



HAL
open science

Activité pharmacologique de dérivés polyphénoliques isolés de Clusiaceae et de Calophyllaceae malaisiennes : effets régulateurs sur des marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité

Caroline Rouger

► **To cite this version:**

Caroline Rouger. Activité pharmacologique de dérivés polyphénoliques isolés de Clusiaceae et de Calophyllaceae malaisiennes : effets régulateurs sur des marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2015. Français. NNT : 2015ANGE0066 . tel-02155239

HAL Id: tel-02155239

<https://theses.hal.science/tel-02155239>

Submitted on 13 Jun 2019

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

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

2014-2015

Thèse de doctorat

Spécialité *Pharmacochimie : produits naturels et biosynthétiques*

**ACTIVITÉ PHARMACOLOGIQUE DE
DÉRIVÉS POLYPHÉNOLIQUES
ISOLÉS DE *CLUSIACEAE* ET DE
CALOPHYLLACEAE MALAISIENNES :
EFFETS RÉGULATEURS SUR DES
MARQUEURS ENDOTHÉLIAUX DE
L'INFLAMMATION ET DE
L'IMMUNITÉ**

Caroline ROUGER |

Sous la direction du Pr. Pascal RICHOMME |

Membres du jury

Pr. Pascal RICHOMME | Directeur

Dr. Séverine DERBRÉ | Encadrante

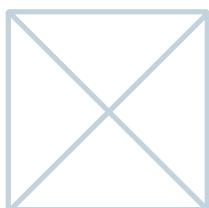
Dr. Catherine VONTHRON-SÉNÉCHEAU | Rapporteur

Pr. Salvador CAÑIGUERAL | Rapporteur

Dr. Béatrice CHARREAU | Examineur

Pr. David GUILLET | Examineur

Dr. Marc LITAUDON | Examineur



Soutenu publiquement le :
11 décembre 2015

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Au cours de mes trois années de thèse, j'ai bénéficié de l'assistance de nombreuses personnes. Je souhaite particulièrement remercier mon directeur de thèse, le Professeur Pascal Richomme, également directeur du laboratoire Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux (SONAS, EA 921, Angers) où j'ai effectué l'essentiel de mes travaux de doctorat. Je le remercie très sincèrement pour la confiance qu'il m'a accordée dès le début de cette thèse, pour sa sérénité, ses précieux conseils, et pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Ses relectures et ses propositions scientifiques réfléchies m'ont notamment valu la publication d'un joli premier article scientifique en tant que premier auteur.

Depuis mon premier stage d'initiation à la recherche au laboratoire SONAS, j'ai été soutenue et très bien encadrée par le Docteur Séverine Derbré. M'avoir proposé de travailler une nouvelle fois avec elle au cours de ce projet fut l'occasion d'approfondir mes compétences dans un domaine qui me plaît tout particulièrement : celui des produits naturels. Je la remercie chaleureusement pour sa gentillesse, sa rigueur, son suivi régulier et ses nombreux conseils. Je lui suis également très reconnaissante pour les heures de monitorat qu'elle m'a permis de réaliser, et pour la confiance qu'elle m'a accordée en me laissant effectuer une partie de ses enseignements. Je la remercie aussi pour la liberté qu'elle m'a laissée au cours de mon co-encadrement de stagiaires, et pour avoir fait en sorte que les deux déménagements de laboratoire que nous avons connus n'affectent en rien l'avancée de mon travail. Ce fut un réel plaisir de l'avoir pour co-encadrante !

Tout le volet de cette thèse dédié aux évaluations biologiques sur les cellules endothéliales n'aurait pas été présent sans la collaboration avec le Docteur Béatrice Charreau, co-directrice de l'équipe 5 de l'UMR 1064 [INSERM, Centre de Recherche en Transplantation & Immunologie (CRTI)] du CHU de Nantes. Je la remercie vivement pour son très bon accueil au sein de son équipe, pour son suivi, son sens critique des résultats et pour ses connaissances pointues dans le domaine de la biologie vasculaire. Je souhaite lui témoigner ma gratitude pour les précieuses explications qu'elle m'a données et qui m'ont permis de mieux comprendre le fonctionnement des cellules endothéliales, aussi complexe soit-il, et d'interpréter correctement certains résultats. Je la remercie aussi pour sa relecture du premier chapitre de ce manuscrit et pour avoir accepté d'être membre de mon jury de soutenance de thèse en tant qu'examinatrice.

Je remercie également le Docteur Ignacio Anegon, directeur du laboratoire INSERM UMR 1064, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour la réalisation des essais biologiques.

Le Docteur Catherine Vonthron-Sénécheau, de l'Université de Strasbourg, ainsi que le Professeur Salvador Cañigueral, de l'Université de Barcelone, m'ont fait l'honneur et le plaisir d'accepter d'évaluer mes travaux de thèse en qualité de rapporteurs et je les en remercie très sincèrement. Merci également au Professeur David Guilet, de l'Université d'Angers, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je tiens à remercier le Docteur Marc Litaudon, de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, CNRS) pour son implication à plusieurs niveaux dans ce projet de thèse. Je le remercie pour l'approvisionnement en plantes sèches, pour les photographies des plantes fraîches qui illustrent ce manuscrit, et pour les diverses mesures expérimentales effectuées à l'ICSN. Il m'a également fait la faveur d'être membre de mon comité de suivi de thèse, m'orientant ainsi vers de bonnes directions, et de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je souhaite remercier le Professeur Joël Boustie, de l'Université de Rennes, d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse, et pour les orientations qu'il a ainsi proposées de donner à mes travaux.

La Malaisie étant la source des plantes étudiées au cours de cette thèse, il n'aurait pas été possible de donner lieu à ce travail sans une collaboration locale. Ainsi, je remercie le Professeur Khalijah Awang, de l'Université de Malaya, pour nous avoir permis d'explorer une partie de la biodiversité malaisienne.

Je ne saurais également remercier assez le Professeur Isabelle Fourasté, de l'Université de Toulouse, pour avoir accepté d'effectuer les études microscopiques des parties de plantes qui sont présentées dans ce manuscrit. J'ai pris beaucoup de plaisir à l'écouter lors de sa formation sur les poudres de drogues végétales, et avoir pu bénéficier de ses grandes compétences dans le domaine de la botanique fut pour moi un honneur.

Divers membres du laboratoire SONAS ont activement contribué au bon déroulement de mes trois ans de thèse. J'exprime ma gratitude au Docteur Sabine Mallet et au Professeur Olivier Duval pour avoir appuyer ma candidature au poste de moniteur à chaque renouvellement. Je remercie Patricia Blanchard pour les tests anti-AGEs qu'elle a effectués, pour son assistance dans l'utilisation de plusieurs appareils, pour les multiples démarches administratives, et pour son soutien et sa complicité durant les travaux

pratiques (TP) avec les étudiants de Pharmacie. Un grand merci aussi au Docteur Anne-Marie Le Ray, non seulement pour sa gestion de la chimiothèque et pour ses conseils après relecture d'une partie de ce manuscrit, mais également pour son implication dans les TP et sa quotidienne joie de vivre.

Je remercie tous ceux qui ont participé à l'analyse des composés que j'ai isolés au cours de ma thèse. Ici se reconnaîtront Benjamin Siegler, le Docteur Ingrid Freuze, et Magali Allain de la Plateforme d'Ingénierie et Analyses Moléculaires (PIAM), pour les analyses de RMN, de masse et LC/MS, et de pouvoir rotatoire et de diffractométrie aux rayons X, respectivement. Sont également concernés le Docteur Thomas Cauchy du laboratoire Moltech Anjou pour les calculs théoriques de dichroïsme circulaire et de pouvoir rotatoire, le Docteur Charlotte Gény pour l'enregistrement des spectres de dichroïsme circulaire à l'ICSN, et le Docteur Rémy Le Guével de la plateforme ImPACcell de Rennes pour l'évaluation de l'hépatotoxicité des composés. Je n'oublie pas de remercier Caroline Servant du pôle de compétitivité Végépolys pour sa formation à l'utilisation de l'extracteur sous pression et pour ses dépannages à travers le prêt de matériel.

La contribution de Sarah Langlois et de Claire Meunier, deux stagiaires du Master 1 Sciences, Technologie et Ingénierie de la Santé (STIS), et surtout de Mamadou Aliou Baldé, stagiaire du Master 2 Polymères et Principes Actifs d'Origine Naturelle (P²AON) et de Nina Corlay, ingénieur d'études au laboratoire SONAS, a permis une forte avancée dans l'isolement et la caractérisation des métabolites secondaires de *Calophyllum tetrapterum*. A eux tous, un grand merci pour ce travail ! J'ai en outre particulièrement apprécié le sens de l'écoute et du respect d'Aliou, ainsi que le dynamisme, la rigueur scientifique, et la bonne humeur de Nina.

Je n'aurais pas pu réaliser un tel travail et obtenir de tels résultats au niveau biologique sans l'aide de plusieurs personnes de l'équipe 5 du laboratoire INSERM UMR 1064. J'adresse donc de vifs remerciements au Docteur Pierre Tonnerre pour m'avoir initiée à la réalisation du test de criblage anti-inflammatoire, au Docteur Angélique Pabois pour m'avoir très bien intégrée au sein du laboratoire, et pour son aide précieuse à la fois pratique et théorique, à Sylvain Pagie et à Marie-Charlotte Mézier pour les cultures cellulaires qu'ils ont entretenues en mon absence et pour les expérimentations qu'ils ont effectuées pour compléter mes données, et à Pierre-Jean Gavlovsky pour son aide et ses plaisanteries !

Je remercie tous ceux que j'ai croisés au laboratoire INSERM UMR 1064, qui m'ont aidée et avec qui j'ai passé de bons moments. Je pense à Laurence Delbos pour sa formation à l'utilisation du cytomètre en flux, mais aussi à de nombreux thésards, post-doctorants et permanents avec qui j'ai partagé quelques pauses, dont Mélanie, Laëtitia, Ludmilla et bien d'autres encore...

L'ambiance au laboratoire SONAS a toujours été conviviale et cela grâce à la présence de chacun de ses représentants. Ainsi je voudrais remercier le Docteur Andreas Schinkovitz pour les bons moments passés avec lui au laboratoire et en TP, et pour l'approvisionnement régulier en chocolats. Je remercie le Docteur Anne Landreau pour sa gentillesse et ses avis concernant mes observations microscopiques. Merci au Docteur Isabelle Baglin, au Professeur Denis Séraphin, et au Docteur Jean-Jacques Helesbeux, pour leur sympathie et leurs bons conseils. Merci aussi à Marie-Christine Aumond et à Nadège Blon pour leur bonne humeur, et à Yannick Abatuci pour son aide à la mesure des points de fusion. Je pense aussi au Docteur Luis Manuel Peña Rodrigues, avec qui j'ai pu échanger en espagnol durant ses passages de quelques semaines au laboratoire, et à tous les doctorants et stagiaires avec qui j'ai passé d'agréables moments : Luc, Alexandre, Taiï, Khaled, Ali, Ariane, Amel, Soprane, Jonathan, Victor, Landy, mais aussi mes deux derniers collègues de bureau, Stéphane et Paul avec qui j'ai bien ri et eu des discussions enrichissantes. Je souhaite enfin particulièrement remercier le Docteur Séverine Boisard, avec laquelle j'ai longtemps partagé mon bureau, pour sa sympathie, sa patience, ses conseils, son soutien, notre complicité et nos nombreux fous rires.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma famille proche qui a toujours été là pour me soutenir. A mes parents, pour leur bienveillance continue et pour leurs encouragements, et à ma sœur, pour son assistance et la grande complicité que nous partageons. Je remercie aussi Thomas, qui prend bien soin de ma chère Cécile.

J'ai aussi une pensée pour mes amis d'horizons divers et variés, qui m'ont soutenue tout au long de ses trois dernières années. Je remercie en particulier François et ma bibi Emilie pour avoir régulièrement pris de mes nouvelles et pour leurs encouragements.

Et enfin, avant tout, un grand merci à Dimitri, mon compagnon. Les satisfactions que m'auront apportées cette thèse n'auront pas été que d'ordre professionnel ! Je lui adresse toute ma reconnaissance pour les maintes fois où il m'a assistée, pour m'avoir supportée et rassurée dans chaque moment, pour sa grande disponibilité, sa patience, sa prévenance, son soutien, ses encouragements, et pour l'amour qu'il me témoigne chaque jour.

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Publications (2012-2015)

- **Anti-inflammatory and immunosuppressive polyphenols from *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* on endothelial cells.**

Rouger C., Derbré S., Charreau B., Pagie S., Litaudon M., Awang K. and Richomme P.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, en préparation

- **Lepidotol A from *Mesua lepidota* inhibits inflammatory and immune mediators in human endothelial cells.**

Rouger C., Derbré S., Charreau B., Pabois A., Cauchy T., Litaudon M., Awang K. and Richomme P.

Journal of Natural Products, **2015**, 78 (9), 2187-2197

- **Identification of minor benzoylated 4-phenylcoumarins from a *Mammea neurophylla* bark extract.**

Dang B. T., Rouger C., Litaudon M., Richomme P., Séraphin D. and Derbré S.

Molecules, **2015**, 20 (10), 17735-17746

- **Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*.**

Dang B. T., Gény C., Blanchard P., Rouger C., Richomme P., Séraphin D., Tonnerre P., Charreau B., Rakolomalala G., Randriamboavonjy J. I., Loirand G., Pacaud P., Litaudon M. and Derbré S.

Fitoterapia, **2014**, 94, 65-75

Communications orales

- « Lepidotols and lepidotins: new phenylcoumarins from *Mesua lepidota* as promising inhibitors of endothelial immune responses and dysfunction »

Rouger C., Derbré S., Charreau B., Pagie S., Litaudon M., Awang K., Richomme P.

63rd International Congress and Annual Meeting of the GA, 23-27 août **2015**, Budapest, Hongrie.

- « Effets anti-inflammatoire et immunomodulateur de composés polyphénoliques isolés de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* »

Rouger C., Derbré S., Charreau B., Litaudon M., Awang K., Le Ray A.-M., Richomme P.

Journée des Doctorants de la SFR QUASAV, 7^{ème} édition, 27 novembre **2014**, Angers, France. (1^{er} prix *ex aequo* de la meilleure présentation)

- « From dereplication and anti-inflammatory screening of *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* species to novel immunomodulatory coumarins from *Mesua lepidota* »

Rouger C., Derbré S., Litaudon M., Awang K., Charreau B., Richomme P.

22nd European Conference of GP2A, 28-29 août **2014**, Nantes, France.

Communications par affiche

- « Lepidotols and lepidotins: new phenylcoumarins from Malaysian *Mesua* species »
Rouger C., Derbré S., Cauchy T., Litaudon M., Awang K., Richomme P.
63rd International Congress and Annual Meeting of the GA, 23-27 août **2015**, Budapest, Hongrie.
- « Variability of *Calophyllum tetrapterum* phytoconstituents in relation with their anti-inflammatory properties »
Rouger C., Baldé M. A., Corlay N., Charreau B., Litaudon M., Awang K., Derbré S., Richomme P.
2^{ème} Symposium International AFERP-STOLON, 15-17 juillet **2015**, Lyon, France. (1^{er} prix ex aequo du meilleur poster)
- « Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of polyphenolic compounds from *Clusiaceae/Calophyllaceae*: a focus on coumarins »
Rouger C., Derbré S., Litaudon M., Awang K., Charreau B., Richomme P.
62nd International Congress and Annual Meeting of the GA, 31 août – 4 septembre **2014**, Guimarães, Portugal.
- « From dereplication and anti-inflammatory screening of *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* species to novel immunomodulatory coumarins from *Mesua lepidota* »
Rouger C., Derbré S., Litaudon M., Awang K., Charreau B., Richomme P.
22nd European Conference of GP2A, 28-29 août **2014**, Nantes, France.
- « Recherche de composés polyphénoliques anti-inflammatoires ou immunomodulateurs dans des extraits de *Clusiaceae/Calophyllaceae* »
Rouger C., Derbré S., Charreau B., Litaudon M., Awang K., Richomme P.
3^{èmes} Journées Scientifiques de l'École Doctorale VENAM, 20-21 janvier **2014**, Le Mans, France. (3^{ème} prix du meilleur poster)
- « Criblage d'extraits de plantes malaisiennes : étude phytochimique et évaluation des propriétés anti-inflammatoires »
Rouger C., Derbré S., Charreau B., Litaudon M., Awang K., Richomme P.
12^{ème} forum des doctorants, 30 mai **2013**, Angers, France. (2^{ème} prix ex aequo du meilleur poster)
- « Selection of *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* extracts based on dereplication and anti-inflammatory properties »
Rouger C., Derbré S., Charreau B., Litaudon M., Awang K., Richomme P.
AFERP & STOLON International Symposium, 22-24 mai **2013**, Brussels, Belgique.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	I
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	VII
TABLE DES MATIERES.....	IX
LISTE DES ABREVIATIONS	XV
TABLE DES FIGURES.....	XIX
TABLE DES TABLEAUX	XXV
TABLE DES ANNEXES.....	XXIX
INTRODUCTION.....	1
Bibliographie de l'introduction	5
CHAPITRE I : CONTEXTE DE L'ETUDE.....	7
1. Présentation de l'endothélium vasculaire et de la greffe	10
1.1. Définition et fonctions physiologiques de l'endothélium vasculaire.....	10
1.2. Définition de la greffe.....	11
2. Le rejet de greffe	11
2.1. Définitions et mécanismes du rejet de greffe.....	11
2.1.1. Définition et cause principale du rejet	11
2.1.2. Types de rejets et leurs mécanismes.....	12
a) Rejet de greffe hyper aigu	12
b) Rejet de greffe aigu	12
c) Rejet de greffe chronique	13
2.2. Traitements immunosuppresseurs : sites d'action et effets secondaires	14
2.3. Implication de l'endothélium vasculaire dans le rejet de greffe	17
2.3.1. Les cellules endothéliales vasculaires : des cibles et des effecteurs du rejet de greffe.....	17
2.3.2. Marqueurs membranaires impliqués dans la dysfonction et les réponses immunes de l'endothélium	17
3. Place des produits d'origine naturelle en prévention des rejets de greffe.....	19
3.1. Molécules aux propriétés immunosuppressives	19
3.2. Composés pouvant prévenir la dysfonction endothéliale.....	22
4. Les familles des Clusiaceae et des Calophyllaceae	23
4.1. Phylogénie des Clusiaceae et des Calophyllaceae	23
4.2. Caractéristiques botaniques	25
4.3. Distribution géographique	26
4.4. Métabolites secondaires	27
4.5. Activités biologiques des composés isolés	29
4.6. Utilisations traditionnelles des Clusiaceae et des Calophyllaceae	29
5. Les genres Garcinia, Calophyllum et Mesua	31
5.1. Considérations botaniques	31
a) Genre <i>Garcinia</i> (Clusiaceae).....	31
b) Genre <i>Calophyllum</i> (Calophyllaceae).....	32
c) Genre <i>Mesua</i> (Calophyllaceae)	32
5.2. Répartition géographique.....	33
5.3. Métabolites secondaires	33
5.3.1. Xanthones	33
a) Structure, nomenclature, biogenèse.....	33
b) Structures isolées dans les 3 genres	34
5.3.2. Benzophénones polyprénylées.....	38
a) Structure, nomenclature, biogenèse.....	38
b) Structures isolées dans les 3 genres	38

5.3.3.	Biflavonoïdes.....	40
	a) Structure, nomenclature, biogenèse.....	40
	b) Structures isolées dans les 3 genres	40
5.3.4.	Coumarines	41
	a) Structure, nomenclature, biogenèse.....	41
	a) Structures isolées dans les genres <i>Calophyllum</i> et <i>Mesua</i>	43
5.3.5.	Chromanones acides	47
	a) Structure, nomenclature, biogenèse.....	47
	b) Structures isolées dans les genres <i>Calophyllum</i> et <i>Mesua</i>	47
5.3.6.	Triterpènes et stéroïdes.....	48
	a) Structure, nomenclature, biogenèse.....	48
	b) Structures isolées dans les genres <i>Calophyllum</i> et <i>Mesua</i>	49
5.3.7.	Autres métabolites secondaires isolés du genre <i>Mesua</i>	51
	6. Conclusion	51
	Bibliographie du chapitre I.....	53
	CHAPITRE II : SELECTION D'EXTRAITS RICHES EN METABOLITES D'INTERET DANS LA PREVENTION DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE	63
	1. Introduction.....	66
	2. Sélection des plantes et obtention des extraits.....	66
	2.1. Sources végétales sélectionnées	66
	2.2. Extraction automatisée du matériel végétal.....	68
	3. Criblage biologique de l'activité inhibitrice de l'expression de VCAM-1.....	70
	3.1. Principe du test en ELISA cellulaire	70
	3.2. Résultats du criblage anti-inflammatoire mesurant l'expression de VCAM-1 <i>in vitro</i>	72
	4. Etude déréplicative des extraits.....	75
	4.1. Identification des principales classes chimiques présentes dans l'ensemble des extraits étudiés.....	75
	4.2. Etude déréplicative des extraits bioactifs.....	83
	4.2.1. Extraits de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	83
	4.2.2. Extraits de <i>Mesua assamica</i>	85
	4.2.3. Extrait de <i>Mesua lepidota</i>	85
	4.2.4. Extraits de <i>Mesua nuda</i>	86
	5. Conclusion	86
	5.1. Extraits sélectionnés	86
	5.2. Effets sur les produits terminaux de la glycation (AGEs)	88
	5.2.1. Principe du test anti-AGEs	88
	5.2.2. Activités anti-AGEs des quatre extraits sélectionnés.....	89
	Bibliographie du chapitre II	91
	CHAPITRE III : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS SELECTIONNES	95
	1. Etude phytochimique de l'extrait DCM de fruits de <i>Mesua lepidota</i>	98
	1.1. Matériel végétal.....	98
	1.1.1. Description de l'espèce.....	98
	1.1.2. Matériel végétal collecté	98
	1.1.3. Etude botanique des fruits de <i>Mesua lepidota</i>	99
	1.2. Purification des phénylcoumarines de l'extrait.....	101
	1.2.1. Profil de l'extrait.....	101
	1.2.2. Fractionnement de l'extrait	103
	a) Fractionnement de l'extrait DCM issu de la 1 ^{ère} extraction (Extrait 1)	105
	b) Fractionnement de l'extrait DCM issu de la 2 ^{nde} extraction (Extrait 2)	106
	1.3. Détermination structurale des composés isolés	107
	1.3.1. Elucidation structurale des phénylcoumarines isolées	107
	a) Série des lépidotols (94 à 98).....	107
	b) Série des lépidotines (99 et 100).....	117
	c) Coumarines de type mammea précédemment décrites (101 et 102).....	120

1.3.2.	Hypothèse de biosynthèse et détermination des stéréochimies	120
1.4.	Conclusion sur l'étude des fruits de <i>Mesua lepidota</i>	122
2.	Etude phytochimique de l'extrait DCM de feuilles de <i>Calophyllum tetrapterum</i> – lot A	123
2.1.	Matériel végétal	123
2.1.1.	Description de l'espèce	123
2.1.2.	Matériel végétal collecté	123
2.1.3.	Etude botanique des feuilles de <i>Calophyllum tetrapterum</i> (lot A)	124
2.2.	Purification des composés majoritaires de l'extrait	126
2.2.1.	Profil de l'extrait	126
2.2.2.	Fractionnement initial	126
	a) Profil chromatographique des fractions obtenues	128
	b) Evaluation biologique des fractions obtenues	128
2.2.3.	Fractionnement de la fraction FIV	130
	a) Composés isolés	130
	b) Evaluation biologique de la tétraptérone (105), PPAP majoritaire de l'extrait	131
2.2.4.	Fractionnement de la fraction FVI	131
2.2.5.	Fractionnement de la fraction FIII et acétylation du composé 105	131
2.3.	Analyse structurale des molécules isolées	133
2.3.1.	Elucidation structurale du PPAP majoritaire : la tétraptérone (105)	133
	a) Détermination des principaux éléments structuraux du composé 105	133
	b) Elucidation structurale du composé 106 et déduction de la structure 105	135
2.3.2.	Elucidation structurale des autres composés isolés	138
	a) Triterpènes et stéroïdes	138
	b) Xanthone 111	139
2.4.	Conclusion sur l'étude des feuilles du lot A de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	139
3.	Etude phytochimique de l'extrait DCM de feuilles de <i>Calophyllum tetrapterum</i> – lot B	139
3.1.	Matériel végétal	139
3.1.1.	Matériel végétal collecté	140
3.1.2.	Etude botanique des feuilles de <i>Calophyllum tetrapterum</i> (lot B)	140
3.2.	Purification des pyranochromanones acides majoritaires de l'extrait	141
3.2.1.	Profil de l'extrait	141
3.2.2.	Fractionnement initial	142
	a) Profil chromatographique des fractions obtenues	143
	b) Evaluation biologique de la fraction F12	143
3.2.3.	Fractionnement de la fraction F12 : purification des deux produits majoritaires de l'extrait	143
3.3.	Elucidation structurale des pyranochromanones acides isolées	144
3.3.1.	Composé majoritaire de l'extrait : acide blancoïque (114)	144
3.3.2.	Acide tétraptérique (115)	146
3.4.	Conclusion sur l'étude des feuilles du lot B de <i>Calophyllum tetrapterum</i> et comparaison avec le lot A	147
4.	Etude phytochimique de l'extrait DCM de feuilles de <i>Mesua assamica</i>	149
4.1.	Matériel végétal	149
4.1.1.	Description de l'espèce	149
4.1.2.	Matériel végétal collecté	149
4.2.	Fractionnement bioguidé initié	150
4.2.1.	Fractionnement de l'extrait DCM	150
4.2.2.	Evaluation biologique des fractions	151
4.3.	Analyse dérégulative de la composition chimique des fractions d'intérêt	151
4.3.1.	Composition des fractions cytotoxiques	152
4.3.2.	Composition des fractions inhibitrices de l'expression de VCAM-1	152
4.4.	Conclusion sur l'étude des feuilles de <i>Mesua assamica</i>	154
5.	Conclusion	154
	Bibliographie du chapitre III	157

CHAPITRE IV : ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE ET IMMUNOREGULATRICE D'UN PANEL DE POLYPHENOLS.....	161
1. Sélection d'un panel de polyphénols isolés de <i>Clusiaceae</i> / <i>Calophyllaceae</i>.....	164
2. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire des polyphénols par ELISA cellulaire.....	166
3. Evaluation de la toxicité des polyphénols sur les cellules endothéliales	167
4. Evaluation de l'effet des polyphénols sur un panel de protéines de l'inflammation et de l'immunité.....	169
4.1. Principe du test par cytométrie en flux.....	169
4.1.1. Principe de la cytométrie en flux	169
4.1.2. Comparaison avec la méthode d'ELISA cellulaire.....	170
4.1.3. Marqueurs membranaires de l'inflammation et de l'immunité analysés	171
4.1.4. Protocole mis en place par cytométrie en flux.....	171
4.2. Effets régulateurs sur différents marqueurs de l'inflammation.....	173
4.2.1. Effets sur l'expression basale des protéines.....	173
4.2.2. Effets sur l'expression induite de VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine	173
4.3. Effets régulateurs sur divers marqueurs des réponses immunes	175
4.3.1. Choix des témoins inhibiteurs.....	175
4.3.2. Effet sur l'expression constitutive de HLA I, HLA-E et MICA	177
4.3.3. Effet sur l'expression régulée de HLA I, HLA II, HLA-E et MICA	179
5. Conclusion et discussion	181
Bibliographie du chapitre IV.....	185
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	189
Bibliographie de la conclusion générale	193
PARTIE EXPERIMENTALE.....	195
1. Matériel végétal	197
2. Extractions.....	199
2.1. Extraction automatisée sous pression	199
2.2. Extraction par appareil de Soxhlet.....	199
3. Méthodes de purification.....	199
3.1. Extraction en phase solide	199
3.2. Chromatographie sur colonne ouverte	200
3.3. Chromatographie flash	200
3.4. Chromatographie liquide haute performance préparative et semi-préparative.....	200
3.5. Chromatographie sur couche mince préparative.....	201
4. Méthodes d'analyse	201
4.1. Chromatographie sur couche mince.....	201
4.2. Chromatographie liquide haute performance	201
4.2.1. HPLC-UV-DAD	201
4.2.2. HPLC-UV-ESI-MS ⁿ	203
4.2.3. HPLC-UV-DEDL.....	203
4.3. Point de fusion.....	204
4.4. Pouvoir rotatoire.....	204
4.5. Spectrophotométrie UV.....	204
4.6. Dichroïsme circulaire électronique	204
4.7. Résonance magnétique nucléaire	204
4.8. Spectrométrie de masse	204
4.8.1. Spectrométrie de masse basse résolution	204
4.8.2. Spectrométrie de masse haute résolution	205
4.9. Cristallographie aux rayons X	205
4.10. Simulation des spectres ECD et des pouvoirs rotatoires	205
5. Purification des composés	205
5.1. Fractionnements de l'extrait DCM de fruits de <i>Mesua lepidota</i>	205

5.1.1.	Chromatographies flash réalisées sur l'extrait brut.....	205
	a) Chromatographie flash en phase inverse sur l'extrait 1.....	205
	b) Chromatographie flash en phase normale sur l'extrait 1.....	206
	c) Chromatographie flash en phase normale sur l'extrait 2.....	206
5.1.2.	HPLC (semi-)préparatives conduites sur les fractions.....	206
	a) Purification de la fraction 5436F_DCM_B.....	206
	b) Purification de la fraction 5436F_DCM_C.....	207
	c) Purification de la fraction 5436F_DCM_H'.....	207
	d) Purification de la fraction 5436F_DCM_I'.....	207
	e) Purification de la fraction 5436F_DCM_J'.....	207
5.2.	Fractionnements de l'extrait DCM de feuilles du lot A de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	208
5.2.1.	Chromatographie flash réalisée sur l'extrait brut.....	208
5.2.2.	Fractionnement de la fraction FIII et réaction d'acétylation.....	208
	a) Chromatographie flash réalisée sur la fraction FIII.....	208
	b) Acétylation de la fraction FIII-11.....	208
	c) Purification de la fraction FIII-11 après réaction d'acétylation.....	208
5.2.3.	Fractionnement de la fraction FIV.....	209
	a) Purifications par chromatographies flash.....	209
	b) Purification de la fraction FIV-6-1-2-1 par CCM préparative.....	210
	c) Purification de la fraction FIV-6-ER-4 par HPLC préparative.....	210
5.2.4.	Fractionnement de la fraction FVI.....	211
	a) Chromatographie flash réalisée sur FVI.....	211
	b) Purifications par chromatographies sur colonne ouverte.....	211
5.3.	Fractionnements de l'extrait DCM de feuilles du lot B de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	211
5.3.1.	Chromatographie flash réalisée sur l'extrait brut.....	211
5.3.2.	Fractionnement de la fraction F12.....	212
5.4.	Fractionnement de l'extrait DCM de feuilles de <i>Mesua assamica</i>	212
6.	Données spectrales des composés isolés.....	212
6.1.	Phénylcoumarines isolées des fruits de <i>Mesua lepidota</i>	213
6.2.	Composés isolés des feuilles de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	223
7.	Evaluation de l'activité inhibitrice de la formation des AGEs.....	232
8.	Evaluation des activités cytotoxiques, anti-inflammatoires et immunosuppressives sur cellules endothéliales.....	232
8.1.	Culture des cellules endothéliales.....	232
8.2.	Evaluation de l'expression de VCAM-1 par ELISA cellulaire.....	233
8.3.	Evaluation de la viabilité cellulaire en parallèle du test ELISA.....	233
8.4.	Evaluation de l'expression de marqueurs de l'inflammation et de l'immunité par cytométrie en flux.....	234
8.5.	Evaluation de l'effet des molécules sur la viabilité cellulaire.....	235
8.6.	Analyse statistique.....	235
	Bibliographie de la partie expérimentale.....	237
	GLOSSAIRE DES TERMES BOTANIQUES.....	239
	Bibliographie du glossaire des termes botaniques.....	243
	ANNEXES.....	245

Liste des abréviations

ABTS : acide 2,2'-Azino-di-(3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulfonique)

Ac : Anticorps

AcOEt : Acétate d'Ethyle

APC : AlloPhycoCyanine

ATCC : *American Type Cell Culture*

BSA : *Bovine Serum Albumin*

c : concentration (en g/100 mL)

CAM : *Cell-Adhesion Molecules*

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CD : Cluster de Différenciation

CDCl₃ : Chloroforme deutéré

CE : Cellule Endothéliale

CHCl₃ : Chloroforme

CI₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50 %

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COSY : *CORrelated SpectroscopY*

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CsA : Ciclosporine A

C_v : Volume de Colonne

d : doublet

DAD : *Diode Array Detector*

DAMPs : *Damage Associated Molecular Patterns*

DCM : Dichlorométhane

dd : doublet de doublet

ddd : doublet de doublet de doublet

DEDL : Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière

DES : *Deep Eutectic Solvent*

DFT : *Density Functional Theory*

Dil : Diluant

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DO : Densité Optique

dq : doublet de quadruplet

ECBM : *Endothelial Cell Basal Medium*

ECD : *Electronic Circular Dichroism*

ECGS : *Endothelial Cell Growth Supplement*

ESI : *ElectroSpray Ionization*
FITC : *Fluorescein IsoThioCyanate*
FSC : *Forward SCatter*
GC : *Gas Chromatography*
GFI : *Geometric Fluorescence Intensity*
GIAOs : *Gauge-Invariant Atomic Orbitals*
Gly : Glyoxal
hbFGF : *human basic Fibroblast Growth Factor*
HE : Huile Essentielle
hEGF : *human Epithelial Growth Factor*
hept : heptuplet
HMGB1 : *High Mobility Group Box 1*
HLA : *Human Leukocyte Antigen*
HMBC : *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*
HMQC : *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*
HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*
HR : Haute Résolution
HSP : *Heat Shock Protein*
HSQC : *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
HUVECs : *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
ICAM-1 : *InterCellular Adhesion Molecule 1*
IFN- γ : Interféron gamma
Ig : Immunoglobuline
IL : InterLeukine
 J : constante de couplage
LT : Lymphocyte T
 m : multiplet
MeOH- d_4 : Méthanol deutéré
MeOH : Méthanol
MICA : *Major histocompatibility complex class I related Chain A*
MM : Masse Molaire
MS : *Mass Spectrometry*
MTT : bromure de 3-(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphénylTétrazolium
 m/z : rapport masse /charge
NaDES : *Natural Deep Eutectic Solvent*
NFAT : *Nuclear Factor of Activated T cells*

NF- κ B : *Nuclear Factor-kappa B*
NK : *Natural Killer*
NO : monoxyde d'azote
NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
NT : Non Traité
PAF : *Platelet Activating Factor*
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
PDTC : *Pyrrolidine DiThioCarbamate*
PLE : *Pressurized Liquid Extraction*
PMT : *PhotoMultiplier Tube*
PPAPs : *PolyPrenylated AcylPhoroglucinols*
q : quadruplet
RAGE : *Receptor for Advanced Glycation End products*
RCT : Récepteur des Cellules T
R_f : Rapport frontal
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : *Reactive Oxygen Species*
RPM : Rotation Par Minute
s : singulet
sext : sextuplet
SLM : *Standard Liter per Minute*
SPE : *Solid Phase Extraction*
SSC : *Side SCatter*
SVF : Sérum de Veau Fœtal
t : triplet
td : triplet de doublet
TFA : *TriFluoroacetic Acid*
TLR : *Toll Like Receptor*
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha*
t_R : temps de Rétention
UV : Ultra-Violet
VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*
 δ : déplacement chimique
 λ : longueur d'onde
[α]_D : pouvoir rotatoire mesuré à 589 nm (raie D du sodium)



Table des figures

CHAPITRE I

Figure 1. Localisation de l'endothélium vasculaire	10
Figure 2. Tapis confluent de cellules endothéliales (HUVECs) observé au microscope à contraste de phase	10
Figure 3. Allo-reconnaissance directe et indirecte	13
Figure 4. Etapes de l'activation lymphocytaire T et cibles des agents immunosuppresseurs	16
Figure 5. Etapes du recrutement des leucocytes sur un site inflammatoire	19
Figure 6. Structures et sites modulés de quelques polyphénols aux propriétés immunosuppressives	20
Figure 7. Prénylation de protéines <i>via</i> la voie du mévalonate et effets sur l'immunité	21
Figure 8. Structures de quelques inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase ou d'enzymes intervenant dans des voies de prénylation	22
Figure 9. Dysfonction endothéliale et exemples de facteurs déclenchants	23
Figure 10. Arbre phylogénétique de l'ordre des malpighiales	24
Figure 11. Distribution géographique des <i>Clusiaceae</i> (A) et des <i>Calophyllaceae</i> (B)	27
Figure 12. Structures de quelques polyphénols isolés de <i>Clusiaceae</i> et de <i>Calophyllaceae</i>	28
Figure 13. Distribution des métabolites secondaires pertinents au sein du clade des clusioïdes	29
Figure 14. Fleur et jeune fruit de <i>G. mangostana</i> L. (A), fleur de <i>Calophyllum inophyllum</i> (B), et <i>Mesua ferrea</i> (plante entière) (C)	30
Figure 15. Schéma de biosynthèse des xanthones	34
Figure 16. Exemples de xanthones isolées du genre <i>Garcinia</i>	35
Figure 17. Exemples de xanthones isolées du genre <i>Calophyllum</i>	35
Figure 18. Schéma de biosynthèse des PPAPs de type B	38
Figure 19. Différents types de PPAPs et numérotation correspondante	38
Figure 20. Exemples de benzophénones prénylées isolées du genre <i>Garcinia</i>	39
Figure 21. Exemples de benzophénones prénylées isolées du genre <i>Calophyllum</i>	39
Figure 22. Benzophénone prénylée isolée du genre <i>Mesua</i>	39
Figure 23. Schéma de biosynthèse des biflavonoïdes	40
Figure 24. Exemples de biflavonoïdes isolés du genre <i>Calophyllum</i>	41
Figure 25. Biflavonoïdes isolés du genre <i>Mesua</i>	41
Figure 26. Schéma de biosynthèse des coumarines de type mammea	43
Figure 27. Exemples de coumarines isolées du genre <i>Calophyllum</i>	43
Figure 28. Schéma de biosynthèse des pyranochromanones acides et des pyranocoumarines	47
Figure 29. Exemples de (pyrano)chromanones acides isolées du genre <i>Calophyllum</i>	48
Figure 30. 4-Chromanones isolée du genre <i>Mesua</i>	48
Figure 31. Schéma de biosynthèse des triterpènes	49

Figure 32. Exemples de triterpènes isolés du genre <i>Calophyllum</i>	49
Figure 33. Exemples d'autres métabolites secondaires isolés du genre <i>Mesua</i>	51

CHAPITRE II

Figure 34. Schéma du test de criblage anti-inflammatoire et du test au MTT	71
Figure 35. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 1, détection à 280 nm) des extraits DCM d'écorces, DCM de feuilles, et MeOH de feuilles de <i>Calophyllum tetrapterum</i> (A = lot A, B = lot B, C = lot C), et spectres UV et masses molaires de quelques composés majoritaires	84
Figure 36. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 1, 280 nm) des extraits DCM et MeOH de feuilles de <i>Mesua assamica</i> , et spectres UV et masses molaires des composés majoritaires	85
Figure 37. Chromatogramme HPLC-UV (méthode 1, 280 nm) de l'extrait DCM de fruits de <i>Mesua lepidota</i> , et spectres UV et masses molaires des composés majoritaires	85
Figure 38. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 1, 280 nm) des extraits d'écorces (B) et de feuilles (L) de <i>Mesua nuda</i> , et spectres UV et masses molaires de quelques composés	86
Figure 39. Représentation schématique de la formation des AGEs	88
Figure 40. Principe du test anti-AGEs	88

CHAPITRE III

Figure 41. Photographies du tronc, des feuilles et des fruits de <i>Mesua lepidota</i>	98
Figure 42. Lieu de récolte des écorces, feuilles et fruits de <i>Mesua lepidota</i> en Malaisie	99
Figure 43. Différentes couches du fruit de <i>Mesua lepidota</i>	99
Figure 44. Coupe transversale du fruit de <i>Mesua lepidota</i>	100
Figure 45. Poudre du fruit de <i>Mesua lepidota</i>	101
Figure 46. Profil HPLC (3D plot) de l'extrait DCM de fruits de <i>Mesua lepidota</i> (méthode 2)	102
Figure 47. Spectre de RMN du proton de l'extrait DCM de fruits de <i>M. lepidota</i> (5436F_DCM)	102
Figure 48. Schémas de fractionnement des extraits DCM de fruits de <i>M. lepidota</i> et molécules isolées	104
Figure 49. Profil HPLC-UV (280 nm, méthode 2) de l'extrait 5436F_DCM mettant en évidence les deux composés majoritaires, les lépidotols A (94) et B (95)	105
Figure 50. Chromatogramme HPLC-UV (301 nm, méthode 3) de la fraction C de 5436F_DCM et composés en ayant été isolés	106
Figure 51. Chromatogrammes (expansions) HPLC-UV (280 nm, méthode 4) des fractions I' et J' de 5436F_DCM et composés en ayant été isolés	107
Figure 52. Spectre de RMN ¹ H (zones de δ 0,5-8,5 ppm et 18,6-19,1 ppm) du composé 94 (300 MHz, CDCl ₃)	108
Figure 53. Spectre de RMN ¹³ C (δ de 10 à 210 ppm) du composé 94 (125 MHz, CDCl ₃)	109

Figure 54. Spectre de masse (ESI) -MS ² du composé 94	109
Figure 55. Expansions des spectres HMBC et NOESY (400 et 500 MHz, CDCl ₃) du composé 94	110
Figure 56. Corrélations observées en HMBC pour l'hydroxyle chélaté (400 MHz, CDCl ₃).....	111
Figure 57. Hypothèses a et b de structure du composé 94 et principales corrélations HMBC indiquées sur la structure a.....	111
Figure 58. Structure du composé 94 identifiée par cristallographie aux rayons X, et équilibre tautomérique de la β-dicétone	112
Figure 59. Expansions du spectre HMBC pour l'attribution des δ de C-4, C-4a et C-7	112
Figure 60. Structures des composés structurellement proches du lépidotol A (94).....	113
Figure 61. Structure et spectre de RMN ¹ H du composé 95 , avec expansions sur les signaux de la chaîne 2-méthylbutyryle (300 MHz, CDCl ₃).....	114
Figure 62. Expansion du spectre COSY sur les signaux de la chaîne acyle du composé 95 (500 MHz, CDCl ₃)	114
Figure 63. Structure du composé 96	115
Figure 64. Structure du composé 97 et valeurs des déplacements chimiques δ (ppm) observés sur les spectres de RMN ¹ H et ¹³ C pour la chaîne acyle	115
Figure 65. Signaux de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) des chaînes substituant la position 6 du composé 98	116
Figure 66. Structure du composé 98 et corrélations HMBC de la chaîne 3-hydroxy-3-méthylbutényle	117
Figure 67. Corrélations COSY et HMBC (500 MHz, CDCl ₃) au niveau du cycle dihydrofurane.....	118
Figure 68. Structure du composé 99 et quelques corrélations des spectres HMBC	118
Figure 69. Structure du composé 100 et expansion de son spectre de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) au niveau des signaux dédoublés.....	119
Figure 70. Structure du composé 101	120
Figure 71. Structure du composé 102	120
Figure 72. Schéma hypothétique de biosynthèse des composés 94 , 95 , 98 , 99 et 100 avec conservation de la stéréochimie	121
Figure 73. Photographies du tronc et des feuilles du lot A de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	124
Figure 74. Site de collecte des écorces et feuilles du lot A de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	124
Figure 75. (A) Section transversale de la nervure de la feuille du lot A de <i>Calophyllum tetrapterum</i> . (B) Détail de la nervure en section transversale. (C) Détail du parenchyme observé en lumière polarisée	125
Figure 76. Profil HPLC (3D plot) de l'extrait DCM de feuilles du lot A de <i>Calophyllum tetrapterum</i> (méthode 5)	126

Figure 77. Schéma de fractionnement de l'extrait DCM de feuilles du lot A de <i>C. tetrapterum</i> et molécules isolées	127
Figure 78. Profil HPLC-UV (280 nm, méthode 5) des fractions FIII, FIV et FVI de l'extrait 5382L_DCM	128
Figure 79. Effet des fractions 5382L_DCM_FI à FXI (0,5, 5 et 50 µg/mL) sur la viabilité et sur l'expression de VCAM-1 des cellules HUVECs, après induction par le TNF-α.....	129
Figure 80. PPAP majoritaire de l'extrait et triterpène et stéroïdes isolés de la fraction FIV.....	130
Figure 81. Chromatogramme HPLC-UV (254 nm, méthode 8) de la fraction FIV-6-ER-4 de 5382L_DCM et composés en ayant été isolés.....	130
Figure 82. Chromatogramme HPLC-UV (280 nm, méthode 5) de la fraction FVI-3 de 5382L_DCM et composés isolés	131
Figure 83. Profil HPLC-DEDL et spectre UV du canophyllol (109) (méthode 5)	132
Figure 84. Conditions réactionnelles et profils HPLC-UV (280 nm, méthode 9) de la fraction FIII-11 avant et après réaction d'acétylation	133
Figure 85. Spectre de RMN ¹ H du composé 105 (500 MHz, MeOH-d ₄ + 0,1 % TFA)	134
Figure 86. Éléments structuraux du composé 105 définis et corrélations HMBC	135
Figure 87. Expansion du spectre HMBC (500 MHz, CDCl ₃) et structure partielle du composé 106 ..	136
Figure 88. Expansions des spectres COSY et HMBC sur les signaux de la chaîne 2-méthylbutyryle du composé 106 (500 MHz, CDCl ₃).....	136
Figure 89. Structure du composé 106	137
Figure 90. Structure du composé 105 déduite à partir de sa réaction avec le chlorure d'acétyle	137
Figure 91. Structure de la laxifloranone (113)	137
Figure 92. Structure du composé 109 identifiée par cristallographie aux rayons X.....	138
Figure 93. Structures des composés 82 et 110 identifiés en mélange.....	138
Figure 94. Structure du composé 111	139
Figure 95. Photographies du tronc et des feuilles du lot B de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	140
Figure 96. Site de récolte des écorces et feuilles du lot B de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	140
Figure 97. (A) Feuille du lot B de <i>Calophyllum tetrapterum</i> en section transversale. (B) Détail de la nervure médiane en section transversale.....	141
Figure 98. Profil HPLC (3D plot) de l'extrait DCM de feuilles du lot B de <i>Calophyllum tetrapterum</i> (méthode 10)	142
Figure 99. Schéma de fractionnement de l'extrait DCM de feuilles du lot B de <i>C. tetrapterum</i> et molécules isolées	142
Figure 100. Chromatogramme HPLC-UV (254 nm, méthode 11) de la fraction F12 de 5617L_DCM et composés isolés	144
Figure 101. Spectre de RMN ¹ H du composé 114 (300 MHz, CDCl ₃).....	145

Figure 102. Structures possibles pour le composé 114 et corrélations HMBC permettant de valider la structure a	145
Figure 103. Structure et spectre de RMN ¹ H (expansion) du composé 115 (300 MHz, CDCl ₃)	146
Figure 104. Expansions des spectres COSY et HMBC sur les signaux de la chaîne acide du composé 115 (500 MHz, CDCl ₃)	147
Figure 105. Schéma de biosynthèse proposé pour le PPAP et la pyranochromanone acide majoritaires des lots A et B de <i>Calophyllum tetrapterum</i>	148
Figure 106. Photographies du tronc et des feuilles de <i>Mesua assamica</i>	149
Figure 107. Site de collecte des écorces et feuilles de <i>Mesua assamica</i> en Malaisie	150
Figure 108. Chromatogramme de la chromatographie flash [280 nm (en violet) et 254 nm (en rouge)] réalisée sur l'extrait DCM de feuilles de <i>M. assamica</i> et fractions obtenues	150
Figure 109. Chromatogrammes HPLC-UV (254 nm, méthode 12) des fractions F8 et F10 de l'extrait 5442L_DCM, et structure générale des xanthones	152
Figure 110. Structures des coumarines de type mammea possibles d'après l'analyse dérégulative des fractions bioactives de l'extrait 5442L_DCM	154

CHAPITRE IV

Figure 111. Composés sélectionnés pour l'étude des effets sur un panel de marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité	165
Figure 112. Effet des polyphénols purifiés, de la ciclosporine (3) et de l'acide zolédronique (126) sur la viabilité des HUVECs après 48 h d'incubation	168
Figure 113. Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux	170
Figure 114. Schéma du protocole de test mesurant l'effet sur des marqueurs de l'inflammation et de l'immunité par cytométrie en flux	172
Figure 115. Effet des composés polyphénoliques (10 µM) sur l'expression basale des marqueurs de l'inflammation à la surface des HUVECs	173
Figure 116. Effet des composés polyphénoliques (10 µM) sur l'expression des marqueurs de l'inflammation induite par le TNF-α	174
Figure 117. Courbe dose-réponse et valeur d'IC ₅₀ du lépidotol A (94) sur l'inhibition de l'expression de VCAM-1	174
Figure 118. Structures des agents immunomodulateurs évalués	175
Figure 119. Analyse par cytométrie en flux de l'effet de l'acide zolédronique (126) à 10 µM sur l'expression constitutive de HLA I, HLA-E et MICA après 66 h de traitement	176
Figure 120. Analyse par cytométrie en flux de l'effet de la ciclosporine (3) et de l'acide zolédronique (126) à 10 µM sur l'expression induite de HLA II (HLA-DR) et de HLA-E	177

Figure 121. Effet des polyphénols (10 μ M) sur l'expression basale des marqueurs de l'inflammation à la surface des HUVECs après 1 h (A) et 48 h (B) d'incubation	178
Figure 122. Observation des cellules endothéliales (HUVECs) au microscope à contraste de phase avant (A) et après (B) activation par l'IFN- γ pendant 48 h.....	179
Figure 123. Effet des composés polyphénoliques (10 μ M) sur l'expression des molécules du HLA de classe I et II induite par l'IFN- γ	180
Figure 124. Effet des composés polyphénoliques (10 μ M) sur l'expression de HLA-E et de MICA modulée par l'IFN- γ	180
Figure 125. Structures des coumarines anti-inflammatoires et immunosuppressives	182
Figure 126. Structure de trois PPAPs testés pour leurs effets sur l'inflammation et/ou sur l'immunité	182
Figure 127. Mécanismes d'action des immunosuppresseurs et effets de deux PPAPs : la guttiférone J (125) et l'isogarcinol (16).....	183

PARTIE EXPERIMENTALE

Figure 128. Structure et spectre UV du lépidotol A (94)	213
Figure 129. Structure et spectre UV du lépidotol B (95)	215
Figure 130. Structure et spectre UV du lépidotol C (96)	216
Figure 131. Structure et spectre UV du lépidotol D (97)	217
Figure 132. Structure et spectre UV du lépidotol E (98)	218
Figure 133. Structure et spectre UV de la lépidotine A (99)	219
Figure 134. Structure et spectre UV de la lépidotine B (100)	220
Figure 135. Structure et spectre UV de mammea A/OB (101).....	221
Figure 136. Structure et spectre UV de mammea A/OC (102).....	222
Figure 137. Structure et spectre UV de la tétraptérone (105)	223
Figure 138. Structure et spectre UV de la tétraptérine (106)	224
Figure 139. Structure du canophyllol (109)	225
Figure 140. Structure du stigmastérol (82)	227
Figure 141. Structure du β -sitostérol (110).....	228
Figure 142. Structure et spectre UV de la 3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (111).....	229
Figure 143. Structure et spectre UV de l'acide blancoïque (114)	230
Figure 144. Structure et spectre UV de l'acide tétraptérique (115).....	231

Table des tableaux

CHAPITRE I

Tableau 1. Classification et effets secondaires des immunosuppresseurs utilisés en transplantation .	14
Tableau 2. Classification des genres au sein des <i>Clusiaceae</i> et des <i>Calophyllaceae</i>	25
Tableau 3. Répartition des principaux métabolites secondaires isolés dans les 3 genres étudiés	33
Tableau 4. Xanthones isolées du genre <i>Mesua</i>	36
Tableau 5. Structures des xanthones isolées du genre <i>Mesua</i>	37
Tableau 6. Nomenclature des coumarines de type mammea, proposée par Crombie <i>et al.</i>	42
Tableau 7. Coumarines isolées du genre <i>Mesua</i>	44
Tableau 8. Structures des coumarines isolées du genre <i>Mesua</i>	46
Tableau 9. Triterpènes isolés du genre <i>Mesua</i>	50
Tableau 10. Structures des triterpènes et de stéroïdes isolés du genre <i>Mesua</i>	50

CHAPITRE II

Tableau 11. Données bibliographiques recueillies sur les 35 espèces fournies	67
Tableau 12. Masses et rendements d'extraction obtenus par PLE à partir des différents organes des plantes sélectionnées.....	69
Tableau 13. Effet des extraits (0,5, 5 et 50 µg/mL) sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF-α	72
Tableau 14. Classes chimiques identifiées dans chaque type d'extrait	75
Tableau 15. Classes chimiques identifiées dans chaque extrait analysé par déréplication	81
Tableau 16. Activités anti-AGEs des extraits sélectionnés	89

CHAPITRE III

Tableau 17. Pouvoirs rotatoires expérimentaux et théoriques des composés 95 , 99 et 101	122
Tableau 18. Effet de la tétraptérone (105) (5, 25 et 50 µM) sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF-α	131
Tableau 19. Effet de la fraction 5617L_DCM_F12 (0,5, 5 et 50 µg/mL) sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF-α	143
Tableau 20. Effet des fractions de 5442L_DCM (0,5, 5 et 50 µg/mL) sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF-α	151
Tableau 21. Données UV et de masse des composés identifiés par déréplication dans les fractions anti-inflammatoires de l'extrait DCM de <i>M. assamica</i>	153

CHAPITRE IV

Tableau 22. Effet des polyphénols purifiés sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF- α	166
Tableau 23. Effet des molécules immunosuppressives témoins sur l'expression constitutive et modulée (par l'IFN- γ) des marqueurs de l'immunité après 48 h d'incubation.....	176

PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 24. Dates, lieux de récoltes et références des échantillons de <i>Clusiaceae</i> et de <i>Calophyllaceae</i> étudiés.....	197
Tableau 25. RMN ^1H (300 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol A (94)	213
Tableau 26. Données de diffraction aux rayons X du lépidotol A (94).....	214
Tableau 27. RMN ^1H (300 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol B (95)	215
Tableau 28. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol C (96)	216
Tableau 29. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol D (97)	217
Tableau 30. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol E (98).....	218
Tableau 31. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la lépidotine A (99).....	219
Tableau 32. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la lépidotine B (100).....	220
Tableau 33. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de mammea A/OB (101).....	221
Tableau 34. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de mammea A/OC (102).....	222
Tableau 35. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [MeOH-d_4 + 0,1 % TFA, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la tétraptérone (105)	223
Tableau 36. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la tétraptérine (106).....	224
Tableau 37. RMN ^1H (270 MHz) et ^{13}C (67,5 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du canophyllol (109).....	225
Tableau 38. Données de diffraction aux rayons X du canophyllol (109).....	226

Tableau 39. RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) [CDCl ₃ , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du stigmastérol (82)	227
Tableau 40. RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) [CDCl ₃ , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du β-sitostérol (110)	228
Tableau 41. RMN ¹ H (270 MHz) et ¹³ C (67,5 MHz) [CDCl ₃ , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la 3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (111)	229
Tableau 42. RMN ¹ H (300 MHz) et ¹³ C (125 MHz) [CDCl ₃ , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de l'acide blancoïque (114)	230
Tableau 43. RMN ¹ H et ¹³ C [CDCl ₃ , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de l'acide tétraptérique (115)	231

Table des annexes

Annexe 1. Table des structures chimiques	247
Annexe 2. Profils chromatographiques (HPLC-UV) des extraits MeOH bioactifs après filtration sur cartouche SPE de polyamide	252
Annexe 3. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 1, 280 nm) des extraits non retenus lors du criblage biologique et de la déréplication	253
Annexe 4. Description de la feuille de <i>Mesua lepidota</i> T. Anderson.....	257
Annexe 5. Analyse de l'huile essentielle des fruits de <i>Mesua lepidota</i>	259
Annexe 6. Spectres de RMN du lépidotol A (94)	261
Annexe 7. Spectres de RMN du lépidotol B (95)	264
Annexe 8. Spectres de RMN du lépidotol C (96)	266
Annexe 9. Spectres de RMN du lépidotol D (97)	268
Annexe 10. Spectres de RMN du lépidotol E (98)	270
Annexe 11. Spectres de RMN de la lépidotine A (99)	272
Annexe 12. Spectres de RMN de la lépidotine B (100)	275
Annexe 13. Spectres de RMN du mélange mammea A/OB (101) / mammea A/OC (102).....	277
Annexe 14. Extraction des fruits de <i>Mesua lepidota</i> par divers solvants « verts »	280
Annexe 15. Spectres de RMN de la tétraptérone (105)	284
Annexe 16. Spectres de RMN de la tétraptérine (106)	286
Annexe 17. Spectres de RMN de l'acide tétraptérique (115)	289
Annexe 18. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 12, 254 nm) des fractions F5, F6, F7 et F9 de l'extrait 5442L_DCM (<i>Mesua assamica</i>)	291
Annexe 19. Evaluation de l'hépatotoxicité de quatre polyphénols prénylés d'intérêt	292

Introduction

Introduction

La connaissance de l'Homme sur les propriétés thérapeutiques des plantes remonte à des milliers d'années. Le développement d'outils d'analyse de plus en plus performants au cours de ces dernières décennies a permis une forte avancée dans l'identification des métabolites secondaires responsables des activités thérapeutiques observées. Il est apparu que les organismes végétaux synthétisent des composés pouvant interagir avec les systèmes biologiques des êtres vivants qui les entourent, dans un but de défense notamment¹. Aujourd'hui, les sites géographiques de forte biodiversité constituent une ressource importante pour l'identification de nouveaux produits naturels d'intérêt, en particulier par la présence d'espèces endémiques².

Depuis une quinzaine d'années maintenant, le laboratoire Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux (SONAS) de l'Université d'Angers étudie les métabolites secondaires de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* principalement originaires de Malaisie et de Nouvelle-Calédonie, régions comptant parmi les 35 « hotspots » de la planète³. De 2009 à 2013, plusieurs composés isolés de ces plantes ont été évalués pour leurs propriétés anti-inflammatoires, par l'équipe 5 « Dysfonction endothéliale et glomérulaire : mécanismes et cibles thérapeutiques » (codirigée par le Dr. Béatrice Charreau) de l'unité INSERM 1064 / *Center of research in transplantation & immunology* (CRTI) du CHU de Nantes, dans le cadre du projet régional PROVASC visant à identifier des produits naturels bénéfiques pour la PROtection VASculaire. Des effets positifs ont ainsi été démontrés sur les cellules endothéliales⁴, ce qui a encouragé les deux équipes à approfondir ces premières investigations.

Dans le domaine de la transplantation d'organes, le risque de rejet de greffe ainsi que la toxicité des médicaments immunosuppresseurs sont des problèmes majeurs. La recherche de nouvelles molécules moins toxiques, et pouvant prévenir les rejets de greffe par des voies différentes s'avère donc nécessaire. Ainsi, toujours dans le cadre d'une étroite collaboration entre le laboratoire SONAS et l'équipe 5 de l'unité INSERM 1064, ce projet de thèse avait pour objectif d'identifier de nouveaux composés extraits de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* malaisiennes, capables de prévenir la dysfonction et l'immunogénicité des cellules endothéliales, qui sont impliquées dans la survenue des rejets de greffe. Il s'agissait plus précisément d'étudier la composition des extraits végétaux apparaissant les plus actifs par dérégulation, c'est-à-dire sans systématiquement en isoler tous les métabolites secondaires, afin de se focaliser sur les structures originales. Il était ensuite prévu d'isoler les produits originaux identifiés. La mise en place d'essais biologiques évaluant les propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives de divers produits d'origine naturels précédemment décrits devait également permettre de définir leur impact sur les cellules endothéliales.

Ce manuscrit se divise en quatre parties. La première se propose de définir le contexte de l'étude, par une présentation de la greffe et des produits d'origine naturelle pouvant en prévenir le rejet. Nous y découvrirons notamment le mode d'action des agents immunosuppresseurs actuellement utilisés en thérapeutique, et l'implication de l'endothélium vasculaire dans le rejet de greffe. Des données bibliographiques relatives à la classification botanique et aux métabolites secondaires des familles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae* seront aussi apportées dans ce premier chapitre, en insistant particulièrement sur les trois genres qui seront étudiés par la suite, *Garcinia*, *Calophyllum* et *Mesua*. Le deuxième chapitre décrira comment s'est fait le choix de différentes espèces végétales parmi un panel de plantes originaires de Malaisie, ainsi que les résultats d'un criblage anti-inflammatoire et d'une étude dérégulatrice des extraits préparés, ayant conduit à la sélection d'extraits riches en métabolites originaux. Le troisième chapitre exposera les études phytochimiques conduites sur quatre extraits d'intérêt, issus des espèces *Mesua lepidota*, *Calophyllum tetrapterum* et *Mesua assamica*. Le matériel végétal de chaque espèce sera présenté, et éventuellement complété par une description anatomique de l'organe utilisé. Différentes classes de métabolites secondaires seront abordées, au travers des coumarines, dont certaines originales, isolées des fruits de *Mesua lepidota* et décelées dans les feuilles de *Mesua assamica*, ou encore des acylphloroglucinols polyprénylés et des pyranochromanones acides, isolés des feuilles de deux lots distincts de *Calophyllum tetrapterum*. Enfin, le quatrième chapitre s'attachera à présenter des investigations conduites en parallèle des travaux de phytochimie, et consistant à évaluer les activités biologiques d'un panel de polyphénols de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae*. Plus précisément, nous nous intéresserons aux effets modulateurs de l'expression de divers marqueurs de l'inflammation et de l'immunité présents à la surface des cellules endothéliales. Ce dernier chapitre présentera ainsi le protocole mis en place par cytométrie en flux pour évaluer l'effet des composés, et mettra en évidence les propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives prometteuses de certains polyphénols polyprénylés.

Bibliographie de l'introduction

1. Agrawal, A. A.; Weber, M. G., On the study of plant defence and herbivory using comparative approaches: how important are secondary plant compounds. *Ecology letters* **2015**, 18, 985-991.
2. Coulerie, P.; Poullain, C., New Caledonia: a 'hot spot' for valuable chemodiversity. *Chemistry & Biodiversity* **2015**, 12, 841-858.
3. Hotspots. Conservation International [en ligne], <http://www.conservation.org/How/Pages/Hotspots.aspx>, consulté le 25 septembre 2015.
4. Dang, B. T.; Geny, C.; Blanchard, P.; Rouger, C.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Tonnerre, P.; Charreau, B.; Rakolomalala, G.; Randriamboavonjy, J. I.; Loirand, G.; Pacaud, P.; Litaudon, M.; Derbre, S., Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*. *Fitoterapia* **2014**, 96, 65-75.

Chapitre I : Contexte de l'étude

Chapitre I : Contexte de l'étude

Pour commencer, il convient d'apporter quelques informations bibliographiques qui permettront de bien appréhender le contexte général de la thèse.

Dans ce travail de thèse, nous nous proposons d'identifier des composés d'origine végétale originaux et susceptibles de prévenir la dysfonction et l'immunogénicité des cellules endothéliales, qui sont impliquées dans la survenue des rejets de greffe.

Ce premier chapitre s'attachera tout d'abord à définir l'endothélium vasculaire et la greffe. Les mécanismes impliqués dans le rejet de greffe, ainsi que les traitements immunosuppresseurs actuellement sur le marché seront ensuite détaillés, avant de préciser le rôle de l'endothélium dans le phénomène de rejet. La troisième partie de ce chapitre sera consacrée aux produits d'origine naturelle présentant un intérêt dans la prévention des rejets en transplantation. Nous nous attarderons ensuite sur les *Clusiaceae* et les *Calophyllaceae*, deux familles de plantes renfermant des composés potentiellement intéressants pour notre étude. Les aspects phylogénétiques et botaniques, la répartition géographique, les principaux métabolites secondaires et leurs activités biologiques, ainsi que les utilisations traditionnelles de ces plantes seront abordés. Enfin, une dernière partie sera consacrée à la description des trois genres étudiés au cours de cette thèse : les genres *Garcinia*, *Calophyllum* et *Mesua*. Les caractères botaniques seront détaillés en vue d'une meilleure compréhension lors de la présentation des espèces végétales étudiées, puis nous insisterons sur les données biogénétiques et structurales des principaux métabolites secondaires synthétisés par ces plantes.

1. Présentation de l'endothélium vasculaire et de la greffe

1.1. Définition et fonctions physiologiques de l'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire est une monocouche de cellules tapissant la face interne des vaisseaux sanguins (**Figure 1**). On estime, chez l'Homme, le nombre de cellules endothéliales (CE) à environ 10^{13} . Les CE sont de forme aplatie et leurs dimensions sont de l'ordre de $0,5 \mu\text{m}$ d'épaisseur, $100 \mu\text{m}$ de longueur et $10 \mu\text{m}$ de largeur. Bénéficiant d'une grande plasticité, leur forme allongée *in vivo* peut devenir cubique en culture *in vitro* lorsqu'elles arrivent à confluence (**Figure 2**).¹

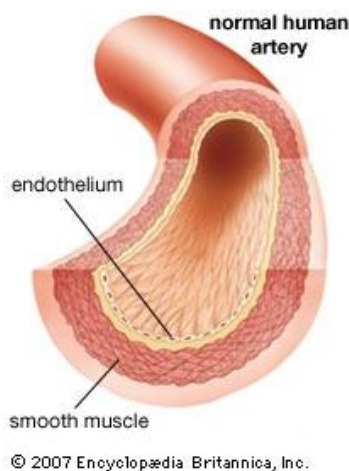


Figure 1. Localisation de l'endothélium vasculaire

(Source : <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/40908/atherosclerosis>)

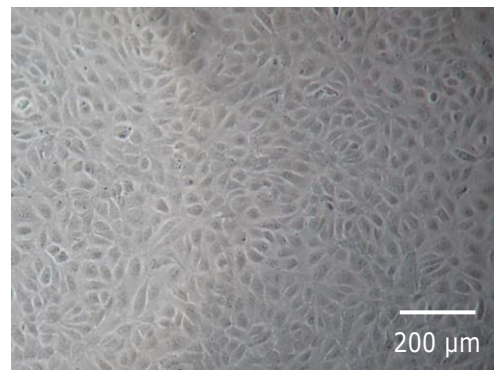


Figure 2. Tapis confluent de cellules endothéliales (HUVECs) observé au microscope à contraste de phase

L'endothélium travaille à maintenir une homéostasie au sein du vaisseau grâce à de multiples interactions. Il préserve la fluidité sanguine mais peut, sous certaines conditions, créer un environnement procoagulant par une activation plaquettaire et la production de facteurs agissant sur la coagulation et la fibrinolyse. Le tonus vasomoteur est également régulé par la production de vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline, et de vasoconstricteurs comme l'endothéline et le *platelet activating factor* (PAF). Les CE s'adaptent aussi à la présence des agents pathogènes en produisant des cytokines telles que l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-18 et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), et des molécules d'adhérence qui contrôlent le passage des leucocytes circulants du compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire.^{1,2}

Malgré ces propriétés communes, les cellules endothéliales présentent une hétérogénéité structurelle en fonction des organes, influençant notamment l'intensité de leurs réponses à un même *stimulus*¹.

1.2. Définition de la greffe

La greffe, ou transplantation, consiste à transférer un greffon d'un individu donneur à un individu receveur. Le greffon peut être un organe (rein, foie, cœur, pancréas, poumon)³, un tissu (cornée, peau, os)⁴, ou des cellules souches hématopoïétiques⁵.

La greffe est utilisée dans des indications vitales ou pour restaurer une fonction essentielle, et constitue par exemple le traitement de choix en phase d'insuffisance rénale chronique terminale⁶. En 2013, sur plus de 5000 greffes d'organes enregistrées en France, 60 % étaient des greffes du rein⁷.

Selon la source du donneur, on distingue trois types de greffes : l'autogreffe lorsque le greffon provient du receveur, l'allogreffe lorsque le donneur et le receveur sont génétiquement différents mais de la même espèce, et enfin la xéngreffe lorsque les individus sont d'espèce différente⁸.

2. Le rejet de greffe

Les premières expériences de transplantation tissulaire furent réalisées chez l'Homme dès le XIX^e siècle, notamment avec l'invention de la greffe épidermique par le Suisse Jacques-Louis Reverdin⁹. Qu'il s'agisse d'organes ou de tissus, le rejet de greffe apparût cependant comme un obstacle majeur à la survie post-transplantation, et ce ne fut que plus tardivement, dans les années 1960, que le recours à un traitement immunosuppresseur fut envisagé lors d'une greffe de rein¹⁰.

2.1. Définitions et mécanismes du rejet de greffe

2.1.1. Définition et cause principale du rejet

Le succès de la transplantation dépend principalement de la réponse immunitaire du receveur, qui peut aller jusqu'au rejet et à la destruction du greffon lorsque celui-ci est reconnu comme étranger. Une telle réponse allo-immune peut être provoquée par trois types d'antigènes du non-soi : ceux du groupe sanguin ABO, ceux du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) appelé *human leukocyte antigen* (HLA) chez l'Homme, et, à plus faible degré, ceux du non-HLA⁸. L'immunogénicité varie cependant selon l'organe ou le tissu greffé, la peau et la moelle osseuse étant les tissus les plus immunogènes¹¹.

Les antigènes HLA sont des protéines retrouvées à la surface des cellules, dont la fonction est de présenter des fragments de peptides dérivés d'antigènes aux récepteurs de cellules de l'immunité. Le CMH, région du génome, code pour deux classes de HLA : les classes I et II. Les molécules du HLA de classe I, présentes à la surface de toutes les cellules nucléées, présentent des peptides dérivés de protéines intracellulaires aux lymphocytes T CD8⁺. Les antigènes du HLA de classe II sont distribués à la surface de certaines cellules de l'immunité uniquement, appelées cellules présentatrices d'antigène (CPA), telles que les lymphocytes B, les macrophages ou les cellules endothéliales. Les peptides qu'ils présentent dérivent de protéines extracellulaires et les lymphocytes T visés expriment la protéine

membranaire CD4. Des sous-types existent au sein de chaque classe de HLA, conduisant à une grande diversité entre les individus⁸.

2.1.2. Types de rejets et leurs mécanismes

a) Rejet de greffe hyper aigu

Le rejet hyper aigu se manifeste dans les minutes ou les heures qui suivent la transplantation. Il est dû à la présence, chez le receveur, d'anticorps (Ac) préformés dirigés contre les antigènes du greffon, en particulier ceux du système ABO ou d'histocompatibilité [HLA et *major histocompatibility complex class I related chain A* (MICA)]. Ces anticorps vont alors se fixer sur le greffon et activer la cascade du complément, entraînant des lésions au niveau des cellules, une thrombose des vaisseaux, et finalement une nécrose du greffon.

Une technique de détection des anticorps cytotoxiques préexistants chez le receveur, appelée le *cross-match*, est systématiquement réalisée avant une greffe. Un résultat faiblement positif du *cross-match*, ainsi qu'une compatibilité ABO entre donneur et receveur, permettent généralement d'éviter le rejet hyper aigu.^{6,11}

b) Rejet de greffe aigu

Sous traitement immunosuppresseur, le rejet aigu survient dans les premières semaines voire les premiers mois post-greffe, avec un pic de fréquence le premier mois. Ce type de rejet peut être médié par des cellules du système immunitaire et/ou par des anticorps, capables de reconnaître des allo-antigènes du donneur.

Deux voies peuvent conduire à une reconnaissance d'antigènes, l'une dite « directe » et l'autre « indirecte ». L'allo-reconnaissance directe fait intervenir des CPA du donneur qui ont quitté le greffon, et dont les molécules du HLA (porteuses de peptides du non-soi) sont reconnues par les lymphocytes T du receveur, *via* le récepteur des cellules T (RCT). L'allo-reconnaissance indirecte fait suite à la reconnaissance, par les LT du receveur, de protéines étrangères (celles du donneur) présentées par les CPA du receveur (**Figure 3**)^{8,11}. Les lymphocytes T ainsi activés vont conduire à la destruction du greffon, qu'il s'agisse de lymphocytes T CD8⁺ devenus cytotoxiques, ou de lymphocytes T CD4⁺ provoquant notamment la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B *via* la sécrétion de cytokines⁸.

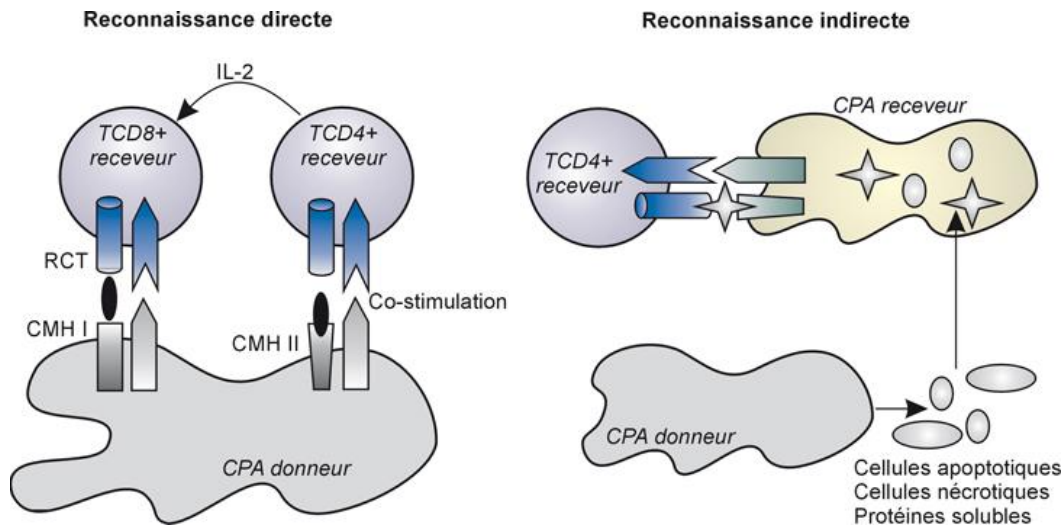


Figure 3. Allo-reconnaissance directe et indirecte

(Source : http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/92/Chapitre_2.html)

Durant le processus de transplantation, des lésions cellulaires de l'allogreffe s'accompagnent de la libération, dans la circulation, de molécules appelées *damage associated molecular patterns* (DAMPs). Ces débris cellulaires peuvent être des protéines oxydées par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites en réponse à l'ischémie et à la reperfusion de l'organe transplanté, ou d'autres protéines telles que la *high mobility group box 1* (HMGB1) ou la *heat shock protein* (HSP). Les DAMPs se lient à des récepteurs de l'immunité innée, les *toll like receptor* (TLR), qui sont exprimés à la surface des cellules dendritiques, des cellules endothéliales vasculaires, et des monocytes notamment. Certains DAMPs sont également des ligands du récepteur aux produits terminaux de la glycation (RAGE), présent entre autres sur les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales. La stimulation des TLR et du récepteur RAGE conduit à l'activation de facteurs de transcriptions dont NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*), ce qui déclenche alors la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α ¹²⁻¹⁴. Au niveau des cellules endothéliales, l'activation des TLR donne lieu à un phénomène inflammatoire par l'expression de chémokines et de sélectines, responsables de la transmigration des leucocytes dans le parenchyme⁶. Plusieurs études expérimentales ont également démontré l'effet stimulateur des DAMPs envers les réponses immunes innée et adaptative¹².

c) Rejet de greffe chronique

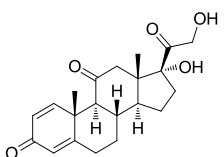
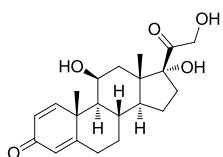
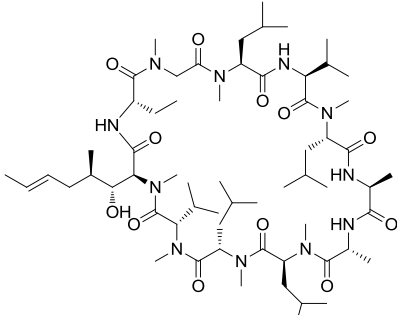
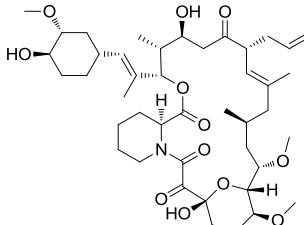
L'incidence du rejet chronique d'organe à cinq ans est environ deux fois plus élevée que celle du rejet aigu à un an¹⁵. Le rejet de greffe chronique apparaît progressivement après plusieurs années et se traduit par une détérioration de la fonction de l'organe. Histologiquement, une athérosclérose des vaisseaux et une fibrose des tissus apparaissent. Des causes immunes et non immunes en sont à l'origine, en commençant par l'âge du donneur et les lésions initiales de l'organe. Les autres

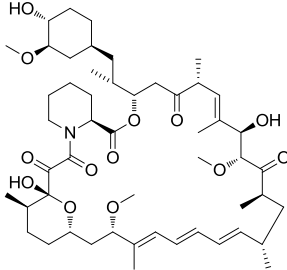
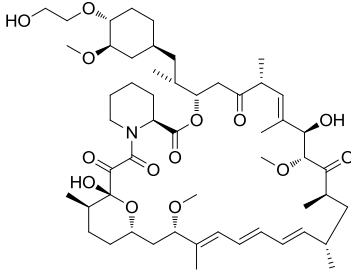
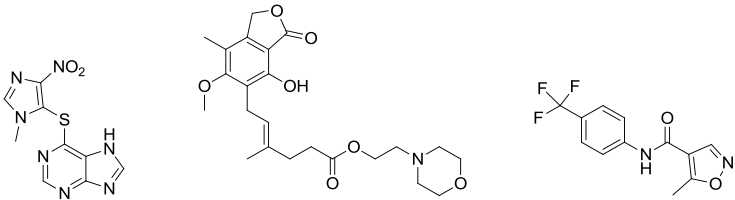
principaux facteurs non immunologiques comprennent les lésions post-ischémie-reperfusion, la fréquence des épisodes de rejet aigu, l'organotoxicité des immunosuppresseurs, et les troubles métaboliques que sont l'hypertension, l'hyperlipidémie et l'hyperglycémie. Des causes immunologiques sont également impliquées avec des attaques allo-immunes médiées par des cellules de l'immunité et par des anticorps. La production de certaines cytokines par les lymphocytes favorise la fibrose tissulaire, tandis que des mécanismes humoraux contribuent à l'artériopathie. Enfin, les infections, virales en particulier, participent à la dysfonction chronique de l'allogreffe.^{11,12}

2.2. Traitements immunosuppresseurs : sites d'action et effets secondaires

Afin d'induire une tolérance immunitaire et d'assurer la survie du greffon, des traitements immunosuppresseurs à la fois préventifs et curatifs sont administrés chez le receveur. Tous ont pour but premier d'empêcher l'activation ou la prolifération lymphocytaire, ou les mécanismes qui leur succèdent. La réponse immune se trouvant ainsi diminuée, les risques d'infections et de cancers sont augmentés et représentent des effets secondaires majeurs du traitement. En outre, de nombreux autres effets indésirables apparaissent fréquemment, souvent caractéristiques de la classe d'immunosuppresseurs à laquelle ils appartiennent (**Tableau 1**).⁸

Tableau 1. Classification et effets secondaires des immunosuppresseurs utilisés en transplantation

Classe	Exemples de molécules, structure, origine ^{16,17}	Effets secondaires ^{8,18}
Corticostéroïdes	<p>Prednisone (1) </p> <p>Prednisolone (2) </p> <p>Hémi-synthétiques (à partir de la diosgénine : <i>Dioscorea sp.</i>)¹⁹</p>	Syndrome de Cushing, rétention hydro-sodée, hyperlipidémie, diabète, hypertension, ostéoporose, retards de cicatrisation, troubles de la croissance, troubles de l'humeur
Inhibiteurs de la calcineurine	<p>Ciclosporine (CsA) (3)²⁰ </p> <p>Tacrolimus (4)²¹ </p> <p>Fongique : <i>Tolypodium inflatum</i></p> <p>Bactérienne : <i>Streptomyces tsukubaensis</i></p>	Néphrotoxicité, neurotoxicité, hypertension, hyperlipidémie, hyperkaliémie, diabète, augmentation de la résorption osseuse, hirsutisme, hyperplasie gingivale, troubles de l'audition, syndrome cholestatique

<p>Inhibiteurs de mTOR²²</p>	<p>Sirolimus ou rapamycine (5)</p>  <p>Bactérienne : <i>Streptomyces hygroscopicus</i></p> <p>Évérolimus (6)</p>  <p>Hémi-synthétique [à partir du sirolimus (5)]</p>	<p>Retards de cicatrisation, éruptions cutanées/acné, ulcères buccaux, stomatite herpétique, anémie, thrombocytopénie, leucopénie, hyperlipidémie, hypokaliémie, perturbation des analyses sanguines hépatiques, douleurs osseuses</p>
<p>Antimétabolites</p>	<p>Azathioprine (7) Mycophénolate mofétil (8)²³ Léfllunomide (9)²⁴</p>  <p>Synthétique (Acide mycophénolique : <i>Penicillium brevicompactum</i>) Synthétique</p>	<p><u>Azathioprine (7)</u> : myélosuppression</p> <p><u>Mycophénolate mofétil (8)</u> : myélosuppression, troubles gastro-intestinaux</p> <p><u>Léfllunomide (9)</u> : leucopénie, perturbation des analyses sanguines hépatiques</p>
<p>Anticorps monoclonaux³</p>	<p>OKT3 (anti-CD3), alemtuzumab (anti-CD52), rituximab (anti-CD20), basiliximab et daclizumab (anti-CD25), éculizumab (anti-C5)</p> <p>Génie génétique</p>	<p><u>Anti-CD3/52/20</u> : syndrome de relargage des cytokines (hypotension, flush, bronchospasme)</p> <p><u>Anti-CD25</u> : réactions allergiques</p>
<p>Ac polyclonaux</p>	<p>Immunoglobulines de cheval ou de lapin anti-lymphocytes humains</p>	<p>Syndrome de relargage des cytokines</p>
<p>Protéines de fusion</p>	<p>Belatacept (CTLA-4-Ig), alefacept (LFA-3-Ig)</p>	

Les immunosuppresseurs peuvent être classés en agents chimiques d'une part, et biologiques d'autre part. Les premiers englobent quatre groupes de molécules, agissant à différents niveaux de l'activation du lymphocyte T. Les corticostéroïdes, utilisés en traitement curatif du rejet aigu, se lient à un récepteur intracellulaire cytoplasmique et le complexe ainsi formé agit sur plusieurs cibles, notamment géniques sur des facteurs de transcription (AP-1, NF-κB), aboutissant à une diminution de la sécrétion de cytokines [IL-1, IL-6, IL-2 et interféron-γ (IFN-γ)]. Les autres classes d'immunosuppresseurs sont administrées en prévention du rejet de greffe aigu. Parmi elles, les inhibiteurs de la calcineurine, représentés par la ciclosporine [CsA (3)] et le tacrolimus (4), modulent également la synthèse de l'IL-2, responsable du signal de prolifération lymphocytaire, et d'autres cytokines telles que le TNF-α et l'IFN-γ. Cet undécapéptide (ciclosporine : Sandimmun®, Neoral®) et ce macrolide antibiotique (tacrolimus : Prograf®), qui opèrent en amont du noyau cellulaire, sont des agents charnières de la thérapeutique immunosuppressive, bien qu'associés à une néphrotoxicité aiguë et chronique. Les inhibiteurs de la protéine mTOR agissent plus en aval, après le récepteur de

l'IL-2, permettant un blocage de la progression du cycle cellulaire et donc une inhibition la prolifération lymphocytaire. L'effet antiprolifératif est aussi obtenu avec les agents anti-métabolites, qui ciblent la synthèse de l'ADN. L'azathioprine (7) est un analogue de base purique inhibant la synthèse des purines ; le mycophénolate mofétil (8) est une prodrogue de l'acide mycophénolique qui inhibe une enzyme clé de la synthèse des bases guanidiques ; et enfin le léflunomide (9), plutôt utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, inhibe une enzyme intervenant dans la synthèse des bases pyrimidiques. (Figure 4)^{17,25}

Parmi les traitements biologiques, les anticorps monoclonaux, qui sont issus d'une même souche de lymphocytes et dirigés contre un récepteur spécifique, sont mis à profit lorsque les mécanismes d'une pathologie sont bien connus. Les sérums antilymphocytaires, mélanges d'immunoglobulines G (IgG) dirigées contre un ensemble de molécules de surface, sont également utilisés. Ces anticorps polyclonaux ont donc de multiples mécanismes d'action. Les cibles des anticorps monoclonaux sont des récepteurs membranaires des lymphocytes tels que CD3, CD20, CD25 (récepteur de l'IL-2) ou CD52, ou encore des fractions du complément comme C5. Plus récemment, l'arsenal thérapeutique des immunosuppresseurs s'est élargi aux protéines de fusion, qui associent un récepteur membranaire et un fragment d'IgG. Elles agissent à la surface des CPA en bloquant des signaux de co-stimulation, ce qui empêche l'activation des lymphocytes T. D'autres traitements à l'étude semblent présenter un intérêt dans la prévention des rejets de greffe, notamment des anticorps monoclonaux anti-CD40, des inhibiteurs de la kinase cytoplasmique JAK3 ou de la protéine kinase C, ou encore des molécules interagissant avec la cascade du complément. (Figure 4)^{3,17}

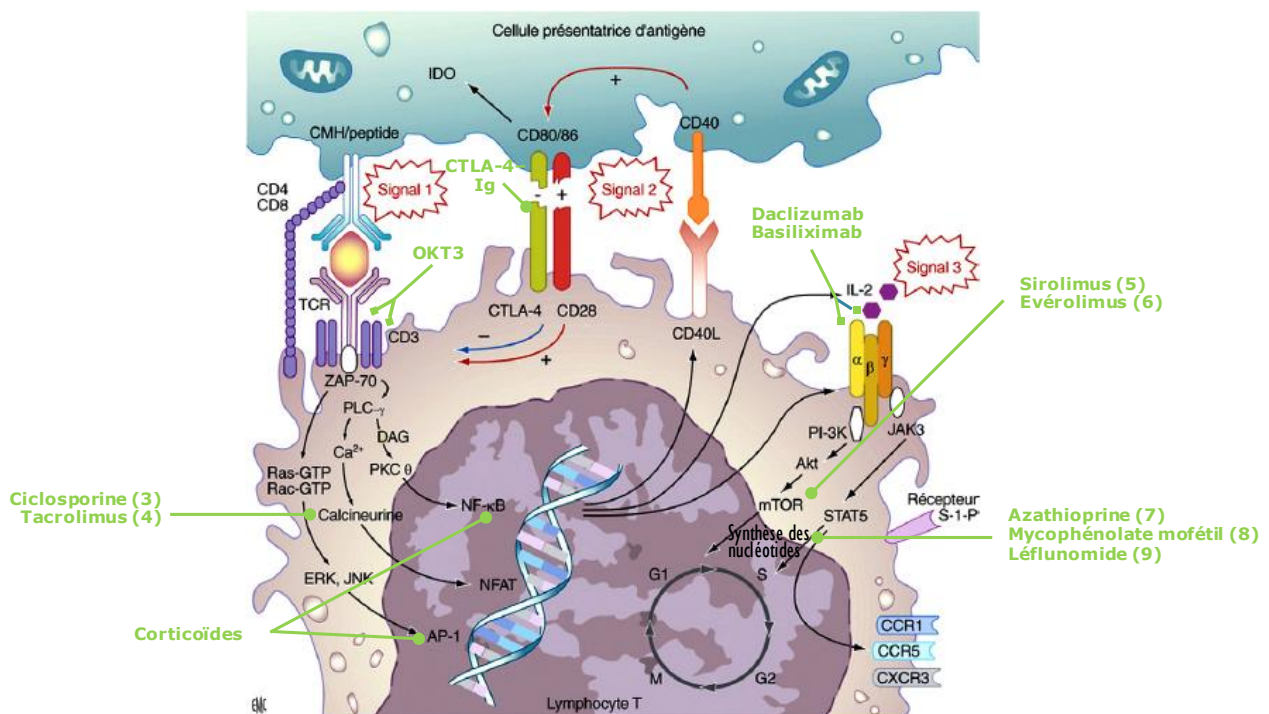


Figure 4. Etapes de l'activation lymphocytaire T et cibles des agents immunosuppresseurs¹⁷

2.3. Implication de l'endothélium vasculaire dans le rejet de greffe

2.3.1. Les cellules endothéliales vasculaires : des cibles et des effecteurs du rejet de greffe

En transplantation, l'endothélium vasculaire constitue la première barrière entre le soi et le non-soi. Ainsi, les éléments sanguins du receveur, et en particulier ceux de l'immunité, rencontrent en premier lieu les cellules endothéliales du greffon. Celles-ci sont alors des cibles passives des réactions immunitaires de l'hôte, puisqu'elles expriment des antigènes majeurs, ceux du groupe sanguin ABO et ceux du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA, MICA), reconnus à la fois par les allo-anticorps et les cellules immunitaires du receveur.²⁶

Les CE sont de plus des acteurs importants de la réponse immunitaire. Etant des cellules présentatrices d'antigènes, elles sont activement engagées dans l'activation des cellules T. Les LT CD8⁺ devenus cytotoxiques peuvent de cette façon proliférer et produire davantage d'IL-2 et d'IFN- γ , cytokines stimulant à leur tour l'expression des HLA de classes I et II sur les CE.²⁶

L'implication des CE dans la physiopathologie des rejets de greffe est aussi liée à leur rôle dans l'inflammation. L'activation des LT CD4⁺ génère la production de cytokines pro-inflammatoires (par les lymphocytes B notamment)²⁷ telles que le TNF- α , qui vont induire l'expression de molécules d'adhésion cellulaire (CAM) à la surface des CE, *via* une activation de la voie NF- κ B²⁶. Cette voie de signalisation est également stimulée lors de la fixation des DAMPs aux TLR ou au récepteur RAGE, ainsi que lors de l'interaction entre les CE et d'autres cellules de l'immunité (*via* les protéines membranaires CD40 et CD40-ligand)²⁸. De l'expression des CAM s'ensuit une migration transendothéliale des leucocytes du sang vers le greffon, instaurant un environnement inflammatoire favorable à la destruction du greffon⁶.

L'endothélium vasculaire pourrait donc être la cible privilégiée de nouvelles stratégies immunosuppressives, à travers une réduction de l'immunogénicité et de la présentation des antigènes²⁶.

2.3.2. Marqueurs membranaires impliqués dans la dysfonction et les réponses immunes de l'endothélium

Comme cela a été décrit précédemment, lors d'une transplantation d'organe, l'endothélium vasculaire manifeste localement deux types de réponses, l'une immunitaire et l'autre inflammatoire.

Les marqueurs membranaires de l'immunité les plus impliqués sont le HLA de classe I, le HLA de classe II, et MICA²⁹, molécules du CMH. Au niveau structurel, les protéines HLA I sont constituées d'une chaîne alpha transmembranaire et de la protéine bêta-2-microglobuline, tandis que les protéines HLA II sont formées de deux chaînes transmembranaires alpha et bêta. La chaîne I- α est codée par trois gènes appelés HLA-A, -B, et -C, et les chaînes II- α et II- β sont également codées par trois paires de gènes nommées HLA-DR, -DP, et -DQ. Ces protéines HLA de classes I et II sont surexprimées lorsque les cellules sont traitées par l'interféron- γ . A côté de ces molécules du CMH

« classique » ayant pour fonction la présentation d'antigènes aux lymphocytes T, d'autres molécules du CMH dit « non classique », ou CMH de classe IB, ont un rôle dans l'immunité innée³⁰. C'est le cas des protéines MIC, dont MICA, induites en réponse à un stress cellulaire et interagissant avec les cellules *natural killer* (NK). En se liant à leur récepteur NKG2D, les protéines MICA activent la cytotoxicité des cellules NK³¹. A l'inverse des protéines du HLA de classe I « classique », les protéines MICA voient leur expression diminuée par l'IFN- γ ³¹. Dans certains cas de transplantation, la protéine HLA-E, appartenant elle aussi au CMH de classe IB, est impliquée dans les réponses immunitaires. Cette protéine, ubiquitaire et surexprimée sous l'influence de l'IFN- γ , est un ligand des récepteurs NKG2A et NKG2C des cellules NK, inhibant (dans le premier cas) ou activant (*via* NKG2C) l'activité lytique des NK³².

L'environnement inflammatoire présent au cours du rejet de greffe se manifeste par une modification phénotypique des cellules endothéliales qualifiée de dysfonction endothéliale. En effet, celle-ci se définit comme l'incapacité des CE à assurer leurs fonctions régulatrices normales, et est initiée par l'activation des CE par des facteurs variés tels que les cytokines pro-inflammatoires³³. Parmi les CAM produites à la surface membranaire se trouvent la E-sélectine et les molécules d'adhérence cellulaire vasculaire 1 (VCAM-1) et intercellulaire 1 (ICAM-1). Ces molécules interviennent au cours des différentes étapes de l'infiltration du greffon par les leucocytes : des intégrines favorisent tout d'abord l'adhésion des monocytes et des polynucléaires ; les sélectines et les molécules de la superfamille des immunoglobulines (VCAM-1, ICAM-1) concourent au roulement et à l'adhésion ferme des lymphocytes ; et les intégrines sont enfin de nouveau impliquées dans la diapédèse^{1,6,28} (**Figure 5**).

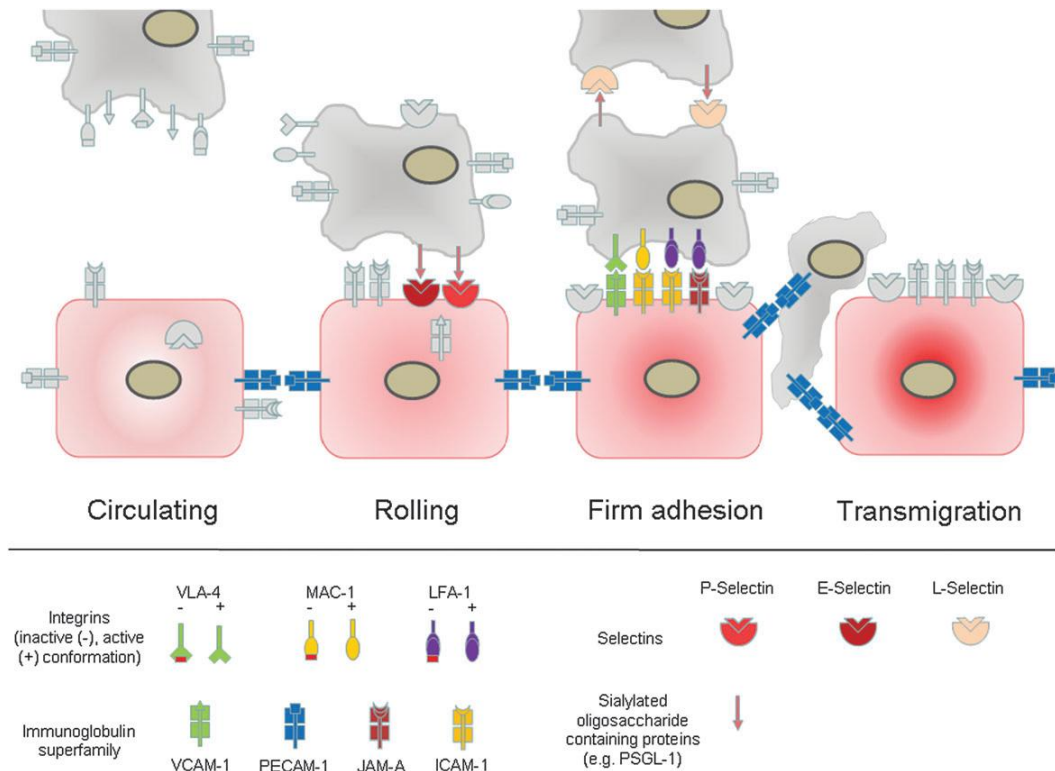


Figure 5. Etapes du recrutement des leucocytes sur un site inflammatoire
(D'après Wijesurendra *et al.*²⁸)

Ces différents marqueurs membranaires de la réponse immunitaire des CE et de la dysfonction endothéliale constituent donc une base d'étude dans la recherche de molécules d'intérêt dans la prévention des rejets de greffe.

3. Place des produits d'origine naturelle en prévention des rejets de greffe

3.1. Molécules aux propriétés immunosuppressives

Plusieurs molécules immunosuppressives déjà utilisées en thérapeutique pour la prévention des rejets de greffe sont extraites de source naturelle. Inhibitrices de la calcineurine, de la protéine mTOR, ou antimétabolites, ces molécules, surtout d'origine fongique ou bactérienne, présentent souvent une structure macrocyclique et azotée (**Tableau 1**).

Les molécules d'origine naturelle décrites comme immunosuppressives dans la littérature appartiennent à des classes chimiques variées, et leurs sources en sont tout aussi diverses. On retrouve en effet des alcaloïdes, des polysaccharides, des lactones macrocycliques ou encore des peptides synthétisés par des plantes, des bactéries, des champignons voire des organismes marins³⁴⁻³⁸. Le règne végétal fournit en outre des composés terpéniques³⁹, stéroïdiques⁴⁰ et polyphénoliques présentant des activités prometteuses. Concernant ces derniers composés polyphénoliques, on distingue des flavonoïdes [e.g. quercétine (**10**)] ou leurs dérivés⁴¹⁻⁴⁵, des acides phénoliques [e.g. cynarine (**11**)]⁴⁶, des coumarines [e.g. glycyrol (**13**)]⁴⁷⁻⁵¹ et une benzophénone [isogarcinol (**16**)]⁵²⁻⁵⁴

(**Figure 6**). Les principaux modèles d'étude utilisés pour déterminer les effets immunosuppresseurs de ces molécules décrivent une inhibition de la prolifération lymphocytaire T et/ou B, une diminution de la sécrétion de cytokines par les splénocytes ou les macrophages, une inhibition de la calcineurine ou de la protéine mTOR, ou encore une suppression de l'activation de la voie NF-κB et de NFAT (*nuclear factor of activated T cells*).

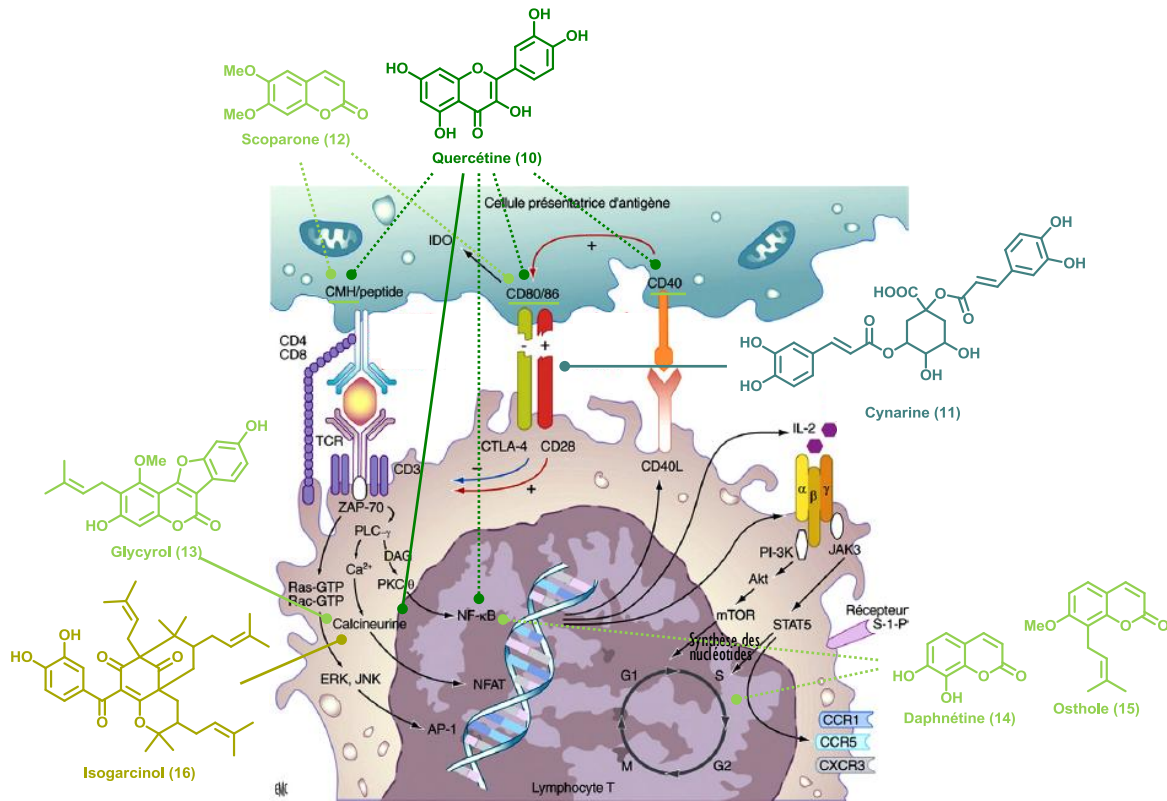


Figure 6. Structures et sites¹⁷ modulés de quelques polyphénols aux propriétés immunosuppresseurs

(En trait plein : interaction directe avec la cible ; en trait pointillé : observation d'un effet à ce niveau) (Exemples de flavonoïde^{44,55}, acide phénolique⁴⁶, coumarines^{49-51,56}, benzophénone⁵³)

Quelques principes actifs non utilisés initialement dans cette indication s'avèrent aussi immunomodulateurs. Les statines, métabolites secondaires d'origine fongique⁵⁷, en sont un exemple intéressant puisque leur emploi tend à s'élargir à certains cas de transplantation³. Prescrites en traitement de l'hypercholestérolémie, les statines inhibent la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase engagée dans la voie de biosynthèse du cholestérol. Certains métabolites intermédiaires de cette voie de biosynthèse, tels que le farnésyl pyrophosphate, sont responsables de la prénylation de protéines dont certaines sont des médiateurs clé des réponses immunitaires (**Figure 7**). La lipophilie du groupement prényle, unité isoprène à cinq atomes de carbones, permet en effet à ces protéines de s'ancrer dans les membranes cellulaires, prérequis souvent essentiel pour leur fonction biologique⁵⁸. Les statines (**Figure 8**) présentent des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppresseurs⁵⁹, ce qui semble donc lié à leur effet inhibiteur (indirect) de la prénylation.

Dans la même voie, les dérivés isoprénoïdes tels que les tocotriénols sont reconnus comme inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase⁶⁰⁻⁶², et plusieurs composés prénylés ont été décrits comme inhibiteurs d'enzymes (synthases, prényltransférases) intervenant dans des voies de prénylation⁶³⁻⁶⁵ (**Figure 8**). On constate d'ailleurs que divers flavonoïdes géranylés⁶⁶ et coumarines prénylées provoquent une dépression du système immunitaire (**Figure 6**). En effet, l'addition de résidus prényles sur des composés polyphénoliques contribue fréquemment à augmenter leurs activités biologiques⁶⁷. Ces observations mettent ainsi en évidence le potentiel immunosuppresseur des molécules à la fois polyphénoliques et prénylées.

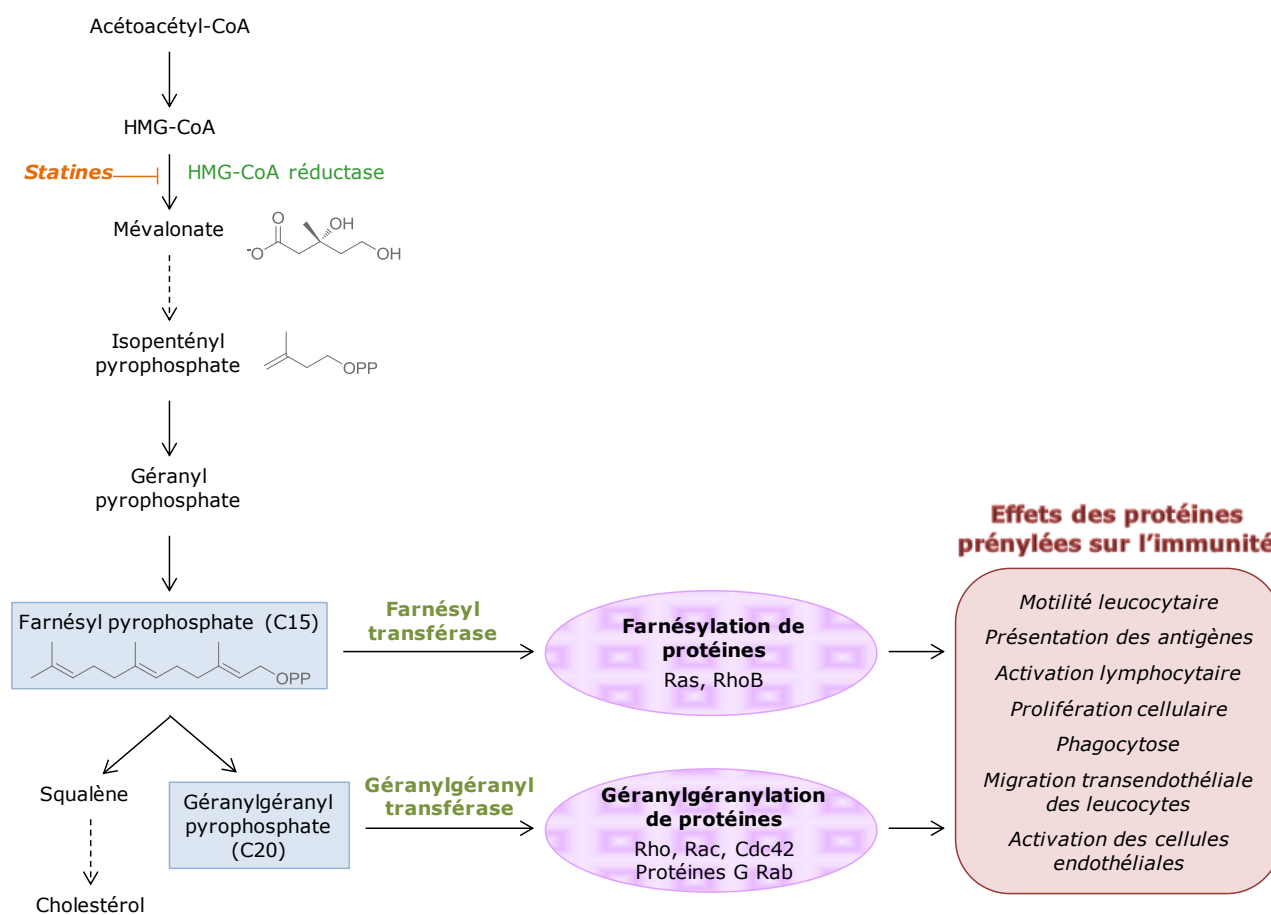


Figure 7. Prénylation de protéines *via* la voie du mévalonate et effets sur l'immunité^{58,68}

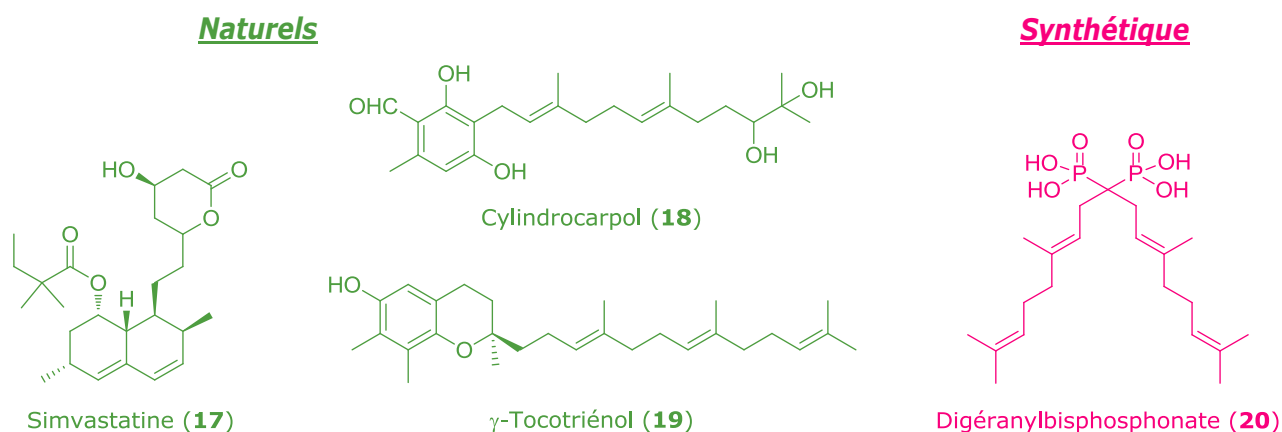


Figure 8. Structures de quelques inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase^{69,70} ou d'enzymes intervenant dans des voies de prénylation^{63,64}

3.2. Composés pouvant prévenir la dysfonction endothéliale

Le rôle central des cellules endothéliales au cours du rejet de greffe a précédemment été exposé, révélant l'endothélium vasculaire comme une cible potentielle de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à limiter le rejet.

Parmi les métabolites secondaires d'origine végétale, les polyphénols sont bien connus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires⁷¹⁻⁷³. Ils réduisent en effet le stress oxydant par piégeage des espèces réactives de l'oxygène ou chélation de métaux générant des radicaux libres, et induisent la libération de monoxyde d'azote *via* différents mécanismes, permettant une relaxation du tonus vasculaire. Au niveau de la cascade conduisant à l'inflammation, les polyphénols agissent à différents niveaux : des effets inhibiteurs des cyclo-oxygénases et des lipoxigénases sont décrits, ainsi qu'une diminution de l'expression des molécules d'adhérence cellulaire liée à la production de NO^{74,75}. Quelques études révèlent ainsi leur effet protecteur contre la dysfonction endothéliale⁷⁶⁻⁷⁸.

D'autre part, l'activation du récepteur aux AGEs favorise la dysfonction endothéliale⁷⁹ (**Figure 9**). Les AGEs, ou produits terminaux de la glycation, sont des molécules formées au cours d'une réaction non enzymatique entre des protéines et des sucres, appelée réaction de Maillard⁸⁰. En cas d'hyperglycémie chronique, on observe une accumulation des AGEs dans les tissus et dans le sang⁸¹ et donc un risque plus prononcé de dysfonction endothéliale. Des composés anti-AGEs contribueraient donc aussi à diminuer la dysfonction de l'endothélium dans ce cas. Ils seraient plus particulièrement bénéfiques pour les patients diabétiques, chez qui la greffe rénale s'avère nécessaire au stade d'insuffisance rénale chronique. Plusieurs études révèlent l'activité inhibitrice de la formation des AGEs par des polyphénols, tels que des flavonoïdes, des coumarines et des procyanidines⁸²⁻⁸⁶.

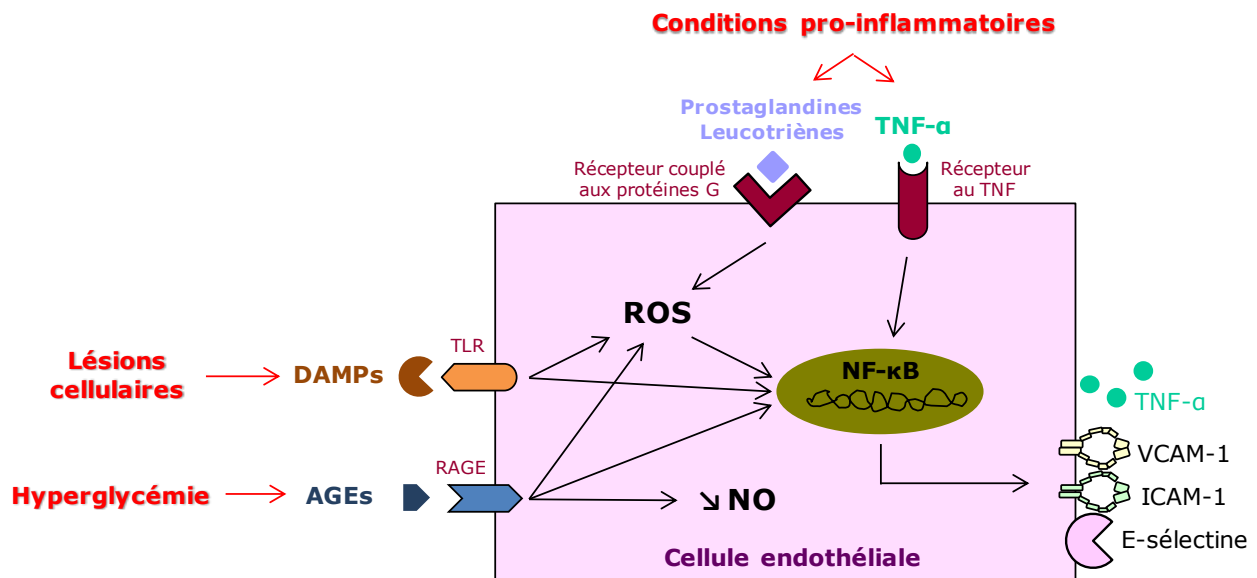


Figure 9. Dysfonction endothéliale et exemples de facteurs déclenchants⁸⁷⁻⁹²

Dans l'objectif d'identifier de nouveaux composés d'origine naturelle prévenant la dysfonction et l'immunogénicité des cellules endothéliales, les polyphénols prénylés apparaissent donc comme une base d'étude privilégiée. Ce type de molécules étant synthétisé par les plantes des familles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae*, nous avons choisi d'étudier différents représentants de ces dernières.

4. Les familles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae*

4.1. Phylogénie des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae*

Selon la classification phylogénétique établie par l'*Angiosperm Phylogeny Group*⁹³ (APG III) et Chase & Reveal en 2009, les familles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae* sont classées dans les rangs taxonomiques suivants :

Règne :	<i>Plantae</i>
Sous-règne :	<i>Tracheophyta</i>
Embranchement :	<i>Spermatophyta</i>
Sous-embranchement :	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospermes)
Classe :	<i>Equisetopsida</i>
Sous-classe :	<i>Magnoliidae</i>
Superordre :	<i>Rosanae</i>
Ordre :	Malpighiales

Les Malpighiales se scindent en trois clades principaux avec d'une part les *Salicaceae* – *Euphorbiaceae*, d'un autre côté les *Rhizophoraceae* – *Clusiaceae*, et enfin les *Malpighiaceae* –

Chrysobalanaceae. Six familles composent le second clade : il s'agit des *Ochnaceae*, des *Clusiaceae*, des *Bonnetiaceae*, des *Calophyllaceae*, des *Hypericaceae* et des *Podostemaceae*⁹³. L'ensemble de ces cinq dernières familles forme le clade des clusioids^{94,95} (**Figure 10**). Bien que placée ici par les analyses phylogénétiques, il est intéressant de noter que la famille des *Podostemaceae* est de morphologie atypique et ne renferme que des espèces aquatiques⁹⁴. Les *Calophyllaceae* étant auparavant non différenciées des *Clusiaceae*, elles forment, depuis la dernière classification de l'APG, une famille à part entière⁹⁶.



Figure 10. Arbre phylogénétique de l'ordre des malpighiales⁹³

La systématique classe les genres compris dans les *Calophyllaceae* et des *Clusiaceae* en deux et trois tribus respectivement. On dénombre au total 14 genres déclinés en environ 900 espèces au sein des *Clusiaceae*, et autant de genres avoisinant les 500 espèces chez les *Calophyllaceae* (**Tableau 2**).

Tableau 2. Classification des genres au sein des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae*^{93,94,97}

Famille des <i>Clusiaceae</i> Lindley	Famille des <i>Calophyllaceae</i> J. Agardh
<u>Tribu des <i>Clusieae</i> Choisy</u>	<u>Tribu des <i>Calophylleae</i> Choisy</u>
<i>Chrysochlamys</i> Poepp.	<i>Calophyllum</i> L.
<i>Clusia</i> L.	<i>Caraipa</i> Aublet
<i>Dystovomita</i> (Engler) D'Arcy	<i>Clusiella</i> Planchon & Triana
<i>Tovomita</i> Aublet	<i>Haploclathra</i> Bentham
<i>Tovomitopsis</i> Planchon & Triana	<i>Kayea</i> Wall.
<u>Tribu des <i>Garcinieae</i> Choisy</u>	<i>Kielmeyera</i> Martius
<i>Allanblackia</i> Bentham	<i>Mahurea</i> Aublet
<i>Garcinia</i> L.	<i>Mammea</i> L.
<u>Tribu des <i>Symphonieae</i> Choisy</u>	<i>Marila</i> Sw.
<i>Lorostemon</i> Ducke	<i>Mesua</i> L.
<i>Montrouziera</i> Planchon & Triana	<i>Neotatea</i> Maguire
<i>Moronobea</i> Aublet	<i>Poeciloneuron</i> Bedd.
<i>Pentadesma</i> Sabine	<u>Tribu des <i>Endodesmieae</i> Engler</u>
<i>Platonia</i> Martius	<i>Endodesmia</i> Bentham
<i>Symphonia</i> L. f.	<i>Lebrunia</i> Staner
<i>Thysanostemon</i> Maguire	

4.2. Caractéristiques botaniques

Les *Clusiaceae* et les *Calophyllaceae* sont principalement des arbres à feuilles persistantes^{*a}. On retrouve néanmoins quelques arbustes et des plantes épiphytes*. Les espèces peuvent être glabres* ou pourvues de poils uni- ou multicellulaires, et leur bourgeon terminal peut être écailleux ou nu.

Les feuilles, opposées* ou parfois spiralées ou alternes*, sont entières et extipulées*, et parfois munies de « glandes » appariées à leur base. Souvent coriaces, elles renferment des stomates* paracytiques*.

Les *Clusiaceae* au sens large, aussi appelée *Guttiferae* et comprenant les *Clusiaceae sensu stricto* (*s. s.*), les *Calophyllaceae* et les *Hypericaceae*, se caractérisent par leur production d'exsudat, sous forme de latex ou de résine. D'après son étymologie, le terme « *Guttiferae* » signifie en effet « porte-gomme »⁹⁵. Des glandes et/ou des canaux sécréteurs sont présents dans la plupart des organes de ces plantes, ce qui est notamment visible sur les feuilles de *Calophyllaceae* souvent ponctuées de taches translucides⁹⁶. L'exsudat produit apparaît généralement blanc à jaunâtre. Ces familles botaniques ont également la particularité de contenir des cristarques*.

^a Les mots suivis d'un « * » sont définis dans le glossaire des termes botaniques.

Les fleurs étant rarement solitaires, l'inflorescence* est terminale ou axillaire sous forme de cyme* ou de thyse*. Les fleurs, actinomorphes* et hypogynes*, sont parfois polygames mais nombreuses sont les espèces dioïques*. Les sépales, au nombre de 2 à 4 ou 5 à 20, sont libres ou occasionnellement fusionnés, le plus souvent accompagnés de 3 à 4 ou de 5 à 8 pétales libres. L'androcée* est généralement composé de nombreuses étamines libres ou fasciculées dont les anthères* s'ouvrent par des fentes, plus rarement par des pores. Les grains de pollen sont assez petits, de diamètre inférieur à 30 µm, et au moins triaperturés*. L'ovaire uni- ou multiloculaire comporte de deux à de nombreux ovules par carpelle*, en placentation axile* (chez la plupart des *Clusiaceae*), pariétale* (dans le genre *Allanblackia* des *Clusiaceae*), apicale* (chez les *Endodesmiae*) ou basale* (chez les *Calophylleae*)⁹⁸. Le style* et le stigmate* sont plus ou moins longs.

Le fruit est une baie* ou une capsule* à déhiscence septicide* ou septifrage*, voire une drupe* chez certaines espèces du genre *Garcinia*. Les graines sont petites à grandes, occasionnellement ailées ou arillées* chez les *Clusiaceae*. Les variations morphologiques et anatomiques de l'ovule et de la graine de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* restent cependant encore assez mal comprises.^{93,99,100}

4.3. Distribution géographique

Alors que certaines *Hypericaceae* telles que le millepertuis se retrouvent en zones tempérées, les deux autres familles émergentes des anciennes Guttifères ont une distribution pantropicale. Les *Clusiaceae* et les *Calophyllaceae* sont réparties dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique du Sud, d'Afrique, et d'Asie du Sud-Est (**Figure 11**).⁹³

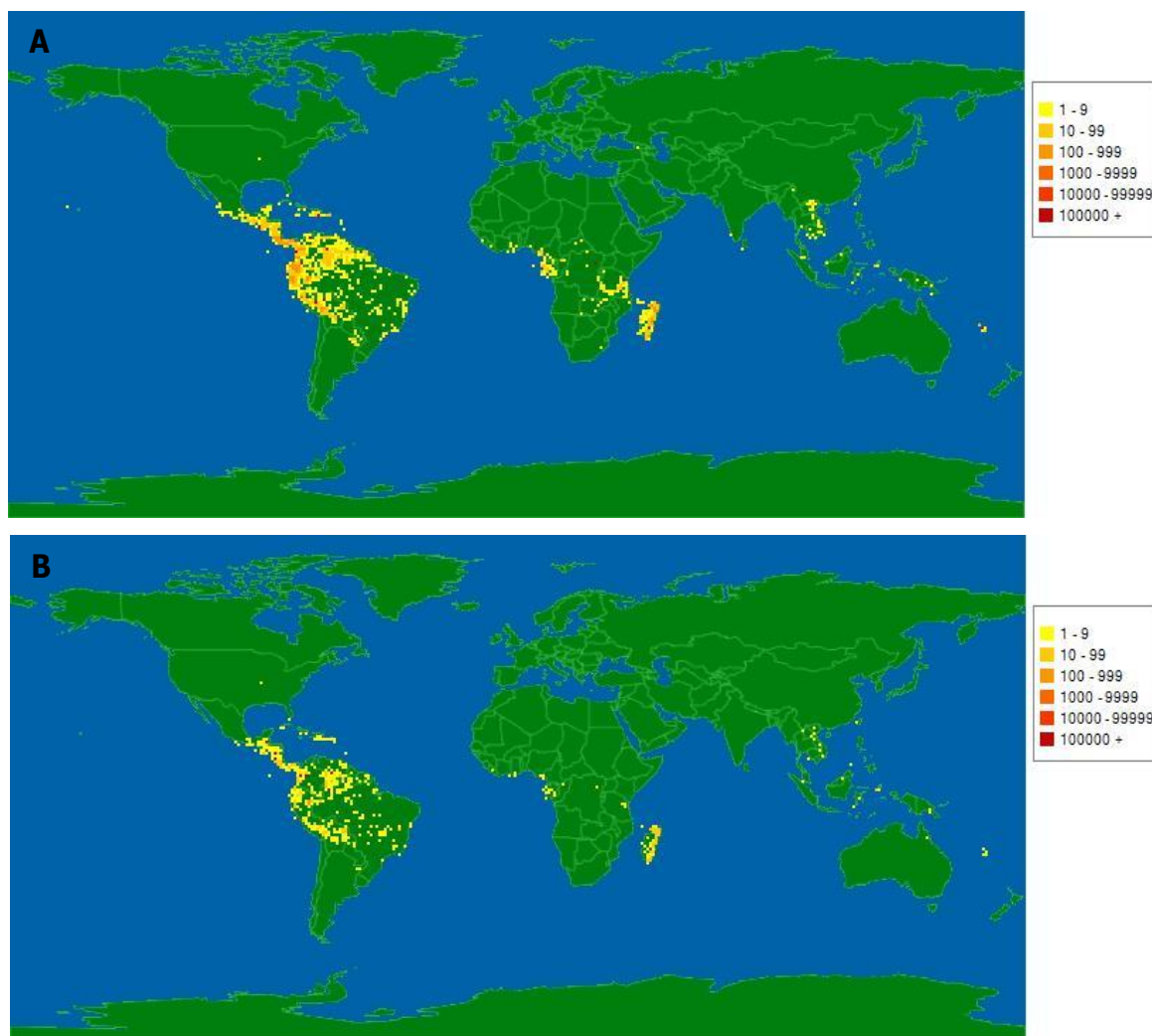


Figure 11. Distribution géographique des *Clusiaceae* (A) et des *Calophyllaceae* (B)¹⁰¹

4.4. Métabolites secondaires

La situation géographique des espèces végétales rassemblées sous les familles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae*, ainsi que la diversité biologique des espèces environnantes, entraînent une chimiodiversité marquée de leurs métabolites secondaires. La composition phytochimique exacte de bon nombre de ces espèces reste, de surcroît, encore inconnue. Des genres tels que *Dystovomita*, *Lorostemon* ou *Thysanostemon* chez les *Clusiaceae*, et *Clusiella*, *Neotatea* ou *Lebrunia* chez les *Calophyllaceae*, n'ont, à notre connaissance, pas fait l'objet d'une étude particulière jusqu'à présent. D'après les bases de données bibliographiques PubMed¹⁰² et Web of Science^{TM103}, ce sont essentiellement des espèces des genres *Garcinia*, *Symphonia*, *Calophyllum*, *Kielmeyera*, *Mammea* et *Mesua* qui sont phytochimiquement décrites dans la littérature.

Les principaux métabolites secondaires isolés de ces espèces végétales sont des dérivés polyphénoliques prénylés. Leurs représentants majeurs sont des xanthones, des coumarines, des dérivés de chromanone avec en particulier des biflavonoïdes et des chromanones acides, et enfin des benzophénones polyprénylées aussi appelées *polyprenylated acylphoroglucinols* (PPAPs) (**Figure**

12)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. La présence de xanthones dans les sécrétions d'espèces appartenant aux *Clusiaceae* a d'ailleurs conduit Lambert *et al.* à donner une nouvelle appellation, celle de xanthique, aux exsudats produits par ces espèces¹⁰⁷.

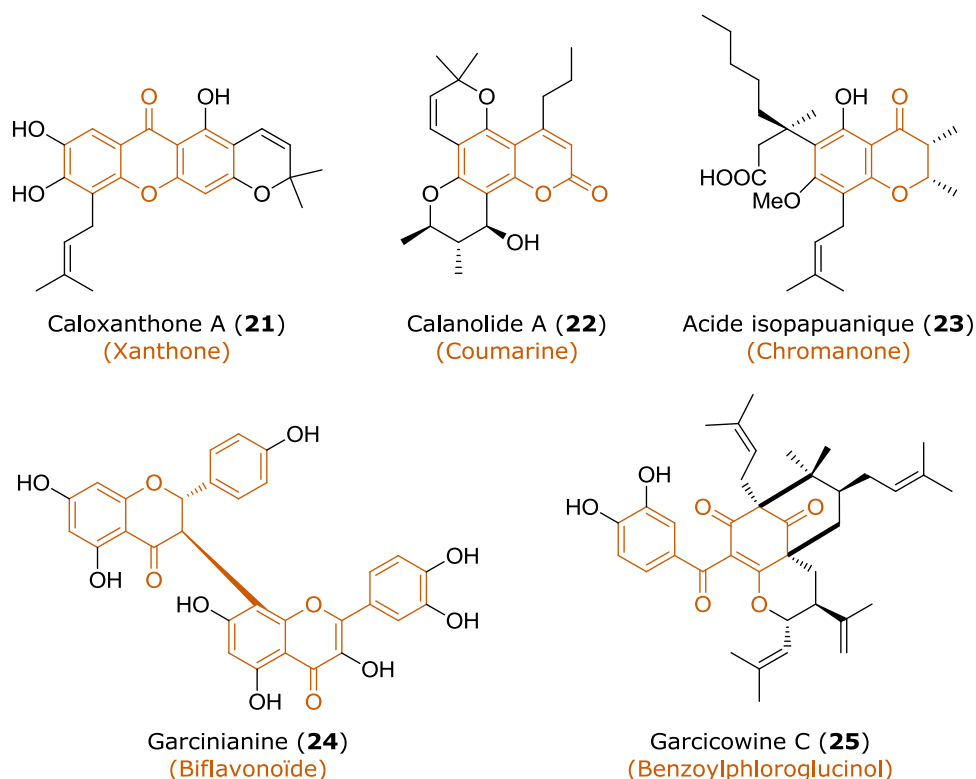


Figure 12. Structures de quelques polyphénols isolés de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae*^{106,108}

D'autres flavonoïdes et notamment des oligomères tels que des procyanidines et des tanins condensés, sont présents chez les deux familles de plantes¹⁰⁹. Des acides-phénols, des tocotriénols, et des tanins hydrolysables ont aussi été isolés^{110,111}.

Dans un article de chimiotaxonomie, Crockett et Robson¹¹² proposent de distinguer les différentes familles du clade des clusioids en fonction des types de métabolites secondaires qu'elles produisent. L'arbre qu'ils proposent (**Figure 13**) indique la présence d'isoflavones et de diterpènes au sein des *Clusiaceae*, à l'instar et de la nervosine isolée de *Garcinia nervosa*¹¹³ et de l'acide chrysochlamique isolé de *Chrysochlamys ulei*¹¹⁴.

Enfin, les triterpènes et les stéroïdes sont ubiquitaires chez ces deux familles botaniques¹⁰⁴.

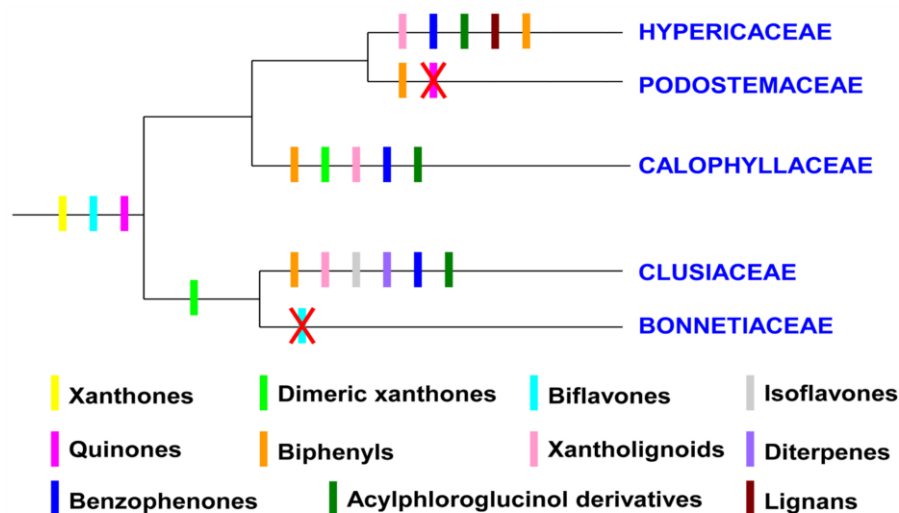


Figure 13. Distribution des métabolites secondaires pertinents au sein du clade des clusioids
 (D'après Crockett et Robson¹¹²)

4.5. Activités biologiques des composés isolés

Les effets biologiques des métabolites secondaires isolés de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* ont été évalués dans de multiples domaines. Il ressort que les benzophénones polyprénylées présentent des activités antioxydantes et anti-inflammatoires importantes, accompagnées d'effets cytotoxiques notamment sur des lignées de cellules cancéreuses^{106,115}. Certaines sont antiparasitaires, sans présenter de cytotoxicité majeure vis-à-vis de cellules de mammifères¹¹⁶. Les xanthones de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* sont également anti-inflammatoires et antitumorales, et ont des propriétés antimicrobiennes, notamment antifongiques, antibactériennes et antipaludiques¹¹⁷. Les coumarines exercent entre autres des effets anti-inflammatoires, antimicrobiens et notamment anti-VIH, et antihypertenseurs¹¹⁸⁻¹²⁰. Certaines, en particulier isolées de *Mesua*, sont en outre décrites pour leurs activités anticholinestérasiques, ce qui est aussi le cas de certains flavonoïdes de *Garcinia*^{121,122}. Notons enfin qu'un biflavonoïde issu de *Garcinia*, la morelloflavone, inhibe l'HMG-CoA réductase *in vitro*¹²³, et que l'activité antiulcéreuse de chromanones acides isolées de *Calophyllum* a été démontrée¹²⁴.

4.6. Utilisations traditionnelles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae*

Près des deux tiers des espèces du genre *Garcinia* produisent des fruits comestibles¹²⁵. De même, certains fruits de *Calophyllaceae* se consomment, comme c'est le cas pour l'espèce *Mammea americana*, dont les baies renferment une pulpe jaune-rougeâtre très aromatique¹²⁶. Les fruits du mangoustanier, *Garcinia mangostana* (**Figure 14**), ont la réputation d'être très agréables au goût tandis que ceux de *G. gummi-gutta*, très acides, voient leur écorce utilisée en condiment. Ce péricarpe a aussi une utilité dans le polissage des ornements en or et en argent. L'huile des graines du genre *Garcinia* est par ailleurs utilisée dans la production de savon et pour le graissage

des machines. Toujours à des fins industrielles, les graisses extraites des graines servent comme émoulinant dans la fabrication de produits cosmétiques. Chez les *Calophyllaceae*, le bois du tronc de *Calophyllum brasiliense* sert surtout à la construction de bateaux.^{106,127,128}

Concernant les utilisations thérapeutiques traditionnelles, les espèces classées dans les familles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae* trouvent leur place essentiellement dans des maux ayant trait aux infections, aux maladies dermatologiques, et aux systèmes musculo-squelettique, digestif et génito-urinaire.

