

UNIVERSITE de LIMOGES
FACULTE de PHARMACIE



ANNEE 2004

THESE n° 343 / 1

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 147858 7

**OPTIMISATION DE LA PROCEDURE
D'EXTRACTION D'UNE MOLECULE ISSUE DU
MACIS DE *MYRISTICA ARGENTEA* : L'ARGENTEANE**

THESE

En vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 26 novembre 2004

Par

MOREAU Bertrand

Né le 01-07-1978 à Guéret

Examineurs de la thèse

M. DUROUX Jean-Luc, Professeur	Président
Mme. ALLAIS Daovy, Maître de conférences	Juge
M. CALLISTE Claude, Maître de conférences	Juge
M. DESVIGNES Eric, Docteur en Pharmacie	Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BEYNETOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE-BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE-CRYPTOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE-CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE-CHIMIE MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-luc

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE-CRYPTOGAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT

OUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy PHARM
BASLY Jean-Philippe CHIR
BATTU Serge C
CALLISTE Claude
CARDI Patrice
CLEDAT Dominique
COMBY Francis
DELEBASSE Sylvie
DREYFUSS Marie-
EA KIM Leng
FAGNERE C
FROISSAP
FOURN
JAM
L

PROFESS

MARBOUTY Jean

Table des matières

INTRODUCTION	1
PARTIE A : ETUDE BOTANIQUE	4
1-SITUATION DE <i>MYRISTICA ARGENTEA</i> DANS LA SYSTEMATIQUE	5
2-LA FAMILLE DES MYRISTICACEES	6
2.1-Présentation de la famille	6
2.2-Utilisations connues	9
2.3-Caractères botaniques principaux du genre <i>Myristica</i>	10
2.3.1-Caractères généraux à la famille	10
2.3.2-Caractères particuliers à <i>Myristica argentea</i>	12
2.4-Conditions de culture et d'exploitation des muscadiers	16
3-CONCLUSION	16
PARTIE B : PRESENTATION PHYTOCHIMIQUE DU GENRE <i>MYRISTICA</i> ET DE <i>MYRISTICA ARGENTEA</i>	19
1-PHYTOCHIMIE GENERALE DU GENRE <i>MYRISTICA</i>	20
1.1-Généralités	20
1.2-Présentation de la chimie du genre <i>Myristica</i>	21
1.3-Etat des connaissances sur <i>Myristic argentea</i>	22
2-PRESENTATION DU MYA 15 (OU ARGENTEANE)	26
2.1-Structure	26
2.2-Propriétés et activités biologiques	27

PARTIE C : LES ANTIOXYDANTS	28
------------------------------------	-----------

1-INTRODUCTION	29
-----------------------	-----------

2-LES RADICAUX LIBRES	29
------------------------------	-----------

2.1-Formation des radicaux libres	30
--	-----------

2.2-Moyens de défense physiologiques contre ces radicaux	32
---	-----------

2.3-Implication des ROS dans certaines pathologies humaines	32
--	-----------

3-LES ANTIOXYDANTS	33
---------------------------	-----------

3.1-Définition	34
-----------------------	-----------

3.2-Mécanismes de piégeage des espèces oxygénées réactives	34
---	-----------

PARTIE D : PARTIE EXPERIMENTALE	38
--	-----------

1-EXTRACTION DE MYA 15 A PARTIR DU MACIS DE <i>MYRISTICA ARGENTEA</i>	39
--	-----------

1.1-Présentation des différents matériels utilisés	39
---	-----------

1.2-Protocole d'extraction	40
-----------------------------------	-----------

1.2.1-Précipitation des graisses	40
----------------------------------	----

1.2.2-Chromatographie liquide en colonne ouverte	42
--	----

1.2.3-Chromatographie liquide moyenne pression avec Sephadex comme phase statique	47
--	----

1.2.4- Chromatographie liquide moyenne pression avec silice C ₁₈ comme phase statique	55
---	----

1.3-Synthèse et conclusion	63
-----------------------------------	-----------

2-EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE MYA 15	67
--	-----------

2.1-Présentation des méthodes de mesure de l'activité antioxydante par	67
---	-----------

RPE	67
------------	-----------

2.1.1-Test d'activité anti DPPH	67
---------------------------------	----

2.2-Protocole et résultats de l'activité antioxydant par RPE	71
---	-----------

2.2.1-Protocole	71
-----------------	----

2.2.2-Résultats 72

CONCLUSION 75

BIBLIOGRAPHIE 78

Abréviations

A [•]	Radical ascorbyle
ADP	Adénosine Di-Phosphate
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI ₅₀	Concentration permettant d'inhiber 50% du Signal de référence
DMPO	5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde
DPPH	Acide déhydrohexahydroxydiphénique
H [•]	radical hydroxyle
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Pression
LOO [•]	Radical peroxyde
MPLC	Chromatographie Liquide Moyenne Pression
Mya 15	Argentéane
O ₂ ^{•-}	Radical superoxyde
PAR	Polyarthrite Rhumatoïde
PBN	Phényl-tert-butylnitron
R [•]	Radical alkyle
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Espèces oxygénées réactives
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SOD	SuperOxyde Dismutase
UV	Ultra Violets
α-T [•]	Radical α-Tocophéroxyde
α-TH	α-Tocophérol

Je remercie Monsieur **Jean-Luc DUROUX** de me faire l'honneur de présider ce jury,
mais aussi pour sa gentillesse et sa disponibilité de tous les instants.

Je remercie tout particulièrement Monsieur **Claude-Alain CALLISTE** qui a été le guide indispensable, attentif et toujours présent tout au long de ce travail.

Je remercie l'ensemble du Laboratoire de Biophysique de la Faculté de Pharmacie de Limoges pour leur accueil chaleureux, ainsi que le Laboratoire de Pharmacognosie et plus particulièrement Madame **Daovy ALLAIS** pour leur aide précieuse.

A mes amis, aux membres de la Corpo Médecine Pharmacie de Limoges, à ma famille pour leur soutien de chaque instant, dans les bons comme les mauvais moments.

Un merci tout particulier à Monsieur **Eric DESVIGNES** et à tout le personnel de la Pharmacie DESVIGNES.

INTRODUCTION

Le présent travail portant sur *Myristica argentea* Warburg (Warburg 1863) est réalisé au laboratoire de Biophysique de l'UFR de pharmacie de Limoges. Ce travail porte plus précisément sur l'un des lignanes contenus dans cette plante, l'argentéane, un dimère de dibenzylbutane. L'objectif principal de ce travail est de développer l'étude des propriétés antioxydantes de l'argentéane. Mais auparavant, il s'agissait de mettre en place un protocole d'extraction suffisamment performant et reproductible de cette molécule à partir du macis de la noix de *Myristica argentea*.

Le travail précédent (Filleur 2001) effectué sur cette même plante au sein du laboratoire de Pharmacognosie (dirigé par le Professeur Chulia A.J.) de la faculté de Pharmacie de Limoges avait pu mettre en évidence des propriétés antioxydantes intéressantes de certains composés et plus particulièrement l'argentéane. Nous nous proposons donc d'approfondir les recherches sur cette molécule et de mesurer plus précisément et par différentes techniques son pouvoir antioxydant.

Myristica argentea est une plante tropicale aromatique dont la terre d'origine est la Papouasie-Nouvelle Guinée et les Moluques ; cette espèce est assez proche du muscadier commun (*M. fragrans* Houtt.), jusque dans son utilisation encore récente en tant qu'épice. C'est un arbre à feuillage persistant, touffu, moyen par la taille, possédant des fleurs en clochettes brunes. Les feuilles ont une forme elliptique, de couleur jaunâtre terne sur le dessus et argentées sur la face inférieure.

On retrouve encore de nos jours un usage local à cette épice, en particulier en Indonésie pour ses propriétés hallucinogènes. Dans cette région, on l'utilise aussi traditionnellement en médecine pour des propriétés digestives (Echevin 1964), tout comme la noix de muscade commune d'ailleurs.

Les différentes études concernant les multiples espèces du genre ont essentiellement porté sur la composition de l'huile essentielle extrait de la noix et du macis, nom donné à l'arille qui correspond à l'enveloppe externe de la noix. Les travaux précédents ont montré la présence de deux grands groupes de molécules : terpènes et lignoïdes. Il est à noter que l'argentéane, le produit travaillé ici, a été mis en évidence pour la première fois dans cette plante lors de l'étude menée en 2001 et citée ci-dessus (Filleur 2001).

Le protocole d'extraction de l'argentéane que nous avons mis au point part de l'extrait éthéro-pétrolique de macis broyé de *Myristica argentea*. Ce protocole s'inspire du travail de Filleur mais les étapes ont été modifiées de telle façon à avoir un protocole final performant, reproductible, le plus court et le moins onéreux possible.

Dans ce manuscrit, nous ferons tout d'abord une rapide présentation botanique de la plante et nous décrirons l'argentéane. Nous parlerons ensuite des méthodes utilisées pour l'évaluation du potentiel antioxydant. Puis viendra la partie expérimentale proprement dite, décrivant l'extraction et la purification de l'argentéane ainsi que la recherche de son activité antioxydante. Puis une discussion sur l'intérêt des propriétés de cette molécule viendra conclure notre travail.

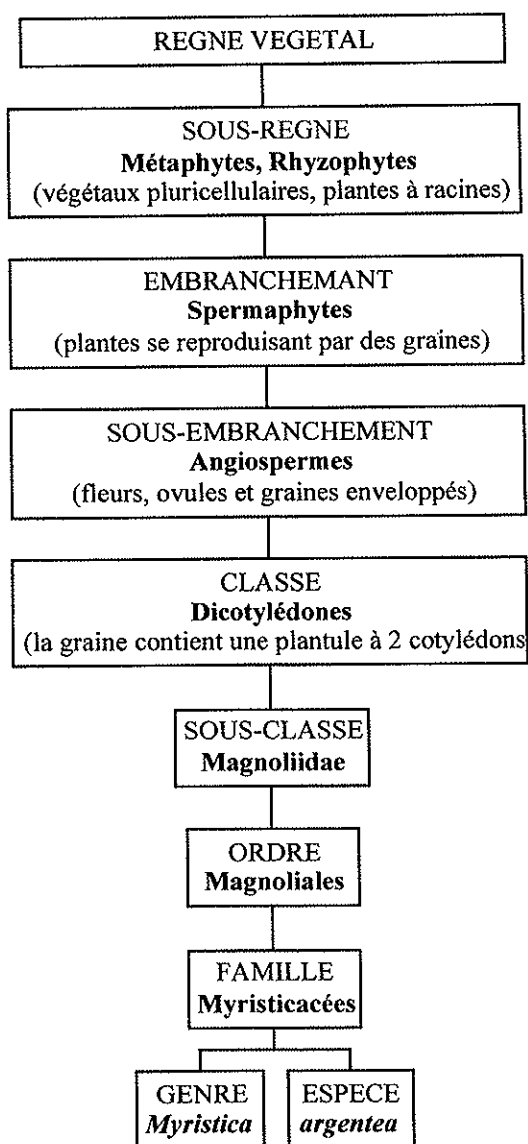
PARTIE A

Étude botanique

Myristica argentea Warb (ou muscadier de type Papua), appartenant à la famille des Myristicacées, a été en réalité peu étudiée d'un point de vue descriptif ; il faut également savoir que la famille est plutôt homogène en termes de caractéristiques botaniques. Nous nous attacherons ici à présenter la plante puis l'argentéane.

1- SITUATION DE *MYRISTICA ARGENTEA* DANS LA SYSTEMATIQUE

Arbre phylogénique (Bhattacharyya 1998) :



Les Spermaphytes renferment de façon générale toutes les plantes à graine. Les Angiospermes sont les plantes aériennes possédant des fleurs. Les Dicotylédones pour simplifier comprennent les plantes dont la plantule contenue dans la graine possède deux cotylédons.

Les *Magnoliidae* sont des plantes qui ont des caractéristiques plutôt archaïques (structure du bois ainsi que de la fleur) qui témoignent en la faveur de l'ancienneté de cette sous-classe. *Myristica argentea* ici présenté appartient aux *Magnoliidae* ligneuses, groupe primitif des régions tropicales et subtropicales. Les espèces appartenant à cette sous-classe sont pour la plupart pourvues d'un appareil sécréteur à essence, la chaleur étant un facteur favorable au développement d'un tel appareil.

2- LA FAMILLE DES MYRISTICACEES

2.1- Présentation générale de la famille (Bhattacharya 1998, Filleur 2001)

Cette famille comporte environ 440 espèces. Toutes montrent une grande homogénéité dans la structure de la fleur femelle. Une étude (Willis 1973) divise cette famille en 19 genres (très proches par ailleurs) présentés ci-dessous :

- *Bicniba*,
- *Brochoneura*,
- *Cephalosphaera*,
- *Coelocaryon*,
- *Componeura* (≈ 11 espèces),
- *Dialyanthera*,
- *Gymnacranthera*,
- *Haematodendron*,
- *Horsfeldia* (≈ 80 espèces),
- *Iryantheria* (≈ 30 espèces),
- *Knema* (≈ 40 espèces),
- *Maloutchia*,
- *Myristica* (≈ 125 espèces),
- *Osteophloeum* ,
- *Otoba*.

- *Pycnanthus*,
- *Scyphocephalum*,
- *Staudtia*,
- *Virola* (≈ 60 espèces).

Les chiffres ne sont donnés que pour les genres les plus représentés.

Les Myristicacées se retrouvent pour la plupart dans des zones tropicales et équatoriales du globe, en terrain ombragé et humide (de type forêts humides de basse altitude). Le genre *Myristica* qui nous intéresse ici est surtout présent naturellement en Asie du Sud-Est et en Indonésie (Sinclair 1968).

La répartition géographique est la suivante (Filleur 2001) :



Figure 1 : Répartition des Myristicacées dans le monde

2.2- Utilisations connues

On utilise de nombreuses Myristicacées comme épices. On recherche ces dernières pour leur saveur dans l'alimentation, ainsi que leur effet favorisant la digestion. En outre, on leur reconnaît certaines propriétés bactéricides, d'où l'intérêt de préparer des plats très épicés pour leur conservation en région chaude. L'industrie (alimentaire, cosmétologique...) utilise aujourd'hui très largement ces plantes et en particulier les muscades.

L'intérêt pharmacologique de cette famille des Myristicacées n'a été que récemment mis en évidence. On sait que des indigènes d'Amérique du Sud (Brésil, Venezuela...) utilise notamment des espèces du genre *Virola* comme narcotique hallucinogène (Holmstedt 1968), mais aussi comme cicatrisant ou anti-inflammatoire, comme poison de flèches pour la chasse, contre les diarrhées, comme stimulant cardiaque...(Le Cointe 1947, Schultes 1971, Gottlieb 1979).

Deux des espèces du genre *Compsonoura* sont utilisées en Colombie dans le traitement de plaies infectées ainsi que pour lutter contre les déficiences mentales (Schultes 1971, Gottlieb 1979). En Amazonie, des espèces du genre *Iryenthera* sont utilisées dans le même type d'indications (Schultes 1971).

En ce qui concerne les espèces du genre *Myristica*, elles sont utilisées en Malaisie pour leurs effets hallucinogènes, mais aussi euphorisants et narcotiques. On observe également une certaine toxicité lorsqu'on consomme leur fruit en quantité importante (Abernethy 1992), y compris pour la noix de muscade. Les « noix » de différentes espèces de *Myristica* (notamment *argentea* et *fragrans*) sont bien sûr employées comme épices, mais également en médecine traditionnelle (Leclerc 1864) dans le cadre de traitement de rhumatismes et de bronchites, ou encore comme stimulant et antidiarrhéique (Bruneton 1993).

La noix de muscade telle qu'on l'entend, c'est-à-dire le fruit de *Myristica fragrans*, est une épice fort recherchée depuis des siècles. On l'utilisait en outre pour différentes propriétés médicinales : antalgique en externe, affections gastriques, diarrhées...(Valnet 1974, Polleti 1982, Van Hellemont 1986).

Outre ces différentes applications plus ou moins médicinales, certaines espèces, dont les graines sont plus cireuses donc plus riches en matières grasses, et contenant une quantité bien moindre en huile essentielle que la véritable muscade, sont utilisées dans la fabrication de bougies. D'autres espèces généralement africaines servent encore à l'extraction de cires industrielles ayant un point de fusion élevé (Dorvault 1978).

On peut ainsi voir, au travers de ces quelques exemples, que les peuples des régions d'origine de ces espèces ont toujours porté de l'intérêt à ces plantes, en particulier dans leur pharmacopée traditionnelle. Mais on voit également que les industries occidentales leur porte tout autant d'intérêt (débouchés dans l'alimentaire, dans la parfumerie, dans la pharmacie et notamment l'homéopathie).

2.3- Caractères botaniques principaux du genre *Myristica* (Perrier de la Bâthie 1952, Crete 1965, Bhattacharyya 1998, Vial 1998)

2.3.1- Caractères généraux à la famille

Le genre *Myristica* est représenté par des plantes ligneuses aromatiques, des arbres tropicaux dioïques et toujours verts. Les feuilles sont entières, alternes, la plupart du temps coriaces et ponctuées de glandes qui vont sécréter une huile aromatique. De plus, lorsque l'on fait une blessure au bois, celui-ci exsude une sève rouge. Tous les tissus renferment de façon générale des cellules sécrétrices qui sont emplies d'une huile essentielle possédant une odeur puissante.

Les fleurs de ce genre sont disposées en cymes. La fleur mâle se réduit à un calice trilobé entourant les étamines dont la base renflée est soudée, et dont le sommet est terminé par une vingtaine d'anthères. La fleur femelle possède un ovaire et un calice pubescents.

La fécondation se fait probablement de façon entomophile car les fleurs très odorantes vont sécréter un nectar attirant fortement les insectes.



Figure 2 : organes et photos de *Myristica fragrans* adulte

Le fruit quant à lui se présente sous la forme d'une drupe (de forme globuleuse ou ovoïde) de 5 à 7 cm de diamètre. A maturité, ce fruit va s'ouvrir par deux valves dont va s'échapper une graine ronde, voire ovoïde, et dont l'endocarpe est ligneux. Cette semence est en outre recouverte d'un arille.

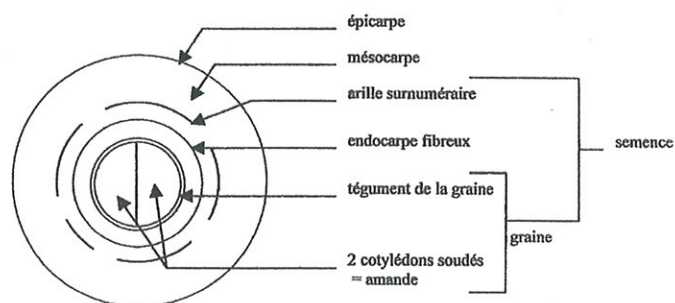


Figure 3 : coupe schématique d'un fruit du genre *Myristica*

2.3.2- Caractères particuliers à *Myristica argentea* Warb.

Myristica argentea Warb. ou muscadier papou de Nouvelle-Guinée (ou encore muscadier sauvage, Pala papua en Indonésien), espèce sur laquelle nous travaillons, est pour sa part un arbre de taille moyenne, de 10 à 12 mètres de haut, plutôt touffu et conique. Les feuilles sont argentées à la face inférieure et le fruit est gros et glabre.

Les noix produites sont plus longues (figure 4C), mais vont être moins aromatiques que ne le sont celles de *Myristica fragrans*, mais il est à noter que toutes les parties de la plante sont aromatiques. C'est un arbre dont le développement et la croissance sont relativement lents.

On l'utilisait jusqu'en 1979 au même titre que la « vraie » noix de muscade (muscade de type Siaw, issue de *Myristica fragrans* Houtt.). Depuis 1979, la noix papoue n'est plus considérée comme équivalente à la vraie noix de muscade, du fait de son arôme considéré moins fin.

La noix de *Myristica argentea* Warb. est cependant toujours utilisée par les peuples indigènes, notamment à Java, pour des propriétés hallucinogènes mais aussi dans la médecine traditionnelle (propriétés digestives, expectorantes...déjà citées auparavant).

On retrouve cet arbre présent naturellement dans les forêts équatoriales en Papouasie-Nouvelle-Guinée (figure 1), mais aussi à Java et aux Moluques, mais de façon moins importante. Il exige pour sa pousse un climat tropical, donc chaud et humide. Il apprécie particulièrement les sols humides, siliceux ou argileux ; il nécessite en outre des emplacements abrités de la lumière directe du soleil, et pousse donc généralement abrité par d'autres arbres plus hauts et bénéficie donc d'un apport important d'humus.

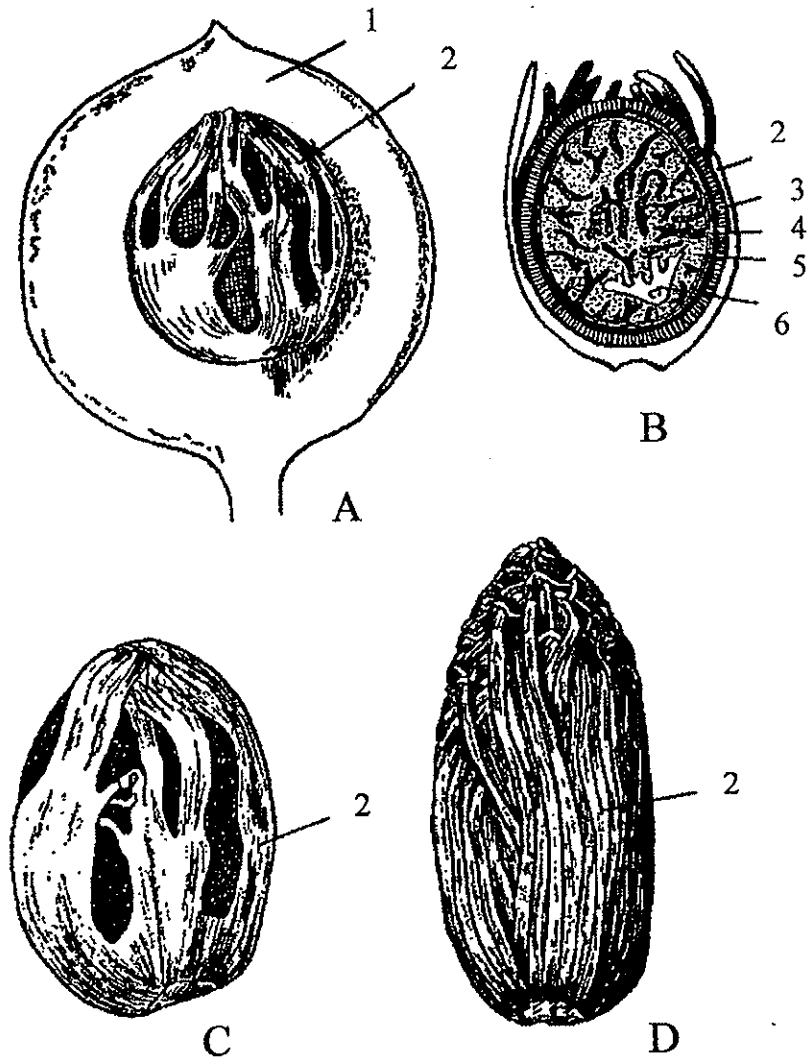


Figure 4 : différents types de noix de muscades

A : fruit de *Myristica fragrans* avec un demi péricarpe enlevé

B : coupe longitudinale de la graine de *Myristica fragrans*

C : graine de *Myristica argentea*

D : graine de *Myristica malabarica*

1 : péricarpe charnu

2 : arille

3 : endocarpe fibreux

4 : périsperme

5 : endosperme

6 : embryon

Les branches sont réparties sur tout le tronc depuis la base.

