt-quatre heures dans les mêmes conditions. Les filtrats sont réunis et évaporés au moyen d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor) à la température maximale de 40°C. Le processus est répété avec les deux solvants suivants. L'eau est éliminée par lyophilisation (Telstar Cryodos 50, pompe Varian DS102).

Les extraits réalisés sont ensuite stockés à température ambiante, à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

Les huiles essentielles autres que celle de Martinique ont été obtenues en Guadeloupe et expédiées en France métropolitaine. Les échantillons de Gourbeyre et Capesterre ont été identifiés par Joseph Fournet de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) en juillet 2005 et celui de Cayenne par Marie-Françoise Prévost de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Cayenne en juillet 2004.

4.2. Essais des drogues végétales

4.2.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation permet la séparation des métabolites secondaires volatiles et non volatiles, par entraînement des premiers (huile essentielle, essence) par la vapeur d'eau. Elle est typiquement réalisée au moyen d'un dispositif tel que celui décrit dans la Pharmacopée Européenne (fig.149). Elle permet à la fois de déterminer le pourcentage d'huile essentielle

présent dans une plante, mais aussi (quoique de façon modeste avec ce type d'appareil) d'obtenir cette huile pour pouvoir l'analyser.

La partie graduée permet la lecture du volume d'huile essentielle obtenue. Dans le cas d'une huile de densité supérieure ou trop voisine de celle de l'eau, on conseille l'utilisation de xylène pour une meilleure lecture des résultats.

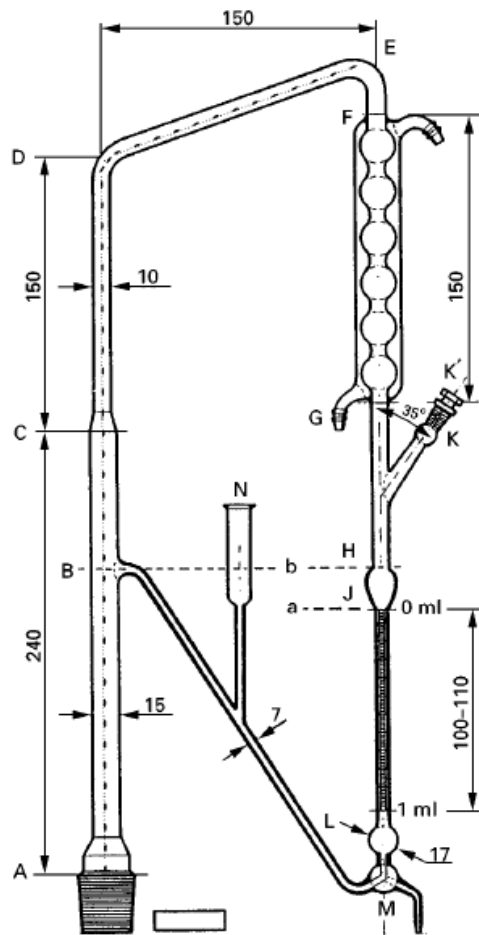


Fig.149. Appareil pour la détermination des huiles essentielles dans les drogues végétales (dimensions en millimètres) (Pharmacopée Européenne 2005)

Le mode opératoire est le suivant :

On introduit, dans un ballon, le volume de liquide indiqué pour l'entraînement à la vapeur et quelques fragments de pierre poreuse. On adapte au ballon l'appareil de condensation. On verse de l'eau *R* par le tube de remplissage (*N*) jusqu'à l'affleurement en (*B*). On enlève ensuite le bouchon (*K'*) et on introduit la quantité prescrite de xylène *R* avec une pipette, en appuyant la pointe au fond de la tubulure (*K*). On replace le bouchon (*K'*) en vérifiant que les deux orifices coïncident. On chauffe le liquide du ballon jusqu'à début d'ébullition et on

distille à la vitesse de 2-3 ml/min pendant 30 min. Le volume de xylène est lu après au moins 10 min au niveau du tube gradué.

On introduit ensuite dans le ballon la quantité de drogue prescrite et on procède à l'entraînement à la vapeur. On arrête le chauffage et on procède à la lecture du volume de xylène après 10 min. Le volume d'huile essentielle est obtenu par soustraction du volume de xylène déterminé précédemment. Le résultat sera ensuite exprimé en % (ml/100g) ou, dans la Pharmacopée, en ml/kg (Pharmacopée Européenne 2005).

Ce procédé a également permis l'obtention d'une petite quantité de l'huile essentielle du lot 2 de Saint-Pierre (Martinique) (rendement : 1,6%). Les autres huiles essentielles ont été réalisées sur place par le docteur Paul Bourgeois selon le même procédé. Les rendements respectifs des lots de Gourbeyre, Capesterre et Cayenne étaient de 0,6%, 0,2% et 0,8%.

4.2.2. Détermination de l'eau par entraînement

On utilise un appareil approprié, décrit dans la figure 150.

Dans un premier temps on introduit dans le ballon 200 ml de toluène et environ 2 ml d'eau.

On distille pendant deux heures, laisse refroidir pendant trente minutes et on lit le volume d'eau à 0,05 ml près.

On introduit ensuite dans le ballon une prise d'essai de la substance à analyser (pesée à 1% près) susceptible de donner 2 ml à 3 ml d'eau environ. On chauffe doucement le ballon pendant 15 minutes en présence d'une substance assurant une ébullition régulière. Lorsque le toluène commence à bouillir, on distille à la vitesse de 2 gouttes environ par seconde jusqu'à ce que la plus grande partie de l'eau soit entraînée, puis on augmente la vitesse de distillation jusqu'à 4 gouttes par seconde. Lorsque toute l'eau a été entraînée, on rince l'intérieur du tube réfrigérant au **toluène**. La distillation est poursuivie pendant 5 minutes, puis on coupe le chauffage et le tube collecteur refroidit à température ambiante. On fait tomber les gouttelettes d'eau adhérant encore à la paroi du tube. Lorsque l'eau et le toluène se sont séparés, on lit le volume d'eau et on détermine, par différence des deux mesures, le nombre de ml d'eau/kg de plante (Pharmacopée Européenne 2005).

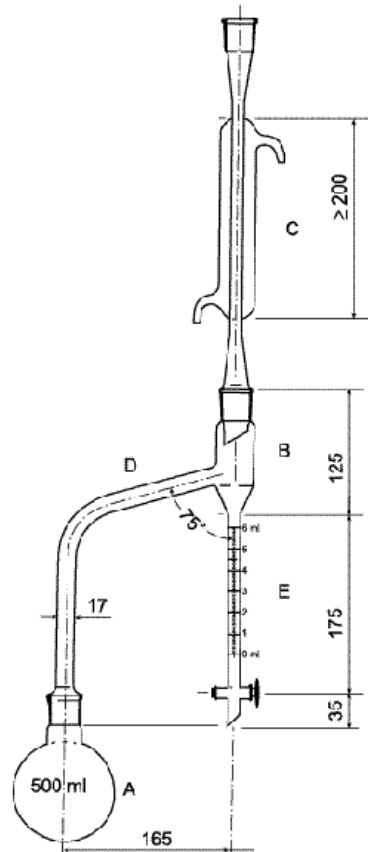


Fig.150. Appareil pour la détermination de l'eau par entraînement (dimensions en millimètres) (Pharmacopée Européenne 2005)

4.2.3. Perte à la dessiccation

Un cristalliseur est placé à l'étuve pour dessiccation, entre 100 et 105°C. Une fois sorti, il est placé dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement, puis pesé. L'opération est répétée jusqu'à obtention d'une masse stable. On place ensuite 1 g de la drogue végétale dans le cristalliseur et le tout est placé à l'étuve jusqu'à l'obtention d'une masse stable. La perte en masse après dessiccation est exprimée en %, par rapport au poids initial de la drogue (Pharmacopée Européenne 2005).

4.2.4. Teneur en cendres totales

Un creuset en silice est placé dans un four à mouffles, à 600°C. Une fois sorti, il est placé dans un dessiccateur jusqu'à refroidissement, puis pesé. L'opération est répétée jusqu'à obtention

d'une masse stable. On place ensuite 1 g de la drogue végétale dans le creuset et le tout est placé à l'étuve pendant une heure pour dessiccation. La Pharmacopée Européenne précisant que l'échantillon ne doit pas prendre feu dans le four à moufles, on peut mettre le creuset au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, puis l'échantillon est laissé deux heures dans le four à moufles, à 600°C (on s'assure de l'absence de flamme). Après refroidissement au dessiccateur et pesée, l'opération est répétée jusqu'à obtention d'une masse stable.

La teneur en cendres donne une indication sur la quantité de minéraux (non combustibles) contenus dans la drogue végétale. Elle est exprimée en % par rapport à la masse initiale de plante (Pharmacopée Européenne 2005).

4.2.5. Teneur en cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique

Les cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique sont constituées par le résidu obtenu après extraction des cendres sulfuriques ou des cendres totales par l'acide chlorhydrique et rapporté à 100 g de drogue.

Dans le creuset utilisé pour l'essai des cendres totales (voir ci-dessus), on ajoute au résidu 15 ml d'eau et 10 ml d'acide chlorhydrique. Le mélange est recouvert d'un verre de montre et porté à douce ébullition pendant 10 minutes. On laisse refroidir. On filtre le résidu sur un filtre sans cendres et on lave à l'eau chaude jusqu'à ce que le filtrat soit neutre. Après dessiccation, le tout est incinéré jusqu'au rouge sombre. On laisse refroidir au dessiccateur et on pèse. L'opération est à répéter jusqu'à ce que la différence entre deux pesées consécutives n'excède pas 1 mg.

4.3. Techniques analytiques de séparation

4.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) se compose d'un support en aluminium ou en verre, sur lequel est fixée une fine couche d'un milieu de sorption (silice, cellulose, alumine, polyamides...) comme phase stationnaire. On la place en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre ; elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile, qui est constituée d'un ou de plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à

étudier, déposé à l'état liquide par appositions successives d'une micropipette en verre et éventuellement séché au sèche-cheveux sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Le comportement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté, phase mobile et phase stationnaire. La CCM est généralement considérée comme une technique de chromatographie par adsorption, mais le partage peut intervenir, dans le cas de l'utilisation d'une phase stationnaire liquide sous forme de film.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son R_f (*rate factor* ou rapport frontal) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) et qui peut donc être compris entre 0 et 1.

Nous utilisons essentiellement des plaques de Silicagel 60 F₂₅₄ prêtes à l'emploi à support en aluminium (Merck). Elles sont imprégnées d'un réactif permettant une meilleure visibilité des molécules absorbant à 254 nm. Les systèmes de solvant les plus couramment employés avec ces plaques sont les suivants :

- extraits dichlorométhane, méthanolique :
éthyl acétate/pétrole (1:1)
dichlorométhane/méthanol (9:1)
- extraits méthanolique, hydrométhanolique, aqueux :
éthyl acétate/acide acétique/acide formique/eau (100:11:11:27)

Ces compositions ne sont bien sûr qu'indicatives et peuvent être adaptés aux besoins spécifiques d'une analyse.

Nous avons également utilisé des plaques de silice RP-18 prêtes à l'emploi à support en verre (Merck). Les systèmes de solvants utilisés consistaient principalement en mélanges de méthanol et d'eau.

La CCM est un outil précieux pour l'analyse en phytochimie : son utilisation est très simple, elle est assez peu onéreuse et surtout elle permet très facilement de recourir à des réactifs chimiques pour la détection, la caractérisation ou l'augmentation du seuil de détection de certaines molécules.

4.3.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La CLHP repose sur les mêmes principes de base que la CCM. Elle est plus complexe d'utilisation, nécessite davantage de précautions et coûte nettement plus cher mais permet surtout une amélioration très importante dans de nombreux domaines, dont deux principaux : le seuil de détection et la résolution. Un système de CLHP classique comprend les éléments suivants :

- un système de pompage (simple ou multiple) pour déplacer la phase mobile à haute pression (2-300 bars)
- un injecteur (manuel ou automatique) pour introduire dans le système à haute pression l'échantillon solubilisé dans un solvant adéquat et exempt de particules en suspension (risque de colonne bouchée)
- une colonne contenant la phase stationnaire. Celle-ci est de granulométrie très fine, c'est d'ailleurs ce qui permet le gain de résolution mentionné plus haut. Ceci explique la nécessité de recourir à des pressions très importantes (et à des matériaux résistant à ces pressions !) pour « forcer » le passage de la phase mobile à travers ce solide finement poreux en un temps raisonnable.
- un détecteur à ultraviolets
- une interface permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur (intégrateur ou logiciel informatique)

Le laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille est équipé d'un système de marque Shimadzu composé de deux pompes LC-10AS, d'un détecteur UV SPD-10A à deux longueurs d'onde et d'un module de contrôle SCL-10A vp . Le tout est piloté via le logiciel LC solutions. Un dégazeur Alltech est placé entre les flacons de solvant et les pompes, afin d'éviter les perturbations dans la détection, provoquées par la présence de bulles d'air dans la phase mobile. Un four est utilisé pour limiter les variations de conditions d'analyse dues à un changement de température dans la pièce.

Nous avons travaillé avec plusieurs colonnes, toutes de type C18 (phase inverse), c'est-à-dire rendues hydrophobes par greffage de résidus octadécyls sur les groupes silanols.

Que ce soit pour des analyses isocratiques (composition du mélange identique pendant toute l'analyse) ou en gradient, nous avons toujours travaillé avec des mélanges méthanol/eau ou acétonitrile/eau, éventuellement acidifiés.

Pour l'analyse des extraits et des fractions de *Lippia alba*, nous avons principalement utilisé un gradient inspiré de celui utilisé dans la monographie proposée pour la verveine odorante

dans la Pharmacopée Française (Pharmeuropa 2004). La colonne est une Supelco Discovery RP-18 (25 cm × 4,6 mm, 5 µm). Les deux solvants sont une solution d'acide orthophosphorique à 0,3 % dans l'eau d'une part et l'acétonitrile d'autre part. Le débit est de 1 ml/min et la température est de 40°C. Le gradient est détaillé dans le tableau 43. Le volume d'injection est de 20 µl.

