

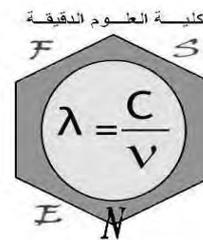
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE CONSTANTINE 1**

*Faculté des Sciences Exactes*

*Département de Chimie*



**THESE**

*Présentée pour l'obtention du titre de DOCTEUR ès SCIENCES*

*en Chimie Organique*

*Option Phytochimie*

*Par*

**NASSIRA KACEM**

*Thème*

**Etude phytochimique et valorisation biologique  
des deux plantes, *Genista quadriflora* Munby  
(Fabaceae) et *Convolvulus tricolor* L.  
(Convolvulaceae)**

*Soutenue le 25/10/2015*

***Membres du jury :***

Noureddine BEGHIDJA	Prof. Université Constantine 1	Président
Salah RHOUATI	Prof. Université Constantine 1	Encadreur
Kurt HOSTETTMANN	Prof. Université Genève - Suisse	Co-encadreur
Philippe CHRISTEN	Prof. Université Genève - Suisse	Examinateur
Jean François GOOSSENS	Prof. Université Lille 2 - France	Examinateur
Zoubir HARRAT	Prof. Institut Pasteur d'Alger	Examinateur

# *Remerciements*

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Salah Rhouati, pour m'avoir accueillie et permis de réaliser mon travail de doctorat dans son laboratoire "Laboratoire des Produits Naturels et de Synthèse Organique, Faculté des Sciences Exactes de Constantine". Aussi, je lui exprime mon immense reconnaissance pour sa confiance en me laissant un grand degré de liberté dans mes recherches tout en étant attentif et généreux en bons conseils.

Je souhaite également remercier mon co-encadreur, Monsieur le Professeur Kurt Hosttetmann, pour m'avoir accueillie dans son équipe avec gentillesse et bienveillance. C'est au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (LPP) de Genève que j'ai eu l'opportunité de réaliser la plus grande partie de ma thèse. Cela fut une expérience très enrichissante qui m'a donné la possibilité de me former en phytochimie avec des appareils modernes, et stimulante en m'ouvrant les portes du monde de la pharmacognosie en réalisant des tests biologiques en rapport avec des pathologies très importantes.

Je remercie Monsieur le Professeur Noureddine Beghidja de l'Institut de Chimie de Constantine<sup>1</sup>, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant la présidence de jury.

J'exprime particulièrement toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Philippe Christen du Laboratoire de Pharmacognosie de Genève, pour ses qualités pédagogiques, les discussions scientifiques et pertinentes, et surtout pour le précieux soutien moral et les encouragements pendant les périodes difficiles. C'est à la fois un privilège et un honneur qu'il me fait de siéger dans ce jury.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Jean-François Goossens, directeur du Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses CUMA (Université de Lille), pour sa compétence et son professionnalisme exemplaires qui m'ont permis, en un mois de stage effectué aux différents services de la Faculté de Pharmacie de Lille, de finaliser une bonne partie de mon travail de thèse. Egalement, je remercie le Pr. Goossens de prendre le temps de lire et d'évaluer mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Zoubir Harrat, directeur de recherche à l'Institut Pasteur d'Alger, qui me fait l'honneur en prenant part au jury de thèse. Egalement, je lui exprime toute ma gratitude pour sa collaboration qui m'a permis de réaliser des tests leishmanicides au service Eco-Epidémiologie Parasitaire.

Mes pensées vont également au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique qui m'a permis, en tant qu'enseignant-chercheur, de bénéficier d'une formation résidentielle de perfectionnement à l'Université de Genève pour une durée de 18 mois et cela par un versement d'une bourse de coopération couvrant la totalité de la période de détachement, le remboursement des frais de laboratoire, la couverture médico-sociale, et la prise en charge des frais de transport.

J'ai eu l'opportunité au cours de ce travail de recherche de réaliser plusieurs collaborations, sans lesquelles cette thèse n'aurait pu être menée à bien. Je remercie amplement toutes les personnes, sans distinction de titre, pour les compétences qu'elles m'ont apportées et enseignées attribuant d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Egalement, je les remercie pour la récolte de la matière végétale et son identification, les tests biologiques, la réalisation des différents spectres. Merci aussi pour le bon accueil de toutes et de tous qui m'a permis, à chaque fois, de m'intégrer et de m'adapter au rythme de travail au sein des différentes équipes de recherches. Tout en souhaitant que ces collaborations initiées se poursuivent, je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

- Université de Genève (Suisse)

Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie: Anne-Emmanuelle Hay, Andrew Marston, Silvian Cretton, Munir Humam, Aurélie Urbain, Claudia Simoes Avello, Gaëtan Glauser, Yves Allenbach, Philippe Eugster, Martine Cabo.

- Université de Lille 2 (France)

- Centre Universitaire de Mesures et d'Analyse (CUMA): Mostafa Kouach, Nathalie Duhal, Brigitte Callens, Céline Lenghart.
- Laboratoire de Pharmacognosie : François Bailleul, Vincent Roumy, Thierry Hennebelle.
- Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire : Nathalie Azarouel, Pierre Lazilliere.
- Laboratoire de Biochimie: Anne Muhr-Tailleux

- Équipe FIOCRUZ ainsi que l'Université d'Anvers.

- Institut Pasteur d'Alger : N. EDDAIKRA

- Université de Sétif : M. Kaabeche, L. Louail, F. Zaïdi, M. Maameche.

- Université de Constantine

- Laboratoire des Produits Naturels et de Synthèse Organique : A. Touil, R. Benkiniouar, A. Zellagui.
- Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications : F. Merouane.

Enfin, mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude vont à ma famille, pour l'affection, le soutien moral et les encouragements tout au long de mes études et durant cette thèse.

## *Abréviations, symboles et conventions*

AcOH	: Acide acétique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
APG	: <i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
ATP	: Adénosine triphosphate
BCG	: Bilié de Calmette et Guérin (vaccin antituberculose)
C-18	: Diméthyl octadécyl silane (phase inverse)
CC	: Chromatographie liquide sur colonne ouverte
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CDC	: <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CD <sub>3</sub> OD	: Méthanol deutéré
CDCl <sub>3</sub>	: Chloroforme deutéré
(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	: Acétone deutérée
CFU	: <i>Colony Forming Units</i>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	: Dichlorométhane
CHCl <sub>3</sub>	: Chloroforme
C.H.U.	: Centre Hospitalier Universitaire
CI <sub>50</sub>	: Concentration inhibitrice à 50%
COSY	: <i>COrrrelation SpectroscopY</i>
CPC	: Chromatographie de partage centrifuge
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
d	: Doublet
DAD	: <i>Diode Array Detector</i>
DEPT	: <i>Distortionless Enhanced Polarization Transfer</i>
$\delta_H$	: Déplacement chimique du proton
$\delta_C$	: Déplacement chimique du carbone
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DPPH	: 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle
EI	: <i>Electronic impact</i>
ESI	: <i>Electrospray Ionization</i>
EtOAc	: Acétate d'éthyle
FID	: Détecteur à ionisation de flamme
GC	: <i>Gaz Chromatography</i>
hbts	: habitants
HMBC	: <i>Heteonuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	: <i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS	: <i>High resolution mass spectrometry</i>
HSQC	: <i>Heteonuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	: Hertz

$^2J$	: Constante de couplage entre atomes séparés par 2 liaisons
$^3J$	: Constante de couplage entre atomes séparés par 3 liaisons
$^4J$	: Constante de couplage entre atomes séparés par 4 liaisons
i.d.	: <i>Internal diameter</i>
I.N.S.P	: Institut National de Santé Publique
IS	: Indice de sélectivité
m	: Multiplet
$[M-H]^-$	: Molécule déprotonée
MeOH	: Méthanol
MPLC	: Chromatographie liquide à moyenne pression
MS <sup>n</sup>	: Spectrométrie de masse en n étapes
M.S.P.R.H	: Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière
m/z	: Masse/charge électrique
NH <sub>4</sub> OH	: Ammoniaque
NOESY	: <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
$\lambda$	: Longueur d'onde
LC	: Leishmaniose cutanée
LMPH	: Laboratoire de Microbiologie, Parasitologie et Hygiène
LV	: Leishmaniose viscérale
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ppm	: Partie par million
q	: Quadruplet
RDA	: Retro-Diels-Alder
RI	: <i>Retention index</i>
RMN	: Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institut</i>
s	: Singulet
sh.	: Epaulement
sp.	: Espèce
ssp.	: Sous-espèce
SVF	: Sérum veau fœtal
t	: Triplet
TOCSY	: <i>TOTAL Correlation Spectroscopy</i>
TOF	: <i>Time of Flight</i>
$t_R$	: Temps de rétention
UPLC	: <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
uma	: Unité de masse atomique
UV	: Ultraviolet
WHO	: <i>World Health Organization</i>

Certaines abréviations sont signalées sous la forme *anglaise* car leurs équivalents en français ne sont que rarement utilisés.

## *Communication et publications*

Une partie de ce travail a fait l'objet d'articles publiés dans des revues scientifiques ainsi qu'une présentation sous forme de poster dans le cadre d'un congrès international.

### Publications

Nassira Kacem, Anne-Emmanuelle Hay, Andrew Marston, Amar Zellagui, Salah Rhouati, and Kurt Hostettmann (2012). **Antioxidant compounds from Algerian *Convolvulus tricolor* (Convolvulaceae) seed husks.** *Natural Product Communications*, 7(7), 873-874.

Nassira Kacem, Jean-François Goossens, Nathalie Duhal, Vincent Roumy, Thierry Hennebelle, Philippe Christen, Kurt Hostettmann, Salah Rhouati (2014). **Determination of alkaloids in endemic *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae).** *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 83-87.

Nassira Kacem, Vincent Roumy, Nathalie Duhal, Fateh Merouane, Philippe Christen, Kurt Hostettmann, and Salah Rhouati. **Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities** (Soumis).

### Communication

Kacem N., Hay A.E., Zellagui A., Rhouati S., and Hostettmann K. (2009). **Structural investigation of phytochemical compounds from Algerian plant *Convolvulus tricolor* (Convolvulaceae).** "57th International Congress and Annual Meeting of the GA | August 16 – 20, 2009, Geneva, Switzerland". *Planta Medica*, 75, 912.

## Table des matières

---

Remerciements	1
Abréviations, symboles et conventions	3
Publications et communications scientifiques	5
Table des matières	6

---

<b>AVANT PROPOS</b>	11
<b>I. INTRODUCTION</b>	13
<b>I.1. La famille Fabaceae</b>	14
I.1.1. Aspects botaniques et classification systématique	14
I.1.2. Distribution géographique	16
I.1.3. Intérêts écologiques et économiques	16
I.1.4. Toxicité des Fabacées et aspect pharmacologique	17
I.1.5. Présentation du genre <i>Genista</i>	18
I.1.6. Travaux phytochimiques antérieurs sur le genre <i>Genista</i>	19
I.1.6.1. Les alcaloïdes	19
I.1.6.1.1. Les alcaloïdes quinolizidiniques	20
I.1.6.1.2. Les alcaloïdes quinolizidiniques du genre <i>Genista</i>	22
I.1.6.1.3. Accumulation des alcaloïdes quinolizidiniques	31
I.1.6.1.4. Biosynthèse des alcaloïdes quinolizidiniques	31
I.1.6.1.5. Activités biologiques et toxicité des alcaloïdes quinolizidiniques	34
I.1.6.1.6. Autres alcaloïdes	36
I.1.6.2. Les flavonoïdes	37
I.1.6.3. Les huiles essentielles	42
I.1.6.4. Autres composés	45
I.1.7. Activités biologiques dans le genre <i>Genista</i>	45
<b>I.2. La famille Convolvulaceae</b>	49
I.2.1. Aspects botaniques et classification systématique	49
I.2.2. Distribution géographique	49
I.2.3. Présentation du genre <i>Convolvulus</i>	50
I.2.4. Travaux phytochimiques antérieurs sur le genre <i>Convolvulus</i>	50
I.2.4.1. Les alcaloïdes	51
I.2.4.1.1. Les alcaloïdes pyrrolidiniques simples	52
I.2.4.1.2. Les nicotinoïdes	53
I.2.4.1.3. Les alcaloïdes tropaniques	54
I.2.4.2. Les composés phénoliques	57
I.2.4.2.1. Les dérivés de l'acide caféique	57
I.2.4.2.2. Les coumarines	57
I.2.4.2.3. Les flavonoïdes	58

I.2.4.3. Les terpènes.....	59
I.2.4.3.1. Sesquiterpènes isolés dans le genre <i>Convolvulus</i> .....	59
I.2.4.3.2. Triterpènes isolés dans le genre <i>Convolvulus</i> .....	59
I.2.4.4. Les dérivés de terpènes isolés dans le genre <i>Convolvulus</i> .....	60
I.2.4.5. Autres composés.....	61
I.2.5. Activités pharmacologiques et biologiques dans le genre <i>Convolvulus</i> .....	62
<b>II. MATERIELS et METHODES</b> .....	64
<b>II.1. Méthodes de séparation analytique</b> .....	65
II.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	67
II.1.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolette/visible (HPLC-UV/VIS).....	67
II.1.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS).....	68
II.1.4. Chromatographie liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution à temps de vol (UPLC/HRMS-TOF) et (UPLC/HRMS).....	68
II.1.5. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) .....	69
<b>II.2. Méthodes chromatographiques préparatives</b> .....	71
II.2.1. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC).....	71
II.2.2. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) .....	72
II.2.3. Chromatographie liquide haute pression semi-préparative (HPLC semi-prép.).....	73
II.2.4. Chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	73
<b>II.3. Méthodes physico-chimiques d'identification</b> .....	73
II.3.1. Spectrométrie ultraviolet (UV).....	73
II.3.2. Spectrométrie de masse (MS).....	73
II.3.2.1. Ionisation par impact électronique (EI).....	74
II.3.2.2. Ionisation par <i>electrospray</i> (ESI).....	75
II.3.2.3. Analyseur quadripolaire.....	76
II.3.2.4. Analyseur à trappe ionique.....	76
II.3.2.5. Analyseur à temps de vol (TOF).....	78
II.3.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	79
II.3.4. Hydrolyse acide.....	81
<b>II.4. Investigation de <i>Genista quadriflora</i> Munby (<i>Fabaceae</i>)</b> .....	82
II.4.1. Aspects botaniques.....	82
II.4.2. Etude chimique.....	84
II.4.2.1. Extraction des alcaloïdes.....	84
II.4.2.2. Extraction de l'huile essentielle.....	87
II.4.2.3. Extraction des flavonoïdes.....	87

II.4.2.3.1. Matériel végétal et extraction.....	87
II.4.2.3.2. Screening HPLC/UV-MS de l'extrait méthanolique de <i>G. quadriflora</i> ...	88
II.4.2.3.3. Fractionnement de l'extrait MeOH de <i>G. quadriflora</i> .....	89
<b>II.5. Investigation de <i>Convolvulus tricolor</i> L. (<i>Convolvulaceae</i>).....</b>	<b>91</b>
II.5.1. Aspects botaniques.....	91
II.5.2. Etude chimique.....	93
II.5.2.1. Matériel végétal .....	93
II.5.2.2. Extraction.....	94
II.5.2.3. Screening HPLC/UV de l'extrait MeOH des graines de <i>C. tricolor</i> .....	95
II.5.2.4. Fractionnement de l'extrait MeOH des graines de <i>C. tricolor</i> .....	95
II.5.2.5. Screening HPLC/UV de l'extrait MeOH des écorces de graines de <i>C. tricolor</i> .....	96
II.5.2.6. Fractionnement de l'extrait MeOH des écorces de graines de <i>C. tricolor</i> .....	96
II.5.2.7. Screening HPLC/UV de l'extrait hydroalcoolique des écorces de graines de <i>C. tricolor</i>	98
II.5.2.8. Fractionnement de l'extrait hydroalcoolique des écorces de graines de <i>C. tricolor</i> .....	99
II.5.2.9. Screening HPLC/UV de l'extrait MeOH des tiges et feuilles de <i>C. tricolor</i> .....	100
II.5.2.10. Fractionnement de l'extrait MeOH des tiges et feuilles de <i>C. tricolor</i> .....	100
II.5.2.11. Screening HPLC/UV de l'extrait MeOH des fleurs de <i>C. tricolor</i> .....	102
II.5.2.12. Fractionnement de l'extrait MeOH des fleurs de <i>C. tricolor</i> .....	102
<b>III. RESULTATS et DISCUSSION.....</b>	<b>104</b>
<b>III.1. Analyse du contenu alcaloïdique de <i>Genista quadriflora</i> .....</b>	<b>105</b>
III.1.1. Identification des alcaloïdes détectés dans les parties aériennes.....	105
III.1.1.1. Alcaloïdes quinolizidiniques.....	106
III.1.1.1.1. Composés bicycliques ( <b>III.1.1</b> , <b>III.1.2</b> ).....	106
III.1.1.1.2. Composés tricycliques ( <b>III.1.3</b> , <b>III.1.4</b> , <b>III.1.5</b> , <b>III.1.6</b> ).....	107
III.1.1.1.3. Composés tétracycliques ( <b>III.1.7</b> , <b>III.1.8</b> , <b>III.1.9</b> , <b>III.1.10</b> , <b>III.1.11</b> )	112
III.1.1.2. Alcaloïdes pipéridiniques ( <b>III.1.12</b> , <b>III.1.13</b> , <b>III.1.14</b> , <b>III.1.15</b> , <b>III.1.16</b> ).....	115
III.1.1.3. Alcaloïdes nicotiniques ( <b>III.1.17</b> ).....	117
III.1.2. Identification des alcaloïdes dans les racines ( <b>III.1.12</b> , <b>III.1.13</b> , <b>III.1.15</b> , <b>III.1.2</b> , <b>III.1.3</b> , <b>III.1.4</b> , <b>III.1.8</b> , <b>III.1.9</b> , <b>III.1.19</b> , <b>III.1.20</b> ).....	119
III.1.3. Considérations biosynthétiques et discussion.....	123
<b>III.2. Analyse de l'huile essentielle de <i>Genista quadriflora</i> .....</b>	<b>126</b>
III.2.1. Identification des monoterpènes.....	126
III.2.2. Identification des sesquiterpènes.....	127
III.2.3. Identification des diterpènes.....	129
III.2.4. Autres composés .....	130
III.2.5. Discussion.....	131
<b>III.3. Identification structurale des composés type dérivés d'acides   hydroxycinnamiques isolés de <i>Convolvulus tricolor</i>.....</b>	<b>137</b>
III.3.1. Identification structurale du composé <b>EMG1(III.3.1)</b> .....	137
III.3.2. Identification structurale du composé <b>EMG2(III.3.2)</b> .....	143

III.3.3. Identification structurale du composé <b>EMG3(III.3.3)</b> .....	148
<b>III.4. Identification structurale de composés dérivés d'acides phénoliques et coumarines isolés de <i>Convolvulus tricolor</i></b> .....	157
III.4.1. Identification structurale du composé <b>EMEG1(III.4.1)</b> .....	157
III.4.2. Identification structurale du composé <b>EMEG2(III.4.2)</b> .....	159
<b>III.5. Identification structurale des flavonoïdes isolés du <i>Convolvulus tricolor</i> et de <i>Genista quadriflora</i></b> .....	163
<b>III.5.1. Dérivés de la quercétine</b> .....	164
III.5.1.1. Identification structurale du composé <b>EMTF4(III.5.1)</b> .....	164
III.5.1.2. Identification structurale du composé <b>EMTF5(III.5.2)</b> .....	169
III.5.1.3. Identification structurale du composé <b>EMGq7(III.5.3)</b> .....	173
III.5.1.4. Identification structurale du composé <b>EMFI6(III.5.4)</b> .....	180
<b>III.5.2. Dérivés du kaempférol</b> .....	183
III.5.2.1. Identification structurale du composé <b>EMTF6(III.5.5)</b> .....	183
III.5.2.2. Identification structurale du composé <b>EMTF8(III.5.6)</b> .....	186
III.5.2.3. Identification structurale du composé <b>EMFI7(III.5.7)</b> .....	190
III.5.2.4. Identification structurale du composé <b>EMTF2(III.5.8)</b> .....	194
III.5.2.5. Identification structurale du composé <b>EMGq12(III.5.9)</b> .....	200
<b>III.5.3. Dérivés de l'isorhamnétine</b> .....	201
III.5.3.1. Identification structurale du composé <b>EMEG5(III.5.10)</b> .....	201
III.5.3.2. Identification structurale du composé <b>EMTF9(III.5.11)</b> .....	206
III.5.3.3. Identification structurale du composé <b>EMAEg2(III.5.12)</b> .....	209
III.5.3.4. Identification structurale du composé <b>EMGq11(III.5.13)</b> .....	213
<b>III.5.4. Dérivés de l'apigénine</b> .....	214
III.5.4.1. Identification structurale du composé <b>EMGq5(III.5.14)</b> .....	214
III.5.4.2. Identification structurale du composé <b>EMGq3(III.5.15)</b> .....	219
<b>III.5.5. Composés type isoflavones</b> .....	221
III.5.5.1. Identification structurale du composé <b>EMGq6(III.5.16)</b> .....	221
III.5.5.2. Identification structurale du composé <b>EMGq13(III.5.17)</b> .....	224
<b>III.6. Discussion</b> .....	225
<b>IV. ACTIVITES BIOLOGIQUES</b> .....	228
<b>IV. A. Activité antiparasitaire</b> .....	229
<b>IV.A.1. Activité antileishmanienne</b> .....	229
IV.A.1.1. Leishmanioses.....	229
IV.A.1.2. Agent pathogène .....	231
IV.A.1.3. Traitements.....	232
IV.A.1.4. Situation de la leishmaniose en Algérie.....	238

<b>IV.A.2. Activité antipaludique</b> .....	241
IV.A.2.1. Paludisme.....	241
IV.A.2.2. Agent pathogène .....	241
IV.A.2.3. Traitements.....	242
IV.A.2.4. Situation du paludisme en Algérie.....	244
<b>IV.A.3. Protocoles expérimentaux des tests</b> .....	247
<b>IV.A.3.1. Test effectué à Fiocruz, Salvador, Bahia (Brésil)</b> .....	247
IV.A.3.1.1. Activité antiparasitaire contre <i>Leishmania amazonensis</i> .....	247
IV.A.3.1.2. Activité antiparasitaire contre <i>Plasmodium falciparum</i> .....	247
IV.A.3.1.3. Activité antiparasitaire contre <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	248
IV.A.3.1.4. Activité cytotoxique sur J774.....	248
<b>IV.A.3.2. Test effectué à l'Université d'Anvers (Belgique)</b> .....	248
IV.A.3.2.1. Activité antiparasitaire contre <i>Leishmania infantum</i> .....	248
IV.A.3.2.2. Activité antiparasitaire contre <i>Plasmodium falciparum</i> .....	249
IV.A.3.2.3. Activité antiparasitaire contre <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	249
IV.A.3.2.4. Activité antiparasitaire contre <i>Trypanosoma brucei</i> .....	249
IV.A.3.2.5. Activité cytotoxique sur MRC-5.....	250
<b>IV.A.3.3. Test effectué à l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie)</b> .....	250
IV.A.3.3.1. Activité antiparasitaire contre <i>Leishmania infantum</i> .....	250
IV.A.3.3.2. Activité antiparasitaire contre <i>Leishmania major</i> .....	250
<b>IV.A.4. Résultats et discussion</b> .....	251
<b>IV.B. Activité antibactérienne et activité antifongique</b> .....	256
IV.B.1. Protocole expérimental de l'activité antibactérienne réalisé à l'Université Constantine1.....	256
IV.B.2. Protocole expérimental de l'activité antifongique réalisé à l'Université Constantine1	257
IV.B.3. Résultats et discussion.....	258
<b>IV.C. Activité antiradicalaire sur le DPPH</b> .....	260
IV.C.1. Protocole expérimental de l'activité antiradicalaire réalisé à l'Université de Genève	260
IV.C.2. Résultats et discussion.....	260
<b>IV.D. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase</b> .....	262
IV.D.1. Maladie d'Alzheimer .....	262
IV.D.2. Protocole expérimental de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase réalisé l'Université de Genève.....	262
IV.D.3. Résultats .....	263
<b>CONCLUSIONS et PERSPECTIVES</b> .....	264
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	271
<b>ANNEXES</b> .....	288
<b>RESUMES</b> (arabe, anglais).....	297

# *Avant propos*

La phytochimie n'a pas perdu de son importance malgré son ancienneté et les développements dans les domaines de la biotechnologie de plus en plus pointus dans la recherche de médicaments. Le règne végétal est toujours une source inépuisable pour la recherche de composés pouvant présenter un intérêt pharmacologique. Les plantes présentent l'avantage d'être accessibles à tous, particulièrement aux pays en voie de développement. La mise au point continue de méthodes de criblages chimique et biologique contribue à l'obtention de composés actifs à partir d'extraits. Les techniques combinées HPLC/UV et HPLC/MS permettent une approche directe *on line* afin de déterminer la nature des composés actifs sans les isoler des extraits. En plus, cette science évolue et s'affine toujours davantage par la performance croissante des techniques analytiques et préparatives d'investigation, supportée par l'accès aux différentes banques de données de la littérature scientifique contribuant à l'identification des métabolites.

Les plantes synthétisent des métabolites primaires à partir de l'eau, de gaz carbonique et d'azote, et alimentent les grandes voies du métabolisme central. Bien que les métabolites secondaires (alcaloïdes, polyphénols, terpenoïdes..), synthétisés à partir des métabolites primaires, n'exercent aucune activité directe au niveau de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction..), on leur confère pourtant un rôle important comme insecticides, participation efficace à la tolérance des végétaux vis-à-vis des stress engendrés par la sécheresse, et les radiations UV. D'autre part, l'industrie pharmaceutique s'appuie amplement sur les métabolites secondaires végétaux pour l'élaboration de nouveaux médicaments.

En Algérie, il existe une importante diversité végétale due à la grande variété de zones bioclimatiques liées aux différences d'altitudes aussi bien qu'aux facteurs climatiques allant de l'humidité du Tell au Nord vers la grande aridité du Sahara au Sud. Néanmoins, seule une petite partie des espèces végétales est étudiée du point de vue chimique et pharmacologique. Par conséquent, les chances sont importantes d'isoler de nouveaux métabolites actifs ou de découvrir d'autres activités à des composés connus. D'autre part, l'Algérie compte parmi les pays les plus touchés par des pathologies réémergentes négligées comme la leishmaniose sévissant à l'état endémique avec trois formes cutanées et une viscérale, en plus de l'invasion du paludisme d'importation connaissant une hausse sérieuse. L'Algérie est également confrontée au phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Il en est de même pour la résistance aux mycoses qui connaissent une augmentation inquiétante. Or, les médicaments employés pour le traitement des différentes maladies sont pour la plupart à coût élevé, et présentent des effets secondaires importants, ce qui rend impératif de trouver des molécules qui sont à la fois actives et sélectives. Ainsi donc, toutes les voies à explorer sont intéressantes, et le règne végétal, par son potentiel, n'est pas des moindres.

Ainsi, notre travail s'inscrit dans une stratégie du Laboratoire des Produits Naturels et de Synthèse Organique de l'Université de Constantine en collaboration avec le Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie de l'Université de Genève, contribuant à une meilleure connaissance des constituants des espèces typiques de la flore algérienne, par des évaluations tout autant chimique, biologique, que taxonomique. C'est ce qui fait en grande partie l'intérêt de notre domaine, situé à l'interface de nombreuses sciences appliquées comme la chimie, la biologie, la pharmacie et la médecine. Dans cette thèse, nous nous sommes concentrés sur deux espèces végétales algériennes dont une plante endémique. La sélection des plantes a été faite sur la base d'une recherche bibliographique indiquant d'une part, l'absence de toute étude phytochimique de l'espèce endémique *Genista quadriflora* (Fabaceae) et d'autre part, sur le peu de travaux reportés sur la deuxième espèce *Convolvulus tricolor* (Convolvulaceae).

Cette thèse s'organise en quatre chapitres:

- Un premier chapitre dédié à la présentation botanique des familles et genres étudiés selon les avancées récentes dans la classification phylogénétique reportées par l'APG (*Angiosperm Phylogeny Group*). Nous y rapportons également un travail bibliographique approfondi répertorié selon le groupe de composés et éventuellement les activités biologiques déjà reportés dans les genres *Genista* et *Convolvulus*.
- Un second chapitre dans lequel nous donnons un aperçu sur les techniques de séparation analytiques et préparatives et également sur les méthodes physico-chimiques d'identification suivies durant ce travail. La seconde partie du chapitre est consacrée à l'étude botanique des espèces de notre travail. On y abordera l'étude chimique des deux plantes en exposant les différents protocoles d'extraction, les profils HPLC/UV-MS ainsi que les schémas de fractionnement des différents extraits.
- Un troisième chapitre regroupant l'ensemble des résultats de l'identification structurale suivi d'une discussion attentive et cela pour les différents composés détectés lors de ce travail.
- Un quatrième chapitre représentant l'évaluation biologique des différents extraits et fractions issus des deux plantes étudiées.

# *Chapitre I*

## *Introduction*

## I.1. La famille Fabaceae

### I.1.1. Aspects botaniques et classification systématique

La famille des Fabacées (**Fabaceae**) ou Légumineuses (**Leguminosae**) appartient à l'ordre des Fabales. C'est une des plus importantes familles parmi les Dicotylédones. Son nom est tiré du mot latin (*Faba*, fève). L'ordre des Fabales renferme uniquement quatre familles: *Fabaceae*, *Surianaceae*, *Quillajaceae* et *Polygaceae*. Les plantes de cet ordre, se caractérisent par leur gynécée qui est formé soit d'un seul carpelle, soit de plusieurs carpelles mais généralement libres entres eux, et de fleurs souvent zygomorphes (Botineau, 2010).

Le nom Fabacées, au sens limité, fut adopté en classification classique de Cronquist (1981), et désigne le groupe des *Fabaceae* ou *Papilionaceae* qui représente la sous-famille des *Faboideae*. En classification phylogénétique APG II (2003), le nom Fabacées prend un sens large et indique le groupe des *Fabaceae* ou *Leguminosae* qui comprend les trois sous-familles : *Faboideae*, *Caesalpinioideae*, et *Mimosoideae*. La position systématique des Fabacées est présentée dans le **Tableau I.1** (Engler, 1889; Cronquist, 1981; Thorne, 1992; Haston, 2009).

**Tableau I.1.** Classifications évolutives de la famille *Fabaceae*.

	Engler (1889-1921)	Cronquist (1981)	Thorne (1992)	APG II (2003)*	APG III (2009)*
Règne	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae	Plantae
Embranchement	Embryophyta	Magnoliophyta	Spermatophytae	Spermatophytae	Spermatophytae
Sous-embranchement	Angiospermae		Angiospermae	Angiospermae	Angiospermae
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida	Magnoliidae	Eudicotyledonae	Equisetopsida
Sous-classe	Archichlamydeae	Rosidae	Rutanae	Rosidae	Magnoliidae
Ordre	Rosales	Fabales	Rutales	Fabales	Fabales
Sous-ordre	Leguminosineae		Fabineae	Eurosidae I	
Famille	Leguminosae	Fabaceae (= Papilionaceae) Mimosaceae Caesalpiniaecae	Fabaceae	Fabaceae (= Leguminosae)	Fabaceae (= Leguminosae)
Sous-famille	Faboideae Caesalpiniaecae Mimosaceae		Faboideae Caesalpiniaecae Mimosaceae Swartzioideae	Faboideae Caesalpiniaecae Mimosaceae	Faboideae Caesalpiniaecae Mimosaceae

\*Angiosperm Phylogeny Group (APG): est un groupe de botanistes travaillant sur la phylogénétique végétale, en utilisant les techniques moléculaires, génétiques et l'analyse des clades (= branches).

Les Fabacées sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles. Les espèces de cette famille sont des plantes à fleurs généralement hermaphrodites régulières ou irrégulières. Le périanthe est généralement double. Le calice est caduc ou persistant, tubuleux ou en cloches, à 5 sépales constituant parfois deux lèvres. La corolle zygomorphe est le plus souvent constituée de 5 pétales.

Les étamines sont au nombre de 5-10 ou très nombreuses, très souvent à filets soudés en un tube staminal fendu ou non, contenant l'ovaire et lui-même contenu dans la carène. Les filets sont monadelphes (tous soudés entre eux), diadelphes (9 soudés et un libre), ou complètement libres. Le gynécée est supère, sessile ou stipité, constitué d'un seul carpelle. Le style est terminal et variable. Le fruit est variable, le plus souvent sec et capsulaire (gousse ou légume), déhiscent par 2 valves. Les feuilles sont simples ou composées, ordinairement alternes et stipulées, parfois plus ou moins entièrement transformées en vrilles (Quezel, 1962).

Avec presque 19500 espèces réparties en plus de 751 genres (The Legume Phylogeny Working Group, 2013), les *Fabaceae* constituent par ordre d'importance le troisième ensemble des Phanérogames (après les *Asteraceae* et les *Orchidaceae*) (Botineau, 2010).

Actuellement, trois sous-groupes sont reconnus à l'intérieur des *Fabaceae* : les *Faboideae*, les *Caesalpinioideae* et les *Mimosoideae*. Dans la plupart des classifications, ces groupes sont considérés comme des sous-familles (Polhill, 1981), cependant elles sont parfois traitées en familles indépendantes (Cronquist, 1981).

Les caractères floraux permettent de distinguer trois-sous familles (**Fig.I.1**), assez différentes entre elles (Judd, 2002; Ozenda, 2004).

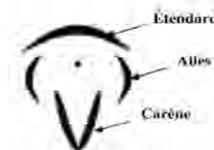
- 
- ***Mimosoideae*** avec fleurs actinomorphes, valvaires et peu apparentes. Une corolle régulière, formée de 4 à 5 pétales et les étamines sont libres entre elles.



- 
- ***Caesalpinioideae*** avec fleurs zygomorphes mais non papilionacées, imbriquées ascendantes et généralement grandes. Corolle irrégulière, qui comprend 5 pétales dont deux inférieurs plus grands recouvrent par leurs bords partiellement les deux latéraux. Les étamines au nombre de 10 sont libres entre elles jusqu'à leur base.



- 
- ***Faboideae*** ou ***Papilionoideae*** avec fleurs papilionacées (un étendard, deux ailes et une carène), les deux pétales inférieurs soudés ou cohérents au sommet. Les étamines au nombre de 10 sont soudées par leurs filets, suivant le genre elles le sont toutes, ou bien l'étamine supérieure reste libre.



**Figure I.1.** Caractères floraux des sous-familles des Fabacées.

### I.1.2. Distribution géographique

La famille est cosmopolite. Elle est particulièrement concentrée dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes comme en Afrique du Sud ou le pourtour méditerranéen (**Fig.I.2**). Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées sont riches en espèces herbacées (Heywood, 1996; Schrire, 2005).



**Figure I.2.** Distribution de la famille Fabaceae (Heywood 1996).

### I.1.3. Intérêts écologiques et économiques

C'est une famille qui a une grande importance économique, les légumineuses riches en graines (jusqu'à 70% du poids sec) représentent, d'une part, une source de protéines végétales pour l'alimentation humaine : *Phaseolus* (haricots), *Pisum sativum* (pois), *Lens culinaris* (lentilles), *Vicia faba* (fève), *Cicer arietinum* (pois chiche), *Glycine max* (soja). Par ailleurs, un certain nombre d'espèces à graines oléagineuses comme l'*Arachis hypogaea* L., une herbe qui permet d'obtenir l'huile d'arachide; on consomme aussi les graines, qui sont les cacahuètes. De même, le *Glycine max* (L.) Merr. (Soja), dont l'huile est de plus en plus consommée. D'autre part, beaucoup de Fabacées sont cultivées comme plantes fourragères, destinées à l'alimentation animale, sous forme de prairies « naturelles » à *Trifolium repens* (trèfles) et *Lotus* ou « artificielles » à *Onobrychis viciifolia* Scop. (Sainfoin), et surtout à *Medicago sativa* (luzernes) (Spichiger, 2004; Botineau, 2010).

Certains *Dalbergia* spp. d'Afrique, de Madagascar, d'Asie, produisent des bois précieux (ébène d'Afrique, palissandres, bois de rose). Alors que, certaines espèces (*Spartium junceum*, *Crotalaria juncea*, ou chanvre du Bengale) fournissent des fibres textiles. D'autre part, les copals (résines) provenant en particulier du *Hymenaea courbaril* L., source du copal du Brésil, et de *H. verrucosa* Gaertn, de l'Est de l'Afrique, source du copal de Madagascar, sont utilisés dans l'industrie des vernis (Botineau, 2010).

Par ailleurs, il a été cité que la gomme arabique (= hétéroglycane), obtenue à partir de l'*Acacia senegal* (L.) Willd. est utilisée comme stabilisant et émulsionnant [E414], alors que, la gomme adragante issue d'un sous-arbrisseau très épineux, *Astragalus gummifer* Labillardière, est utilisée comme épaississant [E413] (Botineau, 2010).

De plus, l'agriculture utilise très largement les Fabacées dans la rotation culturale du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à leurs nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azotes (rhizobiums) (Judd, 2002). Il s'ensuit une symbiose entre la plante infestée et la bactérie : celle-ci fixe l'azote atmosphérique en empruntant l'énergie nécessaire dans les sucres fournis par la plante, et en retour, la plante utilise l'ammoniac synthétisé par la bactérie (Botineau, 2010).

#### **I.1.4. Toxicité des Fabacées et aspect pharmacologique**

La présence de certains métabolites secondaires dans les Fabacées peut entraîner des intoxications de façon directe ou indirecte (Botineau, 2010):

- certains acides aminés non constitutifs, nombreux dans les Fabacées, et qui sont fournis par les bactéries fixatrices d'azote, perturbent gravement les chaînes métaboliques, provoquant les troubles du lathyrisme, qui se produisent à la suite de la consommation d'espèces du genre *Lathyrus*. Cela se traduit chez l'homme par une paralysie progressive des muscles. De véritables « épidémies » ont eu lieu lors de périodes de famines en France en 1700-1701 puis en 1856, lorsque la farine de « jarousse » (*Lathyrus sativus*) a remplacé la farine de blé.
- des intoxications hépatiques et cardio-pulmonaires, dues à la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans des espèces du genre *Crotalaria*, en particulier *Crotalaria retusa*, suite à la consommation de céréales contaminées par les graines, ou suite à l'utilisation de ces plantes pour soigner des troubles grippaux ou asthmatiques.
- contamination suite à la présence de champignons du type *Aspergillus* développés sur les graines en cas d'humidité, et qui élaborent des aflatoxines cancérigènes.
- la principale allergie alimentaire est celle à l'arachide (*Arachis hypogaea*) à cause des allergènes présents dans les graines (cacaahuètes), mais aussi dans l'huile et le beurre d'arachide.
- maladie du favisme, maladie génétique, affectant les populations après absorption de fèves, graines de *Vicia faba*, se traduisant par des troubles neurologiques et hématologiques. Cela est dû au manque d'une enzyme, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase qui joue un rôle de détoxification.
- la glycyrrhizine de la réglisse, présente une action minéralo-corticoïde, qui se traduit par une rétention de sodium et d'eau, accompagnée d'une perte de potassium. Cela provoque un œdème au niveau de la face, des anomalies cardiaques, d'où un risque d'hypertension.

D'autres espèces appartenant à la famille des Fabacées sont plutôt médicinales (Spichiger, 2004; Botineau, 2010):

- le baume de tolu du Pérou, élaboré dans les poches sécrétrices d'arbres sud-américains du genre *Myroxylon*, est utilisé comme antispasmodique, expectorant et antiseptique.
- la racine de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*), est utilisée comme expectorant, anti-inflammatoire, contre les coliques et les brûlures gastriques.
- les tanins du cachou (*Acacia catechu*), utilisés comme anti-diarrhéique.
- les gousses et feuilles du cassié (*Cassia angustifolia*), utilisées comme laxatif et purgatif.
- la gomme du tamarin (*Tamarindus indica*), riche en pectine, sucres simples ainsi qu'en acides organiques (tartrique, malique, citrique), est utilisée comme laxatif doux.
- le mélilotoside (hétéroside) des feuilles de Mélilot (*Melilotus officinalis*), présente des propriétés sédatives et anti-inflammatoires oculaires.
- l'écorce de l'«Arbre de peau» ou Tepescohuite (*Mimosa tenuiflora*) est utilisée depuis la civilisation des Mayas au Mexique dans le traitement des affections dermatologiques, en particulier dans le cas de brûlures.

### **I.1.5. Présentation du genre *Genista***

Le genre *Genista* dont le nom dérive du mot latin *genesta* qui signifie arbuste, appartient à la famille des *Fabaceae* et à la sous-famille cosmopolite des *Faboideae*. Cette sous-famille est la plus importante des Légumineuses, et compte 478 genres, 28 tribus et 13800 espèces (Lewis 2005). Les genres les plus importants sont: *Astragalus* (2000 ssp.), *Indigofera* (700), *Tephrosia* (400), *Trifolium* (300), *Lupinus* (200) (Judd, 2002; Spichiger, 2004). Le genre *Genista*, compte environ 200 espèces de genêts distribuées dans tous les points du globe mais principalement dans la région méditerranéenne (Marino, 2012).

Les plantes du genre *Genista*, sont des arbrisseaux épineux ou parfois inermes et junciformes, caractérisées par des feuilles mono à tri-foliolées, stipulées ou non. Le calice est à 5 segments, les 2 supérieurs libres ou soudés, les 3 inférieurs formant une lèvre à 3 dents profondes. Plus rarement, le calice est campanulé à 5 dents subégales. La carène est oblongue, dressée, biggibeuse latéralement. L'étendard est étroit. Les 10 étamines (5 longues et 5 courtes) sont monadelphes, en tube non fendu. Le stigmate est oblique. La gousse est déhiscence et variable. Les graines sont non arillées (Quezel, 1962).

La classification systématique du genre *Genista* (Pardo, 2004) est présentée comme suit :

<b>Règne :</b>	<i>Plantae</i>
<b>Embranchement :</b>	<i>Spermatophytae</i>
<b>Sous-embranchement :</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Classe :</b>	<i>Equisetopsidae</i>
<b>Sous-classe :</b>	<i>Magnoliidae</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Fabales</i>
<b>Famille :</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Sous-famille :</b>	<i>Faboideae</i>
<b>Tribu :</b>	<i>Genisteae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Genista</i>

L'aire de distribution du genre *Genista* est circum-méditerranéen et s'étend jusqu'au nord-est de l'Europe. Le genre est également très répandu à l'ouest de la Russie, en Turquie, en Syrie et au Caucase (Gibbs, 1966). Les espèces du genre ont une grande plasticité écologique, elles sont présentes dans des territoires soumis à des conditions bioclimatiques très différentes, depuis les zones semi-arides jusqu'aux zones très humides (Azzoui, 2000). En Afrique du Nord, la concentration des plantes du genre est observée en Algérie et au Maroc. En effet, l'Algérie est représentée par 23 espèces, parmi lesquelles 11 sont endémiques (Quezel, 1962; Maire, 1987), alors que le Maroc compte 26 espèces dont cinq sont endémiques, toutes liées aux zones de montagnes (Rif, Moyen Atlas, chaînes orientales, Haut Atlas, et Atlas saharien) (Azzoui, 2000).

#### **I.1.6. Travaux phytochimiques antérieurs sur le genre *Genista***

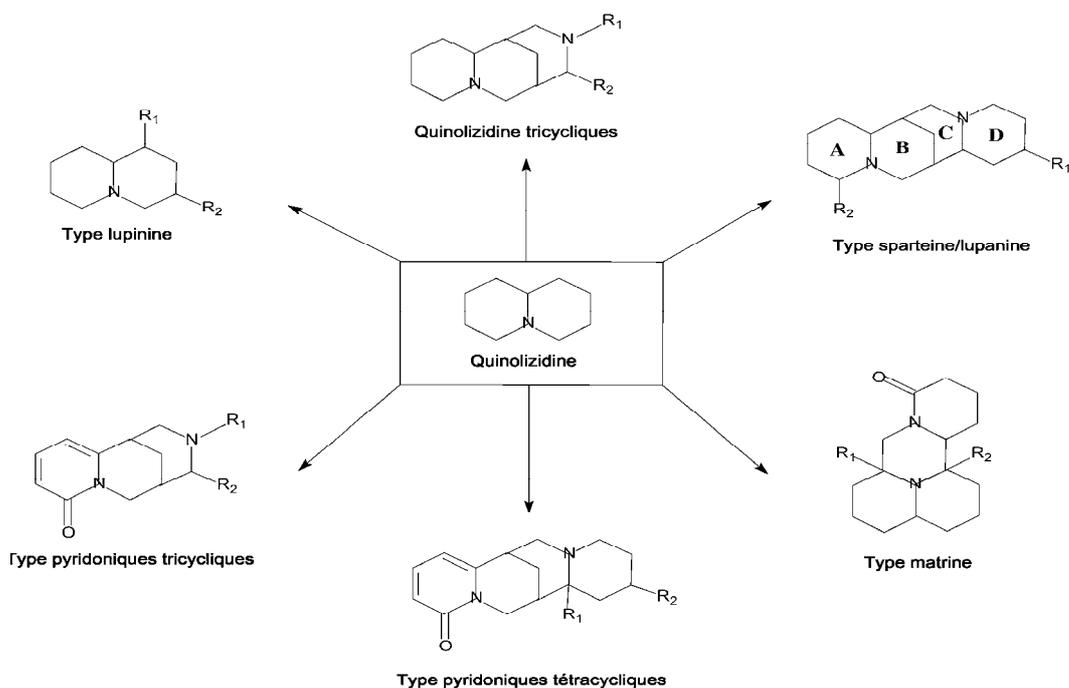
Nous trouvons dans le genre *Genista* les grandes classes de métabolites secondaires typiques de la famille des Fabacées, tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes et les huiles essentielles. Les alcaloïdes constituent un important groupe de produits naturels au sein de la famille des Fabacées et sont souvent considérés comme des marqueurs chimotaxonomiques du genre *Genista* (Greinwald, 1995a).

##### **I.1.6.1. Les alcaloïdes**

Le terme d'alcaloïde (de "al Kaly" = base en arabe) est introduit par le pharmacien allemand Wilhelm MEISSNER pour la première fois en 1819. Un alcaloïde est défini comme étant un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques (Bruneton, 1987). Les alcaloïdes sont des principes actifs de nombreuses plantes médicinales ou toxiques connues depuis l'antiquité. Ils sont à l'origine de nombreux médicaments utilisés en thérapeutique moderne telles que la morphine, la quinine et la cocaïne.

### I.1.6.1.1. Les alcaloïdes quinolizidiniques

Les alcaloïdes prédominants dans la famille des *Fabaceae* sont de type quinolizidinique. Ils sont abondants dans les différentes plantes de la sous-famille des *Papilionadeae* contenant les tribus *Genisteeae*, *Sophoreae*, *Podalyrieae*, et *Thermopsideae* (kinghorn, 1984; Wink, 1993a). Les espèces du genre *Genista* appartenant à la tribu *Genisteeae*, sont riches en alcaloïdes quinolizidiniques (AQs) et peuvent être divisés en 6 groupes structuraux (**Fig.I.3**).

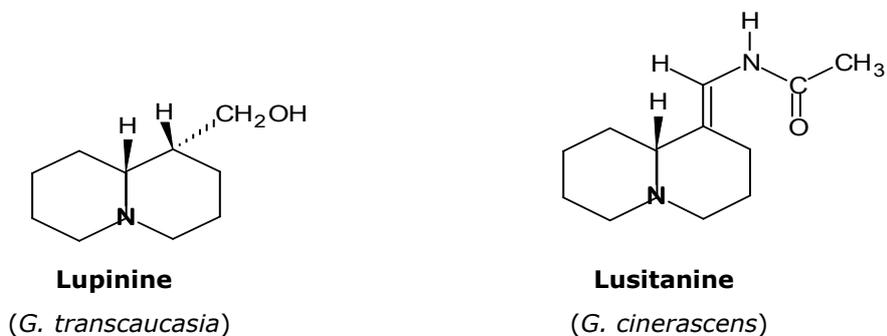


**Figure I.3.** Différents types d'alcaloïdes quinolizidiniques du genre *Genista* (Fabaceae).

#### I.1.6.1.1.1. Les alcaloïdes quinolizidiniques bicycliques

Les AQs bicycliques sont rarement trouvés dans les plantes appartenant au genre *Genista* (Wink, 2010). Il a été reporté l'identification de 2 molécules: la lupinine (Bostogonashvili, 1967) et la lusitanine (Greinwald, 1992).

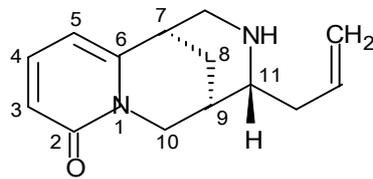
Exemples:



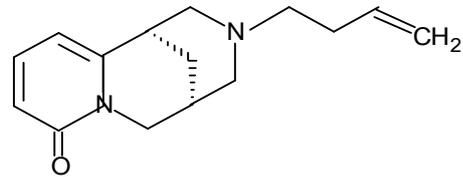
### I.1.6.1.1.2. Les alcaloïdes quinolizidiniques tricycliques

#### a. Type pyridonique

Exemples:



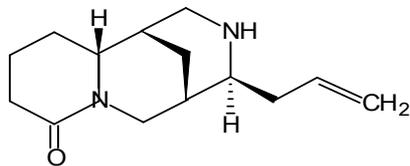
**11-α-Allylcytisine**  
(*G. tinctoria*)



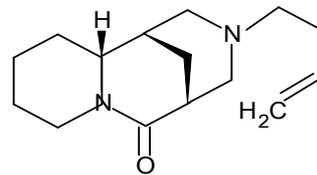
**Rhombifoline**  
(*G. tenera*)

#### b. Type non pyridonique

Exemples:



**Angustifoline**  
(*G. majorica*)

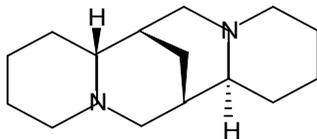


**Virgiboidine**  
(*G. monspessulana*)

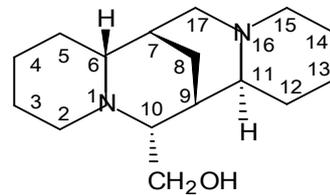
### I.1.6.1.1.3. Les alcaloïdes quinolizidiniques tétracycliques

#### a. Type spartéine

Exemples:



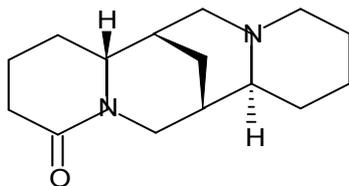
**Spartéine**  
(*G. florida*)



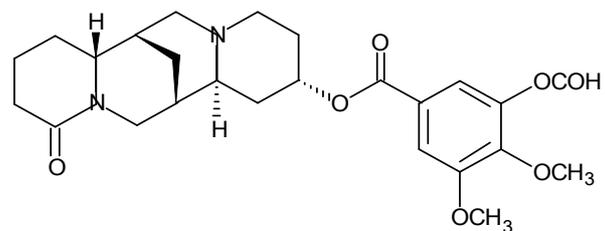
**10-α-Hydroxyméthylspartéine**  
(*G. sessilifolia*)

#### b. Type lupanine

Exemples:



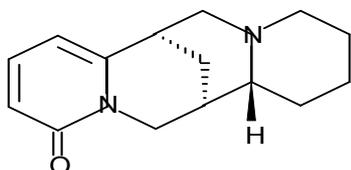
**Lupanine**  
(*G. acanthoclada*)



**Formylcinégalléine**  
(*G. cinera* DC.)

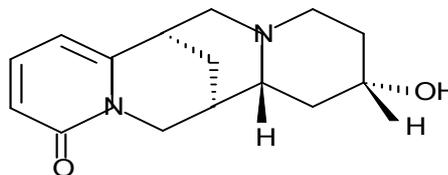
### c. Type pyridonique

Exemples:



**Anagrine**

(*G. aethnensis* DC.)

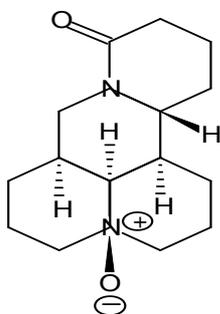


**Baptifoline**

(*G. depressa* DC.)

#### I.1.6.1.1.4. Les alcaloïdes quinolizidiniques de type matrine

Exemple:



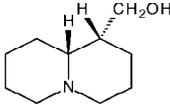
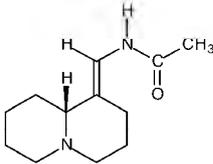
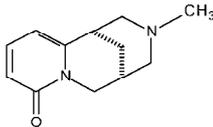
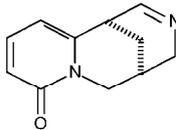
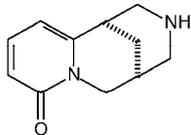
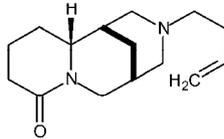
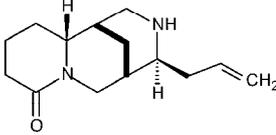
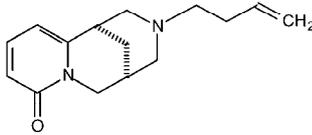
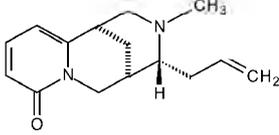
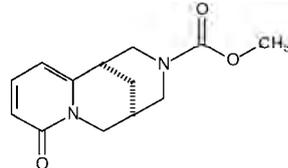
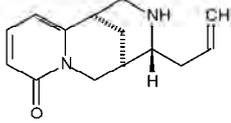
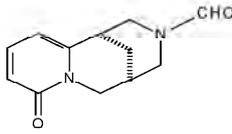
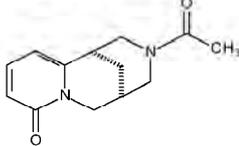
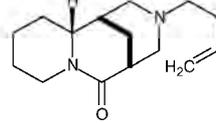
**Oxymatrine**

(*G. aucheri*)

#### I.1.6.1.2. Les alcaloïdes quinolizidiniques du genre *Genista*

La GC/MS est la méthode d'analyse la plus utilisée pour l'identification des différentes structures d'alcaloïdes quinolizidiniques reportées dans le genre *Genista*. Ils peuvent être caractérisés par leurs indices de Kovats en plus des données MS (Wink, 1983a; Wink, 1995). Les alcaloïdes quinolizidiniques isolés et identifiés dans le genre *Genista* sont essentiellement des dérivés de la lupanine, de la spartéine de type  $\alpha$ -pyridonique et très peu de type matrine. Les différentes structures des alcaloïdes quinolizidiniques déjà reportées dans les différentes espèces du genre *Genista* avec les indices de Kovats, ainsi que les valeurs des pics moléculaires et celles des pics de bases sont présentées dans les **Tableaux I.2.a, b, c, et d** et les **Tableaux I.3.a, b, c et d**.

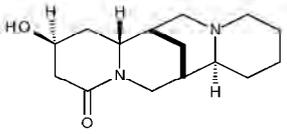
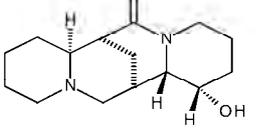
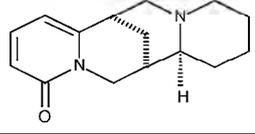
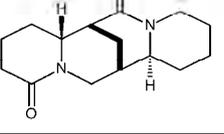
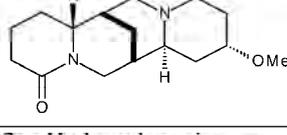
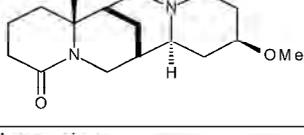
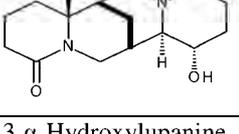
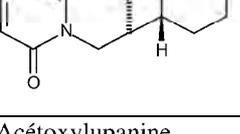
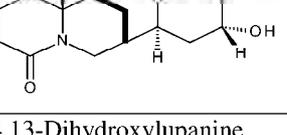
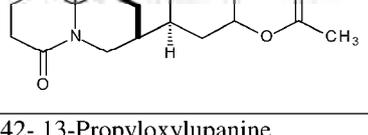
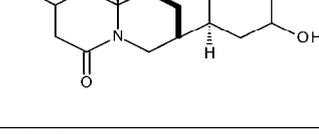
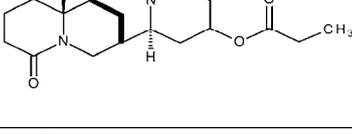
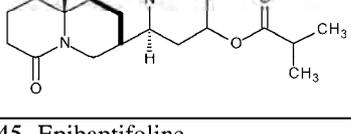
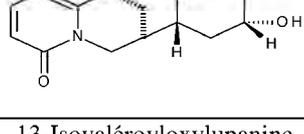
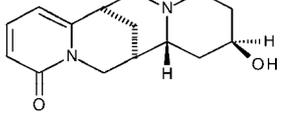
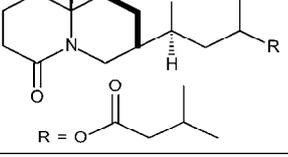
**Tableau I.2.a.** Structures des alcaloïdes isolés dans le genre *Genista* (Fabaceae).

<b>A- Alcaloïdes quinolizidiniques bicycliques</b>					
1- Lupinine	IK : 1420 FB : C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NO M <sup>+</sup> : 169 PB : 83		2- Lusitanine	IK : 1885 FB : C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 208 PB : 166	
<b>B- Alcaloïdes quinolizidiniques tricycliques</b>					
3- N-méthylcytisine	IK : 1955 FB : C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 204 PB : 58		4- Déhydrocystisine	IK : 1972 FB : C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 188 PB : 134	
5- Cytisine	IK : 1990 FB : C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 190 PB : 146		6- Tétrahydrorhombifoline	IK : 2050 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 248 PB : 207	
7- Angustifoline	IK : 2085 FB : C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 234 PB : 193		8- Rhombifoline	IK : 2155 FB : C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 244 PB : 58	
9- Tinctoine	IK : 2230 FB : C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 244 PB : 203		10- N-Carbométhoxycytisine	IK : 2240 FB : C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 248 PB : 146	
11- 11-α-Allylcytisine	IK : 2250 FB : C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 230 PB : 189		12- Formylcytisine	IK : 2315 FB : C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 218 PB : 146	
13- N-Acétyleytisine	IK : 2320 FB : C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 232 PB : 146		14- Virgiboidine	IK : Nd FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 248 PB : 207	

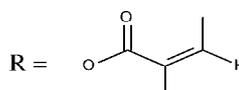
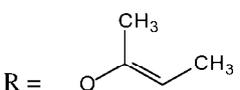
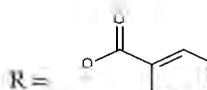
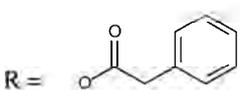
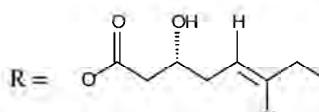
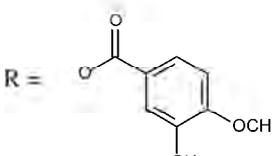
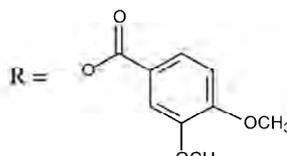
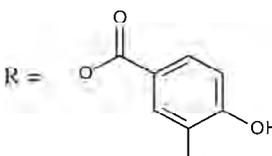
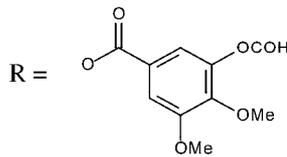
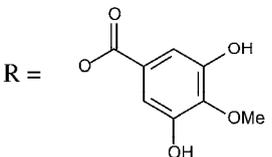
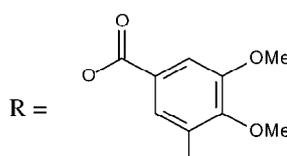
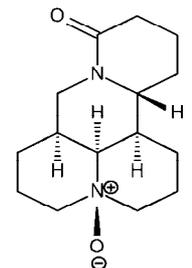
**Tableau I.2.b.** Structures des alcaloïdes isolés dans le genre *Genista* (Fabaceae).

<b>C- Alcaloïdes quinolizidiniques tétracycliques</b>			
15- $\alpha$ -Isospartéine	IK : 1710 FB : C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 234 PB : 98	16- Spartéine	IK : 1785 FB : C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 234 PB : 137
17- $\beta$ -Isospartéine (Pusilline)	IK : 1825 FB : C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 234 PB : 137	18- 11,12-Déhydrospartéine	IK : 1840 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 232 PB : 134
19- Rétamine	IK : 1940 FB : C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 250 PB : 98	20- 10-Hydroxyméthylspartéine	IK : Nd FB : C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 264 PB : 98
21- 13-Hydroxyspartéine	IK : 2000 FB : C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 250 PB : 137	22- 5,6-Déhydrospartéine	IK : 2048 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 232 PB : 134
23- 14-Hydroxyspartéine	IK : 2060 FB : C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 250 PB : 137	24- 17-Oxospartéine	IK : 2070 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 248 PB : 97
25- 5,6-Déhydroisolupanine	IK : 2080 FB : C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 246 PB : 98	26- $\alpha$ -Isolupanine	IK : 2105 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 248 PB : 136
27- 5,6-Déhydrolupanine	IK : 2132 FB : C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 246 PB : 98	28- Lupanine	IK : 2165 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 248 PB : 136
29- 10-Oxospartéine	IK : 2180 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 248 PB : 97	30- 4-Hydroxylupanine	IK : 2250 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 264 PB : 136

**Tableau I.2.c.** Structures des alcaloïdes isolés dans le genre *Genista* (Fabaceae).

31- Nutalline 	IK : 2255 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 264 PB : 264	32- 17-Oxorétamine 	IK : 2278 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 264 PB : 98
33- Thermopsine 	IK : 2310 FB : C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 244 PB : 98	34- 17-Oxolupanine 	IK : 2350 FB : C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 262 PB : 150
35- 13-Méthoxylupanine 	IK : 2370 FB : C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 278 PB : 166	36- 13-Epiméthoxylupanine 	IK : Nd FB : C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 278 PB : 55
37- 12-α-Hydroxylupanine 	IK : 2380 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 264 PB : 41	38- Anagyrene 	IK : 2390 FB : C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O M <sup>+</sup> : 244 PB : 98
39- 13-α-Hydroxylupanine 	IK : 2400 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 264 PB : 152	40- 13-Acétoxylupanine 	IK : 2470 FB : C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> M <sup>+</sup> : 306 PB : 246
41- 4,13-Dihydroxylupanine 	IK : 2510 FB : C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> M <sup>+</sup> : 280 PB : 280	42- 13-Propyloxylupanine 	IK : 2555 FB : C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> M <sup>+</sup> : 320 PB : 246
43- 13-Isobutyryloxylupanine 	IK : 2585 FB : C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> M <sup>+</sup> : 334 PB : 246	44- Baptifoline 	IK : 2630 FB : C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 260 PB : 96
45- Epibaptifoline 	IK : 2650 FB : C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> M <sup>+</sup> : 260 PB : 114	46- 13-Isovaléryloxylupanine 	IK : 2655 FB : C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> M <sup>+</sup> : 348 PB : 246

**Tableau I.2.d.** Structures des alcaloïdes isolés dans le genre *Genista* (Fabaceae).

<p>47- 13-Angéloyloxylupanine</p> <p>IK : 2732 FB : C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> M<sup>+</sup> : 346 PB : 246</p> <p>R = </p>	<p>48- 13-Tigloyloxylupanine</p> <p>IK : 2750 FB : C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> M<sup>+</sup> : 346 PB : 246</p> <p>R = </p>
<p>49- 13-Benzoyloxylupanine</p> <p>IK : 3090 FB : C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> M<sup>+</sup> : 368 PB : 246</p> <p>R = </p>	<p>50- 13-Phénylacétyloxylupanine</p> <p>IK : 3095 FB : C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> M<sup>+</sup> : 382 PB : 246</p> <p>R = </p>
<p>51- Cinérocine</p> <p>IK : 3170 FB : C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> M<sup>+</sup> : 404 PB : 246</p> <p>R = </p>	<p>52- Isocinévanine</p> <p>IK : 3375 FB : C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> M<sup>+</sup> : 414 PB : 246</p> <p>R = </p>
<p>53- Cinévérine</p> <p>IK : 3570 FB : C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> M<sup>+</sup> : 428 PB : 246</p> <p>R = </p>	<p>54- Cinévanine</p> <p>IK : Nd FB : C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> M<sup>+</sup> : 414 PB : 168</p> <p>R = </p>
<p>55- Formylcinégalléine</p> <p>IK : Nd FB : C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> M<sup>+</sup> : 472 PB : 168</p> <p>R = </p>	<p>56- Cinégalline</p> <p>IK : Nd FB : C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> M<sup>+</sup> : 430 PB : 246</p> <p>R = </p>
<p>57- Cinegalléine</p> <p>IK : Nd FB : C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> M<sup>+</sup> : 444 PB : 168</p> <p>R = </p>	<p>58- Oxymatine</p> <p>IK : Nd FB : C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> M<sup>+</sup> : 264 PB : 97</p> <p></p>

IK : indice de Kovats; FB : formule brute; M<sup>+</sup> : masse du pic moléculaire; PB : masse du pic de base; Nd : non déterminé.

**Tableau I.3.a.** Distribution des alcaloïdes quinolizidiniques dans le genre *Genista* (Fabaceae).

N°	Espèces	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	<i>G. abchasica</i>	+														
2	<i>G. acanthoclada</i>			+		+					tr		tr	tr		tr
3	<i>G. aethnensis</i>					+										
4	<i>G. albida</i>			+										+		
5	<i>G. anatolica</i>			+		+							+			
6	<i>G. angulata</i>					+										
7	<i>G. aucheri</i>					+	+									+
8	<i>G. aucheri</i>						+									
9	<i>G. burdurensis</i>															+
10	<i>G. carinalis</i>			+		+			+							
11	<i>G. cinerascens</i>		+	+		+			+			+	+			
12	<i>G. cinerea ssp. austena</i>		+			+	+	+								+
13	<i>G. cinerea ssp. cinerea</i>															
14	<i>G. cinerea ssp. murcica</i>		tr			+	+									
15	<i>G. cinerea ssp. speciosa</i>					tr	+									
16	<i>G. cinerea ssp. valentina</i>		tr			+	+									
17	<i>G. dasycarpa</i>															
18	<i>G. depressa</i>			+					+							
19	<i>G. duriaei</i>															
20	<i>G. ephedroides</i>					+										
21	<i>G. equisetiformis</i>			+		+										
22	<i>G. ferox</i>					+										
23	<i>G. florida</i>			+		+							+	tr		
24	<i>G. florida florida</i>			+		+							+	+		
25	<i>G. florida polygalliphylla</i>			+		+							+	tr		
26	<i>G. humifusa</i>					+										
27	<i>G. hungarica</i>			+												
28	<i>G. hystrix</i>					+										
29	<i>G. involucrata</i>			+		+								+		
30	<i>G. libanotica</i>			+		+										
31	<i>G. lobelli</i>			+		+			+				+	+		+
32	<i>G. lydia</i>			+												
33	<i>G. lydia var. antiochia</i>			+		+			+							
34	<i>G. lydia var. lydia</i>			+		+	+		+							
35	<i>G. majorica</i>		+			+	+	+								+
36	<i>G. microcephala</i>															
37	<i>G. monosperma</i>			+		+										
38	<i>G. monspessulana</i>						+								+	
39	<i>G. nyssana</i>															
40	<i>G. ovata</i>			+		+			+							
41	<i>G. pilosa</i>			+		+							+	tr		
42	<i>G. prostrata</i>															
43	<i>G. pseudopilosa</i>			+		+								+		
44	<i>G. racemosa</i>					+										
45	<i>G. radiata</i>					+										
46	<i>G. ramosissima</i>			+			tr									
47	<i>G. ramosissima</i>					+										
48	<i>G. sandrasica</i>					+							+	+		
49	<i>G. sericea</i>			+			tr									
50	<i>G. sessilifolia</i>			+									+			
51	<i>G. spicata</i>					+										
52	<i>G. subcapitata</i>			+		+			+				+	tr		
53	<i>G. tenera</i>			+	+	+			+				+			
54	<i>G. tinctoria</i>			+		+	+		+	+			+			
55	<i>G. transcaucasica</i>	+		+												
56	<i>G. triflora</i>															
57	<i>G. virgata</i>					+										
58	<i>G. vuralii</i>			+		+	+									

**Tableau I.3.b.** Distribution des alcaloïdes quinolizidiniques dans le genre *Genista* (Fabaceae).

N°	Espèces	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1	<i>G. abchasica</i>																
2	<i>G. acanthoclada</i>	+		+	+								tr	+	tr		
3	<i>G. aethnensis</i>	+			+												
4	<i>G. albida</i>									+				+			
5	<i>G. anatolica</i>			+			+						+	+			+
6	<i>G. angulata</i>													+			
7	<i>G. aucheri</i>	+	+			+							+	+			
8	<i>G. aucheri</i>	+											+	+			
9	<i>G. burdurensis</i>	+											+	+			
10	<i>G. carinalis</i>	+		+									+	+			+
11	<i>G. cinerascens</i>	+	+	+									+	+			
12	<i>G. cinerea ssp. austena</i>	+		+					+				+	+		+	
13	<i>G. cinerea ssp. cinerea</i>																
14	<i>G. cinerea ssp. murcica</i>												tr	+			
15	<i>G. cinerea ssp. speciosa</i>												+	+			
16	<i>G. cinerea ssp. valentina</i>												tr	+			
17	<i>G. dasycarpa</i>	+															
18	<i>G. depressa</i>	+													+		+
19	<i>G. duriaei</i>	+															
20	<i>G. ephedroides</i>				+									+			
21	<i>G. equisetiformis</i>	+															
22	<i>G. ferox</i>																
23	<i>G. florida</i>	+											tr	+			
24	<i>G. florida florida</i>	tr											+	tr			
25	<i>G. florida polygalliphylla</i>	+		tr									+	+			
26	<i>G. humifusa</i>																
27	<i>G. hungarica</i>													+			
28	<i>G. hystrix</i>																
29	<i>G. involucrata</i>	+								+				+			
30	<i>G. libanotica</i>													+			
31	<i>G. lobelli</i>	+										+	+	+			
32	<i>G. lydia</i>	+		+	+			+						+			+
33	<i>G. lydia var. antiochia</i>													+			
34	<i>G. lydia var. lydia</i>													+			
35	<i>G. majorica</i>	+		+					+		+		+	+		+	
36	<i>G. microcephala</i>													+			
37	<i>G. monosperma</i>	+															
38	<i>G. monspessulana</i>														+		
39	<i>G. nyssana</i>	+															
40	<i>G. ovata</i>																+
41	<i>G. pilosa</i>	+		+									+	+			+
42	<i>G. prostrata</i>	+															
43	<i>G. pseudopilosa</i>	tr											+	tr			
44	<i>G. racemosa</i>																
45	<i>G. radiata</i>	+															
46	<i>G. ramosissima</i>	+											tr	+			
47	<i>G. ramosissima</i>																
48	<i>G. sandrasica</i>	+											+	+			
49	<i>G. sericea</i>			tr									tr	tr			
50	<i>G. sessilifolia</i>	+			+	+							+	+			
51	<i>G. spicata</i>																
52	<i>G. subcapitata</i>													+			+
53	<i>G. tenera</i>												+	+	+		
54	<i>G. tinctoria</i>											+		+			+
55	<i>G. transcaucasica</i>											+		+			+
56	<i>G. triflora</i>	+															
57	<i>G. virgata</i>																
58	<i>G. vuralii</i>												+	+			

**Tableau I.3.c.** Distribution des alcaloïdes quinolizidiniques dans le genre *Genista* (Fabaceae).

N°	Espèces	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
1	<i>G. abchasica</i>														
2	<i>G. acanthoclada</i>	tr						+							
3	<i>G. aethnensis</i>														
4	<i>G. albida</i>					+		+							
5	<i>G. anatolica</i>							+	+						+
6	<i>G. angulata</i>							+							
7	<i>G. aucheri</i>			+				+							
8	<i>G. aucheri</i>			+				+							
9	<i>G. burdurensis</i>							+							+
10	<i>G. carinalis</i>		+					+	+						+
11	<i>G. cinerascens</i>							+							+
12	<i>G. cinerea ssp. austena</i>							+	+	+		+	+		
13	<i>G. cinerea ssp. cinerea</i>							+	+						
14	<i>G. cinerea ssp. murcica</i>							tr	+	+					
15	<i>G. cinerea ssp. speciosa</i>							tr	+	tr					
16	<i>G. cinerea ssp. valentina</i>							+	+	+					
17	<i>G. dasycarpa</i>														
18	<i>G. depressa</i>							+							+
19	<i>G. duriaei</i>														
20	<i>G. ephedroides</i>	+					+	+							
21	<i>G. equisetiformis</i>							+							
22	<i>G. ferox</i>														
23	<i>G. florida</i>							+						+	tr
24	<i>G. florida florida</i>							+						tr	tr
25	<i>G. florida polygalliphylla</i>							+						tr	tr
26	<i>G. humifusa</i>														
27	<i>G. hungarica</i>							+							
28	<i>G. hystrix</i>							+							
29	<i>G. involucrata</i>					+		+							
30	<i>G. libanotica</i>							+						+	
31	<i>G. lobelli</i>							+						+	+
32	<i>G. lydia</i>								+		+				
33	<i>G. lydia var. antiochia</i>							+						+	
34	<i>G. lydia var. lydia</i>							+						+	
35	<i>G. majorica</i>							+	+	+		+	+		
36	<i>G. microcephala</i>														
37	<i>G. monosperma</i>							+							
38	<i>G. monspessulana</i>														
39	<i>G. nyssana</i>														
40	<i>G. ovata</i>							+						+	
41	<i>G. pilosa</i>							+	+	+				+	
42	<i>G. prostrata</i>														
43	<i>G. pseudopilosa</i>							+							
44	<i>G. racemosa</i>														
45	<i>G. radiata</i>														
46	<i>G. ramosissima</i>						+		+	+		+			
47	<i>G. ramosissima</i>														
48	<i>G. sandrasica</i>				+			+						+	
49	<i>G. sericea</i>						+			+		+			
50	<i>G. sessilifolia</i>					+		+							
51	<i>G. spicata</i>														
52	<i>G. subcapitata</i>							+	+						
53	<i>G. tenera</i>		+					+							
54	<i>G. tinctoria</i>							+	+					+	
55	<i>G. transcaucasica</i>							+							
56	<i>G. triflora</i>														
57	<i>G. virgata</i>														
58	<i>G. vuralii</i>			+				+						+	

**Tableau I.3.d.** Distribution des alcaloïdes quinolizidiniques dans le genre *Genista* (Fabaceae).

Espèces	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	Références
1 <i>G. abchasica</i>														Lewis 1989
2 <i>G. acanthoclada</i>														Wink 1993b; Tosun 1994
3 <i>G. aethnensis</i>														White 1944
4 <i>G. albida</i>														Tosun 1994
5 <i>G. anatolica</i>														Tosun 1986a; 1994; Christov, 2000
6 <i>G. angulata</i>														Faugeras 1969a
7 <i>G. aucheri</i>													+	Tosun 1986b; 1994
8 <i>G. aucheri</i>														Balandrin 1982
9 <i>G. burdurensis</i>														Tosun 1987a; 1994
10 <i>G. carinalis</i>														Gulubov 1973; Tosun 1994; Christov 2000
11 <i>G. cinerascens</i>														Greinwald 1992
12 <i>G. cinerea</i> ssp. <i>austena</i>	+		+	+				+						Greinwald 1992; Van Rensen 1994
13 <i>G. cinerea</i> ssp. <i>cinerea</i>								+	+	+	+	+		Faugeras 1971; Van Rensen 1994; Harborne 1999
14 <i>G. cinerea</i> ssp. <i>murcica</i>			+	+				+						Greinwald 1992;
15 <i>G. cinerea</i> ssp. <i>speciosa</i>			+	+				+						Van Rensen 1994
16 <i>G. cinerea</i> ssp. <i>valentina</i>			+	+				+						
17 <i>G. dasycarpa</i>														White 1944
18 <i>G. depressa</i>														Christov 2000
19 <i>G. duriaei</i>														White 1944
20 <i>G. ephedroides</i>														White 1944; Pistelli 2001
21 <i>G. equisetiformis</i>														Faugeras 1969b
22 <i>G. ferox</i>														White 1944
23 <i>G. florida</i>														Klein 1933; Greinwald 1995a
24 <i>G. florida florida</i>														Greinwald 1995a
25 <i>G. florida polygalliphylla</i>														Greinwald 1995a
26 <i>G. humifusa</i>														White 1944
27 <i>G. hungarica</i>														Adzet 1973
28 <i>G. hystrix</i>														Steinberger 1976
29 <i>G. involucrata</i>														Tosun 1987b; 1994
30 <i>G. libanotica</i>														Tosun 1987c; 1994
31 <i>G. lobelli</i>														Kirch, 1995
32 <i>G. lydia</i>			+											Ulubelen 1974b; Christov 2000
33 <i>G. lydia</i> var. <i>antiochia</i>														Tosun 1994
34 <i>G. lydia</i> var. <i>lydia</i>														Tosun 1988; 1994
35 <i>G. majorica</i>	+		+	+				+						Greinwald 1992; Van Rensen 1994
36 <i>G. microcephala</i>														Zellagui 2004
37 <i>G. monosperma</i>														White 1944; 1957
38 <i>G. monspessulana</i>														Montllor 1990
39 <i>G. nyssana</i>														White 1944
40 <i>G. ovata</i>														White 1944; Christov 2000
41 <i>G. pilosa</i>														Wink 1983a; Greinwald 1995a; Christov 2000
42 <i>G. prostrata</i>														White 1944
43 <i>G. pseudopilosa</i>														Greinwald 1995a
44 <i>G. racemosa</i>														White 1944
45 <i>G. radiata</i>														White 1944
46 <i>G. ramosissima</i>		+	+	+	+	+	+	+						Van Rensen 1994; Greinwald 1995a
47 <i>G. ramosissima</i>														White 1944
48 <i>G. sandrasica</i>				+										Küçükboyacı 2012
49 <i>G. sericea</i>		+	+	+	+		tr	+						Greinwald 1995a
50 <i>G. sessilifolia</i>														Tosun 1991; 1994
51 <i>G. spicata</i>														White 1944
52 <i>G. subcapitata</i>														Greinwald 1995a; Christov 2000
53 <i>G. tenera</i>														Martins 2005
54 <i>G. tinctoria</i>														Tosun 1994; Christov 2000
55 <i>G. transcaucasica</i>														Bostogonashvili 1967
56 <i>G. triflora</i>														Adzet 1970
57 <i>G. virgata</i>														White 1944
58 <i>G. vuralii</i>			+											Erdemoglu 2009

tr : traces

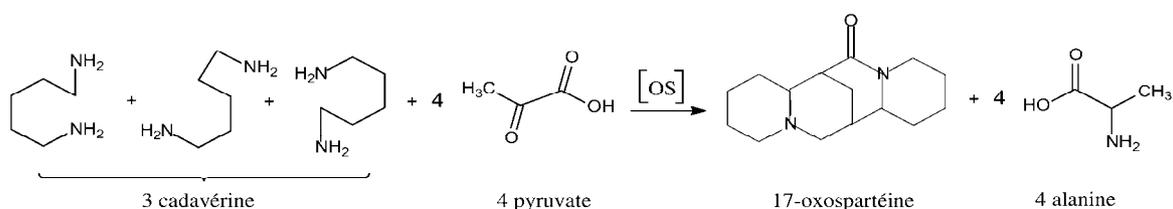
### I.1.6.1.3. Accumulation des alcaloïdes quinolizidiniques

Les AQs sont synthétisés dans les parties aériennes vertes des Légumineuses. Au niveau intracellulaire, les AQs sont accumulés dans les vacuoles des chloroplastes des feuilles. Cependant, une décroissance des AQs au niveau des feuilles, a été signalée pendant l'après-midi et durant la nuit, due à l'exportation des AQs vers les autres organes de la plante *via* le phloème, spécialement vers les fruits. Par conséquent, les AQs sont contenus dans toutes les parties de la plante et préférentiellement accumulés dans les tissus épidermales et subépidermales des tiges et des feuilles. Les AQs sont ordinairement plus abondants au niveau des fruits et des graines matures, leur concentration pouvant atteindre jusqu'à 5% (par rapport au poids de matière desséchée). Pourtant, il a été reporté une décroissance de la teneur des graines en alcaloïdes quinolizidiniques, et cela de 20 – 100% durant la germination et les premières étapes de développement. En effet, durant la germination, les AQs sont transférés des cotylédons vers les racines. Par la suite, les AQs sont dégradés pour former une source d'azote libre pouvant être réutilisé dans le métabolisme de la plante. La contribution des AQs représente 8% de la totalité de l'azote exporté à partir des feuilles. Puis, une nouvelle augmentation du contenu alcaloïdique est observée dès la formation de nouvelles feuilles et atteint son maximum à la période de floraison et à la maturation des fruits (Schütte, 1969; Williams, 1983; Wink, 1984b; 1985; 1987).

