



Thèse

2007

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains
du genre "Detarium" (Fabaceae - Caesalpinioideae) : "D. microcarpum"
Guill. et Perr. et des formes comestibles et toxiques de "D. senegalense"
J.F. Gmel

Cavin, Anne-Laure

How to cite

CAVIN, Anne-Laure. Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains du genre 'Detarium' (Fabaceae - Caesalpinioideae) : 'D. microcarpum' Guill. et Perr. et des formes comestibles et toxiques de 'D. senegalense' J.F. Gmel. Doctoral Thesis, 2007. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:493

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:493>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:493](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:493)

**Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits
africains du genre *Detarium* (Fabaceae - Caesalpinioideae) :
D. microcarpum Guill. et Perr. et des formes comestibles et
toxiques de *D. senegalense* J.F. Gmel.**

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences, mention sciences pharmaceutiques

par

Anne-Laure Cavin

de

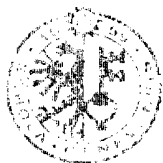
Vullyens (VD)

Thèse N° 3838

Genève

Atelier de reproduction de la Section de physique

2007



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DES SCIENCES

**Doctorat ès sciences
mention sciences pharmaceutiques**

Thèse de *Madame Anne-Laure CAVIN*

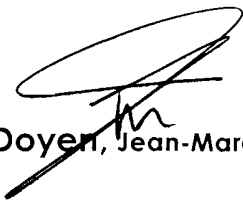
intitulée :

**"Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de
fruits africains du genre *Detarium* (Fabaceae –
Caesalpinioideae) : *D. microcarpum* Guill. et Perr.
et des formes comestibles et toxiques de
D. senegalense J.F. Gmel."**

La Faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs K. HOSTETTMANN, professeur ordinaire et directeur de thèse (Laboratoire de pharmacognosie et phytochimie), A. MARSTON, docteur (Laboratoire de pharmacognosie et phytochimie), P. RUEDI, professeur (University of Zurich, Institute of Organic Chemistry, Zurich, Suisse), O. POTTERAT, docteur (Universität Basel, Institut für Pharmazeutische Biologie, Basel, Schweiz) et Gino MÜLLER, docteur (Musée et jardins botaniques cantonaux, Lausanne, Suisse) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 12 mars 2007

Thèse - 3838 -


Le Doyen, Jean-Marc TRISCONÉ

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives aux thèses de doctorat à l'Université de Genève".

Nombre d'exemplaires à livrer par colis séparé à la Faculté : - 7 -

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Kurt Hostettmann, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et permis de réaliser mon travail de doctorat. C'est dans ce laboratoire de renommée mondiale et présentant un environnement stimulant que j'ai eu le plaisir de passer ces quelques années. J'ai également apprécié de profiter des conseils du Docteur Andrew Marston. Je remercie également le Professeur Kurt Hostettmann de m'avoir permis de présenter quelques uns de mes résultats lors de congrès nationaux et internationaux.

Mes remerciements vont aussi aux membres de mon jury de thèse : Monsieur le Professeur Peter Rüedi (Institute of Organic Chemistry, University of Zürich), Monsieur le Docteur Olivier Potterat, (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Basel), Monsieur le Docteur Gino Müller (Musée et jardins botaniques cantonaux, Lausanne) et Monsieur le Docteur Andrew Marston (Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Genève). Outre le fait qu'ils aient accepté de participer en tant que membres du jury, je les remercie sincèrement pour les discussions très enrichissantes que nous avons eues lors mon examen.

J'ai eu l'opportunité, durant ce travail, de réaliser plusieurs collaborations. Je suis notamment très reconnaissante envers le Professeur Duilio Arigoni (ETH, Zürich), pour avoir partagé avec moi ses connaissances au sujet de la stéréochimie des clérodanes. Je remercie également le Docteur Rosario Scopelliti (EPFL, Lausanne) et le Professeur Helen Stoeckli-Evans (Université de Neuchâtel, Neuchâtel) pour les mesures et interprétations de diffractions aux rayons X, effectuées sur deux des composés isolés. C'est grâce au Professeur Pierre-Alain Carrupt et à son équipe (Laboratoire de Pharmacochimie, Université de Genève) que des tests en solution d'inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase ont pu être réalisés. Je remercie encore le Professeur M.C. Recio (Departament de Farmacologia, Universitat de València, Espania) pour les tests de cytotoxicité effectués sur l'un des composés.

Je remercie aussi Jonathan Kissling pour ses judicieux conseils sur la partie botanique de ce travail, et Assane El Diop pour être allé chercher au Sénégal une thèse portant sur les fruits toxiques de *Detarium*.

Je remercie également tous mes collègues du Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, pour m'avoir encouragée et pour les bons moments passés ensemble. Une mention particulière pour Anne-Emmanuelle Hay qui m'a énormément soutenue et guidée dans ce travail. Merci aussi à Karine, Martine, Fred, Caroline, Aline, Daphné, Aurélie, Sandra et tous les autres, sans oublier mes ex-collègues Anne-Laure, Milena, Julien, Jean-Robert. Sans leur serviabilité, leurs encouragements et la bonne ambiance qu'ils créaient, mes années de thèse auraient eu une toute autre saveur.

Et finalement, mille mercis à ma famille et à mes amis qui m'ont particulièrement épaulée durant cette année 2006.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Ce travail de thèse a été réalisé d'avril 2002 à janvier 2007 à l'Institut de Pharmacognosie et Phytochimie (IPP) de l'Université de Lausanne (avril 2002 à septembre 2004), et au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (LPP) de l'Université de Genève (septembre 2004 à janvier 2007), sous la direction de Monsieur le Professeur Kurt Hostettmann. Certains aspects du présent travail ont été partiellement publiés ou présentés lors de congrès internationaux sous forme de posters.

Publications

Cavin, A.L., Hay, A.E., Marston, A., Stoeckli-Evans, H., Scopelliti, R., Diallo, D. and Hostettmann, K. (2006). Bioactive diterpenes from the fruits of *Detarium microcarpum*. *J. Nat. Prod.* **69**, 768-773.

Cavin, A.L., Arigoni, D., Hay, A.E. and Hostettmann, K. Revision of relative configurations of some clerodane diterpenes (en préparation).

Cavin, A.L., Hay, A.E. and Hostettmann, K. Cyanogenic glycoside derivative from the toxic fruit of *D. senegalense* J.F. Gmel. (en préparation).

Posters

Cavin, A.L., Marston, A. and Hostettmann, K. (2004). Diterpenes isolated from the fruits of *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. *Fall Meeting 2004 of the Swiss Chemical Society, Zürich, Switzerland, October 7, 2004.*

Cavin, A.L., Hay, A.E., Marston, A., Scopelliti, R., Diallo, D. and Hostettmann, K. (2005). Isolation of new bioactive diterpenes from *Detarium microcarpum* Guill. & Perr. *Phytotherapy : The role of an ancient tradition in modern times, Madeira, Portugal, November 1-5, 2005.*

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	i
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	iii
TABLES DES FIGURES ET TABLEAUX	ix
ABREVIATIONS, SYMBOLES ET CONVENTIONS	xiii
1. BUTS DU TRAVAIL	1
2. INTRODUCTION	5
2.1 Considérations écologiques et climatiques en Afrique de l'Ouest	9
2.2 La sous-famille Caesalpinioideae	12
2.3 Traitement taxonomique du genre <i>Detarium</i> Juss	15
2.3.1 Description botanique	15
2.3.2 Espèces du genre <i>Detarium</i>	16
2.3.3 Confusions botaniques	18
2.3.3.1 Présentation de la problématique et causes	18
2.3.3.2 Clarification de la situation botanique	24
2.4 Présentation de <i>Detarium microcarpum</i> Guill. & Perr.	38
2.4.1 Caractères morphologiques et répartition géographique	38
2.4.2 Utilisations traditionnelles	40
2.4.3 Etudes phytochimiques antérieures	43
2.4.3.1 Métabolites primaires	43
2.4.3.2 Métabolites secondaires et leurs activités	44
2.4.3.3 Activités reportées pour <i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	51
2.5 Présentation de <i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel.	54
2.5.1 Caractères morphologiques et répartition géographique	54
2.5.2 Utilisations traditionnelles	56
2.5.2.1 Forme comestible de <i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel.	57
2.5.2.2 Forme toxique de <i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel.	60
2.5.3 Toxicité du genre : aspects cliniques	61
2.5.4 Etudes phytochimiques antérieures	66
2.5.4.1 Forme comestible de <i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel.	66
2.5.4.2 Forme toxique de <i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel.	67

3. RESULTATS	71
3.1 Préparation des extraits	73
3.2 Analyses préliminaires	75
3.2.1 Elimination des sucres	76
3.3 Criblage préliminaire des extraits bruts	78
3.4 Investigation phytochimique de <i>Detarium microcarpum</i> Guill. et Perr.	83
3.4.1 Fractionnement de l'extrait dichlorométhanique et isolement des composés A – F ..	84
3.4.2 Détermination structurale des composés A – F	89
3.4.2.1 Diterpènes de type labdane et clérodane : biosynthèse et chimie	89
3.4.2.2 Composé A	94
3.4.2.3 Composé B	107
3.4.2.4 Composé C	114
3.4.2.5 Composé D	117
3.4.2.6 Composé E	122
3.4.2.7 Composé F	127
3.4.2.8 Configuration absolue des composés A à F	132
3.4.3 Activités biologiques et biochimiques des composés A – F	133
3.5 Comparaison de la composition chimique des fruits de <i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr. et des fruits comestibles et toxiques de <i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel.	135
3.5.1 Comparaison des extraits apolaires et polaires des fruits de <i>D. microcarpum</i> et des deux formes de fruits de <i>D. senegalense</i> par UPLC [®] /ESI/TOF-MS et HPLC/DAD-UV	137
3.6 Fractionnement de l'extrait MeOH s.s. de <i>D. senegalense</i> forme toxique et isolement du composé G	142
3.6.1 Détermination structurale du composé G	142
3.6.2 Voie de biosynthèse des glycosides cyanogénétiques	152
3.7 Implications de la présence d'un dérivé de glycoside cyanogénétique dans le fruit toxique de <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.	153
3.7.1 Glycosides cyanogénétiques	153
3.7.2 Reconsidération des données de la littérature concernant les intoxications dues aux fruits toxiques de <i>D. senegalense</i>	156

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	161
5. PARTIE EXPERIMENTALE.....	167
5.1 Matériel végétal et préparation des extraits.....	169
5.1.1 Matériel végétal	169
5.1.2 Préparation des extraits bruts	171
5.2 Techniques de séparation analytique	172
5.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	172
5.2.2 Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible à barrettes de diode (HPLC/DAD-UV)	173
5.2.3 Chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC [®] /ESI/TOF-MS)	175
5.3 Techniques de séparation préparatives	176
5.3.1 Partage liquide-liquide	176
5.3.2 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	177
5.3.2.1 Chromatographie d'adsorption	177
5.3.2.2 Chromatographie d'exclusion	178
5.3.3 Chromatographie centrifuge à contre-courant (CCC)	179
5.3.4 Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)	179
5.3.5 Chromatographie liquide semi-préparative à haute pression	180
5.3.6 Extraction sur phase solide (SPE)	181
5.4 Méthodes physico-chimiques	182
5.4.1 Mesure du point de fusion (Mp)	182
5.4.2 Polarimétrie ($[\alpha]_D$)	182
5.4.3 Spectrophotométrie UV-visible	183
5.4.4 Spectrométrie infrarouge (IR)	183
5.4.5 Spectrométrie de masse (MS)	184
5.4.6 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	185
5.4.7 Analyse par diffraction aux Rayons X (RX)	186
5.5 Méthodes de criblage chimiques, biochimiques et biologiques	187
5.5.1 Réactifs de révélation chimique sur CCM	187
5.5.2 Détection de HCN par la formation de Bleu de Prusse	188
5.5.3 Mise en évidence de l'activité antifongique sur <i>Cladosporium cucumerinum</i> par bioautographie directe	188

5.5.4 Mise en évidence de l'activité antifongique sur <i>Candida albicans</i> par bioautographie « agar overlay »	189
5.5.5 Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur <i>Bacillus subtilis</i> par bioautographie « agar overlay »	190
5.5.6 Mise en évidence de l'activité antiradicalaire sur le DPPH	191
5.5.7 Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (Test sur plaque)	192
5.5.8 Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (Test en solution)	193
5.5.9 Mise en évidence de la cytotoxicité	193
5.6 Modélisation moléculaire	194
5.7 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés	195
Composé A	195
Composé B	196
Composé C	197
Composé D	198
Composé E	199
Composé F	200
Composé G	201
5.7.1 Données RX	204
5.7.1.1 Composé B	204
5.7.1.2 Composé D	204
6. REFERENCES.....	207
7. RESUME.....	225
8. ABSTRACT.....	229
ANNEXES.....	233

TABLES DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 2.1 - Carte des secteurs climatiques de l'Afrique de l'Ouest	10
Figure 2.2 - Carte de répartition de la famille Fabaceae	12
Figure 2.3 - Phylogénie de la sous-famille Caesalpinioideae	13
Figure 2.4 – Schématisation de la confusion botanique	23
Figure 2.5 – Schématisation de la situation botanique clarifiée	31
Figure 2.6 – Photographies de <i>Detarium microcarpum</i> Guill. et Perr.	38
Figure 2.7 - Carte de répartition de <i>D. microcarpum</i>	39
Figure 2.8 – Photographies de <i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel.	55
Figure 2.9 – Carte de répartition de <i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel.	56
Figure 3.1 – Activité inhibitrice de <i>Cladosporium cucumerinum</i> des trois extraits DCM des fruits de <i>Detarium</i> spp.	81
Figure 3.2 – Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des fractions I – VIII de l'extrait DCM du fruit de <i>D. microcarpum</i>	84
Figure 3.3 – Activité inhibitrice de la croissance de <i>Cladosporium cucumerinum</i> et de <i>Candida albicans</i> des fractions I - VIII de l'extrait DCM du fruit de <i>D. microcarpum</i> ...	85
Figure 3.4 – Schéma d'isolement du composé F de l'extrait dichlorométhanique du fruit dépourvu de graine de <i>D. microcarpum</i>	86
Figure 3.5 – Schéma d'isolement des composés A - E de l'extrait dichlorométhanique du fruit <i>D. microcarpum</i>	87
Figure 3.6 – Chromatogramme HPLC/DAD-UV à 210 nm et spectres enregistrés <i>on-line</i> des composés A – F isolés de l'extrait dichlorométhanique des fruits de <i>D. microcarpum</i>	88
Figure 3.7 – Voies de cyclisation du <i>E,E,E</i> -GGPP conduisant à la formation des labdanes	90
Figure 3.8 – Voie biosynthétique des <i>trans</i> - et <i>cis</i> -clérodanes, série normale	91
Figure 3.9 – Conformation des décalines <i>trans</i> et <i>cis</i>	92
Figure 3.10 – Conformation stéroïdale (a) et non-stéroïdale (b) d'une <i>cis</i> -décaline	93
Figure 3.11 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé A	94
Figure 3.12 – Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé A	96
Figure 3.13 – Spectre RMN de corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C à longue distance (gHMBC) du composé A , avec les corrélations observées les plus importantes	97
Figure 3.14 – Corrélations hétéronucléaires longue distance (gHMBC) observées pour la chaîne 4-carboxyl-3-ène-3-méthylbutyle du composé A	98
Figure 3.15 – Fragments structuraux du composé A	99
Figure 3.16 – Principales corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C longue distance (gHMBC) observées pour le composé A	99

Figure 3.17 – Corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) du composé A	100
Figure 3.18 – Orientation des substituants dans une <i>trans</i> -décaine (série normale).....	101
Figure 3.19 – Orientation relative de C-5, C-9 et C-10, conformation stéroïdale du composé A	102
Figure 3.20 – Structure des précurseurs A et F-1 et de leurs dérivés D et F-4 , respectivement. F-1 et F-4 ne sont pas corrigés (au niveau de l'orientation de CH ₃ -17), et sont représentés selon la série antipodale	103
Figure 3.21 – Structure et configuration relative du composé A	106
Figure 3.22 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé B	107
Figure 3.23 – Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD ₂ Cl ₂) du composé B	108
Figure 3.24 – Principales corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C à longue distance (gHMBC) observées pour le composé B	110
Figure 3.25 – Analyses RX du composé B	111
Figure 3.26 – Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé B	111
Figure 3.27 – Structure et configuration relative du composé B	112
Figure 3.28 – Rotamères du composé B	113
Figure 3.29 – Corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) du composé C	114
Figure 3.30 – Configuration relative du composé C	116
Figure 3.31 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé D	117
Figure 3.32 – Principales corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C à longue distance (gHMBC) concernant les atomes CH-3 et C-4 du composé D	118
Figure 3.33 – Analyses RX du composé D	119
Figure 3.34 – Structure et configuration relative du composé D	120
Figure 3.35 – Spectre EI-MS (70 eV) du composé D	121
Figure 3.36 – Principales corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) observées pour le composé E	122
Figure 3.37 – Orientation relative des substituants sur le cycle A du composé E	123
Figure 3.38 – Structure et configuration relative du composé E . a) illustration bidimensionnelle ; b) illustration tridimensionnelle élaborée par le logiciel de modélisation moléculaire Sybyl®	125
Figure 3.39 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé F	127
Figure 3.40 – Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl ₃) du composé F	128
Figure 3.41 – Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl ₃) du composé F	129
Figure 3.42 – Principales corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) du composé F	130
Figure 3.43 – Structure et configuration absolue du composé F	131
Figure 3.44 – Chromatographie sur couche mince des extraits DCM et MeOH s.s. des fruits toxiques et comestibles de <i>D. senegalense</i> et des fruits de <i>D. microcarpum</i>	136

Figure 3.45 - Chromatogramme et intensité du pic de base (BPI) des extraits DCM de <i>D. microcarpum</i> et des deux formes de fruits de <i>D. senegalense</i>	137
Figure 3.46 – Chromatogramme et intensité du pic de base (BPI) des extraits MeOH s.s. des deux formes de fruits de <i>D. senegalense</i> et de <i>D. microcarpum</i>	138
Figure 3.47 – Chromatogrammes HPLC/DAD-UV à 210 nm des extraits MeOH s.s. des formes comestibles et toxiques de <i>D. senegalense</i> et spectre UV on-line du composé G	140
Figure 3.48 – Schéma d'isolement du composé G de l'extrait MeOH s.s. du fruit toxique de <i>D. senegalense</i>	142
Figure 3.49 – Rapport d'analyse élémentaire du composé G	143
Figure 3.50 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé G	144
Figure 3.51 – Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) du composé G	145
Figure 3.52 – Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) du composé G	146
Figure 3.53 – Corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C à longue distance (gHMBC) observées pour le groupement isovaléronitrile du composé G	147
Figure 3.54 – Spectre IR du composé G	148
Figure 3.55 – Configuration absolue de l'hétérodendrine et de l'épihétérodendrine.....	149
Figure 3.56 – Structure du composé G	151
Figure 3.57 – Voie biogénétique proposée pour l'isovaléronitrile lié à l'hexose du composé G	152
Figure 4.1 – Structure des composés A – F	164
Figure 4.2 – Structure du composé G	166

Tableaux

Tableau 2.1 – Taxons répertoriés pour le genre <i>Detarium</i> dans les bases de données	17
Tableau 2.2 – Descriptions botaniques de <i>D. microcarpum</i> , <i>D. senegalense</i> (Guillemin <i>et al.</i> , 1830-1833) et <i>D. heudelotianum</i> (Baillon, 1865-1866)	19
Tableau 2.3 – Principaux noms vernaculaires de <i>D. microcarpum</i> et <i>D. senegalense</i>	21
Tableau 2.4 – Caractères morphologiques moyens de <i>D. microcarpum</i> et <i>D. senegalense</i> déterminés à partir des tableaux de l'Annexe 1	25
Tableau 2.5 – Mise en évidence des incohérences et des imprécisions botaniques dans le cas de <i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	26
Tableau 2.6 – Mise en évidence des incohérences et des imprécisions botaniques dans le cas de <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.	27
Tableau 2.7 - Principales utilisations de <i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr. en médecine traditionnelle	41
Tableau 2.8 – Utilisations alimentaires, agricoles, vétérinaires et domestiques de <i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	42

Tableau 2.9 – Principales utilisations de la forme comestible de <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. en médecine traditionnelle	57
Tableau 2.10 – Utilisations alimentaires, agricoles, vétérinaires et domestiques de la forme comestible de <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.	59
Tableau 2.11 – Principales utilisations de la forme toxique de <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.	60
Tableau 2.12 – Symptômes observés suite à l’ingestion du fruit toxique de <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.	63
Tableau 2.13 – Etude clinique d’intoxication par le « <i>ditakh</i> »	64
Tableau 3.1 – Extraits préparés à partir des fruits	74
Tableau 3.2 – Extraits sans sucre obtenus par colonne chromatographique ouverte sur résine échangeuse d’ions Diaion® HP20/L	77
Tableau 3.3 – Extraits sans sucre obtenus par partage n-BuOH/H ₂ O	77
Tableau 3.4 – Criblage biologique et biochimique des extraits bruts	79
Tableau 3.5 – Valeurs des déplacements chimiques du ¹ H et du ¹³ C de la décaline des composés A et F-1	104
Tableau 3.6 – Activités inhibitrices des composés A à F sur <i>C. cucumerinum</i> , <i>B. subtilis</i> et l’acétylcholinestérase	133
Tableau 3.7 – Valeurs des déplacements chimiques différant pour l’hétérodendrine et l’épihétérodendrine, ainsi que celles du composé G	149
Tableau 5.1 – Matériel végétal étudié	170
Tableau 5.2 – Réactifs chimiques pour la révélation des CCM.....	187
Tableau 5.3 – Données RMN ¹ H (500 MHz) des diterpènes A-F (δ en ppm et <i>J</i> en Hz)	202
Tableau 5.4 – Données RMN ¹³ C (125 MHz) des diterpènes A-F (δ en ppm et <i>J</i> en Hz)	203
Tableau 5.5 – Données RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) et ¹³ C (125 MHz) du composé G (δ en ppm, <i>J</i> en Hz)	203

ABREVIATIONS, SYMBOLES ET CONVENTIONS

1, 2, 3,...	désignation des composés naturels mentionnés dans l'introduction
$[\alpha]_D$	pouvoir rotatoire à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589.3 nm)
δ	déplacement chimique (RMN)
ε	coefficient d'extinction molaire (UV)
$\lambda_{\max}$	longueur d'onde maximale d'absorption (UV)
A, B, C,...	désignation des composés naturels isolés dans le présent travail
AcOEt	acétate d'éthyle
BPI	intensité du pic de base (<i>Base Peak Intensity</i> , MS)
CC	chromatographie sur colonne ouverte (<i>Column Chromatography</i>)
CCC	chromatographie centrifuge à contre-courant
CCM	chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$	chloroforme deutéré (RMN)
CD_2Cl_2	dichlorométhane bideutééré (RMN)
CD_3OD	méthanol tétradeutééré (RMN)
$CHCl_3$	chloroforme
CH_3CN	acétonitrile
CMC Na	carboxyméthylcellulose sodique
<i>d</i>	doublet (RMN)
Da	Dalton (unité de masse moléculaire)
DAD	détecteur à barrettes de diodes (<i>Diode Array Detector</i> , UV)
DCM	dichlorométhane
<i>dd</i>	double doublet (RMN)
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (RMN)
d.i.	diamètre interne (colonnes HPLC)
DMSO- <i>d</i> ₆	diméthylsulfoxyde hexadeutééré (RMN)
DPPH	radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
EI	ionisation par impact électronique (<i>Electron Impact ionization</i> , MS)
ESI	ionisation par électrospray (<i>ElectroSpray Ionization</i> , MS)
EtOH	éthanol
gdqfCOSY	<i>Gradient Double Quantum Filtered COrrrelation SpectroscopY</i> (RMN)

gHMBC	<i>Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i> (RMN)
gHSQC	<i>Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (RMN)
HPLC	chromatographie liquide à haute performance (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HR	haute résolution (MS)
int. rel.	intensité relative (MS)
IR	spectrométrie infrarouge
<i>J</i>	constante de couplage (RMN)
LD ₅₀	dose de substance causant la mort de 50 % d'une population
<i>m</i>	multiplet (RMN)
MeOH	méthanol
Mp	point de fusion (<i>Melting Point</i>)
MPLC	chromatographie liquide à moyenne pression (<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>)
<i>M_r</i>	masse moléculaire (<i>Molecular Weight</i>)
MS	spectrométrie de masse (<i>Mass Spectrometry</i>)
MTBE	<i>tert</i> -butylméthyléther
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2 <i>H</i> -tétrazolium
<i>m/z</i>	rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires d'ions (MS)
n-BuOH	butanol
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> (RMN)
PEHD	polyéthylène de haute densité
ppm	unité de δ (parties par million = 10 ⁻⁶ , RMN)
R _f	facteur de rétention (<i>Retention Factor</i> , CCM)
RMN	spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
RP	phase inverse (<i>Reversed Phase</i> , phases stationnaires en chromatographie)
<i>s</i>	singulet (RMN)
sp.	espèce botanique non précisée
spp.	plusieurs espèces du même genre botanique
s.s.	sans sucre (qualification d'extraits)
<i>t</i>	triplet (RMN)
t _R	temps de rétention (RMN)
TFA	acide trifluoroacétique (<i>TriFluoroacetic Acid</i> , acidifiant pour phases mobiles)
THF	tétrahydrofurane

TMS	tétraméthylsilane (RMN, référence pour l'échelle des δ)
TOF	analyseur à temps de vol (<i>Time of Flight</i> , MS)
UPLC [®]	chromatographie liquide ultra performante (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> [®])
UV	spectrophotométrie / rayonnement dans le domaine de l'ultra-violet

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment rencontrée dans la littérature. C'est pourquoi elles sont surtout issues de la terminologie anglo-saxonne.

Les couplages analytiques entre une méthode de séparation et une (ou plusieurs) méthode(s) de détection sont indiqués par les abréviations successives de ces dernières, séparées par le signe « / » : HPLC/UV, UPLC[®]/MS,... Lorsqu'il s'agit d'indiquer le type précis de détection, on le fera à l'aide des abréviations correspondantes placées avant celles désignant la méthode générale et séparées par un trait d'union : DAD-UV, ESI-MS,...

1. BUTS DU TRAVAIL

A l'heure actuelle, l'étude de la composition chimique des plantes n'a pas perdu de son intérêt, malgré l'avènement de domaines de plus en plus pointus dans la recherche de médicaments. En effet, le règne végétal est une source jugée inépuisable de molécules pouvant présenter un intérêt thérapeutique. La mise au point continuelle de méthodes de criblage biochimiques et biologiques contribue à l'isolement de composés actifs à partir d'extraits végétaux. De plus, la performance croissante des techniques analytiques et préparatives, ainsi que l'accès de plus en plus facilité à la littérature, rendent leur caractérisation plus aisée. Relevons également que les plantes sources de médicaments présentent l'immense avantage d'être accessibles à tous, et particulièrement aux pays en voie de développement. L'approfondissement des connaissances de plantes de tels pays est capital, afin d'optimiser leurs utilisations.

N'oublions pas cependant que le règne végétal est également une source de poisons puissants. Ainsi, au cours des siècles, l'Homme et l'animal ont appris à distinguer les plantes bénéfiques pour leur santé des plantes toxiques. Cependant, certaines d'entre elles peuvent présenter les deux effets, selon la dose utilisée. Mentionnons par exemple les curares, d'origine botanique diverse (Menispermaceae, Loganiaceae), employés autrefois pour enduire les flèches destinées à la chasse, et qui servirent plus tard comme myorelaxant lors d'anesthésies chirurgicales. Malgré une connaissance certaine des plantes de son environnement, l'Homme demeure cependant fréquemment victime d'intoxications accidentelles dues aux plantes.

Après à un criblage effectué sur sept fruits comestibles, notre travail s'est porté sur l'investigation de trois d'entre eux, faisant partie du genre *Detarium* (Caesalpinioideae). Cette sous-famille des Fabaceae a été relativement peu étudiée. Ainsi, un travail considérable persiste, tant sur le plan de la classification botanique, que phytochimique. Alors que nous nous intéressons ici en premier lieu à la connaissance de la composition chimique des plantes, est-il nécessaire de rappeler combien la botanique est importante pour le phytochimiste ? En effet, quelle valeur aurait l'identification de métabolites secondaires d'une plante, si celle-ci n'était pas clairement définie d'un point de vue taxonomique ? Ainsi, cette étude va porter sur ces deux domaines, puisque le genre *Detarium* n'a, à l'heure actuelle, jamais été révisé d'un point de vue taxonomique, et n'a fait l'objet que de quelques investigations phytochimiques. Il comprend des arbres distribués en Afrique de l'Ouest sub-sahélienne, dont certains fruits sont abondamment consommés. Ce genre comprend également des arbres à fruits toxiques, responsables de nombreuses intoxications. Le traitement des patients victimes de ces dernières est purement symptomatique, en raison du fait que le ou les composés responsables de la toxicité sont

inconnus. Ainsi, même lors d'une prise en charge médicale du patient, une issue mortelle n'est pas rare.

Dès lors, nous nous proposons dans un premier temps de reconsidérer les données de la littérature concernant les espèces du genre *Detarium*, afin de tenter une révision du genre. En effet, une confusion botanique existe entre *D. microcarpum* Guill. et Perr., *D. senegalense* J.F. Gmel., *D. heudelotianum* Baill et les fruits toxiques de *Detarium*.

Dans un deuxième temps, les fruits de *D. microcarpum* Guill. et Perr. faisant partie du régime alimentaire et de la médecine traditionnelle de nombreuses populations, une investigation phytochimique de ces derniers va être menée.

Finalement, une comparaison de la composition chimique des fruits toxiques avec les fruits comestibles va être entreprise, de manière à tenter d'identifier le ou les composés responsables de la toxicité. De plus, cette comparaison permettra de reconsidérer le rang taxonomique de ces fruits d'un point de vue chimique.

2. INTRODUCTION

A l'heure actuelle, environ 250'000 espèces de plantes à fleurs ou Angiospermes sont répertoriées, caractérisées chacune par le système de nomenclature binomiale introduit par Linné en 1753. Ces espèces, unités de base de la classification, sont à leur tour regroupées dans des unités supérieures ou plus globales. A l'origine, Linné inventa une classification basée uniquement sur la morphologie des organes sexuels. Par la suite, les critères de classification ont passablement évolué, prenant en compte les caractères morphologiques totaux des plantes. Plusieurs botanistes ont contribué à créer le système actuel de classification des plantes. Le premier ayant évoqué l'idée d'une classification naturelle des végétaux est Bernard de Jussieu (1699-1777). Cependant, c'est l'un de ses élèves, Michel Adanson (1727-1806), qui a véritablement expliqué les fondements théoriques et la méthode pratique à utiliser dans son ouvrage « Famille de plantes », publié en 1763-1764. Le neveu de Bernard de Jussieu, Antoine-Laurent de Jussieu (1748-1836) reprend ensuite les idées de son oncle et les principes exposés par Adanson dans son ouvrage « *Genera Plantarum* » (1789). C'est cet ouvrage qui est considéré aujourd'hui comme la base de la classification naturelle et de la botanique systématique moderne. Plus tard, Augustin-Pyrame de Candolle (1778-1841) décrit huit grandes classes, et distingue les végétaux vasculaires des non-vasculaires. Son « *Prodromus regni vegetabilis* » (1824-1862) est la première tentative de rédaction d'une flore mondiale. Cet ouvrage a été poursuivi après sa mort par son fils Alphonse de Candolle (1806-1893), pour aboutir à la description de plus de 90'000 plantes. Le point de départ de la nomenclature moderne (premier code) est dû à Alphonse de Candolle, et est connu sous le nom de « Loi de Candolle ». La première publication officielle d'un « Code International de la Nomenclature Botanique » est issue du Congrès de Vienne de 1905. Le Code actuellement en vigueur a été adopté lors du 17^{ème} Congrès de Vienne, en juillet 2005.

C'est certainement Augustin-Pyrame de Candolle qui a le plus influencé tous les systèmes de classification du XX^{ème} siècle. En effet, il fut le premier botaniste à pressentir la tendance fondamentale des fleurs à se transformer et à évoluer. Il décrivit donc les plantes par séries, représentant les modifications logiques par rapport à un plan originel de base. La systématique employée était basée sur la morphologie florale, principe adopté ultérieurement par tous les chercheurs. Par la suite, la notion d'hérédité et d'évolution a clairement été introduite aux piliers traditionnels de la systématique, grâce notamment aux idées développées par Darwin (1809-1882). Cependant, la dualité entre l'approche phylogénétique et l'approche morphologique subsiste. En effet, des systèmes uniquement basés sur des caractères morphologiques permettent de déterminer aisément les taxons, mais ne reflètent que très imparfaitement les affinités entre les groupes. D'un autre côté, des systèmes construits uniquement sur des hypothèses

phylogénétiques sont plus justes, mais d'utilisation difficile pour la détermination des taxons. Ce sont les systèmes de classification élaborés par Rolf M.T. Dahlgren (1985), Cronquist (1988), Robert F. Thorne (1992) et finalement l'*Angiosperm Phylogeny Group* (APG, 1998) qui ont fait successivement référence (Spichiger *et al.*, 2000). A l'heure actuelle, c'est la deuxième version de l'*Angiosperm Phylogeny Group* (APG II, 2003) qui fait référence dans la taxonomie des plantes à fleurs. Cependant, ces systèmes ont le désavantage de traduire l'idée que se font leurs auteurs de l'évolution des organismes. C'est-à-dire que seuls les caractères considérés comme importants par ces botanistes sont utilisés pour délimiter les taxons. Ces différents systèmes de classification peuvent donc être considérés par certains comme subjectifs et la recherche de méthodes plus objectives a été développée, grâce à l'avènement de technologies modernes. Mentionnons notamment le séquençage de gènes qui a permis de révolutionner le système de classification des plantes : c'est la systématique moléculaire. Cette méthode consiste à séquencer un gène, le plus souvent le gène *rbcL* de l'ADN chloroplastique, présent en grande quantité. A l'heure actuelle, cette méthode est employée pour réviser la classification du règne végétal. Les résultats obtenus ont remis en question des lignées classées selon les systèmes basés sur la morphologie. La phylogénétique moléculaire a cependant aussi ses détracteurs : certains estiment que le séquençage d'un gène ne reflète pas une plante dans sa totalité, contrairement à l'étude des caractères morphologiques. D'autres systèmes de classification existent, et permettent d'apporter des informations complémentaires. Notons entre autres la chimiotaxonomie, qui est basée sur la composition en métabolites secondaires des plantes. La micromorphologie est de plus en plus usitée, et notamment la palynologie ou étude microscopique des grains de pollen. Finalement, nous pouvons conclure que chaque type de système de classification apporte des informations, et le tout consiste à trouver le meilleur moyen de les intégrer les uns aux autres pour, d'une part refléter la réalité évolutive des espèces et, d'autre part permettre une identification claire et didactique de celles-ci. Le débat portant sur le meilleur système de classification du règne végétal reste d'actualité et va certainement le rester encore longtemps.

Dans le présent travail, nous sommes confrontés à l'utilisation de ces différents systèmes de classification. En effet, dans un premier temps, nous avons tenté de repositionner différentes espèces du genre *Detarium* (Caesalpinioideae - Fabaceae), sur la base de données morphologiques. Dans un deuxième temps, nous avons reconsidéré le rang taxonomique des arbres à fruits comestibles et toxiques de *D. senegalense* par le biais de l'étude de leur composition en métabolites secondaires, c'est-à-dire sur un plan chimiotaxonomique.

2.1 Considérations écologiques et climatiques en Afrique de l'Ouest

Le continent africain peut être divisé en plusieurs régions climatiques, chacune caractérisée par une pluviométrie annuelle. Le classement de ces régions dans l'ordre croissant est le suivant : le Désert du Sahara, le Maghreb, le Sahel, le Soudan, la Guinée, le Congo et la région des Grands Lacs. Les régions soudaniennes et guinéennes nous intéressent particulièrement dans ce travail puisque c'est là que se rencontrent les espèces *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. et *D. senegalense* J.F. Gmel., sujets de l'étude. La région soudanienne s'étend depuis le Sud du Sahel et est comprise d'Ouest en Est du Mali au Soudan. Elle se situe à une altitude moyenne relativement basse, et ne comprend pas de relief prononcé. La plupart des arbres soudaniens ont ainsi une répartition géographique très vaste, tant en longitude qu'en latitude. D'un bout à l'autre de cette région, le climat se modifie graduellement et l'on peut ainsi comprendre, en tenant compte de la grande amplitude écologique des espèces, qu'il est difficile de délimiter des zones de végétation. Concernant la région guinéenne, elle borde le Golfe de Guinée, s'étend à travers des régions tropicales et forestières, et se termine au Sahel (White, 1986; Arbonnier, 2002). La délimitation du territoire africain en secteurs climatiques est cependant à considérer avec de plus en plus de précautions, en raison du réchauffement climatique croissant. Il engendre en effet un assèchement des territoires, et donc la disparition de certaines espèces végétales (et animales).

Notons que des secteurs plus précis ont été délimités en partitionnant ces régions climatiques. Ainsi, les régions soudaniennes et guinéennes sont séparées du Nord au Sud en quatre secteurs : sahélo-soudanien, soudanien, soudano-guinéen et subguinéen (Figure 2.1), chacun à nouveau caractérisé par une pluviosité annuelle croissante. Les limites de ces zones ne sont pas clairement définies sur le terrain en raison des conditions locales liées au relief et à la qualité des sols qui perturbent la répartition et la conservation des eaux de pluie. Différents types de végétation croissent dans ces zones, bien que certaines espèces soient réparties sur plusieurs d'entre elles (Arbonnier, 2002). Les secteurs soudaniens et soudano-guinéens, dans lesquels poussent *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. et *D. senegalense* J.F. Gmel. seront décrits ici.

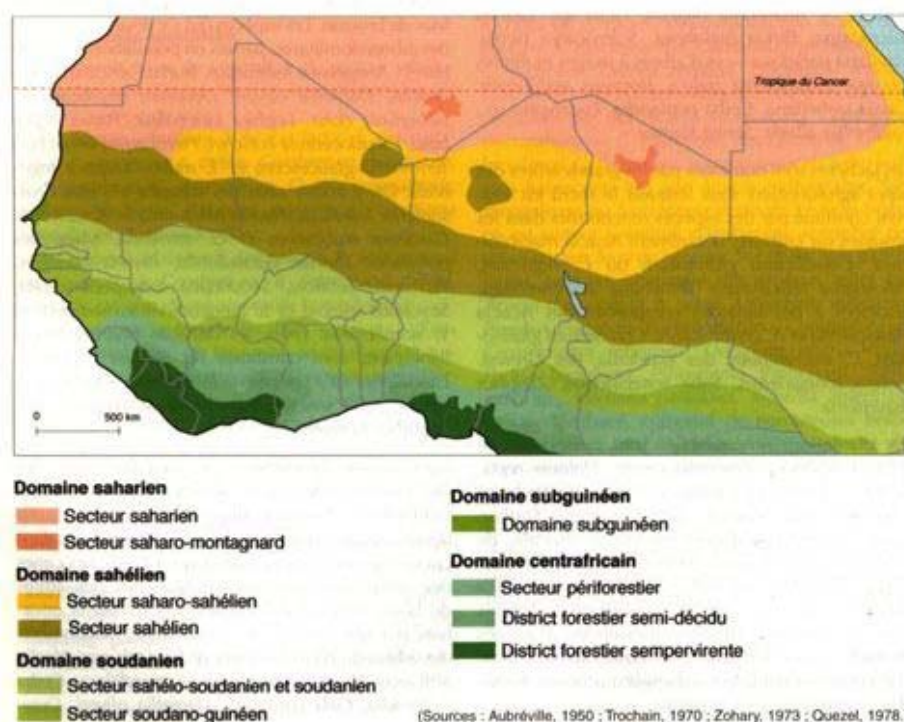


Figure 2.1 - Carte des secteurs climatiques de l'Afrique de l'Ouest (Arbonnier, 2002)

Secteur soudanien

Le secteur soudanien est caractérisé par une moyenne annuelle de 500 à 900 mm de pluie, répartie sur les trois à quatre mois de mousson. Son couvert herbacé est haut de 20 à 150 cm et comporte divers types de végétation savannicole en fonction de la nature du sol. Les savanes arbustives à arborées, croissantes sur des sols rocheux ou cuirassés, comportent des arbres, des buissons et des buissons lianescents. C'est dans ce type de savane, ainsi que dans les savanes boisées et les forêts claires que vit *Detarium microcarpum*. Ce secteur comporte également des galeries forestières, localisées dans les dépressions où les arbres dominants empêchent le développement des herbes. Elles comportent généralement des arbres de 10 à 30 m de haut, des arbustes buissonnants de 4 à 10 m de haut et des buissons lianescents. Dans ce secteur climatique, des formations ripicoles périodiquement inondées, des parcs agroforestiers arborés composés principalement de fruitiers, de jachères et de plantations ornementales sont également observés (Arbonnier, 2002).

Secteur soudano-guinéen

Dans le secteur soudano-guinéen, une pluviométrie de 750 à 1200 mm est enregistrée chaque année. Il comprend notamment des forêts claires, constituées d'arbres aux cimes presque jointives, mais sous lesquelles le couvert et le tapis herbacés sont peu denses. Les savanes

arborées sont quant à elles formées d'arbres espacés, sous lesquels les herbes sont hautes et soumises aux feux de brousse. Les espèces qui s'y développent sont des arbres dominants, parfois en population presque pures et c'est là que se retrouve notamment *D. microcarpum*. Des arbustes et quelques buissons plus ou moins lianescents font également partie de ces forêts claires. Les galeries forestières sont localisées dans les dépressions ou les zones humides. Elles sont surtout composées d'un mélange d'espèces de forêts denses semi-décidues guinéennes et d'espèces de forêts claires. Les cimes des arbres dominants et les branches des arbres de lisière sont généralement enchevêtrées et envahies par les lianes. On y rencontre des arbres de 20 à 40 m de haut tels que *D. senegalense*, *Erythrophleum suaveolens* (Guill. et Perr.) Brenan (Fabaceae) et *Khaya senegalensis* A.Juss. (Meliaceae). Des arbres de 8 à 20 m de haut, des arbustes buissonnants de 3 à 10 m et des buissons lianescents font également partie de ces galeries forestières. Le secteur soudano-guinéen comprend de plus des formations ripicoles, des parcs agroforestiers, des plantations ornementales et des jachères (Arbonnier, 2002).

Etant donnée l'étendue de ces secteurs climatiques, et par conséquent l'étendue de la région dans laquelle poussent *D. microcarpum* et *D. senegalense*, il existe de grandes variations pour ces espèces, tant au niveau de la période de floraison qu'au niveau de la morphologie de l'arbre. En effet, en juillet, les vents chargés d'humidité soufflent du sud-ouest, impliquant des périodes de floraison souvent décalées entre l'Est et l'Ouest, et ceci même lorsque les sites d'observation sont situés sur une même isohyète. Une variation de la période de floraison existe de plus en fonction du secteur soudanien ou soudano-guinéen. A cela s'ajoute encore une grande variabilité interannuelle des précipitations pour un même site (Arbonnier, 2002; Kouyaté et Van Damme, 2002). La topographie et la nature du sol sont des facteurs déterminant la morphologie de l'arbre. Par exemple, l'arbre a tendance à étaler sa cime et à avoir un fût court lorsqu'il est en milieu naturel ouvert, c'est-à-dire lorsqu'il n'a pas à entrer en concurrence avec les arbres voisins pour pouvoir bénéficier de la lumière. A l'inverse, en galerie forestière ou en forêt claire, l'arbre a tendance à s'allonger pour rechercher la lumière et à limiter l'épanouissement de sa cime car il est gêné par les cimes contiguës (Arbonnier, 2002; Kouyaté et Van Damme, 2002).

La répartition géographique, ainsi que l'habitat des deux espèces de *Detarium* étudiées dans le présent travail seront détaillées dans les sous-chapitres correspondants. En ce qui concerne la troisième espèce de *Detarium*, *D. macrocarpum* Harms, elle se rencontre dans la forêt tropicale humide guinéo-congolienne (Arbonnier, 2002; Lebrun et Stork, sous presse).

2.2 La sous-famille Caesalpinioideae

Les Caesalpinioideae sont l'une des trois sous-familles appartenant à la famille Fabaceae. Cette famille, avec plus de 700 genres et 18 000 espèces, forme la troisième plus grande famille des Angiospermes, après les Asteraceae et les Orchidaceae. Les espèces appartenant aux Fabaceae ont une distribution cosmopolite dans les zones tropicale, subtropicale et tempérée comme le montre la Figure 2.2. Les Faboideae, autre sous-famille, sont le seul groupe largement répandu en région tempérée.

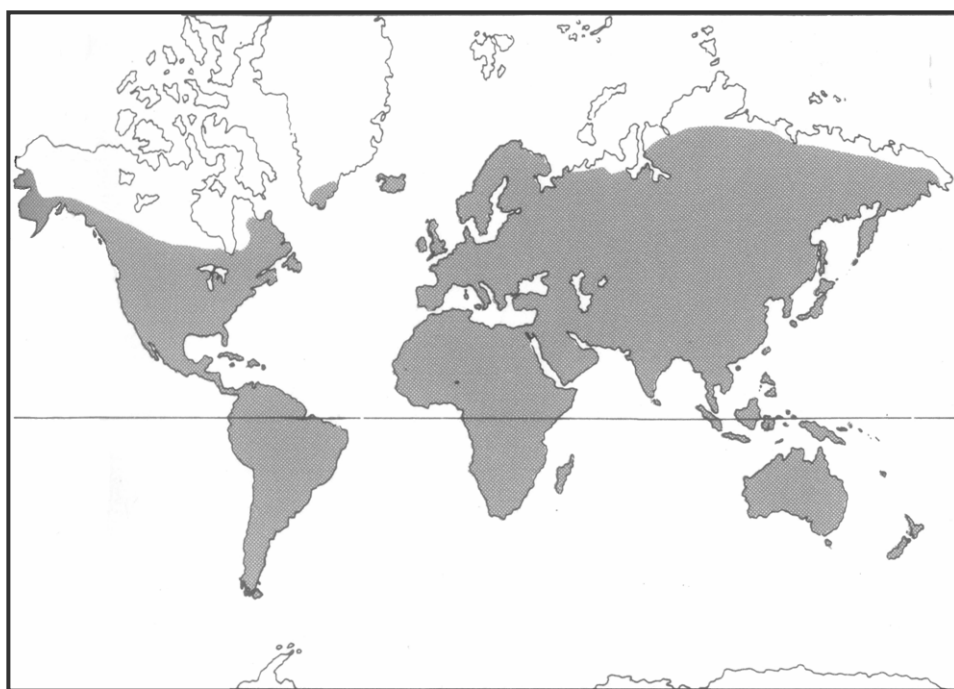


Figure 2.2 - Carte de répartition de la famille Fabaceae (Heywood, 1996)

Les Fabaceae comprennent des plantes herbacées, des arbustes ainsi que des plantes aquatiques, xérophytes et grimpantes. Beaucoup d'espèces de cette famille sont d'une importance majeure pour l'homme au niveau thérapeutique, économique et écologique (Harborne, 1994). Selon le dernier système de classification en vigueur (APG II, 2003), ces espèces sont distribuées en trois sous-familles : Caesalpinioideae, Mimosoideae et Faboideae. La phylogénie est présentée à la Figure 2.3.

Division	Angiospermae
Classe	Eudicot
Sous-classe	Core-Eudicot
Super-ordre	Rosid
Sous-ordre	Eurosid I
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Sous-famille	Caesalpinioideae
	Mimosoideae
	Faboideae (Papilionoideae)

Figure 2.3 - Phylogénie de la sous-famille Caesalpinioideae (APG II, 2003)

Les Caesalpinioideae forment une sous-famille paraphylétique et basale au sein de la famille Fabaceae, tandis que les Mimosoideae et les Faboideae forment des sous-familles monophylétiques (Doyle *et al.*, 2000; Bruneau *et al.*, 2001). La phylogénie des Caesalpinioideae reste cependant peu connue par rapport à celle des deux autres sous-familles. Les Caesalpinioideae sont principalement des arbres et des arbustes tropicaux et subtropicaux (environ 180 genres et 2500-3000 espèces). Les feuilles sont généralement pennées, parfois bipennées. Les fleurs sont plus ou moins irrégulières avec des pétales latéraux couvrant l'étendard dans le bouton. Elles comportent 10 étamines (ou moins), libres ou monadelphes.

Il existe quatre tribus au sein des Caesalpinioideae : les Caesalpinieae, les Cassieae, les Cercideae et les Detarieae. Les relations entre ces tribus et à l'intérieur d'elles-mêmes restent problématiques malgré de récentes études moléculaires (Doyle *et al.*, 2000; Bruneau *et al.*, 2001) et morphologiques (Herendeen *et al.*, 2003). Notons que Doyle *et al.* (2000) avaient repositionné les tribus Cercideae, Detarieae et Amherstieae à l'extrémité des Caesalpinioideae, sur la base de critères morphologiques : Detarieae et Amherstieae seraient ainsi considérées comme des tribus dérivées à cause de la structure élaborée de la fleur. Käss et Wink (1996), ont mené une étude de phylogénie moléculaire sur 49 tribus des Fabaceae. L'arbre phylogénique résultant montre que les tribus Cercideae, Detarieae et Amherstieae seraient effectivement des groupes distincts des Fabaceae, en raison du peu de caractères génétiques communs avec les autres tribus des Fabaceae.

La tribu Detarieae est la plus large de la sous-famille Caesalpinioideae, et probablement la moins étudiée (Tucker, 2002). Elle contient environ 80 genres, essentiellement des arbres tropicaux. Plusieurs efforts ont conjointement été entrepris afin d'élargir les connaissances sur cette tribu. Sur le plan systématique et floristique, plusieurs travaux ont été effectués (Breteler, 1995; Breteler et Wieringa, 1999; Mackinder, 2000). Les travaux en systématique moléculaire sont plus rares. Les travaux de Bruneau *et al.* (2000, 2001) ont permis une meilleure définition des relations phylogénétiques entre les genres de la tribu. Ainsi, les genres *Sindora* et *Sindoropsis* sont les plus proches voisins de *Detarium*. Herendeen (2000) s'est intéressé à l'anatomie, alors que Banks *et al.* (2000, 2001) ont étudié la micromorphologie du pollen. La biologie de la reproduction a été étudiée par Lewis *et al.* (2000) et le développement floral comparé par Tucker (2000a, 2000b, 2000c, 2000d, 2001, 2002).

Malgré la richesse des travaux entrepris, aucun traitement taxonomique global du genre *Detarium*, qui donne pourtant son nom à la tribu, n'a été effectué. Lors de l'élaboration des premières flores de l'Afrique, Aubréville (1936, 1950, 1970), Hutchinson (1927-1936, 1958) et d'autres ont à nouveau étudié le genre, mais sans jamais en faire une révision complète.

De plus, est-il nécessaire de rappeler combien la botanique est indispensable au phytochimiste. Effectivement, travaillant sur un genre peu connu ou une espèce mal identifiée, les métabolites secondaires identifiés par ses soins peuvent alors être attribués à tort à une espèce. C'est dans cette optique d'une approche rigoureuse de la phytochimie, que nous proposons un traitement taxonomique du genre *Detarium*.

2.3 Traitement taxonomique du genre *Detarium* Juss.

2.3.1 Description botanique

Le genre *Detarium* a été décrit pour la première fois en 1789 par De Jussieu.

Detarium Juss., in *Genera Plantarum* 365 (1789). – Type: *Detarium senegalense* J.F. Gmel., in *Syst.* 700 (1791)

Description : arbre à feuilles alternes, imparipennées ou paripennées. Inflorescence en forme de grappe axillaire. Fleur apétale, formée de quatre sépales et comportant dix étamines courtes alternées. Drupe orbiculaire à pulpe farineuse, graine dure et orbiculaire de laquelle partent des fibres.

Aubréville (1936, 1950, 1970) donne dans ses trois ouvrages des caractéristiques morphologiques supplémentaires, mais il semblerait cependant que ces dernières correspondent plus à la description d'une espèce en particulier que du genre lui-même. Ces descriptions ne sont donc pas reportées ici.

Hutchinson *et al.* (1958), quant à eux, établissent une description du genre qui complète celle faite par De Jussieu : feuilles composées, portant de 6 à 12 folioles arrondies, oblongues-elliptiques et habituellement émarginées aux extrémités. Folioles disposées de manière alterne et couvertes de points translucides. Inflorescence dense ou lâche ; calice en bouton glabre ou pubescent. Fruit suborbiculaire ou subglobuleux, plus ou moins aplati.

Nous estimons cependant, que la présence de nombreux points translucides n'est pas une caractéristique du genre, mais de *D. microcarpum* Guill. et Perr. uniquement.

L'observation de photographies des herbier-types (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris) nous a permis de décrire le genre de la manière suivante :

Arbre à feuilles alternes imparipennées ou paripennées, à folioles alternes ou subopposées, ovales, oblongues ou elliptiques. Nervures pennées, peu saillantes, à 15-30 paires de nervures secondaires sécantes au bord du limbe. Nerville réticulée. Inflorescence en grappe axillaire compacte ou lâche. Fleur apétale, à 4 sépales et 8-10 étamines proéminentes blanc crème. Drupe ovoïde ou globuleuse plus ou moins aplatie, de 2 à 8 cm de diamètre, contenant un gros noyau central entouré d'une pulpe farineuse, verdâtre et très fibreuse.

Toutefois, il serait plus adéquat d'étudier les herbiers non photographiés, ou même d'observer des échantillons sur le terrain, pour établir la description du genre de manière définitive.

2.3.2 Espèces du genre *Detarium*

Lors de la consultation de la littérature concernant les différentes espèces appartenant au genre *Detarium*, nous pouvons remarquer que ce dernier n'a été que partiellement révisé. Cependant, à l'heure actuelle, de nombreux spécialistes s'accordent à dire que le genre *Detarium* comporte trois espèces : *D. microcarpum* Guill. et Perr., *D. senegalense* J.F. Gmel. et *D. macrocarpum* Harms (Hutchinson *et al.*, 1958; Aubréville, 1970; Lebrun et Stork, sous presse). Malgré cela, les bases de données récentes ont répertorié jusqu'à six taxons supplémentaires, comme le montre le Tableau 2.1.

Dès lors, qu'en est-il du nombre d'espèces appartenant réellement au genre *Detarium* ?

En ce qui concerne les taxons autres que *D. microcarpum* Guill. et Perr., *D. senegalense* J.F. Gmel. et *D. macrocarpum* Harms., ils ont été révisés de la manière suivante : pour ce qui est de *D. letestui* Pellegr., Baker (1926-1930) émettait déjà un doute quant à son appartenance au genre *Detarium*, car l'ovaire contenait six ovules et le type de fruit était inconnu. Selon lui, tant que ce dernier n'était pas connu, il n'était pas possible d'associer cette espèce au genre *Detarium*. En 1957, cet arbre a été effectivement reclassé dans le genre *Sindoropsis* par Léonard (1996). *D. zeylanicum* Thwaites a, quant à lui, été reclassé dans le genre *Crudia*. *D. beurmannianum* C. Muell., qui selon Kew Garden a été renommé par Schweinf., devenant alors *D. beurmannianum* Schweinf., ex C. Muell, n'a à l'heure actuelle pas encore été révisé. C'est également le statut que possède *D. chevalieri* Harms. Finalement, *D. senegalense sensu auct.* est un taxon banni puisque portant à confusion.

D'un point de vue de la génomique, seuls *D. macrocarpum* Harms et *D. senegalense* J.F. Gmel. ont été partiellement séquencés au niveau de l'intron du gène tRNA-Leu (*trnL*) (Bruneau *et al.*, 2001), ce qui permet seulement de confirmer l'appartenance de ces deux espèces au genre *Detarium*.

Tableau 2.1 – Taxons répertoriés pour le genre *Detarium* dans les bases de données

Base de données	Taxons du genre <i>Detarium</i>	Statut / commentaires
GRIN	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr. <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. <i>D. macrocarpum</i> Harms. <i>D. heudelotianum</i> Baill.	accepté accepté non révisé non révisé
IPNI	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr. <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. <i>D. macrocarpum</i> Harms. <i>D. beurmannianum</i> Schweinf., ex C. Muell. <i>D. chevalieri</i> Harms <i>D. heudelotianum</i> Baill. <i>D. letestui</i> Pellegr. <i>D. zeylanicum</i> Thwaites.	syn. : <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. accepté accepté - - syn. : <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. - reclassé : <i>Crudia zeylanica</i> (Thwaites) Benth.
W ³ TROPICOS	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr. <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. <i>D. macrocarpum</i> Harms. <i>D. beurmannianum</i> C. Muell. <i>D. beurmannianum</i> Schweinf., ex C. Muell. <i>D. chevalieri</i> Harms <i>D. heudelotianum</i> Baill. <i>D. letestui</i> Pellegr. <i>D. zeylanicum</i> Thwaites.	- - - - - - - reclassé : <i>Sindoropsis letestui</i> Pellegr. (J.Léonard) -
GBIF	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr. <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. <i>D. macrocarpum</i> Harms. <i>D. letestui</i> <i>D. senegalensis</i> J.F. Gmel.	accepté ; syn. mal appliqué : <i>D. senegalense</i> J. Gmelin accepté ; syn. clair : <i>D. heudelotianum</i> Baillon accepté tentative de repositionnement taxonomique tentative de repositionnement taxonomique
ILDIS	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr. <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. <i>D. macrocarpum</i> Harms. <i>D. beurmannianum</i> Schweinf. <i>D. heudelotianum</i> Baillon <i>D. senegalense sensu auct.</i> <i>D. zeylanicum</i> Thwaites	accepté ; syn. mal appliqué : <i>D. senegalense</i> J. Gmelin accepté ; syn. clair : <i>D. heudelotianum</i> Baillon accepté provisoire syn. : <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. mal appliqué reclassé : <i>Crudia zeylanica</i> (Thwaites) Benth.

- aucun commentaire sur le statut du taxon

GRIN, Germplasm Resources Information Network (United States Department of Agriculture) ; IPNI, International Plant Name Index (Kew Botanical Garden (Grande-Bretagne), Harvard Herbaria (Etats-Unis), Australian National Herbarium (Canberra, Australie)) ; W³TROPICOS, Missouri Botanical Garden (United States) ; GBIF, Global Biodiversity Information Facility ; ILDIS, International Legume Database & Information Service (Université de Reading).

Il semble donc que ces bases de données fassent plutôt la liste exhaustive des basionymes, que la liste des espèces acceptées pour le genre *Detarium*. Nous allons maintenant nous focaliser sur les trois espèces acceptées pour le genre ainsi que sur *D. heudelotianum* Baill., présenté par la plupart comme étant un synonyme de *D. senegalense* J.F. Gmel.

2.3.3 Confusions botaniques

2.3.3.1 Présentation de la problématique et causes

D. macrocarpum Harms étant une espèce au statut accepté sans équivoque, et n'ayant pas été investiguée dans ce travail, elle ne sera pas traitée ici. Par contre, les rangs taxonomiques de *D. microcarpum* Guill. et Perr., *D. senegalense* J.F. Gmel. et *D. heudelotianum* Baill. ne sont pas très clairs, comme constaté dans le Tableau 2.1. Dans les bases de données GBIF et ILDIS, la situation est relativement explicite : il est dit, à propos de *D. senegalense* J.F. Gmel., que c'est un nom accepté, mais également qu'il est employé à tort pour désigner *D. microcarpum* Guill. et Perr. En ce qui concerne *D. heudelotianum* Baill., il est considéré comme synonyme de *D. senegalense* J.F. Gmel. Pour les bases de données GRIN et W³TROPICOS, *D. microcarpum* Guill. et Perr. et *D. senegalense* J.F. Gmel. sont des taxons acceptés. Dans l'IPNI, base de données souvent considérée comme étant la référence en botanique, le problème rencontré est que *D. senegalense* J.F. Gmel., en plus d'être accepté comme taxon, est employé comme nom valide de *D. microcarpum* Guill. et Perr., et de *D. heudelotianum* Baill. Ceci pose problème car cela signifierait que *D. microcarpum* Guill. et Perr. et *D. heudelotianum* Baill. sont par extension des synonymes, fait improbable car dans toute la littérature consultée, le *D. heudelotianum* est un taxon employé pour désigner systématiquement un arbre portant des fruits toxiques, tandis que les fruits de *D. microcarpum* sont toujours considérés comme comestibles. Dès lors, lorsque dans la littérature, il est question de *D. senegalense*, s'agit-il du « vrai » *D. senegalense* J.F. Gmel., du *D. microcarpum* Guill. et Perr. ou du *D. heudelotianum* Baill.?

Dans le but de clarifier la position taxonomique de *D. microcarpum* Guill. et Perr., *D. senegalense* J.F. Gmel. et *D. heudelotianum* Baill., nous devons revenir aux descriptions originales des espèces. Elles sont présentées dans le Tableau 2.2. Notons que lors de sa description de *D. heudelotianum*, Baillon (1865-1866) estimait que cette plante pourrait être *a priori* considérée comme une espèce distincte de *D. senegalense* à cause de ses différences morphologiques, mais qu'il préfère la considérer comme une forme de *D. senegalense*, cette plante présentant une grande variabilité au niveau de ses caractères morphologiques. La description de *D. heudelotianum* Baill. est toutefois reportée ici, car nous verrons dans la suite de ce travail que certains auteurs estiment qu'il s'agit d'une espèce distincte de *D. senegalense*.

Tableau 2.2 – Descriptions botaniques de *D. microcarpum* (Guillemin *et al.*, 1830-1833), *D. senegalense* (Gmelin, 1791) et *D. heudelotianum* (Baillon, 1865-1866)

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.	<i>D. heudelotianum</i> Baill.
Lieu de récolte	marché de Gorée	-	-
Arbre	- port droit, à rameaux peu nombreux, légèrement dressés	-	- arbre haut de 15 m, tronc droit, rameaux étalés
Bois	-	-	- bois dur et de couleur rouge
Rameau	-	-	- jeunes rameaux pubescents
Feuille	- plus grande que celle de <i>D. senegalense</i> , toujours échancrée	-	- composée ; - 8 à 10 folioles (5 cm de long), ovales et légèrement émarginées aux extrémités ; - minces, membraneuses ; - jeunes folioles pubescentes
Inflorescence	-	- 4 sépales, apétale, étamines alternes	- ramifiées ; - fleur : 4 sépales, 10 étamines (5 longues et 5 courtes)
Fruit	- beaucoup plus petit que celui de <i>D. senegalense</i> , parfaitement orbiculaire, comprimé ; - pulpe beaucoup plus douce et plus agréable au goût que celle de <i>D. senegalense</i>	- drupe orbiculaire à pulpe farineuse ; graine desquelles partent de nombreuses fibres.	-

Le nombre de caractères morphologiques décrits étant restreint, les descriptions botaniques effectuées ultérieurement ont été consultées pour pouvoir disposer d'une description plus précise de ces arbres. Cependant, certaines incohérences ont pu être remarquées. En effet, la comparaison des caractéristiques morphologiques décrites par chaque auteur pour chacun des organes de *D. microcarpum* et *D. senegalense*, montre que certaines d'entre elles sont inversées d'un auteur à l'autre, quand bien même tous les autres organes sont décrits de la même manière. Il ne s'agit donc pas d'une inversion des descriptions botaniques entre *D. microcarpum* et *D. senegalense*, mais bien d'une inversion au niveau d'un organe en particulier. A cela s'ajoute le fait que certains auteurs les décrivent à partir de noms vernaculaires, et que d'autres considèrent *D. heudelotianum* Baill. comme une espèce distincte, ce qui ne simplifie pas les choses.

Facteurs responsables de la confusion botanique

Les raisons ayant conduit à une telle situation botanique sont principalement la grande variation morphologique intra-spécifique, ainsi que le nombre important de noms vernaculaires employés pour désigner un arbre.

La confusion botanique dans le genre *Detarium* est certainement due entre autres à la vaste répartition géographique des espèces de ce genre. En effet, l'immense étendue du territoire et donc les fluctuations édaphiques et climatiques qui en résultent, impliquent de grandes variations morphologiques intra-spécifiques. La diversité morphologique de l'espèce de *D. senegalense* avait déjà été constatée en 1865 par Baillon, comme mentionné précédemment. En 1995, Burkill observe, quant à lui, que les fruits des arbres de *D. senegalense* J.F. Gmel. poussant en forêt sont légèrement plus grands que ceux poussant dans la savane. Des variations morphologiques importantes ont également été remarquées pour l'espèce *D. microcarpum* (Kouyaté et Van Damme, 2002). Cette étude sera présentée en détail dans le chapitre 2.4.1. Cependant, son existence à elle seule permet de montrer la complexité de la problématique quant à l'affirmation de l'existence d'espèces différentes, de sous-espèces, de variétés ou de simples variations morphologiques au sein d'un même taxon, et cela, surtout lorsque sa répartition est aussi vaste.

Une autre hypothèse pouvant expliquer cet imbroglio botanique est le nombre considérable de noms vernaculaires désignant les arbres du genre *Detarium*. Des dizaines d'ethnies occupant le territoire du Sénégal au Soudan, chacune a nommé ces arbres dans son propre dialecte. La traduction des noms vernaculaires en noms latins est une tâche ardue, et cela pour différentes raisons. La première d'entre elles tient au fait qu'à une espèce végétale donnée (et donc à un nom scientifique), s'appliquent en général différents noms vernaculaires dans une langue donnée. La réciprocité est également vraie, puisqu'un même nom tribal peut être employé pour désigner plusieurs espèces botaniques, le plus souvent en raison de l'emploi identique des plantes qu'en fait l'ethnie. De plus, il arrive que des noms différents soient donnés aux divers organes d'une même plante, en fonction de leur importance médicinale ou culturelle. A cela s'ajoute le fait qu'il faut non seulement être botaniste, mais également maîtriser les cinq ou six langues principales du pays pour réaliser ces traductions avec rigueur (Carrière, 2002). De manière à mettre en évidence cette problématique, un tableau regroupant quelques noms vernaculaires de *D. microcarpum* et *D. senegalense* a été établi (Tableau 2.3). Notons que certaines ethnies distinguent *D. senegalense* à fruits comestibles et à fruits toxiques, par le fait qu'elles leur

attribuent deux noms différents. Comme les cas d'intoxications survenus suite à l'ingestion de fruits toxiques de *Detarium* ont été étudiés surtout au Sénégal, ce sont les dialectes principaux de ce pays qui sont reportés.

Tableau 2.3 – Principaux noms vernaculaires de *D. microcarpum* et *D. senegalense*

Dialecte	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. à fruits comestibles	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel. à fruits toxiques
Balante	sara wonko ⁽⁴⁾	bloundi ⁽³⁾ , blundi pok, blâdi ⁽⁴⁾ , blundi ^(4,5) , blanti ⁽⁵⁾	
Bambara	tamba ^(1,2) , tamba guélou, tamba coumba ⁽²⁾ , tamba dala ^(4,5) , sahaonko ⁽⁵⁾	bodo ^(4,6) , taba, tambakumba, tamba, dabapumba ⁽⁵⁾ , ntamankunda ⁽⁶⁾	
Bassari	ata rej ⁽⁴⁾ , o tagèz, a tarédé ⁽⁵⁾	-	
Diola	boulébèben, boulélébeul, foulibèben ⁽³⁾ , bu pokotin ⁽⁵⁾	bu gagund, bu bunkut, bu gahund ⁽⁵⁾	bu fulunkat ⁽⁵⁾
Foula	pompondogo, bodo ⁽⁵⁾	kérènduta ⁽⁵⁾	
Français	petit détâr ⁽⁶⁾	grand détâr ^(6,7)	
Hausa	-	taura ⁽⁷⁾	
Malinké	tamba ^(1,2) , tamba guélou, tamba coumba ⁽²⁾ , tâbâ ⁽⁴⁾ , tambo, vonko, tamba gélu, boro, venko ⁽⁵⁾	tamba ⁽¹⁾ , bodo ^(2,4) , talo ⁽⁵⁾	bodo ^(1,2,4,5) (a)
Mandingue	sara wonko ^(3,5) , tâbo, sararwôke, saraôko, woko ⁽⁴⁾	mamboda ^(2,3,5) , mabodo ^(c) , mâboda ^{(4) (b)} , mambodo, saroko, tali dima ⁽⁵⁾	manbodo ^(2,3) , mabodo ^{(3,4) (b)} , mâboda ^{(4) (b)}
Peul (Sénégal)	dôli, ndôli ⁽⁵⁾	mobodey ⁽⁴⁾ , mbodèy, datékéhi, dolé, bodo ⁽⁵⁾	
Fula-Poular (Guinée)	-	botoboruré, botomel ⁽⁷⁾ , boto ^(7,8)	
Sérér	rahn ⁽²⁾ , dâk, dâg, rân ⁽⁴⁾ , ndanh ⁽⁵⁾	ndoy ^(2,4) , ndoroy ⁽⁴⁾	
Wolof	dan, dank ^(1,2,5) , dâk, dâx, dâha ⁽⁴⁾ , danha ⁽⁵⁾	detah, ⁽¹⁻³⁾ , ditah ⁽⁵⁾	detah ⁽¹⁻³⁾ , ditaq, détax, dōta, hul, holi ⁽⁴⁾ dita yu ney ^(4,5)

⁽¹⁾(Paris et Moyse-Mignon, 1947), ⁽²⁾(Aubréville, 1950), ⁽³⁾(Kerharo et Adam, 1962), ⁽⁴⁾(Kerharo et Adam, 1974), ⁽⁵⁾(Berhaut, 1975), ⁽⁶⁾(Malgras, 1992), ⁽⁷⁾(Burkill, 1995), ⁽⁸⁾(Flore de Guinée)

(a) Le « *bodo* » des Malinkés est nommé *D. heudelotianum* Baill. (Paris et Moyse-Mignon, 1947; Aubréville, 1950). (b) Selon Kerharo et Adam (1974), il semblerait que les fruits toxiques sont plus fréquemment désignés par « *mâbodo* » et les fruits comestibles par « *mâboda* », sans pourtant qu'il y ait de règle à ce sujet.

Ce tableau donne un aperçu de la complexité du problème. En dialecte bambara notamment, « *tamba* » désigne les trois arbres, tandis qu'en malinké, il désigne uniquement la forme comestible de *D. senegalense* et *D. microcarpum*. Quant au « *bodo* », dans les deux langues il se rapporte aux deux formes de *D. senegalense*, tandis qu'en dialecte fouda, il correspond uniquement à *D. microcarpum*.

Le troisième facteur est de nature historique. Lorsque, au XVIII^{ème} siècle, l'Europe s'est intéressée de manière plus systématique à la flore africaine, naturalistes et botanistes issus des différentes puissances coloniales sont allés étudier la flore des pays colonisés par leur gouvernement respectif. Au vu de l'immensité de la tâche, d'une certaine compétition entre les puissances étrangères et du peu de moyens financiers, ces botanistes répertoriaient fréquemment plus d'une centaine d'espèces par jour. De plus, leur principal instrument de travail était l'œil, outil subjectif. Dès lors, les récoltes de plantes, l'étude des herbiers, les descriptions botaniques et la taxonomie ont été réalisées en des temps record, desquelles pouvaient alors résulter certaines imprécisions. A cela s'ajoute le fait qu'il arrivait fréquemment qu'une même plante soit nommée de deux manières différentes, car décrite simultanément par deux auteurs. Ceci explique en partie la présence du nombre de synonymes quelquefois important pour une espèce, ainsi que les confusions d'ordre botanique pouvant survenir.

Compte tenu des données actuelles, les questions suivantes peuvent être posées : *D. senegalense* produit-il des fruits comestibles et/ou toxiques ? S'il produit des fruits toxiques, sont-ils confondus en une seule et même espèce avec ceux de *D. heudelotianum*, ce qui expliquerait pourquoi ce dernier est dans certains cas considéré comme un synonyme de *D. senegalense* ? Et comment cela se fait-il que *D. senegalense* puisse être employé comme synonyme de *D. microcarpum*, étant donné que ce sont deux espèces distinctes selon la plupart des auteurs ? La Figure 2.4 résume cette problématique :

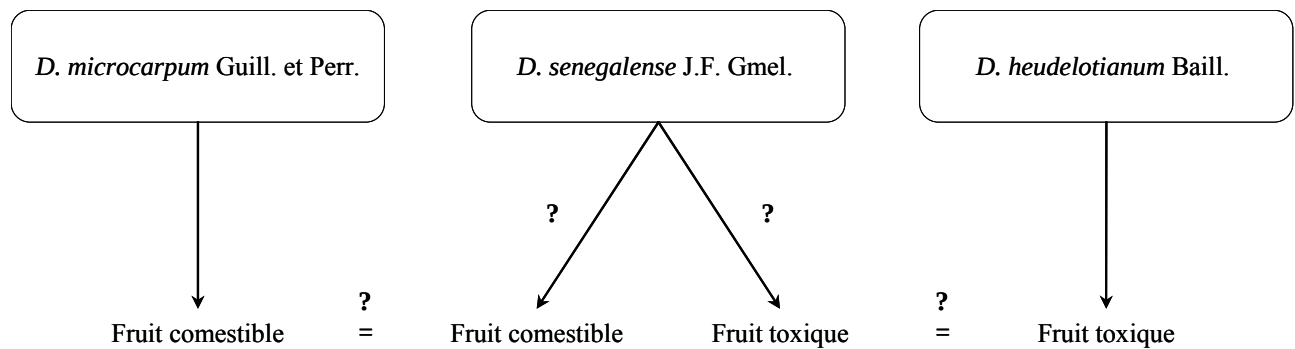


Figure 2.4 – Schématisation de la confusion botanique

2.3.3.2 Clarification de la situation botanique

Pour répondre aux questions soulevées dans le précédent chapitre, il faut en premier lieu revenir aux descriptions originales des espèces. En effet, la comparaison de ces dernières aux descriptions des arbres possédant telle ou telle activité (et notamment une toxicité) pourrait nous indiquer de quelle espèce il s'agit. Malheureusement, comme mentionné précédemment, les descriptions originales (Tableau 2.2) sont trop peu précises et les descriptions botaniques effectuées ultérieurement présentent quelques incohérences.

Dès lors, une revue des principales descriptions botaniques effectuées depuis la découverte de ces espèces jusqu'à aujourd'hui a été entreprise. Un tableau synthétique se dégageant de ces résultats a été établi, puis, les incohérences botaniques ont été mises en évidence.

Les descriptions botaniques de *D. microcarpum* et de *D. senegalense* effectuées jusqu'à ce jour par chacun des auteurs sont présentées sous forme de tableaux (Annexe 1). Les caractéristiques morphologiques des différents organes ne sont pas décrites en fonction des auteurs mais en fonction des organes, de manière à mieux mettre en évidence les imprécisions et surtout les incohérences. Un tableau comportant les caractères morphologiques « moyens » de chacun des organes a été élaboré à partir des données de l'Annexe 1 (Tableau 2.4), pour chacune des deux espèces. Il permet ainsi de mettre en évidence les critères morphologiques de différenciation entre *D. microcarpum* et *D. senegalense*, ainsi que les incohérences relevées pour chacune des espèces (Tableau 2.5 et Tableau 2.6).

Tableau 2.4 – Caractères morphologiques « moyens » de *D. microcarpum* et *D. senegalense* déterminés à partir des tableaux de l'Annexe 1

	Caractères morphologiques « moyens » de <i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	Caractères morphologiques « moyens » <i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
Arbre	- 10 m de haut ; - fût généralement droit, mais peut être tortueux	- 20-40 m de haut mais peut être plus petit ; - cime large et feuillue ; - fût tortueux ou droit
Ecorce et bois	- écorce lisse chez les jeunes arbres puis devient écailleuse ; - écorce claire à noirâtre ou même rouge ; - tranche de l'écorce rouge	- écorce finement fissurée ou écailleuse, épaisse ; - gris-blanc à gris cendré, tranche orange-rouge à brune
Rameau	- blanc ou rouge ; - recouvert d'une pellicule ou pubescence	*
Feuille	- composée pennée ; - 7-9 folioles (7-11 x 3.5-5 cm), arrondies et légèrement émarginées aux extrémités ; - coriaces, glauques dessous ; - nombreux points translucides	- composée pennée ; - 7 à 12 folioles (4-6 x 2.5-3 cm), arrondies et légèrement émarginées aux extrémités ; - minces, coriaces ; - peu ou pas de points translucides ; - jeunes folioles pubescentes
Inflorescence	- panicule dense, court, de couleur crème ; - fleur apétale, 4 sépales, 10 étamines ; - bouton densément pubescent	- en panicule, plus lâche que <i>D. microcarpum</i> , de couleur blanc-crème ; - pédicelle court, fleur apétale, 4 sépales, 10 étamines, ovaire ovoïde pubescent ; - bouton glabre ou faiblement pubescent
Fruit	- ovoïde, petit (3-5 cm de diamètre) ; - pulpe verdâtre, fibreuse, sucrée et comestible ; - souvent avorté	- subglobuleux, légèrement aplati, plus grand que celui de <i>D. microcarpum</i> (5-6 cm de diamètre) ; - pulpe farineuse verdâtre, plus fibreuse que <i>D. microcarpum</i> ; - graine unique ; - parfois toxique
Floraison	- juillet à novembre	- février à mai
Maturation des fruits	- janvier	- novembre à décembre
Habitat	- savane boisée et forêt sèche	- régions plus humides que <i>D. microcarpum</i> : forêt dense demi-sèche, lisière de la forêt dense humide, suit les galeries forestières

* aucune conclusion ne peut être tirée

Le Tableau 2.5 et le Tableau 2.6 reprennent donc les caractères morphologiques « moyens » du Tableau 2.4 pour *D. microcarpum* et *D. senegalense*, respectivement, et les mettent en relief avec les imprécisions ou incohérences relevées dans la littérature.

Tableau 2.5 – Mise en évidence des incohérences et des imprécisions botaniques dans le cas de *D. microcarpum* Guill. et Perr.

	Caractères morphologiques « moyens » de <i>D. microcarpum</i>	Incohérences et imprécisions botaniques relevées pour <i>D. microcarpum</i>
Arbre	- 10 m de haut ; - fût généralement droit, mais peut être tortueux	- cime : régulière ⁽⁸⁾ ; sphérique et assez dense ⁽¹⁰⁾ ; étendue ⁽¹¹⁾
Ecorce et bois	- écorce lisse chez les jeunes arbres puis devient écailleuse ; - écorce claire à noirâtre ou même rouge ; - tranche de l'écorce rouge	- écorce rouge-brune ^(2,7,10) ; claire ^(4,6) ; gris clair à noirâtre ⁽¹⁰⁾
Rameau	- blanc ou rouge ; - recouvert d'une pellicule ou pubescence	- recouvert d'une pellicule de poussière ^(1,3,5) ; recouvert d'une pubescence roussâtre ^(7,10)
Feuille	- composée pennée ; - 7-9 folioles (7-11 x 3.5-5 cm), arrondies et légèrement émarginées aux extrémités ; - coriaces, glauques dessous ; - nombreux points translucides	- jeunes folioles pubescentes ^(1,10) ; - folioles glabres ⁽⁵⁾ ; avec des poils courts ⁽⁷⁾
Inflorescence	- panicule dense, courte, de couleur crème ; - fleur apétale, 4 sépales, 10 étamines ; - bouton densément pubescent	**
Fruit	- ovoïde, petit (3-5 cm de diamètre) ; - pulpe verdâtre, fibreuse, sucrée et comestible ; - souvent avortés	- fruit plus gros que celui de <i>D. senegalense</i> ^(1,5) ; - charnu ^(1,5,9) ; peu charnu ^(2,6)
Floraison	- juillet à novembre	**
Maturation des fruits	- janvier	- décembre à mars ⁽³⁾ - août à janvier ⁽⁸⁾ - janvier ou février ⁽⁹⁾ - février à mars ⁽¹²⁾
Habitat	- savane boisée et forêt sèche	**

** aucune incohérence n'a été relevée.

⁽¹⁾(Aubréville, 1950) ; ⁽²⁾(Hutchinson *et al.*, 1958) ; ⁽³⁾(Ministério do Ultramar, 1958) ; ⁽⁴⁾(Kerharo et Adam, 1962) ;

⁽⁵⁾(Aubréville, 1970) ; ⁽⁶⁾(Kerharo et Adam, 1974) ; ⁽⁷⁾(Berhaut, 1975) ; ⁽⁸⁾(Malgras, 1992) ; ⁽⁹⁾(Baumer, 1995) ;

⁽¹⁰⁾(Arbonnier, 2002) ; ⁽¹¹⁾(Lebrun et Stork, 2003) ; ⁽¹²⁾Echantillons du Laboratoire.

Tableau 2.6 – Mise en évidence des incohérences et des imprécisions botaniques dans le cas de *D. senegalense* J.F. Gmel.

	Caractères morphologiques « moyens » <i>D. senegalense</i>	Incohérences et imprécisions botaniques relevées pour <i>D. senegalense</i>
Arbre	- 20-40 m de haut mais peut être plus petit ; - cime large et feuillue ; - fût tortueux ou droit	**
Ecorce et bois	- écorce finement fissurée ou écailleuse, épaisse ; - gris-blanc à gris cendré, tranche orange-rouge à brune	**
Rameau	*	- rameaux juvéniles verts tiquetés de blanc ⁽⁷⁾ , tomenteux-pubescents ⁽³⁾ ; - rameaux gris foncés ^(1,10) ; lisses ⁽⁵⁾
Feuille	- composée pennée ; - 7 à 12 folioles (4-6 x 2.5-3 cm), arrondies et légèrement émarginées aux extrémités ; - minces, coriaces ; - peu ou pas de points translucides ; - jeunes folioles pubescentes	- folioles vert-jaune clair, mates dessus et devenant luisantes à la longue ⁽¹⁾ ; vert-foncé, mates ⁽⁶⁾ ; vertes et brillantes ⁽²⁾ ; vert pâle ⁽¹³⁾ ; - limbe pubescent sur les deux faces à l'état jeune ⁽¹⁰⁾ ; glabres dessus et glabre ou pubescent dessous ^(7,13) ; glabres ⁽³⁾
Inflorescence	- en panicule, plus lâche que <i>D. microcarpum</i> , de couleur blanc-crème ; - pédicelle court, fleur apétale, 4 sépales, 10 étamines, ovaire ovoïde pubescent ; - bouton glabre ou faiblement pubescent	**
Fruit	- subglobuleux, légèrement aplati, plus grand que celui de <i>D. microcarpum</i> (5-6 cm de diamètre) ; - pulpe farineuse verdâtre, plus fibreuse que <i>D. microcarpum</i> ; - graine unique ; - parfois toxique	- fruit “petit comme une prune” (versus “comme une orange” pour <i>D. microcarpum</i>) ^(1,5) ; fruit petit ⁽⁸⁾
Floraison	- février à mai	**
Maturation des fruits	- novembre à décembre	**
Habitat	- régions plus humides que <i>D. microcarpum</i> : forêt dense demi-sèche, lisière de la forêt dense humide, suit les galeries forestières	**

* aucune conclusion ne peut être tirée ; ** aucune incohérence n'a été relevée.

⁽¹⁾(Aubréville, 1950) ; ⁽²⁾(Hutchinson *et al.*, 1958) ; ⁽³⁾(Ministério do Ultramar, 1958) ; ⁽⁴⁾(Kerharo et Adam, 1962) ; ⁽⁵⁾(Aubréville, 1970) ; ⁽⁶⁾(Kerharo et Adam, 1974) ; ⁽⁷⁾(Berhaut, 1975) ; ⁽⁸⁾(Malgras, 1992) ; ⁽⁹⁾(Baumer, 1995) ; ⁽¹⁰⁾(Arbonnier, 2002) ; ⁽¹¹⁾(Lebrun et Stork, 2003) ; ⁽¹²⁾Echantillons du Laboratoire ; ⁽¹³⁾(D'Almeida, 1984).