Ainsi les espèces du genre *Garcinia* sont utilisées en cas d'acné, de coups de chaleur, d'infections et d'œdèmes. Les fruits sont parfois consommés en cas de flatulences, de diarrhée et de dysenterie amibienne. La médecine ayurvédique les prescrit également en infusion contre les affections cutanées telles que les rougeurs ou les brûlures, et ils seraient aussi toniques pour le cœur et le foie. Le péricarpe de *G. mangostana* soigne traditionnellement les plaies infectées ou suppuratives et les ulcères chroniques. Les effets anti-inflammatoires et antiallergiques des extraits de ce péricarpe et de plusieurs autres espèces de *Garcinia* ont d'ailleurs été démontrés *in vivo* chez le rat.^{106,129,130}

Les feuilles et les écorces de *G. mangostana* ont en outre des propriétés anti-inflammatoires qui justifient leur utilisation sous forme de pommade pour soigner l'eczéma ou encore le psoriasis. Le péricarpe des fruits en décoction est également préconisé en cas de cystite ou de blennorragie. Aux Philippines et en Malaisie, cette indication dans les troubles urinaires concerne aussi les feuilles et les écorces du tronc en infusion. Une décoction des racines peut, de plus, être administrée aux femmes souffrant de troubles menstruels. L'extrait d'écorces est enfin indiqué en cas de dysenterie amibienne, et des cataplasmes du péricarpe des fruits sont, au Venezuela, appliqués en traitement des infections cutanées parasitaires.¹⁰⁵

Dans divers pays asiatiques, *G. gummi-gutta* est à l'inverse conseillé en traitement de la constipation, mais aussi des hémorroïdes, des menstruations irrégulières, des rhumatismes, des œdèmes, et des infections parasitaires de l'intestin. Une préparation tonique des fruits, riches en vitamine C, serait bénéfique dans plusieurs maladies du cœur.¹²⁷



Figure 14. Fleur et jeune fruit de *G. mangostana* L. (A), fleur de *Calophyllum inophyllum* (B), et *Mesua ferrea* (plante entière) (C)¹⁰¹

Dans la famille des *Calophyllaceae*, plusieurs espèces sont aussi traditionnellement utilisées en thérapeutique. Très réputée à Madagascar, l'huile de tamanu, extraite à froid des fruits et des graines de *Calophyllum inophyllum* (**Figure 14**) et riche en acides gras insaturés, s'applique en massage pour bénéficier de ses propriétés cicatrisantes. Cette huile possède de plus des propriétés de filtre UV¹³¹. Toujours dans le domaine de la dermatologie, les écorces de *C. inophyllum* sont, en Inde, particulièrement recommandées en cas de gale¹³². Des tribus indiennes exploitent ses feuilles et ses graines pour traiter les irritations cutanées, les douleurs oculaires, les maux de tête, la calvitie de cause fongique et pour favoriser la pousse des cheveux¹³³. Une décoction de ses feuilles atténuerait également les douleurs et les rougeurs oculaires¹³⁴.

Concernant les maladies de peau, la médecine indienne fait aussi usage des fleurs et des écorces de *Mammea suriga*, spécifiquement dans le soin de l'eczéma¹³².

Les graines de *Mesua ferrea* (**Figure 14**) sont employées, en médecine ayurvédique, en cas de blessure, d'infection microbienne et d'affection cutanée, mais aussi en cas de douleurs, d'inflammation et de rhumatisme. Ces propriétés, notamment antirhumatismales, sont parfois validées scientifiquement par des études chez l'animal.¹³⁵

Ces activités sont proches de celles de *Calophyllum brasiliense*, puisque des infusions et des bains des écorces de cet arbre semblent efficaces contre les rhumatismes, les varicoses, les hémorroïdes et les ulcères chroniques.¹³⁶

La médecine traditionnelle brésilienne attribue enfin à l'espèce *Kielmeyera coriacea* des propriétés curatives face à la malaria et aux maladies infectieuses. Ainsi, l'extrait aqueux de ses feuilles permet de lutter contre le paludisme, la schistosomiase, la leishmaniose, et les infections fongiques et bactériennes.¹³⁶

5. Les genres *Garcinia*, *Calophyllum* et *Mesua*

Les plantes étudiées au cours de cette thèse sont originaires de Malaisie et appartiennent aux genres *Garcinia*, *Calophyllum* et *Mesua*. Afin de mieux comprendre les différents aspects botaniques et phytochimiques qui seront détaillés plus loin, une revue bibliographique sur ces trois genres est ici proposée.

5.1. Considérations botaniques

a) Genre *Garcinia* (*Clusiaceae*)

Le genre *Garcinia* a été décrit pour la première fois par Carl von Linné en 1753 dans son œuvre *Species Plantarum*¹⁰¹. Il englobe environ 400 espèces dont le nom latin est officiellement accepté, mais il existe aussi de nombreux synonymes à ces espèces⁹⁷.

Ces arbres ou arbustes exsudent le plus souvent un latex de couleur jaune à brun clair. Leurs feuilles, simples, sont le plus souvent opposées-décussées*, glabres, très rarement stipulées, et

pétiolées*. Les nervures secondaires sont assez marquées, et des canaux résinifères brunâtres apparaissent ainsi que des glandes translucides. Les fleurs sont solitaires ou en inflorescence. Le nombre de sépales est de (2 ou 3 ou) 4 ou 5, tandis que celui des pétales est de (3 ou) 4 ou 5 (à 8). Les pétales, fasciculés, renferment un nombre d'étamines variable qui sont plus ou moins unies, parfois accompagnées de staminodes* et d'un pistillode*. Les fleurs femelles possèdent parfois aussi des staminodes. Leur ovaire contient au moins 2 loges avec 1 ovule chacune, à placentation axile ou (sub)basale. Le fruit a l'aspect d'une baie ou d'une drupe et comporte 1 à 5 graines, ou parfois plus.^{137,138}

b) Genre *Calophyllum* (*Calophyllaceae*)

Egalement décrit dès 1753, le genre *Calophyllum* L. compte environ 200 espèces au nom latin accepté, plus de 130 synonymes, et une quarantaine d'individus dont le statut n'est pas encore résolu.⁹⁷

Le latex fourni par ces arbres ou arbustes est de couleur blanche ou jaune pâle. Les feuilles, simples et opposées-décussées, sont exstipulées, pétiolées, et généralement glabres. Les nervures secondaires sont nombreuses et des canaux glandulaires translucides apparaissent entre elles. L'inflorescence, terminale ou axillaire, se présente sous la forme d'une cyme ou d'un thyrses. Les fleurs sont le plus souvent bisexuées, avec un calice à 4 sépales libres et décussés, surmonté d'une corolle à 0 à 10 pétales libres imbriqués, blancs. Les étamines sont nombreuses et libres, ou plus rarement soudées, et leurs anthères sont droites et attachées par leur base. On note l'absence de staminodes. L'ovaire, glabre, est uniloculaire et porte un seul ovule à placentation basale. Le style est filiforme et l'unique stigmate présent est généralement pelté*. Le fruit, drupacé, présente un exocarpe fin, un mésocarpe charnu et un endocarpe mince plus ou moins adhérent à la graine. Celle-ci ne porte pas d'arille.^{137,138}

c) Genre *Mesua* (*Calophyllaceae*)

Le genre *Mesua* L. n'est représenté que par 7 espèces dont le nom latin est accepté. En effet, la plupart des autres individus, soit 55 espèces, ont un statut non résolu.⁹⁷

Carl von Linné décrit, en 1753, ce genre comme des arbres aux feuilles opposées, coriaces et pétiolées, portant des glandes translucides qui passent souvent inaperçues. Les nervures secondaires, graciles, sont nombreuses, et les nervures tertiaires scalariformes sont peu marquées. Les fleurs sont hermaphrodites, généralement solitaires et axillaires. Le calice est constitué de 4 (ou 5) sépales imbriqués, et il en est de même pour les pétales de la corolle. Les filets* des nombreuses étamines sont grêles et libres, et les anthères sont droites et soudées à leur base. L'ovaire est biloculaire, chaque loge contenant 2 ovules droits. Les styles sont liés et allongés et le stigmate est pelté. Le fruit est une capsule subligneuse à déhiscence septifrage, dans lequel la cloison est persistante. Il contient 1 à 4 graines sans appendice.¹³⁷

5.2. Répartition géographique

Le genre *Garcinia* s'étend dans toute la zone de distribution des *Clusiaceae*, c'est-à-dire en Amérique centrale et du Sud, en Afrique tropicale et en Asie du Sud-Est. La répartition du genre *Calophyllum* est similaire, bien que la zone d'Afrique tropicale concernée soit principalement l'île de Madagascar. Beaucoup plus restreinte, la zone couverte par le genre *Mesua* se limite quant à elle à l'Asie du Sud-Est, et plusieurs espèces sont endémiques de la péninsule malaise.¹⁰¹

5.3. Métabolites secondaires

Le genre *Garcinia* a fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques, révélant sa richesse en xanthones et en benzophénones polyprénylées, ainsi qu'en biflavonoïdes. Ces séries chimiques, ainsi que des coumarines, ont également été isolées au cours des études conduites sur plusieurs espèces des genres *Calophyllum* et *Mesua*. Le genre *Calophyllum* produit en outre des dérivés acides de chromanones, beaucoup plus rarement identifiés dans le genre *Mesua*. (**Tableau 3**)

Tableau 3. Répartition des principaux métabolites secondaires isolés dans les 3 genres étudiés

Genre	Xanthones	Benzophénones polyprénylées	Biflavonoïdes	Coumarines	Chromanones acides	Triterpènes
<i>Garcinia</i>	X	X	X			X
<i>Calophyllum</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Mesua</i>	X	X	X	X	X	X

Des revues bibliographiques répertoriant les différents métabolites secondaires isolés dans les genres *Garcinia*¹³⁹⁻¹⁴¹ et *Calophyllum*^{104,108} ont été publiées, ce qui n'est pas le cas du genre *Mesua*. Aussi, les aspects structuraux et biogénétiques des principales classes de métabolites secondaires isolées des trois genres sont ici abordés. Il s'agit plus précisément des familles chimiques qui ont été étudiées au cours de ce travail de thèse, avec une description la plus exhaustive possible des composés isolés du genre *Mesua*.

5.3.1. Xanthones

a) Structure, nomenclature, biogenèse

Chez les végétaux supérieurs, la biosynthèse des xanthones fait intervenir deux voies : la voie des polyacétates est impliquée dans la synthèse du cycle A, tandis que le cycle C dérive de la voie de l'acide shikimique.

Il a été postulé que la condensation des unités benzoyl-CoA et malonyl-CoA implique une benzophénone synthase, enzyme ayant été étudiée notamment chez *Garcinia mangostana*¹⁴². Une condensation de Claisen permet ensuite l'aromatation de la chaîne latérale en cycle A, conduisant à

une benzophénone intermédiaire. Des couplages oxydatifs permettent alors la synthèse de xanthones primitives telles que la 1,3,7-trihydroxyxanthone et la 1,3,5-trihydroxyxanthone. Enfin, des prényltransférases peuvent catalyser des transferts de 1 à 3 groupements prényles sur ces xanthones, ensuite capables de se cycliser avec l'hydroxyle en *ortho* [e.g. caloxanthone B (**27**)] (**Figure 15**).^{142,143}

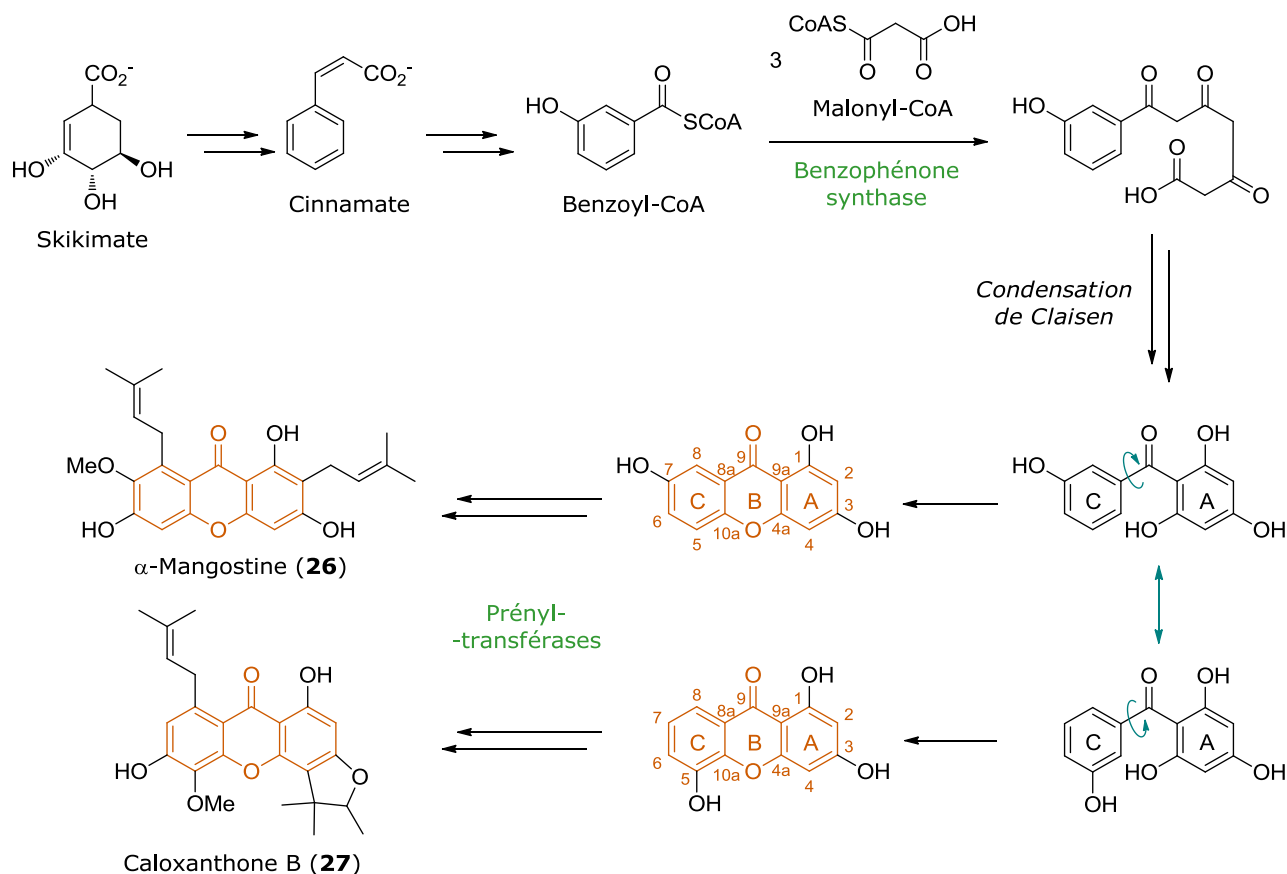


Figure 15. Schéma de biosynthèse des xanthones¹⁴²⁻¹⁴⁴

b) Structures isolées dans les 3 genres

Une grande variété de xanthones a été isolée des trois genres. Cette chimiodiversité est liée aux divers groupements prényles, méthoxyles et phénoliques substituant les positions 2, 4, 5, 6, 7 et 8. La nature de ces substituants est généralement utilisée pour classer les xanthones, et l'on différencie ainsi les xanthones simples plus ou moins oxygénées et prénylées des xanthones plus complexes comme les xanthones « cages » ou encore celles qui sont dimérisées ou glycosylées.¹⁴⁴

❖ Dans le genre *Garcinia*

Des xanthones simples non prénylées ont été isolées du genre *Garcinia*, celles-ci pouvant être mono- à tétraoxygénées. Cependant, des groupements prénylés substituent souvent ces composés [e.g. xanthochymone A (**28**)], et lorsque la substitution a lieu en *ortho* d'un hydroxyle il est fréquent d'observer une cyclisation en dihydrofurane ou en pyrane [e.g. garcinexanthone A (**29**)]. Parmi les

xanthones plus complexes isolées du genre, certaines sont géranylées, glycosylées ou encore polyprénylées « cages » impliquant alors une modification du cycle C [e.g. acide gambogique (**30**)]. La distribution de ces xanthones « cages » semble restreinte au genre *Garcinia*.^{141,144,145} (**Figure 16**)

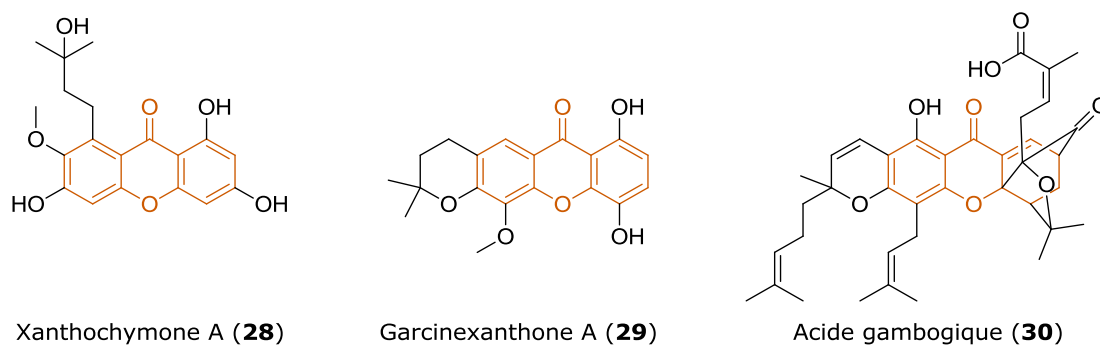


Figure 16. Exemples de xanthones isolées du genre *Garcinia*^{145,146}

❖ Dans le genre *Calophyllum*

Les mêmes types de xanthones simplement oxygénées ou prénylées ont été identifiés dans le genre *Calophyllum*, à l'instar des structures présentées dans la **Figure 17**.

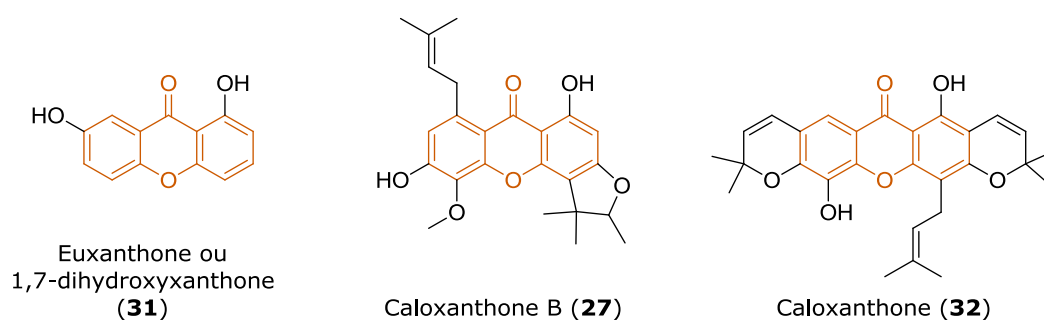


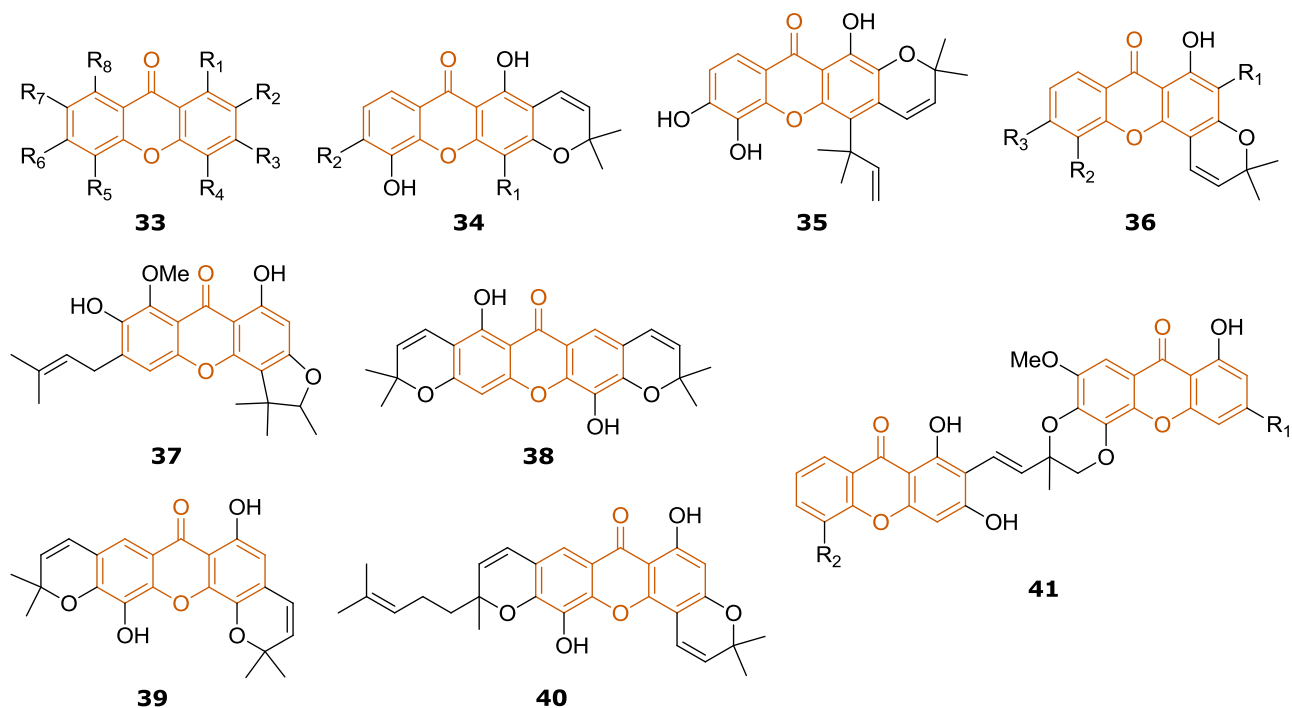
Figure 17. Exemples de xanthones isolées du genre *Calophyllum*^{108,147}

❖ Dans le genre *Mesua*

Des xanthones simples ainsi que des dérivés prénylés parfois tétra- ou pentacycliques ont été isolés du genre *Mesua*. Quelques dimères de xanthones sont également décrits. (**Tableau 4** & **Tableau 5**)

Tableau 4. Xanthones isolées du genre *Mesua*

N°	Nom	Espèce	Partie
26	α -Mangostine	<i>M. congestiflora</i>	Racines ¹⁴⁸
31	Euxanthone ou 1,7-dihydroxyxanthone	<i>M. daphnifolia</i>	Ecorces de tige ^{149,150}
		<i>M. ferrea</i>	Duramen (cœur du bois) ^{151,152} et écorces ^{153,154}
		<i>M. thwaitesii</i>	Bois et écorces ¹⁵⁵
33a	1,5-Dihydroxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ^{152,154} et racines ¹⁵⁶
		<i>M. thwaitesii</i>	Bois et écorces ¹⁵⁵
33b	1,6-Dihydroxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Ecorces de tige ^{157,158}
33c	2-Hydroxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ¹⁵⁴
33d	4-Hydroxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ¹⁵⁴
33e	Mesuaxanthone B ou 1,5,6-trihydroxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ¹⁵⁴ et duramen ¹⁵¹
		<i>M. thwaitesii</i>	Bois et écorces ¹⁵⁵
33f	1-Hydroxy-5-méthoxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ¹⁵⁴
33g	1-Hydroxy-7-méthoxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ^{152,154}
33h	3-Hydroxy-4-méthoxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ¹⁵⁴
33i	5-Hydroxy-1-méthoxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Ecorces ¹⁵³
33j	2-Méthoxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ¹⁵⁴
33k	Mesuaxanthone A ou 1,5-dihydroxy-3-méthoxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Duramen ^{151,152}
33l	Daphnifoline ou 1,3,5-trihydroxy-4-méthoxyxanthone	<i>M. daphnifolia</i>	Ecorces de tige ^{149,150,159}
33m	1,3-Diméthoxy-5-hydroxyxanthone	<i>M. thwaitesii</i>	Bois et écorces ¹⁵⁵
33n	Ferraxanthone ou 1,3-diméthoxy-5,6-dihydroxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Duramen ¹⁶⁰
33o	Tovopyrifoline C	<i>M. ferrea</i>	Racines ¹⁵⁶
33p	1,3,6-Trihydroxy-7,8-diméthoxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ¹⁵⁴
33q	3,6-Dihydroxy-1,7,8-triméthoxyxanthone	<i>M. ferrea</i>	Bois ¹⁵⁴
33r	Cudraxanthone G	<i>M. daphnifolia</i>	Ecorces de tige ^{149,150}
34a	6-Désoxyjacareubine	<i>M. beccariana</i>	Ecorces de tige ¹⁵⁶
		<i>M. ferrea</i> ¹⁶¹	
34b	Jacareubine	<i>M. myrtifolia</i>	Bois ¹⁶²
34c	Caloxanthone C	<i>M. ferrea</i>	Racines ¹⁶³
34d	Macluraxanthone	<i>M. ferrea</i>	Racines ¹⁵⁶
35	Mesuaferrine A	<i>M. ferrea</i>	Racines ¹⁶³
36a	Ananixanthone	<i>M. daphnifolia</i>	Ecorces de tige ^{149,150}
36b	Mesuasine	<i>M. beccariana</i>	Ecorces de tige ¹⁶⁴
37	Mesuaferrine C	<i>M. ferrea</i>	Racines ¹⁶⁵
38	Pyranojacareubine	<i>M. ferrea</i>	Ecorces de tige ^{157,158}
39	Mesuaferrine B	<i>M. ferrea</i>	Racines ¹⁶³
40	Mesuariane	<i>M. beccariana</i>	Ecorces de tige ¹⁶⁴
41a	Mesuaferrol A	<i>M. ferrea</i>	Ecorces ¹⁵³
41b	Mesuaferrol B	<i>M. ferrea</i>	Ecorces ¹⁵³
41c	Mesuabixanthone A	<i>M. ferrea</i>	Ecorces de tige ^{157,158}
41d	Mesuabixanthone B	<i>M. ferrea</i>	Ecorces de tige ^{157,158}

Tableau 5. Structures des xanthones isolées du genre *Mesua*

N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	
33a	OH	H	H	H	OH	H	H	H	
33b	OH	H	H	H	H	OH	H	H	
33c	H	OH	H	H	H	H	H	H	
33d	H	H	H	OH	H	H	H	H	
33e	OH	H	H	H	OH	OH	H	H	
33f	OH	H	H	H	OMe	H	H	H	
33g	OH	H	H	H	H	H	OMe	H	
33h	H	H	OH	OMe	H	H	H	H	
33i	OMe	H	H	H	OH	H	H	H	
33j	H	OMe	H	H	H	H	H	H	
33k	OH	H	OMe	H	OH	H	H	H	
33l	OH	H	OH	OMe	OH	H	H	H	
33m	OMe	H	OMe	H	OH	H	H	H	
33n	OMe	H	OMe	H	OH	OH	H	H	
33o	OH	OMe	OH	H	OH	H	H	H	
33p	OH	H	OH	H	H	OH	OMe	OMe	
33q	OMe	H	OH	H	H	OH	OMe	OMe	
33r	OH		OMe		OH	H	H	H	
34a	H	H							
34b	H	OH							
34c		H							
34d		OH							
36a		OH	H						
36b		H	OH						
41a	OH	OH							
41b	OH	OMe							
41c	OMe	OH							
41d	OMe	OMe							

5.3.2. Benzophénones polyprénylées

a) Structure, nomenclature, biogenèse

La benzophénone polyhydroxylée intermédiaire dans la voie de biosynthèse des xanthones peut également conduire, après prénylation par des prényltransférases, à la formation de benzophénones prénylées. Celles-ci peuvent ensuite subir une réaction de cyclisation intramoléculaire pour former des benzoylphloroglucinols polyprénylés polycycliques ou PPAPs. Plus précisément, les PPAPs dérivent d'un acylphloroglucinol trisubstitué, dont une des chaînes prényles peut de se cycliser sur un des atomes de carbone du noyau phloroglucinol. Trois types de cyclisation sont décrits (A, B et C), et la numérotation de la structure, proposée par Ciochina et Grossman, en dépend.^{106,166,167} (**Figure 18 & Figure 19**)

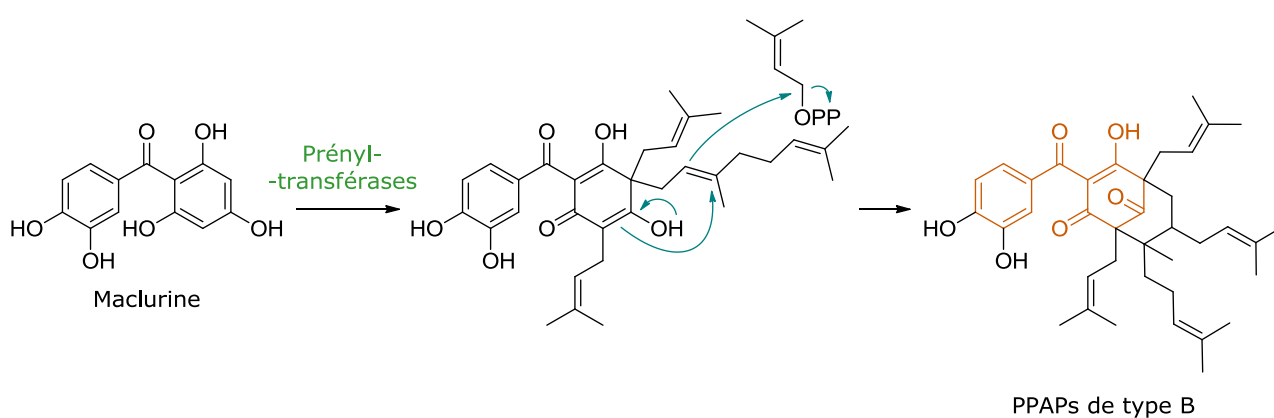


Figure 18. Schéma de biosynthèse des PPAPs de type B¹⁶⁶

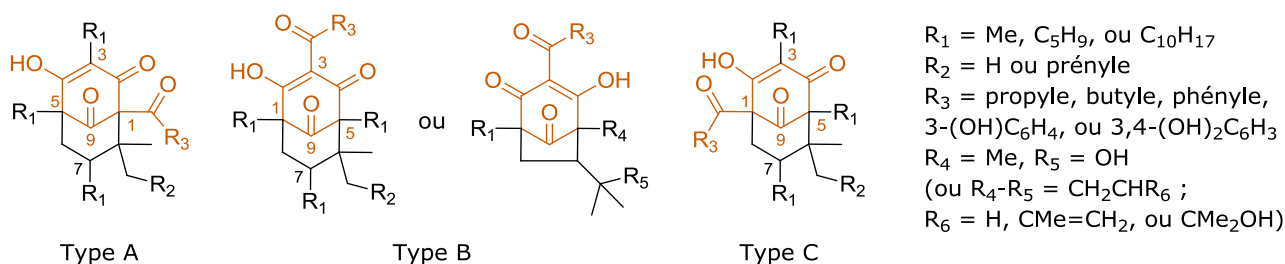


Figure 19. Différents types de PPAPs et numérotation correspondante
(D'après Ciochina et Grossman¹⁶⁸)

b) Structures isolées dans les 3 genres

❖ Dans le genre *Garcinia*

De nombreuses benzophénones polyisoprénylées ont été isolées du genre *Garcinia*, et ces structures sont essentiellement des PPAPs de type B, comme le sont le garcinol (**42**), le xanthochymol (**43**) et les guttiférones (**Figure 20**).

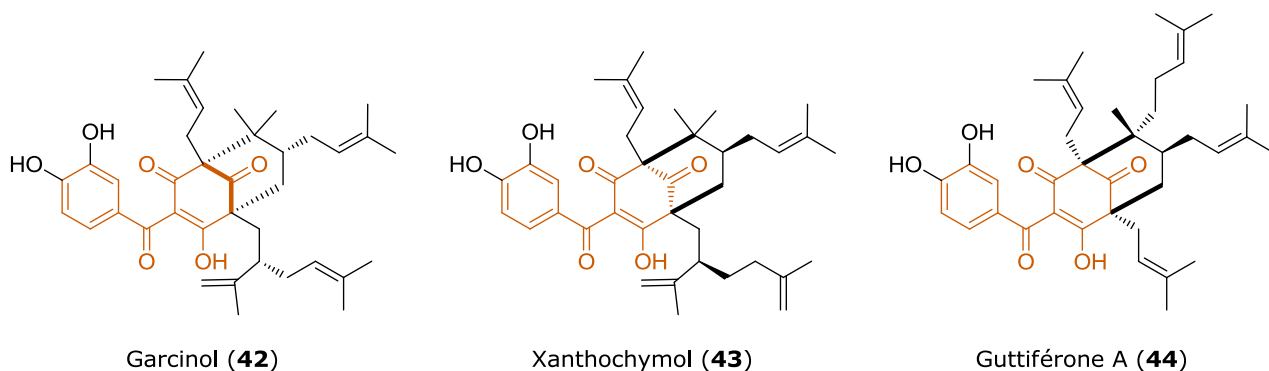


Figure 20. Exemples de benzophénones prénylées isolées du genre *Garcinia*

❖ **Dans le genre *Calophyllum***

Le genre *Calophyllum* est également concerné par la biosynthèse de cette classe de polyphénols, bien que le nombre de métabolites isolés soit très inférieur à celui du genre *Garcinia*. Aussi, à côté des PPAPs non benzylés¹⁶⁹, on trouve des benzophénones prénylées du groupe des PPAPs de type B (**Figure 21**).

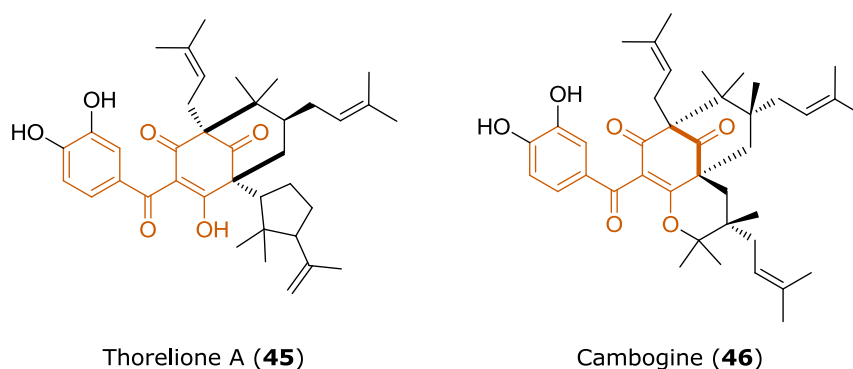


Figure 21. Exemples de benzophénones prénylées isolées du genre *Calophyllum*

❖ **Dans le genre *Mesua***

A notre connaissance, une seule benzophénone polyprénylée a été isolée dans le genre *Mesua*. Il s'agit de la congestiflorone (**47**), qui a été identifiée dans les racines de l'espèce *M. congestiflora*¹⁴⁸ (**Figure 22**).

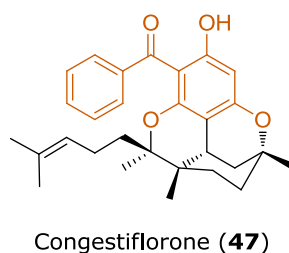


Figure 22. Benzophénone prénylée isolée du genre *Mesua*

5.3.3. Biflavonoïdes

a) Structure, nomenclature, biogenèse

Les biflavonoïdes sont des dimères de flavonoïdes. Ces derniers possèdent, comme squelette de base, un noyau 2-phénylchromane formé par la condensation de 3 unités malonyl-CoA et d'une unité acide hydroxycinnamique suivie d'une cyclisation. La plupart des biflavonoïdes sont des dimères de flavones et de flavanones^a et la liaison entre les deux, le plus souvent issue d'un couplage oxydatif, peut être de type carbone-carbone ou carbone-oxygène-carbone.¹⁷⁰ (**Figure 23**)

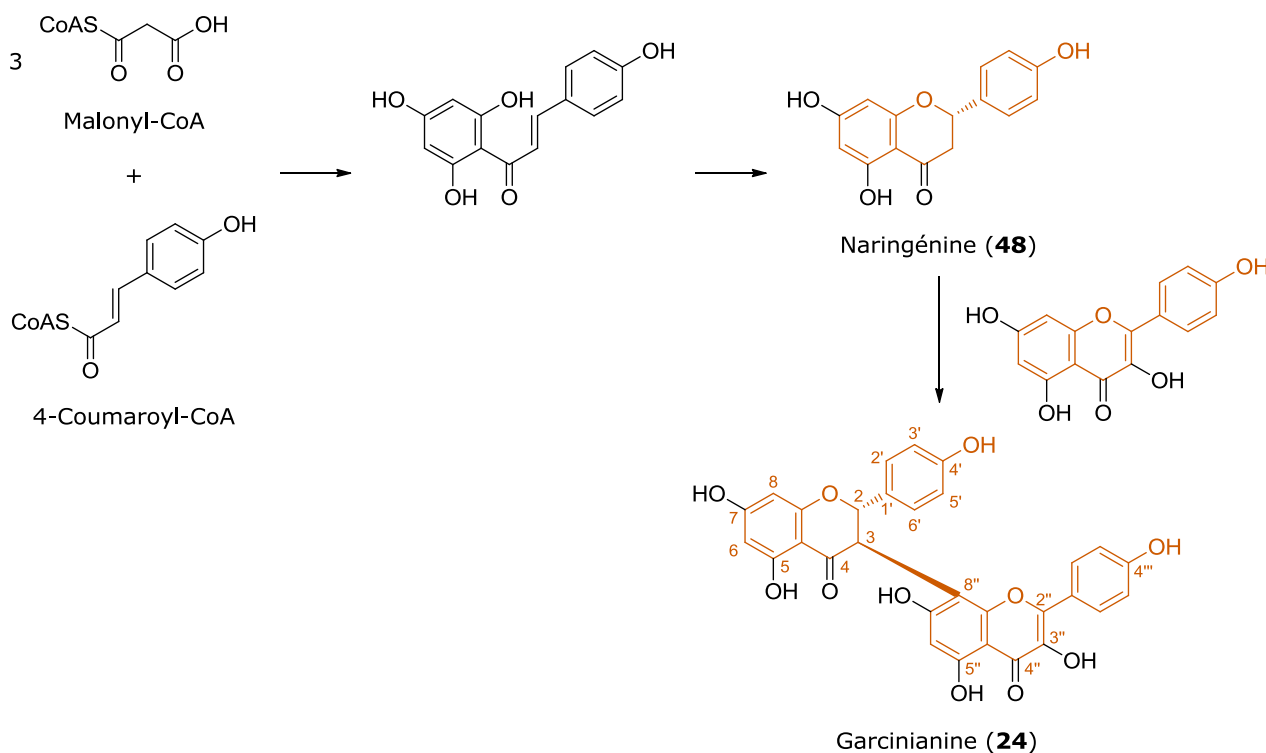
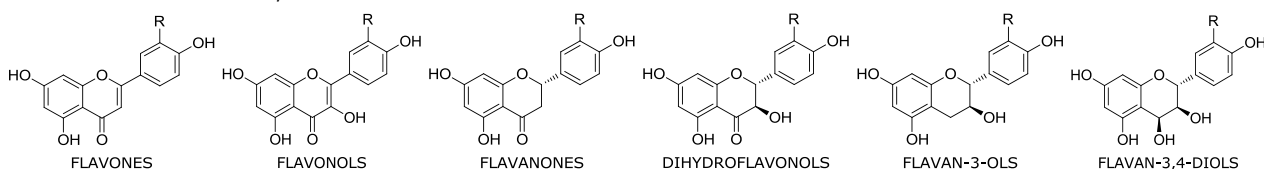


Figure 23. Schéma de biosynthèse des biflavonoïdes

b) Structures isolées dans les 3 genres

Les *Clusiaceae* et les *Calophyllaceae* renferment essentiellement des biflavonoïdes liés en C-3→C-8'' et oxygénés sur les positions 5, 7, 4', 5', 5'', 7'' et 4'''. Il s'agit en général de dimères de type flavone-flavone, flavanone-flavone, flavanone-flavanone ou flavanone-flavanol.¹⁴⁰

^a Les flavonoïdes regroupent plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central. Parmi les flavonoïdes *sensu stricto*, on retrouve les structures de base suivantes :



❖ Dans le genre *Garcinia*

Les biflavonoïdes sont largement présents dans le genre *Garcinia*. La garcinianine (**24**)¹⁷¹ en est un exemple (**Figure 23**).

❖ Dans le genre *Calophyllum*

Les biflavones telles que l'amentoflavone (**49**) et ses dérivés prédominent dans le genre *Calophyllum*. Elles peuvent aussi être prénylées, surtout en position 6'', et même cyclisées comme c'est le cas des pyranoamentoflavones¹⁴⁰ (**Figure 24**).

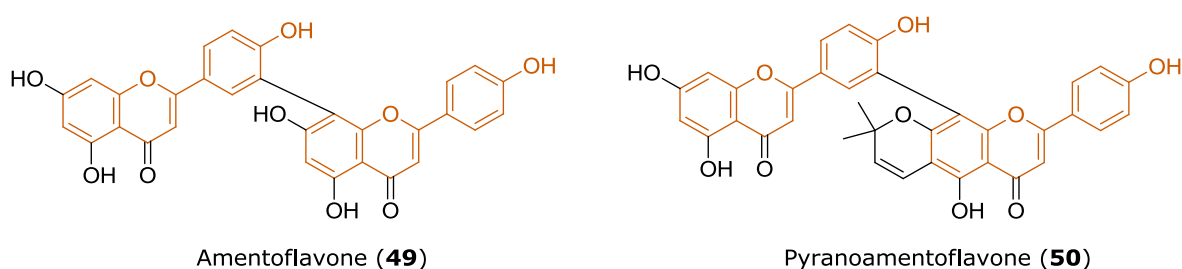


Figure 24. Exemples de biflavonoïdes isolés du genre *Calophyllum*¹⁷²

❖ Dans le genre *Mesua*

A l'heure actuelle, seuls deux biflavonoïdes sont connus dans le genre *Mesua*. Les mesuaferrones A (**51**) et B (**52**) (**Figure 25**) ont été isolées dans les étamines de l'espèce *M. ferrea*^{173,174}.

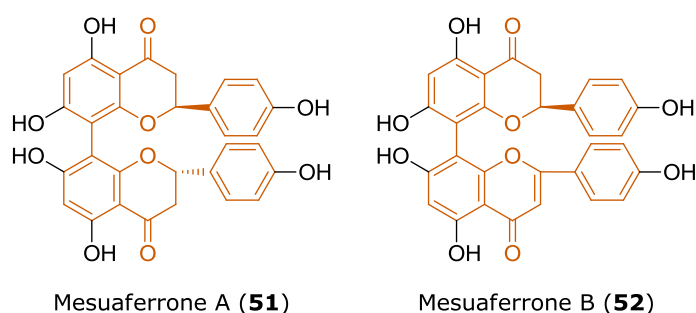


Figure 25. Biflavonoïdes isolés du genre *Mesua*

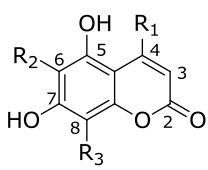
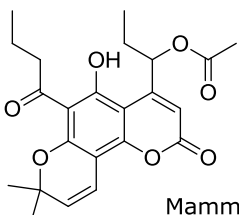
5.3.4. Coumarines

a) Structure, nomenclature, biogenèse

Les *Calophyllaceae*, et en particulier les genres *Mammea*, *Calophyllum* et *Mesua*, se distinguent par la présence de coumarines de type mammea. Celles-ci sont caractérisées par un motif 5,7-dioxycoumarinique substitué par un groupement phényle ou alkyle en position 4 et des chaînes acyle ou prényle en positions 6 ou 8¹⁰⁸. Ces coumarines ont d'ailleurs une nomenclature qui leur est

propre, et qui tient compte des cyclisations pouvant se produire entre la chaîne prényle et un hydroxyle voisin (**Tableau 6**)¹⁷⁵.

Tableau 6. Nomenclature des coumarines de type mammea, proposée par Crombie et al.¹⁷⁵

Structure d'une coumarine de type mammea	1^{ère} lettre (substituant en position 4)	/	2^{ème} lettre	3^{ème} lettre (type de substituant acyle)	4^{ème} lettre (type d'hétérocyclisation si cyclisation entre le substituant prényle et l'hydroxyle en <i>ortho</i>)
	A = phényl B = propyl C = pentyl D = 1-méthylpropyl E = 1-acétoxypropyl	/	A = 6-acyl B = 8-acyl	A = 3-méthylbutyryl B = 2-méthylbutyryl C = butyryl D = 2-méthylpropionyl	Cyclo D = 2,2-diméthylchromène Cyclo E = 3-hydroxy-2,2-diméthyl-dihydropyrane Cyclo F = 2-(1-hydroxy-1-méthyléthyl)dihydrofurane
Exemple :	 Mammea E/AC cyclo D (53)				

Contrairement aux coumarines non substituées en position 4, qui dérivent de la voie de l'acide shikimique¹⁷⁰, les coumarines de type mammea ont une origine biogénétique apparentée à celle des néoflavonoïdes¹⁷⁶. Ainsi, une unité d'un acide dérivant d'un acide aminé variable réagirait avec un noyau phloroglucinol avant qu'un groupement diméthylallyle ne soit incorporé. Un acide α,β -insaturé (tel que l'acide cinnamique dans le cas des mammea A) est ensuite introduit et la condensation entre cet acide et l'hydroxyle phénolique voisin conduit à la formation de la lactone de ces coumarines. C'est seulement ensuite qu'on peut observer une cyclisation complémentaire pour obtenir les dérivés « cyclo »^{177,178}. (**Figure 26**)

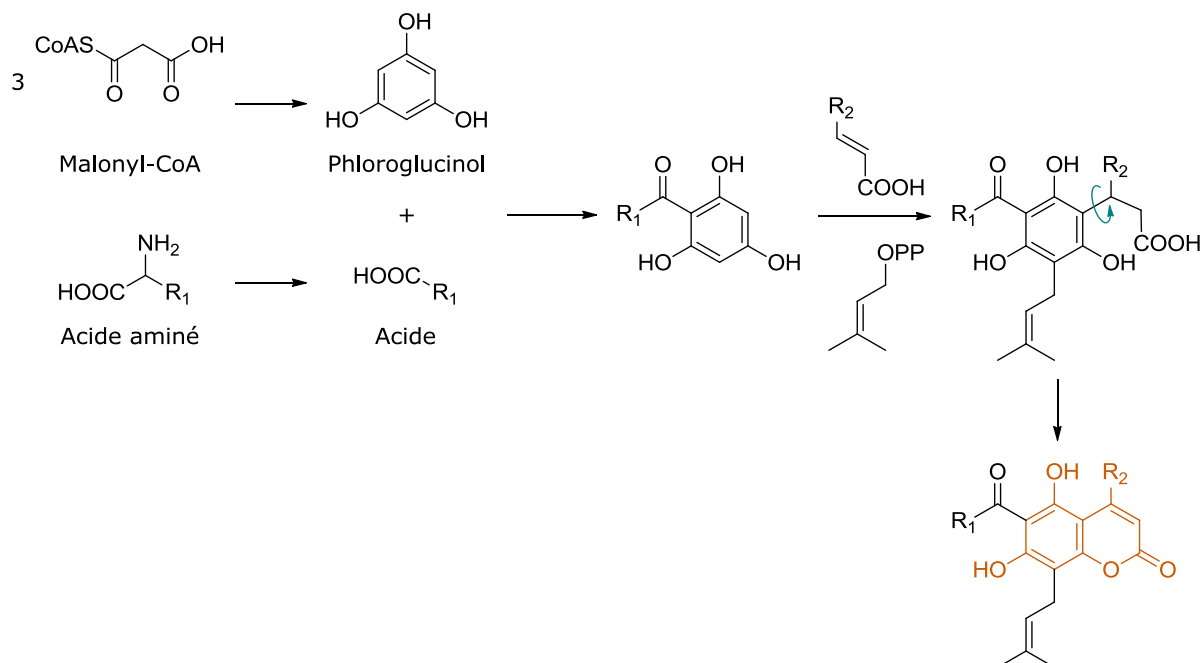


Figure 26. Schéma de biosynthèse des coumarines de type mammea

a) Structures isolées dans les genres *Calophyllum* et *Mesua*

❖ Dans le genre *Calophyllum*

Des coumarines non cyclisées [e.g. mammea C/OB (**54**)] mais également des furano- [e.g. mammea B/BA cyclo F (**55**)], des pyrano- [e.g. oblongulide (**56**)] et des furano-pyranocoumarines [e.g. inophyllum G-1 (**57**)] ont été isolées du genre *Calophyllum* (**Figure 27**). En position 4, des groupements méthyle, propyle, pentyle ou phényle peuvent être rencontrés. La chaîne acyle souvent présente en position 6 ou 8 dépend quant à elle de l'acide aminé de départ utilisé pour la biosynthèse (**Figure 26**), celui-ci étant fréquemment l'isoleucine. Lorsqu'un groupement prényle substitue la position 6 ou 8, il n'est pas rare qu'une hydroxylation se produise au niveau de la double liaison, surtout lorsque ce prényle est cyclisé avec l'un des hydroxyles en position 5 ou 7 (e.g. **55**). Enfin, une méthylation de l'un des hydroxyles est parfois retrouvée (e.g. **56**).

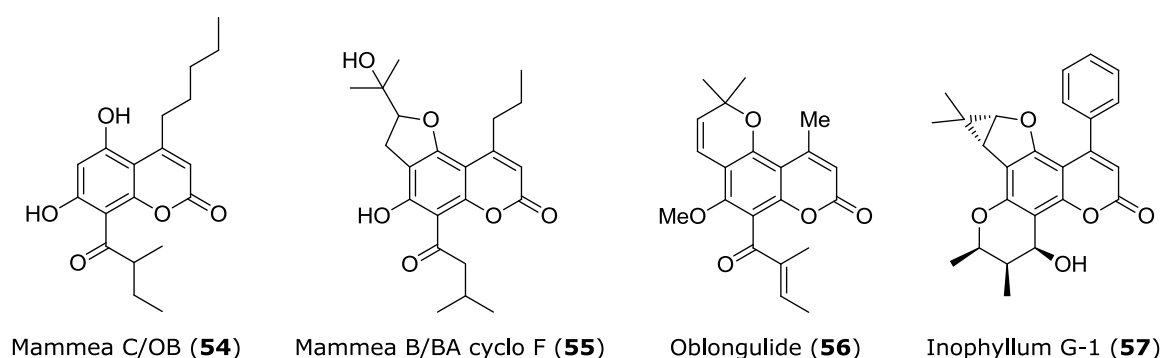


Figure 27. Exemples de coumarines isolées du genre *Calophyllum*

❖ Dans le genre *Mesua*

Les **Tableau 7** et **Tableau 8** présentent les coumarines déjà isolées du genre *Mesua*. Celles-ci sont toutes des coumarines de type mammea, sauf la beccamarine (**58**), dont les positions 5 et 7 ne sont pas substituées par un atome d'oxygène. On distingue des coumarines non cyclisées ainsi que des furano- (structures **58**, **64**, **66** et **67**) et des pyranocoumarines (structures **63** et **65**). Toutes sont des phénylcoumarines, à l'exception de trois molécules : le ferruol A (**59**), qui est substitué par un groupement 1-méthylpropyle, et l'assamène (**60a**) et la surangine C (**60b**), qui portent une chaîne 1-hydroxypropyle en position 4. Les molécules sont généralement prénylées ou géranylées [e.g. mesuagénine C (**62g**)], mais certaines non prénylées ont été isolées à l'instar de la racémosone (**61e**). Concernant le substituant acyle situé en position 6 ou 8, il s'agit d'un 2-méthylpropionyle (e.g. **61d**), d'un butyryle (e.g. **67**), d'un 2-méthylbutyryle (e.g. **60**) ou d'un 3-méthylbutyryle (e.g. **64**).

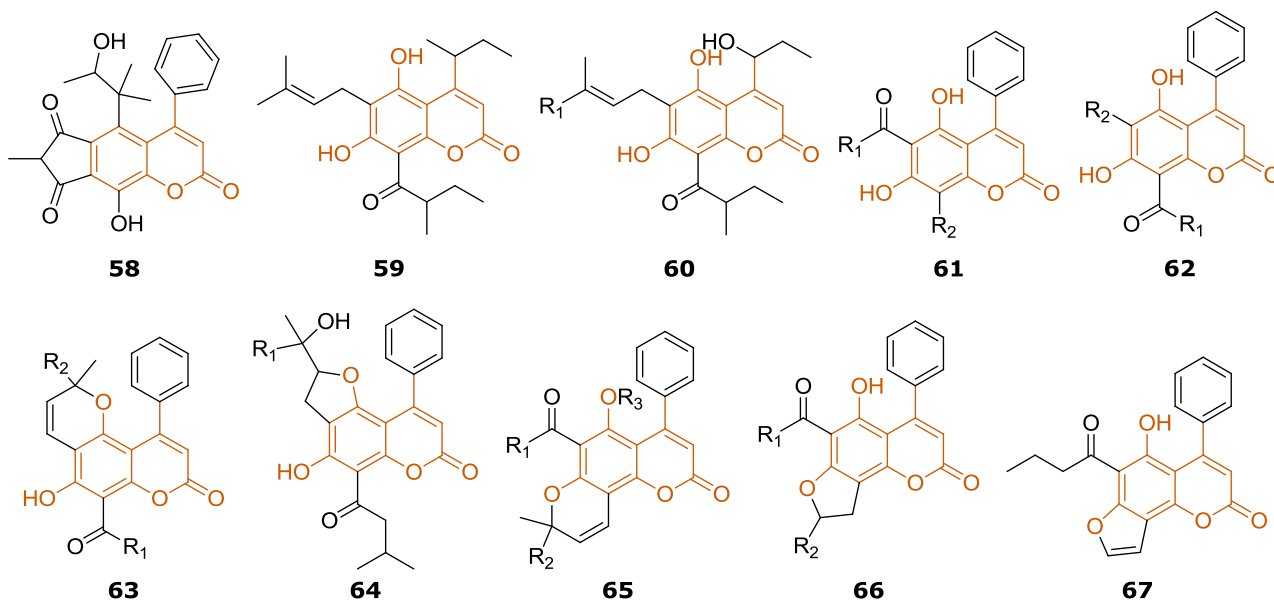
Tableau 7. Coumarines isolées du genre *Mesua*

N°	Nom	Espèce	Partie
58	Beccamarine	<i>M. beccariana</i>	Ecorces de tige ^{179,180}
59	Ferruol A	<i>M. ferrea</i>	Ecorces du tronc ¹⁸¹
60a	Assamène	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
60b	Surangine C	<i>M. ferrea</i>	Bourgeons ¹⁸³ et fleurs ¹⁸²
61a	Mammea A/AA ou mammeisine	<i>M. thwaitesii</i>	Graines ^{a155}
		<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸² et graines ¹⁸⁴
		<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁵
61b	Mammea A/AB	<i>M. beccariana</i>	Ecorces de tige ¹⁶⁴
		<i>M. ferrea</i>	Bourgeons ¹⁸³ et fleurs ¹⁸²
		<i>M. thwaitesii</i>	Graines ^{a155}
61c	Mammea A/AC	<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁵
		<i>M. thwaitesii</i>	Graines ^{b155}
61d	Mammea A/AD ou mesuol	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸² et graines ¹⁸⁶
		<i>M. thwaitesii</i>	Graines ^{b155}
61e	Racémosone	<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁷
61f	5,7-Dihydroxy-6-(2-méthylbutanoyl)-4-phényl-2H-chromèn-2-one	<i>M. ferrea</i>	Bourgeons ¹⁸³ et fleurs ¹⁸²
61g	5,7-Dihydroxy-6-(2-méthylbutanoyl)-8-[(E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyl]-4-phényl-2H-chromèn-2-one	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
61h	5,7-Dihydroxy-6-(3-méthylbutanoyl)-8-[(E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyl]-4-phényl-2H-chromèn-2-one	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
61i	Racémosol	<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁵
62a	Mammea A/BA	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
		<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
		<i>M. kunstleri</i>	Ecorces ¹⁸⁸
62b	Mammea A/BB ou isomammeisine	<i>M. ferrea</i>	Bourgeons ¹⁸³ , feuilles ¹⁸⁹ , fleurs ¹⁸²
		<i>M. kunstleri</i>	Ecorces ¹⁸⁸
		<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁵

^aInterchangeables^bInterchangeables

62c	Mammea A/BC	<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁷
62d	5,7-Dihydroxy-8-(2-méthylbutanoyl)-6-[(E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyl]-4-phényl-2H-chromèn-2-one	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
		<i>M. ferrea</i>	Bourgeons ¹⁸³
		<i>M. kunstleri</i>	Ecorces ¹⁸⁸
62e	5,7-Dihydroxy-8-(3-méthylbutanoyl)-6-[(E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyl]-4-phényl-2H-chromèn-2-one	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
		<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
		<i>M. kunstleri</i>	Ecorces ¹⁸⁸
62f	Isoracémosol	<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁷
62g	Mesuagénine C	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
		<i>M. kunstleri</i>	Ecorces ¹⁸⁸
63a	Mesuagénine A	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
63b	Mesuagénine B	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
63c	Mammea A/BA cyclo D ou isomammeigine	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
64a	Mesuagénine D	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
64b	Mammea A/BA cyclo F	<i>M. elegans</i>	Ecorces ¹²²
65a	Mammea A/AA cyclo D	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸² et graines ¹⁸⁶
65b	Mammea A/AB cyclo D ou mammeigine	<i>M. ferrea</i>	Bourgeons ¹⁸³ , fleurs ¹⁸² , graines ¹⁵⁵
		<i>M. thwaitesii</i>	Graines ¹⁵⁵
65c	Mammea A/AC cyclo D	<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁵
65d	Mammea A/AD cyclo D ou mesuagine	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸² et Graines ¹⁹⁰
		<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁵
		<i>M. thwaitesii</i>	Graines ¹⁵⁵
65e	Mesuarine	<i>M. ferrea</i>	Graines ^{158,191}
65f	5-Hydroxy-6-isobutyryl-8-méthyl-8-(4-méthylpent-3-ényl)-4-phényl-2H-pyrano[2,3- <i>h</i>]chromèn-2-one	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
65g	5-Hydroxy-8-méthyl-6-(2-méthylbutanoyl)-8-(4-méthylpent-3-ényl)-4-phényl-2H-pyrano[2,3- <i>h</i>]chromèn-2-one	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
66a	Mammea A/AA cyclo F ou cyclomammeisine	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
		<i>M. thwaitesii</i>	Ecorces et graines ¹⁵⁵
66b	Mammea A/AB cyclo F	<i>M. ferrea</i>	Bourgeons ¹⁸³ et fleurs ¹⁸²
66c	Mammea A/AC cyclo F	<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁵
66d	Mammea A/AD cyclo F	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
		<i>M. thwaitesii</i>	Graines ¹⁵⁵
66e	8,9-Dihydro-5-hydroxy-6-(2-méthylbutanoyl)-4-phényl-8-(prop-1-èn-2-yl)furo[2,3- <i>h</i>]chromèn-2-one	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
66f	8,9-Dihydro-5-hydroxy-6-(3-méthylbutanoyl)-4-phényl-8-(prop-1-èn-2-yl)furo[2,3- <i>h</i>]chromèn-2-one	<i>M. ferrea</i>	Fleurs ¹⁸²
67	Furanoracémosone	<i>M. racemosa</i>	Feuilles ¹⁸⁷

Tableau 8. Structures des coumarines isolées du genre *Mesua*



N°	R ₁	R ₂	R ₃
60a	Me		
60b			
61a, 62a			
61b, 62b			
61c, 62c			
61d			
61e			
61f		H	
61g, 62d			
61h, 62e			
61i, 62f			
62g			
63a			
63b			
63c		Me	

N°	R ₁	R ₂	R ₃
64a			
64b	Me		
65a		Me	H
65b		Me	H
65c		Me	H
65d		Me	H
65e		Me	Me
65f			H
65g			H
66a			
66b			
66c			
66d			
66e			
66f			

5.3.5. Chromanones acides

a) Structure, nomenclature, biogenèse

Les chromanones acides retrouvées chez les *Calophyllaceae* auraient, selon différents auteurs, une origine biosynthétique similaire à celle des coumarines vues précédemment^{104,178}. Plus précisément, elles dériveraient d'un noyau phloroglucinol condensé à une unité d'acide tiglique. Elles sont d'ailleurs parfois des intermédiaires de synthèse « biomimétique » dans l'élaboration de certaines coumarines¹⁷⁷. De plus, la prénylation de ces composés conduit fréquemment à une cyclisation en noyau pyrane¹⁹². (**Figure 28**)

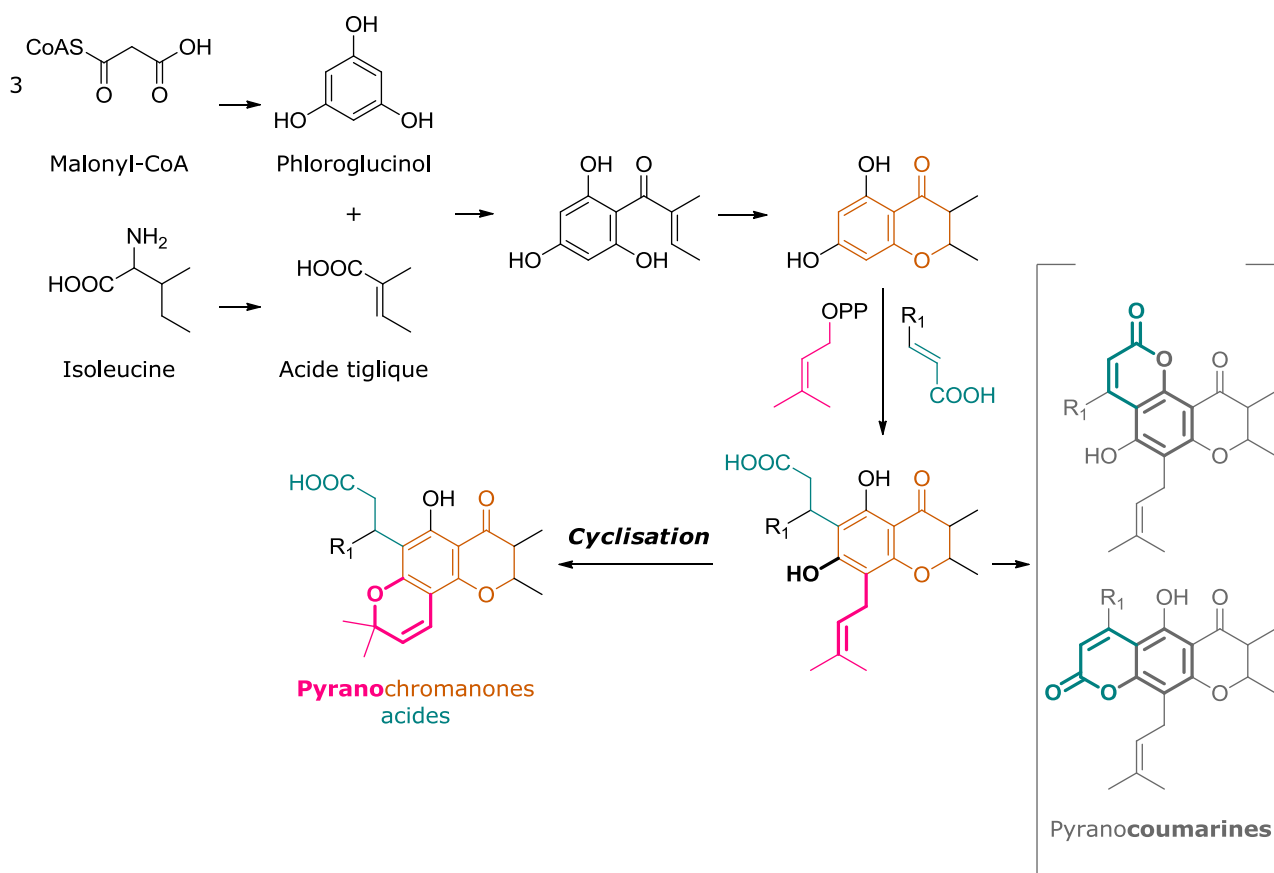


Figure 28. Schéma de biosynthèse des pyranochromanones acides et des pyranocoumarines

b) Structures isolées dans les genres *Calophyllum* et *Mesua*

❖ Dans le genre *Calophyllum*

Les pyranochromanones acides du genre *Calophyllum* peuvent être classées en deux types selon que le cycle *gem*-diméthylpyrène fusionne de façon angulaire [e.g. acide calopolyanique (**68**)] ou linéaire [e.g. acide isoapéralique (**69**)] avec le noyau chromanone¹⁹³. A côté de ces dérivés pyraniques, d'autres 4-chromanones acides prénylées mais non cyclisées en noyau pyrane [e.g. acide brasiliensophyllique B (**70**)] ont été isolées de *Calophyllum brasiliense*¹⁹⁴. (**Figure 29**)

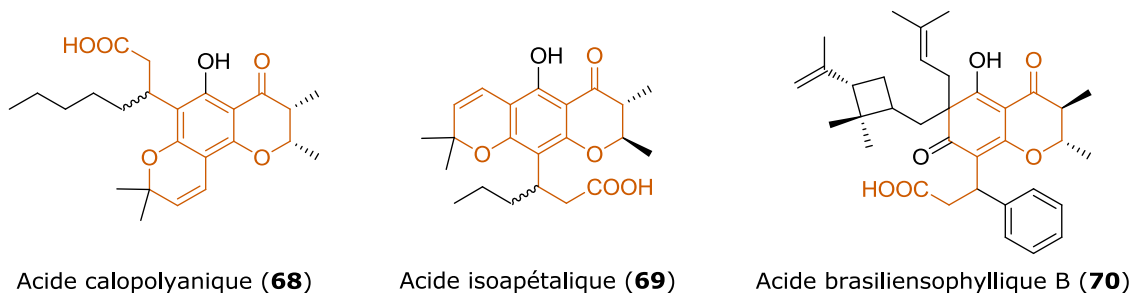


Figure 29. Exemples de (pyrano)chromanones acides isolées du genre *Calophyllum*^{193,195}

❖ Dans le genre *Mesua*

A ce jour, il semble qu'une seule chromanone acide ait été identifiée dans le genre *Mesua* : l'acide mesuanique (71, **Figure 30**), isolé des étamines de l'espèce *M. ferrea*¹⁹⁶.

Une autre chromanone appelée mesuaferrol (72, **Figure 30**), ne présentant pas de fonction acide mais de structure très proche à l'acide mesuanique, a également été découverte dans la même source¹⁹⁷.

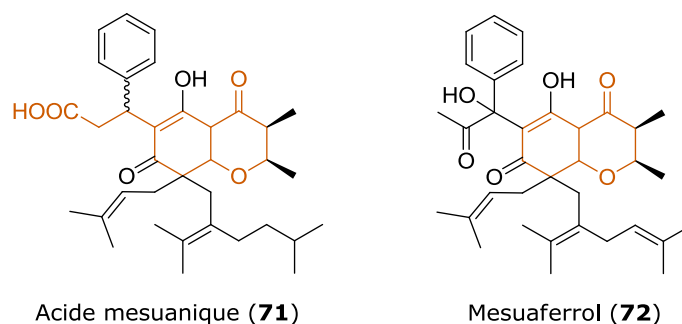
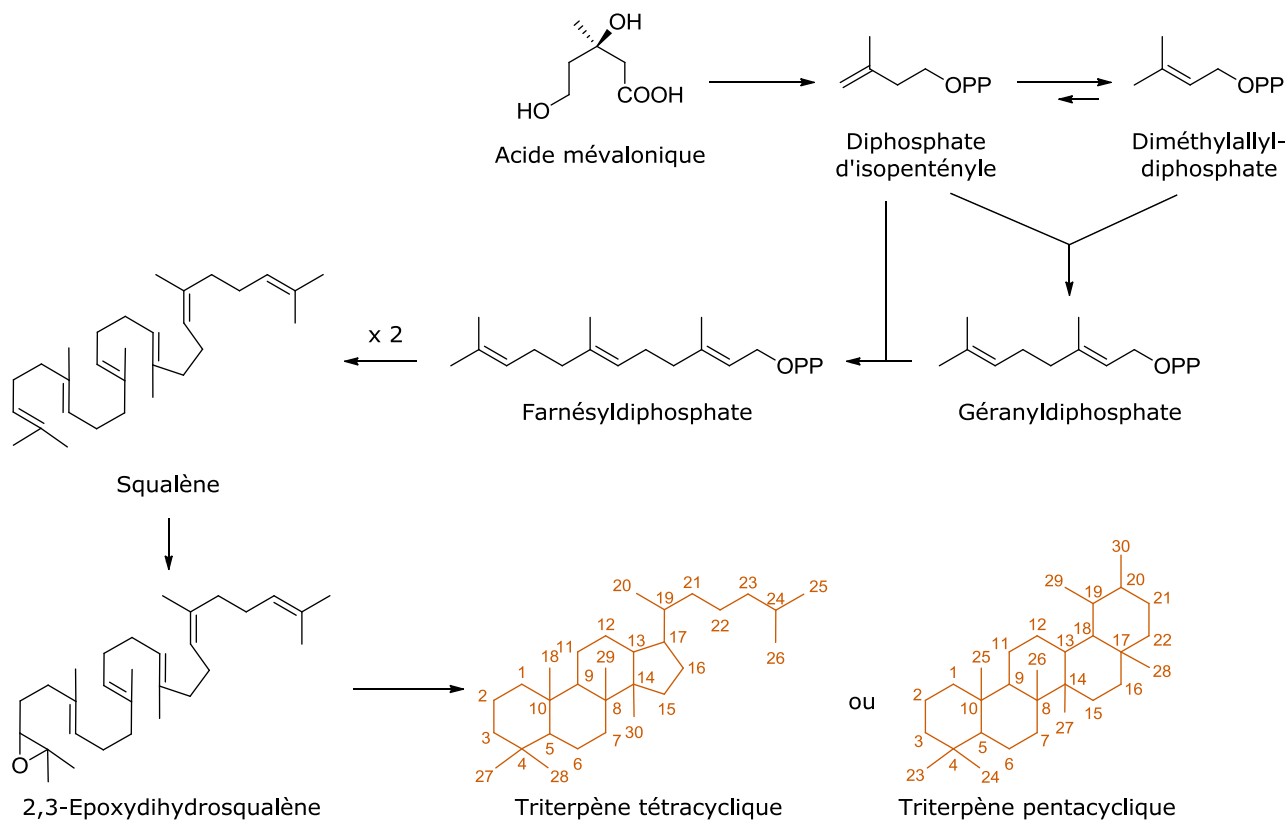


Figure 30. 4-Chromanones isolée du genre *Mesua*

5.3.6. Triterpènes et stéroïdes

a) Structure, nomenclature, biogénèse

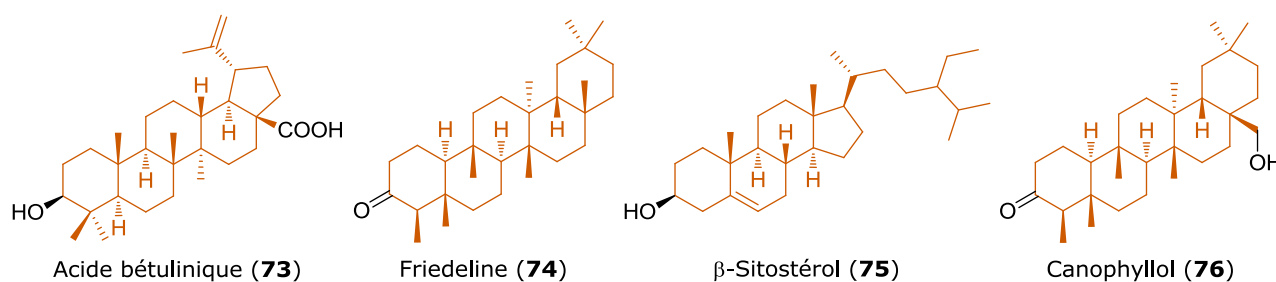
Les triterpènes, tétra- ou pentacycliques, sont biosynthétisés *via* la voie du mévalonate. Plus précisément, ils sont issus de la cyclisation du (3*S*)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène (**Figure 31**). Des déméthylations au niveau des positions 4 et 14 permettent la formation des stéroïdes, possédant un squelette en C₂₇ voire moins.¹⁷⁰


Figure 31. Schéma de biosynthèse des triterpènes

b) Structures isolées dans les genres *Calophyllum* et *Mesua*

❖ Dans le genre *Calophyllum*

Parmi les triterpènes isolés du genre *Calophyllum*, l'acide bétulinique (**73**), la friedeline (**74**), le β -sitostérol (**75**) et le canophyllol (**76**) sont les plus fréquents (**Figure 32**)¹⁰⁴.


Figure 32. Exemples de triterpènes isolés du genre *Calophyllum*

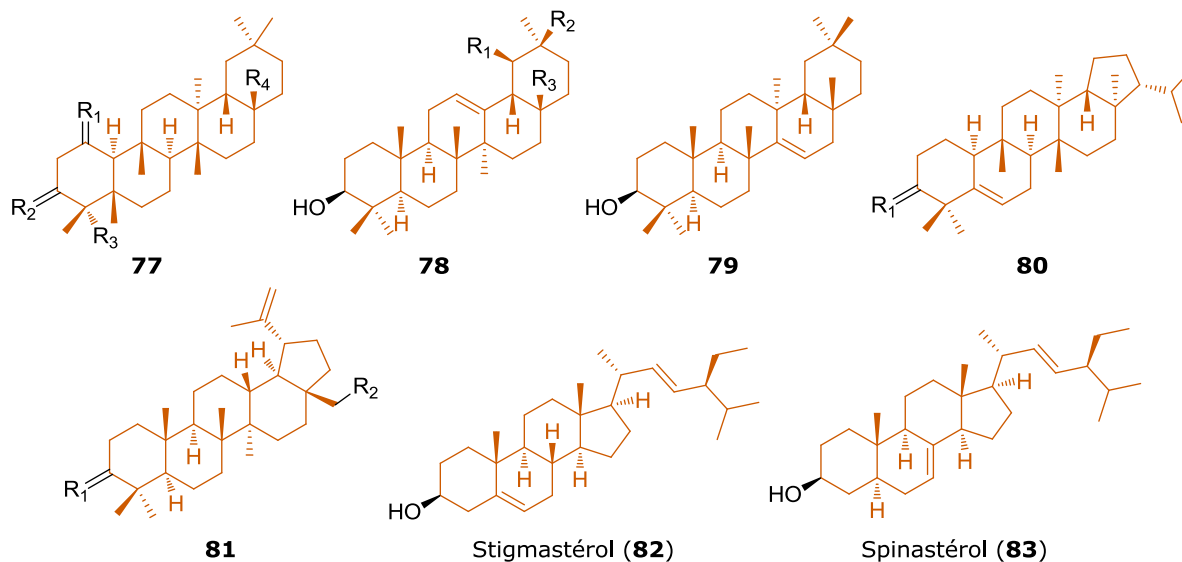
❖ Dans le genre *Mesua*

Plusieurs triterpènes déjà notés dans le genre *Calophyllum* se retrouvent aussi dans le genre *Mesua* (**Tableau 9** & **Tableau 10**). Celui-ci compte également des stéroïdes, dont le stigmastérol (**82**) et le spinastérol (**83**) (**Tableau 10**), respectivement isolés dans les écorces de tige de *M. beccariana*^{164,180} et de *M. ferrea*¹⁹⁸.

Tableau 9. Triterpènes isolés du genre *Mesua*

N°	Nom	Espèce	Partie
73	Acide bétulinique	<i>M. beccariana</i>	Ecorces de tige ¹⁶⁴
		<i>M. ferrea</i>	Ecorces ^{157,158} et racines ^{163,165}
		<i>M. myrtifolia</i>	Ecorces ¹⁶²
74	Friedeline	<i>M. beccariana</i>	Ecorces de tige ¹⁶⁴
		<i>M. daphnifolia</i>	Ecorces de tige ¹⁵⁰
		<i>M. ferrea</i>	Ecorces de tige ¹⁹⁸ et racines ^{163,165}
75	β-Sitostérol	<i>M. ferrea</i>	Duramen ¹⁵² , étamines ¹⁹⁷ et racines ¹⁶⁵
		<i>M. myrtifolia</i>	Ecorces ¹⁶²
		<i>M. thwaitesii</i>	Bois et écorces ¹⁵⁵
77a	Friedelan-1,3-dione	<i>M. daphnifolia</i>	Ecorces de tige ¹⁵⁰
77b	3β-Friedélanol	<i>M. ferrea</i>	Ecorces de tige ¹⁹⁸
77c	Acide myrtifolique	<i>M. myrtifolia</i>	Bois ¹⁶² et écorces ¹⁶²
78a	α-Amyrine	<i>M. ferrea</i>	Etamines ¹⁷³
78b	β-Amyrine	<i>M. ferrea</i>	Etamines ¹⁹⁷
78c	Acide oléanolique	<i>M. myrtifolia</i>	Bois ¹⁶²
79	Taraxérol	<i>M. myrtifolia</i>	Ecorces ¹⁶²
80a	Simiarénol	<i>M. myrtifolia</i>	Ecorces ¹⁶²
80b	Simiarénone	<i>M. myrtifolia</i>	Ecorces ¹⁶²
81a	Lupéol	<i>M. daphnifolia</i>	Ecorces de tige ¹⁵⁰
		<i>M. ferrea</i>	Ecorces de tige ¹⁹⁸
81b	3-Oxo-bétuline	<i>M. ferrea</i>	Ecorces de tige ¹⁹⁸

Tableau 10. Structures des triterpènes et de stéroïdes isolés du genre *Mesua*



N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
77a	O	O	H	Me
77b	H, H	OH, H	H	Me
77c	H, H	OH, H	Me	COOH
78a	Me	H	Me	
78b	H	Me	Me	
78c	H	Me	COOH	
80a	OH, H			
80b	O			
81a	OH, H	H		
81b	O	OH		

5.3.7. Autres métabolites secondaires isolés du genre *Mesua*

Des flavonoïdes tels que la (-)-épicatéchine (**84**)¹⁵³, et des acides phénoliques [acides ellagique (**85**), vanillique (**86**), *p*-coumarique (**87**) et gallique (**88**)] ont été isolés dans le genre *Mesua*¹⁹⁹. En outre, des anthraquinones simples (**89** et **90**) ont été identifiées dans les écorces de tige de *M. beccariana*¹⁷⁹ et de racine de *M. ferrea*¹⁶³ (**Figure 33**).

Enfin, de nombreux terpènes, et particulièrement des sesquiterpènes, ont pu être décrits au cours de l'analyse de l'huile essentielle des feuilles *M. ferrea*²⁰⁰.

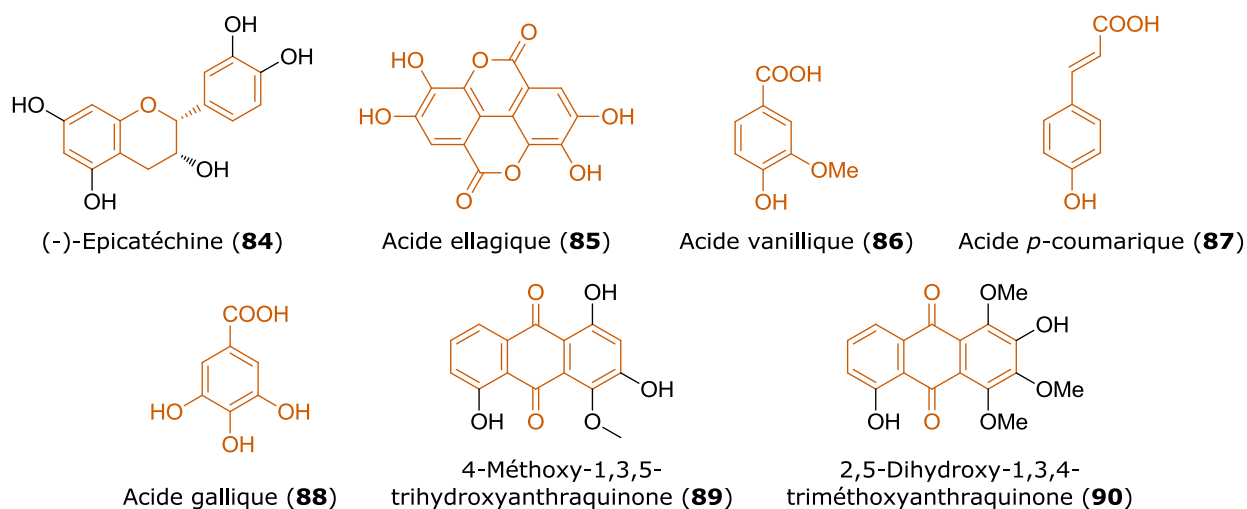


Figure 33. Exemples d'autres métabolites secondaires isolés du genre *Mesua*

6. Conclusion

Cette revue bibliographique relève l'importance d'identifier de nouvelles molécules immunosuppressives et efficaces dans la prévention des rejets de greffe, comme alternative aux agents immunosuppresseurs actuels qui présentent une certaine cytotoxicité, notamment néphrologique. Les espèces végétales appartenant aux familles des *Clusiaceae* et des *Calophyllaceae* sont une source riche en dérivés polyphénoliques prénylés, molécules souvent antioxydantes et anti-inflammatoires. De nombreuses espèces de ces familles sont endémiques et restent encore inconnues ou très peu étudiées au niveau phytochimique, recelant très probablement des molécules originales et actives sur l'inflammation et sur l'immunogénicité.

Bibliographie du chapitre I

1. Ait-Oufella, H.; Maury, E.; Guidet, B.; Offenstadt, G., L'endothélium : un nouvel organe. *Réanimation* **2008**, 17, 126-136.
2. Widlansky, M. E.; Gokce, N.; Keaney, J. F., Jr.; Vita, J. A., The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* **2003**, 42, 1149-1160.
3. Salvadori, M.; Bertoni, E., What's new in clinical solid organ transplantation by 2013. *World Journal of Transplantation* **2014**, 4, 243-266.
4. Filipponi, F.; De, S. P.; Saviozzi, A.; Bozzi, G., Tissue procurement and transplantation: a Tuscany perspective. *Transplantation Proceedings* **2008**, 40, 1811-1813.
5. Farge, D.; Terriou, L.; Dulery, R.; Yakoub-Agha, I.; Badoglio, M.; Cras, A.; Desreumaux, P.; Hadj-Khelifa, S.; Hij, A.; Marjanovic, Z.; Moisan, A.; Faucher, C.; Martin, T.; Vermersch, P., Autogreffe des cellules souches hématopoïétiques dans les maladies auto-immunes : recommandations de la SFGM-TC. *Pathologie Biologie* **2014**, 62, 204-208.
6. Brick, C.; Atouf, O.; Benseffaj, N.; Essakalli, M., Rejet de la greffe rénale : mécanisme et prévention. *Néphrologie & Thérapeutique* **2011**, 7, 18-26.
7. Agence de la biomédecine - Chiffres préliminaires 2013 [en ligne], <http://www.agence-biomedecine.fr>, consulté le 29 janvier 2015.
8. Chandak, P.; Callaghan, C., The immunology of organ transplantation. *Surgery* **2014**, 32, 325-332.
9. Glicenstein, J., Un livre d'or de la chirurgie plastique française. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique* **2010**, 55, 338-353.
10. Haddad, E., Evolution des concepts de l'immunosuppression dans le cadre de la transplantation d'organe. *Archives de Pédiatrie* **2004**, 11, 532-534.
11. Kolopp-Sarda, M.-N.; Malcus, C.; Kohler, C., Immunologie de la transplantation : rejets et infections en transplantation d'organes solides. *Revue Francophone des Laboratoires* **2008**, 2008, 23-30.
12. Land, W. G., Chronic allograft dysfunction: a model disorder of innate immunity. *Biomedical Journal* **2013**, 36, 209-228.
13. Lin, Q.; Li, M.; Fang, D.; Fang, J.; Su, S. B., The essential roles of toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. *International Immunopharmacology* **2011**, 11, 1422-1432.
14. Beijnum, J. R.; Buurman, W. A.; Griffioen, A. W., Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* **2008**, 11, 91-99.
15. Angaswamy, N.; Tiriveedhi, V.; Sarma, N. J.; Subramanian, V.; Klein, C.; Wellen, J.; Shenoy, S.; Chapman, W. C.; Mohanakumar, T., Interplay between immune responses to HLA and non-HLA self-antigens in allograft rejection. *Human Immunology* **2013**, 74, 1478-1485.
16. Taylor, A. L.; Watson, C. J. E.; Bradley, J. A., Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2005**, 56, 23-46.
17. Thervet, É.; Zuber, J.; Sberro, R.; Canaud, G.; Anglicheau, D.; Snanoudj, R.; Mamzer-Bruneel, M.-F.; Martinez, F.; Legendre, C., Traitements immunosuppresseurs : mécanismes d'action et utilisation clinique. *Néphrologie & Thérapeutique* **2011**, 7, 566-581.
18. Saidi, R. F.; Hejazii, K. S. K., Clinical transplantation and tolerance: are we there yet? *International Journal of Organ Transplantation Medicine* **2014**, 5, 137-145.
19. Marker, R. E.; Wagner, R. B., Steroidal sapogenins. *Journal of the American Chemical Society* **1947**, 69, 2167-2230.
20. Survase, S. A.; Kagliwal, L. D.; Annapure, U. S.; Singhal, R. S., Cyclosporin A - A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnology Advances* **2011**, 29, 418-435.
21. Li, C.-J.; Li, L., Tacrolimus in preventing transplant rejection in Chinese patients - optimizing use. *Drug Design, Development and Therapy* **2015**, 9, 473-485.
22. Watson, C. J. E.; Bradley, J. A., Sirolimus and everolimus: inhibitors of mammalian target of rapamycin in liver transplantation. *Transplantation Reviews* **2006**, 20, 104-114.
23. Dong, Y.; Xu, R.; Wang, L.; Zhang, J.; Bai, C.; Sun, A.; Wei, D., A combined feeding strategy for enhancing mycophenolic acid production by fed-batch fermentation in *Penicillium brevicompactum*. *Process Biochemistry* **2015**, 50, 336-340.
24. Herrmann, M. L.; Schleyerbach, R.; Kirschbaum, B. J., Leflunomide: an immunomodulatory drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Immunopharmacology* **2000**, 47, 273-289.

25. Hulin, A., Mécanismes moléculaires de l'activité des immunosuppresseurs actuels en transplantation : rôles du pharmacien. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **2008**, 66, 102-114.
26. Piotti, G.; Palmisano, A.; Maggiore, U.; Buzio, C., Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Frontiers in Immunology* **2014**, 5, 505.
27. Bao, Y.; Cao, X., The immune potential and immunopathology of cytokine-producing B cell subsets: a comprehensive review. *Journal of Autoimmunity* **2014**, 55, 10-23.
28. Wijesurendra, R. S.; Jefferson, A.; Choudhury, R. P., Target: ligand interactions of the vascular endothelium. Implications for molecular imaging in inflammation. *Integrative Biology* **2010**, 2, 467-482.
29. Collins, R. W. M., Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *European Journal of Immunogenetics* **2004**, 31, 105-114.
30. Janeway CA Jr.; Travers P.; Walport M.; Shlomchik M.J., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5^{ème} ed.; Garland Science: New York, **2001**. The major histocompatibility complex and its functions [en ligne], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/>.
31. Chauveau, A.; Tonnerre, P.; Pabois, A.; Gavlovsky, P.-J.; Chatelais, M.; Coupel, S.; Charreau, B., Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *Journal of Innate Immunity* **2014**, 6, 89-104.
32. Iwaszko, M.; Bogunia-Kubik, K., Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis* **2011**, 59, 353-367.
33. Charreau, B., Signaling of endothelial cytoprotection in transplantation. *Human Immunology* **2012**, 73, 1245-1252.
34. Xu, Y.-K.; Liao, S.-G.; Na, Z.; Hu, H.-B.; Li, Y.; Luo, H.-R., *Gelsemium* alkaloids, immunosuppressive agents from *Gelsemium elegans*. *Fitoterapia* **2012**, 83, 1120-1124.
35. Ishikawa, M.; Ninomiya, T.; Akabane, H.; Kushida, N.; Tsujiuchi, G.; Ohyama, M.; Gomi, S.; Shito, K.; Murata, T., Pseurotin A and its analogues as inhibitors of immunoglobulin E production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 1457-1460.
36. Kumar, C. G.; Sujitha, P., Kocuran, an exopolysaccharide isolated from *Kocuria rosea* strain BS-1 and evaluation of its *in vitro* immunosuppression activities. *Enzyme and Microbial Technology* **2014**, 55, 113-120.
37. Amans, D.; Bellosta, V.; Cossy, J., Synthesis of two bioactive natural products: FR252921 and pseudotrienic acid B. *Chemistry - A European Journal* **2009**, 15, 3457-3473.
38. Just-Baringo, X.; Albericio, F.; Alvarez, M., Thiopeptide antibiotics: retrospective and recent advances. *Marine Drugs* **2014**, 12, 317-351.
39. Wei, N.; Li, T.; Chen, H.; Mei, X.; Cao, B.; Zhang, Y.-y., The immunosuppressive activity of pseudolaric acid B on T lymphocytes *in vitro*. *Phytotherapy Research* **2013**, 27, 980-985.
40. Yang, B.-Y.; Xia, Y.-G.; Liu, Y.; Li, L.; Jiang, H.; Yang, L.; Wang, Q.-H.; Kuang, H.-X., New antiproliferative and immunosuppressive withanolides from the seeds of *Datura metel*. *Phytochemistry Letters* **2014**, 8, 92-96.
41. Li, X.; Xuan, B.; Shou, Q.; Shen, Z., New flavonoids from *Campylotropis hirtella* with immunosuppressive activity. *Fitoterapia* **2014**, 95, 220-228.
42. Demirkiran, O.; Mesaik, M. A.; Beynek, H.; Abbaskhan, A.; Choudhary, M. I., Immunosuppressive phenolic constituents from *Hypericum montbretii* Spach. *Records of Natural Products* **2013**, 7, 210-219.
43. Wu, J.; Zhang, M.; Jia, H.; Huang, X.; Zhang, Q.; Hou, J.; Bo, Y., Protosappanin A induces immunosuppression of rats heart transplantation targeting T cells in grafts *via* NF- κ B pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **2010**, 381, 83-92.
44. Huang, R.-Y.; Yu, Y.-L.; Cheng, W.-C.; Ouyang, C.-N.; Fu, E.; Chu, C.-L., Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function. *The Journal of Immunology* **2010**, 184, 6815-6821.
45. Zhang, M.; Zhang, S.; Wu, J.; Sun, Y.; Li, L.; Du, W.; Liu, J.; Hou, J.; Yu, B., The immunosuppressant protosappanin A promotes dendritic cell-mediated expansion of alloantigen-specific Tregs and prolongs allograft survival in rats. *PLoS One* **2013**, 8, e66336.
46. Dong, G.-C.; Chuang, P.-H.; Chang, K.-c.; Jan, P.-s.; Hwang, P.-I.; Wu, H.-B.; Yi, M.; Zhou, H.-X.; Chen, H. M., Blocking effect of an immuno-suppressive agent, cynarin, on CD28 of T-cell receptor. *Pharmaceutical Research* **2009**, 26, 375-381.
47. Li, L.; Deng, X.-Y.; Zhang, L.-X.; Shu, P.; Qin, M.-J., A new coumestan with immunosuppressive activities from *Flemingia philippinensis*. *Fitoterapia* **2011**, 82, 615-619.
48. Li, J.; Tu, Y.; Tong, L.; Zhang, W.; Zheng, J.; Wei, Q., Immunosuppressive activity on the murine immune responses of glycyrol from *Glycyrrhiza uralensis* *via* inhibition of calcineurin activity. *Pharmaceutical Biology* **2010**, 48, 1177-1184.
49. Song, B.; Wang, Z.; Liu, Y.; Xu, S.; Huang, G.; Xiong, Y.; Zhang, S.; Xu, L.; Deng, X.; Guan, S., Immunosuppressive activity of daphnetin, one of coumarin derivatives, is mediated through suppression of NF- κ B and NFAT signaling pathways in mouse T cells. *PLoS One* **2014**, 9, e96502.

50. Xiang, M.; Lu, J.; Zhang, C.; Lan, Y.; Zhou, H.; Li, X.; Peng, W., Identification and quantification of total coumarins from *Urtica dentata* Hand and its roles in promoting immune tolerance via TLR4-mediated dendritic cell immaturation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2013**, *77*, 1200-1206.
51. Zhang, L.; Jiang, G.; Yao, F.; He, Y.; Liang, G.; Zhang, Y.; Hu, B.; Wu, Y.; Li, Y.; Liu, H., Growth inhibition and apoptosis induced by osthole, a natural coumarin, in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **2012**, *7*, e37865.
52. Cen, J.; Shi, M.; Yang, Y.; Fu, Y.; Zhou, H.; Wang, M.; Su, Z.; Wei, Q., Isogarcinol is a new immunosuppressant. *PLoS One* **2013**, *8*, e66503.
53. Cen, J.; Wang, M.; Jiang, G.; Yin, Y.; Su, Z.; Tong, L.; Luo, J.; Ma, Y.; Gao, Y.; Wei, Q., The new immunosuppressant, isogarcinol, binds directly to its target enzyme calcineurin, unlike cyclosporin A and tacrolimus. *Biochimie* **2015**, *111*, 119-124.
54. Fu, Y.; Zhou, H.; Wang, M.; Cen, J.; Wei, Q., Immune regulation and anti-inflammatory effects of isogarcinol extracted from *Garcinia mangostana* L. against collagen-induced arthritis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 4127-4134.
55. Lei, H.; Luo, J.; Tong, L.; Peng, L.-q.; Qi, Y.; Jia, Z.-g.; Wei, Q., Quercetin binds to calcineurin at a similar region to cyclosporin A and tacrolimus. *Food Chemistry* **2011**, *127*, 1169-1174.
56. Peng, L.; Qi, Y.; Wu, H.; Wei, Q., Interaction of glycyrol with calcineurin A studied by spectroscopic methods and docking. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **2011**, *63*, 14-20.
57. Nidhiya, K. A.; Sathya, E.; Nitya, M. R.; Ramasamy, S., Efficiency of purified statin from *Aspergillus tamarii* GRD119 to lower cholesterol levels *in vivo*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **2015**, *30*, 180-183.
58. Greenwood, J.; Steinman, L.; Zamvil, S. S., Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nature Reviews Immunology* **2006**, *6*, 358-370.
59. Kassimatis, T. I.; Goldsmith, D. J. A., Statins in chronic kidney disease and kidney transplantation. *Pharmacological Research* **2014**, *88*, 62-73.
60. Pakpour, S., Towards application of bioactive natural products containing isoprenoids for the regulation of HMG-CoA reductase - a review. *American Journal of Plant Sciences* **2013**, *4*, 1116-1126.
61. Mo, H.; Yeganehjoo, H.; Shah, A.; Mo, W. K.; Soelaiman, I. N.; Shen, C.-L., Mevalonate-suppressive dietary isoprenoids for bone health. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2012**, *23*, 1543-1551.
62. Chao, J.-T.; Gapor, A.; Theriault, A., Inhibitory effect of δ -tocotrienol, a HMG CoA reductase inhibitor, on monocyte-endothelial cell adhesion. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **2002**, *48*, 332-337.
63. Bharate, S. B.; Singh, B.; Vishwakarma, R. A., Modulation of k-Ras signaling by natural products. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 2273-2291.
64. Oldfield, E.; Lin, F.-Y., Terpene biosynthesis: modularity rules. *Angewandte Chemie, International Edition* **2012**, *51*, 1124-1137.
65. Ochocki, J. D.; Distefano, M. D., Prenyltransferase inhibitors: treating human ailments from cancer to parasitic infections. *Medicinal Chemistry Communication* **2013**, *4*, 476-492.
66. Shou, Q.-Y.; Fu, R.-Z.; Tan, Q.; Shen, Z.-W., Geranylated flavonoids from the roots of *Campylotropis hirtella* and their immunosuppressive activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 6712-6719.
67. Yazaki, K.; Sasaki, K.; Tsurumaru, Y., Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1739-1745.
68. Thurnher, M.; Gruenbacher, G.; Nussbaumer, O., Regulation of mevalonate metabolism in cancer and immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids* **2013**, *1831*, 1009-1015.
69. Neuhaus, O.; Wiendl, H.; Kieseier, B. C.; Archelos, J. J.; Hartung, H. P., Cholesterol-reducing medications-a new therapeutic option for multiple sclerosis? Statins as immunomodulators. *Nervenarzt* **2003**, *74*, 704-707.
70. Frank, J.; Chin, X. W. D.; Schrader, C.; Eckert, G. P.; Rimbach, G., Do tocotrienols have potential as neuroprotective dietary factors? *Ageing Research Reviews* **2012**, *11*, 163-180.
71. Gonzalez-Gallego, J.; Garcia-Mediavilla, M. V.; Sanchez-Campos, S.; Tunon, M. J., Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition* **2010**, *104*, S15-S27.
72. Santa-Cecilia, F. V.; Freitas, L. A. S.; Vilela, F. C.; Veloso, C. d. C.; da Rocha, C. Q.; Moreira, M. E. C.; Dias, D. F.; Giusti-Paiva, A.; dos Santos, M. H., Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. *European Journal of Pharmacology* **2011**, *670*, 280-285.
73. Ali, M.; Arfan, M.; Ahmad, M.; Singh, K.; Anis, I.; Ahmad, H.; Choudhary, M. I.; Shah, M. R., Anti-inflammatory xanthenes from the twigs of *Hypericum oblongifolium* Wall. *Planta Medica* **2011**, *77*, 2013-2018.
74. Auger, C.; Schini-Kerth, V. B., Potentiel des polyphénols à améliorer la protection vasculaire en stimulant la fonction endothéliale. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **2014**, *49*, 160-172.

75. Curin, Y.; Andriantsitohaina, R., Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological Reports* **2005**, 57 Suppl, 97-107.
76. Zhao, Q.; Sun, Y.; Ji, Y.; Xu, L.; Liu, K.; Liu, B.; Huang, F., Total polyphenol of *Anemarrhena asphodeloides* ameliorates advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction by regulation of AMP-Kinase. *Journal of Diabetes* **2014**, 6, 304-315.
77. Costa, C. A.; Oliveira, P. R. B.; Bem, G. F.; Cavalho, L. C. R. M.; Ognibene, D. T.; Silva, A. F. E.; Santos Valenca, S.; Pires, K. M. P.; Sousa, P. J. C.; Moura, R. S.; Resende, A. C., *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **2012**, 385, 1199-1209.
78. Dal-Ros, S.; Bronner, C.; Auger, C.; Schini-Kerth, V. B., Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2012**, 419, 381-387.
79. Wu, F.; Feng, J.-Z.; Qiu, Y.-H.; Yu, F.-B.; Zhang, J.-Z.; Zhou, W.; Yu, F.; Wang, G.-K.; An, L.-N.; Ni, F.-H.; Wu, H.; Zhao, X.-X.; Qin, Y.-W.; Luo, H.-D., Activation of receptor for advanced glycation end products contributes to aortic remodeling and endothelial dysfunction in sinoaortic denervated rats. *Atherosclerosis* **2013**, 229, 287-294.
80. Ahmed, N., Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2005**, 67, 3-21.
81. Huebschmann, A. G.; Regensteiner, J. G.; Vlassara, H.; Reusch, J. E. B., Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* **2006**, 29, 1420-1432.
82. Anusiri, P.; Choodej, S.; Chumriang, P.; Adisakwattana, S.; Pudhom, K., Inhibitory effects of flavonoids from stem bark of *Derris indica* on the formation of advanced glycation end products. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, 158, 437-441.
83. Ferchichi, L.; Derbré, S.; Mahmood, K.; Touré, K.; Guilet, D.; Litaudon, M.; Awang, K.; Hadi, A. H. A.; Le Ray, A. M.; Richomme, P., Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry* **2012**, 78, 98-106.
84. Lunceford, N.; Gugliucci, A., *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* **2005**, 76, 419-27.
85. Dang, B. T.; Geny, C.; Blanchard, P.; Rouger, C.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Tonnerre, P.; Charreau, B.; Rakolomalala, G.; Randriamboavonjy, J. I.; Loirand, G.; Pacaud, P.; Litaudon, M.; Derbre, S., Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*. *Fitoterapia* **2014**, 96, 65-75.
86. Ferretti, G.; Neri, D.; Bacchetti, T., Effect of italian sour cherry (*Prunus cerasus* L.) on the formation of advanced glycation end products and lipid peroxidation. *Food and Nutrition Sciences* **2014**, 5, 1568-1576.
87. Xiao, L.; Liu, Y.; Wang, N., New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **2014**, 306, H317-H325.
88. Brownlee, M., Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **2001**, 414, 813-820.
89. Kersse, K.; Bertrand, M. J. M.; Lamkanfi, M.; Vandenabeele, P., NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **2011**, 22, 257-276.
90. Galle, J.; Quaschnig, T.; Seibold, S.; Wanner, C., Endothelial dysfunction and inflammation: what is the link? *Kidney International* **2003**, 63, S45-S49.
91. Goldin, A.; Beckman, J. A.; Schmidt, A. M.; Creager, M. A., Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* **2006**, 114, 597-605.
92. Newton, K.; Dixit, V. M., Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2012**, 4, a006049.
93. Stevens, P. F. Angiosperm phylogeny website. Version 13 [en ligne], <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, consulté le 16 mars 2015.
94. Ruhfel, B. R.; Bittrich, V.; Bove, C. P.; Gustafsson, M. H. G.; Philbrick, C. T.; Rutishauser, R.; Xi, Z.; Davis, C. C., Phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany* **2011**, 98, 306-325.
95. Ruhfel, B. R.; Stevens, P. F.; Davis, C. C., Combined morphological and molecular phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales) and the placement of the ancient rosid macrofossil *Paleoclusia*. *International Journal of Plant Sciences* **2013**, 174, 910-936.
96. Wurdack, K. J.; Davis, C. C., Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* **2009**, 96, 1551-1570.
97. The Plant List (2013). Version 1.1. [en ligne], <http://www.theplantlist.org/>, consulté le 16 mars 2015.

98. Botineau, M., *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Tec & Doc Lavoisier: Paris, **2010**; 1335 p.
99. Stevens, P. F., *The families and genera of vascular plants. Volume IX. Flowering plants: eudicots: berberidopsicales, buxales, crossosomatales, fabales p.p., geraniales, gunnerales, myrtales p.p., proteales, saxifragales, vitales, zygothyllales, clusiaceae alliance, passifloraceae alliance, dilleniaceae, huaceae, picramniaceae, sabiaceae*. Kubitzki, K., Ed.; Springer: Berlin, **2006**, *Clusiaceae-Guttiferae*, p 48.
100. Johansson, J. T. The phylogeny of angiosperms [en ligne], <http://angio.bergianska.se/rosids/Malpighiales/Malpighiales.html>, consulté le 17 mars 2015.
101. Tropicos.org. Missouri botanical garden [en ligne], <http://www.tropicos.org>, consulté le 17 mars 2015.
102. Base de données bibliographique MEDLINE. Mots clés *Chrysochlamys / Clusia / Dystovomita / Tovomita / Tovomitopsis / Allanblackia / Garcinia / Lorostemon / Montrouziera / Moronobea / Pentadesma / Platonía / Symphonia / Thysanostemon / Calophyllum / Caraipa / Clusiella / Haploclathra / Kayea / Kielmeyera / Mahurea / Mammea / Marila / Mesua / Neotatea / Poeciloneuron / Endodesmia / Lebrunia* [En ligne], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, consulté le 18 mars 2015.
103. Base de données bibliographique Web of Science™. Mots clés *Chrysochlamys / Clusia / Dystovomita / Tovomita / Tovomitopsis / Allanblackia / Garcinia / Lorostemon / Montrouziera / Moronobea / Pentadesma / Platonía / Symphonia / Thysanostemon / Calophyllum / Caraipa / Clusiella / Haploclathra / Kayea / Kielmeyera / Mahurea / Mammea / Marila / Mesua / Neotatea / Poeciloneuron / Endodesmia / Lebrunia* [En ligne], <http://apps.webofknowledge.com/>, consulté le 18 mars 2015.
104. Su, X.-H.; Zhang, M.-L.; Li, L.-G.; Huo, C.-H.; Gu, Y.-C.; Shi, Q.-W., Chemical constituents of the plants of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity* **2008**, 5, 2579-2608.
105. Obolskiy, D.; Pischel, I.; Siritwatanametanon, N.; Heinrich, M., *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy Research* **2009**, 23, 1047-1065.
106. Kumar, S.; Sharma, S.; Chattopadhyay, S. K., The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia* **2013**, 89, 86-125.
107. Lambert, J. B.; Donnelly, E. W.; Heckenbach, E. A.; Johnson, C. L.; Kozminski, M. A.; Wu, Y.; Santiago-Blay, J. A., Molecular classification of the natural exudates of the rosids. *Phytochemistry* **2013**, 94, 171-183.
108. Cechinel, F. V.; Meyre-Silva, C.; Niero, R., Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity* **2009**, 6, 313-327.
109. Rao, L. J.; Yada, H.; Ono, H.; Ohnishi-Kameyama, M.; Yoshida, M., Occurrence of antioxidant and radical scavenging proanthocyanidins from the Indian minor spice nagkesar (*Mammea longifolia* planch and triana syn). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12, 31-36.
110. da Silveira, C. V.; Trevisan, M. T.; Rios, J. B.; Erben, G.; Haubner, R.; Pfundstein, B.; Owen, R. W., Secondary plant substances in various extracts of the leaves, fruits, stem and bark of *Caraipa densifolia* Mart. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, 48, 1597-1606.
111. Lavaud, A.; Richomme, P.; Gatto, J.; Aumond, M.-C.; Poullain, C.; Litaudon, M.; Andriantsitohaina, R.; Guilet, D., A tocotrienol series with an oxidative terminal prenyl unit from *Garcinia amplexicaulis*. *Phytochemistry* **2015**, 109, 103-110.
112. Crockett, S. L.; Robson, N. K., Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* **2011**, 5, 1-13.
113. Ilyas, M.; Kamil, M.; Parveen, M.; Khan, M. S., Isoflavones from *Garcinia nervosa*. *Phytochemistry* **1994**, 36, 807-809.
114. Deng, J. Z.; Sun, D. A.; Starck, S. R.; Hecht, S. M.; Cerny, R. L.; Engen, J. R., Chrysochlamic acid, a new diterpenoid-substituted quinol from *Chrysochlamys ulei* that inhibits DNA polymerase beta. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1999**, 1147-1149.
115. Camargo, M. S.; Oliveira, M. T.; Santoni, M. M.; Resende, F. A.; Oliveira-Hohne, A. P.; Espanha, L. G.; Nogueira, C. H.; Cuesta-Rubio, O.; Vilegas, W.; Varanda, E. A., Effects of nemorosone, isolated from the plant *Clusia rosea*, on the cell cycle and gene expression in MCF-7 BUS breast cancer cell lines. *Phytomedicine* **2015**, 22, 153-157.
116. Silva, A. P.; Silva, M. P.; Oliveira, C. G.; Monteiro, D. C.; Pinto, P. L.; Mendonca, R. Z.; Costa Junior, J. S.; Freitas, R. M.; de Moraes, J., Garcinielliptone FC: antiparasitic activity without cytotoxicity to mammalian cells. *Toxicology in Vitro* **2014**, 29, 681-687.
117. Gutierrez-Orozco, F.; Failla, M. L., Biological activities and bioavailability of mangosteen xanthones: a critical review of the current evidence. *Nutrients* **2013**, 5, 3163-3183.
118. Reyes-Chilpa, R.; Estrada-Muniz, E.; Ramirez, A. T.; Amekraz, B.; Aumelas, A.; Jankowski, C. K.; Vazquez-Torres, M., Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences* **2004**, 75, 1635-1647.

119. Venugopala, K. N.; Rashmi, V.; Odhav, B., Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International* **2013**, 963248.
120. Usach, I.; Melis, V.; Peris, J.-E., Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review on pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability. *Journal of the International Aids Society* **2013**, 16, 18567.
121. Tan, W. N.; Khairuddean, M.; Wong, K. C.; Khaw, K. Y.; Vikneswaran, M., New cholinesterase inhibitors from *Garcinia atroviridis*. *Fitoterapia* **2014**, 97, 261-267.
122. Awang, K.; Chan, G.; Litaudon, M.; Ismail, N. H.; Martin, M.-T.; Gueritte, F., 4-Phenylcoumarins from *Mesua elegans* with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 7873-7877.
123. Tuansulong, K. A.; Hutadilok-Towatana, N.; Mahabusarakam, W.; Pinkaew, D.; Fujise, K., Morelloflavone from *Garcinia dulcis* as a novel biflavonoid inhibitor of HMG-CoA reductase. *Phytotherapy Research* **2011**, 25, 424-428.
124. Lemos, L. M. S.; Martins, T. B.; Tanajura, G. H.; Gazoni, V. F.; Bonaldo, J.; Strada, C. L.; Silva, M. G. d.; Dall'Oglio, E. L.; de, S. J. P. T.; Martins, D. T. d. O., Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, 141, 432-439.
125. Walter, A.; Sam, C., *Fruits d'Océanie*. IRD éditions: Paris, **1999**; 312 p.
126. Mourao, K. S.; Beltrati, C. M., Morphology and anatomy of developing fruits and seeds of *Mammea americana* L. (*Clusiaceae*). *Brazilian Journal of Biology* **2000**, 60, 701-711.
127. Semwal, R. B.; Semwal, D. K.; Vermaak, I.; Viljoen, A., A comprehensive scientific overview of *Garcinia cambogia*. *Fitoterapia* **2015**, 102, 134-148.
128. Kvist, L. P.; Andersen, M. K.; Stagegaard, J.; Hesselsøe, M.; Llapasca, C., Extraction from woody forest plants in flood plain communities in Amazonian Peru: use, choice, evaluation and conservation status of resources. *Forest Ecology and Management* **2001**, 150, 147-174.
129. Pedraza-Chaverri, J.; Cardenas-Rodriguez, N.; Orozco-Ibarra, M.; Perez-Rojas, J. M., Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46, 3227-3239.
130. de Melo, M. S.; Quintans, J. d. S.; Araujo, A. A.; Duarte, M. C.; Bonjardim, L. R.; Nogueira, P. C.; Moraes, V. R.; de Araujo-Junior, J. X.; Ribeiro, E. A.; Quintans-Junior, L. J., A systematic review for anti-inflammatory property of *Clusiaceae* family: a preclinical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**, 2014, 960258.
131. Said, T.; Dutot, M.; Martin, C.; Beaudoux, J. L.; Boucher, C.; Enee, E.; Baudouin, C.; Warnet, J. M.; Rat, P., Cytoprotective effect against UV-induced DNA damage and oxidative stress: role of new biological UV filter. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, 30, 203-210.
132. Bhat, P.; Hegde, G. R.; Hegde, G.; Mulgund, G. S., Ethnomedicinal plants to cure skin diseases-an account of the traditional knowledge in the coastal parts of Central Western Ghats, Karnataka, India. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, 151, 493-502.
133. Ayyanar, M.; Ignacimuthu, S., Ethnobotanical survey of medicinal plants commonly used by Kani tribals in Tirunelveli hills of Western Ghats, India. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 134, 851-864.
134. Abe, R.; Ohtani, K., An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, 145, 554-565.
135. Jalalpure, S. S.; Mandavkar, Y. D.; Khalure, P. R.; Shinde, G. S.; Shelar, P. A.; Shah, A. S., Antiarthritic activity of various extracts of *Mesua ferrea* Linn. seed. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 138, 700-704.
136. Albernaz, L. C.; de Paula, J. E.; Romero, G. A. S.; Silva, M. d. R. R.; Grellier, P.; Mambu, L.; Espindola, L. S., Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, 131, 116-121.
137. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA. eFloras (2008) [en ligne], <http://www.efloras.org>, consulté le 23 mars 2015.
138. Florence, J., *Flore de la Polynésie française*. **2004**; Vol. 2, 492 p.
139. Hemshekhar, M.; Sunitha, K.; Santhosh, M. S.; Devaraja, S.; Kemparaju, K.; Vishwanath, B. S.; Niranjana, S. R.; Girish, K. S., An overview on genus *Garcinia*: phytochemical and therapeutical aspects. *Phytochemistry Reviews* **2011**, 10, 325-351.
140. Ferreira, R. O.; Geraldo de Carvalho, M.; Sarmento da Silva, T. M., Occurrence of biflavonoids in *Clusiaceae*: chemical and pharmacological aspects. *Quimica Nova* **2012**, 35, 2271-2277.
141. Chantarasiwong, O.; Batova, A.; Chavasiri, W.; Theodorakis, E. A., Chemistry and biology of the caged *Garcinia xanthon*es. *Chemistry - A European Journal* **2010**, 16, 9944-9962.
142. Nualkaew, N.; Morita, H.; Shimokawa, Y.; Kinjo, K.; Kushiro, T.; De-Eknamkul, W.; Ebizuka, Y.; Abe, I., Benzophenone synthase from *Garcinia mangostana* L. pericarps. *Phytochemistry* **2012**, 77, 60-69.
143. Masters, K.-S.; Brase, S., Xanthon

144. Hay, A.-E., Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédoniennes, *Calophyllum caledonicum* Vieill. et *Garcinia vieillardii* P. : étude et valorisation biologique. **2003**. Thèse de doctorat : Chimie des biomolécules : synthèse, structure et réactivité, Université d'Angers, n° 587, 226 p.
145. Zhang, X.; Li, X.; Sun, H.; Jiang, Z.; Tao, L.; Gao, Y.; Guo, Q.; You, Q., Synthesis and evaluation of novel aza-caged *Garcinia* xanthonones. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, 10, 3288-3299.
146. Trisuwan, K.; Boonyaketguson, S.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S., Oxygenated xanthonones and biflavanoids from the twigs of *Garcinia xanthochymus*. *Tetrahedron Letters* **2014**, 55, 3600-3602.
147. Shen, Y.-C.; Wang, L.-T.; Khalil, A. T.; Chiang, L. C.; Cheng, P.-W., Bioactive pyranoxanthonones from the roots of *Calophyllum blancoi*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2005**, 53, 244-247.
148. Ee, G. C. L.; Teh, S. S.; Kwong, H. C.; Mah, S. H.; Lim, Y. M.; Rahmani, M., A new benzophenone from *Mesua congestiflora*, an inhibitor against human B lymphocyte cancer cell line. *Phytochemistry Letters* **2012**, 5, 545-548.
149. Ee, G. C. L.; Lim, C. K.; Rahmat, A., Structure-activity relationship of xanthonones from *Mesua daphnifolia* and *Garcinia nitida* towards human estrogen receptor negative breast cancer cell line. *Natural Product Sciences* **2005**, 11, 220-224.
150. Ee, G. C. L.; Lim, C. K.; Rahmat, A.; Lee, H. L., Cytotoxic activities of chemical constituents from *Mesua daphnifolia*. *Tropical Biomedicine* **2005**, 22, 99-102.
151. Govindachari, T. R.; Pai, B. R.; Subramaniam, P. S.; Rao, U. R.; Muthukumaraswamy, N., Constituents of *Mesua ferrea*. I. Mesuaxanthone A and mesuaxanthone B. *Tetrahedron* **1967**, 23, 243-248.
152. Chow, Y. L.; Quon, H. H., Chemical constituents of the heartwood of *Mesua ferrea*. *Phytochemistry* **1968**, 7, 1871-1874.
153. Iinuma, M.; Tosa, H.; Tanaka, T.; Riswan, S., Two new dimeric xanthonones in *Mesua ferrea*. *Heterocycles* **1996**, 43, 1999-2004.
154. Gunasekera, S. P.; Ramachandran, S.; Selliah, S.; Sultanbawa, M. U. S., Chemical investigation of Ceylonese plants. XVII. Isolation and structures of the xanthonones in the extractives of *Mesua ferrea* (*Guttiferae*). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1975**, 2447-2450.
155. Bandaranayake, W. M.; Selliah, S. S.; Sultanbawa, M. U. S.; Games, D. E., Chemical investigation of Ceylonese plants. XI. Xanthonones and 4-phenylcoumarins of *Mesua thwaitesii*. *Phytochemistry* **1975**, 14, 265-269.
156. Teh, S. S.; Ee, G. C. L.; Mah, S. H.; Lim, Y. M.; Ahmad, Z., Cytotoxicity and structure-activity relationships of xanthone derivatives from *Mesua beccariana*, *Mesua ferrea* and *Mesua congestiflora* towards nine human cancer cell lines. *Molecules* **2013**, 18, 1985-1994.
157. Singh, S.; Gray, A. I.; Waterman, P. G., Mesuabixanthone-A and mesuabixanthone-B: novel bis-xanthonones from the stem bark of *Mesua ferrea* (*Guttiferae*). *Natural Product Letters* **1993**, 3, 53-58.
158. Sahu Alakh, N.; Hemalatha, S.; Sairam, K., Phyto-pharmacological review of *Mesua ferrea* Linn. *International Journal of Phytopharmacology* **2014**, 5, 6-14.
159. Ee, G. C. L.; Lim, C. K.; Ong, G. P.; Sukari, M. A.; Lee, H. L., Daphnifolin, a new xanthone from *Mesua daphnifolia* (*Guttiferae*). *Journal of Asian Natural Products Research* **2006**, 8, 567-570.
160. Walia, S.; Mukerjee, S. K., Ferrxanthone, a 1,3,5,6-tetraoxygenated xanthone from *Mesua ferrea*. *Phytochemistry* **1984**, 23, 1816-1817.
161. Gopalakrishnan, C.; Shankaranarayanan, D.; Nazimudeen, S. K.; Viswanathan, S.; Kameswaran, L., Antiinflammatory and CNS depressant activities of xanthonones from *Calophyllum inophyllum* and *Mesua ferrea*. *Indian Journal of Pharmacology* **1980**, 12, 181-191.
162. Gunasekera, S. P.; Sudltanbawa, M. U. S., Chemical investigation of Ceylonese plants. Part 20. Extractives of *Mesua myrtifolia*. Isolation and structure of a new triterpene hydroxy-acid, myrtifolic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1977**, 6-10.
163. Teh, S. S.; Cheng Lian Ee, G.; Rahmani, M.; Taufiq-Yap, Y. H.; Go, R.; Mah, S. H., Pyranoxanthonones from *Mesua ferrea*. *Molecules* **2011**, 16, 5647-5654.
164. Teh, S. S.; Ee, G. C. L.; Rahmani, M.; Sim, W. C.; Mah, S. H.; Teo, S. H., Two new pyranoxanthonones from *Mesua beccariana* (*Guttiferae*). *Molecules* **2010**, 15, 6733-6742.
165. Ee, G. C. L.; Teh, S. S.; Rahmani, M.; Taufiq-Yap, Y. H.; Go, R.; Mah, S. H., A new furanoxanthone from the root bark of *Mesua ferrea*. *Letters in Organic Chemistry* **2012**, 9, 457-459.
166. Fromentin, Y.; Cottet, K.; Kritsanida, M.; Michel, S.; Gaboriaud-Kolar, N.; Lallemand, M.-C., *Symphonia globulifera*, a widespread source of complex metabolites with potent biological activities. *Planta Medica* **2015**, 81, 95-107.
167. Richard, J.-A.; Pouwer, R. H.; Chen, D. Y. K., The chemistry of the polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Angewandte Chemie, International Edition* **2012**, 51, 4536-4561.
168. Ciochina, R.; Grossman, R. B., Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Chemical Reviews* **2006**, 106, 3963-3986.

169. Cao, S.; Low, K.-N.; Glover, R. P.; Crasta, S. C.; Ng, S.; Buss, A. D.; Butler, M. S., Sundaicumones A and B, polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Calophyllum sundaicum* with weak activity against the glucocorticoid receptor. *Journal of Natural Products* **2006**, 69, 707-709.
170. Bruneton, J., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4^{ème} ed.; Tec & Doc Lavoisier: Paris, **2009**; 1269 p.
171. Terashima, K.; Aqil, M.; Niwa, M., Garcinianin, a novel biflavonoid from the roots of *Garcinia kola*. *Heterocycles* **1995**, 41, 2245-2250.
172. Cao, S.-G.; Sim, K.-Y.; Goh, S.-H., Biflavonoids of *Calophyllum venulosum*. *Journal of Natural Products* **1997**, 60, 1245-1250.
173. Raju, M. S.; Srimannarayana, G.; Rao, N. V. S., Structure of mesuaferrone-A, a new biflavanone from the stamens of *Mesua ferrea* Linn. *Indian Journal of Chemistry, Section B* **1978**, 16B, 167-168.
174. Raju, M. S.; Srimannarayana, G.; Rao, N. V. S.; Bala, K. R.; Seshadri, T. R., Structure of mesuaferrone-B, a new biflavanone from the stamens of *Mesua ferrea* linn. *Tetrahedron Letters* **1976**, 4509-4512.
175. Crombie, L.; Games, D. E.; McCormick, A., Isolation and structure of mammea B/BA, B/BB, B/BC, and C/BB: a group of 4-propyl and 4-amylcoumarin extractives of *Mammea americana*. *Tetrahedron Letters* **1966**, 151-156.
176. Raad, I.; Terreux, R.; Richomme, P.; Matera, E.-L.; Dumontet, C.; Raynaud, J.; Guilet, D., Structure-activity relationship of natural and synthetic coumarins inhibiting the multidrug transporter P-glycoprotein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 6979-6987.
177. Ramiandrasoa, F.; Kunesch, N.; Poisson, J.; Kunesch, G., Le calofloride, intermédiaire d'un type nouveau de la biogenèse des néoflavonoïdes. *Tetrahedron* **1983**, 39, 3923-3928.
178. Conn, E. E.; Stumpf, P. K., *The biochemistry of plants - A comprehensive treatise* Academic Press: New York, **1981**; Vol. 7, Secondary plant products, 798 p.
179. Ee, G. C. L.; Teh, S. S.; Mah, S. H.; Rahmani, M.; Taufiq-Yap, Y. H.; Awang, K., A novel cyclodione coumarin from the stem bark of *Mesua beccariana*. *Molecules* **2011**, 16, 7249-7255.
180. Teh, S. S.; Ee, G. C. L.; Mah, S. H.; Lim, Y. M.; Rahmani, M., *Mesua beccariana* (Clusiaceae), a source of potential anti-cancer lead compounds in drug discovery. *Molecules* **2012**, 17, 10791-10800.
181. Govindachari, T. R.; Pai, B. R.; Subramaniam, P. S.; Rao, U. R.; Muthukumaraswamy, N., Constituents of *Mesua ferrea*. II. Ferruol A, a new 4-alkylcoumarin. *Tetrahedron* **1967**, 23, 4161-4165.
182. Verotta, L.; Lovaglio, E.; Vidari, G.; Finzi, P. V.; Neri, M. G.; Raimondi, A.; Parapini, S.; Taramelli, D.; Riva, A.; Bombardelli, E., 4-Alkyl- and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. *Phytochemistry* **2004**, 65, 2867-2879.
183. Roy, S. K.; Kumari, N.; Pahwa, S.; Agrahari, U. C.; Bhutani, K. K.; Jachak, S. M.; Nandanwar, H., NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia* **2013**, 90, 140-150.
184. Raju, M. S.; Rao, N. V. S., Isolation of mammeisin from the seeds of *Mesua ferrea*. *Indian Journal of Chemistry* **1969**, 7, 1278-1279.
185. Morel, C.; Guilet, D.; Oger, J.-M.; Seraphin, D.; Sevenet, T.; Wiart, C.; Hadi, A. H. A.; Richomme, P.; Bruneton, J., 6-acylcoumarins from *Mesua racemosa*. *Phytochemistry* **1999**, 50, 1243-1247.
186. Bala, K. R.; Seshadri, T. R., Isolation and synthesis of some coumarin components of *Mesua ferrea* seed oil. *Phytochemistry* **1971**, 10, 1131-1134.
187. Morel, C.; Dartiguelongue, C.; Youhana, T.; Oger, J.-M.; Seraphin, D.; Duval, O.; Richomme, P.; Bruneton, J., New coumarins from *Mesua racemosa*: isolation and synthesis. *Heterocycles* **1999**, 51, 2183-2191.
188. Chan, G.; Kamarudin, M. N. A.; Wong, D. Z. H.; Ismail, N. H.; Abdul, L. F.; Hasan, A.; Awang, K.; Abdul, K. H., Mitigation of H₂O₂-induced mitochondrial-mediated apoptosis in NG108-15 cells by novel mesuagenin C from *Mesua kunstleri* (King) Kosterm. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, 2012, 156521.
189. Ramakrishna, N. V. S.; Kulkarni, A. S.; More, T. S.; Bhat, R. G.; Krishnamurthy, S.; DeSouza, E. P.; Vijayakumar, E. K. S.; Gupte, R. D.; Vadlamudi, R. V. S. V., Screening of natural products for new leads as inhibitors of I κ B α kinase: coumarin derivatives from plant extracts. *Indian Journal of Chemistry - Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* **2004**, 43B, 869-872.
190. Chakraborty, D. P.; Chatterji, D., Structure of Mesuagin, a new 4-phenylcoumarin. *Journal of Organic Chemistry* **1969**, 34, 3784-3786.
191. Bhattacharyya, P.; Chakraborty, P.; Chowdhury, B. K., Mesuarin: a new 4-phenyl-coumarin from *Mesua ferrea*. *Chemistry & Industry* **1988**, 239-240.
192. Wang, H.; Wang, Y.; Li, J.; Chen, L., Research progress of chromanone derivatives from *Calophyllum*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **2011**, 36, 1115-1121.

193. Piccinelli, A. L.; Kabani, A. O.; Lotti, C.; Alarcon, A. B.; Cuesta-Rubio, O.; Rastrelli, L., A fast and efficient HPLC-PDA-MS method for detection and identification of pyranochromanone acids in *Calophyllum* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 76, 157-163.
194. Cottiglia, F.; Dhanapal, B.; Sticher, O.; Heilmann, J., New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Natural Products* **2004**, 67, 537-541.
195. Wang, H.; Sun, Q.-Y.; Yang, F.-M.; Long, C.-L.; Wang, Y.-H.; Tang, G.-H.; Zhao, F.-W.; Niu, H.-M.; Huang, Q.-Q.; Xu, J.-J.; Wataya, Y.; Ma, L.-J., Chromanone derivatives from the pericarps of *Calophyllum polyanthum*. *Helvetica Chimica Acta* **2010**, 93, 2183-2188.
196. Raju, M. S.; Srimannarayana, G.; Subba Rao, N. V., Structure of mesuanic acid. *Indian Journal of Chemistry* **1974**, 12, 884-886.
197. Dennis, T. J.; Kumar, K. A.; Srimannarayana, G., A new cyclo hexadione from *Mesua ferrea*. *Phytochemistry* **1988**, 27, 2325-2327.
198. Islam, R.; Ahmed, I.; Sikder, A. A.; Haque, M. R.; Al-Mansur, A.; Ahmed, M.; Rasheed, M.; Rashid, M. A., Chemical investigation of *Mesua nagassarium* (Burm. f.) Kosterm. *Journal of Basic & Applied Sciences* **2014**, 10, 124-128.
199. Rajesh, K. P.; Manjunatha, H.; Krishna, V.; Kumara Swamy, B. E., Potential *in vitro* antioxidant and protective effects of *Mesua ferrea* Linn. bark extracts on induced oxidative damage. *Industrial Crops and Products* **2013**, 47, 186-198.
200. Keawsa-ard, S.; Kongtaweelert, S., Antioxidant, antibacterial, anticancer activities and chemical constituents of the essential oil from *Mesua ferrea* leaves. *Chiang Mai Journal of Science* **2012**, 39, 455-463.

Chapitre II : Sélection d'extraits riches en métabolites d'intérêt dans la prévention de la dysfonction endothéliale

Chapitre II : Sélection d'extraits riches en métabolites d'intérêt dans la prévention de la dysfonction endothéliale

Parmi un ensemble de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* originaires de Malaisie, plusieurs espèces ont été sélectionnées au début de ce travail de thèse, en vue d'une extraction de leurs métabolites secondaires. L'étude des extraits obtenus a finalement permis d'en retenir quatre, provenant des espèces *Mesua lepidota*, *Mesua assamica* et *Calophyllum tetrapterum*, et paraissant riches en molécules originales et potentiellement inhibitrices de la dysfonction endothéliale.

Au cours de ce deuxième chapitre, nous préciserons les critères qui nous ont guidés dans le choix initial des espèces végétales. Nous présenterons ensuite le principe et les résultats du criblage biologique réalisé *in vitro* sur les extraits obtenus à partir des différentes plantes sélectionnées. S'ensuivra l'analyse déréplivative de ces mêmes extraits, qui met en évidence les principales classes chimiques qui les composent. Le recoupement des données biologiques et phytochimiques déterminera enfin les quatre extraits sélectionnés pour une étude phytochimique approfondie, et leurs effets sur la formation des produits avancés de la glycation (AGEs) *in vitro* concluront ce chapitre.

1. Introduction

Le laboratoire SONAS étudie les métabolites secondaires de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* notamment d'origine malaisienne et néo-calédonienne depuis une quinzaine d'années maintenant. Une coopération avec l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) permet l'approvisionnement en matériel végétal.

Plusieurs composés isolés de ces plantes ont précédemment été évalués pour leurs activités antioxydantes, anti-AGEs et anti-inflammatoires au cours du projet régional PROVASC^a, en collaboration avec l'équipe 5 de l'unité INSERM 1064 / *Center of research in transplantation & immunology* (CRTI) du CHU de Nantes. Les résultats positifs obtenus pour plusieurs molécules, montrant notamment une inhibition de l'expression du marqueur de l'inflammation VCAM-1 à la surface de cellules endothéliales primaires¹, ont incité le laboratoire SONAS à approfondir ces études en élargissant la gamme de dérivés polyphénoliques évalués.

Ainsi, toujours dans le cadre de ces collaborations entre les trois laboratoires, et dans le but d'identifier de nouvelles molécules capables de prévenir la dysfonction endothéliale, un panel de plantes originaires de Malaisie a été sélectionné au début de ce travail de thèse, puis un criblage des extraits a été mené sur la base d'une analyse dérégulative de leur composition et d'une évaluation de leur activité anti-inflammatoire.

2. Sélection des plantes et obtention des extraits

2.1. Sources végétales sélectionnées

A la suite de différentes récoltes effectuées en Malaisie au cours des 20 dernières années, des échantillons de 35 espèces de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae*, réparties dans les 3 genres *Garcinia*, *Calophyllum* et *Mesua*, ont été mis à notre disposition (cf. partie expérimentale). Une revue de la bibliographie sur ces différentes espèces ou variétés nous a, dans un premier temps, permis de discerner les plantes ayant déjà fait l'objet d'études phytochimiques ou pharmacologiques de celles n'ayant jamais été explorées (**Tableau 11**).

Dès lors, plusieurs possibilités s'offraient à nous pour tirer le meilleur parti de ces plantes. Nous pouvons choisir les espèces connues pour renfermer un type particulier de composés, ou encore celles manifestant des effets positifs au niveau vasculaire, notamment antioxydants ou anti-inflammatoires. Afin de favoriser l'identification de molécules alliant originalité structurale et nouvelle activité biologique, notre choix s'est finalement porté sur les plantes n'ayant pas fait l'objet d'études phytochimiques antérieures, et étant très peu décrites pour leurs activités pharmacologiques. Nous nous sommes également affranchis des variétés dont l'espèce avait déjà été investiguée. Ainsi, notre

^a Projet pour la PROtection VASCulaire (PROVASC) sélectionné lors de l'Appel à projet recherches de la région Pays de la Loire, et regroupant 7 partenaires ligériens (2009-2013)

étude s'est cantonnée aux 10 espèces suivantes : *Calophyllum disocurii*, *C. ferrugineum*, *C. ferrugineum* var. *neriifolium*, *C. incrassatum*, *C. tetrapterum*, *C. teysmanii* var. *teysmanii*, *Garcinia dumosa*, *Mesua assamica*, *M. lepidota*, et *M. nuda*, soit 13 lots de plantes au total comprenant les écorces de tronc, les feuilles et, parfois, les fruits.

