

Thèse de doctorat de
l'Université de la Polynésie française

École doctorale du Pacifique (ED-469)

Présentée par
Fanny ROSSI

Pour obtenir le grade de docteur en Sciences de l'Université de la Polynésie française

Discipline : Chimie organique, minérale et industrielle
Spécialité : Chimie analytique

Vers une valorisation industrielle d'un remède traditionnel pour le traitement des intoxications ciguatériques

Présentée et soutenue publiquement le 23 avril 2014,
devant le jury composé de :

John T. Arnason	PR, Université d'Ottawa, Canada	Rapporteur et Président du jury
Michel Sauvain	DR1, UMR152 IRD, Pérou	Rapporteur
Cécile Debitus	DR2, UMR241 IRD, Polynésie française	Examinatrice
Priscille T. Frogier	Délégation à la recherche, Polynésie française	Examinatrice
Laurent Richert	Pacific Biotech, Polynésie française	Examineur
Mireille Chinain	Chercheur, UMR241 ILM, Polynésie française	Co-directrice de thèse
Nabila Gaertner-Mazouni	PR, UMR241 UPF, Polynésie française	Directrice de thèse

Laboratoires d'accueil :

UMR 241 « Écosystèmes insulaires océaniques » et

UMR 152 « Pharmacochimie et pharmacologie pour le développement »

dont les organismes suivants :

Institut de Recherche pour le Développement

BP 529 – 98713 Papeete

Tahiti – Polynésie française



Université Paul Sabatier

118 route de Narbonne – 31062 Toulouse cedex 9

France



Institut Louis Malardé

BP 30 – 98716 Papeete

Tahiti – Polynésie française



Université de la Polynésie française

BP 6570 – 98702 Faa'a

Tahiti – Polynésie française



Entreprise d'accueil :

Pacific Biotech

BP 140 289 - 98701 Arue

Tahiti - Polynésie française



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement les membres du jury d'avoir bien voulu juger ces travaux de recherche :

John Arnason et Michel Sauvain pour me faire l'honneur d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse,

Cécile Debitus et Priscille Frogier pour avoir accepté d'être examinatrices de cette thèse.

Je souhaite ensuite remercier mes directeurs et encadrant de thèse :

Dominique Laurent, sans qui ces travaux n'auraient pas été possibles et qui m'a permis de réaliser une thèse à l'interface de la chimie et de la biologie, comme je le souhaitais. Merci pour ta confiance lors de l'élaboration de ce projet et ce jusqu'à sa réalisation. Ce fut une belle aventure démarrée en 2009, lors de mon stage de M2R puis poursuivie par un VCAT dans ton équipe en Nouvelle-Calédonie, qui malheureusement s'est arrêtée prématurément avant la fin de ma thèse.

Mireille Chinain pour avoir pris le relais, au pied levé, dans la direction de ma thèse à partir de la 3^{ième} année, qui de surcroît est la moins évidente à gérer, et Nabila Gaertner-Mazouni pour m'avoir suivie et soutenue durant ces 3 années.

Laurent Richert, qui a su se rendre disponible, et m'a apporté sa vision de l'entreprise et de la recherche appliquée durant ces travaux.

Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans le soutien financier de l'ANRT et de Pacific Biotech, avec l'attribution d'une bourse CIFRE, et d'un contrat de projets État-Pays labellisé par Tahiti Fa'ahotu. Merci à Bernard Costa d'avoir cru en ce projet et de m'avoir accueillie au sein de Pacific Biotech.

L'école doctorale du Pacifique a aussi contribué au financement de ces travaux de thèse en m'aidant à participer à un congrès international en Autriche.

J'adresse aussi mes chaleureux remerciements à Mohamed Haddad, qui me suit depuis mon M2R et qui était membre de mon comité de thèse. Merci pour tes conseils et ton soutien.

Je suis particulièrement reconnaissante envers Mélanie Roué, récemment devenue « chef », qui entre deux missions et ses propres travaux de recherche, a toujours pris le temps d'écouter mes questionnements et m'a soutenue jusqu'à la fin de la rédaction de ce manuscrit. Merci pour tes conseils scientifiques et ton amitié.

Je remercie l'UMR 152 de Toulouse, les stagiaires et doctorants pour leur accueil lors de mon stage, les permanents, plus particulièrement Nicolas Fabre et

Pierre Péro pour leur temps et leur aide pour les analyses CL-SM/SM, et Valérie Jullian pour la synthèse du CADPE.

Merci à Benoit Stoll pour avoir fait la mission à Tetiaroa avec moi, à la Tetiaroa Society pour nous avoir autorisés à échantillonner là-bas et à Nicolas Leclerc pour nous avoir transporté jusqu'au motu Oroatera. Merci à Jean-Claude Gaertner pour son aide sur le protocole d'échantillonnage et le traitement statistique des données.

Merci à Stéphane Mengant pour son travail consciencieux sur les analyses CL-SM/SM.

Merci à Nady Braidy d'avoir repris avec efficacité les manip sur neurones humains et à Gilles Guillemin pour cette collaboration.

Je souhaite également remercier

toute l'équipe du LMT de l'ILM, Ralph Pawlowiez, Taiana Darius, Taïna Revel, Philippe Cruchet, André Ung et Clémence Gatti. Merci à Taiana et Taïna pour les analyses RBA et à Philippe pour m'avoir formée sur sa CLHP ;

et tout le personnel du centre IRD d'Arue des différents organismes, les permanents et ceux de passage pour avoir contribué à la bonne ambiance de travail et fait que ces 3 années sont passées en un éclair. Merci en particulier à Sylvain Petek pour avoir été toujours disponible et avoir assuré la bonne marche du labo et Roger Thery pour m'avoir « prêté » son pied de tahinu. Merci à Charlotte Leman-Loubière pour ses travaux de stage.

Une pensée particulière pour

Élise Lacoste et Nicolas Martin, les premiers doctorants que j'ai rencontré à Tahiti, qui débutaient aussi leur thèse à quelques jours près, et avec qui j'ai successivement partagé un bureau et de nombreux litres de café.

Tepoerau Maï et Mareva Leu, les putupus, que de bons moments passés dans ce bureau, à travailler ensemble mais aussi à rire... et Vaimiti Dubousquet, notre voisine de bureau. Bon courage pour la suite !

tous les doctorants de l'UPF, pour les bières du jeudi, les roulottes, les cinémas en plein air et les soirées. J'espère que DocTa continuera longtemps après notre départ et qu'elle permettra aux futurs doctorants de l'UPF de se sentir entourés.

Enfin, j'aimerais profondément remercier ma famille, notamment mes parents, pour leur soutien sans faille et leur amour, mes amis fidèles malgré la distance géographique depuis quelques années, pour les conversations mails ou skype réconfortantes et encourageantes, et mon chéri, qui a su m'accompagner tout au long de cette aventure.

Sommaire

<i>Acronymes et abréviations</i>	9
<i>Liste des figures</i>	11
<i>Liste des tableaux</i>	15
<i>Liste des annexes</i>	16
Avant-propos	17
Chapitre 1 État de l'art	19
1. La ciguatéra	20
1.1. Historique	20
1.2. Incidence et répartition	20
1.3. Les toxines responsables de l'intoxication et les vecteurs	23
1.4. Les mécanismes d'action des toxines	27
1.5. Symptômes et syndrome chronique	30
1.6. Impacts socio-économiques	32
1.7. Conclusion	33
2. Les traitements anticiguatériques	33
2.1. Dans la médecine occidentale	34
2.1.1. Les traitements symptomatiques	34
2.1.2. Un produit testé par essais cliniques : le mannitol	35
2.1.3. Les pistes prometteuses : antagonistes et anticorps des toxines	36
2.1.3.1. Le brévénal et les dérivés de la brévétotoxine	36
2.1.3.2. Le gambiéról	38
2.1.3.3. Un inhibiteur de maïtotoxines	40
2.1.3.4. Les anticorps	40
2.2. Dans la médecine traditionnelle	41
2.3. Conclusion	43
3. <i>Heliotropium foertherianum</i> Diane & Hilger	43
3.1. Botanique	43
3.2. Aires de répartition	45
3.3. Écologie	45
3.4. Utilisations traditionnelles	47
3.5. Molécules identifiées	48
3.6. Activités biologiques	50
3.7. Données sur la sous-famille des Heliotropiacées et le genre <i>Heliotropium</i>	50
3.8. Conclusion	54
4. L'acide rosmarinique	54
4.1. Généralités	54
4.2. Biosynthèse dans la plante	55
4.3. Activités biologiques	57
4.4. Détection et quantification	59
4.5. Production et utilisation dans le commerce	61
4.6. Conclusion	63

5.	Les alcaloïdes pyrrolizidiniques	63
5.1.	Généralités	63
5.2.	Biosynthèse dans la plante	64
5.3.	Activités biologiques	65
5.3.1.	Bénéfice et toxicité	65
5.3.2.	Manifestations de la toxicité	66
5.3.3.	Métabolisation	67
5.3.4.	Spécificités structurales et toxicité	68
5.4.	Réglementation	70
5.5.	Méthodes d'identification et de quantification	71
5.5.1.	Extraction et purification	71
5.5.2.	Détection par spectroscopie UV-visible	72
5.5.3.	Chromatographie sur couche mince	72
5.5.4.	Chromatographie gazeuse et liquide	72
5.6.	Conclusion	73
6.	Réglementation pour la commercialisation des produits à base de plantes	74
6.1.	Notions générales de médicaments et de compléments alimentaires	74
6.1.1.	Les médicaments à base de plantes	74
6.1.2.	Les compléments alimentaires à base de plantes	76
6.2.	Différences de réglementation suivant les régions du monde	77
6.2.1.	Amérique du nord	77
6.2.2.	Europe	79
6.2.3.	Région Pacifique ouest et Polynésie française	80
6.3.	Conclusion	81
	Objectifs	82
	Chapitre 2 Évaluation de l'activité biologique d'<i>H. foertherianum</i> face aux ciguatoxines	84
1.	Introduction	85
2.	Test de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris	86
2.1.	Principe du test	86
2.2.	Matériels et méthodes	87
2.2.1.	Produits utilisés	87
2.2.2.	Entretien des cultures cellulaires et ensemencement	88
2.2.3.	Mise en place des tests de cytotoxicité	88
2.2.4.	Effet des produits sur la mortalité des Neuro-2a induite par la P-CTX-1B	88
2.2.5.	Mesure de la viabilité cellulaire	89
2.2.5.1.	Test au MTT	89
2.2.5.2.	Test au rouge neutre	89
2.2.5.3.	Test au LDH	89
2.2.6.	Analyses statistiques	90
2.3.	Résultats	90
2.3.1.	Effet de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i> et de l'AR sur la cytotoxicité	90
2.3.2.	Relation structure-activité des dérivés de l'AR	95
3.	Test d'interaction ligand-récepteur	96
3.1.	Principe du test	96
3.2.	Matériels et méthodes	97
3.2.1.	Produits utilisés	97

3.2.2.	Protocole	97
3.3.	Résultats	98
3.3.1.	Affinité d'extraits d' <i>H. foertherianum</i> et de l'AR au site 5 des CSDPs	98
3.3.2.	Relation structure-activité pour l'affinité de dérivés de l'AR au site 5 des CSDPs	99
4.	Discussion	102
5.	Conclusion	105
Chapitre 3 Caractérisation chimique de l'extrait de feuilles d'<i>H. foertherianum</i>		106
1.	Introduction	107
2.	Matériels et méthodes	107
2.1.	Préparation des extraits de plantes	107
2.2.	Criblage rapide de la présence d'AR et d'AC dans les extraits	110
2.3.	Méthode d'analyse des extraits par CLHP-DAD	110
2.4.	Validation de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'AR et de l'AC dans les extraits	111
2.4.1.	Précision de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'AR et de l'AC dans les extraits	111
2.4.2.	Limites de détection et de quantification de l'AR et de l'AC	112
2.4.3.	Exactitude de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'AR et de l'AC dans les extraits	112
2.5.	Recherche des alcaloïdes pyrrolizidiniques	112
2.5.1.	Détection aux réactifs d'Ehrlich et de Dragendorff	113
2.5.2.	Préparation des extraits	113
2.5.3.	Analyse par CLHP-SM/SM	114
2.6.	Composition chimique globale	115
2.6.1.	Préparation de l'extrait	115
2.6.2.	Analyse par CLHP-SM/SM	116
3.	Résultats	117
3.1.	Rendement d'extraction	117
3.2.	Validation de la méthode de dosage de l'AR et de l'AC par CLHP-DAD	117
3.3.	Comparaison géographique préliminaire sur l'ensemble de la Polynésie française	121
3.4.	Recherche des alcaloïdes pyrrolizidiniques	122
3.5.	Composition chimique globale	123
4.	Discussion	130
5.	Conclusion	134
Chapitre 4 Détermination des conditions optimales de production d'un extrait en vue d'une valorisation industrielle		135
1.	Introduction	136
2.	Disponibilité de la ressource	136
3.	Détermination de zones de collecte potentielles au sein d'une île témoin	137
3.1.	Introduction	137
3.2.	Matériels et méthodes	139
3.2.1.	Plan d'échantillonnage	139
3.2.2.	Dosage par CLHP-DAD de l'AR et de l'AC	140
3.2.3.	Analyse de l'empreinte chimique des extraits d' <i>H. foertherianum</i>	141
3.2.4.	Analyse de la composition chimique globale	141
3.2.5.	Recherche de la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques	142
3.2.6.	Analyse de quelques ions des extraits d' <i>H. foertherianum</i>	142
3.2.7.	Test sur neuroblastomes de souris	142

3.3.	Résultats	143
3.3.1.	Comparaison des teneurs en AR et en AC en fonction des modalités	143
3.3.2.	Composition chimique globale	144
4.	Étude des paramètres de collecte, d'extraction et de conservation des feuilles et des extraits	147
4.1.	Introduction	147
4.2.	Matériels et méthodes	148
4.3.	Résultats	149
4.3.1.	Suivi saisonnier des teneurs en AR et en AC des extraits	149
4.3.2.	Maturation et dimension des feuilles à la collecte	150
4.3.3.	Conservation du matériel végétal avant extraction	151
4.3.4.	Comparaison des méthodes d'extraction	153
4.3.5.	Conservation du filtrat et du lyophilisat	154
5.	Discussion	156
6.	Étapes envisagées pour la production d'extraits d' <i>H. foertherianum</i>	159
7.	Conclusion	163
	Conclusion générale et perspectives	164
	Références bibliographiques	167
	Avant-propos et chap. 1 État de l'art	167
	Chap. 2 Évaluation biologique de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i> face aux ciguatoxines	188
	Chap. 3 Caractérisation chimique de l'extrait de feuilles d' <i>H. foertherianum</i>	190
	Chap. 4 Détermination des conditions optimales de production d'un extrait en vue d'une valorisation industrielle	193
	Annexes	197
	<i>Liste des publications et communications scientifiques</i>	<i>231</i>
	<i>Résumé et Abstract</i>	<i>232</i>

Acronymes et abréviations

AC : acide caféique

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANOVA : analyse de variance

ANSM : agence nationale de sécurité du médicament, anciennement AFSSAPS

ANZFA : *Australia New Zealand food authority*

APs : alcaloïdes pyrrolizidiniques

AR : acide rosmarinique

ATCC : *American type culture collection*

CADPE : ester caféate de dihydroxyphénéthyle

CAPE : ester caféate de phénéthyle

CCM : chromatographie sur couche mince

CG : chromatographie en phase gazeuse

Cl₅₀ : concentration pour laquelle 50 % de la réponse est inhibée

CIFRE : convention industrielle de formation pour la recherche

CLHP : chromatographie liquide à haute pression (-DAD : détecteurs à barrettes de diodes)

cpm : coup par minute

CSDP : canal sodium dépendant du potentiel

CTXs : ciguatoxines, P-CTXs : du Pacifique, C-CTXs : des Caraïbes : I-CTXs : de l'océan Indien

CV : coefficient de variation

DDCSDP : direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations

DGCCRF : direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

DL₅₀ : dose létale médiane, dose causant la mort de 50 % des animaux testés

DSHEA : *dietary supplement health and education act*

EC : écart-type

EFSA : autorité européenne de sécurité des aliments

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMA : agence européenne des médicaments

ESCAP : *european scientific cooperative on phytotherapy*

ESI : *electrospray ionization* ou électronébuliseur

FDA : *food and drug administration*

GEPASUD : laboratoire de géosciences du pacifique sud

IC95 % : intervalle de confiance à 95 %

ICH : *international conference on harmonization*

ILM : institut Louis Malardé

iNOS : *oxyde nitrique synthase inductible*

InsP3 : inositol triphosphate

IRD : institut de recherche pour le développement

ISPF : institut de statistique de Polynésie française

IUPAC : *international union of pure and applied chemistry*

LD : limites de détection

LDH : lactate déshydrogénase

LPS : lipopolysaccharide

LQ : limites de quantification

LR/lc : faible risque/faible préoccupation

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

NADH, NAD : nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase

NL : abrité des vents et côté lagon

NO : abrité des vents et côté océan

OV : ouabaïne et vératridine

OMS : organisation mondiale de la santé

PbTx : brévéttoxine, [³H]PbTx-3 : brévéttoxine-3 tritiée

PICTs : *Pacific island countries and territories* ou pays et territoires insulaires du Pacifique

PLE : extraction liquide sous pression

qPCR : réaction en chaîne de polymérase quantitative

R² : coefficient de corrélation

RMN : résonance magnétique nucléaire

RPMI 1640 : *Roswell park memorial institute medium*

SCX : échangeur de cations forts

SFE : extraction en fluide supercritique

SM : spectromètre de masse et SM/SM : spectromètre de masse en tandem

SPE : extraction en phase solide

TIC : courant ionique total

TILR : test d'interaction ligand récepteur ou RBA : *radiobinding assay* ou test de radio-ligand récepteur

Tr : temps de rétention

UAE : extraction assistée par ultrasons

UE : Union européenne

UICN : Union internationale pour la conservation de la nature

UMR : unité mixte de recherche

UPF : Université de la Polynésie française

UPS : Université Paul Sabatier de Toulouse

UV : ultra-violet

WL : exposé aux vents et côté lagon

WO : exposé aux vents et côté océan

Liste des figures

Figure 1 : Carte de la répartition de la ciguatéra dans le monde.....	22
Figure 2 : Cellule du dinoflagellé <i>Gambierdiscus spp.</i>	23
Figure 3 : Macro-algues du genre <i>Turbinaria</i> (A) et <i>Halimeda</i> (B)	24
Figure 4 : Transfert des ciguatoxines dans la chaîne alimentaire	25
Figure 5 : Cyanobactéries marines benthiques du genre <i>Hydrocoleum</i>	25
Figure 6 : Structure chimique de ciguatoxines du Pacifique (P-CTXs).....	27
Figure 7 : Structure chimique d'une ciguatoxine des Caraïbes (C-CTX-1).....	27
Figure 8 : Structure moléculaire et sites récepteur de neurotoxines du canal sodium de la sous-unité α	28
Figure 9 : Sites et modes d'action des ciguatoxines.....	30
Figure 10 : Apparition et évolution des symptômes de la ciguatéra	31
Figure 11 : Structure chimique du mannitol.	35
Figure 12 : Structure chimique de la brevétoxine-3.....	37
Figure 13 : Structure chimique du brevénal.....	37
Figure 14 : Structure chimique du β -naphtoyl-brevétoxine.....	38
Figure 15 : Structure chimique du α -naphtoyl-brevétoxine.	38
Figure 16 : Structure chimique du gambiéról.....	38
Figure 17 : Structure chimique de l'acide gambiérique A.	39
Figure 18 : Structure chimique de la yessotoxine.	39
Figure 19 : Structure chimique d'un inhibiteur de maïtotoxine.....	40
Figure 20 : Structure chimique d'une maïtotoxine.	40
Figure 21 : Structure chimique de la CTX-3C et de ses haptènes.....	41
Figure 22 : Croquis botanique d' <i>H. foertherianum</i>	44
Figure 23 : Échantillon de l'herbier de la Polynésie française (A) et individu correspondant (B).....	45
Figure 24 : Coupe schématique d'un <i>motu</i> d'atoll des Tuamotu	46
Figure 25 : Les acides phénoliques d' <i>H. foertherianum</i>	48
Figure 26 : Les triterpènes d' <i>H. foertherianum</i>	49
Figure 27 : Les alcaloïdes pyrrolizidiniques d' <i>H. foertherianum</i>	49
Figure 28 : Les flavonoïdes d' <i>H. foertherianum</i>	49
Figure 29 : Structure chimique de l'acide rosmarinique.	55
Figure 30 : Voie biosynthétique proposée par Petersen et al. (2009) pour l'acide rosmarinique.....	56
Figure 31 : Possible devenir métabolique d'acide rosmarinique (AR) contenu dans un extrait de périlla et ingéré par l'humain.	58
Figure 32 : Structure de base des alcaloïdes pyrrolizidiniques : noyau pyrrolizidine.	63
Figure 33 : Base rétronécine des alcaloïdes pyrrolizidiniques.	63
Figure 34 : Précurseurs des alcaloïdes pyrrolizidiniques.....	65

Figure 35 : Exemples de voies de métabolisation des APs de type rétronécine.....	68
Figure 36 : Nécessités structurales pour la toxicité des APs	70
Figure 37 : Schéma de fragmentation d'APs de type rétronécine	73
Figure 38 : Structure chimique des composés utilisés dans l'étude de relation structure-activité.....	86
Figure 39 : Formation de formazan par le biais de la production de NADH induite par le LDH.	87
Figure 40 : Effet protecteur de (A) l'extrait de feuilles sénescences d' <i>H. foertherianum</i> de Tubuai et de (B) l'acide rosmarinique contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a.....	91
Figure 41 : Cytotoxicité de (A) l'extrait de feuilles sénescences d' <i>H. foertherianum</i> de Tubuai et de (B) l'acide rosmarinique sur les cellules Neuro-2a.	92
Figure 42 : Effet protecteur de l'acide rosmarinique contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a mesuré (A) par le test au rouge neutre et (B) par le test au LDH.	93
Figure 43 : Effet de l'extrait de feuilles sénescences d' <i>H. foertherianum</i> de Raivavae contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a.	94
Figure 44 : Effet protecteur de l'acide rosmarinique contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a mesuré par le test au MTT, selon différents moments d'ajout de l'acide rosmarinique par rapport à la P-CTX-1B.	95
Figure 45 : Effet des dérivés de l'acide rosmarinique contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a.	96
Figure 46 : Phénomène de compétition intervenant dans le test d'interaction ligand-récepteur.....	97
Figure 47 : Courbes d'inhibition de la [³ H]PbTx-3, au site 5 des canaux sodium, par deux extraits de feuilles sénescences d' <i>H. foertherianum</i> et par l'acide rosmarinique, déterminées par le TILR.	99
Figure 48 : Courbes d'inhibition de la [³ H]PbTx-3, au site 5 des canaux sodium, par l'acide rosmarinique et ses dérivés, déterminées par le TILR.....	100
Figure 49 : Courbes d'inhibition de la [³ H]PbTx-3, au site 5 des canaux sodium, par la P-CTX-1B et par l'acide rosmarinique ajouté à deux concentrations différentes à la P-CTX-1B, déterminées par le TILR.	101
Figure 50 : Courbes d'inhibition de la [³ H]PbTx-3 au site 5 des canaux sodium par l'acide rosmarinique ajouté à différents moments et déterminées par le TILR.	101
Figure 51 : Îles de Polynésie française et lieux de collecte (triangles rouges) des feuilles d' <i>H. foertherianum</i>	108
Figure 52 : Feuilles sénescences d' <i>H. foertherianum</i>	108
Figure 53 : Protocole de préparation des extraits d' <i>H. foertherianum</i> pour l'analyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques.	114
Figure 54 : Protocole de préparation d'un extrait d' <i>H. foertherianum</i> pour l'étude de sa composition chimique globale.	116
Figure 55 : Courbes de calibration de standards d'acide rosmarinique et d'acide caféique	118
Figure 56 : Chromatogramme d'un extrait d' <i>H. foertherianum</i> (HfT111) à 320 nm, temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics.	119
Figure 57 : Chromatogramme de standards d'acide rosmarinique (rouge) et d'acide caféique (bleu) à 320 nm, temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics.....	119

Figure 58 : Différence de teneurs en acide rosmarinique, déterminées par CLHP-DAD, suivant les îles de collecte des archipels de la Société (A), des Australes et Gambier (B) et des Tuamotu (C) et suivant les quatre archipels de collecte (D), la Société (n = 10), les Tuamotu (n = 16) et les Australes et Gambier (n = 5).	121
Figure 59 : Différence de teneurs en acide caféique, déterminées par CLHP-DAD, suivant les îles de collecte des archipels de la Société (A), des Australes et Gambier (B) et des Tuamotu (C) et suivant les quatre archipels de collecte (D), la Société (n = 10), les Tuamotu (n = 16) et les Australes et Gambier (n = 5).	122
Figure 60 : Spectres de masse SM et SM ² du standard de l'indicine, obtenu en ESI et mode positif. 123	
Figure 61 : Profil chromatographique de la fraction 1 de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i> obtenu par CLHP-DAD à 280 nm (vert), temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics, superposé au courant total ionique obtenu par spectrométrie de masse (noir).	123
Figure 62 : Profil chromatographique de la fraction 2 de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i> obtenu par CLHP-DAD à 280 nm (vert), temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics, superposé au courant total ionique obtenu par spectrométrie de masse (noir).	124
Figure 63 : Profil chromatographique de la fraction 3 de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i> obtenu par CLHP-DAD à 280 nm (vert), temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics, superposé au courant total ionique obtenu par spectrométrie de masse (noir).	124
Figure 64 : Structures chimiques des 24 composés potentiellement identifiés par CLHP-SM dans l'extrait d' <i>H. foertherianum</i>	128
Figure 65 : Vue aérienne de l'atoll de Tetiaroa (A), du <i>motu</i> Rimatu'u (B) et du <i>motu</i> Oroatera (C). 139	
Figure 66 : Échantillonnage des feuilles d' <i>H. foertherianum</i> sur l'atoll de Tetiaroa.....	140
Figure 67 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d' <i>H. foertherianum</i> préparés à partir de feuilles collectées à différentes stations de l'île de Tetiaroa.	143
Figure 68 : Chromatogrammes superposés (λ = 254 (bleu), 280 (rouge) et 320 (vert) nm), temps (min) en fonction de l'absorbance (mAU), d'extraits d' <i>H. foertherianum</i> regroupés et obtenus à partir de feuilles sénescents collectées sur des individus côté océan abrités des vents (NO) et exposés aux vents (WO) et côté lagon abrités des vents (NL) et exposés aux vents (WL).	146
Figure 69 : Étapes du processus de production pour lesquelles des paramètres sont à définir.	147
Figure 70 : Suivi saisonnier sur 2 ans des teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d' <i>H. foertherianum</i>	150
Figure 71 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d' <i>H. foertherianum</i> préparés à partir de feuilles matures, sénescents et sénescents tombées au sol.....	150
Figure 72 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d' <i>H. foertherianum</i> préparés à partir de feuilles sénescents de petite, moyenne et grande taille.....	151
Figure 73 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) d'extraits d' <i>H. foertherianum</i> suivant les conditions de séchage des feuilles collectées.	152
Figure 74 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) d'extraits d' <i>H. foertherianum</i> suivant les conditions de conservation au froid des feuilles collectées.....	152
Figure 75 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) d'extraits d' <i>H. foertherianum</i> de feuilles fraîches ou lyophilisées avant leur extraction.	153
Figure 76 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d' <i>H. foertherianum</i> suivant les conditions d'extraction des feuilles collectées.	153

Figure 77 : Chromatogrammes superposés ($\lambda = 320$ nm), temps (min) en fonction de l'absorbance (mAU), d'extraits d' <i>H. foertherianum</i> obtenus par décoction (bleu), par macération dans de l'éthanol à 60° (rouge) et par reflux (vert).	154
Figure 78 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d' <i>H. foertherianum</i> suivant les conditions de conservation du filtrat.	155
Figure 79 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) d'extraits d' <i>H. foertherianum</i> suivant la durée de conservation du lyophilisat à l'abri de la lumière et à 27°C.	155
Figure 80 : Étapes envisagées pour la production d'un extrait d' <i>H. foertherianum</i>	162

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre des cas de ciguatéra et du taux d'incidence de 1998 à 2012 en Polynésie française (environ 270 000 habitants en 2012).....	21
Tableau 2 : Liste des molécules identifiées d'espèces du genre <i>Heliotropium</i> ou de la sous-famille des Héliotropiacées et de leurs activités biologiques.	51
Tableau 3 : Méthodes de CLHP-DAD employées pour l'analyse de l'acide rosmarinique.	60
Tableau 4 : Utilisation de l'acide rosmarinique comme complément alimentaire.	62
Tableau 5 : Exemples de brevets impliquant l'acide rosmarinique et à vocation santé.	62
Tableau 6 : Exemples d'APs et de leur toxicité chez le rat après une injection intrapéritonéale.	69
Tableau 7 : Effet des dérivés de l'AR contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a en présence d'ouabaïne et vératridine (OV ⁺).	95
Tableau 8 : Affinité de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i> et des dérivés de l'AR.	99
Tableau 9 : Liste des échantillons de feuilles d' <i>H. foertherianum</i> collectées en Polynésie française.	109
Tableau 10 : Gradient de solvants pour les analyses par CLHP-DAD.	110
Tableau 11 : Masses obtenues pour les fractions des extraits déposés sur cartouche SCX.	114
Tableau 12 : Gradient de solvants pour les analyses par CLHP-SM/SM.	115
Tableau 13 : Gradient de solvants par fraction pour les analyses par CLHP-SM/SM.	117
Tableau 14 : Paramètres de la courbe de calibration de l'acide rosmarinique (AR) et de l'acide caféique (AC).	118
Tableau 15 : Précision de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'acide rosmarinique et de l'acide caféique pour un extrait d' <i>H. foertherianum</i>	120
Tableau 16 : Exactitude de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'acide rosmarinique (AR) et de l'acide caféique (AC)	120
Tableau 17 : Temps de rétention (Tr), ions pseudo-moléculaires ([M-H] ⁻) et fragments SM ² , longueur d'onde au maximum d'absorption (λ _{max}) et tentative d'identification de composés de la fraction 1 de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i>	125
Tableau 18 : Temps de rétention (Tr), ions pseudo-moléculaires ([M-H] ⁻) et fragments SM ² , longueur d'onde au maximum d'absorption (λ _{max}) et tentative d'identification de composés de la fraction 2 de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i>	126
Tableau 19 : Temps de rétention (Tr), ions pseudo-moléculaires ([M-H] ⁻) et fragments SM ² , longueur d'onde au maximum d'absorption (λ _{max}) et tentative d'identification de composés de la fraction 3 de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i>	127
Tableau 20 : Masse des fractions obtenues à partir des extraits d' <i>H. foertherianum</i> pour les modalités 141	141
Tableau 21 : Masse des fractions obtenues à partir des extraits d' <i>H. foertherianum</i> pour les modalités 142	142
Tableau 22 : Teneurs en ions calcium, magnésium, sodium et potassium des extraits d' <i>H. foertherianum</i> obtenus à partir de feuilles sénescents collectées sur des individus, côté océan (NO) et exposés aux vents (WO) et côté lagon (NL) et exposés aux vents (WL), de l'île de Tetiaroa.	146
Tableau 23 : Récapitulatif des paramètres étudiés pour les étapes du processus de production.	149

Liste des annexes

Annexe I : Liste des molécules retrouvées chez <i>Heliotropium</i> , leur formule brute et leur masse.	198
Annexe II : Spectres de masse et de fragmentation des fractions 1, 2 et 3 de l'extrait d' <i>H. foertherianum</i>	202
Annexe III : Tableau d'échantillonnage relatif à l'étude de variabilité inter-individus de Tetiaroa....	223
Annexe IV : Tableaux d'échantillonnage relatifs à l'étude des conditions optimales de collecte, d'extraction et de conservation des feuilles et extraits d' <i>H. foertherianum</i>	227

Avant-propos

Les plantes médicinales sont utilisées depuis toujours comme une source pour le traitement de maladies et l'amélioration de la santé humaine (Azmir et al., 2013). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé que 80 % des habitants de la planète s'appuient principalement sur les médicaments traditionnels pour leurs soins de santé primaires et que la majorité implique l'utilisation d'extraits de plantes (Farnsworth et al., 1985).

Les intoxications ciguatériques sont la conséquence d'un phénomène ancien, la ciguatera, et sont causées par des toxines marines connues pour être parmi les plus puissantes. Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de soigner ces intoxications, seuls les symptômes sont soulagés. Les populations du Pacifique, particulièrement touchées par cette affection, ont su s'adapter en utilisant la flore qui les entourait. Le partage de ces connaissances traditionnelles avec la communauté scientifique a permis le recensement d'une centaine de remèdes traditionnels à base de plantes, utilisée dans la région du Pacifique, pour traiter les intoxications ciguatériques (Laurent et al., 1993).

À partir de ce recensement, une série de travaux, réalisée par l'IRD et visant à établir l'activité biologique de ces plantes, a été menée. Ces travaux ont permis d'orienter le sujet de thèse développé dans ce manuscrit, qui s'inscrit dans la continuité des thèses de doctorat de Boydron-Le Garrec (2005) et de Kumar-Roiné (2009), en sélectionnant une plante à étudier en particulier, *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger (Borraginacées). Cette plante fait partie des remèdes traditionnels les plus populaires à travers la Mélanésie et la Polynésie (Bourdy et al., 1992). Les précédentes études sur la composition chimique d'*H. foertherianum* ont mis en lumière la présence de l'acide rosmarinique, composé possédant de multiples activités biologiques (Kumar-Roiné, 2009) mais également d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, composés réputés toxiques, dans les tiges de cette espèce (Ogihara et al., 1997b).

Les principaux objectifs de ces travaux de thèse ont été, dans un premier temps, de confirmer l'activité biologique, pour le traitement des intoxications ciguatériques, de l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum*. La suite des travaux a eu pour but la caractérisation de la composition chimique de l'extrait et la vérification de son innocuité. Enfin, en vue d'une valorisation de cet extrait de plante, la détermination des conditions optimales de production d'un extrait d'*H. foertherianum* a été entreprise.

Ce manuscrit est organisé en quatre chapitres. Le premier chapitre est un état de l'art du contexte dans lequel se placent ces travaux de thèse. Tout d'abord, le phénomène de la ciguatera et les traitements existants seront détaillés puis les connaissances sur *H. foertherianum*, plante utilisée

en médecine traditionnelle, seront exposées. Ensuite, des informations sur la biosynthèse, les activités biologiques et l'identification de l'acide rosmarinique et des alcaloïdes pyrrolizidiniques, composés retrouvés chez *H. foertherianum*, seront précisées. Enfin, un point sur la réglementation en vigueur pour la commercialisation des produits à base de plantes sera abordé.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit concerne l'évaluation biologique de l'extrait d'*H. foertherianum* et de son principe actif face aux toxines responsables des intoxications ciguatériques. Dans ce but, deux tests *in vitro* déjà employés pour la détection des toxines en laboratoire ont été utilisés. Une étude de relation structure activité a aussi été menée avec des composés structuralement proches de l'acide rosmarinique afin de vérifier sa spécificité d'action.

Le troisième chapitre expose les travaux réalisés sur la caractérisation chimique de l'extrait d'*H. foertherianum*. Une méthode de dosage des principes actifs, l'acide rosmarinique et l'acide caféique, a été établie puis une comparaison des teneurs en principes actifs suivant les lieux de collecte des échantillons a été effectuée. Afin de connaître l'ensemble des composés présents dans l'extrait et leur potentielle activité biologique, la composition chimique globale de l'extrait a aussi été étudiée.

La quatrième et dernière partie de ce manuscrit traite de la détermination des conditions optimales de production d'un extrait d'*H. foertherianum* en vue d'une valorisation industrielle. Le travail décrit dans ce chapitre a permis de déterminer des indications quant au choix des zones de collecte, des paramètres de collecte, d'extraction et de conservation des feuilles et des extraits. Les possibilités d'installation industrielle, utilisée dans la production d'extraits de plantes, seront aussi abordées.

Les travaux de thèse décrits dans ce manuscrit ont été réalisés en Polynésie française dans le cadre d'une convention industrielle de formation pour la recherche (CIFRE) et effectués au sein de l'UMR-152 « Pharmacochimie et pharmacologie pour le développement » de l'IRD et de l'UPS pour les deux premières années, en partenariat avec l'ILM et l'UPF, puis pour la suite des travaux au sein de l'UMR-241 « Écosystèmes insulaires océaniques ». Ces trois années de recherche ont été menées en collaboration avec une entreprise locale, Pacific Biotech. Un financement de fonctionnement pour le projet Ciguatrait, labellisé par le pôle d'innovation de Polynésie française Tahiti Fa'ahotu, a aussi été obtenu par le Contrat de projets État-Polynésie française 2008-2013.

Chapitre 1

État de l'art

1. La ciguatéra

1.1. Historique

La ciguatéra ou *ciguatera fish poisoning* est, comme son nom l’indique en anglais, une intoxication alimentaire provoquée par l’ingestion de poissons évoluant dans des écosystèmes coralliens.

Cette intoxication est connue depuis la haute Antiquité. On en retrouve la trace, tant dans l’ancienne Égypte, plus de 2 000 ans avant J.-C. (Halstead, 1965), qu’en Chine au début de l’ère chrétienne (Lewis et King, 1996). Les anecdotes rapportées par les navigateurs Pedro Fernandes de Queiros et James Cook, lors de leurs expéditions entre les 16^{ième} et 18^{ième} siècles, ne font que confirmer l’ancienneté du phénomène (Morrison, 1935). C’est en 1675, que John Locke, philosophe anglais, décrit pour la première fois de manière clinique ce syndrome qui toucha bon nombre d’équipages en ces périodes de grandes expéditions (Bourée et al., 2002). En 1787, le naturaliste portugais Don Antonio Parra dans sa *Descripción de diferentes piezas de historia natural las mas del ramo maritimo* fait référence à un syndrome neurologique qu’il nomme «*siguatera*» (Poli et al., 1997 ; de Fouw et al., 2001 ; Pearn, 2001). D’après Felipe Poey, zoologue-ichtyologue cubain, ce nouveau terme est dérivé de l’appellation du gastéropode Turbo (*Cittarium* ou *Livona pica* L.) nommé «*cigua*» au 18^{ième} siècle dans les Antilles espagnoles (Randall, 1958). Ce mollusque est connu pour provoquer une intoxication neuro-digestive. Cette dénomination est progressivement transférée à la maladie causée par certains poissons de récifs et au phénomène écologique qui en est à l’origine (Laurent, 1993).

1.2. Incidence et répartition

Il est difficile de donner un chiffre précis de l’incidence mondiale de la ciguatéra. Elle touche, selon Bruslé, (1997) entre 10 000 et 50 000 personnes dans le monde annuellement, alors que Fleming et al. (1998) suggèrent une incidence beaucoup plus large, entre 50 000 à 500 000 cas par an. Avec un tel niveau d’incidence, la ciguatéra représente l’intoxication par produits marins la plus répandue au niveau du globe (Lange et al., 1992 ; Glaziou et Legrand, 1994).

L’écart entre les différentes estimations provient d’abord de la difficulté de poser un diagnostic, au vu de la diversité des symptômes et de leur intensité variable, surtout pour des médecins situés hors des zones d’endémie (Dickey et Plakas, 2010). Ensuite, les intoxications ne sont déclarées que dans les pays où il existe une procédure de recensement des cas et pour finir même dans ces derniers, le pourcentage de cas non déclarés est estimé à 80 %. Ce taux de non-déclaration peut s’expliquer d’une part par le recensement d’une seule personne pour un groupe de personnes

intoxiquées et ayant partagé le même repas, et d’autre part, par l’absence de traitement efficace disponible (Dickey et Plakas, 2010). En effet, le recours à la médecine traditionnelle (Bourdy et al., 1992) n’incite pas les personnes intoxiquées à se tourner vers les structures de santé sauf en cas de complications sévères.

La ciguatéra est endémique aux régions coralliennes de la ceinture circumtropicale comprises entre le 35^{ième} parallèle nord et le 35^{ième} parallèle sud (Chateau-Degat, 2005). La prévalence de la ciguatéra est inégalement répartie dans les régions endémiques avec moins de 0,1 % de la population concernée sur les zones comme le Queensland en Australie et la Floride aux États-Unis à plus de 50 % de la population pour les îles du Pacifique (îles Fidji, Hawaii, îles Cook, Nouvelle-Calédonie, Polynésie française, Tuvalu, Tonga, Vanuatu, Wallis et Futuna...) et des Caraïbes (Fleming et al., 1998 ; Dickey et Plakas, 2010) (figure 1).

Une étude récente a tenté de faire le bilan de l’incidence de l’intoxication de type ciguatérique dans 18 pays et territoires insulaires du Pacifique (PICTs), entre 1998 et 2008 (Skinner et al., 2011). Au premier rang des PICTs faisant état d’un taux d’incidence annuel moyen supérieur à 10 cas pour 10 000 habitants sur l’ensemble de la période considérée, on trouve par ordre décroissant : les Tokelau, les îles Cook, les îles Marshall, le Vanuatu, la Polynésie française, les Kiribati, et l’île de Niue. Toujours selon Skinner et al. (2011), la Polynésie française affichait jusqu’à récemment le nombre de cas le plus important de tous les PICTs, mais les îles Fidji la devançant à présent. Selon l’OMS, la situation sanitaire est préoccupante dès que le taux d’incidence dépasse les 100 cas pour 10 000 habitants. Or les chiffres concernant l’ensemble de la Polynésie française (tableau 1) sont vraisemblablement sous-estimés. Ils masquent la situation très préoccupante de certaines de ses îles qui sont inégalement touchées par la ciguatéra. Par exemple, les taux d’incidence relevés pour les îles de la Société sont de l’ordre de 5 cas pour 10 000 habitants alors que ceux pour les îles Gambier sont supérieurs à 300 cas pour 10 000 habitants.

Tableau 1 : Nombre des cas de ciguatéra et du taux d’incidence de 1998 à 2012 en Polynésie française (environ 270 000 habitants en 2012) (source ILM).

	1998	2000	2002	2004	2006	2008	2010	2012
Nombre de cas	692	702	779	583	NC	577	576	456
Taux d'incidence (pour 10 000 habitants)	25	26	28	21	NC	21	21	17

Malgré la sous-estimation de l’incidence de la ciguatéra, on observe une nette augmentation de cas dans les PICTs sur la période de 1973 à 2008. En effet, l’incidence annuelle entre la période 1973-1983 et la période 1998-2008 augmente globalement de 60 %, chaque pays ayant sa propre variabilité (Skinner et al., 2011).

Par ailleurs, il ne faut pas négliger les cas d’importation (figure 1) qui sont de plus en plus fréquemment signalés dans des pays comme les États-Unis, le Canada, le Japon, ou encore en Europe, et qui résultent directement de l’expansion des échanges commerciaux, des activités touristiques et de l’augmentation mondiale de la consommation de poissons tropicaux (Haro et al., 2003).

Par exemple, en 2007, l’Union européenne et les États-Unis ont importé plus de 80 % de leurs produits de la pêche pour subvenir à la demande du consommateur. Or, aux États-Unis, plus de la moitié des importations de la pêche proviennent d’Asie, environ 2,4 % des îles d’Océanie et 2 % des Caraïbes et de l’Atlantique tropical (Dickey et Plakas, 2010).

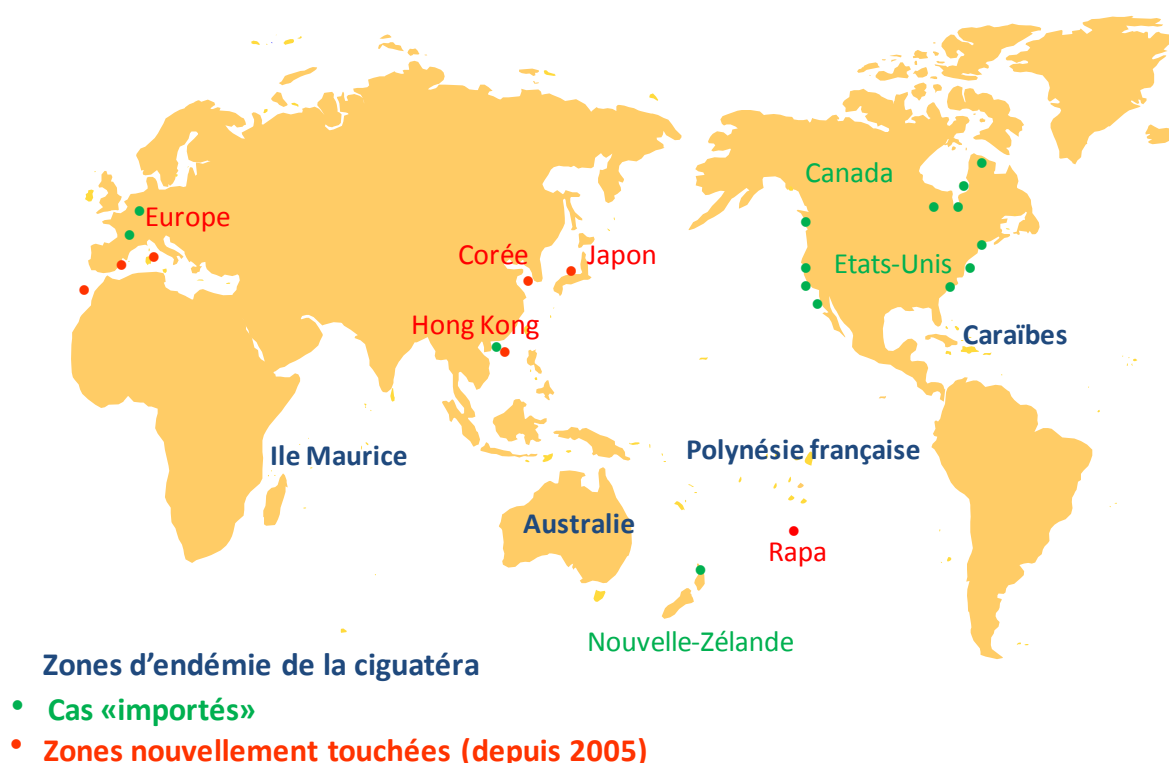


Figure 1 : Carte de la répartition de la ciguatera dans le monde.

Les cas d’importation sont toutefois à distinguer des nouveaux cas de ciguatera ou cas endogènes (figure 1) signalés récemment dans plusieurs zones tempérées du globe (e.g. îles Canaries et zone méditerranée (Aligizaki et Nikolaidis, 2008 ; Fraga et al., 2011) et dans le nord-ouest du golfe du Mexique, (Villareal et al., 2007)) ou encore à Rapa, l’île la plus extrême de l’archipel des Australes. Ces cas autochtones sont directement liés à l’extension des aires de prolifération de la micro-algue *Gambierdiscus sp.* (Pawlowicz et al., 2013), agent causal de la ciguatera, vraisemblablement en réponse aux effets du changement climatique (réchauffement global des eaux de surface et blanchiment du corail) (Llewellyn, 2010) ou à l’activité humaine avec la construction d’infrastructures (Villareal et al., 2007).

La reconnaissance de cas d'importation de la ciguatera dans les zones non-endémiques a poussé les institutions de santé publique mondiales à classer la ciguatera comme la plus commune des maladies d'origine alimentaire liée à la consommation de poissons (Lehane et Lewis, 2000 ; de Fouw et al., 2001). De plus, l'augmentation de cas dans des zones nouvellement touchées renforce l'idée du classement de la ciguatera à l'OMS comme « maladie tropicale négligée ». Ce statut permettrait d'attirer l'attention de la communauté scientifique et biomédicale (Llewellyn et al., 2013) et donc de renforcer les recherches à ce sujet.

1.3. Les toxines responsables de l'intoxication et les vecteurs

C'est en 1977 que l'équipe de R. Bagnis de l'Institut Louis Malardé (ILM) découvrit l'agent responsable de la ciguatera dans les îles Gambier, alors atteintes d'une importante flambée de toxicité. Il s'agit d'une algue unicellulaire benthique de la famille des *Goniodomaceae*, *Gambierdiscus* spp. (Yasumoto et al., 1977 ; Bagnis et al., 1980) (figure 2), qui est ingérée par les poissons herbivores lorsqu'ils broutent les algues macrophytes qui lui servent de support (Laurent et al., 2005).

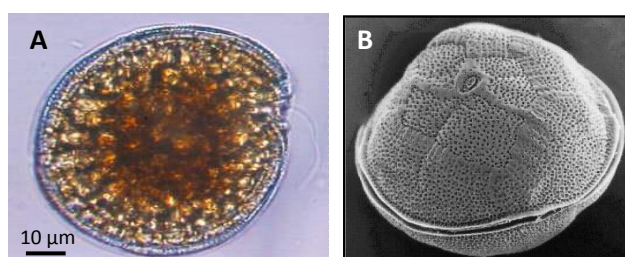


Figure 2 : Cellule du dinoflagellé *Gambierdiscus* spp. © ILM, (A) vue en microscopie optique, (B) vue au microscope électronique à balayage.

Gambierdiscus spp. est connu pour être capable de synthétiser plusieurs toxines telles que les ciguatoxines (CTXs), le gambiérol, les acides gambiériques et les maïtotoxines (Roeder et al., 2010). Ces dernières, hydrophiles, seraient peu susceptibles d'induire une intoxication chez les humains, car peu bioaccumulées dans la chair des poissons (Lewis, 2006), mais pourraient cependant participer au syndrome de type ciguatérique.

Plus de onze espèces distinctes du genre *Gambierdiscus* sont aujourd'hui recensées aussi bien dans l'océan Atlantique que Pacifique. Parmi ces espèces, *G. polynesiensis* Chinain & Faust 1999, *G. australes* Chinain & Faust 1999, *G. pacificus* Chinain & Faust 1999 et *G. excentricus* Fraga 2011 sont connues pour être toxigènes (Chinain et al., 2010a ; Fraga et al., 2011) mais toutes les souches ne produisent pas de toxines selon leur patrimoine génétique et les conditions

environnementales dans lesquelles elles évoluent (Chateau-Degat et al., 2005 ; Chinain et al., 2010a ; Nishimura et al., 2013).

En Polynésie, les micro-algues du genre *Gambierdiscus* se développent de façon épiphyte sur des macro-algues du genre *Turbinaria* ou *Halimeda* (Darius et al., 2007). Les espèces lagunaires ou récifales de poissons herbivores broutent ces macro-algues (figure 3), accumulent et biotransforment les CTXs dans leur chair mais surtout dans leurs viscères et leur tête. Les poissons carnivores vont à leur tour ingérer les poissons herbivores et les CTXs sont ainsi transférées le long de la chaîne alimentaire. Les humains s’intoxiquent ainsi par la consommation de poissons herbivores ou carnivores (Lehane et Lewis, 2000) (figure 4).

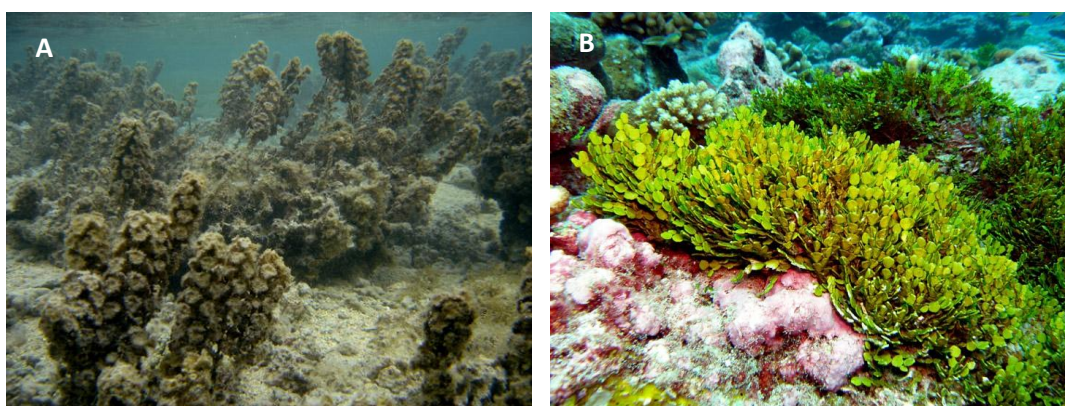


Figure 3 : Macro-algues du genre *Turbinaria* (A) et *Halimeda* (B), © ILM.

Depuis quelques années, un deuxième phénomène a été mis en évidence et a été nommé « ciguatera shellfish poisoning ». Il implique la consommation de mollusques et/ou d’échinodermes et déclenche les mêmes symptômes que la ciguatera avec, semble-t-il, d’autres signes cliniques tels que des paralysies des membres et des brûlures de la bouche et de la gorge (Laurent et al., 2008). La présence de dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* n’a pas été rapportée dans les sites incriminés alors que de larges tapis de cyanobactéries appartenant à l’ordre des *Oscillatoriales* étaient visibles. Les cyanobactéries d’eau douce étant déjà bien connues pour produire des toxines nocives pour l’humain, il est donc fort probable que les cyanobactéries marines (figure 5) puissent elles aussi métaboliser des toxines susceptibles d’être impliquées dans le phénomène de la ciguatera (Laurent et al., 2008, 2012 ; Roué et al., 2014) (figure 4).

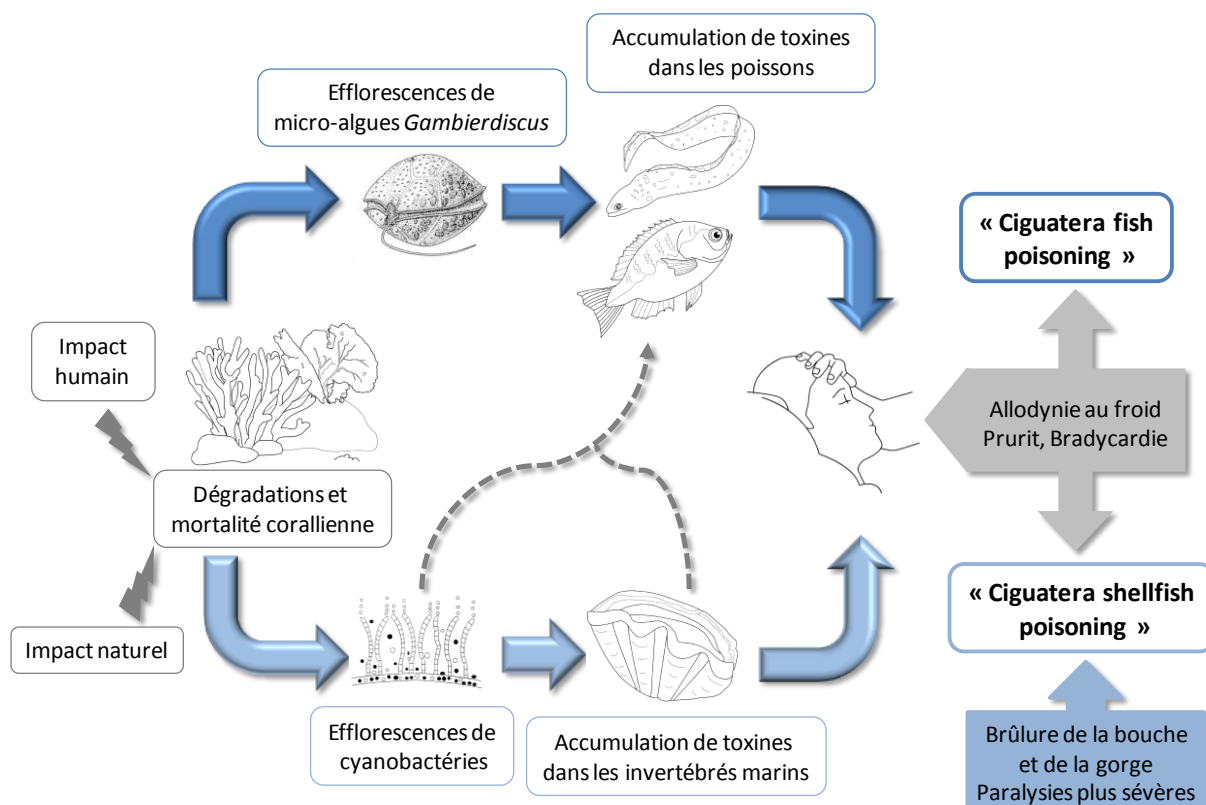


Figure 4 : Transfert des ciguatoxines dans la chaîne alimentaire (adapté de Laurent et al., 2008).

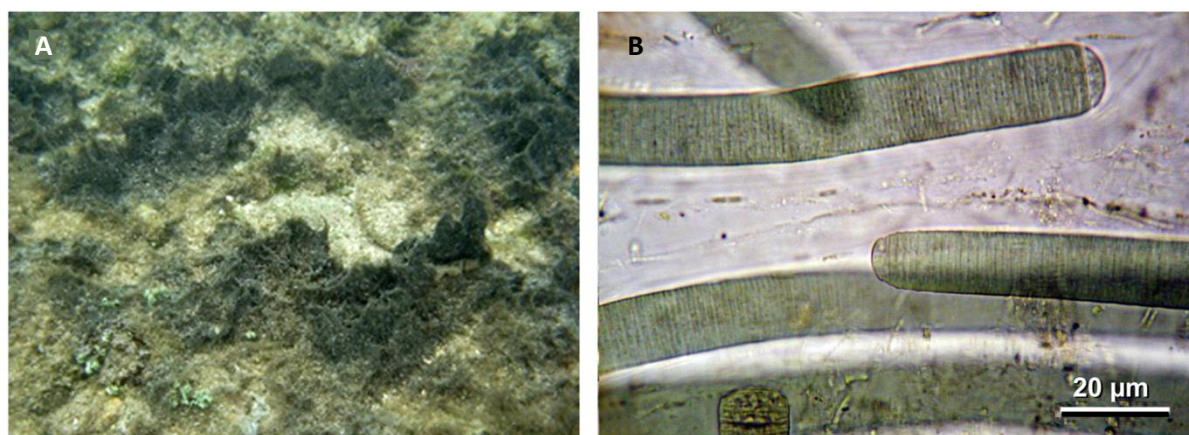


Figure 5 : Cyanobactéries marines benthiques du genre *Hydrocoleum*© Golubic S., (A) tapie de cyanobactéries, (B) vue au microscope optique.

Les dinoflagellés et les cyanobactéries se retrouvent surtout dans des zones coralliennes impactées par l'être humain ou naturellement abimées (Van Dolah, 2000 ; Laurent et al., 2012). Ainsi, des îles jusqu'à présent indemnes du phénomène ciguatérique peuvent être l'objet d'efflorescences de ces micro-organismes et ainsi se retrouver en pleine flambée après une perturbation de leur environnement lagunaire (Pawlowicz, 2012).

Les CTXs, responsables du syndrome ciguatérique, sont des polyéthers cycliques d’un poids moléculaire d’environ 1 000 Da (Lewis, 2006). Selon les régions du monde, il existe plusieurs types de CTXs qui ont des structures chimiques similaires : pour l’océan Pacifique les P-CTXs, pour l’océan Indien les I-CTXs, et pour la mer des Caraïbes les C-CTXs (Caillaud et al., 2010).

Les P-CTXs, composées de treize cycles éthers, sont décrites selon deux types 1 et 2, dont la différence réside notamment au niveau du cycle E (figure 6). Les C-CTXs possèdent, quant à elles, quatorze éthers cycliques (figure 7). La structure des I-CTXs n’a pas encore été élucidée à ce jour. Au total, on dénombre plus d’une quarantaine de congénères : 29 P-CTXs, 12 C-CTXs et 4 I-CTXs, isolés principalement à partir de cellules de dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* et de matrices pisciaires (Wang, 2008 ; Dickey et Plakas, 2010).

La diversité des CTXs provient de leur origine géographique mais aussi de leurs divers degrés d’oxydation. En effet, les CTXs peu oxydées (P-CTX-4) se retrouvent chez les dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* et dans les poissons herbivores mais pas dans les poissons carnivores contrairement aux P-CTX-3 et P-CTX-1 qui sont plus polaires (Dechraoui Bottein et al., 2011). Plus les CTXs sont oxydées et plus leur toxicité est élevée. Par exemple, la P-CTX-1 est onze fois plus toxique que la P-CTX-4 (Satake, 2006). Il existe un phénomène de bioaccumulation et de biotransformation le long de la chaîne alimentaire qui fait que l’on retrouve les CTXs les plus toxiques dans les hauts maillons de la chaîne (Yasumoto, 2005).

Les CTXs font partie des toxines marines les plus puissantes (Lehane, 1999). La létalité de la P-CTX-1 (DL₅₀ de 0,35 µg/kg) injectée en intra-péritonéale à une souris est 280 fois plus importante que celle de la tétrodotoxine, retrouvée chez le poisson ballon ou *fugu*. Chez l’être humain, l’ingestion d’une quantité de 70 ng de CTX peut suffire à provoquer les symptômes d’une intoxication (Satake, 2006).

La P-CTX-1 a été isolée pour la 1^{ère} fois en 1967 (Scheuer et al., 1967 ; Dickey et Plakas, 2010) et sa structure a été élucidée en 1989 (Dickey et Plakas, 2010). Pour isoler 350 µg de CTX pure, 4 tonnes de murènes javanaises ont été collectées en Polynésie française et 125 kg de viscères ont été extraits (Yasumoto, 2005). La 1^{ère} synthèse totale de la CTX-3C a été réalisée par Hiram et al. en 2011. À ce jour, les CTXs, nécessaires pour les études scientifiques, doivent être extraites de murènes et de poissons ou produites par des cultures de dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* (Chinain et al., 2010a).

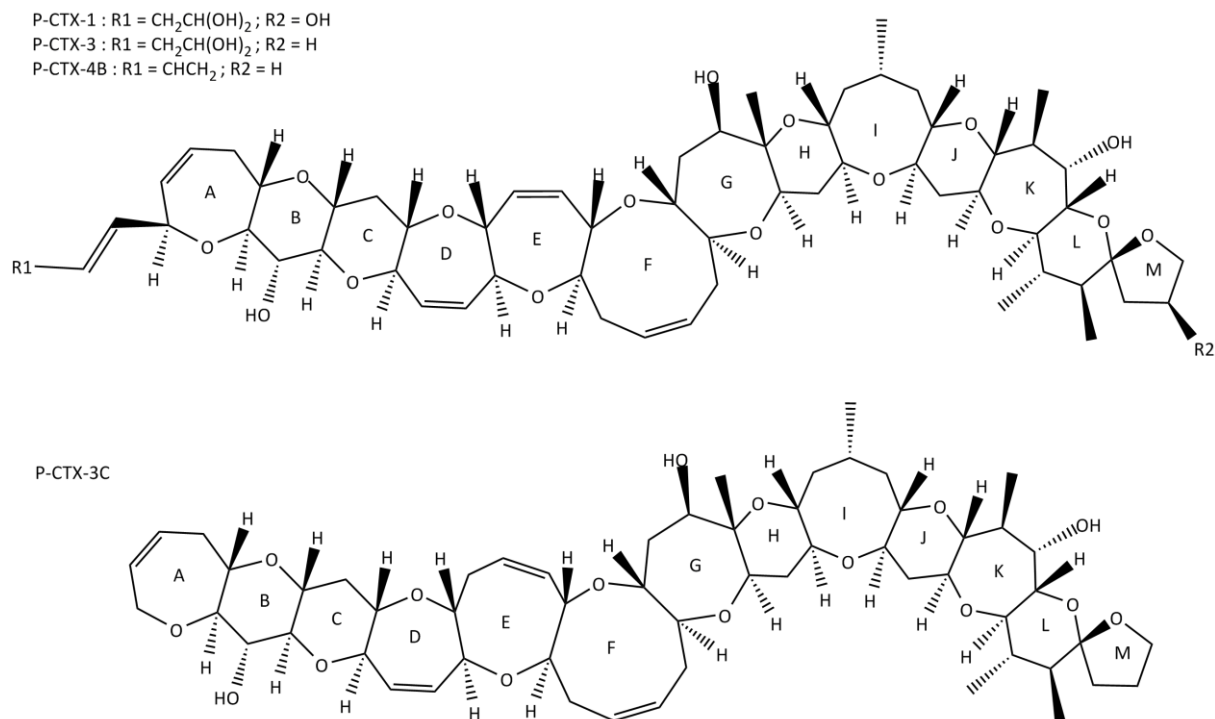


Figure 6 : Structure chimique de ciguatoxines du Pacifique (P-CTXs)
(d'après Nicholson et Lewis, 2006).

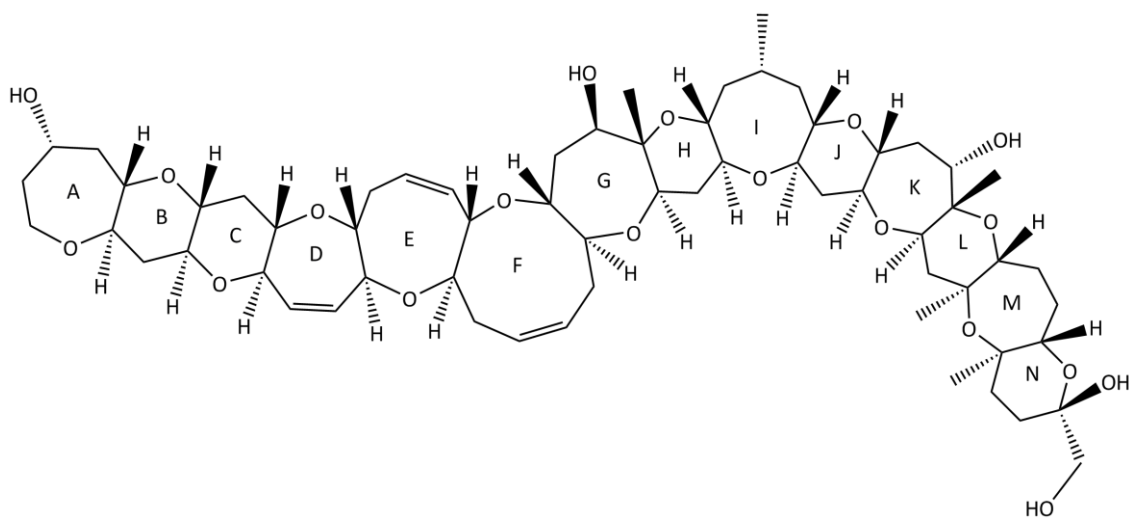


Figure 7 : Structure chimique d'une ciguatoxine des Caraïbes (C-CTX-1)
(d'après Nicholson et Lewis, 2006).

1.4. Les mécanismes d'action des toxines

Les mécanismes d'action détaillés des CTXs, provoquant la multitude de symptômes de la ciguatera, ne sont pas encore complètement connus (Yamaoka et al., 2011). On sait néanmoins que la fixation des CTXs sur le site 5 des canaux sodium dépendant du potentiel (CSDPs), au niveau des sous-unités α de ces récepteurs, va entraîner un flux entrant continu d'ions sodium vers les cellules

nerveuses, engendrant une dépolarisation membranaire et des potentiels d’action spontanés et/ou répétitifs. Cette augmentation marquée de l’excitabilité nerveuse active à son tour une libération soutenue de neurotransmetteurs (jusqu’à épuisement) au niveau des terminaisons nerveuses, provoquant alors une modification de l’efficacité synaptique voire une déficience de la transmission des messages nerveux (Bidard et al., 1984 ; Benoit et al., 1986 ; Molgó et al., 1990).

Les CSDPs sont la cible de nombreuses biotoxines, particulièrement la sous-unité α , selon le site de fixation considéré (Nicholson et Lewis, 2006). Cependant, seules les brévétotoxines (PbTx) produites par le dinoflagellé *Karenia brevis* (Davis) Hansen & Moestrup, ainsi que les CTXs possèdent comme site de fixation cellulaire le site 5 de la sous-unité α des CSDPs (figure 8). Ces deux familles de toxines sont donc en compétition pour la même cible (Lombet et al., 1987). C’est sur cette propriété commune à ces deux familles de toxines qu’est basé notamment le principe du test d’interaction ligand-récepteur (TILR) (cf. chap. 2 parag. 3.1.) (Pawlowicz, 2012).

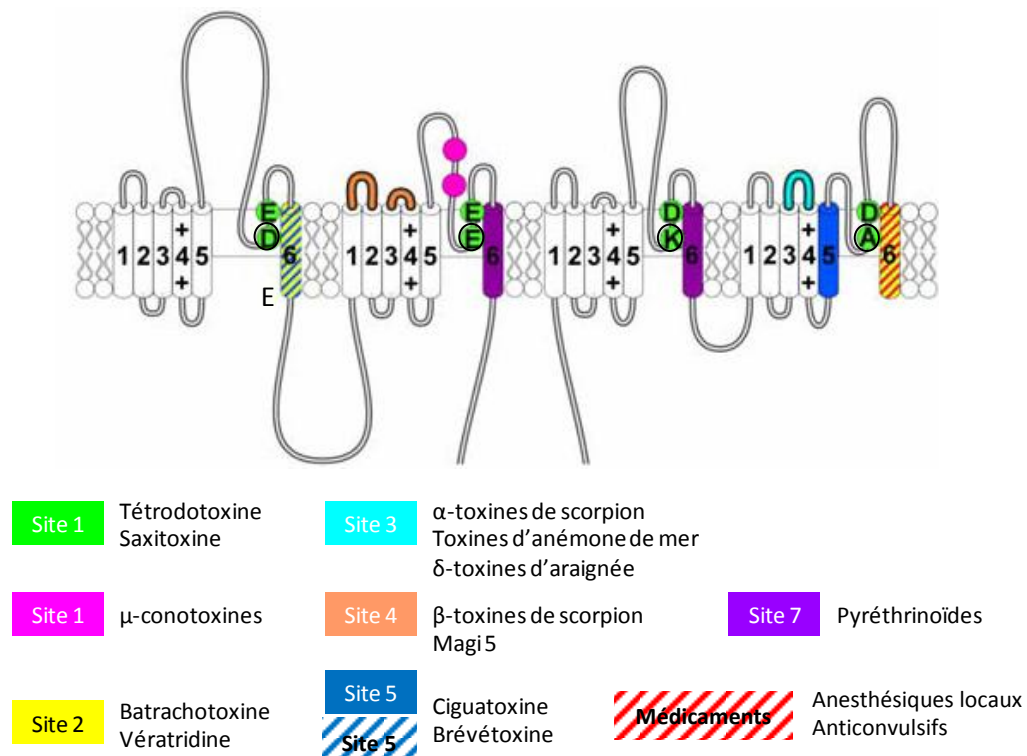


Figure 8 : Structure moléculaire et sites récepteur de neurotoxines du canal sodium de la sous-unité α (Nicholson et Lewis, 2006). Les résidus d’acides aminés (EEDD et DEKA), localisés sur les boucles reliant les segments 5 et 6, forment le filtre de sélectivité aux ions Na^+ . Le site 6 récepteur des δ -conotoxines n’est pas représenté car à ce jour non défini précisément.

L’action des CTXs sur les CSDPs, en tant que cible principale, est la plus connue et la plus étudiée. Cependant, de récentes études ont permis de mettre en évidence l’action inhibitrice des CTXs sur les canaux potassium de myotubes de rats. Les canaux potassium jouent aussi un rôle dans

l'excitabilité des cellules nerveuses (Hidalgo et al., 2002 ; Nicholson et Lewis, 2006).

Les CTXs ont aussi une influence sur les mécanismes d'échange $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$. Les ions calcium intracellulaires jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des cellules excitables, notamment comme second messenger. Les CTXs activent les CSDPs entraînant une augmentation de la concentration cellulaire d'ions sodium, ce qui réduit la capacité de l'échangeur d'ions $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ à faire sortir les ions calcium. Il en résulte une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions calcium et une libération favorisée des neurotransmetteurs Ca^{2+} -dépendant (Nicholson et Lewis, 2006).

Plus précisément, les mécanismes déclenchés par les CTXs (figure 9) sont :

(A) Dans les motoneurones et les neurones sensoriels, les CTXs provoquent une activation continue des canaux Na^+ (1) et bloquent les canaux K^+ (2). Cela cause la dépolarisation de la membrane (3) et conduit à la propagation de potentiels d'actions spontanés et répétitifs (4). L'accumulation des ions Na^+ qui s'en suit provoque un gonflement des axones, des nerfs terminaux et des cellules de Schwann périssynaptiques (5).

(B) Au niveau des synapses, les CTXs induisent une augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} *via* la libération d'ions Ca^{2+} , régulée par l'inositol triphosphate (InsP_3), depuis les zones de stockage interne (6) ou *via* l'activation des canaux Ca^{2+} , provoquée par la dépolarisation terminale (8). La concentration intracellulaire d'ions Ca^{2+} augmente aussi à cause d'une modification dans le gradient des ions Na^+ qui active l'échangeur $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (7), un effet qui se produit également dans les myocytes cardiaques. La propagation du potentiel d'action tonique, initiée dans les axones, induit des libérations répétitives de neurotransmetteurs synchrones et asynchrones au niveau des synapses et de la jonction neuromusculaire (9), pour produire des élévations et diminutions transitoires dans la teneur en quanta des réponses synaptiques. Ceci a pour conséquence des contractions musculaires spontanées et tétaniques (10). De plus, les CTXs peuvent également nuire au recyclage des vésicules synaptiques, ce qui épuise le groupe de vésicules de neurotransmetteurs disponibles pour la libération.

Ainsi, la meilleure connaissance des mécanismes d'action des CTXs permet de mieux comprendre l'origine des symptômes neurologiques de l'intoxication ciguatérique (Nicholson et Lewis, 2006).

L'excrétion des CTXs par l'organisme est très lente car elles sont stockées dans les tissus adipeux (Lewis, 1991). D'après Dechraoui Bottein et al. (2011), les CTXs sont éliminées de la circulation sanguine de rats intoxiqués selon une demi-vie de quatre jours. L'excrétion se fait par les urines ou de façon plus importante par les fèces, cette dernière voie indiquant une élimination hépatique. De plus, les toxines ne seraient pas seulement excrétées mais aussi biotransformées et

distribuées dans les compartiments extravasculaires.

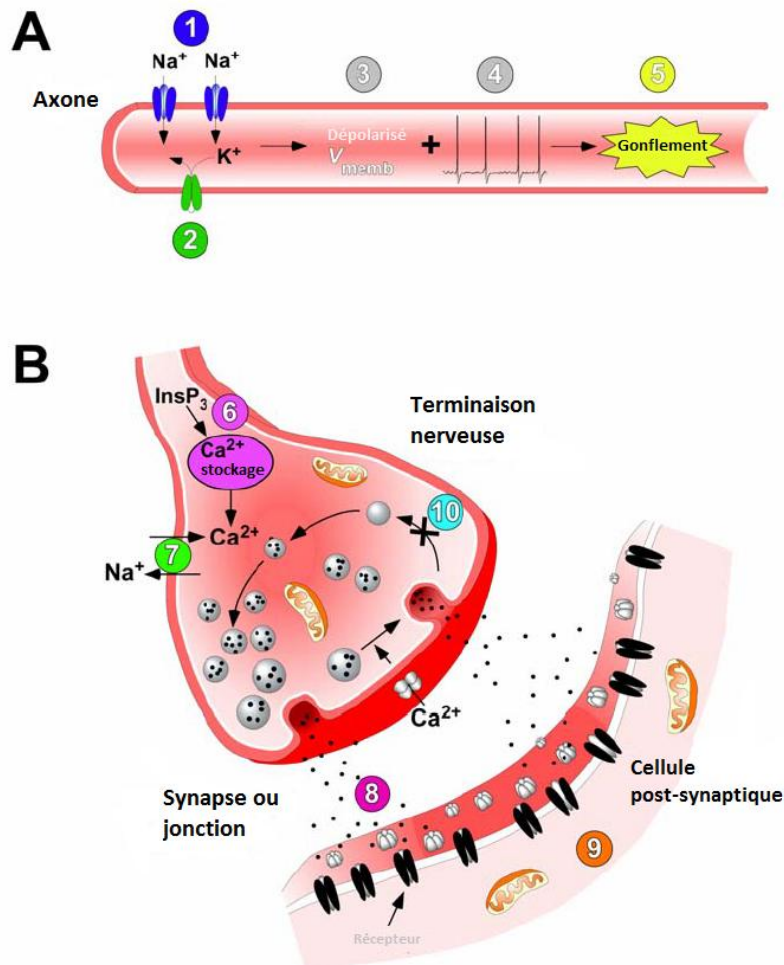


Figure 9 : Sites et modes d'action des ciguatoxines (Nicholson et Lewis, 2006).

1.5. Symptômes et syndrome chronique

Les symptômes de l'intoxication ciguatérique sont divers et variés. Ils rendent d'ailleurs difficile le diagnostic de l'intoxication (Ting et Brown, 2001). Les premiers symptômes qui apparaissent dans les heures suivant le repas toxique sont plutôt gastro-intestinaux, avec des vomissements et des diarrhées. Les manifestations suivantes sont d'ordre neurologique avec un intense prurit, de la paresthésie, des myalgies et une allodynie au froid, qui est un des symptômes caractéristiques de cette intoxication (Zimmermann et al., 2013). Dans certains cas, on observe des symptômes cardiovasculaires avec notamment de la bradycardie et de l'hypotension. Une fatigue générale peut être ressentie (figure 10) (Stewart et al., 2010). Le taux de mortalité de cette intoxication est estimé à moins de 0,1 % des cas, cependant la mort du patient peut survenir en raison d'une insuffisance respiratoire (de Fouw et al., 2001).

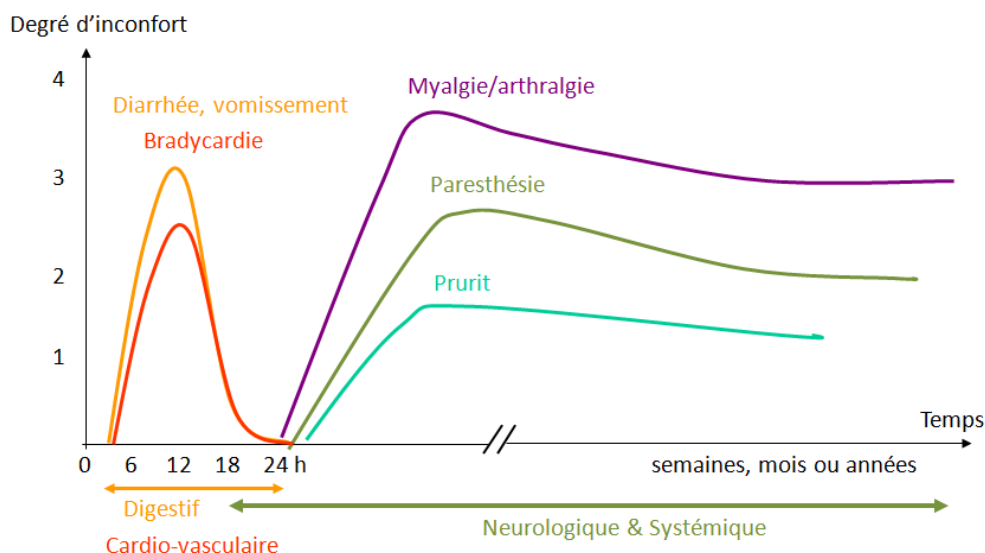


Figure 10 : Apparition et évolution des symptômes de la ciguatera (d'après Lawrence et al., 1980).

Les symptômes sont déclenchés très rapidement après une intoxication mais leur rémanence peut être variable notamment pour les troubles neurologiques. La durée et la sévérité d'une intoxication dépendent de plusieurs facteurs. En effet, le type et la quantité de toxines ingérées, la condition physique et l'historique du patient déterminent en général la réaction de l'organisme (Nicholson et Lewis, 2006).

La diversité des symptômes tient aussi à la diversité chimique des CTXs (cf. parag. 1.3.) qui n'ont pas exactement la même structure suivant les régions du monde où se produisent les intoxications.

En effet, dans le Pacifique, une intoxication de type ciguatérique s'exprimera avec des symptômes à dominance neurologique lors de la phase aiguë, pouvant parfois être sévères (i.e. coma du patient) (Lewis, 2001 ; Chateau-Degat, 2005 ; Friedman et al., 2008). Dans les Caraïbes, on rencontrera une forme avec une prédominance des symptômes gastro-intestinaux, alors que dans l'océan Indien, les cas de ciguatera sont similaires à ceux de la région Pacifique et se doublent d'une composante hallucinatoire observée dans 16 % des cas (Quod et Turquet, 1996 ; Lewis, 2001 ; Friedman et al., 2008).

Dans les cas graves, cette affection peut s'installer de manière chronique après la phase aiguë de la maladie, avec principalement la persistance de certains symptômes neurologiques, plusieurs mois voire même plusieurs années après la primo-intoxication (Lewis et Holmes, 1993 ; Lewis, 2006 ; Chateau-Degat, et al., 2007a et 2007b). Ce phénomène pourrait s'expliquer en partie par la lente élimination des CTXs par l'organisme des patients, en raison du fort caractère lipophile de ces composés, d'où la notion de «seuil symptomatique» (i.e. dose à partir de laquelle les symptômes sont déclenchés) souvent évoquée dans le cas de cette intoxication (Lehane et Lewis,

2000 ; Dickey et Plakas, 2010 ; Hamilton et al., 2010).

Enfin, certains patients développent une intolérance à la consommation de certains produits alimentaires, ressentant de nouveau les symptômes neurologiques même après une longue période de rétablissement. Les produits les plus souvent cités sont l’alcool, les protéines (poisson, poulet, porc...), les cacahuètes, etc. L’origine de ce phénomène pseudo-allergique reste à étudier (Lewis, 2006).

1.6. Impacts socio-économiques

Au-delà du problème de santé humaine, le phénomène de la ciguatéra cause des problèmes socio-économiques comme une augmentation des coûts de santé, une perte de la productivité au travail, une perte pour le tourisme, une perte de vente de poissons sur les marchés locaux ou internationaux, une perte de ressource alimentaire et enfin des migrations de population. Par exemple, les coûts relatifs à la ciguatéra dans les années 90 étaient estimés à 22 millions de dollars par an aux États-Unis et à 1,1 million de dollars par an en Polynésie française (Rongo et al., 2012).

La présence de la ciguatéra entrave le développement de la pêche lagunaire et du marché des fruits de mer dans l’océan Pacifique et les Caraïbes. Certains produits sont interdits à la vente suivant leur espèce, leur taille ou leur provenance géographique (Llewellyn et al., 2013).

Dans la plupart des PICTs, la pêche est l’une des rares activités rémunératrices et source de recettes en devises. Un excellent exemple nous est donné par le commerce des poissons de récif vivants destinés à la restauration, aux Kiribati. Ce commerce a été florissant pendant plusieurs années, assurant aux pêcheurs locaux des revenus très convenables. Selon les estimations, la valeur annuelle nette de cette activité pour les pêcheurs locaux avoisinait un quart de million de dollars australiens, pour un total d’une trentaine de pêcheurs actifs, soit un revenu annuel, par pêcheur, légèrement supérieur à 8 000 dollars australiens, somme considérable au regard de la norme en vigueur dans les îles. En 1999, un grand nombre de consommateurs de Hong Kong ont contracté la ciguatéra en consommant du poisson qui aurait, paraît-il, été exporté par les Kiribati. Cette affaire a été à l’origine de l’interdiction de l’importation à Hong Kong de poissons de récif vivants destinés à la restauration en provenance des Kiribati, ce qui a entraîné la disparition totale de cette filière et la perte de revenus pour les pêcheurs locaux qui se consacraient à cette activité (Laurent et al., 2005).

En Polynésie française, la réglementation protégeant le consommateur entraîne, pour les pêcheurs locaux, une perte d’environ 3 000 tonnes de poissons coralliens interdits de commercialisation chaque année, ce qui équivaldrait à une perte de gain estimée par Bagnis et al. (1992b) à un million de dollars américain. En effet, un arrêté municipal du 8 novembre 1939 interdit

la vente de 13 espèces de poissons lagunaires au niveau du marché de Papeete.

De même, en Australie, certaines espèces sont interdites à la vente et certaines régions, comme la baie Platypus sur l’île Fraser, sont interdites à la pêche des thazards et des barracudas.

À l’île de la Réunion, certaines espèces sont interdites à l’importation et à la commercialisation comme les carangues et les bécunes alors qu’à l’île Maurice dix-sept espèces de sept familles différentes sont interdites à la vente.

En revanche, actuellement il n’existe pas de réglementation sur la pêche de poissons à risque ciguatérique en Nouvelle-Calédonie (Laurent et al., 2005).

Une des conséquences de la ciguatéra, pour les PICTs ayant pour principale ressource la pêche, est une transition alimentaire vers d’autres sources de protéines telles que le poulet et le bœuf surgelé ou en conserve (Rongo et al., 2012). Par exemple aux îles Cook, 70 % de la population ne consomment plus de poissons de récif locaux (Llewellyn et al., 2013). Leur changement de régime alimentaire et la réduction du temps d’exercice physique et de l’activité de pêche n’est donc pas sans conséquence sur l’apparition de maladies comme le diabète et l’obésité (Chinain et al., 2010b). De plus, l’arrêt de la pêche est aussi une perte du savoir traditionnel pour les générations à venir et donc une perte d’un moyen de subsistance et d’une ressource économique (Llewellyn et al., 2013).

1.7. Conclusion

La ciguatéra est un phénomène connu depuis toujours, à l’origine restreint aux zones tropicales du globe mais qui tend à s’étendre vers les zones tempérées. Ce phénomène écologique complexe a des conséquences aussi bien sur la santé publique que sur l’économie des pays qui en sont affectées. L’absence d’une procédure unique de déclaration de la ciguatéra a entravé la compréhension de l’ampleur du problème régional de santé publique. La ciguatéra devrait être traitée comme une maladie émergente pour d’autres régions du monde de plus haute latitude. Une des actions proposées est la classification de la ciguatéra comme «maladie tropicale négligée» pour attirer l’attention et les compétences des communautés biomédicales et écologiques (Llewellyn et al., 2013).

2. Les traitements anticiguatériques

Peu de travaux sont consacrés à la mise au point d’un traitement contre la ciguatéra, malgré le problème de santé publique qu’elle engendre dans les pays du Pacifique. La complexité du phénomène ciguatérique entrave la compréhension des mécanismes d’action des ciguatoxines et retarde le développement de traitements efficaces.

2.1. Dans la médecine occidentale

2.1.1. Les traitements symptomatiques

Les traitements occidentaux anticiguatériques sont essentiellement symptomatiques. À chaque phase de l’intoxication, de nombreux médicaments apportant un soulagement relatif pour un symptôme en particulier ont été testés (cf. Kumar-Roiné et al. 2011a pour revue).

Lors d’une intoxication aigüe, il est important de maintenir les fonctions vitales et il peut être nécessaire de contrôler l’équilibre hydro-électrolytique et de le rétablir avec une injection en intraveineuse de fluide isotonique (Friedman et al., 2008).

Juste après l’intoxication, il peut être réalisé un lavage gastrique, ou une administration d’apomorphine (effet émétique) (Laurent et Amade, 1992), ou de charbon actif pour tenter d’éliminer les toxines plus rapidement (de Fouw et al., 2001). Par la suite, les désordres gastro-intestinaux sont traités avec des antispasmodiques, des antiémétiques, et des antidiarrhéiques (Laurent et Amade, 1992 ; Haro et al., 2003).

La similarité des symptômes entre l’avitaminose B6 et la ciguatéra a conduit à employer un complexe vitaminique (B1, B6 et B12) dans le traitement de cette dernière (Boydron-Le Garrec, 2005). Les signes neurologiques peuvent également être traités avec de la colchicine, de l’acide acétylsalicylique, et du gluconate de calcium en injection (Palafox et Buenconsejo-Lum, 2001).

Le prurit est atténué par des antihistaminiques mais reste difficile à éliminer (Geller et al., 1991 ; Laurent et Amade, 1992 ; Ting et Brown, 2001). Le paracétamol et la nifédipine sont utilisés contre les maux de tête (Calvert et al., 1987 ; Friedman et al., 2008). Contre les douleurs musculaires, des analgésiques sont prescrits (Cheng et Chung, 2004). L’emploi anecdotique d’autres molécules telles que la néostigmine est également rapporté pour traiter les désordres neurologiques (Banner et al., 1963 ; Matsui, 2009).

Le recours à un antidépresseur, l’amitryptiline, est aussi préconisé pour soulager les symptômes neurologiques comme les dysesthésies et les paresthésies (Davis et Villar, 1986 ; Calvert et al., 1987 ; Geller et al., 1991 ; Matsui, 2009). La gabapentine, un antiépileptique ayant une efficacité connue dans les douleurs neuropathiques, a permis une amélioration dans les symptômes polyneuropathiques de deux patients atteints de la ciguatéra. Malheureusement, l’arrêt du traitement a provoqué le retour des symptômes (Perez et al., 2001). L’amitryptiline, la nifédipine et la gabapentine ont notamment été utilisées pour le traitement de formes chroniques avec une efficacité limitée (Boydron-Le Garrec, 2005).

Récemment, Zimmermann et al. (2013) ont évalué l’effet d’analgésiques sur l’allodynie au froid chez la souris et sur des cellules de neuroblastomes humains. Les traitements par le topiramate, l’amitryptiline, le mexilétine et la carbamazépine n’ont pas montré d’amélioration. Cependant, la

lamotrigine et la flupirtine semblaient être de bons candidats avec une inhibition quasi-complète de l’allodynie au froid alors que la phénytoïne ne l’a inhibée que partiellement.

Enfin, dans les formes graves, des analeptiques cardio-vasculaires sont administrés, en cas de choc ou de collapsus (Bagnis, 1968 ; Laurent et Amade, 1992). L’utilisation de stabilisateurs de membrane a également été proposée. La lidocaïne et tocaïnide (Lange et al., 1988) qui bloquent les CSDPs, se sont montrées efficaces par voie parentérale pour atténuer les effets cardio-vasculaires de la CTX chez le chat (Boydron-Le Garrec, 2005).

Les formes aiguës d’intoxication ciguatérique incluant la détresse respiratoire, et parfois le coma, peuvent nécessiter l’hospitalisation et la mise sous assistance respiratoire des patients touchés ainsi que l’administration d’atropine pour corriger les problèmes cardiovasculaires comme la bradycardie et l’hypotension (Haro et al., 2003 ; Friedman et al., 2008). Dans les cas sévères, la dopamine ou l’adrénaline ont été utilisées (Cheng et Chung, 2004).

Enfin, il a été recommandé d’éviter l’absorption d’opiacés et de barbituriques qui pourrait provoquer de l’hypotension. Par ailleurs, les opiacés pourraient interagir avec la maïtotoxine au vu de son rôle potentiel dans le phénomène de la ciguatera (Friedman et al., 2008).

2.1.2. Un produit testé par essais cliniques : le mannitol

Le mannitol a beaucoup été étudié depuis les années 90. C’est un polyol (figure 11) qui est utilisé en solution pour réduire la pression intracrânienne de par sa propriété hypertonique (Wise et Chater, 1962).

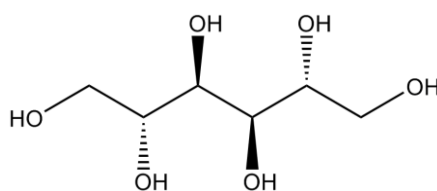


Figure 11 : Structure chimique du mannitol.

Il semble être le traitement le plus efficace chez l’humain pour inverser les manifestations neurologiques de la ciguatera, surtout quand il est administré à large dose (1 g/kg) pendant la phase d’intoxication aiguë qui dure de 1 à 5 jours (Palafox et al., 1988). Une seule étude en simple aveugle (seul le patient ne connaît pas la nature du traitement : placebo ou molécule active) a montré que l’administration de mannitol en injection intraveineuse était plus efficace qu’un mélange de vitamines et de gluconate de calcium (Bagnis et al., 1992a). De plus, l’utilisation d’une solution hyper-osmotique contenant du mannitol a permis de prévenir ou de contrer l’augmentation de

l’excitabilité et le gonflement nodal des nerfs myélinisés de grenouilles (Mattei et al., 1999). Plus récemment, une étude sur le mannitol a permis de comparer l’action de solutions iso-osmolaire et hyper-osmolaire de mannitol sur des neurones de ganglions rachidiens de rats. Les deux solutions ont eu une influence positive sur la majorité des effets induits par les CTXs et ont permis de contrer les symptômes de la ciguatera (Birinyi-Strachan et al., 2005).

Le mécanisme d’action du mannitol reste inconnu. Une des théories est que le mannitol entre en compétition avec les CSDPs (Palafox et al., 1988). Une seconde théorie est que son efficacité est due à sa propriété d’agent osmotique et à sa capacité à réduire l’excès de flux des cellules nerveuses ou à prévenir l’influx d’ions sodium à travers les CSDPs au niveau cellulaire (Friedman et al., 2008). Il est aussi suggéré que le mannitol réagit directement avec les CTXs pour les neutraliser ou les déplacer de leur site d’action (Swift et Swift, 1993). Birinyi-Strachan et al. (2005) ont confirmé que le mécanisme d’action du mannitol n’était pas limité à un effet osmotique mais impliquait un processus plus complexe avec une inhibition de la liaison des CTXs au récepteur.

Cependant, le mannitol injecté en intraveineuse chez la souris n’a pas montré d’efficacité face à des CTXs injectées en intra-péritonéale, que ce soit en préventif ou curatif (Lewis et al., 1993). Purcell et al. (1999) ont réalisé le même type d’expérience mais sur des rats cette fois-ci. Ils ont ainsi confirmé les résultats sur souris en montrant que le mannitol n’agissait pas sur les effets des CTXs au niveau de la conduction nerveuse. Ces résultats vont donc à l’encontre des études précédentes qui montraient une amélioration de l’état des patients. Les premiers essais cliniques n’ayant pas été menés en double aveugle (le patient et le médecin ne connaissent pas la nature du traitement) et le modèle d’étude n’étant pas le même, les recherches ont été poursuivies sur le mannitol (Lewis et al., 1993). Une des seules études en double aveugle a alors comparé le mannitol à une solution saline mais n’a pas permis de confirmer la supériorité de l’efficacité du mannitol (Schnorf et al., 2002).

2.1.3. Les pistes prometteuses : antagonistes et anticorps des toxines

2.1.3.1. Le brévénal et les dérivés de la brévétoxine

Les PbTx étant des analogues des CTXs (figure 12), et ayant comme cible le même site des CSDPs, leurs antagonistes pourraient aussi être des antagonistes des CTXs et donc représenter une voie dans le traitement des intoxications ciguatériques.

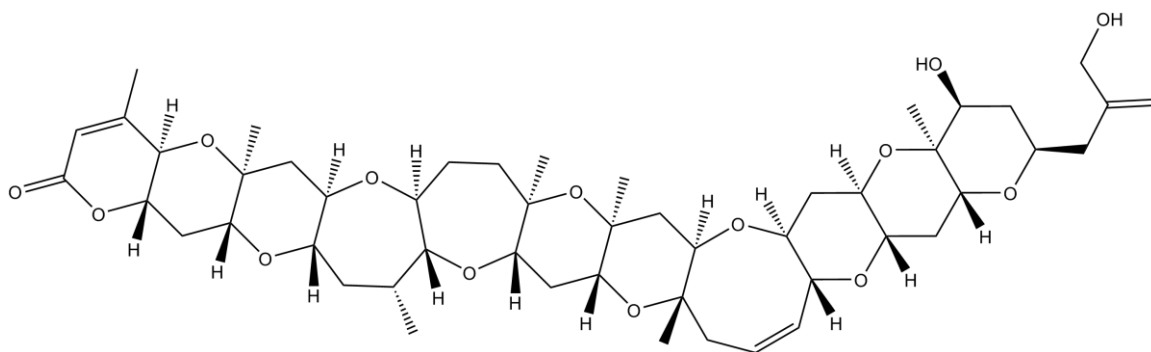


Figure 12 : Structure chimique de la brevéttoxine-3.