Dans les deux cas, les feuilles sont décrites comme paripennées ou imparipennées. Cela peut provenir d'une variation morphologique intra-spécifique, ou parce qu'elles sont disposées de manière alterne ou subopposée. L'une des incohérences qui frappe le plus dans le cas de *D. microcarpum* est la couleur de l'écorce : est-elle rouge-brun, ou gris clair à noirâtre ? Est-ce le même cas que celui décrit pour *D. senegalense*, c'est-à-dire un changement de la coloration de l'écorce en fonction des différentes couches : le liège serait-il gris, tandis que le cambium subérophellodermique rouge ? L'échantillon d'écorce dont nous disposons au Laboratoire confirmerait cette dernière hypothèse (Tableau A.1.2, Annexe 1). Concernant les folioles, il semblerait qu'elles soient pubescentes à l'état juvénile puis glabres à leur maturité. Une autre incohérence marquante touche les fruits : Aubréville (1950, 1970) est le seul auteur à considérer que les fruits de *D. microcarpum* sont plus gros que ceux de *D. senegalense*. Il est cependant intéressant de noter que dans son ouvrage de 1936, il affirmait le contraire. Il semble donc qu'il y ait eu une erreur dans ses écrits de 1950 et 1970, car ceux-ci sont en désaccord avec les descriptions originales de Guillemain *et al.* (1839-1833). Par ailleurs, le nom d'espèce « *microcarpum* » n'a pas été choisi par hasard, mais bien parce qu'il décrit l'apparence du fruit. Au niveau étymologique, « *microcarpum* » signifie « petit fruit » (du *gr.* *mikros* « petit » et *karpos* « fruit »). Ce nom d'espèce a certainement été choisi par opposition à la troisième espèce acceptée du genre *Detarium* : *D. macrocarpum* (du *gr.* *makros* « long, grand »). L'incohérence qui frappe le plus est cependant celle qui concerne la période de maturation des fruits : en effet, d'après le tableau A.1.8 de l'Annexe 1, elle peut être de décembre-janvier à février-mars (Ministério do Ultramar, 1958; Baumer, 1995), ou d'août à janvier (Malgras, 1992). Vu l'énorme écart entre ces deux périodes de maturation, on pourrait supposer que cela est dû au lieu d'observation. Cependant, le *Ministério do Ultramar* décrit des fruits provenant de Madère, Baumer, de la région sahélienne, et Malgras, du Mali. Les données de Malgras sont surprenantes dans la mesure où les fruits analysés dans ce travail proviennent également du Mali et ont été récoltés frais, au mois de mars.

Pour ce qui est de *D. senegalense*, les avis divergent concernant les folioles : il semblerait qu'elles soient pubescentes à l'état jeune puis, à maturité, glabre dessus et glabre ou pubescent dessous (Berhaut, 1975; D'Almeida, 1984). Quant aux observations faites à partir des échantillons de notre Laboratoire, une conclusion peut difficilement être tirée dans la mesure où l'aspect des feuilles de la forme toxique est très différent de la forme comestible (Tableau A.1.4, Annexe 1). Concernant la couleur, elles sont vert-jaune clair selon Aubréville (1950), vert clair selon D'Almeida (1984) ou vert-foncé selon Kerharo and Adam (1974). L'incohérence qui

frappe le plus est à nouveau en rapport avec la taille des fruits : Aubréville, dans ses observations de 1950 et de 1970 estime que ceux du *D. senegalense* sont plus petits que ceux du *D. microcarpum*. Comme indiqué plus haut, cela est en contradiction avec les descriptions originales des espèces. En ce qui concerne la période de maturation des fruits, toutes les données de la littérature concordent : de novembre à décembre (Aubréville, 1950; Ministério do Ultramar, 1958; D'Almeida, 1984; Malgras, 1992; Baumer, 1995). Ces données concordent également avec les échantillons récoltés au Sénégal pour notre travail.

En plus des incohérences remarquées au niveau de la description des organes, le rang taxonomique de *D. microcarpum* Guill. et Perr., *D. senegalense* J.F. Gmel. et *D. heudelotianum* Baill. a toujours prêté matière à discussion : Heckel et Schlagdenhauffen (1889) et Oliver (1868-1937) estimaient que les formes comestibles et toxiques étaient à classer comme deux espèces différentes, compte tenu des différences morphologiques. Baker (1926-1930) considérait *D. microcarpum* comme une forme de *D. senegalense*, et *D. heudelotianum*, comme un synonyme de ce dernier. La position d'Aubréville (1936) n'est pas claire : dans un premier temps, il affirme que ces trois plantes sont confondues en une seule et même espèce ; dans un deuxième temps, en s'appuyant sur les noms vernaculaires, il les considère comme trois espèces distinctes, position approuvée par Paris et Moyse-Mignon (1947).

Cet imbroglio provient probablement du fait que les écrits d'Oliver (1868-1937) et d'Hutchinson et Dalziel (1927-1936), considérés comme faisant référence, aient présenté des erreurs. En effet, Hutchinson *et al.* (1958) relèvent dans « *Flora of West Tropical Africa* » l'origine des confusions : le lot de *D. microcarpum* Guill. et Perr. avait été séparé en deux lots, l'un nommé *D. senegalense* dans « *Flora of Tropical Africa* » d'Oliver (1868-1937), et l'autre nommé *D. microcarpum* dans « *Flora of West Tropical Africa* » de Hutchinson and Dalziel (1927-1936). De la même manière pour *D. senegalense* J.F. Gmel., l'échantillon a été séparé en deux lots, chaque lot ayant été décrit et nommé différemment dans les deux ouvrages pré-cités. En plus de cela, dans la « Flore Forestière de Côte d'Ivoire » d'Aubréville (1936), *D. senegalense* J.F. Gmel. avait été nommé *D. heudelotianum* Baill.

Par conséquent, grâce aux recherches de Hutchinson *et al.* (1958), la classification des espèces du genre *Detarium* s'est trouvée clarifiée. A partir de ce moment-là, *D. microcarpum* Guill. et Perr. et *D. senegalense* J.F. Gmel. ont été considérés comme espèces du genre, tandis que le taxon *D. heudelotianum* Baill. a été reclassé comme étant un synonyme de la forme toxique de *D. senegalense* J.F. Gmel (Hutchinson *et al.*, 1958; Ministério do Ultramar, 1958;

Kerharo et Adam, 1962; Aubréville, 1970; Kerharo et Adam, 1974; Berhaut, 1975; D'Almeida, 1984; Arbonnier, 2002; Lebrun et Stork, sous presse). Cette découverte faite par Hutchinson *et al.* (1958) permet alors de comprendre pourquoi dans les bases de données telles que IPNI, ILDIS, etc..., on trouve que le taxon *D. senegalense* est un synonyme mal appliqué pour parler de *D. microcarpum* Guill. et Perr., et pourquoi *D. heudelotianum* Baill. est considéré comme étant un synonyme de *D. senegalense* J.F. Gmel (Berhaut, 1975; Lebrun et Stork, sous presse). Malgré cette clarification de la situation botanique, il subsiste quelques divergences, dues à l'absence de révision du genre dans sa totalité : Kerharo et Adam (1974) indiquent toujours que *D. senegalense* Gmelin est un synonyme de *D. microcarpum* Guill. et Perr., et que *D. heudelotianum* est le synonyme de *D. senegalense* J.F. Gmelin ; Arbonnier (2002), quant à lui, affine ces définitions en disant que ce sont « en partie » des synonymes.

Finalement, les descriptions d'Hutchinson *et al.* (1958), du Ministério do Ultramar (1958), de Kerharo et Adam (1962 et 1974), de Berhaut (1975), de D'Almeida (1984), d'Arbonnier (2002) et de Lebrun et Stork (2003) concordent bien. Compte tenu de la grande variabilité des caractères morphologiques intra-spécifiques de *D. microcarpum* et de *D. senegalense*, les descriptions botaniques de ces espèces (chapitres 2.4 et 2.5) seront aussi complètes que possible, mais sans toutefois indiquer des caractères morphologiques qui ne seraient pas décrits unanimement par tous ces auteurs. En effet, il semble qu'il vaille mieux décrire un nombre restreint de caractères pour une espèce, mais qui soient retrouvés chez chaque spécimen.

Dans le présent travail, le fait que certains auteurs aient repris les données d'autres botanistes, n'ayant pas les plantes fraîches ou même les herbiers à disposition, a bien entendu été pris en considération. Mais malheureusement, leur source n'était pas indiquée systématiquement. De plus, comme la morphologie de *D. microcarpum* et de *D. senegalense* semble varier considérablement, il aurait été intéressant de pouvoir comparer ces variations en fonctions du lieu de récolte. Malheureusement, celui-ci n'est pas souvent indiqué et aucune discussion n'a pu être engendrée.

En conclusion, *D. microcarpum* Guill. et Perr. est une espèce acceptée, qui produit des fruits comestibles. *D. heudelotianum* n'est pas à considérer comme une espèce. En ce qui concerne *D. senegalense* J.F. Gmel., il semblerait qu'il puisse donner des fruits comestibles ou toxiques, et que cette forme toxique était (et est encore quelquefois) appelée *D. heudelotianum*. La **Figure 2.5** illustre la situation botanique clarifiée, puis la clef des espèces que nous proposons est présentée ci-après.

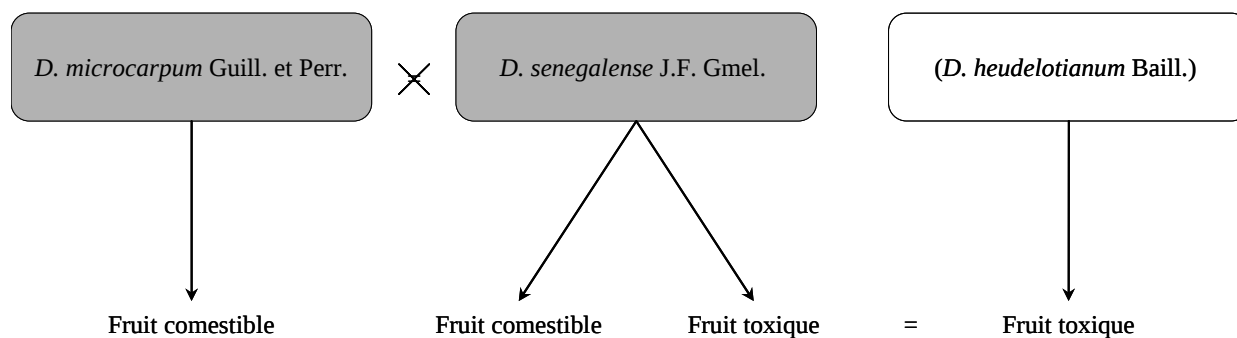


Figure 2.5 – Schématisation de la situation botanique clarifiée

Clef des espèces de *Detarium* Juss.

1. Feuilles comportant 6-8 (-12) folioles, limbe coriace, gris-blanchâtre dessous, et comportant des points translucides ; inflorescence dense ; drupe de 2.5-5 cm de diamètre*D. microcarpum*
- Feuilles comportant (8-) 12-20 folioles, limbe finement coriace ou souple, et vertes dessous ; inflorescence lâche.....2.
2. Calice glabre extérieurement ; arbre des forêts denses semi-sèches ; drupe de 5-7 cm de diamètre, parfois comestible, parfois toxique.....*D. senegalense*
- Calice pubescent extérieurement; grand arbre des forêt dense humide, à très gros fruits*D. macrocarpum*

Une clarification des espèces appartenant au genre *Detarium* ayant été menée, nous allons analyser les descriptions botaniques des fruits incriminés dans les cas d'intoxication, de manière à tenter de les identifier d'un point de vue botanique.

Toxicité du genre : aspects botaniques

En premier lieu, nous devons prendre en considération le fait que quelques auteurs estiment que les fruits responsables de ces intoxications ne sont pas des fruits de *Detarium*, mais ceux d'*Erythrophleum suaveolens* (Guill. et Perr.) Brenan (syn : *E. guineense* G. Don) (Fabaceae). C'est notamment l'avis de Corre, qui estime que ces derniers sont des paralyso-moteurs, au même titre que l'aconitine et la cicutine (Kerharo et Adam, 1974). Baumer (1995) considère quant à lui, que les vertiges prétendument causés par *D. senegalense* sont dus à l'ingestion d'une variété à fruits toxiques. Selon ce botaniste, ils sont différenciables de la variété comestible uniquement par une légère différence de saveur, et par le fait qu'une fois tombés à terre, ils sont délaissés par les animaux. Concernant cette toxicité des fruits de *D. senegalense*, il cite un proverbe haussa qui dit qu'« il ne faut jamais avoir deux fruits de « taura » dans la bouche », le « taura » correspondant donc aux fruits toxiques de *D. senegalense*. Baumer pense toutefois qu'ils peuvent être confondus avec des galls, ou alors avec ceux d'*E. suaveolens*, réputés pour leur haute toxicité. Il se prononce ensuite sur les travaux de Paris et Moyse-Mignon (1947), et affirme que « le fruit de *D. heudelotianum* n'est pas toxique et qu'il est même quelquefois consommé, mais qu'il est moins apprécié que celui de *D. senegalense*. » La position de Baumer n'est alors pas très claire, car dans un premier temps il affirme qu'il existe une variété à fruits toxiques de *D. senegalense* puis, en reprenant les travaux de Paris et Moyse-Mignon, il rapporte que *D. heudelotianum* et *D. senegalense* ne sont pas toxiques, et que les cas d'intoxication seraient dus à l'ingestion des fruits d'*E. suaveolens*.

Les hypothèses avancées pour expliquer l'origine de la confusion entre *E. suaveolens* et *D. senegalense* sont les suivantes : ces deux espèces peuplent les galeries forestières du secteur soudano-guinéen (cf. chapitre 2.1), et sont de plus assez semblables morphologiquement, d'où une méprise possible (Baumer, 1995). En Guinée, *E. suaveolens* est appelé « téli » en dialecte poular et « méli » en dialecte soussou. Or, « méli » est également un nom vernaculaire désignant *D. senegalense*. C'est cette confusion de noms vernaculaires qui expliquerait, selon Burkill (1995), que l'écorce employée comme poison de flèches est en fait celle de *E. suaveolens* et non celle de *D. senegalense*. Kerharo et Adam (1974) relèvent également cette méprise et affirment que le « téli » (*E. suaveolens*) est un fruit différent du « méli » (*D. senegalense*), ce dernier étant également un poison, mais moins redoutable que le « téli ». Ils considèrent que le « méli » est une variété du *D. senegalense* Gmel., dont les habitants de plusieurs régions sénégalaises se servent pour empoisonner leurs flèches. Ce sont l'écorce et le mésocarpe qui sont toxiques. De plus, compte tenu de l'imprécision des déterminations

botaniques et des confusions de dénominations faites avant 1958, ils estiment que les études faites par Heckel et Schlagdenhauffen (1889) et Paris et Moyse-Mignon (1947) concernaient le fruit toxique de *D. senegalense* Gmel et non celui d'*E. suaveolens*. Selon Burkill (1995), même la forme comestible du *D. senegalense* peut présenter une toxicité, en particulier les petits fruits avortés restant sur l'arbre. Une prudence s'impose également avec la graine, car donnée au Nigeria à toute personne qui a été blessée par une flèche empoisonnée, elle induit des vomissements.

Finalement, Corre est le seul botaniste à penser que *D. senegalense* ne peut pas produire de fruits toxiques. Quant à l'avis de Baumer, il n'est pas suffisamment clair. Comme nous allons le voir ci-dessous, tous les autres botanistes considèrent que les fruits incriminés dans les cas d'intoxication proviennent d'une forme toxique de *D. senegalense*.

Dans la littérature, le fruit du *Detarium* incriminé dans les cas d'intoxication est très souvent désigné par ses noms vernaculaires tels que « ditakh » (Imbert et Teyssier, 1986), « ditax » (D'Almeida, 1984). Comme ces noms désignent en dialectes malinké, mandingue et wolof (Tableau 2.3) autant la forme comestible que la forme toxique, cela explique pourquoi d'autres botanistes ont précisé « variété toxique du ditakh » (Burgel *et al.*, 1998; Berthelot *et al.*, 2000) et « faux detah » (Paris et Moyse-Mignon, 1947). D'autres auteurs l'ont simplement nommé « fruit toxique du *Detarium* » (Sambuc, 1887), « variété à fruits amers de *D. senegalense* » (Heckel et Schlagdenhauffen, 1889; Adam *et al.*, 1991) et finalement « variété à fruits toxiques de *D. senegalense* » (Kerharo et Adam, 1962; D'Almeida, 1984).

Ces données suggèrent alors que le fruit toxique est bien un fruit du *D. senegalense* J.F. Gmel. Cela est confirmé par la correspondance entre les caractères morphologiques décrits par les auteurs des études toxicologiques et la clef des espèces que nous avons établie. De plus, l'habitat, les périodes de floraison et de maturation du fruit relevées par les auteurs d'études toxicologiques (D'Almeida, 1984; Imbert et Teyssier, 1986) correspondent à ceux de *D. senegalense* J.F. Gmel. Certaines controverses subsistent, par contre, quant au rang taxonomique du fruit toxique de *D. senegalense* comme nous allons le voir.

Excepté Paris et Moyse-Mignon (1947) qui considéraient le fruit toxique comme une espèce différente (nommée *D. heudelotianum* Baill.), tous les auteurs s'accordent pour dire que *D. senegalense* peut produire des fruits comestibles ou toxiques. La question est maintenant de savoir si les arbres à fruits toxiques et les arbres à fruits comestibles de *D. senegalense* sont des sous-espèces, des variétés ou simplement des formes différentes. Analysons les données fournies par la littérature à ce sujet.

En 1832, Guillemain *et al.* (1830-1833) qualifient ces deux formes de fruits comme étant des variétés de *D. senegalense*. Dans l'étude réalisée par Sambuc (1887), les fruits amers réputés toxiques n'avaient montré aucun effet secondaire. Sur la base de cette étude, Heckel et Schlagdenhauffen (1889) se demandent alors s'il est correct de dire que la variété à fruits amers est toxique. Ils s'interrogent également de savoir si les deux variétés de *D. senegalense* ne présenteraient pas des caractères différentiels plus nombreux et plus importants que ceux décrits par Sambuc. Pobéguin prétend quant à lui que même la forme comestible de *D. senegalense* provoque des vertiges lorsque qu'elle est consommée en grande quantité (Kerharo et Adam, 1974).

Pour ce qui est de Paris et Moyse-Mignon (1947), ils reçurent des fruits connus sous le nom de « faux *detah* » et rendus responsables de cas d'intoxications survenus en Afrique Occidentale Française. L'expéditeur estimait que ces fruits avaient été confondus avec ceux du « *detah* » comestible, déterminé comme étant *D. senegalense* Gmel. Après comparaison des fruits du « faux *detah* » avec ceux de *D. senegalense*, gardé en France sous forme d'herbier, Paris et Moyse-Mignon (1947) considérèrent qu'excepté la saveur amère, les fruits du « vrai » et du « faux *detah* » étaient très analogues. Cependant, au vu de la texture fibreuse des fruits toxiques et de l'aspect des folioles, ils décrivent le « faux *detah* » comme étant une espèce différente, *D. heudelotianum* Baill., et non comme une variété amère du *D. senegalense*. Ils émettent cependant une réserve quant à cette détermination, suggérant alors une seconde identification effectuée sur la base d'herbiers et de l'arbre complet. Pour Aubréville (1950), *D. senegalense* est subdivisé en deux variétés, l'une à fruits comestibles et l'autre à fruits toxiques, malgré l'absence de différences morphologiques. Il considère *D. heudelotianum* Baill. comme un synonyme de *D. senegalense*. En 1962, Kerharo et Adam s'interrogent également sur le rang taxonomique de *D. senegalense* forme toxique, mais sans prendre position. Ils affirment cependant qu'un fait est incontestable : certains arbres produisent des fruits toxiques responsables de nombreux accidents et d'autres fruits sont parfaitement comestibles. Selon eux, les africains connaissent très bien dans chaque région les exemplaires de l'une et l'autre forme et leur donnent quelques fois des noms différents. En 1974, Kerharo et Adam reprennent les résultats obtenus par Paris et Moyse-Mignon 1947 et suggèrent que le « faux *detah* » nommé *D. heudelotianum* Baill. par ces derniers, est en réalité la variété à fruits toxiques de *D. senegalense*, et cela en raison du nom malinké « *bodo* » qui lui est attribué, ainsi que de la description botanique qui en est donnée. Kerharo et Adam considèrent donc les fruits comestibles et toxiques comme deux variétés différentes de *D. senegalense*, mais affirment que

la réponse à cette question n'est pas définitive. Quant à Berhaut (1975), il affirme seulement que *D. heudelotianum* est un arbre à fruits toxiques et qu'il est synonyme de *D. senegalense* Gmel.

D'Almeida (1984) reprend les termes « variété amère » de Heckel et Schlagdenhauffen (1889) pour désigner l'arbre donnant des fruits toxiques. Selon lui, une étude comparative au niveau chimique et toxicologique de cette variété avec la variété comestible permettrait de lever l'ambiguïté qui reste sur l'existence de l'espèce *D. heudelotianum* postulée par Baillon (1865-1866). D'Almeida pense cependant que cette espèce est confondue avec celle de *D. senegalense* en raison de la similitude morphologique des deux arbres. Concernant la présence de fruits toxiques, il se demande s'il ne s'agit pas d'un phénomène de xénie comme c'est le cas pour le *Prunus amygdalus* Batsch. (Rosaceae). En effet, la variété *amara* comporte un hétéroside cyanogénétique qu'il est quelquefois possible de retrouver dans les graines de la variété *dulcis*, qui n'en contient généralement pas. Ce phénomène de xénie résulte de la fécondation croisée par les abeilles : le caractère cyanogénétique étant dominant, les abeilles induiraient ainsi directement la formation de graines amères chez la variété *dulcis* par apport de pollen d'amandier amer.

En ce qui concerne l'aspect botanique de l'étude clinique menée par Imbert et Teyssier (1986), ils estiment que le fruit responsable des intoxications est une variété toxique du *D. senegalense*, appelée anciennement *D. heudelotianum*. Ils affirment eux aussi que la seule manière de distinguer la variété comestible de la variété toxique est d'une part, la saveur plus amère du fruit, et d'autre part, les lieux de récolte : les singes ne consomment pas les fruits toxiques abandonnés sur les arbres dangereux.

L'étude toxicologique d'Adam *et al.* (1991) a été basée sur les données botaniques de Paris et Moyse-Mignon (1947) et Kerharo et Adam (1974). Bien que le taxon *D. heudelotianum* ait été considéré en 1958 comme ne se référant plus à aucune plante, Adam *et al.* estiment tout de même que la question de savoir s'il y a lieu de considérer, en raison des caractères de comestibilité ou de toxicité du fruit, l'existence de deux espèces différentes ou de deux variétés de *D. senegalense*, est encore d'actualité. Ils confirment que seul le goût plus amer et l'odeur plus intense permettent d'identifier la forme toxique et que « les populations rurales du Sénégal n'effectuent leur récolte qu'à partir d'arbres dont les fruits sont consommés ordinairement par les troupes de singes et de cochons sauvages. ». Ils émettent de plus l'hypothèse suivante : « *D. heudelotianum* rencontré sur les lisières forestières n'est-il pas tout simplement *D. senegalense* répandu loin en forêt par les éléphants ? L'examen des crottins montre en effet par tamisage de très nombreuses graines intactes de *D. senegalense*. ». D'où l'éventualité d'être en présence d'un phénomène de xénie. Une autre hypothèse selon eux, est qu'il s'agit de la même variété,

comprenant donc également le composé toxique, mais à des concentrations très faibles dans les fruits comestibles.

Burkill (1995) reconnaît également l'existence de deux formes d'arbres de *D. senegalense* non différenciables morphologiquement. Selon lui, c'est un arbre semi-cultivé au Sénégal et ceux poussant spontanément sont éradiqués systématiquement pour éviter des intoxications. Lui aussi affirme que les Africains peuvent différencier facilement les deux formes d'arbres et qu'en période de maturation du fruit, les toxiques sont délaissés par les animaux. Il pense qu'il est probable que les différences de composition chimique entre ces deux formes d'arbre surviennent à cause de facteurs phénologiques et édaphiques. Quant à Arbonnier (2002), il qualifie les deux types de fruits comme provenant de deux formes d'arbre.

Les échantillons de la forme comestible et toxique que nous avons collectés au Mali présentent des différences morphologiques (cf. Annexe 1) : aspect des feuilles, texture fibreuse du fruit de la forme toxique. Cette constatation nous fait alors plutôt opter pour le statut de variétés différentes entre ces deux arbres. Pour affirmer avec certitude le rang taxonomique de ces deux types d'arbres, il faudrait procéder à une récolte d'échantillons sur plusieurs sites et mener une analyse morphologique approfondie.

Conclusions de la problématique sur la confusion botanique

D'après les recherches bibliographiques effectuées et notre étude, *D. microcarpum* Guill. et Perr. et *D. senegalense* J.F. Gmelin sont des espèces acceptées du genre *Detarium*. Concernant cette dernière espèce, il existe des arbres produisant des fruits comestibles et d'autres des fruits toxiques. La plupart des auteurs affirme que ces deux formes de *D. senegalense* ne sont pas différenciables morphologiquement, et que seule la saveur amère du fruit toxique permet de les distinguer. Autrefois, l'arbre produisant des fruits toxiques était considéré comme une espèce distincte, nommée *D. heudelotianum* Baill. Actuellement, ce taxon est encore quelquefois employé pour désigner la forme toxique. La question du rang taxonomique de la forme toxique est encore d'actualité : certains auteurs considèrent qu'il s'agit de deux variétés différentes, tandis que d'autres estiment qu'il s'agit simplement de formes différentes. Pour notre part, notre étude préalable nous conduit à estimer qu'il s'agit de variétés différentes, en raison de certaines différences morphologiques, d'une part, et de la comestibilité ou de la toxicité du fruit, d'autre part. Cependant, une analyse détaillée des caractères morphologiques, effectuée sur des arbres provenant de diverses régions climatiques serait

nécessaire à l'établissement de la position botanique définitive. Pour éviter toute méprise à ce sujet, nous nommerons dans ce travail ces deux types de fruits : *D. senegalense* à forme toxique et *D. senegalense* à forme comestible.

Dans le présent travail, les espèces *D. microcarpum* Guill. et Perr. et *D. senegalense* J.F. Gmel. seront décrites en détail puisqu'étudiées d'un point de vue phytochimique. Nous allons de surcroît étudier la différence de composition chimique entre les formes toxiques et comestibles des fruits de *D. senegalense*, travail non effectué auparavant. Cette approche chimiotauxonomique permettra d'apporter des informations complémentaires quant au rang taxonomique des deux formes d'arbres.

2.4 Présentation de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr.

2.4.1 Caractères morphologiques et répartition géographique

Detarium microcarpum (Figure 2.6) est un arbre de 8 à 12 m de haut, possédant une écorce écailleuse à tranche rouge. Les feuilles sont pennées et comportent de 6 à 8 (-12) folioles, disposées de manière alterne ou subopposée. La foliole est ovale à elliptique, longue de 7 à 11 cm, large de 3 à 4 cm dans la partie inférieure. Elle est arrondie aux deux extrémités et émarginée au sommet. Le limbe est coriace, glauque, gris-blanchâtre dessous, et comporte des points translucides. L'inflorescence, en panicule ou fascicule axillaire, est courte et dense. La fleur apétale, de couleur crème, comporte 4 sépales, 10 étamines. Le calice en bouton est densément pubescent à l'extérieur. Le fruit est une drupe globuleuse ou subglobuleuse, aplatie, de 2.5 à 5 cm de diamètre. L'épicarpe se craquelle à maturité, le mésocarpe verdâtre est entremêlé de fibres insérées sur le noyau. Le fruit est comestible. Des fruits avortés ou des galles sont fréquents sur certains arbres. Floraison en saison des pluies (Hutchinson *et al.*, 1958; Ministério do Ultramar, 1958; Kerharo et Adam, 1974; Berhaut, 1975; D'Almeida, 1984; Arbonnier, 2002; Lebrun et Stork, sous presse).

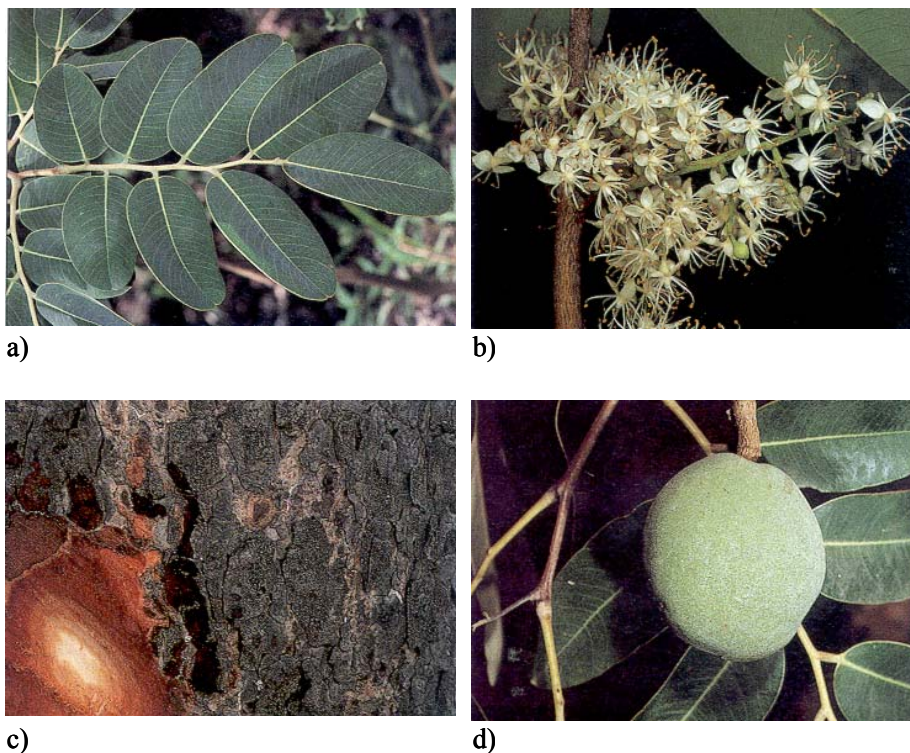


Figure 2.6 – Photographies de *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. (Arbonnier, 2002)

a) feuille ; b) inflorescence ; c) écorce ; d) fruit

Detarium microcarpum est un arbre qui peuple des contrées les plus sèches aux plus humides du secteur soudanien. On le rencontre en particulier dans les savanes arbustives à arborées, les savanes boisées et les forêts claires. Cet arbre pousse également dans les savanes arborées du secteur soudano-guinéen, parfois en population presque pure. Il croît généralement sur des sols sableux ou latéritiques. Sa répartition s'étend du Sénégal au Cameroun, jusqu'au Soudan, de manière irrégulière et grégaire. Comme c'est le cas pour la plupart des arbres soudaniens, il a une répartition géographique très vaste, tant en longitude qu'en latitude et très peu d'espèces poussent en association (White, 1986; Arbonnier, 2002). Autrefois, *D. microcarpum* peuplait également la zone sahélienne, mais il a été presque complètement éliminé lors des dernières sécheresses. La carte de répartition de *D. microcarpum* est présentée à la Figure 2.7.

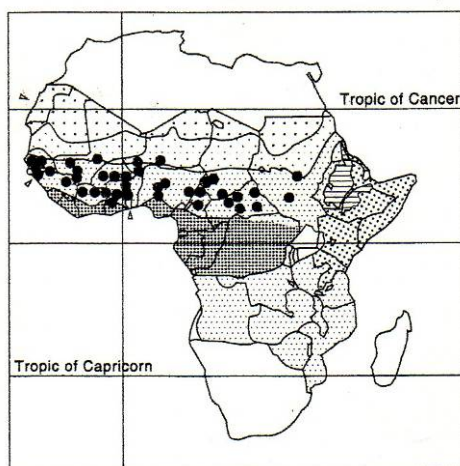


Figure 2.7 - Carte de répartition de *D. microcarpum* (Lebrun et Stork, sous presse)

Une étude très enrichissante a été effectuée sur les variations morphologiques et dendrologiques de dix populations de *D. microcarpum* Guill. et Perr. réparties dans trois zones agro-écologiques du sud du Mali. Ce travail montre qu'il existe une grande variabilité inter-populations au niveau de la dimension des arbres, des feuilles, des graines et des fruits. Les différences morphologiques constatées ont été attribuées à certains facteurs écologiques tels que l'humidité et la nature du sol. En effet, il a été observé que l'humidité du sol influence positivement la taille des organes mesurés. En ce qui concerne les fruits, trois formes différentes ont été recensées : allongées, arrondies et ovoïdes. Les auteurs concluent en disant qu'il faudrait étendre l'étude à l'observation de caractères supplémentaires. Elle devrait, de plus, porter sur des arbres de l'ensemble de l'aire de répartition sahélienne et sub-sahélienne pour pouvoir affirmer l'existence de variétés différentes au sein de la population de *D. microcarpum* (Kouyaté et Van Damme, 2002).

Les fruits de *D. microcarpum* étudiés dans ce travail ont été récoltés à l'état frais par le Professeur K. Hostettmann au marché de Médine à Bamako (Mali), en mars 2000. Ils ont été identifiés par le Dr D. Diallo de l'Institut National de Santé Publique (Bamako, Mali).

2.4.2 Utilisations traditionnelles

D. microcarpum est un arbre de grande importance en Afrique de l'Ouest. En effet, il est employé en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies et fait d'ailleurs partie de plusieurs pharmacopées locales (Burkill, 1995). Parmi les fruits dont disposent les habitants de l'Afrique sub-saharienne, il joue également un rôle important au niveau nutritionnel. Son intérêt aux niveaux écologique et économique n'est pas à négliger non plus. Les utilisations thérapeutiques des différents organes de *D. microcarpum* sont répertoriées dans le Tableau 2.7, tandis que le Tableau 2.8 inventorie ses utilisations alimentaires, agricoles, vétérinaires et domestiques.

Tableau 2.7 - Principales utilisations de *D. microcarpum* Guill. et Perr. en médecine traditionnelle (Kerharo et Adam, 1962; Kerharo et Adam, 1974; Berhaut, 1975; Aquino *et al.*, 1991; Malgras, 1992; Burkill, 1995; Arbonnier, 2002)

Organe	Propriétés / utilisations	Préparation et mode d'administration	Ethnie ou pays
Fruit	Vertige, méningite et nombreux usages magico-religieux	*	Afrique de l'Ouest
Feuille	Traitement des diarrhées et de la dysenterie ; employée comme pansement pour les blessures	*	Nigeria, Mali
	Lèpre, hémorroïde, syphilis, blennorragie et aménorrhée	Décoction, en association avec d'autres plantes	Mali
	Paralysie	Bain et fumigation de racines et feuilles bouillies	Mali
Rameau feuillu	Asthénie, méningite, calme les crampes, et est employé pour le soin des accouchées	Décoction	Mali
Ecorce du tronc	Diarrhées simples et diarrhées sanguinolentes	Ecorce bouillie, administrée <i>per os</i>	*
	Traitement de la dysenterie ; employée comme pansement pour les blessures	*	Nigeria
	Traitement des hémorroïdes et de la blennorragie	*	Foula et Peul Toucouleur au Sénégal
	Amibiase, rhumatismes	*	Niger
	A des propriétés astringentes ; produit une gomme-résineuse	*	*
	Anti-entéralgique, diurétique et utilisé en association avec d'autres plantes pour soigner une forme de maladie mentale	*	*
	Anti-inflammatoire et diurétique	Infusion	Sénégal
Racine	Maux d'estomac et problèmes intestinaux, surtout contre les diarrhées dysentériques. Egalement utilisée comme diurétique	Décoction	Foula et Peul Toucouleur au Sénégal
	Traitement de la tuberculose, variole, bilharziose et des démangeaisons	*	*
	Syphilis	Décoction consommée <i>per os</i>	Sénégal
	Paralysie	Bain et fumigation de racines et feuilles bouillies	Mali
	Epilepsie	Cendres de l'écorce	*
	Traitement médico-magique des maladies mentales	Employée en association avec d'autres plantes	Régions du Cayor et du Ferlo au Sénégal
Différents organes	Diarrhées, dysenteries, diarrhées des nourrissons, hémorroïdes, lèpre, syphilis, blennorragie, rhumatismes, impuissance, stérilité, infections fongiques et affections biliaires	*	Sénégal
	Dysenterie et syphilis	*	Igbo du Nigeria

* non précisé

Il est remarquable de constater que tous les organes du *D. microcarpum*, excepté les inflorescences, sont employés en médecine traditionnelle d'Afrique de l'Ouest. Les maladies concernées sont d'origines diverses, mais touchent principalement les infections bactériennes ou parasitaires de la sphère gastro-intestinale. Plusieurs organes de cet arbre entrent dans des rites magico-religieux, d'où la question de savoir si cet arbre est considéré comme une panacée à cause de son importance culturelle ou parce qu'il possède réellement autant de vertus curatives. Il ne s'agit pas là d'être pessimiste vis-à-vis de potentiels thérapeutiques, mais de prendre également en considération l'importance culturelle qui est attribuée à cet arbre.

Tableau 2.8 – Utilisations alimentaires, agricoles, vétérinaires et domestiques de *D. microcarpum* Guill. et Perr. (Kerharo et Adam, 1962; Kerharo et Adam, 1974; Berhaut, 1975; Malgras, 1992; Burkill, 1995; Lajide *et al.*, 1995; Arbonnier, 2002)

Organe	Propriétés / utilisations	Ethnies ou pays
Fruit	Alimentaire. Le fruit mûr est sucré et riche en vitamine C. Il est consommé frais ou en confiseries	Région soudano-guinéenne, Haute-Volte, Nigeria, Soudan
	La pulpe du fruit est utilisée comme substitut du sucre	Soudan
	Aliment pour le bétail	Afrique de l'Ouest
Graine	Confection de pains et de pâtisseries à partir de la graine cuite ; utilisé comme agent épaississant dans les soupes	Afrique de l'Ouest
Fleur	A une odeur douce, très appréciée des abeilles et du bétail	*
Feuille	Consommée en légumes	Soudan
	Aliment pour le bétail	Afrique de l'Ouest
Bois	Bois facile à travailler, particulièrement résistant aux insectes et à l'eau ; utilisé en menuiserie et dans l'artisanat	Soudan
	Il est interdit de l'employer comme bois pour le feu lors de la cuisson d'un remède, car cela ôterait l'efficacité de ce dernier	Mali
Gomme résineuse de l'écorce	Est employée pour éloigner les insectes des maisons et des habits	Nigeria et autres pays
Racine	Chauffée, la racine dégage une fragrance agréable et est utilisée comme parfum par les femmes	Dinka du Soudan
Différents organes	Attribution de vertus protectrices contre la maladie ; portés comme gri-gri autour du cou ou du buste par les « porteurs de cornes d'antilope »	Bassari du Sénégal
	Médecine vétérinaire : friction des flancs du bétail atteint de la maladie appelée « damon »	Tenda du Sud du Sénégal

* non précisé

A nouveau, le nombre élevé d'usages domestiques révèle l'importance culturelle de cet arbre. Il semblerait que la gomme résineuse et la racine contiennent des composés volatils odorants.

2.4.3 Etudes phytochimiques antérieures

2.4.3.1 Métabolites primaires

Fruit

Comme le fruit de *D. microcarpum* fait partie de l'alimentation quotidienne de nombreuses populations, sa valeur nutritionnelle a été étudiée à plusieurs reprises. Kerharo et Adam (1974) avaient notamment déterminé la composition du fruit séché dépourvu de graine. Il s'est avéré que le fruit présentait une bonne qualité nutritionnelle, et particulièrement une teneur en vitamine C de 0,032 mg/100 g. Dans le but d'évaluer la consommation en vitamines par la population sénégalaise, la teneur en vitamine C de plusieurs fruits a été déterminée par deux autres groupes de recherche. Les teneurs mesurées pour *D. microcarpum* étaient comprises entre 0.0 et 4.0 mg/100 g. A titre de comparaison, le citron contient 450 mg/100 g de vitamine C (Diop *et al.*, 1988; Eromosele *et al.*, 1991). Cette variation de teneur est énorme, et résulte probablement de plusieurs facteurs dont la maturité du fruit et son lieu de récolte, comme mentionné par Auffet et Tanguy (1948). La teneur en minéraux du fruit a également été mesurée. Comparativement aux autres plantes étudiées, le taux en manganèse contenu dans le fruit de *D. microcarpum* est plus élevé ; cependant, comme c'est le cas pour les autres ions, il reste en dessous des valeurs limites indiquées par le *World Health Organisation* (WHO). Les plantes absorbant les ions métalliques du sol par les racines, ces dernières contiennent alors généralement un taux plus élevé que les parties aériennes, dont les fruits. Là encore, l'absorption dépend non seulement de la plante elle-même, mais aussi de facteurs externes tels que la nature du sol, le climat et les pratiques en agriculture (Maiga *et al.*, 2005).

Graine

La graine est l'un des organes qui a été le plus étudié au niveau de ses métabolites primaires. Cela est certainement dû à la présence de polysaccharides qui se montrent prometteurs comme agent liant dans les comprimés, et comme agent de suspension. De plus, étant donné que la graine cuite entre dans la fabrication de pains et de pâtisseries en Afrique de l'Ouest, sa valeur nutritionnelle a également été évaluée. La teneur en lipides totaux de la graine est d'environ 36 % (Anhwange *et al.*, 2004), dont de 2 à 5 % d'acides gras (Giami et Wachuku, 1997). Ces derniers sont intéressants d'un point de vue diététique, car ils sont constitués d'environ 75 % d'acides gras insaturés, dont principalement les acides linoléique et oléique (Balogun et Fetuga, 1985). La graine contient de 11 à 23 % de protéines (Giami et Wachuku,

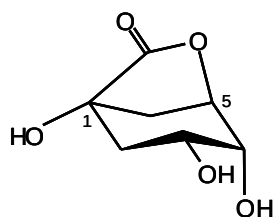
1997; Anhwange *et al.*, 2004), et sa teneur en hydrates de carbone est de 39 % (Akpata et Miachi, 2001), le saccharose étant prédominant (Onweluzo *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent donc que la farine issue des graines possède de bonnes qualités nutritionnelles. La teneur en minéraux a également été évaluée. Cependant, comparativement à d'autres graines étudiées, celle de *D. microcarpum* est relativement pauvre en minéraux, et ne constitue donc pas une source alimentaire importante (Balogun et Fetuga, 1985).

2.4.3.2 Métabolites secondaires et leurs activités

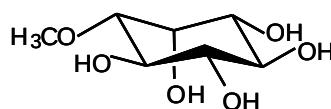
Compte tenu de l'importance médicinale de cet arbre en Afrique de l'Ouest, plusieurs études phytochimiques ont déjà été menées sur les feuilles et l'écorce.

Hydrates de carbone

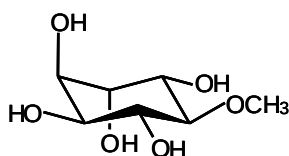
Le L-quino-1,5-lactone (1), le D-(-)-bornésitol (2), le D-pinitol (3), le *myo*-inositol (4), le saccharose, le D-glucose et le D-fructose ont été isolés de l'écorce (Abreu et Relva, 2002). Le D-pinitol (3) se trouve dans de nombreuses plantes, et notamment dans les graines de soja (*Glycine max* (L.) Merr., Fabaceae), dans lesquelles il est en grande concentration. Beaucoup d'activités ont été reportées dans la littérature pour ce cyclitol. En effet, le D-pinitol et ses dérivés sont connus pour leur effet bénéfique dans les cas de résistance à l'insuline, tels que le diabète et les complications qui en découlent : obésité, hyperlipidémie, athérosclérose, hypertension, etc... Le D-pinitol a de plus montré des propriétés anthelminthiques et larvicides sur *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus* (Chaubal *et al.*, 2005), ainsi qu'une activité anti-inflammatoire chez le rat, dans des cas d'inflammations aiguë et subaiguë (Kim *et al.*, 2005). Le D-pinitol aurait de plus des effets bénéfiques sur la prévention et le traitement de la cataracte, en réduisant le taux sanguin de glucose (Jun *et al.*, 2003). En ce qui concerne le *myo*-inositol (4), c'est un composé qui est vital à bon nombre de processus biologiques, autant chez les humains que chez les animaux. Il est entre autre essentiel à la croissance des rongeurs. Chez les humains, ce composé est en partie apporté de manière endogène. Au niveau des activités thérapeutiques observées pour ce composé, il a un effet positif sur la dépression, les attaques de panique et les désordres obsessionnel-compulsifs (Thomson corporation).



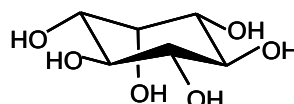
(1) L-quino-1,5-lactone



(2) D-(-)-bornésitol

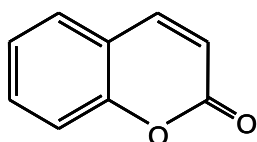


(3) D-pinitol

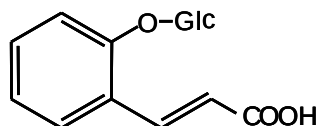
(4) *myo*-inositol

Composés phénoliques

La coumarine (5) (Ikhiri et Ilagouma, 1995) et le mélilotoside (6) (Aquino *et al.*, 1991) ont été isolés de l'écorce. La coumarine (5) possède des propriétés anti-oedémateuses. Elle était indiquée dans les cas de lymphoedème du membre supérieur après traitement radiochirurgical du cancer du sein. Le nombre de cas d'hépatites relevé, imputables à cette molécule, a conduit au retrait du médicament correspondant en 1996, en France, puis dans d'autres pays européens. Concernant les dérivés coumariniques, certains d'entre-eux possèdent des activités pharmacologiques, principalement anticoagulantes. Les plus connus sont le dicoumarol et l'esculoside, tout deux veinotoniques et vasculoprotecteurs (Hostettmann, 1997; Bruneton, 1999). Pour ce qui est du mélilotoside (6), il est contenu dans le mélilot (*Melilotus officinalis* (L.) Pallas, Fabaceae), et a démontré *in vitro* des activités antimicrobiennes contre *Entamoeba histolytica* et *Giardia lamblia* (Calzada *et al.*, 2003).



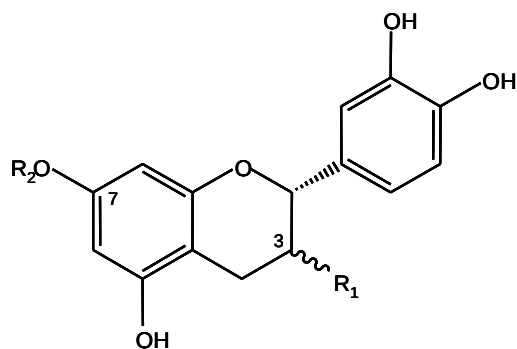
(5) coumarine



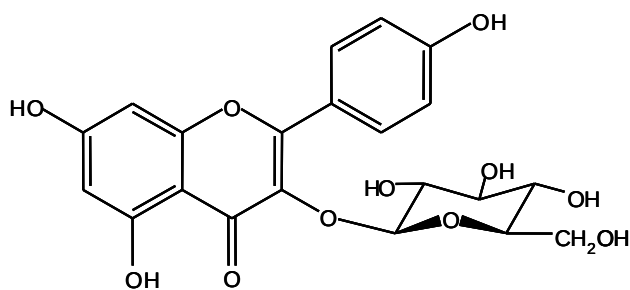
(6) mélilotoside

Flavonoïdes

Des dérivés du flavan-3-ol : la catéchine (**7**), l'épicatéchine (**8**), la catéchine-7-*O*-galloylester (**9**) et l'épicatéchine-3-*O*-galloylester (**10**) (Aquino *et al.*, 1991) ont été isolés de l'écorce, tandis que le kaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside (**11**) a été isolé des feuilles (Lajide *et al.*, 1995). La catéchine (**7**), étant l'une des structures de base des flavan-3-ol, elle se retrouve dans bon nombres d'espèces végétales. Elle est de plus la structure de base donnant lieu aux tanins catéchiques. Comme la plupart des flavonoïdes, elle possède des propriétés antioxydantes (Bruneton, 1999). L'activité anti-HIV-1 des composés **7** à **10** a été évaluée sur une lignée cellulaire infectée par la souche HIV-1_{IIIB}, et le composé **10** a montré une forte toxicité (Aquino *et al.*, 1995).



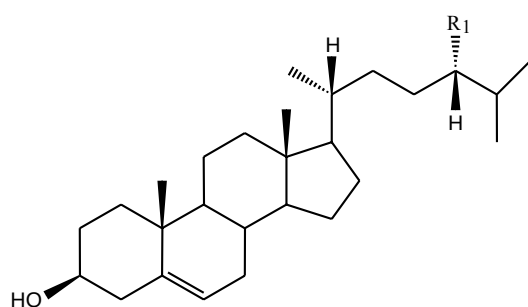
- | | | |
|------|--|--|
| (7) | $R_1 = (S) \text{ OH} ; R_2 = \text{H}$ | catéchine |
| (8) | $R_1 = (R) \text{ OH} ; R_2 = \text{H}$ | épicatéchine |
| (9) | $R_1 = (S) \text{ OH} ; R_2 = \text{O-galloylester}$ | catéchine-7- <i>O</i> -galloylester |
| (10) | $R_1 = (R) \text{ O-galloylester} ; R_2 = \text{H}$ | épicatéchine-3- <i>O</i> -galloylester |



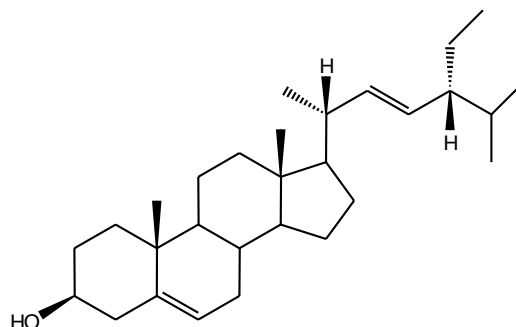
(11) kaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside

Stérols et triterpènes

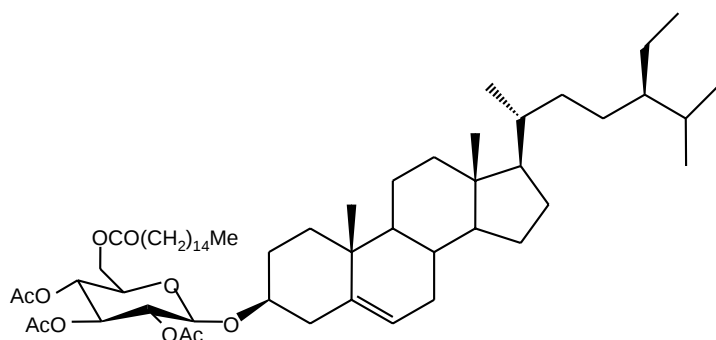
De l'extrait à l'éther de pétrole de l'écorce de *D. microcarpum* ont été isolés le β -sitostérol (**12**), le campestérol (**13**), le stigmastérol (**14**) et un dérivé glycosylé : le sitostérol-3 β -*O*-[6'-*O*-palmitoyl-2',3',4'-*O*-triacétyl- β -*D*-glucopyranoside] (**15**) (Abreu *et al.*, 1998). Le β -sitostérol, le campestérol et le stigmastérol sont les trois stérols que l'on retrouve le plus fréquemment dans l'insaponifiable d'une huile (Bruneton, 1999). Deux triterpènes pentacycliques ont été isolés de l'extrait chloroformique de l'écorce. Il s'agit du lupéol (lup-20(29)-èn-3 β -ol) (**16**) et du lup-20(29)-èn-2 α ,3 β -diol (**17**). Le lupéol (**16**) est un composé produit fréquemment par les plantes, et qui possède différentes activités pharmacologiques : cytostatique, antioxydant et anti-inflammatoire. Il a également démontré *in vivo* une diminution du risque de formation de calculs rénaux (Hatake *et al.*, 2006; Tolstikova *et al.*, 2006).



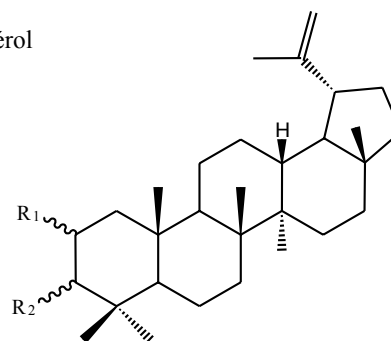
(12) $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ β -sitostérol
 (13) $R_1 = \text{CH}_3$ campestérol



(14) stigmasterol



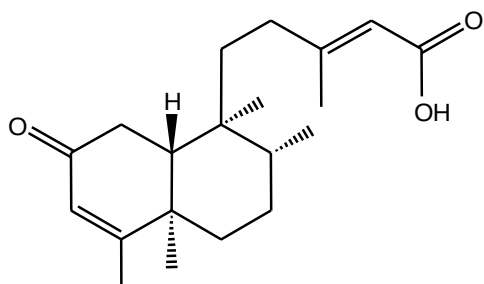
(15) sitostérol-3 β -O-[6'-O-palmitoyl-2',3',4'-O-triacétyl]- β -D-glucopyranoside]



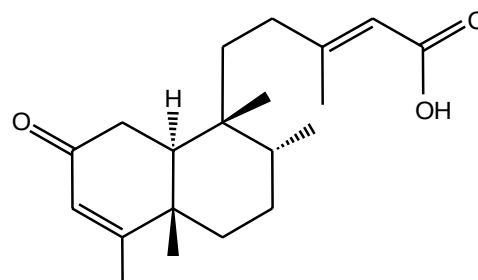
(16) $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \beta\text{-OH}$ lupéol
 (17) $R_1 = \alpha\text{-OH}$; $R_2 = \beta\text{-OH}$ lup-20(29)-èn-2 α ,3 β -diol

Diterpènes et tétranorditerpènes

Un diterpène de type clérodane a été isolé de l'extrait chloroformique de l'écorce ; il s'agit de l'acide 2-oxo-kolavénique (**18**) (Aquino *et al.*, 1992). Trois ans plus tard, un diastéréomère de cette molécule a été isolé du même organe et a été nommé acide *cis*-2-oxokolavénique (**19**) (Ikhiri et Ilagouma, 1995). Lorsque la structure de ce dernier composé est observée, nous pouvons nous interroger de savoir pourquoi les auteurs ont utilisé la dénomination *cis*. En effet, il n'existe, dans cette molécule, aucune relation *cis* entre deux substituants portés par deux carbones chiraux adjacents. Etant donné que la configuration absolue n'a été déterminée pour aucun de ces deux clérodanes, leur représentation est arbitraire, et par conséquent, tant la molécule **18** que la molécule **19** pourraient en réalité être leur énantiomère. En ce qui concerne la nomenclature de ces deux molécules, elle n'est pas précise (voire probablement fausse dans le cas de la molécule **19**), dans la mesure où elle ne donne aucune indication sur la configuration relative. Dans la suite du travail, nous renommerons ces diterpènes en tenant compte de la configuration relative, dans le but de les comparer à ceux que nous avons isolés.

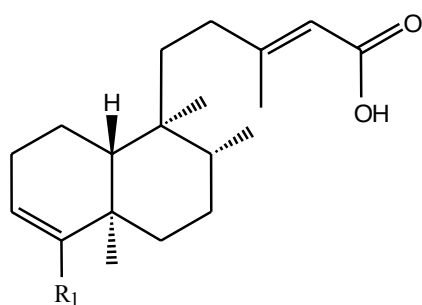


(18) acide 2-oxo-kolavénique ou
acide 2-oxo-3,13*E*-clérodien-15-oïque



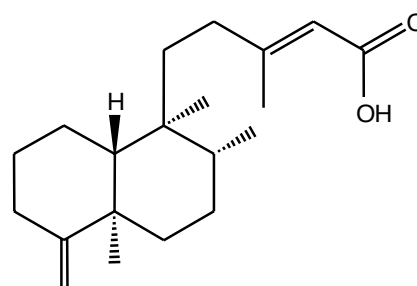
(19) acide *cis*-2-oxokolavénique

La molécule **18**, appelée cette fois acide 2-oxo-3,13*E*-clérodien-15-oïque, a été également isolée de l'extrait méthanolique des feuilles. Cette nomenclature nous renseigne un peu plus sur la configuration relative de la molécule. Du même extrait ont été isolés trois autres diterpènes de type clérodane. Il s'agit de l'acide kolavénique (ou *ent*-3,13*E*-clérodien-15-oïque) (**20**), du 5-(5-formyle-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,2,4a-triméthyle-1-naphthalényle)-3-méthyle-, [1*S*-[1*α*(*E*),2*β*,4*αβ*,8*αα*]] (**21**) et de l'acide *ent*-4(18), 13*E*-clérodien-15-oïque (**22**) (Lajide *et al.*, 1995). En ce qui concerne le composé **21**, il peut parfois être appelé acide 2-penténoïque, mais c'est un nom qui peut prêter à confusion, car il est également employé pour désigner l'acide copalique (**23**).



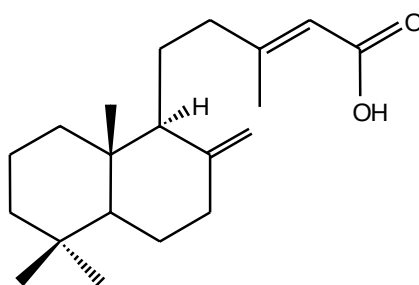
(20) R₁ = CH₃ acide kolavénique

(21) R₁ = CHO 5-(5-formyle-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,2,4a-triméthyle-1-naphthalényle)-3-méthyle-, [1*S*-[1*α*(*E*),2*β*,4*αβ*,8*αα*]]



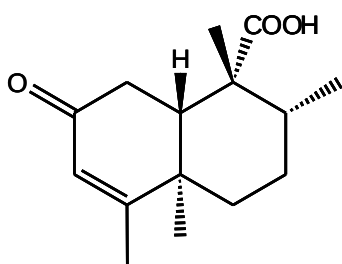
(22) acide *ent*-4(18), 13*E*-clérodien-15-oïque

Un diterpène de type labdane, l'acide copalique (ou acide *ent*-8(17),13*E*-labdadièn-15oïque) (**23**) a été isolé de l'écorce (Ikhiri et Ilagouma, 1995). L'illustration de cette molécule dans leur publication étant imprécise au niveau de l'orientation de la chaîne, la structure représentée ci-après provient des données de Avila et Medina (1993), utilisée comme référence par Ikhiri et Ilagouma (1995). En effet, la structure illustrée par Avila et Medina est plus complète, et ceci bien que la configuration relative ne soit pas non plus déterminée avec certitude. Le (-) acide copalique a montré *in vitro* une forte inhibition de la croissance de certaines bactéries : *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *S. epidermis* (Tincusi *et al.*, 2002).

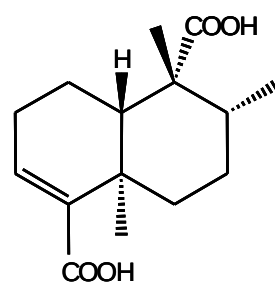


(23) acide copalique

Deux tétranorditerpènes ont été isolés de l'extrait chloroformique de l'écorce : l'acide 1-naphtalène acétique-7-oxo-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,2,4a,5-tétraméthyle (**24**) et l'acide 1-naphtalène acétique-5-carboxy-1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,2,4a-triméthyle (**25**) (Aquino *et al.*, 1992). A nouveau, seule la configuration relative a été déterminée. Cette classe de composés est peu commune dans les plantes, et à ce jour, seules des activités inhibitrices de la croissance des levures *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* ont été reportées (Hosoe *et al.*, 1999).



(24)



(25)

Contrairement aux autres composés isolés de *D. microcarpum*, les diterpènes de type clérodane et labdane ne sont pas largement répandus dans le règne végétal. Il est donc intéressant de s'y attarder, et ceci d'autant plus que des composés de cette classe ont été isolés dans le présent travail. Les diterpènes de type clérodane n'ont pas à l'heure actuelle de propriétés thérapeutiques reconnues. Cependant, de nombreuses activités biologiques ont été reportées, dont la plus fréquente est l'activité « *insect anti-feedant* » (anti-appétante, en français), c'est-à-dire que ce sont des composés qui empêchent les insectes de se nourrir. Les insectes étudiés étaient des termites, des larves de coléoptères ou de lépidoptères, etc... (Lajide *et al.*, 1995; Klein Gebbinck *et al.*, 2002). Les diterpènes de type clérodane présentent de plus fréquemment des activités antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires, et « anti-leishmaniose » (Salah *et al.*, 2003; Gonzalez-Coloma *et al.*, 2005; Jullian *et al.*, 2005; Ben Jannet *et al.*, 2006; Fokialakis *et al.*, 2006). Des propriétés cytotoxiques vis-à-vis de certaines lignées cellulaires ont également été observées (Zhao *et al.*, 1991; Dai *et al.*, 2006). D'autres activités moins fréquemment observées sont également reportées : anti-inflammatoire, gastro-protectrice, relaxant musculaire, hypoglycémiant, anti-oestrogénique, etc... (Bruneton, 1999; Sai Prakash *et al.*, 2002; Brasil *et al.*, 2006).

En ce qui concerne les molécules isolées des feuilles et de l'écorce de *D. microcarpum*, l'acide kolavénique (**20**) a présenté une forte inhibition de bactéries Gram-positif, telles que *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Cette activité a été attribuée en partie à la présence du groupement carboxylique (Tsuji *et al.*, 1978). L'acide kolavénique a de plus montré une activité antimycosique sur plusieurs souches de champignons résistants à la kanamycine (Rashid *et al.*, 1996), ainsi qu'une activité cytotoxique sur trois lignées cellulaires humaines. Ces dernières activités biologiques suggèrent de potentielles activités anti-tumorales pour l'acide kolavénique (**20**) (Zhao *et al.*, 1991). Ce dernier composé, ainsi que l'acide 2-oxo-kolavénique (**18**) ont montré une inhibition modérée de la croissance de plusieurs champignons pathogènes (Salah *et al.*, 2003). Une récente étude reporte que l'acide kolavénique a la capacité de diminuer significativement la pression artérielle chez les souris (Saleem *et al.*, 2005).

De même que les clérodanes, les labdanes n'ont pas d'effet thérapeutique reconnu. Toutefois, plusieurs activités biologiques ou biochimiques ont été reportées pour certains d'entre eux : anti-bactérienne, antifongique, « anti-leishmaniose », anti-inflammatoire, cytotoxique et cardiotonique (Singh *et al.*, 1999). Notons que ces activités sont très semblables à celles reportées pour les clérodanes. Compte tenu de leurs similitudes structurales (décaline et chaîne

latérale comportant une fonction carboxylique), cela n'est pas surprenant. Les labdanes sont des composés qui sont fréquemment retrouvés dans des plantes utilisées en médecine traditionnelle, ce qui suggère un certain potentiel thérapeutique. Pour ce qui est du labdane isolé de l'écorce de *D. microcarpum*, l'acide copalique (23), il a été retrouvé dans de nombreuses espèces végétales, et notamment dans la résine de plusieurs espèces de pins (*Pinus* spp., Pinaceae) (Bruneton, 1999).

2.4.3.3 Activités reportées pour *D. microcarpum* Guill. et Perr.

Feuille

L'activité anti-appétante des composés isolés des feuilles a été évaluée sur les termites *Reticulitermes speratus*, bien qu'aucune indication ne soit donnée à ce propos par les usages traditionnels. Dans cette étude, quatre composés actifs ont été isolés par fractionnement bioguidé. Il s'agit des molécules 18, 20, 21 et 22, toutes des diterpènes de type clérodane. Le kaempférol-3-O- β -glucopyranoside (11), également isolé dans ce travail, n'a présenté seul aucune activité. Cependant, il est reconnu que certains flavonoïdes, substitués ou non, présentent des activités contre les insectes, tel qu'inhiber leur croissance ou empêcher qu'ils se nourrissent. De ce fait, les auteurs de l'article estiment qu'il est possible qu'il y ait une action synergique entre les clérodanes et les flavonoïdes contre *Reticulitermes speratus* ou d'autres agents pathogènes (Lajide *et al.*, 1995). Une autre étude a montré que les feuilles étaient fortement actives sur les larves d'*Aedes aegyptii*, induisant un taux de mortalité supérieur à 80% (Escoubas *et al.*, 1994).

Racine

Un extrait des racines de *D. microcarpum* a montré une activité anti-appétante non négligeable sur *Reticulitermes speratus* (*index anti-feedant* compris entre 10 et 20 %) (Escoubas *et al.*, 1994).

Ecorce

L'écorce de *D. microcarpum* a montré une très forte activité molluscicide sur *Lymnaea natalensis*. Cet escargot est l'hôte d'un parasite nommé *Fasciola gigantica* causant la fasciolose bovine et humaine. Ce parasite est responsable de la mort de milliers de têtes de bétail par année, en Afrique particulièrement (Kela *et al.*, 1989a et 1989b). Les effets histopathologiques d'un extrait de l'écorce ont été évalués sur une autre espèce de *Lymnaea* : *L. stagnalis*. Il a été observé qu'à une dose de 100 ppm, l'extrait de l'écorce conduisait à la mort des cellules constituant les glandes digestives de *L. stagnalis* (Kela et Bowen, 1995). Selon le brevet qui a été déposé concernant l'emploi d'extraits de *D. microcarpum* comme molluscicide et répulsif de bernacles, il semblerait que ce soient les terpènes et leurs dérivés oxygénés qui sont responsables de ces activités (Bowen et Ali, 2005). Enfin, l'extrait éthanolique de l'écorce a été évalué pour son activité anti-microbienne sur gel d'agar. L'extrait a montré une activité modérée contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*. Quant à *Escherichia coli*, *Streptococcus pyrogenes*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*, aucune inhibition de leur croissance n'a pu être observée (Abreu *et al.*, 1998).

Graine

La graine est certainement l'organe qui a été le plus investigué à l'heure actuelle. En effet, les graines sont riches en polysaccharides, qui semblent être relativement prometteurs comme agent viscosifiant ou agent liant, dans la formulation galénique. Des chercheurs ont, dans ce but caractérisé ces polysaccharides d'un point de vue physico-chimique et mesuré leurs propriétés rhéologiques (Ross-Murphy *et al.*, 1998). Ces polysaccharides ont entre autres été testés comme agent liant dans la fabrication de comprimés. Cependant, comparativement à l'emploi de gomme d'*Acacia* ou de liants à base de gélatine, les comprimés étaient très friables et résistaient mal à l'écrasement (Chukwu, 1992). L'utilisation de ces polysaccharides dans des granulés à libération prolongée a également été investiguée. Les profils de dissolution et de désintégration mesurés ont révélé que les granulés à base de gomme de *Detarium* étaient plus friables que ceux à base de gomme adragante, mais moins que ceux à base de la carboxyméthyl-cellulose sodique (CMC Na). Comparativement aux autres excipients, le principe actif était libéré plus lentement dans les granulés contenant de la gomme de *Detarium* (Chukwu, 1994a). Dans des comprimés à libération prolongée, par contre, la libération du principe actif était la plus lente avec la CMC Na (Chukwu, 1994b). Des études sur les polysaccharides extraits de la graine, employés cette fois-ci comme agent de suspension ont été également menées. Cependant, il s'est avéré que les

suspensions faites à base des polysaccharides de *Detarium* étaient très instables, comparativement aux suspensions à base de Veegum[®] et de CMC Na (Attama *et al.*, 1999). Un autre travail a montré que les films obtenus à partir de la gomme de *Detarium*, par rapport à ceux faits à base de gélatine, avaient la même épaisseur, mais retenaient moins l'eau, avantage certain pour la formulation de principes actifs sensibles à l'humidité (Chukwu *et al.*, 1997). Une étude a été menée dans le but d'améliorer la solubilisation des xyloglucanes hydrosolubles du *Detarium*, par dépolymérisation des chaînes entre elles (Picout *et al.*, 2003). Une autre équipe a mené des recherches concernant les propriétés structurales des xyloglucanes extraits des graines de *Detarium*, de manière à optimiser son emploi en pharmacie galénique (Ieiri *et al.*, 2003).

Au niveau des activités biologiques de la gomme, cette dernière a été introduite comme excipient dans une formulation mucoadhésive à base d'hydrochloride de méthformine. Non seulement, la pharmacocinétique mesurée chez les rats était meilleure avec la gomme de *Detarium* qu'avec la CMC Na, mais en plus, il semblerait que la gomme montre une activité antidiabétique agissant en synergie avec le principe actif (Adikwu *et al.*, 2004).

Finalement, les qualités nutritionnelles de l'extrait aqueux de la graine de *D. microcarpum* ont été évaluées, en les ajoutant au milieu nutritif nécessaire à la croissance de différentes souches de *Candida* spp. L'étude montre qu'il n'y a pas un taux de formation de chlamydospores supérieur lors de l'emploi de cet extrait plutôt qu'avec un milieu nutritif classique (Okeke *et al.*, 1995). Au niveau culinaire, grâce aux polysaccharides contenus dans la graine, il a été montré que le pain fait avec cette farine se conserve plus longtemps car il retient mieux l'eau (Onweluzo *et al.*, 1999). Les polysaccharides de la graine se sont montrés également être de bons stabilisants dans les steaks hachés de bœuf. L'avantage est que, la graine étant comestible, aucun effet secondaire ne doit être attendu (Onweluzo *et al.*, 2004).

2.5 Présentation de *Detarium senegalense* J.F. Gmel.

2.5.1 Caractères morphologiques et répartition géographique

Detarium senegalense (Figure 2.8) est un arbre mesurant de 15 à 40 m de haut. L'écorce est foncée, finement fissurée, à tranche rouge. Les feuilles sont pennées et comportent de (8)-12 à 20 folioles disposées de manière alterne. La foliole est ovale à elliptique, longue de 4 à 6 cm, large de 2.5 à 3 cm. Elle est arrondie aux deux extrémités et émarginée au sommet. Le limbe est mince, souple, finement coriace, vert dessous, et peut comporter quelques points translucides. L'inflorescence est en panicule ou fascicule axillaire lâche. La fleur apétale est de couleur crème et comporte 4 sépales, 10 étamines. Le calice en bouton est glabre ou glabrescent. Le fruit est une drupe globuleuse ou subglobuleuse, aplatie, de 5 à 7 cm de diamètre. L'épicarpe se craquelle à maturité, et le mésocarpe verdâtre est entremêlé de fibres insérées sur le noyau. Le fruit peut être comestible ou toxique. Floraison en seconde moitié ou en fin de saison sèche (Hutchinson *et al.*, 1958; Ministério do Ultramar, 1958; Kerharo et Adam, 1974; Berhaut, 1975; Arbonnier, 2002; Lebrun et Stork, sous presse).

La forme toxique se différencie selon nos observations, par des folioles souples, vert vif dessus et vertes dessous, et par une pulpe légèrement plus fibreuse (*cf.* Annexe 1).

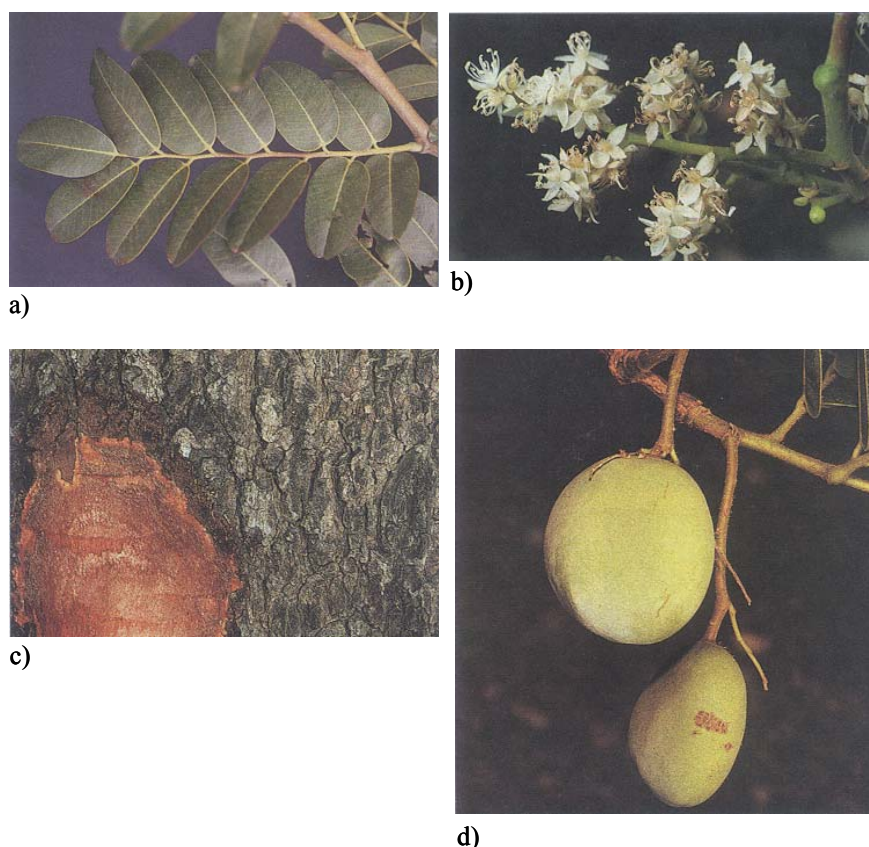


Figure 2.8 – Photographies de *Detarium senegalense* J.F. Gmel. (Arbonnier, 2002)

a) feuille ; b) inflorescence ; c) écorce ; d) fruit

Malheureusement, les données de la littérature ne différencient pas les formes toxiques et comestibles de *D. senegalense* quand il s'agit de présenter leur répartition géographique et leur habitat.

Detarium senegalense J.F. Gmel. est un arbre qui est répandu du Sénégal jusqu'au Soudan, ainsi qu'en Afrique orientale. Il peuple les savanes arborées et les galeries forestières de la zone soudano-guinéenne, et pousse sur les bas-fonds humides et les sols frais (Malgras, 1992; Arbonnier, 2002). A cause de l'assèchement progressif de certaines régions africaines, cet arbre est de plus en plus retrouvé dans des zones à pluviométrie plus élevée que la zone soudano-guinéenne, telles que la forêt tropicale humide guinéo-congolaise. Les espèces se rencontrant principalement à côté de *D. senegalense* sont *Parinari excelsa* Sabine (Chrysobalanaceae), *Erythrophleum suaveolens* (Guill. et Perr.) Brenan (Fabaceae) et *Khaya senegalensis* A. Juss. (Meliaceae) (White, 1986; Lebrun et Stork, sous presse). La carte de répartition de *D. senegalense* est présentée à la Figure 2.9.

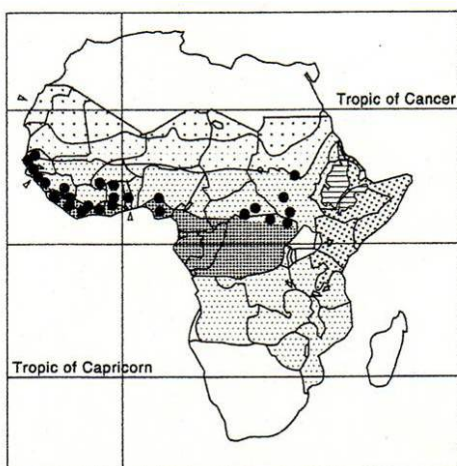


Figure 2.9 – Carte de répartition de *Detarium senegalense* J.F. Gmel. (Lebrun et Stork, sous presse)

Les fruits de *D. senegalense*, forme comestible et forme toxique, étudiés dans ce travail, ont été récoltés à l'état frais à la plantation de Palmara (Sénégal) et identifiés par le Dr Aly Thiocone (Sénégal).

2.5.2 Utilisations traditionnelles

La forme comestible du *D. senegalense* connaît encore plus d'utilisations que *D. microcarpum*, tant en médecine traditionnelle qu'en usage domestique. Ces utilisations sont répertoriées dans le Tableau 2.9 et le Tableau 2.10, respectivement.

2.5.2.1 Forme comestible de *Detarium senegalense* J.F. Gmel.**Tableau 2.9** – Principales utilisations de la forme comestible de *D. senegalense* J.F. Gmel. en médecine traditionnelle (Kerharo et Adam, 1974; Berhaut, 1975; Adam *et al.*, 1991; Malgras, 1992; Burkill, 1995; Arbonnier, 2002).

Organe	Propriétés / utilisations	Préparation et mode d'administration	Ethnie ou pays
Fruit	Lèpre	Les fruits bien mûrs sont malaxés avec de l'eau jusqu'à obtention d'une masse semi-pâteuse. Le liquide exsudé par pression de ce magma est donné en boisson, tandis que le produit restant est employé en friction sur tout le corps.	Peul Toucouleur
	Syphilis	*	*
	Propriété béchique	Fruit cru	Toutes les ethnies présentes au Sénégal
	Rhume ^(a) , angine ^(a) et maladies de poitrine	Pulpe du fruit	*
	Maux de reins chroniques, lumbago	Fruits utilisés en friction locale	*
	Tonique et stimulant lors de voyage	Fruit frais	Nord du Nigeria
	Il est déconseillé de manger ce fruit lors de voyages	Fruit frais	Tribu Salka du clan des Kambari du Nigeria
Graine	Traitement lors d'atteinte par une flèche empoisonnée ; ce traitement induirait des vomissements	Tégument de la graine	Nord du Nigeria
	Anti-moustique	Graines brûlées	Sénégal
Feuille	Constipation ^(a)	Décoction, utilisée en boisson ou en lavement	*
	Dysenterie ^(a)	Décoction, employée en lavement ou en potion	Côte d'Ivoire, Haute-Volta
	Action sur l'intestin, anorexie et anémie	Différentes préparations	Wolof, Sérér
	Gale	Décoction, utilisée en lotion	*
	Fièvre	Les jeunes feuilles sont bouillies et administrées en même temps que la nourriture	Sierra Leone, Nigeria
	Conjonctivite	Macération utilisée en bain oculaire	Sérér, Niominka
	Démangeaisons	Décoction employée en lotion	Côte d'Ivoire, Haute-Volta
	Membres cassés	Onguent fait à partir d'argile et des jeunes feuilles ; est appliqué en cataplasme	Sierra Leone
	Plaies	Feuilles employées comme pansement occlusif	*
	Emploi des feuilles pour laver le corps	-	Clan Kambari du Nord-Ouest du Nigeria

Tableau 2.9 – Suite

Organe	Propriétés / utilisations	Préparation et mode d'administration	Ethnie ou pays
Ecorce	Maux de ventre à caractère grave : coliques, occlusion intestinale	Décoction donnée en boisson ; 1 c.s. suffirait	Diola de Basse-Casamance
	Action sur l'intestin, anorexie, anémie	Différentes préparations	Wolof, Serer
	Soulage en cas d'indigestion	Eau de cuisson de l'écorce	Clan Kambari du Nord-Ouest du Nigeria
	Tuberculose	Administration <i>per os</i>	Sierra Leone
	Pneumonie	En association avec d'autres plantes	*
	Bronchite	*	*
	« Ngal » (cancer ?)	Pulvérisée et administrée par voie interne et externe	Wolof
	Gale	Décoction utilisée en lotion	*
	Maladies de la peau : lèpre, bubons inflammés	Écorce pulvérisée en application externe	Côte d'Ivoire
	Hémostatique et cicatrisant dans les blessures et les « cros-cros »	Écorce pulvérisée	*
	Ejection du placenta	Décoction donnée aux femmes après l'accouchement	Liberia
	Fortifiant en cas de faiblesse et d'anémie	Infusion concentrée	*
	Tonifiant général pour les enfants	Ecorce pulvérisée et ajoutée au porridge	Clan Kambari du Nord-Ouest du Nigeria
	Tonique pour la débilité et l'anémie	Extrait bouilli / infusion à froid	Gambie / Tenda du Sénégal
	Traitement médico-magique de la maladie du sommeil	Macération aqueuse en association avec la plante entière de <i>Leptadenia hastata</i> . Une partie de la solution est donnée en boisson 3 fois/j, tandis que l'autre partie est employée pour laver le malade. Le macérat est utilisé pour le masser.	Socé de Bétanti
Jeune rameau	Antipyrétique	Décoction administrée en même temps que la nourriture	*
Bois	Fortifiant dans la faiblesse et l'anémie	Infusion concentrée	*
Racine	Action sur l'intestin, anorexie et anémie	Différentes préparations et quelques fois en association avec l'écorce	Wolof, Sérér
	Fortifiant dans la faiblesse et l'anémie	Infusion concentrée	*
	Tonique pour la débilité et l'anémie	Infusion à froid	Sénégal
	Analgésique	Infusion à froid utilisée en potion ou lavage	Gambie
Plante entière	Hémostatique post-partum	*	Igbo du Nigeria
Organes non précisés	Traitement médico-magique du sommeil	*	Sénégal

* non précisé

Tableau 2.10 – Utilisations alimentaires, agricoles, vétérinaires et domestiques de la forme comestible de *D. senegalense* J.F. Gmel (Kerharo et Adam, 1962; Kerharo et Adam, 1974; Berhaut, 1975; D'Almeida, 1984; Malgras, 1992; Burkill, 1995; Arbonnier, 2002)

Organe	Propriétés / utilisations	Ethnie ou pays
Fruit	Aliment très populaire. Consommé frais ou cuit, en confiture, bonbon, sirop, glace. On dit que c'est le fruit le plus riche en vitamines.	Sénégal, Gambie, Ghana, Nigeria
	Consommé comme aliment seulement lors de famine	Nupe
	Aliment pour le bétail	*
	Augmentation du « piquant » du tabac à priser, grâce à l'ajout de cendres du fruit brûlé	*
	Utilisation médico-magique	*
Graine	Farine issue de la graine employée comme agent épaississant dans la nourriture	*
	Tégument de la graine consommé en tant qu'aliment	Tenda du Sénégal-Guinée, Libéria
	Tégument de la graine consommé seulement lors de famine	Nord du Nigeria
	Tégument de la graine amalgamé consommé par le bétail	Nupe
	Favorise la fermentation de la bière de millet	Côte d'Ivoire – Haute-Volta
	Confection de colliers et de ceintures avec les graines grillées	Wolof
Feuille	Consommée en légumes	Niger
	Aliment pour le bétail	*
Rameaux	Aliment pour le bétail	*
Ecorce	La résine gommeuse exsudée de l'écorce est brûlée pour parfumer les huttes et les habits	*
	Les cendres de l'écorce brûlée sont employées pour faire du savon	Sierra Leone
Bois	Le bois est difficile à travailler mais est résistant aux termites et aux insectes térébrants ; il est employé pour confectionner des mortiers, meubles, barrières, outils, pirogues, et comme bois pour le feu.	*
Racine	Préparation d'une glu avec les racines bouillies, qui sert à attraper les oiseaux	Nord du Nigeria
	La sève de la racine est appliquée comme couche de revêtement sur les cuivres	Nigeria
	La racine chauffée dégage un parfum agréable	*

* non précisé

2.5.2.2 Forme toxique de *Detarium senegalense* J.F. Gmel.

Bien que toxique, certains organes de cet arbre sont employés pour soigner diverses maladies (Tableau 2.11). Les utilisations non thérapeutiques de cet arbre étant peu nombreuses, elles sont également répertoriées dans ce tableau. Relevons que la toxicité de l'écorce et des fruits est exploitée pour empoisonner les flèches.

Tableau 2.11 – Principales utilisations de la forme toxique de *D. senegalense* J.F. Gmel. (Kerharo et Adam, 1974; D'Almeida, 1984; Burkill, 1995; Arbonnier, 2002)

Organe	Propriétés / utilisations	Préparation et mode d'administration	Ethnie ou pays
Utilisations thérapeutiques			
Fruit	A la réputation de soigner les « maladies de la poitrine »	En association avec d'autres plantes	Sénégal, Guinée
	Syphilis	Sous forme de « taura »	Haussa
	Toux	*	Tenda de la frontière Sénégal-Guinée
	Lèpre	Pâte formée à partir de la pulpe du fruit ; administrée <i>per os</i> en petite quantité et appliquée sur le corps	Sénégal
	Douleur chronique des reins, maladie de Pott	Onguent	Côte d'Ivoire - Haute Volta
	Douleurs du dos	Onguent	Nigeria
	Certaines dermatoses	Cendres des fruits brûlés, utilisées dans la fabrication du savon noir	*
Ecorce	Bronchite, pneumonie, maux de ventre, lèpre et pour tous les maux internes	Macération dans du vin de palme ; à consommer en petite quantité	Balant au Sud du Sénégal
	Maladies de la peau : lèpre, bubons inflammés et sur les blessures en tant qu'hémostatique et cicatrisant	Écorce pulvérisée en application externe	Cote d'Ivoire
Racine	Cors et gerçures du talon	Macéré aqueux utilisé en bain de pied	*
Utilisations non thérapeutiques			
Fruit	Poison pour les flèches	Mésocarpe, en association avec d'autres plantes	Sénégal, Guinée
Ecorce	Poison pour les flèches	*	*
	Accélère la fermentation du vin de palme et lui donne un goût amer	Ajouté au vin de palme	Gambie

* non précisé

Il semble que le fruit et l'écorce de la forme toxique revendiquent certaines utilisations en médecine traditionnelle identiques à celles du fruit et de l'écorce de la forme comestible. Pour ce qui est de la forme toxique, notons que dans les cas où le mode d'administration des préparations est par voie orale, il est spécifié d'en avaler une petite quantité seulement.

2.5.3 Toxicité du genre : aspects cliniques

Lorsque Guillemin *et al.* (1830-1833) ont décrit l'espèce *Detarium senegalense*, ils ont observé que cet arbre pouvait produire des fruits comestibles ou toxiques, ces derniers ayant donné lieu à quelques cas d'intoxication en Sénégal.

La première étude portant sur les symptômes d'intoxication consécutifs à l'ingestion de fruits toxiques de *D. senegalense* fut menée en 1887 par Sambuc. Pour ce faire, il avait administré *per os* 18 g d'extrait alcoolique de ces fruits à des chiens. N'ayant observé aucun effet secondaire, il considéra que la pulpe, même à haute dose, était inerte. Il ajouta cependant qu'aucune conclusion ne pouvait être tirée car l'activité, selon lui, pouvait différer selon les lieux de récolte. En 1889, Heckel et Schlagdenhauffen prétendent, suite aux travaux de Sambuc, que la toxicité serait due à un composé volatil.