Tableau 11. Données bibliographiques recueillies sur les 35 espèces fournies

Espèce	N° d'herbier (KL, Kuala Lumpur) et parties (Ec = écorces, Fe = Feuilles, Fr = fruits)	Informations référencées	
		Composition phytochimique connue	Activités thérapeutiques décrites
<i>C. depressinervosum</i> M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	5643 (Ec, Fe, Fr)		Antioxydant, antibactérien ²
<i>C. disocurii</i> P. F. Stevens	4579 (Ec, Fe)		
<i>C. ferrugineum</i> Ridl.	5552 (Ec, Fe)		
<i>C. ferrugineum</i> Ridl. var. <i>neriifolium</i> (Ridl.) M. R. Hend. & Wyatt-Sm. ^a	4955 (Ec, Fe)		
<i>C. flavoramulum</i> M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	4626 (Ec, Fe)	Biflavonoïdes, acides phénoliques, xanthones, triterpènes ³	Anti-AGEs ³
<i>C. incrassatum</i> M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	4702 (Ec, Fe), 4884 (Ec, Fe, Fr)		
<i>C. molle</i> King	4463, 4601 (Ec, Fe)	Coumarines ⁴	Anti-VIH ⁴
<i>C. pulcherrimum</i> Wall.	4538, 4879, 5326 (Ec, Fe)		Peu cytotoxique sur <i>Artemia salina</i> ⁵
<i>C. symingtonianum</i> M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	4881 (Ec, Fe, Fr)	Xanthones ⁶	Antifongique ⁶
<i>C. tetrapterum</i> Miq. (= <i>C. floribundum</i> Hook. f.)	5382, 5617, 5707 (Ec, Fe)		Antiparasitaire ⁷
<i>C. tetrapterum</i> Miq. var. <i>tetrapterum</i> ^a	5076 (Ec, Fe)		
<i>C. teysmanii</i> Miq. var. <i>teysmanii</i> ^a	4880 (Ec, Fe)	(var. <i>inophylloide</i> : xanthones) ⁸	(var. <i>inophylloide</i> : immunosuppression) ⁸
<i>G. bancana</i> Miq.	4967 (Ec, Fe, Fr), 5033 (Ec, Fe)	Biphényle, benzophénones, flavonoïdes, triterpènes ⁹	Antibactérien ⁹
<i>G. cowa</i> Roxb.	4587, 5526 (Ec, Fe)	Biphényles, xanthones, flavonoïdes, terpènes ¹⁰	Antibactérien ¹¹
<i>G. diversifolia</i> King	5712 (Ec, Fe)	Triterpènes ¹²	
<i>G. dumosa</i> King	5516 (Ec, Fe)		
<i>G. brevirostris</i> Scheff. (= <i>G. eugeniaefolia</i> Wall.)	4611, 5074, 5273, 5456 (Ec, Fe), 5251 (Ec)	Benzophénone ¹³	
<i>G. forbesii</i> King	5146, 5518 (Ec, Fe)	Xanthones ¹⁴	
<i>G. gaudichaudii</i> Planch. & Triana	5483 (Ec, Fe, Fr)	Xanthones ¹⁵	Cytotoxique ¹⁵

^a Variété non référencée dans la base de données The Plant List (<http://www.theplantlist.org>)

<i>G. griffithii</i> T. Anderson	5303 (Ec, Fe)	Xanthones, benzophénones ¹⁶	
<i>G. celebica</i> L. (= <i>G. hombroniana</i> Pierre)	4800 (Ec, fe)	Triterpènes, xanthones, benzophénones, flavonoïdes ¹⁷	Antioxydant, antiagrégant plaquettaire, antibactérien ¹⁷
<i>G. nervosa</i> Miq.	5702 (Ec, Fe)	Flavonoïdes ¹⁸	Antioxydant, anti-inflammatoire, cytotoxique ¹⁹
<i>G. nigrolineata</i> Planch.	5555 (Ec, Fe)	Biphényles, xanthones ²⁰	Antibactérien ²⁰
<i>G. opaca</i> King	4532 (Ec, Fe, Fr), 4560 (Ec, Fe)	Xanthones ²¹ , terpènes ²²	Antiagrégant plaquettaire ²³
<i>G. opaca</i> King var. <i>dumosa</i> Whitmore ^a	5589 (Ec, Fe)		
<i>G. parvifolia</i> (Miq.) Miq.	5073, 5259 (Ec, Fe), 5248 (Ec), 5670 (Ec, Fe, Fr)	Flavonoïdes ²⁴ , phloroglucinols, depsidones, xanthones ²⁵	Antioxydant, anticholinestérasique ²⁴ , antibactérien ²⁵
<i>G. prainiana</i> King	5661 (Ec, Fe)	Triterpènes, flavonoïdes ²⁶	Antioxydant ²⁶
<i>G. pyrifera</i> Ridl.	4523, 4954, 5443 (Ec, Fe)	Benzophénones ²⁷	Inhibiteur du désassemblage des microtubules, cytotoxique ²⁷
<i>G. rostrata</i> (Hassk.) Miq.	5175 (Ec, Fe)		Antioxydant ²⁸
<i>M. assamica</i> (King & Prain) Kosterm.	5442 (Ec, Fe)		
<i>M. elegans</i> (King) Kosterm.	4859, 5310 (Ec, Fe)	Coumarines ²⁹	Anticholinestérasique ²⁹
<i>M. ferrea</i> L.	4515, 4782, 4614 (Ec, Fe)	Coumarines, xanthones, triterpènes, flavonoïdes ³⁰	Antimicrobien, analgésique, antispasmodique, cytotoxique, anti-inflammatoire ³⁰
<i>M. lepidota</i> T. Anderson	5436 (Ec, Fe, Fr)		
<i>M. nuda</i> Kosterm.	5352 (Ec, Fe)		
<i>M. racemosa</i> (Planch.) Kosterm.	4464 (Ec, Fe)	Coumarines ³¹	

2.2. Extraction automatisée du matériel végétal

Afin d'extraire rapidement les métabolites secondaires des différentes parties de plantes, nous avons opté pour l'extraction sous pression (PLE, *pressurized liquid extraction*) à 60°C et 100 bars³². Ces conditions ont été choisies de manière à permettre une extraction efficace tout en limitant le risque de dégradation des composés³³. Entre 2 g et 10 g d'écorces, feuilles, et éventuellement fruits ont été extraits successivement par le dichlorométhane (DCM) et le méthanol (MeOH).

A partir des 13 lots de plantes préalablement sélectionnés, 56 extraits ont été obtenus, avec des rendements d'extraction compris entre 0,7 % et 38 %. Les extraits ont été référencés selon le numéro d'herbier suivi de la partie de plante [en anglais : B pour *bark* (écorce), L pour *leaves* (feuilles), F pour *fruits* (fruits)] et du solvant d'extraction (**Tableau 12**).

^a Variété non référencée dans la base de données The Plant List (<http://www.theplantlist.org>)

Tableau 12. Masses et rendements d'extraction obtenus par PLE à partir des différents organes des plantes sélectionnées

Espèce	Partie	Solvant d'extraction	Extrait obtenu		Rendement d'extraction (%)	
			Nom	Masse (mg)		
<i>Calophyllum dioscurii</i>	Ecorces	DCM	4579B_DCM	756	7,2	
		MeOH	4579B_MeOH	1086	10,4	
	Feuilles	DCM	4579L_DCM	772	7,6	
		MeOH	4579L_MeOH	936	9,3	
<i>Calophyllum ferrugineum</i>	Ecorces	DCM	5552B_DCM	984	9,4	
		MeOH	5552B_MeOH	2037	19,4	
	Feuilles	DCM	5552L_DCM	796	7,7	
		MeOH	5552L_MeOH	1883	18,1	
<i>Calophyllum ferrugineum</i> var. <i>neriifolium</i>	Ecorces	DCM	4955B_DCM	1038	10,7	
		MeOH	4955B_MeOH	1194	12,3	
	Feuilles	DCM	4955L_DCM	692	7,0	
		MeOH	4955L_MeOH	1401	14,1	
<i>Calophyllum incrassatum</i>	Lot A	Ecorces	DCM	4702B_DCM	580	5,9
			MeOH	4702B_MeOH	1325	13,5
		Feuilles	DCM	4702L_DCM	674	6,5
			MeOH	4702L_MeOH	2423	23,3
	Lot B	Ecorces	DCM	4884B_DCM	275	2,6
			MeOH	4884B_MeOH	1281	11,9
		Feuilles	DCM	4884L_DCM	615	6,1
			MeOH	4884L_MeOH	1658	16,5
		Fruits	DCM	4884F_DCM	419	4,3
			MeOH	4884F_MeOH	505	5,1
<i>Calophyllum tetrapterum</i>	Lot A	Ecorces	DCM	5382B_DCM	127	5,1
			MeOH	5382B_MeOH	481	19,1
		Feuilles	DCM	5382L_DCM	672	6,7
			MeOH	5382L_MeOH	1477	14,8
	Lot B	Ecorces	DCM	5617B_DCM	188	8,5
			MeOH	5617B_MeOH	366	16,5
		Feuilles	DCM	5617L_DCM	109	5,5
			MeOH	5617L_MeOH	360	14,9
	Lot C	Ecorces	DCM	5707B_DCM	250	8,7
			MeOH	5707B_MeOH	458	16,0
		Feuilles	DCM	5707L_DCM	271	8,8
			MeOH	5707L_MeOH	971	31,5

<i>Calophyllum teysmanii</i> var. <i>teysmanii</i>	Ecorces	DCM	4880B_DCM	103	3,9
		MeOH	4880B_MeOH	473	17,9
	Feuilles	DCM	4880L_DCM	144	3,6
		MeOH	4880L_MeOH	586	14,8
<i>Garcinia dumosa</i>	Ecorces	DCM	5516B_DCM	429	4,4
		MeOH	5516B_MeOH	2105	21,5
	Feuilles	DCM	5516L_DCM	74	0,7
		MeOH	5516L_MeOH	4053	38,4
<i>Mesua assamica</i>	Ecorces	DCM	5442B_DCM	130	3,5
		MeOH	5442B_MeOH	672	17,9
	Feuilles	DCM	5442L_DCM	120	3,1
		MeOH	5442L_MeOH	859	22,2
<i>Mesua lepidota</i>	Ecorces	DCM	5436B_DCM	37	1,3
		MeOH	5436B_MeOH	352	12,4
	Feuilles	DCM	5436L_DCM	109	3,1
		MeOH	5436L_MeOH	575	16,4
	Fruits	DCM	5436F_DCM	1006	33,5
		MeOH	5436F_MeOH	331	11,0
<i>Mesua nuda</i>	Ecorces	DCM	5352B_DCM	407	16,3
		MeOH	5352B_MeOH	339	13,6
	Feuilles	DCM	5352L_DCM	297	9,6
		MeOH	5352L_MeOH	772	25,0

3. Criblage biologique de l'activité inhibitrice de l'expression de VCAM-1

Nous avons vu que l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la physiopathologie des rejets de greffe, notamment par son implication dans la survenue d'une réponse inflammatoire. Celle-ci étant en grande partie liée à la présentation de molécules d'adhésion cellulaire, telles que VCAM-1, à la surface des cellules de l'endothélium, nous avons choisi d'évaluer l'effet inhibiteur des extraits végétaux sélectionnés sur l'expression de VCAM-1 *in vitro*.

3.1. Principe du test en ELISA cellulaire

Un criblage biologique de l'activité anti-inflammatoire des extraits a été réalisé par mesure de l'expression de la protéine VCAM-1 à la surface de cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humain (HUVECs).

La protéine VCAM-1 n'est pas présente à la surface des cellules endothéliales quiescentes, mais son expression est induite par un traitement au TNF- α avec un maximum 6 heures après traitement. L'induction de VCAM-1 est largement dépendante de la voie NF- κ B et est très fortement inhibée par les antioxydants, inhibiteurs de NF- κ B, tels que le dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC) ou le TEMPOL, ici utilisés comme témoins inhibiteurs.^{34,35}

L'expression de VCAM-1 a été mesurée par une technique d'ELISA cellulaire, préalablement mise en place par l'équipe 5 de l'unité INSERM 1064 / CRTI au cours du projet PROVASC³⁶. Le test consiste à traiter des cellules HUVECs confluentes par les extraits pendant 1 heure, avant stimulation par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α pendant 6 heures. Les cellules sont ensuite fixées, et marquées par des anticorps primaires dirigés contre VCAM-1, puis secondaires couplés à la peroxydase. L'introduction d'un substrat [ABTS, acide 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] de la peroxydase conduit après oxydation à la formation d'un produit vert absorbant à 405 nm. La valeur de la densité optique (DO) lue à cette longueur d'onde (λ) est donc proportionnelle à l'expression du marqueur de l'inflammation VCAM-1 (**Figure 34**).

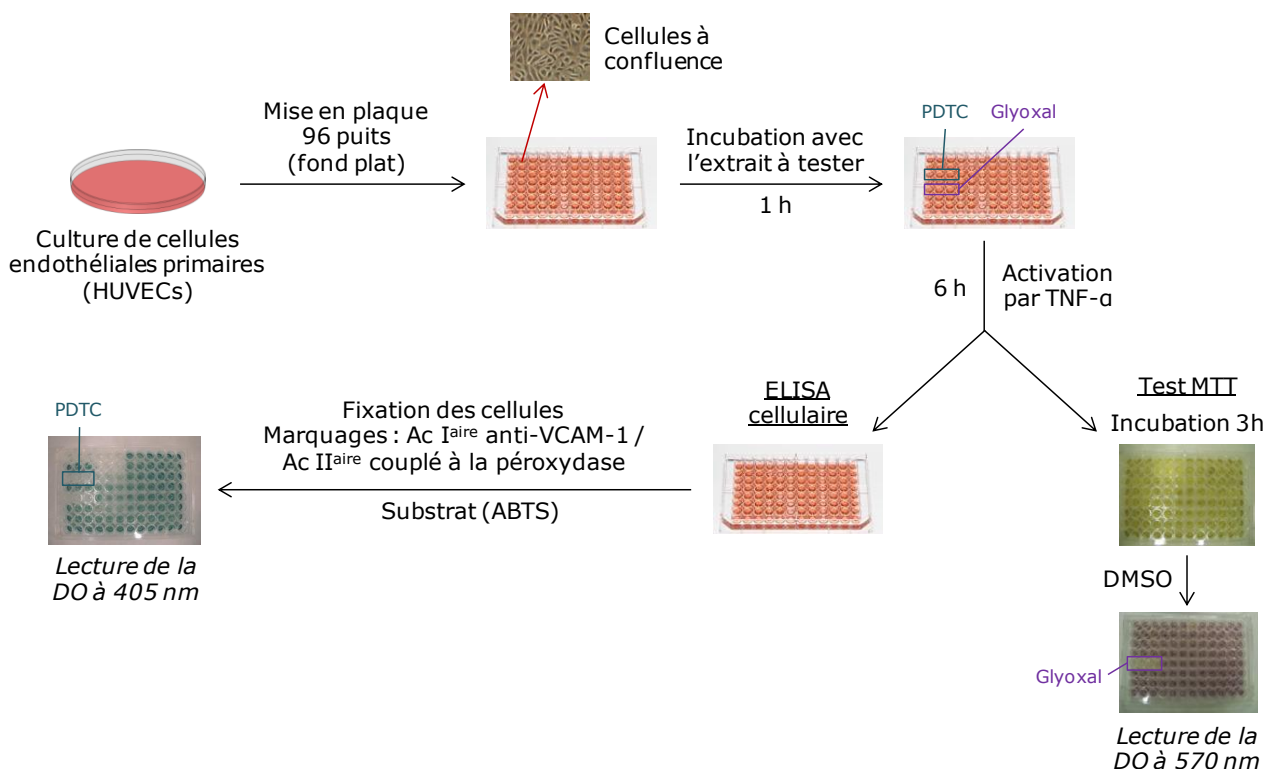


Figure 34. Schéma du test de criblage anti-inflammatoire et du test au MTT

Le tapis confluent d'HUVECs reflète la condition physiologique des cellules au sein du vaisseau sanguin, et l'exposition des cellules aux extraits végétaux avant la stimulation par le TNF- α équivaut à un traitement prophylactique (et non curatif) de la dysfonction endothéliale.

Pour que la valeur de l'absorbance soit comparable entre différentes conditions, il est nécessaire d'avoir le même nombre de cellules pour chacune d'entre elles. En effet, si un extrait est

toxique pour les cellules, le nombre de cellules viables restantes et donc susceptibles de fixer les anticorps est abaissé, ce qui entraîne une diminution de la DO par rapport à un contrôle traité uniquement par le TNF- α . Pour valider les résultats observés, et en même temps déceler les extraits cytotoxiques, l'effet sur la viabilité cellulaire a été évalué en parallèle de l'essai sur VCAM-1. La méthode consiste à évaluer l'activité métabolique des cellules par une coloration au sel de tétrazolium MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium]. Ce sel jaune est réduit en un produit formazan bleu-violet par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives^{37,38}. Une fois ce précipité violet solubilisé dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), la DO du milieu est lue à 570 nm. Le glyoxal, un agent cytotoxique, est utilisé comme témoin dans ce test³⁹ (**Figure 34**).

3.2. Résultats du criblage anti-inflammatoire mesurant l'expression de VCAM-1 *in vitro*

Avant de procéder aux essais biologiques, les extraits méthanoliques les plus riches en tanins ont été filtrés sur cartouche SPE (*solid phase extraction*) de polyamide afin d'éliminer aux maximum ces polymères de flavan-3-ol (tanins condensés) ou esters de l'acide gallique ou ellagique (tanins hydrolysables)⁴⁰, qui peuvent interférer dans les essais biologiques par des interactions non spécifiques⁴¹.

Les 56 extraits de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* ont été évalués *in vitro* aux concentrations de 0,5, 5 et 50 $\mu\text{g/mL}$, chacune en triplicat (**Tableau 13**).

Tableau 13. Effet des extraits (0,5, 5 et 50 $\mu\text{g/mL}$) sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF- α

Les pourcentages d'inhibition de la viabilité cellulaire et de l'expression de VCAM-1 sont calculés par rapport aux DO du témoin non traité et du témoin traité par TNF- α , respectivement. (En fond jaune : 10 à 24 % d'inhibition ; en fond vert : ≥ 25 % d'inhibition de VCAM-1. En gras : effet sur la viabilité cellulaire affectant le résultat observé sur VCAM-1).

Espèce	Extrait (# filtré sur cartouche SPE)	Inhibition de la viabilité cellulaire (%)			Inhibition de l'expression de VCAM-1 induite par le TNF- α (%)		
		0,5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
<i>Calophyllum dioscurii</i>	4579B_DCM	0	0	0	0	3	5
	4579B_MeOH [#]	0	0	0	0	2	10
	4579L_DCM	0	0	0	0	0	8
	4579L_MeOH	0	0	0	1	7	6
<i>Calophyllum ferrugineum</i>	5552B_DCM	0	0	0	0	0	8
	5552B_MeOH [#]	0	0	0	6	0	4
	5552L_DCM	0	0	0	0	0	5
	5552L_MeOH	0	0	0	0	0	0

<i>Calophyllum ferrugineum</i> var. <i>neriifolium</i>	4955B_DCM	0	0	3	0	0	0		
	4955B_MeOH [#]	0	0	2	0	0	0		
	4955L_DCM	0	0	0	0	0	0		
	4955L_MeOH	0	0	0	0	0	0		
<i>Calophyllum incrassatum</i>	Lot A	4702B_DCM	0	0	0	0	0	30	
		4702B_MeOH [#]	0	0	0	7	6	12	
		4702L_DCM	0	0	0	3	0	0	
		4702L_MeOH [#]	0	0	0	0	0	10	
	Lot B	4884B_DCM	3	1	9	0	0	0	
		4884B_MeOH [#]	0	0	0	0	0	0	
		4884L_DCM	0	0	0	0	0	0	
		4884L_MeOH [#]	8	1	0	0	0	0	
		4884F_DCM	0	0	0	0	0	0	
		4884F_MeOH [#]	0	0	0	0	0	3	
	<i>Calophyllum tetrapterum</i>	Lot A	5382B_DCM	0	0	0	12	31	31
			5382B_MeOH [#]	0	0	0	0	0	0
5382L_DCM			0	0	0	29	25	42	
5382L_MeOH [#]			0	0	0	24	36	47	
Lot B		5617B_DCM	0	0	7	0	6	14	
		5617B_MeOH [#]	0	0	0	0	4	9	
		5617L_DCM	0	0	0	0	3	11	
		5617L_MeOH	2	0	0	0	0	0	
Lot C		5707B_DCM	0	0	0	0	0	13	
		5707B_MeOH [#]	0	0	0	0	2	12	
		5707L_DCM	0	0	5	0	5	23	
		5707L_MeOH [#]	0	0	0	0	4	12	
<i>Calophyllum teysmanii</i> var. <i>teysmanii</i>	4880B_DCM	16	32	5	0	0	0		
	4880B_MeOH [#]	0	0	0	0	0	0		
	4880L_DCM	0	0	0	0	0	18		
	4880L_MeOH [#]	0	12	0	0	0	4		
<i>Garcinia dumosa</i>	5516B_DCM	0	0	0	0	0	12		
	5516B_MeOH	0	0	0	0	0	4		
	5516L_DCM	0	0	0	0	6	15		
	5516L_MeOH	0	0	0	0	0	10		
<i>Mesua assamica</i>	5442B_DCM	0	0	0	0	5	17		
	5442B_MeOH [#]	0	0	0	0	1	6		
	5442L_DCM	0	0	32	21	36	77		
	5442L_MeOH	0	0	0	31	44	42		

<i>Mesua lepidota</i>	5436B_DCM	0	0	0	0	17	14
	5436B_MeOH [#]	0	0	0	0	0	0
	5436L_DCM	0	0	0	0	0	0
	5436L_MeOH	0	0	0	0	9	19
	5436F_DCM	0	0	25	0	18	52
	5436F_MeOH [#]	0	0	2	0	4	13
<i>Mesua nuda</i>	5352B_DCM	0	0	0	17	21	31
	5352B_MeOH [#]	0	0	0	17	22	21
	5352L_DCM	0	0	0	19	26	25
	5352L_MeOH	0	0	4	30	43	49
Témoins positifs	PDTC (200 µM)	6			76		
	TEMPOL (2 mM)	2			28		
	Glyoxal (4 mM)	51			85		

Neuf extraits réduisent l'expression de VCAM-1 d'au moins 20 % à 5 µg/mL. Une relation dose-effet peut être remarquée pour la plupart de ces extraits, qui présentent un effet inhibiteur dès 0,5 µg/mL, allant en augmentant jusqu'à 50 µg/mL. Les extraits DCM et MeOH concernés sont issus de 3 espèces : *Calophyllum tetrapterum* (lot A), *Mesua assamica* et *Mesua nuda*. On note cependant que les lots B et C de *C. tetrapterum* présentent une activité nettement moins marquée, de l'ordre de 10 % d'inhibition de l'expression de VCAM-1 à 50 µg/mL pour les différents extraits.

Plus précisément, les neuf extraits les plus actifs sont les extraits DCM d'écorces et DCM et MeOH de feuilles de *C. tetrapterum* (lot A, 5382), les extraits DCM et MeOH de feuilles de *M. assamica*, et les extraits DCM et MeOH d'écorces et de feuilles de *M. nuda*.

L'effet inhibiteur observé avec l'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota* à 50 µg/mL ne peut pas être interprété en raison de la cytotoxicité exercée à cette concentration. Cependant, ce même extrait inhibe 18 % de l'expression de VCAM-1 à la concentration de 5 µg/mL qui n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire. Il fait donc aussi partie des extraits les plus actifs évalués au cours de ce criblage, qui révèle le potentiel anti-inflammatoire des espèces du genre *Mesua* tout particulièrement.

Ces activités anti-inflammatoires sont liées aux métabolites secondaires qui composent les extraits. Aussi, pour resserrer la sélection des extraits à étudier, et préférer ceux potentiellement riches en composés originaux, une étude dérégulative a-t-elle été menée.

4. Etude déréplicative des extraits

4.1. Identification des principales classes chimiques présentes dans l'ensemble des extraits étudiés

Afin d'identifier les principales familles chimiques de métabolites secondaires composant les extraits, une analyse déréplicative a été conduite par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à des détecteurs ultra-violet (UV) et de masse (MS et MS²).

La déréplication consiste à repérer, au sein d'un mélange de produits, des composés déjà connus, sur la base d'une comparaison de leurs profils, notamment spectraux⁴². Cela permet, d'une part, d'établir des corrélations entre l'activité d'un extrait et les métabolites qui le composent, et, d'autre part, de détecter la présence de composés possédant une structure originale.

L'ensemble des extraits a été analysé par HPLC-UV-DAD en phase inverse selon un gradient linéaire standard allant de 100 % d'eau acide (0,1 % d'acide formique) à 100 % de MeOH en 35 minutes. A cette occasion, les extraits MeOH nécessitant une filtration sur cartouche SPE de polyamide pour éliminer les tanins ont été repérés.

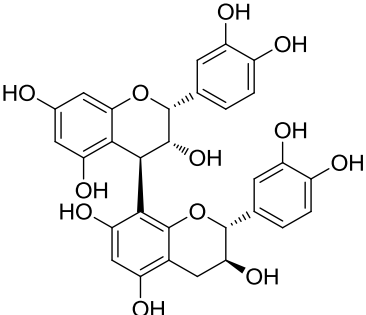
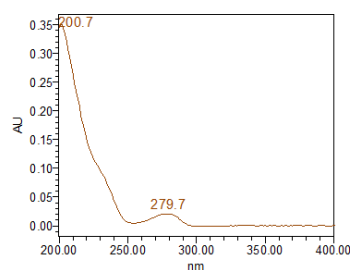
Après optimisation des conditions de séparation des produits, la quasi-totalité des extraits a de nouveau été analysée par HPLC, couplée à des détecteurs UV et de masse en ionisation électrospray (ESI). Les données spectrales obtenues ont permis, pour la plupart des extraits, d'identifier les classes chimiques des composés majoritaires.

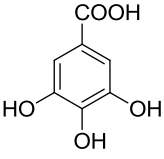
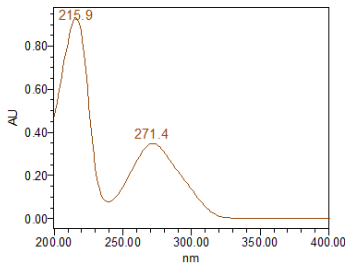
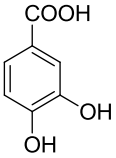
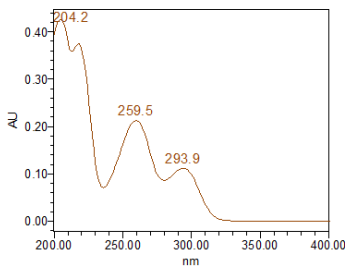
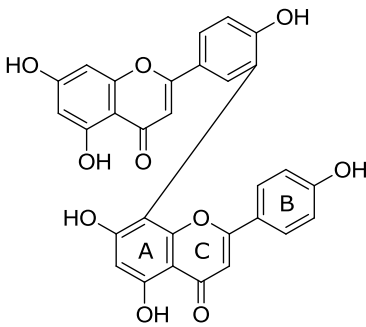
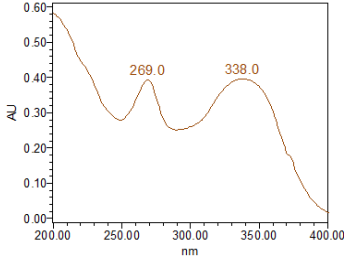
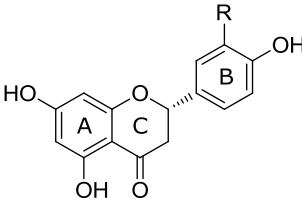
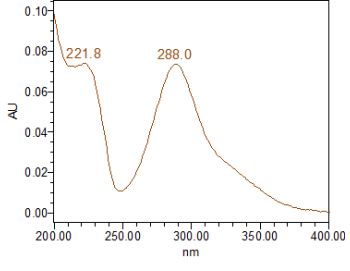
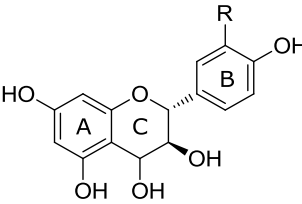
Le **Tableau 14** présente les familles de composés les plus fréquemment retrouvées dans chaque type d'extrait (MeOH ou DCM), avec leur structure chimique, leur temps de rétention (t_R), leur spectre UV, et les fragments observés en masse pour quelques exemples de molécules.

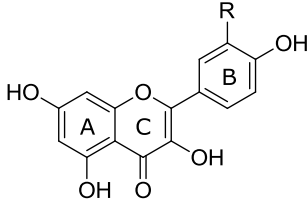
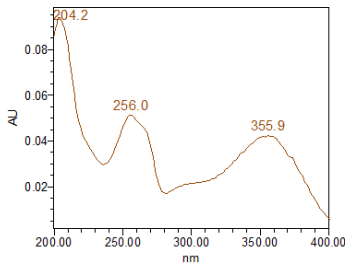
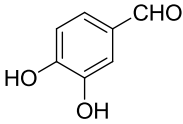
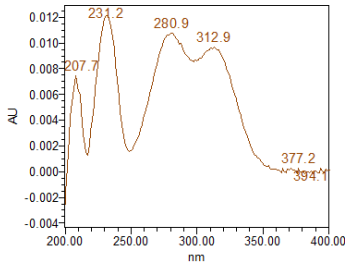
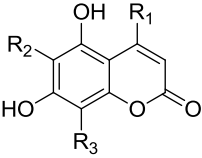
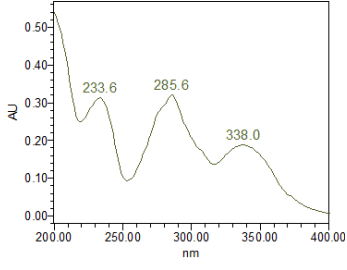
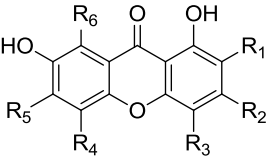
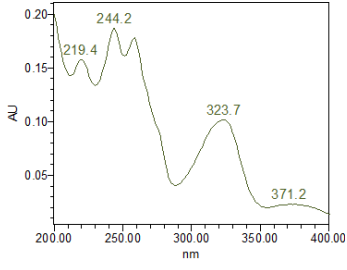
Tableau 14. Classes chimiques identifiées dans chaque type d'extrait

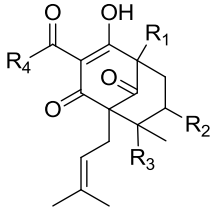
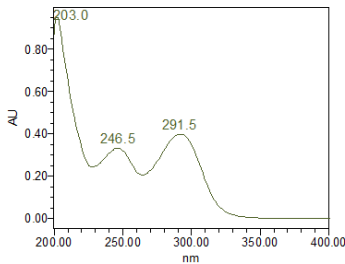
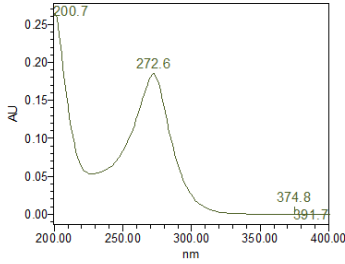
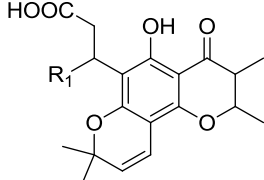
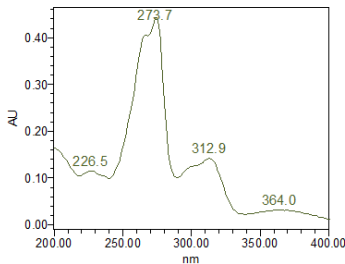
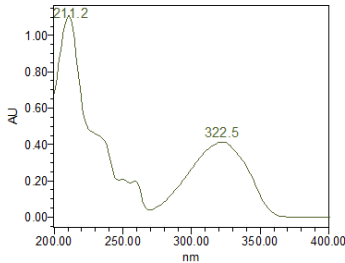
Pour chaque type d'extrait, les classes sont présentées des plus aux moins abondantes.

Le temps de rétention (t_R) indiqué est celui des conditions standard (colonne RP-18, 5 µm, 125 × 4 mm, MeOH / H₂O + 0,1 % HCOOH : 0/100 → 100/0 en 35 min puis 100/0 pendant 10 min).

Classe chimique	Exemples de composés	t _R	Spectre UV et masse
Extraits MeOH	<p>Procyanidines</p>  <p>Epicatechine-(4β→8)-catéchine (91)^{43,44}</p>	10,9 min	 <p>-MS : [M-H]⁻ m/z 577 -MS² : [M-H-152]⁻ m/z 425, [M-H-152-H₂O]⁻ m/z 407</p>

Extraits MeOH	Acides phénoliques	 Acide gallique (88) ⁴⁵	5,3 min	 -MS : [M-H] ⁻ m/z 169 -MS ² : [M-H-CO ₂] ⁻ m/z 125
		 Acide protocatéchique (92) ⁴⁵	8,0 min	 -MS : [M-H] ⁻ m/z 153 -MS ² : [M-H-CO ₂] ⁻ m/z 109
	Biflavonoïdes	 Amentoflavone (49) ⁴⁶⁻⁴⁸	26,3 min	 +MS : [M+H] ⁺ m/z 539 +MS ² : [M+H-C ₈ H ₆ O] ⁺ m/z 421, [M+H-C ₈ H ₆ O-H ₂ O] ⁺ m/z 403, [M+H-C ₉ H ₆ O ₃] ⁺ m/z 377 -MS : [M-H] ⁻ m/z 537 -MS ² : [M-H-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻ m/z 375
	Flavanones ou dihydro- flavonols ^{45,49-51}	 Flavanones	Entre 10 min et 25 min	 Exemple : -MS : [M-H] ⁻ m/z 449 -MS ² : [M-H-H ₂ O] ⁻ m/z 431, [M-H-C ₆ H ₆ O ₃] ⁻ m/z 323, [M-H-désoxyhexose] ⁻ m/z 303, [M-H-désoxyhexose-H ₂ O] ⁻ m/z 285, [M-H-désoxyhexose-galloyl] ⁻ m/z 151
 Dihydroflavonols				

Extraits MeOH	<p>Flavonols</p>  <p>Flavonols^{45,49,51}</p>	<p>Entre 15 min et 25 min</p>	 <p>Exemple : -MS : [M-H]⁻ m/z 447 -MS² : [M-H-C₄H₈O₄]⁻ m/z 327, [M-H-désoxyhexose]⁻ m/z 301, [M-H-hexose]⁻ m/z 285</p>
	<p>Dérivés du benzaldéhyde</p>  <p>3,4-dihydroxybenzaldehyde (93)⁴⁵</p>	<p>6,5 min</p>	 <p>-MS : [M-H]⁻ m/z 137</p>
Extraits DCM (surtout)	<p>Coumarines</p>  <p>Coumarines de type mammea^{52,53}</p>	<p>Entre 25 min et 40 min</p>	 <p>Exemple : +MS : [M+H]⁺ m/z 341 +MS² : [M+H-C₄H₈]⁺ m/z 285</p>
	<p>Xanthones</p>  <p>Xanthones^{45,54,55}</p>	<p>Entre 20 min et 35 min</p>	 <p>Exemple : +MS : [M+H]⁺ m/z 379 +MS² : [M+H-H₂O]⁺ m/z 361, [M+H-C₃H₆]⁺ m/z 337, [M+H-C₄H₈]⁺ m/z 323, [M+H-C₄H₆O]⁺ m/z 309</p>

Extraits DCM (surtout)	<p>Acyl-phloroglucinols polyprénylés</p>	 <p>PPAPS⁵⁶⁻⁵⁸</p>	<p>Entre 30 min et 40 min</p>	 <p>Exemple (profil UV I) : +MS : [M+H]⁺ m/z 562 +MS² : [M+H-H₂O]⁺ m/z 545, [M+H-C₄H₈]⁺ m/z 507, [M+H-C₅H₈]⁺ m/z 495 -MS : [M-H]⁻ m/z 561</p>  <p>Exemple (profil UV II) : +MS : [M+H]⁺ m/z 579 +MS² : [M+H-H₂O]⁺ m/z 561, [M+H-C₁₀H₁₆]⁺ m/z 443, [M+H-C₁₀H₁₆-H₂O]⁺ m/z 425, [M+H-C₁₀H₁₆-2H₂O]⁺ m/z 407</p>
	<p>Chromanones acides</p>	 <p>Pyranochromanones acides^{59,60}</p>	<p>Entre 30 min et 40 min</p>	 <p>Exemple : -MS : [M-H]⁻ m/z 387 -MS² : [M-H-CO₂]⁻ m/z 343, [M-H-C₆H₁₀O₂]⁻ m/z 273</p>
	<p>Non déterminé au vu des données disponibles</p>		<p>Entre 20 min et 35 min</p>	 <p>Exemple (profil UV III) : +MS : [2M+Na]⁺ m/z 715, [M+H]⁺ m/z 347 +MS² : [M+H-C₃H₈O]⁺ m/z 287, [M+H-98]⁺ m/z 249</p>

Dans les extraits MeOH, les acides phénoliques sont les premiers composés élués, avec les dérivés du benzaldéhyde. Les composés retrouvés ici et appartenant à ces deux groupes sont en effet très polaires et présentent une faible masse molaire, inférieure à 200 g/mol. La fonction acide des acides phénoliques permet de les identifier facilement sur les spectres de masse MS² en mode négatif, avec la perte systématique d'un groupement CO₂ (44 Da). Les spectres UV et de masse de deux acides omniprésents indiquent qu'il s'agit des acides protocatéchique (**92**, t_R 8,0 min) et gallique (**88**, t_R 5,3 min). De même, les données spectrales du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde (**93**), élué à 6,5 min, ont permis de l'identifier en comparaison avec la littérature⁴⁵.

Dans la zone d'élution des tanins (t_R 10 min à 25 min), on distingue les dérivés dimériques de flavan-3-ol, qui présentent un maximum d'absorption à 280 nm sur leur spectre UV⁴⁴. Ces procyanidines peuvent être de type B ou A selon qu'une seule liaison (C₄-C₈ ou C₄-C₆) ou deux (C₂-O₇ additionnelle) unissent les deux unités flavaniques, et peuvent donc être différenciées par leur masse⁴³. Les composés présents dans les extraits analysés sont essentiellement de type B, avec une masse molaire (MM) de 578 g/mol [e.g. épicatechine-(4β→8)-catéchine (**91**)]. La fragmentation observée en masse est un effet caractéristique des procyanidines du groupe B, avec une perte de 152 Da en mode négatif, suivie d'une perte d'eau (18 Da)⁴⁴.

Les autres principaux métabolites de ces extraits polaires sont des flavonoïdes. Parmi eux, on distingue des flavanones ou des dihydroflavonols, dont le spectre UV se caractérise par un maximum entre 270 et 295 nm et une inflexion entre 300 et 360 nm⁴⁵. Sur leur spectre de masse, on peut observer des pertes particulières de neutres indiquant que les flavonoïdes sont glycosylés, comme dans l'exemple du **Tableau 14**, qui montre une perte de 146 Da (désoxyhexose) suivie d'une perte de 152 Da (galloyl) en mode -MS², signes de la présence d'une unité galloyl-glucoside. Dans cet exemple, l'ion à *m/z* 151 est en outre caractéristique de la fragmentation de l'aglycone^{49,51}.

Une autre série de flavonoïdes retrouvée est celle des flavonols, dont le spectre UV présente deux bandes d'absorption majeures, l'une entre 355 et 375 nm variant selon le degré d'oxydation du cycle B, et l'autre entre 250 et 285 nm⁴⁵. Comme pour les séries précédentes, les molécules sont souvent glycosylées, comme l'indiquent les pertes de masse de 120 Da (C₄H₈O₄), 146 Da (désoxyhexose) et 162 Da (hexose) de l'exemple présenté.

La catégorie de flavonoïdes la plus importante quantitativement dans les extraits est celle des biflavonoïdes. En spectroscopie UV, ils absorbent autour de 270 nm, ainsi que vers 330 nm sous la forme d'un plateau^{45,46}. Fréquemment retrouvée, l'amentoflavone (**49**, t_R 26,3 min) est ionisée en modes positif et négatif, donnant les ions pseudo-moléculaires [M+H]⁺ à *m/z* 539 et [M-H]⁻ à *m/z* 537. En mode positif, le clivage du cycle C de la seconde unité flavone conduit à l'ion à *m/z* 421, qui après perte d'une molécule d'eau (18 Da) fournit l'ion à *m/z* 403. Une autre voie de fragmentation fait également apparaître un ion à *m/z* 377⁴⁶. Cette fragmentation se produit aussi en mode négatif, faisant apparaître un fragment [M-H-C₉H₆O₃]⁻ à *m/z* 375⁴⁷.

La majeure partie des extraits DCM se compose essentiellement de coumarines de type mammea (4-alkyl ou 4-phénylcoumarines) et/ou de xanthones. Les premières présentent un spectre UV caractérisé par des bandes d'absorption autour de 220-230, 280-290 et 330-370 nm⁶¹, tandis que les xanthones montrent 4 à 5 maxima d'absorption entre 220 et 390 nm, souvent d'intensités décroissantes⁴⁵. Les fragments observés en spectrométrie de masse peuvent permettre de repérer les groupements prényles (56 Da), acyles, ainsi que les cyclisations (e.g. pyrane) présents sur les coumarines de type mammea⁵². Les xanthones prénylées s'identifient également par la perte de neutres de 42 Da (C₃H₆) ou de 56 Da (C₄H₈) comme dans l'exemple du **Tableau 14**⁵⁵.

Des composés de masses assez élevées, comprises entre 440 et 600 g/mol, et perdant des unités prényle (C₅H₈) ou géranyle (C₁₀H₁₆) en mode tandem (+MS²)⁵⁸, ont été identifiés comme des acylphloroglucinols polyprénylés. Leur spectre UV est variable : certains composés présentent un profil (intitulé « profil UV I ») exhibant des bandes d'absorption à 245 et 290 nm, typiques d'un chromophore de type 1,3-dicétone aromatique⁶², et décrites pour quelques benzophénones polyprénylées isolées des genres *Clusia*⁵⁶ et *Garcinia*⁶² ; d'autres montrent une seule bande d'absorption vers 275 nm (profil UV II), révélant des acylphloroglucinols polyprénylés proches de l'hypéricine du millerpertuis⁶³.

Par ailleurs, quelques extraits DCM renferment des pyranochromanones acides. Leurs longueurs d'onde maximales (λ_{\max}) d'absorption, à 227, 265, 274, 300, 313 et 364 nm, signalent un chromophore de type chromanone-chromène tel qu'on le trouve dans les chromanones acides [e.g. acide calopolyanique (**68**)]^{59,64}. Les analyses HPLC-ESI-MS² montrent, en mode négatif, une perte systématique de 44 Da, caractéristique d'une décarboxylation, ainsi qu'un ion résultant de l'élimination d'un groupement alkyle de taille variable (e.g. 114 Da pour un substituant acide hexanoïque), correspondant à la chaîne acide latérale attachée au noyau pyranochromanone⁶⁰.

Notons enfin l'existence, dans plusieurs extraits apolaires, de composés dont les données spectrales UV (profil UV III) et de masse obtenues ne nous ont pas permis d'identifier la classe chimique correspondante. Pour ces molécules, les spectres de masse en mode positif indiquent des masses molaires comprises entre 270 et 370 g/mol, et la fragmentation MS² montre des pertes de 28 Da (CO), de 56 Da (C₄H₈) ou 42 Da (C₃H₆) caractéristiques des molécules prénylées, et de 70 Da (C₄H₆O).

Les triterpènes, composés apolaires pouvant se retrouver dans les extraits DCM, ne sont pas évoqués ici en raison de leur indétectabilité en spectrophotométrie UV.

En suivant cette démarche d'identification par déréplication, nous avons analysé la composition de chaque extrait de façon plus détaillée (**Tableau 15**). On constate ainsi une disparité entre les extraits apolaires du genre *Mesua* d'une part, et ceux du genre *Calophyllum* d'autre part. En effet, les premiers comptent essentiellement des xanthones et des coumarines de type mammea,

tandis que les seconds ont une composition plus variable. De plus, les différents échantillons d'une même espèce présentent parfois des compositions assez distinctes, à l'instar des lots A et B de *C. incrassatum* d'une part et des lots A et B de *C. tetrapterum* d'autre part.

Tableau 15. Classes chimiques identifiées dans chaque extrait analysé par déréplication

En gris : extrait analysés uniquement par HPLC-UV-DAD

Espèce	Extrait (# filtré sur cartouche SPE)	Classes chimiques identifiées (de la plus abondante à la moins abondante)	
<i>Calophyllum dioscurii</i>	4579B_DCM	PPAPs (profils UV I et II)	
	4579B_MeOH [#]	Acides phénoliques, procyanidines	
	4579L_DCM	PPAPs (profils UV I et II)	
	4579L_MeOH	Acides phénoliques, biflavonoïdes, flavanones ou dihydroflavonols, flavonols	
<i>Calophyllum ferrugineum</i>	5552B_DCM	PPAPs (profil UV II), coumarines de type mammea	
	5552B_MeOH [#]	Procyanidines, acides phénoliques, dérivés du benzaldéhyde, flavanones ou dihydroflavonols	
	5552L_DCM	PPAPs (profil UV II), xanthones	
	5552L_MeOH	Biflavonoïdes, acides phénoliques, procyanidines	
<i>Calophyllum ferrugineum</i> var. <i>neriifolium</i>	4955B_DCM	PPAPs (profils UV I et II), xanthones	
	4955B_MeOH	Procyanidines, acides phénoliques	
	4955L_DCM	Xanthones, PPAPs (profils UV I et II)	
	4955L_MeOH	Biflavonoïdes, acides phénoliques, procyanidines, flavonols, flavanones ou dihydroflavonols	
<i>Calophyllum incrassatum</i>	Lot A	4702B_DCM	Xanthones, coumarines de type mammea
		4702B_MeOH [#]	Acides phénoliques, xanthones, coumarines de type mammea, dérivés du benzaldéhyde
		4702L_DCM	Xanthones, coumarines de type mammea
		4702L_MeOH [#]	Procyanidines, acides phénoliques, flavanones ou dihydroflavonols, flavonols, biflavonoïdes
	Lot B	4884B_DCM	Indéterminé (profil UV III)
		4884B_MeOH [#]	Acides phénoliques, procyanidines, dérivés du benzaldéhyde, indéterminé (profil UV III)
		4884L_DCM	Indéterminé (profil UV III)
		4884L_MeOH [#]	Acides phénoliques, flavanones ou dihydroflavonols, flavonols, biflavonoïdes, indéterminé (profil UV III)
		4884F_DCM	Coumarines de type mammea, indéterminé (profil UV III)
		4884F_MeOH [#]	Acides phénoliques, flavonols, coumarines de type mammea, indéterminé (profil UV III)

<i>Calophyllum tetrapterum</i>	Lot A	5382B_DCM	PPAPs (<i>profil UV I</i>), coumarines de type mammea, xanthones
		5382B_MeOH [#]	Procyanidines, acides phénoliques
		5382L_DCM	PPAPs (<i>profils UV I et II</i>), xanthones
		5382L_MeOH [#]	Acides phénoliques, flavonols
	Lot B	5617B_DCM	Chromanones acides
		5617B_MeOH [#]	Procyanidines, acides phénoliques, chromanones acides
		5617L_DCM	Chromanones acides
		5617L_MeOH	Biflavonoïdes, procyanidines, acides phénoliques, flavonols
	Lot C	5707B_DCM	PPAPs (<i>profil UV I</i>), xanthones
		5707B_MeOH [#]	Procyanidines, acides phénoliques
		5707L_DCM	PPAPs (<i>profils UV I et II</i>)
		5707L_MeOH [#]	Procyanidines, acides phénoliques, flavonols, biflavonoïdes
<i>Calophyllum teysmanii</i> var. <i>teysmanii</i>	4880B_DCM	Coumarines de type mammea, xanthones	
	4880B_MeOH [#]	Procyanidines, acides phénoliques, dérivés du benzaldéhyde, flavonols, coumarines de type mammea	
	4880L_DCM	Coumarines de type mammea, PPAPs (<i>profil UV I</i>), indéterminé (<i>profil UV III</i>)	
	4880L_MeOH [#]	Acides phénoliques, flavanones ou dihydroflavonols, flavonols, biflavonoïdes, coumarines, dérivés du benzaldéhyde	
<i>Garcinia dumosa</i>	5516B_DCM	Indéterminé	
	5516B_MeOH	Flavanones ou dihydroflavonols, procyanidines	
	5516L_DCM	Indéterminé	
	5516L_MeOH	Flavanones ou dihydroflavonols, procyanidines	
<i>Mesua assamica</i>	5442B_DCM	Coumarines de type mammea	
	5442B_MeOH [#]	Procyanidines	
	5442L_DCM	Coumarines de type mammea, xanthones	
	5442L_MeOH	Biflavonoïdes, coumarines de type mammea	
<i>Mesua lepidota</i>	5436B_DCM	Coumarines de type mammea, xanthones	
	5436B_MeOH [#]	Acides phénoliques, dérivés du benzaldéhyde	
	5436L_DCM	Xanthones, coumarines de type mammea	
	5436L_MeOH	Acides phénoliques, flavonols	
	5436F_DCM	Coumarines de type mammea	
	5436F_MeOH [#]	Acides phénoliques, procyanidines, coumarines de type mammea	
<i>Mesua nuda</i>	5352B_DCM	Coumarines de type mammea, xanthones	
	5352B_MeOH [#]	Procyanidines, acides phénoliques, flavanones ou dihydroflavonols	
	5352L_DCM	Coumarines de type mammea, xanthones	
	5352L_MeOH	Acides phénoliques, procyanidines, biflavonoïdes	

4.2. Etude dérèpliative des extraits bioactifs

Le criblage biologique réalisé sur les 56 extraits en a fait particulièrement ressortir 9 comme inhibiteurs de l'expression de VCAM-1. Il s'agit d'extraits de *Calophyllum tetrapterum* (lot A), de *Mesua assamica* et de *Mesua nuda*. Un extrait de *Mesua lepidota* s'est également avéré assez actif dans l'essai biologique en ELISA cellulaire. En revanche, nous avons vu que les lots B et C de *C. tetrapterum* présentent une activité beaucoup plus faible que le lot A.

Afin d'analyser qualitativement et quantitativement la composition de ces différents extraits bioactifs, et de comparer les profils chromatographiques des lots A, B et C de *C. tetrapterum*, nous détaillons ici l'analyse dérèpliative menée sur ces échantillons.

4.2.1. Extraits de *Calophyllum tetrapterum*

La **Figure 35** montre les profils chromatographiques des extraits du lot A de *Calophyllum tetrapterum* les plus inhibiteurs de l'expression de VCAM-1, c'est-à-dire les extraits DCM d'écorces et DCM et MeOH de feuilles, ainsi que ceux obtenus avec les deux autres lots de plante, de moindre activité. Leur comparaison met en évidence la similitude de composition des lots A et C, en particulier pour les extraits DCM, riches en acylphloroglucinols polyprénylés. Les 4 extraits DCM possèdent d'ailleurs un PPAP dominant commun, présentant un temps de rétention de 36,1 min, des longueurs d'onde maximales d'absorption à 245 et 291 nm, et une masse molaire de 562 g/mol. Les extraits DCM du lot B sont quand à eux très riches en pyranochromanones acides présentant des spectres UV identiques entre eux (λ_{\max} 227, 265, 274, 300, 312 et 361 nm).

Concernant les extraits MeOH de feuilles, on constate, comme précédemment, une composition similaire des lots A et C, riches en deux molécules de poids moléculaire assez élevé : l'amentoflavone (**49**, t_R 26,3 min), et un autre composé élué à 31,1 min et supposé être aussi un biflavonoïde d'après ses données spectrales. L'amentoflavone (**49**) compose également majoritairement l'extrait MeOH du lot B.

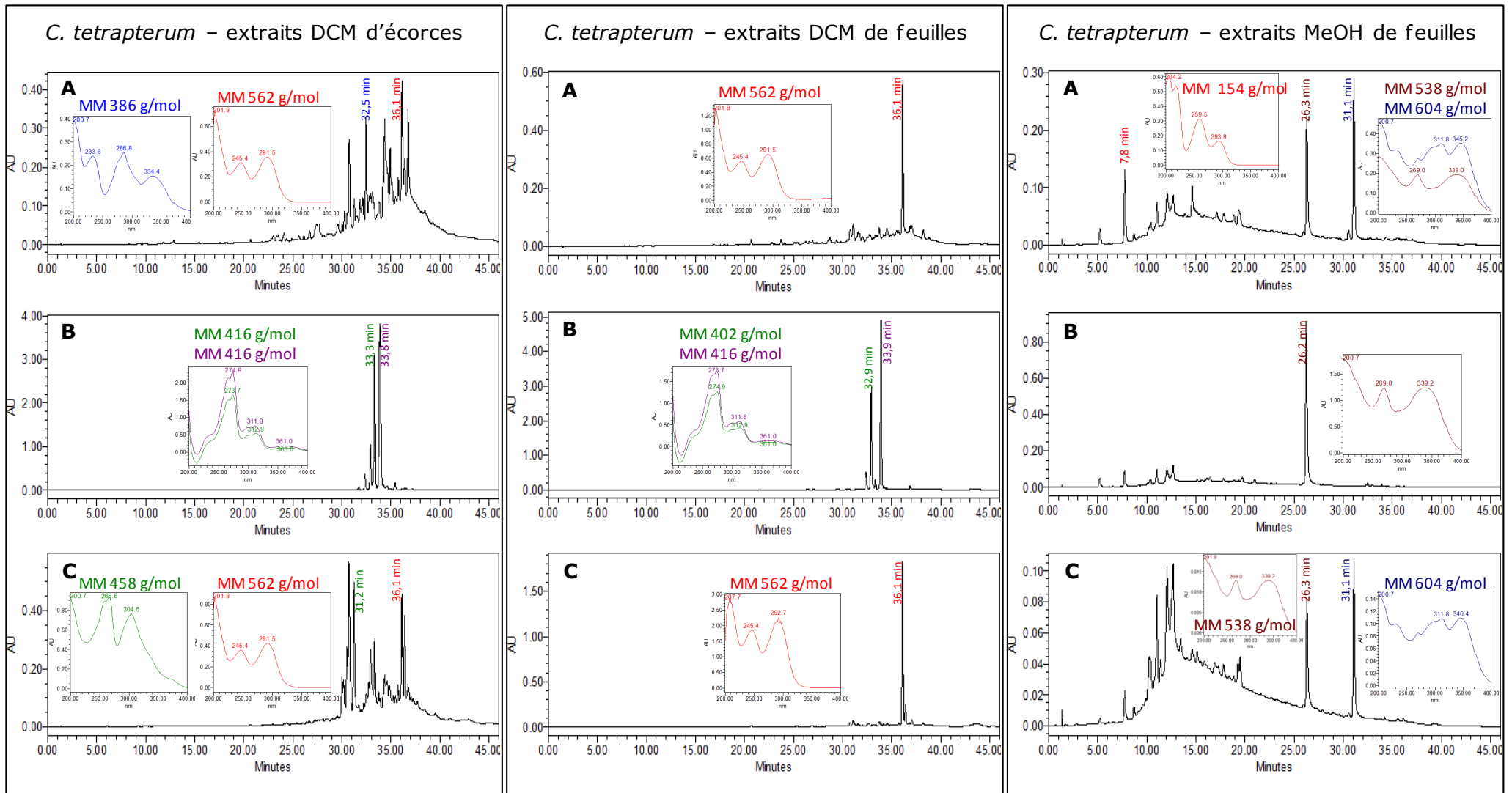


Figure 35. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 1, détection à 280 nm) des extraits DCM d'écorces, DCM de feuilles, et MeOH^a de feuilles de *Calophyllum tetrapterum* (A = lot A, B = lot B, C = lot C), et spectres UV et masses molaires de quelques composés majoritaires

^a Dans un souci de présentation, les chromatogrammes détaillés ici sont ceux des extraits MeOH avant filtration sur cartouche SPE. Les profils obtenus après filtration, selon un gradient d'éluion différent, sont présentés dans l'**Annexe 2**.

4.2.2. Extraits de *Mesua assamica*

Les chromatogrammes des deux extraits de *Mesua assamica* fortement inhibiteurs de l'expression de VCAM-1 sont représentés dans la **Figure 36**. La composition principale de l'extrait DCM de feuilles a aisément été déterminée comme celle de xanthones (e.g. composé de t_R 29,3 min) associées à des coumarines de type mammea (e.g. composé de t_R 34,8 min).

En revanche, certains composés majoritaires de l'extrait MeOH, qui présentent des maxima d'absorption à 220 et 275 nm, n'ont pas été identifiés, les spectres de masses étant difficilement interprétables. Parmi les autres métabolites présents, des biflavonoïdes et quelques coumarines de type mammea ont été remarqués.

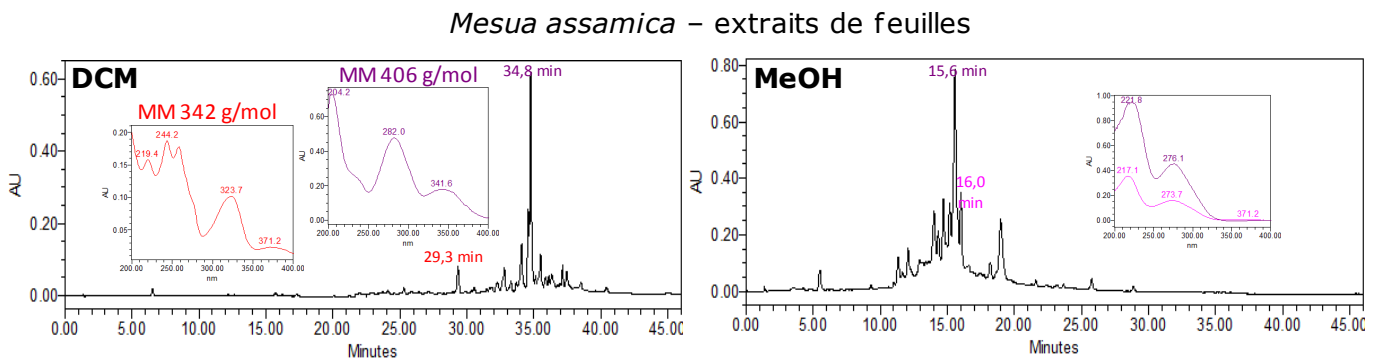


Figure 36. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 1, 280 nm) des extraits DCM et MeOH de feuilles de *Mesua assamica*, et spectres UV et masses molaires des composés majoritaires

4.2.3. Extrait de *Mesua lepidota*

L'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota* est principalement constitué de coumarines de type mammea (**Figure 37**) dont les spectres UV sont originaux, notamment ceux qui présentent des λ_{max} aux alentours de 230, 300 et 360 nm.

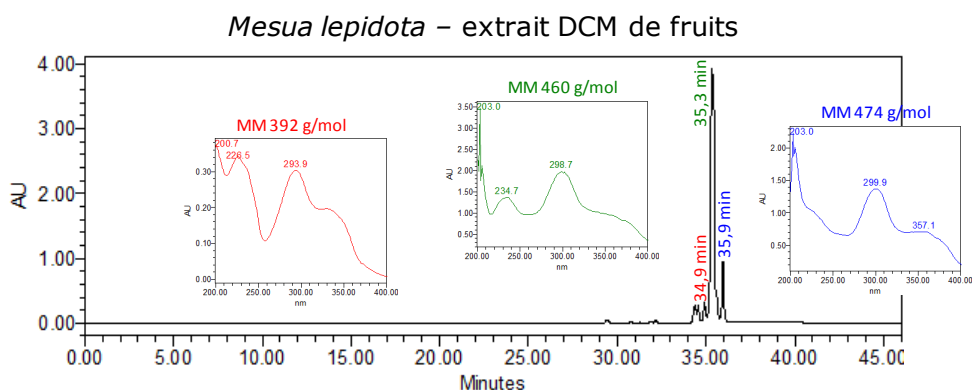


Figure 37. Chromatogramme HPLC-UV (méthode 1, 280 nm) de l'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota*, et spectres UV et masses molaires des composés majoritaires

4.2.4. Extraits de *Mesua nuda*

Les extraits DCM de *Mesua nuda*, bioactifs, contiennent des coumarines présentant des spectres UV également atypiques (cf. § 3.2.3) (**Figure 38**), ainsi que des xanthones. Le produit majoritaire de l'extrait DCM de fruits de *M. lepidota* (**Figure 37**), élué à 35,3 min, est d'ailleurs l'une des molécules prédominantes de l'extrait DCM de feuilles de *M. nuda*.

Concernant les extraits MeOH de *M. nuda*, celui des écorces contient essentiellement des procyanidines, des acides phénoliques, et des flavanones ou des dihydroflavonols (**Annexe 2**). Les spectres UV des produits majoritaires de l'extrait MeOH de feuilles sont quant à eux caractéristiques d'acides phénoliques (**Figure 38**).

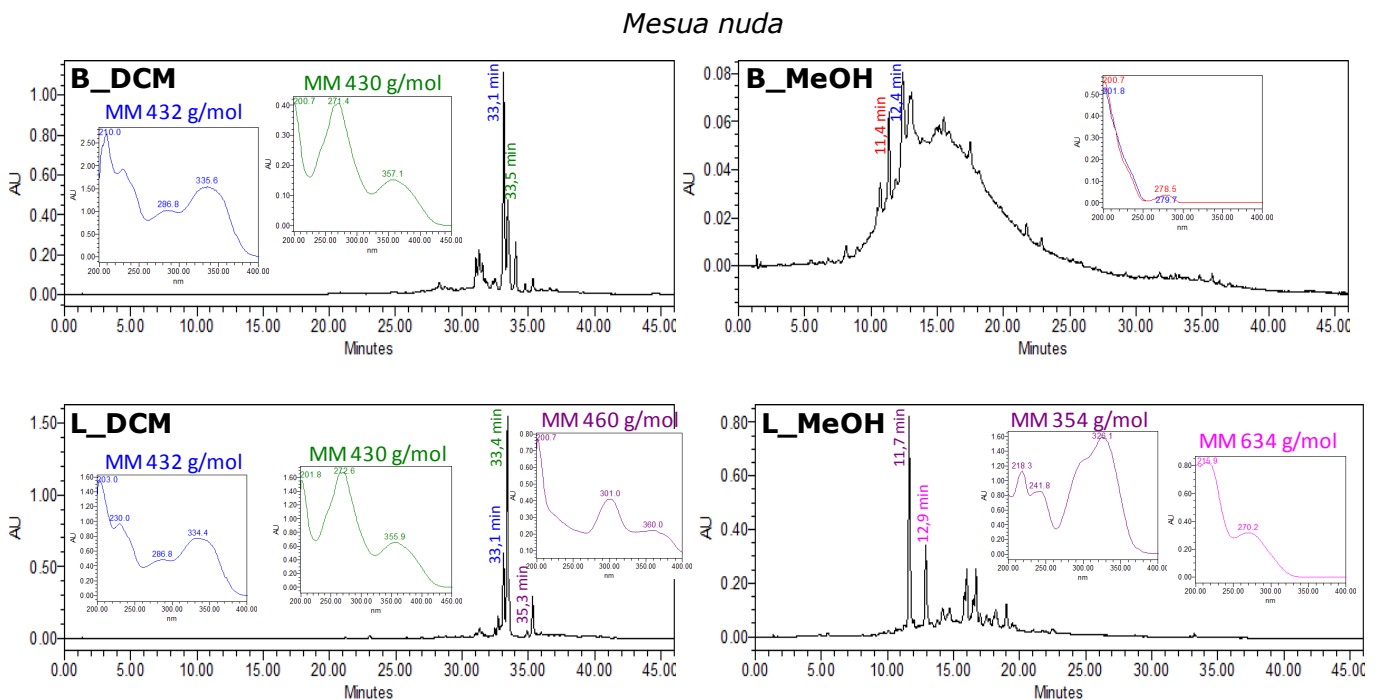


Figure 38. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 1, 280 nm) des extraits d'écorces^a (B) et de feuilles (L) de *Mesua nuda*, et spectres UV et masses molaires de quelques composés

Les profils chromatographiques des autres extraits de *Calophyllum*, *Garcinia* et *Mesua* figurent dans l'**Annexe 3**.

5. Conclusion

5.1. Extraits sélectionnés

Afin de limiter le nombre d'extraits à étudier au cours de cette thèse, en privilégiant ceux contenant des composés originaux et potentiellement anti-inflammatoires et immunorégulateurs, quatre extraits apolaires ont été sélectionnés parmi ceux présentés précédemment.

^a Afin de présenter des chromatogrammes obtenus avec la même méthode d'éluion, celui de l'extrait MeOH d'écorces de *M. nuda* présenté ici est celui obtenu avant filtration sur cartouche SPE.

Le premier extrait choisi est l'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota* (5436F_DCM). En effet, les métabolites secondaires qu'il contient présentent des spectres UV atypiques, supposant la présence d'une série de structures chimiques nouvelles. De plus, cet extrait inhibe l'expression de VCAM-1, bien que modérément (18 % d'inhibition à 5 µg/mL), ce qui est peut-être lié aux composés originaux présents. Enfin, le rendement d'extraction des fruits de *M. lepidota* par le DCM est particulièrement élevé (> 30 %). Ceci garantit l'obtention de plus grandes quantités de produits après purification pour l'identification structurale, un critère d'autant plus important que nous ne disposons que de petits échantillons (environ 20 g) de chaque partie de plante au début de ce travail de thèse.

L'extrait DCM de feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum* (5382L_DCM) est également retenu pour une étude phytochimique approfondie. Le criblage biologique montre en effet une très bonne activité pour cet extrait, et l'analyse déréplicative indique la présence de PPAPs originaux, dont un très majoritaire paraissant facilement isolable pour une élucidation structurale. Le profil des spectres UV obtenus est en effet peu décrit dans la littérature relative aux acylphloroglucinols polyprénylés.

L'extrait DCM de feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum* (5617L_DCM) nous semble opportun pour l'isolement et l'évaluation biologique de pyranochromanones acides. Bien que l'extrait n'inhibe que légèrement l'expression de la protéine VCAM-1, cette classe chimique de polyphénols pourrait avoir un effet plus marqué sur d'autres marqueurs endothéliaux de l'inflammation ou de l'immunité (cf. chapitre IV).

Enfin, l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica* (5442L_DCM) montre une très bonne activité biologique. Sa composition étant variée, un criblage bioguidé peut permettre de cibler le type de composés porteur de l'activité. De plus, les coumarines qu'il contient présentent des spectres UV classiques de coumarines de type mammea, et l'analyse des fragments obtenus en masse lors de la déréplication peut permettre de faire des hypothèses de structures sans isolement préalable des composés.

Ainsi, quatre extraits représentatifs d'une gamme variée de polyphénols polyprénylés sont sélectionnés pour une analyse phytochimique plus poussée. Ces polyphénols pourraient présenter un intérêt dans la prévention de la dysfonction ou de l'immunogénicité des cellules endothéliales.

Rappelons par ailleurs que chez les sujets diabétiques, les risques d'insuffisance rénale et donc de greffe rénale sont accrus. Les produits terminaux de la glycation (AGEs), qui se forment par réaction entre des protéines et des sucres, et qui s'accumulent en cas d'hyperglycémie chronique, participent au développement d'une dysfonction endothéliale. Aussi, un traitement par des composés à la fois anti-inflammatoires, immunosuppresseurs, et anti-AGEs, semblerait particulièrement indiqué chez les personnes souffrant de diabète, doublement exposées au risque de rejet de greffe.

Afin d'évaluer le potentiel anti-AGEs des quatre extraits végétaux préalablement sélectionnés, nous avons mesuré leur effet *in vitro* sur la formation des produits avancés de la glycation.

5.2. Effets sur les produits terminaux de la glycation (AGEs)

5.2.1. Principe du test anti-AGEs

Certains produits terminaux de la glycation, formés au cours de la réaction de Maillard, sont fluorescents (**Figure 39**). Cette propriété de fluorescence peut donc être utilisée pour la détection des AGEs formés *in vitro* dans des conditions bien définies.

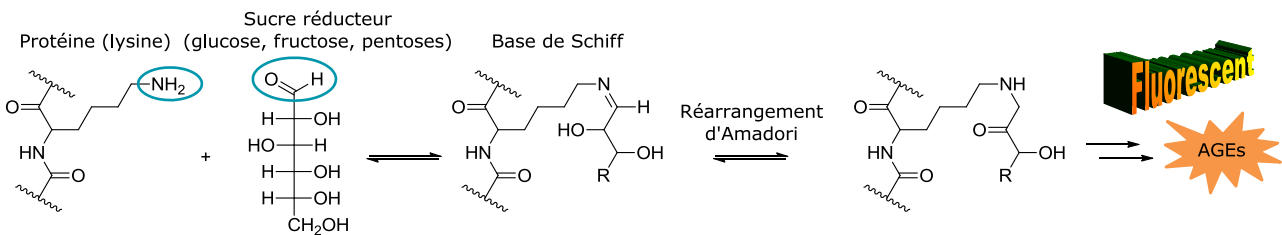


Figure 39. Représentation schématique de la formation des AGEs

Sur cette base, le laboratoire SONAS a développé un test chimique visant à évaluer le potentiel de certains composés ou extraits à inhiber la formation des AGEs. Il consiste à faire réagir une protéine (l'albumine de sérum bovin ou BSA) et un sucre (le ribose) dans des conditions physiologiques, puis à quantifier les AGEs formés par mesure de la fluorescence émise⁶⁵. Afin de pallier à des problèmes d'interférences pouvant être causés par la fluorescence intrinsèque de certains composés testés, une double mesure est effectuée, correspondant à la quantification de deux types d'AGEs formés : ceux de type vesperlysines et ceux de type pentosidine⁶⁶. Un inhibiteur de la formation des AGEs, tel que l'aminoguanidine ici utilisée comme témoin, conduit à une baisse de l'intensité du signal de fluorescence (**Figure 40**).

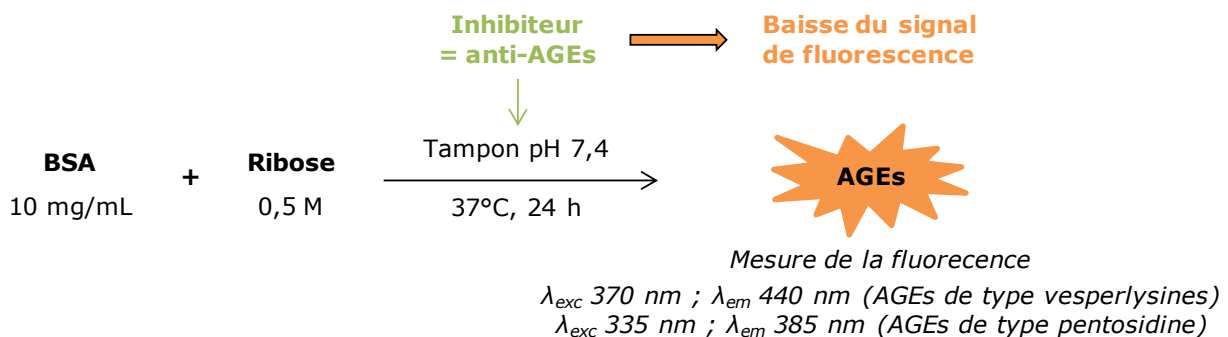


Figure 40. Principe du test anti-AGEs

5.2.2. Activités anti-AGEs des quatre extraits sélectionnés

Les extraits sélectionnés à la suite du criblage biologique et de l'analyse dérégulative, à savoir les extraits DCM de feuilles de *Calophyllum tetrapterum* (lots A et B), de feuilles de *Mesua assamica*, et de fruits de *Mesua lepidota*, ont été évalués pour leurs propriétés anti-AGEs. Des interférences de fluorescence ayant été observées lors de la quantification des AGEs de type vesperlysines, nous avons uniquement tenu compte des résultats obtenus sur la formation des AGEs de type pentosidine (**Tableau 16**).

Tableau 16. Activités anti-AGEs des extraits sélectionnés

Espèce	Extrait	Activité anti-AGEs (AGEs de type pentosidine) : CI ₅₀ (mg/mL)
<i>Calophyllum tetrapterum</i>	Lot A	5382L_DCM
	Lot B	5617L_DCM
<i>Mesua assamica</i>		5442L_DCM
<i>Mesua lepidota</i>		5436F_DCM
Témoin positif		Aminoguanidine

Il ressort de cette étude que l'extrait DCM de fruits de *M. lepidota* présente une forte activité inhibitrice, avec une CI₅₀ 5 fois plus faible que celle de l'aminoguanidine. L'extrait de *M. assamica* a une CI₅₀ environ 10 fois plus élevée que celle de l'extrait de *M. lepidota*, mais qui reste de l'ordre de grandeur de celle du témoin aminoguanidine. Il en va de même pour l'extrait du lot B de *C. tetrapterum*, riche en pyranochromanones acides, dont la CI₅₀ est environ deux fois plus élevée que celle du témoin. En revanche, l'extrait du lot A ne présente pas d'activité inhibitrice prononcée, sa CI₅₀ étant supérieure à 1 mg/mL sur la formation des AGEs de type pentosidine.

On n'observe donc pas de corrélation directe entre l'effet inhibiteur de la protéine VCAM-1, évalué lors du criblage biologique des extraits, et l'activité inhibitrice de la formation des AGEs. L'extrait de *M. lepidota*, riche en coumarines originales, apparaît d'autant plus intéressant à étudier. De plus, l'activité observée avec l'extrait de *M. assamica* suggère que le motif coumarinique de type mammea est un pharmacophore d'intérêt pour notre étude.

Bibliographie du chapitre II

1. Dang, B. T.; Geny, C.; Blanchard, P.; Rouger, C.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Tonnerre, P.; Charreau, B.; Rakolomalala, G.; Randriamboavonjy, J. I.; Loirand, G.; Pacaud, P.; Litaudon, M.; Derbre, S., Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*. *Fitoterapia* **2014**, 96, 65-75.
2. Susanti, D.; Taher, M.; Attoumani, N.; Ahmad, F., Free radical scavenging and antibacterial activities of Malaysian *Guttiferae* plants. *Journal of Medicinal Plants Research* **2011**, 5, 6714-6718.
3. Ferchichi, L.; Derbré, S.; Mahmood, K.; Touré, K.; Guilet, D.; Litaudon, M.; Awang, K.; Hadi, A. H. A.; Le Ray, A. M.; Richomme, P., Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry* **2012**, 78, 98-106.
4. McKee, T. C.; Covington, C. D.; Fuller, R. W.; Bokesch, H. R.; Young, S.; Cardellina, J. H., II; Kadushin, M. R.; Soejarto, D. D.; Stevens, P. F.; Cragg, G. M.; Boyd, M. R., Pyranocoumarins from tropical species of the genus *Calophyllum*: a chemotaxonomic study of extracts in the National Cancer Institute collection. *Journal of Natural Products* **1998**, 61, 1252-1256.
5. Cantrell, C. L.; Berhow, M. A.; Phillips, B. S.; Duval, S. M.; Weisleder, D.; Vaughn, S. F., Bioactive crude plant seed extracts from the NCAUR oilseed repository. *Phytomedicine* **2003**, 10, 325-333.
6. Kawamura, F.; Muhamud, A.; Hashim, R.; Sulaiman, O.; Ohara, S., Two antifungal xanthenes from the heartwood of *Calophyllum Symingtonianum*. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly* **2012**, 46, 181-185.
7. Subeki; Nomura, S.; Matsuura, H.; Yamasaki, M.; Yamato, O.; Maede, Y.; Katakura, K.; Suzuki, M.; Trimurningsih; Chairul; Yoshihara, T., Anti-babesial activity of some Central Kalimantan plant extracts and active oligostilbenoids from *Shorea balageran*. *Planta Medica* **2005**, 71, 420-423.
8. Kijjoa, A., *Natural products in the new millennium: prospects and industrial application*. Rauter, A. P.; Palma, F. B.; Justino, J.; Araujo, M. E.; PinaDosSantos, S., Eds.; Springer: **2002**; Vol. 47. Plant secondary metabolites with immunomodulatory activity, pp 299-309.
9. Rukachaisirikul, V.; Naklue, W.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S., An antibacterial biphenyl derivative from *Garcinia bancana* Miq. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2005**, 53, 342-343.
10. Siridechakorn, I.; Maneerat, W.; Sripisut, T.; Ritthiwigrom, T.; Cheenpracha, S.; Laphookhieo, S., Biphenyl and xanthone derivatives from the twigs of a *Garcinia* sp (*Clusiaceae*). *Phytochemistry Letters* **2014**, 8, 77-80.
11. Auranwiwat, C.; Trisuwan, K.; Saiai, A.; Pyne, S. G.; Ritthiwigrom, T., Antibacterial tetraoxygenated xanthenes from the immature fruits of *Garcinia cowa*. *Fitoterapia* **2014**, 98, 179-183.
12. Tay, B. Y. P., Chemical constituents of *Garcinia mangostana*, *G. parvifolia*, *G. griffithii* and *G. diversifolia* (*Guttiferae*) and their biological activities. **1996**. Thèse de Master en science, Universiti Putra Malaysia, n° FSAS 1996 6, 125 p.
13. Hartati, S.; Soemiati, A.; Wang, H.-B.; Kardono, L. B. S.; Hanafi, M.; Kosela, S.; Qin, G.-W., A novel polyisoprenyl benzophenone derivative from *Garcinia eugeniaefolia*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2008**, 10, 509-513.
14. Leong, Y. W.; Harrison, L. J.; Bennett, G. J.; Tan, H. T. W., Forbesione, a modified xanthone from *Garcinia forbesii*. *Journal of Chemical Research-S* **1996**, 392-393.
15. Xu, Y. J.; Yip, S. C.; Kosela, S.; Fitri, E.; Hana, M.; Goh, S. H.; Sim, K. Y., Novel cytotoxic, polyprenylated heptacyclic xanthonoids from Indonesian *Garcinia gaudichaudii* (*Guttiferae*). *Organic Letters* **2000**, 2, 3945-3948.
16. Nilar; Nguyen, L.-H. D.; Venkatraman, G.; Sim, K.-Y.; Harrison, L. J., Xanthenes and benzophenones from *Garcinia griffithii* and *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* **2005**, 66, 1718-1723.
17. Jamila, N.; Khairuddean, M.; Khan, S. N.; Khan, N.; Osman, H., Phytochemicals from the bark of *Garcinia hombroniana* and their biological activities. *Records of Natural Products* **2014**, 8, 312-316.
18. Ilyas, M.; Kamil, M.; Parveen, M.; Khan, M. S., Isoflavones from *Garcinia nervosa*. *Phytochemistry* **1994**, 36, 807-809.
19. Seruji, N. M. U.; Khong, H. Y.; Kutoi, C. J., Antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of *Garcinia nervosa* (*Clusiaceae*). *Journal of Chemistry* **2013**, 913406.
20. Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Watthanaphanit, A.; Saengsanee, N.; Phongpaichit, S., Benzopyran, biphenyl, and tetraoxygenated xanthone derivatives from the twigs of *Garcinia nigrolineata*. *Journal of Natural Products* **2005**, 68, 1218-1221.
21. Goh, S. H.; Jantan, I.; Gray, A. I.; Waterman, P. G., Prenylated xanthenes from *Garcinia opaca*. *Phytochemistry* **1992**, 31, 1383-1386.
22. Mori, R.; Nugroho, A. E.; Hirasawa, Y.; Wong, C. P.; Kaneda, T.; Shirota, O.; Hadi, A. H. A.; Morita, H., Opaciniols A-C, new terpenoids from *Garcinia opaca*. *Journal of Natural Medicines* **2014**, 68, 186-191.

23. Jantan, I.; Mohd. Yasin, Y. H.; Jalil, J.; Murad, S.; Idris, M. S., Antiplatelet aggregation activity of compounds isolated from *Guttiferae* species in human whole blood. *Pharmaceutical Biology* **2010**, 47, 1090-1095.
24. Hassan, S. H. A.; Fry, J. R.; Abu Bakar, M. F., Phytochemicals content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition properties of indigenous *Garcinia parvifolia* fruit. *BioMed Research International* **2013**, 2013, 138950.
25. Rukachaisirikul, V.; Naklue, W.; Phongpaichit, S.; Towatana, N. H.; Maneenoon, K., Phloroglucinols, depsidones and xanthenes from the twigs of *Garcinia parvifolia*. *Tetrahedron* **2006**, 62, 8578-8585.
26. Klaiklay, S.; Sukpondma, Y.; Rukachaisirikul, V.; Hutadilok-Towatana, N.; Chareonrat, K., Flavanone glucuronides from the leaves of *Garcinia prainiana*. *Canadian Journal of Chemistry* **2011**, 89, 461-464.
27. Roux, D.; Hadi, H. A.; Thoret, S.; Guenard, D.; Thoison, O.; Pais, M.; Sevenet, T., Structure-activity relationship of polyisoprenyl benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the tubulin/microtubule system. *Journal of Natural Products* **2000**, 63, 1070-1076.
28. Jabit, M. L.; Wahyuni, F. S.; Khalid, R.; Israf, D. A.; Shaari, K.; Lajis, N. H.; Stanslas, J., Cytotoxic and nitric oxide inhibitory activities of methanol extracts of *Garcinia* species. *Pharmaceutical Biology* **2009**, 47, 1019-1026.
29. Awang, K.; Chan, G.; Litaudon, M.; Ismail, N. H.; Martin, M.-T.; Gueritte, F., 4-Phenylcoumarins from *Mesua elegans* with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 7873-7877.
30. Chahar, M. K.; Sanjaya, K. D. S.; Geetha, L.; Lokesh, T.; Manohara, K. P., *Mesua ferrea* L.: a review of the medical evidence for its phytochemistry and pharmacological actions. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2013**, 7, 211-219.
31. Morel, C.; Guilet, D.; Oger, J.-M.; Seraphin, D.; Sevenet, T.; Wiart, C.; Hadi, A. H. A.; Richomme, P.; Bruneton, J., 6-acylcoumarins from *Mesua racemosa*. *Phytochemistry* **1999**, 50, 1243-1247.
32. Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering* **2013**, 117, 426-436.
33. Santos, D. T.; Veggi, P. C.; Meireles, M. A. A., Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jaboticaba skins. *Journal of Food Engineering* **2012**, 108, 444-452.
34. Marui, N.; Offermann, M. K.; Swerlick, R.; Kunsch, C.; Rosene, C. A.; Ahmad, M.; Alexander, R. W.; Medford, R. M., Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* **1993**, 92, 1866-1874.
35. Cannizzo, B.; Quesada, I.; Militello, R.; Amaya, C.; Miatello, R.; Cruzado, M.; Castro, C., Tempol attenuates atherosclerosis associated with metabolic syndrome *via* decreased vascular inflammation and NADPH-2 oxidase expression. *Free Radical Research* **2014**, 48, 526-533.
36. Rakotomalala, G.; Agard, C.; Tonnerre, P.; Tesse, A.; Derbre, S.; Michalet, S.; Hamzaoui, J.; Rio, M.; Cario-Toumaniantz, C.; Richomme, P.; Charreau, B.; Loirand, G.; Pacaud, P., Extract from *Mimosa pigra* attenuates chronic experimental pulmonary hypertension. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, 148, 106-116.
37. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65, 55-63.
38. Wang, P.; Henning, S. M.; Heber, D., Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One* **2010**, 5, e10202.
39. Sliman, S. M.; Eubank, T. D.; Kotha, S. R.; Kuppusamy, M. L.; Sherwani, S. I.; Butler, E. S. O. C.; Kuppusamy, P.; Roy, S.; Marsh, C. B.; Stern, D. M.; Parinandi, N. L., Hyperglycemic oxoaldehyde, glyoxal, causes barrier dysfunction, cytoskeletal alterations, and inhibition of angiogenesis in vascular endothelial cells: aminoguanidine protection. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2010**, 333, 9-26.
40. Bruneton, J., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4^{ème} ed.; Tec & Doc Lavoisier: Paris, **2009**; 1269 p.
41. Pohjala, L.; Tammela, P., Aggregating behavior of phenolic compounds - a source of false bioassay results? *Molecules* **2012**, 17, 10774-10790.
42. Wolfender, J.-L.; Ndjoko, K.; Hostettmann, K., Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectrometry: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1000, 437-455.
43. Rodrigues, C. M.; Rinaldo, D.; dos, S. L. C.; Montoro, P.; Piacente, S.; Pizza, C.; Hiruma-Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W., Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21, 1907-1914.

44. Li, H.-J.; Deinzer, M. L., The mass spectral analysis of isolated hops A-type proanthocyanidins by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2008**, 43, 1353-1363.
45. Dey, P. M.; Harborne, J. B., *Methods in plant biochemistry*. Academic Press: London, **1989**; Vol. 1, Plant phenolics, 552 p.
46. Zhang, Y.-X.; Li, Q.-Y.; Yan, L.-L.; Shi, Y., Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, 25, 2173-2186.
47. Wang, G.; Yao, S.; Song, H.; Zhang, X.-X., Rapid screening and structural characterization of antioxidants from the extract of *Selaginella doederleinii* Hieron with DPPH-UPLC-Q-TOF/MS method. *International Journal of Analytical Chemistry* **2015**, 2015, 849769.
48. Liao, S.; Ren, Q.; Yang, C.; Zhang, T.; Li, J.; Wang, X.; Qu, X.; Zhang, X.; Zhou, Z.; Zhang, Z.; Wang, S., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination and pharmacokinetic analysis of amentoflavone and its conjugated metabolites in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, 63, 1957-1966.
49. Cuyckens, F.; Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 39, 1-15.
50. Tala, V. R. S.; Candida da Silva, V.; Rodrigues, C. M.; Nkengfack, A. E.; Campaner dos Santos, L.; Vilegas, W., Characterization of proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (jacq.) G. don. (*Fabaceae*) by flow injection analysis-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules* **2013**, 18, 2803-2820.
51. Saldanha, L. L.; Vilegas, W.; Dokkedal, A. L., Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. *Molecules* **2013**, 18, 8402-8416.
52. Dang, B. T.; Guitton, Y.; Freuze, I.; Grovel, O.; Litaudon, M.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Derbre, S., Dereplication of *Mammea neurophylla* metabolites to isolate original 4-phenylcoumarins. *Phytochemistry Letters* **2015**, 11, 61-68.
53. Yang, H.; Jiang, B.; Reynertson, K. A.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J., Comparative analyses of bioactive *Mammea* coumarins from seven parts of *Mammea americana* by HPLC-PDA with LC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, 4114-4120.
54. Politi, M.; Sanogo, R.; Ndjoko, K.; Guilet, D.; Wolfender, J. L.; Hostettmann, K.; Morelli, I., HPLC-UV/PAD and HPLC-MSⁿ analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new bianthrone. *Phytochemical Analysis* **2004**, 15, 355-364.
55. Kainz, K.; Zehl, M.; Bleier, J.; Merking, B.; Pemmer, T.; Schmidt, N.; Winkler, J.; Kahlig, H.; Krenn, L., New compounds from the tree fern *Metaxya rostrata* C. Presl. *Records of Natural Products* **2014**, 8, 348-353.
56. Porto, A. L. M.; Machado, S. M. F.; de, O. C. M. A.; Bittrich, V.; Amaral, M. d. C. E.; Marsaioli, A. J., Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry* **2000**, 55, 755-768.
57. Piccinelli, A. L.; Campone, L.; Dal Piaz, F.; Cuesta-Rubio, O.; Rastrelli, L., Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20, 1688-1698.
58. Zhou, Y.; Lee, S.; Choi, F. F. K.; Xu, G.; Liu, X.; Song, J.-Z.; Li, S.-L.; Qiao, C.-F.; Xu, H.-X., Qualitative and quantitative analysis of polycyclic polyisoprenylated acylphloroglucinols from *Garcinia* species using ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 678, 96-107.
59. Ha, L. D.; Hansen, P. E.; Duus, F.; Pham, H. D.; Nguyen, L.-H. D., A new chromanone acid from the bark of *Calophyllum dryobalanoides*. *Phytochemistry Letters* **2012**, 5, 287-291.
60. Piccinelli, A. L.; Kabani, A. O.; Lotti, C.; Alarcon, A. B.; Cuesta-Rubio, O.; Rastrelli, L., A fast and efficient HPLC-PDA-MS method for detection and identification of pyranochromanone acids in *Calophyllum* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, 76, 157-163.
61. Carpenter, I.; McGarry, E. J.; Scheinmann, F., Extractives from *Guttiferae*. Part XXI. The isolation and structure of nine coumarins from the bark of *Mammea africana* G. Don. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1971**, 3783-3790.
62. Derogis, P. B. M. C.; Martins, F. T.; de, S. T. C.; Moreira, M. E. d. C.; Souza, F. J. D.; Doriguetto, A. C.; de, S. K. R. D.; Veloso, M. P.; Dos, S. M. H., Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2008**, 46, 278-282.
63. Tatsis, E. C.; Boeren, S.; Exarchou, V.; Troganis, A. N.; Vervoort, J.; Gerothanassis, I. P., Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* **2007**, 68, 383-393.

64. Wang, H.; Sun, Q.-Y.; Yang, F.-M.; Long, C.-L.; Wang, Y.-H.; Tang, G.-H.; Zhao, F.-W.; Niu, H.-M.; Huang, Q.-Q.; Xu, J.-J.; Wataya, Y.; Ma, L.-J., Chromanone derivatives from the pericarps of *Calophyllum polyanthum*. *Helvetica Chimica Acta* **2010**, 93, 2183-2188.
65. Derbre, S.; Gatto, J.; Pelleray, A.; Coulon, L.; Seraphin, D.; Richomme, P., Automating a 96-well microtiter plate assay for identification of AGEs inhibitors or inducers: application to the screening of a small natural compounds library. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 398, 1747-1758.
66. Sero, L.; Sanguinet, L.; Blanchard, P.; Dang, B. T.; Morel, S.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Derbre, S., Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules* **2013**, 18, 14320-14339.

Chapitre III : Etude phytochimique des extraits sélectionnés

Chapitre III : Etude phytochimique des extraits sélectionnés

Ce troisième chapitre présente l'étude phytochimique des 4 extraits de *Calophyllaceae* sélectionnés à la suite du criblage biologique anti-inflammatoire et de l'analyse dérégulative.

Les travaux réalisés sur les fruits de *Mesua lepidota* seront exposés dans un premier temps, comprenant une description botanique du matériel végétal et l'étude phytochimique de l'extrait dichlorométhanique. L'élucidation structurale des composés isolés sera détaillée, mettant en évidence deux nouveaux types de phénylcoumarines.

L'analyse des métabolites secondaires présents dans les extraits DCM de feuilles des lots A et B de *Calophyllum tetrapterum* sera ensuite développée, complétant la description botanique des feuilles. Nous distinguerons ainsi les acylphloroglucinols polyprénylés, majoritaires dans le lot A, des pyranochromanones acides, qui composent principalement l'extrait du lot B.

Enfin, l'initiation d'un fractionnement bioguidé réalisé sur l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica* nous amènera, par dérégulation, à détailler sa composition en coumarines de type mammea.

1. Etude phytochimique de l'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota*

1.1. Matériel végétal

1.1.1. Description de l'espèce

L'espèce *Mesua lepidota* T. Anderson, localement appelée *penaga bayan* en Malaisie, est un arbre glabre élancé, haut d'environ 20 m. Le tronc présente une écorce écailleuse, de couleur brun-rose sur sa face interne. Les feuilles, coriaces et luisantes, sont opposées, simples et entières. Elles sont de forme oblongue-lancéolée, leur base étant aiguë et leur apex acuminé. Elles mesurent 8 à 15 cm de longueur et 3 à 5 cm de largeur. La nervure principale est proéminente sur les deux faces de la feuille, tandis que les nervures secondaires sont imperceptibles. Le pétiole est court, de l'ordre de 5 mm de longueur. L'inflorescence est une ombelle* terminale ou axillaire divisée en grappes de 1 à 3 fleurs, et pouvant mesurer jusqu'à 6 cm de long. Les fleurs sont hermaphrodites, accompagnées de bractées* appariées, et portées par un pédicelle*. Elles se composent de 4 sépales décussés, arrondis, de 5 mm de diamètre, et de 4 pétales resserrés à la base et à l'apex arrondi, blancs ou roses, qui mesurent environ 8 mm de diamètre. Le fruit est une capsule sphérique, subligneuse, atteignant 2,5 cm de diamètre, et associée à un calice également épais et ligneux.^{1,2}

Cette espèce croît en Malaisie péninsulaire et sur l'île de Sumatra en Indonésie. Elle se retrouve dans les plaines et parfois dans les forêts humides saisonnières.¹

1.1.2. Matériel végétal collecté

Les écorces de tronc, les feuilles et les fruits de *Mesua lepidota* (**Figure 41**) ont été identifiés par le botaniste M. Teo Leong Eng et récoltés en juin 2007 dans l'Etat de Johor, au Sud de la Malaisie (**Figure 42**). Un spécimen est déposé à l'herbarium du département de chimie de l'université de Malaya, à Kuala Lumpur, sous la référence KL5436.

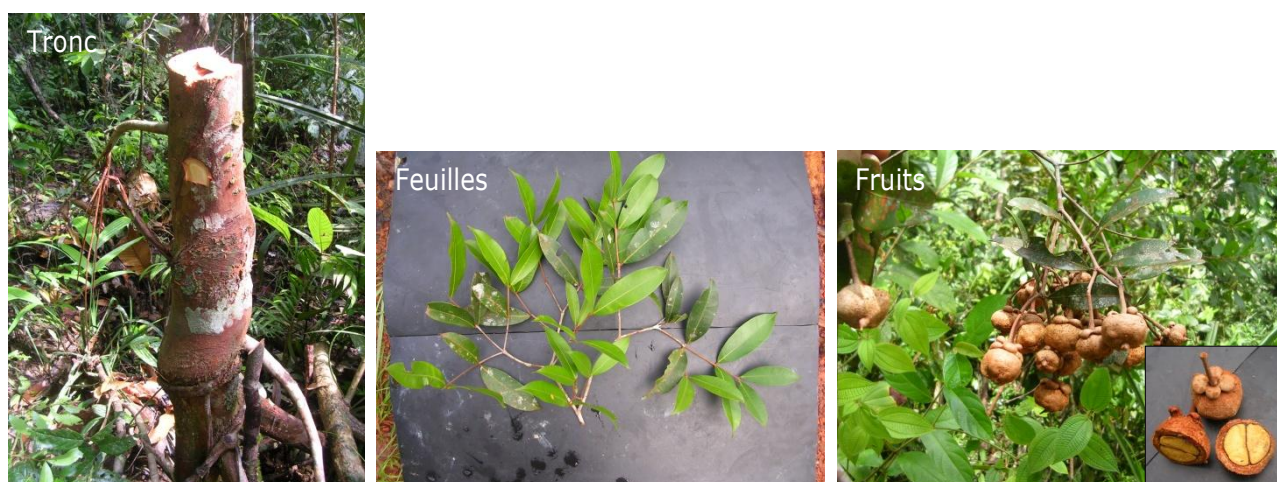


Figure 41. Photographies du tronc, des feuilles et des fruits de *Mesua lepidota*
(Source : Marc Litaudon)



Figure 42. Lieu de récolte des écorces, feuilles et fruits de *Mesua lepidota* en Malaisie
(Source de la carte : <http://www.sihra.org/>)

1.1.3. Etude botanique des fruits de *Mesua lepidota*

L'anatomie de la feuille et du fruit de *Mesua lepidota* est partiellement décrite dans un ouvrage de Vesque³. Afin de comparer anatomiquement les fruits récoltés pour notre étude à cette planche descriptive, et de compléter les données y figurant, nous avons entrepris une étude de la structure des fruits, avec l'aide du Professeur Isabelle Fourasté de l'université de Toulouse.

Macroscopiquement, nous pouvons distinguer les 3 couches qui composent cette capsule ligneuse (**Figure 43**) :

- à la surface externe, qui apparaît abrasée, une zone épicarpique (**A**)
- un mésocarpe épais composé de 3 couches de tissus (**B, C et D**) :
 - o une zone fibreuse striée de façon radiale, beige clair (**B**)
 - o une zone brun plus foncé renfermant des morceaux jaune clair (des canaux sécréteurs) disposés en amas en section transversale, et en canaux en section longitudinale (**C**)
 - o une zone brun-orangé, compacte (**D**)
- sur la face interne, une zone endodermique (**E**)

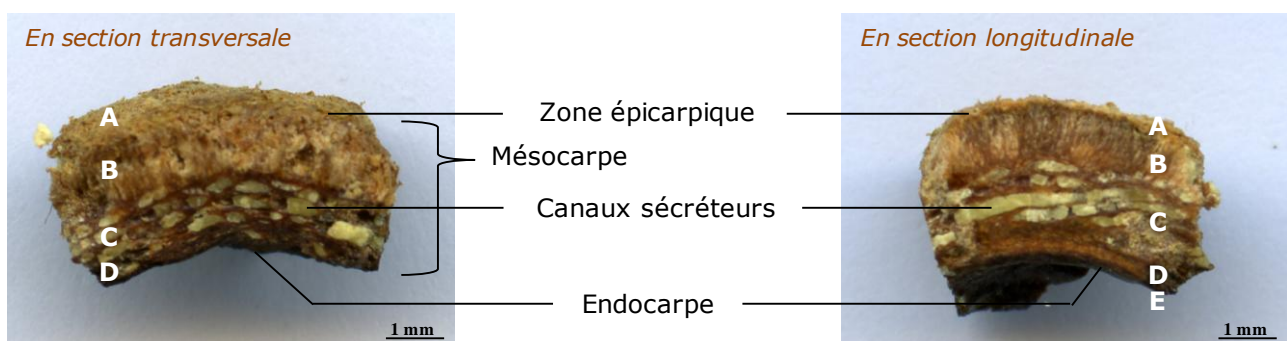


Figure 43. Différentes couches du fruit de *Mesua lepidota*
(A : zone épicarpique ; B, C et D : mésocarpe ; E : zone endocarpique)

L'observation microscopique du fruit en section transversale, réalisée sans technique de coloration en raison de la friabilité de l'échantillon, ainsi que l'observation de la poudre, permettent de décrire plus finement ces différentes couches.

La zone épicarpique (**A**) comprend 3 à 4 assises de petites cellules isodiamétriques* à paroi fine (**Figure 44**) dans lesquelles se situent de petites cellules scléreuses* isolées (surtout visibles dans la poudre, **Figure 45**).

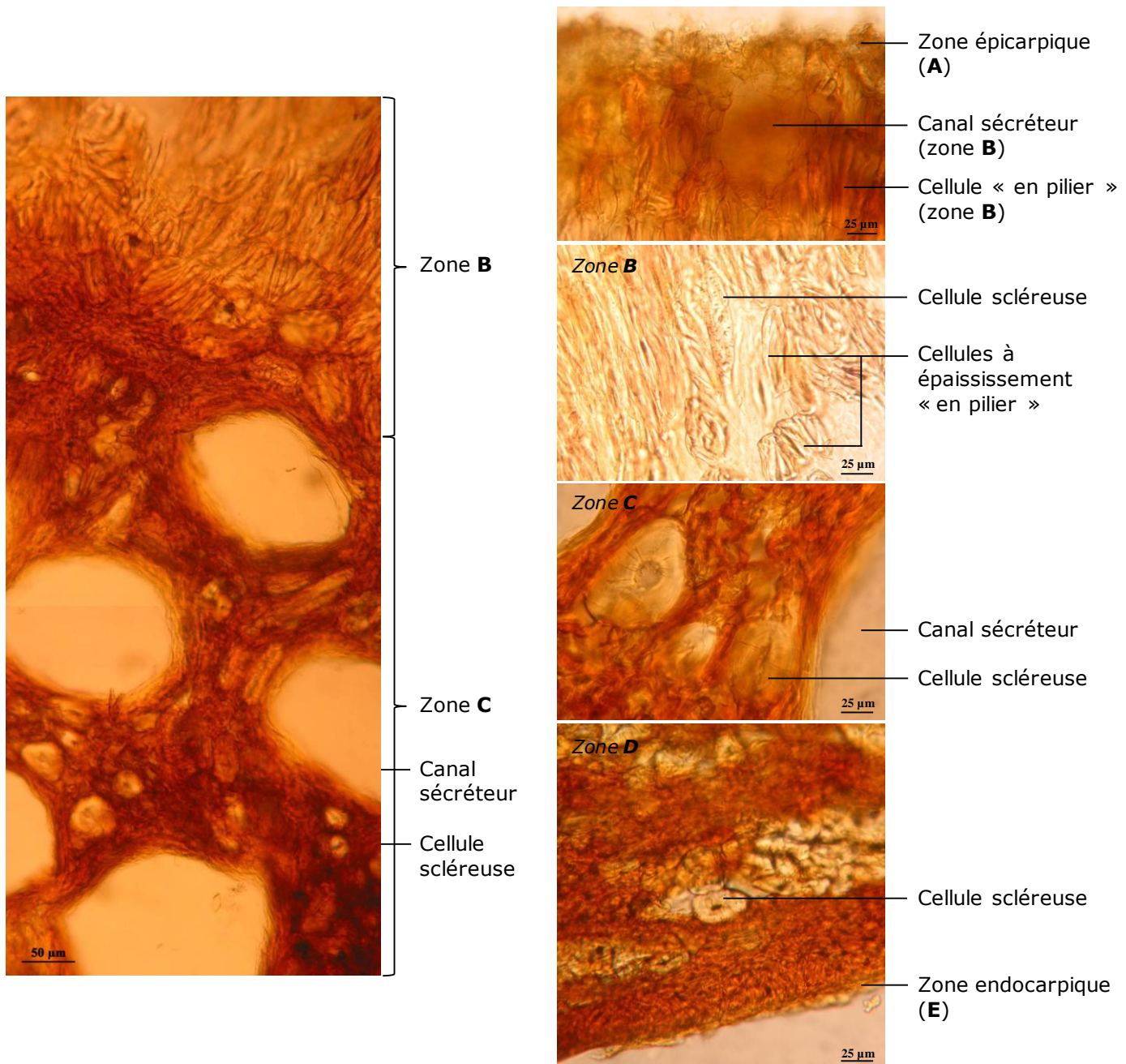


Figure 44. Coupe transversale du fruit de *Mesua lepidota*

Au niveau du mésocarpe, la zone épaisse **B** renferme des canaux sécréteurs, localisés juste sous la zone épicerpique, des cellules allongées à paroi épaisse lisse ici dénommées cellules « en pilier », et des cellules scléreuses à paroi régulièrement épaisse et canaliculée* de même longueur

que les cellules « en pilier ». La zone **C** se compose de nombreuses cellules scléreuses à paroi fortement épaissie et canaliculée, et de nombreux canaux sécréteurs de large diamètre. La zone **D** du mésocarpe, privée de canaux sécréteurs, contient des cellules parenchymateuses* plus ou moins écrasées, ainsi que des cellules scléreuses à paroi fortement épaissie et canaliculée. Enfin, l'endocarpe (**E**) est formé de cellules aplaties. (**Figure 44**)

Les éléments essentiellement retrouvés dans la poudre du fruit sont des fragments de l'épiderme (**A**) constitués de cellules polyédriques et de petites cellules scléreuses, de nombreuses cellules « en pilier » entières ou fragmentées ainsi que des cellules scléreuses du mésocarpe, et quelques faisceaux vasculaires*. (**Figure 45**)

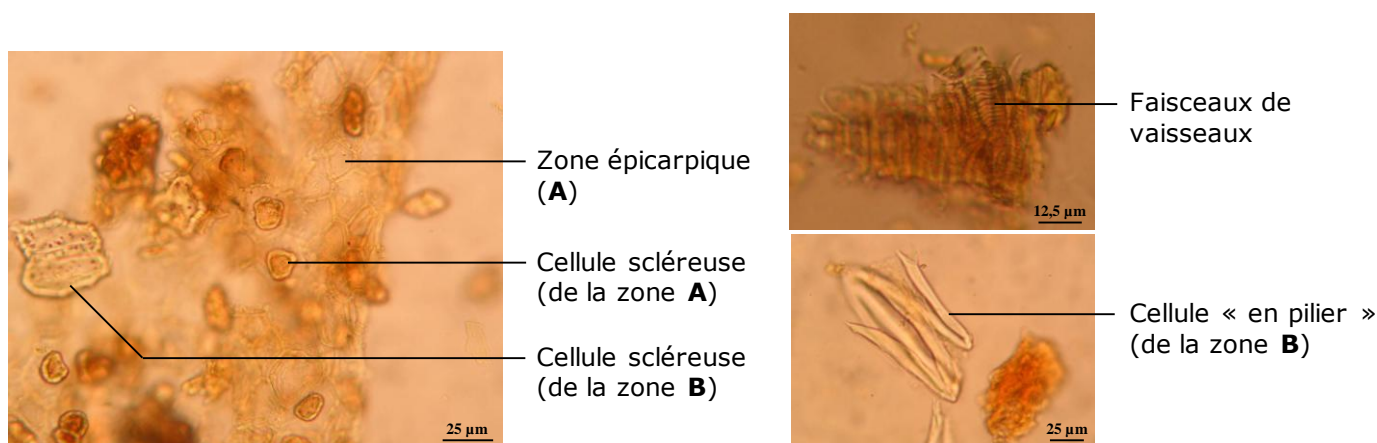


Figure 45. Poudre du fruit de *Mesua lepidota*

Ces éléments complètent les schémas succincts décrits dans la littérature³. Une description de la feuille de *Mesua lepidota* T. Anderson est également proposée en **Annexe 4**.

La présence de canaux sécréteurs dans différents tissus du mésocarpe du fruit suggère que la substance excrétée pourrait être une essence. Nous l'avons vérifié par une extraction de l'huile essentielle (HE) et une analyse de sa composition, qui font l'objet de l'**Annexe 5**.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, l'extrait des fruits obtenu avec le DCM présente une activité inhibitrice modérée sur l'expression de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales. En outre, il renferme des coumarines de structure originale au vu des données spectrales obtenues. Afin d'identifier les molécules majoritaires de l'extrait, nous avons procédé à leur purification.

1.2. Purification des phénylcoumarines de l'extrait

1.2.1. Profil de l'extrait

Le chromatogramme HPLC-DAD de l'extrait DCM de fruits de *M. lepidota* montre nettement la présence d'un composé majoritaire [**94**, t_R 20,0 min (méthode d'élution 2, cf. partie expérimentale)] absorbant à 230, 300 et 360 nm. Celui-ci est accompagné de produits minoritaires. (**Figure 46**)

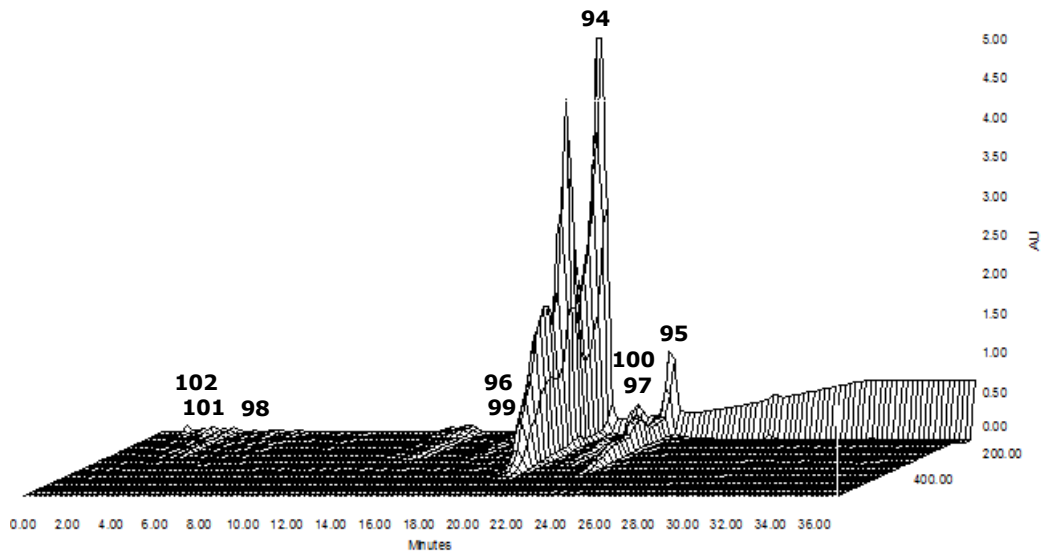


Figure 46. Profil HPLC (3D plot) de l'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota* (méthode 2)

Une analyse du spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (RMN ^1H) réalisé sur l'extrait brut confirme la présence très majoritaire d'un composé (**Figure 47**). Celui-ci se caractérise par la présence de 4 groupements méthyles, 2 groupements méthylènes, et 2 protons éthyléniques pouvant appartenir à des chaînes prényles. La présence d'un groupement phényle est également remarquée avec 5 protons aromatiques situés dans la zone de déplacements chimiques (δ_{H}) de 7 à 8 ppm. Enfin, ce spectre a la particularité d'afficher un proton extrêmement déblindé (δ_{H} vers 19 ppm) qui signe la présence, au sein de la molécule, d'un hydroxyle « chélaté » avec un carbonyle.

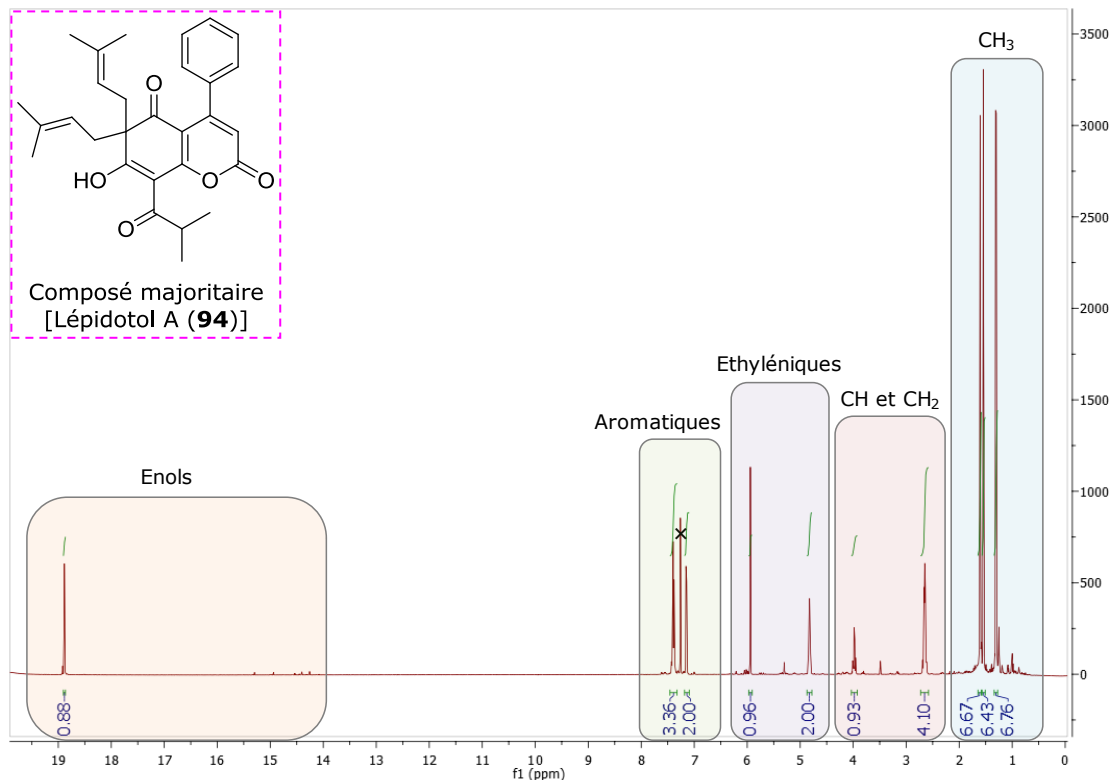


Figure 47. Spectre de RMN du proton de l'extrait DCM de fruits de *M. lepidota* (5436F_DCM)

Quelques signaux de faibles intensités, aux alentours de δ_H 14-15 ppm, indiquent que des composés minoritaires possèdent également des phénols « chélatés » dans leur structure, ceux-ci étant beaucoup moins déblindés que dans le composé majoritaire (**Figure 47**).

L'omniprésence du composé **94** dans l'extrait DCM de fruits de *M. lepidota* a permis de l'identifier directement à partir des spectres de RMN mono- et bidimensionnelle obtenus à partir de ce dernier (cf. § 1.3), révélant un squelette original de phénylcoumarine. Afin d'isoler d'autres molécules de l'extrait appartenant notamment à la même série chimique (dénommée « lépidotol »), une purification des produits minoritaires a été mise en œuvre.

1.2.2. Fractionnement de l'extrait

L'extraction des fruits de *M. lepidota*, au départ réalisée en vue d'effectuer le criblage biologique et l'analyse déréplivative du panel d'extraits de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae*, avait permis d'obtenir 1 g d'extrait à partir de 3 g de matériel végétal. Nous avons ainsi choisi, dans un premier temps, de travailler sur cet extrait (Extrait 1) pour isoler les principaux autres constituants présents (**Figure 48**).

Dans un second temps, une nouvelle extraction sous pression a été réalisée afin de disposer d'une plus grande quantité d'extrait à travailler pour l'isolement d'autres composés. Pour cela, nous avons engagé la quasi-totalité des fruits restants de notre échantillon de départ, soit 19,3 g. L'extraction par le dichlorométhane puis par le méthanol a permis d'obtenir 5,2 g d'extrait DCM et 2,3 g d'extrait MeOH, soit des rendements de 26,9 % et 11,9 %, semblables à ceux obtenus lors de la première extraction (**Tableau 12**). L'analogie des profils chromatographiques (HPLC-UV-DAD) entre les extraits issus des deux extractions a également été vérifiée. L'extrait DCM (Extrait 2) ainsi obtenu a fait l'objet d'un fractionnement pour l'identification de molécules plus minoritaires (**Figure 48**).

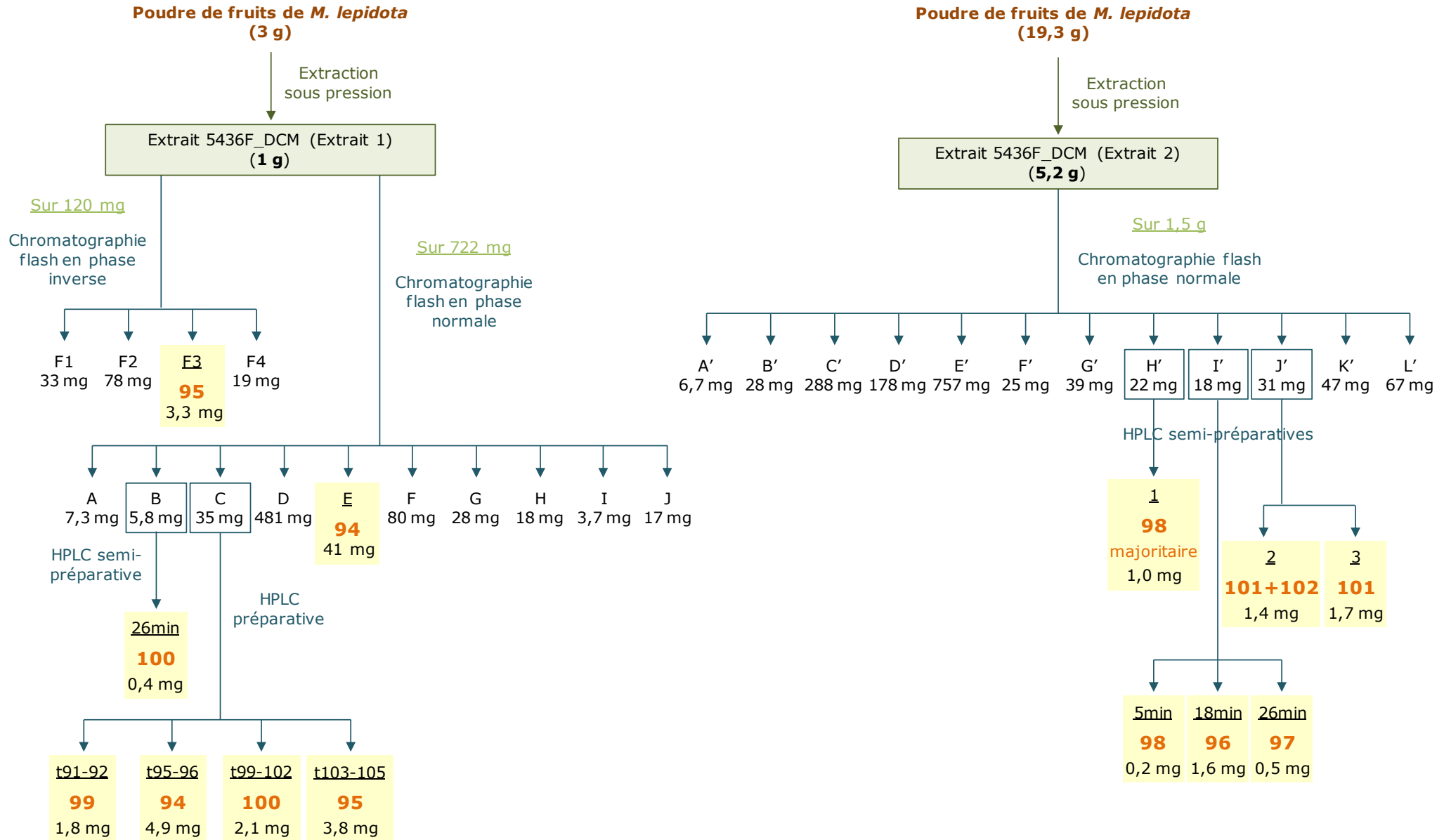


Figure 48. Schémas de fractionnement des extraits DCM de fruits de *M. lepidota* et molécules isolées

a) Fractionnement de l'extrait DCM issu de la 1^{ère} extraction (Extrait 1)

Deux purifications ont été conduites sur l'extrait de départ, une première visant à isoler le second produit majoritaire (**95**) de l'extrait, et une seconde pour isoler des produits plus minoritaires.

❖ Purification du second produit majoritaire de l'extrait

Le composé **95** étant relativement bien séparé des autres sur le chromatogramme HPLC (**Figure 49**), nous avons choisi de le purifier par chromatographie flash en phase inverse. Le lépidotol B (**95**) a ainsi été obtenu pur dans l'une des fractions (F3), tandis qu'une fraction voisine (F2) renfermait en majorité le lépidotol A (**94**), composé prépondérant dans l'extrait.

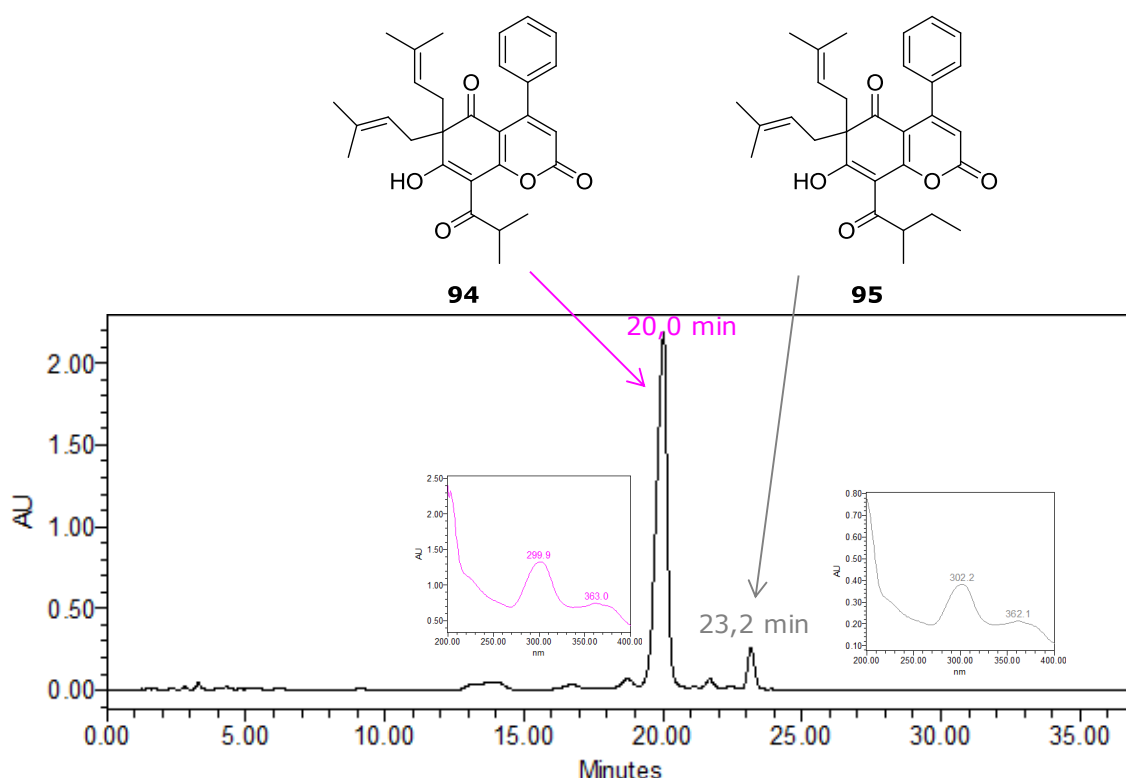


Figure 49. Profil HPLC-UV (280 nm, méthode 2) de l'extrait 5436F_DCM mettant en évidence les deux composés majoritaires, les lépidotols A (94) et B (95)

❖ Purification d'une autre série de coumarines

Une chromatographie flash en phase normale, menée sur une plus grande quantité d'extrait, a permis de purifier une partie du lépidotol A (**94**, fraction E). De deux autres fractions issues de la même chromatographie flash, les composés **99** et **100** ont pu être isolés après HPLC (semi-) préparative. Les lépidotine A (**99**) et lépidotine B (**100**) constituent elles aussi une nouvelle série de coumarines de type mammea. (**Figure 50**)

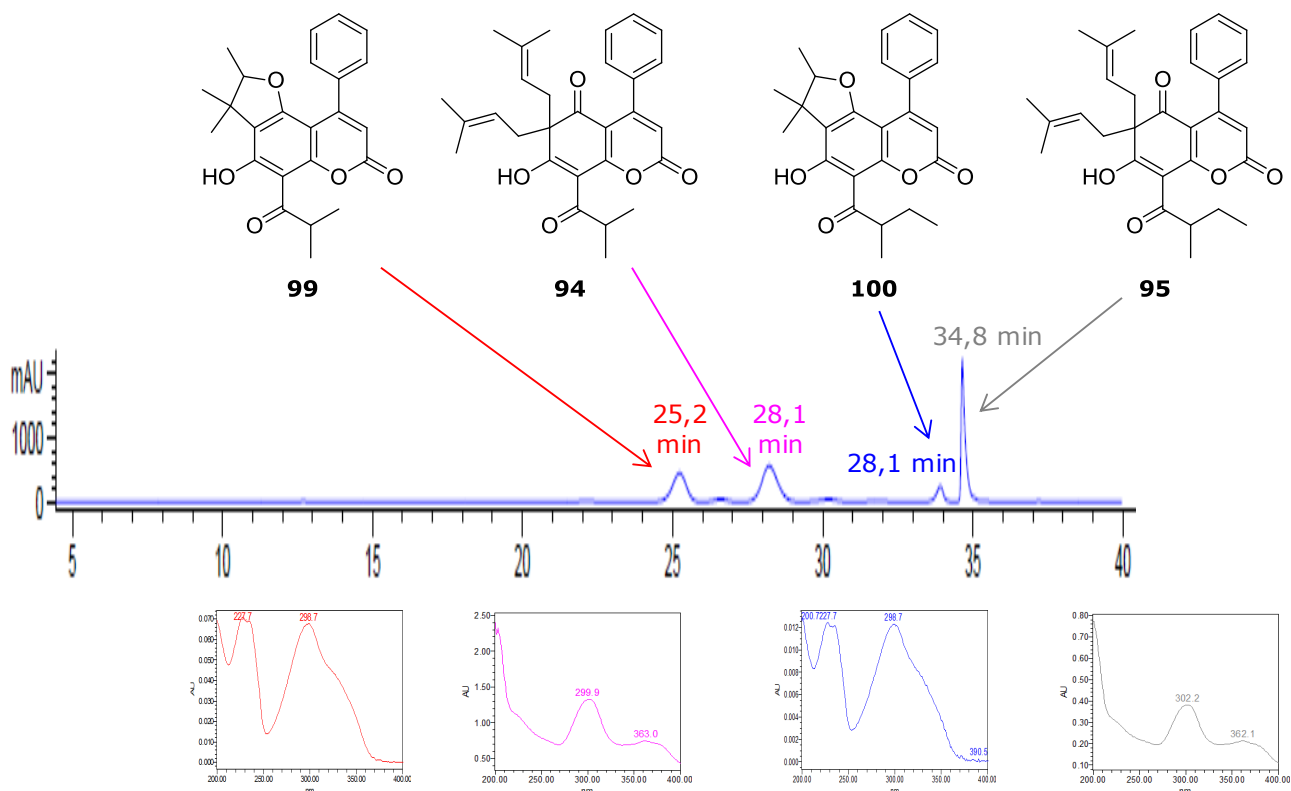


Figure 50. Chromatogramme HPLC-UV (301 nm, méthode 3) de la fraction C de 5436F_DCM et composés en ayant été isolés

b) Fractionnement de l'extrait DCM issu de la 2nde extraction (Extrait 2)

Le second extrait DCM, de 5,2 g, a été en partie fractionné par chromatographie flash en phase normale. Après analyse des fractions par HPLC, un fractionnement a été pratiqué sur 3 d'entre elles par HPLC semi-préparative, en vue d'isoler d'autres molécules appartenant à la série des lépidotols (**94** et **95**) d'après leur spectre UV, ainsi que des composés d'une autre série de coumarines de type mammea. De petites quantités de lépidotols C (**96**), D (**97**) et E (**98**) ont ainsi été purifiées de la fraction I', tandis que les composés déjà connus mammea A/OB (**101**) et mammea A/OC (**102**) ont été obtenus à partir de la fraction J' (**Figure 51**).

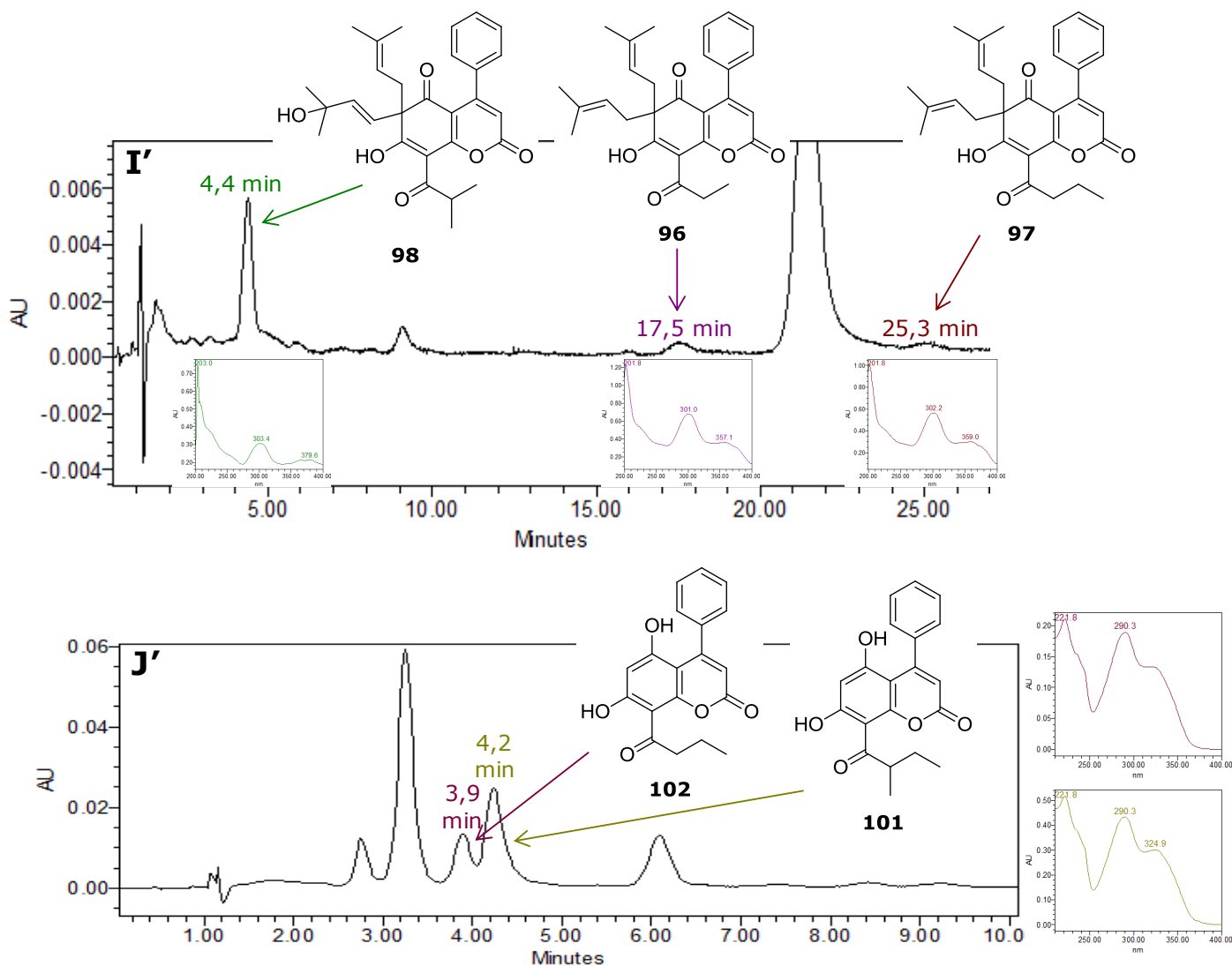


Figure 51. Chromatogrammes (expansions) HPLC-UV (280 nm, méthode 4) des fractions I' et J' de 5436F_DCM et composés en ayant été isolés

1.3. Détermination structurale des composés isolés

La structure des produits isolés a été déterminée grâce aux données de spectrométrie de masse, UV, et de résonance magnétique nucléaire mono- et bidimensionnelle. Une hypothèse de biosynthèse, mettant en lien plusieurs produits isolés, a également été proposée, appuyée par la détermination des configurations absolues des carbones asymétriques.

1.3.1. Elucidation structurale des phénylcoumarines isolées

a) Série des lépidotols (94 à 98)

L'analyse structurale des 5 composés présentant un spectre UV atypique pour des coumarines de type mammea⁴, caractérisé par des λ_{max} aux alentours de 230, 300 et 360 nm, et comprenant le produit majoritaire de l'extrait DCM de fruits de *M. lepidota*, est détaillée ici.

❖ **Composé majoritaire de l'extrait : lépidotol A (94)**

Le composé **94** a été isolé sous la forme d'un solide jaune. Son spectre de masse haute résolution en électrospray (HRESIMS), en mode d'ionisation positive, montre un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 461,2324, indiquant la formule brute $C_{29}H_{32}O_5$.

Dans le solvant des conditions HPLC (mélange eau acide / méthanol), le spectre UV montre des bandes d'absorption à 223 (épaulement), 300 et 363 nm. L'enregistrement dans le MeOH révèle quant à lui des λ_{max} à 226, 298 et 392 nm, confirmant un déplacement bathochrome par rapport aux bandes d'absorption caractéristiques des coumarines de type mammea (220-230, 280-290 et 330-370 nm)⁴.

Le spectre de RMN 1H (**Figure 52**) indique la présence d'un hydroxyle fortement chélaté à δ_H 18,87 ppm (1H, s, OH-7). Les signaux de 5 protons aromatiques à δ_H 7,39 (3H, m, H-3' à H-5') et 7,15 ppm (2H, dd, $J = 7,9$ et $1,4$ Hz, H-2' et H-6'), ainsi que le singulet à δ_H 5,94 ppm, typique du proton d'une α -pyrone (H-3), orientent vers une structure de 4-phénylcoumarine^{5,6}. Ceci est confirmé en RMN ^{13}C (**Figure 53**) par les signaux caractéristiques du phényle monosubstitué à δ_C 138,5 (C-1'), 128,8 (C-4', *para*), 128,1 (C-3' et C-5', *meta*) et 126,9 (C-2' et C-6', *ortho*), deux atomes de carbone éthyléniques à δ_C 110,8 (C-3) et 157,9 ppm (C-4), et une α -pyrone à δ_C 158,6 ppm (C-2).

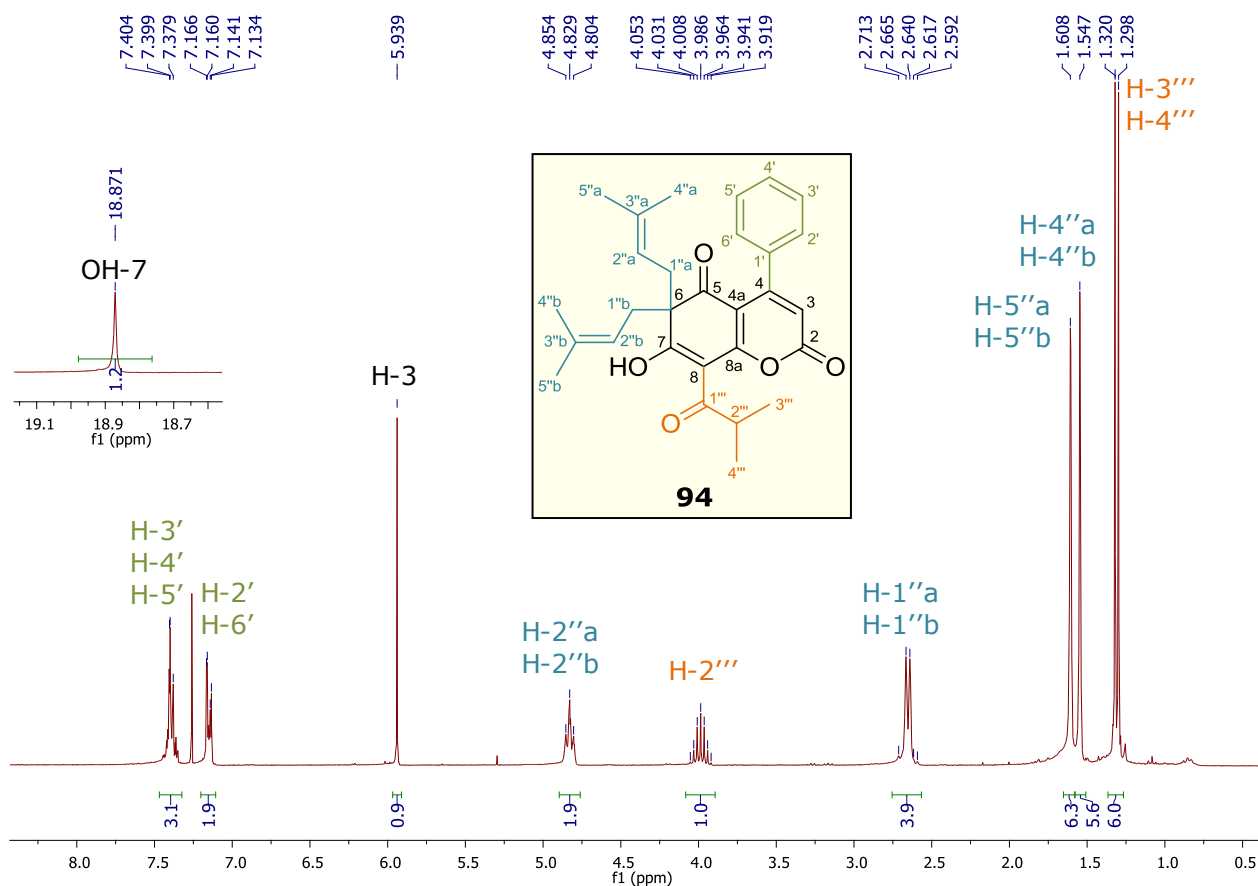


Figure 52. Spectre de RMN 1H (zones de δ 0,5-8,5 ppm et 18,6-19,1 ppm) du composé **94 (300 MHz, $CDCl_3$)**

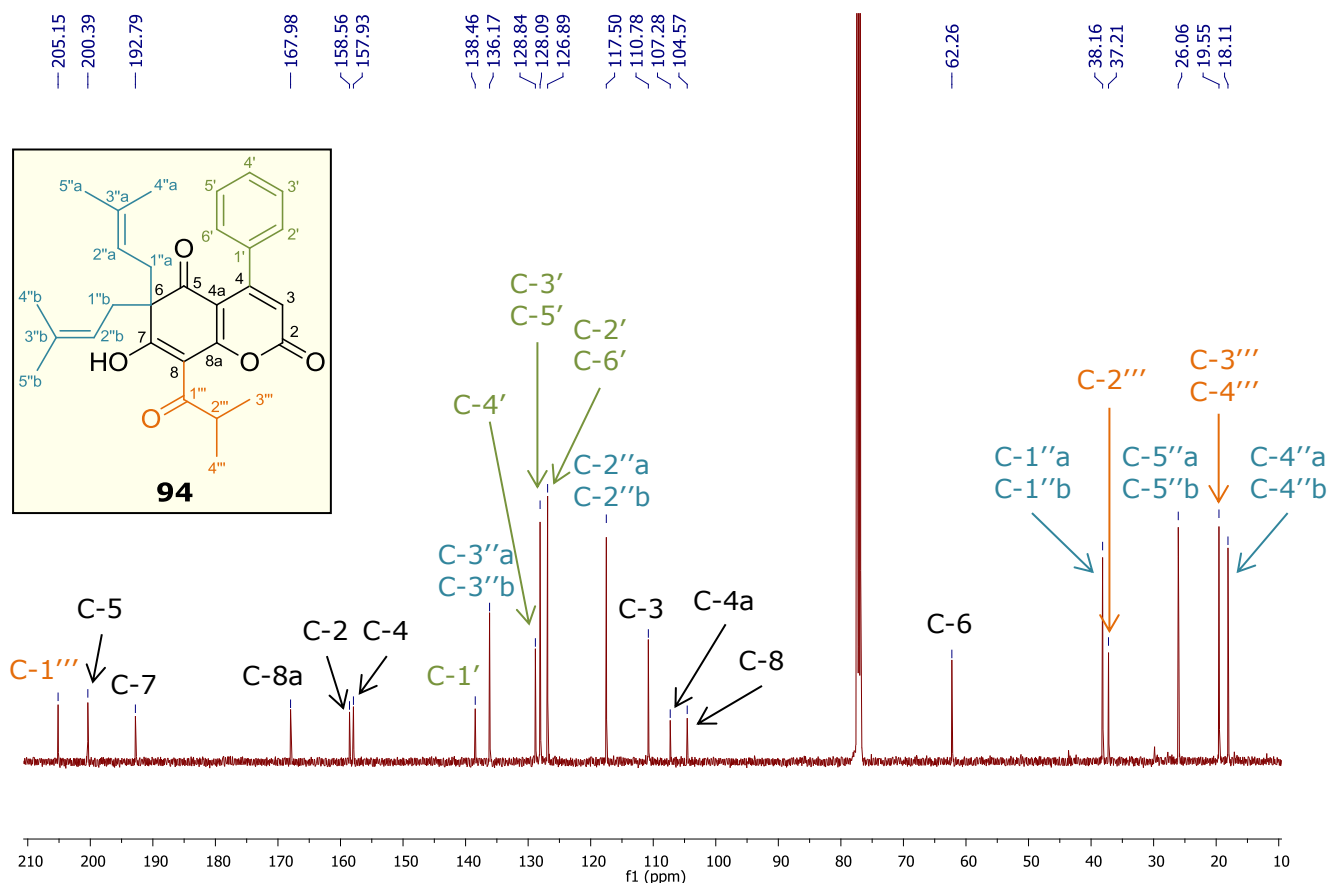


Figure 53. Spectre de RMN ^{13}C (δ de 10 à 210 ppm) du composé 94 (125 MHz, CDCl_3)

Sur le spectre de masse ESI- MS^2 (mode négatif) (Figure 54), l'ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ donne les ions fils $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_9]^-$ à m/z 390 et $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_9-\text{C}_3\text{H}_7]^-$ à m/z 347, ce qui suggère la présence de groupements prényle (69 Da)⁷ et isopropyle (43 Da)⁸ dans la molécule.