Tableau 43. Gradient majoritairement utilisé pour l'analyse en CLHP des extraits, fractions et produits purs de *Lippia alba*.

Intervalle (min)	Acétonitrile (%)
0-20	7→17
20-30	17
30-45	17→25
45-60	25→40
60-65	40→10
65-70	10

La chaîne de CLHP a occasionnellement été utilisée à des fins semi-préparatives (purification de faibles quantités de produits). Pour cela, une colonne Supelco Discovery RP-18 (25 cm × 10 mm, 5 µm) et une boucle d'injection de 500 µl ont été utilisées.

4.3.3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Cette technique est principalement utilisée pour l'analyse ou l'isolement de substances volatiles ou de molécules telles que les acides gras, qui peuvent être rendus volatiles par dérivatisation et sont mieux séparées par cette technique. La spécificité de la CPG est l'inertie de la phase mobile (hydrogène, azote ou hélium), qui ne joue le rôle que de vecteur. La séparation dépend donc uniquement des interactions entre analytes et phase stationnaire. Des gradients sont possibles (et même de règle), mais il s'agit ici de gradients de température. Les colonnes aujourd'hui toutes capillaires, sont plus ou moins polaires.

Les analyses des huiles essentielles de *Lippia alba* ont été réalisées sur un appareil Trace GC Ultra (Thermo Electron Corporation), à détection par FID (*flame ionization Detection*), avec

injecteur split/splitless, piloté par le logiciel Chrom-card. Nous avons travaillé en mode splitless. On a utilisé une colonne apolaire DB1 (JW) (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) (100% diméthylpolysiloxane). Le gaz vecteur était l'azote (1 ml/min). La température d'injection était de 250°C et celle de détection de 285°C. Le gradient utilisé est détaillé dans le tableau 44. Le type de profil chromatographique obtenu est présenté dans la figure 151.

Tableau 44. Gradient utilisé pour l'analyse en CPG des huiles essentielles de différents lots de *Lippia alba*.

Intervalle (min)	température
0-5	40
5-85	40→200
85-87	200

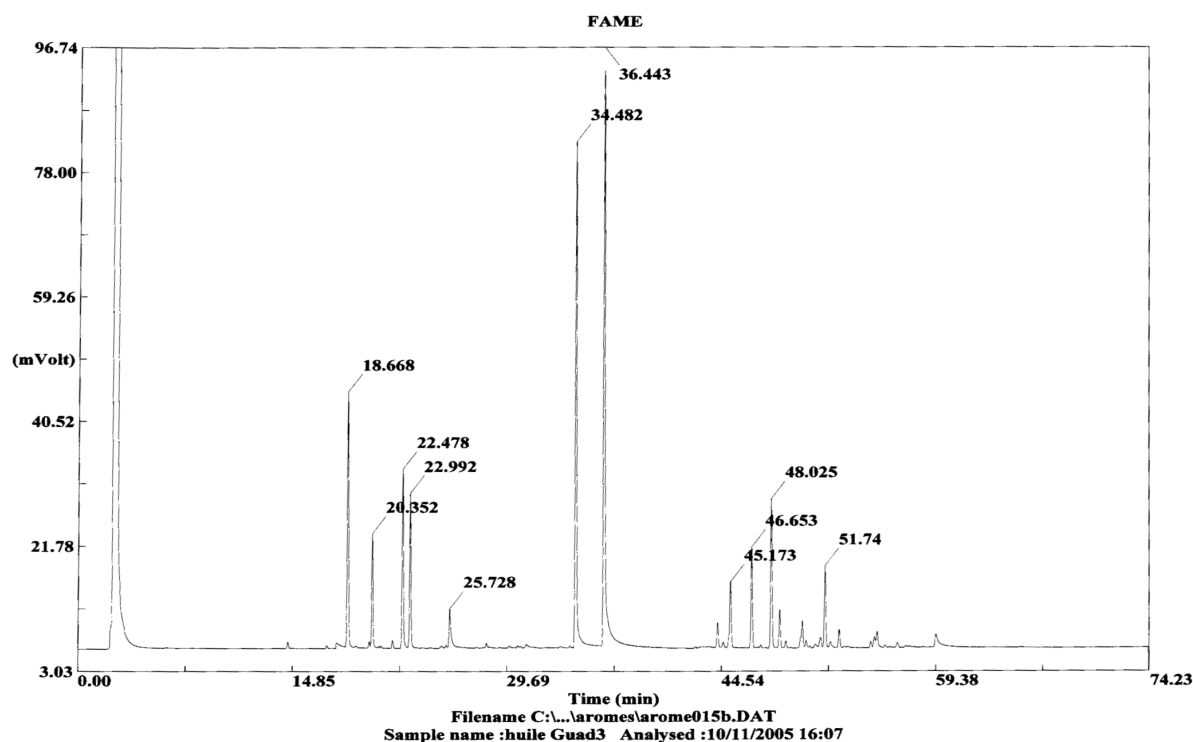


Fig.151. Chromatogramme de l'huile essentielle du lot de plante de Gourbeyre (Guadeloupe) avec le gradient de température utilisé.

4.4. Techniques préparatives de séparation

4.4.1. Chromatographie liquide à basse pression

Cette technique apporte un compromis acceptable pour tout laboratoire entre efficacité et coût de réalisation. Elle ne nécessite aucun matériel dispendieux et, si le temps de réalisation est assez long, elle offre l'avantage, par rapport à la CCM préparative, d'être moins répétitive, plus facilement utilisable pour des masses importantes de produit et accessible à certaines petites automatisations.

Voici les principales caractéristiques de cette technique :

- La colonne est fixée verticalement et la progression de la phase mobile à travers la phase stationnaire est assurée par la pression atmosphérique ou par un léger flux d'azote (maximum 300 mbars).
- La colonne est en verre
- Les pressions étant beaucoup plus faibles qu'en CLHP, il est logique qu'on doive utiliser une granulométrie de phase stationnaire beaucoup moins fine, ce qui nuit forcément à la résolution. En revanche cette qualité étant beaucoup moins chère, on peut se permettre de ne pas réutiliser la phase stationnaire plusieurs fois : cette technique est donc particulièrement précieuse pour des séparations grossières d'extraits qui peuvent définitivement encrasser une colonne
- On peut brancher un collecteur de fractions et/ou un détecteur UV à la sortie de la colonne

En pratique, la colonne est conditionnée manuellement. La phase stationnaire est mise en suspension dans l'éluant de départ et versée en plusieurs fois jusqu'à stabilisation au niveau désiré. L'échantillon à fractionner est soit dissout dans le phase mobile (s'il y est soluble), soit adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 2-3 fois sa masse, puis déposé soigneusement à la surface du gel de silice. Si l'introduction liquide est choisie, l'échantillon doit bien entendu pénétrer dans la colonne avant tout ajout de solvant.

Cette technique s'est avérée très utile pour le dégrossissage d'extrait (Silicagel 60 Merck) et l'isolement de molécules apolaires (Silicagel 60H Merck). Son utilisation est limitée pour des produits très polaires à cause de la tendance qu'ont certains types de molécules de s'adsorber ou de traîner dessus. Le méthanol et surtout l'eau ne peuvent pas être utilisés en trop grande concentration dans la phase mobile, sous peine de dissoudre une partie de la silice.

Nous avons utilisé pour ce travail des mélanges de solvants neutres tels que ceux présentés dans la partie consacrée à la CCM. En effet les conditions d'élution sont généralement fixées par cette technique : on s'efforce d'obtenir une bonne séparation des produits pour un R_f d'environ 0,3.

4.4.2. Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP)

Comme son nom l'indique, cette technique est à mi-chemin entre la basse et la haute pression. Un dispositif de CLMP reprend en fait toute l'organisation d'une chaîne de CLHP (système d'introduction de l'échantillon, progression de la phase mobile assurée par une ou plusieurs pompes, possibilité de programmer un gradient...) mais on travaille à des pressions inférieures (maximum 50 bars). La perte de résolution est assez modérée et le résultat est généralement très satisfaisant.

Nous avons utilisé pour ce travail un système Büchi composé d'une pompe C-605 et d'un contrôleur de pression C-615. Les colonnes, d'une longueur de 460 mm et d'un diamètre interne de 15, 25 ou 35 mm ont été conditionnées selon la procédure standard du constructeur avec de la silice RP-18 15-25 μm ou 25-40 μm (Merck). Une pré-colonne était parfois utilisée. L'élution était réalisée par des mélanges méthanol/eau (le plus souvent) ou acétonitrile/eau.

4.4.3. Filtration sur gel

La filtration sur gel, ou chromatographie d'exclusion, repose sur la séparation de constituants en mélange en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure spatiale. La colonne est remplie d'un gel constitué de billes de polymère. Cette technique a été initialement développée pour des séparations en chimie des polymères et le principe en était simple : plus la molécule est grosse et plus elle est éluée rapidement (elle « tombe » à travers le gel), plus elle est petite et plus elle sera ralentie par l'entrelacs des fibres de la phase stationnaire. Ici la phase mobile ne joue donc que le rôle de véhicule. En pratique, il semblerait que dans le cas de la séparation de petites molécules, on ne puisse exclure l'existence d'interactions de type

adsorption – forces électrostatiques, et l'utilisation de gradients présente un réel intérêt (Hamilton 1977).

Le mélange à séparer est introduit par voie liquide et l'élution est assez rapide sans pression extérieure.

Nous utilisons un gel de dextran hydroxypropylé réticulé, le Sephadex LH-20 (Pharmacia) pour le dégrossissage d'extrait ou la purification de produits. Le Sephadex est très facilement réutilisable et est compatible avec l'utilisation de solvants organiques (le dichlorométhane est par exemple utilisable en mélange avec le méthanol s'il n'excède pas 50% du mélange). Il est utile pour éliminer les chlorophylles ou fractionner un extrait dans lequel des molécules de tailles très différentes sont présentes.

4.5. Méthodes physico-chimiques

4.5.1. Spectrophotométrie UV-visible

L'absorption moléculaire dans le spectre ultraviolet et visible dépend de la structure de la molécule. L'absorption d'énergie est quantifiée et résulte du passage des électrons d'orbitales de l'état fondamental vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieure. La structure particulière d'une molécule est liée à une absorption plus ou moins importante à chaque longueur d'onde observable (UV de 200 à 400 nm ; visible de 400 à 800 nm), ce qui peut se traduire par l'établissement d'un spectre d'absorption (voir tableau 33).

L'absorption dans le domaine du visible est courante et se traduit par une coloration de l'échantillon ; la spectrométrie UV se limite, elle, généralement aux systèmes conjugués. Cette sélectivité peut présenter un avantage : des groupes caractéristiques peuvent être reconnus dans des molécules de complexité très variable.

La spectrophotométrie UV-visible permettra donc :

- De reconnaître des groupements chimiques particuliers, surtout s'ils comportent des doubles liaisons, *a fortiori* conjuguées. L'interprétation d'un spectre ultraviolet est plus aisée que celle d'un spectre visible

- En mesurant, à une longueur d'onde précise (la longueur d'onde d'absorption maximale de la molécule ou du complexe qu'elle forme avec un réactif, λ_{max}), l'intensité de cette absorption (densité optique, DO) par rapport à un témoin de concentration connue, de déterminer la quantité de la molécule présente dans un échantillon.

Au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, nous utilisons un appareil Philips PU8720 UV-visible pour réaliser les spectres d'absorption des molécules isolées. Les mesures de densité optique sont réalisées au moyen d'un spectrophotomètre Hitachi U1100.

4.5.2. Spectrométrie de masse

Cette technique repose sur deux éléments fondamentaux :

- La possibilité, par différentes méthodes, de fragmenter une molécule en différents ions, positifs ou négatifs, de rapports m/z (masse/nombre de charges élémentaires) différents ; le lieu de fragmentation s'appelle la source et de son type dépend l'interprétation des résultats ;
- La détection de ces fragments. Là encore, différentes techniques existent (déflexion par champ magnétique, filtre de masse quadripolaire, trappe ionique, temps de vol) mais leur nature influe essentiellement sur la précision des résultats.

Chaque molécule peut être caractérisée par un profil de fragmentation pour une technique de fragmentation donnée. De plus, il est possible qu'il se forme un ion moléculaire (M^+ , par exemple) ou pseudomoléculaire ($[M+H]^+$), indiquant la masse de la molécule étudiée. La figure 152 montre l'exemple du spectre du toluène par impact électronique, où l'on observe essentiellement l'ion moléculaire à m/z 92 et le fragment issu de la perte d'un hydrogène à m/z 91.

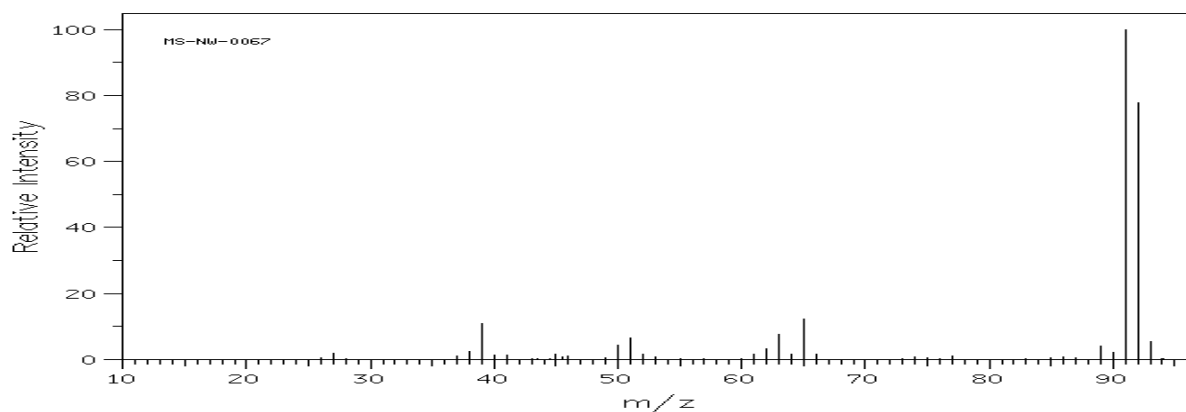


Fig.152. Spectre de masse du toluène par technique d'impact électronique (75 eV) (SDBS)

Nous avons utilisé plusieurs techniques d'ionisation :

- L'impact électronique (SM-IE) : la molécule est bombardée par un flux d'électrons émis par un filament auquel est appliquée une énergie variable (généralement 70 eV) ;
- L'ionisation chimique (SM-IC) : un gaz sous pression (ammoniac, méthane) est utilisé pour générer des ions positifs. Cette technique permet de détecter plus facilement l'ion moléculaire, qui est d'ailleurs souvent très majoritaire.