Les feuilles, entières, sont assez longues (10 à 25 cm) et large de 4 à 10 cm. Elles présentent une couleur pâle (gris jaunâtre) à la partie supérieure et blanchâtre argentée sur la

face inférieure (figure 5A), d'où le nom de la plante. Ces feuilles sont la plupart du temps elliptiques, mais on peut rencontrer des formes moins courantes (oblongues parfois), coriaces, dépourvues de poils et portées par un court pétiole (1 à 2 cm).

L'écorce, sur la face exposée, va être de couleur gris terne, maculée de taches rondes et vertes ; la face interne, quant à elle, est rouge carmin et sécrète un suc, visqueux et épais, rougeâtre, formant une résine compacte et dure en séchant. Les racines restent en surface.

Myristica argentea est un arbre dioïque, avec des fleurs petites et charnues, en forme régulière de clochette et de couleur brune tirant sur le jaune. Il arrive cependant, mais de façon plutôt rare, qu'un même pied porte des fleurs mâles et des fleurs femelles, ou encore même des fleurs hermaphrodites. Le seul moyen de connaître le sexe d'un plant est d'attendre sa maturité et la première floraison.

Les inflorescences mâles (figure 5A) sont longues de 2 à 5 cm et vont se répartir en cymes portant chacune trois à cinq fleurs d'environ 1 à 1,5 cm. Ces fleurs possèdent un pédicelle modeste qui va porter un simple calice (7 à 11 mm de long, 5 mm de large). L'androcée est glabre, avec 8 à 12 étamines se rassemblant en une colonne staminale.

Les inflorescences femelles vont porter une à trois fleurs sur un simple axe principal. Ces fleurs (figure 5E) ont un pédicelle plus large que les fleurs mâles. Celles-ci sont de forme ovoïde ou ellipsoïde (environ 1 cm de long pour 5 mm de large). Leur gynécée est composé d'un ovaire supère en forme de bouteille.

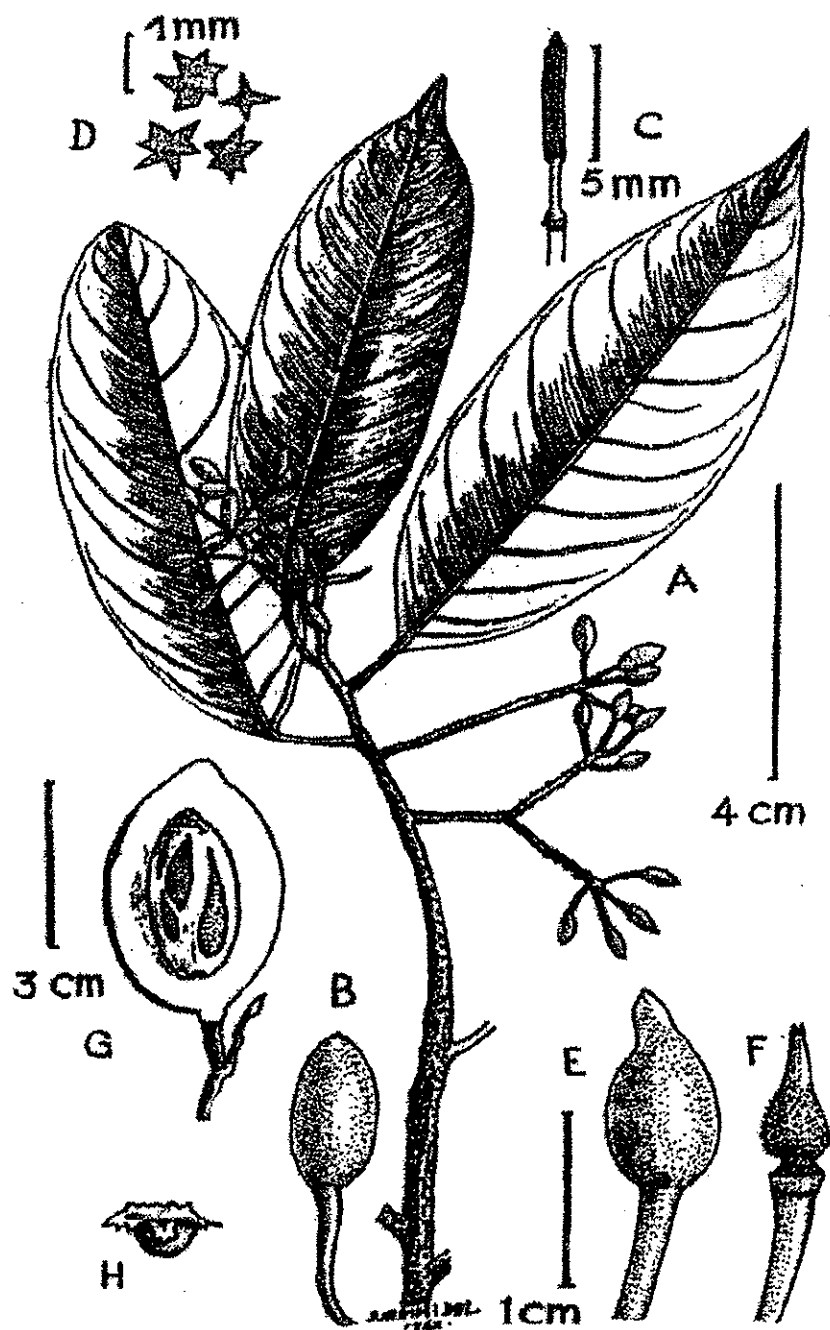


Figure 5 : Organes de *Myristica argentea* Warb.

A : rameau feuillé avec inflorescence mâle
 B : fleur mâle
 C : colonne staminale
 D : forme des grains sous la surface des feuilles

E : fleur femelle
 F : ovaire
 G : fruit en coupe
 H : embryon

Le fruit (figure 4C) produit est une drupe jaunâtre, glabre, de forme et de taille proche de l'abricot. Celui-ci va s'ouvrir à maturité dans le sens de la longueur pour laisser tomber une grosse graine de forme ovoïde d'environ 4 cm de long. La semence est protégée par un tégument rougeâtre, l'arille que l'on nomme aussi sous l'appellation moins « botanique » de macis.

Cet arille recouvre entièrement la graine à sa base pour donner plus haut de larges lobes aplatis. Si on la laisse sécher, cet arille va prendre une teinte tirant plus sur l'orange ou plus précisément le brun, et va en outre devenir cassante.

La graine, qui constitue en fait la véritable noix, renferme une amande dicotylédone brunâtre qui est pourvue d'un coriace revêtement foncé, huileux et râpeux.

Il est à noter que l'arille possède une odeur aromatique plus prononcée que ne peut l'avoir l'amande.

2.4- Conditions de culture et d'exploitation des muscadiers (Perrot 1944, Guyot 1972)

Les amandes enterrées germent en six à sept semaines. Après six mois, on installe l'arbuste dans une plantation à l'abri (notamment d'un trop fort soleil) sous des plantations rapides de type bananier. La récolte pourra commencer au bout de sept à huit ans pour atteindre un maximum de rendement entre quinze et trente ans.

Il faut savoir que le macis est le plus recherché, le prix de vente étant donc supérieur. Avant floraison, il sera impossible de distinguer les pieds mâles des pieds femelles ; sachant qu'un pied mâle peut féconder dix arbres femelles, on arrachera la majeure partie des premiers à maturité.

Ces arbres sont en fleur toute l'année. Du fait qu'il faut un délai de huit mois entre floraison et maturité du fruit, on réalise en général trois récoltes en une année, et ceci au moment où le fruit commence à s'entrouvrir.

3- CONCLUSION

On peut constater à travers cette brève présentation des caractères botaniques dans le genre *Myristica* que l'on a une homogénéité assez remarquable. Cette particularité a fait que pendant longtemps les noix des différentes plantes du genre ont été exploitées, en particulier

par l'industrie alimentaire en tant qu'épice. Et c'est en particulier le cas de *Myristica argentea* commercialisée jusqu'en 1979 en France au même titre que la véritable noix de muscade (à savoir la noix de type Siaw, issue de *Myristica fragrans*) qui reste aujourd'hui la seule commercialisée.

On peut faire une comparaison rapide entre les deux étant donné le certain amalgame fait entre ces deux espèces jusqu'à récemment.

Ces deux plantes qui sont en fin de compte très proches d'un point de vue botanique ne diffèrent principalement que :

- par le limbe des feuilles, argenté sur la face inférieure chez *Myristica argentea* et vert pâle chez *Myristica fragrans*,
- par le fruit et en particulier la graine plus allongée chez *Myristica argentea* et presque ronde chez *Myristica fragrans*.

L'intérêt évident de la noix de type Siaw, tant d'un point de vue alimentaire que relativement à ces différentes utilisations dans les médecines traditionnelles des lieux dont est issue cette plante, amène depuis peu à s'intéresser aux autres plantes du genre *Myristica*. Cet intérêt amène aussi à approfondir les connaissances sur les supposées propriétés médicinales de *Myristica fragrans*, Houtt.. Ces études ont porté en particulier sur la noix et l'huile essentielle issue de la noix de muscade commune et ont montré les propriétés suivantes :

- antagonistes de l'amphétamine (Sherry 1982),
- sédatives (Herron 1982),
- antiagrégantes plaquettaires (Rasheed 1984),
- antibactériennes (Laekman 1990),
- antidiarrhéiques (Gupta 1992),
- une action progestative et estrogénique (Zava 1998),
- une action préventive de l'hypercholestérolémie et l'artériosclérose (Ram 1996),
- un rôle hépatoprotecteur (Dhuley 1997),
- un intérêt chimiopréventif (Park 1998).

En outre, on a pu montrer que la noix de muscade est particulièrement allergisante en ce qui concerne les dermites de contact (Van Den Akker 1990, Dooms Goossens 1990). De plus, un rôle chimiopréventif sur les cancers de la peau (Jannu 1991) et du col utérin chez la souris (Hussain 1991) a également été mis en évidence.

L'étude de Filleur 2001 a montré, cette fois-ci chez *Myristica argentea* des propriétés antiprolifératives et antioxydantes, notamment pour l'argentéane pour lequel nous nous proposons d'approfondir l'étude.

Compte-tenu des diverses propriétés mises en évidence dans les différentes espèces, et de la grande similitude taxonomique, en particulier entre *Myristica argentea* qui nous intéresse ici et *Myristica fragrans*, il est intéressant de faire une approche de la phytochimie du genre *Myristica*, puis de se pencher plus précisément sur *Myristica argentea* et en particulier sur l'argentéane.

PARTIE B

Présentation phytochimique du genre *Myristica* et de l'espèce
Myristica argentea

1- PHYTOCHIMIE GENERALE DU GENRE *MYRISTICA*

Même si nous nous intéressons au travers de ce travail à une espèce en particulier (*Myristica argentea*), il est tout de même intéressant de présenter la chimie « générale » du genre pour dégager les particularités de l'espèce sur laquelle porte notre attention.

1.1- Généralités

Les premiers travaux réels portant sur la chimie des noix de muscade et de leur macis remontent au début du 20^{ème} siècle (Kong in Villiers 1900), ceux-ci ayant principalement porté sur la noix de type Siaw.

Par la suite, et ce jusque dans les années 1960, les différents travaux sont essentiellement tournés vers les matières grasses, autrement dit les glycérides, ainsi que vers les composés volatils. Ceci s'explique par le fait que la valeur aromatique, et donc l'intérêt dans l'industrie alimentaire, est justement due à ces deux groupes chimiques.

On retrouve les traces des premières analyses sur l'huile essentielle entre 1907 et 1908 par Power, sur *M. fragrans*. Selon les zones géographiques d'origine, la teneur en huile essentielle variait entre 5 et 15%, et celle des lipides entre 25 et 40%. Il se trouve que l'on distingue d'autres amandes aromatiques retrouvées dans le commerce, mais aucune ne peut prétendre à la qualité alimentaire de *M. fragrans* ; de ce fait, ces différentes espèces ne peuvent être mélangées. Dans ces espèces, on retrouve notamment :

- la muscade de Macassar des Iles Moluques (*M. argentea* Lin.),
- la muscade de Papouasie-Nouvelle Guinée (*M. argentea* Warb.),
- les muscades de Bombay (*M. malabarica* Lam. et *M. fattua* Houtt.),
- la muscade du Brésil (*M. bicuhyba* Schott.),
- la muscade de Colombie (*M. otopa* Humb.),
- la muscade de Guyane (*M. sebifera* Sw.).

Vers la fin des années 1950, de nombreuses recherches se sont orientées vers l'étude de composés terpéniques, grâce notamment à la mise au point de la chromatographie en phase gazeuse. Depuis, et surtout dans les années 1980 et 1990, beaucoup d'études ont porté sur *M. fragrans* en particulier dans le but d'évaluer ses propriétés biologiques (Hussain 1991, Jannu 1991, Kumari 1992).

Les chercheurs ont pu identifier dans le genre, des acides gras, des terpènes et des composés phénoliques. En ce qui concerne les acides gras et les terpènes, leur proportion peut varier, et parfois de façon importante, selon l'origine géographique de l'espèce mais aussi s'il s'agit du macis ou de la noix. Le temps de conservation et la qualité des plantes influent également sur ces proportions. Si l'on peut retenir un groupe de molécules, ce sont sans doute les lignoïdes qui caractérisent le mieux la famille des Myristicacées (Gottlieb 1979, Massanet 1989).

1.2- Présentation de la chimie du genre *Myristica*

La présentation succincte de la chimie des différents *Myristica* nous paraît intéressante pour aborder la difficulté d'extraire une molécule particulière, étant donné le grand nombre de molécules contenues par ces plantes et leur caractères chimiques propres et en même temps très proches.

L'analyse phytochimique de *Myristica argentea* sera présentée à part.

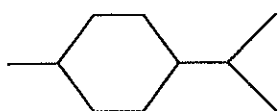
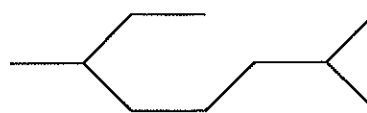
Un grand nombre d'études ont porté sur le muscadier commun (*M. fragrans*) mais peu en fait sur les autres espèces. C'est pourquoi les remarques faites ici ne peuvent être que générales. Ces différentes études ont cependant permis la mise en évidence de nombreux composés (autour de 150, voire plus) que l'on peut répartir en trois grands groupes principaux : acides gras, terpènes, composés phénoliques.

♣ Les acides gras connus sont environ une dizaine. On les retrouve principalement dans la graine et l'huile de noix. Deux acides gras saturés sont le plus souvent représentés : les acides myristique et palmitique.

Acide myristique : $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$

Acide palmitique : $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$

♣ Les dérivés terpéniques sont, pour la plupart, volatils et donc font partie des huiles essentielles de noix et de macis. Ce sont principalement des monoterpènes à squelettes *p*-menthane et myrcane

Squelette *p*-menthane

Squelette myrcane

Figure 6 : squelettes myrcane et *p*-menthane

♣ Les composés phénoliques se composent de nombreux sous-groupes :

- acides phénols,
- phénylpropanoïdes,
- lignanes,
- néo-lignanes.

Les plus importants sont les lignanes et les néolignanes. Ce sont en effet ces composés lignoïdes qui pour la plupart présentent les propriétés (et notamment médicinales) les plus intéressantes. On a retrouvé pour ces composés des propriétés biologiques certaines : activités antitumorales, antivirales, antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes (Mac Rae 1984, Ayres 1990). Ces dérivés lignoïdes suscitent dans la communauté scientifique un vif intérêt.

1.3- Etat des connaissances sur *Myristica argentea* (Filleur 2001)

Le tableau ci-dessous présente les différents composés signalés présents dans *M. argentea*. La colonne de droite indique la partie botanique à partir de laquelle a été extrait le produit figurant sur la colonne de gauche.

Composés	Partie de la plante
Acides gras	
Acide myristique	noix
Acide palmitique	noix
Acide stéarique	noix

Acide oléique	noix
Acide linoléique	noix
Acide linoléique	noix

Terpènes

Monoterpènes à squelette *p*-menthane

α -terpinène	arille
γ -terpinène	arille
limonène	arille
terpinolène	arille
α -phellandrène	arille
β -terpinéol	arille
<i>p</i> -cymène	arille
1,8-cinéole	arille
<i>cis</i> -pipéritol	arille

Monoterpènes à squelette thuyane

Sabinène	arille
----------	--------

Monoterpènes à squelette pinane

α -pinène	arille
β -pinène	arille

Monoterpènes à squelette myrcane

Linalol	arille
β -myrcène	arille
camphène	arille

Furanoïdes

Acide argentofuranoïque arille

Acide phénolique

Acide vanillique arille

Phénylpropanoïdes

Eugénol arille

Méthyleugénol arille

Elémicine arille

Myristicine arille

Safrole arille

Méthylisoeugénol arille

Méthoxyeugénol arille

Lignanes

Type dibenzylebutane

Acide *meso*-dihydroguaiarétique arille

Erythro-austrobailignane arille

Myristargénol-B arille

Threo-austrobailignane-5 arille

Type diaryltétrahydrofurane

Nectandrine-B arille

Type dimère de dibenzylbutane

Argentéane

arille

NéolignanesType arylbenzofurane

Licarine-A

arille

Licarine-B

arille

Déméthylidihydrocarinatidine

arille

Type aryloxyarylpropane*Erythro*-2-(4-allyl-2,6-diméthoxyphénoxy)-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propanol

arille

Erythro-2-(4-allyl-2,6-diméthoxyphénoxy)-1-(3,4-diméthoxyphényl)propanol

arille

machiline-C

arille

Tous ces composés ont des profils chromatographiques assez proches les uns des autres et de plus possèdent un certain caractère gras, ce qui complique fortement la séparation des différentes molécules. On peut de plus constater que la plupart des composés identifiées à partir de l'arille, c'est-à-dire du macis, de *Myristica argentea* Warb. ont, dans leur très grande majorité des structures relativement proches.

Dans ces différents composés, on peut noter comme fait particulièrement intéressant la présence de trois nouveaux composés originaux, non encore observés dans le règne végétal :

- l'acide argentofuranoïque,
- la déméthylidihydrocarinatidine,
- l'argentéane, molécule type dimère et sur laquelle nous nous proposons de travailler.

2- PRESENTATION DE L' ARGENTEANE

2.1- Structure

Cette molécule est un dimère de dibenzylbutane. La formule brute est $C_{40}H_{46}O_8$ et la masse moléculaire est de $654,8 \text{ g.mol}^{-1}$.

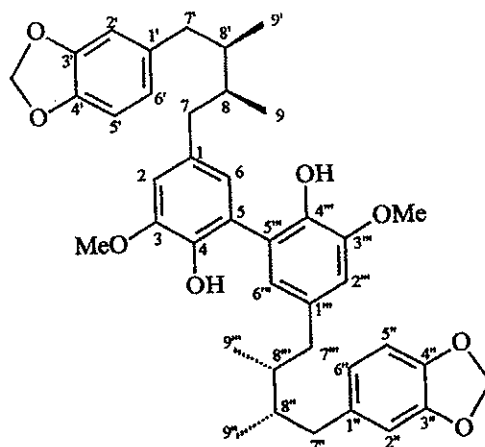


Figure 7 : argentéane
($C_{40}H_{46}O_8$; $M = 654,8 \text{ g.mol}^{-1}$)

L'argentéane est en fait un dilignane, le *bis-erythro-5,5'-bis[1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-4-(3,4-méthylène dioxiphényl)-2,3-diméthylbutane]*.

Ce composé a donc été mis en évidence très récemment, et sa configuration originale de dimère de lignane de type dibenzylbutane n'avait jusqu'alors pas été observé dans le règne végétal.

Il apparaît intéressant de présenter ici le profil analytique HPLC (colonne Silice RP 18, 100% méthanol) de l'extrait de référence d'argentéane obtenu dans l'étude précédente ainsi que son spectre UV. C'est en effet ces données qui nous permettront la comparaison avec les fractions d'extractions et ainsi de sélectionner celles qui devront être retenues (c'est-à-dire contenant l'argentéane). Les voici présentés dans les figures ci-dessous (figure 8) :

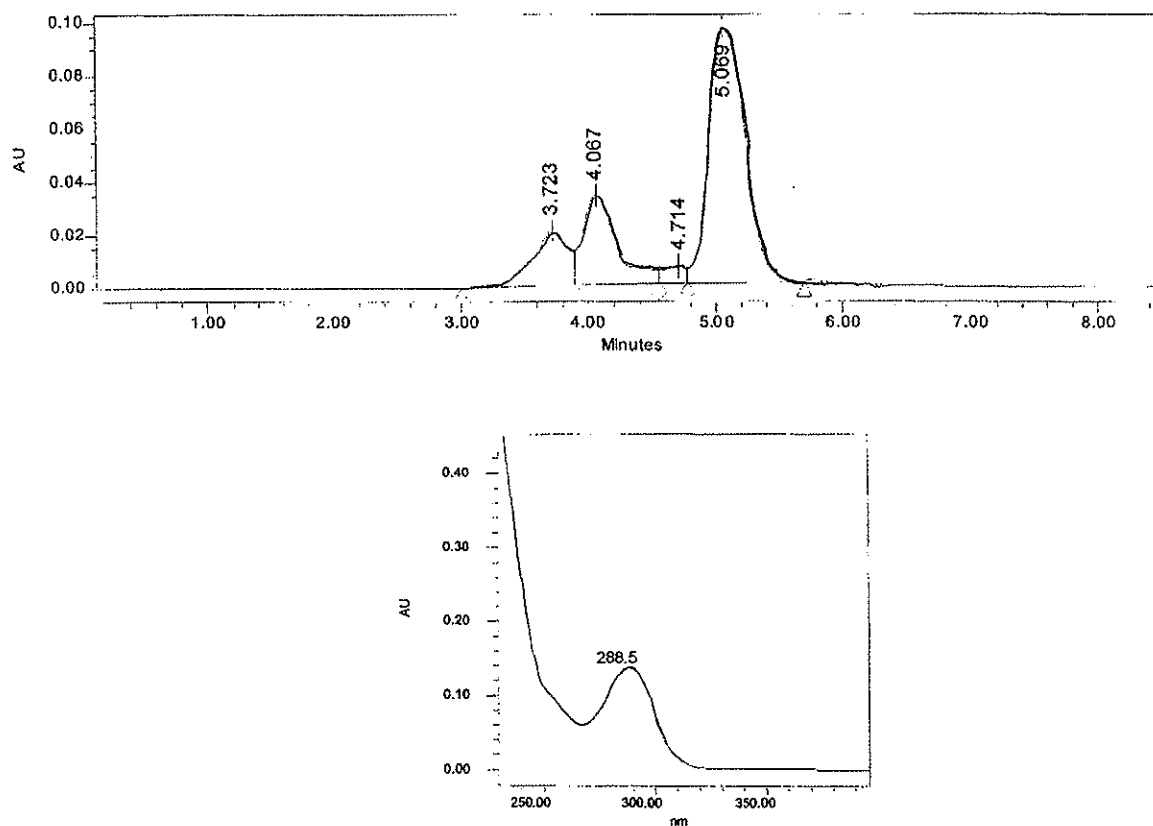


Figure 8 : profil analytique HPLC de l'extrait d'argentéane de référence et spectre UV (silice RP 18, 100% méthanol, isocratique, débit : 1ml/min, volume d'injection : 15 μ l)

2.2-Propriétés et activités biologiques connues

Cette molécule de connaissance récente a été très peu étudiée. L'étude de Filleur (2001) a simplement mis en évidence des propriétés antioxydantes évidentes, apparemment bien supérieures aux différentes molécules de référence que sont notamment la vitamine E et la vitamine C. Ces propriétés seraient liées à la configuration particulière de cette molécule : en effet les autres molécules étudiées dans cette espèce ne se sont pas révélées aussi intéressantes du point de vue de l'activité antioxydante. La présence des fonctions phénoliques semble aussi être au cœur de l'activité de ces molécules, dont l'argentéane bien sûr.