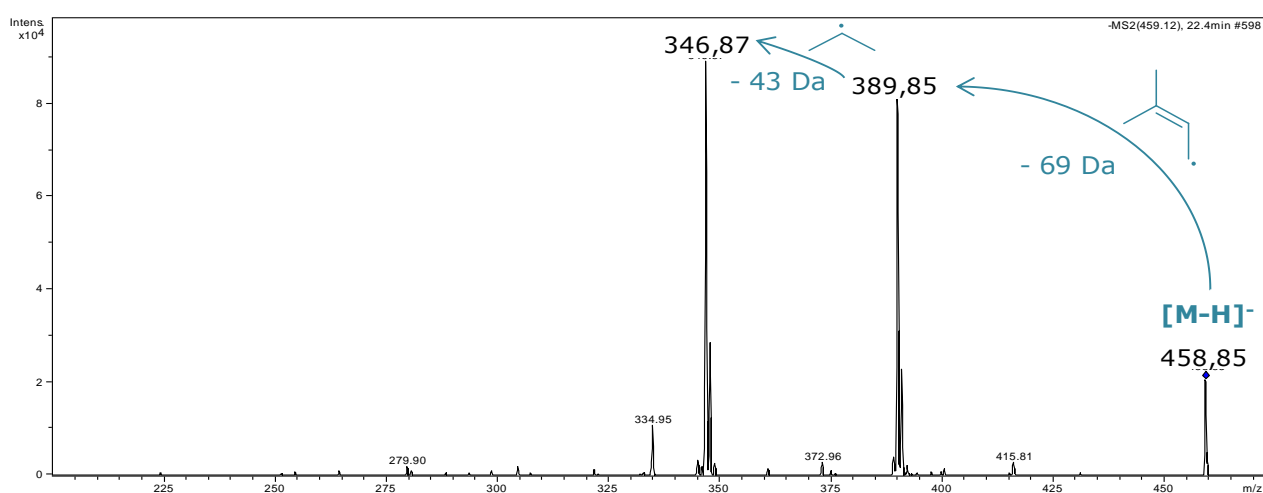


Figure 54. Spectre de masse (ESI) - MS^2 du composé 94

Les signaux caractéristiques de deux chaînes prényles sont observés en RMN ^1H , avec deux protons vinyliques à δ_{H} 4,83 ppm (t, $J = 7,5$ Hz, H-2''a et H-2''b), quatre protons méthyléniques à δ_{H}

2,64 ppm (m, H-1''a et H-1''b) et quatre groupements méthyles à δ_H 1,61 (6H, s, Me-5''a et Me-5''b) et 1,55 ppm (6H, s, Me-4''a et Me-4''b)⁹. Sur le spectre HMBC, une corrélation longue distance entre le carbone à δ_C 62,3 ppm et les protons H-1''a et H-1''b suggère que les deux chaînes prényles sont portées par le même atome de carbone, à savoir C-6. La proximité spatiale déduite du spectre NOESY entre les protons des méthyles à δ_H 1,61 ppm (Me-5''a et Me-5''b) et les protons vinyliques à δ_H 4,83 ppm (H-2''a et H-2''b) indique qu'ils sont en configuration *cis* les uns par rapport aux autres. (**Figure 55**)

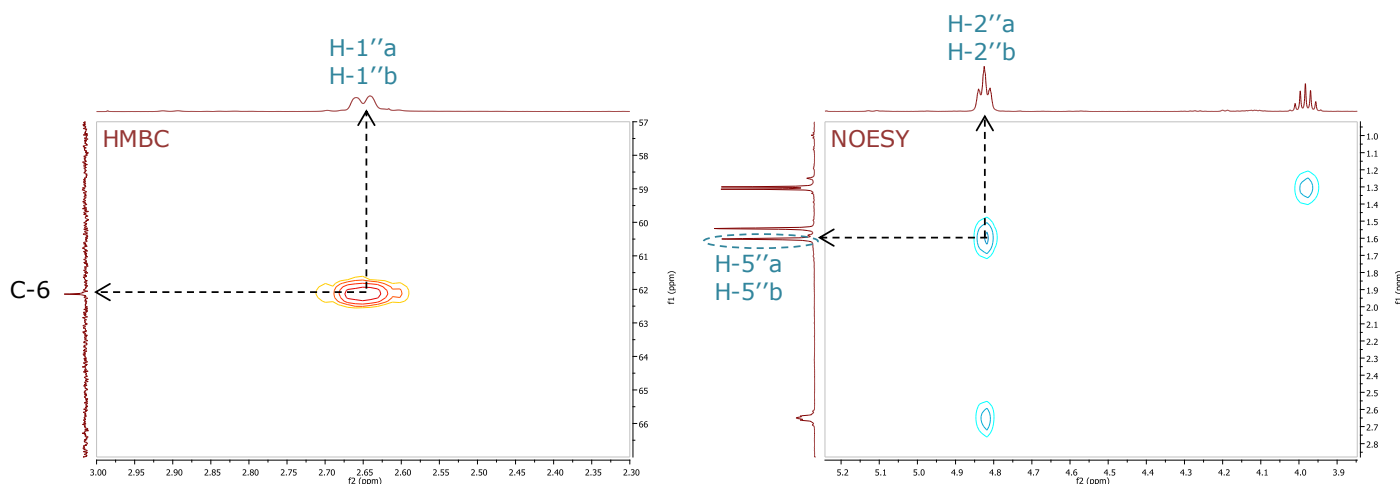


Figure 55. Expansions des spectres HMBC et NOESY (400 et 500 MHz, CDCl₃) du composé 94

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C présentent également les signaux caractéristiques d'une chaîne isobutyryle avec deux groupements méthyles à δ_H 1,31 ppm (6H, d, $J = 6,7$ Hz, Me-3''' et Me-4'''), un proton méthylénique à δ_H 3,99 ppm (1H, hept, $J = 6,7$ Hz, H-2''') et une cétone à δ_C 205,2 ppm (C-1''')¹⁰.

D'après leur origine biosynthétique¹¹, les phénylcoumarines de type mammea sont oxygénées en positions 5 et 7. L'hydroxyle à δ_H 18,87 ppm se trouve donc en position 5 ou en position 7, tandis que les positions 6 et 8 sont occupées par le motif *gem*-diprényle ou la chaîne acyle. Le spectre HMBC (**Figure 56**) montre une corrélation entre l'hydroxyle chélaté et la cétone à δ_C 205,2 ppm (C-1'''), ce qui suppose que cet hydroxyle et la chaîne acyle sont situés sur des positions voisines. Ainsi, deux structures sont possibles à ce stade de l'identification du composé **94** (**Figure 57**).

L'hydroxyle chélaté corrèle en outre avec les atomes de carbone à δ_C 62,3 (C-6), 104,6 (C-8) et 200,4 ppm (C-5) (**Figure 56**), ce qui oriente plutôt vers la structure **a** de la **Figure 57**. Celle-ci correspond à une 4-phénylcoumarine 6-*gem*-diprénylée et 8-acylée, présentant un équilibre tautomérique déplacé vers la forme β -énol-céto en solution dans CDCl₃.

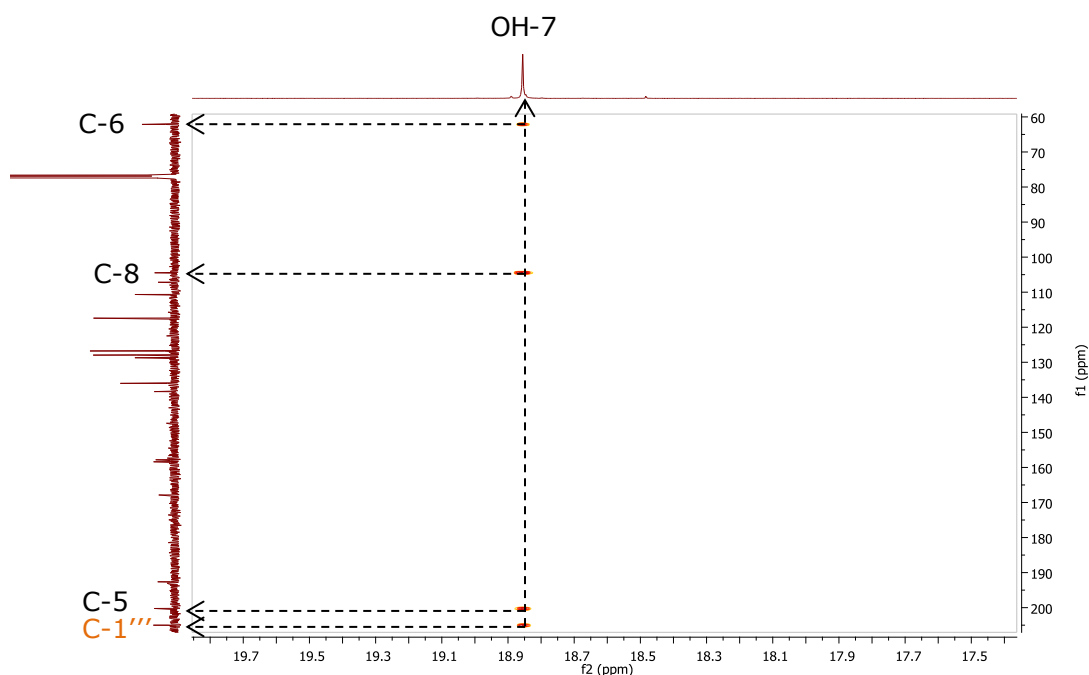


Figure 56. Corrélations observées en HMBC pour l'hydroxyle chélaté (400 MHz, CDCl_3)

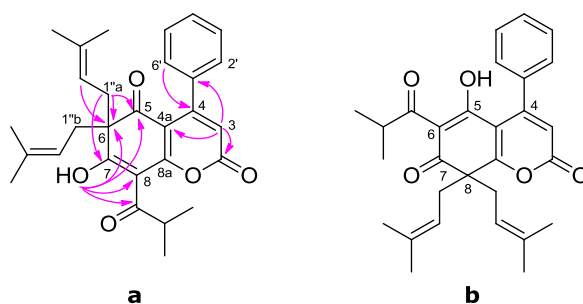


Figure 57. Hypothèses a et b de structure du composé **94** et principales corrélations HMBC indiquées sur la structure a

Le composé **94** ayant cristallisé sous forme d'aiguilles jaunes dans MeOH-d_4 , il a pu être analysé par diffraction des rayons X, ce qui a permis de valider l'hypothèse structurale **a**. Sous forme cristallisée, la dicétone du composé apparaît cependant sous la forme β -cétone-énole (**Figure 58**).

Les valeurs de déplacements chimiques de C-4, C-4a et C-7 ont été attribuées d'après les corrélations du spectre HMBC. Ainsi, l'observation d'une corrélation longue distance entre le proton à δ_{H} 5,94 ppm (H-3) et un atome de carbone à δ_{C} 107,3 ppm permet de localiser ce dernier en C-4a. Les protons H-2' et H-6' (δ_{H} 7,15 ppm) corrélient avec l'atome de carbone à 157,9 ppm (C-4), et les protons H-1'a et H-1'b (δ_{H} 2,64 ppm) des chaînes prényles corrélient avec l'atome de carbone sp^2 déblindé à δ_{C} 192,8 ppm (C-7). Enfin, le signal à δ_{C} 168,0 ppm a par déduction été attribué à la position 8a (**Figure 59**).

Les spectres de RMN 1D et 2D du lépidotol A (**94**) sont répertoriés dans l'**Annexe 6**.

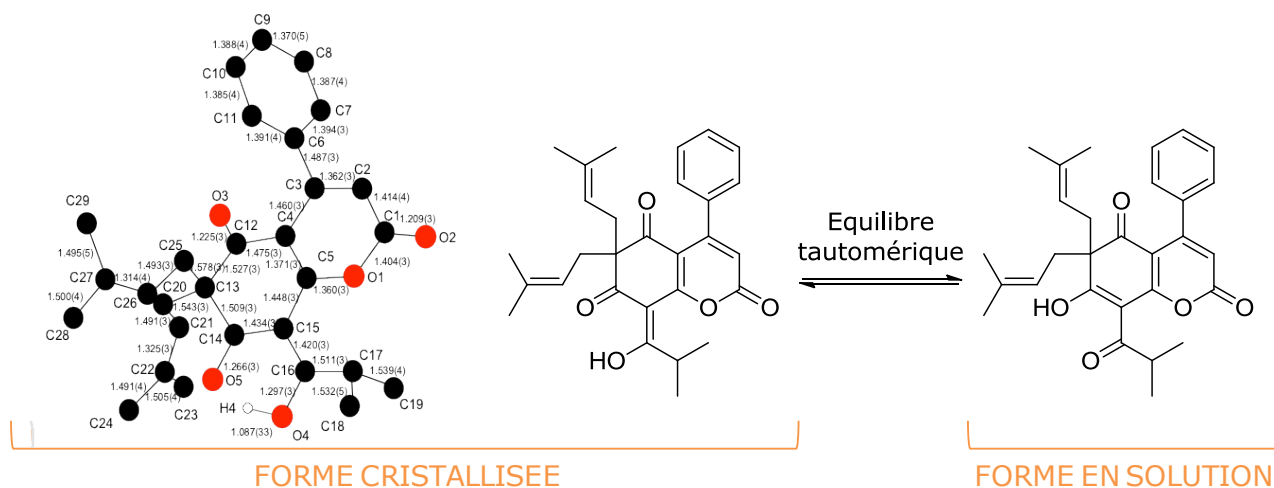


Figure 58. Structure du composé **94** identifiée par cristallographie aux rayons X, et équilibre tautomérique de la β -dicétone

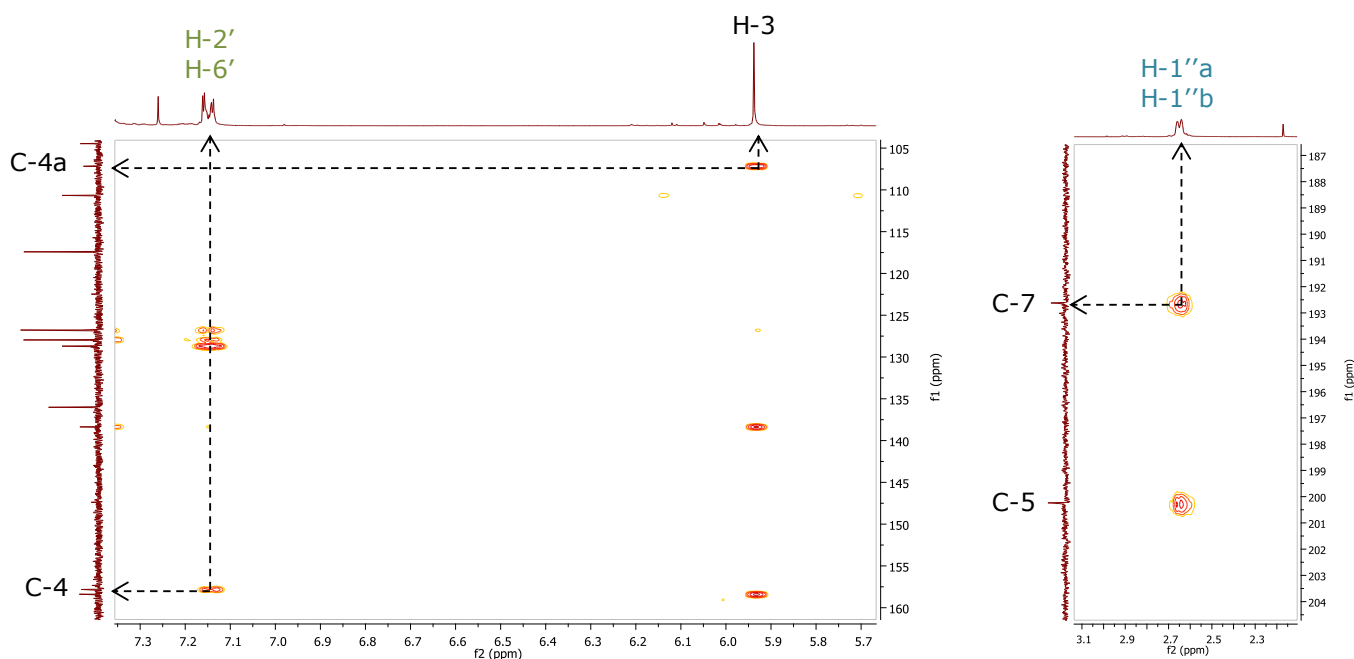


Figure 59. Expansions du spectre HMBC pour l'attribution des δ de C-4, C-4a et C-7

Le composé **94** ainsi identifié a été nommé lépidotol A, du nom de l'espèce de laquelle il a été isolé, *Mesua lepidota*. Il s'agit de la première 4-phényl-6,6-dialkylcoumarine naturelle mise en évidence. On note cependant l'existence d'autres phénylcoumarines diprénylées, telles que le calofloride (**103**), isolé des graines de *Calophyllum verticillatum*¹², et dont la structure présente un motif *gem*-diprénylé en position 8 et un groupement méthylbutyryle en position 6 (**Figure 60**).

Par ailleurs, nous pouvons suggérer que le mammea A/BD (ou isomesuol **104**) est un intermédiaire de synthèse du lépidotol A (**94**), l'étape manquante consistant en une seconde prénylation de la position 6. Ce composé (**104**) a été isolée de *Mammea harmandii*¹⁰, tandis que son isomère, mammea A/AD (ou mesuol **61d**), anti-oxydant et immunomodulateur, a été isolé de *Mesua ferrea*¹³. (**Figure 60**)

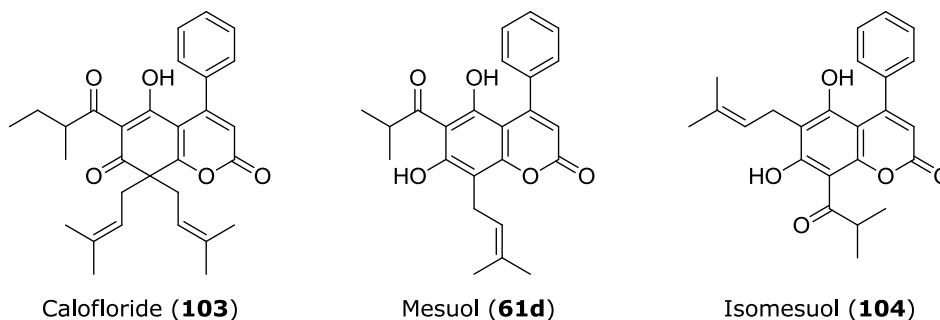


Figure 60. Structures des composés structurellement proches du lépidotol A (94)

❖ Lépidotol B (95)

Le produit **95** a été isolé sous la forme de cristaux jaunes, présentant un pouvoir rotatoire positif ($[\alpha]_D^{21} = +12$) dans le CHCl_3 à la concentration c de 0,1 g/100 mL. L'ion pseudomoléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ à m/z 473,2312 observé sur le spectre HRESIMS indique la formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_5$. La différence de 14 Da avec le lépidotol A (**94**) évoque la présence d'un groupement méthylène supplémentaire sur la molécule **95**.

Le spectre UV de **95** présente les mêmes bandes d'absorption que le lépidotol A (**94**), ce qui implique que les deux molécules possèdent le même squelette de coumarine.

Cependant, les spectres de RMN ^1H (Figure 61) et ^{13}C (Annexe 7) de **94** et de **95** se distinguent par la présence d'un groupement méthine déblindé [δ_{H} 3,81 ppm (sext, $J = 7,0$ Hz, H-2''') ; δ_{C} 43,5 ppm (C-2''')], d'un groupement méthylène [δ_{H} 1,87 (1H, sext, $J = 7,0$ Hz, H-3''') et 1,55 ppm (1H, m, H-3''') ; δ_{C} 27,6 ppm (C-3''')], et de deux groupements méthyles [δ_{H} 1,00 ppm, t, $J = 7,0$ Hz ; δ_{C} 11,7 ppm (Me-4'''), et δ_{H} 1,30 ppm, d, $J = 7,0$ Hz ; δ_{C} 17,0 ppm (Me-5''')]. Les corrélations observées en HMQC, HMBC (Annexe 7) et COSY (Figure 62) entre ces différents groupements confirment que le substituant acyle est une chaîne 2-méthylbutyryle.

Les autres signaux et corrélations observés en RMN étant identiques à ceux du lépidotol A (**94**), on en déduit la structure présentée en Figure 61. Cette nouvelle phénylcoumarine a été nommée lépidotol B (**95**).

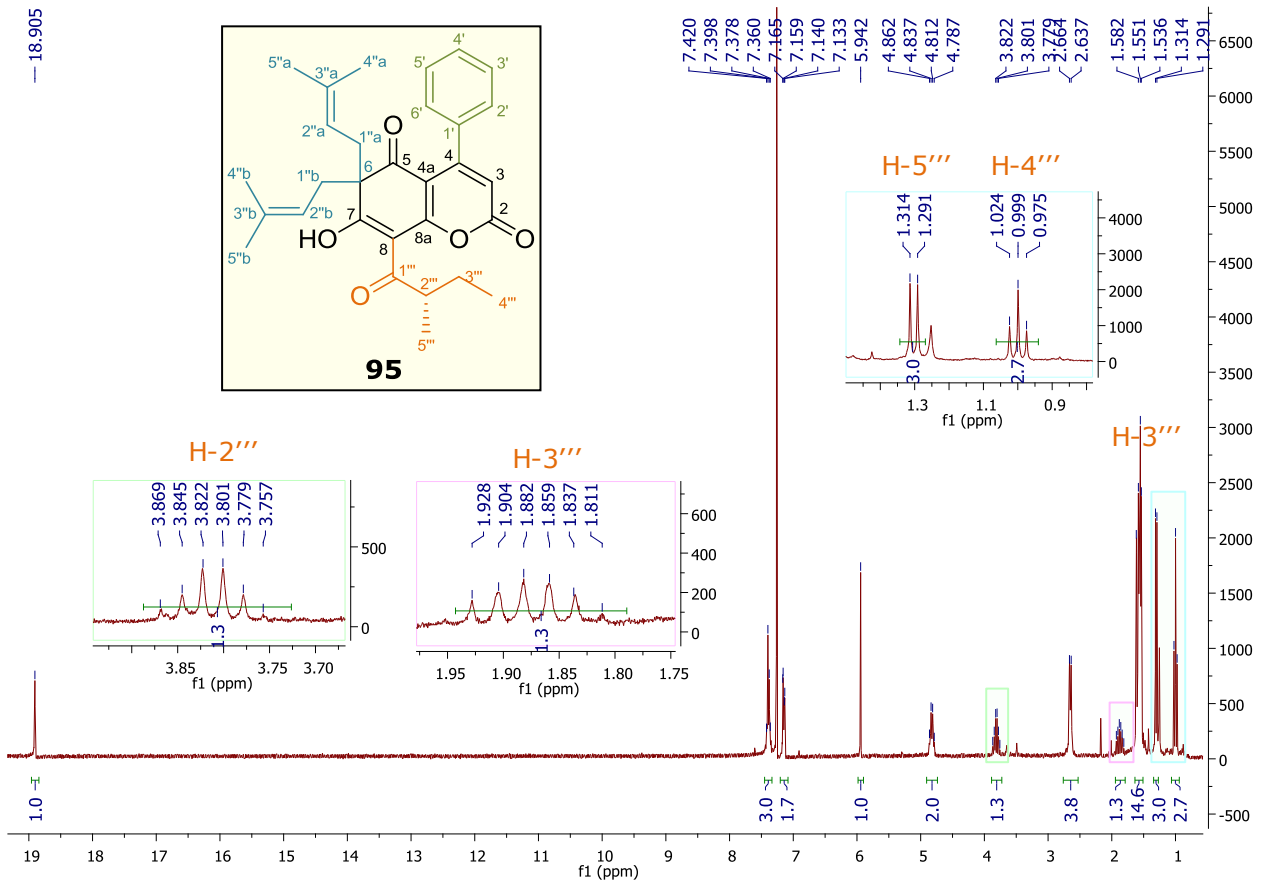


Figure 61. Structure et spectre de RMN ^1H du composé 95, avec expansions sur les signaux de la chaîne 2-méthylbutyryle (300 MHz, CDCl_3)

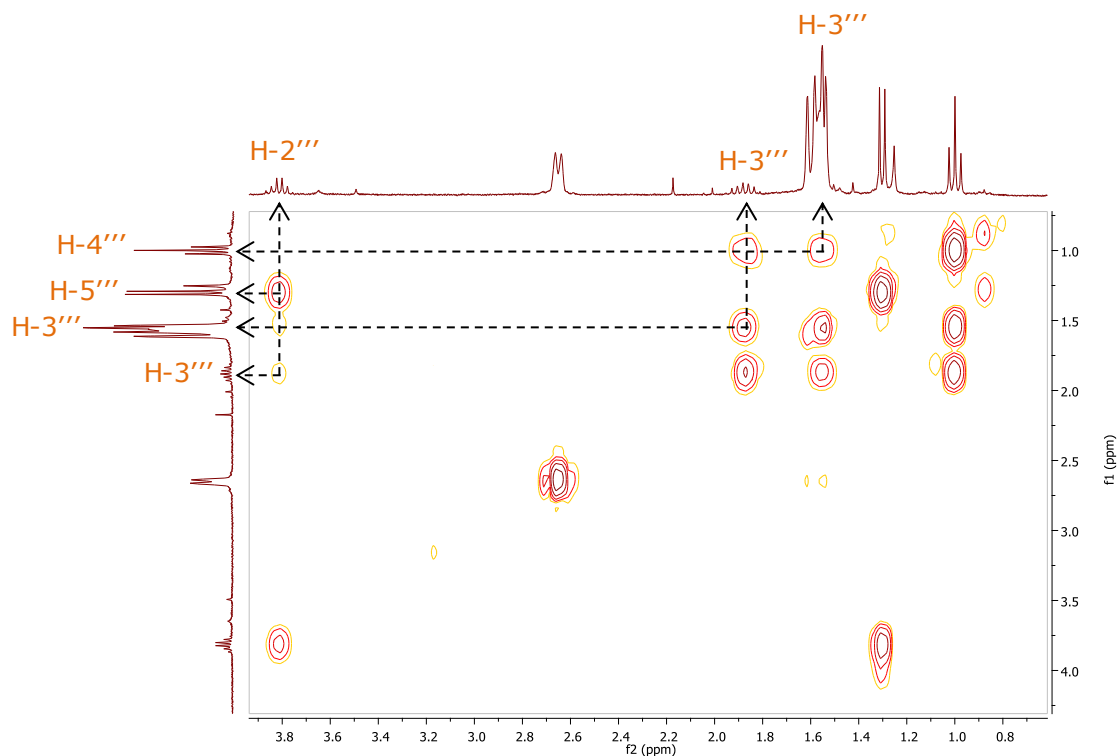


Figure 62. Expansion du spectre COSY sur les signaux de la chaîne acyle du composé 95 (500 MHz, CDCl_3)

❖ Lépidotol C (96)

Le composé **96**, isolé sous forme de poudre jaune, a pour formule brute $C_{28}H_{30}O_5$ d'après son spectre de masse haute HRESI⁻ ($[M-H]^-$ à m/z 445,2026).

Une comparaison des spectres de RMN 1H et ^{13}C avec ceux des molécules **94** et **95** montre que le composé **96** est également une 4-phényl-6,6-dialkylcoumarine, différant des deux autres par sa chaîne acyle en position 8. Celle-ci consiste en une 1-propanone caractérisée par les déplacements chimiques suivants : δ_H 3,26 ppm (2H, q, $J = 7,2$ Hz) ; δ_C 34,5 ppm (C-2''') et δ_H 1,30 ppm (3H, t, $J = 7,2$ Hz) ; δ_C 9,1 ppm (C-3''') (**Figure 63**). L'ensemble de la structure, nommée lépidotol C (**96**), a été validé par des expériences de COSY, HMQC et HMBC (**Annexe 8**).

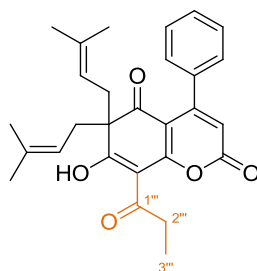


Figure 63. Structure du composé 96

❖ Lépidotol D (97)

La spectrométrie de masse HRESI⁻ montre la présence d'un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 459,2182 pour le composé **97**, correspondant à la formule brute $C_{29}H_{32}O_5$.

Comme pour les deux molécules précédentes (**95** et **96**), seule une différence au niveau du substituant acyle a été observée sur les spectres de RMN 1H et ^{13}C (**Annexe 9**) en comparaison avec le lépidotol A (**94**). En effet, c'est une chaîne 1-butanone qui a ici été identifiée en position 8, avec les valeurs de déplacements chimiques décrits sur la **Figure 64**. Ce quatrième nouveau dérivé de phénylcoumarine a été nommé lépidotol D (**97**).

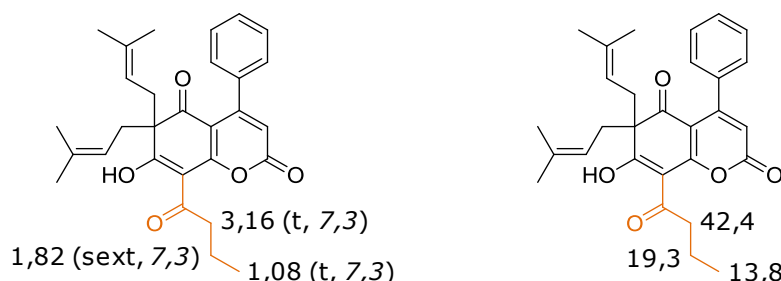


Figure 64. Structure du composé 97 et valeurs des déplacements chimiques δ (ppm) observés sur les spectres de RMN 1H et ^{13}C pour la chaîne acyle

❖ Lépidotol E (98)

La formule brute du composé **98**, $C_{29}H_{32}O_6$, a été déterminée sur la base de son spectre HRESIMS⁻ montrant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à 475,2125. Ce composé, isolé sous la forme d'une poudre jaune et optiquement actif ($[\alpha]_D^{21} = -6$, c 0,05 g/100 mL, $CHCl_3$), présente donc dans sa structure un atome d'oxygène de plus que le lépidotol A (**94**).

Sur le spectre de RMN 1H , les signaux caractéristiques d'une seule chaîne prényle sont présents. On observe également deux protons *E*-éthyléniques d'un système AB à δ_H 5,70 (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H-1''b) et 5,78 ppm (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H-2''b) (**Figure 65**). Sur le spectre HMBC, un atome de carbone sp^3 à champ faible (δ_C 70,0 ppm) corrèle avec les protons H-1''b et H-2''b, ainsi qu'avec deux groupements méthyles à δ_H 1,31 ppm (6H, m, H-4''b et H-5''b), indiquant la présence d'une chaîne 3-hydroxy-3-méthylbutényle en position 6. L'étude approfondie des spectres de COSY, HMQC et HMBC (**Annexe 10**) confirment la structure du lépidotol E (**98**, **Figure 66**), qui dérive probablement du lépidotol A (**94**) par une époxydation de l'une des chaînes prényles.

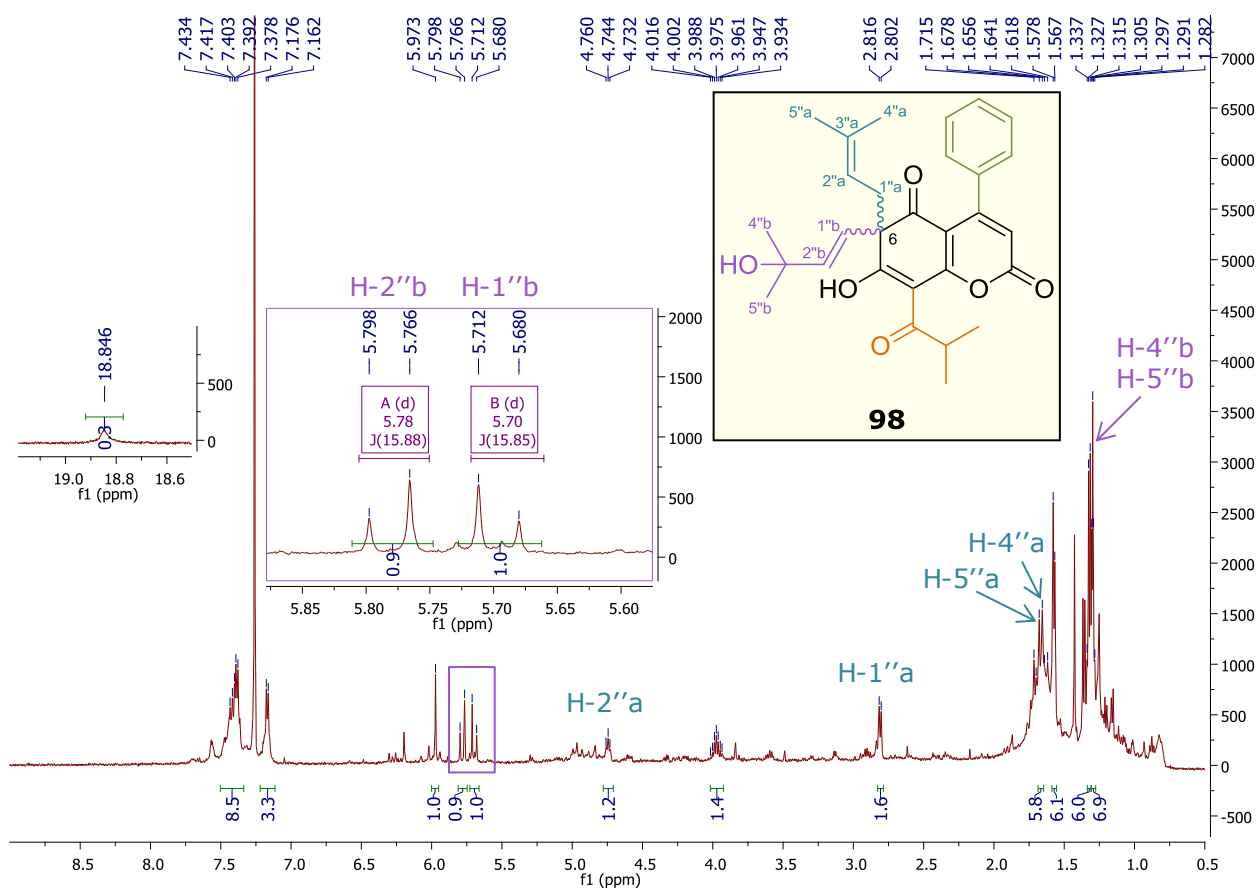


Figure 65. Signaux de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) des chaînes substituant la position 6 du composé 98

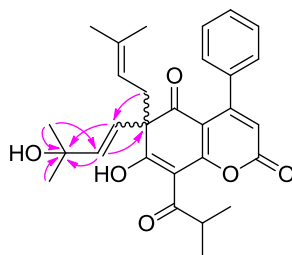


Figure 66. Structure du composé 98 et corrélations HMBC de la chaîne 3-hydroxy-3-méthylbutényle

b) Série des lépidotines (99 et 100)

❖ Lépidotine A (99)

Le composé **99**, obtenu sous la forme de poudre jaune pâle, présente un pouvoir rotatoire positif ($[\alpha]_D^{21} = +3$, c 0,1 g/100 mL, CHCl_3). L'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 393,1699 présent sur son spectre HRESIMS⁺ indique la formule brute $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_5$, correspondant à 13 degrés d'insaturations ou cycles.

Le spectre UV montre des bandes d'absorption à 225, 295 et 330 nm, caractéristiques des coumarines de type mammea. De plus, les signaux typiques des phénylcoumarines se retrouvent sur les spectres de RMN ^1H et ^{13}C , à travers un singulet à δ_{H} 6,05 ppm (H-3) porté par un atome de carbone éthylénique à δ_{C} 110,9 ppm (C-3), et les déplacements chimiques d'un groupement phényle à δ_{H} 7,40 (3H, m, H-3' à H-5') et 7,30 ppm (2H, m, H-2' et H-6'), et δ_{C} 128,8 (C-4'), 127,8 (C-3' et C-5') et 127,5 ppm (C-2' et C-6') (**Annexe 11**).

Les signaux déblindés à δ_{C} 91,5 ppm (C-2'') et à δ_{H} 4,26 ppm (1H, q, $J = 6,5$ Hz, H-2'') suggèrent une substitution par un atome d'oxygène. Les spectres COSY et HMBC indiquent de plus une substitution par un groupement méthyle à δ_{H} 1,07 ppm (3H, d, $J = 6,6$ Hz, Me-4'') sur C-2''. Un signal également déplacé vers les champs faibles (δ_{C} 43,4 ppm) pour l'atome de carbone C-3''' évoque sa proximité avec C-2'', et il existe une corrélation HMBC entre C-3''' et les protons H-4'' du groupement méthyle. Des corrélations longues distances permettent aussi d'identifier un groupement *gem*-diméthyle (C-5'''/C-6''' et C-3''') adjacent à C-2''. L'ensemble de ces éléments met ainsi en évidence une unité 4,4-diméthyl-5-méthyl-dihydrofurane (**Figure 67**). Une corrélation apparaissant sur le spectre NOESY entre H-2'' (δ_{H} 4,26 ppm) et H-6'' (δ_{H} 1,39 ppm) indique enfin que ces protons se trouvent dans le même plan par rapport au cycle dihydrofurane.

Sur le spectre HMBC, les corrélations d'un hydroxyle chélaté à δ_{H} 14,25 ppm avec les atomes de carbone à δ_{C} 164,8 (C-7), 118,2 (C-6) et 104,1 ppm (C-8) permettent de le positionner sur C-7 (**Figure 68**). Par ailleurs, comme pour le lépidotol A (**94**), les signaux caractéristiques d'une chaîne isobutyryle apparaissent sur les spectres de RMN ^1H et ^{13}C , à δ_{H} 1,29 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, Me-3'''), 1,30 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, Me-4'''), 4,10 ppm (1H, hept, $J = 6,7$ Hz, H-2''') et δ_{C} 210,8 ppm (C-1'''). Par déduction, cette chaîne acyle se trouve en position 8, ce qui est en accord avec la localisation du

cycle dihydrofurane en C-5/C-6, confirmée par une analyse HMBC resserrée montrant des corrélations entre H-2'' (δ_H 4,26 ppm) et C-5 (δ_C 161,2 ppm) et C-6 (δ_C 118,2 ppm) (**Figure 68**).

Cette nouvelle coumarine de type mammea a été appelée lépidotine A (**99**).

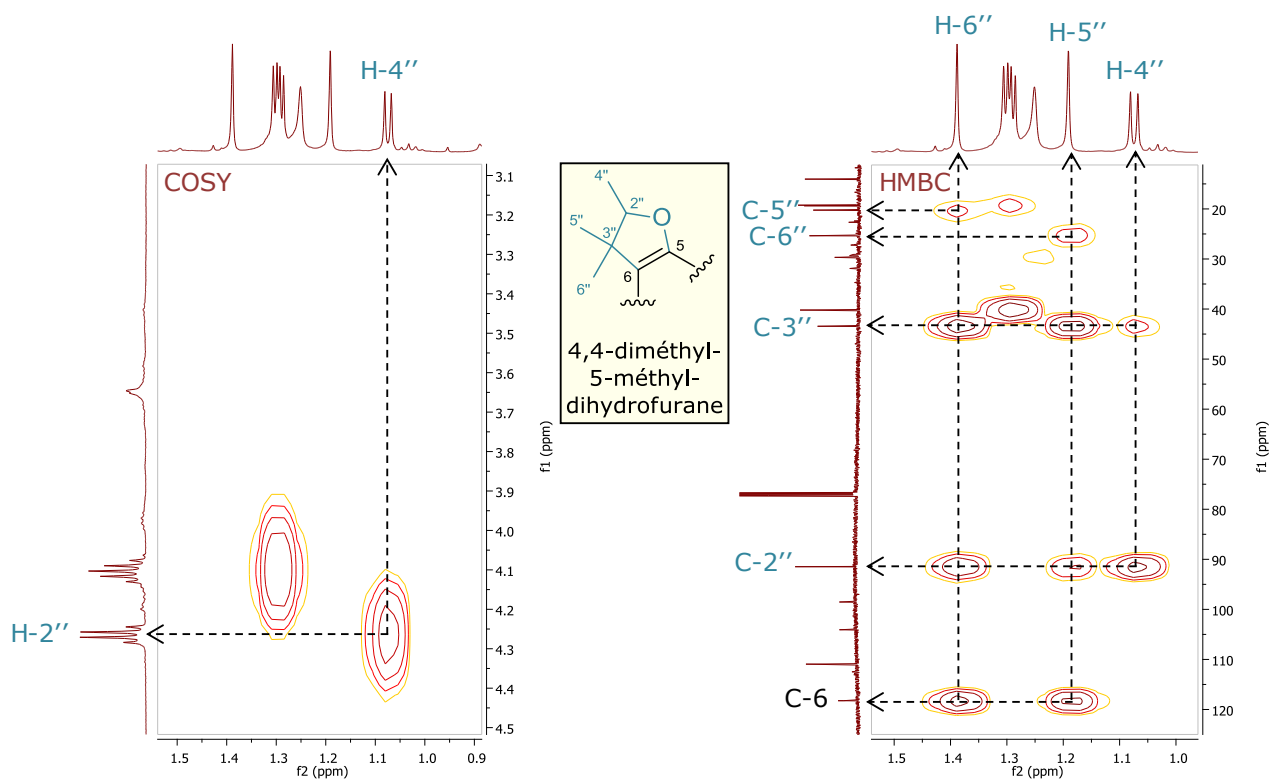


Figure 67. Corrélations COSY et HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) au niveau du cycle dihydrofurane

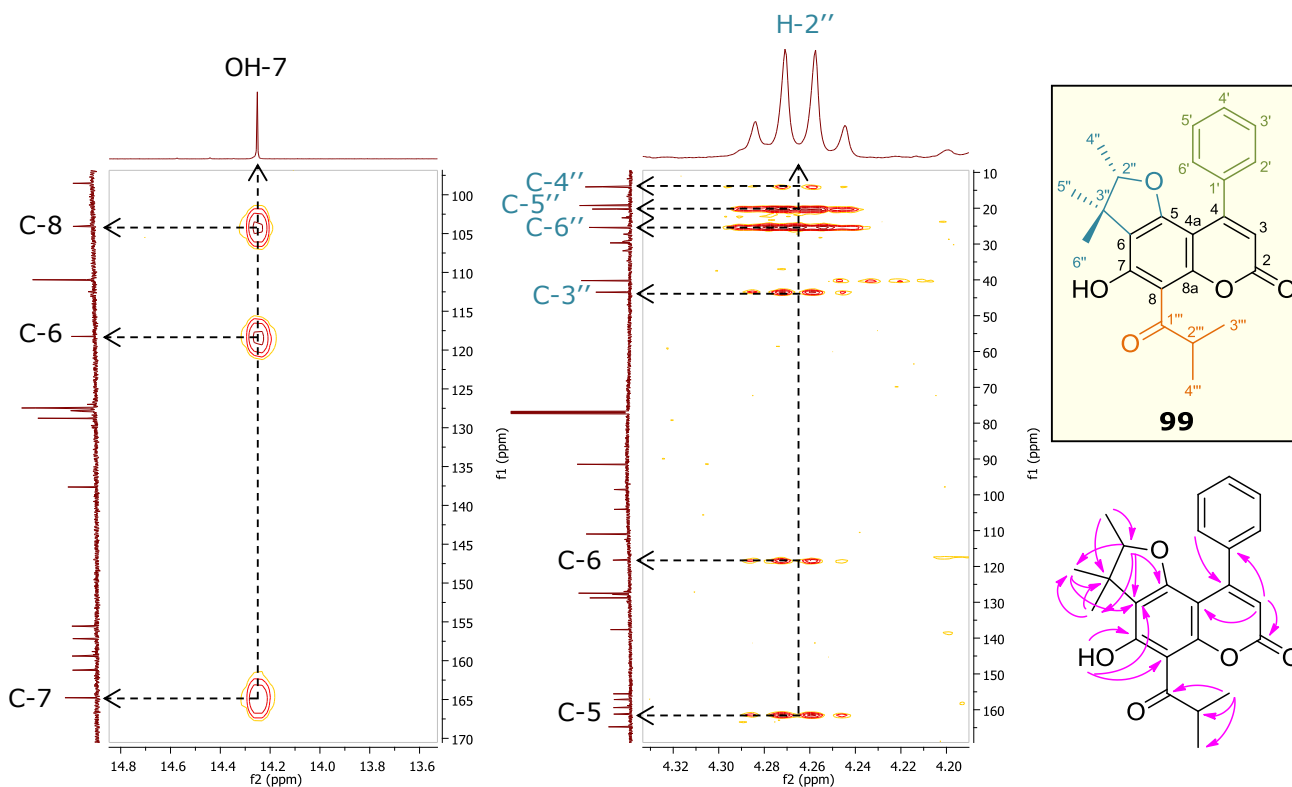


Figure 68. Structure du composé 99 et quelques corrélations des spectres HMBC

❖ Lépidotine B (100)

Le spectre de masse exacte du composé **100**, montrant un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 407,1857, permet d'établir la formule brute $C_{25}H_{26}O_5$.

Les profils des spectres UV et de RMN 1H et ^{13}C sont très proches de ceux de la lépidotine A (**99**), ce qui indique une similarité de structure. En revanche, comme nous l'avons observé pour les lépidotols A (**94**) et B (**95**), la différence de 14 Da entre les deux molécules est due à la présence d'un groupement méthylène supplémentaire dans la chaîne acyle, à δ_H 1,94 (1H, m) et 1,49 ppm (1H, m) et δ_C 27,2 ppm (C-3'''). Les signaux de cette chaîne acyle étant semblables à ceux observés pour le lépidotol B (**95**), nous en déduisons qu'il s'agit d'un groupement 2-méthylbutyryle. Les corrélations 1H - 1H et 1H - ^{13}C (**Annexe 12**) permettent d'identifier la structure de la lépidotine B (**100**, **Figure 69**), sur laquelle le substituant acyle se situe en position 8 de la coumarine, comme précédemment.

La plupart des signaux observés sur les spectres 1H (**Figure 69**) et ^{13}C apparaissent dédoublés, ce qui indique que les deux formes tautomères de la molécule sont présentes en solution dans le chloroforme. Pour tenter de favoriser l'une des deux formes, 0,1% d'acide formique ont été ajoutés à la solution, mais cela n'a entraîné aucun changement au niveau des spectres de RMN.

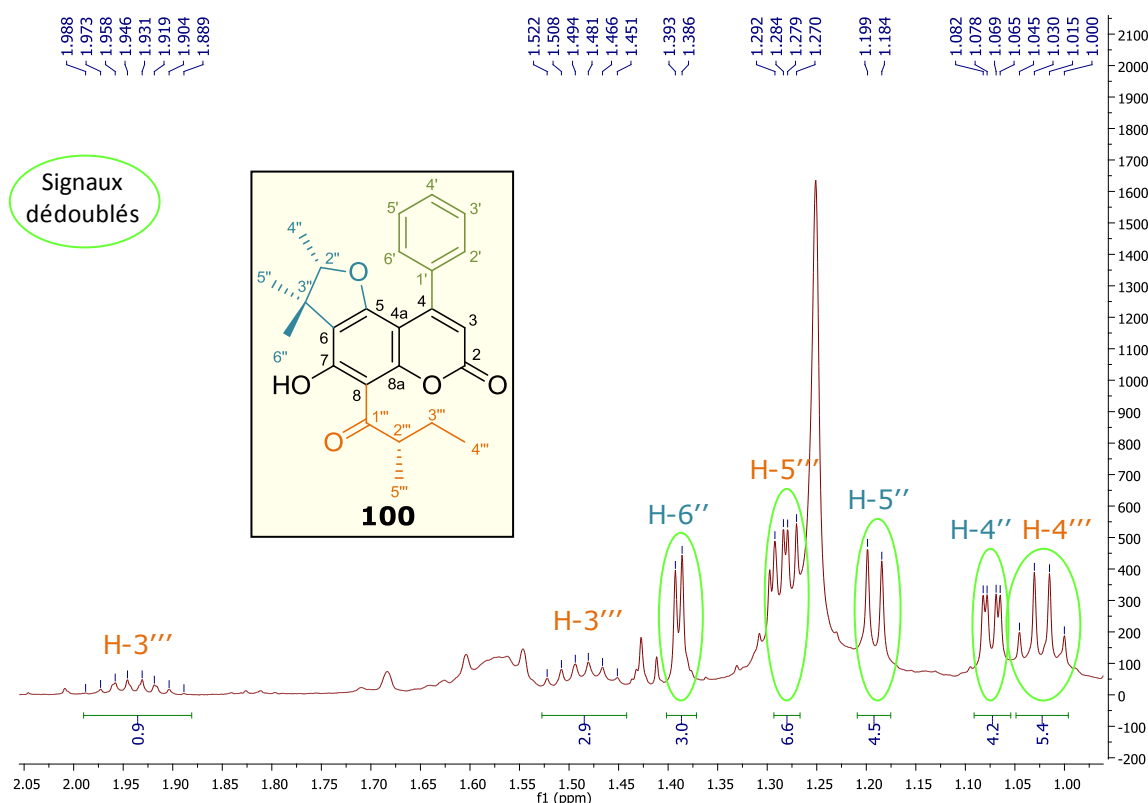


Figure 69. Structure du composé 100 et expansion de son spectre de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) au niveau des signaux dédoublés

c) Coumarines de type mammea précédemment décrites (101 et 102)

❖ Mammea A/OB (101)

Le composé **101** est identifié comme étant la 5,7-dihydroxy-8-(2-méthylbutyryl)-4-phénylcoumarine, aussi appelée mammea A/OB, par comparaison avec les données UV et de RMN ^1H de la littérature¹⁴.

Ce composé (**Figure 70**) a été obtenu lors d'une étape de synthèse des coumarines de type mammea de la série A (4-phénylcoumarines) par Crombie *et al.*¹⁴. Il est ici isolé pour la première fois d'une *Calophyllaceae*, tandis qu'il a récemment été identifié dans une espèce d'*Euphorbiaceae*¹⁵.

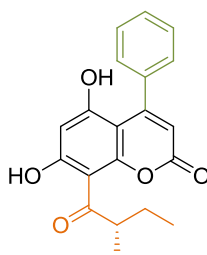


Figure 70. Structure du composé 101

❖ Mammea A/OC (102)

La 5,7-dihydroxy-8-butyryl-4-phénylcoumarine, ou mammea A/OC (**102**), est identifiée en mélange avec mammea A/OB (**101**). Les signaux de RMN ^1H et ^{13}C caractéristiques d'une chaîne butyryle, ainsi que les corrélations homo- et hétéronucléaires (**Annexe 13**), permettent d'établir la structure (**Figure 71**). Ce composé a déjà été synthétisé¹⁶ mais n'a jamais été isolé de source naturelle auparavant.

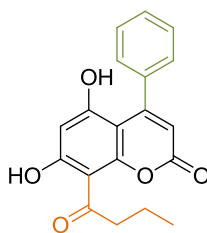


Figure 71. Structure du composé 102

1.3.2. Hypothèse de biosynthèse et détermination des stéréochimies

Les différents composés isolés des fruits de *Mesua lepidota* sont répartis en trois séries distinctes de phénylcoumarines : des structures acylées en position 8 mais non substituées en position 6 (**101** et **102**), des composés cyclisés en C-5/C-6 (lépidotines **99** et **100**), et des métabolites dialkylés en position 6 (lépidotols **94** à **98**). La présence de substituants communs sur plusieurs structures permet de proposer un schéma de biosynthèse les reliant, et faisant intervenir des réactions de C- ou O-prénylations parfois suivies de réarrangements de Claisen et de cyclisations

(**Figure 72**)^{17,18}. Toutes les alkyl- et phénylcoumarines isolées jusqu'à présent et porteuses d'un seul centre asymétrique situé au niveau du C-2 d'un groupement 2-méthyl-oxobutyle, soit mammea C/AB, C/BB, B/AB, B/BB, A/AB (**61b**) et A/BB (**62b**), présentent des pouvoirs rotatoires négatifs¹⁹. Par ailleurs, une configuration *S* peut leur est attribuée d'après une synthèse stéréospécifique de (-)-mammea B/BB²⁰. Nous avons donc affecté une configuration 2''*S* à mammea A/OB (**101**), et présumé une conservation cette dernière pour ses dérivés prénylés, le lépidotol B (**95**) et la lépidotine B (**100**).

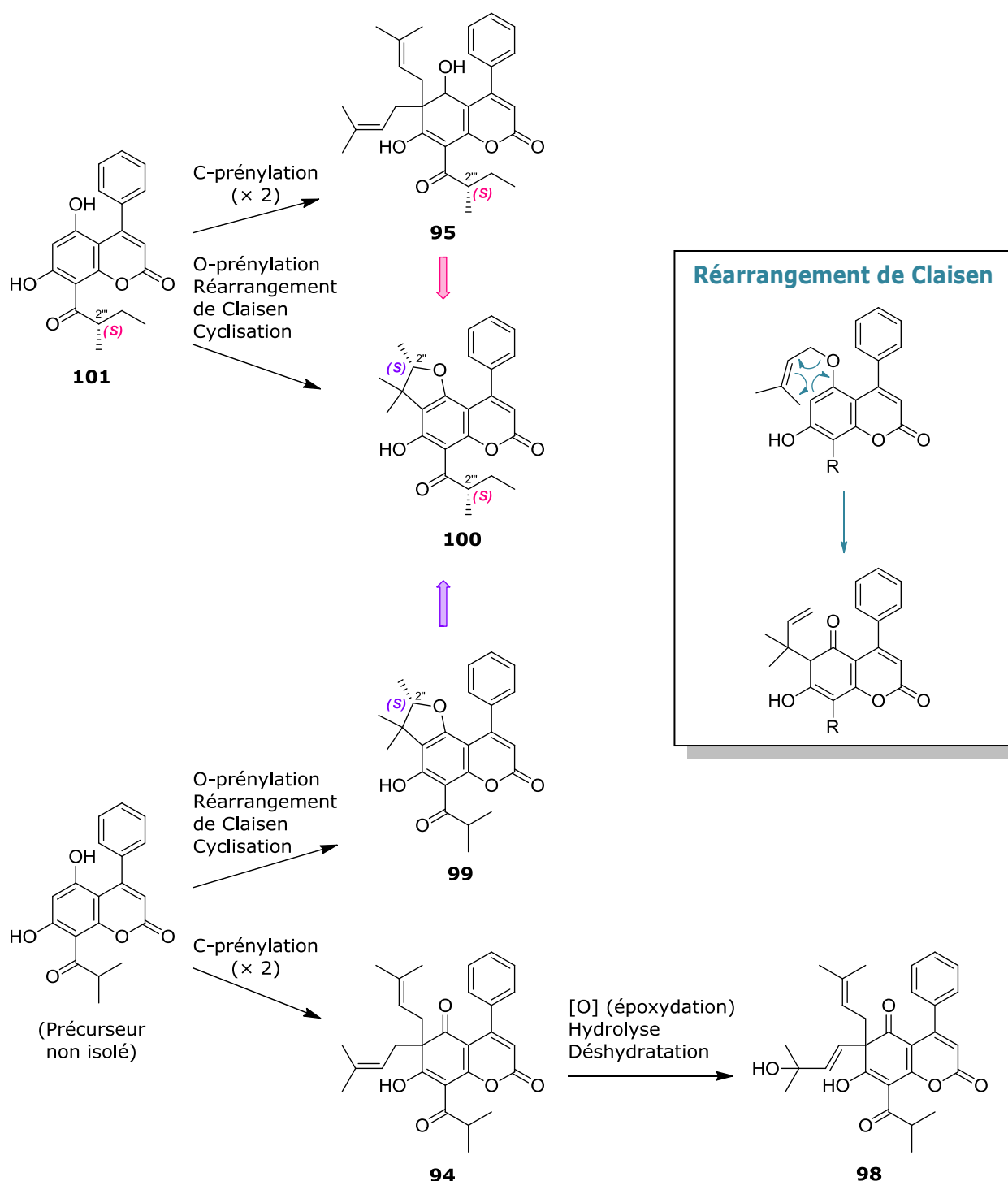


Figure 72. Schéma hypothétique de biosynthèse des composés 94, 95, 98, 99 et 100 avec conservation de la stéréochimie

Afin de valider cette hypothèse, les configurations absolues des composés ont été déterminées. Pour cela, une mesure des spectres de dichroïsme circulaire électronique (ECD) a tout d'abord été réalisée, mais les données pratiques obtenues n'ont pas pu être comparées aux calculs théoriques, en raison d'une trop grande flexibilité des molécules.

Nous avons donc opté pour une autre méthode, qui consiste à comparer les valeurs expérimentales et théoriques des pouvoirs rotatoires^{21,22}. Pour cela, la géométrie optimale d'un énantiomère (e.g. *S*) en phase gazeuse a été calculée, puis l'autre énantiomère théorique a été généré à partir du premier, en s'assurant que toutes les parties flexibles de la molécule conservent les mêmes orientations. Les résultats, reportés dans le **Tableau 17**, montrent que les valeurs théoriques des deux énantiomères sont de même signe, ce qui est dû à la même hélicité du groupement phényle, qui domine au niveau de la réponse chirale en phase statique gazeuse. Lorsque la valeur expérimentale est négative, nous pouvons l'associer à la plus faible des valeurs de pouvoir rotatoire calculées, et de même pour une valeur expérimentale positive qui correspond à la valeur théorique la plus élevée²³. Ainsi, nous proposons une configuration absolue *S* pour mammea A/OB (**101**), ainsi que pour le lépidotol B (**95**) et la lépidotine A (**99**).

Ces résultats sont donc en accord avec l'hypothèse de biosynthèse proposée précédemment.

Tableau 17. Pouvoirs rotatoires expérimentaux et théoriques des composés 95, 99 et 101

Molécule	Pouvoir rotatoire en degrés.[dm.g/cm ³] ⁻¹		
	[α] _D calculé pour la configuration <i>R</i>	[α] _D calculé pour la configuration <i>S</i>	[α] _D expérimental
Mammea A/OB (101)	241	236	- 6
Lépidotol B (95)	10	57	+ 12
Lépidotine A (99)	179	305	+ 3

1.4. Conclusion sur l'étude des fruits de *Mesua lepidota*

Neuf phénylcoumarines ont été isolées de l'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota*, dont sept appartiennent à des séries chimiques nouvellement décrites, celles des lépidotols et des lépidotines.

L'extraction des fruits par le DCM présente un très bon rendement (environ 30%) et fournit très majoritairement du lépidotol A (**94**). Aussi, en parallèle de cette étude, avons-nous comparé les profils et rendements d'extraction de ces fruits par les solvants organiques DCM et MeOH à ceux obtenus par des solvants « verts », en particulier des solvants eutectiques naturels (*natural deep eutectic solvents* ou NaDES)²⁴ et l'eau subcritique. Cette étude est décrite dans l'**Annexe 14**.

2. Etude phytochimique de l'extrait DCM de feuilles de *Calophyllum tetrapterum* – lot A

2.1. Matériel végétal

2.1.1. Description de l'espèce

L'espèce *Calophyllum tetrapterum* Miq. (syn. *Calophyllum floribundum* Hook. f.) est un arbre de 3 à 20 m de hauteur. A l'extérieur, l'écorce est blanchâtre à jaunâtre à brunâtre, fissurée ou lisse en superficie, tandis que la face interne de l'écorce est rougeâtre. Les tiges sont quadrangulaires à plus ou moins arrondies, glabres ou faiblement et transitoirement pubescentes. Les feuilles sont coriaces, elliptiques-lancéolées, franchement acuminées à l'apex et aiguës à la base. Elles mesurent 3,5 à 14 cm de longueur et 1,5 à 6,5 cm de largeur. Elles sont glabres ou légèrement couvertes de poils sur la nervure principale à la face inférieure. Sur le dessus, la nervure principale se resserre progressivement depuis la base. Les nervures secondaires sont nombreuses et rapprochées, généralement apparentes sur les deux faces et en relief. Le pétiole, concave en haut et convexe en bas, mesure 0,4 à 1,5 cm de long. L'inflorescence est généralement axillaire (ou terminale) avec 3 à 11 fleurs, et l'axe mesure 1 à 7,5 cm de long et est glabre ou avec des poils courts à la base. Les bractées sont généralement petites et fugaces. Les pédicelles, de 0,5 à 3 cm de long, sont graciles et souvent épais. La fleur porte généralement 4 ou 8 tépales*, une paire externe ovale à elliptique de 2,2-5 mm par 2-4 mm, et des pièces internes en forme d'ellipse ou de langue de 3,5-8,5 mm par 1,5-3,5 mm. Les étamines sont nombreuses (de 25 à plus de 100) et se composent d'un filament allant jusqu'à 4,5 mm de long et d'anthères d'environ 1 mm de long. L'ovaire mesure environ 1 mm de long, le style 3,5 mm de long, et le stigmate est légèrement bosselé. Le fruit est ellipsoïde à sphérique, de dimensions 6,5-16 mm par 5-12 mm, apiculé ou arrondi à l'apex, et devient grisâtre ou brun pâle au séchage. La couche externe du fruit, d'environ 1 mm d'épaisseur, ne se détache généralement pas nettement du noyau. Les différentes variétés de *C. tetrapterum* présentent des différences au niveau de la nervation du limbe notamment.²⁵⁻²⁷

Cette espèce croît en Inde, en Thaïlande, au Cambodge, au Vietnam, en Malaisie, à Singapour et en Indonésie²⁸.

2.1.2. Matériel végétal collecté

Les écorces et feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum* (**Figure 73**) ont été collectées sur le territoire de Machang, au Nord-est de la Malaisie péninsulaire (**Figure 74**), en mars 2007. Un échantillon d'herbier, référencé sous le nom KL5382, se trouve à l'herbarium du département de chimie de Malaya, à Kuala Lumpur.



Figure 73. Photographies du tronc et des feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum*
(Source : Marc Litaudon)



Figure 74. Site de collecte des écorces et feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum*
(Source de la carte : <http://www.sihra.org/>)

2.1.3. Etude botanique des feuilles de *Calophyllum tetrapterum* (lot A)

Comme dans le cas des feuilles et des fruits de *Mesua lepidota*, l'anatomie des feuilles de *Calophyllum tetrapterum* a été étudiée, en vue d'effectuer une comparaison entre les lots A et B, de composition en métabolites secondaires différente.

Montée dans le réactif carmin vert d'iode, la feuille présente une nervure principale proéminente à la face supérieure et convexe à la face inférieure. La **nervure principale (Figure 75)** se caractérise par :

- un épiderme glabre surmonté d'une cuticule épaisse
- un système conducteur de type secondaire constitué d'un arc libéro-ligneux principal, large et aplati, incluant de petits cristaux d'oxalate de calcium (prismes et macles*) dans les rayons médullaires libériens
- des canaux sécréteurs répartis dans le parenchyme fondamental
- une zone péryclicque fibreuse
- des macles et des prismes d'oxalate de calcium présents dans les cellules du parenchyme
- un épiderme glabre, stomatifère, recouvert d'une cuticule épaisse

Le **limbe** comprend un mésophylle (partie interne) hétérogène asymétrique, avec une seule assise de parenchyme palissadique.

L'observation du lot A en section transversale montre la présence de 3 canaux sécréteurs à la face supérieure de l'arc libéro-ligneux, et la présence très abondante de cristaux d'oxalate de calcium (**Figure 75**).

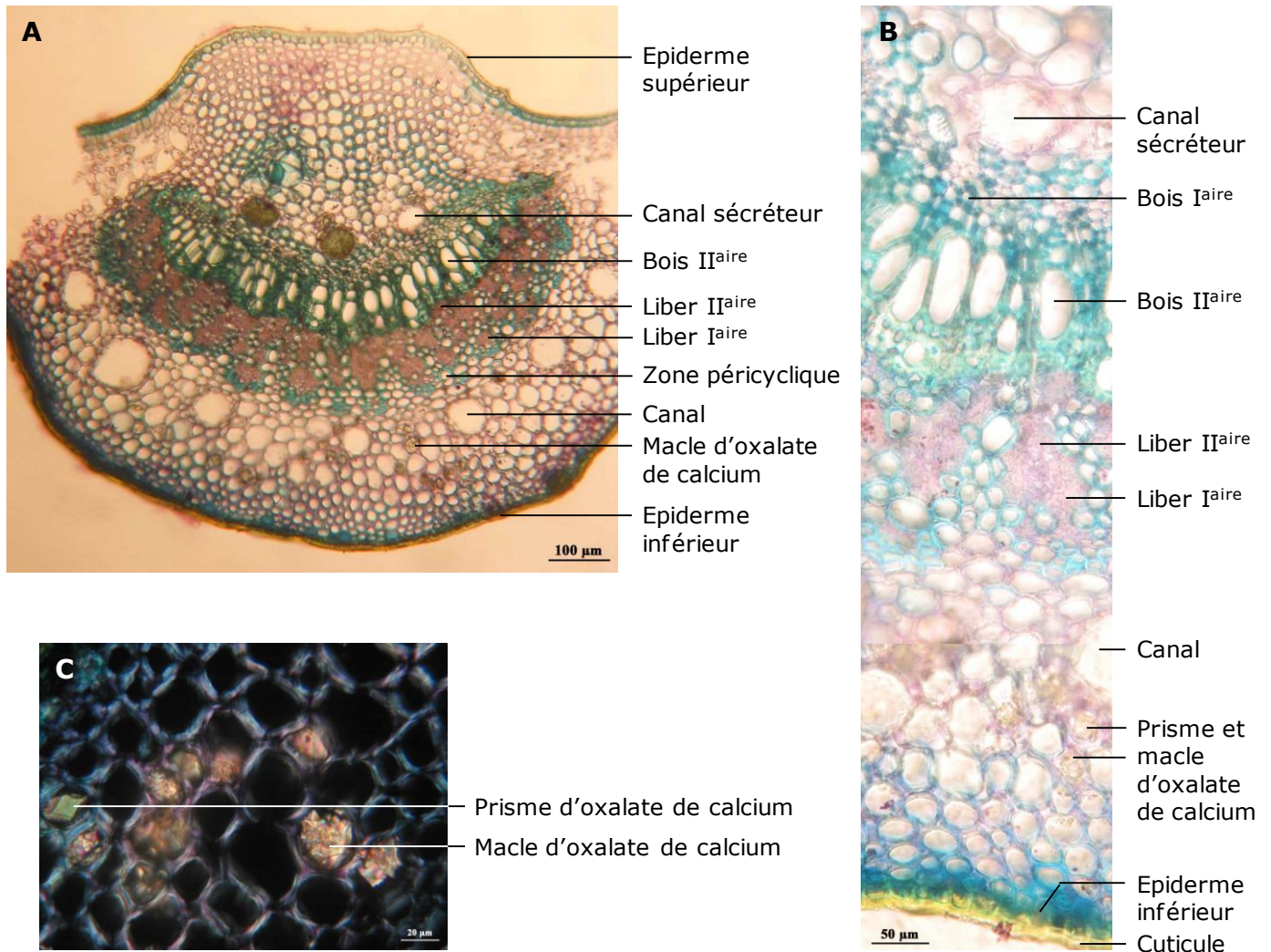


Figure 75. (A) Section transversale de la nervure de la feuille du lot A de *Calophyllum tetrapterum*. (B) Détail de la nervure en section transversale. (C) Détail du parenchyme observé en lumière polarisée

L'extrait DCM de feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum* a montré une activité inhibitrice de l'expression de VCAM-1 assez importante au cours du criblage biologique (cf. chapitre II), et s'est révélé riche en dérivés originaux d'acylphloroglucinols polyprénylés. Afin de déterminer plus précisément la structure de ces produits majoritaires, et d'identifier les métabolites responsables de l'activité biologique observée, des étapes de purifications ainsi qu'une évaluation de l'effet de certaines fractions obtenues ont été réalisées.

2.2. Purification des composés majoritaires de l'extrait

2.2.1. Profil de l'extrait

L'analyse par HPLC-DAD de l'extrait DCM de feuilles du lot A de *C. tetrapterum* montre la présence d'un composé très majoritaire **105** élué après 25,2 min dans les conditions chromatographiques optimisées (méthode 5, cf. partie expérimentale) et présentant des maxima d'absorbance à 245 et 291 nm en spectrophotométrie UV. Des composés plus minoritaires affichant un profil UV semblable au produit **105**, ainsi que des xanthones, sont également présents. (**Figure 76**)

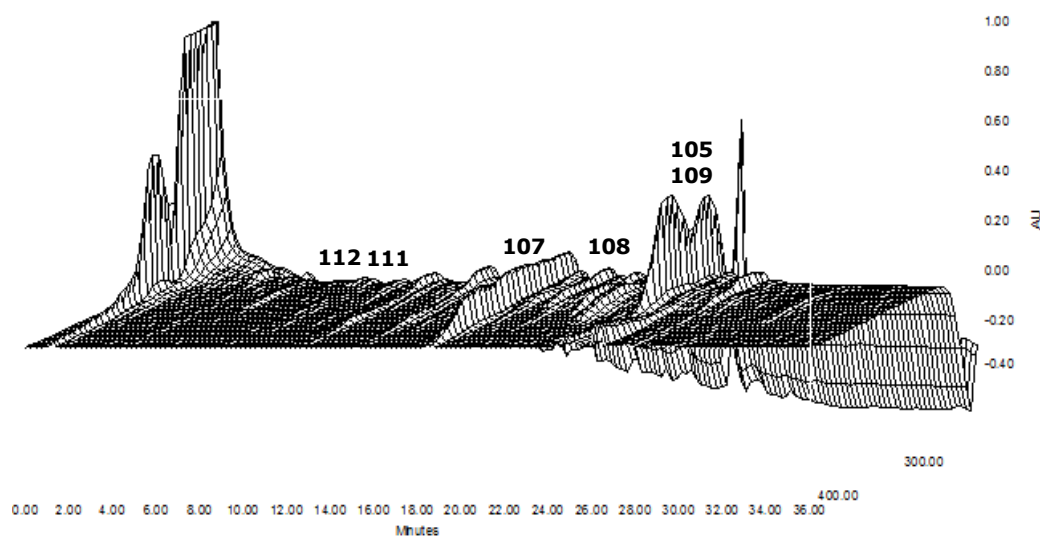


Figure 76. Profil HPLC (3D plot) de l'extrait DCM de feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum* (méthode 5)

Le spectre de RMN ^1H de l'extrait brut indique la présence d'un mélange de composés et ne permet pas d'élucider la structure du produit majoritaire. L'extrait a donc été fractionné en vue d'isoler ce produit identifié comme un acylphloroglucinol polyprénylé d'après l'analyse déréplicative (cf. chapitre II).

2.2.2. Fractionnement initial

Une extraction à grande échelle des feuilles a été réalisée à partir de 425 g de matière première dans un appareil de type Soxhlet. L'extrait DCM, obtenu avec un rendement de 6,2 %, a été analysé par HPLC-UV-DAD afin de vérifier la similitude des compositions de cet extrait et de celui obtenu précédemment par l'extraction automatisée sous pression. Un fractionnement par chromatographie flash en phase normale a ensuite conduit à l'obtention de 11 fractions (FI à FXI) regroupées sur la base des similarités de leurs profils en chromatographie sur couche mince (CCM). (**Figure 77**)

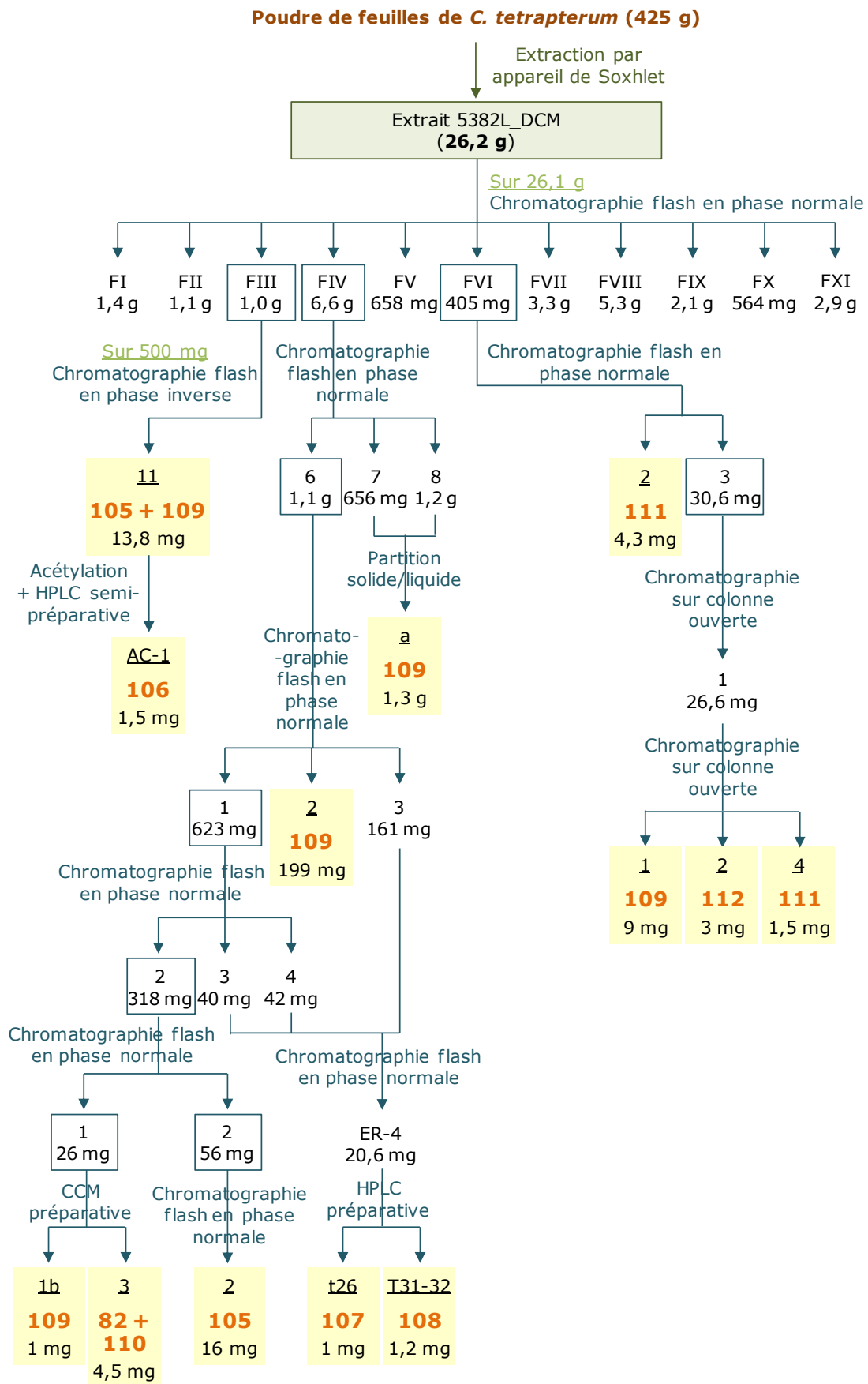


Figure 77. Schéma de fractionnement de l'extrait DCM de feuilles du lot A de *C. tetrapterum* et molécules isolées

a) Profil chromatographique des fractions obtenues

Après révélation par la vanilline sulfurique, l'analyse des CCM des fractions obtenues indique que les fractions FI à FVII contiennent des triterpènes en quantité importante, ce qui ne pouvait être remarqué par une détection UV seule. En outre, d'après une analyse par HPLC-UV-DAD, le PPAP majoritaire de l'extrait (**105**) apparaît comme composant principal des fractions FIII et FIV. La fraction FIV ayant une masse très supérieure à FIII, son étude est privilégiée pour isoler ce composé d'intérêt. La fraction FVI comporte majoritairement deux composés **111** et **112**, bien séparés dans les conditions d'analyse et donc aisément isolables pour une identification structurale ; l'analyse déréglicative ayant identifié le composé **111** comme une xanthone d'après son spectres UV (λ_{\max} 219, 242, 274, 311 et 349 nm). (Figure 78)

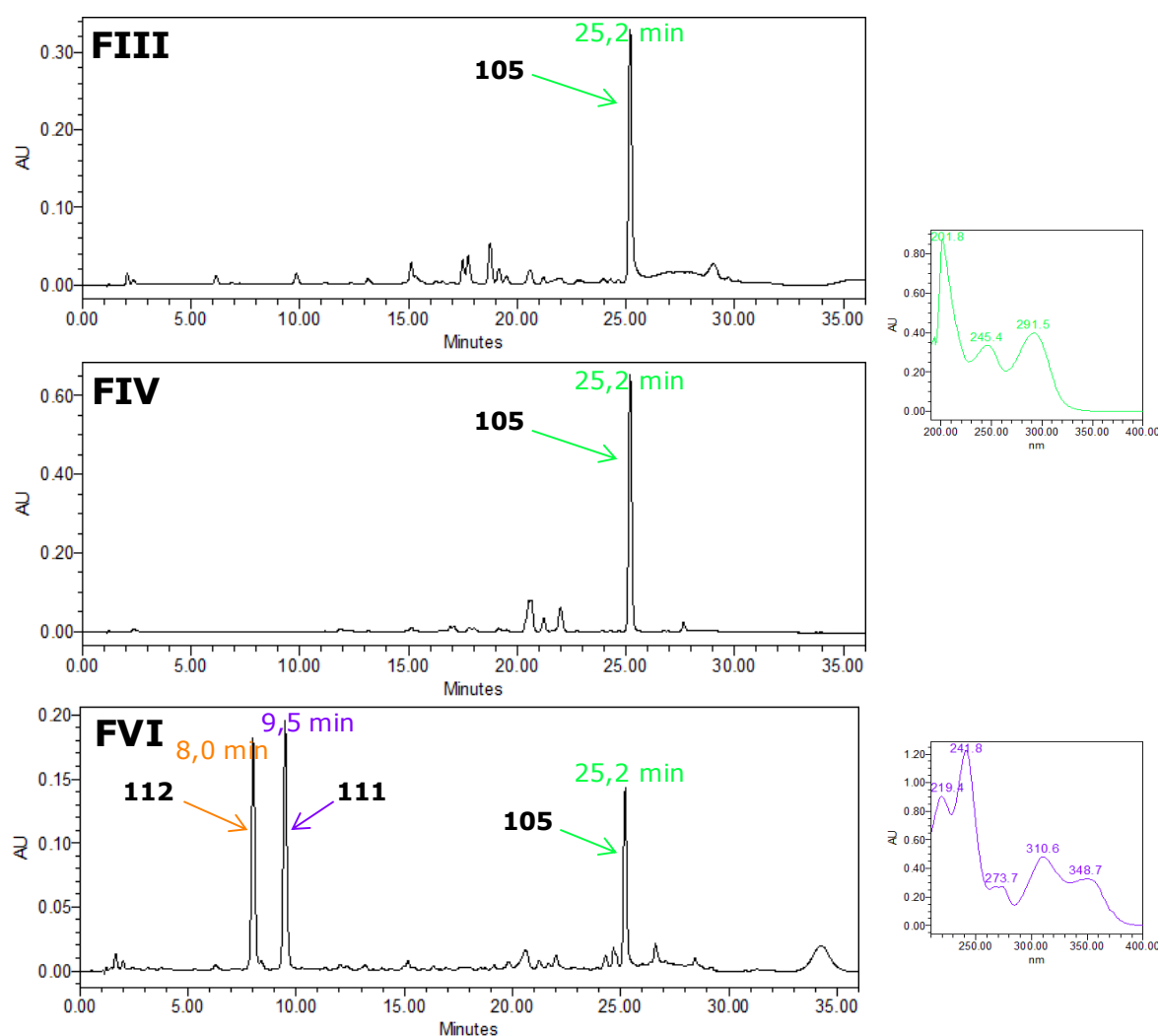


Figure 78. Profil HPLC-UV (280 nm, méthode 5) des fractions FIII, FIV et FVI de l'extrait 5382L_DCM

b) Evaluation biologique des fractions obtenues

Les fractions FI à FXI ont été évaluées par le test de criblage en ELISA cellulaire mesurant l'expression de la protéine VCAM-1 à la surface des cellules HUVECs (cf. chapitre II) (Figure 79)

dans le but d'identifier la ou les fractions contenant les composés responsables de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait. Il apparaît que les 11 fractions ne diminuent pas la viabilité cellulaire en comparaison avec le témoin non traité, et présentent une activité comparable entre elles sur l'expression de VCAM-1, avec une inhibition de l'ordre de 10 à 20 % à 5 µg/mL et d'environ 40 % à 50 µg/mL. Ces effets inhibiteurs sont semblables à ceux exercés par l'extrait brut. Ainsi, aucune fraction n'apparaît nettement plus inhibitrice que les autres, et nous ne pouvons donc pas isoler les composés les plus actifs en suivant une démarche de fractionnement bioguidé. De plus, nous pouvons supposer que l'activité anti-inflammatoire soit due au *totum* de la plante ou à un ou plusieurs composés présents dans l'ensemble des fractions obtenues ici.

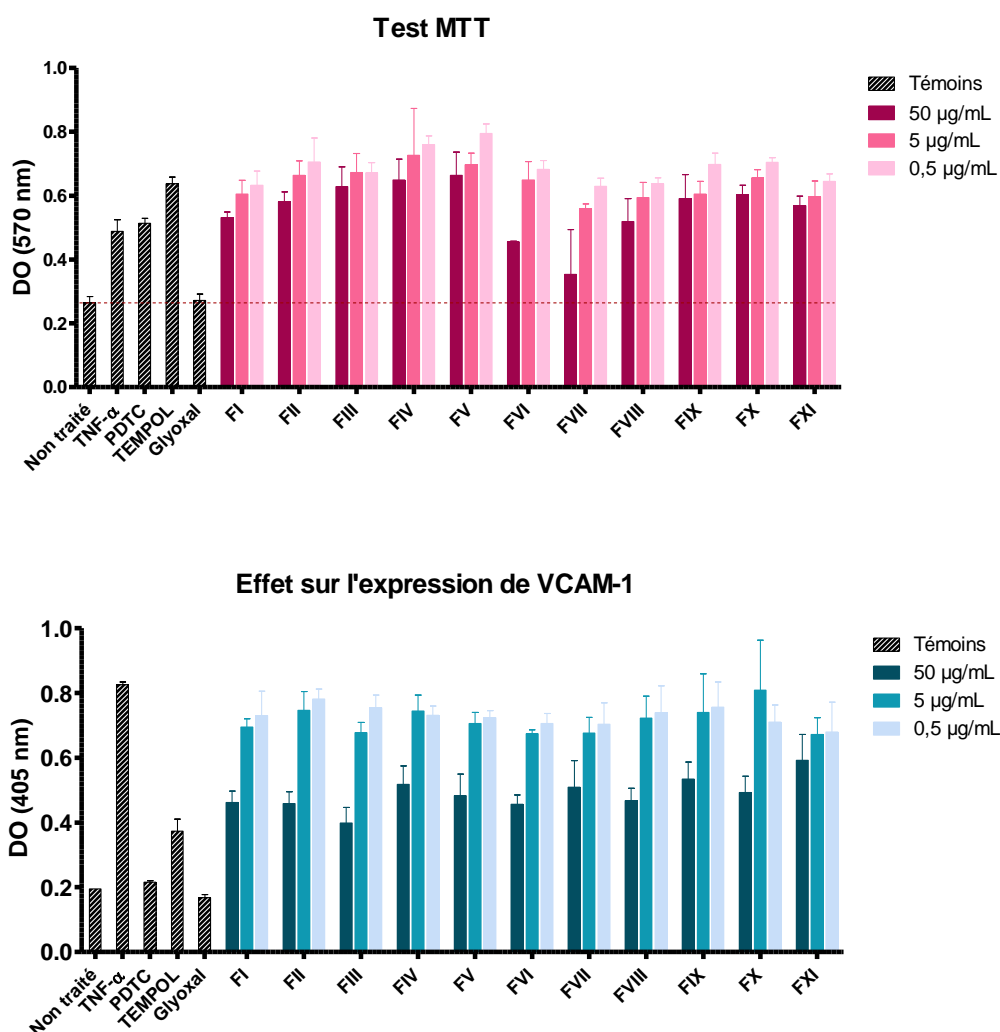


Figure 79. Effet des fractions 5382L_DCM_FI à FXI (0,5, 5 et 50 µg/mL) sur la viabilité et sur l'expression de VCAM-1 des cellules HUVECs, après induction par le TNF-α

Dans le but d'isoler le PPAP majoritaire (**105**) de l'extrait et quelques autres composés de la même série chimique, un fractionnement de la fraction FIV a été effectué dans un premier temps.

2.2.3. Fractionnement de la fraction FIV

a) Composés isolés

A la suite d'une séparation de la fraction FIV par chromatographie flash en phase normale, un important précipité blanc est apparu dans deux sous-fractions (FIV-7 et FIV-8) en présence de l'éluant. Une partition solide/liquide a alors permis de l'isoler et de l'identifier comme un triterpène, le canophyllol (**109**).

La sous-fraction FIV-6, renfermant le PPAP d'intérêt **105**, et moins riche en triterpènes que les sous-fractions voisines d'après les CCM analytiques conduites, a, quant à elle, été soumise à une série de fractionnements (**Figure 77**) conduisant à la purification de 16 mg de tétraptérone (**105**). De cette même sous-fraction (FIV-6), 200 mg de canophyllol (**109**) ont également été obtenus, indiquant que ce triterpène est prépondérant, et rendant d'autant plus difficile la purification des PPAP apolaires présentes simultanément. Par ailleurs, deux stéroïdes ont été conjointement isolés de la fraction FIV-6 par CCM préparative : le stigmastérol (**82**) et le β -sitostérol (**110**). (**Figure 80**)

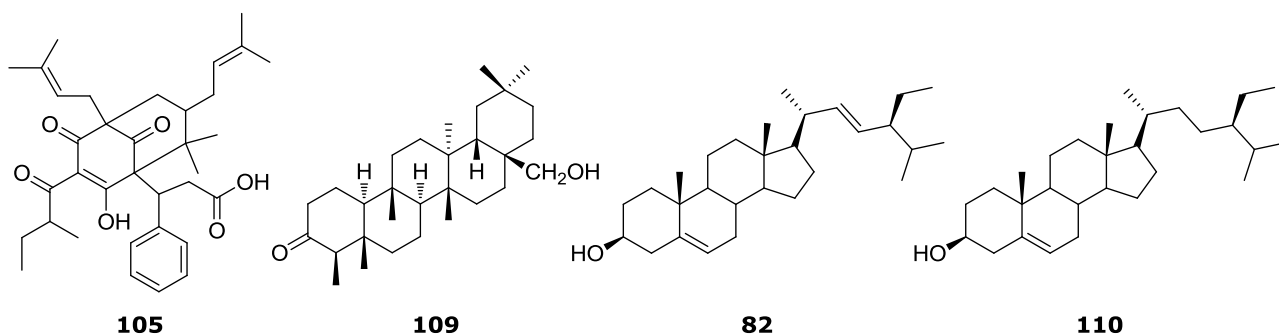


Figure 80. PPAP majoritaire de l'extrait et triterpène et stéroïdes isolés de la fraction FIV

Enfin, une HPLC préparative (**Figure 81**) menée sur des sous-fractions de FIV-6 a permis d'isoler un composé appartenant à la même série chimique que la tétraptérone (**105**) d'après le profil de son spectre UV, le PPAP **108**, ainsi que la molécule **107**.

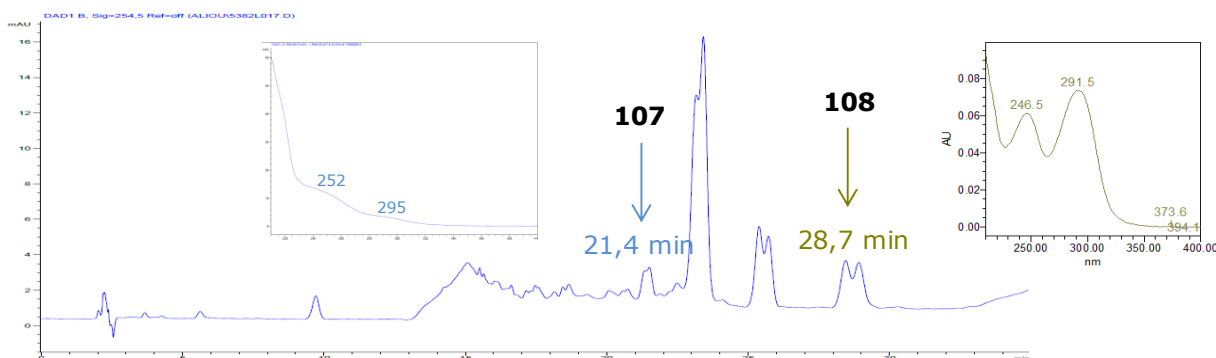


Figure 81. Chromatogramme HPLC-UV (254 nm, méthode 8) de la fraction FIV-6-ER-4 de 5382L_DCM et composés en ayant été isolés

b) Evaluation biologique de la tétraptérone (105), PPAP majoritaire de l'extrait

La tétraptérone (**105**), composé absorbant en UV majoritaire de l'extrait DCM de feuilles du lot A de *C. tetrapterum*, a été évaluée pour son effet sur l'expression de VCAM-1 (**Tableau 18**), par la méthode d'ELISA cellulaire (cf. chapitre II). Elle n'est pas cytotoxique sur les cellules HUVECs aux concentrations testées (5, 25 et 50 μM), et présente une faible activité inhibitrice (12 % d'inhibition de l'expression de VCAM-1) à 50 μM , plus forte concentration évaluée.

Tableau 18. Effet de la tétraptérone (105) (5, 25 et 50 μM) sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF- α

	Molécule	Inhibition de la viabilité cellulaire (%)			Inhibition de l'expression de VCAM-1 induite par le TNF- α (%)		
		5 μM	25 μM	50 μM	5 μM	25 μM	50 μM
	Tétraptérone (105)	0	0	0	0	0	12
Témoins positifs	PDTC (200 μM)		10			92	
	Glyoxal (4 mM)		20			92	

2.2.4. Fractionnement de la fraction FVI

Par une chromatographie flash suivie de deux chromatographies sur colonne ouverte, les trois produits majoritaires de la fraction FVI, à savoir le canophyllol (**109**), le composé **112** et la 3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (**111**) ont été purifiés (**Figure 82**).

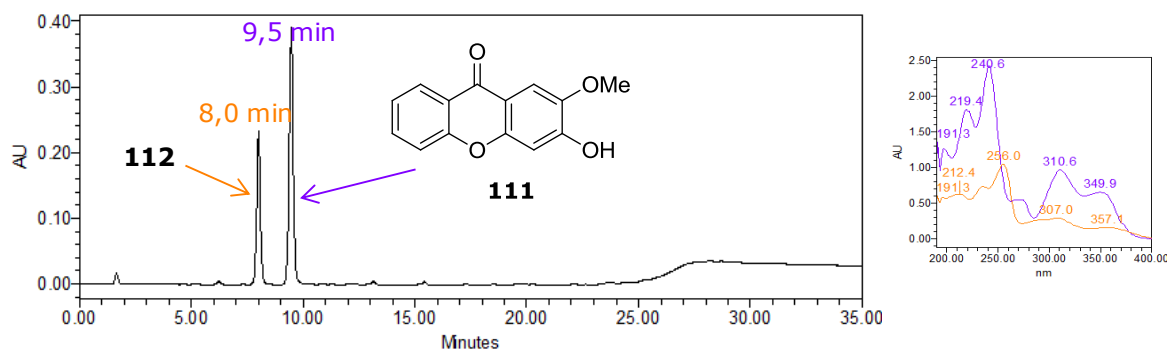


Figure 82. Chromatogramme HPLC-UV (280 nm, méthode 5) de la fraction FVI-3 de 5382L_DCM et composés isolés

2.2.5. Fractionnement de la fraction FIII et acétylation du composé 105

Des difficultés d'élucidation structurale du PPAP **105** isolé dans la fraction FIV (cf. § 2.3) nous ont amenés à tenter de stabiliser sa structure par simple modification chimique. Pour cela, il s'est avéré nécessaire d'identifier une fraction contenant suffisamment du produit **105** pour effectuer la réaction. Le canophyllol (**109**) étant le triterpène prépondérant de l'extrait, nous avons choisi d'évaluer sa proportion dans chacune des fractions et de définir son temps de rétention par HPLC couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL). Il est apparu que, analysés dans les

mêmes conditions HPLC, la tétraptérone (**105**) [t_R 25,2 min (méthode 5, cf. partie expérimentale)] et le canophyllol (**109**) sont élués en même temps (**Figure 83**), ce qui explique la difficulté à purifier le composé **105**.

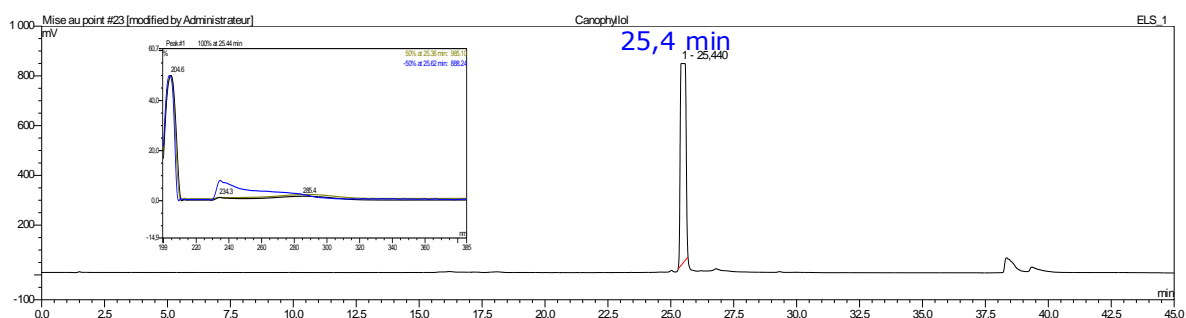


Figure 83. Profil HPLC-DEDL et spectre UV du canophyllol (109) (méthode 5)

L'analyse des fractions FI à FXI par HPLC-DEDL a révélé que la fraction III était moins riche en canophyllol (**109**) que les autres, et a donc été soumise à une purification par chromatographie flash en phase inverse de manière à isoler les produits **105** et **109**. Une réaction d'acétylation a ensuite été mise œuvre sur la fraction d'intérêt (FIII-11, 13,8 mg), riche en produits **105** et **109**, en vue de synthétiser un dérivé acétylé de **105**, présentant des signaux mieux définis en RMN. Cette réaction chimique permet en outre de modifier la polarité du produit d'intérêt et donc de faciliter sa séparation du canophyllol (**109**).

La réaction d'acylation, déjà réalisée avec succès sur l'hyperforine (PPAP) isolée du millepertuis²⁹, a ici consisté à faire réagir les composants de la fraction FIII-11 avec du chlorure d'acétyle en large excès. La solution, initialement limpide et incolore, a progressivement viré au jaune puis au brun au cours de la réaction et un solide blanc est apparu à la surface. L'analyse par HPLC-UV-DAD du produit de la réaction a montré une diminution de la quantité de tétraptérone (**105**) et la formation d'un nouveau produit plus polaire et présentant une λ_{max} d'absorption à 254 nm. Celui-ci a donc été isolé par HPLC semi-préparative et identifié comme la tétraptérine (**106**). Il est apparu que le produit synthétisé n'est pas un dérivé acylé comme attendu, mais un dérivé lactonisé. (**Figure 84**)

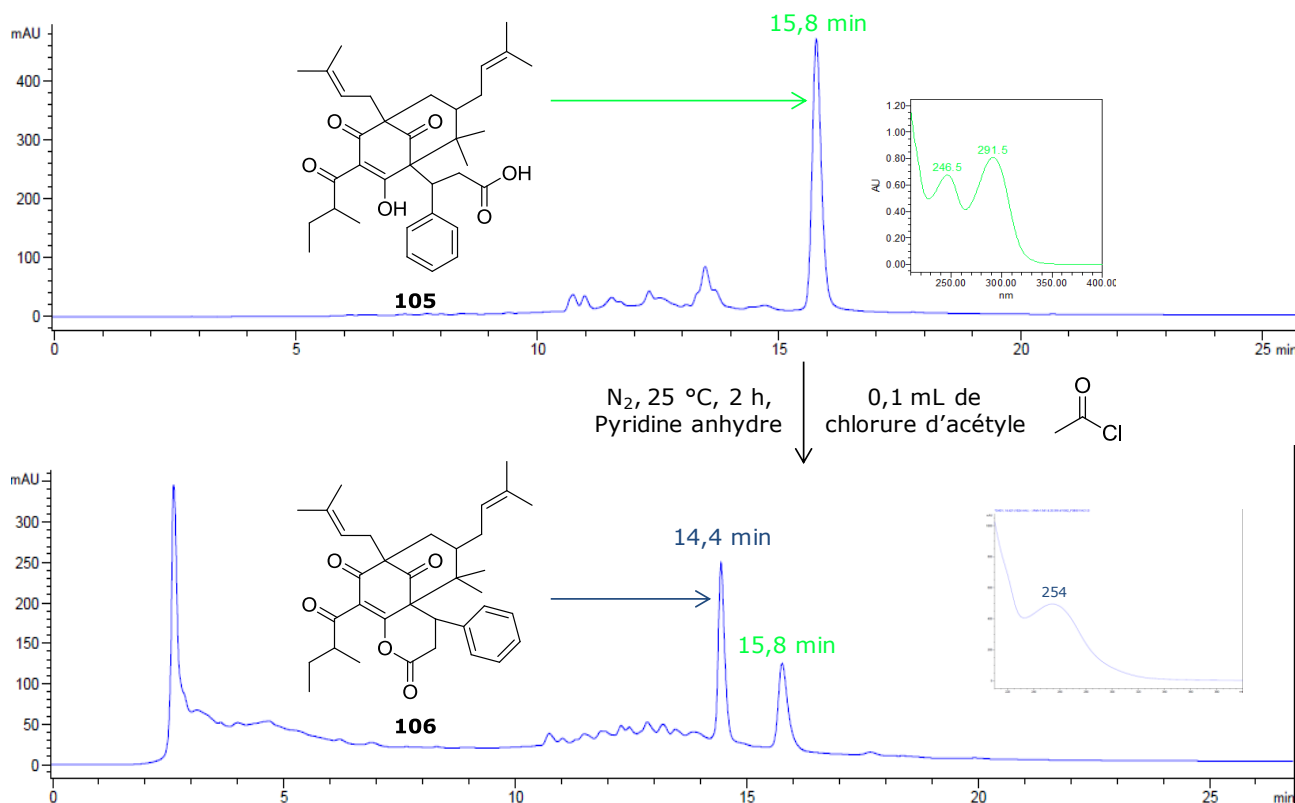


Figure 84. Conditions réactionnelles et profils HPLC-UV (280 nm, méthode 9) de la fraction FIII-11 avant et après réaction d'acétylation

2.3. Analyse structurale des molécules isolées

L'analyse structurale des composés isolés a été effectuée à partir des données spectroscopiques de masse, UV, de RMN, et éventuellement par cristallographie.

2.3.1. Elucidation structurale du PPAP majoritaire : la tétraptérone (105)

a) Détermination des principaux éléments structuraux du composé 105

Le composé **105** a été isolé sous la forme d'une résine incolore. D'après son spectre de masse HRESIMS⁻, il a pour formule brute $C_{35}H_{45}O_6$ ($[M-H]^-$ à m/z 561,3213).

Analysé dans les conditions HPLC (mélange eau acide / méthanol), le composé **105** présente des bandes d'absorption UV à 246 et 291 nm, caractéristiques d'un groupement 1,3-dicétone aromatique³⁰.

L'analyse de la fragmentation en masse en mode positif (ESI-MS²) révèle entre autres des pertes de 18, 56 et 68 Da. La perte d'une molécule d'eau indique que la molécule est hydroxylée, tandis que les pertes de 56 et 68 Da, correspondant respectivement à un isobutène et à un isoprène, signent la présence de chaînes prénylées dans la molécule³¹.

Le spectre de RMN ¹H enregistré dans le chloroforme deutéré montre la présence de nombreux signaux de fortes multiplicités dans la zone de 0,5 à 5,5 ppm. De plus, le signal d'un hydroxyle chélaté à 18,5 ppm apparaît dédoublé. Le même phénomène est constaté sur le spectre de RMN du ¹³C, où la plupart des signaux sont dédoublés, révélant une instabilité de la structure

probablement due à une tautomérie céto-énolique. Ainsi, pour tenter de figer l'une des formes de la molécule, une analyse a été conduite à basse température (273 K) dans CDCl_3 , ce qui a permis de mieux distinguer les signaux sur les spectres de RMN ^1H et ^{13}C . Cependant, la solubilité du produit étant très réduite, les spectres de RMN bidimensionnelle se sont révélés difficilement interprétables. C'est finalement dans le méthanol deutéré associé à 0,1 % d'acide trifluoroacétique que l'analyse a pu être approfondie.

Sur le spectre de RMN ^1H (**Figure 85**), les signaux de 5 protons aromatiques à δ_{H} 7,40 (2H, s large, H-31 et H-35), 7,16 (2H, m, H-32 et H-34) et 7,13 ppm (1H, m, H-33) suggèrent la présence d'un groupement phényle monosubstitué. Deux chaînes prényles s'identifient par la présence de 2 protons vinyliques [δ_{H} 5,16 (1H, m, H-16) et 4,82 ppm (1H, t, $J = 6,7$ Hz, H-21)], 4 protons allyliques [δ_{H} 2,52 (2H, m, H-15) et 2,04 ppm (1H, m, H-20)] et 4 groupements méthyles [δ_{H} 1,71 (3H, s, Me-19), 1,70 (3H, d, $J = 6,2$ Hz, Me-18), 1,64 (3H, s, Me-23) et 1,40 ppm (3H, s, Me-24)].

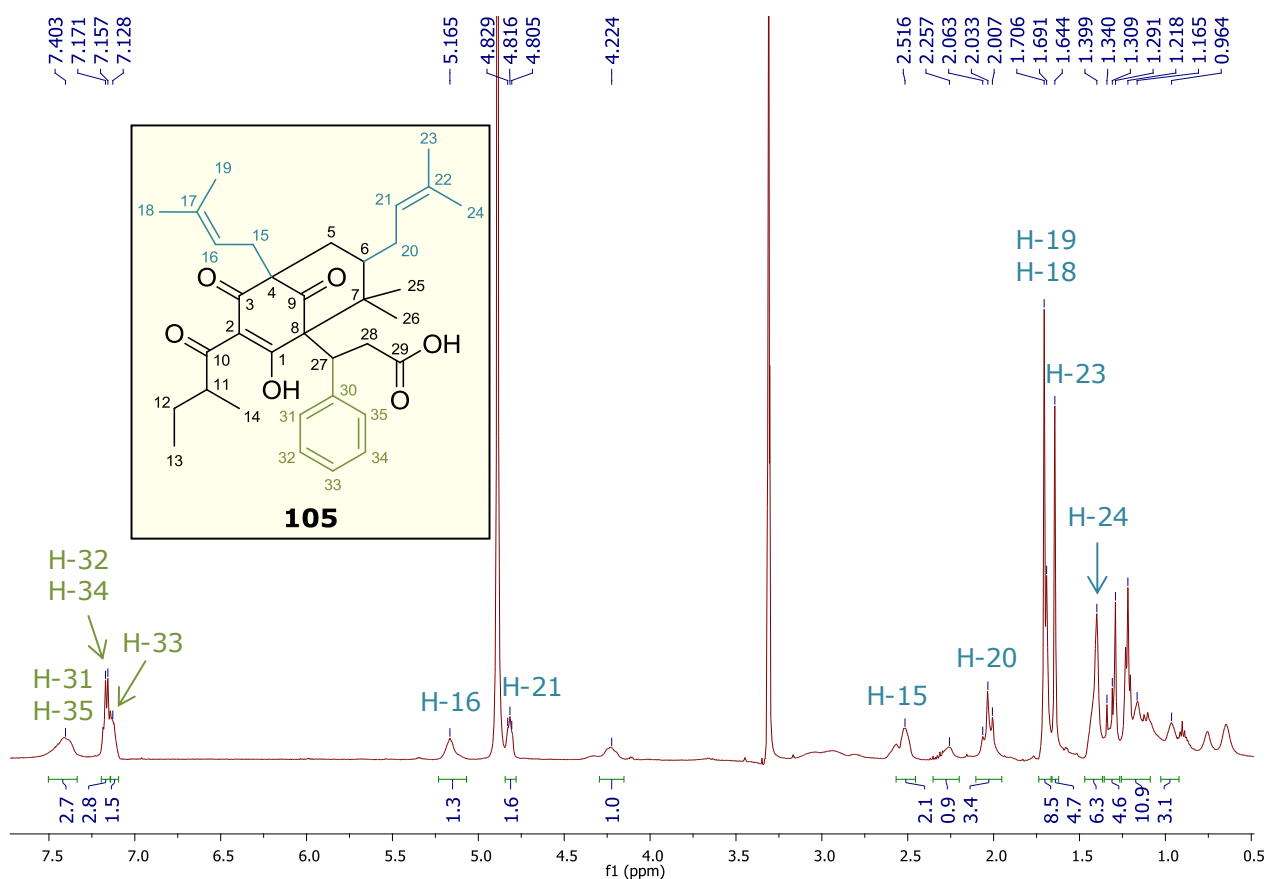


Figure 85. Spectre de RMN ^1H du composé 105 (500 MHz, MeOH-d_4 + 0,1 % TFA)

Le spectre de RMN ^{13}C (**Annexe 15**) met en évidence les signaux d'une 1,3-dicétone énolisée [δ_{C} 196,2 (C-1), 117,2 ppm (C-2) et 199,3 (C-3)], d'une cétone non conjuguée [δ_{C} 210,2 ppm (C-9)] et de 2 atomes de carbone quaternaires [δ_{C} 72,6 (C-8) et 61,5 ppm (C-4)]. Ceux-ci s'accompagnent d'un autre atome de carbone quaternaire moins déblindé [δ_{C} 50,7 ppm (C-7)], d'un méthine [δ_{H} 1,43 ppm (1H, m, H-6) ; δ_{C} 49,8 ppm (C-6)] et d'un méthylène [δ_{H} 2,26 (1H, m, H-5) et 2,02 ppm (1H,

m, H-5) ; δ_C 38,9 ppm (C-5)], d'après les corrélations observées en HMQC. Ces signaux coïncident avec un système bicyclique de type bicyclo[3.3.1]nonane, révélant ainsi une structure de phloroglucinol polyprénylé³².

Les corrélations HMBC (**Annexe 15**) permettent de déterminer la position des substituants prényles ainsi que de 2 groupements méthyles [δ_H 1,22 ppm, m ; δ_C 28,9 ppm (Me-25) et δ_H 1,16 ppm, m ; δ_C 23,8 ppm (Me-26)] autour du noyau bicyclique (**Figure 86**). La structure obtenue est alors incomplète et les corrélations observées en HMBC ne permettent pas de définir ni de placer avec certitude les substituants manquants.

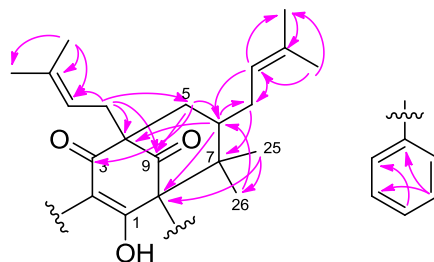


Figure 86. Eléments structuraux du composé 105 définis et corrélations HMBC

b) Elucidation structurale du composé 106 et déduction de la structure 105

Afin de poursuivre l'élucidation structurale du composé **105**, une réaction avec du chlorure d'acétyle a été effectuée (cf. § 2.2.5) en vue d'acétyler la fonction énonol, et d'obtenir ainsi une structure plus stable. Le dérivé **106** synthétisé a été analysé.

L'adduit de l'ion moléculaire $[2M+Na]^+$ à m/z 1111, ainsi que l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 545, observés sur le spectre ESIMS basse résolution, indiquent une perte de 18 Da par rapport à la structure **105**, ce qui correspond au départ d'une molécule d'eau, et non à l'ajout d'un groupement acétyle comme attendu.

Le spectre UV du produit **106** se distingue de celui du composé **105** par une seule bande d'absorption à 254 nm. En outre, le spectre de RMN 1H enregistré dans $CDCl_3$ n'affiche aucun signal au-delà de 12 ppm, ce qui indique qu'il n'y a plus d'énonol chélaté dans la molécule.

L'analyse des spectres de RMN mono- et bidimensionnelle (**Annexe 16**) permet de construire le même squelette bicyclique prénylé que pour le composé **105**.

Sur le spectre HMBC (**Figure 87**), une corrélation apparaît entre le proton à δ_H 4,66 ppm (m, H-27) et les atomes de carbone à δ_C 166,6 (C-1), 64,9 (C-8), 206,0 (C-9), 139,5 (C-30) et 131,6 ppm (C-31 et C-35), ce qui suggère que le groupement phényle est relié au bicyclic, *via* ce méthine (CH-27), au niveau de C-8. Une corrélation supplémentaire entre H-27 et l'atome de carbone à δ_C 164,0 ppm (C-29) informe que cette chaîne est estérifiée.

L'analyse des corrélations homo- et hétéronucléaires met également en évidence la présence d'une chaîne latérale de type 2-méthylbutyryle (**Figure 88**). Par élimination, cette chaîne peut être positionnée sur le C-2 du noyau phloroglucinol.

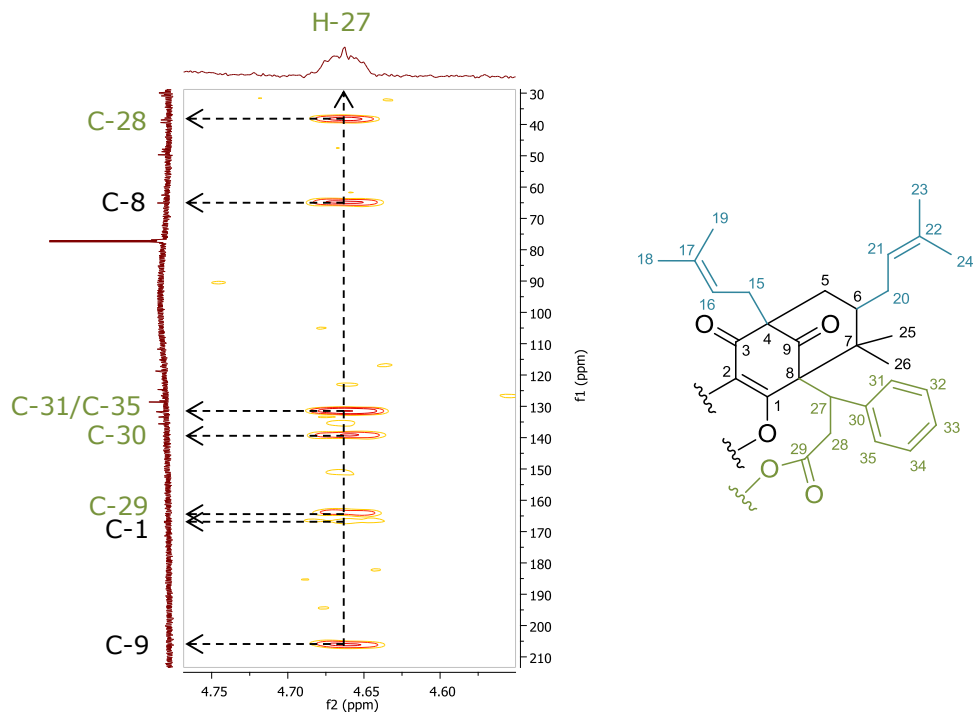


Figure 87. Expansion du spectre HMBC (500 MHz, CDCl_3) et structure partielle du composé **106**

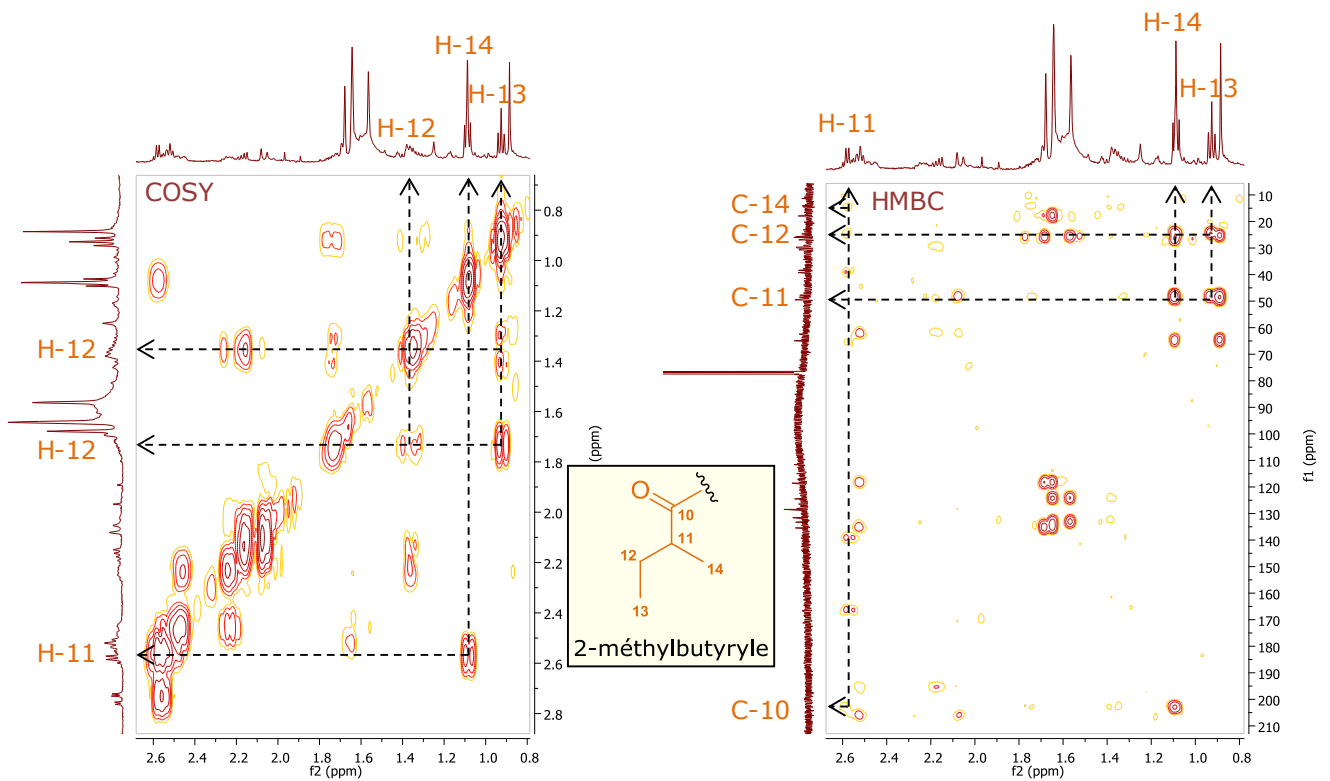
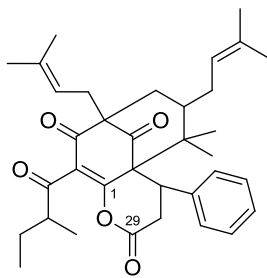
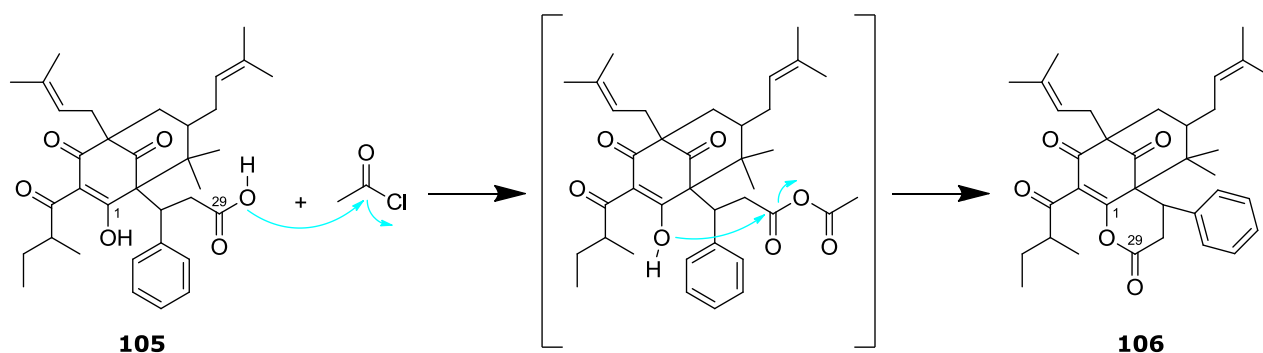


Figure 88. Expansions des spectres COSY et HMBC sur les signaux de la chaîne 2-méthylbutyryle du composé **106** (500 MHz, CDCl_3)

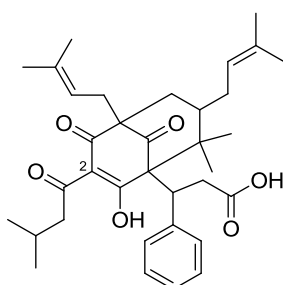
La masse molaire de 544 g/mol suppose que la molécule **106**, appelée tétraptérine, ne comporte que 5 atomes d'oxygène, et donc qu'une lactone relie C-1 et C-29 (**Figure 89**).

Figure 89. Structure du composé **106**

La structure du composé **105** (Figure 90) peut alors à son tour être déduite de celle de **106**, sachant qu'un énol chélaté est présent. Aussi, il apparaît que le composé **105**, qui comporte une fonction acide carboxylique (δ_C 175,7 ppm), a réagi avec le chlorure d'acétyle en formant probablement un anhydride d'acide. La réaction de la fonction alcool de l'énol sur ce dernier (Figure 90) a conduit à la lactone présente dans la structure de la tétraptérine (**106**).

Figure 90. Structure du composé **105** déduite à partir de sa réaction avec le chlorure d'acétyle

Le composé **105**, nommé tétraptérone, a été identifié comme un nouvel acylphloroglucinol polyprénylé, ne se distinguant de la laxifloranone (**113**), précédemment isolée d'une espèce du genre *Marila* (*Calophyllaceae*)³³, que par la chaîne acyle en position 2 (Figure 91). La littérature décrit les déplacements chimiques de cette dernière dans la pyridine deutérée, nous avons donc aussi enregistré les spectres de la tétraptérone (**105**) dans ce solvant, qui permet une meilleure résolution des signaux du spectre ^{13}C par rapport au $CDCl_3$. Les valeurs de δ y sont comparables. Cependant, les configurations des carbones asymétriques de la molécule restent encore à déterminer.

Figure 91. Structure de la laxifloranone (**113**)

2.3.2. Elucidation structurale des autres composés isolés

a) Triterpènes et stéroïdes

❖ Canophyllol (109)

Le composé **109**, obtenu sous la forme d'aiguilles blanches, présente un pouvoir rotatoire négatif ($[\alpha]_D^{21} = -24$, c 0,1 g/100 mL, CHCl_3). De plus, les adduits de l'ion moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 465 et $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ à m/z 477 observés sur les spectres de masse indiquent que la masse molaire de la molécule est de 442 g/mol.

L'identification du canophyllol (**109**) a tout d'abord été réalisée par cristallographie aux rayons X (**Figure 92**). L'analyse a ensuite été complétée par les données de RMN ^1H et surtout ^{13}C , identiques à celles décrites dans la littérature pour le canophyllol, isolé à plusieurs reprises dans le genre *Calophyllum*^{34,35}.

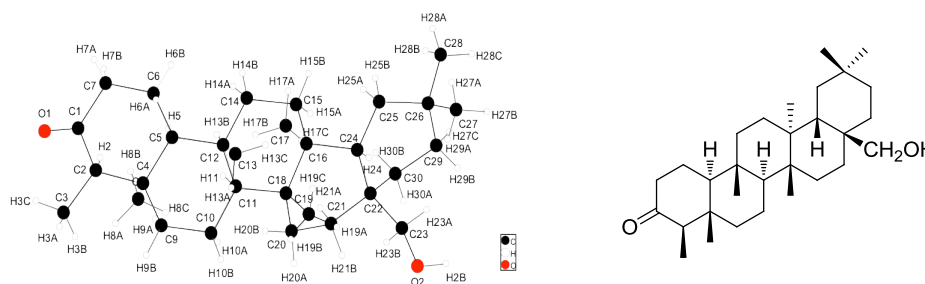


Figure 92. Structure du composé 109 identifiée par cristallographie aux rayons X

❖ Stigmastérol (82) et β -sitostérol (110)

La présence d'un adduit de l'ion moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 435 sur le spectre de masse indique que la masse molaire d'un des composés (**82**) est de 412 g/mol. Des analyses de RMN ^1H et ^{13}C , complétées par des expériences de deuxième dimension, indiquent également la présence d'un second composé (**110**). Le stigmastérol (**82**) et le β -sitostérol (**110**) ont été identifiés par comparaison des valeurs de déplacements chimiques avec la littérature^{36,37}. Ces stéroïdes ont également déjà été isolés d'espèces du genre *Calophyllum*^{38,39}.

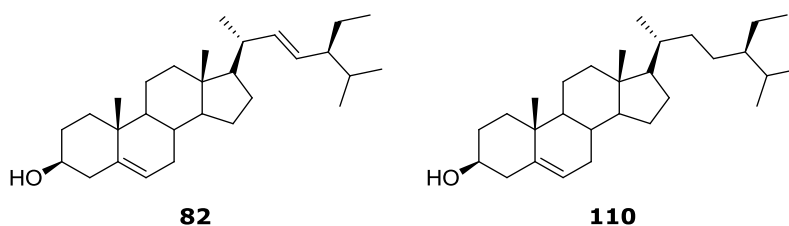


Figure 93. Structures des composés 82 et 110 identifiés en mélange

b) Xanthone 111

Le composé **111** a été isolé sous la forme d'une poudre jaune pâle, et son spectre UV présente des maxima d'absorption à 219, 242, 274, 311 et 349 nm, caractéristiques des xanthonés⁴⁰. Son spectre de masse ESI⁺ montre un adduit de l'ion moléculaire [M+Na]⁺ à *m/z* 265, et ESI⁻ un ion pseudomoléculaire [M-H]⁻ à *m/z* 241, indiquant une masse molaire de 242 g/mol.

La structure de la 3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (**111**) a été identifiée par comparaison des données de RMN avec celles de la littérature⁴¹. Cette xanthone simple a précédemment été isolée dans une autre espèce de *Calophyllum*⁴².

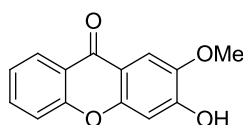


Figure 94. Structure du composé **111**

2.4. Conclusion sur l'étude des feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum*

Deux acylphloroglucinols polyprénylés ont été isolés dans l'extrait DCM de feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum*. Parmi eux, le composé majoritaire, appelé tétraptérone (**105**), est un nouveau dérivé, possédant une fonction acide carboxylique, ce qui est peu décrit pour les PPAPs. Sa structure a été déterminée *via* l'hémisynthèse d'un dérivé, la tétraptérine (**106**). Le PPAP **108** isolé est quant à lui en cours d'élucidation structurale. En outre, trois triterpènes et stéroïdes ainsi qu'une xanthone connus ont été isolés, accompagnés des composés **107** et **112** donc la structure reste à définir.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait ne semble pas liée au PPAP majoritaire **105**. En revanche, le canophyllol (**109**) étant omniprésent dans la plupart des fractions issues du fractionnement initial, il se peut qu'il soit responsable de l'activité inhibitrice de l'expression de VCAM-1, équivalente entre les différentes fractions. Ce triterpène mériterait donc d'être évalué dans le test de criblage en ELISA cellulaire mesurant l'expression de VCAM-1.

3. Etude phytochimique de l'extrait DCM de feuilles de *Calophyllum tetrapterum* – lot B

3.1. Matériel végétal

Un autre lot de *Calophyllum tetrapterum*, le lot B, a été sélectionné pour sa composition différente en polyphénols par rapport au lot A. Ainsi, pour tenter d'expliquer cette chimiodiversité, le

matériel végétal correspondant au lot B a à son tour été analysé. L'anatomie des feuilles a aussi été étudiée afin de lever le doute sur une erreur d'identification de l'espèce.

3.1.1. Matériel végétal collecté

Les écorces et feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum* (**Figure 95**), espèce décrite précédemment (cf. § 2.1.1), ont été récoltées au Nord-ouest de la Malaisie (**Figure 96**), en janvier 2009, soit pendant la période de floraison. Un spécimen se trouve à l'herbarium du département de chimie de Malaya, à Kuala Lumpur, sous la référence KL5617.



Figure 95. Photographies du tronc et des feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum*
(Source : Marc Litaudon)



Figure 96. Site de récolte des écorces et feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum*
(Source de la carte : <http://www.sihra.org/>)

3.1.2. Etude botanique des feuilles de *Calophyllum tetrapterum* (lot B)

L'examen botanique des feuilles des lots A et B de *C. tetrapterum* ne montre pas de différence significative (cf. § 2.1.3). Toutefois, observée en section transversale, la feuille du lot B présente un seul canal sécréteur à la face supérieure de l'arc libéro-ligneux (contre 3 pour le lot A), et les cristaux se font beaucoup plus rares dans le lot B (**Figure 97**).

Ces variations inter-lots peuvent provenir de l'âge de la feuille, d'autant plus que la période de collecte est différente pour les deux lots : le lot A a été collecté en mars, pendant la période de fructification, plus tardivement que le lot B, collecté en janvier durant la floraison de la plante.

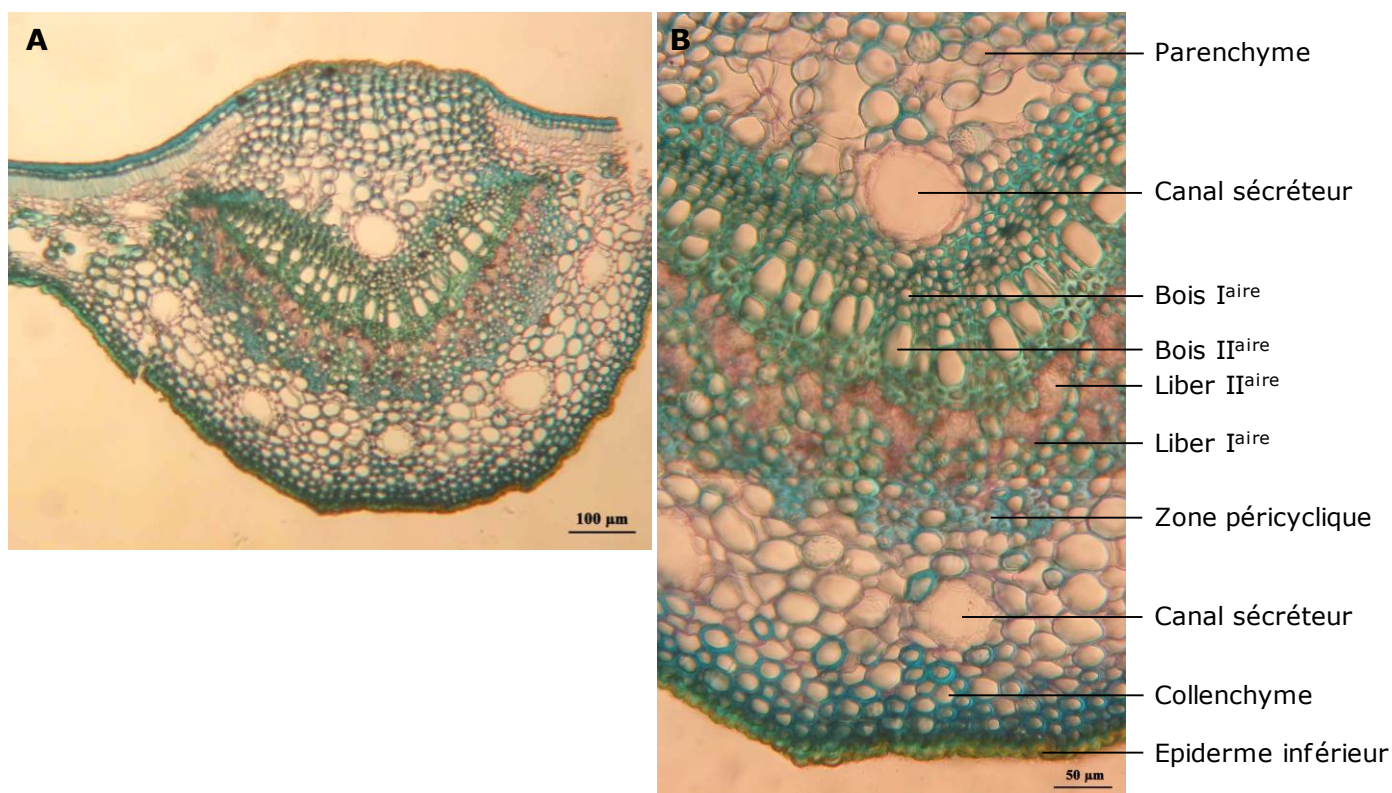


Figure 97. (A) Feuille du lot B de *Calophyllum tetrapterum* en section transversale. (B) Détail de la nervure médiane en section transversale

3.2. Purification des pyranochromanones acides majoritaires de l'extrait

L'analyse dérégulative a montré la présence de pyranochromanones acides dans l'extrait DCM de feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum* (cf. chapitre II). En vue d'évaluer biologiquement l'effet de ce type de polyphénols sur différents marqueurs de l'inflammation et de l'immunité (cf. chapitre IV), les composants majeurs de cet extrait ont été isolés et identifiés.

3.2.1. Profil de l'extrait

D'après son chromatogramme HPLC-DAD (**Figure 98**), l'extrait DCM de feuilles du lot B de *C. tetrapterum* se compose essentiellement de produits exhibant des λ_{max} d'absorption UV aux alentours de 227, 265, 274, 300, 312 et 361 nm. Parmi eux, les composés **114** et **115**, élués respectivement à 12,9 min et 8,7 min dans les conditions optimisées (méthode 10, cf. partie expérimentale), sont très majoritaires. Il s'agit de pyranochromanones acides (cf. chapitre II) aisément purifiables.