Soixante ans plus tard, Paris et Moyse-Mignon (1947) reçurent un échantillon de fruits de *D. senegalense* ayant causé des empoisonnements au Sénégal. Ces auteurs sont parvenus à isoler de ces fruits un composé amer, qu'ils ont décrit comme étant le composé responsable de la toxicité. Cette dernière a tout d'abord été évaluée sur l'extrait alcoolique du fruit : 0.10 g/kg d'extrait alcoolique ont été injectés en intra-veineuse chez le chien. Les symptômes observés furent une hypotension passagère avec vaso-constriction rénale, accompagnée d'une apnée transitoire. Un cas de mort par asphyxie à 0.30 g/kg a été enregistré. Le nombre de chiens employés n'est cependant pas mentionné. Ces chercheurs ont également mené une étude sur des cobayes en leur injectant une dose de 1 g/kg par voie sous-cutanée. Après une courte phase d'excitation, une incoordination motrice et une somnolence ont été observées. Dans ce cas non plus, le nombre d'animaux testés n'est pas mentionné. Chez un des cobayes, une injection sous-cutanée de 2 g/kg a provoqué une paralysie du train postérieur gagnant ensuite tout l'animal. Cette manifestation était accompagnée d'une diminution de la sensibilité et d'un ralentissement de la respiration. Le retour à l'état normal est survenu une à deux heures après l'injection. Ces

auteurs ont également testé l'effet du fruit sur des poissons (*Ides melanotes*), en ajoutant à l'eau de l'aquarium 1 % d'une teinture alcoolique titrée à 20 %. En moins d'une minute, les poissons ont essayé de sortir de l'eau, puis flottaient, ventre en l'air. Environ 15 minutes après avoir remis ces poissons dans de l'eau courante, ils retrouvèrent leur état normal. La toxicité a également été évaluée sur les poissons et les cobayes en leur administrant le composé amer pur : les symptômes observés étaient identiques à ceux observés avec l'extrait alcoolique. Paris et Moyse-Mignon (1947) conclurent leurs études en affirmant que le principe amer semble déprimer le système nerveux central après l'avoir excité transitoirement. Ils ont estimé que, parmi le chien, le cobaye et le poisson, ce dernier est le plus sensible.

D'Almeida a rédigé en 1984 une thèse portant entre autre sur la toxicité aiguë causée par l'ingestion de fruits toxiques de *D. senegalense*. Pour l'étude des symptômes associés à l'intoxication, différentes préparations de ces fruits ont été administrées à des souris. Les résultats de ces essais *in vivo* sont présentés ci-dessous. Des cristaux ont été obtenus après macération des fruits dans de l'éthanol à 90 %. Des solutions aqueuses de ces cristaux à différentes concentrations ont été administrées par voie intra-péritonéale ou *per os* à 30 souris réparties en 6 lots. Même les souris du lot ayant reçu la concentration la plus élevée (20 g de cristaux par kg de souris), n'ont montré aucun symptôme. Un extrait éthanolique du fruit, pur ou dilué, a été administré à 6 lots de souris, chaque lot ayant reçu des concentrations croissantes. C'est à partir d'une dose égale ou supérieure à 3.3 g/kg de souris que le taux de mortalité était égal à 100 %, des suites d'un arrêt respiratoire. Les symptômes associés étaient une polypnée, une somnolence et une paralysie du train postérieur. Dans cet essai, la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée (dose létale 50, LD₅₀) se situe entre 1.25 et 2.5 g/kg. Un macéré aqueux de la pulpe a également été testé chez des souris mais n'a provoqué aucun symptôme. Lors de l'administration de 1 g/kg de décoction aqueuse par voie intra-péritonéale, une polypnée, un abolissement du réflexe de redressement, et une agitation suivie de prostration ont été observés. Les 6 souris testées sont mortes en 1h30. Le taux de létalité est proportionnel à la dose injectée, jusqu'à une concentration de 0.2 g/kg où seule une légère polypnée a été observée. Pour cet extrait, la LD₅₀ mesurée est comprise entre 0.3 et 0.4 g/kg.

Il est intéressant de noter que lorsque de l'eau contenant un quelconque extrait de ces fruits est proposée aux souris, celles-ci s'abstiennent de boire. Il semblerait donc qu'une odeur ou un goût particulier repousseraient ces dernières. S'agirait-il de l'amertume, maintes fois relevée par les différents auteurs ? Au niveau des composés responsables de la toxicité, il semblerait qu'ils soient plus solubles dans l'éthanol que dans l'eau chaude. D'après D'Almeida (1984), le fruit toxique de *D. senegalense* semblerait agir sur les systèmes nerveux, cardio-vasculaire et

respiratoire. La dissection qu'il a effectuée sur une souris morte n'a montré aucune anomalie concernant un organe en particulier.

D'Almeida a également traité les données de 13 cas d'intoxication humaine, dont 11 survenues chez des enfants. Ces derniers avaient ingéré la pulpe du fruit ou un sirop en contenant. Dans tous les cas, des vomissements ont été le signal d'alarme. Les symptômes observés sont reportés dans le Tableau 2.12.

Tableau 2.12 – Symptômes observés suite à l'ingestion du fruit toxique de *D. senegalense* J.F. Gmel. (D'Almeida, 1984).

Observations (nombre de cas touchés/13)	
Système cardio-vasculaire	- accélération du pouls (5) - température inférieure ou égale à 35° (3) - tension artérielle basse (2) - bradycardie avec pouls imprenable (1)
Système digestif	- vomissement (13) - faible diarrhée (2) - légères douleurs abdominales (2)
Système respiratoire	- œdème aigu du poumon conduisant à la mort (1)
Système nerveux central	- somnolence et apathie (7) - convulsion associée à une mydriase bilatérale (2) - coma associé à une mydriase bilatérale (1)
Examens de laboratoire (pratiqués sur 7 malades uniquement)	- hyperglycémie (3 / 7) - vitesse de sédimentation accélérée (5 / 7) - acétonurie (3) - glucosurie (1)
Traitement	traitements toujours symptomatiques ; un seul patient est décédé des suites de l'intoxication.

Malheureusement, le nombre de fruits toxiques ingérés par les patients n'a pu être connu, de telle sorte qu'il n'a pas été possible de mettre en relation cette quantité avec la gravité de l'intoxication. D'après D'Almeida (1984), ce fruit semble exercer son effet toxique plus particulièrement au niveau du système neuro-végétatif, car sur les treize cas observés, seul un patient présentait une conscience normale.

Les pédiatres Imbert et Teyssier (1986) ont étudié huit cas d'intoxications au « *ditakh* » enregistrés au Service de Pédiatrie de l'Hôpital Principal de Dakar (Sénégal), durant les années 1983 et 1984. Ils insistent sur le fait que l'absence de spécificité des symptômes, leur variabilité et quelque fois l'apparition de symptômes antagonistes chez des patients différents, sont des facteurs qui rendent l'établissement du diagnostic relativement difficile. Cependant, grâce à un interrogatoire minutieux, l'origine des intoxications a pu être déterminée avec certitude, et un

tableau clinique a pu en être dégagé. Le Tableau 2.13 résume les conclusions tirées de cette étude.

Tableau 2.13 – Etude clinique d'intoxication par le « *ditakh* » (Imbert et Teyssier, 1986).

Observations	
Etiologie	- Fréquence rare : 8 cas enregistrés pour 109 cas d'intoxication aiguës; il est cependant fort probable que de nombreux cas n'arrivent pas à l'hôpital ou que l'origine de l'intoxication reste inconnue, en raison de la difficulté du diagnostic. - Les personnes de tout âge et des deux sexes peuvent être concernées. Cependant, la fréquence est plus élevée chez les enfants en raison du manque de connaissance du fruit.
Signes cliniques	Les symptômes apparaissent brutalement, en 1 à 4 heures après l'ingestion ; ne sont pas spécifiques et peuvent être variables en fonction des patients. Le nombre de cas enregistrés pour un symptôme est indiqué entre parenthèse. Les symptômes observés surviennent généralement dans l'ordre suivant : - Manifestations digestives dans tous les cas, comprenant des vomissements incoercibles, des douleurs abdominales souvent diffuses, intenses, évoluant par crise. - Troubles de conscience (7) survenant en 1 à 2 heures, pouvant aller de la simple somnolence au coma de stade II ; une agitation est enregistrée dans 3 cas. - Les symptômes suivants sont volontiers associés : tachycardie (8) ; hypothermie (6) ; hypotension (6), voire collapsus (2) avec ou sans déshydratation ; dyspnée <i>sine materia</i> (4) évocatrice d'acidose métabolique ; anomalies pupillaires : mydriase réactive (2), mydriase aréactive (1), myosis (1) ; diarrhée (1).
Examens de laboratoire	Une hyperglycémie a été relevée chez trois patients, tandis qu'un patient a présenté une hypoglycémie.
Evolution	Non traitée, l'évolution peut être favorable (1), mais également mortelle (1). En l'absence d'antidote connu, le traitement est purement symptomatique : il peut consister en une réhydratation, une alcalinisation ou un rétablissement du volume sanguin. Tous les patients ayant été traités ont guéri en moins de 6 h et sans séquelle. En conclusion, l'intoxication par le « <i>ditakh</i> » est le plus souvent bénigne, mais seulement dans le cas où le patient est pris en charge suffisamment tôt, acte difficilement réalisable en campagne.

Imbert et Teyssier (1986) concluent leur étude en affirmant que le tableau clinique évocateur de ce type d'intoxication associe des troubles digestifs, une altération de la conscience plus ou moins sévère, une hypothermie, une dyspnée, des anomalies pupillaires et des troubles cardio-vasculaires. Au niveau pharmacologique, ils suggèrent une toxicité sur les centres neurovégétatifs du système nerveux central, en gardant toutefois une certaine réserve. Ils concluent leur étude en mettant en avant le fait qu'il est impossible de retenir des facteurs pronostics précis, et que malgré le fait que le nombre de fruits avalés par enfant soit connu, aucune corrélation entre le nombre de fruits ingérés et la gravité de l'intoxication ne peut être déduite.

Adam *et al.* (1991) ont également mené ce genre d'étude, et résument les symptômes observés lors de cette intoxication : le début est brutal, marqué par des douleurs abdominales violentes, associées à des vomissements. La survenue de troubles de la conscience peuvent aller de la simple somnolence au coma, et apparaissent comme hautement spécifiques à l'intoxication. Les symptômes suivants sont volontiers associés : tachycardie (dans tous les cas), hypotension artérielle, hypothermie plus ou moins marquée, dyspnée, anomalies pupillaires (myosis ou mydriase). Les examens de laboratoire n'apportent aucun argument au diagnostic. Des désordres hydroélectriques, une acidose métabolique, des troubles de la glycémie (hyper- ou hypo-) sont reportés. En raison de l'absence d'antidote connu, le traitement est symptomatique et constitue en un lavage gastrique abondant, en une correction de la déshydratation et une alcalinisation.

Deux cas supplémentaires d'intoxication chez des enfants ont été décrits sept ans plus tard. Les symptômes sont survenus environ 6 h après ingestion de la variété toxique du « *ditakh* » et consistaient en une sensation de malaise généralisé avec vomissements, obnubilation, myosis, hypotonie globale, hypotension marquée et tachycardie. Une acidose, une hyperglycémie ainsi qu'une légère hypokaliémie ont été également remarquées chez l'enfant atteint le plus sévèrement (Burgel *et al.*, 1998). En 2000, trois autres enfants ont été hospitalisés à Dakar suite à l'ingestion de ce fruit. Les symptômes observés étaient similaires à ceux répertoriés par Imbert et Teyssier (1986) : douleurs abdominales, vomissements, coma profond, pression sanguine non mesurable, bradycardie, bradypnée et hypothermie. Les examens de laboratoires ont révélé une acidose lactique, une hyperglycémie, une leucocytose, une coagulopathie. Un enfant est décédé des suites de l'intoxication, mais les deux autres ont pu retrouver rapidement un état normal grâce à une ventilation mécanique et à l'injection d'épinéphrine et d'atropine. Berthelot *et al.* (2000) rappellent que, bien que ces cas d'intoxications soient reportés dans la littérature depuis plus d'un siècle et demi, la physiopathologie reste inconnue à ce jour. Cette absence de connaissance provient notamment du fait que les symptômes observés sont nombreux, variables selon les cas et surtout peu spécifiques. L'absence de connaissance du ou des composés responsables de la toxicité est également un facteur important. Selon ces auteurs, en raison de l'amélioration rapide de l'état du patient après réanimation, le ou les composés toxiques semblent avoir une courte demi-vie. Ceci, ainsi que l'observation d'une déficience cardio-pulmonaire aiguë, d'une perte de conscience, d'une acidose métabolique et d'un haut taux plasmatique de lactate, leur font fortement penser aux symptômes observés lors d'une

intoxication au cyanure. Cependant, si l'intoxication était effectivement due à la présence de cyanure, les mitochondries ne retrouveraient pas leur état normal après un certain laps de temps.

Ainsi, la détermination du ou des composés responsables des intoxications dues à l'ingestion de fruits toxiques de *D. senegalense* serait hautement bénéfique, afin de pouvoir soigner les patients avec un traitement spécifique.

2.5.4 Etudes phytochimiques antérieures

La première analyse de la composition chimique des deux types de fruits : *D. senegalense* à fruits doux et *D. senegalense* à fruits amers a conduit à la détermination de la présence de tanins, d'acide tartrique, de sucres réducteurs, de lipides et d'amidon dans les deux formes de fruit (Heckel et Schlagdenhauffen, 1889).

2.5.4.1 Forme comestible de *Detarium senegalense* J.F. Gmel.

La composition en métabolites primaires du fruit comestible de *D. senegalense* a été quelque peu étudiée (Kerharo et Adam, 1974). Comme dans le cas de *D. microcarpum*, il présente de bonnes qualités nutritionnelles. Sa teneur en vitamine C est particulièrement remarquable : il en contient de 0.5 à 1 %, ce qui fait de ce fruit le plus riche en vitamine C. Aucune indication n'est cependant donnée sur le degré de maturation et sur le lieu de récolte des fruits analysés. A titre comparatif, le citron contient 0.45 % de vitamine C (Diop *et al.*, 1988). Comme l'une des activités reconnue du fruit est le traitement du rhume et de l'angine, on peut supposer que la teneur élevée en vitamine C est en partie responsable de cette activité (cf. Tableau 2.9). A ce jour, une seule investigation phytochimique a été menée sur ce fruit : la présence d'alcaloïdes en trace, de saponines et de tanins a été révélée par des réactions chimiques, mais la structure des composés n'a pas été déterminée (D'Almeida, 1984).

Activités reportées pour la forme comestible de *D. senegalense*

La farine issue de la graine est employée en médecine traditionnelle comme agent épaississant dans la nourriture. Comme c'est le cas pour *D. microcarpum*, la graine est riche en polysaccharides, dépourvus d'amidon, solubles dans l'eau. A nouveau dans une optique d'utilisation de ces composés comme excipient, plusieurs études de caractérisation physico-chimique ont été entreprises. Il s'est avéré que la gomme de *Detarium* était similaire à celle du Tamarin (*Tamarindus indica* L., Caesalpinioideae) (Wang *et al.*, 1997; Ross-Murphy *et al.*, 2000; Urakawa *et al.*, 2002).

Une étude clinique a été menée dans le but d'observer l'effet de la farine issue des graines, sur les taux sanguins post-prandiaux de glucose et d'insuline. Un abaissement significatif de ces concentrations a été mesuré et il semblerait que les polysaccharides en soient en partie responsables (Onyechi *et al.*, 1998).

2.5.4.2 Forme toxique de *Detarium senegalense* J.F. Gmel.

Jusqu'à ce jour, seules deux investigations phytochimiques portant sur la détermination du ou des composés responsables de la toxicité ont été menées, sans malheureusement aboutir à des résultats concluants. Dans leur étude sur la composition chimique du fruit toxique, Paris et Moyse-Mignon (1947) ont notamment mis en évidence la présence d'alcaloïdes en trace (par précipitation par le réactif de Mayer et Bouchardat), de 0.05 % de principe amer et de 2.0 % d'un acide organique qu'ils ont appelé l'acide détarique. Cet acide a pu être obtenu par précipitation dans du benzène. C'est un principe amer, amorphe, se résignant à l'air. Sa structure exacte n'a pu être déterminée, mais certaines propriétés chimiques ont pu être déduites des réactions chimiques effectuées. Il s'agit d'un acide-alcool dépourvu d'atome d'azote, portant probablement une fonction cétonique et dérivant des sucres. Le poids moléculaire, déterminé par acidimétrie, était voisin de 200 g/mole, et la formule brute calculée à partir du pourcentage relatif de chaque atome était $C_8H_{12}O_6$. En ce qui concerne la toxicité incriminée à ce composé, Paris et Moyse-Mignon (1947) affirment avoir fait des essais *in vivo*, mais ne les décrivent pas. Les quelques mesures physico-chimiques qu'ils ont effectuées sur cette substance sont présentées ci-dessous :

Aspect :	cristallisation en aiguilles
Point de fusion (Mp) :	180°-182°
Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ (c 1%, H ₂ O) :	- 141°
Solubilité :	soluble dans l'eau, l'alcool ; peu soluble dans l'acétone, l'éther, le chloroforme ; insoluble dans le benzène et l'éther de pétrole.

La deuxième investigation phytochimique fut menée par D'Almeida (1984). Des cristaux ont été obtenus par évaporation du filtrat issu de la macération des fractions éthanoliques. Il semblerait qu'il s'agisse d'un dérivé saturé (nommé ici **Z**), comportant un ou plusieurs sucres et possédant au moins une fonction aldéhydique. Les quelques mesures physico-chimiques effectuées sont présentées ci-dessous :

Aspect :	poudre cristalline blanche, à saveur sucrée
Point de fusion (Mp) :	167°-170°

D'Almeida a déterminé la proportion masse/masse relative de chaque atome, mais n'a proposé aucune formule brute. Ayant effectué ce calcul, nous obtenons une formule brute de $(C_1H_2O_1)_n$. Il semblerait donc qu'il s'agisse d'un composé différent de celui isolé par Paris et Moyse-Mignon. (1947). Cependant, vu les moyens techniques dont disposaient ces derniers, la formule brute suggérée doit être considérée avec précaution. En comparant ses résultats avec ceux de Paris et Moyse-Mignon, D'Almeida estime également qu'il s'agit de substances différentes, argumentant que **Z** est sucré et non acide, qu'il est sous forme de poudre, contrairement à l'acide détarique qui cristallise en aiguilles. De plus, **Z** ne fait pas virer la phénolphthaléine en présence de soude comme le font la plupart des acides. La comparaison des points de fusion indique que **Z** se liquéfie à une température d'environ 10°C inférieure à celle de l'acide détarique, différence cependant trop faible pour affirmer avec certitude que les deux composés sont distincts. Au niveau des tests toxicologiques réalisés sur les deux composés, D'Almeida affirme qu'ils présentent la même toxicité sur les chiens et les cobayes, quand bien même Paris et Moyse-Mignon (1947) ne détaillent pas les tests effectués.

Kerharo et Adam (1974) prennent position quant aux travaux réalisés par Paris et Moyse-Mignon et concluent, que comme Heckel et Schlagdenhauffen (1889) prétendaient que les fruits toxiques perdaient toute activité après un mois de conservation, les observations de Paris et Moyse-Mignon faites à partir de fruits vieux de 4 ans perdent tout intérêt.

Adam *et al.* (1991) ont également comparé ces deux investigations phytochimiques et ont tenté d'expliquer la différence des résultats obtenus par trois hypothèses :

Paris et Moyse-Mignon (1947) ayant travaillé sur des fruits vieux d'au moins quatre ans, et D'Almeida (1984) sur des fruits récoltés trois mois auparavant, Adam *et al.* s'interrogent sur la possibilité que l'acide détarique pourrait être un dérivé du polyoside isolé par D'Almeida.

La deuxième hypothèse se fonde sur les techniques de séparation. En effet, il serait possible, grâce aux méthodes de séparation modernes, que D'Almeida ait isolé la totalité du principe actif, tandis que Paris et Moyse-Mignon, par des techniques « plus brutales », aient scindé l'hétéroside, n'obtenant donc pour finir que l'acide détarique.

La possibilité que plusieurs substances soient à l'origine de la toxicité est également envisagée.

Adam *et al.* (1991) concluent en disant que les « diverses études pharmacologiques effectuées ne permettent pas d'identifier précisément un ou plusieurs principes actifs responsables de la toxicité ». Ils suggèrent une comparaison de la composition du fruit comestible et du fruit toxique, de manière à mettre en évidence l'absence ou la présence du composé toxique dans le fruit comestible, mais à des taux tolérables par l'organisme. Et c'est ce que nous nous proposons d'essayer de faire dans ce travail, en plus d'une investigation phytochimique de *D. microcarpum*.

Il est à noter qu'à l'heure actuelle, la forme toxique de *D. senegalense* est enregistrée en tant que plante toxique dans le FDA Poisonous Plant Database.

3. RESULTATS

Différents critères peuvent être envisagés pour la sélection du matériel végétal à étudier.

Il peut s'agir de

- l'utilisation traditionnelle d'une plante par la population locale ;
- des aspects botaniques et chimiotaxonomiques ;
- du comportement des plantes dans leur environnement naturel.

Dans la pratique, ces critères sont dans la mesure du possible utilisés conjointement. Un choix aléatoire de plantes peut également être envisagé en vue d'une étude. Avant d'entreprendre la récolte, une recherche approfondie sur les éventuels travaux scientifiques antérieurs est bien entendu menée. Elle permet d'obtenir des informations sur les composés déjà isolés dans l'espèce investiguée ou dans des espèces du même genre, et par conséquent d'appréhender la recherche de la manière la plus rationnelle possible. Les espèces végétales protégées sont bien entendu exclues d'une telle démarche, et lorsque le travail envisagé porte sur des plantes provenant de pays étrangers, les patrimoines culturels et naturels doivent être strictement respectés.

3.1 Préparation des extraits

Dans le présent travail, il a été choisi d'investiguer sept fruits comestibles, ainsi qu'un fruit toxique : *Detarium senegalense*, forme toxique. Ils ont été récoltés lors de différentes missions scientifiques du Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (LPP). La provenance du matériel végétal, ainsi que les protocoles d'extraction sont décrits aux chapitres 5.1.1 et 5.1.2. L'épuisement successif des plantes séchées par des solvants de polarité croissante (dichlorométhane (DCM), puis méthanol (MeOH)) permet l'extraction d'une grande partie de leurs constituants. Le résultat des extractions est présenté dans le Tableau 3.1. Dans le cas de *Nephelium ramboutan-ake* et de *Dimocarpus longan*, ce sont des extraits éthanoliques qui ont été préparés, pour des raisons pratiques explicitées au chapitre 5.1.2. Dans le cas de ces deux Sapindaceae, le mésocarpe et le péricarpe ont été investigués séparément, puisque ce dernier n'est pas comestible. Pour ce qui est des autres fruits, l'extraction a porté sur le mésocarpe et le péricarpe réunis, puisqu'ils sont tout deux consommés. N'ayant pu obtenir la pulpe de *Talisia esculenta*, seul le péricarpe a été investigué.

Tableau 3.1 – Extraits préparés à partir des fruits

Nom botanique	Organe (poids sec initial)	Extrait	Poids	Rendement
<i>Detarium microcarpum</i> Guill. et Perr. (Caesalpinioideae)	mésocarpe + péricarpe (632 g)	DCM	8.8 g	1.4 %
		MeOH	132.9 g	21.0 %
<i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel. forme comestible (Caesalpinioideae)	mésocarpe + péricarpe (505 g)	DCM	18.8 g	3.7 %
		MeOH	148.8 g	29.4 %
<i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel. forme toxique (Caesalpinioideae)	mésocarpe + péricarpe (158 g)	DCM	4.27 g	2.7 %
		MeOH	65.4 g	41.4 %
<i>Bauhinia reticulata</i> DC. (Caesalpinioideae)	mésocarpe + péricarpe (176 g)	DCM	6.7 g	3.8 %
		MeOH	21.7 g	12.3 %
<i>Ziziphus zizyphus</i> (L.) H. Karst. (Rhamnaceae)	mésocarpe + péricarpe (228 g)	DCM	1.2 g	0.5 %
		MeOH	63.2 g	27.7 %
<i>Nephelium ramboutan-ake</i> (Labill.) Leenh (Sapindaceae)	péricarpe (357.1 g)	EtOH	23.36 g	6.5 %
	mésocarpe (65.5 g)	EtOH	10.38 g	15.8 %
<i>Dimocarpus longan</i> (Lour.) (Sapindaceae)	péricarpe (77.9 g)	EtOH	4.26 g	5.5 %
	mésocarpe (112.5 g)	EtOH	16.53 g	14.7 %
<i>Talisia esculenta</i> Radlk. (Sapindaceae)	péricarpe (extrait hydro-alcoolique) (49.7 mg)	CHCl ₃	20.1 mg	40.4 %
		n-BuOH	15.6 mg	31.3 %

3.2 Analyses préliminaires

Les extraits bruts ont été solubilisés à raison de 10 mg/mL dans un solvant adéquat : le dichlorométhane pour les extraits apolaires et le méthanol pour les extraits polaires. Ils ont ensuite été analysés par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) dans les conditions expérimentales décrites en 5.2.1. Outre l'observation sous rayonnement UV à 254 nm et 366 nm, les plaques ont été révélées à l'aide de réactifs chimiques présentés au point 5.5.1, dans le but de donner un premier aperçu de la composition des échantillons.

Pour les analyses par HPLC/DAD-UV, les extraits bruts ont été solubilisés dans un solvant adéquat : l'acétonitrile (CH_3CN) pour les extraits apolaires, et le méthanol pour les extraits polaires. Dans le cas des extraits apolaires difficilement solubles, ils ont au préalable été dissous dans un volume minimal de tétrahydrofurane (THF), puis complétés *ad* 1 mL. Après centrifugation et décantation, les solutions ont été injectées dans un système HPLC (conditions décrites en 5.2.2), et analysées selon les conditions suivantes :

- échantillon : 10 μL d'une solution à 10 mg/mL d'extrait ;
- colonne : NovaPak[®] C₁₈ (5 μm , 150 x 3,9 mm d.i. ; Waters) ;
- phase mobile : débit 1 mL/min avec les gradients linéaires suivants :
 - a) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 30:70 $\rightarrow$ 100:0 en 30 min (extraits DCM) ou
 - b) $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 30:70 $\rightarrow$ 100:0 en 30 min (extraits MeOH, EtOH ou n-BuOH) ;
- détection : DAD-UV à 210 nm, 254 nm et 366 nm.

Le criblage chimique sur plaque CCM a permis de mettre en évidence relativement peu de classes de composés. La révélation au réactif général de Godin (1954) a montré la présence systématique, dans les extraits bruts polaires, de tanins sur la ligne de dépôt (coloration rouge) (Wagner and Bladt, 1996). Ces mêmes taches prenaient une coloration rouge-brune avec le réactif au chlorure de fer. Quant aux extraits obtenus à partir des fruits de la famille Sapindaceae, de nombreux composés prennent une coloration violette suite au giclage de la CCM avec le réactif de Godin, permettant alors de supposer la présence de saponines (*cf.* 5.5.1).

La présence de ce type de composés n'est pas surprenante, car ils sont fréquemment décrits chez les espèces de cette famille (Bruneton, 1999). Quant au réactif de Dragendorff, seul l'extrait méthanolique de *B. reticulata* a montré une faible réaction. Il semblerait donc, *a priori*, que la forme toxique du fruit de *D. senegalense* ne comporte pas ce type de composés, ce qui est en désaccord avec les études faites par Paris et Moyse-Mignon (1947) (cf. chapitre 2.5.4.2). Cependant, ces chercheurs avaient mis en évidence ce type de composés en quantité de traces, et de plus, par le biais d'un autre réactif : celui de Mayer et Bouchardat.

Lors de l'interprétation des résultats obtenus par réactions chimiques effectuées sur CCM, il faut garder à l'esprit qu'elles ne sont qu'indicatives, et que la présence de résultats faux positifs ou faux négatifs est fréquente.

3.2.1 Elimination des sucres

Une investigation phytochimique de fruits peut présenter quelques inconvénients en raison du taux élevé en sucres. En effet, les extraits méthanoliques ou éthanoliques préparés, compte tenu de la polarité des solvants employés, extraient les sucres de façon presque totale. Ces extraits sont par conséquent collants, très hygroscopiques et des concentrations élevées doivent être employées pour pouvoir détecter les métabolites secondaires, ce qui a effectivement été observé lors des analyses préliminaires par CCM ou HPLC/UV-DAD. Par conséquent, deux méthodes ont été employées pour éliminer les sucres. La première est le partage liquide-liquide n-BuOH/H₂O, appliqué aux extraits de péricarpes, supposés pauvres en sucres, de *Nephelium ramboutan-ake* et de *Dimocarpus longan*. Cette méthode d'élimination des sucres présente l'avantage de ne nécessiter que peu de matériel, mais un inconvénient est la formation d'une émulsion à l'interface difficilement éliminable. Cette technique est peu appropriée pour des extraits très riches en sucres, car il faudrait un nombre très élevé d'extractions, engendrant alors de nombreuses pertes au niveau des métabolites secondaires recherchés. Dès lors, les extraits de mésocarpe ou de mésocarpe + péricarpe, contenant une très grande proportion de sucres, ont été traités au moyen d'une colonne chromatographique ouverte sur résine échangeuse d'ions Diaion[®] HP20/L. Ces deux méthodes sont décrites dans les chapitres 5.3.1 et 5.3.2, respectivement, tandis que les rendements des extraits sans sucre obtenus sont présentés dans les Tableaux 3.2 et 3.3. Seuls les fruits présentant un intérêt marqué ont été traités de cette manière.

Ainsi, les extraits méthanoliques de *Bauhinia reticulata*, *Ziziphus zizyphus* et *Talisia esculenta* n'ont pas été traités, en raison du nombre d'études importantes déjà réalisées sur ces fruits.

Tableau 3.2 – Extraits sans sucre obtenus par colonne chromatographique ouverte sur résine échangeuse d'ions Diaion® HP20/L

Plante / organe	Extrait (poids)	Extrait sans sucre (poids)	Rendement
<i>Detarium microcarpum</i> / mésocarpe + péricarpe	MeOH (116 g)	MeOH s.s. (8.6 g)	7.4 %
<i>D. senegalense</i> forme comestible / mésocarpe + péricarpe	MeOH (21.5 g)	MeOH s.s. (1.6 g)	7.2 %
<i>D. senegalense</i> forme toxique / mésocarpe + péricarpe	MeOH (20.6 g)	MeOH s.s. (2.2 g)	10.7 %
<i>Bauhinia reticulata</i> / mésocarpe + péricarpe	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Ziziphus zizyphus</i> / mésocarpe + péricarpe	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Nephelium ramboutan-ake</i> / mésocarpe	EtOH (10.4 g)	EtOH s.s. (0.6 g)	5.6 %
<i>Dimocarpus longan</i> / mésocarpe	EtOH (16.5g)	EtOH s.s. (1.2 g)	7.2 %
<i>Talisia esculenta</i> / péricarpe	n.t.	n.t.	n.t.

n.t. non traité

Tableau 3.3 – Extraits sans sucre obtenus par partage n-BuOH/H₂O

Plante / organe	Extrait fractionné (poids)	Extrait butanolique sans sucre (poids)	Rendement
<i>Nephelium ramboutan-ake</i> / péricarpe	EtOH (23.36 g)	n-BuOH s.s. (14.04 g)	60.1 %
<i>Dimocarpus longan</i> / péricarpe	EtOH (4.26 g)	n-BuOH s.s. (1.08 g)	25.4 %

Les rendements d'extraction obtenus pour les extraits de mésocarpes de *Nephelium ramboutan-ake* et de *Dimocarpus longan* ne sont que des valeurs indicatives, étant donné que les fruits n'étaient que partiellement lyophilisés. Malgré cela, l'hypothèse de départ qui consistait à penser que la teneur en sucres était nettement plus faible dans le péricarpe que dans le mésocarpe, est confirmée. Concernant les trois extraits méthanoliques des fruits de *Detarium*, leur teneur en sucres est semblable, et avoisine les 90 %.

3.3 Criblage préliminaire des extraits bruts

Tous les extraits préparés (DCM, MeOH s.s., EtOH s.s. et n-BuOH s.s.) ont été soumis à différents tests biologiques, chimiques et biochimiques, dans le but d'orienter nos recherches. Les tests effectués ont tous été réalisés sur CCM. Ce support présente l'avantage de permettre la solubilisation des échantillons dans le solvant le plus approprié, contrairement aux tests en solution souvent réalisés en milieu aqueux. De plus, grâce à leur facilité d'emploi, les tests sur CCM peuvent être utilisés en routine, de manière à effectuer un fractionnement bioguidé. La préparation des tests est détaillée dans les chapitres 5.5.3 à 5.5.7, et les activités suivantes ont pu être évaluées :

- antifongique sur *Cladosporium cucumerinum* (C.c.) et *Candida albicans* (C.a.) ;
- antibactérienne sur *Bacillus subtilis* (B.s.) ;
- antiradicalaire avec l'emploi d'un réactif au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) ;
- inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE).

Les résultats des tests énumérés ci-dessus sont répertoriés dans le Tableau 3.4. L'appréciation des activités a été faite sur la base de l'échelle relative qui a cours dans notre Laboratoire. Elle a donc plus une valeur comparative qu'absolue. Par la suite, lors de l'évaluation de l'activité des composés purs, des résultats semi-quantitatifs pourront être dégagés en testant des solutions de concentration connue pour ces composés.

Tableau 3.4 – Criblage biologique et biochimique des extraits bruts

Nom botanique	Organe	Extrait	C.c.	C.a.	B.s.	DPPH	AChE
<i>Detarium microcarpum</i>	mésocarpe + péricarpe	DCM	+++	+	+++	+	+++
		MeOH s.s.	-	-	++	++	+
<i>D. senegalense</i> , forme comestible	mésocarpe + péricarpe	DCM	+++	-	n.d.	+	+
		MeOH s.s.	-	-	n.d.	++	-
<i>D. senegalense</i> , forme toxique	mésocarpe + péricarpe	DCM	+++	-	n.d.	+	+
		MeOH s.s.	-	-	-	+	-
<i>Bauhinia reticulata</i>	mésocarpe + péricarpe	DCM	+	n.d.	n.d.	+	+
		MeOH	-	n.d.	n.d.	+	-
<i>Ziziphus zizyphus</i>	mésocarpe + péricarpe	DCM	+	n.d.	n.d.	+	+
		MeOH	-	n.d.	n.d.	-	-
<i>Nephelium ramboutan-ake</i>	péricarpe	n-BuOH s.s.	+	n.d.	-	-	-
	mésocarpe	EtOH s.s.	-	n.d.	-	-	-
<i>Dimocarpus longan</i>	péricarpe	n-BuOH s.s.	-	n.d.	++	+	-
	mésocarpe	EtOH s.s.	-	n.d.	-	-	-
<i>Talisia esculenta</i>	péricarpe	CHCl ₃	-	n.d.	n.d.	+	-
		n-BuOH	-	n.d.	n.d.	-	-

- : aucune activité ; + : activité faible ; ++ : activité moyenne ; +++ : activité forte
n.d. : activité non déterminée

Avant tout, il est nécessaire de préciser qu'un résultat observé lors de l'évaluation d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque d'un produit, d'une part, et d'autre part, sa quantité relative dans l'extrait. Ainsi, l'activité marquée d'un extrait peut tout aussi bien provenir d'une faible quantité de constituant très actif, que d'une grande quantité de constituants peu actifs. De plus, étant donnée la faible résolution des composés généralement observée sur CCM, il se peut qu'une activité observée résulte de la somme d'activités de plusieurs constituants. Par conséquent, les résultats de telles investigations doivent toujours être considérés prudemment. De plus, il est important de mentionner que la bonne corrélation entre les résultats, obtenus par le biais de tests sur CCM et de tests en solution n'a pas toujours été démontrée. Or, les tests en solution sont de manière générale plus fiables, d'une part à cause de leur nature, en se rapprochant plus des conditions réelles ; et d'autre part, du fait que les résultats sont quantifiables.

Tous les extraits n'ont pas pu être testés avec les souches de *C. albicans* et *B. subtilis* pour des raisons pratiques de mise en place de ces tests au Laboratoire.

Les 6 extraits issus des fruits de la famille Sapindaceae (*N. ramboutan-ake*, *D. longan* et *T. esculenta*) ne présentent que très peu d'activités. L'extrait n-BuOH s.s. du péricarpe de *N. ramboutan-ake* a montré une faible inhibition du champignon *C. cucumerinum*, tandis que l'extrait CHCl₃ du péricarpe de *T. esculenta* et l'extrait n-BuOH s.s. du péricarpe de *D. longan* ont montré une faible activité anti-radicalaire. Ce dernier extrait a de plus inhibé de façon modérée la croissance de *B. subtilis*. Concernant ce test, la plupart des extraits testés (62.5 %) ont montré une activité modérée à forte. Cependant, cette bactérie est réputée très sensible et de nombreux résultats « faux-positifs » peuvent survenir. Ces résultats sont par conséquent à prendre avec précaution pour la sélection d'extraits prometteurs.

Les extraits DCM de *B. reticulata* et de *Z. zizyphus* n'ont montré que de faibles activités inhibitrices du champignon *C. cucumerinum* et de l'acétylcholinestérase, ainsi qu'un faible effet antiradicalaire sur le DPPH. Quant aux extraits méthanoliques de ces deux fruits, seul celui de *B. reticulata* a montré un léger effet antiradicalaire. Il faut cependant noter que ces deux extraits méthanoliques n'ayant pas été débarrassés de leurs sucres, il se pourrait que les activités potentielles soient masquées. Malgré cela, et surtout compte tenu des résultats prometteurs des extraits des trois fruits de *Detarium* spp., l'investigation phytochimique de ces deux fruits n'a pas été poursuivie dans ce travail.

En effet, ce sont principalement les extraits DCM des fruits de *Detarium* qui présentent le plus d'activités. Ils inhibent tous fortement la croissance du champignon phytopathogène *Cladosporium cucumerinum* (Figure 3.1). Ce sont également ces extraits qui sont de forts inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Cette enzyme est notamment impliquée dans la maladie d'Alzheimer, caractérisée par un déficit neuronal en acétylcholine. Actuellement, la plupart des inhibiteurs de cette enzyme provenant de source végétale sont des alcaloïdes (physostigmine, galanthamine, et alcaloïdes stéroïdiques (Marston *et al.*, 2002). Or, ces molécules présentent certains inconvénients tels qu'une courte demi-vie et de nombreux effets secondaires. Il serait donc prometteur de découvrir des composés actifs appartenant à une classe chimique différente. Les résultats de ce test doivent cependant être pris avec circonspection car le mécanisme d'action de nombreux insecticides (dérivés organophosphorés, carbamates, etc...) réside justement dans l'inhibition de cette enzyme (Weins et Jork, 1996). Il n'est donc pas à exclure, travaillant sur des fruits comestibles et parfois cultivés, que de tels insecticides aient pu être

employés, expliquant alors l'activité de ces extraits. C'est un aspect qui doit être pris en compte, et ce malgré le soin avec lequel les échantillons ont été choisis.

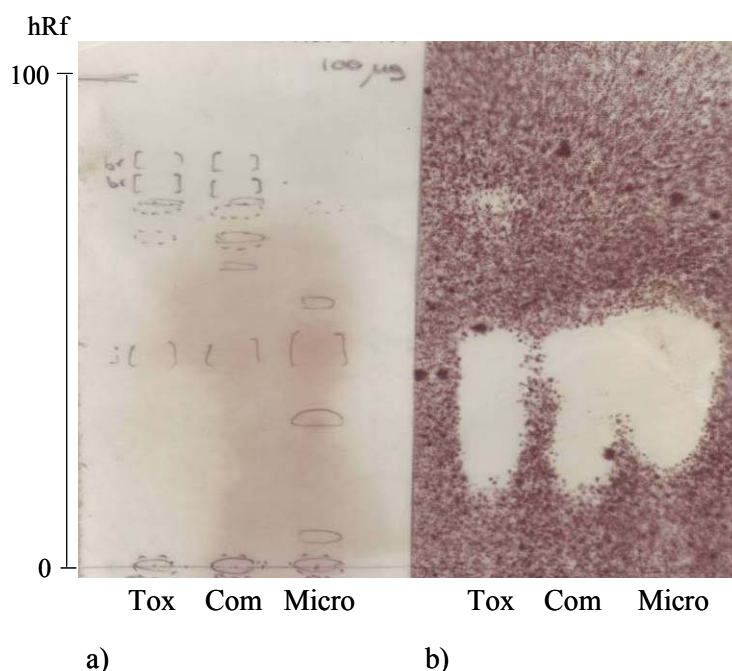


Figure 3.1 – Activité inhibitrice de *Cladosporium cucumerinum* des trois extraits DCM des fruits de *Detarium* spp.

Echantillons : 100 µg d'extrait DCM : Tox : *D. senegalense* forme toxique, Com : *D. senegalense* forme comestible, Micro : *D. microcarpum*

Support : Silicagel 60 F₂₅₄ Merck ; Phase mobile : AcOEt-hexane 1:1 ;

Détection : a) ○ extinction de fluorescence à 254 nm ; ◌ fluorescence à 366 nm ;
[] réactif de Godin

b) inoculum de *Cladosporium cucumerinum* (conditions décrites sous 5.5.3)

Une activité anti-radicalaire sur le DPPH a de surcroît été montrée par les extraits de *Detarium* spp., et particulièrement par les extraits MeOH s.s. Ces résultats positifs peuvent s'expliquer par la présence de composés phénoliques, et en particulier de flavonoïdes, dont l'activité anti-radicalaire a déjà été largement documentée (Potterat, 1997). Cette activité indique alors la probabilité d'isoler ce type de composés dans ces extraits.

Parmi les extraits étudiés, ce sont donc les extraits DCM des fruits de *Detarium* qui présentent le plus d'activités biologiques et biochimiques, et parmi ceux-ci, celui de *D. microcarpum* semble être le plus prometteur. De plus, ce fruit n'a jamais été investigué d'un point de vue phytochimique. C'est donc tout naturellement sur l'extrait DCM de *D. microcarpum* que se sont portées en premier lieu nos recherches. Dans un deuxième temps, une

comparaison des extraits DCM et MeOH s.s. des trois fruits de *Detarium* a été menée par le biais d'une analyse UPLC[®]/ESI/TOF-MS. Cette comparaison a été menée dans deux buts distincts. Premièrement, évaluer les variations de la composition chimique d'espèces du même genre, et donner une opinion concernant le rang taxonomique des formes comestibles et toxiques de *D. senegalense*. En effet, rappelons que la question de savoir s'il s'agit de variétés différentes ou de formes différentes reste d'actualité (cf. chapitre 2.3.3.2). Le deuxième objectif de cette comparaison est de tenter d'identifier le ou les composés responsables des intoxications causées par la forme toxique de *D. senegalense*. En effet, comme nous allons le voir plus loin, un fractionnement bioguidé s'étant avéré difficilement applicable, une approche purement chimique du problème a été menée.

3.4 Investigation phytochimique de *Detarium microcarpum* Guill. et Perr.

Comme précédemment évoqué, le fruit de *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. présente plusieurs caractéristiques qui incitent à l'étudier de manière approfondie :

- aucune investigation phytochimique n'a été publiée sur le fruit ;
- les études phytochimiques des feuilles et de l'écorce ont permis de mettre en évidence la présence de nombreux diterpènes de type clérodane, classe de composés connue pour sa diversité en matière d'activités biologiques (*cf.* chapitre 2.4.3.2) ;
- le criblage biologique et biochimique des extraits du fruit a révélé des activités prometteuses ;
- c'est un fruit abondamment consommé en Afrique de l'Ouest, et utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement des vertiges et des méningites.

L'extrait dichlorométhanique de ce fruit présentant des activités biologiques plus prometteuses que l'extrait méthanolique, il a été investigué.

3.4.1 Fractionnement de l'extrait dichlorométhanique et isolement des composés A à F

Une prise de 8.8 g de l'extrait dichlorométhanique du fruit dépourvu de graine de *D. microcarpum* a été fractionnée par Chromatographie centrifuge à contre-courant (CCC) utilisant le système de solvants hexane-AcOEt-MeOH-H₂O 10:5:5:1. La phase inférieure aqueuse a été utilisée comme phase stationnaire, tandis que la phase supérieure a été pompée dans le sens tête-queue. Cette séparation a été suivie par CCM, et détection UV à 210 nm, et a permis d'obtenir 8 fractions de 240 mL chacune (I - VIII). Ces fractions ont été soumises aux tests d'inhibition de l'acétylcholinestérase et antifongiques sur *Cladosporium cucumerinum* et *Candida albicans*. Les CCM montrant ces activités sont présentées à la Figure 3.2 et à la Figure 3.3.

Les fractionnements effectués ultérieurement ont été guidés par leurs activités sur les trois tests mentionnés ci-dessus, et l'évolution a été suivie par CCM. La pureté des composés a été vérifiée par HPLC (conditions expérimentales décrites en 5.2.2).

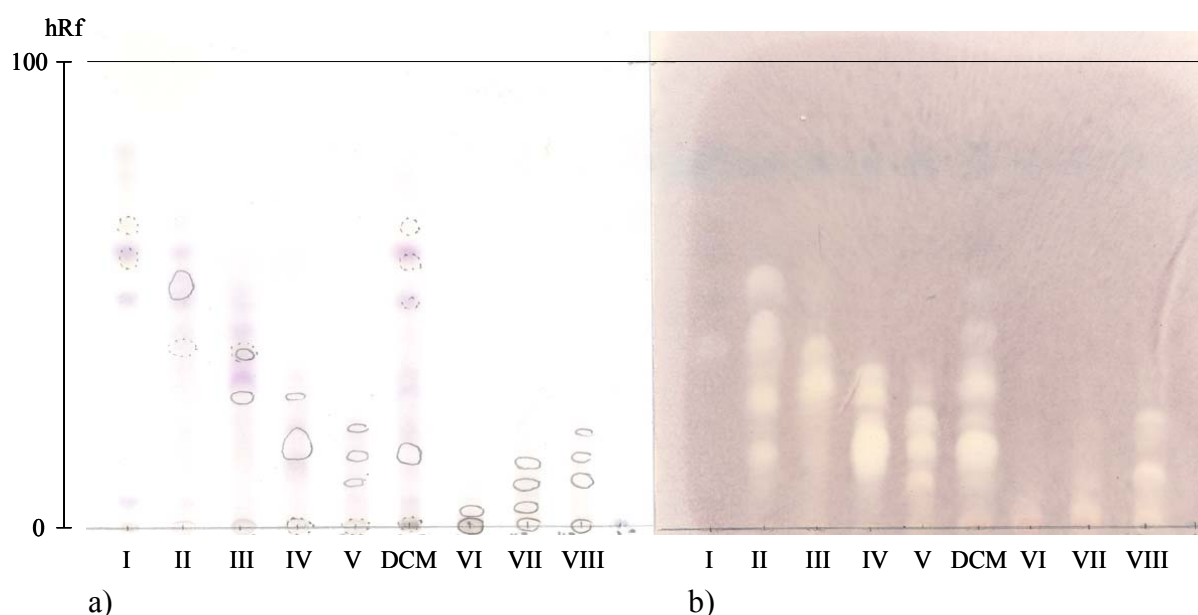


Figure 3.2 – Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase des fractions I – VIII de l'extrait DCM du fruit de *D. microcarpum*

Support : Silicagel 60 F₂₅₄ Merck ; Phase mobile : AcOEt-hexane 1:1 ; Echantillons : 15 µg ;

Détection : a) ○ extinction de fluorescence à 254 nm ; ◌ fluorescence à 366 nm ; coloration des composés dues au réactif de Godin

b) Acétylcholinestérase (conditions décrites sous 5.5.7)

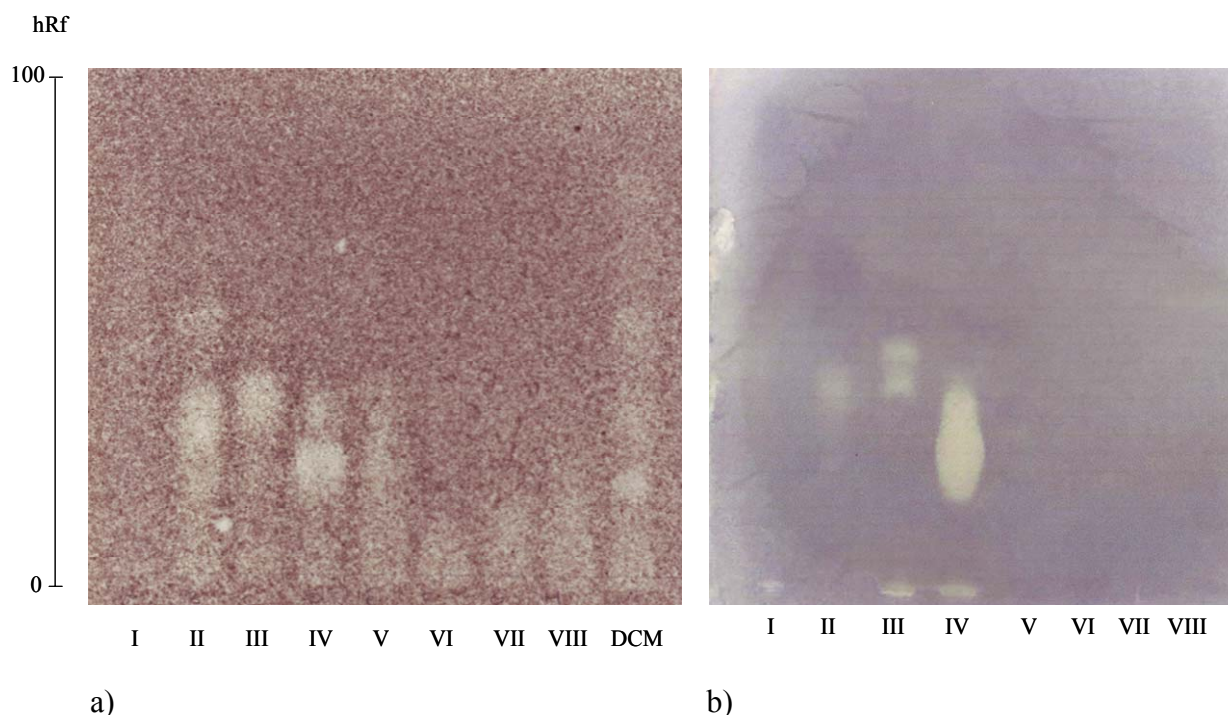


Figure 3.3 – Activité inhibitrice de la croissance de *Cladosporium cucumerinum* et de *Candida albicans* des fractions I - VIII de l'extrait DCM du fruit de *D. microcarpum*

Support : Silicagel 60 F₂₅₄ Merck ; Phase mobile : AcOEt-hexane 1:1 ; Echantillons : 100 µg ;

Détection : a) inoculum de *Cladosporium cucumerinum* (conditions décrites sous 5.5.3)

b) inoculum de *Candida albicans* (conditions décrites sous 5.5.4)

Les Figures 3.2 et 3.3 indiquent que ce sont les fractions II à V qui présentent le plus d'activités. Parmi celles-ci, la fraction IV paraît très intéressante puisqu'elle contient un composé majoritaire qui semble inhiber fortement l'ACHé ainsi que les deux champignons. Ces observations vont guider les fractionnements ultérieurs.

La fraction II (1550 mg) a été purifiée par CCC, utilisant la phase supérieure du système de solvants heptane-CH₃CN-EtOH (6:1:3) comme phase mobile. Sept fractions de 100 mL chacune ont été obtenues (IIk - IIq). La fraction IIk (530 mg) a été purifiée par MPLC, utilisant comme phase mobile un mélange isocratique de CH₃CN-H₂O (40:60), aboutissant à 5 fractions de 70 mL chacune (IIk1 - IIk5). La fraction IIk4 (141 mg) a été séparée sur colonne ouverte (CC) (67 x 2 cm, d.i. 1.7 cm) de Silicagel 60 (63-200 µm). L'utilisation d'un gradient hexane-AcOEt (2:1 – 0:1) a permis d'obtenir 6 fractions (IIk4a - IIk4f) de 40 mL. Le composé F (5 mg) a été purifié à partir de la fraction IIk4b par précipitation dans du CH₃CN. En ce qui concerne les composés G – I, ils se sont dégradés lors de la dernière étape de purification. Ceci a été mis en évidence par CCM, par la disparition de ces composés, d'une part, et d'autre part, par

l'apparition dans les 4 cas d'un composé jaune. Compte tenu de la faible quantité de ces fractions, elles n'ont pu être fractionnées à nouveau. De ce fait, l'identification des produits de départ (G – I) ainsi que leur produit de dégradation respectifs n'ont pu être réalisées. La dégradation des produits est survenue dans les 4 cas lors de l'évaporation au Rotavapor® des fractions obtenues à partir des fractions II_n, II_p et II_q, et ce malgré le contrôle du maintien de la température du bain à 40 °C. Dans le cas de la fraction II_p, il se peut que l'emploi d'acide ait contribué à la dégradation du composé. Par la suite, aucun acide n'a été employé. La Figure 3.4 résume les étapes nécessaires à l'isolement du composé **F** de l'extrait dichlorométhanique du fruit de *D. microcarpum*.

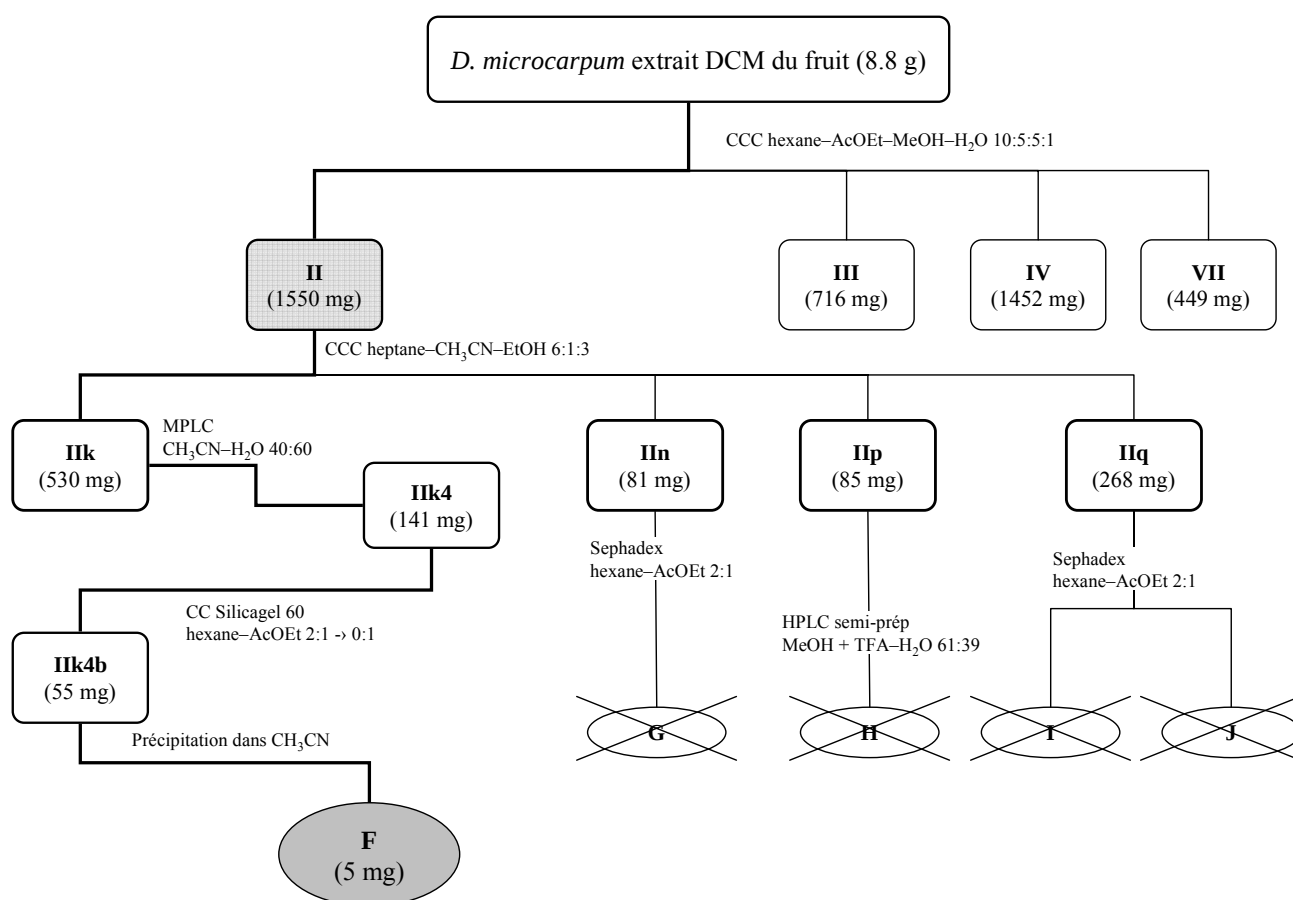


Figure 3.4 – Schéma d'isolement du composé **F** de l'extrait dichlorométhanique du fruit dépourvu de graine de *D. microcarpum*

La fraction III (716 mg) a été purifiée par CCC utilisant la phase supérieure du système de solvant CCC hexane-AcOEt-MTBE-MeOH-MeCN-H₂O (4:2:1:3:2:2) comme phase mobile (Figure 3.5). Cette séparation a permis d'obtenir 6 fractions de 40 mL chacune (III_k - III_p). La fraction III_m (158 mg) a été choisie pour un fractionnement ultérieur au moyen d'une CCC utilisant comme système de solvant heptane-CH₃CN-EtOH-H₂O (30:5:20:1). Deux composés

purs ont pu être obtenus : les composés **A** (9 mg) et **E** (19 mg). Les composés **B** à **D** ont été isolés à partir des fractions IV et VII de la manière suivante : La fraction IV (1452 mg) a été séparée par une CCC utilisant comme système de solvants isooctane-MTBE-MeOH-H₂O (4:4:3:2). Cela a permis l'obtention de 7 fractions de 100 mL chacune (IVk - IVq). Le composé **B** (110 mg) a pu être isolé grâce à une cristallisation à partir de la fraction IVo dans de l'AcOEt additionné de quelques gouttes d'hexane. Un conformère de ce composé (**B-b**, 7 mg) a pu être obtenu par le même procédé, mais en employant un mélange d'isooctane-MTBE. Le composé **C** (13 mg) a quant à lui pu être isolé par précipitation avec du CH₃CN à partir de la fraction IVp (100 mg). La fraction VII (449 mg) a également été fractionnée par CCC avec le système de solvants hexane-AcOEt-MeOH-H₂O (1:1:1:1), ce qui a permis d'aboutir à l'obtention de 8 fractions (VIIk - VIIr, 120 mL chacune). Le composé **D** (16 mg) a été obtenu par cristallisation dans de l'AcOEt additionné de quelques gouttes d'hexane à partir de la fraction VIIm (28 mg). Le schéma de fractionnement présenté à la Figure 3.5 résume ces différentes opérations de purification des composés **B** – **D**.

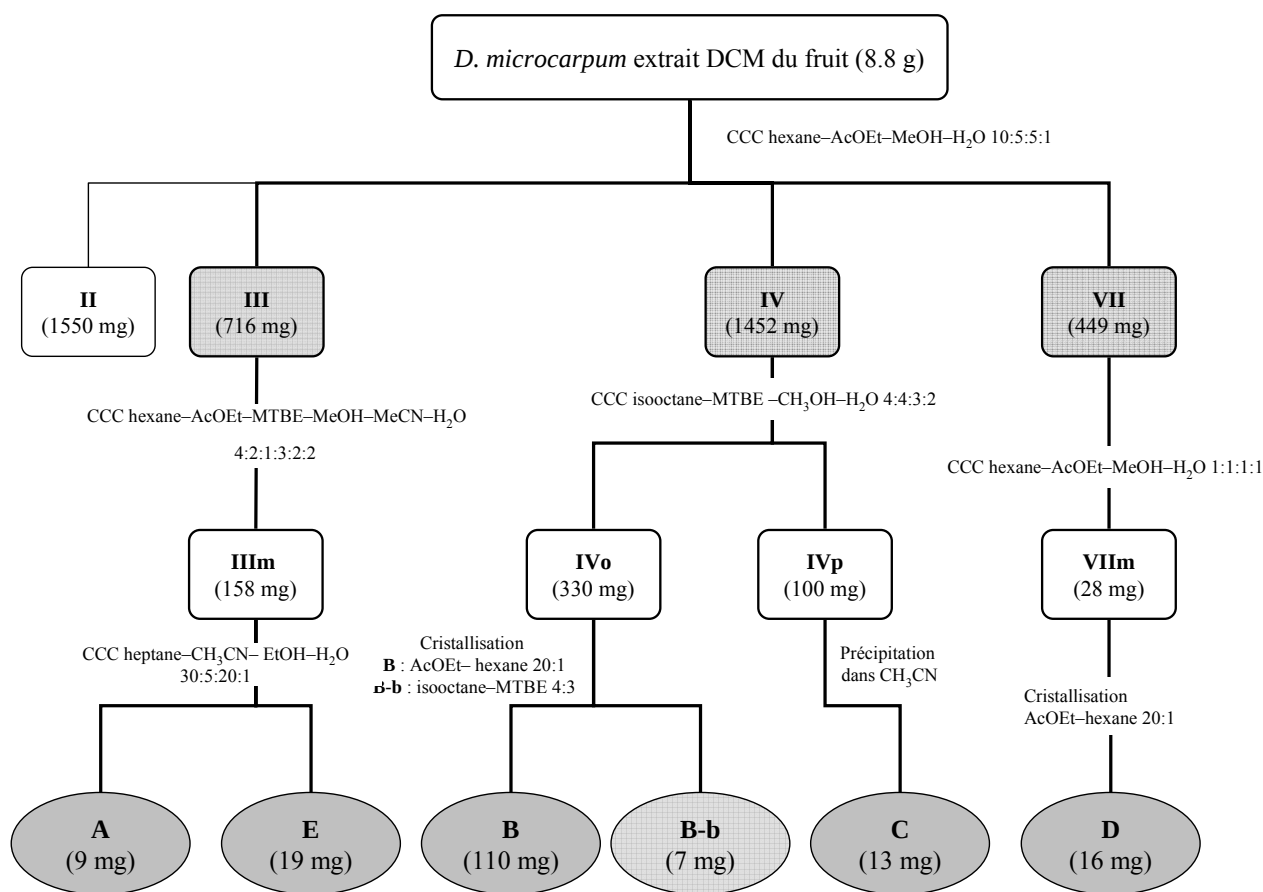


Figure 3.5 – Schéma d'isolement des composés **A** - **E** de l'extrait dichlorométhanique du fruit *D. microcarpum*

La Figure 3.6 présente la répartition des six composés purifiés sur le chromatogramme de l'extrait dichlorométhanique (conditions expérimentales décrites en 5.2.2).

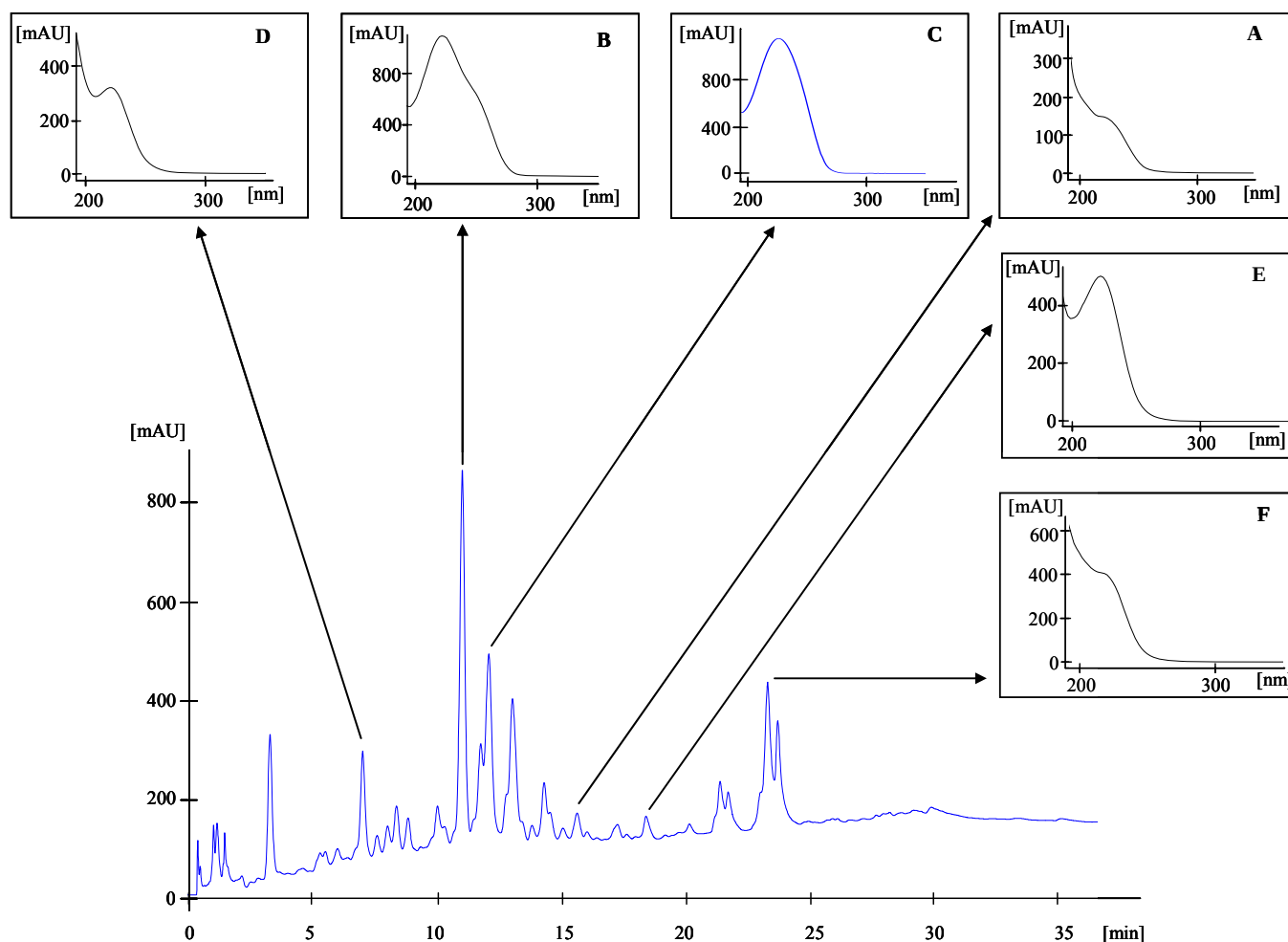


Figure 3.6 – Chromatogramme HPLC/DAD-UV à 210 nm et spectres enregistrés *on-line* des composés **A** – **F** isolés de l'extrait dichlorométhanique des fruits de *D. microcarpum*. Conditions expérimentales décrites en 5.2.2

Notons qu'aucun des composés isolés ne présente un spectre UV caractéristique d'une classe de composés. Ainsi, ces spectres ne seront pas d'une grande aide pour la détermination structurale des composés **A** – **F**, détaillée dans le chapitre qui suit.

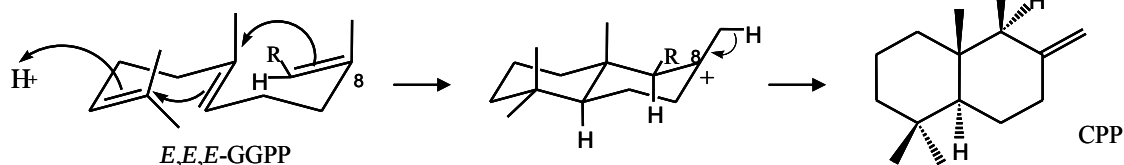
3.4.2 Détermination structurale des composés A – F

Les composés A à F ayant été déterminés comme étant des diterpènes de type clérodane et labdane, nous allons introduire ici des notions sur leur voie de biosynthèse et leur chimie, éléments nécessaires à la compréhension de leur structure, et plus particulièrement leur stéréochimie.

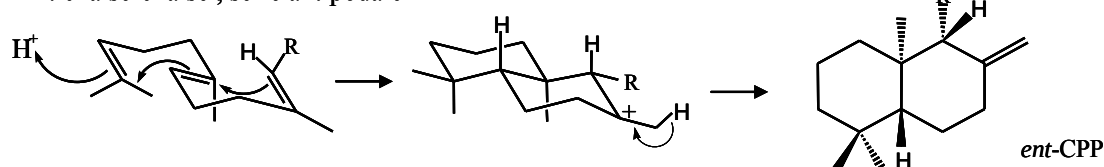
3.4.2.1 Diterpènes de type labdane et clérodane : biosynthèse et chimie

Le précurseur des labdanes et des clérodanes est le *2E,6E,10E*-géranyl-géranyl-pyrophosphate, (*E,E,E*-GGPP). La cyclisation de ce dernier peut en réalité engendrer quatre classes de diterpènes bicycliques en fonction du type de synthase impliquée : des dérivés du casbène, des taxanes, des labdanes et des dérivés tricycliques du copalyl-diphosphate (CPP). Nous allons uniquement développer dans ce travail la voie de biosynthèse des labdanes et de leurs produits de réarrangement : les clérodanes. Cette voie biosynthétique, appelée « cyclisation de type B », fait intervenir l'enzyme copalyl-diphosphate synthase, qui catalyse la formation du CPP à partir du *E,E,E*-GGPP. Cette réaction est un mécanisme concerté de déplacements d'électrons, induit par la protonation de la double liaison C-14/C-15. Cette réaction aboutit à la formation de deux configurations relatives possibles (Figure 3.7, voies B-1 et B-3), en fonction de la conformation du substrat pro-chiral : chaise-chaise ou chaise-bateau. Il existe donc quatre configurations absolues possibles, puisqu'il peut également s'agir des produits de la série antipodale, nommée série *ent* (Figure 3.7, voies B-2 et B-4) (Mac Millan et Beale, 1999).

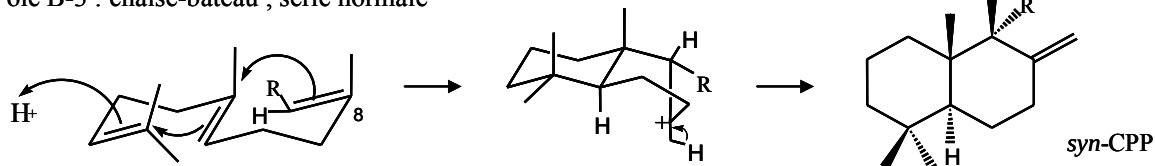
Voie B-1 : chaise-chaise, série normale



Voie B-2 : chaise-chaise, série antipodale



Voie B-3 : chaise-bateau, série normale



Voie B-4 : chaise-bateau, série antipodale

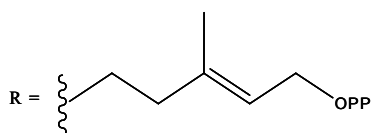
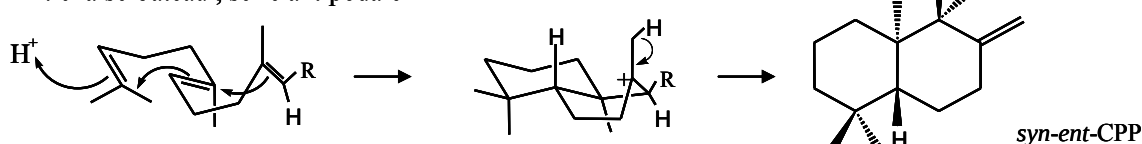


Figure 3.7 – Voies de cyclisation du E,E,E -GGPP conduisant à la formation des labdanes (Mac Millan et Beale, 1999)

Les produits dérivés du CPP ou du *syn*-CPP sont appelés labdanes *stricto sensu*, tandis que ceux provenant de la série antipodale sont appelés *ent*-labdanes. Bien qu'il s'agisse d'une classe de composés largement répandus dans la nature, peu d'études concernant leur biosynthèse ont été menées. En effet, seule l'enzyme impliquée dans la voie B-2 a été caractérisée. Un autre point intéressant à relever est la co-existence fréquente des labdanes et des *ent*-labdanes au sein d'une même espèce, comme par exemple dans *Eperua purpurea* Benth. (Fabaceae) (De Santis et Medina, 1981). En effet, dans une même espèce, les composés dérivent généralement de précurseur d'une seule forme énantiomérique.

Les clérodanes sont formés par un réarrangement des ions intermédiaires 8-carbonium des voies B-1 à B-4. Sur la Figure 3.8, seuls les clérodanes issus de la série normale sont représentés. Les *trans*-clérodanes sont en principe les produits d'un déplacement concerté 1,2 entre C-19 et C-5 (Figure 3.8, séquence a). Dans le cas des *cis*-clérodanes (Figure 3.8, séquence b), un déplacement similaire de C-18 ne peut pas être concerté. De ce fait, pour qu'il y ait un déplacement sétéro-électronique de C-18 à C-5, cela nécessite un changement de conformation dans le cycle A, aboutissant alors à la formation d'une jonction *cis* entre les deux cycles. Cependant, l'expérience réalisée pour démontrer ce réarrangement était peu concluante (Akhila *et al.*, 1991). Dans le cas des clérodanes, nous constatons que la relation *trans* entre le proton H-10 et le groupement méthylique CH₃-20 est un élément figé par la biogénèse.

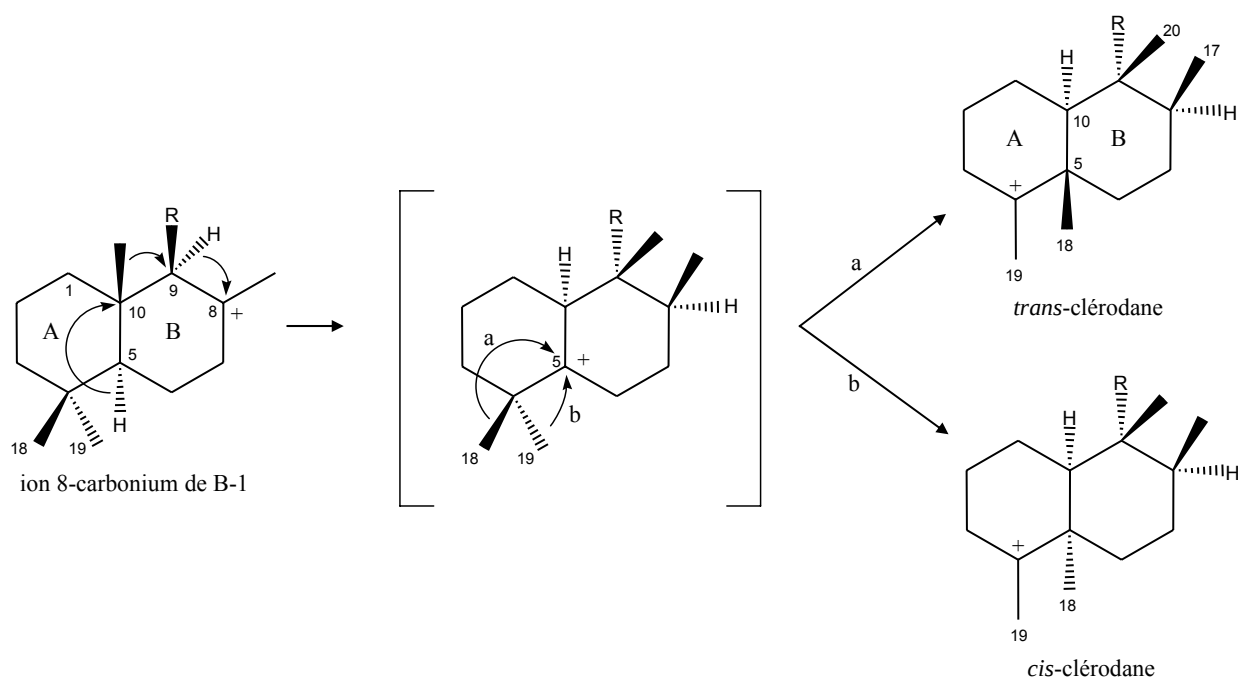


Figure 3.8 – Voie biosynthétique des *trans*- et *cis*-clérodanes, série normale

Conformation *trans* ou *cis* d'une décaline

Une décaline est constituée de deux cyclohexanes accolés. A partir de l'un des cycles, les liaisons constituant l'amorce du deuxième cycle peuvent être de nature *trans* ou *cis*. Ces deux types de décaline sont donc des isomères de configuration et plus précisément des diastéréomères. Une décaline *trans* possède une conformation stable, tandis que la décaline *cis* peut adopter deux conformations, avec possibilité de passage de l'une à l'autre (Figure 3.9) (Dupuis, 2006). Environ 75 % des clérodanes découverts dans la nature possèdent la configuration *cis* (Tokoroyama, 2000).

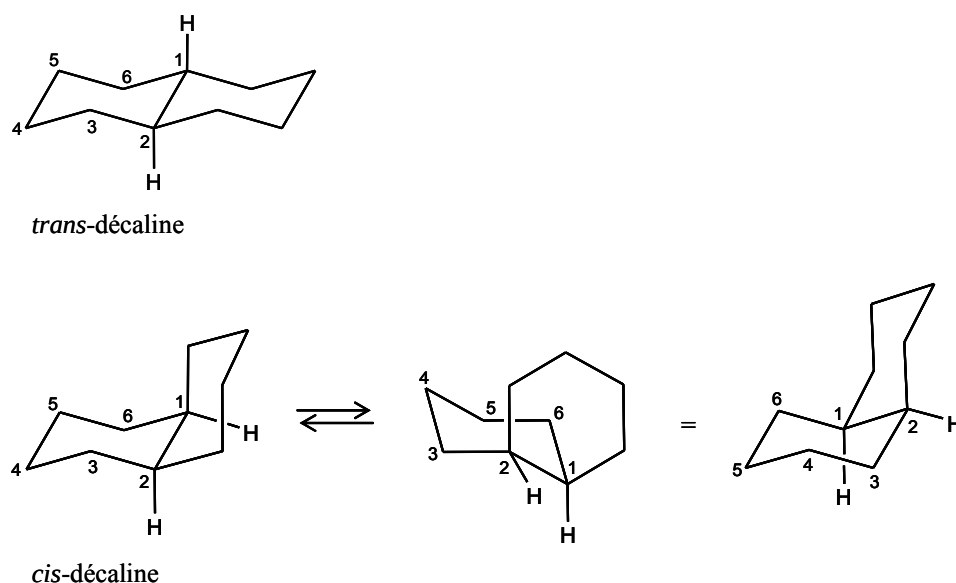


Figure 3.9 – Conformation des décalines *trans* et *cis*

Dans ce travail, pour distinguer les deux conformations possibles d'une *cis*-décaline, nous allons employer les termes « stéroïdal » et « non-stéroïdal ». En effet, dans un stéroïde, dont la jonction entre les cycles A et B est *cis*, la conformation de l'anneau B est figée à cause de la présence du cycle C. Dès lors, le groupement méthyle en C-10 est axial par rapport au cycle B et donc équatorial par rapport au cycle A. Par analogie, dans un diterpène de type clérodane, lorsque le groupement méthyle positionné en C-5 (CH₃-19) est axial vis-à-vis de l'anneau B (et équatorial par rapport à A), la conformation de la *cis*-décaline sera dite « stéroïdale ». Dans le cas contraire, c'est-à-dire lorsque CH₃-19 est équatorial vis-à-vis de B et axial vis-à-vis de A, elle sera « non-stéroïdale » (Figure 3.10). En ce qui concerne les terminologies axial/équatorial et α/β , dans une *cis*-décaline, ces termes ne sont pas redondants. En effet, par exemple, dans la

conformation de type stéroïdal, le H β -4 est équatorial, tandis que dans la conformation non-stéroïdale, H β -4 est axial.

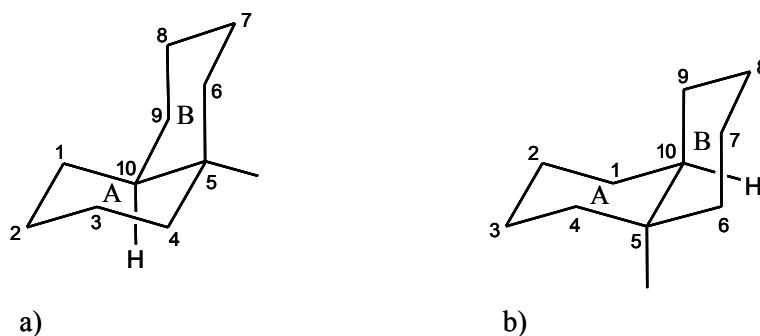


Figure 3.10 – Conformation stéroïdale (a) et non-stéroïdale (b) d’une *cis*-décaline. La nomenclature des diterpènes de type clérodanes est employée ici.

Nous avons maintenant les éléments nécessaires pour aborder la détermination structurale des composés **A** à **F**, et notamment en ce qui concerne la détermination de leurs configurations relatives.

3.4.2.2 Composé A

Le composé **A** se présente sous forme d'un liquide visqueux jaune. Son spectre UV (Figure 3.6) donne peu d'informations quant à la classe de composés auquel il appartient, cependant, il suggère l'absence de chromophore important, vu que seul un maximum à 228 nm est enregistré. La formule brute du composé **A** a été déterminée sur la base d'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution HRESI-MS (Figure 3.11).

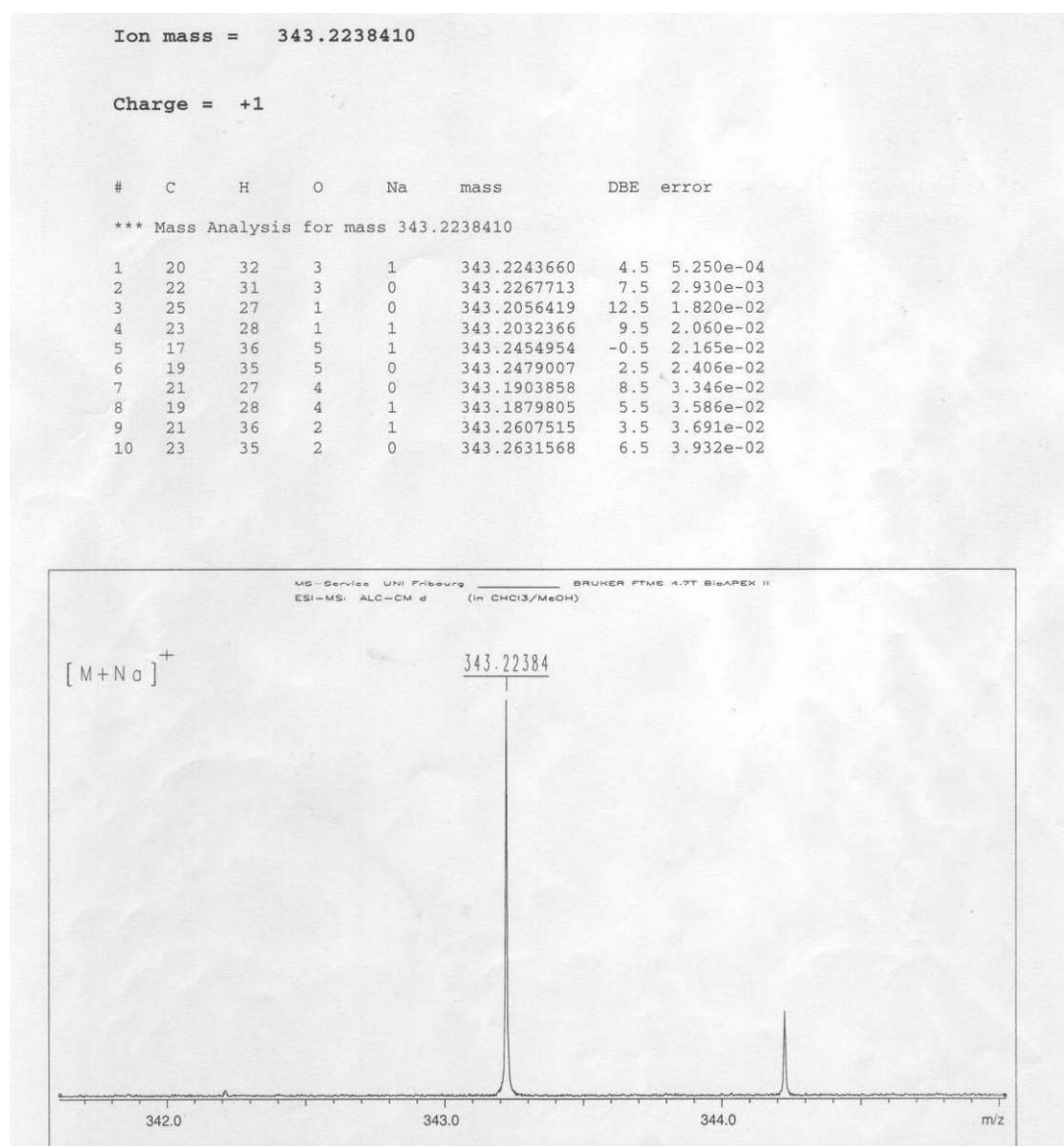


Figure 3.11 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé **A**. Les formules brutes sont données dans l'ordre décroissant d'exactitude.