C'est cette activité associée à une structure originale qui nous pousse à approfondir les études sur l'argentéane.

PARTIE C

LES ANTIOXYDANTS

1- INTRODUCTION

Bien que l'oxygène soit un gaz indispensable à la vie, celui-ci peut se révéler être toxique, de façon indirecte. Il est en effet nécessaire à la formation de molécules très réactives, les radicaux libres oxygénés (ROS). Ces composés, qui ont un rôle physiologique essentiel, peuvent perturber, lorsqu'ils sont en excès, de nombreux mécanismes cellulaires et donc engendrer la formation d'affections organiques. On trouve cependant dans notre organisme des mécanismes naturels de régulation et de défense contre ces ROS. Mais il apparaît également qu'un apport en antioxydants va aider l'organisme à lutter contre les réactions nocives engendrées par les radicaux libres. Il est à noter que parmi les antioxydants trouvés dans le règne végétal, la majeure partie sont des composés phénoliques, dont notre argentéane.

On a pu ainsi montrer que la consommation d'aliments riches en molécules antioxydantes (fruits et légumes notamment) pouvaient être positives. Aujourd'hui, ces antioxydants sont un des centres d'intérêt fort notamment dans le domaine de la cosmétique (compléments alimentaires, Oméga-3, « gélules solaires »...) et représente des chiffres d'affaire et des volumes de ventes non négligeables. Cependant si le rôle évident des antioxydants de façon isolée à été montré par en fait peu d'études, les laboratoires qui mettent en avant ces produits ne réalisent dans la plupart des cas que peu d'études et se basent uniquement sur la bibliographie existante. C'est pourquoi il convient de rester prudent mais qu'il est également fortement intéressant d'étudier ce type de produits, et dans le cas qui nous intéresse l'argentéane.

2- LES RADICAUX LIBRES

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs de ces électrons non appariés, là ou ceux-ci vont généralement par paire. Un radical libre est symbolisé par un point en exposant du symbole de l'atome (ex : H[•]).

Cette particularité rend le radical libre très instable d'un point de vue énergétique mais aussi cinétique ; celui-ci va donc avoir tendance à remplir ses couches électroniques et donc à perdre ou à gagner un électron.

2.1- Formation des radicaux libres

Ces radicaux libres peuvent se former de différentes façons dans l'organisme, par des sources physiologiques. Parmi ces sources, on retrouve :

- le fonctionnement normal de la chaîne mitochondriale, notamment lors du vieillissement physiologique de celle-ci,
- le phénomène d'ischémie-réoxygénation (ou ischémie reperfusion) : celui-ci peut aboutir à la mort de la cellule par formation de radicaux (en l'occurrence des anions superoxyde $O_2^{\cdot-}$),

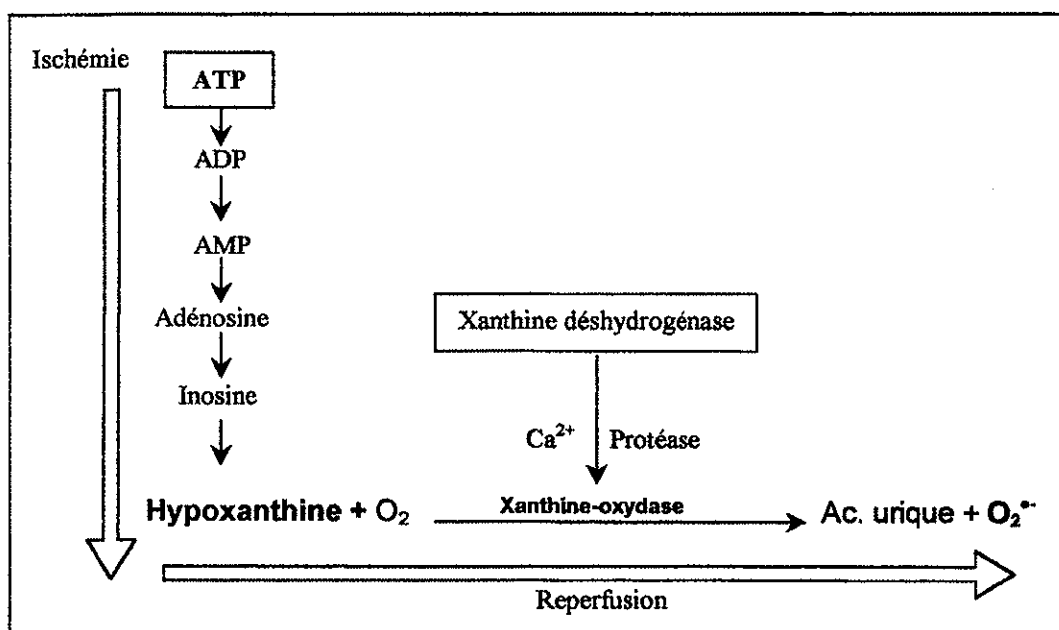


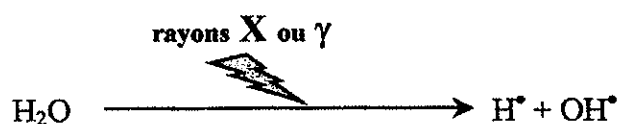
Figure 9 : mécanisme de production de l'anion superoxyde lors du phénomène d'ischémie-réoxygénation

- l'activation des phagocytes : ils produisent des anions superoxydes pour lutter contre les infections bactérienne,
- l'oxydation des catécholamines : la dégradation de ces composés entraîne la production d'un excès d'électron capté par l'oxygène pour former l'anion superoxyde,

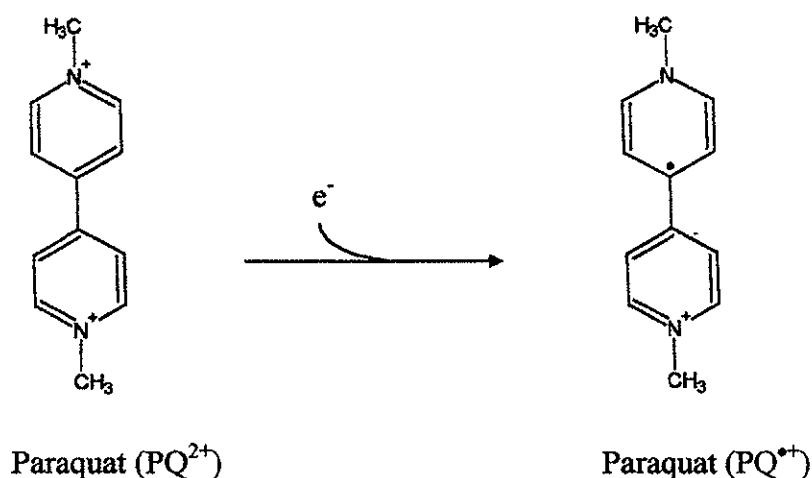
- la cascade de l'acide arachidonique : cet acide gras, constituant des membranes cellulaires, peut dans certains phénomènes inflammatoires conduire à la formation d'anions superoxydes.

Des processus non physiologiques peuvent aussi aboutir à la formation de radicaux libres. On peut citer :

- les radiations ionisantes : les rayons X ou γ pénétrant dans l'organisme « arrachent » en quelque sorte un ou plusieurs électrons aux molécules sur leur chemin,



- les radiations U.V. : le rayonnement solaire (et en particulier les UVA) peut par activation de l'oxygène moléculaire produire des radicaux libres,
- certains composés chimiques peuvent entraîner « un stress oxydant », comme le paraquat par exemple.



Ceci a pour effet dans l'organisme de soumettre les différentes cellules à ce qu'on appelle un « stress oxydatif » : les radicaux libres sont capables de « s'attaquer » à toutes les

macromolécules des cellules pour retrouver un équilibre. On pourra observer des dégradations aussi bien au niveau des lipides que des protéines ou encore des acides nucléiques.

2.2- Moyens de défense physiologiques contre ces radicaux libres

On retrouve dans l'organisme des mécanismes de défense naturels pour lutter contre ces radicaux libres. On ne fera ici que les citer brièvement pour montrer leur diversité. On retrouve :

- des mécanismes enzymatiques qui jouent un rôle de défense primaire en éliminant les radicaux, ou en réparant les conséquences de ces radicaux (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...)
- de « petites molécules antioxydantes » (vitamine E, C, glutathion, acide urique...).

Ces moyens de lutte sont primordiaux puisqu'ils préservent l'organisme des effets délétères des ROS sur l'organisme.

2.3- Implication des ROS dans certaines pathologies humaines (Cérou, 1994)

Le déséquilibre entre les composés pro et antioxydants ainsi que le dysfonctionnement des mécanismes naturels de défense vu ci-dessus peuvent entraîner de graves dysfonctionnements de la cellule, voire conduire à sa mort. Ces mécanismes de morts cellulaires sont impliqués dans le vieillissement naturel mais aussi dans de nombreuses maladies (cardiovasculaires, carcinomes, cataracte, maladie neurodégénératives...).

La participation des radicaux libres a été prouvée dans de nombreuses pathologies. On les retrouve principalement dans deux types de phénomènes.

On retrouve tout d'abord les radicaux libres dans les pathologies liées au vieillissement :

- cancers,
- maladies cardiaque (athérosclérose en particulier),
- affections oculaires (cataracte...),
- maladie d'Alzheimer...

On les retrouve aussi dans de nombreuses affections corrélés à des phénomènes inflammatoires :

- PAR (polyarthrite rhumatoïde),
- arthrite,

- inflammation ORL,
- thyroïdite auto-immune (maladie d'Hashimoto)...

On voit donc que les implications des radicaux libres dans la pathologie humaine sont relativement larges et sont en rapport avec des affections graves. Il apparaît donc judicieux de travailler sur des moyens de suppléer les moyens de défense naturel déficients. On voit donc bien ici l'intérêt de lutter contre ces radicaux libres et donc l'importance des antioxydants, qui peuvent trouver tout leur intérêt aussi bien dans un rôle préventif que curatif.

Différentes études ont été menées pour montrer l'éventuelle influence de la consommation d'antioxydants en particulier sur la survenue de différents cancers.

En ce qui concerne les vitamines et oligo-éléments antioxydants, des études d'observation auraient suggéré des effets protecteurs sur différents cancers (de 10 à 70 % selon la localisation). Des études comprenant une supplémentation en vitamines et oligo-éléments (bêta-caroténoïdes, vitamine E, sélénium...) donnent elles des résultats assez disparates, montrant des effets qui ne sont pas toujours évidents sur la survenue de cancers. On ne peut en aucun aboutir à conseiller une augmentation de la consommation des aliments sources de ces micro nutriments, notamment en ce qui concerne les fruits et les légumes.

Pour ce qui est des polyphénols, différentes études montrent des effets bénéfiques sur la protection contre certains cancers (cancers du poumon et de l'estomac en particulier), sans qu'on ait cependant de certitude du fait de la méconnaissance des compositions et des teneurs de ces produits dans les aliments.

On peut donc dire en conclusion qu'il n'existe pas d'argument suffisamment étayé scientifiquement pour proposer une supplémentation en antioxydants sous forme médicamenteuse. C'est cependant une piste de recherche intéressante.

3- LES ANTIOXYDANTS

Il apparaît intéressant de présenter les antioxydants pour bien comprendre par la suite les systèmes permettant de mesurer leur activité, que nous verrons ensuite dans la partie expérimentale.

3.1- Définition

Un antioxydant est une substance qui, présent à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou évite l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1995).

Parmi les « substrats oxydables », on retrouve toutes les substances et molécules retrouvées dans une cellule vivante (protéines, lipides, acides nucléiques...).

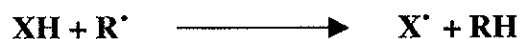
Un antioxydant possède plusieurs modes d'action possibles. Il peut s'agir de l'élimination directe de l'oxygène, le piégeage des ROS, l'inhibition de la formation de ces ROS, la stimulation des mécanismes de défense antioxydantes endogènes.

3.2- Principaux mécanismes de piégeage des espèces oxygénées réactives (Calliste 2001)

On peut ici présenter trois types principaux de mécanismes.

♣ Le premier est le « *mécanisme de transfert du caractère radicalaire avec formation d'un radical réactif dérivé de l'antioxydant* ».

La base de ce mécanisme va être le transfert depuis l'antioxydant (XH) vers le composé radicalaire (R') d'un proton et d'un électron, que l'on peut présenter de la façon suivante :



L'équilibre d'une telle réaction tient par les potentiels d'oxydoréduction des différents éléments mis en jeu. En fait le transfert va se faire du composé ayant le potentiel redox le plus élevé vers celui ayant le potentiel le plus faible, le nouveau radical formé ayant un potentiel plus faible que celui de départ ce qui le rend plus stable, moins réactif et donc d'une demi-vie plus longue. Son élimination se fera plus facilement.

Cependant, bien que le nouveau composé formé soit moins réactif, il n'en reste pour le moins toxique. On peut citer comme exemple le potentiel antioxydant de la vitamine E (ou alpha-tocophérol ou α -T) au cours de la peroxydase lipidique.

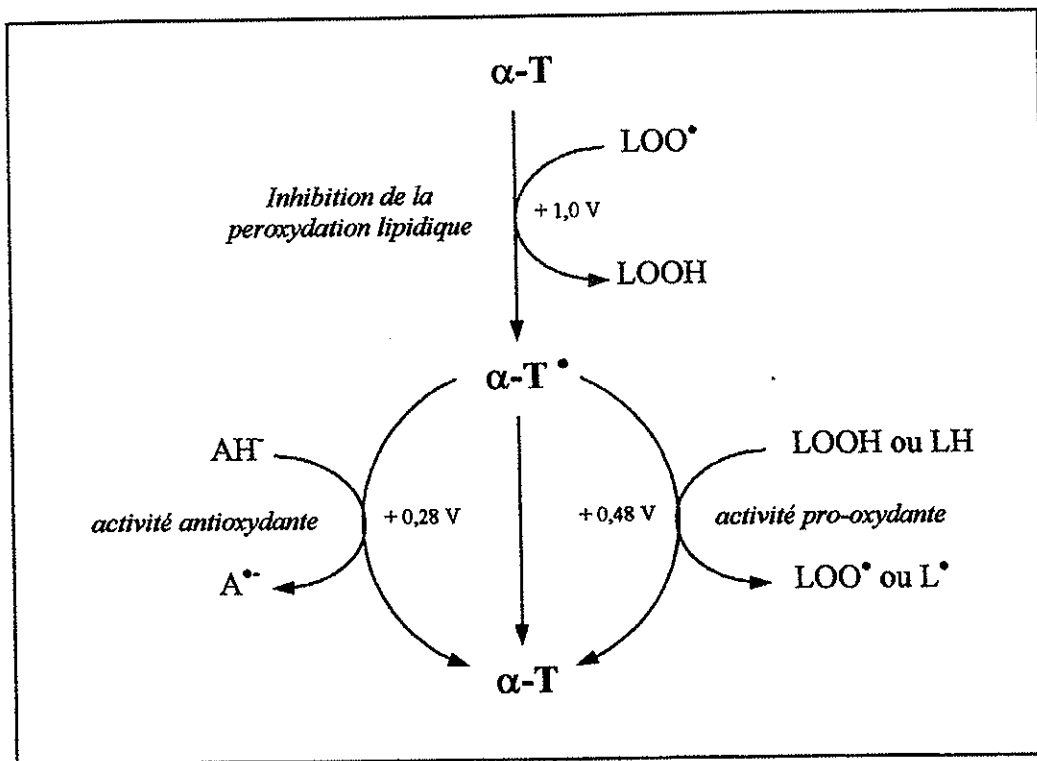
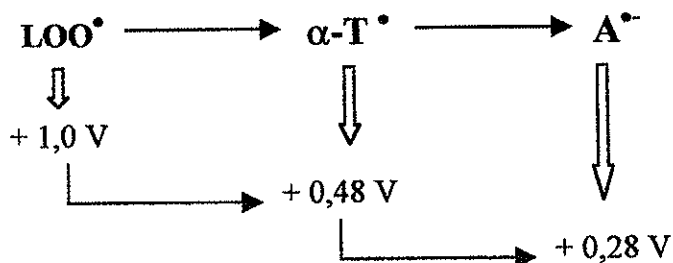


Figure 10 : effet antioxydant ou pro-oxydant de la vitamine E ($\alpha\text{-T}$) lors de la reoxydation lipidique en fonction de la biodisponibilité de la vitamine C (AH^\bullet) (Cadenas, 1997)

Ici (figure 10), l' $\alpha\text{-T}$ capte les radicaux peroxydes formés. L' $\alpha\text{-T}$ donne donc naissance au radical $\alpha\text{-tocophéroxyle}$ ($\alpha\text{-T}^\bullet$). Ce dernier composé peut continuer la peroxydase lipidique et sera dans ce cas pro-oxydant, ou au contraire la stopper et sera dans ce cas antioxydant. C'est dans ce dernier cas l'ascorbate (AH^\bullet) qui va capter le radical $\alpha\text{-T}^\bullet$, pour donner à son tour le radical ascorbyl (A^\bullet) (figure 9).

Dans cette suite de réactions, les composés formés ont des potentiels Redox qui vont en descendant graduellement comme le montre la figure suivante :



Le dernier radical ascorbyl (A^\bullet) n'est pas toxique pour la cellule, il est vite dégradé en déhydroascorbate (A) et en ascorbate (Buettner, 1993).



On peut donc voir à travers cet exemple que la frontière entre pro et antioxydant est mince, et ces propriétés sont fortement liées à l'environnement et peuvent varier selon les données physiologiques du milieu.

♣ On peut ensuite parler du « *mécanisme de transfert du caractère radicalaire entraînant la formation d'un radical stable dérivant de l'antioxydant* ».

Le radical secondairement formé sera donc stable. Citons l'exemple des piègeurs de spin utilisés en RPE. Ici, le composé formé est d'une grande stabilité, avec une réactivité très basse, permettant son élimination.

On peut montrer l'exemple du phényl-*tert*-butylnitron (PBN).



♣ On peut enfin évoquer « *les petites molécules présentant une activité similaire aux enzymes* ».

On parle de « petites » molécules au vu de leur taille par rapport à celle des enzymes qui sont de réelles macromolécules. Ces molécules ont donc des propriétés antioxydantes mimant celles de certaines enzymes spécifiques.

PARTIE D

PARTIE EXPERIMENTALE

Cette étude expérimentale va se décomposer en deux temps. Le but du travail est de mesurer l'activité antioxydante de l'argentéane ; mais avant cela, il convient bien sûr de posséder suffisamment de produit relativement « pur » pour pouvoir faire ces mesures.

Donc, dans un premier temps, nous allons présenter les recherches menées pour aboutir à une méthode d'extraction de l'argentéane à partir de la fraction éthéro-pétrolique du macis de *Myristica argentea*. Ces travaux ont été menés de façon à aboutir à une méthode relativement performante en rendement, temps et reproductibilité.

Dans un deuxième temps, nous présenterons la partie concernant les essais antioxydants proprement dit menés sur l'argentéane obtenu grâce à notre méthode d'extraction.

1- EXTRACTION DE MYA 15 A PARTIR DU MACIS DE *MYRISTICA ARGENTEA*

D'après l'étude de Filleur, l'argentéane a été extrait et purifié à partir de l'extrait éthéro-pétrolique de l'arille de *M. argentea*. Depuis l'extrait brut jusqu'à l'obtention de l'argentéane pur le schéma d'extraction comporte 8 étapes. Le but est ici d'extraire le produit avec le moins d'étapes pour améliorer le rendement et gagner du temps.

On part, comme l'étude précédente, de l'extrait éthéro-pétrologue du macis. Etant donné que le macis renferme une grande quantité de lipides, ces derniers se retrouvent préférentiellement dans l'extrait éthéro-pétrolique qui se présente sous forme liquide.

1.1- Présentation des différents matériels utilisés

1.1.1- Généralités

Cette extraction a fait appel à des matériels très divers et notamment à différents types de chromatographie :

- chromatographie sur couche mince (CCM),
- chromatographie liquide en colonne ouverte,
- chromatographie liquide moyenne pression (MPLC ou Medium Pressure Liquid Chromatography)

- chromatographie liquide haute pression (HPLC ou High Pressure Liquid Chromatography).

Pour la CCM, les plaques suivantes sont utilisées :

- gel de silice 60 F₂₅₄ Merck, 0,2mm sur support aluminium
- gel de silice 60 F₂₅₄ Merck, 0,2mm sur support plastique
- gel de silice RP-18W/UV₂₅₄ Macherey-Nagel, 0,15mm sur support aluminium.

Pour la chromatographie liquide sur colonne ouverte, on utilise une colonne verre de 4cm de diamètre, 70cm de long, avec comme phase stationnaire Sephadex LH-20.

En ce qui concerne les MPLC, on utilise une pompe Büchi B-688, suivi d'une colonne Büchi (diamètre 1,5cm, hauteur 45cm) avec comme phase stationnaire la silice Polygoprep® 60-20 Pg à 1000g (Macherey-Nagel).

On utilisera la même pompe mais avec une colonne de même type mais plus courte (22cm de hauteur), contenant cette fois-ci comme phase stationnaire de la silice RP 18 LiChroprep®RP18 15 à 25 µm -Merck-).

La HPLC utilisée est constituée de l'ensemble Waters pompe (W600) et détecteur à barrette de diode (W996). La colonne est un modèle Waters et contient comme phase stationnaire de la silice µBondapak® C₁₈ (Waters).

1.2-Protocole d'extraction

1.2.1-Précipitation des graisses

Nous commençons donc notre travail sur un extrait éthéro-pétrolique obtenu à partir du macis de *Myristica argentea* Warb.