Le brevénal (figure 13) est un produit naturel issu du dinoflagellé *Karenia brevis* et isolé de cellules en culture par Bourdelais et al. (2004). Il a un effet inhibiteur sur la PbTx-3 qui a été montré par le test d'interaction ligand-récepteur. Le brevénal entre en compétition avec la PbTx-3 pour le site 5 des CSDPs et rend le site indisponible, il agit comme une molécule antagoniste. Ils ont aussi démontré *in vivo* un effet bénéfique contre la PbTx-3 sur des poissons *Gambusia affinis* Baird & Girard 1853 (Bourdelais et al., 2004). Le brevénal est aussi efficace contre les dommages sur l'ADN induits par les PbTxs sur des lymphocytes humains (Sayer et al., 2005). Un brevet a été déposé en 2004 pour l'utilisation du brevénal dans le traitement des intoxications par les CTXs ou par les PbTxs et pour d'autres affections telles que la fibrose kystique (Baden et al., 2005).

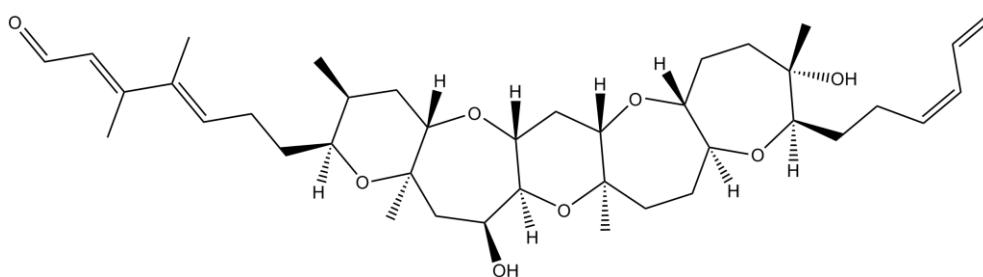


Figure 13 : Structure chimique du brevénal.

Mattei et al. (2008) et Nguyen-Huu et al. (2009) ont étudié l'effet stimulant de la P-CTX-1B sur la sécrétion de catécholamine des cellules chromaffines bovines. Ils ont aussi montré que le brevénal inhibe cet effet de manière dose-dépendante sans pour autant affecter les sécrétions de catécholamine induites par la nicotine. Le β -naphtoyl-brevéttoxine, synthétisé à partir de la PbTx-3, a aussi montré cet effet. Le brevénal et le β -naphtoyl-brevéttoxine (figure 14) ont aussi manifesté un effet inhibiteur des effets bronchoconstricteurs induits par les PbTxs chez la brebis (Abraham et al., 2004).

Un autre dérivé de la PbTx-3, le α -naphtoyl-brevéttoxine (figure 15) a été synthétisé par Purkerson-Parker et al. (2000) et s'est avéré être également un antagoniste de la PbTx-3.

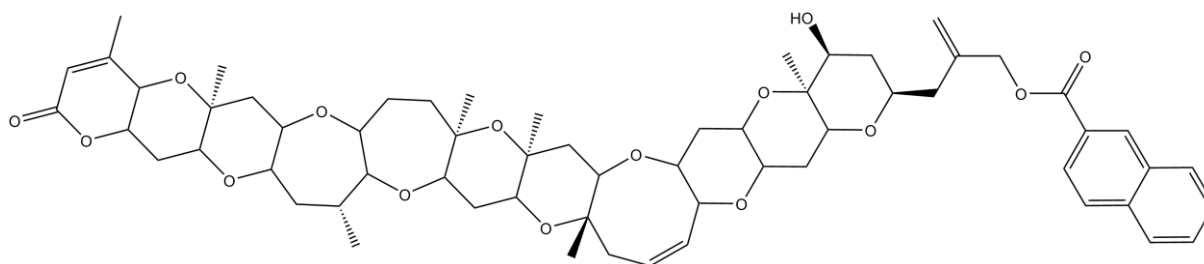


Figure 14 : Structure chimique du β -naphtoyl-brévéttoxine.

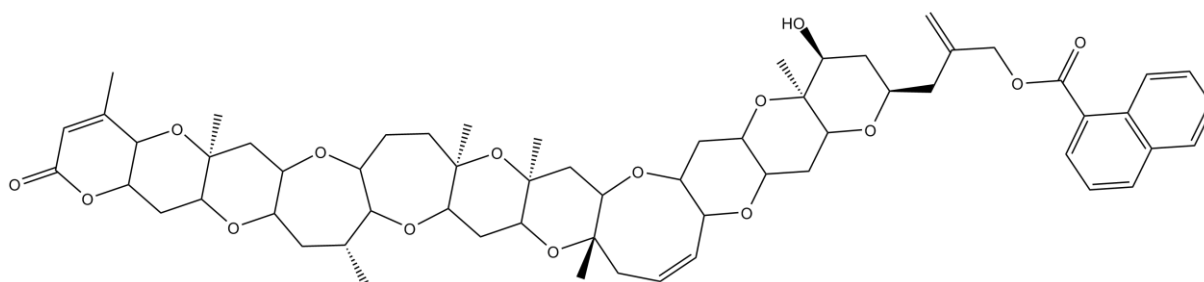


Figure 15 : Structure chimique du α -naphtoyl-brévéttoxine.

2.1.3.2. Le gambiérrol

L'équipe d'Inoue et al. (2003) a montré que le gambiérrol (figure 16) et l'acide gambiérique A (figure 17), qui sont des toxines de type polyéther cyclique produites par les dignoflagellés du genre *Gambierdiscus*, inhibaient la liaison de la brevéttoxine tritiée au site 5 des CSDPs dans le test d'interaction ligand-récepteur. La yessotoxine (figure 18), composé polyéthéré isolé de bivalves, n'a pas montré d'effet inhibiteur et ce résultat suggère qu'il y a un lien entre la taille de la région polycyclique (11 cycles contigus pour la yessotoxine contre 8 pour le gambiérrol) et le degré d'inhibition.

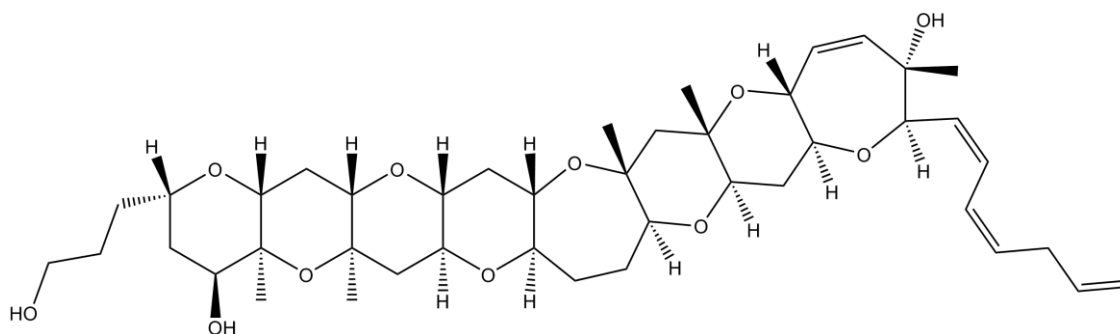


Figure 16 : Structure chimique du gambiérrol.

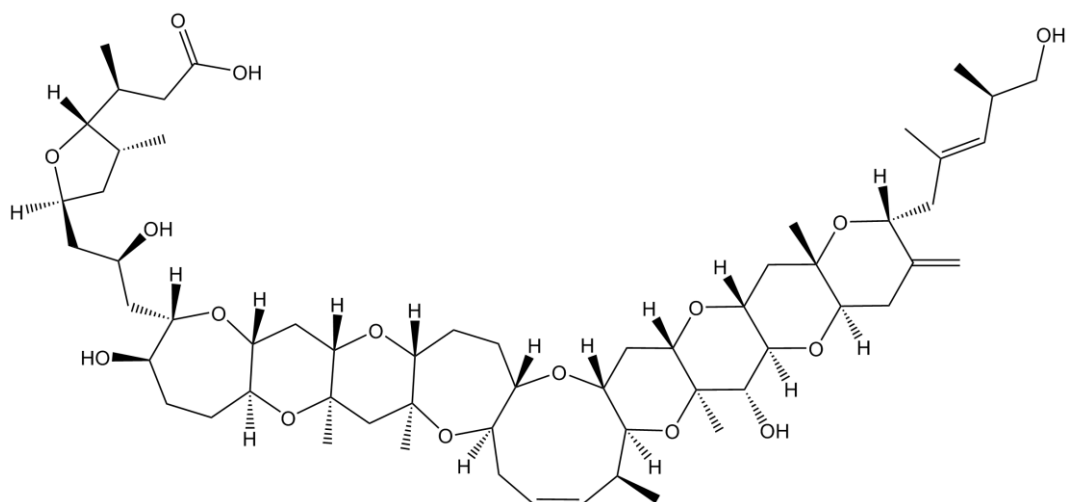


Figure 17 : Structure chimique de l'acide gambiérique A.

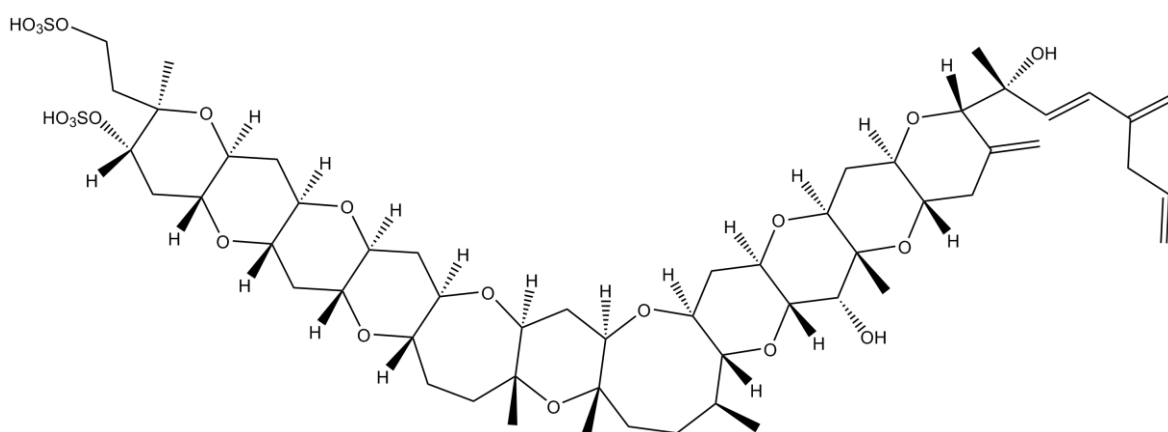


Figure 18 : Structure chimique de la yessotoxine.

LePage et al. (2007) ont confirmé cet effet inhibiteur sur des cultures de neurones granulaires du cervelet de rats en permettant de diminuer l'élévation de la concentration des ions calcium induite par la PbTx-2. Ces résultats ont été comparés avec le brevénal qui a aussi montré un potentiel inhibiteur.

Cependant, Schlumberger et al. (2010) ont observé que le gambiérrol était en fait prioritairement actif sur les canaux potassium et non sodium dans les cellules de muscle strié, ces résultats concordant avec ceux de Ghiaroni et al. (2005) sur les cellules gustatives de souris. Les analogues heptacycliques et tétracycliques du gambiérrol inhibent aussi les canaux potassium sur les cultures de neurones granulaires du cervelet de souris mais ne montrent pas de toxicité chez la souris contrairement au gambiérrol (Pérez et al., 2012).

Les sites d'action du gambiérrol semblent être les canaux sodium et calcium sur les cellules de neuroblastomes humains (Louzao et al., 2006). D'après Cagide et al. (2011), le gambiérrol semble induire une réduction de la viabilité des cellules de neuroblastomes pour une longue période

d’incubation. Pour le moment, deux cibles possibles ont été trouvées pour le gambiérrol : à faible concentration, la toxine inhibe les canaux potassium dépendant du potentiel et à haute concentration, elle active les CSDPs provoquant un influx d’ions calcium dans les cellules de neuroblastomes. Chez la souris, on observe une neurotoxicité de 50 à 80 µg/kg en injection intra-péritonéale (Fuwa et al., 2004).

2.1.3.3. Un inhibiteur de maïtotoxines

Un inhibiteur des maïtotoxines (figure 19) a été conçu par Oishi et al. (2012). C’est un polyéther heptacyclique qui a montré la plus grande efficacité face à l’influx de Ca^{2+} induit par les maïtotoxines (figure 20), sa capacité d’inhibition est même supérieure à celle de la PbTx.

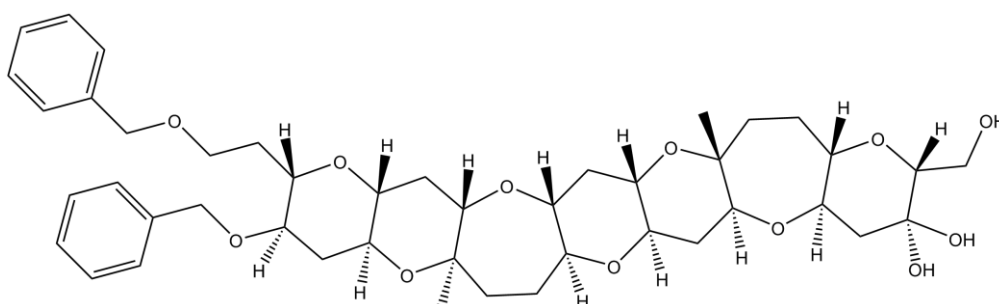


Figure 19 : Structure chimique d’un inhibiteur de maïtotoxine.

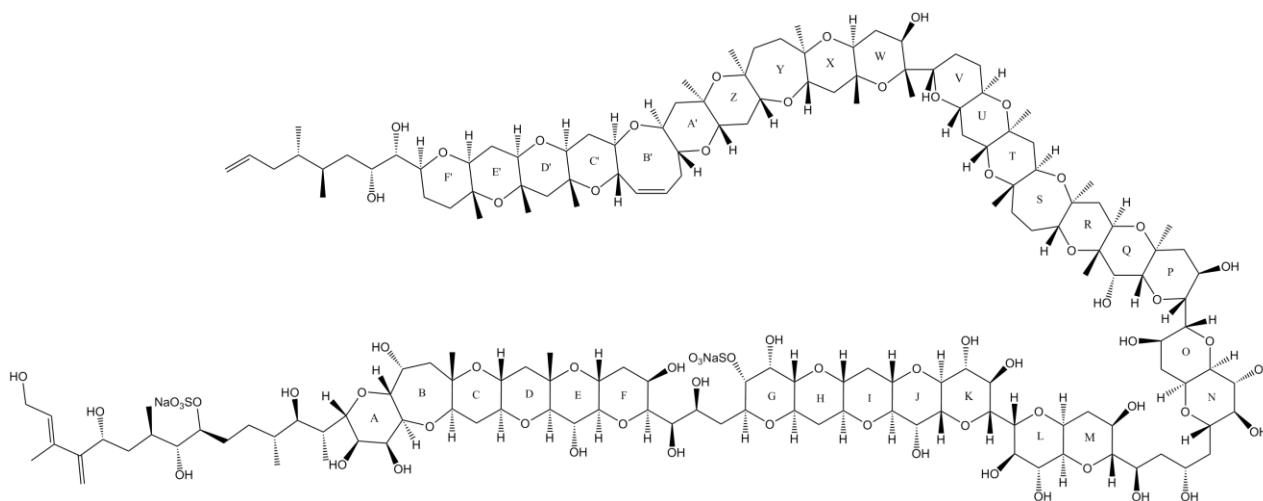


Figure 20 : Structure chimique d’une maïtotoxine.

2.1.3.4. Les anticorps

L’équipe d’Inoue et al. (2009) a réussi à produire deux anticorps monoclonaux spécifiques de la P-CTX-3C à partir d’haptènes non-toxiques (figure 21). Ces deux anticorps ont montré leur

efficacité *in vitro* sur des neuroblastomes de souris et *in vivo* chez la souris. Les pré- et post-traitements par les anticorps chez la souris réduisent les symptômes et la mortalité induite par la P-CTX-3C (figure 21). L'équipe de Tsumuraya et al. (2012) s'est intéressée à la détection de la P-CTX-1B et a produit un anticorps monoclonal pour la détecter par la méthode ELISA. Son application pour le traitement de la ciguatéra est en cours d'étude.

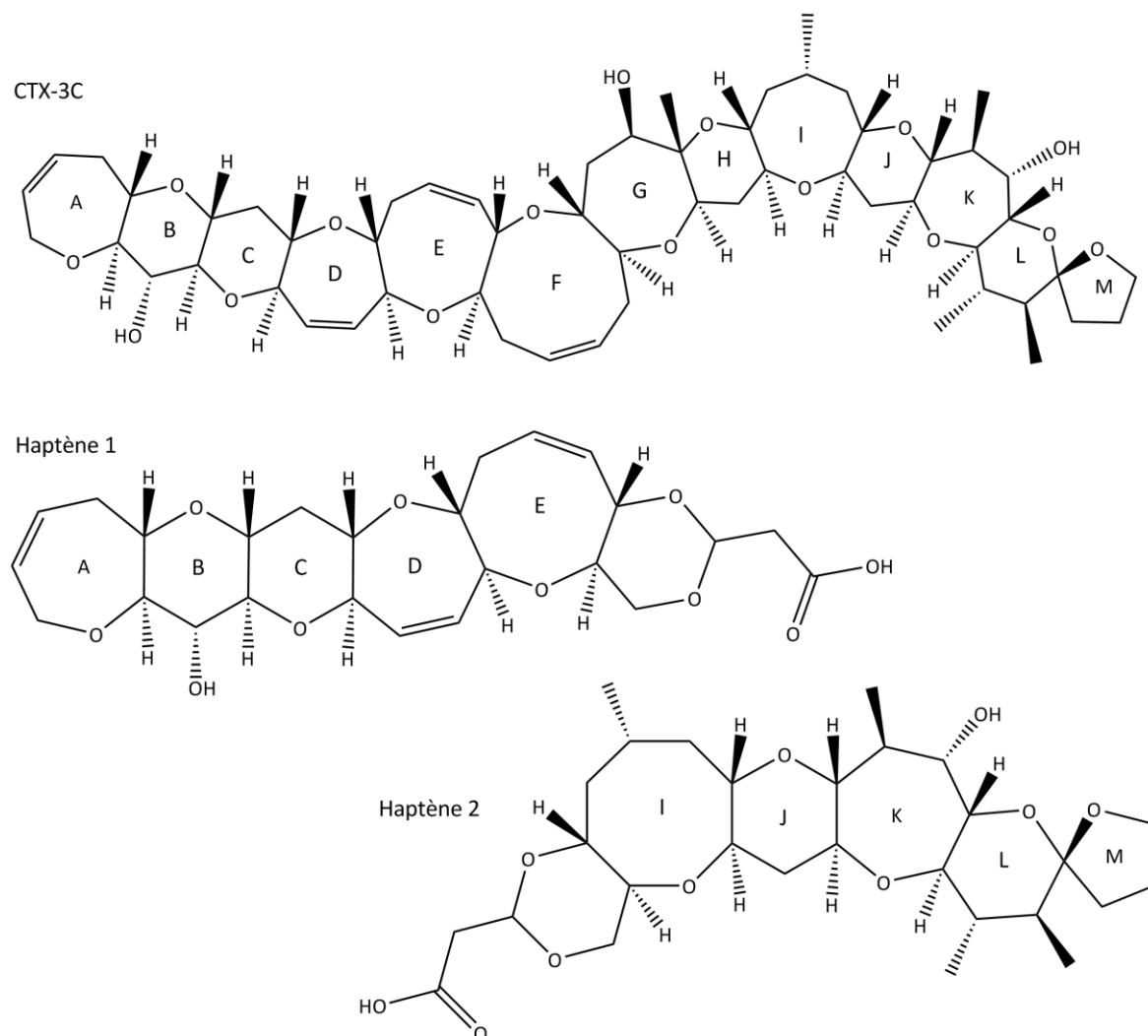


Figure 21 : Structure chimique de la CTX-3C et de ses haptènes (Inoue et al., 2009).

2.2. Dans la médecine traditionnelle

À ce jour, les pistes de traitement du syndrome ciguatérique n'en sont qu'à l'état de recherche et l'utilisation du brévenal, avec un brevet déposé en 2004 est la plus sérieuse mais n'est toujours pas validée chez l'être humain ni développée commercialement. En revanche, de nombreux témoignages rapportent l'utilisation des plantes médicinales pour traiter ce syndrome.

L’IRD a commencé à s’intéresser aux remèdes traditionnels utilisés contre la ciguatéra il y a une vingtaine d’années. Dans le Pacifique, un grand nombre de remèdes traditionnels à base de plantes est préférentiellement utilisé pour traiter la ciguatéra (cf. Kumar-Roiné et al. 2011b pour revue).

Une liste des plantes utilisées dans le Pacifique (Nouvelle-Calédonie, Vanuatu, Polynésie française, Guam, Samoa, Tonga et Fidji) avec leur mode de préparation a ainsi été dressée (Laurent et al., 1993). Les plantes les plus populaires à travers la Mélanésie et/ou la Polynésie sont : *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger (syn. *Argusia argentea* (L.f.) Heine), *Artocarpus altilis* (Parkinson ex F.A. Zorn) Fosberg, *Carica papaya* L., *Syzygium malaccense* (L.) Merrill & Perry, *Vitex rotundifolia* L.f. Moldenke (Bourdy et al., 1992). Le grand nombre de plantes utilisées contre la ciguatéra peut surprendre mais est bien corrélé avec la multiplicité des symptômes observés (Kumar-Roiné et al., 2011b).

Le premier test biologique réalisé sur une vingtaine de ces plantes a été le suivi de souris intoxiquées en intrapéritonéale par des CTXs, auxquelles on a ensuite administré chacune des plantes préparées selon la méthode traditionnelle. Le temps de récupération et la courbe de poids des souris ont été suivis comme indicateur de l’efficacité des plantes. Des effets bénéfiques ont alors été observés pour le mannitol, les feuilles d’*H. foertherianum* et les feuilles de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Laurent et Amade, 1992).

Dans le cadre des thèses de doctorat de Raphaëlle Boydrón-Le Garrec et de Shilpa Kumar-Roiné, une trentaine de plantes parmi la soixantaine recensée précédemment a été criblée au moyen d’un test d’inhibition de la cytotoxicité de la PbTx-3 sur neuroblastomes de souris avec 5 et 0,5 mg/ml d’extraits de plantes. Les extraits les plus actifs ont aussi été testés avec de la CTX (Boydrón-Le Garrec, 2005). Une trentaine de plantes a également été testée sur des cellules de macrophages murins. L’inhibition de la production d’oxyde nitrique déclenchée par les CTXs a été observée et sept plantes ont ainsi montré une activité dont par exemple *Euphorbia hirta* L., *S. malaccense*, *S. terebenthifolius* et *Vitex trifolia* L. (Kumar-Roiné et al., 2009).

À la suite de ces études, quatre extraits de plantes, *E. hirta*, *Cerbera manghas* L., *V. trifolia* et *H. foertherianum*, ont été sélectionnés et leurs effets sur l’expression de cytokines inflammatoires et du gène iNOS, induite par le LPS, ont été étudiés par les techniques de qPCR et d’ELISA. Seuls *E. hirta* et *H. foertherianum* pouvaient agir efficacement sur les médiateurs de l’inflammation (Matsui et al., 2009).

Le test d’interaction ligand-récepteur a ensuite été utilisé sur une vingtaine de plantes afin de déterminer si la réponse inhibitrice de la cytotoxicité observée était due à leur action sur le site 5 des CSDPs. Seuls trois extraits, *H. foertherianum*, *Pandanus tectorius* Parkinson ex du Roi et *V. trifolia* ont montré une réponse face à la liaison de la PbTx-3 sur le site 5 des CSDPs (Kumar-Roiné, 2009).

Les résultats de ces différents tests biologiques ont permis de sélectionner trois des plantes les plus actives : *E. hirta*, *V. trifolia* et *H. foertherianum*. Le fractionnement chimique bio-guidé, par le test de Griess (i.e. pour la détection de l’oxyde nitrique) et/ou le test d’interaction ligand-récepteur (pour *H. foertherianum*), a alors permis l’isolement des principes actifs supposés de chacune de ces plantes. Les composés qui ont été isolés des fractions actives sont respectivement la quercitrine, l’agnuside et l’acide rosmarinique. Seul le composé majoritaire de chaque fraction a été isolé (Kumar-Roiné, 2009).

2.3. Conclusion

Ces résultats prometteurs suggèrent l’application potentielle d’un traitement basé sur les plantes utilisées dans les remèdes traditionnels. De plus, l’incapacité ou le peu de volonté actuelle, du fait de la zone de répartition de la ciguatéra pour le moment limitée aux régions tropicales, de la médecine occidentale à développer un traitement efficace renforce la nécessité de s’orienter vers la médecine traditionnelle. Notre projet s’est intéressé plus particulièrement à *H. foertherianum* en raison de ses résultats aux tests biologiques mais aussi pour son utilisation traditionnelle répandue à travers le Pacifique.

3. *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger

3.1. Botanique

Heliotropium foertherianum N. Diane & H.H. Hilger (figure 22) fait partie de la sous-famille des Heliotropiacées, famille des Boraginacées. Il a été appelé *Argusia argentea* (L.f.) H.H. Heine, *Tournefortia argentea* (L.f.) et enfin, pour le nom le plus ancien, *Messerchmidia argentea* (L.f.) I.M. Johnston (Diane et al., 2003 ; Craven, 2005). D’autres noms moins connus ont aussi été utilisés : *Tournefortia arborea* Blanco, *sarmentosa* sensu Christian non Lam., et *sericea* Cham. (Manner et Elevitch, 2006). Aucune variété n’a été déterminée jusqu’à présent et la variabilité génétique de cette espèce n’est pas documentée.

Les noms communs qui lui sont attribués sont le faux-tabac ou l’arbre à gratte, d’usage surtout en Nouvelle-Calédonie (Pétard, 1986 ; Butaud et al., 2008) ou en anglais *octopus tree* (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2008). Les noms indigènes les plus utilisés en Polynésie française sont *tahinu*, *tohonu* ou *geogeo* (Pétard, 1986).



Figure 22 : Croquis botanique d'*H. foertherianum* (Laurent et al., 1993).

Cette espèce peut se présenter sous la forme d’un arbuste ou d’un arbre pouvant atteindre 5-6 m de hauteur et 50 cm de diamètre, à écorce gris clair à brun noir, profondément crevassée. Les feuilles sont simples, insérées en spirale à l’extrémité des rameaux, à limbe de couleur vert clair, couvert d’une pubescence soyeuse développant une couleur argentée au soleil. Le limbe est charnu, oblancéolé à obovale porté par un court pétiole ailé. Les inflorescences en panicules de cymes dont les rameaux ultimes sont scorpioïdes portent de très nombreuses fleurs. La corolle blanche est divisée en cinq lobes. Le fruit est sous la forme d’une drupe verte charnue, globulaire, se divisant à maturité en deux à quatre petites noix (pyrènes) de couleur brun clair contenant chacune deux à quatre graines insérées dans un tissu liégeux (Butaud et al., 2008).

Ses feuilles et inflorescences distinctes font qu’il est difficile de le confondre avec une autre espèce de son aire de répartition (Manner et Elevitch, 2006). Plusieurs spécimens sont consultables à l’herbier de Polynésie (figure 23).

Cet arbre pousse pratiquement continuellement, la floraison et la fructaison se font en continu tout au long de l’année (Manner et Elevitch, 2006 ; Butaud et al., 2008).



Figure 23 : Échantillon de l’herbier de la Polynésie française (A) et individu correspondant (B)
© Rossi F.

3.2. Aires de répartition

H. foertherianum pousse dans un climat maritime équatorial à subtropical de l’Océan Indien à l’Océan Pacifique (Manner et Elevitch, 2006). Il est indigène en Polynésie française, et est plus particulièrement retrouvé dans l’archipel des Tuamotu mais n’est pas présent aux Marquises (Pétard, 1948 ; Butaud et al., 2008). Il se retrouve dans toute la région Pacifique (Butaud et al., 2008) : aux îles Pitcairn (Waldren et al., 1995), au Japon dans la province d’Okinawa (Tomihara et al., 1993 ; Ogihara et al., 1997a), en Nouvelle-Calédonie, au Vanuatu, aux îles du nord-est de l’Australie (Flood, 1977 ; Rogers, 1993), en Papouasie Nouvelle-Guinée (Butaud et al., 2008), à Hawaii (Manner et Elevitch, 2006), aux îles Fidji (Thompson, 1949). On le retrouve aussi aux îles Xisha en Chine (Cao et al., 2005), en Indonésie et en Malaisie (Butaud et al., 2008), aux Seychelles (Cazes-Duvat et al., 2002), à l’île Maurice (Sauer, 1962), à Madagascar (Butaud et al., 2008), au Kenya et au Mozambique (Schmelzer et Gurib-Fakim, 2008).

Son statut UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) est aujourd’hui LR/lc (faible risque/faible préoccupation) (World Conservation Monitoring Centre, 1998).

3.3. Écologie

H. foertherianum est généralement présent en bord de mer, croissant sur des sols sablonneux ou rocheux. Il tolère des sols infertiles, salins et peu profonds (Manner et Elevitch, 2006).

C'est une espèce pionnière dans les atolls, grâce à ses graines capables de flotter en gardant leur capacité germinative (Guezennec et al., 2006) et à leur dissémination par les oiseaux ou le vent (Butaud et al., 2008). L'exposition à l'eau salée apparaît même être un pré-requis à la germination des graines (Lowman, 1984).

Cet arbre est donc adapté aux conditions écologiques difficiles des atolls et des *motu* d'îles hautes (Butaud et al., 2008). Les seuls critères affectant la survie d'*H. foertherianum* semblent être l'exposition au sel, au vent et la disponibilité de l'eau et des nutriments, bien qu'aucune étude ne se soit véritablement intéressée à l'impact de ces facteurs (Lowman, 1984).

Cette espèce peut être retrouvée sous forme de forêt ou en pied individuel associé avec d'autres espèces (Manner et Elevitch, 2006). D'après l'Atlas de la Polynésie française de l'IRD, *H. foertherianum* se retrouve aussi bien du côté lagon que du côté océan des atolls, formant une frange en bord de mer (Sachet, 1983). Côté lagon, il est plutôt associé à *Suriana maritima* L. et *Scaevola sericea* Vahl (syn. *Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) alors que côté océan, sur un substrat plus grossier, il est associé à *Pemphis acidula* Forst & Forst et *S. sericea* (Jamet et Trichet, 1987 ; Fosberg, 1992). Plus à l'intérieur des terres côté océan, on retrouve *Guettarda speciosa* L. et *Pandanus tectorius* avec *H. foertherianum* mais plus développé qu'en bordure de mer (Sachet, 1983 ; Jamet et Trichet, 1987) (figure 24).

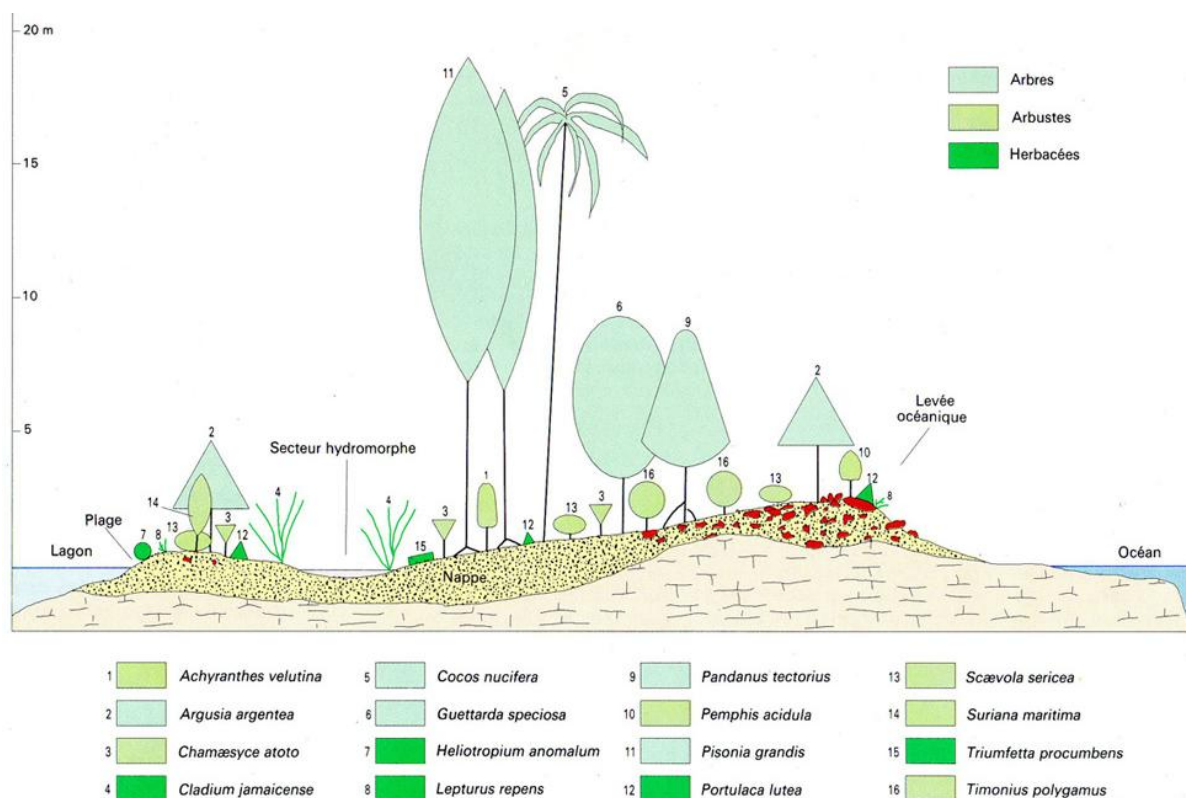


Figure 24 : Coupe schématique d'un *motu* d'atoll des Tuamotu, tiré de l'Atlas de la Polynésie française © IRD.

3.4. Utilisations traditionnelles

Une multitude d'utilisations traditionnelles est recensée pour *H. foertherianum*, autant pour son bois, pour ses emplois divers que pour ses propriétés médicinales.

Son bois est par exemple exploité pour la construction de maison, canoë, ou pour l'artisanat fait-main (Manner et Elevitch, 2006 ; Butaud et al., 2008) et aux Tuamotu il est utilisé en tant que combustible (Butaud et al., 2008).

Ses feuilles sont utilisées comme appât pour poissons aux îles Tokelau. À Tahiti, elles sont employées dans la préparation d'une teinture rouge (Manner et Elevitch, 2006). Aux Kiribati et aux îles Marshall, les femmes ont recours aux feuilles pour leur déodorant (Manner et Elevitch, 2006).

Les feuilles sont ingérées crues en salade aux Kiribati et en Inde ou utilisées pour le fourrage des cochons ou même en tant qu'épice pour la cuisson des cochons (Manner et Elevitch, 2006). Dans les îles des Tuamotu, les feuilles sont réputées pour leur utilisation comme paillis dans les fosses à taro (Doty et al., 1954).

Aux îles Marshall, les feuilles sont préparées en thé ou en bain de vapeur pour arrêter les hémorragies ou pour masquer les blessures (Manner et Elevitch, 2006). Aux îles Tokelau et Tuvalu, c'est par application locale que les feuilles montrent un bénéfice antihémorragique (Guezennec et al., 2006).

À Kosrae, l'écorce est mixée avec de la chair de coco pour traiter les hémorroïdes et les feuilles sont utilisées dans un bain de vapeur comme fortifiant pour les femmes venant d'accoucher alors qu'aux Fidji la plante entière sauf les racines est réputée pour cette utilisation (Manner et Elevitch, 2006).

Aux îles Cook, ce sont les bourgeons foliaires qui sont employés en cas de douleurs locales et rhumatismes. Ces affections sont traitées par les racines aux Fidji (Manner et Elevitch, 2006).

Aux îles Samoa et en Nouvelle-Calédonie, les feuilles sont utilisées contre la fièvre (Guezennec et al., 2006). En Polynésie française, une décoction préparée avec des feuilles est considérée comme un dépuratif énergétique (Pétard, 1986). À Nauru, on emploie l'écorce des racines pour soigner le prurit des enfants et la diarrhée (Manner et Elevitch, 2006).

D'après Ogihara et al. (1997b) et Aung et al. (2010), les piqûres de méduses sont soulagées grâce aux feuilles et tiges au Japon. À Maiao, les jeunes pousses sont utilisées en application locale contre les piqûres de poisson-pierre (Pétard, 1986 ; Butaud et al., 2008).

Enfin, l'utilisation des feuilles sénescents et de l'écorce d'*H. foertherianum* est répandue dans le Pacifique sud comme anticiguatérique, notamment en Nouvelle-Calédonie, au Vanuatu, en Polynésie française (Bourdy et al., 1992), et aux Tonga (Manner et Elevitch, 2006).

3.5. Molécules identifiées

H. foertherianum n'a pas beaucoup été étudié en chimie, seules quelques publications concernent la composition de ses tiges et de ses fruits. L'équipe d'Ogihara a montré la présence, d'acides phénoliques (figure 25), de triterpènes (figure 26), d'alkaloïdes pyrrolizidiniques (figure 27) (Ogihara et al., 1997a et 1997b ; Ogihara et al., 2002) et de flavonoïdes (figure 28) (Wu et Inoue, 1996 ; Ogihara et al., 2012) dans ses tiges et ses fruits. Aung et al. (2010a) ont confirmé la présence d'acides phénoliques dans ses tiges et ses feuilles. Trois hydrocarbures et seize esters méthyliques d'acides gras ont aussi été isolés de ses fruits (Ogihara et al., 2012).

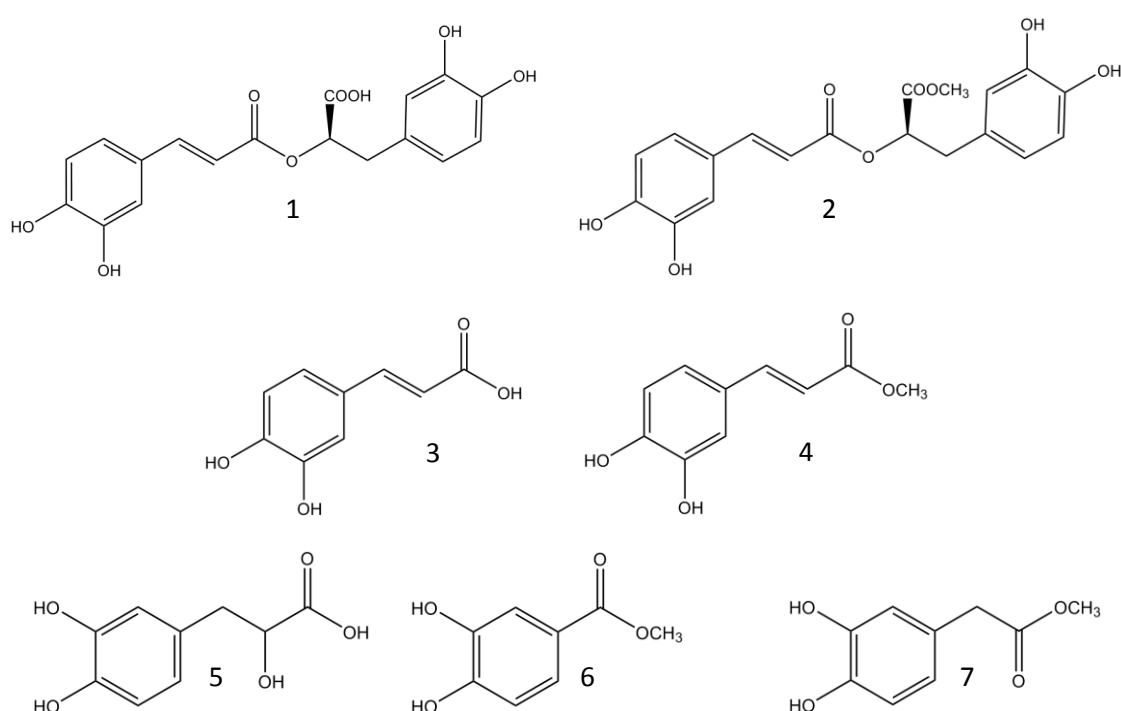


Figure 25 : Les acides phénoliques d'*H. foertherianum* : **1.** Acide rosmarinique **2.** Méthyl ester d'acide rosmarinique **3.** Acide caféique **4.** Méthyl ester d'acide caféique **5.** Acide 3-(3,4-dihydroxyphényl) lactique **6.** 3,4-dihydroxybenzoate de méthyle **7.** Dopacétate de méthyle.

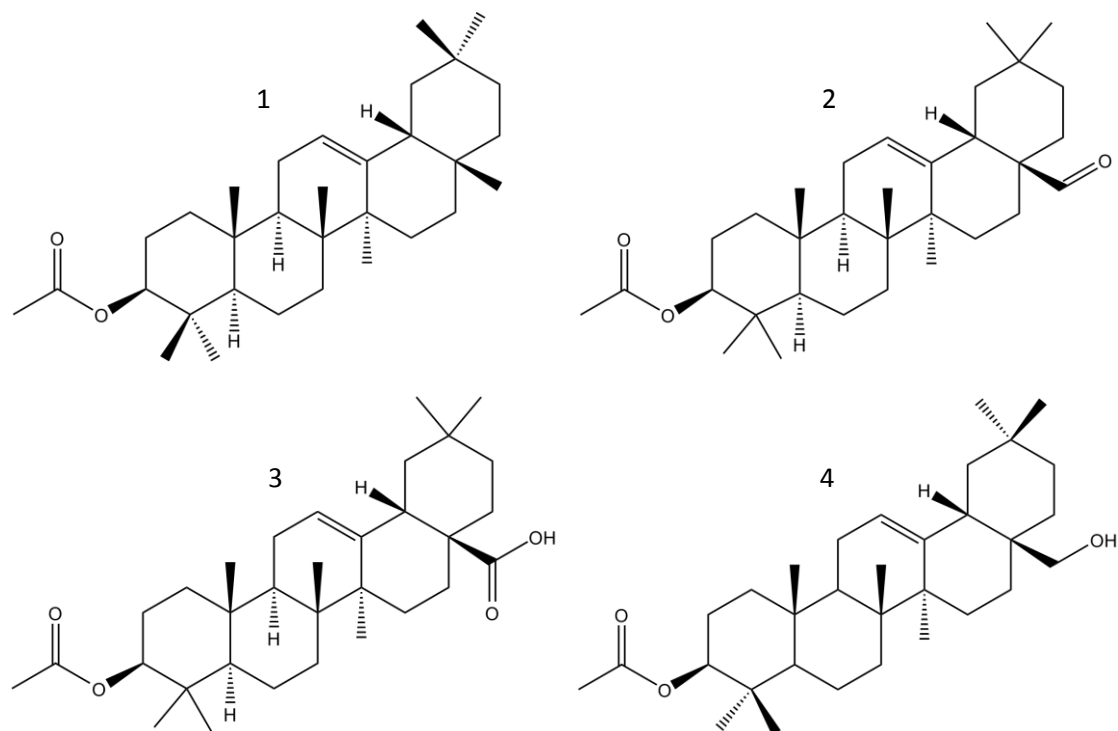


Figure 26 : Les triterpènes d'*H. foertherianum* : 1. Acétate de β -amyrényle
2. Aldéhyde 3-O-acétyl-oléanolique
3. Acétate d'acide oléanolique 4. 3-Acétate d'érythrodiol.

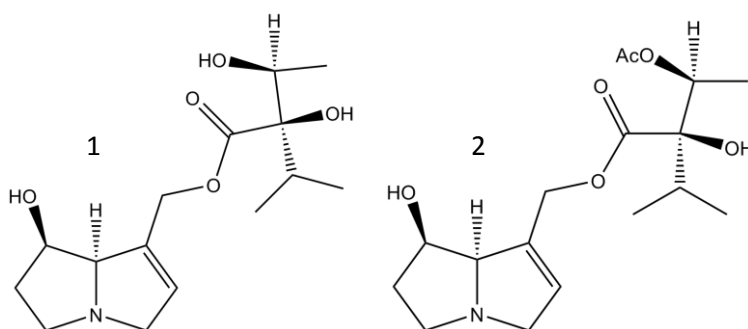


Figure 27 : Les alcaloïdes pyrrolizidiniques d'*H. foertherianum* : 1. Indicine 2. Acétyl indicine.
Leurs équivalents N-oxydes ont aussi été isolés de cette espèce.

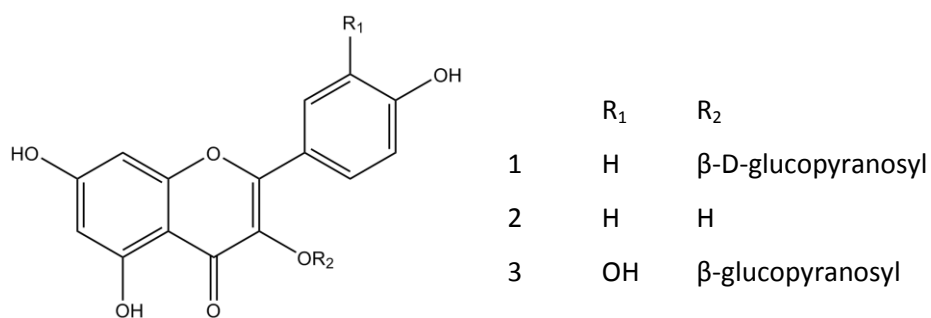


Figure 28 : Les flavonoïdes d'*H. foertherianum* : 1. 3-O- β -D-glucoside de kaempférol 2. Kaempférol
3. 3-O- β -glucoside de quercétine.

3.6. Activités biologiques

D'après une enquête ethnopharmacologique, l'utilisation d'*H. foertherianum* dans la médecine traditionnelle pour traiter la ciguatera est répandue dans le Pacifique. Afin de vérifier son potentiel, des extraits de feuilles et d'écorce ont été administrés à des souris après intoxication par un foie de murène. Ils permettraient une perte de poids réduite des souris et un retour à la normale plus rapide (Laurent et Amade, 1992).

L'extrait de feuilles serait aussi efficace contre les effets neurologiques induits par les CTXs. En effet, il a permis de contrer l'augmentation de l'excitabilité de la membrane nodale des axones myélinisés de grenouilles (Benoit et al., 2000). Il a également montré un effet protecteur contre la cytotoxicité induite par la PbTx-3, analogue des CTXs, sur les neuroblastomes de souris (Boydron-Le Garrec et al., 2005).

Tomihara et al. (1993) ont mis en évidence pour la première fois la propriété antihémostatique d'une décoction de feuilles d'*H. foertherianum* sur des globules rouges mis en contact avec du venin de méduse. Aung et al. (2010b) ont ensuite confirmé cette activité par des tests antihémorragiques sur des souris empoisonnées par du venin de serpent. La propriété antihémostatique de l'extrait a aussi été révélée avec l'inhibition de la lyse des érythrocytes provoquée cette fois-ci par une CTX (Boydron-Le Garrec et al., 2002).

Concernant ses propriétés anti-inflammatoires, il a été montré que l'extrait d'écorce inhibait la production d'oxyde nitrique induite par le lipopolysaccharide sur des macrophages RAW 264.7 (Kumar-Roiné et al., 2009). L'extrait de feuilles a cependant présenté une faible efficacité sur la modulation des médiateurs de l'inflammation c'est-à-dire l'oxyde nitrique synthase et la production de cytokines (Matsui, 2009).

3.7. Données sur la sous-famille des Heliotropiacées et le genre *Heliotropium*

Une trentaine d'espèces appartenant au genre *Heliotropium*, et *Tournefortia*, ou à la sous-famille des Hélotropiacées (tableau 2) a été étudiée depuis les années 70 et les molécules identifiées peuvent se classer en quatre familles chimiques : les stéroïdes, les terpènes, les polyphénols dont l'acide rosmarinique, et les alcaloïdes pyrrolizidiniques qui sont très présents dans cette famille.

Les activités biologiques recensées sont variées et peuvent être autant anti-appétante pour les insectes que antihémorragique ou anti-inflammatoire.

Tableau 2 : Liste des molécules identifiées d’espèces du genre *Heliotropium* ou de la sous-famille des Héliotropiacées et de leurs activités biologiques.

<i>Heliotropium</i>	Molécules identifiées des extraits de plantes	Activités biologiques recensées des extraits de plantes (gras et symbole) ou de leurs molécules (a, b, ou c)	Références bibliographiques
<i>angiospermum</i> Murray	bluménol A, bluménol B, loliolide, β -sitostérol, α -amyrine, β -amyrine		Erosa-Rejón et al., 2009
<i>arbainense</i> Fresen.	héliotrine, europine, 7-angélyl-héliotrine, lasiocarpine, europine		Rizk et al., 1991 ; Zalkow et al., 1979
<i>bacciferum</i> Forssk. (syn. <i>undulatum</i> Vahl)	héleurine, héliotrine, supinine, europine, acides γ -linoléique	toxicité sur un coléoptère*	Farrag et al., 1996 ; El Nadi et al., 2001* ; Guil-Guerrero et al., 2006
<i>bovei</i> Boiss.	lasiocarpine, europine (a), 5'-acétyl-lasiocarpine, 7-acétyl-europine, bovéinine	antifongique (a), anti-appétant pour les insectes (a)	Reina et al., 1995 (a) et 1998b
<i>bracteatum</i> R.Br..	hélibractéatinine, hélibractéatine, rétronécine, hélibractinécine		Lakshmanan et Shanmugasundaram, 1994 et 1995 a
<i>chenopodiaceum</i> (A.DC.) Clos var. <i>ericoideum</i> (Miers) Reiche	7,3'-diméthyl-ériodictyol, ayanine, sakuranétine, kumatakénine, rhamnocitrine		Urzúa et al., 1993
<i>circinatum</i> Griseb.	europine, héliotrine, lasiocarpine	toxicité sur les caillies et leurs œufs*	Eröksüz et al., 2008*
<i>crassifolium</i> Boiss.	europine, ilamine		Farsam et al., 2000
<i>curassavicum</i> L.	héliocurassavicine, héliocurassavinine, héliocoromandaline, héliocurassavine, curassavinine, coromandaline, héliovinine, curassanécine, curassavine, acide curassavique, coromandaline, héliovicine, 9-(3'-isovaleryl) viridifloryl rétronécine, 3'-acétyl-indicine	génotoxique*, antiprotozoaire♦	Mohanraj et al., 1978 et 1982 ; Carballo et al., 1992* ; Subramanian et al., 1980 ; Davicino et al., 1988 ; Abdel-Sattar et al., 2010♦
<i>dissitiflorum</i> Boiss.	héliotrine, europine, 5'-déoxy-lasiocarpine		Shafiee et al., 2002
<i>dolosum</i> De Not.	lasiocarpine, europine, héliosupine, héliotrine, échimidine	toxicité sur les caillies et leurs œufs*, hépatotoxicité sur les souris et les poulets♦	Eröksüz et al., 2001a♦ et b♦, 2002* et 2008*
<i>ellipticum</i> Ledeb.	stigmastérol, β -amyrine (a), épifriedélnol, cycloarténone (a), acétate de β -amyrényle, friedéline (a), europine (b), héliotridine (b), lasiocarpine et son N-oxyde (b)	antimicrobien* (a et b)	Jain et al., 1987* (b) et 2001 (a)
<i>europaeum</i> L.	europine, héliotrine, supinine, héleurine, lasiocarpine, 7-angélyl-héliotrine, acétyl-lasiocarpine, héliotridine estérifié, supinine, supinidine estérifié	hépatotoxique*	Tosun et Tamer, 2004 ; Lee et al., 2007b ; O'Dowd et Edgar, 1989 ; Caple et Heath, 1979* ; Hill et al., 1997* ; Culvenor et al., 1975 ; Culvenor, 1954

<i>filifolium</i> I.M. Johnst	filifolinol (a et c), sénécionate de filifolinyl (b), galangine, acide 3'-hydroxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro[1-benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylique, méthyl 3'-acétyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro[1-benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylate, méthyl 3'-isopentanoyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro[1-benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylate, méthyl 3'-benzoyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro[1-benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylate, ayanine, 3-O-méthylgalangine	antiviral* (a et b), antimicrobien (b), antifongique ♦ (c)	Modak et al., 2004a* (a) et 2010* (b) ; Urzúa et al., 1993, 2001 (b) et 2008* (a) ; Mendoza et al., 2008♦ (c) ; Larghi et al., 2009
<i>floridum</i> Clos	héliovicine, 3'-acétyl-trachélanthamine (a), floridine, floridinine (b), floridimine	anti-appétant* (a) et antifongique* (a et b)	Reina et al., 1997* (a et b) Aung et al., 2010 ; Ogihara et al., 1997a et b ; Ogihara et al., 2002 et 2012 ; Laurent et al., 1992 ; Tomihara et al., 1993 ; Benoit et al., 2000 ; Boydron-Le Garrec et al., 2002 et 2005 ; Kumar-Roiné et al., 2009 ; Wu et Inoue, 1996
<i>foertherianum</i> Diane & Hilger (ou <i>Tournefortia argentea</i> L. f.)	cf. parag. 3.5.	cf. parag. 3.6.	
<i>glutinosum</i> Phil.	4-méthoxy-3-[(2)-7'-méthyl-3'-hydroxyméthyl-2',6'-octadiényl] phénol (a), 5,3'-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone, 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavanone, 4'-acétyl-5-hydroxy-7-méthoxyflavanone	antioxydant* (a)	Modak et al., 2007* (a)
<i>huascoense</i> I.M. Johnst.	3-méthylgalangine, 3,7-diméthylgalangine, alpinone, acide carrizaloïque		Urzúa et al., 2000 ; Villarroel et al., 2001 Reddy et al., 2002* ; Yeo et al., 2011* (a) ; Souza et al., 2005 ; Sanz et al., 1993♦ ; Mattocks et al., 1961 ; Mattocks, 1967a ; Pandey et al., 1982 ; Kugelman et al., 1976● (b) ; Osungunna et al., 2011■ ; Machan et al., 2006+ ; Ogunbinu et al., 2009 ; Dash et Murthy, 2011 (a) ; Srinivas et al., 2000^ ; Boye et al., 2012▼ ; Adelaja et al., 2008† ; Birecka et al., 1984 ; cf. Dash et Abdullah 2013 pour revue
<i>indicum</i> L.	pestalamide B (a), N-(1-oxooctadécyl)glycyl-L-alanylglycyl-L-histidyl glycinamide (a), héliindicine, lycopsamine, indicine et son N-oxyde (b), acétyl-indicine, indicinine, héliotrine, rétronécine, trachélanthamidine, composés volatiles, lindélofidine, supinidine, putrescine, spermidine, spermine, homospermidine	améliore la guérison des plaies* (a), hépatotoxicité ♦, antitumeur ● (b), antimicrobien ■, antituberculeux +, anti-inflammatoire ^, analgésique ▼, histo-gastroprotectif †	
<i>lasiocarpum</i> Fisch. & C.A. Mey.	héliotrine, lasiocarpine, europine, héleurine, héliotropine, acides gras	veino-occlusif*	Culvenor et al., 1986* ; Shakirov et al., 1967 ; Akramov, 1990 ; Chernenko et al., 2011
<i>marifolium</i> J. König ex Retz.	β-sitostérol (a), stigmastérol, β-amyrine, épifriedélnol (a), cycloarténone, acétate de β-amyrényle (a), friedéline, acétate d'épifriedénol, héliotrine, lasiocarpine et son N-oxyde, europine, indicine N-oxyde	antimicrobien* (a)	Singh et Dubey, 2001 (a) ; Jain et Purohit, 1986 ; Radha et al., 2003*

<i>megalanthum</i> I.M. Johnst.	mégalanthine (a), mégalanthonine, lycopsamine (b), 5-hydroxy-7,3',4',5'-tétraméthoxyflavanone, 5,4-dihydroxy-7,3',5'-triméthoxyflavanone, 3,5-dihydroxy-7,3',4',5'-tétraméthoxyflavone	anti-appétant* (a et b) et antifongique (a)	Macías et al., 2009 (a) ; Urzúa et al., 2000 ; Reina et al., 1998a* (b)
<i>ovalifolium</i> Forssk.	acide 4,7,8-triméthoxy-naphthalène-2-carboxylique, 6-hydroxy-5,7-diméthoxy-naphthalène-2- carbaldéhyde (a), héliotropinone A et B (b), supinine, 7-angélylhéliotridine, rétronécine, hélifoline, héliophénanthrone, héliotropamide, rétronécine	anti-inflammatoire* (a), antifongique (b), antibactérien (b)	Kulkarni-Almeida et al., 2008* (a) ; Guntern et al., 2001 (b) et 2003 ; Rizk et al., 1991 ; Mohanraj et al., 1981 ; Guilet et al., 2003
<i>peruvianum</i> L. (syn. <i>arborescens</i> L.)	acide rosmarinique, acides lithospermique A et B, composés volatiles		Motoyama et al., 1996 ; Kays et al., 2005
<i>ramosissimum</i> (Lehm.) Sieber ex DC.		tumorigène*	Schoental et Cavanagh, 1972*
<i>rotundifolium</i> Sieber ex Lehm.	héliotrine, lasiocarpine, 5-acétyl eupopine, eupopine		Asibal et al., 1989
<i>sarmentosum</i> (Lam.) Craven (ou <i>Tournefortia</i> <i>sarmentosa</i> Lam.)	tournefolal (a), acides tournefolique et leur ester éthylque (a), acide salvianolique A (a), acide isosalvianolique (a), acide lithospermique (a), acide salvianolique F, acide rosmarinique (a), tournefolins A, B et C, 2-éthoxy-4,5-dihydroxybenzaldéhyde, acide 2-éthoxy-4,5-dihydroxybenzoïque, supinine, acide salicylique, allantoïne	antiperoxydation des lipides (a), antihépatotoxique* , antioxydant et agent pro-inflammatoire*	Lin et al., 2002 (a); Lin et al., 1999 ; Teng et al., 2012* ; Crowley et Culvenor, 1955 ; Chen et al., 2013♦
<i>scabrum</i> Retz.	héliscabine et rétronécine		Lakshmanan et Shanmugasundaram, 1995b
<i>sclerocarpum</i> Phil.	filifolinol, naringinine, sclérocarpidine		Modak et al., 2009b
<i>sinuatum</i> (Miers) I.M. Johnst.	8 flavonoïdes (flavo n°3=3-méthylgalangine), 4-(3',5'-dihydroxynonadécyl)phenol (a), pentacosanol, 1-hydroxy-3-docosanol (b), pinocembrine, 7-O-méthylériodictyol (c)	antioxydant* (a), antibactérien (b), antiviral (c)	Modak et al., 2003* (a) ; 2004b (b), 2005 et 2012 (c) ; Campos et al., 2012*
<i>spathulatum</i> Rydb.	lycopsamine, amabiline, curassavinine, coromandalinine, héliovicine, coromandaline, curassavine, héliospathine, héliospathuline		Roeder et al., 1991
<i>stenophyllum</i> Hook. & Arn.	sesquiterpènes, pinocembrine, 3-O-méthylgalangine	insecticide*	Modak et al., 2011 ; Urzúa et al., 2013* ; Campos et al., 2012
<i>strigosum</i> Willd.	strigosine	anti-inflammatoire* , antioxydant* , antibactérien* , cytotoxique* , phycotoxique*	Mattocks, 1964 ; Khan et al., 2013* ; Hussain et al., 2010♦ ; Shah et al., 2013♦
<i>subulatum</i> (Hochst. ex DC.) Vatke (syn. <i>zeylanicum</i> (Burm.f.) Lam.)	subulacine, subulacine-N-oxyde, 7-angéloyle héliotrine (a), rétronécine, acide héliotrique, héliotrine	antimicrobien* (a), antidiabétique* , antioxydant* , anti- hyperlipidémique* , anthelminthique*	Singh et al., 2002* (a) ; Muruges et al., 2006♦ ; Latha et al., 2009♦ ; Stermitz et L'Empereur, 1988
<i>supinum</i> L.	supinine, échinatine, trachélanthyl-7-angélylhéliotridine, viridofloryl- 7-angélylhéliotridine, héliosupine	tumorigène pour le pancréas* , répulsif pour les insectes*	Schoental et al., 1970* ; Khan et al., 1983♦ ; Crowley et Culvenor, 1959
<i>taltalense</i> (Phil.) I.M. Johnst.	filifolinol, sénécionate de filifolinyl, naringinine, 3-O-méthylgalangine, 7-O-méthylériodictyol		Modak et al., 2009a
<i>transalpinum</i> Vell.	transalpinécine, subulacine, 1α-2α-époxy-1β-hydroxyméthyl-8α-pyrrolizidine, intermédiaire, lycopsamine, indicine, rindérine, supinine, 3'-acétylindicine, 3'-acétylintermédiaire, 3'-acétylrindérine		Medina et al., 2009 ; Trigo et al., 1993

<i>verdcourtii</i> Craven (ou <i>Tournefortia</i> <i>hirsutissima</i> L.)		hypoglycémique*	Andrade-Cetto et al., 2007*
<i>Tournefortia</i> <i>hartwegiana</i> Steud.	β -sitostérol, stigmastérol, lupéol, acide ursolique, acide oléanolique, sucrose, myoinositol	antidiabétique* et hypoglycémique♦	Ortiz-Andrade et al., 2005* et 2007♦
<i>Tournefortia</i> <i>rufo-sericea</i> Hook f.	indicine, morifoline, tournefortine A et B		Roque-Albelo et al, 2002

3.8. Conclusion

H. foertherianum est une plante tropicale de bord de mer de la famille des Borraginacées. L’acide rosmarinique, son principe actif majeur, semble être responsable de son activité antihémolytique et protectrice vis-à-vis des ciguatoxines. Cependant, cette plante produit aussi des alcaloïdes pyrrolizidiniques, molécules hépatotoxiques couramment retrouvées dans cette famille.

4. L’acide rosmarinique

4.1. Généralités

Les recherches sur l’identification des tannins ont commencé dans les années 50 et l’acide rosmarinique (AR) a été isolé du romarin ou *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiacées) par Scarpati et Oriente (1958). L’AR (figure 29) est un ester d’acide caféique et d’acide 3,4-dihydroxyphényllactique (Petersen et al., 2009). Son nom IUPAC est l’acide (2R)-3-(3,4-dihydroxyphényl)-2-[[[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphényl)prop-2-enoyl]oxy}propanoïque.

C’est un métabolite secondaire qui appartient à la classe des esters hydroxycinnamiques et qui a été retrouvé dans plusieurs familles de plantes notamment les Lamiacées, les Apiacées et les Borraginacées (Kintzios, 2008 ; pour revue, Petersen et al., 2009).

L’AR est présent dans plusieurs herbes culinaires comme la périlla (*Perilla frutescens* L.) (Makino et al., 1998), la sauge (*Salvia officinalis* L.) (Areias et al., 2000), la menthe (*Mentha arvensis* L.) (Ellis et Towers, 1970), le basilic (*Ocimum basilicum* L.) (Tada et al., 1996) et le thym (*Thymus vulgaris* L.) (Dapkevicius et al., 2002).

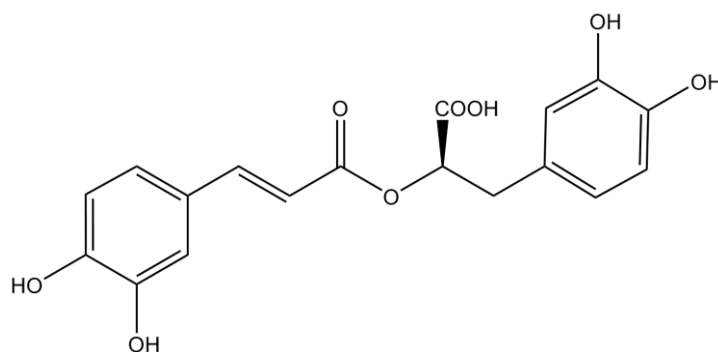


Figure 29 : Structure chimique de l'acide rosmarinique.

L'AR est naturellement présent sous sa forme isomère *trans* comme la majorité des acides phénoliques. La forme *cis* est un produit de l'isomérisation de la forme *trans*, qui apparaît lorsque la molécule est soumise à un stress comme une exposition à la lumière ou à la température (Razboršek, 2011).

Les dérivés les plus connus de l'AR sont l'acide lithospermique, un conjugué d'acide rosmarinique et d'acide caféique et l'acide lithospermique B, un dimère de l'acide rosmarinique (Petersen et Simmond, 2003).

4.2. Biosynthèse dans la plante

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AR ont été retrouvées dans plusieurs espèces de plantes chez les Lamiacées et les Borraginacées dont *Coleus blumei* Benth. (Lamiacées - Petersen et al., 1993 ; Petersen, 1997), *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiacées - Yan et al., 2006 ; Huang et al., 2008), *Anchusa officinalis* L. (Borraginacées - De-Eknamkul et Ellis, 1989), et *Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zucc. (Borraginacées - Yamamura et al., 2001 ; Matsuno et al., 2002). Les ADNs complémentaires codant les différentes enzymes biosynthétiques ont aussi été isolées (cf. pour revue Petersen, 2013). L'AR est biosynthétisé à partir de la L-phénylalanine et la L-tyrosine (Petersen et Simmond, 2003) (figure 30).

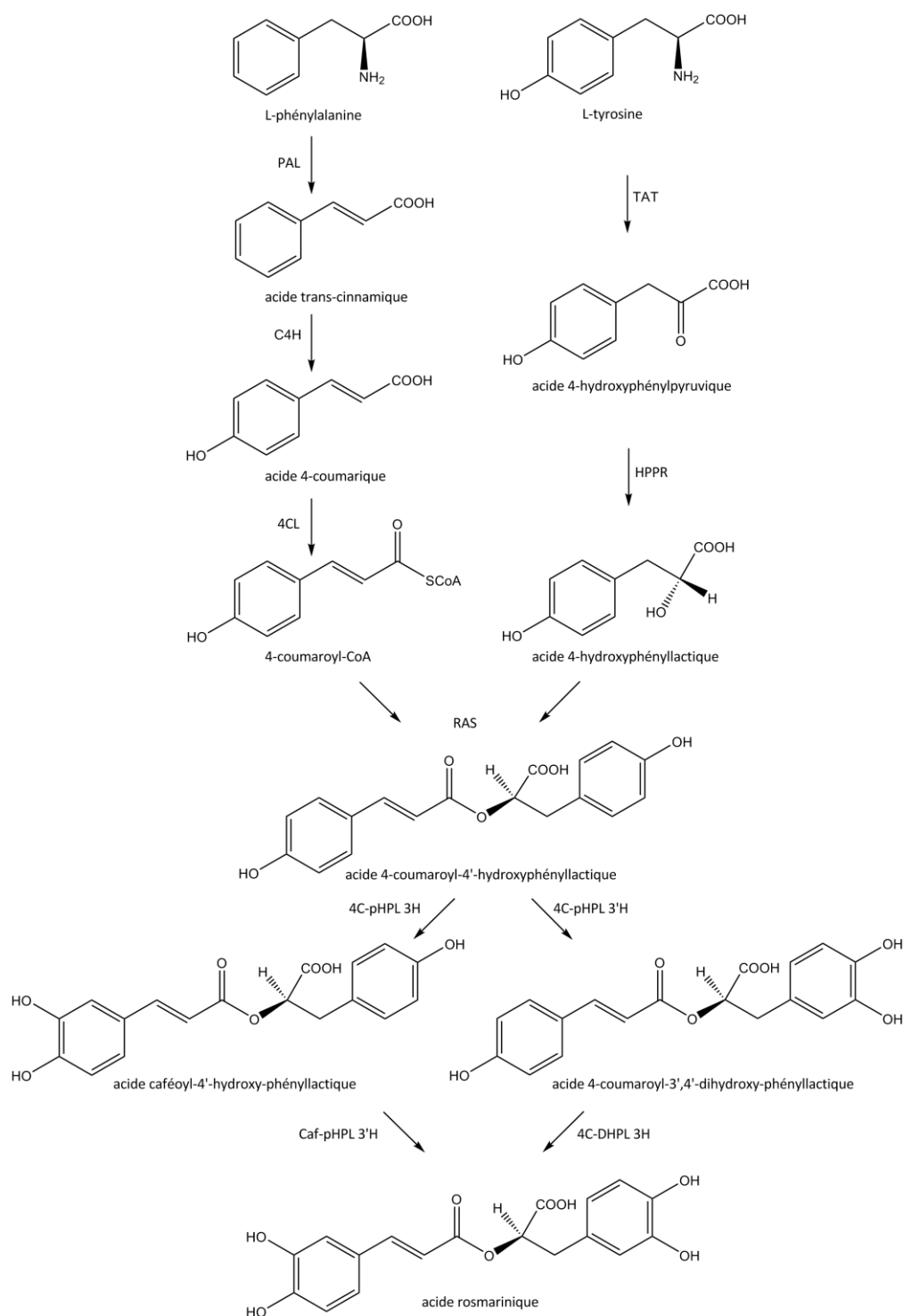


Figure 30 : Voie biosynthétique proposée par Petersen et al. (2009) pour l'acide rosmarinique.

Les enzymes impliquées sont : PAL = phénylalanine ammonia-lyase ; C4H = acide cinnamique 4-hydroxylase ; 4CL = acide coumarique acid CoA-ligase ; TAT = tyrosine aminotransférase ; HPPR = hydroxyphénylpyruvate réductase ; RAS = « acide rosmarinique synthase » ou hydroxycinnamoyl-CoA : hydroxyphényllactate hydroxycinnamoyltransférase ; 4C-pHPL 3H, 4C-pHPL 3'H = 4-coumaroyl-4'-hydroxyphényllactate 3/3'-hydroxylases ; Caf-pHPL 3'H = caféoyl-4'-hydroxyphényllactate 3'-hydroxylase ; 4C-DHPL 3H = 4-coumaroyl-3',4'-dihydroxyphényllactate 3-hydroxylase.

4.3. Activités biologiques

L'AR a de multiples activités biologiques *in vitro* et *in vivo* comme en témoigne une grande quantité de publications sur ce sujet. Les activités qui sont le plus souvent mises en avant sont :

- antioxydante (Frankel et al., 1996 ; Chen et Ho, 1997 ; Nakamura et al., 1998 ; Ogihara et al., 2002 ; Dapkevicius et al., 2002 ; Akowuah et al., 2004 ; Bors et al., 2004 ; Soobrattee et al., 2005 ; Tepe et al., 2007 ; Lee et al., 2008a ; Lee et al., 2013 ; Tepe, 2008 ; Erkan et al., 2008 ; Meng et al., 2009b ; Falé et al., 2009 ; Lamien-Meda et al., 2010 ; Ding et al., 2010 ; Feng et al., 2010 ; Fadel et al., 2011 ; Fujimoto et Masuda, 2012 ; Tache et al., 2012 ; Couto et al., 2012 ; Ferreres et al., 2013),
- anticarcinogène et antimutagène (Osakabe et al., 2004b ; Del Baño et al., 2006 ; Furtado et al., 2008 ; Ding et al., 2010 ; Moon et al., 2010 ; Nabekura et al., 2010 ; Yesil-Celiktas et al., 2010 ; Venkatachalam et al., 2012),
- photo-protectrice (Psotová et al., 2006 ; Lee et al., 2007a ; Clé et al., 2008 ; Sánchez-Campillo et al., 2009 ; Vostálová et al., 2010),
- anti-inflammatoire (Bult et al., 1985 ; Ito et al., 1998 ; Sahu et al., 1999 ; Osakabe et al., 2004b ; Swarup et al., 2007 ; Lee et al., 2008b ; Zdarilová et al., 2009 ; Jiang et al., 2009 ; Geller et al., 2010 ; Gamaro et al., 2011 ; Jang et al., 2011 ; Yang et al., 2013a),
- protectrice contre les maladies neurodégénératives (Fallarini et al., 2009 ; Ren et al., 2009) avec notamment des activités anticholinestérase (Iuvone et al., 2006 ; Lee et al., 2008a ; Falé et al., 2009 ; Wang et al., 2012) et antiamyloïdogénique (Ono et al., 2004 ; Alkam et al., 2007 ; Reinke et Gestwicki, 2007 ; Camilleri et al., 2013),
- protectrice contre les dommages du foie (Osakabe et al., 2002b ; Renzulli et al., 2004 ; Lima et al., 2006 ; Li et al., 2010 ; Domitrović et al., 2013 ; Yang et al., 2013b),
- antiallergique (Ito et al., 1998 ; Osakabe et al., 2004a ; Sanbongi et al., 2004 ; Takano et al., 2004 ; Costa et al., 2012),
- potentiatrice d'un antivenin de serpent (Ticli et al., 2005), réductrice de la toxicité *in vivo* du venin de *Micrurus fulvius* L. (Parker-Cote et al., 2014) et antihémorragique induite par un venin de serpent (Aung et al., 2010, 2011),
- cardioprotectrice (Chlopčíková et al., 2004 ; Kim et al., 2005 ; Karthik et al., 2011, 2012).

Baba et al. (2005) ont étudié l'absorption, la métabolisation et l'excrétion, chez l'humain, de l'AR présent dans un extrait de périlla. Suite à l'ingestion de l'extrait, la concentration en AR a atteint un maximum dans le plasma sanguin au bout de 30 min, suivi par une augmentation graduelle de la

concentration d'AR mono-méthylé, un des principaux métabolites formé à partir d'AR, qui a atteint un pic de concentration au bout de 2 h. La majorité de l'AR et de ses métabolites étaient présents sous leur forme conjuguée dans le plasma sanguin. Ces résultats montrent que l'AR a été rapidement absorbé, conjugué et méthylé dans les tissus, que ses métabolites étaient présents dans le plasma sanguin et qu'ils ont été excrétés dans les urines (figure 31). Environ 75 % des métabolites provenant de l'AR ont été excrétés dans les urines dans les 6 h. En revanche, on ne retrouve pas exactement les mêmes métabolites de l'AR après administration orale chez des rats (Nakazawa et Ohsawa, 1998, 2000 ; Baba et al., 2004).

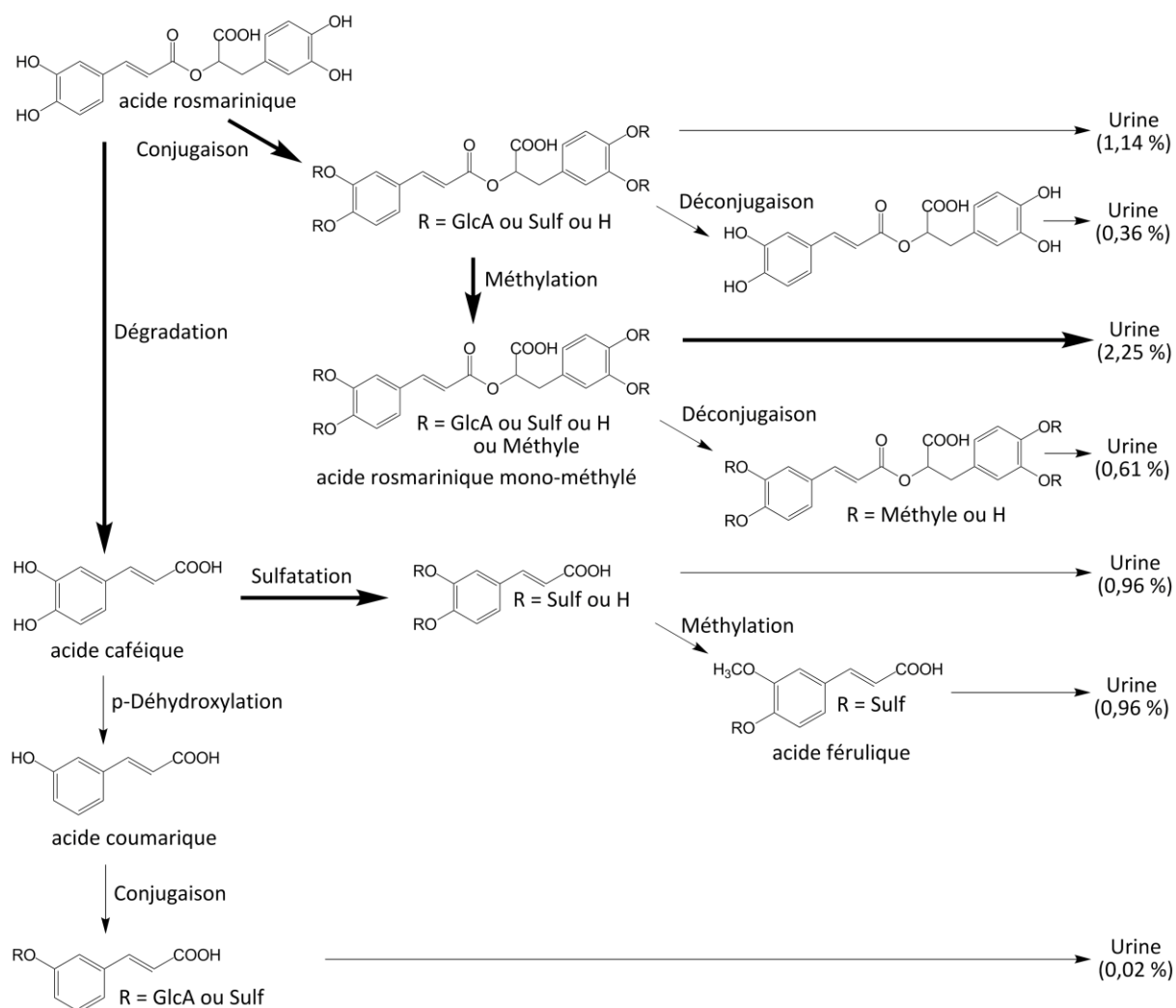


Figure 31 : Possible devenir métabolique d'acide rosmarinique (AR) contenu dans un extrait de périlla et ingéré par l'humain. Les flèches en gras correspondent à la voie principale. GlcA : groupement glucuronide ; Sulf : groupement sulfate (Baba et al., 2005).

Les activités des composés phénoliques tels que l'AR interviennent avant tout dans les mécanismes de défense des plantes. Le rôle des composés phénoliques dans la défense des plantes

est généralement relié à leurs propriétés antibiotique, antinutritive ou antiappétante. En outre, la production d’acides phénoliques participe aussi à la croissance et au développement normal des plantes et n’est pas seulement un moyen de se protéger des facteurs de stress biotiques (e.g. la prolifération de champignons) et abiotiques (e.g. l’exposition aux ultraviolets (UV)). Ces composés sont impliqués entre autres dans la croissance, la pigmentation, la reproduction et la résistance aux pathogènes de la plante (Noel et al., 2005 ; Lattanzio, 2008).

4.4. Détection et quantification

L’AR est facilement détectable par les UV car, d’après la bibliographie, son absorbance maximale se situe entre 325 et 335 nm suivant les conditions expérimentales. La chromatographie sur couche mince (CCM) de même que la chromatographie liquide avec détection UV peuvent être utilisées pour sa détection. Les méthodes décrites dans la bibliographie et présentées ci-après ([tableau 3](#)) concernent la chromatographie liquide à haute pression couplée à un détecteur à barrettes de diodes (CLHP-DAD).

La préparation des échantillons nécessite uniquement l’extraction du matériel végétal puis selon les cas une sonication, filtration ou un passage sur une cartouche d’extraction en phase solide (SPE) avant injection dans le système chromatographique.

Généralement, les analyses chromatographiques sont réalisées en phase inverse avec des colonnes CLHP de type C18. Les éluants sont le méthanol (MeOH) ou l’acétonitrile (MeCN) et l’eau acidifiée. La longueur d’onde de détection est usuellement fixée à 280 ou 320-330 nm. La plupart des méthodes utilisent un gradient multi-étapes.

La quantification de l’AR est le plus souvent mise en œuvre par une méthode de calibration externe. À partir du standard, disponible sur le marché, une droite de calibration est réalisée puis la quantité présente dans l’échantillon est déduite de cette droite.

Tableau 3 : Méthodes de CLHP-DAD employées pour l'analyse de l'acide rosmarinique.

Référence bibliographique	Solvants échantillons	Préparation échantillons	Colonne	Solvants d'élution	Gradient	Débit (ml/min)	Volume d'injection	Longueur d'onde	Temps rétention de l'AR	Calibration
Wang et al., 2004b	EtOH/H ₂ O (30:70)	sonication et centrifugation	C18 150*4,6 mm	0,1 % H ₃ PO ₄ aqueux (A) et H ₃ PO ₄ dans MeOH (B)	0-10' 40-50 % B ; 10-15' 50-60 % B ; 10' 60 % B	1	10 µl	330 nm	8 min	externe avec standard
Bandoniene et Murkovic, 2002	MeOH	extraction et filtration	ODS-80TS	2 % CH ₃ COOH aqueux (A) et MeCN (B)	0-40' 2-40 % B ; 40-50' 40 % B ; 50-60' 40-80 % B	0,2		280 nm	33 min	externe avec standard
Xu et al., 2008	H ₂ O	extraction	C18 200*4,6 mm 5 µm	0,5 % HCOOH aqueux (A) et HCOOH dans MeCN (B)	0-10' 5-20 % B ; 10-17' 20-25 % B ; 17-35' 25-55 % B	1	20 µl	280, 326 et 286 nm	22,5 min	externe avec standard
Troncoso et al., 2005	MeOH/H ₂ O (2:1)	extraction et centrifugation	RP-18e 100*4,6 mm	65,1 % MeCN 34,9 % eau et 0,02 % H ₃ PO ₄ (A) et 22:78:0,25 (B)	2' 100 % B ; 2-8' 100 % A ; 8-10' 100 % B	1,5		330 nm	2,7 min	externe avec standard
Sahin et al., 2011	MeOH	extraction et filtration	C18 3,5 µm 250*4,6 mm	1 % HCOOH aqueux (A) et MeCN (B)	0-10' 13 % B ; 10-20' 41,5 % B ; 20-25' 70 % B ; 25-35' 10 % B	0,5	10 µl	360 nm	25 min	externe avec standard
Hong et Kim, 2010	EtOH/H ₂ O (50:50)	extraction et filtration	C18 5 µm 250*4,6 mm	MeCN/H ₂ O (22:78) et 1 % CH ₃ COOH	isocratique	1	10 µl	320 nm	10,5 min	externe avec standard
Meng et al., 2009a	H ₂ O	extraction et colonne	C18 0,45 µm 250*4,6 mm	0,5 % HCOOH aqueux (A) et HCOOH dans MeCN (B)	95 % A ; 60' 60 % A	0,8		325 et 280 nm		
Mulinacci et al., 2011	EtOH	extraction	RP18 4 µm 150*3,9 mm	0,1 % HCOOH aqueux (A) et MeCN (B)	0-15' 15-25 % B ; 15-25' 25-35 % B ; 25-35' 35-50 % B ; 35-40' 50-100 % B ; 40-48' 100 % B	0,4	5 µl	330 nm	20 min	externe avec standard
Tepe, 2008	70 % EtOH	extraction et filtration	C18 10 µm 250*4,6 mm	2 % CH ₃ COOH aqueux (A) et CH ₃ COOH et MeCN 7:3 (B)	70-30 % A en 40' gradient linéaire	1		320 nm	15 min	externe avec standard
Öztürk et al., 2010	MeOH/H ₂ O	extraction filtration et sep-pack	C18 100*4,6 mm 3 µm	MeOH/H ₂ O/HCOOH 10:88:2 (A) et 90:8:2 (B)	0-15' 100 % A ; 15-20' 85 % A ; 20-30' 50 % A ; 30-35' 0 % A ; 35-42' 100 % A	1	10 µl	280 nm	25,9 min	interne avec le propylparaben
Falé et al., 2009	MeOH		RP18	0,3 % H ₃ PO ₄ (A) MeCN (B) MeOH (C)	0' 90 % A ; 50' 5 % A 80 % B 15 % C		25 µl	entre 200 et 600 nm	20 min	externe avec standard
Natsume et al., 2006			UG120 5 µm 250*4,6 mm	0,1 % TFA aqueux (A) et TFA dans MeCN (B)	10-50 % de B sur 50' gradient linéaire	0,8	10 µl			interne avec AR spiké
Lu et Foo, 1999	MeOH/H ₂ O	extraction et colonne	RP18 152*4 mm 5 µm	2 % CH ₃ COOH aqueux (A) et CH ₃ COOH dans MeCN (B)	20' 4-12 % B ; 30' 20 % B ; 45' 50 % B	1		280 nm	31 min	
Kim et al., 2010	MeOH/H ₂ O	extraction et filtration	ODS 5 µm 100*4,6 mm	MeOH (A) et 0,5 % CH ₃ COOH aqueux (B)	0-10' 5 % A ; 10-40' 5-75 % A	1	20 µl	280 nm		externe avec standard
Abdullah et al., 2008	MeOH/H ₂ O	extraction et centrifugation	ODS 5 µm 280*40 mm	45 % MeOH et 0,01 % H ₃ PO ₄ aqueux	isocratique	0,8	20 µl	333 nm		externe avec standard

4.5. Production et utilisation dans le commerce

La synthèse de l’AR a longtemps été recherchée et a finalement été achevée en 1991 (Zinsmeister et al., 1991). Depuis, plusieurs voies de synthèse chimique de l’AR et de ses dérivés comme l’ester de méthyle, les différents stéréoisomères ou l’acide isorinique, moins hydroxylé, ont été réalisées avec succès (Matsuno et al., 2002).

Les cultures cellulaires et de tissus de plantes sont considérées comme des moyens importants dans la production d’AR (Petersen et Simmond, 2003). Un soin particulier est donc apporté dans l’étude des conditions nécessaires à l’augmentation du rendement en AR dans les cultures (Pavlov et al., 2005 ; Georgiev et al., 2006). Les taux d’accumulation d’AR varient considérablement suivant les espèces utilisées et certaines espèces peuvent même contenir d’autres composés phénoliques supplémentaires (Kintzios, 2008).

La première culture cellulaire de plante accumulant de l’AR provenait de *Coleus blumei* (Razzaque et Ellis, 1977 ; Zenk et al., 1977). Les cultures en suspension de cette espèce ont été les premières à être utilisées dans un but de production biotechnologique de l’AR car elles peuvent accumuler jusqu’à 21 % d’AR par rapport au poids sec (Petersen et Simmond, 2003). Ulbrich et al. (1985) ont rapporté l’isolement d’environ 100 g d’AR depuis une suspension cellulaire cultivée lors d’un procédé à deux étapes dans un bioréacteur de 32 litres pendant une durée de 14 jours.

D’après Sakuta et Komamine (1987), les métabolites secondaires peuvent appartenir à deux catégories suivant leur mode de production (i.e. ceux dont la production est dépendante de la croissance de la plante et ceux dont la synthèse débute après la croissance et est dépendante de la différenciation des cellules). Cette hypothèse ne semble pas s’appliquer à l’AR. En effet, la connexion entre les métabolismes primaires et secondaires semble être causée par la pression dans le milieu de culture, dans laquelle la pression osmotique joue un rôle régulateur. D’autres facteurs peuvent être impliqués comme le type d’hormones ou des facteurs génétiques (Kintzios, 2008). Plusieurs auteurs ont montré que l’accumulation de l’AR pouvait être stimulée par l’ajout d’éléciteurs fongiques (e.g. extraits de levure, préparations à base de *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.) ou du jasmonate de méthyle (Szabo et al., 1999). Ceci renforce l’idée du rôle dans la plante de l’AR en tant que composé de défense contre les pathogènes et les herbivores (Petersen et Simmond, 2003).

L’AR, synthétisé ou isolé de *Rosmarinus officinalis* L., est disponible chez les fournisseurs de produits chimiques à un prix de 217,50 euros les 5 g (pureté de 96 %). Dans le commerce, il est présent surtout sous forme d’extraits de plantes (romarin, origan ou mélisse) (tableau 4). Il est utilisé pour ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes dans les aliments comme par exemple avec le conservateur alimentaire Aquarox® (Vitiva). Dans les produits cosmétiques, il a des propriétés apaisantes et purifiantes (e.g. les soins purifiants Aroma-Perfection® et Masque purifiant doux

(Nuxe)). Enfin, dans les compléments alimentaires, il permet entre autres d’améliorer l’élimination des xénobiotiques.

Tableau 4 : Utilisation de l’acide rosmarinique comme complément alimentaire.

Dénomination	Laboratoire	Indication	Forme galénique	Dose journalière maximale d'AR	Posologie
ROMARINEX® CLASSIQUE	Dissolvurol	Digestion et élimination	Solution buvable	1,275 mg	12 doses
ROMARINEX® CHROME	Dissolvurol	Digestion et équilibre métabolique	Solution buvable	106,72 mg	10 jours
Ménodraine	Nutreov Physcience	Rétention d’eau	comprimé	20 mg	2 mois
Good Bye Stress® Dietactiv	Carrare	Équilibre et détente	gélule	20 mg	15 jours
Holy Basil	New chapter	Résistance au stress	gélule	5,4 mg	2 par jour
Butterbur extract with standardized rosmarinic acid	LifeExtension	Protection contre les substances irritantes	capsule	50 mg	2 par jour

Plusieurs brevets concernant les différentes propriétés de l’AR ont été déposés (tableau 5). En 2010, un brevet de référence PCT/FR2010/000527 sur l’utilisation de l’AR et de ses dérivés pour traiter la ciguatéra a été déposé par l’IRD et étendu à l’international en 2011 (Laurent et al., 2011).

Tableau 5 : Exemples de brevets impliquant l’acide rosmarinique et à vocation santé.

Nom du déposant	Titre	Référence
L’Oréal et Nestec S.A.	Effets biologiques de compositions d’acide rosmarinique	US 2014/0023625
Shangdong luye natural drug research and development	Utilisation de l'acide rosmarinique dans la fabrication de médicaments pour traiter ou prévenir les affections rénales ou hépatiques	US 2010/0130604
Kott et Fletcher	Production d'acide rosmarinique à partir de menthe verte et utilisation de celui-ci	US 2010/0137433
Menon et Fast	Composition antiallergique et méthode associée	WO/2005/074959
SK Chemicals Co Ltd	Composition phytomédicamenteuse destinée à la protection du cartilage	WO/2002/094301
Meiji Seika Kaisha	Procédé de production d'un extrait végétal de Lamiacées contenant des phénols, et utilisation de ce dernier	WO/2002/062365
Nattermann & Cie GmbH	Utilisation de l'acide rosmarinique dans le traitement des inflammations et produits pharmaceutiques utilisés pour cet usage	US 1982 4,329,361

4.6. Conclusion

Les multiples propriétés déjà connues de l’AR pourraient être utiles dans le traitement des intoxications ciguatériques. En effet, sa propriété anti-inflammatoire permettrait la réduction des effets inflammatoires induits par les CTXs, récemment démontrés à l’état chronique de l’intoxication (Matsui et al., 2010). De plus, son effet antiallergique pourrait traiter des patients atteints de la ciguatera qui développent des réactions d’ordre allergique après consommation de poissons, de noix, ou d’alcool. Enfin, les patients les plus sévèrement intoxiqués bénéficieraient de ses propriétés cardioprotectrice et anti-hypotensive.

5. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques

5.1. Généralités

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs) sont composés d’un noyau pyrrolizidine (figure 32), formé par deux cycles à cinq carbones qui partagent un atome d’azote en position 4, et de substituants en position 1 et 7 du noyau.

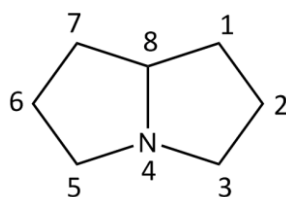


Figure 32 : Structure de base des alcaloïdes pyrrolizidiniques : noyau pyrrolizidine.

Les APs trouvés chez *H. foertherianum* ont une base rétronécine (figure 33). La base rétronécine peut être estérifiée avec un ou plusieurs acides néciqes et peut posséder une insaturation en position 1,2 ou être saturée (Hartmann et Witte, 1995 ; Roeder, 1995). Il existe huit types de base nécine qui se différencient par la position de leurs substituants en position 1, 7 et 8 qui se retrouvent en α ou en β du cycle (Roeder, 1995). Les APs sont généralement retrouvés sous la forme de mélanges de la forme classique et de son dérivé N-oxyde qui prédomine le plus fréquemment (Mattocks, 1986).

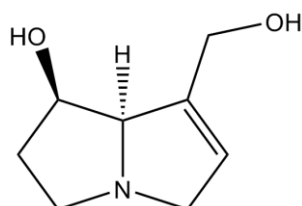


Figure 33 : Base rétronécine des alcaloïdes pyrrolizidiniques.

Plusieurs centaines d’APs ont été décrits dans des familles de plantes allant des Astéracées, Borraginacées, Léguminacées (Rizk et al., 1991 ; Hartmann, 1995), aux Orchidacées et Fabacées (Frölich et al., 2006). Ils sont restreints aux familles faisant parties de la division des Angiospermes (Hartmann et Witte, 1995 ; Hartmann et Ober, 2000).

5.2. Biosynthèse dans la plante

Bien que la base de la biosynthèse des APs et son origine soient connues, les différentes étapes et les mécanismes de régulation sont encore très peu compris. Afin de sélectionner des plantes contenant un minimum ou étant dépourvues d’APs, il est important de connaître les enzymes impliquées dans leur voie de biosynthèse (Dreger et al., 2009). Les bases nécines et les acides néciques sont produits dans le métabolisme des acides aminés (Roeder, 1995).

L’homospermidine synthase est la première enzyme spécifique de la voie de biosynthèse des APs, reliant les métabolismes primaires et secondaires (Ober et Hartmann, 1999). Toutes les cultures de plantes chez les Astéracées, qui produisent des APs, montrent la présence de l’homospermidine synthase (Böttcher et al., 1993).

À partir de la putrescine et de la spermidine, provenant de l’arginine et de l’ornithine (Graser et Hartmann, 2000), l’homospermidine synthase transfère un groupement aminobutyl de l’un à l’autre et forme ainsi l’homospermidine (Ober et Hartmann, 1999) (figure 34).

Les acides néciques sont principalement composés de L-valine, L-leucine, L-isoleucine et de son produit secondaire, la L-thréonine. Ils ne suivent pas la même voie biosynthétique que les nécines (Roeder, 1995).

La biosynthèse des APs intervient en général dans les racines ou les jeunes pousses des plantes où ils sont sous leur forme N-oxyde. Ils sont ensuite transportés vers les parties aériennes de la plante puis sont stockés dans les vacuoles (Borstel et al., 1989). Le lieu de la biosynthèse peut varier entre les espèces mais concerne en général les très jeunes tissus en croissance (i.e. les extrémités des racines ou des jeunes pousses) (Hartmann et Ober, 2000).

Par exemple, dans les racines d’*Eupatorium cannabinum* L. (Astéracées), les cellules du parenchyme cortical expriment l’homospermidine synthase à l’inverse des cellules de l’endoderme. Dès que la croissance végétative s’arrête et que les boutons de fleurs s’ouvrent, l’expression de l’enzyme s’éteint (Anke et al., 2004). Ce mécanisme de régulation permet un niveau relativement constant d’APs par biomasse puisque les APs sont seulement produits tant que la plante produit de la biomasse durant sa croissance (Ober et Kaltenegger, 2009). Les feuilles les plus jeunes de *Cynoglossum officinale* L. (Borraginacées) contiennent une dose d’APs plus de 190 fois supérieure à celle observée au niveau des feuilles matures (van Dam et al., 1994). Chez une autre des

Borraginacées, *Heliotropium indicum*, les APs sont détectables dans tous les organes mais sont majoritairement présents dans les inflorescences (e.g. à plus de 71 % des APs totaux), particulièrement dans les fleurs et les boutons (Frölich et al., 2007).