### I.1.6.1.4. Biosynthèse des alcaloïdes quinolizidiniques

En utilisant la méthode du traçage au  $^{14}\text{C}$ , il a été établi que la biosynthèse des alcaloïdes quinolizidiniques se fait à partir de la lysine, un acide aminé qui serait le premier précurseur des alcaloïdes quinolizidiniques par une suite de séquences (déshydrogénation, oxygénation, estérification) catalysées par des enzymes (**Schéma I.1**) (Nowacki, 1975a; Bunsupa, 2012).

La première étape est la décarboxylation de la lysine grâce à l'enzyme *lysine décarboxylase* qui conduit à la cadavérine (Nowacki, 1975b). Dans une seconde étape catalysée par l'enzyme *17-oxospartéine synthase* [OS], l'activation de cette étape principale se fait en présence du pyruvate ( $\alpha$ -cétoacide) et de l'intermédiaire symétrique cadavérine. Ainsi, une réaction enzymatique de transamination du système cadavérine-pyruvate a lieu pour donner l'alanine (acide  $\alpha$ -aminé) ainsi que le premier alcaloïde quinolizidinique tétracyclique: la 17-oxospartéine (Wink, 1979a; 1979b; 1980; 1984e; 1987) selon la réaction suivante:



L'application de la spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$ , a conduit aux conclusions suivantes: la biosynthèse de la spartéine exige 3 unités de cadavérine, alors que pour former la lupanine, 2 unités de cadavérine sont nécessaires (Rana, 1986).

La spartéine, chimiquement considérée comme le plus "primitif" alcaloïde tétracyclique, a été suggérée comme le précurseur direct de la lupanine et des autres types d'AQs (Nowacki, 1975b). Cependant, une évidence cinétique a été présentée qui se base sur des expériences de photosynthèse menées avec des expositions de courtes durées dans une atmosphère de  $^{14}\text{CO}_2$ . Ces expériences ont permis d'indiquer que la spartéine et la lupanine peuvent être synthétisées indépendamment l'une de l'autre. Ainsi, la déhydrospartéine dérivant de la 17-oxospartéine a été proposé comme précurseur commun à plusieurs squelettes d'alcaloïdes quinolizidiniques (Cho, 1971).

D'autre part, il a été postulé que la biosynthèse des alcaloïdes de type cytosine (pyridoniques tricycliques), se faisait via la lupanine passant par un intermédiaire instable: 6-hydroxylupanine et conduisant au composé 5,6-déhydrolupanine (Asres, 1986).

Par la suite, l'oxydation du noyau A (**Schéma I.1**) du composé 5,6-déhydrolupanine conduit à la formation de la pyridone, permettant la synthèse des alcaloïdes tétracycliques tels que l'anagryne et la baptifoline. Puis, une ouverture du noyau D de la baptifoline va conduire à la formation des alcaloïdes tricycliques: rhombifoline puis cytosine et *N*-méthylcytosine (Saito, 1995). La cytosine est totalement convertie en *N*-méthylcytosine par un transfert du groupement méthyl de l'enzyme *N*-méthyltransférase (SAM) vers la cytosine durant les premiers jours de la germination et de la croissance des plantes (Wink, 1984a).

Dans la famille des *Fabaceae*, il y a formation de deux types d'esters des AQs: les dérivés de la lupanine et ceux de la lupanine, présumés être biosynthétisés comme produits finaux (Saito, 1993). La biosynthèse des esters des AQs est catalysée par deux acyltransférases (ATs): *13- $\alpha$ -hydroxymultiflorine/13- $\alpha$ -hydroxylupanine-O-tigloyltransférase* (HMT/HLT) qui transfèrent le groupe tigloyl de la tigloyl-CoA vers les alcaloïdes tétracycliques 13- $\alpha$ -hydroxymultiflorine ou 13- $\alpha$ -hydroxylupanine. D'autre part, l'enzyme *épilupanine/lupanine-O-coumaroyl transférase* (ECT/LFT) catalyse le transfert du *p*-coumaroyl vers les hydroxyles des alcaloïdes bicycliques: épilupanine ou lupanine (Suzuki, 1994).

La synthèse des alcaloïdes de type dipipéridine, également reportés dans le genre *Genista*, comme l'ammodendrine et l'hystrine (**Tableau I.5**), se fait de manière similaire *via* la lysine comme précurseur en passant par l'intermédiaire cadavérine (**Schéma I.1**). Cet intermédiaire peut être oxydé pour former un noyau pipéridine suivie d'une dimérisation au niveau des cellules pour aboutir au dipipéridine (Nowacki, 1975b).

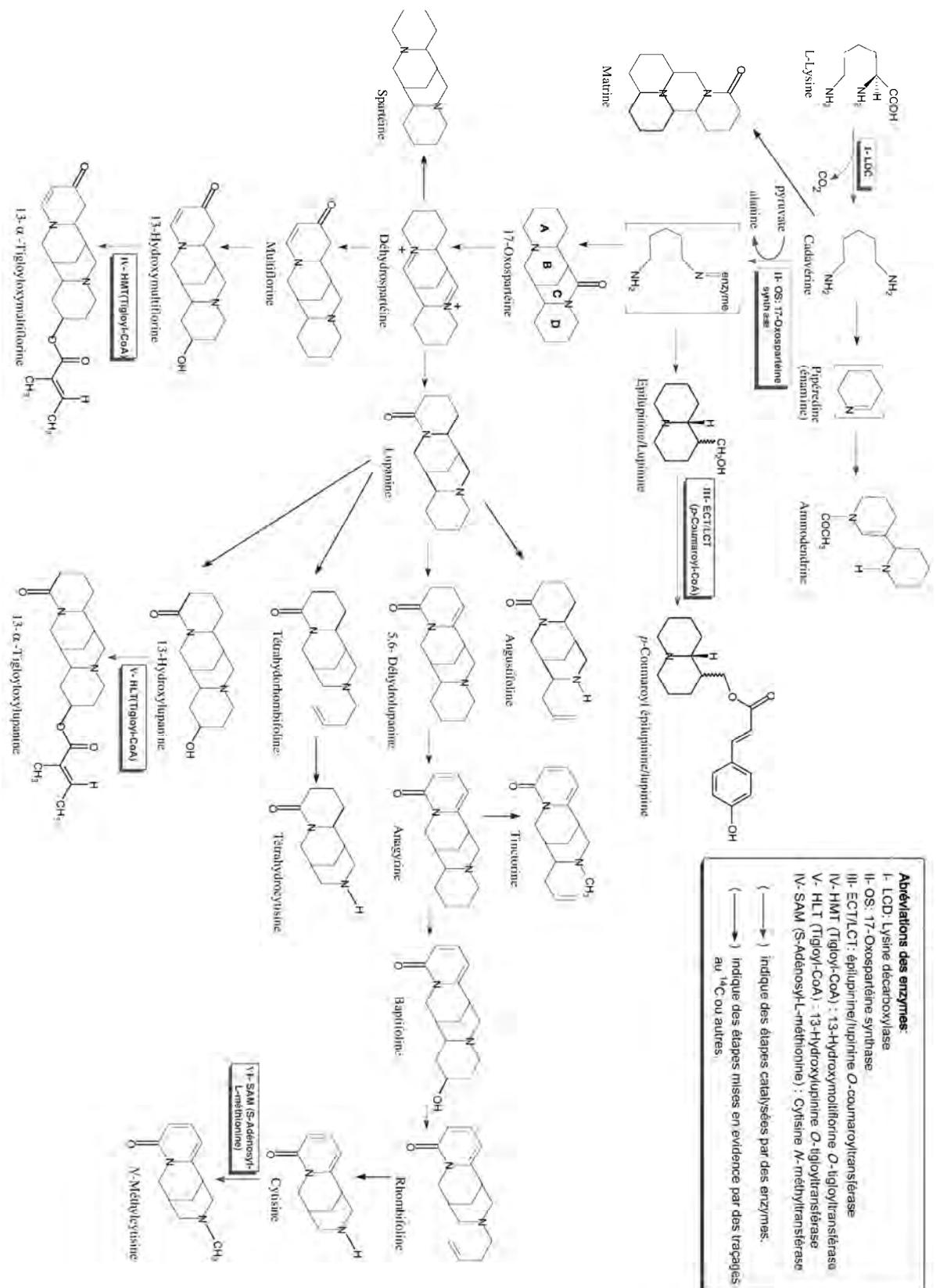


Schéma I.1. Biosynthèse des alcaloïdes quinolizidiniques.

#### **I.1.6.1.5. Activités biologiques et toxicité des alcaloïdes quinolizidiniques**

Les AQS montrent une vaste série d'activités biologiques telles que l'inhibition de l'œdème, de la  $\beta$ -glucuronidase, et de l'acétylcholinestérase, en plus des activités ganglioplégiques, hypoglycémiques, nématophages et anti-microbiennes.

La spartéine est d'une part reconnue comme un tonicardiaque grâce à son activité ganglioplégique (= bloque les récepteurs nicotiniques de la synapse ganglionnaire) (Viars, 1979), d'autre part, pour son activité ocytocique (= augmente modérément le tonus et la vigueur des contractions de l'utérus) (Hazard, 1950). Par ailleurs, le sulfate de spartéine est prescrit dans le traitement de l'érythisme cardiaque et des tachycardies sinusales d'origine neurotonique (Bruneton, 1987). Une étude pharmacologique comparée de la spartéine et de la lupanine, indique que cette dernière avait une action plus rapide, voire même plus puissante vis-à-vis des ganglions sympathiques qui peut s'expliquer par une plus grande aptitude à pénétrer dans les ganglions (Kokou, 1982).

Par ailleurs, les AQS jouent un rôle très important en termes d'écologie. En effet, ce sont des substances répulsives pour les herbivores (mollusques, insectes et mammifères) et qui empêchent la germination d'autres plantes (= activité allélopathique). Ainsi, les AQS représentent un important moyen de défense des différentes espèces des Légumineuses et peuvent être des alternatives écologiques aux pesticides synthétiques. De plus, il a été reporté qu'en se nourrissant du phloème, les parasites *Cuscuta palestina* et *Uresiphita reversallis* séquestrent quelques alcaloïdes quinolizidiniques tels que la *N*-méthylcytisine, la cytosine et l'anagyrine ainsi que la *N*-méthylcytisine et la déhydroaphylline, présentes dans les plantes hôtes *Genista acanthoclada* et *Genista monspessulana*. Ainsi, les AQS en tant que moyen de défense chimique anti-herbivore dans le genre *Genista*, donnent aux parasites une activité allélopathique chimique pour leur propre défense contre les différents prédateurs (Montllor, 1990; Wink, 1993b). Les différentes activités des alcaloïdes quinolizidiniques sont résumées sur le **Tableau I.4**.

**Tableau I.4.** Activités biologiques des alcaloïdes quinolizidiniques.

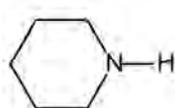
Alcaloïde	Organisme	Effets	Référence	Alcaloïde	Organisme	Effets	Référence
<b>1- Activité antimicrobienne</b>				<b>5- Activités antiparasitaires, nématocides, et molluscicides</b>			
angustifoline (7)	<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	inhibent la croissance	Tyski 1988	N-méthylcytisine (3)	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	Réduction de la mobilité par paralysie	Terada 1982
spartéine (16)	<i>Bacillus subtilis</i> (+)			matrine	<i>Dipylidium caninum</i>		
lupanine (28)	<i>Escherichia coli</i> (-)				<i>Fasciola hepatica</i>		
13 $\alpha$ -hydroxylupanine (39)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)			N-méthylcytisine (3)	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Effet nématocide contre les nématodes du bois de pin	Matsuda 1989
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (+)			cytisine (5)			
spartéine (16)	<i>Streptococcus viridis</i> (+)	inhibe la croissance des bactéries	Wink 1984-b	anagyriine (38)	<i>Helix pomatia</i>	Anti-mollusque	Wink 1984-c
	<i>Micrococcus luteus</i> (+)			cytisine (5)			
	<i>Mycobacterium phlei</i> (+)			spartéine (16)			
	<i>Serratia marcescens</i> (-)			lupanine (28)			
	<i>Bacillus megaterium</i> (+)						
	<i>Bacillus subtilis</i> (+)						
<b>2- Activité antifongique</b>				<b>6- Activité pharmacologique chez les vertébrés</b>			
spartéine (16)	<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> .	inhibent la germination de l'agent pathogène	Wiprich 1985	spartéine (16)	corps humain	ganglioplégique, hypoglycémique, utérotonique, hypertensive, diurétique	Vians 1979 Kinghorn 1984
lupanine (28)				lupanine (28)	corps humain	hypotensif, ganglioplégique, diurétique	Kokou 1982 Kinghorn 1984 Kinghorn 1984
spartéine (16)	<i>Aspergillus oryzae</i>	inhibe la croissance	Wink 1984-b	cytisine (5)	corps humain	hallucinogène	Kinghorn 1984
	<i>Alternaria porri</i>						
	<i>Helminthosporium carbonum</i>						
	<i>Piricularia oryzae</i>						
	<i>Rhizoctonia solani</i>						
	<i>Fusarium oxysporum</i>						
<b>3- Activité allélopathique</b>				<b>1-3-hydroxylupanine (39)</b>			
spartéine (16)	<i>Lupinus albus</i> L.	Inhibent la germination des graines et des radicules	Wink 1983-b	rétamine (19)	corps humain	hypotensif, utérotonique, diurétique	Kinghorn 1984
lupanine (28)	<i>Lactuca sativa</i> L.			oxymatine (58)	souris	Anti-tumeur	Kojima 1970
13-tigloyloxylupanine (48)							
<b>4- Activité insecticide</b>				<b>cytisine (5)</b>			
spartéine (16)	<i>Synonymis mogadorensis</i>	Répulsifs à la consommation	Wink 1990	oxymatine (58)		Antiviral contre le virus de l'hépatite B (HBV)	Ding 2006
lupanine (28)				matrine			
17-oxospartéine (24)				14 $\beta$ -hydroxyoxymatine			
lupanine (1)	<i>Malanoplus bivittatus</i>	Réduction de la consommation	Harley 1957	anagyriine (38)		Anti-viral contre le virus respiratoire syncytial (RSV)	Ma 2002
spartéine (16)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Insecticide	Bernádez 2009	oxymatine (58)			

\* Les structures des molécules sont représentées sur les tableaux I.2.a-, b, c et d.

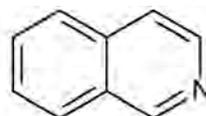
La toxicité des alcaloïdes quinolizidiniques est connue depuis longtemps. Ils sont responsables d'intoxication tant chez le bétail ou les animaux domestiques que chez l'homme. En effet, les graines du *Cytisus laburnum* L. riches en cytisine et anagyrene sont très toxiques causant vomissements, nausées, et tachycardie. De même, les lupins (*Lupinus* sp.) contenant les alcaloïdes lupinine et lupanine présentent une toxicité hépatique importante (Bruneton, 1987). Des effets tératogènes ont été attribués à l'anagyrene conduisant à des malformations chez les veaux, et cela après consommation de plantes riches en cet alcaloïde par des vaches en période de gestation (Keeler, 1976). Pour la spartéine relativement peu toxique, une intoxication aiguë se manifeste par une paralysie du centre respiratoire et des muscles inspiratoires (Hazard, 1950).

### I.1.6.1.6. Autres alcaloïdes

Quelques alcaloïdes de type isoquinoléine (A) et pipéridine (B), sont habituellement rencontrés comme composés minoritaires dans le genre *Genista* (**Tableau I.5**).



Pipéridine (A)



Isoquinoléine (B)

**Tableau I.5.** Structures des alcaloïdes isoquinoléiniques et pipéridiniques isolés dans le genre *Genista* (Fabaceae).

Structure	Source	Formule brute	Masse ( <i>m/z</i> )		Références	
			M <sup>+</sup>	PB*		
	Ammodendrine (A1) (R = H)	<i>G. cinerascens</i> <i>G. florida</i> <i>G. hystrix</i> <i>G. lobelii</i> <i>G. pilosa</i> <i>G. polygalliphylia</i>	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	208	165	Greinwald 1992 Greinwald 1995a Steinegger 1970 Kirch 1995 Christov 2000 Greinwald 1995
	N-méthylammodendrine (A2) (R = CH <sub>3</sub> )	<i>G. burdurensis</i>	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	222	82	Tosun 1987a
	Hystrine (A3)	<i>G. hystrix</i>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	164	163	Steinegger 1968; 1970
	Calycotomine (B1) (R = CH <sub>2</sub> OH)	<i>G. anatolica</i> <i>G. burdurensis</i> <i>G. involucrate</i> <i>G. microcephala</i> <i>G. sessilifolia</i>	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	223	91	Tosun 1986a Tosun 1987a Tosun 1987b Zellagui 2004 Tosun 1994
	Salsolidine (B2) (R = CH <sub>3</sub> )	<i>G. pungens</i> Poir.	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	207	192	Ribas-Marques 1957

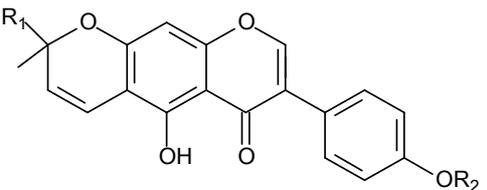
\* PB: pic de base.

### I.1.6.2. Les flavonoïdes

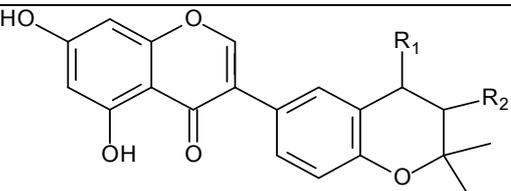
Les Légumineuses sont réputées pour être extraordinairement riches, qualitativement et quantitativement, en flavonoïdes (Harborne, 1969). Dans le genre *Genista*, une grande série de molécules flavoniques ont été isolées, parmi lesquelles les isoflavones peuvent être considérées comme des bio-marqueurs pour le genre. Les isoflavones constituent un groupe de bio-flavonoïdes naturels. La plupart sont synthétisées par les plantes de la famille des *Leguminosae* et sont principalement limitées à la sous-famille des *Papilionoideae* (= *Faboideae*) (Dixon, 2002). Une liste d'isoflavones, reportée dans la littérature jusqu'à la fin 2004, indique 1600 structures connues (Anderson, 2006), alors que 423 nouvelles isoflavones ont été plus récemment décrites, majoritairement originaires de la sous-famille des *Papilionoideae* (Veitch, 2007).

De plus quelques isoflavones originales ont été reportées dans ce genre:

- dérivés de l'alpinumisoflavone

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Réf.
	CH <sub>3</sub>	H	Alpinumisoflavone <b>(<i>G. tenera</i>)</b> Martins 2002
	CH <sub>2</sub> OH	H	Hydroxyalpinumisoflavone <b>(<i>G. ephedroides</i>)</b> Pistelli 1998
	CH <sub>3</sub>	Glc	4'-O-Glucopyranoside alpinumisoflavone <b>(<i>G. pichisermolliana</i>)</b> Noccioli 2011

- dérivés de la pyranoisoflavone isolés des parties aériennes de l'espèce *G. corsica*.

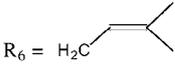
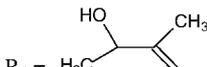
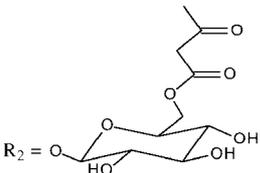
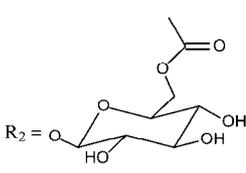
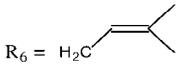
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Réf.
	H	H	Isoderrone Pistelli 2000
	H	OH	Ficuisoflavone
	OH	OH	Dihydroisoderrondiol

Le **Tableau I.6** rassemble les différentes espèces du genre *Genista* avec leur contenu en isoflavones, tandis que les structures respectives de ces molécules flavoniques sont données dans le **Tableau I.7**.

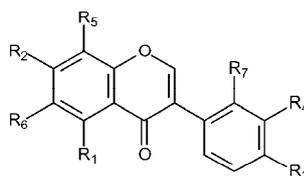
**Tableau I.6.** Distribution des isoflavones dans le genre *Genista* (Fabaceae).

Espèces	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Références			
<i>G. acanthoclada</i>	+			+																												Erdemoglu 2006			
<i>G. aethnensis</i>	+	+		+	+						+	+	+		+	+	+		+		+			+								Luczkiewicz 2003			
<i>G. albidia</i>	+			+																												Erdemoglu 2006			
<i>G. anatolica</i>	+																															Erdemoglu 2006			
<i>G. angelica</i>	+			+																												Harborne 1969			
<i>G. aristata</i>	+																															Harborne 1969			
<i>G. aucheri</i>	+																															Erdemoglu 2006			
<i>G. baetica</i>	+																															Harborne 1969			
<i>G. burdurensis</i>	+																															Erdemoglu 2006			
<i>G. capitellata</i>	+																															Harborne 1969			
<i>G. carinalis</i>	+																															Erdemoglu 2006			
<i>G. carpetana</i>	+																															Harborne 1969			
<i>G. cinerea</i>	+												+								+					+	+					Van Rensen 1995; 1999			
<i>G. corsica</i>	+				+																											Pistelli 2000			
<i>G. cupanii</i>	+			+	+																											Harborne 1969			
<i>G. ephedroides</i>	+			+	+				+	+			+					+		+			+		+							Pistelli 1998; Pinto 2008; Garritano 2005			
<i>G. falcata</i>	+																															Harborne 1969			
<i>G. ferox</i>				+																												Mekkiou 2012			
<i>G. florida</i>	+												+								+					+	+					Van Rensen 1999			
<i>G. germanica</i>	+			+							+	+	+		+	+	+		+		+			+								Luczkiewicz 2003			
<i>G. halacsyi</i>	+	+	+	+	+	+	+						+													+							Fokialakis 2012		
<i>G. hirsuta</i>	+																												+	+			Harborne 1969		
<i>G. hispanica</i>	+			+	+								+																				Paris 1965b		
<i>G. hystrix</i>				+	+																												Harborne 1969		
<i>G. involucrata</i>	+																																Erdemoglu 2006		
<i>G. libanotica</i>	+																																Erdemoglu 2006		
<i>G. lobelli</i>	+			+	+																												Harborne 1969		
<i>G. lydia</i>	+			+															+														Ulubelen 1974a		
<i>G. lydia var. antiochia</i>	+																																Erdemoglu 2006		
<i>G. lydia var. lydia</i>	+																																Erdemoglu 2006		
<i>G. micrantha</i>					+																												Harborne 1969		
<i>G. monospeulana</i>	+			+							+	+	+		+	+	+					+											Luczkiewicz 2003		
<i>G. morisii</i>	+			+	+								+									+		+	+								Giachi 2002		
																																	Pinto 2008		
<i>G. nissana</i>	+	+																																Harborne 1969	
<i>G. obtusirama</i>	+			+	+																												Harborne 1969		
<i>G. pichisermollana</i>	+												+						+				+							+	+		Noccioli 2011		
<i>G. pilosa</i>	+												+								+					+	+						Harborne 1969		
																																		Van Rensen 1999	
<i>G. pumila</i>	+																																	Harborne 1969	
<i>G. ractam</i>				+																														Paris 1963	
<i>G. radiata</i>	+			+	+						+	+	+		+	+	+		+						+								Luczkiewicz 2003		
<i>G. sagittalis</i>	+			+							+	+	+		+	+	+		+														Luczkiewicz 2003		
<i>G. saharae</i>																											+		+					Abdel-Halim 2000	
																																		Mekkiou 2005	
<i>G. salzmannii</i>	+	+		+	+																													Harborne 1969	
<i>G. sandrasica</i>	+			+																														Orhan 2011	
<i>G. scorpius</i>				+																														Harborne 1969	
<i>G. sericea</i>	+			+	+																													Harborne 1969	
<i>G. sessilifolia</i>	+	+		+							+		+																					Erdemoglu 2006	
																																		Tosun 2009	
<i>G. spartioides</i>				+																														Harborne 1969	
<i>G. subcapitata</i>	+	+		+	+																													Harborne 1969	
<i>G. tenera</i>				+	+			+					+									+					+							Borge 2001; Martins 2002; Rauter 2005	
<i>G. teretifolia</i>	+	+																																Harborne 1969	
<i>G. tinctoria</i>	+			+							+	+	+		+	+	+		+		+				+									Perkins 1899	
																																			Luczkiewicz 2004
<i>G. triacanthos</i>				+	+																													Erdemoglu 2006	
<i>G. tricuspidata</i>				+	+									+																				Harborne 1969	
<i>G. tridens</i>	+			+	+																													Boumaza 2006	
<i>G. tridentata</i>				+																														Harborne 1969	
<i>G. triloba</i>				+																														Herrera 1992	
<i>G. ulicina</i>	+			+	+																													Charoux 1941	
<i>G. umbellata</i>	+																																	Harborne 1969	
<i>G. valentina</i>	+																																	Harborne 1969	
<i>G. villarsii</i>	+	+		+	+								+								+					+	+							Van Rensen 1999	
<i>G. vuralii</i>	+			+																														Orhan 2011	

**Tableau I.7.** Structures des isoflavones isolées dans le genre *Genista* (Fabaceae).

Aglycones					
1	Daidzéine	$R_2 = OH, R_3 = OH$	2	Formononétine	$R_2 = OH, R_3 = OCH_3$
3	8-Méthoxyformononétine	$R_2 = OH, R_3 = OCH_3$ $R_5 = OCH_3$	4	Génistéine	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OH$
5	Isoprunétine	$R_1 = OCH_3, R_2 = OH$ $R_3 = OH$	6	3'-Hydroxyisoprunétine	$R_1 = OCH_3, R_2 = OH$ $R_3 = OH, R_4 = OH$
7	Biochanine	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OCH_3$	8	3'-O-Méthylorobol	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OH, R_4 = OCH_3$
9	Wightéone	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OH$  $R_6 = H_2C$ 	10	Laburnétine	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OH$  $R_6 = H_2C$ 
Hétérosides mono-O-glycosides					
11	Daidzine	$R_2 = OGlc, R_3 = OH$	12	Ononin	$R_2 = OGlc, R_3 = OCH_3$
13	Génistine	$R_1 = OH, R_2 = OGlc$ $R_3 = OH$	14	4'-O-Glucopyranoside génistéine	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OGlc$
15	7-O-(6"-Malonyl)-glucopyranoside génistéine	$R_1 = OH, R_3 = OH$  	16	7-O-(6"-Acétyl)-glucopyranoside génistéine	$R_1 = OH, R_3 = OH$  
17	7-O-Glucopyranoside 2'-hydroxygénistéine	$R_1 = OH, R_2 = OGlc$ $R_3 = OH, R_7 = OH$	18	Génistéone	$R_1 = OH, R_2 = OGlc$ $R_3 = OH$  $R_6 = H_2C$ 
19	7-O-Glucopyranoside biochanine A (Sissotrine)	$R_1 = OH, R_2 = OGlc$ $R_3 = OCH_3$	20	7-O-β-Glucopyranoside isoprunétine	$R_1 = OCH_3, R_2 = OGlc$ $R_3 = OH$
Hétérosides di-O-glycosides					
21	7-O-Diglucopyranoside génistéine	$R_1 = OH, R_2 = O(Glc)_2$ $R_3 = OH$	22	4',7-Di-O-gluco-pyranoside génistéine	$R_1 = OH, R_2 = OGlc$ $R_3 = OGlc$
23	4',7-Di-O-gluco-pyranoside isoprunétine	$R_1 = OCH_3, R_2 = OGlc$ $R_3 = OGlc$			
Hétérosides C-glycosides					
24	8-C-Glucopyranoside daidzéine ( Puerarine)	$R_2 = OH, R_3 = OH$ $R_5 = Glc$	25	8-C-Glucopyranoside génistéine	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OH, R_5 = Glc$
26	6-C-Glucopyranoside génistéine	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OH, R_6 = Glc$	27	4'-O-Méthyl-8-C-gluco-pyranoside génistéine	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OCH_3, R_5 = Glc$
28	8-C-Glucopyranoside 4'-O-gluco-pyranosyl-génistéine	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OGlc, R_5 = Glc$	29	8-C-Glucopyranoside orobol	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OH, R_4 = OH$ $R_5 = Glc$
30	8-C-Glucopyranoside 3'-O-méthylorobol	$R_1 = OH, R_2 = OH$ $R_3 = OH, R_4 = OCH_3$ $R_5 = Glc$	31	5-O-Méthyl-8-C-gluco-pyranosylgénistéine	$R_1 = OCH_3, R_2 = OH$ $R_3 = OH, R_5 = Glc$

Glc : glucose

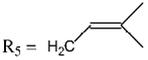
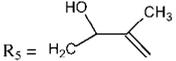


De plus, des molécules de types flavones et flavonols ont également été isolés dans le genre *Genista*, leur distribution ainsi que leurs structures respectives sont indiquées sur le **Tableau I.8** et le **Tableau I.9**.

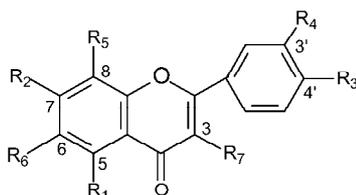
**Tableau I.8.** Distribution des flavones et flavonols dans le genre *Genista* (Fabaceae).

Espèces	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	Référence	
<i>G. acanthoclada</i>		+																										Harborne 1969	
<i>G. aethnensis</i>								+																				Luczkiewicz 2003	
<i>G. albidia</i>																			+	+								Harborne 1969	
<i>G. angelica</i>																				+						+		Paris 1965-a	
<i>G. aristata</i>																				+								Harborne 1969	
<i>G. baetica</i>		+																										Harborne 1969	
<i>G. burdurensis</i>																												Harborne 1969	
<i>G. capitellata</i>																				+								Harborne 1969	
<i>G. carpetana</i>		+																										Harborne 1969	
<i>G. cinerea</i>																												Harborne 1969	
<i>G. corsica</i>		+							+	+																		Pistelli 2000	
<i>G. ephedroides</i>	+	+			+	+	+	+																				Scarpato 2008 Garritano 2005	
<i>G. falcata</i>																				+	+							Harborne 1969	
<i>G. ferox</i>	+	+					+																					Harborne 1969	
<i>G. florida</i>																		+		+	+							Harborne 1969	
<i>G. germanica</i>							+	+																				Luczkiewicz 2003	
<i>G. hirsuta</i>																				+								Harborne 1969	
<i>G. hispanica</i>																				+								Harborne 1969	
<i>G. hystrix</i>																				+								Harborne 1969	
<i>G. januensis</i>		+																										Harborne 1969	
<i>G. lobelli</i>																												Harborne 1969	
<i>G. lydia</i>		+						+																				Ulubelen 1974	
<i>G. micrantha</i>																									+			Harborne 1969	
<i>G. monosperulana</i>								+																				Luczkiewicz 2003	
<i>G. morisii</i>		+			+		+	+								+	+											Giachi 2002 Garritano 2005	
<i>G. nissana</i>		+																										Harborne 1969	
<i>G. obtusirama</i>											+																	Harborne 1969	
<i>G. pichisermolliana</i>		+						+																		+	+	+	Noccioli 2011
<i>G. pilosa</i>											+																		Harborne 1969
<i>G. pseudopilosa</i>																				+	+							Harborne 1969	
<i>G. pumila</i>																				+	+							Harborne 1969	
<i>G. radiata</i>		+					+	+												+	+							Luczkiewicz 2003	
<i>G. ramosissima</i>																				+	+							Harborne 1969	
<i>G. sagittalis</i>							+	+																				Harborne 1969	
<i>G. satzmanni</i>																					+							Harborne 1969	
<i>G. scorpius</i>		+																										Harborne 1969	
<i>G. sericea</i>																				+	+							Harborne 1969	
<i>G. sessilifolia</i>		+	+					+				+					+											Tosun 2009	
<i>G. spartioides</i>		+																										Harborne 1969	
<i>G. subcapitata</i>																				+	+							Harborne 1969	
<i>G. sylvestris</i>																				+	+							Harborne 1969	
<i>G. tenera</i>	+		+					+						+												+		Martins 2002	
<i>G. teretifolia</i>																												Rauter 2005	
<i>G. tinctoria</i>		+		+			+	+			+																	Harborne 1969	
<i>G. tournefortii</i>																				+	+							Luczkiewicz 2004	
<i>G. transcaucasica</i>		+					+	+				+	+															Harborne 1969	
<i>G. triacanthos</i>		+																										Alieva 1976	
<i>G. tricuspdata</i>																										+	+	Harborne 1969	
<i>G. tridens</i>																												Boumaza 2006	
<i>G. ulicens</i>																												Harborne 1969	
<i>G. ulicina</i>																												Harborne 1969	
<i>G. valentina</i>																				+	+							Harborne 1969	
<i>G. villarsii</i>																				+	+	+						Harborne 1969	

**Tableau I.9.** Structures des flavones et flavonols isolés dans le genre *Genista* (Fabaceae).

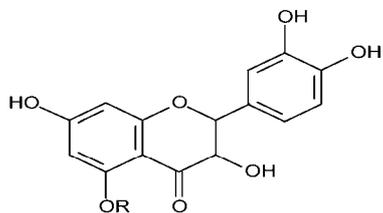
<b>1- Flavones</b> (R <sub>7</sub> = H)					
<b>1.a. Aglycones</b>					
1	Apigénine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH	2	Lutéoline	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH
3	Chrysoériol	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub>	4	3',4',7-Trihydroxyflavone	R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH R <sub>4</sub> = OH
5	Licoflavone C	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH 	6	Ephédroidine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH 
<b>1.b. Hétérosides mono-O-glycosides</b>					
7	7-O-Glucoside apigénine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlc R <sub>3</sub> = OH	8	7-O-Glucoside lutéoline	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlc R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH
9	4'-O-Glucoside lutéoline	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OGlc, R <sub>4</sub> = OH	10	5-O-Glucoside lutéoline	R <sub>1</sub> = OGlc, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH
<b>1.c. Hétérosides di-O-glycosides</b>					
11	7-O-Rutinoside apigénine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlc-O-Rham	12	7-O-Diglucoside lutéoline	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = O(Glc) <sub>2</sub> R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH
13	7-O-Rutinoside lutéoline	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH R <sub>2</sub> = OGlc-O-Rham	14	7,3'-Di-O-glycoside lutéoline	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OGlc R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OGlc
<b>1.d. Hétérosides C-glycosides</b>					
15	Vitéxine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>5</sub> = Glc	16	Orientine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH R <sub>5</sub> = Glc
<b>2- Flavonols</b> (R <sub>7</sub> = OH)					
<b>2.a. Aglycones</b>					
17	Fisetine	R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH R <sub>4</sub> = OH, R <sub>7</sub> = OH	18	Isokaempféride	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>7</sub> = OCH <sub>3</sub>
19	Kaempférol	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>7</sub> = OH	20	Quercétine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH R <sub>7</sub> = OH
<b>2.b. Hétérosides mono-O-glycosides</b>					
21	3-O-Glucoside quercétine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH R <sub>4</sub> = OH, R <sub>7</sub> = OGlc	22	3-O-β-Gluoside isorhamnétine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> R <sub>7</sub> = OGlc
23	3-O-β-Galactoside isorhamnétine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> R <sub>7</sub> = OGal	24	4',5,7-Trihydroxy-3',8- diméthoxy-3-O- glucosylflavone	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> R <sub>5</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>7</sub> = OGlc
<b>2.c. Hétérosides di-O-glycosides</b>					
25	Rutine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH R <sub>7</sub> = OGlc-O-Rham	26	3-O-Robnobioside quercétine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH R <sub>7</sub> = OGal-O-Rham
27	3-O-Robnobioside isorhamnétine	R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OCH <sub>3</sub> R <sub>7</sub> = OGal-O-Rham			

Glc : glucose; Gal : galactose; Rham : rhamnose.



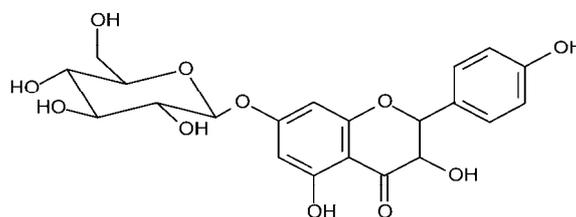
Par ailleurs, quelques molécules flavoniques de type flavanonols, flavanones et isoflavanes ont été reportées dans le genre *Genista*:

▪ **Flavanonols**



R	
H	Taxifoline
CH <sub>3</sub>	5-Méthoxytaxifoline

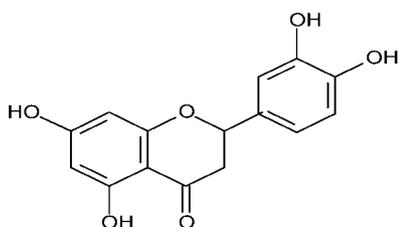
Identifiés dans *G. corsica* (Pistelli, 2000)



**7-O-β-Glucoside amodendrine**

Identifié dans *G. pichisermolliana* (Noccioli, 2011)

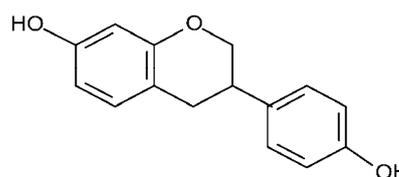
▪ **Flavanone**



**Eriodictyol**

Identifiée dans *G. pichisermolliana* (Noccioli, 2011) et *G. morisii* (Giachi, 2002)

▪ **Isoflavane**



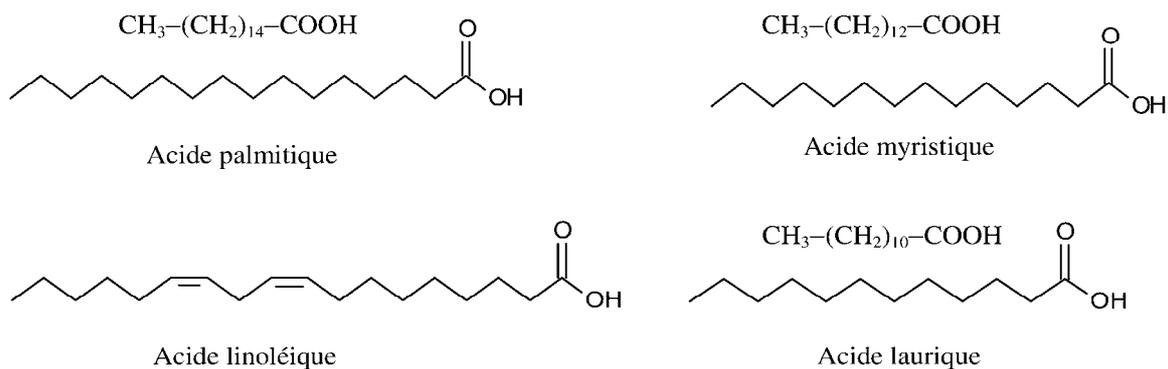
**4',7-Dihydroisoflavane**

Identifiée dans *G. tinctoria* (Łuczkiwicz, 2004)

### I.1.6.3. Les huiles essentielles

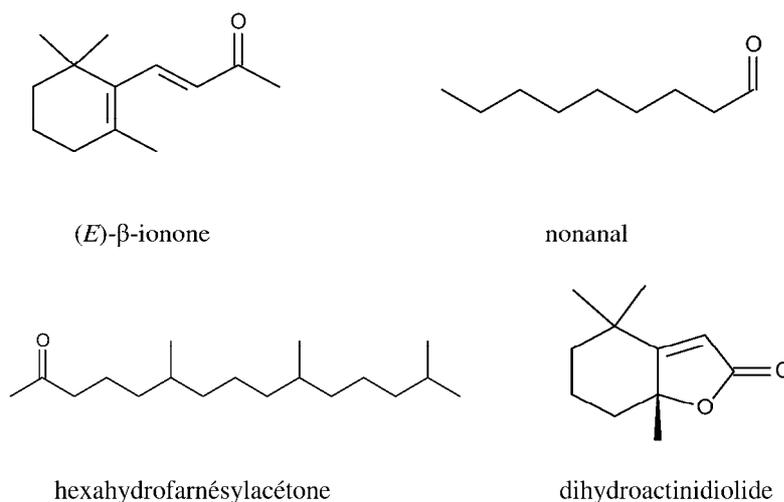
Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de composés terpéniques volatils tels les monoterpènes et les sesquiterpènes, mais peuvent également renfermer d'autres molécules de faible poids moléculaires comme les alcools, les aldéhydes et les cétones (Bruneton, 1987).

Les travaux sur les huiles essentielles du genre *Genista* sont rares. Cependant, les huiles essentielles de quelques espèces endémiques algériennes ont été caractérisées. Ces travaux ont permis d'identifier de nombreux composés volatils présentant une grande diversité chimique. Ainsi, des acides gras volatils tels que les acides palmitique, myristique, linoléique et laurique (**Fig.I.4**), ont été reportés comme composés majoritaires dans les espèces natives d'Algérie: *G. numidica*, *G. saharæ*, *G. ulicina*, *G. vepres*, *G. triscuspidata* et *G. microcephala* (Lograda, 2009; 2010; 2011; 2012). De plus, d'autres composés volatils comme les alcools, cétones, aldéhydes, esters et terpènes ont été retrouvés en faibles concentrations dans les espèces citées précédemment.



**Figure I.4.** Structures des acides gras identifiés dans les espèces natives d'Algérie: *G. numidica*, *G. saharae*, *G. ulicina*, *G. vepres*, *G. triscuspidata* et *G. microcephala*.

D'autre part, des composés volatils tels que (*E*)- $\beta$ -ionone, dihydroactinidiolide, nonanal, et hexahydrofarnésylacétone (**Fig.I.5**) ont été identifiés comme composants majoritaires de l'huile essentielle extraite à partir de l'espèce *G. tinctoria* (Rigano, 2010).



**Figure I.5.** Structures des composés volatils majoritaires identifiés dans l'espèce *G. tinctoria*.

Le **Tableau I.10** rassemble les différentes espèces du genre *Genista* avec leur contenu en huiles essentielles (Lograda, 2009; 2010; 2011; 2012; Rigano, 2010).

**Tableau I.10.** Composition des huiles essentielles des plantes du genre *Genista* (Fabaceae).

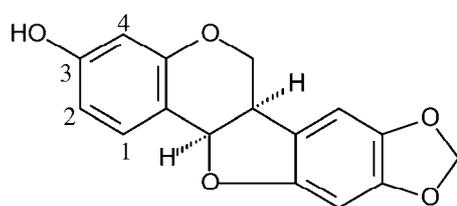
Composés		<i>G. saharae</i>	<i>G. numidica</i>	<i>G. ulicina</i>	<i>G. vepres</i>	<i>G. tricuspidata</i>	<i>G. microcephala</i>	<i>G. tinctoria</i>
<b>Acides gras</b>	Ac. octanoïque	+			+	+		
	Ac. nonanoïque	+	+		+	+		
	Ac. décanoïque	+	+		+	+	+	
	Ac. dodécanoïque	+	+	+	+	+	+	
	Ac. tridécanoïque				+	+		
	Ac. tétradécanoïque	+	+	+			+	
	Ac. pentadécanoïque				+			
	Ac. n-hexadécanoïque	+	+	+	+	+	+	
	Ac. heptadécanoïque	+			+	+		
	Ac. octadécanoïque	+				+	+	
Ac. linoléique	+		+	+	+	+		
<b>Monoterpènes</b>	Terpène-4-ol	+						
	$\alpha$ -Terpinéol	+		+	+	+		
	Géranol	+		+	+			
	(E)- $\beta$ -Ionone	+	+	+	+	+	+	+
	Géranyl linalol	+						
	Linalol		+	+				
	Naphtalène		+	+	+	+		
	(E,E)-Pseudoionone		+			+		
	trans-Linalol oxyde				+			
	Nérol					+		
Dihydroactinidiolide							+	
<b>Nérisoprénoides</b>	$\beta$ -Damacénone E	+	+	+	+	+		
	Megastigmatriènone 4	+						
	Megastigmatriènone 2	+						
	Safranal	+	+		+	+		
	Theaspirane A		+	+			+	
	Theaspirane B		+		+			
	trans- $\beta$ -Ionon-5,6-époxyde				+	+		
	Megastigmatriènone 2					+		
<b>Sesquiterpènes</b>	Elémol	+				+		
	$\beta$ -Borbonène		+					
	Oxyde de caryophyllène		+			+	+	
	$\alpha$ -Calacorène				+			
	Intermédiaireol				+			
	1-Epi-cubénoïl					+		
	$\beta$ -Caryophyllène					+		
	$\gamma$ -Muuroène					+		
	Epi-cubénoïl					+		
	$\alpha$ -Cadinène					+		
	Epi-cédrol					+		
	$\gamma$ -Eudésmol					+		
	$\alpha$ -épi-Muuroloïl					+		
	$\alpha$ -Cadinol						+	
	$\gamma$ -Muuroloïl						+	
Hexahydrofarnésylacétone							+	
<b>Diterpènes</b>	Phytol	+			+	+		
	trans-Phytol	+	+	+	+	+	+	

**Tableau I.10.** Composition des huiles essentielles des plantes du genre *Genista* (suite).

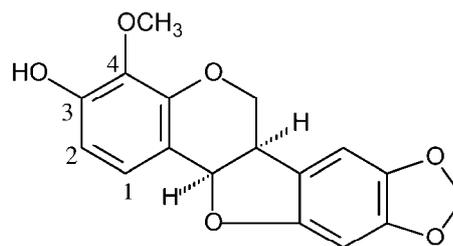
Composés		<i>G. saharac</i>	<i>G. numidica</i>	<i>G. ulicina</i>	<i>G. vepres</i>	<i>G. tricuspidata</i>	<i>G. microcephala</i>	<i>G. tinctoria</i>
<b>Aldéhydes</b>	Pentadécanal	+		+				
	Benzaldéhyde	+						
	(2E,4E)- Décadénal		+		+	+	+	
	Nonanal		+	+		+	+	+
	1,2-Diméthyl-tridécanal					+		
<b>Alcools</b>	Octan-3-ol	+						
	Tétradécanol	+						
	Oct-1-èn-3-ol		+	+		+		
	4-Vinyl-2-méthoxy-phénol		+	+			+	
	2,2,6,7-Tétraméthylbicyclo[4.3.0]nona-4.9(1)-dièn-8-ol				+			
<b>Cétones</b>	$\gamma$ -Tétradécalactone	+						
	6,10,14-Triméthyl-pentadécan-2-one	+	+	+	+	+	+	
	6-Méthyl-hepta-3,5-dièn-2-one			+	+	+		
	Octa-3,5-dièn-2-one		+			+		
<b>Esters</b>	Cyclopentanoate d'éthyle	+						
	Linolénoate de méthyle	+	+					
	9,12,15-Octadécatriionate de méthyle		+			+		
	Octadécan-9,12-diénoïque			+				
	Hexadécanoate de méthyle			+	+	+		
<b>Divers</b>	2-Pentyl furane	+				+	+	
	Tétradécan-3-èn-5-ync		+					

#### I.1.6.4. Autres composés

Quelques ptérocarpanes ont été mis en évidence dans le genre. Ainsi les molécules maackiaïne et 4-méthoxymaackiaïne ont été isolées dans l'espèce *G. pichisermolliana* (Noccioli, 2011).



maackiaïne



4-méthoxymaackiaïne

#### I.1.7. Activités biologiques dans le genre *Genista*

Les plantes du genre *Genista*, riches en alcaloïdes quinolizidiniques, ont été utilisées en médecine traditionnelle, spécialement *G. tinctoria* connue pour ses propriétés diurétique, laxative, purgative, émétique, et sudorifique (Gibbs, 1966). De plus, il a été reporté que les extraits alcaloïdiques des plantes du genre *Genista* montrent essentiellement des activités antimicrobiennes

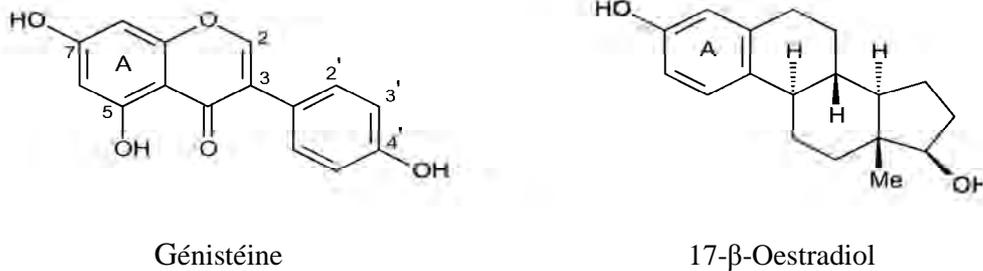
et antifongiques. *G. vuralii* révèle une activité antimicrobienne contre les bactéries *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* aussi bien qu'une activité antifongique envers *Candida krusei*, avec des concentrations inhibitrices minimales (MIC) de 62.5 µg /mL (Erdemoglu, 2009), alors que *G. microcephala* a été reportée avoir une valeur (MIC) de 2 mg/mL contre les bactéries *Sanetta* sp., *Proteus merabilis* et *Enterobacter* sp. (Zellagui, 2004). D'autre part, *G. sandrasica* a montré une activité significative contre les bactéries *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* avec des valeurs (MIC) respectives de 31.25 et 62.5 µg /mL (Küçükboyaci, 2012).

Les flavonoïdes, en raison de leur structure polyphénolique, jouent un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction de certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogenèse et sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes. Ainsi le kaempférol active l'auxine-oxydase alors que la quercétine l'inhibe. En plus, les flavonoïdes dont l'absorption en UV est importante, protègent la plante *vis-à-vis* des rayonnements nocifs (Guignard, 1985). D'autre part, les flavonols ainsi que tous les flavonoïdes avec des hydroxylations en positions C-3' et C-4' forment des complexes avec les métaux et possèdent une activité antioxydante (Pratt, 1990).

Nombreuses sont les espèces du genre *Genista* possédant des vertus médicinales liées aux flavonoïdes, particulièrement les isoflavonoïdes. Ainsi, la génistéine isolée de *G. tinctoria* (Perkins, 1899) est reportée comme étant un "phyto-œstrogène" étudié comme molécule alternative aux composés synthétiques oestradiol et éthylnyl-oestradiol qui jouent un rôle dans le développement normal des voies reproductives chez les humains et sont impliqués dans le cancer de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme (Akiyama, 1987).

Les phytoestrogènes interfèrent avec l'activité œstrogénique soit par une interaction directe avec les récepteurs œstrogéniques, soit indirectement en régularisant la concentration des œstrogènes endogènes (Makela, 1999). A cet effet, il a été reporté que les isoflavones génistéine et daidzéine inhibent la formation et la prolifération des tumeurs cancérogènes du sein chez la femme (Matsumura, 2005).

D'autre part, la génistéine *in vitro*, est l'inhibiteur le plus efficace de l'activité excessive de la 5 $\alpha$ -réductase qui catalyse la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone, un androgène puissant qui est considéré comme un facteur de risque du cancer de la prostate (Evans, 1995). Comparée au 17- $\beta$ -oestradiol, la génistéine présente de grandes similitudes structurales, particulièrement le poids moléculaire, le noyau phénolique A et les hydroxyles en positions C-7 et C-4' (Dixon, 2002). L'hydroxyle en position C-7 est nécessaire pour lier la génistéine au récepteur œstrogène (ER) en mimant le noyau A de l'œstrogène stéroïdique (17- $\beta$ -oestradiol). Par ailleurs, la distance ( $\sim 11.5$  Å) entre les hydroxyles phénoliques en C-7 et C-4' (**Fig.I.6**), permet une liaison optimale de la génistéine aux récepteurs œstrogéniques (Paves, 2010).



**Figure I.6.** Similitudes structurelles entre génistéine et 17-β-oestradiol.

Par ailleurs, une étude visant l'évaluation de l'activité œstrogénique menée *in vitro* sur les aglycones flavoniques libres et leurs molécules glycosylées a montré des comportements différents chez les molécules flavoniques et isoflavoniques. D'une part, les aglycones isoflavoniques libres génistéine et isoprunétine se montrent plus actives que les formes glycosylées correspondantes comme les hétérosides 7-*O*-glucoside génistéine et 4',7-di-*O*-glucoside isoprunétine. D'autre part, les hétérosides flavoniques 7-*O*-glucoside lutéoline et 4'-*O*-glucoside lutéoline sont plus actifs que la génine lutéoline. En plus, la glycosylation en position C-4' pour la lutéoline est plus favorable pour l'activité œstrogénique que celle en position C-7 (Garritano, 2005).

Pour les huiles essentielles, leur volatilité et l'odeur marquée en font des éléments de la communication chimique dans la plante en jouant un rôle dans la pollinisation, et la dispersion des diaspores. Souvent elles constituent un moyen de défense vis-à-vis des prédateurs comme les microorganismes, les champignons, les insectes et les herbivores (Verschaffelt, 1915). D'autre part, les huiles essentielles sont aussi connues pour leurs propriétés pharmacologiques. On leur confère un pouvoir antiseptique, des propriétés expectorantes et diurétiques, aussi bien que des propriétés spasmolytiques et sédatives. Pourtant il est important de noter la toxicité de certaines huiles. Ainsi, 2 gr de menthol peuvent être mortels chez un adulte; chez un jeune enfant des gouttes nasales au menthol peuvent induire un spasme de la glotte avec le risque d'une asphyxie (Bruneton, 1987).

Dans le genre *Genista* on cite une activité anti-microbienne significative liée aux huiles essentielles, en se basant sur des tests menés sur les trois souches bactériennes *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Cette activité a été reportée dans les espèces algériennes: *G. microcephala*, *G. saharae*, ainsi que *G. ulicina* et *G. vepres* (Lograda, 2009; 2010; 2012). D'autre part, on rapporte également une activité antiproliférative et cytotoxique sur des cellules malignes humaines de type mélanome M14, des huiles essentielles extraites de *G. sessilifolia* et *G. tinctoria* (Rigano, 2010). Le **Tableau I.11** illustre quelques autres activités reportées pour le genre *Genista* (Fabaceae).

**Tableau I.11.** Quelques plantes du genre *Genista* mentionnées pour leurs usages pharmaceutiques.

Espèce	Substances actives	Utilisation	Réf.
<i>G. angelica</i>	- Flavonoïdes - Alcaloïdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diurétique</li> <li>• Traitement des ulcères et des calculs rénaux</li> </ul>	Leporatti 1989 Paris 1965-c
<i>G. balansae</i>	PI*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analgésique</li> <li>• Anti-inflammatoire</li> <li>• Cholérétique</li> </ul>	Agelet 2003
<i>G. ephedroides</i>	- Flavone: licoflavone C  - Isoflavones - Flavones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antimutagène, protectrice contre les dommages induits au niveau des chromosomes par les médicaments anticancéreux mitomycine C (MMC) et daunorubicine (DAU)</li> <li>• Antagoniste de l'oestradiol</li> </ul>	Scarpato 2008  Pinto 2008
<i>G. germanica</i>	- Huiles essentielles - Alcaloïdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expulse les urates</li> </ul>	Adams 2009
<i>G. microcephala</i>	PI*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intoxication alimentaire</li> <li>• Infection microbienne</li> </ul>	El Rhaïfari 2002
<i>G. morisii</i>	- Isoflavones - Flavones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antagoniste de l'oestradiol</li> </ul>	Pinto 2008
<i>G. saharae</i>	PI*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Désordres digestifs</li> </ul>	El Rhaïfari 2002
<i>G. tenera</i>	- Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de l'activité acétylcholinestérase</li> <li>• Activité antidiabétique</li> <li>• Anti-hyperglycémique</li> </ul>	Rauter 2009  Rauter 2005
<i>G. tridentata</i>	- Isoflavone: génistéine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antispasmodique</li> </ul>	Herrera 1992
<i>G. sessilifolia</i>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protection contre les radiations UV</li> </ul>	Rigano 2009
<i>G. tinctoria</i>	- Isoflavones	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité anti-oxydante</li> </ul>	
<i>G. tinctoria</i>	- Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibactérienne</li> <li>• Purgative</li> <li>• Sudorifique</li> <li>• Eméto-cathartique</li> </ul>	Boullard 2001
<i>G. sandrasica</i> <i>G. vuralii</i>	- Isoflavones: daïdzéine et génistéine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité anti-oxydante</li> </ul>	Orhan 2011

\* Pas d'indication

## I.2. La famille Convolvulaceae

### I.2.1. Aspects botaniques et classification systématique

La famille *Convolvulaceae* est une famille de la classe des Dicotylédones (ou Magnoliopsida) et fait partie de la sous-classe des Asteridae. Selon l'*Angiosperm Phylogeny Group* (APG III, 2009), la famille des Convolvulacées appartient à l'ordre des Solanales qui renferme quatre autres familles: *Hydroleaceae*, *Montiniaceae*, *Solanaceae*, et *Sphenocleaceae*. La position des Convolvulacées est présentée comme suit :

**Règne** : Plantae

**Embranchement** : Spermatophyta

**Sous-embranchement** : Angiospermae (Magnoliophyta)

**Classe** : Magnoliopsida

**Sous-classe** : Asteridae

**Ordre** : Solanales

**Famille** : *Convolvulaceae*

*Hydroleaceae*

*Montiniaceae*

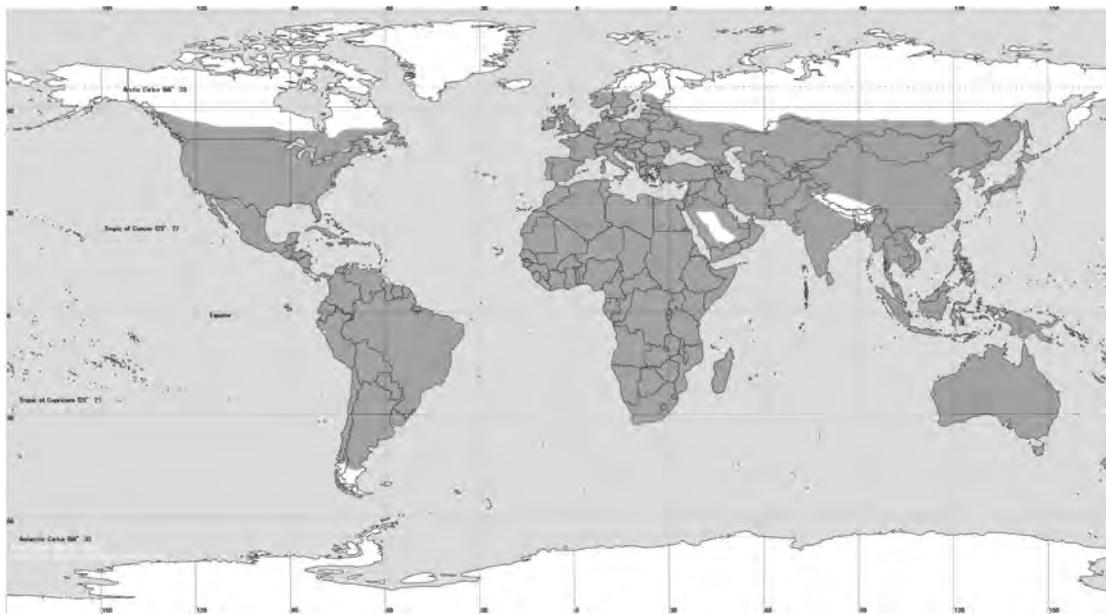
*Solanaceae*

*Sphenocleaceae*

Les Convolvulacées sont des plantes herbacées volubiles et grimpantes, souvent rhizomateuses, généralement à laticifères produisant un latex blanc. Les poils sont variables, souvent bifurqués ou simples. Les feuilles sont alternes, entières ou lobées, sans stipules. Les fleurs sont solitaires ou en glomérules. Le calice est à sépales plus ou moins inégaux, parfois accrescents. La corolle est campanulée ou rotacée. Les 5 étamines sont libres, alternant parfois avec des écailles intrastaminales. Le gynécée supère est constitué de 2 carpelles unis. La fleur possède 1 à 3 styles. Le fruit est capsulaire, indéhiscent ou s'ouvrant en travers ou en 2 valves, à 2 loges contenant chacune 2 graines; celles-ci ont un albumen mucilagineux et un embryon courbe à radicule infère (Coste, 1937; Quezel, 1963; Battandier, 1988).

### I.2.2. Distribution géographique

Les Convolvulacées comprennent de nombreuses espèces ornementales cultivées pour la beauté de leurs fleurs. Quelques-unes ont un intérêt économique comme la patate douce (*Ipomoea batatas* Lam.), le 7<sup>ème</sup> aliment le plus consommé au monde (Contreras, 1995). Cette famille à distribution cosmopolite est composée de quelques 57 genres contenant environ 1930 espèces (Judd, 2002) largement distribuées à l'exception des régions très froides (**Fig.I.7**). Ces plantes sont mieux diversifiées dans les régions tropicales et subtropicales.



**Figure I.7.** Distribution de la famille *Convolvulaceae* (Wikimedia, novembre 2014).

### **I.2.3. Présentation du genre *Convolvulus***

Le genre *Convolvulus* (liserons), dont le nom fait allusion à l'enroulement (*Convolvère*: verbe latin signifiant enrouler) des tiges autour de leur support, est l'un des principaux genres de la famille *Convolvulaceae*. Il comprend environ 250 espèces, se classant en seconde position derrière le genre *Ipomoea* (600 sp.), suivi des genres *Cuscuta* (150) et *Jacquementia* (120) (Judd, 2002).

Les espèces appartenant à ce genre sont des plantes annuelles (buisson) ou vivaces, à tiges souvent volubiles. Les fleurs sont éphémères et ne s'ouvrent que quelques heures, après quoi la corolle se fane. La corolle est rose, bleue, blanche ou jaunâtre, souvent grande, axillaire ou terminale, en cloche, à 5 angles et à 5 plis. Les bractées florales non foliacées n'enveloppent pas le calice qui est divisé jusqu'à la base en 5 lobes presque égaux. Les étamines sont incluses et le style est filiforme à 2 stigmates non capités. La capsule est subglobuleuse, à 2 loges renfermant chacune 2 graines anguleuses. Les feuilles sont entières, sinuées ou palmatiséquées (Coste, 1937; Quezel, 1963).

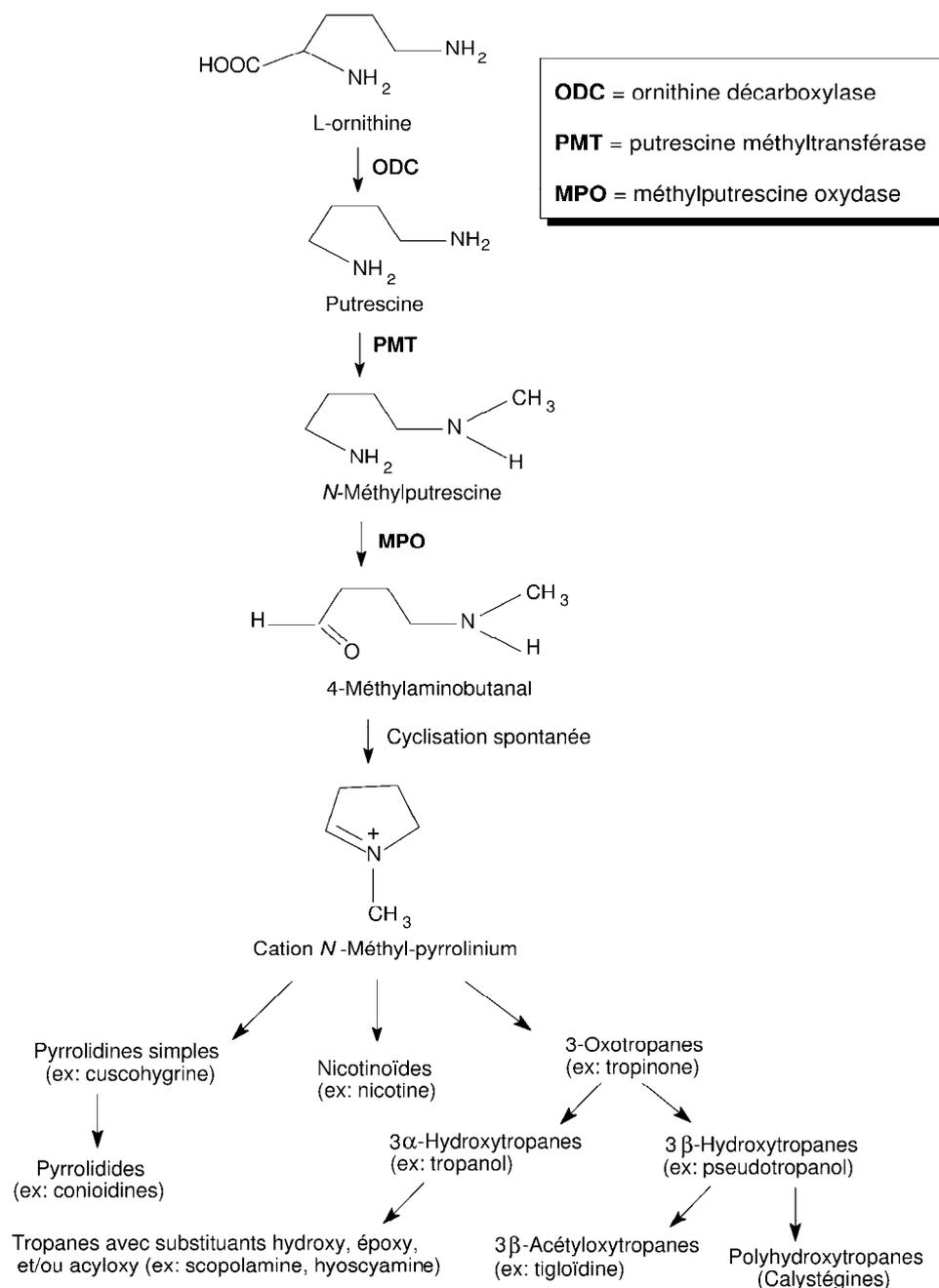
Le genre *Convolvulus* est à distribution cosmopolite, bien que la plupart de ses espèces se rencontrent en région méditerranéenne et à l'ouest de l'Asie. Ce genre est représenté en Algérie par 17 espèces dont cinq sont endémiques dont l'aire de répartition s'étend des rochers et rocailles calcaires du Tell algérien aux pâturages arides désertiques de l'Atlas saharien (Quezel, 1963).

### **I.2.4. Travaux phytochimiques antérieurs sur le genre *Convolvulus***

Nous trouvons dans le genre *Convolvulus* les grandes classes de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpènes, ainsi que quelques autres composés moins fréquents qui seront indiqués dans ce chapitre.

### I.2.4.1. Les alcaloïdes

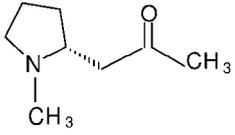
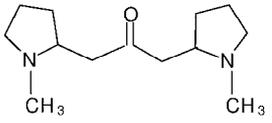
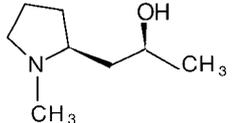
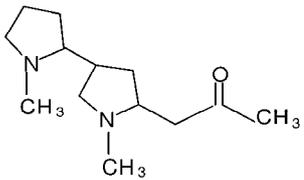
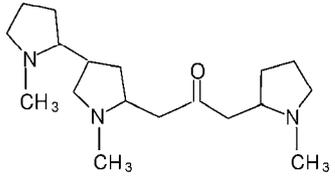
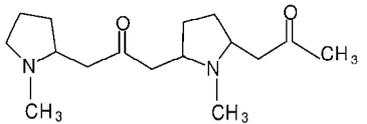
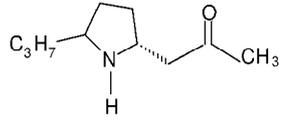
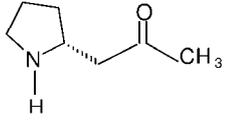
Bien qu'ils ne soient pas nombreux, les alcaloïdes isolés dans le genre *Convolvulus* dérivent tous de l'ornithine. Les alcaloïdes de type pyrrolidine, nicotinique et tropanique sont synthétisés selon le schéma de biosynthèse ci-dessous avec le cation *N*-méthyl-pyrrolinium comme précurseur commun (**Schéma I.2**) (Eich, 2008).



### I.2.4.1.1. Les alcaloïdes pyrrolidiniques simples

Le terme de pyrrolidine a été choisi pour désigner les alcaloïdes dont la structure est caractérisée par un ou deux cycles pyrrolidiniques (tétrahydropyrroles). Les alcaloïdes pyrrolidiniques simples les plus fréquemment cités dans la littérature pour le genre *Convolvulus* sont: l'hygrine, l'hygroline, la cuscohygrine et la *N*-méthylpyrrolidinyl-cuscohygrine (**Tableau I.12**).

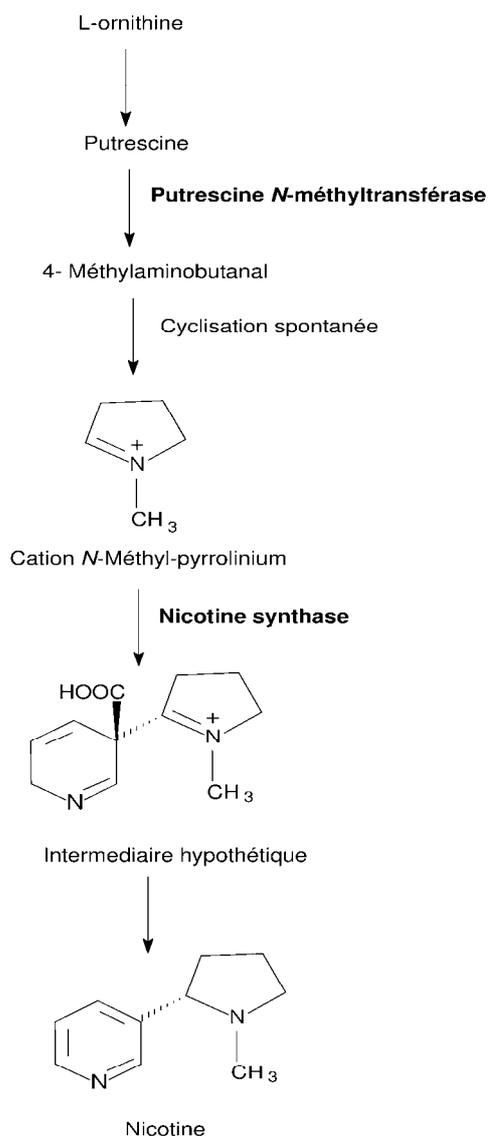
**Tableau I.12.** Exemples d'alcaloïdes pyrrolidiniques simples rencontrés chez les *Convolvulus*.

Structure	Espèces	Références
Hygrine 	<i>C. althaeoides</i> <i>C. arvensis</i>	Jenett-Siems 1996 Schimming 2003
Cuscohygrine 	<i>C. lanatus</i>	Hilal 1983
Hygroline 	<i>C. caput-medusae</i>	Schimming 2003
<i>N</i> -Méthyl-pyrrolidinyl-hygrine 	<i>C. sabatius</i> VIV ssp. <i>mauritanicus</i>	Jenett-Siems 1998
<i>N</i> -Méthyl-pyrrolidinyl-cuscohygrine 	<i>C. sagittatus</i>	Schimming 2003
Phygrine 	<i>C. sagittatus</i> <i>C. arvensis</i>	Schimming 2003
Propylhygrine 	<i>C. althaeoides</i> , <i>C. cantabrica</i>	Jenett-Siems 1996;1998 Schimming 2003
Norhygrine 	<i>C. farinosus</i>	Jenett-Siems 1996

### I.2.4.1.2. Les nicotinoïdes

Le début de l'industrie du tabac fut lancé par l'extraction de la nicotine de l'espèce *Nicotiana tabacum*. La nicotine est l'alcaloïde principal du tabac commercial. Le mélange alcaloïdique est composé à 90% par la nicotine alors que des dérivés de la nicotine tels que nornicotine, anabasine et anatabine ne sont présents qu'à raison de d'environ 5% (Eich, 2008).

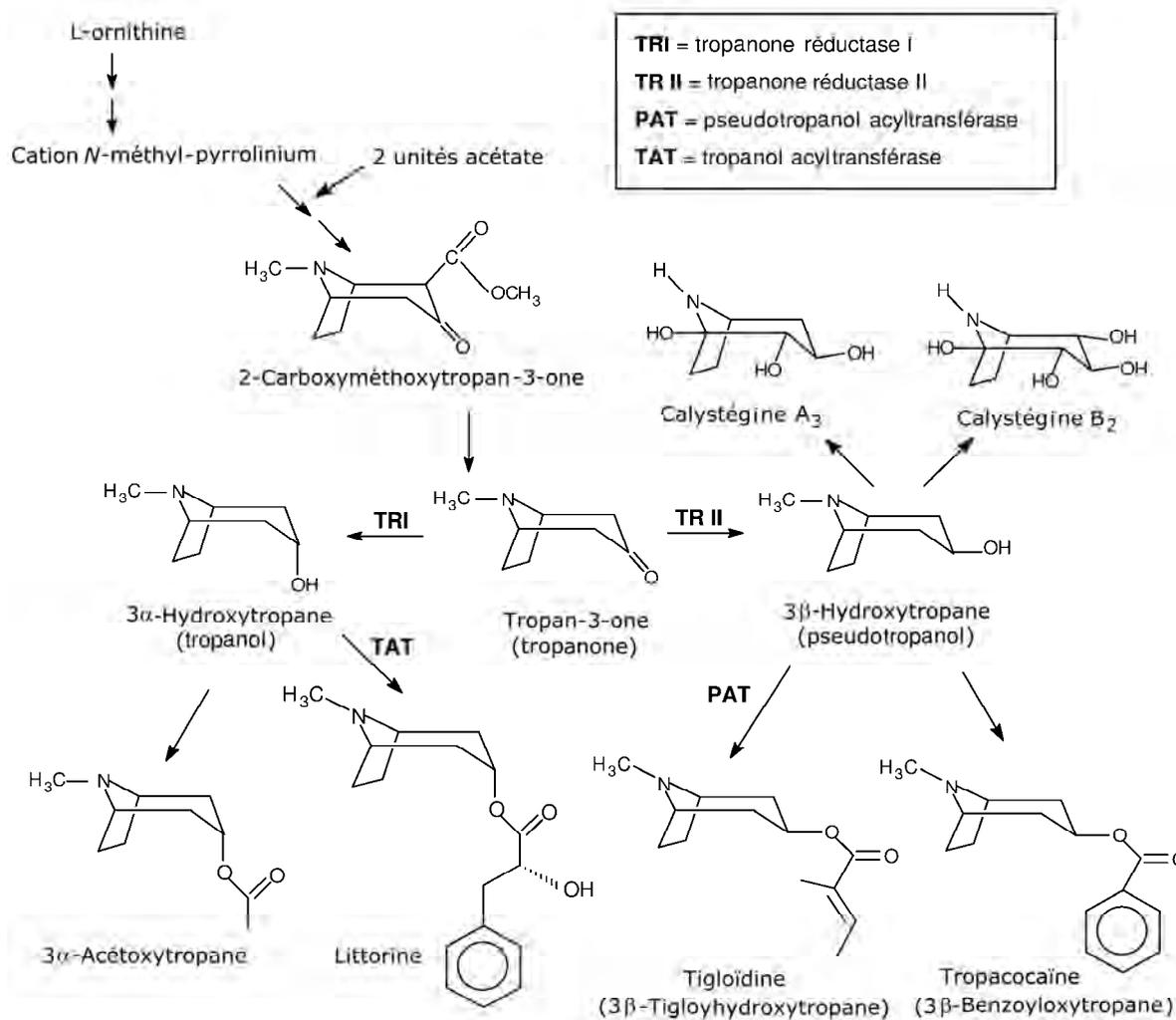
Dans le genre *Convolvulus*, seule la nicotine a été reportée dans les espèces *C. althaeoides* L., *C. lopezocasioi* SVEN., *C. cantabrica* L., *C. sabatius* VIV. ssp. *mauritanicus* (BOISS.) MURB., *C. siculus* L., et *C. subauriculatus* (BURCH.) LINDING. (Jenett-Siems, 1996; 1998; Schimming, 2003). Cet alcaloïde est dérivé de l'ornithine selon le **Schéma I.3**.



**Schéma I.3.** Biosynthèse de l'alcaloïde nicotine.

### I.2.4.1.3. Les alcaloïdes tropaniques

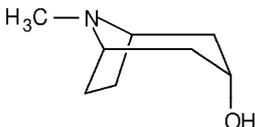
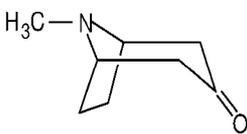
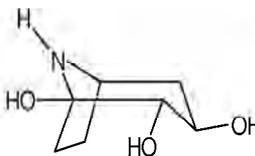
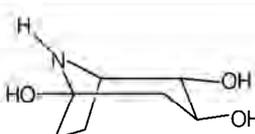
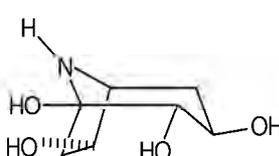
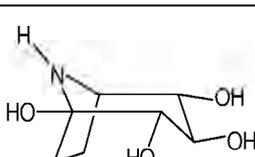
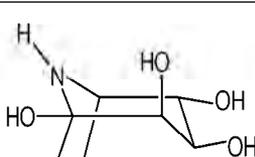
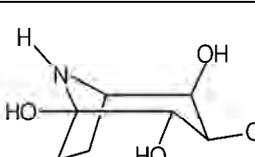
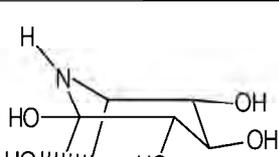
Ces alcaloïdes sont caractérisés par un squelette tropanique bicyclique (*N*-méthyl-8-azabicyclo [3.2.1.] octane. Les plus fréquents sont les alcaloïdes tropaniques simples dérivés du  $\alpha$ - et  $\beta$ -tropanol, ainsi que ceux appartenant à la classe des calystégines (nortropanes polyhydroxylés). Les calystégines A, B et C sont des alcaloïdes tropaniques respectivement trihydroxylés, tétrahydroxylés et pentahydroxylés. Ces alcaloïdes sont synthétisés à partir de l'ornithine selon le **Schéma I.4** (Eich, 2008).



