

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
par

ALBINET Lucile

Excoecaria agallocha L.

Le 16 Mars 2015

Directrice de thèse : VANSTEELANDT Marieke

JURY

Président : FABRE, Nicolas
1er assesseur : VANSTEELANDT, Marieke
2ème assesseur : AMOUROUX, Noël

REMERCIEMENTS

Au Président du jury :

Mr Fabre, Professeur des Universités à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse, je vous remercie de votre disponibilité et d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Aux membres du jury :

Mme Vansteelandt, Maître de Conférences des Universités, et directrice de cette thèse je vous remercie de m'avoir accompagnée dans ce travail et pour votre aide précieuse tout au long de cette thèse.

Mr Amouroux, Pharmacien et intervenant à la Faculté de Pharmacie, je vous remercie d'avoir accepté avec spontanéité de faire parti du jury de cette thèse ainsi que pour votre pédagogie tout au long de nos études.

A mes parents, qui m'ont toujours encouragée et soutenue. A ma sœur, mon frère, Clau et Jean-Christophe merci pour votre présence et votre soutien. Et comme on dit : « La famille, c'est important la famille ! »

A mes amies, Philippine et Sandrine que j'ai eu l'honneur de rencontrer grâce à nos études de pharmacie, et dont l'amitié durera encore pour longtemps. Et merci à tous mes amis qui m'accompagnent au quotidien.

Enfin, **MERCI Rémi** pour ton amour et ta grande patience qui, face à cette thèse, ont été mis à rude épreuve mais qui ne t'a pas empêché de vouloir m'épouser ! De tout mon cœur merci.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 12 |
| PARTIE I : ETUDE BOTANIQUE ET ENVIRONNEMENTALE DES MANGROVES | 13 |
| I. LA MANGROVE | 14 |
| 1) DEFINITION | 14 |
| 1.1) <i>La mangrove en tant que plante</i> | 14 |
| 1.2) <i>La mangrove en tant que communauté</i> | 15 |
| 2) CLASSIFICATION SELON PR TOMLINSON | 15 |
| 2.1) <i>Les mangroves vraies</i> | 16 |
| 2.2) <i>Différenciation des mangroves vraies majeures et mineures</i> | 17 |
| 2.3) <i>Les mangroves associées</i> | 17 |
| 3) SUPERFICIE ET LOCALISATION..... | 18 |
| 3.1) <i>Superficie</i> | 18 |
| 3.2) <i>Localisation</i> | 19 |
| 3.2.1) <i>Au niveau mondial</i> | 19 |
| 3.2.2) <i>Au niveau des zones côtières</i> | 20 |
| 4) ADAPTATIONS BIOLOGIQUES | 23 |
| 4.1) <i>A la salinité de l'eau</i> | 23 |
| 4.2) <i>A l'immersion des racines dans l'eau</i> | 23 |
| II. LA MANGROVE D'ASIE DU SUD EST | 25 |
| 1) LOCALISATION..... | 25 |
| 2) REPARTITION | 25 |
| 3) ESPECES PRESENTES EN ASIE DU SUD-EST | 26 |
| III. EXCOECARIA AGALLOCHA | 29 |
| 1) NOMS | 29 |
| 1.1) <i>Nom scientifique</i> | 29 |
| 1.2) <i>Noms vernaculaires</i> | 30 |
| 2) CLASSIFICATION | 30 |
| 2.1) <i>Historique</i> | 30 |
| 2.2) <i>Classification selon CRONQUIST (1981)</i> | 31 |
| 2.3) <i>Classification phylogénétique</i> | 31 |
| 3) DESCRIPTION BOTANIQUE..... | 32 |
| 3.1) <i>Famille des Euphorbiacées</i> | 32 |
| 3.2) <i>Genre Excoecaria</i> | 32 |
| 3.2.1) <i>Arbre décisionnel pour le genre Excoecaria au sein de la famille des Euphorbiacées</i> | |
| | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2) Appareil végétatif..... | 36 |
| 3.2.3) Appareil reproducteur | 36 |
| 3.3) <i>Excoecaria agallocha</i> | 36 |
| 3.3.1) Appareil végétatif..... | 37 |
| 3.3.2) Appareil reproducteur | 39 |
| 3.3.3) Mode de pollinisation..... | 43 |
| 3.3.4) Dispersion..... | 43 |
| 3.3.5) La germination | 44 |
| 3.4) <i>Effet de la salinité de l'eau sur le développement d'Excoecaria agallocha</i> | 45 |
| 4) CLASSIFICATION AU SEIN DES MANGROVES..... | 47 |
| 4.1) <i>Selon des caractères physiques et environnementaux : classification du Pr. Tomlinson</i> | 47 |
| 4.2) <i>Selon des caractères biologiques</i> | 48 |
| 4.2.1) Paramètres étudiés | 48 |
| 4.2.2) Résultats..... | 49 |
| 5) REPARTITION GEOGRAPHIQUE | 52 |
| 5.1) <i>Au niveau mondial</i> | 52 |
| 5.2) <i>Place de Excoecaria agallocha au niveau de la côte</i> | 53 |
| PARTIE II : COMPOSITION CHIMIQUE | 54 |
| I. LES DITERPENES :..... | 55 |
| 1) LES LABDANES | 57 |
| 2) LES PIMARANES ET ISOPIMARANES | 62 |
| 3) LES ATISANES | 65 |
| 4) LES KAURANES..... | 67 |
| 5) LES BEYERANES..... | 70 |
| 6) LES DAPHNANES..... | 73 |
| 7) LES TIGLIANES | 74 |
| 8) AUTRES DITERPENES | 76 |
| II. LES TRITERPENES | 77 |
| III. LES FLAVONOÏDES | 80 |
| IV. LES TANINS | 84 |
| V. AUTRES..... | 86 |
| PARTIE III : ETUDE PHARMACOLOGIQUE | 89 |
| I. LES MANGROVES EN TANT QUE NOUVELLES SOURCES DE MOLECULES POTENTIELLEMENT VALORISABLES EN THERAPEUTIQUES | 91 |
| 1) DES RECHERCHES NOUVELLES ET INNOVANTES | 91 |
| 2) PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES MANGROVES DEJA ETUDIEES..... | 92 |

| | |
|--|-----------|
| II. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES D'EXCOECARIA AGALLOCHA | 92 |
| 1) ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE D'UN EXTRAIT DE TIGES SUR DES CELLULES DU CANCER DU PANCREAS | 93 |
| 1.1) <i>Recherche de l'extrait au potentiel pharmacologique.</i> | 93 |
| 1.2) <i>Modèle biologique</i> | 94 |
| 1.3) <i>Résultats de l'activité cytotoxique des différents extraits de plante :</i> | 95 |
| 2) ETUDE DE L'ACTIVITE CYTOTOXIQUE D'UN EXTRAIT DE TIGES VIS-A-VIS DU CANCER DU POUMON | 97 |
| 2.1) <i>Extrait de plante et cellules utilisées</i> | 98 |
| 2.2) <i>Résultat de la cytotoxicité de l'extrait :</i> | 99 |
| 2.3) <i>Observation microscopique de l'effet de l'extrait sur la lignée A549</i> | 101 |
| 2.4) <i>Mécanisme d'action de la cytotoxicité de l'extrait d'Excoecaria agallocha</i> | 102 |
| 2.4.3) <i>Effet de l'extrait d'Excoecaria agallocha sur le cycle cellulaire</i> | 102 |
| 2.4.4) <i>Effet de l'extrait d'Excoecaria Agallocha sur le mécanisme d'apoptose des cellules</i> .. | 105 |
| 3) ETUDE DE L'ACTIVITE DE MOLECULES EXTRAITES DE FEUILLES D'EXCOECARIA AGALLOCHA ENVERS LA VOIE HEDGEHOG. | 107 |
| 3.1) <i>La voie de signalisation Hedgehog (Hh)</i> | 107 |
| 3.2) <i>Recherche d'un inhibiteur de la voie de signalisation Hedgehog :</i> | 108 |
| 3.3) <i>Cytotoxicité des molécules actives envers des cellules cancéreuses et non cancéreuse</i>: | 110 |
| 4) ETUDE DE L'ACTION ANTI NOCICEPTIVE D'UN EXTRAIT DE FEUILLES D'EXCOECARIA AGALLOCHA | 113 |
| 4.1) <i>Détermination de l'extrait le plus actif contre les contorsions de souris induites par de l'acide acétique :</i> | 113 |
| 4.2) <i>Effet analgésique de la fraction Alk-Cf</i> | 114 |
| 4.3) <i>Résultats</i> | 115 |
| 4.3.1) <i>Evaluation de l'effet des extraits sur la douleur mécanique</i> | 115 |
| 4.3.2) <i>Pour la douleur thermique</i> | 116 |
| 4.4) <i>Isolement de la ou des molécules actives</i> | 117 |
| 5) ETUDE SUR LE POUVOIR ANTI-INFLAMMATOIRE ET ANALGESIQUE D'EXCOECARIA AGALLOCHA | 118 |
| 5.1) <i>Etude du pouvoir anti-inflammatoire</i> | 118 |
| 5.1.1) <i>Etude de l'œdème</i> | 119 |
| 5.1.2) <i>Etude du tissu granulomateux</i> | 120 |
| 5.2) <i>Etude du pouvoir analgésique</i> | 121 |
| 5.2.3) <i>Méthode de l'acide acétique</i> | 121 |
| 5.2.4) <i>Méthode de l'immersion de la queue dans de l'eau chaude</i> | 122 |
| 6) AUTRES ETUDES MENEES SUR <i>E AGALLOCHA</i> | 123 |

| | |
|--|------------|
| PARTIE IV : ETUDE DE TOXICITE | 125 |
| I. TOXICITE VEGETALE | 126 |
| 1) TOXICITE DES EUPHORBIACEES | 126 |
| 2) TOXICITE D' <i>EXCOECARIA AGALLOCHA</i> | 127 |
| 2.1) <i>Cas clinique de brûlures par Excoecaria agallocha</i> | 127 |
| 2.2) <i>Traitement</i> | 128 |
| II. MOLECULES RESPONSABLES DE LA TOXICITE D'<i>EXCOECARIA AGALLOCHA</i> | 128 |
| 1) LES DITERPENES : DERIVES DU DAPHNANE ET TIGLIANE | 128 |
| 1.1) <i>Dérivés du Daphnane</i> | 129 |
| 1.2) <i>Dérivés du tigliane</i> | 130 |
| 2) TOXICITE DES COMPOSES PRESENTS DANS LE LATEX..... | 131 |
| 2.1) <i>Toxicité des composés initiaux</i> | 131 |
| 2.2) <i>La transestérification</i> | 131 |
| 2.3) <i>Toxicité des molécules transestérifiées</i> | 133 |
| 3) DISCUSSION | 134 |
| 4) CONCLUSION | 134 |
| CONCLUSION | 135 |
| ANNEXE 1 | 136 |
| BIBLIOGRAPHIE | 141 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Classification des mangroves majeures et mineures selon Pr Tomlinson [1], 1986 | 17 |
| Tableau 2 : Liste des espèces de mangroves classées selon leurs implantations au niveau du littoral. [12] | 22 |
| Tableau 3 : Classification des mangroves vraies (majeures et mineures mélangées) retrouvées en Asie du Sud Est selon la FAO. (PNG = Papouasie Nouvelle-Guinée)..... | 27 |
| Tableau 4 : Arbre décisionnel pour le genre <i>Excoecaria</i> au sein de la famille des Euphorbiacées [19] Genres actuels selon l'APG III : * : Picrodendracée ; ** : Phyllantacée ; ***Putranjivacée | 33 |
| Tableau 5 : Effet de différentes concentrations en NaCl sur la germination des pousses d' <i>Excoecaria agallocha</i> après 15 et 30 jours de contact avec les solutions de NaCl. [23]..... | 45 |
| Tableau 6 : Effet de différentes concentrations de NaCl sur les paramètres de croissances après 30 jours de contact avec les solutions de NaCl. [23] | 46 |
| Tableau 7 : Détermination de la succulence des feuilles, la surface foliaire spécifique (SLA), de la concentration en azote sur la base de la masse de feuille sèche (Nmas) et de la concentration en azote sur la base de la surface foliaire (Narea) pour les mangroves vraies et pour les mangroves associées [24] | 49 |
| Tableau 8 : Comparaison des caractéristiques physiques et osmotiques entre 17 mangroves vraies et 6 mangroves associées [24] | 50 |
| Tableau 9 : Labdanes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> (Nm : organe source non mentionné) | 57 |
| Tableau 10 : Pimaranes et Isopimaranes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> . (Nm : organe source non mentionné)..... | 63 |
| Tableau 11 : Atisanes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> . (Nm : organe source non mentionné) | 65 |
| Tableau 12 : Kauranes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 68 |
| Tableau 13 : Beyeranes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 70 |
| Tableau 14 : Daphnanes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 73 |
| Tableau 15 : Tiglianes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 75 |
| Tableau 16 : Autres diterpènes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 76 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 17 : Triterpènes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> . (Nm : organe source non mentionné) | 78 |
| Tableau 18 : Flavonoïdes isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 81 |
| Tableau 19 : Tanins isolés d' <i>Excoecaria agallocha</i> . (Nm : organe source non mentionné) | 85 |
| Tableau 20 : Autres molécules isolées d' <i>Excoecaria agallocha</i> . (Nm : organe source non mentionné) | 86 |
| Tableau 21 : Activité cytotoxique de la fraction éthanolique de l'extrait d'éthanol à différentes concentrations d' <i>Excoecaria agallocha</i> sur des lignées de cellules cancéreuses pancréatiques humaines après 48 h de mise en contact. [62] | 95 |
| Tableau 22 : Valeurs de CI_{50} de la fraction éthanolique de l'extrait d'éthanol d' <i>Excoecaria agallocha</i> sur des lignées de cellules cancéreuses pancréatiques humaines. [62]..... | 95 |
| Tableau 23 : CI_{50} de l'extrait éthanolique d' <i>Excoecaria agallocha</i> sur des lignées de cellules cancéreuses pulmonaires humaines. [66]..... | 99 |
| Tableau 24 : CI_{50} des molécules 1,2 et 8 sur la lignée HaCA _t -Gli-Luc. [50]..... | 109 |
| Tableau 25 : CI_{50} des molécules 1,2 et 8 sur les lignées PANC-1, DU145 et C3H10T1/2. [50]..... | 110 |
| Tableau 26 : Evaluation de l'effet de la fraction Alk-CF sur le nombre de contractions induites par l'acide acétique sur six souris. ($P < 0.05$) [73] | 115 |
| Tableau 27 : Evaluation de l'effet de la fraction Alk-CF sur le temps de latence entre deux réactions douloureuses induites par la plaque chauffante sur six souris. ($P < 0.05$). [73] | 116 |
| Tableau 28 : Effet anti inflammatoire d'extraits d' <i>Excoecaria agallocha</i> sur des œdèmes induits par une injection de carraghénane. [74] | 119 |
| Tableau 29 : Effet des extraits d' <i>Excoecaria agallocha</i> sur la formation de tissus granulomateux induit par des pastilles de cotons. [74]..... | 120 |
| Tableau 30 : Activité analgésique des extrait d' <i>Excoecaria agallocha</i> par diminution des contorsions des souris induites par de l'acide acétique. [74]..... | 121 |
| Tableau 31 : Effet analgésique des extraits d' <i>Excoecaria agallocha</i> lors du test de l'immersion. ($P > 0.05$). [74]..... | 122 |
| Tableau 32 : Test d'irritation de l'oreille des souris impliquant les facteurs critiques d' <i>Excoecaria agallocha</i> . (- : omis). [81]..... | 133 |
| Tableau 33 : Test d'irritation de l'oreille des souris impliquant les facteurs post transestérification et détermination de ces facteurs. (n.d : non déterminé). [81]..... | 133 |

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Superficie de la mangrove dans le monde en hectare. [2] | 20 |
| Figure 2 : Excrétion de sel par les feuilles d' <i>Avicennia germinans</i> par Ulf Mehlig.[13] | 23 |
| Figure 3 : : Schéma des différents systèmes racinaires des mangroves .[6] | 24 |
| Figure 4 : Distribution globale des mangroves avec la densité la plus importante en Asie du Sud Est [7]..... | 26 |
| Figure 5 : Diagramme présentant la répartition des mangroves en Asie du Sud Est . | 26 |
| Figure 6 : Arbre entier d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 36 |
| Figure 7 : Lenticelles permettant les échanges gazeux d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 38 |
| Figure 8 : Représentation du modèle d'Attims..... | 38 |
| Figure 9 : Feuilles vertes d' <i>Excoecaria agallocha</i> passant au rouge avant de tomber. | 38 |
| Figure 10 : Latex présents au sein des feuilles et tiges d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 39 |
| Figure 11 : Inflorescence mâle | 40 |
| Figure 12 : Inflorescence femelle. | 40 |
| Figure 13 : a) Fruits sur l'arbre d' <i>Excoecaria agallocha</i> b) Fruits secs d' <i>Excoecaria agallocha</i> | 41 |
| Figure 14 : <i>Excoecaria agallocha</i> L, A : Rameau reproductif mâle ; B : rameau reproductif femelle ; A1/A2 : fleur mâle ; B1/B2 : Fleur femelle ; B3 : Grappe de fruits ; B4 : Graine ; B5 : Graine ouverte pour montrer l'embryon [21] | 42 |
| Figure 15 : <i>Excoecaria agallocha</i> L. A : Rameau reproductif mâle ; B : Inflorescence mâle ; C : Fleur mâle ; D : Inflorescence mâle juvénile ; E Rameau reproductif femelle ; F : Fleur femelle. [22]..... | 43 |
| Figure 16 : Compositions en ions K^+ , Ca^+ , Mg^+ , Na^+ et Cl^- des mangroves vraies et associées. [24] | 50 |
| Figure 17 : Représentation schématique de l'emplacement des mangroves retrouvées sur l'île de Bintan en Indonésie par rapport à la zone côtière. <i>Excoecaria agallocha</i> se retrouve loin de la côte parmi les mangroves d'arrière plans.[12]..... | 53 |
| Figure 18 : a) Une unité isoprénique = un isoprène ; b) un géranyl pyrophosphate ... | 56 |
| Figure 19 : Voie de biosynthèse des diterpènes..... | 56 |
| Figure 20 : Squelette de base des labdanes | 57 |
| Figure 21 : Squelette de base du groupe pimarane..... | 62 |
| Figure 22 : a) Squelette de base d'un pimarane et b) d'un isopimarane..... | 62 |
| Figure 23 : Squelette de base des atisanes | 65 |
| Figure 24 : Squelette de base des kauranes | 67 |
| Figure 25 : a) Squelette de base des kauranes et b) des ent-kauranes..... | 68 |
| Figure 26 : Squelette de base des beyeranes | 70 |

| | |
|--|-----|
| Figure 27 : Squelette de base des daphnanes | 73 |
| Figure 28 : Squelette de base des tiglianes..... | 74 |
| Figure 29 : Squelette de base des triterpènes..... | 77 |
| Figure 30 : a) Squelette de base d'un flavone ; b) Squelette de base d'un flavonol.. | 81 |
| Figure 31 : Molécule d'acide gallique | 84 |
| Figure 32 : Molécule de flavan-3-ol : catéchol. | 85 |
| Figure 33 : Inhibition de la croissance induite par la fraction éthanolique de l'extrait d'éthanol d' <i>Excoecaria agallocha</i> sur des lignées de cellules cancéreuses pancréatiques humaines. [62]..... | 95 |
| Figure 34 : Inhibition de la croissance de lignées de cellules cancéreuses pulmonaires humaines après 48h de mises en contact avec l'extrait d' <i>Excoecaria agallocha</i> à différentes concentrations. [66]..... | 99 |
| Figure 35 : Etude microscopique par contraste de phase des modifications morphologiques de cellules en contact avec des extraits d' <i>Excoecaria agallocha</i> . A : cellules non traitées (témoin négatif) ; B-D : Concentrations croissantes d'extraits d' <i>Excoecaria agallocha</i> respectivement CI_{50} , $2CI_{50}$ et $3CI_{50}$. [66] | 101 |
| Figure 36 : Schéma du cycle cellulaire..... | 102 |
| Figure 37 : Représentation de la quantité d'ADN d'une cellule en fonction des phases du cycle cellulaire. | 102 |
| Figure 38 : Cytométrie de flux permettant de déterminer la quantité de matériel génétique selon les phases du cycle cellulaire pour des lignées A549 et H1299 après contact avec $2CI_{50}$ d'extrait d' <i>Excoecaria agallocha</i> . [66] | 103 |
| Figure 39 : Western Blot traduisant l'effet de l'extrait d' <i>Excoecaria agallocha</i> à deux concentrations sur les facteurs de l'apoptoses des cellules des lignées A549 et H1299. [66] | 105 |
| Figure 40 : Représentation schématique simplifiée de la voie de signalisation Hh .. | 108 |
| Figure 41 : Nouveaux composés isolés des feuilles d' <i>Excoecaria agallocha</i> . [50]... | 108 |
| Figure 42 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de GLI-1 ainsi que détermination de la viabilité cellulaire suite à la mise en contact des lignées de kératinocytes HaCat-Gli-Luc et les molécules 1, 2 et 8. [50]..... | 109 |
| Figure 43 : Cytotoxicité des molécules 1, 2 et 8 sur les lignées PANC-1, DU145 et C3H10T1/2. [50]..... | 110 |
| Figure 44 : Western blot traduisant l'effet de la molécule 1 sur PTCH, BCL2, GLI1 et β actin au sein du cytosol, du noyau ou de la cellule entière de la lignée de cellules PANC-1. [50]..... | 111 |
| Figure 45 : B : Détermination de la quantité de PTCH après contact de la lignée PANC1 avec la molécule 1 à deux concentrations. C : : Détermination de la quantité de | |

| | |
|--|-----|
| PTCH après contact de la lignée PANC1 avec la molécule 1 à deux concentrations après avoir inhibé l'expression de Smo dans les cellules. [50] | 112 |
| Figure 46 : Effet analgésique de l'extrait total et des principales fractions d'Excoecaria agallocha dans le test de torsion. P<0.01. DCM : dichlorométhane ; Aci-cf : fraction chloroforme acide ; Alk-cf : fraction chloroforme alcaline. [73] | 114 |
| Figure 47 : Modélisation des interactions entre la rutine et les récepteurs COX 1 et COX 2. [73] | 117 |
| Figure 48 : Mélange des facteurs d'Excoecaria A1 – A2 - A3. [81]..... | 129 |
| Figure 49 : Structure de base du mélange du groupe III. [81]..... | 130 |
| Figure 50 : Facteur A1 à A7. [81] | 132 |
| Figure 51 : Facteurs A8 et A9. [81]..... | 132 |

Introduction

Les mangroves représentent un écosystème très particulier, dans lequel les organismes vivants, animaux et végétaux, ont dû développer des systèmes d'adaptation pour vivre et survivre, du fait de conditions environnementales particulières, telles que la salinité de ce milieu ou encore l'immersion des racines dans un sol saturé en eau.

Bien qu'ayant des utilisations médicinales, ancestrales pour la majorité d'entre elles, les plantes de mangroves sont très peu connues du point de vue chimique et encore moins du point de vue pharmacologique. La diversité de ces plantes ainsi que leurs capacités à se développer dans un environnement hostile laissent supposer des compositions chimiques particulières et les classent dans les sources potentielles de nouvelles molécules pharmacologiquement intéressantes.

Les recherches sur les plantes de mangroves se développent en Asie mais très peu d'échos sont faits en Europe. C'est pourquoi ce travail a été initié, afin de mettre en lumière ces recherches en choisissant, parmi toutes les mangroves qui existent, *Excoecaria agallocha* L (Euphorbiacée) qui a la particularité de posséder une toxicité non négligeable et dont l'intérêt pharmacologique commence à émerger chez les chercheurs asiatiques.

L'espèce *Excoecaria agallocha* appartient à la famille des Euphorbiacées, et est caractérisée par la présence d'un latex qui est toxique envers la peau et les muqueuses. Les populations autochtones la craignent du fait des brûlures qu'elle peut engendrer mais dans certaines provinces d'Asie elle est vénérée avec des sculptures qui lui sont dédiées.

La composition chimique des différents organes de la plante a été et continue à être investiguée avec plus de 100 molécules identifiées à ce jour. Les recherches pharmacologiques sur la plante se sont accélérées durant la dernière décennie avec un intérêt particulier pour les propriétés cytotoxiques des molécules et leur effet antalgique.

La première partie de ce travail présente l'écosystème de la mangrove et un descriptif botanique détaillé d'*Excoecaria agallocha* L. La seconde partie expose la composition chimique de cette espèce. La troisième partie est consacrée aux études axées sur l'intérêt pharmacologique et plus particulièrement les études portant sur l'activité cytotoxique et antalgique d'extraits ou de molécules présentes dans la plante. Enfin, la dernière partie développe la toxicité et les facteurs toxiques de cette plante avec un comparatif avec une espèce proche, le Mancenillier (*Hippomane mancinella* L.).

**PARTIE I : ETUDE BOTANIQUE ET
ENVIRONNEMENTALE DES
MANGROVES**

I. La mangrove

Le terme « mangrove » est utilisé pour définir les plantes qui se développent dans les forêts soumises aux marées mais aussi pour décrire l'écosystème lui-même.[1] Selon le contexte évoqué le sens est généralement clair. Mais en 1968, MacNae proposa le terme anglais « mangal » pour décrire la communauté tout en gardant le terme mangrove pour les plantes elles-mêmes. Ce terme n'a pas rencontré beaucoup de soutien dans le monde excepté en Amérique.

En français il n'y a pas de terme pour traduire ce terme anglais « mangal » ; de ce fait il n'a pas été retenu et le seul nom mangrove reste pour décrire la plante ainsi que l'écosystème correspondant.

Ainsi, dans ce document le terme mangrove sera utilisé.

1) Définition

1.1) La mangrove en tant que plante

Les mangroves sont des plantes halophiles, elles sont tolérantes au sel et se développent le long des côtes abritées, les lagunes peu profondes, les estuaires, les rivières ou les deltas.[2]

Le Dr. N. Duke, chercheur australien spécialiste des mangroves, présenta en 1992 une définition générale des mangroves [3] : « Une mangrove est un arbre, un arbuste, un palmier ou une herbacée, généralement de plus de 50 cm de hauteur, qui se développe normalement au-dessus du niveau moyen de la mer dans les zones de marnage¹ des milieux marins côtiers et sur les bords des estuaires ».

Cette définition très générale peut être complétée par celle de Saenger, qui en 2002, proposa une définition plus précise : une mangrove est une plante supérieure (arbre, arbuste, palmier, herbe ou de fougère) qui (1) se développe principalement dans les zones d'estrans des côtes tropicales et subtropicales, qui (2) présente un degré marqué de

¹ Aussi appelée *zone de l'estran* : partie du littoral située entre les limites extrêmes des plus hautes et des plus basses marées.

tolérance face à des concentrations élevées en sel et à l'anoxie² du sol, et qui (3) possède des propagules³ capables de survivre à la dispersion⁴ par l'eau de mer. [4]

1.2) La mangrove en tant que communauté

L'écosystème de la mangrove se situe à l'interface des écosystèmes terrestres et marins. Celui-ci est régulièrement inondé par les marées de l'océan et aussi par de l'eau fraîche, des sédiments, des nutriments, et de la roche sédimentaire provenant des rivières en amont.[2]

Comme tout écosystème, il soutient une importante chaîne alimentaire qui maintient un équilibre fragile de la faune environnante. D'importantes communautés animales vivent grâce à la mangrove ; ainsi, de nombreux singes (*Nasalis larvatus*, *Trachypithecus cristatus*) qui sont des herbivores d'Asie du sud, sont présents uniquement dans cet écosystème et consomment de très grandes quantités de feuilles de mangroves. On trouve aussi des crabes (*Scylla olivacea* ou *Scylla paramamosain*) qui sont également pêchés dans les mangroves et commercialisés. L'eau de mangrove est aussi très riche en poissons dont de nombreuses espèces sont commercialisées. [2]

Une autre partie très importante de la chaîne alimentaire est composée des détritivores ; ce sont des crabes (*Episesarma versicolor*) qui ne se nourrissent que des feuilles mortes tombées des arbres. Certains poissons carnivores attendent les hautes marées pour se nourrir de ces crabes. Cet exemple montre l'équilibre de cet écosystème de plus en plus fragilisé par l'homme et la déforestation.[5]

2) Classification selon Pr Tomlinson

Les plantes des mangroves ne sont pas un groupe d'arbres se ressemblant génétiquement. Elles comprennent une large variété de familles de plantes qui se sont adaptées à un environnement tropical de marées.

Effectuer une classification des mangroves est très délicat. Déterminer si une plante est une mangrove peut parfois devenir un véritable casse-tête. C'est pourquoi les botanistes ne sont pas d'accord sur le nombre d'espèces qui appartiennent aux vraies mangroves. Celui-ci varie entre 50 et 70 selon les classifications.

² Absence d'oxygène.

³ Organe de dissémination (propagation) et de reproduction non sexuée : permet la propagation d'un individu et non d'une espèce.

⁴ Séparation géographique qui permet la colonisation d'un nouveau territoire

Pr Tomlinson (1986) considère qu'il existe au total 54 espèces de mangroves réparties dans 20 genres et 16 familles. [1] (Tableau 1). D'autre part, Dr Duke (1992) reconnaît 69 espèces de mangroves appartenant à 26 genres et 20 familles.[6] Ces chiffres ne comptabilisent que les mangroves vraies majeures ou mineures. Plus récemment, en 2010, le World Atlas of Mangrove considère 73 mangroves vraies en précisant tout de même que cette liste est largement inclusive. [7]

Parmi toutes les classifications celle du Pr Tomlinson en 1986 fait office de référence bien que parfois discutée.[1]

Il a classé les mangroves en trois catégories : mangroves vraies majeures, mangroves vraies mineures et mangroves associées.

Aucune classification n'est parfaite, Mr Tomlinson l'a lui-même admis : « Of course, the group are not sharply circumscribed and the assessment is somewhat subjective, since there is a continuum of possibilities » : bien sûr, les groupes ne sont pas nettement circonscrits et l'évaluation est quelque peu subjective, il existe un continuum de possibilités.[1]

2.1) Les mangroves vraies

Les plantes des mangroves vraies possèdent toutes ou la plupart des caractéristiques suivantes [1]:

- 1) Une fidélité totale à l'environnement de la mangrove ; ce qui signifie qu'elles ne se développent que dans cet écosystème et ne s'étendent pas au niveau des communautés terrestres.
- 2) Un rôle majeur dans la structure de la communauté et la capacité à former des peuplements purs⁵.
- 3) Une spécialisation morphologique qui leur permet de s'adapter à l'environnement ; l'exemple le plus évident sont les racines aériennes, associées aux échanges de gaz, et la viviparité des embryons dont la signification fonctionnelle n'est pas claire.
- 4) Des mécanismes physiologiques pour gérer l'exclusion du sel ce qui leur permet de se développer dans l'eau de mer. Elles excrètent souvent du sel.
- 5) Une séparation taxonomique par rapport aux espèces terrestres. Les mangroves strictes sont séparées de leurs cousins terrestres au moins au niveau du genre et

⁵ Zone où l'on ne retrouve qu'une seule espèce de plante de mangrove.

souvent au niveau de la sous-famille ou de la famille. Pour les mangroves mineures, la séparation se fait plus couramment au niveau du genre.

2.2) Différenciation des mangroves vraies majeures et mineures

Les mangroves vraies se subdivisent en deux classes : les mangroves vraies majeures et les mangroves vraies mineures.

Les mangroves vraies majeures possèdent principalement le critère 1 énoncé par Tomlinson avec le plus souvent plusieurs autres critères réunis. Mais il n'y a pas un nombre de critères précis à respecter ce qui explique les différences de classifications selon les chercheurs.

Les mangroves vraies mineures se distinguent des mangroves vraies majeures par leur inaptitude à former des peuplements purs. Ils peuvent occuper des habitats périphériques, moins impactés par les marées. De plus elles présentent moins de critères énumérés précédemment.

2.3) Les mangroves associées

Il n'y a pas de définition claire des mangroves associées, la limite entre les non mangroves et les mangroves associées est très fine. Selon les botanistes et les critères arbitraires qu'ils utilisent, les classifications varient.

Tableau 1 : Classification des mangroves majeures et mineures selon Pr Tomlinson [1], 1986

| | Famille | Genre | Nombre d'espèces |
|--------------------|----------------|---------------------|------------------|
| Mangroves majeures | Avicenniacees | <i>Avicennia</i> | 8 |
| | Combretacees | <i>Laguncularia</i> | 1 |
| | | <i>Isondria</i> | 2 |
| | Palmaes | <i>Nypa</i> | 1 |
| | Rhizophoracees | <i>Bruguiera</i> | 6 |
| | | <i>Ceriops</i> | 2 |
| | | <i>Kandelia</i> | 1 |
| | | <i>Rhizophora</i> | 8 |
| | Sonneratiacees | <i>Sonneratia</i> | 5 |
| | Total | | 9 |

| | | | |
|-----------------------|----------------|---------------------|----|
| Mangroves Mineures | Bombacacées | <i>Camptostemon</i> | 2 |
| | Euphorbiacées | <i>Excoecaria</i> | 2 |
| | Lythracées | <i>Pemphis</i> | 1 |
| | Meliacées | <i>Xylocarpus</i> | 2 |
| | Myrsinacées | <i>Aegiceras</i> | 2 |
| | Myrsinacées | <i>Osbornia</i> | 1 |
| | Pellicieracées | <i>Pelliciera</i> | 1 |
| | Plumbaginacées | <i>Aegialitis</i> | 2 |
| | Pteridacées | <i>Acrostichum</i> | 3 |
| | Rubiacées | <i>Scyphiphora</i> | 1 |
| | Sterculiacées | <i>Heritiera</i> | 3 |
| Total | | 11 | 20 |

3) Superficie et localisation

3.1) Superficie

La détermination de la superficie mondiale de la mangrove tous types confondus est très compliquée à réaliser. Les estimations varient de manière très importante allant de 12 à 20 millions d'hectares.

La première tentative de mesure de la superficie totale des mangroves a été entreprise en 1980 dans le cadre de l'Evaluation des Ressources Forestières Tropicales par la FAO/UNEP (Food and Agriculture Organisation / United Nations Environment Program). La FAO est connue sous le nom français de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA) L'estimation fut de 15,6 millions d'hectares. [8] D'autres études réalisées dans les années 1980 ont abouti à une estimation à 18,8 millions d'hectares. [2]

Plus récemment, en 2003, la FAO a relancé une étude sur la distribution mondiale des mangroves. [8] Cette étude est basée sur leur précédente étude faite en 1980 et sur l'Evaluation Mondiale des Ressources Forestières des années 2000 menée par la FAO. Il a été demandé à tous les pays de fournir les superficies de toutes les zones de forêts du pays par type de forêt. Cela incluait les mangroves pour 121 pays. A cela se sont ajoutées de nombreuses recherches bibliographiques.

Les résultats ont montré une estimation extrapolée en 2000 de 14,653 millions d'hectares.

En 2011 des chercheurs ont utilisé des méthodes modernes d'imageries pour déterminer la superficie mondiale recouverte par la mangrove. Ces outils sont le Global Land Survey (GLS) et le Landsat archive. Tous deux sont des sources d'images satellites de très bonne résolution. [9] Ces analyses ont permis une estimation de la surface totale de mangrove en 2011 de 13,760 millions d'hectares, se répartissant sur 118 pays.[9] Ceci est inférieur d'environ 11% aux données de la FAO.

Cet écart de superficie peut s'expliquer d'une part, par l'indépendance des pays dans l'estimation faite par la FAO. Chaque pays utilise la méthode de calcul de leur choix qui n'est pas communiquée. D'autre part, l'étude qui utilise les données satellites analyse trois pays de moins que celle de la FAO. Bien qu'étudiant trois pays de moins, l'étude qui se base sur les données satellites très précises peut être considérée comme la plus fiable des deux études.

Cette superficie ne représente que 0,7% du total des forêts tropicales mondiales. [9]

Les données entre 1980 et 2011 présentent une diminution de la surface de la mangrove. Cette diminution peut être le résultat de l'évolution des méthodes de mesures à ce jour plus précises mais, il est aussi important de noter tout de même que la superficie des mangroves tend à diminuer. La diminution de la superficie des mangroves serait de 2,1% par an. Ce qui à terme peut engendrer des problèmes aussi bien sur le plan écologique qu'économique, l'écosystème des mangroves procurant de nombreux avantages tels qu'une protection côtière, un milieu productif ainsi que des bénéfices économiques provenant par exemple de la vente de bois.[10]

3.2) Localisation

3.2.1) Au niveau mondial

Les mangroves sont présentes sur quatre continents : Asie, Afrique, Amérique et Océanie. Elles se développent dans les régions tropicales et subtropicales dont la latitude se situe approximativement entre 30°N et 30°S avec une majorité entre 5°N et 5°S. [9] Leur répartition géographique semblerait être délimitée par une température isotherme de la surface de l'eau de mer à 20°C.[11]

En termes de superficie, la majorité des mangroves est retrouvée en Asie (42%), suivi par l'Afrique (20%), l'Amérique du Nord et Centrale (15%), l'Océanie (12%) et l'Amérique du Sud (11%). [9]

A eux seuls, l'Indonésie, le Brésil, le Nigéria et l'Australie comptent environ 41% de toute la superficie de la mangrove. Et 60% de la mangrove totale est retrouvée dans seulement 10 pays.[8]

La Figure 1 ci-dessous présente la localisation et les superficies globales de mangroves dans le monde.

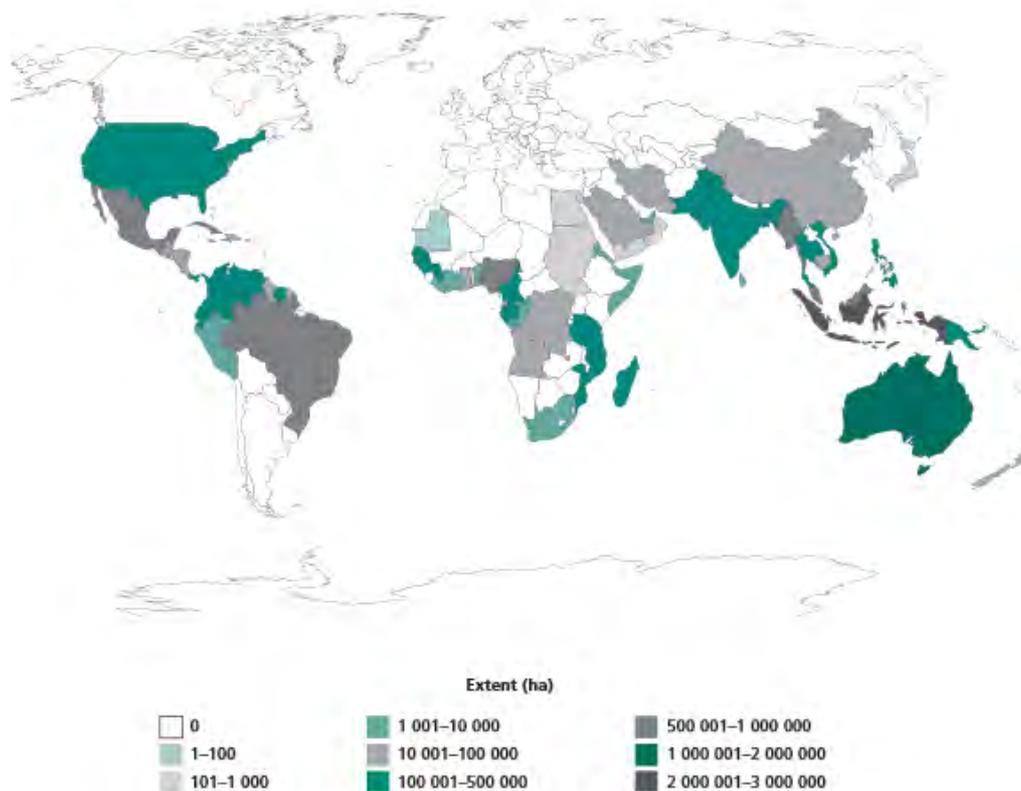


Figure 1 : Superficie de la mangrove dans le monde en hectare. [2]

3.2.2) Au niveau des zones côtières

La disposition des mangroves sur le littoral est divisée en cinq zones. Elles sont classées de celle qui se trouve sur le bord de mer (zone 1) à celle la plus éloignée du bord de mer (zone 5). [12]

Zone 1 : La mangrove la plus exposée : elle se situe au plus près de l'eau et forme une ceinture de mangrove. Très peu d'espèces peuvent survivre à cet environnement, seule *Rhizophora mucronata* (famille des Rhizophoracées) se situe dans cette zone. C'est une mangrove vraie présente dans une grande partie de l'Asie et de l'Afrique de l'Est et qui nécessite que ses racines restent en partie au-dessus de l'eau. Elle est inondée par toutes les marées hautes. Cette zone n'est pas toujours présente.

Zone 2 : La mangrove exposée : cette zone est juste derrière la première zone. Elle est inondée par toutes les marées hautes d'intensité moyenne. Les mangroves majoritaires de cette zone appartiennent aux genres *Sonneratia* (famille Sonneratiacées) et *Avicennia* (famille Acanthacées) qui co-dominent.

Lorsque la zone 1 n'est pas présente ces espèces se retrouvent en première ligne face aux marées hautes.

Zone 3 : La mangrove centrale : cette zone accueille une diversité de mangroves plus importante que les précédentes. Elle est moins souvent inondée.