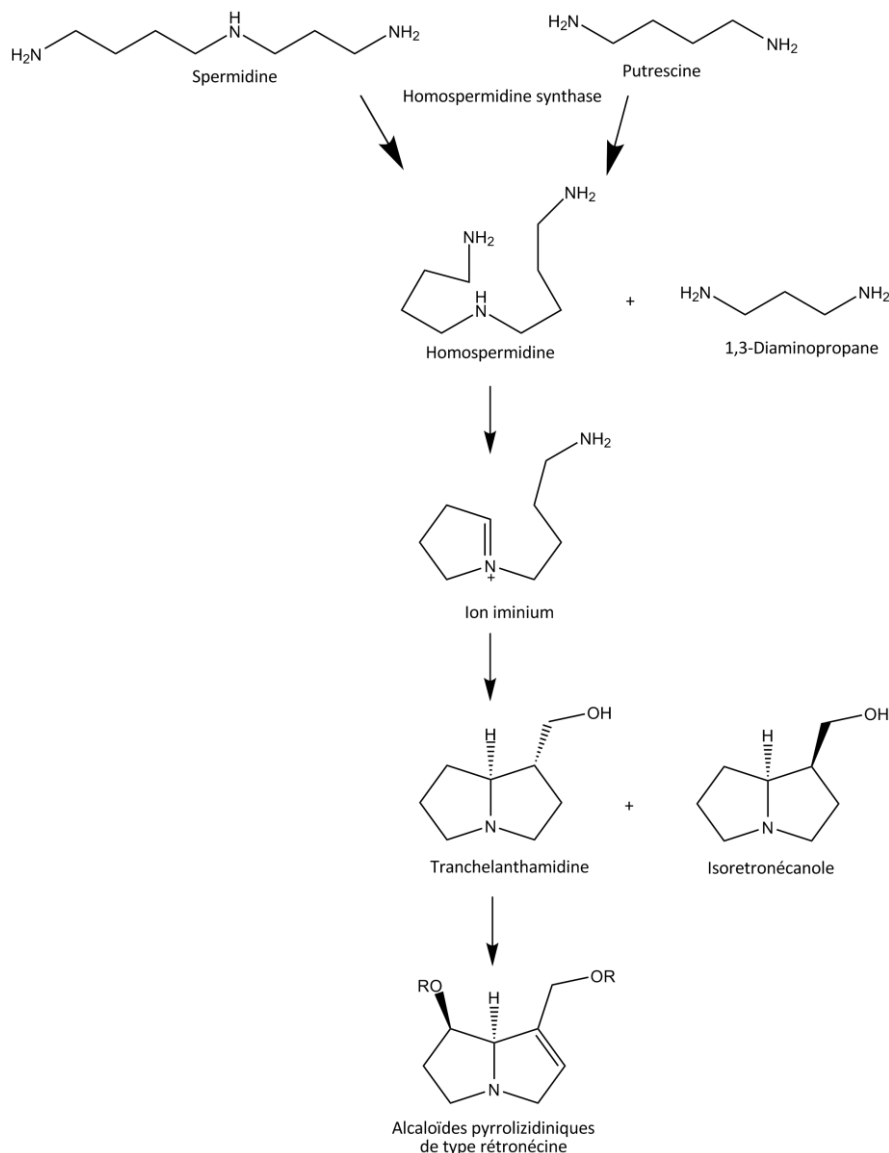


Figure 34 : Précurseurs des alcaloïdes pyrrolizidiniques
(d'après Roeder (1999) et Ober et Kaltenegger (2009)).

5.3. Activités biologiques

5.3.1. Bénéfice et toxicité

Les APs sont plus connus pour leur toxicité que pour leurs activités biologiques bénéfiques. Les APs ont été et sont responsables de l'intoxication de bétail par leur fourrage ou d'humain par l'utilisation de plantes médicinales ou la consommation de lait (Dickinson et al., 1976). Une autre

source de contamination pour l'humain est le miel qui contient les APs du pollen des plantes butinées par les abeilles (Boppré et al., 2008).

Depuis le début des années 90, l'utilisation des compléments alimentaires à base de plantes a rapidement augmenté à l'échelle mondiale. Certains de ces compléments pouvant contenir des alcaloïdes pyrrolizidiniques (Betz et al., 1994), l'exposition des humains par cette voie est une préoccupation majeure (Fu et al., 2004).

Par exemple, la consoude, utilisée pour les affections inflammatoires, contient de la lasiocarpine, de la symphytine et d'autres alcaloïdes pyrrolizidiniques. L'utilisation des feuilles de consoude a été récemment reconnue comme un important risque de santé, car susceptible d'occasionner une toxicité hépatique chez les humains et pouvant présenter un potentiel carcinogénique chez les rongeurs (Stickel et Seitz, 2000).

L'intoxication humaine par des APs recensée comme la plus importante s'est produite en 1974 en Afghanistan, quand environ 35 000 personnes ont été contaminées à partir de graines de plantes du genre *Heliotropium*. 7 200 personnes ont été examinées et 1 600 ont été malades dont plusieurs sont mortes trois à neuf mois après les premiers signes cliniques (Mohabbat et al., 1976).

Après la découverte de l'effet antitumoral de certains APs, plusieurs tentatives ont été faites pour les utiliser dans le traitement des carcinomes (Kupchan et Suffness, 1967 ; Culvenor, 1968 ; Zalkow et al., 1985). Étant donné que l'indicine, entre autre isolée d'*H. foertherianum*, n'a pas d'effet mutagène, son dérivé N-oxyde a été utilisé avec succès dans des essais cliniques contre la leucémie infantile (King et al., 1987). Malheureusement, une nécrose et une cirrhose du foie ont été observées comme effet secondaire et son utilisation thérapeutique a été interrompue immédiatement (Kovach et al., 1979 ; Letendre et al., 1981, 1984).

5.3.2. Manifestations de la toxicité

Le caractère progressif de l'intoxication chronique par les APs suggère qu'une exposition chronique faible a des effets cumulatifs. Les caractéristiques classiques de l'intoxication chronique par les APs sont la maladie veino-occlusive, l'hépto-splénomégalie, la cirrhose et l'émaciation. La maladie veino-occlusive, caractérisée par une douleur épigastrique avec une distension abdominale due aux ascites, a été associée à la consommation humaine de graines, accidentellement contaminées par des APs, ou de remèdes traditionnels à base de plantes (Prakash et al., 1999).

Après le foie, les poumons sont les sites les plus souvent touchés par la toxicité des APs. Les pyrroles formés par le métabolisme du foie peuvent se déplacer vers les poumons. Les premiers changements observés dans le système vasculaire pulmonaire incluent un thrombus dans les vaisseaux de même que l'inflammation aigüe et l'épaississement des parois des vaisseaux conduisant

à une occlusion. Ces effets, ainsi que la fibrose septale interalvéolaire, conduisent à l'hypertension artérielle pulmonaire. Le débit sanguin pulmonaire est donc réduit et le travail est amplifié pour le ventricule droit amenant à une hypertrophie et aboutissant finalement à de l'insuffisance cardiaque congestive (Butler et al., 1970).

Le groupe de Schoental a montré la formation de tumeur primitive du foie chez les rats après qu'ils aient ingérés des APs de *Senecio jacobaea* L. (Cook et al., 1950). Ceci a soulevé la possibilité que les APs pouvaient jouer un rôle dans la carcinogénèse humaine (Schoental, 1968). Depuis lors, plusieurs APs et leurs métabolites ont montré un effet carcinogène chez les rongeurs. Malgré l'enregistrement de plusieurs cas d'exposition humaine aux APs, avec des niveaux d'exposition variant d'intoxication aiguë à chronique, il n'existe pas, à ce jour, de rapports de cancer associé à de telles expositions (Prakash et al., 1999). Cependant, il est largement accepté, prenant en compte leur mécanisme de carcinogénèse chez les rongeurs, qu'ils sont aussi carcinogènes chez les humains (Xia et al., 2003 ; Edgar et al., 2011).

5.3.3. Métabolisation

Lors de l'activation métabolique, les APs montrent une diversité de manifestations génotoxiques (incluant des liaisons à l'ADN, une réticulation de l'ADN, une réticulation entre ADN et protéine, l'échange de chromatide sœur et des aberrations chromosomiques), mutagènes, tératogènes et carcinogènes (cf. citations dans Fu et al. (2004)).

D'après Swick et al. (1982), les APs ingérés sont directement absorbés dans le petit intestin et transportés jusqu'au foie où ils sont métabolisés. Ils sont des substrats pour les enzymes des cytochromes P450 oxydases qui y sont présentes. Les intermédiaires pyrroliques métabolisés sont toxiques pour les cellules car ils réagissent avec les nucléophiles tels que les protéines ou les acides nucléiques (Fu et al., 2002b ; Fu et al., 2004).

Il existe trois routes majeures de métabolisation des APs insaturés, la route empruntée dépendant de leur structure (figure 35). La première est l'hydrolyse des groupements ester de la base nécine, la deuxième est l'oxydation de la base nécine pour former son dérivé N-oxyde et la troisième est la déshydrogénation de la base nécine pour former son didéshydropyrrolizidine (Fu et al., 2004 ; Rosemann, 2006).

Les APs N-oxydes sont plus hydrophiles et donc plus facilement excrétés que les APs correspondants. Cependant, certains APs N-oxydes sont tout aussi toxiques que leurs homologues car ils peuvent aussi être métabolisés par le foie (Mattocks, 1986 ; Chou et al., 2003). Les APs saturés sont quant à eux rapidement excrétés par l'urine et ne montrent donc pas de toxicité particulière (Mattocks, 1986 ; Rosemann, 2006).

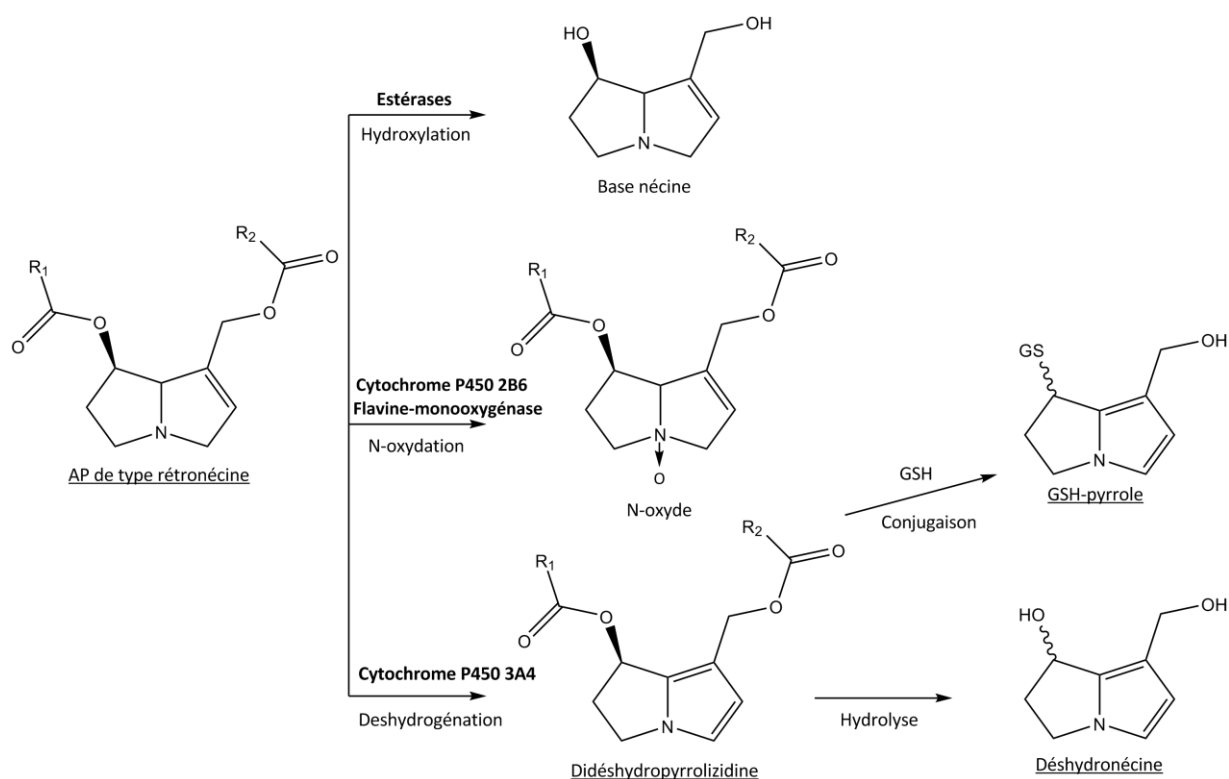


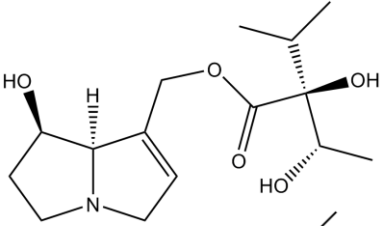
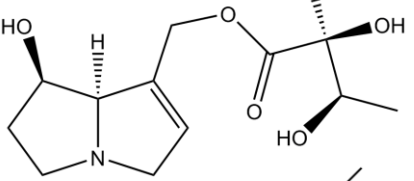
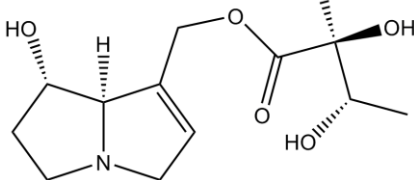
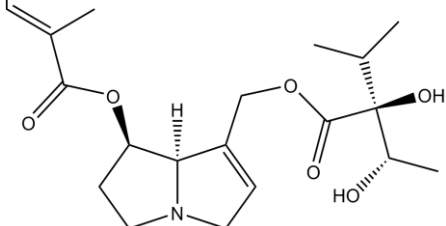
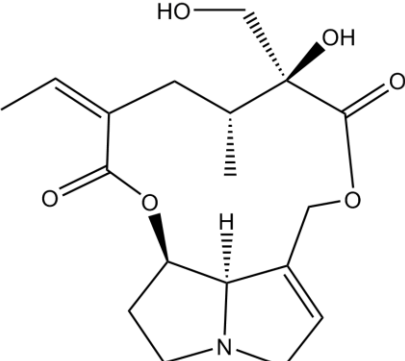
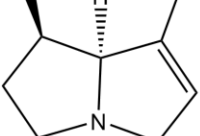
Figure 35 : Exemples de voies de métabolisation des APs de type rétronécine (d'après Fu et al. (2002a) et Rosemann (2006)). Les noms soulignés correspondent aux composés toxiques, GSH pour glutathion.

Dans la plante, les APs sont des précurseurs de molécules de défense ou des phéromones d'insectes comme les papillons, d'où le nom d'arbre à papillons donné à *H. foertherianum* (Boppré, 1986 ; Trigo, 2011). L'adaptation des insectes, qui butinent les plantes contenant des APs, leur permet non seulement de faire face à leur toxicité mais aussi de les accumuler pour leur propre défense. Ceci est en faveur de l'hypothèse du rôle de défense des APs (Hartmann et Ober, 2008).

5.3.4. Spécificités structurales et toxicité

Certaines spécificités structurales telles qu'une insaturation à la position 1,2 (1), qu'un ou deux groupes hydroxyles rattachés à la base rétronécine (2), qu'une estérification d'au moins un des groupes hydroxyles (3) avec une chaîne branchée (4) sont requises pour obtenir une toxicité des APs chez les animaux ou chez l'humain (Mattocks, 1986 ; Prakash et al., 1999). Les APs ont des toxicités *in vivo* très variées suivant leur structure (tableau 6 et figure 36).

Tableau 6 : Exemples d’APs et de leur toxicité chez le rat après une injection intrapéritonéale (d'après EFSA (2007) et FAO/OMS (2011))

Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Structure chimique	DL ₅₀ (mg/kg) ^a
Lycopsamine		1500
Intermédiaire		1500
Échinatine		350
Symphytine		130
Rétrorsine		34
Rétrorsine-N-oxyde		250

^a DL50 : dose létale médiane

L’indicine, isolée de chez *H. foertherianum*, est un diastéréoisomère de la lycopsamine, de l’intermédiaire et de l’échinatine et la stéréochimie de son cycle pyrrolizidine correspond à celle de la lycopsamine et de l’intermédiaire. Ces dernières ont une faible toxicité chez le rat (tableau 6) tout

comme l’indicine, en raison de leur excrétion rapide, vraisemblablement due à la similarité de leur configuration absolue.

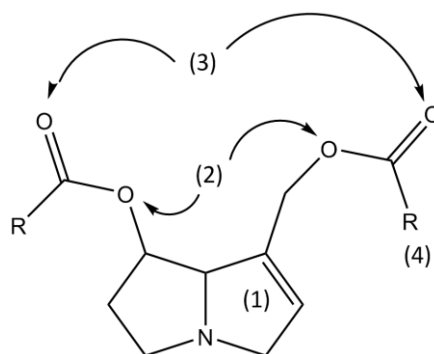


Figure 36 : Nécessités structurales pour la toxicité des APs
(d'après Prakash et al. (1999)).

Les doses et la durée nécessaires à l’intoxication ne sont pas très bien connues. Bien que des traitements variés et des compléments alimentaires aient été suggérés, aucun ne s’est avéré efficace sur le bétail. En général, le bétail intoxiqué et montrant des signes cliniques, ne s’en remet jamais. La prévention est la meilleure mesure de contrôle (Stegelmeier, 2011).

5.4. Réglementation

Kempf et al. (2010) ont fait la synthèse de la situation légale des réglementations concernant les APs dans différentes régions du monde (pour les détails, cf. le rapport de FAO/OMS, 2011).

Dès la fin des années 80, l’OMS a publié un rapport alertant du potentiel risque sur la santé de la contamination par les APs dans la chaîne alimentaire. Les principales causes d’intoxications par les APs sont alors la contamination des céréales par des graines et l’utilisation de plantes médicinales contenant des APs. À cause du potentiel génotoxique des APs, la commission recommande de diminuer le plus possible la contamination de la chaîne alimentaire. Enfin, l’OMS conseille de surveiller les teneurs en APs du miel et des produits laitiers provenant de régions à risque (WHO, 1988 ; Kempf et al., 2010).

Au niveau européen, l’Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) indique dans un rapport de 2007 que du point de vue épidémiologique humain, la maladie veino-occlusive est véritablement liée à la consommation d’APs tandis que leur potentiel carcinogénique n’est pas bien documenté jusqu’à présent. Contrairement aux anciennes recommandations, cette commission exige le principe de non dilution. Cela signifie que les aliments contaminés et leurs produits dérivés ne doivent pas être mélangés avec du matériel non contaminé pour atteindre les limites tolérables de teneurs en APs. Le matériel contaminé doit plutôt être décontaminé ou détruit afin de réduire

l’entrée de composés nocifs dans la chaîne alimentaire. Récemment, la Commission Européenne a approuvé l’huile d’*Echium plantagineum* L. cultivée en tant que nouvel ingrédient alimentaire. C’est la première fois qu’une limite en teneur d’APs est fixée (ils ne doivent pas être détectables, la limite de détection étant à 4 mg/kg d’huile) pour une denrée alimentaire. La commission a aussi exprimé le besoin de méthodes analytiques pour quantifier les APs dans les plantes ingérées par les animaux ou les humains (EFSA, 2007 ; Kempf et al., 2010).

Aux États-Unis en 2001, la FDA (*Food and Drug Administration*) a recommandé aux fabricants de préparations orales dérivées de *Symphytum spp.* ou de produits contenant des APs de les retirer du marché et aux consommateurs d’arrêter de les consommer. Puis la FDA s’est référée à son autorité pour confisquer ces produits si nécessaire. Malgré les différents rapports sur les sérieux effets des APs sur la santé humaine, l’autorité s’est trouvée incapable de définir une dose garantissant l’innocuité par exposition orale (Kempf et al., 2010 ; FAO/OMS, 2011).

En Australie et en Nouvelle-Zélande, l’ANZFA (*Australia New Zealand Food Authority*) a publié un rapport technique en 2001 sur l’évaluation des risques des APs dans les aliments. Comme indiqué par l’EFSA, l’effet carcinogénique des APs chez les rongeurs est établi mais ne peut pas encore être extrapolé aux humains. Les APs sont donc seulement considérés comme un facteur de risque chez les humains dans un scénario d’exposition chronique causant éventuellement une maladie veino-occlusive. Basée sur cette considération, une dose journalière provisoire de 1 mg/kg a été calculée (ANZFA, 2001 ; Kempf et al., 2010).

Actuellement, il n’existe pas d’évaluation toxicologique unique nationale ou internationale et légale des APs dans les aliments. Un consensus européen semble au moins se cristalliser dans lequel les APs sont une classe de composés non désirés dans les aliments destinés aux humains et aux animaux (Kempf et al., 2010).

5.5. Méthodes d’identification et de quantification

Les APs sont des composés plutôt polaires avec une nature basique. Des revues ont recensé leurs différentes méthodes d’analyse (cf. Roeder, 1999 et Crews et al., 2010).

5.5.1. Extraction et purification

Un large panel d’extraction des APs a été utilisé, le plus souvent avec des solvants polaires tels que le méthanol acidifié ou non (Crews et al., 2010). Les extractions avec des solvants moins polaires ne permettent pas de récupérer tous les APs N-oxydes car ils y sont moins solubles (Oberlies et al., 2004).

Une étape additionnelle de purification est généralement réalisée préalablement à l'analyse de l'échantillon en chromatographie. À l'origine, une extraction classique acide-base, répétée 2 ou 3 fois, était effectuée mais la procédure est longue et consomme des volumes importants de solvants. Aujourd'hui, la méthode de choix utilisée sur les extraits bruts est celle des extractions en phase solide SCX (*strong cation exchange*) pour isoler à la fois les bases libres et les dérivés N-oxydes avec un grand rendement et pour éliminer la plupart des molécules interférentes co-extraites (Roeder, 1999 ; Beales et al., 2004). Les phases solides à base de sulfonate de benzyle sur silice sont recommandées. Le solvant d'élution est le plus souvent du méthanol avec une solution aqueuse d'ammonium (Crews et al., 2010).

5.5.2. Détection par spectroscopie UV-visible

Une méthode de spectroscopie UV-visible a été utilisée avec le réactif d'Ehrlich par Azadbakht et Talavaki (2003), elle permet de déterminer la quantité totale d'APs insaturés grâce à une courbe de calibration utilisant des standards.

5.5.3. Chromatographie sur couche mince

La faible absorbance UV de la plupart des APs les empêche d'être visualisés sans réactif. Le réactif le plus utilisé pour la révélation des APs sur plaques de CCM de silice est le réactif d'Ehrlich (Mattocks, 1967b, 1986). Les bases insaturées, transformées avec un cycle pyrrolique insaturé, sont détectées en donnant une couleur rouge magenta tandis que le réactif de Dragendorff détecte les APs saturés (Birecka et al., 1981).

5.5.4. Chromatographie gazeuse et liquide

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG-SM) a beaucoup été utilisée pour l'analyse des APs mais la méthode est destructive et les APs N-oxydes doivent être dérivatisés pour être détectés. Des bibliothèques de plusieurs centaines d'APs ont été créées. La plupart des méthodes utilisent maintenant la CLHP (Crews et al., 2010).

Pour la CLHP, des colonnes C18 sont préférentiellement utilisées avec des phases mobiles composées d'acétonitrile et d'un tampon acide ou basique. La détection par UV se fait à une longueur d'onde non-spécifique de 220 nm pour les APs insaturés car ils n'ont pas de chromophore (Hosch et al., 1996 ; Gray et al., 2004). Une dérivatisation est possible et permet une meilleure

détection en UV mais la CLHP-SM (chromatographie liquide à haute pression couplée à un spectromètre de masse) est devenue la méthode de choix dans les cinq dernières années. En effet, la détection est beaucoup plus sensible et cette méthode nécessite une préparation moins lourde de l'échantillon (Wuilloud et al., 2004).

L'atome d'azote du cycle des APs est facilement ionisable et permet une utilisation en spectrométrie de masse. Le mode d'ionisation positive et l'ionisation par électronébuliseur (ESI) sont les paramètres d'analyse les plus utilisés à cause de la nature polaire des APs. Cependant, l'ESI est moins efficace avec les phases mobiles basiques alors que l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) voit sa sensibilité augmentée dans ces phases (Beales et al., 2004 ; Boppré et al., 2005). La limite de la CLHP-SM est due au fait que certains APs ont le même poids moléculaire et la même formule brute et tous les standards ne sont pas disponibles ; aussi, de plus amples analyses sont nécessaires afin de connaître leur configuration absolue (Lin et al., 1998 ; Wuilloud et al., 2004). Les ions fragments typiques des rétronécines (figure 37), retrouvés chez *H. foertherianum*, sont détectés par spectrométrie de masse en tandem (SM/SM) à m/z 94, 120 et 138 (WHO, 1988).

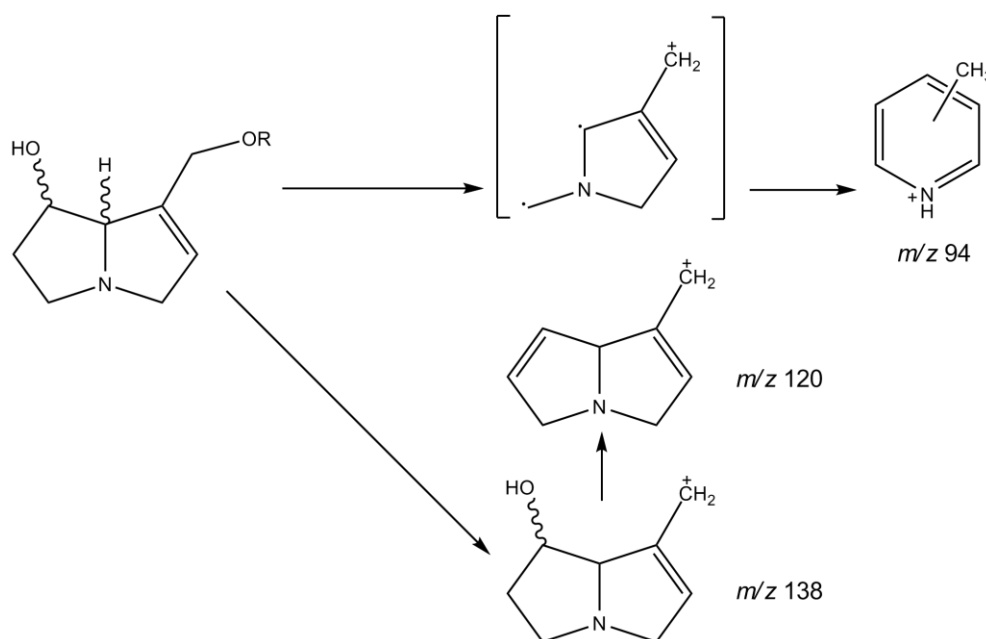


Figure 37 : Schéma de fragmentation d'APs de type rétronécine (d'après Rosemann, 2006).

5.6. Conclusion

Les APs sont probablement les composés toxiques les plus communs issus de plantes et intoxiquant le bétail, la faune et les humains mondialement. Par conséquent, il est important de déterminer les sources d'exposition humaine, d'évaluer le risque pour la santé et de réduire l'exposition à ces composés. Aujourd'hui, une restriction réglementaire sur l'utilisation des plantes

ou des produits dérivés de plantes contenant des APs est appliquée dans plusieurs pays. L’évaluation du risque de santé humaine de l’exposition aux APs doit être justifiée sur la base des mécanismes toxicologiques pour une meilleure efficacité, leurs biotransformations induisant plusieurs types de toxicité (Fu et al., 2004).

À notre connaissance, aucun effet secondaire n’a à ce jour été reporté dans l’utilisation d’*H. foertherianum*, en tant que remède traditionnel contre les intoxications ciguatériques. Néanmoins, la famille des Borraginacées et le genre *Heliotropium* étant connu pour produire ce type d’alcaloïdes, il est nécessaire de s’assurer de l’absence des APs dans l’extrait utilisé à ces fins.

6. Réglementation pour la commercialisation des produits à base de plantes

Les médicaments à base de plantes sont devenus partie intégrante du système de santé actuel. Par exemple, aux États-Unis, entre les années 90 et 2000, leurs ventes ont augmenté d’environ 400 %. Les produits à base de plantes peuvent contenir une ou plusieurs plantes sous n’importe quelle forme. Ils sont constitués soit de plantes brutes soit d’extraits de tout ou partie de plantes (Mosihuzzaman et Choudhary, 2008).

Les produits à base de plantes sont généralement commercialisés sous trois formes : les médicaments, les compléments alimentaires ou les produits naturels en l’état par exemple distribués par les herboristes (Imbert, 2012).

Il faut cependant distinguer les médicaments à base de plantes, soumis à une autorisation de mise sur le marché (AMM) classique, et les médicaments traditionnels à base de plantes qui sont soumis à une mesure d’enregistrement simplifiée (Cirriez, 2012).

6.1. Notions générales de médicaments et de compléments alimentaires

6.1.1. Les médicaments à base de plantes

La Pharmacopée est le recueil à caractère réglementaire des matières premières autorisées à entrer dans la composition des médicaments. C’est un ouvrage destiné aux professionnels de santé (utilisateurs de matières premières ou en charge des préparations pharmaceutiques) et aux laboratoires chargés des contrôles de qualité et de l’évaluation des médicaments. Elle définit les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain et vétérinaire) et les méthodes d’analyses à utiliser pour en assurer leur contrôle.

La Pharmacopée est constituée de différentes monographies. Chaque monographie est un ensemble de spécifications qui définissent les caractéristiques qualitatives et quantitatives d’une

substance en vue d'assurer une qualité optimale compatible avec les exigences de santé publique. Les normes de ce référentiel scientifique font autorité pour toute substance ou monographie figurant dans la Pharmacopée.

Les normes de la Pharmacopée européenne s'appliquent réglementairement à l'ensemble des états membres signataires de la Convention pour l'élaboration de la Pharmacopée européenne (36 états). La Pharmacopée européenne est complétée, pour certains États, par des Pharmacopées nationales. La Pharmacopée américaine (ou USP) et la Pharmacopée japonaise (ou JP) sont avec la Pharmacopée européenne les trois référentiels intégrés dans le système d'harmonisation internationale des normes. D'autres pharmacopées, sans avoir le même statut juridique, sont publiées par différents États du monde (e.g. le Brésil, l'Inde, la Chine).

La liste des Plantes Médicinales de la Pharmacopée française est structurée en deux parties :

- liste A « Plantes médicinales utilisées traditionnellement » (332 plantes),
- liste B « Plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu » (123 plantes).

Cette liste est mise à jour au fur et à mesure de l'évolution des textes réglementaires ou des connaissances scientifiques concernant les médicaments à base de plantes et des demandes d'inscription de drogues végétales (ANSM, 2013).

À ce jour, la liste A contient 4 plantes de la famille des Borraginacées dont *Borago officinalis* L. (bourrache) pour l'utilisation de sa partie aérienne et de ses fleurs, en usage alimentaire ou condimentaire pour ces dernières, en médecine traditionnelle européenne et d'outre-mer. Des plantes enregistrées dans la liste A, et pour lesquelles tous les organes sont connus pour être toxiques, sont par exemple *Artemisia absinthium* L. (grande absinthe - Astéracées), *Atropa belladonna* L. (belladone - Solanacées) et *Symphytum officinale* L. (grande consoude - Borraginacées). Les racines de *S. officinale* sont utilisées en usage cutané pour leurs propriétés cicatrisantes et anti-inflammatoires dans la médecine traditionnelle européenne et d'outre-mer (ANSM, 2012a). Cette plante a aussi été utilisée dans le traitement des ulcères, par la prise de thé ou de gélules disponibles dans le commerce, mais la présence d'APs hépatotoxiques est responsable de la maladie veino-occlusive du foie chez les personnes en consommant régulièrement. Son utilisation a donc été réglementée (Stickel et Seitz, 2000).

La liste B contient 7 plantes de la famille des Borraginacées dont *Heliotropium europaeum* L. (héliotrope ou herbe aux verrues) dont la partie aérienne est utilisée en médecine traditionnelle

européenne et d’outre-mer (ANSM, 2012b). Cette plante, contenant des APs, a été responsable d’intoxications chez le bétail (Hill et al., 1997).

Les médicaments à base de plantes sont soumis aux mêmes procédures d’AMM que les médicaments classiques, cependant depuis 2004, des procédures d’AMM allégées ont été mises en place.

6.1.2. Les compléments alimentaires à base de plantes

Pour être classé comme complément alimentaire, un produit à base de plantes doit correspondre aux critères suivants :

- être destiné à compléter le régime alimentaire ;
- contenir un ou plusieurs ingrédients alimentaires (acides aminés, vitamines, minéraux, herbes ou autres produits à base de plantes) ;
- être destiné à une prise par voie orale sous forme de comprimé, gélule ou liquide ;
- être étiqueté comme complément alimentaire (FDA, 2004, 2006 ; Bandaranayake, 2006).

La position réglementaire par rapport aux compléments alimentaires est indéfinie (aliments ou médicaments ?) et le nombre croissant de produits de ce type sur le marché pose la question de leur innocuité (Schilter et al., 2003 ; Kroes et Walker, 2004 ; Walker, 2004). Plusieurs cas d’intoxications avec des produits à base de plantes ont été rapportés (Betz et al., 1994) et les différences climatiques et agronomiques peuvent conduire à une variabilité dans leur composition chimique (Harkey et al., 2001).

Aux États-Unis, la FDA régule les compléments alimentaires et ceux à base de plantes. Cela signifie qu’ils n’ont pas à respecter les mêmes standards que les médicaments et les médicaments en vente libre, ils ne sont pas tenus d’être standardisés, et il n’y a pas de définitions légales ou réglementaires qui existent pour leur normalisation (Bandaranayake, 2006).

Les emballages de compléments alimentaires peuvent mentionner des allégations de santé mais pas d’indications thérapeutiques comme pour les médicaments (Cirriez, 2012).

Certains produits peuvent n’avoir aucun historique significatif en tant qu’ingrédient alimentaire mais être dérivés de sources qui ont été utilisées dans des produits à base de plantes, dans différentes régions du monde, et ainsi être considérés pour l’utilisation alimentaire (Schilter et al., 2003 ; Kroes et Walker, 2004 ; Walker, 2004). L’historique d’utilisation (pratique alimentaire ou médicale) apporte des informations utiles concernant l’innocuité du produit. Les produits n’ayant jamais été utilisés auparavant dans l’Union Européenne peuvent être considérés comme nouveaux

aliments sous la nouvelle réglementation européenne de 1997 (CE, 1997). Une distinction est faite entre « usage traditionnel », pour lequel les données scientifiques sont limitées et « usage établi » appuyé par des publications scientifiques (Bast et al., 2002).

6.2. Différences de réglementation suivant les régions du monde

Les médicaments à base de plantes sont généralement vendus comme compléments alimentaires aux États-Unis et comme médicaments en Europe, un cadre réglementaire commun n'existant pas entre tous les pays. En conséquence, les informations sur les indications cliniques pour l'utilisation, l'efficacité et l'innocuité sont influencées par l'expérience traditionnelle disponible dans chaque lieu. Par exemple, dans le cas de la grande consoude, en Allemagne, son utilisation externe est restreinte à 100 µg/jour et son utilisation interne a été bannie pour les drogues et médicaments (Stickel et Seitz, 2000). En revanche, aux États-Unis en 2001, à la demande de la FDA, les compléments alimentaires à base de cette plante ont été retirés du marché mais les feuilles, les racines et leurs extraits sont toujours disponibles.

Les critères législatifs pour reconnaître les médicaments à base de plantes utilisés traditionnellement comme thérapies de soins approuvées se heurtent à plusieurs difficultés. Dans une enquête menée dans 129 pays (WHO, 2005), l'OMS a signalé les problèmes suivants concernant les médicaments à base de plantes, notamment le manque :

- de données de recherche ;
- de mécanismes appropriés pour le contrôle des médicaments à base de plantes ;
- d'éducation et de formation ;
- d'expertise au sein des autorités sanitaires nationales et organismes de contrôle ;
- de partage de l'information ;
- de surveillance de l'innocuité ;
- de méthodes pour évaluer leur innocuité et efficacité (Benzie et Watchel-Galor, 2011).

6.2.1. Amérique du nord

Aux États-Unis, sous le *Dietary Supplement Health and Education Act* (DSHEA) de 1994, n'importe quelle herbe, concentré botanique et naturel, métabolite et constituant de l'extrait, est classé comme complément alimentaire. Les compléments alimentaires n'ont pas besoin de l'approbation de la FDA avant d'être commercialisés. En vertu de la DSHEA, les plantes médicinales, qui sont classées comme compléments alimentaires, sont présumées sûres, et la FDA n'a pas le pouvoir d'exiger qu'ils soient approuvés pour leur innocuité et leur efficacité avant d'entrer sur le

marché, contrairement aux médicaments. Cela signifie que le fabricant est en charge de déterminer si les compléments alimentaires fabriqués ou distribués sont en effet inoffensifs et si les indications données sont soutenues par des preuves suffisantes. Toutefois, un fabricant de compléments alimentaires ou le distributeur d'un complément contenant un « nouvel ingrédient alimentaire », qui est un ingrédient qui n'a pas été commercialisé aux États-Unis avant octobre 1994, peut être tenu de suivre un examen de pré-commercialisation concernant les données d'innocuité. En outre, toutes les entreprises nationales et étrangères qui fabriquent des étiquettes d'emballage ou détiennent des compléments alimentaires doivent suivre les bonnes pratiques de fabrication actuelles de la FDA, qui décrivent des procédures pour assurer la qualité des compléments destinés à la vente. La FDA n'a émis aucune réglementation concernant les niveaux de contaminants dans les compléments alimentaires sûrs ou dangereux, mais a mis en place certains niveaux consultatifs dans d'autres aliments. Sous son autorité réglementaire actuelle, la FDA peut retirer du marché un complément alimentaire à base de plantes seulement après qu'il ait été démontré dangereux. L'emballage ou l'étiquette d'un produit, vendu en tant que complément alimentaire à base de plantes aux États-Unis, ne peut pas mentionner le diagnostic, le traitement, la prévention ou la guérison d'une maladie sans l'approbation expresse de la FDA (FDA, 2011 ; Bandaranayake, 2006 ; Benzie et Watchel-Galor, 2011).

Pour les produits à base de plantes, commercialisés en tant que médicaments, une procédure d'AMM était nécessaire jusqu'en 2004. Aujourd'hui, il existe une procédure allégée pour les médicaments à base de plantes qui implique une tolérance concernant la variation de la composition chimique, une non-obligation de recherches précliniques et cliniques ainsi que de mise en évidence des interactions entre composés de l'extrait. Enfin, l'élucidation structurale de tous les composés n'est pas nécessaire (Lehmann, 2013).

Au Canada, les remèdes à base de plantes doivent être conformes avec les réglementations de produits de santé naturels. Dernièrement, la direction de la santé publique du Canada a élaboré un nouveau cadre réglementaire pour les produits de santé naturels qui est entré en vigueur en janvier 2004. La nouvelle réglementation exige entre autres, un meilleur étiquetage, de bonnes pratiques de fabrication, des licences d'exploitation et des licences de produits, et l'apport d'allégations de santé soutenues par des preuves. Cependant, les seules exigences réglementaires imposées sont que tous les produits destinés à un usage médical, y compris les produits de santé naturels, reçoivent un numéro d'identification du médicament. Ce numéro n'est pas nécessaire pour les matières premières brutes (Bandaranayake, 2006).

6.2.2. Europe

En Europe, la directive 2004/24/CE publiée par le Parlement européen et par le Conseil de l’Union européenne fournit les lignes directrices pour l’utilisation des plantes médicinales et vise à harmoniser les procédures des pays européens. La directive établie que les médicaments à base de plantes mis sur le marché nécessitent une autorisation par les autorités nationales de régulation de chaque pays européen et que ces produits doivent avoir un niveau reconnu d’innocuité et d’efficacité (Calapai, 2008).

On distingue trois types d’enregistrement de médicaments à base de plantes :

- une AMM allégée, pour ceux dont l’usage médical est établi et présentant un intérêt médical et un niveau d’innocuité acceptable (données toxicologiques nécessaires) et dont l’utilisation pendant au moins 10 ans dans la communauté européenne est prouvée ;
- une AMM simplifiée, pour ceux dont l’usage traditionnel est établi, dont l’utilisation, pendant au moins 30 ans dans l’Union européenne (UE), et pour ceux provenant de l’extérieur de l’UE au moins 15 ans dans l’UE et 15 ans à l’extérieur, est prouvée (Parlement européen et Conseil de l’Union européenne, 2004) ;
- une AMM classique, pour ceux qui ne correspondent pas aux deux autres catégories, des études précliniques ou cliniques sont alors nécessaires (Lehmann, 2013).

En ce qui concerne leur fabrication et leur qualité, les produits doivent répondre aux mêmes exigences que pour les demandes d’autorisation de mise sur le marché. L’information est basée sur la disponibilité des monographies publiques de la pharmacopée européenne et de leurs équivalents développés par l’industrie pharmaceutique. Les normes proposées permettent non seulement de définir la qualité des produits mais aussi d’éliminer les composés nocifs, les falsifications et les contaminations. Un certain nombre de comités ont été mis en place au sein de l’UE pour tenter de standardiser l’information et les lignes directrices en rapport avec les plantes médicinales (EMA, 2009). Une multitude de rapports ont été produits, des monographies sur les plantes et les préparations, des lignes directrices sur les bonnes pratiques agricoles et de collecte, sur la normalisation des applications et sur la détermination de la composition des plantes (Vlietinck et al., 2009 ; Benzie et Watchel-Galor, 2011).

L’OMS a publié 88 monographies communément utilisées comme références ou comme cadres pour développer des monographies nationales. L’agence européenne des médicaments (EMA) a adopté ces monographies et publié une liste de substances à base de plantes pour évaluation qui inclut 63 monographies avec une liste de produits à base de plantes reliée aux monographies

publiées par l’ESCOP (*European scientific cooperative on phytotherapy*) et les pharmacopées nationales allemandes, françaises et chinoises (Tistaert et al., 2011).

6.2.3. Région Pacifique ouest et Polynésie française

En Australie, la pharmacopée britannique est appliquée à la place d’une pharmacopée nationale. 1 500 produits à base de plantes sont enregistrés en Australie et sont vendus dans les pharmacies en tant que médicaments en vente libre (WHO, 2005).

La Polynésie française est régie par la loi française sauf quand il existe une loi de pays spécifique. La pharmacopée française a été appliquée en Polynésie française dès 1987 d’après l’arrêté suivant paru au journal officiel :

« Arrêté n° 284 CM du 16 mars 1987 portant mise en application de la dixième édition de la pharmacopée française ainsi que l’arrêté 368 CM et 86 CM qui met en application les suppléments de cette édition de la pharmacopée (Gouvernement de la Polynésie française, 1987). »

En France, contrairement à d’autres pays européens, les médicaments à base de plantes relèvent du monopole pharmaceutique et leur mise sur le marché nécessite un enregistrement ou une AMM préalable auprès de l’ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament, anciennement AFSSAPS) (Lehmann, 2013).

La loi organique de 2004, complétant le statut d’autonomie de la Polynésie française, détermine sa compétence en matière de santé. Des arrêtés, spécifiques au pays, sont donc rentrés en vigueur depuis.

En ce qui concerne les compléments alimentaires, la loi française en Polynésie française a été appliquée en 2006 par un arrêté qui définit que ces derniers doivent être inoffensifs, que seuls les minéraux et vitamines peuvent entrer dans leur fabrication. Parmi les substances dont l’utilisation pour leur fabrication est interdite se trouvent les plantes médicinales non alimentaires et non condimentaires.

« Arrêté n° 1169 CM du 16 octobre 2006 pris en application de l’article 11 de la loi du 1^{er} août 1905 relatif aux compléments alimentaires et aux denrées alimentaires dont la présentation comporte des allégations nutritionnelles ou physiologiques (Gouvernement de la Polynésie française, 2006). »

En France, la mise sur le marché de compléments alimentaires nécessite le dépôt d’un

dossier auprès de la DDCSPP (direction départementale de la cohésion sociale et de la protection des populations, anciennement DGCCRF), moins contraignant que pour une AMM de médicaments (Lehmann, 2013).

La vente des produits issus de la médecine traditionnelle chinoise a été réglementée en 2008 en fixant la liste des produits autorisés et des herboristes agréés en Polynésie française avec les arrêtés suivants :

« Arrêté n° 198 CM du 6 février 2008 fixant la liste des matières premières de la pharmacopée traditionnelle pouvant être importées par les herboristes agréés.

Arrêté n° 199 CM du 6 février 2008 fixant la liste des produits médicamenteux de la pharmacopée traditionnelle chinoise et autres spécialités asiatiques dont l'importation et la vente sont autorisées aux herboristes agréés (Conseil de l'ordre des pharmaciens de Polynésie française, 2013 ; Gouvernement de la Polynésie française, 2008a et b). »

En 2010, un arrêté sur la liste des plantes de la pharmacopée française pouvant être vendues en dehors des pharmacies a été publié :

« Arrêté n° 249 CM du 25 février 2010 relatif à la vente au public hors pharmacie des plantes médicinales inscrites à la pharmacopée dans lequel est détaillé la liste des plantes ou parties de plantes médicinales inscrites à la pharmacopée qui peuvent, uniquement sous la forme précisée, être vendues par des personnes autres que les pharmaciens (Gouvernement de la Polynésie française, 2010). »

6.3. Conclusion

Les exigences réglementaires pour la qualité des produits à base de plantes varient en fonction du pays et de la catégorie réglementaire. Le même produit peut être commercialisé en tant que médicament en Europe et en tant que complément alimentaire aux États-Unis. En Europe, les produits à base de plantes médicinales sont produits selon des normes de qualité utilisées pour les produits pharmaceutiques. Cela est particulièrement vrai pour les produits puissants à base de plantes dont les ingrédients actifs sont définis, contribuent sensiblement à l'activité thérapeutique et permettent donc la standardisation des constituants dans une gamme définie et soutenue par une monographie de la pharmacopée (Mosihuzzaman et Choudhary, 2008). En France et par extension en Polynésie française, la commercialisation d'un extrait à base de plantes en tant que complément alimentaire est moins contraignante administrativement que pour un médicament. Cependant, les emballages des produits commercialisés en tant que complément alimentaire ne peuvent pas comporter de mention thérapeutique mais seulement des allégations nutritionnelles ou de santé.

Objectifs

La ciguatéra est aujourd'hui en passe d'être reconnue comme « maladie tropicale négligée ». Cette intoxication alimentaire, jusqu'alors cantonnée aux zones intertropicales, est aujourd'hui présente dans des zones plus tempérées (Madère, Îles Canaries) et commence à atteindre la Méditerranée. Elle pose un problème de santé publique majeur, notamment dans les pays insulaires et territoires du Pacifique (PICTs), où elle touche plus de 50 % de la population, et a des conséquences économiques à la fois sur l'exploitation des ressources marines et sur les systèmes de santé.

Les pistes actuelles de recherche concernant le traitement des intoxications ciguatériques se concentrent essentiellement sur la synthèse ou l'isolement de composés tels que le brévénal, ce qui implique un coût non négligeable pour le développement d'un médicament potentiel. En revanche, d'après les études ethnopharmacologiques menées par l'IRD, une centaine de remèdes à base de plantes, correspondant à une quarantaine d'espèces identifiées, est utilisée traditionnellement dans les PICTs pour traiter ce syndrome. Ces plantes ont donc été testées sur différentes cibles biologiques puis un criblage bioguidé a permis de sélectionner les plus actives d'entre elles et d'isoler leur composé actif majoritaire. Parmi celles-ci, la plus utilisée traditionnellement est *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger (Borraginacées) et son composé actif majoritaire est l'acide rosmarinique.

Dans la perspective de valoriser cette plante pour le traitement des intoxications ciguatériques, ce travail de thèse a ainsi tenté de réaliser plusieurs objectifs.

Le premier objectif, présenté dans le second chapitre de cette thèse, a consisté à valider l'usage traditionnel de l'extrait aqueux de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* en testant son action et celui de l'acide rosmarinique sur l'activité toxique induite par les ciguatoxines (CTXs). Cette validation a été réalisée grâce au test de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris et au test d'interaction ligand-récepteur, couramment utilisés en laboratoire pour la détection des toxines marines telles que les CTXs.

Le deuxième objectif, présenté dans le troisième chapitre de cette thèse, a concerné la connaissance de la composition chimique de l'extrait aqueux de feuilles sénescents d'*H. foertherianum*. En effet, la quantification de la teneur précise en principe actif est nécessaire afin de garantir l'activité biologique de l'extrait. Dans le but d'évaluer des zones de collecte potentielle en Polynésie française, une étude de variabilité géographique a été menée afin de déterminer comment les teneurs en principe actif variaient suivant différentes zones de collecte. D'autre part, en vue d'une valorisation de l'extrait de plante total, l'identification de ses autres

métabolites secondaires, non majoritaires, a été abordée, nécessaire notamment pour la vérification de la qualité de la matière première ainsi que pour le suivi de la dégradation des composés de l'extrait. Enfin, les tiges d'*H. foertherianum* sont susceptibles de renfermer des alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs) tels que l'indicine et son dérivé N-oxyde. Étant donné leur toxicité bien connue chez le bétail et les humains et la réglementation existante, il était donc proscrit de recommander à la population d'utiliser ce remède traditionnel en l'état, sans avoir au préalable vérifiée l'absence des APs dans les extraits de feuilles sénescents d'*H. foertherianum*.

Enfin, l'objectif développé dans le quatrième et dernier chapitre de ces travaux de thèse a concerné le développement potentiel de la production d'un extrait à base d'*H. foertherianum*, standardisé et d'innocuité garantie. Les variations de la composition chimique de l'extrait et de ses principes actifs ont ainsi été analysées suivant les conditions environnementales de collecte, les méthodes d'extraction et de conservation des feuilles.

Chapitre 2

Évaluation de l'activité biologique d'*H. foertherianum* face aux ciguatoxines

1. Introduction

L'activité biologique prometteuse du remède traditionnel à base d'*H. foertherianum* a déjà été exposée lors des thèses de doctorat de Boydron-Le Garrec (2005) et de Kumar-Roiné (2009). En effet, l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* a montré un effet protecteur face à la brévétaxine-3 (PbTx-3), toxine de structure chimique proche des ciguatoxines (CTXs), sur des neuroblastomes de souris (Boydron-Le Garrec et al., 2005) et a permis d'inhiber la production d'oxyde nitrique dans des macrophages (Kumar-Roiné, 2009). Un fractionnement chimique bioguidé par le test d'interaction ligand-récepteur a mené à l'isolement de l'acide rosmarinique (AR) (Kumar-Roiné, 2009).

Il est particulièrement important de s'assurer de l'activité biologique de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* en vue de sa valorisation, mais aussi de celle de son principe actif, l'AR (figure 38). Afin de confirmer leur activité biologique pour le traitement de la ciguatera et donc leur effet protecteur contre les CTXs, des tests biologiques *in vitro* utilisés pour détecter les CTXs ont été employés dans cette étude. Les deux moyens de détection des CTXs mis en œuvre en routine au laboratoire sont : le test de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris (Pawlowicz et al., 2013) et le test d'interaction ligand-récepteur (TILR) (Darius et al., 2007).

Une étude de relation structure-activité a aussi été menée pour vérifier la spécificité d'action de l'AR avec les six molécules suivantes : l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide coumarique, l'ester caféate de dihydroxyphényl (CADPE), l'ester caféate de phényl (CAPE) et la curcumine (figure 38). Les acides caféique, férulique et coumarique ont été choisis parce qu'ils sont produits par le corps humain après ingestion et métabolisation de l'AR (Baba et al., 2005). Ces composés sont connus pour leur activité antioxydante (Chen et Ho, 1997). En ce qui concerne le CADPE et le CAPE, leur structure chimique est proche de celle de l'AR. Le CADPE ne possède pas la substitution carboxyle de l'AR et est cytotoxique sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Dong et al., 2011). La molécule de CAPE porte deux substitutions hydroxyles en moins sur un de ses cycles phénoliques comparé au CADPE. Il a des propriétés cytoprotectrice, antioxydante et antitumorale (Wu et al., 2007). La curcumine est quant à elle composée de deux groupements aromatiques en bout de chaîne, comme l'AR, le CAPE et le CADPE, mais chaque groupement comporte une substitution d'un groupe hydroxyle et méthoxyle comme l'acide férulique. La curcumine est aussi réputée pour ses multiples activités biologiques, notamment sa capacité à traiter les maladies neurodégénératives (Aggarwal et Harikumar, 2009).

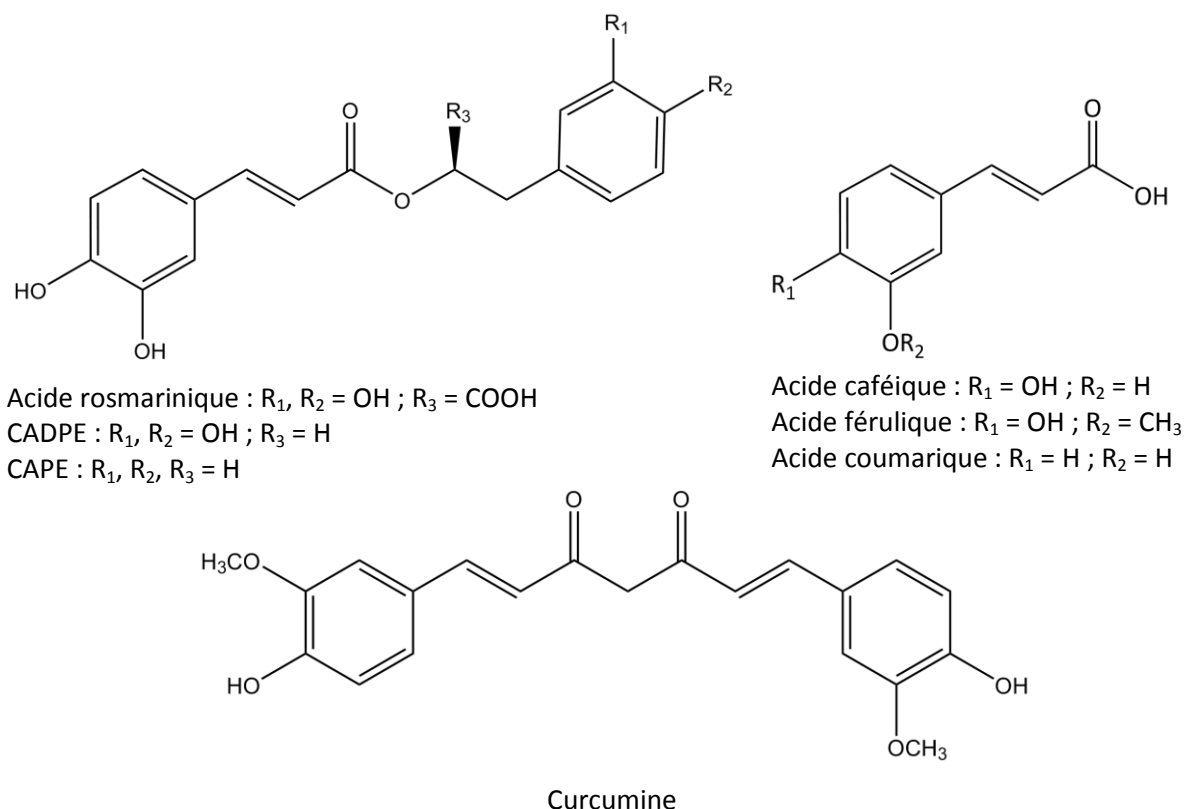


Figure 38 : Structure chimique des composés utilisés dans l'étude de relation structure-activité.

2. Test de cytotoxicité sur neuroblastomes de souris

2.1. Principe du test

Le test *in vivo* de détection de toxicité sur souris des extraits de produits de la mer est un des premiers à avoir été développé mais pose quelques problèmes d'éthique. C'est pourquoi des neuroblastomes de souris (Neuro-2a) ont été cultivés *in vitro* en vue de détecter les CTXs. Cette méthode a aussi une sensibilité plus élevée. Les Neuro-2a sont des neurones transformés qui ont donc leurs propres caractéristiques et permettent d'étudier l'effet des toxines sur les canaux sodium dépendant du potentiel (CSDPs).

La détection de l'effet cytotoxique des CTXs est possible grâce à l'utilisation de potentialisateurs : l'ouabaïne (O) et la vératridine (V). Le premier va agir sur la pompe Na⁺ (ATPase) en limitant l'influx d'ions potassium et la sortie d'ions sodium et le deuxième se fixe sur les CSDPs en les maintenant en position ouverte ce qui provoque un influx d'ions sodium au sein de la cellule (Catterall, 1986). En présence de l'AR, trois méthodes colorimétriques complémentaires de mesure de la cytotoxicité ont été utilisées, c'est à dire un test au MTT, un test au rouge neutre et un au LDH.

Le test au MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) permet de mesurer la viabilité cellulaire représentée par l'activité de la succinate déshydrogénase des

mitochondries qui réduit les sels de tétrazolium ajoutés dans le milieu en formazan (Mosmann, 1983).

Le test au rouge neutre est très répandu et utilisé sur beaucoup de systèmes cellulaires. Il permet de mesurer la viabilité cellulaire. Le rouge neutre est un colorant d'inclusion et la coloration des cellules vivantes permet de montrer l'intégrité membranaire de leurs lysosomes (Borenfreund et al., 1988).

Quant au dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), il permet de mesurer l'intégrité membranaire. En effet, les cellules dont la membrane plasmique a été rompue, libèrent leur contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire, et notamment la LDH, une enzyme stable. La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est proportionnelle à la mort cellulaire. La mesure de l'activité de la LDH permet d'évaluer non seulement la mort cellulaire nécrotique (caractérisée par une rupture précoce de la membrane plasmique) mais aussi une partie de la mort cellulaire apoptotique car les cellules finissent par perdre leur intégrité membranaire au stade ultime du processus apoptotique (« nécrose secondaire ») (Nachlas et al., 1960). En présence de la LDH, le lactate est transformé en pyruvate et le NAD^+ (forme oxydée du nicotinamide adénine dinucléotide) est alors transformé en NADH , H^+ . En présence de NADH , H^+ , le sel de tétrazolium (jaune pâle), rajouté au milieu, est transformé en formazan (rouge). La mesure de l'absorbance du formazan permet de déduire la quantité de LDH relarguée dans le milieu (figure 39 – Decker et Lohmann-Matthes, 1988).

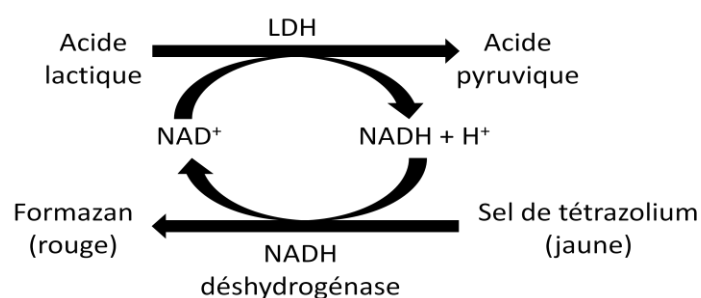


Figure 39 : Formation de formazan par le biais de la production de NADH induite par le LDH.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Produits utilisés

Les acides rosmarinique, caféique, férulique, coumarique, la curcumine et le CAPE ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le CADPE a été synthétisé par le Dr. V. Jullian à l'UMR-152 de Toulouse parce qu'il n'était pas disponible dans le commerce. Deux extraits de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* ont été testés, un de Tubuai et un de

Raivavae. Les extraits ont été obtenus selon le protocole indiqué au [chap. 3 parag. 2.1.](#) et leur concentration en AR a été dosée par chromatographie liquide haute pression couplée à un détecteur à barrettes de diode (CLHP-DAD) selon la méthode décrite au [chap. 3 parag. 2.3.](#)

2.2.2. Entretien des cultures cellulaires et ensemencement

Les Neuro-2a (lignée CCL-131, ATCC, Manassas, Virginie) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 1 % de pyruvate de sodium (100 mM), 1 % de PenStrep (pénicilline 5000 unités/ml) et streptomycine (5000 mg/ml), 1 % de fungizone (amphotéricine B 250 mg/ml), 1 % de glutamax (100x) et 10 % de sérum de bœuf fœtal. Les cellules ont été repiquées deux fois par semaine pour les tests cellulaires dans une flasque de 75 cm² et ensemencées dans des plaques 96 puits à fond plat à une densité d'environ 50 000 cellules par puits. Elles ont ensuite été incubées 24 h à 37°C dans une étuve et à 5 % de CO₂ avant leur exposition aux produits à tester.

2.2.3. Mise en place des tests de cytotoxicité

Le test de toxicité cellulaire sur Neuro-2a de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* et des dérivés d'AR a été adapté du protocole de Boydron-Le Garrec et al. (2005). Les gammes de concentration de l'extrait d'*H. foertherianum*, de l'AR et de ses dérivés ont donc été ajustées entre la valeur minimale nécessaire pour observer un effet sur la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B et la valeur maximale provoquant de la cytotoxicité. Les valeurs de viabilité cellulaire, déduites de tests colorimétriques, ont aussi été vérifiées par une estimation visuelle au microscope.

2.2.4. Effet des produits sur la mortalité des Neuro-2a induite par la P-CTX-1B

Pour chaque microplaque, trois puits ont été traités avec des témoins (conditions OV⁺) d'ouabaïne (O ; 0,5 mM) et de vératridine (V ; 0,05 mM), qui sont des potentialisateurs des CSDPs nécessaires pour la détection de la cytotoxicité des CTXs, dans le but de réduire la viabilité cellulaire à environ 80 %. Trois puits ont été laissés intacts en tant que témoins non traités (cellules et milieu seulement, conditions OV) et six puits ont été traités avec des témoins P-CTX-1B (OV⁺ et 5.10⁻¹³ M de P-CTX-1B, conditions OVCTX⁺). L'ajout de la P-CTX-1B aux témoins OV⁺ a permis de diminuer la viabilité cellulaire de 80 % à 20 %. Différentes périodes d'incubation de l'AR ont aussi été testées en fonction du moment de l'ajout de P-CTX-1B. Les puits ont été traités simultanément avec OV⁺ et l'AR, 2 h, 1 h et 20 min avant l'ajout de la P-CTX-1B et 20 min et 1 h après l'ajout de la P-CTX-1B pour cinq microplaques différentes.

L'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* a été préparé pour une gamme de concentrations finales de 0,55 µg/ml à 5467 µg/ml et l'AR et ses dérivés de 0,12 µg/ml à 1213 µg/ml. Six concentrations de chaque produit ont été ajoutées aux puits traités avec OV⁺ en triplicat et aux puits traités avec OVCTX⁺ en triplicat. Après un temps d'incubation de 17 h, la cytotoxicité des produits a été évaluée grâce aux mesures de viabilité cellulaire.

2.2.5. Mesure de la viabilité cellulaire

2.2.5.1. Test au MTT

La viabilité cellulaire a été déterminée grâce au test au MTT. Tout d'abord, le milieu est retiré par renversement des microplaques. Puis 50 µl de tampon phosphate salin ont été ajoutés puis retirés. Enfin, 50 µl d'une solution de MTT (concentration finale de 0,8 mg/ml) ont été ajoutés aux 96 puits. Après 20 min d'incubation à 37 °C et 5 % de CO₂, 100 µl de diméthylsulfoxyde ont été ajoutés pour dissoudre les cristaux de formazan formés. L'absorbance a été lue à 570 nm grâce à un lecteur de microplaques (BioRad, Hercules, Californie). Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé comme l'absorbance des puits traités par les produits divisée par l'absorbance des puits témoins respectifs.

2.2.5.2. Test au rouge neutre

Pour l'AR, la viabilité cellulaire a aussi été mesurée par le test au rouge neutre (Kit tox-4 de Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) suivant les spécifications du fournisseur. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé comme l'absorbance des puits traités par les produits sur l'absorbance des puits témoins.

2.2.5.3. Test au LDH

Pour l'AR, la viabilité cellulaire a aussi été mesurée par le test au LDH (Kit Tox-7 de Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) avec le protocole suivant. Le temps d'exposition aux produits a été de 17 h, durant lequel les cellules ont été mises en contact avec du RPMI 1640 non supplémenté. Puis 15 µl d'une solution de lyse ont été ajoutés aux puits témoins OV⁺ et incubés durant 45 min à 37°C. Un volume de 45 µl de chaque puits a été transféré dans une nouvelle microplaque et 90 µl de mélange (substrat, cofacteur et colorant) ont été ajoutés à chaque puits. La microplaque a été incubée 10 min à température ambiante couverte par une feuille d'aluminium et la réaction a été stoppée avec 15 µl d'acide chlorhydrique 1 N. L'absorbance a été lue à 490 nm et

le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé comme la différence entre 100 % et le pourcentage de mortalité cellulaire avec

$$\% \text{ mortalité cellulaire} = \frac{(A \text{ puits traités} - A \text{ puits témoins})}{(A \text{ puits lysés} - A \text{ puits témoins})}$$

2.2.6. Analyses statistiques

Chaque échantillon a été testé au minimum 3 fois indépendamment ($n = 9$) et des tests statistiques avec le logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, Californie) ont été utilisés pour regrouper ou discriminer les résultats obtenus.

Afin de déterminer si les valeurs de viabilité cellulaire à différentes concentrations d'un même échantillon étaient statistiquement différentes, un test de normalité a été appliqué avec Shapiro-Wilk, d'Agostino et Pearson et Kolmogorov-Smirnov. Puis si le résultat était positif, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été réalisée avec le post-test Dunnett, sinon le test de Kruskal-Wallis (post-test Dunn) (Motulsky, 2010) a été réalisé pour comparer la réponse des différentes concentrations testées, seuil de significativité fixé à $p < 0,05$.

2.3. Résultats

2.3.1. Effet de l'extrait d'*H. foertherianum* et de l'AR sur la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B

La capacité de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* et de l'AR à inhiber la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les Neuro-2a a été évaluée par le test au MTT. Une concentration de 547 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait d'*H. foertherianum* et de 121 $\mu\text{g/ml}$ pour l'AR a induit une augmentation significative de la viabilité cellulaire comparée au témoin OVCTX⁺. Cependant, des effets cytotoxiques sont apparus à partir de 2 734 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait d'*H. foertherianum* et de 607 $\mu\text{g/ml}$ pour l'AR, indépendamment de la présence de la P-CTX-1B (figure 40 A et B). Une toxicité similaire a aussi été observée avec l'extrait d'*H. foertherianum* et l'AR seuls sur les Neuro-2a (figure 41 A et B). En complément du test au MTT, le test au rouge neutre et le test au LDH ont été employés pour mesurer la viabilité cellulaire en présence de l'AR. Avec ces deux méthodes, la concentration d'AR nécessaire pour inhiber significativement la cytotoxicité de la P-CTX-1B sur les Neuro-2a était de 121 $\mu\text{g/ml}$, comme pour le test au MTT. De plus, lors du test au rouge neutre, l'AR a montré une cytotoxicité au-dessus d'une concentration de 121 $\mu\text{g/ml}$, dans les deux conditions OV⁺ et OVCTX⁺ comme observé avec le test au MTT (figure 42 A). À l'inverse, avec le test au LDH, aucune cytotoxicité

significative de l'AR n'a été observée pour les concentrations testées ce qui signifie qu'il permet de conserver l'intégrité membranaire des cellules Neuro-2a (figure 42 B).

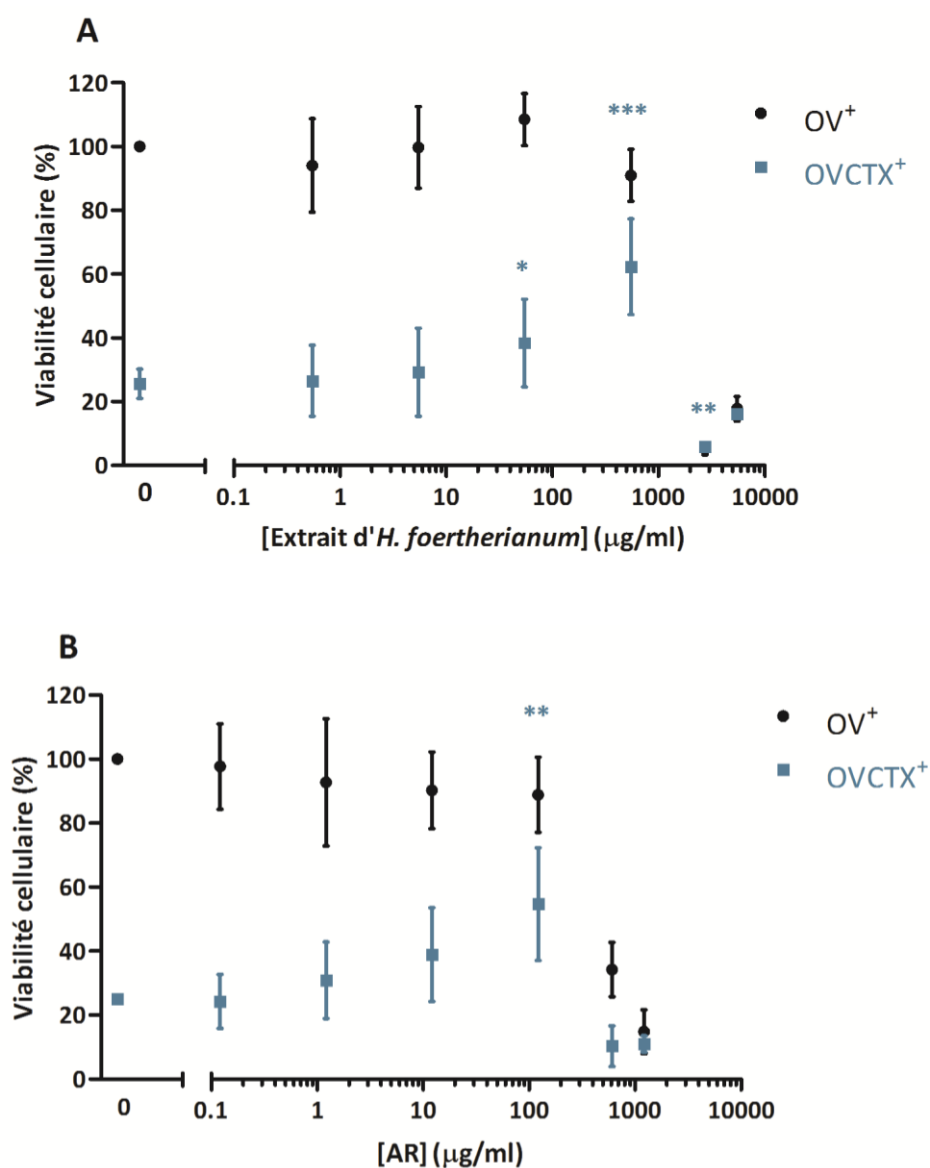


Figure 40 : Effet protecteur de (A) l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* de Tubuai et de (B) l'acide rosmarinique contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a. Les conditions OV⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaïne (0,5 mM) et de vétratridine (0,05 mM), requis pour l'expression de la cytotoxicité de la P-CTX-1B. Les conditions OVCTX⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaïne, de vétratridine et aussi de P-CTX-1B ($5 \cdot 10^{-13}$ M). Après 17 h d'exposition, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test au MTT. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ écart-type (EC) de trois réplicats indépendants. Les concentrations montrant une différence significative de viabilité cellulaire comparées au contrôle OVCTX⁺ ($p < 0,05$) sont indiquées avec un astérisque (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$).

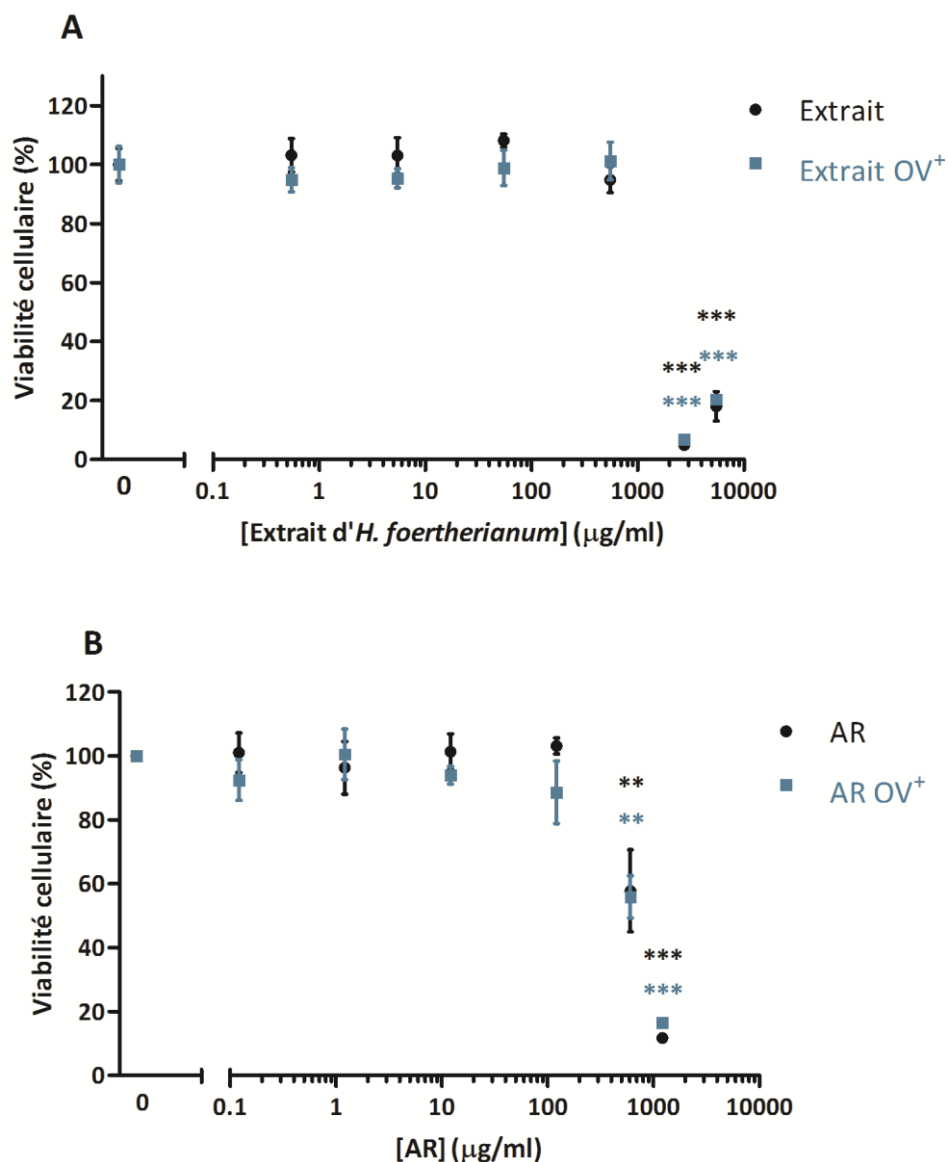


Figure 41 : Cytotoxicité de (A) l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* de Tubuai et de (B) l'acide rosmarinique sur les cellules Neuro-2a. Les conditions Extrait ou AR correspondent aux produits seuls en contact avec les cellules Neuro-2a. Les conditions OV⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaine (0,5 mM) et de vétratridine (0,05 mM), requis pour l'expression de la cytotoxicité de la P-CTX-1B. Après 17 h d'exposition, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test au MTT. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants. Les concentrations montrant une différence significative de viabilité cellulaire comparées au contrôle ($p < 0,05$) sont indiquées avec un astérisque (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$).

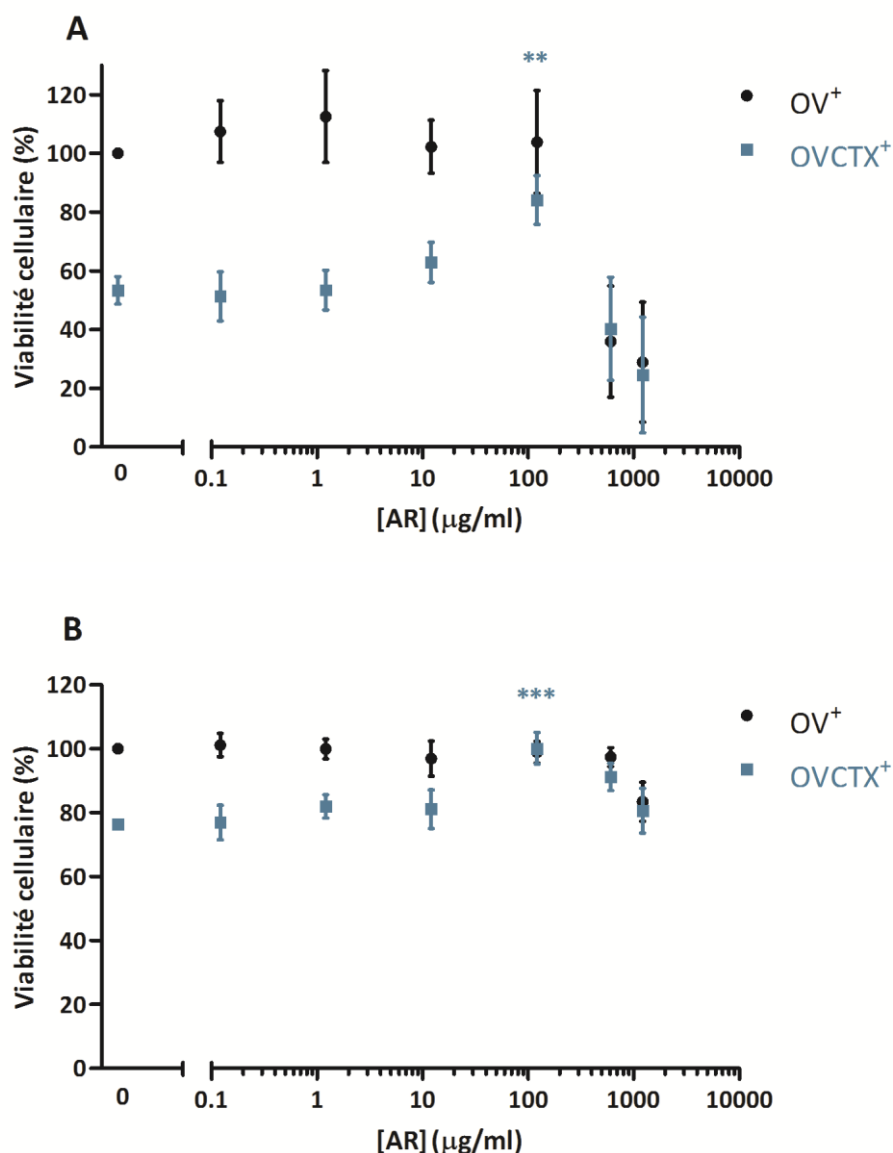


Figure 42 : Effet protecteur de l'acide rosmarinique contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a mesuré (A) par le test au rouge neutre et (B) par le test au LDH. Les conditions OV⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaïne (0,5 mM) et de vétratridine (0,05 mM), requis pour l'expression de la cytotoxicité de la P-CTX-1B. Les conditions OVCTX⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaïne, vétratridine et aussi de P-CTX-1B ($5 \cdot 10^{-13}$ M). Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants. Les concentrations montrant une différence significative de viabilité cellulaire comparées au contrôle OVCTX⁺ ($p < 0,05$) sont indiquées avec un astérisque (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$).

Un extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* de Raivavae (collecté en mars 2011), analysé par CLHP-DAD (cf. chap. 3 para. 3.3.) et ne contenant pas d'AR naturellement, n'a pas montré d'effet protecteur des Neuro-2a face aux CTXs (figure 43).

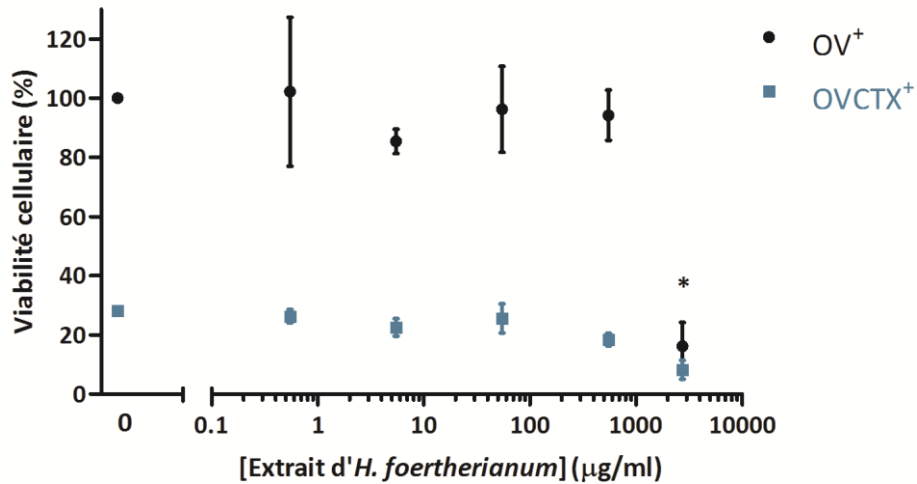


Figure 43 : Effet de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* de Raivavae contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a. Les conditions OV⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaine (0,5 mM) et de vétratridine (0,05 mM), requis pour l'expression de la cytotoxicité de la P-CTX-1B. Les conditions OVCTX⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaine, vétratridine et aussi de P-CTX-1B ($5 \cdot 10^{-13}$ M). Après 17 h d'exposition, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test au MTT. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants. Les concentrations montrant une différence significative de viabilité cellulaire comparées au contrôle OV⁺ ($p < 0,05$) sont indiquées avec un astérisque (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$).

Plusieurs moments d'exposition ont aussi été testés afin de déterminer si l'effet protecteur de l'AR était modifié selon son ajout anticipé ou tardif dans le milieu cellulaire. L'AR a donc été ajouté dans le milieu 2 h, 1 h et 20 min avant la P-CTX-1B et 20 min et 1 h après l'ajout de la P-CTX-1B dans le milieu. L'incubation d'AR pré- ou post-ciguatoxine n'a pas eu d'effet sur sa réponse face à la cytotoxicité induite par les CTXs. Son effet protecteur est donc conservé quelque soit son moment d'ajout par rapport à la P-CTX-1B dans le milieu cellulaire (figure 44).

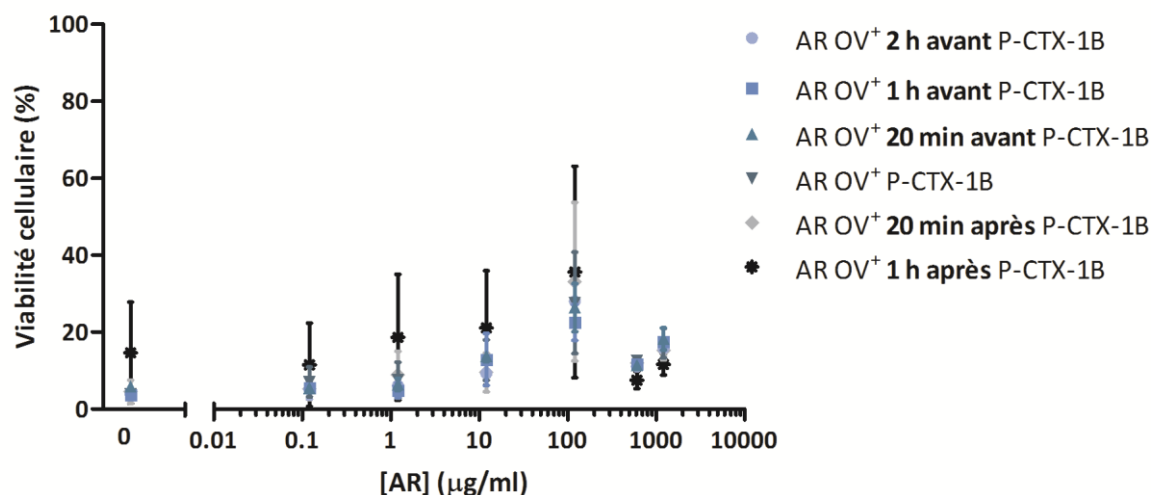


Figure 44 : Effet protecteur de l'acide rosmarinique contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a mesuré par le test au MTT, selon différents moments d'ajout de l'acide rosmarinique par rapport à la P-CTX-1B. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants.

2.3.2. Relation structure-activité des dérivés de l'AR

Seuls l'AR et l'acide caféique ont montré un effet protecteur contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B et ont induit une augmentation de la viabilité cellulaire à une concentration de 121 $\mu\text{g/ml}$. Au contraire, CAPE et CADPE se sont montrés cytotoxiques respectivement à 1,12 et 121 $\mu\text{g/ml}$. L'acide coumarique, l'acide férulique et la curcumine n'ont eu aucun effet significatif face à la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a (figure 45 et tableau 7).

Tableau 7 : Effet des dérivés de l'AR contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a en présence d'ouabaïne et vératridine (OV⁺).

Produits	Maximum de la viabilité cellulaire ($\mu\text{g/ml}$) à	Augmentation de la viabilité cellulaire (%)	Mortalité cellulaire ($\mu\text{g/ml}$) (OV ⁺ et P-CTX-1B) à partir de	Mortalité cellulaire ($\mu\text{g/ml}$) (OV ⁺) à partir de
Acide coumarique	aucun	0	1213	607
Acide férulique	aucun	0	> 1213	1213
Acide caféique	121	15,4	> 1213	1213
Curcumine	aucun	0	> 1213	607
Acide rosmarinique	121	40,7	607	607
Extrait d' <i>H. foertherianum</i>	547	45,7	2734	2734
CADPE	aucun	0	121	121
CAPE	aucun	0	1,21	12,1

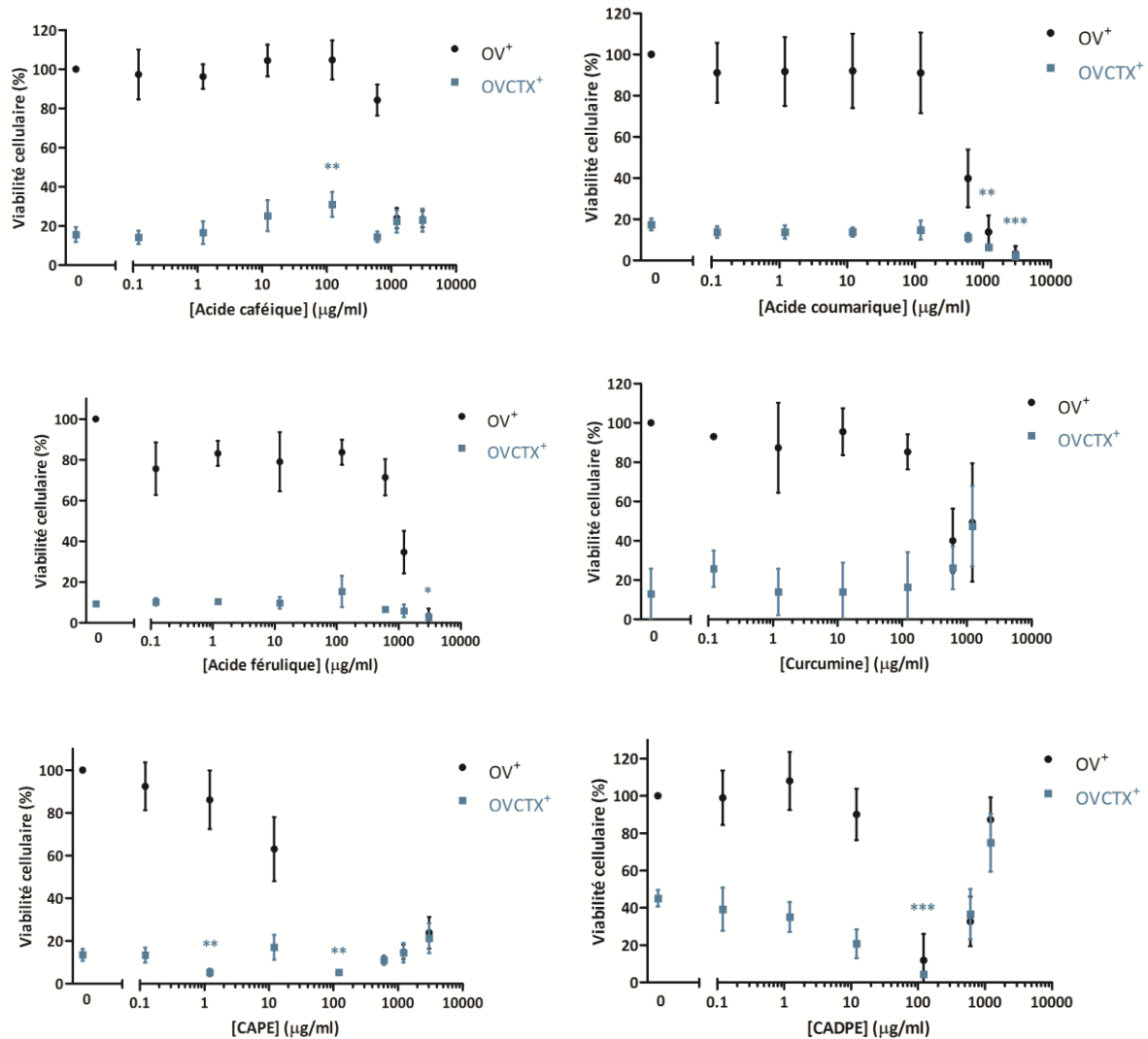


Figure 45 : Effet des dérivés de l'acide rosmarinique contre la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les cellules Neuro-2a. Les conditions OV⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaïne (0,5 mM) et de vétratridine (0,05 mM), requis pour l'expression de la cytotoxicité de la P-CTX-1B. Les conditions OVCTX⁺ correspondent à l'ajout d'ouabaïne, vétratridine et aussi de P-CTX-1B ($5 \cdot 10^{-13}$ M). Après 17 h d'exposition, la viabilité cellulaire a été mesurée par le test au MTT. Les résultats sont exprimés comme la moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants. Les concentrations montrant une différence significative de viabilité cellulaire comparées au contrôle OVCTX⁺ ($p < 0,05$) sont indiquées avec un astérisque (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$).

3. Test d'interaction ligand-récepteur

3.1. Principe du test

Le TILR ou *Receptor binding assay* (RBA) permet de vérifier que les produits ayant un effet lors du test sur les Neuro-2a possèdent bien la capacité de se lier au site 5 des CSDPs, comme c'est le cas des CTXs.

Les récepteurs, des synaptosomes de rat riches en canaux sodiques, sont mis en présence d'un ligand, la brévéttoxine-3 radio-marquée ($[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$). La quantité de complexe ligand-récepteur formée en présence ou en absence de molécules inhibitrices, telles que les PbTx, les CTXs, ou bien d'autres composés, est dosée par la mesure de la radioactivité par scintillation liquide (figure 46). L'inhibition sélective de la fixation de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ au site 5 est observée par la diminution dose-dépendante de la radioactivité. Les CTXs radiomarquées n'étant pas disponibles, la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ est utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice des CTXs. Le TILR devrait ainsi nous permettre de spécifier si la réponse inhibitrice de la cytotoxicité observée avec l'extrait d'*H. foertherianum* et avec les molécules listées précédemment est particulièrement due à leur action sur ces canaux. Aussi, dans cette optique, nous avons recherché si un de nos échantillons inhibait la liaison de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ au site 5 des CSDPs.

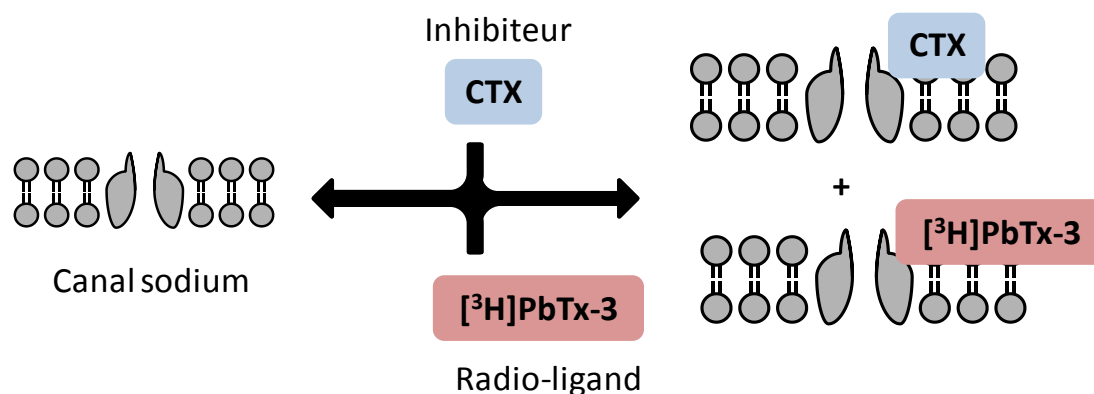


Figure 46 : Phénomène de compétition intervenant dans le test d'interaction ligand-récepteur.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Produits utilisés

Les produits testés sont ceux décrits au parag. 2.2.1.

3.2.2. Protocole

Le protocole suivi a été celui précédemment décrit par Darius et al. (2007). En bref, 100 mg d'extrait ont été pesés ou 20 mg d'AR et de ses dérivés. Les échantillons ont été dissous dans 100 μl de méthanol, complétés jusqu'à 1 ml avec du tampon d'incubation puis vortexés et soniqués 15 min. Après plusieurs essais destinés à définir la gamme de concentration la plus adaptée, les concentrations finales qui ont été choisies sont 40 ; 24 ; 12 ; 4 ; 2,4 ; 1,2 ; 0,4 et 0,12 mg/ml pour les

extraits et 8 ; 4,8 ; 2,4 ; 0,8 ; 0,48 ; 0,24 ; 0,08 et 0,024 mg/ml pour l'AR et ses dérivés. Puis, les échantillons ont été mis en présence de la [³H]PbTx-3 et de synaptosomes dans des tubes adaptés.

Deux temps d'exposition de l'AR par rapport à la [³H]PbTx-3 ont aussi été testés. Dans un cas, l'AR et les synaptosomes ont été incubés pendant 1 h dans les tubes avant l'ajout de la [³H]PbTx-3 et dans l'autre cas, les synaptosomes et la [³H]PbTx-3 ont été incubés 1 h dans les tubes avant l'ajout d'AR. La compétition entre l'AR et la P-CTX-1B pour le site 5 des CSDPs des synaptosomes a aussi été évaluée. La P-CTX-1B, préparée en gamme de concentration de 0,01 pg/ml à 0,1 µg/ml, a été incubée avec de l'AR à 1,2 ou 4,8 mg/ml.

Après une incubation d'1h30, la radioactivité a été décomptée en cpm et le pourcentage relatif par rapport au contrôle a été calculé selon

$$\% \text{ relatif} = \frac{(\text{Échantillon} - \text{NS})}{(100 \% - \text{NS})} \times 100$$

où « Échantillon » correspond à la valeur en cpm obtenue pour chaque concentration de chaque échantillon, « 100 % » correspond à la valeur pour laquelle on observe une fixation totale au site 5 des canaux sodium de la [³H]PbTx-3 et « NS » à la valeur pour laquelle on observe la fixation non spécifique de la [³H]PbTx-3.