**Schéma I.4.** Biosynthèse des principaux types d'alcaloïdes tropaniques isolés dans le genre *Convolvulus*.

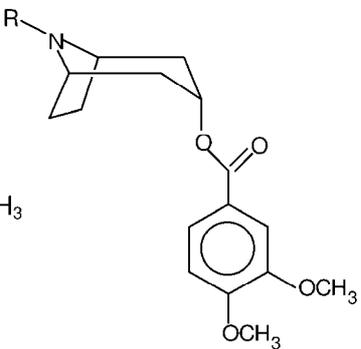
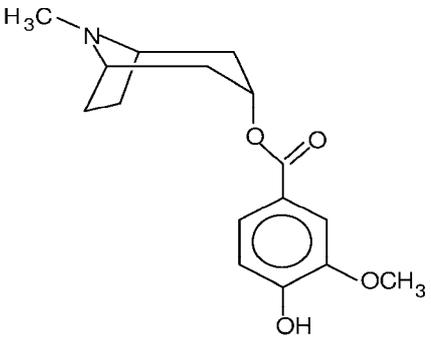
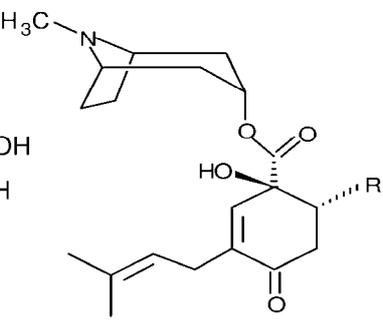
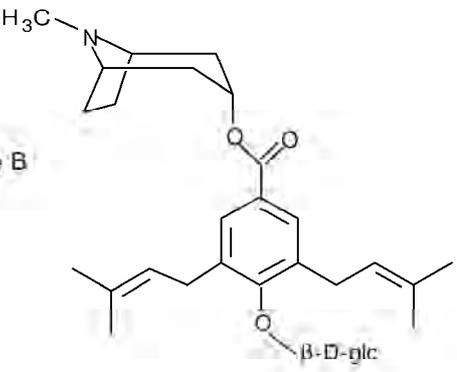
Quelques exemples d'alcaloïdes tropaniques simples déjà reportés dans le genre *Convolvulus* sont indiqués sur le **Tableau I.13** (Dräger, 1995; Todd, 1995; Schimming, 2005).

**Tableau I.13.** Exemples d'alcaloïdes tropaniques simples rencontrés dans le genre *Convolvulus*.

Structure	Espèces
3- $\alpha$ -Hydroxytropane (tropanol) 	<i>C. cantabrica</i> <i>C. lineatus</i> <i>C. sagittatus</i>
Tropan-3-one (tropanone) 	<i>C. arvensis</i> <i>C. sabatius</i> Viv. ssp. <i>mauritanicus</i>
Calystégine A <sub>3</sub> 	<i>C. arvensis</i> <i>C. sabatius</i> Viv. ssp. <i>mauritanicus</i>
Calystégine A <sub>5</sub> 	<i>C. arvensis</i> <i>C. cneorum</i>
Calystégine B <sub>1</sub> 	<i>C. arvensis</i> <i>C. cneorum</i> <i>C. subauriculatus</i>
Calystégine B <sub>2</sub> 	<i>C. subauriculatus</i> <i>C. arvensis</i> <i>C. sabatius</i> Viv. ssp. <i>mauritanicus</i>
Calystégine B <sub>3</sub> 	<i>C. arvensis</i>
Calystégine B <sub>4</sub> 	<i>C. arvensis</i> <i>C. elongates</i>
Calystégine C <sub>1</sub> 	<i>C. sabatius</i> Viv. ssp. <i>mauritanicus</i>

D'autre part, on indique sur le **Tableau I.14** quelques exemples d'alcaloïdes tropaniques substitués également isolés de plantes appartenant au genre *Convolvulus*.

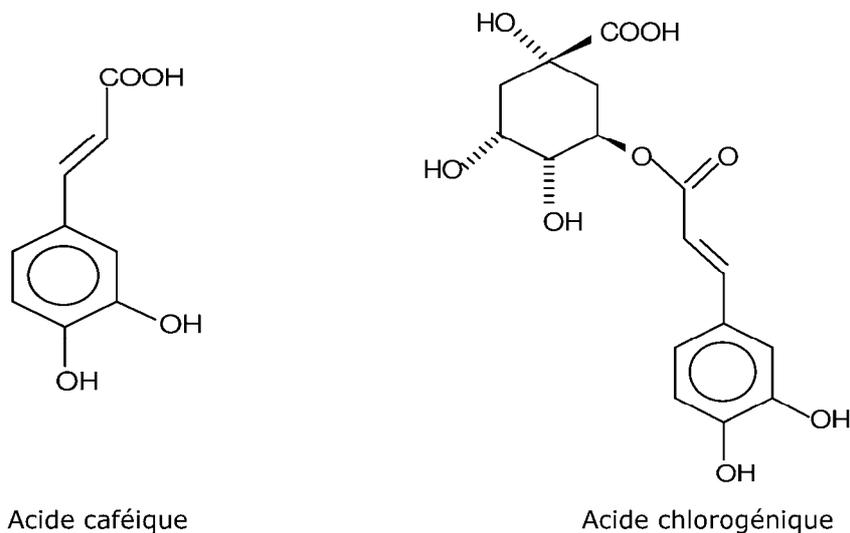
**Tableau I.14.** Exemples d'alcaloïdes tropaniques substitués rencontrés dans le genre *Convolvulus*.

Structure	Espèces	Références
<p>Convolamine R = H                      Convolvine R = CH<sub>3</sub></p> 	<i>C. subhirsutus</i>	Gapparov 2007
<p>Concneorine</p> 	<i>C. cneorum</i>	Mann 1997
<p>Consiculine R = OH                      Consabatine R = H</p> 	<i>C. siculus</i> <i>C. sabatius</i> Viv. ssp. <i>mauritanicus</i>	Jenett-Siems 1998
<p>Merresectine B</p> 	<i>C. sabatius</i> Viv. ssp. <i>mauritanicus</i>	Jenett-Siems 1998

## I.2.4.2. Les composés phénoliques

### I.2.4.2.1. Les dérivés de l'acide caféique

Les plantes du genre *Convolvulus* accumulent des dérivés de l'acide caféique. L'acide caféique, l'acide chlorogénique et leurs dérivés sont souvent isolés chez les plantes de la famille des Convolvulaceae. Dans le genre *Convolvulus*, l'acide chlorogénique a été isolé à partir de l'espèce *C. floridus* L. (Trumm, 1991).



### I.2.4.2.2. Les coumarines

Les hydroxy-coumarines simples, et spécialement la scopolétine et ses dérivés glycosylés comme la scopoline sont des coumarines détectées chez les espèces *Convolvulus puricaulis* CHOISY, *C. arvensis* L., et *C. lanatus* VAHL (Deshpande, 1969; Khalil, 1981; El-Nasr, 1982). D'autre part, les coumarines umbelliférone et esculétine ont été isolées et identifiées pour la première fois dans l'espèce *Convolvulus fatmensis* Ktz. (Atta, 2007). Par ailleurs, il a été reporté l'identification du dérivé glycosylé cichorine dans l'espèce *C. linatus* L. (El-Nasr Seif, 1983) (**Fig.I.8**).

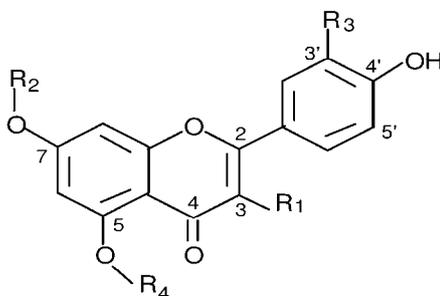
The figure shows the general structure of a coumarin derivative, which is a benzopyrone. It consists of a benzene ring fused to a pyrone ring. The benzene ring has two substituents, R and R<sub>1</sub>, at the 6 and 7 positions respectively. The pyrone ring has a carbonyl group at the 2 position and an oxygen atom at the 1 position.

	R	R <sub>1</sub>
Scopolétine	OH	OCH <sub>3</sub>
Scopoline	Glucose	OCH <sub>3</sub>
Umbelliférone	OH	H
Esculétine	OH	OH
Cichorine	Glucose	OH

**Figure I.8.** Structure des coumarines identifiées dans le genre *Convolvulus*.

### I.2.4.2.3. Les flavonoïdes

Les glycosides des flavonols kaempférol et quercétine, spécialement les 3-*O*-glucosides et 3-*O*-rutinosides, sont fréquents dans le genre *Convolvulus*. Quelques exemples de structures de ces molécules flavoniques sont indiqués dans la **Fig.I.9**. Le **Tableau I.15** rassemble les différentes espèces du genre *Convolvulus* avec leur contenu en composés flavoniques.



		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	Lutéoline-5- <i>O</i> -glucoside	H	H	OH	glc
2	Quercétine	OH	H	OH	H
3	Quercétine-7- <i>O</i> -rhamoside	OH	rham	OH	H
4	Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside	<i>O</i> -glc	H	OH	H
5	Quercétine-3- <i>O</i> -galactoside	<i>O</i> -gal	H	OH	H
6	Rutine	<i>O</i> -glc- <i>O</i> -rham	H	OH	H
7	Kaempférol	OH	H	H	H
8	Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside	<i>O</i> -glc	H	H	H
9	Kaempférol-3- <i>O</i> -rhamnoside	<i>O</i> -rham	H	H	H
10	Kaempférol-7- <i>O</i> -glucoside	OH	glc	H	H
11	Kaempférol-3-rutinoside	<i>O</i> -glc- <i>O</i> -rham	H	H	H
12	Kaempférol-7-rutinoside	OH	glc- <i>O</i> -rham	H	H
13	Kaempférol-3- <i>O</i> -rhamnose-7- <i>O</i> -glucoside	<i>O</i> -rham	glc	H	H
14	Kaempférol-3-galactorhamnoside	<i>O</i> -gal- <i>O</i> -rham	H	H	H
15	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside	<i>O</i> -glc	H	OCH <sub>3</sub>	H

glc: glucose; gal: galactose; rham: rhamnose.

**Figure I.9.** Structure des flavonoïdes isolés dans le genre *Convolvulus*.

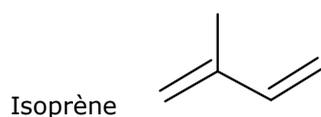
**Tableau I.15.** Distribution des flavonoïdes dans le genre *Convolvulus* (Convolvulaceae).

Espèces	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Réf.
<i>C. microphyllus</i>							+	+								Bisht 1978-a
<i>C. ammannii</i>						+										Patrikeev 1968
<i>C. mazicum</i>	+			+	+				+						+	Menemen 2002
<i>C. arvensis</i>		+	+				+	+	+	+	+	+	+	+		Awaad 2006
<i>C. fatmensis</i>		+					+									Atta 2007

### I.2.4.3. Les terpènes

La diversité remarquable des variétés de terpènes et des substances qui leur sont apparentées (terpénoïdes) rencontrées chez les plantes est un exemple des possibilités chimiques de l'usine végétale. Avec les alcaloïdes et les flavonoïdes, les terpènes sont classés parmi les substances du métabolisme secondaire.

Les terpènes peuvent être considérés comme étant des dérivés de l'isoprène et ont pour formule de base  $(C_5H_8)_n$ .

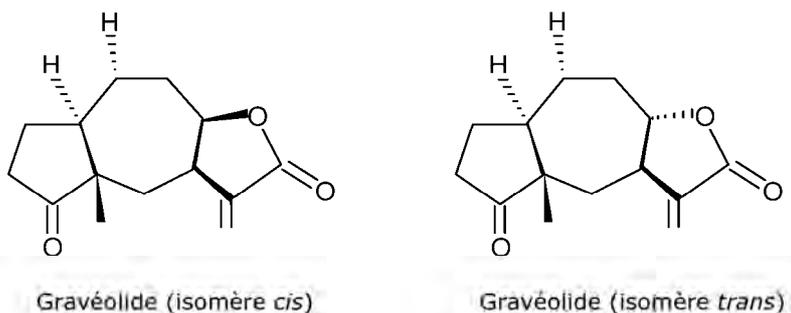


Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue :

- les monoterpènes en  $C_{10}$
- les sesquiterpènes en  $C_{15}$
- les diterpènes en  $C_{20}$
- les triterpènes en  $C_{30}$
- les tétraterpènes en  $C_{40}$
- les polyterpènes ( $C \sim 4000$ )

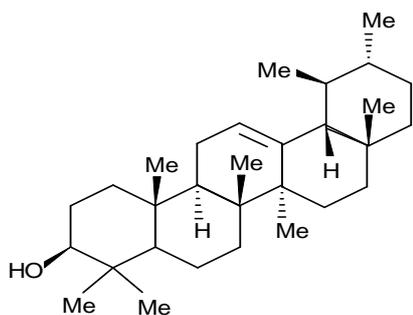
#### I.2.4.3.1. Sesquiterpènes isolés dans le genre *Convolvulus*

L'intérêt pour cette classe chimique dans le genre *Convolvulus* est très faible. En effet, très peu de publications ont été reportées relatant la présence de sesquiterpènes au niveau du genre *Convolvulus*. Néanmoins, on reporte l'identification de la substance 2,3-dihydroaromacétine (gravéolide) qui est une sesquiterpène avec un cycle *trans* lactonique, isolée de l'espèce *Convolvulus oleifolius* ainsi que son isomère *cis* (Abdel-Kader, 2001).

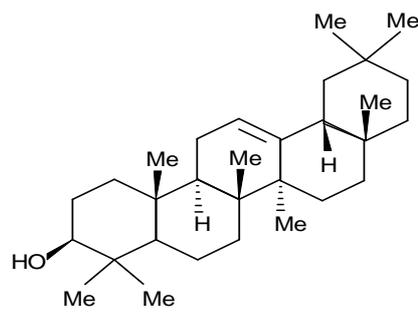


#### I.2.4.3.2. Triterpènes isolés dans le genre *Convolvulus*

Peu de composés de cette classe de substances ont été décrits dans le genre *Convolvulus*. On reporte l'identification de l' $\alpha$ -amyrine isolée des *C. arvensis* et *C. lanatus*, et la  $\beta$ -amyrine identifiée chez *C. lanatus* (Sowemimo, 1973; El-Nasr, 1984).



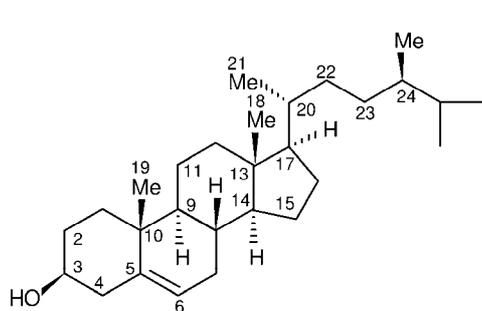
$\alpha$ -amyrine



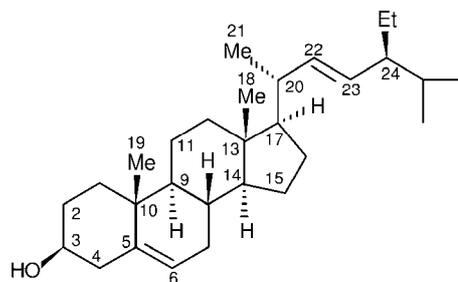
$\beta$ -amyrine

#### I.2.4.4. Les dérivés terpéniques isolés dans le genre *Convolvulus*

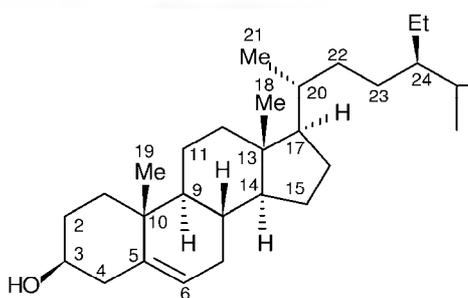
Les stérols ont des structures fondamentalement peu différentes de celles des triterpènes. Ils sont caractérisés par une chaîne latérale surnuméraire de 1 à 2 carbones sous forme de méthyle (ou méthylène) ou éthyle (ou éthylidène), insérés en C<sub>24</sub> (Guignard, 1985; Bruneton, 1987,). Les phytostérols campestérol, stigmastérol,  $\beta$ -sitostérol et  $\beta$ -sitostérol glucoside reportés dans le genre *Convolvulus* sont indiqués sur le **Tableau I.16**.



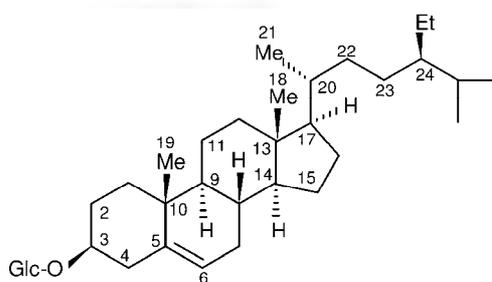
Campestérol (1)



Stigmastérol (2)



$\beta$ -Sitostérol (3)



$\beta$ -Sitostérol glucoside (4)

**Tableau I.16.** Exemples de stérols isolés dans le genre *Convolvulus*.

Espèces	1	2	3	4	Références
<i>C. microphyllus</i>			+	+	Bisht 1978-a; -b
<i>C. oleifolius</i>			+	+	Abdel-Kader 2001
<i>C. arvensis</i>	+	+	+		Sowemimo 1973
<i>C. lanatus</i>	+	+	+		El-Nasr 1984
<i>C. puricaulis</i>			+		Deshpande 1969

### I.2.4.5. Autres composés

On signale aussi l'identification d'autres composés dans le genre *Convolvulus* tels que: alcanes, alcools, sucres libres, esters, acides organiques, acides gras et acides phénoliques (**Tableau I.17**).

**Tableau I.17.** Molécules diverses identifiées dans le genre *Convolvulus*.

Type de molécules	Espèces	Exemples	Références
<b>n-alcanes</b>	<i>C. arvensis</i>	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> : pentacosane C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> : hexacosane C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> : heptacosane C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> : octacosane C <sub>29</sub> H <sub>60</sub> : nonacosane	Sowemimo 1973
	<i>C. microphyllus</i>	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> : triacontane C <sub>31</sub> H <sub>64</sub> : hentricontane	Bisht 1978-b
<b>n-alcools</b>	<i>C. lanatus</i>	C <sub>16</sub> : hexadécanol	El-Nasr 1984
	<i>C. arvensis</i>	C <sub>18</sub> : octadécanol C <sub>19</sub> : nonadécanol C <sub>20</sub> : eicosanol C <sub>21</sub> : heneicosanol C <sub>24</sub> : tétracosanol	Sowemimo 1973
	<i>C. microphyllus</i>	C <sub>26</sub> : hexacosanol C <sub>28</sub> : octacosanol C <sub>30</sub> : triacontanol C <sub>32</sub> : dotriacontanol 29-oxodotriacontanol	Bisht 1978-b  Bhakuni 1996
<b>Acides gras</b>	<i>C. puricaulis</i>	- acide myristique	Deshpande 1969-a
	<i>C. lanatus</i>	- acide palmétique - acide linoléique - acide stearique - acide oléique - acide linoléique	El-Nasr 1984
<b>Acides organiques</b>	<i>C. pluricaulis</i>	- acide 2βH-[5(18), 9(14)-bicyclohexanyl] cyclooctanyl acétique - acide 2βH-octadécahydronaphtacényl-n-hexanoïque - acide 2βH-cyclooctadécanyl acétique - acide 6-hydroxypentadéca-1,6, 15-tricarboxylique - acide 4,16-dioxo-n-octadécanoïque - acide tétratriacontanoïque	Ali 2004  Bhakuni 1996
<b>Acides phénoliques</b>	<i>C. arvensis</i>	- acide gentisique - acide p-coumarique - acide p-hydroxybenzoïque - acide ferulique	Krzaczek 2004
	<i>C. fatmensis</i>	- acide p-hydroxyphénylacétique - acide vanillique - acide salicylique	Atta 2007
<b>Esters</b>	<i>C. pluricaulis</i>	- pentyl n-heptacosanoate - 18βH-n-pentyl-14βH- tridécanylcyclopentyl-1-(2'α-cyclohexyl)carboxylique	Ali 2004
<b>Sucres</b>	<i>C. microphyllus</i>	- rhamnose - sucrose - glucose	Bisht 1978-a
	<i>C. puricaulis</i>	- maltose	Deshpande 1969-b

### **I.2.5. Activités pharmacologiques et biologiques dans le genre *Convolvulus***

Les espèces du genre *Convolvulus* sont des plantes ornementales connues depuis fort longtemps pour leurs vertus médicinales. Le médecin grec Dioscoride, à son époque, a déjà relevé les propriétés purgatives et laxatives de l'espèce *C. sepium* (Dechambre, 1870). D'autre part, à l'époque de la grande médecine arabe, au Moyen-âge, le suc de la résine concentrée et desséchée de la scammonée (*C. scammonia* L.) était employé sous forme de poudre comme purgatif énergétique (Boullard, 2001). Parmi les utilisations en médecine traditionnelle des temps modernes, on signale dans la pratique de la phytothérapie au Maroc l'usage populaire de 2 plantes sous formes de décoctions. L'espèce *C. trabutianus* (Schw. et Muesch) est utilisée pour soigner toux, coqueluche et désordres digestifs, alors que *C. supinus* (Coss. et Kral.) est administrée pour traiter l'hypertension (El Rhaffari, 2002). Ailleurs, la pratique de la phytothérapie en médecine folklorique italienne, révèle l'application des feuilles de *C. arvensis* L. sous forme de cataplasmes immédiatement après vaccination pour éviter les brûlures de la peau (De Natale, 2007). Dans le **Tableau I.18** figurent d'autres activités thérapeutiques reportées dans le genre *Convolvulus*.

Les extraits organiques issus de plantes du genre *Convolvulus* possèdent également des composés ayant des activités biologiques très prononcées. C'est ainsi que le sesquiterpène gravéolide (cf. I.2.4.3.1.1) présente des propriétés antivirales contre l'herpès simple type 1 (HS-1) et une activité contre les cellules cancéreuses de type A2780 chez les humains (Abdel-Kader, 2001). Dans la recherche de nouveaux insecticides naturels dérivés de plantes moins toxiques pour les humains et plus spécifiques, les composés isolés de l'espèce *C. microphyllus* L. Sieb. (29-oxodotriacontanol et l'acide tétratriacontanoïque) montrent une activité antiappétante pour les insectes (Bhakuni, 1996).

**Tableau I.18.** Activités thérapeutiques de quelques espèces du genre *Convolvulus*.

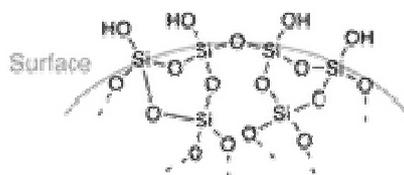
<b>Espèce</b>	<b>Activité</b>	<b>Parties de la plante utilisées</b>	<b>Références</b>
<i>C. althaoieds</i>	- Antioxydante		Tawaha 2007
<i>C. arvensis</i>	- Purgative - Antihémorragique - Antiasthmatique et contre la toux - Traitement de la jaunisse - Traitements du rhumatisme, migraine, diabète et maladies de la peau - Antibactérienne - Antifongique - Antispasmodique - Antimicrobienne - Anticancéreuse	Fleurs	Roberto 1984 Shahina 1994 Walter 1977 Loutfy 1983 Thomas 2000 Al-Antaki 1952 Sina 1968 Awaad 2006 Duraffourd 2002 Bakke 1942 Jawad 1983 Meng 2002
<i>C. bidentatus</i>	- Mal de dents		Walter 1977
<i>C. fatmensis</i>	- Anti-ulcère - Diurétique - Hépatoprotective	Parties aériennes	Atta 2007
<i>C. jalapa</i>	- Purgative	Racines	Alibert 1820
<i>C. lanatus</i>	- Purgative	Racines	Hilal 1983
<i>C. mechoacan</i>	- Purgative	Racines	Alibert 1820
<i>C. microphyllus</i>	- Antifongique		Kapoor 1981
<i>C. olifolius</i>	- Contre l'herpès simple type 1 (HS-1) - Cellules cancéreuses de type A2780 chez les humains		Abdel-Kader 2001
<i>C. pluricaulis</i>	- Antioxydante		Vijayakumar 2005
<i>C. pluricaulis</i>	- Antihypertensive		Dhingra 2007
<i>C. scammonia</i>	- Purgative	Racines	Alibert 1820
<i>C. turpethum</i>	- Purgative	Racines	Alibert 1820

*Chapitre II*  
*Matériels et méthodes*

## II.1. Méthodes de séparation analytique

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique utilisée pour la séparation et l'identification des constituants dans des mélanges simples ou complexes. Le principe de base de la chromatographie repose sur la présence de deux phases non miscibles. L'une des phases est dite stationnaire, contenue dans une colonne ou sur un support planaire, et l'autre mobile qui se déplace au contact de la première. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules sont: la solubilité dans le solvant liquide, la taille, la polarité, la charge électrique, ou la présence de sites particuliers formés par des groupements d'atomes. Ainsi, la différence des propriétés physico-chimiques des composés contenus dans l'échantillon, fait qu'ils sont entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. Ce principe hydrodynamique a donné naissance à plusieurs méthodes analytiques instrumentales, parmi lesquelles on peut citer :

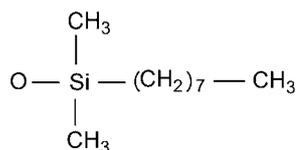
- **La chromatographie de partage:** c'est une chromatographie liquide-liquide basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.
- **Chromatographie d'absorption:** c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide (phase normale) constituée de gel de silice qui est un polymère d'acide silicique  $\text{Si}(\text{OH})_4$  préparé à partir de silicate de sodium. L'intérieur de chaque grain de silice est composé d'atomes de silicium reliés entre eux par des atomes d'oxygène (un silicate). En surface, des groupes silanol ( $\text{Si}-\text{OH}$ ) subsistent et sont responsables de la très forte polarité du gel de silice (**Fig.II.1**).



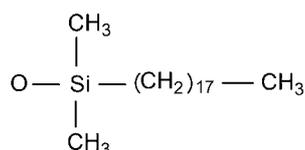
**Figure II.1** Structure du gel de silice.

Ce matériau étant très polaire, il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

- **Chromatographie en phase inverse:** c'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est un adsorbant solide apolaire, nommée phase inverse, qui est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18) (**Fig.II.2**). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (Acétonitrile, Méthanol, eau). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.



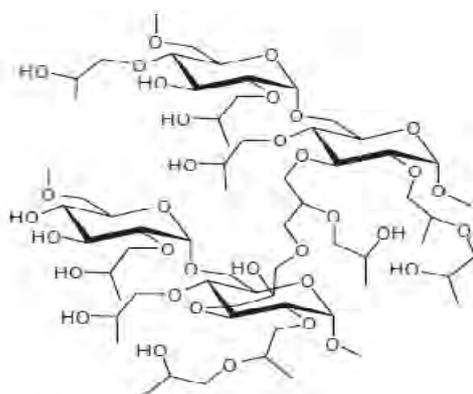
Diméthyl octyl silane (C8)



Diméthyl octadécyl silane (C18)

**Figure II.2.** Phases stationnaires inverses C8 et C18.

- **Chromatographie d'exclusion (exclusion-diffusion)** : Pour cette chromatographie, la phase stationnaire est un solide poreux: le Sephadex LH-20, un gel de dextrane hydroxypropylé (**Fig.II.3**).



**Figure II.3.** Structure du Sephadex LH-20.

Les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores du matériau et sont ainsi retardées, les grosses particules sont exclues de la phase fixe et seront emportées par la phase mobile (**Fig.II.4**). Ce procédé chromatographique permet la séparation des molécules de l'échantillon selon leur taille.



**Figure II.4.** Phénomène diffusion-exclusion en chromatographie d'exclusion.

- **Chromatographie sur échangeurs d'ions**: pour cette chromatographie, la phase stationnaire est une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.

### II.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Une plaque de chromatographie sur couche mince se compose d'un support, en aluminium ou en verre, sur lequel une couche d'adsorbant a été uniformément étalée. Les analyses ont été réalisées, pour la majorité, à l'aide de plaques Silicagel 60 F<sub>254</sub> sur feuille d'aluminium (*Merk*). Pour certains tests biologiques, un support en verre était cependant nécessaire.

Les systèmes éluants, constitués généralement d'un mélange binaire, ternaire ou quaternaire, ainsi que les phases stationnaires étaient constamment adaptés en fonction des extraits et des substances à analyser.

Après développement dans des cuves en verre (*Camag*), l'observation des plaques a été effectuée en lumière visible ou sous UV (254 et 366 nm) et la révélation de ces plaques a été faite en utilisant les réactifs suivants :

- **Réactif de Godin (Révélateur polyvalent)** (Godin, 1954)

Préparé en mélangeant à volumes égaux les solutions A (solution éthanolique de vanilline à 1%) et B (solution aqueuse d'acide perchlorique à 3%). Les plaques sont giclées successivement avec le mélange A/B et une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10%, puis chauffées longuement jusqu'à ce que les composés révélés apparaissent sous forme de taches de diverses couleurs en lumière visible.

- **Réactif de Dragendorff (Révélateur des alcaloïdes)** (Wagner, 1996)

Au moment de l'emploi, un volume de 5 mL de la solution A (0.85 g de nitrate basique de bismuth, 10 g d'acide tartrique à dissoudre dans 40 mL d'eau) est mélangé avec 5 mL de la solution B (dissolution de 16 g de KI dans 40 mL d'eau) en ajoutant une solution de 20 g d'acide tartrique dans 100 mL d'eau. Le mélange est pulvérisé sur les plaques pour donner des taches orange avec les composés alcaloïdiques. Ces tâches révélés disparaissent avec le temps.

- **Réactif de Neu ou NST/PEG (Révélateur des flavonoïdes)** (Wagner, 1996)

*NST/PEG (Naturstoff-Polyethylenglykol)* est une solution méthanolique de diphenylborate de  $\beta$ -aminoéthyle à 1% et le PEG est une solution éthanolique de polyéthylèneglycol à 5%. Les plaques sont giclées consécutivement avec le NST puis par le PEG. Des fluorescences oranges, rouges, jaunes, bleues et vertes sont observées à 366 nm.

### II.1.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolette/visible (HPLC-UV/VIS)

Les analyses HPLC/DAD-UV ont été réalisées à l'aide d'un système Hewlett-Packard série 1100 équipé d'un détecteur UV à réseau de diodes intégré. L'acronyme DAD, désigne le détecteur à barrettes de diodes (*Diode Array Detector*). Les barrettes de diodes au silicium (un semi-conducteur) sont placées dans le plan focal d'un monochromateur à réseau pour contrôler une vaste gamme de longueurs d'ondes et les données d'un spectre complet sont ainsi recueillies en moins d'une seconde.

Les analyses ont été effectuées en phase inverse avec une colonne *Symmetry* RP-18 (5 µm, 150 x 4.6 mm; *Waters*). L'échantillon est injecté dans le système, puis entraîné par la phase mobile à travers la phase stationnaire. Cet appareillage, piloté par le logiciel HP *ChemStations*, permet de travailler en mode isocratique (composition constante de la phase mobile) ou en mode gradient (phase mobile de composition variable). Une pompe délivre la phase mobile à haute pression (<200 bars) à travers la phase stationnaire. La détection a été faite à 210, 254, 280 et 360 nm.

En règle générale, pour l'analyse HPLC/UV, des solutions de 1 à 3 mg/mL pour des extraits bruts, et de 1µg/mL pour les composés purs ont été utilisées. Le volume d'injection est de 10 µL.

### **II.1.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS)**

Les analyses par HPLC/MS ont été réalisées en mode négatif sur deux appareils. A Genève, le système LC-MS utilisé pour réaliser les analyses était composé d'une pompe Varian 9012 (Palo Alto, CA, USA) et d'un spectromètre de masse LCQ (Finnigan MAT) triple quadrupôle modèle TSQ700 équipé d'une interface à *electrospray* (ESI) Finnigan, et contrôlé par le logiciel Xcalibur (version 1.3). A Lille, l'analyse en LC/MS a été effectuée sur un appareil UPLC Accela (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) couplé à un spectromètre de masse triple quadrupôle TSQ Vantage équipé d'une source *electrospray* chauffée, et contrôlé par le logiciel Xcalibur (2.1).

En spectrométrie de masse à plusieurs étapes MS<sup>n</sup>, les ions d'intérêt sont isolés dans l'analyseur à piège d'ions et sélectivement excités pour produire des fragments qui sont à leur tour détectés. L'analyse en LC/MS/MS a été effectuée à Lille avec un appareil UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japon) couplé à un spectromètre de masse triple quadrupôle/trappe d'ions linéaire QTRAP 5500 LCMSMS (AB Sciex, Foster City, USA) équipé d'une source d'ionisation Turvo V et contrôlé par le logiciel Analyst (1.5.2).

La détection a été faite dans le domaine  $m/z$  100–1000 (ou 1300), avec 1 scan par seconde. Les ions moléculaires déprotonnés  $[M-H]^-$  ont été choisis comme ions parents pour la fragmentation.

### **II.1.4. Chromatographie liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse haute résolution à temps de vol (UPLC/HRMS-TOF) et (UPLC/HRMS)**

L'appareil de chromatographie liquide ultra performante (UPLC, Waters, Milford, USA) permet d'améliorer sensiblement la séparation et la résolution des pics chromatographiques, par rapport à un système HPLC classique. Le couplage de cette technique séparative avec un analyseur de masse haute résolution est idéal pour établir la structure des composés originaux.

Les analyses (UPLC/HRMS-TOF) ont été effectuées à Genève à l'aide d'un système Micromass LCT-Premier (Waters), d'un analyseur à temps de vol (TOF = *Time of Flight*) et d'une colonne Acquity UPLC C<sub>18</sub> (50 x 1.0 mm, Waters). Le système de solvants utilisé était le suivant: A : H<sub>2</sub>O + 0.1% HCOOH/ B : MeOH + 1% HCOOH à un débit de 160 µL/min. Le gradient utilisé était le suivant:

Etape	Temps (min)	% B
1	0.0	5
2	3.5	95
3	5.0	100
4	6.0	5

La détection a été réalisée en mode négatif dans le domaine  $m/z$  100–1000, mode centroïde, avec 1 scan par seconde, contrôlée par le logiciel (MassLynx V 4.1).

Une source de type *electrospray* (ESI) était installée avec les conditions d'ionisation suivantes :

- Voltage capillaire : 2.8 kV
- Voltage du cône : 40 V
- Voltage du détecteur : 2300 V
- Voltage du tube de vol : 7200 V
- Température de la source : 120 °C
- Température de désolvatation : 250 °C
- Gaz de nébulisation : N<sub>2</sub> à 600 L/h
- Débit du cône gazeux: 20 L/h

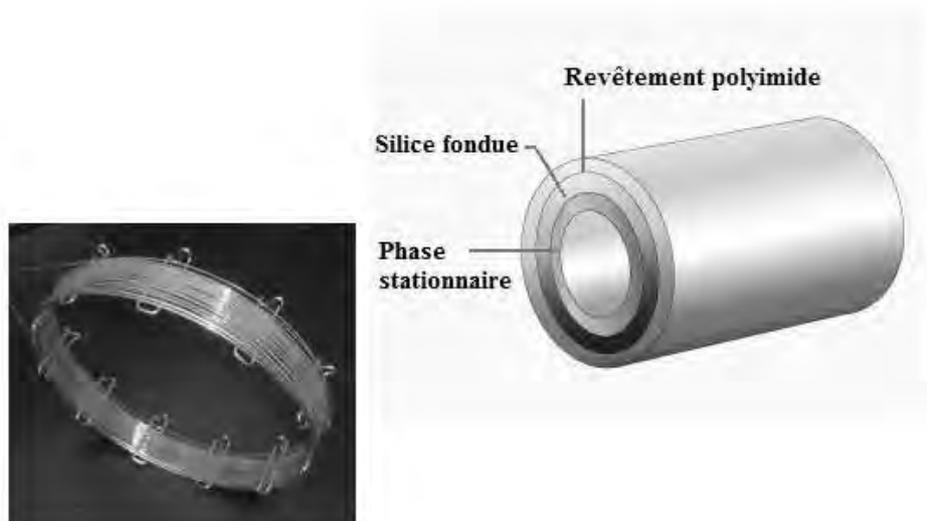
Les analyses (UPLC/HRMS) ont été accomplies à Lille à l'aide d'un appareil UPLC Accela (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) couplé à un spectromètre de masse Exactive Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) équipé d'une source *electrospray* chauffée et contrôlé par le logiciel Xcalibur (2.1).

### II.1.5. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Un chromatographe en phase gazeuse comprend schématiquement 3 modules spécifiques: une chambre d'injection, une colonne installée dans une enceinte thermostatée (four) et un détecteur relié à un ordinateur sur lequel apparaît le chromatogramme.

La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz vecteur ou gaz porteur. A des pressions comprises entre 0.2 et 4 bars, les principaux gaz utilisés comme phase mobile sont l'hélium, l'hydrogène ou l'azote. L'échantillon à analyser est injecté sous forme d'un fluide, en très petites quantités (2 à 3  $\mu$ L), pour être vaporisé dans l'injecteur. Le gaz vecteur l'entraîne dans une colonne de séparation thermostatée.

Les colonnes capillaires sont les plus efficaces et les plus rapides pour l'investigation des huiles essentielles et des alcaloïdes. Elles se présentent sous forme d'un tube enroulé de 1 à 100 m constitué de silice fondue dont la paroi interne est recouverte d'un film chimique représentant la « phase stationnaire »; la paroi externe est gainée d'un revêtement en polyimide qui confère souplesse et robustesse à la colonne (**Fig.II.5**).



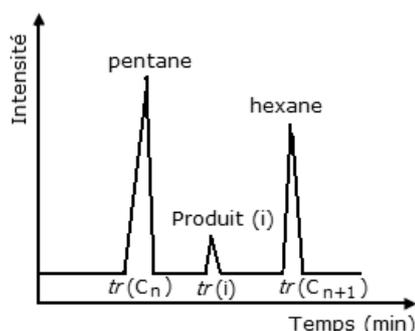
**Figure II.5.** Exemple de colonnes capillaires (WCOT et PLOT) utilisées en GC/MS.

La phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice. On distingue généralement trois catégories (Bouchonnet, 2009):

- **Colonnes apolaires:** constituées d'un film chimique où des groupements méthyles ont été fixés sur la silice.
- **Colonnes peu polaires :** les méthyles sont substitués par des groupements phényles dans des proportions allant de 5 à 30%.
- **Colonnes polaires :** la phase stationnaire est constituée de polyéthylènes-glycols ou de groupements cyano.

Le principe de la séparation en GC/MS repose sur une grandeur thermodynamique qui est le point d'ébullition. Le point d'ébullition d'un composé dépend essentiellement de deux facteurs: le poids moléculaire et la polarité. Par conséquent, un composé ayant un poids et une polarité faibles, est plus volatil et migre d'autant plus vite dans la colonne.

Souvent en chromatographie gazeuse, l'ordre d'éluion des composés est indiqués par un indice de rétention  $I(i)$  au lieu du temps de rétention ( $t_R$ ) qui est fonction du volume d'injection, de la nature des phases stationnaire et mobile, de la longueur de la colonne, du débit de la phase mobile et de la température. Les indices de rétentions ont été définis par (Kovats, 1958); chaque composé ( $i$ ) est associé à un indice de rétention  $I(i)$ . Cet indice est calculé à partir de l'équation (1) de Kovats (**Fig.II.6**) basée sur un système d'étalonnage en utilisant une série d'hydrocarbures linéaires.



Equation.1

$$I(i) = \left[ \frac{t_r(i) - t_r(C_n)}{t_r(C_{n+1}) - t_r(C_n)} + n \right] \cdot 100$$

Où

$t_r(i)$  : temps de rétention du produit obtenu

$t_r(C_n)$  : temps de rétention de l'hydrocarbure  $C_n$

$t_r(C_{n+1})$  : temps de rétention de l'hydrocarbure  $C_{n+1}$

$n$  : nombre de carbones de l'alcane qui précède le produit obtenu

**Figure II.6.** Formule permettant de calculer les indices de Kovats (Van den Dool, 1963).

Les analyses GC-MS ont été effectuées avec un chromatographe Thermo-Finnigan trace GC couplé à un détecteur de masse DSQ simple quadripôle avec une ionisation par impact électronique (EI) à 70 eV. La colonne capillaire utilisée était de type ZB5-MS (5% phényl-arylène et 95% diméthylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  épaisseur du film). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 mL/min. Un autosampler Pal CTC Analytics injectait un volume d'échantillon de 1  $\mu\text{L}$  en mode splitless (sans division) dans un liner linéaire. Les spectres de masse ont été enregistrés pour un domaine de masse de  $m/z$  40-550 (1 scan/s). L'acquisition des spectres a été faite grâce au logiciel d'application Xcalibur version 2.0.7.

## II.2. Méthodes chromatographiques préparatives

### II.2.1. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mis en œuvre dans des colonnes en verre. La taille des colonnes, le diamètre, la granulométrie de la phase solide, le débit de la phase mobile et les volumes recueillis ont été adaptés à la quantité et à la nature (extraits ou fractions) des échantillons à séparer.

#### II.2.1.1. Chromatographie d'adsorption

Les colonnes ouvertes de silice 60 (0.063–0.200 mm, Merck) ont été utilisées pour le fractionnement des différents extraits. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité de l'échantillon déposé. Le choix des conditions d'éluion a été optimisé en se basant sur des tests préalables sur CCM. Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM et HPLC. L'échantillon à fractionner a été introduit en tête de colonne, sous forme solide, après avoir été adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 2 à 3 fois son poids (Hostettmann, 1998).

### II.2.1.2. Chromatographie d'exclusion

Les chromatographies d'exclusion ou filtration sur gel ont été réalisées sur Sephadex LH-20 (G.E. Healthcare). La phase mobile était le MeOH ou le mélange MeOH:H<sub>2</sub>O. Les échantillons à séparer ou à purifier ont été introduits sous forme liquide, après dissolution dans un minimum de phase mobile, et filtrés si nécessaire. Le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM et HPLC.

### II.2.2. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)

Cette technique de séparation permet de fractionner en une seule analyse plusieurs grammes d'un mélange complexe, avec une résolution convenable. La MPLC offre un gain de temps important par rapport à la colonne ouverte, en assurant un débit supérieur à 10 mL/min avec une pression supérieure à la pression atmosphérique (< 40 bars) (Hostettmann, 1998).

Le système utilisé pour la MPLC était constitué d'une pompe Büchi 681 équipée d'un détecteur à longueur d'onde fixe UV detector K 2001 (Knauer) et d'un enregistreur LKB-REC (Pharmacia). Une colonne de verre à gaine plastique (450 x 30 mm, Büchi) avec pour phase stationnaire de la silice en phase inverse de type Lichroprep® RP-18 (15-25 µm, Merck), surmontée d'une pré-colonne Büchi (115 x 10 mm) à gaine métallique, remplie à sec de la même phase stationnaire, a permis de protéger la colonne principale des composés susceptibles de se fixer irréversiblement sur la phase stationnaire (**Fig.II.7**).

Un gradient en plateaux de phase mobile MeOH:H<sub>2</sub>O a été utilisé, et le changement du gradient de la phase mobile au cours de l'analyse s'effectuait manuellement. L'échantillon a été introduit sous forme solide, mélangé avec 3 fois son poids en phase fixe, dans une cartouche d'introduction en verre juste avant la pré-colonne, puis recouvert de sable pour remplir le volume mort. La colonne a été éluée avec un débit d'environ 5 mL/min et la pression était en moyenne comprise entre 15 et 20 bars. Les fractions ont été récoltées dans des cylindres de 100 mL disposés dans un collecteur automatique Büchi 684. Le regroupement des fractions a été fait en se basant sur les résultats des analyses CCM et HPLC.



**Figure II.7.** Colonnes et pré-colonnes (BUCHI) utilisées en MPLC.

### **II.2.3. Chromatographie liquide haute pression semi-préparative (HPLC semi-prép.)**

La chromatographie liquide semi-préparative à haute pression a été utilisée pour les étapes finales de purification d'échantillons de 10 à 100 mg. Les analyses ont été effectuées en phase inverse avec une chaîne HPLC semi-préparative composée d'une pompe à deux voies LC-8A (Shimadzu) équipée d'un dégazeur DG-4413 (Degasys) et d'un détecteur SPD-10A VP (Shimadzu) en utilisant une colonne X-Terra Prep-MS-C18 ODB (5  $\mu$ m, 19 x 150 mm, Waters) avec un débit d'élution de 10 mL/min et une détection à 254 nm. Le système de solvants employé a été H<sub>2</sub>O + 1% AcOH/MeOH. Plusieurs injections ont été effectuées *via* une vanne d'injection, avec à chaque fois, un volume d'injection de 50  $\mu$ L. Les pics d'intérêt ont été récoltés manuellement.

### **II.2.4. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)**

La séparation par chromatographie de partage centrifuge (CPC) a été réalisée sur un appareil TAUTO TBE-300B (Tauto Biotech 300 mL), équipé d'une pompe LC-10AD, d'un détecteur UV-Visible Knauer 100 mV à 254 nm, d'un enregistreur W+W 600 et d'un collecteur de fractions ULTRORAC 2070.

Cette technique basée sur le partage des composés entre deux phases liquides non miscibles, a pour avantage de supprimer les pertes qui peuvent résulter de l'adsorption sur les phases solides. Le fractionnement a été réalisé en utilisant un système de solvants biphasique quaternaire: chloroforme – méthanol – isopropanol – eau, avec les proportions volumiques (5:6:1:4). La colonne a été remplie par les deux phases (1:1) et mise sous rotation à 1000 tours/min. La phase inférieure a été pompée dans la colonne à un débit de 3 mL/min en mode descendant en ayant comme phase mobile la plus dense et la phase stationnaire la moins dense. Puis au cours du fractionnement, le sens de rotation a été inversé et l'autre phase a été utilisée comme éluant. Les fractions ont été collectées à une vitesse de 5 min/tube.

## **II.3. Méthodes physico-chimiques d'identification**

### **II.3.1. Spectrométrie ultraviolet (UV)**

Les spectres UV des différents extraits, fractions et composés purs ont été mesurés lors des analyses HPLC-UV-DAD grâce au détecteur à barrettes de diodes du système HP 1100.

### **II.3.2. Spectrométrie de masse (MS)**

La spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse des molécules ou atomes présents dans un échantillon étudié. Le principe de la mesure repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions. Ce principe impose aux molécules et atomes d'un échantillon d'être préalablement transformés en ions, en phase gazeuse, avant d'être analysés par la spectrométrie de masse. La fragmentation au niveau de l'ion moléculaire, conduit à la formation d'ions fragments caractéristiques indiqués par le rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires ( $m/z$ ), positives ou négatives. Ce rapport est exprimé en daltons (1Da = masse de l'atome d'hydrogène) (Vollhard, 1994), également en uma (unité de masse atomique).

Un spectromètre de masse est constitué des éléments suivants :

- **Une source d'ionisation:** elle a pour but de produire des ions en phase gazeuse, à partir de l'échantillon étudié.
- **Une interface:** elle assure le transport des ions de la source vers l'analyseur.
- **Un analyseur:** il a pour but de trier les ions en fonction de leur masse, et plus spécifiquement en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).
- **Un détecteur:** il permet une détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés.
- **Un système de traitement des données (informatique).**

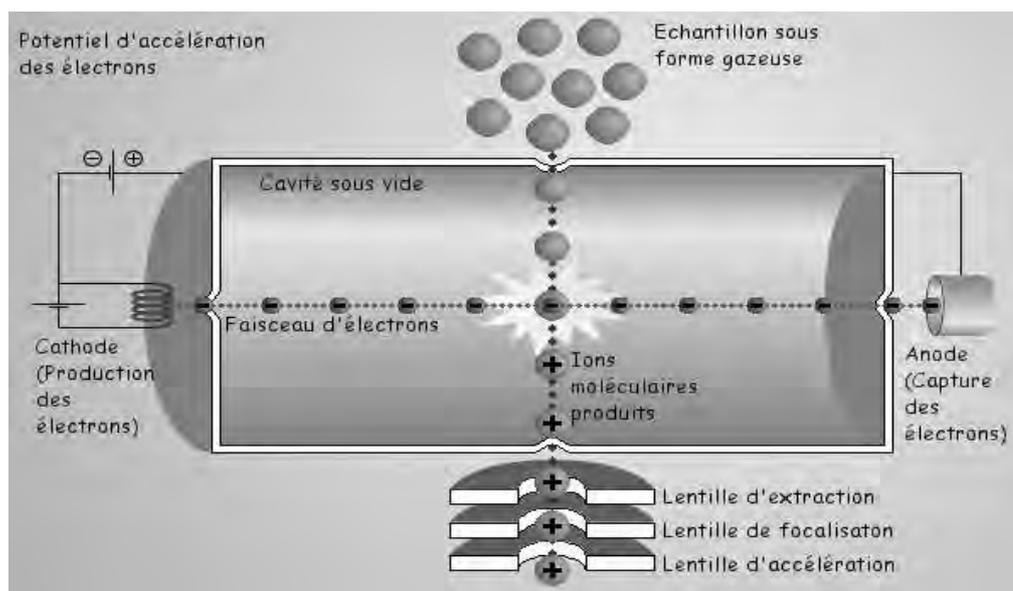
Les spectres de masse peuvent être obtenus par plusieurs modes d'ionisation:

- Impact électronique (EI).
- Electrospray (ESI).
- Bombardement avec des atomes accélérés (FAB).
- Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).
- Ionisation par désorption au laser d'une matrice (MALDI).

Une brève description sera faite pour les deux premières méthodes utilisées au cours de ce travail.

### II.3.2.1. Ionisation par impact électronique (EI)

Ce mode d'ionisation a été appliqué dans l'analyse par GC-MS. L'ensemble des opérations s'est effectué sous vide poussé ( $10^{-3}$  à  $10^{-6}$  Pa). L'appareillage utilisé était un spectromètre de masse à analyseur quadripolaire TSQ 700 Finnigan Mat.

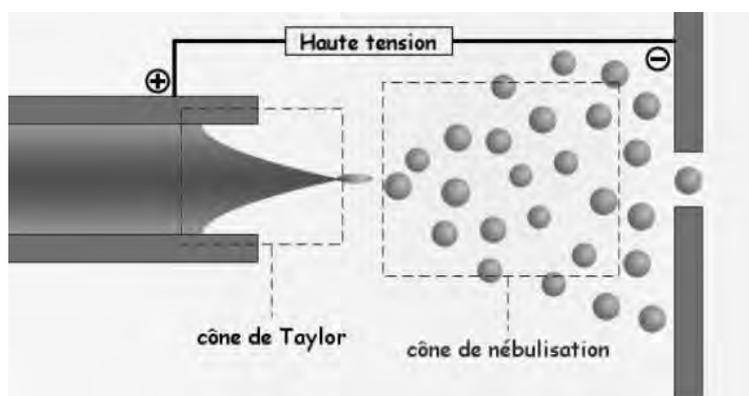


**Figure II.8.** Représentation schématique d'une source d'ionisation par impact électronique (EI) (Wikipedia 2011).

Dans ce mode d'ionisation, les molécules évaporées sont bombardées au moyen d'électrons de haute énergie, atteignant habituellement 70eV et converties en ions. La séparation de ces ions accélérés se fait dans un champ électrique et/ou magnétique selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) (**Fig.II.8**). Les fragments sont formés à partir de l'ion moléculaire et la plupart d'entre eux portent une charge positive unitaire. La masse de l'ion moléculaire en impact électronique présente l'inconvénient de son repérage, souvent très faible, voire indétectable.

### II.3.2.2. Ionisation par *electrospray* (ESI)

La source ESI (*ElectroSpray Ionization*), ou ionisation par électronébulisation, a été développée par J.B. Fenn (prix Nobel 2002). L'ionisation est ici produite par application, à pression atmosphérique, d'une différence de potentiel élevé de 4 à 6 kV sur un liquide traversant un capillaire en silice enchâssé dans un tube au travers duquel circule un gaz inerte (azote), appelé gaz de nébulisation. Il se forme à la sortie du capillaire *via* le cône de Taylor (**Fig.II.9**), un aérosol (*spray*) composé de fines gouttelettes chargées en suspension dans l'air. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes conduit à une augmentation importante de leur densité de charge des forces coulombiennes répulsives atteignent le niveau des tensions superficielles. Les gouttelettes explosent en libérant des ions en phase gazeuse (microgouttelettes). Les ions ainsi générés par protonation ou déprotonation des molécules de l'échantillon sont ensuite transférés vers l'analyseur (March, 1997). La spectrométrie de masse en mode d'ionisation douce (ESI), permet de détecter des ions pseudo-moléculaires (M+1 ou M-1).



**Figure II.9.** Représentation schématique d'une source d'ionisation par *electrospray* (ESI) ((Wikipedia 2011).

Les analyseurs se différencient par leur principe de mesure du rapport  $m/z$  des ions, qui est :

- la dispersion des ions, fondée sur leur moment ou leur énergie cinétique (instruments à secteur magnétique ou électrique).
- la séparation dans le temps, fondée sur la vitesse des ions (TOF).
- la transmission des ions traversant un champ électrodynamique (quadripôle).
- le mouvement périodique dans un champ magnétique ou électrodynamique (pièges ou trappes à ions).

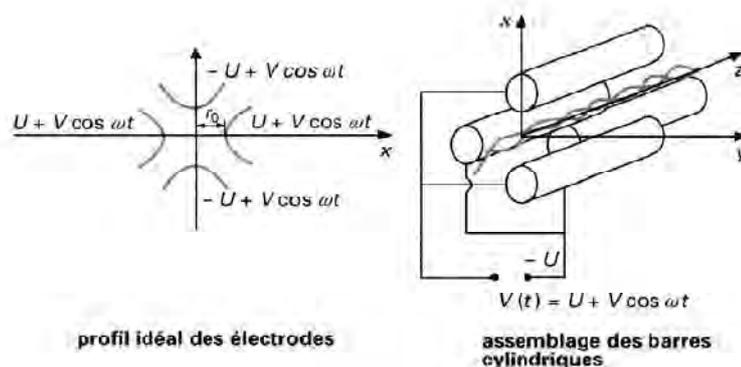
### II.3.2.3. Analyseur quadripolaire

L'analyseur quadripôle comporte quatre électrodes: deux électrodes symétriques par rapport à l'axe central du quadripôle qui sont portées à un potentiel de type  $U+V\cos\omega t$ , les deux autres soumises au même potentiel mais de signe opposé ( $-U-V\cos\omega t$ ) composé d'une tension continue  $U$  et d'une tension alternative  $V\cos\omega t$  (**Fig.II.10**). Les ions formés dans la source entrent dans l'analyseur et subissent l'effet du champ quadripolaire. Selon les valeurs de  $U$  et de  $V$ , certains ions adoptent des trajectoires stables et oscillantes et peuvent être collectés par les barres du quadripôle. Ils sont ensuite focalisés vers le détecteur. Les autres ions vont heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre; ils se déchargent et sont éjectés par le système de pompage (Paul, 1958; Dawson, 1976).

Les avantages de ces appareils sont nombreux:

- L'accélération  $V_0$  nécessaire à l'entrée de l'analyseur quadripolaire est de l'ordre de 200 V, alors qu'elle est de l'ordre de quelques kilovolts pour les analyseurs magnétiques.
- Le passage de l'ionisation positive à négative (ou l'inverse) est aisé et peut être pulsé.
- La grande vitesse de balayage.
- La facilité de maintenance.
- Ce sont des appareils peu coûteux.

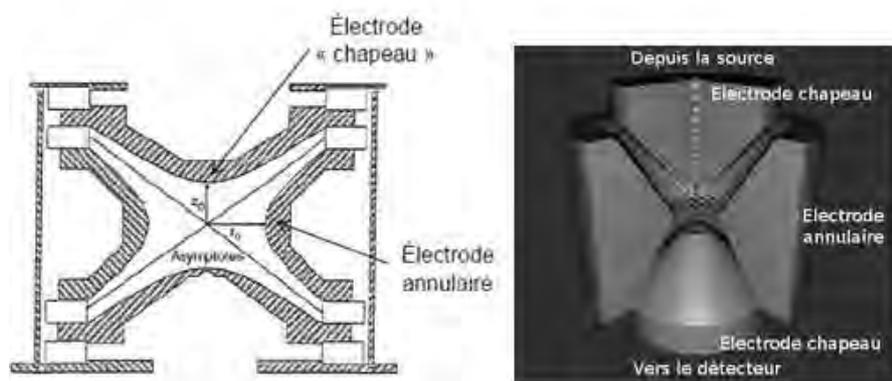
Ces avantages font de l'analyseur quadripolaire un appareil de choix pour le couplage de la chromatographie avec la spectrométrie de masse, spécialement en GC-MS. En effet, ces spectromètres sont équipés de systèmes de pompage assurant un vide de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  mbar. La qualité du vide est un facteur déterminant pour l'analyse. Il s'agit d'évacuer les molécules résiduelles telles que l'azote, l'oxygène et l'eau atmosphériques ainsi que les molécules éluées du chromatographe et qui pourraient contaminer le spectromètre de masse.



**Figure II.10.** Schéma d'un analyseur quadripolaire.

### II.3.2.4. Analyseur à trappe ionique

La trappe à ions est un développement du quadripôle. Dans cet appareil, les quatre quadripôles sont remplacées par trois électrodes métalliques: une électrode annulaire recouverte de part et d'autre de l'espace central par deux électrodes d'entrée et de sortie (dites électrodes chapeaux) de sections hyperboliques (**Fig.II.11**).



**Figure II.11.** Représentation simplifiée d'une trappe ionique (Wikipedia 2011).

Contrairement au quadripôle, la trappe ionique possède la capacité de stocker les ions. L'application d'une radiofréquence de type  $(V\cos\omega t)$  sur l'électrode annulaire produit un champ quadripolaire qui associe à chaque ion une trajectoire stable ou instable d'un mouvement oscillatoire dont la fréquence et l'amplitude dépendent de  $m/z$  et  $V$ . Plusieurs modes de fonctionnements sont possibles. Le plus simple consiste à confiner des ions dans une certaine gamme de masse puis en augmentant de façon progressive la tension alternative, les ions sont déstabilisés de façon successive et éjectés en direction d'un détecteur (March, 1997). Les ions d'intérêt sont sélectivement excités pour produire des fragments qui sont à leur tour détectés. Cette opération, abrégée  $MS^2$ , peut être répétée sur les fragments, générant des spectres  $MS^n$  à plusieurs étapes, c'est la technique MS/MS.

### La spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS)

Les ions formés à la source peuvent être classés selon leurs énergies internes en trois catégories :

- faible énergie interne: ions stables qui ne se décomposent pas et qui constituent le pic moléculaire.
- forte énergie interne: ions instables qui fournissent des ions fragments par décomposition.
- énergie intermédiaire: ions métastables qui ne se décomposent pas dans la source mais durant le vol (entre la source et le détecteur).

La MS/MS est née d'une idée qui consiste à trouver le moyen d'exciter, hors de la source, les ions stables afin d'accroître leur énergie interne et ainsi les faire fragmenter. Les appareillages tandem sont conçus de la manière suivante: une première étape consiste à sélectionner un ion stable particulier issu de la source d'ions (appelé "parent" ou "précurseur") et une seconde étape représente l'analyse des ions issus de sa décomposition (ions "fils" ou "produits"). Ainsi, la trappe d'ions permet d'obtenir l'ion *pseudo*-moléculaire et différents ions de générations successives, par simple renouvellement du processus de piégeage et de fragmentation appelée  $MS^n$  où  $n$  représente le nombre de générations d'ions. Cette technique permet l'interprétation des spectres en donnant une relation de filiation de deux ions, précurseur et produit.

### II.3.2.5. Analyseur à temps de vol (TOF)

L'analyseur à temps de vol (*Time of Flight*) est un analyseur de masse à haute résolution car il permet de déterminer avec grande précision la masse moléculaire des composés étudiés afin de confirmer leur formule brute.

Le principe de l'analyseur à temps de vol, consiste à mesurer le temps que met un ion, soumis à une tension accélératrice préalable (**équation 2**), à parcourir une distance donnée. La masse de l'ion est calculée à partir de son rapport  $m/z$  qui est directement mesurable à partir du temps de vol (**équations 3 et 4**).

$$E_p = z \cdot V_o \quad \text{Equation 2}$$

$E_p$  : énergie potentielle électrostatique  
 $z$  : charge de l'ion  
 $V_o$  : tension accélératrice

L'énergie potentielle électrostatique est transformée en énergie cinétique ( $E_p = E_c$ ).

$$E_c = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad \text{Equation 3}$$

$E_c$  : énergie cinétique  
 $m$  : masse de l'ion  
 $v$  : vitesse de l'ion

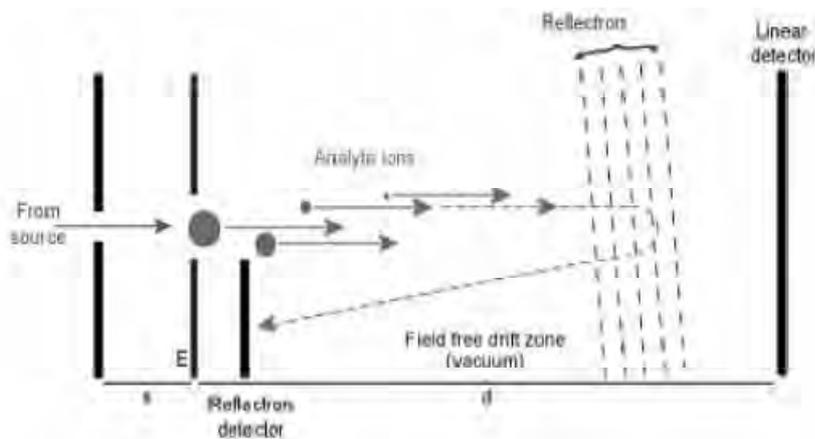
Cette simple égalité contient le rapport  $m/z$  que l'on peut déduire directement de la vitesse  $v$ , donc du temps  $t$  (temps de vol) que met un ion à franchir une distance fixe  $d$ . La séparation des ions ne va donc dépendre que de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Les ions de rapport  $m/z$  le plus petit parviendront au détecteur les premiers (**équation 4**).

$$\frac{m}{z} = 2 \cdot V_o \cdot \frac{t^2}{d^2} \quad \text{Equation 4}$$

$t$  : temps de vol  
 $d$  : distance parcourue

Ce mode de détection comporte cependant certaines limitations en termes de résolution: ainsi deux ions identiques, de même vitesse initiale, mais localisés à deux points différents, entreront dans le tube de vol à des vitesses et des temps différents. Celui le plus loin du détecteur à l'origine sera accéléré plus longtemps et aura donc un temps de vol plus court (Guilhaus, 1995).

Pour pallier ce phénomène, des miroirs électrostatiques appelés "réflectrons" sont interposés sur le trajet ionique, permettant de compenser les différences de vitesse pour une valeur de  $m/z$  donnée en imposant des trajets à parcourir d'autant plus longs que les ions sont plus rapides (**Fig.II.12**).



**Figure II.12.** Représentation schématique d'un analyseur TOF en mode réflectron (Université de Bristol, 2011).

### II.3.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN constitue actuellement la technique la plus puissante et la plus générale d'analyse structurale des composés organiques. C'est une technique qui repose sur la propriété qu'ont des noyaux tels que  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$  et  $^{31}\text{P}$  de posséder un moment magnétique nucléaire permanent. Placés dans un champ magnétique extérieur, ils prennent par rapport à celui-ci certaines orientations bien définies auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts, en se comportant comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée "spin". Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, ce qui introduit des transitions entre niveaux immédiatement contigus dues à l'absorption de radiations électromagnétiques de longueurs d'onde caractéristiques (Boudonneu, 1990; Canet 1991).

Les spectres RMN réalisés à Genève, ont été effectués sur un spectromètre à impulsion Varian Unity Inova 500 (Palo Alto, CA, USA), piloté par le logiciel Solaris VNMR. Sur ce type d'appareil, toutes les transitions sont excitées simultanément par irradiation avec une impulsion multifréquence (large bande), puis l'ordinateur transforme les interférogrammes ainsi obtenus en spectres conventionnels par une opération mathématique (transformée de Fourier). A Lille, les spectres RMN ont été réalisés sur des spectromètres Bruker Avance-I 500 MHz, et 300 MHz. L'analyse des différents spectres RMN a été menée à l'aide du logiciel ACD/Labs (Version 8.13). Les solvants deutérés utilisés pour les mesures en RMN, ont été le  $\text{MeOH-}d_4$ , le  $\text{CHCl}_3-d_1$  et acétone- $d_6$  dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Ces solvants possèdent des déplacements chimiques spécifiques (**Tableau II.1**).

**Tableau II.1.** Déplacement chimique (en ppm) des solvants utilisés en RMN.

Solvants	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm, multiplicité)	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (ppm, multiplicité)
Chloroforme- $d_1$	7.26 (1)	77.0 (3)
Méthanol- $d_4$	4.84 (1), 3.35 (5)	49.0 (7)
Acétone- $d_6$	2.04 (5)	206.0 (1), 29.8 (7)

Les valeurs des déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimées en ppm et les constantes de couplage en hertz (Hz). Des mesures complémentaires, dites bidimensionnelles, sont souvent nécessaires pour mettre en évidence des corrélations homo- et hétéronucléaires entre les atomes de carbone et d'hydrogène et cela pour les molécules analysées. Les différentes techniques réalisées lors de ce travail sont indiquées ci-après.

### II.3.3.1. RMN monodimensionnelle (RMN-1D)

#### II.3.3.1.1. RMN proton ( $^1\text{H}$ )

La RMN du proton fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents groupements présents dans l'environnement électronique d'un hydrogène donné en plus du déplacement caractéristique de chaque proton.

#### II.3.3.1.2. RMN carbone ( $^{13}\text{C}$ )

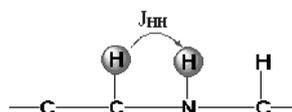
Cette technique permet la mise en évidence des carbones primaires ( $\text{CH}_3$ ), secondaires ( $\text{CH}_2$ ), tertiaire ( $\text{CH}$ ) et dans une moindre mesure des carbones quaternaires ( $\text{C}$ ). Un spectre RMN  $^{13}\text{C}$  peut être réalisé dans différents modes de découplages qui permettent d'améliorer le rapport signal/bruit mais également de simplifier le spectre à quelques signaux plus facilement repérables. Ainsi, la séquence DEPT (*Distortionless Enhanced Polarization Transfer*) est l'une des séquences les plus utilisées, particulièrement DEPT-135. Dans cette dernière séquence, les groupes  $\text{CH}$  et  $\text{CH}_3$  sont positifs, les groupes  $\text{CH}_2$  sont négatifs, tandis que les carbones quaternaires n'apparaissent pas.

### II.3.3.2. RMN bidimensionnelle (RMN-2D)

Les spectres bidimensionnels permettent de mettre en évidence des corrélations homo- et hétéronucléaires entre les atomes de carbone et d'hydrogène au sein des molécules étudiées. Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps: le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage (Günther, 1994).

#### II.3.3.2.1. Corrélations homonucléaires (Croasmun, 1994)

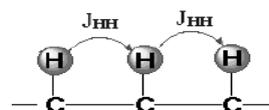
- **COSY (COrrelation SpectroscopY)** [ $J_{\text{H-H}}$ ]:



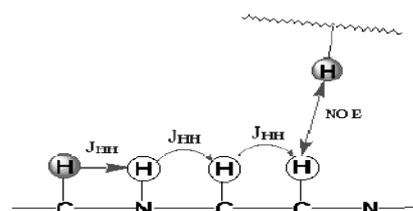
Cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires (protons séparés par deux ou trois liaisons,  $^nJ_{\text{H-H}}$  ( $n \leq 3$ )) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

- **TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)** [ $J_{H-H}$ ]:

Connecte tous les protons dans un même système de spins (corrélations longues distances).



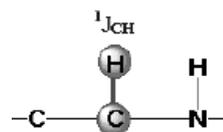
- **NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)** [ $J_{H-H}$ ]:



Cette technique est basée sur les connections Overhauser (NOE)  $^1H$ - $^1H$  dus aux couplages dipolaires à travers l'espace jusqu'à 5 Å.

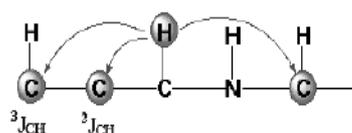
### II.3.3.2.2. Corrélations hétéronucléaires (Croasmun, 1994)

- **HSQC (Heteonuclear Single Quantum Correlation)** [ $^1J_{C-H}$ ]:



Cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Cependant, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

- **HMBC (Heteonuclear Multiple Bond Correlation)** [ $^2J_{C-H}$ ,  $^3J_{C-H}$ ]:



Cette technique permet la détection des couplages longue distance ( $^nJ_{C-H}$ ,  $n>1$ ), en plus de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

### II.3.4. Hydrolyse acide

Les hétérosides (1-5 mg) sont dissous dans un minimum de méthanol, puis traités avec une solution de HCl (2N). Le mélange est chauffé à reflux à 100°C pendant 120 min. La récupération de l'aglycone s'effectue par une extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle. Puis, cet aglycone est soumis à une co-chromatographie avec des témoins authentiques. Les sucres obtenus de la phase aqueuse sont analysés sur CCM en présence de sucres standards et révélés en présence de malonate d'aniline.

## II.4. Investigation de *Genista quadriflora* Munby (*Fabaceae*)

### II.4.1. Aspects botaniques

#### II.4.1.1. Description (Battandier, 1888; Quezel, 1962; Maire 1987)

La plante *Genista quadriflora* Munby (Fig.II.13) est connue en Algérie sous le nom vernaculaire de "Chedida".

C'est un arbrisseau de 0.2-1.75 m de hauteur, à rameaux dressés, courts, raides, forts, non épineux. Le tronc à écorce brune plus ou moins rugueuse peut atteindre 3 cm de diamètre. Le bois est, à cœur brun foncé, à aubier blanchâtre. Les feuilles sont réduites à de simples écailles.

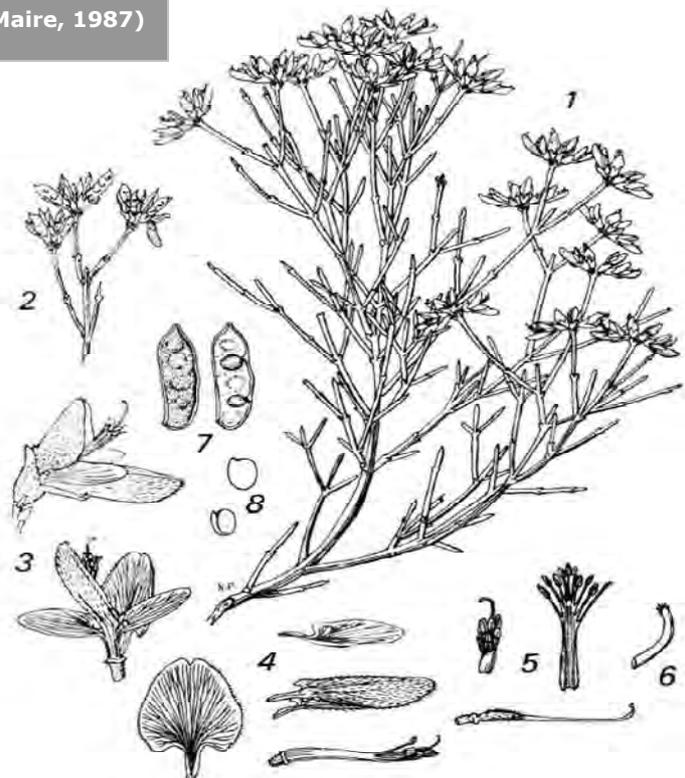
Les fleurs sont jaunes or et mesurent 12-13 mm de longueur. Les folioles sont membraneuses et rudimentaires. Les capitules sont quadriflores, courtement pédonculés, à bractées ovoïdes-aiguës, caduques. Le calice mesure de 4.5-5 mm, est un peu renflé et velu-soyeux tout comme les fleurs et les gousses. L'étendard est plus court que la carène.

La gousse (12-15 x 4 mm), entourée à la base par le calice persistant et souvent par la corolle marcescente, est comprimée et densément pubescente-soyeuse. Elle est brièvement acuminée au sommet, polyspermes, coriace et tardivement déhiscente.

La graine (2 x 1.8 mm) est lenticulaire, brune, lisse; à hile ponctiforme et enfoncé. La radicule est légèrement saillante.



(Maire, 1987)



1. Rameau florifère
2. Rameau fructifère
3. Fleurs
4. Pièces florales
5. Androcée et gynécée
6. Stigmate
7. Gousses
8. Graines.

#### II.4.1.2. Place dans la systématique

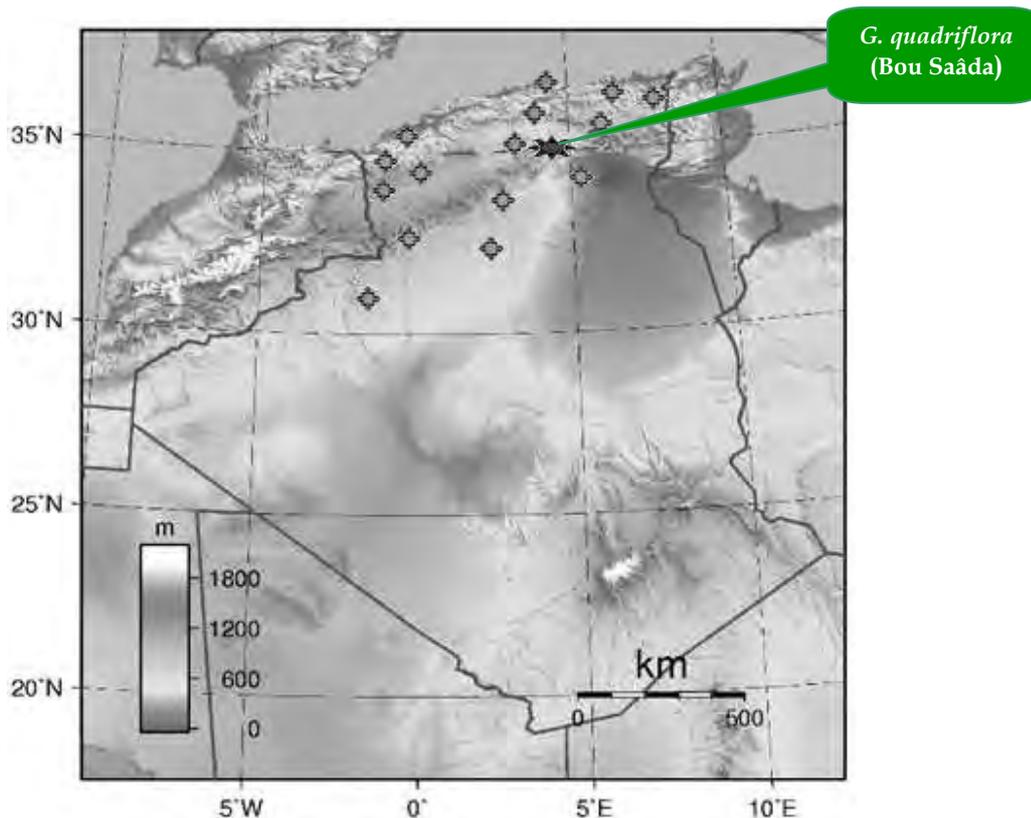
La place de l'espèce *Genista quadriflora* dans la systématique, est présentée selon la classification APG III (2009). Les travaux de Pardo (2004) concernant la phylogénie moléculaire et la systématique du genre *Genista*, ont contribué à clarifier les relations sous genre et section.

<b>Règne :</b>	<i>Plantae</i>
<b>Embranchement :</b>	<i>Spermatophytae</i>
<b>Sous-embranchement :</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Classe :</b>	<i>Equisetopsidae</i>
<b>Sous-classe :</b>	<i>Magnoliidae</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Fabales</i>
<b>Famille :</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Sous-famille :</b>	<i>Faboideae</i>
<b>Tribu :</b>	<i>Genisteae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Genista</i>
<b>Sous-genre :</b>	<i>Spartocarpus</i>
<b>Section :</b>	<i>Cephalospartum</i>
<b>Espèce :</b>	<i>quadriflora</i> Munby

#### II.4.1.3. Répartition géographique

*Genista quadriflora* Munby est une plante endémique du nord-ouest africain. C'est un arbrisseau qui pousse spontanément, répandu dans les forêts claires et les broussailles des montagnes siliceuses, à des altitudes variant entre 1200 et 2400 m (Jahandiez, 1932). C'est une espèce matorrale, calcifuge et mésophile. Son substrat est constitué exclusivement de matériaux basaltiques qui donne naissance à un sol profond de type brun fersialitique à caractère andique qui sont des conditions édaphoclimatiques optimales pour le développement du cèdre et du chêne vert (Benabid, 1988). Ainsi, *G. quadriflora* joue un grand rôle écologique dans la colonisation des forêts dégradées et les zones déboisées (López González, 2001).

D'après Quezel et Santa (1962), en Algérie cette plante est plus fréquente dans les plaines littorales, l'Atlas tellien et sur les sahels littoraux du secteur oranais. Néanmoins, l'espèce est aussi rencontrée dans le sous-secteur du Hodna du Sahara septentrional, dans la région de Bou Saâda (lieu de récolte) (**Fig.II.14**). Cette région du centre-est de l'Algérie, est connue pour son taux de pluviométrie annuel de 226 mm, et se trouve à une altitude de 550 m (Houero, 1977). L'endémicité du taxon est partagée avec le Maroc, où la présence de *G. quadriflora* a également été signalée au nord du pays: Rif, Haut et Moyen Atlas (Azzoui, 2000).



**Figure II.14.** Aire de répartition du genre *Genista* en Algérie.

## II.4.2. Etude chimique

Une recherche bibliographique sur l'espèce endémique *G. quadriflora* n'a pas révélé de résultats d'études chimiques. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'analyse et l'identification des différents métabolites secondaires contenus dans cette plante. Au cours de ce travail, nous avons essentiellement ciblé les métabolites typiques du genre *Genista*, tels que les flavonoïdes, les huiles essentielles et les alcaloïdes. Ces derniers sont souvent considérés comme des marqueurs chimotaxonomiques du genre *Genista* (cf. I.1.6).