Zone 4 : La mangrove en arrière-plan : les mangroves présentes dans cette zone ne sont inondées que par les plus grandes marées hautes. Cela ne signifie pas forcément que cette zone est moins saline que les précédentes, cela dépend des conditions climatiques et de la pente du terrain. Par exemple durant une saison sèche, une partie de l'eau apportée par les grandes marées précédentes s'évapore. Cela laisse un résidu de sel qui ne sera éliminé que lors de la prochaine grande marée haute plusieurs semaines plus tard.

Pour les zones ayant majoritairement des grandes marées celles-ci auront de l'eau fraîche une plus grande partie de l'année.

Zone 5 : la mangrove à l'eau saumâtre : cette zone est majoritairement recouverte d'eau saumâtre avec parfois de l'eau fraîche. Cette zone est majoritairement dominée par les genres *Nypa* (famille *Palmaes*) et *Sonneratia* (famille Sonneratiacées).

Certaines espèces peuvent être retrouvées dans plusieurs zones du fait de leur adaptabilité comme le présente le Tableau 2 : [12]

Tableau 2 : Liste des espèces de mangroves classées selon leurs implantations au niveau du littoral. [12]

| Zone 1 Mangrove très exposée | Zone 4 : mangrove arrière | Zone 5 : Mangrove dans l'eau saumâtre |
|--|---|--|
| <i>Rhizophora mucronata</i> | <i>Acrostichum aureum</i> <i>Aglaiia cucullata</i> | <i>Acanthus ebracteatus</i> <i>Acanthus ilicifolius</i> |
| Zone 2: Mangrove exposée | <i>Barringtonia acutangula</i> | <i>Barringtonia acutangula</i> |
| <i>Avicennia alba</i> <i>Avicennia marina</i> <i>Sonneratia alba</i> <i>Rhizophora mucronata</i> | <i>Bruguiera gymnorhiza</i> <i>Bruguiera sexangula</i> <i>Calophyllum inophyllum</i> <i>Camptostemon schultzei</i> <i>Cycas rumphii</i> | <i>Bruguiera gymnorhiza</i> <i>Cerbera manghas</i> <i>Cerbera odollam</i> <i>Cryptocoryne ciliolata</i> <i>Derris trifoliata</i> |
| Zone 3 : Mangrove centrale | <i>Clerodendrum inerme</i> | <i>Dolichandrone spathacea</i> |
| <i>Acanthus ilicifolius</i> <i>Acrostichum aureum</i> <i>Aegiceras corniculatum</i> <i>Avicennia marina</i> <i>Avicennia officinalis</i> <i>Bruguiera cylindrica</i> <i>Bruguiera gymnorhiza</i> <i>Bruguiera parviflora</i> <i>Bruguiera sexangula</i> <i>Ceriops decandra</i> <i>Ceriops tagal</i> <i>Derris trifoliata</i> <i>Excoecaria agallocha</i> <i>Kandelia candel</i> <i>Lumnitzera littorea</i> <i>lumnitzera racemosa</i> <i>Rhizophora apiculata</i> <i>Rhizophora mucronata</i> <i>Sonneratia alba</i> <i>Xylocarpus granatum</i> <i>Xylocarpus moluccensis</i> | <i>Dalbergia candenatensis</i> <i>Dolichandrone spathacea</i> <i>Excoecaria agallocha</i> <i>Ficus microcarpa</i> <i>Flagellaria indica</i> <i>Gardenia tubifera</i> <i>Glochidion littorale</i> <i>Heritiera littoralis</i> <i>Hibiscus tiliaceus</i> <i>Intsia bijuga</i> <i>Lumnitzera littorea</i> <i>Lumnitzera racemosa</i> <i>Melaleuca cajuputi</i> <i>Melastoma malabathricum</i> <i>Myristica hollrungii</i> <i>Nypa fruticans</i> <i>Pandanus tectorius</i> <i>Phoenix paludosa</i> <i>Pluchea indica</i> <i>Rhizophora apiculata</i> <i>Thespesia populnea</i> <i>Xylocarpus granatum</i> <i>Xylocarpus moluccensis</i> | <i>Gluta velutina</i> <i>Nypa fruticans</i> <i>Oncosperma tigillarum</i> <i>Sonneratia caseolaris</i> <i>Stenochlaena palustris</i> <i>Xylocarpus granatum</i> <i>Xylocarpus moluccensis</i> |

4) Adaptations biologiques

4.1) A la salinité de l'eau

Les mangroves ont une tolérance accrue vis-à-vis de la concentration en sel de l'eau de mer qui les entoure par rapport à la majorité des plantes sur terre. Pour cela les mangroves ont développé un système d'exclusion du sel.

Le plus souvent, pour exclure le plus rapidement le sel de leur xylème, les mangroves utilisent un système d'ultra filtration au niveau de l'endoderme des racines. Mais pour compléter cette action la majorité des mangroves possèdent des mécanismes complémentaires. Certaines déposent le sel dans l'écorce des tiges ou des racines. D'autres espèces appartenant à des genres tels que *Xylocarpus* (famille des Meliacées) et *Excoecaria* (famille Euphorbiacées) accumulent le sel dans les feuilles prêtes à tomber.

Les espèces appartenant aux genres *Aegialitis* (famille des Plumbaginacées), *Aegiceras* (famille des Myrsinacées) ou *Avicennia* (famille des Acanthacées) excrètent aussi le sel par les feuilles mais par des glandes spécialisées. Cette excrétion est parfois visible par la formation de cristaux de sel à la surface des feuilles. (Figure 2) [7]



Figure 2 : Excrétion de sel par les feuilles d'*Avicennia germinans* par Ulf Mehlig.[13]

4.2) A l'immersion des racines dans l'eau

Les mangroves prennent racines le long de la côte et sont donc largement immergées par les marées. De ce fait les sols dans lesquels ces arbres grandissent sont saturés en eau. Or, un sol saturé en eau est dépourvu d'oxygène car celui-ci se diffuse lentement dans un liquide.

Ayant besoin d'oxygène pour se développer, les mangroves se sont adaptées grâce aux racines aériennes. Par comparaison à la majorité des plantes vascularisées, il y a deux

grandes différences : un fort développement de l'aérenchyme⁶ des pneumatophores⁷, et une présence importante de lignine dans les racines de contrefort et les racines planches.[6]

Les racines aériennes sont modifiées pour permettre une vie au-dessus du sol. Contrairement aux racines souterraines elles possèdent une zone d'élongation exagérée après le méristème apical racinaire⁸. [6]

Le système racinaire des mangroves est composé de cinq types de racines différentes (Figure 3) : les racines échasses, les pneumatophores, les racines genoux, les racines planches et les racines de contreforts.[6]

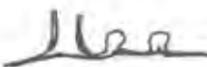
| | |
|--|--|
| Racine échasses |  |
| Pneumatophores |  |
| Racine genoux |  |
| Racine planche (Ressemble à un serpent) |  |
| Racine de contrefort |  |

Figure 3 : : Schéma des différents systèmes racinaires des mangroves .[6]

⁶ Tissu qui forme un canal au niveau des racines et permettant l'échange de gaz entre les pousses et les racines.

⁷ Excroissances spécialisées des racines présentes chez certains arbres qui se développent en milieux humides. Elles se dressent à la verticale au-dessus des sols et des eaux anoxiques ; cette structure aux tissus spongieux transmet l'oxygène au reste des racines.

⁸ Zone de croissance des racines chez les végétaux à l'origine de tous les tissus différenciés de la racine. Il assure non seulement la croissance des racines mais permet également d'optimiser leur croissance en fonction des variations des conditions environnementales.

II. La mangrove d'Asie du Sud Est

L'Asie du Sud-Est est la région qui possède un développement et une diversité de mangroves les plus importants au monde. A elle seule elle possède 42% de la superficie mondiale des mangroves avec une diversité de 52 espèces de mangroves vraies. (Figure 4) [12]

1) Localisation

L'Asie du Sud-Est regroupe entre 10 et 28 pays selon l'organisme qui définit l'inclusion ou non des pays dans cette région.

La Food and Agricultural Organisation (FAO) reconnaît 11 pays littoraux en Asie du Sud Est.

De l'Ouest à l'Est on retrouve : Le Myanmar, la Thaïlande, le Cambodge, le Viet Nam, la Malaisie, Singapour, le Brunei, les Philippines, l'Indonésie, le Timor Oriental et la Papouasie Nouvelle Guinée. Cela représente une distance côtière de 6000 km de l'Ouest à l'Est. [12]

2) Répartition

L'Asie du Sud-Est regroupe 42 % de la totalité des mangroves mondiales, en termes de superficie. La majorité de la surface recouverte par de la mangrove est retrouvée en Indonésie avec presque 60% de la totalité de la mangrove d'Asie du Sud-Est, suivi par la Malaisie 11,7%, le Myanmar 8,8%, la Papouasie Nouvelle Guinée 8,7% et la Thaïlande 5% (Figure 5). [12]

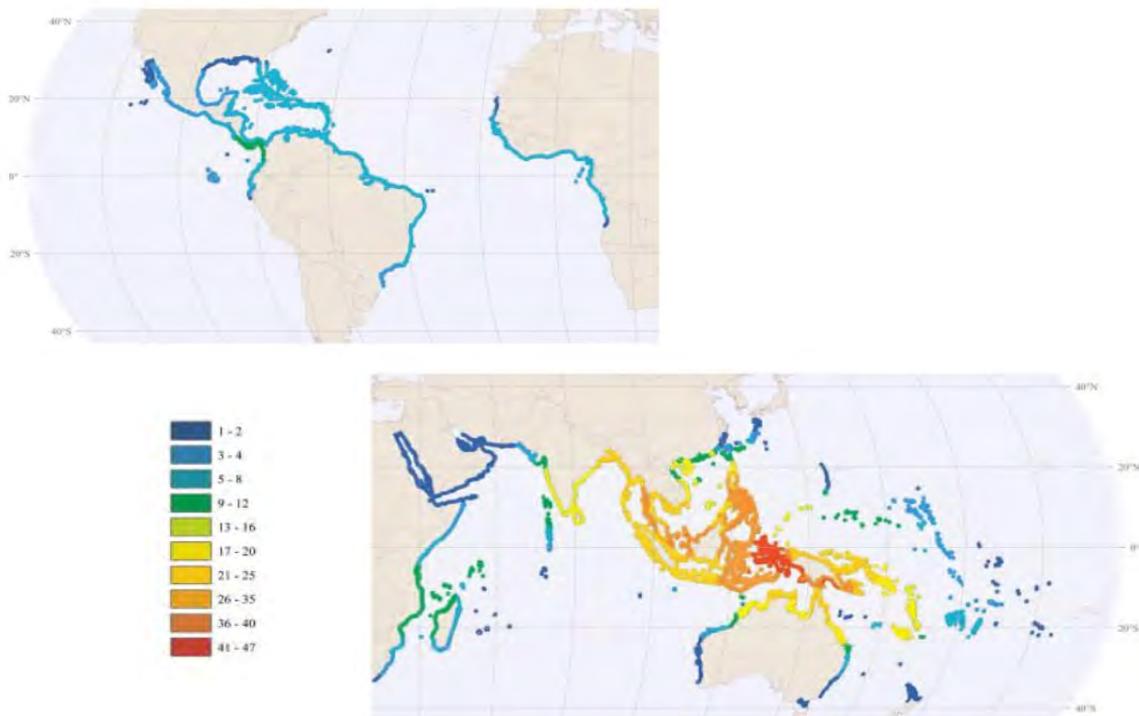


Figure 4 : Distribution globale des mangroves avec la densité la plus importante en Asie du Sud Est [7]

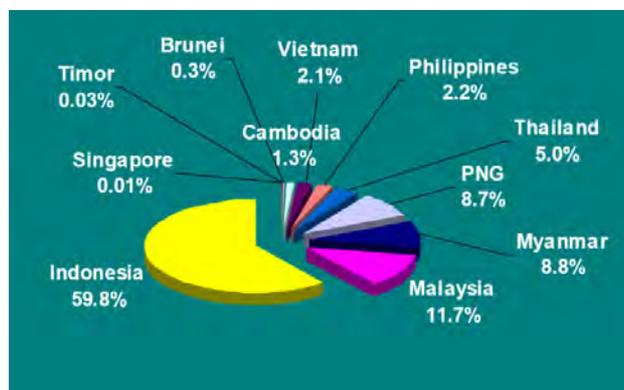


Figure 5 : Diagramme présentant la répartition des mangroves en Asie du Sud Est

3) Espèces présentes en Asie du Sud-Est

Selon la FAO parmi les 268 espèces de plantes retrouvées dans la végétation de la mangrove en Asie du Sud-Est il y a 52 espèces de mangroves vraies retrouvées appartenant à 21 genres. (Tableau 3) [12] (Leur classifications des mangroves vraies n'est pas exactement la même que celle de Tomlinson mais 17 genres sont communs aux deux classifications.)

Tableau 3 : Classification des mangroves vraies (majeures et mineures mélangées) retrouvées en Asie du Sud Est selon la FAO. (PNG = Papouasie Nouvelle-Guinée)

| Familles | Espèces | Brunei | Cambodge | Indonesie | Malaisie | Myanmar | PNG | Philippines | Singapore | Thaïlande | Timor-Leste | Viet Nam |
|----------------------|------------------------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|-------------|-----------|-----------|-------------|----------|
| Acanthacées | <i>Acanthus ebracteatus</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Acanthacées | <i>Acanthus ilicifolius</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Acanthacées | <i>Acanthus volubilis</i> | | X | X | X | X | X | | X | X | | |
| Pteridacées | <i>Acrostichum aureum</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Pteridacées | <i>Acrostichum speciosum</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Plumbaginacées | <i>Aegialitis annulata</i> | | | X | | | X | | | | X | |
| Plumbaginacées | <i>Aegialitis rotundifolia</i> | | X | | | X | | | | X | | |
| Primulacées | <i>Aegiceras corniculatum</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Primulacées | <i>Aegiceras floridum</i> | | X | X | X | | X | X | | | | X |
| Loranthacées | <i>Amyema anisomeres</i> | | | X | | | | | | | | |
| Loranthacées | <i>Amyema gravis</i> | | | X | X | | | | | | | |
| Loranthacées | <i>Amyema mackayense</i> | | | X | | | | | | | | |
| Verbenacées | <i>Avicennia alba</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Verbenacées | <i>Avicennia eucalyptifolia</i> | | | X | | | X | X | | | | |
| Verbenacées | <i>Avicennia lanata</i> | | X | X | | | X | X | X | | | X |
| Verbenacées | <i>Avicennia marina</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Verbenacées | <i>Avicennia officinalis</i> | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Malvacées | <i>Brownlowia argentata</i> | | X | X | X | X | X | X | X | | | |
| Malvacées | <i>Brownlowia tersa</i> | X | X | X | X | X | | X | X | X | | |
| Rhizophoracées | <i>Bruguiera cylindrica</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Rhizophoracées | <i>Bruguiera exaristata</i> | | | X | | | X | | | | X | |
| Rhizophoracées | <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Rhizophoracées | <i>Bruguiera hainesii</i> | | | X | X | X | X | | | X | | |
| Rhizophoracées | <i>Bruguiera parviflora</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Rhizophoracées | <i>Bruguiera sexangula</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Malvacées | <i>Camptostemon philippinense</i> | | | X | X | | | X | | | | |
| Malvacées | <i>Camptostemon schultzei</i> | | | X | | | X | | | | | |
| Rhizophoracées | <i>Ceriops decandra</i> | | X | X | X | X | X | X | | X | | X |
| Rhizophoracées | <i>Ceriops tagal</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Euphorbiacées | <i>Excoecaria agallocha</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Malvacées | <i>Heritiera fomes</i> | | | | | X | | | | | | |
| Malvacées | <i>Heritiera globosa</i> | X | | X | X | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Malvacées | <i>Heritiera littoralis</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Rhizophoracées | <i>Kandelia candel</i> | X | X | X | X | X | | X | X | X | | X |
| Combrétacées | <i>Lumnitzera littorea</i> | | X | X | X | X | X | X | X | | | X |
| Combrétacées | <i>Lumnitzera racemosa</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Arécacées | <i>Nypa fruticans</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Myrtacées | <i>Osbornia octodonta</i> | | | X | X | | X | X | | | | |
| Myrtacées | <i>Oberonia rhizophoreti</i> | | | X | X | | | | | | | |
| Lythracées | <i>Pemphis acidula</i> | | | X | X | | X | X | X | X | | |
| Rhizophoracées | <i>Rhizophora apiculata</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Rhizophoracées | <i>Rhizophora mucronata</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Rhizophoracées | <i>Rhizophora stylosa</i> | | | X | X | | X | X | X | | X | X |
| Rubiacees | <i>Scyphiphora hydrophyllacea</i> | X | X | X | X | | X | X | X | X | | X |
| Lythracées | <i>Sonneratia alba</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Lythracées | <i>Sonneratia apetala</i> | | | | | X | | | | | | |
| Lythracées | <i>Sonneratia caseolaris</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Lythracées | <i>Sonneratia griffithii</i> | | X | | X | X | | | | X | | |
| Lythracées | <i>Sonneratia ovata</i> | | X | X | X | | X | X | X | X | | X |
| Méliacées | <i>Xylocarpus granatum</i> | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Méliacées | <i>Xylocarpus moluccensis</i> | | X | X | X | X | X | X | X | X | | X |
| Méliacées | <i>Xylocarpus rumphii</i> | | X | X | X | | X | X | | | X | |

En Asie du Sud-Est les plantes qui appartiennent à la famille des Euphorbiacées qui se développent dans la mangrove ne sont représentées que par six espèces [12] : *Blumeodendron brookeanum*, *Croton heterocarpus*, *Excoecaria agallocha*, *Excoecaria indica*, *Glochidion littorale* et *Ricinus communis*. Parmi ces six espèces et selon le Tableau 3 seule *Excoecaria agallocha* est classée parmi les mangroves vraies. De plus elle est retrouvée dans tous les pays d'Asie du Sud-Est comme le présente le Tableau 3. [12]

Excoecaria agallocha est une espèce de mangrove très présente en Asie du Sud-Est. Elle est utilisée ancestralement par les populations autochtones pour traiter diverses pathologies. [29] De plus la toxicité de son latex peut faire supposer la présence d'actifs intéressants à valoriser. C'est pour ces raisons que les chercheurs travaillent sur l'isolement de molécules actives qui permettraient de mettre en évidence un intérêt thérapeutique.

III. *Excoecaria agallocha*

1) Noms

1.1) Nom scientifique

Le nom scientifique actuel de la plante étudiée dans ce travail est *Excoecaria agallocha* L : ce nom a été donné par Carl Von Linnée, grand médecin et botaniste suédois qui a révolutionné la botanique et sa classification jusqu'à nos jours. En référence à ce botaniste le terme scientifique de la plante se termine par un « L » pour rappeler qui l'a décrite pour la première fois. Le terme *Excoecaria* est dérivé du latin *ex-caecare* qui signifie « rendre aveugle ».

Néanmoins, d'autres noms ont été donnés à cette plante, mais sont désormais désuets *Excoecaria agallocha* fut décrite pour la première fois, comme beaucoup de plantes d'Asie, par Rumphius dans *Herbarium amboinensis* en 1741. Il nomma cet arbre *Arbor excoecans*. Parallèlement, le prêtre missionnaire Joao de Loureiro nomma cette plante en 1790 : *Commia cochinchinensis* Lour. [14] Ce nom dérive du nom du pays de sa découverte : la Cochinchine. Ces deux noms ne furent pas retenus car ils sont antérieurs à la publication de Carl Von Linnée «*Species plantarum* » en 1753 qui est le point de départ des noms scientifiques en accord avec les règles internationales de nomenclatures en botanique.

Le nom d'*Excoecaria agallocha* L fut retenu comme son nom binomial.

Excoecaria agallocha possède de nombreux synonymes qui peuvent être retrouvés dans la littérature :

- *Excoecaria affinis* Endl.
- *Excoecaria agallocha* var. *camettia* (Wild) Müll.Arg.
- *Excoecaria agallocha* var. *lancifolia* Pax & K.Hoffm
- *Excoecaria agallocha* var. *orthostichalis* Mull. Arg.
- *Excoecaria agallocha* var. *ovalis* (Endl.) Müll.Arg.
- *Excoecaria camettia* Wild.
- *Excoecaria ovalis* Endl.
- *Excoecaria sphaerosperma* F.Muell. ex Pax.
- *Stillingia agallocha* (L.) Baill.

1.2) Noms vernaculaires [12] [15]

Selon les pays d'Asie du Sud-Est et selon les dialectes de chaque pays, *Excoecaria agallocha* est désignée sous divers noms. Selon les provinces, cette plante peut être désignée sous divers noms vernaculaires dans un même pays.

- Au Cambodge : Chheu chhor ou Tatom
- En Indonésie : Buta – buta ou Goro - goro Raci ou Kala pinrang ou Kayu buta ou Kayu Wuta ou Makasuta ou Mata Huli ou Menengan ou Sambuta ou kayu betah
- En Malaisie : Buta –Buta ou Kayu buta – buta ou bebuta
- En Myanmar : Kayaw Thayaw
- Aux Philippines : Alipata ou Batano ou Bota – bota ou Buta ou Buta –buta ou Dipodata ou Gumaingat ou Himbabau ou liñgi ou Lipata ou Lipatang – buhai ou Siak ou Taatum thale ou Tatum
- En Thaïlande : Buu-to ou Tatum thale
- Au Viet Nam : Già

En anglais il est nommé Blind Eyes Tree, nom qui, comme beaucoup de noms vernaculaires, signifie « l'arbre qui rend aveugle ». En français cet arbre est appelé « Palétuvier aveuglant ».

Cette complexité de noms vernaculaires démontre l'utilité d'un nom commun latin binomial : *Excoecaria agallocha* L.

2) Classification

2.1) Historique

Excoecaria agallocha fut décrite et intégrée à la classification existante toujours par Linné, dans la 10^{ème} édition de 1758 de **Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis** (Système de la nature, en trois règnes de la Nature, divisés en classes, ordres, genres et espèces, avec les caractères, les différences, les synonymes et les localisations). En 1975, Webster inclut cet arbre dans la tribu des Hippomaneae du fait de la similarité des inflorescences⁹. [1]

⁹ La disposition des fleurs sur la tige d'une plante à fleur.

A ce jour deux types de classifications sont les plus largement admises. La première est dite la classification classique : classification de CRONQUIST en 1981 qui s'appuie principalement sur des similarités morphologiques et physiologiques, notamment sexuelles. La seconde est la classification APG (Angiosperm Phylogenetic Group), elle se base sur des données de biologie moléculaire (séquençage de régions de l'ADN).

2.2) Classification selon CRONQUIST (1981): [16]

Règne : Plantae
Sous règne : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous classe : Rosidée
Ordre : Euphorbiales
Famille : Euphorbiacées
Genre : Excoecaria
Espèce : *Excoecaria agallocha*.L

2.3) Classification phylogénétique

Selon l'APG III (Angiosperms Phylogeny Group III) 2009 [17]

Clade : Angiospermes
Clade des Dicotylédones vraies ou Eudicotylédones
Clade des dicotylédones vraies ou Eudicotylédones supérieures
Clade des Rosidées
Clade des Fabidées ou Eurosidées
Ordre des Malpighiales
Famille Euphorbiacées
Genre Excoecaria
Espèce *Excoecaria agallocha*

3) Description botanique

3.1) Famille des Euphorbiacées

La famille des Euphorbiacées est une vaste famille cosmopolite de 6500 espèces qui se développe majoritairement dans les zones tropicales à subtropicales. Elle regroupe trois genres principaux : les Euphorbes (1900 espèces), les Crotons (plus de 800 espèces) et les Acalyphas (450 espèces). Cette famille possède un appareil végétatif et des fleurs exceptionnellement variables mais deux caractères restent constants : les fleurs sont unisexuées et le fruit est une capsule tricoque à déhiscence triple (septicide, septifrage et loculicide). Elles présentent aussi souvent un latex blanc qui peut être toxique pour certains. [18]

L'appareil végétatif est d'une diversité exceptionnelle parmi les plantes à fleurs. Ce sont des arbres comme des caoutchoucs, des arbustes ou encore des herbes vivaces ou annuelles. Les feuilles sont aussi très variées, le plus souvent simples, entières et alternes. Mais elles peuvent être composées, parfois entières mais plus ou moins découpées, souvent palmées et parfois opposées. Les fleurs ont aussi des structures très variées mais sont généralement regroupées en inflorescences et toujours unisexuées. Le plus souvent les fleurs mâles et femelles sont groupées sur le même pied : ce sont des espèces monoïques. Fréquemment, les inflorescences sont mixtes comprenant les fleurs mâles et femelles.

Les graines sont fréquemment pourvues d'une excroissance tégumentaire ou caroncule.[18]

3.2) Genre *Excoecaria*

Au sein de la famille des Euphorbiacées le genre *Excoecaria* comporte environ quarante espèces.

3.2.1) Arbre décisionnel pour le genre *Excoecaria* au sein de la famille des Euphorbiacées [19]

Cette clé (Tableau 4) a été réalisée en 1995 où tous ces genres appartenaient aux Euphorbiacées. A ce jour, avec la classification APGIII comme référence, la classification de certains genres a été modifiée ; ainsi certains genres ont été reclassés dans des familles différentes. Ils sont mis en évidence dans le tableau suivant par des astérisques.

Tableau 4 : Arbre décisionnel pour le genre *Excoecaria* au sein de la famille des Euphorbiacées [19]
Genres actuels selon l'APG III : * : Picrodendracée ; ** : Phyllantacée ; *Putranjivacée**

| | | |
|---|--|-------------|
| 1 | Feuilles opposées ou verticillées ¹⁰ | 2 |
| 1 | Feuilles alternes | 3 |
| | | |
| 2 | Feuilles opposées ; fleurs dans un cyathe ¹¹ ; latex présent | Euphorbia |
| 2 | Feuilles opposées ou verticillées par trois; fleurs pas dans un cyathe; latex absent | Choriceras* |
| | | |
| 3 | Feuilles à minuscules poils sécréteurs sur la face inférieure | 4 |
| 3 | Feuilles sans poils sécréteurs sur la face inférieure | 5 |
| | | |
| 4 | Feuilles peltées ¹² ou cordées ¹³ ; sans poils étoilés | Macaranga |
| 4 | Feuilles à la base différentes; si cordées alors présence de poils étoilés | Mallotus |
| | | |
| 5 | Feuilles avec des nectaires aplatis au niveau du pétiole | 6 |
| 5 | Feuilles sans nectaire | 7 |
| | | |
| 6 | Inflorescence = racèmes ¹⁴ ; fruit =capsule ¹⁵ | Croton |
| 6 | Inflorescence = panicule ¹⁶ ; fruit =drupe ¹⁷ | Endospermum |
| | | |
| 7 | Fleurs dans un cyathe; latex présent | Euphorbia |
| 7 | Fleurs solitaires ou en fascicules ¹⁸ , racèmes, cymes ¹⁹ ou panicules | 8 |
| | | |
| 8 | Fruits charnus; parfois à peine | 9 |
| 8 | Fruits sec | 16 |
| | | |
| 9 | Inflorescence = racèmes, cymes ou panicules | 10 |

¹⁰ Feuilles qui sont insérés au même niveau, par groupe de trois unités au minimum, en cercle autour d'un axe.

¹¹ L'inflorescence (disposition des fleurs sur la tige) partielle en forme de coupelle des euphorbes.

¹² De forme arrondie, avec le pétiole attaché au milieu du limbe, le limbe entourant le pétiole.

¹³ En forme de cœur avec la pointe côté apex.

¹⁴ Ensemble de fleurs ou de fruits regroupés sur une tige commune.

¹⁵ Un fruit sec déhiscent contenant généralement de nombreuses graines.

¹⁶ Une inflorescence composée, formée par une grappe de grappes sur un axe simple.

¹⁷ Un fruit charnu à noyau.

¹⁸ Qui se présente en faisceaux attachés par la base et par groupe de trois unités au minimum.

¹⁹ Une inflorescence simple, dans laquelle l'axe principal est terminé par une fleur.

| | | |
|----|--|---------------|
| 9 | Inflorescence fasciculées ou fleurs solitaires | 11 |
| 10 | Feuilles avec des glandes nectarifère en forme « d'oursin » à l'extrémité distale du pétiole (sommet); domatie ²⁰ absente; inflorescence femelle =cyme ; fruit =capsule | Claoxylon |
| 10 | Feuilles sans les glandes nectarifères à l'extrémité distale du pétiole; domatie +/- présente; inflorescence femelle = racème ; fruit charnu | Antidesma** |
| 11 | Fruit > 10mm de long | 12 |
| 11 | Fruit < 10 mm de long, rarement jusqu'à 12 mm pour Breynia | 13 |
| 12 | Le fruit est globulaire, capsule légèrement charnue; séchage dur; 3-4 loges | Petalostigma* |
| 12 | Fruit est une drupe déhiscente; 1 loge | Drypetes*** |
| 13 | Fruit à 2 loges; le dessus des feuilles est tomenteux (cotonneux); nervures tertiaires +/- parallèles | Briedelia** |
| 13 | Fruit à 3 loges; le dessus des feuilles est glabre (sans poils) ; nervures tertiaires non parallèles | 14 |
| 14 | Les fruits mûrs sont blancs | Flueggea** |
| 14 | Les fruits mûrs sont violets/noirs | |
| 15 | Arbuste ramifié, périanthe ²¹ à 6 tépales ²² libres | Phyllanthus** |
| 15 | arbuste érigé; périanthe en coupe | Breynia |
| 16 | Fruit > 11mm; graines avec caroncule (un renflement charnu) | 17 |
| 16 | Fruit < 11mm; graines le plus souvent sans caroncule ou rarement avec (Croton et Sebastiana) | 18 |
| 17 | Fleurs en fascicule axillaire | Petalostigma* |
| 17 | Fleurs terminales en dichasium (cyme bipare) | Jatropha |
| 18 | Graines sans caroncule | 19 |
| 18 | Graines avec caroncule | 29 |
| 19 | Fleurs femelle = racèmes | 20 |

²⁰ Structure spécialement adaptée qui se développe sur un organe végétal et qui, le plus souvent en échange de bénéfices réciproques (phénomène de symbiose), attire des arthropodes, des cyanobactéries.

²¹ L'ensemble des enveloppes (calice et corolle) qui assurent la protection des organes reproducteurs de la fleur (étamines et pistil).

²² Pièce de l'enveloppe florale lorsqu'elle est simple, c'est-à-dire lorsqu'on ne peut pas distinguer des pétales et des sépales.

| | | |
|----|--|-------------------|
| 19 | Fleurs femelles en fascicules ou solitaires | 24 |
| 20 | Herbes annuelles; stipules ²³ à pointe glandulaire | Micrococca |
| 20 | Arbres ou arbustes stipules sans pointe glandulaire | 21 |
| 21 | Plantes entièrement glabre | 22 |
| 21 | Plantes variablement poilues | 23 |
| 22 | Graines enfermées dans une couche charnue jaune; latex absent; nervation tertiaires +/- parallèles | Omalanthus |
| 22 | Graines sans la couche charnue jaune; latex présent; nervation tertiaire indistincte | Excoecaria |
| 23 | Limbe de la feuille avec une paire de glandes basales | Croton |
| 23 | Limbe de la feuille sans paire de glandes basales mais avec une glande nectarifère en forme « d'oursin » à l'extrémité distale du pétiole (sommet) | Claoxylon |
| 24 | Graines bleu-métalliques ou vertes | Margaritaria** |
| 24 | Graines autres | 25 |
| 25 | Fleurs de type 5 | 26 |
| 25 | Fleurs de type 3 | 27 |
| 26 | Plantes glabres | Poranthera** |
| 26 | Plantes poilues | Leptopus** |
| 27 | Arbustes ou arbres ; graines rouges ; feuilles de 35-140mm de long | Glochidion** |
| 27 | Herbes, petits arbustes avec des parties aériennes annuelles ou plantes grimpantes ; graines jamais rouge ; feuilles généralement <35mm de long, rarement jusqu'à 55mm | 28 |
| 28 | Capsule globuleuse déprimée ; disques nectarifères présents dans les fleurs mâles et femelles ; androphore généralement absent | Phyllanthus** |
| 28 | Capsule elliptique ou ovoïde ; disques nectarifères absents ; androphore généralement présent | Sauropus** |
| 29 | Limbe de la feuille avec une paire de glandes basales ; indumentum de poils étoilés ou écailles peltées, > 18 mm de large | Croton |
| 29 | Limbe de la feuille sans glande basale, glabre, < 18 mm de large | Sebastiania** |

²³ Des pièces foliaires, au nombre de deux, en forme de feuilles réduites situées de part et d'autre du pétiole, à sa base, au point d'insertion sur la tige.

3.2.2) **Appareil végétatif**

Ce sont des petits arbres ou arbustes qui possèdent une sève laiteuse typique de la famille des euphorbiacées.

Les feuilles sont alternes, souvent sur de courtes pousses latérales et sont légèrement charnues. A la base de la surface foliaire se trouve une paire de glandes. Elles possèdent un pétiole rainuré avec des stipules très petites. [19]

3.2.3) **Appareil reproducteur**

Selon les espèces, l'inflorescence peut être terminale, ou en épi axillaire ou en grappe. Toutes sont dioïques (= monosexuées), c'est-à-dire qu'elles présentent des pieds mâles et des pieds femelles distincts. Les fleurs mâles ont un petit périanthe avec 2 à 3 étamines qui possèdent des anthères se terminant par deux loges dos à dos.

Les fleurs femelles se présentent en grappes courtes dont le périanthe est plus lobé que chez les fleurs mâles. L'ovaire est bi ou trilobé avec un ovule par lobe. Le style est linéaire. Pour permettre la dissémination des graines, les capsules (fruits), elles aussi trilobées, sont déhiscentes.[19]

3.3) ***Excoecaria agallocha***

Cet arbre a été décrit pour la première fois par Rumphius dans le Herbarium amboinensis en 1741 sous le nom d'*Arbor excoecans*.



Figure 6 : Arbre entier d'*Excoecaria agallocha*

3.3.1) **Appareil végétatif**

Cet arbre de taille moyenne d'environ 8 m peut mesurer jusqu'à 15m de haut. Son écorce grise est lisse mais parfois fissurée, le tronc peut atteindre pour les plus gros 15 cm de diamètre. (Figure 6)

Les racines se développent le long du sol, elles sont souvent nouées mais ne possèdent pas de spécialisation particulière pour l'environnement de la mangrove. Par contre, les jeunes rameaux possèdent de nombreuses lenticelles (Figure 7) qui sont des aspérités colorées permettant de réaliser les échanges gazeux et permettant ainsi à cet arbre de vivre dans un environnement de mangroves.

La pousse de ses branches est généralement orthotropique²⁴ avec de rares et diffuses ramifications suivant le modèle d'Attims : ce modèle définit des axes latéraux initialement orthotropiques, qui poussent verticalement alors que la croissance et les ramifications sont diffuses.(Figure 8) [20]

Il est parfois ramifié à partir de la base ou plus arbustif.

Les feuilles sont disposées en spirale, parfois un peu groupées vers la fin des pousses dressées. Elles sont simples, coriaces avec un pétiole cylindrique de 1 à 2 cm de long. Elles sont ovales à elliptiques, mesurent 6,5 à 10,5 cm de long pour 3,5 à 5 cm de large. Le sommet est arrondi et la marge discrètement dentée. A l'insertion du pétiole se trouve généralement de part et d'autre une paire de glandes basales (nectaires) qui sont circulaires et souvent associées à des excroissances supplémentaires comme des glandes marginales. Chaque feuille présente un bourgeon axillaire à sa base.

Jeunes, les feuilles sont vertes et deviennent oranges à rouges avant de tomber ce qui donne une apparence roussâtre à l'arbre tout entier. (Figure 9) [1]

Le tronc, les racines et les feuilles contiennent du latex blanc très irritant pour la peau et les yeux. (Figure 10)

²⁴ Qui pousse vers le haut.



Figure 7 : Lenticelles permettant les échanges gazeux d'*Excoecaria agallocha*



Figure 8 : Représentation du modèle d'Attims



© Julien Barrault

© Benoît Henry

Figure 9 : Feuilles vertes d'*Excoecaria agallocha* passant au rouge avant de tomber.



Figure 10 : Latex présents au sein des feuilles et tiges d'*Excoecaria agallocha*

3.3.2) Appareil reproducteur

L'arbre est dioïque ce qui signifie qu'il est monosexué, chaque individu porte des caractéristiques mâles ou femelles mais ne peut être les deux en même temps.

Dans les deux cas, l'inflorescence est axillaire, verte pâle, mesure de 3 à 7 cm.

Les fleurs d'*Excoecaria agallocha* sont de très petites tailles. En Australie, la floraison a lieu durant le mois de décembre.

a) Inflorescence mâle

L'inflorescence mâle (Figure 11) peut atteindre 7 cm de long à maturité, et est très souvent aussi longue que les feuilles. Elle peut être seule ou par paire à chaque insertion de feuille. Elle est composée de bractées arrangées en spirale, souvent glandulaires et chaque bractée supporte une fleur mâle.

La fleur mâle est presque sessile. Elle est composée de trois étroits tépales qui composent ici le calice. Trois étamines jaunes, avec des anthères (partie terminale des étamines) binoculaires viennent s'insérer sur un réceptacle charnu. La taille de l'étamine va rapidement atteindre les 5 mm à maturité ce qui est long par comparaison aux autres composants de la fleur. [1] [21] [12]



Figure 11 : Inflorescence mâle

b) Inflorescence femelle

L'inflorescence femelle (Figure 12) est généralement plus petite que l'inflorescence mâle, elle mesure jusqu'à 3-4 cm. Elle possède des bractées glandulaires avec des fleurs sessiles et avec une paire de bractéoles basales. Le pédicelle s'étend jusqu'à 5 mm dans le fruit. Les tépales sont plus larges que celles des fleurs mâles.

L'ovaire est trilobé avec trois styles petits et recourbés.



Figure 12 : Inflorescence femelle.

Le fruit (Figure 13) possède trois loges d'environ 7 mm de diamètre. A maturité, pour libérer les graines, la capsule tricoque se divise en trois coques par trois mécanismes de déhiscence : septicide (à la suture des carpelles), loculicide (chaque coque s'ouvrant

dorsalement sur toute sa longueur) et septifrage (chaque coque se séparant de la colonne centrale).

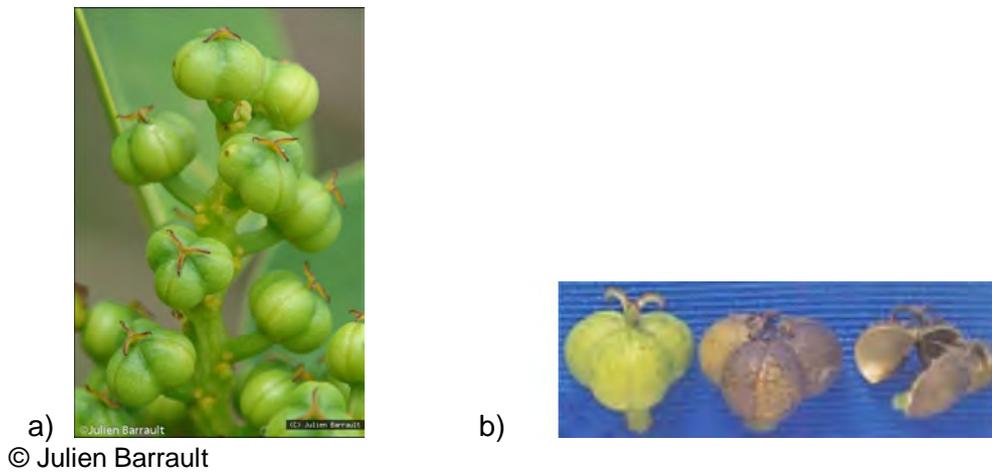


Figure 13 : a) Fruits sur l'arbre d'*Excoecaria agallocha* b) Fruits secs d'*Excoecaria agallocha*

Les graines sont lisses, globulaires et de couleur brunâtre. Elles mesurent environ 3 à 5 mm de diamètre. [1]

Les planches représentant l'appareil végétatif et reproducteur d'*Excoecaria agallocha* sont les suivantes : Figure 14 et Figure 15.



Figure 14 : *Excoecaria agallocha* L, A : Rameau reproductif mâle ; B : rameau reproductif femelle ; A1/A2 : fleur mâle ; B1/B2 : Fleur femelle ; B3 : Grappe de fruits ; B4 : Graine ; B5 : Graine ouverte pour montrer l'embryon [21]



Figure 15 : *Excoecaria agallocha* L. A : Rameau reproductif mâle ; B : Inflorescence mâle ; C : Fleur mâle ; D : Inflorescence mâle juvénile ; E Rameau reproductif femelle ; F : Fleur femelle. [22]

3.3.3) Mode de pollinisation

La pollinisation, du fait que ce sont des arbres dioïques, fait intervenir un élément extérieur. Il est supposé que ce sont majoritairement les abeilles, qui participent à la pollinisation de cet arbre. Ceci est facilité par un nectar jaune très collant. [1]

Ce mode de pollinisation est appelé entomophile c'est-à-dire réalisé par des insectes.

3.3.4) Dispersion

Une caractéristique propre aux mangroves est leur dispersion par l'eau, cela signifie que toutes les graines ont la capacité plus ou moins importante de flotter.