La Cl₅₀, qui est la concentration d'un échantillon capable d'inhiber la fixation de la [³H]PbTx-3 à 50 %, a été calculée par le logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, Californie), d'après la courbe du pourcentage relatif en fonction de la concentration des échantillons, et exprimée en mg/ml.

3.3. Résultats

3.3.1. Affinité d'extraits d'*H. foertherianum* et de l'AR au site 5 des CSDPs

Un extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* contenant 4,45 % d'AR (Extrait de Tubuai), un extrait n'en contenant pas (Extrait de Raivavae), dosés par CLHP-DAD (cf. [chap. 3 parag. 2.3.](#)), et l'AR ont été exposés avec les synaptosomes de rats et la [³H]PbTx-3 dans le TILR. L'extrait de Raivavae, qui ne contient pas d'AR, n'a induit aucune compétition contre la [³H]PbTx-3 alors que lorsque 4,45 % d'AR ont été rajoutés à cet extrait, on a observé une compétition avec la [³H]PbTx-3 jusqu'à environ 10 mg/ml. Sa courbe d'inhibition a alors présenté un profil similaire à celle de l'extrait de Tubuai, contenant de l'AR, et de la courbe de l'AR lui-même ([figure 47](#)).

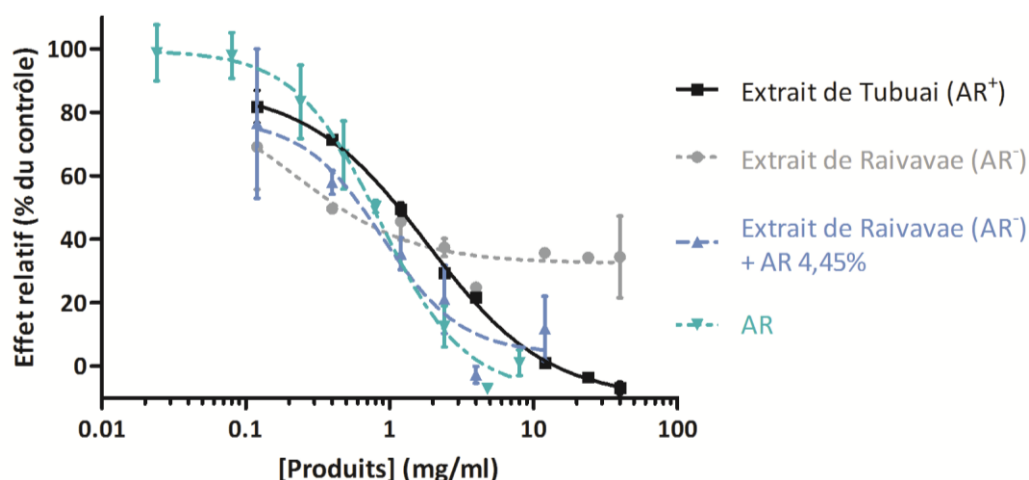


Figure 47 : Courbes d'inhibition de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$, au site 5 des canaux sodium, par deux extraits de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* et par l'acide rosmarinique, déterminées par le TILR. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants.

3.3.2. Relation structure-activité pour l'affinité de dérivés de l'AR au site 5 des CSDPs

L'AR a montré la plus forte affinité au site 5 des CSDPs après la curcumine. L'acide coumarique et férulique ont les plus faibles affinités avec ce site 5, c'est-à-dire respectivement 3 et 5,6 fois moins importantes que celle de l'AR (figure 48 et tableau 8).

Pour les CAPE et CADPE, la réponse obtenue n'était pas une courbe sigmoïde typique d'un phénomène de dose-réponse et leurs courbes d'inhibition ont montré un faible coefficient de corrélation. Bien que la courbe de CAPE ait une CI_{50} inférieure à celle de l'AR, un plateau à partir de 0,1 mg/ml a révélé que CAPE ne pouvait pas déplacer plus de 50 % de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ du site 5 des CSDPs (figure 48). De plus, des valeurs aberrantes ont été obtenues pour CADPE pour les doses supérieures à 1 mg/ml avec une diminution de son affinité pour les CSDPs au fur et à mesure que sa concentration augmentait (tableau 8).

Tableau 8 : Affinité de l'extrait d'*H. foertherianum* et des dérivés de l'AR.

Produits	CI_{50}^a (mg/ml)	IC 95 % ^b	R^2 ^c
Acide coumarique	2,40	0,15 à 38,35	0,89
Acide férulique	4,43	0,93 à 21,20	0,98
Acide caféique	2,38	1,54 à 3,70	0,98
Curcumine	0,01	0,004 à 0,01	0,98
Acide rosmarinique	0,79	0,64 à 0,99	0,96
Extrait d' <i>H. foertherianum</i>	1,69	1,37 à 2,08	0,99
CADPE	0,41	0,14 à 1,17	0,87
CAPE	0,05	0,03 à 0,09	0,84

^a La CI_{50} est la concentration inhibitrice médiane.

^b L'IC 95 % est l'intervalle de confiance à 95 %.

^c R^2 est le coefficient de corrélation.

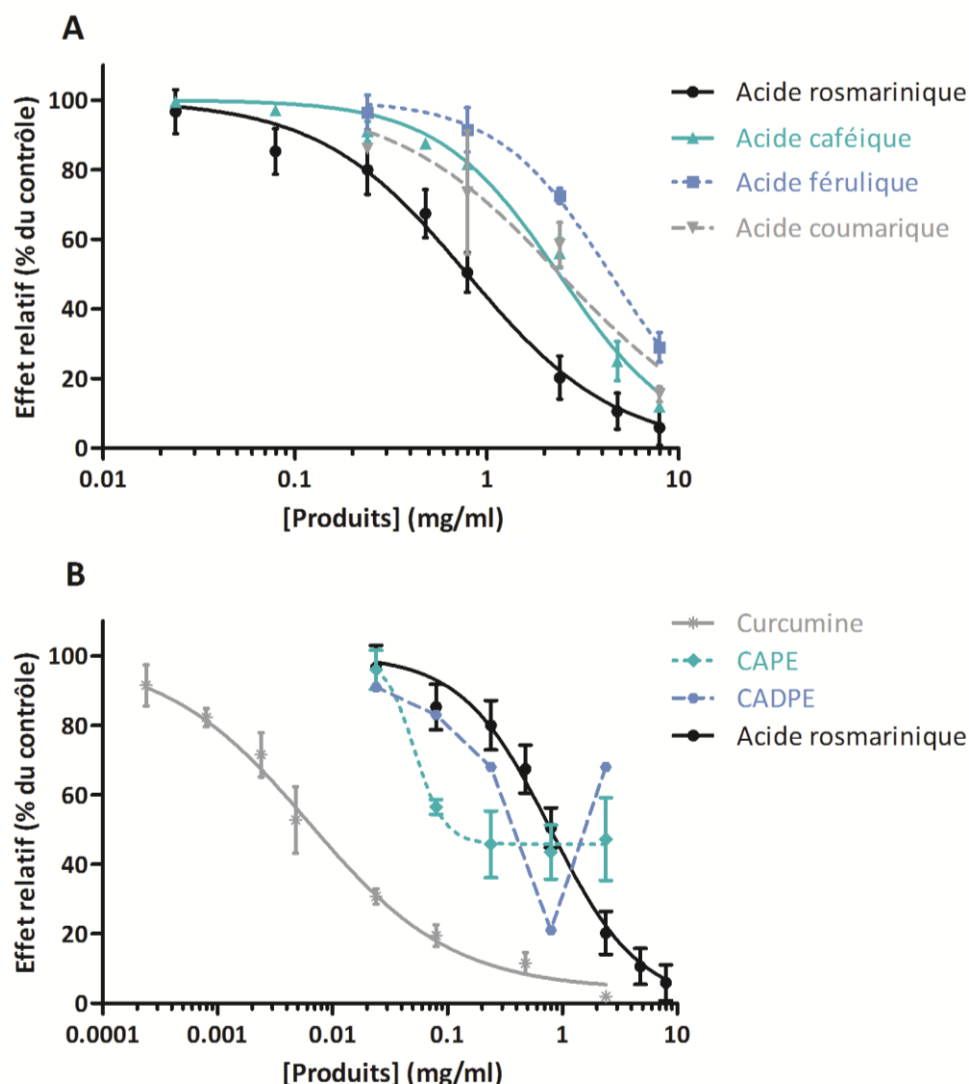


Figure 48 : Courbes d'inhibition de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$, au site 5 des canaux sodium, par l'acide rosmarinique et ses dérivés, déterminées par le TILR. (A) Comparaison de l'acide rosmarinique, de l'acide caféique et de l'acide coumarique. (B) Comparaison du CAPE, du CADPE, de la curcumine et de l'acide rosmarinique. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants.

3.3.3. Confirmation de l'affinité de l'AR au site 5 des CSDPs

La compétition de l'AR face à la P-CTX-1B a été observée grâce à l'ajout de deux concentrations différentes d'AR (1,2 et 4,8 mg/ml) à une concentration de la P-CTX-1B fixée d'après sa courbe d'inhibition. Plus la quantité d'AR, ajoutée à la P-CTX-1B, était élevée, plus la compétition a été importante avec la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$, ce qui montre que ces deux molécules agissent bien sur le même site des CSDPs (figure 49).

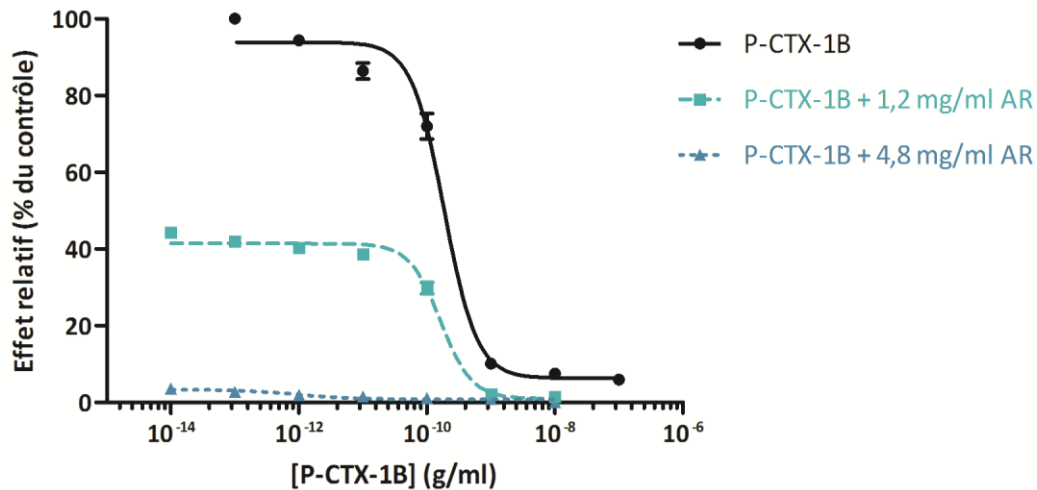


Figure 49 : Courbes d'inhibition de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$, au site 5 des canaux sodium, par la P-CTX-1B et par l'acide rosmarinique ajouté à deux concentrations différentes à la P-CTX-1B, déterminées par le TILR. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants.

L'AR a été ajouté aux synaptosomes 1 h avant, simultanément et 1 h après la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ afin de vérifier si la compétition pour le site 5 des CSDPs était modifiée suivant le moment de l'incubation. Quelque soit le moment d'ajout de l'AR, les courbes d'inhibition étaient identiques, ce qui signifie que cela n'avait pas de conséquence sur sa compétition au site 5 des CSDPs avec la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ et que l'AR permet de déplacer la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ de son site d'action (figure 50).

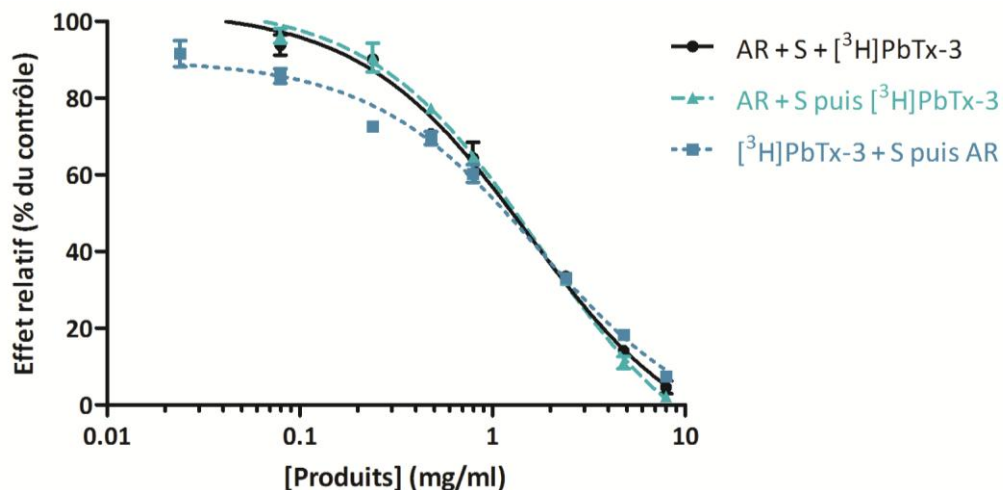


Figure 50 : Courbes d'inhibition de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ au site 5 des canaux sodium par l'acide rosmarinique ajouté à différents moments et déterminées par le TILR. AR + S + $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ correspond à l'ajout simultané de l'acide rosmarinique, des synaptosomes et de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$. AR + S puis $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ correspond à l'ajout simultané de l'acide rosmarinique et des synaptosomes puis 1 h après de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$. $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ + S puis AR correspond à l'ajout simultané de la $[^3\text{H}]\text{PbTx-3}$ et des synaptosomes puis 1 h après de l'acide rosmarinique. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne $\pm$ EC de trois réplicats indépendants.

4. Discussion

Les symptômes neurologiques de la ciguatera peuvent persister pendant des mois et contribuent à la forte morbidité de cette intoxication (Lehane et Lewis, 2000). Benoit et al. (2000) ont déjà mis en évidence la capacité de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* à inverser l'hyperexcitabilité induite par la P-CTX-1B sur les axones myélinisés de grenouilles.

Lors de nos travaux, nous avons évalué la capacité de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* et de l'un de ces composés majoritaires, l'acide rosmarinique, à inhiber la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B sur les Neuro-2a. La cytotoxicité provoquée par la P-CTX-1B a été inhibée par l'extrait d'*H. foertherianum* jusqu'à une concentration de 2734 µg/ml et par l'AR jusqu'à une concentration de 607 µg/ml, concentrations à partir desquelles ils ont montré un effet cytotoxique. Pour évaluer cette inhibition de la cytotoxicité, la viabilité cellulaire a été mesurée par trois méthodes : les tests au MTT, au rouge neutre et au LDH. L'effet bénéfique de l'extrait d'*H. foertherianum* a été confirmé par le test au MTT et celui de l'AR par les trois méthodes.

Cette capacité de l'AR à atténuer la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B et la P-CTX-3C a été également confirmée sur neurones primaires humains par une étude menée en collaboration avec l'équipe australienne du Dr. G. Guillemain, qui dispose de ces cellules et a l'autorisation de les utiliser. Le traitement des neurones humains par l'AR a permis de les protéger contre la toxicité des CTXs tout en maintenant les niveaux intracellulaires de NAD⁺. Pour cela, l'AR a d'abord été évalué seul afin de vérifier son impact sur la viabilité cellulaire et les fonctions cellulaires normales en déterminant l'activité LDH extracellulaire, les niveaux intracellulaires de NAD⁺ et les dommages ADN. La viabilité cellulaire des neurones humains non traités et de ceux traités par l'AR était identique donc l'AR n'a pas d'effet cytotoxique sur les neurones humains à des concentrations de 0,01 à 1 mg/ml. Les trois mêmes méthodes ont été utilisées pour vérifier l'effet de l'AR sur la toxicité induite par les CTXs sur les neurones humains. Il a été montré que le prétraitement ou le post-traitement par l'AR augmentait la viabilité cellulaire, restaurait les niveaux de NAD⁺ cellulaires et atténuait les dommages à l'ADN causés par les CTXs (Braidy et al., 2014).

Nous avons aussi montré que les composés de l'extrait d'*H. foertherianum* et l'AR avaient une affinité pour le site 5 des CSDPs, avec une Cl₅₀ d'environ 1,69 et 0,79 mg/ml respectivement, par le TILR. Ces résultats suggèrent qu'ils sont capables de déplacer les PbTx et les CTXs de leur site d'action et de les remplacer, ou de bloquer leur accès au site d'action. Cependant, le standard de la P-CTX-1B a une Cl₅₀ d'environ 0,26 ng/ml sous les mêmes conditions (Darius et al., 2007). Son affinité pour le site 5 des CSDPs est ainsi 10⁶ fois plus importante que l'affinité des composés de l'extrait d'*H. foertherianum* et de l'AR pour ce site. À titre de comparaison, la P-CTX-1B a une affinité pour le site 5 des CSDPs d'environ 10³ fois supérieure à l'affinité du brévénal, un candidat pour le traitement

de la ciguatéra (Bourdelaïs et al., 2004), cependant difficilement disponible car il faut l'isoler d'un dinoflagellé ou le synthétiser. Les différents temps d'exposition testés avec le test sur Neuro-2a et le TILR n'ont pas montré de différences entre un ajout de l'extrait d'*H. foertherianum* ou de l'AR avant ou après la P-CTX-1B, ce qui suggère que le traitement potentiel de la ciguatéra par ces produits pourrait être à la fois préventif et curatif. Enfin, le rôle de l'AR dans l'effet protecteur de l'extrait d'*H. foertherianum* contre les CTXs a été confirmé par l'évaluation d'un extrait ne contenant naturellement pas d'AR. En effet, ce dernier, provenant d'un autre site en Polynésie française, n'a pas montré d'effet protecteur dans les deux tests sauf quand il était enrichi artificiellement en AR.

L'AR semble être la molécule la plus active de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum*, utilisé en tant que remède traditionnel pour traiter la ciguatéra. En plus de son activité protectrice contre les CTXs, confirmée dans cette étude, l'AR possède d'autres activités biologiques qui pourraient être utiles dans le traitement de la ciguatéra. Tout d'abord, ses propriétés anti-inflammatoires pourraient permettre la réduction de l'effet inflammatoire provoqué par les CTXs et récemment démontré pour les cas d'intoxications chroniques (Matsui et al., 2010). De plus, son effet antiallergique (Osakabe et al., 2004a) pourrait soulager les patients souffrant de la ciguatéra et développant des réactions indésirables suite à la consommation de produits de la mer, cacahuètes ou alcool, qui semblent être de nature allergique (Lewis, 2001). En effet, une étude génétique sur du sang de souris a révélé, qu'après une exposition à la P-CTX-1B, l'expression des gènes était principalement régulée de façon similaire à l'asthme (Ryan et al., 2007). Par ailleurs, les propriétés hypotensives de l'AR (Bult et al., 1985) pourraient aussi être bénéfiques pour les patients sévèrement intoxiqués et souffrant de symptômes cardiovasculaires.

L'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* de Tubuai contient $44,5 \pm 0,79$ mg/g d'extrait ou $4,45 \pm 0,08$ % en masse d'AR, teneur déterminée par des analyses ($n = 3$) par CLHP-DAD. L'effet protecteur de l'extrait d'*H. foertherianum* et de l'AR face à la P-CTX-1B sur les Neuro-2a était maximal à des concentrations respectives de 547 et 121 mg/ml. Par conséquent, d'après sa teneur en AR déterminée par CLHP-DAD, 547 mg/ml d'extrait d'*H. foertherianum* contiennent environ 24 mg/ml d'AR ce qui signifie que l'extrait est cinq fois plus puissant que l'AR seul. On peut donc en déduire que l'activité de l'extrait d'*H. foertherianum* est le résultat des effets de plusieurs de ses composés, qui pourraient agir en synergie avec l'AR. Ce constat, combiné au fait qu'un traitement par un remède traditionnel est plus facile à mettre en œuvre dans les îles de la Polynésie française qu'un traitement par un médicament coûteux, du à la large disponibilité d'*H. foertherianum* dans les zones de bord de mer (Lowman, 1984), soutient le fort potentiel d'*H. foertherianum* contre l'AR pour un traitement de la ciguatéra.

Néanmoins, un traitement par un composé pur tel que l'AR, dont l'innocuité est bien connue, devrait aussi être considéré. Étant donné que d'autres acides phénoliques pourraient avoir une

activité similaire, il était nécessaire de mener une étude de relation structure-activité pour déterminer les fonctions chimiques responsables de l'activité « détoxifiante » de l'AR. Les acides caféique, férulique et coumarique, le CAPE, le CADPE et la curcumine ont été testés pour analyser leur activité protectrice par le test sur Neuro-2a et par le TILR. Nos résultats ont montré que l'acide caféique était le seul des dérivés qui avait une activité positive avec le test sur Neuro-2a. Parmi tous les dérivés, l'AR avait l'activité la plus importante avec une augmentation de la viabilité cellulaire d'environ 40 %. Des résultats concordants ont été obtenus dans les deux tests, Neuro-2a et TILR, pour tous les dérivés exceptés pour le CADPE et la curcumine. En effet, le CADPE a déplacé la [³H]PbTx-3 de son site d'action et a donc montré une faible Cl₅₀ en TILR mais son effet sur les Neuro-2a était cytotoxique. Les résultats concernant le CADPE doivent être interprétés prudemment car nous avons obtenu des valeurs aberrantes par le TILR qui pourraient être expliquées par une dissolution incomplète du composé ou un phénomène de saturation lors de l'étape de filtration. Au sujet de la curcumine, sa Cl₅₀ était la plus faible de tous les produits testés par le TILR mais sa couleur orange vif pourrait créer des interférences dans la mesure de la radioactivité qui est réalisée par scintillation liquide. Sa Cl₅₀ pourrait alors refléter soit son affinité au site 5 des CSDPs, soit être un artefact de coloration provoqué par l'absorbance des photons émis. De plus, la curcumine n'inhibait pas la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B dans le test sur Neuro-2a ce qui n'en fait pas un bon candidat pour le traitement de la ciguatera. Pour finir, le CAPE avait une Cl₅₀ plus faible que l'AR mais son activité n'était pas spécifique du site 5 des CSDPs car il ne pouvait pas déplacer plus de 50 % de la [³H]PbTx-3. Une comparaison des structures et activités de l'AR, du CADPE, du CAPE et de la curcumine a indiqué que la fonction carboxyle de l'AR était un substituant important requis pour son activité biologique contre la P-CTX-1B. En effet, les dérivés qui ne possédaient pas cette fonction n'ont pas montré d'activité bénéfique. De plus, même si l'acide caféique a eu un effet positif sur les Neuro-2a, l'AR a été le composé le plus puissant, ce qui suggère que les deux groupements phénoliques étaient requis pour une activité protectrice contre la P-CTX-1B. Ensuite, la non-activité de la curcumine et de l'acide férulique a confirmé que l'activité bénéfique ne provenait pas seulement des deux groupements phénoliques mais aussi de la fonction carboxyle. Pour finir, le nombre de substitutions hydroxyles sur les groupements phénoliques était important pour obtenir un composé actif. En effet, la différence d'activité entre les acides caféique, férulique et coumarique a montré qu'il fallait au moins deux substitutions hydroxyles. En conclusion, un groupement diphénolique était requis pour provoquer une inhibition de la cytotoxicité induite par la P-CTX-1B. La comparaison de l'AR avec ces six dérivés a permis de souligner que sa structure chimique est importante pour son activité biologique. Cette spécificité d'action apporte un élément de réponse pour une meilleure compréhension de la large utilisation de l'extrait des feuilles sénescents d'*H. foertherianum*, qui contient de l'AR, dans la médecine traditionnelle.

Dans le but de proposer des solutions pour le traitement de la ciguatéra, plusieurs composés font l'objet d'études d'activité *in vitro* et *in vivo*. Le mannitol, beaucoup utilisé pour le traitement de la ciguatéra, a montré des effets bénéfiques *in vitro* mais n'a pas eu de succès *in vivo* (Schnorf et al., 2002) contrairement au remède traditionnel à base de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* qui est utilisé dans tout le Pacifique. Les inhibiteurs de maïtotoxines (Oishi et al., 2012) et les anticorps de CTXs (Inoue et al., 2009) sont quant à eux des candidats prometteurs, plutôt étudié pour leur potentiel dans la détection des toxines, mais leur coût de développement est élevé étant donné qu'ils proviennent de molécules de synthèse. Le gambiérrol et ses analogues ont une forte affinité pour les CSDPs (Inoue et al., 2003) mais sont aussi neurotoxiques chez la souris (Fuwa et al., 2004) et ont un effet cytotoxique sur les Neuro-2a après une longue période d'incubation (Cagide et al., 2011). Enfin, le brévénal a une affinité pour le site 5 des CDSPs du même ordre de grandeur que l'extrait d'*H. foertherianum* mais son accessibilité limitée peut freiner son développement en tant que médicament. L'utilisation de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* pour le traitement de la ciguatéra est donc une voie à suivre avec intérêt.

5. Conclusion

L'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* et l'AR ont une activité bénéfique similaire dans les deux tests *in vitro* mais montrent une cytotoxicité à de fortes concentrations dans le test sur les Neuro-2a. Leur activité dans le TILR suggère une action « détoxifiante » sans les effets délétères provoqués par la P-CTX-1B. L'extrait d'*H. foertherianum* est plus actif que l'AR seul ce qui confirme l'utilité du remède traditionnel à base d'*H. foertherianum* dans le traitement de la ciguatéra. Deux articles de rang A ont été publiés concernant ce chapitre ([cf. liste des publications et communications scientifiques](#)). La complexité chimique de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* est responsable de son activité biologique, d'où l'importance d'étudier sa composition chimique et de ne pas se limiter à l'AR. Cependant, une des limitations de l'utilisation de cet extrait pourrait être la variation de son contenu en AR qui peut avoir une incidence sur son effet protecteur, et qui pourrait dépendre de son lieu ou de sa période de collecte. Ces aspects vont être développés dans les chapitres suivants.

Chapitre 3

Caractérisation chimique de l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum*

1. Introduction

Contrairement à celle des fruits et des tiges (cf. chap. 1 parag. 3.5.), la composition chimique des feuilles d'*H. foertherianum* n'était pas connue. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la composition chimique du filtrat produit à partir de la décoction des feuilles sénescents d'*H. foertherianum*, afin de connaître les molécules ingérées lors de l'utilisation du remède traditionnel et ainsi d'évaluer leurs activités biologiques.

Une attention particulière a été portée à la recherche de l'acide rosmarinique (AR) et de l'acide caféique (AC), considérés comme les principes actifs majeurs de l'extrait, d'après les résultats obtenus et exposés dans le chapitre précédent. À cette fin, des méthodes d'analyse chromatographique de leurs teneurs ont été mises en place.

De plus, une étude préliminaire de la variabilité de leurs teneurs en fonction de la localisation géographique des pieds d'*H. foertherianum* a été menée sur différentes îles de Polynésie française afin de déterminer le(s) site(s) de collecte le(s) plus approprié(s). En effet, la Polynésie française est composée de 118 îles réparties sur cinq archipels : les Australes, la Société, les Tuamotu, les Gambier et les Marquises (figure 51).

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs), composés potentiellement toxiques susceptibles d'être présents dans l'extrait, ont aussi été recherchés avec attention. Enfin, la composition chimique globale de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* a été étudiée afin de détecter et d'identifier un maximum de composés.

Des méthodes complémentaires de chromatographie liquide à haute pression couplée à un détecteur à barrettes de diode (CLHP-DAD), qui permet d'obtenir le spectre d'absorption UV des composés présents, et à la spectrométrie de masse (CLHP-SM), qui permet d'obtenir des informations générales sur la masse et la structure des composés, ont été utilisées à ces fins.

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparation des extraits de plantes

Des feuilles sénescents (i.e. jaunies) d'*H. foertherianum* (figure 52) ont été collectées sur les arbres dans toute la Polynésie française de janvier 2011 à septembre 2012 (tableau 9 et figure 51). L'identification au niveau de l'espèce s'est basée à la fois sur l'observation directe des pieds d'*H. foertherianum* et sur la comparaison avec les spécimens conservés à l'Herbier de Polynésie française.



Figure 51 : Îles de Polynésie française et lieux de collecte (triangles rouges) des feuilles d'*H. foertherianum*.



Figure 52 : Feuilles sénescents d'*H. foertherianum*.

Les extraits d'*H. foertherianum* ont été préparés selon la recette du remède traditionnel, qui décrit la décoction de feuilles jaunies (Bourdy et al., 1992). Selon ce protocole, des feuilles (50 g) ont été mises à bouillir 30 min dans de l'eau distillée (1 l) puis la décoction a été filtrée. Le filtrat a été lyophilisé et l'extrait ainsi obtenu a été conservé à 4°C jusqu'à analyse (tableau 9).

Tableau 9 : Liste des échantillons de feuilles d'*H. foertherianum* collectées en Polynésie française.

Nom de l'échantillon	Collecteurs	Date de collecte	Lieu de collecte	Masse collectée (g)	Nombre de feuilles collectées	Masse lyophilisée (g)	Rendement de l'extrait brut (%)
HfT111	Laurent D.	10/01/2011	<i>Motu</i> One, Tubuai, Australes	280,31	25	10,85	3,87
HfH311	Laurent D.	09/03/2011	Pension Mauarii, Huahine, Société	60,15	28	3,22	5,35
HfR311	Laurent D.	20/03/2011	<i>Motu</i> Piscine, Raivavae, Australes	51,61	15	2,50	4,84
HfTa411a	Laurent D., Rossi F.	06/04/2011	Rivière Piritautia, Tahiti Nui, Société	23,31	16	1,27	5,45
HfTa411b	Laurent D., Rossi F.	06/04/2011	Chez Roger (PK4), Tahiti Iti, Société	27,02	2	0,94	3,48
HfTa411c	Laurent D., Rossi F.	06/04/2011	Punatea village (PK4,7), Tahiti Iti, Société	25,59	6	0,90	3,52
HfTa411d	Laurent D., Rossi F.	06/04/2011	Manava Suite Resort (PK10,8 Punaauia), Tahiti Nui, Société	74,08	9	3,33	4,50
HfM411	Laurent D.	17/04/2011	Golf de Moorea, Société	65,16	7	2,90	4,45
HfRu411	Rossi F.	24/04/2011	Naairoa, Rurutu, Australes	86,78	13	3,71	4,28
HfM611	Rossi F.	05/06/2011	Village Faimano, Moorea, Société	32,61	12	2,14	6,56
HfR611	Laurent D.	05/06/2011	<i>Motu</i> Piscine, Raivavae, Australes	104,34	16	3,15	3,02
HfH911	Rossi F.	03/10/2011	En face du <i>marae</i> Anini, Huahine, Société	119,87	15	5,31	4,43
HfTh1011	Gaertner-Mazouni N.	23/10/2011	<i>Motu</i> à Tahaa, Société	128,79	24	3,38	2,62
HfMa1111	Gaertner-Mazouni N.	09/11/2011	Totegegie aéroport, Mangareva, Gambier	65,44	10	3,98	6,08
HfMau1111	Rossi F.	20/11/2011	<i>Motu</i> Pitiahe, Maupiti, Société	80,63	12	4,47	5,54
HfTi1111a	Laurent D.	23/11/2011	Île aux oiseaux, Tikehau, Tuamotu	56,72	9	2,64	4,65
HfTi1111b	Laurent D.	23/11/2011	<i>Motu</i> est, Tikehau, Tuamotu	42,38	5	1,84	4,34
HfTi1111c	Laurent D.	23/11/2011	Est de Tuherahera, Pension Hotu, Tikehau, Tuamotu	71,67	10	2,43	3,39
HfTi1111d	Laurent D.	23/11/2011	Sud de Tuherahera, Tikehau, Tuamotu	60,68	9	1,96	3,23
HfTi1111e	Laurent D.	23/11/2011	Ouest de Tuherahera, Tikehau, Tuamotu	67,00	6	2,33	3,48
HfMat1111b	Gaertner-Mazouni N.	13/11/2011	Côté océan Rocher emblématique Mataiva, Tuamotu	58,03	13	1,31	2,26
HfMat1111a	Gaertner-Mazouni N.	13/11/2011	Aéroport Mataiva, Tuamotu	82,00	5	1,56	1,90
HfK1111	Entomologiste ILM	18/11/2011	Kaukura, Tuamotu	70,85	7	2,15	3,03
HfA312	Gaertner-Mazouni N.	07/03/2012	Aratika, Tuamotu	61,85	6	2,59	4,19
HfMa512	Laurent D.	08/05/2012	Totegegie aéroport, Mangareva, Gambier	55,28	9	2,18	3,94
HfMak1012	Gaertner-Mazouni N.	30/09/2012	Proche aéroport, Makemo, Tuamotu	49,8	7	3,25	6,53
HfK1112-e	Laurent D.	09/11/2012	Proche aéroport, Kaukura, Tuamotu	34,49	5	1,64	4,76
HfK1112-f	Laurent D.	09/11/2012	Proche aéroport, Kaukura, Tuamotu	30,17	4	1,67	5,54
HfK1112-a	Laurent D.	09/11/2012	<i>Motu</i> Puhī Poto, Kaukura, Tuamotu	26,42	5	1,20	4,54
HfK1112-b	Laurent D.	09/11/2012	<i>Motu</i> Puhī Poto, Kaukura, Tuamotu	30,03	5	1,27	4,23
HfK1112-c	Laurent D.	09/11/2012	<i>Motu</i> Puhī Poto, Kaukura, Tuamotu	39,35	2	1,59	4,04
HfK1112-d	Laurent D.	09/11/2012	<i>Motu</i> Puhī Poto, Kaukura, Tuamotu	32,92	2	1,51	4,59

2.2. Criblage rapide de la présence d'AR et d'AC dans les extraits

En vue d'un criblage rapide des extraits pour la présence d'AR et d'AC, une méthode par chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée. Cette méthode a pour avantage de fournir des résultats en un minimum de temps mais est cependant moins sensible qu'une méthode d'analyse par CLHP-DAD. Les extraits d'*H. foertherianum* dissous dans un mélange méthanol/eau 80 : 20 à 10 mg/ml et les standards d'AR et d'AC (de 0,063 à 2 mg/ml) ont été déposés sur les plaques de silice 60 Å avec indicateur fluorescent. Ces dernières ont été éluées dans un mélange de 74 % de dichlorométhane, 20 % de méthanol, 2 % d'eau et 4 % d'acide formique. Les plaques ont été révélées sous UV à 254, à 365 nm et à l'aide de vanilline sulfurique après chauffage.

2.3. Méthode d'analyse des extraits par CLHP-DAD

Pour l'analyse quantitative de l'AR et de l'AC dans les extraits, l'appareillage qui a été utilisé est une chaîne CLHP-DAD 1260 Agilent (Massy, France). La colonne choisie était de type Luna (Phenomenex, Le Pecq, France), de phase C18(2), de dimension 150 x 4,6 mm, de taille de particules 3 µm et de taille de pores de 100 Å.

En se basant sur la littérature (cf. chap. 1 parag. 4.4.) et après optimisation des conditions, celles retenues pour l'obtention du meilleur profil des extraits, qui *a priori* ont permis d'observer le plus de composés, sont décrites ci-après. Les éluants qui ont été utilisés sont l'eau milliQ acidifiée avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 % et l'acétonitrile. Le débit a été réglé à 0,7 ml/min. Le gradient qui a été utilisé pour les analyses est présenté dans le [tableau 10](#). La détection a été suivie à 210, 254, 280 et 320 nm et enregistrée de 200 à 400 nm. Les standards d'AR et d'AC ont été analysés à 320 nm, respectivement de 5 à 100 µg/ml et de 0,24 à 50 µg/ml, afin d'établir leurs courbes de calibration externe.

[Tableau 10](#) : Gradient de solvants pour les analyses par CLHP-DAD.

Temps (min)	TFA 0,1 % (%)	Acétonitrile (%)
0	95	5
5	76	24
20	76	24
27	100	0
30	100	0
35	95	5
37	95	5

Les extraits ont été dissous à 1 mg/ml dans de l'eau milliQ acidifiée avec du TFA à 0,1 % puis filtrés à 0,45 µm avant injection de 10 µl. Leurs teneurs en AR et en AC des extraits collectés dans toute la Polynésie française ont été calculées d'après leurs courbes de calibration puis les moyennes des teneurs des extraits par archipel de collecte ont été comparées.

Afin de déterminer si les résultats étaient statistiquement différents, un test de normalité a été appliqué selon Shapiro-Wilk, d'Agostino et Pearson et Kolmogorov-Smirnov. Puis, si la distribution était normale, une ANOVA à un facteur a été réalisée avec le post-test Dunnett, sinon le test de Kruskal-Wallis (post-test Dunn) (Motulsky, 2010) a été réalisé pour comparer les teneurs en principes actifs des différents extraits analysés avec un seuil de significativité à $p < 0,05$.

2.4. Validation de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'AR et de l'AC dans les extraits

Pour qu'une méthode d'analyse quantitative soit utilisable, il faut que certains paramètres soient établis et validés, notamment la précision de la méthode (e.g. variabilité entre les injections), les limites de détection et de quantification des analytes dosés, l'exactitude et la spécificité ou la sélectivité de la méthode (FDA, 2000 ; ICH, 2005 ; Rambla-Alegre et al., 2012). Ces paramètres sont analysés d'après les variations des temps de rétention et des aires de pics des produits à doser (Muñoz-Muñoz et al., 2008). La méthode évaluée est celle décrite précédemment dans le [paragraphe 2.3](#).

La méthode de dosage de l'AR et de l'AC par CLHP-DAD a été évaluée avec un extrait d'*H. foertherianum* de Tubuai (HfT111, cf. [tableau 9](#)) et les variations des temps de rétention et des aires de l'AR et de l'AC ont été suivies à 320 nm.

2.4.1. Précision de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'AR et de l'AC dans les extraits

La précision de la méthode est généralement évaluée par trois paramètres : la répétabilité, la variation intra-jour et inter-jour et la reproductibilité. La répétabilité consiste en l'injection successive d'au minimum 5 fois la même préparation du même extrait. La variation intra-jour se mesure en injectant au cours du même jour 5 préparations du même extrait et la variation inter-jour se mesure en injectant, sur 3 jours différents, 5 préparations du même extrait. La reproductibilité exprime la précision entre laboratoires (Rambla-Alegre et al., 2012). Ces paramètres, sauf la reproductibilité, ont été mesurés pour évaluer la précision de la méthode de dosage de l'AR et de l'AC.

2.4.2. Limites de détection et de quantification de l'AR et de l'AC

La limite de détection d'une méthode analytique correspond à la plus faible quantité d'un analyte d'un échantillon qui peut être détectée mais pas forcément quantifiée alors que la limite de quantification concerne la plus petite quantité d'un analyte dans un échantillon qui peut être déterminée avec précision et exactitude (Rambla-Alegre et al., 2012).

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de l'AR et de l'AC ont été calculées d'après les recommandations de l'ICH (*International Conference on Harmonization*) c'est à dire avec les équations suivantes :

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{a} \quad \text{et} \quad LQ = \frac{10 \sigma}{a}$$

où « σ » est l'écart-type de l'ordonnée à l'origine et « a » est la pente de la courbe de calibration de l'acide rosmarinique ou de l'acide caféique.

2.4.3. Exactitude de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'AR et de l'AC dans les extraits

L'exactitude d'une méthode analytique est la correspondance entre une valeur conventionnelle vraie ou une valeur de référence et la valeur trouvée pour un analyte (Rambla-Alegre et al., 2012).

Les standards d'AR et d'AC ont été ajoutés à l'extrait à trois concentrations différentes (50, 100 et 150 % de la teneur déjà présente dans l'extrait). Trois triplicats de chaque concentration ont été analysés par CLHP-DAD. Les pourcentages des teneurs en AR et en AC dosées par rapport aux valeurs connues et les coefficients de variation (CV) des temps de rétention et de l'aire des pics ont été calculés respectivement d'après les équations suivantes :

$$\% \text{ récupération} = \frac{\text{quantité dosée} - \text{quantité de départ}}{\text{quantité ajoutée}} \times 100 \quad \text{et} \quad CV = \frac{\text{Écart-type des valeurs}}{\text{Moyenne des valeurs}} \times 100$$

2.5. Recherche des alcaloïdes pyrrolizidiniques

Les APs ont d'abord été recherchés dans les extraits par une méthode rapide colorimétrique et par CCM puis, à titre de confirmation, par une méthode plus sensible de chromatographie liquide à haute pression couplée à un spectromètre de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM). Un standard d'indicine, APs de type rétronécine, a été commandé chez InterBioScreen (Moscou, Russie) puisqu'à ce jour, c'est le seul type d'APs qui ait été retrouvé chez *H. foertherianum*.

2.5.1. Détection aux réactifs d'Ehrlich et de Dragendorff

Le révélateur classiquement utilisé pour les amines et les composés de la famille des alcaloïdes est le réactif de Dragendorff, solution de bismuth et d'iodure de potassium dans de l'acide acétique. Toutefois, le réactif d'Ehrlich, solution de 4-(diméthylamino)-benzaldéhyde dans de l'acide acétique et de l'acide perchlorique, est un révélateur employé plus spécifiquement pour la détection des APs insaturés (OMS, 1988).

Les plaques CCM, préparées dans les conditions décrites au [paragraphe 2.2.](#), ont été révélées au réactif de Dragendorff. Le standard d'indicine a aussi été déposé à une concentration de 100 µg/ml pour déterminer son seuil de détection par ce réactif. Pour détecter les APs N-oxydes avec le réactif d'Ehrlich, les extraits ont été testés suivant le protocole de l'OMS de 1988.

2.5.2. Préparation des extraits

Avant d'être analysés par CLHP-SM/SM, six extraits, choisis pour leur teneur élevée en AR et en AC (HfMat1111a, HfMat1111b, HfA312, HfK1111, HfTi1111c et HfT111 – [cf. tableau 9](#)) ont été fractionnés par extraction sur phase solide (SPE) de type échangeuse de cations forts (SCX). Cette étape permet de concentrer les APs qui peuvent se trouver à l'état de traces. Le protocole de préparation des extraits a été adapté de Mroczek et al. (2002) ([figure 53](#)).

La cartouche de SCX (40-63 µm) de 500 mg a été conditionnée avec du méthanol de grade CLHP-MS puis de l'acide chlorhydrique (HCl) à 0,05 M. 50 mg d'extrait dissous dans 8 ml d'HCl 0,05 M ont été déposés puis élués pour donner la fraction 1. La fraction 2 a été le résultat du rinçage de la cartouche avec 10 ml de méthanol. La fraction 3, concentrée en APs, a été élue avec 15 ml de mélange méthanol et ammoniacal à 10 % en proportion 75 : 25.

Les fractions obtenues ([tableau 11](#)) ont été analysées par CLHP-DAD ([cf. parag. 2.4.](#)) afin d'optimiser les volumes d'élution et de vérifier l'efficacité de l'étape de rinçage. Elles ont aussi été testées pour la présence d'APs grâce au réactif d'Ehrlich. Enfin, les fractions ont été séchées à l'évaporateur centrifuge et conservées à 4°C avant analyse par CHLP-SM/SM.

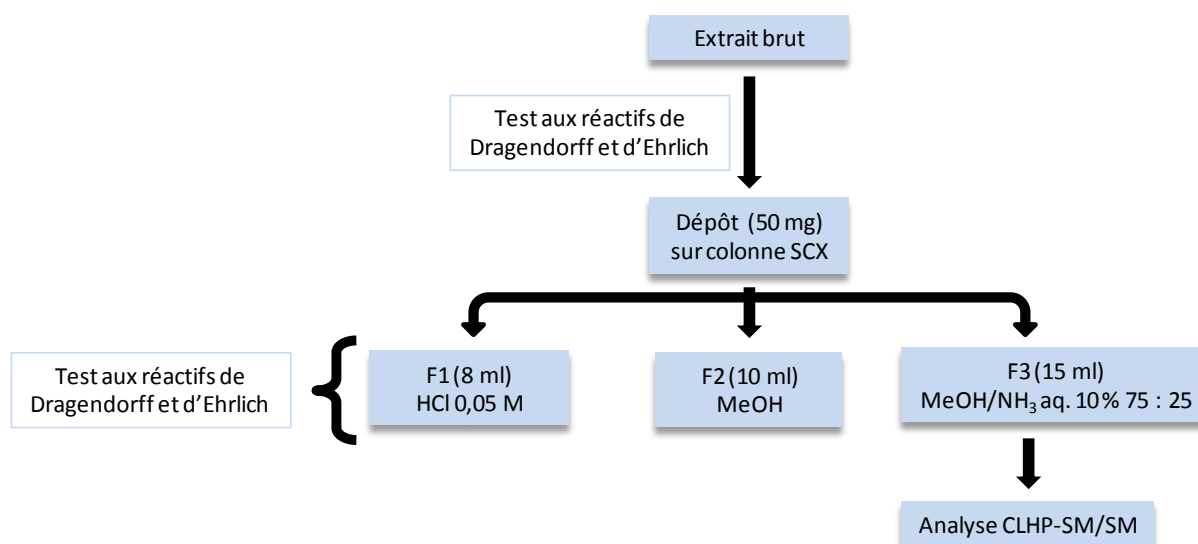


Figure 53 : Protocole de préparation des extraits d'*H. foertherianum* pour l'analyse des alcaloïdes pyrrolizidiniques.

Tableau 11 : Masses obtenues pour les fractions des extraits déposés sur cartouche SCX.

Extrait	Masse (mg)		
	F1	F2	F3
HfMat1111a	42,1	6,9	1,2
HfMat1111b	47,1	1,8	1,3
HfA312	39,3	2,2	0,3
HfK1111	36,2	3,4	0,2
HfTi1111c	45,4	2,8	0,9
HfT111	39,5	2,4	0,6

2.5.3. Analyse par CLHP-SM/SM

Les analyses par CLHP-SM/SM des APs ont été réalisées à l'UMR 152 de l'Université Paul Sabatier de Toulouse par le Pr. N. Fabre.

Une colonne de type C18 ODS (Interchim, Montluçon, France) de dimension 250 x 4,6 mm et de taille de particules 5 µm a été utilisée pour l'analyse des APs. Elle a été thermostatée à 30°C pour les analyses. Les éluants qui ont été utilisés sont l'ammoniaque concentrée R1 à 0,1 % et le méthanol R. Le débit a été réglé à 0,6 ml/min. Un aliquot de 20 µl de chaque extrait a été injecté. Le gradient qui a été utilisé pour les analyses est celui présenté dans le [tableau 12](#).

Tableau 12 : Gradient de solvants pour les analyses par CLHP-SM/SM.

Temps (min)	Ammoniaque concentrée 0,1 % (%)	Méthanol (%)
0	90	10
2	90	10
62	30	70
64	0	100
67	0	100
69	90	10
75	90	10

La détection a été suivie et enregistrée de 200 à 400 nm. Les données de spectrométrie de masse ont été collectées avec un appareil Thermo Finnigan LCQ DECA XP Max équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation (ESI) en mode positif. L'acquisition des données a été réalisée en mode dépendant des données (un scan SM suivi d'un scan SM/SM de l'ion majoritaire).

2.6. Composition chimique globale

2.6.1. Préparation de l'extrait

L'extrait a été fractionné sur phase solide de type C18. La cartouche de 360 mg a d'abord été conditionnée avec 3 ml d'acétonitrile (ACN) puis 3 ml d'acide formique (HCOOH) à 0,1 %. 10 mg d'extrait ont été dissous dans 1 ml d'HCOOH à 0,1 % et déposés sur la cartouche. Les fractions 1, 2 et 3 correspondaient respectivement à l'élution des 9 ml d'un mélange d'ACN et d'HCOOH à 0,1 % en proportion 10 : 90, 22 : 88 et 40 : 60 (figure 54).

Les fractions obtenues ont été analysées par CLHP-DAD selon le protocole du [paragraphe 2.4.](#) afin d'optimiser les volumes d'élution. Enfin, les fractions ont été séchées à l'évaporateur centrifuge et conservées à 4°C avant analyse par CLHP-SM/SM.

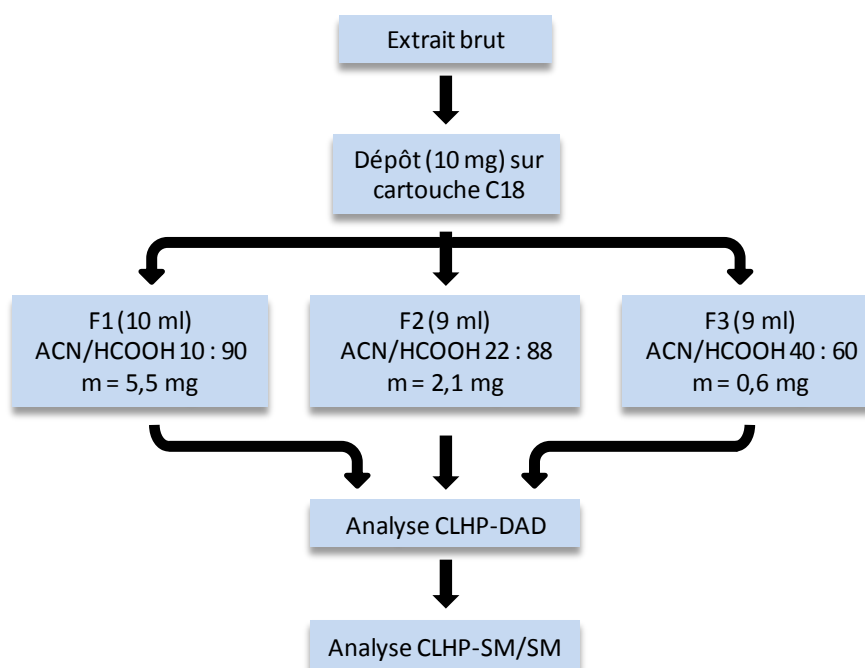


Figure 54 : Protocole de préparation d'un extrait d'*H. foertherianum* pour l'étude de sa composition chimique globale.

2.6.2. Analyse par CLHP-SM/SM

Avant l'analyse par CLHP-SM/SM, les profils chromatographiques ont été optimisés par CLHP-DAD pour chaque fraction afin de permettre l'identification d'un maximum de composés. Les conditions d'analyse étaient identiques à celles décrites au [paragraphe 2.4.](#) sauf pour le gradient de solvants spécifique à chaque fraction.

Les analyses par CLHP-SM/SM des composés d'un extrait ont été réalisées à l'Université de la Nouvelle-Calédonie par S. Mengant. L'appareil CLHP, une Waters 2695, était couplée avec un DAD 2996 et un spectromètre de masse HCT Plus Bruker. La source d'ionisation était par ESI en mode négatif (20 psi au nébuliseur, 6 l/min au séchage et 250°C).

Une colonne de type Nucleodur® 100-5 C18 ec (Macherey-Nagel, Hoerd, France) de dimension 250 x 4,6 mm et de taille de particules 5 µm a été utilisée car elle permettait d'obtenir le profil le plus proche de celui obtenu avec la colonne Luna C18-2 (Phenomenex, Le Pecq, France) utilisée en CLHP-DAD.

Les éluants qui ont été utilisés sont l'acide formique à 0,1 % et l'acétonitrile. Le débit a été réglé à 0,7 ml/min. Les extraits ont été dissous dans 1 ml d'acide formique à 0,1 % puis filtrés à 0,45 µm avant injection de 10 µl. Les gradients qui ont été utilisés pour l'analyse des fractions sont présentés dans le [tableau 13.](#)

Tableau 13 : Gradient de solvants par fraction pour les analyses par CLHP-SM/SM.

Fraction 1 10 % ACN		Fraction 2 22 % ACN		Fraction 3 40 % ACN	
Temps (min)	Gradient (% d'ACN)	Temps (min)	Gradient (% d'ACN)	Temps (min)	Gradient (% d'ACN)
0	5	0	5	0	5
4	5	5	16	5	20
9	11	30	16	50	55
24	11	45	30	53	100
39	45	50	30	57	100
42	100	53	100	60	5
47	100	57	100	65	5
50	5	60	5		
55	5	65	5		

Les fractions ont tout d'abord été analysées en CLHP-SM. Puis les résultats ont été interprétés et les pics d'intérêt sélectionnés d'après la bibliographie. Enfin, une analyse par CLHP-SM/SM sur le même appareillage a été conduite avec les masses sélectionnées pour tenter de confirmer l'identification des produits.

3. Résultats

3.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction obtenu par décoction à partir du matériel végétal frais a été en moyenne de $4,27 \% \pm 1,13 \%$, c'est-à-dire que 100 g de feuilles sénescents fraîches ont donné $4,27 \text{ g} \pm 1,13 \text{ g}$ d'extrait lyophilisé (cf. tableau 9). Le pourcentage en eau retrouvé dans les feuilles fraîches ($n = 6$), après séchage à l'étuve, a été de $88,43 \% \pm 0,77 \%$.

3.2. Validation de la méthode de dosage de l'AR et de l'AC par CLHP-DAD

Les courbes de calibration de l'AR et de l'AC à 320 nm étaient linéaires (R^2 supérieur à 0,99) entre les concentrations de respectivement 5 à 100 $\mu\text{g/ml}$ et 0,2 à 15 $\mu\text{g/ml}$. Leurs limites de détection et de quantification étaient respectivement 1,28 et 4,27 $\mu\text{g/ml}$ et 0,4 et 1,22 $\mu\text{g/ml}$ (tableau 14 et figure 55).

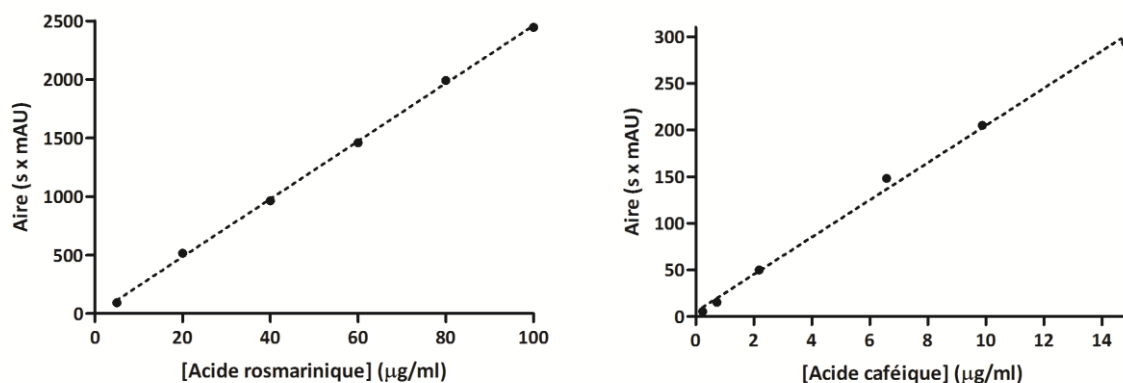


Figure 55 : Courbes de calibration de standards d'acide rosmarinique et d'acide caféique (moyenne et écart-type de $n = 3$ pour chaque concentration), construites avec les aires des pics obtenues par CLHP-DAD en fonction de la concentration des standards.

Tableau 14 : Paramètres de la courbe de calibration de l'acide rosmarinique (AR) et de l'acide caféique (AC).

	Équation de régression linéaire	R^2 ^a	Gamme de calibration (µg/ml)	LD (µg/ml) ^b	LQ (µg/ml) ^c
AC	$y = 19,96x + 5,13$	0,9961	0,2 – 15	0,40	1,22
AR	$y = 24,69x - 10,72$	0,9992	5 – 100	1,28	4,27

^a R^2 est le coefficient de détermination.

^b LD est la limite de détection.

^c LQ est la limite de quantification.

Dans l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum*, l'AR et l'AC ont été identifiés par leur temps de rétention et leur spectre UV, comparés à ceux des standards (figure 56 et figure 57). La pureté des pics a été évaluée grâce au logiciel ChemStation de la CLHP-DAD. Avec la méthode de dosage développée dans cette étude, l'AR et l'AC ont eu un temps de rétention de respectivement 16,8 min et 9,6 min et une absorbance maximale de respectivement 330 nm et 324 nm.

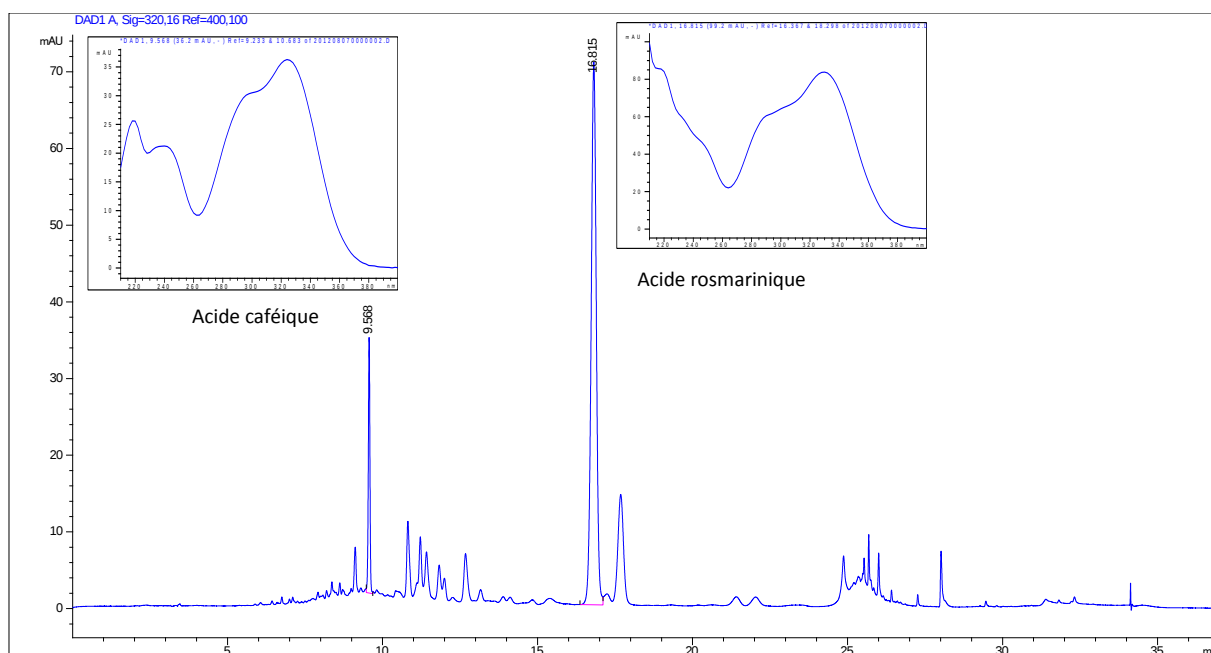


Figure 56 : Chromatogramme d'un extrait d'*H. foertherianum* (HfT111) à 320 nm, temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics. Les spectres UV obtenus pour l'acide rosmarinique (tr 16,8 min) et pour l'acide caféique (tr 9,6 min) sont représentés.

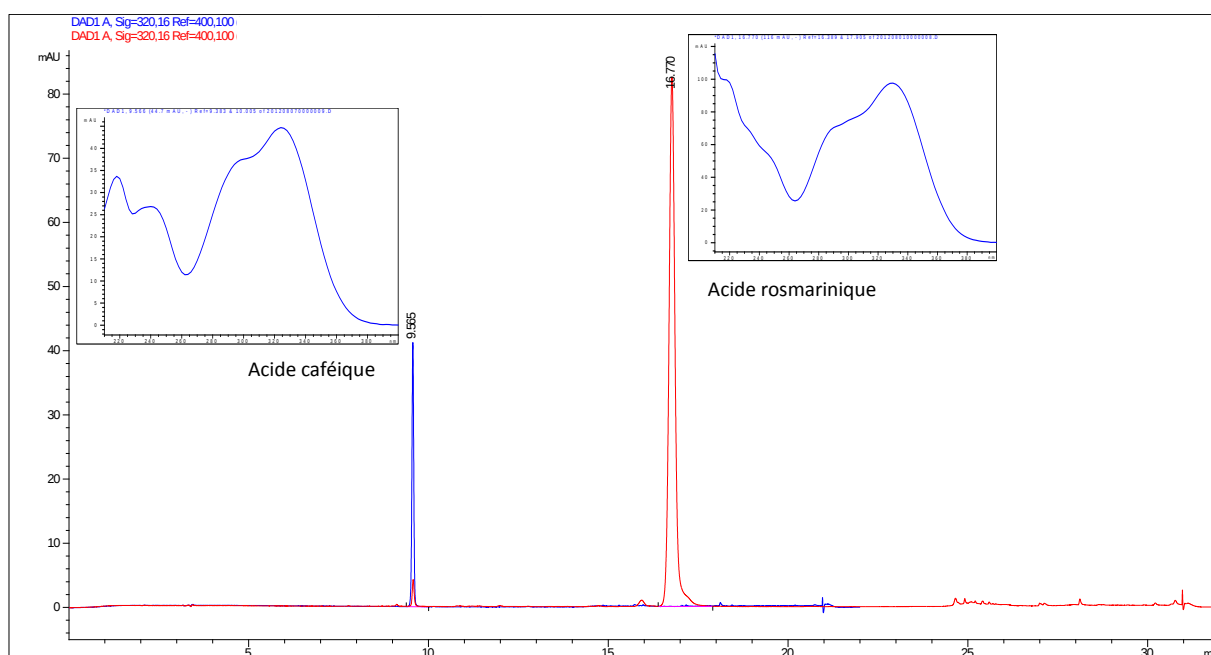


Figure 57 : Chromatogramme de standards d'acide rosmarinique (rouge) et d'acide caféique (bleu) à 320 nm, temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics. Les spectres UV obtenus pour l'acide rosmarinique (tr 16,8 min) et pour l'acide caféique (tr 9,6 min) sont représentés.

La répétabilité, la variation intra-jour et la variation inter-jour des temps de rétention et des aires, obtenues à partir des chromatogrammes de l'extrait d'*H. foertherianum*, ont été évaluées par les coefficients de variation. Ceux des temps de rétention étaient inférieurs à 1 % et ceux des aires étaient inférieurs à 3 % (tableau 15).

Tableau 15 : Précision de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'acide rosmarinique et de l'acide caféique pour un extrait d'*H. foertherianum*.

	Extrait d' <i>H. foertherianum</i>	Temps de rétention ± EC (min)	CV (%) ^a	Aire ± EC ^b	CV (%) ^a
Répétabilité (n=5)	AR	16,66 ± 0,08	0,5	759 ± 13	1,7
	AC	9,56 ± 0,01	0,1	128 ± 1	0,7
Précision intra-jour (n=5)	AR	16,72 ± 0,05	0,3	791 ± 21	2,6
	AC	9,57 ± 0,01	0,1	117 ± 2	1,6
Précision inter-jour (n=15)	AR	16,78 ± 0,11	0,7	793 ± 24	3,0
	AC	9,56 ± 0,04	0,4	118 ± 2	1,8

^a CV pour coefficient de variation.

^b EC pour écart-type.

L'exactitude de la méthode d'analyse d'AR et d'AC a été évaluée par l'ajout de trois quantités connues d'analytes dans l'extrait d'*H. foertherianum*. Le pourcentage de la quantité dosée de l'AR et de l'AC par rapport à la valeur connue était respectivement entre 78 et 88 % et entre 99 et 109 % (tableau 16).

Tableau 16 : Exactitude de la méthode de dosage par CLHP-DAD de l'acide rosmarinique (AR) et de l'acide caféique (AC), évaluée par l'injection de trois répliquats de l'extrait d'*H. foertherianum* auxquels trois quantités différentes d'AR et d'AC (100, 150 et 200 % par rapport à la valeur initiale) ont été rajoutées.

Extrait d' <i>H. foertherianum</i>	100 %		150 %		200 %	
	AR	AC	AR	AC	AR	AC
réplicat 1	88,1	108,8	85,1	108,8	78,5	99,1
réplicat 2	83,5	100,3	83,0	111,0	81,4	100,5
réplicat 3	80,0	104,7	76,8	106,9	77,5	104,0
moyenne (%)	83,9	104,6	81,6	108,9	79,1	101,2
EC (%) ^a	4,1	4,2	4,3	2,0	2,0	2,5
CV (%) ^b	4,9	4,0	5,3	1,9	2,6	2,5

^a EC est l'écart-type.

^b CV est le coefficient de variation.

3.3. Comparaison géographique préliminaire des extraits collectés en Polynésie française

Une première étude de variabilité inter-individus a été menée sur l'ensemble des îles de la Polynésie française où l'on pouvait trouver des pieds d'*H. foertherianum* afin de déterminer les sites de collecte les plus appropriés. Cette espèce est présente en Polynésie française dans la majorité des îles des archipels de la Société, des Tuamotu, des Australes et des Gambier (Butaud, 2008).

De manière générale, malgré que les différences ne soient pas significatives, des teneurs en AR plus importantes ont été quantifiées dans les extraits collectés dans les îles de la Société et des Tuamotu que dans ceux collectés dans les îles des Australes et des Gambier (figure 58 D). La tendance inverse a été observée pour l'AC (figure 59 D). Toutefois, il est à noter que de fortes disparités apparaissent parfois pour les teneurs en AR et en AC d'extraits de différentes îles d'un même archipel (figure 58 et figure 59). Par exemple, les échantillons collectés dans l'archipel des Australes ont montré des teneurs différentes selon leur provenance. En effet, l'île de Tubuai (HfT111) a permis de collecter des feuilles aux teneurs en AR et en AC plus élevées que pour celle de Raivavae (HfR311 et HfR611) (figure 58 B et figure 59 B).

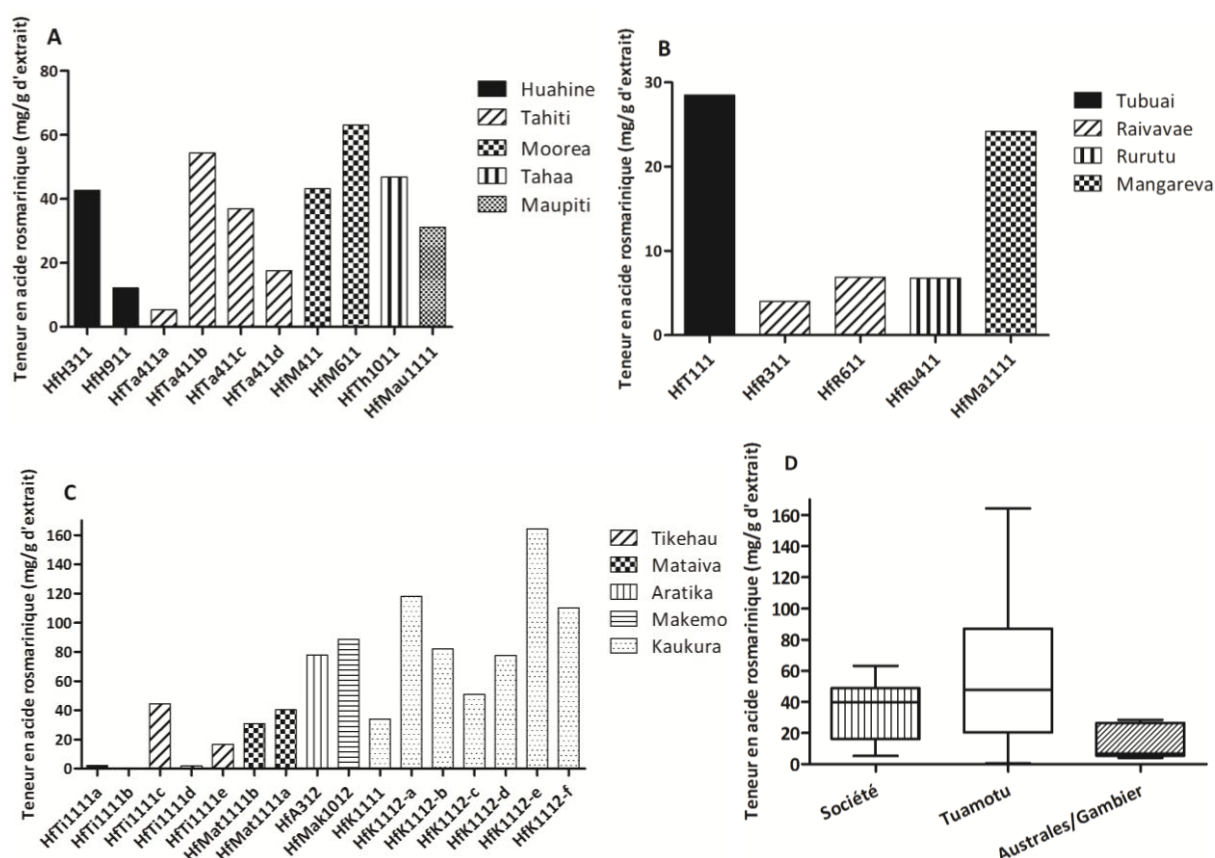


Figure 58 : Différence de teneurs en acide rosmarinique, déterminées par CLHP-DAD, suivant les îles de collecte des archipels de la Société (A), des Australes et Gambier (B) et des Tuamotu (C) et suivant les quatre archipels de collecte (D), la Société (n = 10), les Tuamotu (n = 16) et les Australes et Gambier (n = 5). (D) Médiane encadrée du 1^{er} et 3^{ème} quartile avec les valeurs minimum et maximum.

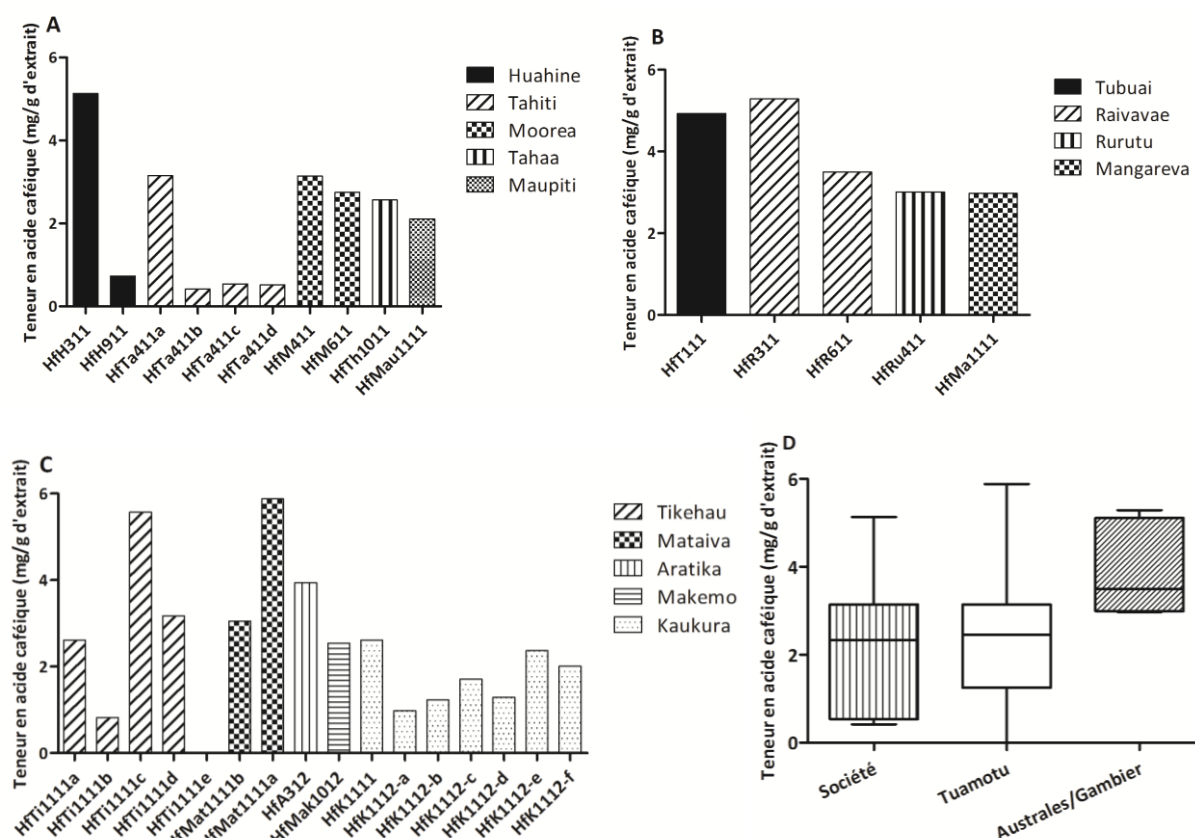


Figure 59 : Différence de teneurs en acide caféique, déterminées par CLHP-DAD, suivant les îles de collecte des archipels de la Société (A), des Australes et Gambier (B) et des Tuamotu (C) et suivant les quatre archipels de collecte (D), la Société (n = 10), les Tuamotu (n = 16) et les Australes et Gambier (n = 5). (D) Médiane encadrée du 1^{er} et 3^{ème} quartile avec les valeurs minimum et maximum.

3.4. Recherche des alcaloïdes pyrrolizidiniques

Ni le réactif de Dragendorff ni celui d'Ehrlich n'ont permis de détecter des APs dans les extraits de feuilles sénescents d'*H. foertherianum*. Afin de confirmer leurs absences, les fractions de six échantillons, obtenues sur phase solide, ont été analysées en CLHP-SM/SM. La fragmentation des APs insaturés de type nécine donne généralement en mode positif un fragment majoritaire à m/z 138 typique de cette base (figure 60). Ce type de fragment a été recherché en priorité puisque l'indicine et son N-oxyde, alcaloïdes pyrrolizidiniques de type nécine, ont déjà été isolés des tiges d'*H. foertherianum* (Ogihara et al., 1997b). Or ces analyses n'ont révélé aucun ion moléculaire ou fragment de masse caractéristique des APs.

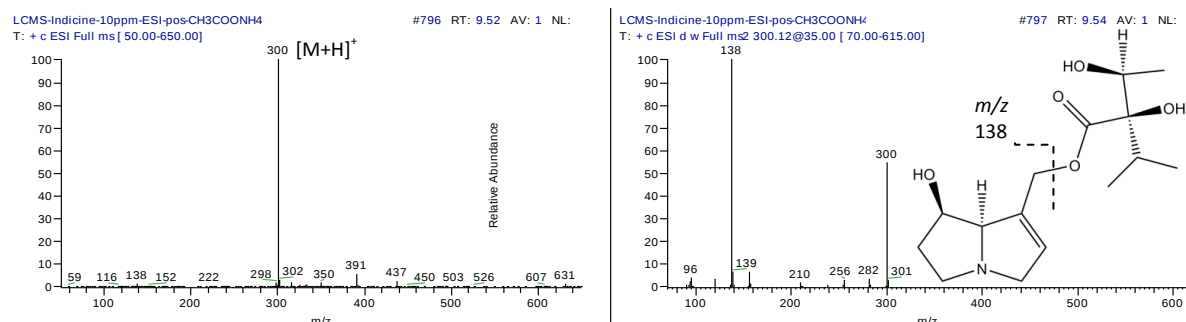


Figure 60 : Spectres de masse SM et SM² du standard de l'indicine, obtenu en ESI et mode positif. La masse de l'indicine correspond au m/z 300 et son fragment majoritaire au m/z 138.

3.5. Composition chimique globale

Les fractions 1, 2 et 3 de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* ont d'abord été analysées par CLHP-DAD afin de caractériser les conditions d'analyse permettant d'obtenir les profils qui mèneraient à l'identification d'un maximum de composés en CLHP-SM (figure 61, figure 62 et figure 63). L'AC était principalement présent dans la fraction 1 alors que l'AR était majoritairement présent dans la fraction 2 (figure 61 et figure 62).

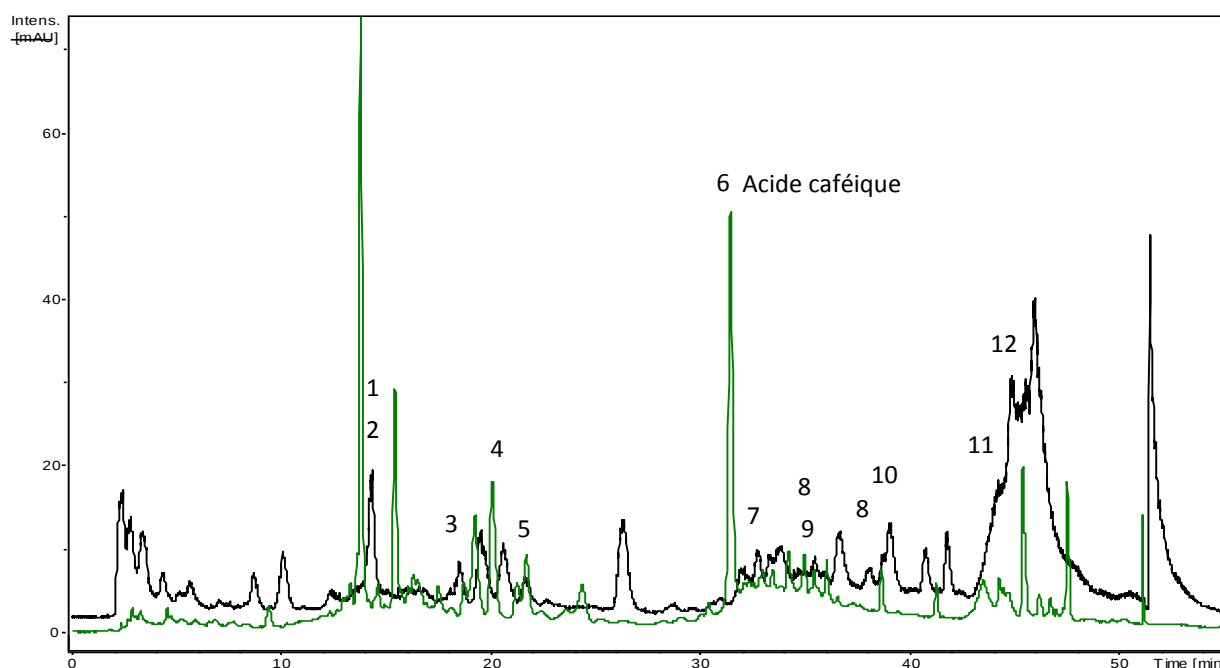


Figure 61 : Profil chromatographique de la fraction 1 de l'extrait d'*H. foertherianum* obtenu par CLHP-DAD à 280 nm (vert), temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics, superposé au courant total ionique obtenu par spectrométrie de masse (noir). Les numéros correspondent aux temps de rétention du courant total ionique pour lesquels un composé a été potentiellement identifié.

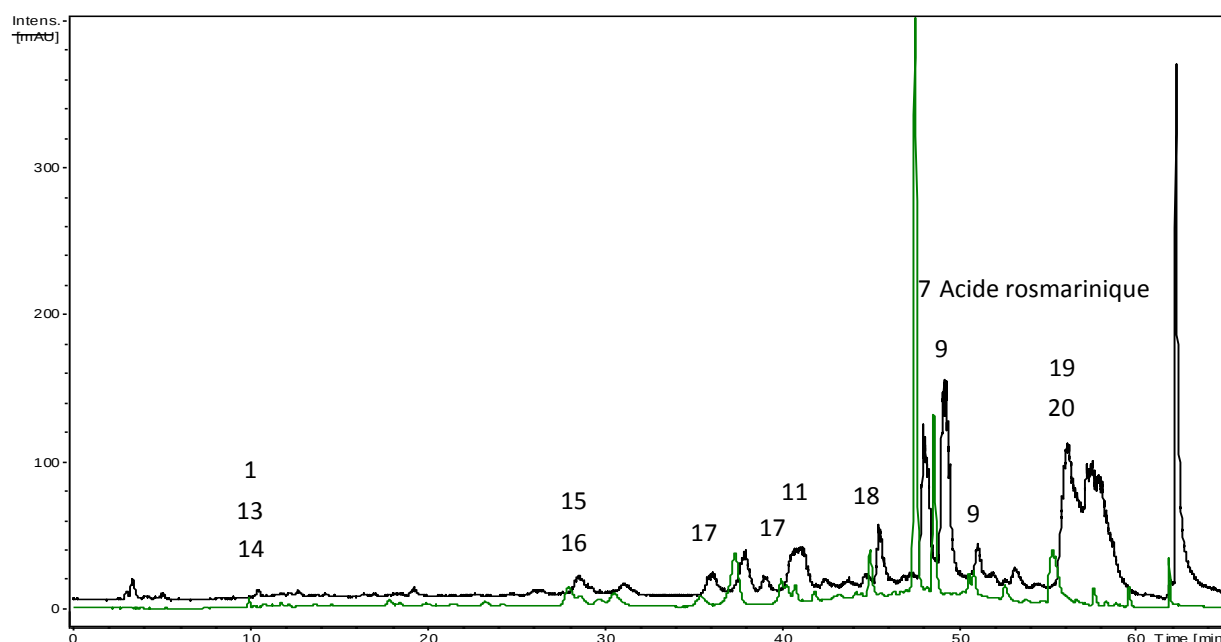


Figure 62 : Profil chromatographique de la fraction 2 de l'extrait d'*H. foertherianum* obtenu par CLHP-DAD à 280 nm (vert), temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics, superposé au courant total ionique obtenu par spectrométrie de masse (noir). Les numéros correspondent aux temps de rétention du courant total ionique pour lesquels un composé a été potentiellement identifié.

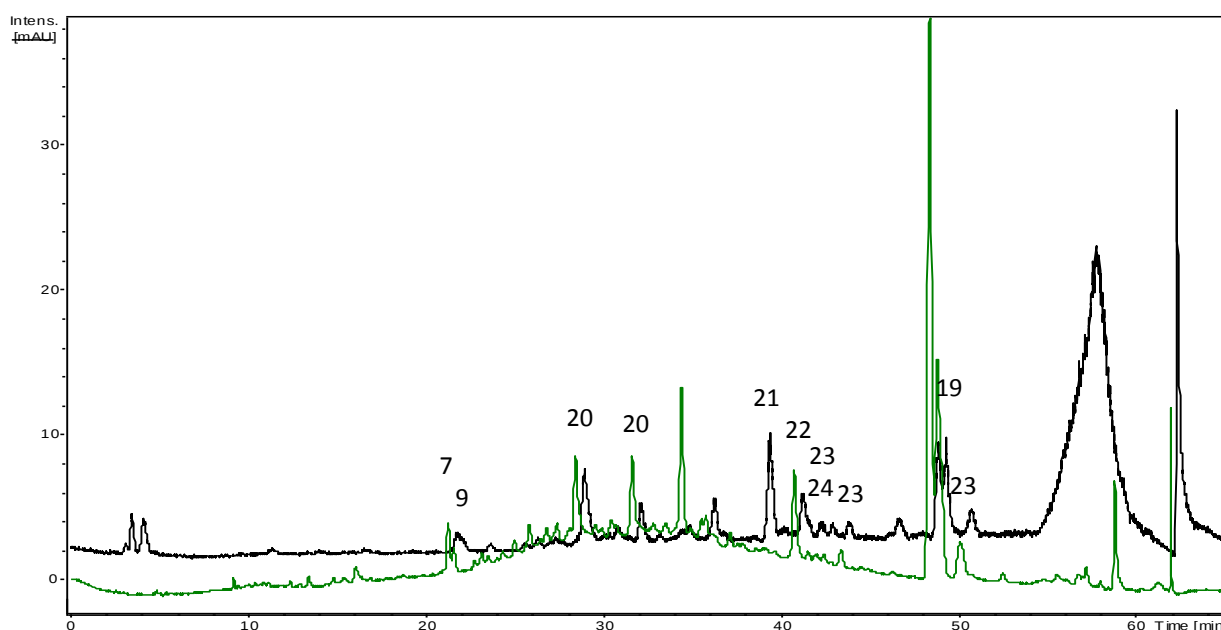


Figure 63 : Profil chromatographique de la fraction 3 de l'extrait d'*H. foertherianum* obtenu par CLHP-DAD à 280 nm (vert), temps (min) en fonction de l'intensité (mAU) des pics, superposé au courant total ionique obtenu par spectrométrie de masse (noir). Les numéros correspondent aux temps de rétention du courant total ionique pour lesquels un composé a été potentiellement identifié.

D'après la bibliographie disponible, une bibliothèque, recensant 164 molécules isolées ou identifiées chez le genre *Heliotropium*, a été construite le plus exhaustivement possible afin de

répertorier la formule chimique et la masse moléculaire de chacune des molécules susceptibles d'être retrouvées chez *H. foertherianum* (annexe I).

Les spectres de masse de 20 pics pour la fraction 1, 15 pour la fraction 2 et 14 pour la fraction 3 ont été extraits du chromatogramme en courant ionique total (TIC) (annexe II). Grâce à notre bibliothèque de molécules du genre *Heliotropium*, les masses des ions correspondant à ces temps de rétention ont pu être comparées et les molécules associées potentiellement identifiées. Au total, 24 molécules, appartenant aux familles des acides phénoliques, flavonoïdes, terpènes ou stérols, ont été potentiellement identifiées par leur masse (tableau 17, tableau 18, tableau 19 et figure 64).

Tout d'abord, grâce à l'analyse en CLHP-SM, les spectres de masse des composés détectables ont été obtenus. Par exemple, l'AR, qui est présent dans les trois fractions à des temps de rétention différents, a été identifié grâce à l'ion pseudo-moléculaire m/z 359 $[M-H]^-$ suggérant une masse de 360 uma. On a aussi pu observer un ion fragment de l'AR à m/z 161 dans la fraction 1. L'AC a été identifié dans la fraction 1 par l'ion pseudo-moléculaire m/z 179 $[M-H]^-$ suggérant une masse de 180 uma. Un ion fragment de l'AC a aussi été observé à m/z 135 (tableau 17).

Tableau 17 : Temps de rétention (Tr), ions pseudo-moléculaires ($[M-H]^-$) et fragments SM^2 , longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) et tentative d'identification de composés de la fraction 1 de l'extrait d'*H. foertherianum*.

Tr (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	Intensité de l'ion	Ions fragment	SM^2 (m/z)	λ_{max} (nm)	Identification proposée	N°
14,3	197	$0,35 \times 10^6$	395 ($[2M-H]^-$) et 179	n.d.	228/274	danshensu (syn. acide salvianique A)	1
	343	$0,2 \times 10^6$	-	n.d.	n.d.	ayanine ou 3,7,3'-triméthylquercétine	2a ou b
18,5	411	$0,5 \times 10^5$	-	353	n.d.	stigmastérol	3
20,6	403	$0,5 \times 10^5$	-	n.d.	228ép/284	mégalanthine	4
21,7	391	$0,65 \times 10^5$	-	n.d.	n.d.	4-(3',5'-dihydroxynonadécyl)phénol	5
32,0	179	$3,25 \times 10^5$	135	135	295ép ^a /324	acide caféique	6
33,3	359	$2,6 \times 10^5$	161	n.d.	n.d.	acide rosmarinique	7
35,5	467	$0,7 \times 10^5$	-	387 et 241	n.d.	acétate de β -amyrine	8
	493	$0,35 \times 10^5$	-	n.d.	n.d.	acide salvianolique A	9
38,1	467	$3,2 \times 10^5$	-	n.d.	n.d.	acétate de β -amyrine	8
39,0	359	$0,1 \times 10^6$	-	n.d.	n.d.	5-hydroxy-7,3',4',5'-tetraméthoxyflavanone	10
44,2	463	$0,3 \times 10^6$	-	n.d.	n.d.	3-O- β -D-glucoside de quercétine	11
44,9	423	$0,08 \times 10^6$	-	n.d.	n.d.	cycloarténone	12

^a ép : épaulement et ^b n.d. : non déterminé

Ensuite, les analyses SM/SM nous ont permis d'obtenir les ions fragments de 10 composés (annexe II) dont la masse (déduite à partir de l'ion pseudo-moléculaire) était répertoriée dans notre

bibliothèque des molécules d'*Heliotropium spp.* Les fragments obtenus ont été comparés à ceux trouvés dans la bibliographie pour les composés potentiellement identifiés. Les spectres UV des molécules potentiellement identifiées ont aussi été extraits des chromatogrammes obtenus en CLHP-DAD et comparés à la littérature lorsqu'ils étaient disponibles.

Pour les composés **1**, **6**, **7**, les fragments obtenus ont été semblables à ceux retrouvés par Ruan et al. (2012), ce qui nous permet de proposer l'identification respective du danshensu, et des acides caféique et rosmarinique (tableau 17). Pour les composés **9**, **16**, **17** et **20**, les ions fragments obtenus ont été semblables à ceux retrouvés par Liu et al. (2007), ce qui nous permet de proposer respectivement l'identification des acides salvianolique A et F, et des acides lithospermique et isosalvianolique C (tableau 18). Plus particulièrement, pour le composé **16**, l'ion pseudo-moléculaire à m/z 313 aurait pu aussi correspondre à celui de la kumatakénine mais les ions fragments obtenus correspondent à ceux de l'acide salvianolique F et ne sont pas caractéristiques de ceux des flavones d'après De Rijke et al. (2006).

Tableau 18 : Temps de rétention (Tr), ions pseudo-moléculaires ($[M-H]^-$) et fragments SM^2 , longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) et tentative d'identification de composés de la fraction 2 de l'extrait d'*H. foertherianum*.

Tr (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	Intensité de l'ion	Ions fragment	SM^2 (m/z)	λ_{max} (nm)	Identification proposée	N°
10,4	197	$0,8 \times 10^5$	395 et 179	179	n.d.	danshensu (syn. acide salvianique A)	1
	255	$0,1 \times 10^5$	-	n.d.	280/315ép	pinocembrine	13
	271	$0,1 \times 10^5$	-	n.d.	280/315ép	naringénine	14
28,5	269	$2,8 \times 10^5$	-	159 et 109	n.d.	tournefolal	15
	313	$1,3 \times 10^5$	-	269 et 159	n.d.	acide salvianolique F	16
36,0	537	$0,9 \times 10^6$	-	493 et 295	295ép/324	acide lithospermique A	17
40,6	537	5×10^5	-	n.d.	295ép/324	acide lithospermique A	17
40,8	463	$1,4 \times 10^6$	-	n.d.	266	3-O- β -glucoside de quercétine	11
45,5	447	$2,9 \times 10^6$	-	n.d.	266/348	3-O- β -D-glucoside de kaempférol ou de lutéoline	18
48,0	359	$7,5 \times 10^6$	-	161 et 179	290ép/330	acide rosmarinique	7
49,2	493	$6,5 \times 10^6$	-	295 et 313	254/290ép/310/335ép	acide salvianolique A	9
51,1	493	1×10^6	-	n.d.	252/288ép/307/335ép	acide salvianolique A	9
56,1	285	$0,35 \times 10^6$	-	205 et 241	n.d.	alpinone ou sakuranétine ou kaempférol	19a ou b ou c
	453	$0,6 \times 10^6$	-	373 et 409	n.d.	n.d.	
	491	$1,15 \times 10^6$	-	295 et 311	n.d.	acide isosalvianolique C	20

^a ép : épaulement et ^b n.d. : non déterminé

Le composé **15** pourrait être identifié comme la galangine, le 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphényl)-4H-chromén-4-one ou flavonoïde 6, le tournefolal ou l'héliophénanthrone, d'après son ion pseudo-moléculaire à m/z 269. Les ions fragments (m/z 159 et 109) (tableau 18) ne correspondent pas à ceux des flavonols (De Rijke et al., 2006) mais pourraient correspondre à ceux du tournefolal. L'ion pseudo-moléculaire du composé **19** pourrait correspondre au kaempférol, à l'alpinone ou à la sakuranétine (tableau 18) mais aucune correspondance avec les fragments retrouvés dans la bibliographie n'a été établie pour le kaempférol et la sakuranétine (De Rijke et al., 2006 ; Liu et al., 2012). L'alpinone, qui est un flavanol tout comme le kaempférol, ne semble pas non plus pouvoir être identifiée comme la molécule qui produit ces fragments. L'ion pseudo-moléculaire du composé **22** pourrait correspondre à celui de la stérubine ou à ceux des héliotropinones A ou B (tableau 19). Cependant, les ions fragments obtenus ne correspondent pas à ceux de la stérubine (ou S-7-O-méthylériodictyol) d'après Lech et al. (2014) et aucune donnée n'a été trouvée dans la bibliographie pour permettre de valider l'identification des héliotropinones.

Tableau 19 : Temps de rétention (Tr), ions pseudo-moléculaires ($[M-H]^-$) et fragments SM^2 , longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) et tentative d'identification de composés de la fraction 3 de l'extrait d'*H. foertherianum*.

Tr (min)	$[M-H]^-$ (m/z)	Intensité de l'ion	SM^2 (m/z)	λ_{max} (nm)	Identification proposée	N°
21,7	359	$2,8 \times 10^5$	n.d.	290ép/330	acide rosmarinique	7
22,1	493	$1,85 \times 10^5$	n.d.	254/290ép/ 310/335ép	acide salvianolique A	9
29,0	491	$6,5 \times 10^5$	n.d.	288/305ép/335ép	acide isosalvianolique C	20
32,1	491	$6,5 \times 10^5$	n.d.	n.d.	acide isosalvianolique C	20
39,4	483	2×10^6	241	n.d.	acétate d'érythrodol	21
41,3	301	7×10^5	165 et 135	228/288	héliotropinone A ou B	22a ou b
42,9	303	$0,6 \times 10^5$	n.d.	n.d.	filifolinol	23
	315	$0,2 \times 10^5$	n.d.	n.d.	7,3'-diméthylériodictyol	24
43,8	303	$3,2 \times 10^5$	285 et 164	260/285	filifolinol	23
48,9	285	$1,8 \times 10^6$	n.d.	288/325ép	alpinone ou sakuranétine ou kaempférol	19a ou b ou c
49,3	285	$1,9 \times 10^6$	n.d.	290/325ép	alpinone ou sakuranétine ou kaempférol	19a ou b ou c
50,7	303	$4,3 \times 10^5$	n.d.	262/280	filifolinol	23

^a ép : épaulement et ^b n.d. : non déterminé

Les composés **8**, et **21** pourraient être identifiés respectivement comme l'acétate de β -amyrine et l'acétate d'érythrodol (tableau 17, tableau 18 et tableau 19) mais les ions fragments obtenus ne correspondent pas à ceux habituellement obtenus en présence de triterpènes (Sánchez-Ávila et al., 2009 ; Burnouf-Radiosevich et al., 1985).

Pour le composé **23**, l'ion pseudo-moléculaire et les fragments obtenus (tableau 19)

semblent coïncider avec ceux trouvés dans la bibliographie pour le filifolinol (Torres et al., 1994). Le composé **3** a un ion pseudo-moléculaire de m/z 411 (tableau 17) et son ion fragment concorde avec un type de fragmentation décrit pour le stigmasterol (Andrasi et al., 2011).