Nous pouvons présenter cette première étape selon le schéma suivant (figure 11) :

EXTRAIT ETHERO-PETROLIQUE

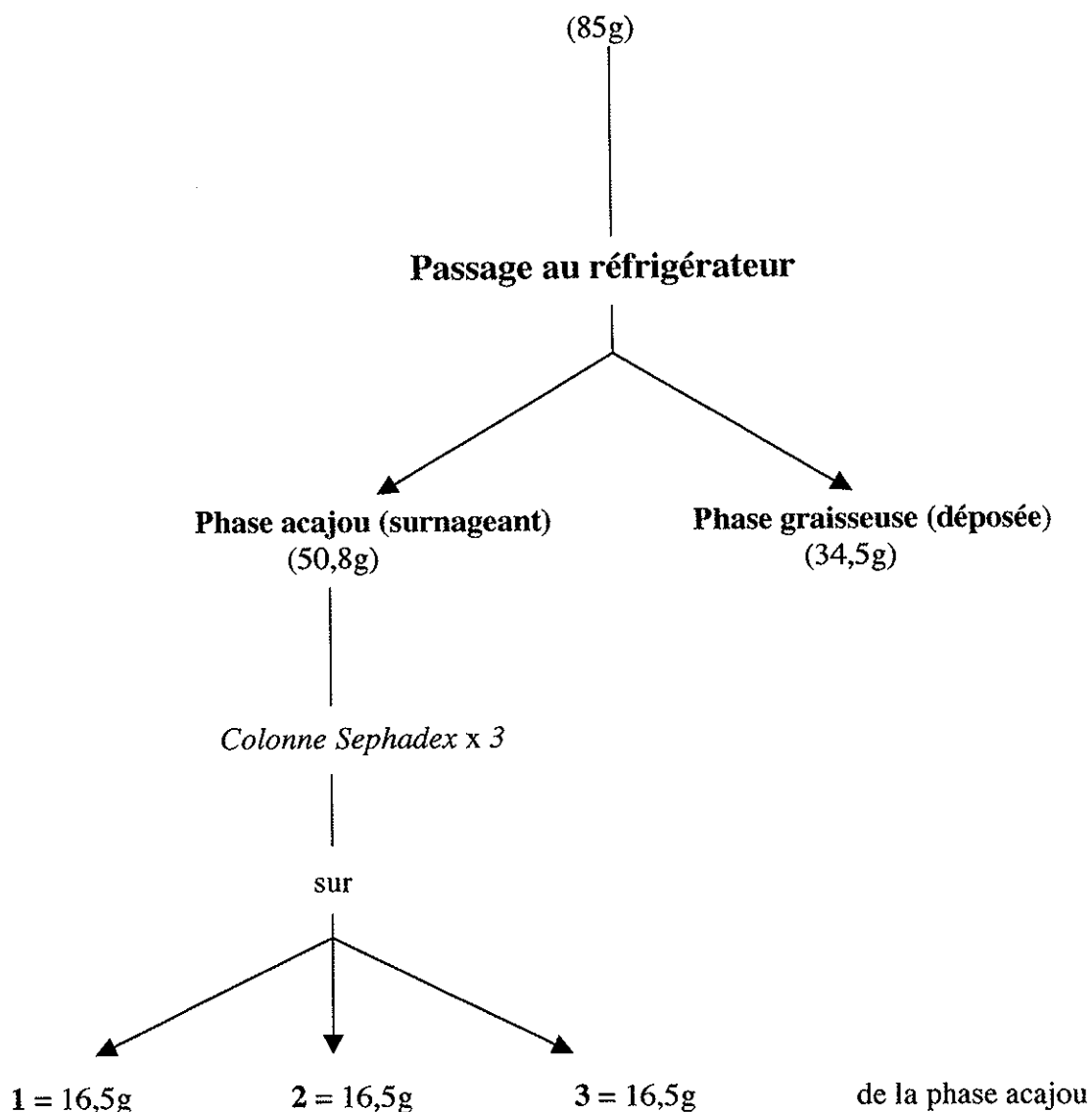


Figure 11 : précipitation à froid des graisses

Lors de cette première étape particulièrement simple, nous avons retiré du produit une grande quantité de graisses qui sont des éléments extrêmement perturbateurs pour la suite de l'extraction (par leur caractère gras propre, leur masse, la « grosseur » des molécules...). Le temps de conservation au froid aura été d'une semaine pour « précipiter » correctement les matières grasses.

La séparation est très facile à réaliser : les graisses ont pris en masse au fond du récipient, et il ne reste donc qu'à récupérer le surnageant, c'est-à-dire la phase acajou, qui nous intéresse. Il est intéressant de noter qu'il faut cependant aller relativement vite à ce

niveau, car la phase grasseuse a tendance à se liquéfier de nouveau à température ambiante et de façon assez rapide.

On obtient donc ici 50,8g de produits qui nous intéressent, c'est-à-dire le surnageant séparé de ses graisses ; on divise cette phase en trois parties identiques de 16,5g (1, 2 et 3) pour réaliser la première étape proprement dite de l'extraction, autrement dit les trois colonnes ouvertes successives (appelées Sephadex dans le tableau ci-dessus).

1.2.2- Chromatographie liquide en colonne ouverte

Nous cherchons ici à réaliser un premier fractionnement grossier des différentes molécules contenues dans la phase conservée, en particulier séparer le groupe des lipides restants. Nous utilisons une colonne ouverte de 4cm de diamètre pour 70cm de long ; la phase mobile utilisée est le méthanol, tandis que la phase stationnaire est du Sephadex LH-20 (Sigma).

La masse de phase acajou est reprise dans 10ml de méthanol et déposée en tête de colonne. On traite un tiers de la masse à chaque fois car la taille de la colonne ne permet pas de traiter plus de masse en une seule fois.

Nous allons récolter en bloc la première partie incolore, puis fractionner en pilulier de 50ml lorsque le liquide sortant de la colonne devient coloré ; lorsque la couleur disparaît, on passe environ 500ml pour nettoyer la colonne et récupérer les éventuels produits restants (voir figure 12).

Nous allons traiter successivement et de la même façon les trois fractions de la phase acajou récupérée à la première étape.

La méthode est résumée dans la figure suivante (figure 12) :

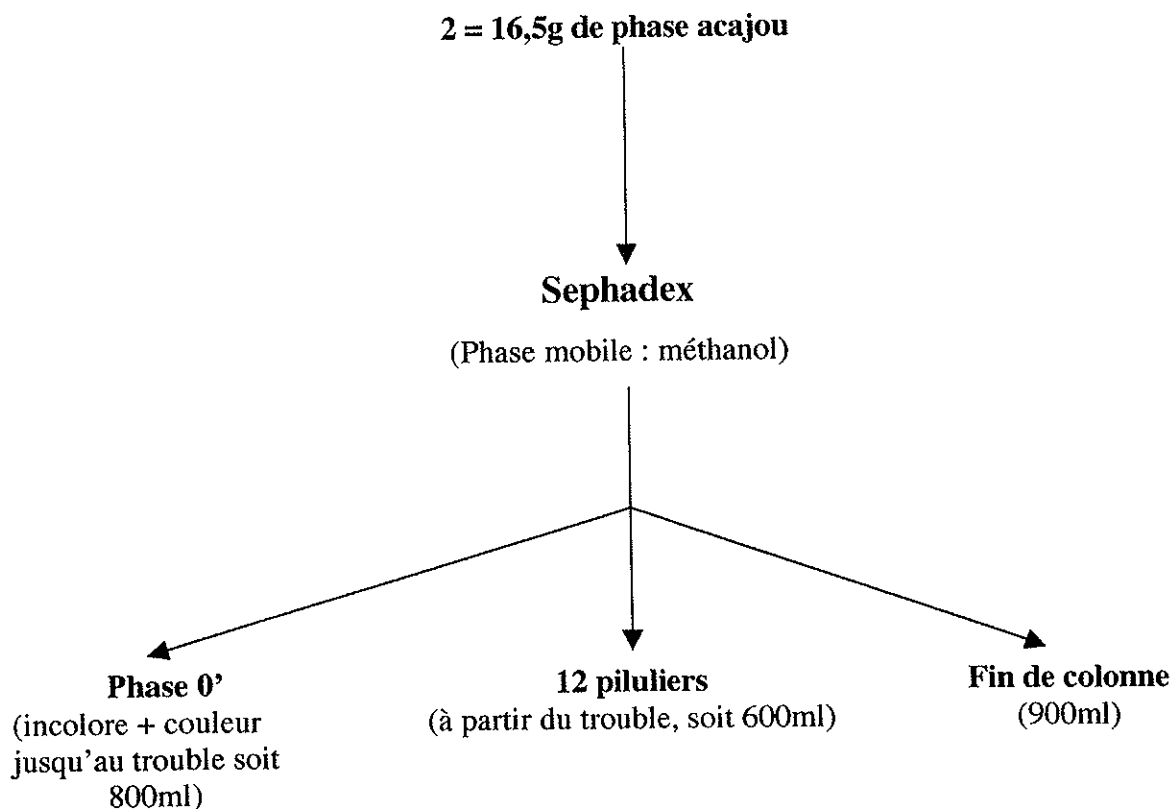


Figure 13 : 2^{ème} colonne ouverte

La seule différence à noter au niveau du protocole est que les premiers piluliers colorés présentant un trouble (comme pour le premier tiers) ne sont pas retenus. En effet l'analyse HPLC avait montré auparavant qu'ils ne contenaient pas d'argentéane mais seulement des impuretés.

Comme précédemment, après analyse des différents échantillons par HPLC, nous avons procédé à des regroupements. Nous avons ici aussi formé trois groupes :

- **groupe 1'** : contient la phase 0' seule ; ce groupe représente 8,69g de produits (soit environ 800ml),
- **groupe 2'** : rassemble les six premiers piluliers récoltés (soit environ 300ml) ; le poids de produits est de 6,45g,
- **groupe 3'** : rassemble les six derniers piluliers récoltés et la fin de colonne (soit environ 1200ml) ; on a ici 1,56g de produits.

C'est le **groupe 3'** qui se révèle, après analyse des spectres UV des pics obtenus par HPLC, contenir l'argentéane.

Puis finalement on traite le dernier tiers de la phase acajou selon le même protocole que le deuxième (figure 14).

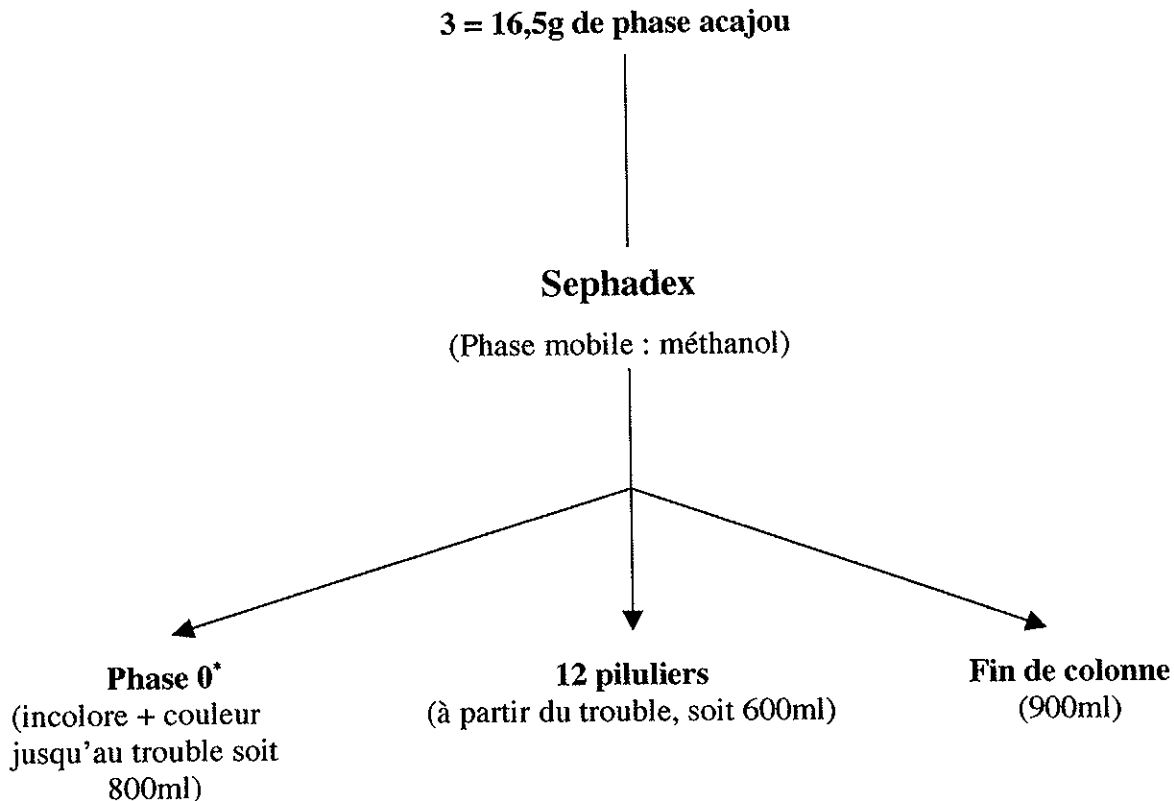


Figure 14 : 3^{ème} colonne ouverte

Comme pour les deux séparations précédentes, nous avons formé trois groupes après analyse des fractions par HPLC. Ces trois groupes sont :

- **groupe 1*** : on a ici pris seulement le début de colonne (800ml) ; ce groupe contient 7,95g de produits,
- **groupe 2*** : sont ici rassemblés les six premiers piluliers récoltés (300ml) ; on a ici 5,39g de produits,
- **groupe 3*** : nous avons rassemblé les six derniers piluliers avec la fin de colonne (1200ml) ; ce groupe contient 1,75g de produits.

Comme précédemment, c'est le dernier groupe (**groupe 3***) qui est retenu pour la suite de l'extraction.

Le chromatogramme obtenu par HPLC du groupe 3* ainsi que le spectre UV du pic représentant l'argentéane sont ci-dessous (figure 15) :

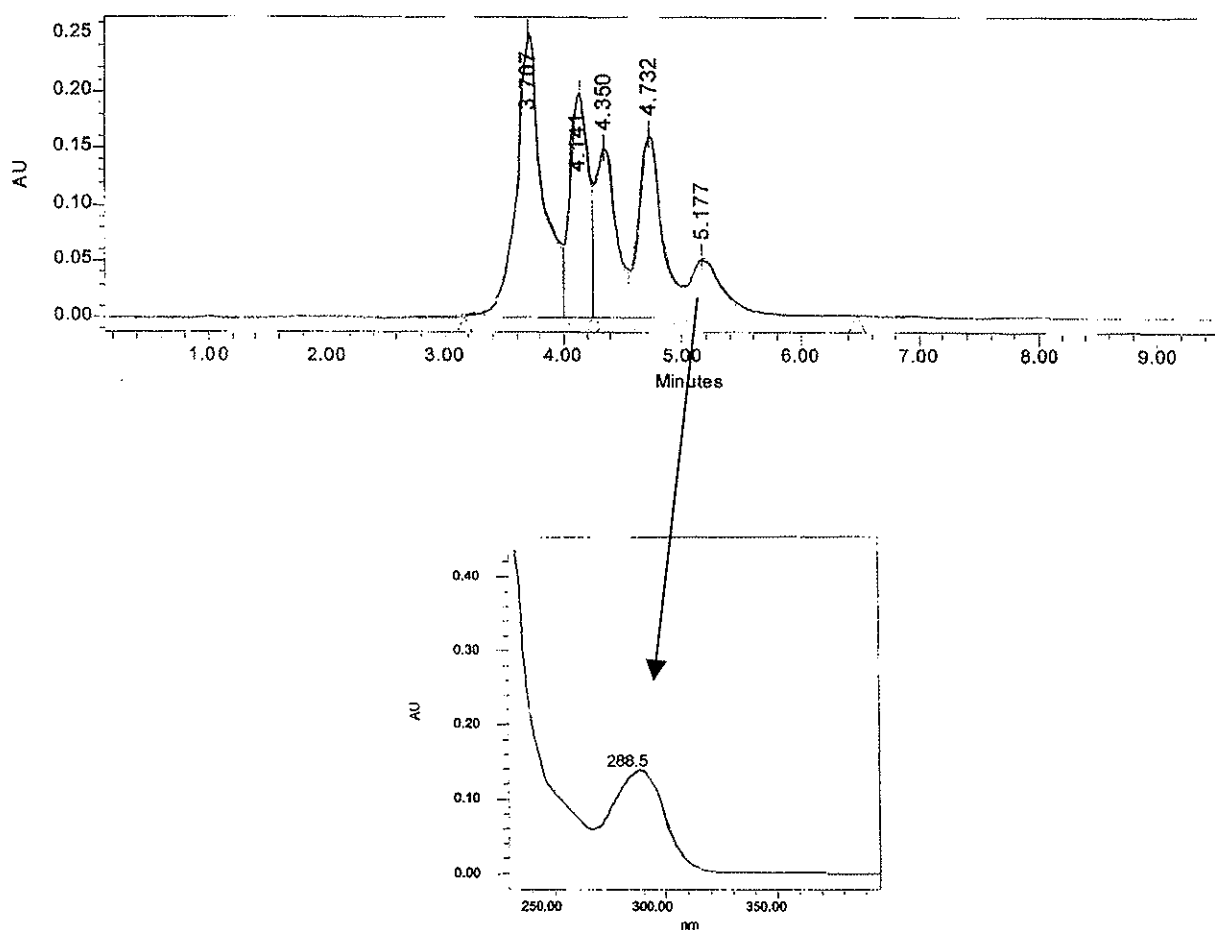


Figure 15 : profil analytique en HPLC du groupe 3* (Sephadex) et spectre UV du pic correspondant à l'argentine (silice RP 18, 100% méthanol, isocratique, débit : 1ml/min, volume d'injection : 15 μ l)

Au final, après cette seconde étape, les 3 groupes 3, 3' et 3* contenant l'argentine, le tout réuni fournit une masse de 4,29g.

Le groupe de tête est représenté principalement par des acides gras.

1.2.3-Chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) avec silice comme phase stationnaire

Cette technique est retenue pour continuer la séparation et tendre vers le produit pur, ou sinon des fractions de plus en plus enrichies en argentéane.

La colonne utilisée fait 1,5cm de diamètre pour 46 cm de long, avec une pré-colonne de 1cm de diamètre pour 12cm de long. La phase stationnaire est la silice Polygoprep® 60-20 Pg à 1000g (Macherey-Nagel).

◆MPLC n°1

Dans un premier temps, nous allons donc traiter 0,83145g du groupe 3, c'est-à-dire le produit issu du premier tiers traité dans l'étape précédente. On reprend cette masse dans 2ml d'un mélange méthanol/chloroforme (50/50). Ce volume est déposé en tête de colonne grâce à une boucle d'injection placée entre la pompe et la colonne.

Le gradient de solvant utilisé est décrit dans le tableau ci-dessous (tableau 1) :

Solvant	Hexane	Chloroforme	Méthanol	Volume
0	100%	/	/	200ml
1	70%	30%	/	100ml
2	50%	50%	/	200ml
3	30%	70%	/	150ml
4	/	99%	1%	200ml
5	/	50%	50%	150ml
6	/	100%	/	100ml
7	100%	/	/	200ml

Tableau 1 : gradient de solvant de la MPLC n°1

NB : les étapes 6 et 7 n'interviennent pas réellement dans la séparation, mais servent pour revenir dans les conditions opératoires initiales, avant le dépôt des produits (on reconditionne en fait la colonne)

Les solvants sont utilisés dans l'ordre croissant de polarité, à partir du moment où le produit est déposé en tête de colonne.

Il est à noter qu'au départ de la séparation, la colonne est saturée dans l'hexane.

La séparation a été réalisée de la façon décrite dans le schéma suivant (figure 16) :

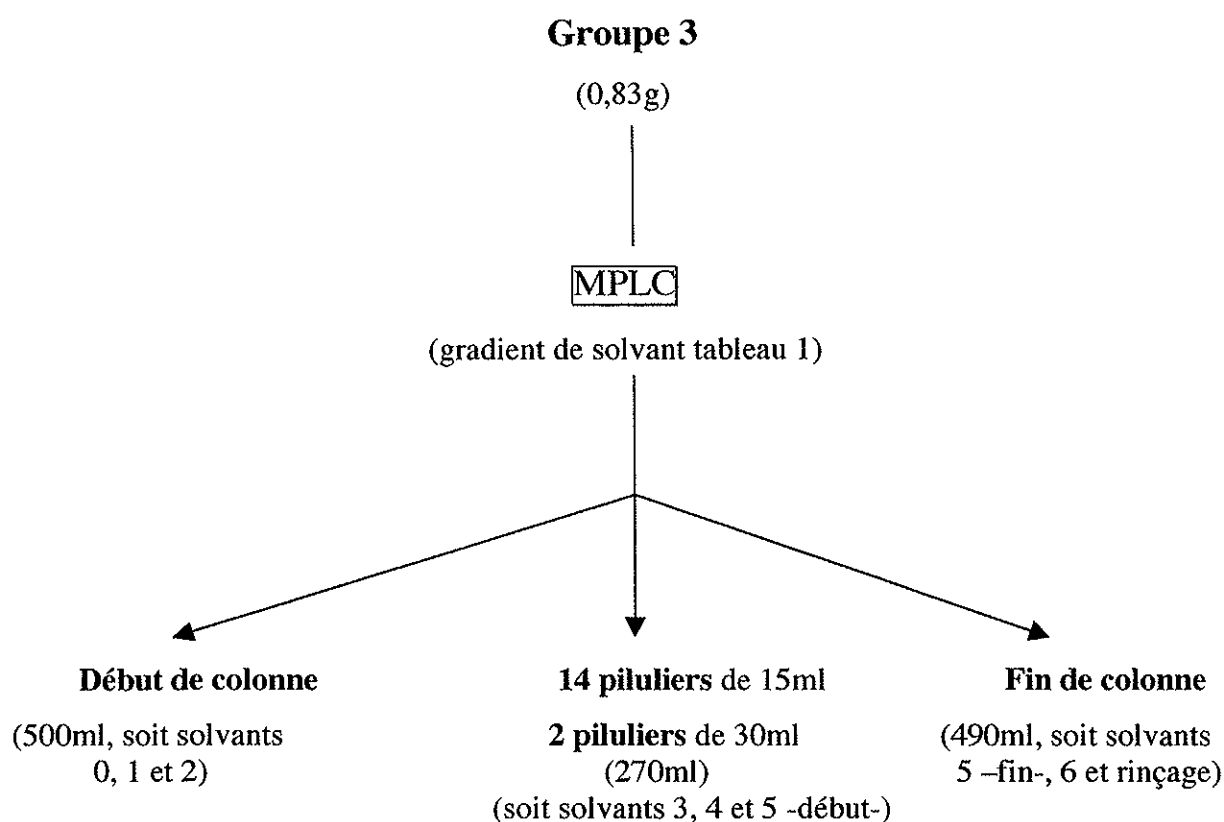


Figure 16 : MPLC n°1

On va ici, comme dans l'étape précédente de colonne ouverte, procéder à des rassemblements après analyse des fractions par HPLC. Voici ici les différents groupes créés et le poids de produits qu'ils contiennent :

- **groupe 1** : « début de colonne → pilulier 4 », 0,454g (560ml),
- **groupe 2** : « pilulier 5 → pilulier 7 », 0,008g (45ml),
- **groupe 3** : « pilulier 8 → pilulier 10 », 0,008g (45ml),
- **groupe 4** : « pilulier 11 → pilulier 16 », 0,007g (120ml),

- **groupe 5** : « fin de colonne », 0,025g (490ml).

On a récupéré au total 0,502g de produits. Le groupe intéressant est ici le groupe 1 qui semble contenir l'argentéane, au vu de l'analyse par HPLC.