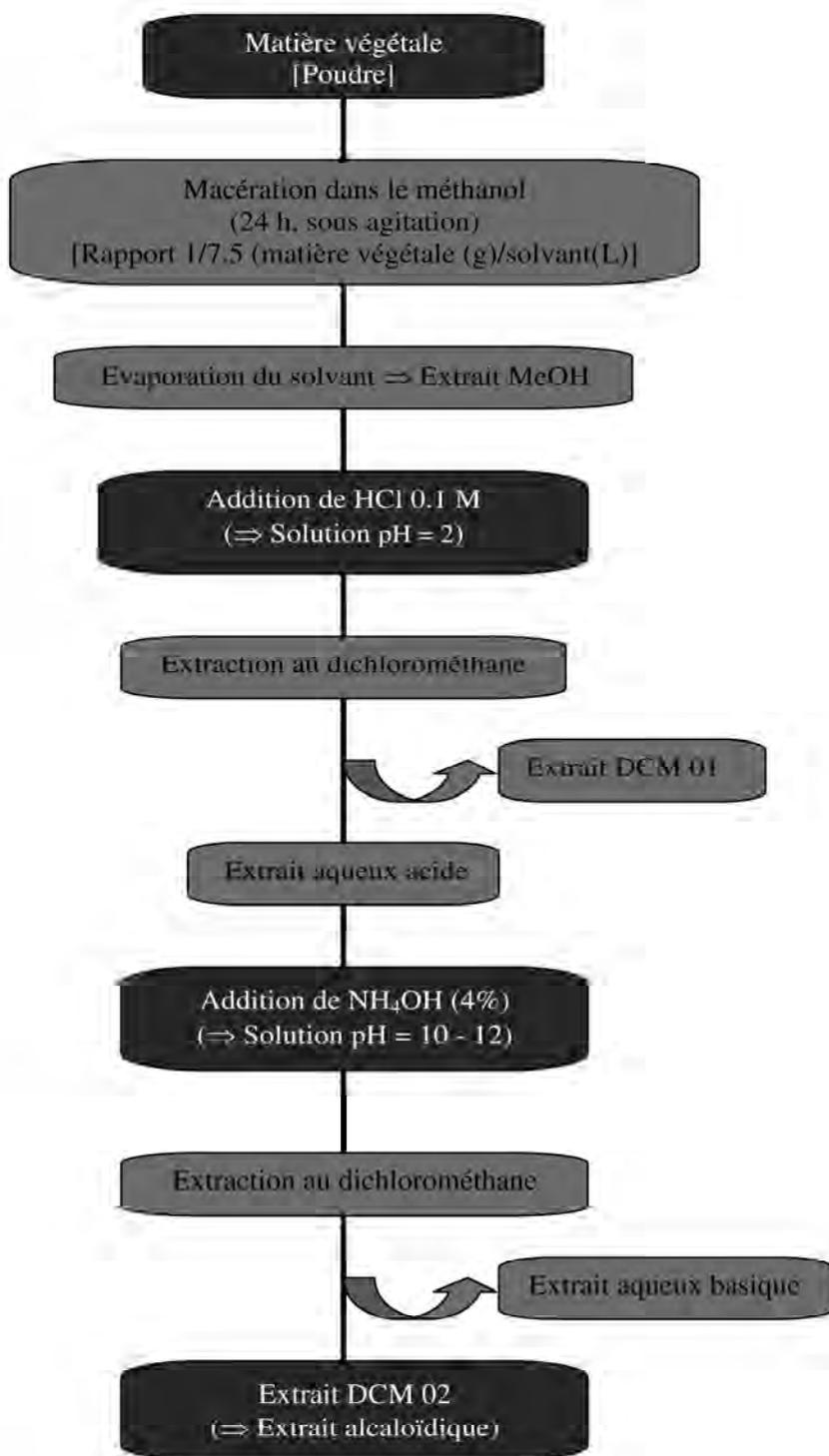
### II.4.2.1. Extraction des alcaloïdes

#### II.4.2.1.1. Matériel végétal

Le premier lot de la plante a été récolté en avril 2009 (échantillon 09), en début de floraison, alors que la récolte du deuxième lot a été faite en juin 2010 (échantillon 10), en pleine floraison de la plante. Un échantillon de référence GQNK10, a été déposé au Laboratoire des Produits Naturels et Synthèse Organique de l'Université de Constantine. L'identification botanique de *Genista quadriflora* Munby a été effectuée par le Professeur M. Kaabeche du Laboratoire de Biodiversité et Ressources Phytogénétiques de l'Université de Sétif. La plante a été séchée à l'ombre, à température ambiante et à l'air libre. Les parties aériennes (PA) ont d'abord été séparées des racines (RA) puis les deux parties de la plante ont été broyées séparément.

#### II.4.2.1.2. Protocole d'extraction

L'extraction des échantillons PA09 et RA09 a été menée au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (LPP) de Genève (Suisse) en mai 2009. Les échantillons PA10 et RA10 ont été extraits au Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de Lille (France) en décembre 2012. Le protocole suivi pour l'extraction des alcaloïdes est indiqué dans la **Figure II.15**.



**Figure II.15.** Protocole d'extraction des alcaloïdes.

- La matière végétale subit une macération dans le méthanol à température ambiante, sous agitation mécanique.
- Après filtration, le solvant alcoolique est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température maximale de 40°C et pression réduite.
- Le résidu est repris dans une solution d'acide chlorhydrique 0.1 M, ce qui permet d'entraîner les alcaloïdes dans l'eau sous forme de sels, puis de les extraire avec du dichlorométhane (DCM).
- Par la suite, la phase aqueuse est basifiée avec de l'ammoniaque (4%) et extraite au DCM.
- Ensuite, la phase organique obtenue est filtrée et le solvant évaporé jusqu'à obtention d'un résidu sirupeux.

#### II.4.2.1.3. Détection par chromatographie sur couches minces (CCM)

Les analyses sur couches minces ont été effectuées sur des plaques de Silicagel 60 F<sub>254</sub> sur feuille d'aluminium (*Merk*). La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou ternaire, constamment adaptée en fonction des extraits et des substances à analyser. Pour la révélation des alcaloïdes contenus dans les différents extraits, c'est le réactif de Dragendorff (cf. II.1.1) qui a été pulvérisé sur les plaques. Il s'agit d'iodobismuthate de potassium qui donne en présence d'alcaloïdes des tâches jaune-orange.

Les phases mobiles utilisées pour l'analyse des extraits sont les suivantes :

- CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH: 85/15/1 (v/v/v).
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH: 80/4/1 (v/v/v).
- EtOAc/MeOH/NH<sub>4</sub>OH: 10/2/1 (v/v/v).
- Acétone/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH: 90/7/3 (v/v/v).
- MeOH/NH<sub>4</sub>OH: 65/1 (v/v).

Le **Tableau II.2** récapitule les quantités de matières végétales utilisées et les poids des extraits alcaloïdiques obtenus.

**Tableau II.2.** Tableau récapitulatif du matériel végétal étudié.

Date de récolte	Partie de la plante	Poids de matière broyée (g)	Poids d'extrait alcaloïdique (g)	Teneur en alcaloïdes η (%)	Code
Avril 2009	Parties aériennes	500	0.288	0.06	PA09AL
	Racines	300	0.147	0.05	RA09AL
Juin 2010	Parties aériennes	400	0.588	0.15	PA10AL
	Racines	150	0.164	0.11	RA10AL

## II.4.2.2. Extraction de l'huile essentielle

### II.4.2.2.1. Matériel végétal

La récolte de *Genista quadriflora* a été faite en juin 2010, en pleine floraison. La plante a été séchée à l'ombre, à température ambiante et à l'air libre puis les parties aériennes ont été broyées grossièrement.

### II.4.2.2.2. Extraction

L'huile essentielle a été obtenue en utilisant la technique de l'hydrodistillation, et cela avec un appareil de type Clevenger. Ainsi, 100 g des parties aériennes de la plante (tiges, feuilles, et fleurs) ont été directement immergées dans un ballon rempli d'eau qui a été ensuite porté à ébullition pendant 3 heures. Le contenu en huile essentielle (%) a été calculé en considérant le volume de l'huile extraite (mL) par 100 g de matériel végétal sec. Un rendement de 0.1% a été obtenu. Par la suite, l'huile essentielle a été stockée hermétiquement à une température de - 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse.

## II.4.2.3. Extraction des flavonoïdes

### II.4.2.3.1. Matériel végétal et extraction

La récolte de la plante a été faite en avril 2009 en début de floraison. La plante a été séchée à l'ombre, à température ambiante et à l'air libre puis broyée. Ceci a permis d'aboutir à 150 g de matière végétale.

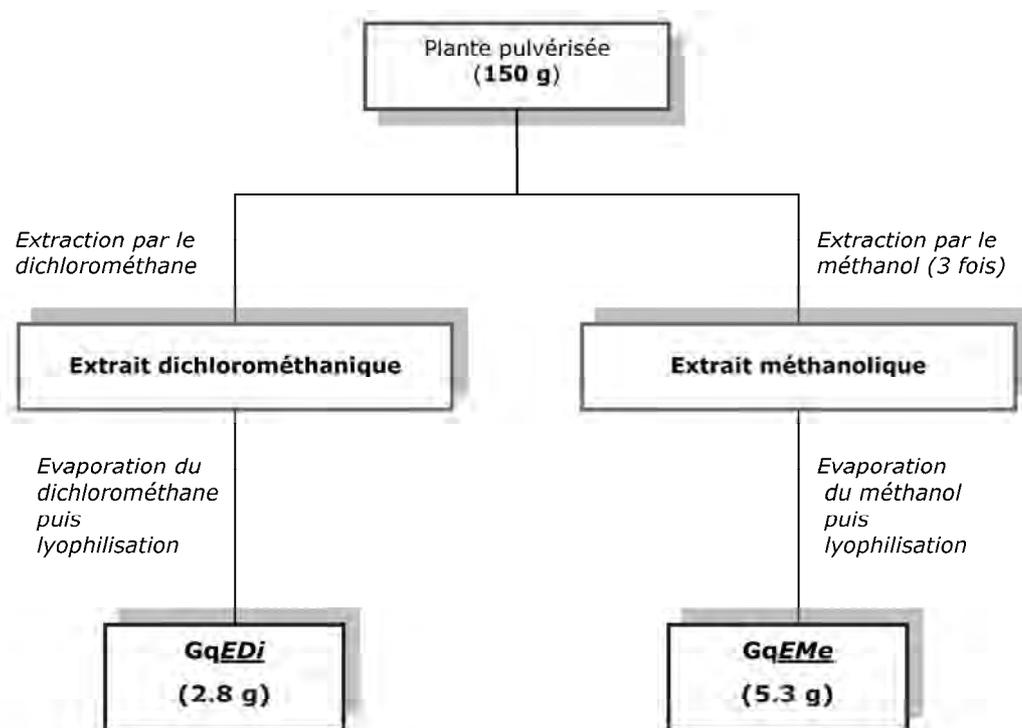
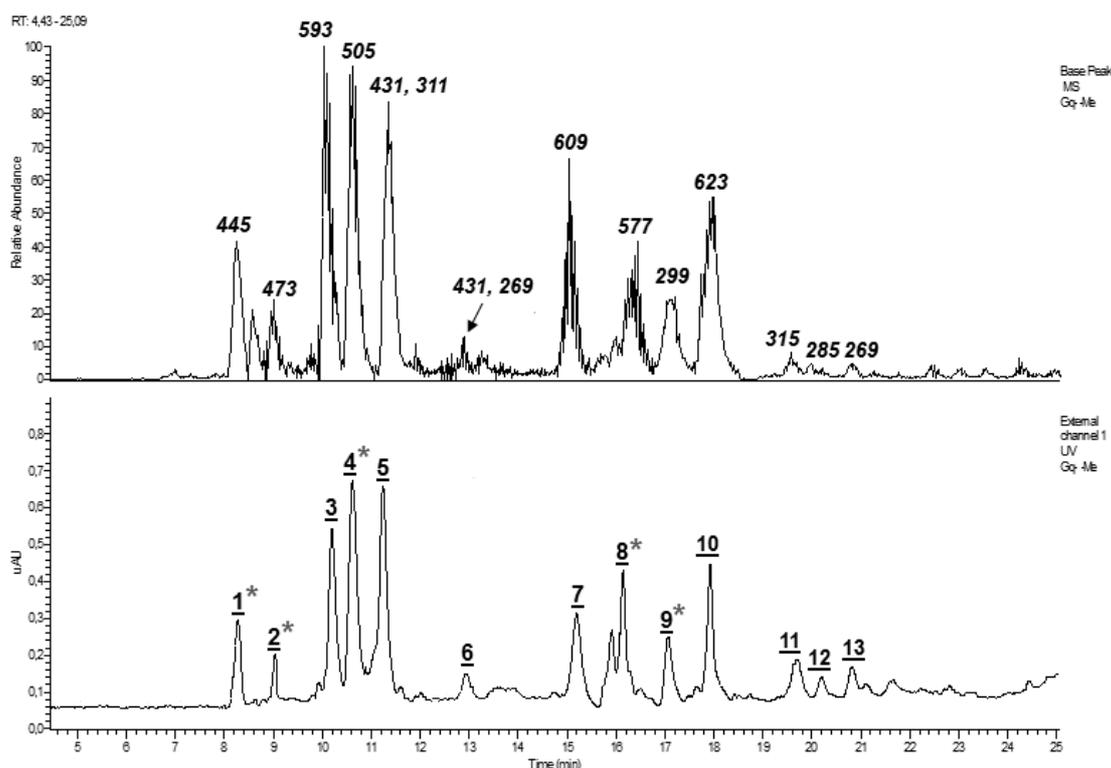


Figure II.16. Schéma de l'extraction des flavonoïdes de *Genista quadriflora*.

L'extraction a été menée au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (LPP) de Genève. Le matériel végétal a été extrait par un solvant apolaire, le dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), et un solvant polaire, le méthanol (MeOH) permettant l'extraction de la majeure partie des constituants. L'expérience a été menée à température ambiante sous agitation mécanique. Après 24 h, le mélange hétérogène a été filtré sur papier plissé et le filtrat évaporé sous pression réduite. Cependant, la couleur verte très foncée de l'extrait (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) a été une indication de la présence d'une quantité significative de chlorophylle. Les solutions ont été évaporés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Labortechnik AG, Flawil) à une température ne dépassant pas 45 °C, puis les résidus ont été lyophilisés et pesés (**Fig.II.16**).

#### II.4.2.3.2. Screening HPLC/UV-MS de l'extrait méthanolique de *G. quadriflora*

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur les contenus des différents extraits obtenus comme indiqué précédemment, une analyse HPLC/UV-MS a été effectuée. L'extrait dichlorométhanolique (**GqEDi**) a présenté un profil contenant essentiellement quelques composés de types aglycones. Cependant, ce résidu contenait également une grande quantité de chlorophylle. Par conséquent, lors de cette étude, c'est l'extrait méthanolique (**GqEMe**), le plus riche en composés qui a été sélectionné. Parmi les composés révélés par les chromatogrammes HPLC/UV-MS à 254 nm, treize composés ont pu être isolés (**Fig.II.17**).

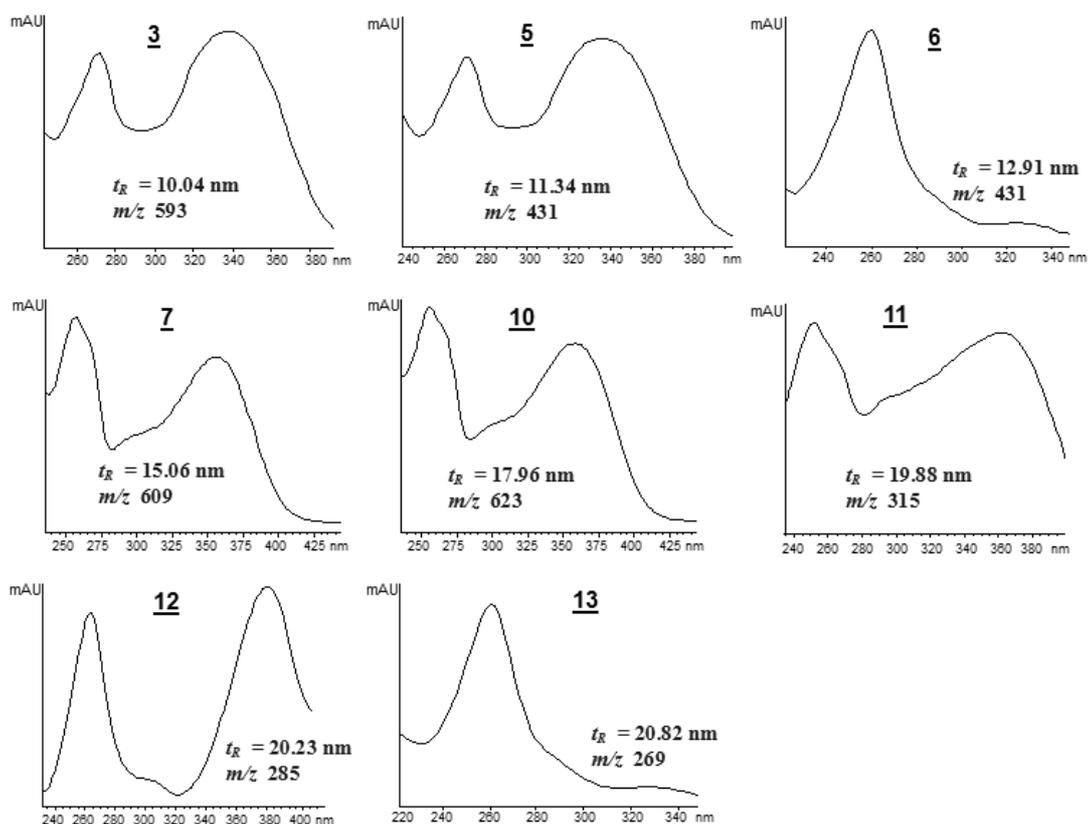


**Figure II.17.** Profil HPLC/UV-MS de l'extrait MeOH de *Genista quadriflora*.

Conditions chromatographiques: Colonne *Symmetry* RP-18 (150 x 4.6 mm i.d.; 5 µm). Solvants: A: H<sub>2</sub>O + 1% AcOH/ B: MeOH; Gradient: 5% à 30% (B) en 5 min, 30% à 60% (B) en 14 min, 60% à 90% (B) en 3 min; isocratique à 90% (B) en 2 min; 90% à 5% (B) en 1 min. Débit 1 mL/min. Détection à 254 nm. Spectre UV-Visible (DAD) balayé de 200 à 550 nm.

\* désigne les composés isolés en cours d'identification.

Les composés identifiés dans cet extrait présentent des spectres UV typiques des flavonoïdes avec deux bandes d'absorption intenses vers 253-272 nm et 336-375 nm (Mabry, 1970). La présence de deux constituants isoflavoniques (**6** et **13**) qui se distinguent par une seule bande d'absorption intense et un épaulement vers 260-262 et 228-330 nm, respectivement (**Fig.II.18**) a également été enregistrée.



**Figure II.18.** Spectres UV à 254 nm des composés identifiés dans l'extrait méthanolique de *G. quadriflora*.

#### II.4.2.3.3. Fractionnement de l'extrait MeOH de *G. quadriflora*

Un premier fractionnement de l'extrait brut méthanolique (**GqEMe**) (3 g) a été réalisé sur une colonne de silicagel conduisant à la récolte de 182 fractions (**Fig.II.19**). Puis, 13 composés ont été ciblés par des purifications successives suivant diverses méthodes chromatographiques (CC sur gel de silice, CC sur gel de Sephadex et HPLC semi-prép.) aboutissant ainsi à huit composés qui ont pu être identifiés par la suite: GqEMe**3** (27 mg), GqEMe**5** (20 mg), GqEMe**6** (2.4 mg), GqEMe**7** (15 mg), GqEMe**10** (21 mg), GqEMe**11** (2.1 mg), GqEMe**12** (1.3 mg), et GqEMe**13** (1.7 mg) dont la pureté a été mise en évidence par HPLC/UV-DAD.

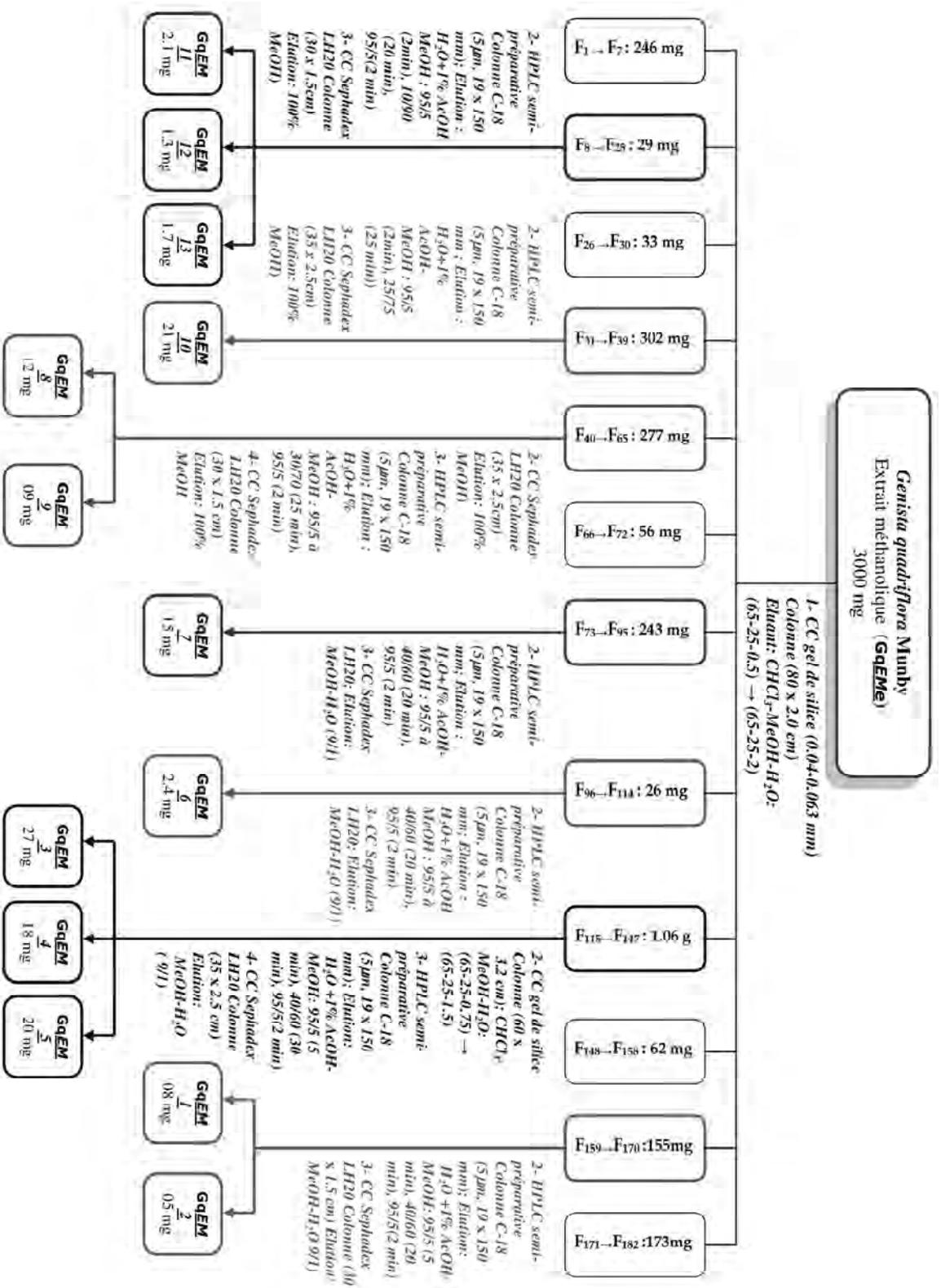


Figure II.19. Schéma de fractionnement de l'extrait méthanolique de *G. quadriflora*.

## II.5. Investigation de *Convolvulus tricolor* L. (Convolvulaceae)

### II.5.1. Aspects botaniques

#### II.5.1.1. Description (Battandier, 1888; Coste, 1937; Quezel, 1963)

Belle du jour (*Convolvulus tricolor* L.), comme son nom l'indique, c'est une plante annuelle diurne, qui ne fleurit que dans la journée. On l'appelle aussi "gloire du matin". En effet, une fois la nuit tombée, ses fleurs se referment. Localement, cette plante porte le nom de "souçane berri".

C'est une plante annuelle de 20-60 cm, velue dans le haut, vert clair, à racines longues et grêles. La tige est dressée, ascendante ou décombante (**Fig.II.20**).

Les feuilles inférieures sont atténuées en pétiole, obovées-spatulées; les supérieures sont sessiles, lancéolées et pubescentes.

Les fleurs de 15 à 22 mm de long au moins, tricolores, à corolles bleues au sommet, blanches au milieu, jaunes dans le fond, sont axillaires et solitaires sur des pédoncules grêles égalant ou dépassant la feuille, apparaissent tout au long de la tige, à la fin recourbées. Les 2 bractées sont linéaires et écartées de la fleur. Le calice est velu et découvert, à lobes ovales-mucronés. La capsule est pubescente. Les sépales sont hispides et longs de 7-10 mm au moins sur la capsule.

Le fruit est une capsule, généralement à 4 graines.



Coste, 1937



**Figure II.20.** *Convolvulus tricolor* L.

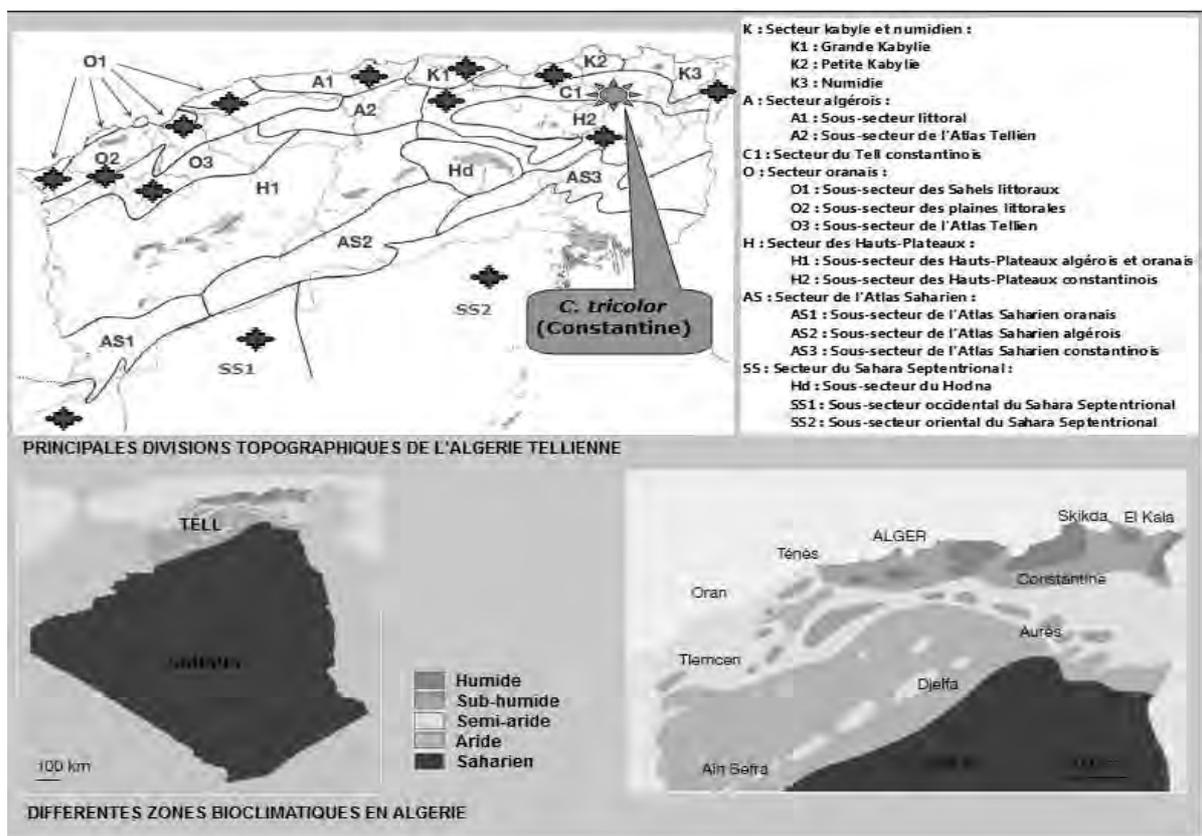
### II.5.1.2. Place dans la systématique

Selon l'Angiosperm Phylogeny Group (APG III, 2009), l'espèce *Convolvulus tricolor* L. appartient à la famille des Convolvulacées (*Convolvulaceae*) qui fait partie de l'ordre des Solanales et qui renferme quatre autres familles: *Hydroleaceae*, *Montiniaceae*, *Solanaceae*, et *Sphenocleaceae*. La position de cette plante dans la systématique est indiquée comme suit :

<b>Règne :</b>	<i>Plantae</i>
<b>Embranchement :</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>Sous-embranchement :</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Classe :</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sous-classe :</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Solanales</i>
<b>Famille :</b>	<i>Convolvulaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Convolvulus</i> L.
<b>Espèce :</b>	<i>Convolvulus tricolor</i> Linnaeus, Carl

### II.5.1.3. Répartition géographique

*Convolvulus tricolor* L., est une plante méditerranéenne commune qui est répandue dans toute la région du Tell de l'Algérie. Elle pousse dans les champs et pelouses argileuses des plaines et des basses montagnes (Quezel, 1963).



Parmi les 17 espèces qui représentent le genre *Convolvulus* en Algérie, *C. tricolor* est fréquente dans le secteur du Tell constantinois (**Fig.II.21**). La récolte du matériel végétal s'est faite à Constantine, une ville du nord-est de l'Algérie au climat subhumide, située à une altitude de 694 m et connue par un taux de pluviométrie annuel aux alentours de 500 mm.

### II.5.2. Etude chimique

Une recherche bibliographique sur l'espèce *C. tricolor* a montré qu'il n'existe en faite que très peu de travaux phytochimiques antérieurs concernant cette plante. Les produits isolés sont essentiellement des alcaloïdes, un polysaccharide, et quelques acides gras (**Tableau II.3**).

**Tableau II.3.** Quelques composés antérieurement isolés de *C. tricolor*.

Type de molécules	Composés	Références
<b>Alcaloïdes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hygrine</li> <li>- Cuscohygrine</li> <li>- Propylhygrine</li> <li>- <i>N</i>-Méthylpyrrolidinylhygrine</li> <li>- <i>N</i>-Méthylpyrrolidinylcuscohygrine</li> <li>- Phygrine</li> <li>- Nicotine</li> <li>- Calystégine A<sub>5</sub></li> <li>- Calystégine B<sub>1</sub></li> <li>- Calystégine B<sub>2</sub></li> </ul>	Jenett-Siems 1996; 1998
<b>Polysaccharide (galactomannane)</b>	- Mannose-β(1→4)-D-mannopyranose- α(1→6)-D-galactopyranoside	Kooiman 1971
<b>Acides gras</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acide palmitique (C-16)</li> <li>- Acide oléique (C-18:1)</li> <li>- Acide stéarique (C-18:2)</li> </ul>	Genest 1966

Nous nous sommes intéressés à l'analyse et à l'identification des différents métabolites secondaires contenus dans cette plante. Au cours de ce travail, nous avons procédé à l'identification des composés détectés au niveau des différentes parties de la plante: tiges et feuilles, fleurs, graines, écorces de graines, et racines.

#### II.5.2.1. Matériel végétal

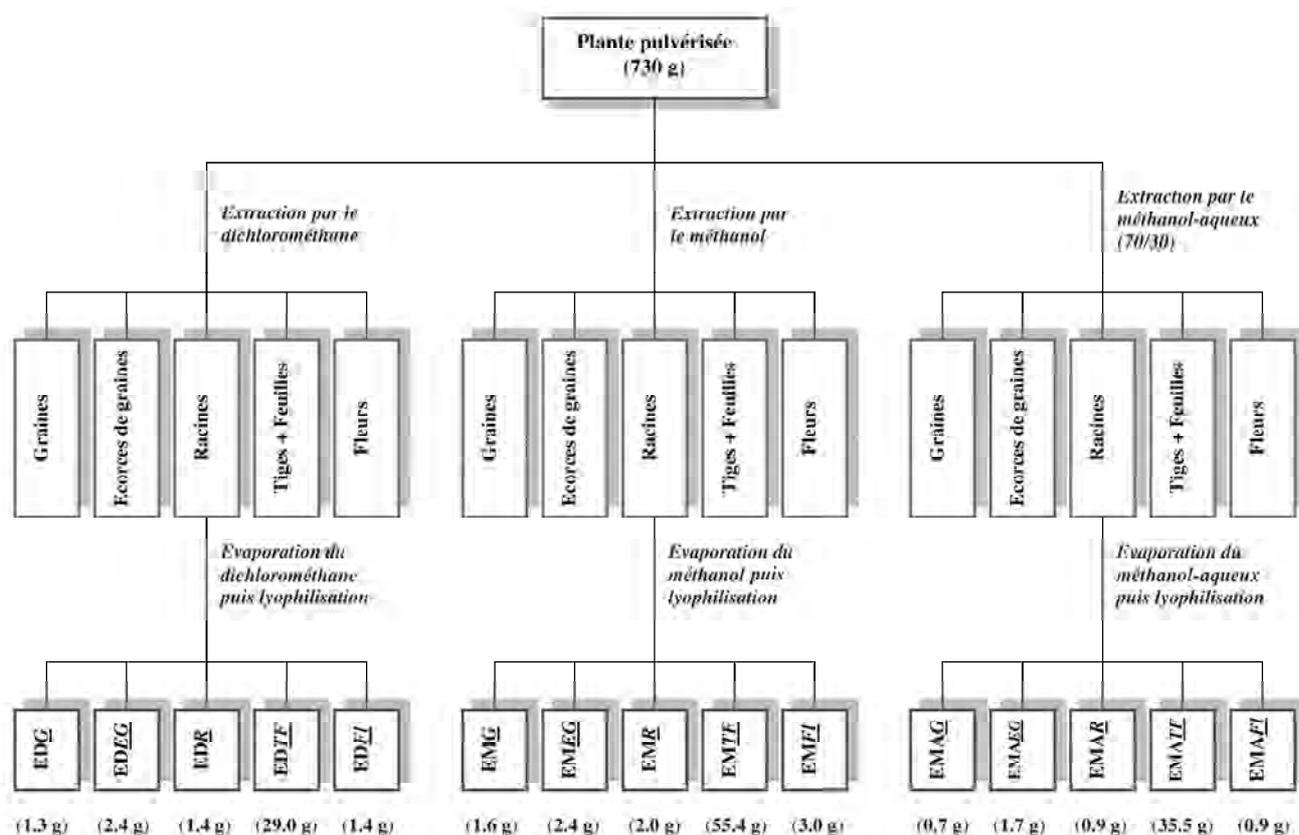
La plante entière a été récoltée en pleine floraison aux environs de la ville de Constantine. Cette opération a été effectuée en 2007 (par le Dr. Zellagui), en 2008 et 2010. Puis, à chaque fois la plante a été séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière. Un échantillon de référence CTNK2010, a été déposé au Laboratoire de Produits Naturels et de Synthèse Organique de l'Université de Constantine. L'identification botanique de *Convolvulus tricolor* L. a été faite par le Pr. Kaabeche du Laboratoire de Biodiversité et Ressources Phytogénétiques de l'Université de Sétif) et par le Dr.

Zellagui du Laboratoire de Produits Naturels et de Synthèse Organique de l'Université de Constantine.

### II.5.2.2. Extraction

L'extraction de la plante a été menée au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (LPP) de Genève (Suisse). Les différentes parties de la plante (730 g) ont été d'abord séparées puis pulvérisées pour obtenir :

- ❖ Fleurs : 13.6 g
- ❖ Tiges + feuilles : 619 g
- ❖ Racines : 37 g
- ❖ Graines : 30 g
- ❖ Ecorces de graines : 27.3 g

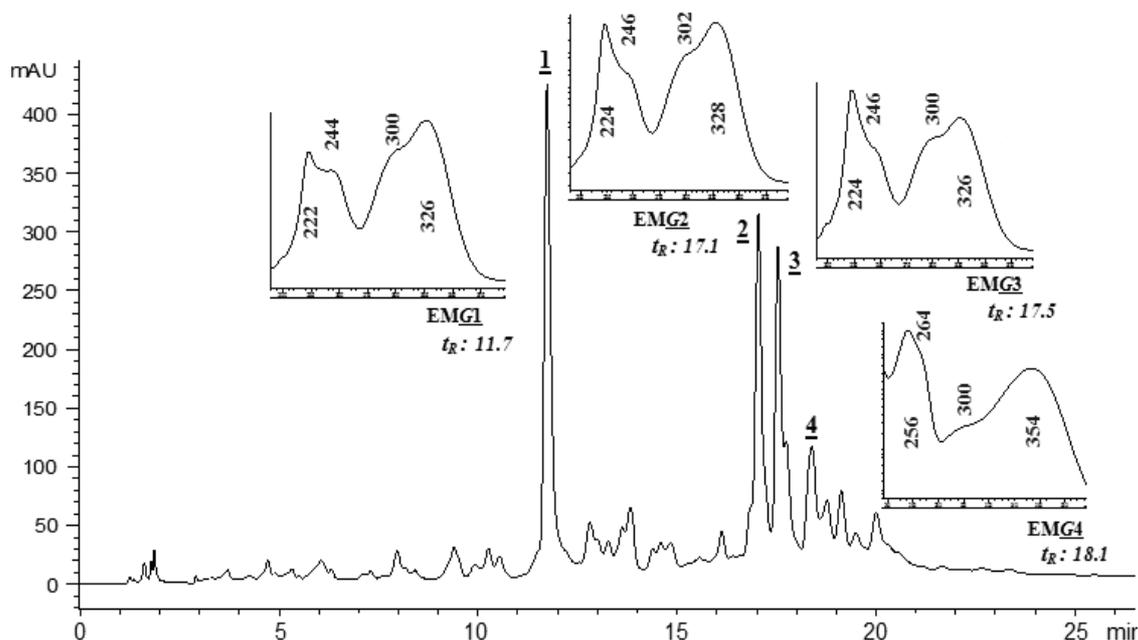


**Figure II.22.** Schéma de l'extraction de *Convolvulus tricolor* L.

Nous avons utilisé la méthode de l'extraction solide-liquide en utilisant successivement le dichlorométhane, le méthanol, et le mélange méthanol-eau (7/3, v/v). Cette expérience a été menée à température ambiante en agitant le mélange pendant 24 h. Cette opération a été répétée trois fois pour chaque solvant. Cependant, la couleur verte très foncée des extraits ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) est une indication de la présence d'une quantité significative de la chlorophylle. Les mélanges hétérogènes ont été filtrés sur papier plissé et les filtrats ont été évaporés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Labortechnik AG, Flawil) à une température ne dépassant pas 45 °C. Les résidus ont ensuite été lyophilisés et pesés (**Fig.II.22**).

### II.5.2.3. Screening HPLC/UV de l'extrait MeOH des graines de *C. tricolor*

L'extrait méthanolique des graines (EMG) de *C. tricolor* a été soumis à l'analyse par chromatographie liquide à haute performance avec détection à réseau de diodes (HPLC/UV-DAD). La **figure II.23** montre le chromatogramme HPLC ainsi que les spectres UV enregistrés. Cette analyse a permis d'obtenir les premières indications sur la nature des quatre constituants majoritaires de cet extrait. Les spectres UV des composés EMG1, EMG2, et EMG3 font apparaître deux maxima vers 222-224 et 326-328 nm et deux épaulements vers 244-246 et 300-302 nm caractéristiques des dérivés des acides cafféoyl-quiniques (Schütz, 2004). Pour le composé EMG4, son spectre UV est typique des flavonoïdes avec deux bandes d'absorption intenses à 256 et 354 nm (Mabry, 1970).



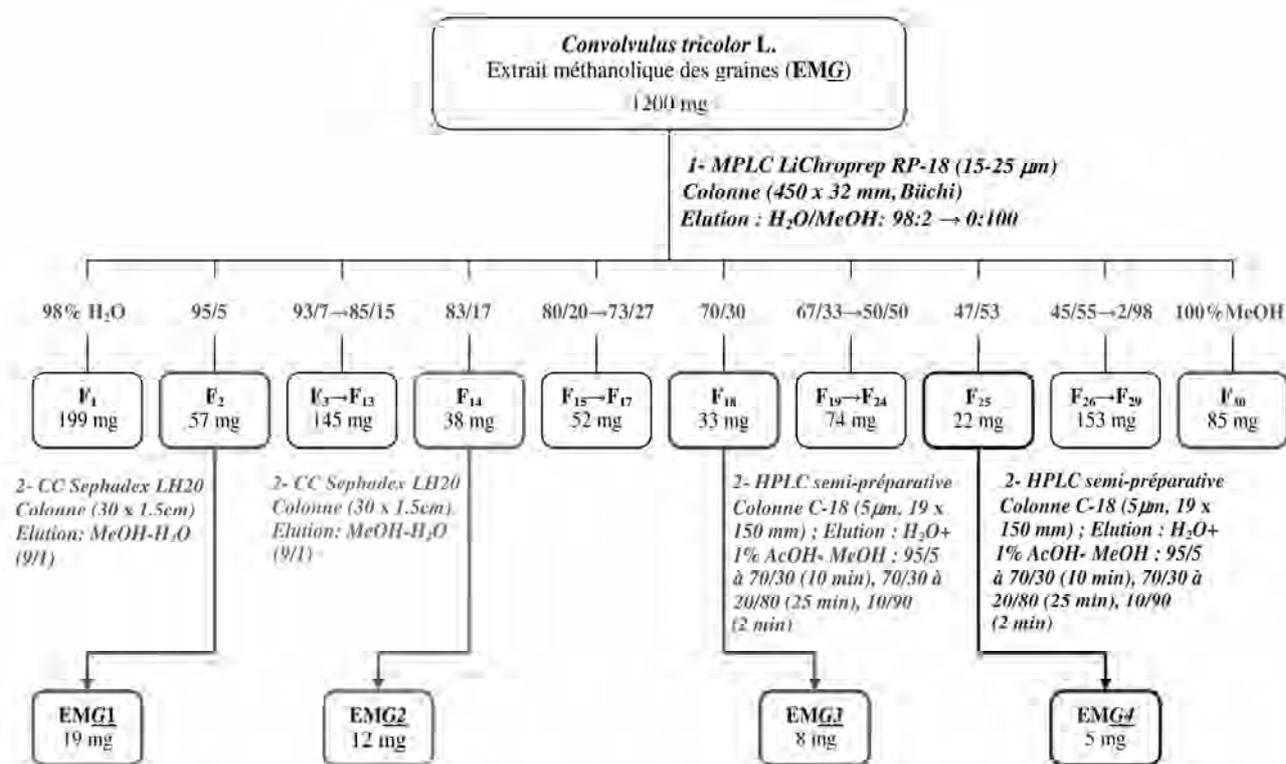
**Figure II.23.** Profil chromatographique HPLC/UV à 254 nm de l'extrait MeOH des graines du *C. tricolor*.

Conditions chromatographiques: Colonne *Symmetry* RP-18 (150 x 4.6 mm i.d.; 5  $\mu$ m). Solvants: **A**: H<sub>2</sub>O + 1% AcOH/ **B**: MeOH; Gradient: 5% à 50% (**B**) en 15 min, 50 à 90% (**B**) en 7 min, isocratique à 90% (**B**) en 2 min; 90 à 5% (**B**) en 1 min. Débit 1 mL/min. Détection à 254 nm. Spectre UV-Visible (DAD) balayé de 190 à 550 nm.

### II.5.2.4. Fractionnement de l'extrait MeOH des graines de *C. tricolor*

Une prise de 1.2 g de EMG a d'abord subi un fractionnement par chromatographie à moyenne pression (MPLC) sur une colonne (450 x 32 mm, Büchi), surmontée d'une pré-colonne Büchi (115 x 10 mm) avec pour phase stationnaire de la silice en phase inverse de type LiChroprep RP-18 (15-25  $\mu$ m, Merck) avec une élution à un débit de 7 mL/min. Un gradient en plateaux de phase mobile MeOH-H<sub>2</sub>O a été utilisé. Le changement du gradient de la phase mobile au cours de l'analyse s'effectuait manuellement. La composition du mélange d'élution MeOH/H<sub>2</sub>O a été appliquée de la manière suivante: 2/98  $\rightarrow$  15/85 en 8 h, 15/85  $\rightarrow$  50/50 en 10 h, et 50/50  $\rightarrow$  100/0 en 12 h. Le regroupement des fractions a été suivi par CCM en utilisant des plaques Silicagel 60 F<sub>254</sub> et comme éluant le système de solvants: EtOAc/HCOOH/CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O: 100/11/11/26 (v/v/v/v).

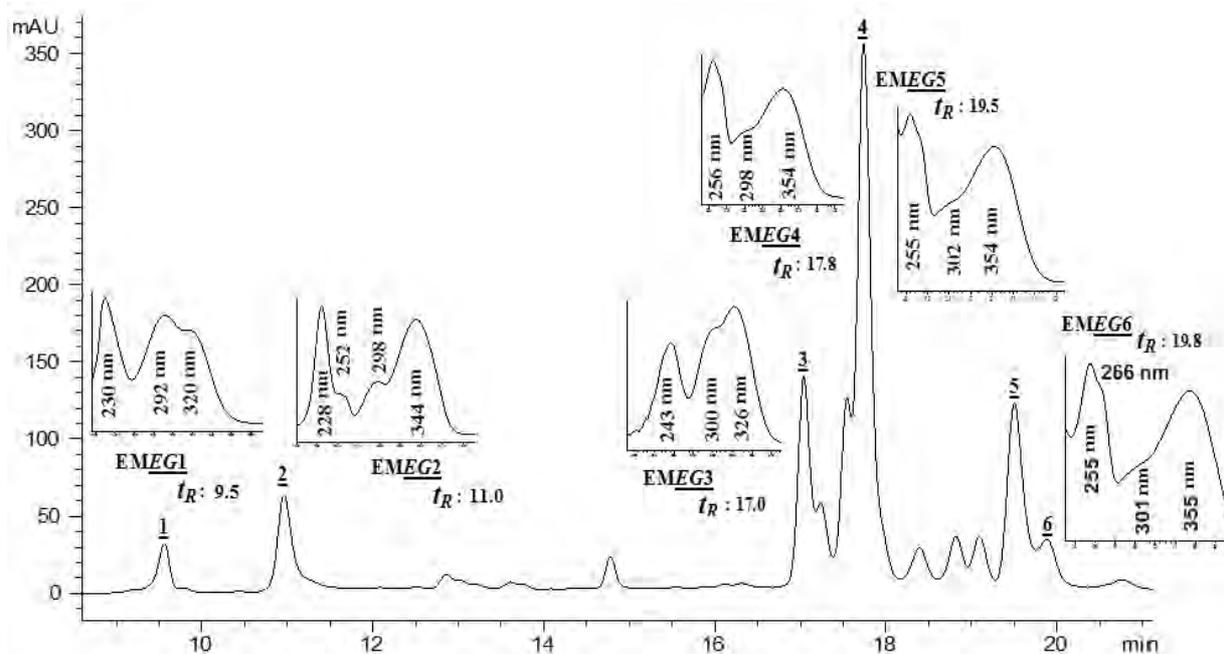
La séparation en MPLC nous a permis d'obtenir 30 fractions (**Fig.II.24**), parmi lesquelles seules les fractions contenant les composés majoritaires révélés lors du screening par HPLC et CCM ont été ciblées et considérées. Les purifications des fractions F2 et F14 ont été effectuées sur colonne de Sephadex LH-20 (30 x 1.5 cm). Ceci a conduit à l'isolation des composés EMG1 (19 mg) et EMG2 (12 mg). D'autre part, les fractions F18 et F25 ont été fractionnées par HPLC semi-préparative en phase inverse ce qui nous a permis de recueillir les composés EMG3 (8 mg) et EMG4 (5 mg).



**Figure II.24.** Schéma de fractionnement de l'extrait MeOH des graines de *C. tricolor*.

#### II.5.2.5. Screening HPLC/UV de l'extrait MeOH des écorces de graines de *C. tricolor*

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur la nature des principaux composés de l'extrait méthanolique des écorces de graines (EMEG) de *C. tricolor*, celui-ci a été soumis à une analyse HPLC couplé à un détecteur UV-DAD (**Fig.II.25**). Les conditions chromatographiques sont identiques à celles appliquées à l'extrait précédent.

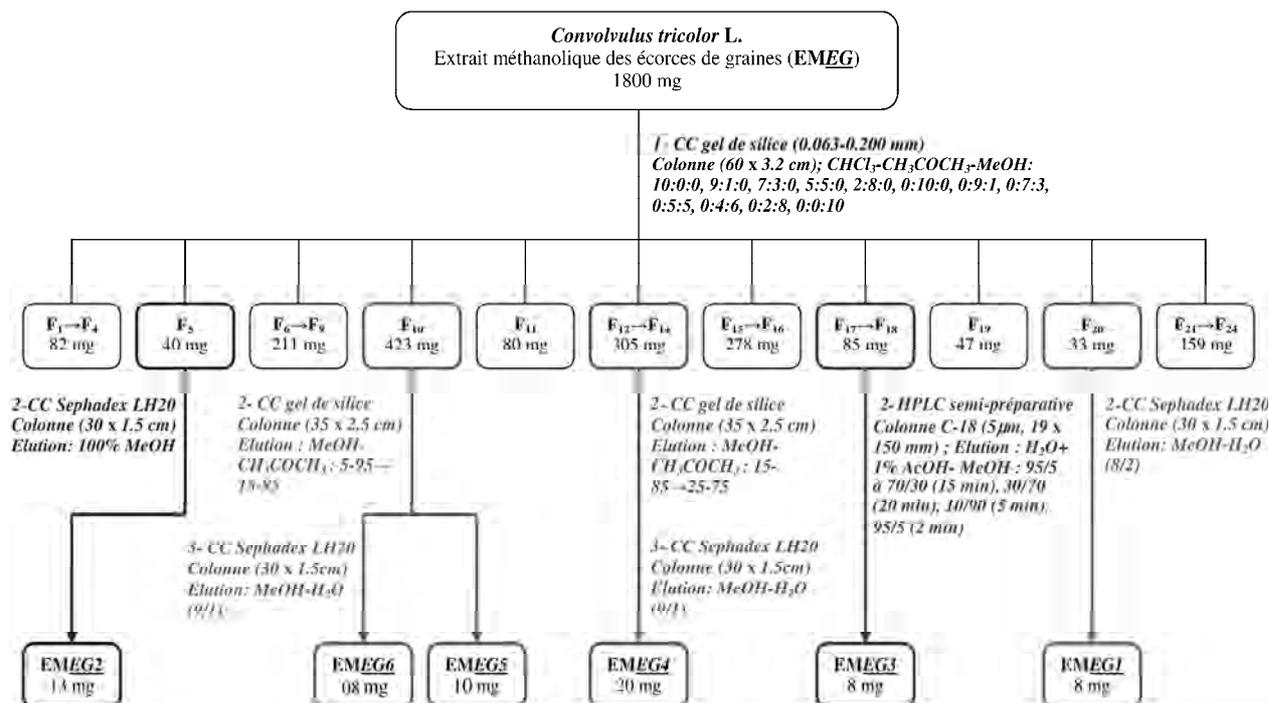


**Figure II.25.** Profil chromatographique HPLC/UV à 254 nm de l'extrait MeOH des écorces de graines de *C. tricolor*.

Parmi les composés révélés par le chromatogramme HPLC/UV à 254 nm, six composés ont pu être isolés. Le composé EMEG1 présentant des maxima d'absorption à 230, 292, et 320 nm nous a orienté vers la structure d'un acide phénolique (Sakushima, 1995). Par ailleurs, le spectre UV du composé EMEG2 fait apparaître deux maximums à 228 et 344 nm et deux épaulements vers 252 et 298 nm caractéristiques d'une coumarine (Xia, 2007). Le spectre UV du troisième composé EMEG3 révèle des maxima d'absorption à 243 et 326 nm et un épaulement à 300 nm spécifiques des dérivés des acides cafféoyl-quiniques (Schütz, 2004). Pour les composés EMEG4, EMEG5, et EMEG6, leurs spectres UV sont typiques des flavonoïdes avec deux bandes d'absorption intenses vers 253-256 nm et 354-356 nm (Mabry, 1970).

#### II.5.2.6. Fractionnement de l'extrait MeOH des écorces de graines de *C. tricolor*

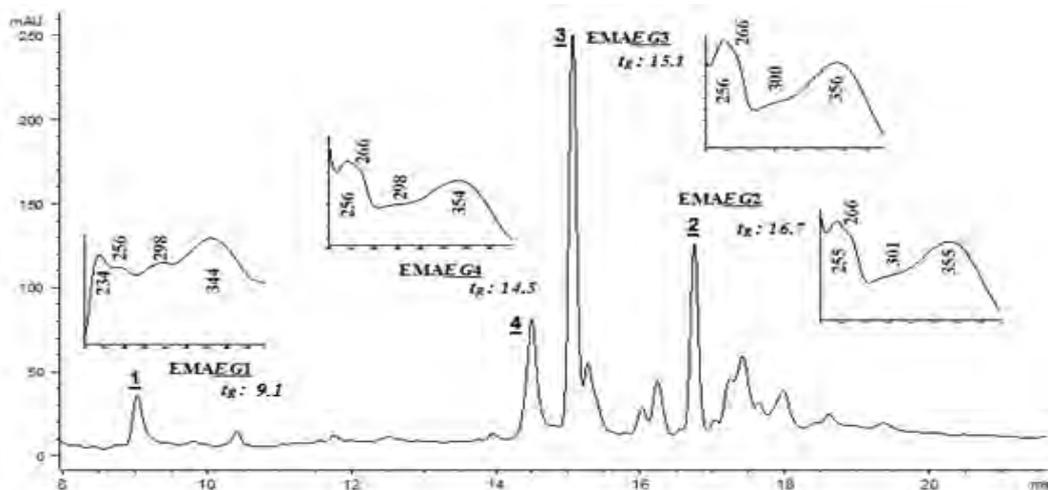
Un premier fractionnement de l'extrait brut méthanolique des écorces de graines EMEG de *C. tricolor* (1.8 g) a été réalisé au moyen d'une colonne ouverte de silicagel 60 (70 – 230 mesh) avec une élution en gradient par palier. Le suivi de la séparation sur colonne a été mené par CCM et a permis d'obtenir 24 fractions (**Fig.II.26**). Cinq fractions ciblées ont été soumises à des purifications à l'aide de diverses méthodes chromatographiques (CC sur gel de silice, CC sur gel de Sephadex et HPLC semi-prép.) aboutissant ainsi à six composés: EMEG1 (8 mg), EMEG2 (13 mg), EMEG3 (8 mg), EMEG4 (20 mg), EMEG5 (10 mg), et EMEG6 (8 mg) dont la pureté a été mise en évidence par HPLC/UV-DAD.



**Figure II.26.** Schéma de fractionnement de l'extrait MeOH des écorces de graines de *C. tricolor*.

### II.5.2.7. Screening HPLC/UV de l'extrait hydroalcoolique des écorces de graines de *C. tricolor*

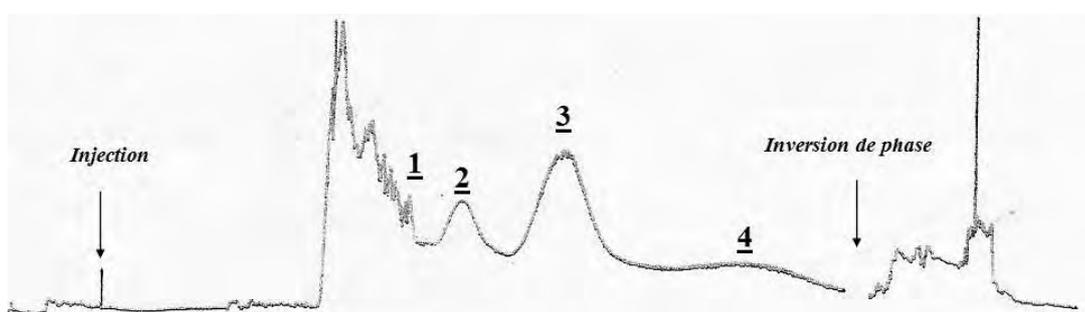
L'extrait hydroalcoolique (EMAE<sub>G</sub>) des écorces de graines de *C. tricolor* a été soumis à l'analyse par chromatographie liquide à haute performance avec détection à réseau de diodes (HPLC/UV). La **Figure II.27** montre le chromatogramme HPLC en plus des spectres UV enregistrés. Cette analyse a permis d'obtenir les premières indications sur la nature des constituants de cet extrait. Ainsi, quatre composés ont été ciblés par notre étude. Le spectre UV du composé EMAEG<sub>1</sub> fait apparaître deux maximums à 234 et 344 nm et deux épaulements vers 256 et 298 nm caractéristiques d'une coumarine (Xia, 2007). Pour les composés EMAEG<sub>2</sub>, EMAEG<sub>3</sub>, et EMAEG<sub>4</sub>, leurs spectres sont typiques des flavonoïdes avec deux bandes d'absorption intenses vers 255-256 nm et 354-356 nm (Mabry, 1970).



**Figure II.27.** Profil chromatographique HPLC/UV à 254 nm de l'extrait hydroalcoolique des écorces de graines de *C. tricolor*.

### II.5.2.8. Fractionnement de l'extrait hydroalcoolique des écorces de graines de *C. tricolor*

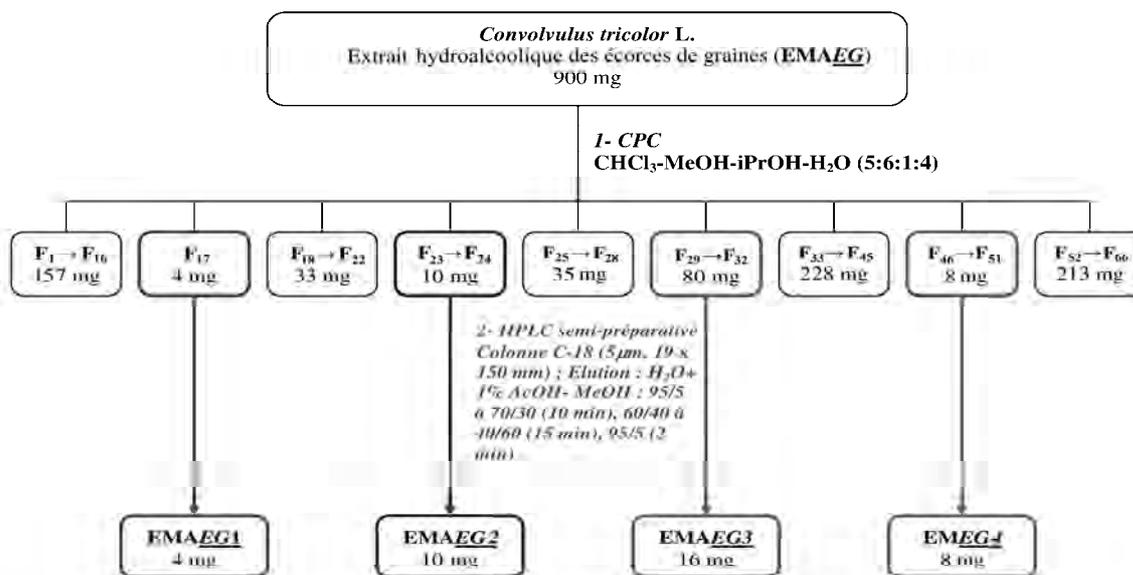
Afin d'obtenir les composés ciblés, l'extrait EMAEG de *C. tricolor* a été fractionné par chromatographie de partage centrifuge (CPC) (**Fig.II.28**). Cette technique basée sur le partage des composés entre deux phases liquides non miscibles, a pour avantage de supprimer les pertes qui peuvent résulter de l'adsorption des composés sur les phases solides. Ainsi le fractionnement a été réalisé en utilisant un système de solvants biphasique quaternaire: chloroforme-méthanol-isopropanol-eau, avec les proportions volumiques (5:6:1:4). La colonne a été remplie par les deux phases (1:1) et mise sous rotation à 1000 tours/min. La phase inférieure a été pompée dans la colonne à un débit de 3 mL/min en mode descendant en ayant comme phase mobile la plus dense et la phase stationnaire la moins dense. Puis, au cours du fractionnement le sens de rotation a été inversé et l'autre phase a été utilisée comme éluant. Les fractions ont été collectées à une vitesse de 5 min/tube.



**Figure II.28.** Profil chromatographique CPC/UV à 254 nm du fractionnement de l'extrait hydroalcoolique des écorces de graines de *C. tricolor*.

Système de solvant : CHCl<sub>3</sub>-MeOH-iPrOH-H<sub>2</sub>O (5:6:1:4). Débit 3 mL/min.

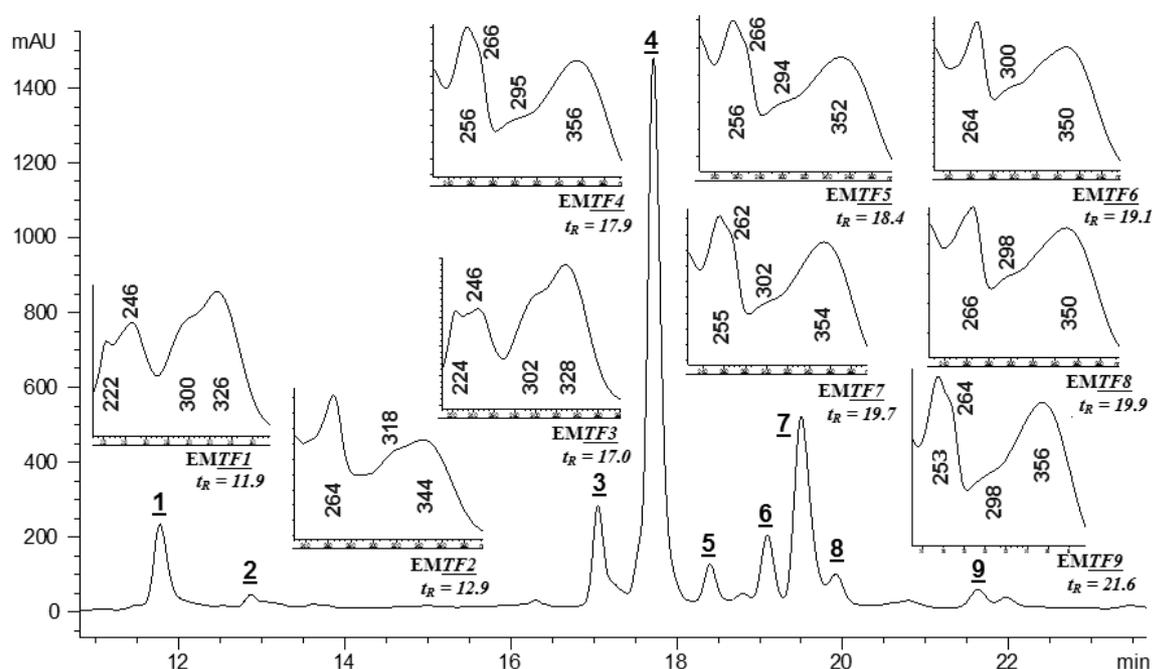
Le premier fractionnement de l'extrait EMAEG du *C. tricolor* (900 mg) réalisé par CPC, a donné 66 fractions (**Fig.II.29**). Un suivi par HPLC et CCM nous a permis d'isoler 3 composés purs EMAEG1 (4 mg), EMAEG2 (10 mg), et EMAEG4 (8 mg). Ensuite, un second fractionnement par HPLC semi-préparative a permis d'isoler un autre composé pur EMAEG3 (16 mg).



**Figure II.29.** Schéma de fractionnement de l'extrait hydroalcoolique des écorces de graines de *C. tricolor*.

### II.5.2.9. Screening HPLC/UV de l'extrait MeOH des tiges et feuilles de *C. tricolor*

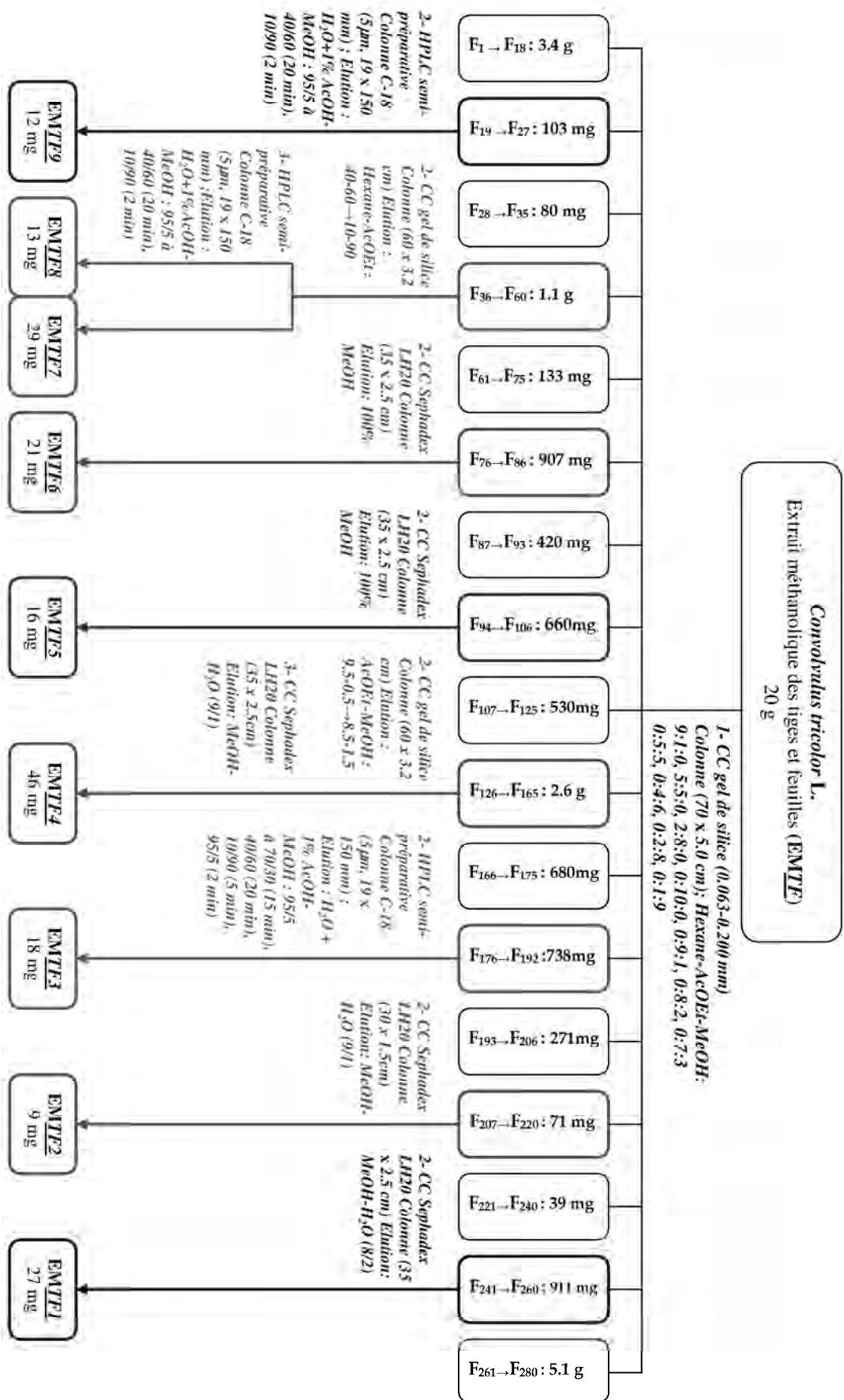
L'extrait méthanolique des tiges et feuilles (EMTF) de *C. tricolor* a été soumis à l'analyse par chromatographie liquide à haute performance avec détection à réseau de diodes (HPLC/UV). La **Figure II.30** montre le chromatogramme HPLC et les spectres UV enregistrés. Cette analyse a permis d'obtenir les premières indications sur la nature des constituants majoritaires de cet extrait. Les spectres UV des composés EMTF1 et EMTF3 font apparaître deux maxima vers 222-224 et 326-328 nm et deux épaulements vers 246 et 300-302 nm caractéristiques des dérivés des acides cafféoyl-quiniques (Schütz, 2004). Pour les sept autres composés, les spectres UV sont typiques des flavonoïdes avec deux bandes d'absorption intenses vers 255-266 et 344-356 nm (Mabry, 1970).



**Figure II.30.** Profil chromatographique HPLC/UV à 254 nm de l'extrait MeOH des tiges et feuilles de *C. tricolor*.

### II.5.2.10. Fractionnement de l'extrait MeOH des tiges et feuilles de *C. tricolor*

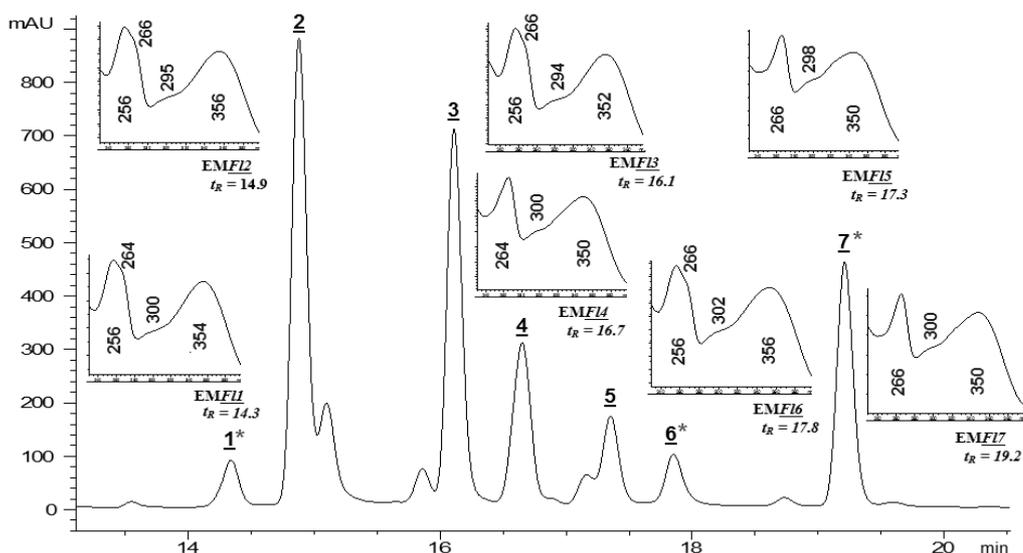
Un premier fractionnement de l'extrait brut méthanolique des tiges et feuilles (EMTF) de *C. tricolor* (20 g) a été réalisé sur une colonne de silicagel, 280 fractions ont été obtenues (**Fig.II.31**). Puis, les composés majoritaires ont été ciblés par des purifications suivant diverses méthodes chromatographiques (CC sur gel de silice, CC sur gel de Sephadex et HPLC semi-prép.) aboutissant ainsi à neuf composés: EMTF1 (27 mg), EMTF2 (9 mg), EMTF3 (18 mg), EMTF4 (46 mg), EMTF5 (16 mg), et EMTF6 (21 mg), EMTF7 (29 mg), EMTF8 (13 mg), et EMTF9 (12 mg) dont la pureté a été mise en évidence par HPLC/UV-DAD



**Figure II.31.** Schéma de fractionnement de l'extrait MeOH des tiges et feuilles de *C. tricolor*.

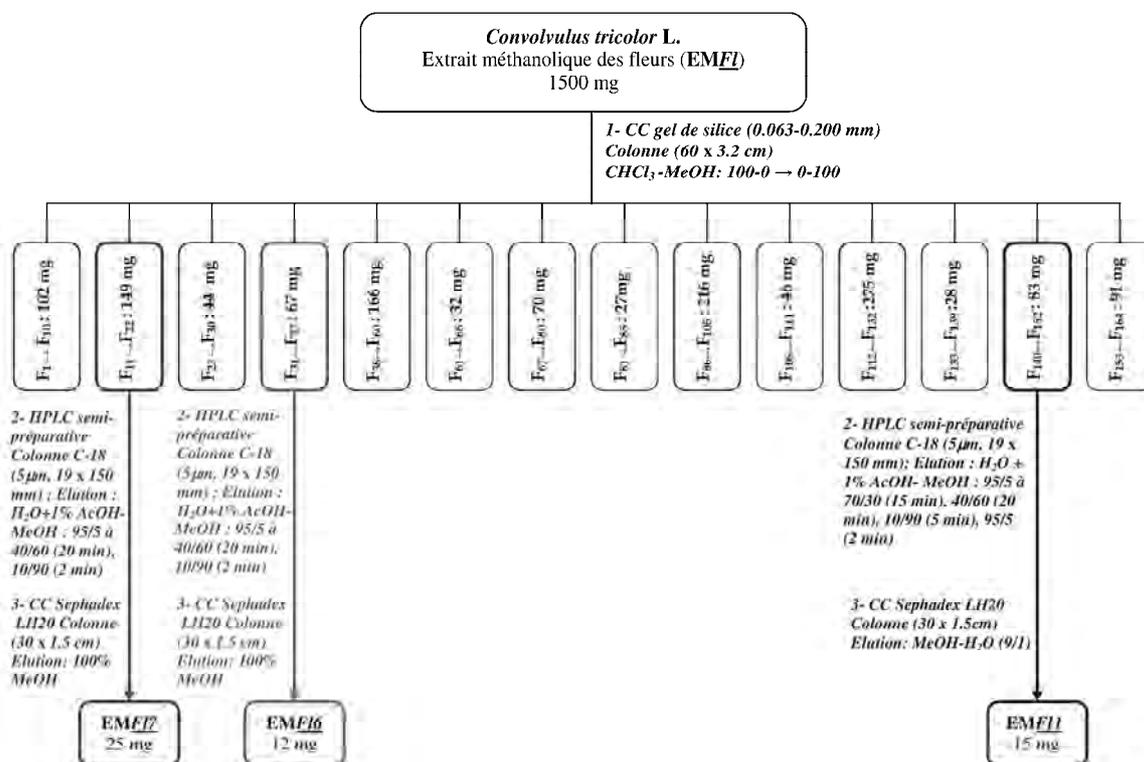
### II.5.2.11. Screening HPLC/UV de l'extrait MeOH des fleurs de *C. tricolor*

Le chromatogramme HPLC-UV de l'extrait méthanolique des fleurs (EMFI) (**Fig.II.32.**) a permis d'obtenir les premières indications sur la nature des sept constituants majoritaires (composés EMFI-1,-2,-3,-4,-5,-6, et -7) qui montrent des spectres UV typiques des flavonoïdes avec deux bandes d'absorption intenses vers 256-266 et 350-356 nm (Mabry, 1970).



**Figure II.32.** Profil chromatographique HPLC/UV à 254 nm de l'extrait MeOH des fleurs de *C. tricolor*.

### II.5.2.12. Fractionnement de l'extrait MeOH des fleurs de *C. tricolor*



**Figure II.33.** Schéma de fractionnement de l'extrait MeOH des fleurs de *C. tricolor*.

Un premier fractionnement de l'extrait brut méthanolique des fleurs (EMF) (1.5 g) a été réalisé sur une colonne de silicagel pour donner 164 fractions (**Fig.II.33**). Puis, trois fractions ont été ciblées par des purifications successives suivant diverses méthodes chromatographiques (CC sur gel de Sephadex et HPLC semi-prép.) aboutissant aux composés: EMTF1 (15 mg), EMTF6 (12 mg), et EMTFZ (25 mg) dont la pureté a été mise en évidence par HPLC/UV-DAD.

*Chapitre III*  
*Résultats et discussion*

### III.1. Analyse du contenu alcaloïdique de *Genista quadriflora*

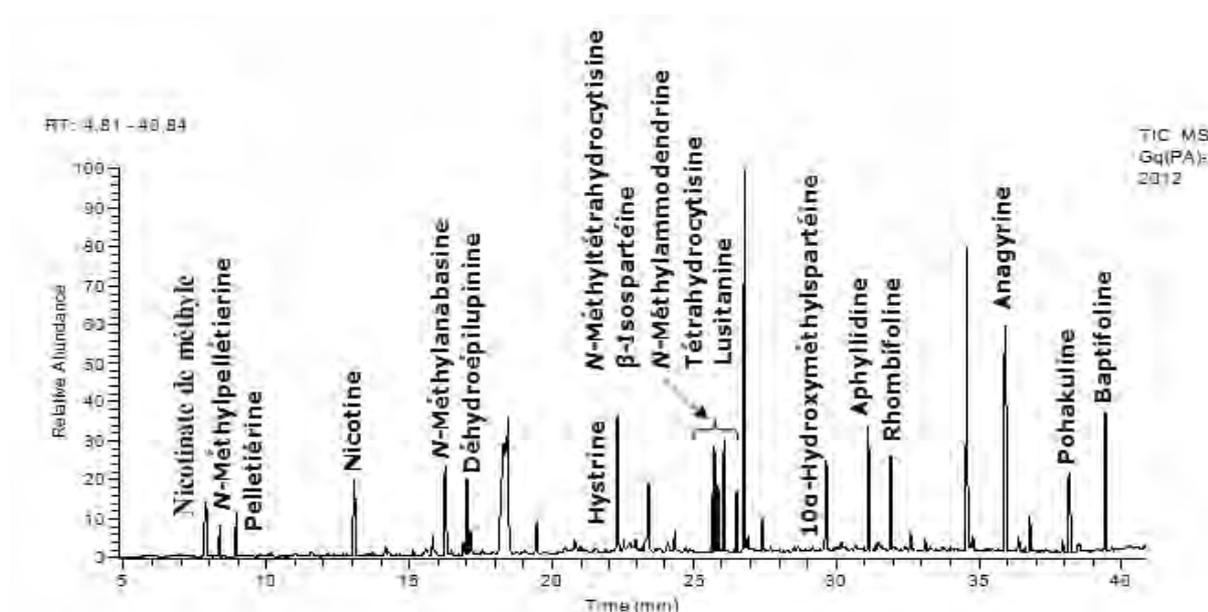
La présence des alcaloïdes a d'abord été détectée dans les différents extraits par la chromatographie sur couches minces (CCM) en utilisant le réactif de Dragendorff qui a été pulvérisé sur les plaques.

L'identification des alcaloïdes, a été réalisée par la GC-EIMS qui est une méthode performante permettant d'obtenir des informations précieuses sur la structure des alcaloïdes détectés. En effet, l'utilisation de l'impact électronique (EI) permet d'obtenir les fragmentations caractéristiques des composés conduisant à l'identification des structures moléculaires. Cette identification a encore été renforcée par l'injection de composés témoins (ex. spartéine), une comparaison des spectres de masse et des indices de rétention (RI) avec les données de la littérature. En plus, nous avons proposé quelques mécanismes de fragmentations indiquant la formation des pics caractéristiques en rapport avec les données reportées dans la littérature.

Les analyses GC-MS ont été effectuées à une température de la ligne de transfert et de l'injecteur maintenue à 250 °C. Le gradient de température était le suivant: 70 °C pendant 1 min, augmentation linéaire de 5 °C/min jusqu'à 285 °C, puis isotherme à cette température pendant 15 min. La durée totale de l'analyse était de 59 min. La température de la source MS a été maintenue à 200 °C.

#### III.1.1. Identification des alcaloïdes détectés dans les parties aériennes

Grâce à la GC-MS, 17 alcaloïdes ont été détectés dans l'extrait des parties aériennes récoltées en 2010 (PA10AL), en pleine floraison de la plante. Ces composés alcaloïdiques sont décrits pour la première fois pour l'espèce endémique *G. quadriflora*. La **Figure III.1** révèle le profil GC-MS représentatif du contenu alcaloïdique (en plus de quelques esters et aldéhydes).