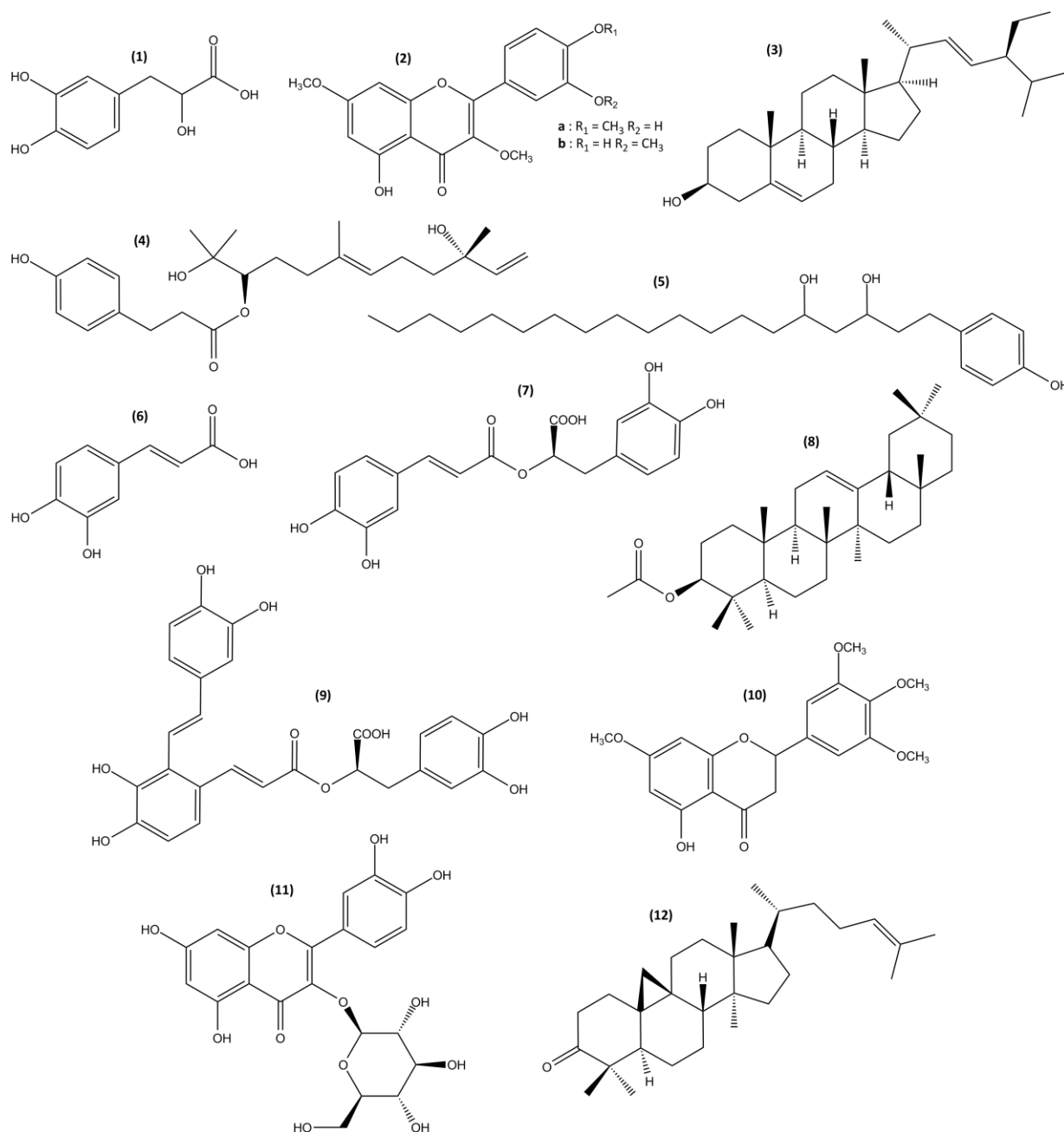


Figure 64 : Structures chimiques des 24 composés potentiellement identifiés par CLHP-SM dans l'extrait d'*H. foertherianum*. Les lettres a, b ou c figurant après les numéros des composés correspondent aux différentes possibilités d'identification pour une même masse.

(1) danshensu (syn. acide salvianique A), (2) a ayanine ou (2) b 3,7,3'-triméthylquercétine, (3) stigmasterol, (4) mégalanthine, (5) 4-(3',5'-dihydroxynonadécyl)phénol, (6) acide caféique, (7) acide rosmarinique, (8) acétate de β -amyrine, (9) acide salvianolique A, (10) 5-hydroxy-7,3',4',5'-tétraméthoxyflavanone, (11) 3-O- β -glucoside de quercétine, (12) cycloarténone, cf. figure 64 (suite) page suivante.

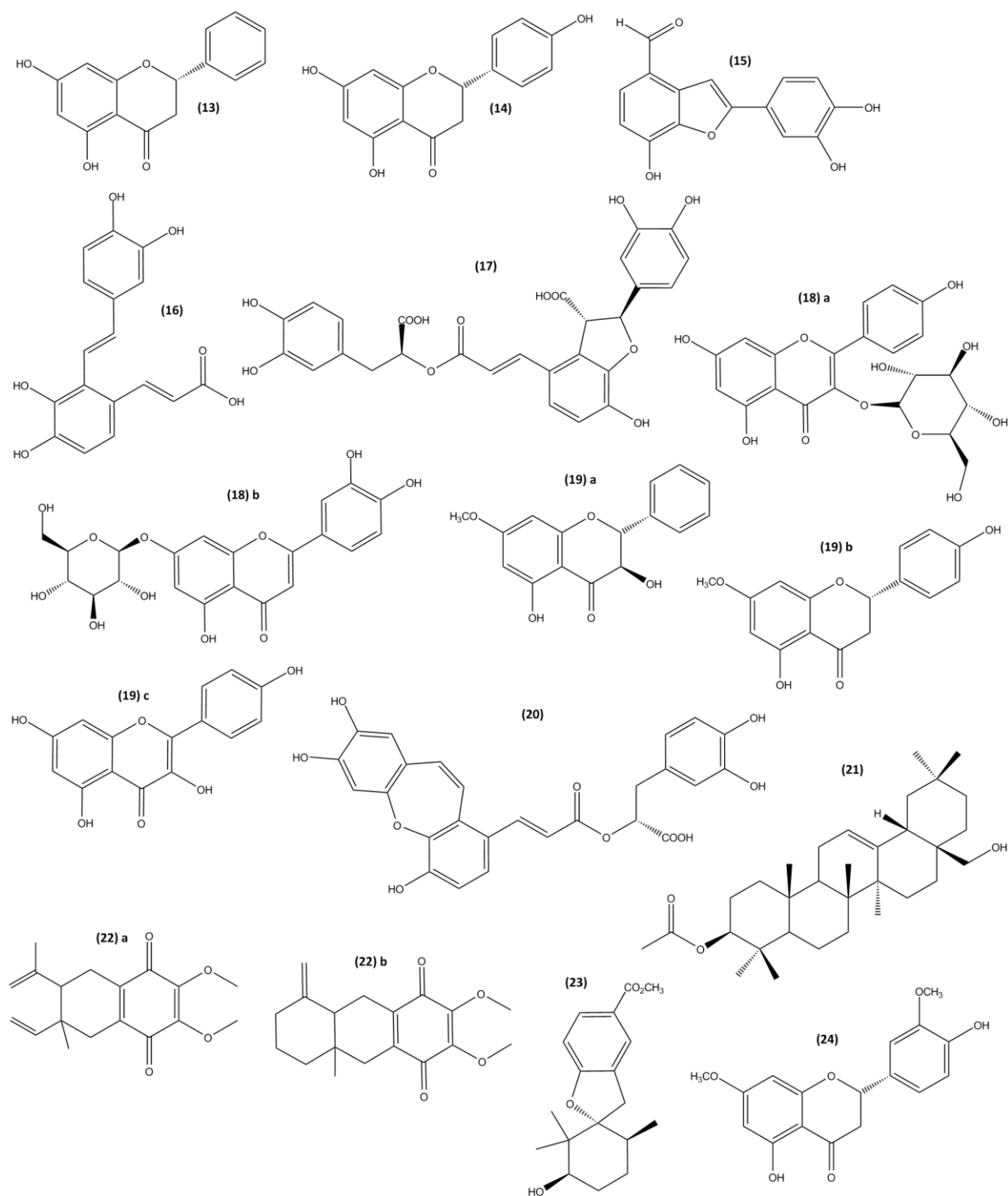


Figure 64 (suite) : Structures chimiques des 24 composés potentiellement identifiés par CLHP-SM dans l'extrait d'*H. foertherianum*. Les lettres a, b ou c figurant après les numéros des composés correspondent aux différentes possibilités d'identification pour une même masse.

(13) pinocembrine, (14) naringénine, (15) tournefolal, (16) acide salvianolique F, (17) acide lithospermique A, (18) a 3-O-β-D-glucoside de kaempférol ou (18) b 7-O-β-D-glucoside de lutéoline, (19) a alpinone ou (19) b sakuranétine ou (19) c kaempférol, (20) acide isosalvianolique C, (21) acétate d'érythrodiol, (22) a héliotropinone A, (22) b héliotropinone B, (23) filifolinol, (24) 7,3'-diméthylériodictyol.

4. Discussion

La méthode développée par CCM pour la détection de l'AR et de l'AC a permis une détection rapide de ces composés dans les extraits d'*H. foertherianum*. Leurs rapports frontaux, distance parcourue sur la plaque par les composés par rapport au solvant, étaient respectivement d'environ 0,4 et 0,6. Leur concentration dans les extraits a même pu être estimée en comparant l'intensité des tâches révélées avec celles des standards. Cette méthode pourrait être utilisée en amont de la chaîne de production d'un extrait d'*H. foertherianum* pour estimer grosso modo la teneur en AR et en AC des lots de feuilles d'*H. foertherianum* avant d'extraire la totalité du lot, ce qui permettrait de sélectionner ceux qui ont les teneurs les plus élevées. Cependant, la commercialisation d'un extrait d'*H. foertherianum* nécessite la connaissance de la quantité précise de principe actif. Il est donc important de doser ces composés par CLHP-DAD.

La méthode développée par CLHP-DAD s'est avérée robuste dans les limites de détection et de quantification de l'AR et de l'AC. En effet, la précision est correcte, c'est-à-dire que l'obtention de coefficients de variation, des temps de rétention et des aires des pics, de moins de 1 % et de 3 % nous permet d'affirmer que la répétabilité est satisfaisante, et que les variations intra-jour et inter-jour sont minimales. L'exactitude de la méthode est satisfaisante car les quantités d'AR et d'AC ajoutées dans l'extrait sont dosées entre 80 et 110 % lors de l'analyse. Enfin, la méthode développée a une spécificité convenable car elle permet d'identifier l'AR et l'AC sans ambiguïté.

Les résultats obtenus par CCM et par CLHP-DAD sont concordants mais la détection de l'AC par CCM reste incertaine du fait de sa faible teneur dans l'extrait. Les teneurs en AR et en AC des extraits provenant de Polynésie française varient respectivement entre 0,7 et 164 mg/g d'extrait et entre 0,4 et 6 mg/g d'extrait dans les échantillons analysés, i.e. entre 0,2 et 60 mg d'AR/g de matière sèche et entre 0,15 et 2 mg d'AC/g de matière sèche. À titre de comparaison, dans la famille des Lamiacées, le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et la sauge (*Salvia officinalis* L.) contiennent environ 10 mg/g de matière sèche d'AR et 0,2 mg/g d'AC alors que la brunelle commune (*Prunella vulgaris* L.) contient environ respectivement 22 et 2 mg/g d'AR et d'AC (Wang et al., 2004b). Des teneurs en AR et en AC du même ordre de grandeur, respectivement de 0,02 à 9 mg/g et de 0,02 à 0,6 mg/g de matière sèche, ont été retrouvées chez 96 taxons des Lamiacées (Janicsák et al., 1999). Les teneurs en AR et en AC des extraits d'*H. foertherianum*, déterminées dans notre étude, sont donc comparables à celles retrouvées dans des plantes à usage alimentaire. On note cependant que la teneur en AR peut atteindre 60 mg/g de matière sèche soit 6 fois plus que dans la sauge.

Les analyses des 32 extraits d'*H. foertherianum* des archipels de la Société, des Tuamotu, des Australes et des Gambier de la Polynésie française montrent une disparité des teneurs en AR et en AC entre les archipels mais aussi entre les îles. En effet, à l'échelle des archipels, les échantillons

collectés dans les Tuamotu et la Société contiennent des teneurs plus élevées en AR et en AC que ceux collectés dans les Australes et les Gambier. Les résultats exposés au [chapitre 2](#) montrent le rôle essentiel de l'AR et de l'AC dans l'activité de l'extrait d'*H. foertherianum*. Par conséquent, la forte variabilité de leurs teneurs suivant le lieu de collecte des feuilles expliquerait pourquoi certaines personnes intoxiquées ne trouvent pas de soulagement après la prise du remède.

H. foertherianum est très répandu aux Tuamotu (Pétard, 1986) et semble coloniser plus difficilement les autres archipels du fait du nombre limité de *motu* (Butaud et al., 2008). Cette espèce affectionne particulièrement les sols calcaires coralliens des atolls (Butaud et al., 2008) qui sont moins présents dans les îles hautes de la Société, des Australes et des Gambier. La plupart des îles qui composent ces archipels sont des volcans éteints et érodés. Les plus anciens se sont immergés et sont devenus des atolls comme la majorité des îles de l'archipel des Tuamotu. Toutes les îles sont situées dans la ceinture des alizées de sud-est et les îles les plus hautes ont donc des sommets humides et des côtés exposés aux vents plus secs. La saison la plus chaude et aussi la plus humide pour les îles de la Société va de novembre à avril tandis que la saison la plus fraîche et sèche est en juillet et en août. Cependant, les îles des Tuamotu n'ont pas de saison vraiment marquée. Enfin, le gradient de hauteurs de précipitations décroît d'ouest en est, depuis les Australes jusqu'aux Marquises (Mueller-Dombois et Fosberg, 1998).

La disparité des teneurs en AR et en AC mise en évidence peut s'expliquer de différentes façons. Tout d'abord, malgré qu'aucune variété d'*H. foertherianum* n'ait à ce jour été décrite, aux vues de l'étendue de la Polynésie française et de sa diversité géographique, on peut supposer l'existence d'écotypes d'*H. foertherianum* suivant les archipels ou les îles de son aire de répartition. Ensuite, les feuilles des différents échantillons n'ont pas été collectées à la même période de l'année ce qui pourrait influencer sur leur teneur en AR et en AC même si la fructaison et la floraison d'*H. foertherianum* sont régulières et souvent synchrones tout au long de l'année. De plus, la différence de climat entre les archipels, de 25 à 28°C de moyenne à l'année dans la Société contre 21 à 26°C dans les Australes et Gambier avec des précipitations plus importantes que dans les Tuamotu et la Société (ISPF, 2014), pourrait peut-être aussi expliquer la différence de teneur en AR et en AC des extraits. En effet, la production de métabolites secondaires chez les plantes est influencée autant par des facteurs biotiques qu'abiotiques (Petinatti et al., 2012). Les facteurs biotiques concernent les aspects physiologiques des plantes et leurs interactions avec d'autres organismes vivants (Petinatti et al., 2012) alors que les facteurs abiotiques incluent, en tant que déclencheurs de stress potentiels, par exemple, les conditions climatiques, la salinité, la chaleur ou le froid, la luminosité. Ces stress environnementaux peuvent générer des dérivés réactifs de l'oxygène qui provoquent des dommages aux cellules (Wang et al., 2004a ; Ksouri et al., 2008) et la réponse des plantes à ce stress est une augmentation de la synthèse des métabolites secondaires,

tels que les polyphénols, pour se protéger des effets oxydatifs (Beckman, 2000 ; Ksouri et al., 2008). Les profils de métabolites secondaires de plantes non cultivées sont le plus souvent propres à chaque population de plantes. Cette caractéristique peut être reliée aux conditions telles que la saison, le moment de la collecte, l'âge des tissus et la température (Petinatti et al., 2012). Des études, concernant la variabilité de la production d'AR par les plantes, ont montré que la période d'irradiation des feuilles d'*Ocimum basilicum* L. était importante (Shiga et al., 2009) et que la récolte des feuilles de *Mentha spicata* L. et *Mentha piperita* L. devait se faire avant la floraison pour maximiser les quantités d'AR produites (Fletcher et al., 2010). En revanche, les disparités observées pour les teneurs en AR et en AC entre les îles d'un même archipel sont plus difficiles à expliquer. Des facteurs tels que la composition du sol ou l'exposition des individus au soleil ou aux vents peuvent intervenir (Ksouri et al., 2008), par conséquent des réplicats seraient nécessaires pour définir si les différences sont dues aux individus mêmes ou aux différentes caractéristiques des sites de collecte d'une même île.

Nous avons montré les activités bénéfiques de l'AR et de l'AC dans le traitement contre les intoxications ciguatériques et l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum*, contenant naturellement 4,45 % d'AR, s'est révélé être le plus actif (cf. chap. 2). L'AR apparaît donc comme un des principes actifs et composé majoritaire de l'extrait. Cependant, les autres composés de l'extrait pouvant exercer un effet synergique avec l'AR et l'AC, nous avons étudié sa composition chimique globale grâce à la CLHP-SM. D'après la bibliographie sur le genre *Heliotropium*, 24 composés ont pu être potentiellement identifiés dans l'extrait d'*H. foertherianum*. Les composés précédemment identifiés dans les tiges d'*H. foertherianum* par l'équipe d'Ogihara et possiblement retrouvés dans notre étude des feuilles sénescents sont l'AR, l'AC, l'acide salvianique A, l'acétate d'érythrodiol, le kaempférol et une de ses formes hétéroside et un hétéroside de la quercétine.

Parmi les composés potentiellement identifiés, certains sont déjà connus pour leurs activités biologiques. Par exemple, pour les composés phénoliques, l'acide salvianolique A a été rapporté par Wang et al. (2009) comme ayant un potentiel cardioprotecteur dans l'infarctus du myocarde chez le rat. Zhang et al. (2012) ont quant à eux montré l'effet protecteur de l'acide salvianolique A face au stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène sur des cellules de neuroblastomes, ce qui en fait un bon candidat dans le traitement des maladies neurodégénératives. L'acide salvianique A ou danshensu a aussi un effet protecteur sur les cellules de neuroblastomes face à un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale dérivé du MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), qui est une neurotoxine (Wang et Xu, 2005). De plus, l'acide salvianique A a des propriétés vasorelaxantes dues à sa capacité à inhiber l'influx d'ions calcium, et par conséquent les canaux calciques dépendant du potentiel de type L, dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Lam et al., 2007).

En ce qui concerne les flavanones, telles que la naringénine ou la pinocembrine par exemple, leur potentialité dans le traitement des maladies neurodégénératives a été mise en avant (Coowar et al., 2009). La naringénine a particulièrement été étudiée pour ses propriétés neuroprotectrices se traduisant soit par la réduction du stress oxydatif de cellules nerveuses (Heo et al., 2004 ; Muthaiah et al., 2013), soit par la réduction de l'effet oxydatif produit par l'oxyde nitrique sur des neurones humains en atténuant l'influx intracellulaire d'ions calcium (Braidy et al., 2010). Des dérivés de la β -amyrine, triterpènes pentacycliques, ont montré des propriétés antinociceptives (Soldi et al., 2008) et un potentiel anti-inflammatoire contre la parodontite chez le rat (Holanda Pinto et al., 2008).

Enfin, le stigmasterol a montré un effet neutralisant des venins de cobra et de vipère et un effet potentialisateur des antivenins chez la souris (Gomes et al., 2007). Les propriétés neuroprotectrices de ces composés sont particulièrement intéressantes pour traiter les symptômes neurologiques afférents à la ciguatera. Leurs mécanismes d'action impliquant les canaux calciques dépendant du potentiel permettraient peut-être d'inhiber l'augmentation de la concentration intracellulaire d'ions calcium déclenchée par les ciguatoxines au niveau des synapses et mise en évidence dans les érythrocytes de cœur de grenouilles (Sauviat et al., 2006). Les activités biologiques des composés potentiellement identifiés dans l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* pourraient ainsi participer à son activité biologique en synergie avec l'AR et l'AC. Le choix de l'utilisation de l'extrait de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* dans le traitement des intoxications ciguatriques serait ainsi renforcé.

En effet, les plantes médicinales sont connues pour être un mélange complexe de composés actifs qui peuvent agir sur plusieurs cibles thérapeutiques à la fois (Yang et al., 2014). Pour les composés qui restent non identifiés et pour confirmer l'identité de ceux potentiellement identifiés dans cette étude, l'analyse des fractions en CLHP-SM haute résolution et leur comparaison à des standards ou leur isolement par CLHP semi-préparative, suivi d'analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN), permettraient d'obtenir davantage d'informations structurales. De plus, cela permettrait de mener une étude quantitative par CLHP-DAD ou -SM sur la majorité des composés de l'extrait et non pas seulement sur les composés majoritaires les plus actifs. Dans le cadre d'une valorisation de l'extrait, il est important de connaître sa composition chimique globale et son profil chromatographique (appelés « empreinte chimique » cf. chap. 4 parag. 3.1.) pour pouvoir établir un contrôle qualité, i.e. garantir une faible variation de sa composition chimique et donc une activité biologique constante (Alaerts et al., 2010).

En ce qui concerne les APs, aucune des deux méthodes utilisées n'a permis de les détecter dans les extraits d'*H. foertherianum*. En effet, les méthodes qualitatives utilisant le Dragendorff et le réactif d'Ehrlich n'ont donné aucun signal. Toutefois, ces méthodes ayant un seuil de détection relativement élevé et une faible sensibilité (Birecka et al., 1981), la présence d'APs à l'état de traces

ne peut être totalement exclue. Les limites de détection des APs sont supérieures à 1 µg/g par les méthodes de CCM (Mattocks, 1967b) et d'environ 100 ng/g par les méthodes de CLHP-SM (FAO/OMS, 2011). Il était donc nécessaire de confirmer la non-présence des APs par une méthode beaucoup plus sensible telle que la CLHP-SM/SM. Afin de faciliter la détection des APS et de les concentrer, les extraits avaient été purifiés au préalable sur cartouche échangeuse d'ions. Ces analyses ont confirmé l'absence des APs dans les extraits de feuilles sénescents d'*H. foertherianum*. Il est possible que l'extraction des feuilles d'*H. foertherianum* par décoction, méthode traditionnelle de préparation de l'extrait, ne permette pas d'obtenir ces composés en quantité suffisante pour les détecter, puisque suivant la méthode d'extraction ou le solvant utilisé, la quantité d'APs extraites peut varier (Hosch et al., 1996 ; Lebada et al., 2000). Néanmoins, les méthodes de concentration des APs sur cartouche échangeuse d'ions et de leur détection par CLHP-SM/SM ont fait leurs preuves et sont utilisées avec succès sur différentes matrices (e.g. miel, plantes). L'indicine et son dérivé N-oxyde, présents dans les tiges d'*H. foertherianum* (Ogihara et al., 1997b), ont un fort potentiel hépatotoxique (Letendre et al., 1984). Cependant, dans l'état actuel des connaissances, aucune intoxication par des APs, provenant de l'utilisation des feuilles en décoction d'*H. foertherianum*, n'a encore été recensée, en dépit de l'utilisation traditionnelle très large qui est faite de ce remède. De plus, bien que le genre *Heliotropium* soit connu pour contenir des APs, il est possible que ces composés ne soient que très peu présents dans les feuilles sénescents, leur biosynthèse intervenant principalement dans les racines ou dans les jeunes pousses (Borstel et al., 1989 ; van Dam et al., 1994), et donc que leur distribution soit très inégale d'un organe à l'autre de la plante (Frölich et al., 2007). Ces observations sont donc également en faveur de l'absence des APs dans les extraits de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* obtenus par décoction. Enfin, au vu des résultats obtenus avec le standard de l'indicine, nous pouvons affirmer qu'il y a moins de quelques nanogrammes d'APs de type rétronécine par milligramme d'extrait d'*H. foertherianum* et ainsi moins de quelques microgrammes par gramme de feuilles sénescents.

5. Conclusion

Une méthode qualitative et une méthode quantitative de dosage de l'AR et de l'AC ont pu être mises au point. Elles ont permis d'analyser plusieurs extraits d'*H. foertherianum* provenant de différentes îles et de différents archipels de la Polynésie française et de montrer leurs différences de teneurs en acide rosmarinique et en acide caféique. Les extraits de feuilles sénescents se sont aussi révélés être dépourvus d'APs, ce qui est en faveur de leur innocuité. Enfin, au total, vingt-quatre composés de feuilles sénescents de l'extrait *H. foertherianum* ont été potentiellement identifiés et pourraient éventuellement contribuer à l'activité biologique de l'extrait dans le traitement du syndrome ciguatérique.

Chapitre 4

Détermination des conditions optimales de production d'un extrait en vue d'une valorisation industrielle

1. Introduction

L'activité biologique *in vitro* et la composition chimique de l'extrait de feuille sénescents d'*H. foertherianum* ont été étudiées dans les chapitres précédents. Basé sur les connaissances médicinales traditionnelles de la population du Pacifique et confirmé par l'approche scientifique, le potentiel d'*H. foertherianum* dans le traitement du syndrome ciguatérique a été illustré dans cette étude. Ce travail de thèse comporte aussi un volet recherche et développement dans la perspective d'une valorisation industrielle de ce remède.

Ce chapitre détaille donc les conditions optimales requises en termes de disponibilité de la ressource, de collecte, d'extraction, et de conservation en vue d'une valorisation industrielle, de la collecte des feuilles d'*H. foertherianum* à leur transformation. La première partie de ce chapitre exposera une étude en cours permettant de caractériser la disponibilité de la ressource par le repérage par télédétection des individus de cette espèce. La seconde partie s'intéressera à la détermination de zones de collecte les plus à même de fournir des extraits biologiquement actifs de composition chimique homogène, en fonction de paramètres environnementaux. Puis, la troisième partie traitera plus particulièrement des conditions optimales de collecte, d'extraction et de conservation des feuilles et des extraits d'*H. foertherianum*, dans le but d'obtenir des extraits aux teneurs en principes actifs les plus élevées. Enfin, la dernière partie proposera un exposé des méthodes utilisées en industrie pour la production d'extraits à base de plantes, tout en indiquant les plus appropriées pour l'exploitation des feuilles d'*H. foertherianum*. Une proposition de chaîne de production d'extraits de feuilles d'*H. foertherianum* sera décrite selon les données disponibles dans la bibliographie, les essais à l'échelle pilote n'ayant pas été abordés.

2. Disponibilité de la ressource

D'après la littérature, le nombre d'individus d'*H. foertherianum* est le plus important sur les îles de type atoll notamment dans l'archipel des Tuamotu (Pétard, 1986). Cette observation, combinée au fait que les feuilles contenant les teneurs les plus élevées en principes actifs ont été décelées dans des échantillons collectés dans l'archipel des Tuamotu (cf. chap. 3), indique que cet archipel est une zone de collecte privilégiée des feuilles d'*H. foertherianum*.

Un des moyens efficaces de déterminer les zones de collecte potentielle, à l'échelle d'un atoll, serait d'utiliser la télédétection. En effet, la télédétection permet par le biais d'images spatiales haute résolution de pré-visualiser les individus ou un groupe d'individus et d'en estimer le nombre, ce qui donne une idée du stock naturel de l'espèce. La méthodologie serait ici dans un premier temps, d'effectuer un échantillonnage le plus complet possible d'un atoll de petite dimension.

La seconde étape consisterait à utiliser des méthodes de télédétection sur des images à très haute résolution afin de cartographier les zones d'habitat potentiel ou avéré d'*H. foertherianum*. Une étude préliminaire de terrain à Tetiaroa, dont la carte satellite complète est disponible, a été réalisée avec le Dr. B. Stoll du laboratoire GEPASUD. L'objectif est de pouvoir caractériser les meilleures zones d'habitat d'*H. foertherianum* pour en déduire les zones de collecte potentielles et d'extrapoler les résultats obtenus à plusieurs atolls des Tuamotu. Les résultats sont en cours de traitement.

3. Détermination de zones de collecte potentielles au sein d'une île témoin

3.1. Introduction

Compte tenu des différences observées au niveau des teneurs en acide rosmarinique (AR) et en acide caféique (AC) des feuilles d'*H. foertherianum* entre les archipels, mais aussi entre plusieurs îles au sein d'un même archipel (cf. chap. 3), il nous a paru intéressant de déterminer si des lieux de collecte étaient plus appropriés que d'autres. Dans le but de garantir la plus grande homogénéité possible dans la composition chimique des extraits ainsi qu'une activité biologique constante, une étude de variabilité inter-individus a été menée au sein d'une même île, sur l'atoll de Tetiaroa.

Les voies de biosynthèse des polyphénols, type de composés *a priori* majoritaires dans l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum* (cf. chap. 3), sont bien décrites mais les facteurs les contrôlant et les régulant, et qui déterminent la qualité et la quantité des polyphénols synthétisés, restent un sujet d'étude actuel. La variation de la production de polyphénols chez les plantes résulte à la fois de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui, par ailleurs, interagissent entre eux.

Les facteurs environnementaux affectant les plantes peuvent être de nature biotique ou abiotique. Les facteurs biotiques environnementaux résultent de l'interaction avec d'autres organismes comme par exemple les dommages causés par les insectes phytophages tandis que les facteurs abiotiques incluent entre autres la température, l'humidité, l'approvisionnement en eau et en minéraux, et le vent (Schulze et al., 2005).

Pour l'étude présentée dans la deuxième partie de ce chapitre, les paramètres environnementaux qui ont été sélectionnés sont la présence des individus côté océan contre côté lagon, et leur degré d'exposition aux vents. Les types de sols retrouvés sur l'atoll de Tikehau, extrapolables aux atolls de Polynésie française, ont été étudiés et leur distribution se base en partie sur la granulométrie du substrat qui varie de « débris coralliens grossiers » côté océan à des « sables coralliens et coquilliers » côté lagon (Jamet et Trichet, 1987). Les polyphénols ne sont pas seulement des composés de défense vis-à-vis des herbivores ou insectes mais jouent aussi un rôle dans la composition du sol pour créer des conditions favorables à la croissance de la plante (Northup et al., 1998). Ils peuvent aussi retenir les cations inorganiques échangeables, tels que les ions

calcium, magnésium et potassium, en fournissant des sites de sorption au niveau de sols acides et fortement lessivés. Ils peuvent également maintenir disponibles des micronutriments métalliques tels que le fer, le magnésium et le cuivre en formant des complexes organiques (Hättenschwiler et Vitousek, 2000). D'après les travaux préliminaires réalisés par Kumar Roiné (2009), les ions sodium, calcium, potassium et magnésium étaient majoritaires dans les extraits d'*H. foertherianum* sur un spécimen de Nouvelle-Calédonie. De plus, ils pourraient potentiellement avoir un intérêt dans le traitement du syndrome ciguatérique par l'induction d'effet osmotique.

Afin de mieux évaluer les variations chimiques potentiellement liées aux conditions environnementales, nous nous sommes intéressés non seulement aux principes actifs, les acides rosmarinique et caféique, mais aussi à l'ensemble des composés de l'extrait pouvant avoir une activité biologique synergique. Depuis le début des années 2000, la comparaison chimique d'extraits à base de plantes est effectuée à partir de l'analyse de chromatogrammes complets (temps de rétention par absorbance à une longueur d'onde fixée) (Li et al., 2004 ; Lu et al., 2005 ; Yan et al., 2005 ; Chen et al., 2007b ; Chen et al., 2007a ; Liu et al., 2007 ; Chen et al., 2008) et non plus seulement à partir de quelques composés sélectionnés comme marqueurs chimiques (Zeng et al., 2012). Ce type de chromatogramme, représentant tous les composés chimiques détectables d'un extrait de plante, est appelé « empreinte chimique » ou « *chemical fingerprint* » (Liu et al., 2013). L'avantage de cette approche est qu'elle permet de rendre compte de la complexité d'un extrait à base de plantes médicinales et de tenir compte de l'ensemble des composés présents, lorsqu'il est compliqué techniquement de connaître la composition exacte de l'extrait composé par composé (Xie et al., 2006). Cette technique est utilisée par exemple pour vérifier la consistance de la composition chimique entre différents lots ou pour caractériser la composition chimique d'extraits provenant de zones de collecte différentes (Zhou et al., 2008 ; Ni et al., 2009). L'OMS a reconnu cette approche comme une stratégie pour l'évaluation des extraits à base de plantes médicinales et recommande l'utilisation de standards, protocoles et méthodes nationaux, pour contrôler l'innocuité et la qualité des plantes médicinales, ainsi que de monographies (Alaerts et al., 2010). Les empreintes chimiques sont aussi recommandées par la FDA et l'EMA (Ni et al., 2009 ; Alaerts et al., 2010). Plusieurs méthodes analytiques sont utilisées pour générer les empreintes chimiques telles que la chromatographie liquide ou gazeuse couplée à une détection par UV, par SM, par RMN ou par ces méthodes combinées (Dunn et Ellis, 2005). Les techniques à base de CLHP sont majoritairement utilisées, dues à leur large présence dans les laboratoires et à leurs propriétés analytiques (Sheridan et al., 2012). Des études récentes ont proposé le concept d'« empreinte chimique améliorée », avec l'utilisation de plusieurs longueurs d'onde pour leur construction, afin de ne pas négliger les informations des composés qui ne seraient disponibles qu'à une longueur d'onde en particulier (Lucio-Gutiérrez et al., 2012).

Nos objectifs pour la seconde partie de ce chapitre étaient donc, en premier lieu, d'évaluer l'effet de l'environnement sur la diversité et la quantité des métabolites retrouvés dans les extraits de feuilles sénescents d'*H. foertherianum*, par le biais de leur empreinte chimique améliorée, et aussi sur leurs teneurs en ions. Dans un deuxième temps, les modifications de l'activité biologique des extraits engendrées par la variabilité de leur composition chimique devaient être vérifiées.

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Plan d'échantillonnage

L'atoll de Tetiaroa (figure 65) a été choisi pour cette étude de variabilité inter-individus. L'île est inhabitée, à 3 h de bateau de Tahiti, et un grand nombre d'individus d'*H. foertherianum* y est présent (Fosberg, 1992). L'échantillonnage a été conçu de façon à collecter des individus correspondant à quatre modalités distinctes à la fois en termes de type d'habitat (côté lagon contre côté océan) et d'exposition aux vents (exposé contre abrité) (figure 66).

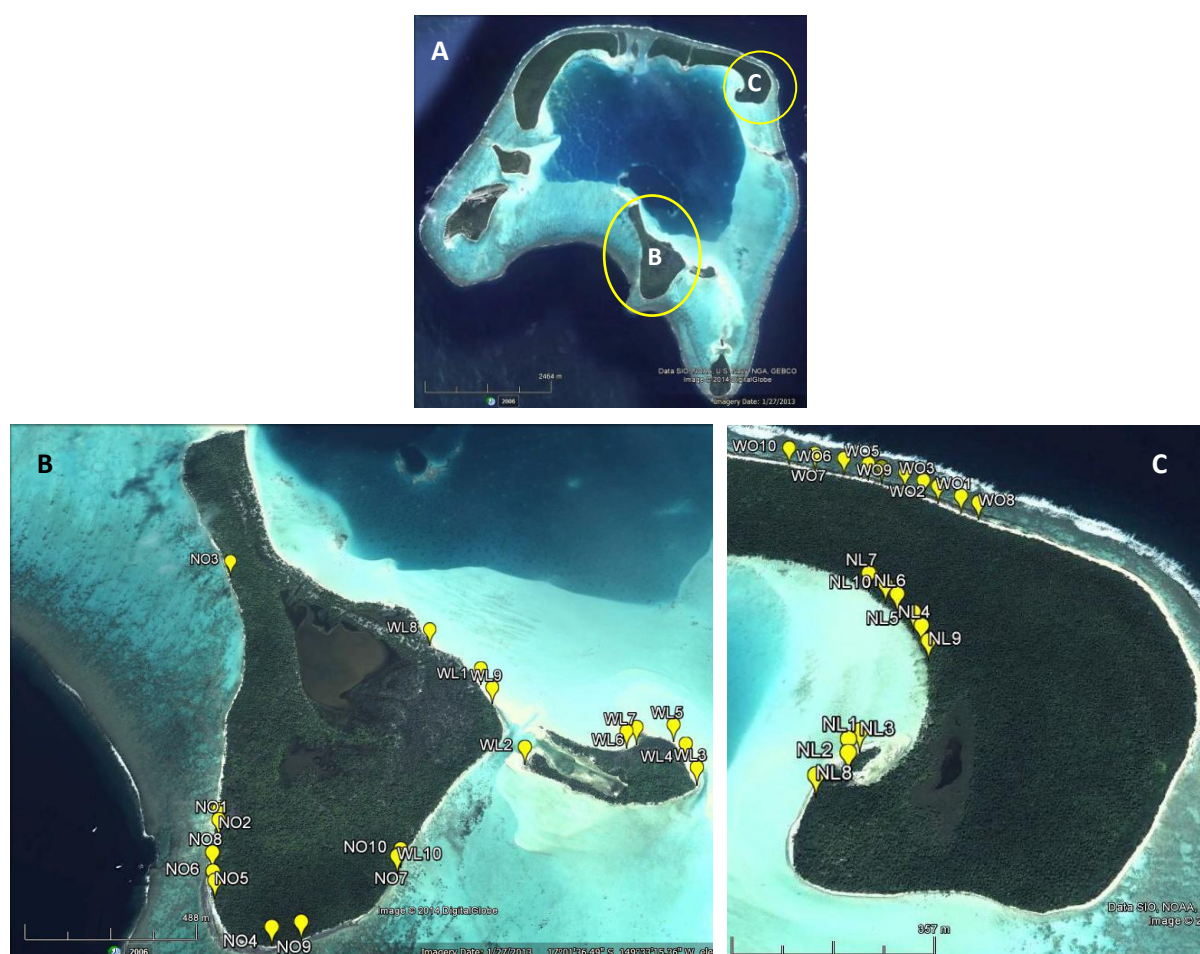


Figure 65 : Vue aérienne de l'atoll de Tetiaroa (A), du motu Rimatu'u (B) et du motu Oroatera (C). Les points jaunes représentent chaque individu dont des feuilles ont été collectées, ©Google Earth.

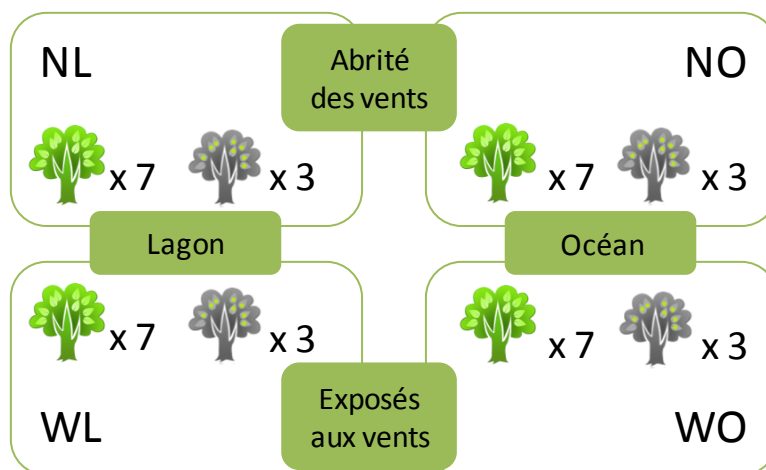


Figure 66 : Échantillonnage des feuilles d'*H. foertherianum* sur l'atoll de Tetiaroa. L pour lagon, O pour océan et W pour exposé aux vents, N pour abrité des vents. Les individus dont les feuilles ont été collectées en lot pour la variabilité inter-individus sont représentés en vert et ceux dont les feuilles ont été collectées en tant que réplicats intra-individus sont illustrés en gris.

Au total, les feuilles de dix individus de chaque modalité ont été collectées sur deux *motu* de Tetiaroa, le *motu* Rimatu'u et le *motu* Oroatera (figure 65). Sur ces dix individus, les feuilles de trois d'entre eux ont été collectées séparément pour les analyser en tant que réplicats intra-individus ($n = 8$). Les feuilles des sept autres ont été collectées groupées ($n = 5$) pour étudier la variabilité inter-individus (figure 66 et cf. annexe III).

Les feuilles ont été rincées à l'eau distillée puis extraites selon la méthode décrite au chapitre 3 paragraphe 2.1.

3.2.2. Dosage par CLHP-DAD de l'AR et de l'AC

Les extraits ont été analysés par CLHP-DAD selon la méthode décrite au chapitre 3 paragraphe 2.3.

Trente et un extraits de chaque modalité ont été analysés individuellement et des tests statistiques, réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, San Diego, Californie), ont été utilisés pour comparer les teneurs en acides rosmarinique et caféique. Afin de déterminer si les résultats étaient statistiquement différents, un test de normalité a été appliqué avec Shapiro-Wilk, d'Agostino et Pearson et Kolmogorov-Smirnov. Puis, si la distribution était normale, une ANOVA à un facteur a été réalisée avec le post-test Dunnett, sinon, le test de Kruskal-Wallis (post-test Dunn) (Motulsky, 2010) a été réalisé pour comparer la réponse des différentes conditions testées avec un seuil de significativité à $p < 0,05$.

3.2.3. Analyse de l'empreinte chimique des extraits d'*H. foertherianum*

Les chromatogrammes intégrés des extraits ont été exportés en fichiers *.CSV du logiciel ChemStation de la CLHP-DAD à cinq longueurs d'onde (225, 254, 280, 320 et 349 nm) afin de recenser le maximum de composés. Les pics listés correspondant à un composé, i.e. pour lequel un spectre UV était disponible, ont été vérifiés sur le logiciel pour chaque extrait. Un numéro de pic a été attribué à chaque temps de rétention par extrait puis assigné à l'ensemble des extraits afin d'obtenir une numérotation uniforme. Pour chaque pic, la longueur d'onde avec laquelle l'aire maximale était obtenue a été sélectionnée. Le tableau final des données correspond à la liste des extraits en fonction des numéros de pic pour une longueur d'onde spécifique. Ces données ont été analysées au moyen d'analyses multivariées inter-classes.

3.2.4. Analyse de la composition chimique globale

Pour chaque modalité, les extraits des individus, dont les feuilles ont été collectées en lot, ont été pesés à 2 mg puis regroupés avant d'être fractionnés (tableau 20) comme spécifiés au chapitre 3 paragraphe 2.6.1. pour être analysés en CLHP-DAD d'après la méthode développée au chapitre 3 paragraphe 2.3. et ensuite en CLHP-SM/SM au service commun de spectrométrie de masse de l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Tableau 20 : Masse des fractions obtenues à partir des extraits d'*H. foertherianum* pour les modalités côté océan abrité (NO) et exposé aux vents (WO) et côté lagon abrité (NL) et exposé aux vents (WL).

Modalités	Fractions	Solvant d'élution (% d'ACN)	Masse (mg)
WO	F1	10	10,3
	F2	22	1,6
	F3	40	0,5
NO	F1	10	9,9
	F2	22	3,5
	F3	40	0,9
WL	F1	10	6,6
	F2	22	3,4
	F3	40	0,3
NL	F1	10	9,3
	F2	22	4,3
	F3	40	0,4

3.2.5. Recherche de la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques

Pour chaque modalité, les extraits des individus, dont les feuilles ont été collectées en lot, ont été pesés à 7 mg puis regroupés avant d'être fractionnés (tableau 21), comme spécifiés au chapitre 3 paragraphe 2.5.2., pour être analysés en CLHP-SM/SM au service commun de spectrométrie de masse de l'Université de Paul Sabatier de Toulouse.

Tableau 21 : Masse des fractions obtenues à partir des extraits d'*H. foertherianum* pour les modalités côté océan abrité (NO) et exposé aux vents (WO) et côté lagon abrité (NL) et exposé aux vents (WL).

Modalités	Fractions	Solvant d'élution	Masse (mg)
WO	F1	HCl	30
	F2	MeOH	3,4
	F3	MeOH/NH ₃	0,1
NO	F1	HCl	40
	F2	MeOH	3,9
	F3	MeOH/NH ₃	0,2
WL	F1	HCl	40,5
	F2	MeOH	6,1
	F3	MeOH/NH ₃	1,2
NL	F1	HCl	40,3
	F2	MeOH	3,4
	F3	MeOH/NH ₃	0,6

3.2.6. Analyse de quelques ions des extraits d'*H. foertherianum*

L'analyse des ions Na⁺, Ca²⁺, K⁺ et Mg²⁺ a été réalisée grâce à un spectromètre d'absorption atomique Varian AA240 (Agilent, Santa Clara, Californie) avec une flamme air et acétylène. Une gamme étalon de chaque ion recherché a été analysée avant le passage des extraits.

Trois extraits de chaque modalité ont été pesés exactement puis regroupés. Pour l'analyse des ions calcium et magnésium, les extraits ont été dissous dans 50 ml d'eau distillée contenant 10 % de chlorure de lanthane. Si nécessaire, les solutions ont été diluées dans de l'eau acidifiée à l'acide chlorhydrique à 0,1 mol/l. Pour l'analyse des ions sodium et potassium, les extraits ont été dissous dans 50 ml d'eau distillée et les solutions ont été diluées dans de l'eau distillée si nécessaire.

3.2.7. Test sur neuroblastomes de souris

Quatre extraits, un pour chaque modalité, seront testés selon la méthode décrite au paragraphe 2. du chapitre 2 afin d'évaluer leur activité biologique.

3.3. Résultats

Les résultats concernant l'analyse de l'empreinte chimique des extraits d'*H. foertherianum*, et permettant d'évaluer leurs variations chimiques potentiellement liées aux conditions environnementales, sont en cours de traitement. De même, les tests d'activité sur neuroblastomes de souris, des extraits collectés à différentes modalités, seront réalisés prochainement.

3.3.1. Comparaison des teneurs en AR et en AC en fonction des modalités

Pour l'AR, aucune différence significative n'est observée entre les individus exposés aux vents et ceux à l'abri des vents mais une différence significative est observée entre les individus qui sont côté lagon et ceux qui sont côté océan. La modalité permettant d'obtenir des extraits ayant la teneur la plus élevée en AR est celle où les individus se trouvent côté lagon (figure 67 A).

Pour l'AC, pour les individus se trouvant côté océan, la différence dans la teneur en AC est significative entre les individus exposés aux vents et ceux à l'abri des vents, ce qui n'est pas le cas côté lagon. En outre, comme pour l'AR, on observe des différences significatives dans les teneurs en AC entre les individus se trouvant côté lagon par rapport à ceux côté océan (figure 67 B).

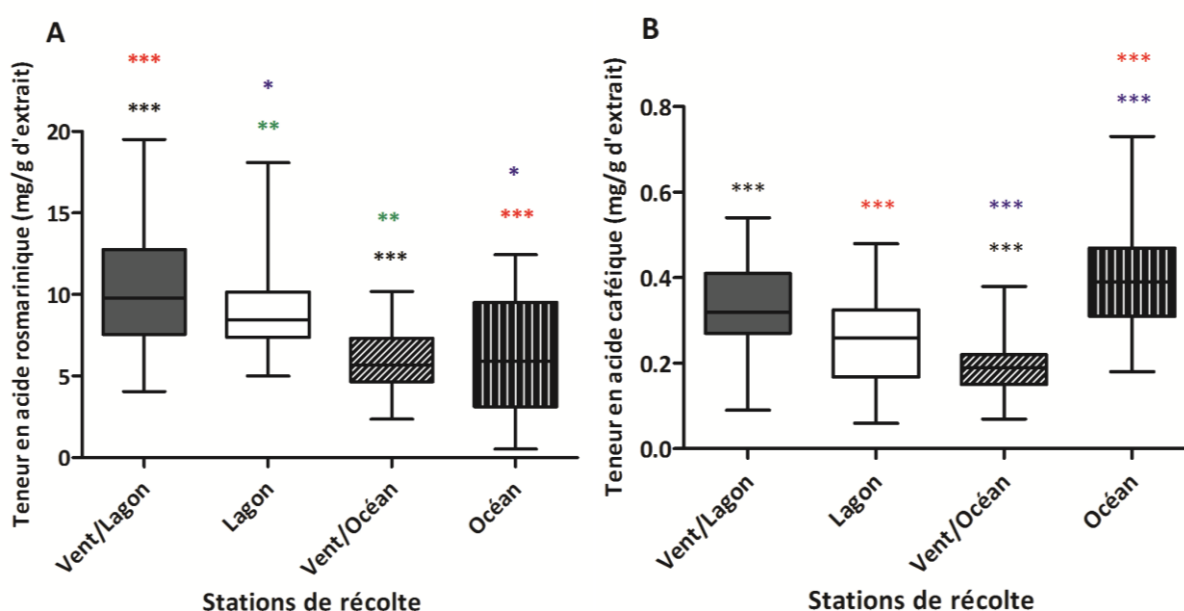
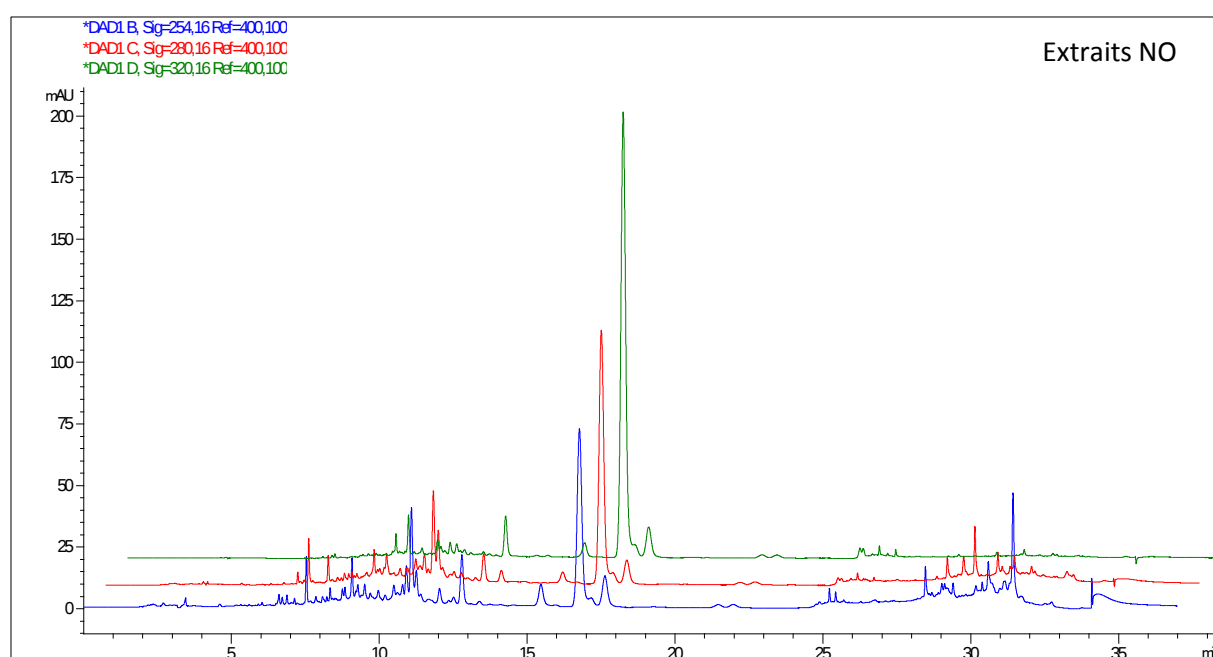


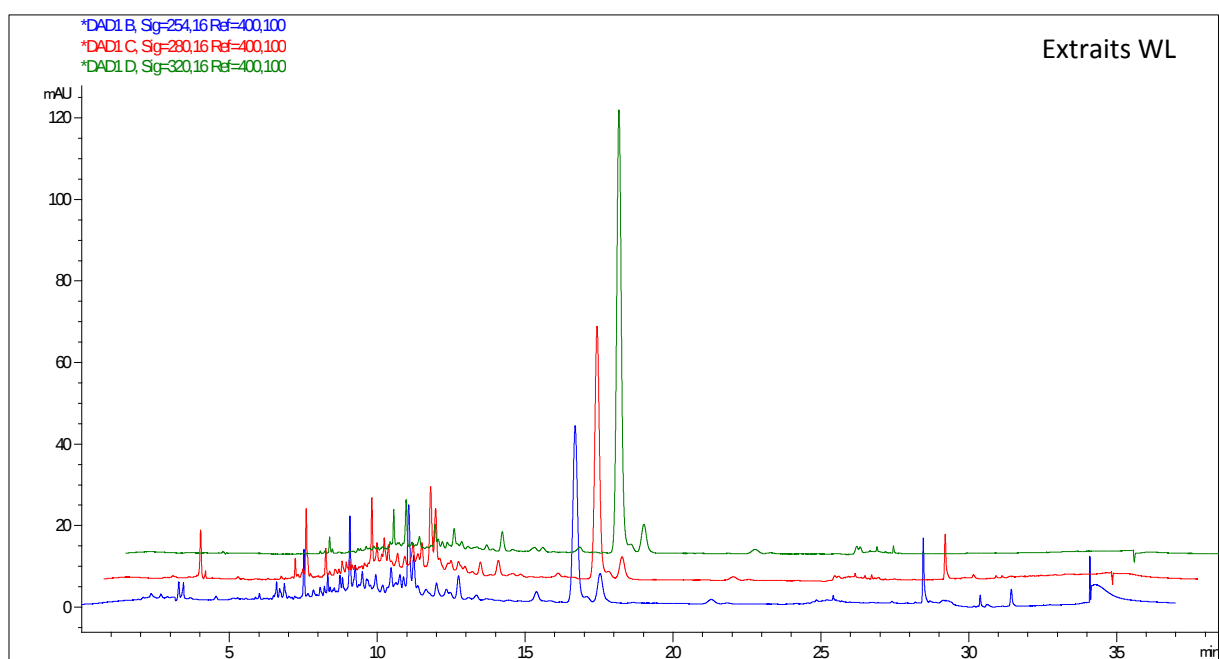
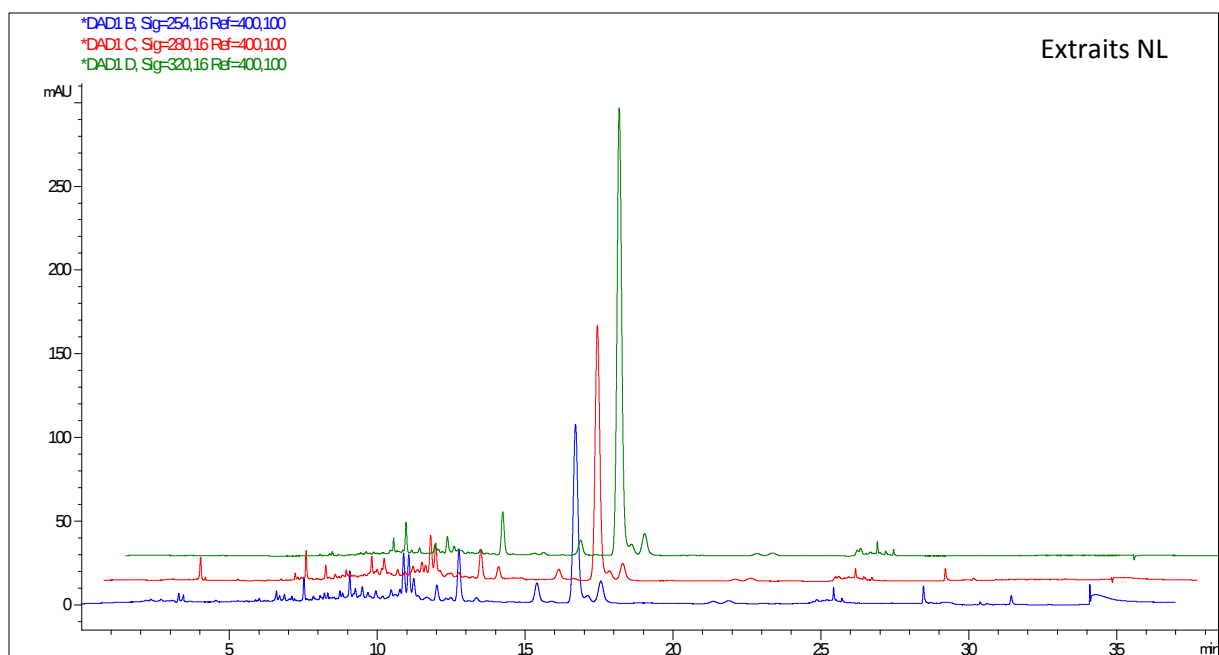
Figure 67 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d'*H. foertherianum* préparés à partir de feuilles collectées à différentes stations de l'île de Tetiaroa. Les échantillons, pour lesquels une différence significative de teneurs est observée ($p < 0,05$), sont indiqués avec un astérisque de couleur identique (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$). Les graphiques représentent la médiane encadrée du 1^{er} et 3^{ème} quartile avec les valeurs minimum et maximum.

3.3.2. Composition chimique globale

Les profils obtenus en CLHP-DAD, des extraits regroupés provenant des modalités NO, WO, NL et WL (figure 68), permettent d'orienter le choix des conditions d'analyses en CLHP-SM/SM. Une comparaison de la composition chimique des extraits par rapport à celle de l'extrait étudié au chapitre précédent sera réalisable grâce à ces analyses complémentaires. De plus, des informations supplémentaires à l'empreinte chimique améliorée, réalisée uniquement par CLHP-DAD, pourront être obtenues sur les composés présents. Les analyses CLHP-SM/SM concernant la composition chimique des extraits et la vérification de leur absence d'APs seront réalisées prochainement.

De manière globale, l'intensité de l'absorbance, relative à leur teneur, de l'ensemble des composés représentés sur les chromatogrammes des modalités côté océan/abrité des vents (NO) et côté lagon/abrité des vents (NL) est plus élevée que sur celles des modalités côté océan/exposé aux vents (WO) et côté lagon/exposé aux vents (WL) (figure 68). Les individus abrités des vents semblent donc produire leurs métabolites secondaires en plus grande quantité que ceux exposés aux vents.





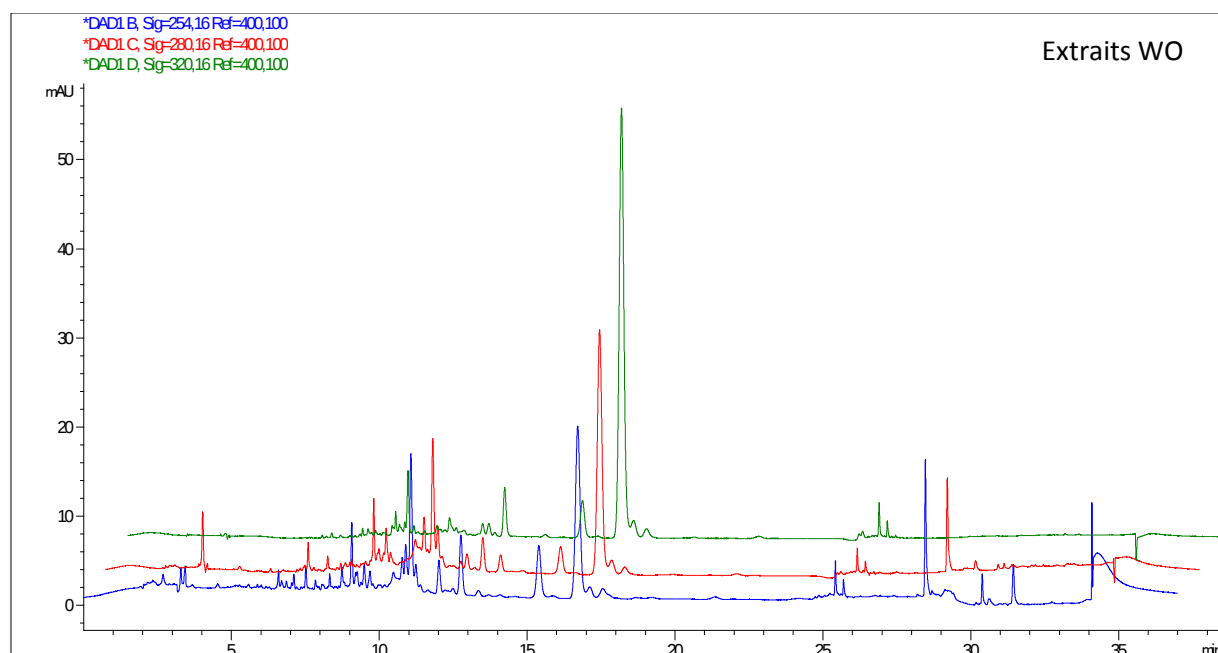


Figure 68 : Chromatogrammes superposés ($\lambda = 254$ (bleu), 280 (rouge) et 320 (vert) nm), temps (min) en fonction de l'absorbance (mAU), d'extraits d'*H. foertherianum* regroupés et obtenus à partir de feuilles sénescents collectées sur des individus côté océan abrités des vents (NO) et exposés aux vents (WO) et côté lagon abrités des vents (NL) et exposés aux vents (WL).

Les extraits, regroupés par modalité, ont aussi été analysés par spectrométrie d'absorption atomique pour leurs teneurs en ions calcium, sodium, magnésium et potassium. Parmi ces quatre ions, les ions sodium sont majoritaires et les ions potassium sont ceux présents en plus faible quantité. De manière générale, les teneurs en ions sont plus importantes pour les échantillons collectés du côté exposés aux vents sauf pour les ions potassium. On observe aussi une différence de la teneur en ions entre les échantillons prélevés côté lagon et ceux côté océan. Seuls les ions sodium sont présents de façon plus importante dans les échantillons prélevés côté océan que dans ceux prélevés côté lagon (tableau 22).

Tableau 22 : Teneurs en ions calcium, magnésium, sodium et potassium des extraits d'*H. foertherianum* obtenus à partir de feuilles sénescents collectées sur des individus, côté océan (NO) et exposés aux vents (WO) et côté lagon (NL) et exposés aux vents (WL), de l'île de Tetiaroa.

Modalité de collecte	Concentration des ions (mg/g d'extrait)			
	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺
NO	11,2	5,3	32,4	5,9
NL	11,0	7,3	23,8	7,4
WL	19,3	16,8	35,9	5,4
WO	13,8	7,1	65,8	2,1
Moyenne $\pm$ EC ^a	13,8 $\pm$ 3,9	9,1 $\pm$ 5,2	39,5 $\pm$ 18,3	5,2 $\pm$ 2,2

^a EC est l'écart-type.

4. Étude des paramètres de collecte, d'extraction et de conservation des feuilles et des extraits

4.1. Introduction

Dans la perspective de la mise en place d'une production industrielle de l'extrait d'*H. foertherianum*, il était nécessaire d'identifier les contraintes locales et les besoins à chaque étape. Tout d'abord, au niveau de la collecte des feuilles, les îles seront sélectionnées parmi celles de l'archipel des Tuamotu en Polynésie française. Il faudra donc mettre en place des filières de collecte sur place et envisager des envois réguliers, par avion ou par bateau, sur Tahiti où l'entreprise Pacific Biotech est implantée. Il était donc indispensable de déterminer (1) la période de l'année la plus propice aux collectes, le type de feuilles à collecter et (2) leur mode de conservation avant l'extraction, qui pourra se faire soit sur la zone de collecte soit à Tahiti (figure 69). Ensuite, il était nécessaire de déterminer (3) le mode d'extraction le plus adapté pour obtenir la quantité la plus importante en principes actifs. Enfin, (5) les modes de conservation de l'extrait avant le conditionnement et (4) du filtrat devaient également être précisés (figure 69).

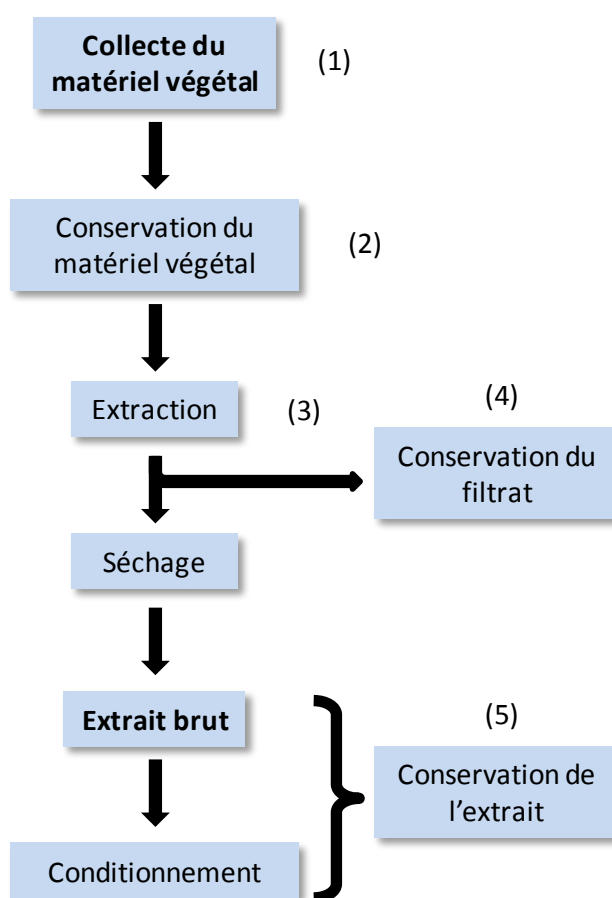


Figure 69 : Étapes du processus de production pour lesquelles des paramètres sont à définir.

4.2. Matériels et méthodes

Pour le suivi saisonnier de la composition chimique d'*H. foertherianum*, les feuilles sénescences d'un pied situé à Arue (Tahiti) ont été collectées tous les deux mois. De novembre 2011 à septembre 2012, les feuilles ont été collectées en lots de 5 feuilles et de novembre 2012 à septembre 2013 en triplicats de 2 feuilles (cf. annexe IV).

Pour l'étude des paramètres de collecte, la variabilité intra-individu a été étudiée, pour cela des feuilles correspondant à différents stades de maturation (matures : vertes, sénescences : jaunies et sénescences tombées au sol : marrons) et à différentes tailles (petite : $14,4 \pm 1,1$ cm (longueur) et $6,0 \pm 0,5$ cm (largeur) ; moyenne : $18,4 \pm 1,8$ cm et $7,1 \pm 0,7$ cm ; grande : $25,7 \pm 1,9$ cm et $10,2 \pm 0,6$ cm) ont été collectées en mars 2012 sur un pied situé à Afaahiti, Presqu'île de Tahiti.

Des feuilles sénescences ont aussi été collectées pour l'étude du mode de conservation du matériel végétal avant extraction (3 jours ou 7 jours séchées à température ambiante i.e. 30°C) et de la stabilité de l'extrait (stocké dans le noir et à température ambiante avant analyse) (cf. annexe IV et tableau 23).

Les feuilles sénescences utilisées pour l'étude (a) de la conservation du filtrat (3 jours à température ambiante ou à 4°C), i.e. de l'extrait avant lyophilisation, (b) du type d'extraction (décoction, infusion ou macération aqueuse) et (c) de la conservation du matériel végétal (-80°C, -20°C ou 4°C) ont toutes été collectées sur le même pied mais en décembre 2012 (cf. annexe IV et tableau 23).

Enfin, la décoction a aussi été comparée à la macération dans de l'éthanol 60° pendant une semaine et à une extraction à reflux dans de l'éthanol à 60° pendant 30 min. Pour chaque méthode d'extraction, deux feuilles sénescences ont été collectées sur un pied situé à Arue (Tahiti) en septembre 2013 (cf. annexe IV et tableau 23).

Dans le but d'évaluer l'impact de la lyophilisation sur les teneurs en AR et en AC de l'extrait, des feuilles sénescences lyophilisées, rapidement après la collecte, de quatre îles de Polynésie française (HfMat1111, HfTa411c, HfTi1111 et HfA312) ont été stockées à 4°C dans un sachet hermétique avant leur extraction et leur analyse (cf. chap. 3 tableau 9).

La préparation des extraits a été effectuée comme décrite dans le paragraphe 2.1. du chapitre 3, leur analyse par CLHP-DAD comme indiquée dans le paragraphe 2.3. du chapitre 3 et leurs teneurs en AR et en AC ont été calculées selon la méthode décrite au paragraphe 3.2. du chapitre 3.

Tableau 23 : Récapitulatif des paramètres étudiés pour les étapes du processus de production.

	Étape	Paramètres	Date de collecte	Lieu de collecte
(1)	Collecte du matériel végétal	maturation	19/03/2012	Presqu'île de Tahiti
		taille	19/03/2012	Presqu'île de Tahiti
(2)	Conservation du matériel végétal	séchage	19/03/2012	Presqu'île de Tahiti
		congélation	04/12/2012	Presqu'île de Tahiti
		lyophilisation	cf. chap. 3 tableau 9	cf. chap. 3 tableau 9
(3)	Extraction	aqueuse	04/12/2012	Presqu'île de Tahiti
		éthanolique	09/09/2013	Tahiti
(4)	Conservation du filtrat	température	04/12/2012	Presqu'île de Tahiti
(5)	Conservation de l'extrait	stockage	19/03/2012	Presqu'île de Tahiti

Quatre extraits ou cinq feuilles au minimum ont été analysés indépendamment pour chaque condition et des tests statistiques, réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, San Diego, Californie) ont été utilisés pour comparer les résultats obtenus. Afin de déterminer si les résultats étaient statistiquement différents, un test de normalité a été appliqué avec Shapiro-Wilk, d'Agostino et Pearson et Kolmogorov-Smirnov. Puis, si la distribution était normale, une ANOVA à un facteur a été réalisée avec le post-test Dunnett, sinon le test de Kruskal-Wallis (post-test Dunn) (Motulsky, 2010) a été réalisé pour comparer la réponse des différentes conditions testées avec un seuil de significativité à $p < 0,05$.

Pour la comparaison des extraits provenant de feuilles lyophilisées et de feuilles fraîches, l'analyse statistique a été réalisée avec le test de Student si les distributions suivaient une loi normale ou avec le test de Wilcoxon (Motulsky, 2010) si elles ne suivaient pas une loi normale. Le seuil de significativité retenu est $p < 0,05$ de manière bilatérale.

4.3. Résultats

4.3.1. Suivi saisonnier des teneurs en AR et en AC des extraits

Le suivi de la teneur en AR sur deux ans de l'extrait de feuilles d'un pied d'*H. foertherianum* de Tahiti (figure 70 A) a montré que la production en AR n'était pas significativement différente de mars à novembre, avec une moyenne sur 2 ans de $9,8 \text{ mg/g} \pm 3,2 \text{ mg/g}$. Cependant, une chute de la production en janvier a été observée avec des teneurs retrouvées dans les feuilles à moins de 5 mg/g d'extrait. La production d'AC a été constante tout au long de l'année avec une moyenne de $0,15 \text{ mg/g} \pm 0,05 \text{ mg/g}$ (figure 70 B). Les teneurs en AR et en AC ne semblaient pas être corrélées avec la température ambiante ni avec l'humidité relative (moyennes mensuelles relevées à Faa'a (Tahiti), d'après le département des sciences atmosphériques de l'université du Wyoming, <weather.uwyo.edu/upperair/sounding.html>) (figure 70 A et B).

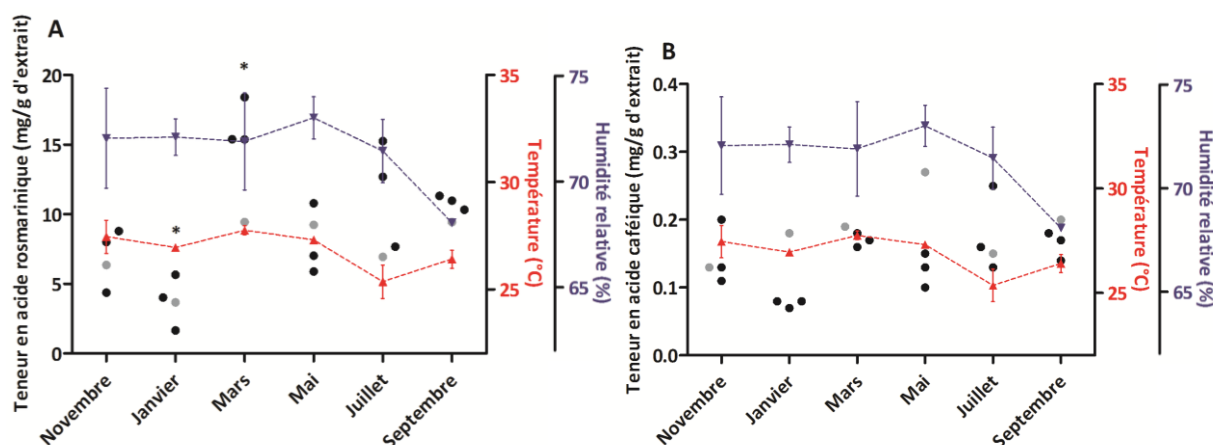


Figure 70 : Suivi saisonnier sur 2 ans des teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d'*H. foertherianum*. En gris sont représentés les échantillons collectés de novembre 2011 à septembre 2012 et en noir ceux de novembre 2012 à septembre 2013. Les échantillons, pour lesquels une différence significative de teneurs est observée ($p < 0,05$), sont indiqués avec un astérisque de couleur identique (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$).

4.3.2. Maturation et dimension des feuilles à la collecte

La teneur en AC de l'extrait d'*H. foertherianum* était constante quelque soit la maturité de la feuille utilisée pour la décoction (figure 71 B). En revanche, la teneur en AR de l'extrait d'*H. foertherianum* de feuilles sénescentes tombées au sol était significativement différente, environ 6 fois plus faible, de celle des feuilles matures et sénescentes (figure 71 A).

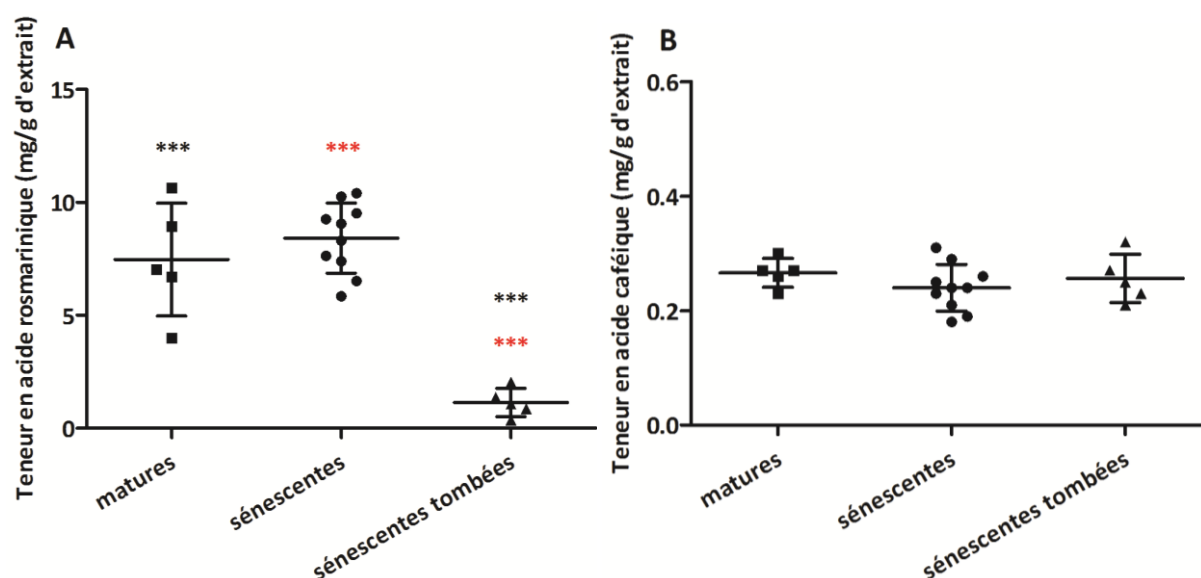


Figure 71 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d'*H. foertherianum* préparés à partir de feuilles matures, sénescentes et sénescentes tombées au sol. Les échantillons, pour lesquels une différence significative de teneurs est observée ($p < 0,05$), sont indiqués avec un astérisque de couleur identique (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$). La moyenne $\pm$ l'écart-type est représentée.

La taille des feuilles sénescentes collectées n'a pas eu d'influence sur la teneur en AR des extraits (figure 72 A). En revanche, la teneur en AC dans les moyennes et grandes feuilles était significativement plus élevée que dans les petites feuilles (figure 72 B).

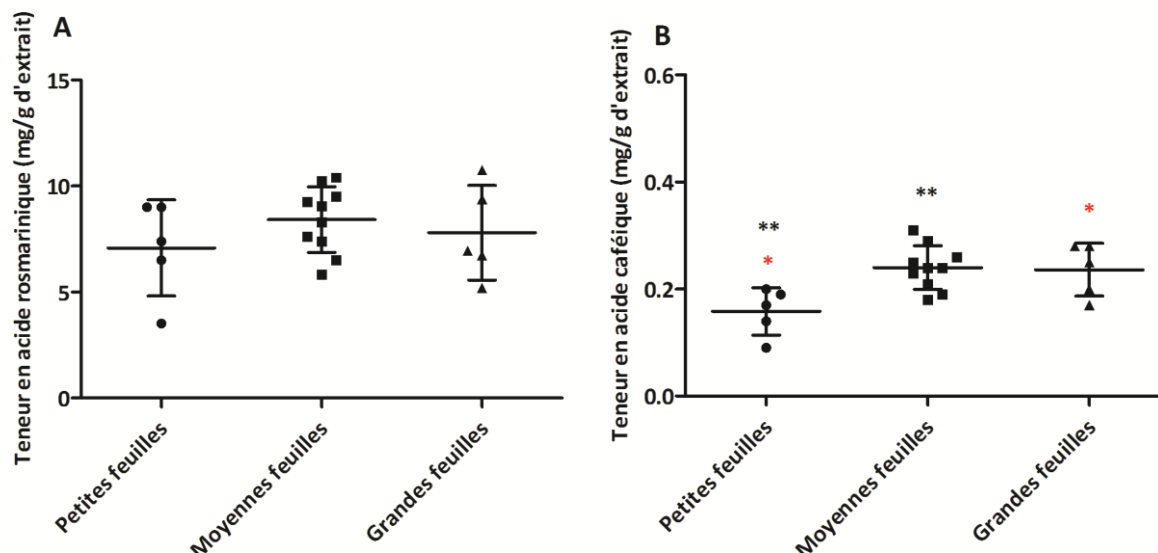


Figure 72 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d'*H. foertherianum* préparés à partir de feuilles sénescentes de petite, moyenne et grande taille. Les échantillons, pour lesquels une différence significative de teneurs est observée ($p < 0,05$), sont indiqués avec un astérisque de couleur identique (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$). La moyenne $\pm$ l'écart-type est représentée.

4.3.3. Conservation du matériel végétal avant extraction

La différence de teneur en AR entre les feuilles extraites fraîches et les feuilles séchées pendant 3 ou 7 jours à 30°C avant extraction était significative, la teneur en AR des feuilles extraites fraîches étant environ 5 à 10 fois plus élevée (figure 73 A). Pour la teneur en AC, aucune différence significative n'a été observée entre des feuilles extraites fraîches et celles séchées 3 ou 7 jours à 30°C avant extraction (figure 73 B).

La teneur en AR des feuilles conservées 3 jours à -20°C et à 4°C était significativement différente, environ 2 fois plus faible, de celle des feuilles extraites immédiatement après leur collecte. La conservation à -80°C des feuilles n'a cependant pas eu d'effet sur la teneur en AR (figure 74 A). En revanche, la teneur en AC des feuilles est demeurée constante, quelque soit leur température de conservation (figure 74 B).

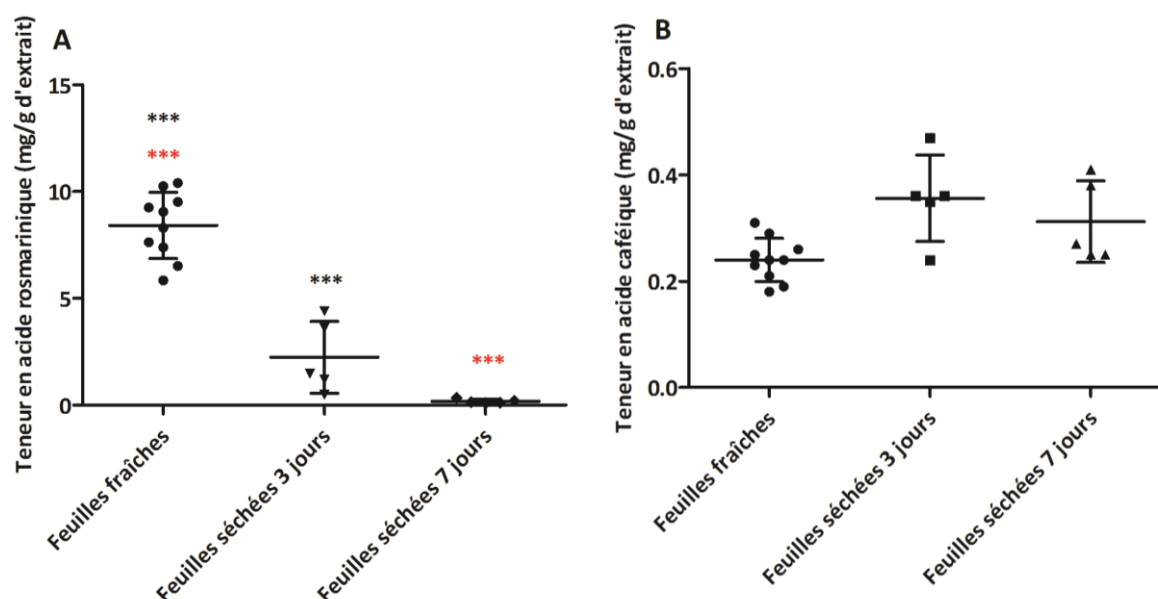


Figure 73 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) d'extraits d'*H. foertherianum* suivant les conditions de séchage des feuilles collectées. Les échantillons, pour lesquels une différence significative de teneurs est observée ($p < 0,05$), sont indiqués avec un astérisque de couleur identique (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$). La moyenne $\pm$ l'écart-type est représentée.

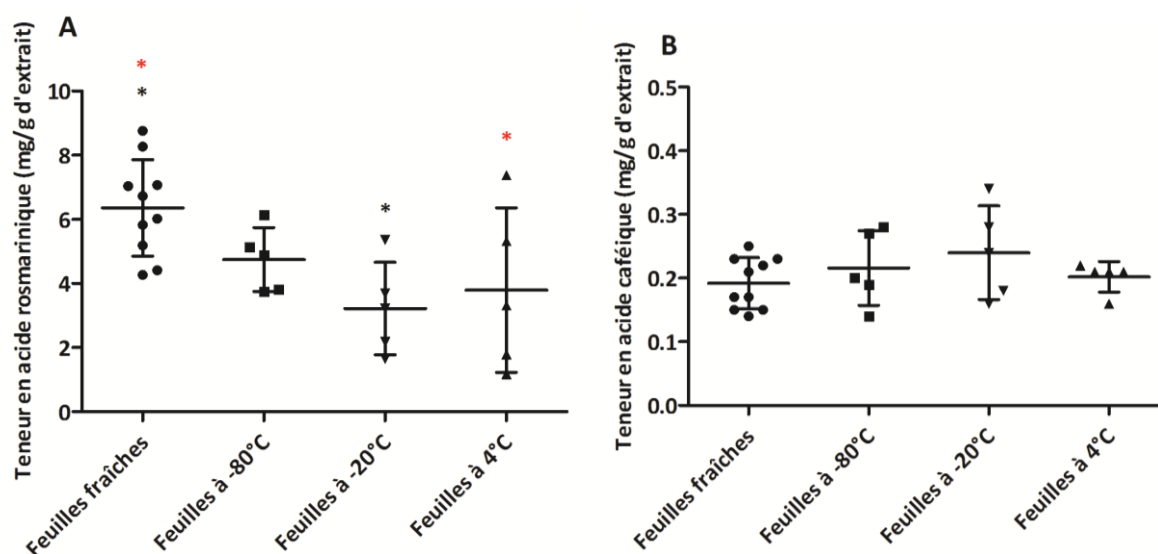


Figure 74 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) d'extraits d'*H. foertherianum* suivant les conditions de conservation au froid des feuilles collectées. Les échantillons, pour lesquels une différence significative de teneurs est observée ($p < 0,05$), sont indiqués avec un astérisque de couleur identique (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$). La moyenne $\pm$ l'écart-type est représentée.

La différence de teneurs en AR et en AC entre des feuilles fraîches préparées en décoction et des feuilles préalablement lyophilisées n'était pas significative (figure 75 A et B). Cependant, une diminution de la teneur en AR dans les feuilles lyophilisées a tout de même pu être notée (figure 75 A).

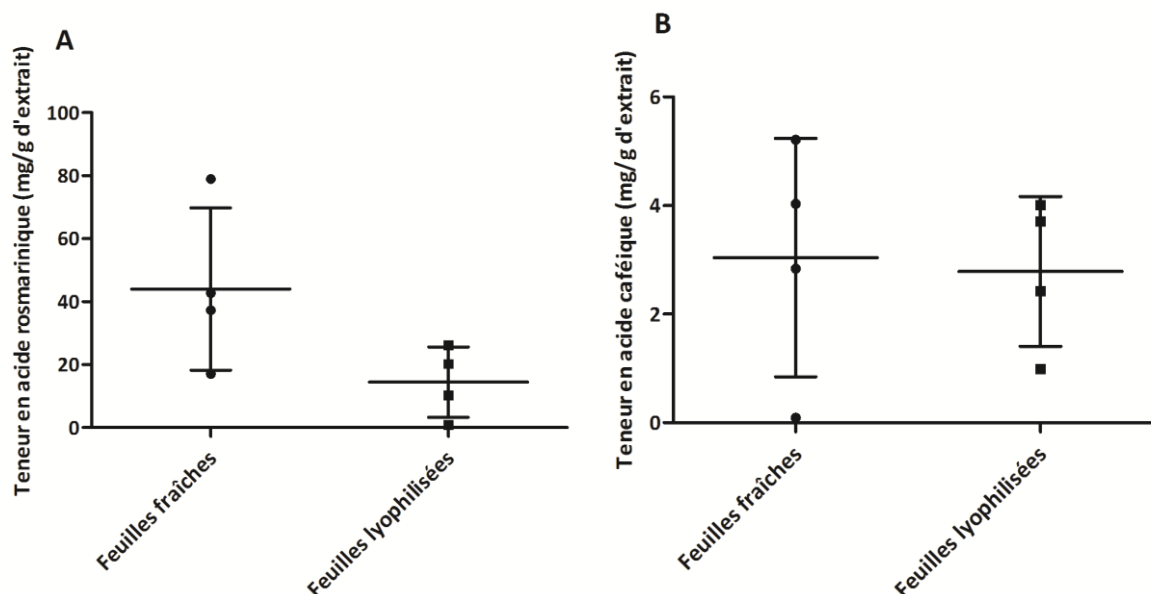


Figure 75 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) d'extraits d'*H. foertherianum* de feuilles fraîches ou lyophilisées avant leur extraction. La moyenne $\pm$ l'écart-type est représentée.

4.3.4. Comparaison des méthodes d'extraction

La méthode d'extraction des feuilles permettant d'obtenir les teneurs les plus élevées à la fois en AR et en AC était la décoction aqueuse. Par comparaison, l'infusion et la macération aqueuses n'ont permis d'obtenir que de faibles quantités, soit environ dix fois moins que les teneurs obtenues par décoction (figure 76).

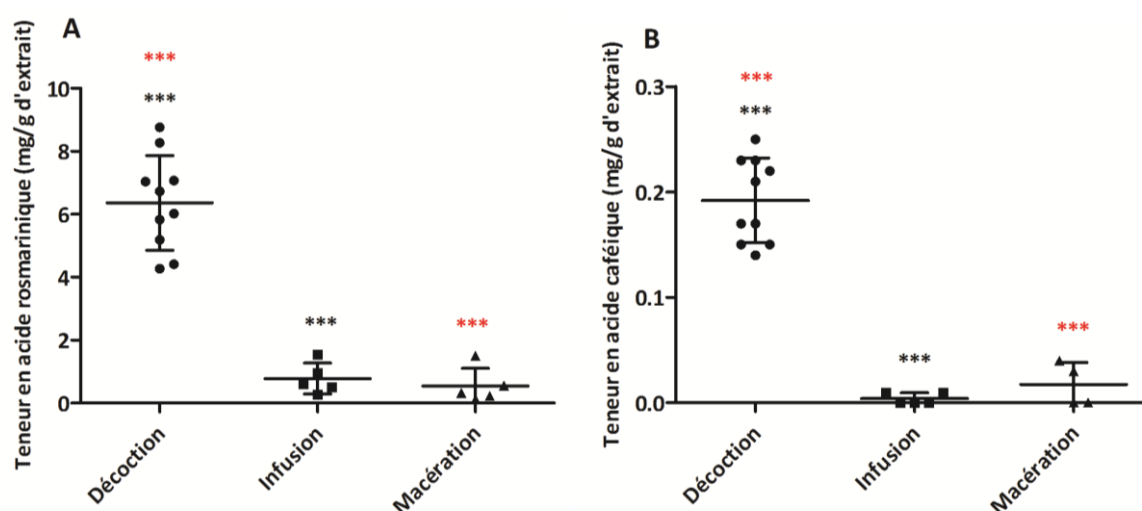


Figure 76 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d'*H. foertherianum* suivant les conditions d'extraction des feuilles collectées. Les échantillons, pour lesquels une différence significative de teneurs est observée ($p < 0,05$), sont indiqués avec un astérisque de couleur identique (* pour $P \leq 0,05$; ** pour $P \leq 0,01$; *** pour $P \leq 0,001$). La moyenne $\pm$ l'écart-type est représentée.

Comparée à la macération dans de l'alcool (72,6 mg d'AR/g d'extrait) ou à l'extraction alcoolique par reflux (69,9 mg/g), c'est la décoction aqueuse des feuilles qui a permis d'obtenir la teneur la plus élevée en AR (111,5 mg/g). Visuellement, les chromatogrammes obtenus pour ces différentes méthodes d'extraction ne présentent pas de différences notables aux 4 longueurs d'onde d'analyse mis à part pour le pic de l'AR et des composés aux temps de rétention 16,9 min, 17,4 min (identifié dans le [chap. 3 parag. 3.5.](#) comme l'acide salvianolique A) et 24,8 min (identifié comme l'acide isosalvianolique C) qui sont présents en quantité plus importante dans l'extrait obtenu par décoction ([figure 77](#)).

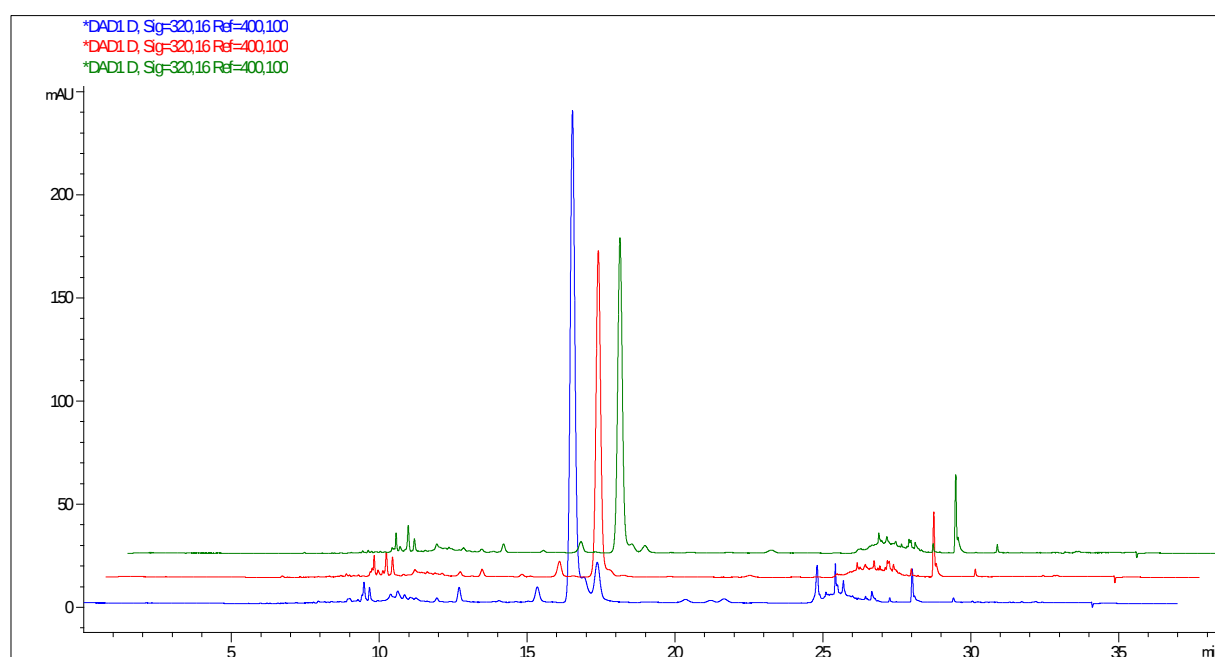


Figure 77 : Chromatogrammes superposés ($\lambda = 320$ nm), temps (min) en fonction de l'absorbance (mAU), d'extraits d'*H. foertherianum* obtenus par décoction (bleu), par macération dans de l'éthanol à 60° (rouge) et par reflux (vert).

4.3.5. Conservation du filtrat et du lyophilisat

Les teneurs en AR et en AC de l'extrait d'*H. foertherianum* avant lyophilisation ont été comparées aux teneurs obtenues après une conservation du filtrat 3 jours à température ambiante ou à 4°C et aux teneurs du filtrat lyophilisé. Les résultats obtenus indiquent que le filtrat peut se conserver indifféremment à 4°C ou à température ambiante pendant 3 jours, sans que ses teneurs en principes actifs en soient modifiées. De même, la lyophilisation n'a pas non plus eu d'impact majeur sur les teneurs en AR et en AC ([figure 78](#)).

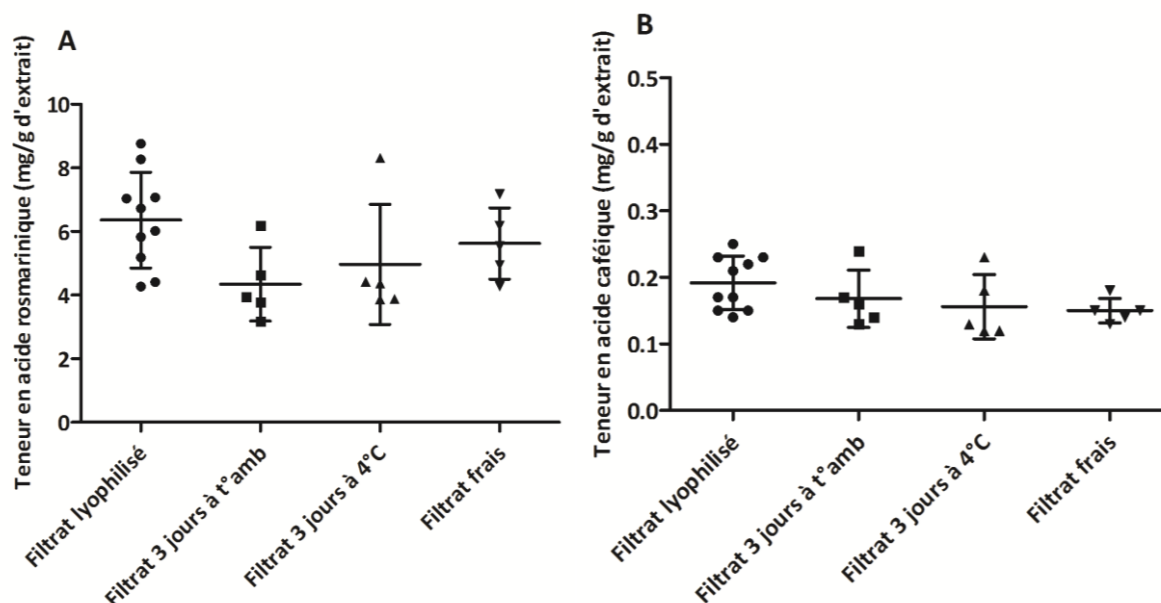


Figure 78 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) des extraits d'*H. foertherianum* suivant les conditions de conservation du filtrat. La moyenne $\pm$ l'écart-type est représentée.

L'extrait d'*H. foertherianum* ($n = 5$) a été analysé par CLHP-DAD à intervalles réguliers (7 fois) pendant plus de sept mois : ses teneurs en principes actifs se sont avérées stables sur toute cette période (figure 79).