◆MPLC n°2

Nous traitons ensuite selon le même protocole le groupe 3', c'est-à-dire la fraction obtenue lors du traitement du deuxième tiers de la chromatographie sur colonne ouverte.

On ne traite ici qu'un gramme de 3', car pour les dimensions de la colonne utilisée, un gramme représente la quantité maximale au-delà de laquelle on risque d'avoir saturation et donc une séparation de mauvaise qualité et non reproductible.

De la même façon, cette masse est reprise dans un mélange méthanol/chloroforme (50/50, 2ml) et on le dépose en tête de colonne.

Le gradient de solvant utilisé est le même que précédemment (tableau 1)

La séparation a été réalisée de façon légèrement différente par rapport à la MPLC n° 1 (figure 17) :

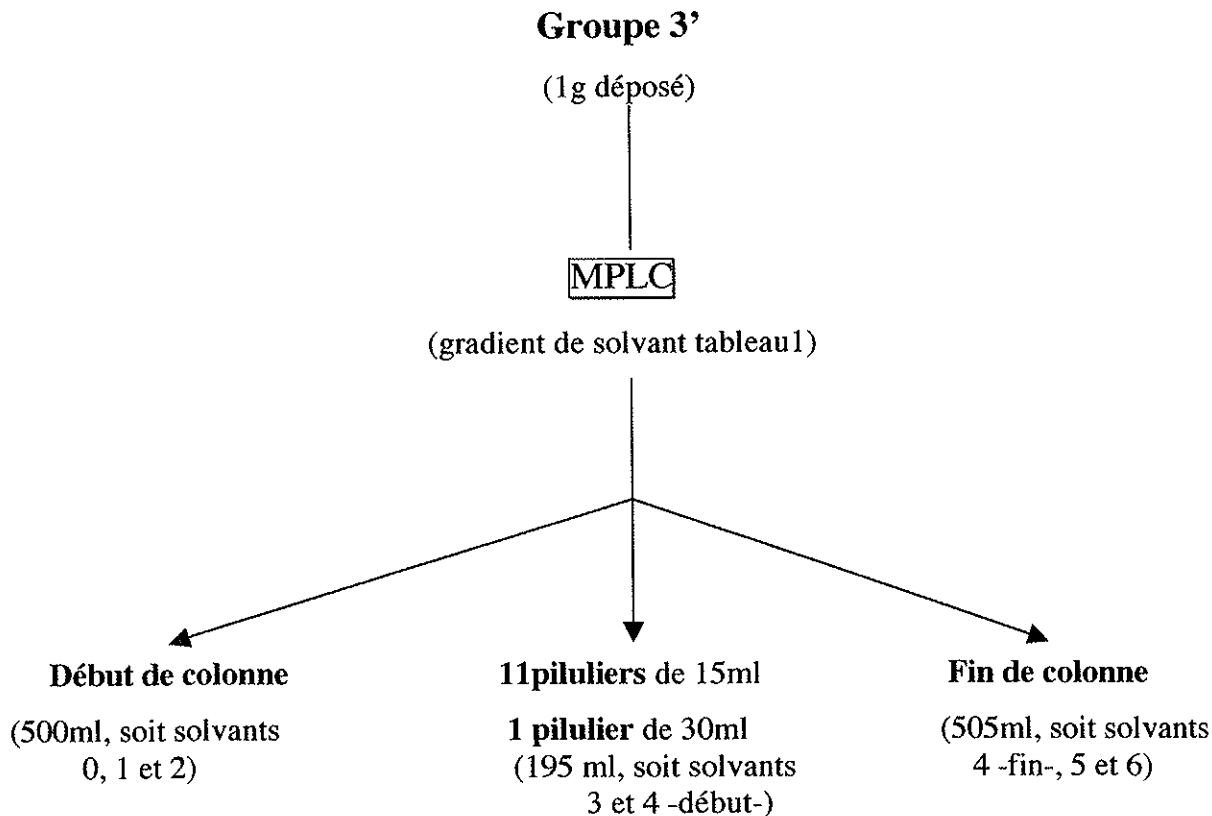


Figure 17 : MPLC n°2

Comme précédemment, après analyse des fractions par HPLC, nous procédons à des rassemblements entre les fractions les plus proches, toujours suivant les similitudes et vis-à-vis du spectre UV de référence de l'argentéane. Voici les groupes ici formés suivis du poids de produits qu'ils contiennent :

- **groupe 1** : « début de colonne », 0,655g (500ml),
- **groupe 2** : « pilulier 1 → pilulier 5 », 0,001g (75ml),
- **groupe 3** : « pilulier 6 → pilulier 9 », 0,003g (60ml),
- **groupe 4** : « pilulier 10 → pilulier 12 », rien (60ml),
- **groupe 5** : « fin de colonne », 0,025g (environ 500ml).

On récupère donc au total 0,68g. La fraction intéressante comme précédemment est le groupe 1 qui contient l'argentéane, les autres ne présentant que des traces très faibles.

Cependant, après ces deux premières MPLC, le résultat est loin d'être satisfaisant. En effet, on se rend compte par le biais des analyses par HPLC réalisés sur les différents échantillons que la séparation n'a pas eu lieu comme prévu. On peut plus facilement s'en rendre compte par le fait que pratiquement tout le produit déposé en tête de colonne ressort presque totalement groupé dans les toutes premières fractions récoltées.

Il apparaît alors judicieux de rassembler les deux groupes 1 (soit les deux débuts de colonnes) et de procéder à une nouvelle MPLC sur ce rassemblement en modifiant le gradient de solvant. On a donc, à ce stade de la séparation, 1,10g de produits à traiter (les deux débuts de MPLC rassemblés), ainsi que le résultat du troisième tiers issu de la première étape de séparation que l'on n'a pas encore touché (soit 1,75g).

◆MPLC n°3

Comme on l'a dit précédemment on va ici traiter les deux débuts de colonne MPLC précédent (soit 1,10g de produits) avec un gradient de solvant tout à fait différent. En effet, puisque la majorité des produits dont l'argentéane se trouvent dans le groupe 1, la solution est de fractionner plus finement dès le départ avec les solvants 1 et 2 et pour éviter que les produits ne traînent trop longtemps dans la colonne la quantité du solvant 0 est divisé par 4. La quantité du solvant 1 est doublée pour permettre un meilleur étalement des produits.

La colonne utilisée est toujours la même.

Solvant	Hexane	Chloroforme	Méthanol	Volume
0	100%	/	/	50ml
1	70 %	30%	/	200ml
2	50%	50%	/	200ml
3	30%	70%	/	200ml
4	/	99%	1%	100ml
5	/	50%	50%	50ml
6	/	100%	/	50ml
7	100ml	/	/	200ml

Tableau 2 : MPLC n°3

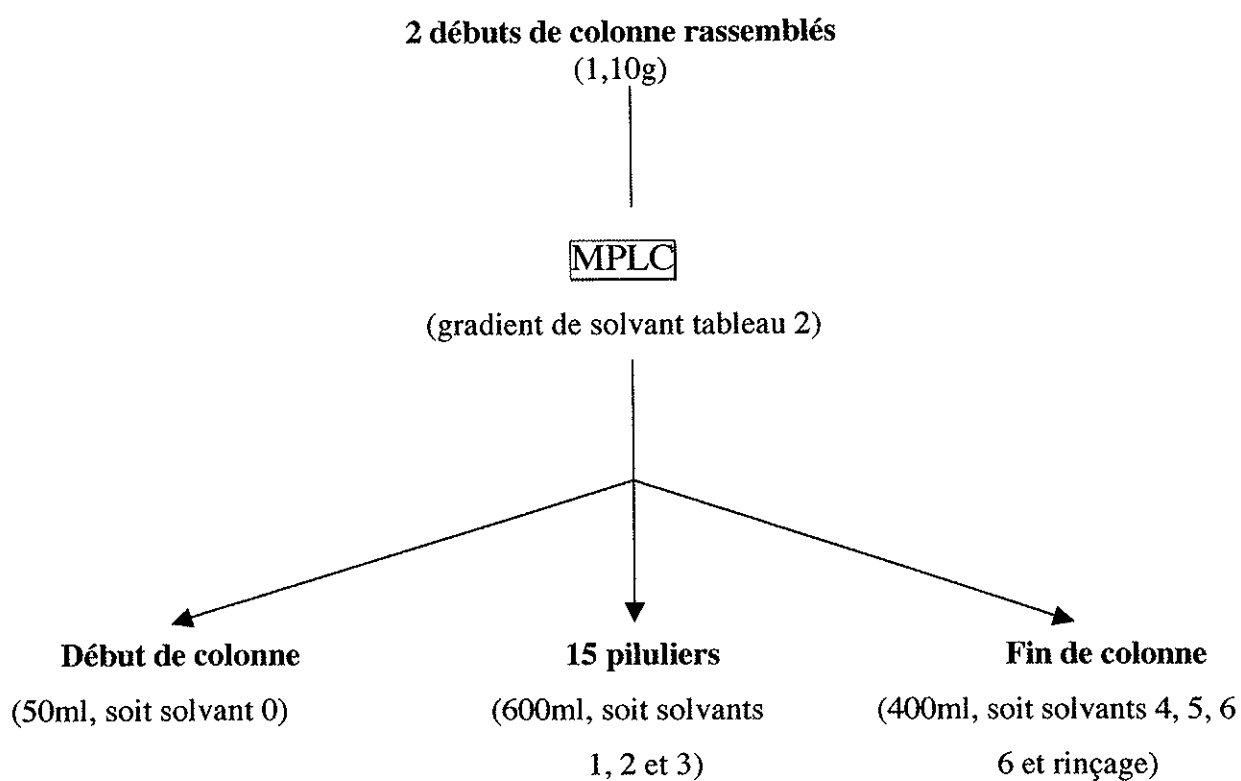


Figure 18 : MPLC n°3

Comme pour les autres MPLC, nous procédons à des rassemblements suite aux résultats de l'analyse des fractions par HPLC. Suivent donc les groupes formés ainsi que le poids de produits contenus dans ces divers groupes :

- 1^{er} groupe : « début de colonne → pilulier 7 », 0,93g (330ml),
- 2^{ème} groupe : « pilulier 10 → pilulier 13 », 0,024g (160ml),
- 3^{ème} groupe : « pilulier 8+9+fin de colonne », 0,098g (480ml).

L'analyse HPLC du groupe 2 est particulièrement intéressante : en effet, il contient l'argentéane en bonne quantité (pur à environ 29 %), qui pour la première fois se dégage bien des autres composés. Ce chiffre de pureté donné ici n'a qu'une valeur relative. Il est obtenu à partir de la surface des pics d'un chromatogramme (à une longueur d'onde donnée). Ce tracé HPLC nous montre, en plus du pic de Mya 15, un « bloc » de produits de polarité très voisine, bloc qu'il est donc possible à séparer de l'argentéane. Nous avons réalisé une étape particulièrement intéressante dans le cheminement de l'extraction du Mya 15.

◆MPLC n°4

Pour vérifier que les deux précédentes MPLC n'ont pas eu d'influence sur l'extraction comme nous le pensons, nous allons procéder à une nouvelle MPLC. Le produit déposé en tête de colonne sera prélevé dans le rassemblement de ce qui restait du groupe 3' et du groupe 3* (non encore touché) issus tous deux des premières colonnes ouvertes (Sephadex).

Nous pourrions donc comparer les résultats obtenus par rapport à ceux qui sont présentés avant, en espérant trouver des fractions où le Mya 15 sera en bonne quantité et sans trop d'impuretés comme pour cette 3^{ème} MPLC, ce qui permettrait de dire que la méthode est reproductible.

Nous avons donc 2,319 g de produits issus du rassemblement du groupe 3' et du groupe 3* comme nous l'avons dit précédemment. Nous allons ici réaliser deux MPLC identiques pour traiter l'ensemble de la masse, la première sur 0,83g de produit, la seconde sur 1,5g. Le gradient de solvant et le protocole sont décrits dans le tableau 2 et le schéma (figure 19) ci-dessous : on utilise en somme le même protocole que précédemment avec la même colonne.

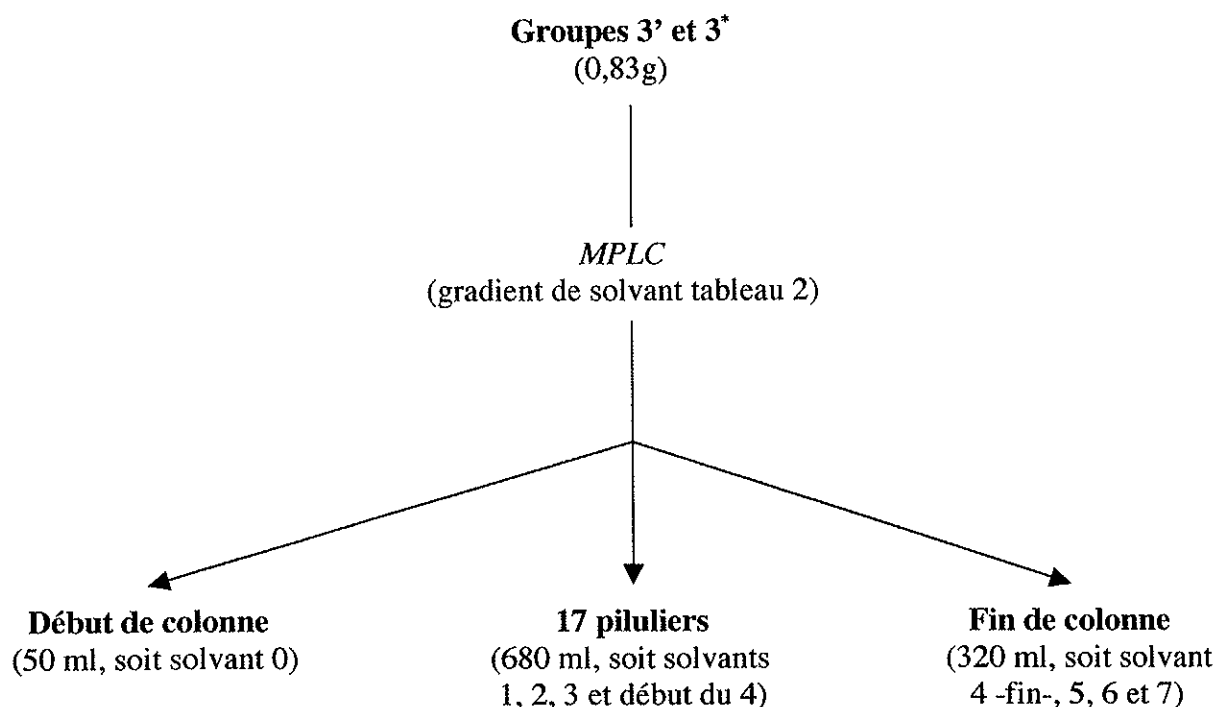


Figure 19 : MPLC n°4

Comme à chaque fois, après analyse des spectres UV obtenus par HPLC avec détecteur à barrette de diodes, nous procédons à des rassemblements de fractions en fonction de leur composition. Voici ici les différents groupes créés ainsi que la masse de produits contenus :

- **1^{er} groupe** : « début de colonne à pilulier 6 », 0,722g (290ml),
- **2^{ème} groupe** : « piluliers 7 à 9 », 0,047g (120ml),
- **3^{ème} groupe** : « piluliers 10 à 13 », 0,024g (160ml),
- **4^{ème} groupe** : « pilulier 14 à la fin de colonne, 0,047g (480ml).

Les deux fractions particulièrement intéressantes sont « 7 à 9 » et « 10 à 13 » : en effet, ces deux groupes présentent les mêmes particularités que le groupe 2 de la précédente colonne, à savoir l'argentéane avec un seul bloc de produits et en quantité relativement importante (22 % pour le premier et 15 % pour le deuxième).

On refait exactement la même colonne (**MPLC n°5**) sur la masse restante du rassemblement des deux groupes 3' et 3* (c'est-à-dire 1,492g, avec le même protocole et le même gradient de solvant). On procède aussi à des regroupements de fractions qui sont présentées avec les masses de produits contenus :

- 1^{er} groupe : « début de colonne à pilulier 5 », 1,134g
- 2^{ème} groupe : « piluliers 6 à 12 », 0,094g,
- 3^{ème} groupe : « pilulier 13 à fin de colonne », 0,070g.

Comme pour les autres MPLC, après analyse des spectres UV par HPLC (figure 20), c'est ici le groupe 2 qui retient notre attention puisque c'est lui qui contient l'argentéane, de plus en bonne proportion (environ 10 %) et relativement bien dégagé du bloc des autres produits (comme pour les fractions retenues auparavant).

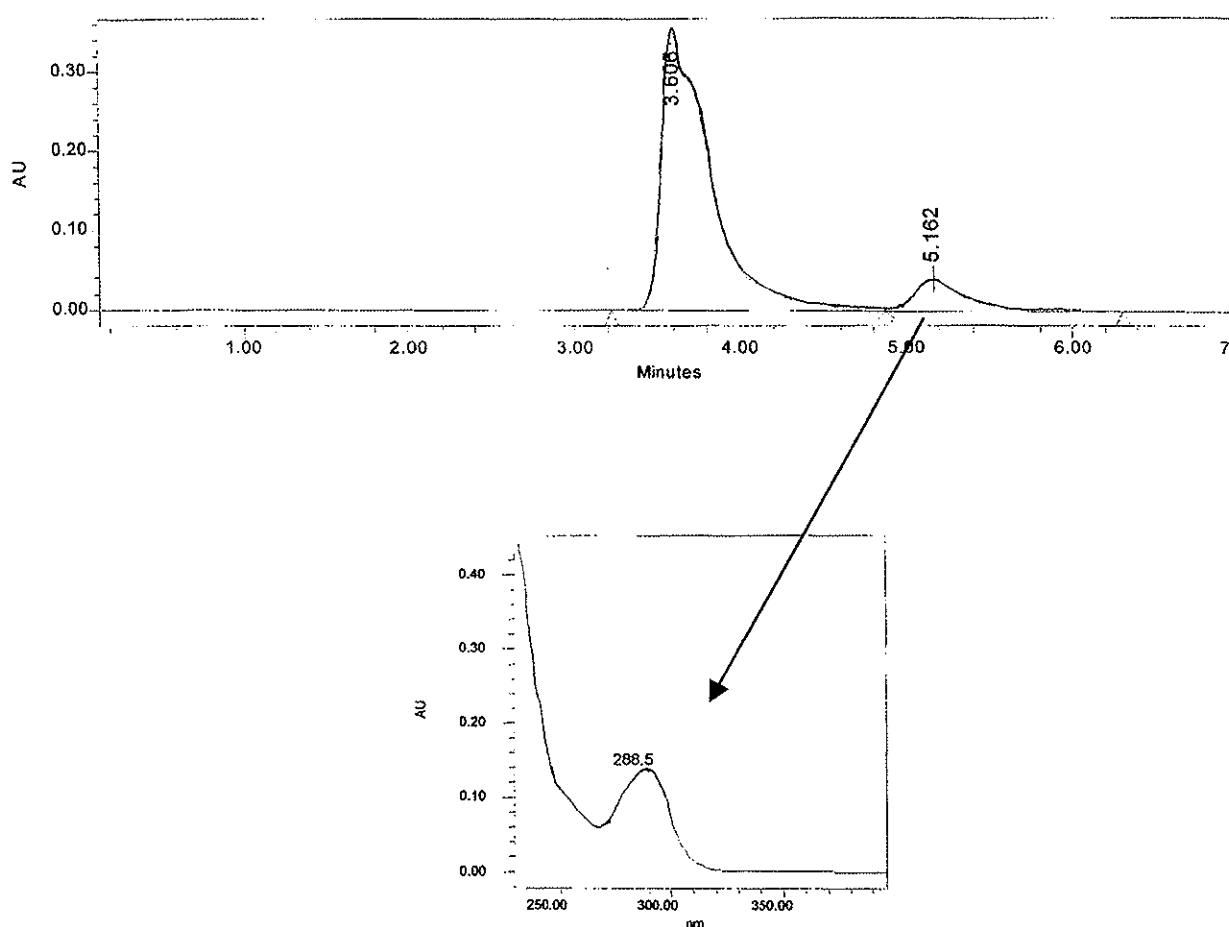


Figure 20 : profil analytique en HPLC de la fraction "6-12" et spectre UV du pic correspondant au pic d'argentéane (silice RP 18, 100% méthanol, isocratique, débit : 1 ml/min, volume d'injection : 15 μ l)

En conclusion de cette troisième étape, on ne peut retenir que les deux dernières MPLC décrites qui sont réellement significatives. En effet dans ces deux MPLC, on arrive à obtenir des fractions très intéressantes : en clair, en fonction des spectres UV obtenu par HPLC, deux blocs de produits assez distincts ont été obtenus, dont l'un contient majoritairement l'argentéane. Nous sommes donc proches du but recherché.

1.2.4- Chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) avec silice greffée C₁₈ comme phase stationnaire

Après cette série de MPLC, et ceci grâce au tracé des spectres UV obtenus après HPLC sur des échantillons, nous aboutissons donc à des fractions qui sont particulièrement intéressantes : en effet nous avons retenu ici quatre groupes qui seront traités pour la suite de l'extraction.

Ces quatre groupes que nous nommerons « 10-13 », « 10-13' », « 7-9 » et « 6-12 », présentent en effet des spectres UV similaires.

Dans un premier temps, nous avons effectué une CCM (avec pour phase mobile un mélange méthanol/eau (80/20), et comme support gel de silice 60 F₂₅₄ Merck) sur silice afin de déterminer si ces quatre groupes se comportent de la même façon face aux mêmes conditions. Les résultats obtenus permettent de dégager deux groupes : « 10-13 » et « 10-13' » qui se comportent de façon pratiquement identique d'une part, et « 7-9 » et « 6-12 » qui se comportent de façon semblable d'autre part.

Vu le profil analytique de ces fractions contenant l'argentéane en HPLC sur colonne RP 18, c'est-à-dire montrant l'argentéane élué bien après les autres composés, il est tout à fait normal que l'on s'oriente plutôt vers une phase stationnaire silice RP 18.

Ainsi dans un deuxième temps, après avoir dégager ces deux groupes, nous allons effectuer des CCM sur plaque de silice RP 18. On cherche donc à vérifier que cette silice RP 18 nous permette d'effectuer une séparation fine et donc d'arriver à l'argentéane.

Une première CCM est réalisée avec comme phase mobile du méthanol pur. Il apparaît une séparation nette entre le pic d'argentéane et le reste des produits, qui ne nous intéressent pas. Cependant l'argentéane migre de façon trop importante, et suit de trop près le front de solvant pour permettre une séparation efficace : nous devons donc trouver un système qui retient plus fortement l'argentéane.

Pour cela on prend pour phase mobile un mélange méthanol/eau (80/20) avec le même type de plaque CCM silice RP 18. Ici on voit toujours une très bonne séparation des différents produits, mais en plus une bonne rétention de l'argentéane, celui-ci migrant de façon éloignée du front de solvant.

On connaît donc le comportement des fractions que l'on va ici exploiter sur silice RP 18 par comparaison avec un argentéane « pur » témoin. Avec le type de solvant que l'on utilise, les impuretés que l'on veut éliminer sortent en premier, alors que l'on voit l'argentéane migrer beaucoup plus lentement et sortir donc en dernier, se séparant très nettement des impuretés.