L'ion pseudo-moléculaire à m/z 343.22384 détecté correspond à la formule brute $C_{20}H_{32}O_3Na$ (masse calculée 343.22492). Cette formule brute indique la présence de 5 insaturations et/ou cycles. Les données RMN ^{13}C (DEPT) (Figure 3.12 ; Tableau 5.4) indiquent la présence de 20 carbones, dont les degrés de substitution sont les suivants : cinq groupements méthyles, six méthylènes, quatre méthines et cinq atomes de carbone quaternaires.

La présence d'un carbone ayant un déplacement chimique à δ_C 170.9 ppm (C-15) permet de suspecter la présence d'une fonction carboxyle. Les déplacements chimiques à δ_C 114.3 et 164.7 ppm (C-14 et C-13, respectivement) sont des valeurs correspondant à des carbones formant une double liaison trisubstituée. L'analyse du spectre gHMBC (Figure 3.13) montre que le proton vinylique (δ_H 5.70 ppm, H-14) (Tableau 5.3) corrèle avec le carbone carboxylique (δ_C 170.9 ppm, C-15), ce qui indique que ce dernier forme avec C-14 et C-13 (δ_C 114.3 et δ_C 164.7 ppm, respectivement) un système conjugué. Les protons méthyléniques H-11 (δ_H 1.28 ppm) et H-12 (δ_H 2.28 ppm) corrélient avec C-13 (δ_C 164.7 ppm), suggérant alors que C-11, C-12 et C-13 sont adjacents. Le spectre gdqfCOSY indique un couplage linéaire entre les protons H-14 (δ_H 5.70 ppm) et H-16 (δ_H 2.18 ppm), confirmant que C-16 (δ_C 19.6 ppm) est lié au carbone quaternaire C-13 (δ_C 164.7 ppm). Les corrélations longue distance 1H - ^{13}C reportées à la Figure 3.14 suggèrent que le composé **A** comporte une chaîne 4-carboxyl-3-ène-3-méthylbutyle.

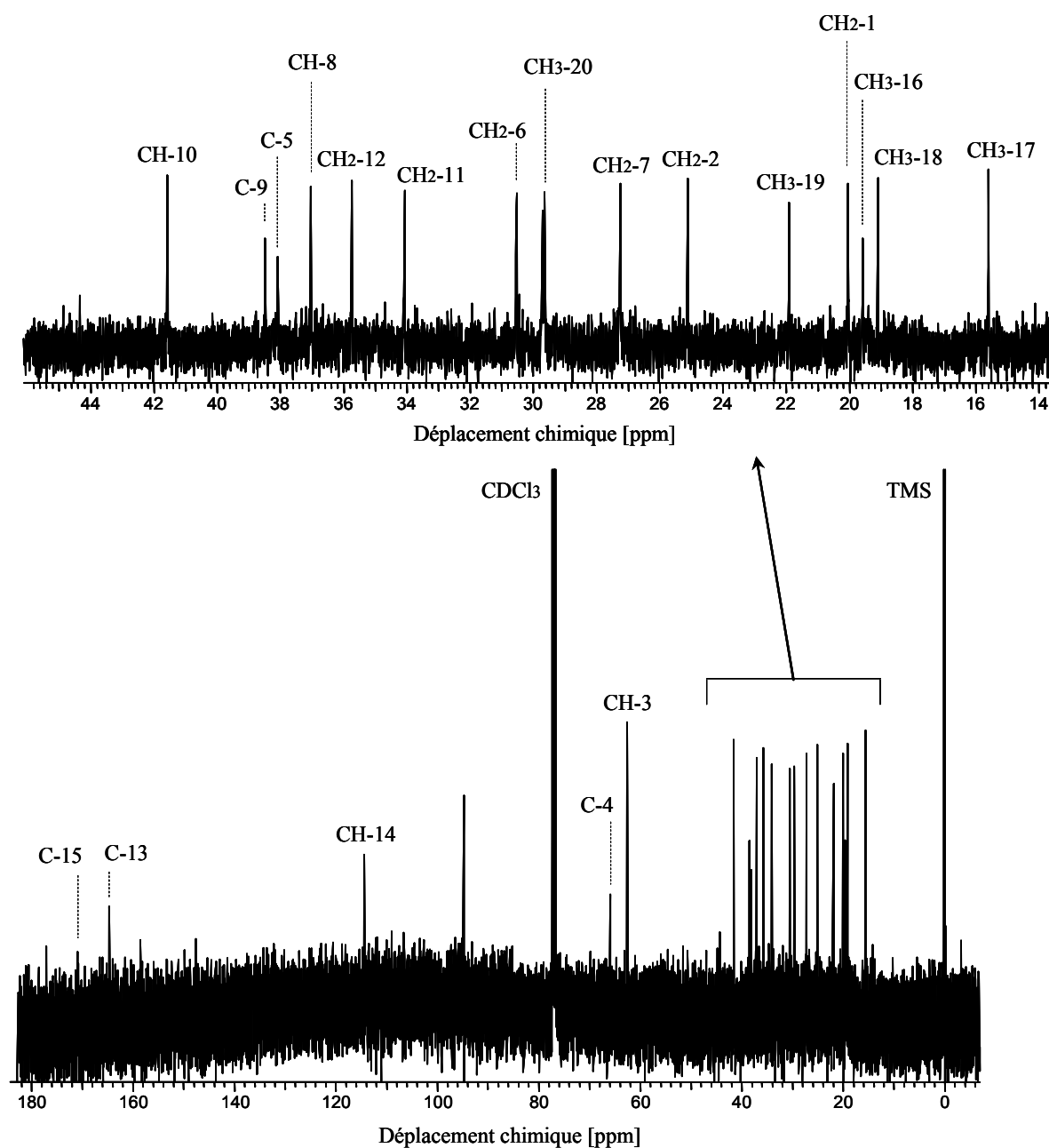


Figure 3.12 – Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé A

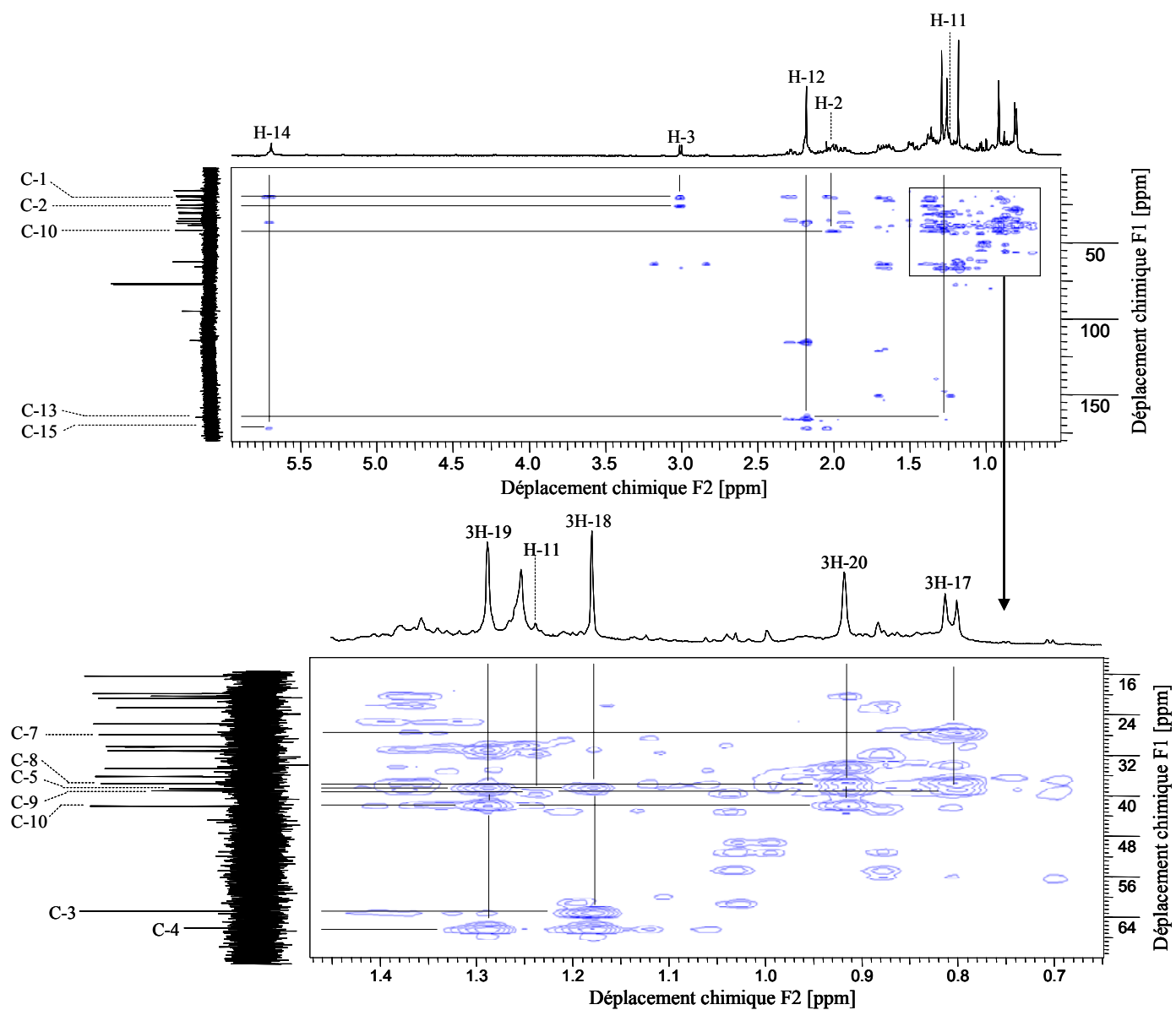


Figure 3.13 – Spectre RMN de corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C à longue distance (gHMBC) du composé A, avec les corrélations observées les plus importantes.

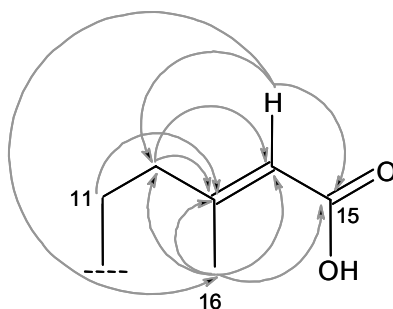


Figure 3.14 – Corrélations hétéronucléaires longue distance (gHMBC) observées pour la chaîne 4-carboxyl-3-ène-3-méthylbutyle du composé **A**.

A ce stade, quatre méthyles, quatre méthylènes, trois méthines, trois carbones quaternaires et trois centres d'insaturation doivent encore être placés sur la molécule. Les protons méthyliques 3H-20 (δ_{H} 0.92 ppm) corrélient fortement sur le spectre gHMBC avec deux carbones méthiniques (δ_{C} 37.0 ppm, C-8 et δ_{C} 41.6 ppm, C-10). Les protons méthyliques 3H-17 (δ_{H} 0.80 ppm) montrent une forte corrélation longue distance ^1H - ^{13}C avec le carbone méthylénique C-7 (δ_{C} 27.2 ppm) ainsi qu'avec le carbone quaternaire C-9 (δ_{C} 38.5 ppm). Ces données permettent de déduire la sous-structure **1a** (Figure 3.15). De manière similaire, la sous-structure **1b** (Figure 3.15) a été générée à partir des corrélations longue distance ^1H - ^{13}C . De telles corrélations ont été observées entre un proton méthylénique H-2 (δ_{H} 2.00 ppm) et le carbone méthinique C-10 (δ_{C} 41.6 ppm), et entre le proton méthinique H-3 (δ_{H} 3.00 ppm) et les carbones méthyléniques C-1 et C-2 (δ_{C} 20.0 et δ_{C} 25.1 ppm, respectivement). Les protons méthyliques 3H-18 (δ_{H} 1.18 ppm) corrélient quant à eux avec le carbone quaternaire C-5 (δ_{C} 38.1 ppm) et le carbone méthinique C-3 (δ_{C} 62.6 ppm). Finalement, les protons méthyliques à δ_{H} 1.29 ppm (3H-19) montrent une corrélation avec les signaux des carbones à δ_{C} 65.9 et δ_{C} 38.1 ppm (C-4 et C-5, respectivement). Cette information, ajoutée à celle de la corrélation longue distance entre les protons méthyliques 3H-19 (δ_{H} 1.29 ppm) et le carbone méthinique C-10 (δ_{C} 41.6 ppm), suggèrent la combinaison des sous-structures **1a** et **1b** de manière à former un dérivé perhydronaphthalène bicyclique **1ab** (Figure 3.15).

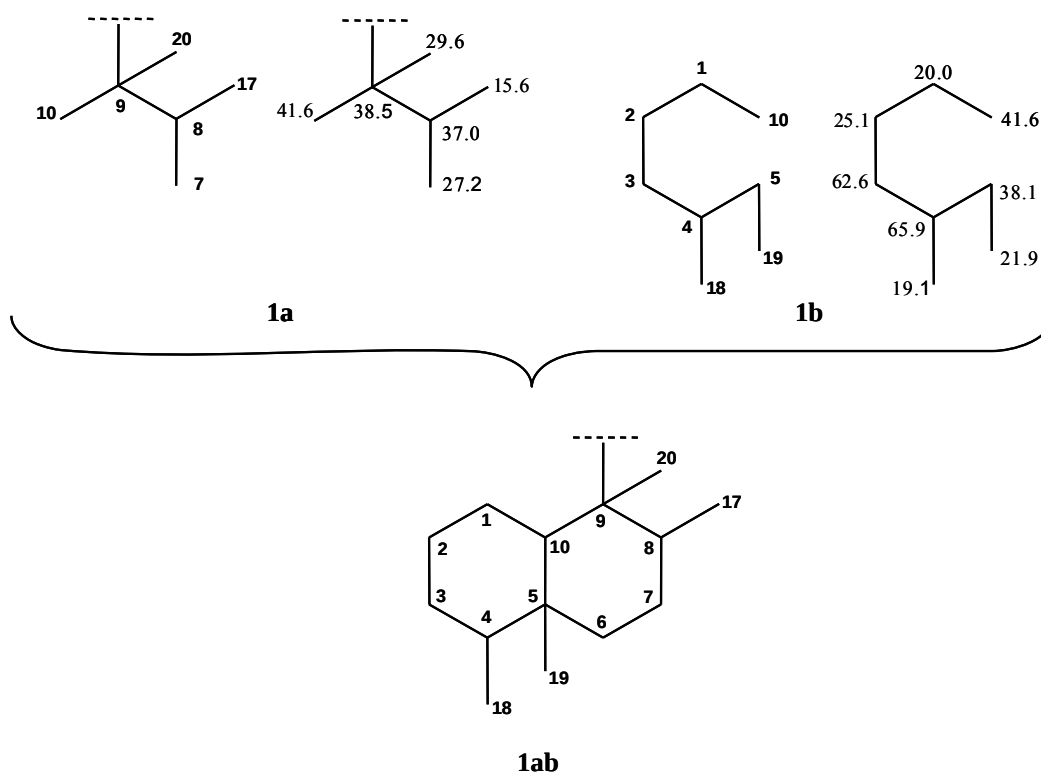


Figure 3.15 – Fragments structuraux du composé A

Les déplacements chimiques dans les bas champs observés pour les signaux C-3 et C-4 indiquent que ces carbones sont liés à un oxygène sous la forme d'un époxyde. Finalement, la chaîne 4-carboxyl-3-ène-3-méthylbutyle est reliée à la sous-structure **1ab** par le carbone quaternaire C-9 (δ_C 38.5 ppm), ce qui est montré sur le spectre gHMBC par la corrélation entre l'un des protons méthyléniques H-11 (δ_H 1.28 ppm) et le carbone méthinique C-8 (δ_C 37.0 ppm). Toutes les corrélations gHMBC décrites ici sont présentées à la Figure 3.16.

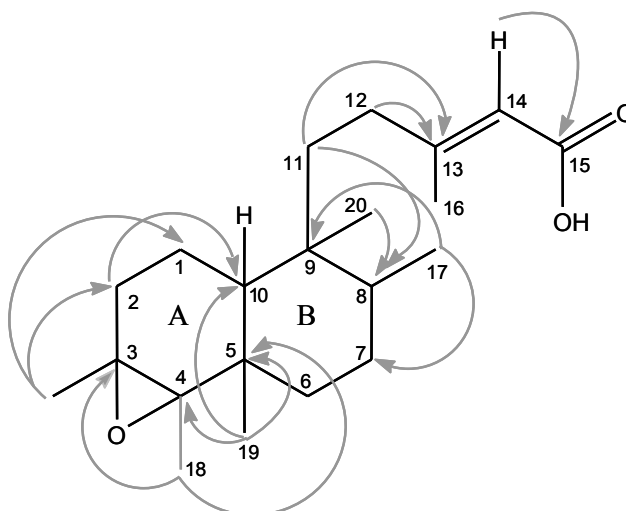


Figure 3.16 – Principales corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C longue distance (gHMBC) observées pour le composé A.

La molécule **A** est donc un diterpène de type clérodane comportant six carbones asymétriques (indiqués par un astérisque sur la Figure 3.17). A l'aide d'une analyse NOESY, nous avons tenté de déterminer la configuration relative de **A**.

Détermination de la configuration relative de A

Dans l'article que nous avons publié sur les composés **A** – **F** (Cavin *et al.*, 2006), le Professeur D. Arigoni (ETH, Zurich) nous a fait remarquer que d'un point de vue biogénétique, il n'était pas possible que le H-10 et le CH₃-20 du composé **A** (nommé composé **1** dans la publication) soient *cis* (Mac Millan et Beale, 1999). De ce fait, la configuration relative de ce composé a été ré-examinée avec son aide. Les corrélations spatiales homonucléaires ¹H-¹H déterminées grâce à une analyse NOESY ont été reconsidérées, et il s'est avéré que des conclusions trop hâtives avaient été tirées. En effet, une corrélation entre H-10 (δ_H 1.38 ppm) et H-3 (δ_H 3.00 ppm) d'une part, et H-10 et 3H-17 (δ_H 0.80 ppm) d'autre part, avaient été observées. Or, les signaux des protons H-1, H-6 et H-7 (δ_H 1.40, 1.36 et 1.37 ppm, respectivement) ont des déplacements chimiques très proches de celui de H-10 (δ_H 1.38 ppm), et, la résolution des taches de corrélations n'étant pas excellente, une erreur a certainement été commise à ce niveau-là. Les corrélations NOE révisées sont présentées à la Figure 3.17.

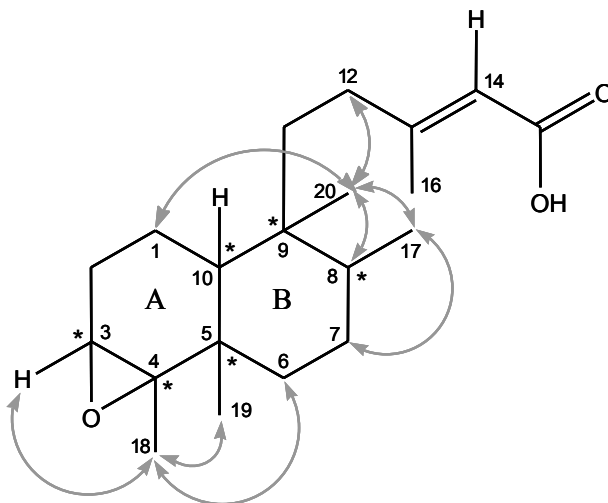


Figure 3.17 – Corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) du composé **A**. Les carbones asymétriques sont mis en évidence par un astérisque.

Peu de corrélations permettent d'indiquer l'orientation des substituants des carbones asymétriques. Cependant, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Aucune corrélation NOE n'ayant été observée entre les protons méthyliques 3H-16 (δ_H 2.18 ppm) et le proton vinylique H-14 (δ_H 5.70 ppm), la double liaison C-14/C-16 a alors une configuration *E*. Du fait que les protons méthyliques 3H-20 (δ_H 0.92 ppm) corrélaient avec les protons méthyliques 3H-17 (δ_H 0.80 ppm), d'une part, et avec le proton méthinique H-8 (δ_H 1.50 ppm), d'autre part, cela implique nécessairement que le groupement méthyle CH₃-20 soit en position équatoriale. En effet, s'il était en position axiale, il ne pourrait corrélérer qu'avec le substituant en position équatoriale, formant un angle de 180° avec le substituant positionné en axial. Etant donné que la configuration absolue de **A** n'a pu être déterminée, fixons arbitrairement le substituant CH₃-20 comme étant β , en plus d'être équatorial. Nous considérons donc uniquement les clérodanes de la série normale, le même raisonnement pouvant être appliqué pour la série antipodale. Cela étant, tenant compte de la biogénétique qui implique que le substituant en C-10 doit être *trans* par rapport au méthyle CH₃-20 (Mac Millan et Beale, 1999), la décaline du composé **A** possède nécessairement une jonction *cis*. En effet, dans le cas d'une *trans*-décaline comportant CH₃-20 β et C-10 α , le groupement méthyle CH₃-20 est en position axiale. Or, il vient d'être montré qu'il est équatorial dans le composé **A** (Figure 3.18).

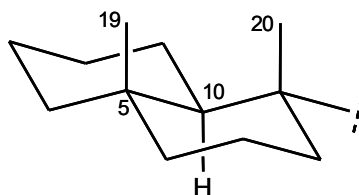


Figure 3.18 – Orientation des substituants dans une *trans*-décaline (série normale)

Par conséquent, le seul cas de figure possible est que H-10 et le groupement méthyle CH₃-19 soient en α , c'est-à-dire qu'il s'agit d'un *cis*-clérodane. Au niveau conformationnel, la *cis*-décaline constituant le composé **A** ne peut être que de type stéroïdal, c'est-à-dire dont CH₃-19 est axial vis-à-vis du cycle B. En effet, s'il s'agissait d'une *cis*-décaline de type non-stéroïdal, le groupement méthyle CH₃-20 serait axial, et il vient d'être montré qu'il est équatorial. Dès lors, l'orientation des carbones asymétriques C-9, C-10 et C-5 du composé **A** sont déterminés et présentés à la Figure 3.19.

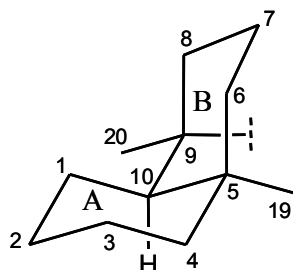


Figure 3.19 – Orientation relative de C-5, C-9 et C-10, conformation stéroïdale du composé **A**

A ce stade, il reste encore à déterminer l'orientation du groupement méthylique CH₃-17, du groupement époxy, et donc de l'orientation de H-3 et CH₃-18. Les corrélations spatiales homonucléaires ¹H-¹H observées entre les protons méthyliques 3H-18 et 3H-19 d'une part, et 3H-18 et un proton méthylénique H-6, d'autre part (Figure 3.17), ne nous permettent pas de déduire l'orientation de l'époxy. Dès lors, une revue de la littérature nous a mené à la lecture de la publication de Fang *et al.* (1988), qui décrivent un clérodane dont l'orientation relative des carbones asymétriques C-5, C-9 et C-10 est identique à celles de **A**. Ce composé (nommé ici **F-1**) a été appelé le 3,4β-époxy-5β,10β-*cis*-17α,20α-clérodan-13(14)èn-15,16-olide (Figure 3.20). Bien que la structure de la chaîne soit différente à partir de C-13, nous avons pensé que la présence de C-11 et C-12 suffisait pour que cette différence structurale n'influence pas les déplacements chimiques des protons et des carbones de la décaline. La configuration relative de **F-1** ayant été déterminée par diffraction aux Rayons X (RX), elle ne peut être remise en question. Nous allons donc comparer **A** et **F-1** dans le but de déterminer l'orientation du groupement méthylique CH₃-17 et du groupement époxy de **A**. Comme Fang *et al.* ont choisi arbitrairement de représenter **F-1** et ses dérivés selon la série antipodale par rapport à **A**, pour faciliter la comparaison, nous allons par convention dès à présent toujours considérer les molécules de Fang *et al.* selon la série antipodale.

Dans le travail de Fang *et al.*, **F-1** est clairement le précurseur de **F-4** par ouverture *trans* diaxiale du groupement époxy (Figure 3.20). Or, les déplacements chimiques des protons et des carbones de **F-4** sont identiques à ceux du composé **D** isolé dans notre travail. La configuration relative de ce dernier ayant été déterminée par RX, elle est incontestable. Cette technique nous a notamment permis de savoir que le groupement méthyle CH₃-17 de **D** était *trans* par rapport à CH₃-20, alors qu'il est placé en *cis* par rapport à CH₃-20 dans **F-4** (Figure 3.20). Dès lors, une incohérence existe à ce niveau-là. Fang *et al.* ayant déduit la configuration relative de **F-4** à partir de celle de **F-1**, il nous a semblé alors nécessaire de reconsidérer les données RX de **F-1**.

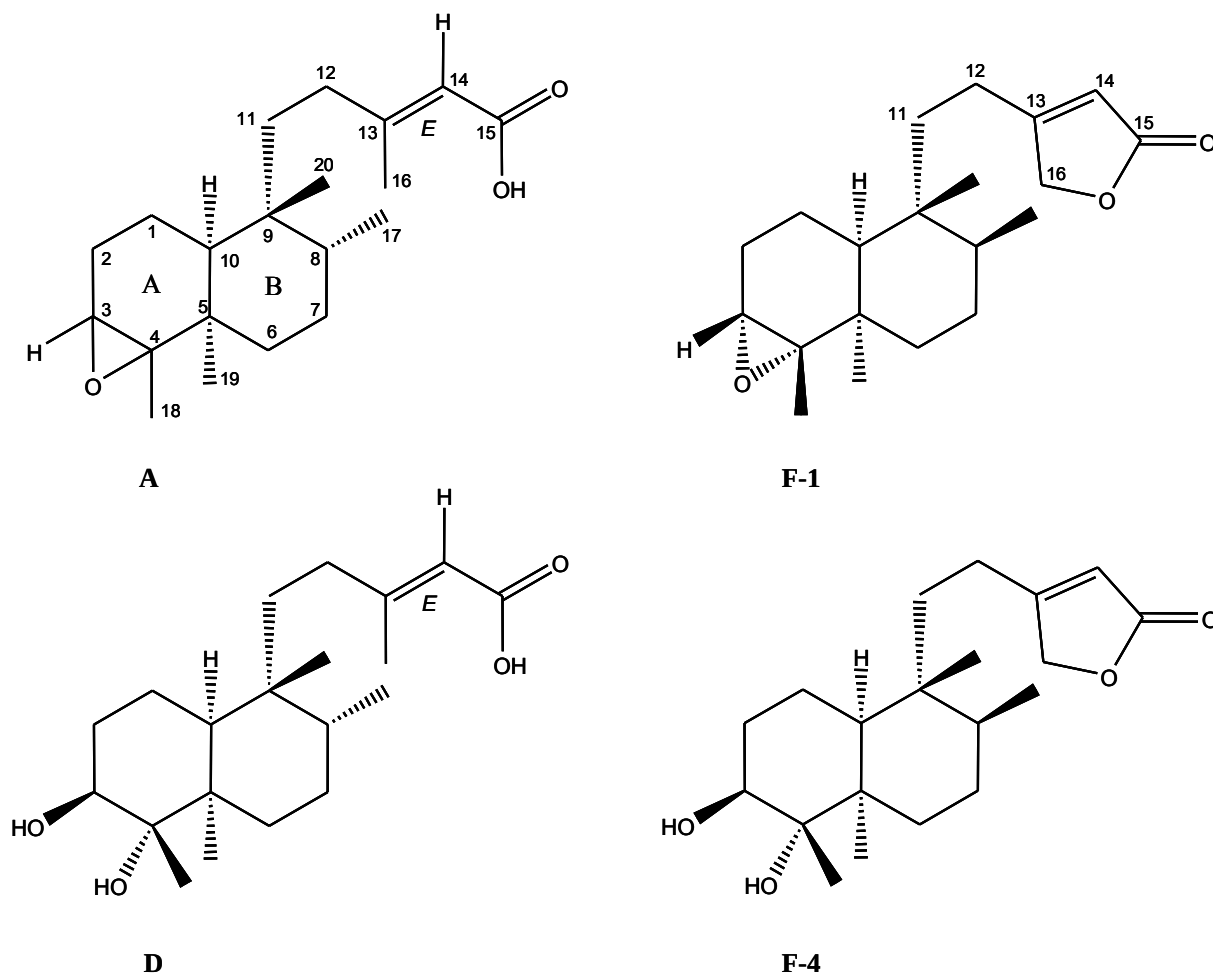


Figure 3.20 – Structure des précurseurs **A** et **F-1** et de leurs dérivés **D** et **F-4**, respectivement. **F-1** et **F-4** ne sont pas corrigés (au niveau de l'orientation de CH₃-17), et sont représentés selon la série antipodale (Fang *et al.*, 1988).

Dans un premier temps, nous avons étudié la représentation ORTEP de **F-1** et nous nous sommes aperçus qu'ils avaient commis une erreur lors de la transcription de cette représentation : elle montre en effet que le groupement méthyle CH₃-17 est équatorial et α , et donc *trans* par rapport à CH₃-20 ! Cela signifie donc d'une part que la décaline de **F-1** a la même configuration relative que celle de **A**, excepté les positions de l'époxy et du CH₃-17 encore non déterminées ; et d'autre part, **F-1** étant le précurseur de **F-4** et **A** celui de **D**, que les décalines de **F-4** et de **D** sont identiques, comme suggéré par les données RMN 1D. Nous avons alors comparé les déplacements chimiques des protons entre **A** et **F-1**, et il s'est avéré qu'ils étaient similaires (Tableau 3.5). Quant aux valeurs des déplacements chimiques des carbones, elles sont également semblables à l'exception de C-2, C-6, C-18, C-19 et C-20 (indiqués en vert dans le Tableau 3.5). Lorsque nous observons ces valeurs de plus près, nous nous apercevons

que comparativement à **A**, C-2 et C-6 de **F-1** ont été inversées. Dans le cas des trois autres carbones, C-18 de **F-1** (δ_C 29.3 ppm) devient C-20 de **A** (δ_C 29.6 ppm), C-19 de **F-1** (δ_C 19.0 ppm) devient C-18 de **A** (δ_C 19.1 ppm) et C-20 de **F-1** (δ_C 21.9 ppm) devient alors C-19 de **A** (δ_C 21.9 ppm). Ces attributions erronées sont possibles dans la mesure où ce travail ayant été réalisé il y a 20 ans, aucune analyse hétéronucléaire à courte distance n'a pu être effectuée. Les protons ont été alors attribués aux carbones par comparaison avec des travaux antérieurs, et notamment ceux de Gage *et al.* (1986).

Tableau 3.5 – Valeurs des déplacements chimiques du ^1H et du ^{13}C de la décaline des composés **A** et **F-1**

Déplacement chimique du ^1H [ppm]			Déplacement chimique du ^{13}C [ppm]		
position	A (CDCl ₃ , 500 MHz)	F-1 (CDCl ₃ , 360 MHz) (Fang <i>et al.</i> , 1988)	position	A (CDCl ₃ , 125 MHz)	F-1 (CDCl ₃ , 90 MHz) (Fang <i>et al.</i> , 1988)
1	1.30 m 1.40 m	1.29 m 1.40 m	1	20.0	20.2
2	1.69 m 2.00 m	1.65 m 1.99 m	2	25.1	30.4
3	3.00 d (5.80)	2.98 d (5.90)	3	62.6	62.5
4	-	-	4	65.9	65.8
5	-	-	5	38.1	38.1
6	1.36 m 1.63 m	1.38 m 1.62 m	6	30.5	25.2
7	1.37 m 1.52 m	1.39 m 1.44 m	7	27.2	27.3
8	1.50 m	1.51 m	8	37.0	36.9
9	-	-	9	38.5	38.6
10	1.38 m	1.40 m	10	41.6	41.8
17	0.80 d (6.40)	0.79 d (5.90)	17	15.6	15.5
18	1.18 s	1.15 s	18	19.1	29.3
19	1.29 s	1.21 s	19	21.9	19.0
20	0.92 s	0.90 s	20	29.6	21.9

différences notables de déplacements chimiques entre **A** et **F-1**.

Lorsque les déplacements chimiques des carbones de **F-1** sont attribués aux bons protons, ils sont identiques à ceux de **A**, confirmant alors que les deux décalines possèdent la même configuration relative. Ainsi, l'orientation du groupement époxy de **A** est α , impliquant alors une relation *trans* entre les deux groupements méthyles CH₃-18 et CH₃-19 (δ_H (**A**) 3.00 ppm (d), $J = 5.80$ Hz ; δ_H (**F-1**) 2.98 ppm (d), $J = 5.90$ Hz). Quant au groupement méthyle CH₃-17, il est en position équatoriale, ayant alors une relation *trans* vis-à-vis de CH₃-20 (δ_H (**A**) 0.80 ppm (d), $J = 6.40$ Hz ; δ_H (**F-1**) 0.79 ppm (d), $J = 5.90$ Hz ; et δ_C 15.6 et 15.5 ppm, pour **A** et **F-1**, respectivement). La configuration relative de **A** est alors démontrée.

Relevons que le nom que Fang *et al.* (1988) ont attribué au composé **F-1** comporte alors une erreur au niveau de l'orientation du groupement méthyle CH₃-17, puisqu'ils l'ont élaboré à partir de la figure transposée (et erronée) de la représentation ORTEP. Dès lors, **F-1** est en réalité le 3,4β-époxy-5β,10β-*cis*-17β,20α-clérodane-13(14)en-15,16-olide ou son énantiomère. Le composé **F-4**, ainsi que les autres composés dont la configuration relative a été déterminée à partir de celle de **F-1**, comportent aussi très certainement cette erreur.

Le but, en mentionnant ces erreurs, n'est pas de blâmer nos collègues, mais plutôt de relever la complexité de la détermination structurale de diterpènes de type labdane ou clérodane, et en particulier en ce qui concerne leur configuration relative. Bien que de nos jours, nous disposions d'analyses RMN plus performantes qu'il y a vingt ans, il n'est toujours pas aisé de déterminer la configuration relative de molécules comportant six centres d'asymétrie, et dont les déplacements chimiques des signaux des protons sont très proches. Cette difficulté s'accroît encore dans le cas des *cis*-décalines, puisque ces dernières peuvent adopter deux conformations différentes, engendrant alors des corrélations NOE différentes. C'est lorsque nous sommes confrontés à de telles molécules que nous pouvons nous rendre compte des limites de la RMN, et de l'importance de considérer d'autres éléments, tels que la voie de biosynthèse de telles molécules et leur chimie.

Ayant démontré la configuration relative de **A**, nous pouvons affirmer qu'au niveau de sa conformation, les atomes C-2, C-3, C-4 et C-5 de la molécule **A** s'approchent de la planarité à cause de la présence de la fonction époxy, et que par conséquent, le cycle A adopte une conformation s'approchant de la demi-chaise. Le cycle B, quant à lui, a une conformation en chaise, contrairement à ce que Fang *et al.* (1988) ont soutenu dans leur publication. Notons que le signal de corrélation entre δ_H 3.00 ppm (H-3) et δ_H 1.38 ppm (H-10) qui nous avait induit en erreur dans notre publication, devrait alors plutôt concerner H-6 (δ_H 1.36 ppm) ou H-1 (δ_H 1.40 ppm).

Ainsi, le composé **A** est un nouveau diterpène de type *cis*-clérodane nommé acide 3β,4β-époxy-5β,10β-*cis*-17β,20α-*ent*-clérod-13*E*-en-15-oïque (acide [5-(5,6-époxy-1,2,4a,5-tétraméthylidécahydronaphtalèn-1-yl)-3-méthylpent-2-énoïque]) ou son énantiomère (Figure 3.21).

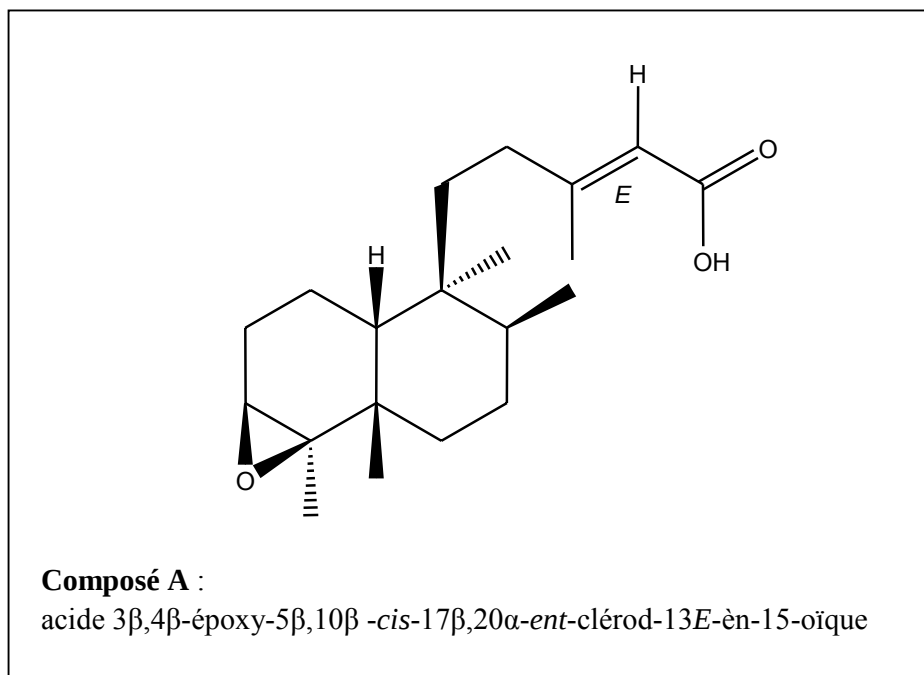


Figure 3.21 – Structure du composé **A**.

Concernant la configuration absolue du composé **A**, celle représentée ici correspond à la série *ent*, puisque d'un point de vue biogénétique, il est plus probable qu'un *cis*-clérodane provienne de cette série plutôt que de la série normale. Une discussion plus approfondie concernant la configuration absolue des composés isolés sera menée au chapitre 3.4.2.8.

3.4.2.3 Composé B

Le composé **B** se présente sous forme de cristaux blancs en aiguilles, après cristallisation dans un mélange hexane/AcOEt. Le spectre UV montre la présence d'un maximum d'absorption à 238 nm (Figure 3.6), valeur à nouveau peu caractéristique d'une classe de composés. L'analyse HRESI-MS a révélé la présence d'un ion pseudo-moléculaire à m/z 341.20890 $[M+Na]^+$, correspondant à la formule brute $C_{20}H_{30}O_3Na$ (masse calculée 341.20926) (Figure 3.22).

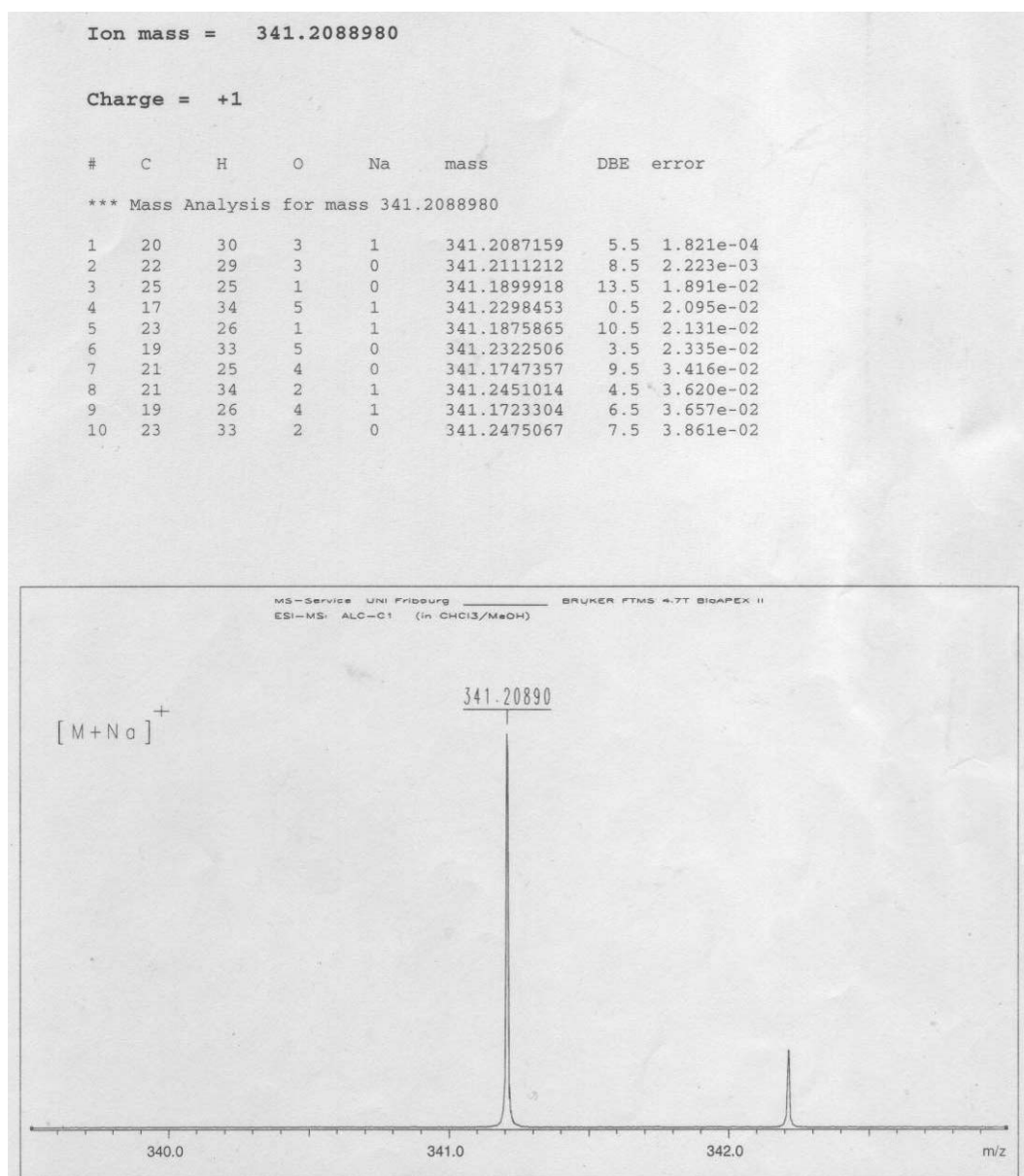


Figure 3.22 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé **B**. Les formules brutes sont données dans l'ordre décroissant d'exactitude.

La similitude de la plupart des valeurs des déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C entre le composé **B** et le composé **A** (Tableaux 5.3 et 5.4) nous permet de supposer qu'il s'agit à nouveau d'un diterpène de type clérodane. Les différences majeures des déplacements chimiques observées entre ces deux molécules concernent principalement les positions 1 (δ_{H} 2.56, 2.82 ppm, δ_{C} 35.7 ppm), 2 (δ_{C} 198.8 ppm), 3 (δ_{H} 5.80 ppm, δ_{C} 128.7 ppm) et 4 (δ_{C} 169.4 ppm) (Figure 3.23). Ceci laisse penser que la différence structurale entre ces deux composés réside au niveau du cycle A de la décaline.

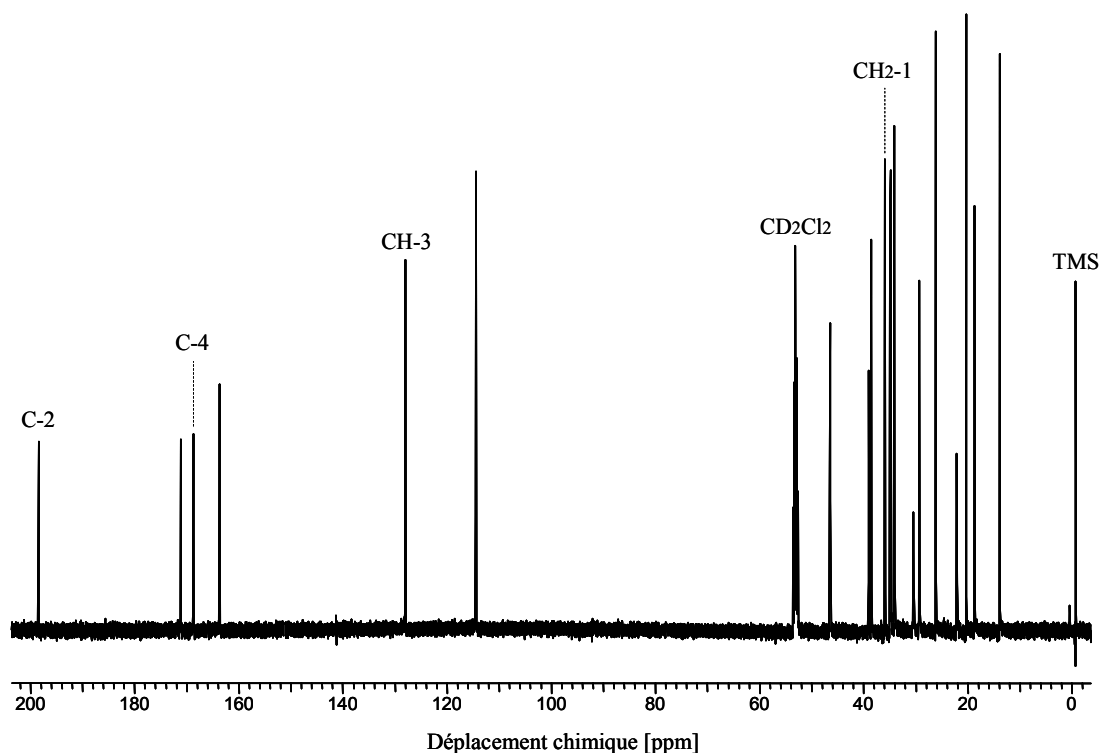


Figure 3.23 – Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CD_2Cl_2) du composé **B**. Seuls les signaux des carbones différents du composé **A** sont mis en évidence.

Les déplacements chimiques des carbones C-12, C-13, C-14, C-15 et C-16, et leur enchaînement révélés par les analyses hétéronucléaires à courte et longue distance, sont similaires à celles observées pour le composé **A**, ce qui suggère que la chaîne 4-carboxyl-3-ène-3-méthylbutyle est à nouveau un élément structural du composé **B**. En ce qui concerne le cycle A de la décaline, comme les signaux des protons H-1 (δ_{H} 2.56 et 2.82 ppm) ont été déplacés dans les champs faibles par rapport au composé **A**, cela suggère la présence d'un carbone adjacent comportant une faible densité électronique. Cette hypothèse est confirmée par le spectre gHMBC qui montre une corrélation entre les protons méthyléniques H-1 et C-2 (δ_{C} 198.8 ppm) (Figure 3.24). Un tel déplacement chimique est caractéristique d'un carbonyle. Les spectres RMN DEPT et gHSQC

montrent qu'il s'agit d'un carbone quaternaire ; C-2 est donc un carbone cétonique. Les valeurs des déplacements chimiques de C-3 et C-4 (δ_C 128.7 et 169.4 ppm, respectivement) indiquent qu'ils sont liés par une double liaison. Le spectre gHSQC indique que C-3 (δ_C 128.7 ppm) est un carbone méthinique dont le proton associé H-3 (δ_H 5.80 ppm) présente un signal dans les champs faibles, et que C-4 (δ_C 169.4 ppm) est un carbone quaternaire. Compte tenu du fort déplacement chimique de ce dernier, cela laisse penser que C-3 est à proximité immédiate du carbone cétonique C-2. Ceci est confirmé par la forte corrélation observée sur le spectre gHMBC entre le proton H-3 et le carbone C-1 (δ_C 35.7 ppm). Les corrélations gHMBC observées entre le proton H-3 (δ_H 5.80 ppm) et les carbones C-18 (δ_C 21.1 ppm) et C-5 (δ_C 39.8 ppm) suggèrent la proximité de ces différents atomes. L'analyse du spectre DEPT montre que C-18 est un carbone méthylique, et l'analyse hétéronucléaire gHSQC indique que les protons associés ont un déplacement chimique à δ_H 1.94 ppm. Ces protons méthyliques montrent en gHMBC une forte corrélation avec le carbone quaternaire C-4 (δ_C 169.4 ppm) suggérant alors que le groupement méthyle CH₃-18 est porté par ce carbone. Les protons méthyliques 3H-18 montrent également une corrélation ^1H - ^{13}C en ^4J , ^4J et ^3J , respectivement avec C-19 (δ_C 31.2 ppm), C-2 (δ_C 198.8 ppm) et C-3 (δ_C 128.7 ppm), confirmant la proximité de ces atomes. Les analyses DEPT et gHSQC indiquent que C-19 est un carbone méthylique, dont les protons 3H-19 associés ont un signal à δ_H 1.24 ppm. Ces derniers montrent une corrélation avec le carbone quaternaire C-5 (δ_C 39.8), suggérant qu'ils sont liés. Les corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C longue distance observées entre les protons méthyliques 3H-19 et C-4 (δ_C 169.4 ppm), C-6 (δ_C 30.1 ppm) et C-10 (δ_C 47.2 ppm) d'une part, et entre les protons méthyléniques H-1 (δ_H 2.82 et 2.56 ppm) et C-10 (δ_C 47.2 ppm), d'autre part, permettent de conclure la démonstration de la structure du cycle A de la décaline. Les corrélations ^1H - ^{13}C longue distance observées entre les protons méthyliques 3H-20 (δ_H 0.82 ppm) et C-9 (δ_C 39.3 ppm), C-10 (δ_C 47.2 ppm), C-11 (δ_C 36.7 ppm) et C-8 (δ_C 35.6 ppm) d'une part, et entre les protons méthyliques 3H-17 (δ_H 0.95 ppm) et C-20 (δ_C 22.9 ppm), d'autre part, indiquent que le composé **B** est l'acide 2-oxocléroda-3,13-diène-15-oïque.

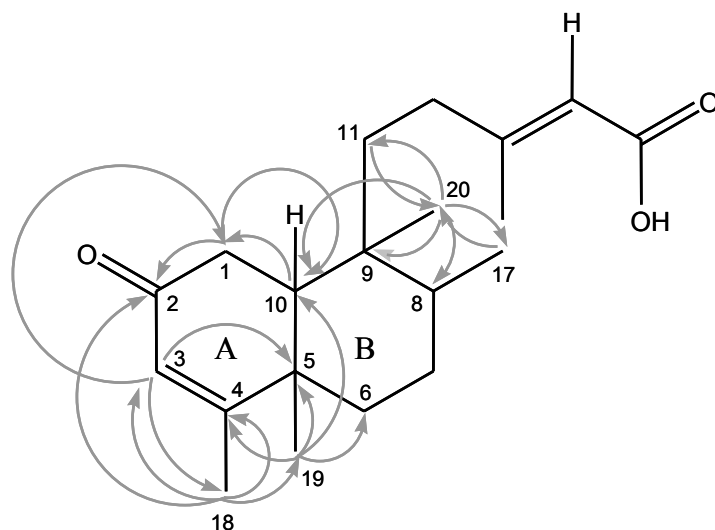
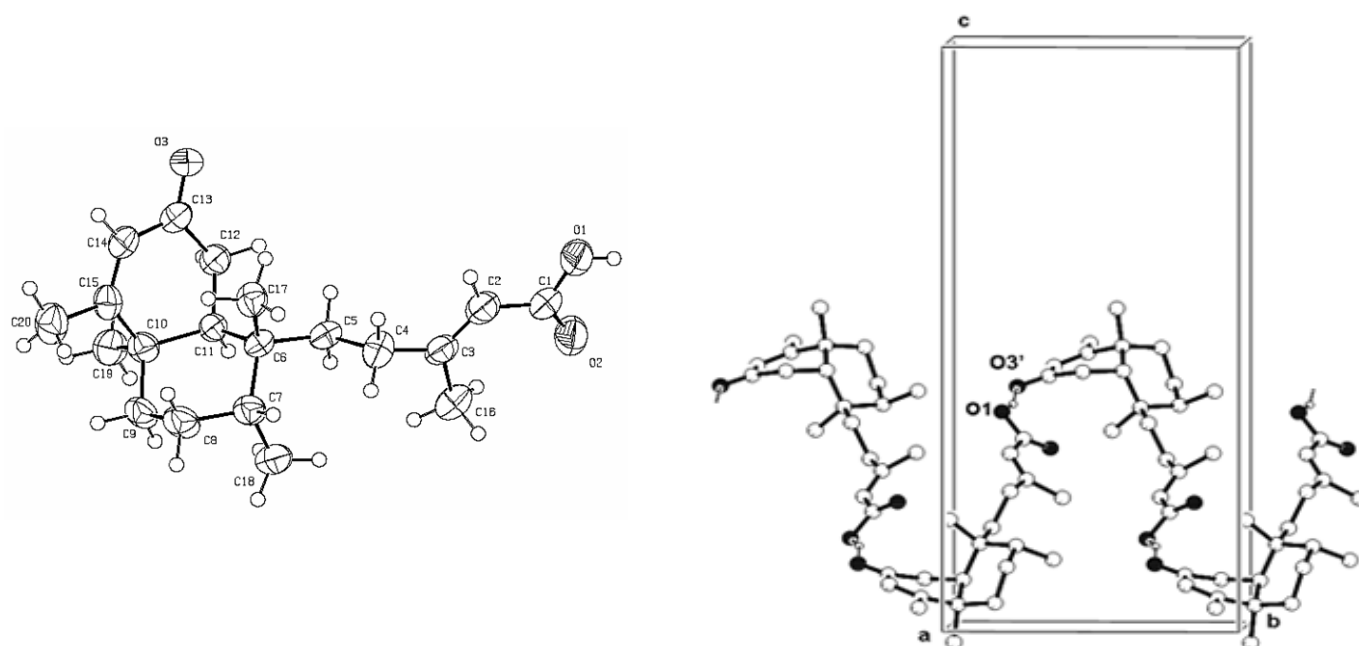


Figure 3.24 – Principales corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C à longue distance (gHMBC) observées pour le composé **B**.

Notons que la fragmentation obtenue par EI-MS du composé **B** (chapitre 5.7) a permis d’observer les mêmes ions-filles que ceux reportés dans la littérature pour ce composé (Hasan *et al.*, 1982; Aquino *et al.*, 1992).

Le composé **B** comporte quatre centres d’asymétrie (C-5, C-8, C-9 et C-10). Comme ce composé a pu être isolé sous forme de cristaux, la configuration relative de la molécule a été établie grâce à une analyse par diffraction aux Rayons X (Figure 3.25-a). La longueur et les angles des liaisons observées sont normales pour un diterpène de type clérodane. Dans la structure cristalline de **B**, il se trouve que les molécules sont liées entre elles par un pont $\text{O-H}\cdots\text{O}$, impliquant le proton acide de l’atome O-1 et l’oxygène carbonyle O-3. De cette manière, une structure hélicoïdale de type polymérique est formée, s’étendant dans la direction *b* comme montré à la Figure 3.25-b. Les données RX sont présentées au chapitre 5.7.1. La décaline du composé **B**, comme montré à la Figure 3.25-a, présente une conformation non-stéroïdale.

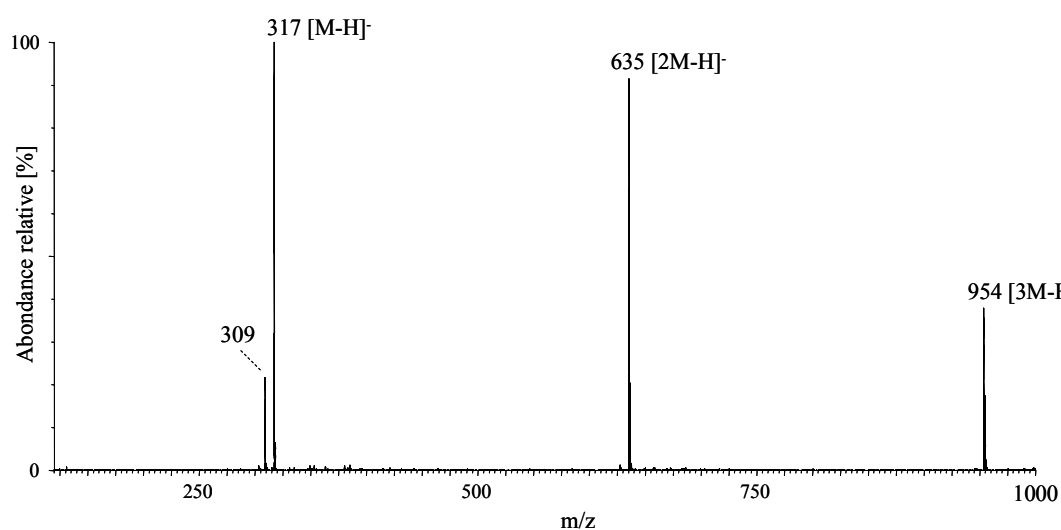
**Figure 3.25**

a - Structure ORTEP du composé **B**.

Note : la numérotation des atomes de carbones n'est pas celle employée dans le présent travail.

b - Structure polymérique du composé **B** vu selon l'axe a. Les ponts hydrogène sont montrés en traits-tillés.

Une analyse par spectrométrie de masse couplée à une ionisation douce (ESI) (Figure 3.26) a permis de montrer qu'en solution, le composé **B** peut également former un dimère ou un trimère. En effet, les ions pseudo-moléculaires m/z suivants ont été observés : 317.2190 $[M-H]^-$, 635.4523 $[2M-H]^-$ et 953.7020 $[3M-H]^-$.

**Figure 3.26** – Spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé **B**

Comparativement à l'acide 2-oxokolavénique déjà isolé de l'écorce et des feuilles de *D. microcarpum* (molécule **18** au chapitre 2.4.3.2) (Aquino *et al.*, 1992; Lajide *et al.*, 1995), le composé **B** possède une décaline en *cis* et une orientation *trans* des groupements méthyliques positionnés en C-8 et C-9. De ce fait, le composé **B** est l'acide 2-oxo-3-èn-5 β ,10 β -*cis*-17 β ,20 α -*ent*-clérod-13*E*-èn-15-oïque ou son énantiomère, et comporte une configuration relative nouvelle (Figure 3.27).

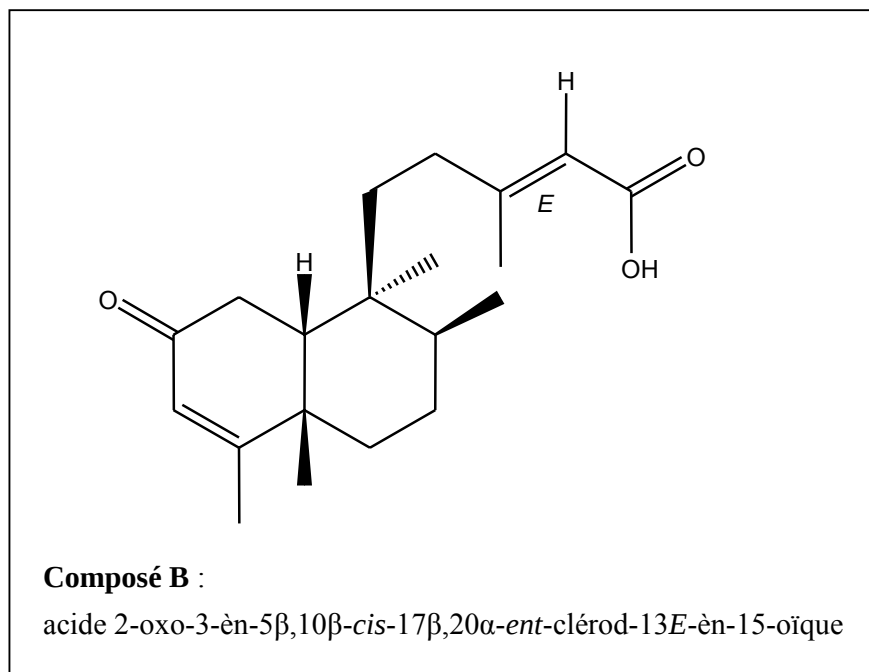
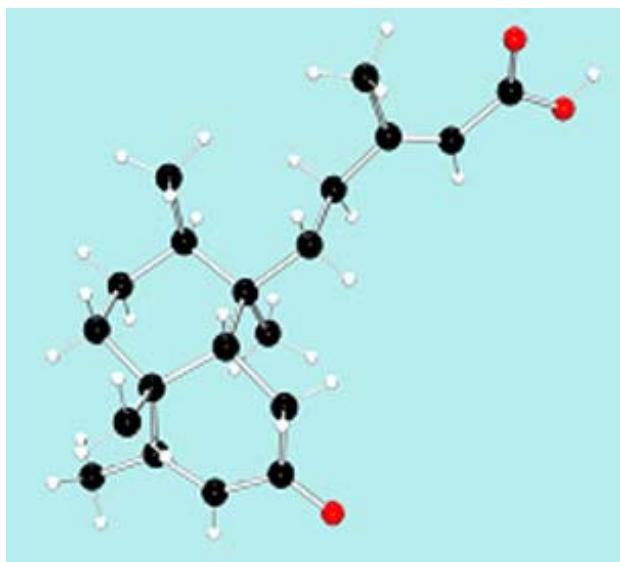


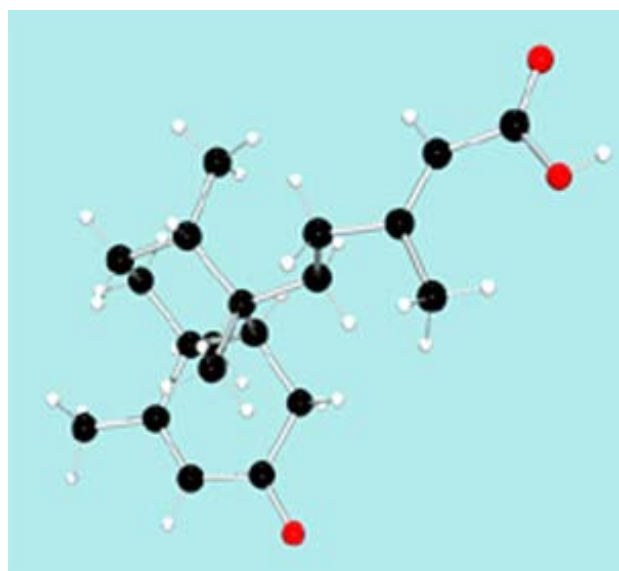
Figure 3.27 – Structure du composé **B**.

Comme dans le cas du composé **A**, il a été choisi de représenter la configuration absolue *ent* de du composé **B** (*cf.* 3.4.2.8).

Notons qu'un rotamère du composé **B** (le composé **B-b**) a pu être obtenu par cristallisation dans un mélange de solvant contenant de l'isooctane et du MTBE, contrairement au composé **B** qui avait cristallisé dans un mélange hexane-AcOEt. Dans le cas de la conformation de **B-b**, une torsion au niveau de la double liaison de la chaîne a eu lieu. La Figure 3.28 présente ces deux rotamères.



a)



b)

Figure 3.28 – Rotamères du composé **B**. a) conformation du cristal obtenu à partir d'un mélange hexane – AcOEt. b) conformation du cristal à partir d'un mélange isooctane – MTBE.

3.4.2.4 Composé C

Ce composé se présente sous la forme d'une poudre blanche amorphe. L'analyse par RMN 1D (Tableaux 5.3 et 5.4) a permis de constater que les déplacements chimiques des signaux des protons et des carbones du composé **C** sont très semblables à ceux de l'acide 2-oxo-kolavénique, isolé des feuilles et de l'écorce de *D. microcarpum* (molécule **18** dans le chapitre 2.4.3.2) (Aquino *et al.*, 1992; Lajide *et al.*, 1995). Puisque cette molécule comporte quatre carbones asymétriques (indiqués par un astérisque sur la Figure 3.29), il peut s'agir de ce composé ou de l'un de ses diastéréomères, comme ce fut le cas pour le composé **B**. Cependant, les déplacements chimiques ^1H et ^{13}C de **C** sont plus semblables à ceux du composé **18** qu'à ceux de **B**, différant de **18** par une jonction *cis* entre les cycles et une orientation *trans* des groupements méthyliques CH_3 -17 et CH_3 -20. Les temps de rétention obtenus par analyse HPLC/DAD-UV de l'extrait (colonne NovaPak[®] C18, CH_3CN - H_2O 30:70 $\rightarrow$ 100:0 en 30 min ; conditions expérimentales décrites sous 5.2.2) pour les composés **B** et **C**, sont respectivement de 11.2 min et 12.4 min, impliquant alors que ce dernier est plus apolaire. Analysons le spectre de corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) pour déterminer la configuration relative de **C**. Notons que plusieurs signaux de protons importants sont très proches : δ_{H} 1.87 ppm (C-10), δ_{H} 1.87 ppm (C-12), δ_{H} 1.88 ppm (C-18) et δ_{H} 0.84 ppm (C-17), δ_{H} 0.83 ppm (C-20). La détermination relative a cependant pu être effectuée à partir des corrélations observées (Figure 3.29).

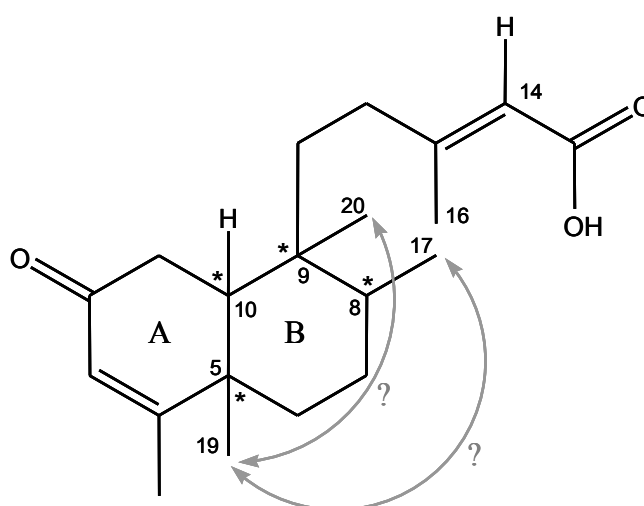


Figure 3.29 – Corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) du composé **C**. Les carbones asymétriques sont mis en évidence par un astérisque.

L'absence de corrélation entre le proton vinylique H-14 (δ_H 5.70 ppm) et les protons méthyliques 3H-16 (δ_H 2.15 ppm) montre que la double liaison possède une configuration *E*. La comparaison du déplacement chimique du signal du carbone de CH₃-19 dans **C** (δ_C 18.2 ppm), **18** (δ_C 19.5 ppm) et **B** (δ_C 31.2 ppm), suggère fortement une jonction *trans* entre les deux cycles, comme dans le composé **18**. Dès lors, si par convention nous posons H-10 en β , le groupement méthyle CH₃-19 est α , ces deux groupements étant axiaux vis-à-vis des deux cycles (chapitre 3.4.3.1). La biosynthèse imposant que le groupement méthyle CH₃-20 soit *trans* par rapport à H-10 (Mac Millan et Beale, 1999), CH₃-20 est donc α et axial, impliquant une orientation équatoriale de la chaîne 4-carboxyl-3-ène-3-méthylbutyle. Le groupement CH₃-17 étant équatorial dans le composé **18** et les protons méthyliques 3H-17 de **C** ayant un signal et une constante de couplage très semblable aux protons 3H-17 du composé **18** (δ_H 0.84 ppm, *J* 6.38 Hz et δ_H 0.85 ppm, *J* 6 Hz, pour **C** et **18**, respectivement), cela suggère que le groupement CH₃-17 de **C** est également équatorial et donc α (Hasan *et al.*, 1982). Ainsi, les groupements méthyles CH₃-17 et CH₃-20 sont *cis*, et tous les deux *trans* vis-à-vis de H-10. Ces orientations sont confirmées par le spectre NOE : aucune corrélation n'étant observée entre les protons méthyliques 3H-20 (δ_H 0.83 ppm) ou 3H-17 (δ_H 0.84 ppm) avec H-10 (δ_H 1.87 ppm), cela confirme que H-10 est *trans* par rapport à ces groupements, et que CH₃-20 et CH₃-17 sont *cis* l'un par rapport à l'autre. Le signal de corrélation spatiale ¹H-¹H observé entre 3H-20 (δ_H 0.83 ppm) ou 3H-17 (δ_H 0.84 ppm) et 3H-19 (δ_H 1.11 ppm) confirme que la jonction entre les cycles est *trans*. Cette corrélation concerne très certainement 3H-20 (δ_H 0.83 ppm), puisque CH₃-17 est équatorial et donc moins proche de 3H-19 dans l'espace. La configuration relative de **C** est présentée à la Figure 3.30.

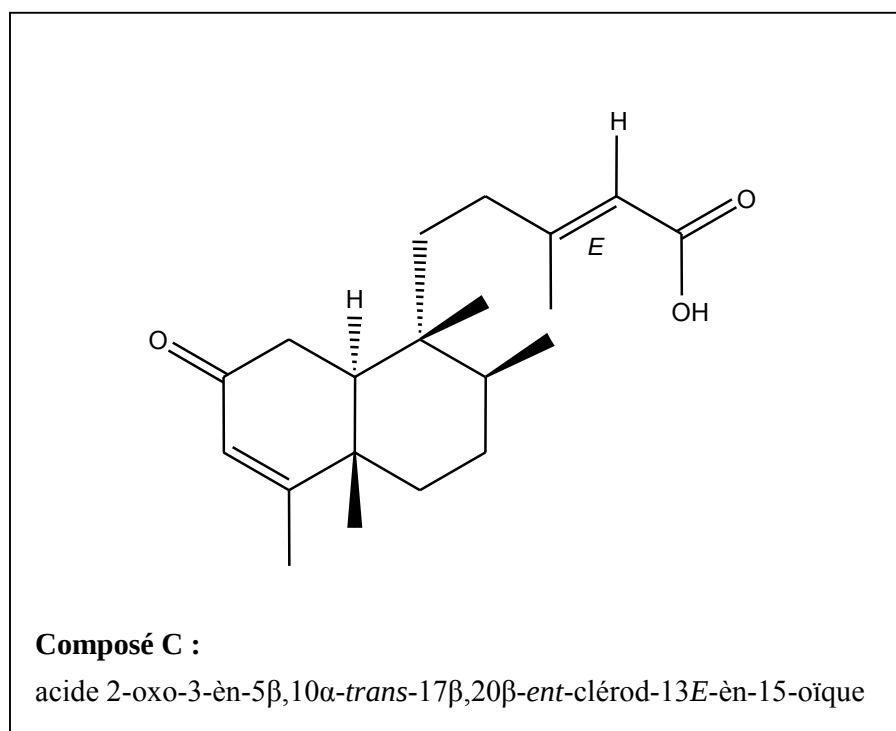


Figure 3.30 – Structure du composé C.

Le composé **C** possède donc la même configuration relative que le composé **18**, isolé entre autres des feuilles et de l'écorce de *D. microcarpum* (Aquino *et al.*, 1992; Lajide *et al.*, 1995). Comme mentionné au chapitre 2.4.3.2, les nomenclatures employées pour désigner la molécule **18** n'étaient pas très précises au niveau de l'orientation spatiale des substituants : en effet, elle a été successivement appelée acide 2-oxo-kolavénique (Aquino *et al.*, 1992), puis acide 2-oxo-3,13*E*-clérodien-15-oïque (Lajide *et al.*, 1995). Par soucis de précision, nous nommons le composé **C** acide 2-oxo-3-èn-5 β ,10 α -*trans*-17 β ,20 β -*ent*-clérod-13*E*-èn-15-oïque. Il peut s'agir en réalité de cette molécule ou de son énantiomère (*cf.* 3.4.2.8).

3.4.2.5 Composé D

Après cristallisation dans un mélange hexane-AcOEt, le composé **D** se présente sous la forme d'aiguilles blanches. Il présente un maximum d'absorption UV à 225 nm (Figure 3.6). L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (HRESI-MS) (Figure 3.31) indique la présence d'un ion pseudo-moléculaire à m/z 361.23507 $[M+Na]^+$, correspondant à la formule brute $C_{20}H_{34}O_4Na$ (masse calculée 361.23548).

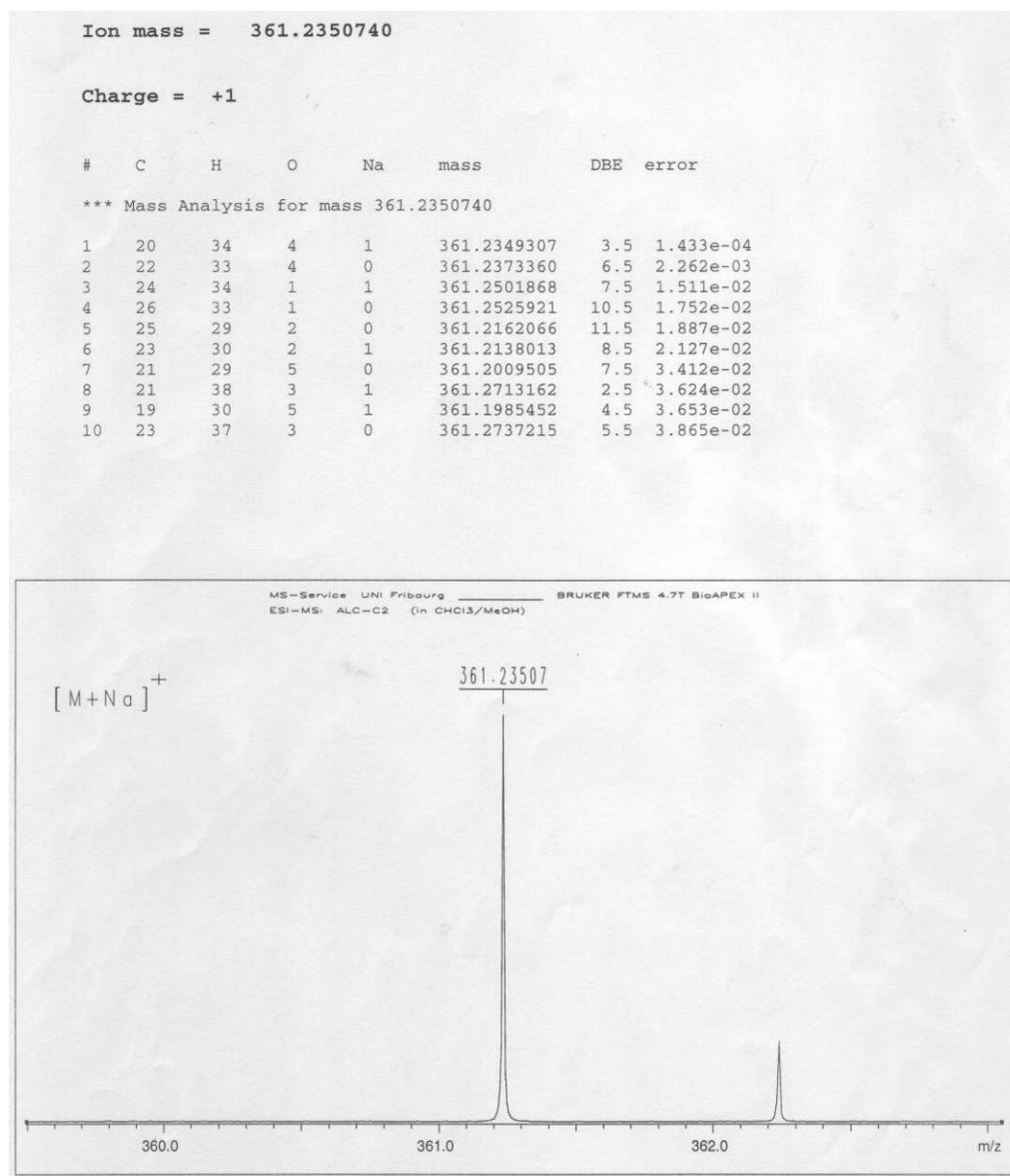


Figure 3.31 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé **D**. Les formules brutes sont données dans l'ordre décroissant d'exactitude.

Les spectres RMN du ^1H et du ^{13}C du composé **D** (Tableaux 5.3 et 5.4) ont montré des valeurs de déplacements chimiques semblables, pour la plupart, à ceux du composé **A**, et ce malgré le fait que les mesures de **D** aient été effectuées dans du CD_3OD et non dans du CDCl_3 pour des raisons d'insolubilité. Les différences les plus marquées de déplacements chimiques entre les composés **A** et **D** concernent les carbones C-3 (δ_{C} 77.0 ppm) et C-4 (δ_{C} 78.1 ppm). Ces valeurs de déplacements chimiques sont caractéristiques de carbones portant un groupement hydroxylique (Silverstein *et al.*, 1998). Il semble donc que **D** soit dérivé de **A** par ouverture du groupement époxy, aboutissant à la formation d'un diol. Cette hypothèse de structure correspond à la formule brute obtenue par HRESI-MS. Observons les données RMN 1D et 2D du composé **D** pour confirmer cette hypothèse. Le spectre DEPT indique que C-4 est un carbone quaternaire et C-3 est un carbone méthinique. Le spectre de corrélations hétéronucléaires gHSQC indique que le proton porté par C-3 présente un signal à δ_{H} 3.48 ppm (H-3). L'analyse de corrélations hétéronucléaires longue distance (Figure 3.32) montre que le signal du proton méthinique H-3 (δ_{H} 3.48 ppm) corrèle avec les signaux de C-1 (δ_{C} 19.3 ppm), C-2 (δ_{C} 29.8 ppm), C-4 (δ_{C} 78.1 ppm) et C-5 (δ_{C} 43.7 ppm), confirmant alors la position du carbone méthinique C-3. Le signal à δ_{C} 78.1 ppm du carbone quaternaire C-4 montre un pic de corrélation avec les signaux des protons méthyléniques H-2 (δ_{H} 1.59 ppm) et H-6 (δ_{H} 2.31 ppm), confirmant alors sa position. La corrélation entre les protons méthyliques H-18 (δ_{H} 1.20 ppm) et C-3 (δ_{C} 77.0 ppm) suggère fortement que le groupement méthyle CH_3 -18 est l'un des substituants du carbone quaternaire C-4.

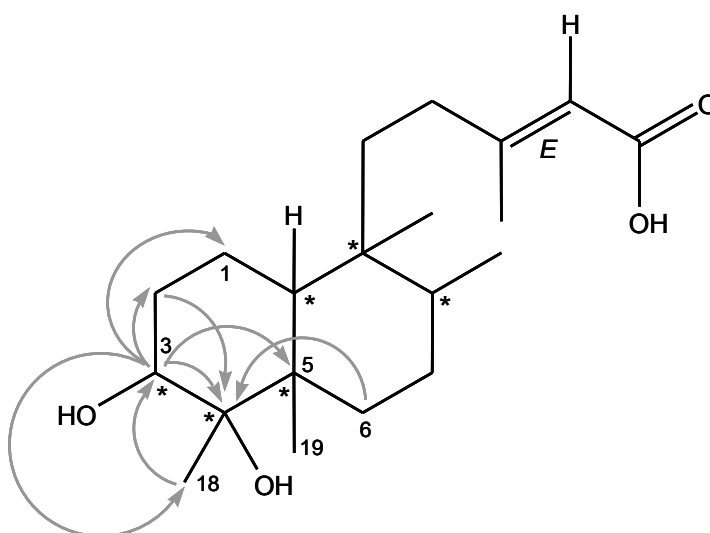


Figure 3.32 – Principales corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C à longue distance (gHMBC) concernant les atomes CH-3 et C-4 du composé **D**. Les carbones asymétriques sont mis en évidence par un astérisque.

Ce diterpène de type clérodane présente six centres asymétriques (indiqués avec un astérisque sur la Figure 3.32). Leurs orientations relatives ont été déterminées par une analyse par diffraction aux Rayons X (Figure 3.33-a).

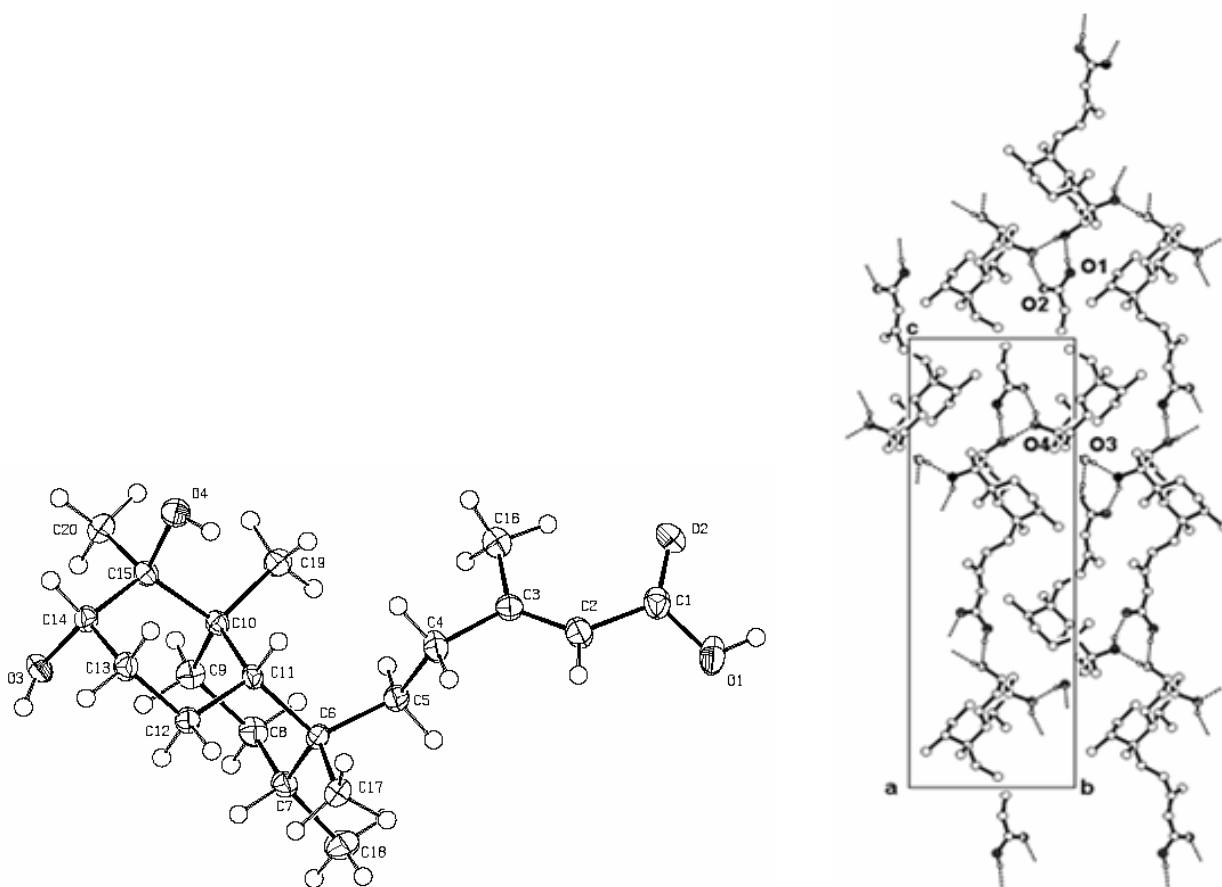


Figure 3.33

a - Structure ORTEP du composé **D**.

Notes : la structure ORTEP déposée correspond à l'antipode du composé **D** ; la numérotation des atomes de carbones n'est pas celle employée dans le présent travail.

b – Structure polymérique du composé **D** vu selon l'axe *a*.

L'illustration ORTEP indique qu'il s'agit d'une *cis*-décaldine portant un diol diaxial en C-3 et C-4 (C-14 et C-15, sur la structure ORTEP). Les groupements méthyles CH₃-17 et CH₃-20 (CH₃-18 et CH₃-17, sur la structure ORTEP) sont *trans* l'un par rapport à l'autre, et CH₃-20 est lui-même *trans* vis-à-vis de H-10 (H-11, sur la structure ORTEP), comme le prédit la biosynthèse (Mac Millan et Beale, 1999). Il s'agit donc d'une *cis*-décaldine de type stéroïdal dont les deux cycles adoptent une conformation en chaise. Les longueurs et les angles de liaison sont normaux pour un tel composé (*cf.* 5.7.1). Sous forme de cristal, la molécule adopte une structure trimérique par la création de ponts hydrogènes entre le groupement carboxylique et les groupements hydroxyles. Cette structure s'étend de manière à former un feuillet bidimensionnel dans le plan *bc* comme montré à la Figure 3.33-b.

Le composé **D** possède une conformation relative nouvelle et se nomme acide 3 α ,4 β -dihydroxy-5 β ,10 β -*cis*-17 β ,20 α -*ent*-clérod-13*E*-èn-15-oïque (Figure 3.34). Il peut s'agir de cette molécule ou de son énantiomère. La discussion concernant la configuration absolue de ce composé sera menée au chapitre 3.4.2.8.

A ce jour, un seul diastéréomère de ce composé a été isolé ; il diffère de **D** par une relation *cis* entre les deux groupements hydroxyliques et entre les groupements méthyliques CH₃-17 et CH₃-20. Ce composé avait été isolé d'une Asteraceae : *Relhania genistifolia* L. (Tsichritzis et Jakupovic, 1990). Cependant, dans ce travail, les déplacements chimiques des signaux de certains protons n'avaient pas été indiqués, et aucun élément de détermination structurale n'avait été décrit.