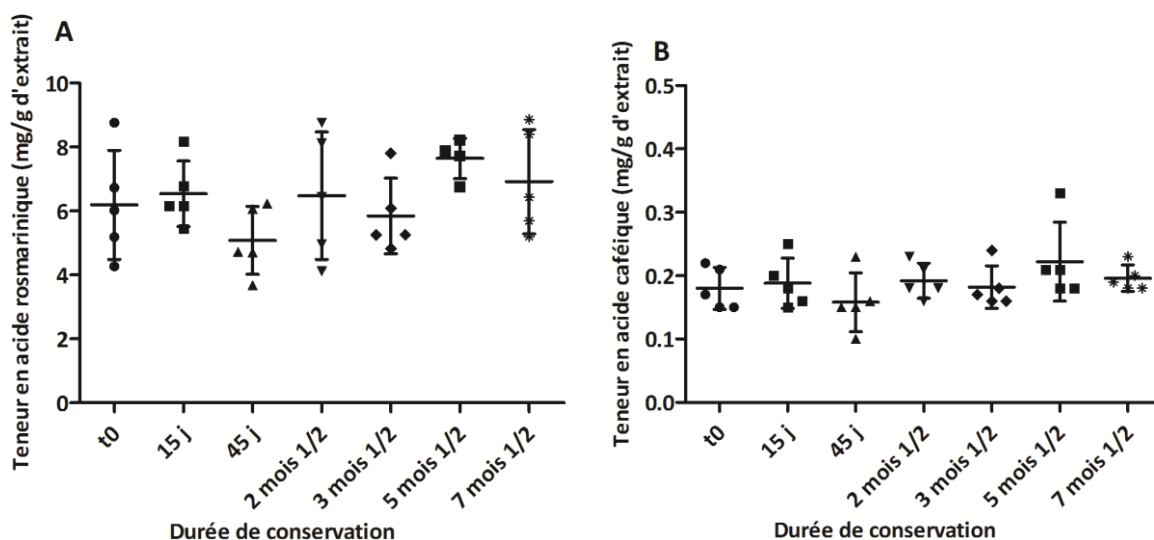


Figure 79 : Teneurs en acide rosmarinique (A) et en acide caféique (B) d'extraits d'*H. foertherianum* suivant la durée de conservation du lyophilisat à l'abri de la lumière et à 27°C. La moyenne $\pm$ l'écart-type est représentée.

5. Discussion

Traditionnellement, il est fait mention de l'utilisation des feuilles sénescents ou de l'écorce d'*H. foertherianum* comme remède contre le syndrome ciguatérique (Laurent et Amade, 1992). Aujourd'hui, *H. foertherianum* a un statut UICN d'espèce à faible risque et à faible préoccupation, i.e. de préoccupation mineure quant à la diminution de son aire de répartition ou du nombre de ses individus (World Conservation Monitoring Centre, 1998). Le travail de thèse de Kumar-Roiné (2009) a permis de tester l'activité biologique des feuilles sénescents et de l'écorce d'*H. foertherianum* mais, pour la présente étude, nous avons choisi d'étudier le remède à base de feuilles, qui s'était montré le plus actif, ce qui permet aussi de ne pas mettre en danger la ressource.

Les premiers résultats de l'étude réalisée à Tetiaroa, pour la sélection des zones de collecte à l'échelle d'un atoll, montrent des différences de teneurs en principes actifs suivant les modalités (côté océan contre côté lagon et exposé aux vents contre abrité des vents). Ces différences doivent maintenant être vérifiées sur l'ensemble des composés présents dans l'extrait, et pouvant participer à son activité biologique, grâce aux analyses statistiques réalisées à partir des empreintes chimiques. L'impact des stress environnementaux sur les voies de biosynthèse des métabolites secondaires chez les plantes est connu. Plusieurs études, notamment en Chine, rapportent les différences de composition chimique de plantes collectées dans différentes régions (Tong et al., 2008 ; Zhang et al., 2008 ; Zhang et al., 2011) mais les facteurs environnementaux impliqués ne sont pas vraiment définis.

Au cours de notre étude, des différences entre les teneurs en ions des extraits ont aussi été observées selon leurs zones de collecte. Les résultats sont globalement comparables à ceux obtenus sur un extrait de Nouvelle-Calédonie car les proportions des teneurs des différents ions sont similaires. Dans les deux cas, la présence des ions sodium est majoritaire alors que les ions potassium sont ceux présents en plus faible quantité. En effet, les analyses des principaux ions présents dans un extrait d'*H. foertherianum* de Nouvelle-Calédonie ont révélé des teneurs en ions calcium de 26,4 mg/g d'extrait, en ions magnésium de 3,7 mg/g, en ions sodium de 33,2 mg/g et en ions potassium de 1,7 mg/g (com. pers. Kumar-Roiné).

Des études sur le vin (Frías et al., 2001) ou le miel (González Paramás et al., 2000) montrent qu'il est possible de classer les échantillons en fonction de leur région d'origine suivant leurs teneurs en ions. De même, chez *Arabidopsis thaliana* la teneur en ions sodium varie entre 329 et 4868 mg/kg selon son lieu de collecte (Baxter et al., 2010). Chez l'halophyte *Atriplex griffithii* var. *stocksii*, on observe que plus la plante est en milieu salin (concentration élevée en NaCl), plus la quantité d'ions sodium accumulée dans les feuilles est élevée alors que les quantités d'ions potassium, magnésium et calcium diminuent. La plupart des halophytes utilise l'accumulation

contrôlée et la séquestration des ions inorganiques comme un mécanisme de base pour ajuster le potentiel osmotique de leur tissus internes à la salinité extérieure. En général les ions potassium sont accumulés en réponse à la faible humidité du sol et les ions sodium sont accumulés sous des conditions salines (Khan et al., 2000). Les fortes valeurs des teneurs en ions sodium, relevées chez *H. foertherianum* pour la modalité « exposé aux vents et côté océan », concordent avec le développement des individus en milieu salin et correspondent aux plus faibles teneurs en principes actifs. Au contraire, chez le soja en culture, le stress provoqué par les sels induit une augmentation de la teneur en acide caféique (Lu et al., 2013).

Aucune tendance particulière relative à la variation de la production d'AR et d'AC par *H. foertherianum* selon la saison de collecte n'a été observée. Les résultats ne semblent pas être corrélés avec les températures et l'humidité relative enregistrées sur Tahiti ce qui correspondrait à la phénologie d'*H. foertherianum* qui produit des fruits et des fleurs toute l'année. Afin d'assurer la production d'un extrait de qualité d'*H. foertherianum* contenant la teneur la plus élevée en AR, et étant donné sa diminution au mois de janvier, il serait judicieux de ne pas collecter de feuilles à cette période de l'année. Il est toutefois à noter que, pour des raisons pratiques, les collectes pour cette étude ont été réalisées à Tahiti, île haute, alors que les zones de collecte des feuilles d'*H. foertherianum* pour la production d'un extrait seront préférentiellement des atolls des Tuamotu. Par conséquent, il serait intéressant de conduire une étude saisonnière sur un atoll afin de vérifier si la production en AR et en AC est aussi quasi-constante tout au long de l'année. À l'inverse, les études réalisées sur des plantes cultivées en région tempérée montrent une différence marquée dans la production d'AR entre les saisons. Ainsi chez *Melittis melissophyllum* L., ou la mélitte à feuilles de mélisse, la production d'acides phénoliques est faible au début de la période végétative de la plante puis augmente durant l'été jusqu'à atteindre un maximum à la fin du cycle phénologique (Skrzypczak-Pietraszek et Pietraszek, 2012). Chez *Mentha spicata* L. (menthe verte) et *Mentha piperita* L. (menthe poivrée), la récolte doit se faire pendant la phase végétative, avant la floraison, pour obtenir une teneur maximale en AR (Fletcher et al., 2010). L'exposition à la chaleur semble être, pour la menthe verte, un stress qui entraîne une diminution de la quantité d'AR, potentiellement due à un changement d'activité biologique pour les enzymes le synthétisant et l'exposition à l'humidité, un critère nécessaire à sa production à des teneurs élevées (Fletcher et al., 2005).

La taille des feuilles n'a pas d'influence sur la teneur en AR mais les feuilles de plus grande taille contiennent plus d'AC. Les feuilles matures ou sénescents contiennent plus de principes actifs que les feuilles sénescents tombées au sol. Traditionnellement, ce sont les feuilles sénescents jaunies qui sont utilisées pour le traitement anticiguatérique et leur composition chimique et leur activité biologique ont été étudiées aux chapitres précédents. Afin d'obtenir un extrait riche en

principes actifs, d'après les résultats exposés précédemment, il est donc conseillé de collecter des feuilles sénescentes de taille moyenne à grande. Del Baño et al. (2003) ont étudié la variation en AR dans les feuilles, fleurs et tiges durant la croissance de *Rosmarinus officinalis*. La teneur en AR a atteint un maximum lors des premières périodes de croissance des feuilles (2,5 % du poids sec) puis diminué d'un facteur 5. Elle s'est ensuite stabilisée jusqu'à la floraison pour diminuer ensuite d'au moins encore un facteur 2.

Après la collecte, le mode de conservation des feuilles avant leur utilisation peut s'avérer critique. En effet, il peut affecter la qualité des plantes en altérant leur composition chimique. Le séchage est utile puisqu'il permet de limiter la croissance et la reproduction de micro-organismes et de réduire le poids de la matière première pour un transport et un stockage moins coûteux (Lin et al., 2011). Il permet aussi de limiter les réactions enzymatiques qui nécessitent des molécules d'eau mais peut induire une dégradation des composés thermolabiles (Keinanen et al., 1996). Dans cette étude, nous avons observé que la teneur en AC des extraits n'était pas modifiée en fonction de la nature des feuilles extraites (fraîches ou sèches). Par contre, pour l'AR, les feuilles collectées doivent être extraites le plus rapidement possible. En effet, plus les feuilles sont laissées à sécher à 30°C, plus la teneur en AR diminue. Plusieurs études s'intéressent à la modification de la composition chimique des plantes lors de l'étape de séchage. Il a été montré, chez la menthe, le romarin et *Echinacea purpurea* (L.) Moench, que la température de séchage était un paramètre important et que plus la température était élevée, plus on observait de dégradations de composés (Fletcher et al., 2005 ; Lin et al., 2011 ; Mulinacci et al., 2011). Cette dégradation peut s'expliquer par le fait que la chaleur est un facteur de stress auquel les tissus vont répondre par la mobilisation des composés phénoliques disponibles afin de contrer ce stress, d'où une diminution globale de la teneur en AR par exemple (Fletcher et al., 2005). Les enzymes polyphénol oxydases et peroxydases sont impliquées dans cette dégradation et peuvent être inactivées par une opération de blanchiment à haute température (Lin et al., 2012).

Une autre méthode éventuelle de conservation des feuilles avant leur extraction est la conservation au froid. Elle serait envisageable dans le cas où les feuilles ne pourraient pas être extraites sur le lieu de collecte et devraient être transportées jusqu'à Tahiti et conservées avant leur extraction. Pour la teneur en AC, nous n'avons pas observé de changement entre les feuilles conservées à -80°C, -20°C et 4°C alors que pour la teneur en AR, seule la congélation à -80°C permet de la maintenir au niveau de celle des feuilles fraîches. Des observations similaires ont été rapportées chez d'autres plantes avec toutefois des résultats variables suivant le type de molécules présentes (Chung et al., 2012). Chez le romarin, les feuilles congelées ont aussi une teneur plus faible en AR que dans les feuilles fraîches. L'hypothèse avancée est que les enzymes endogènes, pendant et après la décongélation, oxydent les deux groupements catéchol de l'AR (Mulinacci et al., 2011). Santos et al.

(2014) ont montré qu'un stockage réfrigéré à 3°C de 10 jours induisait une diminution de la concentration des acides hydroxycinnamiques dans la roquette sauvage, la moutarde rouge et plus particulièrement de l'AR dans la menthe. Une alternative au séchage ou à la congélation peut être la lyophilisation qui préserve généralement bien la composition chimique des plantes pour quelques mois (Fletcher et al., 2005 ; Lin et al., 2011 ; Mulinacci et al., 2011). Notre étude n'a pas montré d'incidence de la lyophilisation des feuilles sur les teneurs en AR et en AC des extraits d'*H. foertherianum*. Cependant, Lin et al. (2011) ont noté, pour un stockage au-delà de trois mois, une diminution de la quantité des dérivés d'AC chez *Echinacea purpurea*, qui peut être due à la polyphénol oxydase. La technique de lyophilisation a aussi un coût beaucoup plus élevé que les séchages à froid ou à chaud (Lin et al., 2011) et apparaît comme non réalisable économiquement sur les différents sites de collecte. De plus, ses effets sur les divers constituants des plantes restent à étudier (Abascal et al., 2005).

En ce qui concerne l'extraction des feuilles d'*H. foertherianum*, la décoction, utilisée traditionnellement, a permis d'obtenir les teneurs les plus élevées en AR et en AC et les extraits obtenus ne contenaient pas d'alcaloïdes pyrrolizidiniques en quantité détectable (cf. chap. 3 parag. 3.4.). Des essais ont été réalisés avec des extractions hydro-alcooliques en vue d'améliorer la conservation du filtrat et de faciliter l'étape de séchage de l'extrait. Les profils obtenus par chromatographie liquide sont *a priori* les mêmes que pour la décoction aqueuse, cependant d'autres molécules peuvent potentiellement être extraites et leur innocuité nécessite d'être vérifiée. Mulinacci et al. (2011) ont montré qu'une extraction à 100 % d'éthanol extrayait une quantité plus importante d'AR des feuilles de romarin qu'une extraction hydro-alcoolique (50 : 50). Cependant, selon la plante utilisée et les molécules d'intérêt recherchées, la composition des solvants d'extraction variera.

Dans le cas où une extraction directement sur le lieu de collecte serait envisagée, le filtrat devra être conservé avant et pendant son transport sur Tahiti. Le filtrat peut être conservé, sans modification de ses teneurs en principes actifs, au moins 3 jours à température ambiante ou à 4°C et sa lyophilisation n'a pas non plus de conséquence notable sur les teneurs en principes actifs de l'extrait. L'extrait lyophilisé est stable au minimum sept mois à température ambiante et à l'abri de la lumière.

6. Étapes envisagées pour la production d'extraits d'*H. foertherianum*

Différents rapports de l'OMS (*Good manufacturing practices for herbal medicines*), de la FDA (*Guidance for industry: Botanical drug products*), de l'EMA (*Herbal medicinal products*) et de la Commission européenne (*Good manufacturing practice: Medicinal products for human and*

veterinary use) ont émis des recommandations quant aux bonnes pratiques relatives à chaque étape de la production de produits dérivés des plantes médicinales (EMA, 1998 ; FDA, 2004 ; OMS, 2007 ; Commission européenne, 2008).

L'avantage de collecter des plantes sauvages, et non cultivées, est de limiter les dépenses liées aux infrastructures de culture. Le problème principal avec ce type de collecte est le risque de substitution par une autre plante morphologiquement proche (Lubbe et Verpoorte, 2011). *H. foertherianum* est, de par la morphologie de ses individus, facilement reconnaissable mais une vérification de l'identité des individus avant la collecte de leurs feuilles serait nécessaire. L'inconvénient d'une extraction des feuilles sur le lieu de collecte, puis d'un envoi du filtrat sur Tahiti à Pacific Biotech, est que la vérification de l'identification des feuilles utilisées ne sera plus possible. Dans le cas où plusieurs zones de collecte seraient envisagées, une centralisation de toutes les feuilles sur le lieu d'extraction sera indispensable pour garantir un contrôle qualité de la matière première. Par ailleurs, les conditions d'hygiène pendant la collecte et le traitement de la plante doivent permettre d'éviter les contaminations, bactériennes par exemple (Lubbe et Verpoorte, 2011). Les contaminants peuvent aussi être de type chimique comme les métaux lourds ou les pesticides, ce qui implique de mettre en place un contrôle qualité sur la chaîne de production (Mosihuzzaman et Choudhary, 2008).

En ce qui concerne la collecte des feuilles d'*H. foertherianum*, il reste à déterminer la quantité de feuilles potentiellement collectable par pied et donc la quantité d'extraits productibles pour une zone de collecte contenant un nombre d'individus donné. On sait déjà d'après notre étude que 100 g de feuilles donnent $4,3 \text{ g} \pm 1,2 \text{ g}$ d'extrait (cf. chap. 3) et que les teneurs en AR et en AC oscillent respectivement entre 0,7 et 164 mg/g d'extrait et 0 et 6 mg/g d'extrait suivant le lieu de collecte.

Après la collecte, les feuilles d'*H. foertherianum*, après lavage, devront être extraites ou à défaut congelées le plus rapidement possible avant extraction, afin d'éviter toute dégradation de leur composition chimique (figure 80).

Différents types d'extraction sont actuellement utilisés en industrie pour la production d'extraits à base de plantes comme l'extraction Soxhlet ou en réacteur batch comme par exemple la macération. L'extraction Soxhlet est une méthode d'extraction solide-liquide conventionnelle qui est aujourd'hui un modèle utilisé pour la comparaison de nouvelles méthodes d'extraction alternatives. Elle se déroule à haute température, ce qui peut entraîner la dégradation des composés chimiques de la matière première (Wang et Weller, 2006). Les défauts majeurs des méthodes d'extraction conventionnelles sont les temps d'extraction longs, le coût élevé des solvants de haute pureté, l'évaporation nécessaire d'une grande quantité de solvant, et le risque de décomposition thermique de certains composés (Luque de Castro et García-Ayuso, 1998). Des techniques alternatives ont donc

été développées, dont l'extraction en fluide supercritique (SFE) qui utilise du dioxyde de carbone, l'extraction liquide sous pression (PLE) aussi appelée extraction accélérée par solvant (ASE), et l'extraction assistée aux ultrasons (UAE) (Wijngaard et al., 2012). Ces techniques sont considérées comme « vertes » puisqu'elles correspondent aux standards établis par l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (Azmir et al., 2013). La SFE est utilisée depuis plusieurs années, notamment pour la préparation industrielle de café décaféiné (Perrut, 2000). Ses avantages sont entre autres qu'elle s'effectue à température ambiante, que le recyclage et la réutilisation du fluide supercritique est possible et que la séparation du soluté et du solvant est rapide par dépressurisation du fluide supercritique (Azmir et al., 2013). La PLE est utilisée à de hautes pressions et hautes températures (Garcia-Salas et al., 2010) et, à l'instar de l'extraction Soxhlet, peut conduire à la dégradation de composés de la matière première. Cependant cette technique est plus rapide et consomme moins de solvants que l'extraction Soxhlet (Oniszczuk et Hawryl, 2011). Quant à l'UAE, elle rend plus facile l'extraction des composés organiques et inorganiques de la plante grâce à l'énergie ultrasonore (Herrera et de Castro, 2005), pouvant aussi être couplée à d'autres méthodes d'extraction plus conventionnelles telle que l'extraction Soxhlet (Vinatoru, 2001).

L'efficacité de l'extraction dépend aussi du choix des solvants (Wang et Weller, 2006). L'affinité entre les solvants et le soluté, leur toxicité pour l'environnement et pour l'homme et la faisabilité financière doivent être prises en compte (Azmir et al., 2013). Par exemple, l'extraction de l'AR à partir de *Melissa officinalis* L., ou de la mélisse, est plus efficace avec de l'éthanol qu'avec du méthanol et le solvant idéal est un mélange éthanol-eau en proportion 1 : 1 (Penchev et al., 2010). La difficulté avec l'utilisation de l'eau est que son point d'ébullition est élevé et qu'il est donc difficile de sécher les extraits obtenus mais son coût est le moins élevé.

Les feuilles d'*H. foertherianum* étant traditionnellement extraites par décoction, i.e. mises à bouillir dans de l'eau, l'extraction Soxhlet serait envisageable et ne devrait pas entraîner la dégradation des composés d'intérêt de l'extrait. L'installation d'un extracteur Soxhlet serait aussi moins coûteuse par rapport à celle des nouvelles techniques. Une extraction avec un mélange éthanol-eau serait préférable si l'extraction Soxhlet est retenue afin de faciliter l'étape de séchage de l'extrait (figure 80). L'idéal serait quand même d'extraire les feuilles d'*H. foertherianum* à l'eau afin d'éviter les contraintes industrielles de sécurité lors de l'utilisation de solvants à grande échelle.

Le séchage du filtrat pourra se faire par différentes techniques, largement utilisées dans l'industrie des plantes, soit par lyophilisation, ce qui permettrait d'utiliser l'eau uniquement comme solvant d'extraction, soit par séchage sous vide permettant des températures de séchage très basses (SPX, 2013).

Les résultats présentés au parag. 4.3.5. ont montré que la lyophilisation du filtrat, issu de la décoction de feuilles d'*H. foertherianum*, avait un impact négligeable sur les teneurs en AR et en AC

de l'extrait. De plus, l'extrait était stable plusieurs mois, de ce fait ces deux techniques de séchage sont envisageables (figure 80).

Le conditionnement le plus adapté pour les extraits secs d'*H. foertherianum* semble être les gélules ou les sachets-dose dont le contenu est à dissoudre, qui permettent de doser précisément la quantité d'extrait et, partant, la teneur en principes actifs dans le produit final (figure 80). Il peut aussi être envisagé de conditionner l'extrait sous forme d'ampoules, ce qui permettrait d'éviter l'étape de séchage du filtrat.

La société Pacific Biotech dispose déjà d'un lyophilisateur de grandes dimensions, ce qui éviterait les coûts d'investissement pour d'autres appareillages et faciliterait le conditionnement d'un extrait sec chimiquement stable dans des gélules. Des contraintes supplémentaires se posent avec la production d'un extrait liquide sous forme d'ampoules, notamment pour sa conservation, ce qui rajouterait une étape d'autoclavage, de filtration ou de rajout de conservateurs pour empêcher la dégradation des composés et la présence bactérienne.

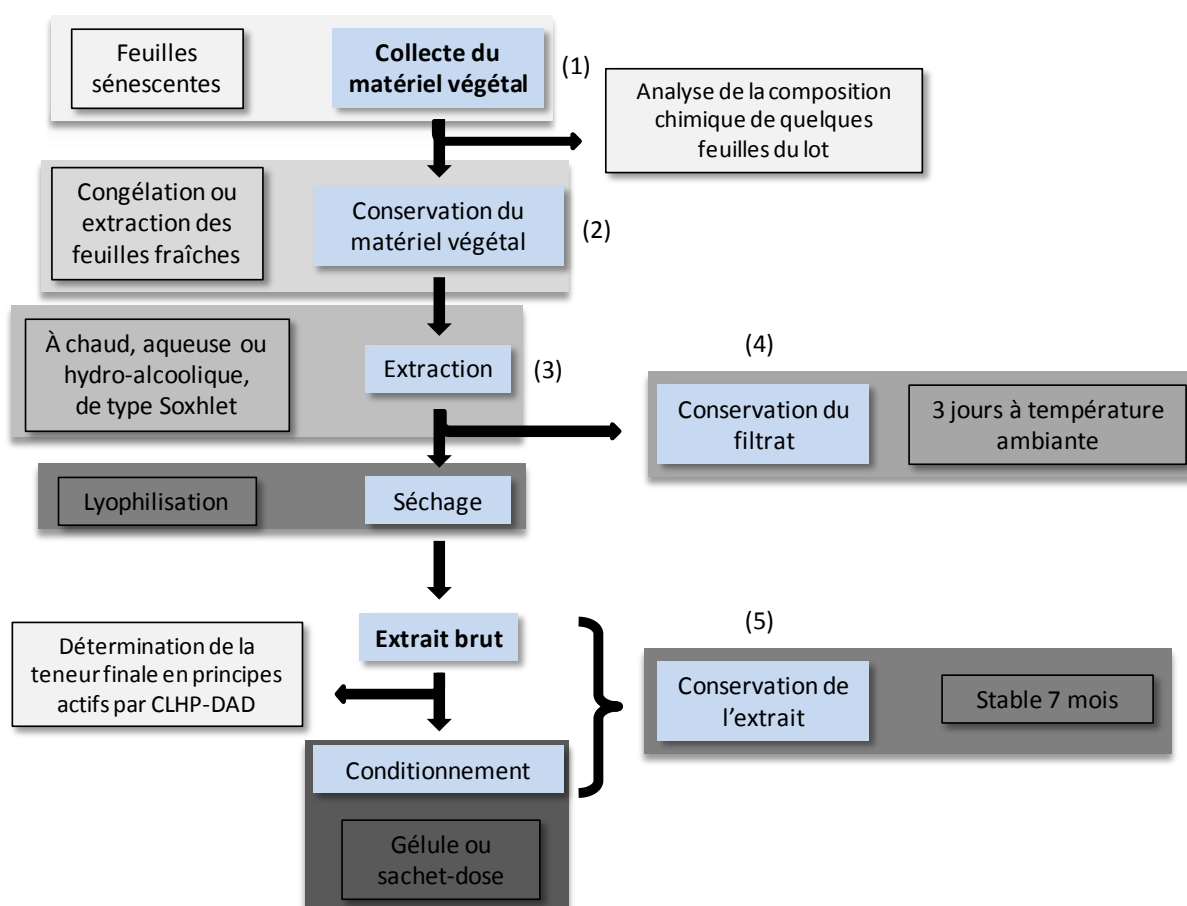


Figure 80 : Étapes envisagées pour la production d'un extrait d'*H. foertherianum*.

Un autre aspect très important lors de la production d'extraits préparés à partir de plantes collectées dans la nature, souligné par le *Guidelines for Good Agricultural and Wild Collection Practices for Medicinal and Aromatic Plants* (GACP-MAP), est leur traçabilité. Les lots de feuilles collectées doivent être étiquetés avec les informations relatives à la collecte et à leur transformation, et il faut veiller à ce que ce document soit transmis du collecteur au transformateur (EUROPAM, 2010).

7. Conclusion

Des paramètres nécessaires à l'élaboration d'une chaîne de production d'un extrait d'*H. foertherianum* ont été étudiés. Les zones de collecte devront être choisies attentivement en fonction des critères environnementaux tels que la présence des individus côté lagon ou océan. L'importance de ces critères par rapport à l'ensemble des composés chimiques de l'extrait reste encore à déterminer. Brièvement, les feuilles jaunies et de taille moyenne à grande peuvent être collectées toute l'année sauf en période chaude et humide. Dans l'idéal, l'extraction, de type décoction, doit être réalisée rapidement ou après conservation des feuilles à -80°C. Le filtrat peut être conservé quelques jours alors que l'extrait lyophilisé peut être conservé plusieurs mois.

Dans la perspective de la mise en place d'une installation à l'échelle industrielle, des essais au niveau des étapes d'extraction et de séchage devront être menés à l'échelle pilote afin de vérifier les résultats obtenus en laboratoire.

Conclusion générale et perspectives

Les études présentées dans ce manuscrit ont apporté des éléments de réponse dans le cadre de la perspective de valorisation d'un extrait de feuilles d'*H. foertherianum*, inspiré d'un remède utilisé en médecine traditionnelle du Pacifique.

La zone d'endémie de la ciguatéra, intoxication alimentaire bien connue des populations du Pacifique, s'étend vers les régions plus tempérées du fait de l'acclimatation des *Gambierdiscus spp.*, producteurs des ciguatoxines. Le nombre de cas d'intoxication dans le monde est aujourd'hui estimé entre 50 000 et 500 000 et ne pourra donc qu'augmenter prochainement. Or il n'existe toujours pas de traitements satisfaisants pour soigner les personnes intoxiquées. Au vu des nombreux témoignages positifs des utilisateurs du remède et des résultats obtenus lors des recherches précédentes, l'étude approfondie du remède à base de feuilles sénescents d'*H. foertherianum* s'avérerait indispensable.

Nos travaux ont ainsi permis de confirmer l'activité biologique *in vitro* de l'extrait d'*H. foertherianum* ainsi que de ses principes actifs, les acides rosmarinique et caféique. Leur activité protectrice face aux ciguatoxines a été démontrée sur des cellules neuronales de souris et humaines et semble provenir d'une action « détoxifiante » de l'extrait et de ses principes actifs, qui seraient capables de déloger les ciguatoxines de leur site d'action. L'activité de l'extrait d'*H. foertherianum* s'est révélée plus importante que celle de ses principes actifs seuls. Il est vrai que l'action synergique des composés d'extrait de plante est souvent tenue pour responsable de leur activité car elle permet leur action sur plusieurs cibles thérapeutiques simultanément. Par ailleurs, la synthèse de molécules de structure chimique proche de l'acide rosmarinique permettrait de rechercher les candidats-médicaments les plus actifs, mais le coût de développement d'un tel produit ne permettrait pas une application à court ou moyen terme, contrairement à la valorisation de l'extrait d'*H. foertherianum*.

Des études *in vivo* chez la souris évaluant l'activité biologique de l'extrait aqueux d'*H. foertherianum* sont en cours. Les premiers résultats n'étant pas reproductibles, des expériences supplémentaires seront conduites. Dans l'idéal, l'étape suivante serait de mener des essais cliniques notamment dans le but de connaître la posologie exacte de l'extrait à préparer, pour le moment basée sur des pratiques traditionnelles. Une dose efficace est en effet difficile à définir avec les connaissances actuelles puisque nous avons montré que les teneurs en principes actifs variaient selon la provenance des feuilles collectées. Cependant, la majeure contrainte pour le lancement d'essais cliniques est les frais à engager par les promoteurs, particulièrement concernant les assurances requises pour obtenir une autorisation auprès de l'ANSM.

La connaissance de la composition chimique de la plante a aussi été renforcée par notre étude de l'extrait aqueux, inspiré de la préparation traditionnelle des feuilles sénescents d'*H. foertherianum* par décoction. L'activité biologique de l'extrait dépendant directement de sa concentration en principes actifs, il était indispensable de se doter d'une méthode analytique robuste afin de vérifier leurs teneurs. D'une part, les composés pouvant participer à l'activité biologique de l'extrait d'*H. foertherianum* ont été potentiellement identifiés et d'autre part les alcaloïdes pyrrolizidiniques, composés fortement toxiques, ont été recherchés. Des techniques de CLHP-DAD et CLHP-SM ont donc été utilisées à ces fins. Ces analyses ont révélé la présence de composés phénoliques et terpéniques connus pour leurs propriétés neuroprotectrices ou anti-inflammatoires et susceptibles de participer à l'activité biologique de l'extrait dans le traitement des intoxications ciguatériques. L'innocuité des extraits aqueux a aussi été établie, l'absence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les extraits concordant avec l'absence de témoignages d'une éventuelle hépatotoxicité du remède traditionnel.

La grande variabilité des teneurs en principes actifs suggère un effet fort de l'environnement sur la production des métabolites secondaires d'*H. foertherianum* ou l'existence d'écotypes, qui s'expliquerait par l'évolution génétique des plantes disséminées sur les différents archipels de la Polynésie française. Une étude de type « *barcoding* moléculaire » permettrait d'étudier la diversité génétique des individus d'*H. foertherianum* et de la comparer à la variabilité des teneurs en principes actifs. Si l'existence d'écotypes ou de variétés d'*H. foertherianum* et le lien avec leurs teneurs en principes actifs sont avérés, il sera alors possible de sélectionner ceux dont les feuilles contiennent le plus de principes actifs. Enfin, la connaissance précise des composés présents dans l'extrait passera par la confirmation de leur identification réalisée par correspondance avec des standards commerciaux ou par des techniques spectroscopiques telles que la SM haute résolution et la RMN. La recherche des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les jeunes feuilles et matures, et dans d'autres parties de la plante comme les tiges, l'écorce ou les racines, devra aussi être considérée afin de mieux comprendre leur absence dans les feuilles sénescents.

Dans la perspective de valorisation industrielle de cet extrait de plante, la détermination des conditions optimales de production à l'échelle du laboratoire était nécessaire. En premier lieu, à l'échelle de la Polynésie française puis à l'échelle d'un atoll, les zones de collecte favorables à la production d'un extrait, à hautes teneurs en principes actifs et de ce fait actif dans le traitement des intoxications ciguatériques, ont été déterminées. Ensuite, les paramètres de collecte, d'extraction et de conservation des feuilles et de l'extrait, permettant d'obtenir un extrait à hautes teneurs en principes actifs, ont été définis. Enfin, une réflexion a été menée sur les possibilités d'installation relative à la production à l'échelle industrielle d'un extrait d'*H. foertherianum*.

La ressource devra être quantifiée, par comptage ou télédétection, sur les îles choisies pour la collecte des feuilles sénescents d'*H. foertherianum*. Des essais à l'échelle pilote devront aussi être menés selon les indications dispensées dans ce manuscrit afin de définir le schéma de production de l'extrait d'*H. foertherianum* et de dimensionner les installations. Une possibilité de « filière *tahinu* » pourrait être envisagée avec l'extraction des feuilles sur le lieu de collecte, puis le filtrat serait rapatrié sur Tahiti pour conditionner l'extrait sous forme de gélule ou de sachet-dose et pour doser ses teneurs en principes actifs. Étant donné la variabilité de la teneur en principes actifs dans les extraits, suivant le lieu de collecte des feuilles d'*H. foertherianum*, la nécessité d'un extrait standardisé est avérée.

Un dossier d'autorisation de mise sur le marché pourra être déposé soit à l'ANSM pour commercialiser cet extrait en tant que médicament à base de plantes d'usage traditionnel, soit à la DDCSPP pour commercialiser cet extrait en tant que complément alimentaire. Dans le premier cas, la rédaction d'une monographie de l'usage des feuilles sénescents d'*H. foertherianum* sera nécessaire.

Au final, ces travaux permettront de mettre à la disposition des populations, touchées par la ciguatéra, un extrait de plante à faible coût, dosé en principes actifs et dont l'innocuité soit établie.

Références bibliographiques

Avant-propos et chap. 1 État de l'art

- Abdel-Sattar, E., Maes, L., Salama, M.M., 2010. *In vitro* activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytother. Res.* 24, 1322–1328.
- Abdullah, Y., Schneider, B., Petersen, M., 2008. Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in *Marantaceae* species. *Phytochem. Lett.* 1, 199–203.
- Abraham, W.M., Bourdelais, A.J., Sabater, J.R., Ahmed, A., Lee, T.A., Serebriakov, I., Baden, D.G., 2004. Airway responses to aerosolized brevetoxins in an animal model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 26–34.
- Adelaja, A.A., Ayoola, M., Otulana, J., Akinola, O.B., Olayiwola, A., Ejiwunmi, A., 2008. Evaluation of the histogastroprotective and antimicrobial activities of *Heliotropium Indicum* Linn (Boraginaceae). *Malaysian J. Med. Sci.* 15, 22–30.
- Akowuah, G., Zhari, I., Norhayati, I., Sadikun, A., Khamsah, S., 2004. Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chem.* 87, 559–566.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2008. Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysis* in the Mediterranean Sea. *J. Biol. Res.* 9, 75–82.
- Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A., Nabeshima, T., 2007. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A β ₂₅₋₃₅. *Behav. Brain Res.* 180, 139–145.
- Andrade-Cetto, A., Revilla-Monsalve, C., Wiedenfeld, H., 2007. Hypoglycemic effect of *Tournefortia hirsutissima* L., on n-streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 112, 96–100.
- Anke, S., Niemüller, D., Moll, S., 2004. Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiol.* 136, 4037–4047.
- ANSM, 2012a. Liste A des plantes médicinales utilisées traditionnellement. Pharmacopée française.
- ANSM, 2012b. Liste B des plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu. Pharmacopée française.
- ANSM, 2013. Pharmacopée. <[http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/\(offset\)/1](http://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee/(offset)/1)> (consulté le 29 octobre 2013).
- ANZFA, 2001. Pyrrolizidine alkaloids in food: a toxicological review and risk assessment. *Tech. Rep. Ser. No. 2* 1–16.
- Areias, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreres, F., Seabra, R.M., 2000. Flavonoids and phenolic acids of sage: Influence of some agricultural factors. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6081–6084.
- Asibal, C.F., Gelbaum, L.T., Zalkow, L.H., 1989. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium rotundifolium*. *J. Nat. Prod.* 52, 726–731.
- Aung, H.T., Furukawa, T., Nikai, T., Niwa, M., Takaya, Y., 2011. Contribution of cinnamic acid analogues in rosmarinic acid to inhibition of snake venom induced hemorrhage. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 2392–2396.
- Aung, H.T., Nikai, T., Komori, Y., Nonogaki, T., Niwa, M., Takaya, Y., 2010a. Biological and pathological studies of rosmarinic acid as an inhibitor of hemorrhagic *trimeresurus flavoviridis* (habu) venom. *Toxins.* 2, 2478–2489.
- Aung, H.T., Nikai, T., Niwa, M., Takaya, Y., 2010b. Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. *J. Nat. Med.* 64, 482–486.
- Azadbakht, M., Talavaki, M., 2003. Qualitative and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids of wheat and flour contaminated with *Senecio* in Mazandaran province farms. *Iran. J. Pharm. Res.* 2, 179–183.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K.,

- Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* 117, 426–436.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Terao, J., 2004. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci.* 75, 165–178.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Yasuda, A., Muto, Y., Hiyoshi, K., Takano, H., Yoshikawa, T., Terao, J., 2005. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Eur. J. Nutr.* 44, 1–9.
- Baden, D.G., Abraham, W.M., Bourdelais, A.J., 2005. Fused pentacyclic polyethers, Patent US 2005/0148539.
- Bagnis, R., 1968. Clinical aspects of Ciguatera (Fish Poisoning) in French Polynesia. *Hawaii Med. J.* 28, 25–28.
- Bagnis, R., Chanteau, S., Chungue, E., Hurtel, J.M., Yasumoto, T., Inoue, A., 1980. Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent. *Toxicon* 18, 199–208.
- Bagnis, R., Spiegel, A., Boutin, J.P., Burucoa, C., Nguyen, L., Cartel, J.L., Capdevielle, P., Imbert, P., Prigent, D., Gras, C., 1992a. Evaluation of the efficacy of mannitol in the treatment of ciguatera in French Polynesia. *Med. Trop.* 52, 67–73.
- Bagnis, R., Spiegel, A., Nguyen, N., Plichart, R., 1992b. Public health, epidemiological and socioeconomic patterns of ciguatera in Tahiti, in: Tosteson, T. (Ed.), *Proceedings of the 3rd International Conference on Ciguatera Fish Poisoning*. Puerto Rico, pp. 157–168.
- Bandaranayake, W., 2006. Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs. *Med. Plant Biotechnol.* 25–58.
- Bandoniène, D., Murkovic, M., 2002. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method. *J. Biochem. Biophys. Methods* 53, 45–49.
- Banner, A.H., Shaw, S.W., Alender, C.B., Helfrich, P., 1963. Fish intoxication. *South Pacific Com.* 141.
- Bast, A., Chandler, R.F., Choy, P.C., Delmulle, L.M., Gruenwald, J., Halkes, S.B.A., Keller, K., Koeman, J.H., Peters, P., Przyrembel, H., de Ree, E.M., Renwick, A.G., Vermeer, I.T.M., 2002. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 12, 195–211.
- Beales, K.A., Betteridge, K., Colegate, S.M., Edgar, J.A., 2004. Solid-phase extraction and LC-MS analysis of pyrrolizidine alkaloids in honeys. *J. Agric. Food Chem.* 52, 6664–6672.
- Benoit, É., Laurent, D., Mattei, C., Legrand, A.-M., Molgó, J., 2000. Reversal of Pacific ciguatoxin-1B effects on myelinated axons by agents used in Ciguatera treatment. *Cybiurn* 24, 33–40.
- Benoit, É., Legrand, A.-M., Dubois, J.M., 1986. Effects of ciguatoxin on current and voltage clamped frog myelinated nerve fibre. *Toxicon* 24, 357–364.
- Benzie, I.F., Watchel-Galor, S., 2011. Herbal Medicine: an introduction to its history, usage, regulation, current trends, and research needs, in: Benzie, I.F., Watchel-Galor, S. (Eds.), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. CRC Press, pp. 1–10.
- Betz, J., Eppley, R., Taylor, W., Andrzejewski, D., 1994. Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum sp.*). *J. Pharm. Sci.* 83, 649–653.
- Bidard, J.-N., Vijverberg, H.P.M., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.-M., Bagnis, R., Lazdunski, M., 1984. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. *J. Biol. Chem.* 259, 8353–8357.
- Birecka, H., Catalfamo, J.L., Eisen, R.N., 1981. A sensitive method for detection and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 20, 343–344.
- Birecka, H., DiNolfo, T.E., Martina, W.B., Frohlich, M.W., 1984. Polyamines and leaf senescence in pyrrolizidine alkaloid-bearing *Heliotropium* plants. *Phytochemistry* 23, 991–997.
- Birinyi-Strachan, L.C., Davies, M.J., Lewis, R.J., Nicholson, G.M., 2005. Neuroprotectant effects of iso-osmolar D-mannitol to prevent Pacific ciguatoxin-1 induced alterations in neuronal excitability : a comparison with other osmotic agents and free radical scavengers. *Neuropharmacology* 49, 669–686.
- Boppré, M., 1986. Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (pyrrolizidine alkaloids). *Naturwissenschaften* 73, 17–26.

- Boppré, M., Colegate, S.M., Edgar, J.A., Fischer, O.W., 2008. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5662–5672.
- Boppré, M., Colegate, S.M., Edgar, J.A., 2005. Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. *J. Agric. Food Chem.* 53, 594–600.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K., Lu, Y., Foo, L.Y., 2004. Antioxidant mechanisms of polyphenolic caffeic acid oligomers, constituents of *Salvia officinalis*. *Biol. Res.* 37, 301–311.
- Borstel, K. V., Witte, L., Hartmann, T., 1989. Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids. *Phytochemistry* 28, 1635–1638.
- Böttcher, F., Adolph, R.-D., Hartmann, T., 1993. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 32, 679–689.
- Bourdelaïs, A.J., Campbell, S., Jacocks, H., Naar, J., Wright, J.L.C., Carsi, J., Baden, D.G., 2004. Brevenal is a natural inhibitor of brevetoxin action in sodium channel receptor binding assays. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24, 553–563.
- Bourdy, G., Cabalion, P., Amade, P., Laurent, D., 1992. Traditional remedies used in the Western Pacific for the treatment of ciguatera poisoning. *J. Ethnopharmacol.* 36, 163–174.
- Bourée, P., Quod, J.-P., Turquet, J., 2002. L'ichtyosarcotoxisme de type ciguatera. *Rev. française des Lab.* 342, 65–70.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Lewis, R.J., Molgó, J., Laurent, D., 2005. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicon* 46, 625–634.
- Boydron-Le Garrec, R., 2005. Évaluation du potentiel thérapeutique de plantes traditionnellement utilisées dans le Pacifique pour traiter l'intoxication ciguatérique. Thèse de doctorat de l'Université de la Nouvelle-Calédonie, Nouméa. 257 p.
- Boydron-Le Garrec, R., Sauviat, M.-P., Benoit, E., Molgo, J., Laurent, D., 2002. L'hémolyse des érythrocytes humains par la P-CTX-1: une méthode pour évaluer les remède traditionnels utilisés en Nouvelle-Calédonie pour traiter la ciguatera, in: *Toxines et Recherches Biomédicales (Coll. Rencontres en toxinologie SFET)*, 101–104.
- Boye, A., Koffuor, G., Amoateng, P., 2012. Analgesic activity and safety assessment of *Heliotropium indicum* Linn. (Boraginaceae) in rodents. *Int. J. Pharmacol.* 8, 91–100.
- Bruslé, J., 1997. Ciguatera Fish Poisoning - A review. Sanitary and Economic Aspects. INSERM, Paris, France. 150 pp.
- Bult, H., Herman, A.G., Rampart, M., 1985. Modification of endotoxin-induced haemodynamic and haematological changes in the rabbit by methylprednisolone, F(ab')₂ fragments and rosmarinic acid. *Br. J. Pharmacol.* 84, 317–327.
- Butaud, J.-F., Gérard, J., Guibal, D., 2008. *Heliotropium foertherianum*, in: *Guide des arbres de Polynésie Française : Bois et utilisations*. pp. 134-138. ISBN : 2915654379.
- Butler, W.H., Mattocks, A.R., Barnes, A.J.M., 1970. Lesions in the liver and lungs of rats given pyrrole derivatives of pyrrolizidine alkaloids. *J. Pathol.* 100, 169–175.
- Cagide, E., Louzao, M.C., Espiña, B., Ares, I.R., Vieytes, M.R., Sasaki, M., Fuwa, H., Tsukano, C., Konno, Y., Yotsu-Yamashita, M., Paquette, L.A., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2011. Comparative cytotoxicity of gambierol versus other marine neurotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 835–842.
- Caillaud, A., de la Iglesia, P., Darius, H.T., Pauillac, S., Aligizaki, K., Fraga, S., Chinain, M., Diogène, J., 2010. Update on methodologies available for ciguatoxin determination: perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. *Mar. Drugs* 8, 1838–1907.
- Calapai, G., 2008. European Legislation on Herbal Medicines. *Drug Saf.* 31, 428–431.
- Calvert, G., Hryhorczuk, D., Leikin, J., 1987. Treatment of ciguatera fish poisoning with amitriptyline and nifedipine. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 25, 423–428.
- Camilleri, A., Zarb, C., Caruana, M., Ostermeier, U., Ghio, S., Högen, T., Schmidt, F., Giese, A., Vassallo, N., 2013. Mitochondrial membrane permeabilisation by amyloid aggregates and protection by polyphenols.

- Biochim. Biophys. Acta 1828, 2532–2543.
- Campos, A.M., Lissi, E., Chavez, M., Modak, B., 2012. Antioxidant activity in heterogeneous and homogeneous system of the resinous exudates from *Heliotropium stenophyllum* and *H. sinuatum* and of 3-O-methylgalangin their main component. Bol. Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromat. 11, 549–555.
- Cao, L., Pang, Y.L., Liu, N.F., 2005. Status of the Red-footed Booby on the Xisha Archipelago, South China Sea. Waterbirds 28, 411–419.
- Caple, I.W., Heath, T.J., 1979. Effect of chronic liver damage caused by ingestion of *Heliotropium europaeum* on bile formation in sheep. J. Comp. Pathol. 89, 83–88.
- Carballo, M., Mudry, M.D., Larripa, I.B., Vilamail, E., D'Aquino, M., 1992. Genotoxic action of an aqueous extract of *Heliotropium curassavicum* var. *argentinum*. Mutat. Res. 279, 245–253.
- Cazes-Duvat, V., Paskoff, R., Durand, P., 2002. Recent evolution of the two coralline islands of the Seychelles Bank (western Indian Ocean): Denis and Bird. Géomorphologie Reli. Process. Environ. 8, 211–222.
- CE, 1997. Recommandations concernant les aspects scientifiques relatifs à la présentation des informations requises pour étayer les demandes d'autorisation de mise sur le marché de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires. J. Off. des communautés Eur. L253/1–L253/36.
- Chateau-Degat, M.-L., 2005. Portrait épidémiologique de la Ciguatera dans le Pacifique-sud. Thèse de doctorat de l'Université de Laval, Québec. 189 p.
- Chateau-Degat, M.-L., Beuter, A., Vauterin, G., Nguyen, N.L., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.-M., Chansin, R., Dewailly, E., 2007a. Neurologic signs of ciguatera disease: evidence of their persistence. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 1170–1175.
- Chateau-Degat, M.-L., Chinain, M., Cerf, N., Gingras, S., Hubert, B., Dewailly, É., 2005. Seawater temperature, *Gambierdiscus* spp. variability and incidence of ciguatera poisoning in French Polynesia. Harmful Algae 4, 1053–1062.
- Chateau-Degat, M.-L., Huin-Blondey, M.-O., Chinain, M., Darius, T., Legrand, A.-M., Nguyen, N.L., Laudon, F., Chansin, R., Dewailly, E., 2007b. Prevalence of chronic symptoms of ciguatera disease in French Polynesian adults. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 842–846.
- Chen, J.H., Ho, C.-T., 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. J. Agric. Food Chem. 45, 2374–2378.
- Chen, M.-L., Wu, S., Tsai, T.-C., Wang, L.-K., Chou, W.-M., Tsai, F.-M., 2013. Effect of aqueous extract of *Tournefortia sarmentosa* on the regulation of macrophage immune response. Int. Immunopharmacol. 17, 1002–1008.
- Cheng, C.C., Chung, C.H., 2004. Ciguatera fish poisoning : a challenge to emergency physicians. Hong Kong J. Emerg. Med. 11, 173–177.
- Chernenko, T. V., Gusakova, S.D., Glushenkova, A.I., 2011. Lipids and alkaloids from *Heliotropium lasiocarpum*. Chem. Nat. Compd. 47, 603–605.
- Chinain, M., Darius, H.T., Ung, A., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D., Pauillac, S., 2010a. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. Toxicon 56, 739–750.
- Chinain, M., Darius, H.T., Ung, A., Fouc, M.T., Revel, T., Cruchet, P., Pauillac, S., Laurent, D., 2010b. Ciguatera risk management in French Polynesia : the case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). Toxicon 56, 674–690.
- Chlopčíková, S., Psotová, J., Míketová, P., Soušek, J., Lichnovský, V., Simánek, V., 2004. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. Phyther. Res. 18, 408–413.
- Chou, M.W., Wang, Y.-P., Yan, J., Yang, Y.-C., Beger, R.D., Williams, L.D., Doerge, D.R., Fu, P.P., 2003. Riddelliine N-oxide is a phytochemical and mammalian metabolite with genotoxic activity that is comparable to the parent pyrrolizidine alkaloid riddelliine. Toxicol. Lett. 145, 239–247.
- Cirriez, J., 2012. Médicament traditionnel à base de plantes, complément alimentaire, nutriment : point de la situation. Rapport UPHOC 1–3.
- Clé, C., Hill, L.M., Niggeweg, R., Martin, C.R., Guisez, Y., Prinsen, E., Jansen, M. a K., 2008. Modulation of

- chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* 69, 2149–2156.
- Conseil de l'ordre des pharmaciens de Polynésie française, 2013. Pharmacopée traditionnelle chinoise, dans : Réglementation. <www.ordre-pharmaciens-polynesie.com/> (consulté le 11 novembre 2013).
- Cook, J.W., Duffy, E., Schoental, R., 1950. Primary liver tumours in rats following feeding with alkaloids of *Senecio jacobaea*. *Br. J. Cancer* 4, 405–410.
- Costa, R.S., Carneiro, T.C.B., Cerqueira-Lima, A.T., Alcântara-Neves, N.M., Pontes-de-Carvalho, L.C., Velozo, E., Oliveira, E.J., Figueiredo, C.A., 2012. *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. *Int. Immunopharmacol.* 13, 126–134.
- Couto, R.O., Conceição, E.C., Chaul, L.T., Oliveira, E.M.S., Martins, F.S., Bara, M.T.F., Rezende, K.R., Alves, S.F., Paula, J.R., 2012. Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. *Food Chem.* 131, 99–105.
- Craven, L.A., 2005. Malesian and australian *Tournefortia* transferred to *Heliotropium* and notes on delimitation of Boraginaceae. *Blumea* 50, 375–381.
- Crespy, V., Castiel, I., Bel-Rhild, R., Page, N., Raab, T., 2014. Biological effects of compositions of rosmarinic acid, Patent US 2014/0023625.
- Crews, C., Berthiller, F., Krska, R., 2010. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 327–338.
- Crowley, C., Culvenor, C., 1955. Occurrence of supinine in *Tournefortia sarmentosa* Lam. *Aust. J. Chem.* 8, 464–465.
- Crowley, C., Culvenor, H., 1959. The alkaloids of *Heliotropium supinum* L., with observations on viridifloric acid. *Aust. J. Chem.* 12, 694–705.
- Culvenor, C.C.J., 1954. The alkaloids of *Heliotropium europaeum* L.. II. Isolation and structures of the third major alkaloid and two minor alkaloids, and isolation of the principal n-Oxides. *Aust. J. Chem.* 7, 287–297.
- Culvenor, C.C.J., 1968. Tumor-inhibitory activity of pyrrolizidine alkaloids. *J. Pharm. Sci.* 57, 1112–1117.
- Culvenor, C.C.J., Edgar, J.A., Smith, L.W., Kumana, C.R., Lin, H.J., 1986. *Heliotropium lasiocarpum* fisch and mey identified as cause of veno-occlusive disease due to herbal tea. *Lancet* 26, 978.
- Culvenor, C.C.J., Johns, S.R., Smith, L.W., 1975. Acetylasiocarpine, an alkaloid from *Heliotropium europaeum*. *Aust. J. Chem.* 28, 2319–2322.
- Dapkevicius, A., van Beek, T.A., Lelyveld, G.P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J.P.H., Venskutonis, R., 2002. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *J. Nat. Prod.* 65, 892–896.
- Darius, H.T., Ponton, D., Revel, T., Cruchet, P., Ung, A., Tchou Fouc, M., Chinain, M., 2007. Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay. *Toxicon* 50, 612–626.
- Dash, G., Abdullah, M., 2013. A review on *Heliotropium indicum* L. (Boraginaceae). *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4, 1253–1258.
- Dash, G.K., Murthy, P.N., 2011. Studies on wound healing activity of *Heliotropium indicum* Linn. leaves on rats. *IRSN Pharmacol.* 2011, 1–8.
- Davicino, J.G., Pestchanker, M.J., Giordano, O.S., 1988. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium curassavicum*. *Phytochemistry* 27, 960–962.
- Davis, R., Villar, L., 1986. Symptomatic improvement with amitriptyline in ciguatera fish poisoning. *N Engl J Med* 315, 65.
- De Fouw, J.C., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A., 2001. Ciguatera fish poisoning: a review. *RIVM Report*, 1–66.
- Dechraoui Bottein, M.-Y., Wang, Z., Ramsdell, J.S., 2011. Toxicokinetics of the ciguatoxin P-CTX-1 in rats after intraperitoneal or oral administration. *Toxicology* 284, 1–6.
- De-Eknamkul, W., Ellis, B.E., 1989. Behavior of free aromatic amino acid pools in rosmarinic acid-producing cell

- cultures of *Anchusa officinalis* L. Plant Physiol. 89, 429–433.
- Del Baño, M.J., Castillo, J., Benavente-García, O., Lorente, J., Martín-Gil, R., Acevedo, C., Alcaraz, M., 2006. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. J. Agric. Food Chem. 54, 2064–2068.
- Diane, N., Jacob, C., Hilger, H.H., 2003. Leaf anatomy and foliar trichomes in Heliotropiaceae and their systematic relevance. Flora 198, 468–485.
- Dickey, R.W., Plakas, S.M., 2010. Ciguatera: a public health perspective. Toxicon 56, 123–136.
- Dickinson, J.O., Cooke, M.P., King, R.R., Mohamed, P.A., 1976. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 169, 1192–11196.
- Ding, H.-Y., Chou, T.-H., Liang, C.-H., 2010. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*. Food Chem. 123, 254–262.
- Domitrović, R., Skoda, M., Vasiljev Marchesi, V., Cvijanović, O., Pernjak Pugel, E., Stefan, M.B., 2013. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Food Chem. Toxicol. 51, 370–378.
- Doty, M.S., House, J.N., Miller, H.A., Wilson, K., 1954. Floristics and plant ecology of Raroia atoll, Tuamotus. Atoll Res. Bull. 33, 1–61.
- Dreger, M., Stanisławska, M., Krajewska-patan, A., Mielcarek, S., Mikołajczak, P.Ł., Buchwald, W., 2009. Pyrrolizidine alkaloids – chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage. Herba Pol. 55, 127–147.
- Edgar, J.A., Colegate, S.M., Boppré, M., Molyneux, R.J., 2011. Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. Food Addit. Contam. Part A 28, 308–324.
- EFSA, 2007. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission related to pyrrolizidine alkaloids as undesirable substances in animal feed. EFSA J. 447, 1–51.
- Ellis, B.E., Towers, G.H.N., 1970. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. Biochem. J. 118, 291–297.
- EMA, 2009. Guideline on declaration of herbal substances and herbal preparations in herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. EMEA/HMPC/CHMP/CVMP/287539/2005 Rev. 1.
- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E., 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chem. 110, 76–82.
- Eröksüz, Y., Ceribasi, A.O., Cevik, A., Eröksüz, H., Tosun, F., Tamer, U., 2008. Toxicity of *Heliotropium dolosum*, *Heliotropium circinatum*, and *Senecio vernalis* in parental quail and their progeny, with residue evaluation of eggs. Turk. J. Vet. Anim 32, 475–482.
- Eröksüz, Y., Eröksüz, H., Ozer, H., Canatan, H., Yaman, I., Cevik, A., 2001a. Toxicity of dietary *Heliotropium dolosum* seed to broiler chickens. Vet Hum Toxicol 43, 334–338.
- Eröksüz, Y., Eröksüz, H., Ozer, H., İlhan, N., Cevik, A., Yaman, I., Ceribasi, A., 2002. Toxicity of dietary *Heliotropium dolosum* seed to Japanese quail. Vet Hum Toxicol 44, 264–268.
- Eröksüz, Y., Eröksüz, H., Ozer, H., Sener, B., Tosun, F., Akyüz, C., 2001b. Toxicity of dietary *Heliotropium dolosum* seed to mice. Vet Hum Toxicol 43, 152–155.
- Erosa-Rejón, G., Peña-rodríguez, L.M., Sterner, O., 2009. Secondary Metabolites from *Heliotropium angiospermum*. J Mex Chem Soc 53, 44–47.
- Fadel, O., El Kirat, K., Morandat, S., 2011. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. Biochim. Biophys. Acta 1808, 2973–2980.
- Falé, P.L., Borges, C., Madeira, P.J.A., Ascensão, L., Araujo, M.E.M., Florencio, M.H., Serralheiro, M.L.M., 2009. Rosmarinic acid, scutellarein 40-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (falso boldo). Food Chem. 114, 798–805.
- Fallarini, S., Miglio, G., Paoletti, T., Minassi, A., Amoruso, A., Bardelli, C., Brunelleschi, S., Lombardi, G., 2009.

- Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1072–1084.
- FAO/OMS, 2011. Document de travail sur les alcaloïdes de pyrrolizidine. 5^{ème} session de la commission du codex alimentarius, La Haye, Pays-Bas. 86 p.
- Farnsworth, N., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organ.* 63, 965–981.
- Farrag, N.M., Abdel-Aziz, E.M., El-Shafae, A.M., Ateya, A.M., Domiaty, M.M. El, 1996. Pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium bacciferum* Forssk from Egypt. *Int. J. Pharmacogn.* 34, 374–377.
- Farsam, H., Yassa, N., Sarkhail, P., Shafiee, A., 2000. New pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium crassifolium*. *Planta Med.* 66, 389–391.
- FDA, 2004. Guidance for industry : Botanical drug products.
- FDA, 2006. Guidance for industry on complementary and alternative medicine products and their regulation by the Food and Drug Administration.
- FDA, 2011. Dietary supplements guidance documents and regulatory information. <www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/DietarySupplementD/default.htm> (consulted the december 12, 2013).
- Feng, L., Jia, X., Zhu, M.-M., Chen, Y., Shi, F., 2010. Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. in vitro and in tumor-bearing mice. *Molecules* 15, 9145–9156.
- Ferreres, F., Vinholes, J., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Gonçalves, R.F., Andrade, P.B., 2013. In vitro studies of α -glucosidase inhibitors and antiradical constituents of *Glandora diffusa* (Lag.) D.C. Thomas infusion. *Food Chem.* 136, 1390–1398.
- Firdous, S., Ansari, N., Fatima, I., Malik, A., Afza, N., Iqbal, L., Lateef, M., 2012. Ophiamides A-B, new potent urease inhibitory sphingolipids from *Heliotropium ophioglossum*. *Arch. Pharm. Res.* 35, 1133–1137.
- Fleming, L.E., Baden, D.G., Bean, J.A., Weisman, R., Blythe, D.G., 1998. Marine Seafood Toxin Diseases: Issues In Epidemiology & Community Outreach, in: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, W.T. (Ed.), *Harmful Algae. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Xunta de Galicia (Spain)*, pp. 245–248.
- Flood, P.G., 1977. Coral cays of the Capricorn and bunker groups, Great Barrier reef province, Australia. *Atoll Res. Bull.* 195, 1–26.
- Fosberg, F., 1992. Vegetation of the Society Islands. *Pacific Sci.* 46, 232–250.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., Zapata, M., 2011. *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* 11, 10–22.
- Frankel, E.N., Huang, S.-W., Aeschbach, R., Prior, E., 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic Acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 44, 131–135.
- Friedman, M.A., Fleming, L.E., Fernandez, M., Bienfang, P., Schrank, K., Dickey, R.W., Bottein, M.-Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R., Reich, A., 2008. Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Mar. Drugs* 6, 456–479.
- Frölich, C., Hartmann, T., Ober, D., 2006. Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). *Phytochemistry* 67, 1493–1502.
- Frölich, C., Ober, D., Hartmann, T., 2007. Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. *Phytochemistry* 68, 1026–1037.
- Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W., 2002a. Genotoxic Pyrrolizidine Alkaloids — Mechanisms Leading to DNA Adduct Formation and Tumorigenicity. *Int. J. Mol. Sci.* 3, 948–964.
- Fu, P.P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W., 2004. Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab. Rev.* 36, 1–55.
- Fu, P.P., Yang, Y., Xia, Q., Chou, M.W., Cui, Y.Y., Lin, G., 2002b. Pyrrolizidine Alkaloids - Tumorigenic Components in Chinese Herbal Medicines and Dietary Supplements. *J. Food Drug Anal.* 10, 198–211.
- Fujimoto, A., Masuda, T., 2012. Antioxidation mechanism of rosmarinic acid, identification of an unstable

- quinone derivative by the addition of odourless thiol. *Food Chem.* 132, 901–906.
- Furtado, M.A., de Almeida, L.C.F., Furtado, R.A., Cunha, W.R., Tavares, D.C., 2008. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutat. Res.* 657, 150–154.
- Fuwa, H., Kainuma, N., Tachibana, K., Tsukano, C., Satake, M., Sasaki, M., 2004. Diverted Total Synthesis and Biological Evaluation of Gambierol Analogues: Elucidation of Crucial Structural Elements for Potent Toxicity. *Chemistry (Easton)*. 10, 4894–4909.
- Gamaro, G.D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P., Ardenghi, P., 2011. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *IRSN Pharmacol.* 2011, 1–6.
- Geller, F., Schmidt, C., Göttert, M., Fronza, M., Schattel, V., Heinzmann, B., Werz, O., Flores, E.M.M., Merfort, I., Laufer, S., 2010. Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia americana*. *J. Ethnopharmacol.* 128, 561–566.
- Geller, R., Olson, K., Senécal, P., 1991. Ciguatera fish poisoning in San Francisco, California, caused by imported barracuda. *West. J. Med.* 155, 639–642.
- Georgiev, M., Pavlov, A., Ilieva, M., 2006. Selection of high rosmarinic acid producing *Lavandula vera* MM cell lines. *Process Biochem.* 41, 2068–2071.
- Ghiaroni, V., Sasaki, M., Fuwa, H., Rossini, G.P., Scalera, G., Yasumoto, T., Pietra, P., Bigiani, A., 2005. Inhibition of voltage-gated potassium currents by gambierol in mouse taste cells. *Toxicol. Sci.* 85, 657–665.
- Glaziou, P., Legrand, A., 1994. The epidemiology of ciguatera fish poisoning. *Toxicon* 32, 863–873.
- Gouvernement de la Polynésie française, 1987. Arrêté n°284 CM du 16 mars 1987 (publié le 26 mars). *Journal officiel de la Polynésie française* n°13, page 498. <www.lexpol.pf> (consulté le 11 novembre 2013).
- Gouvernement de la Polynésie française, 2006. Arrêté n°1169 CM du 16 octobre 2006 (publié le 26 octobre). *Journal officiel de la Polynésie française* n°43, page 3732. <www.lexpol.pf> (consulté le 11 novembre 2013).
- Gouvernement de la Polynésie française, 2008a. Arrêté n°198 CM du 6 février 2008 (publié le 14 février). *Journal officiel de la Polynésie française* n°7, page 624. <www.lexpol.pf> (consulté le 11 novembre 2013).
- Gouvernement de la Polynésie française, 2008b. Arrêté n°199 CM du 6 février 2008 (publié le 14 février). *Journal officiel de la Polynésie française* n°7, page 630. <www.lexpol.pf> (consulté le 11 novembre 2013).
- Gouvernement de la Polynésie française, 2010. Arrêté n°249 CM du 25 février 2010 (publié le 4 mars). *Journal officiel de la Polynésie française* n°9, page 967. <www.lexpol.pf> (consulté le 11 novembre 2013).
- Graser, G., Hartmann, T., 2000. Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. *Planta* 211, 239–245.
- Gray, D.E., Porter, A., O'Neill, T., Harris, R.K., Rottinghaus, G.E., 2004. A rapid cleanup method for the isolation and concentration of pyrrolizidine alkaloids in comfrey root. *J. AOAC Int.* 87, 1049–1057.
- Guezennec, J., Moretti, C., Simon, J.-C. (Eds), 2006. Annexe 1. Fiche des espèces végétales du groupe 1. Dans : *Substances naturelles en Polynésie française : Stratégies de valorisation*. IRD Éditions, Montpellier. ISBN : 9782709917728.
- Guilet, D., Guntern, A., Ioset, J.-R., Queiroz, E.F., Ndjoko, K., Foggin, C.M., Hostettmann, K., 2003. Absolute configuration of a tetrahydrophenanthrene from *Heliotropium ovalifolium* by LC-NMR of its Mosher esters. *J. Nat. Prod.* 66, 17–20.
- Guil-Guerrero, J.L., López-Martínez, J.C., Gómez-Mercado, F., Campra-Madrid, P., 2006. Gamma-linolenic and stearidonic acids from Moroccan Boraginaceae. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 43–47.
- Guntern, A., Ioset, J., Queiroz, E., 2003. Heliotropamide, a Novel Oxopyrrolidine-3-carboxamide from *Heliotropium ovalifolium*. *J. Nat. Prod.* 66, 1550–1553.
- Guntern, A., Ioset, J.-R., Queiroz, E.F., Foggin, C.M., Hostettmann, K., 2001. Quinones from *Heliotropium ovalifolium*. *Phytochemistry* 58, 631–635.
- Halstead, B., 1965. *Poisonous and venomous marine animals of the world (Vol. 1)*, US government printing office, Washington DC.

- Hamilton, B., Whittle, N., Shaw, G., Eaglesham, G., Moore, M.R., Lewis, R.J., 2010. Human fatality associated with Pacific ciguatoxin contaminated fish. *Toxicon* 56, 668–673.
- Han, C., Kwak, W.-J., Joung, K., Yoo, H., Kum, D., Cho, Y.-B., Ryu, K., Rhee, H., Kim, T., Jung, I., Lee, S., Yi, J., Kim, J., Um, K., 2002. Herbal drug composition for cartilage protection, Patent WO/2002/094301.
- Harkey, M., Henderson, G., Gershwin, M., Stern, J., Hackman, R., 2001. Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 1101–1106.
- Haro, L. de, Pommier, P., Valli, M., 2003. Emergence of imported ciguatera in Europe : report of 18 cases at the Poison Control Centre of Marseille. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41, 927–930.
- Hartmann, T., 1995. Pyrrolizidine alkaloids between plants and insects: a new chapter of an old story. *Chemoecology* 139–146.
- Hartmann, T., Ober, D., 2000. Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Top. Curr. Chem.* 209, 208–243.
- Hartmann, T., Ober, D., 2008. Defense by Pyrrolizidine Alkaloids : Developed by Plants and Recruited by Insects, in: Schaller, A. (Ed.), *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer Netherlands, pp. 213–231. ISBN: 978-1-1020-8182-8
- Hartmann, T., Witte, L., 1995. Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids, in: Pelletier, S. (Ed.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives Vol 9*. Pergamon press, Oxford, pp. 155–233.
- Hidalgo, J., Liberona, J.L., Molgó, J., Jaimovich, E., 2002. Pacific ciguatoxin-1B effect over Na⁺ and K⁺ currents, inositol 1,4,5-triphosphate content and intracellular Ca²⁺ signals in cultured rat myotubes. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1055–1062.
- Hill, B., Gaul, K., Noble, J., 1997. Poisoning of feedlot cattle by seeds of *Heliotropium europaeum*. *Aust. Vet. J.* 75, 360–361.
- Hirama, M., Oishi, T., Uehara, H., Inoue, M., Maruyama, M., Oguri, H., Satake, M., 2001. Total synthesis of ciguatoxin CTX3C. *Science*. 294, 1904–1907.
- Hong, E., Kim, G.-H., 2010. Comparison of extraction conditions for phenolic, flavonoid content and determination of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* var. *acuta*. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 1353–1359.
- Hosch, G., Wiedenfeld, H., Dingermann, T., Roeder, E., 1996. A new high performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in plant material. *Phytochem. Anal.* 7, 284–288.
- Huang, B., Yi, B., Duan, Y., Sun, L., Yu, X., Guo, J., Chen, W., 2008. Characterization and expression profiling of tyrosine aminotransferase gene from *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) in rosmarinic acid biosynthesis pathway. *Mol. Biol. Rep.* 35, 601–612.
- Hussain, S., Jamil, M., Ullah, F., Khan, A., Arfan, M., Ahmad, S., Khatoon, L., 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of the plant *Heliotropium strigosum*. *African J. Biotechnol.* 9, 7738–7743.
- Imbert, P., 2012. Réglementation des médicaments traditionnels à base de plantes en Europe dans : *Médicaments traditionnels à base de plantes*. <<http://www.entretiens-internationaux.mc/medicaments-traditionnels-a-base-de-plantes-62.html>> (consulté le 11 novembre 2013).
- Inoue, M., Hirma, M., Satake, M., Sugiyama, K., Yasumoto, T., 2003. Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. *Toxicon* 41, 469–474.
- Inoue, M., Lee, N., Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirma, M., 2009. Use of monoclonal antibodies as an effective strategy for treatment of ciguatera poisoning. *Toxicon* 53, 802–805.
- Ito, H., Miyazaki, T., Ono, M., Sakurai, H., 1998. Antiallergic activities of rabdosiin and its related compounds: chemical and biochemical evaluations. *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1051–1056.
- Iuvone, T., Filippis, D. De, Esposito, G., D'Amico, A., Izzo, A.A., 2006. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 1143–1149.
- Jain, S.C., Purohit, M., 1986. Antitumor active pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium marifolium* RETZ. *Chem*

- Pharm Bull 34, 5154–5156.
- Jain, S.C., Sharma, R., 1987. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium ellipticum*. Chem Pharm Bull 35, 3487–3489.
- Jain, S.C., Singh, B., Jain, R., 2001. Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. Fitoterapia 72, 666–668.
- Jamet, R., Trichet, J., 1987. Étude du milieu terrestre des atolls de la Polynésie française : caractéristiques et potentialités agricoles. Cah. ORSTOM. Série Pédologie XXIII, 275–293.
- Jang, A.-H., Kim, T.-H., Kim, G.-D., Eun, J., Jin, H., Soo, S., Jin, Y.-H., Seek, Y., Park, C.-S., 2011. Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. Int. Immunopharmacol. 11, 1–7.
- Jiang, W.-L., Chen, X.-G., Qu, G.-W., Yue, X.-D., Zhu, H.-B., Tian, J.-W., Fu, F.-H., 2009. Rosmarinic acid protects against experimental sepsis by inhibiting proinflammatory factor release and ameliorating hemodynamics. Shock 32, 608–613.
- Kagan, J., 1968. Luteolin 7-glucoside, the flavonoid pigment of *Heliotropium tenellum*. Phytochemistry 7, 505–506.
- Karthik, D., Arunkumar, E., Viswanathan, P., Anuradha, C.V., 2012. Rosmarinic acid treatment alleviates fibrotic changes in the myocardium induced in a rat model of insulin resistance. Asian Pacific J. Trop. Dis. 2, S920–S926.
- Karthik, D., Perivasami, V., Anuradha, C. V., 2011. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. J. Cardiovasc. Pharmacol. 58, 514–521.
- Kays, S., Hatch, J., Yang, D., 2005. Volatile floral chemistry of *Heliotropium arborescens* L. 'Marine'. HortScience 40, 1237–1238.
- Kempf, M., Reinhard, A., Beuerle, T., 2010. Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. Mol. Nutr. Food Res. 54, 158–168.
- Khan, H., Khan, M.A., Gul, F., Hussain, S., Ashraf, N., 2013. Anti-inflammatory activity of *Heliotropium strigosum* in animal models. Toxicol. Ind. Health, 1–7.
- Khan, M., Ahmad, F., Ahmad, I., Osman, S., 1983. Nonedible seed oils as insect repellent. J. Am. Oil Chem. Soc. 60, 949–950.
- Kim, D.-S., Kim, H.-R., Woo, E.-R., Hong, S.-T., Chae, H.-J., Chae, S.-W., 2005. Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase. Biochem. Pharmacol. 70, 1066–1078.
- Kim, S., Yun, E.J., Bak, J.S., Lee, H., Lee, S.J., Kim, C.T., Lee, J.-H., Kim, K.H., 2010. Response surface optimised extraction and chromatographic purification of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* leaves. Food Chem. 121, 521–526.
- King, S.A., Suffness, M., Leyland-Jones, B., Hoth, D.F., O'Dwyer, P.J., 1987. Indicine N-oxide : Clinical use of a pyrrolizidine alkaloid. Cancer Treat. Rep. 71, 517–523.
- Kintzios, S., 2008. Secondary Metabolite Production from Plant Cell Cultures : the Success Stories of Rosmarinic Acid and Taxol, in: Ramawat, K.G., Merillon, J.M. (Eds.), Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Springer Berlin Heidelberg, pp. 85–100.
- Kott, L., Fletcher, R., 2010. Production of rosmarinic acid from spearmint and uses thereof, Patent US 2010/0137433.
- Kovach, J.S., Ames, M.M., Powis, G., Moertel, C.G., Hahn, R.G., Creagan, E.T., 1979. Toxicity and pharmacokinetics of a pyrrolizidine alkaloid, indicine N-oxide, in humans. Cancer Res. 39, 4540–4544.
- Kroes, R., Walker, R., 2004. Safety issues of botanicals and botanical preparations in functional foods. Toxicology 198, 213–220.
- Kugelman, M., Liu, W., Axelrod, M., McBride, T., Rao, K., 1976. Indicine-N-oxide : the antitumor principle of *Heliotropium indicum*. Llyodia 339, 125–128.

- Kulkarni-Almeida, A., Suthar, A., Goswami, H., Vishwakarma, R., Chauhan, V.S., Balakrishnan, A., Sharma, S., 2008. Novel leads from *Heliotropium ovalifolium*, 4,7,8-trimethoxy-naphthalene-2-carboxylic acid and 6-hydroxy-5,7-dimethoxy-naphthalene-2-carbaldehyde show specific IL-6 inhibitory activity in THP-1 cells and primary human monocytes. *Phytomedicine* 15, 1079–1086.
- Kumar-Roiné, S., 2009. Valorisation de remèdes traditionnels utilisés dans le traitement de la ciguatera dans le Pacifique. Thèse de doctorat de l'Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa. 220 p.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Pauillac, S., Laurent, D., 2011a. Ciguatera fish poisoning and other seafood intoxication syndromes: A revisit and a review of the existing treatments employed in ciguatera fish poisoning. *South Pacific J. Nat. Appl. Sci.* 28, 1–26.
- Kumar-Roiné, S., Matsui, M., Reybier, K., Darius, H.T., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D., 2009. Ability of certain plant extracts traditionally used to treat ciguatera fish poisoning to inhibit nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 123, 369–377.
- Kumar-Roiné, S., Taiana Darius, H., Matsui, M., Fabre, N., Haddad, M., Chinain, M., Pauillac, S., Laurent, D., 2011b. A review of traditional remedies of Ciguatera Fish Poisoning in the Pacific. *Phyther. Res.* 25, 947–958.
- Kupchan, S.M., Suffness, M.I., 1967. Tumor inhibitors XXII. Senecionine and senecionine N-oxide, the active principles of *Senecio triangularis*. *J. Pharm. Sci.* 56, 541–543.
- Lakshmanan, A.J., Shanmugasundaram, S., 1994. Helibractinecine, a pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium bracteatum*. *Phytochemistry* 36, 245–248.
- Lakshmanan, A.J., Shanmugasundaram, S., 1995a. Ester alkaloids of *Heliotropium bracteatum*. *Phytochemistry* 40, 291–294.
- Lakshmanan, A.J., Shanmugasundaram, S., 1995b. Heliscabine, a pyrrolizidine ester alkaloid from *Heliotropium scabrum*. *Phytochemistry* 39, 473–475.
- Lamien-Meda, A., Nell, M., Lohwasser, U., Börner, A., Franz, C., Novak, J., 2010. Investigation of antioxidant and rosmarinic acid variation in the sage collection of the genebank in Gatersleben. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3813–3819.
- Lange, W., Kreider, S., Hattwick, M., 1988. Potential benefit of tocainide in the treatment of ciguatera: report of three cases. *Am. J. Med.* 84, 1087–1088.
- Lange, W., Snyder, F., Fudala, P., 1992. Travel and ciguatera fish poisoning. *Arch. Intern. Med.* 152, 2049–2053.
- Larghi, E.L., Operto, M.A., Torres, R., Kaufman, T.S., 2009. New inhibitors of the complement system inspired in K76-COOH. A SAR study of filifolinol derivatives through modifications of the C3' position. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 6172–6175.
- Latha, S., Selvamani, P., Pal, T.K., Gupta, J.K., 2009. Anthelmintic activity of *Heliotropium zeylanicum* and *Capparis sepiaria* L. *Asian J. Chem.* 21, 5780–5782.
- Lattanzio, V., 2008. Recent Advances in Polyphenol Volume I. Blackwell. 437 p. ISBN: 9781405158374.
- Laurent, D., 1993. La ciguatera: une intoxication liée à la consommation de poissons tropicaux. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 73, 7–19.
- Laurent, D., Pauillac, S., Chinain, M., Darius, T., Kumar-Roiné, S., 2011. Use of rosmarinic acid and the derivatives thereof to treat ciguatera, Patent WO2011012780 A1.
- Laurent, D., Amade, P., 1992. Remèdes traditionnels contre la ciguatera en Nouvelle Calédonie. *Sci. la vie Pharmacol.* 2, 1–84.
- Laurent, D., Bourdy, G., Amade, P., Cabalion, P., Bourret, D., Cabalion, P., 1993. La gratte ou ciguatera. Ses remèdes traditionnels dans le Pacifique Sud, ORSTOM. ed. ISBN : 2-7099-1171-X
- Laurent, D., Kerbrat, A.-S., Darius, H.T., Girard, E., Golubic, S., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Chinain, M., Molgo, J., Pauillac, S., 2008. Are cyanobacteria involved in Ciguatera Fish Poisoning-like outbreaks in New Caledonia? *Harmful Algae* 7, 827–838.
- Laurent, D., Kerbrat, A.-S.S., Darius, H.T., Rossi, F., Yeeting, B., Haddad, M., Golubic, S., Pauillac, S., Chinain, M., 2012. Ciguatera Shellfish Poisoning (CSP), a new ecotoxicological phenomenon. From cyanobacteria to humans via giant clams, in: Jensen, M.A. (Ed.), *Food Chains: New Research*. Nova Publishers, pp. 1–43.

- Laurent, D., Yeeting, B., Labrosse, P., Gaudechoux, J.-P., 2005. Ciguatera: a field reference guide. 91 p. ISBN: 2-7099-1556-1.
- Lawrence, D.N., Enriquez, M.B., Lumish, R.M., Maceo, A., 1980. Ciguatera Fish Poisoning in Miami. J. Am. Med. Assoc. 244, 254–258.
- Lee, H.J., Cho, H.-S., Park, E., Kim, S., Lee, S.-Y., Kim, C.-S., Kim, D.K., Kim, S.-J., Chun, H.S., 2008a. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. Toxicology 250, 109–115.
- Lee, J., Jung, E., Koh, J., Kim, Y.S., Park, D., 2008b. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. J. Dermatol. 35, 768–771.
- Lee, J., Kim, Y.S., Park, D., 2007a. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. Biochem. Pharmacol. 74, 960–968.
- Lee, J.H., Park, K.H., Lee, M.-H., Kim, H.-T., Seo, W.D., Kim, J.Y., Baek, I.-Y., Jang, D.S., Ha, T.J., 2013. Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. Food Chem. 136, 843–852.
- Lee, S.T., Knill, A.M., Michalewicz, A., Stevens, V., Colegate, S.M., 2007b. Chapter 81 *Heliotropium europaeum* alkaloids: a quaternary pyrrolizidine alkaloid approach to ELISA development, in: Poisonous Plants: Global Research and Solutions. pp. 476–480.
- Lehane, L., 1999. Ciguatera Fish Poisoning a review in a risk-assessment framework. Natl. Off. Anim. Plant Heal. Agric. Fish. For. 1–86.
- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. Int. J. Food Microbiol. 61, 91–125.
- Lehmann, H., 2013. Le médicament à base de plantes en Europe. Statut, enregistrement, contrôles. Thèse de doctorat de l'Université de Strasbourg, Strasbourg. 341 p.
- LePage, K.T., Rainier, J.D., Johnson, H.W.B., Baden, D.G., Murray, T.F., 2007. Gambierol acts as a functional antagonist of neurotoxin site 5 on voltage-gated sodium channels in cerebellar granule neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. 323, 174–179.
- Letendre, L., Ludwig, J., Perrault, J., Smithson, W.A., Kovach, J.S., 1984. Hepatocellular toxicity during the treatment of refractory acute leukemia with indicine N-oxide. Cancer 54, 1256–1259.
- Letendre, L., Smithson, W.A., Gilchrist, G.S., Burgert, E.O., Hoagland, C.H., Ames, M.M., Powis, G., Kovach, J.S., 1981. Activity of indicine N-oxide in refractory acute leukemia. Cancer 47, 437–441.
- Lewis, R., 1991. Excretion of ciguatoxin from fishes. SPC Ciguatera Inf. Bull. 7–9.
- Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. Toxicon 39, 97–106.
- Lewis, R.J., 2006. Ciguatera: Australian perspectives on a global problem. Toxicon 48, 799–809.
- Lewis, R.J., Holmes, M.J., 1993. Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. Comp. Biochem. Physiol. 106C, 615–628.
- Lewis, R.J., King, G.K., 1996. Ciguatera (fish poisoning), in: Williamson, J., Fenner, P., Burnett, J., Rifkin, J. (Eds.), Venomous and Poisonous Marine Animals: A Medical and Biological Handbook. UNSW Press, p. 504.
- Lewis, R.J., Wong Hoy, A.W., Sellin, M., 1993. Ciguatera and mannitol: *In vivo* and *in vitro* assessment in mice. Toxicon 31, 1039–1050.
- Li, G., Jiang, W., Qu, G., Tian, J., 2010. Use of rosmarinic acid in manufacture of medicaments for treating or preventing hepatic and renal diseases, Patent US 2010/0130604.
- Li, G.-S., Jiang, W.-L., Tian, J.-W., Qu, G.-W., Zhu, H.-B., Fu, F.-H., 2010. *In vitro* and *in vivo* antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. Phytomedicine 17, 282–288.
- Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2006. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. Life Sci. 79, 2056–2068.
- Lin, G., Zhou, K.-Y., Zhao, X.-G., Wang, Z.-T., But, P.P.H., 1998. Determination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids by on-line high performance liquid chromatography mass spectrometry with an electrospray interface. Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 1445–1456.
- Lin, Y., Tsai, Y., Kuo, Y., 1999. Phenolic compounds from *Tournefortia sarmentosa*. J. Nat. Prod. 62, 1500–1503.

- Lin, Y.Y., Chang, Y.Y., Kuo, Y., Shiao, M., 2002. Anti-Lipid-Peroxidative Principles from *Tournefortia sarmentosa*. J. Nat. Prod. 65, 745–747.
- Llewellyn, L., Tester, P., Hallegraeff, G., 2013. IOC/IPHAB-XI/Inf.14: CIGUATERA – A neglected tropical disease: An international plan for improved research and management. In: Documents for the eleventh session of the IOC intergovernmental panel on harmful algal blooms, UNESCO headquarters, Paris, France.
- Llewellyn, L.E., 2010. Revisiting the association between sea surface temperature and the epidemiology of fish poisoning in the South Pacific: reassessing the link between ciguatera and climate change. Toxicon 56, 691–697.
- Lombet, A., Bidard, J.-N., Lazdunski, M., 1987. Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel. FEBS Lett. 219, 355–359.
- Louzao, M.C., Cagide, E., Vieytes, M.R., Fuwa, H., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2006. The sodium channel of human excitable cells is a target for gambierol. Cell. Physiol. Biochem. 17, 257–268.
- Lowman, M.D., 1984. Grazing of *Utetheisa pulchelloides* larvae on its host plant, *Argusia argentea*, on Coral Cays of the Great Barrier. Biotropica 16, 14–18.
- Lu, Y., Foo, L.Y.Y., 1999. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. Phytochemistry 51, 91–94.
- Machan, T., Korth, J., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., Pyne, S.G., 2006. Composition and antituberculosis activity of the volatile oil of *Heliotropium indicum* Linn. growing in Phitsanulok, Thailand. Flavour Fragr. J. 21, 265–267.
- Macías, F.A., Simonet, A.M., D’Abrosca, B., Maya, C.C., Reina, M., Gonzalez-Coloma, A., Cabrera, R., Giménez, C., Villarroel, L., 2009. Megalanthine, a bioactive sesquiterpenoid from *Heliotropium megalanthum*, its degradation products and their bioactivities. J. Chem. Ecol. 35, 39–49.
- Makino, T., Ono, T., Muso, E., Honda, G., 1998. Inhibitory Effect of *Perilla frutescens* and its phenolic constituents on cultured murine mesangial cell proliferation. Planta Med. 64, 541–545.
- Manner, H.I., Elevitch, C.R., 2006. *Tournefortia argentea* (tree heliotrope). In: Elevitch, C.R. (Ed.), Species Profiles Pacific Island Agroforestry. Permanent agriculture resources, Holualoa, Hawaii, 1–12.
- Matsui, M., Kumar-Roine, S., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2010. Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line. Toxicon 56, 776–784.
- Matsui, M., Kumar-Roiné, S., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2009. Characterisation of the anti-inflammatory potential of *Vitex trifolia* L. (Labiatae), a multipurpose plant of the Pacific traditional medicine. J. Ethnopharmacol. 126, 427–433.
- Matsui, M.O., 2009. Rôle des cytokines dans la ciguatera : application à l’étude de remèdes traditionnels du Pacifique. Thèse de doctorat de l’Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa. 187 p.
- Matsuno, M., Nagatsu, A., Ogihara, Y., Ellis, B.E., Mizukami, H., 2002. CYP98A6 from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid biosynthesis. FEBS Lett. 514, 219–224.
- Mattei, C., Molgó, J., Marquais, M., Vernoux, J., Benoit, E., 1999. Hyperosmolar D-mannitol reverses the increased membrane excitability and the nodal swelling caused by Caribbean ciguatoxin-1 in single frog myelinated axons. Brain Res. 847, 50–58.
- Mattei, C., Wen, P.J., Nguyen-Huu, T.D., Alvarez, M., Benoit, E., Bourdelais, A.J., Lewis, R.J., Baden, D.G., Molgó, J., Meunier, F.A., 2008. Brevenal inhibits pacific ciguatoxin-1B-induced neurosecretion from bovine chromaffin cells. PLoS One 3, 1–9.
- Mattocks, A.R., 1964. 378. Strigosine, the major alkaloid of *Heliotropium strigosum*. J. Chem. Soc. 1974–1977.
- Mattocks, A.R., 1967a. Minor alkaloids of *Heliotropium indicum* L. J. Chem. Soc. C, 329–331.
- Mattocks, A.R., 1967b. Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. Anal. Chem. 39, 443–447.
- Mattocks, A.R., 1986. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Academic Press. 369 p. ISBN: 0124805701.
- Mattocks, A.R., Schoental, R., Crowley, C., Culvenor, C.C.J., 1961. 1064. Indicine: the Major Alkaloid of *Heliotropium*. J. Chem. Soc. 5400–5403.

- Medina, J.C.M., Gauze, G.F., Vidotti, G.J., Sarragiotto, M.H., Basso, E.A., Peixoto, J.L.B., 2009. Structural characterization of saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell by NMR spectroscopy and theoretical calculations. *Tetrahedron Lett.* 50, 2640–2642.
- Mendoza, L., Modak, B., Torres, R., Cotoras, M., 2008. *In vitro* sensitivity of *Botrytis Cinerea* to resinous exudates of *Heliotropium filifolium* and geranyl derivatives compounds. *J. Chil. Chem. Soc.* 53, 25–27.
- Meng, L., Lozano, Y., Bombarda, I., Gaydou, E.M., Li, B., 2009a. Polyphenol extraction from eight *Perilla frutescens* cultivars. *Comptes Rendus Chim.* 12, 602–611.
- Meng, L., Lozano, Y.F., Gaydou, E.M., Li, B., 2009b. Antioxidant activities of polyphenols extracted from *Perilla frutescens* varieties. *Molecules* 14, 133–140.
- Menon, G., Fast, D., 2005. Anti-allergy composition and related method, Patent WO/2005/074959.
- Modak, B., Contreras, M.L., González-Nilo, F., Torres, R., 2005. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 309–312.
- Modak, B., Galeno, H., Torres, R., 2004a. Antiviral activity on *Hantavirus* and apoptosis of Vero cells of natural and semi-synthetic compounds from *Heliotropium filifolium* resin. *J. Chil. Chem. Soc.* 49, 143–145.
- Modak, B., Rivas, A., Vallejos, E., Mar, A., 2012. Antiviral activity *in vitro* and *in vivo* of natural flavonoids isolated from *Heliotropium sinuatum* against infectious salmon anemia virus (ISAV). *Bol. Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromat.* 11, 377–384.
- Modak, B., Rojas, M., Torres, R., 2009a. Chemical analysis of the resinous exudate isolated from *Heliotropium taltalense* and evaluation of the antioxidant activity of the phenolics components and the resin in homogeneous and heterogeneous systems. *Molecules* 14, 1980–1989.
- Modak, B., Rojas, M., Torres, R., Rodilla, J., Luebert, F., 2007. Antioxidant activity of a new aromatic geranyl derivative of the resinous exudates from *Heliotropium glutinosum* Phil. *Molecules* 12, 1057–1063.
- Modak, B., Salina, M., Rodilla, J., Torres, R., 2009b. Study of the chemical composition of the resinous exudate isolated from *Heliotropium sclerocarpum* and evaluation of the antioxidant properties of the phenolic compounds and the resin. *Molecules* 14, 4625–4633.
- Modak, B., Sandino, A.M., Arata, L., Cárdenas-Jirón, G., Torres, R., 2010. Inhibitory effect of aromatic geranyl derivatives isolated from *Heliotropium filifolium* on infectious pancreatic necrosis virus replication. *Vet. Microbiol.* 141, 53–58.
- Modak, B., Torres, R., Lissi, E., delle Monache, F., 2003. Antioxidant capacity of flavonoids and a new arylphenol of the resinous exudate from *Heliotropium sinuatum*. *Nat. Prod. Res.* 17, 403–407.
- Modak, B., Torres, R., Urzúa, A., 2011. Seasonal variation of the flavonoids pinocembrin and 3-O-methylgalangin, in the surface component mixture (resinous exudates and waxy coating) of *Heliotropium stenophyllum*. *J. Chil. Chem. Soc.* 56, 532–534.
- Modak, B., Torres, R., Wilkens, M., Urzúa, A., 2004b. Antibacterial activity of compounds isolated of the resinous exudate from *Heliotropium sinuatum* on phytopathogenic bacteria. *J. Chil. Chem. Soc.* 49, 5–10.
- Mohabbat, O., Younos, M.S., Merzad, A.A., Srivastava, R.N., Sediq, G.G., Aram, G.N., 1976. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in north-western Afghanistan. *Lancet* 380, 269–271.
- Mohanraj, S., Kulanthaivela, P., Subramaniana, P.S., Herz, W., 1981. Helifoline, a pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium ovalifolium*. *Phytochemistry* 20, 1991–1995.
- Mohanraj, S., Subramanian, P.S., Culvenor, C.C.J., Edgar, J.A., Frahn, J.L., Smith, L.W., Cockrum, P.A., 1978. Curassavine, an alkaloid from *Heliotropium curassavicum* Linn. with a C8 necic acid skeleton. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 423–424.
- Mohanraj, S., Subramanian, P.S., Herz, W., 1982. Minor alkaloids of *Heliotropium curassavicum*. *Phytochemistry* 21, 1775–1779.
- Molgó, J., Comella, J.X., Legrand, a M., 1990. Ciguatoxin enhances quantal transmitter release from frog motor nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* 99, 695–700.
- Moon, D.-O., Kim, M.-O., Lee, J.-D., Choi, Y.H., Kim, G.-Y., 2010. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Lett.* 288, 183–191.

- Morrison, J., 1935. The journal of a boat wain's mate of the Bounty, Golden Coc. ed. London. 242 p.
- Mosihuzzaman, M., Choudhary, M.I., 2008. Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 80, 2195–2230.
- Motoyama, E., Tada, H., Shimomura, K., Yoshihira, K., Ishimaru, K., 1996. Caffeic acid esters in tissue cultures of *Heliotropium pervianum*. Plant Tissue Cult. Lett. 13, 73–74.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Bellumori, M., Giaccherini, C., Martini, V., Michelozzi, M., 2011. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. Talanta 85, 167–176.
- Muruges, K., Yeligar, V., Dash, D.K., Sengupta, P., Maiti, B.C., Maity, T.K., 2006. Antidiabetic, antioxidant and antihyperlipidemic status of *Heliotropium zeylanicum* extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. Biol. Pharm. Bull. 29, 2202–2205.
- Nabekura, T., Yamaki, T., Hiroi, T., Ueno, K., Kitagawa, S., 2010. Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals. Pharmacol. Res. 61, 259–263.
- Nadi, A. El, Elhag, E., Zaitoon, A., Al-Doghairi, M., 2001. Toxicity of three plants extracts to *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). Pakistan J. Biol. Sci. 4, 1503–1505.
- Nakamura, Y., Ohto, Y., Murakami, A., Ohigashi, H., 1998. Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* f. *viridis*. J. Agric. Food Chem. 46, 4545–4550.
- Nakazawa, T., Ohsawa, K., 1998. Metabolism of rosmarinic acid in rats. J. Nat. Prod. 61, 993–996.
- Nakazawa, T., Ohsawa, K., 2000. Metabolites of orally administered *Perilla frutescens* extract in rats and humans. Biol. Pharm. Bull. 23, 122–127.
- Natsume, M., Muto, Y., Fukuda, K., Tokunaga, T., Osakabe, N., 2006. Determination of rosmarinic acid and luteolin in *Perilla frutescens* Britton (Labiatae). J. Sci. Food Agric. 86, 897–901.
- Nguyen-Huu, T.D., Mattei, C., Wen, P.J., Bourdelais, A.J., Lewis, R.J., Benoit, E., Baden, D.G., Molgó, J., Meunier, F.A., 2009. Ciguatera-induced catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: mechanism of action and reversible inhibition by brevenal. Toxicon 56, 792–796.
- Nicholson, G.M., Lewis, R.J., 2006. Ciguaterins : Cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. Mar. Drugs 4, 82–118.
- Nishimura, T., Sato, S., Tawong, W., Sakanari, H., Uehara, K., Shah, M.M.R., Suda, S., Yasumoto, T., Taira, Y., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2013. Genetic diversity and distribution of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) in coastal areas of Japan. PLoS One 8, e60882.1–e60882.14.
- Noel, J.P., Austin, M.B., Bomati, E.K., 2005. Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. Curr. Opin. Plant Biol. 8, 249–253.
- O'Dowd, D.J., Edgar, J.A., 1989. Seasonal dynamics in the pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium europaeum*. Aust. J. Ecol. 14, 95–105.
- Ober, D., Hartmann, T., 1999. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 14777–14782.
- Ober, D., Kaltenecker, E., 2009. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. Phytochemistry 70, 1687–1695.
- Oberlies, N.H., Kim, N.-C., Brine, D.R., Collins, B.J., Handy, R.W., Sparacino, C.M., Wani, M.C., Wall, M.E., 2004. Analysis of herbal teas made from the leaves of comfrey (*Symphytum officinale*): reduction of N-oxides results in order of magnitude increases in the measurable concentration of pyrrolizidine alkaloids. Public Health Nutr. 7, 919–924.
- Ogihara, K., Irah, R., Higa, M., Yogi, S., 1997a. Studies on Constituents from the Twigs of *Messerschmidia argentea* II. Bull. Coll. Sci. Ryukyus 64, 53–59.
- Ogihara, K., Kuwae, M., Suzuka, T., Higa, M., 2012. Constituents from the fruits of *Messerschmidia argentea* (IV). Bull. Coll. Sci. Ryukyus 93, 47–54.