Ces deux techniques ont souvent été utilisées ensemble en première intention, à l'aide d'un spectromètre 55Q710 Finnigan mat, au Centre Universitaire de Mesure et D'Analyse (CUMA). Elles donnent les meilleurs résultats pour le diterpène, mais sont trop brutales pour les iridoïdes et les polyphénols. Il existe néanmoins, en cas d'indisponibilité d'une autre méthode, une possibilité de réaliser le spectre de masse d'un iridoïde par ionisation chimique, s'il est préalablement peracétylé (Bailleul 1980).

- *L'electrospray-ionspray* (SM-ESI) : La solution contenant la substance à analyser est introduite dans la source *via* un capillaire à la sortie duquel un champ électrique intense est appliqué, ce qui entraîne en nébulisation de la solution à pression atmosphérique. Les gouttelettes produites dans ces conditions sont hautement chargées, et les charges sont déterminées par la polarité du champ appliqué sur le capillaire. Ce processus, appelé *electrospray* peut être assisté par un flux coaxial de gaz nébulisant. Cette variante, appelée *ionspray*, permet de prendre en charge des débits d'introduction d'échantillon supérieurs. La désolvatation des gouttelettes est assurée par un flux d'azote chaud à contre-courant (fig.153) (Montaudo 2002). Cette technique, développée pour les polymères, est particulièrement utile pour les

molécules de masse moléculaire élevée (>500 Da), notamment les polyphénols. L'ion moléculaire n'est pas observé, mais on détecte des adduits classiques ($[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$). Nous avons utilisé, pour plusieurs produits, un spectromètre API3000 (Perkin-Elmer Sciex) à triple quadripôle au Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse de l'Université de Lille 2. Cet appareil permet en outre d'utiliser le mode SM-SM (ou SM^2), qui consiste en la refragmentation de fragments sélectionnés, pour une analyse plus fine (ce procédé permet par exemple de cibler une masse intéressante en cas de doute sur la pureté du produit analysé).

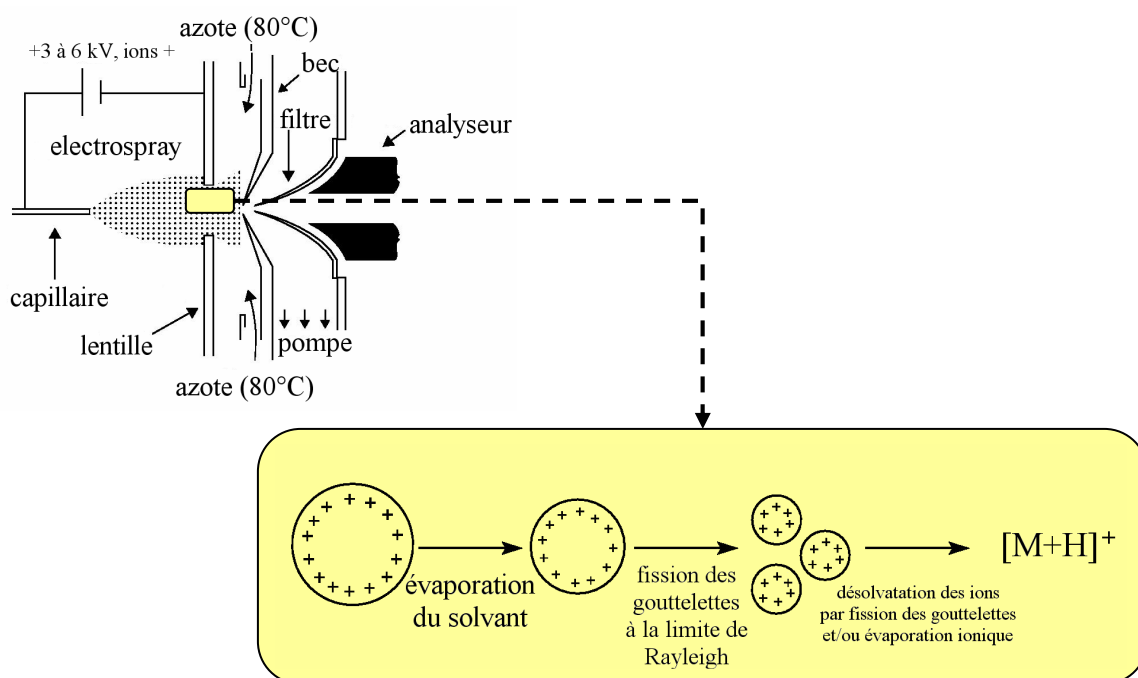


Fig.153. Représentation schématique d'une source ESI et formation des ions à partir des gouttelettes du nébulisat (adapté et traduit de Montaudo 2002).

La détection a toujours été faite en mode positif.

Deux techniques basées sur la spectrométrie de masse ont été utilisées. Il s'agit de techniques chromatographiques couplées à des détecteurs par spectrométrie de masse. L'appareillage et les objectifs de ces techniques étant plus ou moins différents de ceux de la SM ou des dites techniques de séparation seules, nous les évoquons ici :

4.5.2.1. Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM)

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse (SM) combine les avantages de ces deux techniques (haute sélectivité et informations structurales). Généralement, on utilise des montages en série CLHP/UV/SM, qui permettent d'obtenir simultanément deux types d'informations spectrales. Ainsi, cette technique peut renseigner efficacement sur la pureté d'un produit et évite au maximum le parasitage des résultats par des contaminants quelconques. En outre, ce système peut être utilisé avec les mêmes objectifs qu'un spectromètre de masse conventionnel.

Pour le présent travail, les analyses CLHP/UV/SM ont été menées au Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA), sur un système ThermoElectron à détection UV par barette de photodiodes et spectromètre de masse Surveyor MSQ. La fragmentation a été obtenue par deux types de sources, reposant sur des modes d'ionisation différents :

- APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*) – type d'ionisation chimique réalisée à pression atmosphérique, un peu moins brutale que la méthode initiale. L'ion moléculaire M^+ peut être détecté
- ESI (quadripolaire) – En plus des adduits décrits plus hauts, on peut détecter des ions $[M+CH_3CN]^+$, en raison de l'utilisation fréquente d'acétonitrile dans le mélange d'élution du système de CLHP.

4.5.2.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

Cette technique a été utilisée en plus de la CPG classique pour l'analyse de la composition des huiles essentielles de *Lippia alba*. Elle permet d'obtenir à la fois les temps de rétention des constituants volatils de l'échantillon pour un programme donné et leurs spectres de masse. Les systèmes modernes sont par ailleurs généralement pilotés par un logiciel, qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés. La coélution avec des témoins authentiques en CPG peut permettre de confirmer une proposition de structure.

Nous avons travaillé, à l'Institut des Sciences de l'Agriculture (ISA) de Lille, sur un appareil de CPG Varian CP8400, fonctionnant avec un passeur d'échantillons CP3800. Le spectromètre de masse était un Saturn 2000 MS/MS. Nous avons travaillé sous le logiciel Varian WS. La colonne était une VF-5ms (Varian) (greffée 5% phényl 95% diméthylpolysiloxane). Les bibliothèques consultées pour les spectres de masse étaient NIST MAINLIB et replib (fig.154). Les indices de Kovats des composés ont été déterminés avec cet appareillage à l'aide d'une série d'alcane linéaires (de 9 à 16 carbones), injectés en mélange avec les échantillons d'huiles essentielles. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus sur des colonnes de même type dans la littérature (95% diméthylpolysiloxane, 5% phénylméthylpolysiloxane : DB5, HP5, HP5ms, CP-Sil 8 CB).

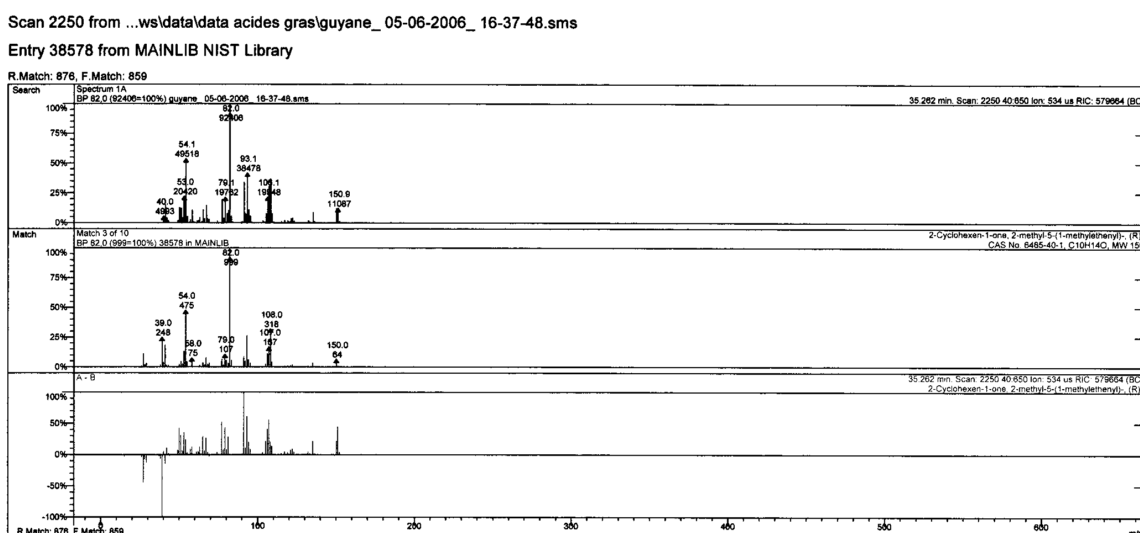


Fig.154. Comparaison, dans Varian WS, du spectre de masse d'un composé de l'huile essentielle de Cayenne (Guyane) avec celui, issu de MAINLIB, d'une des molécules proposées par le programme (la carvone)

4.5.3. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire repose sur la propriété qu'ont certains atomes, possédant un moment de spin I non nul (c'est-à-dire un nombre de masse A et/ou un numéro atomique Z impairs), de pouvoir prendre plusieurs orientations bien définies, auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts, quand ils sont placés dans un champ magnétique B_0 . En pratique, les atomes les plus faciles à étudier sont ceux possédant

un moment de spin $I=1/2$, or la plupart des atomes couramment retrouvés dans des molécules, qu'elles soient d'origine chimique ou naturelle ont au moins un isotope qui se trouve dans ce cas de figure (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{19}F ...). L'orientation de ces atomes peut être modifiée par leur soumission à une radiation électromagnétique supplémentaire, dans le domaine des radiofréquences ($\lambda=3.10^7$ à 10^{11} nm, contre 10 à 800 pour le domaine UV-visible), et la mesure de la fréquence de précession autour de B_0 lors du retour à la position d'équilibre sera différente en fonction de l'environnement moléculaire précis de chaque atome.

En phytochimie, les deux atomes les plus étudiés sont l'hydrogène (proton) ^1H et le carbone 13, ^{13}C . Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées.

4.5.3.1. RMN du ^1H

La réalisation d'un spectre de RMN du ^1H est une étape fondamentale dans la détermination structurale d'une molécule. De plus, elle ne nécessite que quelques minutes, depuis l'avènement de la RMN à transformée de Fourier.

En RMN du ^1H , trois informations sont importantes :

- Le déplacement chimique (δ) : c'est une fréquence exprimable en Hz, qui est en pratique toujours présentée sous la forme d'une échelle de ppm (rapport de la fréquence de résonance sur celle du champ magnétique B_0), qui a l'avantage d'être la même quelle que soit la puissance de l'appareil. Elle donne une indication sur la nature des groupements chimiques présents. Par exemple, dans la molécule de toluène, un groupement méthyle ne résonne pas à la même fréquence que le cycle aromatique qu'il substitue (fig.155) (Canet 2002).

En fonction de la force du champ magnétique B_0 , qui est synonyme de puissance de l'appareil, on peut distinguer plus ou moins finement des différences de δ infimes. Par exemple, on n'observe que deux pics, dans le spectre de la figure 155, alors que quatre types de protons sont présents dans la molécule de toluène.

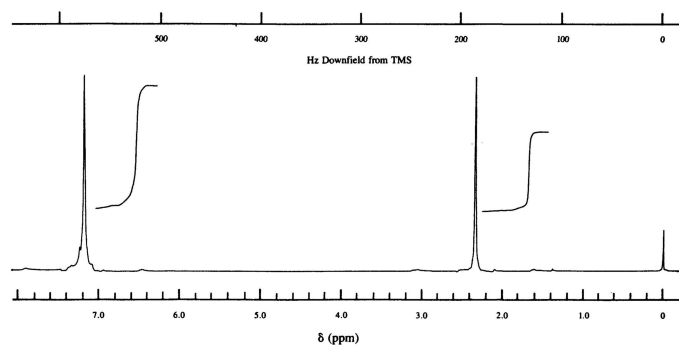


Fig.155. Spectre de RMN du ^1H du toluène enregistré à 80 MHz. En haut fréquence de résonance en Hz, en bas échelle conventionnelle exprimée en ppm (Macomber 1998).

- L'intégration : l'aire sous la courbe de chaque pic est proportionnelle au nombre d'atomes d'hydrogène équivalents concernés. Par exemple, dans la figure 155, la surface du pic à δ 2,4 représente $3/8^{\text{èmes}}$ (trois protons sur huit) de la surface totale des deux pics. La prise en compte de l'intégration nécessite souvent la connaissance de la masse totale de la molécule (cf. spectrométrie de masse).
- Le couplage : chaque proton est couplé avec ses voisins immédiats non équivalents dans la molécule. Ceci se traduit par un changement de forme des signaux observés. Le signal d'un proton indique le nombre de protons avec lesquels il est couplé ($n+1$ raies pour n voisins) et peut même donner des renseignements d'ordre structural, *via* l'écartement de ces raies, mesuré en Hz et appelé constante de couplage (J).