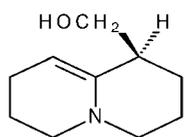
**Figure III.1.** Chromatogramme GC-MS de l'extrait alcaloïdique (PA10AL) des parties aériennes de *Genista quadriflora*.

### 1.1.1. Alcaloïdes quinolizidiniques

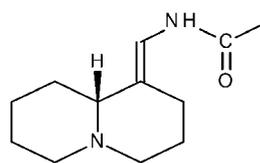
Cette étude a permis l'identification d'alcaloïdes de type quinolizidine (QAs) comme alcaloïdes majoritaires. Ces molécules ont été caractérisées par les indices de rétention (RI) en chromatographie gazeuse, leurs fragmentations spécifiques en spectrométrie de masse, et une comparaison avec les données reportées dans la littérature (Neuner, 1964; Schumann, 1968; Wink, 1993a). Cette investigation a révélé la présence de 11 QAs représentés par trois groupes distincts:

#### III.1.1.1.1. Composés bicycliques

Deux alcaloïdes appartenant à ce groupe ont été identifiés: la déhydroépilupinine ( $m/z$  167) et la lusitanine ( $m/z$  208).



Déhydroépilupinine (**III.1.1**)



Lusitanine (**III.1.2**)

#### - Lusitanine

Formule brute:  $C_{12}H_{20}N_2O$ ,  $M = 208$  g/mol.

RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
1870	208 (2)	136(100), 166(88), 179(18), 110(8)

Le spectre de masse en impact électronique du composé **lusitanine (III.1.2)** révèle un ion moléculaire à  $m/z$  208 [ $M^+$ ] (Fig.III.2) qui correspond à une de formule brute  $C_{12}H_{20}N_2O$  avec un degré d'insaturation de 4. Le spectre de masse exhibe un pic de base  $m/z$  136 indiquant une structure bicyclique d'un alcaloïde de type quinolizidine di-azoté.

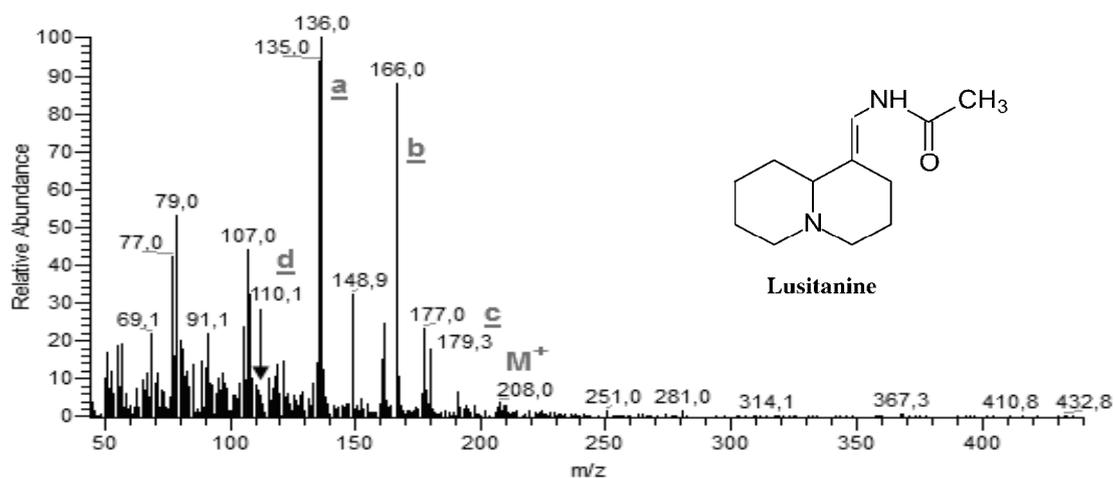
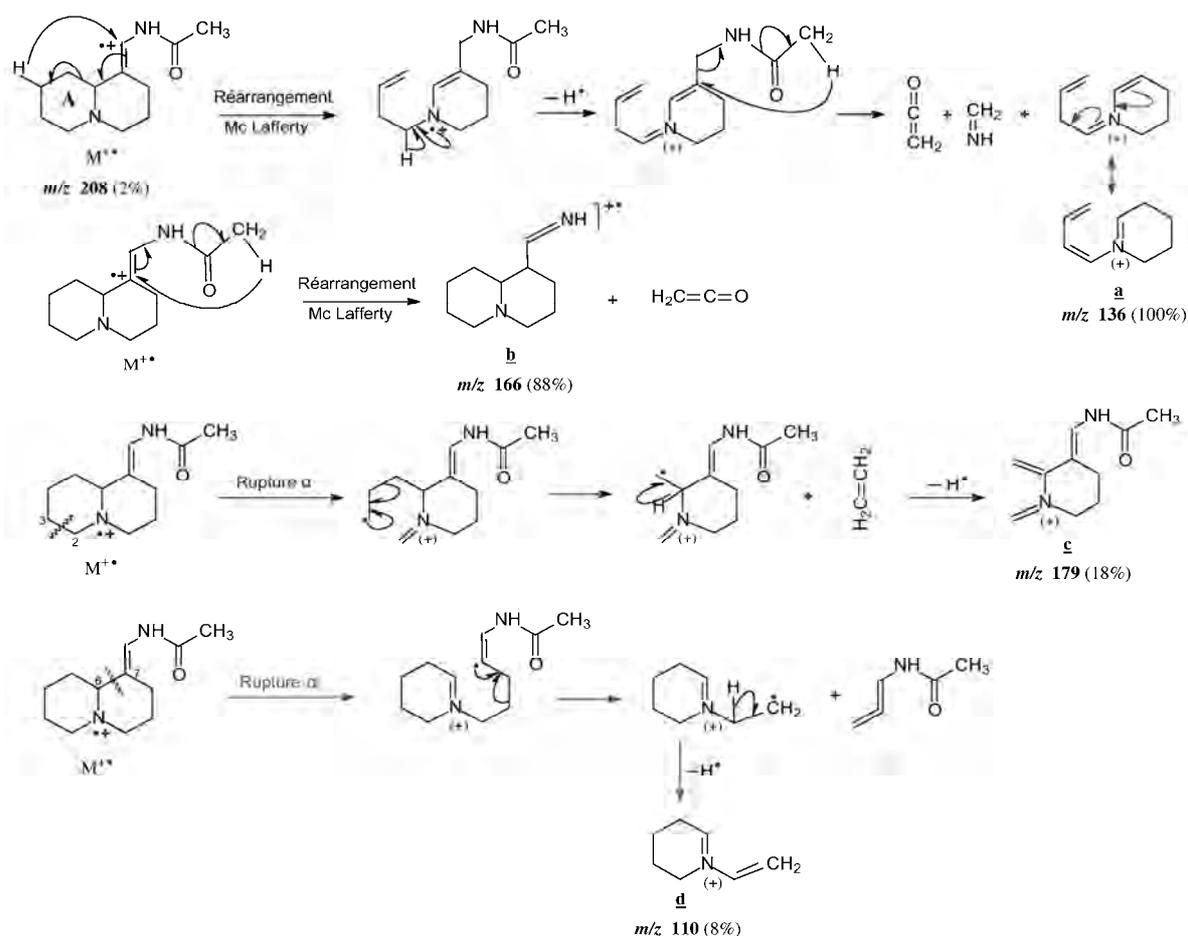


Figure III.2. Spectre de masse de la lusitanine (III.1.2).

## Mécanisme de fragmentation

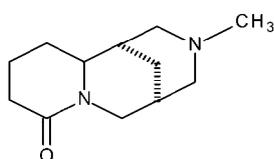
Pour la formation des fragments caractéristiques de la lusitanine, un réarrangement de Mc Lafferty permet l'ouverture du cycle A et l'obtention du pic de base **a**  $m/z$  136  $[M-C_3H_6NO]^+$  (**Fig.III.3**). Un deuxième réarrangement de Mc Lafferty va donner l'ion fragment **b**  $m/z$  166  $[M-C_2H_2O]^+$ . D'autre part, une première rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> va engendrer l'ion fragment **c**  $m/z$  179  $[M-C_2H_5]^+$ , et une seconde rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> va permettre d'avoir le pic **d**  $m/z$  110  $[M-C_5H_8NO]^+$ .



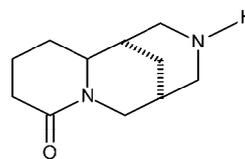
**Figure III.3.** Proposition de fragmentation de la lusitanine avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

### III.1.1.1.2. Composés tricycliques

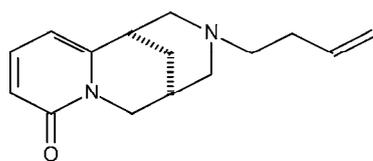
Quatre molécules assez rares dans le genre *Genista* ont été identifiées: la *N*-méthyltétrahydrocytisine ( $m/z$  208), la tétrahydrocytisine ( $m/z$  194), la rhombifoline ( $m/z$  244) et la pohakuline ( $m/z$  266).



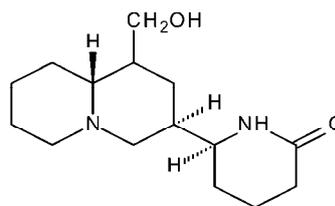
*N*-Méthyltétrahydrocytisine (**III.1.3**)



Tétrahydrocytisine (**III.1.4**)



Rhombifoline (**III.1.5**)



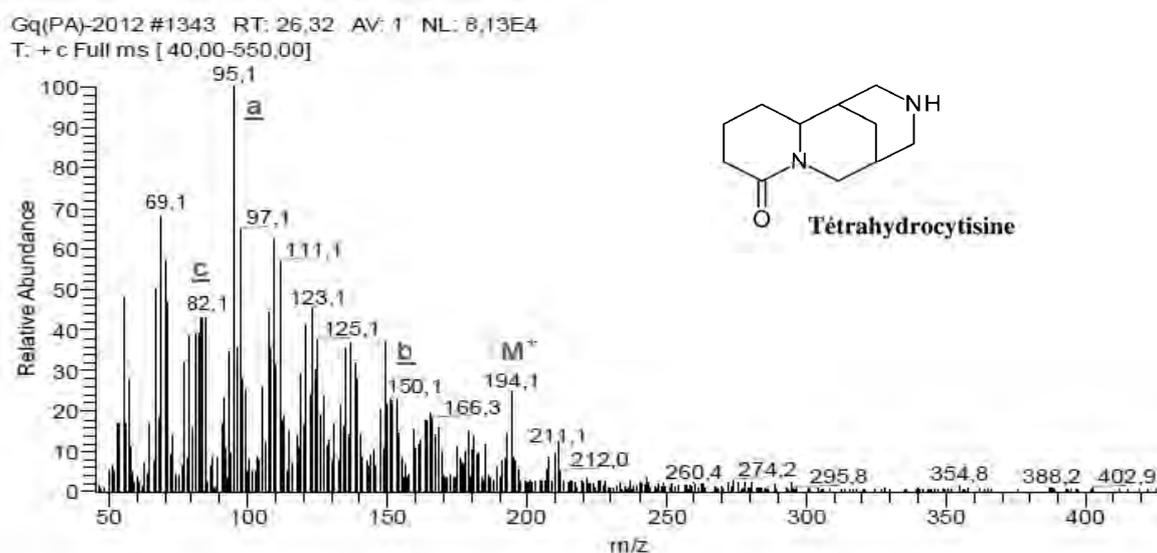
Pohakuline (**III.1.6**)

### - Tétrahydrocytisine

Formule brute:  $C_{11}H_{18}N_2O$ ,  $M = 194$  g/mol.

RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
1861	194 (25)	95(100), 82(42), 150(21)

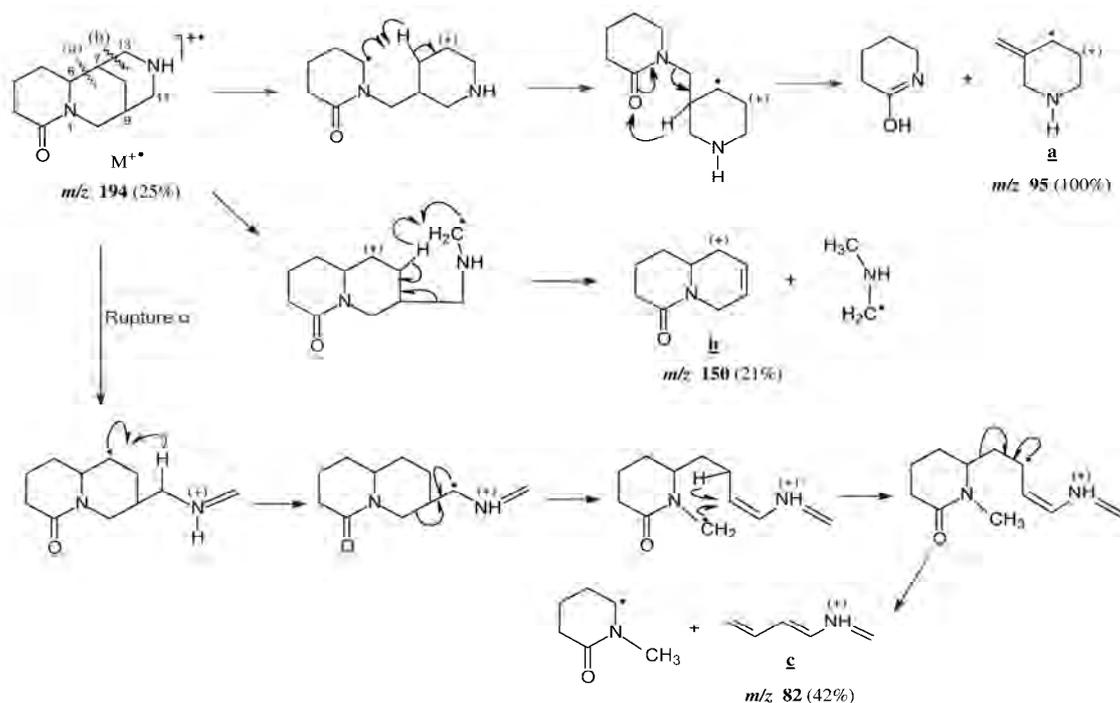
Le spectre de masse en impact électronique du composé **tétrahydrocytisine (III.1.4)** révèle un ion moléculaire à  $m/z$  194 [ $M$ ]<sup>+</sup> (**Fig.III.4**) qui correspond à une de formule brute  $C_{11}H_{18}N_2O$  avec un degré d'insaturation de 4. En plus, le spectre de masse montre un pic de base  $m/z$  95 indiquant une structure tricyclicque d'un alcaloïde de type quinolizidine di-azoté.



**Figure III.4.** Spectre de masse de la tétrahydrocytisine (III.1.4).

### Mécanisme de fragmentation

Pour la formation des fragments caractéristiques de la tétrahydrocytisine, on suggère une première rupture au niveau de la liaison  $C_6-C_7$  qui donne le pic de base **a**  $m/z$  95 [ $M-C_5H_9NO$ ]<sup>+</sup> (**Fig.III.5**). Une deuxième rupture a au niveau de la liaison  $C_7-C_{13}$ , va engendrer les ions fragments **b**  $m/z$  150 [ $M-C_2H_6N$ ]<sup>+</sup> et **c**  $m/z$  82 [ $M-C_6H_{10}NO$ ]<sup>+</sup>.



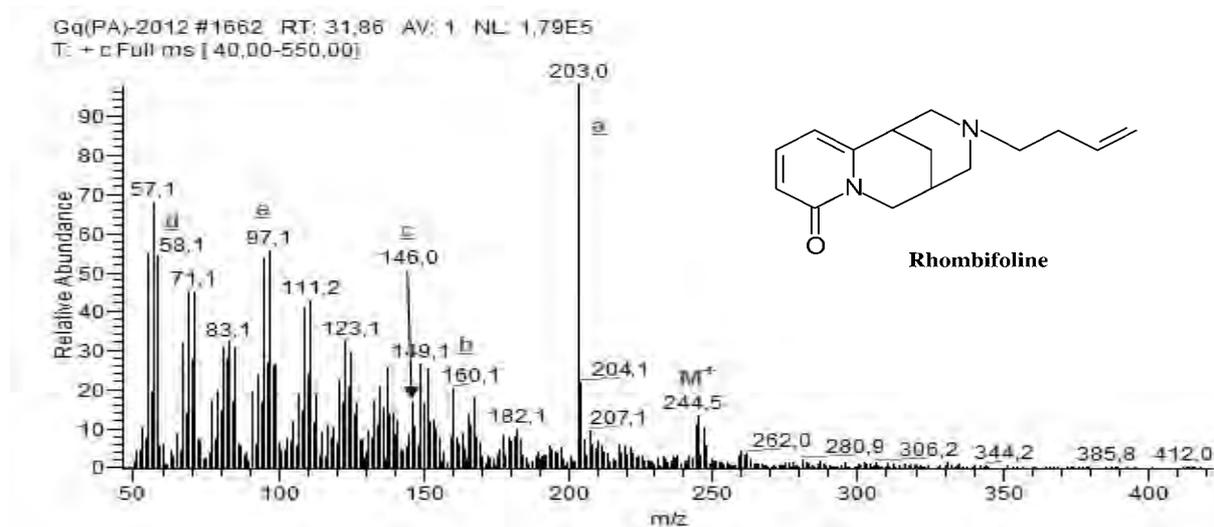
**Figure III.5.** Proposition de fragmentation de la tétrahydrocystisine avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

### - Rhombifoline

**Formule brute:**  $C_{15}H_{20}N_2O$ ,  $M = 244$  g/mol.

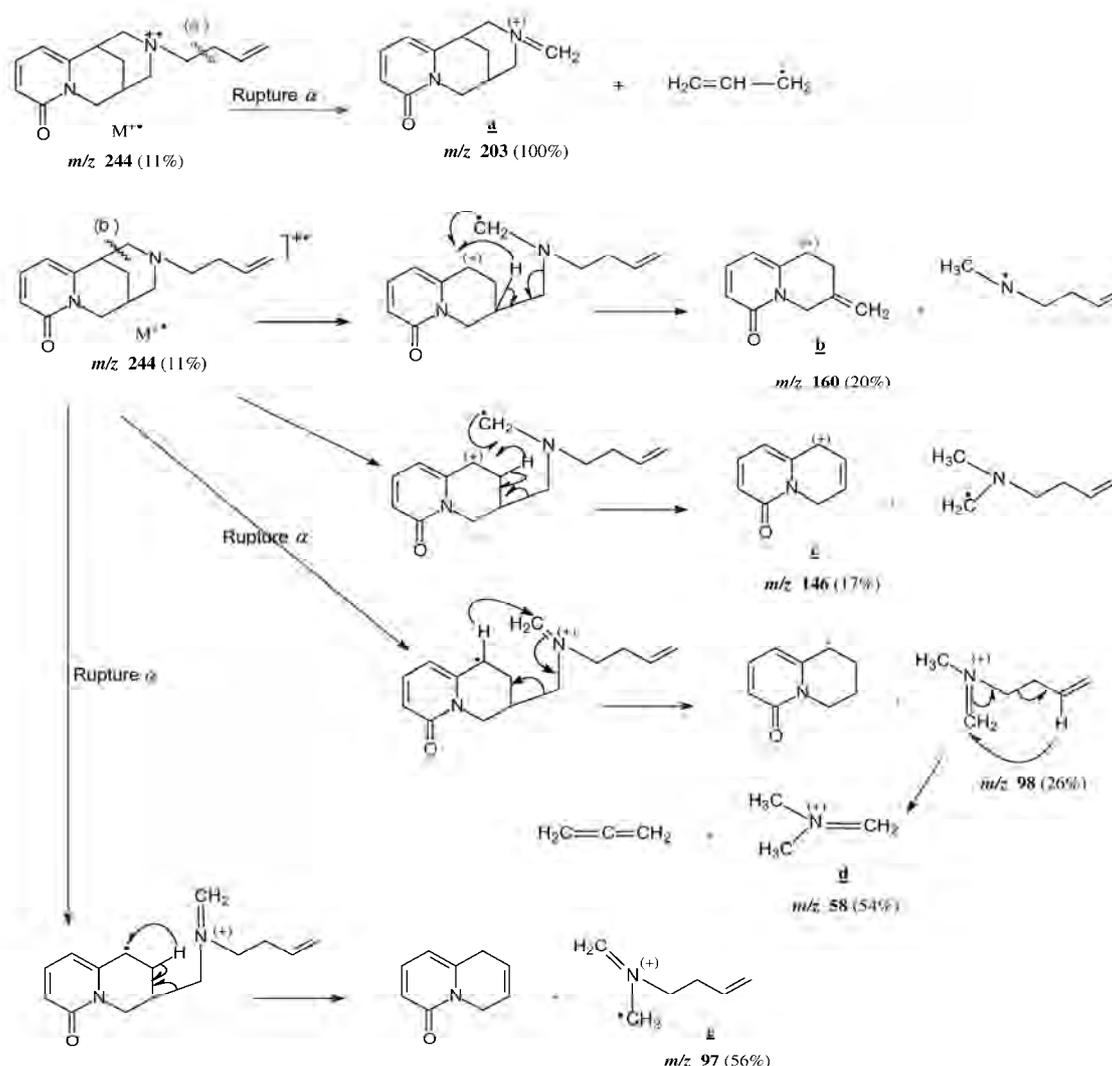
RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
2158	244 (11)	203(100), 97(56), 58(54), 160(20), 146(17)

Le spectre de masse en impact électronique du composé **rhombifoline (III.1.5)** révèle un ion moléculaire à  $m/z$  244  $[M]^+$  (**Fig.III.6**) qui correspond à une de formule brute  $C_{15}H_{20}N_2O$  avec un degré d'insaturation de 7. Le spectre de masse montre un pic de base  $m/z$  203 caractéristique d'une structure  $\alpha$ -pyridonique tricyclique d'un alcaloïde de type quinolizidine di-azoté.



**Figure III.6.** Spectre de masse de la rhombifoline (III.1.5).

Pour la formation des principaux fragments de la rhombifoline (**Fig.III.7**), on propose une première rupture  $\alpha$  suivant la voie (a) qui mène à la formation du pic **a**  $m/z$  203  $[M-C_3H_5]^+$ . En deuxième lieu, une rupture est proposée selon la voie (b) et qui donne deux ions fragments relativement faibles **b**  $m/z$  160  $[M-C_5H_{10}N]^+$ , et **c**  $m/z$  146  $[M-C_6H_{12}N]^+$ . En plus, la rupture selon la seconde voie va engendrer deux autres ions fragments assez intenses puisqu'ils sont issus d'une rupture  $\alpha$ : **e**  $m/z$  97  $[M-C_9H_9NO]^+$ , et après un réarrangement de Mc Lafferty le pic **d**  $m/z$  58  $[M-C_{12}H_{12}NO]^+$ .



**Figure III.7.** Proposition de fragmentation de la rhombifoline avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

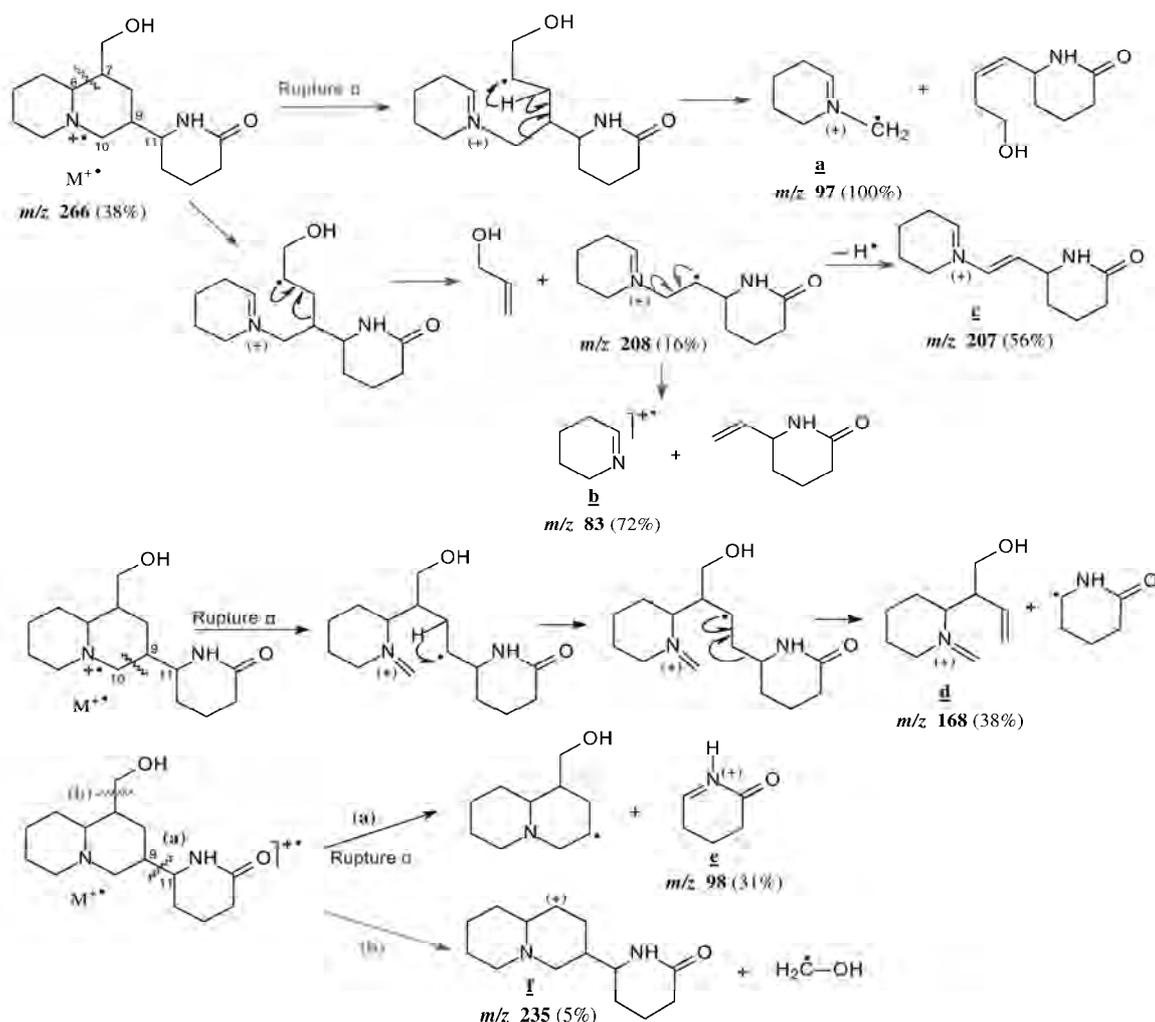
### - Pohakuline

**Formule brute:**  $C_{15}H_{26}N_2O_2$ , **M** = 266 g/mol.

RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
2549	266(38)	97(100), 83(72), 207(56), 168(38), 98(31), 235(5)

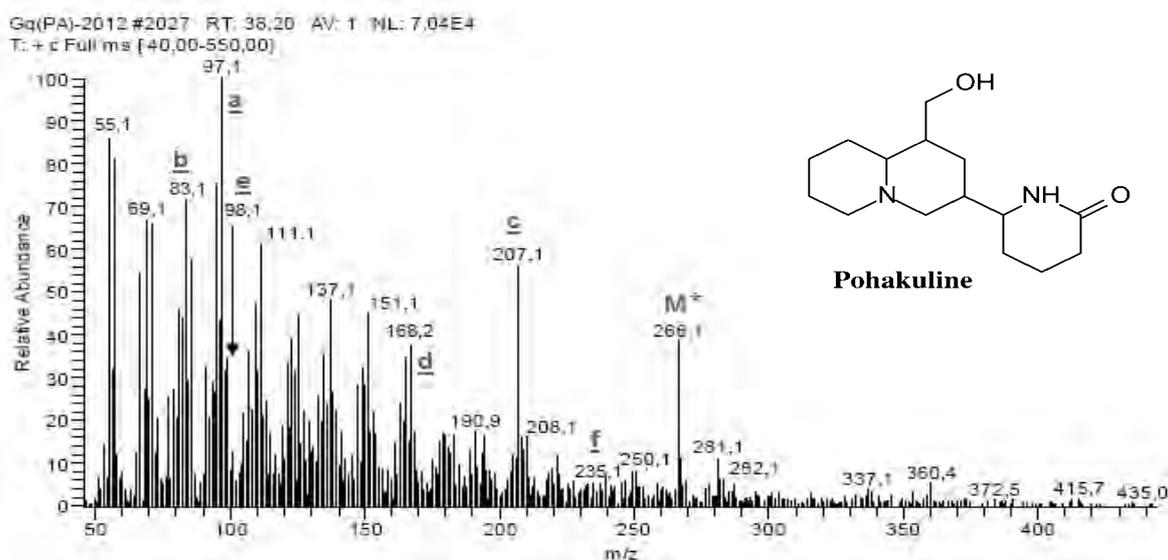
## Mécanisme de fragmentation

Pour la formation des fragments caractéristiques de la pohakuline, on suggère une rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> (**Fig.III.8**) qui permet d'obtenir le pic de base **a**  $m/z$  97 [M-C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> ainsi que deux autres ions fragments de plus faibles intensités **b**  $m/z$  83 [M-C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> et **c**  $m/z$  207 [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O]<sup>+</sup>. Une autre rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> va engendrer l'ion fragment **d**  $m/z$  168 [M-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NO]<sup>+</sup>, alors qu'une troisième rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>, va permettre d'avoir le pic **e**  $m/z$  98 [M-C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>NO]<sup>+</sup>. Pour le pic **f**  $m/z$  235, son obtention se fait via la perte du fragment radical CH<sub>2</sub>OH.



**Figure III.8.** Proposition de fragmentation de la pohakuline avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

Le spectre de masse en impact électronique de la **pohakuline (III.1.6)** révèle un ion moléculaire à  $m/z$  266 [M]<sup>+</sup> (**Fig.III.9**) qui correspond à une de formule brute C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec un degré d'insaturation de 4. En plus, le spectre de masse montre un pic de base  $m/z$  97 indiquant une structure tricyclique d'un alcaloïde de type quinolizidine di-azoté.

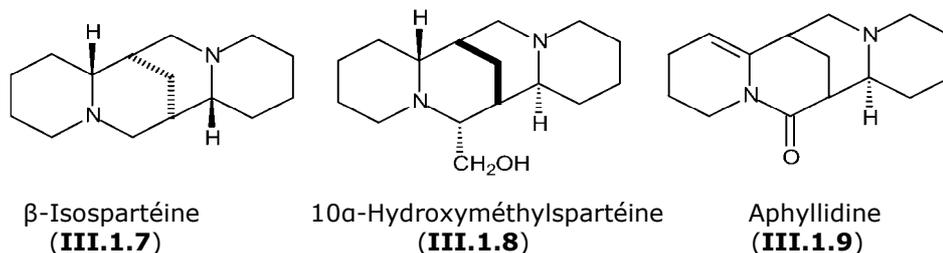


**Figure III.9.** Spectre de masse de la pohakuline (III.1.6).

### III.1.1.1.3. Composés tétracycliques

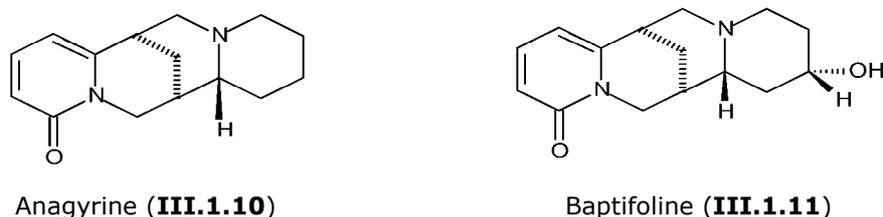
#### ▪ Type-spartéine

Trois composés de type spartéine ont été identifiés: la  $\beta$ -isopartéine ( $m/z$  234), la 10 $\alpha$ -hydroxyméthylspartéine ( $m/z$  264) et l'aphyllidine ( $m/z$  246).



#### ▪ type $\alpha$ -pyridone

Deux molécules de type  $\alpha$ -pyridone ont été identifiées: l'anagrine ( $m/z$  244) et la baptifoline ( $m/z$  260).

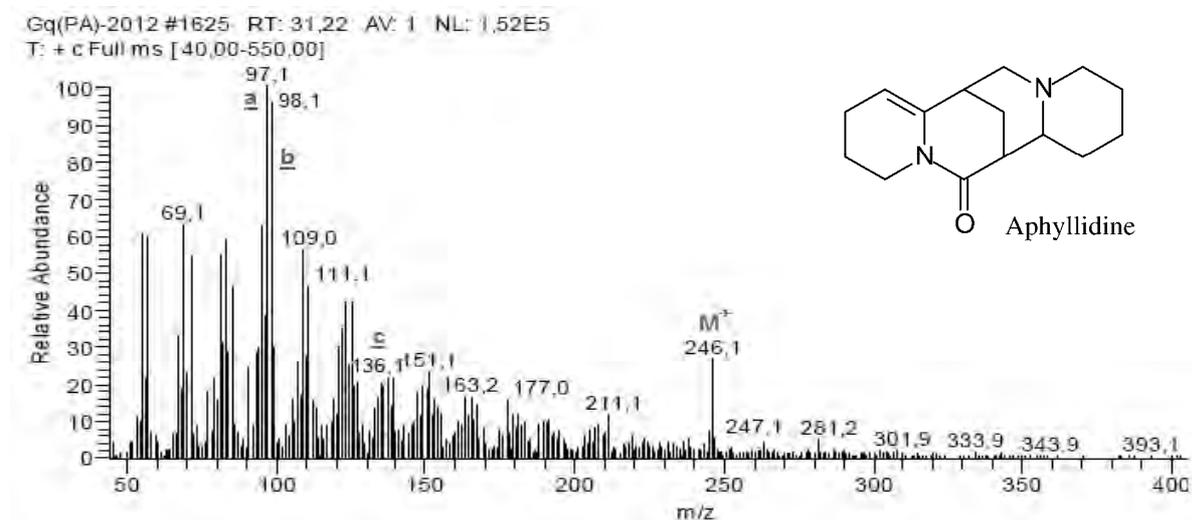


#### - Aphyllidine

Formule brute:  $C_{15}H_{22}N_2O$ ,  $M = 246$  g/mol.

RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
2122	246 (27)	97(100), 98(96), 136(19)

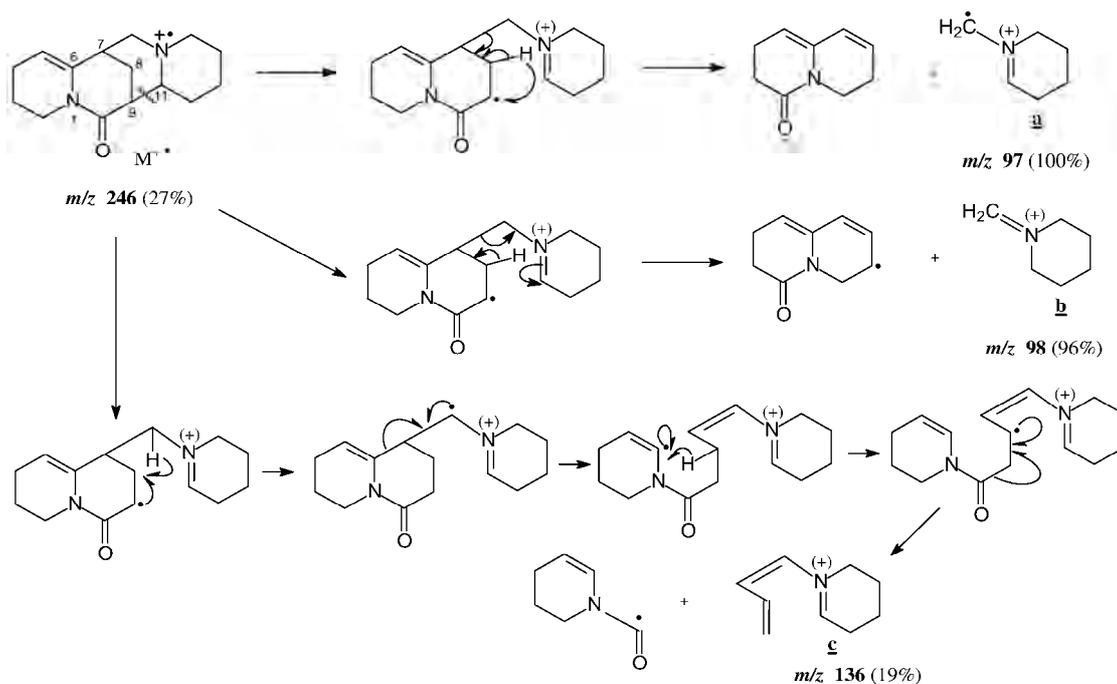
Le spectre de masse en impact électronique de l'aphyllidine (**III.1.9**) révèle un ion moléculaire à  $m/z$  246  $[M]^+$  (**Fig.III.10**) qui correspond à une de formule brute  $C_{15}H_{22}N_2O$  avec un degré d'insaturation de 6. Le spectre de masse de ce composé montre un pic de base  $m/z$  97 caractéristique d'une structure tétracyclique d'un alcaloïde de type quinolizidine di-azoté.



**Figure III.10.** Spectre de masse de l'aphyllidine (**III.1.9**).

### Mécanisme de fragmentation

Pour la formation des fragments caractéristiques de l'aphyllidine, on propose une rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison  $C_9-C_{11}$  qui aboutit aux pics **a**  $m/z$  97  $[M-C_9H_{11}NO]^+$ , **b**  $m/z$  98  $[M-C_9H_{10}NO]^+$  et **c**  $m/z$  136  $[M-C_6H_8NO]^+$  (**Fig.III.11**).



**Figure III.11.** Proposition de fragmentation de l'aphyllidine avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

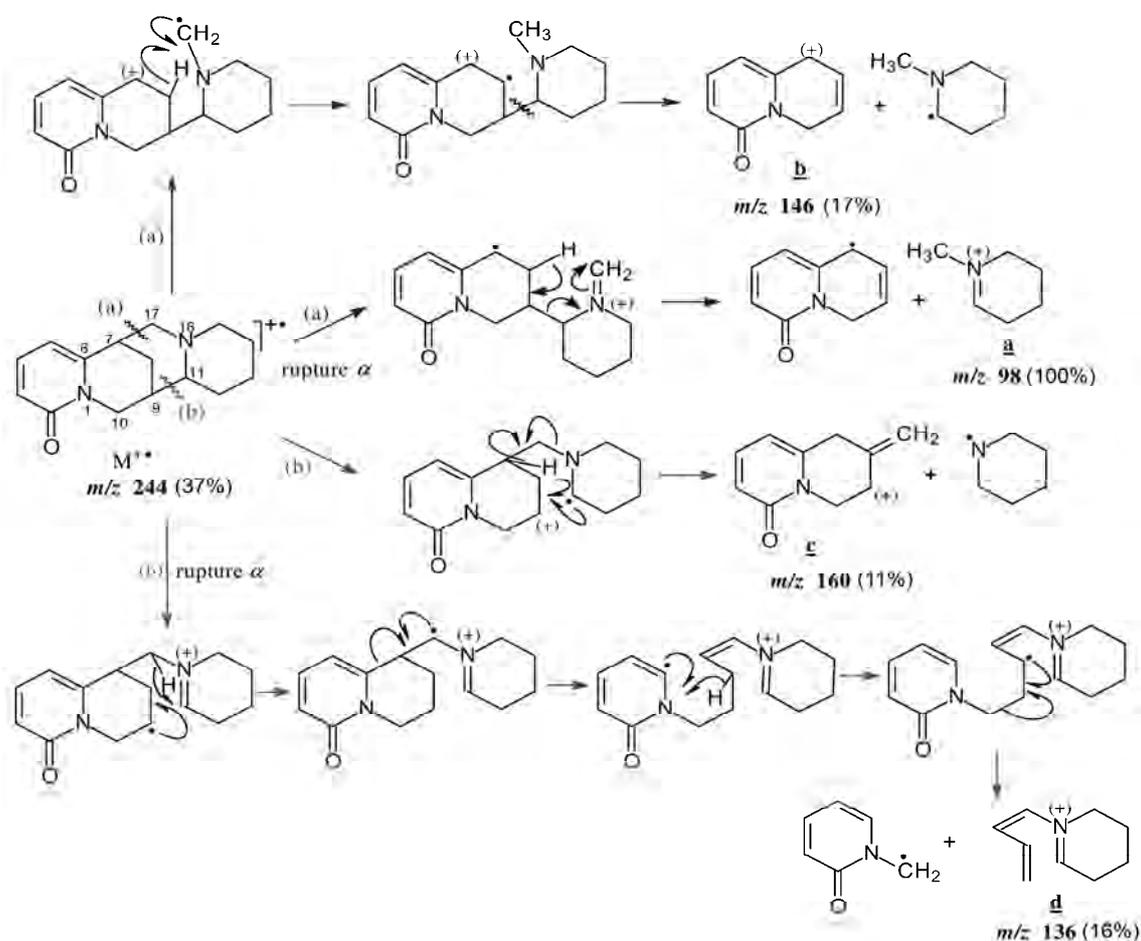
## - Anagyridine

Formule brute:  $C_{15}H_{20}N_2O$ ,  $M = 244$  g/mol.

RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
2400	244 (37)	98(100), 146(17), 136(16), 160(11)

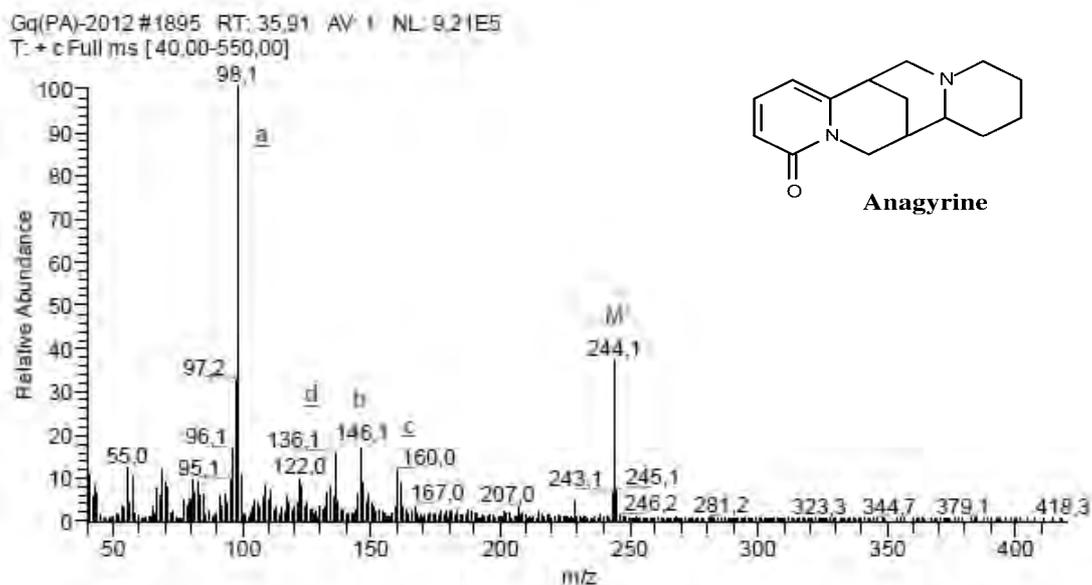
### Mécanisme de fragmentation

Pour la formation des fragments caractéristiques de l'anagyridine, on suggère une première rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison  $C_7-C_{17}$  qui donne le pic de base **a**  $m/z$  98 [ $M-C_9H_8NO$ ] $^+$ , et un autre pic plus faible **b**  $m/z$  146 [ $M-C_6H_{12}N$ ] $^+$  (Fig.III.12). Une deuxième rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison  $C_9-C_{11}$  va engendrer les ions **c**  $m/z$  160 [ $M-C_5H_{10}N$ ] $^+$  et **d**  $m/z$  136 [ $M-C_6H_6NO$ ] $^+$ .



**Figure III.12.** Proposition de fragmentation de l'anagyridine avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

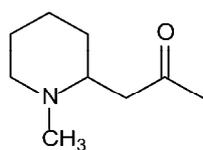
Le spectre de masse en impact électronique de l'anagyridine (III.1.10) révèle un ion moléculaire à  $m/z$  244 [ $M$ ] $^+$  (Fig.III.13) qui correspond à une de formule brute  $C_{15}H_{20}N_2O$  avec un degré d'insaturation de 7. Le spectre de masse montre un pic de base  $m/z$  98 indiquant une structure  $\alpha$ -pyridonique tétracyclique d'un alcaloïde de type quinolidine di-azoté.



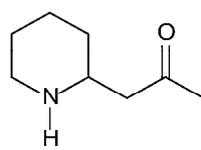
**Figure III.13.** Spectre de masse de l'anagryne (III.1.10).

### III.1.1.2. Alcaloïdes pipéridiniques

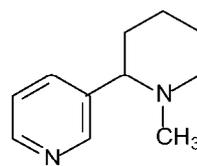
Les alcaloïdes pipéridiniques (PAs) dérivent de la lysine qui est le même précurseur des (QAs) (Nowacki, 1975b). C'est la raison pour laquelle, fréquemment les alcaloïdes pipéridiniques sont détectés dans le genre *Genista* comme alcaloïdes minoritaires en plus des alcaloïdes quinolizidiniques, tels que l'ammodendrine et l'hystrine (**Tableau I.5**) identifiées dans *G. hystrix* (Steinegger, 1970), et la *N*-méthylammodendrine dans *G. burdensis* (Tosun, 1987a). Dans cette présente étude, *G. quadriflora* a révélé la présence de 5 PAs: la *N*-méthylpelletière ( $m/z$  155), la pelletière ( $m/z$  141), la *N*-méthylanabasine ( $m/z$  176), l'hystrine ( $m/z$  164) et la *N*-méthylammodendrine ( $m/z$  222).



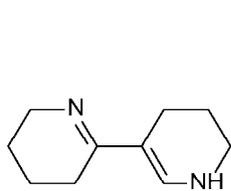
*N*-Méthylpelletière (**III.1.12**)



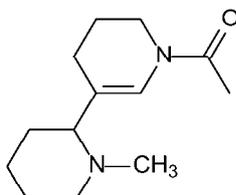
Pelletière (**III.1.13**)



*N*-méthylanabasine (**III.1.14**)



Hystrine (**III.1.15**)



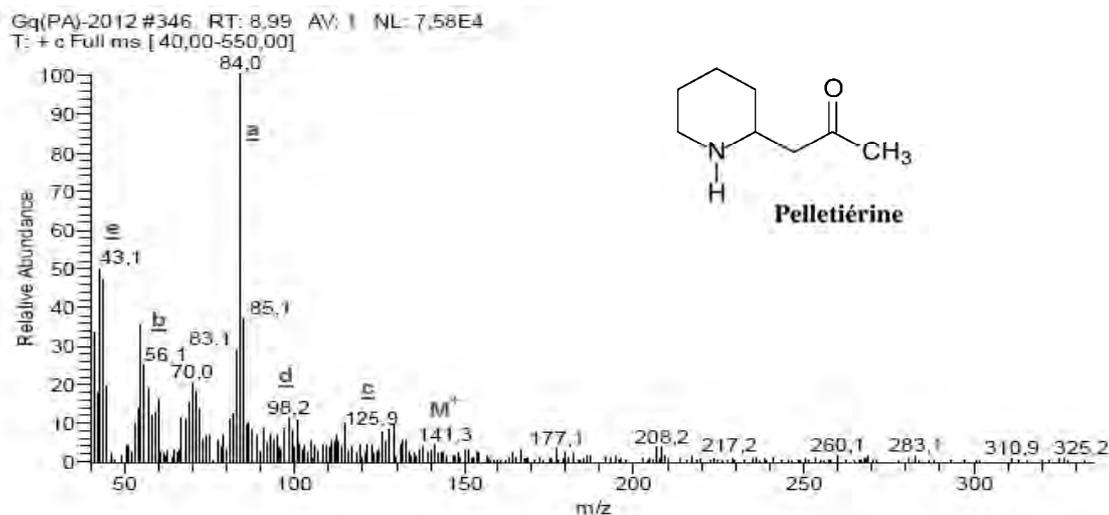
*N*-Méthylammodendrine (**III.1.16**)

## - Pelletière

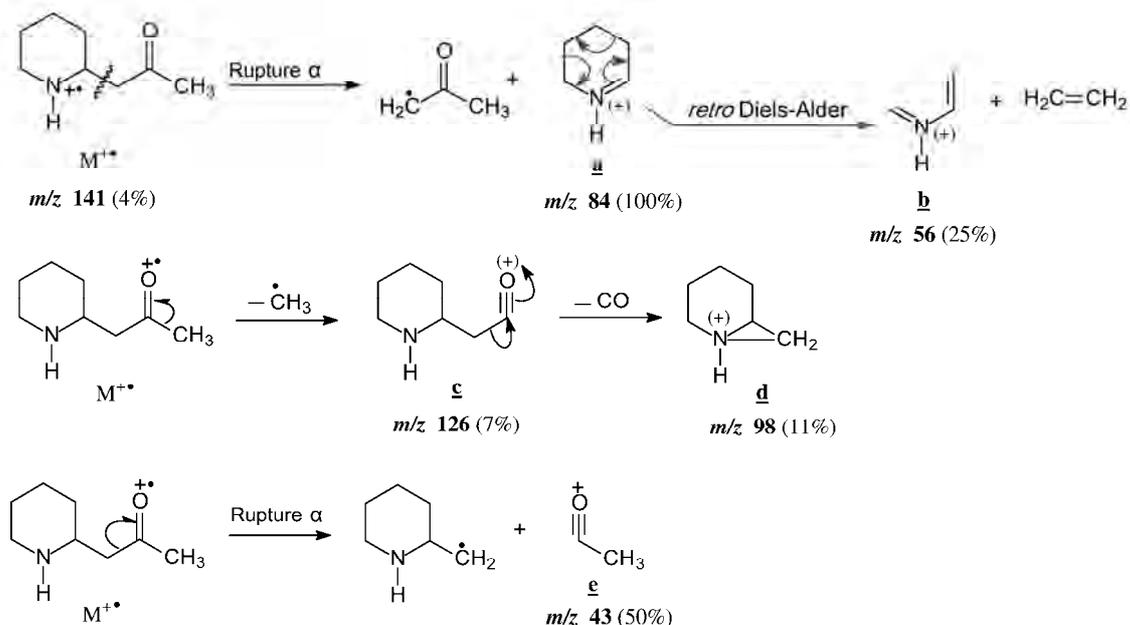
Formule brute:  $C_8H_{15}NO$ ,  $M = 141$  g/mol.

RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
1122	141(4)	84(100), 43(50), 56(25), 98(11), 126(7)

Le spectre de masse en impact électronique de la **pelletière (III.1.13)** révèle un ion moléculaire à  $m/z$  141 [ $M$ ]<sup>+</sup> (**Fig.III.14**) qui correspond à une de formule brute  $C_8H_{15}NO$  avec un degré d'insaturation de 2. Le spectre de masse montre un pic de base  $m/z$  84 indiquant une structure monocyclique d'un alcaloïde de type pipéridine mono-azoté.



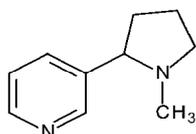
## Mécanisme de fragmentation



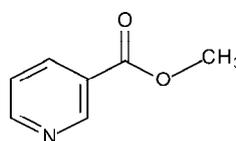
Pour la formation des fragments caractéristiques de la nicotine, on suggère une rupture  $\alpha$  par rapport à la fonction amine qui permet d'obtenir le pic de base **a**  $m/z$  84  $[M-C_3H_5O]^+$ . Par la suite, une réaction type *retro* Diels-Alder va donner l'ion fragment **b**  $m/z$  56  $[M-C_2H_4]^+$ . Par ailleurs, une première rupture  $\alpha$  par rapport à la fonction carbonyle va engendrer le pic **c**  $m/z$  126  $[M-CH_3]^+$ , puis une perte de CO à partir de cet ion va permettre d'aboutir au pic **d**  $m/z$  98. Une deuxième rupture  $\alpha$  par rapport à la fonction carbonyle, va conduire à la formation du fragment **e**  $m/z$  43  $[M-C_6H_{12}N]^+$  (**Fig.III.15**).

### III.1.1.3. Alcaloïdes nicotiques

C'est un type d'alcaloïdes peu commun dans le genre *Genista*, pourtant la nicotine et la nornicotine ont déjà été isolés dans la famille des Légumineuses (Clement, 1997). Notre étude nous a permis d'aboutir à l'identification de la nicotine ( $m/z$  162) dans *G. quadriflora*, en plus d'un dérivé de l'acide nicotinique: le nicotinate de méthyle ( $m/z$  137).



Nicotine (**III.1.17**)



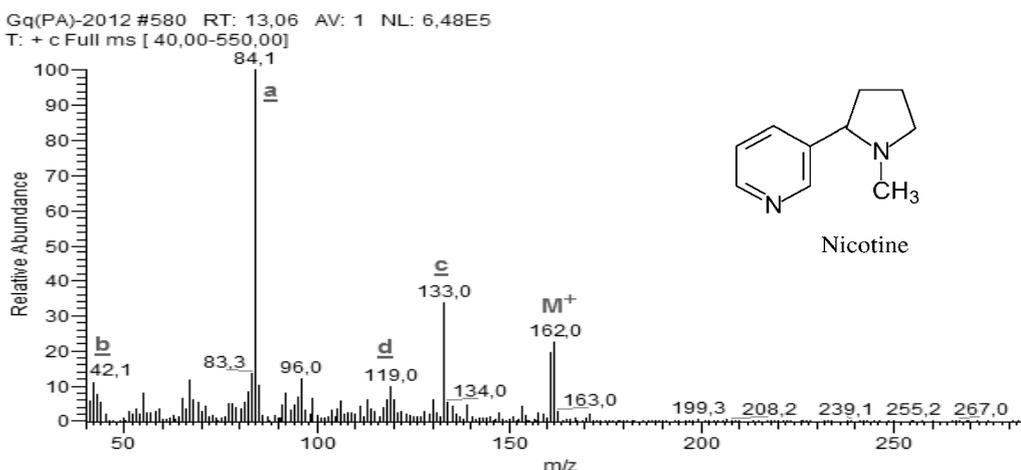
Nicotinate de méthyle (**III.1.18**)

#### - Nicotine

Formule brute:  $C_{10}H_{14}N_2$ ,  $M = 162$  g/mol.

RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
1282	162(22)	84(100), 133(34), 42(11), 119(10)

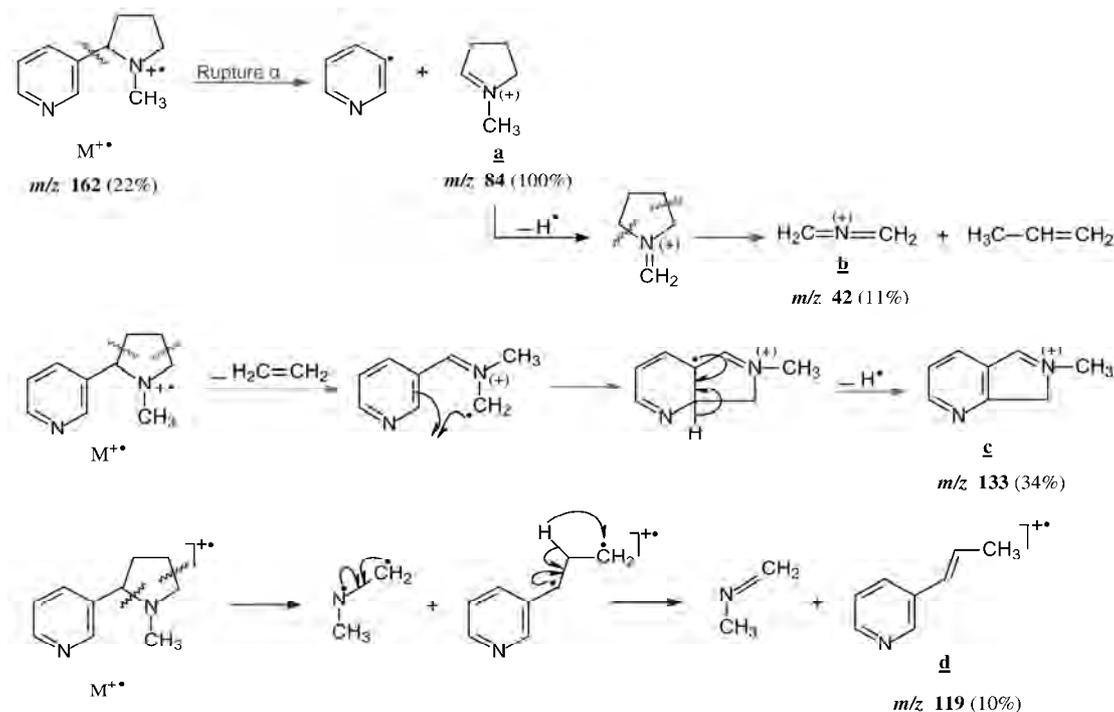
Le spectre de masse en impact électronique de la nicotine (**III.1.17**) révèle un ion moléculaire à  $m/z$  162  $[M]^+$  (**Fig.III.16**) qui correspond à une de formule brute  $C_{10}H_{14}N_2$  avec un degré d'insaturation de 5. Le spectre de masse montre un pic de base  $m/z$  84 indiquant une structure bicyclique d'un alcaloïde pyridinique di-azoté.



**Figure III.16.** Spectre de masse de la nicotine (III.1.17).

## Mécanisme de fragmentation

Pour la formation des fragments caractéristiques de la nicotine, on suggère une rupture  $\alpha$  qui permet d'obtenir le pic de base **a**  $m/z$  84  $[M-C_5H_4N]^+$ ; ce dernier en subissant une double rupture va conduire à la formation du fragment **b**  $m/z$  42  $[M-C_8H_{10}N]^+$ . D'autre part, les doubles ruptures de l'ion radical parent, suivies de réarrangements selon le mécanisme proposé, permettent d'aboutir aux fragments **c**  $m/z$  133  $[M-C_2H_5]^+$  et **d**  $m/z$  119  $[M-C_2H_5N]^+$  (**Fig.III.17**).

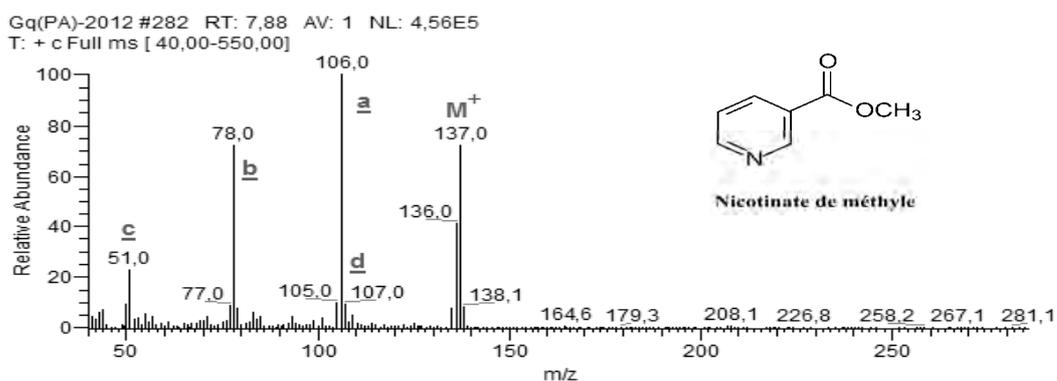


**Figure III.17.** Proposition de fragmentation de la nicotine avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

## - Nicotinate de méthyle

Formule brute:  $C_7H_7NO_2$ ,  $M = 137$  g/mol.

RI	EI-MS, $m/z$ , abondance %	
	$M^+$	Ions caractéristiques
1075	137(73)	98(100), 78(72), 51(23), 107(9)

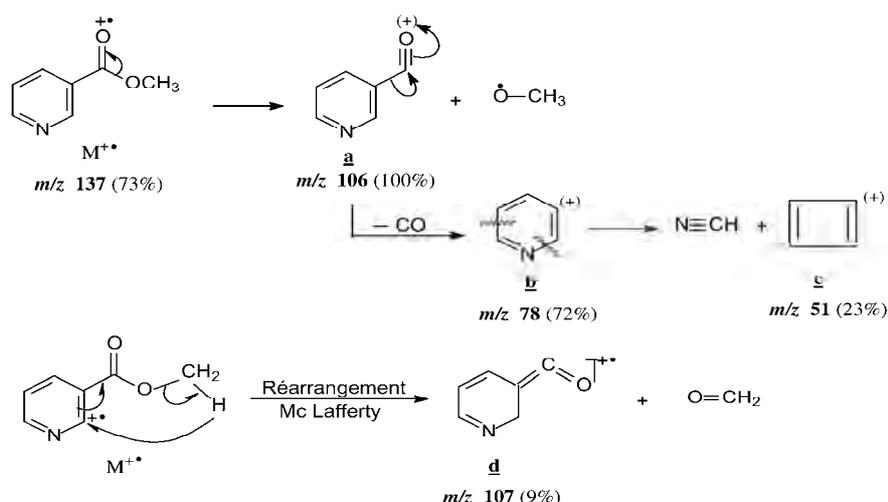


**Figure III.18.** Spectre de masse du nicotinate de méthyle (III.1.18).

Le spectre de masse en impact électronique du **nicotinate de méthyle (III.1.18)** révèle un ion moléculaire à  $m/z$  137  $[M]^{+\bullet}$  (**Fig.III.18**) qui correspond à une de formule brute  $C_7H_7NO_2$  avec un degré d'insaturation de 5. Le spectre de masse montre un pic de base  $m/z$  106 indiquant une structure monocyclique d'un dérivé de l'acide nicotinique à noyau pyridinique mono-azoté.

### Mécanisme de fragmentation

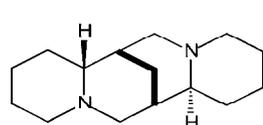
Pour la formation des fragments caractéristiques du nicotinate de méthyle, on suggère une rupture  $\alpha$  par rapport à la fonction carbonyle qui permet d'obtenir le pic de base **a**  $m/z$  106  $[M-OCH_3]^+$ . Une perte de CO va générer le pic **b**  $m/z$  78. Suite à cela, une double rupture du fragment **b** va engendrer l'ion fragment **c**  $m/z$  51  $[M-C_3H_4NO_2]^+$ . D'autre part, un réarrangement de Mc Lafferty permet d'aboutir au pic **d**  $m/z$  107  $[M-CH_2O]^+$  (**Fig.III.19**).



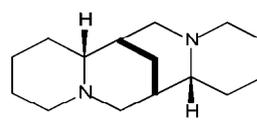
**Figure III.19.** Proposition de fragmentation du nicotinate de méthyle avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

### III.1.2. Identification des alcaloïdes dans les racines

L'analyse GC-MS a permis d'identifier 10 alcaloïdes dans l'extrait des racines récoltées en 2010 (RA10AL), en pleine floraison de la plante. Trois structures d'alcaloïdes pipéridiniques (PAS), la *N*-méthylpelletièreine (**III.1.12**), la pelletièreine (**III.1.13**) et l'hystrine (**III.1.15**). Ainsi que, sept structures d'alcaloïdes quinolizidiniques, la lusitanine (**III.1.2**), la *N*-méthyltétrahydrocytisine (**III.1.3**), la tétrahydrocytisine (**III.1.4**), la 10 $\alpha$ -hydroxyméthylspartéine (**III.1.8**) et l'aphyllidine (**III.1.9**), la spartéine (**III.1.19**) et son isomère l' $\alpha$ -isospartéine (**III.1.20**) à  $m/z$  234. Le nicotinate de méthyle (**III.1.18**), a également été identifié dans les racines.

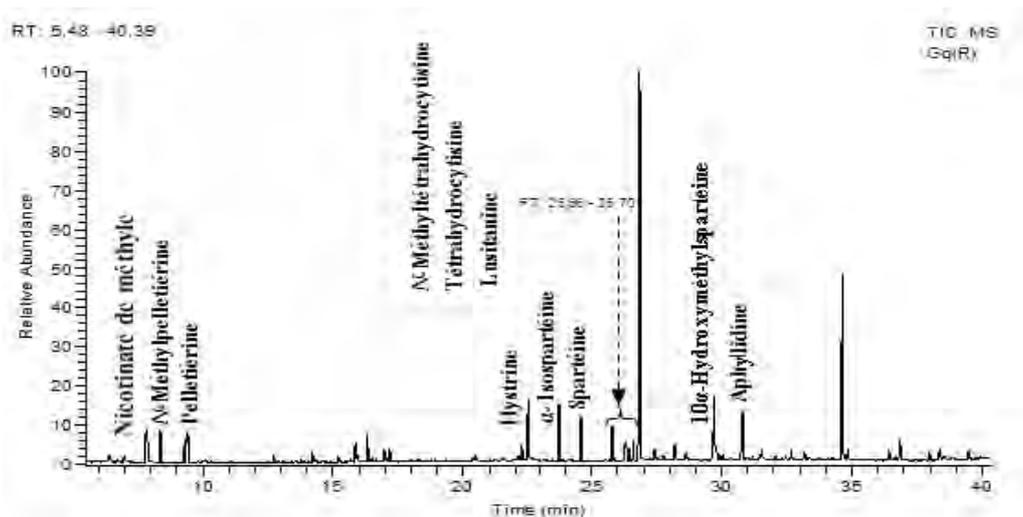


Spartéine (**III.1.19**)



$\alpha$ -Isospartéine (**III.1.20**)

La **Figure III.20** révèle le profil GC-MS représentatif du contenu alcaloïdique des racines (en plus de quelques esters et aldéhydes).



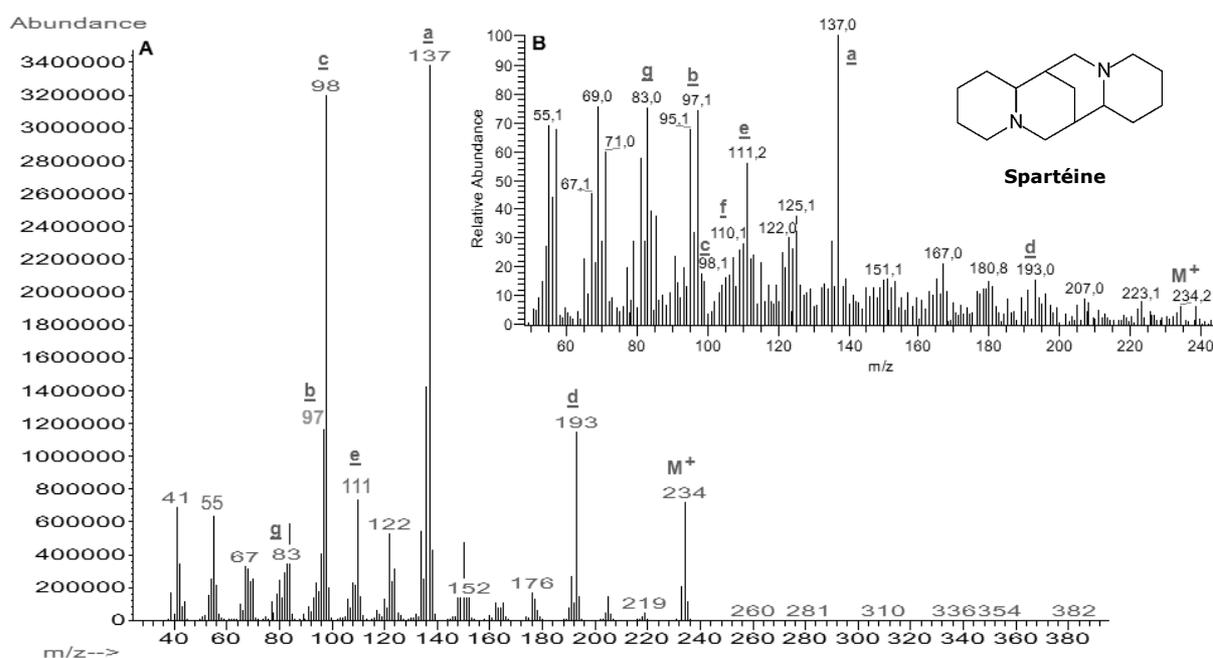
**Figure III.20.** Chromatogramme GC-MS de l'extrait alcaloïdique (RA10AL) des racines de *Genista quadriflora*.

### - Sparteïne

**Formule brute:  $C_{15}H_{26}N_2$ , M = 234 g/mol.**

RI	EI-MS, m/z, abondance %	
	M <sup>+</sup>	Ions caractéristiques
1779	234(7)	137(100), 97(74), 98(18), 83(75), 111(56), 110(28)

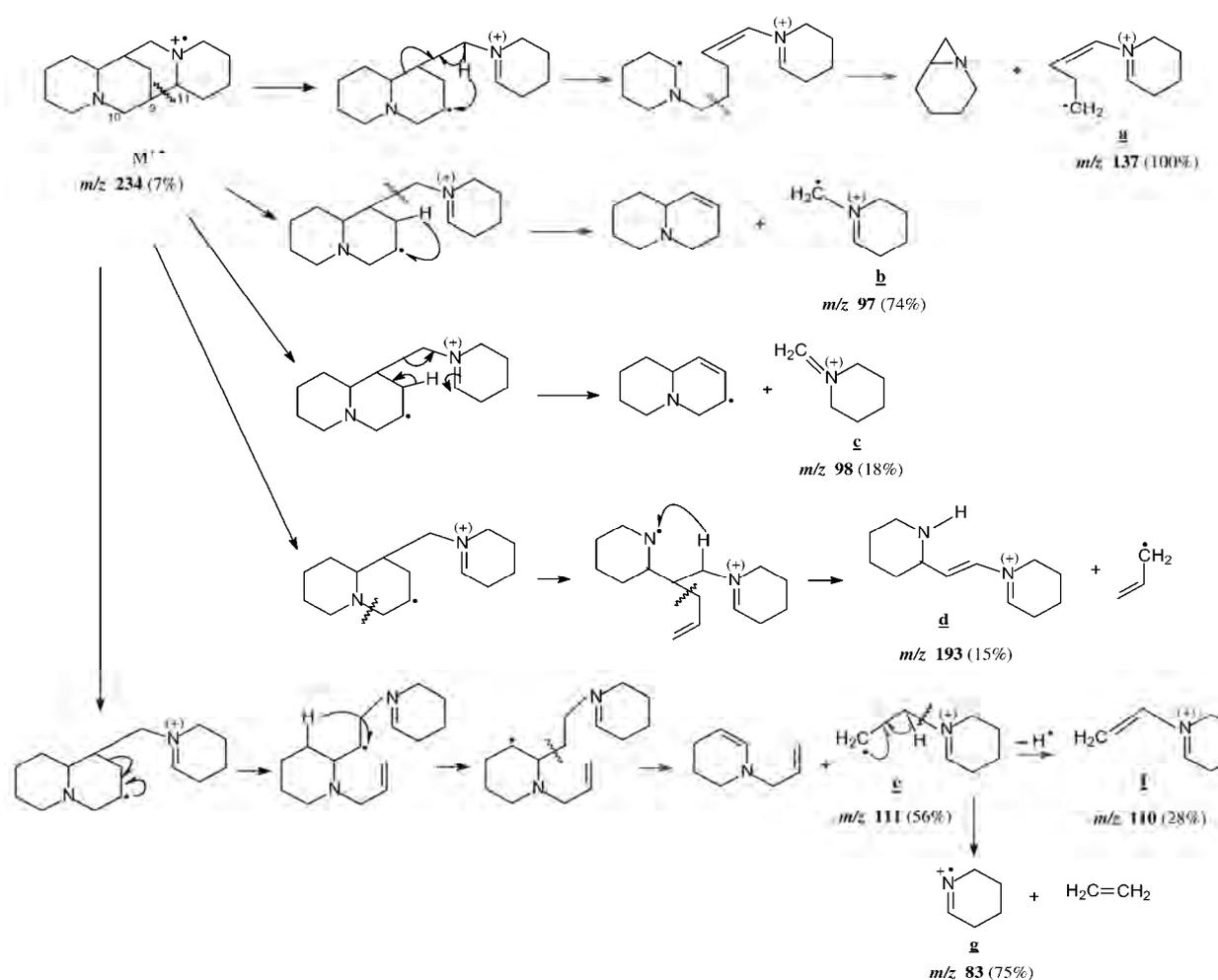
Le spectre de masse en impact électronique de la **sparteïne (III.1.19)** révèle un ion moléculaire à  $m/z$  234 [M]<sup>+</sup> (**Fig.III.21**) qui correspond à une de formule brute  $C_{15}H_{26}N_2$  avec un degré d'insaturation de 4. Le spectre de masse montre un pic de base  $m/z$  137 indiquant une structure tétracyclique d'un alcaloïde de type quinolizidine di-azoté.



**Figure III.21.** Spectres de masse de la sparteïne (III.1.19). A: spectre du composé témoin; B: spectre du composé isolé de *G. quadriflora*.

## Mécanisme de fragmentation

Pour la formation des fragments caractéristiques de la spartéine, on suggère une première rupture  $\alpha$  au niveau de la liaison C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>, suivie de réarrangements et d'autres ruptures (**Fig. III.22**) permettant l'obtention du pic de base **a**  $m/z$  137 [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N]<sup>+</sup>. La formation des fragments **b**  $m/z$  97 [M-C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>N]<sup>+</sup>, **c**  $m/z$  98 [M-C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, **d**  $m/z$  193 [M-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, **e**  $m/z$  111 [M-C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>N]<sup>+</sup>, **f**  $m/z$  110 [M-C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup> et **g**  $m/z$  83 [M-C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N]<sup>+</sup> se fait selon les ruptures et les réarrangements présentés ci-dessous.



**Figure III.22.** Proposition de fragmentation de la spartéine avec les principaux fragments obtenus en GC-EIMS.

Pour l'extrait alcaloïdique des parties aériennes récoltées en 2009, au début de la floraison de la plante, seuls 3 composés ont été détectés: l'anagryne (**III.1.10**), la pelletiérine (**III.1.13**) et le nicotinate de méthyle (**III.1.18**). Pour l'extrait alcaloïdique des racines (RA09AL), trois composés ont été détectés sous forme de traces: la 10 $\alpha$ -hydroxyméthylspartéine (**III.1.8**), la pelletiérine (**III.1.13**) et le nicotinate de méthyle (**III.1.18**).

Les données GC-MS des alcaloïdes identifiés dans l'espèce *G. quadriflora* sont indiquées dans le **Tableau III.1**. Les indices de rétentions (RI) ont été calculés à partir de l'équation de Van Den Dool et Kratz. Les fragmentations caractéristiques ainsi que les références bibliographiques nous ont permis de confirmer les structures alcaloïdiques proposées.

**Tableau III.1.** Alcaloïdes identifiés dans *Genisia quadriflora* par GC-EIMS. M<sup>+</sup>: Ion moléculaire; RI: Indice de rétention; PA: Parties aériennes (2010 et 2009); R: Racines (2010 et 2009); + : Présent; - : Absent; \* Composés nouveaux dans le genre *Genisia*.