- Ogihara, K., Miyagi, Y., Higa, M., Seiichi Yogi, 1997b. Pyrrolizidine alkaloids from *Messerschmidia argentea*. *Phytochemistry* 44, 545–547.
- Ogihara, K., Nakazato, R., Higa, M., 2002. DPPH-radical Scavenging Constituents from the Twigs of *Messerschmidia argentea* (III). *Bull. Fac. Sci. Univ. Ryukyus* 74, 73–80.
- Ogunbinu, A.O., Flamini, G., Cioni, P.L., Adebayo, M.A., Ogunwande, I.A., 2009. Constituents of *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *Moringa oleifera* Lam., *Heliotropium indicum* L. and *Bidens pilosa* L. from Nigeria. *Nat. Prod. Commun.* 4, 573–578.
- Oishi, T., Konoki, K., Tamate, R., Torikai, K., Hasegawa, F., Matsumori, N., Murata, M., 2012. Artificial ladder-shaped polyethers that inhibit maitotoxin-induced Ca^{2+} influx in rat glioma C6 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 3619–3622.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M., 2004. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's b-amyloid fibrils *in vitro*. *J. Neurosci. Res.* 75, 742–750.
- Ortiz-Andrade, R.R., García-Jiménez, S., Castillo-España, P., Ramírez-Avila, G., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., 2007. Alpha-glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: an anti-hyperglycemic agent. *J. Ethnopharmacol.* 109, 48–53.
- Osakabe, N., Takano, H., Chiaki, S., Yasuda, A., Yanagisawa, R., Inoue, K.-I., Yoshikawa, T., 2004a. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *BioFactors* 21, 127–131.
- Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Sanbongi, C., Kato, Y., Osawa, T., Yoshikawa, T., 2002b. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 798–806.
- Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Yoshikawa, T., 2004b. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* 25, 549–557.
- Osungunna, M., Adediji, K., 2011. Phytochemical and antimicrobial screening of methanol extract of *Heliotropium indicum* leaf. *J. Microbiol. Antimicrob.* 3, 213–216.
- Öztürk, N., Tunçel, M., Uysal, U.D., Oncu-Kaya, E.M., Koyuncu, O., 2010. Determination of rosmarinic acid by high-performance liquid chromatography and its application to certain *Salvia* species and rosemary. *Food Anal. Methods.* 4, 300–306.
- Palafox, N.A., Buenconsejo-Lum, L.E., 2001. Ciguatera fish poisoning: Review of clinical manifestations. *Toxin Rev.* 20, 141–160.
- Palafox, N.A., Jain, L.G., Pinano, A.Z., Gulick, T.M., Williams, R.K., Schatz, I.J., 1988. Successful treatment of ciguatera fish poisoning with intravenous mannitol. *J. Am. Med. Assoc.* 259, 2740–2742.
- Pandey, V.B., Signh, J., Rao, Y. V., Acharya, S.B., 1982. Isolation and pharmacological action of heliotrine, the major alkaloid of *Heliotropium indicum* seeds. *Planta Med.* 45, 229–233.
- Parker-Cote, J.L., O'Rourke, D.P., Miller, S.N., Brewer, K.L., Rosenbaum, M.D., Meggs, W.J., 2014. Trypsin and rosmarinic acid reduce the toxicity of *Micrurus fulvius* venom in mice. *Clin. Toxicol.* 52, 118–120.
- Parlement européen, Conseil de l'Union européenne, 2004. Directive 2004/24/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004. *J. Off. l'Union Eur.* L136, 85–90.
- Pavlov, A.I., Georgiev, M.I., Panchev, I.N., Ilieva, M.P., 2005. Optimization of rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM plant cell suspension in a laboratory bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 21, 394–396.
- Pawlowicz, R., 2012. Développement d'outils pour une meilleure surveillance du risque lié aux intoxications par biotoxines marines en Polynésie. Thèse de doctorat de l'Université de la Polynésie française, Faa'a. 191 p.
- Pawlowicz, R., Darius, H.T., Cruchet, P., Rossi, F., Caillaud, A., Laurent, D., Chinain, M., 2013. Evaluation of seafood toxicity in the Australes archipelago (French Polynesia) using the neuroblastoma cell-based assay. *Food Addit. Contam. Part A* 37–41.
- Pearn, J., 2001. Neurology of ciguatera. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70, 4–8.
- Perez, C.M., Vasquez, P.A., Perret, C.F., 2001. Treatment of ciguatera poisoning with gabapentin. *N. Engl. J. Med.* 344, 692–693.

- Pérez, S., Vale, C., Alonso, E., Fuwa, H., Sasaki, M., Konno, Y., Goto, T., Suga, Y., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2012. Effect of gambierol and its tetracyclic and heptacyclic analogues in cultured cerebellar neurons: a structure-activity relationships study. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1929–1937.
- Pétard, P., 1948. Description et usages de quelques plantes indigènes de Tahiti. La végétation madréporique du district de Teavaro (îles Moorea). *J. Soc. Ocean.* 4, 115–131.
- Pétard, P., 1986. *Tournefortia argentea*, dans : *Plantes Utiles de Polynésie : Raau Tahiti*. 354 p. ISBN : 2904171061.
- Petersen, M., 1997. Cytochrome P450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. *Phytochemistry* 45, 1165–1172.
- Petersen, M., 2013. Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochem. Rev.* 12, 207–227.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S., 2009. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70, 1663–1679.
- Petersen, M., Häusler, E., Karwatzki, B., Meinhard, J., 1993. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta* 189, 10–14.
- Petersen, M., Simmond, M.S.J., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62, 121–125.
- Poli, M.A., Lewis, R.J., Dickey, R.W., Musser, S.M., Buckner, C.A., Carpenter, L.G., 1997. Identification of caribbean ciguatoxins as the cause of an outbreak of fish poisoning among U.S. soldiers in Haiti. *Toxicon* 35, 733–741.
- Prakash, A.S., Pereira, T.N., Reilly, P.E.B., Seawright, A.A., 1999. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat. Res.* 443, 53–67.
- Psotová, J., Svobodová, A., Kolarová, H., Walterová, D., 2006. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84, 167–174.
- Purcell, C.E., Capra, M.F., Cameron, J., 1999. Action of mannitol in ciguatoxin-intoxicated rats. *Toxicon* 37, 67–76.
- Purkerson-Parker, S.L., Fieber, L.A., Rein, K.S., Podona, T., Baden, D.G., 2000. Brevetoxin derivatives that inhibit toxin activity. *Chem. Biol.* 7, 385–393.
- Quod, J.-P., Turquet, J., 1996. Ciguatera in Reunion island (SW Indian Ocean): Epidemiology and clinical patterns. *Toxicon* 34, 779–785.
- Randall, J.E., 1958. A review of Ciguatera, tropical fish poisoning, with a tentative explanation of its cause. *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.* 8, 236–267.
- Razboršek, M.I., 2011. Stability studies on trans-rosmarinic acid and GC-MS analysis of its degradation product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 1010–1006.
- Razzaque, A., Ellis, B., 1977. Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta* 137, 287–291.
- Reddy, J.S., Rao, P.R., Reddy, M.S., 2002. Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats. *J. Ethnopharmacol.* 79, 249–251.
- Reina, M., Gonzalez-Coloma, A., Gutierrez, C., Cabrera, R., Henriquez, J., Villarroel, L., 1998. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium megalanthum*. *J. Nat. Prod.* 61, 1418–20.
- Reina, M., Gonzalez-Coloma, A., Gutierrez, C., Cabrera, R., Henriquez, J., Villarroel, L., 1997. Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridum*. *Phytochemistry* 46, 845–853.
- Reina, M., Meriçli, A.H., Cabrera, R., González-Coloma, A., 1995. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bovei*. *Phytochemistry* 38, 355–358.
- Reina, M., Meriçli, A.H., González-Coloma, A., 1998. A Minor pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium bovei*. *Nat. Prod. Lett.* 11, 291–296.
- Reinke, A.A., Gestwicki, J.E., 2007. Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility. *Chem. Biol. Drug Des.* 70, 206–215.
- Ren, P., Jiang, H., Li, R., Wang, J., Song, N., Xu, H.-M., Xie, J.-X., 2009. Rosmarinic acid inhibits 6-OHDA-induced neurotoxicity by anti-oxidation in MES23.5 cells. *J. Mol. Neurosci.* 39, 220–225.

- Renzulli, C., Galvano, F., Pierdomenico, L., Speroni, E., Guerra, M.C., 2004. Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B1 and ochratoxin-A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2). *J. Appl. Toxicol.* 24, 289–296.
- Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Hassan, N.M., 1991. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium arbainense* and *H. ovalifolium*. *Qatar Univ. Sci.* 11, 113–119.
- Roeder, E., 1995. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie* 50, 83–98.
- Roeder, E., 1999. Analysis of pyrrolizidine alkaloids. *Curr. Org. Chem.* 3, 557–576.
- Roeder, E., Breitmaiera, E., Birecka, H., Frohlich, M.W., Badzies-Crombach, A., 1991. Pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium spathulatum*. *Phytochemistry* 30, 1703–1706.
- Roeder, K., Erler, K., Kibler, S., Tester, P., Van The, H., Nguyen-Ngoc, L., Gerdts, G., Luckas, B., 2010. Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus spp.* *Toxicon* 56, 731–738.
- Rogers, R.W., 1993. Plant colonization of a rubble bank on Heron island, Great barrier reef, Australia. *Atoll Res. Bull.* 384, 1–9.
- Rongo, T., van Woesik, R., Woesik, R. Van, 2012. Socioeconomic consequences of ciguatera poisoning in Rarotonga, southern Cook Islands. *Harmful Algae* 20, 92–100.
- Roque-Albelo, L., Schroeder, F.C., Conner, W.E., Bezzerides, A., Hoebeke, E.R., Meinwald, J., Eisner, T., 2002. Chemical defense and aposematism: the case of *Utetheisa galapagensis*. *Chemoecology* 12, 153–157.
- Rosemann, G.M., 2006. Analysis of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species by HPLC-MS/MS in order to evaluate related food health risks. Phd thesis of the University of Pretoria, Pretoria. 105 p.
- Roué, M., Gugger, M., Golubic, S., Amzil, Z., Araoz, R., Turquet, J., Chinain, M., Laurent, D., 2014. Marine cyanotoxins potentially harmful to human health, in: La Barre, S., Kornprobst, J.M. (Eds.), *Outstanding marine molecules*. Wiley-Blackwell.
- Sachet, M.-H., 1983. Takapoto atoll, Tuamotu archipelago : Terrestrial vegetation and flora. *Atoll Res. Bull.* 277, 1–48.
- Sahin, S., Demir, C., Malyer, H., 2011. Determination of phenolic compounds in *Prunella* L. by liquid chromatography-diode array detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 1227–1230.
- Sahu, A., Rawal, N., Pangburn, M.K., 1999. Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochem. Pharmacol.* 57, 1439–1446.
- Sakuta, M., Komamine, A., 1987. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: Constabel F., Vasil I.K. (Eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, vol IV. Academic Press, San Diego, pp. 97–114.
- Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R., Inoue, K.-I., Sadakane, K., Ichinose, T., Yoshikawa, T., 2004. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clin. Exp. Allergy* 34, 971–977.
- Sánchez-Campillo, M., Gabaldon, J.A., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Baño, M.J., Alcaraz, M., Vicente, V., Alvarez, N., Lozano, J.A., 2009. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem. Toxicol.* 47, 386–392.
- Sanz, J.M. De, Rafael Rornán, B., Zambrano, O., 1993. Hepatotoxicidad de la maleza *Heliotropium indicum* L. (Rabo de alacran) Familia Boraginaceae. *Rev. Cient.* III, 68–73.
- Satake, M., 2006. Marine Polyether Compounds. *Top. Heterocycl. Chem.* 5, 21–51.
- Sauer, J.D., 1962. Effects of recent tropical cyclones on the coastal vegetation of Mauritius. *J. Ecol.* 50, 275–290.
- Sayer, A., Hu, Q., Bourdelais, A.A.J., Baden, D.G., Gibson, J.E., 2005. The effect of brevenal on brevetoxin-induced DNA damage in human lymphocytes. *Arch. Toxicol.* 79, 683–688.
- Scarpati, M., Oriente, G., 1958. Isolamento e costituzione dell' acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off.*). *Ric Sci* 28, 2329–2333.
- Scheuer, P.J., Takahashi, W., Tsutsumi, J., Yoshida, T., 1967. Ciguatoxin: isolation and chemical nature. *Science* 155, 1267–1268.
- Schilter, B., Andersson, C., Anton, R., Constable, A., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A., Korver, O., Smit, F., Walker, R., 2003. Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in

- p>
food and food supplements. Food Chem. Toxicol. 41, 1625–1649.
- Schlumberger, S., Ouanounou, G., Girard, E., Sasaki, M., Fuwa, H., Louzao, M.C., Botana, L.M., Benoit, E., Molgó, J., 2010. The marine polyether gambierol enhances muscle contraction and blocks a transient K⁺ current in skeletal muscle cells. Toxicon 56, 785–791.
- Schmelzer, G.H., Gurib-Fakim, A. (Eds.), 2008. Medicinal plants (Vol 11), in: Plant Ressources of Tropical Africa. PROTA, p. 790.
- Schnorf, H., Tauraii, M., Cundy, T., 2002. Ciguatera fish poisoning A double-blind randomized trial of mannitol therapy. Neurology 58, 873–880.
- Schoental, R., 1968. Toxicology and carcinogenic action of pyrrolizidine alkaloids. Cancer Res. 28, 2237–2246.
- Schoental, R., Cavanagh, J.B., 1972. Brain and spinal cord tumors in rats treated with pyrrolizidine alkaloids. J. Natl. Cancer Inst. 49, 665–671.
- Schoental, R., Fowler, M.E., Coady, A., 1970. Islet cell tumors of the pancreas found in rats given pyrrolizidine alkaloids from *Amsinckia intermedia* Fisch and Mey and from *Heliotropium supinum* L. Cancer Res. 30, 2127–2131.
- Shafiee, A., Salimi, M., Farsam, H., Yassa, N., 2002. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium dissitiflorum* Boiss. DARU 10, 168–170.
- Shah, S.M., Hussain, S., Khan, A.-U., Shah, A.-U.-H.A., Khan, H., Ullah, F., Tullah, B., 2013. Cytotoxic and phytotoxic actions of *Heliotropium strigosum*. Toxicol. Ind. Health 1–4.
- Shakirov, T., Akramov, S., Yunusov, S., 1967. Isolation of heliotrine by the ion-exchange method. Chem. Nat. Compd. 3, 411–412.
- Singh, B., Dubey, M.M., 2001. Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. ex Retz. *in vivo* and *in vitro*. I. Antimicrobial screening. Phyther. Res. 15, 231–234.
- Singh, B., Sahu, P.M., Singh, S., 2002. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. Fitoterapia 73, 153–155.
- Skinner, M.P., Brewer, T.D., Johnstone, R., Fleming, L.E., Lewis, R.J., 2011. Ciguatera fish poisoning in the Pacific Islands (1998 to 2008). PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1416.1–e1416.7.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. Mutat. Res. 579, 200–213.
- Souza, J.S.N., Machado, L.L., Pessoa, O.D.L., Braz-Filho, R., Overk, C.R., Yao, P., Cordell, G.A., Lemos, T.L.G., 2005. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium indicum*. J. Braz. Chem. Soc. 16, 1410–1414.
- Srinivas, K., Rao, M.E.B., Rao, S.S., 2000. Anti-inflammatory activity of *Heliotropium indicum* Linn. and *Leucas aspera* Spreng. in albino rats. Indian J. Pharmacol. 32, 37–38.
- Stegelmeier, B.L., 2011. Pyrrolizidine Alkaloid-Containing Toxic Plants (*Senecio*, *Crotalaria*, *Cynoglossum*, *Amsinckia*, *Heliotropium*, and *Echium spp.*). Vet. Clin. North Am. : Food Anim. Pract. 27, 419–428.
- Stermitz, F.R., L'Empereur, K.M., 1988. Identity of “subulacine N-oxide” with 1β,2β-epoxy-1α-hydroxymethyl-8α-pyrrolizidine. Tetrahedron Lett. 29, 4943–4944.
- Stewart, I., Lewis, R.J., Eaglesham, G.K., Graham, G.C., Poole, S., Craig, S.B., 2010. Emerging tropical diseases in Australia. Part 2. Ciguatera fish poisoning. Ann. Trop. Med. Parasitol. 104, 557–571.
- Stickel, F., Seitz, H.K., 2000. The efficacy and safety of comfrey. Public Health Nutr. 3, 501–508.
- Subramanian, P., Mohanraj, S., Cockrum, P., Culvenor, C., Edgar, J.J.F., Smith, L., 1980. The alkaloids of *Heliotropium curassavicum*. Aust. J. Chem. 33, 1357–1363.
- Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A., Basu, A., 2007. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 3367–3370.
- Swick, R., Cheeke, P., Patton, N., Buhler, D., 1982. Absorption and excretion of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids and their effects on mineral metabolism in rabbits. J. Anim. Sci. 55, 1417–1424.
- Swift, A.E.B., Swift, T.R., 1993. Ciguatera. Clin. Toxicol. 31, 1–29.
- Szabo, E., Thelen, A., Petersen, M., 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell Rep. 18, 485–489.

- Tache, A., Radu, G.-L., Litescu, S.-C., 2012. Assessment of role of rosmarinic acid in preventing oxidative process of low density lipoproteins. Chem. Pap. 66, 1166–1170.
- Tada, H., Ikeda, Y., Omoto, T., Shimomura, K., Ishimaru, K., 1996. Rosmarinic acid and related phenolics in adventitious root cultures of *Ocimum basilicum* L. Plant Tissue Cult. Lett. 13, 69–71.
- Takano, H., Osakabe, N., Sanbongi, C., Yanagisawa, R., Inoue, K., Yasuda, A., Natsume, M., Baba, S., Ichiishi, E., Yoshikawa, T., 2004. Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. Exp. Biol. Med. 229, 247–254.
- Teng, C.-Y., Lai, Y.-L., Huang, H.-I., Hsu, W.-H., Yang, C.-C., Kuo, W.-H., 2012. *Tournefortia sarmentosa* extract attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity. Pharm. Biol. 50, 291–396.
- Tepe, B., 2008. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. Bioresour. Technol. 99, 1584–1588.
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A., Aydin, E., 2007. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Frey & Bornm.) Bornm. Food Chem. 100, 985–989.
- Thompson, L., 1949. The relations of men, animals, and plants in an island community (Fiji). Am. Anthropol. 51, 253–267.
- Ticli, F.K., Hage, L.I.S., Cambraia, R.S., Pereira, P.S., Magro, A.J., Fontes, M.R.M., Stábeli, R.G., Giglio, J.R., França, S.C., Soares, A.M., Sampaio, S. V., 2005. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. Toxicon 46, 318–327.
- Ting, J.Y., Brown, a F., 2001. Ciguatera poisoning: a global issue with common management problems. Eur. J. Emerg. Med. 8, 295–300.
- Tistaert, C., Dejaegher, B., Vander Heyden, Y., 2011. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. Anal. Chim. Acta 690, 148–161.
- Tomihara, Y., Ogihara, K., Araki, Y., Shimoji, K., Fukumura, K., Tokumura, K., Nozaki, M., 1993. Purification of antihemolytic factor from the *Messerschmidia argentea*. eikanken-okinawa.jp 27, 64–66.
- Tosun, F., Tamer, U., 2004. Determination of pyrrolizidine alkaloids in the seeds of *Heliotropium europaeum* by GC-MS. Ankara Ecz. Fak. Derg. 33, 7–9.
- Trigo, J.R., 2011. Effects of pyrrolizidine alkaloids through different trophic levels. Phytochem. Rev. 10, 83–98.
- Trigo, J.R., Witte, L., Jr., K.S.B., Hartmann, T., Barata, L.E.S., 1993. Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. J. Chem. Ecol. 19, 669–679.
- Troncoso, N., Sierra, H., Carvajal, L., Delpiano, P., Günther, G., 2005. Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet-visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary. J. Chromatogr. A 1100, 20–25.
- Tsumuraya, T., Takeuchi, K., Yamashita, S., Fujii, I., Hiram, M., 2012. Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1B: thiol strategy and detection using a sandwich ELISA. Toxicon 60, 348–357.
- Ulbrich, B., Wiesner, W., Arens, H., 1985. Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth., in: Neumann, K.-H., Barz, W., Reinhard, E. (Eds.), Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Springer Berlin Heidelberg, pp. 293–303.
- Urzúa, A., Echeverría, J., Rezende, M.C., Wilkens, M., 2008. Antibacterial properties of 3 H-spiro[1-benzofuran-2,1'-cyclohexane] derivatives from *Heliotropium filifolium*. Molecules 13, 2385–2393.
- Urzúa, A., Modak, B., Santander, R., 2013. Insecticidal properties of *Heliotropium stenophyllum* essential oil on the house fly, *Musca domestica* L. Bol. Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromat. 12, 196–200.
- Urzúa, A., Modak, B., Torres, R., 2001. Identification of a new aromatic geranyl derivative in the resinous exudate of *Heliotropium filifolium* (Boraginaceae). Boletín la Soc. Chil. Química 46, 175–178.
- Urzúa, A., Modak, B., Villarreal, L., Torres, R., Andrade, L., Mendoza, L., Wilkens, M., 2000. External Flavonoids From *Heliotropium Megalanthum* and *H. Huascoense* (Boraginaceae). Chemotaxonomic Considerations.

- Boletín la Soc. Chil. Química 45, 23–29.
- Urzúa, A., Villarroel, L., Torres, R., Teillier, S., 1993. Flavonoids in the resinous exudate of Chilean *Heliotropium* species from *Cochranea* section. *Biochem. Syst. Ecol.* 21, 744.
- Van Dam, N.M., Verpoorte, R., Meijden, E. van der, 1994. Extreme differences in pyrrolizidine alkaloid levels between leaves of *Cynoglossum officinale*. *Phytochemistry* 37, 1013–1016.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl, 133–141.
- Venkatachalam, K., Gunasekaran, S., Jesudoss, V.A.S., Namasivayam, N., 2013. The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65, 409–418.
- Villareal, T. a., Hanson, S., Qualia, S., Jester, E.L.E., Granade, H.R., Dickey, R.W., 2007. Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 6, 253–259.
- Villarroel, L., Torres, R., Urzúa, A., Reina, M., Cabrera, R., Gonzalez-Coloma, A., 2001. *Heliotropium huascoense* resin exudate: chemical constituents and defensive properties. *J. Nat. Prod.* 64, 20–23.
- Vlietinck, A., Pieters, L., Apers, S., 2009. Legal requirements for the quality of herbal substances and herbal preparations for the manufacturing of herbal medicinal products in the European union. *Planta Med.* 75, 683–688.
- Vostálová, J., Zdarilová, A., Svobodová, A., 2010. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 171–181.
- Waldren, S., Florence, J., Chepstow-Lusty, A.J., 1995. Rare and endemic vascular plants of the Pitcairn Islands, south-central Pacific Ocean: a conservation appraisal. *Biol. Conserv.* 74, 83–98.
- Walker, R., 2004. Criteria for risk assessment of botanical food supplements. *Toxicol. Lett.* 149, 187–195.
- Wang, D.-Z., 2008. Neurotoxins from Marine Dinoflagellates : A Brief Review. *Mar. Drugs* 6, 349–371.
- Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K., 2004. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.* 87, 307–311.
- Wang, J., Xu, H., Jiang, H., Du, X., Sun, P., Xie, J., 2012. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* 47, 113–119.
- WHO, 1988. Pyrrolizidine alkaloids. *Environ. Heal. Criteria* 80, 1–345.
- WHO, 2005. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines. ISBN 92 4 159323 7.
- Wise, B.L., Chater, N., 1962. The value of hypertonic mannitol solution in decreasing brain mass and lowering cerebrospinal-fluid pressure. *J. Neurosurg.* 19, 1038–1043.
- World Conservation Monitoring Centre, 1998. *Argusia argentea*. In: IUCN Red List Threat. Species Version 2013.2. <www.iucnredlist.org> (consulted the April 29, 2013).
- Wu, Y., Inoue, K.-I., 1996. Analyses of flavonoids in leaves of *Messerschmidia argentea* Johnston from Japan. *J. Zhejiang Med. Univ.* 25, 1–3.
- Wuilloud, J.C.A., Gratze, S.R., Gamble, B.M., Wolnik, K.A., 2004. Simultaneous analysis of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in comfrey root by LC-ion trap mass spectrometry. *Analyst* 129, 150–156.
- Xia, Q., Chou, M.W., Kadlubar, F.F., Chan, P.-C., Fu, P.P., 2003. Human liver microsomal metabolism and DNA adduct formation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 66–73.
- Xu, J., Shen, J., Cheng, Y., Qu, H., 2008. Simultaneous detection of seven phenolic acids in Danshen injection using HPLC with ultraviolet detector. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9, 728–733.
- Yamamura, Y., Ogihara, Y., Mizukami, H., 2001. Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon* :

- cDNA cloning and gene expression. *Plant Cell Rep.* 20, 655–662.
- Yamaoka, K., Inoue, M., Hirama, M., 2011. A study on mechanisms of toxic actions of ciguatoxins: existence of functional relationship between CTX3C and charged residues of voltage sensors in Nav1.4 sodium channel. *Forensic Toxicol.* 29, 125–131.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., Wu, J.Y., 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci.* 170, 853–858.
- Yang, E., Ku, S., Lee, W., Lee, S., 2013a. Barrier protective effects of rosmarinic acid on HMGB1-induced inflammatory responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Physiology* 228, 975–982.
- Yang, T., Shen, D.-P., Wang, Q.-L., Tao, Y.-Y., Liu, C.-H., 2013b. Investigation of the absorbed and metabolized components of Danshen from Fuzheng Huayu recipe and study on the anti-hepatic fibrosis effects of these components. *J. Ethnopharmacol.* 148, 691–700.
- Yasumoto, T., 2005. Chemistry, etiology, and food chain dynamics of marine toxins. *Proc. Japan Acad.* 81, 43–51.
- Yasumoto, T., Nakajima, I., Bagnis, R., Adachi, R., 1977. Finding of a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* 43, 1021–1026.
- Yeo, D., Attioua, B., Lehalle, C., Kossi, M., N'guessan, J.D., Djaman, A.J., Lobstein, A., Frossard, N., 2011. Isolation of wound healing compounds from *Heliotropium indicum*. *J. Appl. Pharm. Sci.* 01, 102–106.
- Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., Vardar-Sukan, F., 2010. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnolic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 158–163.
- Zalkow, L.H., Bonetii, S., Gelbaum, L., Gordon, M., Patil, B., Shani, A., Derveer, D. Van, 1979. Pyrrolizidine alkaloids from middle eastern plants. *J. Nat. Prod.* 42, 603–614.
- Zalkow, L.H., Glinski, J.A., Gelbaum, L.T., Fleischmann, T.J., McGowan, L.S., Gordon, M.M., 1985. Synthesis of pyrrolizidine alkaloids indicine, intermedine, lycopsamine, and analogs and their N-oxides. Potential antitumor agents. *J. Med. Chem.* 28, 687–694.
- Zdarilová, A., Svobodová, A., Simánek, V., Ulrichová, J., 2009. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid suppress lipopolysaccharide-induced alteration in human gingival fibroblasts. *Toxicol. Vit.* 23, 386–392.
- Zenk, M., El-Shagi, H., Ulbrich, B., 1977. Production of rosmarinic acid by cell-suspension cultures of *Coleus blumei*. *Naturwissenschaften* 64, 585–586.
- Zenk, M., Etschenberg, E., Graf, E., 1982. Use of rosmarinic acid in the treatment of inflammations and pharmaceutical products used there in, Patent US 1982 4,329,361.
- Zimmermann, K., Deuis, J.R., Inserra, M.C., Collins, L.S., Namer, B., Cabot, P.J., Reeh, P.W., Lewis, R.J., Vetter, I., 2013. Analgesic treatment of ciguatoxin-induced cold allodynia. *Pain* 154, 1999–2006.
- Zinsmeister, H.D., Becker, H., Eicher, T., 1991. Moose, eine Quelle biologisch aktiver Naturstoffe? *Angew. Chemie* 103, 134–151.

Chap. 2 Évaluation biologique de l'extrait d'*H. foertherianum* face aux ciguatoxines

- Aggarwal, B.B., Harikumar, K.B., 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 40–59.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Yasuda, A., Muto, Y., Hiyoshi, K., Takano, H., Yoshikawa, T., Terao, J., 2005. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Eur. J. Nutr.* 44, 1–9.
- Benoit, É., Laurent, D., Mattei, C., Legrand, A.-M., Molgó, J., Benoit, E., Molgó, J., 2000. Reversal of Pacific ciguatoxin-1B effects on myelinated axons by agents used in Ciguatera treatment. *Cybiu* 24, 33–40.
- Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N., 1988. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays—The

- neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. Vitro.* 2, 1–6.
- Bourdelaïs, A.J., Campbell, S., Jacocks, H., Naar, J., Wright, J.L.C., Carsi, J., Baden, D.G., 2004. Brevenal is a natural inhibitor of brevetoxin action in sodium channel receptor binding assays. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24, 553–563.
- Boydron-Le Garrec, R., 2005. Évaluation du potentiel thérapeutique de plantes traditionnellement utilisées dans le Pacifique pour traiter l'intoxication ciguaterique. Thèse de doctorat de l'Université de la Nouvelle-Calédonie, Nouméa. 257 p.
- Boydron-Le Garrec, R., Benoit, E., Sauviat, M.-P., Lewis, R.J., Molgó, J., Laurent, D., 2005. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. *Toxicon* 46, 625–634.
- Braidy, N., Matin, A., Rossi, F., Chinain, M., Laurent, D., Guillemin, G.J., 2014. Neuroprotective Effects of Rosmarinic Acid on Ciguatoxin in Primary Human Neurons. *Neurotox. Res.* 25, 226–234.
- Bult, H., Herman, A.G., Rampart, M., 1985. Modification of endotoxin-induced haemodynamic and haematological changes in the rabbit by methylprednisolone, F(ab')₂ fragments and rosmarinic acid. *Br. J. Pharmacol.* 84, 317–327.
- Cagide, E., Louzao, M.C., Espiña, B., Ares, I.R., Vieytes, M.R., Sasaki, M., Fuwa, H., Tsukano, C., Konno, Y., Yotsu-Yamashita, M., Paquette, L.A., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2011. Comparative cytotoxicity of gambierol versus other marine neurotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 835–842.
- Catterall, W.A., 1986. Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 953–985.
- Chen, J.H., Ho, C.-T., 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2374–2378.
- Darius, H.T., Ponton, D., Revel, T., Cruchet, P., Ung, A., Tchou Fouc, M., Chinain, M., 2007. Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay. *Toxicon* 50, 612–626.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M.-L., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods* 115, 61–69.
- Dong, A., Fang, Y., Zhang, L., Xie, J., Wu, X., Zhang, L., Lian, X., Chen, Y., Luo, J., Liu, M., 2011. Caffeic acid 3,4-dihydroxy-phenethyl ester (CADPE) induces cancer cell senescence by suppressing Twist expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339, 238–249.
- Fuwa, H., Kainuma, N., Tachibana, K., Tsukano, C., Satake, M., Sasaki, M., 2004. Diverted Total Synthesis and Biological Evaluation of Gambierol Analogues: Elucidation of Crucial Structural Elements for Potent Toxicity. *Chem. – A Eur. J.* 10, 4894–4909.
- Inoue, M., Hirama, M., Satake, M., Sugiyama, K., Yasumoto, T., 2003. Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A. *Toxicon* 41, 469–474.
- Inoue, M., Lee, N., Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M., 2009. Use of monoclonal antibodies as an effective strategy for treatment of ciguatera poisoning. *Toxicon* 53, 802–805.
- Kumar-Roiné, S., 2009. Valorisation de remèdes traditionnels utilisés dans le traitement de la ciguatera dans le Pacifique. Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa. 220 p.
- Lehane, L., Lewis, R.J., 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 91–125.
- Lewis, R.J., 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon* 39, 97–106.
- Lowman, M.D., 1984. Grazing of *Utetheisa pulchelloides* larvae on its host plant, *Argusia argentea*, on Coral Cays of the Great Barrier. *Biotropica* 16, 14–18.

- Matsui, M., Kumar-Roine, S., Darius, H.T., Chinain, M., Laurent, D., Pauillac, S., 2010. Pacific ciguatoxin 1B-induced modulation of inflammatory mediators in a murine macrophage cell line. *Toxicon* 56, 776–784.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Motulsky, H.J., 2010. *Intuitive biostatistics: a nonmathematical guide to statistical thinking*, 2nd ed. Oxford University Press. ISBN: 0199730067.
- Nachlas, M., Margulies, S., Goldberg, J., Seligman, A., 1960. The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.* 326, 317–326.
- Oishi, T., Konoki, K., Tamate, R., Torikai, K., Hasegawa, F., Matsumori, N., Murata, M., 2012. Artificial ladder-shaped polyethers that inhibit maitotoxin-induced Ca^{2+} influx in rat glioma C6 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 3619–3622.
- Osakabe, N., Takano, H., Chiaki, S., Yasuda, A., Yanagisawa, R., Inoue, K.-I., Yoshikawa, T., 2004a. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *BioFactors* 21, 127–131.
- Pawlowicz, R., Darius, H.T., Cruchet, P., Rossi, F., Caillaud, A., Laurent, D., Chinain, M., 2013. Evaluation of seafood toxicity in the Australes archipelago (French Polynesia) using the neuroblastoma cell-based assay. *Food Addit. Contam. Part A* 37–41.
- Ryan, J.C., Bottein Dechraoui, M.-Y., Morey, J.S., Rezvani, A., Levin, E.D., Gordon, C.J., Ramsdell, J.S., Van Dolah, F.M., 2007. Transcriptional profiling of whole blood and serum protein analysis of mice exposed to the neurotoxin Pacific Ciguatoxin-1. *Neurotoxicology* 28, 1099–109.
- Schnorf, H., Taurarii, M., Cundy, T., 2002. Ciguatera fish poisoning A double-blind randomized trial of mannitol therapy. *Neurology* 58, 873–880.
- Wu, W.-M., Lu, L., Long, Y., Wang, T., Liu, L., Chen, Q., Wang, R., 2007. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes : A structure–activity insight. *Food Chem.* 105, 107–115.

Chap. 3 Caractérisation chimique de l'extrait de feuilles d'*H. foertherianum*

- Alaerts, G., Merino-Arévalo, M., Dumarey, M., Dejaegher, B., Noppe, N., Matthijs, N., Smeyers-Verbeke, J., Vander Heyden, Y., 2010. Exploratory analysis of chromatographic fingerprints to distinguish rhizoma Chuanxiong and rhizoma Ligustici. *J. Chromatogr. A* 1217, 7706–7716.
- Andrási, N., Helenkár, A., Záray, G., Vasanits, A., Molnár-Perl, I., 2011. Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids, as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas chromatography mass spectrometry: analysis of dissolved steroids in wastewater samples. *J. Chromatogr. A* 1218, 1878–1890.
- Beckman, C.H., 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 101–110.
- Birecka, H., Catalfamo, J.L., Eisen, R.N., 1981. A sensitive method for detection and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry* 20, 343–344.
- Borstel, K. V., Witte, L., Hartmann, T., 1989. Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids. *Phytochemistry* 28, 1635–1638.
- Bourdy, G., Cabalion, P., Amade, P., Laurent, D., 1992. Traditional remedies used in the Western Pacific for the

- treatment of ciguatera poisoning. J. Ethnopharmacol. 36, 163–174.
- Braidy, N., Grant, R., Adams, S., Guillemin, G.J., 2010. Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. FEBS J. 277, 368–382.
- Burnouf-Radosevich, M., Delfel, N.E., England, R., 1985. Gas chromatography-mass spectrometry of oleanane and ursane type triterpenes - Application to *Chenopodium quinoa* triterpenes. Phytochemistry 24, 2063–2066.
- Butaud, J.-F., Gérard, J., Guibal, D., 2008. *Heliotropium foertherianum*, dans : Guide Des Arbres de Polynésie Française : Bois et Utilisations. pp. 134-138. ISBN : 2915654379.
- Coowar, D., Couhce, E., Koncina, E., 2009. Chromenone derivatives useful for the treatment of neurodegenerative diseases, Patent EP 2 112 145 A1.
- van Dam, N.M., Verpoorte, R., Meijden, E. van der, 1994. Extreme differences in pyrrolizidine alkaloid levels between leaves of *Cynoglossum officinale*. Phytochemistry 37, 1013–1016.
- FAO/OMS, 2011. Document de travail sur les alcaloïdes de pyrrolizidine. 5^{ème} session de la commission du codex alimentarius, La Haye, Pays-Bas. 86 p.
- FDA, 2000. Guidance for industry; Analytical procedures and methods validation; Chemistry, manufacturing, and Controls Documentation. 33 p.
- Fletcher, R.S., Slimmon, T., Kott, L.S., 2010. Environmental Factors Affecting the Accumulation of Rosmarinic Acid in Spearmint (*Mentha spicata* L.) and Peppermint (*Mentha piperita* L.). Open Agric. J. 4, 10–16.
- Frölich, C., Ober, D., Hartmann, T., 2007. Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three *Boraginaceae* species. Phytochemistry 68, 1026–1037.
- Gomes, A., Saha, A., Chatterjee, I., Chakravarty, A.K., 2007. Viper and cobra venom neutralization by beta-sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). Phytomedicine 14, 637–643.
- Heo, H.J., Kim, D.-O., Shin, S.C., Kim, M.J., Kim, B.G., Shin, D.-H., 2004. Effect of antioxidant flavanone, naringenin, from *Citrus junoson* neuroprotection. J. Agric. Food Chem. 52, 1520–1525.
- Holanda Pinto, S.A., Pinto, L.M.S., Cunha, G.M.A., Chaves, M.H., Santos, F.A., Rao, V.S., 2008. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. Inflammopharmacology 16, 48–52.
- Hosch, G., Wiedenfeld, H., Dingermann, T., Roeder, E., 1996. A new high performance liquid chromatography method for the simultaneous quantitative analysis of pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides in plant material. Phytochem. Anal. 7, 284–288.
- ICH, 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1). 17 p.
- ISPF, 2014. Températures moyennes. L'environnement en Polynésie française, <www.ispf.pf> (consulté le 30 avril 2013).
- Janicsák, G., Mathé, I., Miklossy-Vari, V., Blunden, G., 1999. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. Biochem. Syst. Ecol. 27, 733–738.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdely, C., 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. C. R. Biol. 331, 865–873.

- Lam, F.F.Y., Yeung, J.H.K., Chan, K.M., Or, P.M.Y., 2007. Relaxant effects of danshen aqueous extract and its constituent danshensu on rat coronary artery are mediated by inhibition of calcium channels. *Vascul. Pharmacol.* 46, 271–277.
- Lebada, R., Schreier, A., Scherz, S., Resch, C., Krenn, L., Kopp, B., 2000. Quantitative analysis of the pyrrolizidine alkaloids senkirkine and senecionine in *Tussilago farfara* L. by capillary electrophoresis. *Phytochem. Anal.* 11, 366–369.
- Lech, K., Witkoś, K., Jarosz, M., 2014. HPLC-UV-ESI MS/MS identification of the color constituents of sawwort (*Serratula tinctoria* L.). *Anal. Bioanal. Chem.* DOI 10.1007/s00216-013-7589-3
- Letendre, L., Ludwig, J., Perrault, J., Smithson, W.A., Kovach, J.S., 1984. Hepatocellular toxicity during the treatment of refractory acute leukemia with indicine N-oxide. *Cancer* 54, 1256–1259.
- Liu, A.-H., Guo, H., Ye, M., Lin, Y.-H., Sun, J.-H., Xu, M., Guo, D.-A., 2007. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1161, 170–182.
- Liu, H., Li, X., Xiao, J., Wang, S., 2012. A convenient method for simultaneous quantification of multiple phytohormones and metabolites: application in study of rice-bacterium interaction. *Plant Methods* 8, 2.
- Mattocks, A., 1967. Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr. A* 27, 505–508.
- Mroczek, T., Glowinski, K., Wlaszczyk, A., 2002. Simultaneous determination of N-oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 949, 249–262.
- Mueller-Dombois, D., Fosberg, F.R., 1998. Chapter VIII Eastern Polynesia, in: *Vegetation of the Tropical Pacific Islands*. pp. 385–391. ISBN: 978-1-4419-8686-3.
- Muñoz-Muñoz, A.C., Grenier, A.C., Gutiérrez-Pulido, H., Cervantes-Martínez, J., 2008. Development and validation of a high performance liquid chromatography-diode array detection method for the determination of aging markers in tequila. *J. Chromatogr. A* 1213, 218–223.
- Muthaiah, V.P.K., Venkatasamy, L., Michael, F.M., Chandrasekar, K., Venkatachalam, S., 2013. Neuroprotective role of naringenin on carbaryl induced neurotoxicity in mouse neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 4, 192–197.
- Ogihara, K., Miyagi, Y., Higa, M., Seiichi Yogi, 1997b. Pyrrolizidine alkaloids from *Messerschmidia argentea*. *Phytochemistry* 44, 545–547.
- OMS, 1988. Pyrrolizidine alkaloids: Environmental health criteria Series No. 80. 345 p. ISBN: 9241542802.
- Pétard, P., 1986. *Tournefortia argentea*, dans : *Plantes Utiles de Polynésie : Raau Tahiti*. 354 p. ISBN : 2904171061.
- Petinatti, D., Petinatti, S., Niehues, M., Peporine, N., 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 5–16.
- Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., Carda-Broch, S., 2012. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *J. Chromatogr. A* 1232, 101–109.
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A* 1112, 31–63.
- Ruan, M., Li, Y., Li, X., Luo, J., Kong, L., 2012. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Guan-Xin-Ning injection by HPLC-DAD-ESI-MS(n). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 59, 184–189.
- Sánchez-Avila, N., Priego-Capote, F., Ruiz-Jiménez, J., de Castro, M.D.L., 2009. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with

- multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction. *Talanta* 78, 40–48.
- Sauviat, M.-P., Boydrón-Le Garrec, R., Masson, J.-B., Lewis, R.J., Vernoux, J.-P., Molgo, J., Laurent, D., Benoit, E., 2006. Mechanisms involved in the swelling of erythrocytes caused by Pacific and Caribbean ciguatoxins. *Blood Cells. Mol. Dis.* 36, 1–9.
- Shiga, T., Shoji, K., Shimada, H., Hashida, S., Goto, F., Yoshihara, T., 2009. Effect of light quality on rosmarinic acid content and antioxidant activity of sweet basil, *Ocimum basilicum* L. *Plant Biotechnol.* 26, 255–259.
- Soldi, C., Pizzolatti, M.G., Luiz, A.P., Marcon, R., Meotti, F.C., Mioto, L.A., Santos, A.R.S., 2008. Synthetic derivatives of the alpha- and beta-amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 3377–3386.
- Torres, R., Villarroel, L., Urzúa, A., Monache, F.D., Monache, G.D., Gacs-Baitz, E., 1994. Reports a rearranged geranyl aromatic derivative from the resinous exudate of *Heliotropium filifolium*. *Phytochemistry* 36, 249–250.
- Wang, B., Lüttge, U., Ratajczak, R., Wang, B., Lüttge, U., Ratajczak, R., 2004a. Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C3 halophyte *Suaeda salsa* L. *J. Plant Physiol.* 161, 285–293.
- Wang, H., Provan, G.J., Helliwell, K., 2004b. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem.* 87, 307–311.
- Wang, S., Tian, S., Yang, F., Yang, H., Yang, X., Du, G., 2009. Cardioprotective effect of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 615, 125–132.
- Wang, X.-J., Xu, J.-X., 2005. Salvianic acid A protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced cytotoxicity. *Neurosci. Res.* 51, 129–138.
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., He, K., 2014. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* 92, 133–147.
- Zhang, H., Gao, M., Zhang, L., Zhao, Y., Shi, L., Chen, B., Wang, Y., Wang, S., Du, G., 2012. Salvianolic acid A protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against H₂O₂-induced injury by increasing stress tolerance ability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 479–483.

Chap. 4 Détermination des conditions optimales de production d'un extrait en vue d'une valorisation industrielle

- Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E., 2005. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phyther. Res.* 19, 655–660.
- Alaerts, G., Merino-Arévalo, M., Dumarey, M., Dejaegher, B., Noppe, N., Matthijs, N., Smeyers-Verbeke, J., Vander Heyden, Y., 2010. Exploratory analysis of chromatographic fingerprints to distinguish rhizoma Chuanxiong and rhizoma Ligustici. *J. Chromatogr. A* 1217, 7706–7716.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H. a., Ghafoor, K., Norulaini, N. a. N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* 117, 426–436.
- Baxter, I., Brazelton, J.N., Yu, D., Huang, Y.S., Lahner, B., Yakubova, E., Li, Y., Bergelson, J., Borevitz, J.O., Nordborg, M., Vitek, O., Salt, D.E., 2010. A coastal cline in sodium accumulation in *Arabidopsis thaliana* is driven by natural variation of the sodium transporter AtHKT1;1. *PLoS Genet.* 6, e1001193.
- Del Baño, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Río, J.A., Ortuno, A., Quirin, K.-W., Gerard, D., 2003. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4247–4253.

- Chen, C., Zhang, H., Xiao, W., Yong, Z.-P., Bai, N., 2007a. High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries. *J. Chromatogr. A* 1154, 250–259.
- Chen, P., Ozcan, M., Harnly, J., 2007b. Chromatographic fingerprint analysis for evaluation of *Ginkgo biloba* products. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 251–261.
- Chen, Y., Zhu, S.-B., Xie, M.-Y., Nie, S.-P., Liu, W., Li, C., Gong, X.-F., Wang, Y.-X., 2008. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. *Anal. Chim. Acta* 623, 146–156.
- Chung, I.-M., Kim, J.-W., Seguin, P., Jun, Y.-M., Kim, S.-H., 2012. Ginsenosides and phenolics in fresh and processed Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer): Effects of cultivation location, year, and storage period. *Food Chem.* 130, 73–83.
- Commission européenne, 2008. EU guide to good manufacturing practice for medicinal products for human and veterinary use. 6 p. ISBN: 978-3-87193-418-6.
- Dunn, W.B., Ellis, D.I., 2005. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal. Chem.* 24, 285–295.
- EMA, 1998. Report from the ad hoc working group on herbal medicinal products. 101 p.
- EUROPAM, 2010. Guidelines for Good Agricultural and Wild Collection Practices for Medicinal and Aromatic Plants (GACP-MAP). 13 p.
- FDA, 2004. Guidance for industry: Botanical drug products. 52 p.
- Fletcher, R.S., Slimmon, T., Kott, L.S., 2010. Environmental factors affecting the accumulation of rosmarinic acid in spearmint (*Mentha spicata* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.). *Open Agric. J.* 4, 10–16.
- Fletcher, R.S., Slimmon, T., McAuley, C.Y., Kott, L.S., 2005. Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L.). *J. Sci. Food Agric.* 85, 2429–2436.
- Fosberg, F., 1992. Vegetation of the Society Islands. *Pacific Sci.* 46, 232–250.
- Frías, S., Trujillo Pérez, J., Peña, E., Conde, J., 2001. Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 145–149.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* 15, 8813–8826.
- González Paramás, A.M., Barez, J.A.G., Garcia-villanova, R.J., Pala, T.R., Albajar, R.A., Sanchez, J.S., 2000. Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *J. Sci. Food Agric.* 80, 157–165.
- Hättenschwiler, S., Vitousek, P., 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends Ecol. Evol.* 15, 238–243.
- Herrera, M.C., de Castro, M.D.L., 2005. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* 1100, 1–7.
- Jamet, R., Trichet, J., 1987. Etude du milieu terrestre des atolls de la Polynésie française: caractéristiques et potentialités agricoles. *Cah. ORSTOM. Série Pédologie XXIII*, 275–293.
- Keinanen, M., Julkunen-Tiitto, R., 1996. Effect of sample preparation method on birch (*Betula pendula* Roth) leaf phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2724–2727.
- Khan, M.A., Ungar, I.A., Showalter, A.M., 2000. Effects of salinity on growth, water relations and ion accumulation of the subtropical perennial halophyte, *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Ann. Bot.* 85, 225–232.

- Kumar-Roiné, S., 2009. Valorisation de remèdes traditionnels utilisés dans le traitement de la ciguatera dans le Pacifique. Université de Nouvelle-Calédonie, Nouméa. 220 p.
- Laurent, D., Amade, P., 1992. Remèdes traditionnels contre la ciguatera en Nouvelle Calédonie. Sci. la vie Pharmacol. 2, 1–84.
- Li, B.-Y., Hu, Y., Liang, Y.-Z., Xie, P.-S., Du, Y.-P., 2004. Quality evaluation of fingerprints of herbal medicine with chromatographic data. Anal. Chim. Acta 514, 69–77.
- Lin, L., Lei, F., Sun, D.-W., Dong, Y., Yang, B., Zhao, M., 2012. Thermal inactivation kinetics of *Rabdosia serra* (Maxim.) Hara leaf peroxidase and polyphenol oxidase and comparative evaluation of drying methods on leaf phenolic profile and bioactivities. Food Chem. 134, 2021–2029.
- Lin, S.-D., Sung, J.-M., Chen, C.-L., 2011. Effect of drying and storage conditions on caffeic acid derivatives and total phenolics of *Echinacea Purpurea* grown in Taiwan. Food Chem. 125, 226–231.
- Liu, A.-H., Lin, Y.-H., Yang, M., Guo, H., Guan, S.-H., Sun, J.-H., Guo, D.-A., 2007. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSⁿ. J. Chromatogr. B 846, 32–41.
- Liu, F., Ong, E.S., Li, S.F.Y., 2013. A green and effective approach for characterisation and quality control of *Chrysanthemum* by pressurized hot water extraction in combination with HPLC with UV absorbance detection. Food Chem. 141, 1807–1813.
- Lu, G.-H., Chan, K., Liang, Y.-Z., Leung, K., Chan, C.-L., Jiang, Z.-H., Zhao, Z.-Z., 2005. Development of high-performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese *Angelica* from related umbelliferae herbs. J. Chromatogr. A 1073, 383–392.
- Lu, Y., Lam, H., Pi, E., Zhan, Q., Tsai, S., 2013. Comparative metabolomics in *Glycine max* and *Glycine soja* under salt stress to reveal the phenotypes of their offspring. J. Agric. Food Chem. 61, 8711–8721.
- Lubbe, A., Verpoorte, R., 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. Ind. Crops Prod. 34, 785–801.
- Lucio-Gutiérrez, J.R., Coello, J., MasPOCH, S., 2012. Enhanced chromatographic fingerprinting of herb materials by multi-wavelength selection and chemometrics. Anal. Chim. Acta 710, 40–49.
- Luque de Castro, M., García-Ayuso, L., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. Anal. Chim. Acta 369, 1–10.
- Mosihuzzaman, M., Choudhary, M.I., 2008. Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 80, 2195–2230.
- Motulsky, H.J., 2010. Intuitive biostatistics: a nonmathematical guide to statistical thinking, 2nd ed. Oxford University Press. ISBN: 0199730067.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Bellumori, M., Giaccherini, C., Martini, V., Michelozzi, M., 2011. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. Talanta 85, 167–176.
- Ni, Y., Lai, Y., Brandes, S., Kokot, S., 2009. Multi-wavelength HPLC fingerprints from complex substances: An exploratory chemometrics study of the *Cassia* seed example. Anal. Chim. Acta 647, 149–158.
- Northup, R., Dahlgren, R., McColl, J., 1998. Polyphenols as regulators of plant-litter-soil interactions in northern California's pygmy forest: a positive feedback? Biogeochemistry 42, 189–220.
- OMS, 2007. WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. 92 p. ISBN: 9789241547161.
- Oniszczuk, A., Hawryl, A., 2011. 6 Sample preparation of plant material, in: Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. (Eds.), High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. CRC Press, pp. 107–142.
- Penchev, P., Angelov, G., Condoret, J.-S., 2010. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). Rev. Génie Ind. 5, 115–123.

- Perrut, M., 2000. Supercritical Fluid Applications: Industrial Developments and Economic Issues. Ind. Eng. Chem. Res. 39, 4531–4535.
- Pétard, P., 1986. *Tournefortia argentea*, dans: Plantes Utiles de Polynésie : Raau Tahiti. 354 p. ISBN : 2904171061.
- Santos, J., Oliveira, M.B.P.P.B., Ibáñez, E., Herrero, M., 2014. Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage. J. Chromatogr. A 1327, 118–131.
- Schulze, E., Beck, E., Muller-Hohenstein, K., 2005. Plant Ecology. Springer Berlin, Heidelberg. 702 p. ISBN: 354020833X.
- Sheridan, H., Krenn, L., Jiang, R., Sutherland, I., Ignatova, S., Marmann, A., Liang, X., Sendker, J., 2012. The potential of metabolic fingerprinting as a tool for the modernisation of TCM preparations. J. Ethnopharmacol. 140, 482–491.
- SPX, 2013. Installations de séchage d’e&e. dans : Produits d’e&e. <www.extraction.de/france/sechage.html> (consulté le 12 janvier 2014).
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Pietraszek, J., 2012. Chemical profile and seasonal variation of phenolic acid content in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae). J. Pharm. Biomed. Anal. 66, 154–161.
- Tong, L., Wang, Y., Xiong, J., Cui, Y., YigangZhou, Yi, L., 2008. Selection and fingerprints of the control substances for plant drug *Eucommia ulmodies* Oliver by HPLC and LC-MS. Talanta 76, 80–84.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrason. Sonochem. 8, 303–313.
- Wang, L., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends Food Sci. Technol. 17, 300–312.
- Wijngaard, H., Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N., 2012. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. Food Res. Int. 46, 505–513.
- World Conservation Monitoring Centre, 1998. *Argusia argentea*. In: IUCN Red List Threat. Species Version 2013.2. <www.iucnredlist.org> (consulted the April 29, 2013).
- Xie, P., Chen, S., Liang, Y., Wang, X., Tian, R., Upton, R., 2006. Chromatographic fingerprint analysis--a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. J. Chromatogr. A 1112, 171–180.
- Yan, S., Xin, W., Luo, G., Wang, Y., Cheng, Y., 2005. An approach to develop two-dimensional fingerprint for the quality control of Qingkailing injection by high-performance liquid chromatography with diode array detection. J. Chromatogr. A 1090, 90–97.
- Zeng, S., Wang, L., Chen, T., Wang, Y., Mo, H., Qu, H., 2012. Direct analysis in real time mass spectrometry and multivariate data analysis: a novel approach to rapid identification of analytical markers for quality control of traditional Chinese medicine preparation. Anal. Chim. Acta 733, 38–47.
- Zhang, X.-G., Han, T., Zhang, Q.-Y., Zhang, H., Huang, B.-K., Xu, L.-L., Qin, L.-P., 2008. Chemical fingerprinting and hierarchical clustering analysis of *Centella asiatica* from different locations in China. Chromatographia 69, 51–57.
- Zhang, Y., Cao, G., Ji, J., Cong, X., Wang, S., Cai, B., 2011. Simultaneous chemical fingerprinting and quantitative analysis of crude and processed *Radix Scrophulariae* from different locations in China by HPLC. J. Sep. Sci. 34, 1429–1436.
- Zhou, J., Zhang, T., Wang, Q., Chen, J., 2008. Chromatographic fingerprint analysis of varietal differences among three Species of Baishouwu and simultaneous analysis of three bioactive constituents by use of LC–DAD. Chromatographia 68, 213–218.

Annexes

Annexe I : Liste des molécules retrouvées chez *Heliotropium*, leur formule brute et leur masse.

Groupe chimique	Nom de la molécule	Formule brute	Masse moléculaire	Référence bibliographique ^a
Divers	1-hydroxy-3-docosanone	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340	Modak et al., 2004
	2-éthoxy-4,5-dihydroxybenzaldéhyde	C ₉ H ₁₀ O ₄	182	Lin et al., 1999
	acide 2-éthoxy-4,5-dihydroxybenzoïque	C ₉ H ₁₀ O ₅	198	Lin et al., 1999
	acide 3'-hydroxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro[1-benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylique (dérivé 1 du filifolinol)	C ₁₇ H ₂₂ O ₄	290	Urzúa et al., 2008
	méthyl 3'-acétyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro[1-benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylate (dérivé 2 du filifolinol)	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	346	Urzúa et al., 2008
	méthyl 3'-isopentanoxyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro[1-benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylate (dérivé 3 du filifolinol)	C ₂₃ H ₃₂ O ₅	388	Urzúa et al., 2008
	méthyl 3'-benzoyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro[1-benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylate (dérivé 4 du filifolinol)	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408	Urzúa et al., 2008
	acide 4,7,8-triméthoxy-naphthalène-2-carboxylique	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	262	Kulkarni-Almeida et al., 2008
	6-hydroxy-5,7-diméthoxy-naphthalène-2-carbaldéhyde	C ₁₃ H ₁₂ O ₄	232	Kulkarni-Almeida et al., 2008
	allantoïne	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	158	Lin et al., 1999
	acide carrizaloïque	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318	Villarreal et al., 2001
	acide curassavique	C ₈ H ₁₆ O ₄	176	Subramanian et al., 1980
	filifolinol	C ₁₈ H ₂₄ O ₄	304	Modak et al., 2009a
	sénécionate de filifolinyle	C ₂₃ H ₃₀ O ₅	386	Modak et al., 2009b
	monopalmitate de glycérol	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	330	Firdous et al., 2012
	N-(1-oxo-octadécyl)glycyl-L-alanglycyl-L-histidyl glycineamide	C ₃₃ H ₅₈ N ₈ O ₆	662	Yeo et al., 2011
	héliophénanthrone	C ₁₇ H ₁₈ O ₃	270	Guilet et al., 2008
	acide héliotrique, acide héliotrinique	C ₈ H ₁₆ O ₄	176	Singh et al., 2002
	héliotropamide	C ₃₆ H ₃₆ N ₂ O ₈	624	Guntern et al., 2003
	héliotropinone A	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	302	Guntern et al., 2001
	héliotropinone B	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	302	Guntern et al., 2001
	homospermidine	C ₈ H ₂₁ N ₃	159	Birecka et al., 1984
	loliolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	196	Erosa-Rejón et al., 2009
	myoinositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180	Ortiz-Andrade et al., 2007
	ophiamide A	C ₄₃ H ₈₅ NO ₅	695	Firdous et al., 2012
	ophiamide B	C ₄₉ H ₉₅ NO ₁₀	857	Firdous et al., 2012
	pentacosanol	C ₂₅ H ₅₂ O	368	Modak et al., 2004
	pestalamide B	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₅	342	Yeo et al., 2011
	putrescine	C ₄ H ₁₂ N ₂	88	Birecka et al., 1984
	acide salicylique	C ₇ H ₆ O ₃	138	Lin et al., 1999
	sclérocarpidine	C ₁₆ H ₁₃ O ₆	301	Modak et al., 2009a
	spermidine	C ₇ H ₁₉ N ₃	145	Birecka et al., 1984
	spermine	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	202	Birecka et al., 1984
	sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342	Ortiz-Andrade et al., 2007
	3'-acétyltrachélanthamine	C ₁₇ H ₂₉ NO ₅	327	Reina et al., 1998
	1α-2α-époxy-1β-hydroxyméthyl-8α-pyrrolizidine	C ₈ H ₁₃ NO ₂	155	Medina et al., 2009
	3'-acétylindicine	C ₁₇ H ₂₇ NO ₆	341	Ogihara et al., 1997
	3'-acétylindicine-N-oxyde	C ₁₇ H ₂₇ NO ₇	357	Ogihara et al., 1997

3'-acétylintermédiaire	C ₁₇ H ₂₇ NO ₆	341	Trigo et al., 1993
3'-acétylrindérine	C ₁₇ H ₂₇ NO ₆	341	Trigo et al., 1993
5'-acétyllasiocarpine	C ₂₃ H ₃₅ NO ₈	453	Reina et al., 1995
5'-déoxylasiocarpine	C ₂₁ H ₃₃ NO ₆	395	Shafiee et al., 2002
7-acétyleuropine	C ₁₈ H ₂₉ NO ₇	371	Reina et al., 1995
7-angéloylhéliotrine	C ₂₁ H ₃₃ NO ₆	395	Singh et al., 2002
7-angélylhéliotridine (rivularine)	C ₁₃ H ₁₉ NO ₃	237	Crowley et Culvenor, 1959
7-angélylhéliotrine	C ₂₁ H ₃₃ NO ₆	395	Tosun et Tamer, 2004
9-(3'-isovaléryl)viridiflorylrétronécine	C ₂₀ H ₃₃ NO ₆	383	Davicino et al., 1988
amabiline	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄	283	Roeder et al., 1991
bovéinine	C ₁₆ H ₂₃ NO ₆	325	Reina et al., 1998
coromandaline	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	285	Roeder et al., 1991
coromandalinine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄	283	Mohanraj et al., 1982
curassanécine	C ₈ H ₁₅ NO ₂	157	Mohanraj et al., 1982
curassavine	C ₁₆ H ₂₉ NO ₄	299	Roeder et al., 1991
curassavinine	C ₁₆ H ₂₇ NO ₄	297	Mohanraj et al., 1982
échimidine	C ₂₀ H ₃₁ NO ₇	397	Eröksüz et al., 2001
échinatine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299	Crowley et Culvenor, 1959
europine	C ₁₆ H ₂₇ NO ₆	329	O'Dowd et Edgar, 1989
floridimine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₅	301	Reina et al., 1997
floridine	C ₁₇ H ₂₉ NO ₆	343	Reina et al., 1997
floridinine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₅	301	Reina et al., 1997
héleurine	C ₁₆ H ₂₇ NO ₄	297	Tosun et Tamer, 2004
hélibractéatine	C ₁₃ H ₂₁ NO ₄	255	Lakshmanan et Shanmugasundaram, 1995
hélibractéatinine	C ₁₃ H ₂₁ NO ₄	255	Lakshmanan et Shanmugasundaram, 1995
hélibractinécine	C ₈ H ₁₅ NO ₃	173	Lakshmanan et Shanmugasundaram, 1994
hélifoline	C ₁₃ H ₂₁ NO ₄	255	Mohanraj et al., 1981
hélindicine	C ₁₅ H ₂₃ NO ₄	281	Souza et al., 2005
héliocoromandaline	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	285	Mohanraj et al., 1982
héliocurassavicine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	285	Mohanraj et al., 1982
héliocurassavine	C ₁₆ H ₂₉ NO ₄	299	Mohanraj et al., 1982
héliocurassavinine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	285	Mohanraj et al., 1982
héliospathine	C ₁₆ H ₂₇ NO ₅	313	Roeder et al., 1991
héliospathuline	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299	Roeder et al., 1991
héliosupine	C ₂₀ H ₃₁ NO ₇	397	Crowley et Culvenor, 1959
héliotrine (héliotropine)	C ₁₆ H ₂₇ NO ₅	313	Pandey et al., 1982
héliovicine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	285	Roeder et al., 1991
héliovinine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄	283	Mohanraj et al., 1982
héliscabine	C ₁₃ H ₂₁ NO ₄	255	Lakshmanan et Shanmugasundaram, 1995
ilamine	C ₁₆ H ₂₇ NO ₅	313	Farsam et al., 2000
indicine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299	Ogihara et al., 1997

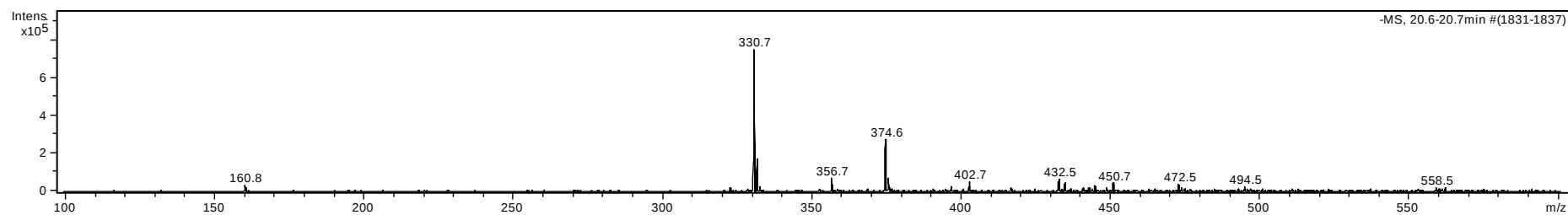
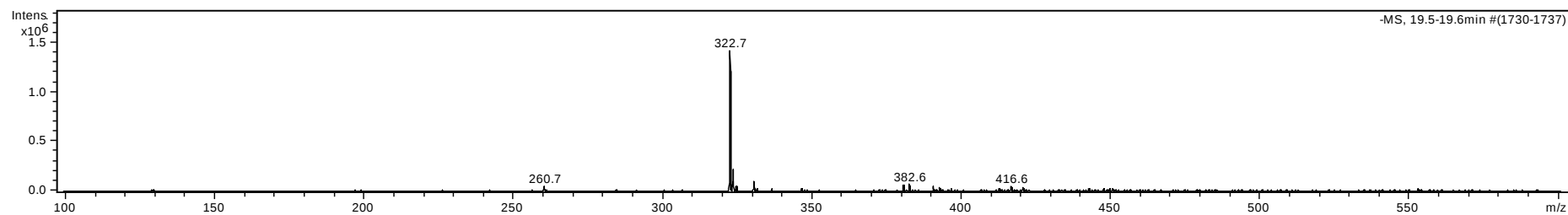
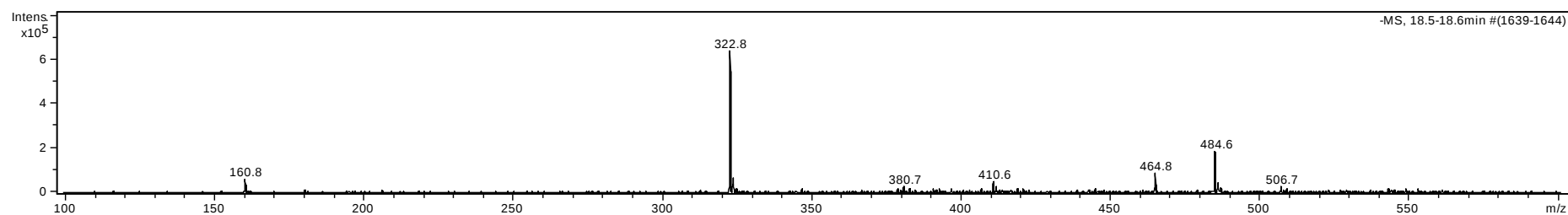
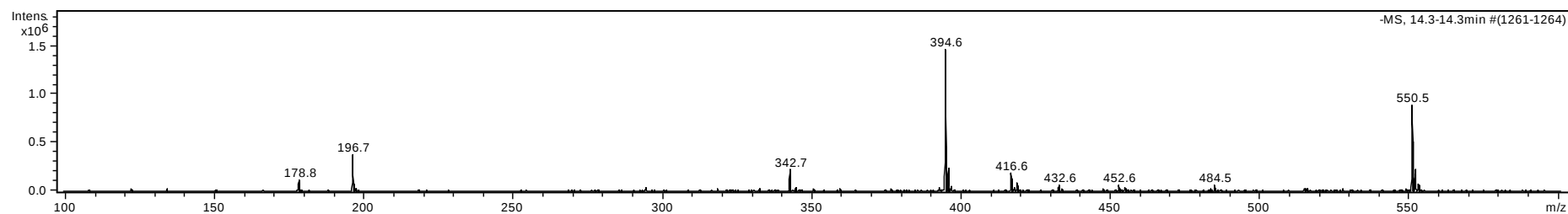
	indicine-N-oxyde	C ₁₅ H ₂₅ NO ₆	315	Ogihara et al., 1997
	intermédiaire	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299	Trigo et al., 1993
	lasiocarpine	C ₂₁ H ₃₃ NO ₇	411	O'Dowd et Edgar, 1989
	lindélofidine	C ₈ H ₁₅ NO	141	Dash et Abdullah, 2013
	lycopsamine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299	Roeder et al., 1991
	mégalanthonine	C ₁₅ H ₂₇ NO ₅	301	Reina et al., 1998
	morifoline	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299	Roque-Albelo et al., 2002
	rétronécine	C ₈ H ₁₃ NO ₂	155	Lakshmanan et Shanmugasundaram, 1994
	rindérine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₅	299	Trigo et al., 1993
	strigosine	C ₁₄ H ₂₅ NO ₄	271	Mattocks, 1964
	subulacine	C ₈ H ₁₃ NO ₂	155	Singh et al., 2002
	supinidine	C ₈ H ₁₃ NO	139	Dash et Abdullah, 2013
	supinine	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄	283	Crowley et Culvenor, 1955
	tournefortine A	C ₁₅ H ₂₇ NO ₅	301	Roque-Albelo et al., 2002
	tournefortine B	C ₁₅ H ₂₇ NO ₅	301	Roque-Albelo et al., 2002
	trachélanthamidine	C ₈ H ₁₅ NO	141	Davicino et al., 1988
	trachélanthyl-7-angélylhéliotridine	C ₂₀ H ₃₁ NO ₆	381	Schoental et al., 1970
	transalpinécine	C ₈ H ₁₅ NO ₃	173	Medina et al., 2009
	viridofloryl-7-angélylhéliotridine	C ₂₀ H ₃₁ NO ₆	381	Schoental et al., 1970
Flavonoïdes	3-méthylgalangine	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284	Modak et al., 2004
	3,5-dihydroxy-7,3',4',5'-tetraméthoxyflavone	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	374	Urzúa et al., 2000
	3,7-diméthylgalangine	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	298	Urzúa et al., 1993
	5,4-dihydroxy-7,3',5'-triméthoxyflavanone	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	346	Urzúa et al., 2000
	5-hydroxy-7,3',4',5'- tétraméthoxyflavanone	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	360	Urzúa et al., 2000
	7,3'-diméthylériodictyol	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	316	Urzúa et al., 1993
	7-O-méthylériodictyol (stérubine)	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302	Modak et al., 2012
	7-O-β-D glucoside de lutéoline	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448	Kagan, 1968
	3-O-β-glucoside de quercétine	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464	Wu et Inoue, 1996
	3-O-β-D-glucoside de kaempférol	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448	Wu et Inoue, 1996
	alpinone	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286	Urzúa et al., 2000
	ayanine	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344	Urzúa et al., 1993
	flavonoïde 1 (2-(3,4-dihydroxyphényl)-5-hydroxy-7-méthoxy-4H-chromén-4-one)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300	Modak et al., 2005
	flavonoïde 2 (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-3-méthoxy-4H-chromén-4-one) desméthoxytaureidine	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	Modak et al., 2005
	flavonoïde 4 (3,7,3'-triméthylquercétine)	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344	Modak et al., 2005
	flavonoïde 5 (5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-4H-chromén-4-one)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300	Modak et al., 2005
	flavonoïde 6 (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphényl)-4H-chromén-4-one)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270	Modak et al., 2005
	flavonoïde 7 (acétate de 5,7-dihydroxy-4-oxo-2-phényl-4H-chromén-3-yl)	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	Modak et al., 2005
	flavonoïde 8 (5,7-dihydroxy-2-phényl-4H-chromén-4-one) chrysine	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254	Modak et al., 2005
	galangine	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270	Urzúa et al., 1993
	kaempférol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286	Ogihara et al., 2012
	kumatakénine	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	Urzúa et al., 1993
	naringénine	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272	Modak et al., 2004

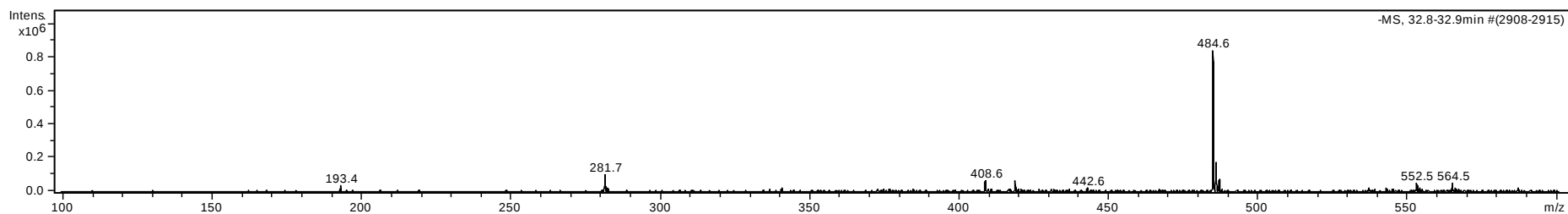
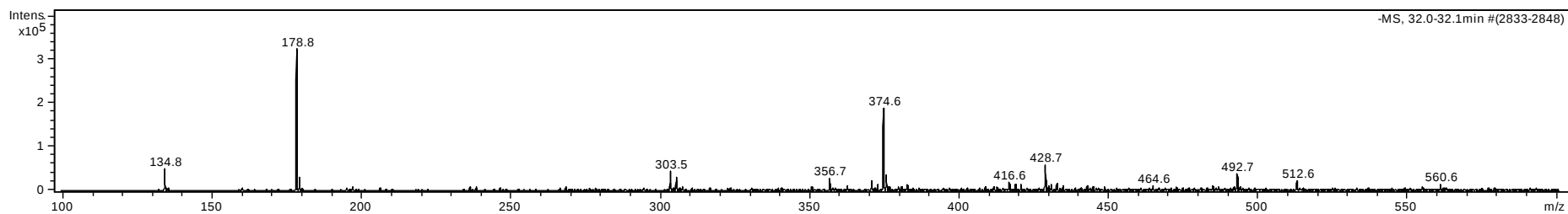
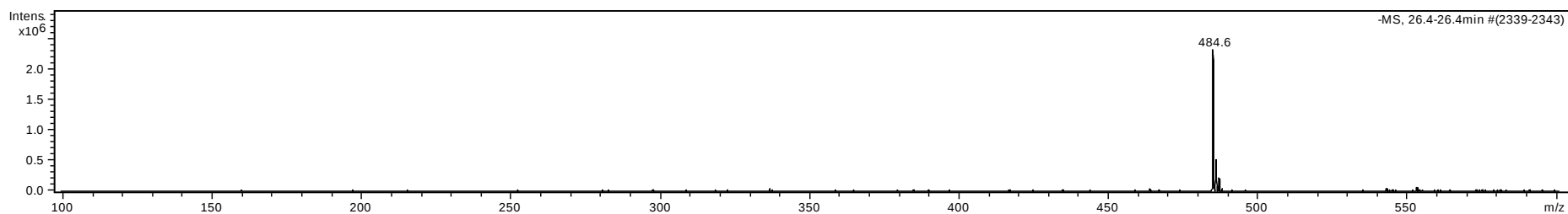
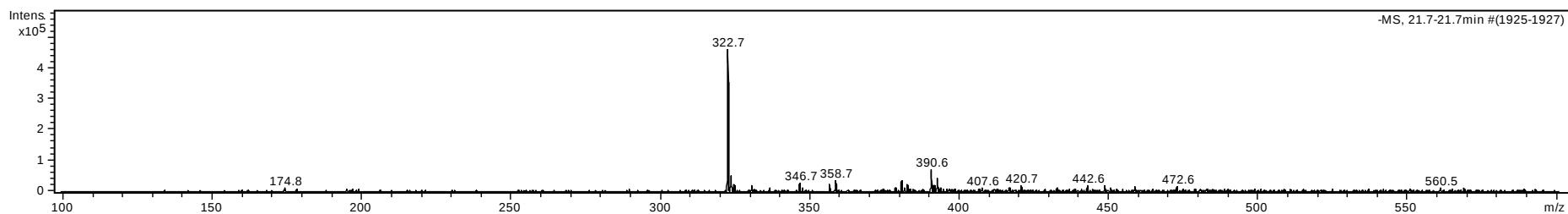
Composés phénoliques	pinoembrine	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256	Modak et al., 2004
	rhamnocitrine (kaempférol 7-O-méthyléther)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300	Urzúa et al., 1993
	sakuranétine	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286	Urzúa et al., 1993
	acide 3-(3,4-dihydroxyphényl)lactique	C ₉ H ₁₀ O ₅	198	Ogihara et al., 2002
	3,4-dihydroxybenzoate de méthyle	C ₈ H ₈ O ₄	168	Ogihara et al., 2012
	4-(3',5'-dihydroxynonadécyl)phénol	C ₂₅ H ₄₄ O ₃	392	Modak et al., 2003
	4-méthoxy-3-[(2)-7'-méthyl-3'-hydroxyméthyl-2',6'-octa-diényl]phénol	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276	Modak et al., 2007
	caféate de méthyle	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194	Ogihara et al., 2002
	acide caféique	C ₉ H ₈ O ₄	180	Ogihara et al., 2002
	dopacétate de méthyle	C ₉ H ₁₀ O ₄	182	Ogihara et al., 2012
	acide isosalvianolique C	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₀	492	Lin et al., 2002
	acide lithospermique A	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	538	Lin et al., 2002
	acide lithospermique B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718	Chen et al., 2013
	rosmarinat de méthyle	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	374	Ogihara et al., 2002
	acide rosmarinique	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360	Lin et al., 2002
	acide salvianolique A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	494	Lin et al., 2002
	acide salvianolique F	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	Lin et al., 2002
	tournefolal	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270	Lin et al., 2002
	éthyl ester d'acide tournefolique B	C ₁₉ H ₁₆ O ₆	340	Lin et al., 2002
	acide tournefolique A	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	Lin et al., 2002
	acide tournefolique B	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	Lin et al., 2002
	tournefoline A	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	Lin et al., 1999
	tournefoline B	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	248	Lin et al., 1999
	tournefoline C	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	234	Lin et al., 1999
Stérols	β-sitostérol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	Singh et Dubey, 2001
	3-O-glucoside de β-sitosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	576	Firdous et al., 2012
	stigmastérol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	Singh et Dubey, 2001
	aldéhyde 3-O-acétyloléanolique	C ₃₂ H ₅₀ O ₃	482	Ogihara et al, 1997
Terpènes	α-amyrine	C ₃₀ H ₅₀ O	426	Erosa-Rejón et al., 2009
	acétate de β-amyrine	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	468	Singh et Dubey, 2001
	β-amyrine	C ₃₀ H ₅₀ O	426	Singh et Dubey, 2001
	bluménol A	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	224	Erosa-Rejón et al., 2009
	bluménol B	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	226	Erosa-Rejón et al., 2009
	cycloarténone	C ₃₀ H ₄₈ O	424	Singh et Dubey, 2001
	épifriedélanol (friedélan-3β-ol)	C ₃₀ H ₅₂ O	428	Singh et Dubey, 2001
	acétate d'épifriedényl	C ₃₂ H ₅₄ O ₂	470	Singh et Dubey, 2001
	3-acétate d'érythrodiol	C ₃₂ H ₅₂ O ₃	484	Ogihara et al, 1997
	friedéline	C ₃₀ H ₅₀ O	426	Jain et al., 2001
	lupéol	C ₃₀ H ₅₀ O	426	Ortiz-Andrade et al., 2007
	mégalanthine	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404	Macías et al., 2009
	3-acétate d'acide oléanolique	C ₃₂ H ₅₀ O ₄	498	Ogihara et al, 1997
	acide oléanique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456	Ortiz-Andrade et al., 2007
	acide ursolique	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456	Ortiz-Andrade et al., 2007

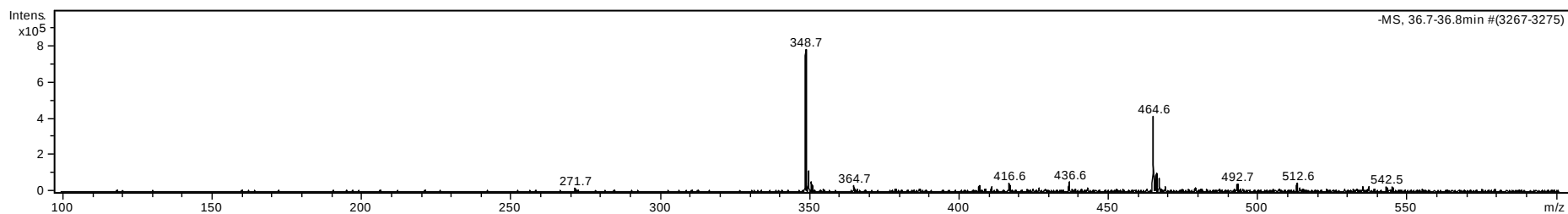
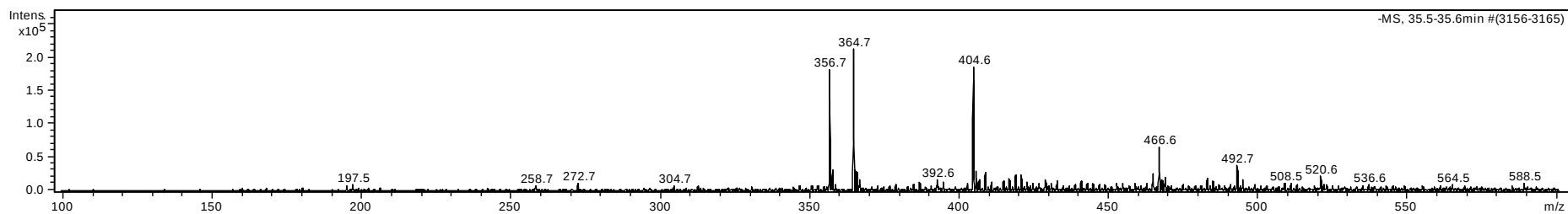
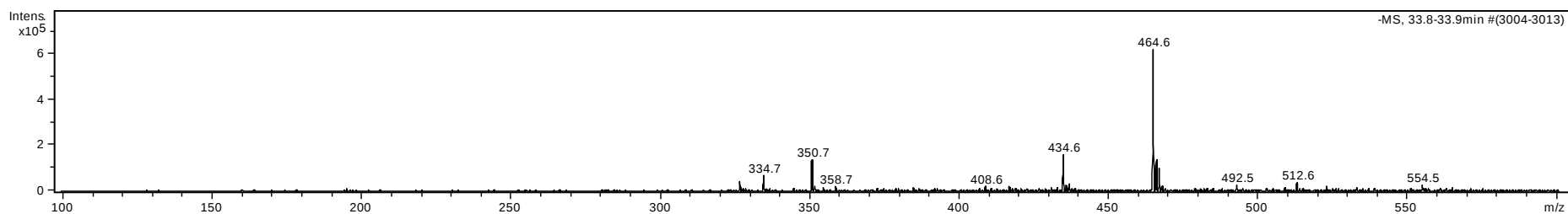
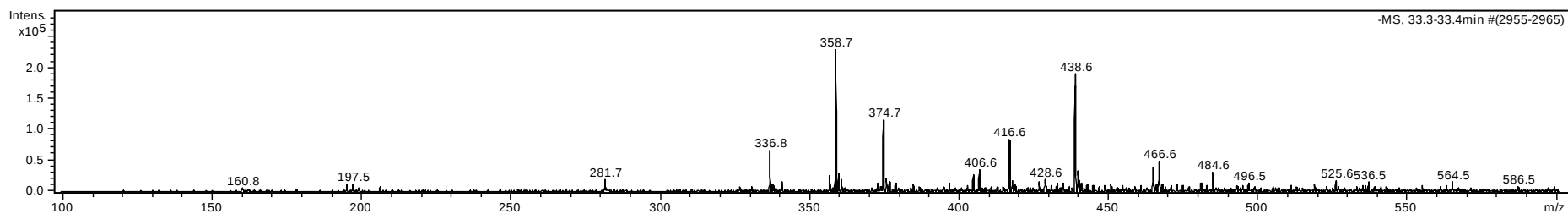
^a par souci de clarté du tableau, la liste des références (cf. [Références bibliographiques : Avant-propos et chap. 1 État de l'art](#)) n'est pas exhaustive.

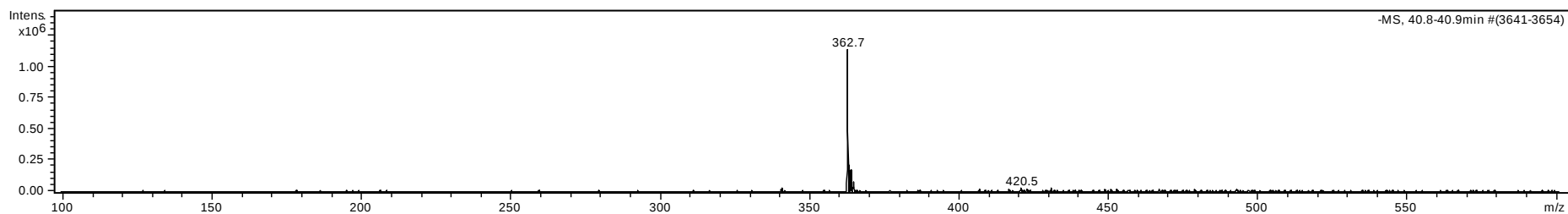
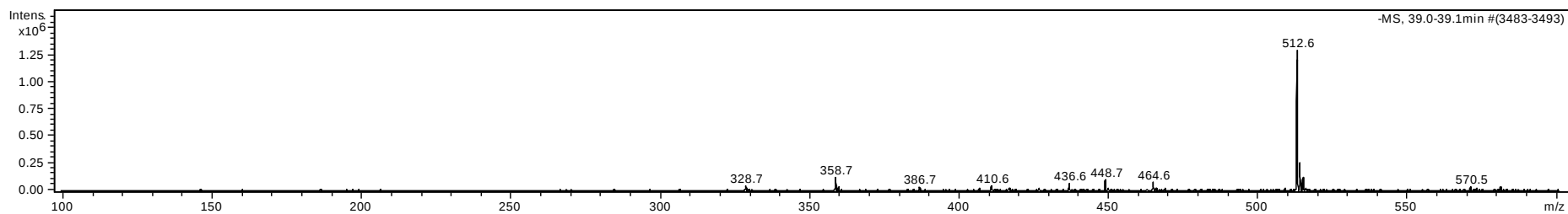
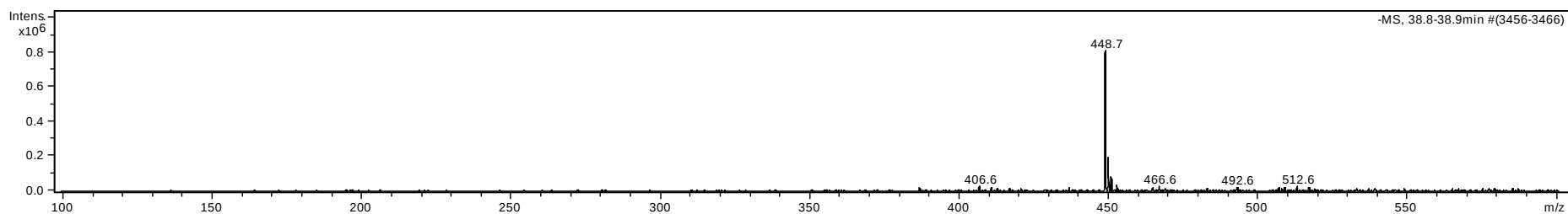
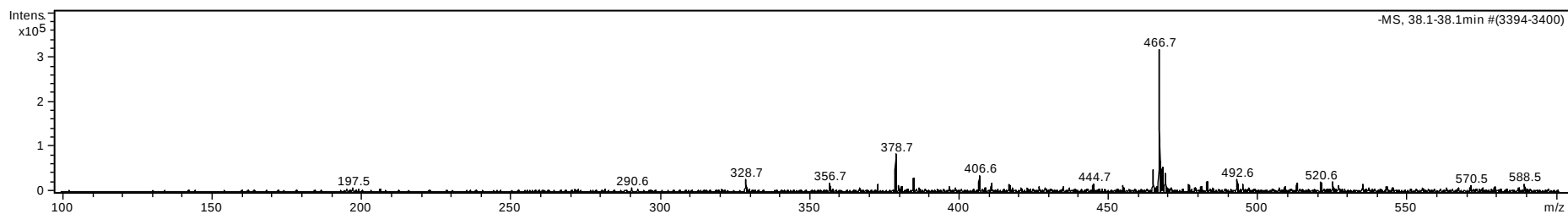
Annexe II : Spectres de masse et de fragmentation des fractions 1, 2 et 3 de l'extrait d'*H. foertherianum*.