4.5.3.2. RMN du ^{13}C

L'isotope ^{13}C ne représente qu'1% des atomes de carbone existant. La sensibilité de cette expérience n'est donc pas excellente, ce qui oblige à multiplier le nombre des expériences (*scans*) sur plusieurs heures afin d'obtenir un spectre de bonne qualité. Ceci est particulièrement handicapant pour les substances naturelles qui sont souvent isolées en faible quantité par rapport aux produits de la chimie de synthèse. En revanche, la résolution obtenue est très supérieure à celle des spectres du ^1H , pour un même appareil : les déplacements chimiques s'échelonnent généralement sur plus de 200 ppm, contre 10 ou 15 pour le proton ! Il existe des couplages en RMN du ^{13}C , mais on utilise aujourd'hui majoritairement des expériences dites « ^1H -découplées », qui permettent un gain appréciable de sensibilité.

Plusieurs expériences permettent, au moyen de séquences d'impulsions particulières de conserver une partie des informations qu'aurait apportées le couplage ^1H - ^{13}C , tout en bénéficiant du gain de sensibilité procuré par le découplage. Il s'agit d'expériences de spin-écho J -modulé (APT : *Attached Proton Test* encore appelé *jmod*) pouvant impliquer un transfert de polarisation (DEPT : *Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer*). Nous avons toujours utilisé le *jmod* pour ce travail. Il permet la différenciation dans le spectre des pics correspondant à des carbones portant un nombre pair d'hydrogènes (secondaires ou quaternaires) de ceux correspondant à des carbones portant un nombre impair d'hydrogènes (primaires ou tertiaires).

4.5.3.3. RMN bidimensionnelle

Certaines techniques permettent la visualisation, sous forme de carte, des corrélations existant entre différents signaux, qu'ils appartiennent au même spectre ou non. Des tâches, qui sont en fait une vue « de dessus », sous la forme de courbes de niveau, des pics de corrélation, matérialisent l'existence d'un lien quelconque entre deux atomes (liaison chimique, proximité dans l'espace...). Les spectres monodimensionnels concernés peuvent, pour une lecture plus facile, être reportés sur les axes des abscisses et des ordonnées.

Plusieurs expériences ont été utilisées (Croasmun 1987, Lambert 2003) :

- COSY (*CORrelation SpectroscopY*) : visualisation du voisinage immédiat des atomes d'hydrogène, par interactions scalaires (à travers les liaisons chimiques). L'intérêt n'est pas énorme *a priori* par rapport au simple spectre du ^1H , mais il apporte un gain certain de clarté et permet de distinguer différents signaux dans un massif pour les attribuer précisément.
- TOCSY (*Total Correlation SpectroscopY*) : indique, en plus des voisins immédiats, les voisins plus éloignés... ce qui permet de reconstituer plus facilement l'enchaînement des protons sur le squelette carboné.
- ROESY (*Rotational nuclear Overhauser Effect SpectroscopY*) : met en évidence les interactions dipolaires de deux atomes hydrogènes. C'est donc une technique intéressante en terme de stéréochimie.
- HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) : indique quel proton est directement lié à quel carbone.
- HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) : montre la corrélation entre un atome de carbone et un proton situés à plusieurs liaisons de distance (typiquement

trois). Cette technique complète très bien le COSY pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule.

Les spectres de RMN présentés ou évoqués dans ce mémoire ont été réalisés sur des spectromètres Bruker Avance 300 ou 500 au Laboratoire d'Application de RMN (LARMN) de l'Université de Lille 2 et traités principalement avec les logiciels Topspin (Bruker) et MestReC (Mestrelab Research).

4.5.4. Spectrométrie infrarouge

Les radiations infrarouges se situent dans la partie du spectre électromagnétique comprise entre la région visible et celle des micro-ondes. La région la plus utile pour l'analyse de molécules organiques est celle située entre 4000 et 400 cm^{-1} . L'absorption de ces radiations par un composé provoque une variation de l'énergie de rotation et de vibration des liaisons chimiques de ce composé, qui peut être détectée (détecteur à thermocouple). On observe ainsi au niveau du spectre une série de bandes rotato-vibratoires dont le nombre d'onde $\bar{\nu}$, inverse d'une longueur d'onde et exprimé en cm^{-1} , dépend des masses relatives des atomes, de la constante de force des liaisons ainsi que de la géométrie des atomes. Le spectre du toluène est donné en guise d'exemple dans la figure 156.

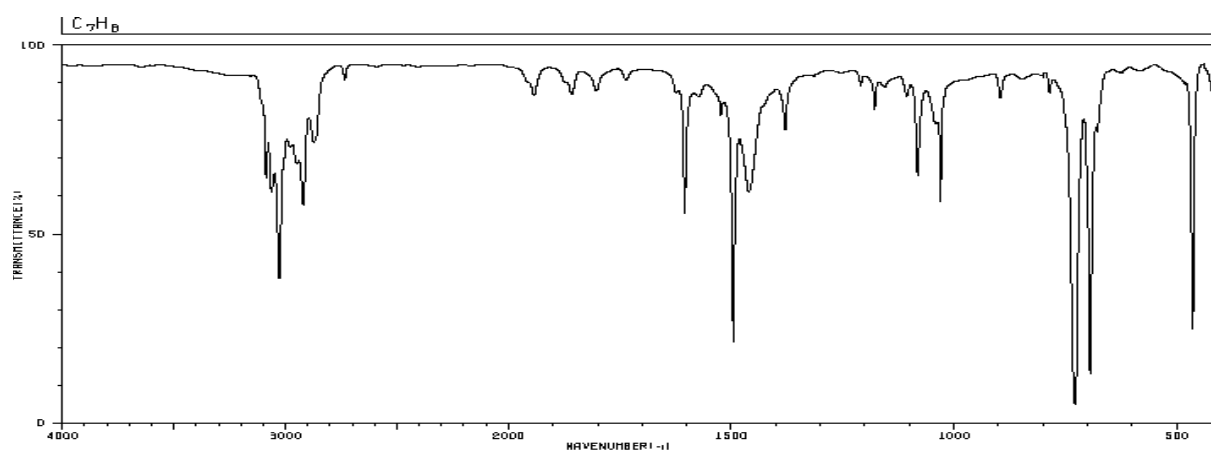


Fig.156. Spectre infrarouge (film liquide) du toluène (SDBS)

Les appareils anciens, à monochromateur, procèdent par balayage et enregistrements successifs dans la gamme de nombres d'onde à analyser. Les systèmes plus récents sont des spectromètres infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), où la gamme complète des radiations passe simultanément à travers l'échantillon. Le résultat est un interférogramme, qui est converti mathématiquement en spectre classique infrarouge. Cette technique permet à la fois un temps d'analyse court, une excellente résolution et l'obtention de résultats faciles à traiter (Silverstein 1998). Elle peut également permettre de travailler sur des quantités plus restreintes de produit.

L'appareil utilisé pour ce travail est un Thermo Nicolet Avatar 320 FT-IR.

4.6. Méthodes chimiques de criblage

4.6.1. Réactifs de révélation chimique sur CCM

L'utilisation de réactifs chimiques en solution, vaporisés sur les plaques de chromatographie sur couche mince après élution, permet l'obtention de renseignements supplémentaires sur l'appartenance d'une molécule à tel ou tel groupe phytochimique. Elles complètent les observations faites en lumière du jour ou sous lampe ultraviolette à 254 nm (fluorescence ou, sur plaque traitée, extinction de la fluorescence) et 366 nm (fluorescence assez spécifique des systèmes insaturés conjugués) et peuvent éventuellement permettre de localiser certains composés, invisibles sans dérivatisation chimique (c'est le cas du diterpène isolé lors de ce travail).

L'utilisation d'un réactif polyvalent est particulièrement adaptée pour réunir rationnellement les fractions primaires récoltées suite à une séparation préparative ou semi-préparative.

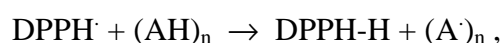
Le tableau 45 présente les différents réactifs chimiques pour CCM utilisés dans ce travail.

Tableau 45. Réactifs chimiques pour la révélation des CCM.

Réactif	Substances révélées	Mode d'utilisation
vanilline sulfurique (Godin 1954)	réactif polyvalent	Mélanger en parts égales une solution éthanolique de vanilline à 1% et une solution aqueuse d'acide perchlorique à 3%. Vaporiser le mélange sur la plaque, puis une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10%. Après chauffage intense, les composés organiques apparaissent sous forme de taches colorées en lumière du jour.
anisaldéhyde (Deleu-Quettier 2000)	réactif polyvalent	Préparer une solution de p-anisaldéhyde à 0,5% dans un mélange CH ₃ OH/AcOH/H ₂ SO ₄ (85:10:5). Pulvériser sur la plaque. Après chauffage intense, les composés organiques apparaissent sous forme de taches colorées en lumière du jour.
Dragendorff modifié selon Munier (Randerath 1971)	alcaloïdes	Mélanger un volume d'une solution de 17 g de sou-nitrate de bismuth et de 200 g d'acid etartrique dans 800 ml d'eau et un volume d'une solution de 160 g d'iodure de potassium dans 400 ml d'eau. Diluer extemporanément 50 ml de cette solution mère dans 500 ml d'eau et y dissoudre 100 g d'acide tartrique. Pulvériser sur la plaque.
Phtalate d'aniline (Harborne 1998)	oses	Préparer une solution d'aniline à 1% (v/v) dans un mélange <i>n</i> -BuOH/Et ₂ O/H ₂ O (49:49:2). Ajouter 1,5% d'acide phtalique (m/v). Pulvériser sur la plaque. Après chauffage intense, les oses apparaissent sous forme de taches colorées en lumière du jour.
Perchlorure de fer (Wagner 1983)	polyphénols	Préparer une solution de FeCl ₃ à 10% dans un mélange CH ₃ OH-H ₂ O (1:1) et la vaporiser sur la plaque. Les polyphénols apparaissent sous forme de taches de couleur en lumière du jour.
Neu (Wagner 1983)	flavonoïdes	Préparer une solution de diphenylborate d'éthanolamine à 1% dans le méthanol et ajouter 5% de PEG 4000. Vaporiser sur la plaque. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes orange, jaunes, bleues et vertes à 366 nm.

4.6.2. Mise en évidence sur CCM de l'activité antiradicalaire sur le DPPH

Le DPPH (fig.157) est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm (fig.158) qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres (fig.159). Ainsi en chromatographie sur couche mince (CCM), les composés actifs sont visualisables sous la forme de taches jaunes sur fond violet. On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



où $(\text{AH})_n$ représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH $^\bullet$ (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H.

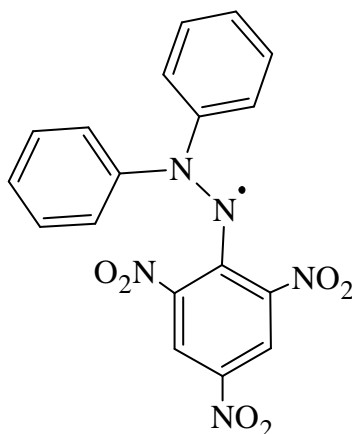


Fig.157. 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH)

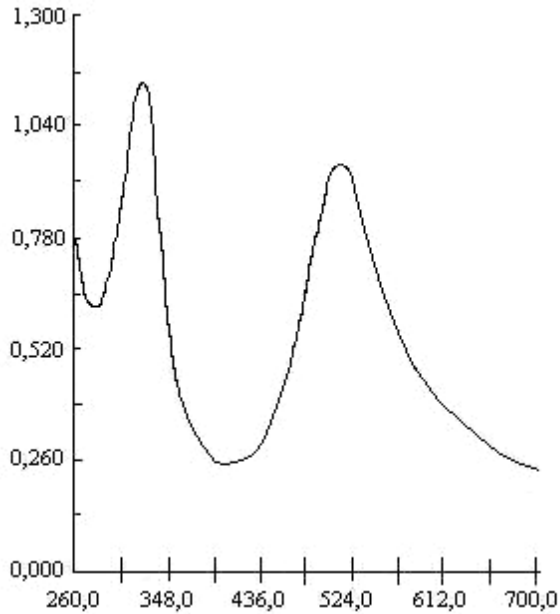


Fig.158. Spectre UV du DPPH sous forme radicalaire (DPPH[·])

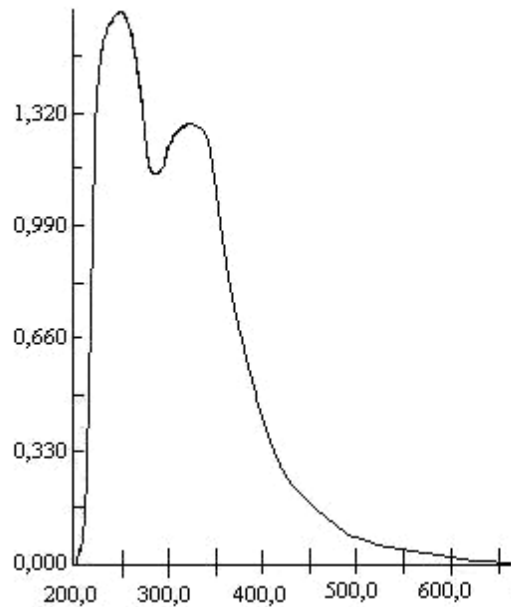


Fig.159. Spectre UV du DPPH après réduction par la rutine (DPPH-H)

Le DPPH est commercial, peu onéreux et ne nécessite qu'une mise en solution dans le méthanol pour être utilisé comme révélateur en CCM. Cette solution peut être stockée au congélateur pour des périodes assez longues sans diminution notable d'activité du radical.

Certaines substances réagissent immédiatement (acide caféique, quercétol) et d'autres plus lentement. Le temps optimal de réaction est de trente minutes à une heure, mais certains composés peuvent éventuellement devenir positifs après une nuit à l'obscurité (aloïne, émodine).

La détection des composés ayant une activité de capteurs de radicaux libres est réalisée par pulvérisation d'une solution de DPPH à 2 mg/ml dans le méthanol. Le DPPH utilisé pour ce travail a été fourni par Sigma Chemical.