Excoecaria agallocha fait partie des mangroves dont les graines (trois par fruit) sont les unités de dispersion et sont dispersées telles quelles. Le fruit vert tombe de l'arbre, le calice se détache et les graines sont rapidement exposées du fait de la dégradation de

l'enveloppe du fruit au contact de l'eau. Toutefois les fruits peuvent s'éloigner par flottaison de l'arbre mère avant que la ou les graines ne soient libérées et n'atteignent le lieu d'implantation final. [1]

On peut opposer ce mode de dispersion à celui d'autres mangroves. Par exemple pour la famille des Rhizophoracées (type très spécialisé de mangroves) l'unité de dispersion est un semis qui se développe par viviparité. [1] C'est-à-dire que la germination de la graine se fait quand celle-ci se trouve encore sur l'arbre mère. C'est alors ce semis qui sera dispersé et permettra le développement d'un nouvel arbre. Ils sont très reconnaissables sur les plages comme des petits bâtons verticaux plantés dans le sol.

3.3.5) **La germination [1]**

L'étape de la germination est une étape critique pour toutes les graines dans le règne végétal. Cette étape est d'autant plus compliquée pour les mangroves du fait de la composition des sols et les marées qui ne facilitent pas l'implantation.

Pour les mangroves il existe trois modes de germination qui peuvent être corrélés à la taille de la graine.

- Germination épigée :

Les arbres qui ont des graines ou semis de petites tailles ont une germination épigée. Cela signifie que la graine est soulevée au-dessus du sol par la croissance de la plantule qu'elle renferme. Ainsi les cotylédons²⁵ se retrouvent exposés à l'air.

- Germination hypogée :

Les mangroves dont la taille des graines ou des semis est comprise entre 6 et 10 cm ont majoritairement une germination hypogée. Contrairement à la germination épigée, lors de cette germination, la graine ainsi que les cotylédons restent sous terre.

- Germination de type *Rhizophora* :

Cette germination est la plus spécialisée. C'est une germination où toutes les espèces présentent une viviparité (la germination de la graine se fait quand celle-ci se trouve

²⁵ Cotylédons: premières ébauches des feuilles.

encore sur l'arbre mère) avec des semis de grandes tailles entre 5 et 70 cm de long. C'est une germination épigée modifiée.

Excoecaria agallocha possède une graine de petite taille, maximum 5 mm, de ce fait elle possède une germination épigée avec des cotylédons légèrement cunéiformes (qui s'élargissent de la base vers le sommet).

3.4) Effet de la salinité de l'eau sur le développement d'*Excoecaria agallocha*

La salinité est l'un des facteurs environnementaux les plus stressants qui peuvent perturber le développement de certaines plantes.

Excoecaria agallocha est, comme tous les arbres de la mangrove, halophyte. Cela signifie qu'il est adapté aux milieux salins. Les études présentées ci-dessous permettent de mettre en évidence la sensibilité de cet arbre pour des concentrations croissantes en NaCl. Dans leurs recherches, S.Sivvasankaramoorthy et al [23] ont étudié l'impact de la salinité sur la germination de la graine d'*Excoecaria agallocha* et sur les quantités de composés organiques qu'il contient selon les concentrations en NaCl du milieu de culture.

L'étude a porté sur la croissance de graines immergées dans des milieux contenant des concentrations variables de NaCl : de 0 à 300 mM selon les paramètres étudiés.

Les graines récoltées ont été mises en culture dans des boîtes de cultures possédant de l'eau à des concentrations croissantes en NaCl. Chaque boîte de culture renferme 25 graines. A J15 et à J30 le nombre de germinations a été comptabilisé et la taille de la pousse, des racines, le nombre de feuilles ainsi que le poids frais et sec de la jeune plante ont été mesurés comme le montrent les Tableau 5 et Tableau 6.

Tableau 5 : Effet de différentes concentrations en NaCl sur la germination des pousses d'*Excoecaria agallocha* après 15 et 30 jours de contact avec les solutions de NaCl. [23]

| Concentration en NaCl (mM) | A J15 | | | A J30 | | |
|----------------------------|-------------------|---------------------------|------------------|-------------------|---------------------------|------------------|
| | Nombre de graines | Nombre de graines germées | % de germination | Nombre de graines | Nombre de graines germées | % de germination |
| Contrôle | 25 | 20 | 80 | 25 | 25 | 100 |
| 50 | 25 | 15 | 60 | 25 | 18 | 72 |
| 100 | 25 | 12 | 48 | 25 | 16 | 64 |
| 150 | 25 | 10 | 40 | 25 | 12 | 48 |
| 200 | 25 | 6 | 24 | 25 | 9 | 36 |

Tableau 6 : Effet de différentes concentrations de NaCl sur les paramètres de croissances après 30 jours de contact avec les solutions de NaCl. [23]

| Concentration of NaCl (mM) | A J30 | | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------|------------------------|
| | Longueur des pousses (cm) | Longueur des racines (cm) | Nombre de feuilles | Poids plante fraîche (g) | Poids plante sèche (g) |
| Contrôle | 12 | 10,5 | 5 | 9,26 | 2,84 |
| 100 | 13,5 | 12,6 | 7 | 10,54 | 3,9 |
| 150 | 14,5 | 13,2 | 8 | 11,55 | 4,26 |
| 200 | 15 | 15,5 | 11 | 13,98 | 5,06 |
| 250 | 14,5 | 12,5 | 8 | 10,26 | 3,85 |
| 300 | 12,5 | 11 | 5 | 9,47 | 3,56 |

Les résultats des premières mesures montrent que pour le groupe contrôle, qui est composé d'eau non salée, le pourcentage de germinations est de 80% à J15 et de 100% à J30. Dans les mêmes conditions de conservation mais avec une concentration en NaCl de 200 mM, le taux de germination à J15 n'est que de 24% et de 36% à J30. Ces résultats montrent qu'une concentration en sel (NaCl) ne favorise pas la germination des graines d'*Excoecaria agallocha*. L'expérience n'étudie pas la germination après 30 jours mais puisqu'elle est plus importante à J30 qu'à J15 il serait intéressant de déterminer après quelle durée la germination est maximale. Nous pourrions en effet supposer que la germination aura lieu plus tardivement qu'à J30.

La seconde partie de l'expérience se concentre sur les caractéristiques morphologiques des pousses qui se sont développées à J30. Pour le groupe contrôle les mesures rapportent en moyenne une longueur de pousse de 12,0 cm, des racines de 10,5 cm, 5 feuilles, et un poids frais de 9,26 g et un poids sec de 2,84 g. Les résultats augmentent jusqu'à un maximum atteint pour une concentration de 200mM : longueur des pousses de 15,0 cm, des racines de 15,5 cm, 11 feuilles, un poids frais de 13,98 g et sec de 5,06 g. A des concentrations supérieures les mesures diminuent de nouveau pour se rapprocher de celles du contrôle.

La plante a donc un développement plus optimal dans un milieu salin mais dont la concentration se situe autour de 200 mM de NaCl.

L'étude ne fait pas apparaître d'écart type, de ce fait il n'est pas possible de déterminer si la dispersion des résultats est faible. Cette information permettrait d'appuyer la fiabilité des données.

Ces expériences permettent de démontrer qu'*Excoecaria agallocha* est bien une plante halophile. Même si une eau riche en NaCl provoque dans un premier temps un effet négatif sur la germination avec un nombre de graines germées diminué, ce phénomène s'inverse sur le développement des pousses qui suit. Les pousses vont se développer plus rapidement et seront de ce fait plus rapidement aptes à résister aux difficultés extérieures qui influent sur la sélection naturelle des plantes.

Dans son environnement naturel, *Excoecaria agallocha* se développe dans l'eau qui provient des océans, majoritairement Indien et Pacifique. La concentration en sel des océans se situe autour de 500 mM (soit 30 g.l⁻¹). De plus, *Excoecaria agallocha* est aussi retrouvée dans des zones moins souvent inondées où la concentration en sel est plus importante. L'étude précédente montre qu'au-dessus de 200 mM le développement d'*Excoecaria agallocha* décroît, cette décroissance peut être extrapolée pour 500 mM. Cela signifie que l'eau des océans n'est pas le milieu le plus favorable à un développement optimal de cette plante mais grâce à des adaptations physiologiques celle-ci survit à cet environnement néfaste.

Cette étude permet aussi de déterminer des concentrations en sel optimales en vue, si besoin, d'une culture intensive. En effet, si les chercheurs mettent en évidence des molécules actives qui peuvent être développées en tant que médicaments cela demandera une forte utilisation de la plante. Il sera inimaginable de détruire la mangrove existante pour l'équilibre de l'écosystème. Ce type d'études pourrait permettre le développement de protocoles afin d'optimiser la germination et la pousse de la plante en culture contrôlée.

4) Classification au sein des mangroves

4.1) Selon des caractères physiques et environnementaux : classification du Pr. Tomlinson [1]

Excoecaria agallocha fait partie des espèces dont la classification au sein des mangroves peut être discutée. Fait-elle partie des mangroves vraies ou des mangroves associées ?

Pr Tomlinson classa *Excoecaria agallocha* parmi les mangroves vraies dans les éléments mineurs de celles-ci. [1] Le seul élément qui permet de classer *Excoecaria agallocha* dans les mangroves vraies est la présence de lenticelles sur cet arbre. Ce sont des pores présents à la surface de l'écorce et qui permettent les échanges gazeux entre l'atmosphère et les tissus internes de l'arbre. Bien que cela ne fasse qu'une seule adaptation à son environnement, celle-ci est rarement retrouvée dans les mangroves. [5] De plus, cette espèce ne forme que rarement des peuplements purs ce qui l'a classée parmi les éléments mineurs des mangroves vraies.

Cet arbre est à la limite de deux classifications et de ce fait son appartenance aux mangroves vraies mineures ou aux mangroves associées fait débats au sein de la communauté botanique. Néanmoins, c'est la classification de Tomlinson qui est retenue à ce jour.

4.2) Selon des caractères biologiques

En 2010, Wang et al [24] ont décidé de comparer les mangroves selon des caractères morphologiques tels que les caractéristiques des feuilles mais aussi selon des caractères biochimiques et physiologiques tels que les paramètres osmotiques. Cette méthode leur a permis de classer des espèces controversées dont *Excoecaria agallocha*.

L'hypothèse développée est la suivante : les vraies mangroves et les mangroves associées se différencient physiologiquement et écologiquement dans leurs capacités à survivre dans l'environnement de la mangrove.

De ce fait les chercheurs ont étudié les paramètres physiologiques des feuilles de 33 espèces de mangroves dont 17 vraies mangroves et 6 mangroves associées qui ont permis d'établir une base de données. Dix autres mangroves dites controversées dont *Excoecaria agallocha* ont ensuite été étudiées pour déterminer à quelle classe de mangrove les rattacher.

4.2.1) Paramètres étudiés

Les paramètres étudiés ont été les suivants :

- Osmolalité de la sève des feuilles : la concentration totale des particules dissoutes, indépendamment de leur nature moléculaire. Elle est exprimée en mmol.kg^{-1} ,
- Succulence de la feuille : teneur en eau sur la base de la surface foliaire en g.dm^{-2} ,
- Surface foliaire spécifique (SLA) : correspond à la surface de la feuille sur la masse de feuilles sèches en $\text{cm}^{-2}.\text{g}^{-1}$,

- Nmass : concentration en azote sur la base de la masse de feuille sèche mg.g^{-1} ,
- Narea : concentration en azote sur la base de la surface foliaire en g.m^{-2} ,
- Concentration en ions : calcium, magnésium, potassium, sodium et chlorure en g.m^{-2} .

4.2.2) Résultats

- Mangroves vraies et associées dont la classification est reconnue.

Tableau 7 : Détermination de la succulence des feuilles, la surface foliaire spécifique (SLA), de la concentration en azote sur la base de la masse de feuille sèche (Nmas) et de la concentration en azote sur la base de la surface foliaire (Narea) pour les mangroves vraies et pour les mangroves associées [24]

| Groupes | Espèces | Code de la plante | Succulence (g.dm-2) | SLA (cm-2.g-1) | Nmass (mg.g-1) | Naire (g.m-2) |
|---------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|----------------|---------------|
| VRAIES MANGROVES | <i>Aegiceras corniculatum</i> | Ac | 2,81+/-0,04 | 66,19+/-4,72 | 13,35+/-0,41 | 2,02+/-0,07 |
| | <i>Avicennia marina</i> | Am | 2,83+/-0,19 | 73,63+/-7,38 | 22,86+/-1,37 | 3,14+/-0,23 |
| | <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> | Bg | 3,48+/-0,71 | 69,44+/-8,17 | 14,11+/-2,04 | 2,17+/-0,33 |
| | <i>Bruguiera rhynchopetala</i> | Bv | 2,53+/-0,27 | 84,74+/-16,62 | 13,92+/-1,17 | 1,66+/-0,19 |
| | <i>Bruguiera sexangula</i> | Bs | 2,41+/-0,30 | 68,23+/-13,06 | 13,19+/-0,44 | 1,98+/-0,38 |
| | <i>Ceriops tagal</i> | Ct | 4,39+/-1,46 | 44,16+/-12,28 | 8,56+/-0,93 | 2,12+/-0,42 |
| | <i>Kandelia obovata</i> | Ko | 3,43+/-0,08 | 64,01+/-1,01 | 18,96+/-1,48 | 2,96+/-0,27 |
| | <i>Rhizophora apiculata</i> | Ra | 4,68+/-0,27 | 43,68+/-1,83 | 12,13+/-2,30 | 2,77+/-0,41 |
| | <i>Rhizophora stylosa</i> | Rs | 5,03+/-0,02 | 40,32+/-1,18 | 14,22+/-1,35 | 2,83+/-0,04 |
| | <i>Lumnitzera racemosa</i> | Lr | 4,82+/-0,84 | 93,14+/-8,24 | 14,03+/-1,67 | 1,41+/-0,13 |
| | <i>Lumnitzera littorea</i> | Ll | 4,73+/-0,29 | 60,41+/-2,30 | 9,56+/-0,84 | 1,47+/-0,10 |
| | <i>Sonneratia alba</i> | Sa | 4,28+/-0,48 | 90,40+/-2,84 | 30,89+/-1,43 | 4,10+/-0,16 |
| | <i>Sonneratia caseolaris</i> | Sc | 4,65+/-0,36 | 88,48+/-10,37 | 26,66+/-0,92 | 3,04+/-0,40 |
| | <i>Sonneratia X gulngai</i> | Sg | 3,59+/-0,39 | 93,24+/-8,16 | 24,99+/-2,89 | 2,69+/-0,43 |
| | <i>Sonneratia X hainanensis</i> | SK | 4,08+/-0,30 | 70,76+/-2,04 | 18,96+/-4,49 | 2,70+/-0,68 |
| | <i>Sonneratia ovata</i> | So | 4,28+/-0,07 | 47,09+/-2,21 | 13,00+/-0,97 | 1,73+/-0,08 |
| | <i>Scyphiphora hydrophyllacea</i> | Sh | 4,58+/-0,19 | 80,92+/-1,31 | 10,06+/-1,43 | 1,24+/-0,16 |
| | Moyenne | | 3,92 | 71,48 | 14,72 | 2,26 |
| Groupes | Espèces | Code de la plante | Succulence (g.dm-2) | SLA (cm-2.g-1) | Nmass (mg.g-1) | Naire (g.m-2) |
| MANGROVES ASSOCIEES | <i>Barringtonia racemosa</i> | Br | 2,65+/-0,13 | 144,89+/-8,43 | 23,69+/-1,18 | 1,64+/-0,06 |
| | <i>Cerbera manghas</i> | Cm | 2,39+/-0,26 | 164,60+/-28,97 | 29,78+/-3,22 | 1,80+/-0,14 |
| | <i>Dolichandrone spathacea</i> | Ds | 1,47+/-0,04 | 160,41+/-28,97 | 30,04+/-3,04 | 1,87+/-0,20 |
| | <i>Hibiscus tiliaceus</i> | Ht | 1,70+/-0,18 | 128,41+/-4,10 | 25,95+/-1,74 | 2,02+/-0,11 |
| | <i>Pongamia pinnata</i> | Pp | 0,81+/-0,11 | 199,39+/-3,63 | 36,07+/-6,41 | 1,81+/-0,31 |
| | <i>Thespesia populnea</i> | Tp | 1,59+/-0,02 | 143,39+/-13,92 | 15,93+/-1,81 | 1,11+/-0,04 |
| | | Moyenne | | 1,75 | 156,85 | 26,5 |

Tableau 8 : Comparaison des caractéristiques physiques et osmotiques entre 17 mangroves vraies et 6 mangroves associées [24]

| | Vraies Mangroves | Mangroves associées |
|---|-------------------------------|----------------------------------|
| SLA (cm ² .g ⁻¹) | 70,68+/-15,21 (43,68 - 93,24) | 157,02+/-24,62 (128,41 - 100,39) |
| Succulence (g.dm ⁻²) | 3,92+/-0,87 (2,41 - 5,03) | 1,77+/-0,66 (0,81 - 2,65) |
| Nmass (mg.g ⁻¹) | 15,72+/-5,27 (8,56 - 26,66) | 26,91+/-6,84 (15,93 - 36,07) |
| Na (g.m ⁻²) | 2,83+/-0,59 (1,97 - 3,74) | 0,28+/-0,20 (0,09 - 0,64) |
| Cl (g.m ⁻²) | 4,55+/-1,443 (2,61 - 6,63) | 0,52+/-0,28 (0,19 - 0,88) |
| K/Na | 0,25+/-0,13 (0,07 - 0,51) | 1,10+/-0,50 (0,56 - 2,01) |
| Osmolarité (mmol.kg ⁻¹) | 1195+/-246 (785 - 1709) | 648+/-81 (566 - 751) |

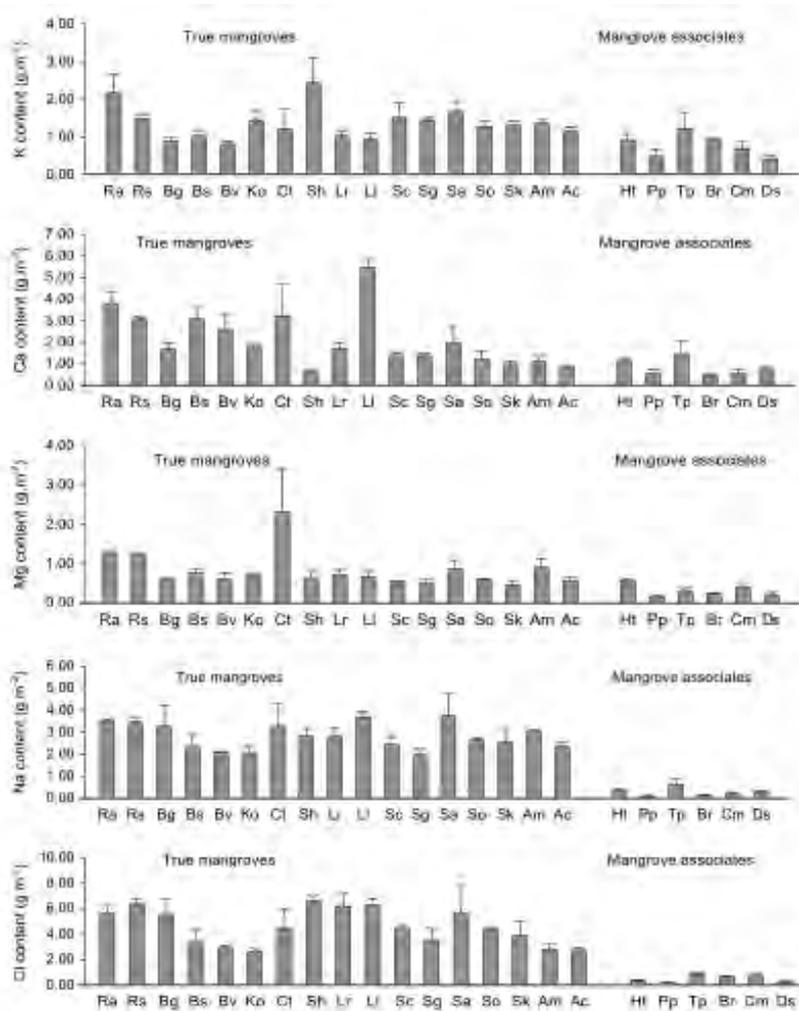


Figure 16 : Compositions en ions K⁺, Ca⁺, Mg⁺, Na⁺ et Cl⁻ des mangroves vraies et associées. [24]

Les Tableau 7 et Tableau 8 mettent en évidence que la succulence des feuilles des mangroves vraies a des valeurs qui vont de 2,41 g.dm⁻² à 4,82 g.dm⁻². La valeur moyenne

est de $3,92 \text{ g.dm}^{-2}$. Les mêmes mesures pour les mangroves associées montrent un minimum à $0,81 \text{ g.dm}^{-2}$ et un maximum à $2,65 \text{ g.dm}^{-2}$ avec une valeur moyenne de $1,75 \text{ g.dm}^{-2}$.

Les résultats indiquent que les mangroves vraies ont une succulence des feuilles plus importante que les mangroves associées, elle est en moyenne doublée.

Les mesures de la surface foliaire spécifique mettent en évidence que les vraies mangroves ont une surface foliaire spécifique inférieure aux mangroves associées : les mangroves vraies ont une surface foliaire de $40,32$ à $93,24 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$ alors que les mangroves associées ont des valeurs de $128,41$ à $199,39 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$.

De même, la mesure de la concentration en azote a permis de distinguer les deux catégories avec une concentration en azote supérieure à 20 mg.g^{-1} pour les mangroves associées (excepté pour *Thespesia populnea*) et une concentration inférieure à 20 mg.g^{-1} pour les mangroves vraies (excepté pour *Sonneriata* et *Avicennia marina*). La concentration moyenne en azote pour les mangroves vraies est significativement inférieure à celle des mangroves associées avec des concentrations moyennes respectives de $15,72 \text{ mg.g}^{-1}$ et $26,91 \text{ mg.g}^{-1}$.

Les dosages des ions présentés dans la Figure 16 ont aussi montré une divergence entre mangroves vraies et mangroves associées. Les différences les plus importantes sont observées pour les ions Na^+ et Cl^- . Les valeurs moyennes de Na^+ et Cl^- sont respectivement de $2,83 \text{ g.m}^{-2}$ et $4,55 \text{ g.m}^{-2}$ pour les vraies mangroves et de $0,28 \text{ g.m}^{-2}$ et $0,52 \text{ g.m}^{-2}$ pour les mangroves associées.

Ainsi, cette étude montre que les mangroves vraies présentent une succulence et des concentrations en ions Na^+ et Cl^- supérieures à celles des mangroves associées. L'inverse a été observé pour la surface foliaire spécifique et la concentration en azote. Ces premières mesures ont permis de mettre en évidence une possible distinction entre les mangroves vraies et associées par certaines caractéristiques et propriétés osmotiques de leurs feuilles.

- Résultats pour *Excoecaria agallocha* :

Les résultats obtenus pour *Excoecaria agallocha* montrent une SLA de $131,40 \pm 24,71 \text{ cm}^2.\text{g}^{-1}$, une succulence de la feuille de $2,24 \pm 0,38 \text{ g.dm}^{-2}$, une N_{mass} de $23,14 \pm 2,06 \text{ mg.g}^{-1}$; une concentration en ions Na^+ de $0,44 \pm 0,04 \text{ g.m}^{-2}$, une concentration en ions Cl^- de $1,16 \pm 0,22 \text{ g.m}^{-2}$ et un rapport K^+/Na^+ de $1,18 \pm 0,18$. Tous ces résultats sont dans les moyennes retrouvées pour les mangroves associées.

Seule l'osmolalité de $987 \pm 91 \text{ mmol.kg}^{-1}$ classerait cette espèce dans les mangroves vraies.

La conclusion retenue par les auteurs de cette étude est qu'*Excoecaria agallocha* appartient à la classe des mangroves associées d'après les caractéristiques étudiées.

Suite à ces résultats, la classification de cet arbre dans les mangroves vraies, comme l'a décrit Tomlinson, peut être remise en question.

A ce jour, les scientifiques restent divisés. Comme le précise Tomlinson, en dehors de toute uniformisation de la classification, chaque botaniste trouvera une classification des mangroves qui lui est propre en fonction des critères retenus. Le choix de caractéristiques précises qui permettent de définir une classification universelle des mangroves n'a pas encore vu le jour et le débat restera sûrement ouvert encore de nombreuses années.

A ce jour, les deux classifications d'*Excoecaria agallocha* sont retrouvées dans la littérature avec tout de même une majorité de références pour la mangrove vraie mineure basée sur les textes de Tomlinson considérés comme une référence.

5) Répartition géographique

5.1) Au niveau mondial

Excoecaria agallocha est implantée majoritairement sur tout le littoral allant de l'Asie (majoritairement Asie du Sud-Est) jusqu'à l'Australie incluse.[2] Cette espèce est également présente sur les côtes de l'Afrique de l'Est.

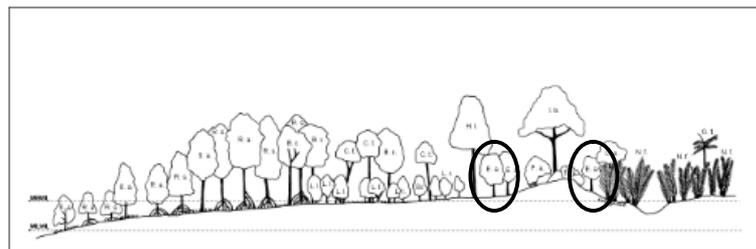
En Océanie elle est retrouvée dans les pays suivants : les îles Samoa, Guam, les états de Micronésie, Niué, les Palaos, Papouasie Nouvelle Guinée, îles Salomon, les îles Tonga ainsi que dans les territoires français d'outre-mer : Nouvelles Calédonie, Wallis et Futuna.

En Asie elle est présente dans 17 des 25 pays littoraux : Birmann, Bangladesh, Brunei Darussalam, Cambodge, Chine, Inde, Indonésie, Japon, Malaisie, Maldives, les Philippines, Singapour, Sri Lanka, Thaïlande, Timor Leste et Viet Nam.

5.2) Place de *Excoecaria agallocha* au niveau de la côte

Excoecaria agallocha peut être retrouvée au niveau des plages et dans les estuaires avec un sol sablonneux mais aussi sur des zones plus élevées jusqu'à 400m. [1] Dans ces zones plus reculées le sol est composé d'un mélange d'argile et de terreau.[12] Cet arbre peut également se retrouver au milieu d'espèces de la forêt tropicale.

De ce fait elle appartient à la zone 4 : zone des mangroves d'arrière-plan. Cette zone contient la plus grande diversité en mangroves. (Figure 17)



Substrates of frontal area consist of coarse sands, while inland it is mixed with loam & clay.

| | |
|------------------------------------|---|
| B.c. - <i>Bruguiera cylindrica</i> | C.b. - <i>Cerbera odollam</i> |
| C.t. - <i>Ceriops tagal</i> | <u>E.a. - <i>Excoecaria agallocha</i></u> |
| H.l. - <i>Heritiera littoralis</i> | I.b. - <i>Intsia bijuga</i> |
| L.l. - <i>Lumnitzera littorea</i> | L.r. - <i>Lumnitzera racemosa</i> |
| N.f. - <i>Nypa fruticans</i> | O.t. - <i>Oncosperma tigillarium</i> |
| P.a. - <i>Pemphis acidula</i> | R.a. - <i>Rhizophora apiculata</i> |
| R.s. - <i>Rhizophora stylosa</i> | Sc. - <i>Scyphiphora hydrophyllacea</i> |
| S.a. - <i>Sonneratia alba</i> | |

Figure 17 : Représentation schématique de l'emplacement des mangroves retrouvées sur l'île de Bintan en Indonésie par rapport à la zone côtière. *Excoecaria agallocha* se retrouve loin de la côte parmi les mangroves d'arrière plans.[12]

Partie II : COMPOSITION CHIMIQUE

Les recherches sur les différentes mangroves vraies et mangroves associées ont permis de découvrir de nouvelles molécules ou de mettre en évidence des molécules déjà connues. Ces molécules appartiennent à des classes chimiques variées, et proviennent du métabolisme primaire ou du métabolisme secondaire.

Les composés tels que les acides aminés, les hydrates de carbures et les protéines sont des produits primaires du métabolisme qui sont vitaux pour le processus de maintien de la vie. D'autres tels que les alcaloïdes, les dérivés phénoliques, les stéroïdes et terpénoïdes sont des produits secondaires du métabolisme qui possèdent des propriétés toxiques, pharmacologiques et écologiques importantes.

Les recherches sur *Excoecaria agallocha* ont, à ce jour, mené à l'identification de plus de 100 métabolites secondaires dont la majorité sont des diterpènes. Un tableau résumé de toutes les molécules isolées est situé en Annexe 1.

I. Les diterpènes :

Les diterpènes sont des molécules composées de 20 atomes de carbones issus de la condensation de quatre unités d'isoprènes. La formule brute générale du noyau est $C_{20}H_{32}$. Ils peuvent être linéaires, bicycliques, tricycliques, tétracycliques, pentacycliques ou macrocycliques. [25]

Ces métabolites secondaires sont très fréquemment retrouvés dans les familles suivantes : Labiacées, Verbenacées, Celastracées, Thymelaeacées et Euphorbiacées. Ils sont aussi très présents dans des espèces marines et des insectes.

Selon « The Dictionnary of natural products 2014 » il existe 16935 diterpènes dont 11937 qui proviennent de la branche verte et 1647 chez les Euphorbiacées.[26] Les méthodes modernes analytiques ont permis d'accélérer considérablement le nombre de diterpènes découverts en peu de temps.[27]

Cette classe chimique intéresse grandement les chercheurs de par l'activité pharmacologique que possèdent certains diterpènes tels que le Paclitaxel (Taxol^R) ou le docétaxel (Taxotere^R) utilisés en chimiothérapie. [27]

Les diterpènes décrits chez *E. agallocha* sont majoritairement bicycliques et tricycliques.

Ils appartiennent aux sous-familles des diterpènes suivantes : labdanes, atisanes, kauranes, pimaranes, beyeranes, daphanes, et tiglianés.[28]

Le point de départ de la biosynthèse de toutes ces molécules est le géranyl pyrophosphate lui-même issu de quatre unités isopréniques (Figure 18).

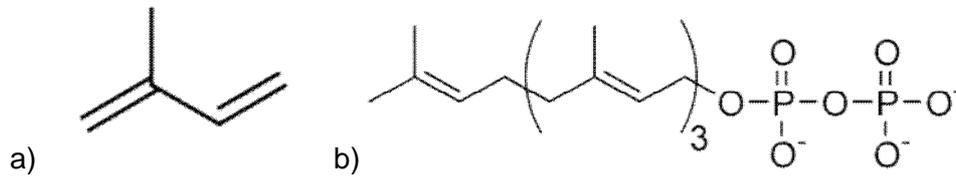


Figure 18 : a) Une unité isoprénique = un isoprène ; b) un géranyl pyrophosphate

Cette molécule va, par une cyclisation suivie de réarrangements, donner naissance au noyau de base des diterpènes.

La voie de biosynthèse des diterpènes est la suivant (Figure 19) :

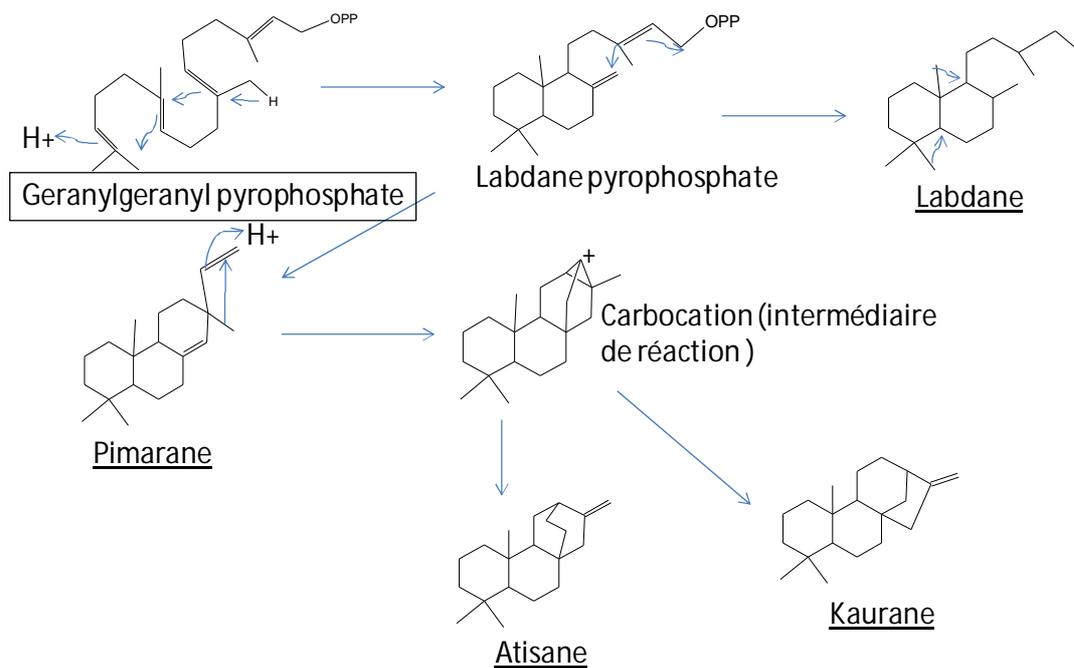


Figure 19 : Voie de biosynthèse des diterpènes

1) Les labdanes

Les labdanes représentent une sous-famille de diterpènes bicycliques qui sont le résultat d'une cyclisation d'un précurseur appelé géranyl géranyl pyrophosphate. (Figure 20)

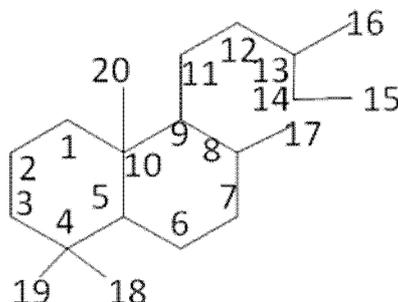
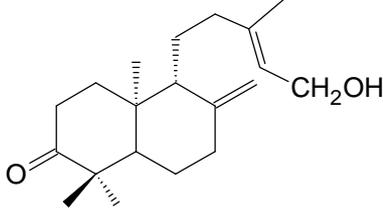
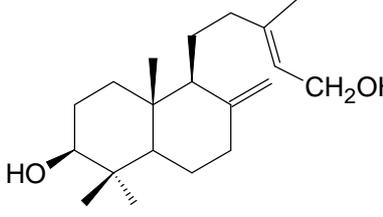
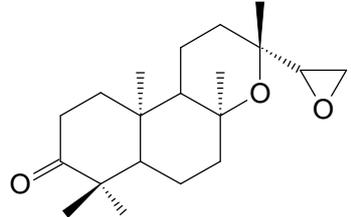
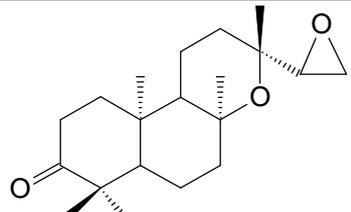
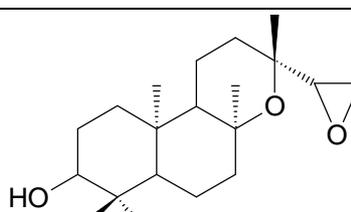
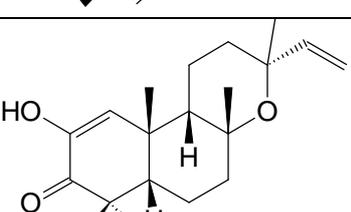
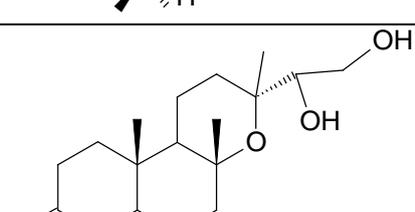


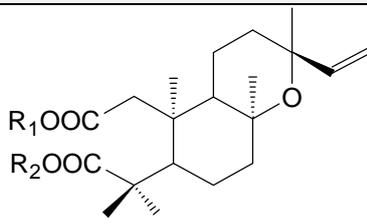
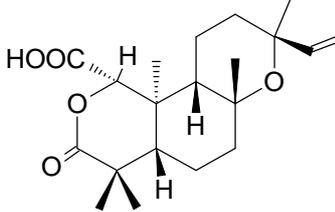
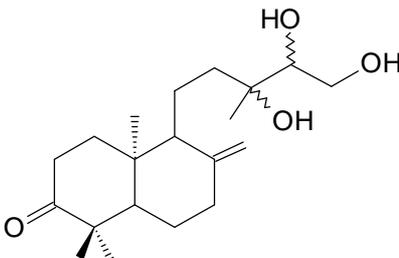
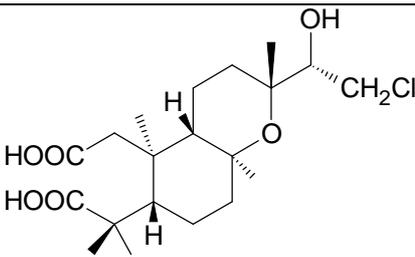
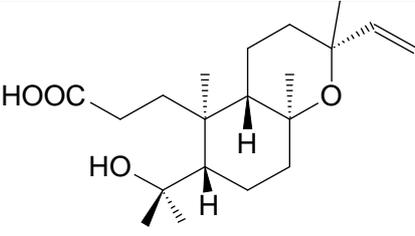
Figure 20 : Squelette de base des labdanes

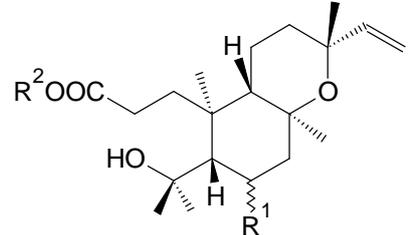
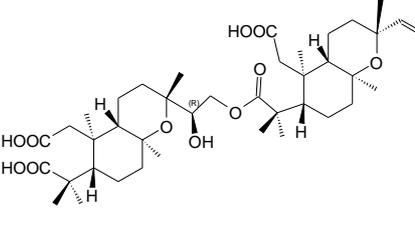
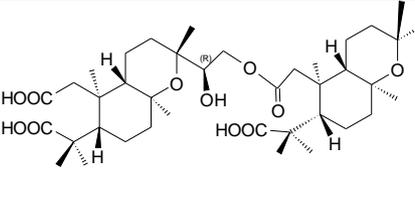
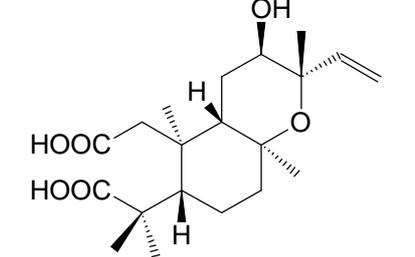
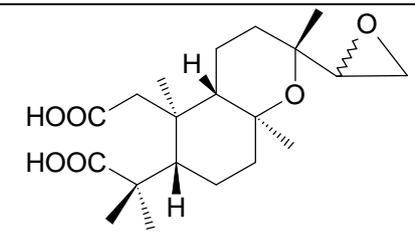
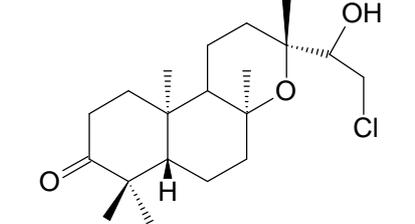
L'ensemble des diterpènes labdanes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés ci-dessous. (Tableau 9) Ces molécules qui présentent un caractère apolaire ont toutes été isolées après une extraction à l'éther.