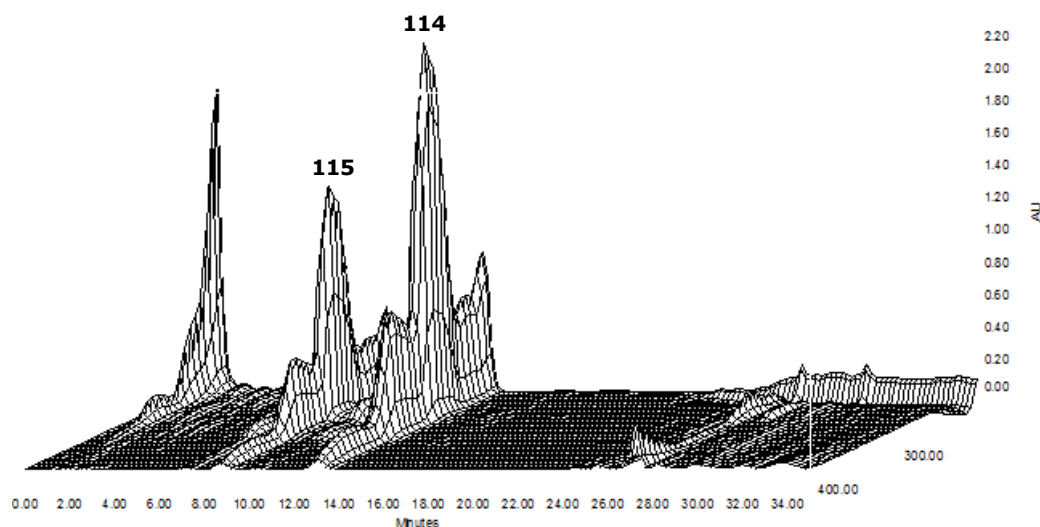


Figure 98. Profil HPLC (3D plot) de l'extrait DCM de feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum* (méthode 10)

3.2.2. Fractionnement initial

Afin de disposer de plus d'extrait de départ en vue d'une purification des composés, une nouvelle extraction automatisée sous pression des feuilles *C. tetrapterum* (lot B) a été conduite sur 10,7 g de drogue, aboutissant à 415 mg d'extrait DCM et 1,6 g d'extrait MeOH, soit des rendements respectifs de 3,9 % et 14,6 %, similaires à ceux obtenus à plus petite échelle (cf. chapitre II). L'extrait DCM a dans un premier temps été fractionné en 23 fractions (F1 à F23) par chromatographie flash en phase normale (Figure 99).

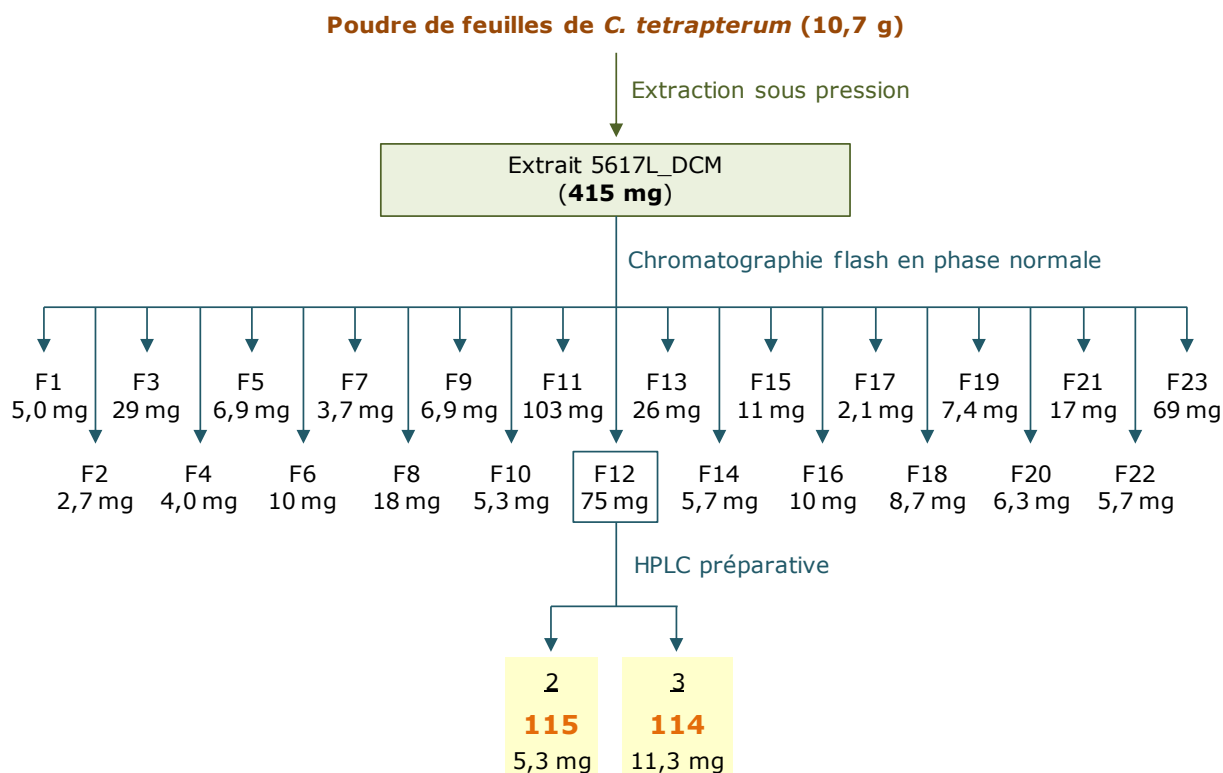


Figure 99. Schéma de fractionnement de l'extrait DCM de feuilles du lot B de *C. tetrapterum* et molécules isolées

a) Profil chromatographique des fractions obtenues

L'ensemble des fractions obtenues a été analysé par HPLC-UV-DAD, montrant que les fractions 5617L_DCM_F10 à F16 sont très riches en pyranochromanones acides. Parmi ces 7 fractions, 5617L_DCM_F12 se compose essentiellement des molécules majoritaires de l'extrait, **114** et **115**. Ces deux molécules sont également prépondérantes dans les fractions F11 et F13.

b) Evaluation biologique de la fraction F12

La fraction F12, concentrée en produits d'intérêt, a été évaluée biologiquement grâce au test de criblage anti-inflammatoire (*cf.* chapitre II). Les résultats (**Tableau 19**) montrent une inhibition de l'expression de VCAM-1 à la surface des cellules HUVECs plus importante qu'avec l'extrait brut (3 et 11 % d'inhibition à 5 et 50 µg/mL respectivement, *cf.* chapitre II), ce qui suggère que les composés **114** et **115** possèdent un pharmacophore impliqué dans l'activité anti-inflammatoire de l'extrait.

Tableau 19. Effet de la fraction 5617L_DCM_F12 (0,5, 5 et 50 µg/mL) sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF-α

	Produit testé	Inhibition de la viabilité cellulaire (%)			Inhibition de l'expression de VCAM-1 induite par le TNF-α (%)		
		0,5 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	0,5 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL
	5617L_DCM_F12	0	0	0	23	22	24
Témoins positifs	PDTC (200 µM)	0			83		
	Glyoxal (4 mM)	19			84		

Une purification des composés **114** et **115** à partir de la fraction F12 a donc été envisagée.

3.2.3. Fractionnement de la fraction F12 : purification des deux produits majoritaires de l'extrait

Une purification de la fraction 5617L_DCM_F12 par HPLC préparative (**Figure 100**) a permis d'isoler les deux composés majoritaires de l'extrait, à savoir l'acide blancoïque (**114**) et l'acide tétraptérique (**115**), nouvelle pyranochromanone acide.

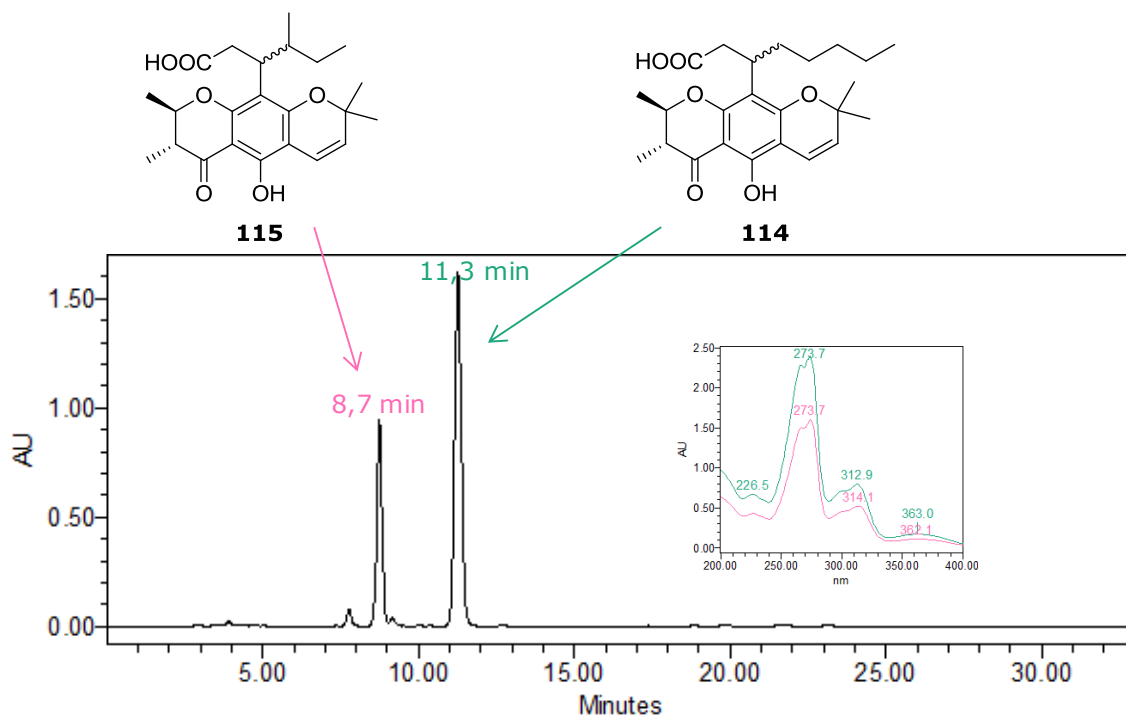


Figure 100. Chromatogramme HPLC-UV (254 nm, méthode 11) de la fraction F12 de 5617L_DCM et composés isolés

3.3. Elucidation structurale des pyranochromanones acides isolées

3.3.1. Composé majoritaire de l'extrait : acide blancoïque (114)

Le composé **114** a été isolé sous la forme d'une résine jaune verdâtre. Les ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ à m/z 417 et $[M-H]^-$ à m/z 415, observés sur les spectres de masse basse résolution, révèlent une masse molaire de 416 g/mol.

Le spectre UV observé lors de l'analyse HPLC montre des bandes d'absorption à 227, 265, 274, 300, 313 et 363 nm, ce qui suggère la présence d'un noyau pyranochromanone⁴³.

Sur le spectre de RMN 1H (**Figure 101**), les signaux caractéristiques d'un cycle 2,2-diméthylchromène apparaissent sous la forme de 2 doublets à δ_H 6,60 (1H, H-6) et 5,46 ppm (1H, H-7), présentant chacun une constante de couplage de 10,0 Hz, typique de deux protons *cis* éthyléniques. En outre, deux protons apparaissent sous la forme de quadruplets dédoublés à δ_H 4,13 (1H, dq, $J = 13,2$ et 6,2 Hz, H-2) et 2,52 ppm (1H, dq, $J = 13,2$ et 7,0 Hz, H-3) indiquent la présence d'un motif 2,3-diméthylchromanone. La valeur de 13,2 Hz pour leur constante de couplage commune révèle une conformation *trans* pour H-2 et H-3. La présence d'un hydroxyle chélaté à δ_H 12,48 ppm et d'un acide carboxylique à δ_C 179,0 ppm sur le spectre de RMN ^{13}C sont également en faveur d'une structure de pyranochromanone acide.^{43,44}

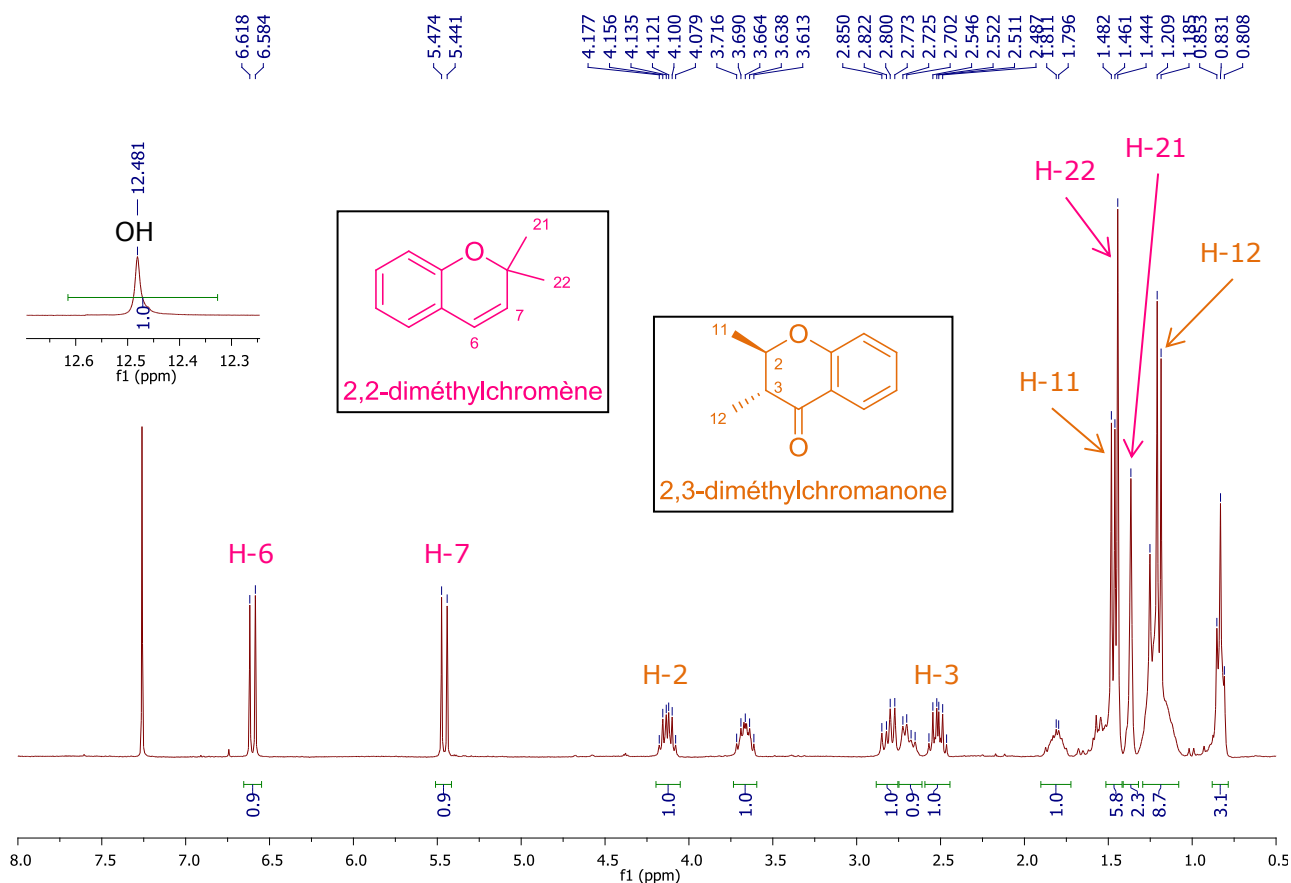


Figure 101. Spectre de RMN ^1H du composé 114 (300 MHz, CDCl_3)

En spectrométrie de masse en mode ESI- MS^2 , la perte de 142 Da ($[\text{M}-\text{H}-\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2]^-$ à m/z 273) suggère qu'un acide octanoïque substitue le noyau pyranochromanone. Les corrélations observées en HMBC confirment la nature de cette chaîne acide.

Deux structures peuvent donc être proposées à ce stade de l'étude : l'une linéaire (**a**), et l'autre angulaire (**b**) (**Figure 102**). Les corrélations observées sur le spectre HMBC ainsi que les valeurs de déplacements chimiques ^1H et ^{13}C comparées à la littérature indiquent qu'il s'agit de l'acide blancoïque, linéaire **a**⁴⁵. L'hydroxyle chélaté est en particulier déblindé à δ_{H} 12,48 ppm, alors qu'il serait aux alentours de 12,70 ppm dans la forme angulaire⁴³.

L'acide blancoïque a été isolé plusieurs fois dans des espèces du genre *Calophyllum*^{43,45}.

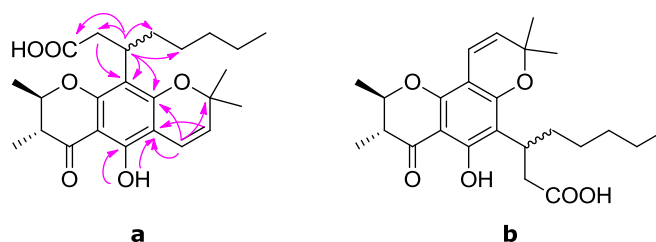


Figure 102. Structures possibles pour le composé 114 et corrélations HMBC permettant de valider la structure **a**

3.3.2. Acide tétraptérique (115)

Le composé **115**, isolé sous la forme d'une résine jaune verdâtre, présente la formule brute $C_{23}H_{30}O_6$ d'après l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 403,2118 observé sur son spectre HRESIMS⁺. La différence de 14 Da avec l'acide blancoïque (**114**) suggère que le produit **115** possède un groupement méthylène de moins que ce dernier.

Le profil spectral UV de **115** est identique à celui de **114**, ce qui indique qu'ils présentent les mêmes chromophores, *i.e.* ceux d'une pyranochromanone acide.

Au niveau des spectres de RMN ¹H (**Figure 103**) et ¹³C (**Annexe 17**), les signaux caractérisant un noyau de pyranochromanone acide sont retrouvés. La différence avec le composé **114** réside dans la présence de deux groupements méthines [δ_H 3,44 ppm (td, $J = 10,1$ et $5,2$ Hz, H-13) ; δ_C 36,0 ppm (C-13), et δ_H 1,83 ppm (m, H-16) ; δ_C 37,1 ppm (C-16)], de deux groupements méthylènes dont un déblindé [δ_H 2,90 (1H, dd, $J = 14,6$ et $10,1$ Hz, H-14) et 2,70 ppm (1H, dd, $J = 14,6$ et $5,2$ Hz, H-14) ; δ_C 36,2 ppm (C-14), et δ_H 1,61 (1H, m, H-17) et 1,13 ppm (1H, m, H-17) ; δ_C 26,9 ppm (C-17)] et de deux groupements méthyles [δ_H 0,90 ppm (t, $J = 7,4$ Hz, H-18) ; δ_C 11,0 ppm (C-18), et δ_H 0,69 ppm (d, $J = 6,7$ Hz, H-19) ; δ_C 17,0 ppm (C-19)]. Des expériences de COSY, HMQC et HMBC (**Figure 104** & **Annexe 17**) révèlent que ces groupements sont ceux d'un acide 4-méthylhexanoïque substitué en position 3.

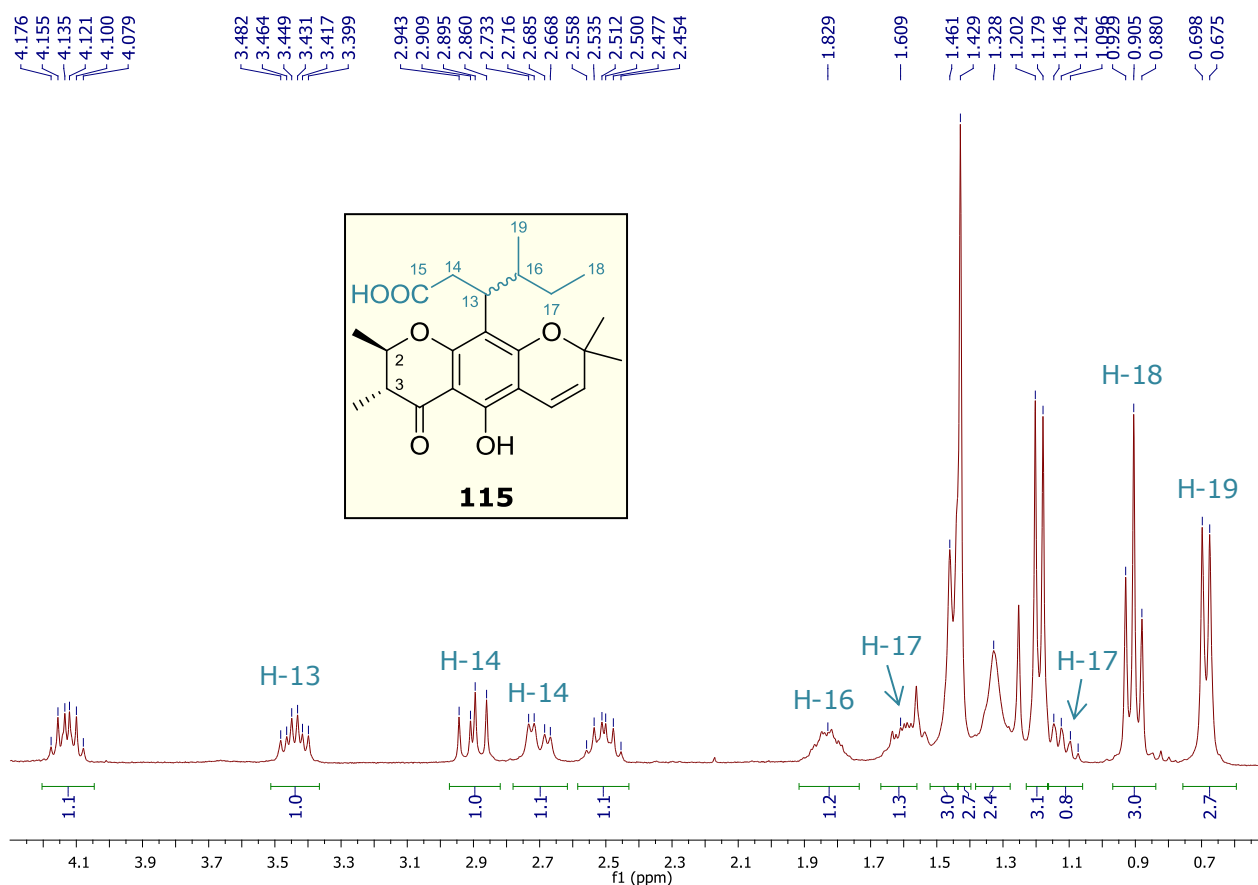


Figure 103. Structure et spectre de RMN ¹H (expansion) du composé 115 (300 MHz, CDCl₃)

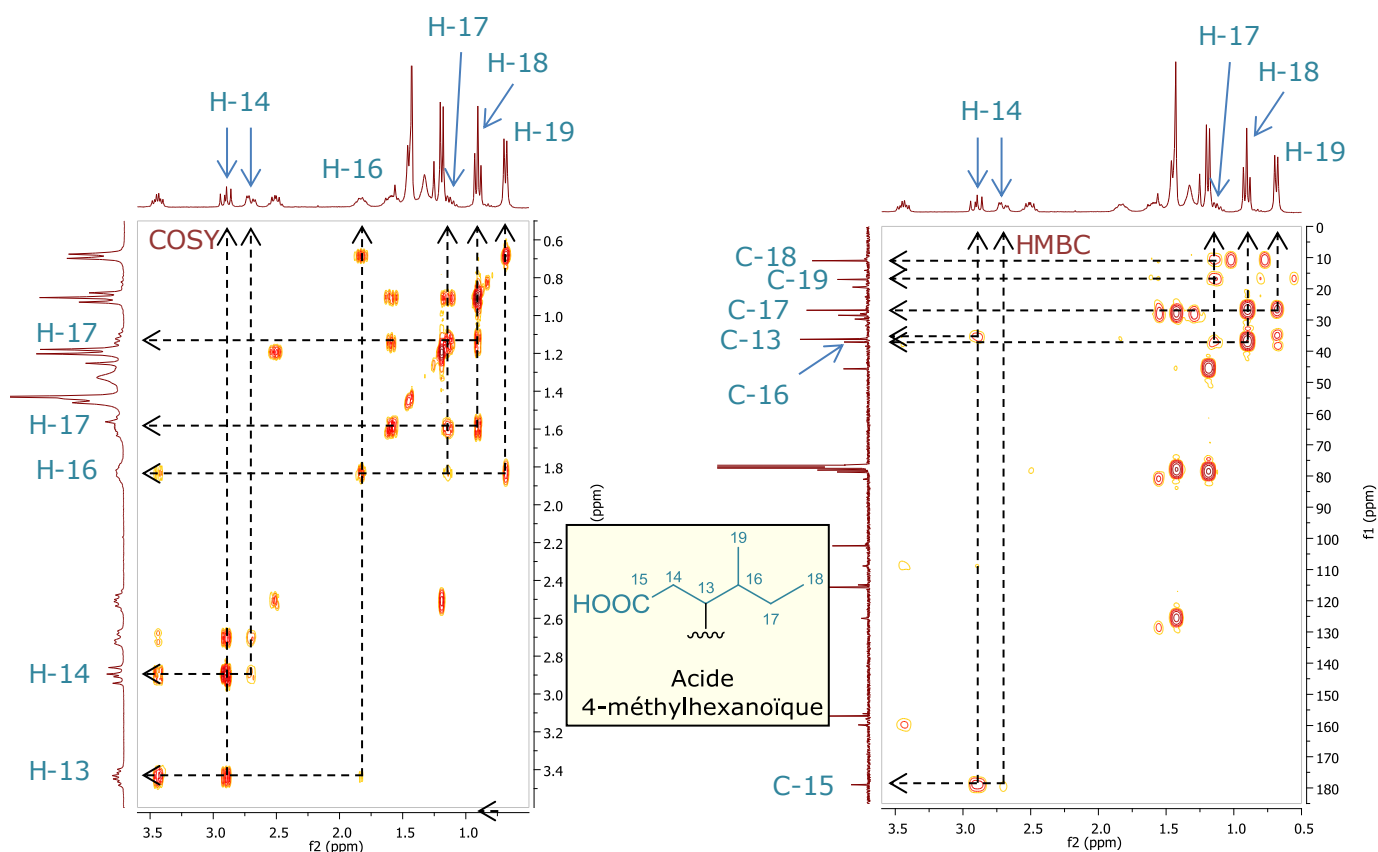


Figure 104. Expansions des spectres COSY et HMBC sur les signaux de la chaîne acide du composé 115 (500 MHz, CDCl₃)

Le composé **115** présente donc une structure similaire à celle de l'acide blancoïque par sa forme linéaire et la conformation *trans* des protons H-2 et H-3 (**Figure 103**). Ce nouveau composé, se distinguant d'autres pyranochromanones acides de même masse connues⁴⁶ par sa chaîne acide méthylée, a été appelé acide tétraptérique, du nom de l'espèce de laquelle il a été isolé. La configuration absolue des deux centres asymétriques (C-13 et C-16) reste cependant à déterminer.

3.4. Conclusion sur l'étude des feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum* et comparaison avec le lot A

Les deux pyranochromanones acides majeures de l'extrait DCM de feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum* ont été isolées : l'acide blancoïque (**114**) d'une part, en quantité suffisamment importante pour évaluer ses effets biologiques (*cf.* chapitre IV), et l'acide tétraptérique (**115**) d'autre part, dont la structure est nouvelle.

Aucune coumarine de type mammae n'a été détectée dans les deux lots de *Calophyllum tetrapterum*. En revanche, des composés polyphénoliques acides ont été isolés dans les deux lots, A et B. Une origine biosynthétique commune pour les pyranochromanones acides et les PPAPs isolés est donc probable, comme cela est proposé dans la **Figure 105**.

Eu égard à cette hypothèse, nous pourrions approfondir l'étude phytochimique de *Calophyllum tetrapterum*, en recherchant des composés de type pyranochromanone acide portant un groupement phényle, et de type PPAPs acides substitués par une chaîne alkyle.

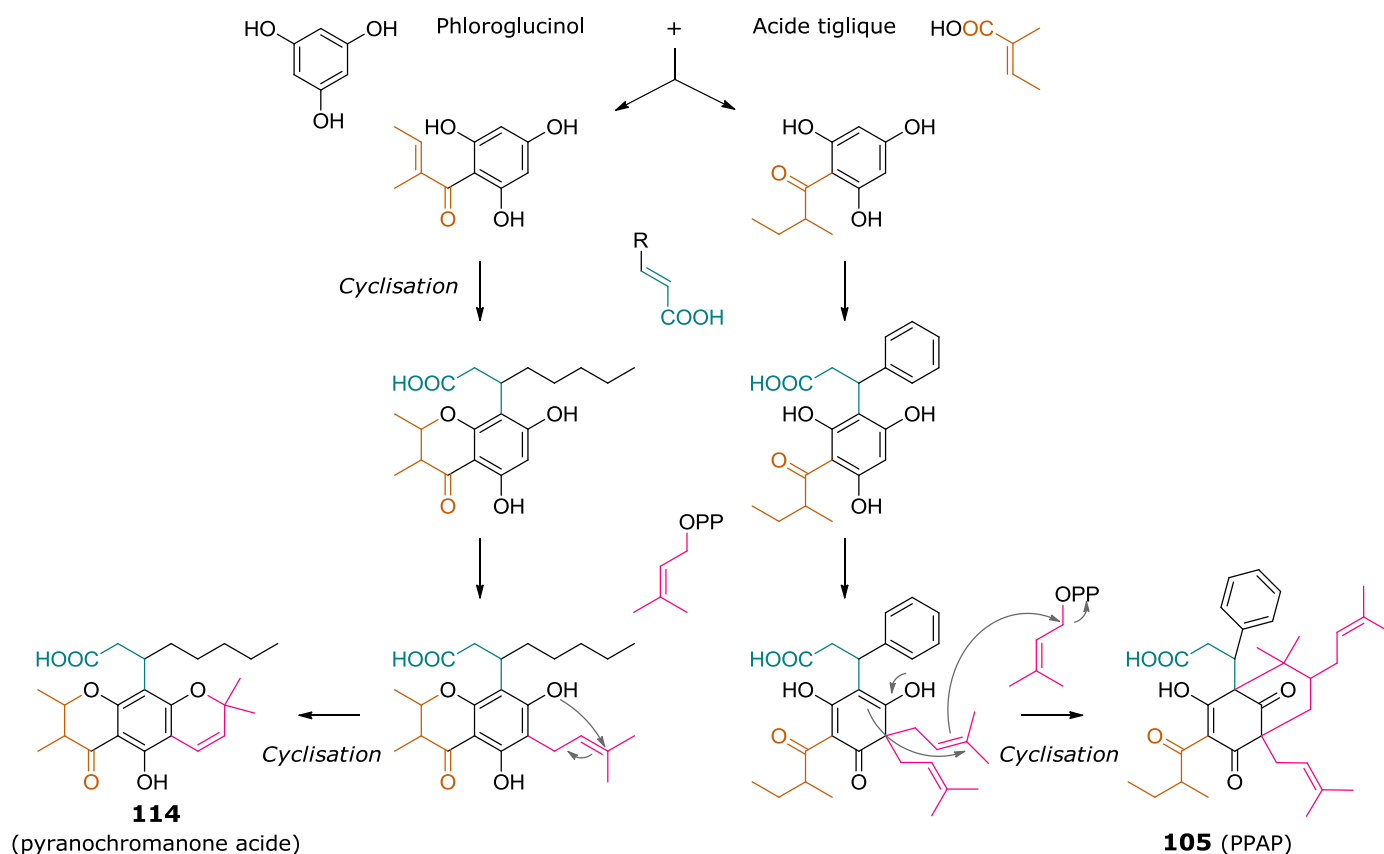


Figure 105. Schéma de biosynthèse proposé pour le PPAP et la pyranochromanone acide majoritaires des lots A et B de *Calophyllum tetrapterum*

4. Etude phytochimique de l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica*

4.1. Matériel végétal

4.1.1. Description de l'espèce

L'espèce *Mesua assamica* (King & Prain) Kosterm. est un grand arbre glabre dont l'écorce est de couleur grise. Elle présente des feuilles entières opposées, coriaces, ovales-lancéolées, acuminées à la base et à l'apex. Ces feuilles, dont la face supérieure est parfois brillante, mesurent 8 à 12 cm de long et 3,5 à 4,5 cm de large, et leurs nervures sont nombreuses et graciles. Le pétiole est mince, long d'environ 1 cm. L'inflorescence consiste en des panicules* terminales et axillaires de 7 à 15 cm de long dont les branches sont glabres. Les pédicelles ont une longueur de 5 mm et les rameaux portent des bractées à leur base. Les sépales sont au nombre de 4, imbriqués, et mesurent au moins 4 mm de long, tandis que les 4 pétales, blancs, sont légèrement plus courts et larges. Le fruit, de 2 cm de diamètre, est globuleux, recouvert d'un épais calice accrescent*, et comporte une seule graine.⁴⁷

Géographiquement, cette espèce s'étend au Sud de l'Asie, et plus particulièrement en Inde, en Birmanie, en Malaisie péninsulaire et à Bornéo.²⁸

4.1.2. Matériel végétal collecté

Les écorces et les feuilles de *Mesua assamica* (**Figure 106**) ont été collectées en juillet 2007 à Gerik, dans l'Etat de Perak au Nord de la Malaisie (**Figure 107**). Un échantillon d'herbier, référencé KL5442, se trouve à l'herbarium du département de chimie de l'université de Malaya, à Kuala Lumpur.



Figure 106. Photographies du tronc et des feuilles de *Mesua assamica*
(Source : Marc Litaudon)



Figure 107. Site de collecte des écorces et feuilles de *Mesua assamica* en Malaisie
(Source de la carte : <http://www.sihra.org/>)

Ayant montré une très bonne activité inhibitrice de l'expression de VCAM-1 au cours du criblage biologique (cf. chapitre II), l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica* a été sélectionné en vue d'initier un criblage bioguidé des métabolites actifs. Une étude déréplicative a également permis de décrire la composition des fractions d'extrait d'intérêt.

4.2. Fractionnement bioguidé initié

4.2.1. Fractionnement de l'extrait DCM

Afin de travailler sur une quantité suffisante d'extrait, 10,3 g de feuilles de *M. assamica* ont de nouveau été extraits sous pression, permettant l'obtention de 271 mg d'extrait DCM (2,6 % de rendement) et 2,3 g d'extrait MeOH (22,3 % de rendement).

Un fractionnement de l'extrait DCM a ensuite été réalisé par chromatographie flash en phase normale pour conduire à 10 fractions (F1 à F10) (**Figure 108**).

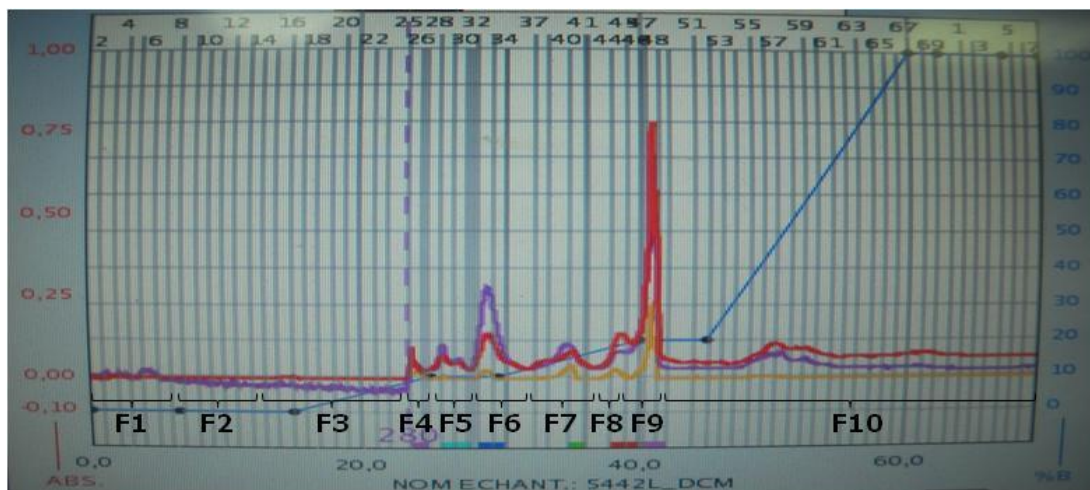


Figure 108. Chromatogramme de la chromatographie flash [280 nm (en violet) et 254 nm (en rouge)] réalisée sur l'extrait DCM de feuilles de *M. assamica* et fractions obtenues

4.2.2. Evaluation biologique des fractions

Le test sur VCAM-1 employant la méthode d'ELISA cellulaire (*cf.* chapitre II) a été utilisé afin d'évaluer l'effet des fractions de l'extrait obtenues. La fraction F2 n'a cependant pas été évaluée dans ce test en raison de sa masse trop faible (1,1 mg).

Le résultat (**Tableau 20**) indique que les fractions F8 et F10 sont toxiques pour les cellules HUVECs à 50 µg/mL, comme l'était l'extrait brut à la même concentration (*cf.* chapitre II). Les fractions les plus inhibitrices de l'expression de VCAM-1 et non cytotoxiques sont F5, F6, F7 et F9. Celles-ci inhibent plus de 25 % de l'expression de la protéine à 50 µg/mL, et, comparé à l'extrait brut (36 % d'inhibition de VCAM-1), F7 montre une meilleure activité à 5 µg/mL.

Tableau 20. Effet des fractions de 5442L_DCM (0,5, 5 et 50 µg/mL) sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF-α
(En fond jaune : 10 à 24 % d'inhibition ; en fond vert : ≥ 25 % d'inhibition de VCAM-1)

	Produit testé	Inhibition de la viabilité cellulaire (%)			Inhibition de l'expression de VCAM-1 induite par le TNF-α (%)		
		0,5 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	0,5 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL
Fractions de l'extrait DCM de feuilles de <i>Mesua assamica</i> (5442L_DCM)	F1	0	0	0	10	9	6
	F3	0	0	0	0	0	0
	F4	0	0	0	0	0	0
	F5	0	0	0	2	2	38
	F6	0	0	0	7	11	31
	F7	0	0	0	4	44	41
	F8	0	0	23	3	17	13
	F9	0	0	0	12	5	26
	F10	0	0	52	10	10	89
Témoins positifs	PDTC (200 µM)	0			84		
	Glyoxal (4 mM)	21			77		

Afin d'identifier les principales familles chimiques constituant les fractions cytotoxiques d'une part, et anti-inflammatoires vis-à-vis de VCAM-1 d'autre part, une étude dérégulative a été menée.

4.3. Analyse dérégulative de la composition chimique des fractions d'intérêt

La principale méthode analytique utilisée pour l'identification des familles chimiques présentes dans les fractions a été la spectrophotométrie UV après séparation sur HPLC analytique. Les données de spectrométrie de masse obtenues à partir du chromatogramme HPLC de l'extrait brut ont également permis de décrire certains composés des fractions inhibant l'expression de VCAM-1.

Seules les données obtenues pour les composés majoritaires sont présentées ici.

4.3.1. Composition des fractions cytotoxiques

L'analyse des chromatogrammes HPLC-UV des fractions F8 et F10 de l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica* (5442L_DCM) révèle que les composés majoritaires présentent des spectres UV typiques de xanthones, avec 4 à 5 bandes d'absorption d'intensités décroissantes⁴⁰ (**Figure 109**). Le spectre de masse en mode tandem (+MS²) du composé majoritaire de F8, élué à 6,2 min, indique par ailleurs une prénylation par la perte de 56 Da (C₄H₈)⁴⁸.

Ces données suggèrent que des xanthones (*cf.* chapitre IV) pourraient être responsables de la cytotoxicité des fractions et de l'extrait brut à 50 µg/mL.

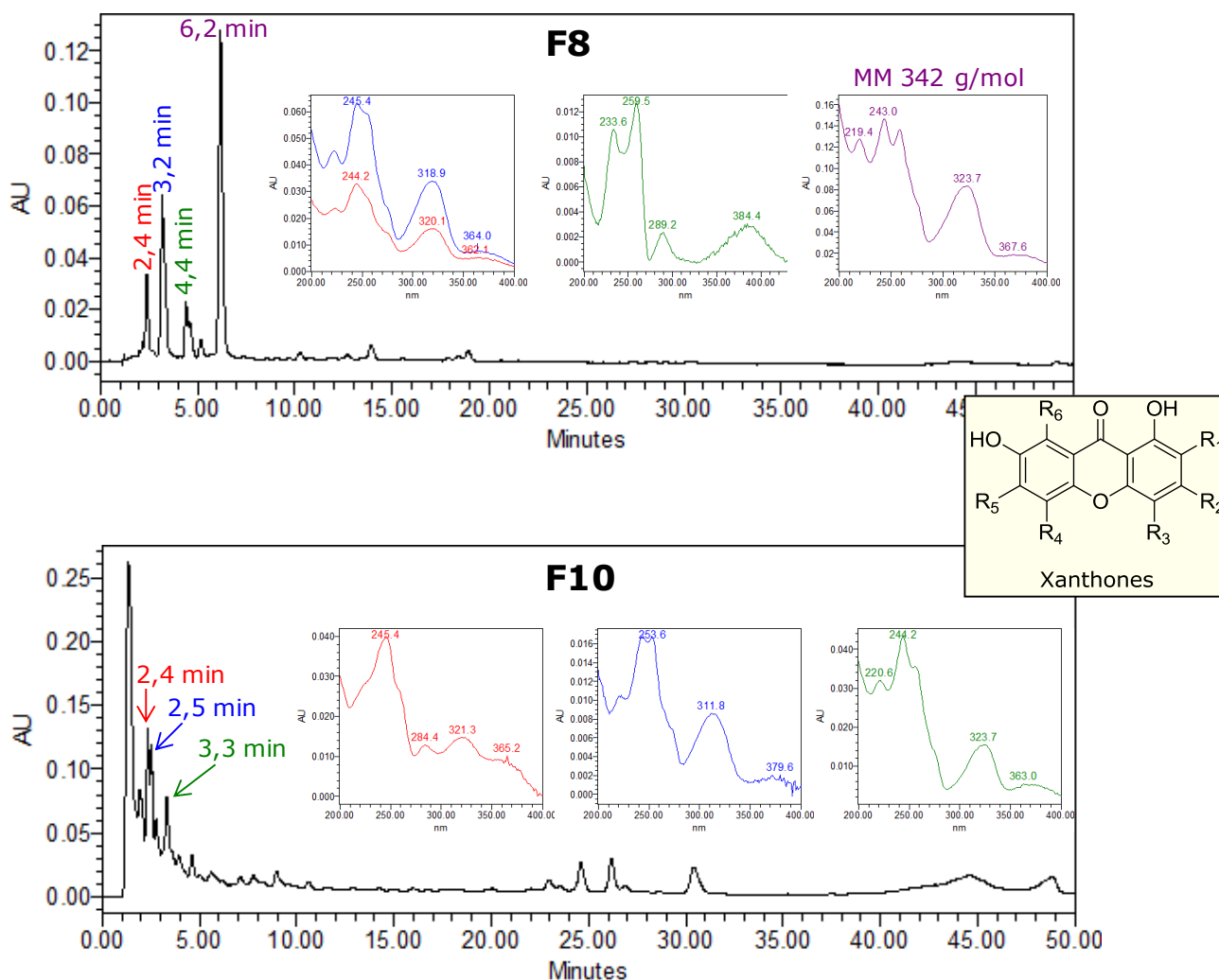


Figure 109. Chromatogrammes HPLC-UV (254 nm, méthode 12) des fractions F8 et F10 de l'extrait 5442L_DCM, et structure générale des xanthones

4.3.2. Composition des fractions inhibitrices de l'expression de VCAM-1

Parmi les produits majoritaires contenus dans les fractions F5, F6, F7 et F9 de *Mesua assamica*, plusieurs composés présentant des spectres UV de xanthones sont, comme précédemment indiqué, retrouvés (**Annexe 18**). Cependant, une majorité de coumarines de type mammea est

également détectée, ce qui permet de supposer qu'elles sont responsables des activités anti-inflammatoires observées.

Concernant ces dernières, le profil des spectres UV est variable (**Annexe 18**), et permet de distinguer les molécules en fonction de leurs substituants. En effet, les λ_{\max} des coumarines de type mammea sont différentes selon que le substituant acyle est en position 6 ou 8. De plus, le profil des spectres de masse, et en particulier les fragmentations en mode tandem, orientent vers certains types de structures. Ainsi, les coumarines non cyclisées perdent une unité de 56 Da, correspondant à un groupement prényle, pour former un ion stable, ce qui n'est pas le cas des dérivés cyclisés.^{49,50}

Le **Tableau 21** présente les données des coumarines de type mammea qui ont été identifiées dans les fractions bioactives par déréplication.

Tableau 21. Données UV et de masse des composés identifiés par déréplication dans les fractions anti-inflammatoires de l'extrait DCM de *M. assamica*

Fraction(s) de l'extrait	t_R (min)	UV λ_{\max} (nm)	(+)-ESI-MS m/z	(+)-ESI-MS ² m/z (par ordre décroissant d'intensité)	(-)-ESI-MS m/z	Structures possibles (Figure 110)
F6 et F9	14,2	230, 280, 350	423 [M+H] ⁺	MS ² [423] : 351 (-72), 405 (-18), 333 (-90), 387 (-36), 333 (-90)	421 [M-H] ⁻	66a ou 66b ou 116 ⁵⁰
F6	17,8	230, 282, 343	393 [M+H] ⁺	MS ² [393] : 337 (-56), 319 (-74)	391 [M-H] ⁻	61c ⁵¹ ou 61d ¹⁴
F7	18,3	222, 294, 330	431 [M+H] ⁺	MS ² [431] : 315 (-116), 371 (-60), 375 (-56), 389 (-42), 345 (-86)	429 [M-H] ⁻	117 ou 118 ^{52,53}
F6	20,1	230, 283, 340	407 [M+H] ⁺	MS ² [407] : 351 (-56), 333 (-74)	405 [M-H] ⁻	61a ou 61b ⁵⁰
F5	22,8	232, 286, 369	405 [M+H] ⁺	MS ² [405] : 387 (-18), 359 (-46), 317 (-88)	403 [M-H] ⁻	65a ⁵⁰

A titre d'exemple, le composé élué à 18,3 min et retrouvé dans la fraction F7 présente une bande d'absorption déplacée aux alentours de 290-295 nm, ce qui indique que le substituant acyle se trouve en position 8⁵⁰. La fragmentation en masse de l'ion quasi-moléculaire est typique des coumarines de type mammea E. En effet, tant en mode positif que négatif, une perte de 60 Da est observée (AcOH), ce qui suggère la présence d'un groupement 1-acétoxypropyle en position 4 de la coumarine⁴⁹. Une perte complémentaire de 56 Da ([M+H-AcOH-C₄H₈]⁺ à m/z 315) en mode positif indique de plus la présence d'un groupement prényle, qui par déduction substitue la position 6. D'après la masse molaire de la molécule (430 g/mol), deux structures sont possibles pour ce composé : mammea E/BA (**117**) et mammea E/BB (**118**), déjà isolés de source naturelle⁵².

Les données relatives aux autres composés ont été traitées de la même façon et ont permis de proposer une ou plusieurs structures, présentées dans la **Figure 110**. Une comparaison du t_R avec des standards permettrait de valider les hypothèses formulées.

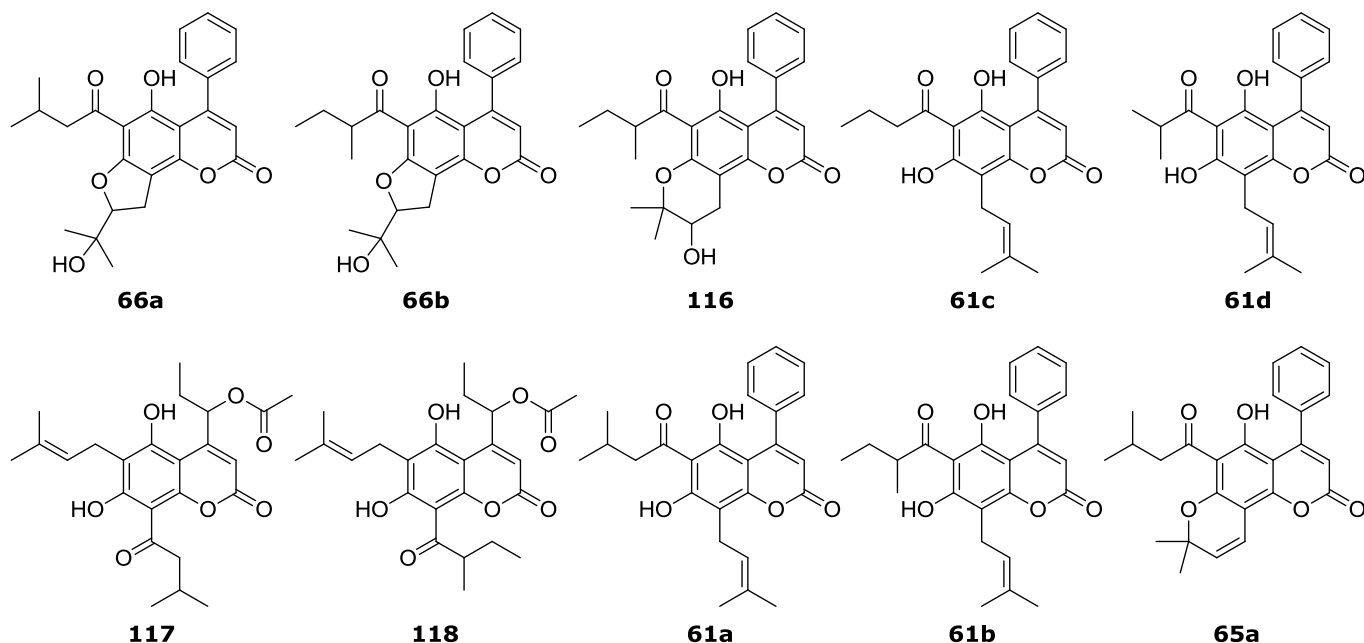


Figure 110. Structures des coumarines de type mammea possibles d'après l'analyse déréplicative des fractions bioactives de l'extrait 5442L_DCM

Dans le cas précis des coumarines et des xanthones, une méthode d'identification automatisée des métabolites secondaires présents au sein d'un mélange est actuellement en cours d'installation au laboratoire SONAS. Celle-ci devrait permettre par la suite de s'intéresser aux composés minoritaires des fractions d'intérêt que nous avons mises en évidence.

4.4. Conclusion sur l'étude des feuilles de *Mesua assamica*

L'initiation d'un fractionnement bioguidé sur l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica* a mis en évidence la présence de xanthones dans les fractions cytotoxiques, et de diverses coumarines de type mammea dans les fractions inhibitrices de l'expression de VCAM-1. Le squelette de ces coumarines est confirmé comme un pharmacophore d'intérêt dans la recherche de composés prévenant la dysfonction endothéliale.

5. Conclusion

L'étude phytochimique de ces quatre extraits de *Mesua* et de *Calophyllum*, précédemment sélectionnés pour leur composition originale en métabolites secondaires et pour leur activité

inhibitrice de l'expression de la protéine VCAM-1, a permis d'isoler et d'identifier neuf nouveaux polyphénols polyprénylés naturels.

Les fruits de l'espèce *Mesua lepidota* ont été décrits anatomiquement et se sont avérés riches en phénylcoumarines originales, dont le composé majoritaire, le lépidotol A (**94**), sera également décrit pour ses activités anti-inflammatoires et immunomodulatrices au cours du chapitre IV. Des coumarines de type mammea ont aussi été retrouvées dans les fractions bioactives de l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica*, grâce à l'étude dérèplicative menée au cours du fractionnement bioguidé initié.

Concernant les feuilles des lots A et B de *Calophyllum tetrapterum*, l'approche descriptive de l'anatomie n'a pas montré de différence significative qui supposerait une erreur d'identification de l'espèce. Cette observation est en faveur de la présence de deux chémotypes. Aussi, le PPAP majoritaire identifié dans le lot A se distingue par la présence d'une fonction acide carboxylique, ce qui caractérise également les pyranochromanones acides retrouvées dans le lot B. Des éléments communs dans leur voie de biogénèse peuvent donc être envisagés, tandis que les différences de composition peuvent être dues à l'environnement, aux conditions climatiques et à l'âge des feuilles.

Bibliographie du chapitre III

- Boer, E.; Ella, A. B., *Plant Resources of South-East Asia N° 18: Plants Producing Exudates*. Backhuys Publishers: Leiden, **2000**; 189 p.
- King, G., Materials for a flora of the Malayan Peninsula. *Journal of the Asiatic Society of Bengal* **1890**, 59, 185.
- Vesque, J.-J. S. M., *Epharמושis sive materiae ad instruendam anatomiam systematis naturalis*. Delapierre: Vincennes, **1889**; Vol. 2, *Genitalia foliaque garciniearum et calophyllearum*, 194 p.
- Carpenter, I.; McGarry, E. J.; Scheinmann, F., Extractives from *Guttiferae*. Part XXI. The isolation and structure of nine coumarins from the bark of *Mammea africana* G. Don. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1971**, 3783-3790.
- Guilet, D.; Helesbeux, J.-J.; Seraphin, D.; Sevenet, T.; Richomme, P.; Bruneton, J., Novel Cytotoxic 4-Phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*. *Journal of Natural Products* **2001**, 64, 563-568.
- Verotta, L.; Lovaglio, E.; Vidari, G.; Finzi, P. V.; Neri, M. G.; Raimondi, A.; Parapini, S.; Taramelli, D.; Riva, A.; Bombardelli, E., 4-Alkyl- and 4-phenylcoumarins from *Mesua ferrea* as promising multidrug resistant antibacterials. *Phytochemistry* **2004**, 65, 2867-2879.
- Wittenauer, J.; Falk, S.; Schweiggert-Weisz, U.; Carle, R., Characterisation and quantification of xanthenes from the aril and pericarp of mangosteens (*Garcinia mangostana* L.) and a mangosteen containing functional beverage by HPLC-DAD-MSn. *Food Chemistry* **2012**, 134, 445-452.
- Yang, M.; Wang, W.; Sun, J.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Liang, H.; Guo, D.-a., Characterization of phenolic compounds in the crude extract of *Hedysarum multijugum* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21, 3833-3841.
- Hay, A. E.; Guilet, D.; Morel, C.; Larcher, G.; Macherel, D.; Le, R. A. M.; Litaudon, M.; Richomme, P., Antifungal chromans inhibiting the mitochondrial respiratory chain of pea seeds and new xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Medica* **2003**, 69, 1130-1135.
- Reutrakul, V.; Leewanich, P.; Tuchinda, P.; Pohmakotr, M.; Jaipetch, T.; Sophasan, S.; Santisuk, T., Cytotoxic coumarins from *Mammea harmandii*. *Planta Medica* **2003**, 69, 1048-1051.
- Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J., Synthesis of mammeins and surangin A. *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, 2929-2932.
- Ramiandrasoa, F.; Kunesch, N.; Poisson, J.; Kunesch, G., Le calofloride, intermédiaire d'un type nouveau de la biogenèse des néoflavonoïdes. *Tetrahedron* **1983**, 39, 3923-3928.
- Chahar, M. K.; Sanjaya, K. D. S.; Lokesh, T.; Manohara, K. P., *In-vivo* antioxidant and immunomodulatory activity of mesuol isolated from *Mesua ferrea* L. seed oil. *International Immunopharmacology* **2012**, 13, 386-391.
- Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J., Synthesis of the *Mammea* coumarins. Part 1. The coumarins of the *Mammea* A, B, and C series. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1987**, 317-331.
- Sandjo, L. P.; Foster, A. J.; Rheinheimer, J.; Anke, H.; Opatz, T.; Thines, E., Coumarin derivatives from *Pedilanthus tithymaloides* as inhibitors of conidial germination in *Magnaporthe oryzae*. *Tetrahedron Letters* **2012**, 53, 2153-2156.
- Morel, C.; Dartiguelongue, C.; Youhana, T.; Oger, J.-M.; Seraphin, D.; Duval, O.; Richomme, P.; Bruneton, J., New coumarins from *Mesua racemosa*: isolation and synthesis. *Heterocycles* **1999**, 51, 2183-2191.
- Ballantyne, M. M.; Murray, R. D. H.; Penrose, A. B., An out-of-ring Claisen rearrangement during the synthesis of nieshoutin and obliquetin. *Tetrahedron Letters* **1968**, 4155-4158.
- Chamberlain, T. R.; Collins, J. F.; Grundon, M. F., Claisen rearrangements in the biosynthesis of 1,1- and 1,2-dimethylallyl derivatives. Biosynthesis of the quinoline alkaloid, ravenoline. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* **1969**, 1269-1270.
- Du, L.; Mahdi, F.; Jekabsons, M. B.; Nagle, D. G.; Zhou, Y.-D., Natural and semisynthetic mammea-type isoprenylated dihydroxycoumarins uncouple cellular respiration. *Journal of Natural Products* **2011**, 74, 240-248.
- Begley, M. J.; Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J., Synthesis of the *Mammea* coumarins. Part 4. Stereochemical and regiochemical studies, and synthesis of (-)-*Mammea* B/BB. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1987**, 353-357.
- Stephens, P. J.; McCann, D. M.; Cheeseman, J. R.; Frisch, M. J., Determination of absolute configurations of chiral molecules using ab initio time-dependent density functional theory calculations of optical rotation: how reliable are absolute configurations obtained for molecules with small rotations? *Chirality* **2005**, 17, S52-S64.

22. Autschbach, J., Time-dependent density functional theory for calculating origin-independent optical rotation and rotatory strength tensors. *ChemPhysChem* **2011**, 12, 3224-3235.
23. Mazzeo, G.; Giorgio, E.; Zanasi, R.; Berova, N.; Rosini, C., Absolute configuration through the DFT simulation of the optical rotation. Importance of the correct selection of the input geometry: a caveat. *Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75, 4600-4603.
24. Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H., Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 766, 61-68.
25. King, G., Materials for a flora of the Malayan Peninsula. *Journal of the Asiatic Society of Bengal* **1890**, 59, 175.
26. Ridley, H. N.; Hutchinson, J., *The flora of the Malay Peninsula*. L. Reeve & co., Ltd.: London, **1922**; Vol. 1. *Polypetalae*, 918 p.
27. Arboretum, A., *Journal of the Arnold arboretum*. Arnold Arboretum, Harvard University: Cambridge, Mass, **1980**; Vol. 61, 783 p.
28. Global Biodiversity Information Facility (GBIF) [en ligne], <http://www.gbif.org/>, consulté le 25 juin 2015.
29. Verotta, L.; Appendino, G.; Belloro, E.; Bianchi, F.; Sterner, O.; Lovati, M.; Bombardelli, E., Synthesis and biological evaluation of hyperforin analogues. Part I. Modification of the enolized cyclohexanedione moiety. *Journal of Natural Products* **2002**, 65, 433-438.
30. Derogis, P. B. M. C.; Martins, F. T.; de, S. T. C.; Moreira, M. E. d. C.; Souza, F. J. D.; Doriguetto, A. C.; de, S. K. R. D.; Veloso, M. P.; Dos, S. M. H., Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2008**, 46, 278-282.
31. Piccinelli, A. L.; Campone, L.; Dal Piaz, F.; Cuesta-Rubio, O.; Rastrelli, L., Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, 20, 1688-1698.
32. Gustafson, K. R.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G.; Fuller, R. W.; McKee, T. C.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Cragg, G. M.; Boyd, M. R., The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron* **1992**, 48, 10093-10102.
33. Bokesch, H. R.; Groweiss, A.; McKee, T. C.; Boyd, M. R., Laxifloranone, a new phloroglucinol derivative from *Marila laxiflora*. *Journal of Natural Products* **1999**, 62, 1197-1199.
34. Ali, M. S.; Mahmud, S.; Perveen, S.; Ahmad, V. U.; Rizwani, G. H., Epimers from the leaves of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **1999**, 50, 1385-1389.
35. Li, Y.-Z.; Li, Z.-L.; Yin, S.-L.; Shi, G.; Liu, M.-S.; Jing, Y.-K.; Hua, H.-M., Triterpenoids from *Calophyllum inophyllum* and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells. *Fitoterapia* **2010**, 81, 586-589.
36. Da Silva, F. M. A.; Koolen, H. H. F.; Barisson, A.; De Souza, A. D. L.; Pinheiro, M. L. B., Steroids and triterpene from the bark of *Unonopsis guatterioides* R. E. FR. (*Annonaceae*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, 4, 522-523.
37. Husain, K.; Jamal, J. A.; Jalil, J., Phytochemical study of *Cananga odorata* Hook. F. & Thoms (*Annonaceae*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, 4, 465-467.
38. Ee, G. C. L.; Mah, S. H.; Teh, S. S.; Rahmani, M.; Go, R.; Taufiq-Yap, Y. H., Soulamarin, a new coumarin from stem bark of *Calophyllum soulattri*. *Molecules* **2011**, 16, 9721-9727.
39. Mah, S. H.; Ee, G. C. L.; Teh, S. S.; Rahmani, M.; Lim, Y. M.; Go, R., Phylattrin, a new cytotoxic xanthone from *Calophyllum soulattri*. *Molecules* **2012**, 17, 8303-8311.
40. Dey, P. M.; Harborne, J. B., *Methods in plant biochemistry*. Academic Press: London, **1989**; Vol. 1, Plant phenolics, 552 p.
41. Habib, A. M.; Reddy, K. S.; McCloud, T. G.; Chang, C. J.; Cassady, J. M., New xanthenes from *Psorospermum febrifugum*. *Journal of Natural Products* **1987**, 50, 141-145.
42. Ferchichi, L.; Derbré, S.; Mahmood, K.; Touré, K.; Guilet, D.; Litaudon, M.; Awang, K.; Hadi, A. H. A.; Le Ray, A. M.; Richomme, P., Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry* **2012**, 78, 98-106.
43. Wang, H.; Sun, Q.-Y.; Yang, F.-M.; Long, C.-L.; Wang, Y.-H.; Tang, G.-H.; Zhao, F.-W.; Niu, H.-M.; Huang, Q.-Q.; Xu, J.-J.; Wataya, Y.; Ma, L.-J., Chromanone derivatives from the pericarps of *Calophyllum polyanthum*. *Helvetica Chimica Acta* **2010**, 93, 2183-2188.
44. Ha, L. D.; Hansen, P. E.; Duus, F.; Pham, H. D.; Nguyen, L.-H. D., A new chromanone acid from the bark of *Calophyllum dryobalanoides*. *Phytochemistry Letters* **2012**, 5, 287-291.
45. Stout, G. H.; Sears, K. D., *Calophyllum* products. III. Structure of blancoic acids. *Journal of Organic Chemistry* **1968**, 33, 4185-4190.
46. Alarcon, A. B.; Cuesta-Rubio, O.; Cardenas, P. J.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L., Constituents of the Cuban endemic species *Calophyllum pinetorum*. *Journal of Natural Products* **2008**, 71, 1283-1286.

47. Society, C. A., *The tropical agriculturist*. J. Ferguson: London, **1901**; Vol. 20, 878 p.
48. Kainz, K.; Zehl, M.; Bleier, J.; Merkingner, B.; Pemmer, T.; Schmidt, N.; Winkler, J.; Kahlig, H.; Krenn, L., New compounds from the tree fern *Metaxya rostrata* C. Presl. *Records of Natural Products* **2014**, 8, 348-353.
49. Dang, B. T.; Geny, C.; Blanchard, P.; Rouger, C.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Tonnerre, P.; Charreau, B.; Rakolomalala, G.; Randriamboavonjy, J. I.; Loirand, G.; Pacaud, P.; Litaudon, M.; Derbre, S., Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*. *Fitoterapia* **2014**, 96, 65-75.
50. Dang, B. T.; Guitton, Y.; Freuze, I.; Grovel, O.; Litaudon, M.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Derbre, S., Dereplication of *Mammea neurophylla* metabolites to isolate original 4-phenylcoumarins. *Phytochemistry Letters* **2015**, 11, 61-68.
51. Thebtaranonth, C.; Imraporn, S.; Padungkul, N., Phenylcoumarins from *Ochrocarpus Siamensis*. *Phytochemistry* **1981**, 20, 2305-2306.
52. Yang, H.; Jiang, B.; Reynertson, K. A.; Basile, M. J.; Kennelly, E. J., Comparative analyses of bioactive *Mammea* coumarins from seven parts of *Mammea americana* by HPLC-PDA with LC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, 4114-4120.
53. Dang, B. T.; Rouger, C.; Litaudon, M.; Richomme, P.; Séraphin, D.; Derbré, S., Identification of minor benzoylated 4-phenylcoumarins from a *Mammea neurophylla* bark extract. *Molecules* **2015**, 20, 17735-17746.

Chapitre IV : Etude de l'activité anti-inflammatoire et immunorégulatrice d'un panel de polyphénols

Chapitre IV : Etude de l'activité anti-inflammatoire et immunorégulatrice d'un panel de polyphénols

Au cours des précédents chapitres, diverses classes de polyphénols ont été mises en évidence dans les extraits de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae*. Afin de connaître plus précisément celles qui présentent un intérêt potentiel dans la prévention des rejets de greffe, une étude de l'activité anti-inflammatoire et immunorégulatrice a été conduite sur un panel de polyphénols purifiés.

Ce dernier chapitre présentera tout d'abord l'ensemble des composés d'origine naturelle sélectionnés pour cette étude, puis les effets observés sur l'expression induite de la protéine VCAM-1 par la méthode d'ELISA cellulaire. Une troisième partie mettra en avant l'évaluation de la toxicité des molécules d'origine végétale, en vue de choisir une concentration adéquate pour la suite des essais biologiques. Enfin, les effets de ces molécules sur une large gamme de marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité évalués par cytométrie en flux seront présentés, suivis d'une discussion sur les structures biologiquement actives.

1. Sélection d'un panel de polyphénols isolés de *Clusiaceae* / *Calophyllaceae*

Travaillant depuis plusieurs années à l'isolement de métabolites secondaires synthétisés par les *Clusiaceae* et les *Calophyllaceae*, le laboratoire SONAS a pu enrichir sa chimiothèque en divers polyphénols polyprénylés. Ces composés sont généralement doués de propriétés antioxydantes¹ et anti-inflammatoires^{2,3}, et des effets inhibiteurs de molécules d'adhésion telles que VCAM-1^{4,5} ont déjà été observés. Les activités immunosuppressives de plusieurs dérivés polyphénoliques ont aussi été démontrées, notamment celles du glycyrol (**13**)⁶ et de l'isogarcinol (**16**)⁷.

Ainsi, plusieurs polyphénols représentatifs des familles chimiques retrouvées dans les extraits de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* (cf. chapitre II) ont été sélectionnés (**Figure 111**), pour une étude de leurs effets sur l'expression de marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité. Tous les produits testés provenaient de la chimiothèque du laboratoire SONAS (responsable : Dr. Anne-Marie Le Ray).

Les résultats présentés dans les chapitres II et III montrent que les coumarines de type mammea sont prépondérantes dans plusieurs extraits ou fractions au potentiel anti-inflammatoire. Celles-ci semblent donc particulièrement opportunes à étudier, notamment au niveau des relations structure-activité. Ainsi a-t-on choisi de comparer l'effet de sept types de coumarines différemment substituées. Parmi elles, se trouvent trois phénylcoumarines : mammea A/AA (**61a**)⁸, qui porte une chaîne acyle en position 6 et une unité prényle sur C-8 ; mammea A/AA cyclo F (**66a**)⁸, dont l'unité prényle est cyclisée avec l'hydroxyle ; et le lépidotol A (**94**)⁹, nouvellement isolé de *Mesua lepidota* et diprényle en position 6. Présentant un substituant différent en position 4, la propylcoumarine cyclisée mammea B/AB cyclo F (**119**)⁸ a été choisie, ainsi que deux 1-acétoxypropylcoumarines en mélange, le neurophyllol A (**120**) et le neurophyllol B (**121**)¹⁰ (17 % et 83 % respectivement), qui sont des dérivés hydroxylés de mammea E. Outre des coumarines de type mammea, deux coumarines simples ont enfin été intégrées au panel : la coumarine (**122**) et l'ombelliférone (**123**) uniquement hydroxylée en position 7.

Egalement très retrouvées dans les extraits DCM de *Calophyllum* et de *Mesua*, les xanthones prénylées sont ici représentées par la caloxanthone C (**34c**) et la calothwaitesixanthone (**124**)¹¹, cyclisées de façon linéaire pour la première et angulaire pour la seconde. La benzophénone cage prénylée qu'est la guttiférone J (**125**)¹² a également été incluse dans les tests biologiques en tant qu'acylphloroglucinol polyprénylé (PPAP), tandis que dans la famille des pyranochromanones acides figure l'acide blancoïque (**114**), isolé de *Calophyllum tetrapterum* au cours de ce travail de thèse.

Enfin, un biflavonoïde simple, l'amentoflavone (**49**)¹³, représente ici les polyphénols extraits par le MeOH.

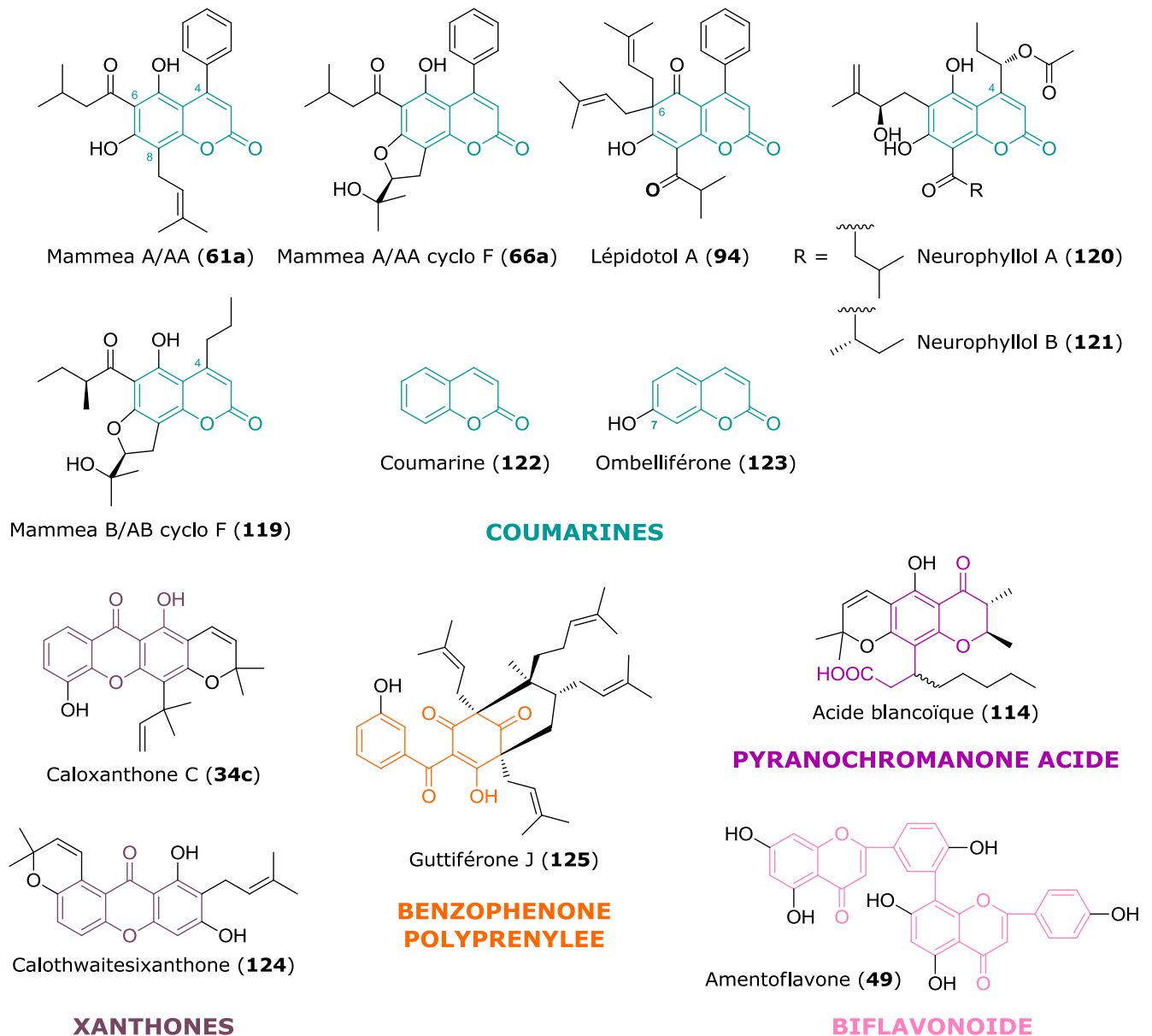


Figure 111. Composés sélectionnés pour l'étude des effets sur un panel de marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité

Ce sont donc douze composés répartis dans cinq classes de polyphénols qui ont été sélectionnés, en vue d'évaluer leurs effets anti-inflammatoires et immunorégulateurs.

L'équipe 5 de l'unité INSERM 1064 / CRTI de Nantes (codirection : Dr. Béatrice Charreau) a pour objectifs de comprendre les mécanismes initiateurs de la dysfonction endothéliale et d'identifier des cibles moléculaires en vue de protéger l'endothélium et le greffon en cas de transplantation d'organe. Pour cela, l'un de ces principaux axes de recherche consiste à étudier le rôle des molécules du HLA de classe I non classique, en particulier MICA et HLA-E, qui sont exprimées par les cellules endothéliales du greffon. C'est au sein de cette équipe de recherche qu'ont été évalués les effets des polyphénols sélectionnés sur des marqueurs membranaires de la dysfonction endothéliale dans un premier temps, et des réponses immunes de l'endothélium dans un second temps.

2. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire des polyphénols par ELISA cellulaire

Tout d'abord, afin d'évaluer l'effet des molécules précitées à la fois sur l'expression de la protéine VCAM-1 et sur la viabilité cellulaire, le protocole utilisant la méthode d'ELISA cellulaire décrite au chapitre II a été appliqué. Les cellules HUVECs ont été traitées aux concentrations de 0,5, 5 et 50 μM pour la plupart des composés. En effet, le lépidotol A (**94**) et l'acide blancoïque (**114**) ont été évalués avant leur purification, à 0,5, 5 et 50 $\mu\text{g/mL}$, ce qui correspond à environ 1, 10 et 100 μM de lépidotol A (**94**) et à 0,8, 8 et 80 μM d'acide blancoïque (**114**). Tous les échantillons ont été testés en triplicat. (**Tableau 22**)

Tableau 22. Effet des polyphénols purifiés sur la viabilité des cellules HUVECs et sur leur expression de VCAM-1 après induction par le TNF- α

Les pourcentages d'inhibition de la viabilité cellulaire et de l'expression de VCAM-1 sont calculés par rapport aux DO du témoin non traité et du témoin traité par TNF- α , respectivement. (En fond vert : 25 à 49 % d'inhibition ; en fond rose : ≥ 50 % d'inhibition de VCAM-1. En gras : effet sur la viabilité cellulaire affectant le résultat observé sur VCAM-1).

Famille chimique	Composé	Inhibition de la viabilité cellulaire (%)			Inhibition de l'expression de VCAM-1 induite par le TNF- α (%)		
		0,5 μM ou 0,5 $\mu\text{g/mL}$	5 μM ou 5 $\mu\text{g/mL}$	50 μM ou 50 $\mu\text{g/mL}$	0,5 μM ou 0,5 $\mu\text{g/mL}$	5 μM ou 5 $\mu\text{g/mL}$	50 μM ou 50 $\mu\text{g/mL}$
Coumarines	61a	0	0	0	10	14	69
	66a	0	0	0	12	20	29
	94 majoritaire^a	0	0	25	0	18	52
	119	0	0	0	11	16	27
	120 + 121	0	0	37	0	0	51
	122	0	0	0	0	0	20
	123	0	0	0	0	0	30
Xanthones	34c	0	21	61	19	32	91
	124	0	0	63	19	17	31
Benzophénone (PPAP)	125	0	0	0	16	20	59
Pyranochromanone acide	114 majoritaire^b	0	0	0	23	22	24
Biflavonoïde	49	0	0	0	5	20	31
Témoins positifs	PDTC (200 μM)		3			64	
	TEMPOL (2 mM)		0			22	
	Glyoxal (4 mM)		31			71	

^a Concentrations de 0,5, 5 et 50 $\mu\text{g/mL}$ équivalentes à environ 1, 10 et 100 μM de lépidotol A (**94**)

^b Concentrations de 0,5, 5 et 50 $\mu\text{g/mL}$ équivalentes à environ 0,8, 8 et 80 μM d'acide blancoïque (**114**)

Il ressort de cet essai que les coumarines présentent une activité anti-inflammatoire plus ou moins marquée à 50 μM en fonction de leurs substitutions. La phénylcoumarine non cyclisée **61a** montre plus de 60 % d'inhibition de la protéine VCAM-1 sans altération de la viabilité cellulaire. En revanche, les deux coumarines qui comportent un cycle dihydrofuranique (**66a** et **119**) sont beaucoup moins inhibitrices à 50 μM , et d'activités très comparables entre elles. Cet effet pourrait être dû à la perte d'un phénol libre, induisant une moindre activité anti-oxydante. Les coumarines plus simples **122** et **123** sont quant à elles inactives à 0,5 et 5 μM et modérément inhibitrices à 50 μM . Les effets observés à 50 μM avec le mélange de neurophyllols (**120+121**) et à 50 $\mu\text{g/mL}$ avec l'extrait riche en lépidotol A (**94**) ne sont pas interprétables en raison de la toxicité exercée parallèlement sur les HUVECs.

Pour leur part, les xanthones diminuent fortement la viabilité cellulaire à 50 μM , et la caloxanthone C (**34c**), cyclisée de façon linéaire, est même toxique dès 5 μM . Néanmoins, une baisse non négligeable (19 %) de l'expression induite de VCAM-1 est observée à 0,5 μM .

La benzophénone polyprénylée **125** présente ici autant d'intérêt que la coumarine **61a**, puisqu'elle induit une diminution de l'expression de VCAM-1 du même ordre de grandeur aux trois concentrations évaluées, sans diminuer la viabilité des cellules.

Concernant la fraction riche en acide blancoïque (**114**), on note une activité inhibitrice constante à 0,5, 5 et 50 $\mu\text{g/mL}$, autour de 23 % d'inhibition. L'effet ne semble donc pas dose-dépendant.

Enfin, une relation dose-effet apparaît avec le biflavonoïde **49**, dont le potentiel anti-inflammatoire s'avère similaire à celui des coumarines de type mammea cyclisées (**66a** et **119**).

En définitive, les xanthones apparaissant cytotoxiques, et les activités des deux mammea cyclo F (**66a** et **119**) sur VCAM-1 étant semblables, il a été décidé de ne pas poursuivre l'étude de l'effet des xanthones **34c** et **124** ni de mammea B/AB cyclo F (**119**) sur les autres marqueurs membranaires de l'inflammation et de l'immunité.

3. Evaluation de la toxicité des polyphénols sur les cellules endothéliales

Afin de choisir une concentration en polyphénols purifiés adéquate pour la suite des expérimentations, l'effet sur la viabilité des cellules HUVECs a été évalué à plusieurs concentrations et après une période de 48 h, correspondant à la durée maximale d'incubation requise pour les essais biologiques. Pour cela, le test de viabilité au MTT a été utilisé, et deux agents immunosuppresseurs témoins ont également été évalués de façon à pouvoir comparer leur effet à celui des polyphénols végétaux.

Chaque polyphénol purifié a été testé à 1, 10 et 100 μM , voire à la concentration intermédiaire de 50 μM . Les témoins immunosuppresseurs que sont la ciclosporine (**3**)^{14,15} et l'acide zolédronique (**126**)^{16,17} ont quant à eux été testés uniquement à 10 μM , concentration usuellement utilisée en culture cellulaire d'après la littérature. Des dilutions de DMSO équivalentes à celles retrouvées dans les solutions de polyphénols à 10 et 100 μM ont été utilisées comme contrôles négatifs, tandis qu'une solution de glyoxal à 4 mM a constitué un contrôle positif de cytotoxicité (**Figure 112**).

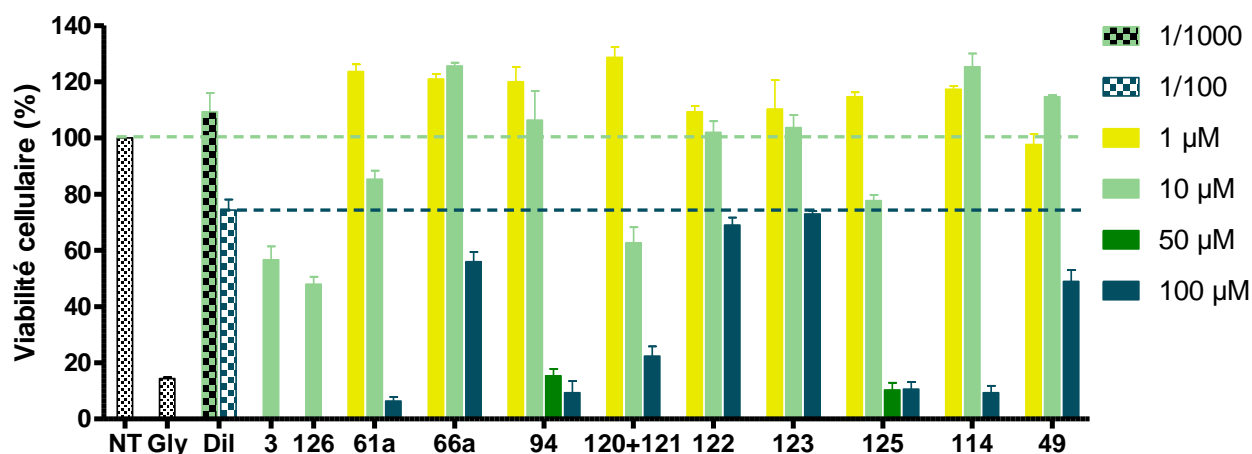


Figure 112. Effet des polyphénols purifiés, de la ciclosporine (3**) et de l'acide zolédronique (**126**) sur la viabilité des HUVECs après 48 h d'incubation**

Un contrôle « diluant » (Dil) est utilisé pour les solutions à 10 et à 100 μM (dilutions de DMSO à 1/1000 et 1/100 – *ligne bleue en pointillés*, respectivement). Un contrôle non traité (NT) – *ligne verte en pointillés* – ainsi qu'un contrôle de cytotoxicité (Gly pour glyoxal à 4 mM) apparaissent également.

Les résultats (**Figure 112**) montrent que le solvant (DMSO) dilué au 1/100, comme dans les solutions de polyphénols à 100 μM , diminue la viabilité des cellules HUVECs d'environ 25 %. Concernant les molécules végétales, seules les coumarines simples **122** et **123** sont atoxiques aux trois concentrations évaluées. Les coumarines de type mammea sont toutes toxiques à 100 μM , atoxiques à 1 μM , mais leur effet à 10 μM est variable. En effet, les dérivés monoprénylés et non cyclisés **61a** et **120/121** entraînent une baisse notable (jusqu'à 37 %) de la viabilité cellulaire à 10 μM , mais s'avèrent cependant moins néfastes que les deux agents immunosuppresseurs témoins (**3** et **126**) à la même concentration. Le dérivé cyclo F de mammea A/AA (**66a**) apparaît comme le moins toxique des coumarines de type mammea puisqu'aucun effet n'apparaît avant 10 μM , et la viabilité à 100 μM n'est atténuée que de 20 % par rapport au contrôle « diluant » correspondant. Ces résultats suggèrent un « effet protecteur » du cycle formé entre les substituants en C-7 et C-8 des coumarines de type mammea, ce qui est accord avec la littérature¹⁸. Le composé diprénylé **94**

abaisse quant à lui nettement la viabilité cellulaire entre 10 et 50 μM . Le pourcentage de cellules viables est, en outre, comparable entre des traitements par ce lépidotol A (**94**) à 50 et à 100 μM .

La benzophénone **125** n'impacte pas la viabilité des cellules à 1 μM , mais la décroît dès 10 μM , tout en restant moins toxique que les composés immunosuppresseurs de référence. Par analogie avec la coumarine **94**, une importante toxicité est notée à 50 et à 100 μM .

Concernant l'acide blancoïque (**114**), il n'affecte pas, comme le lépidotol A (**94**), les cellules à 1 ni à 10 μM , mais réduit fortement leur viabilité (de 65 %) à 100 μM .

L'effet du biflavonoïde (**49**) est enfin comparable à celui de mammea A/AA cyclo F (**66a**), étant non toxique jusqu'à 10 μM et l'étant modérément à 100 μM .

En conséquence, bien que l'ensemble des composés soit inoffensif pour les cellules à 1 μM et parfois nuisible à 10 μM , cette dernière concentration semble être un bon compromis entre toxicité et effet anti-inflammatoire (*cf.* partie 2). De plus, l'effet toxique est moins marqué avec les polyphénols végétaux qu'avec la ciclosporine (**3**) et l'acide zolédronique (**126**) à cette dilution. C'est donc à 10 μM que l'ensemble des métabolites polyphénoliques a été testé par la suite.

4. Evaluation de l'effet des polyphénols sur un panel de protéines de l'inflammation et de l'immunité

A la suite des résultats obtenus sur VCAM-1 en ELISA cellulaire, l'étude des effets des polyphénols végétaux sur l'endothélium a été élargie à plusieurs protéines de l'inflammation et de l'immunité. Pour cela, nous avons eu recours à la cytométrie en flux.

4.1. Principe du test par cytométrie en flux

4.1.1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste à analyser des cellules de façon quantitative et multiparamétrique. Cette technique permet en effet de recueillir des informations sur la taille et la granulosité des cellules, ainsi que sur l'intensité de leur fluorescence.

Les cellules mises en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceaux lumineux. La lumière diffusée est captée par deux photodiodes, une première dans le prolongement du laser (*forward scatter*, FSC), à faible angle, qui permet de refléter le diamètre cellulaire, et une seconde à angle droit (*side scatter*, SSC) qui permet de refléter la granulosité des cellules. Grâce à des lasers d'excitation, lorsque les cellules sont marquées par un ou des fluorochromes, elles émettent des signaux de différentes longueurs d'onde qui sont détectés par plusieurs photomultiplicateurs (PMT) (**Figure 113**). Il s'agit alors de comparer le signal émis par les cellules marquées au bruit de fond émis par les cellules non marquées (auto-fluorescence) pour rendre compte de la quantité de marqueurs présents à la surface des cellules.¹⁹

Après avoir sélectionné la population à étudier d'après ses caractéristiques morphologiques (**Figure 113, A**), l'intensité de fluorescence émise par un nombre défini d'évènements (nombre de cellules analysées) est enregistrée, laquelle est représentée par une répartition en cloche grâce à une forte amplification du signal. (**Figure 113, B**).

La cytométrie en flux est ainsi adaptée pour la quantification simultanée de plusieurs marqueurs (multimarquage), bien qu'ici nous l'ayons exclusivement employée en monomarquage pour évaluer l'expression de diverses protéines de l'inflammation et de l'immunité.

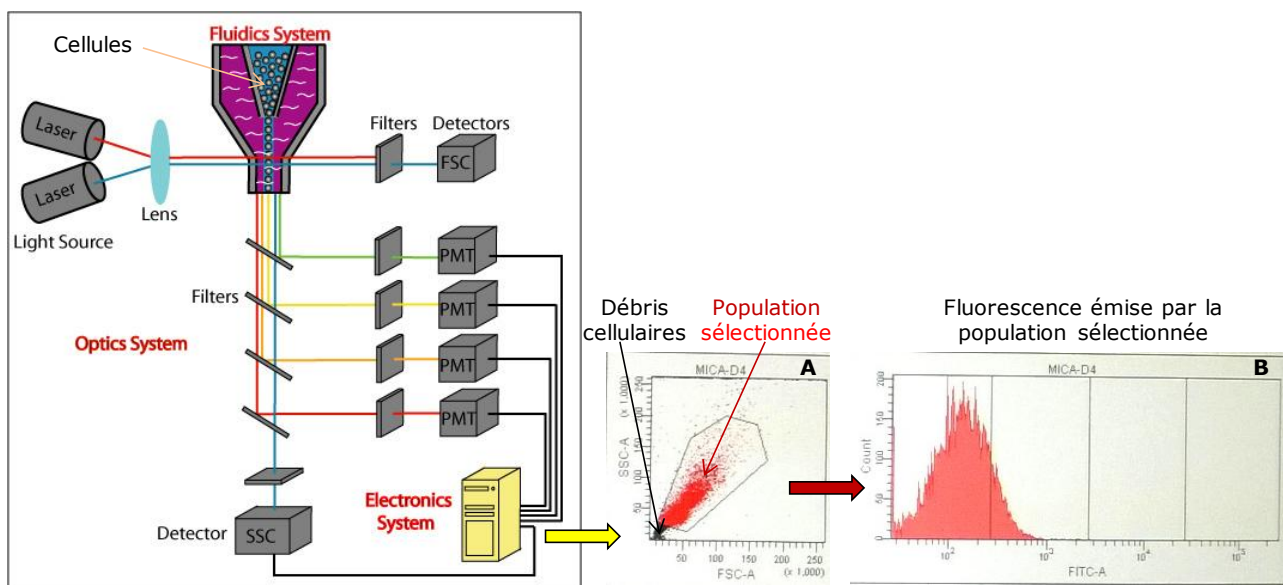


Figure 113. Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux
(Source : http://www.selectscience.net/flow_cytometry_buying_guide.aspx)

4.1.2. Comparaison avec la méthode d'ELISA cellulaire

Tout comme la technique d'ELISA cellulaire, la cytométrie en flux requiert, pour l'évaluation de l'expression d'une protéine de surface, l'utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine visée puis d'un anticorps secondaire marqué. Il est également courant d'employer directement un anticorps primaire marqué par un fluorochrome pour se dispenser d'un double marquage.

En ELISA cellulaire, la lecture se fait par mesure de la densité optique, donc l'anticorps secondaire est toujours couplé à une peroxydase. Ceci implique qu'une seule protéine membranaire peut être analysée dans une même expérience. En revanche, en cytométrie en flux, l'utilisation d'anticorps marqués par différents fluorochromes en fonction de la protéine analysée permet d'explorer plusieurs marqueurs à la fois sur une même cellule.

De plus, le test par ELISA cellulaire ne peut être utilisé que pour l'analyse de protéines fortement induites car le résultat est basé sur une lecture d'absorbance, qui nécessite une amplitude suffisante d'expression. La cytométrie en flux permet quant à elle d'observer des différences d'expression plus faibles car le résultat s'appuie sur l'analyse d'un grand nombre de cellules. Elle a

également l'avantage de s'affranchir d'un contrôle parallèle mesurant la viabilité cellulaire, puisque seules les cellules viables sont analysées.

En revanche, les conditions de l'ELISA se rapprochent plus des conditions physiologiques dans l'endothélium, de par la confluence des cellules au moment du marquage. En effet, pour l'analyse en cytométrie, les cellules sont remises en suspension avant le marquage, offrant une plus grande surface pour la fixation des anticorps.

4.1.3. Marqueurs membranaires de l'inflammation et de l'immunité analysés

Par la technique de cytométrie en flux, trois marqueurs endothéliaux de surface intervenant dans les processus inflammatoires ont été analysés : VCAM-1 (aussi appelé CD106), ICAM-1 (ou CD54) et la E-sélectine (ou CD62E). Contrairement à VCAM-1 et à la E-sélectine, il existe une expression basale de ICAM-1 par les cellules endothéliales quiescentes. Par ailleurs, ces trois protéines sont fortement exprimées après 6 heures d'induction par le TNF- α ^{20,21}, et inhibées par le PDTC²².

Quatre molécules du CMH impliquées dans les réponses immunes de l'endothélium ont également été explorées : le HLA de classe I classique, le HLA de classe II classique (HLA-DR), et HLA-E et MICA, qui sont des molécules du HLA de classe I non classique. Lorsque les cellules endothéliales sont mises en culture, leur expression du CMH de classe II disparaît, ce qui est cependant restauré après un traitement par l'IFN- γ ²³. Les trois autres protéines sont quant à elles constitutivement exprimées à la surface des cellules HUVECs^{24,25}. L'IFN- γ induit une forte surexpression du HLA de classe I classique, du HLA de classe II et de HLA-E au bout de 48 heures²⁶⁻²⁹, tandis qu'il provoque l'effet inverse sur l'expression de MICA^{30,31}.

4.1.4. Protocole mis en place par cytométrie en flux

La **Figure 114** schématise le protocole de l'essai biologique par cytométrie en flux, pour lequel des cellules HUVECs confluentes ont tout d'abord été prétraitées pendant 1 heure par les polyphénols végétaux à une concentration finale de 10 μ M.

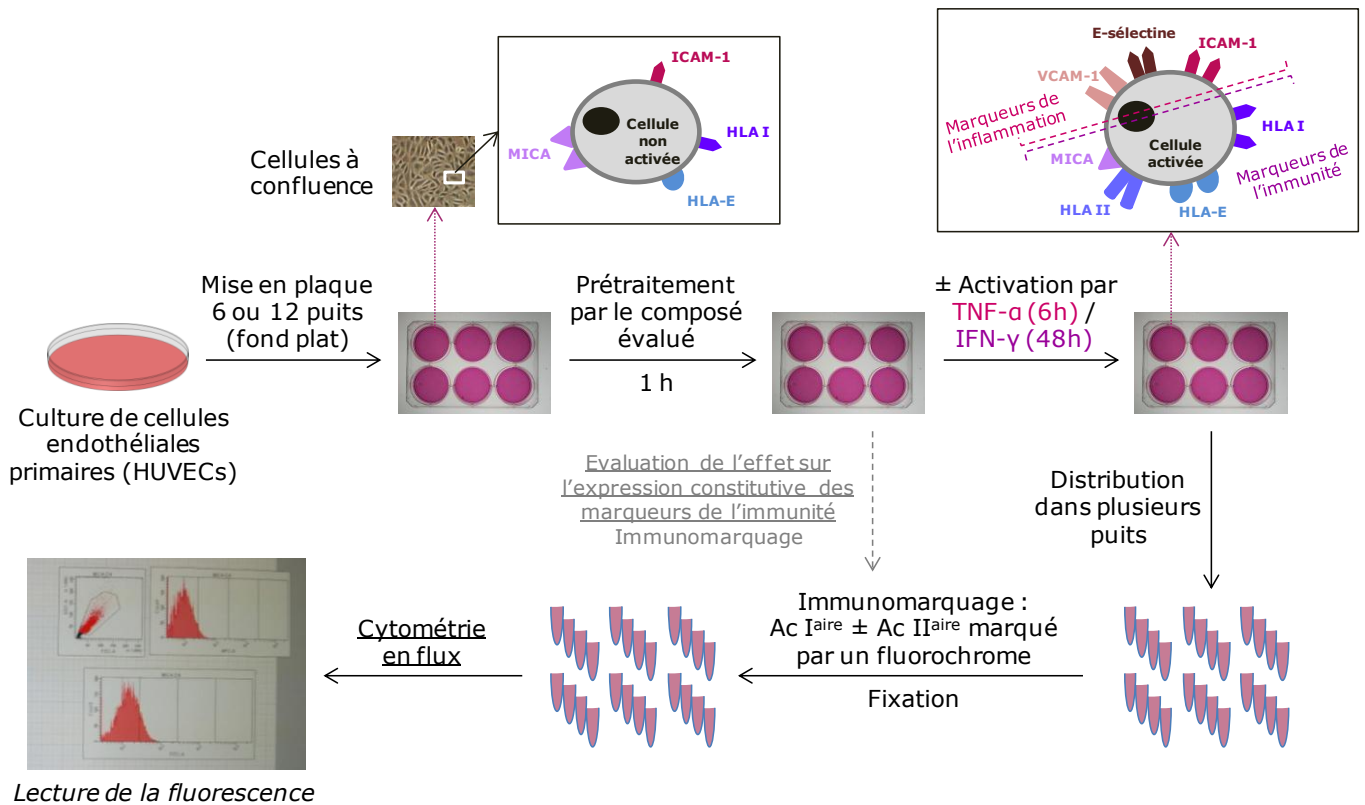


Figure 114. Schéma du protocole de test mesurant l'effet sur des marqueurs de l'inflammation et de l'immunité par cytométrie en flux

Pour évaluer l'effet sur l'expression induite des protéines de l'inflammation, les cellules ont ensuite été stimulées par le $\text{TNF-}\alpha$ pendant 6 heures, tandis que l'effet sur l'expression régulée des marqueurs de l'immunité a été déterminé après activation des cellules pendant 48 heures par l' $\text{IFN-}\gamma$. Chacune de ces conditions a été opposée à une condition analogue sans cytokines, servant de contrôle d'une part, et permettant d'analyser l'effet des métabolites secondaires sur l'expression basale des marqueurs d'autre part. L'effet des polyphénols sur l'expression constitutive de HLA I, HLA-E et MICA a également été observé après seulement 1 heure d'incubation.

A la fin de ces traitements, les cellules de chaque puits ont été uniformément réparties dans un nombre de puits de plaque P96 variant selon le nombre de marquages à effectuer, et incluant un puits contrôle non marqué visant notamment à détecter une éventuelle auto-fluorescence des cellules. L'immunomarquage a consisté à incuber des anticorps primaires dirigés contre chacune des protéines et éventuellement couplé à un fluorochrome, puis si besoin des anticorps secondaires porteurs d'un fluorochrome. Enfin, les cellules ont été fixées, et la fluorescence émise, proportionnelle à l'expression du marqueur membranaire analysé, a été lue par un cytomètre en flux.

Il est à noter que, pour faciliter le traitement des résultats, seuls des monomarquages ont ici été effectués. Il est cependant possible d'envisager la mise en place d'une méthode de criblage analysant un large panel de marqueurs cellulaires, et s'effectuant sur de grandes séries d'échantillons, par l'emploi de comarquages cellulaires.

4.2. Effets régulateurs sur différents marqueurs de l'inflammation

L'effet des polyphénols a été mesuré sur des cellules non activées d'une part, pour détecter un éventuel effet pro-inflammatoire, et après induction des marqueurs par le TNF- α d'autre part, pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire.

4.2.1. Effets sur l'expression basale des protéines

En l'absence de TNF- α , les protéines membranaires VCAM-1 et E-sélectine ne sont pas exprimées par les cellules HUVECs. La molécule d'adhérence cellulaire ICAM-1 est quant à elle faiblement exprimée, en comparaison à la surproduction entraînée par 6 h de traitement au TNF- α . Le **Figure 115** montre de plus que les composés polyphénoliques testés n'exercent pas d'effet inducteur sur les trois protéines évaluées, ce qui rend compte de l'absence d'effet pro-inflammatoire à 10 μ M.

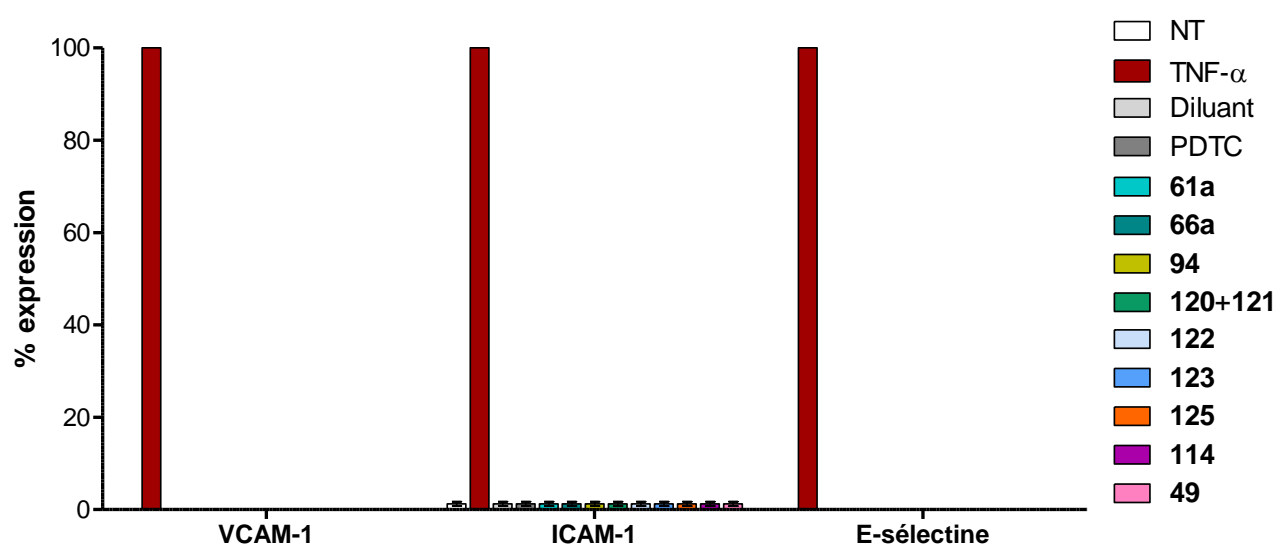


Figure 115. Effet des composés polyphénoliques (10 μ M) sur l'expression basale des marqueurs de l'inflammation à la surface des HUVECs

4.2.2. Effets sur l'expression induite de VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine

Comme pour le test en ELISA cellulaire, le PDTC à 200 μ M a été utilisé comme témoin inhibiteur de l'expression induite de VCAM-1, ICAM-1 et de la E-sélectine. L'analyse par cytométrie en flux de l'effet des polyphénols sur ces protéines induites (**Figure 116**) révèle que VCAM-1 est la protéine sur laquelle ces molécules végétales ont le plus d'effet. Comme cela était attendu, les résultats observés en cytométrie et en ELISA sont similaires, les coumarines de type mammea **61a**, **94** et **120/121** ainsi que la benzophénone **125** inhibant significativement l'expression induite de VCAM-1 par rapport au contrôle TNF- α . Les autres métabolites polyphénoliques n'ont que peu ou pas d'effet sur ce marqueur.

L'expression de la protéine ICAM-1 apparaît aussi légèrement diminuée en présence des composés **94**, **120/121** et **125**, alors que la E-sélectine n'est pas affectée.

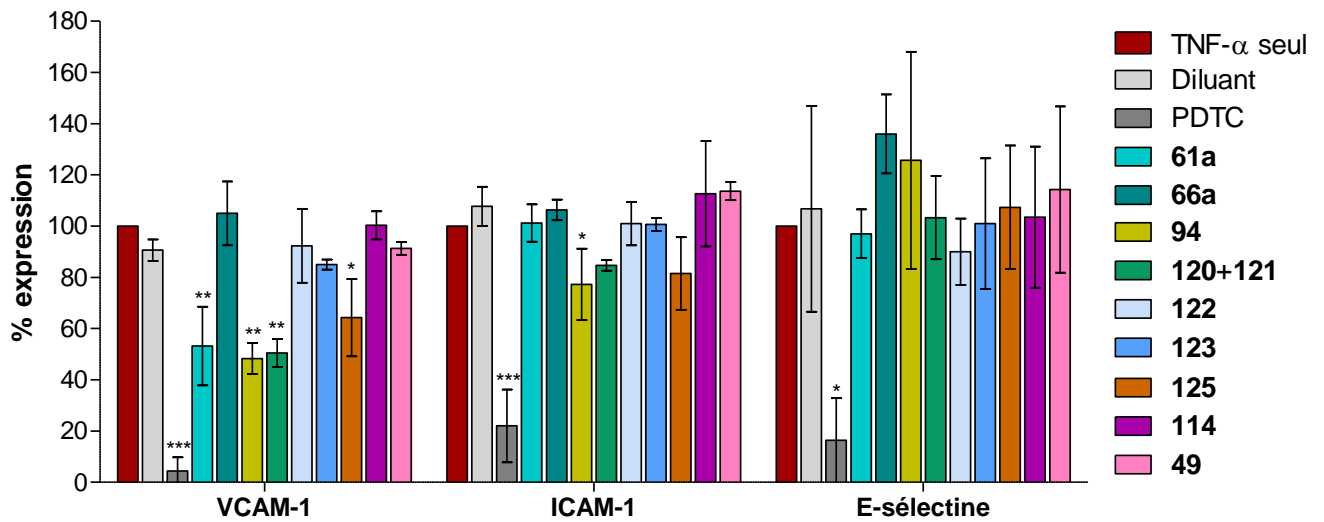


Figure 116. Effet des composés polyphénoliques (10 μ M) sur l'expression des marqueurs de l'inflammation induite par le TNF- α

On constate ainsi que la pyranochromanone acide **114** et le biflavonoïde **49** ne modulent pas l'expression de ces trois marqueurs de l'inflammation. Pourtant, la littérature fait état d'activités anti-inflammatoires pour l'amentoflavone (**49**) dès 10 μ M, à travers des inhibitions de la production de NO notamment³², mais également de l'expression de VCAM-1 et de ICAM-1⁵. Ces effets étant décrits sur des lignées cellulaires autres que les HUVECs et après une période d'incubation de 24 h, il semblerait judicieux d'établir une courbe montrant l'effet des composés en fonction du temps.

Compte tenu de l'effet marqué du lépidotol A (**94**) et de son originalité structurale, une étude plus détaillée de sa relation effet-dose sur l'expression induite de VCAM-1 a été menée. Sept concentrations comprises entre 0,75 et 50 μ M ont été testées par cytométrie en flux afin d'établir la valeur d'IC₅₀ (**Figure 117**). Celle-ci est de 10,2 μ M, ce qui correspond sensiblement à la concentration choisie au préalable pour tester l'ensemble des polyphénols.

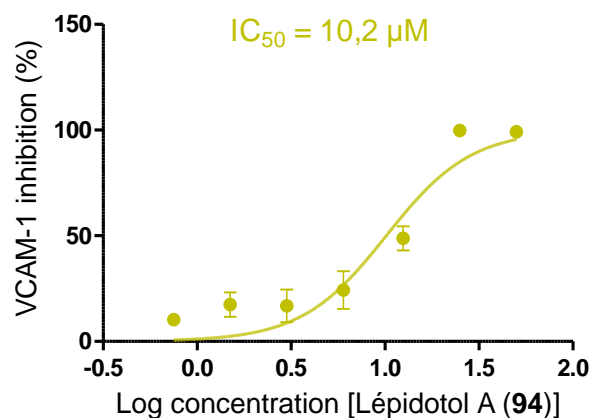


Figure 117. Courbe dose-réponse et valeur d'IC₅₀ du lépidotol A (94) sur l'inhibition de l'expression de VCAM-1

4.3. Effets régulateurs sur divers marqueurs des réponses immunes

La technique de cytométrie en flux a également été employée pour évaluer l'effet des molécules d'origine végétale sur un panel de marqueurs membranaires de l'immunité. En amont, plusieurs témoins inhibiteurs de l'expression de ces marqueurs ont été choisis.

4.3.1. Choix des témoins inhibiteurs

Les statines sont décrites comme inhibitrices de l'expression des molécules du CMH de classe I et II³³, et les bisphosphonates et la ciclosporine (**3**) sont également connus pour leurs effets sur l'immunité^{14,34}. Ainsi, plusieurs de ces composés ont été testés à différentes concentrations en vue de sélectionner des témoins immunosuppresseurs. La ciclosporine (**3**) a été testée à 2,5 et à 10 μM , concentrations préalablement administrées à des cellules endothéliales¹⁴, en prétraitement de 1 h comme dans le cas des polyphénols. La fluvastatine (**127**) et la simvastatine (**17**)³⁵ ont toutes deux été évaluées à 0,1 et à 1 μM , et l'acide zolédronique (**126**) à 1 et à 10 μM , chacun ayant été pré-incubé avec les cellules pendant 18 h, conformément aux protocoles *in vitro* trouvés dans la littérature^{17,36}. La **Figure 118** présente les structures de ces composés immunomodulateurs.

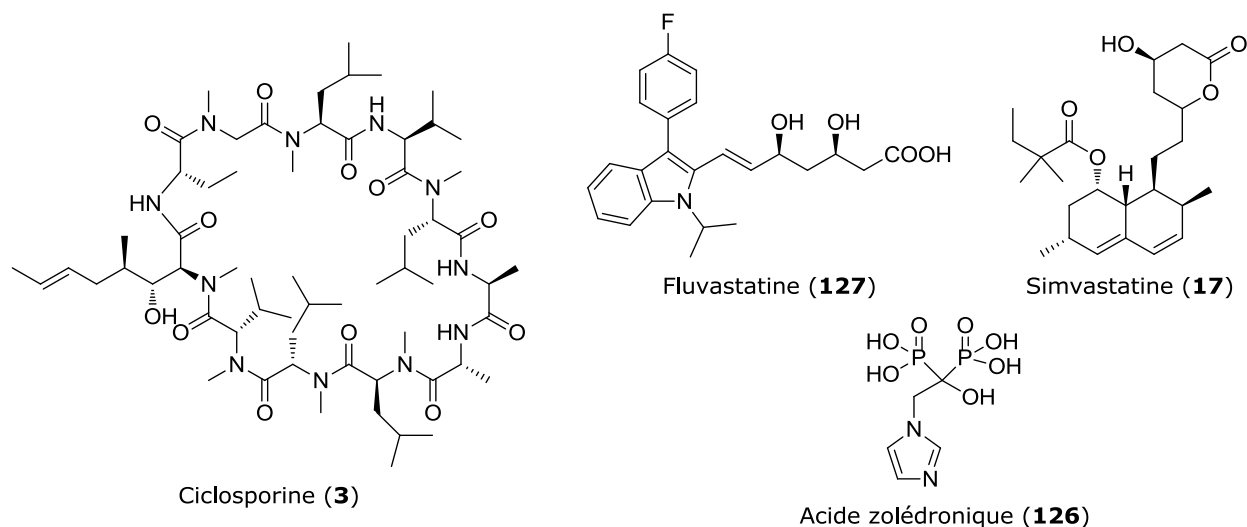


Figure 118. Structures des agents immunomodulateurs évalués

L'observation au microscope du tapis cellulaire après 18 h d'incubation avec les composés **127** ou **17** à 1 μM révèle que la majorité des cellules sont mortes, d'où une toxicité des statines à cette concentration. Par ailleurs, aucun effet inhibiteur n'est noté sur l'expression basale des marqueurs aussitôt après la période de prétraitement (de 1 h ou 18 h), quelque soit l'agent testé.

En revanche, 48 h plus tard, une diminution notable de l'expression basale de HLA I apparaît en présence de ciclosporine (**3**), de simvastatine (**17**) et d'acide zolédronique (**126**) à 2,5, 0,1 et 10 μM , respectivement. L'expression constitutive de HLA-E est aussi nettement réprimée par ces mêmes composés aux concentrations les plus élevées. Sur la protéine constitutive MICA, parmi les composés testés, seul le bisphosphonate **126** à 10 μM montre un effet inhibiteur. (**Tableau 23**)

Tableau 23. Effet des molécules immunosuppressives témoins sur l'expression constitutive et modulée (par l'IFN-γ) des marqueurs de l'immunité après 48 h d'incubation

(Cases grisées : témoin immunomodulateur non testé sur la protéine MICA)

Composé	Concentration	Inhibition moyenne de l'expression basale des marqueurs après 48 h (%)			Inhibition moyenne de l'expression des marqueurs modulée par l'IFN-γ (48 h) (%)			
		HLA I	HLA-E	MICA	HLA I	HLA II	HLA-E	MICA
Ciclosporine (3)	2,5 μM	17	9		1	0	14	
	10 μM	0	13	0	0	41	37	7
Fluvastatine (127)	0,1 μM	0	0		0	10	20	
Simvastatine (17)	0,1 μM	10	13	0	0	0	33	0
Acide zolédronique (126)	1 μM	0	4		0	2	4	
	10 μM	24	48	36	0	43	44	31

L'acide zolédronique (**126**) à 10 μM apparaît ainsi comme le témoin le plus immunosuppresseur vis-à-vis des molécules du HLA de classe I, de HLA-E et de MICA constitutivement exprimés, ce qui est aisément remarquable sur les histogrammes de fluorescence obtenus (**Figure 119**).

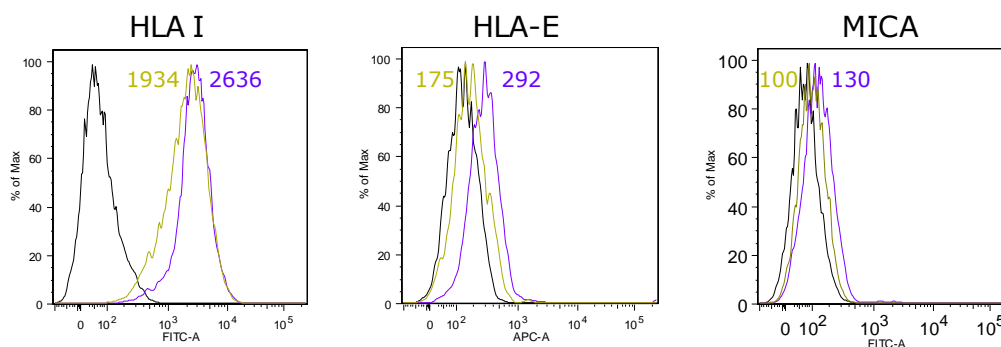


Figure 119. Analyse par cytométrie en flux de l'effet de l'acide zolédronique (126) à 10 μM sur l'expression constitutive de HLA I, HLA-E et MICA après 66 h de traitement

(En noir : morphologie de la population ; en violet : expression constitutive ; en vert : effet du composé **126**. Les valeurs des moyennes géométriques de fluorescence sont indiquées)

L'expression du HLA de classe I induit n'est refreinée par aucun des agents testés. En revanche, les molécules inhibitrices de l'expression basale de HLA-E exercent globalement un effet encore plus marqué sur son expression induite par l'IFN-γ. La fluvastatine (**127**) présente également un effet inhibiteur sur ce marqueur surexprimé. Sur la protéine MICA, l'effet inhibiteur de l'IFN-γ est surtout potentialisé par l'acide zolédronique (**126**), qui induit une inhibition quatre fois plus importante que la ciclosporine (**3**). (**Tableau 23**)

L'effet des composés sur les molécules du HLA de classe II induites est différent : la simvastatine (**17**) n'apparaît pas inhibitrice, alors que la fluvastatine (**127**) l'est modérément. La

ciclosporine (**3**) et l'acide zolédronique (**126**) à 10 μ M présentent quant à eux d'importants effets inhibiteurs, comparables entre eux (**Figure 120**).

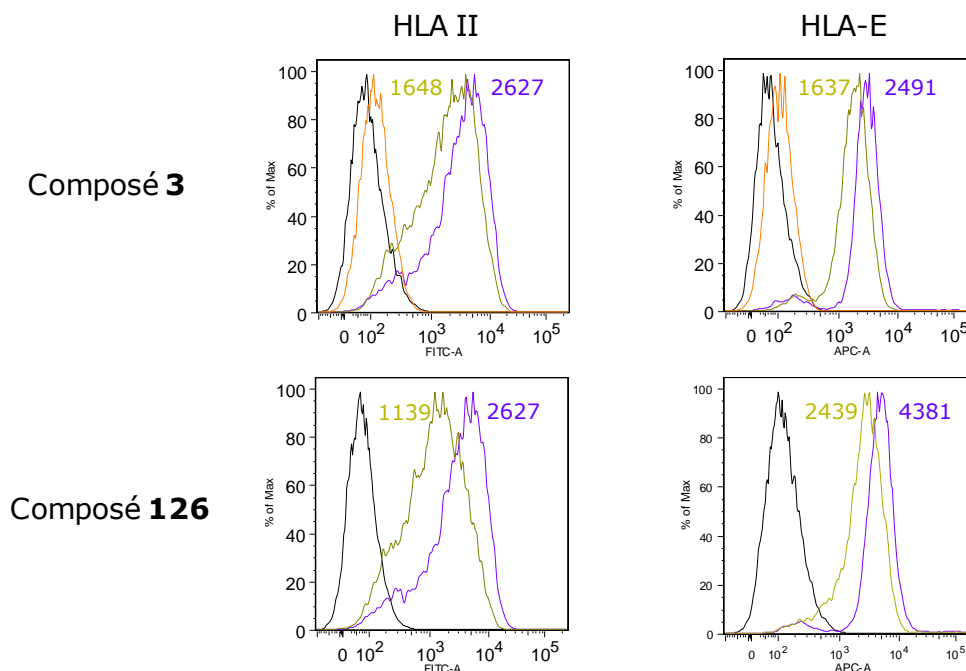


Figure 120. Analyse par cytométrie en flux de l'effet de la ciclosporine (3**) et de l'acide zolédronique (**126**) à 10 μ M sur l'expression induite de HLA II (HLA-DR) et de HLA-E** (En noir : morphologie de la population non traitée ; en orange : auto-fluorescence des cellules ; en violet : expression induite par 48 h d'IFN- γ ; en vert : effet des composés **3** ou **126** sur l'expression induite. Les valeurs des moyennes géométriques de fluorescence sont indiquées)

Ainsi, considérant les multiples effets inhibiteurs de la ciclosporine (**3**) et de l'acide zolédronique (**126**) à 10 μ M, nous avons choisi de conserver ces deux témoins pour la poursuite des essais biologiques sur les marqueurs de l'immunité.

4.3.2. Effet sur l'expression constitutive de HLA I, HLA-E et MICA

Les mesures de fluorescence des cellules non activées par l'IFN- γ , après 1 h de prétraitement par les polyphénols, puis 48 h plus tard, montrent globalement que les effets inhibiteurs s'intensifient avec le temps (**Figure 121**).

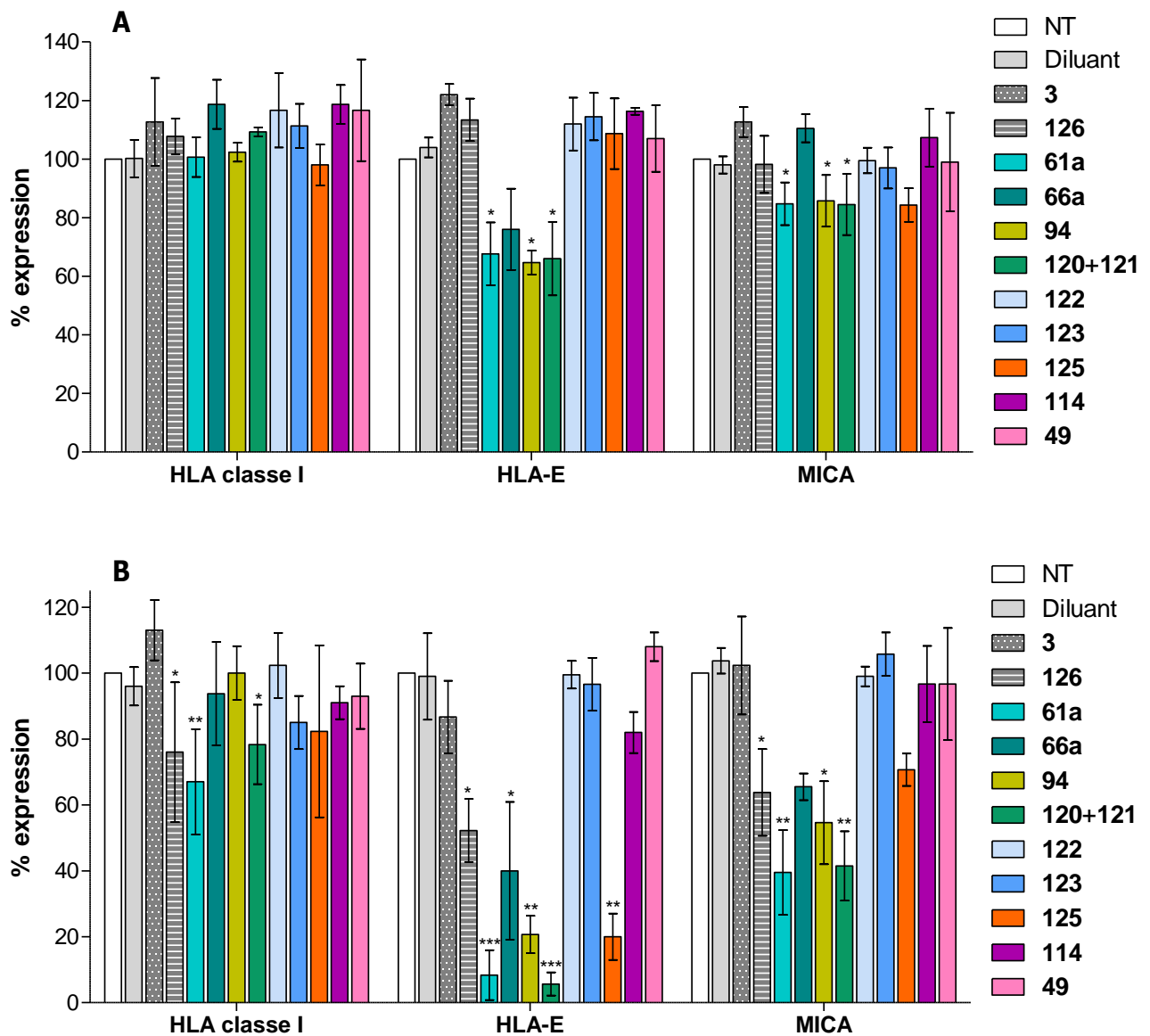


Figure 121. Effet des polyphénols (10 μ M) sur l'expression basale des marqueurs de l'inflammation à la surface des HUVECs après 1 h (A) et 48 h (B) d'incubation

De façon plus détaillée, des effets inhibiteurs sont observés sur les molécules du HLA de classe I classique seulement après 48 h d'incubation. Les coumarines **61a** et **120/121** diminuent alors significativement l'expression de ces protéines. Les composés **123**, **125**, **114** et **49** tendent aussi légèrement à les diminuer.

Comparativement, la protéine HLA-E est beaucoup plus sensible aux polyphénols testés que les molécules du HLA de classe I classique. Les coumarines de type mammaea (**61a**, **66a**, **94** et **120/121**) inhibent environ 30 % de son expression au bout d'1 h, et vont jusqu'à l'inhiber à plus de 90 % (**61a** et **120/121**) après 48 h. On remarque cependant qu'avec le temps, une différence d'effet s'installe entre ces coumarines, la moins active étant celle cyclisée (**66a**). La benzophénone **125** est sans effet après 1 h d'incubation, mais finit par inhiber fortement (80 %) l'expression de HLA-E après

2 jours de traitement. L'acide blancoïque (**114**) induit également une inhibition modérée (20 %) après 48 h d'incubation.

Les molécules nettement inhibitrices de l'expression de HLA-E le sont aussi vis-à-vis de la protéine MICA, bien que leur effet soit plus pondéré. De plus, lorsque l'on compare les différentes coumarines les unes par rapport aux autres, on remarque un profil d'activité similaire envers HLA-E et MICA. Il en est autrement de la guttiférone J (**125**), qui manifeste une activité inhibitrice dès 1 h après le traitement des HUVECs. Enfin, en ce qui concerne la pyranochromanone acide **114**, elle ne modifie pas significativement l'expression basale de MICA à 10 μ M et aux temps d'incubation testés.

Les essais mesurant l'expression des molécules du HLA de classe II démontrent quand à eux que les polyphénols évalués ne sont pas immunostimulants. En effet, cette protéine n'est alors pas exprimée.

4.3.3. Effet sur l'expression régulée de HLA I, HLA II, HLA-E et MICA

L'observation des cellules en microscopie avant et après traitement par l'IFN- γ permet d'observer leurs changements de morphologie. En effet, les cellules deviennent très allongées lorsqu'elles sont activées (**Figure 122**). Certains traitements, en particulier par la guttiférone J (**125**) et le lépidotol A (**94**) à 10 μ M, entraînent la mort de nombreuses cellules activées par l'IFN- γ , ce qui se manifeste par la présence de celles-ci dans le surnageant des puits.

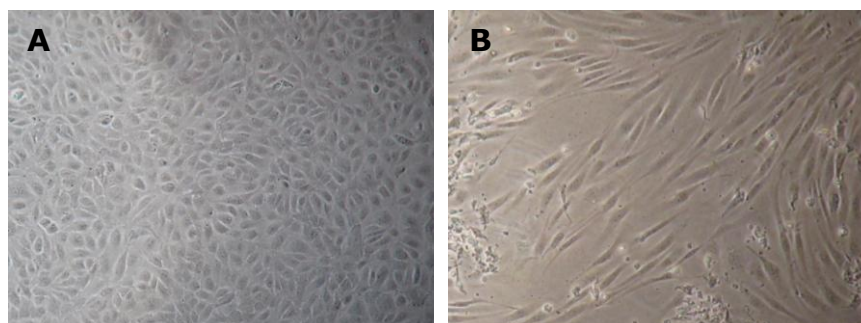


Figure 122. Observation des cellules endothéliales (HUVECs) au microscope à contraste de phase avant (A) et après (B) activation par l'IFN- γ pendant 48 h

Après activation des cellules endothéliales par l'IFN- γ , les molécules du HLA de classe I sont fortement surexprimées, et comme le montre la **Figure 123**, un prétraitement par les polyphénols ne permet pas d'enrayer cette surexpression. Les coumarines substituées (**61a**, **66a**, **94**, **120/121**, **123**) et la benzophénone **125**, ainsi que la ciclosporine (**3**), tendent au contraire à l'intensifier.

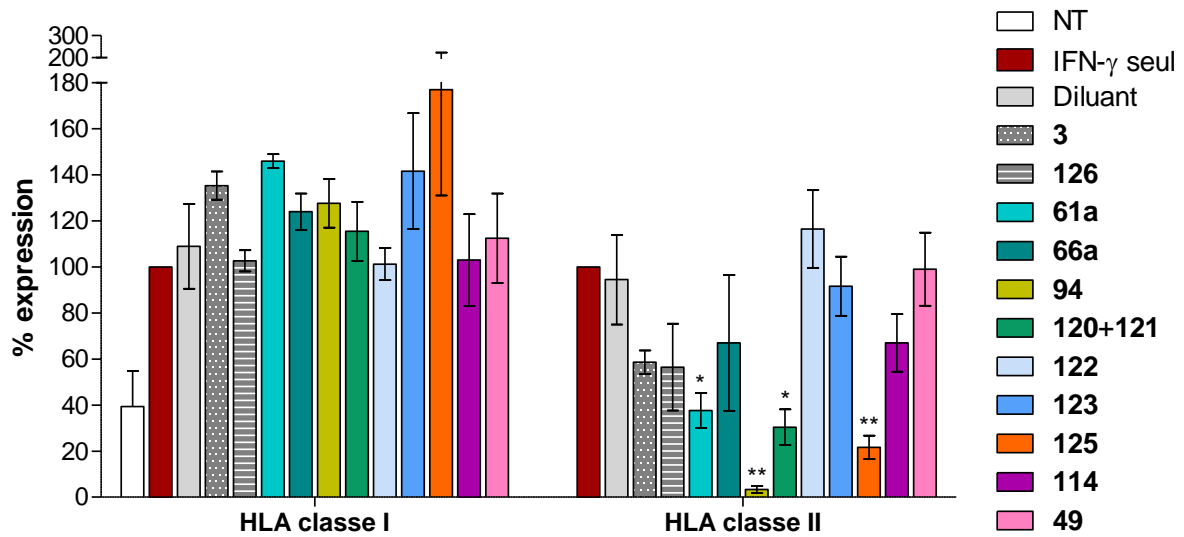


Figure 123. Effet des composés polyphénoliques (10 μ M) sur l'expression des molécules du HLA de classe I et II induite par l'IFN- γ

Concernant les molécules du HLA de classe II induites, elles sont inhibées par les coumarines de type mammaea (**61a**, **66a**, **94** et **120/121**) ainsi que par la benzophénone **125** et la pyranochromanone acide **114**, comme nous l'observons sur l'expression constitutive de HLA-E après 48 h d'incubation. La coumarine cyclisée **66a** apparaît de nouveau la moins active des coumarines de type mammaea, pendant que le lépidotol A (**94**) exerce la plus forte activité immunosuppressive, avec 95 % d'inhibition.

Comparé à l'effet sur l'expression basale de HLA-E (**Figure 121**), le même profil d'activité des polyphénols est retrouvé sur son expression induite par l'IFN- γ (**Figure 124**). Seul le composé **114** fait exception, n'étant pas actif ici. Les valeurs d'inhibitions restent très élevées, allant de 55 % [pour mammaea A/AA cyclo F (**66a**)] à 90 % [pour la guttiférone J (**125**)].

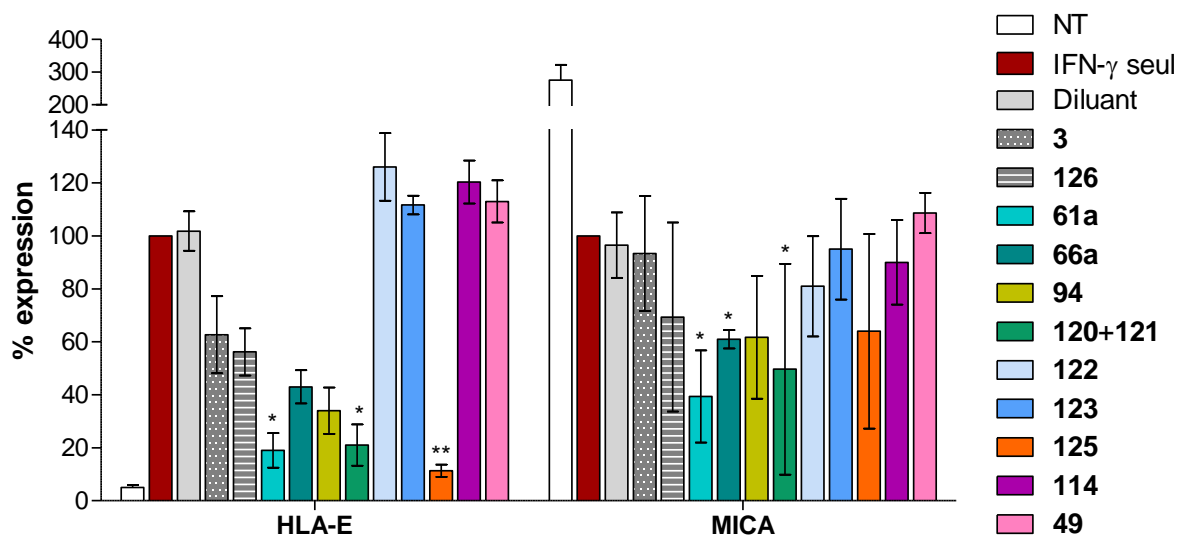


Figure 124. Effet des composés polyphénoliques (10 μ M) sur l'expression de HLA-E et de MICA modulée par l'IFN- γ

L'expression de la protéine MICA est réduite d'environ 2,5 fois par la cytokine IFN- γ (**Figure 124**). A cet effet, s'ajoute celui des coumarines de type mammea (**61a**, **66a**, **94**, **120/121**) et de la guttiférone J (**125**), qui potentialisent l'activité de l'IFN- γ . Ainsi, une inhibition additionnelle de 36 % (**125**) à 60 % (**61a**) apparaît.

Tout comme le biflavonoïde **49**, les deux coumarines simples (**122** et **123**) sont inactives vis-à-vis de l'expression des molécules HLA de classe II, HLA-E et MICA.

5. Conclusion et discussion

Dans notre recherche de composés diminuant les réponses inflammatoires et immunes de l'endothélium, il s'avère que ce sont certains dérivés de coumarine et la benzophénone **125** qui présentent le plus d'intérêt.

Parmi les protéines de l'inflammation évaluées, VCAM-1 est la plus affectée par les composés testés, tandis que du côté des marqueurs de la réponse immunitaire, les molécules du HLA de classe II (HLA-DR) et HLA-E sont les plus touchés, tant au niveau de leur expression constitutive qu'induite. L'expression de MICA est plus modérément inhibée, que ce soit en présence ou en l'absence d'IFN- γ . Concernant les molécules du HLA de classe I, seule l'expression constitutive est sous-régulée.

Considérant les différents groupements qui substituent les coumarines testées, il apparaît que les molécules prénylées, et hydroxylées en position 5 et 7 (coumarines de type mammea), sont les plus actives. En effet, le noyau de base des coumarines ne semble pas impliqué dans l'activité puisque la coumarine (**122**) et l'ombelliférone (**123**) n'induisent pas d'effet inhibiteur. Les composés **61a** et **120/121** présentent les mêmes effets sur les différents marqueurs immuns de surface, suggérant que le substituant en position 4 de la coumarine ne joue pas sur l'activité. En revanche, la présence de chaînes prényles et/ou de groupements phénols libres est nécessaire, puisqu'en cas de cyclisation (**66a**), une baisse de la cytotoxicité mais également de l'activité anti-inflammatoire et immunosuppressive est observée. Le nombre de substituants prényles ne semble pas discriminant, mais les molécules mono-prénylées (**61a** et **120/121**) semblent agir plus fortement sur HLA-E et MICA tandis que le composé diprényle (**94**) a un effet plus prononcé sur les molécules du HLA de classe II. Afin de valider ces hypothèses, une étude plus poussée des relations structure-activité des coumarines peut être envisagée, en incluant notamment des composés plus ou moins hydroxylés en position 5 et éventuellement cyclisés à ce niveau, ainsi que des dérivés substitués ou non en position 4 (**Figure 125**). Leur effet pourrait aussi être comparé à celui de coumarines connues comme immunosuppressives telles que le glycyrol (**13**)³⁷ (cf. chapitre I). Le mesuol [ou mammea A/AD (**61d**)], décrit dans la littérature comme immunostimulant³⁸, mériterait également d'être testé sur le panel de marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité étudiés au cours de cette thèse.

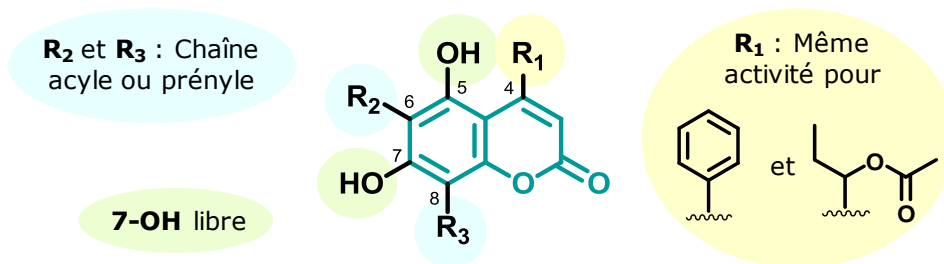


Figure 125. Structures des coumarines anti-inflammatoires et immunosuppressives

Des activités anti-inflammatoires et immunomodulatrices ont déjà été décrites pour certaines coumarines auparavant³⁹. Cependant, à notre connaissance, il s'agit ici de la première étude de relation structure-activité concernant les coumarines de type mammea et leurs effets sur des marqueurs de la dysfonction endothéliale et des réponses immunitaires.