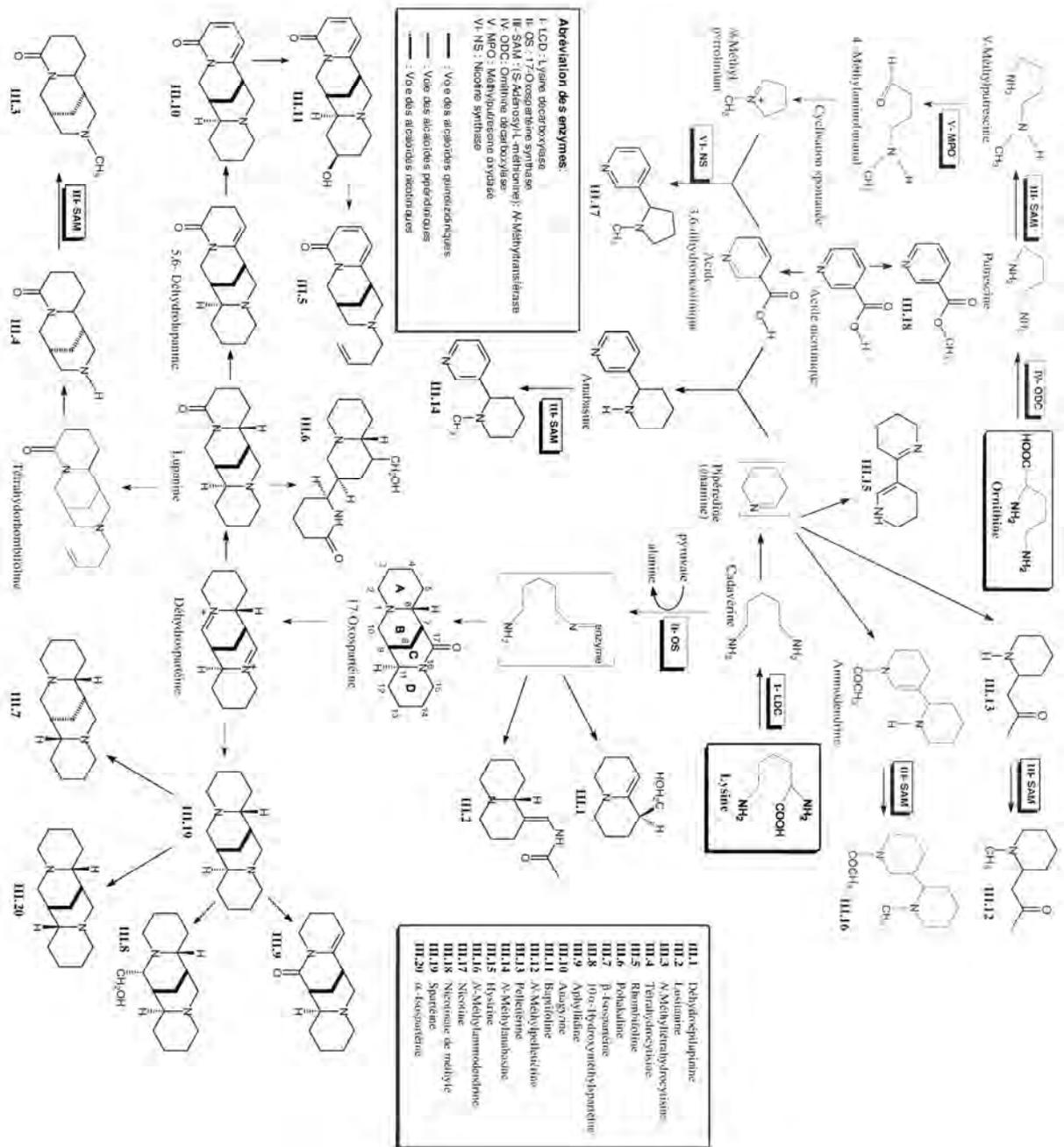
Alcaloïdes	RI	M <sup>+</sup>	Ions caractéristiques (abondance %)	PA10	PA09	R10	R09	Réf.
Nicotinate de méthyle	1075	137	106(100), 78(72), 137(73), 136, 51(23), 107(9)	+	+	+	+	Muralidhar 2007
N-Méthylpelletérine	1098	155	98(100), 70(66), 96(20), 112(12), 155(9)	+	-	+	-	Stevens 1992
Pelletérine	1122	141	84(100), 43(50), 56(25), 98(11), 126(7), 141(4)	+	+	+	+	Stevens 1992
Nicotine*	1282	162	84(100), 133(34), 162(22), 42(11), 119(10)	+	-	-	-	Wink 1986
N-Méthylanabasmine*	1403	176	97(100), 119(24), 176(13), 147(11), 175(9)	+	-	-	-	Fitch 1974
Déhydroépipilupinine*	1442	167	98(100), 97(60), 136(59), 167(37), 108(19)	+	-	-	-	Wink 1995
Hysirine	1668	164	163(100), 164(57), 107(39), 108(18), 149(15)	+	-	+	-	Wink 1995
$\alpha$ -Isospartéine	1729	234	97(100), 98(33), 84(32), 137(30), 234(13)	-	-	+	-	Greinwald 1992
Spartéine	1779	234	137(100), 97(74), 98(18), 83(75), 193(15), 234(7)	-	-	+	-	Greinwald 1995a
N-Méthyltétrahydrocytisine*	1802	208	95(100), 109(62), 96(42), 208(39), 58(32)	+	-	+	-	Greinwald 1995b
$\beta$ -Isospartéine	1831	234	137(100), 97(62), 55(55), 84(25), 234(5)	+	-	-	-	Greinwald 1991
N-Méthylammodendrine	1836	222	97(100), 222(59), 136(46), 207(29), 150(29)	+	-	-	-	Wink 1995
Tétrahydrocytisine*	1861	194	95(100), 82(42), 194(25), 150(21)	+	-	+	-	Wink 1995
Lustanine	1870	208	136(100), 135(94), 166(88), 179(18), 208(2)	+	-	+	-	Wink 1995
10 $\alpha$ -Hydroxyméthylspartéine	2028	264	98(100), 111(63), 137(45), 110(41), 264(13)	+	-	+	+	Tosun 1994
Aphyllidine*	2122	246	97(100), 98(96), 246(27), 136(19)	+	-	+	-	Wink 1995
Rhombifoline	2158	244	203(100), 97(56), 58(54), 160(20), 146(17), 244(11)	+	-	-	-	Greinwald 1995a
Anagyriine	2400	244	98(100), 244(37), 146(17), 136(16), 160(11)	+	+	-	-	Wink 1995
Pohakouline*	2549	266	97(100), 83(72), 207(56), 266(38), 168(38), 110(32)	+	-	-	-	Kadooka 1976
Baptifoline	2627	260	98(100), 114(62), 96(56), 260(22), 160(12)	+	-	-	-	El-Shazly 2001

### II.1.3. Considérations biosynthétiques et discussion

- L'étude du profil alcaloïdique de l'espèce algérienne *G. quadriflora* montre une grande diversité dans les structures. Nos résultats sont en accord avec les études publiées sur l'investigation des alcaloïdes des différentes espèces du genre *Genista* (**Tableaux I.3.a, -b, -c, -d**, et **Tableau I.5**). En effet, les alcaloïdes quinolizidiniques qui sont des marqueurs chimio-taxonomiques significatifs pour le genre, ont été identifiés comme les principaux composés alcaloïdiques dans l'espèce étudiée.
- D'autres études ont déjà reporté l'anagyridine (**III.1.10**) comme étant l'alcaloïde le plus abondant dans les espèces du genre *Genista*, accompagné par la lupanine et la spartéine (**III.1.19**) (Erdemoglu 2009; Küçükboyaci, 2012). Notre étude confirme ces résultats à l'exception de la lupanine qui n'a pas été détectée dans *G. quadriflora*. Par ailleurs, la présence de la voie  $\alpha$ -pyridone est confirmée par la détection de l'anagyridine (**III.1.10**), de la rhombifoline (**III.1.5**) et de la baptifoline (**III.1.11**). La spartéine (**III.1.19**) souvent détectée comme l'alcaloïde majoritaire dans plusieurs espèces du genre *Genista* (Wink, 1983a), est présente dans l'espèce étudiée avec deux isomères: l' $\alpha$ -isospartéine (**III.1.20**) et la  $\beta$ -isospartéine (**III.1.7**). Il est également intéressant de signaler que les 5 QAs: déhydroépilupinine (**III.1**), *N*-méthyltétrahydrocytisine (**III.1.3**), tétrahydrocytisine (**III.1.4**), pohakuline (**III.1.6**) et aphyllidine (**III.1.9**) sont rapportés dans le genre *Genista* et sont des constituants assez rares pouvant être considérés comme des marqueurs pour *G. quadriflora*.
- Des alcaloïdes pipéridiniques dérivant du même précurseur lysine que les alcaloïdes quinolizidiniques (Nowacki, 1975b), et souvent cités comme alcaloïdes minoritaires dans le genre ont été identifiés dans *G. quadriflora*. Il s'agit de la *N*-méthylpelletière (**III.1.12**), la pelletière (**III.1.13**), la *N*-méthylanabasine (**III.1.14**), l'hystrine (**III.1.15**) et la *N*-méthylammodendrine (**III.1.16**), dont les trois premiers sont identifiés dans le genre pour la première fois.
- Des composés pyridiniques inédits dans le genre *Genista*, ont été également détectés dans *G. quadriflora*. Il s'agit de la nicotine (**III.1.17**) et le nicotinate de méthyle (**III.1.18**). Cependant, la nicotine est biosynthétisée dans les plantes à partir de l'ornithine.

Le **Schéma III.1**, représente une proposition des voies de biosynthèse conduisant à la formation des différents alcaloïdes identifiés dans *G. quadriflora*.

**Schéma III.1.** Voies de biosynthèse des alcaloïdes identifiés dans *Genista quadriflora*.



- Les alcaloïdes quinolizidiniques sont bio-synthétisés par la cyclisation de la cadavérine formée à partir de la lysine, en subissant une décarboxylation par l'enzyme *lysine décarboxylase* (**LDC**). Dans une seconde étape catalysée par l'enzyme *17-oxospartéine synthase* (**OS**), l'activation de l'étape principale, se fait en présence de pyruvate et de trois unités cadavérine. Sachant que pour les alcaloïdes bicycliques comme les deux composés déhydroépilupinine (**III.1.1**) et lusciane (**III.1.2**), leur biosynthèse se fait par l'incorporation de deux unités cadavérine (Rana, 1986).
- La spartéine n'est pas le précurseur direct, puisque la déhydrospartéine a été postulée comme précurseur commun aux deux alcaloïdes tétracycliques spartéine et lupanine pouvant être

synthétisés indépendamment (Wink, 1979a). Ainsi, quatre composés en plus de la spartéine (**III.1.19**) se trouvent synthétisés par cette voie dans *G. quadriflora*, identifiés comme étant les isomères  $\alpha$ -isospartéine (**III.1.20**) et  $\beta$ -isospartéine (**III.1.7**), 10 $\alpha$ -hydroxyméthylspartéine (**III.1.8**), et aphyllidine (**III.1.9**).

- Les relations biosynthétiques entre les QAs sont décrites sur le **Schéma III.1**. Ainsi, la formation de l'anagyrine se fait via la lupanine en passant par le composé 5,6-déhydrolupanine (Asres, 1986). Par la suite, une oxydation du noyau A conduit à la formation de l' $\alpha$ -pyridone, permettant la synthèse des alcaloïdes tétracycliques: anagyrine (**III.1.10**) et baptifoline (**III.1.11**). Puis, une ouverture du noyau D de la baptifoline aboutit à la formation de l'alcaloïde tricyclique: rhombifoline (**III.1.5**) (Saito, 1995).
- Les deux autres alcaloïdes tricycliques *N*-méthyltétrahydrocytisine (**III.1.3**) et tétrahydrocytisine (**III.1.4**) sont issus d'une éventuelle dégradation de la lupanine en alcaloïdes tricycliques en donnant en premier lieu le composé tétrahydrorhombifoline (Greinwald, 1995b). La *N*-méthyltétrahydrocytisine est obtenue sous l'action de l'enzyme *N*-méthyl transférase (**SAM**), et ceci par un transfert d'un groupement méthyle de la *S*-adénosyl-*L*-méthionine vers la tétrahydrocytisine (Wink, 1984a). Pour l'alcaloïde tricyclique pohakuline (**III.1.6**) qui a la particularité de ne pas avoir tous les cycles "pontés", sa formation pourrait être générée par rupture de la liaison N<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> de la lupanine (Murakoshi, 1984).
- A partir de la lysine, précurseur des alcaloïdes quinolizidiniques, les alcaloïdes de type pipéridine sont également synthétisés en passant par l'intermédiaire cadavérine. Cet intermédiaire est oxydé pour former un noyau pipéridine conduisant aux composés *N*-méthylpelletièrene (**III.1.12**) et pelletièrene (**III.1.13**). Puis, une dimérisation du noyau pipéridine aboutit à la dipipéridine qui est à l'origine de l'hystrine (**III.1.15**) (Nowacki, 1975b). Par la suite, le transfert du groupement méthyle de la *S*-adénosyl-*L*-méthionine (Wink, 1984a) vers l'ammodendrine va conduire à la *N*-méthylammodendrine (**III.1.16**).
- La biosynthèse de la nicotine qui possède un noyau pyridinique lié à noyau pyrrolidinique se fait par une réaction de condensation de l'acide 3,6-dihydronicotinique avec le cation *N*-méthyl pyrrolinium.
  - Le noyau pyrrolidinique dérive de la putrescine formée à partir du précurseur ornithine par une décarboxylation catalysée par l'enzyme *ornithine décarboxylase* (**ODC**). L'étape suivante est une méthylation de la putrescine en *N*-méthylputrescine sous l'action de l'enzyme putrescine méthyltransférase (Smith, 1975). L'enzyme *N*-méthylputrescine oxydase (**MPO**) catalyse la conversion de la *N*-méthylputrescine en 4-méthylaminobutanal par cyclisation spontanée, conduit au cation *N*-méthyl pyrrolinium.
  - Pour la formation du noyau pyridinique, l'acide nicotinique est activé par réduction pour donner l'acide 3,6-dihydronicotinique qui est le véritable précurseur utilisé pour la biosynthèse du noyau pyridinique (Leete, 1983). La condensation de cet acide avec le

cation *N*-méthyl pyrrolinium ainsi que la décarboxylation, sont catalysées par l'enzyme *nicotine synthase* (Friesen, 1990; Shoji, 2002). Le point d'attachement du noyau pyrrolidinique sur le squelette du noyau pyridine, se fait en position C-3 après la perte du groupement carboxyle (Scott, 1967).

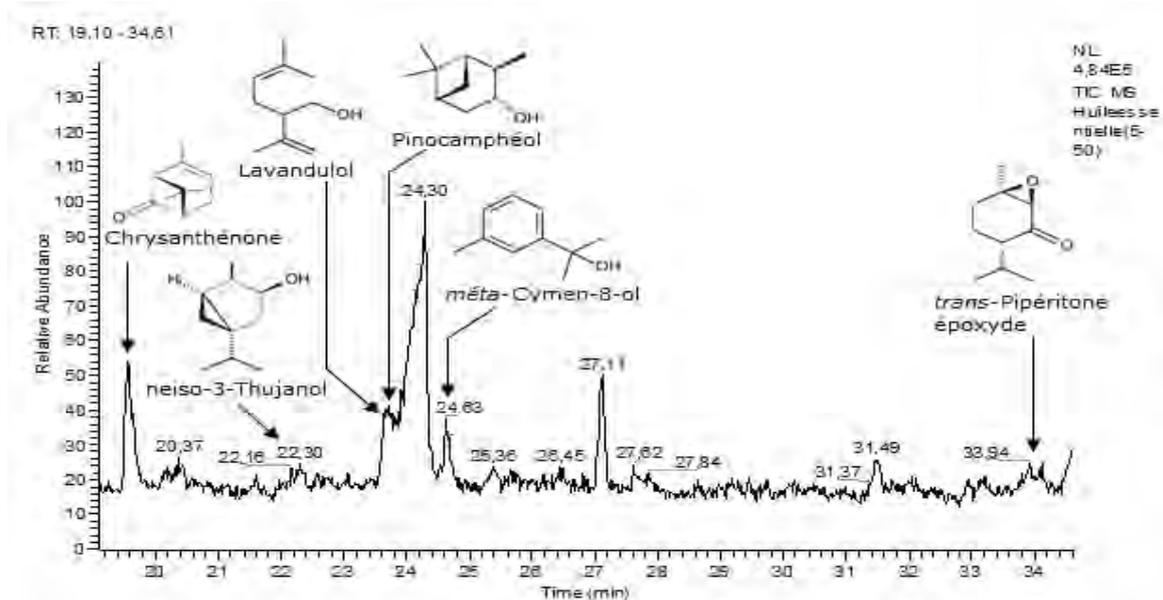
- Parallèlement à la nicotine, la *N*-méthylanabasine (**III.1.14**) est synthétisée via la décarboxylation et la condensation de l'acide 3,6-dihydronicotinique avec le noyau pipéridine dérivé de la lysine pour aboutir à l'anabasine qui subit une méthylation sous l'action de la *N*-méthyltransférase (**SAM**) (Bush, 2002).

## III.2. Analyse de l'huile essentielle de *Genista quadriflora*

La GC-EIMS est la méthode la plus couramment utilisée pour le dosage et l'identification des huiles essentielles. Les analyses ont été effectuées avec un chromatographe Thermo-Finnigan trace GC couplé à un détecteur de masse DSQ simple quadripôle avec une ionisation par impact électronique (EI) à 70 eV. La température de l'injecteur a été maintenue à 300 °C et celle de la source à 200 °C. Le gradient de température consistait en une première élévation de 55°C jusqu'à 100 °C, à 1 °C/min. La seconde élévation a été de 100°C jusqu'à 250 °C, à 5 °C/min. Puis la température a été maintenue à 250 ° pendant 15 min. La durée totale de l'analyse était de 90 min. L'huile essentielle a été diluée dans le méthanol à raison de 1/50 (v/v).

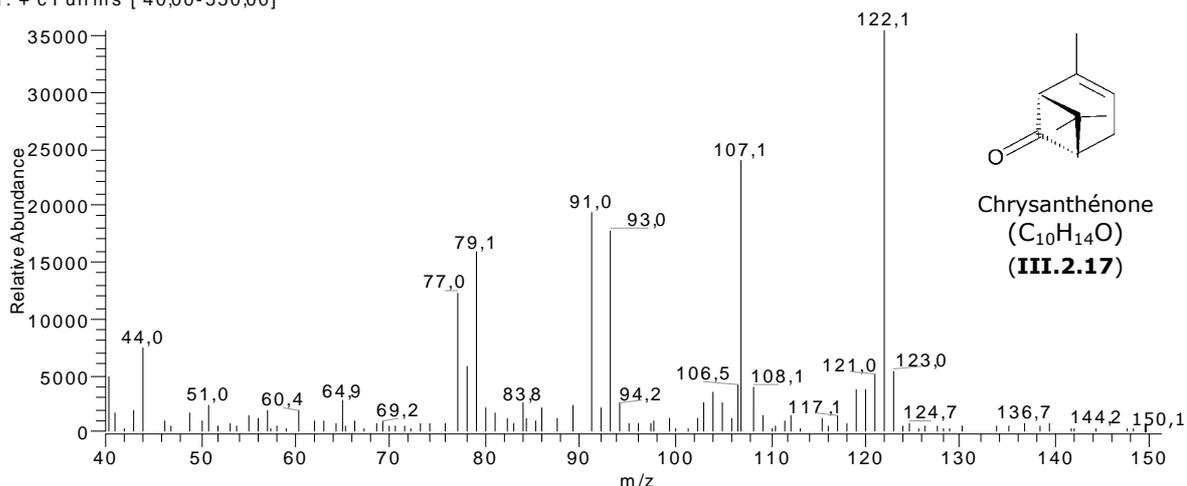
### III.2.1. Identification des monoterpènes

Les monoterpènes représentent 0.78 % de l'huile essentielle. Les composés majoritaires sont: la chrysanthénone (**III.2.17**) (0.07%) (**Fig.III.24**), le *trans*-pipéritone époxyde (**III.2.38**) (0.03%), le *neiso*-3-thujanol (**III.2.18**) (0.02%), le lavandulol (**III.2.21**) (0.02%), le pinocampheol (**III.2.23**) (0.02%), et le *méta*-cymen-8-ol (**III.2.25**) (0.02%) (**Fig.III.23**).



**Figure III.23.** Analyse GC-EIMS des monoterpènes majoritaires identifiés dans *Genista quadriflora*.

Huile essentielle(5-50) #955 RT: 19,57 AV: 1 NL: 3,53E4  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]

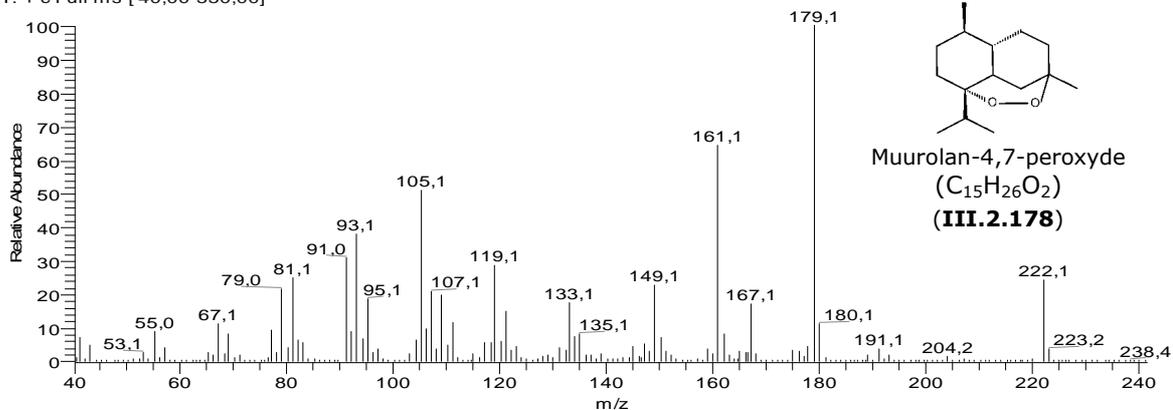


**Figure III.24.** Spectre de masse du monoterpène majoritaire chrysanthénone identifié dans *Genista quadriflora*.

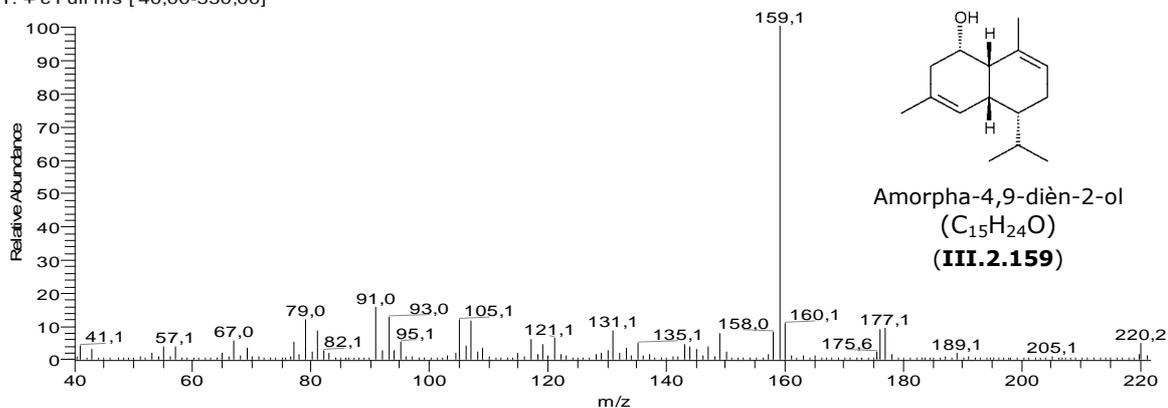
### III.2.2. Identification des sesquiterpènes

Les sesquiterpènes représentent 65.18% de l'huile essentielle et parmi ceux-ci, les composés majoritaires: muurolan-4,7-péroxyde (19.42%), amorpha-4,9-diène-2-ol (10.40%) (**Fig. III.25**) et d'autres composés indiqués sur le chromatogramme (**Fig.III.26**). Les spectres de masse de 12 sesquiterpènes sont joints dans l'**Annexe A.5**.

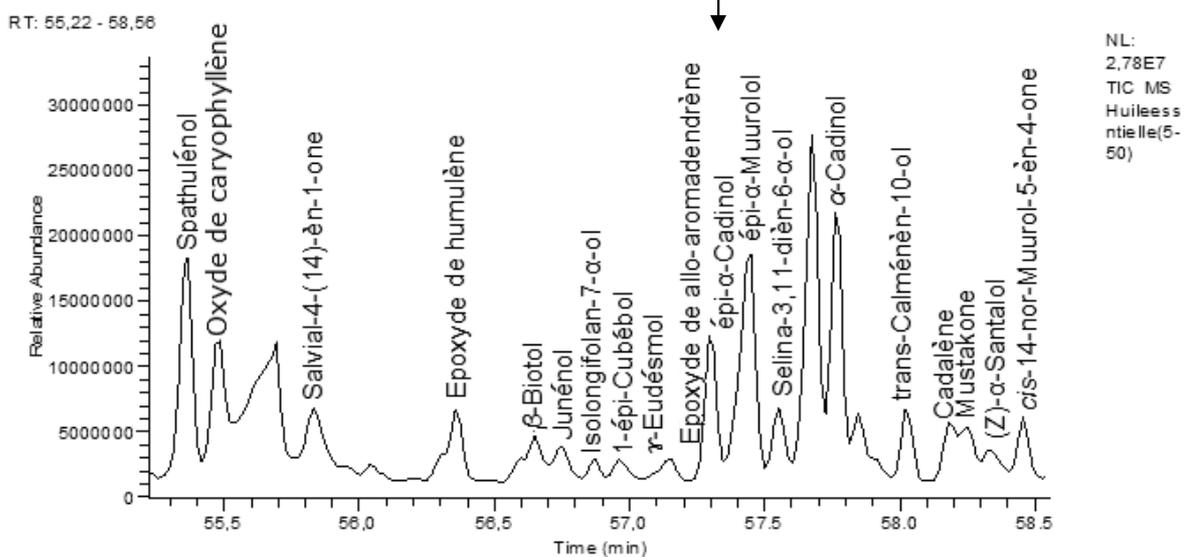
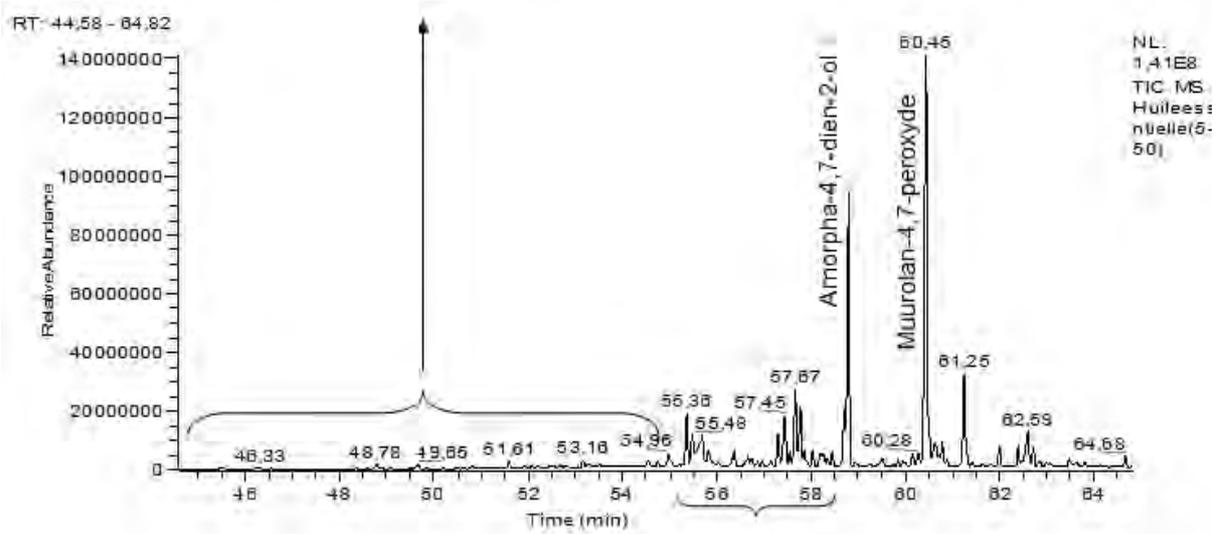
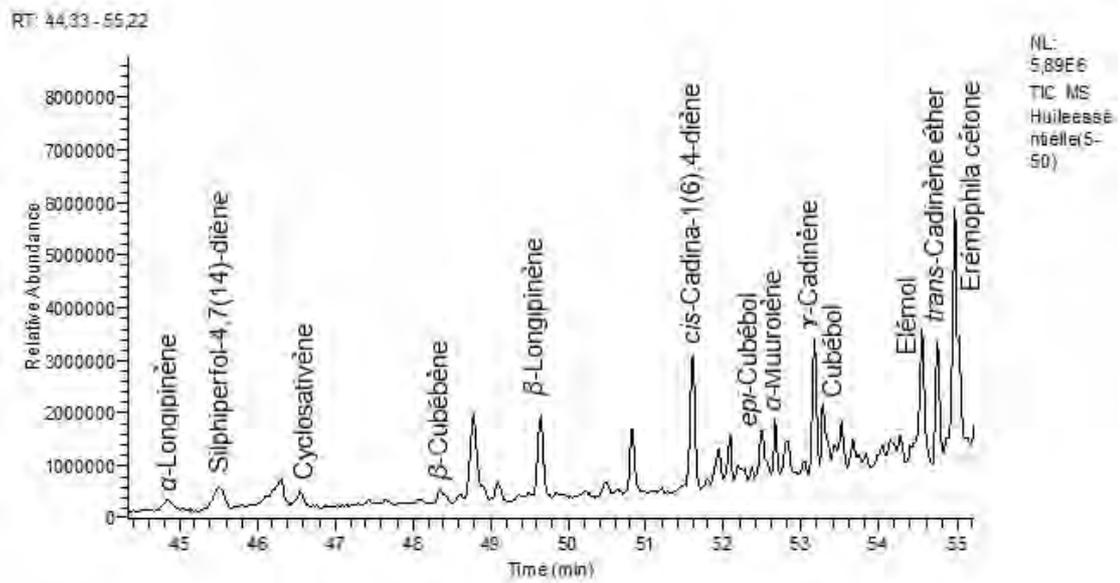
Huile essentielle(5-50) #3307 RT: 60,44 AV: 1 NL: 1,68E7  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



Huile essentielle(5-50) #3213 RT: 58,80 AV: 1 NL: 2,53E7  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



**Figure III.25.** Spectres de masse des deux sesquiterpènes majoritaires identifiés dans *Genista quadriflora*.

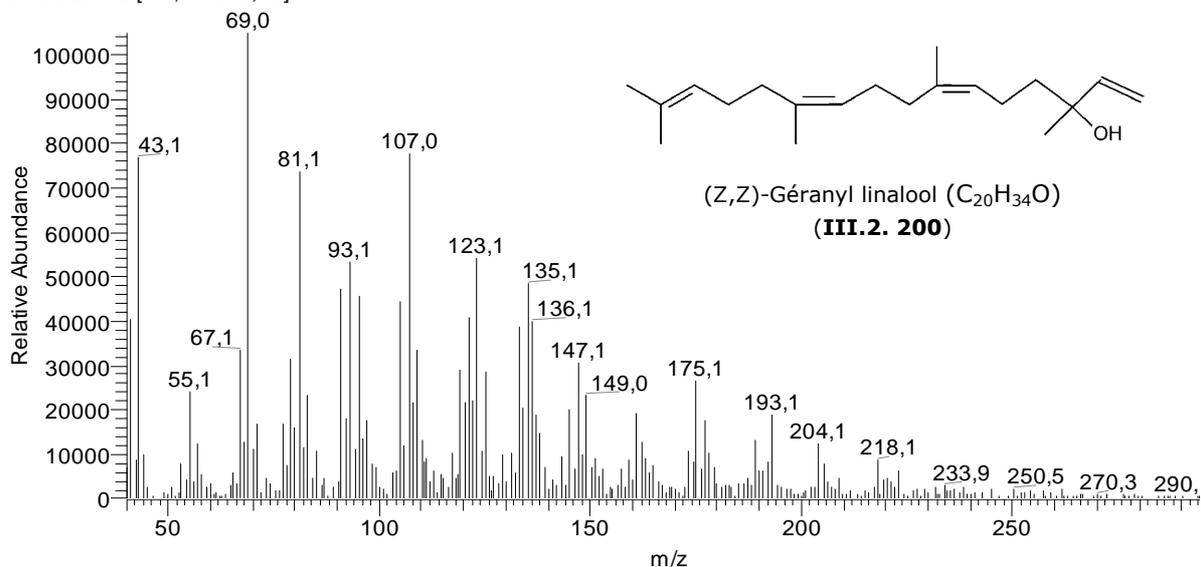


**Figure III.26.** Chromatogramme de quelques sesquiterpènes principaux identifiés dans *Genista quadriflora* par GC-EIMS.

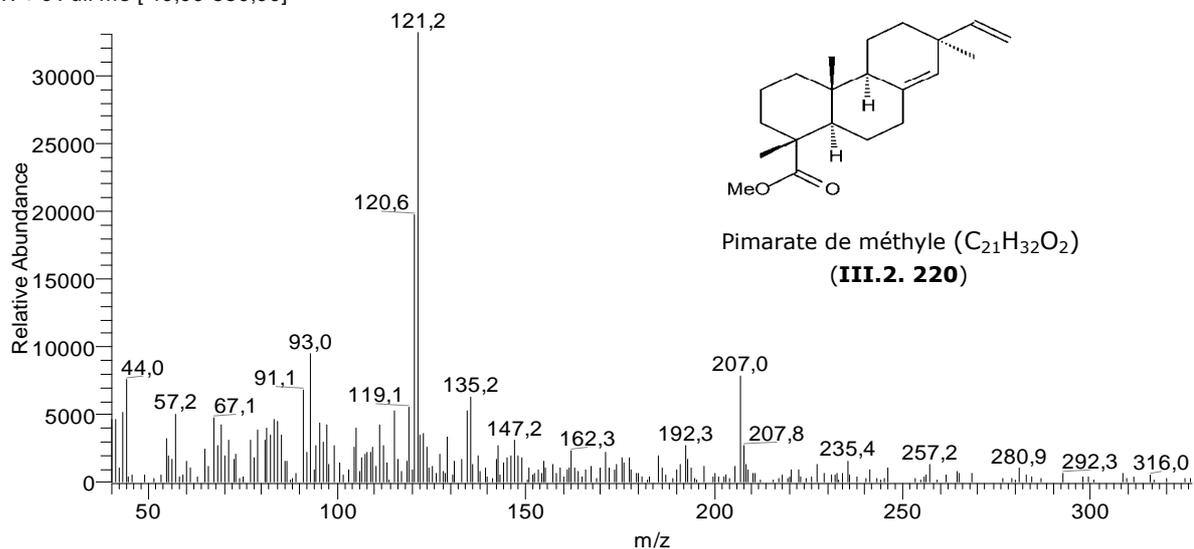
### III.2.3. Identification des diterpènes

Les diterpènes représentent 0.89 % de l'huile essentielle et parmi ceux-ci le (Z,Z)-géranyl linalool (0.34%), l'abiéta-8(14),13(15)-diène (0.22%) et le pimarate de méthyle (0.01%) (**Fig.III.27** et **Fig.III.28**).

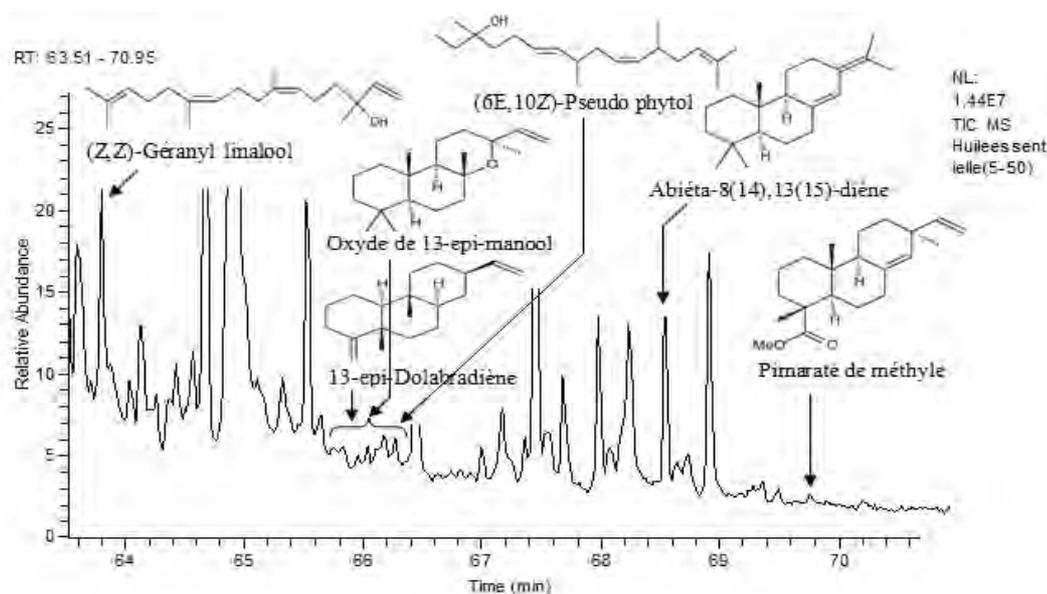
Huileessentielle(5-50) #3502 RT: 63,82 AV: 1 NL: 1,05E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



Huileessentielle(5-50) #3844 RT: 69,77 AV: 1 NL: 3,30E4  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



**Figure III.27.** Spectres de masse de deux diterpènes identifiés dans *Genista quadriflora* par GC-EIMS.



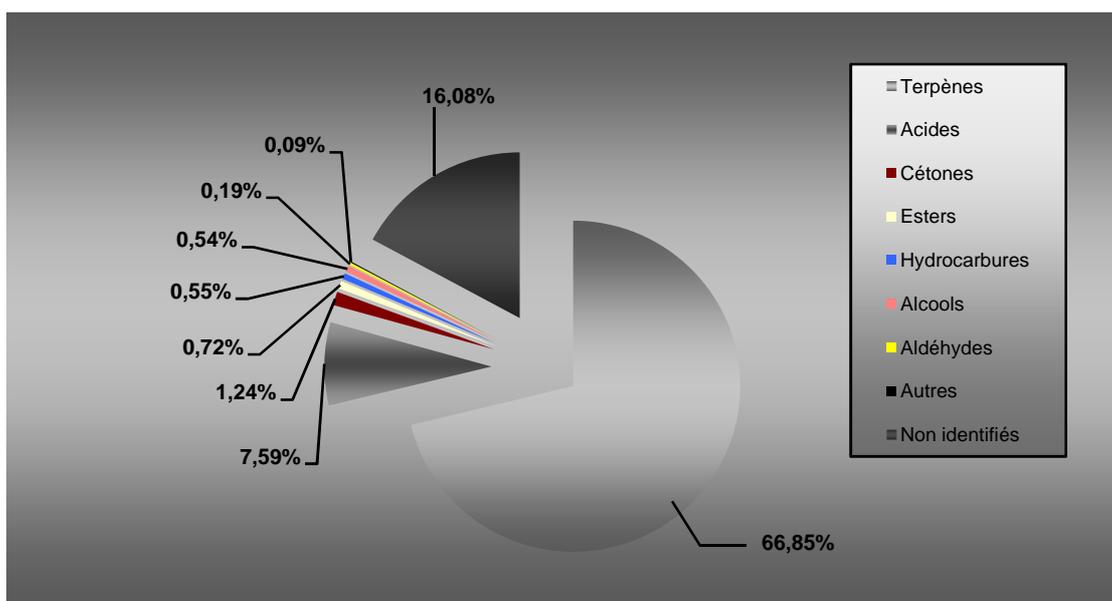
**Figure III.28.** Chromatogramme des diterpènes identifiés dans *G. quadriflora* par GC-EIMS.

#### III.2.4. Autres composés identifiés

- **Les acides** (7.59 % de l'huile) sont représentés par des acides gras saturés comme l'acide dodécanoïque (laurique) (3.14%), l'acide hexadécanoïque (palmitique) (2.49%) et l'acide tétradécanoïque (myristique) (1.12%). En plus, des acides gras insaturés ont également été identifiés comme l'acide oléique (0.09%) et l'acide linoléique (0.07%).
- **Les cétones** (1.24 % de l'huile) majoritaires sont représentées par la (E)-jasmone (0.3%) et la 2-heptadécanone (0.84%).
- **Les esters** (0.72 % de l'huile) majoritaires sont l'hexadécanoate d'éthyle (0.34%) et le benzoate de penthyle (0.2%).
- **Les aldéhydes** (0.19 % de l'huile) majoritaires identifiés sont le n-nonanal (0.15%) et l'*ortho*-tolualdéhyde (0.1%).
- **Les hydrocarbures** (0.55 % de l'huile) majoritaires identifiés sont le n-heneicosane (0.10%), le n-eicosane (0.08%) et le n-nonadécane (0.07%).
- **Les alcools** (0.54 % de l'huile). L'alcool majoritaire est le n-nonadécanol-1 (0.20%).
- **Divers** (0.09 % de l'huile). D'autres composés ont été également détectés parmi lesquels: l'*ortho*-vanilline (0.01%) et la myristicine (0.07%).
- **Composés non identifiés** (16.08 % de l'huile). Ce sont des composés non identifiés et dont les pourcentages sont supérieurs à 0.01%.

### III.2.5. Discussion

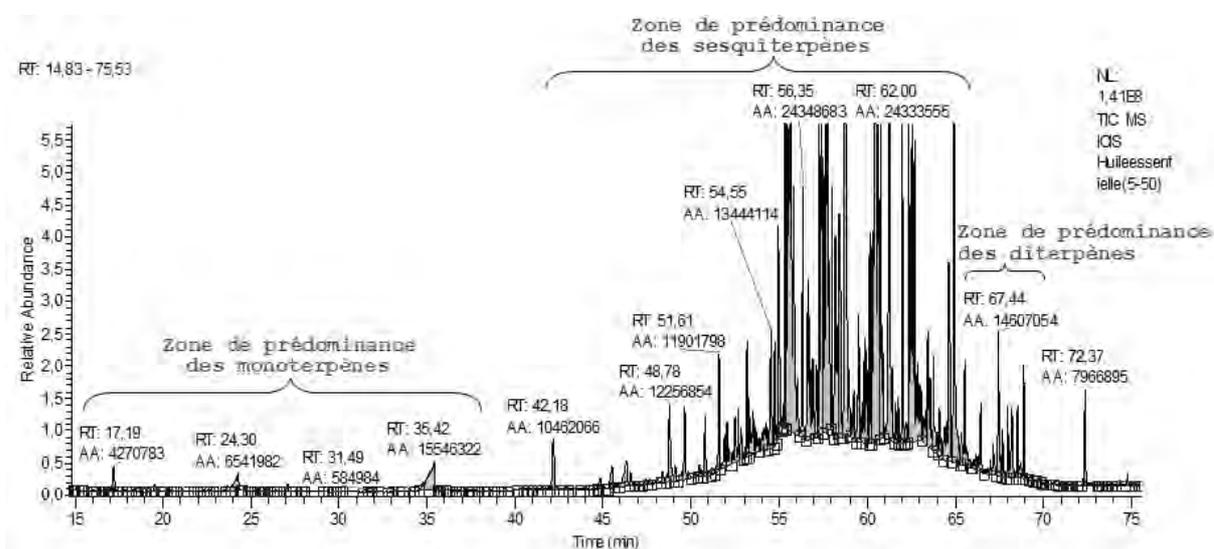
- Au terme de notre investigation sur la composition chimique de l'huile essentielle de *G. quadriflora*, 222 composés ont été identifiés représentant 77.77 % de la composition globale du mélange (**Tableaux III.2.a,-b,-c,-d**). Leurs structures sont indiquées en annexe (**Tableaux A.1,-2,-3,-4**).
- L'identification a été réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en impact électronique. Les spectres de masse expérimentaux ont été comparés à ceux stockés dans la banque de données de NIST 02 disponible sur l'appareil GC/MS et aux spectres de masse publiés (Adams 2007; Ansorena, 2001; Palmeira, 2004; Adio, 2005; Andrade, 2007; Pino, 2005; Kundakovic, 2007). Ces composés sont principalement des terpènes; esters, alcools, cétones, aldéhydes, acides et hydrocarbures sont également présents dans cette huile mais en plus faibles proportions (**Fig.III.29**).
- Le rendement en huile essentielle obtenue par hydrodistillation des parties aériennes de cette plante est de 0.10% (volume/masse, v/m). Parmi les composés, 197 le sont pour la première fois dans le genre.



**Figure III.29.** Répartition en % des principales classes de composants de l'huile essentielle de *Genista quadriflora*.

- L'huile essentielle est caractérisée par une importante présence de composés appartenant à la classe des terpènes (66.85%) et par la prédominance des sesquiterpènes (65.18%) (**Fig.III.30**). Il faut noter que dans cette famille de composés, la plupart d'entre eux sont des terpènes oxygénés.

- On remarque que les acides gras représentent seulement 7.59 % de l'huile dans l'espèce étudiée, alors qu'ils sont majoritaires selon les travaux entrepris sur les autres espèces algériennes: *G. numidica*, *G. saharae*, *G. ulicina*, *G. vepres*, *G. triscuspidata* et *G. microcephala* (Lograda, 2009; 2010; 2011; 2012).
- Par ailleurs, les autres composés (alcools, aldéhydes, cétones, esters, hydrocarbures et autres) sont faiblement représentés dans l'huile de *G. quadriflora*, et cela aussi bien qualitativement que quantitativement (3.33 %).
- La quantification a été faite grâce au logiciel Chemstation de Agilent Instrument et par le calcul des aires relatives aux composés volatils par rapport à l'aire totale du chromatogramme réalisé sur un appareil équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (GC/FID).



**Figure III.30.** Chromatogramme GC-FID avec les zones de prédominances des trois types de composés terpéniques de *G. quadriflora*.

**Tableau III.2.a.** Composés identifiés dans l'huile essentielle de *G. quadriflora* par GC-EIMS.

N°	Composé	$t_R$ (min)	RI <sub>calc.</sub>	RI <sub>ref.</sub>	Formule brute	M <sup>+</sup>	%	Réf.
1	benzaldéhyde*	7.81	962	960	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	106	0.02	Ad.
2	acide hexanoïque	8.49	982	973	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116	0.06	Ad.
3	1,2,4-triméthyl benzène	10.70	1020	1025	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub>	120	0.02	Ad.
4	alcool benzyle	11.10	1025	1031	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	108	0.01	Ad.
5	phénylacétaldéhyde	12.31	1040	1042	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	120	0.05	Ad.
6	méthylbenzylalcool	13.55	1055	1063	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122	0.02	Ad.
7	acétophénone	13.77	1058	1065	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	120	0.03	Ad.
8	<i>ortho</i> -tolualdéhyde	14.00	1061	1067	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	120	0.10	Ad.
9	n-octanol*	14.55	1068	1068	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	130	0.04	Ad.
10	acide heptanoïque	14.74	1070	1071	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130	0.03	An.
11	<i>para</i> -tolualdéhyde	15.04	1074	1081	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	120	0.02	Ad.
12	3-méthyl-1,2-cyclohexanedione	15.98	1086	1088	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	126	tr	Ad.
13	linalool*	16.94	1095	1096	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	tr	Ad.
14	$\alpha$ -oxyde pinène	17.00	1098	1099	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152	tr	Ad.
15	n-nonanal	17.19	1101	1100	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142	0.15	Ad.
16	acide 2-éthyl hexanoïque	18.37	1112	1122	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144	0.01	Ad.
17	chrysanthénone	19.57	1126	1127	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150	0.07	Ad.
18	néoiso-3-thujanol	22.30	1152	1151	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	0.02	Ad.
19	citronellal	22.73	1156	1153	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	tr	Ad.
20	2-acétyl-3-éthyl pyrazine	23.05	1159	1160	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O	150	tr	Ad.
21	lavandulol	23.61	1165	1169	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	0.02	Ad.
22	n-nonanol	23.62	1165	1169	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	144	0.02	Ad.
23	pinocampheol	23.69	1166	1170	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	0.02	Ad.
24	acide octanoïque*	24.30	1172	1171	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144	0.26	Ad.
25	<i>méta</i> -cymen-8-ol	24.65	1175	1179	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150	0.02	Ad.
26	santalone	25.34	1182	1180	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	164	0.01	Ad.
27	furfuryl acétone	25.36	1183	1183	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	136	0.01	Ad.
28	(4E)-décenal	26.16	1190	1196	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	tr	Ad.
29	n-dodécane	27.09	1200	1200	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170	0.04	Ad.
30	n-décanal	27.13	1201	1201	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	156	tr	Ad.
31	verbénone	27.93	1207	1205	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150	0.01	Ad.
32	iso-dihydro carvéol	28.66	1213	1214	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	tr	Ad.
33	<i>cis</i> -carvéol	30.41	1228	1227	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152	tr	Ad.
34	2-prényl cyclopentanone	30.46	1229	1229	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152	0.01	Ad.
35	isobornyl formate	31.54	1237	1239	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	182	0.02	Ad.
36	isovalérate de hexyle	32.12	1242	1244	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	186	0.01	Ad.
37	<i>cis</i> -pipéritone époxyde	32.97	1249	1254	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	168	0.01	Ad.
38	<i>trans</i> -pipéritone époxyde	33.92	1257	1256	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	168	0.03	Ad.
39	acide nonanoïque*	35.35	1269	1270	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	158	0.01	Ad.
40	alcool <i>méta</i> -anisique	37.94	1290	1282	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138	0.01	Ad.
41	(E)-anéthole	38.04	1291	1284	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	148	0.01	Ad.
42	(8Z)-undécenal	39.13	1300	1300	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	168	tr	Ad.
43	n-tridécane	39.15	1300	1300	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184	tr	Ad.
44	<i>ortho</i> -vanilline	39.40	1303	1302	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152	0.01	Ad.
45	<i>trans</i> -(E)-jasmonol	41.58	1323	1324	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	168	tr	Ad.
46	acétate de verbanol	43.98	1346	1343	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196	0.04	Ad.
47	$\alpha$ -longipinène	44.83	1354	1352	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.05	Ad.
48	$\alpha$ -cubébène	44.89	1356	1348	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.05	Ad.
49	(Z)- $\beta$ -damascénone*	45.79	1363	1364	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O	190	0.02	Ad.
50	acide décanoïque*	46.31	1368	1366	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172	0.29	Ad.
51	cyclosativène	46.54	1370	1371	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.09	Ad.
52	8-epi-dictamnol	47.67	1381	1380	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O	178	0.04	Ad.
53	(Z)- $\beta$ -damascone	48.15	1385	1386	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	192	0.05	Ad.
54	$\beta$ -cubébène	48.36	1387	1388	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.03	Ad.
55	$\alpha$ -duprezianène	48.40	1388	1388	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.04	Ad.
56	$\beta$ -élémente	48.60	1390	1390	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.10	Ad.
57	(E)-Jasmone	48.78	1391	1391	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	164	0.30	Ad.
58	7-epi-sesquithujène	48.88	1392	1391	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.07	Ad.
59	sibirène	49.11	1394	1400	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.08	Ad.
60	$\beta$ -longipinène	49.65	1400	1400	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.42	Ad.

**Tableau III.2.b.** Composés identifiés dans l'huile essentielle de *G. quadriflora* par GC-EIMS.

N°	Composé	$t_R$ (min)	RI <sub>calc.</sub>	RI <sub>ref.</sub>	Formule brute	M <sup>+</sup>	%	Réf.
61	(Z)-caryophyllène	49.94	1408	1408	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.05	Ad.
62	(E)-caryophyllène	50.17	1416	1419	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.06	Ad.
63	(E)- $\alpha$ -ionone	50.45	1425	1430	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	192	0.08	Ad.
64	<i>cis</i> -thujopsène	50.64	1431	1431	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.09	Ad.
65	$\gamma$ -élémane	50.67	1432	1436	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.26	Ad.
66	nérylyl acétone*	50.81	1437	1436	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O	194	0.25	Ad.
67	<i>cis</i> -cadinane-1(6),4-diène	51.61	1463	1463	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.46	Ad.
68	ishwarane	51.78	1465	1466	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.03	Ad.
69	$\alpha$ -macrocarpène	51.92	1473	1472	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.05	Ad.
70	(E)- $\beta$ -Ionone*	51.94	1474	1488	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	192	0.05	Ad.
71	benzoate de penthyle	52.06	1478	1478	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	192	0.20	Ad.
72	widdra-2,4-(14)-diène	52.15	1481	1482	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.03	Ad.
73	lactate de menthyle	52.17	1482	1482	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	228	0.03	Ad.
74	$\alpha$ -amorphène	52.24	1484	1484	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.04	Ad.
75	11 $\alpha$ H-himachala-1,4-diène	52.34	1487	1486	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.02	Ad.
76	<i>trans</i> -muurolo-4(14),5-diène	52.36	1488	1493	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.03	Ad.
77	epi-cubébol	52.50	1492	1494	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.13	Ad.
78	$\beta$ -alaskène	52.52	1493	1498	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	tr	Ad.
79	<i>cis</i> -cadinane-1,4-diène	52.54	1494	1495	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	tr	Ad.
80	sandalore	52.55	1494	1497	C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O	210	tr	Ad.
81	$\alpha$ -muuroloène	52.67	1498	1500	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.13	Ad.
82	$\beta$ -dihydroagarofurane	52.79	1502	1503	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.12	Ad.
83	(Z)- $\alpha$ -bisabolène	53.03	1509	1507	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.03	Ad.
84	cameroonan-7- $\alpha$ -ol	53.05	1509	1511	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.01	Ad.
85	$\gamma$ -cadinène	53.16	1512	1513	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.20	Ad.
86	$\delta$ -amorphène	53.17	1513	1512	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.15	Ad.
87	<i>cis</i> -dihydroagarofurane	53.26	1515	1520	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.14	Ad.
88	cubébol	53.28	1516	1515	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.12	Ad.
89	myristicine	53.36	1518	1518	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	192	0.07	Ad.
90	<i>trans</i> -calaménène	53.43	1520	1522	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202	0.05	Ad.
91	$\delta$ -cadinène	53.45	1521	1523	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.03	Ad.
92	<i>cis</i> -calaménène	53.52	1523	1529	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202	0.18	Ad.
93	acétate de chavibétol	53.68	1527	1525	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206	0.12	Ad.
94	$\alpha$ -macrocarpène	53.80	1531	1527	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202	0.03	Ad.
95	10-epi-cubébol	53.85	1532	1535	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.02	Ad.
96	$\alpha$ -cadinène*	54.04	1538	1538	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	0.05	Ad.
97	$\alpha$ -calacorène*	54.18	1542	1545	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub>	200	0.02	Ad.
98	occidentolol	54.27	1544	1552	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.04	Ad.
99	<i>cis</i> -cadinène éther	54.44	1549	1553	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.09	Ad.
100	élémol*	54.55	1552	1549	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.45	Ad.
101	<i>trans</i> -cadinène éther	54.74	1558	1558	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.10	Ad.
102	$\beta$ -vétivénène	54.75	1558	1555	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202	0.10	Ad.
103	(E)-veltonal	54.77	1559	1556	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206	0.10	Ad.
104	$\beta$ -calacorène	54.91	1563	1565	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub>	200	0.12	Ad.
105	silphiperfol-5-èn-3-ol A	54.94	1564	1559	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.14	Ad.
106	érérophila cétone	54.95	1564	1560	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.15	Ad.
107	diméthyl ionone	54.98	1565	1567	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.13	Ad.
108	maaliol	55.03	1566	1567	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.09	Ad.
109	palustrol	55.07	1567	1568	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.10	Ad.
110	(1 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -époxy)-amorph-4-ène	55.22	1572	1572	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.05	Ad.
111	$\alpha$ -cédrène époxyde	55.33	1575	1575	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	1.00	Ad.
112	spatulénol	55.36	1576	1578	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	1.23	Ad.
113	oxyde de caryophyllène *	55.48	1579	1583	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	1.47	Ad.
114	acide dodécanoïque*	55.69	1585	1580	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	200	3.14	Pi.
115	salvial-4-(14)-èn-1-one	55.83	1589	1594	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.71	Ad.
116	viridiflorol	55.90	1591	1592	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.40	Ad.
117	fokiénol	55.99	1594	1596	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.13	Ad.
118	$\beta$ -copaèn-4- $\alpha$ -ol	56.06	1596	1590	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.22	Ad.
119	longibornéol	56.16	1599	1599	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.01	Ad.
120	cédrol	56.18	1599	1600	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.01	Ad.

**Tableau III.2.c.** Composés identifiés dans l'huile essentielle de *G. quadriflora* par GC-EIMS.

N°	Composé	$t_R$ (min)	RI <sub>calc.</sub>	RI <sub>ref.</sub>	Formule brute	M <sup>+</sup>	%	Réf.
121	guaïol	56.20	1600	1600	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.01	Ad.
122	<i>cis</i> -dihydro-mayurone	56.30	1604	1595	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206	0.30	Ad.
123	humulène époxyde	56.37	1606	1608	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.36	Ad.
124	<i>cis</i> -isolongifolanone	56.42	1608	1613	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.20	Ad.
125	β-atlantol	56.65	1614	1608	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.14	Ad.
126	β-biotol	56.60	1616	1613	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.39	Ad.
127	junéol	56.70	1617	1619	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.17	Ad.
128	acétate de (E)- isoeugénol	56.74	1619	1615	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206	0.20	Ad.
129	isolongifolan-7-α-ol	56.80	1621	1619	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.08	Ad.
130	muurola-4,10(14)-dièn-1-β-ol	56.87	1623	1631	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.21	Ad.
131	1-epi-cubéol*	56.96	1626	1628	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.29	Ad.
132	γ-eudésmol*	57.10	1631	1632	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.02	Ad.
133	6-méthyl-6-(3-méthylphényl)-heptan-2-one	57.12	1632	1640	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.06	Ad.
134	gymnomitrone	57.15	1633	1632	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.06	Ad.
135	α-acoréol	57.15	1633	1633	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.06	Ad.
136	allo-aromadendrène époxyde	57.29	1638	1641	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	1.37	Ad.
137	epi-α-cadinol	57.40	1642	1640	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	1.44	Ad.
138	epi-α-muurolol	57.47	1644	1642	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	1.30	Ad.
139	séline-3,11-dièn-6-α-ol	57.52	1646	1644	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.15	Ad.
140	α-muurolol	57.53	1646	1646	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.17	Ad.
141	cubéol	57.55	1647	1646	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.18	Ad.
142	3-iso-thujopsanone	57.57	1647	1642	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.15	Ad.
143	α-cadinol	57.76	1654	1654	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	2.29	Ad.
144	<i>cis</i> -calamanèn-10-ol	57.81	1656	1661	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.50	Ad.
145	3-butyl phthalide	57.85	1657	1648	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	190	0.09	Ad.
146	alohimachalol	57.90	1659	1662	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.10	Ad.
147	3-thujopsanone	57.93	1660	1654	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.05	Ad.
148	<i>trans</i> -calaménèn-10-ol	58.02	1663	1669	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.60	Ad.
149	14-hydroxy-9-epi-(E)-caryophyllène	58.11	1666	1669	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.01	Ad.
150	cadalène	58.18	1669	1676	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub>	198	0.59	Ad.
151	mustakone	58.23	1671	1677	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.20	Ad.
152	khusilol	58.25	1671	1676	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O	204	0.23	Ad.
153	(Z)-α-santalol	58.33	1674	1675	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.40	Ad.
154	hexyl-2-hydroxybenzoate	58.40	1676	1675	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	222	0.08	Ad.
155	<i>cis</i> -14-nor-muurolo-5-èn-4-one	58.46	1678	1689	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206	0.50	Ad.
156	(2Z,6Z)-farnésal	58.58	1682	1684	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.05	Ad.
157	germacra-4(15),5,10(14)-trièn-1-α-ol	58.68	1686	1686	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	1.20	Ad.
158	eudésma-4(15),7-dièn-1β-ol	58.75	1688	1688	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	1.02	Ad.
159	amorpha-4,9-dièn-2-ol	58.80	1690	1700	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	10.40	Ad.
160	10-nor-calaménèn-10-one	58.94	1695	1702	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O	202	0.26	Ad.
161	amorpha-4,9-dièn-14-al	59.01	1697	1704	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.04	Ad.
162	<i>cis</i> -thujopsénal	59.12	1701	1709	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.02	Ad.
163	(E)-apritone	59.15	1703	1708	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.03	Ad.
164	mayurone	59.20	1705	1710	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> O	204	0.30	Ad.
165	14-hydroxy-4,5-dihydro-caryophyllène	59.22	1706	1706	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.07	Ad.
166	14-hydroxy-α-humulène	59.24	1707	1714	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.07	Ad.
167	(2E,6Z)-farnésal	59.34	1712	1713	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.04	Ad.
168	(Z)-α-atlantone	59.43	1717	1718	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.11	Ad.
169	(Z)-nuciférol	59.52	1721	1725	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.44	Ad.
170	vétisélinéol	59.64	1727	1731	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.05	Ad.
171	curcuménol	59.65	1727	1734	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	234	0.04	Ad.
172	oplopanone	59.78	1735	1740	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	238	0.13	Ad.
173	isobicyclgermacrénal	59.85	1737	1734	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.27	Ad.
174	(2E,6E)-farnésol	59.97	1743	1743	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.25	Ad.
175	γ-costol	59.98	1743	1746	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.16	Ad.
176	muurolan-4,7-oxyde	60.14	1751		C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	0.65	Adi.
177	β-acoradiéol	60.28	1758	1763	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	1.03	Ad.
178	muurolan-4,7-peroxyde	60.44	1766		C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	238	19.42	Adi.

**Tableau III.2.d.** Composés identifiés dans l'huile essentielle de *G. quadriflora* par GC-EIMS.

N°	Composé	$t_R$ (min)	RI <sub>calc.</sub>	RI <sub>ref.</sub>	Formule	M <sup>+</sup>	%	Réf.
179	$\gamma$ -curcumèn-15-al	60.49	1768	1768	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.50	Ad.
180	14-oxy- $\alpha$ -muurolène	60.51	1769	1768	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.86	Ad.
181	$\alpha$ -costol	60.54	1771	1774	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.20	Ad.
182	epi-cyclocolorénone	60.61	1774	1775	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	1.18	Ad.
183	acide tétradécanoïque*	60.63	1775	1775	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	228	1.12	Ku.
184	(E)- $\alpha$ -atlantone	60.71	1779	1778	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.25	Ad.
185	14-hydroxy- $\alpha$ -muurolène	60.77	1782	1780	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.99	Ad.
186	7-acétoxy-éléma-1,3-dièn-8-ol	60.87	1786	1786	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	280	0.24	Ad.
187	14-hydroxy- $\delta$ -cadinène	61.18	1802	1803	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	0.06	Ad.
188	iso-acorone	61.32	1813	1811	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	236	0.25	Ad.
189	acétate d'isolongifolol	61.41	1820	1820	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	264	0.13	Ad.
190	occidol	61.43	1823	1837	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.05	Ad.
191	$\beta$ -vétivone	61.44	1823	1823	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	218	0.05	Ad.
192	acétate d'eudésm-7(11)-èn-4-ol	61.65	1839	1840	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	264	0.11	Ad.
193	1,10- $\beta$ -époxy-6-oxofuranoérérophilane	61.91	1860	1849	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	246	tr	Ad.
194	acide <i>cis</i> - thujopsénique	62.02	1869	1864	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	234	0.92	Ad.
195	2- heptadécane	62.38	1897	1897	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O	254	0.84	Ans
196	n-nonadécane*	62.42	1900	1900	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	268	0.07	Ad.
197	carissone	63.01	1918	1927	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	236	0.23	Ad.
198	cyclohexadécanolide	63.34	1928	1934	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	254	0.09	Ad.
199	phytol*	63.65	1937	1943	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296	tr	Ad.
200	(Z,Z)-géranyl linalool	63.82	1952	1961	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O	290	0.34	Ad.
201	acide hexadécanoïque*	64.92	1975	1960	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	2.49	Ad.
202	(E,Z)-géranyl linalool	65.28	1986	1987	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O	290	0.04	Ad.
203	1-eicosène	65.37	1988	1988	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	280	0.07	Ad.
204	(6Z,10Z)-pseudo phytol	65.39	1989	1988	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O	292	0.06	Ad.
205	hexadécanoate d'éthyle	65.53	1993	1993	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	0.34	Ad.
206	n-eicosane	65.67	2000	2000	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	282	0.08	Ad.
207	13-epi-dolabradiène	65.75	2002	2000	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	272	0.03	Ad.
208	oxyde de 13-epi-manool	65.91	2008	2010	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O	290	0.02	Ad.
209	juvibione	66.01	2014	2018	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	266	0.03	Ad.
210	(6E,10Z)-pseudo phytol	66.03	2016	2018	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O	292	0.04	Ad.
211	polygodial	66.05	2016	2017	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	234	0.02	Ad.
212	nootkatinol	67.23	2082	2088	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	250	0.04	Ad.
213	n-heneicosane*	67.56	2100	2100	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	296	0.10	Ad.
214	acide linoléique*	68.08	2132	2133	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	0.07	Ad.
215	acide oléique	68.19	2138	2142	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282	0.09	Ad.
216	abiéta-8(14),13(15)-diène	68.53	2159	2154	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	272	0.22	Ad.
217	1-docosène	68.64	2181	2189	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub>	308	0.14	Ad.
218	n-nonadécanol-1	68.91	2182	2181	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O	284	0.20	Pa.
219	n-docosane*	69.37	2200	2200	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	310	0.02	Ad.
220	pimarate de méthyle	69.77	2232	2238	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316	0.01	Ad.
221	n-tricosane*	71.12	2300	2300	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	324	0.01	Ad.
222	n-tétracosane*	74.39	2400	2400	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	338	0.02	Ad.
Total des composés identifiés							77.77	

RI<sub>calc.</sub> : Indices de rétention mesurés sur la colonne ZB-5; RI<sub>ref.</sub> : Indices de rétention à partir de la littérature; % : Pourcentages mesurés sur la colonne ZB-5; tr: Composés à l'état de traces (<0.01%); \* composés déjà identifiés dans le genre *Genista*; Références: Ad. : (Adams, 2007); Adi. : (Adio, 2005); An. : (Andrade et al., 2007); Ans. : (Ansorena et al., 2001); Ku. : (Kundakovic et al., 2007); Pa. : (Palmeira et al., 2004); Pi. : (Pino et al., 2005).

### III.3. Identification structurale des composés dérivés d'acides hydroxycinnamiques isolés de *Convolvulus tricolor*

Dans cette partie de notre travail, l'identification structurale de tous les composés a été faite par la combinaison de plusieurs techniques, la spectroscopie ultraviolette, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire à 1 et à 2 dimensions

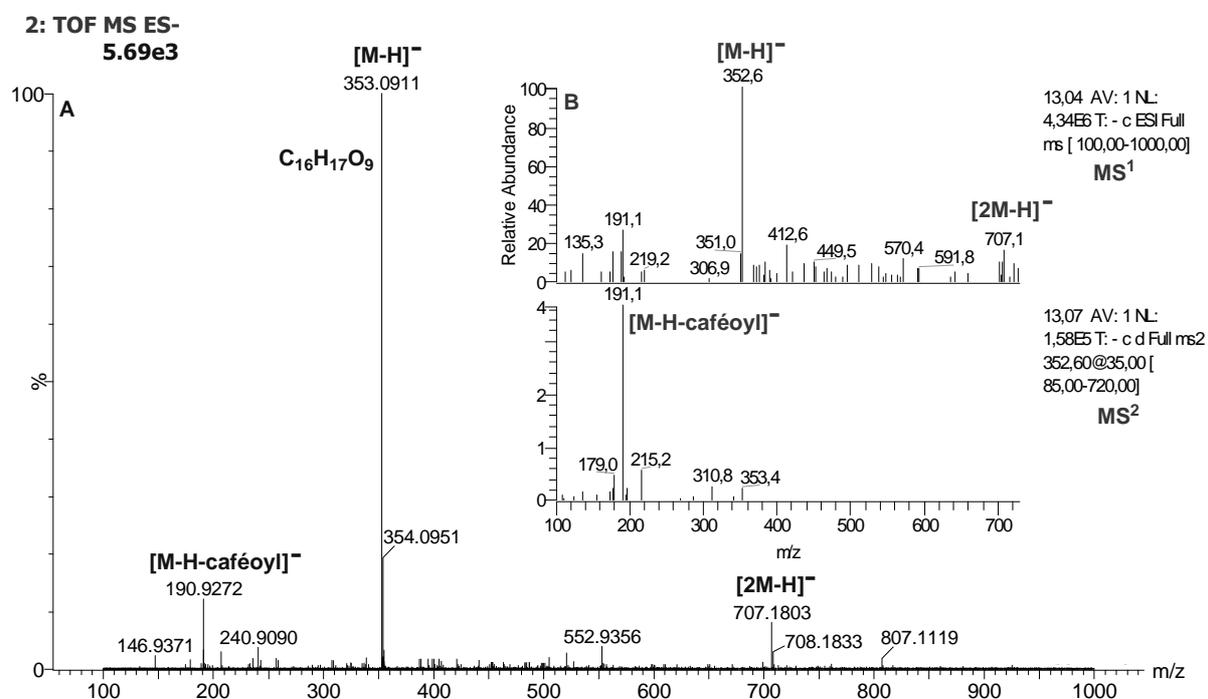
Les composés dérivés d'acides hydroxycinnamiques ont été isolés de l'extrait méthanolique des graines (**EMG**) de *C. tricolor* (cf. II.5.2.4).

#### III.3.1. Identification structurale du composé **EMG1(III.3.1)**

Le composé **EMG1(III.3.1)** se présente sous la forme de poudre jaune pâle, montrant une fluorescence bleue à 365 nm après révélation avec le réactif de Neu suggérant la présence d'un acide phénolique (Wagner, 1996). Le profil du spectre HPLC-UV-DAD présente des maxima d'absorption à 222 et 326 nm avec des épaulements à 244 et 300 nm (**Fig.II.23**), typique des dérivés d'acides hydroxycinnamiques (Kammerer, 2004). L'analyse HPLC a montré que la pureté du composé est de 97.5% à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution HRMS-TOF (**Fig.III.31.A**) du composé **EMG1(III.3.1)** en mode négatif présente un ion quasi-moléculaire à  $m/z$  353.0911 (calculée 353.0914)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 354 uma correspondant à la formule brute  $C_{16}H_{18}O_9$  avec un degré d'insaturation de 8.

D'autre part, la fragmentation MS/MS (**Fig.III.31.B**) donne un pic de base à  $m/z$  191 correspondant à une perte d'une unité caféoyle (-162 uma).



**Figure III.31.** Spectres de masse HRMS-TOF (A) et ESI-MS/MS (B) en mode négatif du composé **EMG1(III.3.1)**.

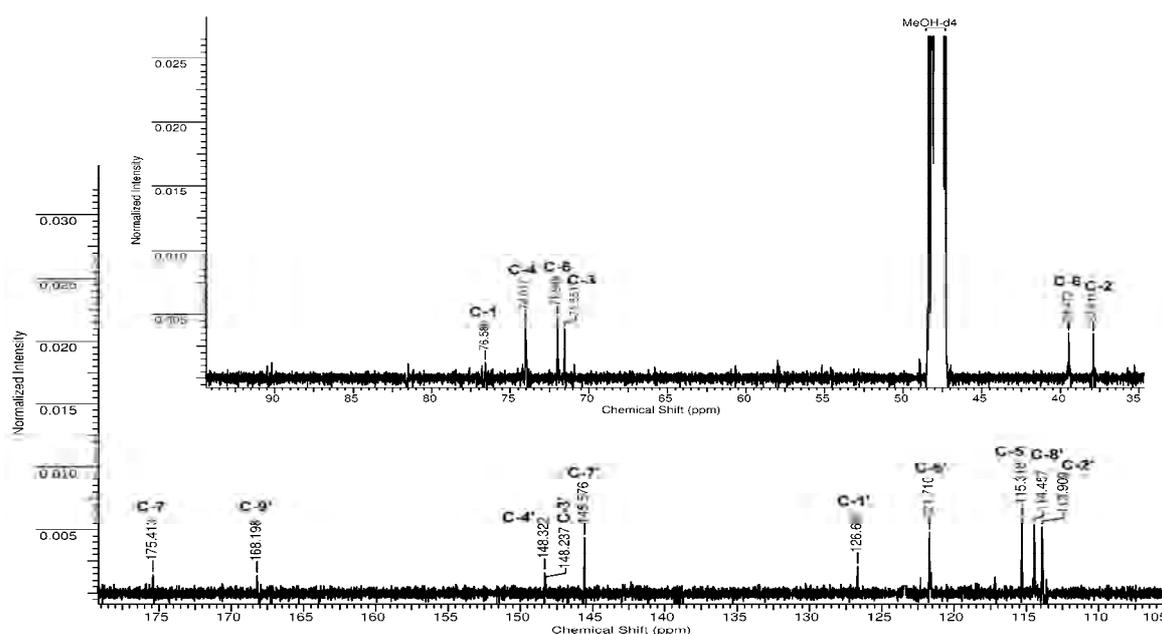
Ceci nous a orientés vers une structure d'acide mono-caféoylquinique (Clifford, 2003), en admettant l'existence de quatre isomères: l'acide 1-*O*-caféoylquinique, l'acide 3-*O*-caféoylquinique, l'acide 4-*O*-caféoylquinique et l'acide 5-*O*-caféoylquinique (numérotation IUPAC). Cependant, les intensités relatives des ions dans les spectres de masse de chaque isomère sont significativement différentes. En effet, les deux acides 1-*O*-caféoylquinique et 5-*O*-caféoylquinique présentent les mêmes spectres MS<sup>2</sup>, à savoir un pic de base à  $m/z$  191 [acide quinique-H]<sup>-</sup> et un ion faible à  $m/z$  179 [acide caféique-H]<sup>-</sup>. Par ailleurs, l'acide 3-*O*-caféoylquinique présente un pic de base en MS<sup>2</sup> à  $m/z$  191 et un pic à  $m/z$  179 relativement intense (50% du pic de base), alors que l'acide 4-*O*-caféoylquinique présente un pic de base en MS<sup>2</sup> à  $m/z$  173 [acide quinique-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> (Clifford, 2005).

Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif du composé **EMG1(III.3.1)** sont indiqués dans le **Tableau III.3**. On remarque la présence d'un pic de base en MS<sup>2</sup> à  $m/z$  191 et d'un faible ion à  $m/z$  179 (< 10%). Ceci nous a orientés vers les isomères 1-*O*-caféoylquinique et 5-*O*-caféoylquinique. Sachant qu'une différence entre ces deux isomères, est constatée au niveau du pic à  $m/z$  135 en MS<sup>2</sup> qui serait non détectable pour le premier et < 3% pour le second (Clifford, 2005), la structure de ce composé est à priori l'isomère 5-*O*-caféoylquinique.

**Tableau III.3.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMG1(III.3.1)**.

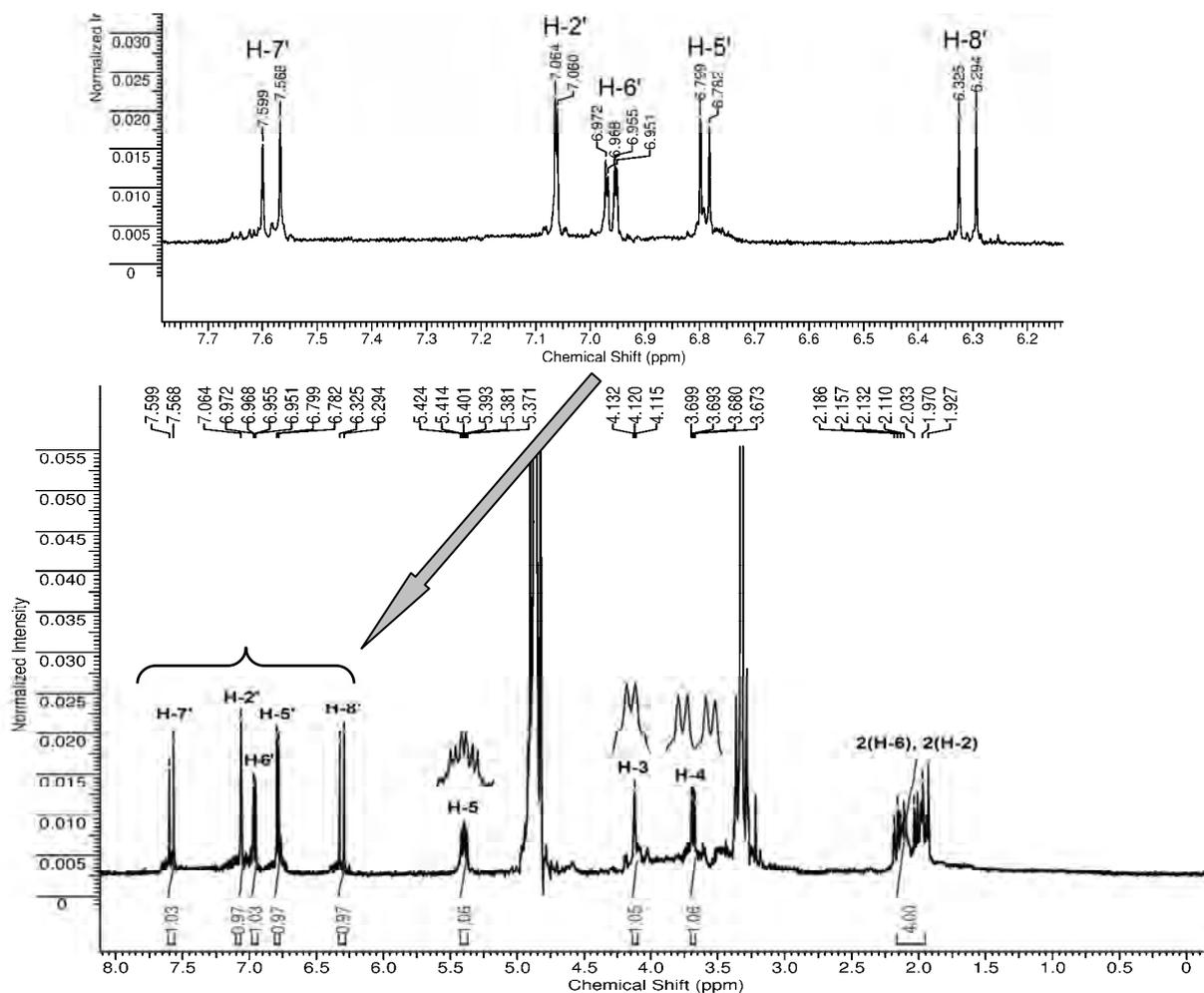
Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353(100), 191(26.4), 707(16.2), 135(14.3), 173(4.9)	191(100), 179(9.1), 135(2.8), 173(3.7)

Afin de confirmer la structure proposée, nous avons eu recours à la RMN. Ainsi, l'étude du spectre <sup>13</sup>C a permis de mettre en évidence la présence de 16 atomes de carbone (**Fig.III.32**), dont deux carbonyles à  $\delta_c$  175.4 ppm et  $\delta_c$  168.2 ppm.



**Figure III.32.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **EMG1(III.3.1)**.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  a montré la présence de 12 protons (**Fig.III.33**), suggérant l'existence d'un seul noyau aromatique substitué. Ce spectre correspond à celui d'un acide mono-caféoylquinique. Les protons aromatiques, attribués au groupement caféoyle apparaissent sous forme de signaux de type ABX à 7.06 ppm (d,  $J = 2.0$  Hz), 6.96 ppm (dd,  $J = 8.3, 2.0$  Hz) et 6.79 ppm (d,  $J = 8.3$  Hz) impliquant respectivement les protons en positions H-2', H-6' et H-5'. Le proton H-6' présente un couplage *ortho* avec le proton H-5' et un couplage *méta* avec le proton H-2'. D'autre part, on a observé deux larges doublets à 7.58 ppm (d,  $J = 15.6$  Hz) et 6.31 ppm (d,  $J = 15.6$  Hz) attribués respectivement aux protons H-7' et H-8' de la chaîne latérale du groupe caféoyle indiquant une *trans*-conjugaison (Pauli, 1998).



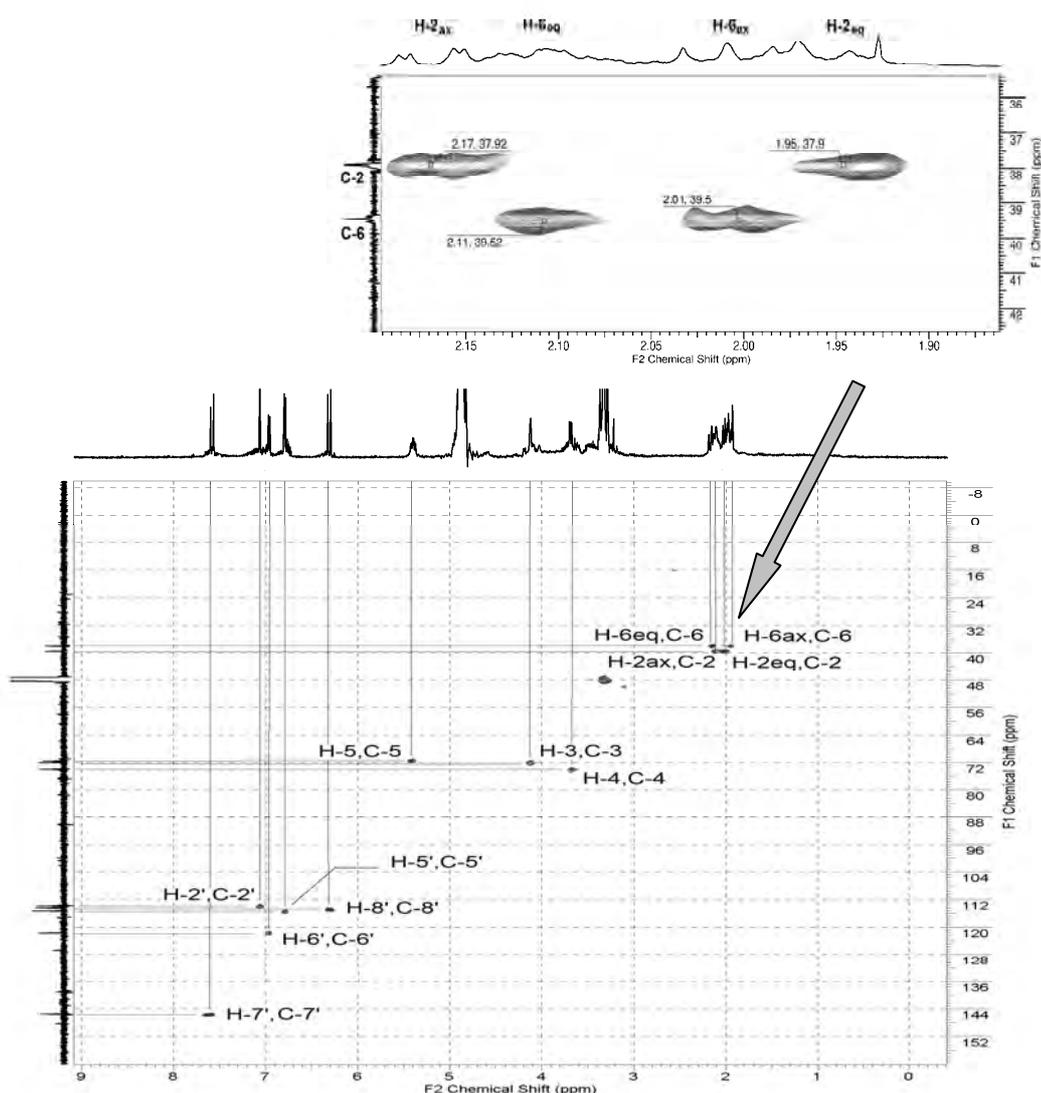
**Figure III.33.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **EMQ1(III.3.1)**.