4.7. Réactions chimiques simples

4.7.1. Acétylation

Le produit est dissout dans un mélange pyridine/anhydride acétique (1:1) et laissé 15 heures sous agitation à température ambiante. Le mélange est ensuite versé sur un peu de glace et le ballon utilisé pour la réaction est rincé à l'eau glacée. Le produit de l'acétylation est extrait trois fois par 10 ml de chloroforme. La solution chloroformique est lavée trois fois avec 10 ml d'une solution aqueuse de sulfate de cuivre (1 g/40 ml), 3 fois avec 30 ml de la même solution puis deux fois avec 10 ml d'eau. La phase organique est ensuite évaporée. Le dérivé peracétylé est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice 60H avec comme éluant l'éther (pour le composé **7**) ou un mélange $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (15:3:2) (pour le composé **8**).

4.7.2. Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide est réalisée en milieu sulfurique à chaud (H_2SO_4 N, chauffage à reflux pendant 1 heure). La solution est neutralisée après refroidissement par addition de carbonate de baryum. Après centrifugation de la suspension, le surnageant est distillé sous pression réduite jusqu'à siccité puis repris par un mélange $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1). La solution est comparée sur CCM bidimensionnelle de silice à des témoins authentiques également dissous dans le mélange $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Plusieurs solvants de migration sont utilisables. On utilise le phtalate d'aniline comme révélateur des sucres sur la plaque.

4.8. Mesure d'activité des composés isolés

4.8.1. Détermination de l'activité inhibitrice vis-à-vis du DPPH

Cet essai repose sur le même principe que le test de détection des composés antiradicaux sur CCM par le DPPH (voir plus haut), mais il permet ici une détermination quantitative de cette activité antiradicalaire.

Le test en solution s'effectue en mélangeant 10 ml d'une solution de DPPH à 10 mg/250 ml avec 100 μl du composé à tester à différentes concentrations (0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00

mg/ml) dans un solvant approprié. En effet, aucune différence n'a été détectée lorsque des mesures ont été effectuées sur des mêmes échantillons solubilisés dans différents solvants. Il est donc possible de dissoudre les composés aussi bien dans du DMSO que dans de l'eau, du méthanol ou du chloroforme sans qu'il y ait une quelconque influence du solvant. Les valeurs sont mesurées à 517 nm avec un spectrophotomètre, après une heure.

4.8.2. Détermination de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'anion-radical superoxyde

Pour chaque dosage 5 essais sont réalisés.

4.8.2.1. Dosage de l'anion-radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) : principe général

La quantité d' $O_2^{\cdot-}$ est mesurée en utilisant la réduction du cytochrome *c* (Cohen 1978) qui se traduit par un changement de coloration détecté au spectrophotomètre à 550 nm. La concentration de l'anion est calculée grâce au coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* réduit : $\epsilon_{550nm} = 21 \text{ nmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.8.2.2. Modèle acellulaire

Dans le modèle acellulaire, l' $O_2^{\cdot-}$ est produit par le système enzymatique hypoxanthine-xanthine oxydase (Aruoma 1989). Les tubes de dosage et de référence contiennent 50 μl d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) (30 mM), 5 μl d'hypoxanthine (30 mM) dans KOH (50 mM), 50 μl de cytochrome *c* (0,5 mM) et 100 μl de concentrations croissantes d'extrait de plante dans un volume final de 1,5 ml tamponné par KH_2PO_4 -KOH (50 mM) pH 7,4 (cf. tableau 46). Après 3 minutes à température ambiante, la réaction est initialisée en ajoutant 100 μl de xanthine oxydase (1 U/ml) uniquement dans les tubes de dosage. L'absorbance des solutions de dosage est mesurée contre celle des tubes de référence, qui ne contiennent ni hypoxanthine, ni xanthine oxydase, exactement cinq minutes plus tard.

Tableau 46. Volumes (μl) des réactifs utilisés pour le dosage de l'anion-radical superoxyde en modèle acellulaire (tubes 3 et 4 à multiplier par le nombre de concentrations en médicament).

Tubes	$\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$	hypoxanthine	composé	EDTA	cytochrome <i>c</i>	xanthine oxydase
1	1400	-	-	50	50	-
2	1295	5	-	50	50	100
3	1250	-	150	50	50	-
4	1145	5	150	50	50	100

4.8.2.3. Modèle cellulaire

Préparation des granulocytes neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles sont obtenus à partir de sang frais anticoagulé de patients, fourni par le service de biochimie de l'Hôpital Cardiologique du CHRU de Lille. 15 ml sont collectés dans un tube gradué conique de 50 ml.

Les granulocytes neutrophiles (GN) sont isolés progressivement par gradient de densité.

Le sang est dilué au demi dans un tampon Na_2HPO_4 (PBS) 0,1M, pH 7,4. A l'aide d'une seringue, on dépose délicatement 10 ml d'Histopaque au fond du tube, puis on centrifuge à 1500 t/min à température ambiante. On obtient trois « phases » : le plasma, l'Histopaque et (au fond) les globules rouges. Les GN se trouvent à l'interface entre Histopaque et érythrocytes (un film blanchâtre est visible). On aspire donc doucement à l'aide d'une pipette le plasma (dont 10 ml sont conservés) et l'Histopaque.

On procède ensuite à l'hémolyse :

Le culot sanguin est complété à 16 ml par le plasma précédemment mis de côté, puis à 40 ml par une solution de chlorure d'ammonium isotonique (NH_4Cl 0,15 M, NaHCO_3 10 mM) pH 7,4. Après agitation (par retournement), le liquide est réparti en deux tubes qui sont tous deux complétés à 40 ml avec le chlorure d'ammonium. Les deux tubes sont placés dans la glace, avec agitation périodique, jusqu'à hémolyse. Après 12 minutes dans l'eau glacée, on centrifuge 10 minutes à 1500 t/min à 4°C.

On élimine ensuite les surnageants et les culots sont lavés deux fois avec 10 ml de Hank's HEPES (HH, mélange 10 ml/100ml).

La dernière phase consiste en une numération des GN (afin de réaliser la dilution appropriée au dosage) et un test de vitalité :

Dans un tube à hémolyse, 0,3 ml de suspension cellulaire sont mélangés à 0,3 ml d'une solution de bleu trypan (0,4 % dans de l'eau physiologique). On incube 10 min à 37°C. Une numération des GN colorés et non colorés est réalisée sur cellule de Thoma. Le pourcentage de GN ne prenant pas la coloration du bleu Trypan correspond au pourcentage de vitalité cellulaire. On utilise les GN ainsi préparés si 95% des cellules obtenues sont bien des GN et que 95% des GN sont viables.

Détermination de l'inhibition de la production de superoxyde

Les GN sont pré-incubés 15 minutes avec les différentes concentrations de la substance à tester. Puis on incube 15 minutes à 37°C avec le cytochrome *c* et le PMA (4β-phorbol-12-myristate-13-acétate), qui est l'activateur de la production du superoxyde par les GN (il agit au niveau de la protéine kinase C). Dans les tubes de référence (sans superoxyde), on utilise la superoxyde dismutase (SOD) pour qu'une production basale variable d'O₂⁻ n'interfère pas avec le dosage (voir tableau 47 pour les quantités de réactifs).

Tableau 47. Concentrations et volumes (μl) des différents réactifs utilisés pour le dosage de l'anion radical superoxyde en modèle cellulaire (tubes 5 et 6 à multiplier par le nombre de concentrations en médicament).

Tubes	HH pH 7,4	GN 2,5.10⁶/ml	composé	PMA 160 nM	SOD 2500 U/ml	cytochrome <i>c</i> 2 mg/ml
1	400	400	-	-	100	100
2	500	400	-	-	-	100
3	800	400	-	100	100	100
4	400	400	-	100	-	100
5	700	400	100	100	100	100
6	300	400	100	100	-	100

Après l'incubation, on centrifuge 5 minutes à 2500 t/min puis on lit les DO à 550 nm.

4.8.3. Test d'inhibition de l'oxydation des LDL

4.8.3.1. Principe

Lors de l'oxydation des LDL, les acides gras polyinsaturés sont peroxydés et les chaînes carbonées subissent un réarrangement moléculaire. Ce réarrangement conduit à la formation de diènes conjugués dont l'absorbance peut être mesurée en spectrophotométrie UV à 234 nm. L'oxydation des LDL est initiée avec du cuivre et, sur les composés testés, un effet antioxydant est recherché.

La cinétique d'apparition des diènes est particulière et trois phases sont dégagées :

- une phase de latence (résistance à l'attaque radicalaire due aux antioxydants endogènes des LDL),
- une phase de propagation (formation des diènes jusqu'à une quantité maximale),
- une phase de dégradation (dégradation des diènes).

Lorsqu'un composé est antioxydant, il provoque alors un allongement de la phase de latence. Il se forme très peu de diènes d'où une faible augmentation de l'absorbance.

4.8.3.2. Mode opératoire

L'isolement des LDL est réalisé à partir d'une poche de plasma normolipémique de 240 ml, obtenue au Centre Régional de Transfusion Sanguine. Les LDL sont protégées de l'oxydation par addition du réactif d'Alaupovic (glutathion, acide caproïque, EDTA, chloramphénicol). Elles sont isolées par ultracentrifugation séquentielle à la densité : 1,030-1,053 par addition de KBr. La quantité de LDL isolée est déterminée par dosage des protéines selon la méthode de Peterson (1977). Elles sont conservées à +4°C en présence d'EDTA. Les résultats sont obtenus au moyen d'un spectrophotomètre SpectraMaxPlus thermorégulable avec lecture de microplaque 96 puits.

Avant toute oxydation, les LDL sont mises en dialyse contre du PBS (0,01 M) à +4°C sous agitation afin d'éliminer l'EDTA qui est utilisé pour « chélater » les traces de métaux libres dans les solutions tampons et éviter l'oxydation des LDL. Le bain de dialyse est changé trois fois au cours des 24 heures. Lorsque la dialyse est terminée, la concentration des LDL est ajustée de manière à obtenir 0,125 mg de protéines/ml de LDL. Une solution de cuivre 16,6

μM est préparée en diluant une solution mère 1,66 mM (420 mg de CuSO_4 dans 1 litre d'eau) dans 2 ml d'eau distillée. Des solutions mères à 1 mg/ml des produits à tester sont préparées dans le solvant approprié (eau, méthanol ou DMSO selon les produits). A partir de cette solution mère, une gamme de concentrations est réalisée dans du PBS 0,01 M pour chaque extrait.

La répartition dans les puits est établie comme suit :

- LDL + Cu (triplicat)
- LDL + Cu + gamme de concentration des produits (triplicat)

La formation des diènes conjugués est suivie à 234 nm à 30°C toutes les 10 minutes durant 10 heures sur un spectrophotomètre SpectraMaxPlus (Molecular Devices).

4.8.4. Approche de l'activité neurosédative par détermination de l'activité sur les récepteurs aux benzodiazépines et GABA_A

Des essais ont été réalisés afin de déterminer l'éventuelle activité agoniste de certains produits majoritaires de *Lippia alba* sur le récepteur aux benzodiazépines (BZD) et sur un sous-type de récepteur au GABA (acide γ -aminobutyrique), le récepteur GABA_A . Ces deux cibles ont été choisies car elles représentent des modes d'action assez classiques pour des médicaments inhibiteurs du système nerveux central. Les deux tests sont des essais de *binding* utilisant à chaque fois un radioligand agoniste spécifique du récepteur. Ils ont été réalisés par la société CEREP.

4.8.4.1. Récepteur central aux benzodiazépines

Cet essai est inspiré de celui proposé par Speth en 1979.

Des homogénats de membranes de cortex cérébral de rat (représentant 100 μg de protéines) sont incubés 60 minutes à 4°C avec du flunitrazépam (fig.160) tritié à la concentration de 0,4 nM, avec ou sans le composé à tester, dans un tampon Tris-HCl à 50 mM (pH 7,7).

Le binding non-spécifique est déterminé en présence de diazépam (fig.161) à 3 μM .

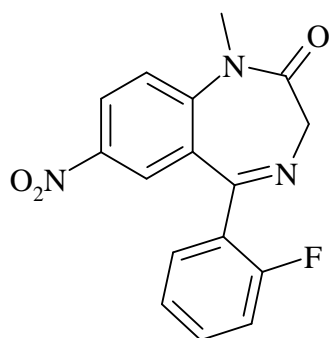


Fig.160. Flunitrazépam

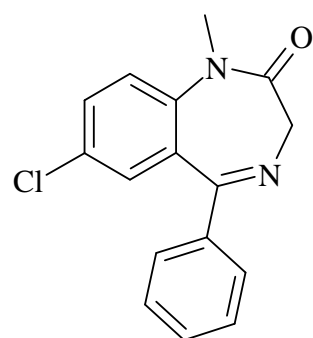


Fig.161. Diazépam

Après l'incubation, les échantillons sont rapidement filtrés sous vide au moyen de filtres en fibre de verre (GF/B, Packard) préalablement humidifiés par une solution de PEI (polyéthylèneimine) à 0,3% et rincés plusieurs fois par du tampon glacé Tris-HCl à 50 mM grâce à un collecteur de cellules à 96 puits (Unifilter, Packard). Les filtres sont séchés, puis leur radioactivité est mesurée dans un compteur de scintillation (Topcount, Packard) à l'aide d'un cocktail de scintillation (Microscint 0, Packard).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la fixation spécifique du radioligand agoniste de contrôle par le composé testé.

Le composé de référence standard est le diazépam, qui est testé à plusieurs concentrations dans chaque expérience pour obtenir une courbe de compétition à partir de laquelle sa CI_{50} (concentration inhibant 50% de la fixation du flunitrazépam) est calculée.

4.8.4.2. Récepteur humain GABA_A

Cet essai est inspiré de celui proposé par Snodgrass en 1978.

Des homogénats de membranes cellulaires de cortex cérébral de rat (500 µg de protéines) sont incubés pendant 10 minutes à 4°C avec une solution à 5nM de muscimol tritié (agoniste GABA_A marqué, fig.162), avec ou sans composé à tester, dans un tampon contenant 25 mM de Hepes/Tris (pH 7,0).