Ainsi nous allons donc réaliser une MPLC avec les mêmes conditions que pour la CCM précédente, qui semblent permettre une bonne séparation des produits.

Nous allons procéder à une MPLC sur silice RP 18 avec comme phase mobile un mélange méthanol/eau (80/20). Cette fois-ci, nous allons placer un détecteur UV en sortie de colonne : en effet d'après les remarques faites précédemment, nous devrions observer un premier pic symbolisant les impuretés que l'on veut éliminer puis un second révélant la présence de l'argentéane. Cette méthode avec le détecteur permettra de travailler de manière moins empirique et limitera la collecte en petites fractions dans les piluliers seulement au moment où on observera les pics grâce au détecteur UV placé en fin de colonne.

Le protocole va logiquement être le suivant :

- dans un premier temps, on utilise la phase mobile méthanol/eau (80/20) en récoltant massivement jusqu'à la sortie du premier bloc révélé par le premier pic apparaissant avec le détecteur : ce premier bloc nous permet théoriquement d'éliminer les impuretés ;
- puis on fait couler la colonne, toujours avec le mélange méthanol/eau (80/20), environ 50 ml pour bien étaler les produits et laisser sortir les éventuelles impuretés restantes présentes (ceci en recueillant des fractions par piluliers de 10 ml).
- Puis on passe enfin à 100 % de méthanol comme phase mobile, pour récupérer l'argentéane , en contrôlant toujours la survenue du deuxième pic avec le détecteur, ce deuxième pic symbolisant la sortie de l'argentéane comme nous avons pu l'observer sur les CCM.

◆MPLC n°6

Dans un premier temps, nous allons travailler sur les 50mg des deux fractions « 10-13 » (MPLC n°3 et n°4) rassemblées. Ces 50mg ont été repris dans 2 ml d'un mélange méthanol/chloroforme (50/50), volume déposé en tête de colonne.

La colonne mesure 22cm de long pour 1,5cm de diamètre ; comme on l'a dit précédemment la phase stationnaire est de la silice RP 18. Le détecteur UV utilisé est un modèle Jasco UV 975 couplé à un traceur Linseis L250E.

Le protocole se résume au schéma suivant (figure 21) :

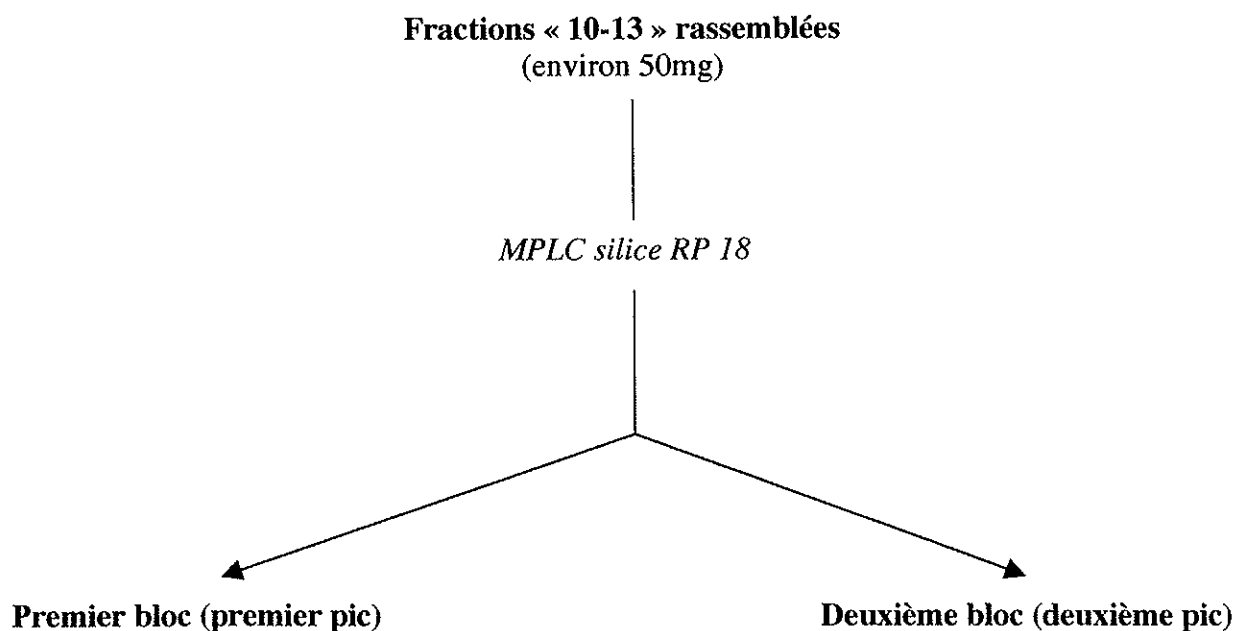


Figure 21 : MPLC silice RP 18 (n°6)

Les différentes fractions récoltées sont donc déterminées comme nous l'avons dit précédemment grâce au détecteur UV couplé à la colonne.

On a passé au total environ 100 ml du mélange méthanol/eau distillée (80/20) et environ 100 ml de méthanol pur . Il est à noter qu'ici, nous avons procédé à un fractionnement par pilulier de 10 ml (le premier étant récolté après la fin de la sortie du premier bloc, le dernier pilulier récolté étant le 14).

Après confirmation des résultats attendus par HPLC, on observe l'argentéane dans les piluliers 10 à 14 de façon très majoritaire. Ces fractions rassemblées pèsent 17 mg, et sont donc mises de côté. Il faut noter qu'il sera sans doute nécessaire de retraiter cette masse pour pouvoir l'exploiter et aller plus loin en purification, car on peut s'apercevoir sur le spectre UV obtenu après HPLC que l'argentéane sort « superposé » avec un autre produit parasitant fortement (produit dont on ne connaît pas la nature).

◆MPLC n°7

Nous allons procéder à une deuxième MPLC sur C_{18} , portant cette fois-ci sur la masse représentée par le rassemblement des fractions « 6-12 » et « 7-9 », soit en fait 134,7 mg de produit. On reprend cette masse dans environ 2 ml d'un mélange méthanol/eau distillée (50/50), que l'on dépose de la même manière que précédemment en tête de colonne.

Il faut noter que pour cette MPLC on utilise un volume beaucoup plus important de mélange méthanol/eau distillée (80/20, environ 350ml) pour étirer plus fortement les produits et obtenir une séparation plus nette des différents produits à récolter.

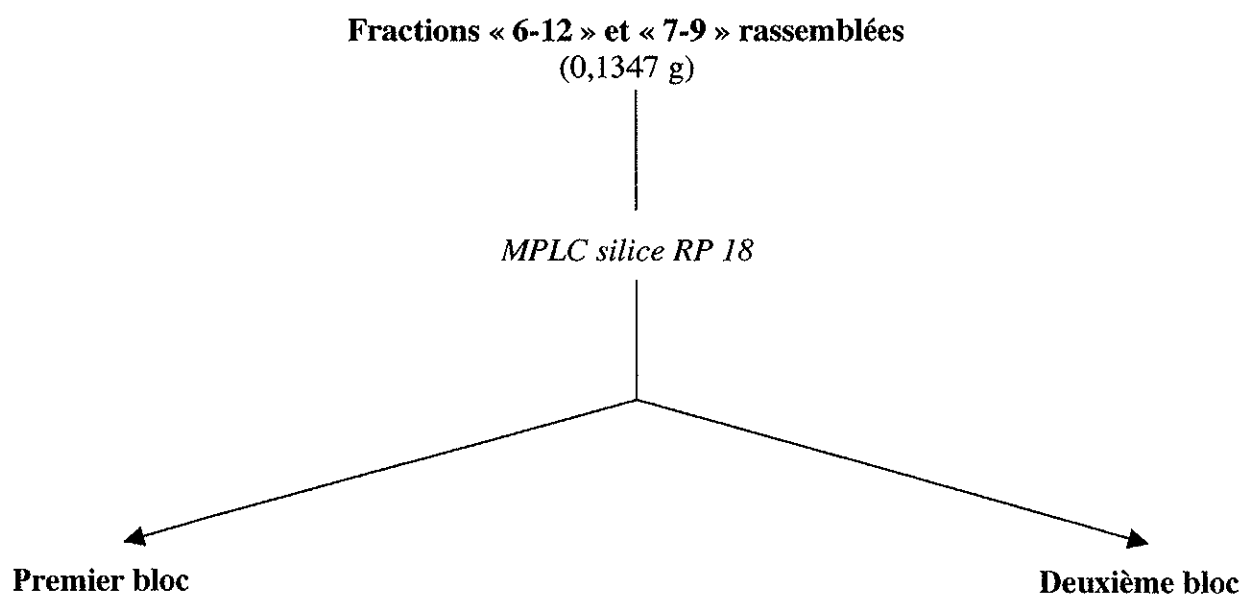


Figure 22 : MPLC silice RP 18 (n°7)

Le suivi pour le fractionnement est toujours effectué sous contrôle du détecteur UV en sortie de colonne.

La première série de pics observés avec le détecteur est appelée premier bloc : on sait qu'ils ne contiennent pas l'argentéane par comparaison avec les spectres UV en HPLC (aussi avec une colonne RP 18). En effet l'argentéane sort dans ce que l'on nomme le deuxième bloc.

Ici seul le deuxième bloc nous intéresse : c'est en effet ici que se trouve l'argentéane. On a donc récolté des piluliers seulement à partir de ce moment.

Grâce à l'analyse par HPLC, on ne conserve que le pilulier 4 (figure 23) de ce deuxième bloc qui contient l'argentéane pratiquement pur (majoritaire à 95%). On conserve donc ces 5 mg récoltés de côté pour les tests d'activité à réaliser.

Le pilulier 5 présente également un profil très intéressant (figure 24) : l'argentéane est majoritaire à 75% :

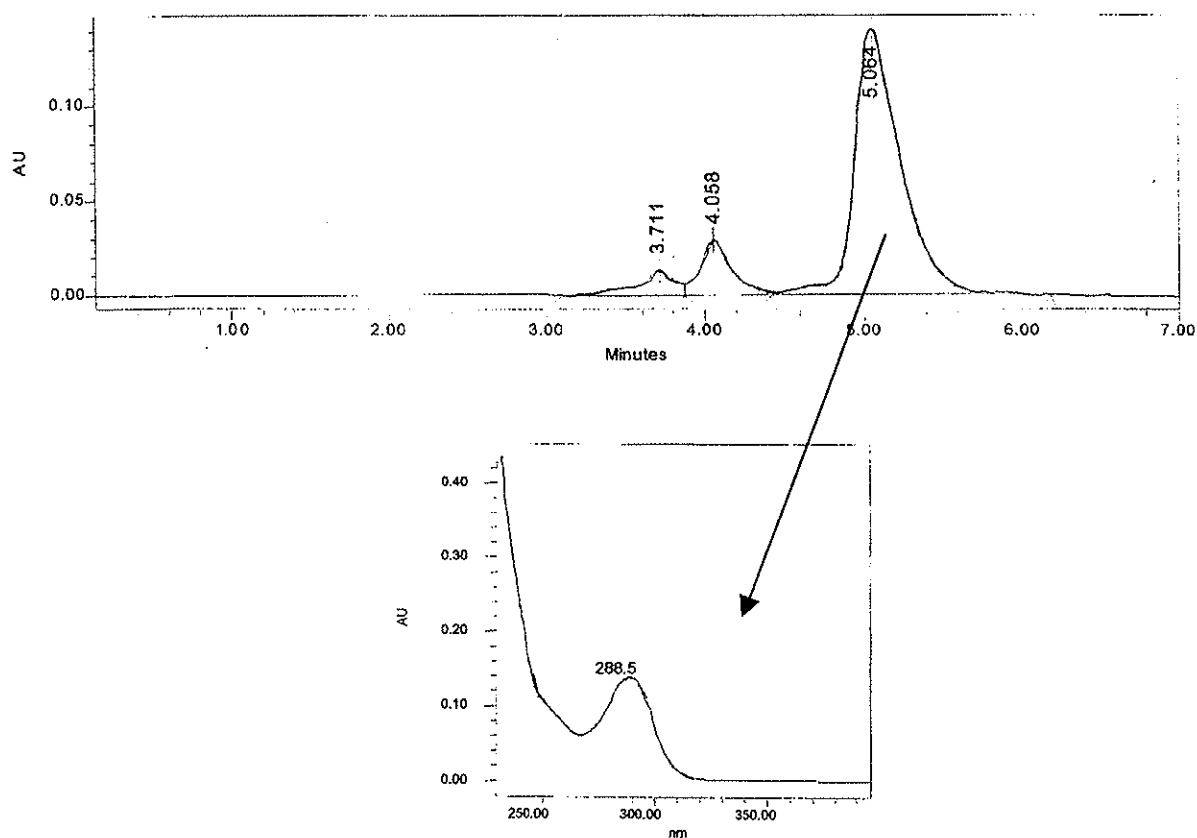


Figure 23 : profil analytique en HPLC de la fraction 4 et spectre UV du pic correspondant à la sortie de l'argentéane

(silice RP 18, 100% méthanol, isocratique, débit : 1ml/min, volume d'injection : 15 μ l)

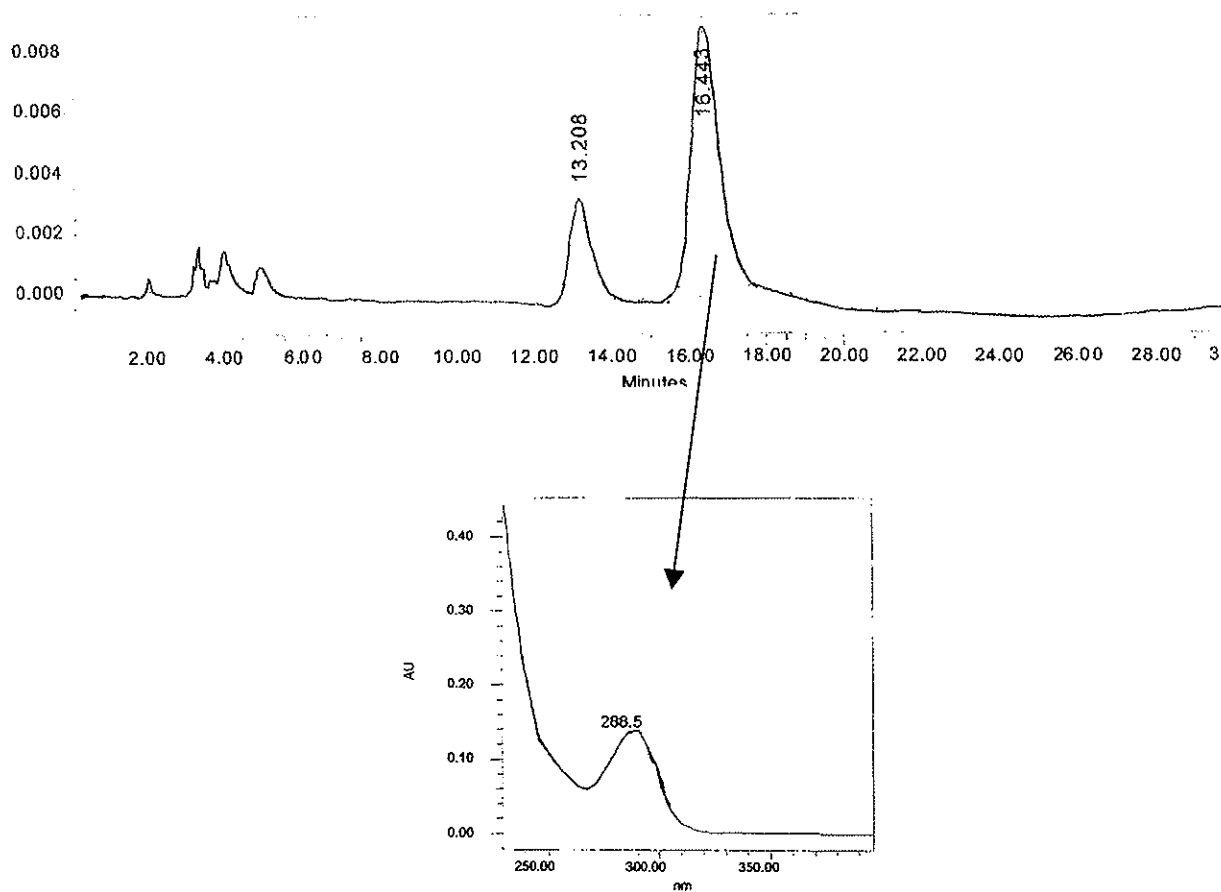


Figure 24 : profil analytique en HPLC de la fraction 5 et spectre UV correspondant à la sortie de l'argentéane
(silice RP 18, méthanol/eau distillée -90/10-, isocratique, débit : 5ml/min, volume d'injection : 300 μ l)

Nous sommes donc arrivé ici à obtenir l'argentéane de façon relativement pure (autour de 70 % de pureté, en moyenne sur les deux fractions retenues). Nous avons donc, au bout de quatre étapes, obtenu environ 13mg de produits contenant l'argentéane de façon majoritaire à partir de 85 g d'extrait éthéro-pétrolique.

Il est à noter que nous avons confirmé la nature du produit extrait par RMN : la mesure effectuée confirme que nous sommes bien en présence de l'argentéane.

Remarques :

Cependant, en ce qui concerne, le résultat de la MPLC n°6, nous voulons vérifier s'il est possible d'affiner la séparation et ainsi obtenir l'argentéane encore plus pur, et en particulier s'il est possible d'éliminer le produit "parasite" dont le spectre se superpose à celui de l'argentéane dont nous avons déjà parlé précédemment. Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé à une nouvelle MPLC exactement similaire à la n°7. Il faut noter que l'on a rajouté aux 17mg issus de cette MPLC n°6 la masse issue d'un rinçage accru de la colonne utilisée pour les MPLC n°6 et 7, pour récupérer le maximum d'argentéane : cela porte la masse à traiter à 39mg.

Le protocole est identique aux précédents et se résume dans le schéma suivant (MPLC n° 8, figure 25) :

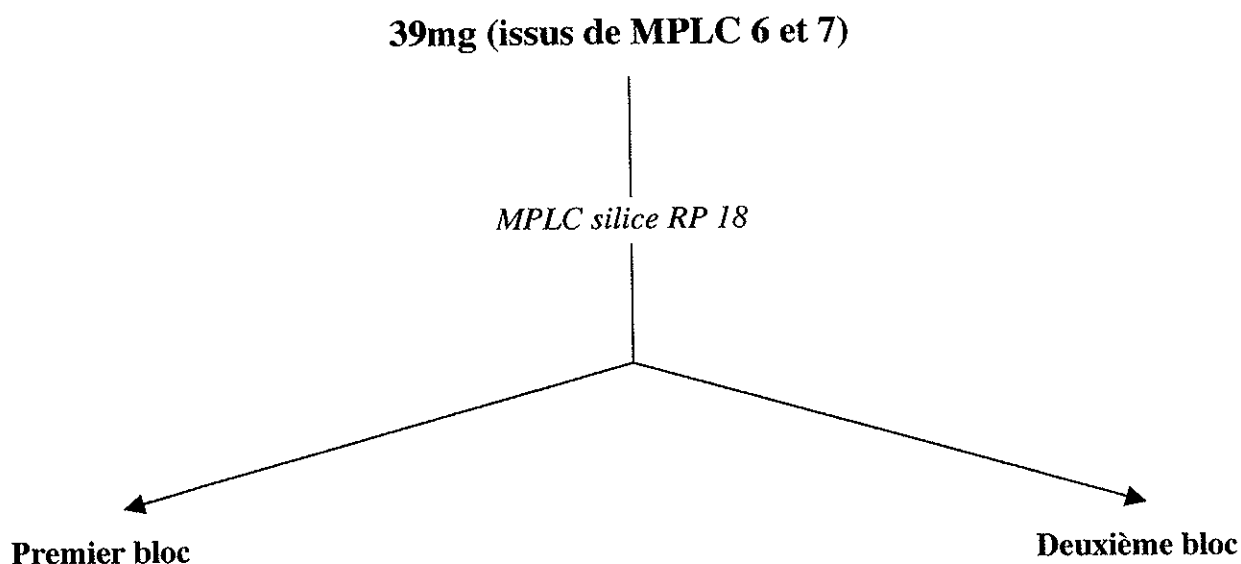


Figure 25 : MPLC silice RP 18 (n°8)

Dans un premier temps, on passe environ 350ml de mélange méthanol/eau distillée (80/20), puis on passera ensuite à 100% de méthanol pour la fin de la séparation.

Comme précédemment, le suivi grâce au détecteur UV permet de distinguer deux blocs : le premier représente les impuretés que l'on souhaite éliminer et le deuxième contient l'argentéane.

Pour affiner les mesures, nous réalisons des fractions de 5ml au niveau du deuxième pic pour trouver le moment où l'argentéane est élué et donc améliorer la pureté du produit récolté.

Dans le deuxième bloc (deuxième pic sortant de la colonne) sont récoltés 27,82mg de produit. Malheureusement, après analyse des échantillons et de leur spectre UV en HPLC comme habituellement, on s'aperçoit que dans les fractions que l'on retient (c'est-à-dire les 27,82mg), le pic de sortie de l'argentéane est superposé à nouveau à celui du produit parasite. Il nous faut donc trouver un système permettant de séparer ces deux pics qui se superposent dans le protocole utilisé en silice RP 18 jusqu'à présent.

Dans ce but est réalisée une colonne HPLC test avec comme éluant un mélange méthanol/eau distillée (95/5). Ce test n'est pas concluant, car les deux pics sont superposés comme précédemment.

On réalise donc ensuite une autre HPLC test avec cette fois-ci le mélange méthanol/eau distillée (90/10) comme éluant. Le test se révèle ici concluant puisqu'on observe une bonne séparation des pics auparavant superposés.

C'est pourquoi nous allons réaliser une nouvelle MPLC Silice RP 18 dans les mêmes conditions que précédemment mais en utilisant le mélange méthanol/eau distillée (90/10) (on change de solvant pour étirer plus longtemps les produits mais qu'ils sortent tout de même de la colonne, ce qui prendrait un temps très long avec un mélange 80/20). On va donc traiter les 27,82mg récupérés précédemment, avec le mélange précédent pendant trois heures (temps nécessaire pour étaler correctement les produits) pour ensuite passer à 100 % de méthanol.