Le spectre révèle la présence de signaux caractéristiques des protons de l'acide quinique entre 5.40 et 1.95 ppm. Ainsi, les trois signaux situés entre  $\delta$  3.69 et 5.40 ppm ont été attribués aux protons H-3, H-4 et H-5. Le déblindage du signal correspondant au proton H-5 à 5.4 ppm (1H, ddd,  $J = 9.8, 9.2, 4.9$  Hz) par rapport au spectre de l'acide quinique (Clifford, 1986), confirme que le rattachement du groupement caféoyle est en position 5 du cycle quinique (Pauli, 1998).

Des signaux en positions plus blindées des protons H-3 ( $\delta$  4.12 ppm) et H-4 ( $\delta$  3.69 ppm) indiquent que les groupements hydroxyles rattachés aux carbones correspondants sont libres.

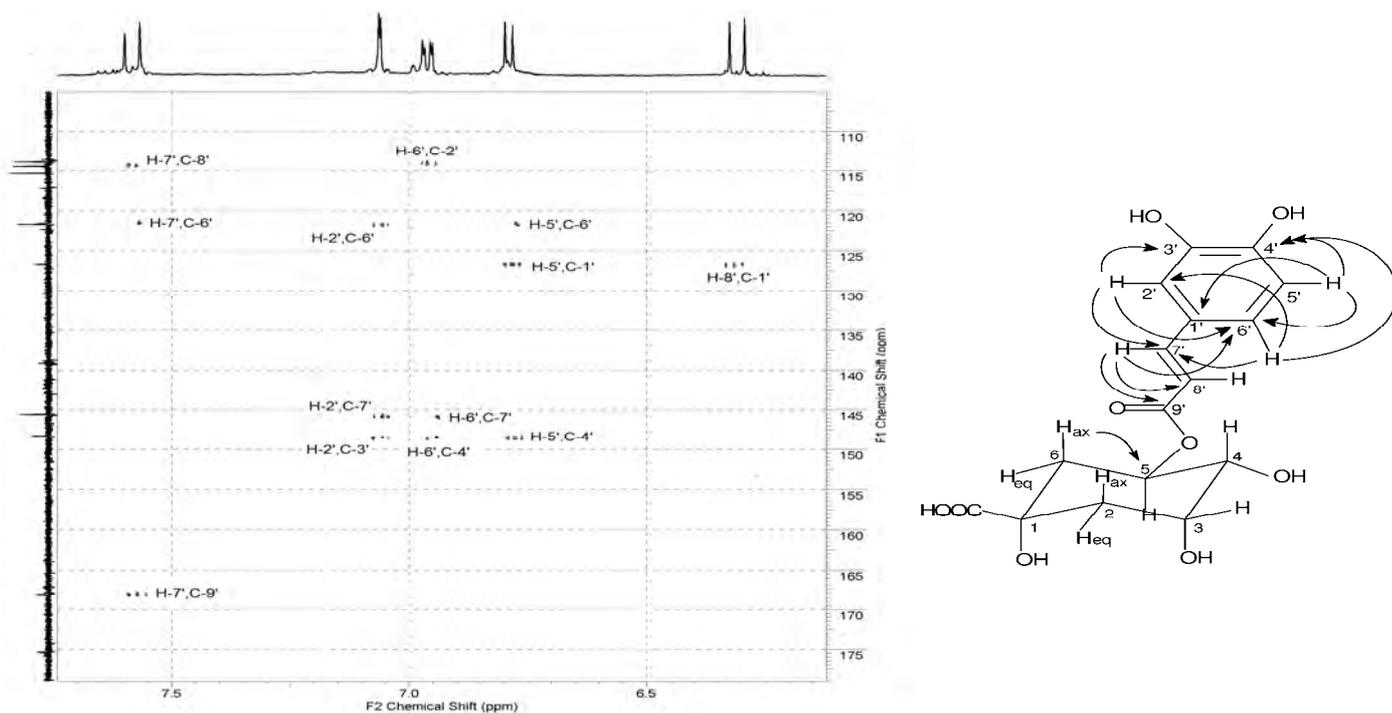
Les deux protons correspondant à un méthylène saturé en position C(6) du cycle quinique, apparaissent sous la forme d'un doublet de doublets de doublet pour le proton équatorial à  $\delta$  2.12 ppm ( $J = 12.5, 4.9, 2.9$  Hz, H-6<sub>eq</sub>) et un doublet de doublets pour le proton axial à  $\delta$  2.01 ppm ( $J = 12.5, 9.8$  Hz, H-6<sub>ax</sub>). D'autre part, les signaux des protons attachés au carbone C(2) apparaissent sur le spectre à  $\delta$  2.17 ppm (dd,  $J = 14.6, 3.2$  Hz, H-2<sub>ax</sub>) et à  $\delta$  1.95 ppm (ddd,  $J = 14.6, 3.3, 2.9$  Hz, H-2<sub>eq</sub>).

L'attribution des signaux aux différents noyaux, repose sur les données de corrélations hétéro-nucléaires courtes distances HSQC (**Fig.III.34**). Les résultats sont indiqués dans le **Tableau III.4**.



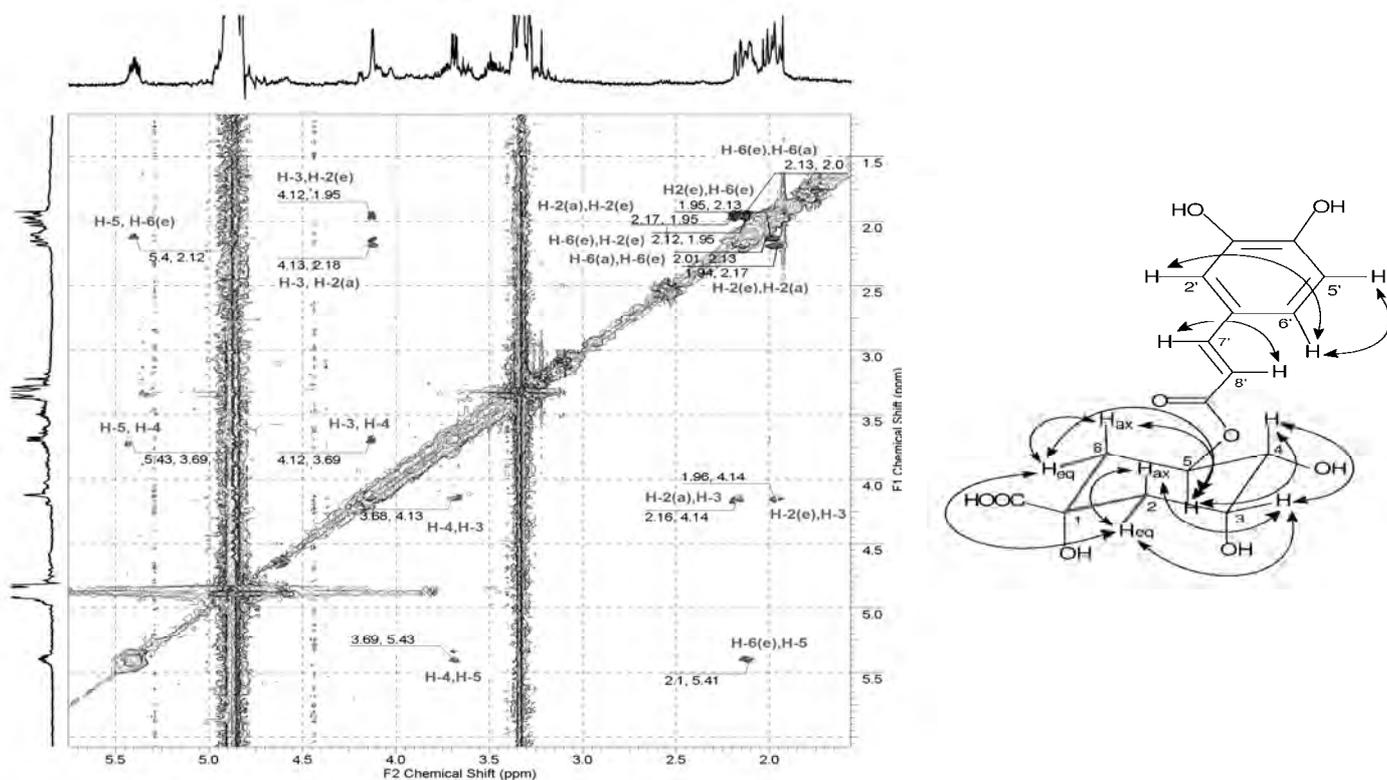
**Figure III.34.** Spectre RMN-2D HSQC <sup>C-H</sup>J du composé **EMQ1(III.3.1)**.

Les attributions des différents pics sont également confirmées par les corrélations longues distances de l'expérience HMBC (**Fig.III.35**), spécialement pour les protons des groupements du noyau caféoylé.



**Figure III.35.** Spectre RMN-2D HMBC et les corrélations hétéronucléaires  ${}^2J$  -  ${}^3J$  du composé **EMG1(III.3.1)**.

La structure de ce composé est complétée par les différents couplages  ${}^1H$ - ${}^1H$  du cycle quinique en utilisant les données de l'expérience TOCSY (**Fig.III.36**).



**Figure III.36.** Spectre RMN-2D TOCSY et les principales corrélations homonucléaires du composé **EMG1(III.3.1)**.

Ainsi, le proton H-4 (*dd*,  $J = 9.8, 3.4$  Hz) révèle des corrélations homonucléaires indiquées par le couplage di-axiale (H-4/H-5) et un couplage typique d'une interaction axiale-équatoriale (H-4/H-3). D'autre part, le proton H-3 (*q*,  $J = 3.1$  Hz) est indiqué par les corrélations: di-équatoriale (H-3/H-2eq) et équatoriale-axiale pour les couplages (H-3/H-4) et (H-3/H-2ax). Pour le proton le plus déblindé, H-5 (*ddd*,  $J = 10.2, 9.8, 4.9$  Hz), le spectre TOCSY montre les corrélations de type di-axiale pour les couplages H-5/H-6ax et H-5/H-4, et axiale-équatoriale pour le couplage H-5/H-6eq. Ces résultats sont en accord avec les valeurs déjà publiées (Tolonen).

Les signaux des protons méthyléniques 2H(2) et 2H(6) sont détectés dans l'intervalle  $\delta$  1.9–2.17 ppm. Le proton axial H-6ax apparaît comme un doublet de doublets en présentant un large couplage vicinal de type *trans* di-axiale avec le proton H-5 ( ${}^3J = 10.2$  Hz). Egalement le proton H-6eq apparaissant comme un doublet de doublets de doublet et révèle une corrélation longue distance avec le proton H-2eq ( ${}^4J = 2.9$  Hz) qui peut être expliquée par un couplage quatre liaisons de type-W (Barfield, 1969) (**Fig.III.36**). Par ailleurs, les protons liés en position C-2, sont localisés à  $\delta$  2.17 (*dd*,  $J = 14.6, 3.2$  Hz) et  $\delta$  1.95 (*ddd*,  $J = 14.6, 3.3, 2.9$  Hz) pour respectivement les protons axial et équatorial.

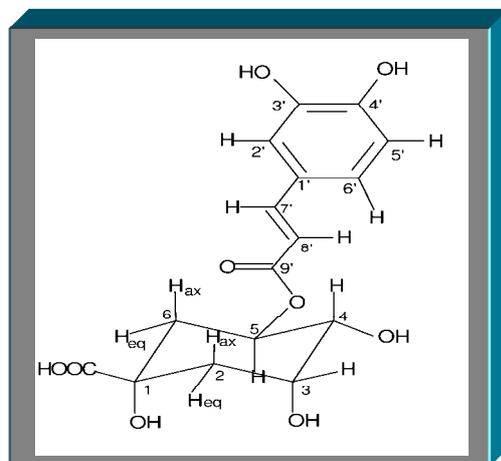
**Tableau III.4.** Données spectrales RMN  ${}^1\text{H}$ ,  ${}^{13}\text{C}$ , HMBC et TOCSY du composé **EMQ1(III.3.1)**.

Position	${}^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	${}^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations ${}^1\text{H} - {}^{13}\text{C}$ )	TOCSY (corrélations ${}^1\text{H} - {}^1\text{H}$ )
1		76.6		
H-2 <sub>ax</sub>	2.17 <i>dd</i> (14.6, 3.2)			H-2 <sub>eq</sub> , H-3
2		37.9		
H-2 <sub>eq</sub>	1.95 <i>ddd</i> (14.6, 3.3, 2.9)			H-2 <sub>ax</sub> , H-3, H6 <sub>eq</sub>
3	4.12 <i>q</i> (3.1)	72.0		H-2 <sub>ax</sub> , H-4, H-2 <sub>eq</sub>
4	3.69 <i>dd</i> (9.8, 3.4)	74.0		H-5, H-3
5	5.40 <i>ddd</i> (10.2, 9.8, 4.9)	71.6		H-6 <sub>ax</sub> , H-4, H-6 <sub>eq</sub>
H-6 <sub>eq</sub>	2.12 <i>ddd</i> (12.5, 4.9, 2.9)			H-6 <sub>ax</sub> , H-5, H-2 <sub>eq</sub>
6		39.5		
H-6 <sub>ax</sub>	2.01 <i>dd</i> (12.5, 10.2)		C-5	H-6 <sub>eq</sub> , H-5
7		175.4		
1'		126.7		
2'	7.06 <i>d</i> (2.0)	113.9	C-3', C-6', C7'	
3'		148.2		
4'		148.3		
5'	6.79 <i>d</i> (8.3)	115.3	C-1', C-4', C-6'	H-6'
6'	6.96 <i>dd</i> (8.3, 2.0)	121.7	C2', C-4', C-7'	H-5', H-2'
7'	7.58 <i>d</i> (15.6)	145.6	C-6', C-8', C-9'	H-8'
8'	6.31 <i>d</i> (15.6)	114.5	C-1'	H-7'
9'		168.2		

*d*: doublet; *dd*: doublet de doublet; *ddd*: doublet de doublets de doublet; *q*: quadruplet.

H<sub>ax</sub>: proton axial, H<sub>eq</sub>: proton équatorial.

En accord avec les données UV, ESI-MS, TOF-MS et RMN, le composé **EMG1(III.3.1)** est identifié comme étant l'acide 5-O-[E]-caféoylquinique, connu sous le nom d'acide chlorogénique. Une comparaison des données spectrales de ce composé avec celles de la littérature (Shutz, 2004; Tamura, 2004) a permis de confirmer l'identité de ce produit.



Structure du composé **EMG1(III.3.1)**:

**Acide 5-O-[E]-caféoylquinique** (acide chlorogénique)

### III.3.2. Identification structurale du composé **EMG2(III.3.2)**

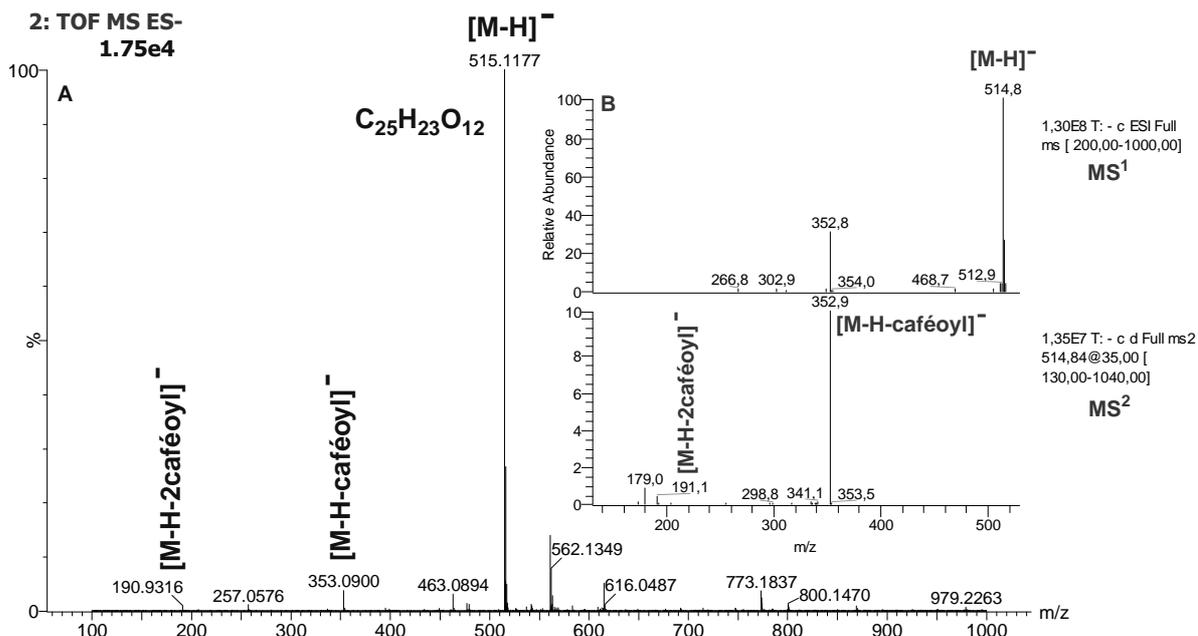
Le composé **EMG2(III.3.2)** est une gomme jaunâtre amorphe qui présente comme le composé précédent, une fluorescence bleue avec le réactif de Neu. Le profil du spectre HPLC-UV-DAD est aussi typique des dérivés d'acides hydroxycinnamiques avec des maxima d'absorption à 224 et 328 nm et des épaulements à 246 et 302 nm (**Fig.II.23**). L'analyse HPLC a montré que la pureté du composé est de 91.8% à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution HRMS-TOF (**Fig.III.37.A**) du composé **EMG2(III.3.2)** en mode négatif révèle un ion pseudomoléculaire à  $m/z$  515.1177  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 516 uma de formule brute  $C_{25}H_{24}O_{12}$  avec un degré d'insaturation de 14. D'autre part, la fragmentation MS/MS (**Fig.III.37.B**) donne un pic de base à  $m/z$  353 correspondant à une perte d'une unité caféoyle (-162 uma), en plus d'un autre pic d'intensité plus faible à  $m/z$  191 indiquant la perte de deux unités caféoyle (- 2 x 162 uma). Ceci nous a orientés vers une structure d'acide di-caféoyl quinique. Les isomères d'acides di-O-caféoylquiniques (diCQA) sont de types: 1,3-diCQA, 1,4-diCQA, 1,5-diCQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA et 4,5-diCQA (Clifford, 2005).

Les principaux fragments donnés par les spectres  $MS^1$  et  $MS^2$  en mode *electrospray* négatif du composé **EMG2(III.3.2)** sont indiqués dans le **Tableau III.5**.

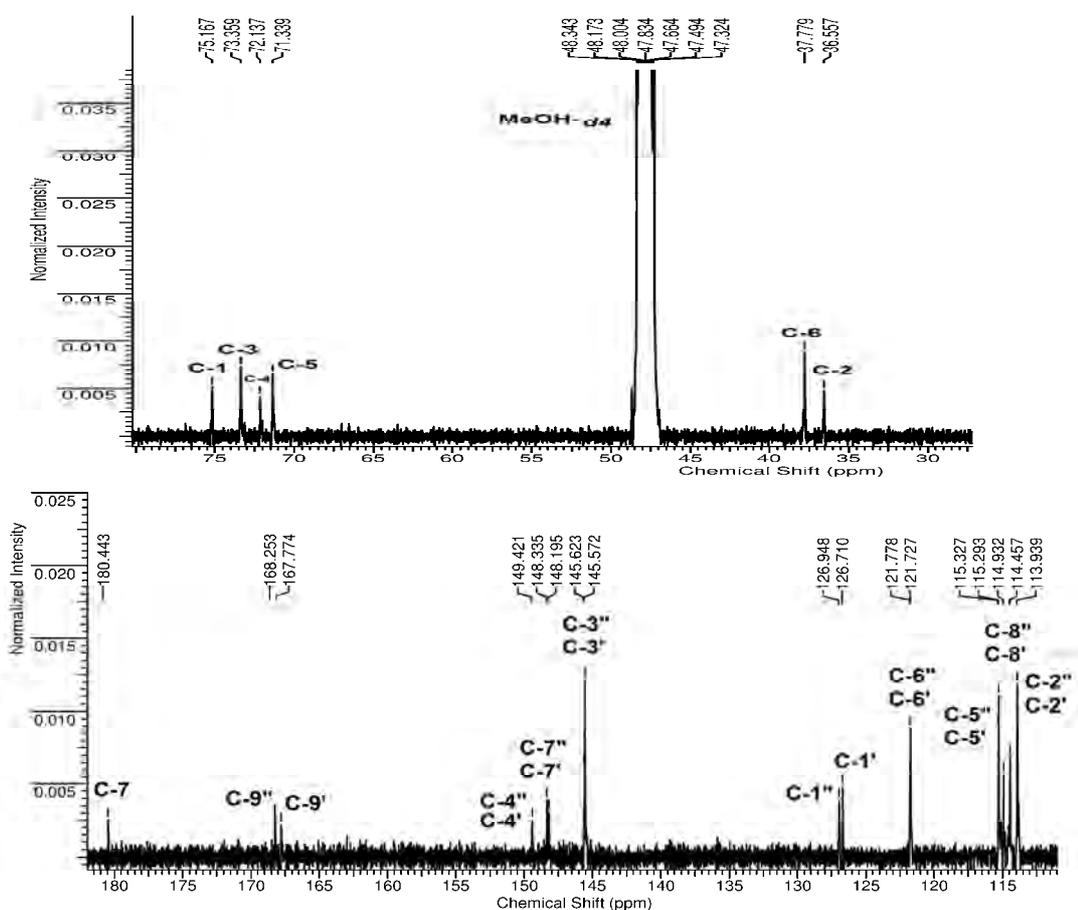
**Tableau III.5.** Données ESI-MS/ $MS^2$  du composé **EMG2(III.3.2)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	$MS^1$	$MS^2$
$C_{25}H_{24}O_{12}$	515 (100), 353 (30.8)	353 (100), 179 (8.0), 191 (3.9), 173 (1.4), 341 (1.2), 335 (1.0)



**Figure III.37.** Spectres de masse HRMS-TOF (A) et ESI-MS/MS (B) en mode négatif du composé **EM2(III.3.2)**.

Afin de déterminer les positions des unités caféoyles sur le cycle quinique, des expériences RMN 1D et 2D ont été réalisées.

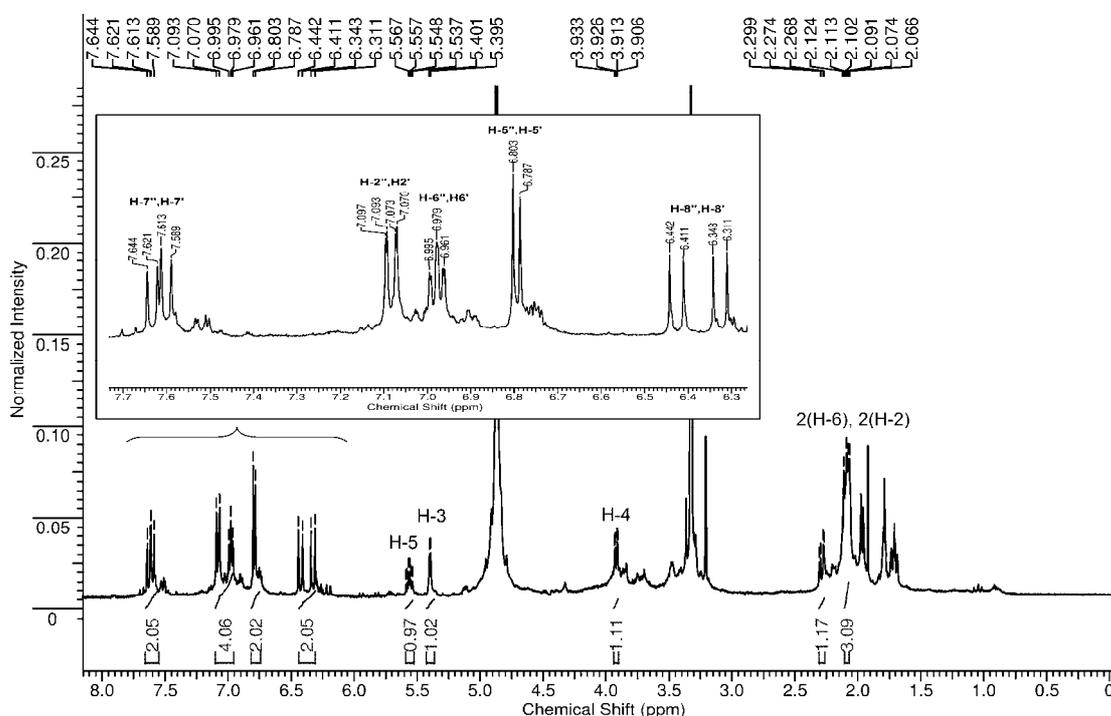


**Figure III.38.** Spectre RMN  $^{13}C$  (125 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **EM2(III.3.2)**.

L'étude du spectre  $^{13}\text{C}$  a permis de mettre en évidence la présence de 25 atomes de carbone (**Fig.III.38**). Tous les signaux aromatiques sont dédoublés ce qui confirme la présence de deux groupements caféoyles. Les signaux  $\delta_{\text{C}}$  168.25 ppm (C-9'') et 167.77 ppm (C-9') sont attribués aux carbonyles des groupements caféoyles alors que les signaux à  $\delta_{\text{C}}$  149.45, 149.42, 145.62 et 145.57 ppm correspondent respectivement aux carbones C-4'', C-4', C-3'' et C-3' portant les hydroxyles sur les cycles aromatiques.

Pour la partie quinique de la molécule, on distingue le signal du carbone carboxylique à  $\delta_{\text{C}}$  180.44 ppm (C-7). Ceux des groupements méthylène ( $\text{CH}_2$ ) à 37.78 ppm (C-6) et 36.56 ppm (C-2), ceux des groupements méthine ( $\text{CH}$ ) à  $\delta_{\text{C}}$  73.40 (C-3), 72.14 (C-4) et 71.34 (C-5), alors que le carbone quaternaire apparaît à  $\delta_{\text{C}}$  75.17 ppm (C-1). Cette dernière valeur située entre  $\delta_{\text{C}}$  73-76 ppm indique que l'hydroxyle en C-1 est libre. Elle serait entre  $\delta_{\text{C}}$  80-81 ppm s'il était substitué (Merfort, 1992).

L'expérience RMN  $^1\text{H}$  a été réalisée afin de déterminer les positions des unités caféoyles sur le cycle quinique. Premièrement, ce spectre (**Fig.III.39**) montre la présence de 17 protons, suggérant l'existence de deux noyaux aromatiques tri-substitués. Les protons aromatiques, attribués aux groupements caféoyles apparaissent dédoublés entre  $\delta$  6–8 ppm. D'autre part, on a observé deux larges doublets à  $\delta$  7.63 ppm ( $J = 15.6$  Hz) et  $\delta$  7.61 ( $J = 16.0$  Hz) ppm correspondant respectivement aux protons H-7'' et H-7'. Ces derniers révèlent des couplages avec les protons H-8'' à  $\delta$  6.43 ppm et H-8' à  $\delta$  6.33 ppm des chaînes latérales des deux groupements caféoyles indiquant des *trans*-conjugaisons (Pauli, 1998).

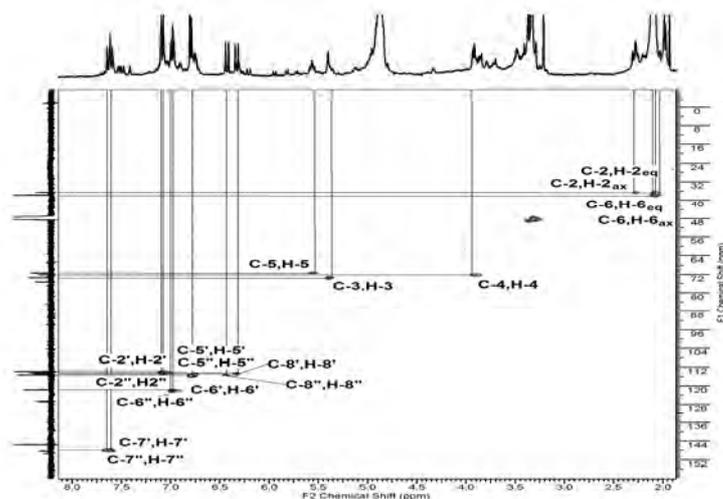


**Figure III.39.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **EMG2(III.3.2)**.

Deuxièmement, sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ , les signaux des protons H-5 ( $\delta$  5.56 ppm) et H-3 ( $\delta$  5.40 ppm) apparaissent déblindés par rapport à leurs positions dans l'acide quinique non substitué indiquant que les groupements caféoyles sont rattachés aux hydroxyles des positions 5 et 3

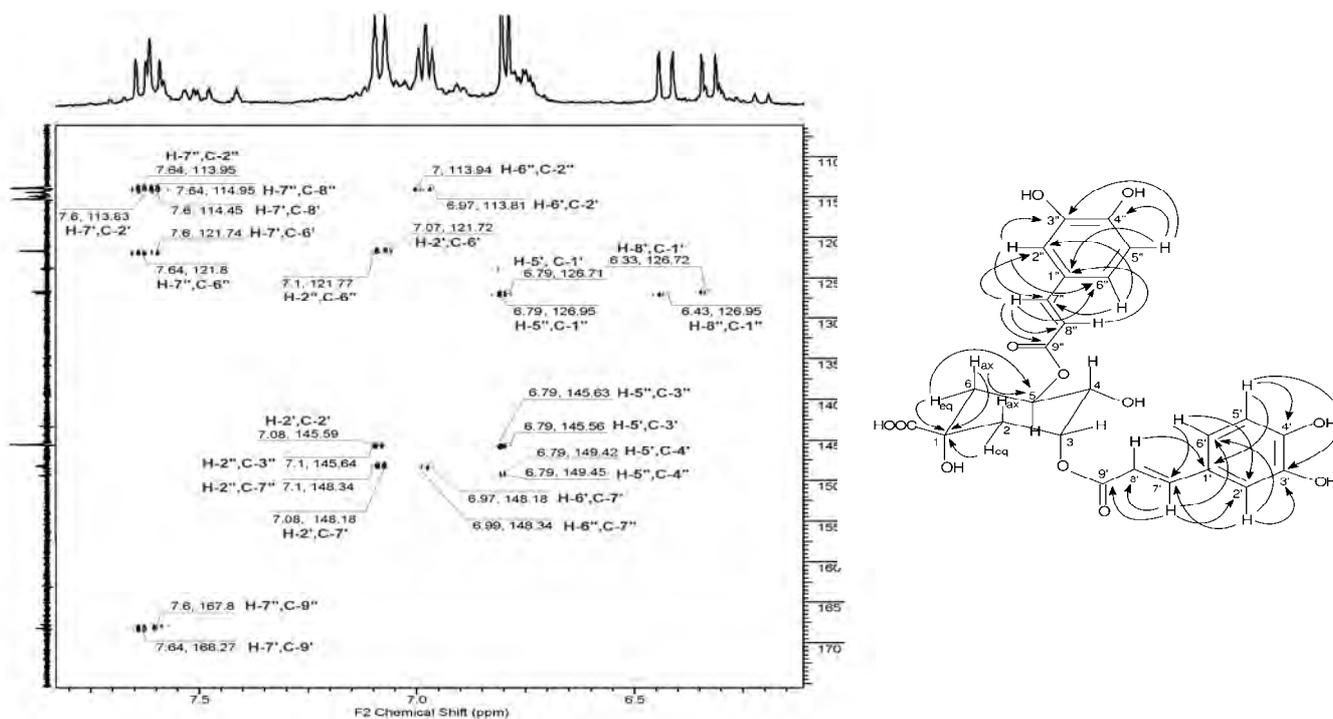
(Clifford, 1986; Pauli, 1998). Par contre, le signal blindé du proton H-4 ( $\delta$  3.92 ppm) montre que l'hydroxyle rattaché au carbone correspondant est libre. D'autre part, le proton H-4 est observé ayant un couplage axiale-axiale ( $J = 9.3$  Hz) avec le proton H-5 et un couplage axial-équatorial ( $J = 3.4$  Hz) avec le proton H-3. Ceci nous a permis d'établir la conformation structurale du cycle quinique. En effet, le premier groupe *O*-caféoyle est en position équatoriale et le second en position axiale dans les positions respectivement 5 et 3.

L'attribution des signaux aux différents noyaux, repose sur les données de corrélations hétéronucléaires courtes distances HSQC (**Fig.III.40**).



**Figure III.40.** Spectre RMN-2D HSQC  $C-H$  du composé **EMQ2(III.3.2)**.

Les attributions des différents pics sont confirmées par les corrélations longues distances de l'expérience HMBC (**Fig.III.41**).



**Figure III.41.** Spectre RMN-2D HMBC et les différentes corrélations hétéronucléaires  ${}^2J$  -  ${}^3J$  du composé **EMQ2(III.3.2)**.

La structure du composé **EMG2(III.3.2)** complétée par les différents couplages  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , notamment pour le cycle quinique, a mené aux mêmes conclusions que celles obtenues pour le composé précédent et cela en utilisant les données de l'expérience TOCSY. Les résultats sont indiqués sur le **Tableau III.6**.

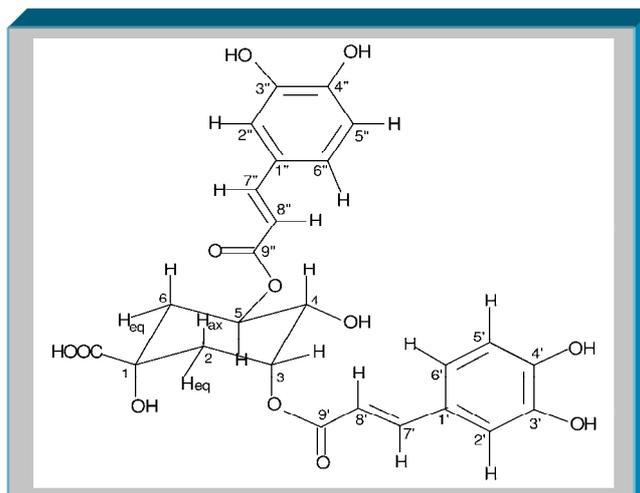
**Tableau III.6.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC et TOCSY du composé **EMG2(III.3.2)**.

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	TOCSY (corrélations $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )
1		75.17		
H-2 <sub>ax</sub>	2.29 <i>dd</i> (15.1, 3.1)			H-2 <sub>eq</sub> , H-3
2		36.56		
H-2 <sub>eq</sub>	2.07 <i>m</i>		C-1	H-2 <sub>ax</sub> , H-3, H-6 <sub>eq</sub>
3	5.40 <i>q</i> (3.1)	73.36		H-2 <sub>ax</sub> , H-4, H-2 <sub>eq</sub>
4	3.92 <i>dd</i> (9.3, 3.4)	72.14		H-5, H-3
5	5.56 <i>ddd</i> (11.1, 9.4, 5.1)	71.34		H-6 <sub>ax</sub> , H-4, H-6 <sub>eq</sub>
H-6 <sub>eq</sub>	2.11 <i>ddd</i> (13.0, 5.1, 2.5)		C-1, C-5	H-6 <sub>ax</sub> , H-5, H-2 <sub>eq</sub>
6		37.78		
H-6 <sub>ax</sub>	2.09 <i>dd</i> (12.9, 11.0)		C-1, C-5	H-6 <sub>eq</sub> , H-5
7		180.44		
1'		126.71		
2'	7.07 <i>d</i> (2.0)	113.81	C-3', C-6', C7'	
3'		145.57		
4'		149.42		
5'	6.79 <i>d</i> (7.8)	115.29		H-6'
6'	6.97 <i>dd</i> (8.0, 2.0)	121.73	C2', C-7'	H-5', H-2'
7'	7.61 <i>d</i> (16.0)	148.19	C-2', C-6', C-8', C-9'	H-8'
8'	6.33 <i>d</i> (16.1)	114.46	C-1'	H-7'
9'		167.77		
1"		126.95		
2"	7.09 <i>d</i> (2.0)	113.94	C-3", C-6", C7"	
3"		145.62		
4"		149.45		
5"	6.79 <i>d</i> (7.8)	115.33	C-1", C-3", C-4"	H-6"
6"	6.99 <i>dd</i> (7.0, 2.0)	121.77	C2", C-7"	H-5", H-2"
7"	7.63 <i>d</i> (15.6)	148.33	C-2", C-6", C-8", C-9"	H-8"
8"	6.43 <i>d</i> (15.6)	114.93	C-1"	H-7"
9"		168.25		

*d*: doublet; *dd*: doublet de doublet; *ddd*: doublet de doublets de doublet; *q*: quadruplet; *m*: multiplet.  
H<sub>ax</sub>: proton axial, H<sub>eq</sub>: proton équatorial.

Selon les données UV, ESI-MS, TOF-MS et RMN, le composé **EMG2(III.3.2)** est identifié comme étant l'acide 3,5-di-*O*-[E]-caféoylquinique. La comparaison des données spectrales de ce composé avec celles de la littérature (Shutz, 2004; Zhu, 2004) a permis une confirmation de la structure de ce produit.

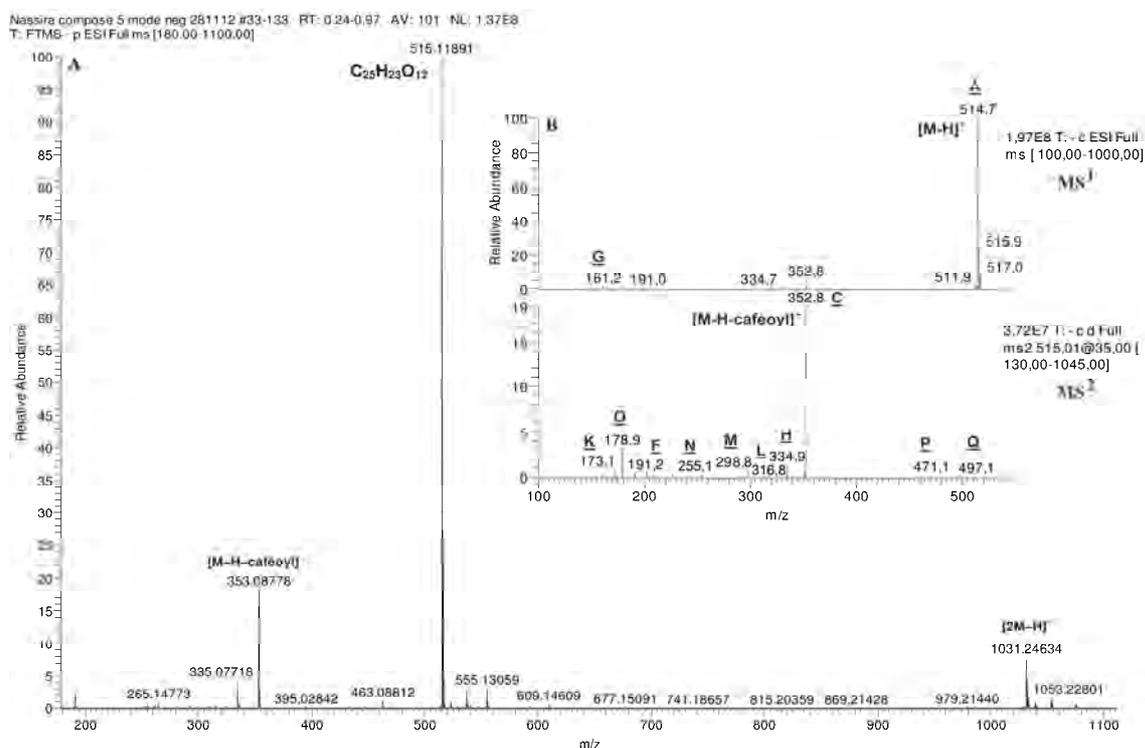
Structure du composé **EMG2(III.3.2)**:  
**Acide 3,5-di-O-[E]-caféoylquinique**



### III.3.3. Identification structurale du composé **EMG3(III.3.3)**

Le composé **EMG3(III.3.3)** se présente sous la forme d'une poudre jaune, montrant comme le composé précédent une fluorescence bleue avec le réactif de Neu. Le profil du spectre HPLC-UV-DAD est aussi typique des dérivés d'acides hydroxycinnamiques avec des maxima d'absorption à 224 et 326 nm et des épaulements à 246 et 300 nm (**Fig.II.23**). L'analyse HPLC a montré que la pureté du composé est de 93.4% à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution (**Fig.III.42.A**) de ce composé en mode négatif présente un ion quasi-moléculaire à  $m/z$  515.11891 (calculée 515.11950)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 516 uma correspondant à la formule brute  $C_{25}H_{24}O_{12}$  avec un degré d'insaturation de 14.



**Figure III.42.** Spectres de masse HR-MS (A) et ESI-MS/MS (B) en mode négatif du composé **EMG3(III.3.3)**.

D'autre part, la fragmentation MS/MS (**Fig.III.42.B**) donne deux pics significatifs à  $m/z$  353 et à  $m/z$  191 correspondant à une perte respectivement d'un groupe caféoyle (-162 uma) ou de deux groupes caféoyle (-2 x 162 uma). Ceci nous a orientés comme pour le composé précédent vers une structure d'acide di-*O*-caféoylquinique (Clifford, 2003; 2005).

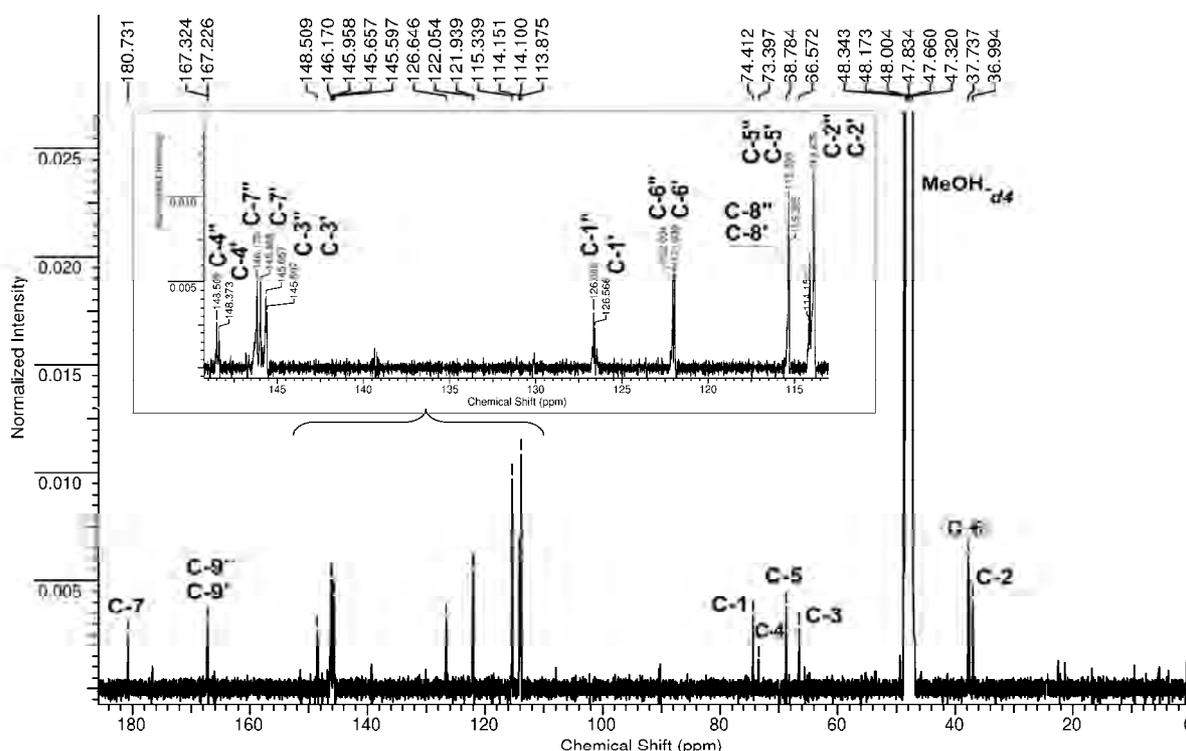
Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif du composé **EMG3(III.3.3)** sont indiqués dans le **Tableau III.7**.

**Tableau III.7.** Données ESI-MS/MS du composé **EMG3(III.3.3)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515(100), 353(5), 161(1)	497(<1), 471(1), 353(100), 335(7), 317(<1), 299(4.0), 255(1), 191(3), 179(17), 173(4)

Comme pour le composé précédent, des expériences RMN 1D et 2D ont été réalisées dans le but de déterminer les positions des unités caféoyles sur le cycle quinique.

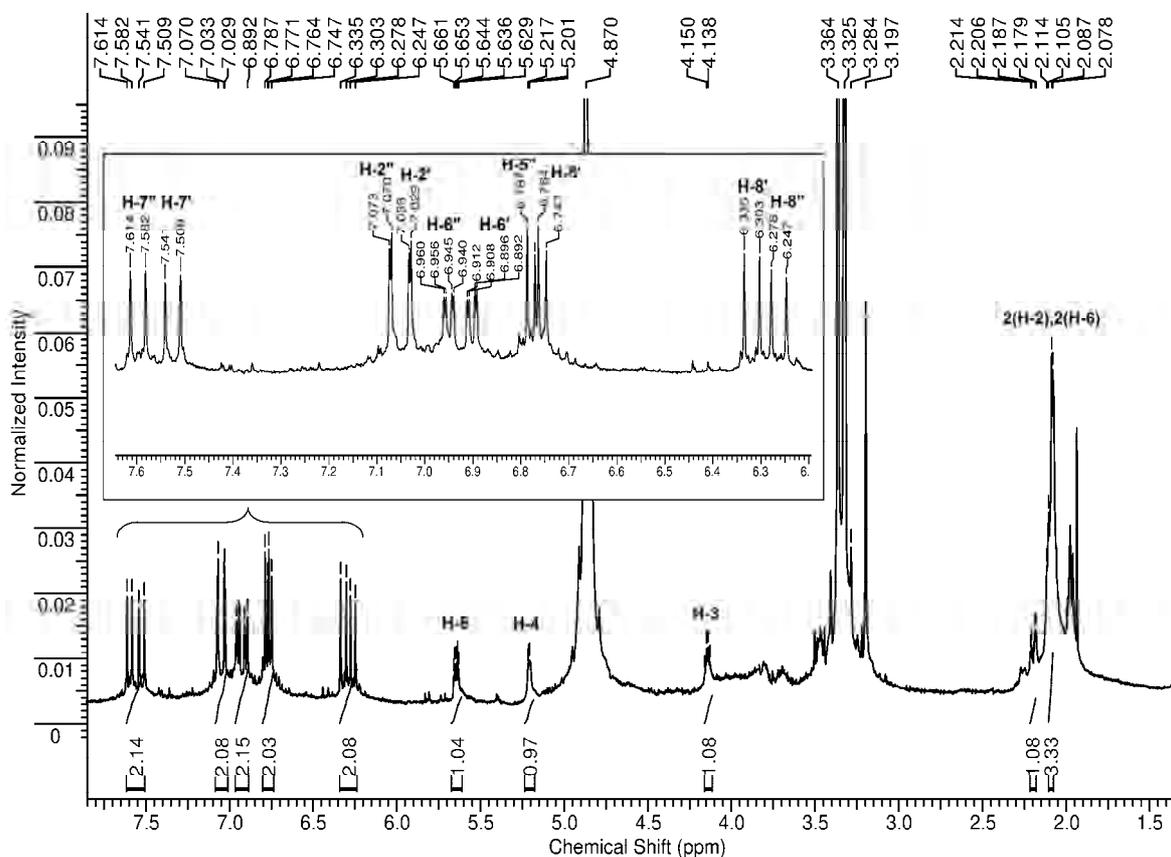
L'étude du spectre <sup>13</sup>C a permis de mettre en évidence la présence de 25 atomes de carbone (**Fig.III.43**). Tous les signaux aromatiques sont dédoublés ce qui confirme la présence de deux groupements caféoyles. Pour la partie quinique de la molécule, on distingue le signal du carbone carboxylique à  $\delta_c$  180.73 ppm (C-7), ceux des groupements méthylène à 37.74 ppm (C-6) et 36.99 ppm (C-2), ceux des groupements méthine à  $\delta_c$  73.40 (C-4), 68.78 (C-5) et 66.57 (C-3) et celui du carbone quaternaire à  $\delta_c$  74.41 ppm (C-1).



**Figure III.43.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>) du composé **EMG3(III.3.3)**.

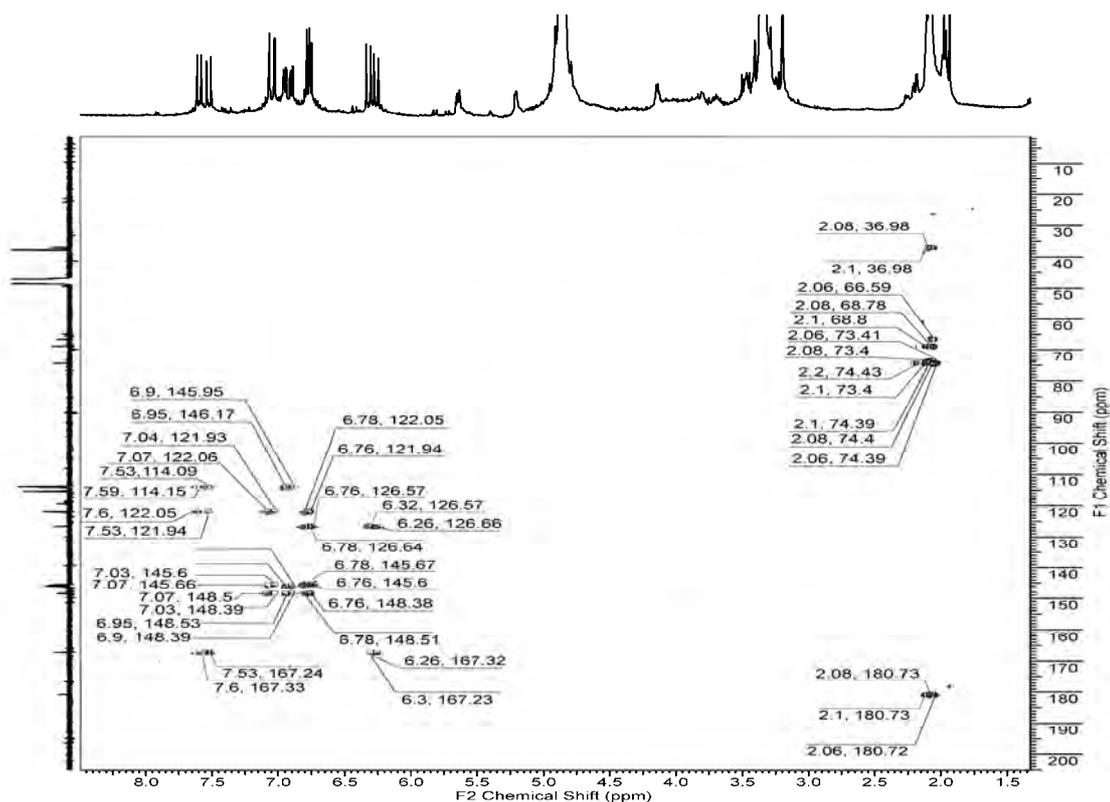
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé (**Fig.III.44**) a montré la présence de 17 protons, suggérant la présence de deux noyaux aromatiques tri-substitués. Les protons aromatiques, attribués aux groupements caféoyles apparaissent dédoublés vers  $\delta$  6–8 ppm, identiques à ceux déjà analysés pour le composé précédent. La différence est constatée au niveau du cycle quinique.

En effet, le spectre montre des signaux limités dans la zone 2.06 – 5.64 ppm du spectre indiquant la présence de sept protons appartenant au cycle quinique. Ainsi, les protons H-5 ( $\delta$  5.64 ppm) et H-4 ( $\delta$  5.21 ppm) apparaissent déblindés par rapport à leurs positions dans l'acide quinique non substitué suggérant que les groupements caféoyles sont rattachés aux hydroxyles des positions 5 et 4 (Clifford, 1986; Pauli, 1998). Par contre, le signal en position plus blindée du proton H-3 ( $\delta$  4.14 ppm), indique que l'hydroxyle rattaché au carbone correspondant est libre.



**Figure III.44.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **EMG3(III.3.3)**.

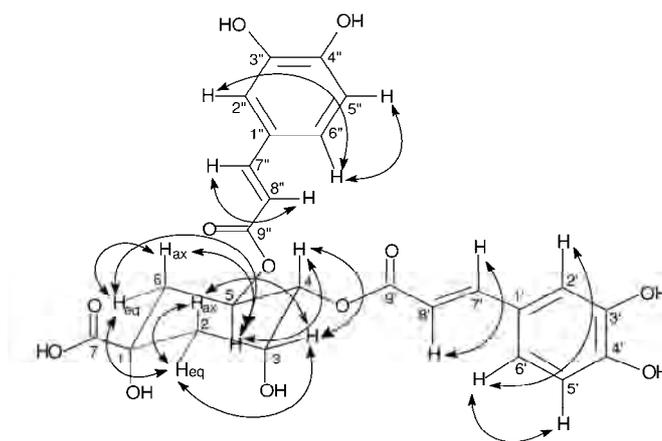
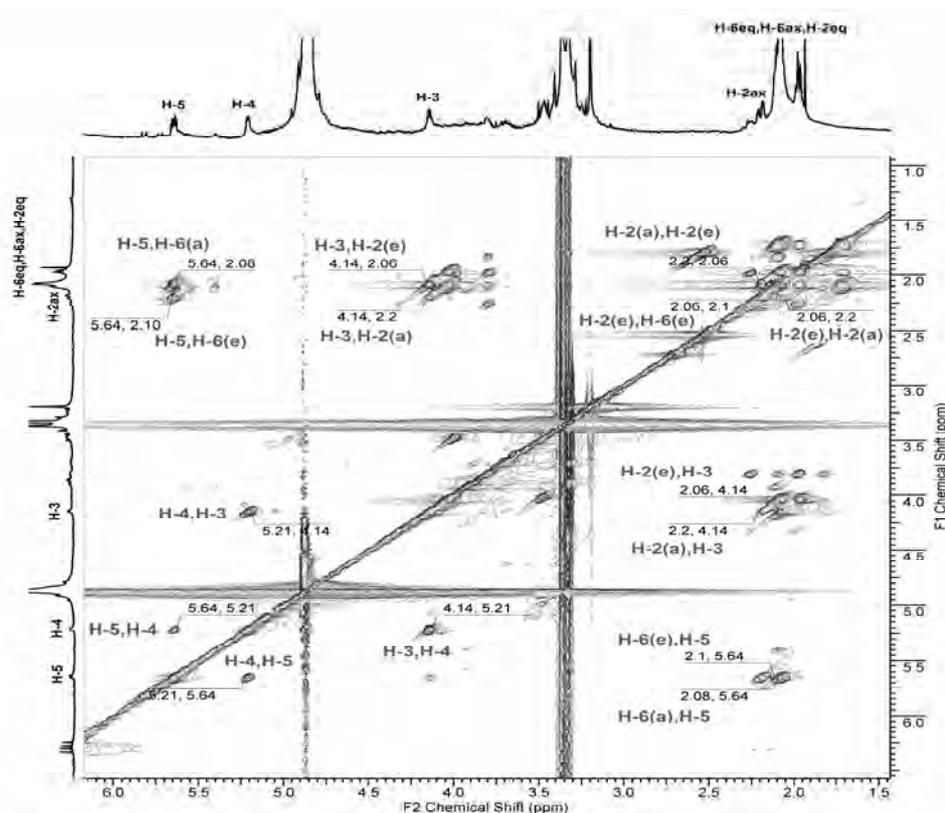
L'attribution des signaux aux différents noyaux, repose sur les données de corrélations hétéronucléaires courtes distances HSQC. Les résultats sont indiqués dans le **Tableau III.8**. Les attributions des différents pics ont été également confirmées par les corrélations longues distances de l'expérience HMBC (**Fig.III.45**).



**Figure III.45.** Spectre RMN-2D HMBC et les différentes corrélations hétéronucléaires  ${}^2J-{}^3J$  du composé **EMG3(III.3.3)**.

La structure de ce composé est complétée par les différents couplages  ${}^1\text{H}-{}^1\text{H}$  du cycle quinique en utilisant les données de l'expérience TOCSY (**Fig.III.46**). Ainsi, le premier proton déblindé H-4 (dd,  $J = 8.6, 2.7$  Hz) est indiqué par la corrélation di-axiale (H-4/H-5) et une corrélation axiale-équatoriale (H-4/H-3). D'autre part, pour le second proton déblindé H-5 (ddd,  $J = 9.0, 8.2, 4.3$  Hz), le spectre TOCSY montre des corrélations di-axiales pour les couplages H-5/H-6ax et H-5/H-4, et axiale-équatoriale pour le couplage H-5/H-6eq. Ces résultats sont en accord avec les valeurs publiées (Pauli, 1998). Ceci nous a permis d'établir la conformation structurale du cycle quinique. En effet, les deux groupements *O*-caféoyle sont équatoriaux dans les positions 5 et 4.

En plus, les signaux des protons méthéniques 2H(2) et 2H(6) sont détectés entre  $\delta$  2.06–2.20 ppm. Le proton axial H-6ax apparaît comme un doublet de doublet en présentant un large couplage vicinal *trans* di-axial avec le proton H-5 ( $^3J = 9.0$  Hz). Le proton H-6eq apparaît comme un doublet de doublets de doublet et montre une corrélation longue distance avec le proton H-2eq ( $^4J = 2.4$  Hz) qui peut être expliquée par un couplage à travers quatre liaisons de type-W (Barfield, 1969). Par ailleurs, les protons liés à la position C-2 sont localisés à  $\delta$  2.20 (dd,  $J = 13.2, 4.3$  Hz, H-2ax) et  $\delta$  2.06 (m, H-2eq).



**Figure III.46.** Spectre RMN-2D TOCSY et les différentes corrélations homonucléaires du composé **EM3(III.3.3)**.

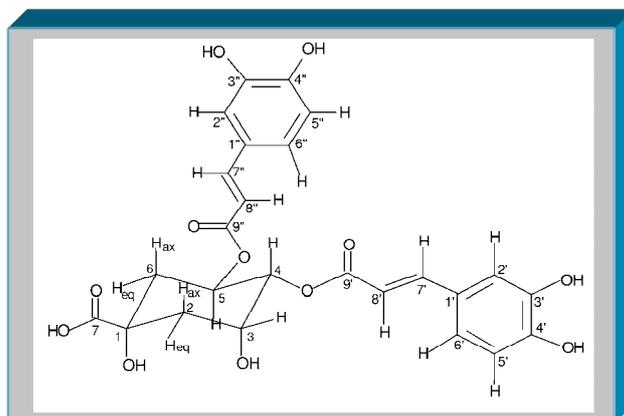
**Tableau III.8.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC et TOCSY du composé **EMG3(III.3.3)**.

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, J(Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	TOCSY (corrélations $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )
1		74.41		
H-2 <sub>ax</sub>	2.20 <i>dd</i> (13.2, 4.3)		C-1	H-2 <sub>eq</sub> , H-3
H-2 <sub>eq</sub>	2.06 <i>m</i>	36.99	C-1, C-3, C-4, C-7	H-2 <sub>ax</sub> , H-3, H-6 <sub>eq</sub>
3	4.14 <i>q</i> (4.9)	66.57		H-2 <sub>ax</sub> , H-4, H-2 <sub>eq</sub>
4	5.21 <i>dd</i> (8.6, 2.7)	73.40		H-5, H-3
5	5.64 <i>ddd</i> (9.0, 8.2, 4.3)	68.78		H-6 <sub>ax</sub> , H-4, H-6 <sub>eq</sub>
H-6 <sub>eq</sub>	2.10 <i>ddd</i> (13.5, 4.4, 2.4)		C-1, C-4, C-5, C-7	H-5, H-2 <sub>eq</sub>
H-6 <sub>ax</sub>	2.08 <i>dd</i> (13.5, 9.0)	37.74	C-1, C-4, C-5, C-7	H-5
7		180.73		
1'		126.57		
2'	7.03 <i>d</i> (2.4)	113.83	C-3', C-6', C7'	H-6'
3'		145.60		
4'		148.37		
5'	6.76 <i>d</i> (8.3)	115.31	C-1', C-3', C-4', C-6'	H-6'
6'	6.90 <i>dd</i> (8.3, 2.0)	121.94	C2', C-4', C-7'	H-5', H-2'
7'	7.53 <i>d</i> (16.1)	145.96	C-6', C-8', C-9'	H-8'
8'	6.32 <i>d</i> (16.1)	114.10	C-1', C-9'	H-7'
9'		167.23		
1''		126.65		
2''	7.07 <i>d</i> (2.0)	113.88	C-3'', C-6'', C7''	H-6''
3''		145.66		
4''		148.51		
5''	6.78 <i>d</i> (8.3)	115.34	C-1'', C-3'', C-4'', C-6''	H-6''
6''	6.95 <i>dd</i> (8.1, 2.2)	122.05	C2'', C-4'', C-7''	H-5'', H-2''
7''	7.60 <i>d</i> (15.6)	146.17	C-6'', C-8'', C-9''	H-8''
8''	6.26 <i>d</i> (15.6)	114.15	C-1'', C-9''	H-7''
9''		167.32		

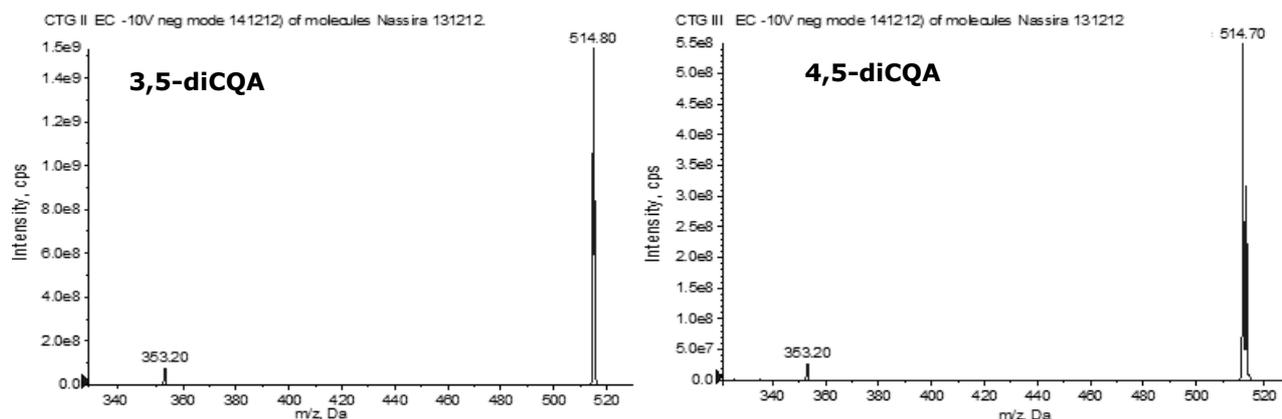
*d*: doublet; *dd*: doublet de doublet; *ddd*: doublet de doublets de doublet; *q*: quadruplet; *m*: multiplet.  
H<sub>ax</sub> : proton axial; H<sub>eq</sub> : proton équatorial.

Selon les données UV, ESI-MS, HR-MS et RMN, le composé **EMG3(III.3.3)** est identifié comme étant l'acide 4,5-di-O-[E]-caféoylquinique. Une comparaison des données spectrales de ce composé avec celles de la littérature (Zhu, 2004; Han, 2008) a permis de confirmer l'identité de ce produit.

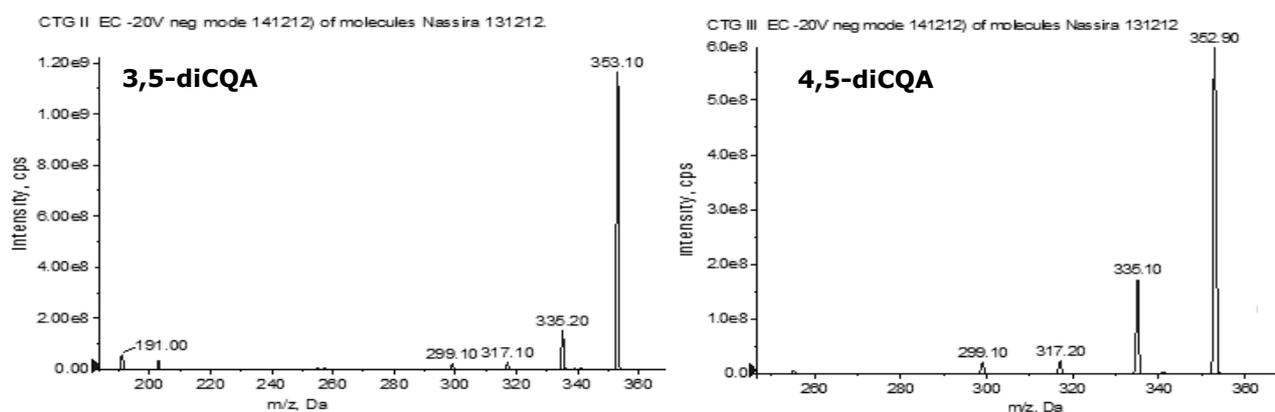
Structure du composé **EMG3(III.3.3)**:  
**Acide 4,5-di-O-[E]-caféoylquinique**



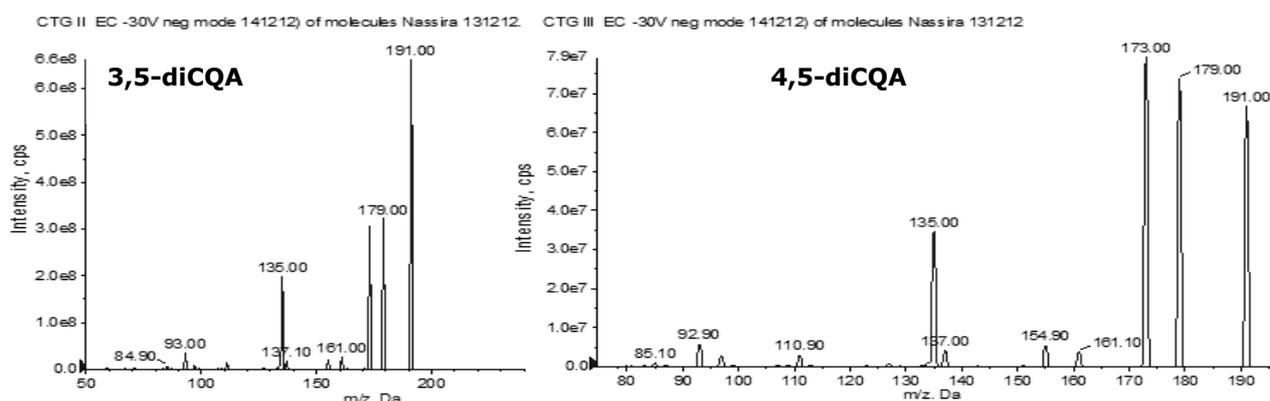
Afin de mieux distinguer par la spectrométrie de masse les deux isomères de position 3,5-diCQA(**III.3.2**) et 4,5-diCQA(**III.3.3**) identifiés au cours de ce travail, on a eu recours à la spectrométrie de masse à plusieurs étapes MS<sup>n</sup>. Ceci nous a permis de déduire que la différence entre les deux isomères réside dans les spectres MS<sup>3</sup> (**Fig.III.47.C**). Ainsi, l'isomère 3,5-diCQA présente un pic de base à *m/z* 191 alors que le second isomère 4,5-diCQA se distingue par un pic intense à *m/z* 173, un fragment issu de la rupture d'une unité caféoyloyle en position 4 de l'acide quinique selon le mécanisme de fragmentation proposé (**Fig.III.48**) et qui confirme une substitution en position 4.



**Figure. III.47.A.** Spectres de masse MS<sup>1</sup> en mode négatif des isomères 3,5-diCQA et 4,5-diCQA.



**Figure. III.47.B.** Spectres de masse MS<sup>2</sup> en mode négatif des isomères 3,5-diCQA et 4,5-diCQA.



**Figure. III.47.C.** Spectres de masse MS<sup>3</sup> en mode négatif des isomères 3,5-diCQA et 4,5-diCQA.

Les données MS<sup>1</sup>, MS<sup>2</sup>, et MS<sup>3</sup> en mode négatif sont indiquées dans le **Tableau III.9**.

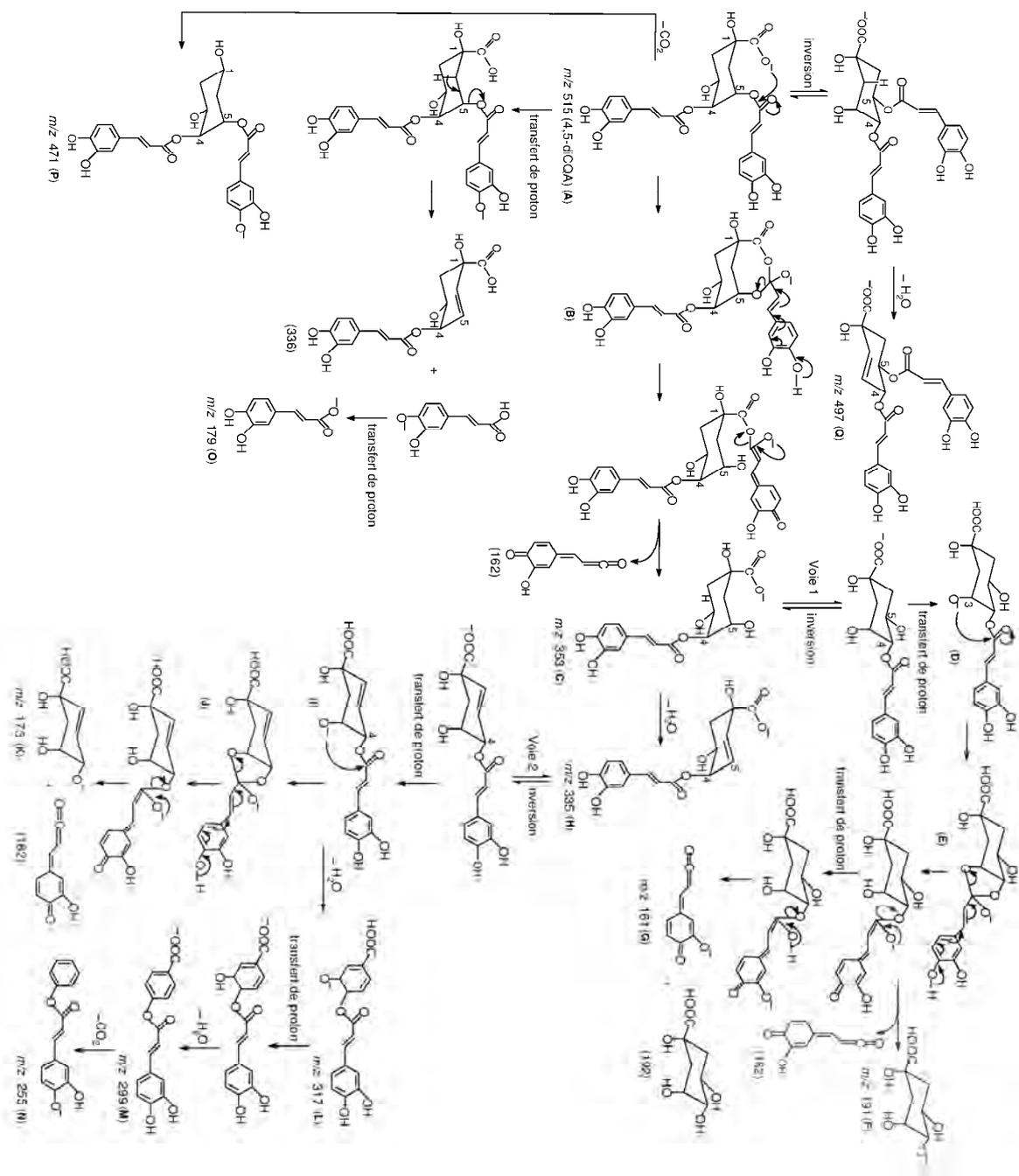
**Tableau III.9.** Données MS<sup>1</sup>, MS<sup>2</sup>, et MS<sup>3</sup> en mode négatif des composés 3,5-diCQA et 4,5-diCQA.

Isomère	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>
3,5-diCQA	515(100), 353(5)	353(100), 335(13), 173(11.6), 179(9.5), 191(4.8), 203(3.1), 317(2.2), 299(1.7)	191(100), 179(48.6), 173(46.0), 135(30.1), 353(5.2)
4,5-diCQA	515(100), 353(7)	353(100), 335(28.9), 173(24.9), 179(17.8), 191(6.7), 203(5.6), 317(3.7), 299(3.4), 161(2.1)	173(100), 179(93.1), 191(84.2), 135(43.6), 353(16.9), 161(4.6)

Le mécanisme de fragmentation de l'acide 4,5-di-*O*-caféoylquinique(**III.3.3**) est également proposé (**Fig.III.48**).

- L'ionisation se fait initialement avec le proton le plus acide de la molécule porté par la fonction COOH et cela dans tous les dérivés de l'acide quinique suivie d'une migration séquentielle de proton (Clifford, 2005). D'autre part, sachant que la rupture de la partie acétyle en position 4 est très difficile, c'est une perte d'une unité caféoyle en position 5 qui doit se faire initialement (Clifford, 2003).
- En considérant l'ion moléculaire déprotoné **A** à  $m/z$  515  $[M-H]^-$ , on suggère la perte de la première unité caféoyle en impliquant COO<sup>-</sup> ayant une conformation chaise 1,3-*syn*-diaxiale avec le dérivé caféique attaché à C5 (Clifford, 2005). Ainsi, COO<sup>-</sup> agit comme un nucléophile en attaquant le carbonyle de l'acétyle attaché à C5 formant ainsi l'intermédiaire bicyclique **B**. Puis, une migration du proton de l'hydroxyle en para va conduire à la fragmentation permettant la formation de **C** à  $m/z$  353  $[M-H-C_9H_6O_3]^-$  qui est le fragment majoritaire en MS<sup>2</sup>, et cela par une perte de la première unité caféoyle (-162 uma). A partir de là, nous avons considéré deux voies de fragmentation afin d'expliquer les fragments observés sur le spectre (**Fig.III.42B**).
- Dans la première voie du mécanisme proposé, une inversion de **C** suivie d'un transfert intramoléculaire de proton conduisent à l'intermédiaire **D** où l'hydroxyle déprotoné en C3 agit comme un nucléophile en attaquant le carbonyle de l'acétyle attaché à C4 formant ainsi l'intermédiaire bicyclique **E**. On a d'une part, une fragmentation qui va aboutir à la perte d'une seconde unité caféoyle engendrant **F** à  $m/z$  191  $[M-H-2x162]^-$ . Et d'autre part, un transfert intramoléculaire de proton va permettre la rupture de l'acide quinique (-192 uma) comme fragment neutre et l'obtention du fragment **G** à  $m/z$  161  $[M-H\text{-caféoyl-acide quinique}]^-$ .
- Dans la deuxième voie du mécanisme, l'élimination d'une molécule d'eau conduit à **H** à  $m/z$  335  $[M-H-H_2O\text{-caféoyl}]^-$ . Puis, une inversion de **H** suivie d'un transfert intramoléculaire de proton ont permis de conduire à **I**. A partir de ce dernier fragment, deux processus de fragmentation sont envisagés. Premièrement, attaque nucléophile et transfert de proton intramoléculaire où l'hydroxyle déprotoné en C3 va agir comme un nucléophile en attaquant le carbonyle de l'acétyle attaché à C4 formant ainsi l'intermédiaire bicyclique **J**. Suite à cela, la rupture de la seconde unité caféoyle liée à C4, va conduire à la formation du fragment **K** à  $m/z$  173  $[M-H-H_2O-2x\text{caféoyl}]^-$ .

**Figure III.48.** Mécanisme de fragmentation de l'acide 4,5-O-dicaféoylquinique en mode négatif ESI-MS/MS.



- Deuxièmement, l'élimination d'une molécule d'eau au niveau de **I** va mener au fragment **L** à  $m/z$  317  $[M-H-\text{caféoyl}-2xH_2O]^-$ . En poursuivant dans cette séquence, la perte d'une seconde molécule d'eau va permettre une aromatisation complète du noyau de l'acide benzoïque pour donner le fragment **M** à  $m/z$  299  $[M-H-\text{caféoyl}-3xH_2O]^-$ . Enfin, la perte du dioxyde de carbone ( $-44$  uma) va engendrer le fragment **N** à  $m/z$  255  $[M-H-\text{caféoyl}-2xH_2O-CO_2]^-$ .
- Par ailleurs, en considérant le fragment quasi-moléculaire **A**, la perte d'un dioxyde de carbone a permis d'aboutir au fragment **P** à  $m/z$  471  $[M-H-CO_2]^-$ . Dans une autre séquence, une inversion de **A** suivie de l'élimination d'une molécule d'eau vont mener à la formation du fragment **Q** à  $m/z$

497 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>. En plus, une élimination du fragment neutre (-336) a permis l'obtention de l'acide caféique déprotoné **O** à  $m/z$  179 [acide caféique-H]<sup>-</sup>.

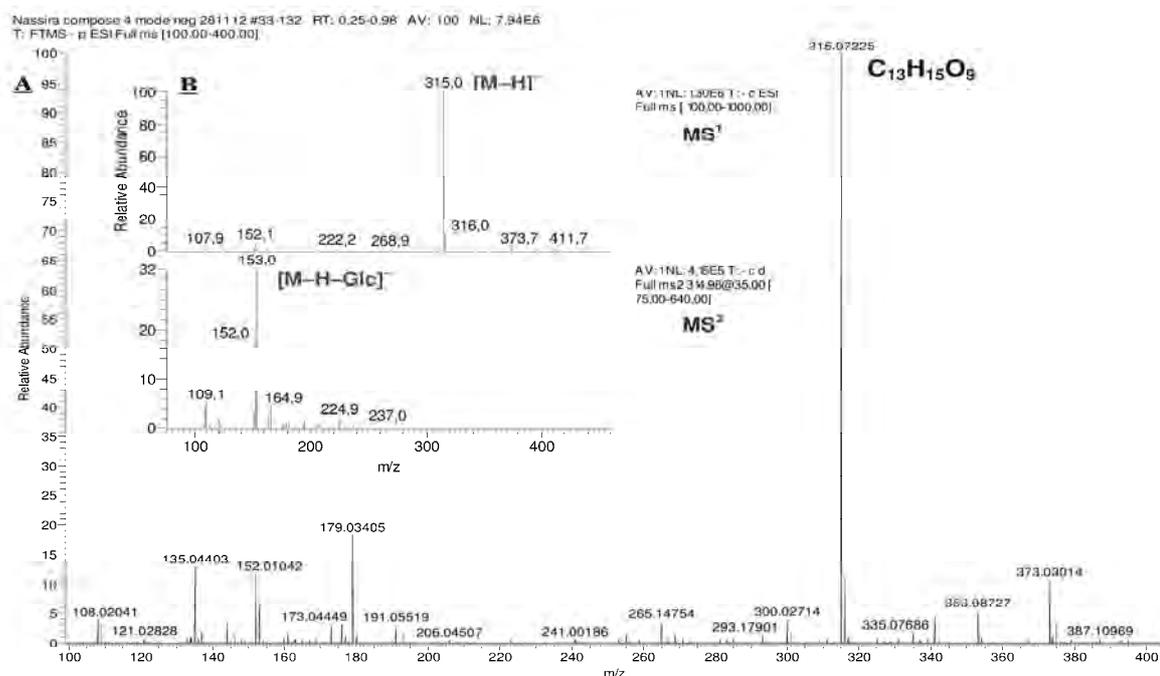
### III.4. Identification structurale de composés dérivés d'acides phénoliques et de coumarines isolés de *Convolvulus tricolor*

Ces composés ont été isolés de l'extrait méthanolique des écorces de graines (**EMEG**) de *C. tricolor* (cf. II.5.2.6).