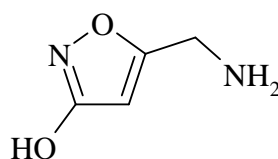


Fig.162. Muscimol

Le binding non-spécifique est déterminé en présence de muscimol à 10 μ M.

Après l'incubation, les échantillons sont rapidement filtrés sous vide au moyen de filtres en fibre de verre (Filtermat A, Wallac) préalablement humidifiés par une solution de PEI à 0,3% et rincés plusieurs fois par du tampon glacé Tris-HCl à 50 mM grâce à un collecteur de cellules à 48 puits (Mach II, Tomtec). Les filtres sont séchés, puis leur radioactivité est mesurée dans un compteur de scintillation (Betaplate 1204, Wallac) à l'aide d'un scintillateur solide (Meltilex B/HS, Wallac).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la fixation spécifique du radioligand agoniste de contrôle par le composé testé.

Le composé de référence standard est le muscimol, qui est testé à plusieurs concentrations dans chaque expérience pour obtenir une courbe de compétition à partir de laquelle sa CI_{50} est calculée.

Bibliographie

Abad, M.J., Bermejo, P., Villar, A., Sanchez Palomino, S., Carrasco, L. (1997). Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytother. Res.* **11**, 198-202.

Achenbach, H., Weibel, R., Raffelsberger, B., Addae-Mensah, I. (1981). Iridoid and other constituents of *Canthium subcordatum*. *Phytochemistry* **20**, 1591-1595.

Adams, C.D. (1972). Flowering plants of Jamaica. University of the West Indies. Glasgow University Press, Glasgow.

Agrawal, P.K. (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. Editions Elsevier, New-York.

Ahmad, M., Yousuf, S., Khan, M.B., Hoda, M.N., Ahmad, A.S., Ansari, M.A., Ishrat, T., Agrawal, A.K., Islam, F. (2006). Attenuation by *Nardostachys jatamansi* of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical, and immunohistochemical studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **83**, 150-160.

Alanís, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J., Ceballos, G.M. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 153-157.

Almeida, M.M.B., Lopes, M.F.G., Nogueira, C.M.D., Magalhães, C.E.V., Morais, N.M.T. (2002). Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* **22**, 94-97.

Andary, C., Wylde, R., Laffite, C., Privat, G., Winternitz, F. (1982). Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanche rapum-genistae*. *Phytochemistry* **21**, 1123-1127.

Andary, C., Privat, G., Wylde, R., Heitz, A. (1985). Phéliposide et arénarioside, deux nouveaux esters hétérosidiques de l'acide caféique isolés de *Orobanche arenaria*. *J. Nat. Prod.* **48**, 778-783.

Andrighetti-Fröhner, C.R., Sincero, T.C.M., da Silva, A.C., Savi, L.A., Gaido, C.M., Bettega, J.M.R., Mancini, M., de Almeida, M.T.R., Barbosa, R.A., Farias, M.R., Barardi, C.R.M., Simões, C.M.O. (2005). Antiviral evaluation of plants from Brazilian atlantic tropical forest. *Fitoterapia* **76**, 374-378.

APG (Angiosperm Phylogeny Group) (2002). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* **141**, 399–436.

Aritomi, M. (1963). Terniflorin, a new flavonoid compound in flowers of *Clematis terniflora* var. *robusta*. *Chem. Pharm. Bull.* **11**, 1225-1228.

Aruoma, O., Halliwell, B., Hoey, B., Butler, J. (1989). The antioxydant action of N-acetylcystein : its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* **6**, 593-597.

Atti-Serafini, L., Pansera, M.R., Atti-Santos, A.C., Rossato, M., Pauletti, G.F., Rota, L.D., Paroul, N., Moyna, P. (2002). Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. grown in southern Brazil. *Rev. Bras. Plant. Med.* **4**, 72-74.

Baher Nik, Z., Mirza, M., Shahmir, F. (2004). Essential oil of *Marrubium cuneatum* Russell and its secretory elements. *Flavour Fragr. J.* **19**, 233–235.

Bahl, J.R., Garg, S.N., Singh, S.C., Bansal, R.P., Naqvi, A.A., Kumar, S. (2000). Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains. *Flavour Fragr. J.* **15**, 199-200.

Bahl, J.R., Sinha, S., Naqvi, A.A., Bansal, R.P., Gupta, A.K., Kumar, S. (2002). Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*. *Flavour Fragr. J.* **17**, 127-132.

Bailleul, F (1980). Le *Feretia apodanthera* Del. (Rubiaceés), recherches chimiques et pharmacologiques. Mémoire de Doctorat ès Sciences Pharmaceutiques, Université René Descartes, Paris.

Barbosa, F.G., Lima, M.A.S., Silveira, E.R. (2005). Total NMR assignments of new [C7-O-C7]-biflavones from leaves of the limonene–carvone chemotype of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. *Magn. Reson. Chem.* **43**, 334-338.

Barbosa, F.G., Lima, M.A.S., Braz-Filho, R., Silveira, E.R. (2006). Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. *Biochem. Sys. Ecol.* **34**, 819-821.

Bianco, A., Passacantilli, P. (1981). 8-epiloganin, an iridoid glucoside from *Odontites verna*. *Phytochemistry* **20**, 1873-1876.

Boros, C.A., Stermitz, F.R. (1990). Iridoids. An updated review. Part I. *J. Nat. Prod.* **53**, 1055-1147.

Bozin, B., Nimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1822-1828.

Bourdy, G., Chavez de Michel, L.R., Roca-Coulthard, A. (2004). Pharmacopeia in a shamanistic society : the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). *J. Ethnopharmacol.* **91**, 189-208.

Braga, M.E.M., Ehlert, P.A.D., Ming L.C., Meireles M.A.A. (2005). Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. *J. of Supercritical Fluids* **34**, 149–156.

Bray, L. (2005). Phylogénie des Angiospermes. <http://www.botanique.org> consulté le 21/10/05.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie – phytochimie – plantes médicinales. Troisième édition, Tec & Doc, éditions Lavoisier, Paris.

Caceres, A., Alvarez, A.V., Ovando, A.E., Samayoa, B.E. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J. Ethnopharmacol.* **31**, 193-208.

Canet, D., Boubel, J.C., Canet-Soulas, E. (2002). La RMN – concepts, méthodes et applications. Deuxième édition. Sunod, Paris.

Carr, G. (2004). Vascular Plant Family Access Page. <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/pfamilies.htm>. Site du département de botanique de l'Université de Hawaii, consulté le 27/06/05.

Castro, D.M., Ming, L.C. (1998). Cultivation of *Lippia alba*, an important medicinal plant in Brazil. Communication par affiche : *New Crops and New Uses: Biodiversity and Sustainability*, Phoenix, 8-11 novembre.

Castro, D.M., Ming, L.C., Marques, M.O.M. (2002). Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. Ex. Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. *Acta Hort.* **569**, 111-115.

Catalán, C.A.N., Merep, D.J., Retamar, J.A. (1977). El aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. de la provincia de Tucumán. *Riv. Ital EPPOS* **59** (10), 513-518.

Chen, Z.N., Xu, P.J., Yao, T.R. (1988). Structure of clerodendrin isolated from *Clerodendron trichotomum* Thunb. *Yaoxue Xuebao* **23**, 789-791.

Cheng, T.O. (2005). All teas are not created equal. The chinese green tea and cardiovascular health. *Int. J. Cardiol.* **108**, 301-308.

Ciccio, J.F., Ocampo, R.A. (2004). El aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) cultivada en la region tropical humeda del Carribeano Costa Rica. *Ing. Cienc. Quim.* **21**, 13-16.

Citoğlu, G., Tanker, M., Sever, B. (1999). Flavonoid aglycons from *Ballota saxatilis* subsp. *Saxatilis*. *Pharm. Biol.* **37**, 158-160.

Citoğlu, G.S., Çoban, T., Sever, B., İscan, M. (2004). Antioxidant properties of *Ballota* species growing in Turkey. *J. Ethnopharmacol.* **92**, 275-280.

Citoğlu, G.S., Yılmaz, B. S., Tarıkahya, B., Tıprıdamaz, R. (2005). Chemotaxonomy of *Ballota* species. *Chem. Nat. Comp.* **41**, 299-302.

Cocker, W., Cross, B.E., Duff, S.R., Edward, J.T., Holley, T.F. (1953). The constitution of marrubiin. Part I. *J. Chem. Soc.* 2540-2548.

Cohen, H.J., Chovaniec, M.E. (1978). Superoxide generation by digitonin stimulated guinea pig granulocytes. A basis for continuous assay for monitoring superoxyde production and for the study of activation of generating system, *J. Clin. Invest.* **61**, 1081-1087.

Cohen, M. (2002). Stress oxydant, glycation protéique, vieillissement et maladies liées à l'âge. *La Phytothérapie Européenne* **6**, 18-26.

Corrêa, C.B.V. (1992). Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Ex Britt. & Wilson – erva-cidreira. *Rev. Bras. Farm.* **73**, 57-64.

Coste, H. (1998). Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes. Librairie scientifique et technique Albert Blanchard, Paris.

Costa, M., Stasi, L.C., Kirizawa, M., Mendacolli, S.L.J., Gomes, C., Trolin, G. (1989). Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. Part 2. *J. Ethnopharmacol.* **27**, 25-33.

Couladis, M., Chinou, I.B., Tzakou, O., Loukis, A. (2002). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ballota pseudodictamnus*. *Phytother. Res.* **16**, 723-726.

Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. Res.* **17**, 194-195.

Craveiro, A.A., Alencar, J.W., Matos, F.J.A., Andrade, C.H.S., Machado, M.I.L. (1981). Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. *J. Nat. Prod.* **44**, 598-601.

Croasmun, W.R., Carlson, R.M.K. (1987). Two-dimensional NMR spectroscopy – applications for chemists and biochemists. VCH, New-York.

Cuendet, M. (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : *Fagraea blumei* (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : *Bartsia alpina* (Scrophulariaceae), *Loiseleuria procumbens* (Ericaceae) et *Campanula barbata* (Campanulaceae). Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.

Daels-Rakotoarison, D., Seidel, V., Gressier, B., Brunet, C., Tillequin, F., Bailleul, F., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, M., Cazin, J.C. (2000). Neurosedative and antioxydant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra*. *Arzneim.-Forsch./Drug. Res.* **50**, 16-23.

Damtoft, S. (1992). Iridoid glucosides from *Lamium album*. *Phytochemistry* **31**, 175-178.

Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S.R., Nielsen, B.J. (1993). Iridoids and verbascosides in *Retzia*. *Phytochemistry* **34**, 239-243.

Davis P.H. (1978). Flora of Turkey and the east Aegean islands, vol. 7. University Press, Edinburgh.

Deleu-Quettier C. (2000) Les polyphénols bioactifs de l'aubépine (*Crataegus monogyna*) et du sarrasin (*Fagopyrum esculentum*) : obtention *in vivo* et *in vitro*. Mémoire de doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille.

Dellacassa, E., Soler, E., Menendez, P., Moyna, P. (1990). Essential oils from *Lippia alba* Mill. N.E. Brown and *Aloysia chamaedryfolia* Cham. (Verbenaceae) from Uruguay. *Flavour Fragr. J.* **5**, 106-108.

DellaGreca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Monaco, P., Zarelli, A. (2000). Antialgal ent-labdane diterpenes from *Ruppia maritima*. *Phytochemistry*, **55**, 909-913.

Delmas, D., Jannin, B., Latruffe, N. (2005). Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 377-395.

Dewick, P.M. (2002). Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley & sons, Chichester.

Di Stasi, L.C., Oliveira, G.P., Carvalhaes, M.A., Queiroz-Junior, M., Tien, O.S., Kakinami, S.H., Reis, M.S. (2002). Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* **73**, 69-91.

Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C. (2005). Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 305-311.

Ducourthial, G. (2005). Atlas de la flore magique et astrologique de l'Antiquité. En ligne : <http://194.254.96.19/ducourthial/>, consulté le 17/11/05.

El-Ansari, M., Nawwar, M.A., Saleh, N.A.M. (1995). Stachysetin, a diapienin-7-glucoside-*p,p'*-dihydroxy-truxinate from *Stachys aegyptica*. *Phytochemistry* **40**, 1543-1548.

El-Bardai, S., Morel, N., Wibo, M., Fabre, N., Llabres, G., Lyoussi, B., Quetin-Leclercq, J. (2003). The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Med.*, **69** (1), 75-77.

El-Naggar, L.J., Beal, J.L. (1980). Iridoids. A review. *J. Nat. Prod.*, **43**, 649-707.

Endo, K., Takahashi, K., Abe, T., Hikino, H. (1982). Structure of forsythoside B, an antibacterial principle of *Forsythia koreana* stems. *Heterocycles* **19**, 261-264.

Engler, M.B., Engler, M.M. (2004). The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. *Nutr. Res.* **24**, 695-706.

EUFIC (European Food Information Council) (2002). Food Additives approved by the EU (E-number list by category). Disponible en ligne : http://www.eufic.org/fr/quickfacts/e-numbers_eufic.pdf, consulté le 15/09/05

Ferrerres, F., Tomas-Barberan, F.A., Tomas-Lorente, F. (1986). Flavonoid compounds from *Ballota hirsuta*. *J. Nat. Prod.* **49**, 554-555.

FDA (Food and Drug Administration) (2003). Code of Federal Regulations. Titre 21, volume 3. Consulté en ligne : http://a257.g.akamaitech.net/7/257/2422/14mar20010800/edocket.access.gpo.gov/cfr_2003/aprqr/pdf/21cfr182.3109.pdf le 16/09/05.

Fischer, U., Lopez, R., Pöll, E., Vetter, S., Novak, J., Franz, C.M. (2004). Two chemotypes within *Lippia alba* populations in Guatemala. *Flavour Fragr. J.* **19**, 333-335.

Flavornet. http://www.flavornet.org/f_kovats.html. Consulté le 23/07/06.

Fournet, J. (2002) Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique (tome 2), CIRAD - Gondwana editions, Tartane.