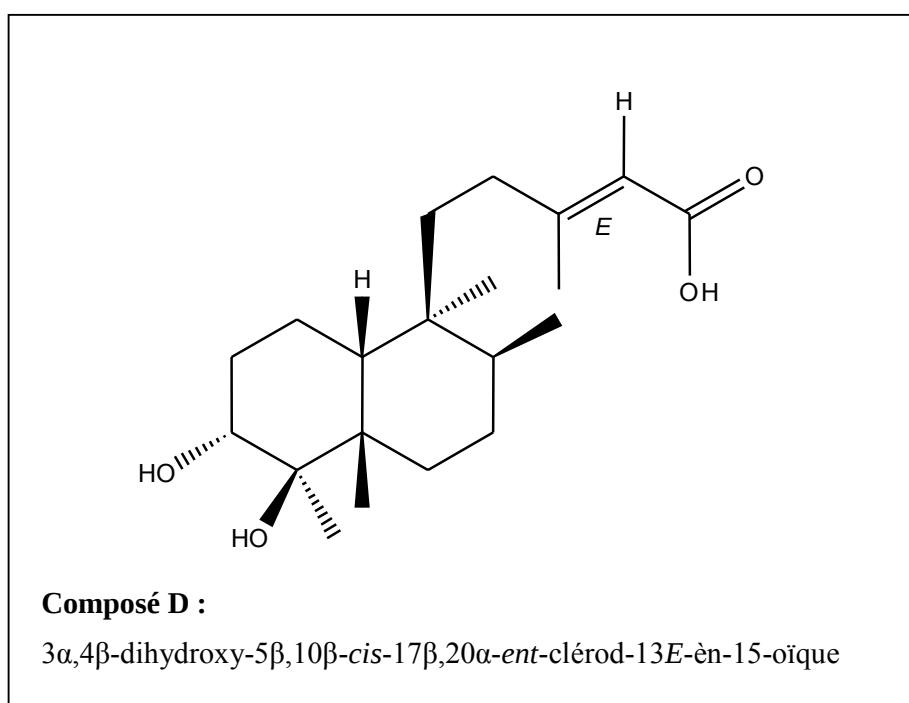


Figure 3.34 – Structure du composé **D**

Une analyse EI-MS (70 eV) (Figure 3.35) a été menée de manière à pouvoir la comparer à celle que Tsichritzis et Jakupovic (1990) avaient effectuée sur le diastéréomère de **D**. Dans les deux cas, l'ion moléculaire (m/z 338.2) est presque totalement fragmenté. Les ions filles majoritaires détectés sont identiques pour les deux composés (indiqués sur la Figure 3.35), et diffèrent par leur abondance relative.

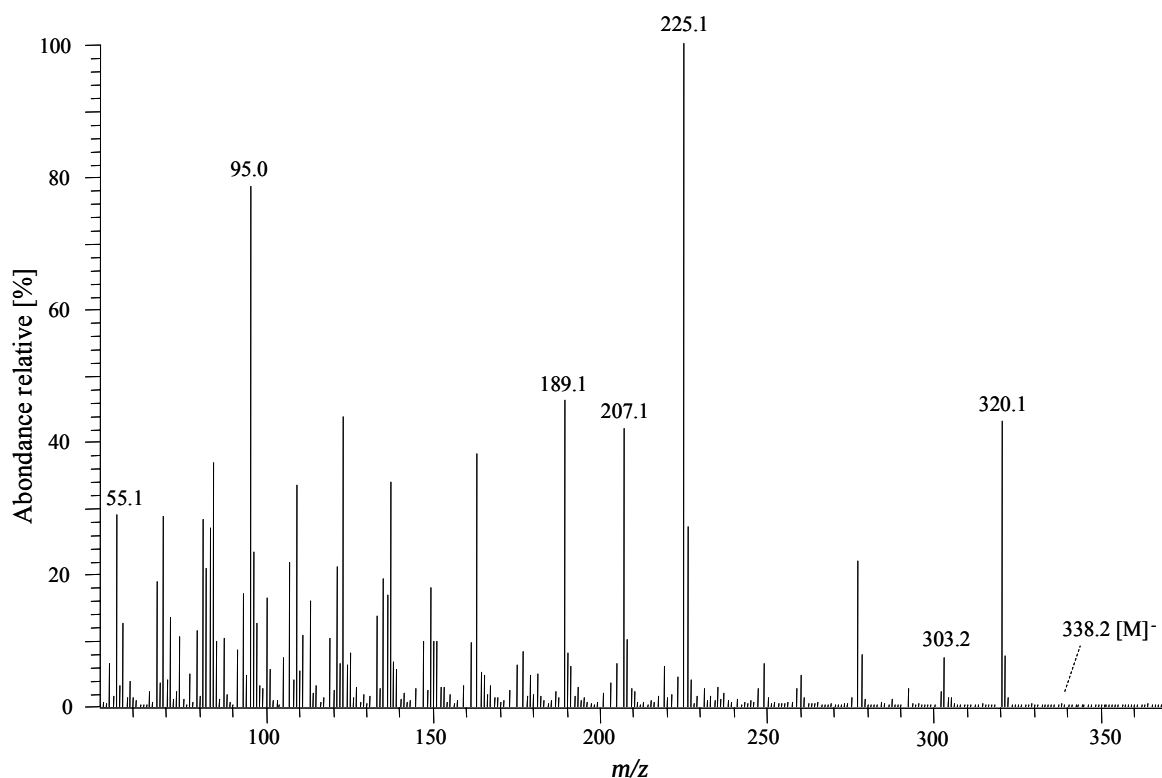


Figure 3.35 – Spectre EI-MS (70 eV) du composé **D** (conditions expérimentales décrites en 5.4.5). Les fragments dont m/z est indiqué, sont ceux retrouvés dans le diastéréomère de **D** isolé par Tschritzis et Jakupovic (1990).

D'un point de vue biogénétique, le composé **D** provient probablement du composé **A** par ouverture du cycle époxyde, ou d'un composé différant de **A** uniquement par une orientation α du cycle époxyde. En effet, compte tenu de l'orientation diaxiale des groupements hydroxyles, nous pouvons supposer que l'ouverture a été guidée par la règle de Fürst-Plattner (Fürst et Plattner, 1949). Dès lors, connaissant l'orientation diaxiale des groupements hydroxyles, il n'est pas possible de prédire quelle était l'orientation du groupement époxy précurseur.

3.4.2.6 Composé E

Le composé **E** se présente sous la forme d'une huile jaune. Son analyse par spectrométrie de masse en impact électronique (EI-MS) (conditions expérimentales décrites sous 5.4.5), a montré un schéma de fragmentation identique au niveau qualitatif à celui obtenu pour le composé **D**.

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de **E** se sont avérés être très similaires à ceux de **D** (Tableaux 5.3 et 5.4), et ce malgré la différence de solvant dans lequel les deux analyses ont été menées. Les analyses RMN 2D (gHSQC et gHMBC) effectuées ont permis de confirmer que le composé **E** a la même structure plane que **D**. Les temps de rétention obtenus par analyse HPLC/DAD-UV (colonne NovaPak[®] C18, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 30:70 $\rightarrow$ 100:0 en 30 min ; cf. 5.2.2) des composés **D** et **E**, indiquent que **D** est beaucoup plus polaire : t_R (**D**) 6.8 min ; t_R (**E**) 17.8 min. Le composé **E** n'ayant pu être cristallisé, sa configuration relative a été déterminée grâce à l'analyse d'un spectre de corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H . Les corrélations observées sont présentées à la Figure 3.36.

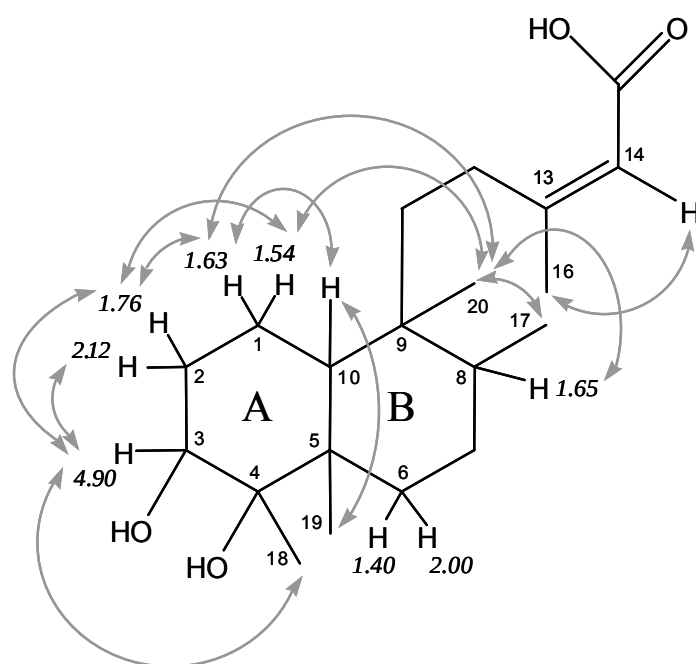


Figure 3.36 – Principales corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) observées pour le composé **E**. Les déplacements chimiques des signaux des protons sont indiqués en italique (valeurs en ppm, 500 MHz, CDCl_3).

Avant d'analyser les corrélations NOE, signalons que dans notre publication relatant la détermination structurale de ce composé (Cavin *et al.*, 2006), nous avons affirmé que le groupement méthyle CH_3 -17 était *cis* vis-à-vis de CH_3 -20. Or, selon le Professeur D. Arigoni (ETH, Zürich), ces deux groupements méthyliques devraient être *trans*. Dès lors, nous avons, avec son aide, analysé à nouveau les corrélations NOE et il s'est avéré que ces groupements méthyles étaient effectivement *trans* l'un par rapport à l'autre. Analysons en détail les corrélations NOE observées sur ce composé :

La forte corrélation entre le proton vinylique H-14 (δ_{H} 5.70 ppm) et les protons méthyliques H-16 (δ_{H} 2.20 ppm) indique que la double liaison possède une configuration Z. Concernant la décaline, nous pouvons aisément affirmer que la jonction entre les deux cycles est *cis*, puisque H-10 (δ_{H} 1.72 ppm) corrèle fortement avec les protons méthyliques H-19 (δ_{H} 1.23 ppm). Comme la configuration absolue de ce composé n'a pas pu être déterminée, fixons arbitrairement H-10 et CH_3 -19 comme étant α .

Déterminons l'orientation des substituants du cycle A de la décaline (Figure 3.37).

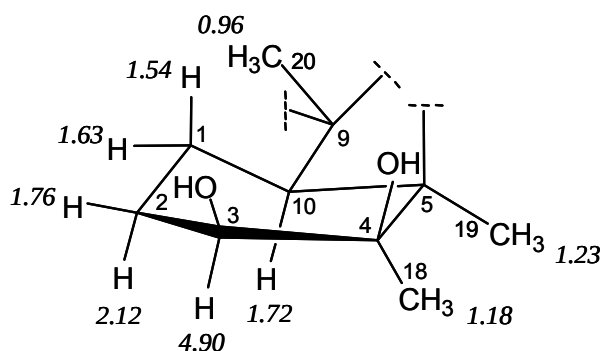


Figure 3.37 – Orientation relative des substituants sur le cycle A du composé E. Les déplacements chimiques des signaux des protons sont indiqués en italique (valeurs en ppm, 500 MHz, CDCl_3).

Les corrélations observées entre les protons méthyliques 3H -20 (δ_{H} 0.96 ppm) et les deux protons méthyléniques H-1 (δ_{H} 1.54 et δ_{H} 1.63 ppm) impliquent que la liaison C-9/C-20 doit être le bisecteur dièdre de H-1 α et H-1 β , et donc que la liaison C-10/C-9 doit l'être aussi. Le groupement méthyle CH_3 -20 est alors équatorial et la liaison C-10/C-9 équatoriale par rapport au cycle A, et presque coplanaire avec la liaison C-10/C-1. H-10 est alors axial par rapport à A et, la décaline étant *cis*, équatorial par rapport à B. Le groupement méthyle CH_3 -20 est ainsi équatorial et β . La biogénèse confirme la relation *trans* entre CH_3 -20 et H-10 (Mac Millan et Beale, 1999). Les atomes C-20, C-9, C-10, et C-1 s'approchent ainsi de la coplanarité. Comme H-10 (δ_{H} 1.72 ppm) corrèle avec H-1 (δ_{H} 1.63 ppm), ce dernier doit forcément être

équatorial vu que H-10 est axial. H-1 (δ_H 1.63 ppm) est donc α et équatorial, impliquant que H-1 β (δ_H 1.54 ppm) est axial. Le proton méthylénique H-2 possédant un signal à δ_H 1.76 ppm corrèle avec les deux protons méthyléniques H-1 α et H-1 β ; il est donc implicitement en position équatoriale et β . Ainsi, H-2 (δ_H 2.12 ppm) est axial et α .

Le proton méthinique H-3 (δ_H 4.90 ppm) corrélant avec H-2 α et H-2 β , il doit être α , impliquant une orientation β du 3-OH. Ainsi, ce groupement hydroxyle est presque anti-périplanaire par rapport à H-2 α , fait confirmé par le déplacement chimique de ce dernier dans les champs faibles (δ_H 2.12 ppm). Nous avons auparavant constaté que les déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **E** étaient très similaires à ceux de **D**. L'exception concerne H-3 et C-3 : δ_H 4.90 et 3.48 ppm et δ_C 81.8 et 77.0 ppm, pour **E** et **D**, respectivement. Comment expliquer ces différences ? La seule explication possible résulte de la formation d'un pont hydrogène entre les deux groupements hydroxyles. En effet, le proton du 3-OH forme un pont hydrogène avec l'oxygène du 4-OH, diminuant ainsi la densité électronique de C-3, (mesurable par le déplacement chimique de son signal vers les bas champs à 81.8 ppm). Ce phénomène se traduit également au niveau du proton méthinique par une augmentation de son acidité, mesurable par un déplacement considérable de son signal vers les bas champs (H-3, δ_H 4.90 ppm). La diminution de la densité électronique de C-3 influence le signal de C-4 qui se déplace légèrement vers les hauts champs (C-4 δ_C 75.8 ppm, *versus* δ_C 78.1 ppm dans le composé **D**). Ainsi, c'est uniquement une orientation *cis* des deux groupements hydroxyles, formant un angle proche de 0°, qui permet la formation d'un tel pont hydrogène. En accord avec cette orientation, le pic de corrélation observé entre δ_H 4.90 ppm (H-3) et δ_H 1.18 ppm (3H-18) est particulièrement intense. Ainsi, les atomes C-2, C-3, C-4 et C-5 s'approchent de la coplanarité.

En ce qui concerne le cycle B de la décaline, le déplacement chimique de H-6 (δ_H 2.00 ppm) dans les champs forts, comparativement au même atome dans **D** (δ_H 2.31 ppm), suggère qu'il subit l'influence du 4-OH. Ainsi, ce dernier étant β , H-6 (δ_H 2.00 ppm) l'est par conséquent également. Il reste maintenant à déterminer l'orientation du groupement méthyle positionné en C-8, le CH₃-17. La constante de couplage des protons 3H-17 (δ_H 0.83 ppm ; J = 6.80 Hz) étant inférieure à 7.0 Hz, cela suggère qu'il est en position équatoriale. En effet, nous avons remarqué dans la littérature portant sur la configuration relative de décalines, que la constante de couplage entre des protons méthyliques et le proton vicinal est inférieure à 7.0 lorsque le méthyle est en position équatoriale, et supérieure à cette valeur dans le cas où il est axial (Bohlmann *et al.*, 1984; Whitehead *et al.*, 1990; Nabeta *et al.*, 1995). Cette affirmation est également vérifiée dans le cas des composés **A** à **E** que nous avons isolés (Tableaux 5.3 et 5.4) : **A**, **C**, **D** et **E**, dont CH₃-

17 est équatorial : $J = 6.40, 6.38, 6.83, 6.80$ Hz, respectivement ; et dans le cas du composé **B** où CH_3 -17 est axial : $J = 7.32$ Hz. Dès lors, l'orientation relative des six carbones asymétriques de la molécule est démontrée (Figure 3.38-a). Nous constatons alors que le cycle B adopte une conformation en demi-chaise, C-5, C-6, C-8, C-9 et C-10 étant parfaitement coplanaires. Du fait que le cycle B soit en demi-chaise et que le cycle A adopte une conformation s'approchant d'une demi-chaise, H-10 et CH_3 -19 sont pratiquement coplanaires (Figure 3.38-b). Ce n'est alors certainement pas un hasard si **E** est le seul *cis*-clérodane isolé pour lequel la corrélation spatiale homonucléaire ^1H - ^1H entre H-10 et 3H-19 est observable, et qui plus est, de manière intense. Ainsi, le composé **E** possède une nouvelle configuration relative, et est nommé acide $3\alpha,4\alpha$ -dihydroxy- $5\beta,10\beta$ -*cis*- $17\beta,20\alpha$ -*ent*-clérod-13*Z*-èn-15-oïque (Figure 3.38). Il peut également s'agir de son énantiomère comme il en sera question au chapitre 3.4.2.8.

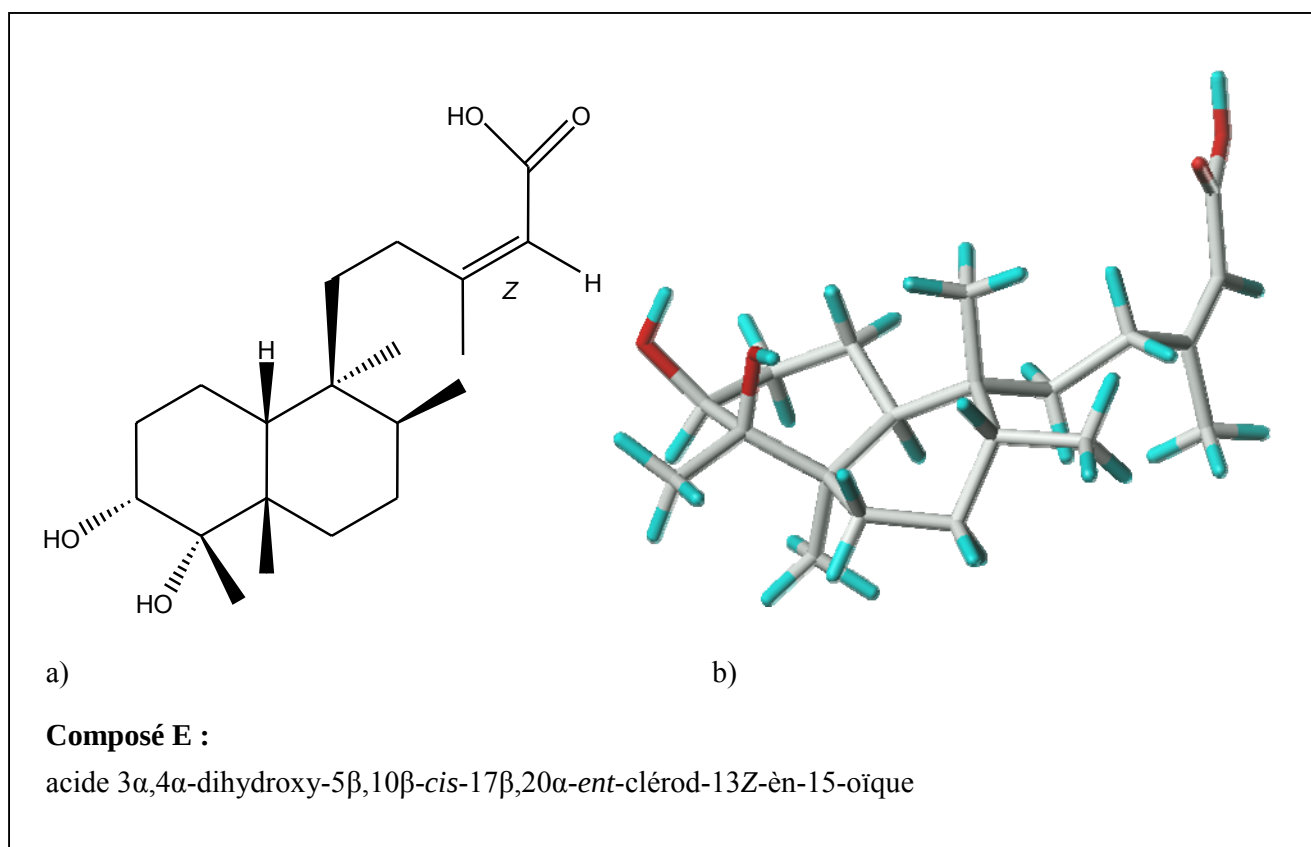


Figure 3.38 – Structure du composé **E**. a) illustration bidimensionnelle ; b) illustration tridimensionnelle (de l'énantiomère) élaborée par le logiciel de modélisation moléculaire Sybyl[®] (conditions expérimentales cf. 5.6)

Le composé **E** diffère de son diastéréomère **D** par l'orientation *Z* de la double liaison et par une orientation *cis* des groupements hydroxyles. C'est certainement ce dernier aspect qui influence le plus le temps de rétention. En effet, *a posteriori* l'apolarité de **E** peut s'expliquer par le fait que les groupements hydroxyles étant du même côté β , l'« arrière » de la molécule est ainsi dépourvu de tout groupe polaire. Notons tout de même que ce comportement aurait été difficilement prévisible *a priori*.

La position relative *cis* des diols est tout à fait remarquable de par sa rareté. En effet, comme nous l'avons vu dans les paragraphes traitant des molécules **A** et **D**, d'un point de vue biogénétique, un diol *trans* dérive habituellement de l'ouverture d'un époxide, réaction guidée généralement par la règle de Fürst-Plattner. La condition nécessaire à l'ouverture d'un époxide selon Fürst-Plattner est que le mécanisme soit concerté, c'est-à-dire que les quatre centres impliqués dans la réaction soient placés dans un même plan. Le diol formé est alors *trans* (Fürst et Plattner, 1949). Le diol du composé **E** étant *cis*, il n'est alors pas le produit d'une ouverture de l'époxide selon Fürst-Plattner. Dès lors, le mécanisme réactionnel ayant donné naissance au composé **E** est très probablement une attaque par un acide fort sur l'époxide. Etant donné que C-3 est moins substitué que C-4, c'est ce dernier qui a porté la charge positive, pour ensuite subir l'attaque d'un nucléophile (OH^-). Comme les groupements OH du composé **E** sont α , nous pouvons affirmer que l'époxide précurseur était α .

3.4.2.7 Composé F

Le composé F se présente sous la forme d'une poudre blanche amorphe. L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution HRESI-MS (Figure 3.39) a montré la présence d'un ion pseudo-moléculaire m/z 327.22953 $[M+Na]^+$, correspondant à la formule brute, $C_{20}H_{32}O_2Na$ (masse calculée m/z 327.23000).

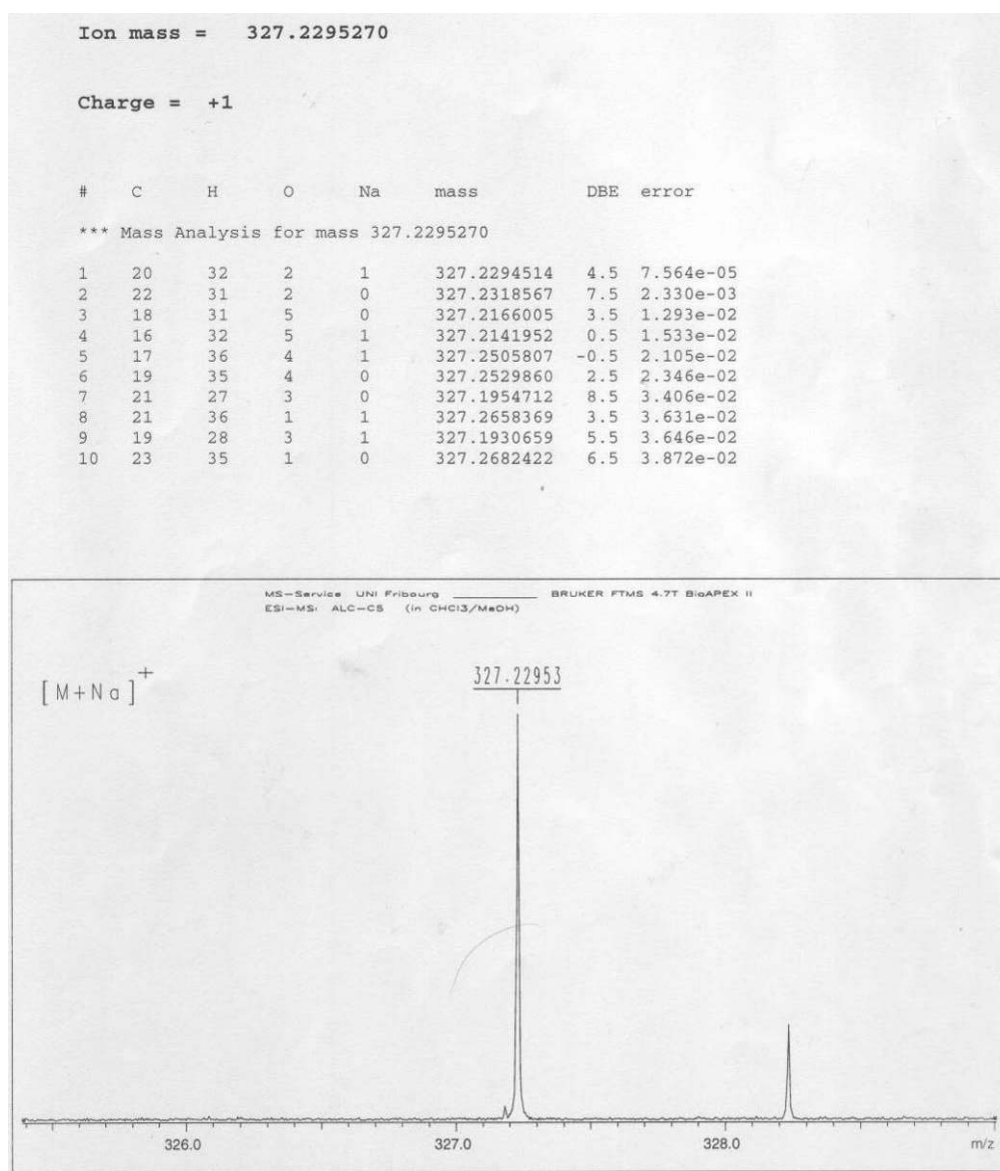


Figure 3.39 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé F. Les formules brutes sont données dans l'ordre décroissant d'exactitude.

L'analyse par RMN 1D du composé a montré des déplacements chimiques des signaux des ^1H et ^{13}C identiques à ceux de l'acide copalique, composé déjà isolé de l'écorce de *D. microcarpum*, et présenté dans le chapitre 2.4.3.2 (molécule **23**) (Ikhiri et Ilagouma, 1995). Le composé **F** est donc un diterpène de type labdane. Ses spectres RMN ^1H et ^{13}C sont présentés à la Figure 3.40 et Figure 3.41, respectivement ; seuls les déplacements chimiques propres à la classe des labdanes et à l'acide copalique sont indiqués. L'ensemble des valeurs des déplacements chimiques des signaux des protons et des carbones de **F** sont présentés dans les Tableaux 5.3 et 5.4.

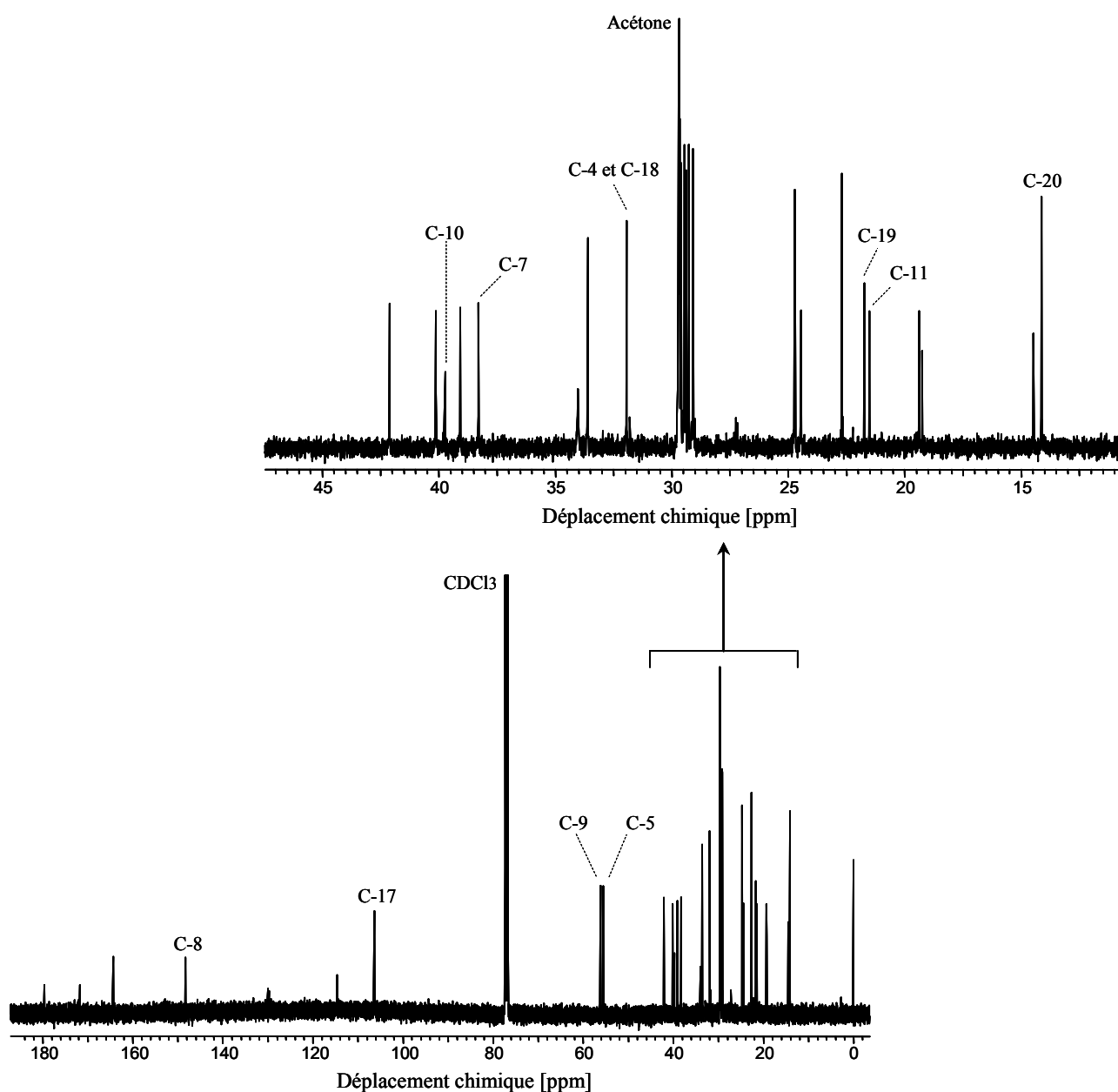


Figure 3.40 – Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) du composé **F**.

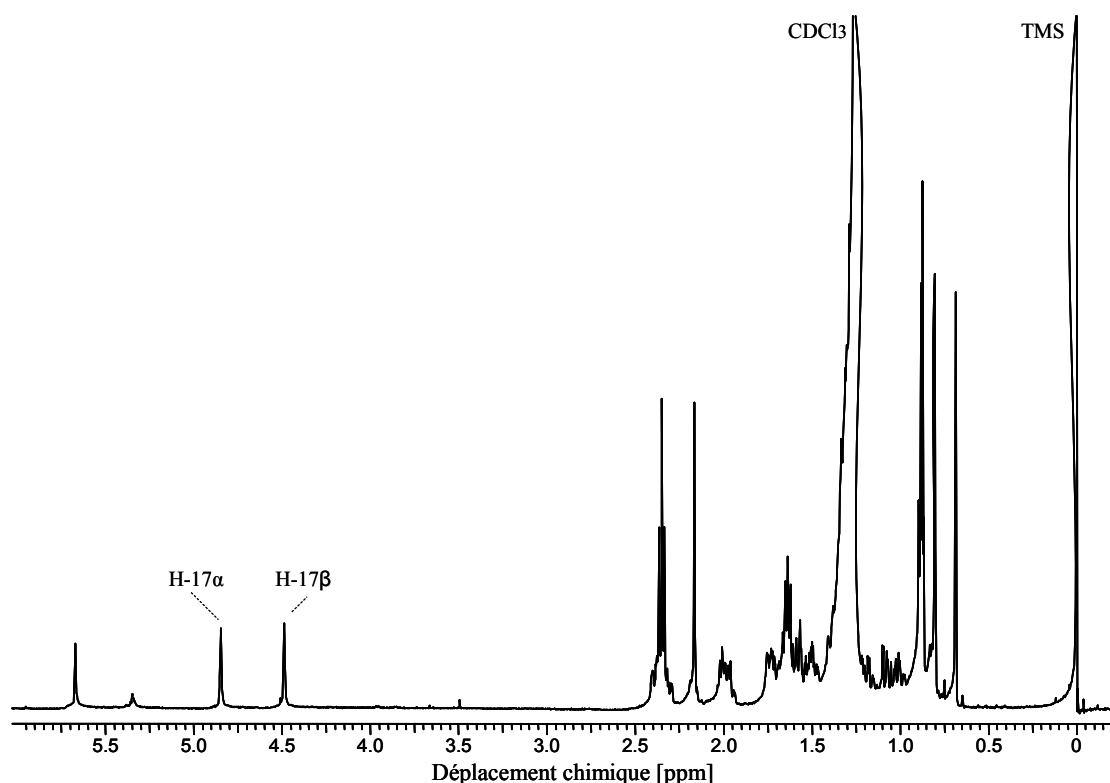


Figure 3.41 – Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé **F**.

Les signaux caractéristiques de l'acide copalique sont :

- un déplacement chimique du carbone exo-méthylénique C-17 à δ_{C} 106.4 ppm, et le déplacement des signaux des protons associés H-17 à δ_{H} 4.49 et 4.85 ppm ;
- étant porteur du carbone C-17, le signal de C-8 est ainsi déplacé dans les champs faibles (δ_{C} 148.3 ppm) ;
- la présence de deux carbones méthyliques C-18 (δ_{C} 33.6 ppm) et C-19 (δ_{C} 21.7 ppm) en C-4 (δ_{C} 33.6 ppm) ;
- la jonction entre les deux cycles de la décaline : C-10 (δ_{C} 39.7 ppm) porte le carbone méthylique C-20 (δ_{C} 14.5 ppm), tandis que C-5 (δ_{C} 55.5 ppm) est un carbone méthinique.

Les analyses hétéronucléaires à courte et longue distances (gHSQC et gHMBC) effectuées ont confirmé l'identité du composé **F**.

Comme mentionné dans l'introduction de ce travail, la structure relative de l'acide copalique isolé de l'écorce de *D. microcarpum* (molécule **23**, chapitre 2.4.3.2) (Ikhiri et Ilagouma, 1995) était imprécise, puisque l'orientation spatiale de la chaîne n'était pas indiquée. Dès lors, déterminons la configuration relative des trois centres asymétriques du composé **F**

(mis en évidence par un astérisque à la Figure 3.42) par une analyse NOESY. Les corrélations NOE importantes pour la détermination de la configuration sont présentées à la Figure 3.42.

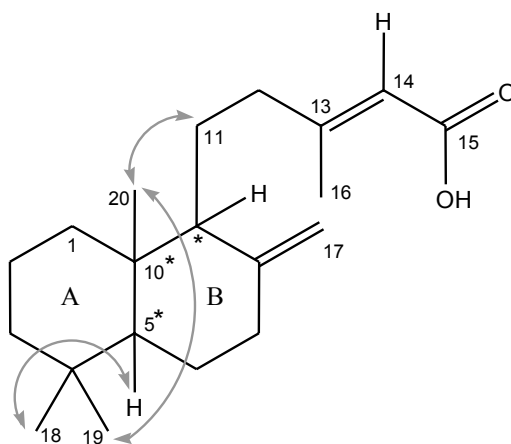


Figure 3.42 – Principales corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H (NOESY) du composé **F**. Les carbones asymétriques sont mis en évidence par un astérisque.

Concernant la chaîne 4-carboxyl-3-ène-3-méthylbutyle, l'absence d'une corrélation spatiale ^1H - ^1H entre H-14 (δ_{H} 5.67 ppm) et 3H-16 (δ_{H} 2.16 ppm) suggère que la double liaison a une configuration *E*. Les protons méthyliques 3H-18 (δ_{H} 0.80 ppm) corrélient avec les protons méthyliques 3H-20 (δ_{H} 0.68 ppm), impliquant alors que ces deux substituants sont *cis*. Posons arbitrairement ces deux substituants comme étant α ; ils sont par conséquent axiaux. Le groupement méthyle CH_3 -19 étant porté, tout comme CH_3 -18, par le carbone C-4, CH_3 -19 est alors β et équatorial. L'effet « *Nuclear Overhauser* » entre 3H-19 (δ_{H} 0.86 ppm) et H-5 (δ_{H} 1.08 ppm), d'une part, et l'absence de corrélation entre 3H-18 (δ_{H} 0.80 ppm) et H-5 (δ_{H} 1.08 ppm), d'autre part, indiquent que ce proton méthinique est axial et β , et donc que la jonction entre les deux cycles est de nature *trans*. La corrélation entre H-20 (δ_{H} 0.68) et H-11 (δ_{H} 1.67 ppm) suggère que la chaîne est équatoriale et par conséquent α . Dès lors, la configuration relative de l'acide copalique est démontrée pour la première fois et son nom précis est acide 5-(2-méthylène-5,5,8a-triméthyl-(1*R*,4*aR*,8*aR*)-décahydronaphthalèn-1-yl)-3-méthyl-pent-2*E*-énoïque. Le cycle A de la décaline adopte une conformation chaise, tandis que le cycle B s'approche de la conformation d'une demi-chaise, du fait de la présence du groupement méthylénique.

La comparaison du pouvoir rotatoire du composé **F** ($[\alpha]_D^{23}$ -14.7 (c 1.7 ; CHCl₃)) avec celui du (-) acide copalique isolé de *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, également une Caesalpinioideae ($[\alpha]_D^{23}$ -15.3 (c 1.5 ; CHCl₃)) (Tincusi *et al.*, 2002), a permis d'affirmer que **F** est également le (-) acide copalique, appartenant donc à la série des *ent*-labdanes (Figure 3.43). Cette forme énantiomérique n'a été isolée que de deux autres espèces végétales : *Hymenaea courbaril* var. *altissima* (Ducke) Y.T.Lee & Langenh. (Caesalpinioideae) (Nakano et Djerassi, 1961) et *Cheilanthes argentea* (Gmel.) Kunze (Sinopteridaceae) (Wollenweber *et al.*, 1982). L'énantiomère (+) de l'acide copalique est plus fréquemment rencontré dans le règne végétal, et notamment dans plusieurs espèces appartenant au Caesalpinioideae : *Copaifera multijuga* Hayne, *C. guianensis* Desf., *C. duckei* Dwyer, *C. cearensis* Huber ex Ducke, (Cascon et Gilbert, 2000; Pinto *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2002; Barreto *et al.*, 2005).

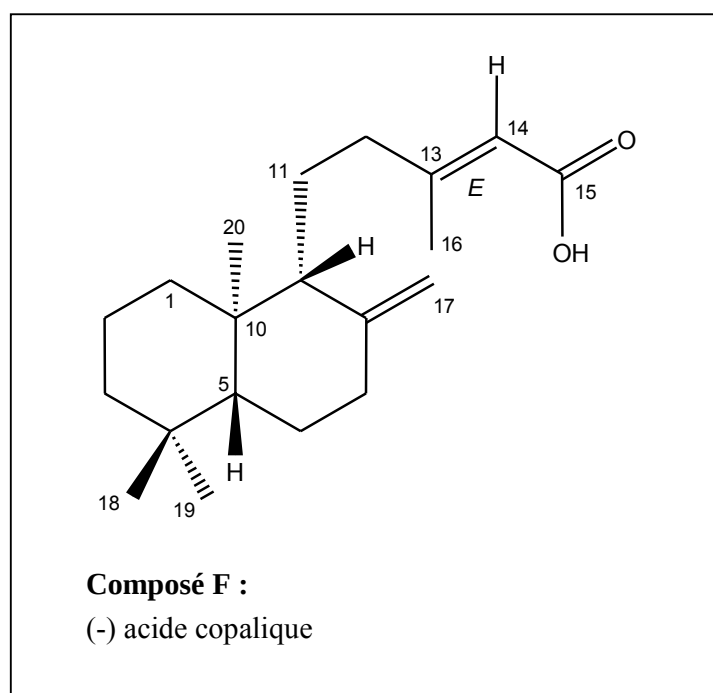


Figure 3.43 – Structure du composé **F**.

3.4.2.8 Configuration absolue des composés A - F

Seule la configuration absolue du composé **F** a pu être déterminée, par la mesure de son pouvoir rotatoire et comparaison avec la littérature. Les configurations absolues des nouveaux *cis*-clérodanes **A**, **B**, **D** et **E**, et du *trans*-clérodane **C** n'ont pas pu être déterminées, par manque de données sur l'activité optique de cette classe de composés. Une autre approche que l'activité optique, fréquemment utilisée en Phytochimie pour déterminer la configuration absolue de composés, consiste à greffer un substituant chiral de configuration absolue connue. Une méthode souvent employée est l'estérification de Mosher qui consiste à greffer successivement les cations énantiomériques (*R*) et (*S*)-(+)- α -méthoxy- α -(trifluorométhyl)-phénylacétyl (MTPA) sur un groupement électro-donneur tel qu'un groupement hydroxyle (Guilet *et al.*, 2003). Cette méthode aurait pu être appliquée aux *cis*-clérodanes **D** et **E**. En effet, bien que comportant deux groupements hydroxyliques en C-3 et C-4, le 4-OH ne devrait pas réagir puisqu'il s'agit d'un groupement hydroxyle tertiaire. Dès lors, la configuration absolue du 3-OH aurait pu être déterminée, puis celle de la molécule entière par déduction. Cette méthode n'aurait par contre pas pu être appliquée aux *cis*-clérodanes **A** à **C** puisqu'ils ne comprennent aucun groupement hydroxyle sur la décaline. La chaîne étant labile, il n'est d'aucune utilité d'entreprendre une réaction chimique sur l'acide carboxylique présent à l'extrémité de la chaîne.

La configuration absolue choisie pour la représentation des *cis*-clérodanes **A** à **E** était *ent*, et cela pour deux raisons. Premièrement, le *trans*-labdane **F** isolé de la même plante provient de la série antipodale, ce qui permet de supposer, compte tenu de la biogenèse, que les composés **A** à **E** le sont également. En effet, au niveau du métabolisme secondaire d'une plante, celle-ci ne développe généralement pas toutes les voies biogénétiques possibles d'une classe de composés. Dès lors, dans une plante et même dans les espèces apparentées, des composés issus d'une même voie biogénétique, et donc d'une même série énantiomérique, sont généralement retrouvés. Deuxièmement, il a été constaté que la plupart des *cis*-clérodanes isolés de matériel végétal proviennent de cette série énantiomérique. Par conséquent, il est plus probable que les composés **A** à **E** isolés proviennent de la série antipodale *ent*.

Concernant le composé **C** déjà isolé des feuilles et de l'écorce de *D. microcarpum*, (Aquino *et al.*, 1992 ; Lajide *et al.*, 1995) son pouvoir rotatoire avait été déterminé et il s'avère être identique à celui mesuré dans ce travail : $[\alpha]_D^{23}(\mathbf{C})$ -56.5 (c 0.7 ; CHCl₃), $[\alpha]_D$ (Lajide *et al.*, 1995) -54 (c 1.0 ; CHCl₃) et $[\alpha]_D^{21}$ (Hasan *et al.*, 1982) -56.5 (c 0.52 ; CHCl₃). Ainsi, ils proviennent donc de la même série énantiomérique, fait peu surprenant puisqu'ils sont issus de la même plante. La configuration absolue n'a cependant pas pu être certifiée comme étant *ent*.

3.4.3 Activités biologiques et biochimiques des composés A - F

Les diterpènes **A** à **F** ont été soumis aux mêmes tests d'activités que ceux effectués sur les extraits, c'est-à-dire antifongiques sur *Cladosporium cucumerinum* et *Candida albicans*, antibactérien sur *Bacillus subtilis*, antiradicalaire sur DPPH et inhibiteur de l'acétylcholinestérase (conditions expérimentales cf. 5.5.3 à 5.5.7, respectivement). Les seules activités inhibitrices significatives des composés purs isolés ont été observées sur les souches de *C. cucumerinum* et *B. subtilis*, et l'enzyme acétylcholinestérase (Tableau 3.6).

Tableau 3.6 – Activités inhibitrices des composés **A** à **F** sur *C. cucumerinum*, *B. subtilis* et l'acétylcholinestérase

Composé	<i>Cladosporium cucumerinum</i> ^a	<i>Bacillus subtilis</i> ^a	acétylcholinestérase ^a
A	10	100	10
B	100	> 100	0.1
C	> 100	> 100	1
D	> 100	> 100	> 10
E	10	100	10
F	> 100	100	> 10
miconazole ^b	1		
galanthamine ^b			0.01
chloramphénicol ^b		10	

^a Quantité minimale inhibitrice [µg] évaluée sur CCM. Conditions expérimentales cf. 5.5.3, 5.5.5 et 5.5.7

^b Composés de référence

Le composé **B** inhibe faiblement la croissance du champignon *C. cucumerinum*, tandis que les composés **A** et **E** ont montré une plus forte activité inhibitrice à 10 µg. Cependant, comparativement au témoin miconazole, ces deux cléro-danes ne peuvent pas être considérés comme très prometteurs. Concernant l'activité antibactérienne sur *B. subtilis*, seuls les composés **A**, **E** et **F** ont montré une faible activité. Pour le composé **F**, cette activité avait déjà été reportée par Tincusi *et al.* (2002). Des activités plus intéressantes ont été constatées avec l'acétylcholinestérase. En effet, une inhibition de l'enzyme a été observée pour les composés **A** et **E** à 10 µg, et à 1 µg pour le composé **C**. Le diastéréomère de ce dernier, le composé **B**, a montré une inhibition de cette enzyme à 0.1 µg. Les tests sur plaque effectués étant semi-quantitatifs, nous avons procédé à un test en solution (cf. 5.5.8) pour évaluer le pourcentage d'inhibition de l'enzyme par le composé **B** à 10⁻⁵ M. Une inhibition de l'enzyme à 71 % a pu être observée. Par comparaison, la galanthamine à 10⁻⁵ M, utilisée comme témoin positif, inhibe

l'enzyme à 97 % (Bruehlmann *et al.*, 2004). Ainsi, le composé **B** présente en solution une activité inhibitrice de l'enzyme acétylcholinestérase considérée comme moyenne.

Il est intéressant de constater que les deux couples de diastéréomères **B**, **C** et **D**, **E** ne présentent pas les mêmes activités biologiques et biochimiques.

Il avait été mentionné dans le chapitre 2.4.3.2, que les clérodanes et les labdanes ne possèdent à l'heure actuelle aucune propriété thérapeutique, mais que de nombreuses activités biologiques leurs sont reconnues : « *insect anti-feedant* », anti-bactérienne, antifongique, antiparasitaire, « anti-leishmaniose ». D'autres propriétés (cytotoxiques, anti-inflammatoires, hypoglycémiantes, etc..) avaient également été reportées pour cette classe de composés. En ce qui concerne plus particulièrement le composé connu **C**, Salah *et al.* (2003) avaient reporté qu'il inhibait la croissance de nombreux champignons. Dans notre évaluation, il s'est révélé être inactif sur *C. cucumerinum*. Sa légère inhibition de l'acétylcholinestérase est mise en évidence pour la première fois dans ce travail.

Parmi les nouveaux clérodanes que nous avons isolés de *D. microcarpum*, tous montrent une inhibition faible à moyenne de *C. cucumerinum*, *B. subtilis* et de l'acétylcholinestérase, confirmant la potentialité thérapeutique de cette classe de composés.

3.5 Comparaison de la composition chimique des fruits de *D. microcarpum* Guill. et Perr. et des fruits comestibles et toxiques de *Detarium senegalense* J.F. Gmel.

Le but de cette comparaison étant de pouvoir identifier le ou les composés responsables de la toxicité du fruit toxique de *D. senegalense*, notre travail s'est principalement focalisé sur les deux formes de fruits de ce dernier. Idéalement, une telle recherche est menée en effectuant un fractionnement bioguidé. Dans notre cas, il s'agirait donc de trouver un test permettant de mettre en évidence la toxicité du fruit chez l'Homme. Or, il a été relevé à plusieurs reprises dans la littérature, que les symptômes d'intoxication sont dépourvus de spécificité, et variables d'un individu à l'autre. Pour rappel, les principaux symptômes sont des vomissements, douleurs abdominales, troubles de la conscience pouvant aller jusqu'au coma, tachycardie, hypothermie, hypotension et des problèmes respiratoires. Touchant tous les systèmes vitaux du corps humains, il est dès lors très difficile de trouver une cible *in vitro*, le sens éthique (et la loi) ne nous permettant pas d'effectuer un fractionnement bioguidé du fruit toxique *via* un test sur des animaux. De plus, il a été relevé à plusieurs reprises dans la littérature, que la gravité de l'intoxication n'était pas proportionnelle aux nombres de fruits ingérés (*cf.* chapitre 2.5.3). Dès lors, le ou les composés toxiques sont-ils en quantités variables dans les fruits ? Seraient-ils variables selon les régions de cueillette, ou selon le degré de maturation du fruit ? Certains patients présentent-ils une quelconque « immunité » vis-à-vis de cette toxicité ? Tous ces paramètres ne rendent pas aisée la détermination du ou des composés responsables de la toxicité. Rappelons également que seules deux investigations phytochimiques ont été menées à ce jour (Paris et Moyse-Mignon, 1947; D'Almeida, 1984). Seuls Paris et Moyse-Mignon (1947) ont pu prouver la toxicité d'un composé isolé par le biais de tests sur les animaux. Quant à D'Almeida, il a isolé du fruit un composé qu'il supposait toxique, mais sans avoir pu le prouver. Dans les deux cas, le composé n'a pu être identifié, et les quelques données physico-chimiques mesurées indiquent que les deux composés isolés sont différents (*cf.* chapitre 2.5.4.2).

Compte tenu de l'absence de test à notre disposition, nous avons donc recherché le composé toxique à l'aide de techniques analytiques uniquement, c'est-à-dire en comparant les extraits de fruits, en espérant mettre en évidence un composé présent dans le fruit toxique et absent du fruit comestible. Bien entendu, cette approche « à l'aveugle » est quelque peu présomptueuse, dans la

mesure où, comme mentionné précédemment, il se peut que non seulement un, mais plusieurs composés soient toxiques. Nous avons dû également envisager que le ou les composés soient minoritaires dans l'extrait, mais extrêmement puissants. Dans un premier temps, une comparaison des extraits DCM et MeOH sans sucre (MeOH s.s.) des fruits de *D. microcarpum* et des fruits comestibles et toxiques de *D. senegalense* a été effectuée par CCM (Figure 3.44).

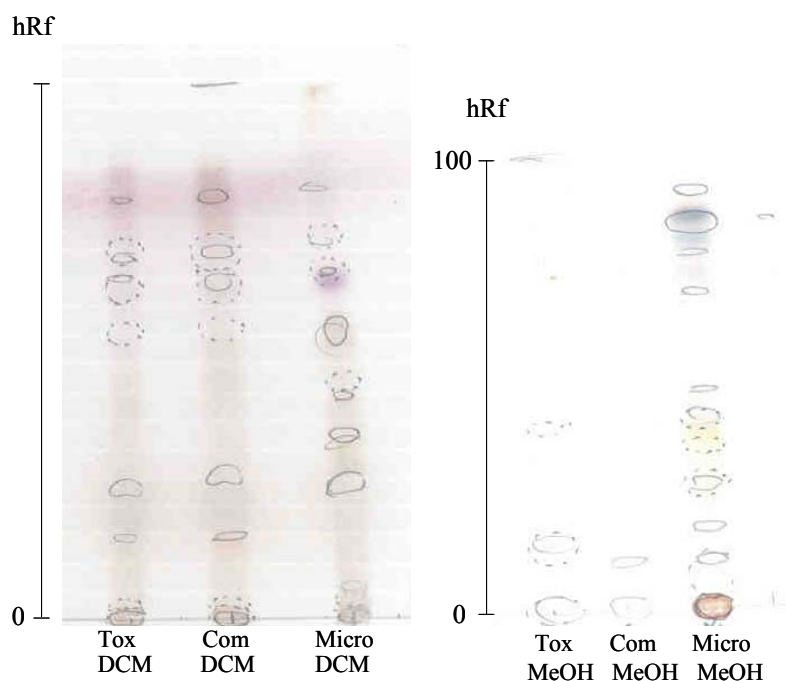


Figure 3.44 – Chromatographie sur couche mince des extraits DCM et MeOH s.s. des fruits toxiques et comestibles de *D. senegalense* et des fruits de *D. microcarpum*

Echantillons : 100 µg d'extrait DCM ou MeOH s.s. ; Tox : *D. senegalense* forme toxique, Com : *D. senegalense* forme comestible, Micro : *D. microcarpum*

Support : Silicagel 60 F₂₅₄ Merck ; Phase mobile : AcOEt-hexane 1:1 pour les extraits DCM, et CHCl₃-MeOH-H₂O 65:35:5 pour les extraits MeOH s.s.

Détection : ○ extinction de fluorescence à 254 nm ; ◌ fluorescence à 366 nm ; coloration au réactif de Godin (conditions expérimentales décrites sous 5.5.1)

Les extraits DCM des deux formes de fruits de *D. senegalense* possèdent le même profil sur CCM. Quant à l'extrait DCM de *D. microcarpum*, il diffère par quelques composés supplémentaires. Les extraits MeOH s.s. des formes comestibles et toxiques de *D. senegalense* semblent contenir peu de composés, comparativement à celui de *D. microcarpum*. Bien entendu, ces analyses ne sont que préliminaires, et la comparaison de ces extraits par UPLC[®]/ESI/TOF-MS permettra d'obtenir plus d'informations sur leur composition.

3.5.1 Comparaison des extraits apolaires et polaires des fruits de *D. microcarpum* et des deux formes de fruits de *D. senegalense* par UPLC®/ESI/TOF-MS et HPLC/DAD-UV

Les extraits DCM et MeOH s.s. des fruits de *D. microcarpum*, et des formes comestibles et toxiques des fruits de *D. senegalense* ont été analysés dans un premier temps par UPLC®/ESI/TOF-MS en mode négatif. Les chromatogrammes des trois extraits DCM sont présentés à la Figure 3.45, tandis que ceux des extraits MeOH s.s. le sont à la Figure 3.46 (conditions expérimentales décrites sous 5.2.3). Relevons la qualité extraordinaire de la séparation et de la résolution des pics par l'UPLC® : un temps d'analyse de 7.0 minutes suffit pour permettre la visualisation des pics majoritaires.

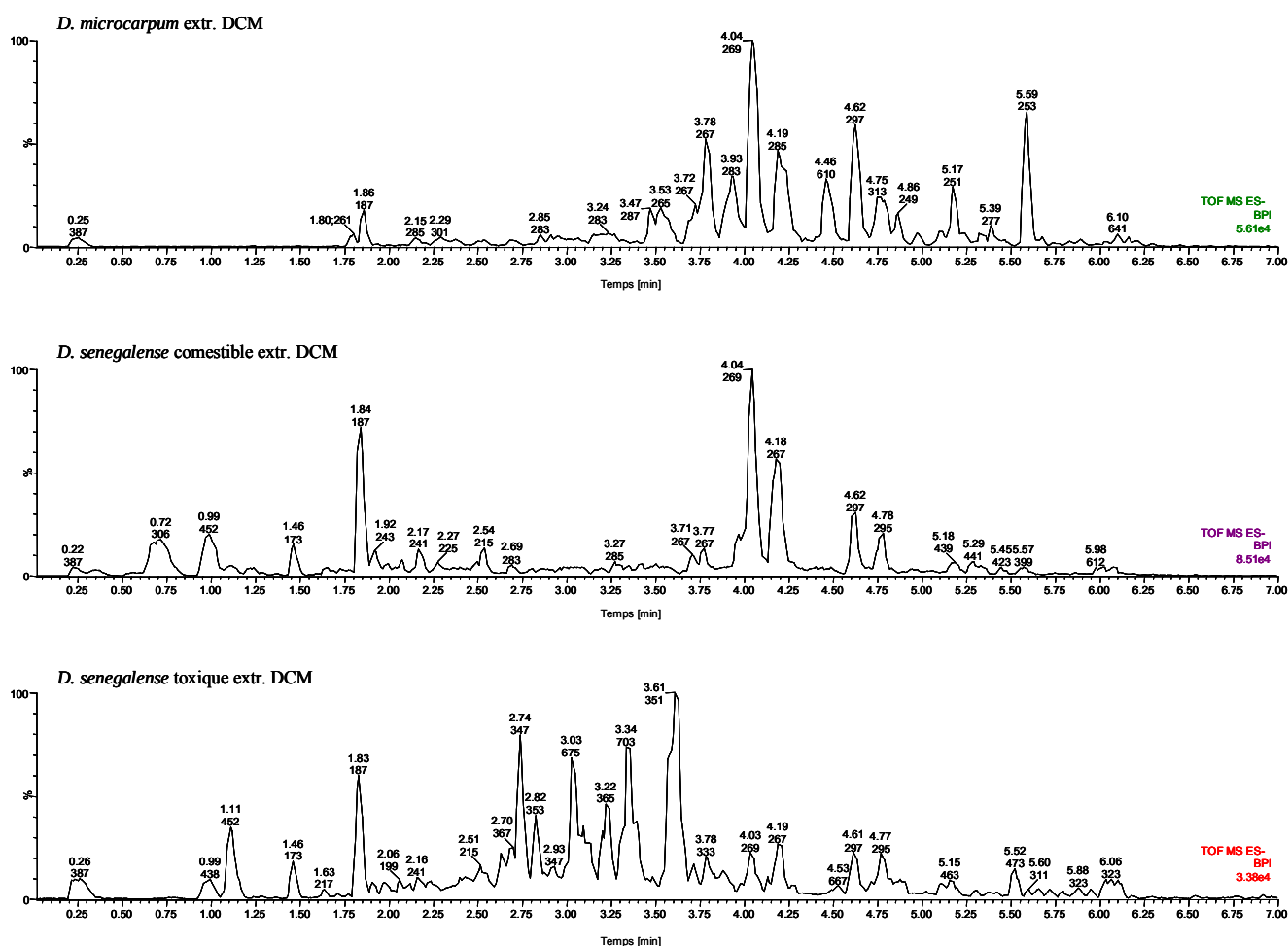


Figure 3.45 - Chromatogramme et intensité du pic de base (BPI) des extraits DCM de *D. microcarpum* et des deux formes de fruits de *D. senegalense*.

Colonne Acquity UPLC® BEH C18 (50.0 x 1.0 mm d.i., 1.7 μ m) ; température 35 °C ; gradient CH₃CN-H₂O + 0.1 % ac. formique 5:95 → 98:2 en 7.0 min ; débit 0.3 mL/min ; interface ESI, mode négatif ; voltage du cône 40 V (cf. 5.2.3).

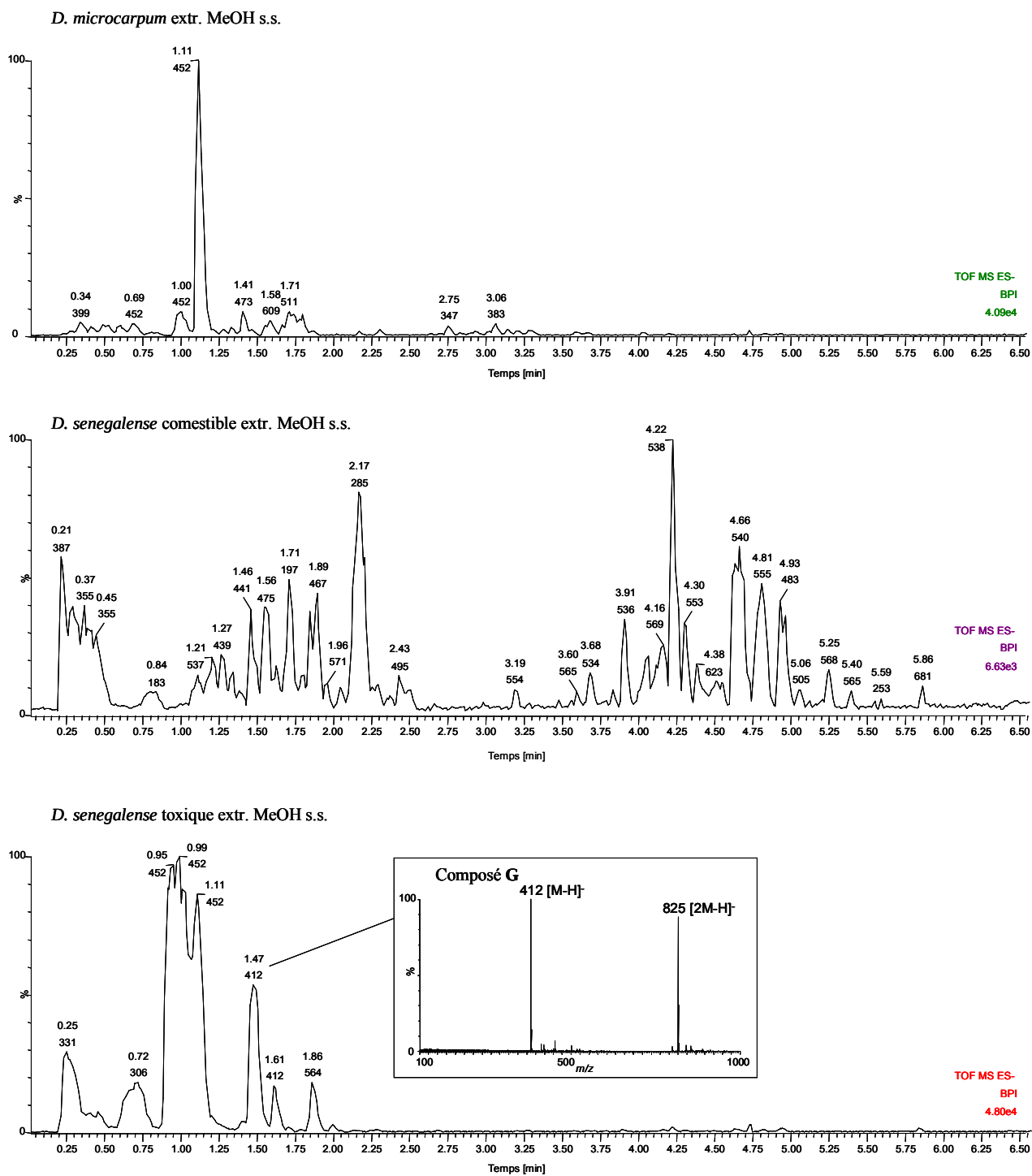


Figure 3.46 – Chromatogramme et intensité du pic de base (BPI) des extraits MeOH s.s. des deux formes de fruits de *D. senegalense* et de *D. microcarpum*.

Colonne Acquity UPLC[®] BEH C18 (50.0 x 1.0 mm d.i., 1.7 μ m) ; température 35 °C ; gradient CH₃CN-H₂O + 0.1 % ac. formique 5:95 $\rightarrow$ 98:2 en 7.0 min ; débit 0.3 mL/min ; interface ESI, mode négatif ; voltage du cône 40 V (cf. 5.2.3).

Les trois extraits DCM présentent quelques pics chromatographiques paraissant être identiques. Notons cependant que les données de temps de rétention et de masse moléculaire de deux pics ne sont pas suffisantes pour affirmer que ce sont les mêmes composés. La similitude entre les profils chromatographiques des trois extraits est tout de même assez modeste. Cela n'est pas étonnant en ce qui concerne *D. microcarpum* et *D. senegalense*, espèces différentes. Dans le cas des formes comestibles et toxiques de *D. senegalense*, par contre, s'agissant de la même espèce, il aurait été peu surprenant de retrouver plus d'analogies. Le chromatogramme de la forme toxique comporte 5 pics majoritaires absents de celui de la forme comestible, caractérisés par leur temps de rétention (t_R) et leur rapport m/z : t_R 2.74, m/z 347 ; t_R 3.03, m/z 675 ; t_R 3.22, m/z 365 ; t_R 3.34, m/z 703 ; t_R 3.61, m/z 351. Les composés A à F isolés de l'extrait DCM de *D. microcarpum* semblent absents des deux autres extraits.

En ce qui concerne les extraits MeOH s.s. des trois fruits, nous constatons en premier lieu que celui de *D. senegalense* forme comestible est nettement plus riche en composés apolaires. Cela est probablement dû à l'extraction au DCM (précédant celle au MeOH, cf. 5.1.2) qui fut incomplète, ces composés apolaires ayant été alors dans un second temps extraits par le méthanol. Comparativement aux extraits DCM dont nous avons parlé précédemment, qui présentaient tout de même quelques similitudes, les extraits MeOH s.s. sont très différents. En effet, aucun pic chromatographique de la forme comestible de *D. senegalense* n'est retrouvé dans les deux autres extraits. En ce qui concerne *D. microcarpum*, deux pics présentant un rapport m/z de 452 (t_R 1.00 et 1.11 min), dont le pic majoritaire, sont retrouvés dans la forme toxique de *D. senegalense*. Ce dernier comporte de surcroît un ion de même rapport m/z à 452 (un autre isomère ?) à t_R 0.95 min. Rappelons que le but du présent travail est de rechercher un ou des composés présents dans la forme toxique et absents des deux autres fruits. Dans cette optique-là, cinq pics majoritaires ont été remarqués : t_R 0.25, m/z 331 ; t_R 0.72, m/z 306 ; t_R 1.47, m/z 412 ; t_R 1.61, m/z 412 et t_R 1.86, m/z 564. Relevons que ces quatre derniers composés possèdent un rapport m/z pair, impliquant donc une masse moléculaire impaire. Cela suggère alors la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote, fait intéressant lorsqu'un composé toxique est recherché. En effet, les alcaloïdes ou les glycosides cyanogénétiques par exemple, comportent un ou plusieurs atomes d'azote et sont connus pour leur toxicité. De plus, rappelons que Paris et Moyse-Mignon (1947) avaient mis en évidence la présence d'alcaloïdes en trace dans les fruits de *D. senegalense* forme toxique, et que Berthelot *et al.* (2000) avaient relevé que les symptômes d'une intoxication due à ce fruit étaient similaires à ceux observés lors d'une intoxication au cyanure.

Compte tenu de la présence de composés présentant une masse moléculaire impaire dans l'extrait MeOH s.s. du fruit toxique, c'est cet extrait qu'il a été choisi d'investiguer, plutôt que l'extrait DCM.

Les extraits MeOH s.s. des formes toxiques et comestibles de *D. senegalense* ont été également comparés par HPLC/DAD-UV, ce mode de détection permettant ainsi d'acquérir des informations qualitatives supplémentaires sur la composition des extraits. De plus, dans notre Laboratoire, le suivi de l'isolement se fait généralement par cette technique, lorsque les informations obtenues par CCM sont insuffisantes. Ainsi, les chromatogrammes des extraits MeOH s.s. des formes comestibles et toxiques des fruits de *D. senegalense* sont présentés à la Figure 3.47.

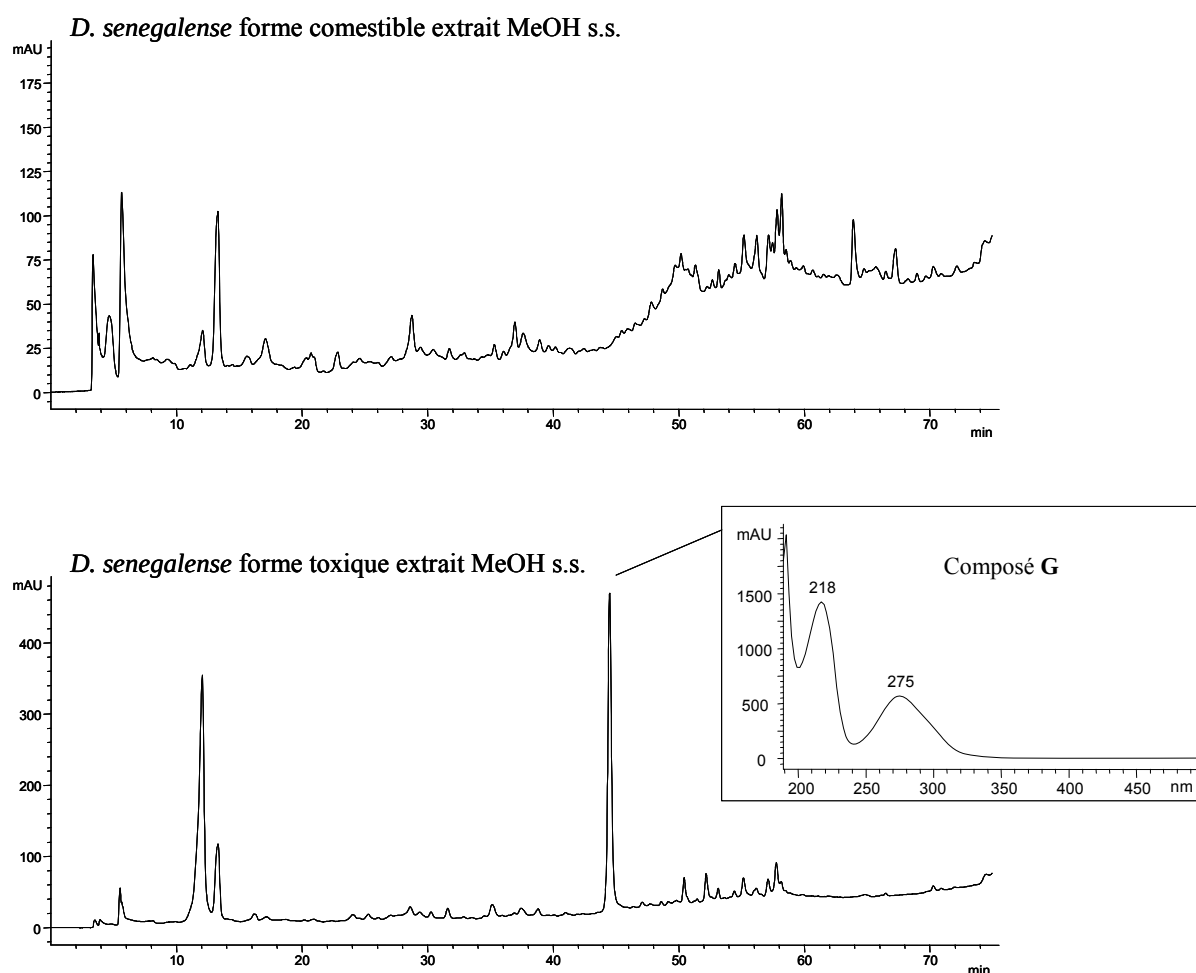


Figure 3.47 – Chromatogrammes HPLC/DAD-UV à 210 nm des extraits MeOH s.s. des formes comestibles et toxiques de *D. senegalense* et spectre UV on-line du composé **G**.

Colonne SymmetryShield® C18 (150 x 2.1 mm d.i., 5 µm) (Waters Co., Milford, MA, USA) ; gradient CH₃CN-H₂O 0:100 → 30:70 en 40 min, puis 30:70 → 80:20 en 30 min, puis 80:20 → 100:0 en 5 min. Conditions expérimentales cf. 5.2.2

Avec ce mode de détection UV-Vis, trois pics majoritaires sont observés dans l'extrait de la forme toxique. Les deux premiers pics (t_R 12.0 et 13.3 min) semblent également faire partie de l'extrait de la forme comestible. Le spectre UV du pic à t_R 13.3 min est identique dans les deux extraits (λ_{max} 220 nm), par contre, pour le composé à t_R 12.0 min, son spectre UV présente un maximum d'absorption à λ_{max} 220 nm dans le cas de l'extrait comestible, et des maxima à λ_{max} 218 et 278 nm dans le cas de l'extrait du fruit toxique. Concernant le troisième pic majoritaire de l'extrait du fruit toxique (composé **G**), il est totalement absent de l'extrait comestible, et son spectre UV présente des maxima d'absorption à λ_{max} 218 et 275 nm (Figure 3.47). Il a été choisi d'isoler ce composé, car en plus d'être absent de l'extrait de la forme comestible, il possède une masse moléculaire impaire, et est majoritaire avec les deux modes de détection employés. La détection de ce composé par DAD-UV facilitera le suivi de son isolement.

3.6 Fractionnement de l'extrait MeOH s.s. de *D. senegalense* forme toxique et isolement du composé G

Le composé **G** présente une masse moléculaire impaire, et est de surcroît majoritaire par détection UV et MS dans l'extrait. De plus, il semble pouvoir être isolé facilement. En effet, une seule étape a été nécessaire (Figure 3.48).

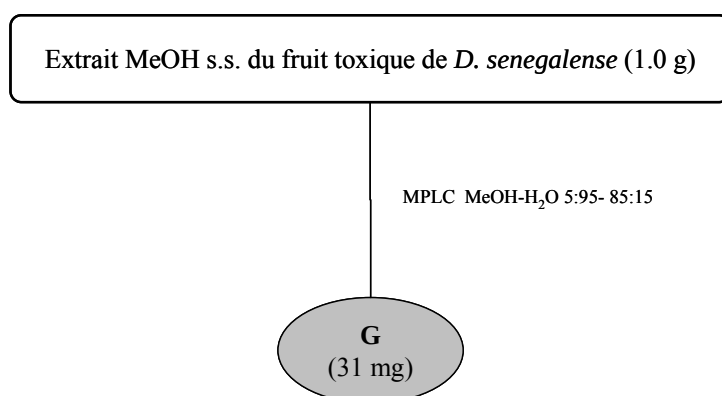


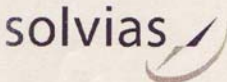
Figure 3.48 – Schéma d'isolement du composé **G** de l'extrait MeOH s.s. du fruit toxique de *D. senegalense*

1.0 g de l'extrait MeOH s.s. du fruit toxique de *D. senegalense* a été fractionné par MPLC (conditions expérimentales cf. 5.3.4), utilisant comme phase mobile un gradient MeOH-H₂O 5:95 à 85:15. Cette séparation, suivie par détection UV à 210 nm, a permis d'obtenir 3 fractions dont une de 30 mL contenant le composé **G** pur. Sa pureté a été vérifiée par HPLC (conditions expérimentales cf. 5.2.2).

3.6.1 Détermination structurale du composé G

Le composé **G** se présente sous forme d'une poudre jaune amorphe. Son spectre UV montre la présence de deux maxima d'absorption à 218 et 275 nm (Figure 3.47). Compte tenu de sa masse moléculaire impaire détectée par ESI/TOF-MS (Figure 3.46), il semblerait qu'il comporte un nombre impair d'atome(s) d'azote. Une analyse élémentaire a alors été effectuée (Figure 3.49), et a confirmé la présence d'un atome d'azote. Cependant, la masse moléculaire proposée par cette analyse diffère de celle obtenue par ESI/TOF-MS de 36 g/mole. En effet,

l'analyse élémentaire affirme que la formule brute est $C_{18}H_{27}NO_{12}$ (PM 449.41 g/mole), alors que notre analyse par ESI/TOF-MS indique un ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 412 en mode négatif. Compte tenu des conditions d'ionisation employées extrêmement douces, (voltage du cône 40V ; conditions expérimentales cf. 5.2.3), nous supposons qu'aucune fragmentation n'a eu lieu lors de cette analyse. Une seconde analyse HRESI-MS a alors été effectuée (Figure 3.50), et a révélé la présence d'un ion pseudo-moléculaire à m/z 436.11864 $[M+Na]^+$, corroborant les résultats obtenus par ESI/TOF-MS. La formule brute proposée pour l'ion pseudo-moléculaire obtenu par HRESI-MS, et qui est en accord avec le nombre de carbones et de protons observés en RMN, est $C_{18}H_{23}NO_{10}$. En effet, la masse calculée pour l'ion pseudo-moléculaire observé $[M+Na]^+$ est m/z 436.12197 (masse observée m/z 436.11864). Ainsi, le résultat de l'analyse élémentaire suggérant une formule brute de $C_{18}H_{27}NO_{12}$, diffère de deux molécules d'eau. La seule explication possible est que le composé **G** ait été incomplètement séché avant son analyse.



Solvias AG
 Analytics Rosental
 WRO-1055 3 28
 Mattenstrasse 22
 Postfach
 CH-4002 Basel
 Switzerland

Analytical Report

Solvias Order No.	06-00537
Customer	Université de Genève, Ecole de Pharmacie Genève-Lausanne, Anne-Laure Cavin, Genève 4
Order Date	25.01.2006
Quality Standard	ISO 9001
Archive	SOLVIAS
Test finished	26.01.2006

Product	Tx-C1
Solvias Sample No.	49'571 (06-00537-001)
Reference Material	-
Sum Formula	C18.H27.N.O12, MW: 449.41

Test	Method / Instruction	Specification/Theory	Result	Finding
C	A_31_031_01	48.11 +/- 0.3 % m/m	43.44 % m/m	
C	A_31_031_01	48.11 +/- 0.3 % m/m	43.59 % m/m	
H	A_31_031_01	6.06 +/- 0.3 % m/m	8.79 % m/m	
H	A_31_031_01	6.06 +/- 0.3 % m/m	9.11 % m/m	
N	A_31_031_01	3.12 +/- 0.3 % m/m	1.95 % m/m	
N	A_31_031_01	3.12 +/- 0.3 % m/m	1.86 % m/m	
O	A_31_018_01	42.72 +/- 0.3 % m/m	33.09 % m/m	
O	A_31_018_01	42.72 +/- 0.3 % m/m	33.05 % m/m	

(C: compliant, NC: non-compliant)

Issued by	Dr. Eberhard König	26.01.2006
------------------	--------------------	------------

This Analytical Report was compiled by a validated laboratory information system and comes therefore without genuine signatures. The approval was done in the laboratory information system by means of traceable electronic signatures.

Figure 3.49 – Rapport d’analyse élémentaire du composé **G**.

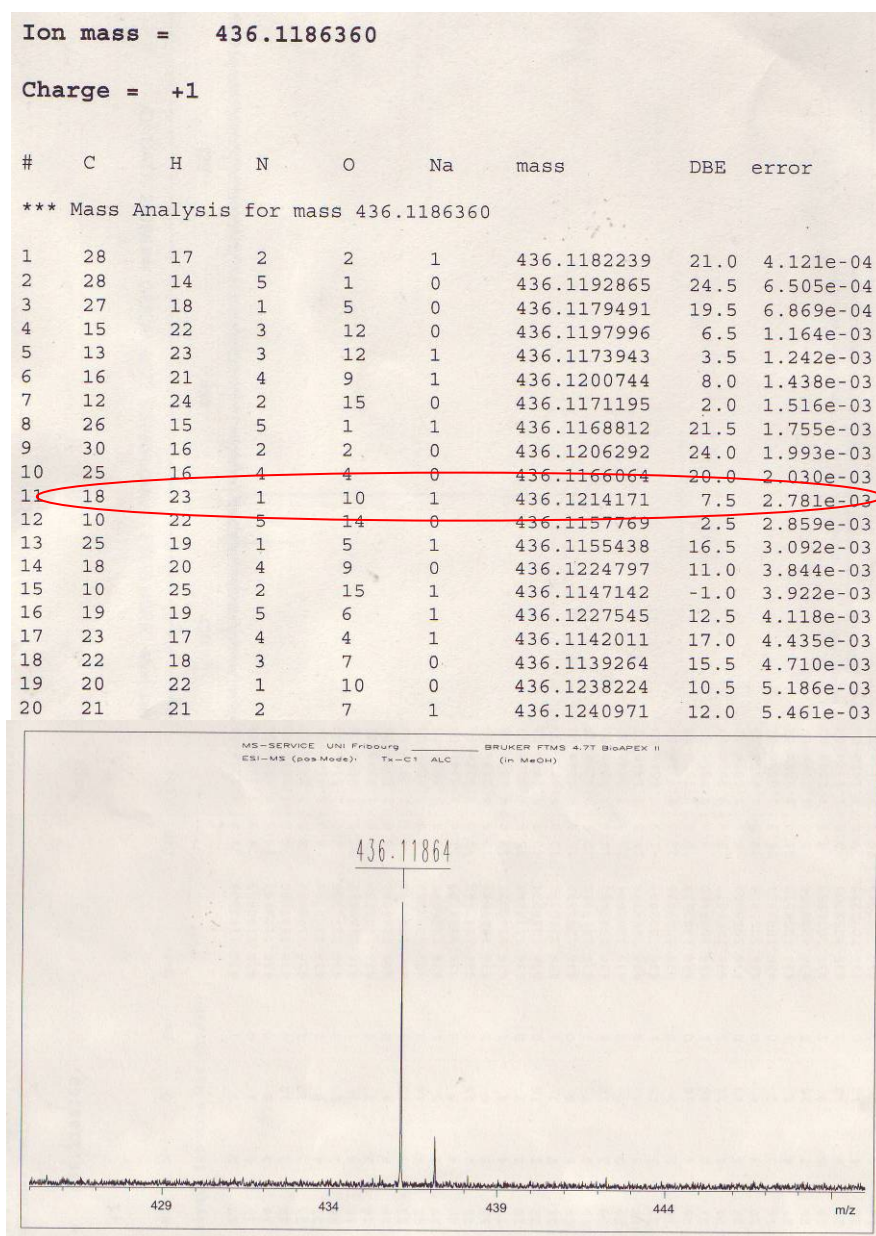


Figure 3.50 – Rapport d'analyse HRESI-MS du composé **G**. Les formules brutes sont données dans l'ordre décroissant d'exactitude.

La formule brute $C_{18}H_{23}NO_{10}$ indique la présence de 8 insaturations et/ou cycles. Analysons les spectres RMN 1H et ^{13}C de ce composé (Figures 3.53 et 3.54, respectivement).

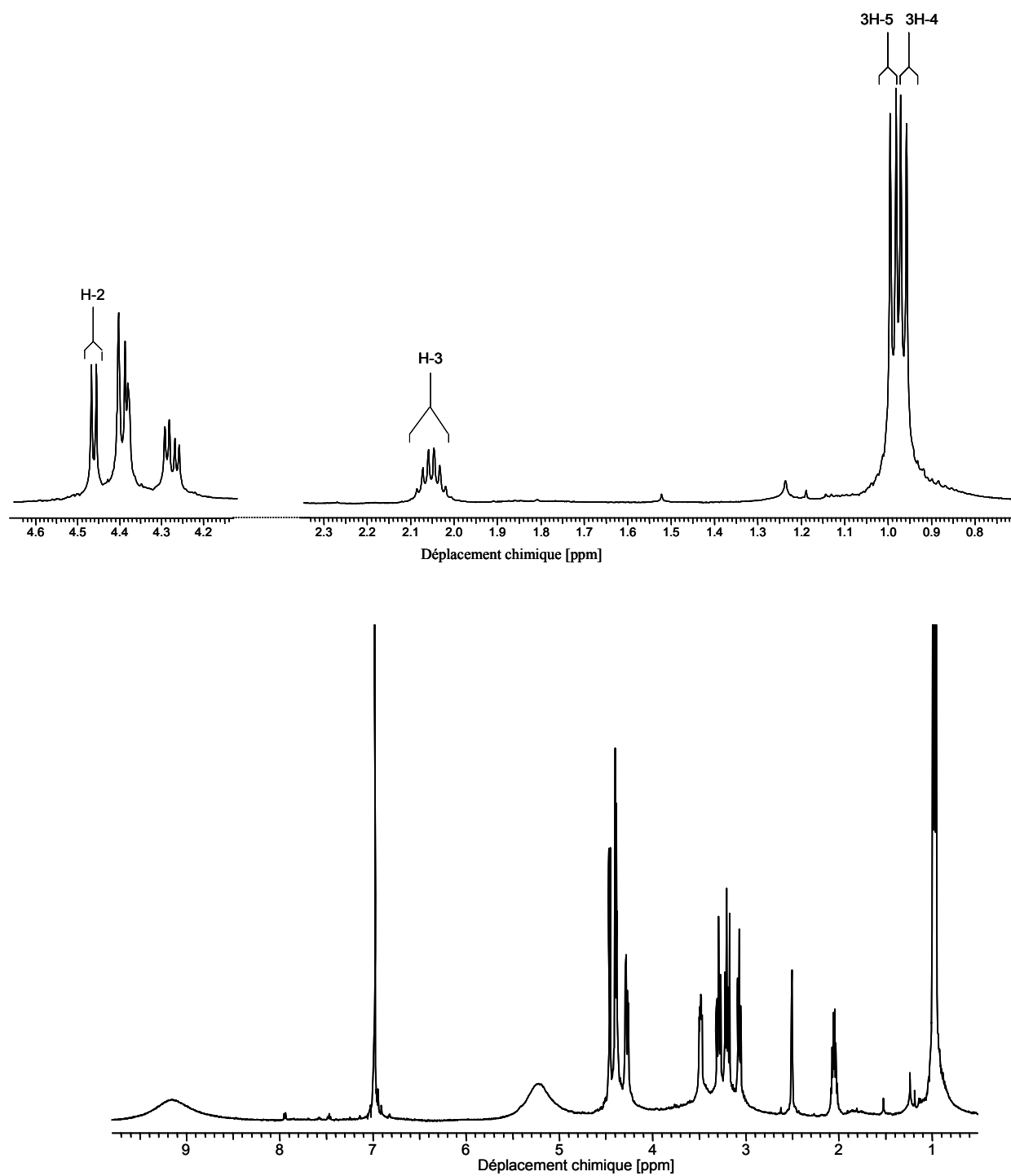


Figure 3.51 – Spectre RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé **G** et détails.