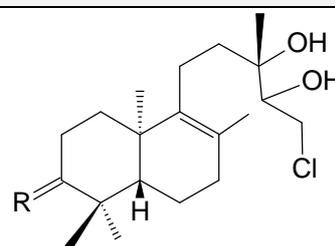
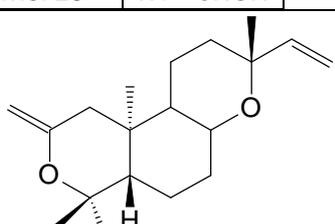
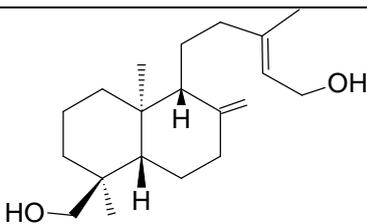
Tableau 9 : Labdanes isolés d'*Excoecaria agallocha* (Nm : organe source non mentionné)

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|--|-----------------------|--|---|--------|--------|----------|---------|---------|--------|----------|---------|---------|--------|----------|---------|--------|---------|----------|---------|--------|--------|------------|-----------|
| 1 | Ribénone | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | 304,47 | <table border="1"> <tr> <td>Mol 1 :</td> <td>R1 = O</td> <td>R2 = H</td> <td>R3 = CH3</td> </tr> <tr> <td>Mol 2 :</td> <td>R1 = OH</td> <td>R2 = H</td> <td>R3 = CH3</td> </tr> <tr> <td>Mol 3 :</td> <td>R1 = H2</td> <td>R2 = H</td> <td>R3 = CH3</td> </tr> <tr> <td>Mol 4 :</td> <td>R1 = O</td> <td>R2 = OH</td> <td>R3 = CH3</td> </tr> <tr> <td>Mol 5 :</td> <td>R1 = O</td> <td>R2 = H</td> <td>R3 = CH2OH</td> </tr> </table> | Mol 1 : | R1 = O | R2 = H | R3 = CH3 | Mol 2 : | R1 = OH | R2 = H | R3 = CH3 | Mol 3 : | R1 = H2 | R2 = H | R3 = CH3 | Mol 4 : | R1 = O | R2 = OH | R3 = CH3 | Mol 5 : | R1 = O | R2 = H | R3 = CH2OH | Bois [29] |
| Mol 1 : | R1 = O | R2 = H | R3 = CH3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 2 : | R1 = OH | R2 = H | R3 = CH3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 3 : | R1 = H2 | R2 = H | R3 = CH3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 4 : | R1 = O | R2 = OH | R3 = CH3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 5 : | R1 = O | R2 = H | R3 = CH2OH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Ribénol | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | 306,48 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Ent-13-epi-monoyloxyde | C ₂₀ H ₃₄ O | 290,48 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | Ent-11α-hydroxy-3-oxo-134-epi-manoyl oxide | C ₂₀ H ₃₂ O ₄ | 336,46 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | Ent-16-hydroxy-3oxo-13-epi-manoyl oxide | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | 320,47 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|----|--|-------------------|-----------------------|--|---|
| 6 | ent-15-hydroxy-labda-8(17),13E-diene-3-one | $C_{20}H_{32}O_2$ | 304,47 |  | Bois [29] |
| 7 | (13E)-labda-8(17),13-diène-3β,15-diol | $C_{20}H_{34}O_2$ | 306,48 |  | |
| 8 | Excoecarin A | $C_{20}H_{32}O_3$ | 320,47 |  | Bois [30] |
| 9 | Excoecarin B | $C_{20}H_{32}O_3$ | 320,47 |  | |
| 10 | Excoecarin C | $C_{20}H_{34}O_3$ | 322,48 |  | |
| 11 | Ent-13-epi-8,13-epoxy-2-hydroxylabdan-1,14diene-3-one | $C_{20}H_{30}O_3$ | 318,45 |  | |
| 12 | Ent-13-epi-8,13-epoxy-2-hydroxylabdan-1,14diene-3-one | $C_{20}H_{34}O_4$ | 338,48 |  | Bois [31] |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | | | |
|----------|--|--|-----------------------|---|---|--------|----------|----------|-----------|----------|-----------|
| 13 | ent -13-8,13-epoxy-2,3-secolab-14-ene-2,3-dioicacid | C ₂₀ H ₃₂ O ₅ | 352,46 |  <table border="1" data-bbox="853 548 1220 660"> <tr> <td>Mol 13 :</td> <td>R1 = H</td> <td>R2 = H</td> </tr> <tr> <td>Mol 14 :</td> <td>R1 = H</td> <td>R2 = CH3</td> </tr> </table> | Mol 13 : | R1 = H | R2 = H | Mol 14 : | R1 = H | R2 = CH3 | Bois [31] |
| Mol 13 : | R1 = H | R2 = H | | | | | | | | | |
| Mol 14 : | R1 = H | R2 = CH3 | | | | | | | | | |
| 14 | ent -13-8,13-epoxy-2,3-secolab-14-ene-2,3-dioicacid-3-méthyl ester | C ₂₁ H ₃₄ O ₅ | 366,49 | | | | | | | | |
| 15 | Acide 13-épi-8,13-époxy-2-oxa-3-oxolabol-14-ène-1R-carboxylique | C ₂₀ H ₃₀ O ₅ | 350,45 |  | | | | | | | |
| 16 | Excoecarin G1 | C ₂₀ H ₃₄ O ₄ | 338,48 |  <table border="1" data-bbox="901 1209 1204 1299"> <tr> <td>Mol 16 :</td> <td>14 R</td> </tr> <tr> <td>Mol 17 :</td> <td>14 S</td> </tr> </table> | Mol 16 : | 14 R | Mol 17 : | 14 S | Bois [32] | | |
| Mol 16 : | 14 R | | | | | | | | | | |
| Mol 17 : | 14 S | | | | | | | | | | |
| 17 | Excoecarin G2 | C ₂₀ H ₃₄ O ₄ | 338,48 | | | | | | | | |
| 18 | Excoecarin F | C ₂₀ H ₃₃ ClO ₆ | 404,47 |  | | | | | | | |
| 19 | Excoecarin H | C ₂₀ H ₃₄ O ₄ | 338,48 |  | Bois [33] | | | | | | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | |
|----------|------------------------------------|----------------------|-----------------------|--|---|-----------------|----------|--|--|
| 20 | Agallochin M | $C_{21}H_{36}O_5$ | 368,51 |  <table border="1" data-bbox="837 616 1252 660"> <tr> <td>Mol 20 :</td> <td>R1 = βOH</td> <td>R2 = CH3</td> </tr> </table> | Mol 20 : | R1 = β OH | R2 = CH3 | Nm : Organe source non mentionné [28] | |
| Mol 20 : | R1 = β OH | R2 = CH3 | | | | | | | |
| 21 | Excoecarin R1 | $C_{40}H_{64}O_{11}$ | 720,93 |  | Bois [34] | | | | |
| 22 | Excoecarin R2 | $C_{40}H_{64}O_{11}$ | 720,93 |  | | | | | |
| 23 | Excoecarin S | $C_{20}H_{32}O_6$ | 368,46 |  | | | | | |
| 24 | Excoecarin T1 | $C_{20}H_{32}O_6$ | 368,46 |  | Bois [35] | | | | |
| 25 | Excoecarin T2 | $C_{20}H_{32}O_6$ | 368,46 | <table border="1" data-bbox="837 1624 1252 1713"> <tr> <td>Mol 24</td> <td>14R</td> </tr> <tr> <td>Mol 25</td> <td>14S</td> </tr> </table> | Mol 24 | 14R | Mol 25 | 14S | |
| Mol 24 | 14R | | | | | | | | |
| Mol 25 | 14S | | | | | | | | |
| 26 | Agallochin A | $C_{20}H_{33}ClO_3$ | 356,47 |  | Racine [36] | | | | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | |
|--------|---|--|-----------------------|---|---|---|--------|---------|
| 27 | Agallochin B | C ₂₀ H ₃₃ O ₃ | 321,47 |  | Racine [36] | | | |
| 28 | Agallochin C | C ₂₁ H ₃₄ O ₃ | 334,49 | | | <table border="1"> <tr> <td>Mol 27</td> <td>R : = O</td> </tr> <tr> <td>Mol 28</td> <td>R : = CHO</td> </tr> </table> | Mol 27 | R : = O |
| Mol 27 | R : = O | | | | | | | |
| Mol 28 | R : = CHO | | | | | | | |
| 29 | Agallochin E | C ₁₉ H ₃₀ O ₂ | 290,44 |  | | | | |
| 30 | ent-15,18-duhydroxylabda-8(17),13E-diène | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | 306,48 |  | Bois [35] | | | |

La majorité des labdanes présentés ont été extraits du bois d'*Excoecaria agallocha*. Seuls quelques-uns sont issus des racines. A ce jour, aucun labdane n'a été extrait des feuilles, ou du latex de cet arbre. Cette remarque ne signifie pas que seuls le bois et les racines contiennent des labdanes, il est possible que les études de cette classe chimique au sein des feuilles ou du latex n'aient pas, à ce jour, encore été menées.

Il est intéressant de remarquer que deux des molécules retrouvées au niveau des racines ainsi qu'une molécule présente dans le bois possèdent un élément chloré dans leurs structures. Les plantes halophytes sont en contact avec de très fortes concentrations en sel et donc en ions Na⁺ et Cl⁻.

2) Les pimaranes et isopimaranes

Le squelette de base du groupe pimarane est le suivant (Figure 21) :

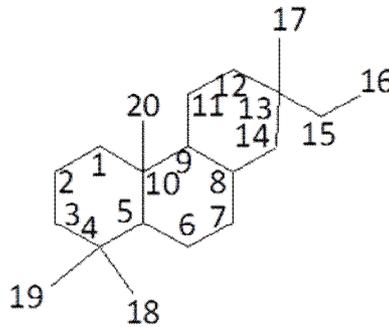


Figure 21 : Squelette de base du groupe pimarane

Ce sont des diterpènes tricycliques provenant de la cyclisation du labdane pyrophosphate.[27]

Dans le cas du pimarane les configurations du 13 vinyl et 13 methyl sont β et α respectivement. Il peut aussi être appelé ent-pimarane. (Figure 22 a)

Pour l'isopimarane l'orientation du 13 vinyl et 13 methyl est α et β respectivement. Il peut aussi être appelé ent-isopimarane. [27] (Figure 22 b)

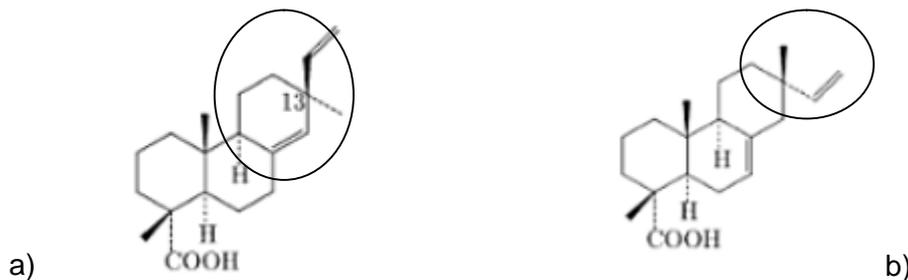
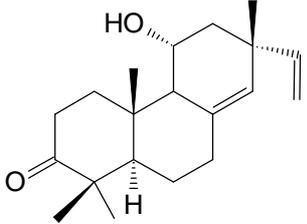
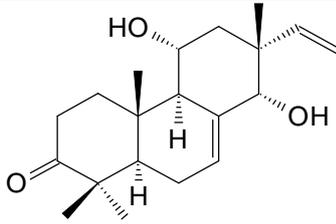
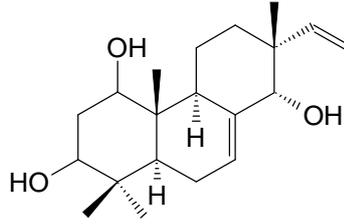
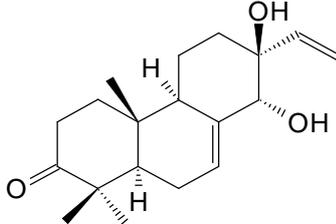
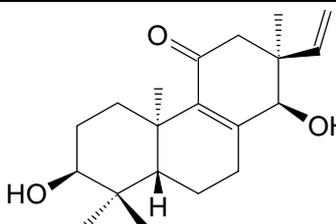
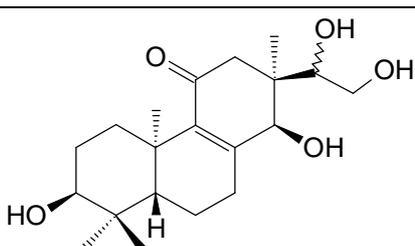


Figure 22 : a) Squelette de base d'un pimarane et b) d'un isopimarane

L'ensemble des diterpènes pimaranes et isopimaranes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Pimaranes et Isopimaranes isolés d'*Excoecaria agallocha*. (Nm : organe source non mentionné)

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|----|------------------------------------|-------------------|-----------------------|--|---|
| 31 | Agallochin D | $C_{20}H_{30}O_2$ | 302,45 |  | Nm [28] |
| 32 | Agallochin J | $C_{20}H_{30}O_3$ | 318,45 |  | Nm [28] |
| 33 | Agallochin K | $C_{20}H_{32}O_3$ | 320,47 |  | |
| 34 | Agallochin L | $C_{19}H_{28}O_3$ | 304,42 |  | |
| 35 | Agallochaol A | $C_{20}H_{30}O_3$ | 318,45 |  | Tiges ou feuilles [37] |
| 36 | Agallochaol B | $C_{20}H_{32}O_5$ | 352,46 |  | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|----|---|--|-----------------------|----------------------|---|
| 37 | ent-3α,11β-dihydroxyisopimara-8(14),15-dien-2-one | C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | 318,45 | | Nm [28] |
| 38 | Agallochaol D | C ₂₀ H ₃₂ O ₄ | 336,46 | | Tiges ou feuilles [38] |
| 39 | Agallochaol E | C ₂₀ H ₃₂ O ₅ | 352,46 | | |
| 40 | Agallochaol F | C ₂₀ H ₃₂ O ₅ | 352,46 | | |

Lorsque les organes sources sont énoncés comme « Tiges ou feuilles » cela signifie que dans l'étude les molécules sont extraites à partir d'un mélange de tiges et feuilles. De ce fait il est impossible de déterminer la localisation de ces molécules dans une structure végétale précise.

3) Les atisanes

La famille des atisanes appartient aux diterpènes tétracycliques. Cette famille possède un cycle qui relie les carbones C12 et C8. Ce cycle supplémentaire est typique de cette famille.

Le squelette de base des atisanes est le suivant (Figure 23) :

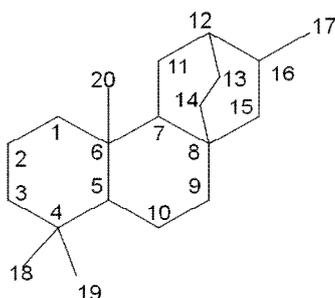
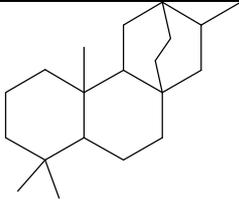
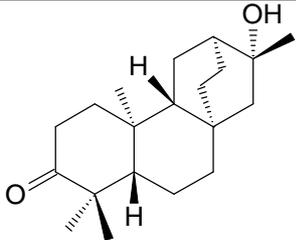
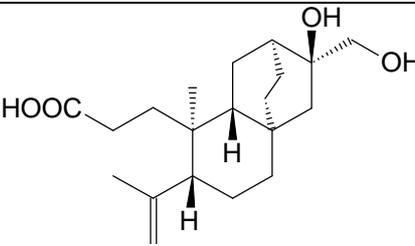
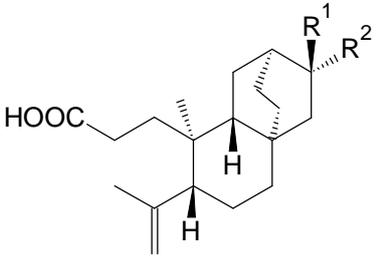
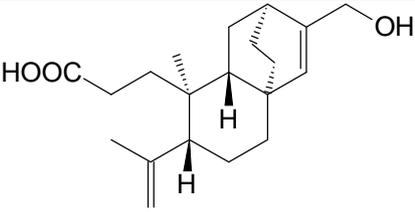


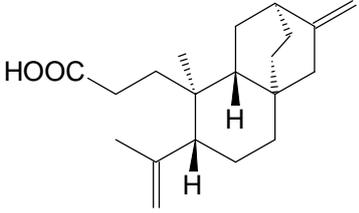
Figure 23 : Squelette de base des atisanes

L'ensemble des diterpènes atisanes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Atisanes isolés d'*Excoecaria agallocha*. (Nm : organe source non mentionné)

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organes sources |
|----|------------------------------------|--|-----------------------|----------------------|---|
| 41 | Excoecarin N | C ₂₀ H ₃₀ O ₅ | 350,45 | | Bois [39] |
| 42 | Excoecarin V3 | C ₂₀ H ₃₂ O ₄ | 336,46 | | Tiges [40] |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organes sources | | | | | | | | | |
|--------|---|--|-----------------------|--|---|----------------------|---------|--------|-------------------------|---------|--------|-------------------------|--------|------------------------|
| 43 | ent-atisane-16α-ol | C ₂₀ H ₃₄ O | 290,48 |  | Tiges [40] | | | | | | | | | |
| 44 | ent-16β-hydroxyatisan-3-one | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | 304,47 |  | Nm [28] | | | | | | | | | |
| 45 | Agallochaol C | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | 320,47 |  | Tiges ou feuilles [38] | | | | | | | | | |
| 46 | Agallochaol G | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | 320,47 |  <table border="1" data-bbox="837 1400 1252 1534"> <tr> <td>Mol 36</td> <td>R1 : CH₃</td> <td>R2 : OH</td> </tr> <tr> <td>Mol 37</td> <td>R1 : CH₂OH</td> <td>R2 : OH</td> </tr> <tr> <td>Mol 38</td> <td>R1 : CH₂OH</td> <td>R2 : H</td> </tr> </table> | Mol 36 | R1 : CH ₃ | R2 : OH | Mol 37 | R1 : CH ₂ OH | R2 : OH | Mol 38 | R1 : CH ₂ OH | R2 : H | Tiges ou feuilles [41] |
| Mol 36 | R1 : CH ₃ | R2 : OH | | | | | | | | | | | | |
| Mol 37 | R1 : CH ₂ OH | R2 : OH | | | | | | | | | | | | |
| Mol 38 | R1 : CH ₂ OH | R2 : H | | | | | | | | | | | | |
| 47 | Agallochaol H | C ₂₀ H ₃₂ O ₄ | 336,46 | | | | | | | | | | | |
| 48 | Agallochaol I | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | 320,47 | | | | | | | | | | | |
| 49 | Agallochaol J | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | 304,47 |  | Tiges ou feuilles [41] | | | | | | | | | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organes sources |
|----|---|--|-----------------------|--|---|
| 50 | Agallochaol Q (activité anti-inflammatoire) | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | 308,50 |  | Tiges [42] |

Comme précédemment, certains auteurs ne précisent pas dans leurs articles la partie végétale à partir desquelles les molécules ont été isolées. Mais, d'autres études qui n'ont étudié que les tiges ont isolé des molécules dont la structure chimique leur est proche. Cette comparaison permet de supposer que dans le mélange tiges/feuilles extrait, ces molécules proviendraient de la tige. Mais il est aussi probable que ces molécules proviennent des feuilles. Seule une recherche ciblée avec un extrait de chaque structure végétale répondrait à cette question.

Parmi cette sous famille chimique seule la molécule Agallochaol Q a été étudiée pour son activité biologique. Elle a montré une potentielle activité anti-inflammatoire. [42]

4) Les kauranes

Comme les atisanes, les kauranes possèdent un cycle qui leur est propre. Celui-ci relie les carbonnes C13 et C8. Ils appartiennent donc aussi aux diterpènes tétracycliques. De plus, ils possèdent en C16 une ramification qui permettra de les différencier de la classe des beyeranes.

Le squelette de base des kauranes est le suivant (Figure 24):

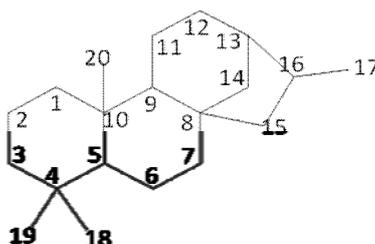
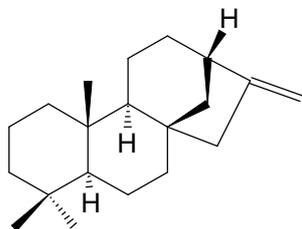


Figure 24 : Squelette de base des kauranes

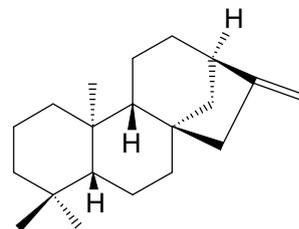
Deux types de kauranes existent : les kauranes et les ent-kauranes qui se différencient par la configuration du C20 et des configurations du 5H et du cycle D. De plus les cycles A, B et C sont en configuration opposé dans les deux types. [27] (Figure 25)



C20 en orientation β

Et 5H et cycle D en orientation α

→ Kauranes



C20 en orientation α

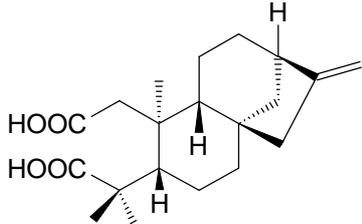
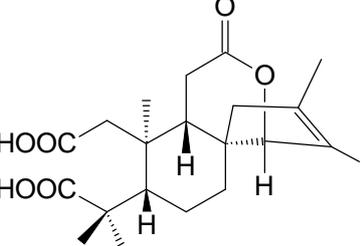
Et 5H et cycle D en orientation β

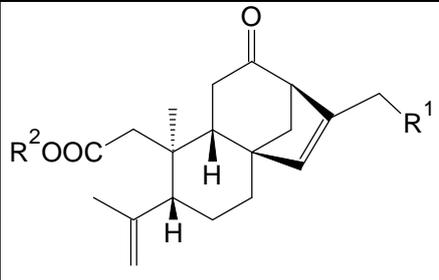
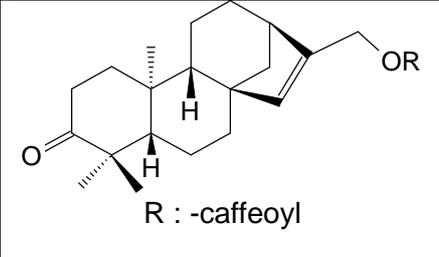
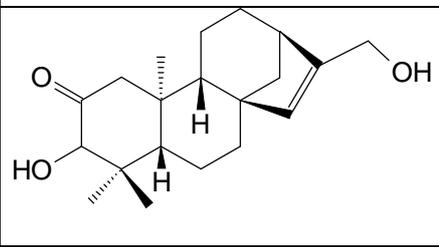
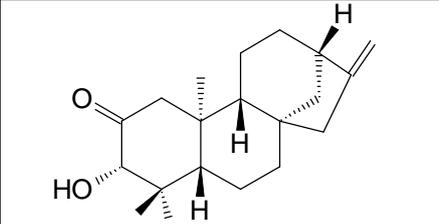
→ ent-kauranes

Figure 25 : a) Squelette de base des kauranes et b) des ent-kauranes

L'ensemble des diterpènes kauranes et ent-kauranes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Kauranes isolés d'*Excoecaria agallocha*

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|----|------------------------------------|-------------------|-----------------------|--|---|
| 51 | Excoecarin V2 | $C_{20}H_{30}O_4$ | 334,45 |  | Tiges [40] |
| 52 | Excoecarin M | $C_{20}H_{28}O_6$ | 364,43 |  | Bois [39] |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | | | | | | | | | |
|--------|---|--|-----------------------|---|---|---------|--------|--------|-----------------|--------|--------|------------------|--------|--------|--------|--------|------------|
| 53 | Agallochaol K (Activité anti-inflammatoire) | C ₁₉ H ₂₆ O ₄ | 318,41 |  <table border="1" data-bbox="829 694 1268 896"> <tr> <td>Mol 53</td> <td>R1 : OH</td> <td>R2 : H</td> </tr> <tr> <td>Mol 54</td> <td>R1 : O-caffeoyl</td> <td>R2 : H</td> </tr> <tr> <td>Mol 55</td> <td>R1 : O-coumaroyl</td> <td>R2 : H</td> </tr> <tr> <td>Mol 56</td> <td>R1 : H</td> <td>R2 : H</td> </tr> </table> | Mol 53 | R1 : OH | R2 : H | Mol 54 | R1 : O-caffeoyl | R2 : H | Mol 55 | R1 : O-coumaroyl | R2 : H | Mol 56 | R1 : H | R2 : H | Tiges [42] |
| Mol 53 | R1 : OH | R2 : H | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 54 | R1 : O-caffeoyl | R2 : H | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 55 | R1 : O-coumaroyl | R2 : H | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 56 | R1 : H | R2 : H | | | | | | | | | | | | | | | |
| 54 | Agallochaol L | C ₂₉ H ₃₆ O ₆ | 480,59 | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | Agallochaol M | C ₂₉ H ₃₆ O ₅ | 464,59 | | | | | | | | | | | | | | |
| 56 | Agallochaol N | C ₁₉ H ₂₆ O ₃ | 302,41 | | | | | | | | | | | | | | |
| 57 | Agallochaol O (Activité anti-inflammatoire) | C ₂₉ H ₃₆ O ₅ | 464,59 |  <p>R : -caffeoyl</p> | | | | | | | | | | | | | |
| 58 | Agallochaol P | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | 320,47 |  | Bois [43] | | | | | | | | | | | | |
| 59 | Excoecarin K | C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | 304,47 |  | | | | | | | | | | | | | |

Les molécules de cette sous-famille ont été retrouvées principalement dans les tiges à l'exception de l'Excoecarin K retrouvée dans le bois.

Les molécules Agallochaols K à P ont été isolées lors la même étude que l'Agallochaol Q précédemment présenté. Toutes ces molécules ont été testées pour une potentielle activité anti-inflammatoire. Seules les Agallochaols K et O (comme l'Agallochaol Q cf. sous famille des atisanes) ont présenté une activité anti-inflammatoire non négligeable. [42]

5) Les beyeranes

La famille des beyeranes est très proche de celle des kauranes. Ils se différencient par la position de la ramification qui, pour les beyeranes se situe en C13 alors qu'elle est en C16 pour les Kauranes.

Ils font donc partis des diterpènes tétracycliques.

Le squelette de base des beyeranes est le suivant (Figure 26):

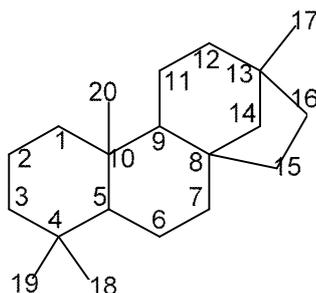
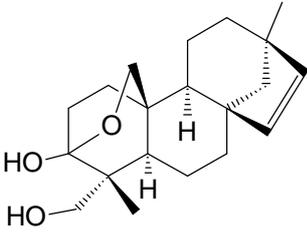
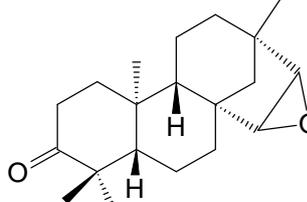
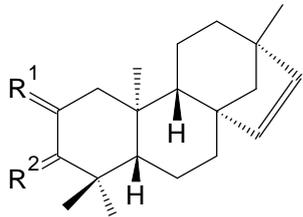
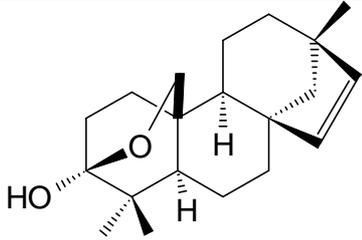
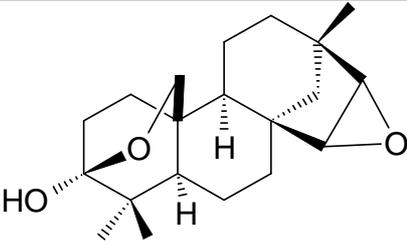
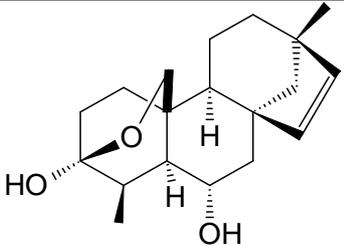
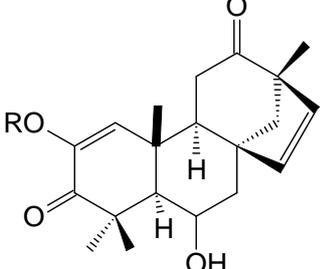


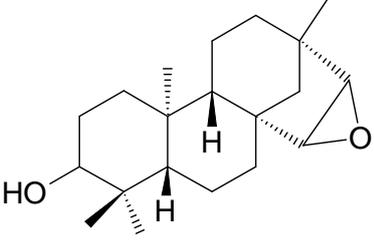
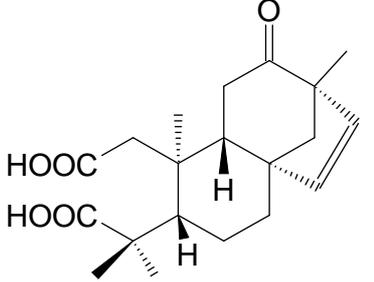
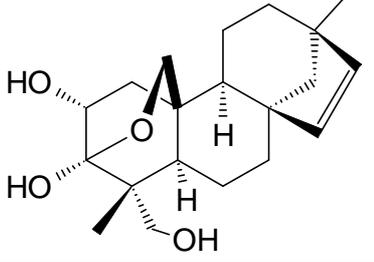
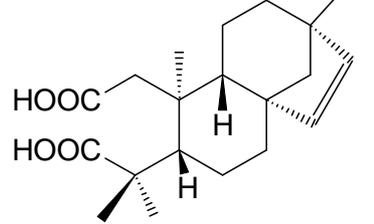
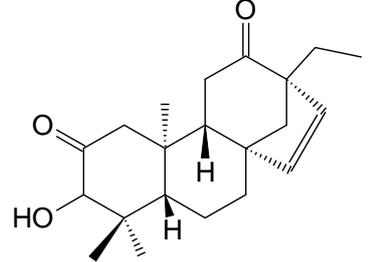
Figure 26 : Squelette de base des beyeranes

L'ensemble des diterpènes beyeranes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Beyeranes isolés d'*Excoecaria agallocha*

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|----|------------------------------------|-------------------|-----------------------|--|---|
| 60 | Excoecarin D | $C_{20}H_{30}O_3$ | 318,45 |  | Bois [43] |
| 61 | Excoecarin E | $C_{20}H_{30}O_2$ | 302,45 |  | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | | | | | | |
|--------|--|--|-----------------------|--|---|---------|-----------|--------|---------|--------|--------|--------|-----------|-----------|
| 62 | Stachenol | C ₂₀ H ₃₀ O | 286,45 |  <table border="1" data-bbox="829 600 1225 728"> <tr> <td>Mol 62</td> <td>R1 : H2</td> <td>R2 : α-OH</td> </tr> <tr> <td>Mol 63</td> <td>R1 : H2</td> <td>R2 : O</td> </tr> <tr> <td>Mol 64</td> <td>R1 : O</td> <td>R2 : α-OH</td> </tr> </table> | Mol 62 | R1 : H2 | R2 : α-OH | Mol 63 | R1 : H2 | R2 : O | Mol 64 | R1 : O | R2 : α-OH | Bois [43] |
| Mol 62 | R1 : H2 | R2 : α-OH | | | | | | | | | | | | |
| Mol 63 | R1 : H2 | R2 : O | | | | | | | | | | | | |
| Mol 64 | R1 : O | R2 : α-OH | | | | | | | | | | | | |
| 63 | Stachenone | C ₂₀ H ₃₀ O | 286,45 | | | | | | | | | | | |
| 64 | ent-3β-hydroxybeyer-15-en-2-one | C ₂₀ H ₂₉ O | 285,44 | | | | | | | | | | | |
| 65 | Agallochin G | C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | 286,45 |  | Racines [44] | | | | | | | | | |
| 66 | Agallochin H | C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | 318,45 |  | | | | | | | | | | |
| 67 | Agallochin I | C ₁₉ H ₂₈ O ₃ | 304,42 |  | Racines [44] | | | | | | | | | |
| 68 | 2-acetoxy-1,15-beyeradiene-3,12-dione | C ₂₁ H ₂₈ O ₅ | 360,44 |  <table border="1" data-bbox="829 1859 1077 1937"> <tr> <td>Mol 68</td> <td>R : Ac</td> </tr> <tr> <td>Mol 69</td> <td>R : H</td> </tr> </table> | | Mol 68 | R : Ac | Mol 69 | R : H | | | | | |
| Mol 68 | R : Ac | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 69 | R : H | | | | | | | | | | | | | |
| 69 | 2-hydroxy-1,15-beyeradiene-3,12-dione | C ₂₀ H ₂₈ O ₄ | 332,43 | | | | | | | | | | | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|----|---|--|-----------------------|--|---|
| 70 | ent-15,16-epoxybeyerane-3α-ol | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | 304,47 |  | Bois [35] |
| 71 | ent-12-oxo-2,3-secobeyer-15-ene-2,3-dioic acid | C ₂₀ H ₂₈ O ₅ | 348,43 |  | |
| 72 | Excoecarin V1 | C ₂₀ H ₃₀ O ₄ | 334,45 |  | Tiges [40] |
| 73 | ent-2,3-secobeyer-15-ene-2,3-dioic acid | C ₂₀ H ₃₀ O ₄ | 334,45 |  | |
| 74 | ent-3β-hydroxybeyer-15-ène-2,12-dione | C ₂₁ H ₃₀ O ₃ | 330,46 |  | Nm [28] |

Les molécules de cette sous-famille sont retrouvées dans toutes les structures végétales : bois, tiges et racines. C'est la première famille qui présente un si large éventail en termes de localisation au sein de la structure végétale. A ce jour, ces molécules n'ont pas d'activité potentielle identifiée.

6) Les daphnanes

Cette classe chimique est connue, comme les tiglianes (cf 1.8) pour renfermer les molécules toxiques de la famille des Euphorbiacées. Celles-ci sont irritantes pour la peau, les yeux et elles sont impliquées pour certaines, dans l'induction de tumeurs.[45] Une étude menée par C. Karalai et son équipe a mis en évidence l'implication de ces molécules dans des brûlures dues au latex d'*Excoecaria agallocha*. [46] Cette étude sera détaillée dans la partie IV « Toxicité » de ce manuscrit. Les daphnanes sont des diterpènes tricycliques dont la caractéristique commune est la présence d'un orthoester benzoate entre C9-C14 et C13.

Le squelette de base des daphnanes est le suivant (Figure 27):

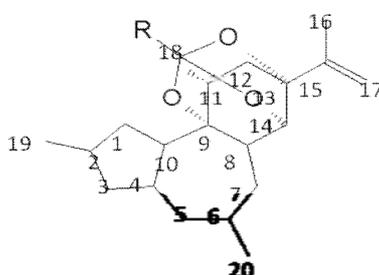
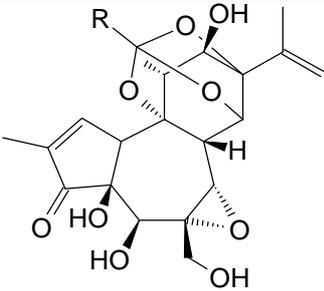


Figure 27 : Squelette de base des daphnanes

L'ensemble des diterpènes daphnanes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Daphnanes isolés d'*Excoecaria agallocha*

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | | | | | | | |
|--------|--|-------------------|-----------------------|---|---|--|--------|--|--------|--|--------|------------------------------|--------|------------------------------|--|
| 75 | Facteur A1 (Toxicité) | $C_{36}H_{49}O_8$ | 609,77 | | Latex [46] | | | | | | | | | | |
| 76 | Facteur A2 (Toxicité) | $C_{36}H_{47}O_8$ | 607,75 | | | | | | | | | | | | |
| 77 | Facteur A3 (Toxicité) | $C_{30}H_{39}O_8$ | 527,62 | | | | | | | | | | | | |
| 78 | Facteur A4 (Toxicité) | $C_{26}H_{30}O_9$ | 486,51 | | | | | | | | | | | | |
| 79 | Facteur A5 (Toxicité) | $C_{28}H_{32}O_8$ | 496,55 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | <table border="1"> <tr> <td>Mol 75</td> <td>R : Me-(CH₂)₈-(CH=CH)₃</td> </tr> <tr> <td>Mol 76</td> <td>R : Me-(CH₂)₆-(CH=CH)₄</td> </tr> <tr> <td>Mol 77</td> <td>R : Me-(CH₂)₄-(CH=CH)₂</td> </tr> <tr> <td>Mol 78</td> <td>R : CHO-(CH=CH)₂</td> </tr> <tr> <td>Mol 79</td> <td>R : CHO-(CH=CH)₃</td> </tr> </table> | Mol 75 | R : Me-(CH ₂) ₈ -(CH=CH) ₃ | Mol 76 | R : Me-(CH ₂) ₆ -(CH=CH) ₄ | Mol 77 | R : Me-(CH ₂) ₄ -(CH=CH) ₂ | Mol 78 | R : CHO-(CH=CH) ₂ | Mol 79 | R : CHO-(CH=CH) ₃ | |
| Mol 75 | R : Me-(CH ₂) ₈ -(CH=CH) ₃ | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 76 | R : Me-(CH ₂) ₆ -(CH=CH) ₄ | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 77 | R : Me-(CH ₂) ₄ -(CH=CH) ₂ | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 78 | R : CHO-(CH=CH) ₂ | | | | | | | | | | | | | | |
| Mol 79 | R : CHO-(CH=CH) ₃ | | | | | | | | | | | | | | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | |
|--------|--|-------------------|---|--|---|--------|--|
| 80 | Facteur A6 (Toxicité) | $C_{36}H_{49}O_9$ | 625,77 |  | Latex [46] | | |
| 81 | Facteur A7 (Toxicité) | $C_{36}H_{47}O_9$ | 623,75 | | | | |
| | | | <table border="1"> <tr> <td>Mol 80</td> <td>R : Me-(CH₂)₈-(CH=CH)₃</td> </tr> <tr> <td>Mol 81</td> <td>R : Me-(CH₂)₆-(CH=CH)₄</td> </tr> </table> | | | Mol 80 | R : Me-(CH ₂) ₈ -(CH=CH) ₃ |
| Mol 80 | R : Me-(CH ₂) ₈ -(CH=CH) ₃ | | | | | | |
| Mol 81 | R : Me-(CH ₂) ₆ -(CH=CH) ₄ | | | | | | |

L'origine de la toxicité de ces molécules sera développée dans la partie IV : toxicité.

7) Les tiglianes

Les tiglianes, comme énoncé précédemment, sont des molécules présentant un caractère irritant voire cancérigène.

Ce sont des esters dérivés de diterpènes tétracycliques présentant des fonctions alcools.

Le squelette de base des tiglianes est le suivant (Figure 28) :

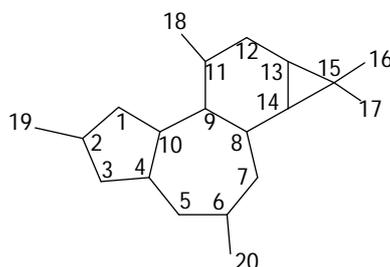
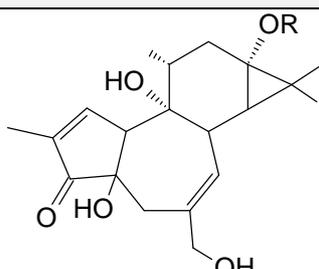
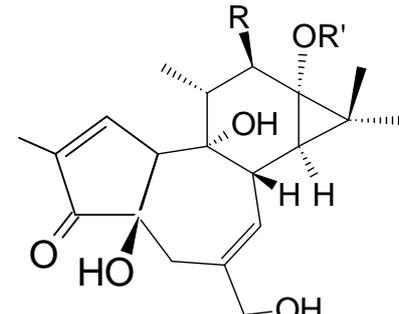


Figure 28 : Squelette de base des tiglianes

L'ensemble des diterpènes tiglianes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Tiglianes isolés d'*Excoecaria agallocha*

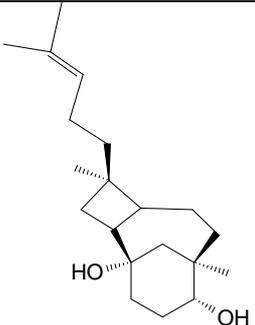
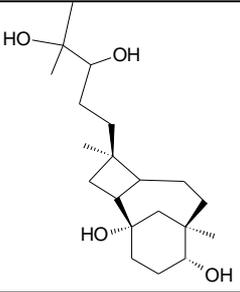
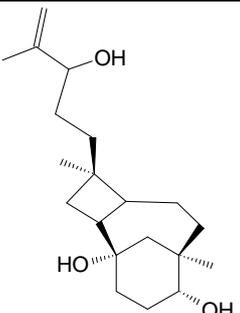
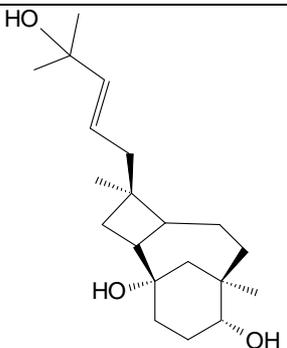
| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | |
|--------|---|---|-----------------------|---|---|---|--------|---|
| 82 | Facteur A8 (Toxicité) | C ₃₄ H ₄₉ O ₆ | 533,75 |  | Latex [46] | | | |
| 83 | Facteur A9 (Toxicité) | C ₃₆ H ₅₁ O ₆ | 579,78 | | | <table border="1"> <tr> <td>Mol 82</td> <td>R : Me-(CH₂)₇-(CH=CH)₂-CH₂-</td> </tr> <tr> <td>Mol 83</td> <td>R : Me-(CH₂)₇-(CH=CH)₃-CH₂-</td> </tr> </table> | Mol 82 | R : Me-(CH ₂) ₇ -(CH=CH) ₂ -CH ₂ - |
| Mol 82 | R : Me-(CH ₂) ₇ -(CH=CH) ₂ -CH ₂ - | | | | | | | |
| Mol 83 | R : Me-(CH ₂) ₇ -(CH=CH) ₃ -CH ₂ - | | | | | | | |
| 84 | ester-12-desoxyphorbol-13-(3E,5E-decadienoate) | C ₃₁ H ₄₃ O ₆ | 511,67 |  | Tiges [47] | | | |
| | | | | <table border="1"> <tr> <td>Mol 84</td> <td>R : H</td> <td>R' : -CO-CH₂-(CH=CH)₂-CH₂CH₂CH₂CH₃</td> </tr> </table> | | Mol 84 | R : H | R' : -CO-CH ₂ -(CH=CH) ₂ -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ |
| Mol 84 | R : H | R' : -CO-CH ₂ -(CH=CH) ₂ -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ | | | | | | |

De même que pour la sous-famille des Daphnanes la toxicité de ces molécules sera développée dans la partie IV : Toxicité.