La classe des benzophénones « cages » semble être tout aussi intéressante, à l'instar de la guttiférone J (**125**), ici inhibitrice de l'expression de VCAM-1, ICAM-1, HLA de classe II, HLA-E et MICA. L'isogarcinol (**16**) est en outre décrit comme agent immunosuppresseur inhibiteur de la calcineurine⁴⁰. Ces deux composés étant hydroxylés sur leur cycle benzénique, l'on peut suspecter que ces substitutions sont importantes pour l'activité. Par ailleurs, si l'on compare l'effet sur VCAM-1 des deux acylphloroglucinols que sont la guttiférone J (**125**) (59 % d'inhibition à 50 µM) et la tétraptérone (**105**) (12 % d'inhibition à 50 µM) isolé de *Calophyllum tetrapterum* (cf. chapitre III), l'on peut déduire que le système bicyclononane polyprénylé n'est pas à lui seul le socle de l'activité des benzophénones bioactives. (**Figure 126**)

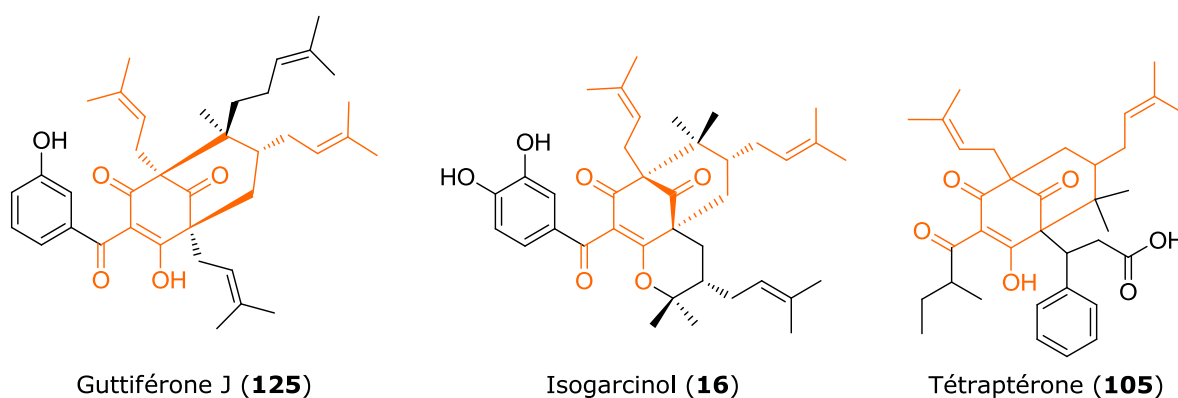


Figure 126. Structure de trois PPAPs testés pour leurs effets sur l'inflammation et/ou sur l'immunité

Sachant que l'isogarcinol (**16**) inhibe la calcineurine⁴⁰, tout comme la ciclosporine (**3**) utilisée en thérapeutique, et que la guttiférone J (**125**) inhibe l'expression de plusieurs marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité, les benzophénones polyprénylées pourraient présenter un double intérêt dans la prévention des rejets de greffe. En effet, elles sont susceptibles à

la fois de réduire la prolifération des lymphocytes T et de diminuer la présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe II des cellules présentatrices d'antigènes que sont les cellules endothéliales (**Figure 127**). Ainsi semble-t-il pertinent d'approfondir l'étude des relations structure-activité de cette classe de polyphénols prénylés, comme cela fut déjà effectué, pour cette famille structurale, lors de l'étude des propriétés inhibitrices du désassemblage des microtubules⁴¹ et antiplasmodiales⁴².

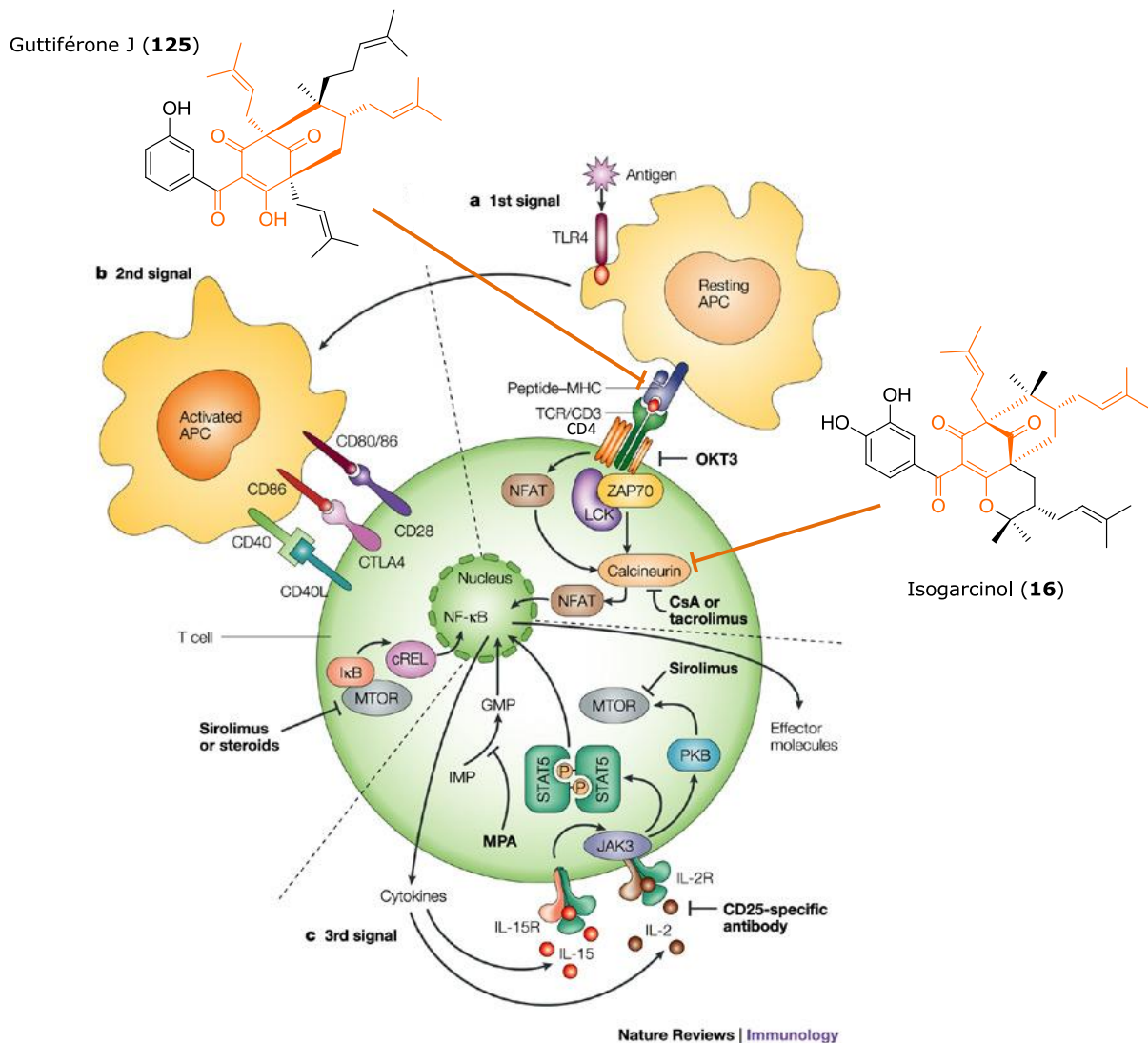


Figure 127. Mécanismes d'action des immunosuppresseurs⁴³ et effets de deux PPAPs : la guttiférone J (125) et l'isogarcinol (16)

Le lépidotol A (**94**) et la guttiférone J (**125**) entraînent des effets semblables à la même concentration de 10 μ M, bien que leurs structures soient très différentes. Etant donné qu'une interaction avec la calcineurine a été démontrée pour les deux molécules immunosuppressives que sont le glycyrol (**13**)³⁷ et l'isogarcinol (**16**)⁴⁰, une coumarine et une benzophénone, et que la calcineurine active la voie NF- κ B induisant l'expression des molécules d'adhérence cellulaire⁴⁴, il est possible que l'effet inhibiteur des composés **94** et **125** sur les expressions de VCAM-1 et de ICAM-1

soit dû à une inhibition de la calcineurine. Une étude de ces interactions avec l'enzyme cible permettrait d'étayer cette hypothèse. L'effet anti-inflammatoire de ces composés pourrait cependant aussi s'expliquer simplement par l'activité anti-oxydante des polyphénols⁴⁵. Ainsi est-il aujourd'hui envisagé d'étudier leurs mécanismes d'action de façon plus approfondie, notamment au travers de tests fonctionnels. Il sera également possible d'élargir l'étude à d'autres marqueurs de l'inflammation et de l'immunité, afin de voir si les effets des composés sont spécifiques ou non.

Les coumarines et les benzophénones présentant d'une certaine hépatotoxicité⁴⁶⁻⁴⁹, les principaux composés ayant montré un intérêt au cours de notre étude, à savoir mammea A/AA (**61a**), mammea A/AA cyclo F (**66a**), le lépidotol A (**94**) et la guttiférone J (**125**), ont été évalués pour leurs effets sur les hépatocytes (cf. **Annexe 19**). Les résultats montrent une hépatotoxicité des deux coumarines non cyclisées (**61a** et **94**) et de la benzophénone **125** à 10 µM. Il serait intéressant de comparer ces résultats avec ceux de la ciclosporine (**3**) dans les mêmes conditions, puisqu'elle aussi présente des effets toxiques au niveau hépatique⁵⁰.

En conclusion, il a été démontré que certains polyphénols polyprénylés sont capables d'inhiber l'expression de protéines endothéliales de surface impliquées dans les réactions immunitaires et les processus inflammatoires. Ces résultats offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la prévention des rejets de greffe, actuellement pris en charge par des agents immunosuppresseurs agissant au niveau des lymphocytes T. Les données de toxicologie obtenues sur les hépatocytes sont cependant à prendre en compte pour envisager un développement de ces composés en thérapeutique.

Bibliographie du chapitre IV

1. Fouotsa, H.; Lannang, A. M.; Dzoyem, J. P.; Tatsimo, S. J. N.; Neumann, B.; Mbazona, C. D.; Razakarivony, A. A.; Nkengfack, A. E.; Eloff, J. N.; Sewald, N., Antibacterial and antioxidant xanthenes and benzophenone from *Garcinia smeathmannii*. *Planta Medica* **2015**, 81, 594-599.
2. Santa-Cecilia, F. V.; Freitas, L. A. S.; Vilela, F. C.; Veloso, C. d. C.; da Rocha, C. Q.; Moreira, M. E. C.; Dias, D. F.; Giusti-Paiva, A.; dos Santos, M. H., Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. *European Journal of Pharmacology* **2011**, 670, 280-285.
3. Ali, M.; Arfan, M.; Ahmad, M.; Singh, K.; Anis, I.; Ahmad, H.; Choudhary, M. I.; Shah, M. R., Anti-inflammatory xanthenes from the twigs of *Hypericum oblongifolium* Wall. *Planta Medica* **2011**, 77, 2013-2018.
4. Chao, J.-T.; Gapor, A.; Theriault, A., Inhibitory effect of δ -tocotrienol, a HMG CoA reductase inhibitor, on monocyte-endothelial cell adhesion. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **2002**, 48, 332-337.
5. Tanaka, S.; Sakata, Y.; Morimoto, K.; Tambe, Y.; Watanabe, Y.; Honda, G.; Tabata, M.; Oshima, T.; Masuda, T.; Umezawa, T.; Shimada, M.; Nagakura, N.; Kamisako, W.; Kashiwada, Y.; Ikeshiro, Y., Influence of natural and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1. *Planta Medica* **2001**, 67, 108-113.
6. Li, J.; Tu, Y.; Tong, L.; Zhang, W.; Zheng, J.; Wei, Q., Immunosuppressive activity on the murine immune responses of glycyrol from *Glycyrrhiza uralensis* via inhibition of calcineurin activity. *Pharmaceutical Biology* **2010**, 48, 1177-1184.
7. Fu, Y.; Zhou, H.; Wang, M.; Cen, J.; Wei, Q., Immune regulation and anti-inflammatory effects of isogarcinol extracted from *Garcinia mangostana* L. against collagen-induced arthritis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, 4127-4134.
8. Raad, I.; Terreux, R.; Richomme, P.; Matera, E.-L.; Dumontet, C.; Raynaud, J.; Guilet, D., Structure-activity relationship of natural and synthetic coumarins inhibiting the multidrug transporter P-glycoprotein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 6979-6987.
9. Rouger, C.; Derbre, S.; Charreau, B.; Pabois, A.; Cauchy, T.; Litaudon, M.; Awang, K.; Richomme, P., Lepidotol A from *Mesua lepidota* inhibits inflammatory and immune mediators in human endothelial cells. *Journal of Natural Products* **2015**, 78, 2187-2197.
10. Dang, B. T.; Geny, C.; Blanchard, P.; Rouger, C.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Tonnerre, P.; Charreau, B.; Rakolomalala, G.; Randriamboavonjy, J. I.; Loirand, G.; Pacaud, P.; Litaudon, M.; Derbre, S., Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*. *Fitoterapia* **2014**, 96, 65-75.
11. Hay, A.-E.; Helesbeux, J.-J.; Duval, O.; Labaied, M.; Grellier, P.; Richomme, P., Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sciences* **2004**, 75, 3077-3085.
12. Merza, J.; Mallet, S.; Litaudon, M.; Dumontet, V.; Seraphin, D.; Richomme, P., New cytotoxic guttiferone analogues from *Garcinia virgata* from New Caledonia. *Planta Medica* **2006**, 72, 87-89.
13. Ferchichi, L.; Derbré, S.; Mahmood, K.; Touré, K.; Guilet, D.; Litaudon, M.; Awang, K.; Hadi, A. H. A.; Le Ray, A. M.; Richomme, P., Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry* **2012**, 78, 98-106.
14. Charreau, B.; Coupel, S.; Goret, F.; Pourcel, C.; Soullillou, J.-P., Association of glucocorticoids and cyclosporin A or rapamycin prevents E-selectin and IL-8 expression during LPS- and TNF α -mediated endothelial cell activation. *Transplantation* **2000**, 69, 945-953.
15. Zhang, A. H.; Wang, X. Q.; Han, W. B.; Sun, Y.; Guo, Y.; Wu, Q.; Ge, H. M.; Song, Y. C.; Ng, S. W.; Xu, Q.; Tan, R. X., Discovery of a new class of immunosuppressants from *Trichothecium roseum* co-inspired by cross-kingdom similarity in innate immunity and pharmacophore motif. *Chemistry - An Asian Journal* **2013**, 8, 3101-3107.
16. Bringmann, A.; Schmidt, S. M.; Weck, M. M.; Brauer, K. M.; von Schwarzenberg, K.; Werth, D.; Gruenebach, F.; Brossart, P., Zoledronic acid inhibits the function of Toll-like receptor 4 ligand activated monocyte-derived dendritic cells. *Leukemia* **2007**, 21, 732-738.
17. Muraro, M.; Mereuta, O. M.; Carraro, F.; Madon, E.; Fagioli, F., Osteosarcoma cell line growth inhibition by zoledronate-stimulated effector cells. *Cellular Immunology* **2007**, 249, 63-72.
18. Reyes-Chilpa, R.; Estrada-Muniz, E.; Ramirez, A. T.; Amekraz, B.; Aumelas, A.; Jankowski, C. K.; Vazquez-Torres, M., Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences* **2004**, 75, 1635-1647.
19. El Hentati, F.-Z.; Iobagiu, C.; Lambert, C., Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Revue Francophone des Laboratoires* **2009**, 2009, 23-32.

20. Hubbard, A. K.; Rothlein, R., Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Biology & Medicine* **2000**, 28, 1379-1386.
21. Bardin, N.; Mutin, M.; Lesaule, G., 4. Analyse des cellules endothéliales. *Revue Française des Laboratoires* **1996**, 1996, 96-100.
22. Beauparlant, P.; Hiscott, J., Biological and biochemical inhibitors of the NF- κ B/Rel proteins and cytokine synthesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **1996**, 7, 175-190.
23. Pober, J. S.; Tellides, G., Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends in Immunology* **2012**, 33, 49-57.
24. Riederer, I.; Sievert, W.; Eissner, G.; Molls, M.; Multhoff, G., Irradiation-induced up-regulation of HLA-E on macrovascular endothelial cells confers protection against killing by activated natural killer cells. *PLoS One* **2010**, 5, e15339.
25. Clesca, P. T., Endothelial cells and acute rejection in organ transplantation: a review with emphasis on adhesion molecules. *International Congress Series* **2002**, 1237, 181-191.
26. Iwaszko, M.; Bogunia-Kubik, K., Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis* **2011**, 59, 353-367.
27. Christova, R.; Jones, T.; Wu, P.-J.; Bolzer, A.; Costa-Pereira, A. P.; Watling, D.; Kerr, I. M.; Sheer, D., P-STAT1 mediates higher-order chromatin remodelling of the human MHC in response to IFN γ . *Journal of Cell Science* **2007**, 120, 3262-3270.
28. Collins, T.; Korman, A. J.; Wake, C. T.; Boss, J. M.; Kappes, D. J.; Fiers, W.; Ault, K. A.; Gimbrone, M. A., Jr.; Strominger, J. L.; Pober, J. S., Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1984**, 81, 4917-4921.
29. Coupel, S.; Moreau, A.; Hamidou, M.; Horejsi, V.; Soullilou, J.-P.; Charreau, B., Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* **2007**, 109, 2806-2814.
30. Zhang, C.; Niu, J.; Zhang, J.; Wang, Y.; Zhou, Z.; Zhang, J.; Tian, Z., Opposing effects of interferon- α and interferon- γ on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors. *Cancer Science* **2008**, 99, 1279-1286.
31. Chauveau, A.; Tonnerre, P.; Pabois, A.; Gavlovsky, P.-J.; Chatelais, M.; Coupel, S.; Charreau, B., Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *Journal of Innate Immunity* **2014**, 6, 89-104.
32. Lee, E.; Shin, S.; Kim, J.-K.; Woo, E.-R.; Kim, Y., Anti-inflammatory effects of amentoflavone on modulation of signal pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2012**, 33, 2878-2882.
33. Singh, P.; Kohr, D.; Kaps, M.; Blaes, F., Influence of statins on MHC class I expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, 1173, 746-751.
34. Bukowski, J. F.; Dascher, C. C.; Das, H., Alternative bisphosphonate targets and mechanisms of action. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, 328, 746-750.
35. Ii, M.; Losordo, D. W., Statins and the endothelium. *Vascular Pharmacology* **2007**, 46, 1-9.
36. Belliard, G.; Coupel, S.; Charreau, B., Effet de la fluvastatine sur l'expression du CMH de classe I par les cellules endothéliales humaines. *Néphrologie & Thérapeutique* **2005**, 1, 221-227.
37. Peng, L.; Qi, Y.; Wu, H.; Wei, Q., Interaction of glycyrol with calcineurin A studied by spectroscopic methods and docking. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* **2011**, 63, 14-20.
38. Chahar, M. K.; Sanjaya, K. D. S.; Lokesh, T.; Manohara, K. P., *In-vivo* antioxidant and immunomodulatory activity of mesuol isolated from *Mesua ferrea* L. seed oil. *International Immunopharmacology* **2012**, 13, 386-391.
39. O'Kennedy, R.; Thornes, R. D., *Coumarins: biology, applications and mode of action*. Wiley: Chichester, **1997**; 348 p.
40. Cen, J.; Wang, M.; Jiang, G.; Yin, Y.; Su, Z.; Tong, L.; Luo, J.; Ma, Y.; Gao, Y.; Wei, Q., The new immunosuppressant, isogarcinol, binds directly to its target enzyme calcineurin, unlike cyclosporin A and tacrolimus. *Biochimie* **2015**, 111, 119-124.
41. Roux, D.; Hadi, H. A.; Thoret, S.; Guenard, D.; Thoison, O.; Pais, M.; Sevenet, T., Structure-activity relationship of polyisoprenyl benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the tubulin/microtubule system. *Journal of Natural Products* **2000**, 63, 1070-1076.
42. Lyles, J. T.; Negrin, A.; Kennelly, E. J.; Khan, S. I.; He, K., *In vitro* antiplasmodial activity of benzophenones and xanthenes from edible fruits of *Garcinia* species. *Planta Medica* **2014**, 80, 676-681.
43. Kahan, B. D., Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nature Reviews Immunology* **2003**, 3, 831-838.
44. Sun, S.-C., The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunological Reviews* **2012**, 246, 125-140.
45. Auger, C.; Schini-Kerth, V. B., Potentiel des polyphénols à améliorer la protection vasculaire en stimulant la fonction endothéliale. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **2014**, 49, 160-172.

46. Chao, X.; Zhou, X.; Zheng, G.; Dong, C.; Zhang, W.; Song, X.; Jin, T., Osthole induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Pharmaceutical Biology* **2014**, 52, 544-550.
47. Uehara, T.; Kiyosawa, N.; Shimizu, T.; Omura, K.; Hirode, M.; Imazawa, T.; Mizukawa, Y.; Ono, A.; Miyagishima, T.; Nagao, T.; Urushidani, T., Species-specific differences in coumarin-induced hepatotoxicity as an example toxicogenomics-based approach to assessing risk of toxicity to humans. *Human & Experimental Toxicology* **2008**, 27, 23-35.
48. Pardo-Andreu, G. L.; Nunez-Figueredo, Y.; Tudella, V. G.; Cuesta-Rubio, O.; Rodrigues, F. P.; Pestana, C. R.; Uyemura, S. A.; Leopoldino, A. M.; Alberici, L. C.; Curti, C., The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: ensuing energetic and oxidative stress implications. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2011**, 253, 282-289.
49. Reis, F. H.; Pardo-Andreu, G. L.; Nunez-Figueredo, Y.; Cuesta-Rubio, O.; Marin-Prida, J.; Uyemura, S. A.; Curti, C.; Alberici, L. C., Clusianone, a naturally occurring nemorosone regioisomer, uncouples rat liver mitochondria and induces HepG2 cell death. *Chemico-Biological Interactions* **2014**, 212, 20-29.
50. Van den Hof, W. F. P. M.; Van Summeren, A.; Lommen, A.; Coonen, M. L. J.; Brauers, K.; van Herwijnen, M.; Wodzig, W. K. W. H.; Kleinjans, J. C. S., Integrative cross-omics analysis in primary mouse hepatocytes unravels mechanisms of cyclosporin A-induced hepatotoxicity. *Toxicology* **2014**, 324, 18-26.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'approche utilisée au début de ce travail de thèse pour la sélection des extraits, qui a consisté en un criblage biologique assisté d'une analyse dérégulative, a été efficace pour l'identification de molécules d'intérêt biologique présentant des squelettes originaux. Ainsi a-t-elle initialement permis de sélectionner quatre extraits de *Calophyllaceae* renfermant des métabolites secondaires potentiellement anti-inflammatoires et immunorégulateurs.

L'étude phytochimique de l'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota* a conduit à l'isolement de neuf phénylcoumarines dont sept présentent une structure originale. En effet, la série des lépidotols, coumarines de type mammea diprénylées en position 6, ainsi que celle des lépidotines, dérivés cyclisés en C-5/C-6, ont été caractérisées. L'extrait, très majoritairement composé de lépidotol A (**94**), a montré une puissante activité inhibitrice de la formation des produits terminaux de la glycation (AGEs). De plus, le lépidotol A (**94**) s'est révélé anti-inflammatoire et immunosuppresseur par des effets inhibiteurs de l'expression de molécules d'adhérence cellulaire et de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. La combinaison de ces propriétés biologiques semble particulièrement intéressante en prévention des complications rénales chez les sujets diabétiques. Ces patients, chez qui les AGEs s'accumulent¹, sont en effet exposés à un risque d'insuffisance rénale dont l'ultime traitement est la greffe du rein.

Deux chémotypes de *Calophyllum tetrapterum* ont été investigués. L'extrait DCM de feuilles du premier (lot A) s'est avéré riche en acylphloroglucinols polyprénylés (PPAPs). Parmi les deux PPAPs qui en ont été isolés, le composé majoritaire, nommé tétraptérone (**105**), possède une structure originale comprenant une fonction acide carboxylique. Son élucidation structurale a nécessité d'analyser, au préalable, un dérivé cyclisé obtenu par hémi-synthèse, la tétraptérine (**106**). Dans l'extrait de feuilles de ce lot A, l'isolement des PPAPs a été entravé par la présence de nombreux triterpènes, dont le canophyllol (**109**). Une évaluation biologique anti-VCAM-1 de la tétraptérone (**105**) a montré une activité quasi nulle par rapport à celle de l'extrait brut, suggérant que le canophyllol (**109**) pourrait être responsable de l'effet observé avec l'extrait. Pour appuyer cette hypothèse, ce triterpène **109** sera prochainement évalué pour son activité anti-VCAM-1. La détermination structurale de trois autres composés isolés de l'extrait, dont un PPAP, est actuellement en cours. Ainsi, à l'image de la série des lépidotols et des lépidotines identifiés dans l'extrait de *Mesua lepidota*, une collection de PPAPs originales et présentant un profil d'absorption UV commun pourrait être constituée à partir de l'extrait DCM de feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum*. A partir de l'extrait DCM de feuilles du second chémotype de *Calophyllum tetrapterum* (lot B), deux pyranochromanones acides ont été isolées, dont l'acide tétraptérique (**115**), de structure originale. L'analyse dérégulative a montré que l'extrait est essentiellement composé de cette classe de polyphénols. De plus, un schéma de biosynthèse prenant en compte les deux classes de métabolites

acides identifiées dans les deux chémotypes, à savoir les PPAPs acides et les pyranochromanones acides, a été proposé à l'issue de cette étude. Une analyse plus fine de la variabilité des composés synthétisés par chacun des chémotypes permettrait d'étayer cette hypothèse.

L'analyse dérégulatrice ainsi que le fractionnement bioguidé initiés sur l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica*, inhibiteur de l'expression de VCAM-1, ont montré que les fractions bioactives étaient riches en coumarines de type mammea dont des dérivés de type mammea A, substitués par un groupement phényle en position 4, et des dérivés de type mammea E, portant un substituant 1-acétoxypropyle en C-4. Des xanthones ont par ailleurs été détectées dans les fractions cytotoxiques de l'extrait.

Les observations précédentes ont une nouvelle fois été constatées au cours de l'étude des effets sur l'endothélium d'un panel de polyphénols issus de la chimiothèque du SONAS, représentatifs des classes chimiques identifiées dans les *Clusiaceae* et *Calophyllaceae*. En effet, une forte diminution de la viabilité cellulaire a été causée par les xanthones évaluées, et des inhibitions de l'expression induite de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales ont été produites par des coumarines de type mammea A [e.g. mammea A/AA (**61a**)] et mammea E [e.g. neurophyllols (**120/121**)]. L'activité anti-inflammatoire de ces coumarines et de la guttiférone J (**125**), un PPAP de type benzophénone, s'est surtout manifestée sur la protéine VCAM-1. Au niveau des marqueurs de l'immunité, des activités immunosuppressives parfois très importantes se sont présentées vis-à-vis des molécules du HLA de classe II (HLA-DR), de HLA-E et de MICA. De même que sur l'expression de VCAM-1, les polyphénols actifs ont été la guttiférone J (**125**) et les coumarines de type mammea, le dérivé cyclisé mammea A/AA cyclo F (**66a**) montrant à chaque fois la plus faible activité inhibitrice. La mesure de l'effet sur les molécules du HLA de classe I classique a révélé une très faible sous-régulation par ces polyphénols, et uniquement sur l'expression constitutive de la protéine. Outre les effets sur les cellules endothéliales, rappelons que deux produits naturels de type coumarine et benzophénone, le glycyrol (**13**) et l'isogarcinol (**16**), décrits comme immunosuppresseurs dans la littérature, inhibent la calcineurine^{2,3}. Celle-ci joue en effet un rôle critique dans la fonction des lymphocytes T⁴, acteurs importants du rejet de greffe. Il serait alors intéressant de mesurer les effets du lépidotol A (**94**) et de la guttiférone J (**125**) sur cette phosphatase, également présente dans les cellules endothéliales et impliquée dans l'expression de plusieurs marqueurs endothéliaux de l'inflammation.

Bibliographie de la conclusion générale

1. Huebschmann, A. G.; Regensteiner, J. G.; Vlassara, H.; Reusch, J. E. B., Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* **2006**, 29, 1420-1432.
2. Li, J.; Tu, Y.; Tong, L.; Zhang, W.; Zheng, J.; Wei, Q., Immunosuppressive activity on the murine immune responses of glycyrol from *Glycyrrhiza uralensis* via inhibition of calcineurin activity. *Pharmaceutical Biology* **2010**, 48, 1177-1184.
3. Cen, J.; Wang, M.; Jiang, G.; Yin, Y.; Su, Z.; Tong, L.; Luo, J.; Ma, Y.; Gao, Y.; Wei, Q., The new immunosuppressant, isogarcinol, binds directly to its target enzyme calcineurin, unlike cyclosporin A and tacrolimus. *Biochimie* **2015**, 111, 119-124.
4. Feske, S.; Okamura, H.; Hogan, P. G.; Rao, A., Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, 311, 1117-1132.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

1. Matériel végétal

Les dates et lieux de récoltes des échantillons de *Calophyllum*, *Garcinia* et *Mesua* étudiés au cours de ce travail de thèse sont présentés dans le **Tableau 24**. L'abréviation KL du numéro d'herbier est utilisée pour Kuala Lumpur (Malaisie). Les parties de plante sont abrégées ainsi : Ec = écorce, Fe = feuille, Fr = fruit.

Tableau 24. Dates, lieux de récoltes et références des échantillons de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* étudiés.

Espèce	N° d'herbier KL (parties)	Site de collecte	Date de collecte
<i>C. depressinervosum</i> M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	5643 (Ec, Fe, Fr)	H. S. Gerik, Perak	01/04/2009
<i>C. disocurii</i> P. F. Stevens	4579 (Ec, Fe)	241 Km Gua Musang vers K. Lipis, Pahang	21/03/1996
<i>C. ferrugineum</i> Ridl.	5552 (Ec, Fe)	H. S. Ulu Sat, Bkt Bakar Machang, Kelantan	14/03/2008
<i>C. ferrugineum</i> Ridl. var. <i>neriifolium</i> (Ridl.) M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	4955 (Ec, Fe)	153 Km de Mersing à Rompin, Johor	18/10/2000
<i>C. flavoramulum</i> M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	4626 (Ec, Fe)	27 Km Dungun vers K. Berang, Terengganu	12/09/1996
<i>C. incrassatum</i> M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	4702 (Ec, Fe)	H. S. Cepam, Gerik, Perak	27/05/1997
	4884 (Ec, Fe, Fr)	H. S. Gunung Arong, Johor	08/04/1999
<i>C. molle</i> King	4463 (Ec, Fe)	H. S. Gunung Klien, Gerik, Perak	14/03/1993
	4601 (Ec, Fe)	H. S. Lenggong, Johor	14/06/1996
<i>C. pulcherrimum</i> Wall.	4538 (Ec, Fe)	H. S. Jemaluang, Mersing, Johor	06/09/1995
	4879 (Ec, Fe)	H. S. Gunung Arong, Johor	08/04/1999
	5326 (Ec, Fe)	H. S. Madek, Keluang, Johor	16/11/2006
<i>C. symingtonianum</i> M. R. Hend. & Wyatt-Sm.	4881 (Ec, Fe, Fr)	H. S. Gunung Arong, Johor	08/04/1999
<i>C. tetrapterum</i> Miq. (= <i>C. floribundum</i> Hook. f.)	5382 (Ec, Fe)	H. S. Ulu Sat Machang, Kelantan	19/03/2007
	5617 (Ec, Fe)	H. S. Sg. Badak Jitra, Kedah	21/01/2009
	5707 (Ec, Fe)	H. S. Sg. Badak, Jln Gerik vers Jeli, Perak	23/01/2010
<i>C. tetrapterum</i> Miq. var. <i>tetrapterum</i>	5076 (Ec, Fe)	H. S. Bkt. Bauk, Dungun, Terengganu	21/08/2004
<i>C. teysmannii</i> Miq. var. <i>teysmannii</i> ^a	4880 (Ec, Fe)	H. S. Gunung Arong, Johor	08/04/1999
<i>G. bancana</i> Miq.	4967 (Ec, Fe, Fr)	39 Km Mersing vers Keluang, Johor	21/10/2000
	5033 (Ec, Fe)	51 Km de Dungun à K. Berang, Terengganu	14/05/2003
<i>G. cowa</i> Roxb.	4587 (Ec, Fe)	H. S. Bkt. Slim, Perak	25/04/1996
	5526 (Ec, Fe)	H. S. Bkt. Kachi Sintok, Kedah	25/01/2008
<i>G. diversifolia</i> King	5712 (Ec, Fe)	H. S. Ulu Jelai, K. Lipis, Pahang	10/02/2010
<i>G. dumosa</i> King	5516 (Ec, Fe)	H. S. Madek, Keluang, Johor	28/11/2007

<i>G. brevirostris</i> Scheff. (= <i>G. eugeniaefolia</i> Wall.)	4611 (Ec, Fe)	H. S. Teloi, Kedah	18/07/1996
	5074 (Ec, Fe)	H. S. Bkt. Bauk, Dungun, Terengganu	20/08/2004
	5273 (Ec, Fe)	H. S. Ulu Sat, Machang, Kelantan	06/07/2006
	5456 (Ec, Fe)	H. S. Ulu Jelai, K. Lipis, Pahang	31/07/2007
	5251 (Ec)	Jln Pdg Golf - K. Lipis, Pahang	26/05/2006
<i>G. forbesii</i> King	5146 (Ec, Fe)	43 Km Keluang vers Mersing	31/05/2005
	5518 (Ec, Fe)	H.S. Madek, Keluang, Johor	29/11/2007
<i>G. gaudichaudii</i> Planch. & Triana	5483 (Ec, Fe, Fr)	H. S. Gunung Kenderong, Gerik, Perak	24/10/2007
<i>G. griffithii</i> T. Anderson	5303 (Ec, Fe)	H. S. Sg. Badak, Jitra, Kedah	18/09/2006
<i>G. celebica</i> L. (= <i>G. hombroniana</i> Pierre)	4800 (Ec, fe)	H. S. Jambu Bongkok, Terengganu	24/07/1998
<i>G. nervosa</i> Miq.	5702 (Ec, Fe)	H. S. Gunung Kenderong, Gerik, Perak	22/01/2010
<i>G. nigrolineata</i> Planch.	5555 (Ec, Fe)	H. S. Ulu Sat, Bkt. Bakar Machang, Kelantan	14/03/2008
<i>G. opaca</i> King	4532 (Ec, Fe, Fr)	H. S. Jemaluang, Mersing, Johor	05/09/1995
	4560 (Ec, Fe)	119 Km Mersing vers Keluang, Johor	05/02/1996
<i>G. opaca</i> King var. <i>dumosa</i> Whitmore	5589 (Ec, Fe)	H. S. Bkt. Belata, Ulu Bernam, Selangor	01/05/2008
<i>G. parvifolia</i> (Miq.) Miq.	5073 (Ec, Fe)	1,2 Km Kg. Tok Kah vers Jerangau, Terengganu	20/08/2004
	5248 (Ec)	H. S. Sg. Temau, K. Lipis, Pahang	25/05/2006
	5259 (Ec, Fe)	11 Km Sanggang vers K. Kangsar, Perak	22/06/2006
	5670 (Ec, Fe, Fr)	H. S. Meranto Gua Musang, Kelantan	13/05/2009
<i>G. prainiana</i> King	5661 (Ec, Fe)	H. S. Meranto Gua Musang, Kelantan	13/05/2009
<i>G. pyrifer</i> Ridl.	4523 (Ec, Fe)	246 Km K. Bahru vers K. Lipis, Gua, Musang	03/08/1995
	4954 (Ec, Fe)	H. S. Kuala Tembeling, Pahang	29/09/2000
	5443 (Ec, Fe)	H. S. Kenderong, Gerik, Perak	11/07/2007
<i>G. rostrata</i> (Hassk.) Miq.	5175 (Ec, Fe)	H. S. Sg. Kedah, 20 Km, Gerik-Jeli, Perak	16/09/2005
<i>M. assamica</i> (King & Prain) Kosterm.	5442 (Ec, Fe)	H. S. Kenderong, Gerik, Perak	11/07/2007
<i>M. elegans</i> (King) Kosterm.	4859 (Ec, Fe)	H. S. Terenas, Gulau, Kedah	02/03/1999
	5310 (Ec, Fe)	H. S. Sg. Badak, Jitra, Kedah	19/09/2006
<i>M. ferrea</i> L.	4515 (Ec, Fe)	Gua Musang, Kelantan	01/08/1995
	4614 (Ec, Fe)	H. S. Rimba Teloi, Kedah	19/07/1996
	4782 (Ec, Fe)	Bkt. Seteng, Ulu Kluang, Jeli, Kelantan	17/06/1998
<i>M. lepidota</i> T. Anderson	5436 (Ec, Fe, Fr)	H. S. Madek, Lenggong Keluang, Johor	22/06/2007
<i>M. nuda</i> Kosterm.	5352 (Ec, Fe)	H. S. Teloi Baling, Kedah	08/02/2007
<i>M. racemosa</i> (Planch.) Kosterm.	4464 (Ec, Fe)	H. S. Gunung Klien, Perak	14/03/1995

2. Extractions

2.1. Extraction automatisée sous pression

Les écorces, feuilles et fruits (entre 2 et 10 g) des différentes espèces de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae* broyés au moulin à café ont été introduits, en mélange avec 1 à 1,5 fois leur volume en terre de diatomée [Resprep™, granulométrie 30/40 mesh (Restek, Lisses, France)], dans une cellule d'extraction en inox de 120 mL [pour extracteur Büchi® E-914 (Büchi, Rungis, France)], de 33 mL ou de 11 mL [pour extracteur Dionex™ ASE 200 (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France)]. Une couche de sable de quartz (0,3-0,9 mm) (Büchi) puis un filtre de cellulose ont été placés de part et d'autre de la cellule. Trois cycles d'extraction successifs ont alors été réalisés par le DCM puis par le MeOH selon les méthodes décrites ci-après.

Pour l'extracteur Büchi® E-914, la première extraction a été faite à 60 °C sans surpression pendant 5 min, et la deuxième et la troisième extraction ont été réalisées à 60 °C et 100 bars pendant 10 min après un préchauffage d'une minute. Chaque cycle a été suivi d'une purge du solvant sous flux d'azote pendant 2 min. Pour l'extracteur Dionex™ ASE 200, les 3 cycles d'extraction ont été identiques, consistant en un préchauffage de 5 min, suivi d'une phase statique à 60 °C et 100 bars pendant 8 min, avant une décharge sous flux d'azote pendant 2 min.

Le solvant a été évaporé à siccité sous pression réduite à 40 °C par un évaporateur rotatif.

2.2. Extraction par appareil de Soxhlet

425 g de poudre de feuilles de *Calophyllum tetrapterum* (lot A, KL5382) ont été successivement extraits par le DCM et le MeOH au moyen d'un appareil de Soxhlet. Pour chaque solvant, l'opération a duré 72 heures. Les extraits obtenus ont ensuite été concentrés sous pression réduite à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif, pour obtenir des extraits DCM et MeOH secs de 26,2 g (rendement 6,2 %) et 56,1 g (rendement 13,2 %) respectivement.

3. Méthodes de purification

3.1. Extraction en phase solide

Les extraits méthanoliques riches en tanins ont été purifiés par extraction en phase solide (SPE) sur cartouche de polyamide Upti-Clean™ P6 1 g/6 mL (Interchim, Montluçon, France). Environ 50 mg d'extrait solubilisé dans 5 mL de MeOH ont été chargés sur la cartouche, préalablement activée par 20 mL de MeOH. Les produits non retenus sur la colonne ont ensuite été élués par environ 30 mL de MeOH.

3.2. Chromatographie sur colonne ouverte

Pour réaliser les chromatographies sur colonne ouverte, des colonnes en verre de 15 × 1,5 cm et de 12 × 1,5 cm ont été remplies de gel de silice Si60 40-63 µm (Merck, Darmstadt, Allemagne). La proportion de phase stationnaire choisie a été de 100 g de silice pour 1 g d'échantillon à purifier, et les échantillons ont été injectés sous forme liquide, dilués dans la phase mobile initiale.

3.3. Chromatographie flash

Les purifications par chromatographie flash ont été réalisées sur un système CombiFlash Rf-200 (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA) et équipé de pompes binaires, d'un détecteur UV multi-longueurs d'onde et d'un collecteur de fractions.

Les échantillons ont été injectés sous forme solide, adsorbés sur de la silice de 60 Å, 40-60 µm (Acros Organics, Geel, Belgique) en cas de séparation en phase normale, ou sur de la silice C18 de 70 Å, 45-75 µm (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pour les séparations en phase inverse. Les colonnes pré-remplies utilisées en phase normale ont été des colonnes RediSep® Rf 40-60 µm 80 g/125 mL et 125 g/210 mL (Teledyne Isco), PuriFlash™ PF-30SIHP 30 µm 4 g/5 mL et 40 g/48 mL (Interchim), GraceResolv™ Silica 40 µm 12 g/16 mL, 24 g/32 mL et 330 g/440 mL (Grace Davison Discovery Science, Epernon, France). Celle utilisée en phase inverse a été une colonne Reveleris® C18 RP 40 µm 12 g/18 mL (Grace).

3.4. Chromatographie liquide haute performance préparative et semi-préparative

Pour les purifications par HPLC préparative, nous avons eu recours à une chaîne PrepStar assistée par le logiciel ProStar/Dynamax, et munie de deux pompes PrepStar 218, d'une vanne d'injection manuelle équipée d'une boucle de 5 mL, d'un détecteur UV-visible ProStar 325 et d'un collecteur ProStar 701 (Varian S.A., Beuvry, France). Les colonnes utilisées ont été une Omnispher C18 de 250 × 21,4 mm (10 µm) (Varian) et une Pursuit XRs C18 de 250 × 21,2 mm (5 µm) (Agilent Technologies, Les Ulis, France).

Les séparations par HPLC semi-préparative ont été menées soit sur un système comprenant un module de séparation Waters 2695 et un détecteur UV à barrette de diodes Waters 2996 pilotés par le logiciel Empower 1 (Waters, Guyancourt, France), soit sur un appareil Agilent HP 1100 series muni d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'une vanne d'injection manuelle, d'un détecteur UV à barrette de diodes et d'un collecteur 1260 Infinity, et assisté du logiciel Chemstation for LC 3D (Agilent). Sur le premier appareil, une colonne Lichrospher® 100 RP18 de 150 × 4,6 mm (5 µm) (Merck) a été utilisée pour les séparations, tandis que sur l'appareil Agilent une colonne Luna C18 de 250 × 10 mm (5 µm) (Phenomenex, Le Pecq, France) a été employée.

Avant injection pour HPLC préparative, les échantillons ont été solubilisés dans un mélange MeOH (qualité isocratique)/eau milliQ + 0,1 % d'acide formique le plus proche possible de la condition initiale d'élution, et filtrés sur une membrane en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 0,45 µm. Les échantillons séparés par HPLC semi-préparative ont quant à eux été solubilisés dans le MeOH (qualité gradient) avant d'être centrifugés à 13000 rotations par minute (RPM) pendant 10 min.

3.5. Chromatographie sur couche mince préparative

La CCM préparative a été réalisée sur une plaque de verre Silica gel 60 F₂₅₄ de 20 × 20 cm, épaisseur de la couche 1 mm (Merck). L'échantillon a été déposé sous forme d'une bande horizontale à 2 cm du bord inférieur, puis développé dans une cuve chromatographique avec un éluant constitué de DCM et d'acétone en proportions 95/5. La plaque a été observée sous lampe UV à 254 nm et en partie révélée à la vanilline sulfurique afin de repérer les produits d'intérêt, qui ont ensuite été récupérés par grattage de la plaque de silice et désorption avec le DCM.

4. Méthodes d'analyse

4.1. Chromatographie sur couche mince

Le choix des phases mobiles pour les fractionnements par chromatographie flash, sur colonne ouverte et sur couche mince préparative, ainsi que le suivi des fractionnements pour le rassemblement de fractions, ont été réalisés par CCM sur des plaques de silice 60 F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur sur support d'aluminium (Merck). Les composés ont été visualisés après observation sous éclairage UV à 254 et 365 nm, ainsi que par révélation à la vanilline sulfurique. Cette dernière a consisté en une pulvérisation du révélateur suivie d'un chauffage de la plaque à l'étuve pendant 1 min à 100 °C.

4.2. Chromatographie liquide haute performance

4.2.1. HPLC-UV-DAD

Les analyses par HPLC ont été effectuées soit sur un module de séparation Waters 2695 couplé à un détecteur UV à barrette de diodes Waters 2996 et piloté par le logiciel Empower 1 (Waters), soit sur un équipement Agilent HP 1100 series équipé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'une vanne d'injection manuelle et d'un détecteur UV à barrette de diodes, et assisté du logiciel Chemstation for LC 3D (Agilent).

Avant injection, les échantillons ont été solubilisés dans le MeOH (qualité gradient) et centrifugés à 13000 RPM pendant 10 min afin d'éliminer les éventuelles particules en suspension. 10 à 20 µL d'échantillon concentré à 1 à 10 mg/mL ont été injectés sur une colonne Lichrospher® 100 RP18 de 150 × 4,6 mm (5 µm) (Merck), ou, pour la mise au point des séparations par HPLC (semi-) préparative, sur une colonne Luna C18 de 250 × 4,6 mm (5 µm) (Phenomenex), Omnispher C18 de

250 × 4,6 mm (5 µm) (Varian) ou Pursuit XRs C18 de 250 × 4,6 mm (5 µm) (Agilent). La phase mobile a été constituée d'eau acide (eau milliQ + 0,1 % d'acide formique) et de MeOH (qualité gradient) en proportions variables selon la méthode (cf. ci-dessous). Le débit a été fixé à 1 mL/min et la détection UV a été faite entre 200 et 400 ou 600 nm.

Pour l'analyse de l'ensemble des extraits, un gradient linéaire standard a été appliqué sur la colonne Lichrospher®, allant de 100 % d'eau acide à 100 % de MeOH en 35 min, avant une phase isocratique de 10 min à 100 % de MeOH (méthode 1).

Pour les analyses de l'extrait DCM des fruits de *Mesua lepidota* et de ses fractions, ont été appliquées :

- la méthode 2, sur colonne Lichrospher®, consistant en un mode isocratique à 20/80 (eau acide/MeOH) pendant 15 min suivi d'un gradient de 20/80 à 0/100 de 15 à 30 min, puis 100 % de MeOH de 30 à 37 min ;
- la méthode 3, sur colonne Omnispher, impliquant un mode isocratique à 15/85 (eau acide/MeOH) pendant 30 min puis un passage à 0/100 en 1 min, et un maintien à 0/100 de 31 à 40 min ;
- la méthode 4, sur colonne Lichrospher®, avec une phase mobile constituée d'eau acide/MeOH à 20/80 de 0 à 30 min, puis de 100 % de MeOH de 31 à 40 min.

Les systèmes d'élution utilisés pour l'analyse des fractions de l'extrait DCM de feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum* ont été :

- sur colonne Lichrospher® :
 - la méthode 5, un gradient allant d'eau acide/MeOH 55/45 à 0/100 en 25 min et suivi de 100 % de MeOH pendant 10 min ;
 - la méthode 6, un gradient allant d'eau acide/MeOH 30/70 à 0/100 en 25 min et suivi de 10 min à 100 % de MeOH ;
 - la méthode 7, un gradient allant d'eau acide/MeOH 45/55 à 0/100 en 25 min et terminé par 10 min à 0/100 ;
- sur colonne Omnispher, la méthode 8, constituée du gradient suivant : eau acide/MeOH 45/55 de 0 à 10 min, passage à 15/85 en 2 min, isocratique à 15/85 de 12 à 30 min, puis plateau à 0/100 atteint en 5 min ;
- sur colonne Luna, la méthode 9, consistant en un gradient allant d'eau acide/MeOH 30/70 à 0/100 en 10 min et suivi d'une élution isocratique avec 100 % de MeOH pendant 15 min.

Concernant les analyses par HPLC-UV-DAD de l'extrait DCM de feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum* et de ses fractions, les méthodes d'élution suivantes ont été utilisées :

- sur colonne Lichrospher[®], la méthode 10, consistant en un mode isocratique à 20/80 (eau acide/MeOH) pendant 20 min, suivi d'un gradient atteignant la proportion 0/100 en 5 min ensuite maintenue de 25 à 35 min ;
- sur colonne Pursuit XRs, la méthode 11, consistant en une série d'élutions isocratiques : eau acide/MeOH 10/90 pendant 10 min, 5/95 de 12 à 22 min, et enfin 0/100 de 23 à 33 min.

Les fractions de l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica* ont été analysées par HPLC-UV-DAD sur colonne Lichrospher[®], avec la méthode 12, formée d'un gradient eau acide/MeOH 30/70 à 10/90 en 25 min, suivi d'un plateau à 10/90 pendant 10 min, puis d'un nouveau gradient atteignant 0/100 en 7 min, pour finir par un isocratique à 0/100 de 42 à 50 min.

4.2.2. HPLC-UV-ESI-MSⁿ

Les analyses HPLC-UV-MSⁿ ont été conduites sur un système Waters 2795 connecté à un détecteur UV Waters 2487 (Waters) et à un spectromètre de masse Esquire 3000 PLUS composé d'un système d'ionisation électrospray et d'un analyseur de type trappe ionique, et relié au logiciel HyStar (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Les spectres de masse ont été traités par le logiciel DataAnalysis (Bruker).

Les échantillons ont été préparés de la même façon que précédemment et les conditions d'analyse ont été celles optimisées sur la colonne Lichrospher[®] 100 RP18 de 150 × 4,6 mm (5 µm) (Merck). La détection UV a été faite aux longueurs d'onde de 254 et 280 nm.

Le spectromètre de masse a été réglé de la façon suivante : gaz de collision : hélium, amplitude d'énergie de collision : 1 V ; gaz de séchage et de nébulisation : N₂, 7 L/min ; pression du gaz de nébulisation : 30 psi ; température de séchage : 340 °C ; débit : 1 mL/min ; split : 1:9 ; plage de mesures : m/z 50-1500 Da, avec une cible moyenne de 500 uma. Les analyses ont été enregistrées en modes d'ionisation positif et/ou négatif.

4.2.3. HPLC-UV-DEDL

Les analyses en HPLC-UV-DEDL ont été réalisées sur un appareil Ultimate 3000 Dionex équipé d'une pompe et d'un détecteur UV à barrette de diodes Ultimate 3000 Dionex (Thermo Fisher Scientific) et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière PL-ELS 2100 (Varian), et piloté par le logiciel Chroméléon (Thermo Fisher Scientific).

Les paramètres suivants ont été réglés au niveau du DEDL : température d'évaporation et de nébulisation : 50 °C ; débit du gaz : 1,6 SLM.

Les échantillons, préparés comme précédemment, ont été injectés sur la colonne Lichrospher[®] 100 RP18 de 150 × 4,6 mm (5 µm) (Merck).

4.3. Point de fusion

Les mesures de point de fusion ont été effectuées sur un appareil Stuart™ SMP3 (Bibby Scientific, Roissy Charles de Gaulle, France).

4.4. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ont été enregistrés sur un polarimètre Anton Paar MCP 300/500 (Anton Paar, Les Ulis, France), à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de Gif-sur-Yvette.

4.5. Spectrophotométrie UV

Les spectres UV ont été obtenus sur un spectrophotomètre UV-visible Thermo Scientific Evolution 60 (Thermo Fisher Scientific).

4.6. Dichroïsme circulaire électronique

La mesure des spectres de dichroïsme circulaire électronique (ECD) a été faite sur un spectropolarimètre JASCO J-810 (Jasco France, Bouguenais, France) à l'Université Paris Sud *via* l'ICSN.

4.7. Résonance magnétique nucléaire

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été mesurés sur des spectromètres Jeol GSX WB 270 MHz (Jeol Europe, Croissy-sur-Seine, France), Bruker Avance DRX 300 ou 500 MHz, ou, pour le lépidotol A (**94**), Bruker Avance III HD 400 MHz (Bruker) par l'entreprise Bruker à Strasbourg. L'enregistrement des spectres de RMN bidimensionnelle (COSY, NOESY, HMQC, HMBC) a été effectué sur les spectromètres Bruker Avance DRX 500 MHz ou Bruker Avance III HD 400 MHz (Bruker). Des solvants deutérés appropriés ont été utilisés, le signal du solvant non deutéré résiduel servant de référence. Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en partie par million (ppm) et les constantes de couplage (J) en Hertz (Hz).

4.8. Spectrométrie de masse

4.8.1. Spectrométrie de masse basse résolution

La spectrométrie de masse par injection directe (ou infusion) a été réalisée au moyen du spectromètre de masse décrit dans la partie 3.2.2, dans les conditions standard suivantes : température : 250 °C ; débit : 4 L/min ; pression : 10 psi.

4.8.2. Spectrométrie de masse haute résolution

Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés, après ionisation électrospray (ESI) en mode positif ou négatif, sur un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific) à l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC). Les pics majoritaires sont décrits selon le rapport masse/charge (m/z).

4.9. Cristallographie aux rayons X

Les données de diffraction aux rayons X ont été obtenues à température ambiante et à la longueur d'onde de 0,71073 Å (radiation monochromatique K α du molybdène), sur un diffractomètre Bruker KappaCCD (Bruker), à partir de monocristaux des composés analysés.

4.10. Simulation des spectres ECD et des pouvoirs rotatoires

Les calculs ont été effectués avec le programme Gaussian09¹, en phase gazeuse. Les géométries de l'état fondamental ont tout d'abord été optimisées par une méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), avec la fonctionnelle hybride PBE0 (avec 25 % d'échange exact)^{2,3}. La base de Pople de type 6-311++G(2df,2pd) a été utilisée, étant une méthode adaptée pour les calculs de pouvoir rotatoire et d'ECD⁴⁻⁶. Les rotations optiques ont été calculées par la méthode des GIAOs (*gauge-invariant atomic orbitals*)^{5,7}. Les énergies des états excités ont été déterminées au même niveau de théorie que les états fondamentaux, par une méthode de DFT, et les ECD correspondants ont été obtenus par une forme gaussienne élargie ($\sigma = 0,4$ eV) avec l'application GaussSum⁸.

5. Purification des composés

5.1. Fractionnements de l'extrait DCM de fruits de *Mesua lepidota*

5.1.1. Chromatographies flash réalisées sur l'extrait brut

a) Chromatographie flash en phase inverse sur l'extrait 1

120 mg de l'extrait 5436F_DCM ont été fractionnés par chromatographie flash en phase inverse sur colonne Reveleris® C18 12 g, en utilisant un mélange d'eau et de MeOH comme éluant. Le gradient de la phase mobile a été le suivant : 0 % → 50 % MeOH 0-10 min, 50 % → 75 % MeOH 10-30 min, 75 % → 80 % MeOH 30-40 min, 80 % MeOH 40-78 min, 80 % → 90 % MeOH 78-88 min, 90 % MeOH 88-98 min, 90 % → 100 % MeOH 98-99 min, 100 % MeOH 99-108 min. Le débit a été fixé à 20 mL/min et la détection a été faite à 226 et 301 nm. Quatre fractions ont été obtenues après regroupement selon les profils des CCM analytiques : 5436F_DCM_F1 (33 mg), 5436F_DCM_F2 (78 mg), 5436F_DCM_F3 [lépidotol B (**95**)] (3,3 mg) et 5436F_DCM_F4 (19 mg).

b) Chromatographie flash en phase normale sur l'extrait 1

Une chromatographie flash en phase normale a été menée sur 722 mg de l'extrait 5436F_DCM obtenu suite à la première extraction des fruits, sur une colonne RediSep® Rf 80 g. A un débit de 40 mL/min et aux longueurs d'onde de détection 254 et 280 nm, le gradient suivant, utilisant du cyclohexane et de l'acétate d'éthyle (AcOEt) pendant 145 min, puis l'AcOEt et un mélange AcOEt/MeOH (80/20), a été appliqué : 0 % AcOEt 0-10 min, 0 % → 3 % AcOEt 10-15 min, 3 % AcOEt 15-25 min, 3 % → 5 % AcOEt 25-30 min, 5 % AcOEt 30-40 min, 5 % → 10 % AcOEt 40-45 min, 10 % AcOEt 45-60 min, 10 % → 20 % AcOEt 60-70 min, 20 % AcOEt 70-80 min, 20 % → 100 % AcOEt 80-130 min, 100 % AcOEt 130-145 min, 0 % → 100 % AcOEt/MeOH (80/20) 145-146 min, 100 % AcOEt/MeOH (80/20) 146-160 min. Dix fractions ont été réunies d'après les profils CCM : 5436F_DCM_A (7,3 mg), B (5,8 mg), C (35 mg), D (481 mg), E [lépidotol A (**94**)] (41 mg), F (80 mg), G (28 mg), H (18 mg), I (3,7 mg) et J (17 mg).

c) Chromatographie flash en phase normale sur l'extrait 2

1,5 g de l'extrait obtenu à la suite de la seconde extraction des fruits ont été fractionnés par chromatographie flash en phase normale, sur la même colonne que précédemment (RediSep® Rf 80 g), dans les mêmes conditions de débit (40 mL/min) et de détection UV (254 et 280 nm). Le gradient de la phase mobile, constituée des mêmes éluants que précédemment (cyclohexane et AcOEt puis AcOEt et AcOEt/MeOH 80/20), a quant à lui été adapté de la façon suivante pour améliorer la séparation des composés : 0 % AcOEt 0-20 min, 0 % → 3 % AcOEt 20-25 min, 3 % AcOEt 25-45 min, 3 % → 5 % AcOEt 45-50 min, 5 % AcOEt 50-70 min, 5 % → 10 % AcOEt 70-80 min, 10 % AcOEt 80-95 min, 10 % → 20 % AcOEt 95-100 min, 20 % AcOEt 100-105 min, 20 % → 100 % AcOEt 105-130 min, 100 % AcOEt 130-140 min, 0 % → 100 % AcOEt/MeOH (80/20) 140-141 min, 100 % AcOEt/MeOH (80/20) 141-155 min. Les contenus des tubes collectés ont été rassemblés en 12 fractions : 5436F_DCM_A' (6,7 mg), B' (28 mg), C' (288 mg), D' (178 mg), E' (757 mg), F' (25 mg), G' (39 mg), H' (22 mg), I' (18 mg), J' (31 mg), K' (47 mg) et L' (67 mg).

5.1.2. HPLC (semi-)préparatives conduites sur les fractions

a) Purification de la fraction 5436F_DCM_B

La fraction 5436F_DCM_B a été purifiée par HPLC semi-préparative sur la colonne Lichrospher® 100 RP18 150 × 4,6 mm (5 µm). La méthode utilisée a été la méthode 4 (cf. 4.2.1) avec un débit de 1 mL/min. La détection à 254 nm a permis une collecte manuelle. Trois injections de 100 µL du produit (5,8 mg) solubilisé dans le MeOH (19 mg/mL) ont conduit à l'isolement de 0,4 mg de lépidotine B (**100**) (5436F_DCM_B 26min).

b) Purification de la fraction 5436F_DCM_C

Une HPLC préparative a été réalisée sur la fraction 5436F_DCM_C (35 mg), avec la colonne Omnispher C18 250 × 21,4 mm (10 µm). Deux injections de 5 mL de produit dilué à 3,5 mg/mL dans un mélange eau acide/MeOH 10/90 ont été faites. La phase mobile, constituée d'eau acide (0,1 % d'acide formique) et de MeOH, a consisté en : 82 % MeOH 0-70 min, 82 % → 85 % MeOH 70-75 min, 85 % MeOH 75-95 min, 85 % → 90 % MeOH 95-100 min, 90 % MeOH 100-105 min, 90 % → 100 % MeOH 105-110 min, 100 % MeOH 110-130 min. Le débit a été fixé à 22 mL/min, et les longueurs d'onde de détection à 300 et 330 nm au vu des λ_{\max} des composés présents. Quatre produits purifiés ont été récupérés : la lépidotine A (**99**) (5436F_DCM_C_t91-92, 1,8 mg), le lépidotol A (**94**) (5436F_DCM_C_t95-96, 4,9 mg), la lépidotine B (**100**) (5436F_DCM_C_t99-102, 2,1 mg) et le lépidotol B (**95**) (5436F_DCM_C_t103-105, 3,8 mg).

c) Purification de la fraction 5436F_DCM_H'

La fraction H' a été purifiée par HPLC semi-préparative sur la colonne Lichrospher® 100 RP18 150 × 4,6 mm (5 µm). 21,6 mg d'échantillon ont été solubilisés à 36 mg/mL dans le MeOH afin d'injecter 6 fois 100 µL, selon le gradient d'élution suivant, constitué d'eau acide (0,1 % d'acide formique) et de MeOH : 80 % MeOH 0-10 min, 80 % → 100 % MeOH 10-11 min, 100 % MeOH 11-21 min, au débit de 1 mL/min. Une fraction de 1,0 mg (5436F_DCM_H'1), dont le constituant majoritaire est le lépidotol E (**98**) (aire sous la courbe pour ce composé = 30 % à 301 nm), a été retenue.

d) Purification de la fraction 5436F_DCM_I'

Un fractionnement de 5436F_DCM_I' a été effectué par HPLC semi-préparative, sur la colonne Lichrospher® 100 RP18 150 × 4,6 mm (5 µm), selon la méthode 4 (cf. 4.2.1), à 1 mL/min. Le produit (17,8 mg) a été injecté par volumes de 100 µL dilués à 17 mg/mL. Trois composés ont été manuellement collectés, par détection à 254 nm : le lépidotol E (**98**) (5436F_DCM_I' 5min, 0,2 mg), le lépidotol C (**96**) (5436F_DCM_I' 18min, 1,6 mg) et le lépidotol D (**97**) (5436F_DCM_I' 26min, 0,5 mg).

e) Purification de la fraction 5436F_DCM_J'

La fraction 5436F_DCM_J' a également été purifiée par HPLC semi-préparative sur la colonne Lichrospher® 100 RP18 150 × 4,6 mm (5 µm). La phase mobile, constituée d'eau acide (0,1 % d'acide formique) et de MeOH, a été utilisée en mode isocratique avec 75 % de MeOH de 0 à 15 min, puis 100 % de MeOH de 16 à 26 min. Ainsi, 1,4 mg d'un mélange mammea A/OB (**101**) et mammea A/OC (**102**) (5436F_DCM_J'2), ainsi que 1,7 mg de mammea A/OC (**101**) purifié (5436F_DCM_J'3) ont été collectés.

5.2. Fractionnements de l'extrait DCM de feuilles du lot A de *Calophyllum tetrapterum*

5.2.1. Chromatographie flash réalisée sur l'extrait brut

L'extrait brut 5382L_DCM (26,1 g) a été fractionné par chromatographie flash en phase normale sur une colonne GraceResolv™ Silica 330 g, avec le DCM et un mélange DCM/MeOH 90/10 comme éluants, selon le gradient suivant : 0 % DCM/MeOH 0-30 min, 0 → 50 % DCM/MeOH 30-120 min, 50 → 100 % DCM/MeOH 120-140 min, à 65 mL/min. La détection a été réalisée à 254 et 290 nm. Les profils des CCM ont conduit au rassemblement en 11 fractions : 5382L_DCM_FI (1,4 g), FII (1,1 g), FIII (1,0 g), FIV (6,6 g), FV (658 mg), FVI (405 mg), FVII (3,3 g), FVIII (5,3 g), FIX (2,1 g), FX (564 mg) et FXI (2,9 g).

5.2.2. Fractionnement de la fraction FIII et réaction d'acétylation

a) Chromatographie flash réalisée sur la fraction FIII

500 mg de la fraction 5382L_DCM_FIII ont été purifiés par chromatographie flash en phase inverse sur une colonne Reveleris® C18 12 g. L'élution a été faite à un débit de 30 mL/min, avec le gradient suivant composé d'eau et de MeOH : 40 % MeOH 0-7 min, 40 % → 70 % MeOH 7-20 min, 70 % → 80 % MeOH 20-40 min, 80 % → 100 % MeOH 40-55 min, 100 % MeOH 55-100 min. La longueur d'onde de détection a été fixée à 254 nm. L'analyse des profils en CCM a conduit à la réunion en 15 fractions : 5382L_DCM_FIII-1 (11,6 mg), 2 (5,0 mg), 3 (6,8 mg), 4 (10,6 mg), 5 (7,4 mg), 6 (0,9 mg), 7 (1,4 mg), 8 (4,1 mg), 9 (2,1 mg), 10 (5,5 mg), 11 (13,8 mg), 12 (9,8 mg), 13 (14,3 mg), 14 (56 mg) et 15 (118 mg).

b) Acétylation de la fraction FIII-11

La réaction d'acétylation a été effectuée dans un pilulier, selon la méthode décrite par Verotta *et al.*⁹. Elle a consisté à faire réagir la fraction 5382L_DCM_FIII-11 (12 mg) avec du chlorure d'acétyle (0,1 mL, soit 1,406 mmol) en large excès, dans 2 mL de pyridine anhydre, à 25 °C pendant 2 h et sous atmosphère inerte (N₂). Le produit de la réaction a ensuite été dilué dans 20 mL d'eau distillée, puis extrait deux fois par l'acétate d'éthyle (2 × 20 mL). La phase organique a été lavée par une solution d'acide chlorhydrique à 10 % (1 × 20 mL) puis par une solution saturée en bicarbonate de sodium (2 × 20 mL). L'ajout d'une solution saturée en chlorure de sodium a permis le retour à la neutralité avant séchage de la solution par du sulfate de sodium, filtration et évaporation du solvant sous pression réduite.

c) Purification de la fraction FIII-11 après réaction d'acétylation

La fraction 5382L_DCM_FIII-11-AC (fraction après réaction) a été purifiée par HPLC semi-préparative sur la colonne Luna C18 250 × 10 mm (5 µm). 3 mg d'échantillon ont été injectés à 4

reprises et élués selon la méthode suivante, comprenant de l'eau acide (0,1 % d'acide formique) et du MeOH : 70 % → 100 % MeOH 0-10 min puis 100 % MeOH 10-27 min, à un débit de 4,7 mL/min. 1,5 mg de tétraptérine (**106**) (5382L_DCM_FIII-11-AC-1) ont été purifiés.

5.2.3. Fractionnement de la fraction FIV

a) Purifications par chromatographies flash

❖ Fractionnement de FIV

La chromatographie flash en phase normale conduite sur 5382L_DCM_FIV (6,4 g) a requis l'utilisation d'une colonne RediSep[®] Rf 125 g et un éluant composé de cyclohexane et d'acétate d'éthyle puis acétate d'éthyle et MeOH. Pour une détection à 254 et 290 nm, et un débit de 55 mL/min, le système d'élution appliqué a été : 0 % → 30 % AcOEt 0-35 min, 30 % AcOEt 35-50 min, 30 % → 100 % AcOEt 50-60 min, 100 % AcOEt 60-70 min, 0 → 10 % MeOH 70-85 min. 14 fractions ont été récoltées avec un rendement total de 57 %, parmi lesquelles 5382L_DCM_FIV-6 (1,1 g), 7 (656 mg) et 8 (1,2 g).

❖ Fractionnement de FIV-6

La fraction 5382L_DCM_FIV-6 (1,06 g) a été fractionnée par chromatographie flash en phase normale, sur colonne PuriFlash[™] PF-30SIHP de 40 g. Le gradient d'élution, constitué de cyclohexane et d'AcOEt a été : 0 % → 20 % AcOEt 0-90 min, 20 % → 50 % AcOEt 90-100 min. Le débit d'élution a été de 30 mL/min et la détection UV a été faite à 254 et 290 nm. Les fractions 5382L_DCM_FIV-6-1 (623 mg), 2 (199 mg) et 3 (161 mg) ont été collectées.

❖ Fractionnement de FIV-6-1

Pour le fractionnement de 5382L_DCM_FIV-6-1 (621 mg), une colonne PuriFlash[™] PF-30SIHP de 40 g a été utilisée, dans les conditions d'élution (cyclohexane/AcOEt) suivantes : 0 % AcOEt 0-10 min, 0 % → 20 % AcOEt 10-90 min, 20 % → 70 % AcOEt 90-105 min. Cette chromatographie flash en phase normale a été effectuée sous un débit de 25 mL/min, à des longueurs d'onde de détection de 254 et 290 nm. Les 4 fractions suivantes ont été constituées d'après leurs profils en CCM : 5382L_DCM_FIV-6-1-1 (6,2 mg), 2 (318 mg), 3 (40 mg) et 4 (42 mg).

❖ Fractionnement de FIV-6-1-2

Par chromatographie flash en phase normale sur colonne GraceResolv[™] Silica 24 g, la fraction 5382L_DCM_FIV-6-1-2 (315 mg) a été fractionnée en utilisant un mélange de cyclohexane et d'AcOEt comme éluant : 3 % → 10 % AcOEt 0-90 min, 10 % AcOEt 90-100 min, 10 % → 30 % AcOEt 100-105 min. Le débit a été fixé à 15 mL/min et les détections à 254 et 290 nm. 5 fractions ont été

rassemblées sur la base de leurs profils en CCM : 5382L_DCM_FIV-6-1-2-1 (26 mg), 2 (56 mg), 3 (33 mg), 4 (5,6 mg) et 5 (5,8 mg).

❖ Fractionnement de FIV-6-1-2-2

La fraction 5382L_DCM_FIV-6-1-2-2 (56 mg) a été chromatographiée sur une colonne PuriFlash™ PF-30SIHP de 4 g, à un débit de 12 mL/min, avec des détecteurs UV à 254 et 290 nm, et selon le système d'éluion (cyclohexane/AcOEt) suivant : 2 % → 5 % AcOEt 0-20 min, 5 % AcOEt 20-25 min, 5 % → 6 % AcOEt 25-26 min, 6 % AcOEt 26-45 min. 16 mg de tétraptérone (**105**) (5382L_DCM_FIV-6-1-2-2-2) ont été purifiés.

❖ Fractionnement de FIV-6-ER

Les fractions 5382L_DCM_FIV-6-1-3, FIV-6-1-4 et FIV-6-3, présentant des profils HPLC-UV identiques, ont été réunies en une fraction nommée 5382L_DCM_FIV-6-ER. Celle-ci (160 mg) a été fractionnée par chromatographie flash en phase normale sur colonne PuriFlash™ PF-30SIHP 40 g, avec un débit de 20 mL/min et des détecteurs UV à 254 et 290 nm. L'éluant, constitué de cyclohexane et d'AcOEt, a consisté en un gradient : 0 % → 10 % AcOEt 0-30 min, 10 % → 70 % AcOEt 30-70 min, 70 % → 100 % AcOEt 70-75 min. Avec un rendement total de 75 %, 6 fractions ont été obtenues, dont la fraction 5382L_DCM_FIV-6-ER-4 (20,6 mg).

b) Purification de la fraction FIV-6-1-2-1 par CCM préparative

La fraction 5382L_DCM_FIV-6-1-2-1 (25 mg) a été fractionnée par CCM préparative, selon la méthode décrite dans la partie 3.5. Cinq fractions ont été obtenues : 5382L_DCM_FIV-6-1-2-1-1a (R_f 0,72, 1,6 mg), 1b [canophyllol (**109**), R_f 0,72, 1 mg], 2 (R_f 0,59, 1,0 mg), 3 [mélange stigmastérol (**82**) et β -sitostérol (**110**), R_f 0,50, 4,5 mg] et 4 (R_f 0,79, 2,7 mg).

c) Purification de la fraction FIV-6-ER-4 par HPLC préparative

Une HPLC préparative a été conduite sur la fraction 5382L_DCM_FIV-6-ER-4 (20 mg), avec la colonne Omnispher C18 250 × 21,4 mm (10 μ m). Le produit a été injecté dilué à 4 mg/mL dans 5 mL d'éluant. La phase mobile, constituée d'eau acide (0,1 % d'acide formique) et de MeOH, a consisté en 55 % à 100 % MeOH de 0 à 30 min suivis de 100 % MeOH de 30 à 35 min. Le débit a été fixé à 22 mL/min, et les longueurs d'onde de détection à 254 et 290 nm. Le composé **107** (5382L_DCM_FIV-6-ER-4-t26, 1,0 mg) et le PPAP **108** (5382L_DCM_FIV-6-ER-4-t31-32, 1,2 mg) ont été purifiés.

5.2.4. Fractionnement de la fraction FVI

a) Chromatographie flash réalisée sur FVI

Le fractionnement de 5382L_DCM_FVI (405 mg) a tout d'abord consisté en une chromatographie flash en phase normale sur colonne PuriFlash™ PF-30SIHP 40 g, à un débit de 30 mL/min, avec des détections UV à 254 et 310 nm. L'éluant a été composé de DCM et d'un mélange DCM/MeOH (95/5), et la méthode d'élution utilisée a été : DCM/MeOH (95/5): 0 % 0-8 min, 0 % → 5 % 8-25 min, 5 % 25-33 min, 5 % → 10 % 33-40 min, 10 % 40-48 min, 10 % → 20 % 48-55 min, 20 % 55-63 min, 20 % → 100 % 63-75 min, 100 % 75-85 min. Neuf fractions ont été collectées avec un rendement total de 47 %, dont 5382L_DCM_FVI-2 [3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (**111**), 4,3 mg] et 3 (30,6 mg).

b) Purifications par chromatographies sur colonne ouverte

❖ Fractionnement de FVI-3

Une colonne en verre de 12 × 1,5 cm a été utilisée pour la purification de 5382L_DCM_FVI-3. Un gradient de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (100:0 à 95:5) a été utilisé, afin de récupérer 3 fractions : 5382L_DCM_FVI-3-1 (26,6 mg), 2 (1,2 mg) et 3 (0,8 mg).

❖ Fractionnement de FVI-3-1

La fraction 5382L_DCM_FVI-3-1 (26,6 mg) a également été fractionnée par chromatographie sur colonne ouverte, à l'aide d'une colonne de 15 cm de long et de 1,5 cm de diamètre. La phase mobile a consisté en un gradient allant de 100 % de cyclohexane à un mélange cyclohexane/AcOEt 95/5. Trois produits ont ainsi été purifiés : le canophyllol (**109**) (5382L_DCM_FVI-3-1-1, 9 mg), le composé **112** (5382L_DCM_FVI-3-1-2, 3 mg) et la 3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (**111**) (5382L_DCM_FVI-3-1-4, 1,5 mg).

5.3. Fractionnements de l'extrait DCM de feuilles du lot B de *Calophyllum tetrapterum*

5.3.1. Chromatographie flash réalisée sur l'extrait brut

L'extrait brut 5617L_DCM (415 mg) a été fractionné par chromatographie flash en phase normale sur une colonne PuriFlash™ PF-30SIHP de 40 g, avec une phase mobile constituée de cyclohexane et d'acétate d'éthyle selon la méthode suivante : 0 → 20 % AcOEt 0-90 min, 20 → 100 % AcOEt 90-100 min, 100 % AcOEt 100-120 min. Le débit a été de 20 mL/min et la détection a été faite à 254 et 280 nm. D'après les profils chromatographiques de la chromatographie flash et de CCM, 23 fractions ont été regroupées : 5617L_DCM_F1 (5,0 mg), F2 (2,7 mg), F3 (29 mg), F4 (4,0 mg), F5 (6,9 mg), F6 (10 mg), F7 (3,7 mg), F8 (18 mg), F9 (6,9 mg), F10 (5,3 mg), F11 (103 mg),

F12 (75 mg), F13 (26 mg), F14 (5,7 mg), F15 (11 mg), F16 (10 mg), F17 (2,1 mg), F18 (8,7 mg), F19 (7,4 mg), F20 (6,3 mg), F21 (17 mg), F22 (5,7 mg) et F23 (69 mg).

5.3.2. Fractionnement de la fraction F12

Une HPLC préparative a été réalisée sur la fraction 5617L_DCM_F12 (40 mg), avec la colonne Pursuit XRs C18 250 × 21,2 mm (5 µm). 5 mL de produit dilué à 4 mg/mL dans un mélange eau acide/MeOH 10/90 ont été injectés à 2 reprises. La phase mobile, constituée d'eau acide (0,1 % d'acide formique) et de MeOH, a consisté en : 90 % MeOH 0-10 min, 90 % → 95 % MeOH 10-12 min, 95 % MeOH 12-15 min. Le débit a été fixé à 22 mL/min, et les longueurs d'onde de détection à 254 et 270 nm. L'acide tétraptérique (**115**) (5617L_DCM_F12-2, 5,3 mg) et l'acide blancoïque (**114**) (5617L_DCM_F12-3, 11,3 mg) ont été isolés.

5.4. Fractionnement de l'extrait DCM de feuilles de *Mesua assamica*

Les 271 mg d'extrait brut 5442L_DCM ont été fractionnés par chromatographie flash en phase normale sur une colonne GraceResolv™ Silica de 12 g. L'éluant a été composé de cyclohexane et d'un mélange AcOEt/MeOH (90/10), et la méthode d'éluion, exprimée en pourcentage du second solvant (mélange AcOEt/MeOH), a été la suivante : 0 % 0-15 min, 0 → 10 % 15-25 min, 10 % 25-30 min, 10 → 20 % 30-40 min, 20 % 40-45 min. Le débit a été fixé à 15 mL/min et les composés ont été détectés à 254 et 280 nm. Ce fractionnement a permis l'obtention de 10 fractions : 5442L_DCM_F1 (24 mg), F2 (1,1 mg), F3 (14 mg), F4 (25 mg), F5 (18 mg), F6 (28 mg), F7 (19 mg), F8 (16 mg), F9 (47 mg) et F10 (70 mg).

6. Données spectrales des composés isolés

Les spectres UV présentés sont ceux enregistrés par le détecteur à barrette de diodes couplé à l'HPLC, dans la condition d'éluion indiquée pour le temps de rétention (t_R).

6.1. Phénylcoumarines isolées des fruits de *Mesua lepidota*

❖ Lépidotol A 94

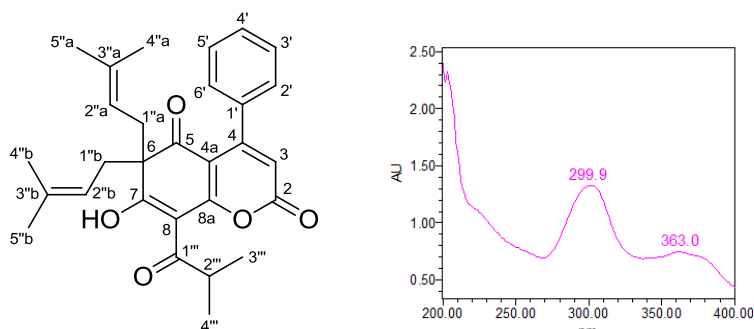


Figure 128. Structure et spectre UV du lépidotol A (94)

- Aspect : aiguilles jaunes
- HPLC : $t_R = 20,0$ min (méthode 2)
- Point de fusion : 88 – 90 °C
- Formule brute : $C_{29}H_{32}O_5$
- HRESIMS : m/z 461,2324 $[M+H]^+$ (masse calculée : 461,2323)
- UV (nm, MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 226 (3,96), 298 (3,86), 392 (3,68)

Tableau 25. RMN 1H (300 MHz) et ^{13}C (125 MHz) $[CDCl_3, \delta$ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol A (94)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	158,6		4'	128,8	7,39, m
3	110,8	5,94, s	1''a, 1''b	38,2	2,64, m
4	157,9		2''a, 2''b	117,5	4,83, t (7,5)
4a	107,3		3''a, 3''b	136,2	
5	200,4		4''a, 4''b	18,1	1,55, s
6	62,3		5''a, 5''b	26,1	1,61, s
7	192,8		1'''	205,2	
8	104,6		2'''	37,2	3,99, hept (6,7)
8a	168,0		3'''	19,6	1,31, d (6,7)
1'	138,5		4'''	19,6	1,31, d (6,7)
2', 6'	126,9	7,15, dd (7,9, 1,4)	OH-7		18,87, s
3', 5'	128,1	7,39, m			

Tableau 26. Données de diffraction aux rayons X du lépidotol A (94)

Formule chimique	C ₂₉ H ₃₂ O ₅
Poids moléculaire	460,55
Système cristallin, groupe d'espace	Orthorombique, Pbc _a
Maille élémentaire	a = 24,274(2) Å, α = 90 ° b = 16,262(1) Å, β = 90 ° c = 12,626(2) Å, γ = 90 °
Volume	4984,0(9) Å ³
Z, densité calculée	8, 1,228 Mg/m ³
Coefficient d'absorption	0,083 mm ⁻¹
F(000)	1968
Dimensions du cristal	0,36 × 0,17 × 0,13 mm
Domaine angulaire (θ)	3,33 ° - 27,52 °
Indices de Miller	-31 ≤ h ≤ 29, -16 ≤ k ≤ 19, -14 ≤ l ≤ 16
Nombre de réflexions mesurées / indépendantes	52592 / 5512 [R(int) = 0,1208]
Complétude à θ = 25,00	98,6 %
Correction d'absorption	Semi-empirique sur les réflexions équivalentes
Transmission max. et min.	0,989 et 0,877
Méthode d'affinement	Par moindres carrés sur F ²
Données / restrictions / paramètres	5512 / 0 / 317
Facteur de véracité sur F ²	1,023
R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0598, wR2 = 0,1082
R (ensemble des données)	R1 = 0,1791, wR2 = 0,1426
Densité électronique résiduelle	0,207 et -0,231 e.Å ⁻³
Numéro de dépôt CCDC	1053375

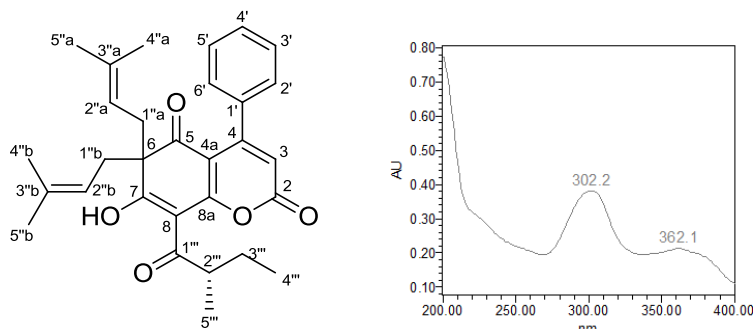
❖ Lépidotol B 95

Figure 129. Structure et spectre UV du lépidotol B (95)

- Aspect : cristaux jaunes
- HPLC : $t_R = 23,2$ min (méthode 2)
- Point de fusion : 73 – 75 °C
- Formule brute : $C_{30}H_{34}O_5$
- HRESIMS : m/z 473,2312 $[M-H]^-$ (masse calculée : 473,2333)
- $[\alpha]_D^{21}$: + 12 °. $[dm.g/cm^3]^{-1}$ (c 0,1, $CHCl_3$)
- UV (nm, MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 226 (4,10), 302 (3,96), 394 (3,91)

Tableau 27. RMN 1H (300 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol B (95)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	158,4		4'	128,7	7,39, m
3	110,7	5,94, s	1''a, 1''b	38,1	2,65, m
4	157,7		2''a, 2''b	117,4	4,82, m
4a	107,2		3''a, 3''b	136,0	
5	200,4		4''a, 4''b	18,0	1,55, s et 1,54, s
6	62,1		5''a, 5''b	25,9	1,61, s et 1,58, s
7	192,7		1'''	204,4	
8	105,2		2'''	43,5	3,81, sext (7,0)
8a	167,8		3'''	27,6	1,87, sext (7,0) et 1,55, m
1'	138,3		4'''	11,7	1,00, t (7,0)
2', 6'	126,7	7,15, dd (8,0, 1,6)	5'''	17,0	1,30, d (7,0)
3', 5'	127,9	7,39, m	OH-7		18,91, s

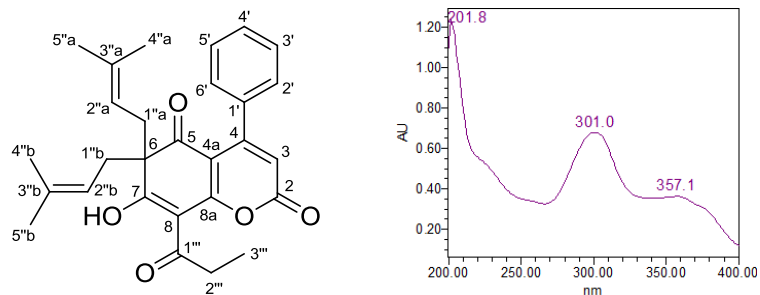
❖ Lépidotol C 96

Figure 130. Structure et spectre UV du lépidotol C (96)

- Aspect : poudre jaune
- HPLC : $t_R = 17,5$ min (méthode 4)
- Formule brute : $C_{28}H_{30}O_5$
- HRESIMS : m/z 445,2026 $[M-H]^-$ (masse calculée : 445,2020)
- UV (nm, MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 285 (3,47), 400 (3,58)

Tableau 28. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol C (96)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	158,4		3', 5'	127,9	7,39, m
3	110,5	5,94, s	4'	128,7	7,39, m
4	157,8		1''a, 1''b	37,8	2,65, d (7,4)
4a	107,0		2''a, 2''b	117,3	4,82, t (7,4)
5	199,6		3''a, 3''b	136,0	
6	61,9		4''a, 4''b	18,0	1,55, s
7	192,5		5''a, 5''b	25,9	1,61, s
8	105,0		1'''	201,8	
8a	167,9		2'''	34,5	3,26, q (7,2)
1'	138,3		3'''	9,1	1,30, t (7,2)
2', 6'	126,7	7,14, dd (7,8, 1,3)	OH-7		18,93, s

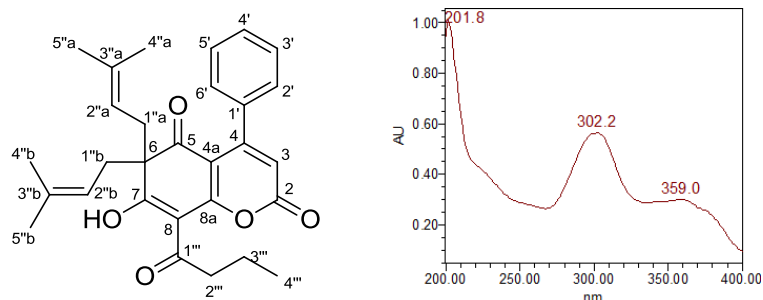
❖ Lépidotol D 97

Figure 131. Structure et spectre UV du lépidotol D (97)

- Aspect : poudre jaune
- HPLC : $t_R = 25,3$ min (méthode 4)
- Formule brute : $C_{29}H_{32}O_5$
- HRESIMS : m/z 459,2182 $[M-H]^-$ (masse calculée : 459,2177)
- UV (nm, MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 285 (3,59), 405 (3,52)

Tableau 29. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol D (97)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	158,3		4'	128,7	7,39, m
3	110,7	5,94, s	1''a, 1''b	37,9	2,65, d (7,1)
4	157,4		2''a, 2''b	117,3	4,82, t (7,1)
4a	106,9		3''a, 3''b	136,0	
5	200,4		4''a, 4''b	18,0	1,55, s
6	62,1		5''a, 5''b	25,9	1,60, s
7	192,6		1'''	200,5	
8	105,2		2'''	42,4	3,16, t (7,3)
8a	165,9		3'''	19,3	1,82, sext (7,3)
1'	138,3		4'''	13,8	1,08, t (7,3)
2', 6'	126,7	7,15, dd (6,9, 1,1)	OH-7		18,87, s
3', 5'	127,9	7,39, m			

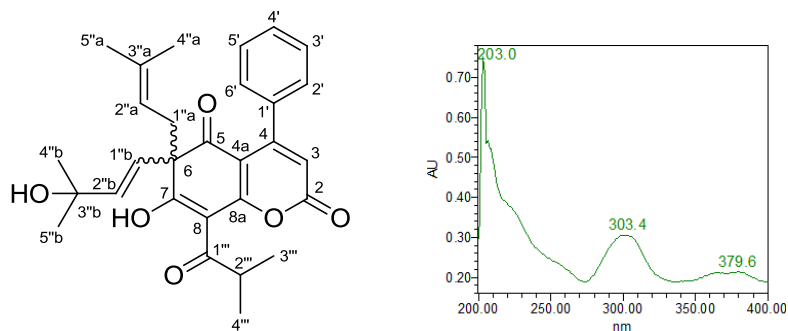
❖ Lépidotol E 98

Figure 132. Structure et spectre UV du lépidotol E (98)

- Aspect : poudre jaune
- HPLC : $t_R = 4,4$ min (méthode 4)
- Formule brute : $C_{29}H_{32}O_6$
- HRESIMS : m/z 475,2125 $[M-H]^-$ (masse calculée : 475,2126)
- $[\alpha]_D^{21}$: -6 °. $[dm.g/cm^3]^{-1}$ (c 0,05, $CHCl_3$)
- UV (nm, MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 290 (3,90), 325 (3,81), 405 (3,80)

Tableau 30. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du lépidotol E (98)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	158,3		2''a	117,9	4,74, t (7,1)
3	110,7	5,97, s	3''a	135,9	
4	157,9		4''a	18,1	1,57, m
4a	107,0		5''a	25,8	1,67, m
5	199,3		1''b	124,9	5,70, d (15,9)
6	63,4		2''b	141,6	5,78, d (15,9)
7	190,0		3''b	70,0	
8	103,7		4''b	29,8 ^a	1,31, m
8a	168,5		5''b	29,9 ^a	1,31, m
1'	138,0		1'''	204,8	
2', 6'	126,6	7,17, m	2'''	36,8	3,98, hept (6,6)
3', 5'	128,1	7,39, m	3'''	19,5	1,32, d (6,6)
4'	128,9	7,39, m	4'''	19,5	1,32, d (6,6)
1''a	34,9	2,81, d (7,1)	OH-7		18,85, s

^a Interchangeables

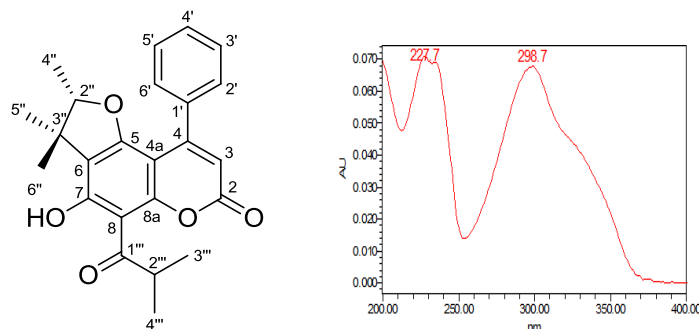
❖ Lépidotine A 99

Figure 133. Structure et spectre UV de la lépidotine A (99)

- Aspect : poudre jaune pâle
- HPLC : $t_R = 18,7$ min (méthode 4)
- Formule brute : $C_{24}H_{24}O_5$
- HRESIMS : m/z 393,1699 $[M+H]^+$ (masse calculée : 393,1697)
- $[\alpha]_D^{21} : + 3 \text{ } ^\circ \cdot [\text{dm} \cdot \text{g}/\text{cm}^3]^{-1}$ (c 0,1, CHCl_3)
- UV (nm, MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 225 (4,22), 295 (4,15), 330 (3,99)

Tableau 31. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la lépidotine A (99)

Position	^{13}C	^1H	Position	^{13}C	^1H
2	159,4		4'	128,8	7,40, m
3	110,9	6,05, s	2''	91,5	4,26, q (6,6)
4	155,6		3''	43,4	
4a	98,5		4''	14,0	1,07, d (6,6)
5	161,2		5''	20,2	1,19, s
6	118,2		6''	25,4	1,39, s
7	164,8		1'''	210,8	
8	104,1		2'''	40,2	4,10, hept (6,7)
8a	157,2		3'''	19,3	1,29, d (6,7)
1'	137,6		4'''	19,4	1,30, d (6,7)
2', 6'	127,5	7,30, m	OH-7		14,25, s
3', 5'	127,8	7,40, m			

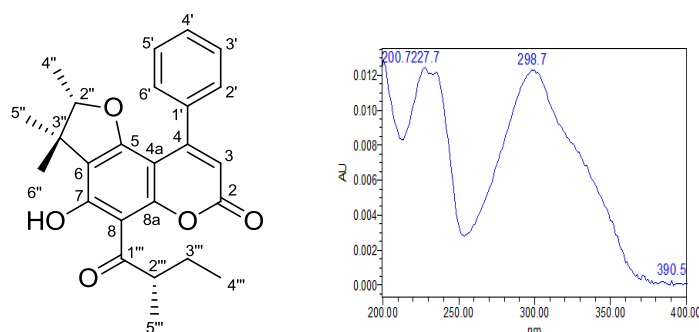
❖ **Lépidotine B 100**

Figure 134. Structure et spectre UV de la lépidotine B (100)

- Aspect : poudre jaune pâle
- HPLC : $t_R = 26,7$ min (méthode 4)
- Formule brute : $C_{25}H_{26}O_5$
- HRESIMS : m/z 407,1857 $[M+H]^+$ (masse calculée : 407,1853)
- $[\alpha]_D^{21}$: $0^\circ \cdot [dm \cdot g/cm^3]^{-1}$ (c 0,1, $CHCl_3$)
- UV (nm, MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 225 (4,02), 295 (3,90), 330 (3,66)

Tableau 32. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la lépidotine B (100)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	159,4		4'	128,8	7,39, m
3	111,0	6,05, s	2''	91,5 et 91,4 ^a	4,26, q (6,6)
4	155,5		3''	43,4	
4a	98,5		4''	14,1 et 14,0 ^a	1,08, d (6,6) et 1,07, d (6,6) ^a
5	161,2 ^a		5''	20,3 et 20,2 ^a	1,20, s et 1,18, s ^a
6	118,2 ^a		6''	25,4 et 25,3 ^a	1,39, s et 1,38, s ^a
7	164,8 et 164,7 ^a		1'''	210,7 et 210,6 ^a	
8	104,6 et 104,5 ^a		2'''	46,8 ^a	3,95, sext (6,6)
8a	157,2 ^a		3'''	27,3 et 27,2 ^a	1,94, m et 1,49, m
1'	137,7		4'''	11,8 ^a	1,03, t (7,5) et 1,01, t (7,5) ^a
2', 6'	127,5	7,30, m	5'''	16,7 et 16,6 ^a	1,29, d (6,6) et 1,28, d (6,6) ^a
3', 5'	127,8	7,39, m	OH-7		14,32, s et 14,30, s ^a

^a Les signaux des deux formes tautomères sont observables.

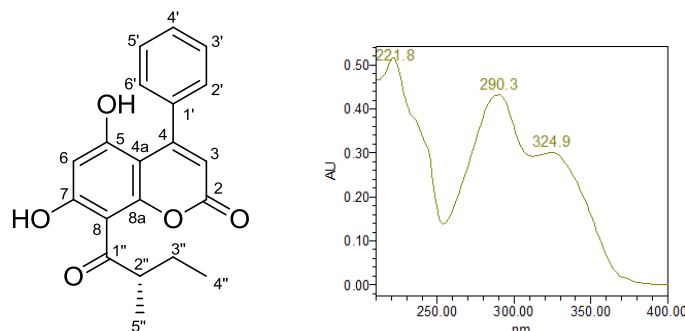
❖ **Mammea A/OB 101**^{10,11}

Figure 135. Structure et spectre UV de mammea A/OB (101)

- Aspect : poudre verdâtre
- HPLC : $t_R = 4,2$ min (méthode 4)
- Formule brute : $C_{20}H_{18}O_5$
- Masse molaire : 338 g/mol
- $[\alpha]_D^{21} : -6 \text{ } ^\circ \cdot [\text{dm} \cdot \text{g}/\text{cm}^3]^{-1}$ (c 0,05, CHCl_3)
- UV (nm, MeOH) λ_{max} (log ϵ) : 225 (4,07), 260 (3,82), 290 (3,87), 330 (3,98), 385 (3,31)

Tableau 33. RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de mammea A/OB (101)

Position	^{13}C	^1H	Position	^{13}C	^1H
2	158,7		2', 6'	127,4	7,43, m
3	111,9	6,01, s	3', 5'	129,6	7,55, m
4	154,1		4'	130,3	7,55, m
4a	100,9		1''	210,2	
5	159,6		2''	46,9	3,93, sext (6,7)
6	101,6	6,26, s	3''	27,1	1,93, m et 1,49, m
7	168,9		4''	11,7	1,01, t (7,2)
8	104,6		5''	16,5	1,28, d (6,7)
8a	157,5		OH-7		14,11, s
1'	136,4				

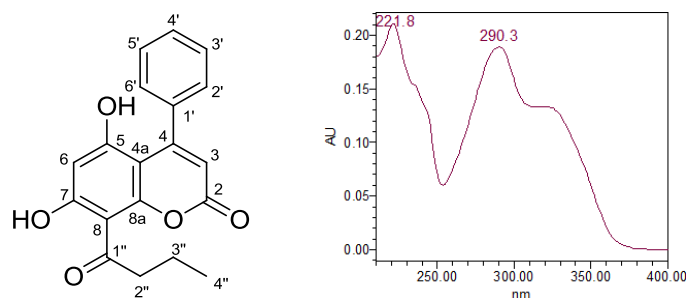
❖ **Mammea A/OC 102**¹²

Figure 136. Structure et spectre UV de mammea A/OC (102)

- Aspect : poudre verdâtre
- HPLC : $t_R = 3,9$ min (méthode 4)
- Formule brute : $C_{19}H_{16}O_5$
- Masse molaire : 324 g/mol

Tableau 34. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de mammea A/OC (102)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	158,7		1'	136,4	
3	111,9	6,01, s	2', 6'	127,4	7,43, m
4	154,1		3', 5'	129,6	7,55, m
4a	100,9		4'	130,3	7,55, m
5	159,6		1''	206,0	
6	101,5	6,25, s	2''	46,6	3,30, t (7,1)
7	168,9		3''	17,9	1,81, sext (7,1)
8	104,6		4''	13,8	1,06, t (7,1)
8a	157,5		OH-7		14,11, s

6.2. Composés isolés des feuilles de *Calophyllum tetrapterum*

❖ Tétraptérone 105

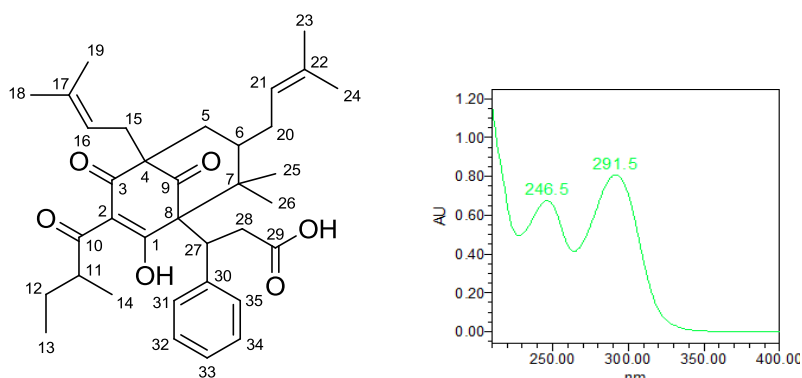


Figure 137. Structure et spectre UV de la tétraptérone (105)

- Aspect : résine incolore
- HPLC : $t_R = 25,2$ min (méthode 5)
- Formule brute : $C_{35}H_{46}O_6$
- HRESIMS : m/z 561,3213 $[M-H]^-$ (masse calculée : 561,3222)
- $[\alpha]_D^{21} : + 2^\circ \cdot [dm \cdot g/cm^3]^{-1}$ (c 0,05, $CHCl_3$)

Tableau 35. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) $[MeOH-d_4 + 0,1\% TFA, \delta$ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la tétraptérone (105)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
1	196,2		18	26,2	1,70, d (6,2)
2	117,2		19	18,2	1,71, s
3	199,3		20	30,4	2,04, m
4	61,5		21	125,6	4,82, t (6,7)
5	38,9	2,26, m et 2,02, m	22	Non déterminé	
6	49,8	1,43, m	23	25,9	1,64, s
7	50,7		24	17,6	1,40, s
8	72,6		25	28,9	1,22, m
9	210,2 ^a		26	23,8	1,16, m
10	210,3 ^a		27	44,7	4,22, s large
11	Non déterminé	2,57, m	28	40,9	3,03, m et 2,93, m
12	23,8	1,77, m et 1,35, m	29	175,7	
13	12,0	0,96, m	30	143,7	
14	Non déterminé	1,10, m	31, 35	132,7	7,40, s large
15	31,5	2,52, m	32, 34	128,9	7,16, m
16	120,8	5,16, m	33	127,8	7,13, m
17	135,7				

^a Interchangeables

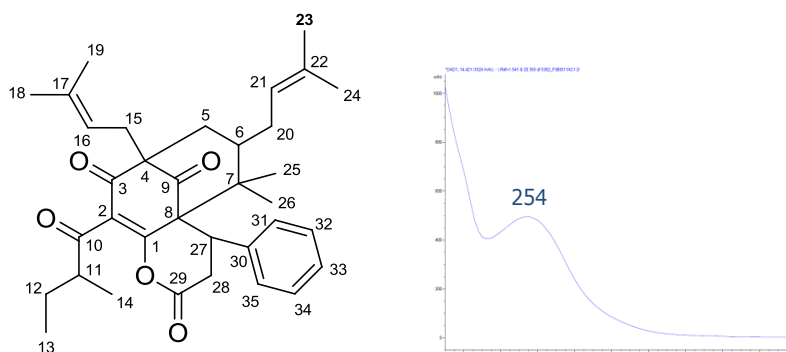
❖ **Tétraptérine 106 [dérivé synthétisé à partir de la tétraptérone (105)]**

Figure 138. Structure et spectre UV de la tétraptérine (106)

- Aspect : résine incolore
- HPLC : $t_R = 14,4$ min (méthode 9)
- Formule brute : $C_{35}H_{44}O_5$
- Masse molaire : 544 g/mol

Tableau 36. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la tétraptérine (106)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
1	164,0 ^a		18	26,0	1,64, s
2	111,6		19	18,1	1,69, s
3	195,4		20	29,7	2,46, m et 2,24, m
4	62,4		21	124,5	4,80, t (6,3)
5	39,2	2,16, dd (14,4, 6,9) et 2,07, d large (14,4)	22	133,3	
6	49,5	1,36, m	23	25,8	1,64, s
7	48,5		24	17,9	1,56, s
8	64,9		25	27,0	0,89, s
9	206,0		26	25,5	1,09, s
10	203,1		27	39,2	4,66, m
11	48,3	2,57, sext (6,7)	28	38,4	2,74, dd (16,4, 4,1) et 2,56, m
12	24,4	1,74, m et 1,35, m	29	166,6 ^a	
13	11,4	0,93, t (7,5)	30	139,5	
14	14,4	1,09, d (7,0)	31, 35	131,6	7,49, m
15	30,7	2,52, m	32, 34	128,5	7,31, m
16	118,6	4,98, t (6,4)	33	128,1	7,31, m
17	135,4				

^a Interchangeables

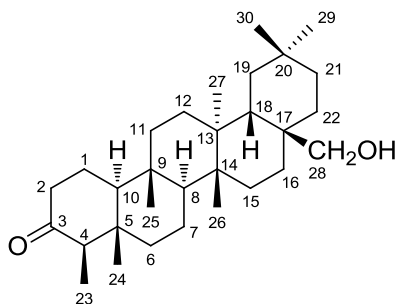
❖ **Canophylloïl 109**^{13,14}

Figure 139. Structure du canophylloïl (109)

- Aspect : aiguilles blanches
- HPLC : $t_R = 25,4$ min (méthode 5)
- Formule brute : $C_{30}H_{50}O_2$
- Masse molaire : 442 g/mol
- $[\alpha]_D^{21} : -24 \text{ } ^\circ \cdot [\text{dm} \cdot \text{g}/\text{cm}^3]^{-1}$ (c 0,1, CHCl_3)

Tableau 37. RMN ^1H (270 MHz) et ^{13}C (67,5 MHz) [CDCl_3 , δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du canophylloïl (109)

Position	^{13}C	^1H	Position	^{13}C	^1H
1	22,2		16	29,1	
2	41,5		17	35,1	
3	213,3		18	39,4	
4	58,2		19	34,4	
5	42,0		20	28,1	
6	41,2		21	31,3	
7	18,2		22	33,3	
8	52,4		23	6,7	0,88, d (6,9)
9	37,4		24	14,6	0,73, s
10	59,5		25	18,0	0,87, s
11	35,4		26	19,0	0,98, s
12	30,0		27	19,1	0,92, s
13	39,3		28	68,0	3,64, s
14	38,1		29	34,2	1,00, s
15	31,2		30	32,8	1,13, s

Tableau 38. Données de diffraction aux rayons X du canophyllol (109)

Formule chimique	C ₃₀ H ₅₀ O ₂
Poids moléculaire	442,70
Système cristallin, groupe d'espace	Orthorhombique, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Maille élémentaire	a = 6,457(1) Å, α = 90 ° b = 14,0572(8) Å, β = 90 ° c = 28,711(4) Å, γ = 90 °
Volume	2606,0(6) Å ³
Z, densité calculée	4, 1,128 Mg/m ³
Coefficient d'absorption	0,068 mm ⁻¹
F(000)	984
Dimensions du cristal	0,39 × 0,09 × 0,07 mm
Domaine angulaire (θ)	4,06 ° - 26,08 °
Indices de Miller	-7 ≤ h ≤ 7, -17 ≤ k ≤ 13, -35 ≤ l ≤ 35
Nombre de réflexions mesurées / indépendantes	19335 / 2899 [R(int) = 0,0526]
Complétude à θ = 25,00	98,6 %
Correction d'absorption	Semi-empirique sur les réflexions équivalentes
Transmission max. et min.	0,995 et 0,895
Méthode d'affinement	Par moindres carrés sur F ²
Données / restrictions / paramètres	2899 / 0 / 300
Facteur de véracité sur F ²	1,052
R [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0469, wR2 = 0,0916
R (ensemble des données)	R1 = 0,1126, wR2 = 0,1085
Densité électronique résiduelle	0,150 et -0,139 e.Å ⁻³

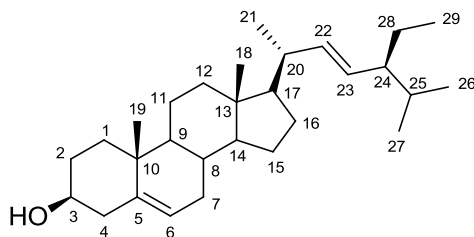
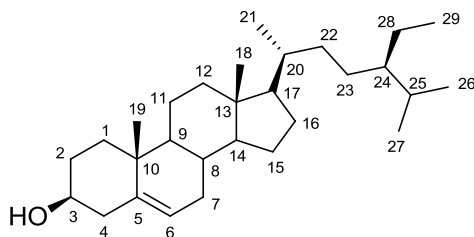
❖ **Stigmastérol 82**^{15,16}

Figure 140. Structure du stigmastérol (82)

- Aspect : cristaux blancs
- R_f sur CCM : 0,50 (DCM/acétone 95/5)
- Formule brute : $C_{29}H_{48}O$
- Masse molaire : 412 g/mol

Tableau 39. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du stigmastérol (82)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
1	37,4	1,84, m et 1,07, m	16	28,4	
2	29,8	1,48, m	17	56,1	
3	72,0	3,52, m	18	12,0	0,68, s
4	42,5	2,30, dd (13,1, 5,2) et 2,24, m	19	19,6	1,01, s
5	140,9		20	40,6	2,04, m
6	121,9	5,35, d (3,8)	21	21,2	1,02, d (6,5)
7	32,1	1,96, m	22	138,5	5,15, dd (15,2, 8,8)
8	32,1	1,52, m	23	129,4	5,01, dd (15,2, 8,8)
9	50,3		24	51,4	
10	36,7		25	31,8	1,52, m
11	21,2		26	21,4	0,84, d (6,4)
12	39,8		27	18,9	0,79, d (6,5)
13	42,4		28	25,6	
14	56,9		29	12,4	0,80, m
15	24,5				

❖ **β-Sitostérol 110**^{15,16}Figure 141. Structure du β -sitostérol (110)

- Aspect : cristaux blancs
- R_f sur CCM : 0,50 (DCM/acétone 95/5)
- Formule brute : $C_{29}H_{50}O$
- Masse molaire : 414 g/mol

Tableau 40. RMN 1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] du β -sitostérol (110)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
1	37,4	1,84, m et 1,07, m	16	28,4	
2	29,8	1,48, m	17	56,1	
3	72,0	3,52, m	18	12,0	0,68, s
4	42,5	2,30, dd (13,1, 5,2) et 2,24, m	19	19,6	1,01, s
5	140,9		20	36,3	
6	121,9	5,35, d (3,8)	21	18,9	
7	32,1	1,96, m	22	34,1	
8	32,1	1,52, m	23	26,2	
9	50,3		24	46,0	
10	36,7		25	29,0	
11	21,2		26	19,6	
12	39,8		27	19,2	
13	42,4		28	23,2	
14	56,9		29	12,2	
15	24,5				

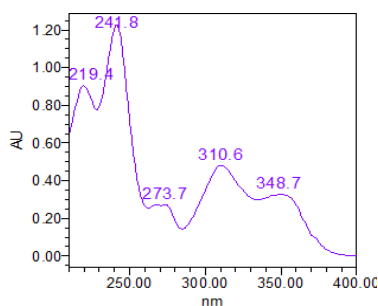
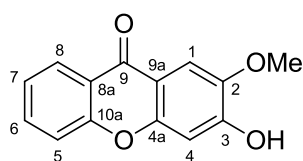
❖ **3-Hydroxy-2-méthoxyxanthone 111**¹⁷

Figure 142. Structure et spectre UV de la 3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (111)

- Aspect : poudre jaune pâle
- HPLC : $t_R = 9,5$ min (méthode 5)
- Formule brute : $C_{14}H_{10}O_4$
- Masse molaire : 242 g/mol

Tableau 41. RMN 1H (270 MHz) et ^{13}C (67,5 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de la 3-hydroxy-2-méthoxyxanthone (111)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
1	105,4	7,70, s	8	126,6	8,34, dd (7,9, 1,8)
2	144,5		8a	121,5	
3	152,5		9	176,3	
4	102,8	7,02, s	9a	115,1	
4a	152,8		10a	156,3	
5	117,8	7,48, d (8,0)	OMe-2	56,4	4,04, s
6	134,1	7,69, ddd (8,0, 7,5, 1,8)	OH-3		6,38, s large
7	123,8	7,37, dd (7,9, 7,5)			

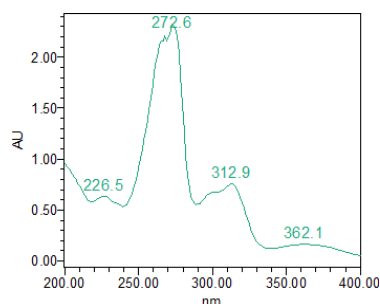
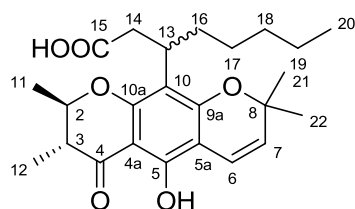
❖ **Acide blancoïque 114**¹⁸

Figure 143. Structure et spectre UV de l'acide blancoïque (114)

- Aspect : résine jaune verdâtre
- HPLC : $t_R = 12,9$ min (méthode 10)
- Formule brute : $C_{24}H_{32}O_6$
- Masse molaire : 416 g/mol

Tableau 42. RMN 1H (300 MHz) et ^{13}C (125 MHz) [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de l'acide blancoïque (114)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	78,8	4,13, dq (13,2, 6,2)	12	10,5	1,20, d (7,0)
3	45,6	2,52, dq (13,2, 7,0)	13	30,6	3,66, m
4	199,4		14	38,5	2,81, dd (14,9, 8,2) et 2,69, dd (14,9, 7,1)
4a	101,8		15	179,0	
5	157,0		16	33,1	1,81, m et 1,52, m
5a	102,6		17	27,3	1,27, m et 1,14, m
6	115,6	6,60, d (10,0)	18	31,6	1,25, m
7	125,7	5,46, d (10,0)	19	22,6	1,23, m
8	78,1		20	14,1	0,83, t (6,7)
9a	159,8		21	28,0	1,37, s
10	108,8		22	28,4	1,44, s
10a	156,2		OH-5		12,48, s
11	19,5	1,47, d (6,2)			

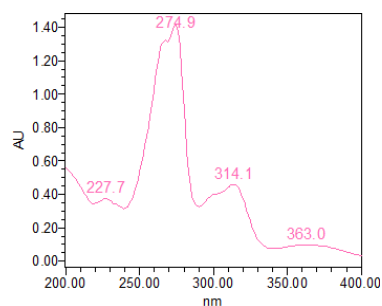
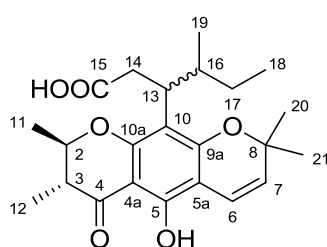
❖ **Acide tétraptérique 115**

Figure 144. Structure et spectre UV de l'acide tétraptérique (115)

- Aspect : résine jaune verdâtre
- HPLC : $t_R = 8,7$ min (méthode 10)
- Formule brute : $C_{23}H_{30}O_6$
- HRESIMS : m/z 403,2118 $[M+H]^+$ (masse calculée : 403,2115)

Tableau 43. RMN 1H et ^{13}C [$CDCl_3$, δ ppm (TMS = 0), (multiplicité, J Hz)] de l'acide tétraptérique (115)

Position	^{13}C	1H	Position	^{13}C	1H
2	78,7	4,13, dq (13,2, 6,3)	11	19,5	1,45, d (6,3)
3	45,7	2,51, dq (13,2, 6,9)	12	10,5	1,19, d (6,9)
4	199,4		13	36,0	3,44, td (10,1, 5,2)
4a	101,9		14	36,2	2,90, dd (14,6, 10,1) et 2,70, dd (14,6, 5,2)
5	157,0		15	179,0	
5a	102,4		16	37,1	1,83, m
6	115,6	6,59, d (10,0)	17	26,9	1,61, m et 1,13, m
7	125,6	5,44, d (10,0)	18	11,0	0,90, t (7,4)
8	78,1		19	17,0	0,69, d (6,7)
9a	159,8		20	28,0	1,33, s large
10	108,9		21	28,5	1,43, s
10a	156,2		OH-5		12,48, s

7. Evaluation de l'activité inhibitrice de la formation des AGEs

L'activité inhibitrice de la formation des produits avancés de la glycation (AGEs) a été évaluée selon la méthode décrite par Séro *et al.*¹⁹. L'essai a été réalisé en microplaque de 96 puits à l'aide d'un automate Freedom Evo® 100 (Tecan, Lyon, France) dirigé par le logiciel Evoware. L'albumine de sérum bovin (BSA, 10 mg/mL) a été incubée avec le D-ribose (0,5 M) et l'extrait à tester (1 µg/mL à 1 mg/mL) dans un tampon phosphate (50 mM) à pH 7,4 (0,02 % NaN₃). Les solutions ont été incubées en microplaque (96 puits) à 37 °C pendant 24 h dans un système clos, avant mesure de la fluorescence des AGEs. Pour corriger les phénomènes d'interférence de fluorescence, la fluorescence résultant de l'incubation, dans les mêmes conditions, de la BSA (10 mg/mL) et de l'extrait testé (1 µg/mL à 1 mg/mL), a été soustraite pour chaque mesure. Un contrôle négatif, correspondant à 100 % d'inhibition de la formation des AGEs, a consisté en des puits contenant uniquement de la BSA. Un contrôle positif, relatif à une absence d'inhibition de la formation des AGEs, a consisté en des puits ne contenant que de la BSA (10 mg/mL) et du D-ribose (0,5 M). Le volume final de chaque puits a été de 100 µL. La fluorescence des AGEs de type vesperlysines (λ_{exc} 370 nm ; λ_{em} 440 nm) et de type pentosidine (λ_{exc} 335 nm ; λ_{em} 385 nm) a été mesurée par un spectrofluorimètre pour microplaques Infinite M200 (Tecan). Pour chaque concentration de produit testé, le pourcentage d'AGEs formés a été calculé par la formule suivante : [fluorescence (échantillon) - fluorescence (blanc de l'échantillon)] / [fluorescence (contrôle positif) - fluorescence (blanc du contrôle positif)] × 100. La concentration d'extrait inhibant 50 % de la formation des AGEs (CI₅₀) a été calculée à partir des courbes effet-dose en utilisant le logiciel SigmaPlot 12.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Allemagne), et comparée avec celle de l'aminoguanidine, composé de référence.

8. Evaluation des activités cytotoxiques, anti-inflammatoires et immunosuppressives sur cellules endothéliales

Les essais *in vitro* sur cellules endothéliales ont été effectués au sein de l'unité INSERM 1064 / *Center of research in transplantation & immunology* (CRTI) du CHU de Nantes, dans l'équipe du Dr. Béatrice Charreau.

8.1. Culture des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales primaires de veine de cordon ombilical humain (HUVECs 16642 ou 18071) (Lonza Verviers SPRL, Verviers, Belgique) ont été cultivées à 37 °C avec 5 % de CO₂, dans un milieu de culture basal des cellules endothéliales (ECBM, PromoCell, Heidelberg, Allemagne) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone™, Thermo Fisher Scientific), 4 µL/mL de supplément de croissance des cellules endothéliales (ECGS)/Héparine, 0,1 ng/mL de facteur humain de croissance épithéliale (hEGF), 1 ng/mL de facteur humain basique de croissance des fibroblastes (hbFGF), 1 µg/mL d'hydrocortisone (C-39210, PromoCell), 2 mM de glutamine, 100 U/mL

de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Les cellules à confluence ont été utilisées entre les passages 3 et 6.

8.2. Evaluation de l'expression de VCAM-1 par ELISA cellulaire

Pour réaliser le test en ELISA cellulaire, les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence dans des plaques 96 puits à fond plat (Nunc, Roskilde, Danemark) prétraitées par de la gélatine à 1 %. L'essai a été réalisé selon le protocole décrit par Rakotomalala *et al.*²⁰. Les cellules ont été incubées pendant 1 h à 37 °C avec 100 µL d'inhibiteur de l'expression de VCAM-1 ou de produits à tester (concentration 2X). Les contrôles inhibiteurs utilisés ont été le dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC, 2X = 400 µM) et le 4-hydroxy-TEMPO (TEMPOL, 2X = 4 mM) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis), et les solutions de produits à tester ont été préalablement filtrées sur membrane stérile en polyfluorure de vinylidène de 0,45 µm (Merck). Les cellules ont ensuite été activées par ajout de 100 µL de TNF-α (concentration finale = 200 U/mL) (R&D Systems, Lille, France), entraînant une concentration finale X en produit à tester. Un contrôle négatif, de non-expression de VCAM-1, a été constitué par des puits remplis de milieu de culture seul, tandis qu'un contrôle positif, correspondant à 100 % d'expression de VCAM-1, a consisté en des puits traités uniquement par le TNF-α. Après 6 h d'activation par le TNF-α à 37 °C avec 5 % de CO₂, le surnageant a été éliminé et les cellules ont été fixées par une solution de glutaraldéhyde à 0,2 % (Sigma-Aldrich) pendant 30 min à température ambiante, puis mises en contact avec une solution de blocage du glutaraldéhyde [glycine à 0,1 M (Euromedex, Souffelweyersheim, France)] pendant 30 minutes, avant saturation des plaques par 1 % de BSA (Sigma-Aldrich) durant la nuit. Une solution d'anticorps IgG de souris anti-VCAM-1 (5 µg/mL) (R&D Systems) a été déposée, puis, après incubation pendant 3 h et lavages, une solution d'anticorps secondaires IgG2a anti-souris couplés à la peroxydase de raifort (1 µg/mL) (Cell SciencesTM Inc., Canton, MA, Etats-Unis) a été à son tour incubée pendant 2 h à température ambiante. Pour la révélation, un substrat de la peroxydase, l'acide 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS, 1 mg/mL) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, Etats-Unis) a été incubé pendant 20 min à 37 °C à l'abri de la lumière, et la densité optique (DO) a été lue à 405 nm par un lecteur de microplaque. Chaque expérience a été réalisée en triplicat, et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'expression de VCAM-1 par rapport au contrôle positif.

8.3. Evaluation de la viabilité cellulaire en parallèle du test ELISA

L'effet sur la viabilité cellulaire a été quantifié par un dosage colorimétrique au MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium]. Les cellules HUVECs ont été cultivées dans les conditions précédemment décrites, avec, comme contrôle d'inhibition de la viabilité cellulaire, le glyoxal (concentration finale : 4 mM) (Sigma-Aldrich). Après traitement par les différents produits à tester et activation par le TNF-α pendant 6 h, le milieu a été remplacé par une solution de MTT à 1

mg/mL (Sigma-Aldrich), et la plaque a été incubée pendant 3 h à 37 °C. La solution a ensuite été éliminée, et du DMSO a été introduit pour dissoudre les cristaux violets de formazan produits par les cellules viables. La DO a été lue à 570 nm et les expériences ont été exécutées en triplicat. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la viabilité cellulaire par rapport au témoin non traité.

8.4. Evaluation de l'expression de marqueurs de l'inflammation et de l'immunité par cytométrie en flux

Pour évaluer l'effet des molécules purifiées sur l'expression membranaire de marqueurs de l'inflammation et de l'immunité, les cellules endothéliales ont été cultivées jusqu'à confluence dans des plaques 6 puits ou 12 puits à fond plat (Nunc) pré-enduites de gélatine à 1 %. Les cellules ont ensuite été déprivées, par remplacement du milieu de culture (complet, avec facteurs de croissance et 10 % de SVF) par du milieu sans facteurs de croissance et dont la proportion de SVF est réduite à 2 %. Pour les essais sur les marqueurs de l'inflammation, les produits à tester ont été incubés pendant 1 h (concentration finale = 10 µM pour les molécules végétales et 200 µM pour le PDTC), puis, comme pour l'essai par ELISA cellulaire, les cellules ont été activées par du TNF-α (50X, pour concentration finale = 200 U/mL) pendant 6 h. Pour évaluer l'effet sur les marqueurs de l'immunité, une partie des témoins inhibiteurs testés a été incubée pendant 18 h. Les témoins concernés sont la simvastatine (0,1 µM)²¹, la fluvastatine (0,1 µM)²² et l'acide zolédronique (10 µM)²³ (Sigma-Aldrich). Les molécules végétales (10 µM) et le témoin ciclosporine (10 µM)²⁴ (Sandimmun® 50 mg/mL, Novartis Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France) ont quant à eux été incubés pendant 1h. Les cellules ont ensuite été activées par de l'IFN-γ (100X, pour concentration finale = 100 U/mL) (R&D Systems) pendant 48 h. Dans les deux essais, un contrôle positif d'activation a été constitué par un puits uniquement traité par la cytokine TNF-α ou IFN-γ, et un contrôle négatif a consisté en un puits rempli de milieu seul. Les expériences ont été répétées 3 à 5 fois avec et sans cytokines afin de mesurer l'effet sur les expressions constitutives et induites des différentes protéines de l'inflammation et de l'immunité. L'effet sur l'expression basale des marqueurs de l'immunité a également été mesuré immédiatement après la première heure d'incubation des composés d'origine végétale.

L'immunomarquage a été effectué tel que précédemment décrit^{25,26} : les cellules de chaque puits ont été remises en suspension par une solution de trypsine (0,025 %)-EDTA (0,01 %) (Life Technologies) et distribuées dans plusieurs puits (nombre variant selon le nombre de marquages) d'une plaque 96 puits à fond conique. Après 2 lavages avec du tampon phosphate (PBS) contenant 1 % de BSA et 0,05 % d'azoture de sodium (Sigma-Aldrich), les cellules ont été incubées à l'obscurité à 4 °C pendant 30 min avec une solution d'anticorps primaires (10 µg/mL ou dilution au 1/100^e). Les anticorps primaires utilisés pour l'essai sur les marqueurs de l'inflammation ont été des IgG de souris anti-VCAM-1 et anti-hE/P-sélectine non conjugués, et anti-ICAM-1 conjugué à l'isothiocyanate de

fluorescéine (FITC), et ceux utilisés pour l'essai sur les marqueurs de l'immunité ont été des IgG de souris anti-pan HLA classe I [anti-HLA-A, -B et -C, clone W6/32 (ATCC)], anti-pan HLA classe II (anti-HLA-DR, clone L243), anti-MICA (clone AMO1) (BamOmab, Tübingen, Allemagne) et anti-HLA-E conjugué à l'allophycocyanine (APC) (clone 3D12) (Miltenyi Biotec, Paris, France). Pour les marquages utilisant un anticorps primaire non conjugué, les cellules ont été lavées 3 fois et une seconde incubation avec un anticorps secondaire anti-IgG et IgM (H+L) de souris conjugué au FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, Etats-Unis) a été mise en œuvre pendant 30 min à 4 °C et à l'obscurité. Après 2 étapes de lavage, les cellules ont été fixées par 1 % de paraformaldéhyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, Etats-Unis) pendant 15 min à 4 °C, et conservées dans la solution de lavage jusqu'à la lecture. Un contrôle négatif, visant à détecter une éventuelle interférence de fluorescence, a consisté en un puits non marqué (en cas d'anticorps primaire conjugué) ou marqué seulement par l'anticorps secondaire. La fluorescence a été mesurée sur 10000 cellules par échantillon, avec un cytomètre en flux BD FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, Etats-Unis), et l'analyse a été faite à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, Etats-Unis). Les données ont été représentées en histogrammes reportant l'intensité de fluorescence (GFI) sur une échelle logarithmique (axe des x) en fonction du nombre de cellules (axe des y). Le pourcentage d'expression des marqueurs membranaires a été calculé par la formule suivante :
$$\frac{[\text{moyenne géométrique de fluorescence (échantillon)} - \text{moyenne géométrique de fluorescence (contrôle non marqué de l'échantillon)}]}{[\text{moyenne géométrique de fluorescence (contrôle positif TNF-}\alpha \text{ ou IFN-}\gamma) - \text{moyenne géométrique de fluorescence (contrôle non marqué du contrôle positif)}]} \times 100$$
. Pour le lépidotol A (**94**), la concentration inhibant 50 % de l'expression de VCAM-1 (CI₅₀) a été calculée à partir de la courbe effet-dose obtenue à partir d'une gamme de concentrations (0,75, 1,5, 3, 6, 12,5, 25, et 50 μM).

8.5. Evaluation de l'effet des molécules sur la viabilité cellulaire

L'effet des molécules purifiées sur les cellules HUVECs à 48 h a été évalué par le test colorimétrique au MTT (*cf.* 8.3), avec une modification des conditions comme suit : avant introduction des produits à tester, le milieu de culture (complet) a été remplacé par du milieu déprivé, sans facteurs de croissance et avec seulement 2 % de SVF. Les cellules n'ont pas été activées par le TNF- α , et les molécules à tester ont été incubées pendant 48 h avant introduction de la solution de MTT.

8.6. Analyse statistique

Les données des essais biologiques sur cellules endothéliales ont été exprimées en moyenne \pm écart-type, et comparées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Une astérisque (*) indique un $p < 0,05$ et 2 astérisques (**) désignent un $p < 0,01$.

Bibliographie de la partie expérimentale

1. Gaussian 09 Revision D.1. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
2. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M., Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters* **1996**, *77*, 3865-3868.
3. Adamo, C.; Barone, V., Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: the PBE0 model. *The Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 6158-6170.
4. Stephens, P. J.; McCann, D. M.; Cheeseman, J. R.; Frisch, M. J., Determination of absolute configurations of chiral molecules using ab initio time-dependent density functional theory calculations of optical rotation: how reliable are absolute configurations obtained for molecules with small rotations? *Chirality* **2005**, *17*, S52-S64.
5. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Cheeseman, J. R.; Frisch, M. J., Calculation of optical rotation using density functional theory. *The Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 5356-5371.
6. McCann, D. M.; Stephens, P. J., Determination of absolute configuration using density functional theory calculations of optical rotation and electronic circular dichroism: chiral alkenes. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 6074-6098.
7. Cheeseman, J. R.; Frisch, M. J.; Devlin, F. J.; Stephens, P. J., Hartree-fock and density functional theory ab initio calculation of optical rotation using GIAOs: basis set dependence. *The Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 1039-1046.
8. O'Boyle, N. M.; Tenderholt, A. L.; Langner, K. M., Software news and updates cclib: a library for package-independent computational chemistry algorithms. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, *29*, 839-845.
9. Verotta, L.; Appendino, G.; Belloro, E.; Bianchi, F.; Sterner, O.; Lovati, M.; Bombardelli, E., Synthesis and biological evaluation of hyperforin analogues. Part I. Modification of the enolized cyclohexanedione moiety. *Journal of Natural Products* **2002**, *65*, 433-438.
10. Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J., Synthesis of the *Mammea* coumarins. Part 1. The coumarins of the *Mammea* A, B, and C series. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1987**, 317-331.
11. Sandjo, L. P.; Foster, A. J.; Rheinheimer, J.; Anke, H.; Opatz, T.; Thines, E., Coumarin derivatives from *Pedilanthus tithymaloides* as inhibitors of conidial germination in *Magnaporthe oryzae*. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53*, 2153-2156.
12. Morel, C.; Dartiguelongue, C.; Youhana, T.; Oger, J.-M.; Seraphin, D.; Duval, O.; Richomme, P.; Bruneton, J., New coumarins from *Mesua racemosa*: isolation and synthesis. *Heterocycles* **1999**, *51*, 2183-2191.
13. Ali, M. S.; Mahmud, S.; Perveen, S.; Ahmad, V. U.; Rizwani, G. H., Epimers from the leaves of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1385-1389.
14. Li, Y.-Z.; Li, Z.-L.; Yin, S.-L.; Shi, G.; Liu, M.-S.; Jing, Y.-K.; Hua, H.-M., Triterpenoids from *Calophyllum inophyllum* and their growth inhibitory effects on human leukemia HL-60 cells. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 586-589.
15. Da Silva, F. M. A.; Koolen, H. H. F.; Barisson, A.; De Souza, A. D. L.; Pinheiro, M. L. B., Steroids and triterpene from the bark of *Unonopsis guatteroides* R. E. FR. (*Annonaceae*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, *4*, 522-523.
16. Husain, K.; Jamal, J. A.; Jalil, J., Phytochemical study of *Cananga odorata* Hook. F. & Thoms (*Annonaceae*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, *4*, 465-467.
17. Habib, A. M.; Reddy, K. S.; McCloud, T. G.; Chang, C. J.; Cassidy, J. M., New xanthenes from *Psorospermum febrifugum*. *Journal of Natural Products* **1987**, *50*, 141-145.
18. Stout, G. H.; Sears, K. D., *Calophyllum* products. III. Structure of blancoic acids. *Journal of Organic Chemistry* **1968**, *33*, 4185-4190.

19. Sero, L.; Sanguinet, L.; Blanchard, P.; Dang, B. T.; Morel, S.; Richomme, P.; Seraphin, D.; Derbre, S., Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules* **2013**, *18*, 14320-14339.
20. Rakotomalala, G.; Agard, C.; Tonnerre, P.; Tesse, A.; Derbre, S.; Michalet, S.; Hamzaoui, J.; Rio, M.; Cario-Toumaniantz, C.; Richomme, P.; Charreau, B.; Loirand, G.; Pacaud, P., Extract from *Mimosa pigra* attenuates chronic experimental pulmonary hypertension. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *148*, 106-116.
21. Coupel, S.; Leboeuf, F.; Boulday, G.; Soullillou, J.-P.; Charreau, B., RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **2004**, *15*, 2429-2439.
22. Belliard, G.; Coupel, S.; Charreau, B., Effet de la fluvastatine sur l'expression du CMH de classe I par les cellules endothéliales humaines. *Néphrologie & Thérapeutique* **2005**, *1*, 221-227.
23. Muraro, M.; Mereuta, O. M.; Carraro, F.; Madon, E.; Fagioli, F., Osteosarcoma cell line growth inhibition by zoledronate-stimulated effector cells. *Cellular Immunology* **2007**, *249*, 63-72.
24. Charreau, B.; Coupel, S.; Goret, F.; Pourcel, C.; Soullillou, J.-P., Association of glucocorticoids and cyclosporin A or rapamycin prevents E-selectin and IL-8 expression during LPS- and TNF α -mediated endothelial cell activation. *Transplantation* **2000**, *69*, 945-953.
25. Chauveau, A.; Tonnerre, P.; Pabois, A.; Gavlovsky, P.-J.; Chatelais, M.; Coupel, S.; Charreau, B., Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *Journal of Innate Immunity* **2014**, *6*, 89-104.
26. Coupel, S.; Moreau, A.; Hamidou, M.; Horejsi, V.; Soullillou, J.-P.; Charreau, B., Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* **2007**, *109*, 2806-2814.

Glossaire des termes botaniques

Glossaire des termes botaniques

Accrescent (adj.) : se dit d'un organe qui continue à croître après la fécondation¹.

Actinomorphe (adj.) : une fleur est dite actinomorphe lorsqu'elle a une symétrie axiale¹.

Alterne (adj.) : inséré alternativement sur la tige, à des niveaux et dans des plans différents¹.

Androcée (n. m.) : ensemble des organes reproducteurs mâles d'une fleur¹.

Anthère (n. f.) : partie terminale renflée de l'étamine, contenant le pollen et généralement formée de deux loges¹.

Aperture (n. f.) : ouverture dans l'enveloppe du grain de pollen¹.