Franconi, F., Coinu, R., Carta, S., Urgeghe, P.P., Ieri, F., Mulinacci, N., Romani, A. (2006). Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 3121-3125.

Frighetto, N., de Oliveira, J.G., Siani, A.C., das Chagas, K.C. (1998). *Lippia alba* Mill. N.E. Br. as a source of linalool. *J. Essent. Oil Res.* **10**, 578-580.

Fulke, J.W.B., Henderson, M.S., McCrindle, R. (1968). Some reactions of the diterpene marrubiin and its congeners. *J. Chem. Soc. (C)*, 807-810.

Fun, C.E., Svendsen, A.B. (1990). The essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. *J. Essent. Oil Res.* **2** (5), 265-267.

Gafner, S. (1997). Search for new antifungal and antibacterial compounds: studies on the african plants *Inulanthera nuda* (Asteraceae), *Myrica serrata* (Myricaceae) and *Newbouldia laevis* (Bignoniaceae). Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.

Gazola, R., Machado, D., Ruggiero, C., Singi, G., Macedo Alexandre, M. (2004). *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus* : effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. *Pharmacological Research* **50**, 477-480.

Giardinaggio.it (2006). Photographie disponible en ligne : http://www.giardinaggio.it/speciali/Grigie/Ballota_pseudodictamnus.jpg. Consulté le 20/09/06.

Girón, L.M., Freire, V., Alonzo, A., Cáceres, A. (1991). Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J. Ethnopharmacol.* **34**, 173-187.

Godin, P. (1954). A new spray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses. *Nature* **154**, 134.

Gomes, E.C., Ming, L.C., Moreira, E.A., Miguel, O.G., Miguel, M.D., Kerber, V.A., Contin, A., Filho, A.W. (1993). Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.BR. (Verbenaceae). *Rev. Bras. Farm.* **74**, 29-32.

Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, A., Prévost, M.F. (2004). Pharmacopées traditionnelles en Guyane. IRD éditions, Paris.

Gritsenko, E.N., Litvinenko, V.I. (1969). Flavonoids from *Galeopsis ladanum*. *Khim. Prir. Soedin.* **5**, 55-56.

Gritz, D.C., Srinivasan, M., Smith, S.D., Kim, U., Lietman, T.M., Wilkins, J.H., Priyadharshini, B., John, R.K., Aravind, S., Prajna N.V., Duraisami Thulasiraj, R., Whitcher J.P. (2006). The Antioxidants in Prevention of Cataracts Study: effects of antioxidant supplements on cataract progression in South India. *Br. J. Ophthalmol.* **90**, 847-851.

Guarnaccia, R., Madyastha, K.M., Tegtmeier, E., Coscia, C.J. (1972). Geniposidic acid, an iridoid-glucoside from *Genipa americana*. *Tetrahedron Lett.* **13**, 5125-5127.

Guerrero, M.F., Puebla, P., Martin, M.L., Arteaga, L., San Roman, L. (2002). Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **80**, 37-42.

Guignard, J.L. (2001). Botanique systématique moléculaire. Masson, Paris.

Gupta, S.K., Khanuja, S.P.S., Kumar, S. (2001). *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. *Current Science* **81**, 206-210.

Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.*, **16**, 33-50.

Hamilton, R.J., Sewell, P.A. (1977). Introduction to high performance liquid chromatography. Editions Chapman & Hall, New York.

Harborne, J.B. (1963). Plant polyphenols. X. Flavone and aurone glycosides of *Antirrhinum*. *Phytochemistry* **2**, 327-334.

Harborne, J.B. (1964). Plant polyphenols. XII. Occurrence of tricin and of glycoflavones in grasses. *Phytochemistry* **3**, 421-428.

Harborne, J.B. (1994). The flavonoids – Advances in research since 1986. Editions Chapman & Hall, Cambridge.

Harborne, J.B. (1998). Phytochemical methods – a guide to modern techniques of plant analysis. Troisième édition. Chapman & Hall, London.

Hegde, V.R., Pu, H., Patel, M., Das, P.R., Strizki, J., Gullo, V.P., Chou, C-C., Buevich, A.V., Chan, T-M. (2004). Three new compounds from the plant *Lippia alva* as inhibitors of chemokine receptor 5 (CCR5). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5339-5342.

Hegnauer, R. (1973). Chemotaxonomie der pflanzen, band 6: Rafflesiaceae – Zygophyllaceae. Birkhauser, Bâle et Stuttgart.

Heinrich, M., Rimpler, H., Barrera, N.A. (1992). Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico) : ethnopharmacologic evaluation. *J. Ethnopharmacol.* **36**, 63-80.

Hochberg, M., Kohen, R., Enk, C.D. (2006). Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocytes. *Biomed. Pharmacother.* **60**, 233-237.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97** (7), 1027-1031.

Horie, T., Shibata, K., Yamashita, K., Fujii, K., Tsukayama, M., Ohtsuru, Y. (1998). ¹³C NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones. *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 222-230.

Hostettmann, K., Marston, A., Hostettmann, M. (1998). Preparative chromatography techniques – applications in natural product isolation. Deuxième édition, éditions Springer, Berlin.

Housti, F., Andary, C., Gargadennec, A., Amssa, M. (2002). Effects of wounding and salicylic acid on hydroxycinnamoylmalic acids in *Thunbergia alata*. *Plant. Physiol. Biochem.* **40**, 761-769.

Howard, R.A. (1989). Flora of the Lesser Antilles. Arnold arboretum, Harvard University. Jamaica Plain, Massachusetts.

Hu, M., Skibsted, L.H. (2002). Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus. *Food Chem.* **76**, 329-333.

Imai, K., Mayama, T. (1953). Chemical constituents of *Erigeron species* (Compositae). II. *Erigeron annuus*. 2. *Yakuku Zasshi* **73**, 131-134.

Inoue, K., Garner, C., Ackermann, B.L., Oe, T., Blair, I.A. (2006). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry characterization of oxidized amyloid beta peptides as potential biomarkers of Alzheimer's disease. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **20**, 911-918.

Inouye, H., Saito, S., Taguchi, H., Endo, T. (1969). Zwei neue iridoidglucoside aus *Gardenia jasminoides*: gardenosid und geniposid. *Tetrahedron Lett.* **28**, 2347–2350.

ISB (Institute for Systematic Botany): Atlas of Florida Vascular plants. En ligne : <http://www.plantatlas.usf.edu/synonyms.asp?plantID=1589>. Consulté le 5/07/06.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P. (2002). Botanique systématique – une perspective phylogénétique. De Boeck Université, Paris et Bruxelles.

Karioti, A., Skaltsa, H., Heilmann, J., Sticher, O. (2003). Acylated flavonoid and phenylethanoid glycosides from *Marrubium velutinum*. *Phytochemistry* **64**, 655-660.

Karioti, A., Heilmann, J., Skaltsa, H. (2005). Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Phytochemistry* **66**, 1060-1066.

Kasai, R., Ogawa, K., Ohtani, K., Ding, J.K., Chen, P.Q., Fei, C.J., Tanaka, O. (1991). Phenolic glycosides from Nuo-Mi-Xang-Cao, a Chinese acanthaceous herb. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 927-929.

Khalil, A.T., Gedara, S.R., Lahloub, M.F., Halim, A.F. (1996). Diterpenes and a flavone from *Leucas neufliaseana*. *Phytochemistry*, **41**, 1569-1571.

Kırmızıbekmez, H. (2002). *Globularia* türleri üzerinde farmakognozik çalışmalar. Thèse de doctorat, Université Hacettepe, Ankara.

Knöss, W., Reuter, B., Zapp, J. (1997). Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. *Biochem. J.* **326**, 449-454.

Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T., Fukushima, S. (1984). Studies on the constituents of *Cistanchis Herba*. IV. Isolation and structures of two new phenylpropanoid glycosides, cistanosides C and D. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 3880-3885.

Kobayashi, H., Oguchi, H., Takizawa, N., Miyase, T., Ueno, A., Usmanghani, K., Ahmad, M. (1987). New phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa* (Shrenk) Hook. f. I. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3309-3314.

Kumar, S., Bahl, J.R., Bansal, R.P., Garg, S.N., Naqvi, A.A., Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Darokar, M.P., Singh, V., Sinha, S. (2002). *Lippia alba* plant named “Bhurakshak”. United States Patents and Trademarks Office, PP113,110 P2.

Kuo, W.H., Wang, C.J., Young, S.C., Sun, Y.C., Chen, Y.J., Chou, F.P. (2004). Differential induction of the expression of GST subunits by geniposide in rat hepatocytes. *Pharmacology* **70**, 15-22.

Lambert, J.B., Mazzola, E.P. (2003). Nuclear magnetic resonance spectroscopy – an introduction to principles, applications and experimental methods. Pearson/Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Laonigro, G., Lanzetta, R., Parrilli, M., Adinolfi, M., Mangoni, L. (1979). The configuration of the diterpene spiroethers from *Marrubium vulgare* and from *Leonotis leonurus*. *Gazz. Chim. Ital.* **109**, 145-150.

Lawrence, B.M. (1984). The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfum. Flavor.* **9**, 41-51.

Lazari, D.M., Skaltsa, H.D., Constantinidis, T. (1999). Essential oils of *Marrubium velutinum* Sm. and *Marrubium peregrinum* L., growing wild in Greece. *Flavour Fragr. J.* **14**, 290-292.

Leclercq, P.A., Delgado, H.S., Garcia, J., Hidalgo, J.E., Cerrutti, T., Mestanza, M., Rios, F., Nina, E., Nonato, L., Alvarado, R., Menendez, R. (1999). Aromatic plant oils of the peruvian Amazon. Part 1. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. And *Cornutia odorata* (Poeppig) Poeppig ex Schauer, Verbenaceae. *J. Essent. Oil Res.* **11**, 753-756.

Leigh, C., Walton, C.S. (2004). *Lippia (Phylla canescens)* in Queensland. *Pest status review series – Land protection*. <http://www.nrm.qld.gov.au/pests/psas/pdfs/lippia.pdf>. Site du gouvernement du Queensland, consulté le 4/05/05.

Leong, L.P., Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* **76**, 69-75.

Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Canigueral, S., Dellacassa, E. (2001). Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flavour Fragr. J.* **16**, 356-359.

Luc, G., Lecerf, J.M., Bard, J.M., Hachulla, E., Fruchart, J.C., Devulder, B. (1991). Cholestérol et athérosclérose. Masson, collection Abrégés, Paris.

Luxford, C., Morin, B., Dean, R.T., Davies, M.J. (1999). Histone H1- and other protein- and amino acid-hydroperoxides can give rise to free radicals which oxidize DNA. *Biochem. J.* **344**, 125-134.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. (1970). The systematic identification of flavonoïds. Springer-Verlag, Berlin.

McKay, D.L., Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res.* **20**, 519-530.

Macomber, R.S. (2002). A complete introduction to modern NMR spectroscopy. Wiley Interscience, New York.

Mallavarapu, G.R., Bahl, J.R., Bansal, R.P., Garg, S.N., Ramesh, S., Kumar, S. (2000). Essential oil of *Lippia alba*, a rich source of linalool. *J. Med. Arom. Plant Sciences* **22**, 765-767.

Martin-Nizard, F., Sahpaz, S., Furman, C., Fruchart, J.C., Duriez, P., Bailleul, F. (2003). Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity. *Planta Med.*, **69** (3), 207-211.

Martini, M.C., Seiller, M. (1999). Actifs et additifs en cosmétologie. Deuxième édition, Tec & Doc, EMinter, Paris.

Matos, F.J.A., Machado, M.I.L., Craveiro, A.A., Alencar, J.W. (1996). Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. *J. Essent. Oil Res.* **8** (6), 695-698.

Merikli, A.H., Merikli, F., Tuzlaci, E. (1988). Flavonoids of *Ballota acetabulosa*. *Act. Pharm. Turc.* **30**, 143-144.

Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., Remacle, J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, **17**, 235-248.

Miyazawa, M., Okuno, Y., Fukuyama, M., Nakamura, S., Kosaka, H. (1999). Antimutagenic activity of polymethoxylated flavonoids from *Citrus aurantium*. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 5239-5244.

Montaudo, G., Lattimer, R.P. (2002). Mass spectrometry of polymers. CRC Press, Boca Raton.

Moon, M.K., Choi, B.M., Oh, G.S., Pae, H.O., Kim, J.D., Oh, C.S., Kim, D.H., Rho, Y.D., Shin, M.K., Lee, H.S., Chung, H.T. (2003). Catalposide protects Neuro 2A cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity via the expression of heme oxygenase-1. *Toxicol. Lett.* **145**, 46-54.

Morin, B., Bubb, W.A., Davies, M.J., Dean, R.T., Fu, S. (1998). 3-hydroxylysine, a potential marker for studying radical-induced protein oxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1265-1273.

Munkombwe, N.M. (2003). Acetylated phenolic glycosides from *Harpagophytum procumbens*. *Phytochemistry* **62**, 1231-1234.

Nagy, M., Gergel, D., Grancai, D., Novomesky, P., Ubik, K. (1996). Antilipoperoxidative activity of some phenolic constituents from *Marrubium peregrinum* L. *Farm. Obz.* **65**, 283-285.

Nagy, M., Svajdlenka, E. (1998). Comparison of essential oils from *Marrubium vulgare* L. and *M. peregrinum* L. *J. Essent. Oil Res.* **10**, 585–587.

Nakaoki, T. (1935). Glucoside of the flavone of the white flower. IV. Constituents of *Cosmos bipinnatus*, Cav. *Yakugaku Zasshi* **55**, 967-978.

Nicoletti, M., Galeffi, C., Multari, G., Garbarino, J.A., Gambaro, V. (1988). Polar constituents of *Calceolaria ascendens*. *Planta Med.* **54**, 347-348.

Novelli, G.P. (1997). Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.*, **48**, 517-527.

Oliveira, D.R., Leitão, G.G., Santos, S.S., Bizzo, H.R., Lopes, D., Alviano, C.S., Alviano, D.S., Leitão, S.G. (2006). Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **108**, 103-108.

Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chem. Toxicol.* **41**, 703-717.