8) Autres diterpènes

L'ensemble des autres diterpènes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Autres diterpènes isolés d'*Excoecaria agallocha*

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|----|------------------------------------|-------------------|-----------------------|--|---|
| 85 | Excogallochaols A | $C_{20}H_{34}O_2$ | 306,48 |  | Tiges ou feuilles [48] |
| 86 | Excogallochaols B | $C_{20}H_{36}O_4$ | 340,50 |  | |
| 87 | Excogallochaols C | $C_{20}H_{34}O_3$ | 322,48 |  | Tiges ou feuilles [48] |
| 88 | Excogallochaols D | $C_{20}H_{34}O_4$ | 338,48 |  | |

Ces quatre molécules isolées par Ji-Dong-Wang et son équipe [48] a permis de mettre en évidence un nouveau squelette chimique totalement différent des molécules précédentes qui selon les recherches n'aurait été extrait que d'*Excoecaria agallocha*. Une telle différence de squelette peut laisser supposer que la voie de biosynthèse de ces diterpènes atypiques est différente de celle des diterpènes plus classiques présentés précédemment.

II. Les triterpènes

Les triterpènes sont des molécules pentacycliques. Ils dérivent de la condensation de six molécules d'isoprène avec une formule brute de $C_{30}H_{48}$.

Le squelette de base des triterpènes est le suivant (Figure 29) :

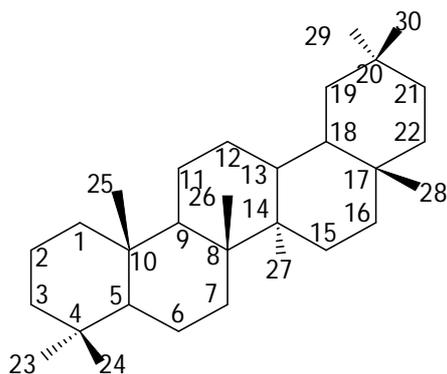
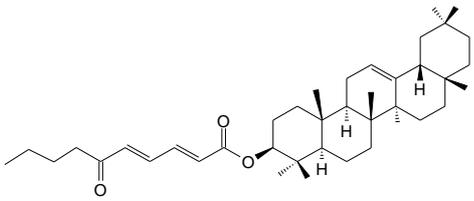
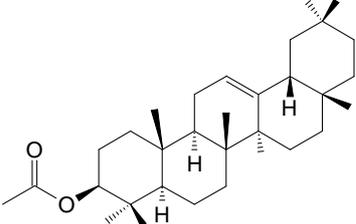
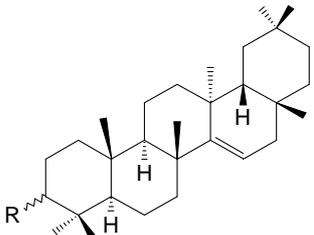
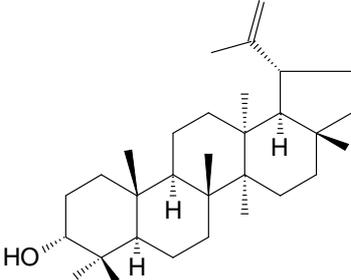
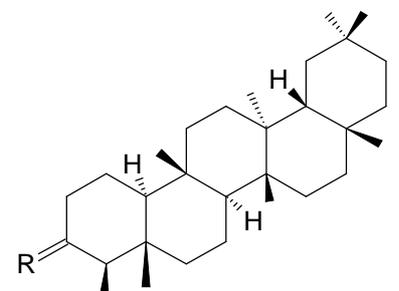
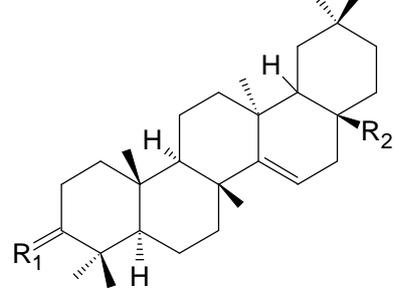
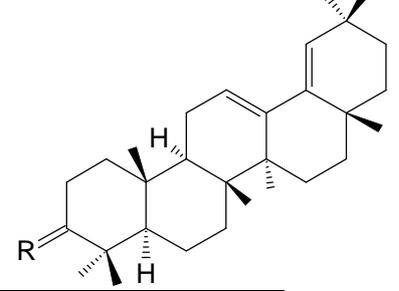
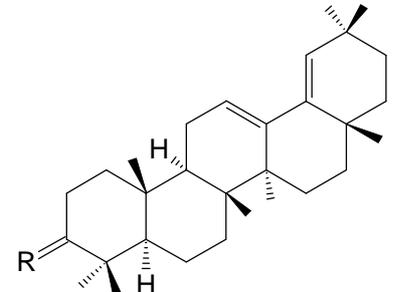


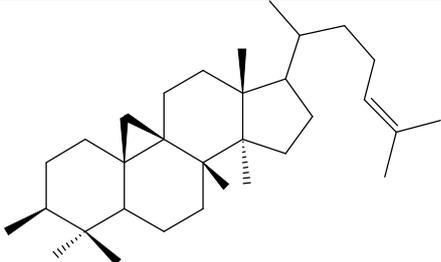
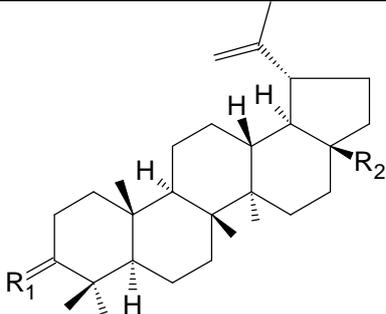
Figure 29 : Squelette de base des triterpènes

L'ensemble des triterpènes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Triterpènes isolés d'*Excoecaria agallocha*. (Nm : organe source non mentionné)

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | | | |
|--------|---|--|-----------------------|--|---|--------|-------|--------|----------|--------|----------|
| 89 | 3β-[(2E,4E)-5-oxo-decadienoyloxy]dean-12-ene | C ₄₀ H ₆₂ O ₃ | 590,92 |  | Nm [28] | | | | | | |
| 90 | β-amyrin acetate | C ₃₂ H ₅₂ O ₂ | 468,75 |  | | | | | | | |
| 91 | Taraxerone | C ₃₀ H ₄₉ O | 425,71 |  <table border="1" data-bbox="837 1265 1157 1400"> <tr> <td>Mol 91</td> <td>R : O</td> </tr> <tr> <td>Mol 92</td> <td>R : __OH</td> </tr> <tr> <td>Mol 93</td> <td>R : __OH</td> </tr> </table> | | Mol 91 | R : O | Mol 92 | R : __OH | Mol 93 | R : __OH |
| Mol 91 | R : O | | | | | | | | | | |
| Mol 92 | R : __OH | | | | | | | | | | |
| Mol 93 | R : __OH | | | | | | | | | | |
| 92 | 3-epitaraxerol | C ₃₀ H ₅₀ O | 426,72 | | | | | | | | |
| 93 | taraxerol | C ₃₀ H ₅₀ O | 426,72 | | | | | | | | |
| 94 | 3-epilupeol | C ₃₁ H ₅₂ O | 440,74 |  | | | | | | | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | | | |
|---------|---|--|-----------------------|---|---|--------------|-----------|------------|---------|------------|---------|
| 95 | Fridelin | C ₃₀ H ₅₀ O | 426,72 |  <table border="1" data-bbox="837 705 1157 828"> <tr> <td>Mol 95</td> <td>R : O</td> </tr> <tr> <td>Mol 96</td> <td>R : β-OH,H</td> </tr> <tr> <td>Mol 97</td> <td>R : α-OH,H</td> </tr> </table> | Mol 95 | R : O | Mol 96 | R : β-OH,H | Mol 97 | R : α-OH,H | Nm [28] |
| Mol 95 | R : O | | | | | | | | | | |
| Mol 96 | R : β-OH,H | | | | | | | | | | |
| Mol 97 | R : α-OH,H | | | | | | | | | | |
| 96 | Fridelin3βol | C ₃₀ H ₅₀ O | 426,72 | | | | | | | | |
| 97 | Fridelin3αol | C ₃₀ H ₅₂ O | 426,72 | | | | | | | | |
| 98 | 3β-acetoxy-taraxer-14-en-28-oic acid | C ₃₂ H ₅₀ O ₃ | 482,74 |  <table border="1" data-bbox="837 1153 1316 1187"> <tr> <td>Mol 98</td> <td>R1 : β-Oac,H</td> <td>R2 : COOH</td> </tr> </table> | Mol 98 | R1 : β-Oac,H | R2 : COOH | | | | |
| Mol 98 | R1 : β-Oac,H | R2 : COOH | | | | | | | | | |
| 99 | β-amyrin | C ₂₉ H ₄₇ O | 438,89 |  <table border="1" data-bbox="837 1500 1157 1534"> <tr> <td>Mol 99</td> <td>R : β-OH, H</td> </tr> </table> | Mol 99 | R : β-OH, H | | | | | |
| Mol 99 | R : β-OH, H | | | | | | | | | | |
| 100 | β-amyrin acetate | C ₃₂ H ₅₀ O | 450,74 |  <table border="1" data-bbox="837 1859 1173 1982"> <tr> <td>Mol 100</td> <td>R : β-AcO,H</td> </tr> <tr> <td>Mol 101</td> <td>R : O</td> </tr> <tr> <td>Mol 102</td> <td>R : α-OH,H</td> </tr> </table> | Mol 100 | R : β-AcO,H | Mol 101 | R : O | Mol 102 | R : α-OH,H | |
| Mol 100 | R : β-AcO,H | | | | | | | | | | |
| Mol 101 | R : O | | | | | | | | | | |
| Mol 102 | R : α-OH,H | | | | | | | | | | |
| 101 | β-amyrone | C ₃₀ H ₄₆ O | 422,68 | | | | | | | | |
| 102 | epiβ-amyrin | C ₃₀ H ₄₈ O | 424,70 | | | | | | | | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source | | | | | |
|---------|---------------------------------------|--|-----------------------|--|---|---------|-------------|------------|---------|--------|
| 103 | Cycloartenol | C ₃₂ H ₅₄ | 438,77 |  | Nm [28] | | | | | |
| 104 | 3,28-dihydroxylopeol | C ₃₀ H ₅₁ O ₂ | 443,72 |  | | | | | | |
| 105 | 28-hydroxylup-20-(29)-en-3-one | C ₃₀ H ₄₈ O ₂ | 440,70 | <table border="1"> <tr> <td>Mol 104</td> <td>R1 : β-OH,H</td> <td>R2 : CH2OH</td> </tr> <tr> <td>Mol 105</td> <td>R1 : O</td> <td>R2 : CH2OH</td> </tr> </table> | | Mol 104 | R1 : β-OH,H | R2 : CH2OH | Mol 105 | R1 : O |
| Mol 104 | R1 : β-OH,H | R2 : CH2OH | | | | | | | | |
| Mol 105 | R1 : O | R2 : CH2OH | | | | | | | | |

Les triterpènes sont des molécules dont le poids molaire est plus important que les molécules précédentes. Les sources bibliographiques ne permettent pas de déterminer les organes sources pour cette famille chimique ainsi que si des études pharmacologiques ont été effectuées suite aux extractions.

III. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont, pour certains, responsables de la coloration des fleurs dont le pouvoir attracteur conditionne la pollinisation entomophile.

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et possèdent le même élément structural de base : l'enchaînement 2-phénylchromane. Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central.

De plus, les molécules sont substituées le plus fréquemment par trois hydroxyles phénoliques en C5, C7 et C4' de la génine, mais l'un d'entre eux peut être absent.

Les molécules les plus présentes dans cette famille sont les flavones et les flavanols (Figure 30). Elles peuvent être engagées en C3 ou C7 par une liaison hétérosidique. La partie osidique mono ou disaccharidique est le plus souvent formée par du D-glucose, D-galactose, D-allose, des pentoses ou des acides D-glucuroniques ou D-galacturoniques.

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces se concentrent majoritairement dans l'épiderme des feuilles, ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle (partie interne d'une feuille). [49]

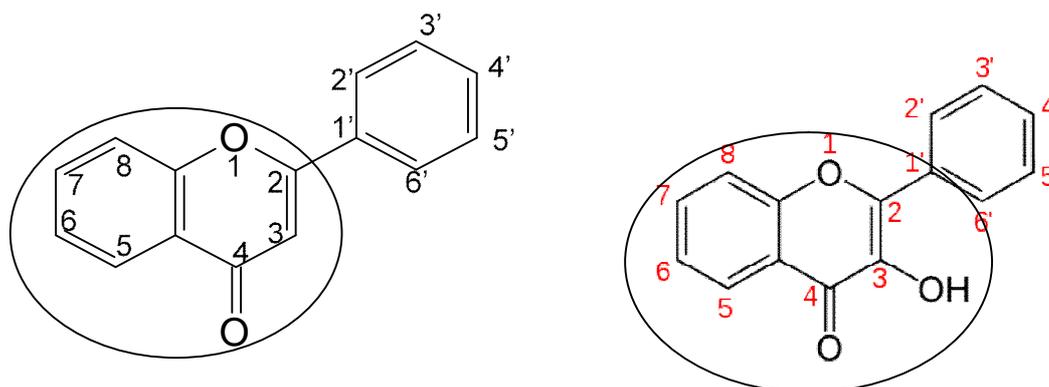
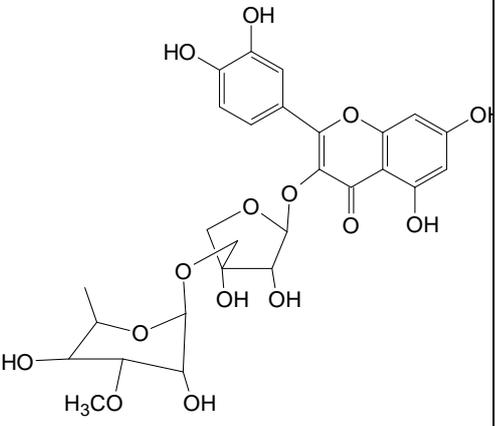
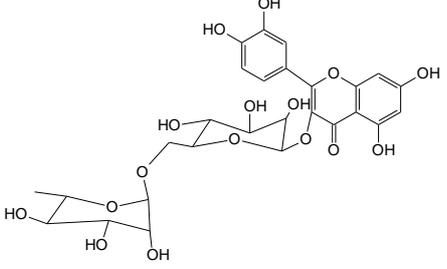
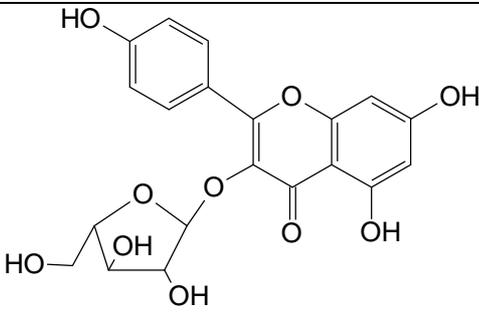
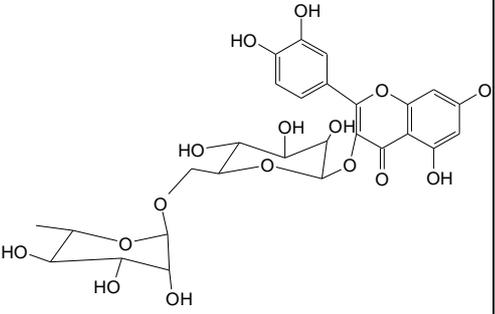


Figure 30 : a) Squelette de base d'un flavone ; b) Squelette de base d'un flavanol

L'ensemble des flavonoïdes isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Flavonoïdes isolés d'*Excoecaria agallocha*

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|-----|---|----------------------|-----------------------|----------------------|---|
| 106 | - (testée pour une activité cytotoxique) | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 448,38 | | Feuilles [50] |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|-----|---|----------------------|-----------------------|--|---|
| 107 | - (testée pour une activité cytotoxique) | $C_{27}H_{30}O_{15}$ | 594,52 |  | Feuilles [50] |
| 108 | Afzeline | $C_{21}H_{20}O_{10}$ | 432,38 |  | |
| 109 | Quercitrine | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 448,38 |  | |
| 110 | Rutine | $C_{27}H_{30}O_{16}$ | 610,52 |  | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|-----|---|----------------------|-----------------------|----------------------|---|
| 111 | Kaempferol-3-O-(2-O-acetyl-α-L-rhamnopyranoside) | $C_{23}H_{22}O_{11}$ | 474,41 | | Feuilles [50] |
| 112 | Kaempferide-3-O-α-L-rhamnopyranoside | $C_{22}H_{22}O_{10}$ | 446,40 | | |
| 113 | Kaempferol-3-O-α-L-arabinofuranoside (Testée pour une activité cytotoxique) | $C_{20}H_{18}O_{10}$ | 418,35 | | Tiges [40] |
| 114 | 3,5,7,3',5'-pentahydroxy-2R,3R-flavononol 3-O-α-L-rhamnopyranoside | $C_{21}H_{22}O_{11}$ | 450,39 | | |

Les flavonoïdes ont un poids molaire comparable aux triterpènes précédemment présentés. Ils sont retrouvés dans les feuilles d'*Excoecaria agallocha* à l'exception d'un composé qui a été isolé à partir de tiges. Ce sont tous des hétérosides flavonoïques mono ou disaccharidiques engagés en C3.

Les molécules 106 à 113 ont été testées par l'équipe de Rifai et al [50] pour une potentielle activité sur l'inhibition de la voie Hedgehog qui est une voie de régulation de la croissance cellulaire. Une activation inappropriée de cette voie de signalisation est impliquée dans le développement de cancers. Cette étude sera développée dans la partie III « Pharmacologie ».

IV. Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques (polyphénols) avec une masse moléculaire pouvant être bien supérieure à la majorité des molécules. [51] En 1987 Mole et Waterman ont défini les tanins comme des « produits naturels phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses ». [49]

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes de tanins différents par leurs structures : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. [52][49]

Les tanins hydrolysables sont composés d'esters d'un sucre (le plus fréquemment le glucose) ou d'un polyol apparenté et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol tel que l'acide gallique (Figure 31). Pour appartenir à la famille des tanins ces molécules doivent renfermer au minimum trois unités d'acide gallique.

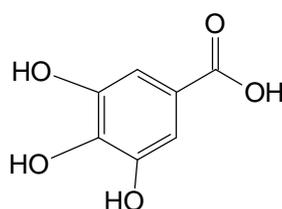


Figure 31 : Molécule d'acide gallique

Les tanins condensés sont des polymères flavaniques constitués d'une unité flavan-3-ol aussi appelée catéchol (Figure 32). Pour appartenir à la famille des tanins un minimum de deux unités de flavan-3-ol est nécessaire.

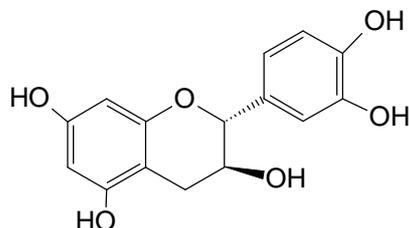


Figure 32 : Molécule de flavan-3-ol : catéchol.

L'ensemble des tanins isolés d'*Excoecaria agallocha* sont présentés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Tanins isolés d'*Excoecaria agallocha*. (Nm : organe source non mentionné)

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|-----|--|----------------------|-----------------------|----------------------|---|
| 115 | Excoecariphenol C | $C_{37}H_{30}O_{24}$ | 858,62 | | |
| 116 | Excoecariphenol D (Etude du potentiel d'inhibition des mécanismes impliqués dans l'Hépatite C) | $C_{46}H_{36}O_{31}$ | 1084,76 | | Nm [53] |

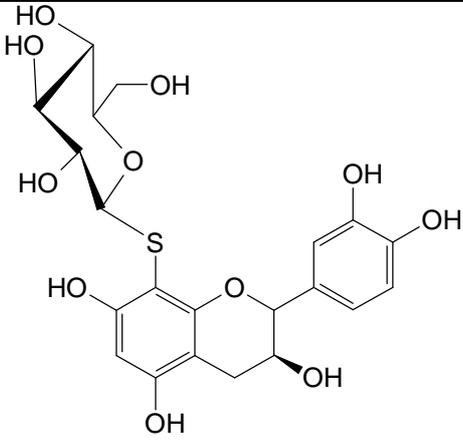
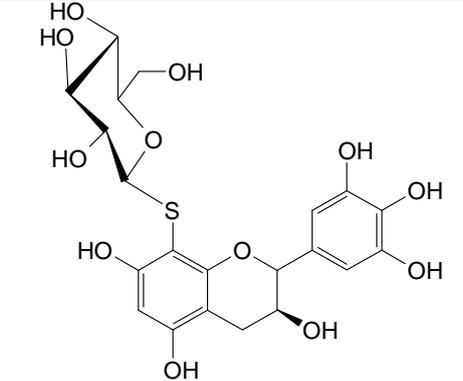
Les tanins retrouvés à ce jour chez *Excoecaria agallocha* appartiennent tous aux tanins hydrolysables mais nous ne pouvons pas affirmer que cet arbre ne possède pas de tanins condensés. Les études recherchant des tanins condensés n'ont peut-être pas encore été menées.

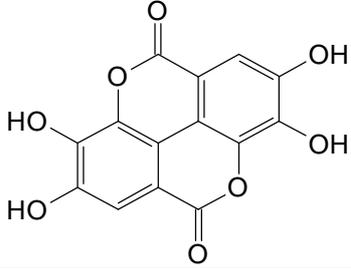
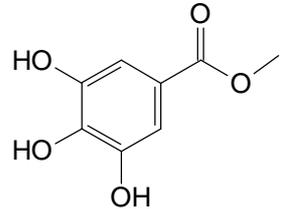
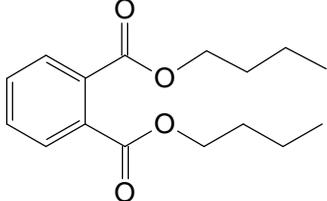
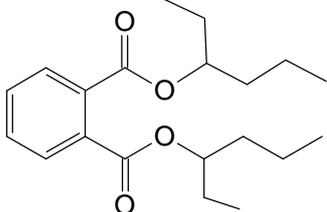
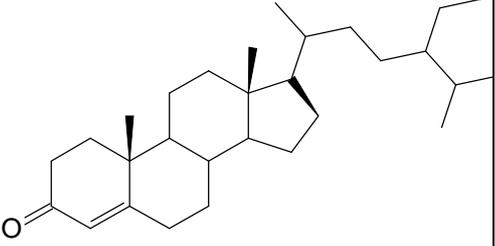
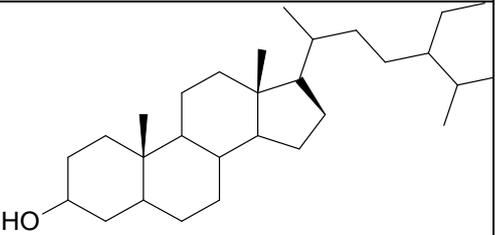
Une étude menée par Yongxin Li et son équipe a testé ces quatre polyphénols pour une potentielle activité in vitro dans l'inhibition de systèmes impliqués dans le mécanisme de l'hépatite C. [53]

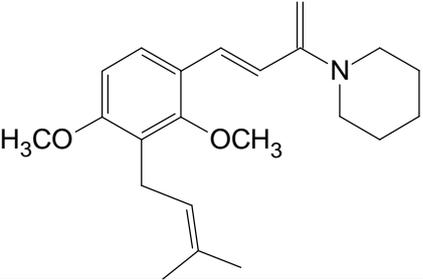
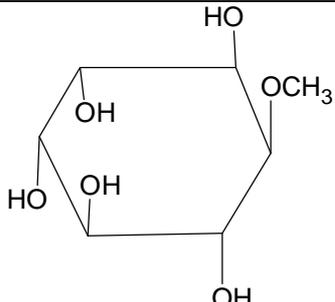
V. Autres

L'ensemble des autres molécules isolées d'*Excoecaria agallocha* sont présentées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Autres molécules isolées d'*Excoecaria agallocha*. (Nm : organe source non mentionné)

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|-----|--|---------------------------|-----------------------|--|---|
| 117 | Excoecariphenol A (polyphénol) | $C_{21}H_{24}O_{11}$ S | 484,47 |  | Nm |
| 118 | Excoecariphenol B (polyphénol) | $C_{21}H_{24}O_{12}$ S | 500,47 |  | [53] |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|-----|------------------------------------|-------------------|-----------------------|--|---|
| 119 | Acide ellagique | $C_{14}H_6O_8$ | 302,19 |  | Nm [28] |
| 120 | Acide behenique | $C_{22}H_{44}O_2$ | 340,58 | Me-(CH ₂) ₂₀ -COOH | |
| 121 | Methylgallate | $C_8H_8O_5$ | 184,15 |  | |
| 122 | Dibutyl phtalate | $C_{16}H_{24}O_4$ | 280,36 |  | |
| 123 | Diethylhexyl phtalate | $C_{20}H_{30}O_4$ | 334,45 |  | |
| 124 | Stigmast-4-en-3-one | $C_{29}H_{48}O$ | 412,69 |  | |
| 125 | β-Sitnosterol | $C_{29}H_{52}O$ | 416,72 |  | |

| N° | Nom commun et activité potentielle | Formule brute | Masse molaire (g/mol) | Formules développées | Source bibliographique et organe source |
|-----|--|-------------------|-----------------------|--|---|
| 126 | (E)-2,4-dimethoxy-3-(ψ,ψ-dimethylalkyl)cinnamoylpiperide | $C_{22}H_{31}O_2$ | 327,48 |  | Nm [28] |
| 127 | Quebrachitol | $C_7H_{14}O_6$ | 194,18 |  | |

Ainsi, à l'heure actuelle, plus d'une centaine de molécules ont été isolées d'*Excoecaria agallocha*. L'ensemble des molécules présentées ci-dessus ont été extraites de divers organes/sécrétions d'*Excoecaria agallocha* : bois, tiges, feuilles, racines, écorces et latex. La majorité d'entre elles ont été retrouvées dans le bois (surtout pour les labdanes), dans les feuilles ou les tiges. Cela peut s'expliquer par le fait que les chercheurs se sont concentrés sur une structure végétale particulière pour leurs études en choisissant de préférence le bois, les feuilles et les tiges. Mais une multitude de molécules ne signifie pas qu'elles seront plus intéressantes du point de vue pharmacologique. Le latex renferme peu de molécules mais celles-ci possèdent une forte toxicité caractéristique de cet arbre.

De futures études sur cette plante mettront peut être en évidence encore de nombreuses molécules qui la composent.

Une grande partie des molécules découvertes appartient à la famille des diterpènes qui peuvent être intéressantes du point de vue pharmacologique. Du fait de sa grande utilisation ancestrale ainsi que la méconnaissance des arbres de mangroves, les chercheurs ont espoir de découvrir une molécule pharmacologiquement active extraite de cette plante.

Partie III : ETUDE PHARMACOLOGIQUE

Les plantes sont les piliers du système de la médecine traditionnelle. Le plus ancien témoignage date de 2600 avant Jésus-Christ en Mésopotamie qui informe, avec peu de détail, sur l'usage de cent substances dérivées de plantes. [54]

Les produits naturels présentent une complexité et une diversité moléculaire exceptionnelle mais la flore reste à ce jour à peine exploitée. Malgré des recherches intensives parmi les 300.000 espèces végétales existant sur Terre (parfois estimées jusqu'à 500.000) seules 6% des plantes supérieures ont été examinées pharmacologiquement et seulement 15 % investiguées phytochimiquement. [55]

A ce jour, les molécules naturelles non modifiées issues de la flore qui ont été approuvées comme médicament sont peu importantes : 5 sur 1355 recensées durant les 30 dernières années. Les molécules synthétiques totalement développées en laboratoire représentent 29 %. Mais les molécules naturelles sont toujours utiles aux recherches et le seront toujours comme sources de nouvelles structures de bases. Elles seront modifiées en laboratoire pour optimiser leur action par hémisynthèse. Ces molécules naturelles modifiées représentent 22 % des molécules découvertes voire 28 % si l'on inclut les molécules de synthèse qui utilisent un pharmacophore d'origine naturelle. [55]

L'approche naturelle et l'approche synthétique de recherche de nouvelles molécules doivent être considérées comme complémentaires et non opposées.

Pour axer les recherches et sélectionner les plantes pouvant relever un intérêt dans la recherche de molécules présentant un potentiel intérêt pharmacologique, deux principales approches peuvent être menées par les chercheurs : la première est l'approche ethnobotanique qui étudie les utilisations ancestrales des plantes par les populations locales; la seconde est l'approche chimiotaxonomique qui permet de sélectionner les plantes appartenant à une famille botanique connue pour leur production de certains composés d'une classe chimique particulière.

Excoecaria agallocha a, dans tous les pays d'Asie du Sud-Est, des utilisations ancestrales pour des problèmes de santé divers. [29] Aux Philippines, le latex est utilisé comme caustique dans les ulcères coriaces. L'huile extraite du bois ou du latex est appliquée sur la peau lors de maladies dermatologiques. Mâcher un petit morceau d'écorce provoque vomissement et purge, cela est utilisé pour des cures drastiques lors de constipation. Le mélange de racine pillée avec du gingembre peut servir, sous forme d'une préparation huileuse, à réduire la transpiration excessive des mains et des pieds. [29]

Dans la Province Centrale, de très faibles portions de jus mélangé à du jus de noix de coco sont prises pour traiter l'asthme et la pneumonie. Une décoction de feuilles est utilisée pour traiter l'épilepsie, elle peut aussi être appliquée à l'extérieur des ulcères.

En Thaïlande, de par son effet purgatif, la résine est utilisée comme anti-helminthique.

Dans la région de Milne Bay et en Nouvelle Guinée les racines sont utilisées comme abortif. [29]

Ces utilisations ancestrales permettent de suggérer la présence de molécules bioactives pouvant potentiellement présenter un intérêt futur en thérapeutique, et permettent de justifier les travaux de recherche sur cette plante. Aussi, l'étude de sa composition chimique a été initiée et a mis en évidence la présence, dans des extraits de cette plante, de diterpènes (cf partie précédente).

I. Les mangroves en tant que nouvelles sources de molécules potentiellement valorisables en thérapeutiques

1) Des recherches nouvelles et innovantes

La mangrove occupe une superficie entre 12 et 20 millions de km² avec un minimum de 54 espèces [1]. C'est l'écosystème le plus productif au niveau mondial et le support génétique de diverses communautés de faunes et flores terrestres et aquatiques. [56] A ce jour, les données ethnobotaniques sur les usages médicaux des mangroves sont très limitées mais il est tout de même décrit des utilisations ancestrales pour la majorité d'entre elles.

Leurs capacités à se développer dans un milieu aussi hostile que l'eau salée peut laisser supposer que les mangroves possèdent des mécanismes de défenses spécifiques qui pourraient être à l'origine de molécules aux activités biologiques intéressantes pour la recherche médicale.

Très peu d'expérimentations contrôlées ont été menées pour prouver la véracité de ces informations. Les recherches sur les composés chimiques présents dans les mangroves en sont à leurs débuts.

Néanmoins, des travaux de recherche de nouveaux composés ont été menés sur certaines espèces de mangroves [56] [57] [58]. Mais un faible nombre de ces études portent sur la caractérisation des molécules responsables de l'activité décrite pour les extraits.

Connaître les molécules qui composent ces plantes et leurs activités biologiques est important, non seulement pour découvrir des nouveaux composés potentiellement

valorisables en thérapeutique mais aussi pour mettre en lumière de nouvelles sources de composés biologiquement actifs.

2) Propriétés pharmacologiques des mangroves déjà étudiées

Parmi les travaux de recherche sur des espèces de mangroves et les résultats des évaluations de l'activité biologique réalisées *in vitro*, nous pouvons citer ceux-ci : l'espèce *Calophyllum inophyllum* possède deux molécules ayant un fort potentiel inhibiteur de la reverse transcriptase du VIH-1 [57] : inophyllum B et P. Une saponine triterpénoïde isolée de *Acanthus ilicifolius* a révélé des propriétés anti-leucémiques.[58] Un autre composé isolé de cette même espèce, un dérivé sucré de la 2-benzoxazoline a montré des propriétés antitumorales et antivirales [59]. Dans cette même plante a été extraite la 2- benzoxalinone qui présente une activité contre la leishmaniose comparable à celle de médicaments présents sur le marché.[60] L'extrait d'écorce de *Brigueira sexangula* a été reconnu actif contre deux tumeurs : le sarcome 180 et le carcinome du poumon Lewis. Il a aussi été isolé des feuilles de *Clerodendrum inerme* deux protéines antivirales, qui interfèrent avec la réplication virale.[61] Le 1,2-dithioane (Brugine) extrait de *Bruguiera sexangula* a montré une activité antitumorale contre le sarcome 180 et de Lewis.

Même si de nombreux travaux sont relatés dans la littérature, aucune molécule extraite de mangrove n'a à ce jour été développée et commercialisée.

II. Propriétés pharmacologiques d'*Excoecaria agallocha*

Les travaux de recherches de molécules bioactives originales sur *Excoecaria agallocha* ont été effectués selon deux stratégies. La première est l'approche par fractionnement bioguidé : les extraits bruts sont testés sur différents modèles *in vitro* afin de mettre en évidence une potentielle activité biologique *in vitro*. Si une réponse positive est observée, les extraits bioactifs sont fractionnés et les fractions obtenues sont testées sur le(s) même(s) modèle(s) biologiques. Cette étape de fractionnement est répétée, jusqu'à l'obtention de la (ou des) molécule(s) pure(s) responsable(s) de l'activité observée. Malheureusement la majorité des études publiées à ce jour s'arrêtent à la phase initiale avec l'évaluation de l'activité biologique des extraits bruts. La seconde méthodologie utilisée par les chercheurs est l'isolement systématique dans un premier temps de toutes les molécules

d'un extrait (ou les molécules appartenant à une famille chimique particulière) puis l'évaluation de leur activité biologique in vitro.

1) Etude de l'activité cytotoxique d'un extrait de tiges sur des cellules du cancer du pancréas [62]

Le cancer du pancréas est l'un des cancers les plus virulents avec plus de 10 000 nouveaux cas par an en France.[63] Les traitements de chimiothérapie et de radiothérapie n'ont qu'un effet minime sur ce cancer. La survie à 5 ans est de 8 %, ce qui signifie qu'une personne diagnostiquée d'un cancer du pancréas aurait, en moyenne, 8 % de chances de vivre 5 ans (ou plus) à la suite de son diagnostic comparativement à une personne dans la population générale qui n'est pas atteinte de cancer. [64]

Lors de l'ablation de la tumeur, la survie relative post-chirurgie à 5 ans est de 20%.[64]

Il est donc nécessaire de continuer les recherches dans le but de trouver de nouvelles stratégies de traitement pour ce cancer.

1.1) Recherche de l'extrait au potentiel pharmacologique.

L'intérêt de cette étude est de déterminer le potentiel d'un extrait de tige d'*Excoecaria agallocha*. Les jeunes tiges récoltées à côté de Ratnagiri (latitude 17,072 / longitude 73,668) ont été séchées et broyées. La poudre obtenue a ensuite été extraite à l'éthanol puis celui-ci a été évaporé.

L'extrait brut a ensuite été de nouveau extrait par différents solvants, du moins polaire au plus polaire (éther, chloroforme, benzène, acétate d'éthyle, acétone, éthanol et méthanol). A chaque extraction, des étapes de centrifugation et filtration ont été réalisées afin de récupérer les fractions respectives.

Les activités antibactériennes et antifongiques de celles-ci ont ensuite été testées sur un panel de sept agents pathogènes : cinq bactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*) et deux champignons (*Aspergillus fischeri* et *Candida albicans*).

Les résultats de cette étude qui ne sont pas détaillés ont montré que les extraits apolaires tels que les extraits éther ou chloroforme n'ont aucun effet sur le développement des bactéries ou des champignons. Seuls les extraits polaires, et notamment l'extrait

éthanolique, ont présenté une activité antibactérienne et/ou antifongique. La fraction la plus active a ensuite été testée sur des lignées cellulaires tumorales pancréatiques.

1.2) Modèle biologique

Différentes lignées cellulaires tumorales d'origine humaine ont été utilisées afin d'évaluer l'activité antiproliférative de la fraction éthanolique :

- Miapaca-2 : cellules issues d'un carcinome pancréatique ; **ATCC® CRL-1420™**
- PANC-1 : cellules issues d'un carcinome des cellules du conduit pancréatique ; **ATCC® CRL-1469™**
- Capan-1 : cellules issues d'un adénocarcinome pancréatique ; **ATCC® HTB-79™**
- BxPC-3 : cellules issues d'un adénocarcinome pancréatique ; **ATCC® CRL-1687™**

Les lignées cellulaires ont étéensemencées à une densité de 3×10^4 cellules / puits sur une plaque de 96 puits. Chaque lignée cellulaire a été mise en contact avec l'extrait éthanolique à des concentrations de 1 à 100 $\mu\text{g/ml}$ pendant 48h. Chaque concentration a été testée en triple.

La viabilité cellulaire des lignées a été déterminée au bout de 48h d'incubation par une méthode colorimétrique utilisant un sel de tétrazolium (MTS : [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]). Ce composé de couleur jaune, se transforme en un composé pourpre, le formazan, par métabolisation par des enzymes mitochondriales chez des cellules dont le métabolisme est actif. La mesure se fait par la mesure de l'absorbance à 490 nm, la longueur d'onde du pourpre.

Le contrôle positif a consisté en du Flavopiridol, molécule qui inhibe les phosphokinases, bloquant ainsi le cycle cellulaire. Le contrôle négatif est composé du milieu de culture neutre.

Il est à noter que l'éthanol, utilisé comme solvant, n'a pas été testé (ou les résultats n'ont pas été montrés) pour déterminer sa non toxicité/activité envers les lignées cellulaires.

1.3) Résultats de l'activité cytotoxique des différents extraits de plante :

Tableau 21 : Activité cytotoxique de la fraction éthanolique de l'extrait d'éthanol à différentes concentrations d'*Excoecaria agallocha* sur des lignées de cellules cancéreuses pancréatiques humaines après 48 h de mise en contact. [62]

| Concentrations des extraits (µg/ml) | % d'inhibition de la croissance | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|-----------|--------|--------|
| | Lignées cellulaires | | | |
| | Capan-1 | Miapaca-2 | PANC-1 | BxPC-3 |
| 1 | 0 | 8 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 19 | 0 | 0 |
| 10 | 58 | 59 | 0 | 0 |
| 30 | 73 | 73 | 0 | 0 |
| 100 | 81 | 79 | 35 | 36 |

Tableau 22 : Valeurs de CI_{50} de la fraction éthanolique de l'extrait d'éthanol d'*Excoecaria agallocha* sur des lignées de cellules cancéreuses pancréatiques humaines. [62]

| Lignées cellulaires | Moyennes de la CI_{50} (µg/ml) ($P < 0.005$) | |
|---------------------|--|--------------|
| | Extrait éthanolique d' <i>E. agallocha</i> | Flavopiridol |
| Capan-1 | 4 | 0,08 |
| Miapaca-2 | 7 | 0,04 |
| PANC-1 | > 100 | 0,03 |
| BxPC-3 | >100 | 0,11 |

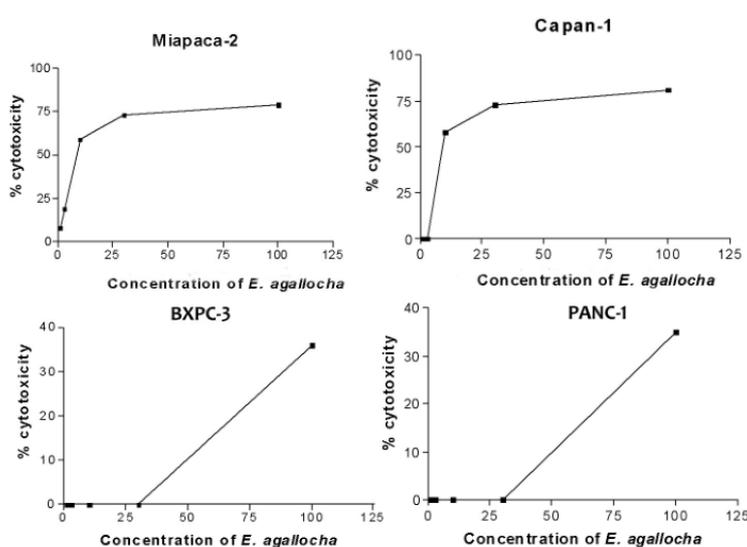


Figure 33 : Inhibition de la croissance induite par la fraction éthanolique de l'extrait d'éthanol d'*Excoecaria agallocha* sur des lignées de cellules cancéreuses pancréatiques humaines. [62]

Selon le Tableau 21, l'extrait éthanolique induit une diminution dose-dépendante de la prolifération cellulaire les lignées Miapaca-2 et Capan-1, avec un maximum d'inhibition respectivement de 79 et 81% à la plus forte concentration testée (100 µg/ml). Pour les deux autres lignées PANC-1 et BxPC-3 une diminution de la prolifération cellulaire n'est notée qu'à la plus forte concentration testée, avec 35 et 36% d'inhibition respectivement.

Ainsi, les lignées CAPAN-1/MIACAPA-2 et BxPC-3 / PANC-1 n'ont pas la même sensibilité envers l'extrait éthanolique. Pour les premières lignées, l'inhibition est très forte dès de faibles concentrations, avec une inhibition quasiment stabilisée à une concentration moyenne aux alentours de 30µg/mL. (Figure 33)

Contrairement à ces deux premières, pour les lignées BxPC-3 et PANC-1, aux concentrations testées seule la concentration de 100µg/mL induit une diminution de la prolifération cellulaire.

A une même concentration l'inhibition de la prolifération est supérieure sur les lignées CAPAN-1/MIACAPA-2.