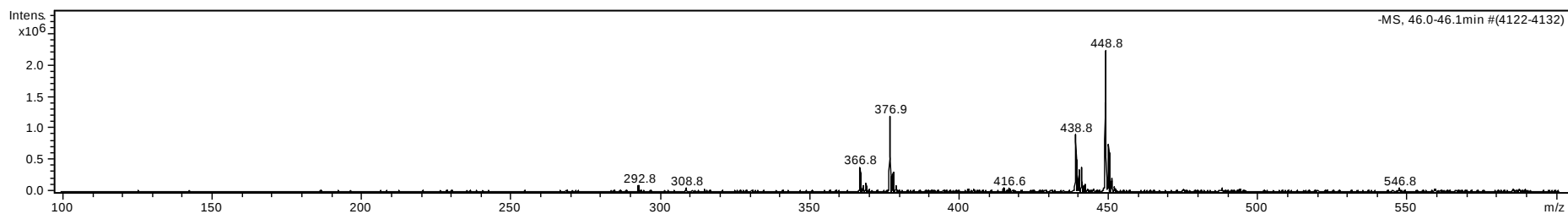
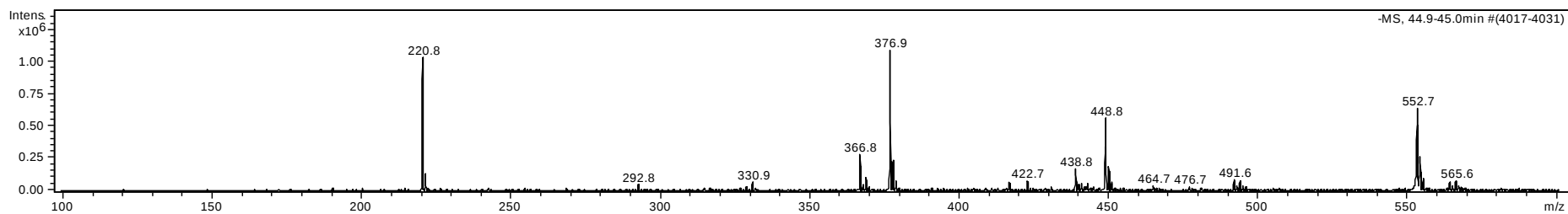
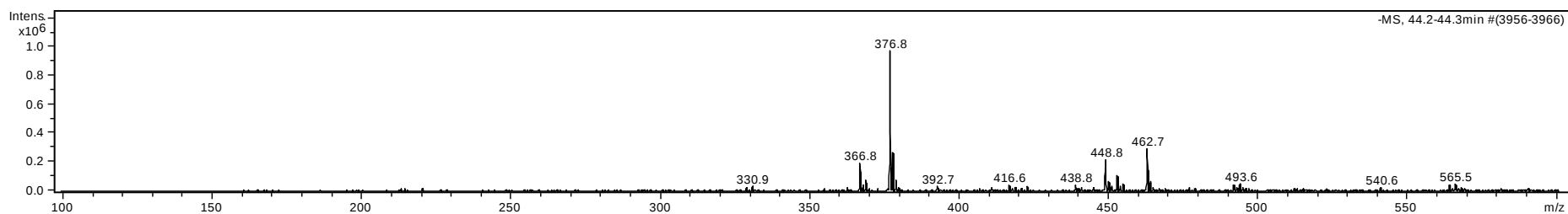
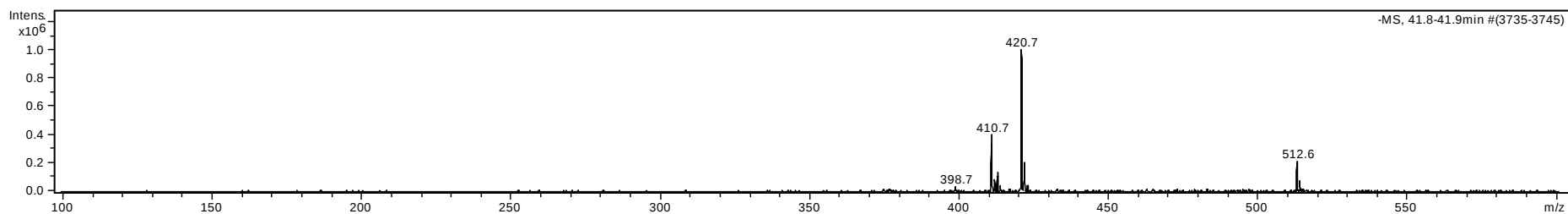
Spectres de masse de la fraction 1



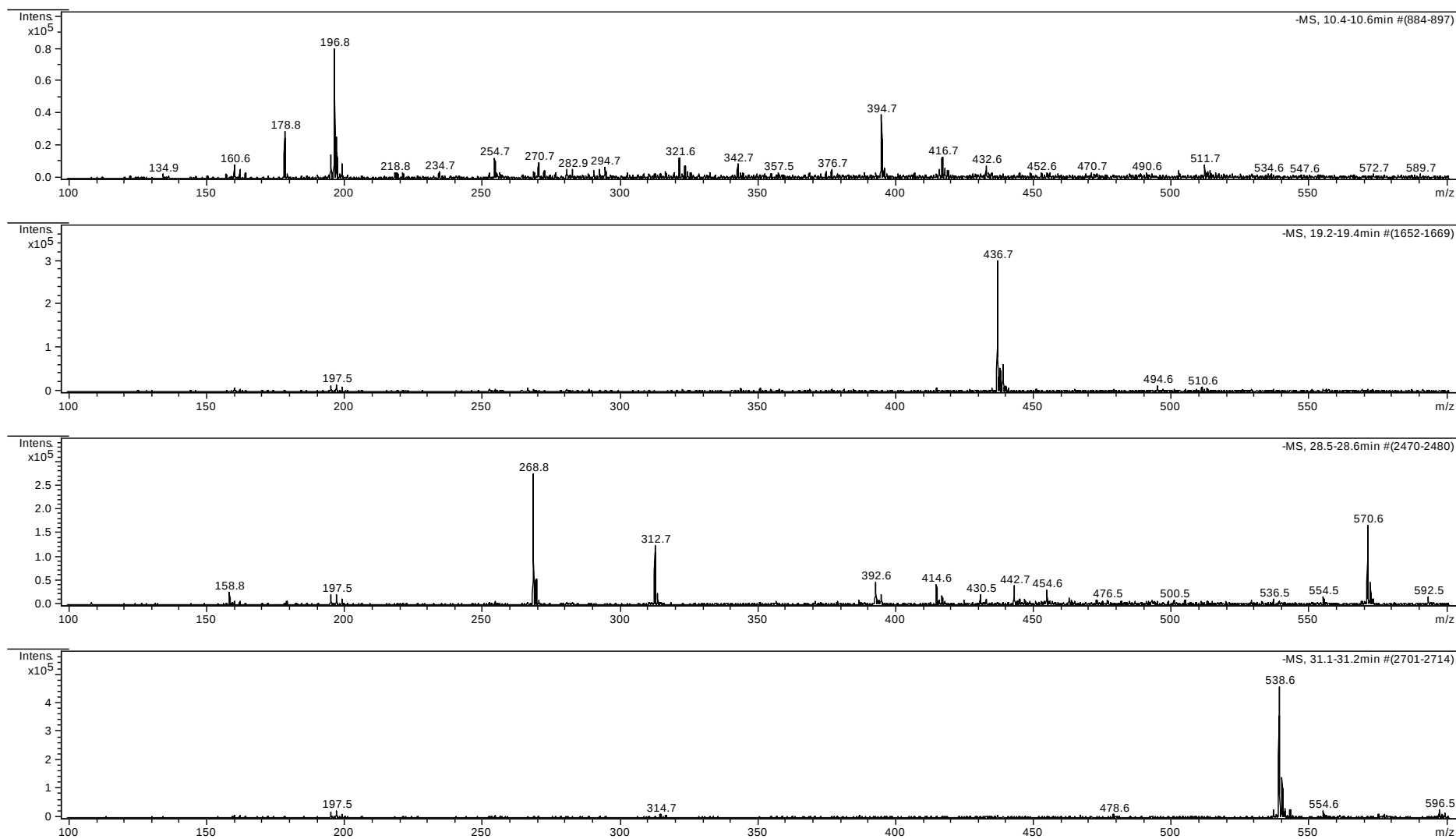


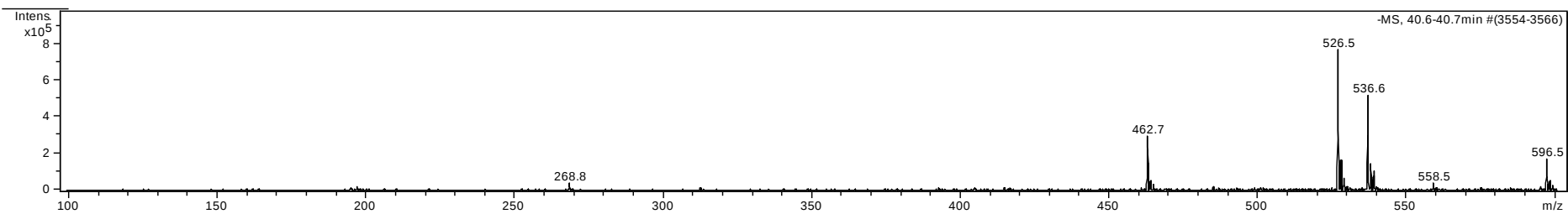
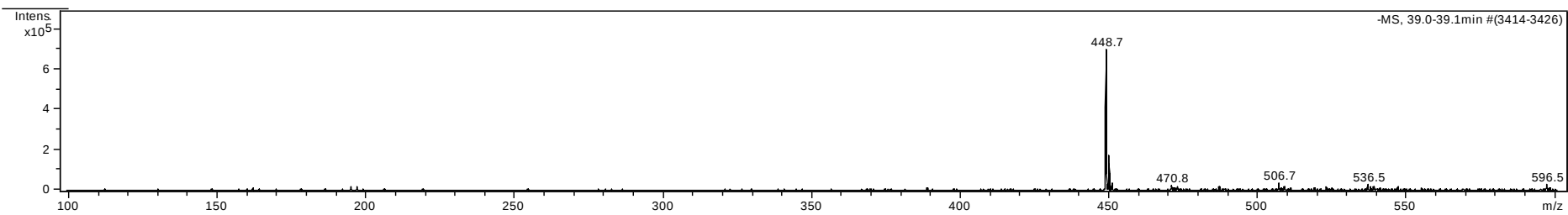
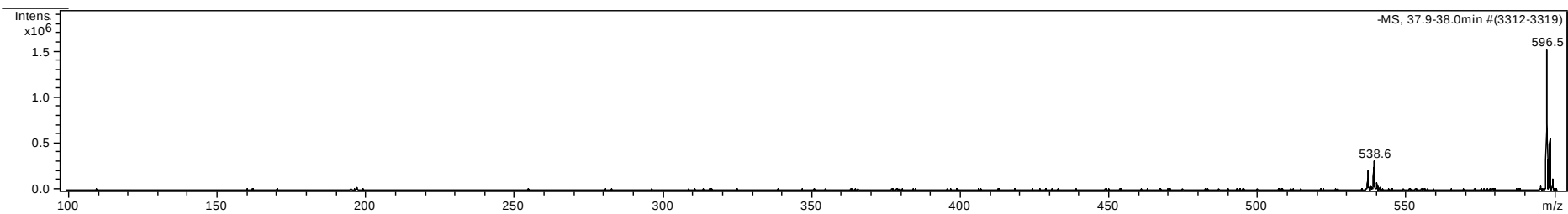
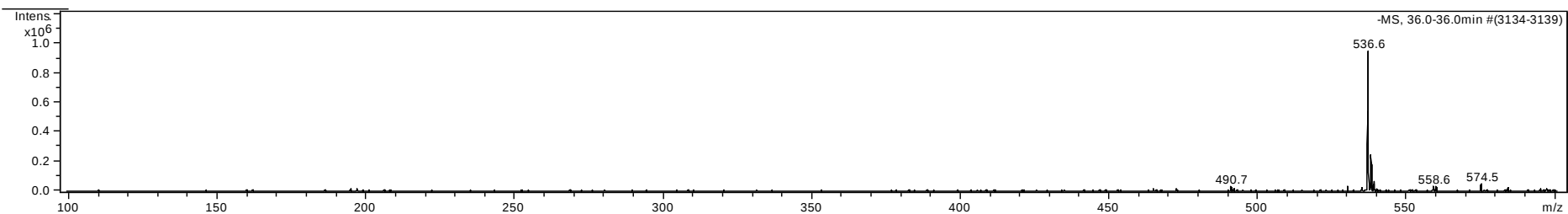


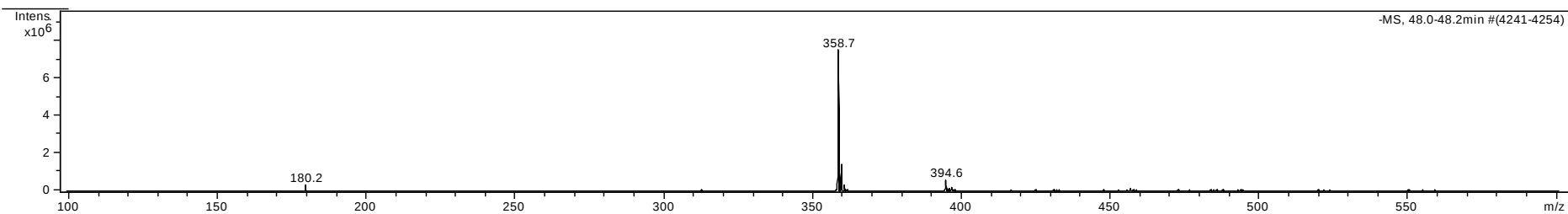
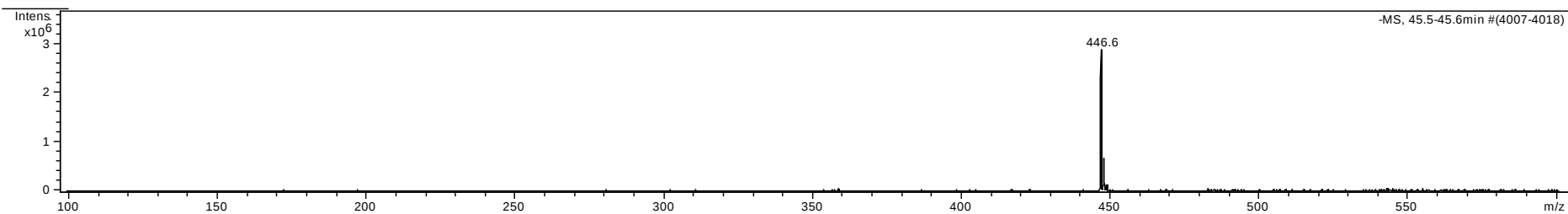
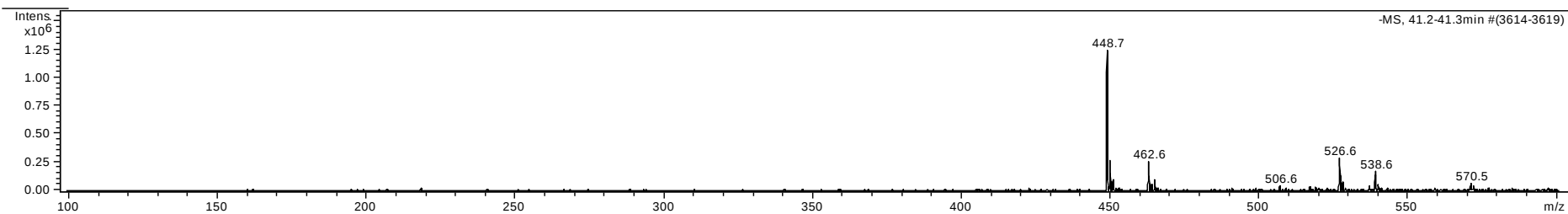
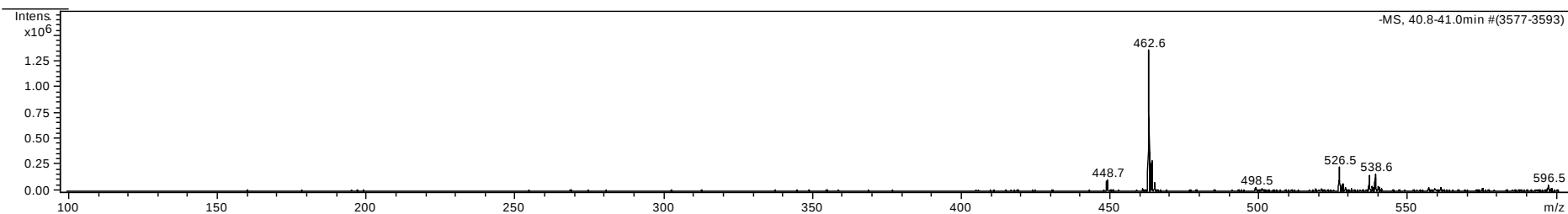


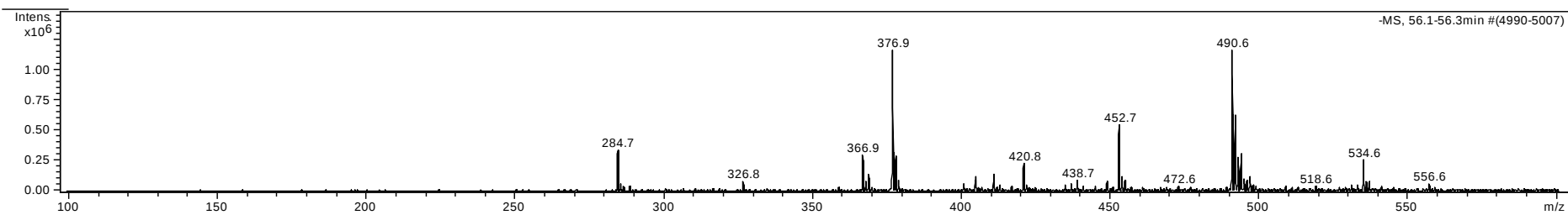
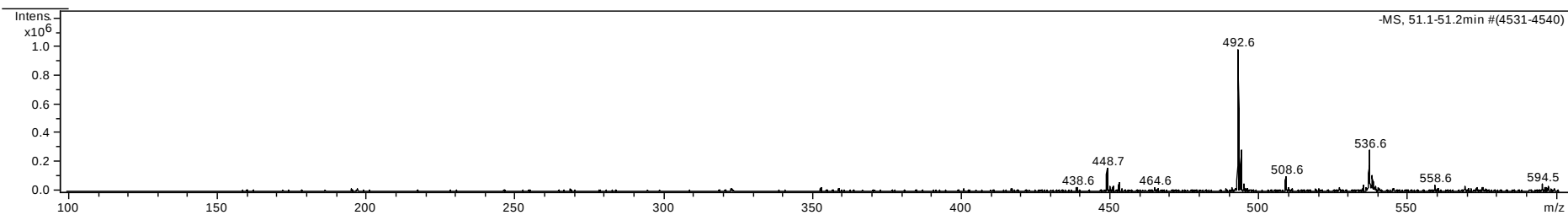
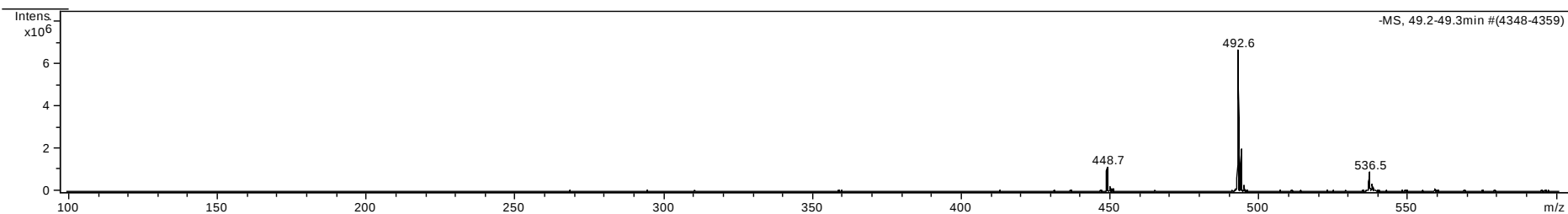


Spectres de masse de la fraction 2

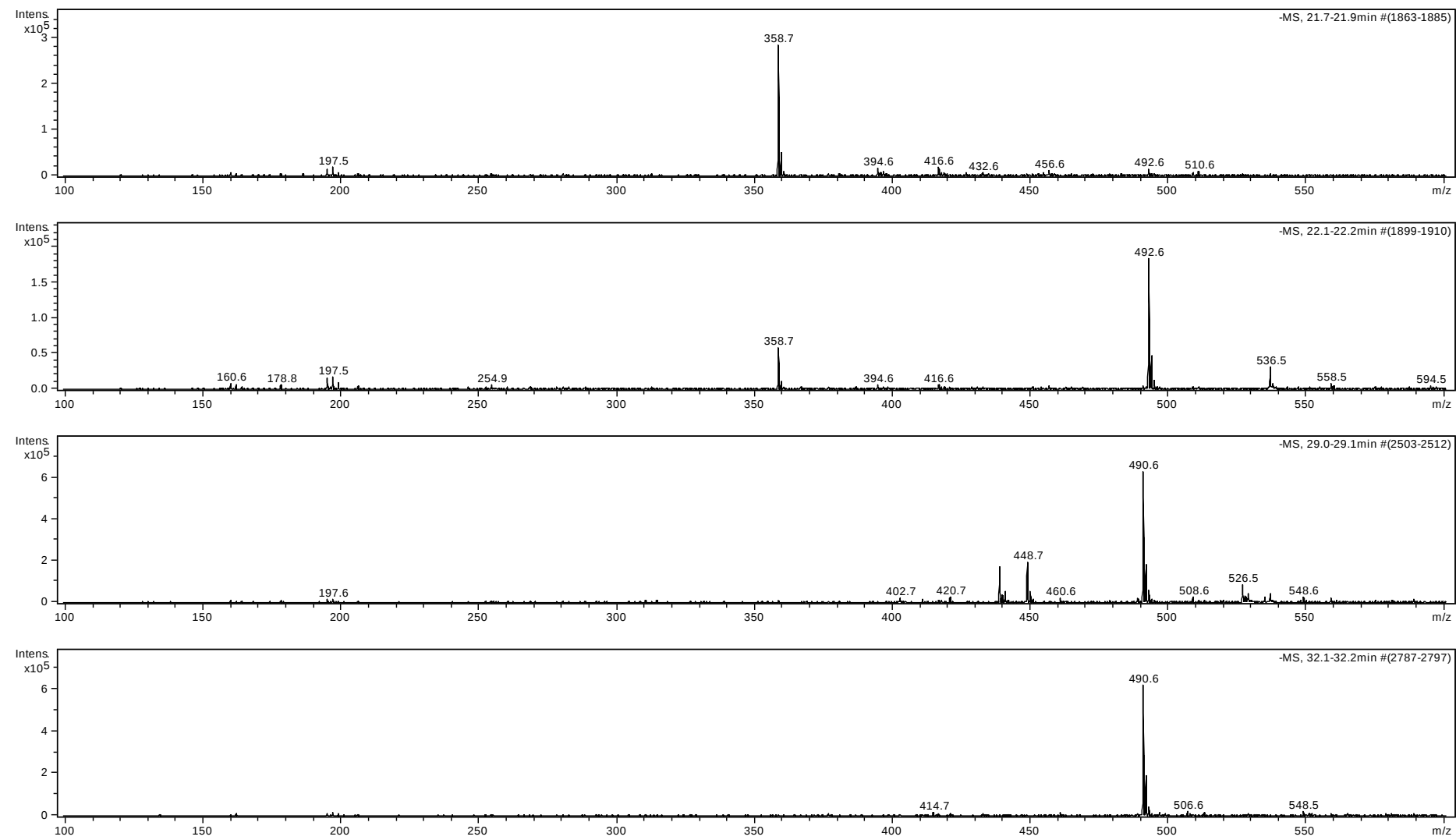


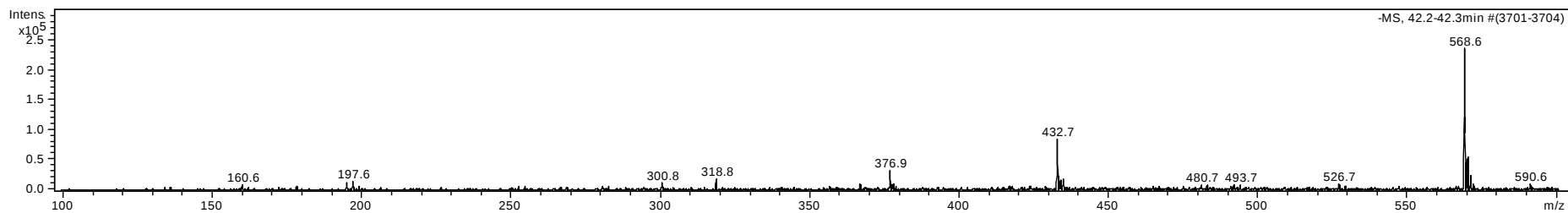
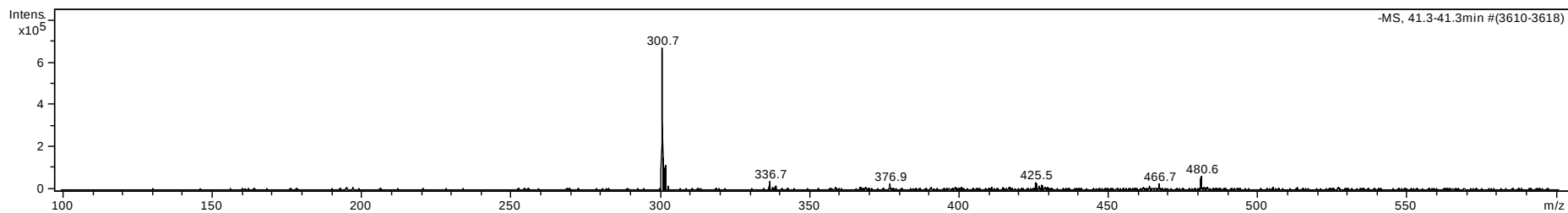
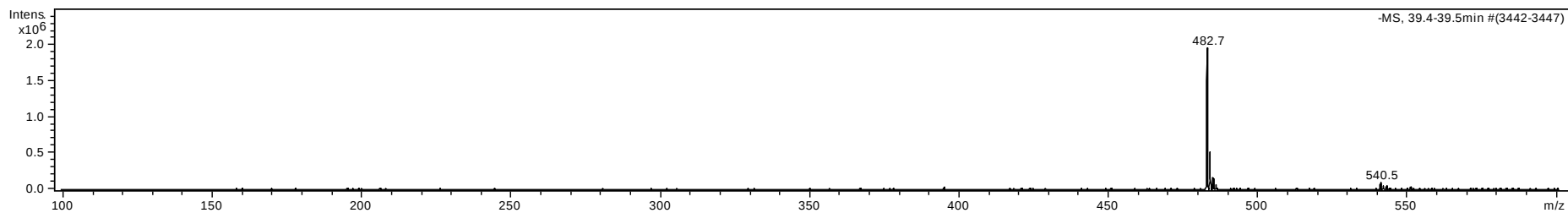
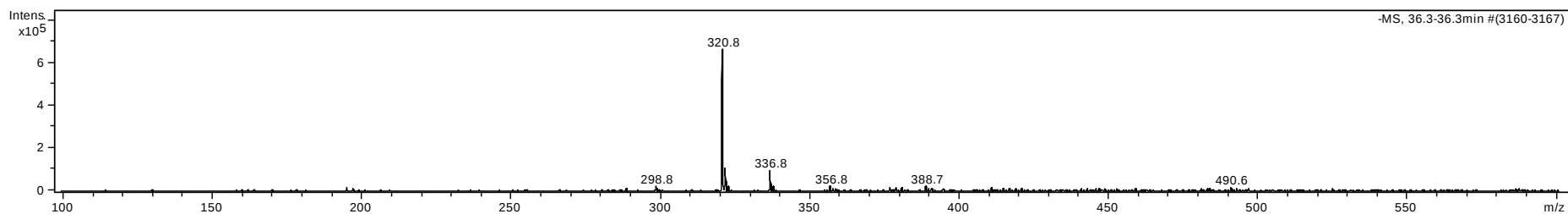


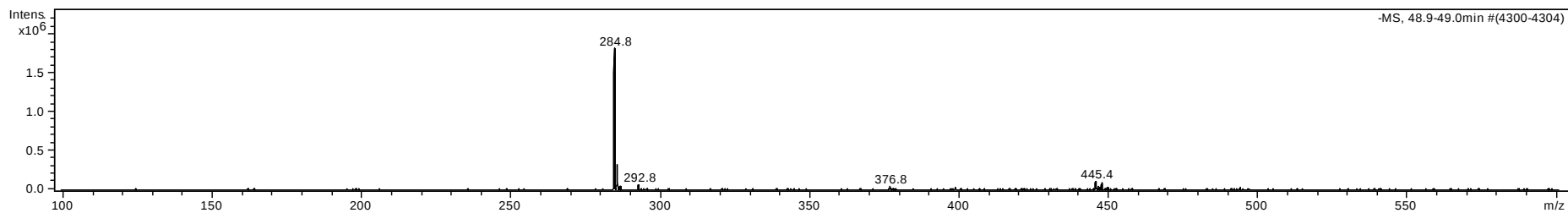
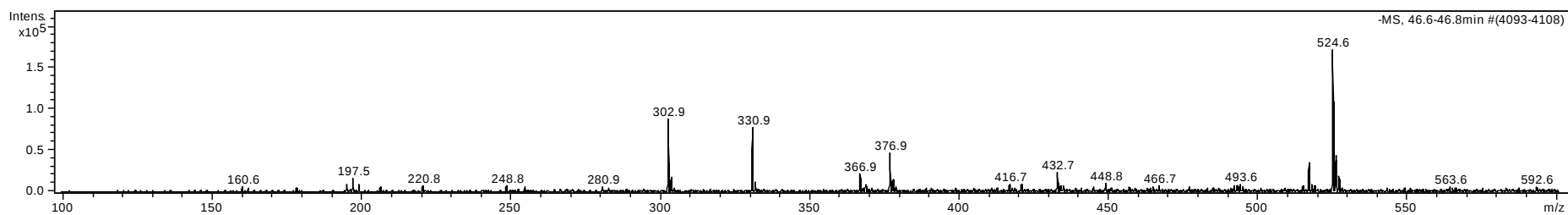
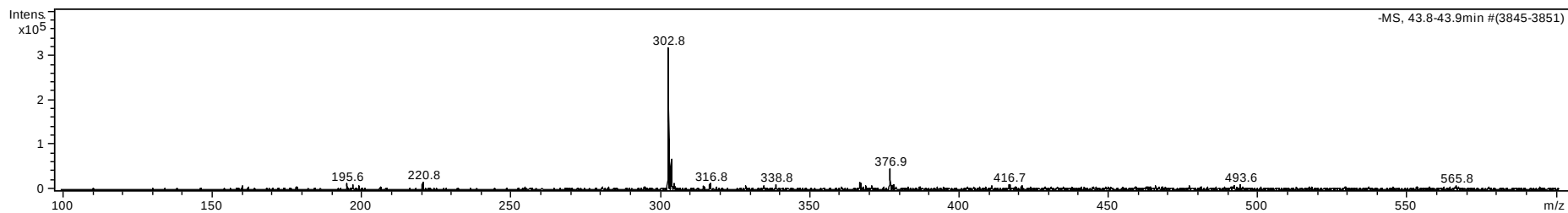
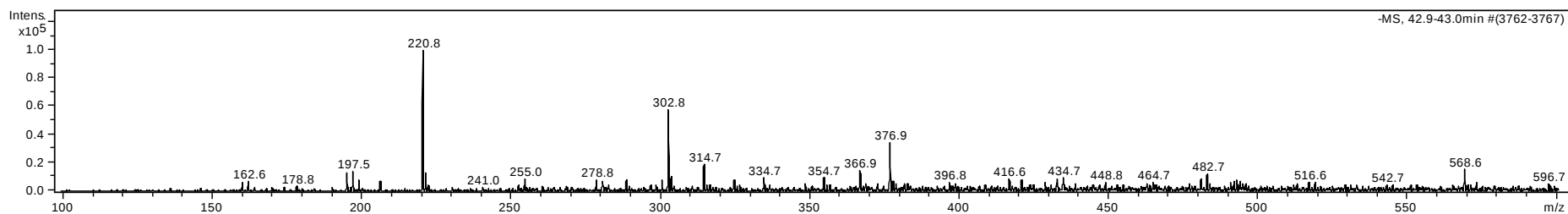


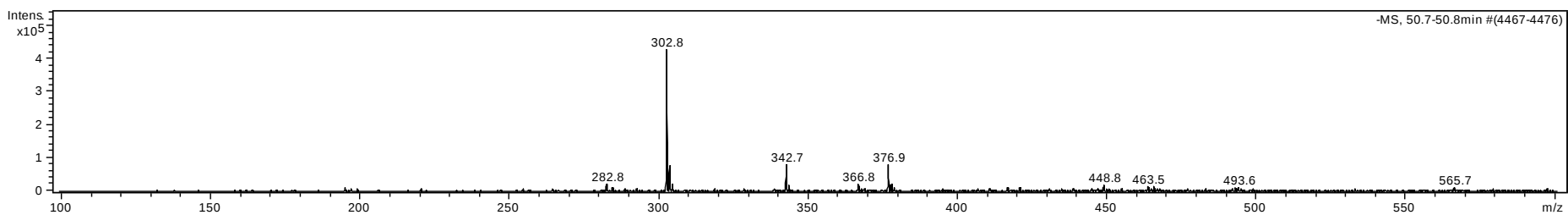
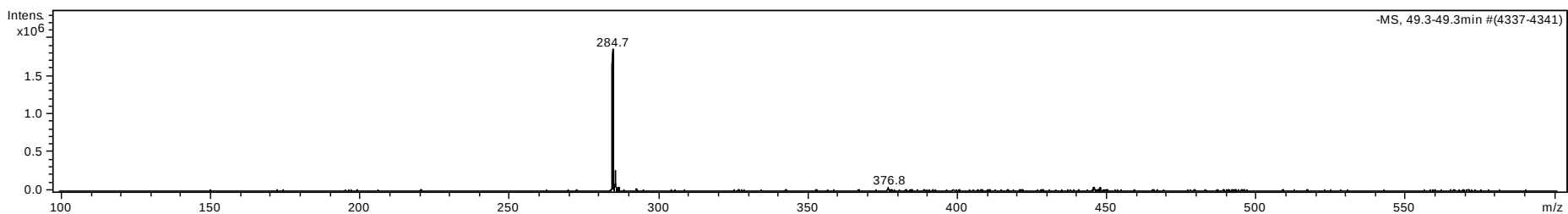


Spectres de masse de la fraction 3



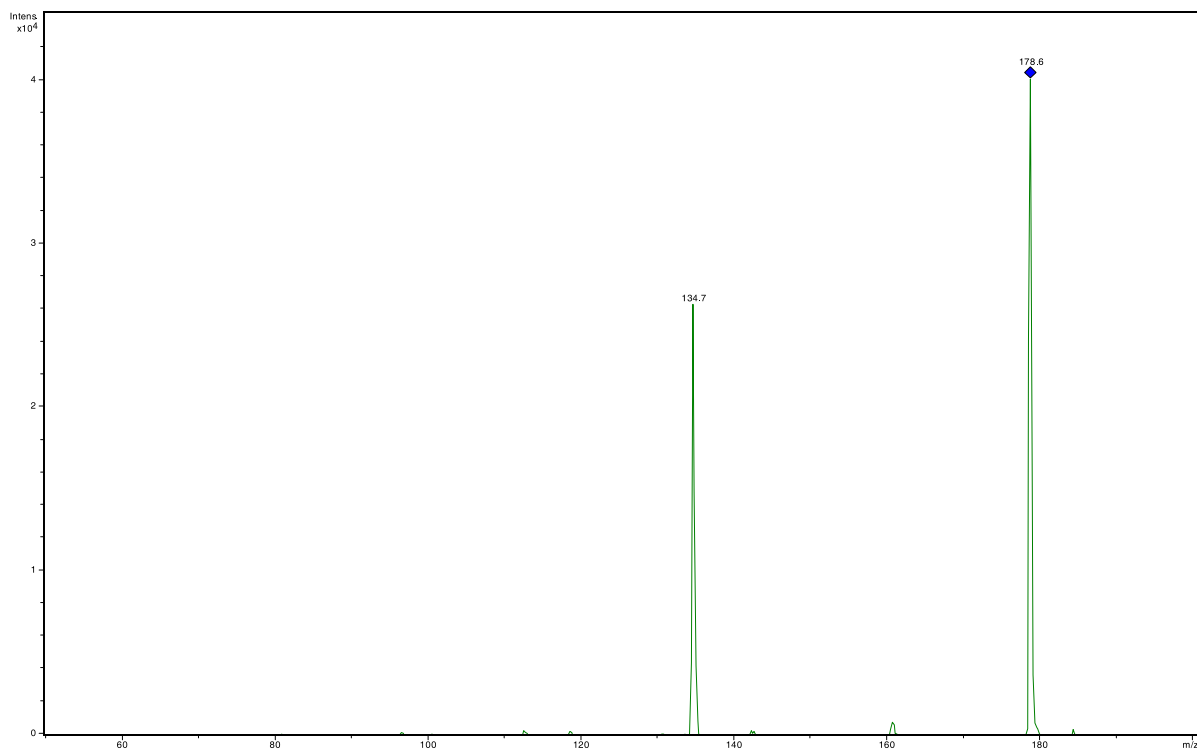




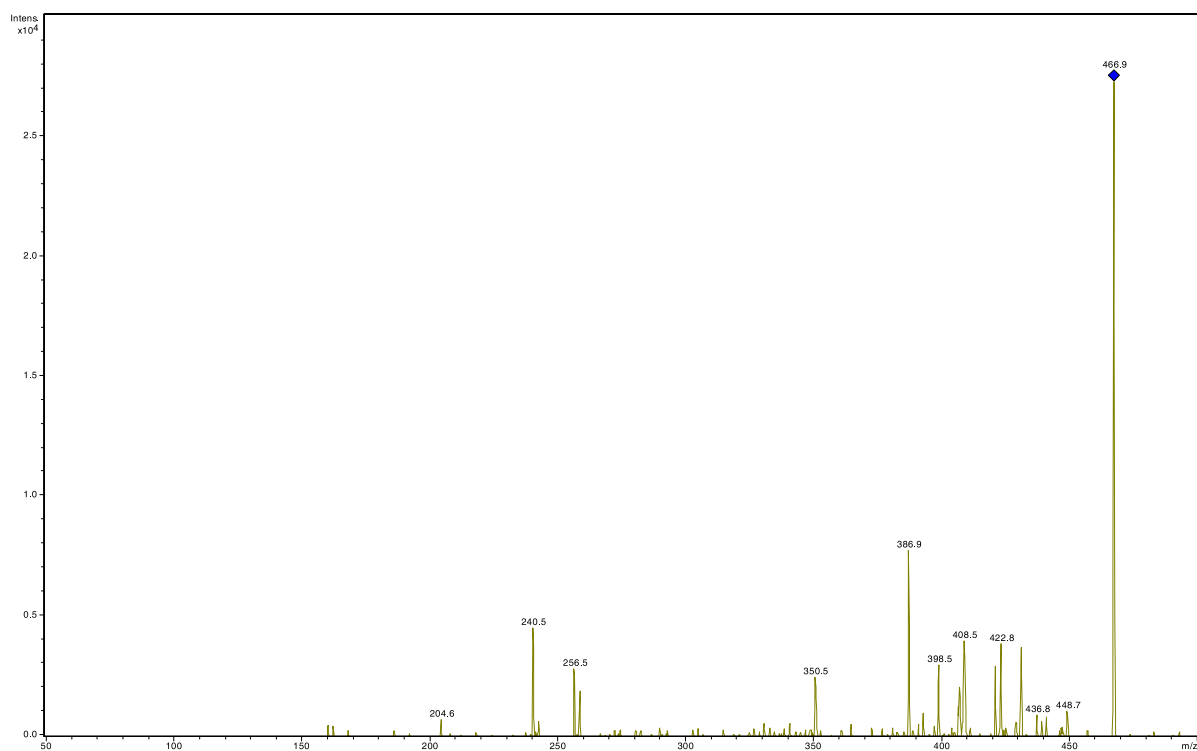


Spectres de fragmentation de la fraction 1

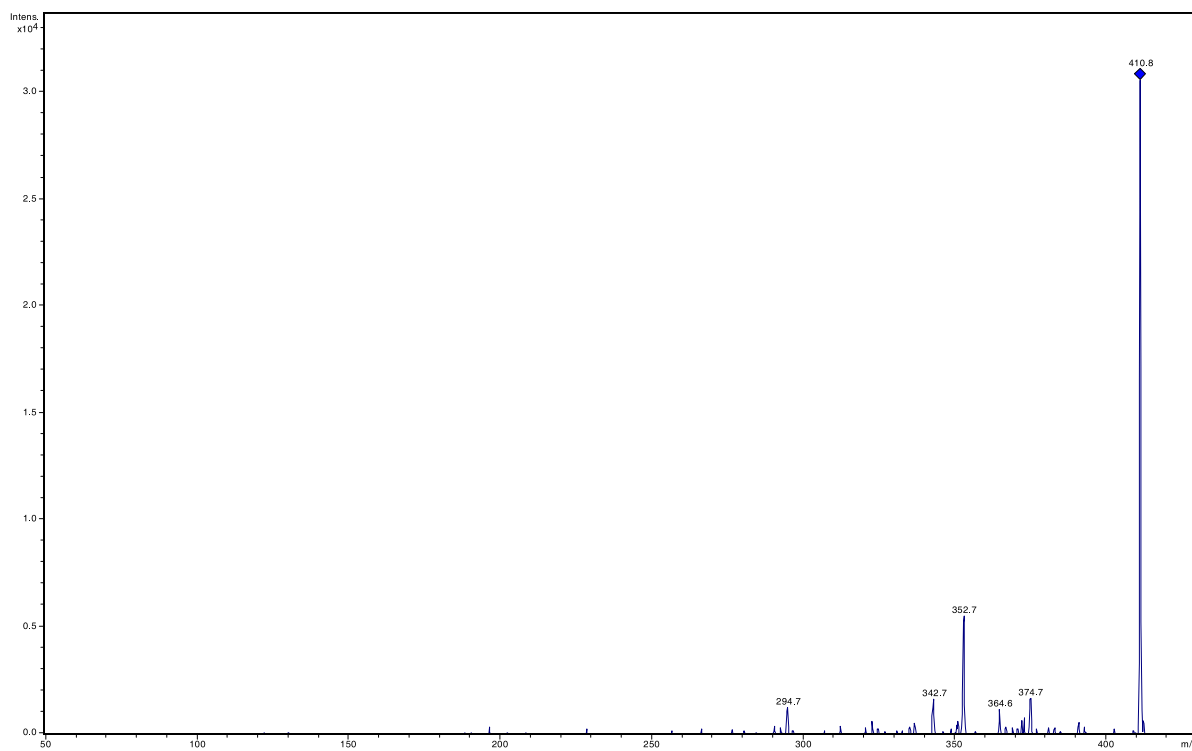
F1 178.8



F1 466.7

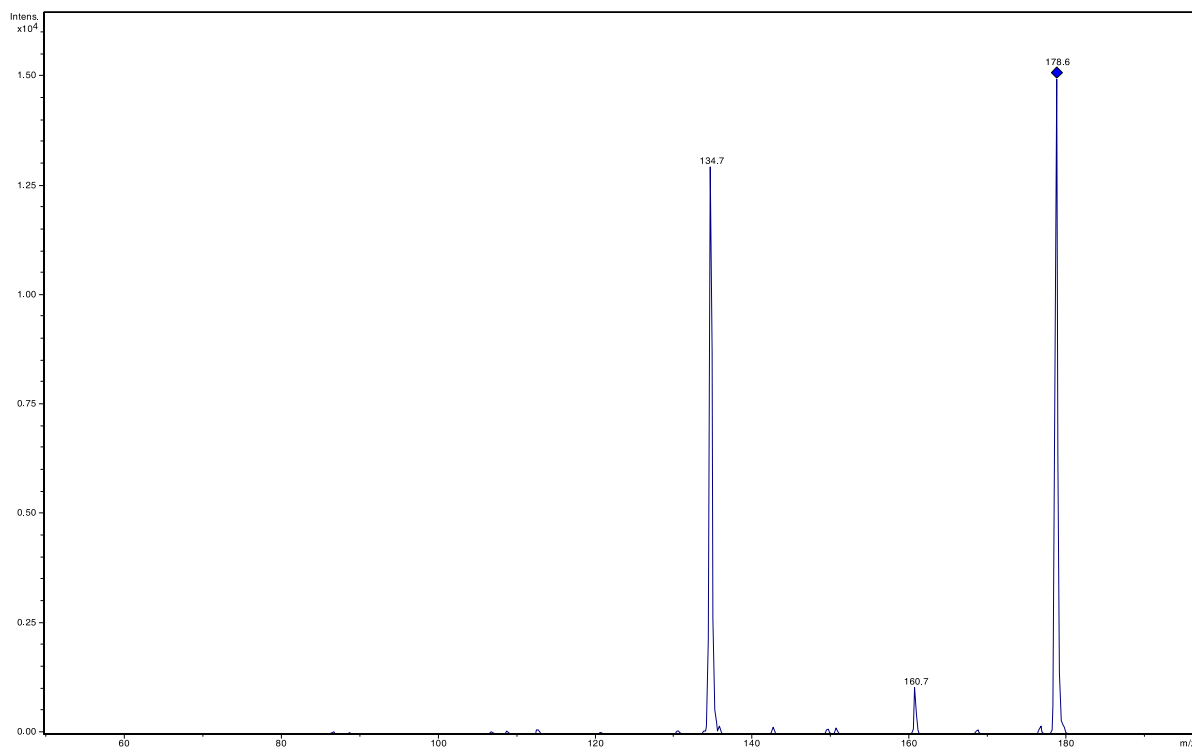


F1 410.7



Spectres de fragmentation de la fraction 2

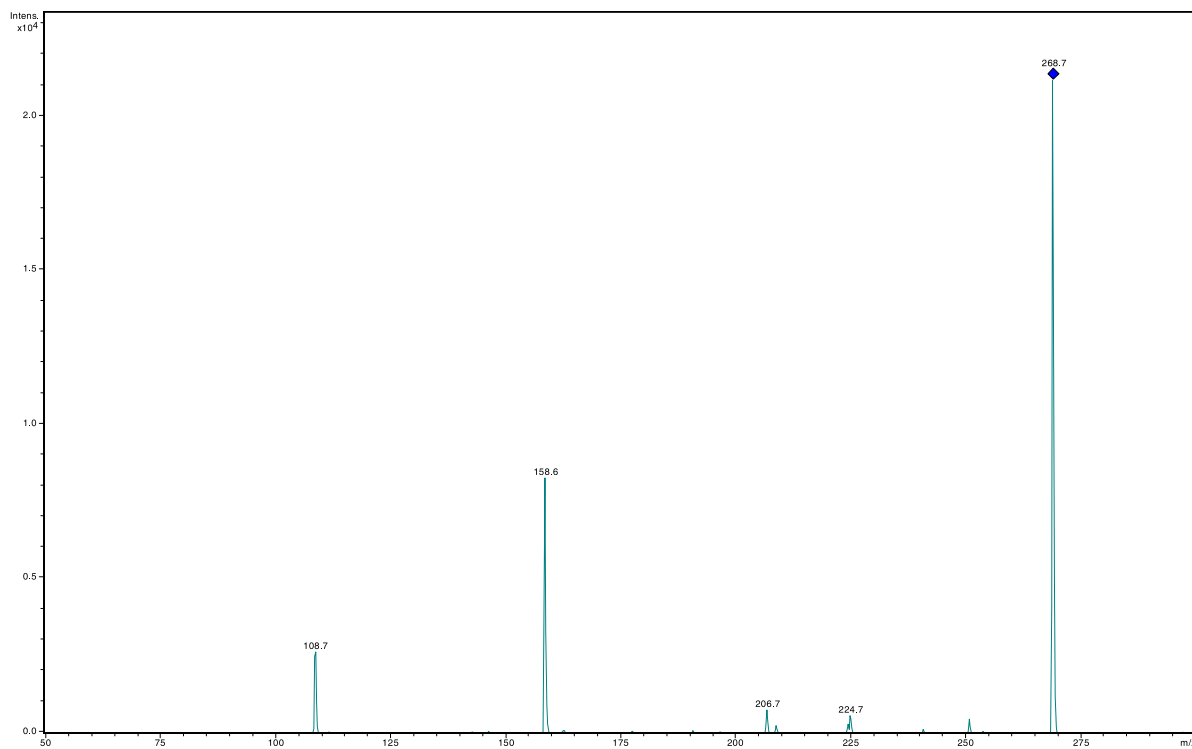
F2 178.8



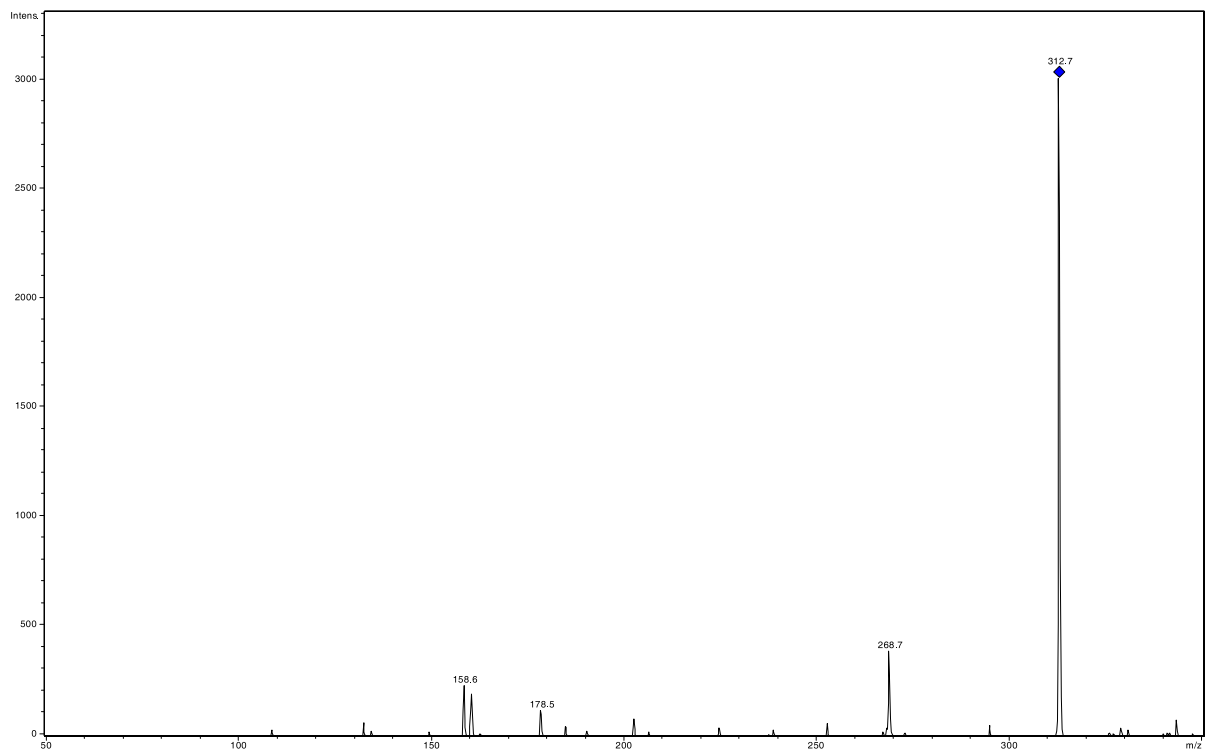
F2 196.8



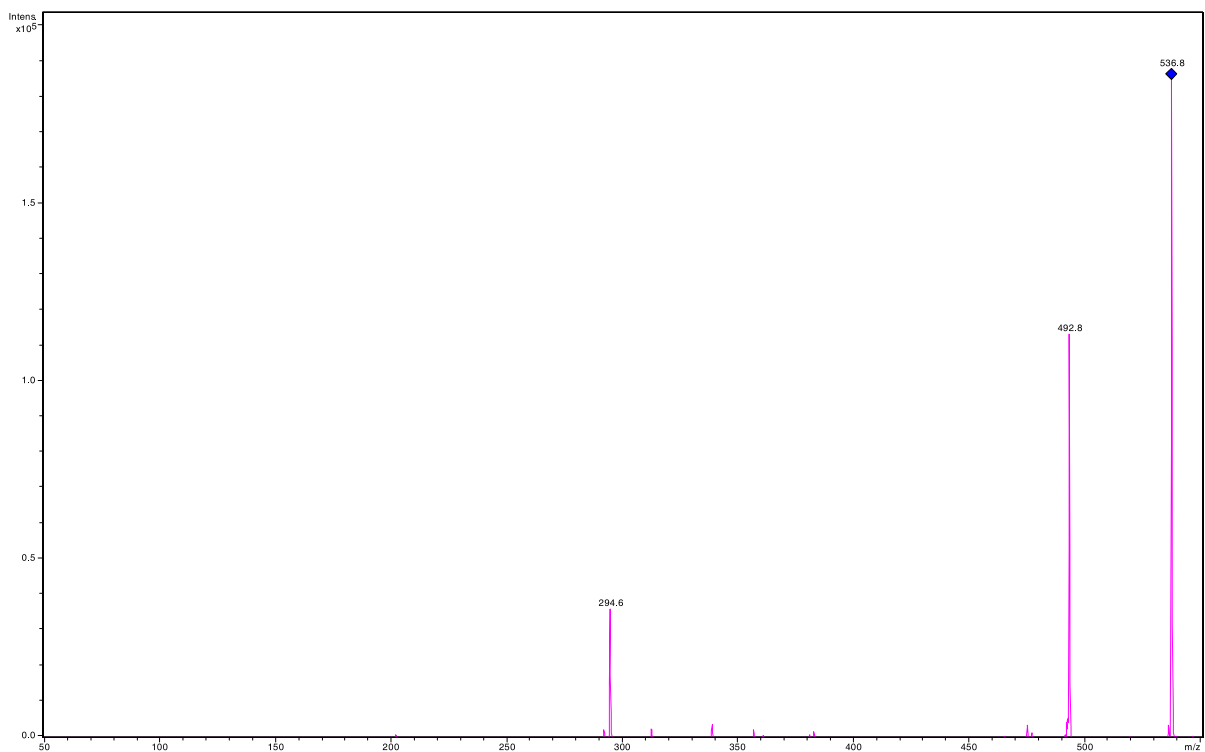
F2 268.8



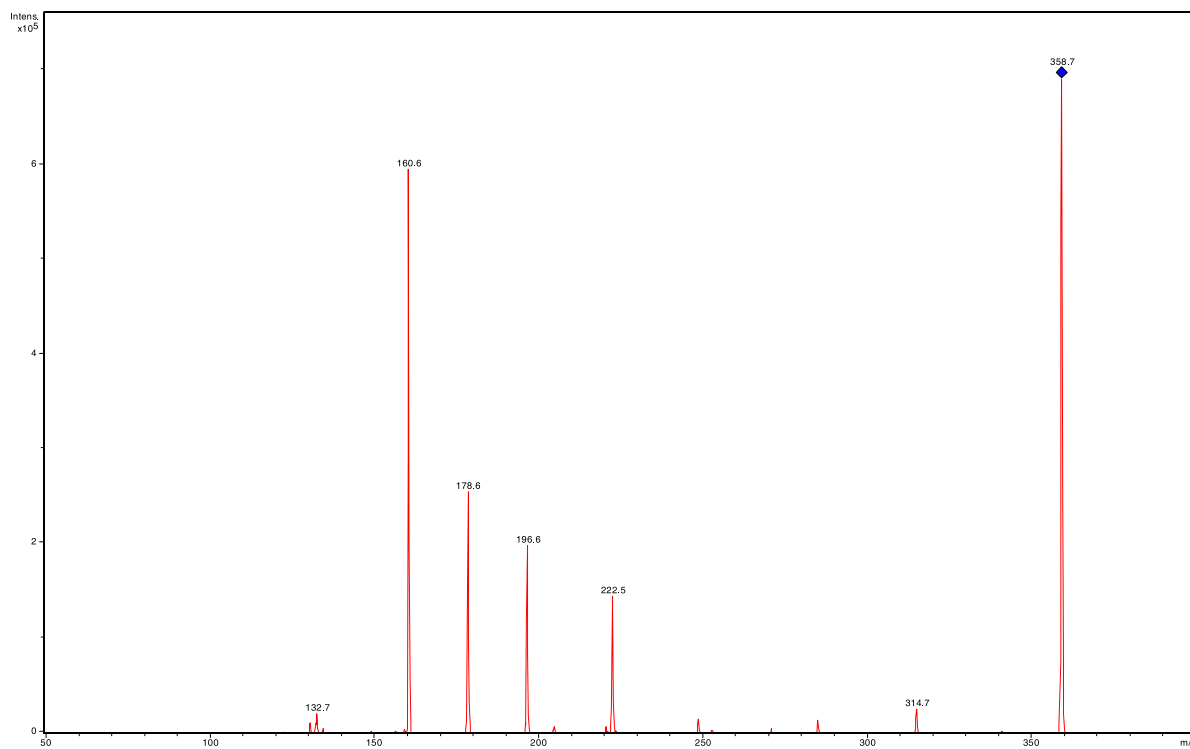
F2 312.7



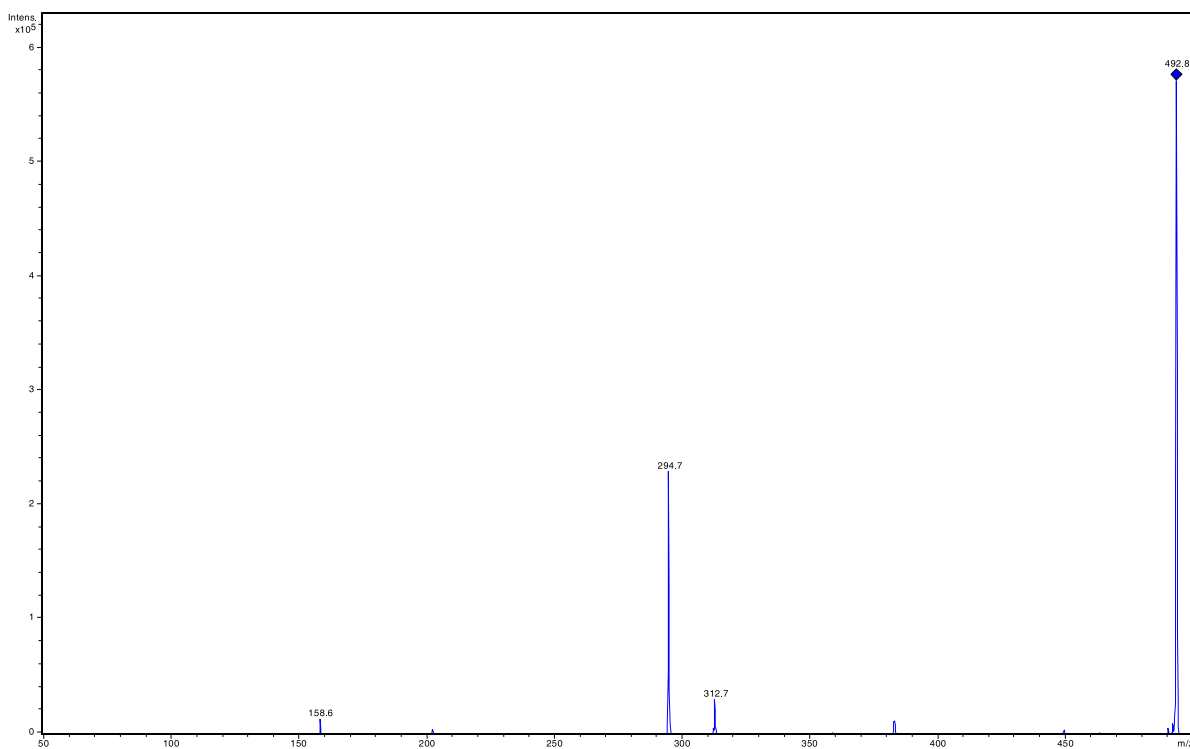
F2 536.6



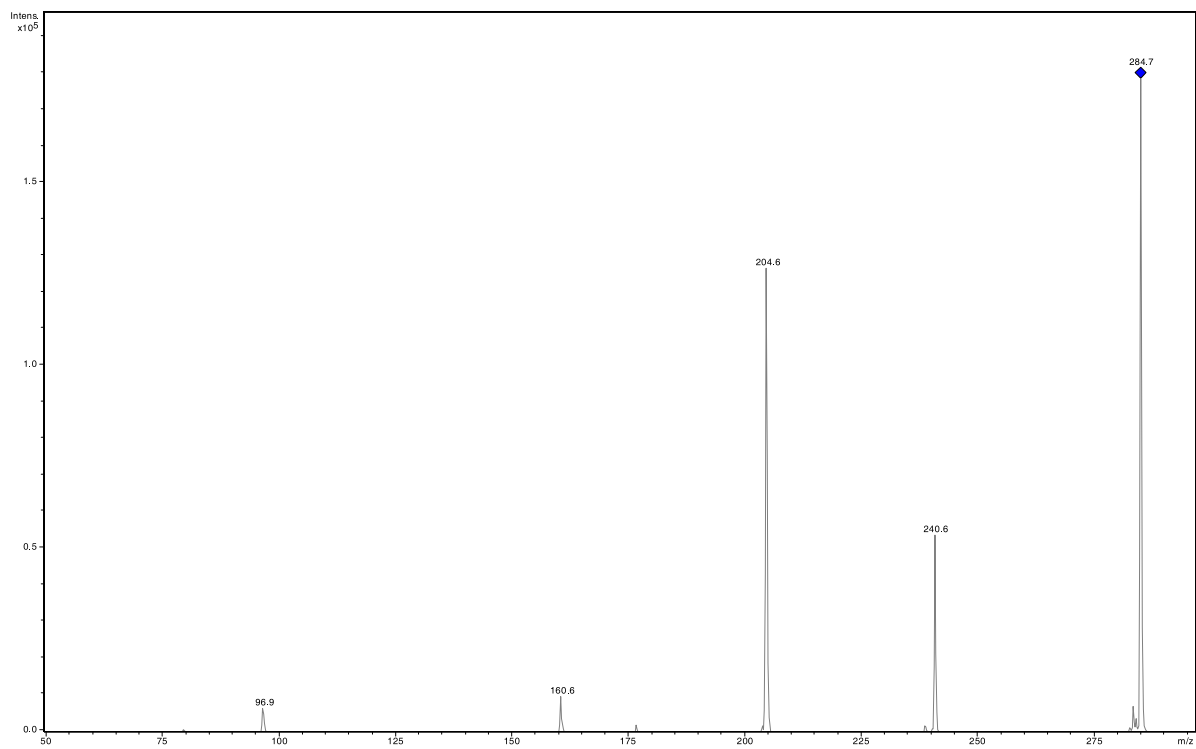
F2 358.7



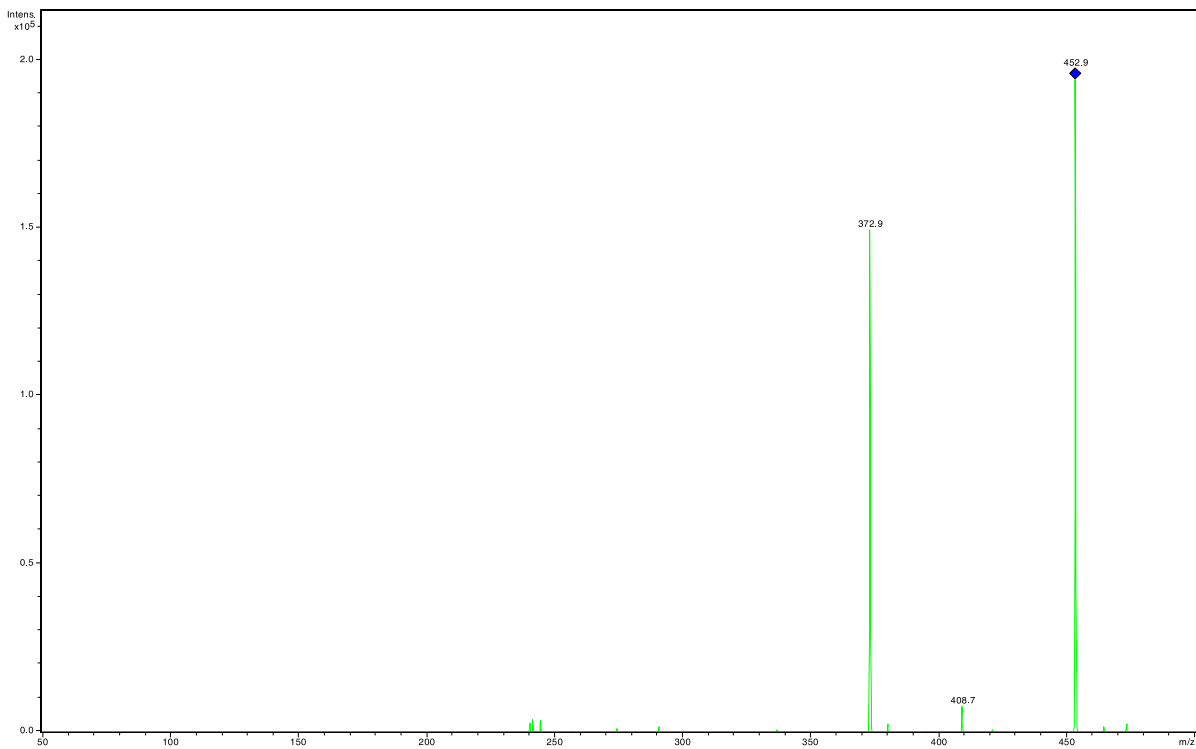
F2 492.6



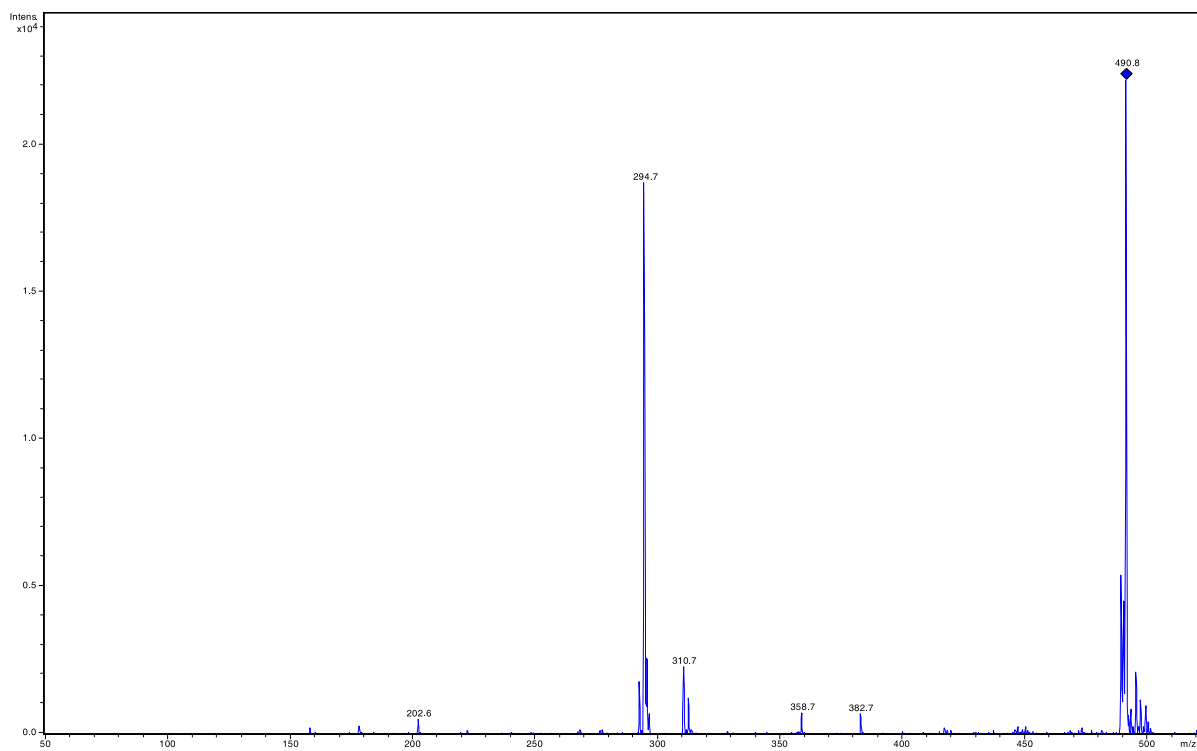
F2 284.7



F2 452.7

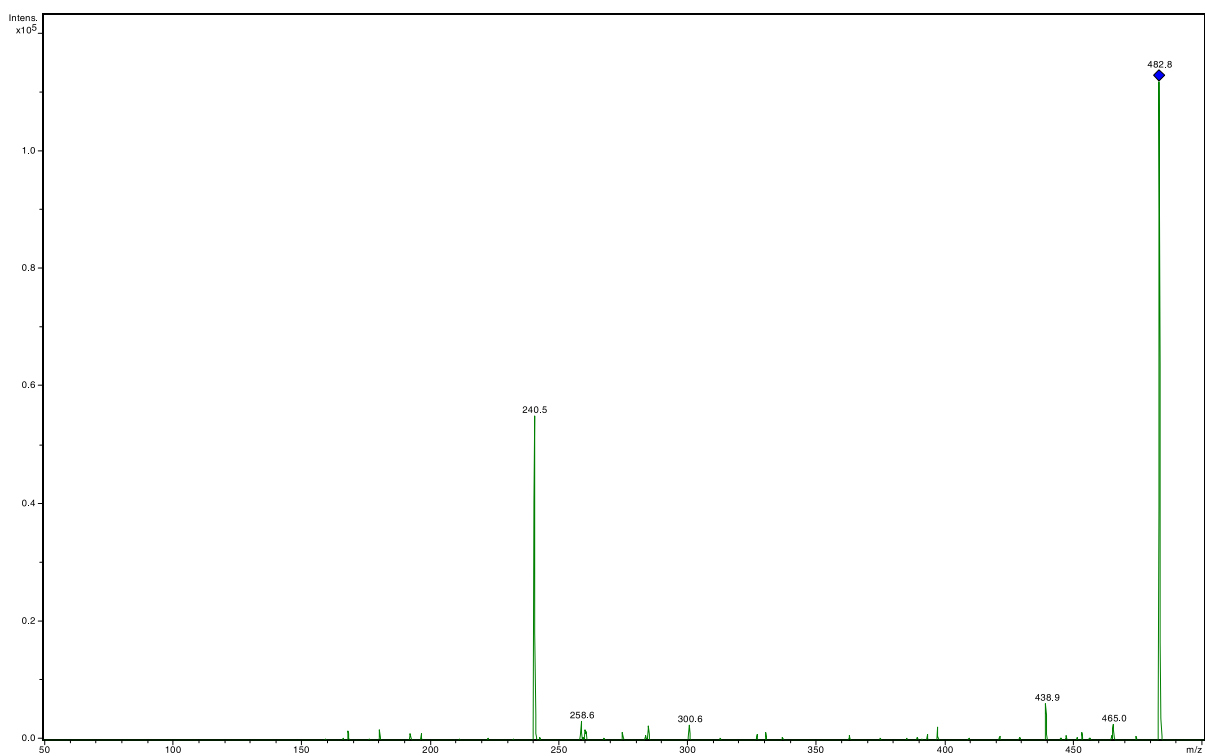


F2 490.6

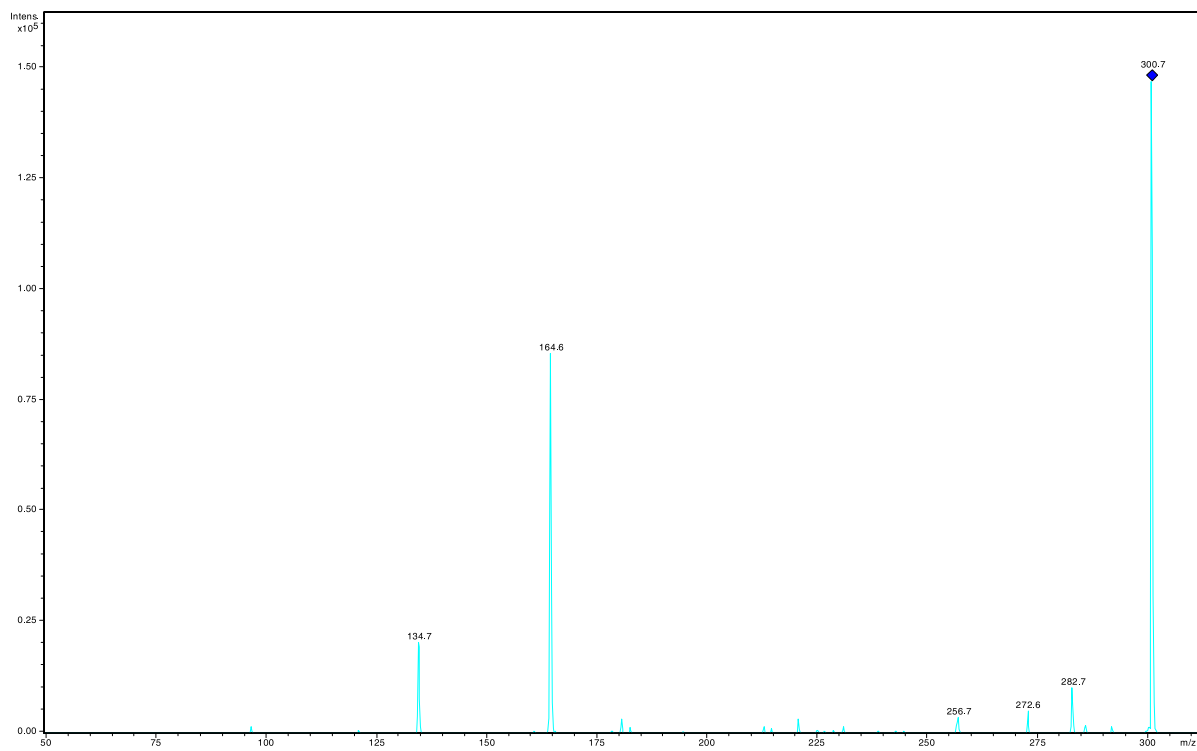


Spectres de fragmentation de la fraction 3

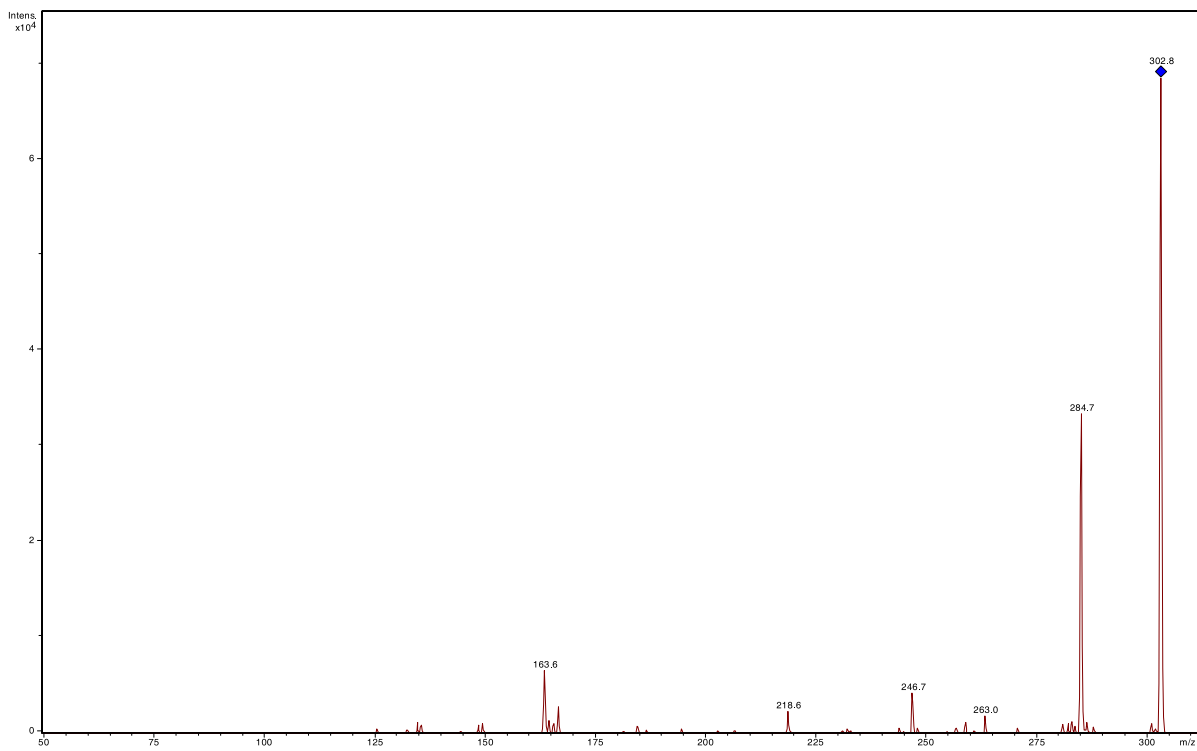
F3 482.7



F3 300.7



F3 302.8



Annexe III : Tableau d'échantillonnage relatif à l'étude de variabilité inter-individus de Tetiaroa.

Exposition	Habitat	Date collecte	Individu	Individu en fleurs, fruits/type de sol	Nom échantillon	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Masse fraîche (g)	Extrait lyophilisé (mg)	Rendement de l'extrait brut (%)
Vents dominants	Bord de lagon	19/02/13	WL1	fruits et fleurs/sable	WL1			37	2064	5,6
			WL2	fruits/corallien	WL2			36	1825	5,1
			WL3	fruits et fleurs/ sable	WL3			38	1933	5,1
			WL4	fruits et fleurs/sable	WL4			23	1508	6,6
			WL5	fruits/sable	WL5			27	1788	6,6
			WL6	fruits/sable	WL6			43	1877	4,4
			WL7	fruits/sable	WL7			45	2286	5,1
			WL8	fruits/sable	WL81	14	6	3	131	4,4
					WL82	15,5	7,8	5	115	2,3
					WL83	14,5	6,6	4	104	2,6
					WL84	15,2	7,4	5	186	3,7
					WL85	16,3	7,8	5	197	3,9
					WL86	14,5	6,8	5	182	3,6
					WL87	14,7	7,3	5	142	2,8
					WL88	16,8	7,8	5	195	3,9
			WL9	fruits et fleurs/corallien	WL91	14,5	6,9	6	168	2,8
					WL92	15,4	7,2	7	246	3,5
					WL93	13,8	6,2	3	116	3,9
					WL94	17,3	8,2	7	176	2,5
					WL95	12,7	6,6	4	135	3,4
					WL96	19,5	8,4	10	292	2,9
					WL97	13,4	5,8	5	71	1,4
					WL98	12,3	5,2	3	64	2,1
			WL10	fruits et fleurs/sable et corallien	WL101	22	9,3	8	291	3,6
					WL102	18,7	9,1	7	283	4,0
					WL103	16,2	7	4	46	1,2
					WL104	16,8	7,3	4	43	1,1
					WL105	15,5	7,5	5	117	2,3
					WL106	17,5	8,6	7	173	2,5
					WL107	19,5	7,7	7	140	2,0
					WL108	18	7,6	6	10	0,2

Exposition	Habitat	Date collecte	Individu	Individu en fleurs, fruits/type de sol	Nom échantillon	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Masse fraîche (g)	Extrait lyophilisé (mg)	Rendement de l'extrait brut (%)
Vents dominants	Bord d'océan	20/02/13	WO1	fruits et fleurs/corallien	WO1			29	1319	4,5
			WO2	fruits et fleurs/corallien	WO2			32	1555	4,9
			WO3	fruits et fleurs/corallien	WO3			50	1153	2,3
			WO4	fruits et fleurs/corallien	WO4			29	983	3,4
			WO5	fruits/corallien	WO5			43	1460	3,4
			WO6	fruits/corallien	WO6			54	1506	2,8
			WO7	fruits et fleurs/corallien	WO7			51	1651	3,2
			WO8	fruits et fleurs/corallien	WO81	17	7	4	11	0,3
					WO82	22,7	7,6	8	215	2,7
					WO83	15,5	5,7	4	50	1,3
					WO84	21,2	8	9	265	2,9
					WO85	20	6,3	5	128	2,6
					WO86	20,5	7,4	6	193	3,2
					WO87	18,2	6,6	4	61	1,5
					WO88	15,2	5,5	3	55	1,8
					WO91	15,2	7,3	6	66	1,1
					WO92	19,8	8,2	8	151	1,9
					WO93	19	9,5	10	174	1,7
					WO94	17	9,2	10	346	3,5
					WO95	16,1	6,5	5	121	2,4
					WO96	11,8	6,2	4	241	6,0
					WO97	19	7,5	8	218	2,7
					WO98	19,5	9,6	12	342	2,9
					WO101	23,5	9,7	14	397	2,8
					WO102	19	7,5	8	260	3,3
					WO103	15,2	7,1	8	252	3,2
			WO10	fruits/corallien	WO104	14	5,8	4	128	3,2
					WO105	18,6	7,2	8	263	3,3
					WO106	15	7,2	2	105	5,3
					WO107	16,5	7,4	5	92	1,8
					WO108	14,5	5,6	4	95	2,4

Exposition	Habitat	Date collecte	Individu	Individu en fleurs, fruits/type de sol	Nom échantillon	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Masse fraîche (g)	Extrait lyophilisé (mg)	Rendement de l'extrait brut (%)
Vents non dominants	Bord de lagon	20/02/13	NL1	fruits/sable et corallien	NL1			17	844	5,0
			NL2	fruits et fleurs/sable et corallien	NL2			12	677	5,6
			NL3	fruits/sable et corallien	NL3			10	603	6,0
			NL4	fruits/sable	NL4			28	1132	4,0
			NL5	fruits/sable	NL5			42	1483	3,5
			NL6	très peu fruits/sable	NL6			20	657	3,3
			NL7	fruits et fleurs/sable	NL7			16	504	3,2
			NL8	pas de fleurs et fruits/sable et corallien	NL81	25	9,4	9	318	3,5
					NL82	21	8	6	114	1,9
					NL83	21,7	8,5	6	147	2,5
					NL84	16	6	3	77	2,6
					NL85	20	7,2	6	196	3,3
					NL86	25	9	9	315	3,5
					NL87	15,3	5,7	4	103	2,6
					NL88	19,5	6,9	4	146	3,7
					NL91	x	x	x	x	x
					NL92	17,7	6	4	97	2,4
					NL93	17,5	6,6	4	95	2,4
			NL9	fruits et fleurs/sable	NL94	14,1	4,5	2	192	9,6
					NL95	25,5	8,3	7	211	3,0
					NL96	25,5	8,9	8	299	3,7
					NL97	16	5,7	3	103	3,4
					NL98	20	7,9	6	93	1,6
					NL101	14	5,3	2	67	3,4
					NL102	16,2	7,1	8	168	2,1
					NL103	16,3	5,6	4	24	0,6
			NL10	fruits et fleurs/sable	NL104	14,4	4,8	2	23	1,2
					NL105	15,5	5,1	5	102	2,0
					NL106	21	7,2	7	208	3,0
					NL107	13,8	5	2	66	3,3
					NL108	14,5	6	3	111	3,7

Exposition	Habitat	Date collecte	Individu	Individu en fleurs, fruits/type de sol	Nom échantillon	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Masse fraîche (g)	Extrait lyophilisé (mg)	Rendement de l'extrait brut (%)
Vents non dominants	Bord d'océan	19/02/13	NO1	fleurs/corallien	NO1			11	479	4,4
			NO2	fruits/corallien	NO2			18	764	4,2
			NO3	fruits/sable	NO3			16	631	3,9
			NO4	fruits et fleurs/sable et corallien	NO4			21	821	3,9
			NO5	pas de fleurs et fruits/sable	NO5			15	597	4,0
			NO6	fleurs/sable	NO6			29	981	3,4
			NO7	fruits et fleurs/sable	NO7			22	1037	4,7
			NO8	fruits et fleurs/sable	NO81	16,4	5,1	2	92	4,6
					NO82	26	7,3	7	205	2,9
					NO83	22,5	5,9	5	104	2,1
					NO84	15,7	4,2	1	99	9,9
					NO85	20	4,9	3	106	3,5
					NO86	23,8	7,7	6	85	1,4
					NO87	20,5	6,1	4	98	2,5
					NO88	17,8	5,1	3	129	4,3
					NO91	32	9	12	469	3,9
					NO92	24	7,4	3	127	4,2
			NO9	fruits/sable	NO93	22	6,3	4	179	4,5
					NO94	16	4,1	2	78	3,9
					NO95	24,5	9,1	7	259	3,7
					NO96	27	6,8	5	227	4,5
					NO97	28,5	9,3	8	295	3,7
					NO98	20,5	7,1	5	157	3,1
					NO101	13,7	5,5	3	107	3,6
					NO102	14	7,3	4	151	3,8
			NO10	fruits et fleurs/corallien	NO103	16,7	6,3	6	149	2,5
					NO104	16	7,4	4	121	3,0
					NO105	13,7	4	2	63	3,2
					NO106	17,8	7,6	4	164	4,1
					NO107	14	6,7	4	108	2,7
					NO108	16,5	7,6	4	89	2,2

Annexe IV : Tableaux d'échantillonnage relatifs à l'étude des conditions optimales de collecte,
d'extraction et de conservation des feuilles et extraits d'*H. foertherianum*.

Lieu de collecte saisonnier	Nom d'échantillon	Date collecte	Masse fraîche (g)	Nombre de feuilles	Extrait (g)
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa911	29/09/2011	57,79	24	2,55
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa1111	29/11/2011	49,94	8	1,71
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa212	1/02/2012	61,25	9	1,51
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa312	2/04/2012	31,59	12	0,994
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa 512	1/06/2012	41,34	14	1,64
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa 712	1/08/2012	49,89	13	1,76
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa912	27/09/2012	26,21	6	0,979
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa1112-1	29/11/2012	5,82	2	0,162
	HfTa1112-2		7,15	2	0,232
	HfTa1112-3		12,58	2	0,483
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa0113-1	29/01/2013	7,30	2	0,243
	HfTa0113-2		3,91	2	0,107
	HfTa0113-3		7,89	2	0,241
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa0313-1	27/03/2013	7,84	2	0,229
	HfTa0313-2		6,46	2	0,222
	HfTa0313-3		7,45	2	0,249
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa0513-1	29/05/2013	6,10	2	0,193
	HfTa0513-2		7,56	2	0,22
	HfTa0513-3		5,50	2	0,125
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa0713-1	31/07/2013	5,26	2	0,193
	HfTa0713-2		6,05	2	0,201
	HfTa0713-3		7,07	2	0,261
Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	HfTa0913-1	21/09/2013	7,52	2	0,335
	HfTa0913-2		7,41	2	0,289
	HfTa0913-3		7,00	2	0,255

Comparaison	Nom d'échantillon	Date collecte et (d'extraction)	Maturité	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Masse fraîche et (avant extraction) (g)	Extrait (g)	Rendement de l'extrait brut (%)
Entre feuilles sénescentes (s)	FJ1	19/03/2012	s	20,0	6,5	5,65	0,20	3,53
	FJ2		s	16,6	6,0	3,63	0,12	3,30
	FJ3		s	15,7	6,2	4,16	0,17	4,08
	FJ4		s	15,8	7,3	5,91	0,22	3,72
	FJ5		s	18,0	7,4	5,06	0,11	2,17
	FJ6		s	19,0	7,4	6,39	0,20	3,12
	FJ7		s	19,4	7,8	6,28	0,13	2,07
	FJ8		s	19,8	7,7	6,68	0,12	1,79
	FJ9		s	19,0	7,1	4,59	0,12	2,61
	FJ10		s	20,8	7,8	6,35	0,23	3,62
Entre feuilles sénescentes, matures (m) et sénescentes tombées (st)	FV1	19/03/2012	m	17,6	6,4	4,12	0,10	2,42
	FV2		m	17,5	7,2	6,06	0,15	2,47
	FV3		m	19,1	6,3	4,76	0,12	2,52
	FV4		m	17,2	7,7	4,93	0,14	2,83
	FV5		m	18,0	6,7	4,44	0,19	4,27
	FM1		st	22,0	6,7	6,24	0,14	2,24
	FM2		st	20,3	8,0	4,68	0,10	2,13
	FM3		st	17,8	7,3	4,48	0,16	3,57
	FM4		st	21,3	7,9	6,14	0,10	1,62
	FM5		st	22,8	8,9	6,89	0,19	2,75
Entre des petites, moyennes et grandes feuilles	FP1	19/03/2012	s	15,2	6,4	4,71	0,05	1,06
	FP2		s	16,0	6,3	3,68	0,06	1,63
	FP3		s	13,5	6,3	3,99	0,04	1,00
	FP4		s	13,8	5,4	2,88	0,09	3,13
	FP5		s	13,5	5,4	2,86	0,03	1,05
	FG1		s	24,4	9,5	10,44	0,38	3,64
	FG2		s	23,2	9,8	10,22	0,27	2,64
	FG3		s	26,1	10,2	11,24	0,36	3,20
	FG4		s	27,5	11,1	13,42	0,50	3,73
	FG5		s	27,5	10,4	11,45	0,35	3,06
Entre des feuilles séchées 3 jours et 7 jours avant extraction	FSEC31	19/03/2012 (22/03/2012)	s	22,5	9,0	8,87 (1,01)	0,28	3,15
	FSEC32		s	18,7	7,0	5,93 (0,58)	0,14	2,36
	FSEC33		s	18,0	7,5	5,59 (0,60)	0,14	2,50
	FSEC34		s	21,0	9,3	8,90 (0,91)	0,20	2,24
	FSEC35		s	21,6	7,8	6,62 (0,74)	0,20	3,02
	FSEC71	19/03/2012 (26/03/2012)	s	23,3	7,5	8,87 (0,77)	0,16	1,80
	FSEC72		s	23,8	8,5	7,04 (0,59)	0,11	1,56
	FSEC73		s	22,3	8,2	7,57 (0,75)	0,24	3,17
	FSEC74		s	20,3	8,1	8,49 (0,92)	0,27	3,18
	FSEC75		s	20,5	8,3	7,32 (0,75)	0,25	3,42

Comparaison	Nom échantillon	Date collecte	Maturité	Longueur (cm)	Largeur (cm)	Masse fraîche (g)	Extrait lyophilisé (g)	Rendement de l'extrait brut (%)
Entre feuilles extraites, immédiatement après la collecte, en décoction	FJ1	4/12/2012	sénescences	24,2	9,1	10,85	0,268	2,47
	FJ2			18,0	6,6	6,26	0,197	3,14
	FJ3			20,0	7,6	7,28	0,224	3,07
	FJ4			19,4	7,9	7,67	0,243	3,16
	FJ5			21,0	8,2	8,74	0,207	2,36
	FJ6			27,3	9,5	12,73	0,323	2,53
	FJ7			19,0	7,5	12,68	0,158	1,24
	FJ8			22,4	8,8	7,07	0,254	3,59
	FJ9			18,2	8,2	9,83	0,273	2,77
	FJ10			17,2	7,1	7,68	0,189	2,46
Entre feuilles conservées à -80°C, -20°C et 4°C 3 jours avant extraction	FJ801		sénescences	19,0	9,0	13,26	0,242	1,82
	FJ802			20,4	8,2	10,02	0,221	2,20
	FJ803			16,8	6,9	6,67	0,101	1,51
	FJ804			23,8	9,2	10,57	0,125	1,18
	FJ805			18,4	6,9	6,01	0,061	1,01
	FJ201		sénescences	23,5	7,7	10,74	0,246	2,29
	FJ202			19,8	7,7	7,35	0,041	0,55
	FJ203			19,3	7,4	7,17	0,066	0,92
	FJ204			20,5	7,0	6,11	0,030	0,49
	FJ205			13,8	6,7	6,34	0,052	0,82
Entre une infusion et une macération de feuilles	FJ41		sénescences	17,8	6,7	6,47	0,058	0,89
	FJ42			22,9	8,7	10,11	0,155	1,53
	FJ43			18,5	7,4	6,45	0,052	0,80
	FJ44			22,0	8,8	10,16	0,113	1,11
	FJ45			16,0	7,3	6,19	0,104	1,68
	FJI1		sénescences	19,3	8,5	9,16	n.d. ^a	n.d.
	FJI2			16,1	6,0	3,97	n.d.	n.d.
	FJI3			17,4	7,5	7,11	n.d.	n.d.
	FJI4			27,3	10,9	15,55	n.d.	n.d.
	FJI5			16,1	7,4	7,35	n.d.	n.d.
Entre un filtrat stocké 3 jours à température ambiante, et à 4°C avant lyophilisation et analysé juste après l'extraction	FJM1		sénescences	21,0	9,0	9,22	0,075	0,81
	FJM2			17,0	7,0	6,45	0,054	0,84
	FJM3			20,5	8,4	9,05	0,072	0,79
	FJM4			20,5	7,8	8,47	0,065	0,76
	FJM5			21,0	8,5	10,42	0,041	0,39
	FJF1		sénescences	20,0	7,5	8,11	0,046	0,56
	FJF2			11,8	6,0	3,48	0,021	0,60
	FJF3			23,2	8,8	10,80	0,157	1,45
	FJF4			16,0	6,5	5,20	0,059	1,13
	FJF5			20,0	7,6	6,98	0,070	1,00
	FJF41		sénescences	21,0	8,2	9,20	0,173	1,88
	FJF42			16,2	5,1	3,26	0,012	0,37
	FJF43			23,0	8,5	9,35	0,131	1,40
	FJF44			21,0	7,9	7,75	0,074	0,95
	FJF45			19,2	8,0	7,59	0,036	0,47
	FJA1		sénescences	17,0	7,1	6,09	0,195	3,20
	FJA2			19,3	7,8	7,84	0,327	4,17
	FJA3			20,0	8,2	7,94	0,264	3,32
	FJA4			16,6	6,1	4,50	0,166	3,68
	FJA5			19,9	8,0	7,04	0,237	3,36

^a n.d. : non déterminé

Comparaison entre des feuilles extraites fraîches et des feuilles lyophilisées avant extraction			Masse feuilles (nbr feuilles)		Extrait (g)	
Nom échantillon	Collecteurs	Lieu de collecte	Fraîches	Lyophilisées immédiatement après collecte	De feuilles fraîches	De feuilles lyophilisées immédiatement après collecte
HFTa411c	D. Laurent, F. Rossi	Punatea village (PK4,7), Tahiti Iti, Société	25,59 g (6)	4,06 g (6)	0,9	1,10
HFTi1111e	D. Laurent	Ouest de Tuherahera, Tikehau, Tuamotu	67,00 g (6)	13,16 g (10)	2,33	3,26
HFMat1111a	N. Gaertner-Mazouni	aéroport Mataiva, Tuamotu	82,00 g (5)	16,46 g (7)	1,56	3,20
HfA312	N. Gaertner-Mazouni	Aratika, Tuamotu	61,85 g (6)	9,74 g (7)	2,59	2,38

Comparaison des méthodes d'extraction	Nom échantillon	Lieu de collecte	Date collecte	Masse fraîche (g)	Nombre de feuilles	Extrait (g)
Décoction	FJD	Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	9/09/2013	4,53	2	0,152
Macération EtOH 60°	FJMEtOH	Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	9/09/2013	4,64	2	0,134
Extraction à reflux EtOH 60°	FJREtOH	Plage du Tombeau du roi, Arue, Tahiti Nui, Société	9/09/2013	5,84	2	0,194

Liste des publications et communications scientifiques

Publications

Braidy N., Matin A., Rossi F., Chinain M., Laurent D., Guillemin G. J. (2014) Neuroprotective effects of rosmarinic acid on ciguatoxin in primary human neurons. *Neurotoxicity research*, 25 (2), 226-234.

Pawlowiez R., Darius H. T., Cruchet P., Rossi F., Caillaud A., Laurent D., Chinain M. (2013) Evaluation of seafood toxicity in the Australes archipelago (French Polynesia) using the neuroblastoma cell-based assay. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30 (3), 567-586.

Rossi F., Jullian V., Pawlowiez R., Kumar-Roiné S., Haddad M., Darius H. T., Gaertner-Mazouni N., Chinain M., Laurent D. (2012) Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid, against a Pacific ciguatoxin. *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (1), 33-40.

Laurent D, Kerbrat A.S., Darius T., Rossi F., Yeeting B., Haddad M., Golubic S., Pauillac S., Chinain, M. (2012) Ciguatera Shellfish Poisoning (CSP), a new ecotoxicological phenomenon. From cyanobacteria to humans via giant clams, in *Food chain: new research*. Jensen M.A. & Muller D.W (Eds.), Nova Publishers, pp. 44.

Communications orales et affichées internationales

Rossi F., Laurent D., Richert L., Gaertner-Mazouni N., Chinain M. (2013) A traditional plant remedy, *H. foertherianum* against Ciguatera. Poster au 12th *Pacific Science Inter-Congress* à Suva, Fidji.

Rossi F., Jullian V., Pawlowiez R., Kumar-Roiné S., Haddad M., Darius H. T., Gaertner-Mazouni N., Chinain M., Laurent D. (2012) Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid, against a Pacific ciguatoxin. Présentation orale de 15 min au 13th *International Congress of the Society of Ethnopharmacology* à Graz, Autriche.

Communications orales et affichées nationales

Rossi F. (2013) Caractérisation chimique d'extraits d'*H. foertherianum*, remède traditionnel contre la ciguatera. Présentation orale aux Doctoriales de l'UPF, Université de la Polynésie française, Tahiti.

Rossi F. (2012) Effet protecteur d'*H. foertherianum* et de l'acide rosmarinique face aux ciguatoxines. Présentation orale aux Doctoriales de l'UPF, Université de la Polynésie française, Tahiti.

Rossi F., Richert L., Gaertner-Mazouni N., Darius H.T., Chinain M., Laurent D. (2011) Valorisation industrielle d'un remède traditionnel pour le traitement des intoxications ciguatériques. Poster aux Doctoriales de l'UPF, Assemblée de Polynésie, Tahiti.

Travaux de vulgarisation

Laurent D., Rossi F. (2013) La médecine traditionnelle au secours des intoxications humaines, dans : 50 ans de recherche pour le développement en Polynésie française. Editions IRD, ISBN : 978-2-7099-1753-7

Vers une valorisation industrielle d'un remède traditionnel pour le traitement des intoxications ciguatérique

Malgré leur existence ancienne et leur incidence dans la zone intertropicale, aucun traitement efficace, autre que symptomatique, n'est disponible à l'heure actuelle pour traiter les intoxications ciguatériques. La médecine traditionnelle à base de plantes vient alors au secours des populations. Dans la région du Pacifique, une des plantes les plus utilisées, et présentant des potentialités dans le traitement de la ciguatera, est *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger. Toutefois, cette plante, de la famille des Boraginacées, est connue pour produire des alcaloïdes pyrrolizidiniques, composés hépatotoxiques. Dans ce travail, l'activité biologique sur cellules neuronales et la composition chimique des feuilles d'*H. foertherianum* ont été étudiées, en vue d'une valorisation d'un extrait de cette plante. Dans un premier temps, la confirmation de l'activité biologique *in vitro* de l'extrait aqueux d'*H. foertherianum* et de ses principes actifs, les acides rosmarinique et caféique, a été apportée. Ensuite, la caractérisation chimique de l'extrait aqueux par CLHP-SM a mené à l'identification potentielle de 24 composés et à la vérification de l'absence des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Enfin, l'étude des paramètres de collecte, de conservation et d'extraction des feuilles et extraits a permis de détailler les conditions nécessaires à l'obtention d'un extrait à la teneur maximale en principes actifs dont l'activité biologique serait garantie. Ainsi, la production locale d'un extrait d'*H. foertherianum*, dosé en principes actifs et dont l'innocuité est établie, en tant que traitement contre les intoxications ciguatériques peut être sérieusement envisagée.

Mots-clés : ciguatera, *H. foertherianum*, acide rosmarinique, alcaloïdes pyrrolizidiniques

To industrial development of a traditional remedy for the treatment of ciguatera fish poisoning

Despite its former existence and its impact in the intertropical zone, no effective treatment, other than symptomatic, is available to treat ciguatera fish poisoning yet. People can only rely on traditional herbal medicine. In the Pacific region, one of the most used plants, which is promising for the treatment of ciguatera fish poisoning, is *Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger. However, this plant, from the Boraginaceae family, is known for producing hepatotoxic compounds such as pyrrolizidine alkaloids. In order to valorize this plant extract, its biological activity on neuronal cells and its chemical composition with the means of HPLC-DAD and HPLC-MS have been studied in this work. First, the *in vitro* biological activity of the aqueous extract of *H. foertherianum* leaves and its active principles, rosmarinic and caffeic acids, was confirmed. Then the chemical characterization of the aqueous extract led to the possible identification of 24 compounds and the verification of the absence of pyrrolizidine alkaloids. Finally, the study of the harvest, conservation and extraction parameters of leaves and extracts permits to specify the conditions needed for obtaining an extract with a high level of active principles and whose biological activity is guaranteed. Therefore, a local production of an extract from *H. foertherianum* as a treatment against ciguatera fish poisoning, dosed in active principles and whose safety is established, can be seriously considered.

Keywords: ciguatera poisoning, *H. foertherianum*, rosmarinic acid, pyrrolizidine alkaloids