Apiculé (adj.) : dont l'apex se rétrécit brusquement en une pointe courte².

Arille (n. m.) : appendice entourant en partie ou totalement la graine, souvent charnu².

Baie (n. f.) : fruit charnu contenant généralement plusieurs graines dans sa pulpe¹.

Bractée (n. f.) : feuille transformée à l'aisselle d'une ou de plusieurs fleurs¹.

Canalicule (n. m.) : petit canal traversant une paroi cellulaire et reliant intérieur et extérieur³.

Capsule (n. f.) : fruit sec déhiscent provenant d'un ovaire à plusieurs carpelles soudés entre eux¹.

Carpelle (n. m.) : organe élémentaire femelle de la fleur, qui contient le(s) ovule(s)¹.

Cellule scléreuse : cellule à paroi épaissie, lignifiée et canaliculée³.

Cristarque (n. m.) : cellule à paroi partiellement épaissie et lignifiée contenant un ou plusieurs cristaux⁴.

Cyme (n. f.) : **inflorescence** définie dont l'apex est occupé par une fleur, la plus ancienne².

Déhiscence (n. f.) : procédure naturelle d'ouverture d'un organe (ex. : **anthère**, fruit), souvent sec, pour libérer son contenu (ex. : pollen, graines). La déhiscence d'une **capsule** est dite **septicide** lorsque l'ouverture se fait suivant la ligne de soudure de 2 carpelles adjacents. Elle est, en outre, dite **septifrage** dans le cas particulier où les graines sont réunies sur une colonne ou une fausse cloison en position centrale.^{1,2}

Dioïque (adj.) : portant des fleurs unisexuées sur des pieds différents².

Drupe (n. f.) : fruit charnu indéhiscent, dont l'endocarpe est lignifié, et contenant généralement une seule graine¹.

Epiphyte (adj. et n. f.) : plante ayant comme support une autre plante sans qu'il y ait de relation de parasitisme¹.

Exstipulé (adj.) : dépourvu de **stipule**¹.

Faisceau vasculaire (*syn.* Faisceau libéro-ligneux) : formation composée de bois et de liber³.

Filet (n. m.) : partie amincie de l'étamine qui supporte les **anthères**¹.

Glabre (adj.) : dépourvu de poils².

Grappe (n. f.) : **inflorescence** indéfinie¹.

Hypogyne (adj.) : pièce florale qui s'insère au-dessous de l'ovaire².

Inflorescence (n. f.) : groupe de fleurs¹.

Isodiamétrique (adj.) : se dit d'une cellule de forme polyédrique, quasi sphérique⁵.

Macle (n. f.) : agglomérat de cristaux prismatiques d'oxalate de calcium, en forme d'oursin³.

Ombelle (n. f.) : **inflorescence** dans laquelle les **pédoncules** sont tous insérés au même point et de longueur égale¹.

Opposé (adj.) : inséré face à face sur la tige¹.

Opposé-décussé (adj.) : se dit de feuilles opposées deux à deux et disposées perpendiculairement d'un nœud à l'autre².

Panicule (n. f.) : **inflorescence** ramifiée de type grappe dont la base est plus large que la partie apicale¹.

Paracytique (adj.) : un **stomate** est dit paracytique lorsqu'il est entouré d'une ou de plusieurs cellules annexes, parallèles à l'axe longitudinal de l'ostiole et des cellules de garde³.

Parenchyme (n. m.) : tissu de cellules indifférenciées, de forme variable, à paroi généralement cellullosique³.

Pédicelle (n. m.) : axe secondaire d'une inflorescence, supportant chacune de ses fleurs (ou fruits)¹.

Pédoncule (n. m.) : axe principal de l'inflorescence¹.

Pelté (adj.) : se dit d'un organe orbiculaire fixé par son centre².

Persistant (adj.) : qui reste sur la plante quelque soit la saison¹.

Pétiole (n. m.) : partie de la feuille qui relie le limbe à la tige¹.

Pistillode (n. m.) : vestige de pistil stérile dans une fleur mâle¹.

Placentation (n. f.) : disposition des ovules sur le placenta. La placentation est dite **axile** lorsque les ovules sont disposés le long de l'axe central d'un ovaire pluriloculaire, **pariétale** quand ils sont sur la paroi d'un ovaire uniloculaire au niveau de la ligne de soudure des carpelles, **apicale** s'ils sont suspendus au sommet d'un ovaire non compartimenté, et **basale** s'ils sont attachés à la base d'un ovaire à une seule loge.^{1,6}

Staminode (n. m.) : étamine stérile².

Stigmate (n. m.) : partie terminale du **carpelle**¹.

Stipule (n. f.) : élément d'origine foliaire situé près de la tige au niveau de l'insertion du **pétiole**¹.

Stomate (n. m.) : formation épidermique permettant les échanges gazeux et constituées de deux cellules spécialisées délimitant une fente (l'ostiole)³.

Style (n. m.) : partie intermédiaire entre l'ovaire et le **stigmate**¹.

Tépale (n. m.) : nom donné aux sépales et aux pétales lorsqu'ils se ressemblent⁶.

Thyrse (n. m.) : **inflorescence** composée de **cymes** de taille réduite disposées en **grappe**¹.

Bibliographie du glossaire des termes botaniques

1. Botanique.org. Fenêtre sur la botanique et la biodiversité [en ligne], <http://www.botanique.org>, consulté le 24 mars 2015.
2. Stevens, P. F. Angiosperm phylogeny website. Version 13 [en ligne], <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>, consulté le 16 mars 2015.
3. ANSM. Glossaire des termes anatomiques utiles pour l'identification B (Drogues végétales) [en ligne], http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/b029e39f101863656ed1c8fd29b7bd91.pdf, consulté le 16 mars 2015.
4. Baas, P. Anatomical contributions to plant taxonomy II [en ligne], <http://www.repository.naturalis.nl/document/565809>, consulté le 17 mars 2015.
5. Nultsch, W., *Botanique générale*. De Boeck Université: Paris, **1998**; 602 p.
6. Botineau, M., *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Tec & Doc Lavoisier: Paris, **2010**; 1335 p.

Annexes

Annexe 1. Table des structures chimiques

1 – Prednisone	14
2 – Prednisolone.....	14
3 – Ciclosporine A (CsA).....	14
4 – Tacrolimus	14
5 – Sirolimus ou rapamycine.....	15
6 – Evérolimus	15
7 – Azathioprine	15
8 – Mycophénolate mofétil.....	15
9 – Léflunomide.....	15
10 – Quercétine	20
11 – Cynarine	20
12 - Scoparone	20
13 – Glycyrol	20
14 – Daphnéine.....	20
15 – Osthole	20
16 – Isogarcinol	20
17 – Simvastatine	22
18 – Cylindrocarpol	22
19 – γ -Tocotriénol	22
20 – Digéranylebisphosphonate	22
21 – Caloxanthone A	28
22 – Calanolide A	28
23 – Acide isopapuanique.....	28
24 – Garcinianine	28, 40
25 – Garcicowine C.....	28
26 – α -Mangostine.....	34
27 – Caloxanthone B	34, 35
28 – Xanthochymone A	35
29 – Garcinexanthone A.....	35
30 – Acide gambogique.....	35
31 – Euxanthone ou 1,7-dihydroxyxanthone	35
32 – Caloxanthone	35
33a – 1,5-Dihydroxyxanthone	36
33b – 1,6-Dihydroxyxanthone	36
33c – 2-Hydroxyxanthone	36
33d – 4-Hydroxyxanthone.....	36
33e – Mesuaxanthone B ou 1,5,6-trihydroxyxanthone.....	36
33f – 1-Hydroxy-5-méthoxyxanthone.....	36
33g – 1-Hydroxy-7-méthoxyxanthone	36

33h – 3-Hydroxy-4-méthoxyxanthone	36
33i – 5-Hydroxy-1-méthoxyxanthone	36
33j – 2-Méthoxyxanthone	36
33k – Mesuaxanthone A ou 1,5-dihydroxy-3-méthoxyxanthone	36
33l – Daphnifoline ou 1,3,5-trihydroxy-4-méthoxyxanthone	36
33m – 1,3-Diméthoxy-5-hydroxyxanthone	36
33n – Ferraxanthone ou 1,3-diméthoxy-5,6-dihydroxyxanthone	36
33o – Tovopyrifoline C	36
33p – 1,3,6-Trihydroxy-7,8-diméthoxyxanthone	36
33q – 3,6-Dihydroxy-1,7,8-triméthoxyxanthone	36
33r – Cudraxanthone G	36
34a – 6-Désoxyjacareubine	36
34b – Jacareubine	36
34c – Caloxanthone C	36
34d – Macluraxanthone	36
35 – Mesuaferri A	36
36a – Ananixanthone	36
36b – Mesuasinone	36
37 – Mesuaferri C	36
38 – Pyranojacareubine	36
39 – Mesuaferri B	36
40 – Mesuarianone	36
41a – Mesuaferri A	36
41b – Mesuaferri B	36
41c – Mesuabixanthone A	36
41d – Mesuabixanthone B	36
42 – Garcinol	39
43 – Xanthochymol	39
44 – Guttiférone A	39
45 – Thorelione A	39
46 – Cambogine	39
47 – Congestiflorone	39
48 – Naringénine	40
49 – Amentoflavone	41
50 – Pyranoamentoflavone	41
51 – Mesuaferri A	41
52 – Mesuaferri B	41
53 – Mamea E/AC cyclo D	42
54 – Mamea C/OB	43
55 – Mamea B/BA cyclo F	43

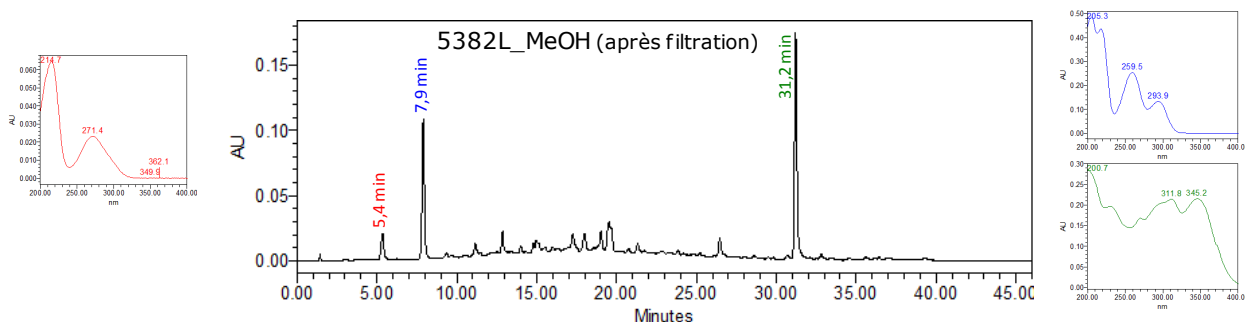
56 – Oblongulide	43
57 – Inophyllum G-1.....	43
58 – Beccamarine.....	46
59 – Ferruol A.....	46
60a – Assamène	46
60b – Surangine C	46
61a – Mameea A/AA ou mammeisine	46
61b – Mameea A/AB.....	46
61c – Mameea A/AC	46
61d – Mameea A/AD ou mesuol	46
61e – Racémosone	46
61f – 5,7-Dihydroxy-6-(2-méthylbutanoyl)-4-phényl-2 <i>H</i> -chromèn-2-one.....	46
61g – 5,7-Dihydroxy-6-(2-méthylbutanoyl)-8-[(<i>E</i>)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyl]-4-phényl-2 <i>H</i> -chromèn-2-one	46
61h – 5,7-Dihydroxy-6-(3-méthylbutanoyl)-8-[(<i>E</i>)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyl]-4-phényl-2 <i>H</i> -chromèn-2-one	46
61i – Racémosol.....	46
62a – Mameea A/BA.....	46
62b – Mameea A/BB ou isomammeisine	46
62c – Mameea A/BC	46
62d – 5,7-Dihydroxy-8-(2-méthylbutanoyl)-6-[(<i>E</i>)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyl]-4-phényl-2 <i>H</i> -chromèn-2-one	46
62e – 5,7-Dihydroxy-8-(3-méthylbutanoyl)-6-[(<i>E</i>)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dienyl]-4-phényl-2 <i>H</i> -chromèn-2-one	46
62f – Isoracémosol.....	46
62g – Mesuagénine C	46
63a – Mesuagenine A	46
63b – Mesuagenine B	46
63c – Mameea A/BA cyclo D ou isomammeigine	46
64a – Mesuagenine D	46
64b – Mameea A/BA cyclo F	46
65a – Mameea A/AA cyclo D.....	46
65b – Mameea A/AB cyclo D ou mammeigine.....	46
65c – Mameea A/AC cyclo D.....	46
65d – Mameea A/AD cyclo D ou mesuagine	46
65e – Mesuarine	46
65f – 5-Hydroxy-6-isobutyryl-8-méthyl-8-(4-méthylpent-3-ènyl)-4-phényl-2 <i>H</i> -pyrano[2,3- <i>h</i>]chromèn-2-one	46
65g – 5-Hydroxy-8-méthyl-6-(2-méthylbutanoyl)-8-(4-méthylpent-3-ènyl)-4-phényl-2 <i>H</i> -pyrano[2,3- <i>h</i>]chromèn-2-one.....	46
66a – Mameea A/AA cyclo F ou cyclomammeisine	46

66b – Mammea A/AB cyclo F	46
66c – Mammea A/AC cyclo F	46
66d – Mammea A/AD cyclo F	46
66e – 8,9-Dihydro-5-hydroxy-6-(2-méthylbutanoyl)-4-phényl-8-(prop-1-èn-2-yl)furo[2,3- <i>h</i>]chromèn-2-one .	46
66f – 8,9-Dihydro-5-hydroxy-6-(3-méthylbutanoyl)-4-phényl-8-(prop-1-èn-2-yl)furo[2,3- <i>h</i>]chromèn-2-one..	46
67 – Furanoracémosone	46
68 – Acide calopolyanique	48
69 – Acide isoapétalique	48
70 – Acide brasiliensophyllique B	48
71 – Acide mesuanique	48
72 – Mesuaferrol	48
73 – Acide bétulinique	49
74 – Friedeline	49
75 – β -Sitostérol	49
76 – Canophyllol	49
77a – Friedelan-1,3-dione	50
77b – 3 β -Friedélanol	50
77c – Acide myrtifolique	50
78a – α -Amyrine	50
78b – β -Amyrine	50
78c – Acide oléanolique	50
79 – Taraxérol	50
80a – Simiarénol	50
80b – Simiarénone	50
81a – Lupéol.....	50
81b – 3-Oxo-bétuline	50
82 – Stigmastérol	50
83 – Spinastérol	50
84 – (-)-Epicatéchine	51
85 – Acide ellagique	51
86 – Acide vanillique.....	51
87 – Acide <i>p</i> -coumarique	51
88 – Acide gallique	51
89 – 4-Méthoxy-1,3,5-trihydroxyanthraquinone	51
90 – 2,5-Dihydroxy-1,3,4-triméthoxyanthraquinone	51
91 – Epicatéchine-(4 β →8)-catéchine	75
92 – Acide protocatéchine	75
93 – 3,4-Dihydroxybenzaldéhyde	75
94 – Lépidotol A	112
95 – Lépidotol B	114

96 – Lépidotol C	115
97 – Lépidotol D	115
98 – Lépidotol E	117
99 – Lépidotine A	118
100 – Lépidotine B	119
101 – Mameea A/OB	120
102 – Mameea A/OC	120
103 – Calofloride	113
104 – Isomesuol	113
105 – Tétraptérone	137
106 – Tétraptérine	137
107 – <i>Non identifié</i>	
108 – <i>PPAP non identifié</i>	
109 – Canophyllol	138
110 – β -Sitostérol	138
111 – 3-Hydroxy-2-méthoxyxanthone	139
112 – <i>Non identifié</i>	
113 – Laxifloranone	137
114 – Acide blancoïque	145
115 – Acide tétraptérique	146
116 – Mameea A/AB cyclo E	154
117 – Mameea E/BA	154
118 – Mameea E/BB	154
119 – Mameea B/AB cyclo F	165
120 – Neurophyllol A	165
121 – Neurophyllol B	165
122 – Coumarine	165
123 – Ombelliférone	165
124 – Calothwaitesixanthone	165
125 – Guttiférone J	165
126 – Acide zolédronique	175
127 – Fluvastatine	175

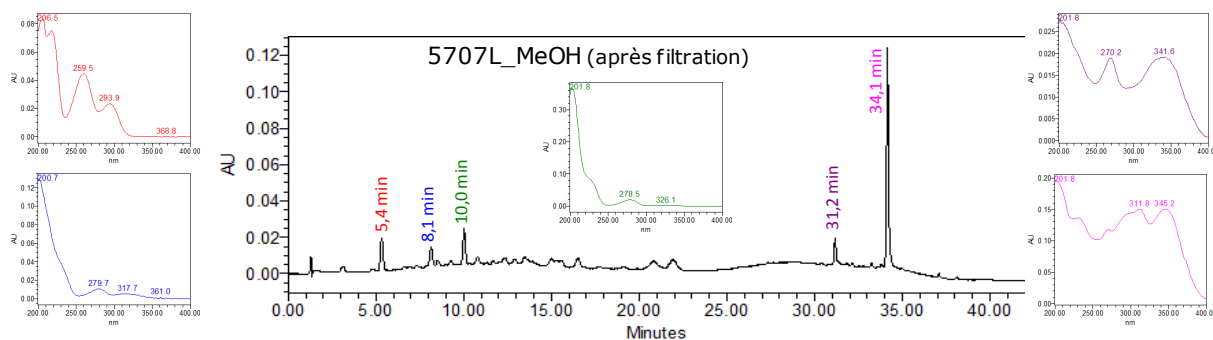
Annexe 2. Profils chromatographiques (HPLC-UV) des extraits MeOH bioactifs après filtration sur cartouche SPE de polyamide

Calophyllum tetrapterum (lot A)



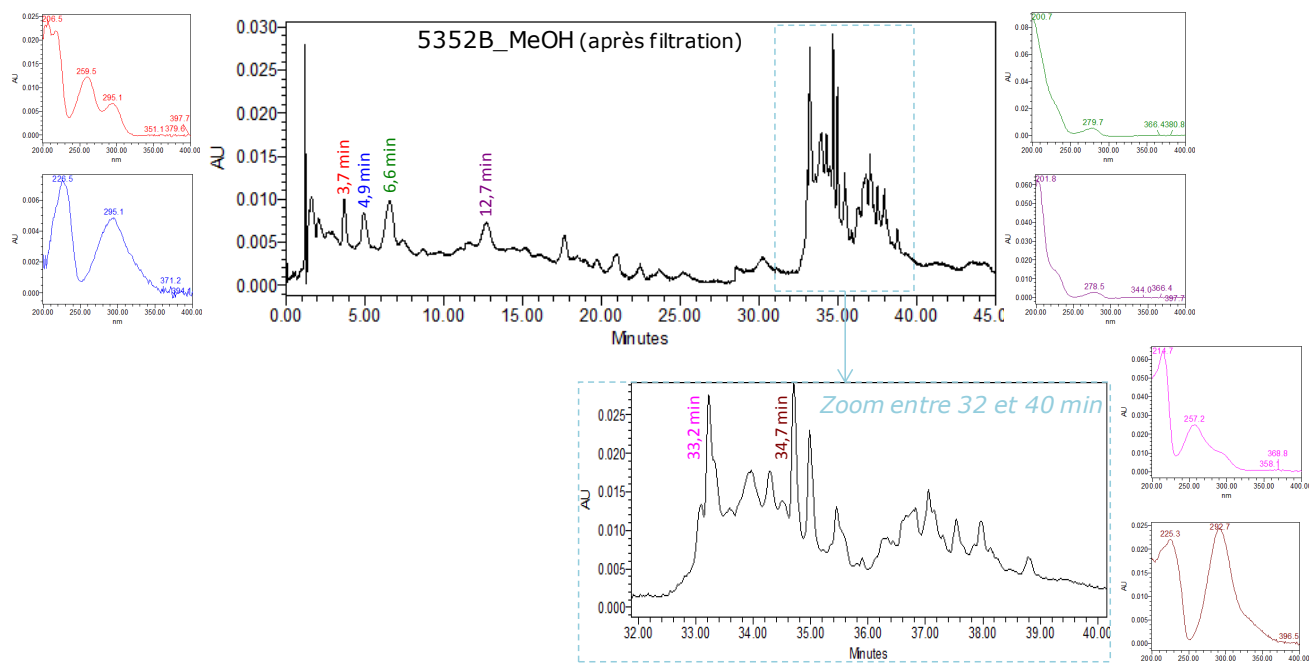
Gradient d'élution : Méthode 1

Calophyllum tetrapterum (lot C)



Gradient d'élution : H₂O + 0,1 % HCOOH / MeOH : 90/10 → 60/40 de 0 à 12 min, 60/40 de 12 à 22 min, 60/40 → 0/100 de 22 à 35 min, 0/100 de 35 à 42 min

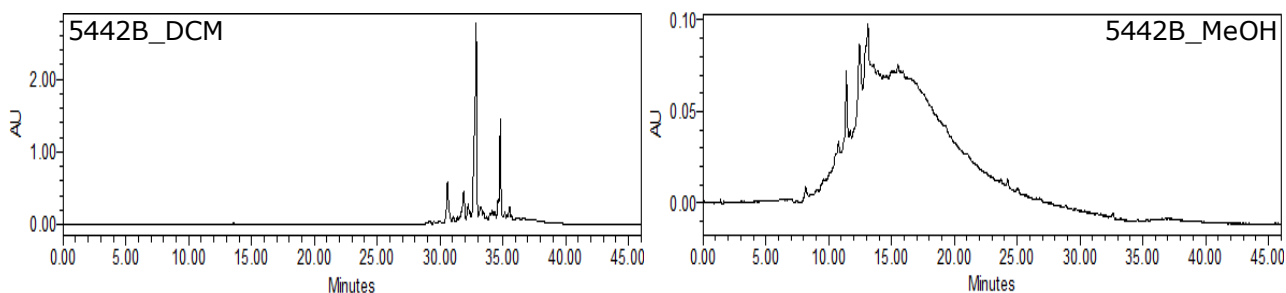
Mesua nuda



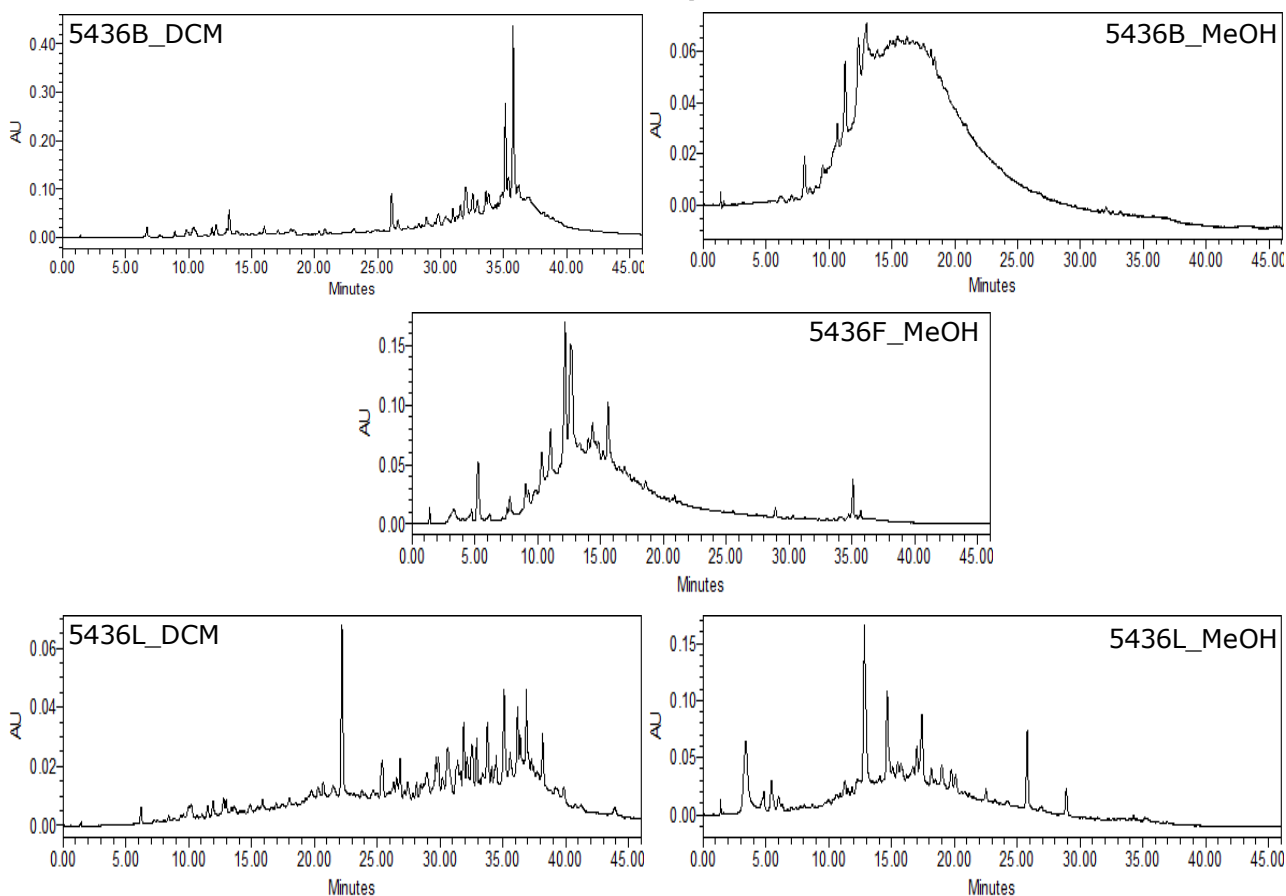
Gradient d'élution : H₂O + 0,1 % HCOOH / MeOH : 80/20 de 0 à 12 min, 80/20 → 70/30 de 12 à 17 min, 70/30 de 17 à 30 min, 70/30 → 0/100 de 30 à 35 min, 0/100 de 35 à 45 min

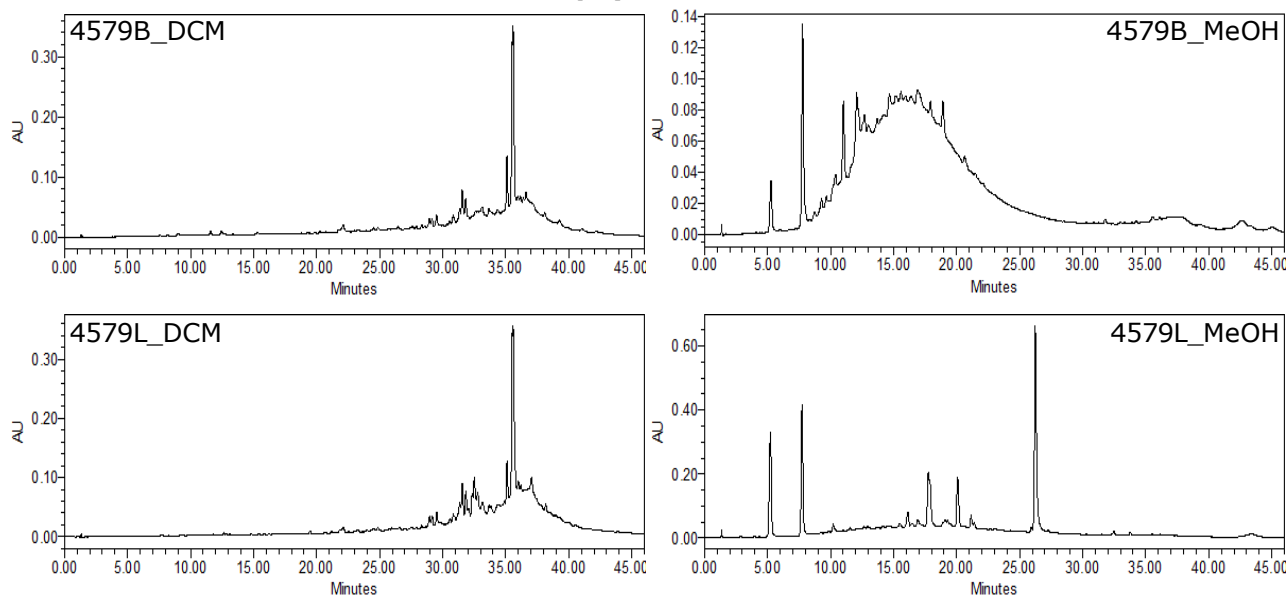
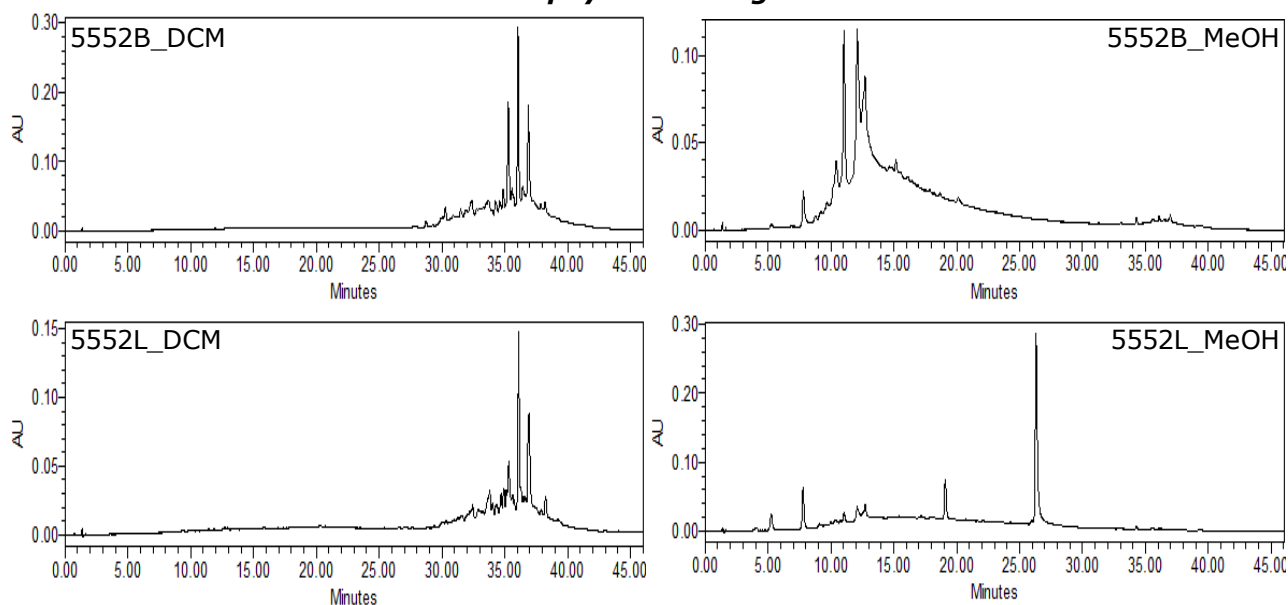
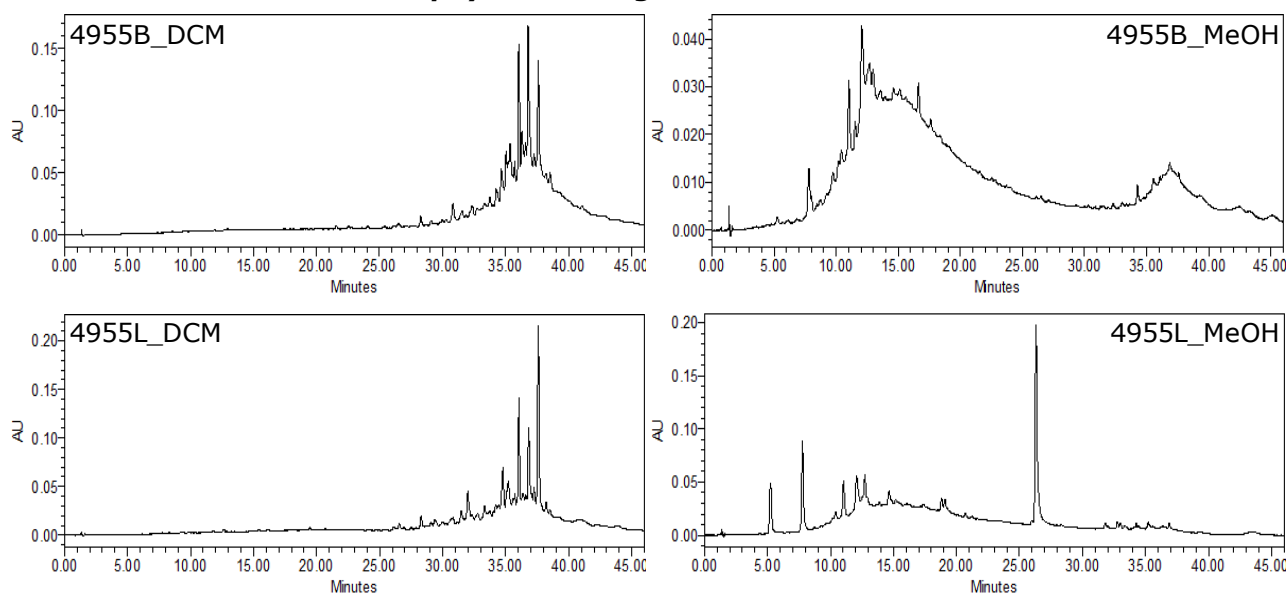
Annexe 3. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 1, 280 nm) des extraits non retenus lors du criblage biologique et de la déréplication

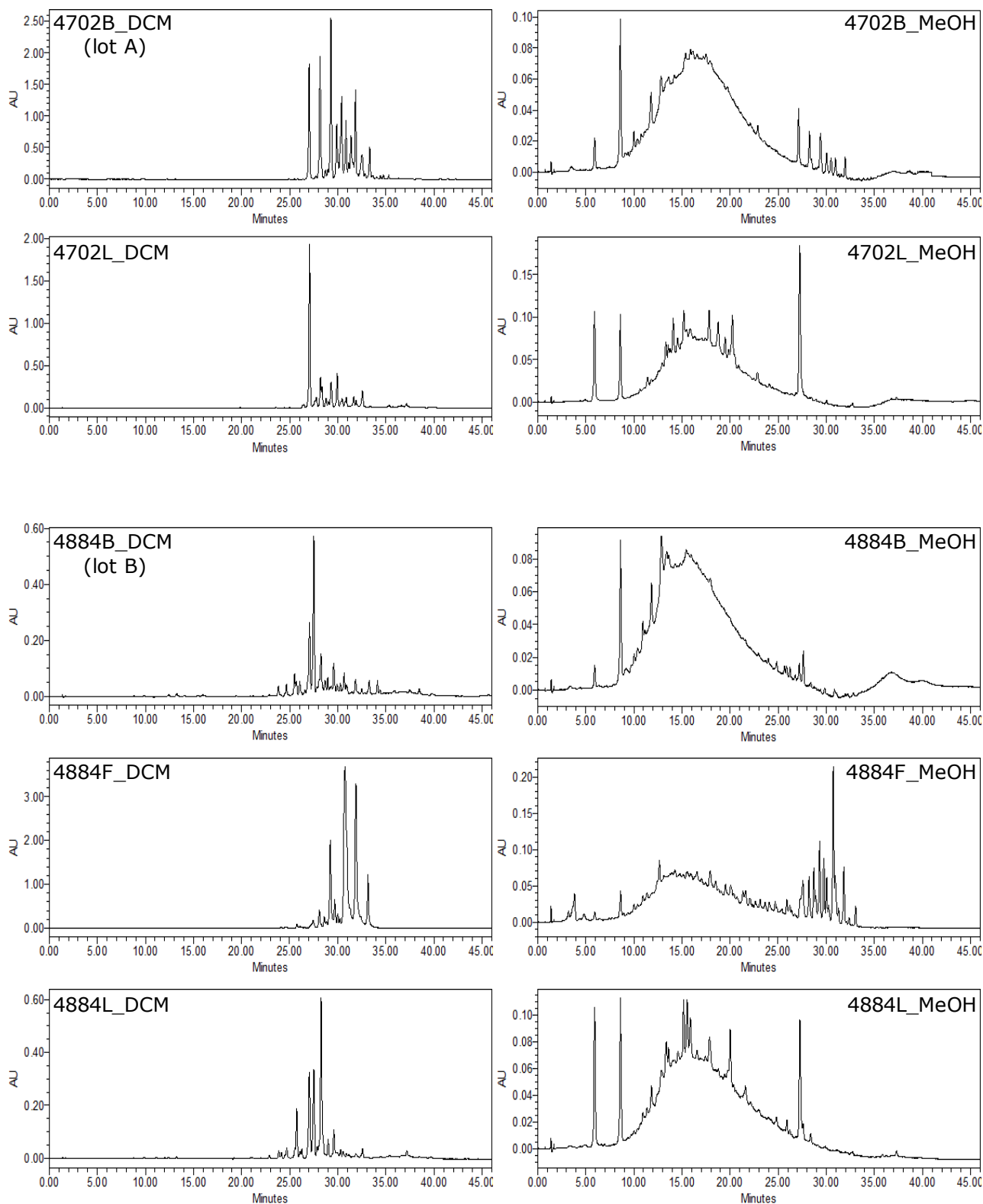
Mesua assamica

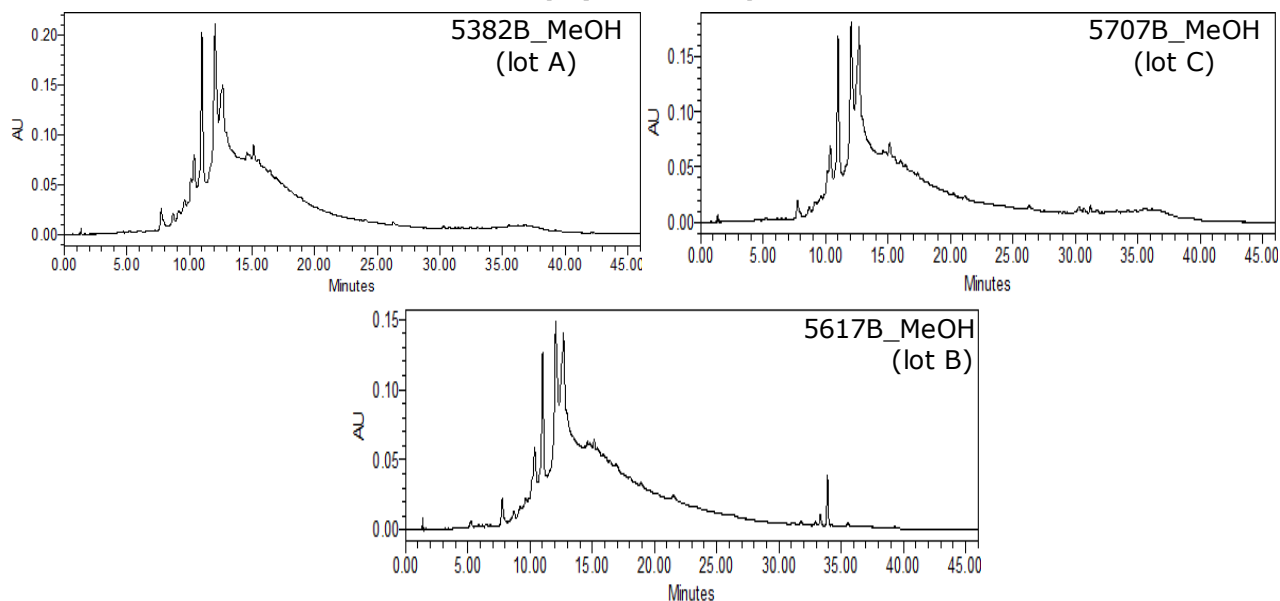
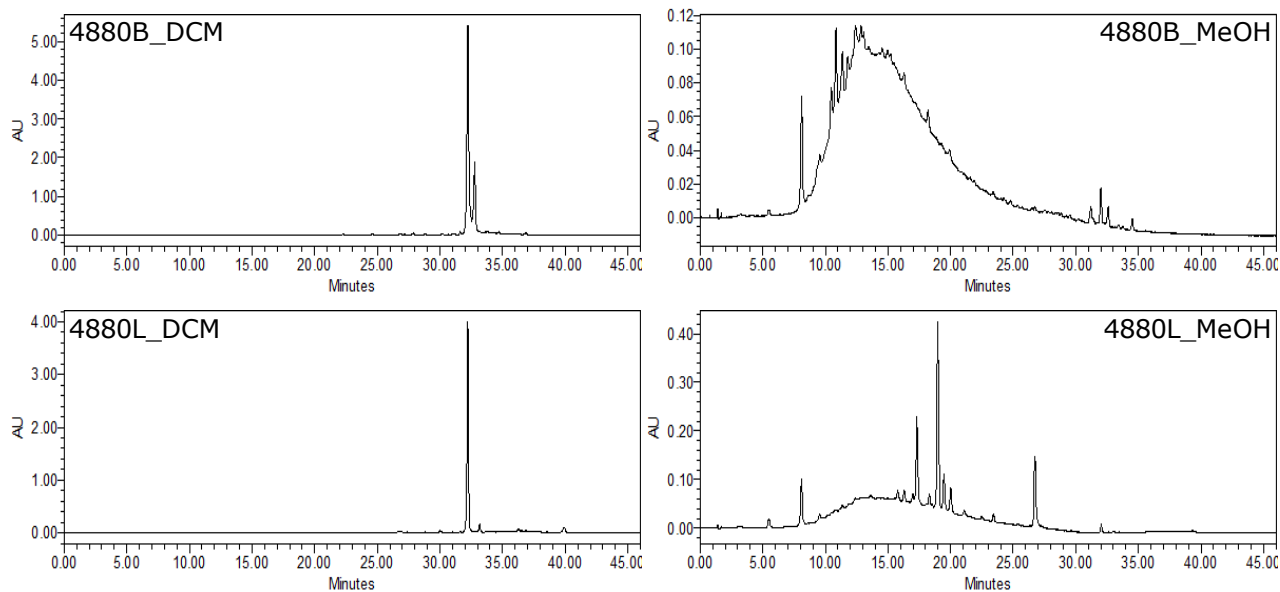
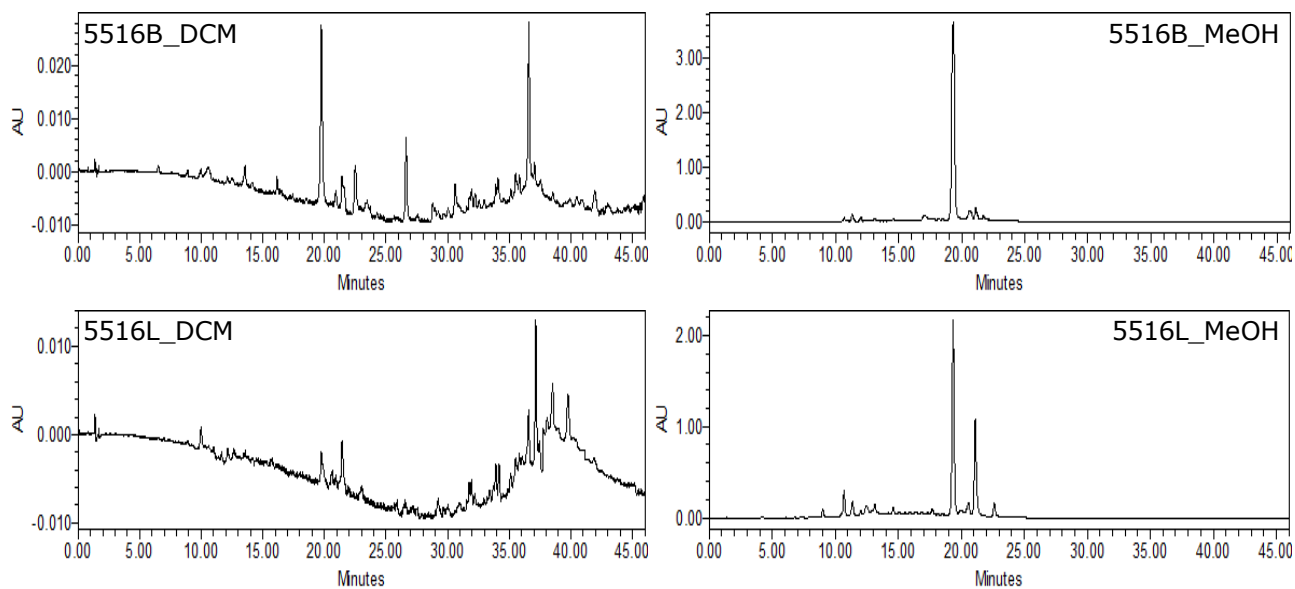


Mesua lepidota



Calophyllum dioscurii***Calophyllum ferrugineum******Calophyllum ferrugineum var. neriifolium***

Calophyllum incrassatum

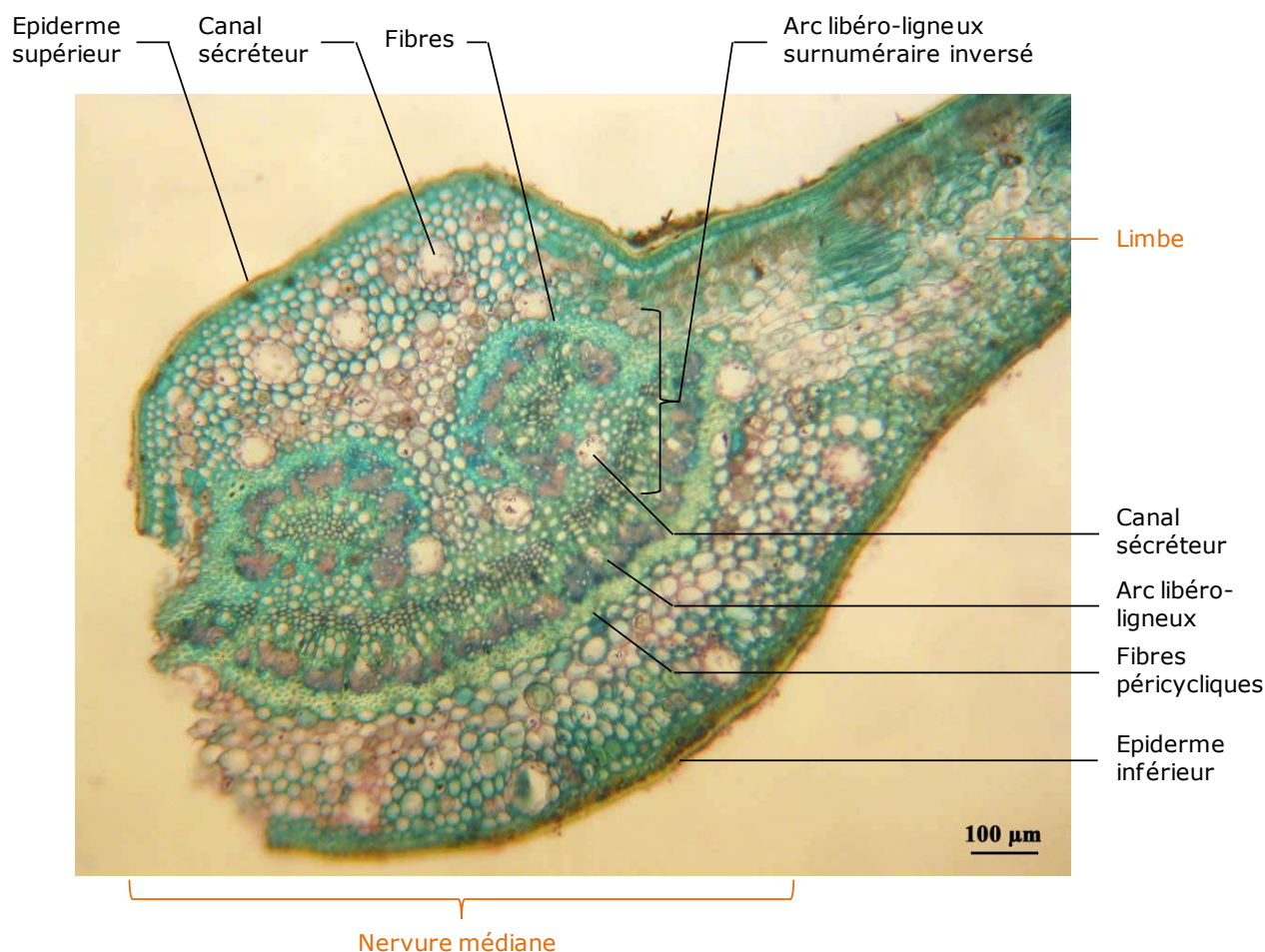
Calophyllum tetrapterum***Calophyllum teysmanii* var. *teysmanii******Garcinia dumosa***

Annexe 4. Description de la feuille de *Mesua lepidota* T. Anderson

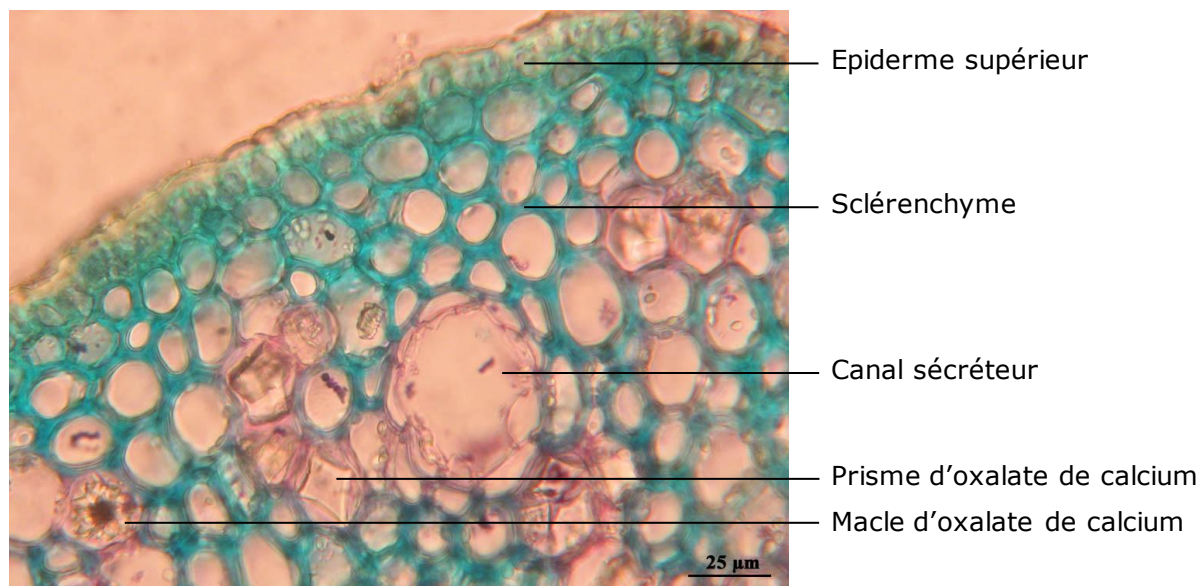
En section transversale, la feuille de *M. lepidota* montée dans le réactif carmin vert d'iode présente une nervure principale proéminente à la face supérieure et convexe à la face inférieure. Cette **nervure principale** est caractérisée par :

- un système conducteur de type secondaire constitué d'un arc libéro-ligneux principal, large et aplati, surmonté de 2 arcs libéro-ligneux surnuméraires inversés
- des canaux sécréteurs répartis dans le parenchyme fondamental
- une zone péri-cyclique fibreuse
- des macles* et des prismes d'oxalate de calcium présents dans les cellules du parenchyme
- une cuticule épaisse aux faces supérieure et inférieure

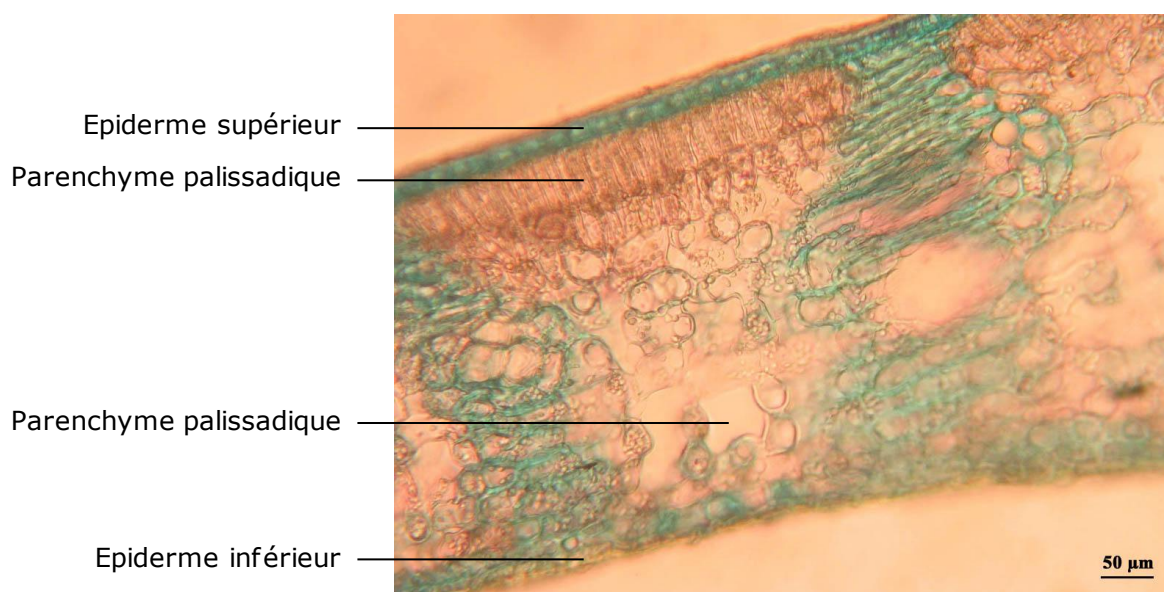
Le **limbe** est constitué d'épidermes glabres, cuticularisés, et portant des stomates à la face inférieure. Son mésophylle (partie interne) est hétérogène asymétrique, composé d'une à deux assises de parenchyme palissadique et d'un parenchyme lacuneux. Des poches sécrétrices se trouvent au niveau des nervures secondaires.



Section transversale de la feuille



Section transversale de la nervure principale de la feuille – détails des tissus compris entre un arc libéro-ligneux surnuméraire et l'épiderme supérieur

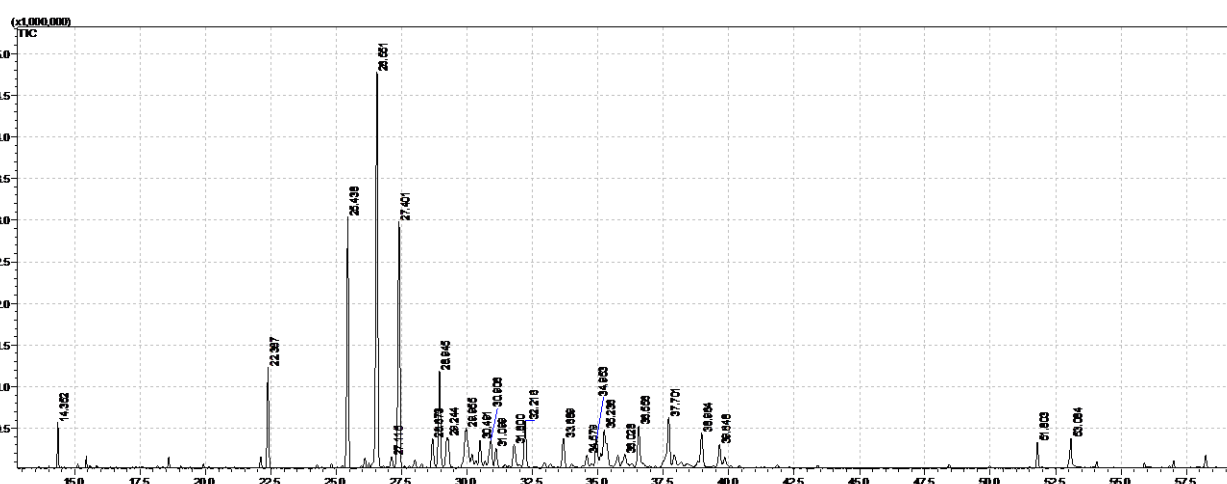


Section transversale du limbe de la feuille

Annexe 5. Analyse de l'huile essentielle des fruits de *Mesua lepidota*

Suite à un nouvel approvisionnement plus conséquent en fruits de *Mesua lepidota*, une extraction de l'huile essentielle a été réalisée par micro-ondes. La composition de cette huile essentielle a ensuite été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse (GC-MS) et, par comparaison des t_R et des spectres de masse obtenus avec ceux de banques de données spécifiques (NIST 11, NIST 11s et FFNSC), la plupart des composants (soit en « GC surface » 90 %) a finalement été identifiée.

Pour l'extraction, 350 g de fruits séchés ont été extraits pendant 40 min à 350 Watts dans un appareil NEOS-GR (Milestone), conduisant à l'obtention d'environ 0,1 mL d'huile essentielle. Celle-ci a été analysée sur un équipement GCMS-QP2010 SE (Shimadzu), avec une colonne Zebron™ ZB-5 (Phenomenex®) de dimensions 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, dans les conditions suivantes : injection : 3 µL (split 10) à 250 °C ; gaz vecteur : hélium à 13,6 mL/min (débit constant) ; programme du four : augmentation de 5 °C/min de 30 °C à 120 °C, puis de 2 °C/min jusqu'à 180 °C, puis de 5 °C/min jusqu'à 250 °C, puis 3 min de maintien à 250 °C ; paramètres du détecteur de masse (impact électronique, -70 eV) : source à 200 °C, interface à 250 °C.



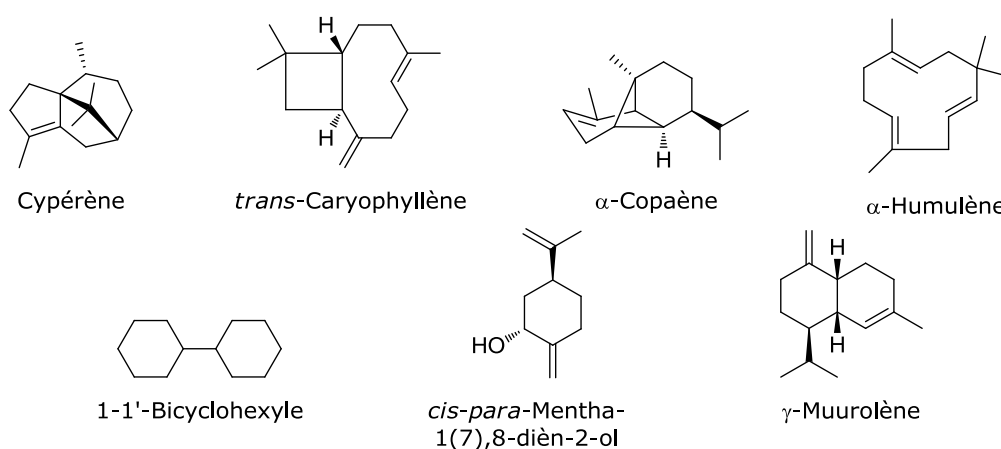
Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle des fruits de *Mesua lepidota*

Composants principaux de l'huile essentielle (en bleu : l'utilisation de standards serait nécessaire pour confirmer l'identification des molécules ; en gris : composé non identifié)

Temps de rétention (min)	% d'aire	Molécule
14,352	1,3	Acétophénone
22,387	4,5	1,1'-Bicyclohexyle
25,438	12,8	α -Copaène
26,551	22,8	Cypérène
27,115	0,6	α -Gurjunène
27,401	14,0	(E)-Caryophyllène
28,673	1,7	Non déterminé

28,945	5,6	α -Humulène
29,244	2,5	Rotundène
29,955	4,0	γ -Muuroène
30,491	1,4	β -Sélinène
30,906	2,0	α -Sélinène
31,099	1,1	α -Amorphène
31,800	1,7	ϵ -Amorphène
32,216	2,8	Non déterminé
33,689	2,0	Non déterminé
34,579	0,6	Alcool de caryophyllène
34,953	1,7	Spathuléol
35,236	3,5	Oxyde de β -caryophyllène
36,028	0,4	Non déterminé
36,556	2,5	Epoxyde de humulène II
37,701	4,1	<i>Cis-para-mentha-1(7),8-dièn-2-ol</i>
38,964	2,2	Non déterminé
39,648	1,3	Non déterminé
51,803	1,1	Acide hexadécanoïque, méthyl ester
53,084	1,7	Acide n-hexadécanoïque

Les constituants majoritaires sont le cypérène (22,8 %), le *trans*-caryophyllène (14,0 %), l' α -copaène (12,8 %), l' α -humulène (5,6 %), 1,1'-bicyclohexyle (4,5 %), le *cis-para-mentha-1(7),8-dièn-2-ol* (4,1 %), et le γ -muuroène (4,0 %). Ainsi, par comparaison avec l'huile essentielle extraite des feuilles de l'espèce *Mesua ferrea*^a, le *trans*-caryophyllène, l' α -humulène et le γ -muuroène (respectivement 30,9 %, 6,0 % et 3,5 % dans l'HE des feuilles de *M. ferrea*) apparaissent comme des composants majoritaires communs.

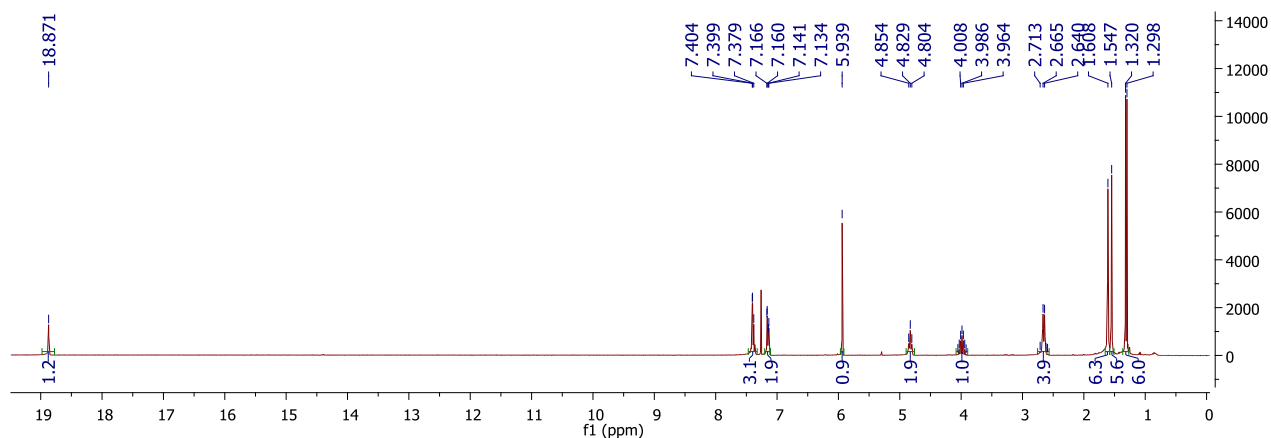


Structures des composés majoritaires de l'HE de fruits de *Mesua lepidota*

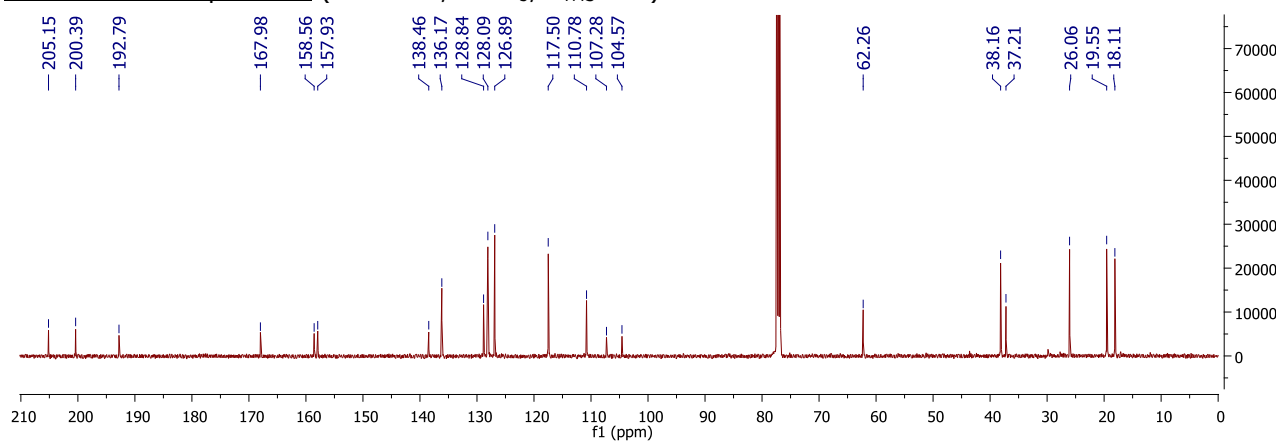
^a Keawsa-ard, S.; Kongtaweelert, S., Antioxidant, antibacterial, anticancer activities and chemical constituents of the essential oil from *Mesua ferrea* leaves. *Chiang Mai Journal of Science* **2012**, 39, 455-463.

Annexe 6. Spectres de RMN du lépidotol A (94)

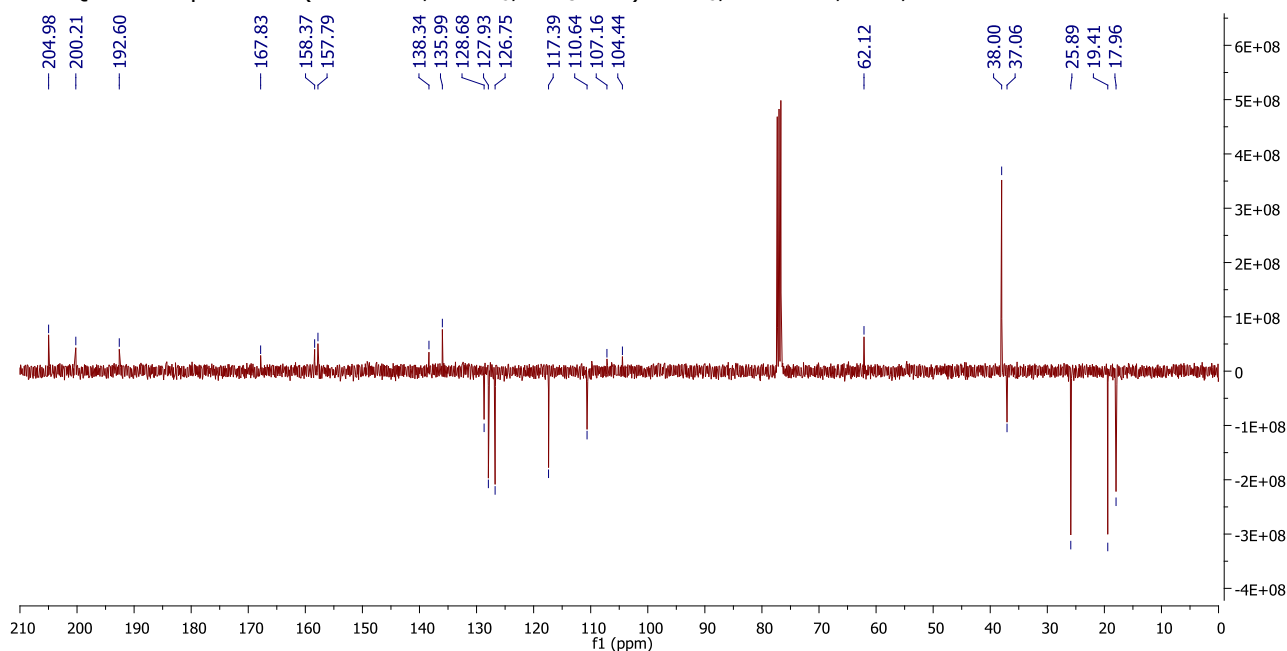
RMN ^1H du composé **94** (300 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

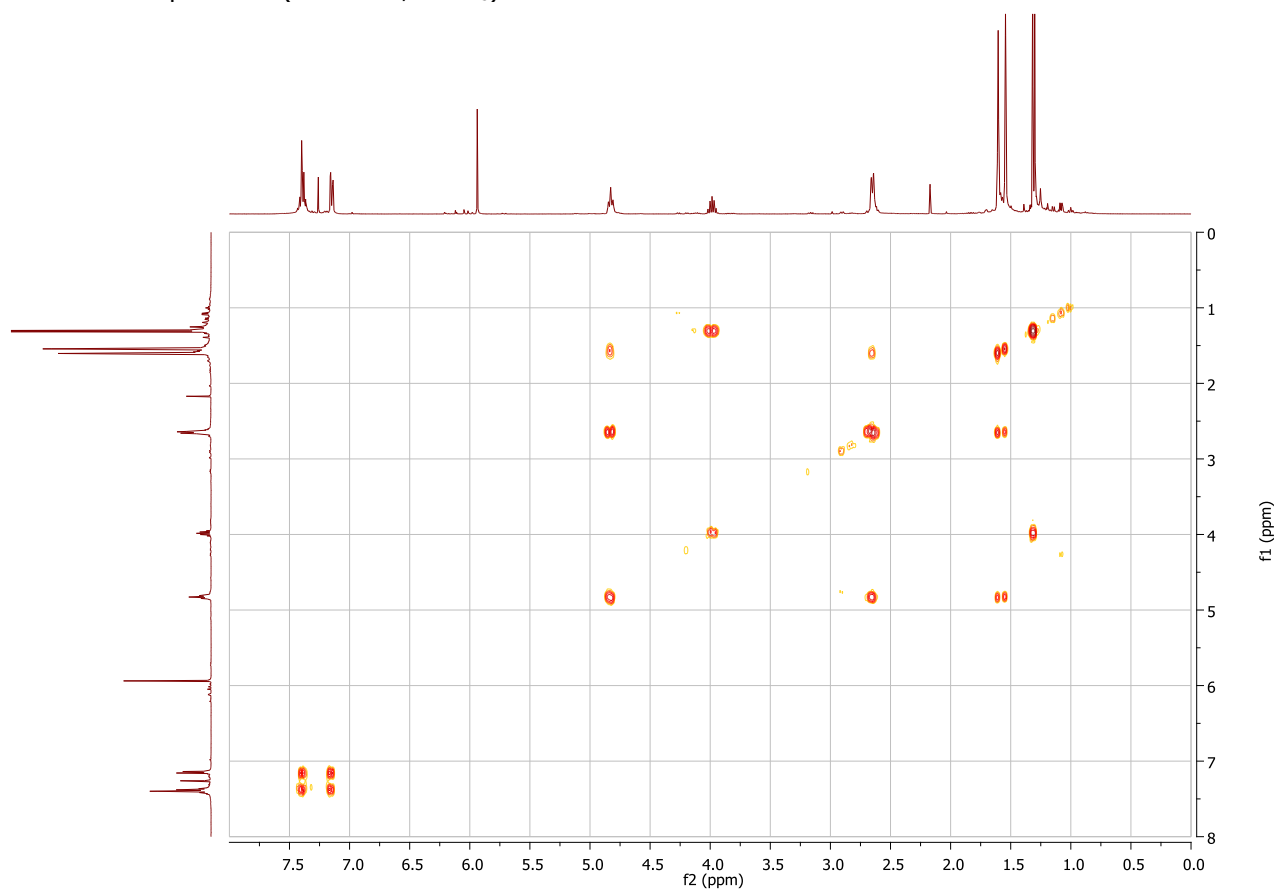
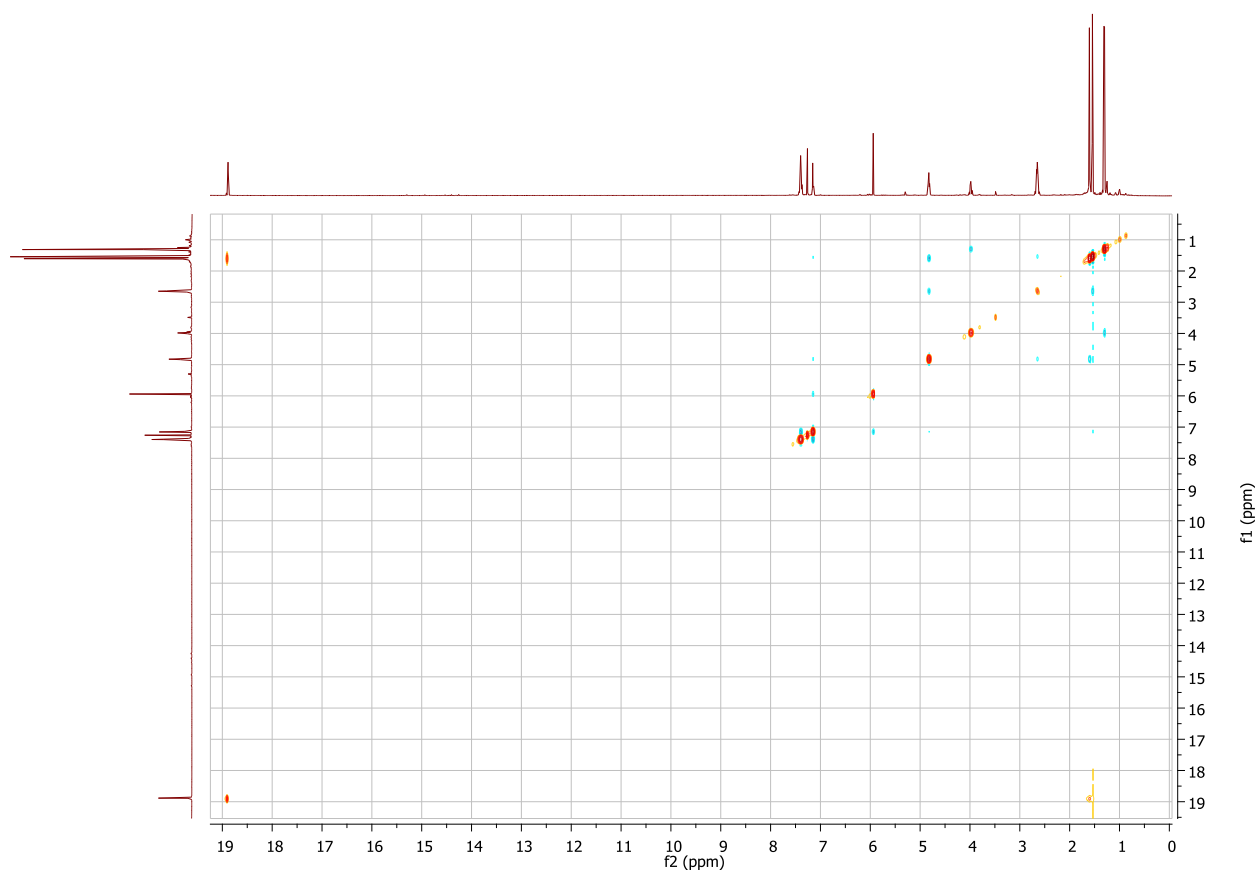


RMN ^{13}C du composé **94** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

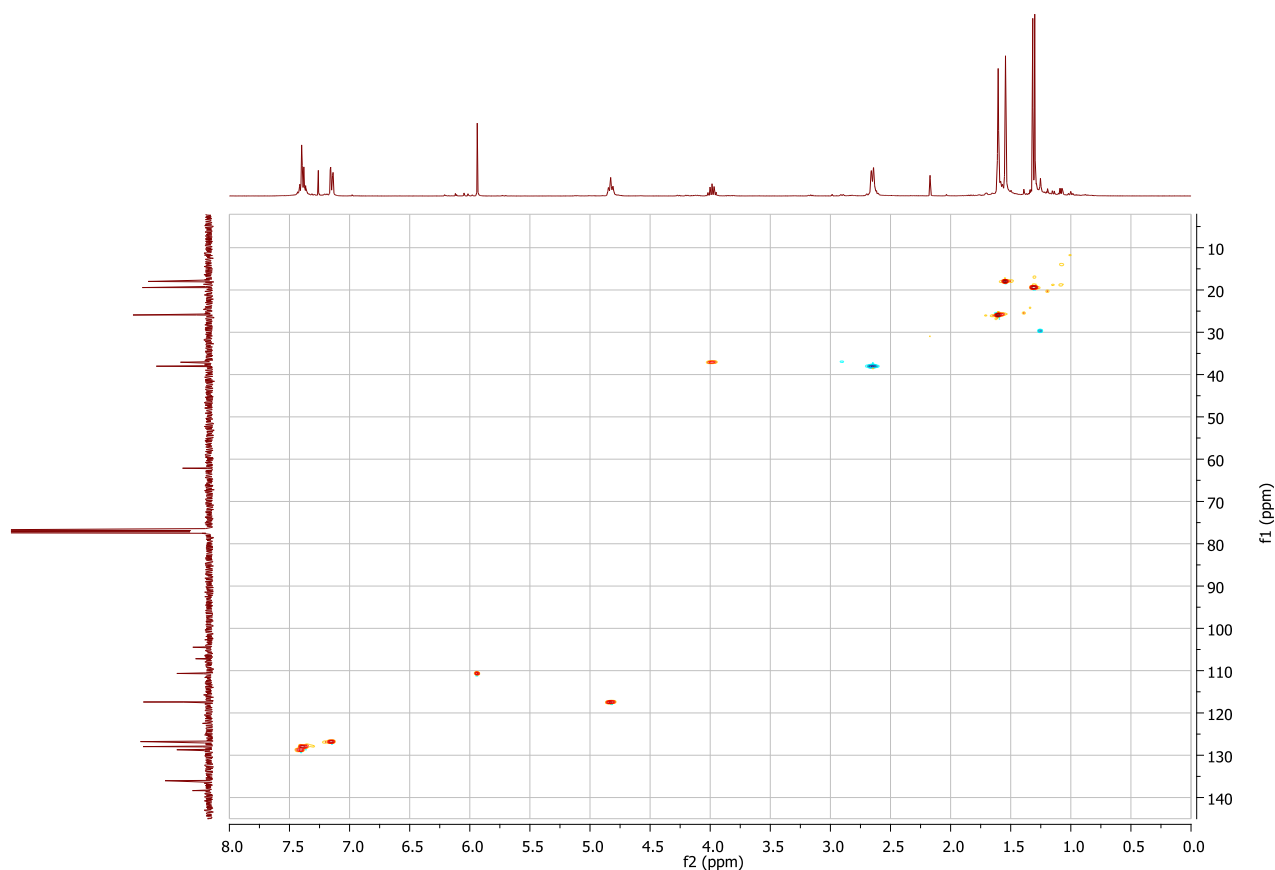


DEPTQ du composé **94** (100 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$) : CH_3 , $\text{CH} < 0$; CH_2 , $\text{C} > 0$

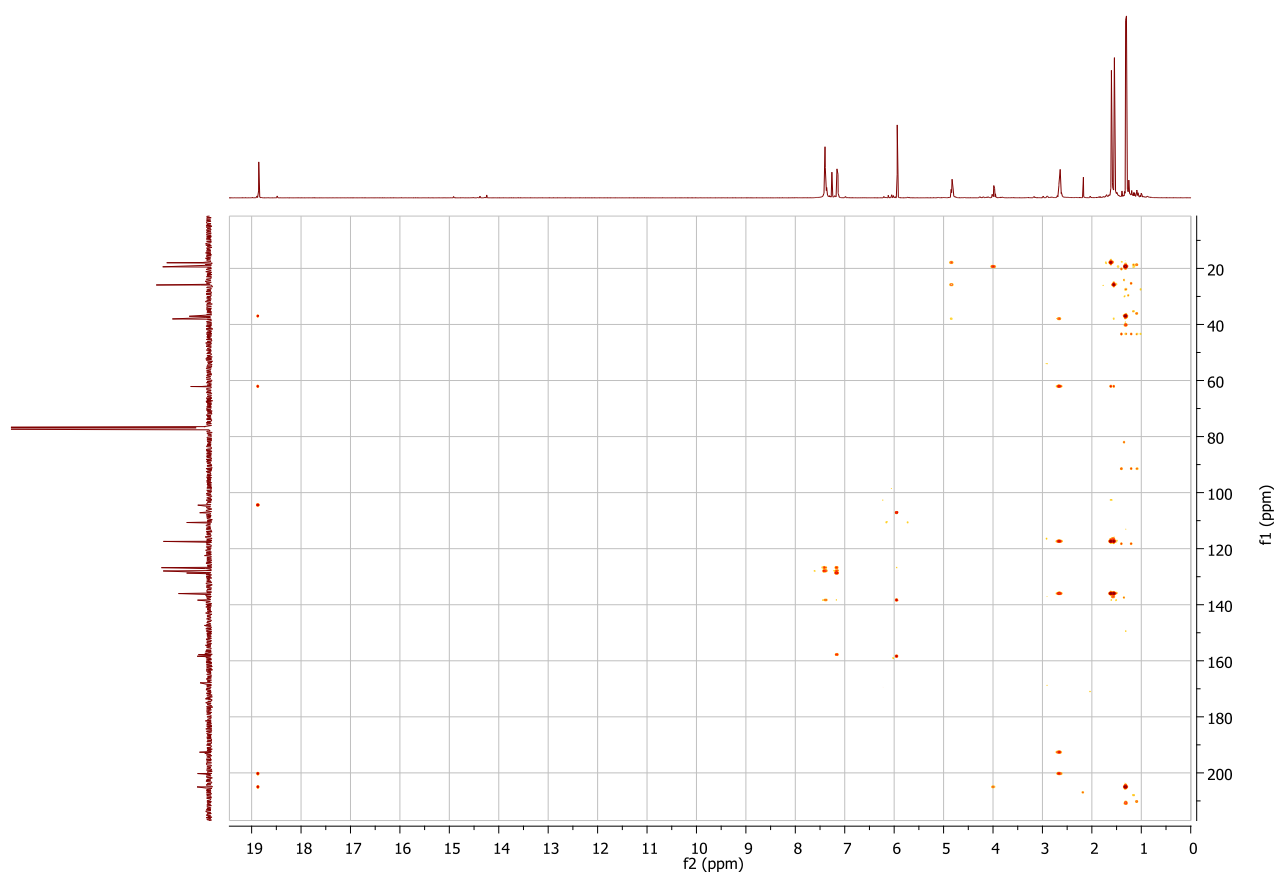


COSY du composé **94** (400 MHz, CDCl₃)NOESY du composé **94** (500 MHz, CDCl₃)

HSQC éditée du composé **94** (400 MHz, CDCl₃) : CH₃, CH > 0 (en rouge) ; CH₂ < 0 (en bleu)

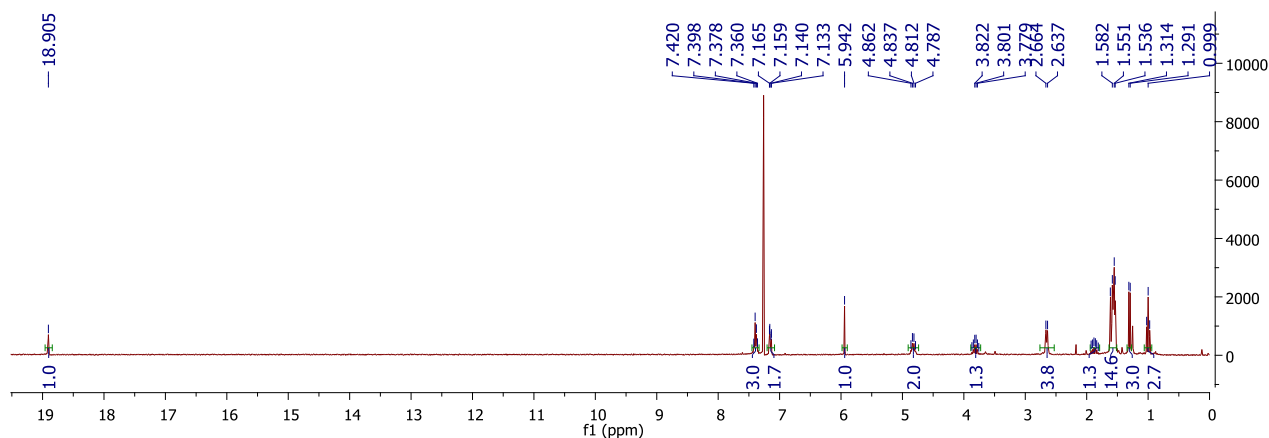


HMBC du composé **94** (400 MHz, CDCl₃)

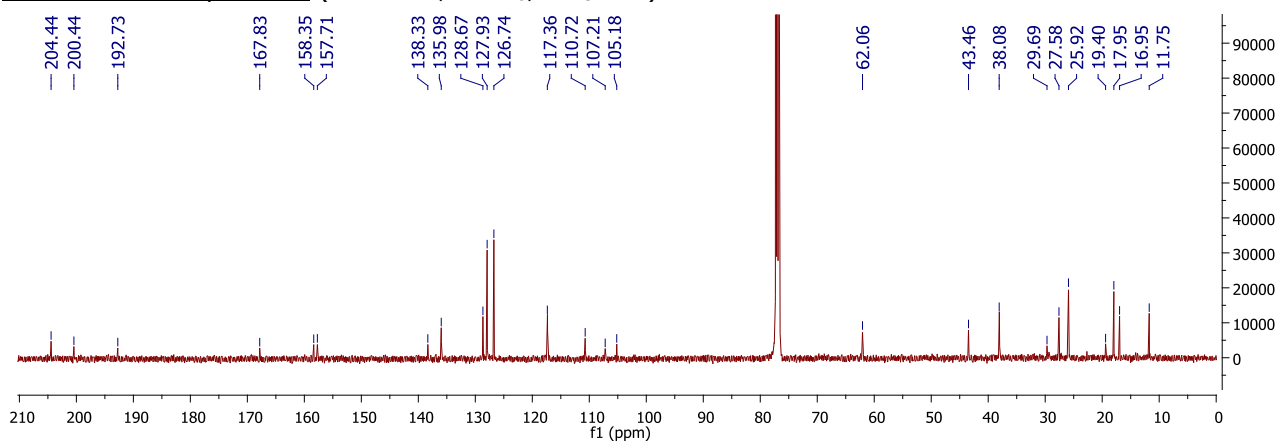


Annexe 7. Spectres de RMN du lépidotol B (95)

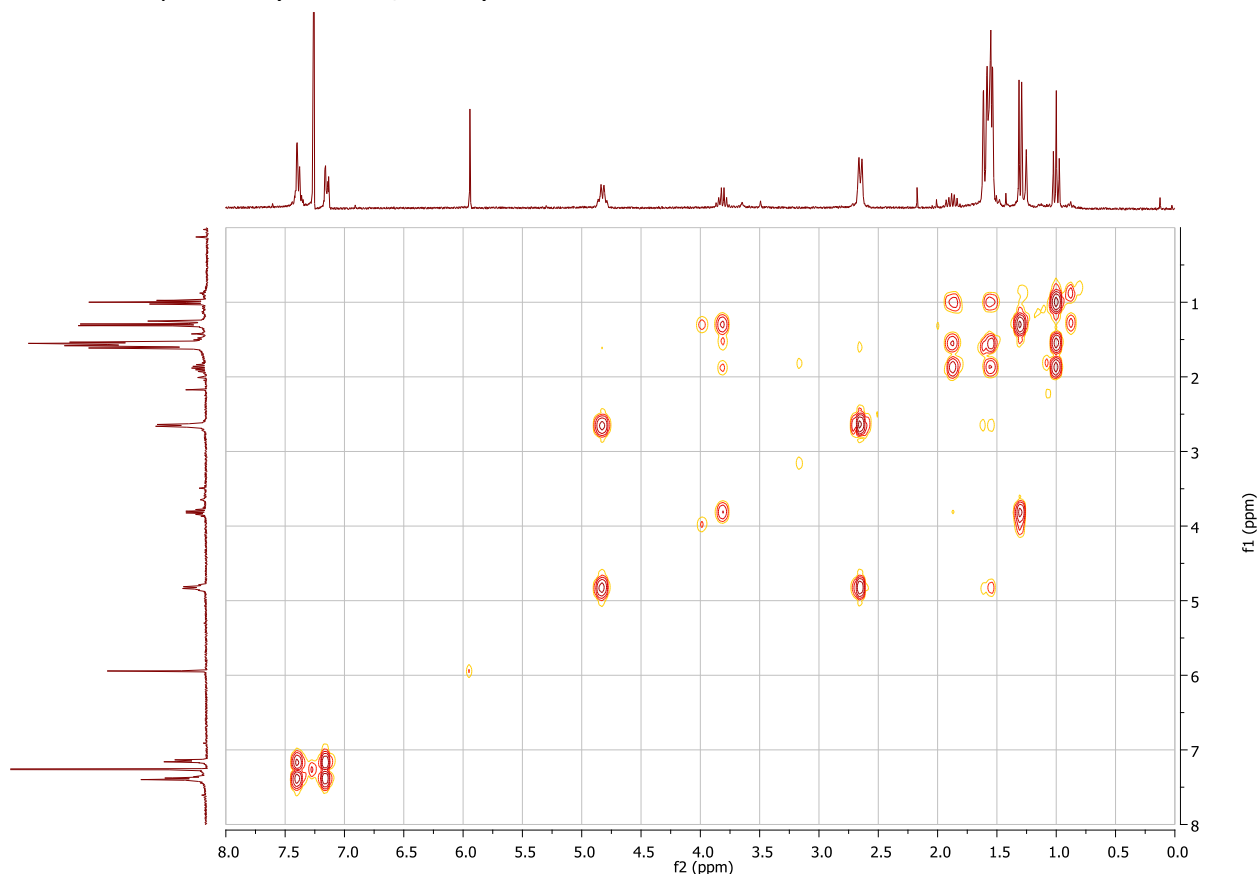
RMN ^1H du composé **95** (300 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

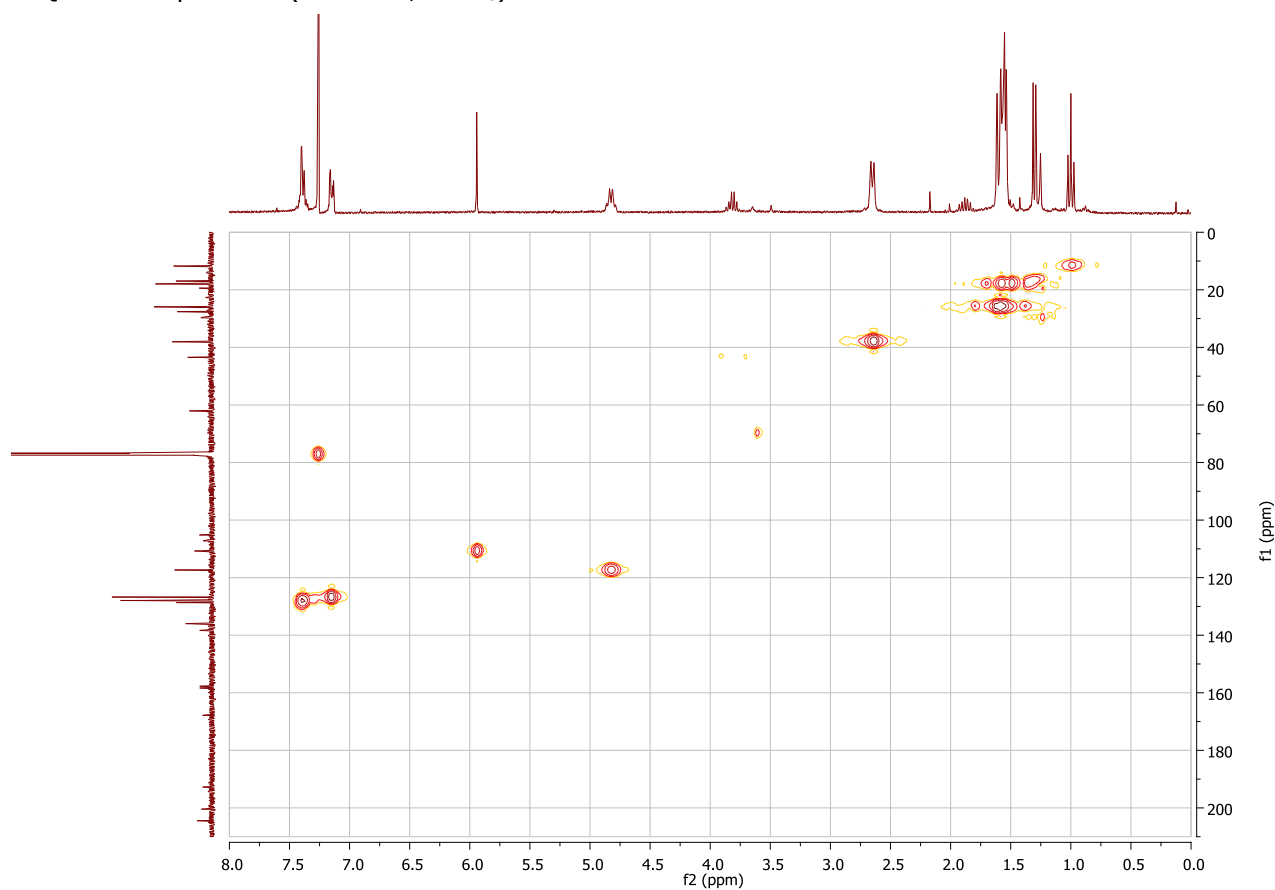
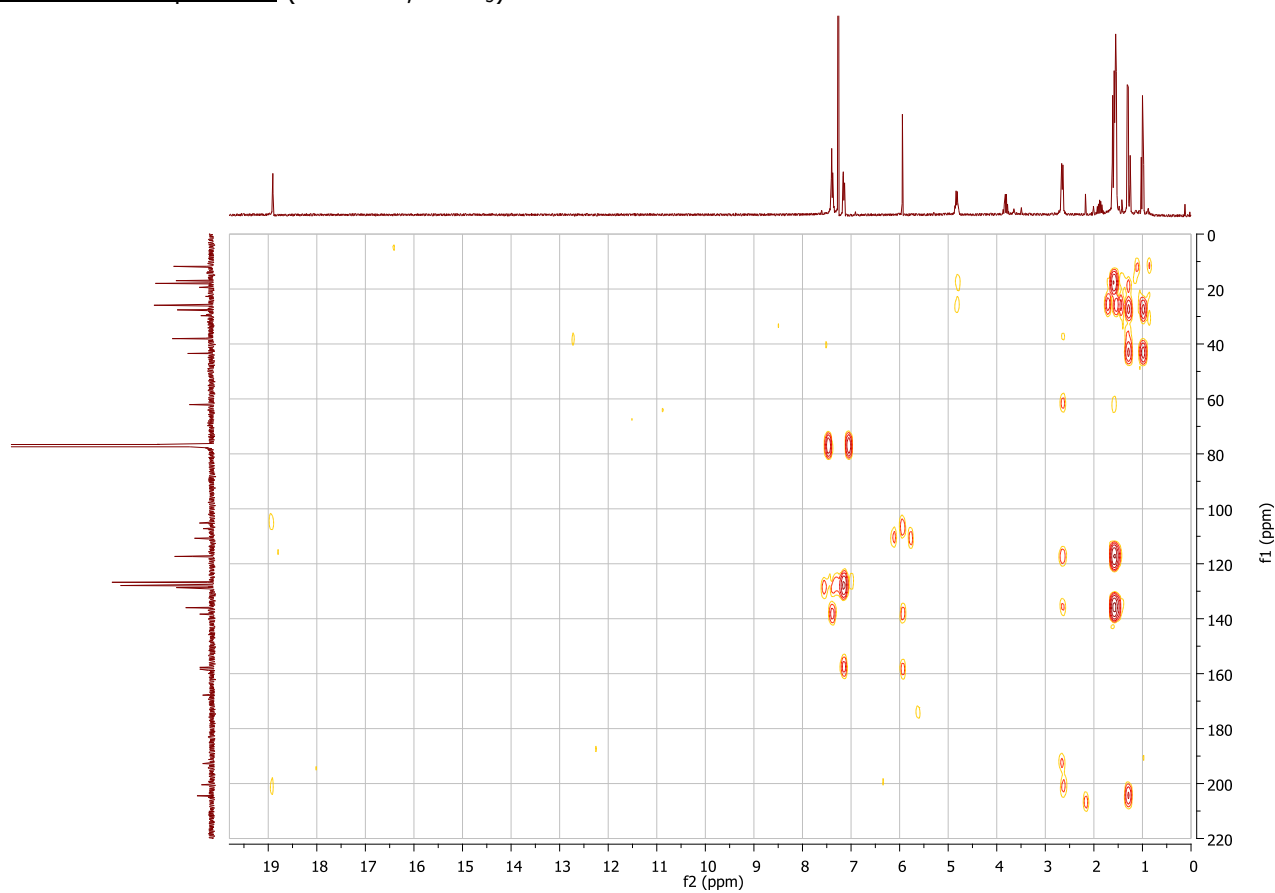


RMN ^{13}C du composé **95** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



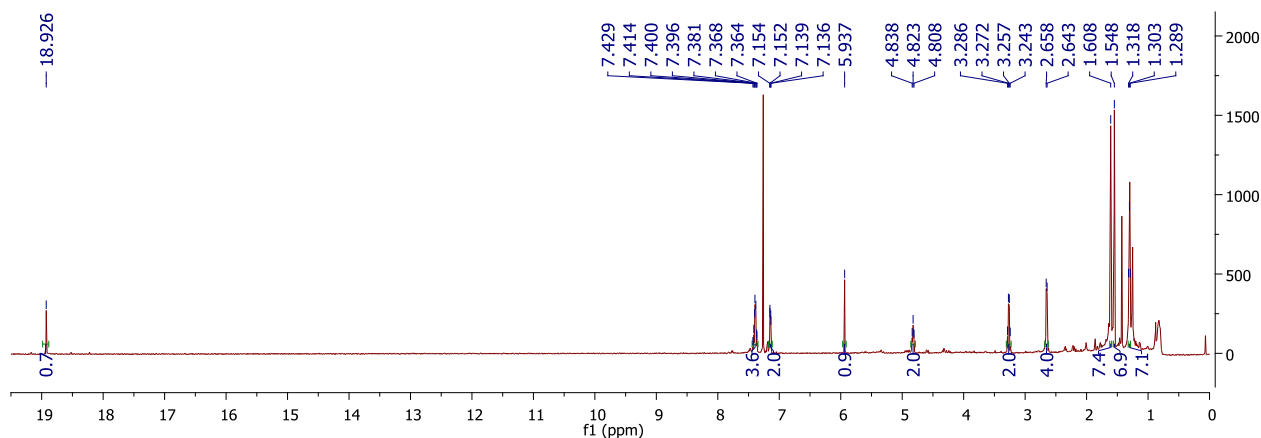
COSY du composé **95** (500 MHz, CDCl_3)



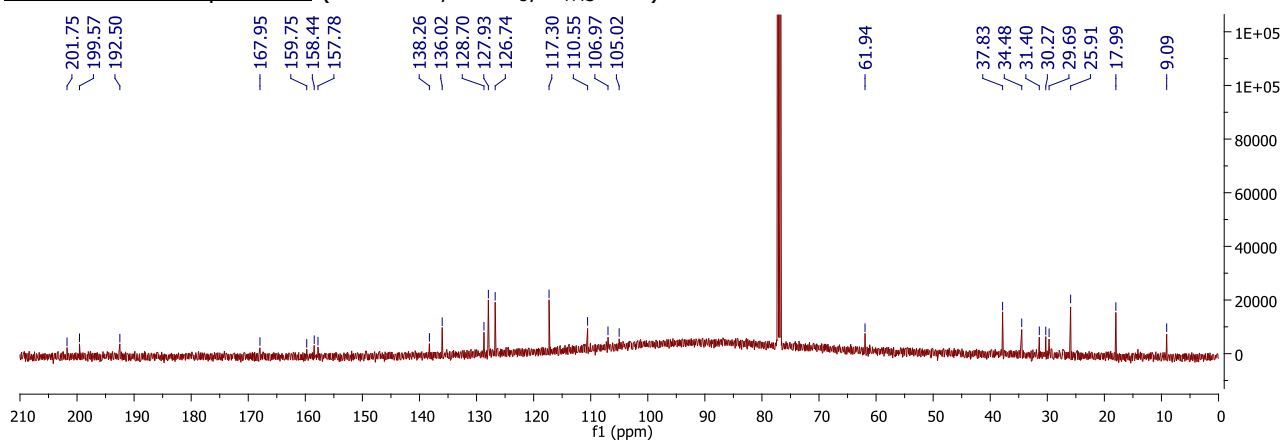
HMOC du composé **95** (500 MHz, CDCl₃)HMBC du composé **95** (500 MHz, CDCl₃)

Annexe 8. Spectres de RMN du lépidotol C (96)

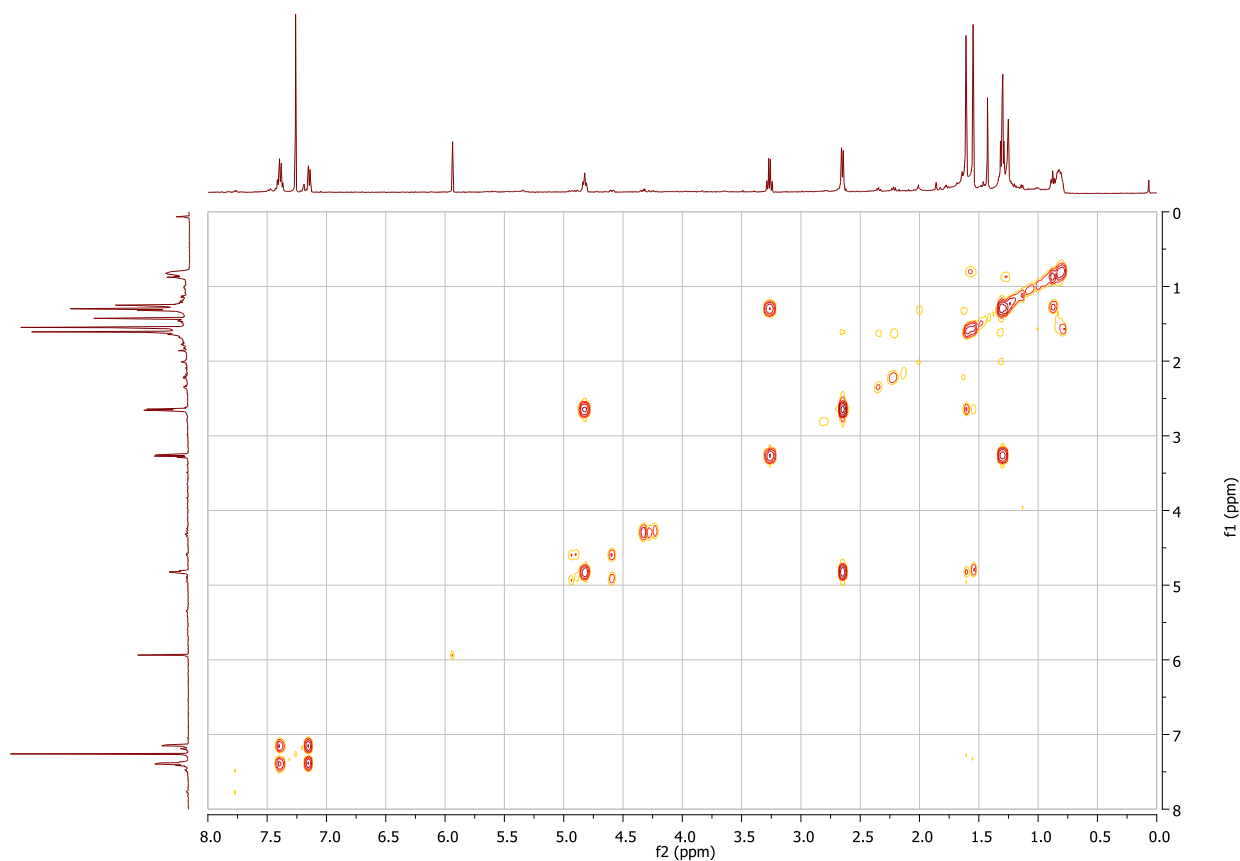
RMN ^1H du composé **96** (500 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

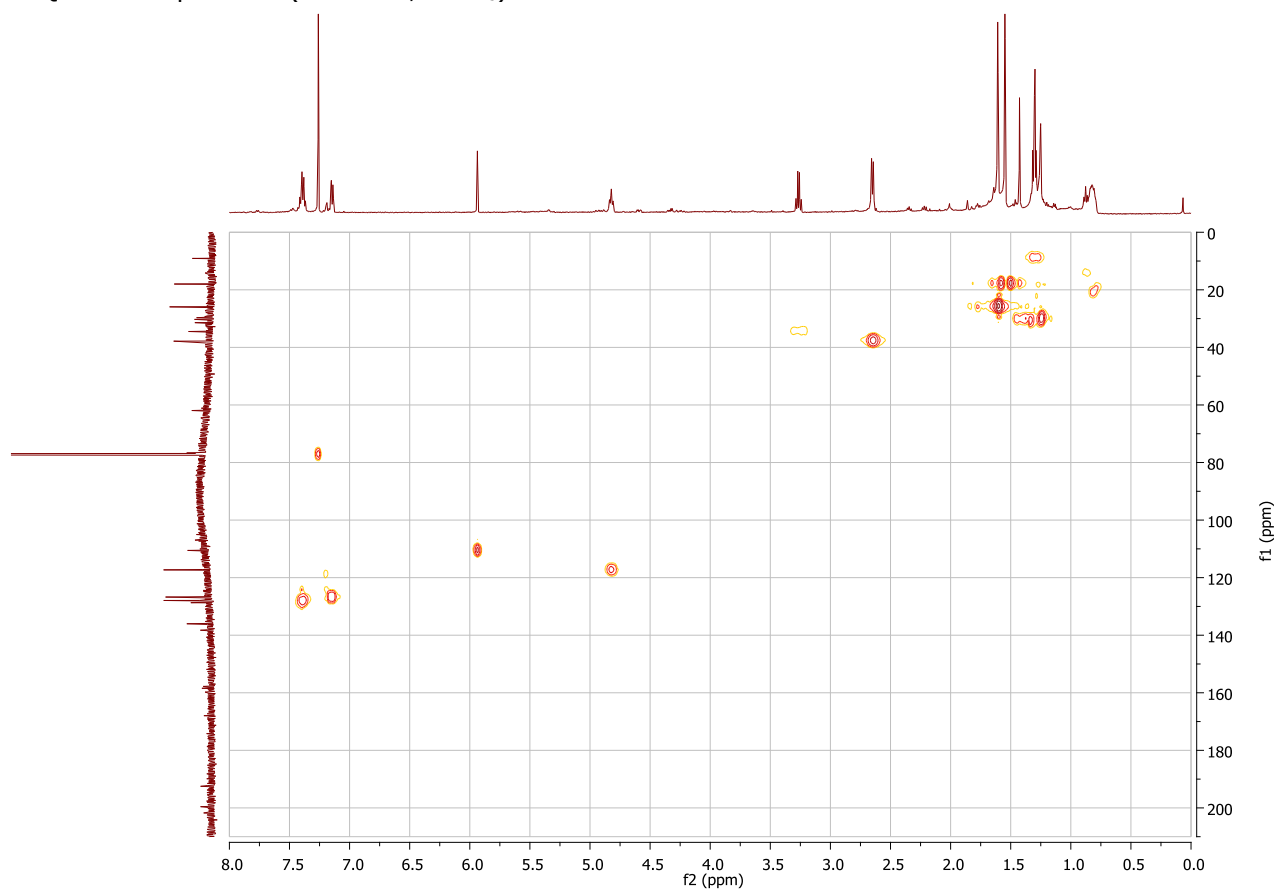
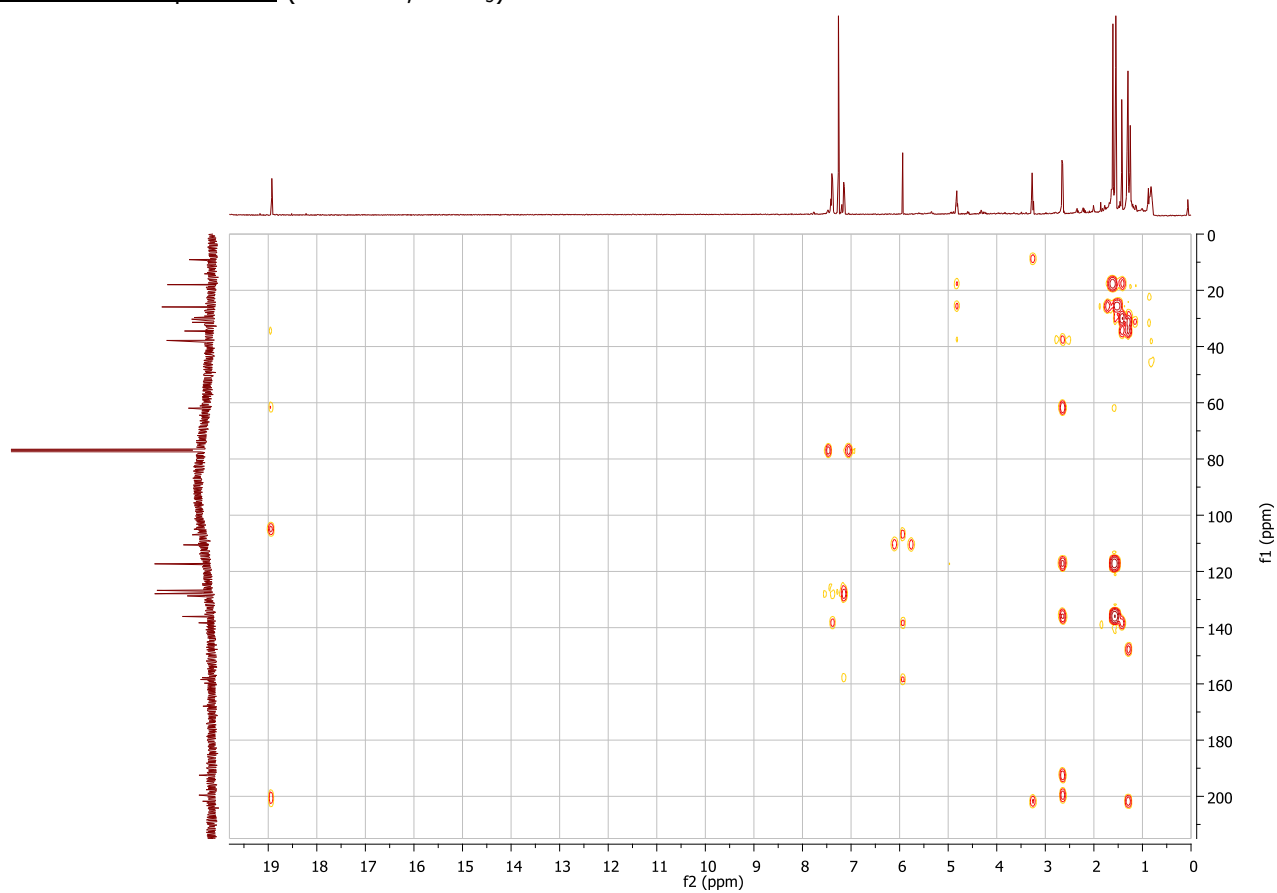


RMN ^{13}C du composé **96** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



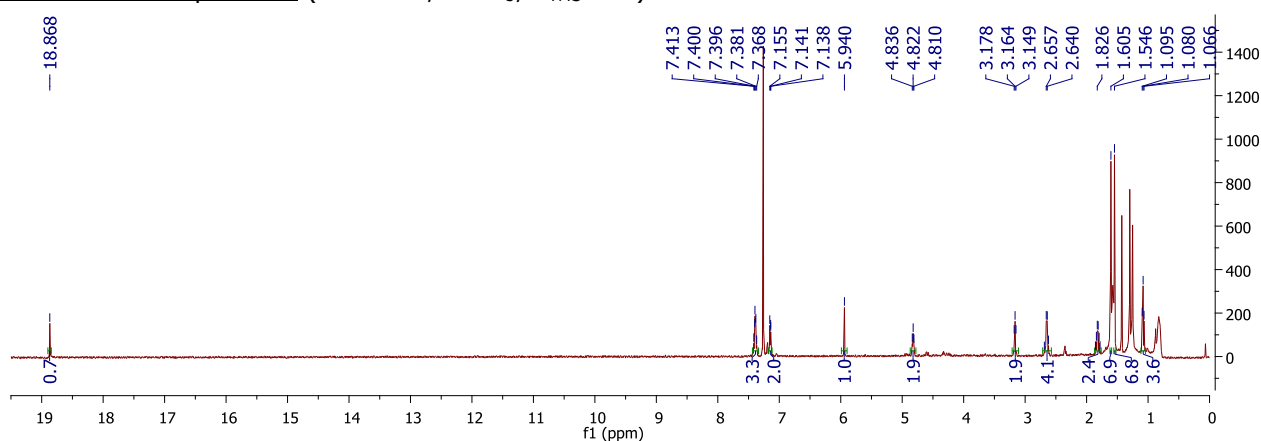
COSY du composé **96** (500 MHz, CDCl_3)



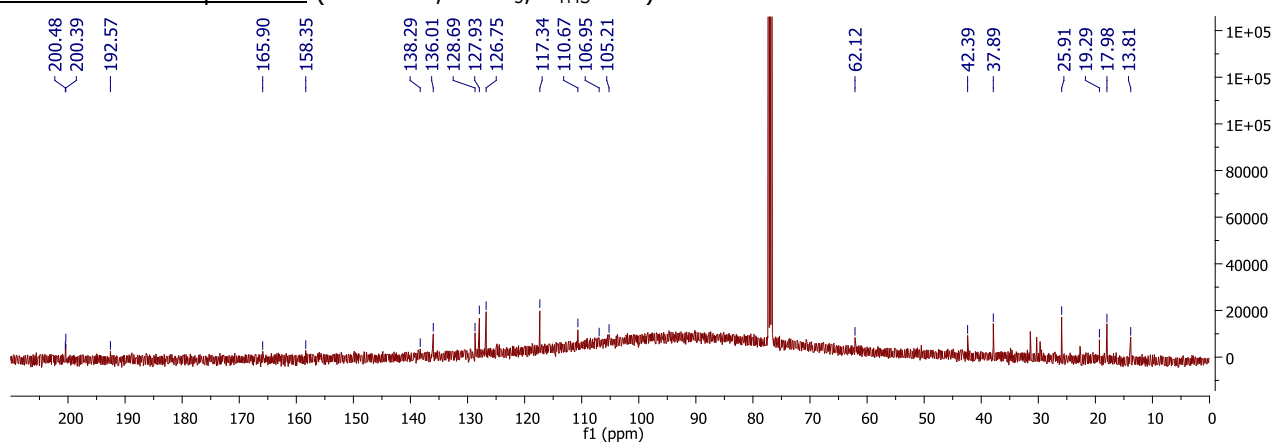
HMQC du composé **96** (500 MHz, CDCl₃)HMBC du composé **96** (500 MHz, CDCl₃)

Annexe 9. Spectres de RMN du lépidotol D (97)

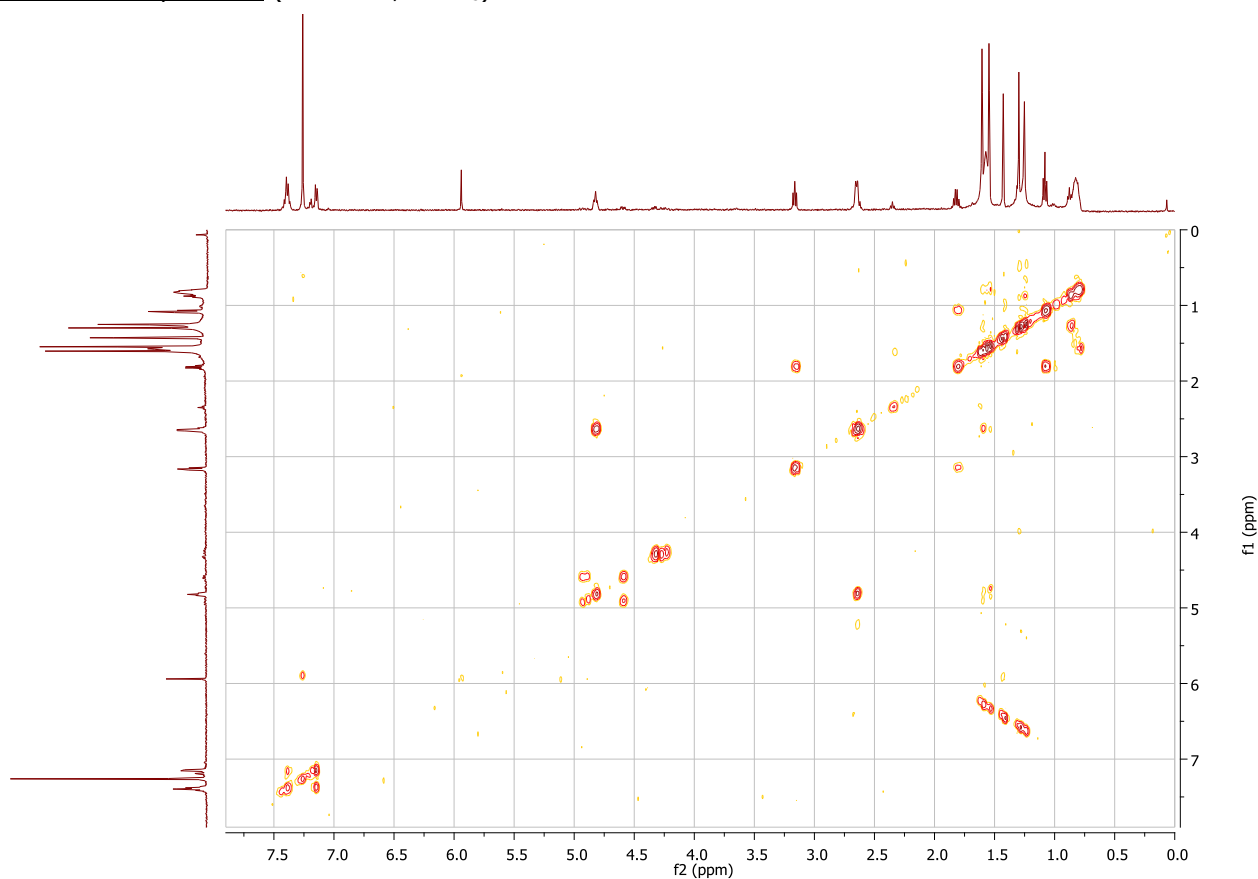
RMN ^1H du composé **97** (500 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

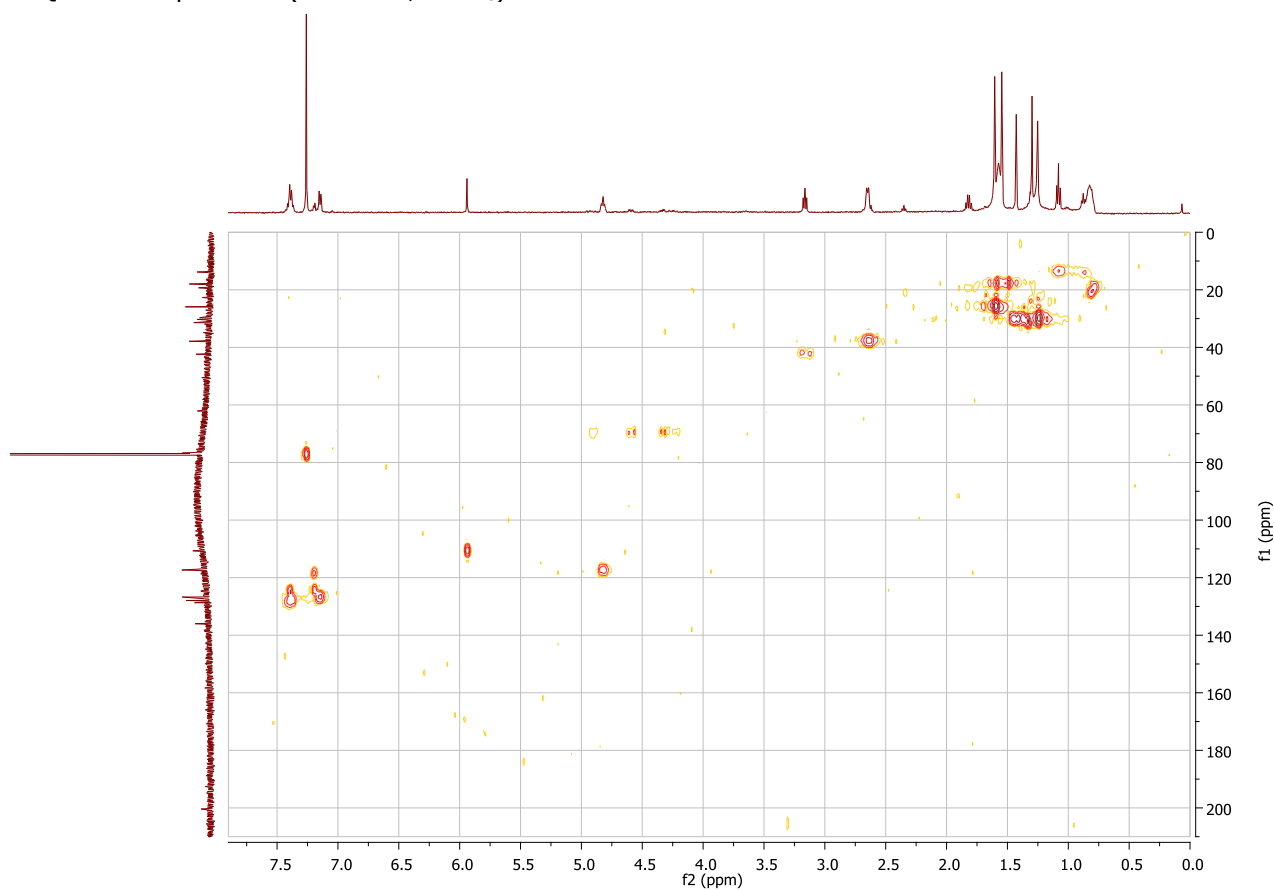
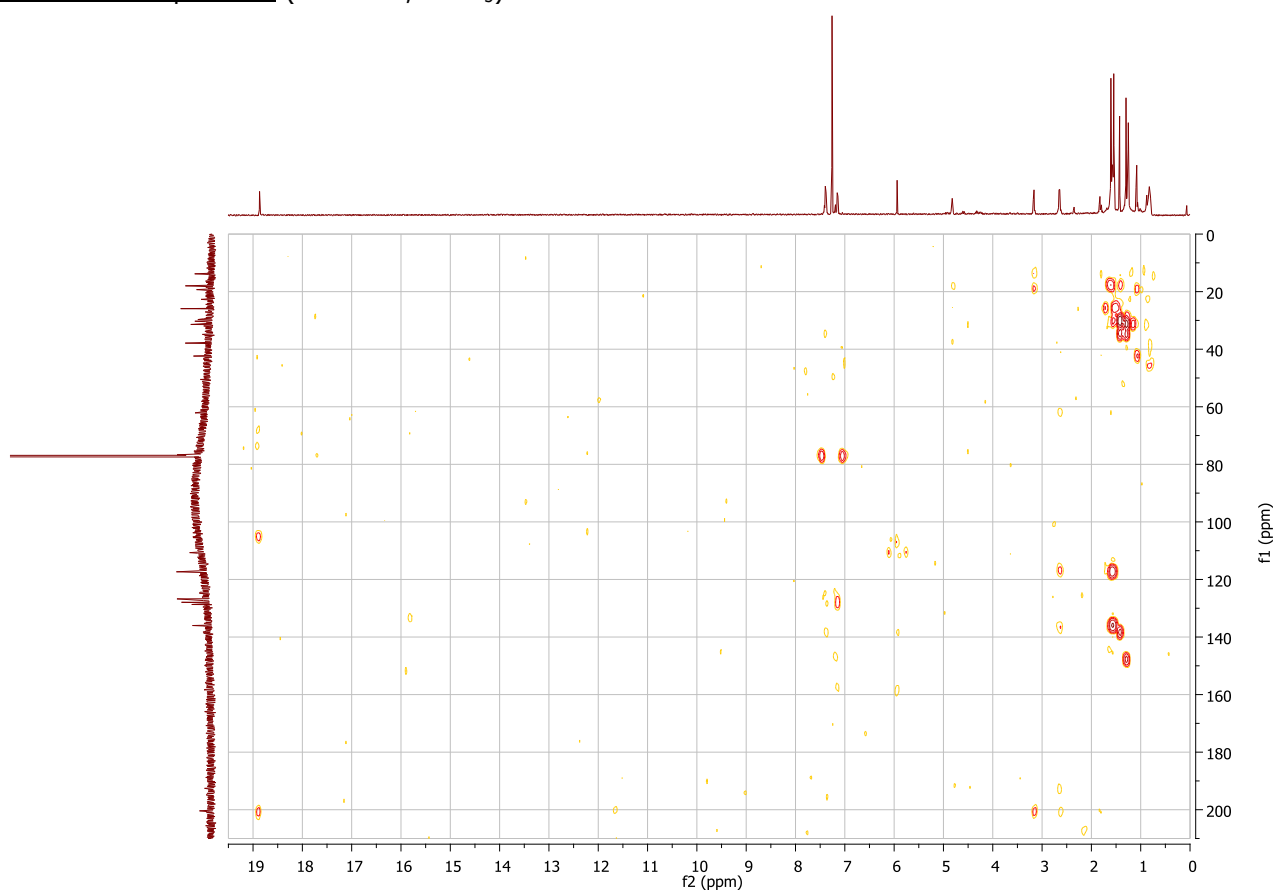


RMN ^{13}C du composé **97** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



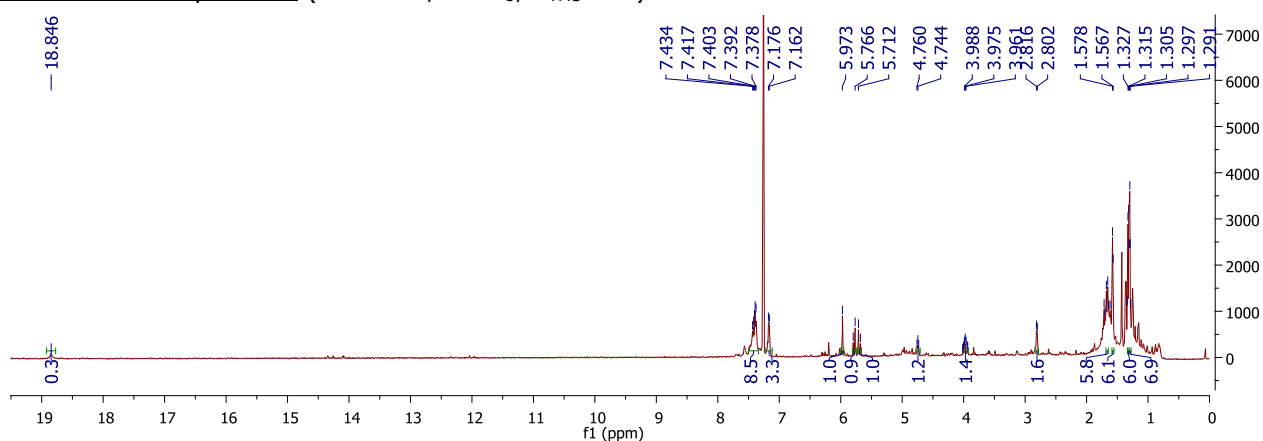
COSY du composé **97** (500 MHz, CDCl_3)



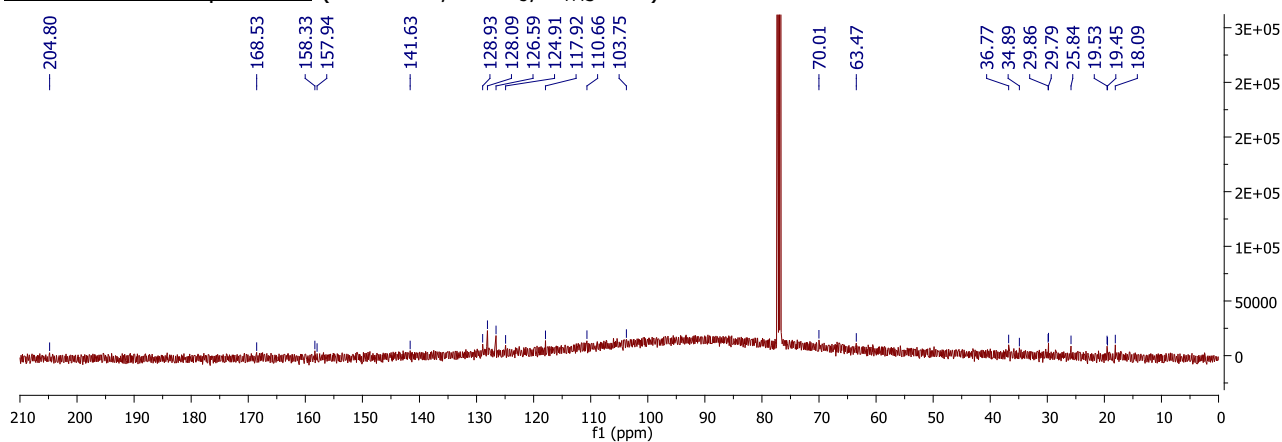
HMQC du composé **97** (500 MHz, CDCl₃)HMBC du composé **97** (500 MHz, CDCl₃)

Annexe 10. Spectres de RMN du lépidotol E (98)

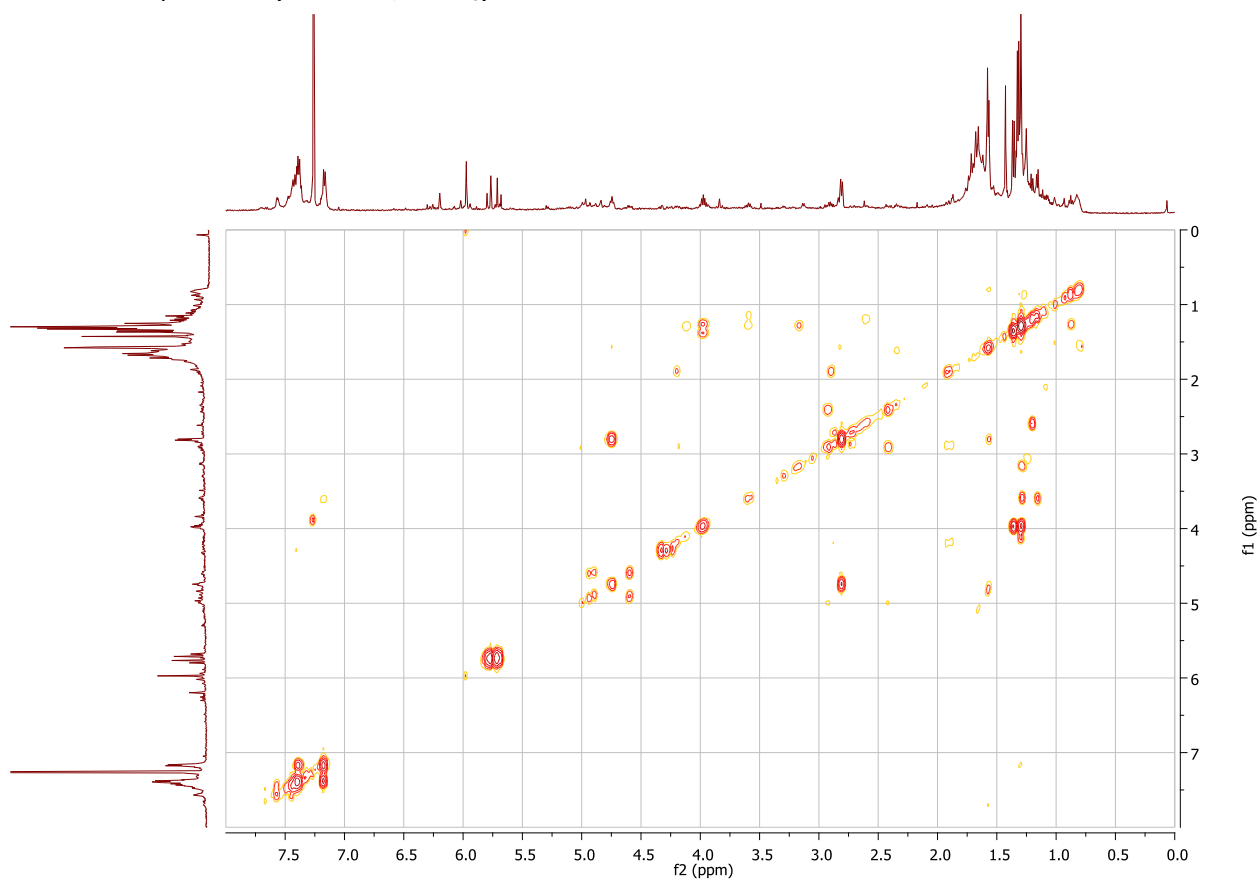
RMN ^1H du composé **98** (500 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