Oyama, K., Kondo, T. (2004). Total synthesis of 7,4'-di-*O*- β -D-glucopyranoside, a component of blue flower pigment of *Salvia patens*, and seven chiral analogues. *Tetrahedron* **60**, 2025-2034.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A. (2001a). *Lippia* : traditional uses, chemistry and pharmacology : a review. *J. Ethnopharmacol.* **76**, 201-204.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Villar, A. (2001b). Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). *Il Farmaco* **56**, 501-504.

Payot, M. (2003). Le jardin secret du pharmacien. *L'Express* du 18/12/2003. Consulté en ligne : <http://www.lexpress.fr/info/france/dossier/domtom/dossier.asp?ida=421077>. Consulté le 26/04/06.

Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356.

Pharmacopée Européenne, édition 5.0 (2005). Direction Européenne de la Qualité du Médicament (EDQM).

Pharmeuropa (2004). Lemon verbena leaf. *Pharmeuropa* **16**, 400-402.

Pherobase. <http://pherobase.com/database/kovats/>. Consulté le 23/07/06.

Pick, G., Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J. Immunol. Methods* **38**, 161-170.

Pino Alea, J.A., Ortega Luis, A.G., Rosado Pérez, A., Rodríguez Jorge, M., Baluja R. (1996). Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Rev. Cubana Farm.* **30** (1), 0-0. En ligne à l'adresse suivante : http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100007&lng=es&nrm=iso. Consulté le 6/05/05.

Puertas-Mejia, M., Hillebrand, S., Stashenko, E., Winterhalter, P. (2002). In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour. Fragr.* **17**, 380-384.

Ramos, A., Visozo, A., Piloto, J., Garcia, A., Rodriguez, C.A., Rivero, R. (2003). Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **87**, 241-246.

- Randerath, K. (1971). Chromatographie sur couches minces. Gauthier-Villars, Paris.
- Rastrelli, L., Caceres, A., Morales, C., Simone, F., Aquino, R. (1998). Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*, **49**, 1829-1832.
- Ricciardi, G.A.L., Veglia, J.F., Ricciardi, A.I.A., Bandoni, A.L. (1999). Examen comparado de la composicion de los aceites esenciales de especies autoctonas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, **8**, 103-106. En ligne à l'adresse suivante : <http://www1.unne.edu.ar/cyt/exactas/e-029.pdf>. Consulté le 9/05/05.
- Ricciardi, G.A.L., Ricciardi, A.I.A., Bandoni, A.L. (2000). Fitoquímica de Verbenaceas (Lippias y Aloysias) del nordeste argentino. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes. En ligne à l'adresse suivante : http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/8_exactas/e_pdf/e_039.pdf. Consulté le 10/05/05.
- Rigano, D., Grassia, A., Bruno, M., Rosseli, S., Piozzi, F., Formisano, C., Arnold, N.A., Senatore, F. (2006). Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *J. Nat. Prod.* **69**, 836-838.
- Robard, I. (2004). Plantes médicinales d'outre-mer et pharmacopées : aspects juridiques, économiques et culturels. *Phytothérapie* **1**, 16-21.
- Ruffa, M.J., Wagner, M.L., Suriano, M., Vicente, C., Nadinic, J., Pampuro, S., Salomón, H., Campos, R.H., Cavallaro, L. (2004). Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses. *Antivir. Chem. Chemother.* **15**, 153-159.
- Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L., Bailleul, F. (2002). Polyphenols from *Ballota acetabulosa*. *Biochem. Syst. And Ecol.* **30**, 601-604.
- Salei, L.A., Popa, D.P., Lazur'evskii, G.V. (1967). Diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. I. *Chem. Nat. Comp.* **2** (4), 200-201.

Salei, L.A., Popa, D.P., Doleish, L., Lazur'evskii, G.V. (1968). The structure of peregrinol, a diterpenoid from *Marrubium peregrinum*. II. *Chem. Nat. Comp.* **3** (2), 75-78.

Salei, L.A., Popa, D.P., Lazur'evskii, G.V. (1970). The structure of peregrinin. *Chem. Nat. Comp.* **6** (2), 202-205.

Salei, L.A., Popa, D.P., Lazur'evskii, G.V. (1972). 4',5,6,7-tetramethoxyflavone from *Marrubium peregrinum*. *Chem. Nat. Comp.* **5** (3), 156-157.

Samuelsson, G. (1999). Drugs of natural origin – a textbook of pharmacognosy. Quatrième édition, Apotekarsocieteten, Taylor and Francis, Stockholm.

Sastri, V.D.N., Seshadri, T.R.A. (1946). Synthesis of 5,6,7-trihydroxyflavones and their derivatives. II. *Ind. Acad. Sci. (A)* **23A**, 273-277.

Savona, G., Bruno, M., Piozzi, F., Barbagallo, C. (1982). Diterpenes from *Ballota* species. *Phytochemistry* **21**, 2132-2133.

Scarpa, G.F. (2004). Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *J. Ethnopharmacol.* **91**, 115-135.

Scarpati, M.L., Oriente, G. (1960). Isolation from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) of phaselic acid; its constitution and synthesis. *Gazz. Chim. Ital.* **90**, 212-219.

Scarpati, M.L., Delle Monache, F. (1963). Isolation from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. *Annal. Chim.* **53**, 356-367.

Schoonen, W.M., Salinas, C.A., Kiemeney, L.A.L.M., Stanford, J.L. (2005). Alcohol consumption and risk of prostate cancer in middle-aged men. *Int. J. Cancer* **113**, 133-140.

Schroeder, M.A., Lopez, A.E., Martinez, G.C. (2004). Resultados preliminares del análisis foliar de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Pluchea sagittalis* (Lamb) Cab., *Petiveria alliacea* L. y *Ocimum selloi* Benth. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional

del Nordeste, Corrientes. En ligne à l'adresse suivante : <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/5-Agrarias/A-035.pdf>. Consulté le 11/05/05.

Schulz, M., Strack, D., Weissenböck, G., Markham, K.R., Dellamonica, G., Chopin, J. (1985). Two luteolin *O*-glucuronides from primary leaves of *Secale cereale*. *Phytochemistry* **24**, 343-345.

Scott, G. (1993). Atmospheric oxidation and antioxidants - volume 2. Elsevier, Amsterdam.

SDBSWeb : <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, consulté le 21/08/06).

Seidel, V., Bailleul, F., Libot, F., Tillequin, F. (1997). A phenylpropanoid glycoside from *Ballota nigra*. *Phytochemistry*, **44**, 691-693.

Seidel, V., Bailleul, F., Tillequin, F. (1999). Terpenoids and phenolics in the genus *Ballota* L. (Lamiaceae). *Recent Res. Devel. Phytochem.* **3**, 27-39.

Seidel, V., Verholle, M., Malard, Y., Tillequin, F., Fruchart, J.C., Duriez, P., Bailleul, F., Teissier, E. (2000). Phenylpropanoids from *Ballota nigra* L. inhibit *in vitro* LDL peroxidation. *Phytother. Res.*, **14**, 93-98.

Senatore, F., Rigano D. (2001). Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flavour Fragr. J.* **16**, 169-171.

Sevin, A. (1943). Comparative activity of different polyhydroxy derivatives of flavone on the capillary resistance of the normal and scorbutic guinea pig. *Compt. Rend.* **216**, 505-507.

Sies, H., Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 1315S-1321S.

Silverstein, R.M., Basler, G.C., Morill, T.C. (1998). Identification spectrométrique de composés organiques. De Boeck Université, Paris, Bruxelles.

Singh, G., Pandey, S.K., Leclercq, P.A., Sperkova, J. (1999). Studies on essential oils. Part 15. GC/MS analysis of chemical constituents of leaf oil of *Lippia alba* (Mill.) from North India. *J. Essent. Oil Res.* **11**, 206-208.

Singh, G., Rao, G.P., Kapoor, P.S., Singh, O.P. (2000). Chemical constituents and antifungal activity of *Lippia alba* Mill. leaf essential oil. *J. Med. Arom. Plant Sciences* **22**, 701-703.

Skaltsa, H., Bermejo, P., Lazari, D., Silvan, A.M., Skaltsounis, A.-L., Sanz, A., Abad, M.J. (2000). Inhibition of prostaglandin E2 and leucotriene C4 in mouse peritoneal macrophages and thromboxane B2 production in human platelets by flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 47-53.

Snodgrass, S.R. (1978). Use of [³H]muscimol for GABA receptor studies. *Nature* **273**, 392-394.

Soffriti, M., Belpoggi, F., Degli Esposti, D., Lambertini, L., Tibaldi, E., Rigano, A. (2006). First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.* **114**, 379-385.

Speth, R.C., Wastek, G.J., Yamamura, H.I. (1979). Benzodiazepine receptors: temperature dependence of [³H]flunitrazepam binding. *Life Sci.* **24**, 351-357.

Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., Martínez, J.R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **27** (105), 579-597.

Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., Martinez, J.R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J Chromatogr. A.* **1025**, 93-103.

Stephens, L.J., Wheeler, D.M.S. (1970). Synthesis of diterpenoid acids - X. Stereochemistry of marrubiin, the C₈ and C₉ positions. *Tetrahedron*, **26**, 1561-1567.

Sticher, O. (1970). Thevesid, ein neues iridoidglucosid aus *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Apocynaceae). *Tetrahedron Lett.* **11**, 3195.

Stout, M.G., Reich, H., Huffman, M.N. (1964). 4',5,6,7-oxygenated flavones and flavanones. *J. Pharm. Sci.* **53**, 192-195.

Sumaryono, W., Proksch, P., Wray, V., Wittle, L., Hartmann, T. (1991). Qualitative and quantitative analysis of the phenolic constituents from *Orthosiphon aristatus*. *Planta Medica* **57**, 176-180.

Takeda, Y., Nishimura, H., Inouye, H. (1977). Two new iridoid glucosides from *Mussaenda parviflora* and *Mussaenda shikokiana*. *Phytochemistry* **16**, 1401-1404.

Taşdemir, D. (1997). Phytochemical and biological investigation of turkish *Leonurus* species, emphasizing on the diterpenoids of *Leonurus persicus*. Mémoire de doctorat, Institut Suisse de la Technologie, Zurich.

Tavares, E.S., Julião, L.S., Lopes, D., Bizzo, H.R., Lage, C.L.S., Leitão, S.G. (2005). Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Rev. Bras. Farmacogn.* **15**, 1-5.

Telek, E., Toth, L., Botz, L., Mathe, I. (1997). [Chemical tests with Marrubium species. Official data on Marubii herba in Pharmacopoeia Hungarica VII]. *Acta Pharm. Hung.* **67**, 31-37. Résumé : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=9163258&query_hl=1. Consulté le 30/06/05.

Terblanché, F.C., Kornelius, G. (1996). Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – a literature review. *J. Essent. Oil Res.* **8**, 471-485.

Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Lavoisier, éditions Tec & Doc, Paris.

Trevisan, M.T.S., Macedo, F.V.V. (2003). Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quim. Nova* **26** (3), 301-304.

Tucker, A.O., Maciarello, M.J., (1999). Volatile leaf oil of the “Licorice Verbena” [*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton and P. Wils. var. *carterae* Moldenke] from the North American Herb Trade. *J. Essent. Oil Res.*, **11**, 314-316.

Ulrich, S., Wolter, F., Stein, J.M. (2005). Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 452-461.

Vale, T.G., Matos, F.J.A., Lima, T.C.M., Viana, G.S.B. (1999). Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *J. Ethnopharmacol.* **167**, 127-133.

Vale, T.G., Furtado, E.C., Santos Jr., J.G., Viana, G.S.B. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine* **9**, 709-714.

Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M.J., Guzmán, C.A., Zygadlo, J.A., Ariza-Espinar, L., Sanz, J., García-Vallejo, M.C. (1993). Volatile constituents of four *Lippia* species from Córdoba (Argentina). *J. Essent. Oil Res.* **5**, 513-524.

Viana, G.S.B., do Vale, T.G., Rao, V.S.N., Matos, F.J.A. (1998). Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. *Pharm. Biol.* **36**, 347-351.

Viana, G.S.B., do Vale, T.G., Silva, C.M.M., de Matos, F.J.A. (2000). Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 1314-1317.

Vinson, J.A. (2006). Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* **13**, 151-162.

Vitto, L.A., Petenatti, E.M., Petenatti M.E. (1997). Recursos herbolarios de San Luis (Republica Argentina) Primera parte : plantas nativas. *Multequina* **6**, 49-66.

Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M. (1983). Drogenanalyse – dünnschicht-chromatographische analyse von arzneidrogen. Springer-Verlag, Berlin.

Wang, S., Ghisalberti, E.L., Ridsdill-Smith, J. (1998). Bioactive isoflavonols and other components from *Trifolium subterraneum*. *J. Nat. Prod.* **61**, 508-510.

Wiseman, H. (1995). Tamoxifen as an antioxidant and cardioprotectant. *Biochem. Soc. Symp.* **61**, 209-219.

Wu, J., Huang, J., Xiao, Q., Zhang, S., Xiao, Z., Li, Q., Long, L., Huang, L. (2004). Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR data for 10 phenylethanoid glycosides. *Magn. Res. Chem.* **42**, 659-662.

Yang, F., Li, X.C., Wang, H.Q., Yang, C.R. (1996). Flavonoid glycosides from *Colebrookea oppositifolia*. *Phytochemistry*, **42** (3), 867-870.

Yoshida, K., Kameda, K., Kondo, T. (1993). Diglucuronoflavones from purple leaves of *Perilla ocimoides*. *Phytochemistry* **33**, 917-919.

Zamora-Martinez, M.C., Nieto de Pascual Pola, C. (1992). Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. *J. Ethnopharmacol.* **35**, 229-257.

Zétola, M., Lima, T.C.M., Sonaglio, D., Gonzalez-Ortega, G., Limberger, R.P., Petrovick, P.R., Bassani, P.R. (2002). CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* Verbenaceae (Brazilian false melissa). *J. Etnopharmacol.* **82**, 207-215.

Zhao, J., Lahiri-Chatterjee, M., Sharma, Y., Agarwal, R. (2000). Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. *Carcinogenesis* **21**, 811-816.

Zoghbi, M.d.G.B., Andrade, E.H.A., Santos, A.S., Silva, M.H.L., Maia, J.G.S. (1998). Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour. Fragr. J.* **13**, 47-48.