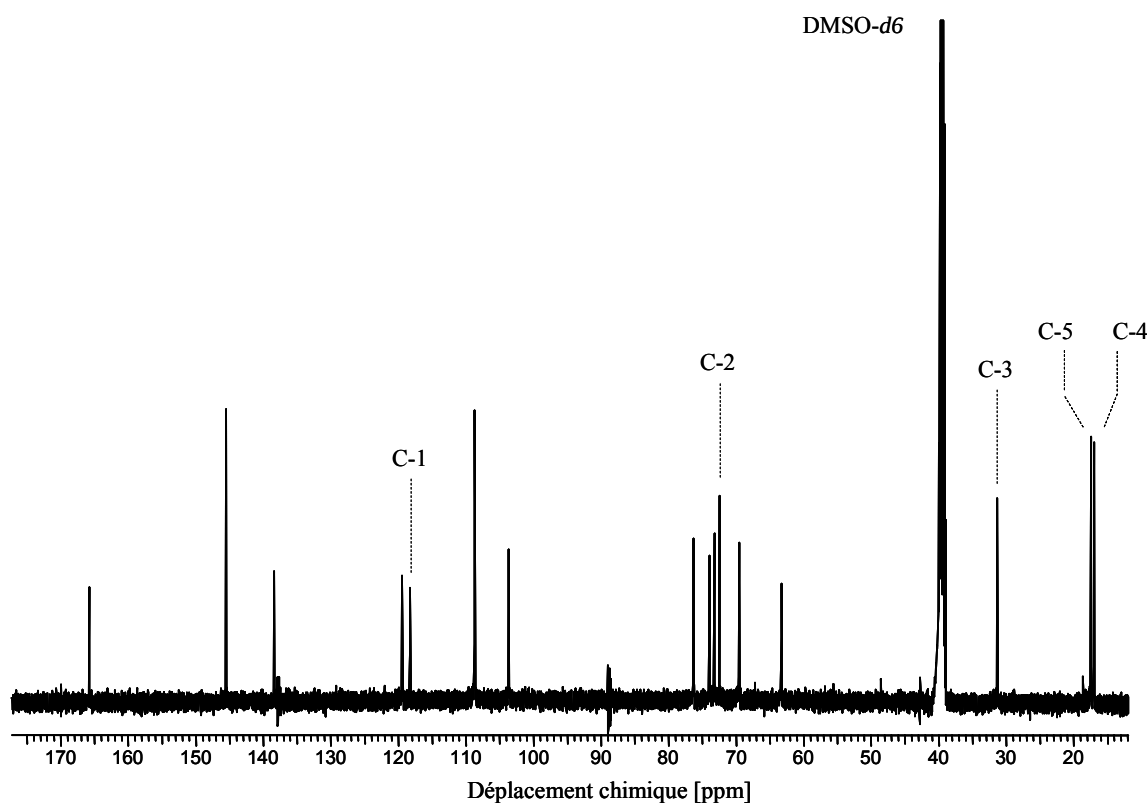


Figure 3.52 – Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) du composé **G**.

Le spectre RMN ^{13}C indique la présence de 18 carbones. Ceux présentant des déplacements chimiques compris entre δ_{C} 63.3 et 76.3 ppm suggèrent fortement la présence d'un hexose. Les protons ayant des signaux compris entre δ_{H} 3.07 et 3.48 ppm confirment cette hypothèse. Le carbone anomérique C-1' est observable à δ_{C} 103.7 ppm, tandis que le proton (H-1') qui lui est associé, possède un signal caractéristique à δ_{H} 4.39 ppm. Le spectre RMN ^{13}C montre de plus des signaux caractéristiques d'un cycle aromatique substitué en 3'', 4'' et 5'' par des groupements hydroxyliques : δ_{C} 119.5 ppm (C-1''), δ_{C} 108.7 ppm (C-2''/C-6''), δ_{C} 145.5 ppm (C-3''/C-5'') et δ_{C} 138.5 ppm (C-4''). Le carbone carbonyle (C-7'') est observable à δ_{C} 165.8 ppm. Les analyses RMN 2D à courte et longue distance (gHSQC et gHMBC) effectuées, montrent la présence d'un groupement galloyl lié en 6' à l'hexose. La comparaison de nos valeurs avec celles de la littérature permet de confirmer cette hypothèse structurale (Isaza *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2006). Il reste ainsi 5 carbones, 8 protons et 1 atome d'azote à placer sur la structure, en vertu de la formule brute obtenue par HRESI-MS. Les analyses DEPT et gHSQC permettent d'identifier deux groupements méthyles : le carbone à δ_{C} 17.0 ppm porte les protons à δ_{H} 0.99 ppm (CH₃-5), et celui à δ_{C} 17.4 ppm porte ceux à δ_{H} 0.97 ppm (CH₃-4). Ces deux spectres permettent de plus l'identification de deux méthines : le

carbone à δ_C 31.3 ppm (C-3) porte le proton à δ_H 2.05 ppm (H-3), tandis que celui à δ_C 72.5 ppm (C-2) est lié au proton δ_H 4.47 ppm (H-2). La présence d'une corrélation gHMBC (Figure 3.53) entre les protons méthyliques 3H-5 (δ_H 0.99 ppm) et le carbone méthinique C-3 (δ_C 31.3 ppm), d'une part, et les corrélations observées sur le spectre gdcfCOSY entre le proton méthynique H-3 (δ_H 2.05 ppm) et les protons méthyliques 3H-5 et 3H-4 (δ_H 0.99 ppm et δ_H 0.97 ppm, respectivement), d'autre part, suggèrent que les deux groupements méthyles CH_3 -4 et CH_3 -5 sont portés par le carbone méthinique C-3. D'autres corrélations observées sur le spectre gHMBC ont permis de déduire la structure du composé **G** (Figure 3.53) : les corrélations entre les protons 3H-5 et le carbone C-2 (δ_C 72.5 ppm), et le proton H-3 (δ_H 2.05 ppm) avec C-2, suggèrent que ce dernier est lié à C-3. Cela est confirmé par les corrélations entre le proton H-2 (δ_H 4.47 ppm) et les carbones C-3, C-4 et C-5. Le carbone méthinique C-2 est lié à l'hexose par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique sur le carbone anomérique C-1', comme le suggèrent les corrélations entre H-2 et C-1' (δ_C 103.7 ppm), et H-1' (δ_H 4.39 ppm) et C-2. Sachant qu'il reste à placer un atome de carbone et un atome d'azote sur la molécule, l'étude de la littérature confirme l'hypothèse la plus probable de la présence d'un nitrile en C-2. En effet, le déplacement chimique de C-1 dans les champs faibles (δ_C 118.3 ppm) est en accord avec les données de la littérature (Lankhorst *et al.*, 1995; Lechtenberg *et al.*, 1996; Nakajima et Ubukata, 1998). Les corrélations gHMBC entre le proton H-2 (δ_H 4.47 ppm) et C-1, et H-3 (δ_H 2.05 ppm) et C-1 confirment la position du groupement nitrile. Ainsi, un groupement isovaléronitrile est fixé sur l'hexose en position 1' par une liaison O-glycosidique.

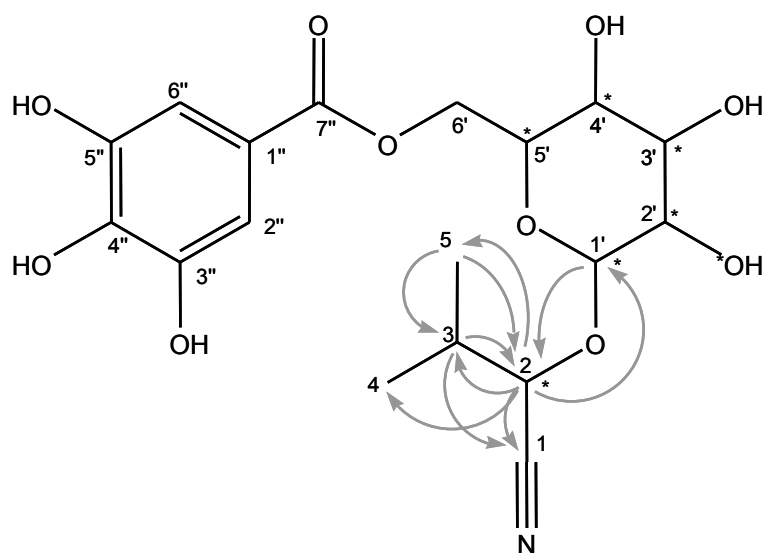


Figure 3.53 – Corrélations hétéronucléaires 1H - ^{13}C à longue distance (gHMBC) observées pour le groupement isovaléronitrile du composé **G**. Les carbones asymétriques sont mis en évidence par un astérisque.

La présence d'une fonction nitrile a été confirmée par spectrométrie Infra-Rouge (IR). Le spectre IR du composé **G** est présenté à la Figure 3.54.

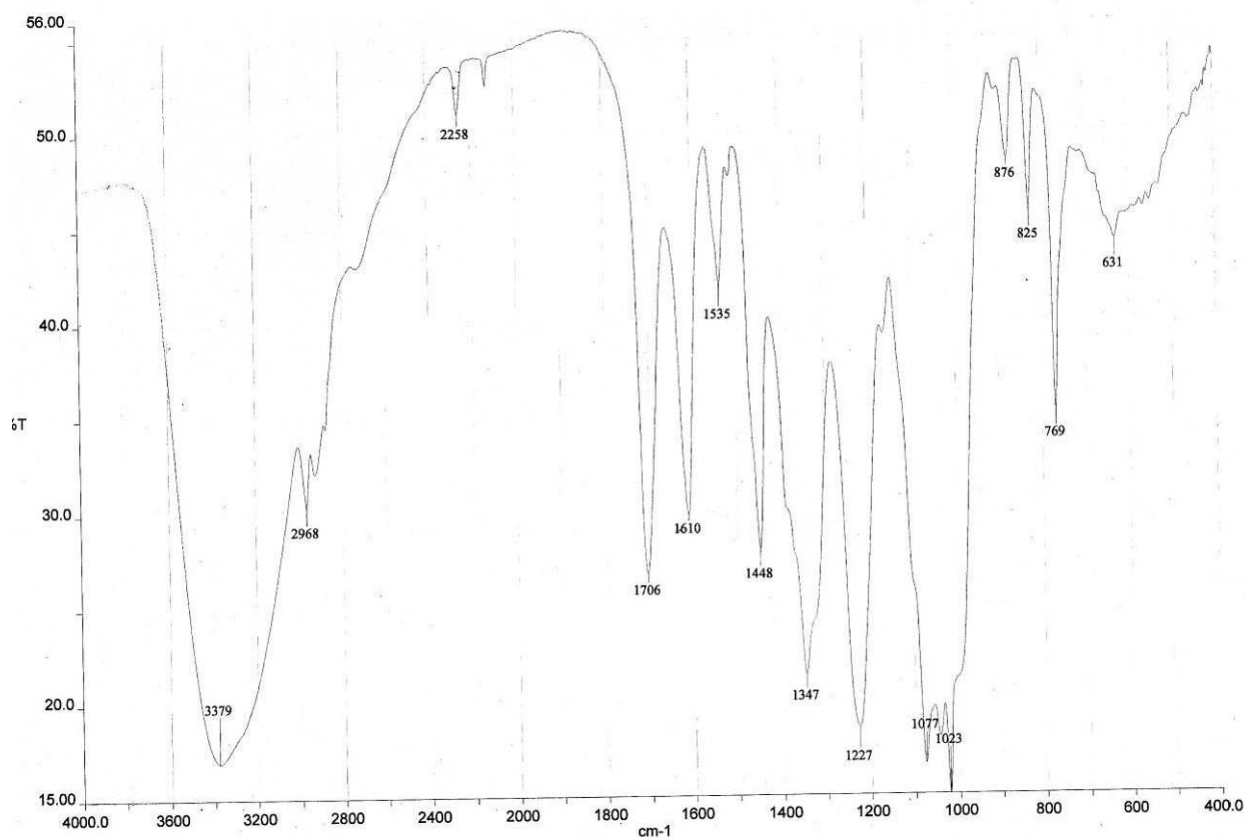


Figure 3.54 – Spectre IR du composé **G** (pastille de KBr ; 4 scans ; 2.0 cm⁻¹ ; 400-4000 cm⁻¹, conditions expérimentales cf. 5.4.4)

Le maximum d'absorption à 2258 cm⁻¹, en comparaison avec la littérature, confirme la présence d'une fonction nitrile dans le composé **G** (litt. 2225-2255 cm⁻¹) (Pourmohseni *et al.*, 1993; Silverstein *et al.*, 1998; Otsuka *et al.*, 2004). La bande d'absorption du nitrile est diminuée d'intensité, en raison du fait que le carbone (C-2) portant le nitrile est lié à un atome d'oxygène (Pourmohseni *et al.*, 1993). D'autres fonctions de ce composé ont pu être mises en évidence : les groupements hydroxyles : 3379 cm⁻¹, s (litt. 3300-3600 cm⁻¹, s) (Nakajima et Ubukata, 1998) ; la fonction ester : 1706 cm⁻¹, m (litt. 1704 cm⁻¹, m) (Otsuka *et al.*, 2004).

La libération d'acide cyanhydrique par ce composé a en outre été vérifiée par la formation de Bleu de Prusse (conditions opératoires cf. 5.5.2).

Lorsque l'isovaléronitrile est lié en 1' par une liaison β à du *D*-glucose, la molécule est nommée hétérodendrine ou épihétérodendrine, selon la configuration absolue *S* ou *R*, respectivement, de C-2 (Figure 3.55) (Jaroszewski, 1986; Lechtenberg *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 2002).

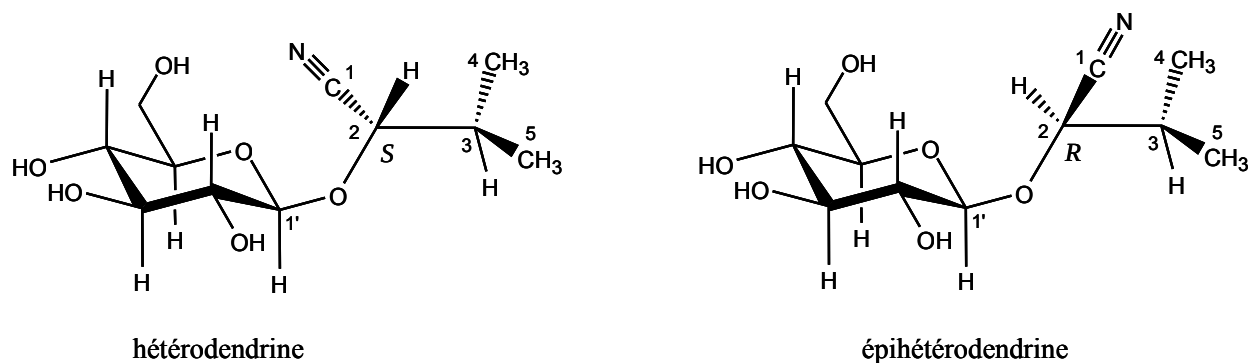


Figure 3.55 – Configuration absolue de l'hétérodendrine et de l'épihétérodendrine

Il a été mis en évidence que les déplacements chimiques ^1H et ^{13}C sont très similaires pour ces deux épimères, à l'exception du carbone asymétrique C-2, du proton associé H-2 et du carbone anomérique (Lankhorst *et al.*, 1995). Le Tableau 3.7 présente ces valeurs, ainsi que celles mesurées pour le composé **G**.

Tableau 3.7 – Valeurs des déplacements chimiques différant pour l'hétérodendrine et l'épihétérodendrine (Lankhorst *et al.*, 1995), ainsi que celles du composé **G**

position	(S)-hétérodendrine		(R)-épihétérodendrine		Composé G	
	δ_{H} (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	δ_{C} (DMSO- <i>d</i> 6) ^a	δ_{H} (600 MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	δ_{C} (DMSO- <i>d</i> 6) ^a	δ_{H} (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6)	δ_{C} (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6)
1	-	117.8	-	118.6	-	118.3
2	4.74	70.7	4.55	72.6	4.47	72.5
1'	4.32	100.9	4.29	103.4	4.39	103.7

^a fréquence non donnée

Compte tenu de la très grande similitude entre les valeurs de **G** et celles de l'épihétérodendrine, nous pouvons supposer que la configuration absolue de C-2 du composé **G** est *R*. Nous pourrions confirmer cela par l'observation de l'augmentation de l'intensité des signaux du spectre NOE, lorsque H-1' est irradié, selon les travaux effectués par Lankhorst *et al.* (1995).

Concernant l'identité de l'hexose, les valeurs de constante de couplage entre H-2' et H-1', et H-2' et H-3' ($J_{2',1'}$ 8.3 et $J_{2',3'}$ 8.3) (cf. Tableau 5.5) indiquent que ces trois protons sont axiaux. Par conséquent, les groupements hydroxyles OH-2' et OH-3' sont équatoriaux, et la liaison O-glycosidique en C-1' est β . De la même manière, les valeurs de constante de couplage entre H-4' et H-3', et H-4' et H-5' ($J_{4',3'}$ 9.28 et $J_{4',5'}$ 9.28) (cf. Tableau 5.5) suggèrent la position axiale de ces protons. Ainsi, l'hexose lié au groupement isovaléronitrile est un β -glucose. Concernant la configuration absolue de ce sucre, une hydrolyse avec une β -D-glucosidase permettrait de déterminer s'il appartient à la série D ou L. Cependant, à notre connaissance, la grande majorité des glucoses provenant de matériel végétal appartiennent à la série D. Pour confirmer la configuration absolue du sucre (*D* ou *L*), d'autres manipulations telles que la formation d'un cristal, puis analyse par diffraction aux rayons X pourraient être réalisées (Agrawal, 1992).

Le composé **G** est donc nommé 6'-O-galloyl-(*R*)-épihétérodendrine (Figure 3.56).

Le glycoside cyanogénétique épihétérodendrine n'a été isolé que d'une seule espèce végétale : l'orge (*Hordeum vulgare* L., Poaceae) (Erb *et al.*, 1979). Son épimère, l'hétérodendrine, a par contre été retrouvée dans plusieurs espèces végétales, et a été isolé pour la première fois d'*Heterodendron oleaefolium* Desf. (Sapindaceae) (Nahrstedt et Huebel, 1978). Le composé **G** est une molécule nouvelle, car c'est la première fois que l'isovaléronitrile lié à un β -glucose est isolé sous forme estérifiée avec un acide gallique. Jusqu'à ce jour, un seul glycoside cyanogénétique lié à un groupement galloyl a été reporté : il s'agit du 6'-O-galloylprunasine, isolé de deux espèces de la famille Melastomataceae, et d'une espèce de la famille Elaeocarpaceae (Isaza *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2006).

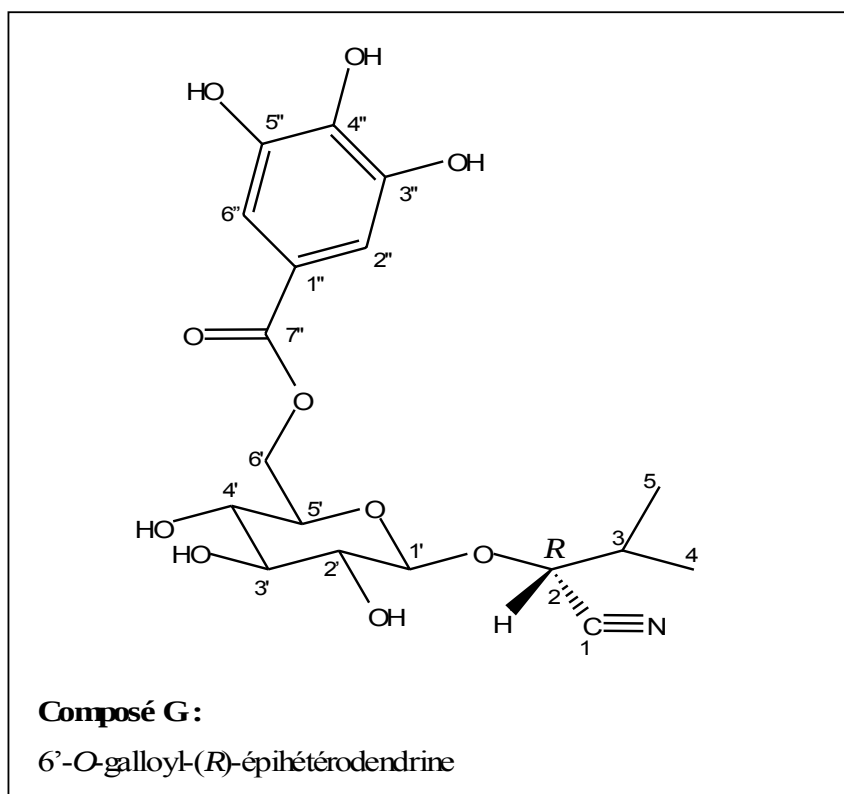


Figure 3.56 – Structure du composé **G** : 6'-O-galloyl-(*R*)-épihétérodendrine.

3.6.2 Voie de biosynthèse des glycosides cyanogénétiques

Les glycosides cyanogénétiques sont formés à partir d'acides aminés, et sont classés en fonction de la nature de ces derniers. L'isovaléronitrile lié au glucose du composé **G** dérive très probablement de la L-Leucine comme proposé par Lechtenberg *et al.* (1996), selon les réactions proposées à la Figure 3.57. Des expériences de marquage ont en effet montré la formation de glycosides cyanogénétiques à partir d'acides aminés, via les aldoximes correspondants. Les spécialistes s'accordent à dire que cette voie fait intervenir deux complexes multi-enzymatiques (ou deux protéines multi-fonctionnelles), évitant ainsi la dégradation des produits intermédiaires (Lechtenberg *et al.*, 1996; Bruneton, 1999).

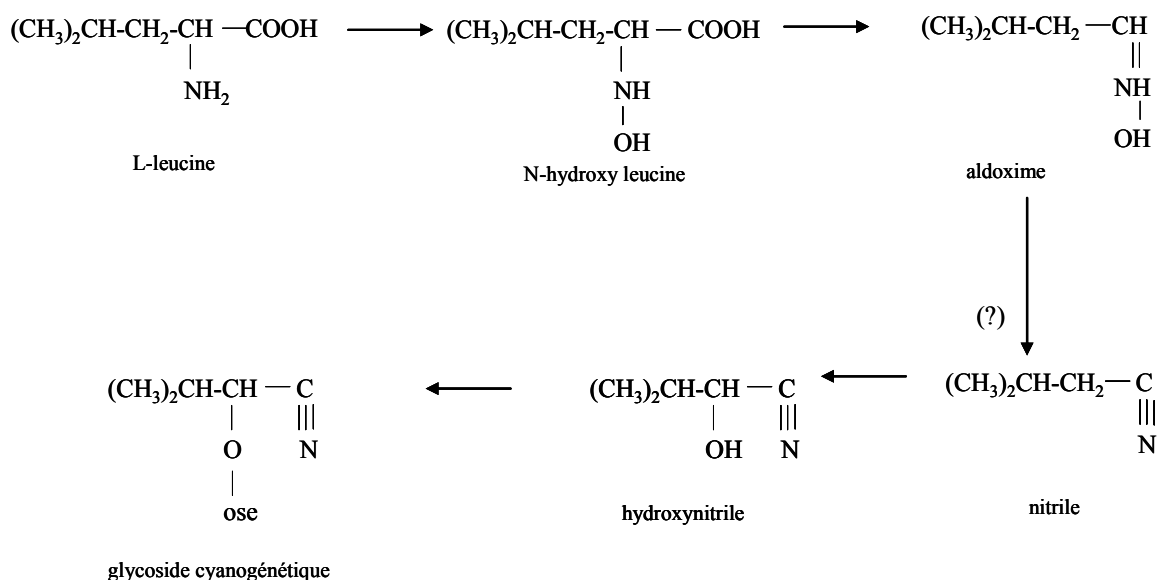


Figure 3.57 – Voie biogénétique proposée pour la formation du composé **G** (Lechtenberg *et al.*, 1996; Bruneton, 1999)

3.7 Implications de la présence d'un dérivé de glucoside cyanogénétique dans le fruit toxique de *D. senegalense* J.F. Gmel.

Avant de discuter de l'implication de la présence d'un dérivé galloylé d'un glucoside cyanogénétique dans le fruit toxique de *D. senegalense*, rappelons quelques généralités sur les glycosides cyanogénétiques.

3.7.1 Glycosides cyanogénétiques

Les glycosides cyanogénétiques sont présents dans plus de 2500 espèces végétales, dont les familles botaniques les plus représentées sont Fabaceae, Rosaceae, Linaceae, Asteraceae, etc... Les glycosides cyanogénétiques sont des métabolites secondaires des plantes qui peuvent avoir un caractère chimiotaxonomique. Relevons notamment que de nombreuses espèces appartenant à la sous-classe Core-Eudicot, dont les Fabaceae font partie (*cf.* Figure 2.3), contiennent des représentants de cette classe de composés. Quelques plantes économiquement importantes de la famille Fabaceae contiennent des glycosides cyanogénétiques : le haricot igname (*Sphenostylis stenocarpa* Harms), certaines espèces de trèfle (*Trifolium* spp.), le haricot commun et autres espèces du genre (*Phaseolus vulgaris*, *P. lunatis*), le pois (*Pisum sativum*), *Acacia* spp., *Vicia* spp., *Lotus corniculatus*, *Lathyrus sativus*, etc... (Jones, 1998).

Malgré le fait qu'un nombre important d'espèces contiennent ce type de composés, seule une quarantaine ont été décrits dans la littérature. En effet, ces composés sont difficiles à isoler à cause de l'instabilité des cyanhydrines : sous l'action du broyage de la plante, les glycosides cyanogénétiques sont mis en contact avec deux enzymes, initialement localisées dans un autre compartiment cellulaire. Dans un premier temps, des β -glycosidases hydrolysent le composé, libérant ainsi le sucre, d'une part, et la cyanhydrine, d'autre part. Une deuxième enzyme, l' α -hydroxynitrile lyase, intervient dans un second temps pour catalyser la libération d'acide cyanhydrique (HCN) (Nakajima et Ubukata, 1998; Vetter, 2000). Il est intéressant de relever que la quantité de ces enzymes peut varier en fonction de l'organe. Ceci a notamment été mis en évidence dans *Elaeocarpus sericopetalus* F. Muell. (Elaeocarpaceae), dont les fruits et le tronc

ne contiennent pas suffisamment de β -glycosidases, comparativement aux feuilles, pour une hydrolyse complète des glycosides cyanogénétiques (Miller *et al.*, 2006).

Concernant le taux de glycosides cyanogénétiques dans les plantes, il est connu qu'il est extrêmement variable au sein d'une même espèce. Les facteurs responsables de cette variation sont de nature endogène et/ou exogène. Une étude sur le taux de glycosides cyanogénétiques dans *Trifolium repens* L. (Fabaceae) a montré, par exemple, que ces derniers n'étaient formés que dans le cas où les deux allèles du gène codant pour les glycosides cyanogénétiques étaient dominants. Concernant les facteurs exogènes, il a été observé par exemple, que le taux de glycosides cyanogénétiques était plus élevé dans les lots de *Trifolium repens* croissant en basse altitude, où la quantité de neige en hiver était peu importante et les températures pas trop basses, et pour lesquelles les précipitations estivales étaient faibles. Une étude sur le manioc (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae) a montré que la teneur en glycosides cyanogénétiques dans les racines était généralement inférieure à 100 mg/kg, mais que dans certains cas, elles en contenaient plus de 500 mg/kg. De telles variations ont également été observées pour les espèces du genre *Sorghum* (L.) Moench. (Poaceae). Certaines investigations ont montré que le taux de glycosides cyanogénétiques maximal était atteint au stade de maturation du fruit. Notons de plus que le taux de HCN libéré dépend non seulement de la quantité de glycosides cyanogénétiques présents, mais également de la quantité de β -glycosidase et de α -hydroxynitrile lyase (Vetter, 2000).

Il a été démontré à plusieurs reprises que le rôle des glycosides cyanogénétiques était de défendre la plante vis-à-vis des prédateurs (parasites, mollusques, insectes, vertébrés). Cependant, certains animaux, dont les hommes, ont la capacité de détoxifier l'acide cyanhydrique, lorsque les doses sont relativement faibles. En ce qui concerne l'homme, on distingue cinq voies de détoxification différentes, dont la principale fait intervenir les enzymes sulfurtransférases. Afin que cette voie de détoxification soit optimale, il est nécessaire que le régime alimentaire soit riche en acides aminés soufrés. Ainsi, lorsque la quantité de protéines consommée est faible, les intoxications chroniques à l'acide cyanhydrique surviennent plus facilement. En ce qui concerne la dose létale de HCN pour l'homme, elle est de 0.5-3.5 mg/kg de poids corporel. Notons encore que la sensibilité des animaux vis-à-vis du HCN varie considérablement en fonction de l'espèce (Jones, 1998).

Mécanisme de toxicité et traitement

Le mécanisme de toxicité de l'acide cyanhydrique consiste à empêcher l'utilisation de l'oxygène par les cellules en inhibant la cytochrome C oxydase, complexe enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les tissus dépendant fortement de l'apport en oxygène (système nerveux central et système cardiaque) sont ainsi touchés en premier lieu. La seule manifestation caractéristique de ce type d'intoxication est l'odeur d'amande amère que dégage l'haleine du patient. Cependant, certaines personnes n'ont pas la capacité de sentir cette odeur. Relevons que les intoxications au cyanure sont plus fréquentes et plus grave par inhalation que par ingestion. Les symptômes d'une intoxication aiguë sont : polypnée, vomissements, hypotension, rougeur généralisée, céphalée, tachycardie, acidose métabolique, œdème pulmonaire, convulsions, coma et mort en quelques heures. Une intoxication chronique se manifeste par des troubles digestifs et psychiques, perte de poids, asthénie, bronchite chronique, conjonctivite (Fattorusso et Ritter, 1998).

Les mesures d'urgence à prendre, lors d'une intoxication par ingestion, consistent en premier lieu à effectuer un massage cardiaque, une ventilation assistée avec de l'oxygène 100 % et inhalation de nitrite d'amyle pendant 20-30 secondes, chaque minute. Les antidotes peuvent être une injection intra-veineuse rapide de tétracémate dicobaltique, ou une perfusion de nitrite de sodium (3 %) suivie d'une perfusion de thiosulfate de sodium à 25 %. Le lavage gastrique est différé jusqu'à ce que la ventilation assistée soit mise en place et que les antidotes aient agi (Fattorusso et Ritter, 1998).

Bon nombre d'aliments consommés à travers le monde contiennent des glycosides cyanogénétiques. Pour la plupart d'entre eux, cependant, la partie consommée n'en contient pas. C'est le cas pour de nombreuses céréales (*Triticum* spp., *Hordeum vulgare* L., *Avena sativa* L., *Sorghum* spp., Poaceae), pour lesquelles la graine est consommée, alors que ce sont les feuilles qui contiennent des glycosides cyanogénétiques. Il existe cependant de nombreuses plantes, pour lesquelles la partie consommée est aussi celle qui contient les glycosides cyanogénétiques. Citons les amandes et autres espèces du genre *Prunus* L. (Rosaceae), les haricots (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae), le bambou (*Dendrocalamus* spp., *Bambusa* spp., Poaceae), les fruits de la passions (*Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae), les noix de macadamia (*Macadamia ternifolia* F. Muell., Protaceae), etc... Grâce à sa capacité à se détoxifier vis-à-vis de HCN, l'homme a donc la possibilité de consommer ces aliments. Cependant, leur consommation doit se faire lentement et en quantité suffisamment faible pour permettre au corps une détoxification progressive. Quant à la racine de manioc (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae), aliment

largement consommé sur le continent africain, sa teneur très élevée en acide cyanhydrique nécessite une cuisson longue avant de pouvoir être consommée.

Nous avons maintenant les éléments nécessaires pour la reconsidération des données des cas d'intoxication par le fruit toxique de *D. senegalense*

3.7.2 Reconsidération des données de la littérature concernant les intoxications dues aux fruits toxiques de *D. senegalense* J.F. Gmel.

Compte tenu de ce qui précède, les symptômes observés lors d'intoxications par les fruits de *D. senegalense* sont très similaires à ceux observés lors d'une intoxication aiguë au cyanure. En effet, comme relevé au chapitre 2.5.3, les huit groupes de chercheurs ayant travaillé sur ces cas reportent des troubles digestifs, dont des vomissements violents, une altération de la conscience pouvant aller de la somnolence au coma stade II, et une déficience cardio-pulmonaire, symptômes similaires à ceux reportés dans le cas d'une intoxication au cyanure. Compte tenu du fait que nous avons isolé un dérivé galloylé de glucoside cyanogénétique de ce fruit, il est donc fort probable que ce soit le (ou l'un des) composés responsables des intoxications. Bertelot *et al.* (2000) avaient d'ailleurs relevé la similitude des symptômes entre ces deux types d'intoxication. Ils avaient cependant rejeté cette hypothèse, car dans le cas d'une intoxication à *D. senegalense*, les mitochondries retrouvaient leur état normal après un certain laps de temps. Or, il ne nous semble pas que cela soit contradictoire avec la présence d'un dérivé de glucoside cyanogénétique. En effet, si la dose ingérée n'est pas trop élevée, le corps est capable de se détoxifier complètement, permettant aux mitochondries et donc à tous les organes de retrouver leur état normal (Vetter, 2000). C'est certainement cette capacité de détoxification qui explique le retour à un état normal chez la plupart des patients, malgré l'absence de soins médicaux (Imbert et Teyssier, 1986; Adam *et al.*, 1991; Burgel *et al.*, 1998; Berthelot *et al.*, 2000). La teneur en protéines du régime alimentaire variant d'un individu à l'autre, et pouvant être assez pauvre selon les populations, peut être l'un des éléments expliquant la différence de sensibilité à ce fruit entre les patients. Un autre facteur pouvant expliquer cette différence de sensibilité est naturellement la quantité de glucosides cyanogénétiques contenue dans les plantes. Comme nous l'avons vu précédemment, le taux de glycosides cyanogénétiques est extrêmement variable au sein d'une même espèce, en raison de facteurs endogènes et/ou

exogènes. Ainsi, l'absence de corrélation relevée par Imbert et Teyssier (1986) entre le nombre de fruits ingérés et la gravité de l'intoxication n'est pas surprenante. Toutes les études réalisées sur ce type d'intoxication relèvent que ce sont majoritairement les enfants qui sont touchés. Cela est peu surprenant, vu que la dose létale de glycosides cyanogénétiques (ou de tout autre poison) est plus facilement atteinte chez eux. D'autres éléments relevés dans la littérature semblent confirmer l'implication de glycosides cyanogénétiques dans les intoxications aux fruits de *D. senegalense*. En effet, Heckel et Schlagdenhauffen (1889) relevaient que la toxicité semblait être due à un composé volatil, puisque dans certains cas, l'extrait alcoolique des fruits administré à des chiens pouvait ne provoquer aucun symptôme. Or, nous avons parlé, dans le chapitre précédent, de la nature instable des cyanhydrines, pouvant expliquer la disparition de la toxicité au fil du temps. Plusieurs auteurs, dont Paris et Moyse-Mignon (1947) et D'Almeida (1984), ont relevé une amertume dans le composé qu'ils supposaient toxique. Ce dernier observa de plus dans ses expériences, que de l'eau contenant l'extrait de fruit n'était pas bue par les souris. Il émet alors l'hypothèse qu'une odeur repoussante ou l'amertume en est la cause. En effet, les glycosides cyanogénétiques sont généralement amers. Il apparaît ainsi que toutes les observations semblent converger vers la responsabilité du 6'-O-galloyl-(R)-épihétérodendrine (composé **G**) dans la toxicité des fruits de *D. senegalense*.

Concernant les deux composés toxiques que Paris et Moyse-Mignon et D'Almeida avaient isolés, rappelons qu'ils n'avaient pas pu être identifiés, mais qu'ils semblaient être différents, suite aux quelques analyses chimiques préliminaires effectuées (cf. 2.5.4.2). Pour la même raison, et notamment concernant la mesure du point de fusion (cf. 5.7), le composé **G** isolé dans ce travail, semble également être différent. Relevons cependant quelques similitudes entre ces trois molécules : la présence d'un sucre et de groupements hydroxyliques. Ces données soulèvent donc les questions suivantes. Y a-t-il plusieurs composés responsables de la toxicité du fruit ? Les analyses chimiques préliminaires effectuées par Paris et Moyse-Mignon et D'Almeida sont-elles suffisamment fiables ? Et surtout, le composé **G** présente-il réellement une toxicité ? Pour répondre à cette dernière question, il faudrait l'évaluer. Or, le sens éthique et la loi obligent une évaluation préliminaire *in vitro* avant des tests *in vivo*. Nous avons donc mesuré la toxicité du composé **G** au moyen d'un test colorimétrique sur trois lignées cellulaires différentes (conditions expérimentales décrites sous 5.5.9). Aucune activité cytotoxique n'a pu être détectée à 100 µM. Malheureusement, lorsque ce test a été effectué, la structure du composé **G** n'était pas encore connue. Ainsi, un test ciblé ou un traitement préalable du composé **G** permettant la libération de HCN, n'a pas pu être entrepris. Une des perspectives de ce travail est

donc d'évaluer la toxicité du composé **G**. Rappelons que la libération de HCN a tout de même pu être vérifiée par le test du bleu de Prusse (*cf.* 5.5.2).

Dans le cas d'une toxicité démontrée pour le composé **G**, une autre perspective de ce travail consisterait à le doser dans le fruit. Cette mesure devrait être effectuée sur plusieurs lots, de provenance et de degrés de maturation différents, de manière à mettre en évidence les facteurs influençant le taux de ce composé. A ce jour, il existe quelques méthodes qualitatives et (semi-) quantitatives pour la détection de glycosides cyanogénétiques dans du matériel végétal. Elles sont classées en deux groupes selon qu'elles quantifient les glycosides cyanogénétiques totaux ou seulement la quantité de HCN libéré.

Le composé **G** a été recherché dans les feuilles et l'écorce de la forme toxique de *D. senegalense*, l'écorce étant, comme le mésocarpe, employée comme poison de flèche par certaines ethnies. La recherche a été effectuée par UPLC[®]/ESI/TOF-MS sur les extraits DCM et MeOH de l'écorce et des feuilles. Aucun ion pseudo-moléculaire correspondant au composé **G** n'a été retrouvé. Serait-ce dû à la présence, dans ces organes, d'une quantité plus importante d'enzymes permettant la libération de HCN, que dans le mésocarpe, comme cela avait été constaté dans le cas d'*Elaeocarpus sericopetalus* F. Muell. (Elaeocarpaceae) (Miller *et al.*, 2006), induisant alors une dégradation totale des glycosides cyanogénétiques lors du broyage des feuilles et de l'écorce ? Ou la toxicité serait-elle due à un autre composé ? Il serait cependant peu surprenant de retrouver le composé **G** dans d'autres organes de *D. senegalense* que les fruits. Une évaluation qualitative et quantitative des glycosides cyanogénétiques dans ces organes permettrait sans doute de répondre à cette question. Il serait également intéressant d'isoler et d'identifier les trois autres composés, détectés par ESI/TOF-MS, qui présentaient un poids moléculaire impair. Nous trouverions peut-être d'autres glycosides cyanogénétiques, ou des alcaloïdes, comme les avaient détectés en quantité de trace Paris et Moyse-Mignon (1947).

Considérons maintenant l'aspect taxonomique de la forme toxique de *D. senegalense*. Rappelons que cet arbre peut fournir des fruits comestibles ou toxiques. Selon la plupart des scientifiques ayant travaillé sur cette problématique, ces deux formes d'arbres sont non distinguables d'un point de vue morphologique. A cause du caractère de comestibilité ou de toxicité du fruit, certains estiment qu'il s'agit de deux variétés différentes, tandis que d'autres considèrent qu'il s'agit simplement de formes différentes (*cf.* chapitre 2.3.3.2). Pour notre part, notre étude préalable nous avait amené à penser qu'il s'agissait de variétés différentes, en raison de certaines différences morphologiques observées. L'analyse du profil chromatographique des

deux formes de fruits menée dans ce travail confirme notre position préalable. En effet, dans le chapitre 3.5.1, nous avons constaté une plus forte ressemblance entre les extraits DCM et MeOH s.s. de *D. microcarpum* et ceux de *D. senegalense* forme comestible, qu'entre ce dernier et la forme toxique de *D. senegalense*. Dès lors, en vertu des différences morphologiques que nous avons observées entre les deux formes de fruits et de la différence marquée entre les profils chromatographies DAD-UV et ESI/TOF-MS, il nous semble plus approprié de considérer ces deux formes d'arbre comme étant des variétés différentes de *D. senegalense*. Ainsi, d'un point de vue chimiotaxonomique, nous estimons que les arbres *D. senegalense* produisant des fruits comestibles et toxiques sont deux variétés différentes.

Une question vient cependant à l'esprit : comment cela se fait-il que la plupart des chercheurs ayant mené une étude sur les intoxications dues à la forme toxique de *D. senegalense* ont estimé que cette dernière ne différait morphologiquement pas de la forme comestible ? L'hypothèse la plus probable, et déjà avancée par D'Almeida (1984) et Adam *et al.* (1991), est la survenue d'un phénomène de xénie. Ce phénomène est entre autres rencontré chez *Prunus amygdalus* Batsch (Rosaceae) : la variété *amara* comporte un hétéroside cyanogénétique qu'il est quelquefois possible de retrouver dans les graines de la variété *dulcis*, qui n'en contiennent généralement pas. Ce phénomène de xénie résulte de la fécondation croisée par les abeilles : le caractère cyanogénétique étant dominant, les abeilles induisent directement la formation de graines amères chez la variété *dulcis*, par apport de pollen d'amandier amer. Ainsi, ce phénomène pourrait expliquer que deux arbres morphologiquement identiques puissent fournir des fruits comestibles ou toxiques, par apport du pollen de la variété toxique de *D. senegalense*.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La révision de la littérature concernant les espèces du genre *Detarium* (Fabaceae - Caesalpinioideae) a permis de détecter des facteurs responsables de la confusion botanique dans le genre. Parmi ceux-ci, relevons qu'un lot de *D. microcarpum* Guill. et Perr. avait été séparé en 2 lots, l'un appelé *D. microcarpum* et l'autre *D. senegalense* ; et que la même erreur s'était produite pour *D. senegalense* J.F. Gmel : un lot ayant été nommé correctement, et l'autre *D. heudelotianum* Baill. L'analyse détaillée des données de la littérature a permis de clarifier la situation botanique. Ainsi, *D. microcarpum* Guill. et Perr. est une espèce au statut accepté, qui produit des fruits comestibles. *D. heudelotianum* Baill. n'est pas à considérer comme une espèce. *D. senegalense* J.F. Gmel. peut produire, quant à lui, des fruits comestibles ou toxiques. Cette forme toxique était (et est encore quelquefois) appelée *D. heudelotianum* Baill. La question de la position taxonomique des arbres produisant des fruits comestibles, et de ceux produisant des fruits toxiques reste d'actualité. Certains chercheurs estiment, en effet, qu'il s'agit simplement de deux formes différentes, en raison de l'absence de caractères morphologiques distincts, tandis que d'autres considèrent qu'il s'agit de deux variétés différentes. Pour notre part, nous rejoignons cette dernière opinion, en raison de l'observation de différences morphologiques entre les deux formes d'arbres.

Un criblage biochimique et biologique de 16 extraits de plantes a permis de relever le caractère prometteur des trois fruits du genre *Detarium* testés : *D. microcarpum*, ainsi que les formes comestibles et toxiques des fruits de *D. senegalense*. Une inhibition du champignon phytopathogène *Cladosporium cucumerinum* a été relevée pour les trois extraits dichlorométhaniques. Celui de *D. microcarpum* présentait de plus une inhibition marquée de l'acétylcholinestérase, enzyme impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Ainsi, c'est cet extrait qu'il a été choisi d'investiguer. Six composés purs ont pu être isolés par fractionnement bioguidé, puis identifiés comme diterpènes. Les composés **A** à **E** sont de type clérodane, tandis que le composé **F** est de type labdane. Le composé **A** (acide 3 β ,4 β -époxy-5 β ,10 β -*cis*-17 β ,20 α -*ent*-clérod-13*E*- η -15-oïque) est un *cis*-clérodane original (Figure 4.1). Le composé **C** a été identifié comme étant l'acide 2-oxo-3- η -5 β ,10 α -*trans*-17 β ,20 β -*ent*-clérod-13*E*- η -15-oïque, déjà isolé des feuilles et de l'écorce de *D. microcarpum* (Aquino *et al.*, 1992; Lajide *et al.*, 1995). L'analyse par diffraction aux rayons X des cristaux du composé **B** a montré qu'il s'agissait d'un diastéréomère de ce dernier. Il diffère de **C** par une jonction *cis* entre les cycles, et une relation *trans* entre les groupements méthyliques CH₃-17 et CH₃-20. Ainsi, ce composé est appelé acide 2-oxo-3- η -5 β ,10 β -*cis*-17 β ,20 α -*ent*-clérod-13*E*- η -15-oïque; il présente une configuration relative nouvelle. Les composés **D** et **E** sont également des *cis*-clérodanes,

diastéréomères l'un de l'autre. La configuration de **D** a pu être déterminée par diffraction aux rayons X, tandis que celle de **E** l'a été par l'analyse de corrélations spatiales homonucléaires ^1H - ^1H . **D** et **E** se nomment respectivement acide $3\alpha,4\beta$ -dihydroxy- $5\beta,10\beta$ -*cis*- $17\beta,20\alpha$ -*ent*-clérod- $13E$ -*en*-15-oïque et acide $3\alpha,4\alpha$ -dihydroxy- $5\beta,10\beta$ -*cis*- $17\beta,20\alpha$ -*ent*-clérod- $13Z$ -*en*-15-oïque. **E** diffère donc de **D** par une orientation *Z* de la double liaison, et une orientation *cis* des deux groupements hydroxyles. Relevons que cette orientation *cis* des deux groupements hydroxyles est plus rarement observée qu'une orientation *trans* diaxiale. Quand au composé **F**, il s'agit du (-) acide copalique, déjà isolé de l'écorce de *D. microcarpum* (Ikhiri and Ilagouma, 1995). **F** est le seul composé pour lequel il a été possible de déterminer la configuration absolue, par mesure de son pouvoir rotatoire et comparaison avec les données de la littérature.

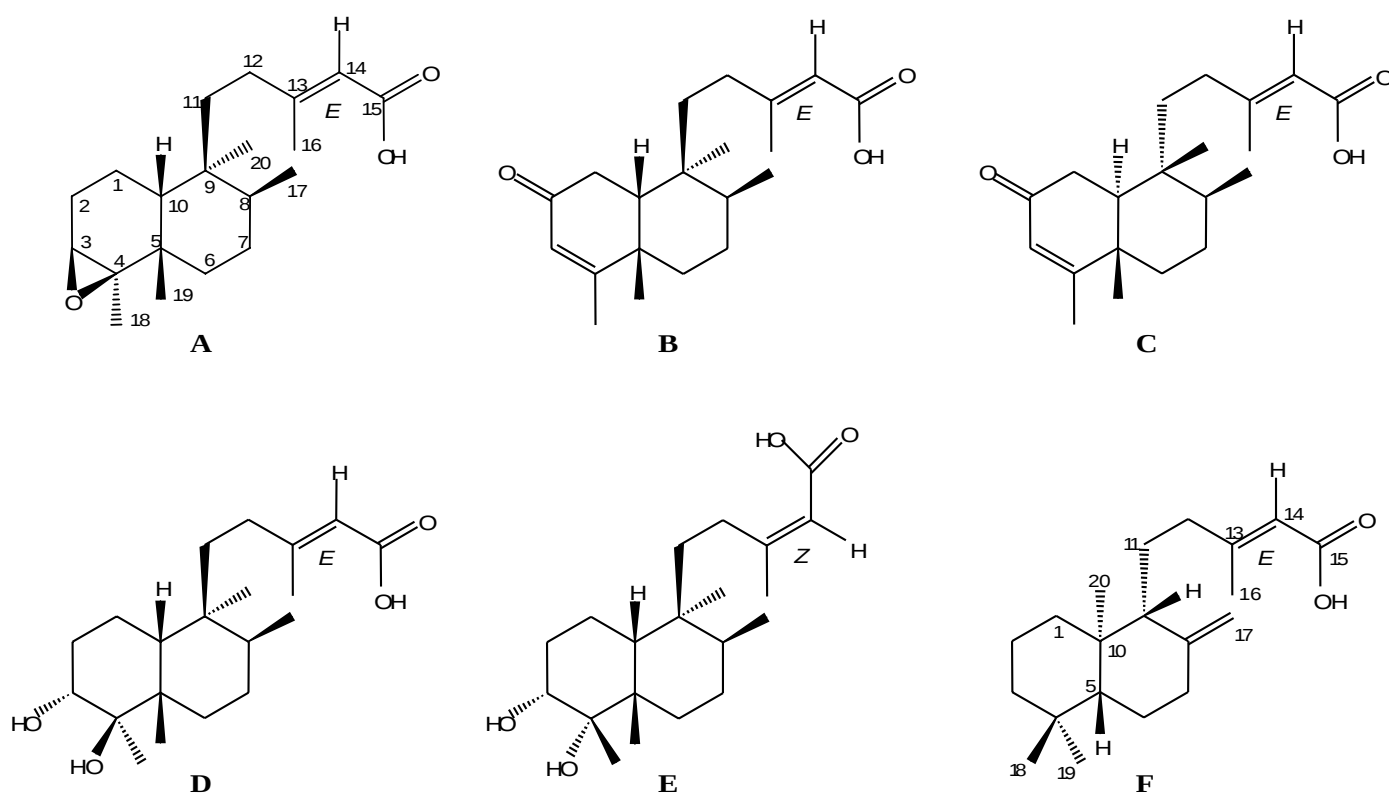


Figure 4.1 – Structure des composés **A - F**

Bien que les labdanes et les clérodanes soient largement répandus au sein du règne végétal, il existe un manque certain de données détaillées concernant leur détermination structurale, d'une part, et leur voie de biosynthèse, d'autre part. Cette affirmation touche particulièrement les clérodanes, moins étudiés encore. Relevons que ce travail présente pour la première fois une élucidation structurale complète de l'acide copalique, pourtant isolé à plusieurs reprises. Nos recherches ont donc contribué à la connaissance de la configuration relative d'un labdane connu, en plus d'avoir permis de découvrir de nouvelles configurations relatives de *cis*-clérodanes. Il est intéressant de relever que les six composés isolés sont issus de la même voie biogénétique, puisque que les clérodanes sont des produits de réarrangements des labdanes.

En ce qui concerne les activités biologiques et biochimiques observées pour les composés **A** – **F**, le composé **B** inhibe faiblement la croissance du champignon *Cladosporium cucumerinum*, tandis que les composés **A** et **E** ont révélé une plus forte inhibition à 10 µg. Ces deux composés ont également montré lors du test sur plaque une activité inhibitrice modérée de l'enzyme acétylcholinestérase. Le composé **B** a présenté lors du test en solution une activité inhibitrice moyenne de cette enzyme. Les diterpènes étant une classe de composés présentant fréquemment des activités biologiques, il serait intéressant d'évaluer leur potentiel biologique et biochimique sur d'autres cibles.

L'objectif de découvrir le ou les composés responsables des intoxications dans le fruit *D. senegalense* forme toxique n'était pas dépourvu d'ambition ! En effet, le manque de spécificité des symptômes observés lors de ces intoxications, et leurs variations d'un patient à l'autre rendent la détermination du ou des sites d'action du composé toxique très complexe. Par conséquent, le choix d'un test *in vitro* approprié s'est avéré impossible, et notre but devait donc être mené par le biais de méthodes chimiques uniquement.

L'analyse de la comparaison des extraits des fruits toxiques et comestibles, par UPLC[®]/ESI/TOF-MS, a permis de relever la présence de cinq composés majoritaires dans l'extrait MeOH sans sucre (s.s.) du fruit toxique, et absents du fruit comestible et de *D. microcarpum*. Parmi ces composés, notre choix d'isolement s'est porté sur le composé **G**, largement majoritaire dans l'extrait, et présentant une masse moléculaire impaire, suggérant alors la présence d'atome(s) d'azote. Le composé **G** isolé (Figure 4.2) s'est avéré être le 6'-*O*-galloyl-(*R*)-épihétérodendrine, un dérivé de glucoside cyanogénétique. C'est la première fois que ce composé est décrit dans la littérature.

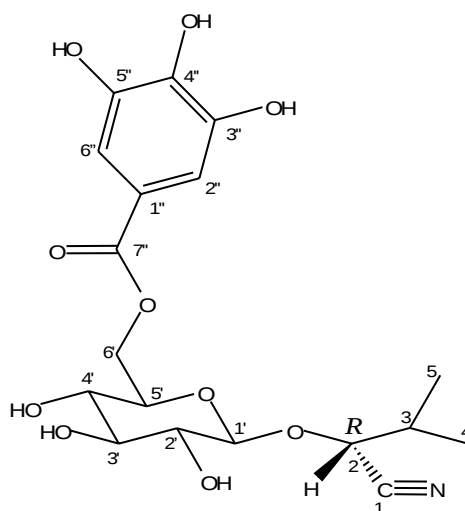


Figure 4.2 – Structure du composé **G**

La présence d'un dérivé de glucoside cyanogénétique dans le fruit toxique permet de présumer fortement de sa responsabilité dans les intoxications dues à l'ingestion de ce fruit. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les symptômes observés lors d'une intoxication aux fruits toxiques de *D. senegalense* sont très similaires avec ceux survenant dans le cas d'une intoxication au cyanure. De plus, plusieurs éléments de la littérature mentionnés à propos de ces intoxications, semblent confirmer cette hypothèse. Cependant, aucun test biologique n'a pu être effectué pour le prouver, ce qui constitue l'une des premières perspectives de ce travail. Dans un deuxième temps, et dans le cas où **G** présente une toxicité, son dosage dans le fruit devrait être effectué. Il serait de plus intéressant d'identifier les quatre autres composés présents dans le fruit toxique et absents du fruit comestible.

D'un point de vue chimiotaxonomique, la comparaison des profils chromatographiques par UPLC[®]/ESI/TOF-MS des extraits DCM et MeOH s.s. des deux formes de fruits, renforcent notre opinion préalable fondée sur les données de la littérature, de les considérer comme deux variétés différentes. Nous estimons donc qu'il existe deux variétés de *D. senegalense*, différentes morphologiquement, l'une produisant des fruits comestibles, et l'autre des fruits toxiques. Une hypothèse permettant d'expliquer la production de fruits toxiques par un arbre morphologiquement identique à celui générant des fruits comestibles, est la survenue d'un phénomène de xénie, comme suggéré par D'Almeida (1984) et Adam *et al.* (1991). La mise en évidence, dans ce travail, d'un dérivé de glucoside cyanogénétique (**G**) dans la forme toxique du fruit de *D. senegalense* corrobore cette hypothèse, puisqu'un tel phénomène survient notamment dans la variété *dulcis* de *Prunus amygdalus* Batsch. (Rosaceae).

5. PARTIE EXPERIMENTALE

5.1 Matériel végétal et préparation des extraits

5.1.1 Matériel végétal

Tous les organes étudiés dans ce travail sont des fruits. Ils sont issus de plantes de différentes familles botaniques. Le Tableau 5.1 présente l'origine et la date de récolte des différents échantillons. Dans tous les cas, l'identification botanique a été faite en collaboration avec un botaniste local. Pour ce qui est des fruits récoltés au Mali, leur identification a été faite par le Dr D. Diallo (Département de Médecine Traditionnelle, Institut National de Santé Publique, Bamako), ceux provenant du Sénégal ont été identifiés par le Dr. A. Thiocone (Université de Genève, Suisse). Les fruits partiellement lyophilisés de *Nephelium ramboutanake* et *Dimocarpus longan* ont été achetés dans un marché à Singapour par le Dr Koh (School of Life Science and Chemical Technology, Ngee Ann Polytechnic, Singapore). *Talisia esculenta*, dont un extrait hydroalcoolique du fruit a été préparé, a été identifié par le Dr Emerson Ferreira-Queiroz (Ache, Sao Paolo, Brésil).

Tableau 5.1 – Matériel végétal étudié

Nom botanique	Lieu / date de récolte	Organe	Poids
<i>Detarium microcarpum</i> Guill. et Perr. (Caesalpinioideae)	Marché de Médine, Bamako, Mali / 03.2002	Fruit séché	738 g
<i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel. forme comestible (Caesalpinioideae)	Plant de Palmara, Sénégal / 12.2003	Fruit séché	803 g
<i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel. forme toxique (Caesalpinioideae)	Plant de Palmara, Sénégal / 12.2003	Fruit séché	415 g
<i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel. forme toxique (Caesalpinioideae)	Plant de Palmara, Sénégal / 12.2003	Feuilles	100 g
<i>Detarium senegalense</i> J.F. Gmel. forme toxique (Caesalpinioideae)	Plant de Palmara, Sénégal / 12.2003	Ecorce	785 g
<i>Bauhinia reticulata</i> DC. (Caesalpinioideae)	Mali / 02.2000	Fruit séché	230 g
<i>Ziziphus zizyphus</i> (L.) H. Karst. (Rhamnaceae)	Marché de Médine, Bamako, Mali / 02.2000	Fruit séché	244 g
<i>Nephelium ramboutan-ake</i> (Labill.) Leenh (Sapindaceae)	Marché de Singapour / 02.2003	Fruit partiellement lyophilisé, dépourvu de graine	780 g
<i>Dimocarpus longan</i> (Lour.) (Sapindaceae)	Marché de Singapour / 02.2003	Fruit partiellement lyophilisé, dépourvu de graine	485 g
<i>Talisia esculenta</i> Radlk. (Sapindaceae)	Sao Paolo, Brésil / 08.2003	Extrait hydro-alcoolique du péricarpe	25.3 g

Après la récolte, le matériel végétal a été étendu sur place en fine couche pour qu'il sèche à l'air libre. Cependant, les fruits contenant une forte proportion de sucres, il a été difficile d'obtenir un séchage complet. Partiellement ou totalement secs, ces fruits ont été ensuite conditionnés avant d'être envoyés au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (LPP) où ils ont été conservés en atmosphère contrôlée (21 °C, faible humidité ambiante) jusqu'à leur étude. Pour ce qui est des fruits envoyés de Singapour, n'étant que partiellement secs, ils ont été conservés au congélateur (-18 °C). Toutes ces précautions servent à minimiser les divers

mécanismes de fermentation et d'attaques microbiennes inhérents au caractère organique de ces matières premières.

5.1.2 Préparation des extraits bruts

Dans notre laboratoire, la première étape dans la préparation d'extraits végétaux est le broyage du matériel en présence d'azote liquide (N_2), afin d'éviter toute dégradation thermique. Sous cette forme broyée, la drogue présente une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement des extractions. La méthode d'extraction de routine que nous employons est la macération successive dans deux solvants de polarité croissante : le dichlorométhane et le méthanol. La plante broyée est d'abord mise en contact avec le dichlorométhane à raison de 1,5 L de solvants pour 250 g de drogue. Après 24 h d'agitation mécanique à température ambiante, le mélange hétérogène est filtré sur papier plissé (Schleier & Schuell), et le résidu est à nouveau extrait 2 fois 24 h dans les mêmes conditions. Les filtrats sont réunis, le solvant évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor ; max. 40 °C) et le résidu sec lyophilisé et pesé : on parle alors d'extrait brut dichlorométhanique (DCM). Le résidu non extractible au dichlorométhane est traité de la même manière avec 3 extractions successives au méthanol. Après réunion des filtrats, évaporation du solvant et lyophilisation, on obtient l'extrait brut méthanolique (MeOH).

Pour ce qui est du mésocarpe de *Nephelium ramboutan-ake* et de *Dimocarpus longan*, un essai de lyophilisation a été entrepris, mais contenant beaucoup de sucres, ils n'ont pu être lyophilisés que partiellement. Ces fruits étant extrêmement collants, un broyage n'a pas pu être entrepris. Les mésocarpes ont donc été coupés en petits morceaux, puis extraits à l'éthanol 95 %, dans les mêmes proportions que pour les extraits DCM et MeOH. Le rendement d'une extraction de matériel végétal concassé étant plus faible que celui d'une poudre, le résidu d'extraction a été broyé, puis extrait à nouveau afin d'augmenter le rendement. En effet, la première extraction à l'éthanol 95 % a permis d'extraire une grande partie des sucres, rendant alors possible le broyage du résidu d'extraction. Les quantités d'extraits indiqués dans le Tableau 3.1 sont donc la somme des deux filtrats séchés, obtenus par ces extractions. En ce qui concerne le péricarpe des deux fruits, il a été broyé, lyophilisé, puis extrait avec de l'éthanol 95 % dans les mêmes conditions que celles décrites pour les extraits bruts DCM et MeOH. Quatre extraits bruts éthanoliques (EtOH) ont ainsi été obtenus du péricarpe et du mésocarpe de *N. ramboutan-ake* et *D. longan*.

Dans le cas de *Talisia esculenta*, le fruit séché n'a malheureusement pas pu être obtenu et c'est un extrait hydro-alcoolique du péricarpe qui nous a été envoyé. Cet extrait ne se dissolvant étrangement pas dans de l'éthanol 95 %, un partage liquide-liquide $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$ (10 mL:10 mL) de 49.7 mg de l'extrait, puis lavage de la phase aqueuse avec du butanol (n-BuOH) (10 mL) a alors été effectué. Les extraits bruts chloroformique (CHCl_3) (20.0 mg) et butanolique (n-BuOH) (15.6 mg) obtenus ont ainsi été soumis aux criblages chimique, biochimique et biologique.

5.2 Techniques de séparation analytique

5.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) se compose d'un support, en aluminium ou en verre, sur lequel a été étendue une fine couche d'un milieu d'adsorption (p. ex. la silice, SiO_2) comme phase stationnaire. Ces plaques sont plongées d'environ 0.5 cm dans une phase mobile. Cette dernière est généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, adapté au type de séparation recherché. Les composés déposés à 1 cm du bas de la plaque sont alors dissous par la phase mobile qui progresse par capillarité le long de la phase stationnaire. Selon la nature des phases mobile et stationnaire, deux types de mécanismes d'interaction permettent la séparation de composés présents en mélange : l'adsorption sur la surface de la phase stationnaire solide, et le partage entre un film de phase stationnaire liquide et la phase mobile (Pachaly, 1999).

Pour les analyses de routine par CCM, nous utilisons généralement des plaques de Silicagel® 60 F₂₅₄ prêtes à l'emploi à support en aluminium (Merck). Celles-ci sont développées dans des cuves en verre conventionnelles (Camag), dont l'atmosphère a été préalablement saturée en vapeurs de phase mobile. Les systèmes de solvants employés dans notre travail sont les suivants:

- extraits DCM : hexane-AcOEt (1:1)
- extraits MeOH : $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (65:35:5)

Du fait de ses faibles contraintes techniques, de son emploi simple et de son coût relativement modeste, la CCM est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. Les quantités déposées sur les plaques sont

normalement de 100 µg pour les extraits et de 10 µg pour les produits purs. Il s'agit également d'un support facilement utilisable pour caractériser ultérieurement des substances par leurs réactivités chimiques ou leurs activités sur certaines cibles biologiques ou biochimiques. Ces aspects seront traités plus loin au chapitre 5.5.

L'incorporation dans la phase stationnaire des plaques du commerce de produits permettant la visualisation des composés UV-actifs à 254 nm, permet la détection des produits à faible activité spectrale dans le domaine du visible (environ 450-700 nm).

5.2.2 Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible à barrettes de diode (HPLC/DAD-UV)

La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance, abrégée HPLC (CLHP en français). Les principes de base permettant de séparer des produits d'un mélange sont les mêmes que ceux décrits dans le cas de la CCM. L'immense avantage de la HPLC par rapport à la chromatographie sur couche mince réside dans l'amélioration sensible des paramètres de seuil de détection et de résolution de séparation, ainsi que dans les possibilités d'automatisation du procédé.

Dans notre laboratoire, nous sommes équipés de chromatographes HP-1050 et 1100 de la marque Hewlett-Packard®. Ces appareillages, pilotés par le logiciel HP ChemStation®, permettent de travailler en mode isocratique (composition constante de la phase mobile) ou en mode gradient (phase mobile de composition variable en cours d'analyse).

L'acronyme DAD désigne le détecteur à barrettes de diodes (*Diode Array Detector*). Ce dernier est composé de barrettes constituées de plusieurs centaines de diodes au silicium (un semi-conducteur), mélangé à des éléments du groupe III (p. ex. : Ga) ou V (p. ex. : As) pour améliorer sa conductivité. Plusieurs barrettes de diodes placées dans le plan focal d'un monochromateur à réseau peuvent contrôler simultanément une vaste gamme de longueurs d'ondes et les données d'un spectre complet sont ainsi recueillies en moins d'une seconde. Ce type de détection est d'un apport considérable dans la caractérisation des pics sur un chromatogramme HPLC/UV, car il permet de visualiser le spectre UV de chaque constituant. Ainsi, certaines classes de métabolites secondaires de plantes (flavonoïdes, xanthones,...) ayant un spectre UV caractéristique peuvent être mises en évidence par une simple analyse HPLC/DAD-UV.

En analyse de routine, une colonne NovaPak[®] C₁₈ (Waters) en acier inoxydable d'une longueur de 15 cm et d'un diamètre interne (d.i.) de 3,9 mm est utilisée. La phase stationnaire qu'elle contient est composée d'un gel de silice modifié chimiquement par greffage de résidus octadécyls (C-18) sur les groupes silanols. La granulométrie de la phase stationnaire est de 5 µm. Dans le domaine de l'analyse phytochimique, l'étude de matrices complexes rend indispensable l'élution en mode gradient, afin de garder un temps d'analyse raisonnable, tout en obtenant une bonne résolution des pics chromatographiques. Dans le présent travail, une phase mobile binaire composée de proportions variables d'acétonitrile (CH₃CN) ou de méthanol (MeOH) comme solvant apolaire et d'eau, tous de qualité HPLC (SpS, Romil[®]) est utilisée. De manière à améliorer la résolution des composés, un ajout d'acide trifluoroacétique (TFA) en concentration de 0,05 % peut être fait dans la phase aqueuse. Cependant, l'emploi d'acide a été rapidement proscrit pour l'analyse des composés isolés de l'extrait DCM de *D. microcarpum*, car il générerait la dégradation des composés.

Les temps d'analyses étaient compris dans le présent travail entre 30 et 90 min, et la pression d'environ 100 à 150 bars.

5.2.3 Chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse (UPLC[®]/ESI/TOF-MS)

La chromatographie liquide ultra performante (UPLC[®], Waters, Milford, USA) permet d'améliorer sensiblement la séparation et la résolution des pics chromatographiques, par rapport à un système HPLC classique. Le couplage de cette technique séparative avec un analyseur de masse à haute résolution est idéal pour établir une comparaison de fractions ou d'extraits, ou d'effectuer de la déréplication. Le système UPLC[®] est composé des mêmes éléments qu'un système HPLC (*cf.* 5.2.2). Dans notre Laboratoire, tous les éléments de l'UPLC[®] sont de la marque Acquity[®] (Waters, Milford, USA). Toutes les analyses effectuées dans ce travail ont été faites avec les paramètres suivants : les solutions d'échantillons (20 µg/mL dans MeOH-H₂O 85:15) sont injectés en quantité de 5 µL. Les extraits analysés par cette technique ont été préalablement purifiés par SPE (*cf.* 5.3.6). La colonne employée (Acquity UPLC[®] BEH) possède les caractéristiques suivantes : dimensions 50.0 x 1.0 mm d.i. ; phase stationnaire C18 ; diamètre des particules 1.7 µm, température 35 °C. Le système de solvants employés était le suivant : CH₃CN-H₂O + 0.1 % acide formique, à un débit de 0.3 mL/min. Le gradient utilisé était le suivant :

0.0 min	CH ₃ CN-H ₂ O	5.0:95.0 %
7.02 min	CH ₃ CN-H ₂ O	98.0:2.0 %
10.0 min	CH ₃ CN-H ₂ O	98.0:2.0 %

L'analyseur de masse de type temps de vol (*Time Of Flight*, en anglais, abrégé TOF) (LCT Premier, Micromass[®], Waters) est connecté à la sortie du détecteur DAD par une interface de type électrospray (ESI). Les analyses ont toutes été réalisées dans les conditions suivantes : mode négatif ; voltage du capillaire 2800 V ; voltage du cône 40 V ; voltage de l'ouverture « 1 » 15 V ; température de désolvatation 250 °C ; température de la source 120 °C ; voltage du « *multiple channel plate* » (MCP) 2650 V. La masse de référence était donnée pour une solution de Leucine Enkephaline synthétique, dessiquée (Sigma), à 5 µg/mL dans CH₃CN-H₂O 50:50. Cette solution est infusée au moyen d'une deuxième pompe (LC-10AD_{VP} Shimadzu[®]), débit 30 µL/min ; fréquence 1/4 scans. En mode normal, la masse de référence est la Leucine Enképhaline ²¹³C [M-H]⁻ à *m/z* 556.2672. De manière à éviter un déplacement des signaux de trop forte intensité, ceux-ci sont référencés par rapport à la Leucine Enkephaline [M-H]⁻ (*m/z* 554.2615).

5.3 Techniques de séparation préparatives

5.3.1 Partage liquide-liquide

Les solvants employés pour le partage liquide-liquide étaient du butanol (n-BuOH) et de l'eau, les sucres étant des composés très solubles dans ce dernier solvant, comparativement aux métabolites secondaires. Le n-BuOH employé doit au préalable avoir été saturé en eau, de manière à ne pas fausser le partage de l'extrait entre les deux phases non miscibles. En ce qui concerne l'élimination des sucres d'un extrait, cette technique a l'avantage d'être simple au niveau de l'appareillage, et plus rapide que la réalisation d'une colonne chromatographique ouverte. Les inconvénients sont la formation d'une émulsion à l'interface, difficilement éliminable. De plus, c'est une méthode qui ne convient pas à des quantités d'extraits trop grandes, ainsi qu'à une concentration en sucres trop élevée.

Les conditions opératoires sont les suivantes : 23.36 g d'extrait EtOH du péricarpe de *Nephelium ramboutan-ake* ont été partagés entre 500 mL de n-BuOH et le même volume d'eau dans une ampoule à décanter. Après agitation des deux phases et décantation, la phase n-BuOH est récupérée, séchée au rotavapor. La phase aqueuse est à nouveau lavée avec 500 mL de n-BuOH. Cette phase butanolique est récupérée, séchée et ajoutée à la précédente. Le poids total des fractions sèches obtenu était de 14.04 g. Ces mêmes opérations ont été effectuées dans le cas de *Dimocarpus longan*, partant de 4.26 g d'extrait EtOH, et employant 200 mL de chaque phase. 1.08 g d'extrait n-BuOH ont ainsi été obtenus.

5.3.2 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

5.3.2.1 Chromatographie d'adsorption

La méthode généralement utilisée en première intention pour le fractionnement d'extraits bruts ou de fractions complexes est la chromatographie sur colonne ouverte. Les mécanismes de séparation sont les mêmes que ceux qui ont été décrits pour la CCM (*cf.* 5.2.1). La taille de la colonne, la granulométrie de la phase stationnaire et la composition initiale de la phase mobile sont déterminées d'après la quantité et la qualité de l'échantillon à fractionner (extrait brut ou fraction enrichie) et au moyen d'analyses CCM préalables (Hostettmann *et al.*, 1998). Dans le présent travail, la phase stationnaire employée est du Silicagel[®] 60 (Merck) de granulométrie 40-63 μm ou 63-200 μm .

Le conditionnement manuel d'une colonne commence par le dépôt d'un coton hydrophile dans l'embouchure d'écoulement. La phase stationnaire est mise en suspension dans l'éluant de départ puis versée dans la colonne en plusieurs fois jusqu'à stabilisation au niveau désiré. L'introduction de l'échantillon peut être « liquide » ou « solide ». L'introduction liquide peut être employée lorsque l'échantillon se solubilise totalement dans une petite quantité d'éluant de départ. Dès lors, l'échantillon dissout est déposé délicatement sur la phase stationnaire. Dans notre travail, l'échantillon ne se solubilisant pas entièrement dans une petite quantité de liquide, une introduction solide de l'échantillon a été effectuée. L'échantillon est alors adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 2-3 fois sa masse, au moyen d'un solvant dans lequel l'échantillon est totalement soluble. Après évaporation du solvant, l'échantillon adsorbé sur la phase stationnaire est déposé soigneusement à la surface du gel de silice. Le tout est ensuite recouvert d'une fine couche protectrice de sable, afin que l'introduction d'éluant ne perturbe pas le dépôt de l'échantillon.

Les phases mobiles pour colonnes ouvertes utilisées dans ce travail sont des mélanges binaires ou ternaires à base de méthanol, de chloroforme et d'eau. La composition de l'éluant de départ est déterminé par analyse CCM, en essayant de faire migrer les substances d'intérêt à un R_f d'environ 0,3. L'élution se fait en mode gradient et les dernières fractions sont lixiviées avec du méthanol pur. Le débit varie en fonction du type de séparation souhaité et peut aller d'environ 1 mL/min (fractions enrichies) à 10 mL/min (extrait brut). Les fractions sont récupérées dans des tubes à essai (10-250 mL) disposés sur un collecteur (ISCO Retriever II[®], Büchi B-683). L'analyse par CCM du contenu des tubes permet finalement de réunir rationnellement les fractions avant d'éliminer les solvants à l'évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor[®]).

5.3.2.2 Chromatographie d'exclusion

Les chromatographies d'exclusion ou filtration sur gel ont été réalisées soit dans le but d'éliminer les sucres contenus dans les extraits, employant alors comme phase stationnaire du Diaion[®] HP20/L, soit comme méthode de purification de fractions, employant du Sephadex[®] LH-20.

- **Diaion[®] HP20/L**

Le Diaion[®] HP20/L est une résine absorbante non ionique de type polystyrène qui adsorbe la section hydrophobique des molécules organiques. De cette façon, les sucres ne possédant pas de partie apolaire sont élués immédiatement avec de l'eau, tandis que les composés comportant une section hydrophobe sont retenus sur la phase stationnaire (Kubota *et al.*, 2005). Ces derniers sont alors désorbés grâce à du méthanol. Une fraction aqueuse riche en sucres est obtenue dans un premier temps, tandis que les métabolites secondaires sont récoltés dans la phase méthanolique. La fraction intermédiaire contenant les deux solvants, et donc les sucres et les autres composés n'est ainsi généralement pas employée. Les quantités d'extrait obtenues après élimination des sucres sont présentées dans le Tableau 3.2. Pour ce qui est des conditions chromatographiques employées, la longueur et le diamètre de la colonne ouverte sont fonction du poids d'extrait à fractionner, tandis que la quantité d'eau et de méthanol à employer est dictée par le suivi de la séparation sur CCM. Dans le cas de l'extrait méthanolique de *D. microcarpum*, les conditions étaient les suivantes :

- Quantité d'échantillon : 20 g dissout dans 20 mL d'eau
- Colonne : longueur : 80 cm ; diamètre 5 cm
- Volume d'eau : 1.0 L
- Volume de MeOH : 2.5 L

- **Sephadex[®] LH-20**

Cette phase stationnaire a été employée pour la purification des fractions BN et BQ de l'extrait DCM de *D. microcarpum*. Le système de solvants employé était un système binaire hexane–AcOEt 2 :1 → 0 :1, à un débit de 0.4 à 1.0 mL. L'introduction des échantillons a été faite sous forme liquide. Les fractions ont été récoltées par un collecteur automatique ISCO[®] 1220. Le suivi des séparations, ainsi que le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses CCM.

5.3.3 Chromatographie centrifuge à contre-courant (CCC)

La chromatographie centrifuge à contre-courant (CCC) a la particularité d'employer comme phase stationnaire une phase liquide. Cette technique est donc basée sur le partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles, préparées par mélange de deux ou plusieurs solvants. Une des phases est maintenue stationnaire grâce à une force centrifuge ; l'autre est percolée au travers, jouant alors le rôle de phase mobile. Le choix du système de solvants peut se faire selon un diagramme ternaire de phases, ou par l'utilisation de gammes préétablies. La CCC présente l'avantage de séparer les composés selon un mécanisme différent des chromatographies « classiques », c'est-à-dire utilisant une phase solide comme phase stationnaire. Dès lors, la CCC est volontiers employée lorsque des composés ne sont pas séparables par chromatographies « classiques » (Renault *et al.*, 2002). Dans notre travail, les séparations par CCC ont été réalisées sur un appareil CCC-1000 Planetary Countercurrent Chromatograph[®] (Pharma-Tech Research Corporation, Baltimore, MA, USA) d'une capacité de 320 ou 640 mL (d.i. 2.6 mm) avec une vitesse de rotation de 1000 tours/min. Les phases étaient délivrées par deux pompes à flux constant Waters 6000A (Milford, MA, USA) à un débit de 2 à 3 mL/min (boucle d'injection de 20 ou 60 mL). Un détecteur UV/VIS à longueur d'onde variable Knauer (Berlin, Allemagne) (210 ou 254 nm) et un enregistreur LKB Bromma 2210 étaient connectés à l'appareillage. La CCC a été employée à maintes reprises dans le fractionnement de l'extrait DCM de *D. microcarpum*, dont les systèmes de solvants sont donnés au fur et à mesure (*cf.* Figure 3.4 et 3.5). Les fractions ont été recueillies par un collecteur automatique RediFrac[®] (Pharma Biotech), et rassemblées selon les résultats des analyses par CCM.

5.3.4 Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)

Cette technique de séparation permet de fractionner en une analyse plusieurs grammes d'un mélange complexe, avec une résolution convenable. En MPLC, la pression de travail est comprise entre 15 et 20 bars. Dans notre laboratoire nous disposons d'installations comprenant une pompe Büchi 681, un détecteur à longueur d'onde fixe UV Detector K 2001 (Knauer) et un enregistreur Pharmacia LKB-REC 1 (Pharmacia). La phase stationnaire inverse utilisée était exclusivement LiChroprep RP-18 (15-25 μ m ; Merck), conditionnée dans une colonne de verre à gaine plastique (45 x 2-4 cm), adaptée à la pression de travail. Une précolonne à gaine

métallique, remplie de phase stationnaire, permet d'alléger la charge imposée sur les parois de la colonne. Les systèmes d'élution utilisés dans ce travail étaient des mélanges binaires CH₃CN-H₂O ou MeOH-H₂O en proportions variables. La composition de l'éluant de départ est déterminée par une analyse HPLC préalable. Le changement de phase mobile en cours d'analyse s'effectuait à l'aide d'un dispositif à gradient Büchi B-687. L'échantillon a été introduit sous forme solide en le mélangeant à 2-3 fois son poids en phase stationnaire, puis disposé dans une cartouche d'introduction en verre, et finalement recouvert de sable pour remplir le volume mort. Le tout est raccordé en série dans le système à moyenne pression, juste avant la précolonne. L'évolution de la séparation a été suivie par un détecteur UV Knauer variable et enregistrée sur un appareil LKB Bromma 2210. Les fractions ont été récoltées dans des tubes de 250 mL par un collecteur automatique Büchi 684.

5.3.5 Chromatographie liquide semi-préparative à haute pression

La chromatographie liquide semi-préparative à haute pression est une technique largement répandue pour les étapes finales de purification ; elle est utilisée pour la séparation de mélanges de 1 à 100 mg. Par convention, elle correspond aux colonnes comportant un diamètre interne (d.i.) de 8 à 25 mm, et des particules de diamètre de 5 à 10 µm. Dans le présent travail, cette technique a été employée afin de purifier la fraction BP de l'extrait DCM de *D. microcarpum*. Cette séparation par chromatographie semi-préparative a été réalisée sur une colonne à compression radiale µBondapak[®] de dimension 100 x 25 mm d.i., granulométrie 10 µm (Waters, Milford, MA, USA), employant une pompe 2 voies Shimadzu LC-8A. La détection à 210 nm, a été réalisée grâce à un détecteur UV LKB Bromma 2151 et à un enregistreur LKB 2210. La récolte des fractions a été réalisée manuellement.

5.3.6 Extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide est une technique chromatographique solide-liquide utilisant une cartouche remplie de phase stationnaire, et qui permet une purification préliminaire d'un extrait. L'élution de la cartouche se fait grâce à une mise sous vide. Cette technique présente l'avantage d'être très rapide, et peu coûteuse malgré l'utilisation unique de chaque cartouche. Elle est donc très adaptée pour la préparation d'échantillons destinés à être analysés par spectrométrie de masse (MS). Ainsi, cela évite l'introduction de composés difficilement éliminables dans l'analyseur. L'emploi d'un système de solvants approprié permet l'élimination des composés très lipophiles, tout en solubilisant un maximum de métabolites secondaires. Dans notre travail, chaque extrait analysé par UPLC[®]/ESI/TOF-MS a été préparé de cette manière. La cartouche Sep-Pak[®] (Waters Corporation, Milford, Mass, USA) employée a été lavée avec 2 mL de MeOH qualité HPLC (SpS, Romil[®]), de manière à libérer les chaînes constituant la phase stationnaire. La cartouche est ensuite conditionnée avec 1 mL de solution MeOH-H₂O 85:15. Une prise de 5.0 mg d'échantillon, préalablement solubilisé dans 0.5 ml de MeOH-H₂O 85:15 est déposé sur la cartouche, en ajustant le débit à environ 1 goutte/min. Les métabolites secondaires sont élués par 1 mL du système de solvants. Le filtrat ainsi obtenu est ensuite évaporé, puis dissout dans 250 µL de solvant, de manière à obtenir une solution de 20 µg/mL.

5.4 Méthodes physico-chimiques

5.4.1 Mesure du point de fusion (Mp)

Les points de fusion (Mp, P.F. en français) des composés purs sont mesurés à l'aide d'un appareil à plaque chauffante Mettler FP 80/82. Une pointe de spatule du composé est déposée sur une lamelle en verre, elle-même déposée sur une plaque qui est progressivement chauffée. Le changement d'état est observé à l'aide d'un microscope Wild, et la température correspondante est relevée, sans correction.

5.4.2 Polarimétrie ($[\alpha]_D$)

La polarimétrie est une méthode d'analyse basée sur la mesure du pouvoir rotatoire, propriété que présentent certaines substances, dites optiquement actives, de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée linéaire. Une déviation dans le sens des aiguilles d'une montre caractérise les composés dextrogyres (+), alors que les composés lévogyres (-) entraînent une déviation opposée. Aucun lien n'existe cependant entre le signe du pouvoir rotatoire observé et la nature de l'énantiomère analysé. Le pouvoir rotatoire des composés isolés, dissous dans du méthanol ou du chloroforme, est mesuré à température ambiante grâce à un polarimètre Perkin Elmer 241 MC[®] équipé d'une lampe à sodium. La solution, introduite dans une cellule de 10 cm de longueur (l), est traversée par un rayon lumineux polarisé à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589,3 nm). La formule utilisée est alors la suivante :

$$[\alpha]_D^T = \frac{1000 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$

α = angle de rotation en degrés lu à la température T,

l = longueur en décimètres de la cellule polarimétrique,

c = concentration de la substance en g/L.

Dans le chapitre 5.7, les concentrations se rapportant aux mesures polarimétriques sont exprimées par convention en g/100 mL.

5.4.3 Spectrophotométrie UV-visible

Les composés purs isolés ont été dissous dans du méthanol (MeOH) ou de l'acétonitrile (CH₃CN). Leur spectre UV-visible a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 20[®], piloté par un logiciel développé par la même entreprise. Les données issues de ces mesures sont mentionnées dans le chapitre 5.7 sous la forme : $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ), où $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm représente les longueurs d'onde des maxima en nm. ϵ est l'absorbance molaire à ces longueurs d'onde, si b (couche de solution traversée) est exprimé en centimètres et c (concentration) en moles/L dans la formule suivante (loi de Beer-Lambert) :

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b$$

5.4.4 Spectrométrie infrarouge (IR)

Le spectre IR du composé **G** a été déterminé sur un spectromètre FT-IR Spectrum One[®] Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA). La technique employée pour la préparation de l'échantillon solide est la création d'une pastille de KBr. 2 mg du composé pur ont été intimement broyés avec 150 mg de KBr anhydre (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suisse). Ce mélange de poudre est ensuite introduit dans un moule, puis mis sous presse hydraulique (Perkin Elmer), à 10 bar, afin d'obtenir une pastille transparente. Le spectre de cette dernière a été mesuré entre 400 et 4000 cm⁻¹ ; largeur de fente spectrale 2 cm⁻¹.