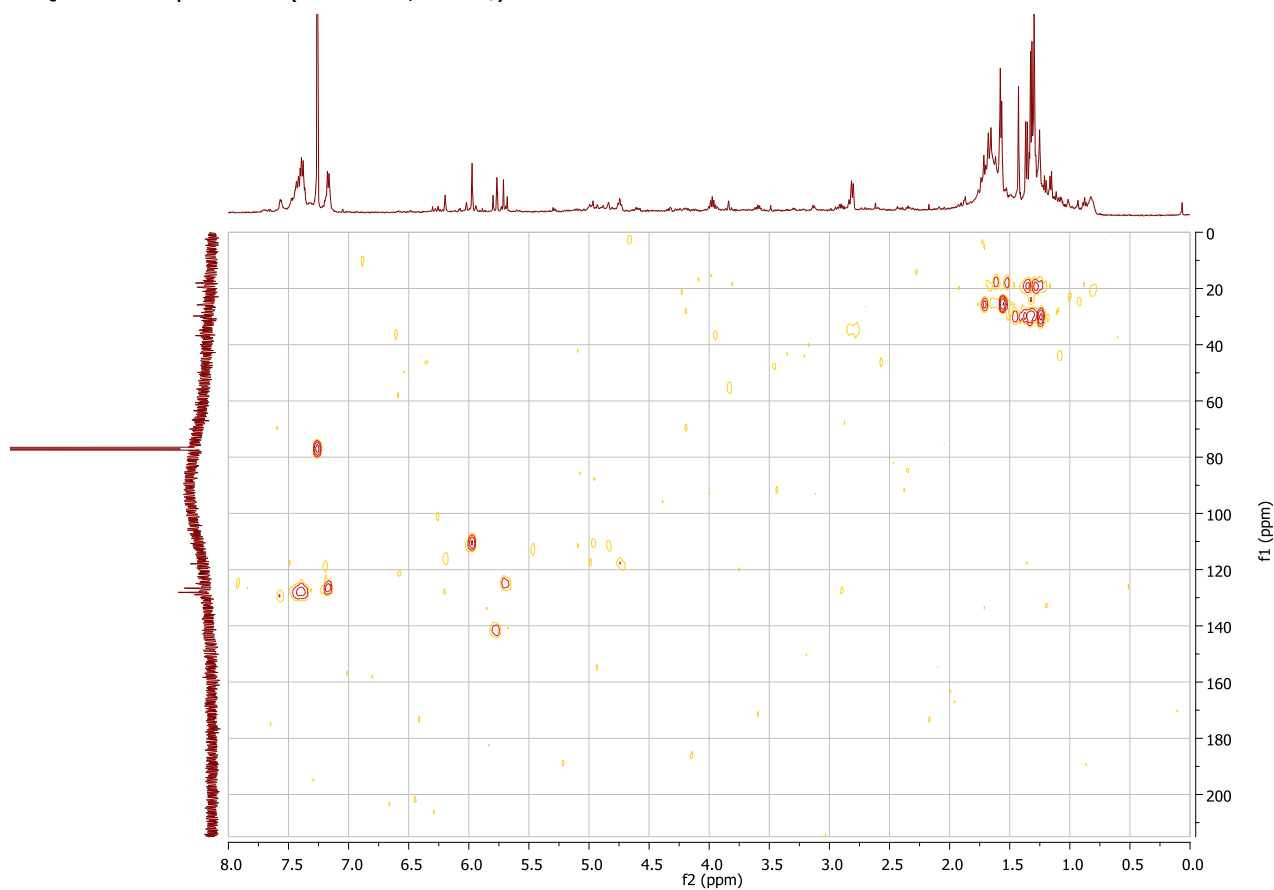
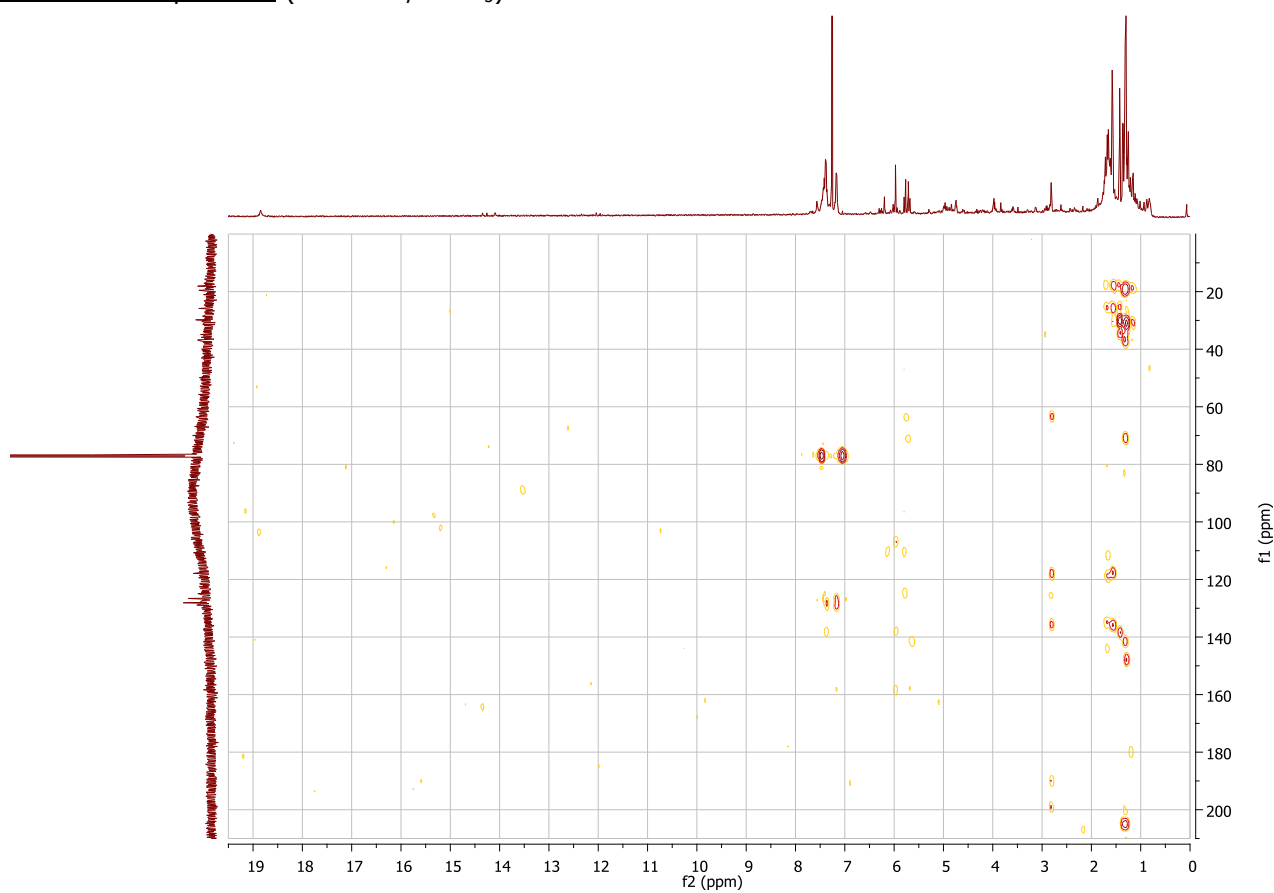


RMN ^{13}C du composé **98** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



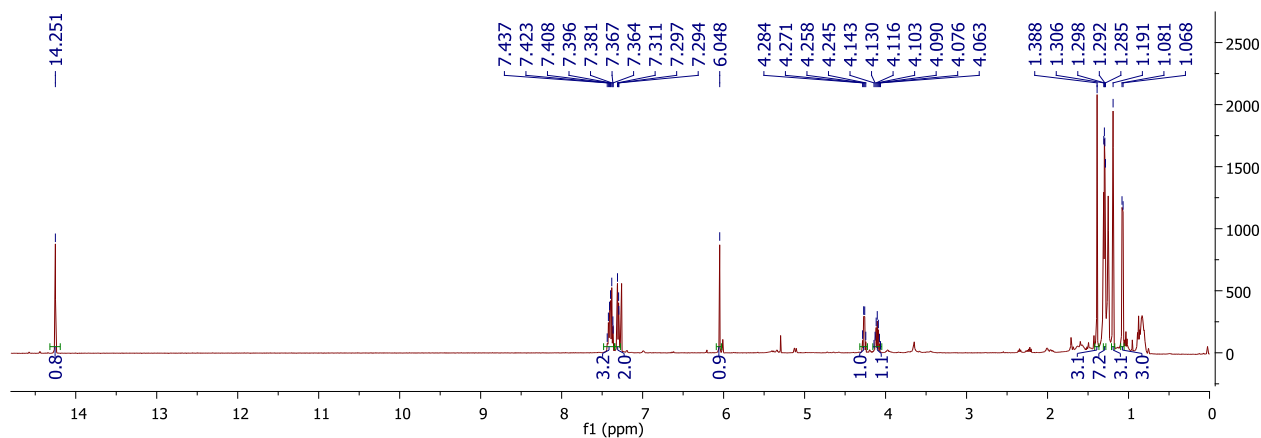
COSY du composé **98** (500 MHz, CDCl_3)



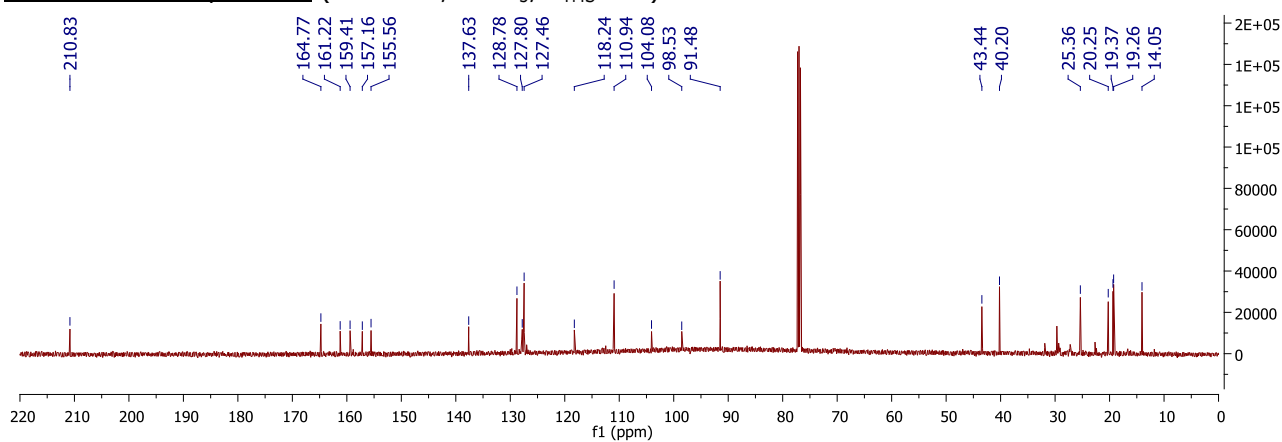
HMQC du composé **98** (500 MHz, CDCl₃)HMBC du composé **98** (500 MHz, CDCl₃)

Annexe 11. Spectres de RMN de la lépidotine A (99)

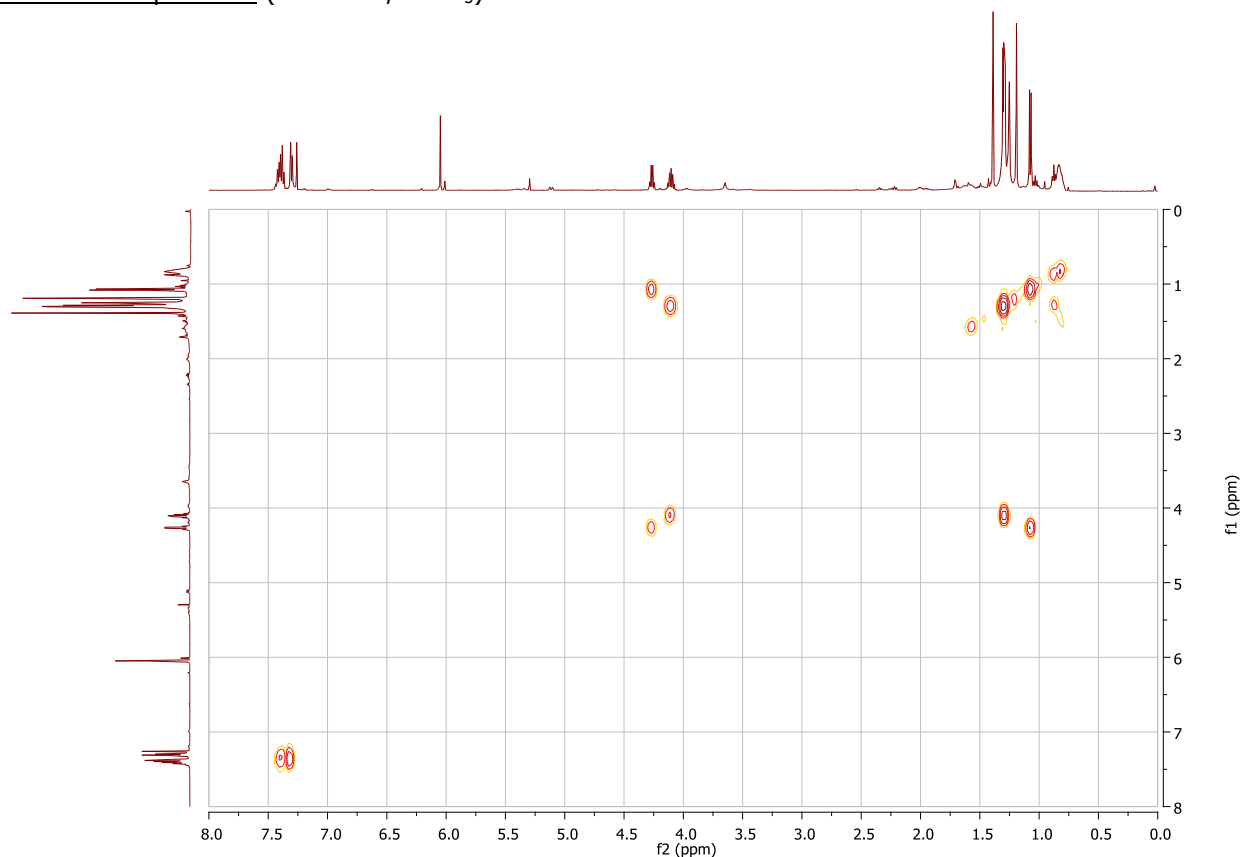
RMN ^1H du composé **99** (500 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

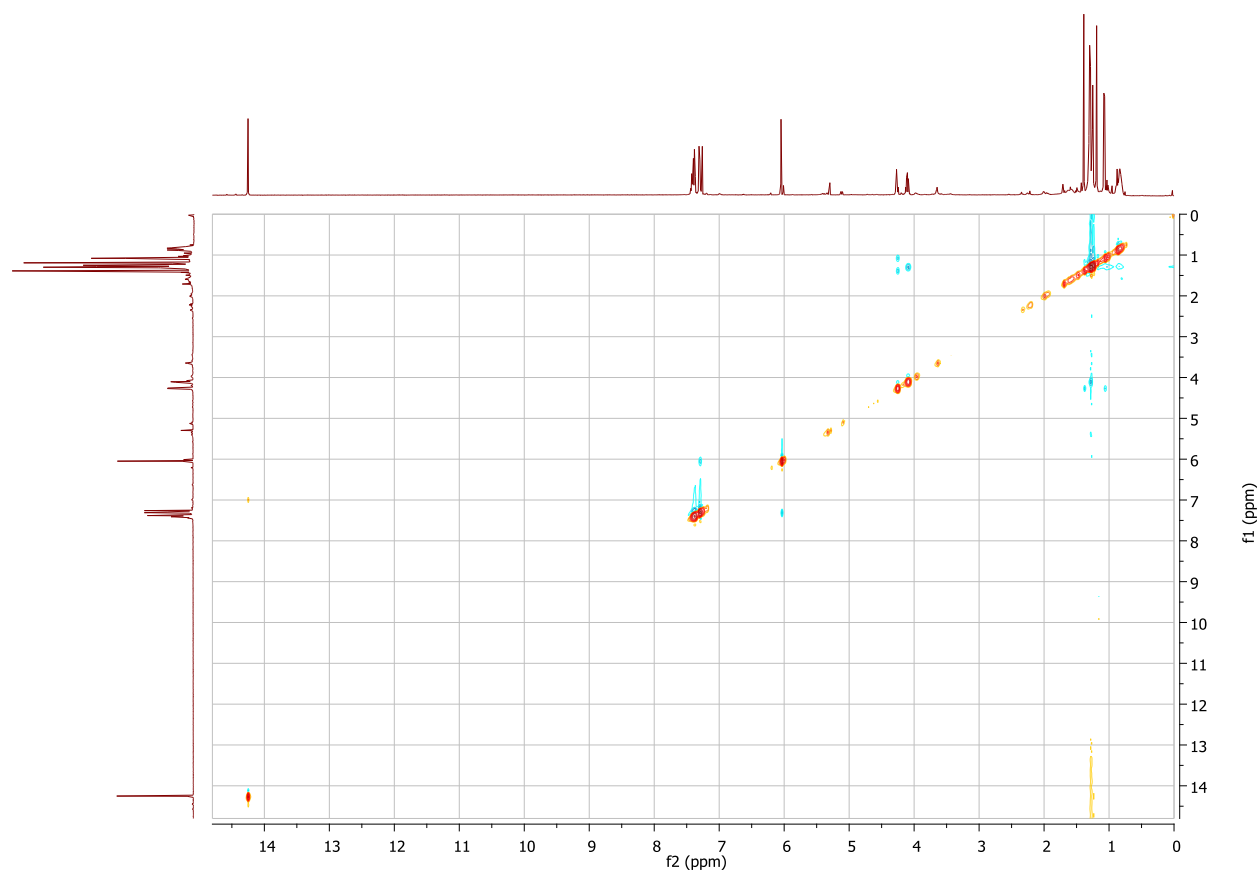
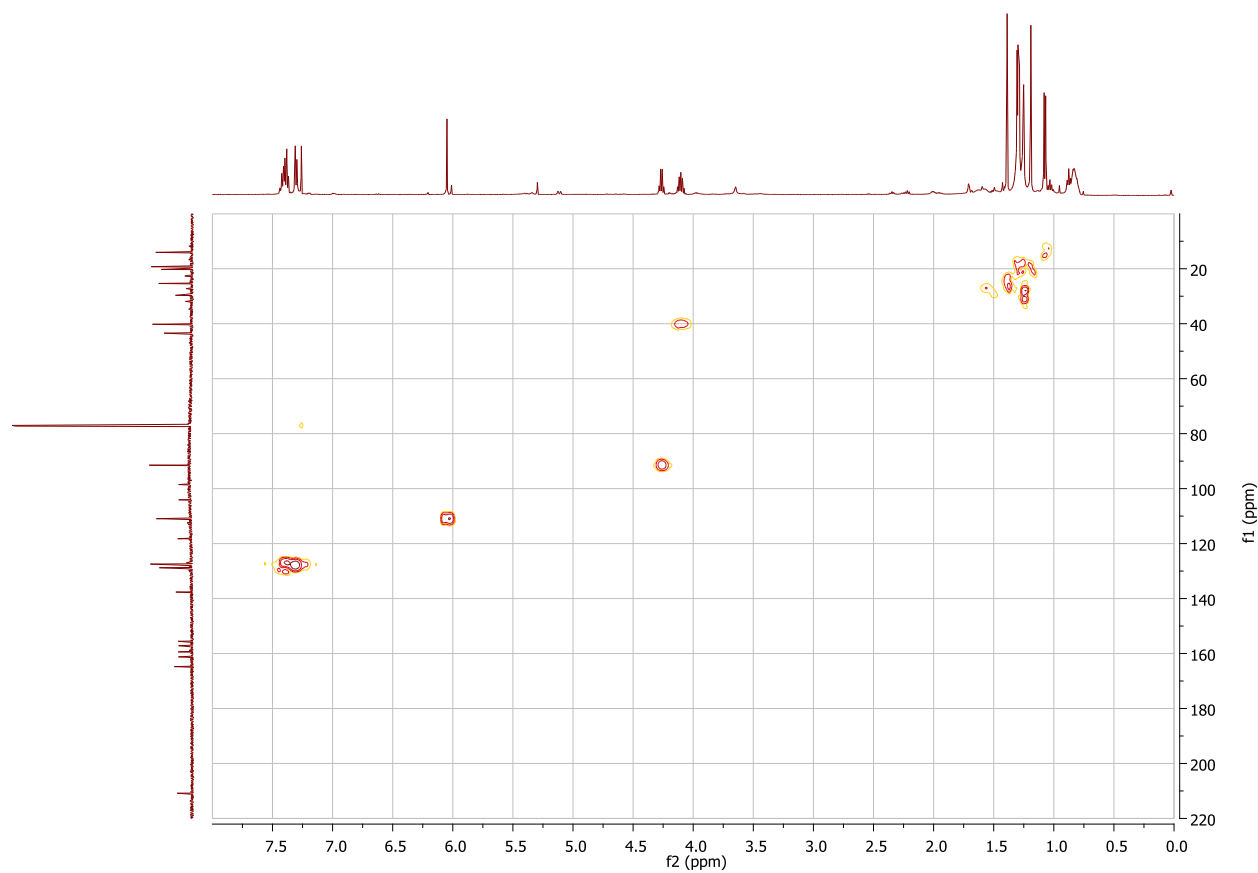


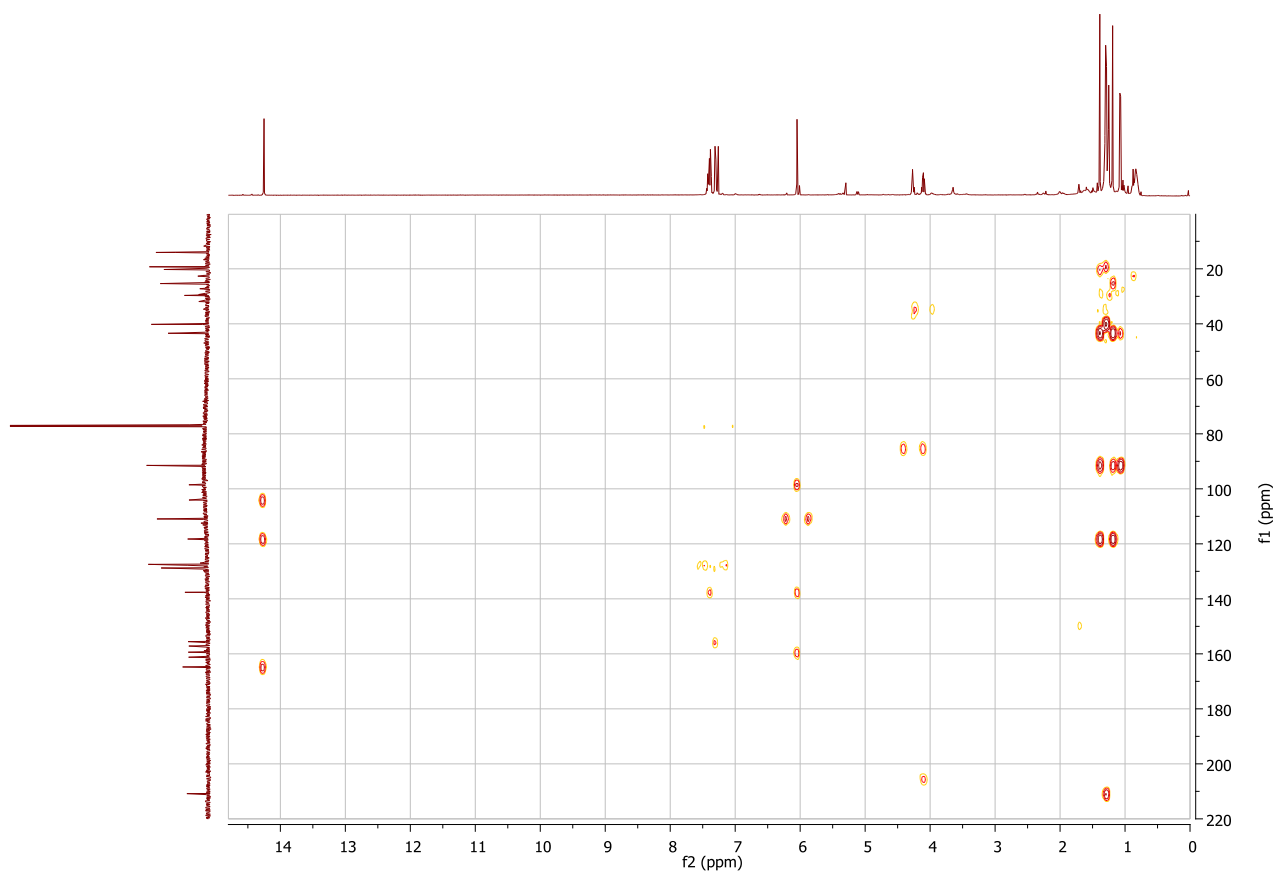
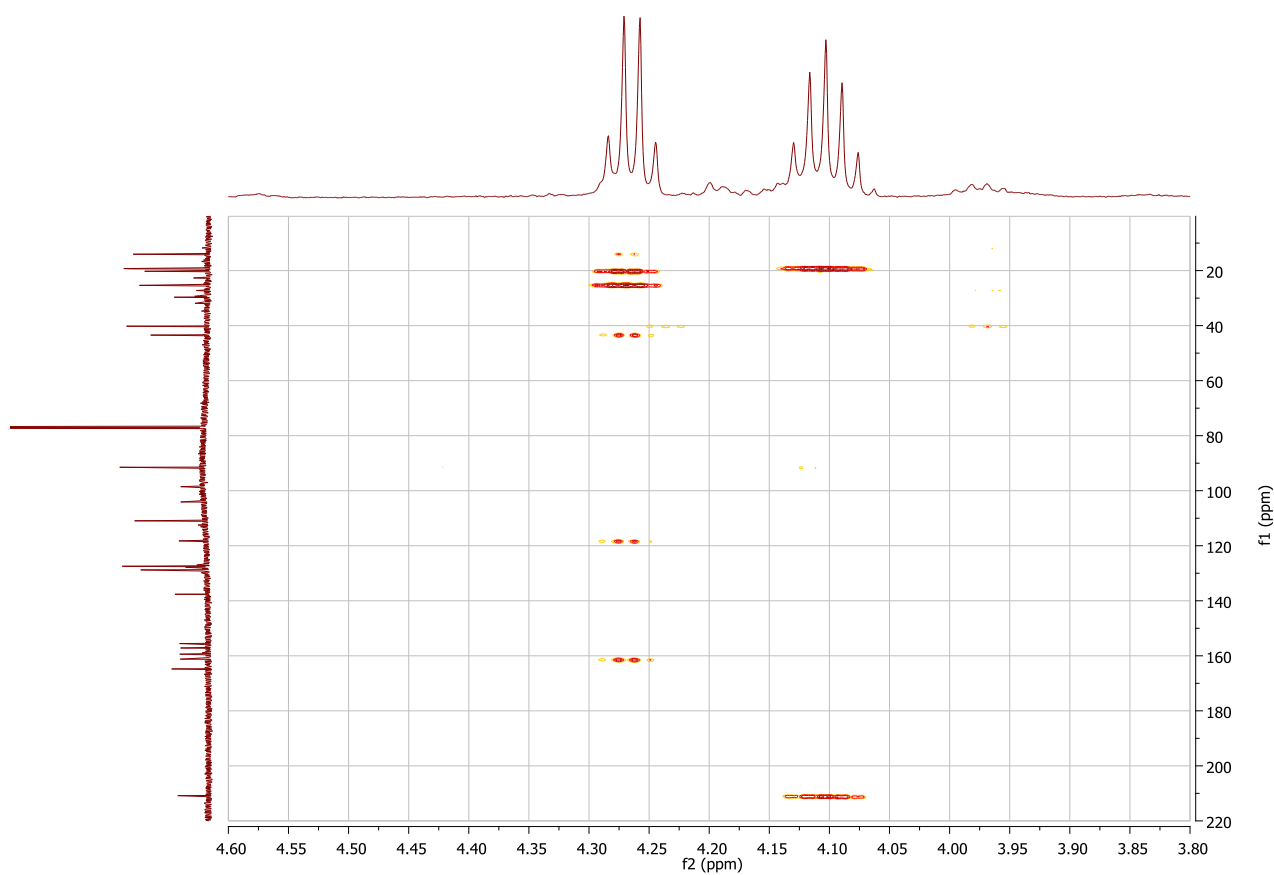
RMN ^{13}C du composé **99** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



COSY du composé **99** (500 MHz, CDCl_3)

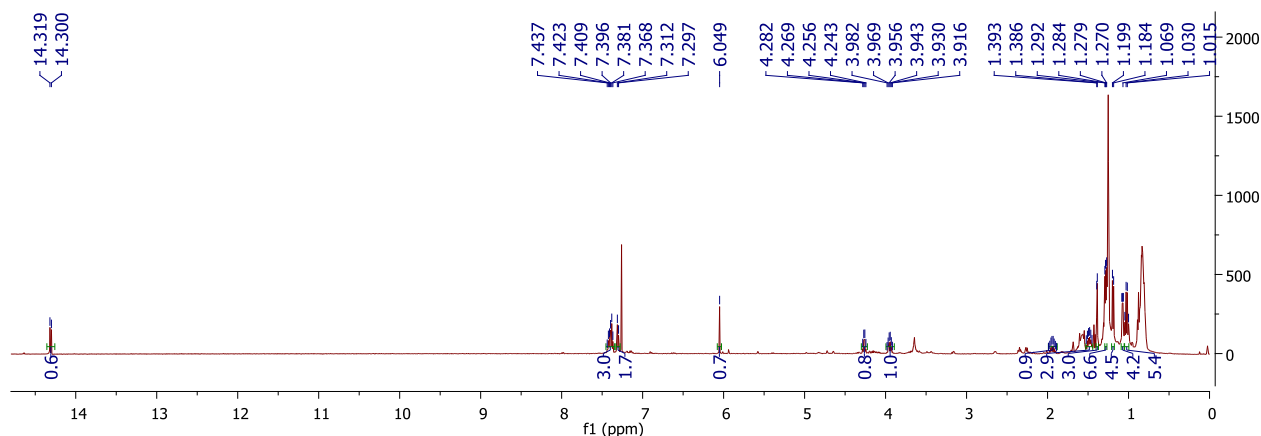


NOESY du composé **99** (500 MHz, CDCl₃)HMQC du composé **99** (500 MHz, CDCl₃)

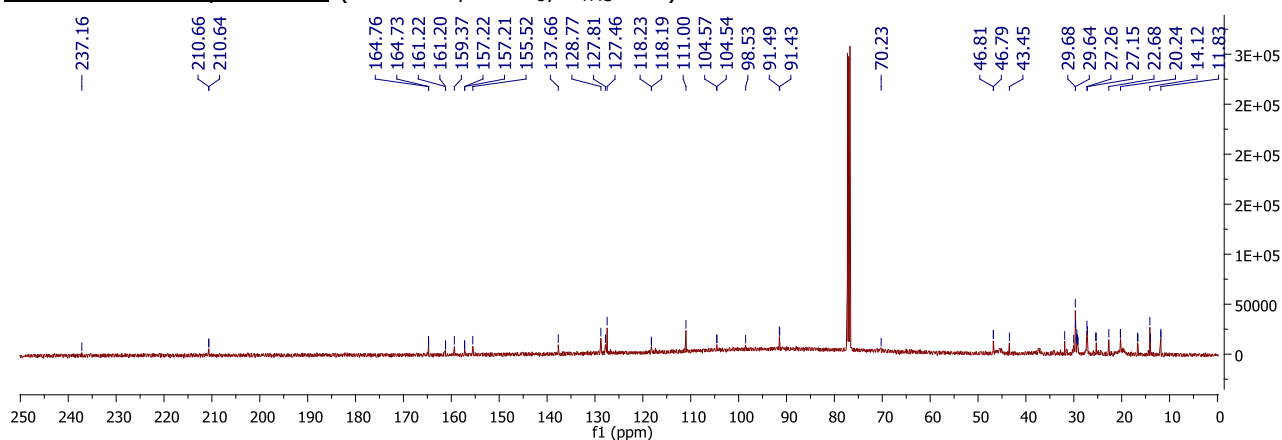
HMBC du composé **99** (500 MHz, CDCl₃)HMBC resserrée (δ_H 3,80-4,60 ppm) du composé **99** (500 MHz, CDCl₃)

Annexe 12. Spectres de RMN de la lépidotine B (100)

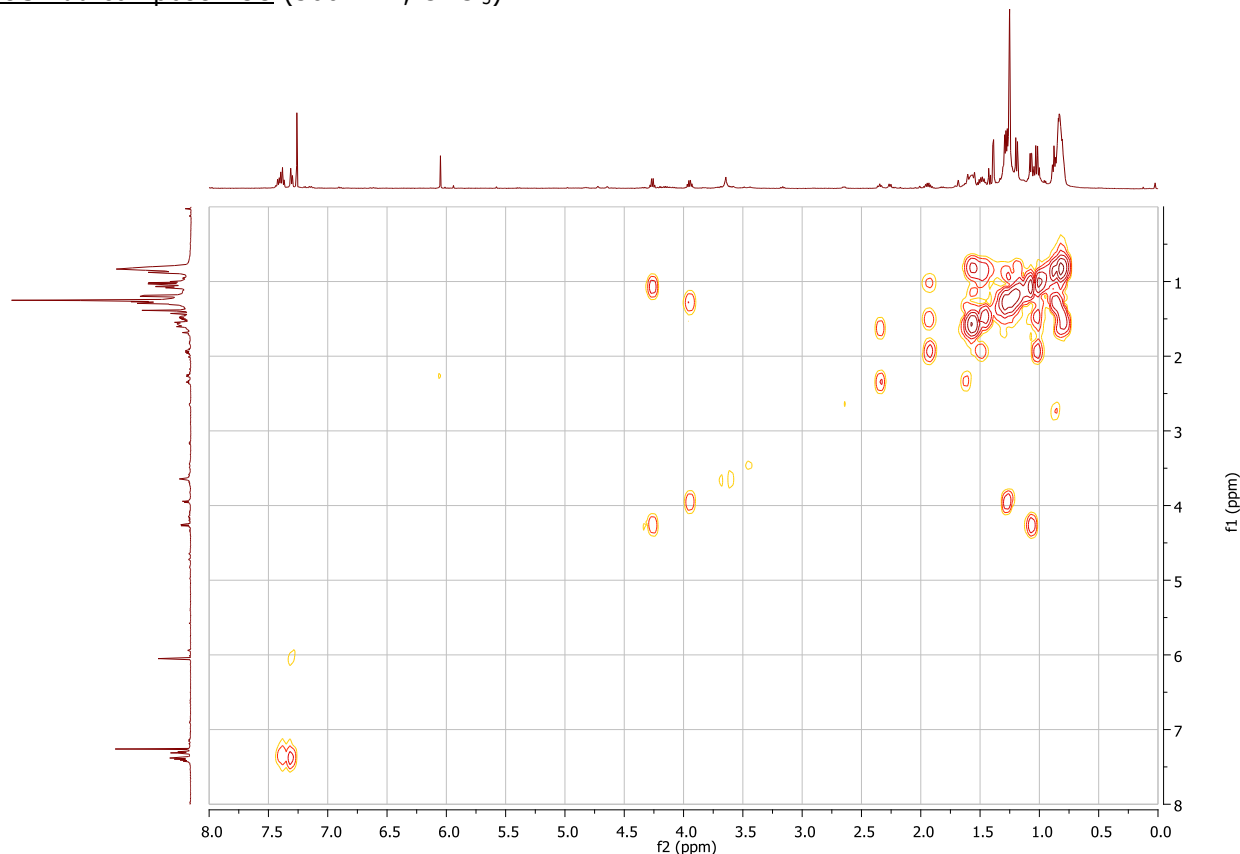
RMN ^1H du composé **100** (500 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

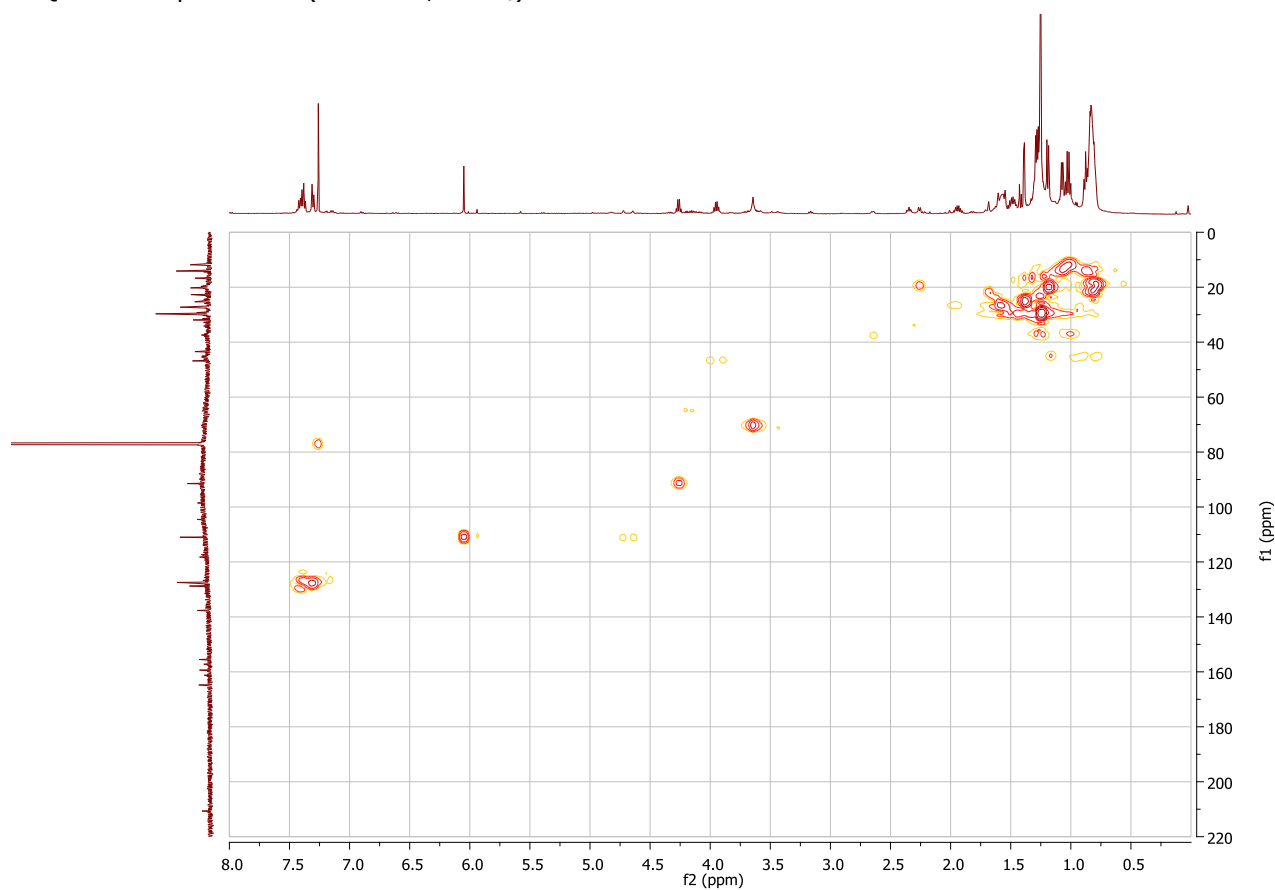
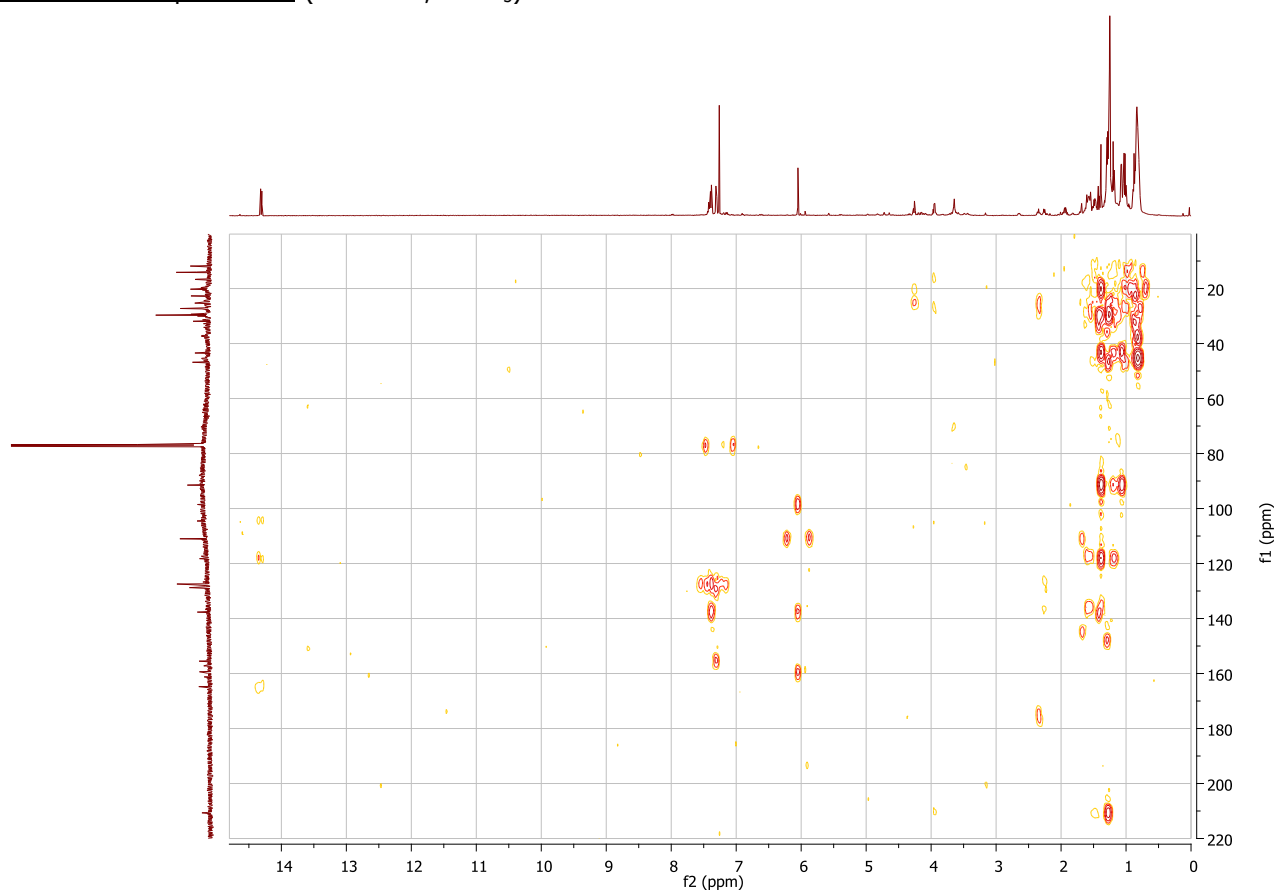


RMN ^{13}C du composé **100** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



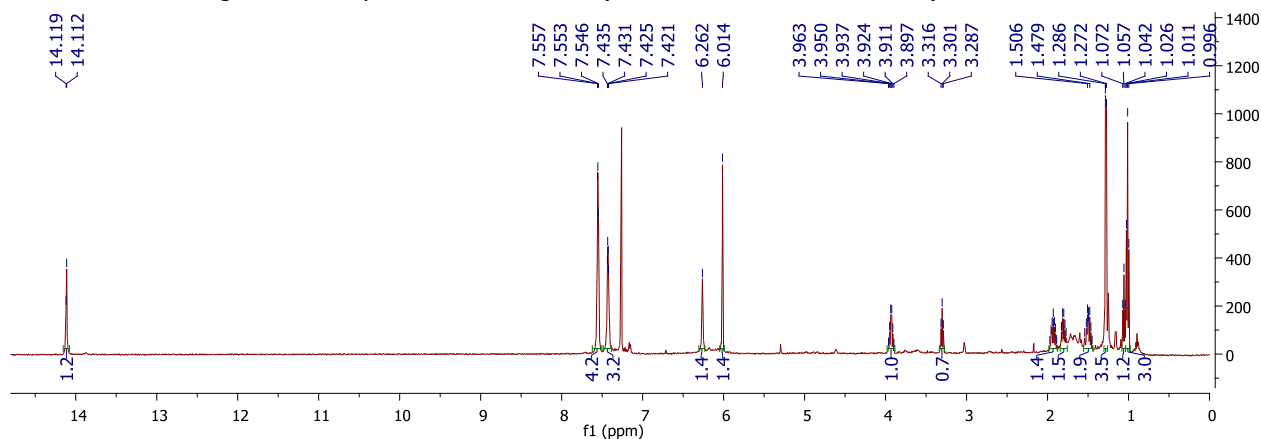
COSY du composé **100** (500 MHz, CDCl_3)



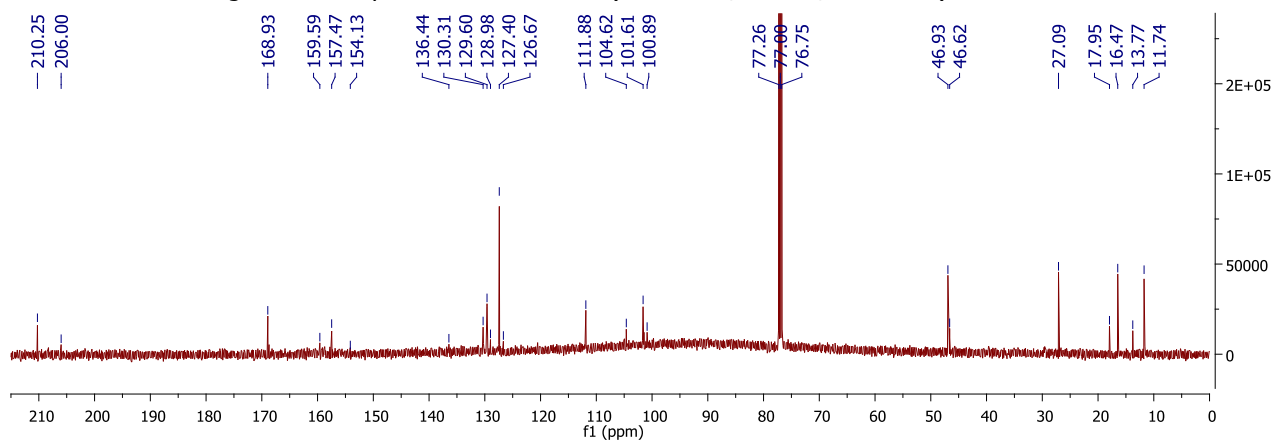
HMQC du composé **100** (500 MHz, CDCl₃)HMBC NMR du composé **100** (500 MHz, CDCl₃)

Annexe 13. Spectres de RMN du mélange mammea A/OB (101) / mammea A/OC (102)

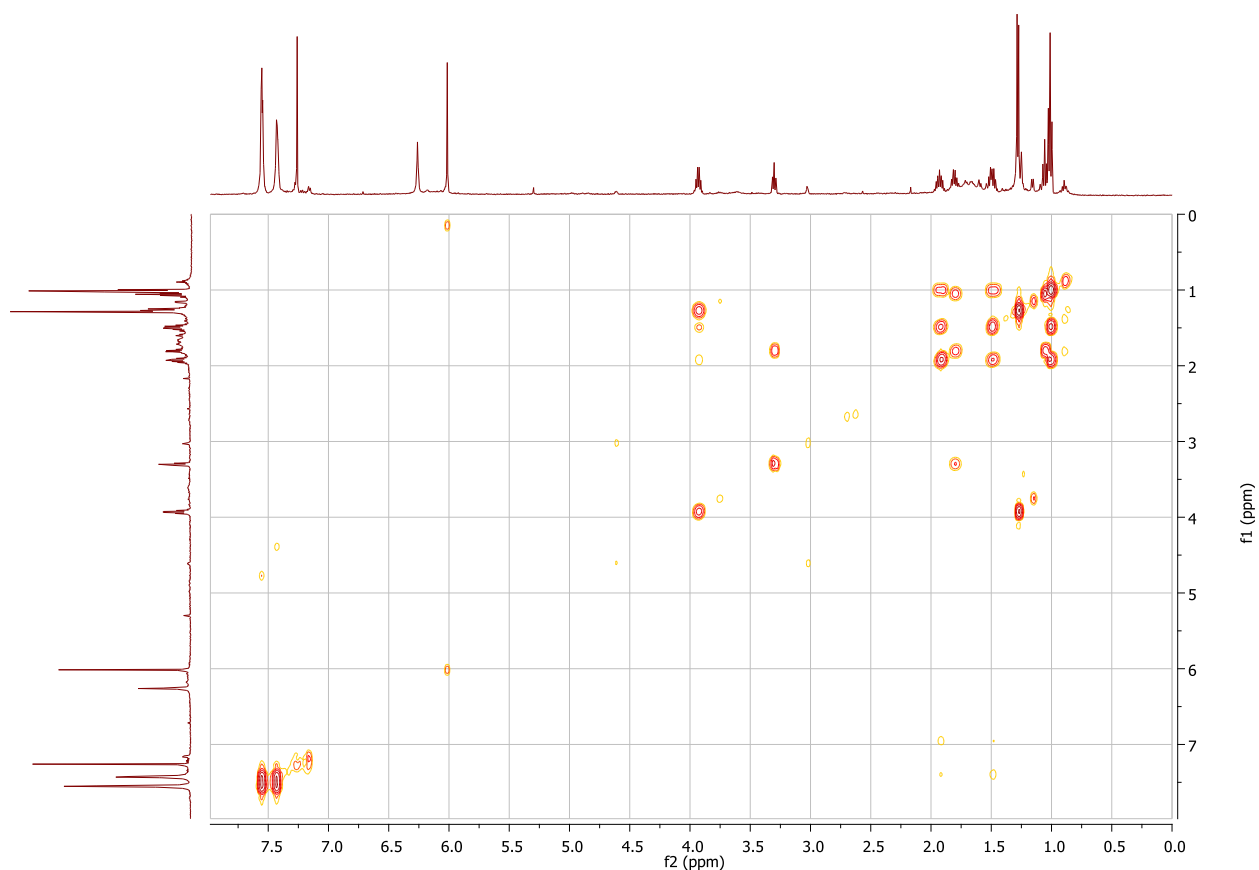
RMN ^1H du mélange des composés **101** et **102** (500 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



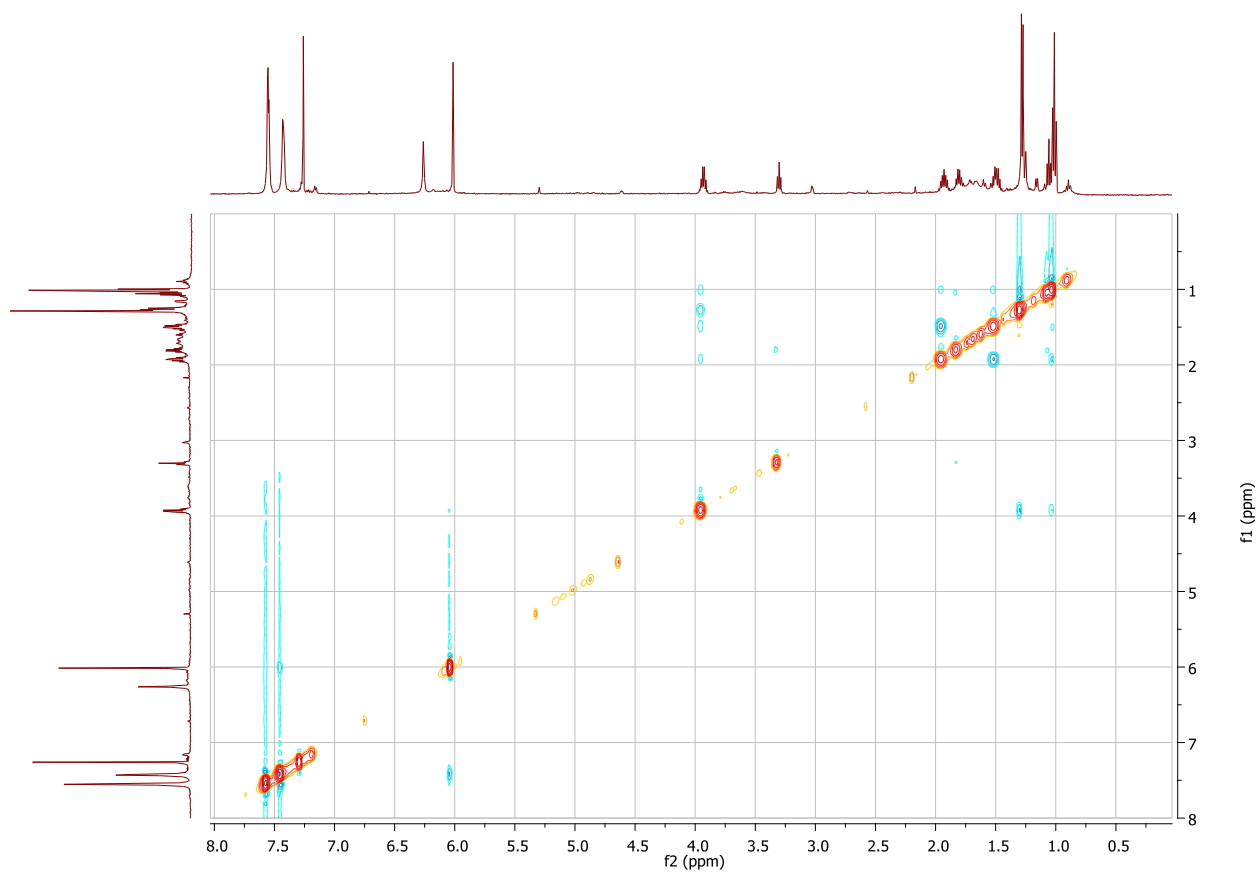
RMN ^{13}C du mélange des composés **101** et **102** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

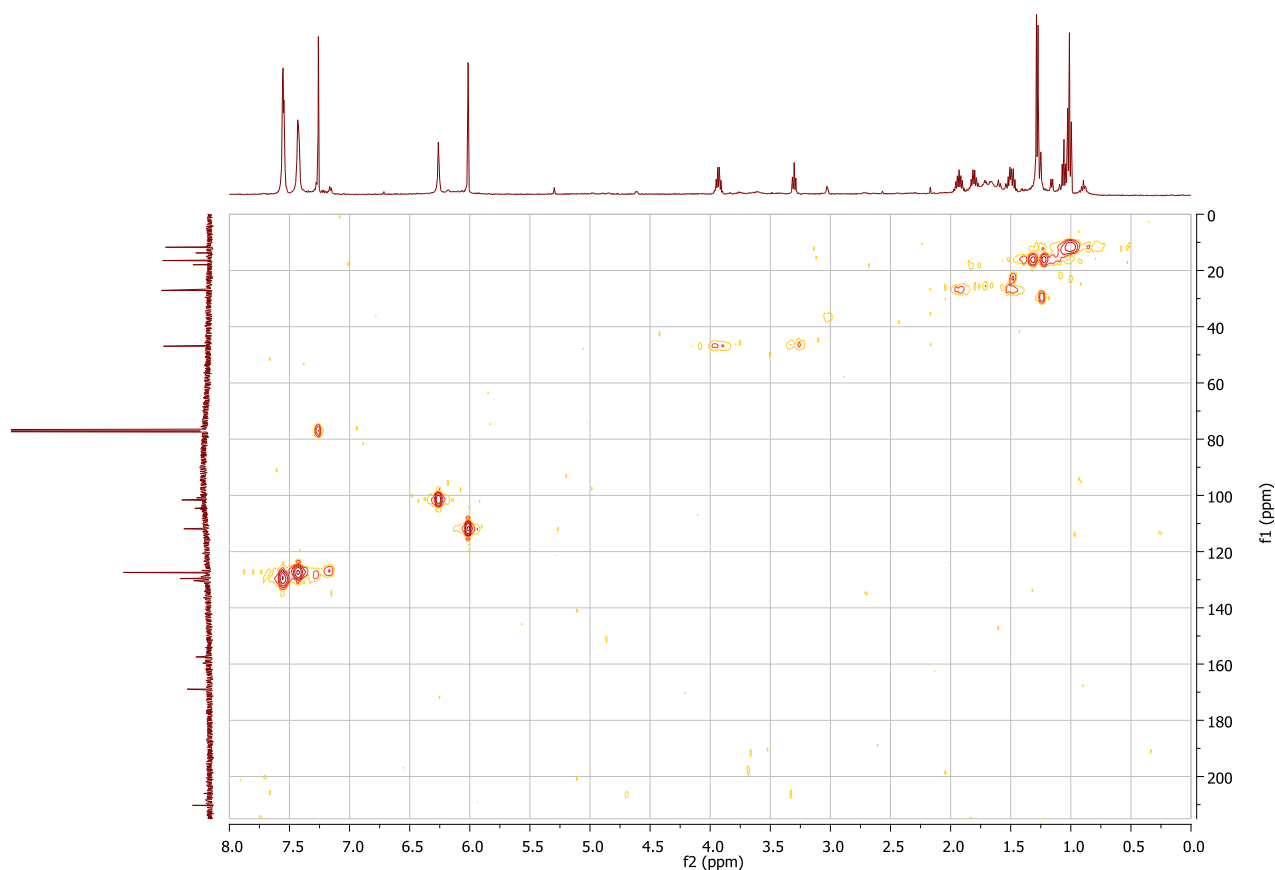
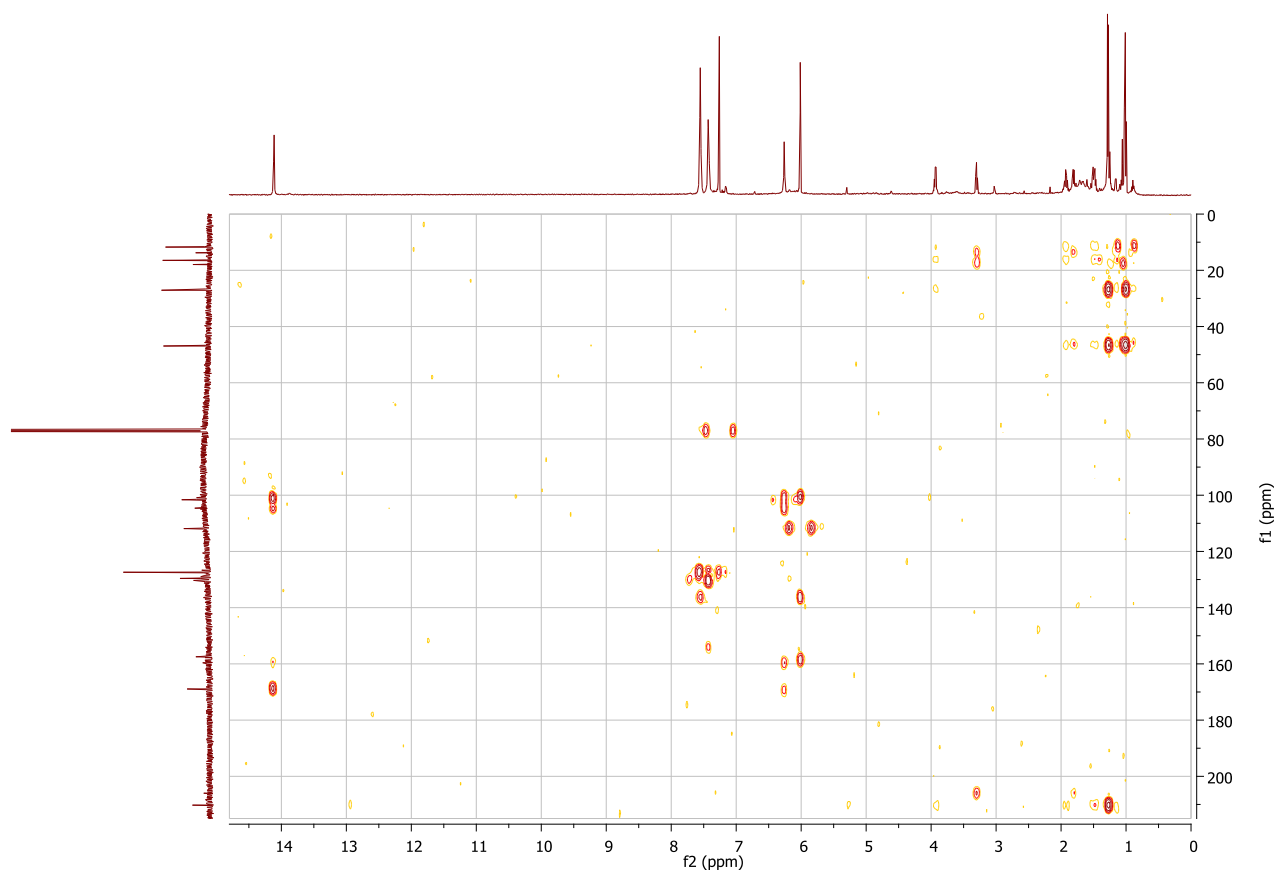


COSY du mélange des composés **101** et **102** (500 MHz, CDCl₃)



NOESY du mélange des composés **101** et **102** (500 MHz, CDCl₃)



HMOC du mélange des composés **101** et **102** (500 MHz, CDCl₃)HMBC du mélange des composés **101** et **102** (500 MHz, CDCl₃)

Annexe 14. Extraction des fruits de *Mesua lepidota* par divers solvants « verts »

❖ Extraction par des solvants eutectiques

➤ Définition et propriétés des solvants eutectiques

Les DES (*deep eutectic solvents*) sont des liquides composés d'un mélange de sels et/ou de produits organiques, et qui ont un point de fusion beaucoup plus faible que leurs composants pris individuellement^a. Les solvants eutectiques profonds naturels (*natural DES* ou NaDES), présents dans les plantes, sont des solvants « verts » qui constituent une bonne alternative aux solvants classiquement utilisés en chimie d'extraction. Des NaDES peuvent par exemple être formés par mélange de chlorure de choline et d'acides carboxyliques^b, et leur utilisation comme solvant d'extraction permet d'extraire diverses familles chimiques de métabolites secondaires en fonction de leur polarité^{cd}. Un autre avantage des solvants eutectiques est leur usage possible dans les tests biologiques, pour solubiliser les composés évalués.

➤ Préparation des solvants eutectiques profonds naturels (NaDES)

Le tableau ci-dessous indique la composition des 2 NaDES qui ont été préparés. Le DES1, qui contient du 1,2-propanediol, a été choisi en vue de remplacer le méthanol. Le DES2 a quant à lui été préparé avec de l'acide phénylpropionique, afin de favoriser les interactions de type π -stacking (entre aromatiques) pour l'extraction des composés phénoliques d'intérêt retrouvés dans l'extrait DCM^c.

La méthode par évaporation décrite par Dai *et al.*^d a été utilisée pour la préparation des NaDES. Ainsi, les 2 composants ont été dissous dans l'eau, puis une partie de l'eau a été évaporée à l'évaporateur rotatif à 50 °C jusqu'à l'obtention d'un liquide visqueux. Les solvants obtenus ont enfin été placés au dessiccateur jusqu'à ce qu'ils atteignent un poids constant.

Composition des 2 solvants eutectiques préparés

Nom	Composant A	Composant B	Ratio molaire (A:B)
DES1	Chlorure de choline	1,2-Propanediol	1:2
DES2	Chlorure de choline	Acide phénylpropionique	1:2

^a Choi, Y. H.; van Spronsen, J.; Dai, Y.; Verberne, M.; Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R., Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology* **2011**, 156, 1701-1705.

^b Abbott, A. P.; Boothby, D.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K., Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 9142-9147.

^c Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H., Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents. *Journal of Natural Products* **2013**, 76, 2162-2173.

^d Dai, Y.; Witkamp, G.-J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H., Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 6272-6278

➤ Extraction des fruits de *Mesua lepidota*

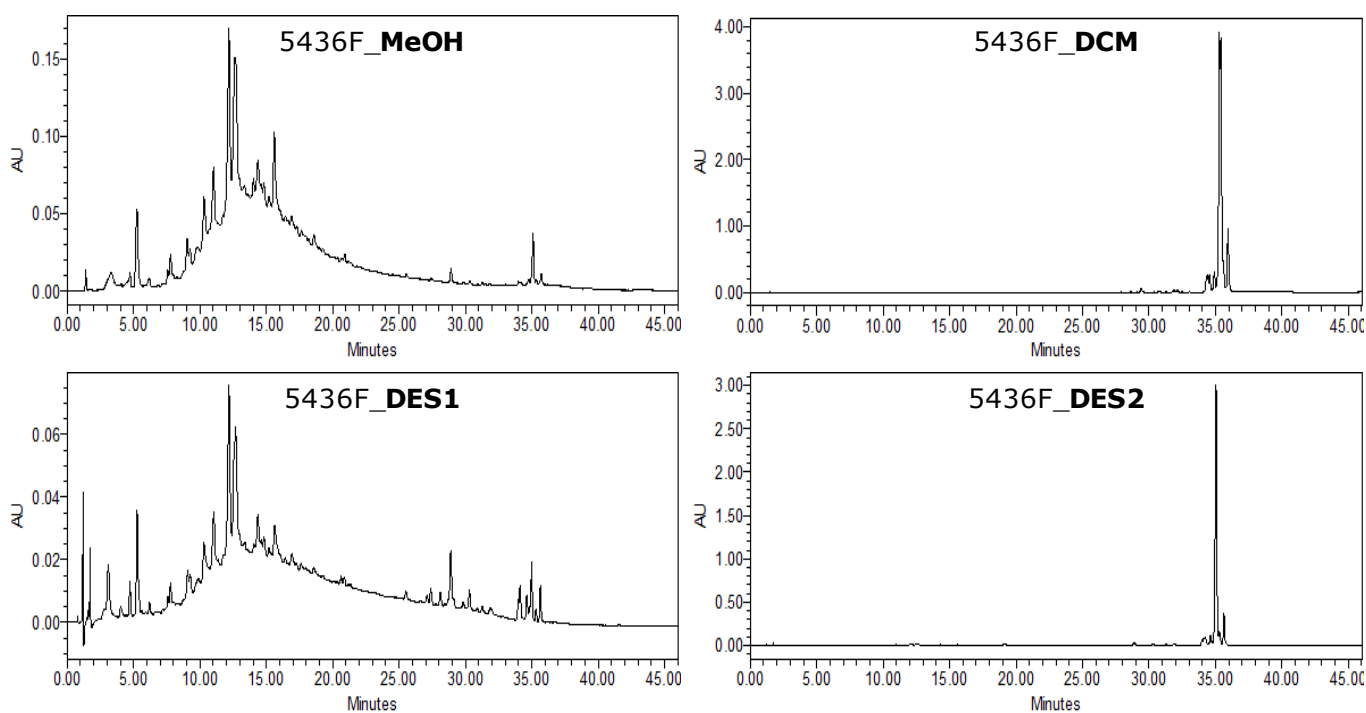
• Méthodologie employée

100 mg de fruits séchés ont été mis en contact avec 1,5 mL de NaDES dans un erlen de 10 mL, sous agitation et chauffage à 40 °C, pendant 1 heure. La même procédure a été suivie en utilisant du MeOH et du DCM, en prenant soin de rajouter régulièrement du solvant pour garder un volume constant. Les extraits obtenus ont ensuite été centrifugés et filtrés sur une membrane de 0,45 µm.

L'extrait DES1 a été dilué avec le même volume d'eau milliQ, tandis que l'extrait DES2, non miscible à l'eau, a été dilué dans un mélange eau/éthanol 70/30. Ces solutions, ainsi que les extraits DCM et MeOH nouvellement obtenus, ont été analysés par HPLC analytique, sur un appareil Waters 2695 couplé à un détecteur à barrette de diodes Waters 2996, sur une colonne Lichrospher® 100 RP18 (150 × 4,6 mm, 5 µm, Merck).

En raison de leur stabilité à température ambiante, les solvants eutectiques sont très difficilement évaporables, c'est pourquoi nous avons choisi de les éliminer des extraits à l'aide de chromatographies flash en phase inverse (colonne Grace Reveleris® C18 RP, 4 g/5 mL ; débit 12 mL/min), en utilisant l'eau et l'éthanol comme éluants pour conserver l'usage de solvants « verts ». Le DES1 a été éliminé après passage de 10 volumes de colonne (C_v) d'eau, puis les molécules extraites ont été récupérées par élution avec un mélange eau/éthanol 50/50 (7 C_v) suivi de 100% d'éthanol jusqu'à élution de tous les produits. Le DES2, plus apolaire, a été évacué par le mélange eau/éthanol 50/50 pendant 10 C_v , et les composés extraits ont été élués avec 100% d'éthanol.

• Profils chromatographiques des extraits et rendements d'extraction



Profils HPLC-UV (280 nm, méthode 1) des 4 extraits de fruits de *M. lepidota*

Comme attendu, on constate une similarité des profils chromatographiques entre les extraits MeOH et DES1 d'une part, et DCM et DES2 d'autre part.

Rendements d'extraction des fruits de *M. lepidota* par les 4 solvants

	Solvant d'extraction	Rendement d'extraction
Solvants polaires	MeOH	24,0 %
	DES1 (chlorure de choline + 1,2-propanediol)	6,5 %
Solvants apolaires	DCM	19,0 %
	DES2 (chlorure de choline + acide phénylpropionique)	12,5 %

Les rendements d'extraction sont donc meilleurs avec le MeOH et le DCM. Cependant, ils restent assez élevés avec les solvants eutectiques, qui constituent donc une alternative intéressante aux solvants organiques plus polluants pour extraire certains composés naturels d'intérêt tels que les phénylcoumarines.

❖ Extraction par l'eau subcritique

➤ Définition et propriétés de l'eau subcritique

L'eau est à l'état subcritique lorsqu'elle est chauffée à une température maximale égale à celle de son point critique (374 °C), avec une pression suffisante pour maintenir son état liquide. Dans cet état, sa constante diélectrique diminue, ce qui lui confère la propriété de solubiliser des composés hydrophobes^a. L'extraction par l'eau subcritique est donc un procédé à la fois écologique et économique donnant accès à certains composés apolaires.

➤ Extraction des fruits de *Mesua lepidota*

• Méthodologie employée

1,8 g de poudre de fruits séchés de *Mesua lepidota* ont été introduits dans une cartouche de 40 mL, en mélange avec le même volume de terre de diatomée. L'extraction a été effectuée sur un extracteur Büchi® E-914 selon 2 cycles de 10 min à 100 °C et 50 bar.

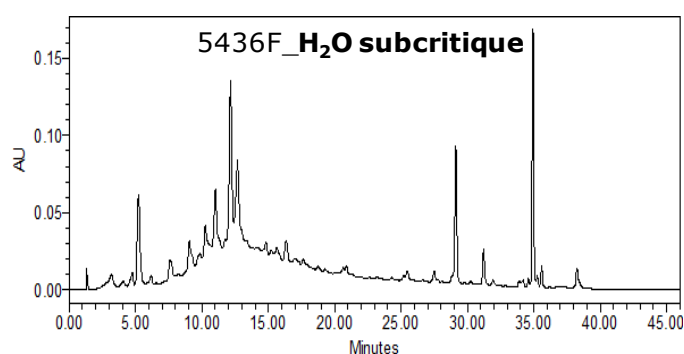
L'extrait obtenu a été analysé par HPLC analytique avec la même méthode que celle décrite pour les extraits DES.

• Profil chromatographique de l'extrait et rendement d'extraction

L'extrait par l'eau subcritique a été obtenu avec un rendement d'extraction assez élevé, de 21,4 %. Pour rappel, le rendement était respectivement de 33,5 % et 11,0 % pour les extraits DCM et MeOH obtenus par extraction sous pression.

^a Miller, D. J.; Hawthorne, S. B., Solubility of liquid organic flavor and fragrance compounds in subcritical (hot/liquid) water from 298 K to 473 K. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2000**, 45, 315-318.

Le profil chromatographique de l'extrait, présenté ci-dessous, est intermédiaire à ceux obtenus avec le MeOH et avec le DCM, puisqu'on y retrouve à la fois des composés polaires comme les tanins, et des produits apolaires tels que le lépidotol A (**94**, t_R 35 min).

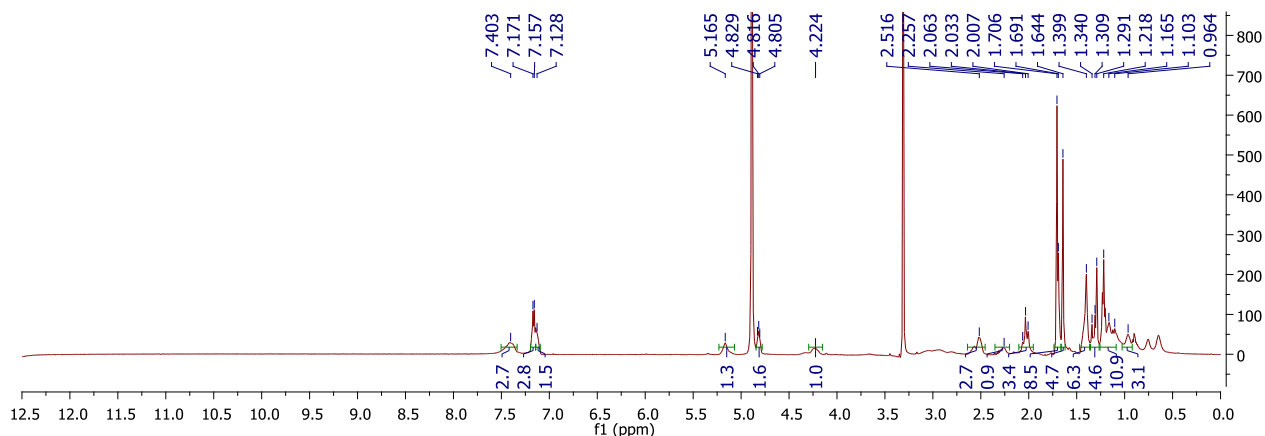


Profil HPLC-UV (280 nm, méthode 1) de l'extrait de fruits de *M. lepidota* obtenu par l'eau subcritique

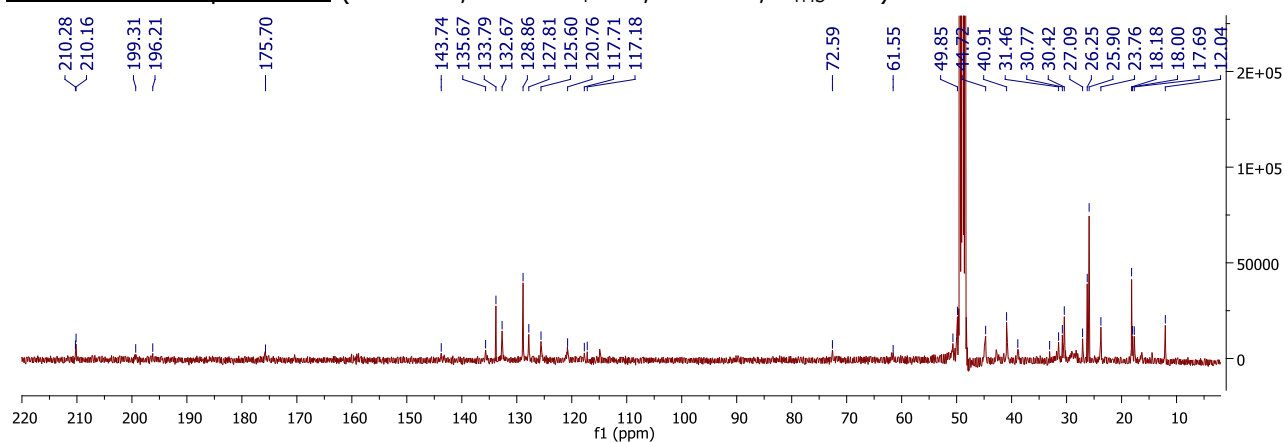
En conclusion, cette étude montre que des solvants « verts » peuvent être employés pour l'extraction de métabolites d'intérêt. Des solvants eutectiques spécifiques permettent d'extraire soit une majorité de composés polaires comme dans le cas du MeOH, soit uniquement des métabolites apolaires comme dans le cas du DCM. Concernant les fruits de *M. lepidota*, le rendement d'extraction reste cependant meilleur avec les solvants organiques classiquement utilisés (DCM et MeOH). L'essai d'extraction par l'eau subcritique a montré une moindre sélectivité d'extraction des composés en fonction de leur polarité. Cette technique est donc moins adaptée pour extraire en priorité les métabolites d'intérêt des fruits de *Mesua lepidota*, qui sont des composés apolaires.

Annexe 15. Spectres de RMN de la tétraptérone (105)

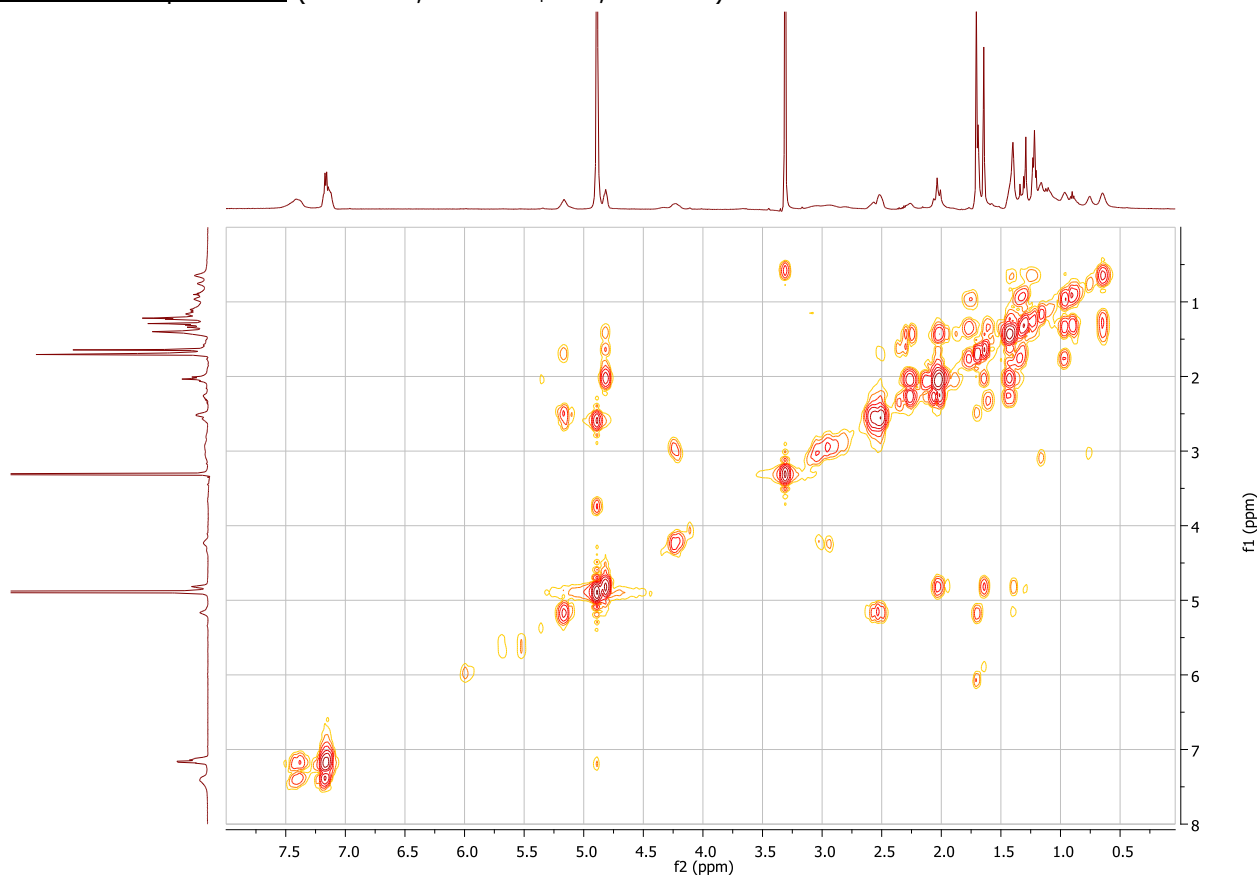
RMN ^1H du composé **105** (500 MHz, MeOH- d_4 + 0,1 % TFA, $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

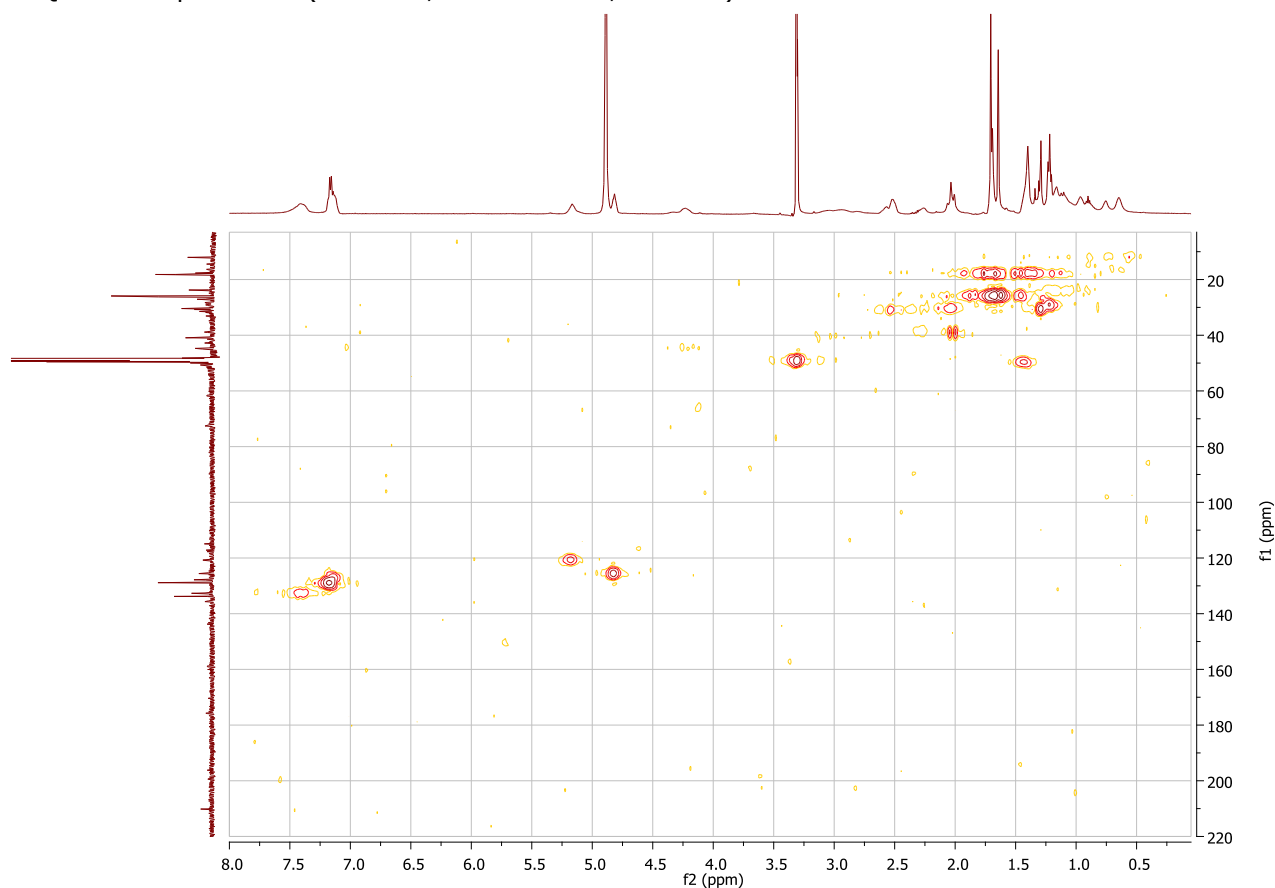
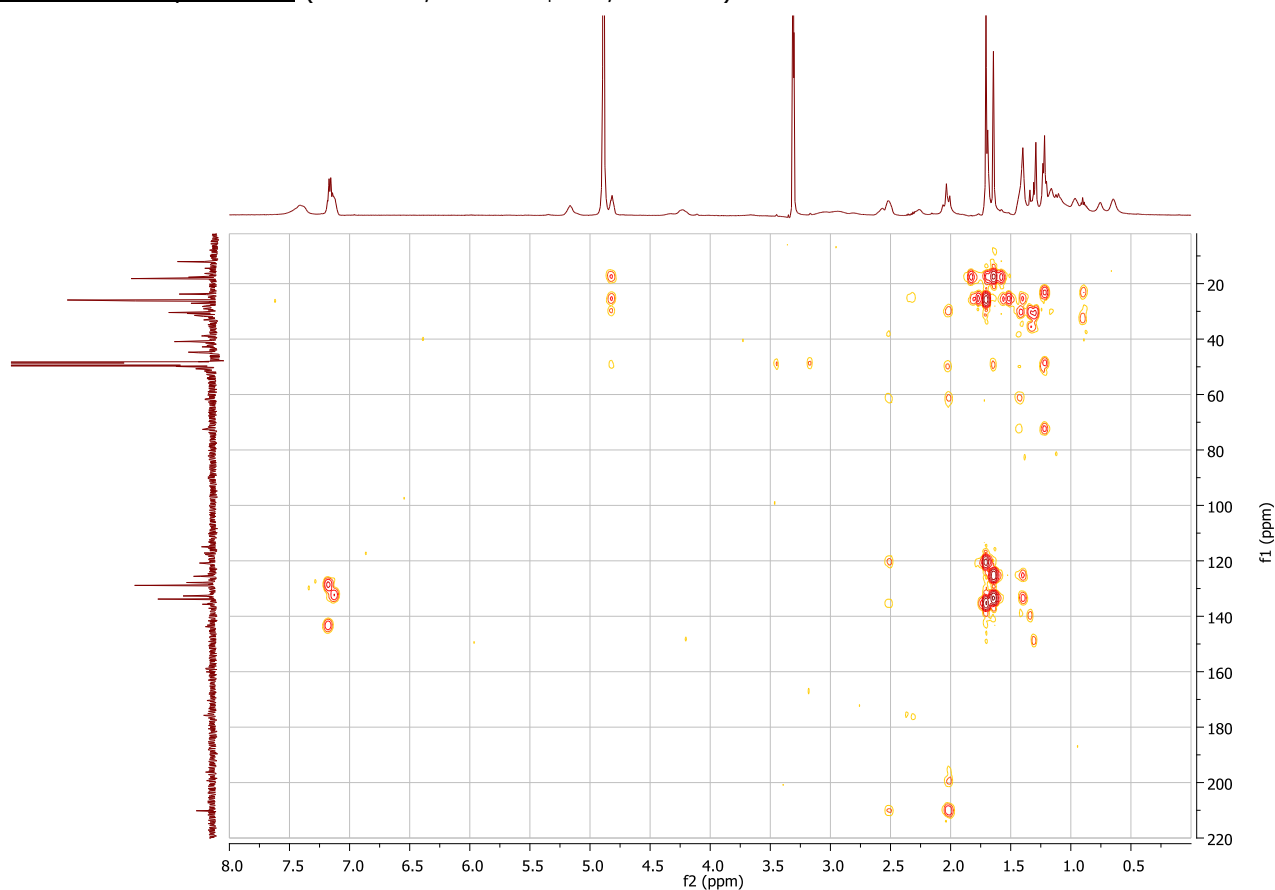


RMN ^{13}C du composé **105** (125 MHz, MeOH- d_4 + 0,1 % TFA, $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



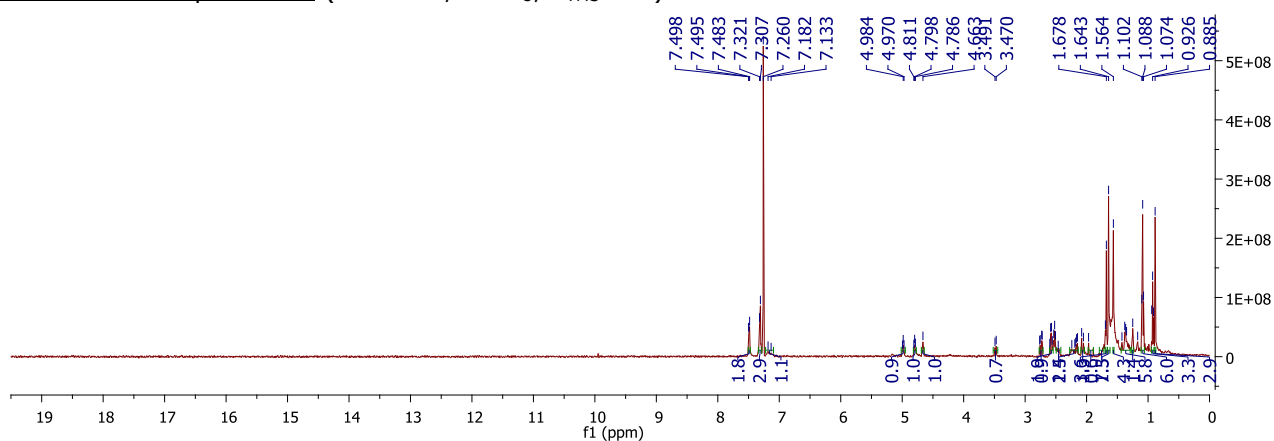
COSY du composé **105** (500 MHz, MeOH- d_4 + 0,1 % TFA)



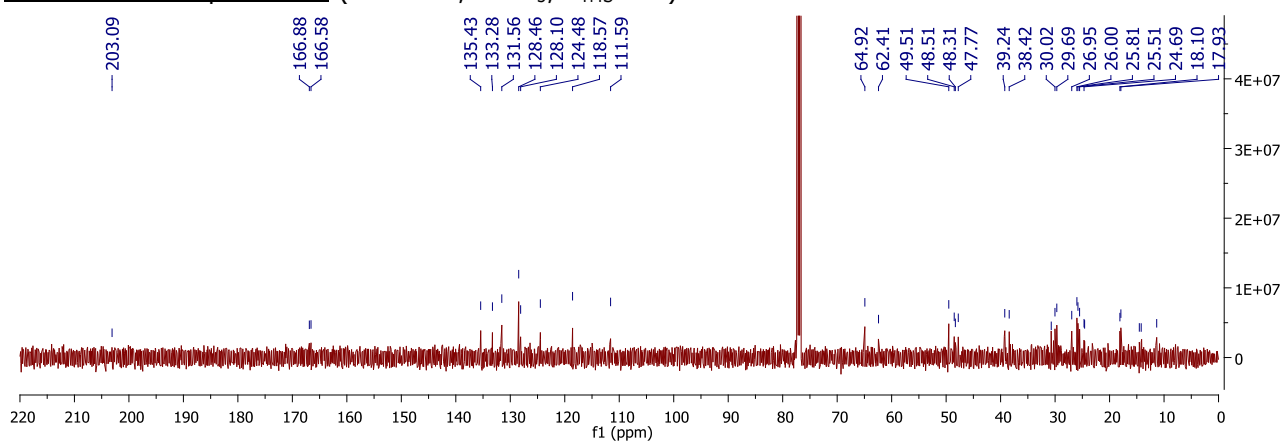
HMQC du composé **105** (500 MHz, MeOH-d₄ + 0,1 % TFA)HMBC du composé **105** (500 MHz, MeOH-d₄ + 0,1 % TFA)

Annexe 16. Spectres de RMN de la tétraptérine (106)

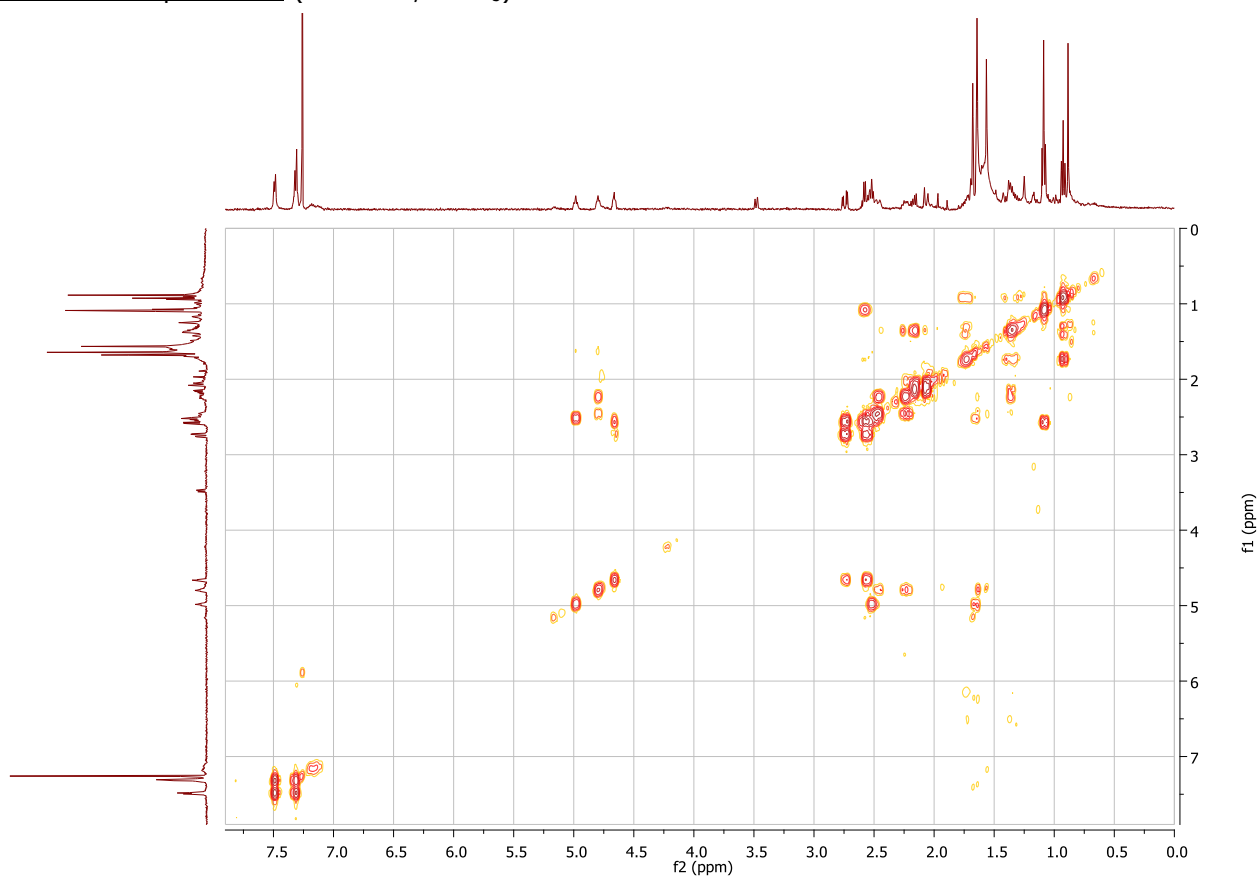
RMN ^1H du composé **106** (500 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

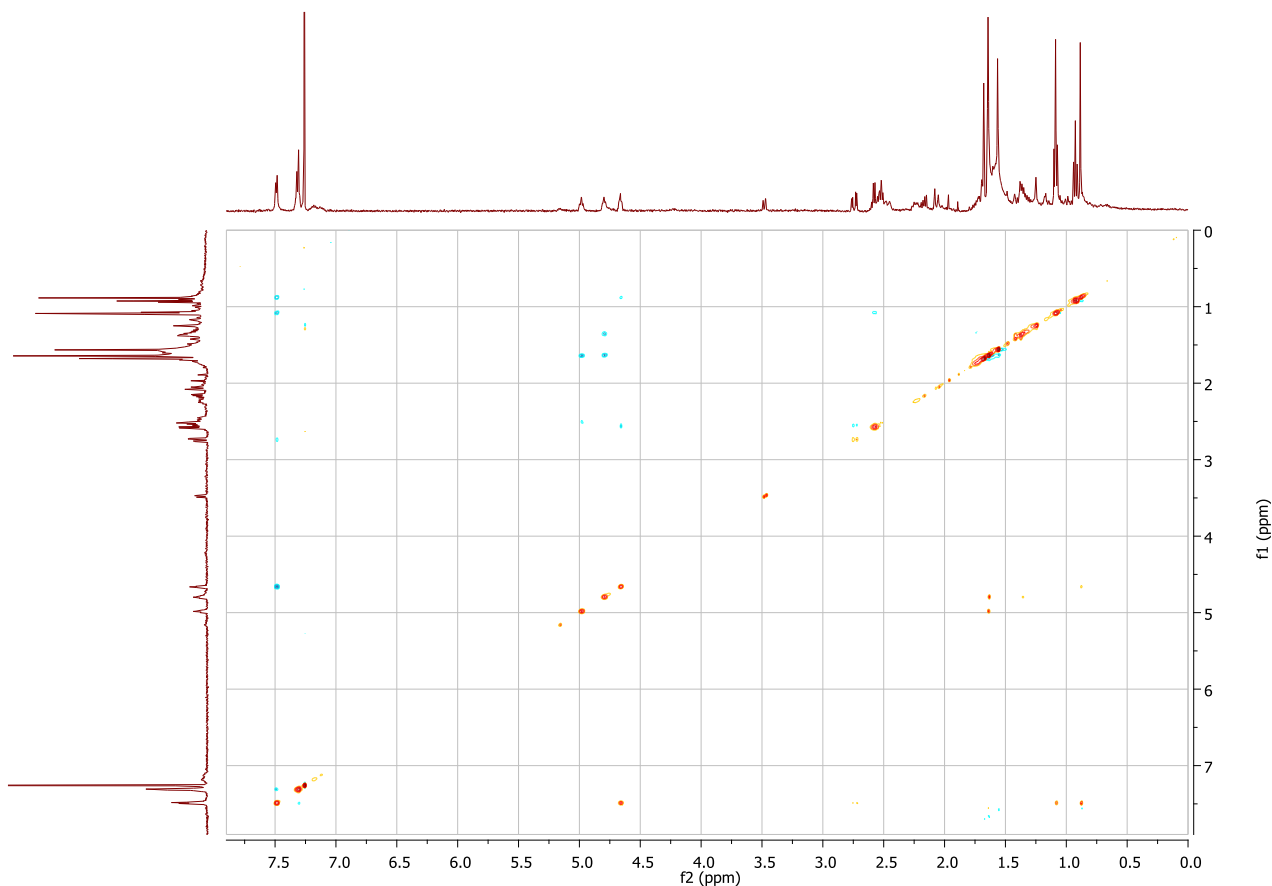
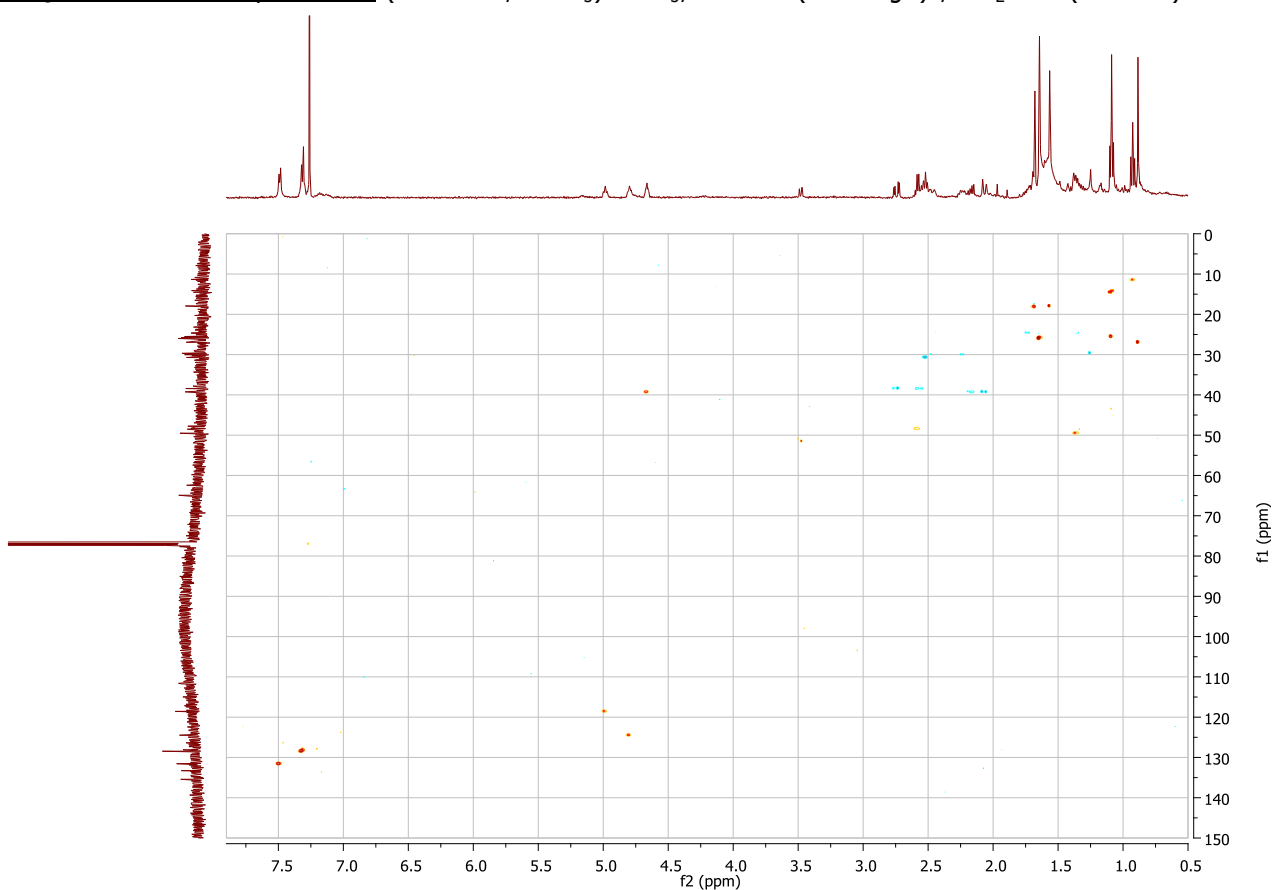


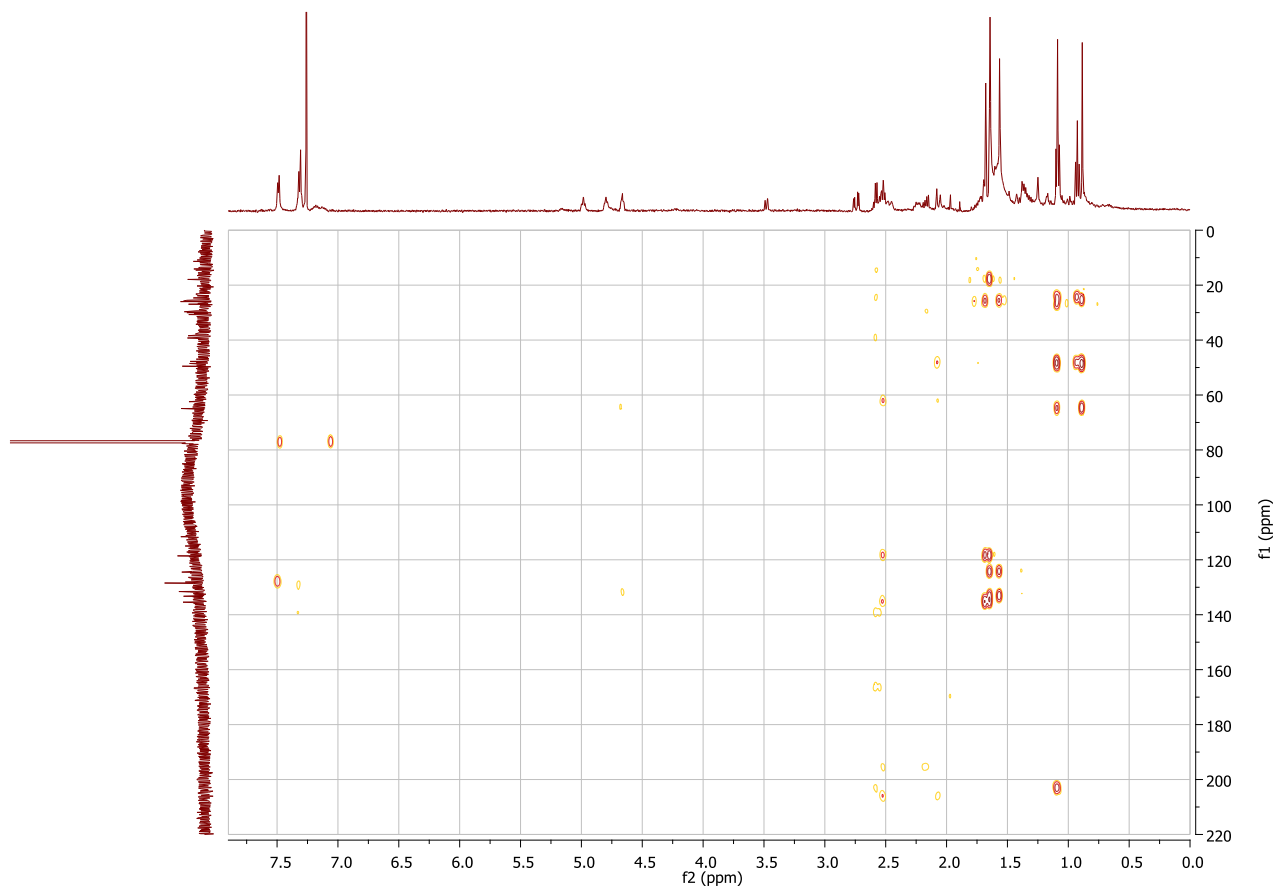
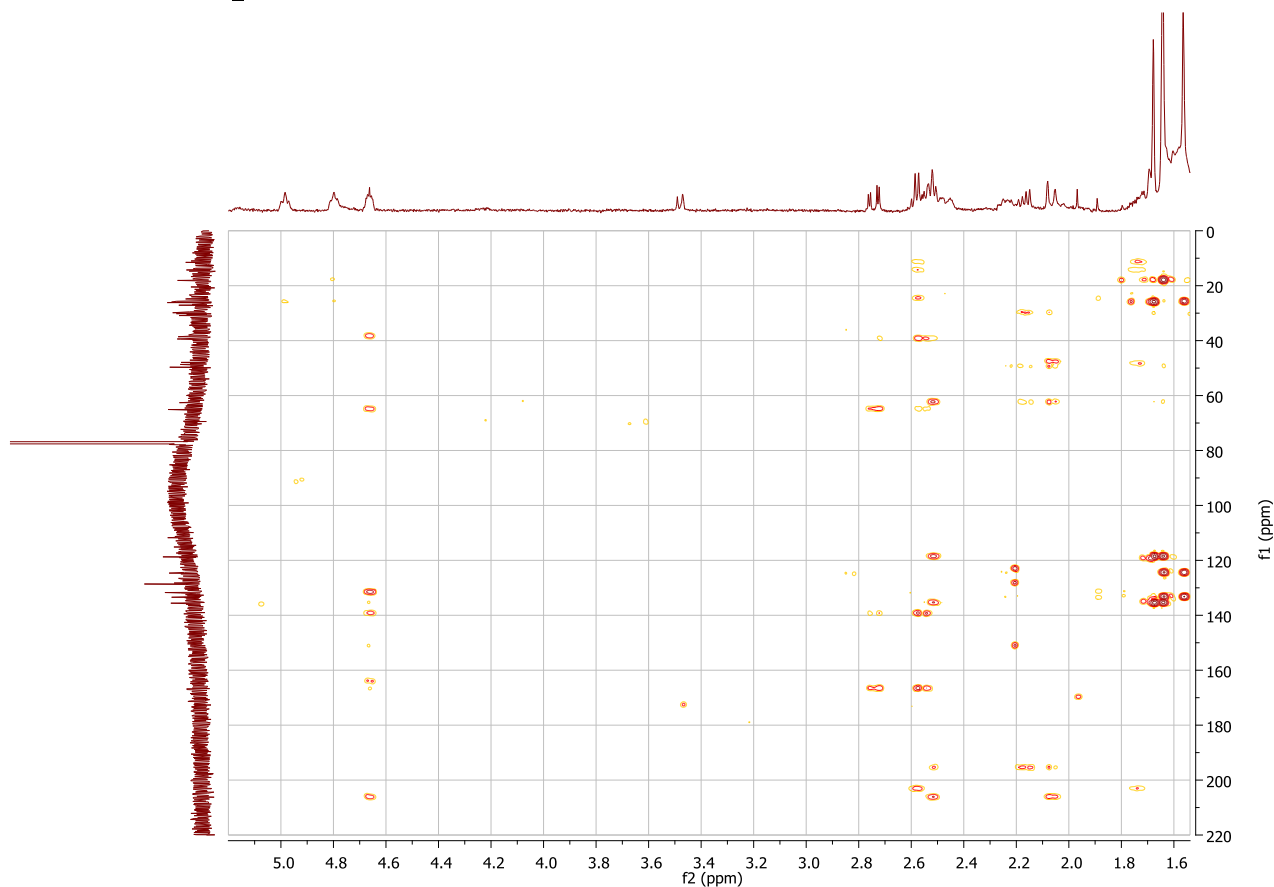
RMN ^{13}C du composé **106** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)



COSY du composé **106** (500 MHz, CDCl_3)

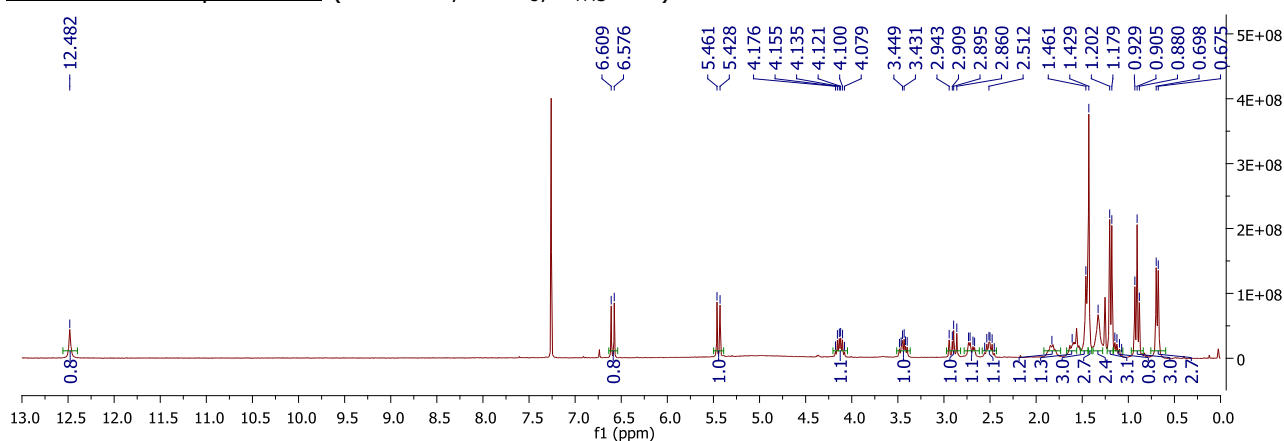


NOESY du composé **106** (500 MHz, CDCl₃)HSQC éditée du composé **106** (500 MHz, CDCl₃) : CH₃, CH > 0 (en rouge) ; CH₂ < 0 (en bleu)

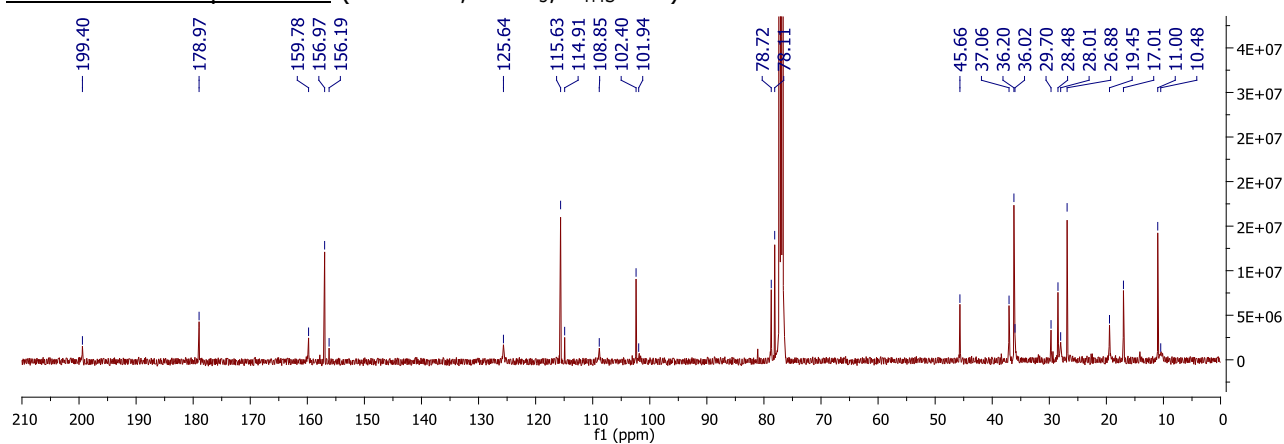
HMBC du composé **106** (500 MHz, CDCl₃)HMBC (zoom sur δ_H 1,5-5,2 ppm) du composé **106** (500 MHz, CDCl₃)

Annexe 17. Spectres de RMN de l'acide tétraptérique (**115**)

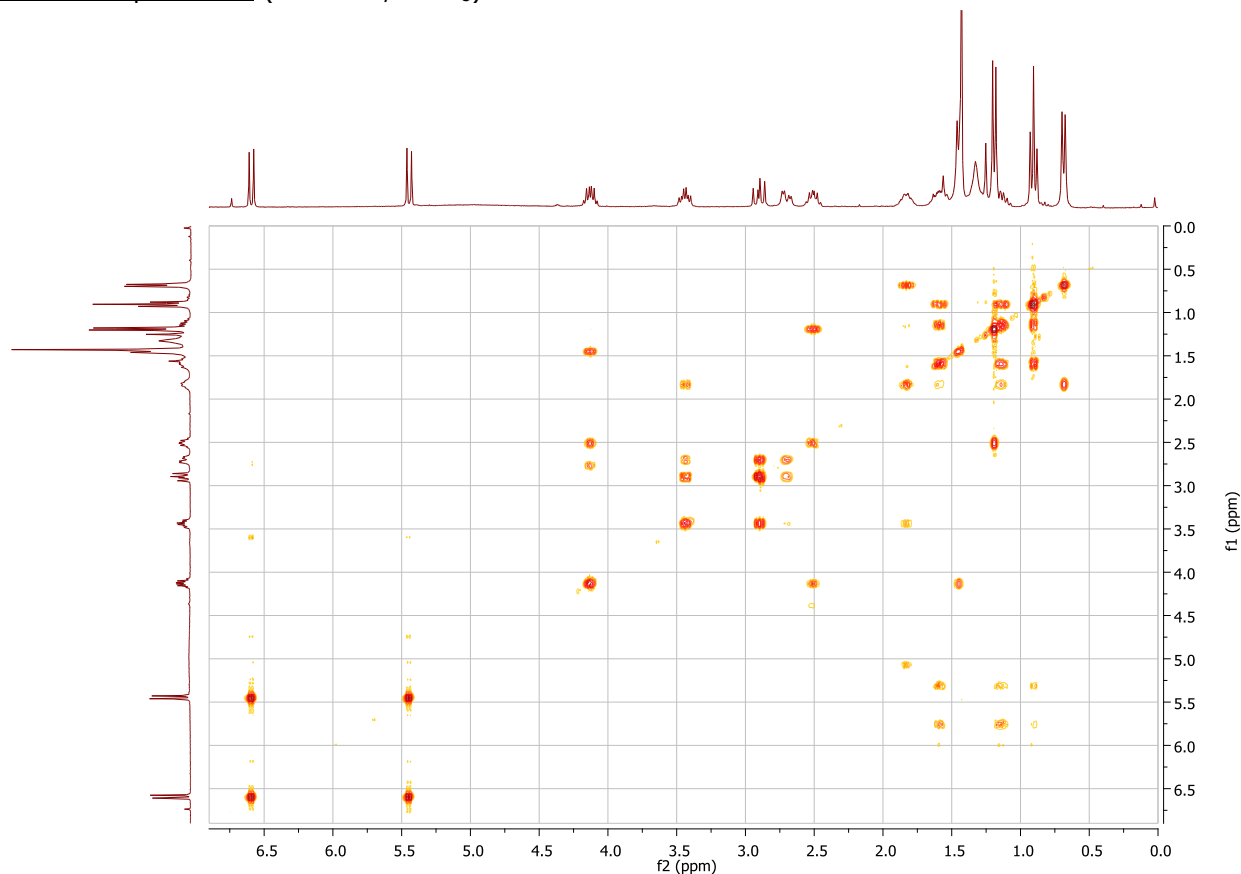
RMN ^1H du composé **115** (300 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

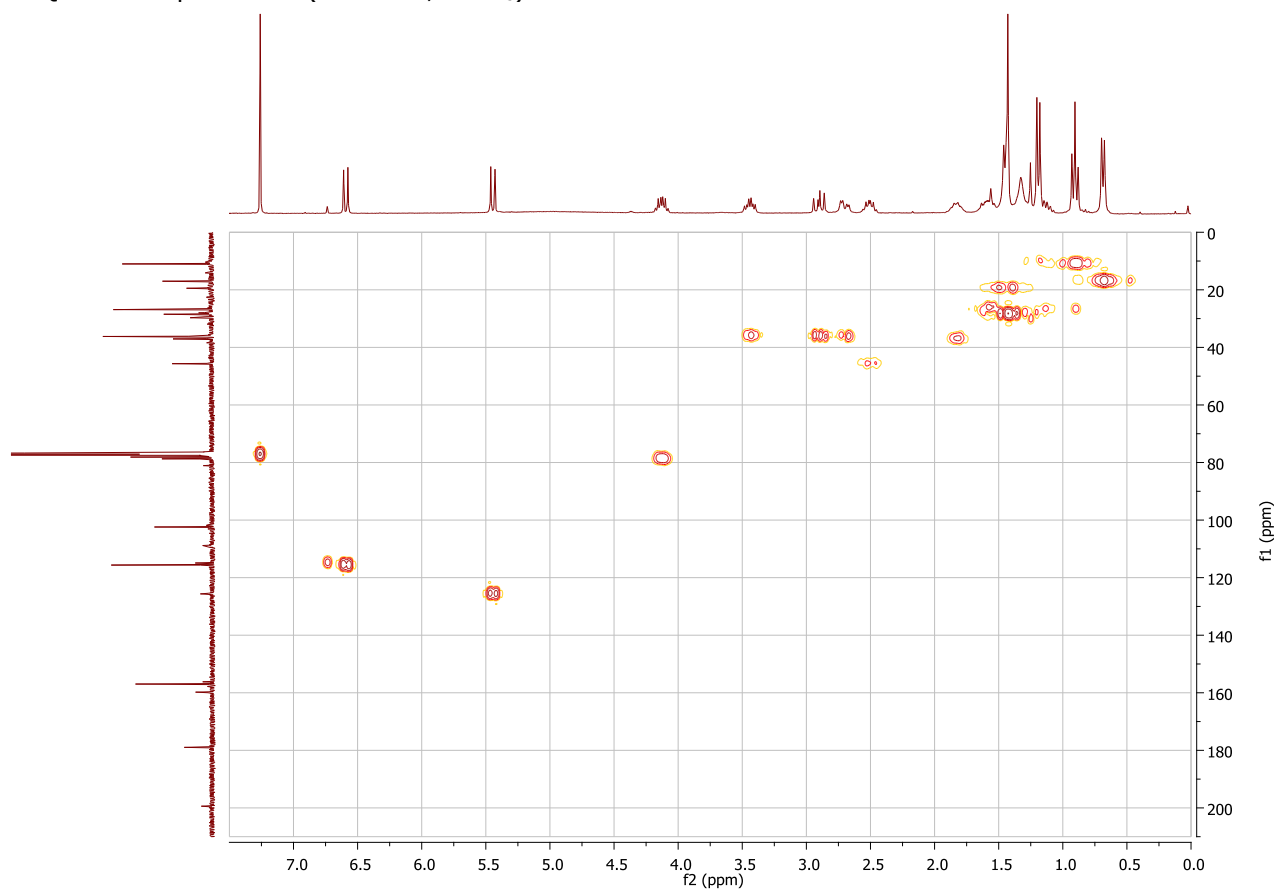
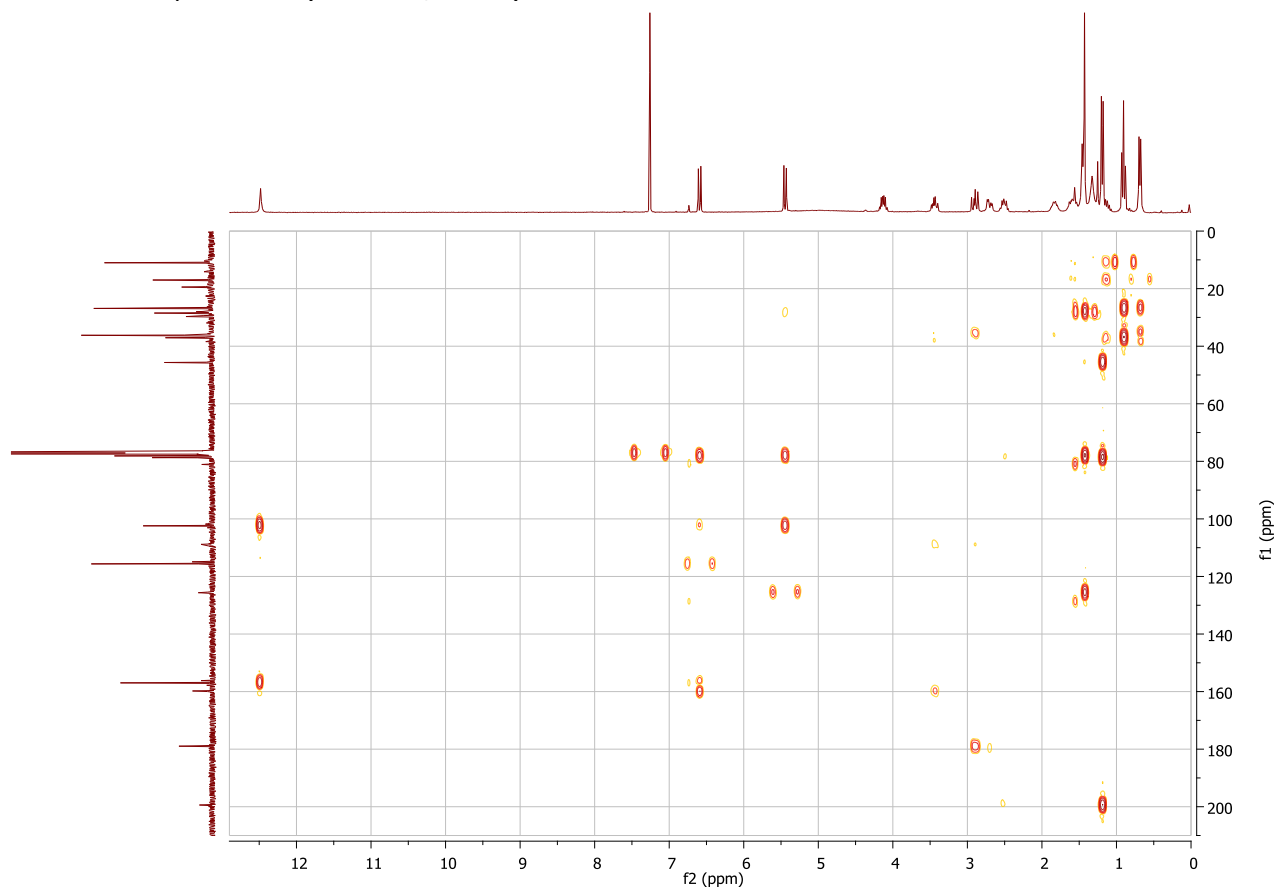


RMN ^{13}C du composé **115** (125 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{TMS}} = 0$)

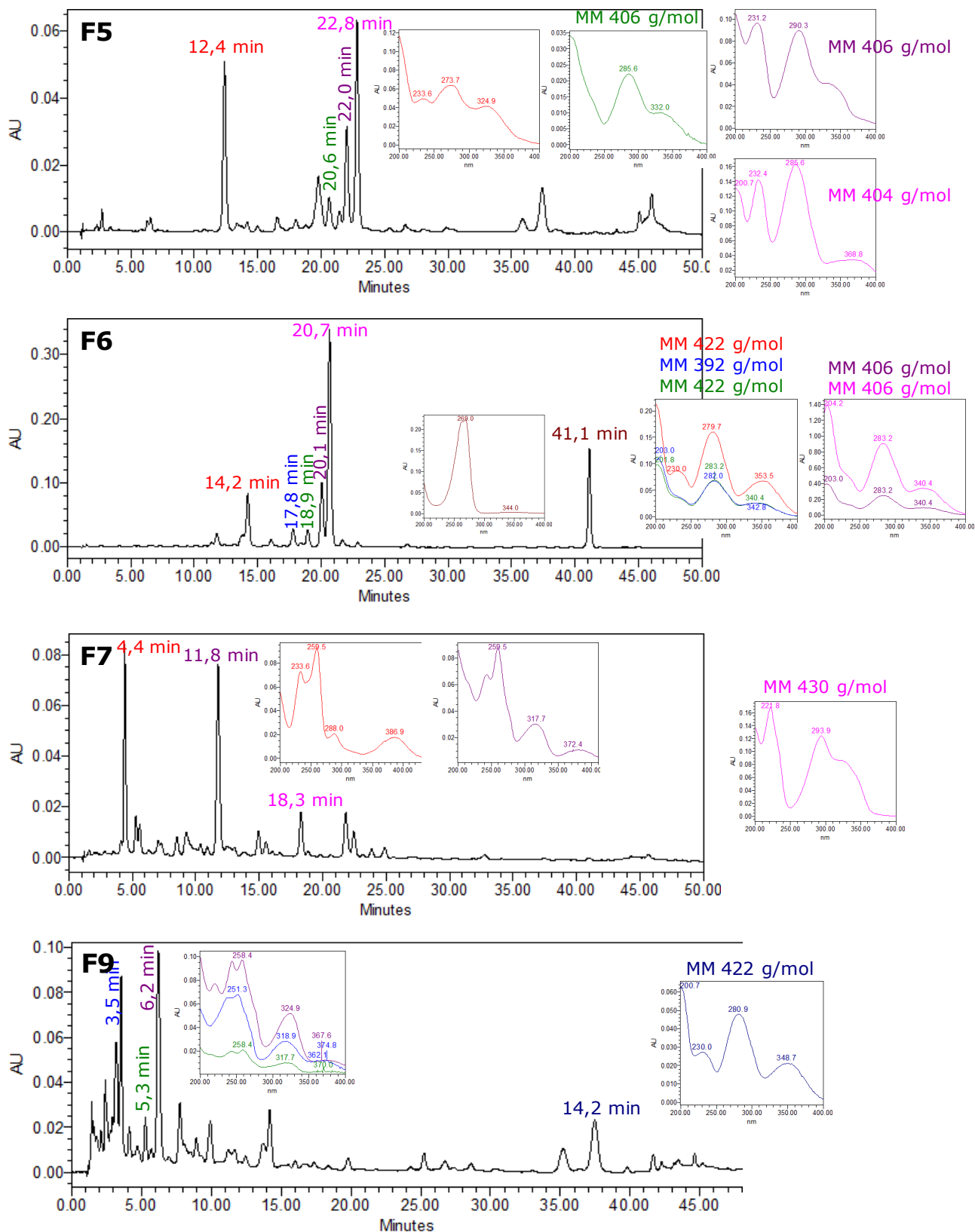


COSY du composé **115** (500 MHz, CDCl_3)



HMQC du composé **115** (500 MHz, CDCl₃)HMBC du composé **115** (500 MHz, CDCl₃)

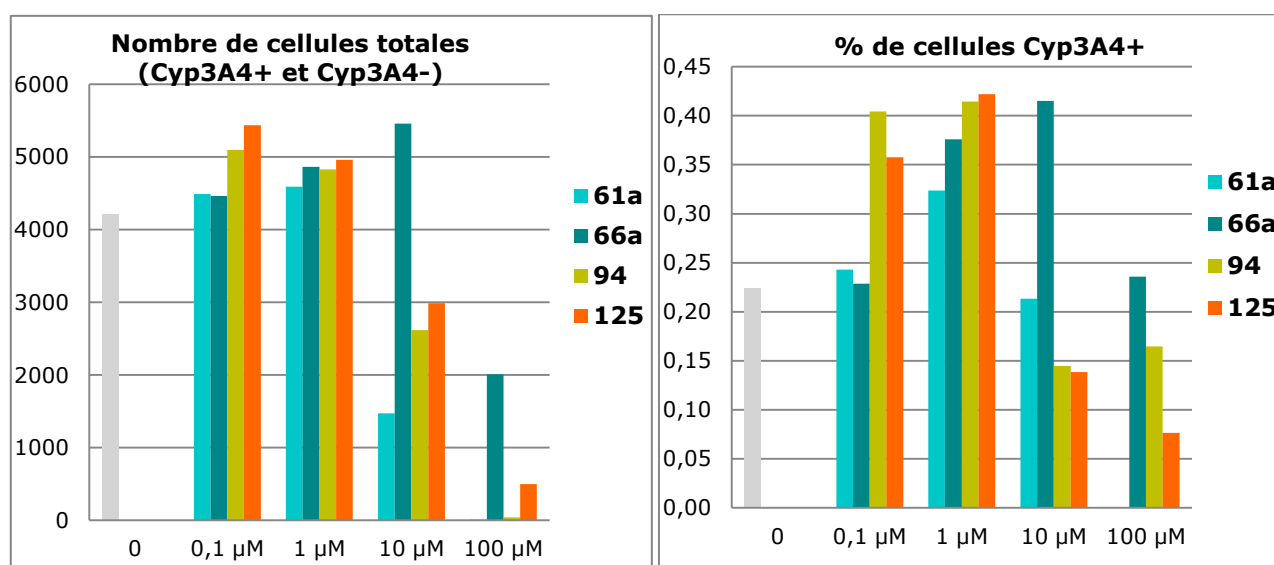
Annexe 18. Chromatogrammes HPLC-UV (méthode 12, 254 nm) des fractions F5, F6, F7 et F9 de l'extrait 5442L_DCM (*Mesua assamica*)



Annexe 19. Evaluation de l'hépatotoxicité de quatre polyphénols prénylés d'intérêt

L'effet de mammea A/AA (**61a**), de mammea A/AA cyclo F (**66a**), du lépidotol A (**94**) et de la guttiférone J (**125**) sur l'intégrité hépatocytaire et sur l'expression du cytochrome P450 3A4 a été mesuré par la plateforme ImPACcell (Imagerie Pour Analyse du Contenu cellulaire) de Rennes (responsable : Dr. Rémy Le Guével).

L'ensemble de ces composés a été testé aux concentrations de 0,1, 1, 10 et 100 μM sur des cellules HepaRG. Ces cellules hépatiques ont été exposées aux polyphénols pendant 48 heures, et chaque condition a été répétée deux fois.



Le premier graphique montre le nombre moyen de cellules vivantes à la fin de chaque traitement. Il révèle que la coumarine cyclisée (**66a**) est hépatotoxique à 100 μM seulement, tandis que les trois autres polyphénols le sont dès 10 μM . Mammea A/AA (**61a**) apparaît comme la plus toxique de ces trois molécules, entraînant la mort du tiers des cellules à 10 μM . Cette toxicité pourrait être due à l'action directe des composés ou à l'action de métabolites hépatiques des produits initiaux.

Le comptage des cellules exprimant la CYP3A4 hépato spécifique (2^{ème} graphique ci-dessus) indique que l'ensemble des molécules induit l'expression de cette enzyme à 1 μM . La coumarine **94** et la benzophénone **125** l'induisent dès 0,1 μM . A 10 μM , seul mammea A/AA cyclo F (**66a**) conserve cette activité inductrice de l'enzyme.

Ainsi, l'effet toxique exercé sur les cellules hépatiques HepaRG est similaire à celui observé sur les cellules endothéliales HUVECs aux concentrations de 1, 10 et 100 μM .

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Caroline Rouger**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **30 / 09 / 2015**



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

RÉSUMÉ

Afin d'identifier de nouveaux composés prévenant la dysfonction et l'immunogénicité des cellules endothéliales qui sont impliquées dans la survenue des rejets de greffe, nous nous sommes intéressés aux métabolites secondaires de différentes espèces de *Clusiaceae* et de *Calophyllaceae*. Tout d'abord, 4 extraits DCM de *Calophyllaceae* malaisiennes ont été sélectionnés sur la base d'une étude dérèplicative et d'un criblage biologique anti-inflammatoire. Puis, l'étude phytochimique de l'extrait de fruits de *Mesua lepidota* a permis d'isoler 9 coumarines de type mammea, dont 7 constituent 2 nouvelles séries : Les lépidotols et les lépidotines. L'étude des extraits de 2 lots de feuilles de *Calophyllum tetrapterum* a quant à elle conduit à l'isolement de dérivés polyphénoliques distincts : Des acylphloroglucinols polyprénylés dans le lot A, dont le composé majoritaire, la tétraptérone, est un dérivé acide original, et des pyranochromanones acides dans le lot B, dont un nouveau dérivé appelé acide tétraptérique. Le même protocole appliqué à l'extrait de feuilles de *Mesua assamica* a montré que les fractions cytotoxiques sont riches en xanthones, tandis que les fractions anti-inflammatoires renferment des coumarines de type mammea. Parallèlement à ces études phytochimiques, un panel de polyphénols représentatifs des classes chimiques retrouvées dans les *Clusiaceae* et les *Calophyllaceae* ont été évalués pour leurs effets sur divers marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité. Il apparaît ainsi que les coumarines de type mammea et la guttiférone J, une benzophénone polyprénylée, inhibent significativement l'expression de VCAM-1 ainsi que des molécules HLA de classe II, HLA-E et MICA.

mots-clés : *Calophyllaceae*, *Calophyllum*, *Mesua*, polyphénols polyprénylés, coumarines, dysfonction endothéliale, anti-inflammatoires, immunomodulateurs.

ABSTRACT

In order to identify new compounds preventing endothelial cells dysfunction and immunogenicity which are involved in the emergence of graft rejection, the secondary metabolites of different *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* species were investigated. Firstly 4 DCM extracts originating from Malaysian *Calophyllaceae* species were selected through a dereplication analysis combined with an anti-inflammatory screening. Then, the phytochemical study of the fruits extract of *Mesua lepidota* allowed us to isolate 9 mammea coumarins, among which 7 represent 2 novel series, i.e. lepidotols and lepidotins. The phytochemical study of 2 different batches of *Calophyllum tetrapterum* leaves led to the isolation of distinct polyphenolic derivatives: polyprenylated acylphloroglucinols were identified in batch A, with the major compound, tetrapterone, as a new acid derivative, whilst chromanone acids were identified in batch B, including a new derivative named as tetrapteric acid. The same protocol applied to *Mesua assamica* leave extract showed that cytotoxic fractions were rich in xanthenes whereas anti-inflammatory fractions contained numerous mammea coumarins. Along with these phytochemical studies, a panel of polyphenols representative of the chemical classes generally identified in *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* species were evaluated for their effects on various endothelial markers of inflammation and immunity. Mammea coumarins and guttiferone J, a polyprenylated benzophenone, appeared to significantly inhibit the expression of VCAM-1 as well as that of HLA class II molecules, HLA-E and MICA.

keywords : *Calophyllaceae*, *Calophyllum*, *Mesua*, polyprenylated polyphenols, coumarins, endothelial dysfunction, anti-inflammatory, immunomodulators.