On peut résumer le protocole comme suit (MPLC n°9, figure26) :

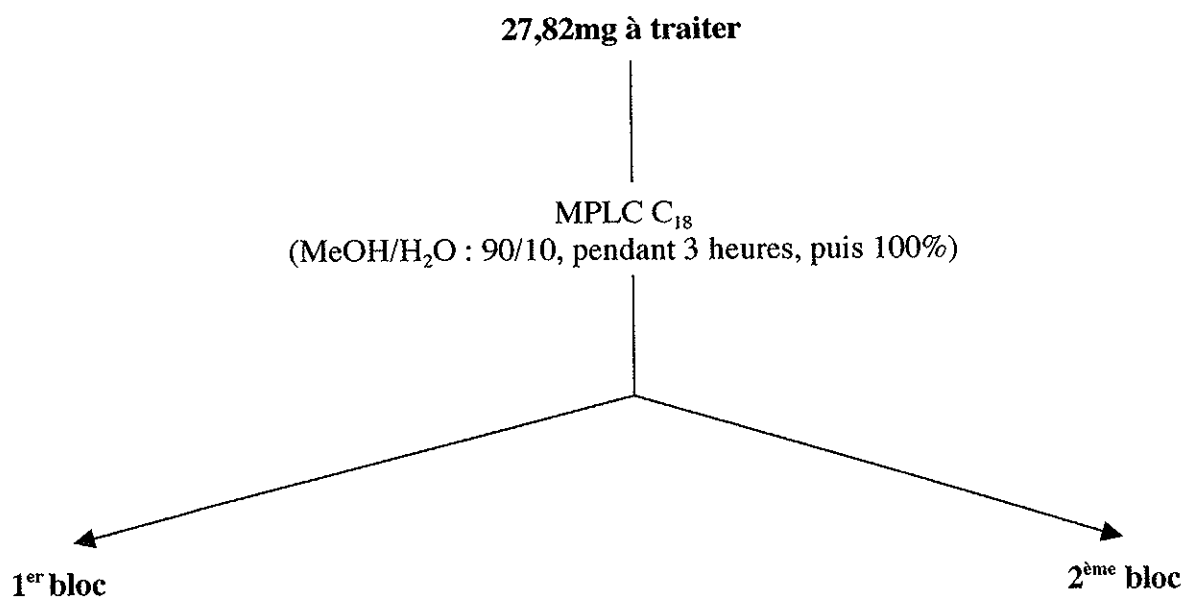


Figure 26 : MPLC silice RP 18 (n°9)

Le 1^{er} bloc est très réduit, voire insignifiant, car la purification sur ce produit parasite est déjà faite auparavant.

Le deuxième bloc va se présenter sous la forme d'un pic « aplati » qui représente en fait le produit parasite dont on veut se débarrasser, suivi de la présence d'un pic très aplati et très long (en fait une droite au-dessus de la ligne de base au détecteur UV) qui représente l'argentéane que l'on veut. On récupère ici environ 8mg d'argentéane.

Ces 8mg vont finalement être purifié par le passage en HPLC semi-préparative.

L'HPLC semi-préparative permet beaucoup plus de précision, mais est une méthode plus coûteuse et contraignante que la MPLC.

Le système de pompe et de lampes est celui cité dans le paragraphe "partie D, 1.1", la colonne est une Waters Prep LC 25 mm module (phase stationnaire silice RP 18) Module. On utilise comme éluant un mélange méthanol/eau distillée (90/10), avec un débit de 5ml/min. Nous ne pouvons passer plus de 300µl de solution à la fois compte-tenu des caractéristiques de la colonne.

Nous suivons en "direct" avec cette méthode l'apparition des pics de produits mais aussi le spectre UV du produit qui sort de la colonne. On peut donc récolter seulement au moment très précis de la sortie d'argentéane. Ici, nous ne pouvons passer plus de 0,3ml de solution à la fois : cette méthode nécessite donc la répétition de la même injection de nombreuses fois pour traiter toute la quantité de produit.

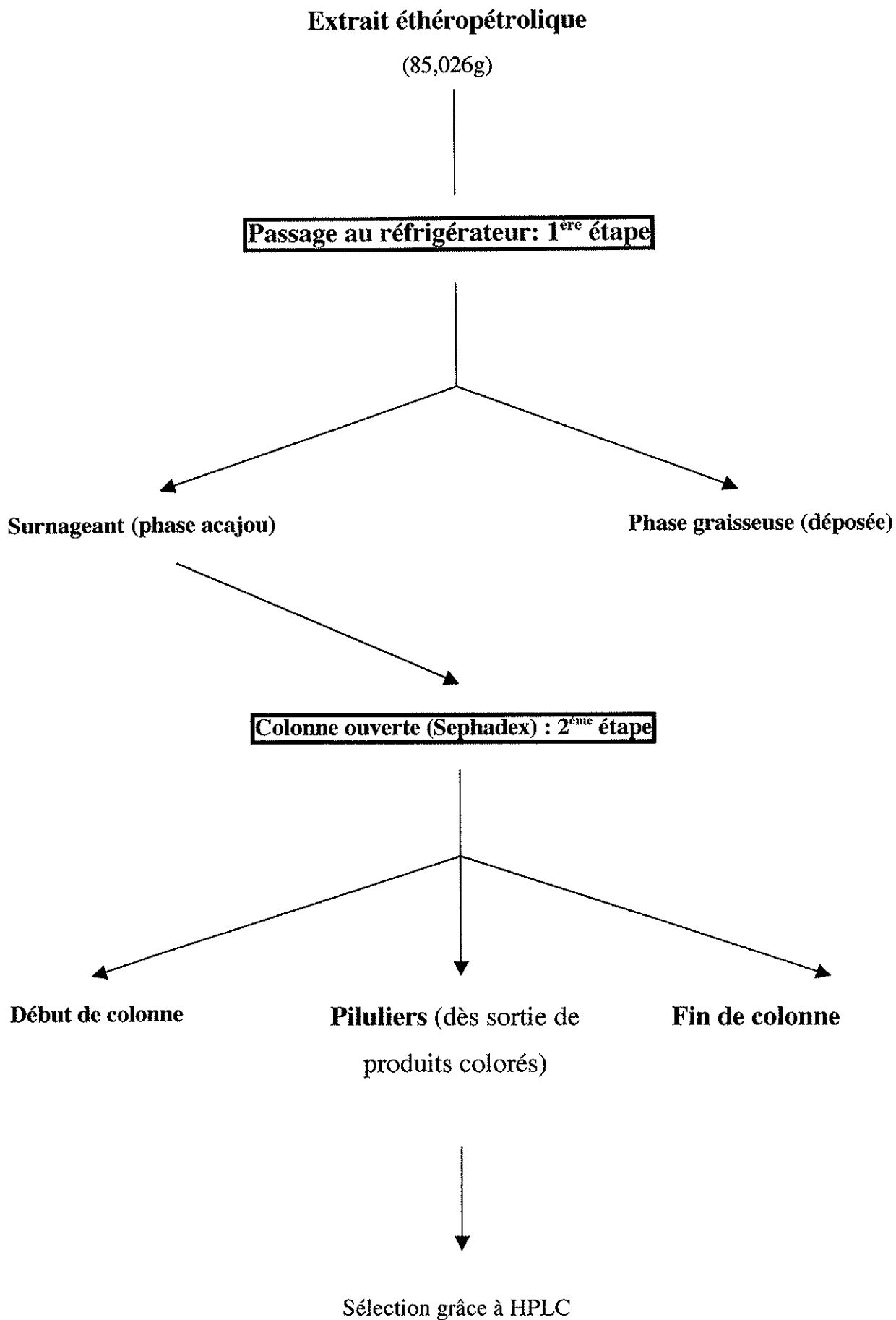
Cette méthode permet, sur les 8mg traités de récupérer 5 mg d'argentéane pur.

Il est à noter que nous avons rencontré un problème majeur à cet endroit nous empêchant d'exploiter ces 5 mg : en effet, auparavant nous avons toujours ramené à sec nos produits en les séchant à l'étuve thermostatée à 37°C et sous filet d'azote ; ici, nous avons ramené à sec nos produits en chauffant sous vide à environ 50°C. Il se trouve que ce traitement a sans doute dégradé le produit, puisqu'une fois séché, on ne retrouve plus le même spectre, et on n'a donc plus le même produit.

Ceci est important car, cela nous permet de dire qu'il faut éviter de traiter les fractions contenant de l'eau (comme dans ce dernier cas) à trop haute température (en tout cas supérieure à 37°C) sous risque de le dégrader.

1.3- Synthèse et conclusion

Un récapitulatif de l'extraction peut être fait sous forme de tableau.



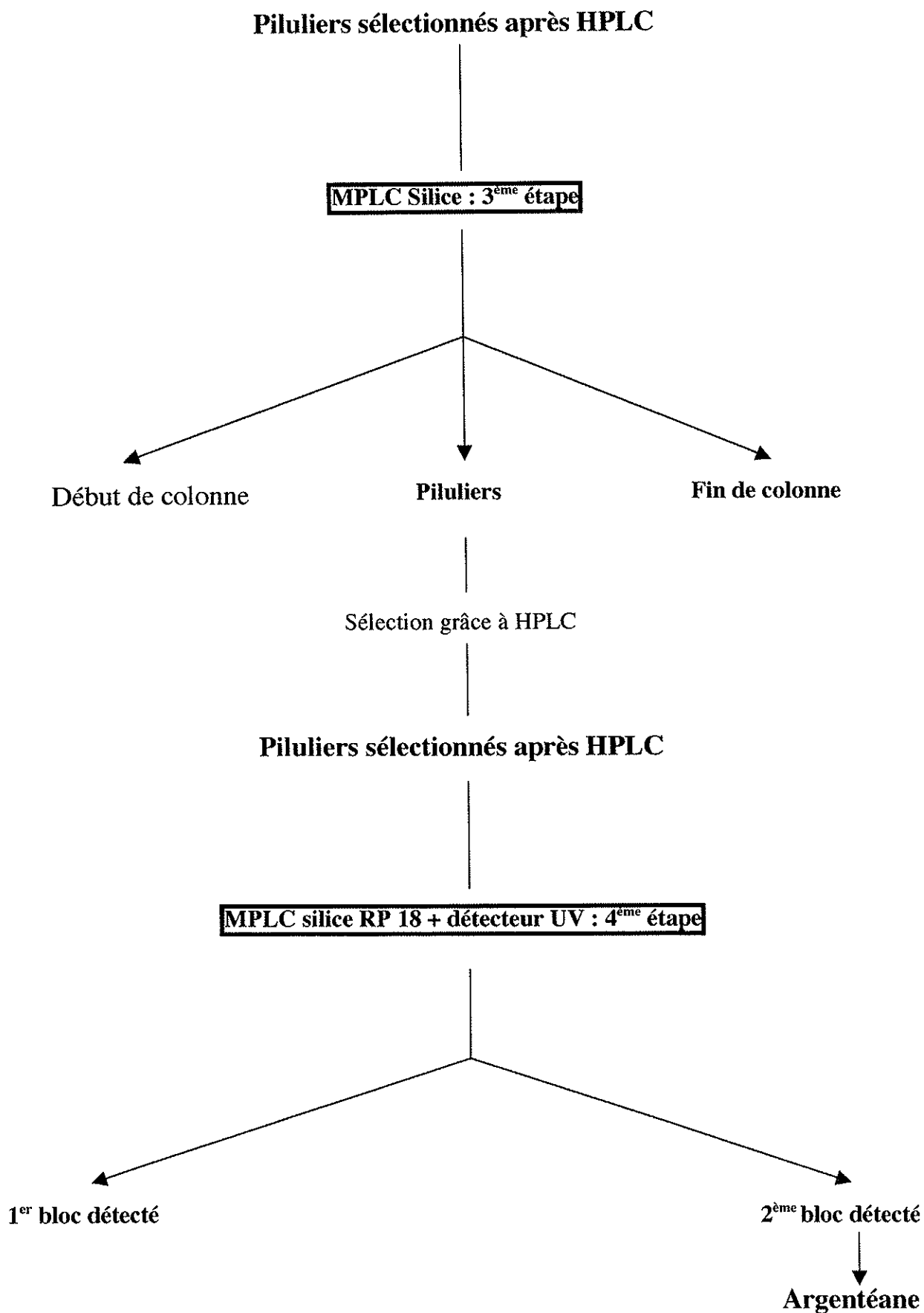


Figure 27 : synthèse du protocole d'extraction

Nous obtenons au final 13mg de produit qui servira pour les tests par la suite (13mg de produit contenant au minimum 70 % d'argentéane).

Voici le protocole avec les poids de produits à traiter et les différents volumes à récolter :

Première étape : séparation des graisses par précipitation à froid

Deuxième étape : séparation en colonne ouverte sur Sephadex LH 20 (70x4cm)

- dépôt de 16,5g de produit
- passage de 1100ml de méthanol : non récupéré
- passage de 1200ml de méthanol : fraction retenue (**argentéane**)

Troisième étape : séparation en MPLC silice (45x1,5cm)

- dépôt d'environ 1g de produit à la fois
- passage de solvant selon le gradient suivant (tableau 5):

Solvant	Hexane	Chloroforme	Méthanol	Volume
0	100 %	/	/	50 ml
1	70 %	30 %	/	200 ml
2	50 %	50 %	/	200 ml
3	30 %	70 %	/	200 ml
4	/	99 %	1 %	100 ml
5	/	50 %	50 %	50 ml
6	/	100 %	/	50 ml
7	100 %	/	/	200 ml

Tableau 5 : gradient de solvant de la MPLC silice type

- 290 premiers ml non retenus
- 280ml suivants retenus (**argentéane**)
- 480 derniers ml non retenus : rinçage

Quatrième étape : séparation en MPLC RP 18 couplée à détecteur UV

- on commence avec 350ml de mélange méthanol/eau distillée (80/20)
- puis on passe à 100 % méthanol
- la récolte se fait par suivi avec le détecteur UV : l'argentéane est le tout dernier produit sortant.

Il est obtenu directement 13mg d'argentéane exploitable pour les analyses ultérieures. En réalité, nous avons obtenu plus de masse que cela dans les étapes d'affinement ultérieures par HPLC semi-préparative : malheureusement cette masse a été perdue lors de sa remise à sec (comme nous l'avons expliqué ci-avant). Cette masse représentait environ 5mg.

Nous pouvons donc estimer qu'en seulement quatre étapes, nous sommes arrivés à obtenir l'argentéane. Les résultats obtenus sont donc intéressants, mais peuvent être fortement améliorés : il est évident que des améliorations peuvent être apportées à la méthode pour la rendre plus fiable, augmenter le rendement et la rendre plus facilement reproductible.

Il semble que les trois premières étapes soient relativement performantes : il ne sera pas évident d'améliorer cette partie. En revanche, dans l'objectif d'un approfondissement du présent travail, il apparaît que la quatrième étape (c'est-à-dire la MPLC silice RP 18) peut être améliorée pour obtenir l'argentéane pur à ce niveau.

Au travers de ce protocole, nous avons en partie atteint nos objectifs : nous réduisons fortement le nombre d'étapes nécessaires à l'extraction de l'argentéane (passant de huit à quatre). Cependant, ce protocole mis en place est une base de travail qui peut être poursuivi : il sera nécessaire d'augmenter la fiabilité, la reproductibilité et le rendement de cette méthode.

2- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE MYA 15

2.1-Présentation des méthodes de mesure de l'activité antioxydante par RPE

2.1.1- Test d'activité sur le radical DPPH (Calliste, 2001)

L'activité antioxydante de l'argentéane est ici mise en évidence par sa capacité à inhiber un radical stable, le 1,1-Diphényl-2-Pyryl-Hydrzyl (**DPPH**, figure 28).

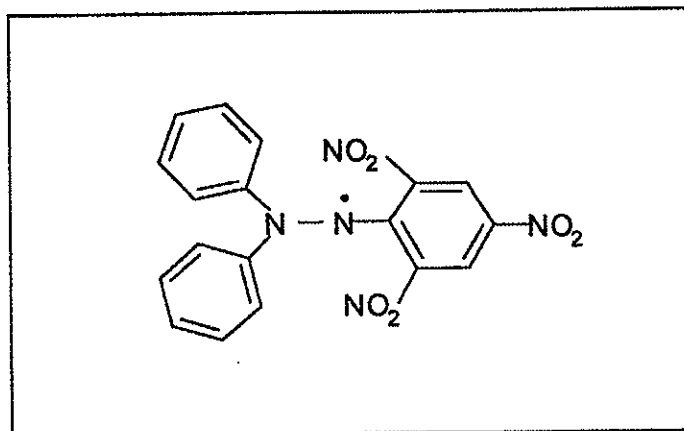


Figure 28 : formule du radical DPPH

Ce radical est couramment utilisé dans les tests destinés à déterminer l'activité antioxydante de divers composés, et notamment des composés phénoliques.

Dans un premier temps, la réaction va se faire par capture d'un atome d'hydrogène provenant du composé phénolique testé par le radical DPPH. Sur la figure 29 est donné un exemple de la première étape de la réaction entre le radical DPPH et un phénol. Elle donne naissance au diphenylpicrylhydrazine ainsi qu'à un radical phénoxy (figure 29) ; cette étape est la première d'une cascade de réactions (fragmentations, additions...), qui peuvent éventuellement influencer les résultats obtenus, en particulier en parasitant les cinétiques de la capture du DPPH par le composé en test.

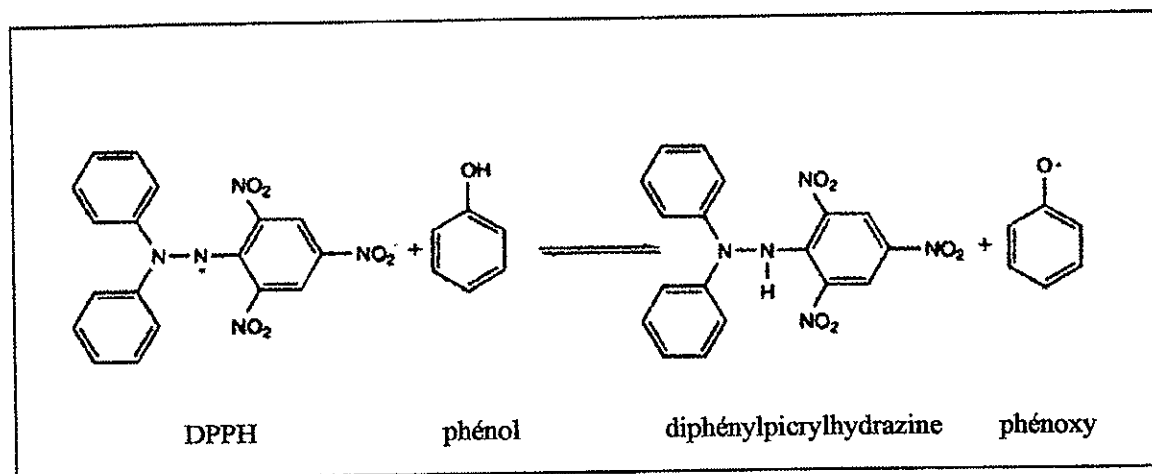


Figure 29 : réaction du radical DPPH avec un phénol

Le radical DPPH est utilisé fréquemment car il présente plusieurs avantages notables :

- son spectre est caractéristique en RPE, et de plus facilement détectable,
- il est stable dans le temps,
- solubilisé dans l'éthanol, il permet l'utilisation de nombreux solvants pour les composés à tester.

On obtient le signal de référence par le procédé suivant : on mélange, à volume égal, une solution éthanolique du radical DPPH ($5 \cdot 10^{-4}$ M) avec le solvant utilisé pour le produit mesuré. C'est la double intégrale du signal obtenu qui est utilisée car elle est en fait proportionnelle à la quantité de radicaux libres retrouvés dans la solution testée. Une mesure est donc ensuite effectuée avec la solution de DPPH et la solution de la molécule à tester, toujours à volume égal. Une diminution du nombre de radicaux libres se produit si le composé testé a des propriétés antioxydantes et donc par conséquent une diminution du signal est observée (figure 30). De ce fait, une nouvelle mesure de la double intégrale du signal permet donc de quantifier l'activité antioxydante (Gao, 1999 ; Ogata, 2000).

Les résultats sont généralement exprimés en pourcentage d'inhibition du signal de référence, qui est donné par la formule :

$$\% \text{ inhibition} = (ref - mesure) / (ref - bdf)$$

Nous nommons dans cette formule :

- *ref* la double intégrale du signal de référence, donné par le mélange DPPH / solvant seul,
- le terme *mesure* représente la double intégrale correspondant à la mesure obtenue avec le mélange DPPH / produit à tester,
- le terme *bdf* représente quant à lui la mesure du bruit de fond occasionné par le solvant seul (c'est en fait un paramètre de correction).

Sur la figure 30 est représentée l'évolution du spectre RPE en fonction de différentes concentrations de vitamine E. Cette dernière constitue généralement la référence pour ce test sur le radical DPPH.

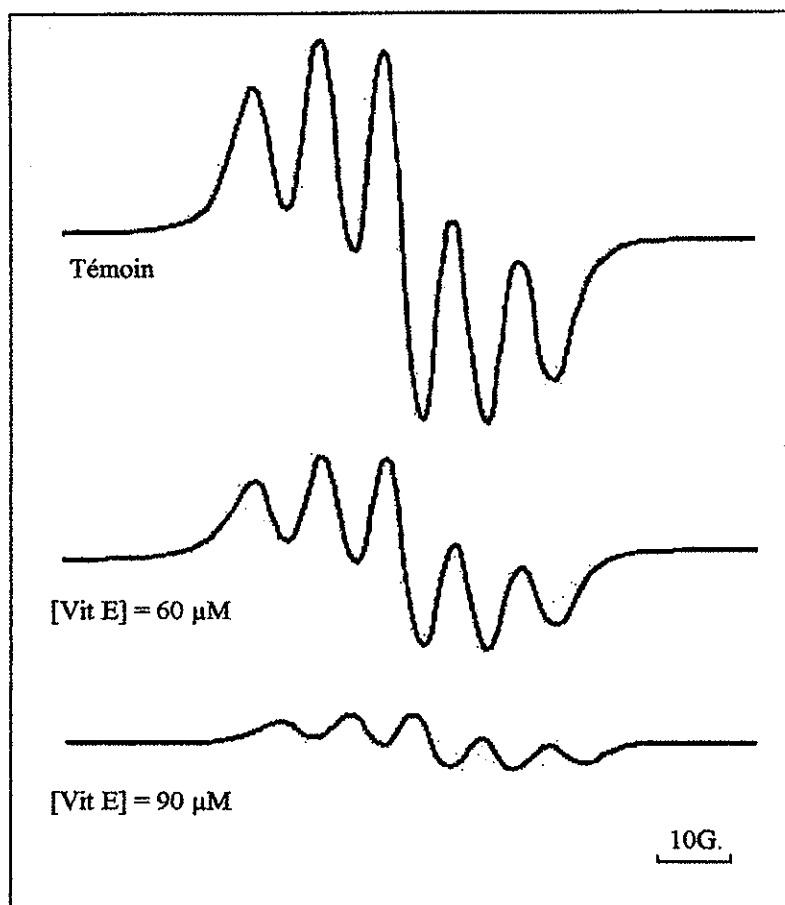


Figure 30 : évolution du spectre RPE du radical DPPH dans l'éthanol en fonction de différentes concentration de vitamine E

Lorsque l'on reproduit les mesures pour différentes concentrations du produit à étudier, nous sommes en mesure de tracer une courbe du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration du produit et donc par la suite de déterminer ce que l'on appelle la CI_{50} , c'est-à-dire la concentration qui permet d'inhiber 50 % du signal de référence.

Le suivi de la réduction du radical DPPH peut être effectué par spectrophotométrie, car cette réaction induit un changement de couleur du violet au jaune, la détection se faisant à une longueur d'onde de 517 nm (Brand-Williams, 1995 ; Soares, 1997 ; Tseng, 1997). C'est une technique qui se révèle assez précise, sans pourtant être aussi sensible que la RPE ; de plus, les quantités de produits nécessaires sont plus importantes.

2.2- Protocole et résultats de la mesure de l'activité antioxydante par RPE

Comme nous l'avons dit précédemment, nous n'avons pu réaliser ici que le test d'activité anti-DPPH.