5.4.5 Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse (MS, SM en français) est fondée sur la mesure directe du rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires (m/z), positives ou négatives, d'ions obtenus à partir de la substance à analyser. Ce rapport est exprimé en daltons (1 Da = masse de l'atome d'hydrogène). Les ions sont formés dans la « source » de l'appareil, puis séparés par l'« analyseur » et finissent par atteindre le « détecteur ». Le spectre obtenu représente l'abondance relative des différentes espèces ioniques présentes, comme une fonction de m/z (Silverstein *et al.*, 1998). En fonction de la source d'ionisation employée, l'analyse par spectrométrie de masse permet d'obtenir des informations sur le processus de fragmentation d'un composé ou sur sa masse moléculaire. L'impact électronique (EI) provoque une fragmentation forte, impliquant une disparition presque totale de l'ion moléculaire. Par contre, ce procédé permet d'obtenir des informations sur les processus de fragmentation, et donc sur la structure des composés étudiés. Etant donné que les diterpènes de type clérodane et labdane n'ont pas ou peu été étudiés à ce niveau-là, cette méthode n'a pas été d'une grande aide. Certains produits purs isolés ont tout de même été caractérisés par ce mode d'ionisation. L'ensemble des opérations s'effectue dans une enceinte dans laquelle règne un vide poussé (10^{-3} à 10^{-6} Pa). L'appareillage utilisé dans notre laboratoire est un spectromètre de masse tandem à analyseurs quadrupolaires TSQ 700[®] (Finnigan MAT) dont les paramètres expérimentaux sont les suivants : une énergie de 70 eV est appliquée sur le filament lors des mesures. La température de la sonde augmente linéairement de 50 °C à 300 °C en 1 min, alors que les températures de la source et des quadrupôles sont maintenues respectivement à 150 °C et 70 °C.

Un mode d'ionisation douce, comme par exemple l'électrospray (ESI) permet, quant à lui de détecter l'ion pseudo-moléculaire, et donc de connaître la masse moléculaire du composé. L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (HRESI-MS) permet, grâce à un couplage entre l'ESI et un analyseur TOF (*Time Of Flight*), de déterminer la formule brute du composé. Tous les composés nouveaux isolés ont été soumis à cette analyse. Les mesures ont été réalisées par le Professeur T. Jenny du Laboratoire de Chimie Organique à l'Université de Fribourg, sur un spectromètre de masse à électrospray Bruker FTMS 4.7T BioAPEX II[®].

5.4.6 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La méthode de choix pour l'identification des composés naturels isolés est la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN), qui repose sur la propriété qu'ont des noyaux tels que ^1H , ^{13}C , ^{14}N et ^{17}O de posséder un moment magnétique nucléaire permanent. Placés dans un champ magnétique extérieur, ils prennent par rapport à celui-ci certaines orientations bien définies, auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts. Pour une valeur donnée de champ, des transitions entre niveaux immédiatement contigus sont dues à l'absorption de radiations électromagnétiques de longueurs d'onde caractéristiques dans la région des radiofréquences (Silverstein *et al.*, 1998).

Les mesures RMN ont été effectuées sur spectromètre à impulsions UNITY Inova 500[®] de Varian, piloté par le logiciel Solaris VNMR[®] du même fabricant, installé sur une station de travail Sun[®]. Sur ce type d'appareil, toutes les transitions sont excitées simultanément par irradiation avec une impulsion multifréquence (large bande), puis l'ordinateur transforme les interférogrammes ainsi obtenus en un spectre conventionnel par une opération mathématique (transformée de Fourier). Les déplacements chimiques δ des différents signaux sont exprimés en ppm par rapport au signal de référence du standard interne, le tétraméthylsilane (TMS). Pour chaque élément possédant un moment magnétique nucléaire permanent, ces déplacements sont caractéristiques de son environnement nucléaire et électronique dans la molécule. Les solvants deutérés utilisés pour les mesures NMR dans le présent travail sont le CDCl_3 , le CD_2Cl_2 , le CD_3OD et le $\text{DMSO}-d_6$ (D^r Glaser SA). La température de travail a été de 26 °C pour toutes les mesures effectuées.

Les spectres RMN ^1H sont enregistrés à une radiofréquence de 499,87 MHz et les spectres RMN ^{13}C à 125,70 MHz. Des mesures complémentaires, dites « bidimensionnelles », sont nécessaires pour mettre en évidence des corrélations homo- et hétéronucléaires entre les atomes de carbone et d'hydrogène au sein des molécules analysées. Il s'agit des expériences suivantes, réalisées grâce à des programmes de séquences d'impulsions, fournis par Varian pour l'instrument décrit plus haut : gHMBC, gHSQC, gdqfCOSY et DEPT.

5.4.7 Analyse par diffraction aux Rayons X (RX)

Les analyses par diffraction aux Rayons X (RX) ont été menées dans le Laboratoire de Chimie Supramoléculaire des Lanthanides du Professeur J.C. Bünzli (EPFL, Lausanne), par le D^r R. Scopelliti. Les données d'intensité ont été collectées à 140 °K (-133 °C), sur un diffractomètre Oxford Diffraction KM4/Sapphire CCD[®], équipé d'un monochromateur au graphite (radiation MoK α , λ = 0.71073 Å). L'analyse des résultats a été effectuée par le Professeur H. Stoeckli-Evans (Institut de Microtechnique, Université de Neuchâtel, Neuchâtel). Les structures ont été résolues par les méthodes directes en utilisant le programme SHELXS[®] (Sheldrick, 1990). Les affinements et les calculs ultérieurs ont été effectués avec le système SHELXL-97[®] (Sheldrick, 1999). Les protons ont été introduits de façon théorique en utilisant les paramètres par défaut de SHELXL[®], et affinés en tant que groupes rigides. Les atomes autres que H ont été affinés anisotropiquement, en utilisant une matrice complète pondérée en fonction des moindres carrés sur F². Les deux composés ont cristallisé selon le groupe chiral d'espace orthorhombique $P 2_12_12_1$. Cependant, il n'a pas été possible de déterminer leur configuration absolue.

Les données cristallographiques des composés **B** et **D** ont été déposées au “ *Cambridge Crystallographic Data Centre* ”. Les numéros de déposition sont CCDC 297329 pour le composé **B**, et CCDC 297330 pour le **D**. Des copies des données peuvent être obtenues gratuitement en contactant le CCDS, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (Fax : +44-1223/336-033; e-mail: deposit@ccds.cam.ac.uk).

5.5 Méthodes de criblage chimiques, biochimiques et biologiques

5.5.1 Réactifs de révélation chimique sur CCM

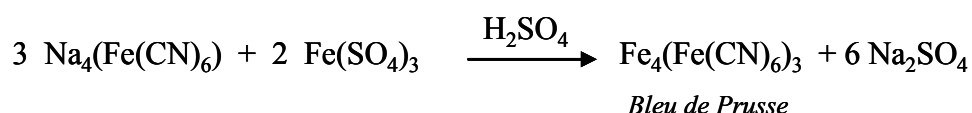
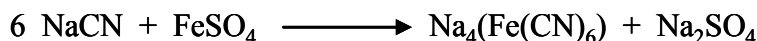
La vaporisation de réactifs chimiques en solution sur les chromatogrammes sur couche mince (CCM), permettent de compléter les observations faites visuellement sous les lampes UV à 254 nm (extinction de la fluorescence) et 366 nm (fluorescence propre). En effet, un choix adapté de réactifs permet non seulement de mettre en évidence des constituants ou classes de constituants présents dans un extrait (criblage général), mais offre en plus une méthode simple et rapide pour localiser un composé particulier dans un mélange (extrait ou fraction). L'utilisation d'un réactif polyvalent est particulièrement adaptée pour réunir rationnellement les fractions primaires récoltées suite à une séparation préparative ou semi-préparative. Le Tableau 5.2 présente les différents réactifs chimiques pour CCM utilisés dans ce travail.

Tableau 5.2 – Réactifs chimiques pour la révélation des CCM

Réactif : substances révélées	Mode d'utilisation
Godin (1954) : réactif polyvalent	Mélanger en parts égales une solution éthanolique de vaniline à 1% et une solution aqueuse d'acide perchlorique à 3 %. Vaporiser le mélange sur la plaque, puis une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10 %. Après chauffage intense, les composés organiques apparaissent sous forme de taches colorées (Wagner and Bladt, 1996).
Chlorure de fer : tanins, polyphénols	Préparer une solution de FeCl_3 à 10 % dans un mélange MeOH- H_2O (1:1) et la vaporiser sur la plaque. Les polyphénols apparaissent sous forme de taches de couleur (Wagner and Bladt, 1996).
Dragendorff : alcaloïdes	Préparer une solution contenant 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'ac. tartrique dans 40 ml d'eau (= A) et une solution contenant 16 g de KI dans 40 ml d'eau (= B). Mélanger extemporanément 5 ml de A, 5 ml de B, 100 ml d'eau et 20 g d'acide tartrique. Vaporiser le mélange sur la plaque. Les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orange (Wagner and Bladt, 1996).

5.5.2 Détection de HCN par la formation de Bleu de Prusse

Nous avons mis en évidence la formation de HCN par le composé **G**, selon les réactions suivantes (Svehla, 1979):



Notre protocole a été adapté de la manière suivante : A 5 mg de composé **G** pur ont été ajoutés 0.3 mL de H₂SO₄ 10 %. Ce mélange a été chauffé à 80 °C pendant 15 minutes. Les opérations suivantes ont été effectuées à chaud : ajout de NaOH 20 % jusqu'à obtention d'un pH basique (environ 0.5 mL), et chauffage sous agitation pendant 10 min. 1.5 mL de Na₂SO₄ 25 % puis environ 1 mL de H₂SO₄ 10 % (jusqu'à pH 1) ont ensuite été ajoutés. La solution a à nouveau été chauffée à 80 °C pendant 10 minutes. Finalement, un excès de FeCl₃ a été ajouté (environ 500 mg), et un précipité bleu est apparu.

5.5.3 Mise en évidence de l'activité antifongique sur *Cladosporium cucumerinum* par bioautographie directe

La moisissure *Cladosporium cucumerinum* est un champignon microscopique phytopathogène s'attaquant particulièrement au membres de la famille des Cucurbitaceae. D'autres espèces du genre *Cladosporium* peuvent être impliquées dans des affections touchant l'homme, comme des allergies respiratoires, des infections cutanées ou du système nerveux central (Salaki *et al.*, 1984; Cruz *et al.*, 1997).

Le test par bioautographie directe utilisé dans notre laboratoire a été décrit par Homans *et al.* (1970). Les plaques CCM développées et séchées, sont vaporisées avec une suspension de conidies de *C. cucumerinum* (fournies par Syngenta) dans du bouillon de Sabouraud maltosé (Difco). Les plaques sont ensuite incubées pendant 3 jours à température ambiante en atmosphère humide (boîte en PEHD avec un fond d'eau). Le champignon se développe en produisant un pigment gris-vert, ce qui permet la visualisation aisée des zones d'inhibition de

croissance incolores. Les extraits et fractions sont déposés à raison de 100 µg, les produits purs de 10 µg. Le miconazole est utilisé comme contrôle positif (10 µg), alors que le chloramphénicol est déposé comme contrôle négatif (10 µg).

5.5.4 Mise en évidence de l'activité antifongique sur *Candida albicans* par bioautographie « agar overlay »

Candida albicans est une levure faisant partie de la flore commensale gastro-intestinale, buccale et vaginale de l'être humain. Ce champignon microscopique peut cependant devenir pathogène chez les personnes dont les mécanismes de défense sont déficients, comme par exemple chez les patients atteints du SIDA. Les résistances du microorganisme à l'arsenal thérapeutique existant étant de plus en plus nombreuses, il est nécessaire d'identifier de nouveaux composés toxiques pour cette levure.

Le test par bioautographie « *agar overlay* » utilisé dans notre laboratoire avec *C. albicans* a été mis au point par Rahalison *et al.* (1991). Les chromatogrammes sur couche mince sont d'abord développés sur des plaques de silicagel de 10 x 20 cm avec un support en verre. La phase mobile doit être exempte d'acide. Il est très important de sécher complètement les plaques afin d'éliminer toute trace de solvant. Toutes les opérations décrites ci-après sont effectuées sous flux laminaire, avec les précautions d'usage lors de la manipulation de microorganismes potentiellement pathogènes. La souche de *C. albicans* utilisée est fournie par le D^r Michel Monod du Service de Dermatologie du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV). Après développement en boîte de Pétri sur gélose de Sabouraud (Biokar), une colonie du germe est mise en culture liquide dans 50 mL de bouillon de Sabouraud (Biokar). Après agitation pendant 1 nuit à température ambiante, 1 mL de cette solution est prélevé afin d'inoculer 50 mL d'un second milieu de culture à base de bouillon de Sabouraud. Ce dernier est agité à température ambiante pendant 6 h, afin d'atteindre la phase de croissance exponentielle du microorganisme. 5 mL de cette solution sont ensuite introduits dans chacune des fractions de 50 mL de milieu gélifié à l'extrait de malt (Biokar), préparées et maintenues à l'état liquide à 45 °C. Ces milieux contiennent alors environ 10⁵ cellules/mL. La technique de l'« *agar overlay* » consiste à verser sur les plaques CCM développées, à l'aide d'une pipette stérile et en fine couche de 1-2 mm d'épaisseur, l'inoculum à base de gélose à l'extrait de malt. Ce dernier se solidifie alors en refroidissant. Après incubation pendant 1 nuit à 30 °C en atmosphère humide (boîte de PEHD avec un fond d'eau), les bioautogrammes sont révélés par vaporisation d'une

solution aqueuse de bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2*H*-tétrazolium (MTT) à 2.5 mg/mL. Cette substance, métabolisée par *C. albicans* en un dérivé formazan violet, permet de visualiser, après 4 h d'incubation dans les mêmes conditions que précédemment, les zones d'inhibition incolores sur fond violet.

De l'éthanol à 94 % est vaporisé sur les plaques, pour arrêter la croissance fongique et pour la conservation. Les extraits et fractions sont déposés à raison de 100 µg, les produits purs de 10 µg. Le miconazole est utilisée comme contrôle positif (10 µg), alors que le chloramphénicol est déposé comme contrôle négatif (10 µg).

5.5.5 Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur *Bacillus subtilis* par bioautographie « agar overlay »

Bacillus subtilis est une bactérie aérobie à Gram positif, sporogène, se présentant sous forme de bâtonnets généralement mobiles. Ce germe, parfois responsable d'intoxications alimentaires ou d'infections opportunistes chez l'homme, peut être aisément manipulé en laboratoire et de manière sûre. L'intérêt de son utilisation dans nos tests de routine réside dans le fait qu'une espèce voisine, *B. anthracis*, est l'agent du charbon (*anthrax* des Anglo-Saxons). Cette infection peut atteindre de nombreuses espèces animales (mammifères et oiseaux), y compris l'homme, mais avec une nette prédilection pour les herbivores (Berche *et al.*, 1988). On peut espérer que, par réaction croisée, des molécules actives contre *B. subtilis* le soient également contre *B. anthracis*.

Le test par bioautographie « agar overlay » utilisé dans notre laboratoire avec *B. subtilis*, est très similaire à celui qui est utilisé pour le dépistage de l'activité anti-*Candida* (5.5.4) (Rahalison *et al.*, 1991). Les chromatogrammes sont développés de la même manière que pour le test avec *C. albicans* (plaques à support de verre), et les manipulations ultérieures se font également sous flux laminaire avec les précautions d'usage décrites auparavant. La souche de *B. subtilis* utilisée (ATCC 6633) est obtenue chez Sigma. Après développement en boîte de Pétri sur gélose de Luria-Bertani (10 g/L tryptone + 5 g/L extrait autolytique de levure + 10 g/L NaCl + 15 g/L agar bactériologique type A, Biokar), une colonie du germe est prélevée et mise en culture liquide dans 50 mL de bouillon de Luria-Bertani (gélose de Luria-Bertani *sans* l'agar). Après agitation pendant 1 nuit à température ambiante, un volume de 0,5 mL de cette solution est prélevé afin d'inoculer 50 mL d'un second milieu de culture à base de bouillon de Luria-Bertani. Ce dernier est agité à température ambiante pendant 8 h afin d'atteindre la phase de croissance

exponentielle du microorganisme. 0,5 mL de cette solution est ensuite introduite dans chacune des fractions de 50 mL de gélose de Luria-Bertani, préparées et maintenues à l'état liquide à 45 °C. Ces milieux contiennent alors environ 10^8 cellules/mL.

L'inoculum à base de gélose de Luria-Bertani (environ 20 mL) est versé en fine couche (1-2 mm) sur les plaques CCM de 10 x 20 cm, et se solidifie en refroidissant. Après incubation pendant 1 nuit à 30 °C en atmosphère humide (boîte de PEHD avec un fond d'eau), les bioautogrammes sont révélés par vaporisation d'une solution aqueuse de bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT) à 2,5 mg/mL. Cette substance est presque instantanément métabolisée par *B. subtilis* en un dérivé formazan violet, permettant ainsi de visualiser les zones d'inhibition incolores sur fond violet. Pour arrêter la croissance bactérienne et la conservation des bioautogrammes, de l'éthanol à 94 % est ensuite vaporisé sur les plaques. Après avoir séché, ces dernières sont finalement recouvertes d'un film adhésif transparent. Les extraits et fractions sont déposés à raison de 100 µg, les produits purs de 10 µg. Le chloramphénicol est utilisé comme contrôle positif (10 µg).

5.5.6 Mise en évidence de l'activité antiradicalaire sur le DPPH

Les radicaux libres sont produits dans notre organisme sous l'action de facteurs déclenchants externes (UV, radiations ionisantes, fumées de combustion, poussières d'amiante et de silice, antiseptiques, médicaments, pesticides, solvants,...), mais également dans le cadre de phénomènes biologiques importants, comme la respiration cellulaire. Certaines cellules immunitaires (leucocytes, macrophages) utilisent quant à elles les radicaux libres pour la destruction de microorganismes infectieux dans leurs lysosomes. Parmi les radicaux libres auxquels notre organisme est exposé, on retrouve les espèces réactives de l'oxygène telles que les radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyle ($OH^{\cdot}$) et peroxydes ($RO_2^{\cdot}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2). La production permanente de ces molécules réactives dans notre corps est généralement contrôlée par l'action de systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, etc...) ou d'antioxydants (vitamine E, β -carotène, etc...). Lorsque cet équilibre précaire est rompu en faveur des radicaux libres, il se produit un stress oxydatif, qui va entraîner la peroxydation des lipides et l'attaque des bases azotées et des acides aminés. Par les dommages ainsi causés à nos cellules, ces différents mécanismes semblent jouer un rôle prépondérant dans les phénomènes du vieillissement et engendrer des pathologies tels que des cancers et des troubles neurodégénératifs, comme les maladies

d'Alzheimer ou de Parkinson. L'apport exogène d'antioxydants (alimentation, médicaments,...) pourrait donc ralentir, voire prévenir ces désordres physiologiques (Cuendet, 1999).

Pour détecter l'activité antiradicalaire dans notre laboratoire, nous utilisons le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en routine repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. Le test peut être effectué sur plaque CCM (évaluation qualitative ou semi-quantitative d'extraits, fractions ou produits purs) et sur microplaque à 96 puits (évaluation quantitative de produits purs). Compte tenu des résultats obtenus dans notre travail, seul le test sur plaque CCM a été employé ici. Le mode opératoire est le suivant : Vaporiser sur les plaques CCM développées et séchées, une solution méthanolique de DPPH à 0,2 %. Après un temps de réaction optimal de 30 min, les composés à propriété antiradicalaire sont localisés par l'apparition de zones jaunes sur fond violet.

5.5.7 Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (Test sur plaque)

L'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7) est l'enzyme responsable de l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) au niveau des synapses cholinergiques. Les inhibiteurs de cette enzyme (iAChE) provoquent donc une augmentation de la transmission cholinergique, avec les effets parasympathomimétiques qui l'accompagnent. Leur usage clinique regroupe des indications telles que la maladie d'Alzheimer, le glaucome et la myasthénie grave.

Le test de l'inhibition de l'AChE mené dans notre laboratoire pour le criblage des extraits et produits naturels est le suivant (Marston *et al.*, 2002) : une solution d'AChE à 1000 unités dans 150 mL de tampon tris de pH 7,8 (6 g/L H₂O = 0,05 M) est préparée, puis 150 mg d'albumine y sont ajoutés (= solution A). Mélanger 1 part d'une solution éthanolique d'acétate de 1-naphtyle à 250 mg/100 mL et 4 parts d'une solution aqueuse de « Fast Blue Salt B » à 200 mg/80 mL (= solution B). Les plaques CCM développées et séchées sont vaporisées avec la solution A, puis incubées 20 min en atmosphère humide (boîte en PEHD avec un fond d'eau) à 37 °C. La solution B est ensuite vaporisée : une coloration pourpre apparaît sur la plaque CCM après 1-2 min, sauf dans les zones incolores occupées par des inhibiteurs de l'AChE. Les extraits et fractions sont déposés à raison de 10 µg, les produits purs de 1 µg. La galanthamine est utilisée comme contrôle positif (1 µg).

5.5.8 Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (Test en solution)

Compte tenu de la forte inhibition de l'acétylcholinestérase par le composé **B** sur CCM, il a ensuite été testé en solution par le test d'Ellman. Ce dernier permet une quantification de l'activité par mesure du pourcentage d'inhibition de l'enzyme. Le composé a été testé à une concentration de 10^{-5} M. Ce test sur microplaque a été réalisé en collaboration avec le groupe de Pharmacochimie du Laboratoire de Chimie Thérapeutique (Prof P.A. Carrupt, Université de Genève) (Bruehlmann *et al.*, 2004). La galanthamine, utilisée comme composé de référence, présente une inhibition de 97 % à 10^{-5} M.

5.5.9 Mise en évidence de la cytotoxicité

Ce test a été réalisé par le Professeur M.C.Recio (Departament de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Espania).

La cytotoxicité du composé **G** a été mesurée par un test colorimétrique modifié du 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazolium bromure (MTT) (Mosmann, 1983).

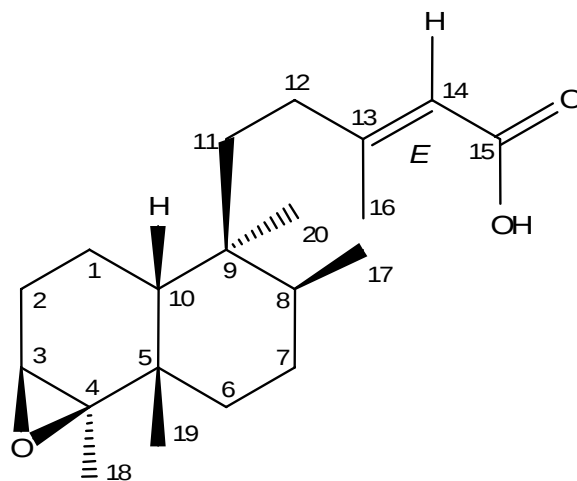
Des neutrophiles péritonéaux de rats, des neutrophiles humains (1×10^6 cellules) et des macrophages de souris RAW 264.7 (2×10^5 cellules) ont été exposés au composé **G** (5 μ L d'une solution à 100 μ M du composé **G**) sur microplaque, pendant 1-3 heures pour les neutrophiles humains et de rats, et pendant 24 heures à 37 °C pour les macrophages de souris. Ensuite, 100 μ L d'une solution à 5 mg/mL de MTT ont été ajoutés aux microplaques, lesquelles ont été incubées à 37 °C (3-4 heures) jusqu'à ce que des dépôts violets (dérivé formazan) apparaissent. Ce métabolite formé par les cellules a ensuite été solubilisé dans 100 μ L de diméthylsulfoxyde (DMSO). Toutes les expériences ont été réalisées en *triplica*. L'absorbance a été mesurée à 490 nm par l'intermédiaire d'un lecteur de plaque Labsystems Multiskan® MCC/340. Une diminution de l'absorbance de la solution indique une diminution de la viabilité cellulaire et donc une cytotoxicité du composé testé.

5.6 Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire du composé **E** a été réalisée par le Prof P.A. Carrupt (Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Université de Genève). La structure 3D du composé **E** a été effectuée sur station de travail PC LINUX[®], utilisant le logiciel de modélisation moléculaire SYBYL[®] 7.2 (Tripos Associates, St.Louis, MO, USA), incluant le SLN23[®] (*Sybyl Line Notation*) et le SPL[®] (*Sybyl Program Language*). La géométrie de départ du composé a été optimisée à l'aide du champ de forces « *Merck Molecular Force Field* » (MMFF94s), incluant les charges atomiques partielles (Halgren, 1999). Le conformère le plus proche des données RMN NOESY a été retenu (Figure 3.38-b).

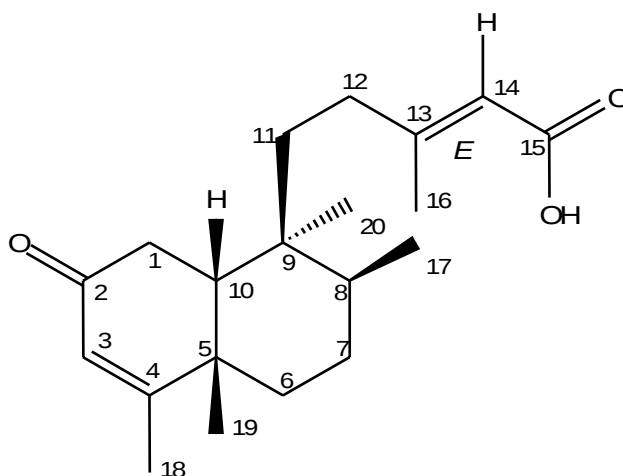
5.7 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

Composé A



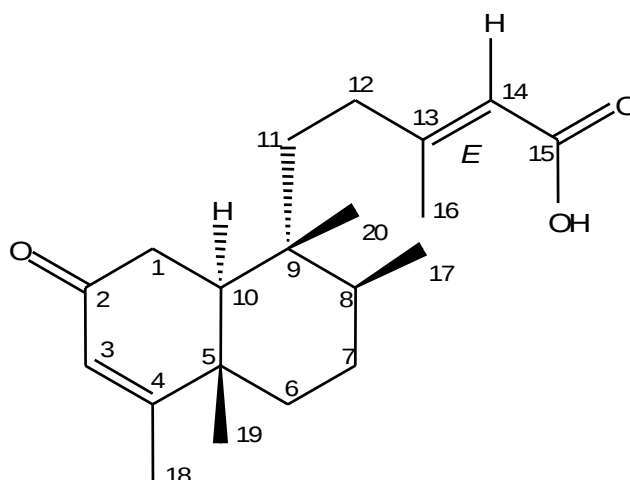
Nom chimique	acide [5-(5,6-époxy-1,2,4a,5-tétraméthyl-décahydronaphtalène-1-yl)-3-méthylpent-2-énoïque]
Nom trivial	acide 3 β ,4 β -époxy-5 β ,10 β - <i>cis</i> -17 β ,20 α - <i>ent</i> -clérod-13 <i>E</i> -én-15-oïque
Formule	C ₂₀ H ₃₂ O ₃
Masse exacte	320.2351 Da
Aspect	huile jaune
$[\alpha]_D^{23}$	+70.6 (<i>c</i> 0.1, CHCl ₃)
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{CN}}$ nm (log ϵ)	228 (4.01)
HRESI-MS	<i>m/z</i> 343.22384 [M+Na] ⁺ (masse calculée 343.22492)
Données ¹ H-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.3
Données ¹³ C-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.4

Composé B



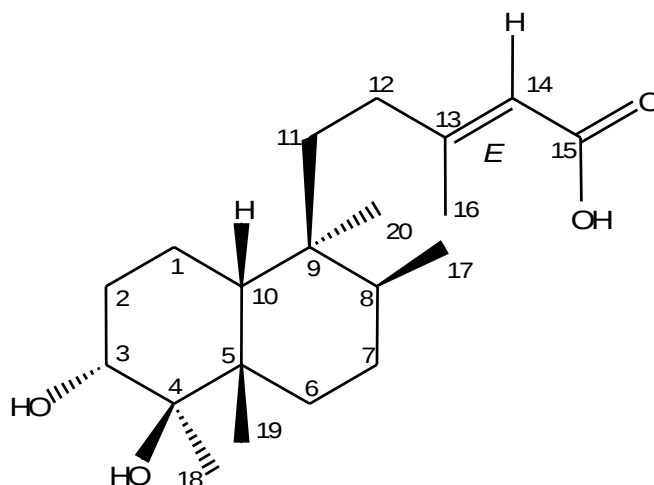
Nom chimique	acide 2-oxo-3-èn-5 β ,10 β - <i>cis</i> -17 β ,20 α - <i>ent</i> -clérod-13 <i>E</i> -èn-15-oïque
Formule	C ₂₀ H ₃₀ O ₃
Masse exacte	318.2194 Da
Aspect	aiguilles blanches (hexane-AcOEt)
Mp	159-164 °C
$[\alpha]_D^{23}$	-55.1 (<i>c</i> 1.2, CHCl ₃)
UV $\lambda_{\max}^{CH_3CN}$ nm (log ϵ)	238 (4.23)
EI-MS 70 eV <i>m/z</i> (int. rel.)	319 [M] ⁺ (7), 272 (5), 205 (16), 163 (28), 135 (40), 124 (100), 122 (57), 95 (58), 69 (32), 55 (35)
HRESI-MS	341.20890 [M+Na] ⁺ (masse calculée 341.20926)
Données ¹ H-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.3
Données ¹³ C-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.4
Données RX	<i>cf.</i> 5.7.1

Composé C



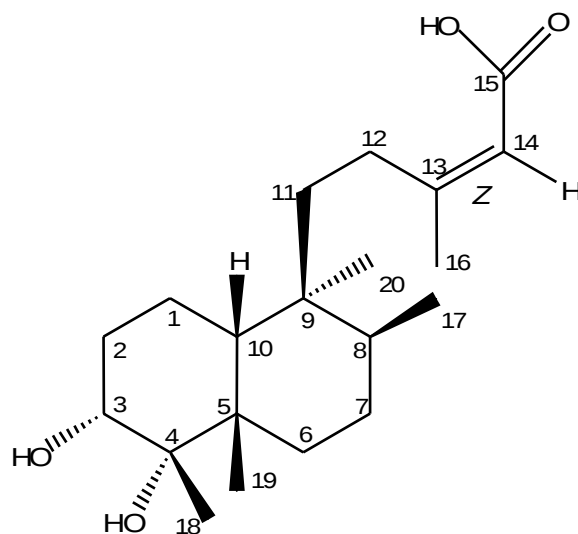
Nom chimique	acide 2-oxo-3-èn-5β,10α- <i>trans</i> -17β,20β- <i>ent</i> -clérod-13 <i>E</i> -èn-15-oïque
Nom trivial	acide 2-oxo-kolavénique
Formule	C ₂₀ H ₃₀ O ₃
Masse exacte	318.2194 Da
Aspect	poudre blanche amorphe
$[\alpha]_D^{23}$	-56.5 (c 0.7 ; CHCl ₃)
Données ¹ H-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.3
Données ¹³ C-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.4

Composé D



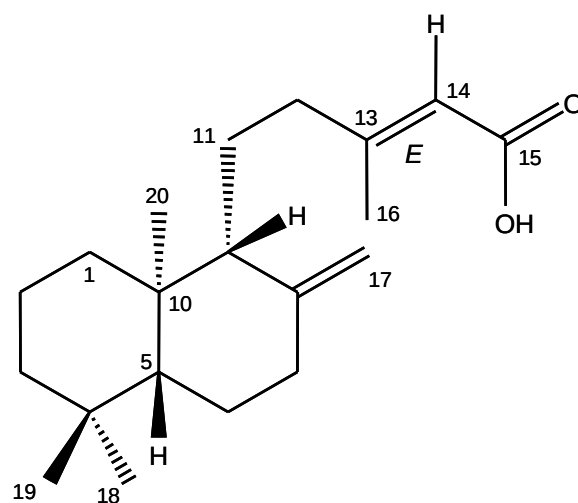
Nom chimique	acide 3 α ,4 β -dihydroxy-5 β ,10 β - <i>cis</i> -17 β ,20 α - <i>ent</i> -clérod-13 <i>E</i> -èn-15-oïque
Formule	C ₂₀ H ₃₄ O ₄
Masse exacte	338.2457 Da
Aspect	aiguilles blanches (hexane-AcOEt)
Mp	216-221 °C
$[\alpha]_D^{23}$	-20.4 (<i>c</i> 0.9, MeOH)
UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ)	225 (3.63)
EI-MS 70 eV <i>m/z</i> (int. rel.)	338 [M] ⁺ (0.2), 320 (43), 303 (3), 277 (22), 225 (100), 207 (42), 189 (46), 163 (38), 149 (18), 137 (34), 123 (44), 113 (16), 109 (34), 95 (79), 84 (36), 69 (29), 55 (29)
HRESI-MS	361.23507 [M+Na] ⁺ (masse calculée 361.23548)
Données ¹ H-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.3
Données ¹³ C-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.4
Données RX	<i>cf.</i> 5.7.1

Composé E



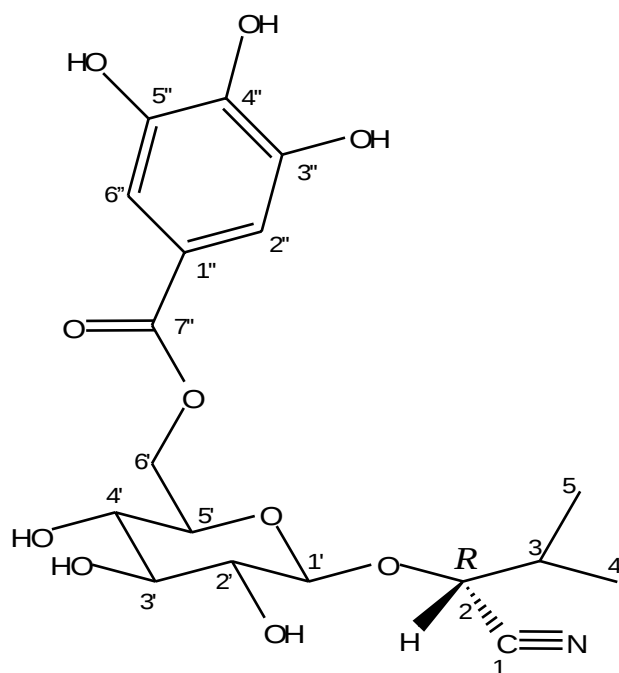
Nom chimique	acide 3 α ,4 α -dihydroxy-5 β ,10 β - <i>cis</i> -17 β ,20 α - <i>ent</i> -clérod-13 <i>Z</i> -èn-15-oïque.
Formule	C ₂₀ H ₃₄ O ₄
Masse exacte	338.2457 Da
Aspect	huile jaune
$[\alpha]_D^{23}$	-2.6 (<i>c</i> 1.8, CHCl ₃)
UV $\lambda_{\max}^{CH_3CN}$ nm (log ϵ)	225 (3.38)
EI-MS 70 eV <i>m/z</i> (int. rel.)	338 [M] ⁺ (0.01), 320 (13), 303 (53), 277 (5), 225 (16), 207 (46), 189 (61), 163 (26), 149 (42), 137 (41), 123 (76), 113 (76), 109 (56), 95 (100), 84 (26), 69 (56), 55 (51)
HRESI-MS	361.23507 [M+Na] ⁺ (masse calculée 361.23548)
Données ¹ H-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.3
Données ¹³ C-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.4

Composé F



Nom chimique	acide <i>ent</i> -8(17), <i>E</i> -labdadièn-15-oïque
Nom trivial	(-) acide copalique
Formule	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
Masse exacte	304.2402 Da
Aspect	poudre blanche amorphe
$[\alpha]_D^{23}$	-14.7 (<i>c</i> 1.7, CHCl ₃)
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{CN}}$ nm (log ϵ)	225 (3.23)
EI-MS 70 eV <i>m/z</i> (int. rel.)	304 [M] ⁺ (20), 289 (85), 256 (45), 205 (29), 177 (44), 149 (41), 137 (100), 123 (54), 109 (62), 95 (76), 81 (69), 69 (73), 55 (70)
HRESI-MS	327.22953 [M+Na] ⁺ (masse calculée <i>m/z</i> 327.23000)
Données ¹ H-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.3
Données ¹³ C-RMN	<i>cf.</i> Tableau 5.4

Composé G



Nom chimique provisoire	6'-O-galloyl-(<i>R</i>)-épihétérodendrine
Formule	C ₁₈ H ₂₃ NO ₁₀
Masse exacte	413.1322 Da
Aspect	poudre orange amorphe
Mp	111-115°
$[\alpha]_D^{23}$	+84.5 (c 0.7, MeOH)
UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ)	218 (4.29), 275 (3.88)
IR $\nu_{\max}$ (KBr) cm ⁻¹	3379 (OH), 2968, 2258 (C≡N), 1706 (C=O), 1610, 1535, 1448, 1347, 1227, 1077-1023, 876, 825, 769, 631
HRESI-MS m/z	436.11864 [M+Na] ⁺ (masse calculée m/z 436.12197)
Données ¹ H- et ¹³ C-RMN	cf. Tableau 5.5

Tableau 5.3 – Données RMN ^1H (500 MHz) des diterpènes **A-F** (δ en ppm et J en Hz).

Les mesures ont été effectuées dans du CDCl_3 pour les composés **A** et **D-F**. Le composé **B** a été mesuré dans CD_2Cl_2 et le composé **C** dans CD_3OD .

position	A	B	C	D	E	F
1	1.30 m 1.40 m	2.56 d (18.56) 2.82 dd (6.35, 18.55)	2.30 m 2.38 d (3.61)	1.42 m 1.83 m	1.54 m 1.63 m	1.00 m 1.73 m
2	1.69 m 2.00 m		-	1.59 m 2.01 m	1.76 m 2.12 m	1.50 m 1.57 m
3	3.00 d (5.80)	5.80 s	5.68 s	3.48 s	4.90 s	1.17 m 1.39 m
5			-			1.08 m
6	1.36 m 1.63 m	1.48 m 1.84 m	1.48 m 1.83 m	1.08 m 2.31 m	1.40 m 2.00 m	1.30 m 1.55 m
7	1.37 m 1.52 m	1.30 m 1.60 m	1.51 m 1.52 m	1.32 m 1.47 m	1.40 m 1.45 m	1.96 m 2.38 m
8	1.50 m	1.60 m	1.52 m	1.67 m	1.65 m	
9						1.57 m
10	1.38 m	1.42 m	1.87 m	1.74 m	1.72 m	
11	1.28 m 1.90 m	1.18 m 1.68 m	1.37 m 1.43 m	1.28 m 1.96 m	1.32 m 1.93 m	1.50 m 1.67 m
12	1.98 m 2.28 m	2.06 m 2.06 m	1.87 m 2.02 m	2.06 m 2.37 m	2.29 m 2.06 m	1.98 m 2.31 m
14	5.70 s	5.65 s	5.70 s	5.67 s	5.70 s	5.67 s
16	2.18 s	2.14 d (0.98)	2.15 d (1.14)	2.14 s	2.20 s	2.16 s
17	0.80 d (6.40)	0.95 d (7.32)	0.84 d (6.38)	0.82 d (6.83)	0.83 d (6.80)	4.49 s 4.85 s
18	1.18 s	1.94 d (1.46)	1.88 m	1.20 s	1.18 s	0.80 s
19	1.29 s	1.24 s	1.11 s	1.20 s	1.23 s	0.86 s
20	0.92 s	0.82 s	0.83 s	0.97 s	0.96 s	0.68 s

Tableau 5.4 – Données RMN ^{13}C (125 MHz) des diterpènes **A-F** (δ en ppm et J en Hz).

Les mesures ont été effectuées dans du CDCl_3 pour les composés **A** et **D-F**. Le composé **B** a été mesuré dans CD_2Cl_2 et le composé **C** dans CD_3OD .

position	A	B	C	D	E	F
1	20.0	35.7	35.3	19.3	18.3	39.1
2	25.1	198.8	199.8	29.8	25.8	19.4
3	62.6	128.7	125.7	77.0	81.8	42.1
4	65.9	169.4	172.5	78.1	75.8	33.6
5	38.1	39.8	40.3	43.7	41.9	55.5
6	30.5	30.1	36.4	30.2	28.3	24.5
7	27.2	26.9	27.3	29.2	27.7	38.3
8	37.0	35.6	36.0	38.2	36.9	148.3
9	38.5	39.3	39.2	40.2	39.1	56.2
10	41.6	47.2	46.1	43.5	42.6	39.7
11	34.1	36.7	35.9	35.8	34.4	21.5
12	35.7	34.8	34.6	36.8	36.1	40.1
13	164.7	164.4	163.9	163.3	164.5	164.3
14	114.3	115.2	114.8	116.3	114.5	114.6
15	170.9	171.8	170.5	170.5	171.0	171.8
16	19.6	19.5	19.6	19.3	19.5	19.2
17	15.6	14.6	15.9	16.4	15.8	106.4
18	19.1	21.1	19.1	21.9	21.5	33.6
19	21.9	31.2	18.2	21.8	20.7	21.7
20	29.6	22.9	18.0	29.9	29.2	14.5

Tableau 5.5 – Données RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) et ^{13}C (125 MHz) du composé **G** (δ en ppm, J en Hz).

position	^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	^{13}C (125 MHz)
1	-	118.3
2	4.47 d (5.86)	72.5
3	2.05 ddd (6.35, 6.83)	31.3
4	0.97 d (6.83)	17.4
5	0.99 d (6.35)	17.0
1'	4.39 m	103.7
2'	3.07 dd (8.30, 8.30)	73.2
3'	3.21 dd (7.81, 8.79)	76.3
4'	3.29 dd (9.28, 9.28)	69.6
5'	3.48 m	73.9
6'	4.28 dd (4.88, 5.37)	63.3
	4.38 m	
1''	-	119.5
2''/6''	7.0	108.7
3''/5''	-	145.5
4''	-	138.5
7''	-	165.8

5.7.1 Données RX

5.7.1.1 Composé B

Les cristaux de **B** ont été obtenus par évaporation lente d'un mélange hexane-AcOEt sous forme d'aiguilles blanches. Données cristallines : Formule empirique = $C_{20}H_{30}O_3$; $M_r = 318.4$; $T = 140(2)$ K ; système cristallin = orthorhombique ; groupe spatial = $P2_12_12_1$; dimension de la maille cristalline (Å) : $a = 7.739(2)$ Å, $b = 10.156(2)$ Å, $c = 22.793(4)$ Å, $V = 1791.5(7)$ Å³, $Z = 4$, $D_{calc} = 1.181$ Mg/m³, $\lambda = 0.71073$ Å, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.077$ mm⁻¹, $F_{ooo} = 696$, taille du cristal = $0.23 \times 0.10 \times 0.08$ mm, domaine angulaire en theta : $\theta = 3.20 - 25.05^\circ$, espace réciproque exploré = $-8 \leq h \leq 8$, $-12 \leq k \leq 12$, $-27 \leq l \leq 27$, réflexions mesurées = 10832, réflexions indépendantes = 1755 ($R_{int} = 0.182$, cristal peu diffractant), pourcentage de données collectées jusque theta = 25.05° , 95.5%. Aucune correction d'absorption ou d'extinction n'a été appliquée. Méthode d'affinement : matrice complète pondérée en fonction des moindres carrés sur F^2 , données/contraintes/paramètres = 1755/1/216, $S = 1.02$, Indices R finaux [$I > 2\sigma(I)$] : $R1 = 0.0774$, $wR2 = 0.1849$, indices R indices (toutes les données) : $R1 = 0.1075$, $wR2 = 0.2083$. La configuration absolue n'a pas été déterminée (paires de Friedel $\Delta f''$ moyennées à zéro), densité résiduelle = 0.26 et -0.25 e Å⁻³.

Les valeurs RX mesurées du composé **B** sont reportées en Annexe 2.

5.7.1.2 Composé D

Les cristaux de **D** ont été obtenus par évaporation lente d'un mélange hexane-AcOEt sous forme d'aiguilles blanches. Données cristallines : Formule empirique = $C_{20}H_{34}O_4$; $M_r = 338.47$; $T = 140(2)$ K, système cristallin orthorhombique, groupe spatial = $P2_12_12_1$; dimension de la maille cristalline : $a = 7.2148(4)$ Å, $b = 9.5841(9)$ Å, $c = 27.361(2)$ Å, $V = 1891.9(2)$ Å³, $Z = 4$, $D_{calc} = 1.188$ Mg/m³, $\lambda = 0.71073$ Å, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.081$ mm⁻¹, $F_{ooo} = 744$, taille du cristal = $0.27 \times 0.10 \times 0.07$ mm, domaine angulaire en theta : $\theta = 3.20 - 25.05^\circ$, espace réciproque exploré = $-8 \leq h \leq 8$, $-12 \leq k \leq 12$, $-27 \leq l \leq 27$, réflexions mesurées = 11611, réflexions indépendantes = 1866 ($R_{int} = 0.051$), pourcentage de données collectées jusque theta = 25.02° , 95.1%. Aucune correction d'absorption ou d'extinction n'a été appliquée. Méthode d'affinement : matrice complète pondérée en fonction des moindres carrés sur F^2 , données/contraintes/paramètres = 1866/3/231, $S = 0.97$, Indices R finaux [$I > 2\sigma(I)$] : $R1 =$

0.0328, $wR2 = 0.0570$, indices R (toutes les données): $R1 = 0.0498$, $wR2 = 0.9614$. La configuration absolue n'a pas été déterminée (paires de Friedel $\Delta F''$ moyennées à zéro), densité résiduelle 0.15 et -0.12 e Å⁻³.

Les valeurs RX mesurées du composé **D** sont reportées en Annexe 2.

6. REFERENCES

A

- Abreu, P.M., Rosa, V.S., Araújo, E.M., Canda, A.B., Kayser, O., Bindseil, K.U., Siems, K. and Seemann, A. (1998). Phytochemical analysis and antimicrobial evaluation of *Detarium microcarpum* bark extracts. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **8**, 107-109.
- Abreu, P.M. and Relva, A. (2002). Carbohydrates from *Detarium microcarpum* bark extract. *Carbohydr. Res.* **337**, 1663-1666.
- Adam, F., Adam, J.C. and Hasselot, N. (1991). Intoxication par ingestion de ditakh (Sénégal). *Med. Trop.* **51**, 455-458.
- Adikwu, M.U., Yoshikawa, Y. and Takada, K. (2004). Pharmacodynamic-pharmacokinetic profiles of metformin hydrochloride from a mucoadhesive formulation of a polysaccharide with antidiabetic property in streptozotocin-induced diabetic rat models. *Biomaterials* **25**, 3041-3048.
- Agrawal, P.K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **31**, 3307-3330.
- Akhila, A., Rani, K. and Thakur, R.S. (1991). Biosynthesis of the clerodane furano-diterpene lactone skeleton in *Tinospora cordifolia*. *Phytochemistry* **30**, 2573-2576.
- Akpata, M.I. and Miachi, O.E. (2001). Proximate composition and selected functional properties of *Detarium microcarpum*. *Plant Foods Hum. Nutr.* **56**, 297-302.
- Anhwange, B.A., Ajibola, V.O. and Oniye, S.J. (2004). Chemical studies of the seeds of *Moringa oleifera* (Lam.) and *Detarium microcarpum* (Guill. & Perr.). *J. Biol. Sci.* **4**, 711-715.
- APG II (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG II. *Bot. J. Linnean Soc.* **141**, 399-436.
- Aquino, R., Ciavatta, M.L., De Tommasi, N., De Simone, F. and Pizza, C. (1991). Catechins from *Detarium microcarpum*. *Fitoterapia* **62**, 455.
- Aquino, R., Ciavatta, M.L., De Tommasi, N. and Gàcs-Baitz, E. (1992). Tetranorditerpenes from *Detarium microcarpum*. *Phytochemistry* **31**, 1823-1825.
- Aquino, R., De Simone, F., De Tommasi, N., Piacente, S. and Pizza, C. (1995). Structure and biological activity of sesquiterpene and diterpene derivatives from medicinal plants. In : Hostettmann, K., Marston, M., Maillard, M., Hamburger, M. (eds.), *Phytochemistry of Plants used in Traditional Medicine*, Proceedings of the Phytochemical Society of Europe n°37, Clarendon Press, Oxford, pp. 268-275.
- Arbonnier, M. (2002). *Arbres, Arbustes et Lianes des Zones Sèches d'Afrique de l'Ouest*. 2^{ème} Ed., CIRAD - MNHN, Paris, pp. 9-18, 234-235.
- Attama, A.A., Adikwu, M.U. and Esimone, C.O. (1999). Sedimentation studies on chalk suspensions containing blends of Veegum and *Detarium* gum as suspending agents. *Boll. Chim. Farm.* **138**, 521-525.

- Aubréville, A. (1936). *La Flore Forestière de la Côte d'Ivoire*. Vol. 1. La Rose Editeurs, Paris, pp. 266-268.
- Aubréville, A. (1950). *Flore Forestière Soudano-Guinéenne*. Société d'Editions Géographiques Martines et Coloniales, Paris, pp. 227-231.
- Aubréville, A. (1970). *Flore du Cameroun*. MNHN - Laboratoire de Phanérogamie, Paris, pp. 6-8.
- Avila, D. and Medina, J.D. (1993). Constituents of the seed pods of *Eperua purpurea*. *J. Nat. Prod.* **56**, 1586-1589.

B

- Baillon, H. (1865-1866). *Adansonia - Recueil Périodique d'Observations Botaniques*. Tome 6. Editions E. Martinet, Paris, pp. 200-202.
- Baker, E.G. (1926-1930). *The "Leguminosae" of Tropical Africa*. Vol. 3, Part 3. Erasmus Press, Ghent, pp. 747-748.
- Balogun, A.M. and Fetuga, B.L. (1985). Fatty acid composition of seed oils of some members of the Leguminosae family. *Food Chem.* **17**, 175-182.
- Banks, H.I. and Klitgaard, B.B. (2000). Palynological Contribution to the Systematics of Detarioid Legumes (Leguminosae : Caesalpinioideae). In : Herendeen, P.S. and Bruneau, A. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 9. Kew, Royal Botanic Gardens, London, pp. 79-106.
- Banks, H.I., Klitgaard, B.B. and Crane, P.R. (2001). Palynological contribution to the systematics of the Caesalpinioideae (Leguminosae). In : *Legumes down under*, Abstracts, 7, The Fourth International Legume Conference, Australian National University, Canberra, Australia.
- Barreto, A.G., Biscaia, E.C., Florencio da Veiga, V., Pinto, A.C., Freire de Carvalhaes, S. and Maciel, M.A.M. (2005). Ion-exchange chromatography applied to the isolation of acidic fraction from copaiba (*Copaifera multijuga*) oil and from sacaca (*Croton cajucara*). *Quim. Nova* **28**, 719-722.
- Baumer, M. (1995). *Arbres, Arbustes et Arbrisseaux Nourriciers en Afrique Occidentale*. Enda Editions, Dakar, pp. 83-84.
- Ben Jannet, H., Chaari, A., Bakhrouf, A. and Mighri, Z. (2006). Structure-antibacterial activity relationship of secondary metabolites from *Ajuga pseudoiva* Rob. leaves. *Nat. Prod. Res., Part A: Struct. Synth.* **20**, 299-304.
- Berche, P., Gaillard, J.L. and Simonet, M. (1988). *Bactériologie - Les Bactéries des Infections Humaines*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, pp. 345-353.

- Berhaut, J. (1975). *Flore Illustrée du Sénégal - Ficoïdées à Légumineuses*. Tome IV. Gouvernement du Sénégal, Ministère de la Protection de la Nature, Ministère du Développement Rural, Direction des Eaux, Dakar, pp. 375-382.
- Berthelot, P.G., N'Diaye, M., Diatta, B., Guerry, B., Angel, G. and Saissy, J.M. (2000). Acute intoxication after ditakh fruit ingestion. *Intensive Care Med.* **26**, 1587.
- Bohlmann, F., Gerke, T., Jakupovic, J., King, R.M. and Robinson, H. (1984). Cadina-4,11-diene from *Viguiera oblongifolia*. *Phytochemistry* **23**, 1183-1184.
- Bowen, I.D. and Ali, A.Y. (2005). Terpenes, their oxygenated derivatives and terpene-rich plant extracts as molluscicides and barnacle repellents. Patent number 2005051083. Compton Developments Ltd., UK, p. 44.
- Brasil, D.S.B., Moreira, R.Y.O., Muller, A.H. and Alves, C.N. (2006). Theoretical and experimental study of aparisthman : a natural product with anti-ulcer activity. *Int. J. Quantum Chem.* **106**, 2706-2713.
- Breteler, F.J. (1995). The Boundary between Amherstieae and Detarieae (Caesalpinioideae). In : Crisp, M.D. and Doyle, J.J. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 7. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 53-62.
- Breteler, F.J. and Wieringa, J.J. (1999). *Generic Delimitation in Caesalpinioideae*. XVI International Botanical Congress, St. Louis, Missouri, USA.
- Bruehlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.A. and Testa, B. (2004). Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chem. Biodiversity* **1**, 819-829.
- Bruneau, A., Breteler, F.J., Wieringa, J.J., Gervais, G.Y.F. and Forest, F. (2000). Phylogenetic Relationships in Tribes Macrolobieae and Detarieae as Inferred from Chloroplast *trnL* Intron Sequences. In : Herendeen, P.S. and Bruneau, A. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 9. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 121-149.
- Bruneau, A., Forest, F., Herendeen, P.S., Klitgaard, B.B. and Lewis, G.P. (2001). Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Syst. Bot.* **26**, 487-514.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3^{ème} Ed., Technique & Documentation, Paris.
- Burgel, P.R., Camara, P., Collet-Burgel, C., Soko, T.O. and Hovette, P. (1998). L'intoxication au ditakh : une intoxication tropicale méconnue. 2 observations. *Presse Med.* **27**, 1528.
- Burkill, H.M. (1995). *The Useful Plants of West Tropical Africa - Vol. 3 Families J - L*. 2nd Ed., Whitefriars Press, London, pp. 101-105.

C

- Calzada, F., Velazquez, C., Cedillo-Rivera, R. and Esquivel, B. (2003). Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytother. Res.* **17**, 731-732.
- Carrière, M. Flore de Guinée : Appellations vernaculaires et usages traditionnels de quelques plantes, [En ligne]. <http://perso.orange.fr/a.i.r.e./guilex2.htm> (Page consultée le 20 juillet 2002)
- Cascon, V. and Gilbert, B. (2000). Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* **55**, 773-778.
- Cavin, A.L., Hay, A.E., Marston, A., Stoeckli-Evans, H., Scopelliti, R., Diallo, D. and Hostettmann, K. (2006). Bioactive diterpenes from the fruits of *Detarium microcarpum*. *J. Nat. Prod.* **69**, 768-773.
- Chaubal, R., Pawar, P.V., Hebbalkar, G.D., Tungikar, V.B., Puranik, V.G., Deshpande, V.H. and Deshpande, N.R. (2005). Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-pinitol - A bioactive carbohydrate. *Chem. Biodiversity* **2**, 684-688.
- Chukwu, A., Okorie, O. and Ofoefule, S.I. (1997). Properties of films obtained from the polysaccharide derived from *Detarium microcarpum* gum. *Niger. J. Nat. Prod. Med.* **1**, 34-38.
- Chukwu, A. (1992). Studies on *Detarium microcarpum* gum I. Comparative evaluation as a binder in tablets containing tartrazine dye. *S.T.P. Pharma Sciences* **2**, 463-468.
- Chukwu, A. (1994a). Studies on *Detarium microcarpum* gum II. Investigation as a prolonged release matrix for encapsulated chlorpheniramine maleate. *S.T.P. Pharma Sciences* **4**, 399-403.
- Chukwu, A. (1994b). Studies on *Detarium microcarpum* gum III. In vitro characteristics of prolonged-release chlorpheniramine maleate tablets. *S.T.P. Pharma Sciences* **4**, 404-408.
- Cruz, A., Saenz de Santamaria, M., Martinez, J., Martinez, A., Guisantes, J. and Palacios, R. (1997). Fungal allergens from important allergenic fungi imperfecti. *Allergol. Immunopathol.* **25**, 153-158.
- Cuendet, M. (1999). *Recherche de Nouveaux Composés Capteurs de Radicaux Libres et Antioxydants à partir d'une Plante d'Indonésie : Fagraea blumei (Loganiaceae) et de trois Plantes d'Altitude : Bartsia alpina (Scrophulariaceae), Loiseleuria procumbens (Ericaceae) et Campanula barbata (Campanulaceae)*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences, Université de Lausanne, pp. 2-8.

D

- Dai, S.J., Tao, J.Y., Liu, K., Jiang, Y.T. and Shen, L. (2006). Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* with cytotoxic activities. *Phytochemistry* **67**, 1326-1330.
- D'Almeida, P.A. (1984). *Trente-trois Cas d'Intoxication par les Plantes Observés au Service de Pédiatrie de l'Hôpital Principal de Dakar*. Thèse de doctorat, Département de Pharmacie, Hôpital Principal de Dakar, Sénégal, pp. 124-170.
- De Candolle, A.P. (1825-1827). *Prodromus Systematis Naturalis*. Vol. 2. Editions Treuttel et Würtz, Paris.
- De Jussieu, A.L. (1789). *Genera Plantarum - Secundum Ordines Naturales Disposita*. Editions Herissant & Barrois, Paris, p. 365.
- De Santis, V. and Medina, J.D. (1981). Crystalline racemic labda-8(20), 13-dien-15-oic acid in the trunk resin of *Eperua purpurea*. *J. Nat. Prod.* **44**, 370-372.
- Diop, P.A., Franck, D., Grimm, P. and Hasselmann, C. (1988). High-performance liquid chromatography determination of vitamin C in fresh fruits from West Africa. *J. Food Comp. Anal.* **1**, 265-269.
- Doyle, J.J., Chapill, J.A., Bailey, C.D. and Kajita, T. (2000). Towards a Comprehensive Phylogeny of Legumes : Evidence from *rbcL* Sequences and Non-molecular Data. In : Herendeen, P.S. and Bruneau A. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 9. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 1-20.
- Dupuis, G. Cours de chimie organique, Lycée Faidherbe de Lille, France, [en ligne]. <http://www.faidherbe.org/site/cours/dupuis/conform.htm>. (Page consultée le 17 septembre 2006)

E

- Erb, N., Zinsmeister, H.D., Lehmann, G. and Nahrstedt, A. (1979). A new cyanogenic glycoside from *Hordeum vulgare*. *Phytochemistry* **18**, 1515-1517.
- Eromosele, I.C., Eromosele, C.O. and Kuzhkuzha, D.M. (1991). Evaluation of mineral elements and ascorbic acid contents in fruits of some wild plants. *Plant Foods Hum. Nutr.* **41**, 151-154.
- Escoubas, P., Lajide, L. and Mizutani, J. (1994). Insecticidal and antifeedant activities of plant compounds. In : Hedin, P.A., Menn, J.J. and Hollingworth, R.M. (eds.), *Natural and Engineered Pest Management Agents*. ACS, Columbus, pp. 162-171.

F

- Fang, N., Yu, S., Mabry, T.J., Abboud, K.A. and Simonsen, S.H. (1988). Terpenoids from *Ageratina saltillensis*. *Phytochemistry* **27**, 3187-3196.
- Fattorusso, V. and Ritter, O. (1998). *Vademecum Clinique – Du Diagnostic au Traitement*. 15^{ème} Ed., Editions Masson, Paris, p. 1513.
- Fokialakis, N., Kalpoutzakis, E., Tekwani, B.L., Skaltsounis, A.L. and Duke, S.O. (2006). Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus* sp. and semisynthetic derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 1775-1778.
- Fürst, A. and Plattner, P.A. (1949). Steroids and sex hormones. CLX. 2(a),3(a)- and 2(b),3(b)-Oxidocholestane; the configuration of the 2-hydroxycholestanes. *Helv. Chim. Acta* **32**, 275-283.

G

- Gage, D.A. (1986). *A Chemosystematic Study of the Genus Piptothrix (Compositae, Eupatorieae)*. Thesis, University of Texas, Austin, pp. 321-432.
- Giami, S.Y. and Wachuku, O.C. (1997). Composition and functional properties of unprocessed and locally processed seeds from three underutilized food sources in Nigeria. *Plant Foods Hum. Nutr.* **50**, 27-36.
- Gmelin, J.F. (1791). *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis*. Tomus II, 13^{ème} Ed., Editions Impensis Georg. Emanuel. Beer., p. 700.
- Gonzalez-Coloma, A., Guadano, A., Tonn, C.E. and Sosa, M.E. (2005). Antifeedant / insecticidal terpenes from Asteraceae and Labiatae species native to Argentinean semi-arid lands. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **60**, 855-861.
- Guilet, D., Guntern, A., Ioset, J.R., Queiroz, E., Ndjoko, K., Foggin, C.M. and Hostettmann, K. (2003). Absolute configuration of a tetrahydrophenanthrene from *Heliotropium ovalifolium* by LC-NMR of its Mosher esters. *J. Nat. Prod.* **66**, 17-20.
- Guillemin, J.A., Perrotet, S. and Richard, A. (1830-1833). *Florae Senegambiae Tentamen*. Tomus primus. Editions APUD; Treuttel et Würtz, Paris, pp. 269-271.

H

- Halgren, T.A. (1999). MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular interaction energies and geometries. *J. Comput. Chem.* **20**, 730-740.
- Harborne, J.B. (1994). Phytochemistry of the Leguminosae. In : Bisby, F.A., Buckingham, J. and Harborne, J.B. (eds.), *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae - Vol. I Plants and their Constituents*. Chapman & Hall, Cambridge.
- Hasan, C.M., Healey, T.M. and Waterman, P.G. (1982). Kolavane and kaurane diterpenes from the stem bark of *Xylopia aethiopica*. *Phytochemistry* **21**, 1365-1368.
- Hatake, K., Hori, K., Takahashi, S., Sakamoto, K., Mukoyama, T. and Tsujimura, N. (2006). Triterpenes and their use as cancer-metastasis inhibitors and health functional foods. Patent number 2006151902. Sakamoto Bio Co. Ltd., Akita Prefecture, Japan.
- Heckel, E. and Schlagdenhauffen, F. (1889). Sur les deux variétés de *Detarium senegalense* à fruits comestibles et à fruits amers, au point de vue botanique et chimique. *J. Pharm. Chim.* **21**, 401-414, 472-478.
- Herendeen, P.S. (2000). Structural Evolution in the Caesalpinioideae (Leguminosae). In : Herendeen, P.S. and Bruneau, A. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 9. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 45-64.
- Herendeen, P.S., Lewis, G.P. and Bruneau, A. (2003). Floral morphology in caesalpinoid legumes : testing the monophyly of the "Umtiza Clade" *Int. J. Plant Sci.* **164**, 393-407.
- Heywood, V.H. (1996). *Les Plantes à Fleurs - 306 Familles de la Flore Mondiale*. Editions Nathan, Paris, pp. 149-152.
- Homans, A.L. and Fuchs, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* **51**, 327-329.
- Hosoe, T., Nozawa, K., Lumley, T.C., Currah, R.S., Fukushima, K., Takizawa, K., Miyaji, M. and Kawai, K.I. (1999). Tetranorditerpene lactones, potent antifungal antibiotics for human pathogenic yeasts, from a unique species of *Oidiodendron*. *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 1591-1597.
- Hostettmann, K. (1997). *Tout Savoir sur le Pouvoir des Plantes Sources de Médicaments*. Editions Favre, Lausanne, pp. 93, 104, 135.
- Hostettmann, K., Marston, A. and Hostettmann, M. (1998). *Preparative Chromatography Techniques - Applications in Natural Product Isolation*. 2nd Ed., Springer Verlag, Berlin, pp. 10-11, 53.
- Hutchinson, J., Dalziel, J.M. and revised by Keay, R.W.J. (1958). *Flora of West Tropical Africa*. Vol I, part II. 2nd Ed., The Whitefriars Press, London, p. 457.

I

- Ieiri, D., Kawamura, T., Mimura, M., Urakawa, H.I., Yuguchi, Y. and Kajiwara, K. (2003). Solution structure for xyloglucans extracted from various seeds. *Sen'i Gakkaishi* **59**, 93-98.
- Ikhiri, K. and Ilagouma, A.T. (1995). Constituents of *Detarium microcarpum* bark. *Fitoterapia* **66**, 274.
- Imbert, P. and Teyssier, J. (1986). Intoxication aiguë par ingestion de ditakh. A propos de 8 observations. *Med. Trop.* **46**, 79-83.
- Isaza, J.H., Ito, H. and Yoshida, T. (2001). A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry* **58**, 321-327.

J

- Jaroszewski, J.W. (1986). Heterodendrin in *Acacia* spp. *J. Nat. Prod.* **49**, 927-928.
- Jones, D.A. (1998). Why are so many food plants cyanogenic ? *Phytochemistry* **47**, 155-162.
- Jullian, V., Bonduelle, C., Valentin, A., Acebey, L., Duigou, A.G., Prevost, M.F. and Sauvain, M. (2005). New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 5065-5070.
- Jun, J.G., Jun, Y.J., Kim, J.J., Kim, Y.A., Kim, Y.J. and Lee, W.G. (2003). Chiroinositol or pinitol for treatment of cataract. Patent number 2003029333. Amicogen Co. Ltd., South Korea.

K

- Käss, E. and Wink, M. (1996). Molecular evolution of the Leguminosae : Phylogeny of the tree subfamilies based on *rbcL*-sequences. *Biochem. Syst. Ecol.* **24**, 365-378.
- Kela, S.L., Ogunsusi, R.A., Ogbogu, V.C. and Nwude, N. (1989a). Susceptibility of two-week old *Lymnaea natalensis* to some plant extracts. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* **42**, 189-192.
- Kela, S.L., Ogunsusi, R.A. , Ogbogu, V.C. and Nwude, N. (1989b). Screening of some Nigerian plants for molluscicidal activity. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* **42**, 195-202.

- Kela, S.L. and Bowen, I.D. (1995). The histopathological effect of *Detarium microcarpum* extract, a naturally occurring plant molluscicide on the mid-gut and digestive gland of *Lymnaea stagnalis*. *Cell Biol. Int.* **19**, 175-181.
- Kerharo, J. and Adam, J.G. (1962). Premier inventaire des plantes médicinales et toxiques de la Casamance. *Ann. Pharm. Fr.* **20**, 726-727.
- Kerharo, J. and Adam, J.G. (1974). *La Pharmacopée Sénégalaise Traditionnelle : Plantes Médicinales et Toxiques*. Editions Vigot Frères, Paris, pp. 285-287.
- Kim, J.C., Shin, J.Y., Shin, D.H., Kim, S.H., Park, S.H., Park, R.D., Park, S.C., Kim, Y.B. and Shin, Y.C. (2005). Synergic antiinflammatory effects of pinitol and glucosamine in rats. *Phytother. Res.* **19**, 1048-1051.
- Klein Gebbinck, E.A., Jansen, B.J.M. and De Groot, A. (2002). Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry* **61**, 737-770.
- Kouyaté, A.M. and Van Damme, P. (2002). Caractères morphologiques de *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. au sud du Mali. *Fruits* **57**, 231-238.
- Kubota, H., Endo, K. and Tanahashi, M. (2005). Plant extracts with reduced amounts of sugars and amino acids. Patent number 200452675. Kao Corporation, Japan.

L

- Lajide, L., Escoubas, P. and Mizutani, J. (1995). Termite antifeedant activity in *Detarium microcarpum*. *Phytochemistry* **40**, 1101-1104.
- Lankhorst, P.P., Smeets, J.W.H. and Haasnoot, C.A.G. (1995). Discrimination of the two diastereoisomeric glycosides heterodendrin and epi-heterodendrin by the combined use of NOE and molecular mechanics. *Carbohydr. Res.* **269**, 17-27.
- Lebrun, J.P. and Stork, A.L. (2003). *Tropical African Flowering Plants, Ecology and Distribution*. Vol. 1. *Annonaceae - Balanitaceae*. Edition des Conservatoire et Jardin botaniques, Genève, pp. 21, 22, 31.
- Lebrun, J.P. and Stork, A.L. (sous presse). *Enumération des Plantes à Fleurs d'Afrique Tropicale*. Edition des Conservatoire et Jardin botaniques, Genève, pp. 19-22, 31.
- Lechtenberg, M., Nahrstedt, A. and Fronczek, F.R. (1996). Leucine-derived nitrile glucosides in the Rosaceae and their systematic significance. *Phytochemistry* **41**, 779-785.
- Léonard, J. (1996). *Generic Delimitations in Flowering Plants*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, pp. 443-455.
- Lewis, G.P., Simpson, B.B. and Neff, J.L. (2000). Progress in Understanding the Reproductive Biology of the Caesalpinioideae (Leguminosae). In : Herendeen, P.S. and Bruneau, A.

(eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 9. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 65-78.

Ling, S.K., Tanaka, T. and Kouno, I. (2002). New cyanogenic and alkyl glycoside constituents from *Phyllagathis rotundifolia*. *J. Nat. Prod.* **65**, 131-135.

M

Mac Millan, J. and Beale, M.H. (1999). Diterpene Biosyntheses. In : Barton, D., Nakanishi, K. and Meth-Cohn, O. (eds.), *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Vol. 2. *Isoprenoids including Carotenoids and Steroids*. Elsevier, Lausanne, pp. 217-230.

Mackinder, B. (2000). The Monophyly and Taxonomic Position of *Berlinia* Hook. f. (Leguminosae-Caesalpinioideae) : A Preliminary Study. In : Herendeen, P.S. and Bruneau, A. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 9. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 151-163.

Maiga, A., Diallo, D., Bye, R. and Paulsen, B.S. (2005). Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2316-2321.

Malgras, D. (1992). *Arbres et Arbustes Guérisseurs des Savanes Maliennes*. Editions Karthala et ACCT, Paris, pp. 228-230.

Marston, A., Kissling, J. and Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Anal.* **13**, 51-54.

Miller, R.E., Stewart, M., Capon, R.J. and Woodrow, I.E. (2006). A galloylated cyanogenic glycoside from the Australian endemic rainforest tree *Elaeocarpus sericopetalus* (Elaeocarpaceae). *Phytochemistry* **67**, 1365-1371.

Ministério do Ultramar, Jardim e Museu Agrícola do Ultramar (1958). *Detarium senegalense* Gmel. In : *Essências Florestais da Guiné Portuguesa*. Vol. 10. Laboratório de Histologia e Tecnologia de Madeiras, Lisboa, pp. 5-9.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.

N

- Nabeta, K., Kigure, K., Fujita, M., Nagoya, T., Ishikawa, T., Okuyama, H. and Takasawa, T. (1995). Biosynthesis of (+)-cubenene and (+)-epicubenol by cell-free extracts of cultured cells of *Heteroscyphus planus* and cyclization of [2H]farnesyl diphosphates. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1935-1939.
- Nahrstedt, A. and Huebel, W. (1978). Cyanogenic compounds from *Heterodendron oleaefolium*. *Phytochemistry* **17**, 314-315.
- Nakajima, N. and Ubukata, M. (1998). Facile synthesis of cyanogen glycosides (*R*)-prunasin, linamarin and (*S*)-heterodendrin. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **62**, 453-458.
- Nakano, T. and Djerassi, C. (1961). Terpenoids. XLVI. Copalic acid. *J. Org. Chem.* **26**, 167-173.
- Nielsen, K.A., Olsen, C.E., Pontoppidan, K. and Moller, B.L. (2002). Leucine-derived cyano glucosides in barley. *Plant Physiol.* **129**, 1066-1075.
- Nogueira, R.T., Giacomini, R.A., Shepherd, G.J. and Imamura, P.M. (2002). A new ent-clerodane diterpene from *Hymenaea courbaril* var. *altissima*. *J. Brazilian Chem. Soc.* **13**, 389-391.

O

- Okeke, C., Etim, G., Ukwueze, V., Onwuka, J. and Attah, O. (1995). Formation of chlamydospores by *Candida albicans* in agar media containing plant extracts. *J. Mycol. Méd.* **5**, 115-118.
- Oliver, D. (1868-1937). *Flora of Tropical Africa*. Vol. 2. L. Reeve and Co, London, p. 313.
- Onweluzo, J.C., Leelavathi, K. and Rao, P.H. (1999). Effect of *Detarium microcarpum* (Dm) and *Mucuna flagellipes* (Mf) gums on the quality of white bread. *Plant Foods Hum. Nutr.* **54**, 173-182.
- Onweluzo, J.C., Ramesh, H.P. and Tharanathan, R.N. (2001). Characterization of free sugars and xyloglucan-type polysaccharides of two tropical legumes. *Carbohydr. Polym.* **47**, 253-257.
- Onweluzo, J.C., Obanu, Z.A. and Okwandu, M.C. (2004). Potentials of gum from *Detarium microcarpum* (DM) and *Mucuna flagellipes* (MF) seeds as raw beef burger stabilizers. *Plant Foods Hum. Nutr.* **59**, 137-141.
- Onyechi, U.A., Judd, P.A. and Ellis, P.R. (1998). African plant foods rich in non-starch polysaccharides reduce postprandial blood glucose and insulin concentrations in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* **80**, 419-428.

Otsuka, H., Takeda, Y., Hirata, E., Shinzato, T. and Bando, M. (2004). Glochidiolide, isoglochidiolide, acuminaminoside, and glochidacuminosides A-D from the leaves of *Glochidion acuminatum* Muell. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 591-596.

P

Pachaly, P. (1999). *Dünnschicht-Chromatographie in der Apotheke*. 1 bis 4. Lieferung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Paris, R. and Moyse-Mignon, H. (1947). A reputedly toxic Leguminosa of French West Africa "false detah" *D. heudelotianum*. *Ann. Pharm. Fr.* **5**, 11-16.

Picout, D.R., Ross-Murphy, S.B., Errington, N. and Harding, S.E. (2003). Pressure cell assisted solubilization of xyloglucans : tamarind seed polysaccharide and detarium gum. *Biomacromolecules* **4**, 799-807.

Pinto, A.C., Braga, W.F., Rezende, C.M., Garrido, F.M.S., Veiga, V.F., Bergter, L., Patitucci, M.L. and Antunes, O.A.C. (2000). Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated Silica Gel. *J. Brazilian Chem. Soc.* **11**, 355-360.

Potterat, O. (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Curr. Org. Chem.* **1**, 415-440.

Pourmohseni, H., Ibenthal, W.D., Machinek, R., Remberg, G. and Wray, V. (1993). Cyanoglucosides in the epidermis of *Hordeum vulgare*. *Phytochemistry* **33**, 295-297.

R

Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M. and Frenk, E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anal.* **2**, 199-203.

Rashid, M.A., Hossain, M.A., Hasan, C.M. and Reza, M.S. (1996). Antimicrobial diterpenes from *Polyalthia longifolia* var. *pendula* (Annonaceae). *Phytother. Res.* **10**, 79-81.

Renault, J.H., Nuzillard, J.M., Intes, O. and Maciuk, A. (2002). Solvent Systems. In : Berthod, A. (ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry - Vol. 38 The Support Free Liquid Stationary Phase*. Wilson & Wilson's, Paris, pp. 49-83. .

Ross-Murphy, S.B., Wang, Q. and Ellis, P.R. (1998). *Structure and mechanical properties of polysaccharides*. *Macromol. Symp.* **127**, 13-21.

Ross-Murphy, S.B., Ellis, P.R. and Wang, Q. (2000). Solution characterization of the xyloglucan extracted from *Detarium senegalense* Gmelin. Book of Abstracts, 219th ACS National Meeting, San Francisco, CA, p. CELL-061.

S

Sai Prakash, C.V., Hoch, J.M. and Kingston, D.G.I. (2002). Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the madagascar rainforest. *J. Nat. Prod.* **65**, 100-107.

Salah, M.A., Bedir, E., Toyang, N.J., Khan, I.A., Harries, M.D. and Wedge, D.E. (2003). Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga monandra* (L.) Müll. et Arg. (Euphorbiaceae). *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7607-7610.

Salaki, J.S., Louria, D.B. and Chmel, H. (1984). Fungal and yeast infections of the central nervous system. A clinical review. United States: 108-132.

Saleem, R., Ahmed, M., Ahmed, S.I., Azeem, M., Khan, R.A., Rasool, N., Saleem, H., Noor, F. and Faizi, S. (2005). Hypotensive activity and toxicology of constituents from root bark of *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Phytother. Res.* **19**, 881-884.

Sambuc, M.C. (1887). *Contribution à la Flore et à la Matière Médicale de la Sénégalie*. Thèse de doctorat, Ecole Supérieure de Pharmacie, Montpellier.

Sheldrick, G.M. (1990). SHELXS-97 - Program for Crystal Structure Determination. *Acta Crystallogr.* **A46**, 467-473.

Sheldrick, G.M. (1999). *SHELXL-97*. Universität Göttingen, Göttingen, Germany.

Silverstein, R.M., Basler, G.C. and Morill, T.C. (1998). *Identification Spectrométrique de Composés Organiques*. 5^{ème} Ed., De Boeck Université, Bruxelles.

Singh, M., Pal, M. and Sharma, R.P. (1999). Biological activity of the labdane diterpenes. *Planta Med.* **65**, 2-8.

Spichiger, R.E., Savolainen, V.S. and Figeat, M. (2000). *Botanique Systématique des Plantes à Fleurs*. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, pp. 7-25.

Svehla, G. (1979). *Vogel's Textbook of Macro and Semimicro Qualitative Inorganic Analysis*. 5th Ed., Longman, London, p. 313.

T

- Thomson corporation. *PDRhealth*, [En ligne].
http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/myo_0145.shtml (Page consultée le 24 septembre 2006)
- Tincusi, B.M., Jimenez, I.A., Bazzocchi, I.L., Moujir, L.M., Mamani, Z.A., Barroso, J.P., Ravelo, A.G. and Hernandez, B.V. (2002). Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Med.* **68**, 808-812.
- Tokoroyama, T. (2000). Synthesis of clerodane diterpenoids and related compounds - stereoselective construction of the decaline skeleton with multiple contiguous stereogenic centers. *Synthesis* **5**, 611-633.
- Tolstikova, T.G., Sorokina, I.V., Tolstikov, G.A., Tolstikov, A.G. and Flekhter, O.B. (2006). Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids : I. Natural lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **32**, 37-49.
- Tsichritzis, F. and Jakupovic, J. (1990). Diterpenes and other constituents from *Relhania* species. *Phytochemistry* **29**, 3173-3187.
- Tsuji, H., Tani, Y. and Ueda, H. (1978). Antibacterial properties of kolavenic acid isolated from *Solidago altissima* roots. *Bokin Bobai* **6**, 170-172.
- Tucker, S.C. (2000a). Evolutionary loss of sepals and / or petals in detarioid taxa *Aphanocalyx*, *Brachystegia*, and *Monopetalanthus* (Leguminosae : Caesalpinioideae). *Am. J. Bot.* **87**, 608-624.
- Tucker, S.C. (2000b). Floral development and homeosis in *Saraca* (Leguminosae : Caesalpinioideae : Detarieae). *Int. J. Plant Sci.* **161**, 537-549.
- Tucker, S.C. (2000c). Floral development in tribe Detarieae (Leguminosae : Caesalpinioideae) : *Amherstia*, *Brownea*, *Tamarindus*. *Am. J. Bot.* **87**, 1385-1407.
- Tucker, S.C. (2000d). Organ Loss in Detarioid and other Leguminous Flowers, and the Possibility of Saltatory Evolution. In : Herendeen, P.S. and Bruneau, A. (eds.), *Advances in Legume Systematics*, Part 9. Kew, Royal Botanical Gardens, London, pp. 107-120.
- Tucker, S.C. (2001). The ontogenetic basis for missing petals in *Crudia* (Leguminosae : Caesalpinioideae : Detarieae). *Int. J. Plant Sci.* **162**, 83-89.
- Tucker, S.C. (2002). Comparative floral ontogeny in Detarieae (Leguminosae : Caesalpinioideae) - 1. Radially symmetrical taxa lacking organ suppression. *Am. J. Bot.* **89**, 875-887.

U

- Urakawa, H., Mimura, M. and Kajiwar, K. (2002). Diversity and versatility of plant seed xyloglucan. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **14**, 355-376.

V

- Vetter, J. (2000). Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* **38**, 11-36.

W

- Wagner, H. and Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin, Appendix A.
- Wang, Q., Ellis, P.R., Ross-Murphy, S.B. and Burchard, W. (1997). Solution characteristics of the xyloglucan extracted from *Detarium senegalense* Gmelin. *Carbohydr. Polym.* **33**, 115-124.
- Weins, C. and Jork, H. (1996). Toxicological evaluation of harmful substances by *in situ* enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A* **750**, 403-407.
- White, F. (1986). *La Végétation de l'Afrique*. Orstom - Unesco, Paris, pp. 117-119, 197.
- Whitehead, I.M., Ewing, D.F., Threlfall, D.R., Cane, D.E. and Prabhakaran, P.C. (1990). Synthesis of (+)-5-epi-aristolochene and (+)-1-deoxycapsidiol from capsidiol. *Phytochemistry* **29**, 479-482.
- Wollenweber, E., Rüedi, P. and Seigler, D.S. (1982). Diterpenes of *Cheilanthes argentea*, a fern from Asia. *Z. Naturforsch.* **37c**, 1283-1285.

Z

- Zhao, G.X., Jung, J.H., Smith, D.L., Wood, K.V. and McLaughlin, J.L. (1991). Cytotoxic clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia*. *Planta Med.* **57**, 380-383.

7. RESUME

Le genre *Detarium* (Fabaceae - Caesalpinioideae) comprend des arbres distribués en Afrique de l'Ouest sub-sahélienne. Une confusion taxonomique dans le genre, concernant notamment des arbres à fruits toxiques, nous a amenés à effectuer une révision des espèces du genre *Detarium*. Il en ressort principalement que *D. microcarpum* Guill. et Perr. est une espèce au statut accepté, dont les fruits sont comestibles. *D. heudelotianum* Baill. n'est pas à considérer comme une espèce. *D. senegalense* J.F. Gmel. est également une espèce au statut accepté pouvant produire des fruits comestibles ou toxiques. Ces deux formes d'arbres sont reconnues comme morphologiquement identiques selon la plupart des botanistes. Certains les considèrent toutefois comme des variétés différentes, tandis que d'autres les qualifient simplement de formes différentes.

Compte tenu des activités biochimiques et biologiques prometteuses de l'extrait dichlorométhanique de *D. microcarpum*, ce dernier a été investigué en premier lieu. Six composés purs ont pu être isolés et identifiés. Tous sont des diterpènes de type labdane ou clérodane. Parmi les clérodanes, quatre d'entre eux possèdent une jonction *cis* entre les cycles, et ont une configuration relative nouvelle. L'acide 3 β ,4 β -époxy-5 β ,10 β -*cis*-17 β ,20 α -*ent*-clérod-13*E*-èn-15-*oïque* est décrit pour la première fois. Le (-) acide copalique, un *trans*-labdane, et l'acide 2-oxo-kolavénique, un *trans*-clérodane, avaient déjà été isolés de l'écorce et des feuilles.

Les composés incriminés dans la toxicité des fruits de *D. senegalense* ne sont pas connus. Dans le but de les identifier, une comparaison des profils chromatographiques avec détection ESI/TOF-MS et DAD-UV des formes comestibles et toxiques, a été effectuée. Un composé largement majoritaire dans l'extrait méthanolique du fruit toxique, et absent du fruit comestible, a été isolé et caractérisé : il s'agit du 6'-*O*-galloyl-(*R*)-épihétérodendrine, un dérivé de glucoside cyanogénétique. La toxicité de ce composé est fortement suspectée, étant donnée la similarité observée entre les symptômes survenant lors d'une intoxication au cyanure et à ces fruits. Cependant, elle doit encore être prouvée.

D'un point de vue chimiotaxonomique, la différence des profils chromatographiques entre les formes comestibles et toxiques nous incite à les qualifier de variétés différentes de *D. senegalense*. La production de fruits toxiques par des arbres morphologiquement identiques aux arbres produisant des fruits comestibles, pourrait être due à un phénomène de xénie, comme suggéré par d'autres auteurs. La présence d'un dérivé de glycoside cyanogénétique dans le fruit toxique corrobore cette hypothèse.

8. ABSTRACT

The genus *Detarium* (Fabaceae - Caesalpinioideae) consists of trees distributed over West sub-Saharan Africa. A taxonomical confusion within the genus, notably concerning trees with toxic fruits, has led to a revision of the members of the *Detarium* genus. It has been established that *D. microcarpum* Guill. et Perr. is a species with an accepted status, whose fruits are edible. *D. heudelotianum* Baill. cannot be considered as a species. *D. senegalense* J.F. Gmel. is also a species with an accepted status, producing either edible or toxic fruits. Both tree forms are recognized as morphologically identical, according to most botanists. However, some consider them as different varieties, whereas others simply qualify them as different forms.