Pour ces deux lignées la CI_{50} , qui est la concentration qui induit une inhibition de 50% de la prolifération cellulaire, est de 7µg/ml sur Miapaca-2 et de 4µg/ml sur Capan-1 (Tableau 22). Les lignes directrices de l'Institut National du Cancer (INC) considère qu'un extrait est « actif » si la CI_{50} est inférieure à 20µg/ml. [65] Les extraits utilisés peuvent donc être considérés comme actifs envers les lignées Capan-1 et Miapaca-2.

Le flavopiridol, utilisé comme témoin positif de l'expérience, présente des CI_{50} envers toutes les lignées bien plus faibles que l'extrait allant de 0.03 µg/mL pour PANC-1 à 0.11 µg/mL pour BxPC-3. Il possède donc un fort pouvoir cytotoxique. Cette importante cytotoxicité envers des lignées cancéreuses met en question son action envers des cellules saines.

La question se pose aussi logiquement pour l'extrait testé mais cette expérience ne teste pas l'extrait sur des lignées saines pancréatiques. Si les résultats de cette étude présentaient une cytotoxicité envers les lignées saines alors, bien que moins intéressant il serait tout de même utile de poursuivre les études pour déterminer LA molécule responsable de l'activité antiproliférative sur les lignées cancéreuses. L'extrait est un mélange très complexe de molécules et de ce fait cette molécule n'est peut-être pas la même que celle responsable de la toxicité envers les lignées saines.

L'équipe de RC Patil a, dans cette étude, permis de mettre en évidence une activité antiproliférative d'un extrait éthanolique de tiges d'*Excoecaria agallocha* sur deux lignées pancréatiques cancéreuses. Les prochaines étapes de leurs travaux sont de fractionner l'extrait pour isoler les molécules présentes et les tester selon le même protocole pour déterminer la ou les molécules responsables de l'activité et à quelles concentrations. Des tests de toxicité sur cellules saines devront être réalisés afin de comparer l'activité des molécules isolées sur cellules cancéreuses et sa cytotoxicité sur cellules saines (sélectivité de l'activité)

Il sera aussi intéressant de comprendre pourquoi l'extrait est actif sur deux lignées et inactif sur les deux autres. Quelles sont les points communs et les différences entre ces lignées. Cela donnerait un point de départ de la recherche sur le mécanisme d'action de la molécule active présente dans l'extrait.

2) Etude de l'activité cytotoxique d'un extrait de tiges vis-à-vis du cancer du poumon [66]

Le cancer du poumon est un des problèmes majeurs en termes de santé publique engendrant plus d'un 1,58 millions de décès en 2012 dans le monde.[67] C'est la principale cause de décès par cancer au niveau mondial.

Deux types de cancer du poumon sont reconnus : le cancer « à petites cellules » et le cancer « non à petites cellules ». Ce second type de cancer représente 80 % des cancers du poumon tout confondu.

Pour le cancer non à petites cellules la chimiothérapie n'intervient qu'en soutien de la chirurgie pour les stades peu avancés mais, pour les stades plus avancés elle devient le traitement de référence.

A ce jour, les principales molécules utilisées sont le cisplatine, le carboplatine, l'étoposide, le paclitaxel, le docétaxel, la gemcitabine, le vinorelbine et le pemetredex. [68]

L'étude suivante présente l'intérêt de la recherche de molécules anticancéreuses à visée des cancers non à petites cellules à partir d'*Excoecaria Agallocha*.

L'équipe de RC Patil a étudié la possible activité d'un extrait de tiges d'*Excoecaria agallocha* envers les cellules présentes dans les cancers du poumon non à petites cellules.

2.1) Extrait de plante et cellules utilisées

L'extrait utilisé est un extrait éthanolique de tiges d'*Excoecaria agallocha* collectées vers Ratnagiri. Il est utilisé à des concentrations de 1, 3, 10, 30 et 100 µg/ml. L'activité antiproliférative sur lignées cellulaires tumorales du poumon a été comparée à celle du flavopiridol, utilisé comme contrôle positif. La mise en contact des cellules avec l'extrait à différentes concentrations a été de 48h et la révélation des cellules vivantes a été faite comme dans l'étude précédente par la méthode colorimétrique au MTS. Les mesures d'absorbances permettent de déterminer le pourcentage de cellules vivantes ou mortes.

Les cellules humaines cancéreuses utilisées appartiennent à deux lignées distinctes qui se différencient par la présence ou l'absence de la Protéine 53 (P53). Cette protéine est un facteur de transcription qui, lors de son activation, met en action une chaîne réactionnelle provoquant l'apoptose de la cellule. Cette fonction permet de conserver les cellules viables et d'éliminer celles qui possèdent une anomalie. Lors des cancers cette protéine est majoritairement absente et de ce fait les cellules cancéreuses se multiplient très rapidement.

Lignées P53 +/+ : aussi appelées de « type sauvage » la protéine P53 est exprimée normalement.

- A549 : ATCC® CCL-185™
- H460 : ATCC® HTB-177™

Lignées P53 -/- : Le gène de P53 est muté, de ce fait P53 n'est pas exprimée.

- H1299 : ATCC® CRL-5803™
- H358 : ATCC® CRL-5807™

Ces quatre lignées sont des lignées de carcinomes non à petites cellules.

Une lignée de cellules saines de fibroblastes de poumon a également été utilisée : la lignée WI-38. Cela permet de vérifier si les molécules contenues dans l'extrait présentent une toxicité vis-à-vis de cellules saines.

2.2) Résultat de la cytotoxicité de l'extrait :

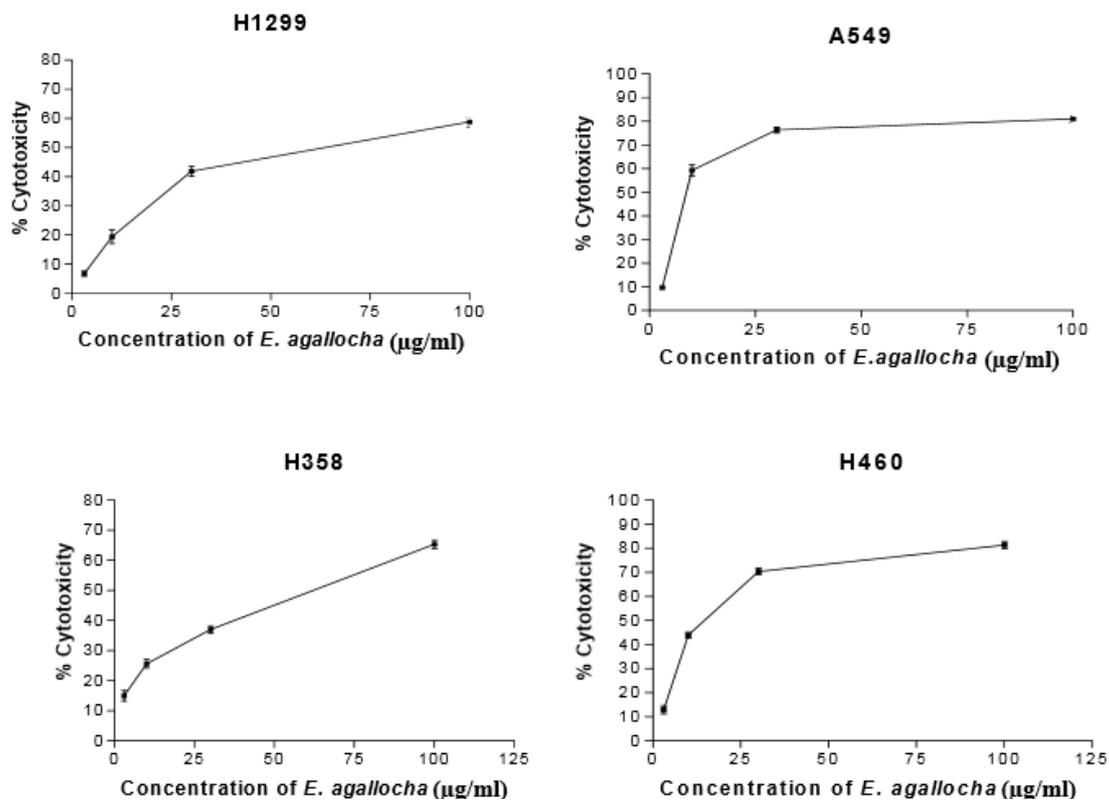


Figure 34 : Inhibition de la croissance de lignées de cellules cancéreuses pulmonaires humaines après 48h de mises en contact avec l'extrait d'*Excoecaria agallocha* à différentes concentrations. [66]

Tableau 23 : CI50 de l'extrait éthanolique d'*Excoecaria agallocha* sur des lignées de cellules cancéreuses pulmonaires humaines. [66]

| Lignées cellulaires | Moyenne des CI 50 (µg/ml) (P<0.001) | |
|---------------------|---|--------------|
| | Extrait éthanolique des tiges d' <i>E.agallocha</i> | Flavopiridol |
| A549 | 8 | 0,005 |
| H460 | 11 | 0,005 |
| H358 | 57 | 0,006 |
| H1299 | 62 | 0,006 |
| WI-38 | 100 | 0,006 |

Ces résultats montrent une activité cytotoxique ou antiproliférative de l'extrait importante sur A549 et H4600, celle-ci est moindre sur les lignées H358 et H1299 et très faible sur la lignée saine WI38.

Parmi les deux lignées P53 +/+ la lignée la plus sensible à l'extrait éthanolique est la lignée A549 avec une réduction de la viabilité des cellules de 81% à une concentration de 100 µg/ml (Figure 34). CI50 de 8 µg/mL

Pour les lignées P53+/+ la CI50 est atteinte pour une concentration d'extrait de 8µg/ml pour la lignée A549 et 11µg/ml pour la lignée H460. Pour les lignées P53-/- il faut atteindre une concentration supérieure à 50µg/ml pour obtenir le même niveau de cytotoxicité : respectivement 57µg/ml et 62µg/ml pour les lignées H358 et H1299. (Tableau 23)

Cela montre une sensibilité plus élevée des lignées P53 +/+ (A549 et H460) vis-à-vis de l'extrait d'*Excoecaria Agallocha* que les lignées P53-/- (H358 et H1299).

L'extrait présente une CI50 de 100 µg/mL sur la lignée saine de fibroblastes pulmonaires, WI-38 (Tableau 23). Grâce à ces résultats on peut déterminer le ratio « Toxicité / Activité » aussi appelé indice de sélectivité qui correspond à : « CI50 cellules saines » / « CI50 cellules tumorales ». L'intérêt est d'isoler des extraits ou molécules qui possèdent un indice de sélectivité élevée, à concentration égale l'extrait ou la molécule sont actifs et peu toxiques.

Les rapports Toxicité/Activité de l'extrait sont : pour la lignée A549 : $100/8 = 12.5$; pour la lignée H460 : $100/11=9.09$; pour la lignée H358 : $100/57=1.75$ et pour la lignée H1299 : $100/62=1.61$. Le rapport de sélectivité est le plus élevé pour la lignée A549.

Le Flavopiridol présente une cytotoxicité très importante, bien plus importante que celle de l'extrait d'*Excoecaria agallocha*, avec une CI50 de 0,05 µg/ml et 0.06 µg/mL. Le ratio « Toxicité/Activité » est de 1 (0.006/0.005) à 1,2 (0.006/0.005). Ce ratio met en évidence que bien que la cytotoxicité envers les cellules cancéreuses est présente dès des concentrations très faibles en flavopiridol la toxicité envers les cellules saines apparait aux mêmes concentrations.

Cette première expérience met en évidence une sensibilité des lignées cancéreuses vis-à-vis de l'extrait éthanolique d'*Excoecaria agallocha* ainsi qu'une cytotoxicité moindre sur les cellules saines.

Selon l'Institut National du Cancer l'extrait éthanolique est considéré comme actif pour les deux lignées P53+/+ puisque les CI50 sont inférieures à 20µg/ml.

2.3) Observation microscopique de l'effet de l'extrait sur la lignée A549 :

La lignée A549 (P53 +/+) a été mise en contact avec l'extrait à trois concentrations différentes (CI_{50} , $2CI_{50}$ et $3CI_{50}$). Un témoin négatif a été réalisé en parallèle. Chaque condition expérimentale a été photographiée au microscope à contraste de phase après 24h de traitement. (Figure 35)

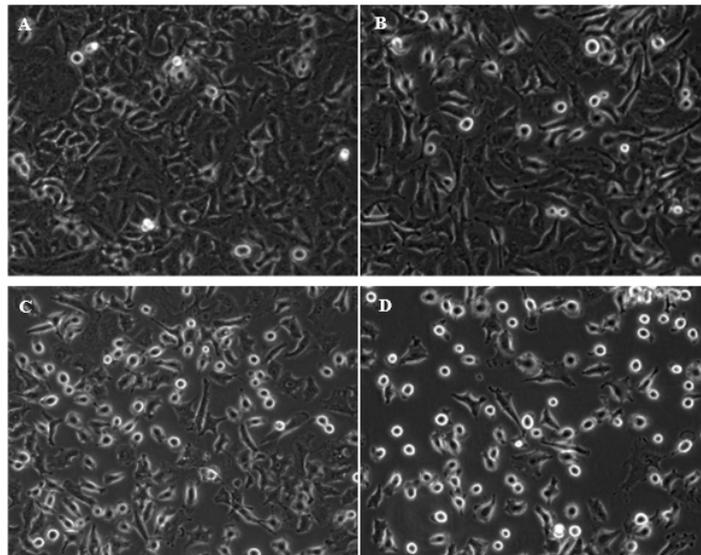


Figure 35 : Etude microscopique par contraste de phase des modifications morphologiques de cellules en contact avec des extraits d'*Excoecaria agallocha*. A : cellules non traitées (témoin négatif) ; B-D : Concentrations croissantes d'extraits d'*Excoecaria agallocha* respectivement CI_{50} , $2CI_{50}$ et $3CI_{50}$. [66]

D'après la Figure 35 le groupe contrôle de cellules (A) montre un ensemble de cellules typiques en monocouche. Les cellules mises en contact avec l'extrait d'*Excoecaria agallocha* (B, C et D) sont moins nombreuses, la diminution étant plus importante quand la concentration de l'extrait est augmentée. Elles présentent aussi des changements morphologiques : les cellules se sont arrondies avec une perte de leur adhérence. Le noyau ainsi que les membranes semblent se rétrécir et la chromatine apparaît plus brillante du fait de la condensation.

Ces observations microscopiques mettent en évidence une éventuelle action de l'extrait d'*Excoecaria agallocha* sur la morphologie cellulaire des cellules A549, au niveau des membranes ainsi qu'au niveau du noyau.

2.4) Mécanisme d'action de la cytotoxicité de l'extrait d'*Excoecaria agallocha*

Pour comprendre plus précisément le mécanisme d'action de la cytotoxicité les chercheurs ont cherché à savoir si les lignées se retrouvent en mort cellulaire par un processus d'apoptose ou par un arrêt de la progression du cycle cellulaire.

2.4.3) Effet de l'extrait d'*Excoecaria agallocha* sur le cycle cellulaire

Présentation du cycle cellulaire :

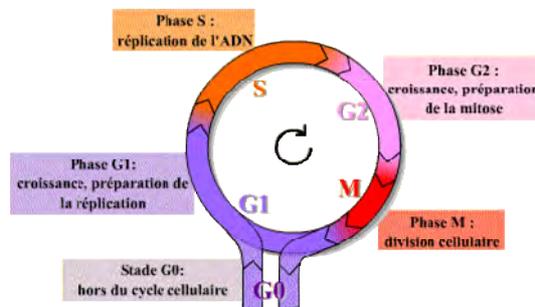


Figure 36 : Schéma du cycle cellulaire.

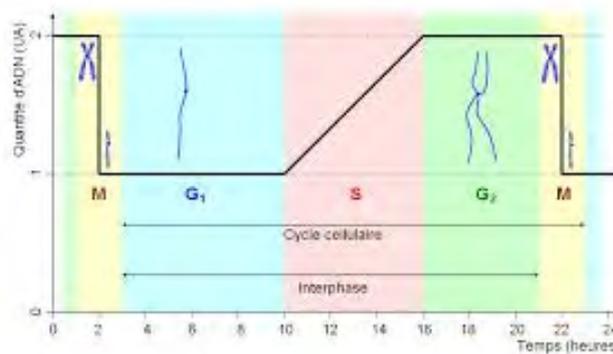


Figure 37 : Représentation de la quantité d'ADN d'une cellule en fonction des phases du cycle cellulaire.

Comme le présentent les Figure 36 et Figure 37, le cycle cellulaire est constitué de toutes les étapes qui permettent de passer d'une cellule mère à deux cellules filles possédant le même contenu génétique. Il intègre un cycle de croissance et un cycle de division permettant la prolifération cellulaire.

Il est composé de quatre phases G1 – S – G2 et M. [69] La phase G0 est hors du cycle cellulaire ; c'est la phase de repos de la cellule sans multiplication cellulaire.

Les étapes du cycle cellulaire :

- Phase G1 : cette phase est la plus longue et la plus variable du cycle. Durant cette phase la cellule se prépare à la phase S. Une fois passé le point de restriction, un point de non retour, les cellules sont irréversiblement engagées dans le cycle et l'entrée en division ne dépend plus de la présence ou non de facteurs mitogènes.
- Phase S : la phase S est la phase de réplication de l'ADN.
- Phase G2 : comme la phase G1 : phase d'intervalle où il n'y a pas de modification de la quantité d'ADN mais cette phase permet la préparation à la phase suivante.
- Phase M : phase de mitose où les chromosomes dédoublés sont répartis dans les deux cellules filles.

Pour déterminer un effet potentiel de l'extrait d'*Excoecaria agallocha* sur le cycle cellulaire, les chercheurs ont analysé les extraits par cytométrie de flux. Cette technique permet de déterminer la quantité de matériel génétique à différentes phases de cycle cellulaire. A chaque fois sont comparés un témoin et un extrait à une concentration de 2CI₅₀ après 24h de mise en contact.

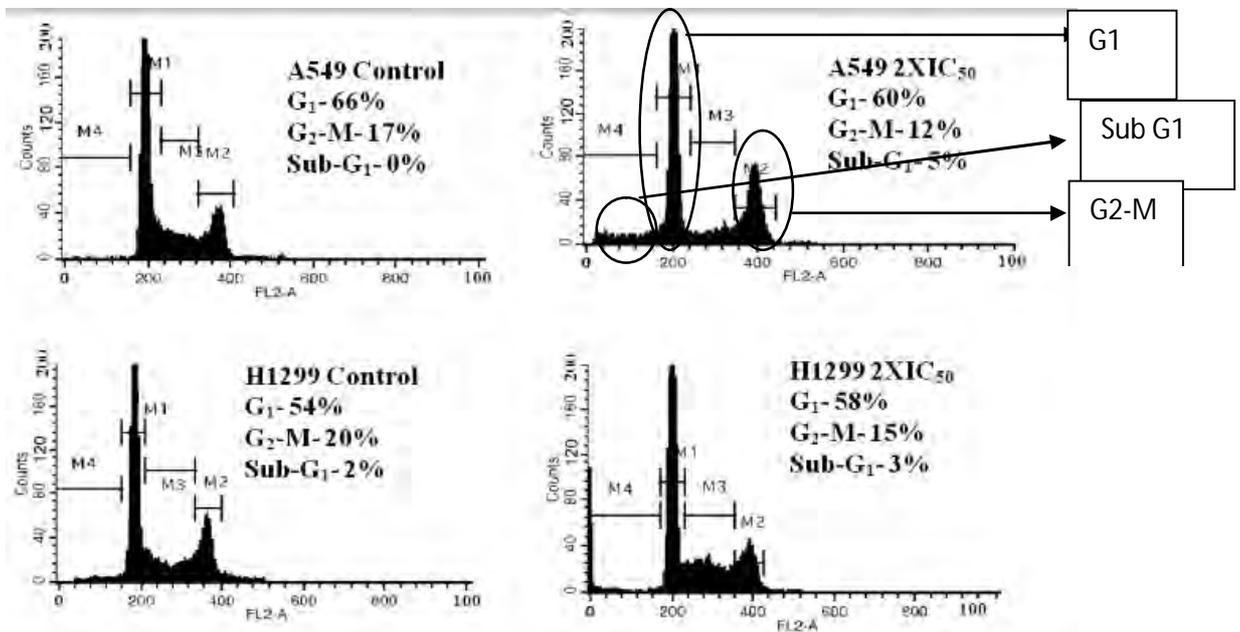


Figure 38 : Cytométrie de flux permettant de déterminer la quantité de matériel génétique selon les phases du cycle cellulaire pour des lignées A549 et H1299 après contact avec 2CI₅₀ d'extrait d'*Excoecaria agallocha*. [66]

La cytométrie de flux (Figure 38) de la lignée A549 montre une augmentation de la proportion de cellules en phase SubG1 (5%) par rapport au contrôle (0%) La phase sub G1 est, dans la cytométrie de flux, la zone juste avant le pic de la phase G1. La présence de cellules dans cette phase permet de déterminer la proportion de cellules en apoptoses.

En parallèle une diminution du nombre de cellules en phase G1 et en phase G2-M a pu être observée. L'ADN retrouvé dans la phase subG1 est composé de fragments d'ADN de petites tailles. Les cellules qui sont dans cette phase n'ont plus un contenu génétique viable. La présence de ces fragments d'ADN est évocatrice d'un phénomène d'apoptose des cellules.

Cette étude de cytométrie de flux peut être discutée car il faut noter que cette méthode de détection des cellules en apoptoses peut s'avérer difficile en raison de la présence de débris cellulaires. Par conséquent, l'analyse des cellules en Sub-G1 devrait être complétée par une analyse morphologique des noyaux après coloration au Hoechst 33342.[70] Ce composé émet une fluorescence bleue au contact de l'ADN. Les noyaux des cellules apoptotiques apparaissent condensés et/ou fragmentés ce qui est mis en évidence par la coloration.

Pour la lignée H1299 cultivée dans les mêmes conditions que la lignée précédente aucune augmentation du nombre des cellules en phase Sub G1 n'a été observée. Il y a une augmentation de la quantité de cellules en phase G1 passant de 54% pour le témoin à 58% pour l'extrait. Cette augmentation des cellules en phase G1 indique un arrêt de la phase G1. Le nombre de cellules en phase G2-M passe de 20% à 15 %. Cette diminution est la répercussion du blocage des cellules en phase G1.

Cette cytométrie de flux a permis de mettre en évidence les systèmes de morts cellulaires impliqués par l'extrait d'*Excoecaria agallocha*. La mort cellulaire des cellules de la lignée A549 serait due à un phénomène d'apoptose alors que les cellules de la lignée H1299 seraient soumises à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Pour appuyer ces résultats les chercheurs ont poursuivi l'étude en étudiant les facteurs d'apoptoses présent dans chaque lignée.

2.4.4) Effet de l'extrait d'*Excoecaria Agallocha* sur le mécanisme d'apoptose des cellules

Les chercheurs ont utilisé la méthode du Western Blot pour déterminer la présence de facteurs de l'apoptose dans les cellules traitées.

Les facteurs étudiés sont les suivants :

- Bcl-2 : Protéine qui a une action anti-apoptotique
- Bax : Protéine pro-apoptotique
- PARP : Substrat clivé et inactivé par les protéases (enzymes qui coupent les protéines) pendant l'apoptose. S'il n'est pas clivé il n'y a pas d'apoptose.
- P53 : Protéine qui agit en tant que facteur de transcription. Lors de son activation un cycle d'apoptose est engagé. Lors de cancer cette protéine est très souvent absente.
- P21 : Protéine qui est un inhibiteur des kinases cycline dépendante. Elle est activée par P53. En plus de l'arrêt de croissance elle peut être impliquée dans la sénescence cellulaire.
- β -actine : Protéine qui est impliquée dans la mobilité, la structure et l'intégrité de la cellule. Les β -actines sont souvent utilisées comme contrôles de l'intégrité de la cellule, de la dégradation protéique dans les PCR ou les Western blot.

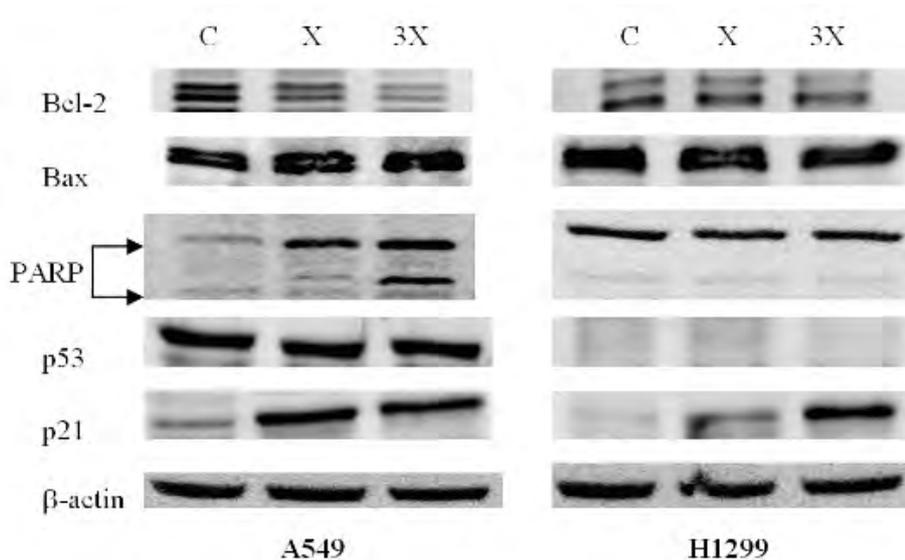


Figure 39 : Western Blot traduisant l'effet de l'extrait d'*Excoecaria agallocha* à deux concentrations sur les facteurs de l'apoptoses des cellules des lignées A549 et H1299. [66]

Selon la Figure 39 les deux lignées se différencient bien par la présence (A549) ou l'absence (H1299) de la protéine P53.

Une augmentation de la quantité de la protéine P21 est observée pour les deux lignées lorsque celles-ci sont mises en contact avec l'extrait d'*Excoecaria agallocha*. La lignée H1299 ne possédant pas de protéine P53 ceci permet de supposer que l'augmentation de P21 n'est pas dépendante de la présence de P53. La protéine Bcl-2 qui est une protéine anti-apoptotique est diminuée de manière dose dépendante dans la lignée A549 alors que dans la lignée H1299 son niveau est resté le même. La quantité de protéine Bax reste inchangée en présence de l'extrait. La protéine PARP est quant à elle clivée dans la lignée A549 ce qui confirme le mécanisme d'apoptose. Aucun clivage n'est observé pour la lignée H1299.

Ainsi, concernant la lignée A549, ces résultats mettent en évidence une diminution des protéines anti-apoptotique et une augmentation des protéines pro-apoptotiques avec, pour confirmation, le clivage de la protéine PARP qui est caractéristique du cycle d'apoptose.

La lignée H1299 ne présente aucune diminution ou augmentation protéique présentant une apoptose. Cela peut s'expliquer par le fait que ces cellules ne possèdent pas la P53. Ceci est concordant avec les résultats de la cytométrie de flux, l'hypothèse de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 est maintenue.

Les cellules cancéreuses ont, pour la majorité, leurs capacités d'apoptoses réduites voire nulles. Elles se répliquent sans jamais qu'il n'y ait de dégradation cellulaire. Il est important de trouver des agents cytotoxiques capables d'augmenter ou de restaurer cette capacité d'apoptose. Les agents cytotoxiques peuvent agir sur les différents acteurs de l'apoptose. La diminution du taux de BCL-2 facteur anti apoptotique peut être une voie d'exploration. Dans cette étude l'induction d'apoptose par un extrait d'*Excoecaria agallocha* des cellules cancéreuses A549 est associée à la diminution du taux de BCL2 ainsi qu'au clivage de PARP qui est le marqueur de l'apoptose.

Cette étude a donc mis en évidence une sensibilité des lignées cancéreuses du poumon envers l'extrait de tiges d'*Excoecaria agallocha*. Les cellules P53+/+ présentent une plus grande sensibilité envers l'extrait d'*Excoecaria agallocha* que les cellules P53-/. Or, les cellules cancéreuses sont majoritairement P53-/, de ce fait des études plus axées sur cette lignée devraient être effectuées.

3) Etude de l'activité de molécules extraites de feuilles d'*Excoecaria agallocha* envers la voie Hedgehog.

Contrairement aux études précédentes, l'équipe de Yusnita Rifai a décidé de tester directement des molécules d'un extrait de feuilles d'*E.agallocha*.

Des molécules ont été isolées de feuilles d'*Excoecaria agallocha* et leur activité biologique a été évaluée sur des modèles *in vitro*. Les modèles utilisés ont pour but de mettre en évidence une éventuelle capacité d'inhibition de la voie de signalisation Hedgehog impliqué dans la survenue de cancer. L'extrait étudié est un extrait éthanolique de feuilles.[50]

3.1) La voie de signalisation Hedgehog (Hh)

La voie de signalisation Hedgehog a tout d'abord été mise en évidence chez la drosophile avant d'être étudiée chez le mammifère puis l'humain. [71]

C'est une voie de régulation de la croissance cellulaire, de la différenciation et la survie des cellules. Cette voie joue un rôle important dans le développement embryonnaire chez de nombreuses espèces ainsi que dans la prolifération et la survie cellulaire chez l'adulte.

Une activation inappropriée de cette voie de signalisation est impliquée dans le développement de cancers.

L'inhibition de cette voie de régulation fait partie des nouvelles stratégies pharmacologiques dont les cibles sont les protéines impliquées dans cette régulation : PTCH, SMO et Gli.[72]

Lorsque la voie Hh est inactive, le récepteur PTCH (Patched) inhibe la protéine membranaire SMO (Smothered). Les facteurs de transcriptions activateurs GliA sont localisés dans le cytoplasme. Ils y sont clivés pour former CiR et GLIR qui, une fois dans le noyau, vont réprimer l'expression des gènes cibles. Lorsque le ligand HH se fixe à PTCH, l'inhibition de SMO est levée. SMO va alors permettre à CiA et GLIA d'activer l'expression des gènes cibles de la voie. (Figure 40) [71]

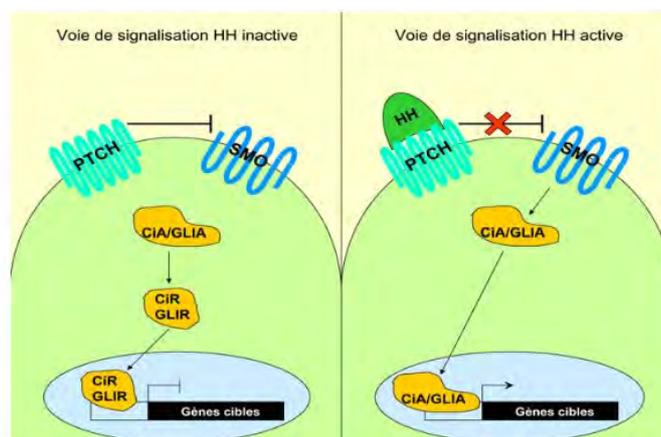


Figure 40 : Représentation schématique simplifiée de la voie de signalisation Hh

3.2) Recherche d'un inhibiteur de la voie de signalisation Hedgehog : [50]

Les feuilles sèches d'*Excoecaria agallocha* ont été extraites par du méthanol. L'extrait a été séparé entre de l'hexane, de l'acétate d'éthyle et du butanol. Des étapes successives de fractionnement par HPLC (Chromatographie liquide haute performance) ont permis d'isoler huit composés ((3) afzeline, (4) quercitrine, (5) rutine, (6) kaempferol-3-O-(2-O-acetyl- α -L-rhamnopyranoside, (7) kaempferide 3-O- α -L-rhamnopyranoside et (8) kaempferol 3-O- α -L-arabinofuranoside dont deux nouveaux : les composés 1 et 2.

Les composés 1 et 2 sont présentés ci-dessous (Figure 41) : ils appartiennent à la famille des flavonoïdes.

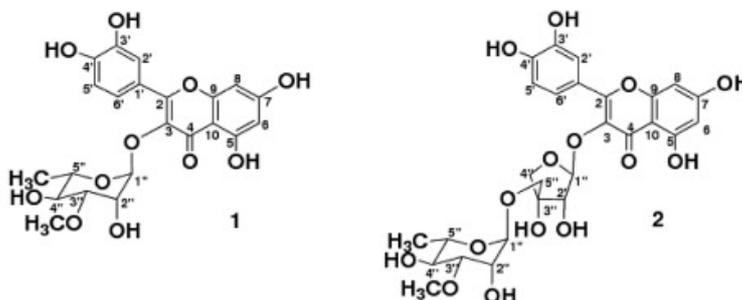


Figure 41 : Nouveaux composés isolés des feuilles d'*Excoecaria agallocha*. [50]

Dans un premier temps, les huit composés isolés ont été testés pour déterminer leur action inhibitrice envers l'activité transcriptionnelle de Gli1. Pour cela les chercheurs ont induit l'expression de Gli-1 chez une lignée humaine de kératinocyte : HaCaT-Gli-Luc.

96 échantillons contenant chacun 2×10^5 cellules HaCaT-Gli-Luc ont été mis en contact avec les huit composés. L'activité de Gli-1 a été mesurée ainsi que la viabilité cellulaire des kératinocytes. (Figure 42)

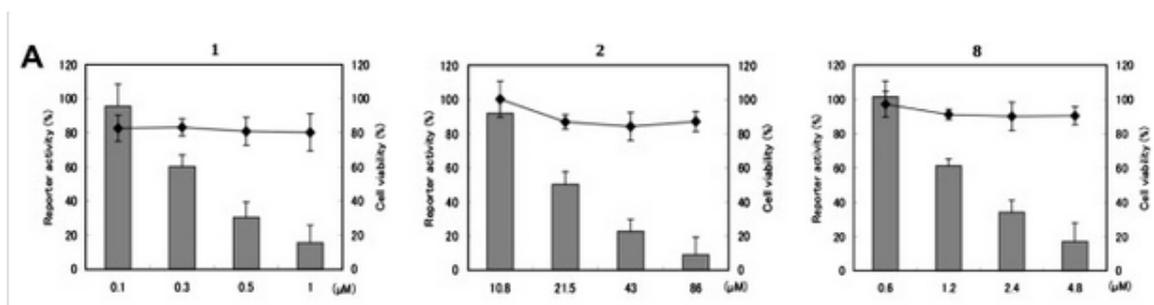


Figure 42 : Inhibition de l'activité transcriptionnelle de Gli-1 ainsi que détermination de la viabilité cellulaire suite à la mise en contact des lignées de kératinocytes HaCat-Gli-Luc et les molécules 1, 2 et 8. [50]

Tableau 24 : CI50 des molécules 1,2 et 8 sur la lignée HaCaT-Gli-Luc. [50]

| Composés | Inhibition transcriptionnelle de Gli. CI 50, μM |
|----------|---|
| 1 | 0,5 |
| 2 | 19,1 |
| 8 | 2 |

La Figure 42 et le Tableau 24 ci-dessus représentent les résultats obtenus pour les trois molécules dont l'activité est intéressante. (Les résultats des autres molécules ne sont pas présentés dans l'étude.) Ces trois molécules sont les deux nouvelles molécules 1 et 2 ainsi que la 8 : kaempferol 3-O- α -L-arabinofuranoside.

Les résultats montrent une diminution de l'activité dose dépendante de la protéine Gli-1 avec, pour la molécule 1 une CI 50 de 0,5 μ M, pour la molécule 2 une CI 50 à 19,1 μ M et pour la molécule 8 une CI 50 à 2,0 μ M. On peut noter que ces trois molécules appartiennent à la famille des flavonoïdes.

Sur ces trois molécules, la molécule 1 présente la CI 50 la plus basse ce qui laisse supposer son fort potentiel inhibiteur de la voie Hh/Gli-1 pour les expériences suivantes.

Il convient de noter que la viabilité cellulaire est restée stable quelles que soient les concentrations utilisées.

3.3) Cytotoxicité des molécules actives envers des cellules cancéreuses et non cancéreuses:

L'étape suivante est de déterminer la cytotoxicité des molécules envers des cellules cancéreuses et non cancéreuses.

Les cellules humaines utilisées sont :

- PANC 1 : cellules issues de carcinomes pancréatiques (NCI – PBCF - CRL1469)
- DU145 : cellules issues de cancers de la prostate (HTB-81)
- C3H10T1/2 : fibroblastes sains

Les molécules 1, 2 et 8 sont mises en présence des cellules ci-dessus à des concentrations entourant la CI50 précédemment déterminée et la viabilité cellulaire est alors déterminée pour chaque concentration.

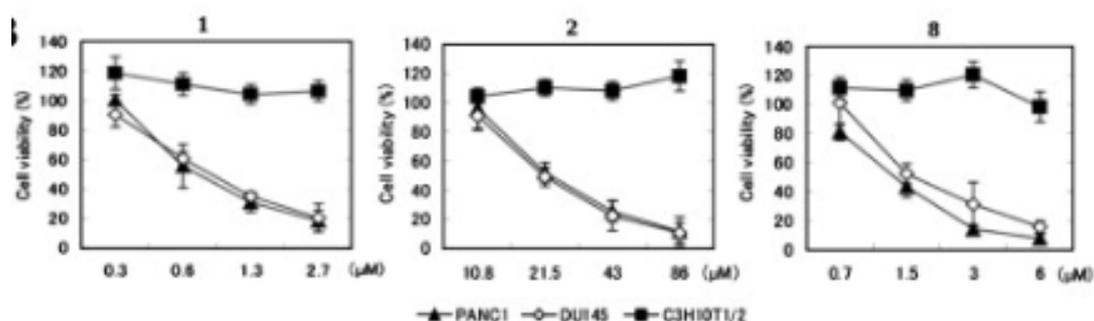


Figure 43 : Cytotoxicité des molécules 1, 2 et 8 sur les lignées PANC-1, DU145 et C3H10T1/2. [50]

Tableau 25 : CI50 des molécules 1,2 et 8 sur les lignées PANC-1, DU145 et C3H10T1/2. [50]

| Composés | Cytotoxicité (CI 50 µM) | | |
|----------|-------------------------|-------|-----------|
| | PANC-1 | DU145 | C3H10T1/2 |
| 1 | 0,7 | 0,8 | >100 |
| 2 | 20 | 22 | >100 |
| 8 | 1,8 | 2,4 | >100 |

Les graphiques (Figure 43) montrent une viabilité cellulaire fortement diminuée par les trois molécules mais pour des concentrations différentes. C'est la molécule 1 qui possède la plus importante cytotoxicité avec des CI50 envers PANC1 et DU145 respectivement de 0,7 et 0,8 µM. Les molécules 2 et 8 présentent aussi une cytotoxicité moindre envers PANC1

avec 20,0 et 1,8 μM respectivement et envers DU145 avec des CI50 de 22,0 et 2,4 μM . Les molécules 1, 2 et 8 ne présentent pas de toxicité sur la lignée saine aux concentrations testées. (Tableau 25)

Afin de déterminer l'effet de la molécule 1 sur l'expression des protéines induites par Gli-1, les chercheurs ont déterminé les quantités de protéines PTCH et BCL-2 dans les cellules PANC1. Cette lignée cellulaire pancréatique est la plus sensible envers la molécule 1.

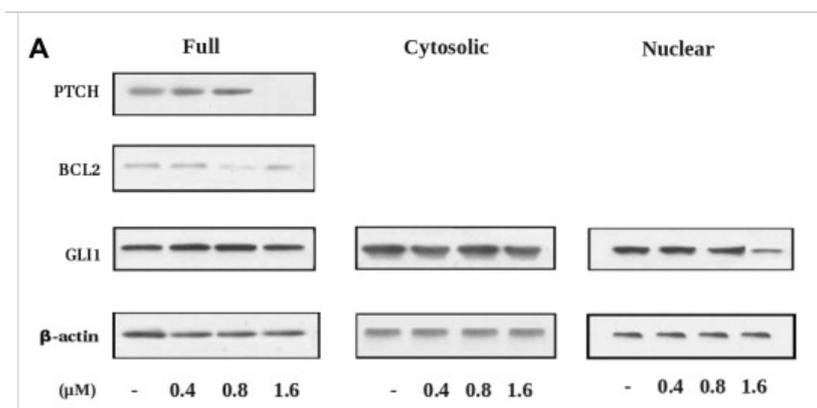


Figure 44 : Western blot traduisant l'effet de la molécule 1 sur PTCH, BCL2, GLI1 et β actin au sein du cytosol, du noyau ou de la cellule entière de la lignée de cellules PANC-1. [50]

Le western blot (Figure 44) met en évidence une diminution de la quantité de PTCH dans la cellule. A la concentration de 1,6 μM de molécule 1 on observe la disparition de PTCH au sein de la cellule. La protéine BCL2 diminue aussi de manière moins nette.

Ces résultats mettent aussi en évidence la diminution de la quantité de GLI1 au niveau nucléaire à la concentration la plus élevée de 1,6 μM .

Des composés, tels que la cyclopamine qui est un alcaloïde naturel qui inhibe la voie Hedgehog en inhibant l'activation de Smo, sont à ce jour étudiés en tant que potentiels anticancéreux.[72] Mais il existe des mutants de Smo, tel que SmoM2, qui seraient résistants à ces molécules. Les chercheurs ont donc voulu vérifier l'importance de Smo dans l'action du composé 1.

Pour cela les chercheurs ont inhibé l'expression de Smo dans les cellules de PANC1 et déterminé la quantité de PTCH retrouvé après traitement par la molécule 1 via la quantité d'ARNm.