2.2.1- Protocole

Pour réaliser la réaction, nous mélangeons 50 μ l de solution éthanolique de DPPH ($5 \cdot 10^{-4}$ M, soit 3,94mg de DPPH dans 20ml d'éthanol) et 50 μ l de la solution à tester. Ce mélange est agité durant 5 secondes et ces 100 μ l sont placés dans un microtube qui est ensuite inséré dans la cavité de mesure de la RPE. On effectuera la mesure 3 minutes après la mise en présence des deux produits.

La détermination de la CI_{50} est réalisée après des mesures d'inhibition du signal de référence sur une gamme de concentration du composé à tester (0,015 à 0,500 mg/ml) ; les concentrations massiques sont ici utilisées plutôt que des concentrations molaires, puisque l'argentéane n'a pu être totalement purifié.

Pour les mesures, le spectre de référence du radical DPPH est obtenu grâce au spectromètre ESP300E Brücker. On réalise les différentes mesures avec les paramètres suivants :

- fréquence micro-onde : 9,79 Ghz
- puissance micro-onde : 4,02 mW

- atténuation : 17 dB

2.2.2-Résultats

Nous allons exprimer ici les résultats en CI_{50} : c'est la concentration à laquelle le produit testé inhibe 50 % du spectre de référence du radical DPPH.

Pour cela, comme nous l'avons dit, nous mesurons le pourcentage d'inhibition de ce spectre de référence pour différentes concentrations du produit à tester.

Voici présentés ci-dessous sous forme de tableau et de courbe, ces différents pourcentages d'inhibition :

Concentrations (mg/ml)	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625
% d'inhibition	78,3	69,2	46,1	24,5	15,1	8,0

Tableau 6 : inhibition du signal DPPH en fonction de la concentration

Pourcentage d'inhibition en fonction de concentration

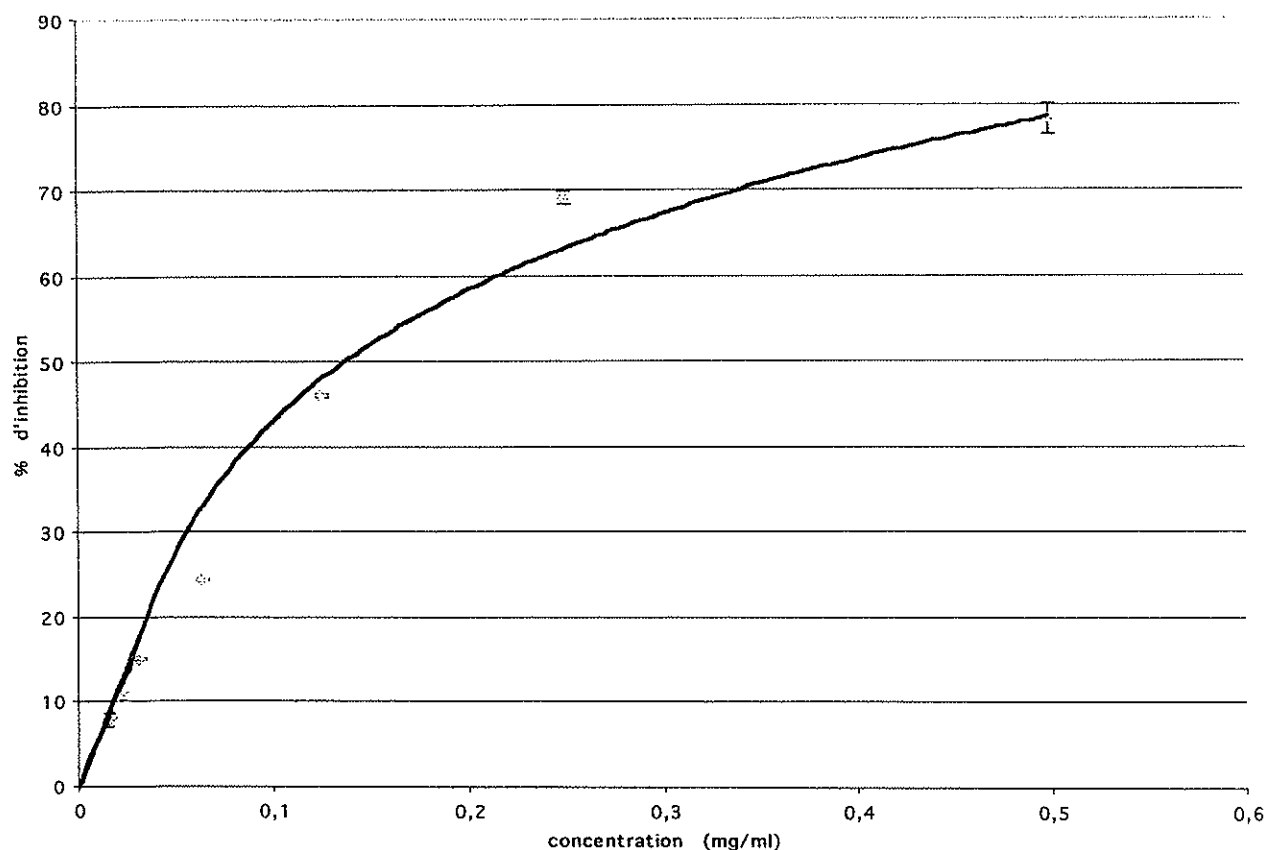


figure 31 : inhibition du signal DPPH en fonction de la concentration

A partir de ces données, on peut dire que la solution traitée que l'on a testé est antioxydante et que sa CI_{50} est de **140 $\mu\text{g/ml}$** .

Pour interpréter ces résultats, nous allons prendre pour référence les CI_{50} de quelques molécules et extrait connus pour leur caractère antioxydant :

- Pycnogenol : 25 $\mu\text{g/ml}$
- Marc de raisin : 17 $\mu\text{g/ml}$
- Quercétine : 12 $\mu\text{g/ml}$
- Vitamine E : 25 $\mu\text{g/ml}$

Nous avons donc cherché à confirmer le potentiel antioxydant de l'argentéane. Nous avons été obligé de nous limiter à la réalisation du test d'activité anti-DPPH, mais les résultats sont cependant très satisfaisants.

En effet, la solution testée est environ 5 fois moins active que la vitamine E, qui reste "la" molécule antioxydante de référence. De plus, comme il est nécessaire de le rappeler, cette solution ne contient environ que 70 % d'argentéane : de ce fait, sans présager de l'activité des impuretés présentes dans l'extrait testé, on peut espérer que l'activité de l'argentéane pur (ou plus pur que celui testé) soit supérieure.

Pour la suite de l'interprétation des résultats, nous allons parler des CI_{50} en mol.l^{-1} (ou M). Pour les deux molécules de référence (vitamine E et quercétine) dont nous avons parlé ici, les CI_{50} sont les suivantes :

- Vitamine E : $5,8.10^{-5}\text{M}$ ($M = 431\text{g/mol.}$)
- Quercétine : $3,97.10^{-5}\text{M}$ ($M = 302,23\text{g/mol.}$)

En ce qui concerne l'argentéane ici testé, à ce niveau, il est nécessaire d'extrapoler : nous devons considérer que la masse testée est à 100 % de l'argentéane. Dans ce cas, on peut définir une CI_{50} à $21,4.10^{-5}\text{M}$ ($M = 654,8\text{g/mol.}$).

En prenant en compte la teneur de la solution testée en argentéane (estimée à 70%), et en négligeant l'activité des autres composés présents dans la solution, la CI_{50} de l'argentéane serait alors de $98\mu\text{g/ml}$, soit $14,98.10^{-5}\text{M}$.

Comme précédemment les résultats sont satisfaisants : on voit que l'argentéane testé est seulement 3 à 4 fois moins actif que respectivement la vitamine E ou la quercétine. Il faut toutefois rester prudent car ici nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses et extrapoler les résultats.

En tout état de cause, et compte tenu du caractère relatif des résultats obtenus, on peut tout de même confirmer que le potentiel antioxydant de l'argentéane reste une réalité et paraît intéressant par rapport aux références dans ce domaine.

CONCLUSION

Le travail que nous avons réalisé avait pour but d'améliorer le protocole d'extraction de l'argentéane à partir du macis de *Myristica argentea* Warb. et de confirmer le potentiel antioxydant de cette molécule.

En ce qui concerne le potentiel d'extraction, le bilan est plutôt satisfaisant. En effet, lors de son étude, Filleur (2001) avait eu besoin en tout de huit étapes de séparation pour parvenir à isoler l'argentéane. Nous sommes arrivés au cours de notre travail à obtenir l'argentéane après seulement quatre étapes. Cependant il faut apporter une nuance à ce résultat : en effet même si nous arrivons à extraire rapidement l'argentéane, il faut rappeler que la pureté que l'on obtient après quatre étapes se situe seulement autour de 70 %. De ce fait, le protocole d'extraction mis au point au travers de ce travail va apparaître comme une base de travail pour obtenir l'argentéane.

De plus, il faut en outre noter que le rendement de cette extraction reste relativement faible : à partir de 85g d'extrait éthéro-pétrolique de macis de *Myristica argentea* Warb., on obtient seulement 13 mg de produit exploitable en fin d'extraction (il est à noter que l'on a perdu environ 5 mg de produit qui a été dégradé lors d'une étape de remise à sec).

Malgré ces quelques nuances, le bilan de cette extraction reste satisfaisant car le protocole établi reste relativement rapide, simple et peu coûteux à mettre en œuvre : il reste toutefois à progresser en terme de rendement, et sur la pureté du produit obtenu.

Pour ce qui est du potentiel antioxydant, les conclusions tirées seront forcément un peu plus limitées. En effet compte-tenu de la pureté de l'argentéane obtenu, nous n'avons pu réaliser que le test d'activité anti-DPPH, et les résultats obtenus ne donnent qu'un ordre de grandeur de cette activité. Cependant, on peut confirmer que l'argentéane possède un

potentiel antioxydant tout à fait intéressant. Malgré la pureté relative du produit testé et sans présager de l'influence des impuretés présentes sur l'activité, l'activité de l'argentéane ici testé se situe à un niveau 4 à 5 cinq fois inférieure à des molécules de référence telles que vitamine E ou quercétine (reconnues pour leur activité antioxydante). Il faut également noter que l'argentéane possède une structure relativement différente de celle des antioxydants classiques (quercétine ou vitamine E), ce qui ajoute à l'originalité de cette molécule et à l'intérêt que l'on peut lui porter.

Les perspectives d'avenir sur ce travail sont donc intéressantes et se scindent en deux parties :

- parvenir à perfectionner le protocole d'extraction pour encore améliorer le rendement et parvenir à un produit final beaucoup plus pur,
- confirmer et définir plus précisément le réel potentiel antioxydant de l'argentéane et, diversifiant les tests réalisés.

L'argentéane de part ses caractéristiques particulières reste donc un sujet d'étude intéressant dans le domaine alimentaire mais aussi thérapeutique, compte-tenu du développement de l'intérêt porté à toutes les molécules antioxydantes dans de possibles traitements de maladies impliquant des radicaux libres.

BIBLIOGRAPHIE

AFNOR

Recueil des normes françaises. Epices, aromates, café, thé, cacao

Normes NF V32-106, NF V32-125, 1^{ère} édition, (1982)

AYRES D.C., LOIKE J.D.

Lignans : chemical, biological and clinical properties

Cambridge University Press ed., UK (1990)

BHATTACHARYYA B., JOHRI B.M.

Flowering plants : taxonomie and phylogenèse

Springer Verlag ed., Narosa publishing House (1998), 129-131

BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.E., BERSET C.

Use of free radical méthode to evaluate antioxidant activity

Lebensm. Wiss. technol. (1995), 28, 25-30

BRITIGAN B.E., COFFMAN T.J., BUETTNER G.R.

Spin tramping evidence for the lack of significant hydroxyl radical production during the respiration burst of human phagocytes using a spin adduct resistant to superoxide-mediated destruction

J. Biol. Chem. (1990), 265 (5), 2650-2656

BRUNETON J.

Phytochimie-Plantes médicinales

Tec & Doc Lavoisier-Londres-Paris-New York, France (1993), 241-254

BRUNETON J.

Pharmacognosie – Phytochimie – Plantes médicinales

Tec & Doc Lavoisier-Londres-Paris-New York, France (1999), 569-570

BUETTNER G.R.

Spin tramping : ESR parameters of spin adducts

Free Rad. Biol. Med. (1987), 3, 259-303

CADENAS E.

Basic mechanisms of antioxidant activity

Biofactors (1997), **6**, 391-397

CALLISTE C.A.

Evaluation des potentiels antioxydant et antiprolifératif de plantes médicinales. Valorisation des fractions de la feuille de châtaigner

Thèse de doctorat d'université, Limoges : Université de Limoges (2001), 235p

CEROU S.

Radicaux libres et pathologie humaine : actualisation et perspectives d'avenir

Thèse d'exercice-Pharmacie, Limoges : Université de Limoges (1994), 188p

COUTOIS M., MAUPOIL V., FANTINI E., DUROT I. JAVOUHEY-DONZEL A., ATHIAS P., GRINBERG A., ROCHETTE L.

Correlation between direct ESR spectroscopic measurements and electromechanical and biochemical assessment of exogenous free radical injury in isolated rat cardiac myocytes

Free Radic. Biol. Med. (1998), **24** (1), 121-131

CRETE P.

Précis de botanique, tome II

Masson ed., Paris, (1985)

DOOMS GOOSSENS A., DUBELLOU R., DEGREEF H.

Contact and systematic contact type dermatitis to spices

dermato. Clin. (1990), **8** (1), 89-93

DORVAULT F.

L'Officine

Editions Vigot (1978), XX^e (ed), 926-927

DHULEY J.N., NAIK S.R.

Protective effect of Rhinax, a herbal formulation against Cc14 induced
J. Ethnopharmacol. (1997), **56** (2), 159-164

FILLEUR F.

Etude phytochimique et structure de lignoïdes isolés du macis de *Myristica argentea* Warb
(Myristicacées)
Thèse de doctorat d'université, Limoges : Université de Limoges (2001), 228p

FINKELSTEIN E., ROSEN G.M., RAUCKMAN E.

Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxyde spin-trapped adducts
Mol. Pharmacol. (1981), **21**, 262-265

GAO Z., HUANG K., YANG X., XU H.

Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoides extracted from the radix of
Scutellaria baicalensis Georgi
Biochem. Biophys. Acta. (1999), **1472**, 643-650

GOTTLIEB O.R.

Lignans and neolignans
Rev. Latinoamer. De Quimica (1974), **5**, 1-11

GOTTLIEB O.R.

In new naturel products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical
activity
Wagner H. et Wolff P. edition, Springer Verlag, Berlin (1997), 227

GOTTLIEB O.R.

Neolignans
Prog. Chem. Org. Nat. Prod. (1978), **35**, 1-72

GOTTLIEB O.R.

Chemical studies on médicinal myristicaceae from Amazonia

GUPTA S., YADAVA J.N.S., MEHROTA R., TANDON J.S.

Profil anti diarrhéique d'un extrait et de quelques fractions de *Myristica fragrans* sur l'action des entérotoxines induites par *Escherichia coli*

Int. J. Pharmacogn. (1992), **30** (3), 179-183

HALLIWELL B., AESCHBACH R., LOLIGER J., ARUOMA O.I.

The characterization of antioxidants

Food. Chem. Toxicol. (1995), **33** (7), 601-617

HALLIWELL B.

Antioxidants : The basics – What they are and how to evaluate them

Adv. Pharmacol (1997), **38**, 3-20

HALLIWELL B.

Free radicals and antioxidants : a personal view

Nutr. Rev. (1994), **52** (8), 253-265

HALLIWELL B.

Mechanisms involved in the generation of the free radicals

pathol.. Biol. (1994), **44** (1), 6-13

HALLIWELL B.

The antioxidant paradox

Lancet (2000), **355**, 1179-1180

HOLMSTEDT B., LINGREN J.E.

Chemical constituents and pharmacology of south americana snuff

Public Health Serv. Publ. (1967), **1645**, 339-373

HUANG S.H., LEONARD L., SHI X., GOINS M.R., VALLYATHAN V.

Antioxidant activity of lazaroïd (U-754112E) and its protective effects against crystalline silica-induced cytotoxicity

Free Radic. Biol. Med. (1998), **24** (4), 529-536

HUSSAIN S.P., RAO A.R.

Chemopreventive action of mace (*Myristica fragrans* Houtt) on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix in mice

Cancer Letters (1991), **56** (3), 231-234

JANNU L.N., HUSSAIN S.P., RAO A.R.

Chemopreventive action of mace on DMBA induced papillomagenesis in the skin of mice

Cancer Letters (1991), **56** (1), 59-63

KONG IN VILLIERS S.

Traité des altérations et des falsifications des substances alimentaires

Doin O. Edn. (1900), 346-352

KUMARI M.V.R.

Modulatory influences of mace on hepatic detoxification systems and bone marrow genotoxicity in male Swiss albinos mice

Nutr. Res. (1992), **12** (3), 385-394

LAEKMAN G.M., VAN HOOFF L.M., HAEMER S.A., VAN BERG D.A.R., HERMAN A.G., VLIETINCK A.J.

Eugenol a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation

Phytother. Res. (1990), **4** (3), 90-96

LECLERC J.

Des plantes médicinales de l'Ile de la Réunion et de leur application à le thérapeutique

Ozouk, Saint Denis, Réunion (1864)

LE COINTE P.

Amazonia brasileira, Arvores e plantas uteis

Editoria Nacional, Sao Paulo, 2nd ed. (1947), **3**, 480-481

LUO G.M., QI D.H., ZHENG Y.G., MU Y., YAN G.L., YANG T.S., SHEN J.C.

ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron

FEBS Letters (2001), **492**, 29-32

Mc RAEW.D., TOWERS G.H.N.

Biological activities of lignans

Phytochemistry (1984), **26**, 1207-1220

MASSANET G.M., PANDO E., RODRIGUEZ-LUIS F., ZUBIA E.

Lignans : a review

Fitoterapia (1989), **60** (1), 3-35

MOTTLEY C., CONNOR H.D., MASSON R.P.

[17O]oxygen hyper fine structure for the hydroxyl and superoxide radical adducts of the spin traps DMPO, PBN and 4-PBN

Biochem. Biophys. Res. Comm. (1986), **141** (2), 622-628

NODA Y., ENZAI K., MORI A., KOHNO M., SHINMEI M., PACKER L.

Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system

Biochem. Mol. Biol. Int. (1997), **42** (1), 35-44

OGATA M., HOSHI M., URANO S. ENDO T.

Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds

Chem ; Pharm. Bull. (2000), **48** (10), 1467-1469

PARK S., LEE D.K., YANG C.H.

Inhibition of fos-jun DNA complex formation by DHGA in vitro cytotoxic effects on cancer cells

Cancers Letters (1998), **127**, 23-28

PERRIER DE LA BATHIE H.

Flore de Madagascar et des Comores : Myristicacées

Typographie Firmin-Didot et Cie ed. (1952), 1-13

POLETTI A.

Fleurs et plantes médicinales

Delachaux et Niestlé ed. (1982), Tome 2

RAM A., LAURIA P., GUPTA R., SHARMA V.N.

Hypolipidoemic effect of *Myristica fragrans* fruit

J. Ethnopharmacol. (1996), **55** (1), 49-53

RASHEED A., LAEKMAN G.M. VLIETINCK A.J., JANSSENS J.

Pharmacological influence of nutmeg and nutmeg constituents on rabbit platelet function

Planta médica (1984), **50** (3), 222-226

RIMBACH G., HOHLER D., FISCHER A., ROY S., VIRGILI F., PALLAUF J., PACKER L

Methods to assess free radicals and antioxidative stress in biological systems

Arch. Anim. Nutr. (1999), **52**, 203-222

SCHULTES R.E.

A new narcotic snuff from the northwest Amazon

Botanical Museum Leaflets, Harvard University (1954), **16**, 241-260

SCHULTES R.E.

De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. V. Virola as orally administered hallucinogen

Botanical Museum Leaflets, Harvard University (1969), **22**, 229-240

SCHULTES R.E., HOLMSTEDT B.

De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. VIII. Miscellaneous notes on Myristicaceous plants of South America

Llodia (1971), **34**, 61-78

SHERRY C.I., RAY L.E., HERRON R.E.

The pharmacological effects of a lignoin extract of *numa* (*M. fragrans*)

Int. J. Crud. Drug. Res. (1982), **20**, 37-41

SHERRY C.I., ERDELT D.R.

Nutmeg oil : effect on acuta amphetamine

Int. J. Crud. Res. (1982), **20**, 89-92

SINCLAIR J.

The genus *Myristica* in Malesia and outside Malesia

The Garden's Bulletin of Singapore (1968), 1-537

SOARES J.R., DINIS T.C.P., CUNHA A.P., ALMEIDA L.M.

Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*

Free. Rad. Res. (1997), 496-478

TSENG T.H., KAO E.S., CHU C.Y., CHOU F.P. LIN WHU H.W., WANG C.J.

Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hépatocytes

Food. Chem. Toxicol. (1997), **35**, 1159-1164

VALNET J.

Aromathérapie

Maloine SA ed., Paris (1974), 6è ed., 232-239

VAN DEN AKKER T.W., ROESYANTO MAHADI I.D.

Contact allergy with spices

Contact Dermatitis (1990), **22** (5), 267-272

VAN HELLEMONT

Compendium de phytothérapie

APB Service Scientifique ed., (1986), 258-259

VIAL B.

Botanique végétale

Similia ed. (1998)

WARBURG O.

Monographie der Myristicaceen

Nova Acta Acad. Leop-Carol. (1897), **68**, 1-680

WILLIS J.C.

A dictionary of flowering plants and ferns

Cambridge University Press (1973), 771-778

ZAVA D.T., Mc GUIRE W.L.

Androgen action through estrogen receptor in a human breast cancer cell line

Endocrinol. (1978), **103**, 624-631

ZAVA D., DOLLBAUM C., BLEN M.

Estrogen and progestin bioactivity of foods, herbs and spices

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1998), **217** (3), 369-378

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 343

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

Myristica argentea Warb. contient une molécule isolée récemment, l'argentéane, qui présente un potentiel antioxydant tout à fait intéressant.

L'activité antioxydante de diverses molécules est aujourd'hui mise à profit pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres.

L'extraction de l'argentéane à partir du macis restait longue et difficile. Nous avons donc tenté de proposer un protocole simplifié : de huit étapes avant notre étude, nous avons ramené le nombre d'étapes nécessaires à quatre, pour obtenir un argentéane malheureusement encore insuffisamment purifié.

Pour tester l'activité antioxydante, nous avons réalisé un test sur le radical DPPH. L'argentéane possède bien un réel potentiel antioxydant (intéressant par rapport à la vitamine E prise pour référence), mais il nous a été difficile de donner une valeur précise, compte-tenu de la teneur en argentéane de l'extrait testé.

En somme, même si nos résultats sont satisfaisants, le présent travail reste une base de travail pour l'avenir : il sera nécessaire de finaliser le protocole d'extraction et de préciser l'activité antioxydante.

MOTS-CLES

Myristica argentea, Argentéane, Extraction, Antioxydant, Chromatographies, DPPH.

SPECIALITE DOCTORALE

Pharmacie

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR ET DU LABORATOIRE

Université de Limoges, Laboratoire de Biophysique, UFR de Pharmacie, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges Cedex, France