An investigation of the dichloromethane extract of *D. microcarpum* was undertaken because of its promising biochemical and biological activities. Six pure compounds were isolated and identified. They were all diterpenes of the labdane or clerodane type. Among the clerodanes, four possess a *cis* junction of the rings, and have new relative configurations. The compound 3 β ,4 β -epoxy-5 β ,10 β -*cis*-17 β ,20 α -*ent*-clerod-13*E*-en-15-oic acid is described for the first time. Two other compounds, (-) copalic acid, a *trans*-labdane, and 2-oxo-kolavenic acid, a *trans*-clerodane, have already been isolated from the bark and the leaves.

The compounds responsible for the toxicity of the fruits of *D. senegalense* were not known until the present research project. For their identification, a comparison between the chromatographic profiles of the edible and toxic forms was performed with ESI/TOF-MS and DAD-UV detection. A predominant compound in the methanol extract of the toxic fruit, and absent from the edible fruit, was isolated and characterized: this is 6'-*O*-galloyl-(*R*)-epiheterodendrin, a derivative of cyanogenic glucoside. Given the similarity observed between the symptoms of cyanide poisoning and poisoning by these fruits, this compound is suspected to be toxic. Nevertheless, this still has to be proved.

From a chemotaxonomic point of view, the difference between the chromatographic profiles of the edible and toxic forms suggests their distinction as different varieties of *D. senegalense*. The production of toxic fruits by trees morphologically identical to those producing edible fruits, is probably due to a phenomenon of xenia, as suggested by other authors. The presence of a cyanogenic glycoside derivative in the fruit corroborates this hypothesis.

ANNEXES

Annexe 1 - Comparaison des descriptions botaniques de *D. microcarpum* Guill. et Perr. et *D. senegalense* J.F. Gmel. en fonction des organes

Lorsque les auteurs nomment les plantes différemment de *D. microcarpum* Guill. et Perr. et de *D. senegalense* J.F. Gmel., cela est indiqué dans la rubrique correspondante.

Tableau A.1.1 – Description de l'arbre

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.	
(Guillemin <i>et al.</i> , 1830-1833)	- fût droit ; - rameaux peu nombreux.	- fût tortueux.	
(Baker, 1926-1930)	*	- fût tortueux.	
(Paris and Moyse-Mignon, 1947)	<i>D. microcarpum</i> Gill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> Gmelin	<i>D. heudelotianum</i> Baillon
	- 10 m de haut ; - fût droit.	- 6-8 m de haut ; - fût tortueux.	- 15-20 m de haut.
(Aubréville, 1950)	- 10 m de haut.	- 20 m de haut ; - trapu, cime puissante et très feuillue.	
(Hutchinson <i>et al.</i> , 1958)	- 10 m de haut.	- 10-35 m de haut.	
(Ministério do Ultramar, 1958)	- 12 m de haut.	- 20 m de haut.	
(Kerharo and Adam, 1962)	- petit arbre.	- grand arbre.	
(Aubréville, 1970)	- petit arbre	*	
(Kerharo and Adam, 1974)	- 8-9 m de haut ; - fût droit.	- 25-30 m de haut ; - fût droit, cylindrique ; - cime basse, à branches trapues étalées.	
(Berhaut, 1975)	- 8-10 m de haut ; - sommet en touffe.	- 15-30 m ; - sommet en large couronne feuillue.	
(D'Almeida, 1984)	*	- 15-30 m ; - fût droit, cylindrique ; - sommet en large couronne feuillue.	
(Malgras, 1992)	- petit arbre ; - cime régulière.	- forte cime.	
(Baumer, 1995)	*	- grand arbre ; - cime très large.	
(Burkill, 1995)	- 10 m de haut ; - tronc et branches tortueux.	- 36 m de haut ; - tronc faiblement arc-bouté ; - cime large.	
(Arbonnier, 2002)	- 8-10 m de haut ; - fût droit ; - cime sphérique et assez dense.	- 25-30 m de haut ; - fût cylindrique, souvent mal conformé ; - cime basse et branches trapues étalées.	
(Lebrun and Stork, sous presse)	- 9-10 m de haut ; - tronc et rameaux tortueux ; - cime étendue.	- 15-36 m de haut ; - tronc droit, cylindrique, relativement court (6-12 m de long, 40 cm de diamètre, 3 m de circonférence) ; - cime large, très feuillue.	

* non précisé

Tableau A.1.2 – Description de l'écorce et du bois

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.		<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(Aubréville, 1950)	- écorce lisse chez les jeunes arbres, devenant ensuite écailleuse ; - tranche rouge.		- écorce écailleuse chez les gros arbres ; - gris cendrée, parfois bleutée ; - tranche de l'écorce orange brique avec une couche externe plus claire, un peu collante.
(Hutchinson <i>et al.</i> , 1958)	- écorce écailleuse ; - rouge-brune.		*
(Ministério do Ultramar, 1958)	*		- écorce avec des marques de plis, très rugueuse, et forme des lambeaux non détachables ; - épaisse, rougeâtre à l'intérieur, gris-blanc à l'extérieur.
(Kerharo and Adam, 1962)	- écorce très claire, presque blanchâtre.		- écorce foncée, à tranche assez tendre, de couleur rouge-rosé avec des fibres blanches.
(Aubréville, 1970)	- écorce lisse chez les jeunes arbres devenant ensuite écailleuse ; - tranche rouge.		*
(Kerharo and Adam, 1974)	- écorce lisse et claire.		- écorce finement fissurée, noirâtre.
(Berhaut, 1975)	- écorce craquelée, rougeâtre.		*
(D'Almeida, 1984)	*		- écorce finement fissurée, gris-foncé.
(Malgras, 1992)	- écorce brun-rouge.		- écorce gris cendré, très épaisse.
(Baumer, 1995)	*		- écorce gris cendré, parfois bleutée. Elle est épaisse à tranche orange brique.
(Burkill, 1995)	- bois dur et brun foncé.		- bois blanc et fin ; cœur du bois dur, de couleur brun-rouge.
(Arbonnier, 2002)	- écorce lisse à texture craquelée, se desquamant en écailles ; - gris clair à noirâtre, tranche fibreuse rouge foncé.		- écorce finement fissurée, noirâtre, à écailles petites et à tranche rouge foncé à brune.
(Lebrun and Stork, sous presse)	- écorce se desquamant en écaille.		*
Echantillons du Laboratoire (secs)	<i>D. microcarpum</i>	<i>D. senegalense</i> forme comestible	<i>D. senegalense</i> forme toxique
	- liège gris foncé, se desquamant en écaille et découvrant un cambium subérophellodermique rouge ; - phelloderme beige.	- liège gris foncé, se desquamant en écaille et découvrant un cambium subérophellodermique rouge ; - phelloderme brun clair-rouge.	- liège gris foncé, se desquamant en écaille et découvrant un cambium subérophellodermique orange ; - phelloderme brun-rouge.

* non précisé

Tableau A.1.3 – Description des rameaux

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(Aubréville, 1950)	- rameau blanc ou rouge, lisse, comme renflé avec des marques de plis à la hauteur des cicatrices foliaires. Les rameaux blancs sont recouverts d'une sorte de pellicule de poussière qui s'enlève en frottant.	- rameau de couleur gris foncé.
(Ministério do Ultramar, 1958)	- rhytidome des jeunes rameaux s'enlevant facilement, découvrant une pellicule rugueuse rouge.	- rameau juvénile tomenteux-pubescent.
(Aubréville, 1970)	- rameau blanc ou rouge, lisse, renflé avec des marques de plis à la hauteur des cicatrices foliaires. Les rameaux blancs sont recouverts d'une sorte de pellicule de poussière qui s'enlève en frottant. En grattant la surface, apparaît une pellicule verte.	- rameau lisse.
(Berhaut, 1975)	- jeune rameau facilement couvert d'une pubescence roussâtre.	- jeune rameau vert plus ou moins tiqueté de blanc.
(Malgras, 1992)	- ramille orangée ou blanche.	*
(Arbonnier, 2002)	- rameau blanchâtre, à pubescence jaune à rousse ou rougeâtre avec des marques de plis à la hauteur des cicatrices foliaires.	- gris foncé.
(Lebrun and Stork, sous presse)	- tige de 30-60 cm de long, renflée et ridée au point d'insertion.	*

* non précisé

Tableau A.1.4 – Description de la feuille composée

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.		<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(Guillemin <i>et al.</i> , 1830-1833)	- grandes folioles échancrées.		- petites folioles ; - présence de petites glandes transparentes remplies d'un liquide odorant.
(Heckel and Schlagdenhauffen, 1889)	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> à fruits doux	<i>D. senegalense</i> à fruits amers
	*	- un tiers plus courte et plus fine que celle de la variété amer.	- un tiers plus longue et plus large que celle de la variété comestible.
(Baker, 1926-1930)	*		- 7 à 12 folioles, ovales-oblongues, obtuses ou émarginées.
(Aubréville, 1936)	Tamba		Bodo
	- 5 à 9 folioles alternes, coriaces ; - nombreux points translucides.		- 8 à 12 folioles alternes, papyracées ; - points translucides peu nombreux, plus gros que ceux du <i>D. microcarpum</i> .
(Paris and Moyse-Mignon, 1947)	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> Gmelin	<i>D. heudelotianum</i> Baill.
	- grandes folioles émarginées.	- 5 à 10 folioles émarginées, coriaces ; - présence de points translucides.	- peu de points translucides.

Tableau A.1.4 – Suite

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(Aubréville, 1950)	- grandes folioles (7-11 x 3.5-5 cm), très coriaces, parfois cireuses ; - limbe gris-vert glauque, mat dessus ; - très nombreux points translucides ; - jeunes folioles légèrement pubescentes sur les deux faces ; - feuillage jaunissant avant de tomber.	- 10 à 11 folioles alternes, petites (4-6 x 2.5-3 cm), minces ; - limbe vert jaune clair, mat dessus devenant luisant à la longue ; - points translucides peu nombreux ou absents ; - jeunes folioles légèrement pubescentes sur les deux faces.
(Hutchinson <i>et al.</i> , 1958)	- grandes folioles (7-11 x 3.5-5 cm), arrondies et émarginées aux extrémités ; - épaisses, coriaces, glauques dessous ; - nombreux points translucides.	- petites folioles (4-6 x 2.5-3 cm), arrondies et émarginées aux extrémités ; - finement coriaces, vertes et brillantes ; - peu de points translucides.
(Ministério do Ultramar, 1958)	- 7 à 9 folioles (7-11 x 3.5-5 cm) ; - pétiole glabre.	- 10 à 11 folioles (4-6 x 2.5-3 cm), disposées de manière alterne ou opposée ; - folioles oblongues-elliptiques ou ovales, arrondies à la base et aux extrémités, sommet émarginé ; glabres et coriaces ; - nervures latérales nombreuses et fines, saillantes sur la face inférieure ; - pétiole tomenteux ; pétiolule résistant, légèrement tomenteux, 3-5 mm de long.
(Kerharo and Adam, 1962)	- folioles plus grandes que celles de <i>D. senegalense</i>, ovales et arrondies aux deux extrémités.	- folioles plus petites et plus foncées que celles de <i>D. microcarpum</i>, ovales et arrondies aux deux extrémités.
(Aubréville, 1970)	- feuille imparipennée comportant 6 à 12 folioles (7-11 x 3.5-5 cm) ; - folioles oblongues-elliptiques, arrondies ou obtuses à la base ; sommet arrondi et légèrement émarginé ; - foliole glabre, coriace et criblée de points translucides ; - nombreuses nervures secondaires avec nervilles intermédiaires ; - feuillage jaunissant avant de tomber.	- folioles plus petites que celles de <i>D. microcarpum</i>, minces, à sommet obtus.
(Kerharo and Adam, 1974)	- feuille imparipennée comportant 3 à 4 paires de folioles (9 x 4.5 cm) ; - folioles ovales, arrondies aux deux extrémités et émarginées au sommet ; - points translucides épars ; - limbe épais, glauque.	- feuille imparipennée comportant 5 à 6 paires de folioles (5 x 3 cm) ; - folioles ovales, arrondies aux deux extrémités ; - vert mat plus foncé que celles de <i>D. microcarpum</i>.
(Berhaut, 1975)	- feuille paripennée comportant 7 à 9 folioles (5-8 x 3-4 cm) disposées de manière alterne ou subopposée ; - rachis (10-15 cm) ; - folioles ovales ou ovales-elliptiques, base arrondie, sommet arrondi et émarginé ; - criblée de points translucides peu denses ; - limbe gris blanchâtre dessous, avec des poils courts ; bordé d'un filet translucide ; - 15 à 25 nervures latérales entremêlées de nervures plus courtes ; - pétiole épaissi à la base, 3-4 cm de long avant la première foliole ; pétiolules (5-6 mm), épaissis et ridés.	- feuille paripennée comportant 10 à 12 folioles (4-6 x 3-4 cm), rarement opposées ; - rachis (10-25 cm) ; - folioles ovales-elliptiques ou elliptiques, base arrondie et dissymétrique, sommet arrondi et généralement émarginé ; - limbe glabre dessus, glabre ou pubescent dessous ; - 10 à 15 nervures étalées, d'autres plus courtes entre les principales ; réseau de nervilles très développé, translucide à l'état frais. Filet translucide sur le bord du limbe ; - pétiole épaissi à la base, 15-20 mm avant la 1^{ère} foliole ; pétiolules (3-5 mm), pubérulents.

Tableau A.1.4 – Suite

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.	
(D'Almeida, 1984)	*	- feuille paripennée comportant 8 à 10 folioles (4-6 x 3-4 cm), subopposées ou alternes ; - rachis (10-25 cm) ; - foliole ovale, base arrondie ou dissymétrique, sommet généralement émarginé ; - limbe vert pâle, glabre dessus, glabre ou pubescent dessous ; - présence de quelques points translucides ; - nervure principale convexe sur la face supérieure et saillante sur l'autre face ; 10-15 nervures secondaires et réseau de nervilles très développé, translucides bordant le limbe ; - pétiole épaissi à la base, 15-20 mm avant la première foliole ; pétiolules (3-5 mm), souvent pubérulents.	
(Malgras, 1992)	- feuille imparipennée à folioles alternes.	- feuille imparipennée à folioles alternes.	
(Arbonnier, 2002)	- feuille imparipennée comportant 3, 4 ou 6 paires de folioles (7-11 x 3.5-5 cm) disposées de manière alterne ou subopposée ; - folioles ovales, oblongues ou elliptiques, sommet arrondi et souvent échancré ; la base est arrondie ou subcordée ; - limbe épais, glauque, gris blanchâtre dessous, pubescent à l'état jeune, bordé d'un filet translucide ; - folioles criblées de points translucides épars ; - nervure pennée, peu saillante, 15 à 30 paires de nervures secondaires sécantes au bord du limbe ; nervilles réticulées ; - pétiolule épaissi et ridé, 2-5 mm de long.	- feuille imparipennée ; - 5 à 6 paires de folioles (4-6 x 2.5-3 cm) disposées de manière alterne ou subopposée ; - folioles ovales, oblongues ou elliptiques, sommet arrondi et souvent échancré ; la base est arrondie ou subcordée, plus ou moins dissymétrique ; - limbe mince, glauque, vert vif dessus, pubescent sur les deux faces à l'état jeune, bordé d'un filet translucide ; - avec ou sans points translucides épars ; - nervure pennée, peu saillante, 15 à 30 paires de nervures secondaires sécantes au bord du limbe ; nervilles réticulées ; - pétiolule de 3-5 mm de long ; - par rapport à <i>D. microcarpum</i>, les feuilles sont plus fines et moins coriaces, avec des folioles plus nombreuses et plus petites, vert foncé sur le dessus.	
Echantillons du Laboratoire (secs)	<i>D. microcarpum</i>	<i>D. senegalense</i> forme comestible	<i>D. senegalense</i> forme toxique
	- foliole (6-7 x 3-4 cm), gris-vert dessus et brun-gris dessous, coriace ; - nombreux points translucides.	- foliole (5-6 x 2-3 cm), vert-jaune dessus et jaunâtre dessous ; - moins coriace que celle de <i>D. microcarpum</i> ; - absence de point translucide.	- foliole (5-6 x 2-3 cm), vert vif dessus et verte dessous, fine ; - absence de point translucide.

* non précisé

Tableau A.1.5 – Description de l'inflorescence

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.		<i>D. senegalense</i> J.F.Gmel.
	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> à fruits doux	<i>D. senegalense</i> à fruits amers
(Heckel and Schlagdenhauffen, 1889)	*	- style court (ne dépasse pas les étamines les plus longues), cintré en arc et terminé par un stigmate légèrement capité.	- ovaire portant un style droit ou légèrement courbe, très développé, dépassant de beaucoup les étamines les plus longues ; stigmate assez fortement capité ; - étamines longues et courtes en alternance.
(Oliver, 1868-1937)	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> à fruits doux	<i>D. senegalense</i> à fruits amers
	*	- fleurs subsessiles ; - anthère à connectif légèrement spiculé.	- fleurs courtement pédicellées ; - anthère mutique.
(Baker, 1926-1930)	*		- inflorescence en panicule, pubescente.
(Aubréville, 1950)	- inflorescence axillaire, courte, ramassée, formant des boules très fleuries ; - calice très pubescent dans les boutons floraux et le restant dans la fleur épanouie.		- inflorescence plus grande et plus lâche que celle de <i>D. microcarpum</i> ; - calice glabre, même dans le bouton.
(Hutchinson <i>et al.</i> , 1958)	- inflorescence dense, de couleur crème ; - calice en bouton densément pubescent à l'extérieur.		- inflorescence lâche, de couleur blanc-crème ; - calice en bouton, glabre ou faiblement pubescent à l'extérieur.
(Ministério do Ultramar, 1958)	- panicule courte, plus dense que celle de <i>D. senegalense</i> ; - calice très pubescent en bouton et le restant dans la fleur épanouie.		- en panicule ou fascicule axillaire ; pédicelle court et résistant, pubescent ; bractéoles très petites, caduques ; - fleur apétale ; 4 sépales (4 mm de long), lancéolés, glabres ou pubescents à l'extérieur ; face interne comportant de longs poils blancs ; - calice en bouton, glabre ou pubescent ; - 10 étamines libres ; filet long ; anthère dorsifix, oblongue, traversée longitudinalement par une fente ; - ovaire sessile ovoïde uniloculaire, biovulé et densément pubescent ; style glabre, incurvé ; stigmate capité bifurqué.
(Kerharo and Adam, 1962)	- blanchâtre.		- blanchâtre.
(Aubréville, 1970)	- inflorescence très condensée, axe pubescent ; - fleurs blanches ; - boutons globuleux, pubescents extérieurement.		- inflorescence lâchement fleurie ; - ramification des inflorescences tomenteuse.
(Kerharo and Adam, 1974)	- fascicule de racèmes axillaires compacts ; - fleur de couleur crème ; - boutons densément pubescents.		- fascicule lâche de fleurs couleur crème, en racème axillaire ; - boutons glabres ou glabrescents.
(Berhaut, 1975)	- fleurs en grappe courte, longue de 2-5 cm, venant sur les rameaux aoûtés à l'aisselle des feuilles tombées, ou à l'aisselle des jeunes feuilles ; les grappes peuvent être fasciculées par 2 ou 3 ; - fleur apétale, blanchâtre, large de 8-10 mm, 4 sépales elliptiques, 10 étamines.		- panicule plus ou moins ramifiée de 10-15 cm de long ; ramifications de 5-8 cm de long ; - fleurs distiques ; - pédicelles courts, à peine 1 mm ; - fleur apétale, 10 étamines blanches à 2 loges, à filet long de 6 mm, insérés autour de l'ovaire ovoïde pubescent.

Tableau A.1.5 – Suite

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(D'Almeida, 1984)	*	- inflorescence en panicule axillaire plus ou moins ramifiée (5-8 cm de long) ; - fleur blanc-crème en racème axillaire et en position distique ; - pédicelle de 1 mm de long ; - calice glabre ou glabrescent même dans le bourgeon ; - 4 sépales elliptiques (5-6 mm x 2-3 mm) ; 10 étamines blanches biloculaires, filet de 6 mm de long ; ovaire ovoïde pubescent.
(Malgras, 1992)	- fleurs blanc-crème en panicules axillaires.	- inflorescence à la base des rameaux de l'année.
(Arbonnier, 2002)	- grappe axillaire courte et compacte, 2-5 cm de long ; - fleur apétale, 4 sépales, 8-10 étamines proéminentes blanc-crème ; - bouton floral densément pubescent.	- grappe axillaire lâche, 10-15 cm de long ; - fleur apétale, 4 sépales (5-6 x 2-3 mm), 8-10 étamines proéminentes blanc-crème ; - bouton floral glabre ; - inflorescence plus lâche que celle du <i>D. microcarpum</i> .

* non précisé

Tableau A.1.6 – Descriptions du fruit

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(Guillemin <i>et al.</i> , 1830-1833)	- fruit orbiculaire, comprimé ; - beaucoup plus petit que celui de <i>D. senegalense</i> ; - pulpe plus douce et plus agréable au goût que celle de <i>D. senegalense</i> .	- fruit de la grosseur d'un abricot-pêche ; - pulpe farineuse, verdâtre et douceâtre ; - nombreuses fibres partant du noyau orbiculaire, constitué de deux gros cotylédons épais, blancs, très durs.
(Baker, 1926-1930)	*	- fruit drupacé, ovoïde à orbiculaire et faiblement aplati ; - graine irrégulièrement ovale et aplatie.
(Aubréville, 1936)	Tamba	Bodo
	- 4-5 cm de diamètre	- fruit plus gros que les tamba (6 cm de diamètre)
(Paris and Moyse-Mignon, 1947)	<i>D. microcarpum</i> Gill. et Perr. - fruit fortement aplati ; - 3-4 cm de diamètre ; - saveur sucrée, comestible.	<i>D. senegalense</i> Gmelin - ovoïde ; - 5 cm de diamètre ; - saveur acide et sucrée ; - fruit comestible.
		<i>D. heudelotianum</i> Baillon - arrondi, analogue à celui de <i>D. senegalense</i> mais plus fibreux ; - saveur acide et sucrée devenant rapidement amère ; - fruit toxique.
(Aubréville, 1950)	- fruit subglobuleux, charnu ; - gros comme une orange.	- fruit aplati, peu charnu ; - gros comme une prune.
(Hutchinson <i>et al.</i> , 1958)	- fruit suborbiculaire, aplati, peu charnu ; - 4 cm de diamètre et 2.5 cm d'épaisseur ; - comestible ; - forme souvent des fruits avortés ou des galls.	- fruit subglobuleux, épais, charnu ; - 5-6 cm de diamètre et 3.5-4 cm d'épaisseur ; - comestible ou toxique, et dans ce dernier cas, est appelé <i>D. heudelotianum</i> Baill.

Tableau A.1.6 – Suite

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(Ministério do Ultramar, 1958)	- petit ; - nombreux fruits avortés restant sur l'arbre ayant l'aspect de galles ; ils sont recouverts d'une pellicule rougeâtre, comme les rameaux juvéniles.	- fruit drupacé globuleux (6 cm de diamètre), mésocarpe fibreux et juteux, endocarpe très dur comportant une seule graine plate, ovale.
(Kerharo and Adam, 1962)	- fruit sphérique, aplati ; - un peu plus petit que celui de <i>D. senegalense</i> .	- fruit subsphérique, légèrement aplati ; - plus gros et plus foncé que celui de <i>D. microcarpum</i> .
(Aubréville, 1970)	- gros fruit charnu ; - comestible, très agréable au goût.	- fruit peu charnu ; - petit comme une prune ; - parfois comestible, parfois toxique.
(Kerharo and Adam, 1974)	- fruit suborbitaire, aplati, peu charnu ; - 2.5-4 cm de diamètre.	- fruit subglobuleux, légèrement aplati, fibreux et charnu ; - 5 cm de diamètre.
(Berhaut, 1975)	- fruit irrégulièrement ovoïde ou globuleux ; - 3-4 cm de diamètre ; - épicarpe qui se craquelle à maturité ; - pulpe farineuse sucrée entremêlée de fibres insérées sur le noyau central qui est assez gros.	- fruit irrégulièrement ovoïde ou globuleux ; - 3-5 cm de diamètre ; - pulpe verte farineuse acidulée entremêlée de fibres adhérent au gros noyau central.
(D'Almeida, 1984)	*	- drupe globuleuse, irrégulièrement ovoïde et légèrement aplatie ; - épicarpe épais, coriace, de couleur gris-cendré ; - mésocarpe constitué d'une faible épaisseur de pulpe verte, farineuse au goût acidulé, entremêlé d'un dense réseau de fibres adhérent au noyau central ; - son poids est de 40 g ; - existence de fruit comestible ou toxique.
(Malgras, 1992)	- drupe subglobuleuse brun foncé.	- petit fruit ; - aplati, peu charnu.
(Baumer, 1995)	- fruit sphérique ou subglobuleux, charnu ; - 3-8 cm de diamètre ; - épicarpe brun coriace devenant crustacé en séchant ; - couche pulpeuse très fibreuse et même ligneuse dans la partie inférieure, enfermant une seule graine ; - goût sucré.	- fruit aplati ; - plus gros que celui de <i>D. microcarpum</i> ; - épicarpe de couleur brune ; - mésocarpe pulpeux verdâtre, pénétré par un réseau filandreux attaché au noyau dur de la graine.
(Burkill, 1995)	*	- fruit globulaire, légèrement aplati ; - 5-8 cm de diamètre ; - graine unique entourée d'un entrecroisement de fibres et d'une pulpe verte.
(Arbonnier, 2002)	- drupe ovoïde ou globuleuse plus ou moins aplatie ; - 2.5-5 cm de diamètre ; - épicarpe se craquelant à maturité ; - gros noyau central entouré d'une pulpe farineuse verdâtre, fibreuse et sucrée ; - fruits avortés de 1-2 cm de diamètre fréquents sur certains arbres.	- drupe ovoïde ou globuleuse plus ou moins aplatie ; - 5-6 cm de diamètre ; - gros noyau central entouré d'une pulpe farineuse, verdâtre, fibreuse, acidulée et sucrée.
(Lebrun and Stork, sous presse)	*	- les fruits sont toxiques mais une forme non toxique est consommée.

Tableau A.1.6 – Suite

Echantillons du Laboratoire (secs)	<i>D. microcarpum</i>	<i>D. senegalense</i> forme comestible	<i>D. senegalense</i> forme toxique
	- drupe de 4 cm de diamètre - épicarpe brun, coriace, se craquelant à maturité ; - mésocarpe pulpeux, brunâtre, sucré, entrecoupé de fibres ; - graine unique, aplatie, dure.	- drupe de 5-6 cm de diamètre ; - épicarpe brun, coriace, se craquelant à maturité ; - mésocarpe pulpeux, verdâtre, entrecoupé de nombreuses fibres partant du noyau ; - endocarpe ligneux, épais de 3 mm ; - graine unique, aplatie, dure.	- identique au fruit de la forme comestible, mais semble être plus fibreux.

* non précisé

Tableau A.1.7 - Période de floraison

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F.Gmel.
(Aubréville, 1936)	Tamba	Bodo
	Septembre à octobre	Février à avril
(Aubréville, 1950)	Juillet à novembre	Février à mai
(Ministério do Ultramar, 1958)	Juillet à décembre (Madère)	Février à mars (Madère)
(D'Almeida, 1984)	*	Février à mai (Sénégal)
(Malgras, 1992)	Juillet à octobre (Mali)	Février à mai (Mali)
(Arbonnier, 2002)	En saison des pluies	En seconde moitié ou en fin de saison sèche

Tableau A.1.8 - Période de maturation des fruits (et lieu d'observation si précisé)

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(Aubréville, 1950)	*	Novembre à décembre
(Ministério do Ultramar, 1958)	Décembre à mars (Madère)	Octobre à décembre (Madère)
(D'Almeida, 1984)	*	Novembre à décembre (Sénégal)
(Malgras, 1992)	Août à janvier (Mali)	Novembre à décembre (Mali)
(Baumer, 1995)	Janvier ou février (région sahélienne)	Novembre à décembre
Echantillons du Laboratoire (secs)	<i>D. microcarpum</i>	<i>D. senegalense</i> forme comestible
	Février à mars (Mali)	Septembre à octobre (Sénégal)
		<i>D. senegalense</i> forme toxique
		Deux périodes de récolte selon nos sources : au nord du Sénégal sont mûrs en décembre à janvier et au Sud du pays, le sont plus tard.

* non précisé

Tableau A.1.9 - Habitat

	<i>D. microcarpum</i> Guill. et Perr.	<i>D. senegalense</i> J.F. Gmel.
(Aubréville, 1936)	Tamba - brousse soudanaise et savanes boisées, forêts denses.	Bodo *
(Aubréville, 1950)	- terrains secs, savanes boisées, et forêts claires des zones soudano-guinéennes et sahélo-soudaniennes ; - souvent abondant par petit peuplement.	- forêt dense demi-sèche, lisière de la forêt dense humide, suit les galeries forestières.
(Hutchinson <i>et al.</i> , 1958)	- savanes sèches.	- régions forestières et régions bordant les savanes humides.
(Ministério do Ultramar, 1958)	- forêts ouvertes et savanes arborées de la région sahélo-soudaniennes.	- forêts sèches ouvertes des régions littorales et sublittorales de Guinée Portugaise et de Casamance ; - galerie forestière de la région soudano-guinéenne jusqu'à la lisière de la forêt dense humide.
(Kerharo and Adam, 1962)	- forêts et savanes boisées soudaniennes.	- forêts guinéennes où il forme avec d'autres arbres le fond des forêts sèches.
(Aubréville, 1970)	- savanes boisées soudano-guinéennes.	- galeries forestières et forêts sèches guinéennes ; quelques fois en forêt dense humide.
(Kerharo and Adam, 1974)	- forêt et savanes boisées soudaniennes ; - forme parfois de petits peuplements par drageonnement.	- forme le fond des forêts pré-guinéennes ; - existe également dans la région soudanienne, mais croît uniquement dans les galeries humides.
(Berhaut, 1975)	- terrains découverts de la savane boisée ; préfère la savane sèche.	- lieux frais des savanes humides, lisière des galeries forestières.
(Malgras, 1992)	- sols sableux ou latéritiques des zones soudanienne et soudano-guinéenne, jusqu'aux abords du Sahel.	- savanes arborées en zone soudano-guinéenne, souvent le long des forêts-galeries.
(Burkill, 1995)	- savane sèche, zone sub-saharienne.	- savanes et forêts humides ; - pousse souvent en agglomérat ; - <i>D. senegalense</i> pousse dans des régions plus humides que <i>D. microcarpum</i> .
(Arbonnier, 2002)	- grégaire, surtout sur les cuirasses latéritiques ou les jachères.	- distribution irrégulière, localement très commune.
(Lebrun and Stork, sous presse)	- formations sèches, forêts ouvertes et savanes boisées ; croît dans les dépressions, sur les sols alluvionnaires, latéritiques ou en jachère. - est quelques fois cultivé.	- forêt fermée et bordure forestière dans les régions de savane humide ; savane ouverte, jusqu'à 650 m d'altitude.

Annexe 2 – Données RX des composés B et D

A.2.1 - Données RX du composé B

Table A.2.1.1 - Crystal Data and Details of the Structure Determination compound B

Crystal Data	
Formula	C ₂₀ H ₃₀ O ₃
Formula Weight	318.44
Crystal System	Orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (No. 19)
a, b, c [Å]	7.739(2) 10.156(2) 22.793(4)
V [Å ³]	1791.4(7)
Z	4
D(calc) [g/cm ³]	1.181
μ (MoKa) [mm ⁻¹]	0.077
<i>F</i> _{ooo}	696
Crystal Size [mm]	0.08 x 0.10 x 0.23

Data Collection	
Temperature [°K]	140
Radiation [Å]	MoKa 0.71073
Theta Min-Max [°]	3.2, 25.0
Dataset	-8: 8 ; -12: 12 ; -27: 27
Tot., Uniq. Data, R(int)	10832, 3012, 0.177
Observed data [<i>I</i> > 2.0 σ (<i>I</i>)]	1655

Refinement	
Nref, Npar	3012, 209
R, wR2, S	0.0779, 0.2058, 0.92
$w = 1/[S^2(FO^2) + (0.0927P)^2]$ WHERE $P = (FO^2 + 2FC^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00
Flack x	0(3)
Min. and Max. Resd. Dens. [e Å ⁻³]	-0.23, 0.25

Note : les numéros des atomes correspondent à ceux de la structure ORTEP de la Figure 3.25

Table A.2.1.2 - Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms for compound B

Atom	x	y	z	U(eq) [Å ²]
O1	-0.1351(6)	0.1558(3)	0.35608(15)	0.0813(14)
O2	-0.1849(6)	0.3170(4)	0.29300(15)	0.0733(14)
O3	0.4592(6)	-0.3054(3)	0.10624(18)	0.0752(15)
C1	-0.0882(8)	0.2302(5)	0.3109(2)	0.0590(19)
C2	0.0795(8)	0.1922(5)	0.2885(2)	0.0600(19)
C3	0.1657(8)	0.2498(4)	0.24591(19)	0.0530(18)
C4	0.3424(7)	0.2026(5)	0.2287(2)	0.0573(18)
C5	0.3461(7)	0.1408(4)	0.16664(18)	0.0473(14)
C6	0.5279(6)	0.1079(4)	0.14289(17)	0.0417(14)
C7	0.6410(7)	0.2341(4)	0.14094(19)	0.0510(16)
C8	0.8082(8)	0.2091(5)	0.1078(2)	0.0623(19)
C9	0.7722(7)	0.1681(5)	0.0452(2)	0.0543(17)

Table A.2.1.2 – Suite

Atom	x	y	z	U(eq) [Å ²]
C10	0.6699(6)	0.0401(4)	0.04063(19)	0.0470(16)
C11	0.5031(6)	0.0497(4)	0.07991(18)	0.0403(14)
C12	0.4105(6)	-0.0837(4)	0.0797(2)	0.0473(16)
C13	0.5197(8)	-0.2013(5)	0.0890(2)	0.0567(19)
C14	0.7013(7)	-0.1913(5)	0.0755(2)	0.0520(17)
C15	0.7764(6)	-0.0805(5)	0.05439(19)	0.0497(16)
C16	0.1016(8)	0.3690(5)	0.2133(2)	0.0630(19)
C17	0.6088(7)	0.0089(5)	0.18445(18)	0.0517(16)
C18	0.5499(8)	0.3555(5)	0.1158(2)	0.0647(19)
C19	0.6129(8)	0.0242(5)	-0.02489(19)	0.0617(18)
C20	0.9650(7)	-0.0806(6)	0.0406(2)	0.071(2)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

Table A.2.1.3 - Hydrogen Atom Positions and Isotropic Displacement Parameters for compound

Atom	x	y	z	U(iso) [Å ²]
H1	-0.22750	0.18510	0.37040	0.1220
H2	0.13280	0.11800	0.30630	0.0720
H4A	0.38220	0.13640	0.25760	0.0690
H4B	0.42390	0.27770	0.23000	0.0690
H5A	0.27680	0.05890	0.16730	0.0570
H5B	0.28950	0.20240	0.13900	0.0570
H7	0.67330	0.25550	0.18230	0.0610
H8A	0.87930	0.29010	0.10790	0.0750
H8B	0.87450	0.13890	0.12780	0.0750
H9A	0.88350	0.15730	0.02430	0.0650
H9B	0.70690	0.23910	0.02540	0.0650
H11	0.42400	0.11190	0.05910	0.0480
H12A	0.32080	-0.08210	0.11070	0.0570
H12B	0.35040	-0.09360	0.04160	0.0570
H14	0.77210	-0.26650	0.08170	0.0620
H16A	-0.02160	0.35830	0.20450	0.0950
H16B	0.16630	0.37850	0.17660	0.0950
H16C	0.11830	0.44760	0.23750	0.0950
H17A	0.71570	-0.02540	0.16720	0.0770
H17B	0.52790	-0.06390	0.19110	0.0770
H17C	0.63490	0.05200	0.22190	0.0770
H18A	0.63540	0.42440	0.10780	0.0970
H18B	0.46500	0.38800	0.14420	0.0970
H18C	0.49110	0.33160	0.07920	0.0970
H19A	0.71540	0.01270	-0.04960	0.0920
H19B	0.54970	0.10290	-0.03740	0.0920
H19C	0.53800	-0.05320	-0.02870	0.0920
H20A	1.01150	-0.16950	0.04590	0.1060
H20B	1.02490	-0.01950	0.06700	0.1060
H20C	0.98240	-0.05270	-0.00010	0.1060

The Temperature Factor has the Form of $\exp(-T)$ Where
 $T = 8 \cdot (\pi^2) \cdot U \cdot (\sin(\theta)/\lambda)^2$ for Isotropic Atoms

Table A.2.1.4 - (An)isotropic Displacement Parameters for compound **B**

Atom	U(1,1) or U	U(2,2)	U(3,3)	U(2,3)	U(1,3)	U(1,2)
O1	0.101(3)	0.059(2)	0.084(2)	0.012(2)	0.038(2)	0.021(2)
O2	0.073(3)	0.073(2)	0.074(2)	0.006(2)	0.018(2)	0.018(3)
O3	0.085(3)	0.0395(19)	0.101(3)	0.0009(19)	0.040(2)	-0.005(2)
C1	0.066(4)	0.042(3)	0.069(3)	-0.009(3)	0.008(3)	0.005(3)
C2	0.075(4)	0.046(3)	0.059(3)	-0.005(2)	0.004(3)	0.005(3)
C3	0.066(4)	0.037(2)	0.056(3)	-0.007(2)	0.001(3)	0.002(3)
C4	0.061(4)	0.059(3)	0.052(2)	-0.006(2)	0.000(2)	0.014(3)
C5	0.056(3)	0.034(2)	0.052(2)	-0.005(2)	-0.002(2)	0.001(2)
C6	0.045(3)	0.034(2)	0.046(2)	0.0003(19)	-0.003(2)	0.006(2)
C7	0.055(3)	0.047(3)	0.051(2)	-0.004(2)	0.003(2)	-0.009(3)
C8	0.060(4)	0.063(3)	0.064(3)	-0.009(3)	0.004(3)	-0.026(3)
C9	0.045(3)	0.058(3)	0.060(3)	0.005(2)	.008(2)	0.019(3)
C10	0.037(3)	0.049(3)	0.055(2)	0.000(2)	-0.002(2)	-0.004(2)
C11	0.034(3)	0.039(2)	0.048(2)	-0.003(2)	0.001(2)	-0.001(2)
C12	0.038(3)	0.046(2)	0.058(3)	-0.005(2)	-0.001(2)	-0.001(2)
C13	0.070(4)	0.040(3)	0.060(3)	-0.004(2)	0.010(3)	0.005(3)
C14	0.050(3)	0.045(3)	0.061(3)	0.000(2)	0.004(2)	0.013(3)
C15	0.038(3)	0.060(3)	0.051(2)	-0.004(2)	0.002(2)	0.005(3)
C16	0.067(4)	0.050(3)	0.072(3)	-0.007(3)	-0.007(3)	0.013(3)
C17	0.046(3)	0.058(3)	0.051(2)	0.006(2)	0.001(2)	0.012(3)
C18	0.083(4)	0.043(3)	0.068(3)	-0.002(2)	0.008(3)	-0.004(3)
C19	0.070(4)	0.063(3)	0.052(2)	-0.006(2)	0.001(3)	-0.002(3)
C20	0.049(4)	0.082(4)	0.081(3)	-0.007(3)	0.008(3)	0.009(3)

The Temperature Factor has the Form of $\text{Exp}(-T)$ Where $T = 8 \cdot (\pi^2) \cdot U \cdot (\sin(\Theta)/\lambda)^2$ for Isotropic Atoms $T = 2 \cdot (\pi^2) \cdot \sum_i h(i) \cdot h(j) \cdot U(i,j) \cdot Astar(i) \cdot Astar(j)$, for Anisotropic Atoms. $Astar(i)$ are Reciprocal Axial Lengths and $h(i)$ are the Reflection Indices.

Table A.2.1.5 - Bond Distances (Å) for compound **B**

O1	-C1	1.328(6)	C4	-H4B	0.9900
O2	-C1	1.226(7)	C5	-H5A	0.9900
O3	-C13	1.221(6)	C5	-H5B	0.9900
O1	-H1	0.8400	C7	-H7	1.0000
C1	-C2	1.447(8)	C8	-H8A	0.9900
C2	-C3	1.315(7)	C8	-H8B	0.9900
C3	-C4	1.501(8)	C9	-H9A	0.9900
C3	-C16	1.505(7)	C9	-H9B	0.9900
C4	-C5	1.548(6)	C11	-H11	1.0000
C5	-C6	1.544(7)	C12	-H12A	0.9900
C6	-C11	1.564(6)	C12	-H12B	0.9900
C6	-C17	1.517(6)	C14	-H14	0.9500
C6	-C7	1.553(6)	C16	-H16A	0.9800
C7	-C8	1.520(8)	C16	-H16B	0.9800
C7	-C18	1.532(7)	C16	-H16C	0.9800
C8	-C9	1.512(7)	C17	-H17A	0.9800
C9	-C10	1.526(7)	C17	-H17B	0.9800
C10	-C11	1.574(6)	C17	-H17C	0.9800
C10	-C19	1.566(6)	C18	-H18A	0.9800
C10	-C15	1.509(7)	C18	-H18B	0.9800
C11	-C12	1.533(6)	C18	-H18C	0.9800
C12	-C13	1.478(7)	C19	-H19A	0.9800
C13	-C14	1.442(8)	C19	-H19B	0.9800
C14	-C15	1.355(7)	C19	-H19C	0.9800
C15	-C20	1.493(7)	C20	-H20A	0.9800
C2	-H2	0.9500	C20	-H20B	0.9800
C4	-H4A	0.9900	C20	-H20C	0.9800

Table A.2.1.6 - Bond Angles (°) for compound **B**

C1	-O1	-H1	109.00	C10	-C11	-C12	109.1(3)
O1	-C1	-C2	111.5(5)	C6	-C11	-C12	113.2(3)
O2	-C1	-C2	128.4(5)	C11	-C12	-C13	116.5(4)
O1	-C1	-O2	120.0(5)	O3	-C13	-C14	120.2(5)
C1	-C2	-C3	126.6(5)	C12	-C13	-C14	118.0(4)
C2	-C3	-C4	120.9(5)	O3	-C13	-C12	121.8(5)
C2	-C3	-C16	123.7(5)	C13	-C14	-C15	123.5(5)
C4	-C3	-C16	115.4(4)	C10	-C15	-C20	119.4(4)
C3	-C4	-C5	112.7(4)	C14	-C15	-C20	119.6(5)
C4	-C5	-C6	115.2(4)	C10	-C15	-C14	120.9(4)
C5	-C6	-C11	107.0(4)	C1	-C2	-H2	117.00
C5	-C6	-C17	107.5(3)	C3	-C2	-H2	117.00
C5	-C6	-C7	110.2(3)	C3	-C4	-H4A	109.00
C7	-C6	-C17	109.4(4)	C3	-C4	-H4B	109.00
C11	-C6	-C17	111.9(3)	C5	-C4	-H4A	109.00
C7	-C6	-C11	110.8(3)	C5	-C4	-H4B	109.00
C6	-C7	-C18	114.6(4)	H4A	-C4	-H4B	108.00
C8	-C7	-C18	109.9(4)	C4	-C5	-H5A	108.00
C6	-C7	-C8	110.9(4)	C4	-C5	-H5B	108.00
C7	-C8	-C9	111.0(5)	C6	-C5	-H5A	108.00
C8	-C9	-C10	113.2(4)	C6	-C5	-H5B	108.00
C9	-C10	-C11	109.5(3)	H5A	-C5	-H5B	108.00
C9	-C10	-C15	113.2(4)	C6	-C7	-H7	107.00
C11	-C10	-C15	112.3(3)	C8	-C7	-H7	107.00
C11	-C10	-C19	108.5(4)	C18	-C7	-H7	107.00
C15	-C10	-C19	105.6(4)	C7	-C8	-H8A	109.00
C9	-C10	-C19	107.4(4)	C7	-C8	-H8B	109.00
C6	-C11	-C10	116.4(4)	C9	-C8	-H8A	109.00
C9	-C8	-H8B	109.00	C6	-C17	-H17B	109.00
H8A	-C8	-H8B	108.00	C6	-C17	-H17C	109.00
C8	-C9	-H9A	109.00	H17A	-C17	-H17B	109.00
C8	-C9	-H9B	109.00	H17A	-C17	-H17C	110.00
C10	-C9	-H9A	109.00	H17B	-C17	-H17C	109.00
C10	-C9	-H9B	109.00	C7	-C18	-H18A	109.00
H9A	-C9	-H9B	108.00	C7	-C18	-H18B	109.00
C6	-C11	-H11	106.00	C7	-C18	-H18C	109.00
C10	-C11	-H11	106.00	H18A	-C18	-H18B	110.00
C12	-C11	-H11	106.00	H18A	-C18	-H18C	109.00
C11	-C12	-H12A	108.00	H18B	-C18	-H18C	110.00
C11	-C12	-H12B	108.00	C10	-C19	-H19A	109.00
C13	-C12	-H12A	108.00	C10	-C19	-H19B	110.00
C13	-C12	-H12B	108.00	C10	-C19	-H19C	109.00
H12A	-C12	-H12B	107.00	H19A	-C19	-H19B	110.00
C13	-C14	-H14	118.00	H19A	-C19	-H19C	109.00
C15	-C14	-H14	118.00	H19B	-C19	-H19C	109.00
C3	-C16	-H16A	109.00	C15	-C20	-H20A	110.00
C3	-C16	-H16B	109.00	C15	-C20	-H20B	109.00
C3	-C16	-H16C	110.00	C15	-C20	-H20C	109.00
H16A	-C16	-H16B	109.00	H20A	-C20	-H20B	110.00
H16A	-C16	-H16C	110.00	H20A	-C20	-H20C	109.00
H16B	-C16	-H16C	109.00	H20B	-C20	-H20C	109.00
C6	-C17	-H17A	109.00				

Table A.2.1.7 - Torsion Angles (°) for compound **B**

O2	-C1	-C2	-C3	4.2(9)
O1	-C1	-C2	-C3	-176.7(5)
C1	-C2	-C3	-C16	0.7(8)
C1	-C2	-C3	-C4	177.6(5)
C16	-C3	-C4	-C5	-70.1(5)
C2	-C3	-C4	-C5	112.7(5)
C3	-C4	-C5	-C6	171.9(4)
C4	-C5	-C6	-C17	60.7(5)
C4	-C5	-C6	-C7	-58.4(5)
C4	-C5	-C6	-C11	-178.9(3)
C11	-C6	-C7	-C8	-51.7(5)
C11	-C6	-C7	-C18	73.4(5)
C17	-C6	-C7	-C8	72.1(4)
C17	-C6	-C7	-C18	-162.8(4)
C5	-C6	-C11	-C10	165.8(3)
C5	-C6	-C7	-C8	-169.9(4)
C5	-C6	-C7	-C18	-44.8(5)
C7	-C6	-C11	-C12	173.3(4)
C17	-C6	-C11	-C10	-76.8(5)
C17	-C6	-C11	-C12	50.9(5)
C5	-C6	-C11	-C12	-66.6(4)
C7	-C6	-C11	-C10	45.7(5)
C6	-C7	-C8	-C9	60.3(5)
C18	-C7	-C8	-C9	-67.4(5)
C7	-C8	-C9	-C10	-61.7(5)
C8	-C9	-C10	-C11	51.9(5)
C8	-C9	-C10	-C19	169.6(4)
C8	-C9	-C10	-C15	-74.3(5)
C9	-C10	-C11	-C12	-174.6(4)
C9	-C10	-C11	-C6	-45.0(5)
C19	-C10	-C11	-C6	-162.0(4)
C15	-C10	-C11	-C6	81.7(4)
C15	-C10	-C11	-C12	-47.9(5)
C9	-C10	-C15	-C20	-31.1(6)
C11	-C10	-C15	-C14	28.5(6)
C11	-C10	-C15	-C20	-155.8(4)
C19	-C10	-C15	-C14	-89.6(5)
C19	-C10	-C15	-C20	86.1(5)
C19	-C10	-C11	-C12	68.4(4)
C9	-C10	-C15	-C14	153.2(4)
C6	-C11	-C12	-C13	-85.0(5)
C10	-C11	-C12	-C13	46.4(5)
C11	-C12	-C13	-C14	-23.1(6)
C11	-C12	-C13	-O3	158.6(4)
O3	-C13	-C14	-C15	177.8(5)
C12	-C13	-C14	-C15	-0.5(7)
C13	-C14	-C15	-C20	-178.8(4)
C13	-C14	-C15	-C10	-3.1(7)

Table A.2.1.8 - Contact Distances (Å) for compound **B**

O1	.C19_a	3.276(6)	C17	.C3_h	3.534(7)
O1	.O3_b	2.680(6)	C17	.C13	3.125(7)
O1	.C16_c	3.325(6)	C18	.C4	3.408(7)
O2	.C16	2.915(7)	C19	.O1_i	3.276(6)
O3	.O1_c	2.680(6)	C19	.C13	3.536(7)
O1	.H19A_a	2.8200	C20	.C8	3.532(8)
O2	.H7_d	2.8200	C20	.C12_g	3.561(7)
O2	.H16A	2.4200	C1	.H16A	2.8000
O2	.H12A_b	2.6400	C1	.H16C_c	3.0800
O2	.H5A_b	2.7100	C2	.H16C_c	2.9800
O3	.H20C_e	2.8200	C4	.H18B	2.8600
O3	.H1_c	1.8700	C4	.H17C	2.7400
C2	.C16_c	3.569(8)	C4	.H7	2.8200
C3	.C17_f	3.534(7)	C5	.H18C	3.0000
C4	.C18	3.408(7)	C5	.H18B	2.7200
C8	.C20	3.532(8)	C5	.H16B	2.8000
C12	.C20_d	3.561(7)	C5	.H12A	2.6100
C13	.C19	3.536(7)	C7	.H4B	2.6700
C13	.C17	3.125(7)	C8	.H17A	2.8300
C14	.C17	3.288(7)	C8	.H16A_g	2.9800
C15	.C17	3.361(6)	C8	.H20B	3.0100
C16	.O2	2.915(7)	C9	.H20C	2.9600
C16	.C2_b	3.569(8)	C9	.H20B	2.7800
C16	.O1_b	3.325(6)	C9	.H18C	2.8400
C16	.C17_f	3.532(7)	C10	.H17A	2.9800
C17	.C15	3.361(6)	C11	.H18C	2.8600
C17	.C14	3.288(7)	C12	.H17B	2.7000
C17	.C16_h	3.532(7)	C12	.H19C	2.6800
C12	.H20B_d	3.0700	H1	.O3_b	1.8700
C12	.H1_c	2.9700	H1	.C12_b	2.9700
C12	.H5A	2.6700	H1	.C13_b	2.7000
C13	.H17B	2.7100	H1	.H12A_b	2.5100
C13	.H19C	3.0800	H2	.H4A	2.2300
C13	.H1_c	2.7000	H4A	.C17	2.7400
C13	.H17A	2.9400	H4A	.H2	2.2300
C14	.H19C	3.0300	H4A	.H17C	2.2900
C14	.H17A	2.6900	H4B	.C7	2.6700
C15	.H17A	2.6700	H4B	.C18	2.8900
C15	.H8B	2.8900	H4B	.H7	2.2300
C16	.H8A_d	3.0600	H4B	.H16B	2.5500
C16	.H5B	2.8000	H4B	.H18B	2.2800
C17	.H16C_h	2.8300	H4B	.C17_f	3.0600
C17	.H4A	2.7400	H4B	.H17B_f	2.4400
C17	.H8B	2.7600	H5A	.C12	2.6700
C17	.H12A	2.9400	H5A	.H12A	1.9600
C17	.H4B_h	3.0600	H5A	.H17B	2.3700
C18	.H11	2.9600	H5A	.O2_c	2.7100
C18	.H5B	2.6000	H5B	.C16	2.8000
C18	.H9B	2.6700	H5B	.C18	2.6000
C18	.H4B	2.8900	H5B	.H11	2.2900
C19	.H12B	2.8000	H5B	.H16B	2.2000
C19	.H20C	3.0200	H5B	.H18B	2.3300
C20	.H8B	3.0700	H5B	.H18C	2.4500
C20	.H9A	2.5200	H7	.O2_g	2.8200
C20	.H12B_g	2.9900	H7	.C4	2.8200
C20	.H19A	2.9800	H7	.H4B	2.2300
H7	.H17C	2.2700	H12A	.H1_c	2.5100
H8A	.C16_g	3.0600	H12B	.C19	2.8000

Table A.2.1.8 – Suite

H8A	.H16A_g	2.4300	H12B	.C20_d	2.9900
H8A	.H18A	2.3300	H12B	.H19C	2.2000
H8A	.H19B_j	2.3500	H14	.H20A	2.2500
H8B	.C15	2.8900	H16A	.O2	2.4200
H8B	.C17	2.7600	H16A	.C1	2.8000
H8B	.C20	3.0700	H16A	.C8_d	2.9800
H8B	.H17A	2.2600	H16A	.H8A_d	2.4300
H8B	.H20B	2.4200	H16B	.C5	2.8000
H9A	.C20	2.5200	H16B	.H4B	2.5500
H9A	.H19A	2.5900	H16B	.H5B	2.2000
H9A	.H20B	2.3200	H16B	.H18B	2.4300
H9A	.H20C	2.3300	H16C	.C1_b	3.0800
H9A	.H18C_j	2.5000	H16C	.C2_b	2.9800
H9B	.C18	2.6700	H16C	.C17_f	2.8300
H9B	.H18C	2.2700	H16C	.H17A_f	2.5400
H9B	.H19B	2.3300	H16C	.H17C_f	2.3700
H11	.C18	2.9600	H17A	.C8	2.8300
H11	.H5B	2.2900	H17A	.C10	2.9800
H11	.H18C	2.3400	H17A	.C13	2.9400
H11	.H19B	2.4100	H17A	.C14	2.6900
H12A	.C5	2.6100	H17A	.C15	2.6700
H12A	.C17	2.9400	H17A	.H8B	2.2600
H12A	.H5A	1.9600	H17A	.H16C_h	2.5400
H12A	.H17B	2.4400	H17B	.C12	2.7000
H12A	.H20B_d	2.5800	H17B	.C13	2.7100
H12A	.O2_c	2.6400	H17B	.H5A	2.3700
H17B	.H12A	2.4400	H19A	.H20C	2.4500
H17B	.H4B_h	2.4400	H19A	.O1_i	2.8200
H17C	.C4	2.7400	H19B	.H9B	2.3300
H17C	.H4A	2.2900	H19B	.H11	2.4100
H17C	.H7	2.2700	H19B	.H8A_k	2.3500
H17C	.H16C_h	2.3700	H19C	.C12	2.6800
H18A	.H8A	2.3300	H19C	.C13	3.0800
H18B	.C4	2.8600	H19C	.C14	3.0300
H18B	.C5	2.7200	H19C	.H12B	2.2000
H18B	.H4B	2.2800	H20A	.H14	2.2500
H18B	.H5B	2.3300	H20B	.C8	3.0100
H18B	.H16B	2.4300	H20B	.C9	2.7800
H18C	.C5	3.0000	H20B	.C12_g	3.0700
H18C	.C9	2.8400	H20B	.H8B	2.4200
H18C	.C11	2.8600	H20B	.H9A	2.3200
H18C	.H5B	2.4500	H20B	.H12A_g	2.5800
H18C	.H9B	2.2700	H20C	.C9	2.9600
H18C	.H11	2.3400	H20C	.C19	3.0200
H18C	.H9A_k	2.5000	H20C	.H9A	2.3300
H19A	.C20	2.9800	H20C	.H19A	2.4500
H19A	.H9A	2.5900	H20C	.O3_l	2.8200

Table A.2.1.9 - Hydrogen Bonds ($\text{\AA}$, $^\circ$) for compound **B**

O1 -- H1 .. O3	0.8400	1.8700	2.680(6)	161.00	4_555
C16 -- H16A .. O2	0.9800	2.4200	2.915(7)	111.00	.

Translation of Symmetry Code to Equiv.Pos

a = [2555.00]	= 1/2-x,-y,1/2+z
b = [4555.00]	= -x,1/2+y,1/2-z
c = [4545.00]	= -x,-1/2+y,1/2-z
d = [1455.00]	= -1+x,y,z
e = [3445.00]	= -1/2+x,-1/2-y,-z
f = [4655.00]	= 1-x,1/2+y,1/2-z
g = [1655.00]	= 1+x,y,z
h = [4645.00]	= 1-x,-1/2+y,1/2-z
i = [2554.00]	= 1/2-x,-y,-1/2+z
j = [3555.00]	= 1/2+x,1/2-y,-z
k = [3455.00]	= -1/2+x,1/2-y,-z
l = [3545.00]	= 1/2+x,-1/2-y,-z

A.2.2 - Données RX du composé **D**

Table A.2.2.1 - Crystal Data and Details of the Structure Determination for compound **D**

Crystal Data	
Formula	C ₂₀ H ₃₄ O ₄
Formula Weight	338.47
Crystal System	Orthorhombic
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (No. 19)
a, b, c [$\text{\AA}$]	7.2148(4) 9.5841(9) 27.361(2)
V [$\text{\AA}^3$]	1891.9(2)
Z	4
D(calc) [g/cm^3]	1.188
μ (MoKa) [mm^{-1}]	0.081
F_{ooo}	744
Crystal Size [mm]	0.07 x 0.10 x 0.27
Data Collection	
Temperature ($^\circ\text{K}$)	140
Radiation [$\text{\AA}$]	MoKa 0.71073
Theta Min-Max [$^\circ$]	3.1, 25.0
Dataset	-7: 7 ; -11: 11 ; -32: 32
Tot., Uniq. Data, R(int)	11611, 3197, 0.047
Observed data [$I > 2.0 \sigma(I)$]	2359
Refinement	
Nref, Npar	3197, 217
R, wR2, S	0.0326, 0.0599, 0.85
$w = 1/[\text{S}^2 \text{ (FO}^2 \text{)} + (0.0227\text{P})^2]$ WHERE $\text{P} = (\text{FO}^2 + 2\text{FC}^2)/3$	
Max. and Av. Shift/Error	0.00, 0.00
Flack x	0.1(11)
Min. and Max. Resd. Dens. [$\text{e \AA}^{-3}$]	-0.13, 0.15

Note : les numéros des atomes correspondent à ceux de la structure ORTEP de la figure 3.33

Table A.2.2.2 - Final Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement Parameters of the non-Hydrogen atoms for compound **D**

Atom	x	y	z	U(eq) [$\text{\AA}^2$]
O1	0.7530(2)	0.97114(16)	1.14603(5)	0.0452(5)
O2	0.5678(2)	0.81244(15)	1.11051(5)	0.0374(5)
O3	0.92876(19)	1.06097(13)	0.72968(4)	0.0275(4)
O4	0.84853(18)	0.76002(13)	0.80831(4)	0.0263(5)
C1	0.6920(3)	0.8996(2)	1.10782(7)	0.0271(7)
C2	0.7948(3)	0.9376(2)	1.06313(6)	0.0277(7)
C3	0.7417(3)	0.91901(19)	1.01686(6)	0.0254(7)
C4	0.8674(3)	0.9665(2)	0.97589(6)	0.0263(7)
C5	0.7952(3)	1.0985(2)	0.95017(6)	0.0232(6)
C6	0.9115(3)	1.14863(19)	0.90573(6)	0.0191(6)
C7	0.8175(3)	1.2795(2)	0.88285(6)	0.0237(7)
C8	0.6394(3)	1.2430(2)	0.85586(6)	0.0248(7)
C9	0.6668(3)	1.1339(2)	0.81584(6)	0.0233(7)
C10	0.7579(3)	0.9973(2)	0.83428(6)	0.0170(6)
C11	0.9378(3)	1.03558(19)	0.86409(6)	0.0170(6)
C12	1.0973(3)	1.0784(2)	0.82981(6)	0.0206(6)
C13	1.1419(2)	0.9701(2)	0.79103(6)	0.0226(6)
C14	0.9745(2)	0.9414(2)	0.75940(6)	0.0205(6)
C15	0.8039(3)	0.89892(19)	0.78977(6)	0.0185(6)
C16	0.5638(3)	0.8552(2)	1.00126(7)	0.0407(9)
C17	1.1027(3)	1.1895(2)	0.92639(6)	0.0262(7)
C18	0.7833(3)	1.3985(2)	0.91933(7)	0.0324(7)
C19	0.6146(3)	0.9176(2)	0.86585(6)	0.0247(7)
C20	0.6430(3)	0.8736(2)	0.75505(6)	0.0258(7)

U(eq) = 1/3 of the trace of the orthogonalized U Tensor

Table A.2.2.3 - Hydrogen Atom Positions and Isotropic Displacement Parameters for compound **D**

Atom	x	y	z	U(iso) [$\text{\AA}^2$]
H1	0.69230	0.94840	1.17100	0.0680
H2	0.91240	0.98020	1.06780	0.0330
H3	1.02530	1.10730	0.72400	0.0410
H4	0.91640	0.76730	0.83310	0.0390
H4A	0.87890	0.89040	0.95160	0.0320
H4B	0.99230	0.98540	0.98930	0.0320
H5A	0.78990	1.17500	0.97440	0.0280
H5B	0.66690	1.08060	0.93900	0.0280
H7	0.90560	1.31650	0.85780	0.0280
H8A	0.58800	1.32890	0.84100	0.0300
H8B	0.54760	1.20760	0.87970	0.0300
H9A	0.74520	1.17430	0.78970	0.0280
H9B	0.54480	1.11130	0.80130	0.0280
H11	0.97850	0.94790	0.88070	0.0200
H12A	1.06400	1.16710	0.81350	0.0250
H12B	1.20980	1.09560	0.84970	0.0250
H13A	1.24510	1.00410	0.77040	0.0270
H13B	1.18230	0.88250	0.80700	0.0270
H14	1.00560	0.86230	0.73700	0.0250
H16A	0.48760	0.83540	1.03010	0.0610
H16B	0.58870	0.76810	0.98370	0.0610
H16C	0.49760	0.91990	0.97970	0.0610

Table A.2.2.3 - Suite

Atom	x	y	z	U(iso) [$\text{\AA}^2$]
H17A	1.17660	1.10520	0.93190	0.0390
H17B	1.08630	1.23920	0.95740	0.0390
H17C	1.16670	1.25020	0.90300	0.0390
H18A	0.68540	1.37110	0.94220	0.0490
H18B	0.74500	1.48250	0.90160	0.0490
H18C	0.89760	1.41770	0.93750	0.0490
H19A	0.52590	0.86990	0.84450	0.0370
H19B	0.54830	0.98380	0.88680	0.0370
H19C	0.67880	0.84880	0.88620	0.0370
H20A	0.53880	0.83330	0.77310	0.0390
H20B	0.68180	0.80900	0.72920	0.0390
H20C	0.60470	0.96230	0.74040	0.0390

The Temperature Factor has the Form of $\text{Exp}(-T)$ Where

$T = 8 \cdot (\pi^2) \cdot U \cdot (\sin(\theta)/\lambda)^2$ for Isotropic Atoms

Table A.2.2.4 - (An)isotropic Displacement Parameters for compound D

Atom	U(1,1) or U	U(2,2)	U(3,3)	U(2,3)	U(1,3)	U(1,2)
O1	0.0565(10)	0.0589(11)	0.0202(7)	-0.0043(8)	0.0070(8)	0.0144(10)
O2	0.0531(10)	0.0295(9)	0.0296(8)	0.0045(7)	0.0107(8)	-0.0115(9)
O3	0.0337(8)	0.0271(8)	0.0218(7)	0.0073(6)	0.0007(6)	-0.0067(8)
O4	0.0342(9)	0.0188(8)	0.0258(7)	0.0015(6)	-0.0004(7)	0.0041(7)
C1	0.0354(14)	0.0246(13)	0.0213(11)	0.0024(10)	0.0014(11)	0.0068(12)
C2	0.0318(14)	0.0274(13)	0.0240(10)	0.0032(9)	0.0047(10)	-0.0002(12)
C3	0.0374(13)	0.0155(11)	0.0233(10)	-0.0001(9)	0.0035(10)	0.0019(11)
C4	0.0302(13)	0.0293(13)	0.0194(10)	0.0027(10)	0.0039(9)	0.0014(11)
C5	0.0324(13)	0.0173(11)	0.0199(9)	-0.0009(9)	0.0030(9)	0.0018(11)
C6	0.0244(12)	0.0176(11)	0.0152(9)	-0.0022(8)	-0.0012(9)	0.0001(10)
C7	0.0305(13)	0.0179(12)	0.0226(10)	0.0002(9)	0.0067(10)	0.0006(11)
C8	0.0273(13)	0.0218(12)	0.0252(10)	0.0028(9)	0.0007(10)	0.0069(11)
C9	0.0205(12)	0.0242(12)	0.0253(10)	0.0002(9)	-0.0019(9)	0.0013(10)
C10	0.0155(11)	0.0177(11)	0.0179(9)	0.0011(8)	0.0024(9)	0.0005(9)
C11	0.0214(11)	0.0161(11)	0.0136(9)	0.0025(9)	0.0011(9)	0.0019(10)
C12	0.0182(12)	0.0250(11)	0.0186(9)	-0.0007(9)	-0.0005(9)	-0.0038(10)
C13	0.0219(11)	0.0276(12)	0.0182(9)	0.0014(9)	0.0037(9)	-0.0018(10)
C14	0.0258(12)	0.0194(11)	0.0163(9)	0.0012(9)	-0.0007(9)	0.0012(10)
C15	0.0208(11)	0.0162(11)	0.0184(9)	0.0030(9)	-0.0020(9)	0.0022(10)
C16	0.0565(17)	0.0394(15)	0.0263(12)	-0.0003(11)	0.0052(12)	-0.0193(14)
C17	0.0322(14)	0.0257(12)	0.0208(10)	-0.0037(9)	-0.0005(10)	-0.0029(11)
C18	0.0387(14)	0.0212(12)	0.0372(11)	-0.0049(10)	0.0028(11)	0.0042(11)
C19	0.0256(13)	0.0246(12)	0.0239(10)	-0.0028(9)	0.0017(9)	-0.0022(11)
C20	0.0293(13)	0.0265(12)	0.0217(10)	-0.0038(9)	-0.0012(10)	-0.0008(11)

The Temperature Factor has the Form of $\text{Exp}(-T)$ Where $T = 8 \cdot (\pi^2) \cdot U \cdot (\sin(\theta)/\lambda)^2$ for Isotropic Atoms $T = 2 \cdot (\pi^2) \cdot \sum_i h(i) \cdot h(j) \cdot U(i,j) \cdot A^*(i) \cdot A^*(j)$, for Anisotropic Atoms. $A^*(i)$ are Reciprocal Axial Lengths and $h(i)$ are the Reflection Indices.

Table A.2.2.5 - Bond Distances (Å) for compound **D**

O1	-C1	1.325(2)	C2	-H2	0.9500
O2	-C1	1.227(3)	C4	-H4A	0.9900
O3	-C14	1.443(2)	C4	-H4B	0.9900
O4	-C15	1.461(2)	C5	-H5A	0.9900
O1	-H1	0.8400	C5	-H5B	0.9900
O3	-H3	0.8400	C7	-H7	1.0000
O4	-H4	0.8400	C8	-H8A	0.9900
C1	-C2	1.476(3)	C8	-H8B	0.9900
C2	-C3	1.335(2)	C9	-H9A	0.9900
C3	-C4	1.512(3)	C9	-H9B	0.9900
C3	-C16	1.485(3)	C11	-H11	1.0000
C4	-C5	1.539(3)	C12	-H12A	0.9900
C5	-C6	1.554(3)	C12	-H12B	0.9900
C6	-C17	1.541(3)	C13	-H13A	0.9900
C6	-C7	1.557(3)	C13	-H13B	0.9900
C6	-C11	1.584(2)	C14	-H14	1.0000
C7	-C18	1.536(3)	C16	-H16A	0.9800
C7	-C8	1.523(3)	C16	-H16B	0.9800
C8	-C9	1.527(3)	C16	-H16C	0.9800
C9	-C10	1.549(3)	C17	-H17A	0.9800
C10	-C11	1.576(3)	C17	-H17B	0.9800
C10	-C15	1.576(2)	C17	-H17C	0.9800
C10	-C19	1.549(3)	C18	-H18A	0.9800
C11	-C12	1.540(3)	C18	-H18B	0.9800
C12	-C13	1.519(3)	C18	-H18C	0.9800
C13	-C14	1.511(2)	C19	-H19A	0.9800
C14	-C15	1.540(3)	C19	-H19B	0.9800
C15	-C20	1.520(3)	C19	-H19C	0.9800
C20	-H20A	0.9800	C20	-H20C	0.9800
C20	-H20B	0.9800			

Table A.2.2.6 - Bond Angles (°) for compound **D**

C1	-O1	-H1	110.00	C15	-C10	-C19	106.06(15)
C14	-O3	-H3	110.00	C10	-C11	-C12	111.23(14)
C15	-O4	-H4	109.00	C6	-C11	-C12	110.20(15)
O1	-C1	-O2	123.18(18)	C6	-C11	-C10	115.65(17)
O1	-C1	-C2	111.04(17)	C11	-C12	-C13	113.68(15)
O2	-C1	-C2	125.78(18)	C12	-C13	-C14	110.81(14)
C1	-C2	-C3	127.5(2)	O3	-C14	-C13	111.15(15)
C2	-C3	-C16	125.17(18)	O3	-C14	-C15	109.34(13)
C2	-C3	-C4	119.40(19)	C13	-C14	-C15	112.21(14)
C4	-C3	-C16	115.43(15)	O4	-C15	-C20	103.89(14)
C3	-C4	-C5	112.55(17)	C10	-C15	-C20	114.70(17)
C4	-C5	-C6	115.43(17)	C14	-C15	-C20	108.39(14)
C7	-C6	-C11	108.30(13)	C10	-C15	-C14	115.29(16)
C7	-C6	-C17	109.42(15)	O4	-C15	-C10	108.87(13)
C11	-C6	-C17	109.30(16)	O4	-C15	-C14	104.61(15)
C5	-C6	-C7	109.18(16)	C1	-C2	-H2	116.00
C5	-C6	-C11	114.60(15)	C3	-C2	-H2	116.00
C5	-C6	-C17	105.96(14)	C3	-C4	-H4A	109.00
C6	-C7	-C8	112.17(16)	C3	-C4	-H4B	109.00
C6	-C7	-C18	114.01(14)	C5	-C4	-H4A	109.00
C8	-C7	-C18	110.50(17)	C5	-C4	-H4B	109.00
C7	-C8	-C9	113.32(17)	H4A	-C4	-H4B	108.00
C8	-C9	-C10	113.58(14)	C4	-C5	-H5A	108.00
C9	-C10	-C15	110.08(14)	C4	-C5	-H5B	108.00

Table A.2.2.6 – Suite

C11	-C10	-C19	112.08(14)	C6	-C5	-H5A	108.00
C9	-C10	-C19	108.37(17)	C6	-C5	-H5B	108.00
C11	-C10	-C15	111.46(16)	H5A	-C5	-H5B	107.00
C9	-C10	-C11	108.73(15)	C6	-C7	-H7	107.00
C8	-C7	-H7	107.00	C3	-C16	-H16A	109.00
C18	-C7	-H7	107.00	C3	-C16	-H16B	109.00
C7	-C8	-H8A	109.00	C3	-C16	-H16C	109.00
C7	-C8	-H8B	109.00	H16A	-C16	-H16B	109.00
C9	-C8	-H8A	109.00	H16A	-C16	-H16C	109.00
C9	-C8	-H8B	109.00	H16B	-C16	-H16C	109.00
H8A	-C8	-H8B	108.00	C6	-C17	-H17A	110.00
C8	-C9	-H9A	109.00	C6	-C17	-H17B	109.00
C8	-C9	-H9B	109.00	C6	-C17	-H17C	109.00
C10	-C9	-H9A	109.00	H17A	-C17	-H17B	109.00
C10	-C9	-H9B	109.00	H17A	-C17	-H17C	109.00
H9A	-C9	-H9B	108.00	H17B	-C17	-H17C	109.00
C6	-C11	-H11	106.00	C7	-C18	-H18A	109.00
C10	-C11	-H11	106.00	C7	-C18	-H18B	109.00
C12	-C11	-H11	106.00	C7	-C18	-H18C	110.00
C11	-C12	-H12A	109.00	H18A	-C18	-H18B	109.00
C11	-C12	-H12B	109.00	H18A	-C18	-H18C	109.00
C13	-C12	-H12A	109.00	H18B	-C18	-H18C	110.00
C13	-C12	-H12B	109.00	C10	-C19	-H19A	109.00
H12A	-C12	-H12B	108.00	C10	-C19	-H19B	109.00
C12	-C13	-H13A	109.00	C10	-C19	-H19C	109.00
C12	-C13	-H13B	109.00	H19A	-C19	-H19B	109.00
C14	-C13	-H13A	110.00	H19A	-C19	-H19C	109.00
C14	-C13	-H13B	109.00	H19B	-C19	-H19C	110.00
H13A	-C13	-H13B	108.00	C15	-C20	-H20A	110.00
O3	-C14	-H14	108.00	C15	-C20	-H20B	109.00
C13	-C14	-H14	108.00	C15	-C20	-H20C	109.00
C15	-C14	-H14	108.00	H20A	-C20	-H20B	110.00
H20A	-C20	-H20C	109.00	H20B	-C20	-H20C	109.00

Table A.2.2.7 - Torsion Angles (°) for compound D

O2	-C1	-C2	-C3	21.4(3)
O1	-C1	-C2	-C3	-159.6(2)
C1	-C2	-C3	-C16	0.2(3)
C1	-C2	-C3	-C4	179.54(18)
C2	-C3	-C4	-C5	-106.8(2)
C16	-C3	-C4	-C5	72.5(2)
C3	-C4	-C5	-C6	-176.67(15)
C4	-C5	-C6	-C7	178.19(15)
C4	-C5	-C6	-C11	56.5(2)
C4	-C5	-C6	-C17	-64.06(19)
C7	-C6	-C11	-C10	-53.0(2)
C7	-C6	-C11	-C12	74.2(2)
C17	-C6	-C11	-C10	-172.13(14)
C17	-C6	-C11	-C12	-44.93(19)
C17	-C6	-C7	-C8	172.52(14)
C5	-C6	-C11	-C10	69.1(2)
C5	-C6	-C11	-C12	-163.65(16)
C5	-C6	-C7	-C8	-71.93(18)
C5	-C6	-C7	-C18	54.6(2)
C11	-C6	-C7	-C8	53.5(2)
C11	-C6	-C7	-C18	-179.97(17)
C17	-C6	-C7	-C18	-60.9(2)

Table A.2.2.7 – Suite

C6	-C7	-C8	-C9	-56.5(2)
C18	-C7	-C8	-C9	175.05(15)
C7	-C8	-C9	-C10	55.2(2)
C8	-C9	-C10	-C11	-50.5(2)
C8	-C9	-C10	-C15	-172.84(17)
C8	-C9	-C10	-C19	71.6(2)
C15	-C10	-C11	-C12	46.1(2)
C11	-C10	-C15	-O4	72.32(19)
C11	-C10	-C15	-C14	-44.8(2)
C19	-C10	-C11	-C6	-68.5(2)
C19	-C10	-C11	-C12	164.84(15)
C9	-C10	-C15	-O4	-166.94(16)
C9	-C10	-C15	-C14	75.9(2)
C9	-C10	-C15	-C20	-51.1(2)
C9	-C10	-C11	-C6	51.31(19)
C9	-C10	-C11	-C12	-75.38(18)
C15	-C10	-C11	-C6	172.83(14)
C11	-C10	-C15	-C20	-171.80(15)
C19	-C10	-C15	-O4	-49.9(2)
C19	-C10	-C15	-C14	-167.06(15)
C19	-C10	-C15	-C20	65.96(19)
C6	-C11	-C12	-C13	175.53(15)
C10	-C11	-C12	-C13	-54.8(2)
C11	-C12	-C13	-C14	59.1(2)
C12	-C13	-C14	-C15	-54.7(2)
C12	-C13	-C14	-O3	68.07(17)
O3	-C14	-C15	-C10	-74.41(18)
O3	-C14	-C15	-C20	55.70(18)
O3	-C14	-C15	-O4	166.07(12)
C13	-C14	-C15	-C10	49.4(2)
C13	-C14	-C15	-C20	179.51(15)
C13	-C14	-C15	-O4	-70.13(18)

Table A.2.2.8 - Contact Distances (Å) for compound D

O1	.O3_a	2.6557(18)	C9	.O3	3.101(2)
O1	.C20_a	3.417(2)	C16	.C3_b	3.543(3)
O2	.O4_b	2.8140(18)	C16	.C4_b	3.450(3)
O2	.C16	3.017(2)	C16	.O2	3.017(2)
O3	.C9	3.101(2)	C19	.C4	3.551(3)
O3	.O1_c	2.6557(18)	C19	.C5	3.166(3)
O3	.O4_d	2.7022(18)	C20	.O1_c	3.417(2)
O4	.O3_f	2.7022(18)	C1	.H4_b	3.0200
O4	.O2_e	2.8140(18)	C1	.H18C_g	3.0200
O1	.H20C_a	2.8500	C1	.H16A	2.6600
O2	.H16A	2.2900	C3	.H16B_e	3.0800
O2	.H4_b	2.0400	C4	.H17B	3.1000
O2	.H11_b	2.5900	C4	.H17A	2.8600
O2	.H4A_b	2.9200	C4	.H16B_e	2.9700
O3	.H12A	2.6900	C4	.H16A_e	3.0300
O3	.H20C	2.5400	C4	.H11	2.7300
O3	.H9A	2.3700	C4	.H19C	3.0200
O3	.H1_c	1.8300	C5	.H8B	2.8300
O3	.H4_d	2.8500	C5	.H19B	2.7200
O4	.H11	2.8400	C5	.H18A	2.7400
O4	.H19C	2.6000	C5	.H19C	3.0800
O4	.H13B	2.6800	C5	.H16C	2.8600

Table A.2.2.8 – Suite

O4	.H19A	2.7400	C7	.H12A	2.8100
O4	.H3_f	1.9400	C8	.H19B	2.7100
C3	.C16_e	3.543(3)	C8	.H5B	2.7600
C4	.C16_e	3.450(3)	C9	.H20C	2.6800
C4	.C19	3.551(3)	C9	.H12A	2.8800
C5	.C19	3.166(3)	C10	.H5B	3.0500
C11	.H4A	2.8000	H1	.C14_a	2.9000
C11	.H4	2.7100	H1	.H3_a	2.2000
C12	.H17A	2.8600	H1	.H20C_a	2.5500
C12	.H7	2.7800	H2	.H4B	2.2200
C12	.H3	2.9500	H2	.C18_h	2.9400
C12	.H9A	2.9200	H2	.H18A_h	2.4500
C12	.H17C	2.6400	H2	.H18B_h	2.5700
C13	.H4	2.7800	H3	.C12	2.9500
C14	.H9A	2.9000	H3	.H12A	2.5300
C14	.H1_c	2.9000	H3	.H13A	2.2600
C15	.H3_f	3.0800	H3	.H1_c	2.2000
C16	.H5B	2.8500	H3	.O4_d	1.9400
C16	.H4A_b	3.0000	H3	.C15_d	3.0800
C16	.H18C_g	3.0000	H3	.H4_d	2.2300
C17	.H18C	2.6600	H4	.C11	2.7100
C17	.H12B	2.4100	H4	.C13	2.7800
C17	.H4B	2.7200	H4	.C19	2.7600
C18	.H5A	2.6200	H4	.H11	2.2100
C18	.H17B	2.8600	H4	.H13B	2.3300
C18	.H2_g	2.9400	H4	.H19C	2.3800
C19	.H4A	3.0300	H4	.O2_e	2.0400
C19	.H5B	2.5700	H4	.C1_e	3.0200
C19	.H8B	2.8500	H4	.O3_f	2.8500
C19	.H20A	2.7200	H4	.H3_f	2.2300
C19	.H4	2.7600	H4A	.C11	2.8000
C20	.H9B	2.7000	H4A	.C19	3.0300
C20	.H19A	2.5900	H4A	.H11	2.1400
H1	.O3_a	1.8300	H4A	.H16B	2.5600
H4A	.H19C	2.3300	H9A	.O3	2.3700
H4A	.O2_e	2.9200	H9A	.C12	2.9200
H4A	.C16_e	3.0000	H9A	.C14	2.9000
H4A	.H16A_e	2.3600	H9A	.H7	2.5800
H4B	.C17	2.7200	H9A	.H12A	2.3900
H4B	.H2	2.2200	H9B	.C20	2.7000
H4B	.H17A	2.3600	H9B	.H13A_i	2.5400
H5A	.C18	2.6200	H9B	.H20C	2.2400
H5A	.H17B	2.2700	H11	.O4	2.8400
H5A	.H18A	2.2100	H11	.C4	2.7300
H5A	.H17B_g	2.5100	H11	.H4	2.2100
H5B	.C8	2.7600	H11	.H4A	2.1400
H5B	.C10	3.0500	H11	.H13B	2.5700
H5B	.C16	2.8500	H11	.H17A	2.5100
H5B	.C19	2.5700	H11	.H19C	2.3700
H5B	.H8B	2.2000	H11	.O2_e	2.5900
H5B	.H16C	2.2600	H12A	.O3	2.6900
H5B	.H19B	1.9100	H12A	.C7	2.8100
H7	.C12	2.7800	H12A	.C9	2.8800
H7	.H9A	2.5800	H12A	.H3	2.5300
H7	.H12A	2.2000	H12A	.H7	2.2000
H7	.H17C	2.3400	H12A	.H9A	2.3900
H8A	.H18B	2.4900	H12A	.H14_d	2.3800
H8B	.C5	2.8300	H12A	.H20B_d	2.5600
H8B	.C19	2.8500	H12B	.C17	2.4100

Table A.2.2.8 – Suite

H8B .H5B	2.2000	H12B .H17A	2.2600
H8B .H18A	2.5200	H12B .H17C	2.1000
H8B .H19B	2.1500	H13A .H3	2.2600
H13A .H9B_j	2.5400	H18A .C5	2.7400
H13B .O4	2.6800	H18A .H5A	2.2100
H13B .H4	2.3300	H18A .H8B	2.5200
H13B .H11	2.5700	H18A .H2_g	2.4500
H14 .H20B	2.4000	H18B .H8A	2.4900
H14 .H12A_f	2.3800	H18B .H2_g	2.5700
H16A .O2	2.2900	H18C .C17	2.6600
H16A .C1	2.6600	H18C .H17B	2.2500
H16A .C4_b	3.0300	H18C .C1_h	3.0200
H16A .H4A_b	2.3600	H18C .C16_h	3.0000
H16B .H4A	2.5600	H19A .O4	2.7400
H16B .C3_b	3.0800	H19A .C20	2.5900
H16B .C4_b	2.9700	H19A .H20A	1.9900
H16C .C5	2.8600	H19B .C5	2.7200
H16C .H5B	2.2600	H19B .C8	2.7100
H17A .C4	2.8600	H19B .H5B	1.9100
H17A .C12	2.8600	H19B .H8B	2.1500
H17A .H4B	2.3600	H19C .O4	2.6000
H17A .H11	2.5100	H19C .C4	3.0200
H17A .H12B	2.2600	H19C .C5	3.0800
H17B .C4	3.1000	H19C .H4	2.3800
H17B .C18	2.8600	H19C .H4A	2.3300
H17B .H5A	2.2700	H19C .H11	2.3700
H17B .H18C	2.2500	H20A .C19	2.7200
H17B .H5A_h	2.5100	H20A .H19A	1.9900
H17C .C12	2.6400	H20B .H14	2.4000
H17C .H7	2.3400	H20B .H12A_f	2.5600
H17C .H12B	2.1000	H20C .O3	2.5400
H20C .C9	2.6800	H20C .O1_c	2.8500
H20C .H9B	2.2400	H20C .H1_c	2.5500

Table A.2.2.9 - Hydrogen Bonds (Å,°) for compound D

O1 -- H1 .. O3	0.8400	1.8300	2.6557(18)	167.00	2_675
O3 -- H3 .. O4	0.8400	1.9400	2.7022(18)	151.00	4_756
O4 -- H4 .. O2	0.8400	2.0400	2.8140(18)	153.00	3_567
C9 -- H9A .. O3	0.9900	2.3700	3.101(2)	130.00	.
C11 -- H11 .. O2	1.0000	2.5900	3.534(2)	158.00	3_567
C16 -- H16A .. O2	0.9800	2.2900	3.017(2)	131.00	.

Translation of Symmetry Code to Equiv.Pos

a = [2675.00]	= 3/2-x, 2-y, 1/2+z
b = [3467.00]	= -1/2+x, 3/2-y, 2-z
c = [2674.00]	= 3/2-x, 2-y, -1/2+z
d = [4756.00]	= 2-x, 1/2+y, 3/2-z
e = [3567.00]	= 1/2+x, 3/2-y, 2-z
f = [4746.00]	= 2-x, -1/2+y, 3/2-z
g = [3477.00]	= -1/2+x, 5/2-y, 2-z
h = [3577.00]	= 1/2+x, 5/2-y, 2-z
i = [1455.00]	= -1+x, y, z
j = [1655.00]	= 1+x, y, z