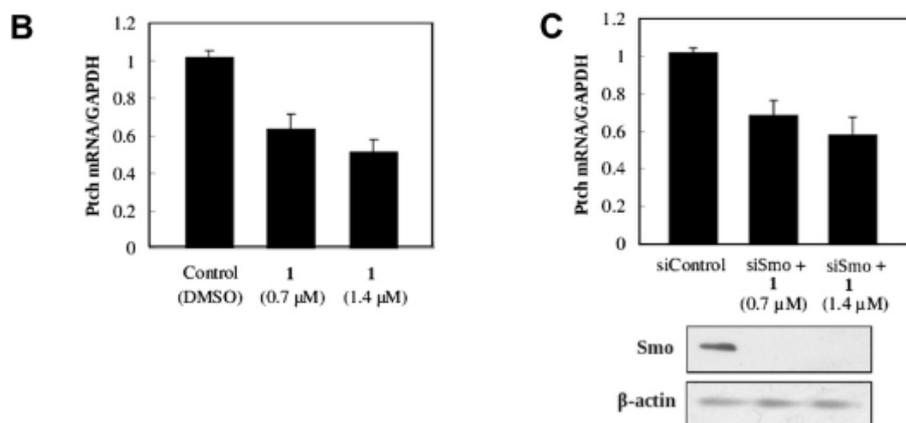


Figure 45 : B : Détermination de la quantité de PTCH après contact de la lignée PANC1 avec la molécule 1 à deux concentrations. C : : Détermination de la quantité de PTCH après contact de la lignée PANC1 avec la molécule 1 à deux concentrations après avoir inhibé l'expression de Smo dans les cellules. [50]

L'absence de Smo a été vérifiée par western blot (Figure 45), et les résultats mettent en évidence que l'absence de Smo ne modifie pas la quantité de PTCH dans la cellule. La quantité de PTCH continue de décroître en présence de la molécule 1, indépendamment de la quantité de Smo présente.

La molécule 1 présente un mode d'inhibition de la voie Hedgehog indépendant de la présence de la protéine Smo.

En conclusion, cette étude relate l'isolement de huit composés à partir de feuilles d'*Excoecaria agallocha* et l'évaluation de leur activité biologique sur un modèle in vitro. Les résultats obtenus ont mis en évidence une activité inhibitrice de l'une des 2 nouvelles molécules isolées, sur la voie Hedgehog présente dans de nombreux cancers. Cette molécule appartient à la famille des flavonoïdes.

Contrairement à des molécules déjà connues telle que la cyclopamine qui inhibe la protéine Smo, la molécule 1 ne possède pas le même mécanisme d'action. Celui-ci, bien qu'encore inconnu, inhiberait la translocation des facteurs de transcription GLI1 dans le noyau de PANC1. De plus la molécule 1 n'a pas d'action sur les cellules saines ce qui est un point positif pour la suite des études.

Il est tout de même important de noter que les résultats des Tableau 24 et Tableau 25 ne précisent pas d'écart type, les dispersions des résultats des CI50 sont donc inconnues rendant les résultats potentiellement critiquables.

Cette nouvelle voie d'inhibition reste à approfondir pour déterminer plus précisément le mécanisme d'action.

4) Etude de l'action anti nociceptive d'un extrait de feuilles d'*Excoecaria agallocha* [73]

Les feuilles d'*Excoecaria agallocha* ont été et sont toujours, plus minoritairement, utilisées par les habitants de l'Asie du Sud Est pour traiter des douleurs chroniques, des rhumatismes et des inflammations. C'est pourquoi les chercheurs ayant conduit l'étude présentée ci-dessous ont voulu d'une part démontrer l'action de cette plante en tant qu'antidouleur sur des tests in vivo, et d'autre part identifier le(s) composé(s) responsable(s) de l'action anti nociceptive.

Les feuilles fraîches d'*Excoecaria Agallocha* récoltées sur la côte Kollidam ont été séchées et extraites à l'éthanol. Après une évaporation sous pression réduite la masse visqueuse obtenue a été diluée dans de l'eau puis séparée en quatre. Chaque fraction a été respectivement extraite par avec du n-hexane, du dichlorométhane (DCM) et du chloroforme (CF). La fraction au chloroforme a été divisée en deux fractions dont une a été acidifiée (Aci-CF) et la seconde alcalinisée (Alk-CF).

4.1) Détermination de l'extrait le plus actif contre les contorsions de souris induites par de l'acide acétique :

Les souris ont été prétraitées oralement par les différentes solutions et extraits à tester avant de leur injecter une solution d'acide acétique en intrapéritonéale qui provoque des douleurs se manifestant par des contorsions abdominales et des étirements des pattes postérieures. Ce test est aussi appelé le « test de torsion ». Six souris ont été utilisées par groupe.

Les extraits testés ont été les suivants : l'extrait total (100mg/kg), l'extrait hexane, dichlorométhane, l'extrait acide chloroforme Aci-CF et l'extrait basique chloroforme Alk-Cf à une concentration de 5mg/kg. Le témoin positif est la Pentazocine qui est un dérivé opioïde (10mg/kg). Un témoin négatif de carboxy méthyl cellulose a été réalisé en parallèle.

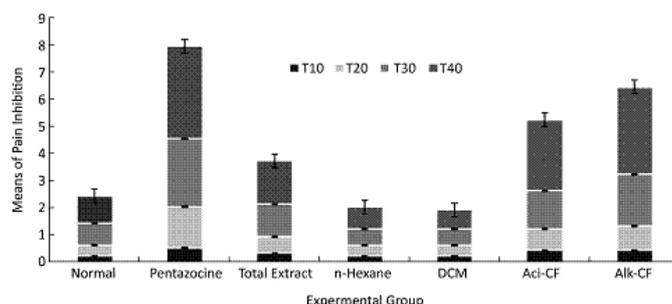


Figure 46 : Effet analgésique de l'extrait total et des principales fractions d'*Excoecaria agallocha* dans le test de torsion. $P < 0.01$. DCM : dichlorométhane ; Aci-cf : fraction chloroforme acide ; Alk-cf : fraction chloroforme alcaline. [73]

A concentration égale la fraction qui diminue le plus l'effet nocif de l'acide acétique est la fraction chloroforme alcaline (Alk-CF) (Figure 46). C'est donc cet extrait qui a été utilisé dans la suite de l'étude.

4.2) Effet analgésique de la fraction Alk-Cf

La fraction Alk-CF a été testée *in vivo* sur des souris à trois concentrations 15 – 20 et 25 mg/kg en administration *per os*. Le contrôle positif a consisté en de la pentazocine administrée à 10mg/kg par voie intra péritonéale.

Le test a consisté en la détermination de l'efficacité de la fraction active pour diminuer une douleur mécanique et une douleur thermique.

La douleur mécanique a été induite chez les souris par une injection intrapéritonéale d'acide acétique. Celui-ci provoque des contractions abdominales et des étirements des membres postérieurs.

La douleur thermique a été recréée en mettant les souris sur une source de chaleur métallique provoquant ainsi des sauts ou des léchages des pattes arrières lors de la sensation douloureuse.

Après avoir testé les extraits, un second test a été réalisé avec comme différence par rapport au premier, l'ajout de naloxone, un antagoniste opioïde, 15 min avant la prise de la fraction testée afin de déterminer si les molécules actives utilisent la voie opioïde pour atténuer la douleur.

La naloxone est un composé antagoniste des récepteurs morphiniques, c'est à dire qu'il se fixe sur les mêmes récepteurs que les composés morphiniques mais ne déclenche pas de réaction. C'est pourquoi il est utilisé lors d'intoxication aux morphiniques.

4.3) Résultats

4.3.1) Evaluation de l'effet des extraits sur la douleur mécanique

Tableau 26 : Evaluation de l'effet de la fraction Alk-CF sur le nombre de contractions induites par l'acide acétique sur six souris. ($P < 0.05$) [73]

| Traitement | Dose (mg/kg) | Nombre de Contorsions | % d'inhibition |
|------------------------|--------------|-----------------------|----------------|
| Contrôle | 10 ml | 42,50 +/- 5,96 | |
| Pentazocine | 10 | 10,20 +/- 1,82 | 81,5 |
| Pentazocine + Naloxone | 10 + 2 | 37,40 +/- 0,65 | 15,6 |
| Alk-CF | 10 | 25,40 +/- 4,25 | 58,2 |
| | 15 | 18,32 +/- 3,42 | 67,3 |
| | 20 | 12,35 +/- 6,36 | 71,8 |
| | 25 | 9,25 +/- 4,12 | 80,5 |
| Alk-CF+ Naloxone | 25 + 2 | 38,70 +/- 2,31 | 17,5 |

Les résultats de cette expérience (Tableau 26) ont mis en évidence une diminution du nombre de contorsions abdominales supérieure à 80% après traitement à la pentazocine à 10 mg/kg ou avec la fraction Alk-CF à 25 mg/kg. L'inhibition induite par la fraction Alk-CF paraît dose-dépendante.

La diminution du nombre de contractions est due à une diminution du seuil de la douleur et donc à une action antinociceptive de l'extrait.

La seconde partie de l'expérience avec l'injection de naloxone en amont donne des résultats comparables pour la fraction Alk-CF et la pentazocine.

Alors que la pentazocine seule a permis une diminution des contractions de 81,5 % lors du 1^{er} test, l'inhibition passe à 15,6 % lorsque l'injection de naloxone a été faite avant. De même pour la fraction Alk-CF le pourcentage d'inhibition passe de 80,5% à 17,5% lorsqu'elles sont précédées de l'injection de naloxone.

La naloxone en tant qu'antagoniste des récepteurs opioïdes (morphinique) va bloquer ces récepteurs et diminuer l'analgésie normalement créée par les composés opioïdes. La Pentazocine est un dérivé opioïde, de ce fait il est tout à fait normal que le nombre de contractions soit augmenté car l'analgésie est en partie contrée par la naloxone.

Il semblerait, au vu de ces résultats, que la ou les molécule(s) responsable(s) de l'activité antinociceptive de l'extrait Alk-CF agirait au niveau de ces récepteurs opioïdes.

4.3.2) Pour la douleur thermique

Tableau 27 : Evaluation de l'effet de la fraction Alk-CF sur le temps de latence entre deux réactions douloureuses induites par la plaque chauffante sur six souris. (P<0.05). [73]

| Traitement | Dose (mg/kg) | Durée entre deux réactions douloureuses (s) | | | | |
|------------------------|--------------|---|---------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 0 min | 15 min | 30 min | 45 min | 60 min |
| Contrôle | 10 ml | 1,50 +/- 0,08 | 2,13 +/- 0,03 | 2,15 +/- 0,01 | 2,54 +/- 0,01 | 2,90 +/- 0,01 |
| Pentazocine | 10 | 2,17 +/- 0,03 | 5,59 +/- 0,06 | 11,32 +/- 0,02 | 16,12 +/- 0,04 | 20,11 +/- 0,02 |
| Pentazocine + Naloxone | 10 + 2 | 1,19 +/- 0,03 | 4,46 +/- 0,08 | 9,32 +/- 0,02 | 12,25 +/- 0,05 | 16,32 +/- 0,02 |
| Alk-CF | 10 | 1,59 +/- 0,03 | 4,29 +/- 0,02 | 7,67 +/- 0,02 | 10,33 +/- 0,03 | 13,99 +/- 0,02 |
| | 15 | 1,98 +/- 0,01 | 4,43 +/- 0,05 | 8,07 +/- 0,01 | 11,69 +/- 0,02 | 14,11 +/- 0,02 |
| | 20 | 1,85 +/- 0,02 | 4,31 +/- 0,01 | 8,06 +/- 0,01 | 11,22 +/- 0,02 | 13,10 +/- 0,02 |
| | 25 | 2,03 +/- 0,01 | 4,63 +/- 0,08 | 8,21 +/- 0,01 | 12,15 +/- 0,01 | 16,13 +/- 0,03 |
| Alk-CF+ Naloxone | 25 + 2 | 1,98 +/- 0,01 | 3,63 +/- 0,05 | 6,32 +/- 0,01 | 10,15 +/- 0,05 | 9,13 +/- 0,02 |

Dans cette expérience la capacité de la fraction Alk-CF à retarder la réaction douloureuse face au stimulus thermique est inférieure à celle de la pentazocine ; les temps de latence sont, au bout de 60 min, de 20,11s pour la pentazocine et 16,13s pour la fraction Alk-CF.

L'utilisation de la naloxone en amont diminue aussi l'action analgésique des produits, diminuant ainsi les temps de latence à 16,32s pour la pentazocine et 9,13s pour la fraction Alk-CF. (Tableau 27)

Ces deux expériences, dont les résultats sont concordants, suggèrent que la fraction Alk-CF utilise, au moins en partie, les récepteurs opioïdes pour exercer l'effet anti-nociceptif qui a été démontré. L'action anti nociceptive, bien que très largement antagonisée par la naloxone, reste présente ce qui permet de supposer qu'un mécanisme d'action périphérique est aussi mis en marche par la fraction Alk-CF.

4.4) Isolement de la ou des molécules actives

Les chercheurs ont effectué différentes étapes d' HPLC (Chromatographie liquide haute performance) de l'extrait testé et six flavonoïdes ont été isolés et identifiés : Rutine, Quercétine, Myricétine, Kampferol, Luteoline et isorhamnetine. Ceux-ci ont pu être quantifiés, et les taux suivants ont été retrouvés : 70,3 – 2,2 – 4,9 – 10,0 – 6,1 et 4,3% w/v (respectivement). La présence majoritaire de la Rutine peut faire supposer à son rôle important dans l'activité antinociceptive de la fraction Alk-CF.

Les expériences ont permis de supposer que la fraction Alk-CF possède deux voies d'actions d'analgésies : périphérique et centrale. Elles peuvent être attribuées à la rutine qui est la molécule dont la concentration est majoritaire.

L'action centrale a été démontrée par l'antagonisation de la naloxone sur les deux expériences.

Pour vérifier son implication dans l'action périphérique antinociceptive les chercheurs ont modélisé en 3D la molécule de rutine ainsi que les récepteurs COX1 et COX 2 qui sont les récepteurs des prostaglandines, hormones qui induisent la douleur. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent ce récepteur. Cette modélisation a permis de mettre en évidence qu'il y a bien des interactions entre la rutine et les récepteurs COX 1 et COX 2. (Figure 47)

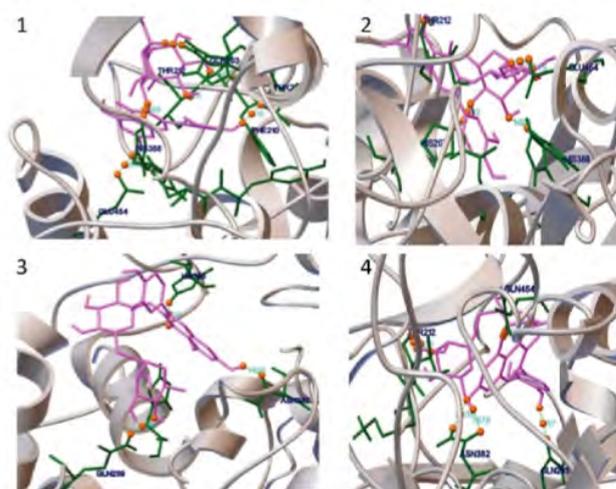


Figure 47 : Modélisation des interactions entre la rutine et les récepteurs COX 1 et COX 2. [73]

Cette étude a permis d'une part de mettre en évidence la présence de flavonoïdes dans les feuilles d'*Excoecaria Agallocha* et d'autre part de suggérer leur implication dans l'action antinociceptive de la rutine.

La simulation ci-dessus met en évidence que la rutine possède une structure chimique qui interagit avec les récepteurs COX 1 et COX 2 et de ce fait pourrait avoir une

action sur les récepteurs périphériques de la douleur. Son action au niveau central n'est encore que supposée. Une étude avec la rutine seule devrait déterminer l'impact au niveau opioïde.

Cette étude a permis de mettre en avant un potentiel analgésique de l'extrait alcalin chloroformique d'*E.agallocha*. Les chercheurs ont tenté de déterminer quelle molécule serait responsable de cette analgésie. Leurs recherches se sont logiquement penchées dans un premier temps sur la rutine du fait de sa présence majoritaire dans l'extrait. Mais il est nécessaire d'effectuer des études plus approfondies et précises en testant molécule par molécule pour les comparer. Il est possible que la molécule qui possède la plus forte action analgésique soit une des molécules minoritaires.

5) Etude sur le pouvoir anti-inflammatoire et analgésique d'*Excoecaria agallocha*

L'équipe de M.Babuselvam a comparé l'activité anti-inflammatoire et analgésique d'extraits de feuilles, de graines et de latex d'*Excoecaria agallocha* par rapport à de l'aspirine. [74] L'aspirine, ou acide acétylsalicylique, est un médicament dont les propriétés anti-inflammatoires et analgésiques sont reconnues et dont le mécanisme d'action est parfaitement élucidé.

Les feuilles, les graines et le latex des arbres ont été récoltés dans la forêt de mangrove de Pichavaram. Les feuilles et les graines ont été séchées et réduites en poudre puis extraites à l'éthanol. Le latex séché et réduit en poudre a été extrait pour obtenir un extrait méthanolique.

Durant l'étude, six souris ont été utilisées par groupe essais ou contrôle.

5.1) Etude du pouvoir anti-inflammatoire

Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules à visée antiinflammatoire, les chercheurs ont mis en place deux tests : le premier recherche l'impact des extraits sur la réduction d'un œdème et le second étudie l'impact des extraits sur la formation de tissu inflammatoire : le tissu granulomateux.

5.1.1) Etude de l'œdème

Une injection de 0,05 ml de solution de carraghénane à 1,0% est injectée dans la patte arrière gauche des souris créant ainsi une inflammation. Un volume équivalent de solution saline est injecté dans la patte arrière droite des souris (contrôle négatif). Le volume des pattes est déterminé avant les traitements et après 1h, 2h, 3h et 4h après les injections de carraghénane. Les extraits végétaux (de 250 et 500mg/kg) ont été administrés par voie orale 120 min avant l'injection de carraghénane, à des concentrations de 250 et 500 mg/kg. Le contrôle positif a consisté en de l'aspirine, testée à 100mg/kg a été administré 60 min avant. Les résultats sont présentés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Effet anti inflammatoire d'extraits d'*Excoecaria agallocha* sur des œdèmes induits par une injection de carraghénane. [74]

| | Dose (mg/kg) | 1 heure | | 2 heures | | 3 heures | | 4 heures | |
|----------|--------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|----------------|
| | | Augmentation du volume de l'œdème | % d'inhibition | Augmentation du volume de l'œdème | % d'inhibition | Augmentation du volume de l'œdème | % d'inhibition | Augmentation du volume de l'œdème | % d'inhibition |
| Latex | 250 | 0,24+/-0,01 | 32,43 | 0,29+/-0,01 | 35,53 | 0,18+/-0,01 | 55,26 | 0,16+/-0,01 | 57,89 |
| | 500 | 0,22+/-0,01 | 43,24 | 0,17+/-0,01 | 57,5 | 0,16+/-0,01 | 57,89 | 0,14+/-0,01 | 63,15 |
| Feuilles | 250 | 0,23+/-0,01 | 35,13 | 0,21+/-0,01 | 50 | 0,18+/-0,01 | 52,63 | 0,16+/-0,01 | 57,89 |
| | 500 | 0,19+/-0,01 | 48,6 | 0,16+/-0,01 | 60 | 0,15+/-0,01 | 60,52 | 0,15+/-0,01 | 62,15 |
| Graines | 250 | 0,20+/-0,01 | 39,39 | 0,23+/-0,01 | 42,5 | 0,16+/-0,01 | 55,16 | 0,13+/-0,01 | 60,61 |
| | 500 | 0,18+/-0,01 | 54,05 | 0,16+/-0,01 | 60,52 | 0,14+/-0,01 | 60,61 | 0,11+/-0,01 | 69,69 |
| Contrôle | _ | 0,37+/-0,01 | _ | 0,41+/-0,01 | _ | 0,39+/-0,01 | _ | 0,38+/-0,01 | _ |
| Aspirine | 100 | 0,21+/-0,01 | 33,6 | 0,18+/-0,01 | 52,8 | 0,17+/-0,01 | 59,8 | 0,15+/-0,01 | 61,7 |

Le contrôle qui n'a pas de traitement atteint un maximum d'inflammation à 2h.

Les résultats montrent une inhibition de l'œdème induit par la carraghénane par le latex, les feuilles et les graines avec respectivement un pourcentage d'inhibition de 63.15%, 62.15% et 69.69% pour une concentration de 500mg/kg. A la concentration de 250mg/kg le pourcentage d'inhibition est moins élevé.

Le contrôle positif effectué par l'aspirine présente une inhibition à 4h de 61.7%.

Les extraits étudiés à une concentration de 500mg/kg présentent donc une inhibition comparable voire plus importante que celle de l'aspirine à 100mg/kg.

5.1.2) Etude du tissu granulomateux

Des pastilles de coton de 5mm d'épaisseur qui ont été préalablement imprégné d'ampicilline (un antibiotique) ont été introduites en sous-cutané par une incision au niveau de l'abdomen.

Chaque groupe de souris ont été traitées quotidiennement, durant six jours, par les différents extraits d'*Excoecaria agallocha* à 250mg/kg ou à 500mg/kg ou par l'aspirine à 100mg/kg.

Le septième jour les animaux ont été sacrifiés, les pastilles disséquées et granulomes séchés à 60 ° C pendant une nuit pour déterminer le poids sec. La différence entre le poids initial et le poids final a été considéré que le poids des tissus granulomateux produits en réaction à la pastille de coton. (Tableau 29)

Tableau 29 : Effet des extraits d'*Excoecaria agallocha* sur la formation de tissus granulomateux induit par des pastilles de cotons. [74]

| Traitement | Dose (mg/kg) | Poids sec du tissu granulomateux (mg) | % d'inhibition |
|------------|--------------|---------------------------------------|----------------|
| Contrôle | – | 46,60+/-1,16 | – |
| Aspirine | 100 | 22,4+/-1,73 | 56,23 |
| Latex | 250 | 28,37+/-0,87 | 40,02 |
| | 500 | 24,40+/-1,15 | 50,41 |
| Feuilles | 250 | 23,4+/-0,85 | 52,32 |
| | 500 | 21,6+/-0,81 | 56,32 |
| Graines | 250 | 27,6+/-1,25 | 41,13 |
| | 500 | 20,6+/-1,10 | 57,03 |

Les groupes exposés aux extraits de latex, feuilles et graines présentent des masses de tissus granulomateux diminuées par rapport au groupe contrôle avec des inhibitions pour les concentrations de 500mg/kg de 50.41%, 56.32% et 57.03% respectivement. Le contrôle positif d'aspirine à 100mg/kg présente une inhibition de l'inflammation de 56.23%.

Tous les extraits présentent une action anti inflammatoire mais l'extrait issu des graines d'*Excoecaria agallocha* se distingue pour les deux tests par une action anti inflammatoire supérieure au contrôle positif.

5.2) Etude du pouvoir analgésique

5.2.3) Méthode de l'acide acétique

Ce test aussi appelé « test de torsion » consiste à provoquer des douleurs vives au niveau de l'abdomen des souris en injectant en intrapéritonéal une solution d'acide acétique. Cette douleur se traduit par des contorsions abdominales et des étirements des membres postérieurs.

Une solution d'acide acétique 0,6% à une dose de 10mL/kg a été injectée à toutes les souris par voie intra péritonéale. Une demi-heure avant l'injection d'acide acétique les extraits de feuilles, de graines et de latex (250 à 500mg/kg) ainsi que l'aspirine à 100mg/kg (témoin positif) et l'eau distillée (témoin négatif) ont été administrés respectivement à chaque groupe de souris.

Les chercheurs mesurent le nombre de contorsions ou étirement en 20 min. (Tableau 30)

Tableau 30 : Activité analgésique des extrait d'*Excoecaria agallocha* par diminution des contorsions des souris induites par de l'acide acétique. [74]

| Traitements | Contorsions dues à l'acide acétique dans le test animal | | |
|-------------|---|---------------------------------|--------------------------|
| | Dose (mg/Kg) | Nombre de contorsions en 20 min | pourcentage d'inhibition |
| Contrôle | 3ml/kg | 46,78+/-10,9 | – |
| Aspirine | 100 | 16,77+/-1,07 | 66,00 |
| latex | 250 | 20,49+/-0,85 | 51,56 |
| | 500 | 13,63+/-0,62 | 72,00 |
| Feuilles | 250 | 20,50+/-0,13 | 51,56 |
| | 500 | 11,05+/-0,25 | 74,30 |
| Graines | 250 | 19,62+/-0,87 | 57,00 |
| | 500 | 7,39+/-0,88 | 84,60 |

Le groupe contrôle négatif présente une moyenne de 46,78 contorsions durant les vingt minutes. Les trois extraits présentent une forte diminution du nombre de contorsions aux concentrations de 500mg/kg : 72% pour l'extrait de latex, 74,30% pour l'extrait de feuilles et 84,6% pour l'extrait de graines. L'aspirine, à une concentration de 100 mg/kg a diminué le nombre de contorsions de 66% De ce fait, dans cette expérience, tous les extraits présentent une inhibition plus importante que l'aspirine mais les concentrations en extraits testées sont aussi plus élevées.

5.2.4) Méthode de l'immersion de la queue dans de l'eau chaude

L'expérience consiste à immerger le bout de la queue des rats sur 3 cm dans de l'eau à 55+/-0,5°C. Lorsque la chaleur est trop importante provoquant une douleur, alors le rat retire sa queue de l'eau. Le temps de réaction est déterminé grâce à un chronomètre.

Les groupes de rats ont eu les mêmes extraits que précédemment aux concentrations de 250 et 500mg/kg, l'aspirine à 100mg/kg et de l'eau distillée. Tous ont été administrés per os. (Tableau 31).

Tableau 31 : Effet analgésique des extraits d'*Excoecaria agallocha* lors du test de l'immersion. (P>0.05).

[74]

| Traitements | Méthode de l'immersion de la queue dans de l'eau chaude | | |
|-------------|---|-----------------------------|--------------------------|
| | Dose (mg/Kg) | Temps de réaction moyen (s) | Pourcentage d'inhibition |
| Contrôle | 3ml/kg | 2,646+/-0,47 | — |
| Aspirine | 100 | 16,57+/-0,54 | 62,72 |
| latex | 250 | 4,689+/-0,52 | 48,00 |
| | 500 | 6,701+/-0,39 | 65,80 |
| Feuilles | 250 | 3,927+/-0,24 | 40,10 |
| | 500 | 5,92+/-0,24 | 61,25 |
| Graines | 250 | 18,16+/-0,53 | 72,72 |
| | 500 | 18,57+/-0,90 | 80,29 |

Selon le Tableau 31, le groupe contrôle négatif a présenté un temps de latence moyen de 2,646s. Les extraits présentent les plus fortes inhibitions toujours aux concentrations de 500mg/kg avec des inhibitions de 65,8% pour l'extrait de latex, 61,25% pour l'extrait de feuille et 80,29% pour l'extrait de graine. Tous ces résultats sont équivalents voire bien supérieur à celui de l'aspirine avec 62,72% d'inhibition.

Encore une fois l'extrait de graine présente les meilleurs résultats.

Les prostaglandines sont bien connues pour leurs implications dans la réponse inflammatoire et les mécanismes de l'inflammation. La carragénine qui induit des œdèmes de la patte est sensible à l'inhibition des cyclooxygénases mais pas à l'inhibition des lipoxygénases. Cette caractéristique a été utilisée pour évaluer l'effet d'anti-inflammatoires non stéroïdiens qui dans un premier temps inhibe la cyclooxygénase. Il a été démontré que les doses qui permettent la suppression de l'œdème induit par la carragénine corréleront

raisonnablement avec les doses thérapeutiques des agents anti-inflammatoires cliniquement efficaces.

Cette étude a démontré une action anti inflammatoire des extraits d'*E.agallocha* mais plus particulièrement de l'extrait de graines qui présente des résultats meilleurs que l'aspirine. Mais il faut tout de même noter que la concentration utilisée de 500mg/kg est très importante. Une recherche de composés actifs est nécessaire pour affiner les recherches.

L'analgésie induite par les extraits a aussi été démontrée. La méthode de l'immersion de la queue dans l'eau chaude est considérée comme sélective pour des composés à affinité opioïde. Cela peut laisser supposer que l'extrait d'*E.agallocha* agit par une voie périphérique en inhibant les prostaglandines et par une voie centrale en inhibant des récepteurs centraux.

Cette étude ne permet pas de faire de conclusion mais elle permet d'orienter les recherches futures. Ainsi, il sera intéressant d'identifier et d'isoler la (ou les) molécule(s) responsables de l'activité de l'extrait de graine et de déterminer son mécanisme d'action afin de caractériser son effet anti-inflammatoire et analgésique.

En comparant avec les études de la composition chimique d'*E.agallocha* présentées dans la partie II on peut remarquer que la composition de la graine n'a pas encore été étudiée. Les chercheurs ont donc un double travail qui est dans un premier temps d'isoler les composés de l'extrait de graines puis de tester chaque molécule pour trouver celle qui possède un intérêt thérapeutique.

6) Autres études menées sur *E agallocha*

Les recherches d'une possible action pharmacologique ne se sont pas seulement axées sur les domaines présentés ci-dessus. Une étude en 2010 menée par Mahabuba Rahman et son équipe [75] a porté sur l'effet hypoglycémiant d'un extrait méthanolique de tiges d'*E.agallocha* . L'effet de l'extrait a été comparé à celui du Glibenclamide, un hypoglycémiant actuellement utilisé dans le traitement du diabète. Les résultats ont montré une diminution de la glycémie pour l'extrait d'*E.agallocha* mais pas équivalente à celle induite par le glibenclamide. L'extrait a néanmoins présenté une action hypoglycémiante, de ce fait, il serait intéressant d'isoler la molécule responsable de cette action et de la comparer au Glibenclamide.

De même en 2009, P.Thirunavukkarasu et son équipe [76] ont étudié l'effet d'un extrait d'écorce d'*E.agallocha* sur une acidité gastrique induite par des Anti-inflammatoires.

Cette étude a été faite dans le but d'étudier l'intérêt potentiel de molécules pour traiter les ulcères digestifs. Comme pour l'étude précédente l'extrait montre une capacité à diminuer l'acidité mais qui n'est pas égale au témoin positif, l'oméprazole (un inhibiteur de la pompe à proton utilisé dans la diminution de l'acidité gastrique). Un fractionnement et un isolement des molécules impliquées dans la diminution de l'acidité gastrique est nécessaire pour les comparer à l'oméprazole.

Deux autres études ont étudié des molécules en particuliers. La première est celle de Yongli Li et son équipe qui a étudié l'activité de polyphénols sur des mécanismes impliqués dans l'hépatite C. Seule une molécule présente une activité intéressante qui devra être approfondie.

Les études scientifiques portant sur les propriétés pharmacologiques des molécules extraites d'*E.agallocha* sont de plus en plus nombreuses mais il reste beaucoup de chemin à parcourir. A ce jour un grand nombre d'études ne portent que sur des extraits, qui représentent donc un mélange complexe de molécules. De plus, la majorité de ces études n'en sont qu'aux tests *in vitro* et à ce niveau il n'est pas encore possible d'extrapoler la ou les activités *in vitro* mises en évidence.

Il serait maintenant intéressant que les groupes de recherche continuent ce travail en isolant et caractérisant les molécules potentiellement responsables des activités observées. Ceci permettrait ensuite d'approfondir les études pharmacologiques *in vitro* puis *in vivo*, en déterminant notamment les mécanismes d'actions.

Partie IV : ETUDE DE TOXICITE

I. Toxicité végétale

La toxicité dans le règne végétal est partout et d'une variété infinie. C'est la toxicité la plus sournoise car les plantes toxiques peuvent ne présenter aucun signe de dangerosité à première vue. Le plus souvent les fruits les plus toxiques ont l'air des plus appétissants tel que l'arum ou bien le muguet très toxique mais qui possède une odeur suave. [77]

La majorité des plantes qui sont toxiques sont regroupées dans peu de familles : on compte majoritairement les Euphorbiacées, les Brassicacées, les Alliacées, les Urticacées et les Renonculacées, Fabacées. Les Euphorbiacées sont les plantes qui possèdent le plus grand pouvoir irritant. [78] Mais pour toutes ces familles la toxicité n'est présente que chez quelques espèces alors que d'autres espèces de la même famille seront quant à elles comestibles. Aussi, dans une même plante certaines parties qui la composent seront toxiques alors que d'autres seront comestibles : l'if est toxique dans toutes ses parties sauf l'arille rouge qui est comestible.[77]

Les composés toxiques peuvent, s'ils sont utilisés à bon escient, devenir des médicaments efficaces. Toute plante toxique est potentiellement d'intérêt pharmaceutique. Du médicament au poison tout est question de dose. [77]

1) Toxicité des Euphorbiacées

La famille des Euphorbiacées est connue pour le latex qu'elle contient. Ce latex se répartit majoritairement dans les tiges des arbres mais aussi pour certains dans les feuilles. Il est souvent toxique. Son niveau de toxicité est différent selon la plante. Il peut aller de la brûlure légère à une dermite bulleuse provoquée par le Mancenillier par exemple.

Le Mancenillier, *Hippomane Mancinella*, est un exemple type de la famille des Euphorbiacées présentant une forte toxicité. Il est intéressant de comparer sa toxicité à celle d'*Excoecaria agallocha* car ils renferment en partie les mêmes molécules irritantes.

Originaire du Panama il est très présent dans les Antilles notamment le long des plages. Il possède un latex très toxique présent dans son tronc, ses tiges, ses feuilles et ses fruits. Il possède deux types de toxicité : une toxicité cutanée majoritairement par les feuilles lorsqu'il y a un frottement avec la peau mais aussi une forte toxicité interne par ingestion de ses fruits qui ressemblent à de petites pommes vertes. La seule ingestion d'un fruit provoque

des stomatites, des lésions labiales érosives hémorragiques, des œdèmes pharyngés empêchant la déglutition. Le contact entre le latex et la peau provoque des dermatites bulleuses sévères, parfois purpuriques. [79] Même l'eau qui ruisselle sur les feuilles lors de pluies se charge en composés toxiques et provoque des brûlures. Il est fortement conseillé de ne pas rester sous ces arbres lors des averses.

L'intoxication alimentaire du fruit du Mancenillier peut avoir des conséquences dramatiques alors que la toxicité cutanée, bien que impressionnante, a de très bons pronostics de réparation si le traitement pour diminuer l'inflammation et éviter une surinfection lors de la reconstruction de l'épithélium est bien suivi.

2) Toxicité d'*Excoecaria agallocha*

Excoecaria agallocha possède un latex dont la toxicité cutanée est reconnue mais qui laisse peu de séquelles sur le long terme. Les brûlures d'*Excoecaria agallocha* sont le plus souvent retrouvées en cas d'éclaboussures de latex lors de la coupe de branches de cet arbre.

Un des rares cas de brûlure retranscrit est celui d'un garçon de 13 ans de Matara au Sri Lanka présenté ci-après.[80]

2.1) Cas clinique de brûlures par *Excoecaria agallocha*

L'enfant de 13 ans a été admis à l'hôpital après avoir été brûlé par du latex d'*Excoecaria agallocha* alors qu'il coupait quelques branches. Il a ressenti la sensation de brûlure au niveau de son œil droit ainsi qu'au niveau des zones exposées en 15 min. L'examen ophtalmologique a mis en évidence au niveau de la cornée des zones où celle-ci est dénudée ainsi qu'une injection conjonctivale c'est-à-dire une inflammation simultanée de la conjonctive et des paupières de l'œil droit.

L'examen dermatologique deux jours après les brûlures révèle des érythèmes et des œdèmes avec des brûlures superficielles de la peau autour de l'œil droit et sur le front. L'examen a aussi montré des petites pustules dans les zones érythémateuses au niveau de la face, les membres supérieurs, le tronc et les cuisses.

2.2) Traitement

Il n'y a pas de protocole prédéfini. L'objectif est de limiter l'apparition d'une infection et diminuer la douleur de la brûlure. Pour le garçon, il a été traité par voie orale par de l'amoxicilline et du paracétamol et localement par un mélange de pommades contenant des antibiotiques : néomycine, bacitracine et polymyxine.

Au bout de cinq jours, l'épithélium de la cornée s'est recréé et les lésions cutanées ont partiellement cicatrisé. L'amélioration s'est poursuivie et la visite au bout d'un mois a permis de faire le point : les deux yeux étaient normaux et la peau bien que cicatrisée présentait des petites cicatrices et une hypo-pigmentation post inflammatoire.

Si le contact avec le latex est important les brûlures d'*Excoecaria agallocha* peuvent, à l'extrême, rendre aveugle. Mais sa toxicité reste bien inférieure à celle de son cousin le Mancenillier : *Hippomane Mancinella* qui peut engendrer la mort par la simple ingestion de ses fruits [45].

II. Molécules responsables de la toxicité d'*Excoecaria agallocha* [81]

1) Les diterpènes : dérivés du daphnane et tigliane

C.Karalai et son équipe ont isolé à partir de latex frais les composés présents.

Le latex frais est mis en contact avec de l'acétone puis filtré et évaporé. L'extrait séparé en deux est mis en contact avec de l'eau pour l'un et avec de l'acétate d'éthyle pour le second ce qui permet d'extraire deux fractions (partage liquide / liquide) : une fraction hydrophile (aqueuse) et une fraction hydrophobe (organique).

La phase organique a ensuite été testée pour son pouvoir irritant. Il est déterminé par l'application de la substance sur une oreille de souris, la seconde servant de témoin négatif. L'unité irritante par 24h (IU²⁴) de cette fraction de 17 µg/oreille. Ce résultat implique que la fraction hydrophobe possède un pouvoir irritant moyen.

La phase aqueuse n'a pas été testée pour son pouvoir irritant ce qui aurait dû être effectuée pour comparer les deux fractions. Dans cette étude seule la fraction hydrophobe a été approfondie.

Différents composés ont pu être isolés de cet extrait : dans un premier temps ont été isolés des groupes de diterpènes non irritants : Facteurs critiques d'*Excoecaria A'* : Groupe I, II, III. Ces composés qui n'ont pas d'action irritante sont appelés généralement « facteurs cachés » ou « facteurs critiques ». En effet, ils peuvent être activés par une transestérification formant des groupes de facteurs qui ont une action irritante : A1 à A9. A ce stade les composés irritants endogènes n'ont pas été détectés.

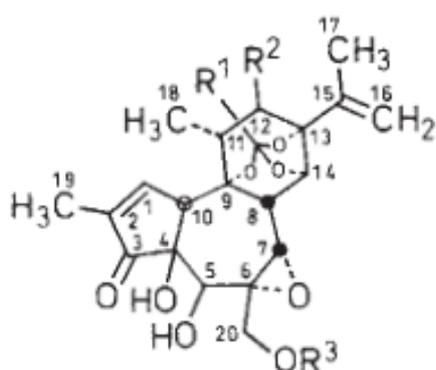
Mais, compte tenu de la présence d'entités fortement insaturées et donc très labiles une procédure plus rapide et plus douce a été élaborée par les chercheurs. Cette méthode a enfin permis d'isoler directement des diterpènes qui possèdent une action irritante : des facteurs irritants d'*Excoecaria A* : A1 A2 et A3.

Les composés du latex sont des terpènes qui appartiennent aux familles des daphnanes (facteurs irritants A1-A2-A3 ainsi que les groupes I et II des facteurs critiques (non irritants)) et des tiglanes (groupe III des facteurs critiques).

1.1) Dérivés du Daphnane

- **Le mélange des facteurs d'*Excoecaria A1 – A2 - A3*** (Figure 48) : C'est un mélange de composés dérivés de l'ester de 5β-hydroxyresiniferonol-6α,7α-époxyde.

Ce mélange a été découvert dans le latex sous cette forme :



- A1 : R1 : CH₃(CH₂)₈(CH=CH)₃ ; R2: H ; R3: H
- A2 : R1 : CH₃(CH₂)₆(CH=CH)₄ ; R2: H ; R3: H
- A3 : R1 : CH₃(CH₂)₄(CH=CH)₂ ; R2: H ; R3: H

Figure 48 : Mélange des facteurs d'*Excoecaria A1 – A2 - A3*. [81]

- **Facteurs critiques d'*Excoecaria A'* : les mélanges des groupes I et II :**

a) Le groupe I :

Le groupe I est un ensemble de molécules dérivées du 9,13,14-orthoester-20-esters de 5β-hydroxyresiniferonol-6α,7α-époxyde.

C'est le groupe le plus présent dans la fraction acétate d'éthyle en terme de rendement (27% de rendement contre 3,1% pour le groupe II et 6,2% pour le groupe III). Ces composés possèdent en R1 différents alkyls inconnus, R2 est un hydrogène et en R3 des longues chaines carbonées dont le nombre de carbones varient de 22 à 30.

Le détail des molécules n'est pas décrit dans cette étude puisque les molécules ne sont pas totalement identifiées.

b) Le groupe II :

Le groupe II est un ensemble de molécules dérivées du 9,13,14-orthoester-20-esters de 5 β ,12 β -dihydroxyresiniferonol-6 α ,7 α -epoxide. Ces structures sont très proches de celles du groupe I.

Ces composés possèdent en R1 différents alkyls inconnus, en R2 une fonction alcool et en R3 des longues chaines carbonées dont le nombre de carbones varient de 22 à 30.

Le détail des molécules n'est pas décrit dans cette étude puisque les molécules ne sont pas totalement identifiées.

1.2) Dérivés du tigliane

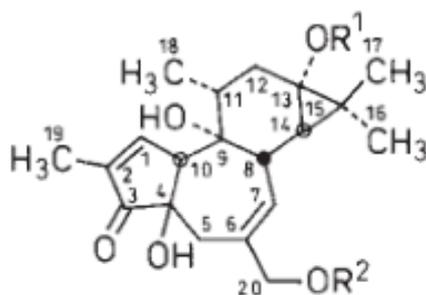


Figure 49 : Structure de base du mélange du groupe III. [81]

- Le mélange du groupe III

Le groupe III (Figure 49) est un ensemble de molécules dérivées du 13,20- diester du type de tigliane 12- deoxyphorbol avec de longues chaines aliphatiques saturées ou insaturées.

Ces composés possèdent en R1 différents alkyls inconnus et en R2 des longues chaines carbonées dont le nombre de carbones varient de 18 à 30.

Le détail des molécules n'est pas décrit dans cette étude.

2) Toxicité des composés présents dans le latex

Le pouvoir irritant est déterminé par l'application de la substance sur une oreille de souris, la seconde servant de témoin négatif.

Le témoin positif est une solution de TPA (Tétradécanoyl Phorbol Acétate) qui est reconnue pour provoquer des irritations.

Il est déterminé le DI50 qui est la Dose Irritante 50. Elle correspond à la dose pour laquelle 50% des souris présentent une irritation sur le lieu d'application.

2.1) Toxicité des composés initiaux

Le mélange A1 – A2 – A3 possèdent une dose irritante médiane ID_{50}^{24} (dose pour laquelle 50% des souris présentent une irritation sur 24h) de 0,0080 μ g/oreille ce qui évoque un pouvoir irritant important.

Le facteur A1 par comparaison est le facteur irritant M2 (ou 3) retrouvé dans *Hippomane mancinella* ou Mancenillier. [45]

- Les groupes I, II et III n'ont induit aucune activité irritante.

Ces résultats montrent que le latex d'*Excoecaria agallocha* possède bien des molécules bioactives à action irritante.

Les molécules A1 A2 et A3 ne se différencient des molécules du groupe I que par la longueur de la chaîne fixée en C20. Les molécules irritantes sont dénuées de ce groupement alkyl alors que les molécules non irritantes possèdent une longue chaîne alkyl en C20.

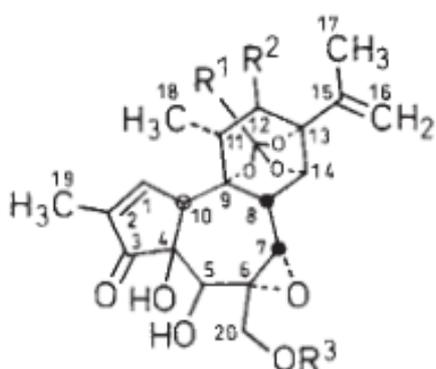
2.2) La transestérification

Les facteurs critiques d'*Excoecaria agallocha* (groupe I, II et III) sont mis en contact avec du méthoxyde de sodium (NaOCH₃) qui entraîne une réaction de transestérification. Cette réaction va faire un échange de la longue chaîne d'alkyle située en C20 par un hydrogène.

Les molécules ainsi formées sont les suivantes (Figure 50 et Figure 51) :

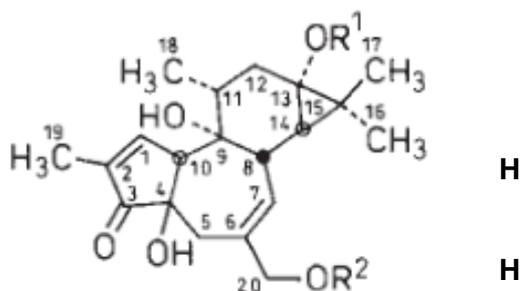
- Les facteurs de groupe I ont donné les composés A1 – A2 – A3 et A4 - A5
- Les facteurs de groupe II ont donné les composés A6 – A7
- Les facteurs de groupe III ont donné les composés A8 – A9

Il est important de noter que l'on retrouve dans ces molécules les facteurs A1 A2 et A3 qui ont été isolés précédemment à partir du latex. La concordance a été déterminée par comparaison des masses moléculaires et des spectres de masse des molécules.



- A1 : R1 : CH₃(CH₂)₄(CH=CH)₂ ; R2: H ; **R3: H**
 A2 : R1 : CH₃(CH₂)₈(CH=CH)₃ ; R2: H ; **R3: H**
 A3 : R1 : CH₃(CH₂)₆(CH=CH)₄ ; R2: H ; **R3: H**
 A4 : R1 : OHC(CH=CH)₂ ; R2: H ; **R3: H**
 A5 : R1 : OHC(CH=CH)₃ ; R2: H ; **R3: H**
 A6 : R1 : CH₃(CH₂)₈(CH=CH)₃ ; R2: H ; **R3: H**
 A7 : R1 : CH₃(CH₂)₆(CH=CH)₄ ; R2: H ; **R3: H**

Figure 50 : Facteur A1 à A7. [81] Rq : A4 et A5 peuvent être considérés comme le résultat d'une auto-oxydation de A1 et A2.



- A8 : R1 : CH₃(CH₂)₇(CH=CH)₂CH₂CO ; **R2: H**
 A9 : R1 : CH₃(CH₂)₇(CH=CH)₃CH₂CO ; **R2: H**

Figure 51 : Facteurs A8 et A9. [81]

2.3) Toxicité des molécules transestérifiées

Tableau 32 : Test d'irritation de l'oreille des souris impliquant les facteurs critiques d'*Excoecaria agallocha*. (- : omis). [81]

| Facteurs critiques d' <i>Excoecaria agallocha</i> | UI24 / DI2450 (µg/oreille) |
|---|----------------------------|
| I | > 50 / - |
| II | > 40 / - |
| III | 9 / 4,4 |

Tableau 33 : Test d'irritation de l'oreille des souris impliquant les facteurs post transestérification et détermination de ces facteurs. (n.d : non déterminé). [81]

| Facteurs critiques originaux | Facteurs post transestérification | |
|------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | UI24 / DI2450 (µg/oreille) | Facteurs identifiées |
| I | 0,05 / 0,037 | A1 /A2 / A3 |
| | n.d | A4 /A5 |
| II | 3,8 / n.d | A6 / A7 |
| III | 1,3 / 0,013 | A8 / A9 |

Les facteurs dérivés du groupe I : le mélange A1, A2, A3 possède un pouvoir irritant comme précédemment énoncé avec une UI²⁴ de 0.05µg/oreille et une DI²⁴₅₀ de 0.037µg/oreille (Tableau 33). Le même test effectué avec les facteurs critiques du groupe I avait montré une UI24 > 50 µg/oreille (Tableau 32) : pas de pouvoir irritant. Au vu de ce résultat la DI²⁴₅₀ n'a pas été effectuée.

De même pour le groupe de facteurs dérivant du groupe III : le mélange A8 et A9 possède une UI²⁴ de 1.3 µg/oreille et une DI²⁴₅₀ de 0.013 µg/oreille. Le test des facteurs critiques du groupe III avait présenté une UI²⁴ de 9 µg/oreille et une DI²⁴₅₀ de 4.4 µg/oreille.

Cette expérience montre l'importance de la nature du groupement en C20 pour le caractère irritant ou pas des molécules présentes dans le latex.

3) Discussion

Le latex des Euphorbiacées est connu pour sa toxicité chez certaines espèces. Une des plus connue est l'*Hippomane mancinella* ou Mancenillier. W.Adolf et E.Hecker [45] ont déterminé les facteurs composants le latex de l'Hippomane. Les familles chimiques retrouvées sont les même que pour *Excoecaria Agallocha*, les daphnanes et les tiglianes.

Cependant, leur étude a montré que les composés toxiques se situaient dans la partie hydrophile de l'extraction faite du latex et non dans la partie hydrophobe. L'étude précise aussi que la fraction hydrophile est minoritaire en quantité (5% de l'extrait) par rapport à la fraction hydrophobe (91,8% de l'extrait) [82]. Or, l'étude du latex d'*Excoecaria agallocha* ne portait que sur la partie hydrophobe de l'extraction certainement car cette fraction était majoritaire lors du fractionnement. Il serait intéressant de faire la même étude sur la partie hydrophile de l'extrait d'*Excoecaria agallocha* pour mettre en évidence peut être d'autres facteurs irritants d'*Excoecaria agallocha*.

4) Conclusion

Le latex d'*Excoecaria agallocha* est un mélange complexe de molécules dont certaines présentent une action irritante.

Toutes ces molécules possèdent des similitudes structurales avec comme noyaux de base soit le noyau daphnane soit le noyau tigliane. La seule différence entre les facteurs irritants et non irritants est la présence ou pas d'une longue chaîne alkyle positionnée en C20.

Les facteurs responsables de l'action irritante du latex sont les facteurs irritants A1, A2, A3 qui sont endogènes au latex. Ces composés ne possèdent pas de fonction alkyl en C20.

Les facteurs non irritants ou encore appelés facteurs critiques sont les composés des groupes I, II et III. Ils possèdent tous une longue chaîne alkyl en C20. Bien que non irritants ils peuvent être activés par une transestérification alcaline en composés très irritants.

Conclusion

Excoecaria agallocha est un arbre de mangrove peu ou pas connu en Europe. Il est par contre redouté par les habitants de la côte océanique d'Asie du Sud Est du fait des brûlures cutanées qu'il peut engendrer, heureusement le plus souvent sans séquelle à long terme. Il fait partie d'un environnement riche et complexe qui est celui de la mangrove. Cet écosystème permet le développement de multiples espèces qui ont toutes un point commun, leur capacité à survivre dans un milieu très hostile (humidité, immersion par de l'eau très salée).

La sauvegarde des mangroves et leur intégrité sont vitales pour un maintien de l'écosystème qui apporte nourriture et bois aux populations côtières.

Les arbres de mangroves sont encore peu connus des chercheurs scientifiques du point de vue de leurs compositions chimiques et de leurs propriétés pharmacologiques. Les études récentes sur *Excoecaria agallocha* ont permis de mettre en évidence une composition chimique variée, avec plus de 100 molécules isolées et décrites. Par ailleurs, des recherches ont été menées sur des extraits d'*Excoecaria agallocha* et leur potentiel intérêt en thérapeutique dans diverses pathologies, telles que le diabète, l'hypertension, les infections, les cancers et les douleurs. Ces études ne sont que les prémices de longues années de recherches et permettent de guider les chercheurs pour affiner les recherches.

A ce jour, aucune étude n'a pu prouver de façon précise une relation structure/activité fiable d'une molécule issue d'*Excoecaria agallocha*. De nombreuses études restent à effectuer pour pouvoir conclure si une ou des molécules qui composent *Excoecaria agallocha* peuvent avoir un intérêt pharmacologique et s'ajouter à l'arsenal thérapeutique que nous possédons.

Cette thèse a tenté de réunir un ensemble d'informations regroupant des recherches botaniques, chimiques, pharmacologiques et cliniques pour mieux appréhender l'écosystème des mangroves et le potentiel intérêt de ces plantes en thérapeutique, en utilisant l'exemple d'*Excoecaria agallocha*. Cette thèse pourra être complétée selon l'évolution des recherches et découvertes faites par les chercheurs dans les années à venir.

ANNEXE 1

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des molécules isolées d'*Excoecaria agallocha*.

| N° de la molécule | Formule brute | Formule développée | Organe source | Activité potentielle | Source bibliographique |
|-------------------|--|---|---------------|----------------------|------------------------|
| 1 | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | Ribenone | Bois | NT | [29] |
| 2 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | Ribenol | Bois | NT | |
| 3 | C ₂₀ H ₃₄ O | Ent-13-epi-monoyloxyde | Bois | NT | |
| 4 | C ₂₀ H ₃₂ O ₄ | Ent-11α-hydroxy-3-oxo-13-epi-manoyl oxide | Bois | NT | |
| 5 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | Ent-16-hydroxy-3oxo-13-epi-manoyl oxide | Bois | NT | |
| 6 | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | ent-15-hydroxy-labda-8(17),13^E-diene-3-one | Bois | NT | |
| 7 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | (13E)-labda-8(17),13-diène-3β,15-diol | Bois | NT | |
| 8 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | Excoecarin A | Bois | NT | [30] |
| 9 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | Excoecarin B | Bois | NT | |
| 10 | C ₂₀ H ₃₄ O ₃ | Excoecarin C | Bois | NT | |
| 11 | C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | Ent-13-epi-8,13-epoxy-2-hydroxylabdan-1,14diene-3-one | Bois | NT | [31] |
| 12 | C ₂₀ H ₃₄ O ₄ | Ent-13-epi-8,13-epoxy-2-hydroxylabdan-1,14diene-3-one | Bois | NT | |
| 13 | C ₂₀ H ₃₂ O ₅ | ent -13-8,13-epoxy-2,3-secolab-14-ene-2,3-dioicacid | Bois | NT | |
| 14 | C ₂₁ H ₃₄ O ₅ | ent -13-8,13-epoxy-2,3-secolab-14-ene-2,3-dioicacid-3-méthyl ester | Bois | NT | |
| 15 | C ₂₀ H ₃₀ O ₅ | Acide 13-épi-8,13-époxy-2-oxa-3-oxolabol-14-ène-1R-carboxylique | Bois | NT | |
| 16 | C ₂₀ H ₃₄ O ₄ | Excoecarin G1 | Bois | NT | [32] |
| 17 | C ₂₀ H ₃₄ O ₄ | Excoecarin G2 | Bois | NT | |
| 18 | C ₂₀ H ₃₃ ClO ₆ | Excoecarin F | Bois | NT | |
| 19 | C ₂₀ H ₃₄ O ₄ | Excoecarin H | Bois | NT | [33] |
| 20 | C ₂₁ H ₃₆ O ₅ | Agallochin M | - | NT | [28] |
| 21 | C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁ | Excoecarin R1 | Bois | NT | [34] |
| 22 | C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁ | Excoecarin R2 | Bois | NT | |
| 23 | C ₂₀ H ₃₂ O ₆ | Excoecarin S | Bois | NT | [35] |
| 24 | C ₂₀ H ₃₂ O ₆ | Excoecarin T1 | Bois | NT | |

| N° de la molécule | Formule brute | Formule développée | Organe source | Activité potentielle | Source bibliographique |
|-------------------|--|---|-------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 25 | C ₂₀ H ₃₂ O ₆ | Excoecarin T2 | Bois | NT | |
| 26 | C ₂₀ H ₃₃ ClO ₃ | Agallochin A | Racine | NT | [36] |
| 27 | C ₂₀ H ₃₃ O ₃ | Agallochin B | Racine | NT | |
| 28 | C ₂₁ H ₃₄ O ₃ | Agallochin C | Racine | NT | |
| 29 | C ₁₉ H ₃₀ O ₂ | Agallochin E | Racine | NT | |
| 30 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | ent-15,18-duhydroxylabda-8(17),13E-diène | tige | NT | [35] |
| 31 | C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | Agallochin D | Racines | NT | [28] |
| 32 | C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | Agallochin J | – | NT | |
| 33 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | Agallochin K | – | NT | |
| 34 | C ₁₉ H ₂₈ O ₃ | Agallochin L | – | NT | |
| 35 | C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | Agallochaols A | Tiges ou feuilles | NT | [37] |
| 36 | C ₂₀ H ₃₂ O ₅ | Agallochaol B | Tiges ou feuilles | NT | |
| 37 | C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | ent-3α,11β-dihydroxyisopimara-8(14),15-dien-2-one | Bois | NT | [28] |
| 38 | C ₂₀ H ₃₂ O ₄ | Agallochaol D | Tiges ou feuilles | NT | [38] |
| 39 | C ₂₀ H ₃₂ O ₅ | Agallochaol E | Tiges ou feuilles | NT | |
| 40 | C ₂₀ H ₃₂ O ₅ | Agallochaol F | Tiges ou feuilles | NT | |
| 41 | C ₂₀ H ₃₀ O ₅ | Excoecarin N | Bois | NT | [39] |
| 42 | C ₂₀ H ₃₂ O ₄ | Excoecarin V3 | Tiges | NT | [40] |
| 43 | C ₂₀ H ₃₄ O | ent-atisane-16α-ol | Tiges | NT | [28] |
| 44 | | ent-16β-hydroxyatisan-3-one | Inconnue | NT | |
| 45 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | Agallochaol C | Tiges ou feuilles | NT | [38] |
| 46 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | Agallochaol G | Tiges ou feuilles | NT | [41] |
| 47 | C ₂₀ H ₃₂ O ₄ | Agallochaol H | Tiges ou feuilles | NT | |
| 48 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | Agallochaol I | Tiges ou feuilles | NT | |
| 49 | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | Agallochaol J | Tiges ou feuilles | NT | |
| 50 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | Agallochaol Q | Tiges | Etude du pouvoir anti-inflammatoire | [42] |

| N° de la molécule | Formule brute | Formule développée | Organe source | Activité potentielle | Source bibliographique |
|-------------------|--|---|-------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 51 | C ₂₀ H ₃₀ O ₄ | Excoecarin V2 | Tige | NT | [40] |
| 52 | C ₂₀ H ₂₈ O ₆ | Excoecarin M | | NT | [39] |
| 53 | C ₁₉ H ₂₆ O ₄ | Agallochaol K | Tige | Etude du pouvoir anti-inflammatoire | [42] |
| 54 | C ₂₉ H ₃₆ O ₆ | Agallochaol L | Tige | NT | |
| 55 | C ₂₉ H ₃₆ O ₅ | Agallochaol M | Tige | NT | |
| 56 | C ₁₉ H ₂₆ O ₃ | Agallochaol N | Tige | NT | |
| 57 | C ₂₉ H ₃₆ O ₅ | Agallochaol O | Tige | Etude du pouvoir anti-inflammatoire | |
| 58 | C ₂₀ H ₃₂ O ₃ | Agallochaol P | Tige | NT | |
| 59 | C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | Excoecarins K | Tiges ou feuilles | NT | [43] |
| 60 | C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | Excoecarin D | Tiges ou feuilles | NT | [43] |
| 61 | C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | Excoecarin E | Tiges ou feuilles | NT | |
| 62 | C ₂₀ H ₃₀ O | Stachenol | Tiges ou feuilles | NT | |
| 63 | C ₂₀ H ₃₀ O | Stachenone | Tiges ou feuilles | NT | |
| 64 | C ₂₀ H ₂₉ O | ent-3β-hydroxybeyer-15-en-2-one | Tiges ou feuilles | NT | |
| 65 | C ₂₀ H ₃₀ O ₂ | Agallochin G | Racines | NT | |
| 66 | C ₂₀ H ₃₀ O ₃ | Agallochin H | Racines | NT | [44] |
| 67 | C ₁₉ H ₂₈ O ₃ | Agallochin I | Racines | NT | |
| 68 | C ₂₁ H ₂₈ O ₅ | 2-acetoxy-1,15-beyeradiene-3,12-dione | Racines | NT | |
| 69 | C ₂₀ H ₂₈ O ₄ | 2-hydroxy-1,15-beyeradiene-3,12-dione | Racines | NT | |
| 70 | C ₂₀ H ₃₂ O ₂ | ent-15,16-epoxy-beyerane-3α-ol | Bois | NT | [35] |
| 71 | C ₂₀ H ₂₈ O ₅ | ent-12-oxo-2,3-secobeyer-15-ene-2,3-dioic acid | Bois | NT | |
| 72 | C ₂₀ H ₃₀ O ₄ | Excoecarin V1 | Tiges | NT | [40] |
| 73 | C ₂₀ H ₃₀ O ₄ | ent-2,3-secobeyer-15-ene-2,3-dioic acid | Tiges | NT | |
| 74 | C ₂₁ H ₃₀ O ₃ | ent-3β-hydroxybeyer-15-ène-2,12-dione | Bois | NT | [28] |
| 75 | C ₃₆ H ₄₉ O ₈ | Facteur A1 | | Toxicité cutanée | [46] |
| 76 | C ₃₆ H ₄₇ O ₈ | Facteur A2 | | | |

| N° de la molécule | Formule brute | Formule développée | Organe source | Activité potentielle | Source bibliographique | |
|-------------------|---------------|--|-------------------|---|------------------------|------|
| 77 | C30H39O8 | Facteur A3 | | | | |
| 78 | C26H30O9 | Facteur A4 | | | | |
| 79 | C28H32O8 | Facteur A5 | | | | |
| 80 | C36H49O9 | Facteur A6 | | | | |
| 81 | C36H47O9 | Facteur A7 | | | | |
| 82 | C34H49O6 | Facteur A8 | | | | |
| 83 | C36H51O6 | Facteur A9 | | | | |
| 84 | C31H43O6 | ester-12-desoxyphorbol-13-(3E,5E-decadienoate) | Tiges ou feuilles | NT | | [47] |
| 85 | C20H34O2 | Excogallochaols A | Tiges ou feuilles | NT | | [48] |
| 86 | C20H36O4 | Excogallochaols B | Tiges ou feuilles | NT | | |
| 87 | C20H34O3 | Excogallochaols C | Tiges ou feuilles | NT | | |
| 88 | C20H34O4 | Excogallochaols D | Tiges ou feuilles | NT | | |
| 89 | C40H62O3 | 3β-[(2E,4E)-5-oxo-decadienoyloxy]dean-12-ene | Feuilles | NT | [28] | |
| 90 | C32H52O2 | β-amyrin acetate | Feuilles | NT | | |
| 91 | C30H49O | Taraxerone | Feuilles | NT | | |
| 92 | C30H50O | 3-epitaraxerol | Feuilles | NT | | |
| 93 | C30H50O | taraxerol | Feuilles | NT | | |
| 94 | C31H52O | 3-epilupeol | Feuilles | NT | | |
| 95 | C30H50O | Fridelin | – | NT | | |
| 96 | C30H50O | Fridelin3βol | – | NT | | |
| 97 | C30H52O | Fridelin3αol | – | NT | | |
| 98 | C32H50O3 | 3β-acetoxy-taraxer-14-en-28-oic acid | – | NT | | |
| 99 | C29H47O | β-amyrin | – | NT | | |
| 100 | C32H50O | β-amyrin acetate | – | NT | | |
| 101 | C30H46O | β-amyrone | – | NT | | |
| 102 | C30H48O | epiβ-amyrin | – | NT | | |
| 103 | C32H54 | Cycloartenol | – | NT | | |
| 104 | C30H51O2 | 3,28-dihydroxylupeol | – | NT | | |
| 105 | C30H48O2 | 28-hydroxylup-20-(29)-en-3-one | – | NT | | |
| 106 | C21H20O11 | - | Feuilles | Activité inhibitrice sur la voie Hedgehog | [50] | |
| 107 | C27H30O15 | - | Feuilles | | | |
| 108 | C21H20O10 | Afzeline | Feuilles | | | |
| 109 | C21H20O11 | Quercitrine | Feuilles | | | |

| N° de la molécule | Formule brute | Formule développée | Organe source | Activité potentielle | Source bibliographique |
|-------------------|---------------|--|---------------|--|------------------------|
| 110 | C27H30O16 | Rutine | Feuilles | | |
| 111 | C23H22O11 | Kaempferol-3-O-(2-O-acetyl-α-L-rhamnopyranoside) | Feuilles | | |
| 112 | C22H22O10 | Kaempferide-3-O-α-L-rhamnopyranoside | Feuilles | | |
| 113 | C20H18O10 | Kaempferol-3-O-α-L-arabinofuranoside (Testée pour une activité cytotoxique) | Feuilles | | |
| 114 | C21H22O11 | 3,5,7,3',5'-pentahydroxy-2R,3R-flavononol 3-O-α-L-rhamnopyranoside | Tiges | NT | [40] |
| 115 | C37H3024 | Excoecariphenol C | - | Inhibition de mécanismes impliqués dans l'Hépatite C | [53] |
| 116 | C46H36O31 | Excoecariphenol D | - | | |
| 117 | C21H24O11S | Excoecariphenol A | - | | |
| 118 | C21H24O12S | Excoecariphenol B | - | | |
| 119 | C14H6O8 | Acide ellagique | - | NT | [28] |
| 120 | C22H44O2 | Acide behénique | - | NT | |
| 121 | C8H8O5 | Methylgallate | - | NT | |
| 122 | C16H24O4 | Dibutyl phtalate | - | NT | |
| 123 | C20H30O4 | Diethylhexyl phtalate | - | NT | |
| 124 | C29H48O | Stigmast-4-en-3-one | - | NT | |
| 125 | C29H52O | β-Sitosterol | - | NT | |
| 126 | C22H31O2 | (E)-2,4-dimethoxy-3-(ψ,ψ-dimethylalkyl)cinnamoylpiperidine | - | NT | |
| 127 | C7H14O6 | Quebrachitol | - | NT | |

BIBLIOGRAPHIE

1. Tomlinson PB. The Botany of Mangroves. Cambridge University Press; 1994.
2. FAO. The world's mangroves. 2007
3. Barry Clough. Continuing the journey amongst mangroves. 2013.
4. Saenger P. Mangrove Ecology, Silviculture and Conservation. Springer; 2002.
5. Jin Eong Ong, Wooi Khoon Gong. Structure, function and management of mangrove ecosystems. ISME Mangrove Educational Book Series. 2013.
6. K. Kathiresan BLB. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems. Advances in Marine Biology. 2001;81–251.
7. Spalding M, Collins MS, Mami Kainuma and Lorna, Kainuma M, Collins L. World Atlas of Mangroves. 2010.
8. M.L Wilkie, Fortune S. Statuts and trends of mangrove area worldwide. Forest Ressources Assessment Working Paper. 2003.
9. Giri C, Ochieng E, Tieszen LL, Zhu Z, Singh A, Loveland T, et al. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. Global Ecology and Biogeography. 2011;20:154–9.
10. Ovees Ahmad Bhat, K.Sasidhar. Mangroves as a potential source of medecines. 2014;
11. Perillo GME, Wolanski E, Cahoon DR, Brinson MM. Coastal Wetlands : An Integrated Ecosystem Approach Chap 20. Elsevier; 2009.
12. Wim Giesen, Stephan Wulffraat, Max Zieren. Mangrove guidebook for Southeast Asia. 2006 Jul.
13. Eolpecies, rapid reponse ; Excreted salt crystals on surface of Black Mangrove (*Avicennia germinans*) leaf, near Perimirim, Augusto Corrêa, Pará, Brazil.
14. Flora cochinchinensis: sistens plantas in regno Cochinchina nascentes. Quibus accedunt aliæ observatæ in Sinensi imperio, Africa Orientali, Indiæque locis variis. Omnes dispositæ secundum systema sexuale Linnæanum. Ulyssipone. 1790.
15. Bunyaphatsara, Nuntavan. Plant ressources of South-Est Asia. 2001.

16. Cronquist A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press; 1981.
17. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2009;161:105–21.
18. Abrégé de botanique, 15ème édition -. Société Française d'Ethnopharmacologie. 2012.
19. Short PS, I.D. Cowie. *Flora of the Darwin Region*. 2011.
20. Rolland DOUZET. *Petit lexique de botanique à usage du débutant*. 2007th ed.
21. Hooker WJ. *Companion to the Botanical magazine*. 1836.
22. Engler, H.G.A. *Das Pflanzenreich Regni vegetalis conspectus - Euphorbiaceae-crotonioideae - Hippomeneae*. 1912.
23. T. Balasubramanian¹ 2. The effect of NaCl salinity on seed germination of *Excoecaria agallocha* L. *Current Botany*. 2011;1.
24. Wang L, Mu M, Li X, Lin P, Wang W. Differentiation between true mangroves and mangrove associates based on leaf traits and salt contents. *J Plant Ecol*. 2010.
25. Lanzotti PV. Diterpenes for Therapeutic Use. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, editors. *Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 3173–91.
26. *Dictionary of Natural Products*. 2014.
27. Xu R, Ye Y, Zhao W. *Introduction to Natural Products Chemistry*. CRC Press; 2011.
28. Yin B-W, Shen L-R, Zhang M-L, Zhao L, Wang Y-L, Huo C-H, et al. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Excoecaria*. *Chemistry & Biodiversity*. 2008;5:2356–71.
29. Konishi T, Azuma M, Itoga R, Kiyosawa S, Fujiwara Y, Shimada Y. Three New Labdane-Type Diterpenes from Wood, *Excoecaria agallocha*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1996;44:229–31.
30. Konishi T, Kiyosawa S, Konoshima T, Fujiwara Y. Chemical Structures of Excoecarins A, B and C: Three New Labdane-Type Diterpenes from Wood, *Excoecaria agallocha*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1996;44:2100–2.
31. Konishi T, Fujiwara Y, Konoshima T, Kiyosawa S. Five New Labdane-Type Diterpenes from *Excoecaria agallocha*. IV. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1998;46:1393–8.

32. Konishi T, Konoshima T, Fujiwara Y, Kiyosawa S, Miyahara K, Nishi M. Stereostructures of New Labdane-Type Diterpenes, Excoecarins F, G1, and G2 from the Wood of *Excoecaria agallocha*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1999;47:456–8.
33. Konishi T, Konoshima T, Fujiwara Y, Kiyosawa S. Stereostructure of Excoecarin H, a Novel seco-Labdane-Type Diterpene from *Excoecaria agallocha*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1998;46:721–2.
34. Konishi T, Yamazoe K, Konoshima T, Maoka T, Fujiwara Y, Miyahara K. New Bis-secolabdane Diterpenoids from *Excoecaria agallocha*. *Journal of Natural Products*. 2003;66:108–11.
35. Konishi T, Yamazoe K, Konoshima T, Fujiwara Y. Seco-labdane type diterpenes from *Excoecaria agallocha*. *Phytochemistry*. 2003;64:835–40.
36. Anjaneyulu AS., Rao VL. Five diterpenoids (agallochins A–E) from the mangrove plant *Excoecaria agallocha* Linn. *Phytochemistry*. 2000;55:891–901.
37. Wang J-D, Guo Y-W. Agallochols A and B, Two New Diterpenes from the Chinese Mangrove *Excoecaria agallocha* L. *Helvetica Chimica Acta*. 2004;87:2829–33.
38. Wang J-D, Li Z-Y, Guo Y-W. Secoatisane- and Isopimarane-Type Diterpenoids from the Chinese Mangrove *Excoecaria agallocha* L. *Helvetica Chimica Acta*. 2005;88:979–85.
39. Tenji Konishi TK. Novel diterpenes, excoecarins M and N from the resinous wood of *Excoecaria agallocha*. *Tetrahedron Letters*. 2000;41:3419–22.
40. Konishi T, Yamazoe K, Kanzato M, Konoshima T, Fujiwara Y. Three Diterpenoids (Excoecarins V1&V3) and a Flavanone Glycoside from the Fresh Stem of *Excoecaria agallocha*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2003;51:1142–6.
41. Wang J-D, Li Z-Y, Xiang W-S, Guo Y-W. Further New Secoatisane Diterpenoids from the Chinese Mangrove *Excoecaria agallocha* L. *Helvetica Chimica Acta*. 2006;89:1367–72.
42. Li Y, Liu J, Yu S, Proksch P, Gu J, Lin W. TNF- α inhibitory diterpenoids from the Chinese mangrove plant *Excoecaria agallocha* L. *Phytochemistry*. 2010;71:2124–31.
43. Konishi T, Konoshima T, Fujiwara Y, Kiyosawa S. Excoecarins D, E, and K, from *Excoecaria agallocha*. *Journal of natural products*. 63:344–6.
44. Anjaneyulu ASR, Rao VL, Sreedhar K. Ent-Kaurane and Beyerane Diterpenoids from *Excoecaria agallocha*. *Journal of Natural Products*. 2002;65:382–5.

45. Adolf W, Hecker E. On the active principles of the spurge family, X. Skin irritants, cocarcinogens, and cryptic cocarcinogens from the latex of the manchineel tree. *Journal of Natural Products*. 1984;47:482–96.
46. Karalai C, Wiriyaichitra P, Opferkuch H, Hecker E. Cryptic and Free Skin Irritants of the Daphnane and Tigliane Types in Latex of *Excoecaria agallocha*¹. *Planta Medica*. 1994;60:351–5.
47. Erickson KL, Beutler JA, Cardellina JH, McMahon JB, Newman DJ, Boyd MR. A Novel Phorbol Ester from *Excoecaria agallocha*. *Journal of Natural Products*. 1995;58:769–72.
48. Wang J-D, Zhang W, Li Z-Y, Xiang W-S, Guo Y-W, Krohn K. Elucidation of excogallochaols A-D, four unusual diterpenoids from the Chinese mangrove *Excoecaria agallocha*. *Phytochemistry*. 2007;68:2426–31.
49. Bruneton J. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. Paris; Cachan: Tec & Doc Lavoisier; 2009.
50. Rifai Y, Arai MA, Sadhu SK, Ahmed F, Ishibashi M. New Hedgehog/GLI signaling inhibitors from *Excoecaria agallocha*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011;21:718–22.
51. Binti Abdui Rahim A. *Caractérisations physico-chimiques des tannins de Mangrove comme inhibiteurs de corrosion*. Nancy 1; 2005.
52. *Faculté de pharmacie de Monastir- DCEP-1. Les tanins - Pharmacognosie*. 2013.
53. Li Y, Yu S, Liu D, Proksch P, Lin W. Inhibitory effects of polyphenols toward HCV from the mangrove plant *Excoecaria agallocha* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012;22:1099–102.
54. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;1830:3670–95.
55. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Product*. 2012;75:311–35.
56. K.Sasidhar. Ch. Tirupathi., Z.Vishnuvardhan and R. Hema Krishna4. A Review on Chemistry of Mangrove Plants and Prospects of Mangroves as Medicinal Plant. *International Journal of Green and Herbal Chemistry*. 2013;2:943–53.
57. Patil AD, Freyer AJ, Eggleston DS, Haltiwanger RC, Bean MF, Taylor PB, et al. The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *Journal of medicinal chemistry*. 1993;36:4131–8.

58. Minocha PK, Tiwari KP. A triterpenoidal saponin from roots of *Acanthus illicifolius*. *Phytochemistry*. 1981;20:135–7.
59. Sithranga Boopathy N, Kathiresan K. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. *Journal of Oncology*. 2011;2010.
60. Kapil A, Sharma S, Wahidulla S. Leishmanicidal Activity of 2-Benzoxazolinone from *Acanthus illicifolius in vitro*. *Planta Medica*. 1994;60:187–8.
61. Olivieri F, Prasad V, Valbonesi P, Srivastava S, Ghosal-Chowdhury P, Barbieri L, et al. A systemic antiviral resistance-inducing protein isolated from *Clerodendrum inerme* Gaertn. is a polynucleotide:adenosine glycosidase (ribosome-inactivating protein). *FEBS Letters*. 1996;396:132–4.
62. Patil R, Manohar SM, Upadhye MV, Katchi V, Rao AJ, Mule A, et al. Anti Reverse Transcriptase and Anticancer activity of stem ethanol extracts of *Excoecaria agallocha* (Euphorbiaceae). *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*. 2012;40.
63. Thierry ANDRE, Pascal HAMMEL. *Le cancer du pancréas en questions*. 2014.
64. Société canadienne du Cancer. *Statistiques de survie au cancer du pancréas*.
65. Teicher, Beverly A, Andrews, Paul A. *Anticancer Drug Development Guide - Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*. 2004.
66. R. C. Patil, , Sonal M. Manohar, , V. I. Katchi, , Asha J. Rao, and Alpana Moghe. Ethanollic Stem Extract of *Excoecaria Agallocha* Induces G1 Arrest or Apoptosis in Human Lung Cancer Cells Depending on Their P53 Status. *taiwania*. 2012;57:89–98.
67. OMS | Cancer, Aide-mémoire N°297. WHO. 2014.
68. Emmanuelle Bara, Stéphanie Belaud, Valérie Delavigne, Marianne Duperray. *Le traitement des cancers du poumon*. Collection guide de référence. Institut National du Cancer; 2010.
69. Lacave R, Larsen C-J, Robert J. *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext; 2005.
70. Mohamed Boumhras. *Atelier de cyométrie en flux* -. Memoire Online.
71. Guillaume Chatel. *Etude de la voie de signalisation Hedgehog dans les cancers du côlon*. 2009.
72. Sheikh A, Alvi AA, Aslam HM, Haseeb A. Hedgehog pathway inhibitors – current status and future prospects. *Infectious Agents and Cancer*. 2012;7:29.

73. Selvaraj G, Kaliamurthi S, Thirungnasambandam R, Vivekanandan L, Balasubramanian T. Anti-nociceptive effect in mice of thillai flavonoid rutin. *Biomedical and environmental sciences*. 2014;27:295–9.
74. Babuselvam, M.; Ravikumar, S.; Farook, K. A. Mohamed; Abideen, S.; Mohamed, M. Peer; Uthiraselvam, M., Ravikumar, S. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic effects on the extracts of different parts of *Excoecaria agallocha* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012;Vol. 2:p108.
75. M Rahman, A Siddika, B Bhadra, S Rahman. Antihyperglycemic Activity Studies on Methanol Extract of *Petrea Volubilis* L. (Verbenaceae) Leaves and *Excoecaria Agallocha* L. (Euphorbiaceae) Stems. *Advances in Natural and Applied Science*. 2010;
76. P. Thirunavukkarasu LR. Anti ulcer activity of *Excoecaria agallocha* bark on NSAID induced Gastric ulcer in albino rats. *Global Journal of Pharmacology*. 2009;3:123–6.
77. Lemoine C. *Les plantes toxiques*. Editions Jean-paul Gisserot; 2004.
78. Emeritus. *The Poisoned Weed: Plants Toxic to Skin: Plants Toxic to Skin*. Oxford University Press; 2004.
79. Jean BRUNETON. *Plantes toxiques - 3ème édition Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux. Éditions TECHNIQUE & DOCUMENTATION - LAVOISIER*. 2005.
80. Kumarasinghe SP, Seneviratne R. Skin and eye injury due to latex of *Excoecaria agallocha*. *Australas. J. Dermatol*. 1998;39:275–6.
81. Karalai C, Wiryachitra P, Opferkuch H, Hecker E. Cryptic and Free Skin Irritants of the Daphnane and Tigliane Types in Latex of *Excoecaria agallocha*¹. *Planta Medica*. 2007;60:351–5.
82. Valérie Rosemain. *Le Mancenillier Hippomane mancinella* L. 1997.

TITRE ET RESUME EN ANGLAIS

Excoecaria agallocha. L

Mangroves constitute a very special ecosystem where live organisms, animals and plants. They have to develop coping systems to live and survive, due to particular environmental conditions, such as the salinity of the environment or the immersion of the roots in water saturated soil.

Excoecaria agallocha, a species belonging to the family Euphorbiaceae, is a plant that lives in this ecosystem, especially in Southeast Asia and which is known for its toxicity. This plant has been the subject of phytochemical studies ; researchers are firstly interested in the compounds responsible for the toxicity of this plant, but also because of its particular way of life, in its secondary metabolites potentially gifted by biological activity and which would potentially be used in therapy.

Works reported in the literature have highlighted many secondary metabolites belonging to different chemical classes such as terpenes and flavonoids. Diterpenes, mostly isolated from the wood and stems, were particularly studied, and constitutes almost 70% of the molecules of this plant.

Relatively few pharmacological studies have focused on isolated molecules, such works described in the literature have mainly considered complex extracts of this plant. Some have suggested to have antiproliferative and analgesic activities. Finally, works on the toxicity of this plant have revealed the involvement of daphnanes type diterpenes and tiglanes in the toxicity induced by latex *Excoecaria agallocha*.

This bibliographic work allows to show interest in the mangrove plants, as part of the search for bioactive molecules via an example, *E. agallocha*, plant chosen for its potential high number of molecules associated with extreme living environment as well as toxicity.

RESUME : Les mangroves représentent un écosystème très particulier, dans lequel les organismes vivants, animaux et végétaux, ont dû développer des systèmes d'adaptation pour vivre et survivre, du fait de conditions environnementales particulières, telles que la salinité de ce milieu ou encore l'immersion des racines dans un sol saturé en eau.

Excoecaria agallocha, une espèce appartenant à la famille des Euphorbiacées, est une plante qui vit au sein de cet écosystème, notamment en Asie du sud-est, et qui est connue pour sa toxicité. Cette plante a fait l'objet d'études phytochimiques, les chercheurs s'intéressant d'une part aux composés responsables de la toxicité de cette plante, mais également, du fait de ses conditions de vie particulières, à des métabolites secondaires potentiellement doués d'une activité biologique et qui seraient éventuellement valorisables en thérapeutique.

Les travaux relatés dans la littérature ont mis en évidence de nombreux métabolites secondaires appartenant aux grandes familles chimiques tels que les terpènes et les flavonoïdes. Les diterpènes, principalement isolés du bois et des tiges, ont été particulièrement étudiés, et représentent presque 70% des molécules isolées de cette plante.

Relativement peu d'études pharmacologiques portent sur les molécules isolées, les travaux de ce type décrits dans la littérature portant majoritairement sur des extraits encore complexes de cette plante. Certains sembleraient présenter des activités antiprolifératives et antalgiques. Enfin, des travaux portant sur la toxicité de cette plante ont mis en évidence l'implication de diterpènes de type daphnanes et tiglanes dans la toxicité induite par le latex d'*Excoecaria agallocha*.

Ce travail bibliographique permet ainsi de montrer l'intérêt porté aux plantes de mangroves, dans le cadre de la recherche de molécules bioactives, via un exemple, *E. agallocha*, plante choisie pour sa potentielle richesse moléculaire liée à son milieu de vie extrême ainsi que sa toxicité.

Titre et résumé en Anglais : voir la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Pharmacie

MOTS-CLES : *Excoecaria agallocha* L. ; euphorbiacées ; écosystème ; mangrove ; diterpènes ; in vitro ; antiprolifératif ; toxicité.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

**Laboratoire de Pharmacognosie
Université Paul Sabatier Toulouse III
Faculté des Sciences Pharmaceutiques
31062 Toulouse Cedex 09, France**

Directeur de thèse : Mme VANSTEELANDT Marieke