#### III.4.1. Identification structurale du composé **EMEG1**(III.4.1)

Le composé **EMEG1**(III.4.1) est obtenu sous la forme de cristaux blancs. La révélation au réactif de Neu a donné une coloration bleue sous UV à 365 nm laissant envisager une structure d'acide-phénol (Wagner, 1996). Le spectre UV-DAD (**Fig.II.25**) de ce composé présente des maxima d'absorption à 230, 292 et 320 nm caractéristiques d'un acide phénolique (Sakushima, 1995). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 80.6% à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution enregistré HR-MS (**Fig.III.49.A**) de ce composé en mode négatif présente un ion quasi-moléculaire de  $m/z$  315.07225 (calculée pour 315.07216) [M-H]<sup>-</sup> qui suggère une masse moléculaire de 316 uma correspondant à la formule brute C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub> qui admet un nombre d'insaturation  $i = 6$ . D'autre part, la fragmentation MS/MS de l'analyse LC/ESI-MS(-) donne un pic de base à  $m/z$  153 [M-H-Glc]<sup>-</sup> (**Fig.III.49.B**) qui indique la perte d'un hexose, correspondant ainsi à la masse déprotonée de l'acide gentisique (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>). Par la suite, ce fragment ayant une perte de CO<sub>2</sub> est représenté par le pic à  $m/z$  109 [M-H-162-44]<sup>-</sup>.



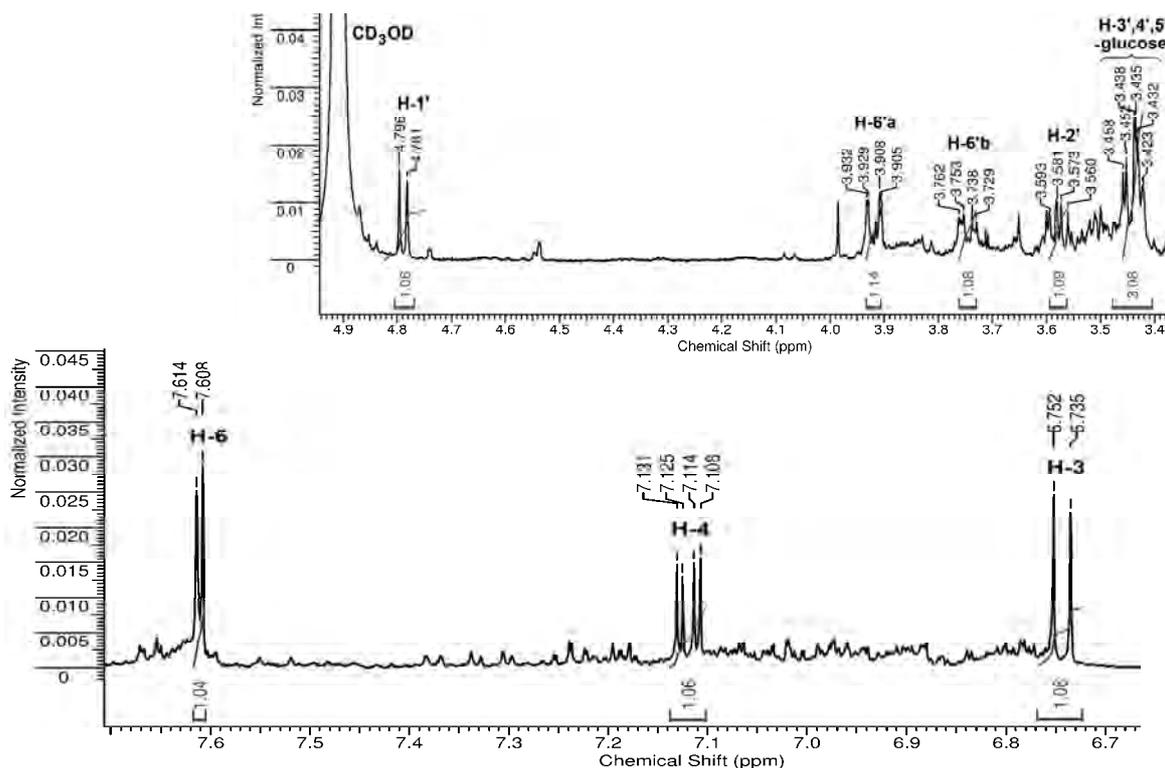
**Figure III.49.** Spectres de masse HR/MS (**A**) et ESI-MS/MS (**B**) en mode négatif du composé **EMEG1**(III.4.1).

Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif de ce composé sont indiqués sur le **Tableau III.10**.

**Tableau III.10.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMEG1(III.4.1)**.

Formule	ESI (-) ( <i>m/z</i> , %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	631(2.6), 315(100), 152(4), 108(2)	153(100), 109(15), 108(12)

Le spectre RMN <sup>1</sup>H (**Fig.III.50**) présente trois signaux dans la zone aromatique correspondant à un système ABX impliquant les protons de résonance δ<sub>H</sub> 7.61 (d, *J* = 3.0 Hz, H-6), 7.12 (dd, *J* = 8.8, 3.1 Hz, H-4), et 6.76 (d, *J* = 8.7 Hz, H-3). Le proton H-4 présente un couplage *ortho* avec le proton H-3 et un couplage *mé*ta avec le proton H-6. Ces signaux sont caractéristiques d'un cycle benzénique trisubstitué en positions 1, 2 et 5. La présence d'un sucre est détectée par le doublet correspondant au proton anomérique H-1' à 4.79 ppm avec une constante de couplage *J* = 7.3 Hz (couplage di-axial avec le proton H-2') indiquant la configuration β de l'hexose. Les signaux des autres protons du sucre sont cités dans le **Tableau III.11**; parmi lesquels on distingue le signal du proton H-3' de résonance δ<sub>H</sub> 3.43 apparaissant sous la forme d'un triplet (*J* = 9.5 Hz). Cette donnée est caractéristique du glucose (Shimoda, 2002).

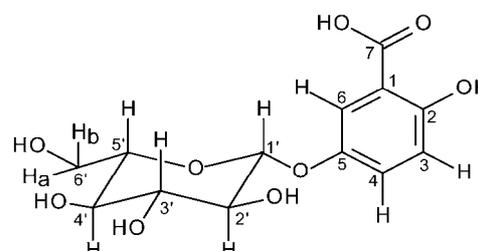


**Figure III.50.** Spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMEG1(III.4.1)**.

L'attribution des signaux aux différents noyaux a été faite sur la base des données de corrélations hétéronucléaires courtes distances HSQC. Les résultats des différents déplacements en RMN-<sup>1</sup>H et RMN-<sup>13</sup>C sont indiqués sur le **Tableau III.11**.

**Tableau III.11.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **EMEG1(III.4.1)**.

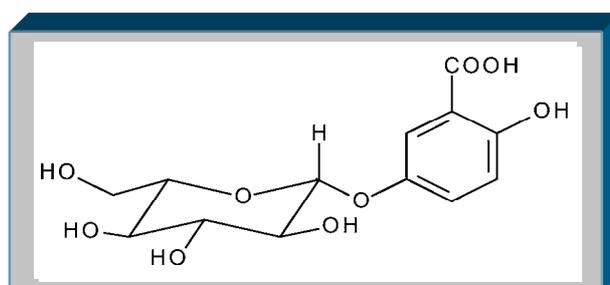
Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ * $\delta$ (ppm)
1		
2		
3	6.76, <i>d</i> , (8.7)	115.7
4	7.12, <i>dd</i> , (8.8 et 3.1)	115.5
5		
6	7.61, <i>d</i> , (3.0)	118.1
7		
1'	4.79, <i>d</i> , (7.2)	102.5
2'	3.57, <i>dd</i> , (10.1 et 6.9)	75.8
3'	3.43, <i>t</i> , (9.5)	76.6
4'	3.44, <i>t</i> , (10.0)	73.6
5'	3.42, <i>m</i> , (9.5)	77.9
H-6' <sub>a</sub>	3.92, <i>dd</i> , (12.1 et 1.6)	
6'		61.1
H-6' <sub>b</sub>	3.74, <i>dd</i> , (11.9 et 4.6)	



*d*: doublet; *dd*: doublet de doublet; *t*: triplet; *m*: multiplet.

\* valeurs obtenues de spectre de corrélations HSQC.

L'ensemble des données précédentes comparées à celles de la littérature (Sakushima, 1995; Shimoda, 2002; Shakya, 2006) nous a permis d'établir la structure du composé **EMEG1(III.4.1)** comme étant l'acide 2,5-dihydroxy benzoïque-5-*O*- $\beta$ -glucoside (acide gentisique-5-*O*- $\beta$ -glucoside).



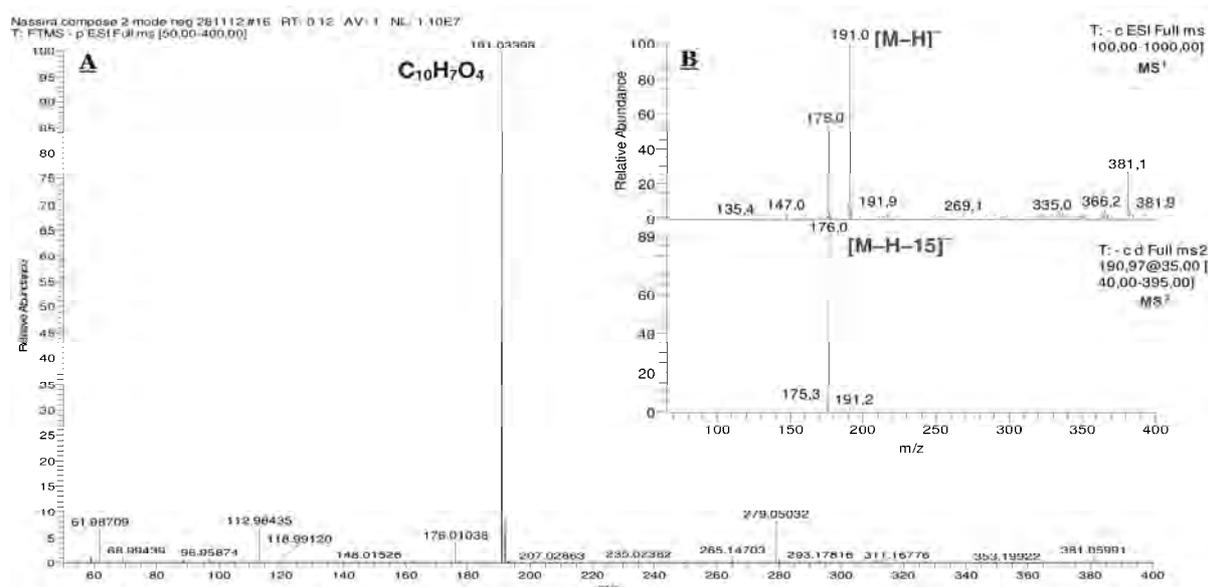
Structure du composé **EMEG1(III.4.1)**:

**Acide gentisique-5-*O*- $\beta$ -glucoside**

### III.4.2. Identification structurale du composé **EMEG2(III.4.2)**

Le composé **EMEG2(III.4.2)** se présente sous la forme de cristaux jaunâtres. Par CCM, la révélation avec KOH 10% a donné une coloration bleu-violacé sous UV à 365 nm laissant envisager une structure type coumarine (Wagner, 1996). Le profil du spectre UV-DAD (**Fig.II.25**) de ce composé est typique des coumarines avec deux maxima à 228 et 344 nm et deux épaulements vers 252 et 298 nm (Xia, 2007). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 99.7% à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution (**Fig.III.51.A**) montre un ion quasi-moléculaire à  $m/z$  191.03396 (calculée 191.03498)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 192 uma de formule brute  $C_{10}H_8O_4$  avec un degré d'insaturation de 7. D'autre part, la fragmentation MS/MS révèle un pic de base à  $m/z$  176  $[M-H-15]^-$  qui indique la perte d'un groupement méthyle (**Fig.III.51.B**).



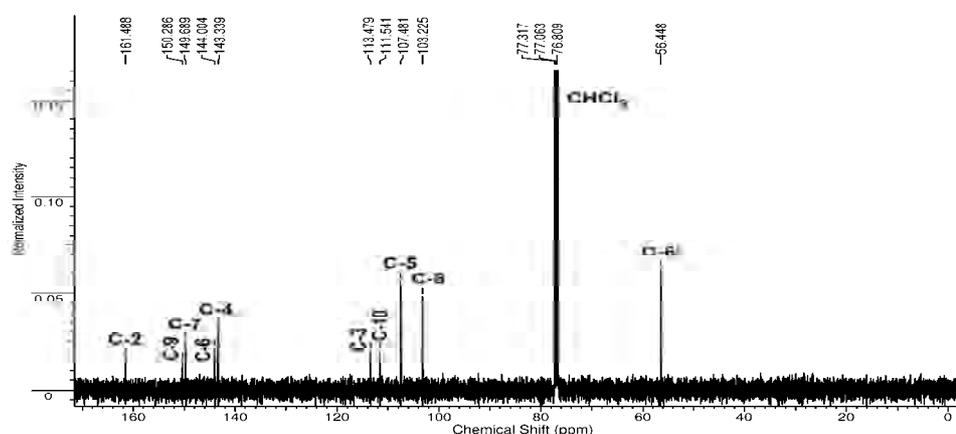
**Figure III.51.** Spectres de masse HR/MS (**A**) et ESI-MS/MS (**B**) en mode négatif du composé **EMEG2(III.4.2)**.

Les principaux fragments donnés par les spectres  $MS^1$  et  $MS^2$  en mode *electrospray* négatif de ce composé sont indiqués sur le **Tableau III.12**.

**Tableau III.12.** Données ESI-MS/ $MS^2$  du composé **EMEG2(III.4.2)**.

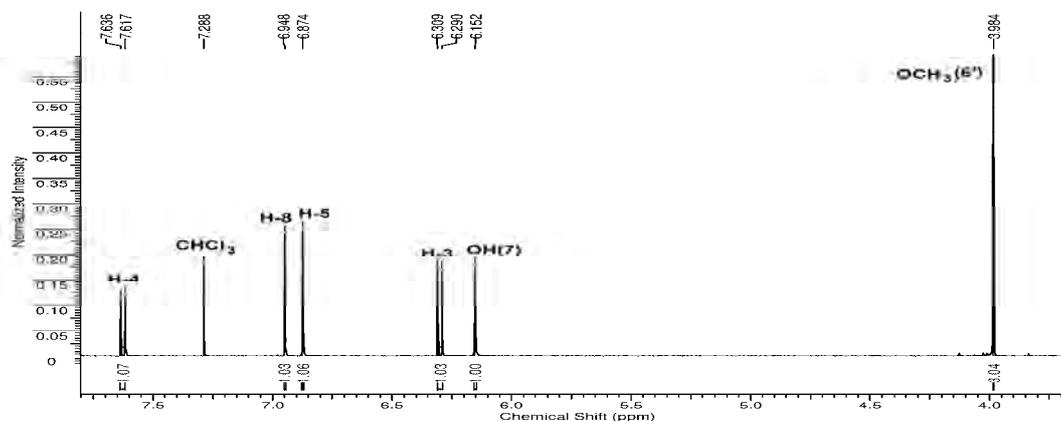
Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	$MS^1$	$MS^2$
$C_{10}H_8O_4$	381(26.1), 191(100), 176(53)	176(100), 175(5), 191(2)

Afin d'élucider la structure de cette coumarine, premièrement un spectre RMN  $^{13}C$  a été réalisé et qui confirme la présence de 10 atomes de carbone (**Fig.III.52**).



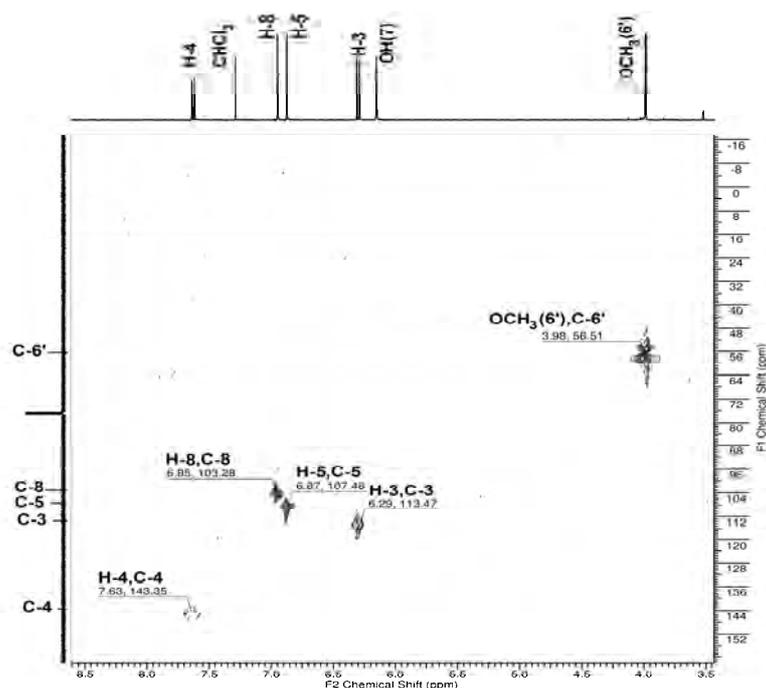
**Figure III.52.** Spectre RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ) du composé **EMEG2(III.4.2)**.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Fig.III.53**) a permis de mettre en évidence les deux doublets des protons H-3 et H-4 du noyau coumarine ( $\delta_{\text{H}}$  6.30 et 7.63 ppm,  $J = 9.5$  Hz). En plus, on retrouve deux singulets dans la zone aromatique des protons H-5 ( $\delta_{\text{H}} = 6.87$  ppm) et H-8 ( $\delta_{\text{H}} = 6.95$  ppm), ainsi qu'un signal caractéristique du groupement méthoxyle intégrant pour trois protons à 3.98 ppm.



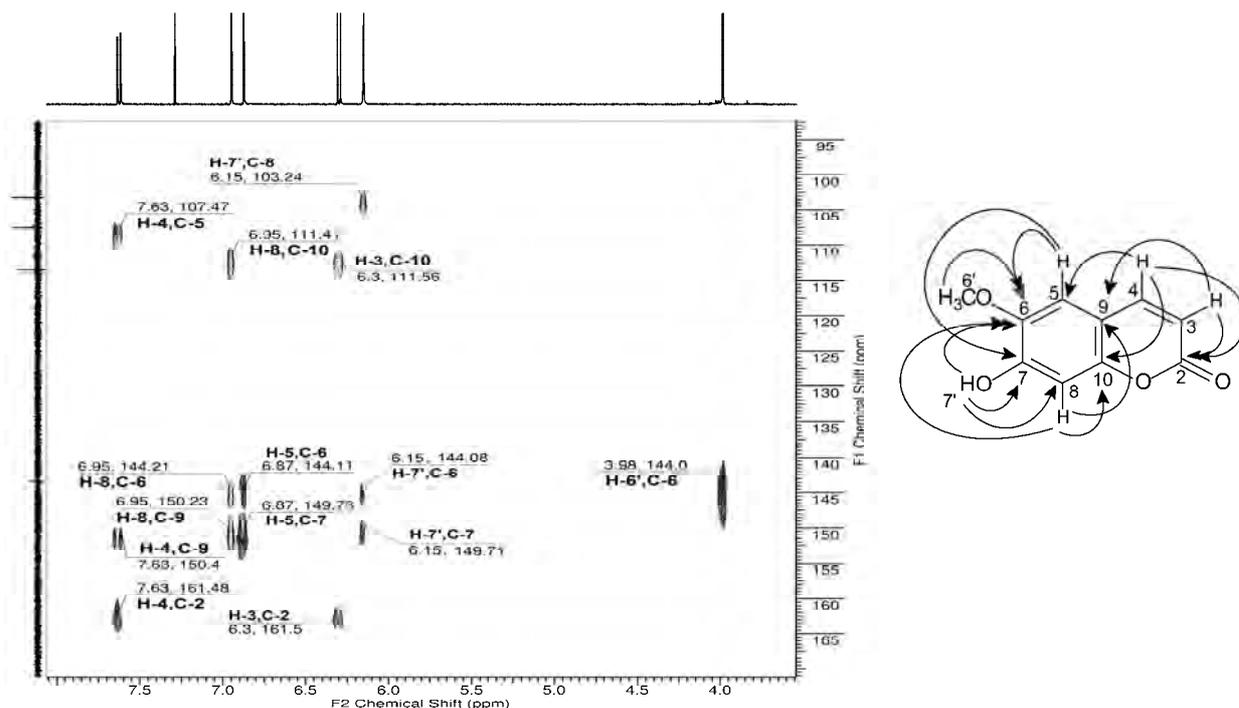
**Figure III.53.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du composé **EMEG2(III.4.2)**.

L'analyse du spectre de corrélations hétéronucléaires courtes distances HSQC a permis d'attribuer les protons aux carbones correspondants (**Fig.III.54**).



**Figure IV.54.** Spectre RMN-2D HSQC  $^{\text{C-H}}$  du composé **EMEG2(III.4.2)**.

Les différentes corrélations longues distances de l'expérience HMBC (**Fig.III.55**) en particulier la forte corrélation  $^3J$  entre les protons de  $\text{OCH}_3$  et le carbone C-6 ( $\delta_{\text{C}} = 144.0$  ppm) nous ont permis de conclure que le groupement méthoxyle est attaché à la position 6 du noyau coumarine. L'hydrogène de l'hydroxyle en position 7 présente une corrélation  $^2J$  avec le carbone C-7 ( $\delta_{\text{C}} = 149.7$  ppm) et des corrélations  $^3J$  avec les carbones C-6 ( $\delta_{\text{C}} = 144.0$  ppm) et C-8 ( $\delta_{\text{C}} =$  ppm). Toutes les données spectrales sont résumées sur le **Tableau III.13**.



**Figure III.55.** Spectre RMN-2D HMBC et les différentes corrélations hétéronucléaires  $^2J$  -  $^3J$  du composé **EMEG2(III.4.2)**.

**Tableau III.13.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et les corrélations HMBC du composé **EMEG2(III.4.2)**.

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
2		161.5	
3	6.30 <i>d</i> (9.5)	113.5	C-2, C-10
4	7.63 <i>d</i> (9.5)	143.3	C-2, C-5, C-9
5	5.87 <i>s</i>	107.5	C-6, C-7
6		144.0	
7		149.7	
8	6.95 <i>s</i>	103.2	C-6, C-9, C-10
9		150.3	
10		111.5	
6' (OCH <sub>3</sub> )	3.98 <i>s</i>	56.5	C-6
7 (OH)	6.15 <i>s</i>		C-6, C-7, C-8

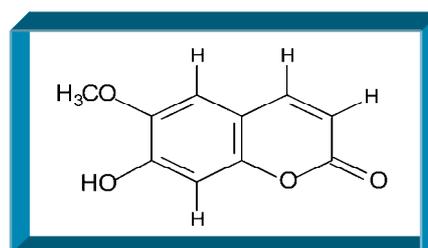
*s*: singulet; *d*: doublet.

L'étude des données UV, HR-MS, ESI-MS et RMN comparées avec celles reportées dans la littérature (Vasconcelos, 1998; Ng, 2004; Xia, 2007) nous ont permis d'identifier le composé **EMEG2(III.4.2)** comme étant la scopolépine.

Structure du composé **EMEG2(III.4.2)**:

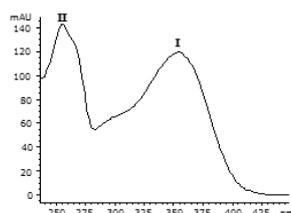
**Scopolépine**

(7-hydroxy-6-méthoxy-coumarine)



### III.5. Identification structurale des flavonoïdes isolés de *Convolvulus tricolor* et de *Genista quadriflora*

En spectrophotométrie ultraviolette-visible les spectres des flavonoïdes dans le méthanol, présentent un profil bien caractéristique avec des maxima d'absorption dans deux régions différentes: vers 310–560 nm et 230–295 nm désignés respectivement par bande I et bande II. Les maxima d'absorption en UV-visible de différents types de flavonoïdes sont indiqués dans la **Figure III.56** (Gayon, 1968; Markham, 1982).

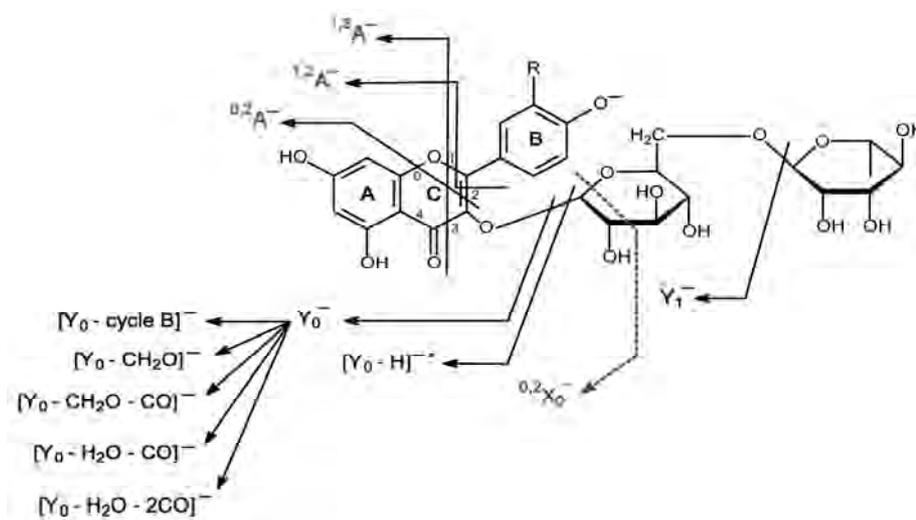


Type de flavonoïdes	Structure	Bande II (nm)	Bande I (nm)
Flavones		250-280	310-350
Flavonols	(3-OH libre)	250-280	350-385
	(3-OH substitué)	250-280	330-360
Isoflavones		245-275	310-330 (sh)
Flavanones	(R = H)	275-295	300-330 (sh)
Flavanonols	(R = OH)		
Chalcones		230-270	340-390
Aurones		230-270	380-430
Anthocyanines	(R = H)	270-280	465-560
Anthocyanidines	(R = OH)		

sh: épaulement.

**Figure III.56.** Maxima d'absorption en UV-visible de différents types de flavonoïdes.

Aussi, la caractérisation structurale des flavonoïdes a été faite par la spectroscopie de masse par ionisation *electrosparay* en mode négatif ESI(-)/MS. La nomenclature des différents fragments a été faite selon les règles de Domon (1988) et Ma (1997). Dans la **Figure III.57**, est proposé un exemple de fragmentation adaptée à un flavonol diglycosylé.



**Figure III.57.** Nomenclature des fragments issus des fragmentations ESI-MS en mode négatif des flavonols.  
(Figure adaptée de Domon (1988) et Ma (1997).)

Les ions contenant l'aglycone sont indiqués par  $k,lX_j^-$ ,  $Y_j^-$ , où  $j$  est le numéro de la liaison interglycosidique rompue, compté à partir de l'aglycone, et  $k$  et  $l$  désignent les ruptures au niveau des cycles de sucres. Les ions  $k,lA^-$  (ou  $k,lB^-$ ) sont spécifiques des ruptures de l'aglycone, où  $k$  et  $l$  indiquent les liaisons rompues au niveau du noyau C.

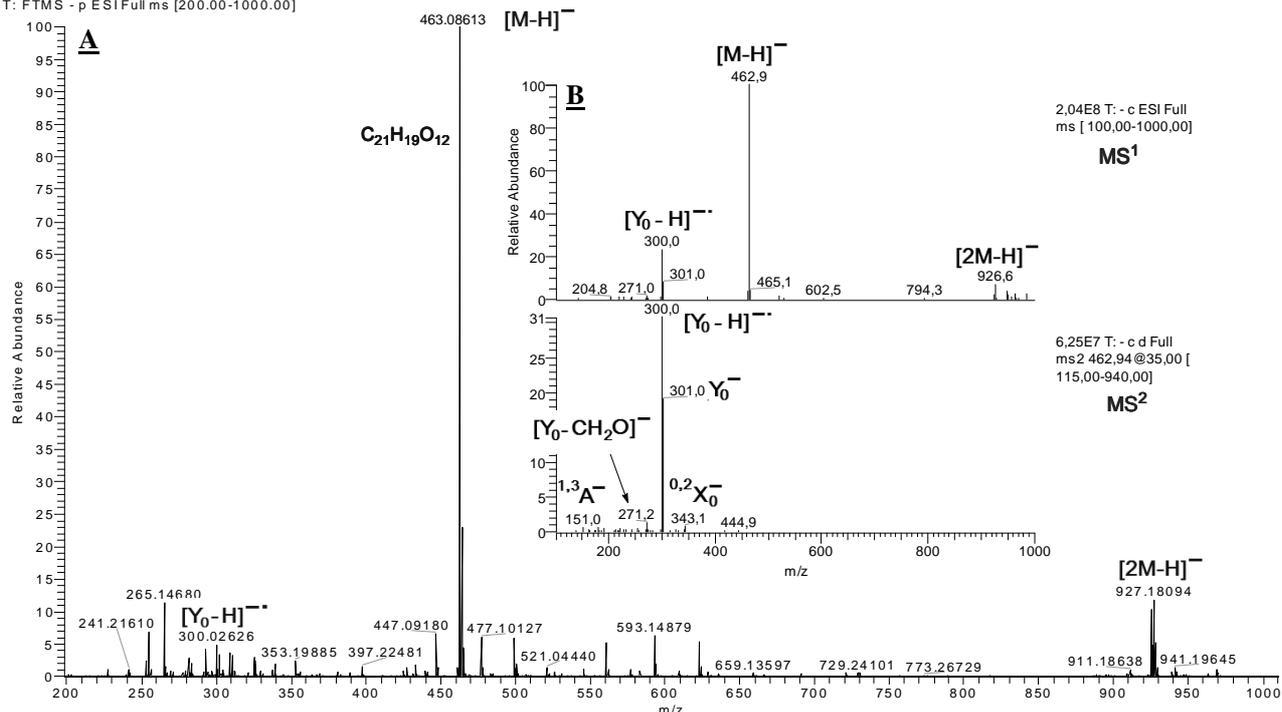
### III.5.1. Dérivés de la quercétine

Les dérivés de la quercétine présentent une fluorescence jaune-orange à 365 nm après révélation au réactif de Neu suggérant la présence d'un flavonoïde avec un noyau B ayant deux hydroxyles adjacents (Wagner, 1996).

#### III.5.1.1. Identification structurale du composé **EMTF4(III.5.1)**

Le composé **EMTF4(III.5.1)** se présente sous forme de poudre jaunâtre. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes (tiges+feuilles) de *C. tricolor* (cf. II.5.2.10). Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) à 256 et 356 nm, et deux épaulements à 266 et 295 nm (**Fig.II.30**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 98.8 à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution (**Fig.III.58.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire indiquant un flavonol mono-*O*-glycosylé à  $m/z$  463.08613 (calculée 463.08710)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 464 uma correspondant à la formule brute  $C_{21}H_{20}O_{12}$  avec un degré d'insaturation de 12.



**Figure III.58.** Spectres de masse HR/MS (A) et ESI-MS/MS (B) en mode négatif du composé **EMTF4(III.5.1)**.

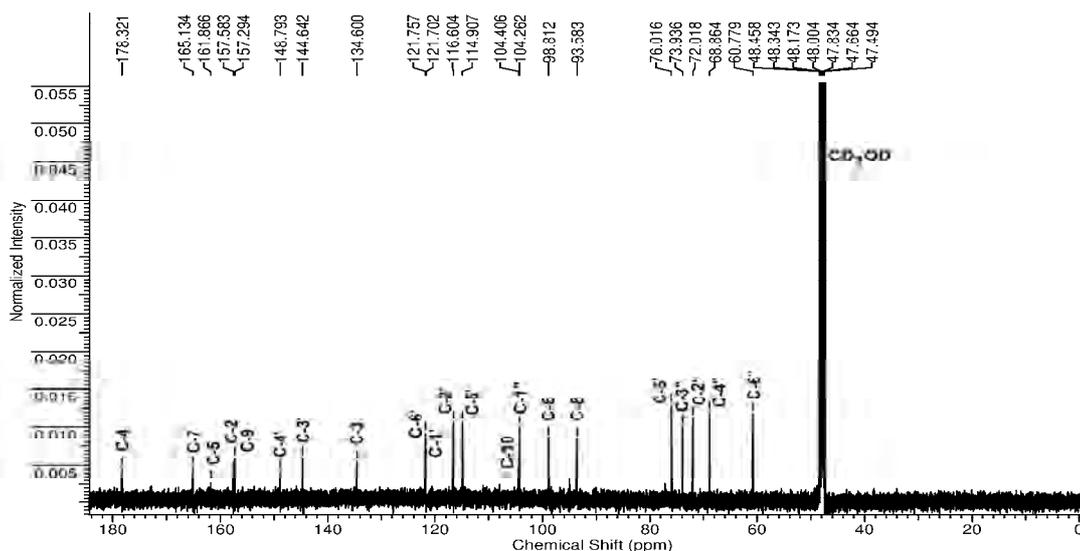
L'analyse du spectre de masse réalisé en ESI(-)MS/MS (**Fig.III.58.B**) révèle les principaux fragments établis pour les flavonols (**Fig.III.57**). Ainsi sur le spectre MS<sup>2</sup>, la fragmentation de l'ion [M-H]<sup>-</sup> à m/z 463 entraîne la perte d'un hexose (-162 uma) caractérisée par le fragment Y<sub>0</sub><sup>-</sup> à m/z 301. En plus, les deux spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> présentent un ion-radical à m/z 300 [Y<sub>0</sub>-H]<sup>-•</sup> plus intense que l'ion Y<sub>0</sub><sup>-</sup> à m/z 301 indiquant d'une part, une substitution préférentiellement en position 3 de l'aglycone (Cuyckens, 2004; Ablajan, 2006). D'autre part, la valeur du fragment Y<sub>0</sub><sup>-</sup> à m/z 301 nous a orientés vers l'aglycone quercétine. La présence d'autres pics a été constatée indiquant des fragmentations typiques d'un aglycone de type flavonol (Fabre, 2001): premièrement, on observe l'ion <sup>1,3</sup>A<sup>-</sup> à m/z 151 issu de la fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA); deuxièmement, on remarque que l'ion Y<sub>0</sub><sup>-</sup> est précurseur du fragment à m/z 271 [Y<sub>0</sub>-CH<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> obtenu par la perte de la molécule neutre CH<sub>2</sub>O (-30 uma). Le fragment <sup>0,2</sup>X<sub>0</sub><sup>-</sup> [M-H-120]<sup>-</sup> à m/z 343 indique une rupture des liaisons 0,2 au niveau d'un sucre de type hexose (glucose ou galactose).

Suite à cela, la structure de ce composé est proposée comme étant une quercétine-3-O-glycosylée dont les principaux fragments caractéristiques sont présentés sur le **Tableau III.14**.

**Tableau III.14.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMTF4(III.5.1)**.

Formule	ESI (-) (m/z, %)	
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
	463(100), 300(23), 301(8)	300(100), 301(62), 271(4), 343(3), 927(7), 271(1)
		299(2), 151(2), 179(2), 255(1)

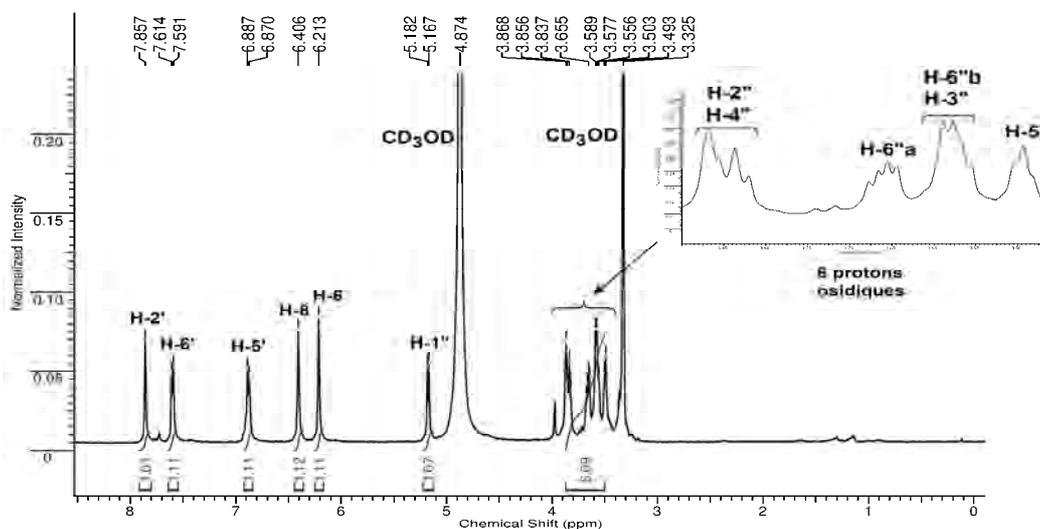
En faisant appel à la RMN 1D et 2D, nous avons pu compléter l'identification de la structure de ce composé. Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (**Fig.III.59**) a permis de retrouver les 21 carbones de la molécule. Parmi ceux attribués à l'aglycone, on distingue les signaux des carbones C-3 et C-2 respectivement à  $\delta\text{C}$  134.2 et 157.9 ppm. Ceci est en faveur d'une glycosylation de l'hydroxyle en position C-3 qui se reflète par un blindage ( $\Delta = -1.3$  ppm) du carbone portant l'hydroxyle glycosylé et un déblindage ( $\Delta = +11$  ppm) du carbone C-2 en position *ortho*. Ces comparaisons ont été faites par rapport aux données RMN  $^{13}\text{C}$  de la molécule quercétine reportées dans la littérature (Markham, 1978).



**Figure III.59.** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMTF4(III.5.1)**.

Par ailleurs, l'hydrolyse acide a conduit à l'identification d'un sucre de type D-galactose d'une part et la quercétine comme aglycone d'autre part par CCM comparative en présence d'échantillons authentiques.

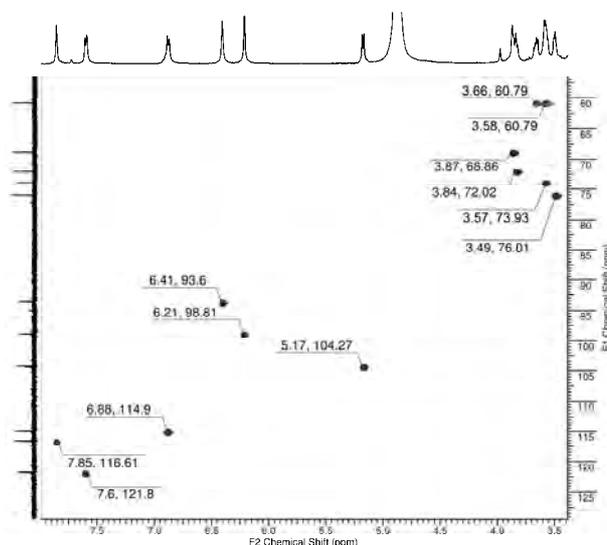
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Fig.III.60**) présente les signaux essentiels qui ont permis de mettre en évidence une substitution de type hydroxyle en position C-5 et C-7 du cycle A et cela en constatant des couplages *mé*ta des protons H-6 et H-8 respectivement à  $\delta\text{H}$  6.21 et 6.41 ppm.



**Figure III.60.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMTF4(III.5.1)**.

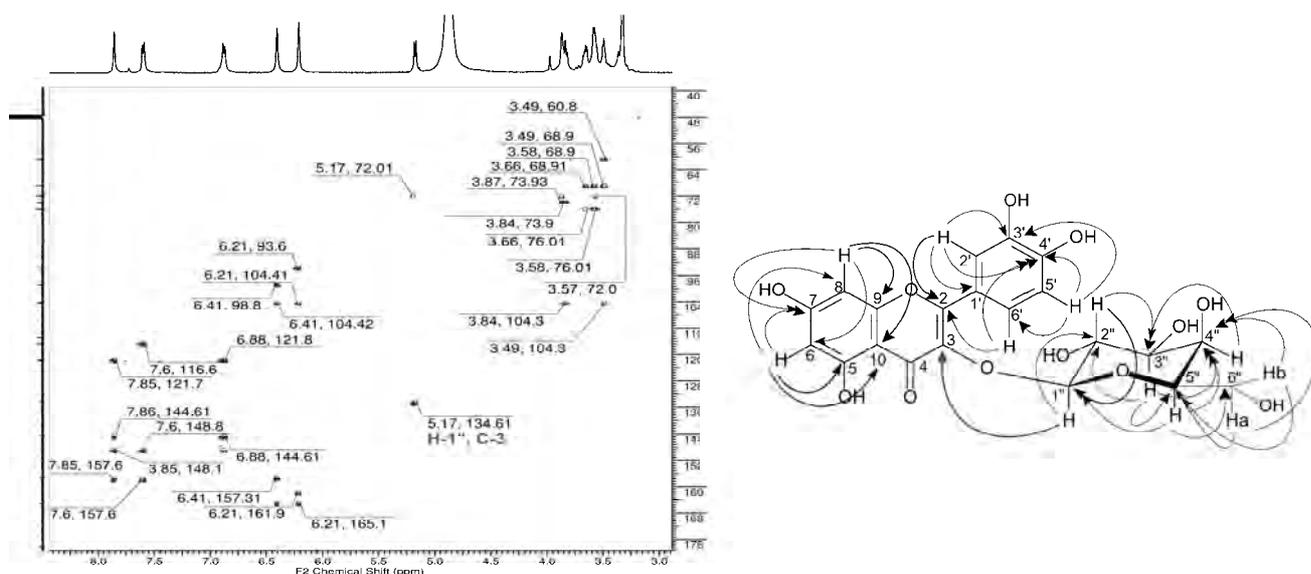
Les signaux des protons de résonance  $\delta_H$  7.85 [1H, d,  $J = 2$  Hz, H-2'], 7.60 [1H, dd,  $J = 8.3, 2.2$  Hz, H-6'], et 6.88 [1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5'] de type ABX sont caractéristiques du noyau B 3',4'-dihydroxylé de la quercétine. La nature du sucre est déduite du signal H-3'' qui apparaît sous forme de doublet de doublet à  $\delta_H$  3.57 ppm, indiquant un couplage di-axial H-3''/H-2'' et axial-équatorial H-3''/H-4'', caractéristique du galactose (**Tableau III.15**).

L'analyse du spectre de corrélation hétéronucléaires courtes distances HSQC a permis d'attribuer les protons aux carbones correspondants (**Fig.III.61**).



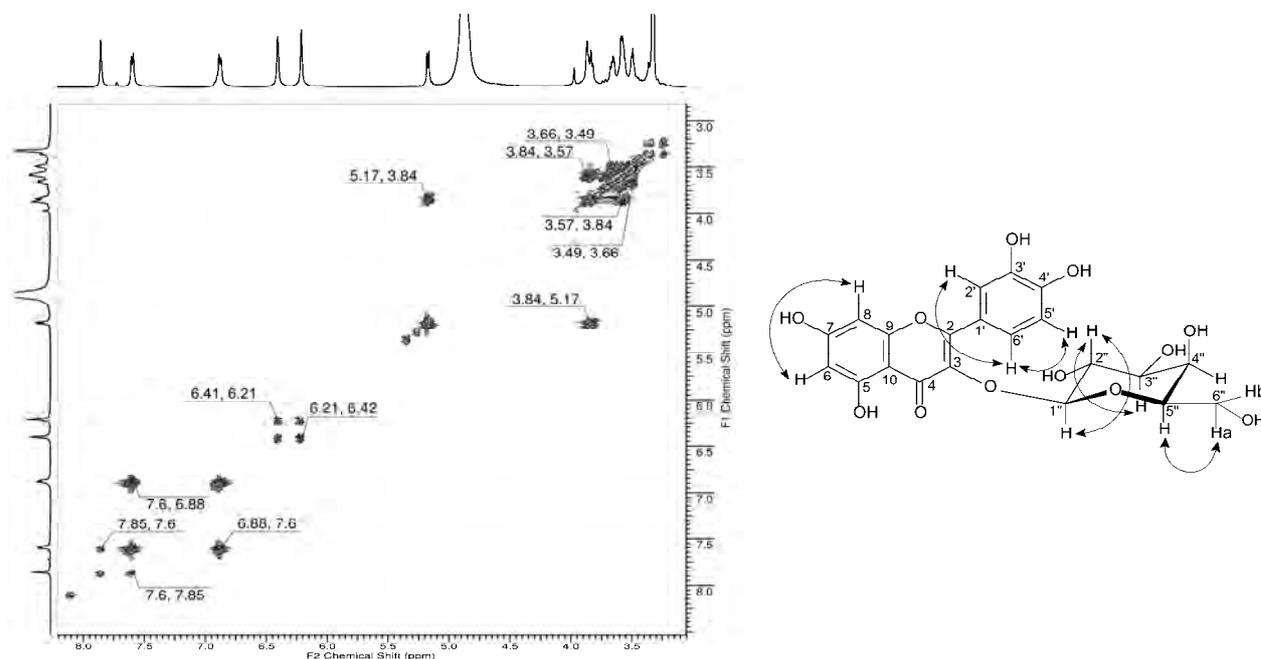
**Figure III.61.** Spectre RMN-2D HSQC  $C-H$  du composé **EMTF4(III.5.1)**.

La position du sucre est indiquée par le spectre HMBC dans lequel nous observons une corrélation entre le proton anomérique du galactose à  $\delta_H$  5.17 (H-1'', d,  $J=7.8$  Hz) et le carbone à  $\delta_C$  à 134.6 (C-3) indiquant que le sucre est lié à l'aglycone via l'hydroxyle en position C-3 (**Fig.III.61**). En considérant cette constante de couplage, la configuration  $\beta$  est attribuée au sucre indiquant un couplage di-axiale entre les protons H-1'' et H-2''.



**Figure III.62.** Spectre RMN-2D HMBC et corrélations hétéronucléaires  $^2J - ^3J$  du composé **EMTF4(III.5.1)**.

Le spectre de corrélations homonucléaires COSY (**Fig.III.63**), a permis de confirmer les attributions précédentes en montrant les couplages H-6/H-8, H-2'/H-6', et H-5'/H-6'. Nous y observons également des corrélations spécifiques des protons du sucre tels que H-1''/H-2'', H-3''/H-4'', et H-5''/ H-6''a.



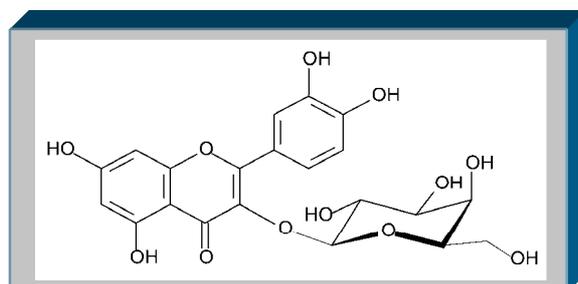
**Figure III.63.** Spectre COSY et principales corrélations homonucléaires du composé **EMTF4(III.5.1)**.

**Tableau III.15.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC et COSY du composé **EMTF4(III.5.1)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, J(Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	COSY (corrélations $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )
<b>Aglycone (quercétine)</b>	2		157.6		
	3		134.6		
	4		178.3		
	5		161.9		
	6	6.21, <i>d</i> , (2.0)	98.8	C-5, C-7, C-8, C-10	H-8
	7		165.1		
	8	6.41, <i>d</i> , (2.0)	93.6	C-6, C-7, C-9, C-10	H-6
	9		157.3		
	10		104.4		
	1'		121.7		
2'	7.85, <i>d</i> , (2.0)	116.6	C-2, C-1', C-3', C-4'	H-6'	
3'		144.6			
4'		148.8			
5'	6.88, <i>d</i> , (8.3)	114.9	C-3', C-4', C-6'	H-6'	
6'	7.60, <i>dd</i> , (8.3 et 2.2)	121.8	C-2, C-2', C-4'	H-2', H-5'	
<b>Galactose</b>	1''	5.17, <i>d</i> , (7.8)	104.3	C-3, C-2''	H-2''
	2''	3.84, <i>t</i> , (8.8)	72.0	C-1'', C-3''	H-1''
	3''	3.57, <i>dd</i> , (9.3 et 3.2)	73.9	C-2'', C-4'', C-5''	H-2''
	4''	3.86, <i>d</i> , (3.3)	68.9	C-2'', C-3''	H-3''
	5''	3.49, <i>t</i> , (6.0)	76.0	C-1'', C-4'', C-6''	H-6a
	H-6a	3.66, <i>dd</i> , (11.0 et 6.1)		C-4'', C-5''	H-5''
	H-6b	3.58, <i>d</i> , (5.9)	60.8	C-4'', C-5''	

*s* : singulet; *d* : doublet; *dd* : doublet de doublet; *t*, triplet; *m* : multiplet.

Toutes ces données appuyées par une comparaison avec celles de la littérature (Boguslavskaya, 1991; Bennini, 1992; Dai, 2009) nous permettent d'attribuer au composé **EMTF4(III.5.1)** la structure correspondant à la quercétine-3-O-β-D-galactopyranoside.

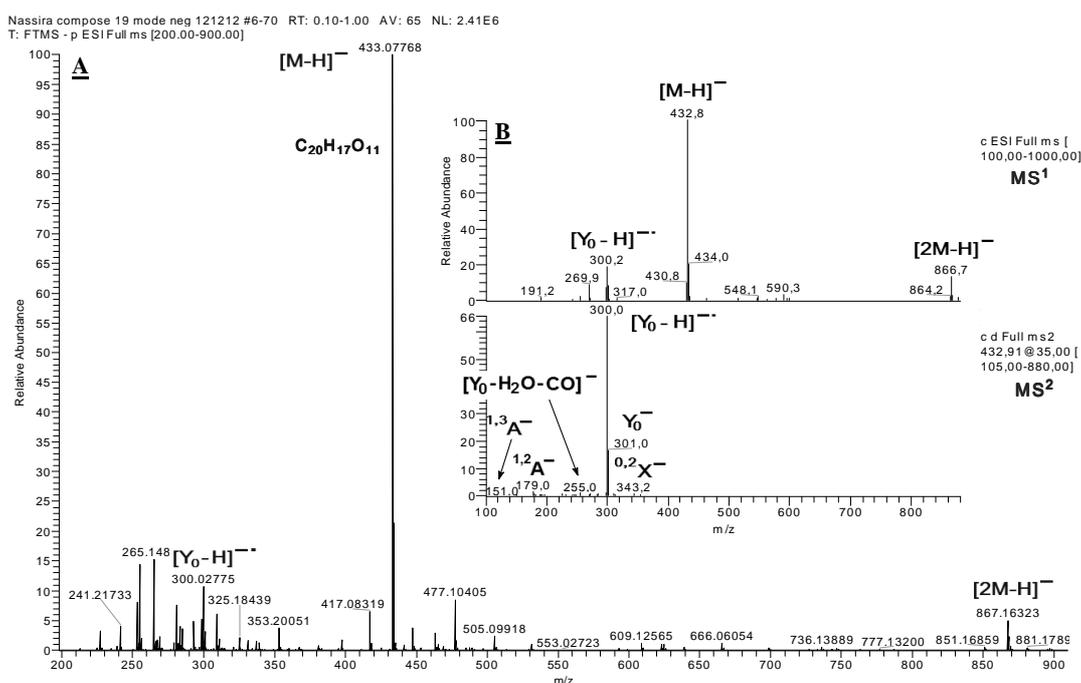


Structure du composé **EMTF4(III.5.1)**:  
**Quercétine-3-O-β-D-galactopyranoside** (hypéroside)

### III.5.1.2. Identification structurale du composé **EMTF5(III.5.2)**

Le composé **EMTF5(III.5.2)** se présente sous la forme d'une poudre jaune. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes (tiges+feuilles) de *C. tricolor* (cf. **II.5.2.10**). Le spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 256 et 352 nm, et deux épaulements à 266 et 294 nm (**Fig.II.30**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 99.7 à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution (**Fig.III.64.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire indiquant un flavonol mono-*O*-glycosylé à  $m/z$  433.07766 (calculée 433.07654)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 434 uma correspondant à la formule brute  $C_{20}H_{18}O_{11}$  avec un degré d'insaturation de 12.



**Figure III.64.** Spectres de masse HR/MS (**A**) et ESI-MS/MS (**B**) en mode négatif du composé **EMTF5(III.5.2)**

En comparant les données obtenues du spectre de masse réalisé en ESI(-)MS/MS (**Fig.III.64.B**) avec celles du composé précédent, on peut en déduire qu'on est également en présence d'une quercétine-3-O-glycosylée avec pour différence la nature du sucre. Le spectre MS<sup>2</sup> révèle le fragment Y<sub>0</sub><sup>-</sup> à m/z 301 caractéristique de la quercétine qui est engendré par la perte d'un pentose (-132 uma) de l'ion quasi-moléculaire [M-H]<sup>-</sup> à m/z 433. Le fragment <sup>0,2</sup>X<sub>0</sub><sup>-</sup> [M-H-90]<sup>-</sup> à m/z 343 indique une rupture des liaisons 0,2 (**Fig.III.57**) au niveau du sucre témoignant ainsi de la présence d'un pentose (arabinose ou xylose).

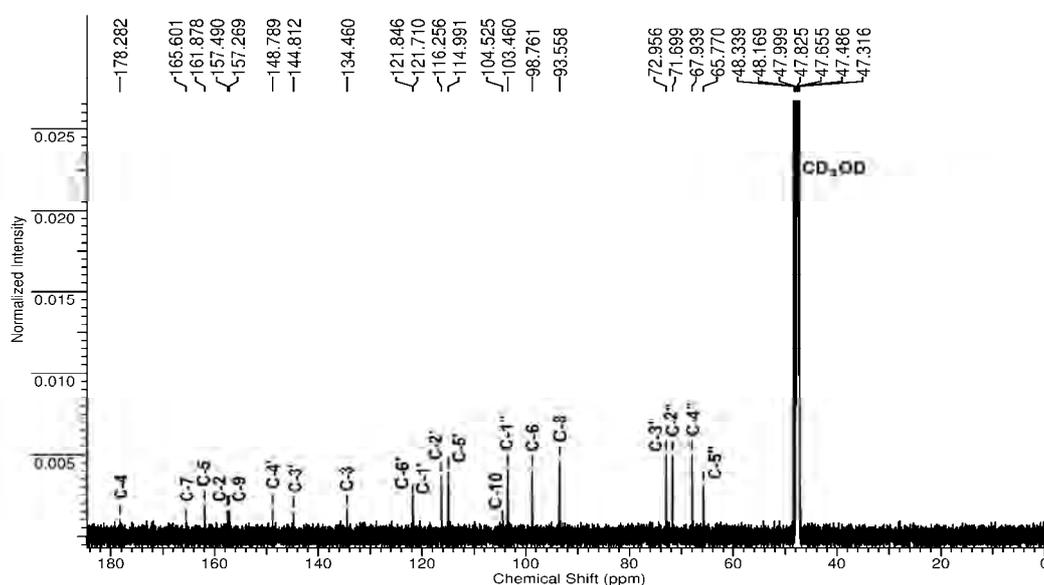
L'hydrolyse acide a permis d'identifier le L-arabinopyranose comme sucre et la quercétine comme aglycone par CCM comparatives avec des échantillons authentiques.

Suite à cela, la structure de ce composé est proposée comme étant une quercétine-3-O-glycosylée par le sucre arabinose. Les principaux fragments caractéristiques de ce composé sont présentés dans le **Tableau III.16**.

**Tableau III.16.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMTF5 (III.5.2)**.

Formule	ESI (-) (m/z, %)	MS <sup>2</sup>
C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
	433(100), 300(19), 867(13), 299(11), 301(8), 271(4), 255(2)	300(100), 301(25), 179(2), 343(1), 271(1), 255(1), 151(<1)

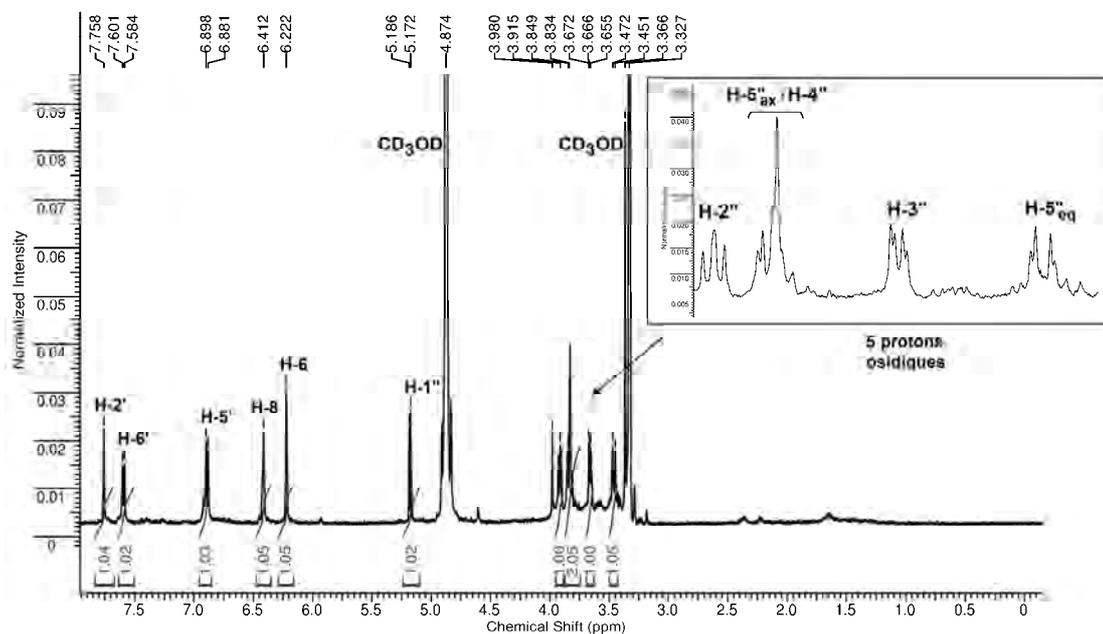
La structure de ce composé a pu être confirmée par l'analyse des données RMN 1D et 2D. Ainsi, grâce au spectre RMN <sup>13</sup>C (**Fig.III.65**), on a pu distinguer les signaux des vingt carbones de la molécule.



**Figure III.65.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMTF5 (III.5.2)**.

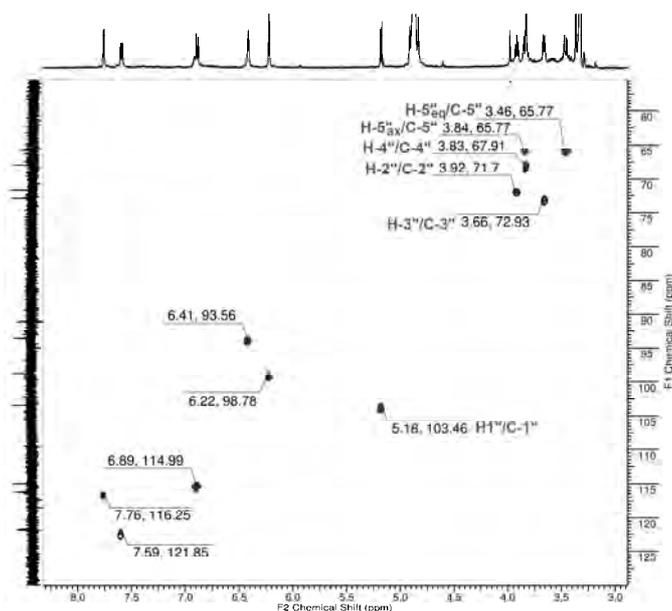
Le spectre RMN <sup>1</sup>H (**Fig.IV.66**) montre les signaux de résonance δ<sub>H</sub> 7.76 [1H, d, J = 1.5 Hz, H-2'], 7.59 [1H, dd, J = 8.3, 1.5 Hz, H-6'], et 6.89 [1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'] caractéristiques du noyau B 3',4'-dihydroxylé de la quercétine. Le doublet du proton anomérique du sucre résonne à δ<sub>H</sub>

5.18 ppm avec une constante de couplage de 6.8 Hz indiquant la configuration  $\alpha$  du sucre arabinopyranoside.



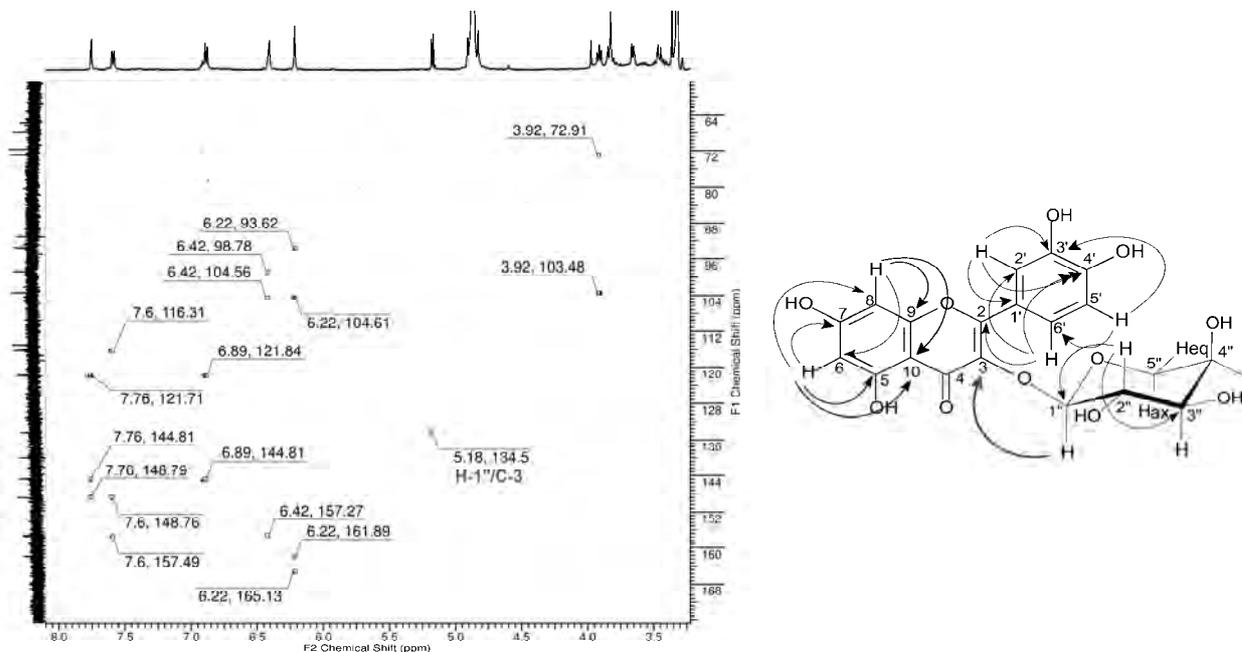
**Figure III.66.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMTF5** (III.5.2).

L'analyse du spectre de corrélation hétéronucléaires courtes distances HSQC a permis d'attribuer les protons aux carbones correspondants (**Fig.III.67**).



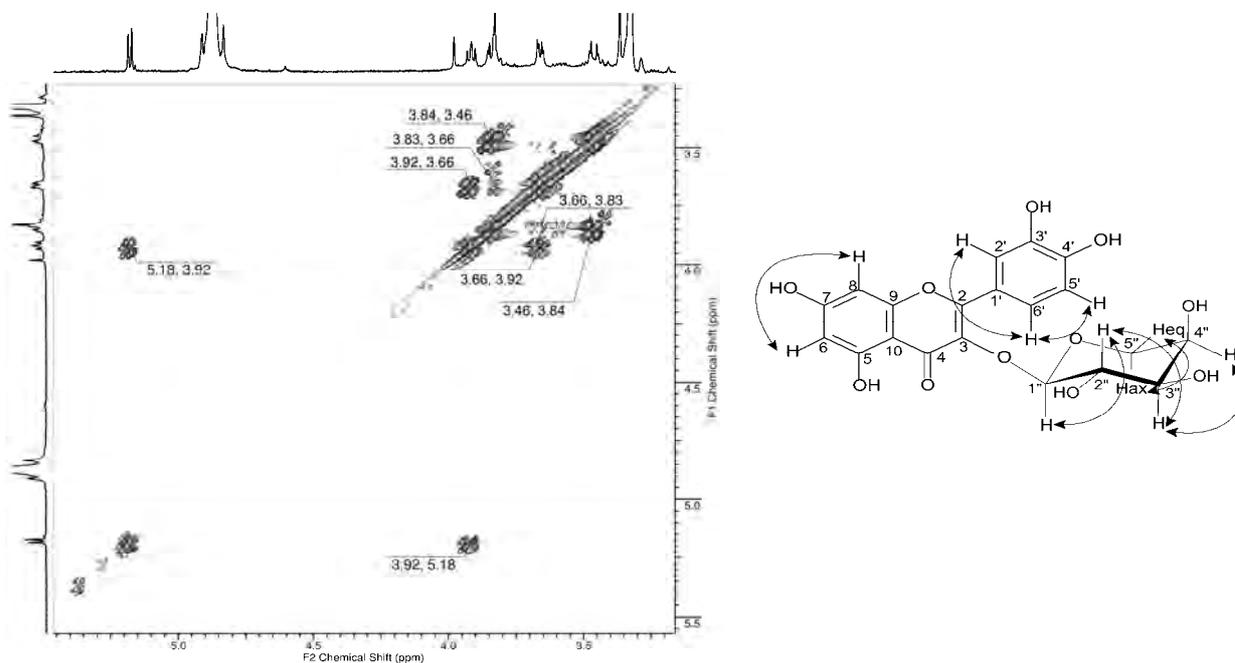
**Figure III.67.** Spectre RMN-2D HSQC  $^{\text{C}}\text{H}$  du composé **EMTF5** (III.5.2).

La position du sucre est indiquée par le spectre de corrélation hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  à longues distances HMBC (**Fig.III.68**) dans lequel nous observons la corrélation entre le proton anomérique  $\text{H}1''$  ( $\delta_{\text{H}}$  5.18 ppm) de l'arabinose et le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  à 134.6 (C-3) indiquant une glycosylation de l'hydroxyle en position 3 de l'aglycone quercétine.



**Figure III.68.** Spectre RMN-2D HMBC e corrélations hétéronucléaires  $^2J_{-3}J$  du composé **EMTF5 (III.5.2)**.

En plus, le spectre de corrélations homonucléaires COSY (**Fig.III.69**) confirme les attributions précédentes en montrant en particulier les couplages H-6/H-8, H-2'/H-6', et H-5'/H-6' confirmant ainsi la présence de la quercétine. Nous y observons également des corrélations spécifiques des protons du sucre arabinose H-1''/H-2'', H-2''/H-3'', H-3''/H-4'', et H-5''<sub>ax</sub>/H-5''<sub>eq</sub>.



**Figure III.69.** Spectre COSY (zone des protons du sucre) et les différentes corrélations homonucléaires du composé **EMTF5 (III.5.2)**.

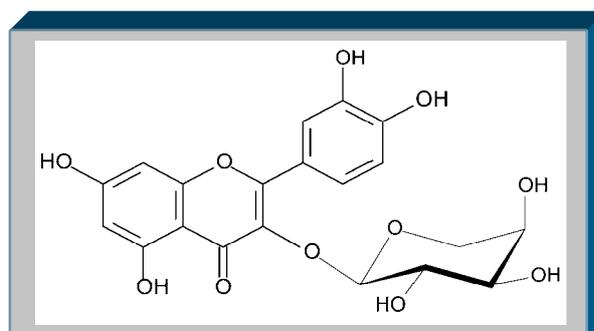
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone ainsi que les différentes corrélations hétéronucléaires HMBC et homonucléaires COSY sont rassemblés dans le **Tableau III.17**.

**Tableau III.17.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC et COSY du composé **EMTF5(III.5.2)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	COSY (corrélations $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )
Aglycone (quercétine)	2		157.5		
	3		134.5		
	4		178.3		
	5		161.9		
	6	6.22, <i>d</i> , (1.9)	98.8	C-5, C-7, C-8, C-10	H-8
	7		165.1		
	8	6.41, <i>d</i> , (1.9)	93.6	C-6, C-9, C-10	H-6
	9		157.3		
	10		104.6		
	1'		121.7		
	2'	7.76, <i>d</i> , (1.5)	116.3	C-1', C-3', C-4'	
	3'		144.8		
4'		148.8			
5'	6.89, <i>d</i> , (8.3)	115.0	C-3', C-6'	H-6'	
6'	7.59, <i>dd</i> , (8.3 et 1.5)	121.8	C-2, C-2', C-4'	H-2', H-5'	
Arabinose	1''	5.18, <i>d</i> , (6.8)	103.5	C-3	H-2''
	2''	3.92, <i>dd</i> , (8.2 et 6.8)	71.7	C-1'', C-3''	H-1'', H-3''
	3''	3.66, <i>dd</i> , (8.3 et 2.9)	72.9		H-2'', H-4''
	4''	3.83, <i>ddd</i> , (5.2, 3.5, 2.5)	67.9		H-3''
	H-5'' <sub>ax</sub>	3.84, <i>dd</i> , (13.4 et 5.1)			H-5'' <sub>eq</sub>
	H-5'' <sub>eq</sub>	3.46, <i>dd</i> , (13.4 et 3.2)	65.8		H-5'' <sub>ax</sub>

*s* : singulet; *d* : doublet; *dd* : doublet de doublet; *ddd* : doublet de doublets de doublets.  
ax : axial; eq : équatorial.

De ces données qui sont similaires à celles indiquées par la littérature (Fraisie, 2000; Schieber, 2002; Stark, 2005) nous en déduisons que le composé **EMTF5 (III.5.2)** correspond à la quercétine-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (guaijavérine).



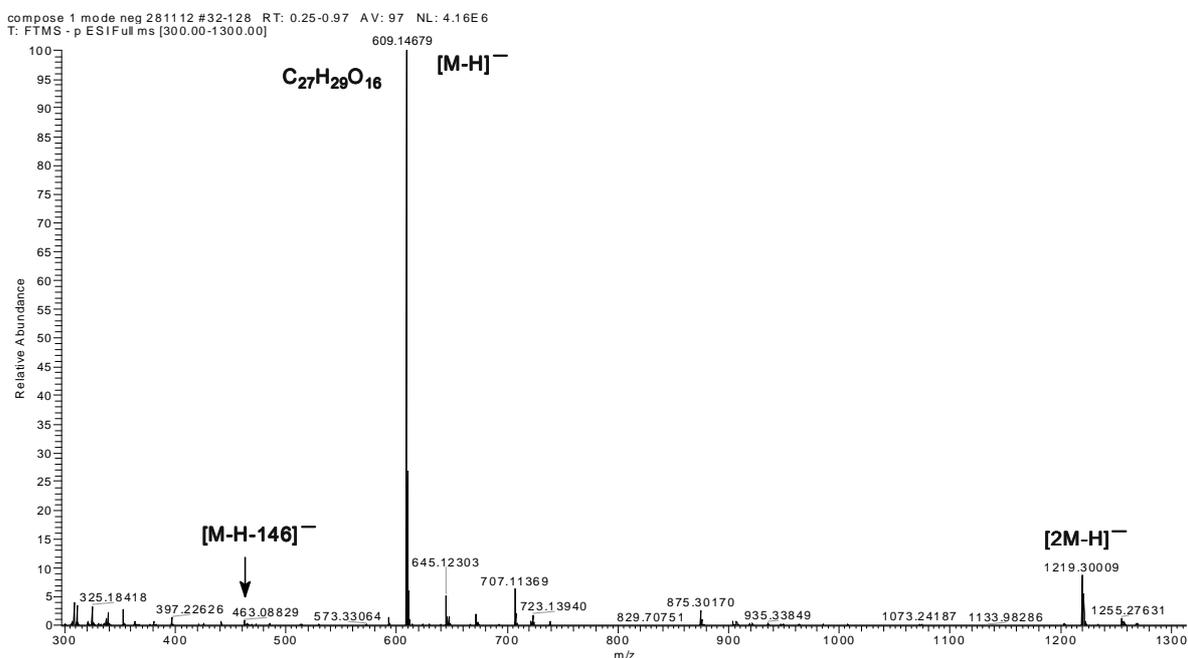
Structure du composé **EMTF5 (III.5.2)**:

**Quercétine-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside** (guaijavérine)

### III.5.1.3. Identification structurale du composé **EMGq7(III.5.3)**

Le composé **EMGq7(III.5.3)** se présente sous la forme d'une poudre jaune. Il est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique de *Genista quadriflora* (cf. II.4.2.3.3). Le profil du spectre UV-DAD montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) à 256 et 354 nm et deux épaulements à 264 et 300 nm (**Fig.II.18**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 99.8 à 254 nm.

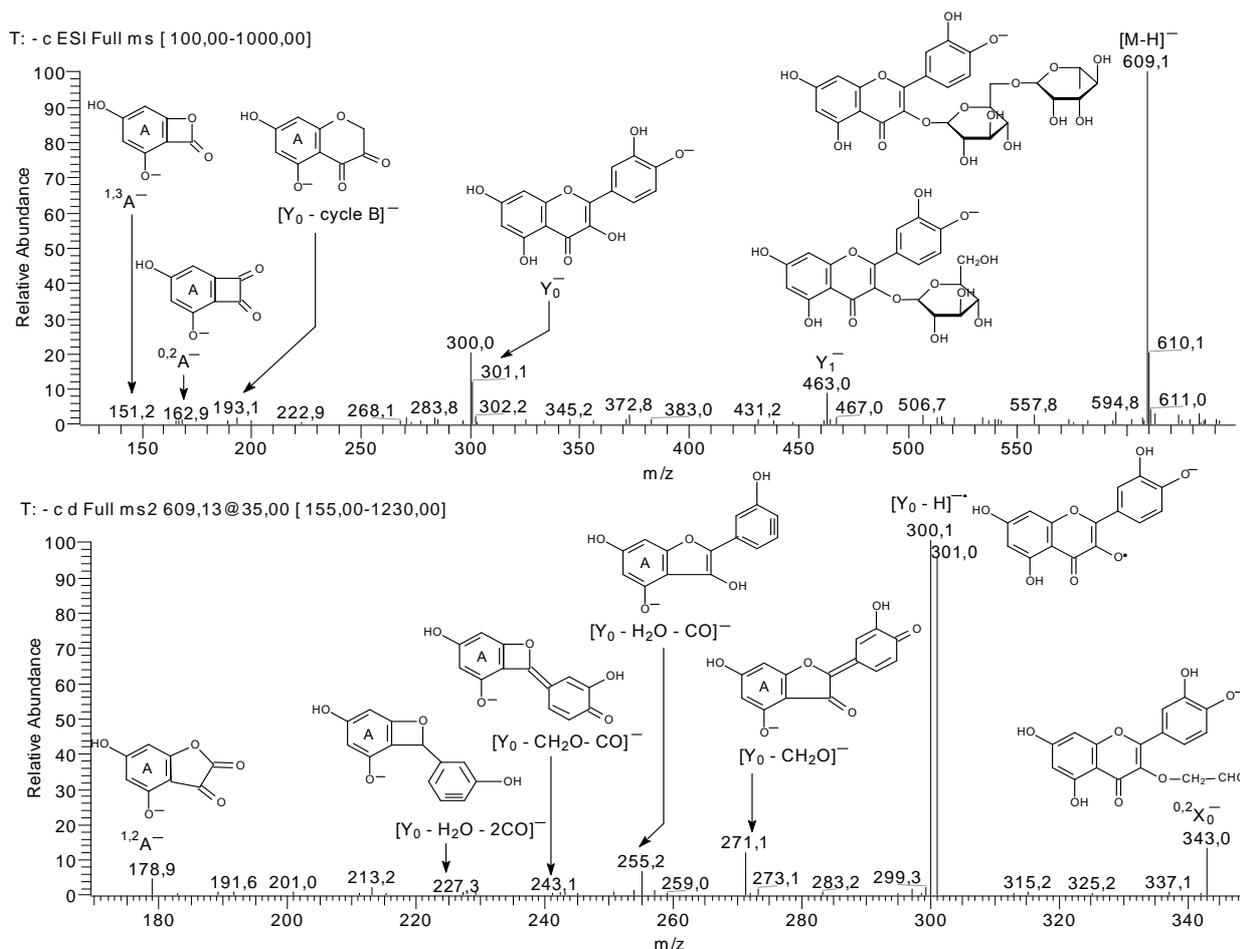
Le spectre de masse haute résolution (**Fig.III.70**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire d'un flavonol di-*O*-glycosylé à  $m/z$  609.14679 (calculé 609.14611)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 610 uma correspondant à la formule brute  $C_{27}H_{30}O_{16}$  avec un degré d'insaturation de 13.



**Figure III.70.** Spectre de masse HR/ESI-MS en mode négatif du composé **EMGqZ(III.5.3)**.

La fragmentation MS/MS de l'analyse LC/ESI-MS(-) du spectre  $MS^1$  (**Fig.III.71**) révèle la présence du fragment  $Y_1^-$  à  $m/z$  463 (8.6%) obtenu par suite d'une perte d'un rhamnose (-146 uma); la faible abondance de ce fragment est caractéristique d'une substitution en position 3 de l'aglycone (Ferrerres, 2004) (**Fig.III.57**).

- La présence de l'ion  $Y_0^-$  à  $m/z$  301 sur le spectre  $MS^2$  nous oriente vers l'aglycone quercétine pouvant être obtenue suite à la rupture de deux unités hexoses (146-162 uma) à partir de l'ion pseudo moléculaire à  $m/z$  609.
- Par ailleurs, on observe plusieurs pics indiquant des fragmentations typiques d'un aglycone de type flavonol (Fabre, 2001). Ainsi, la fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA) engendre la formation de l'ion  $^{1,3}A^-$  à  $m/z$  151 et une rupture directe de la liaison entre les cycles C et B génère le fragment  $[Y_0 - \text{cycle B}]^-$  à  $m/z$  193 ainsi que la formation de l'ion  $^{1,2}A^-$  à  $m/z$  179 issu d'une rupture des liaisons 1 et 2 du cycle C.
- La perte de petites molécules neutres comme CO (-28 uma),  $CH_2O$  (-30 uma), et  $H_2O$  (-18 uma) sont également enregistrées. On constate que l'ion  $Y_0^-$  est précurseur des fragments  $[Y_0-CH_2O]^-$ ,  $[Y_0-CH_2O-CO]^-$ ,  $[Y_0-H_2O]^-$ ,  $[Y_0-H_2O-CO]^-$ , et  $[Y_0-H_2O-2CO]^-$  respectivement à  $m/z$  271, 243, 283, 255 et 227.
- Concernant les sucres attachés à l'aglycone, le fragment  $^{0,2}X_0^-$   $[M-H-146-120]^-$  à  $m/z$  343 indique la perte d'un sucre terminal de type rhamnose suivie d'une rupture des liaisons 0,2 au niveau du sucre intermédiaire de type hexose (glucose ou galactose) (Cuyckens, 2004).



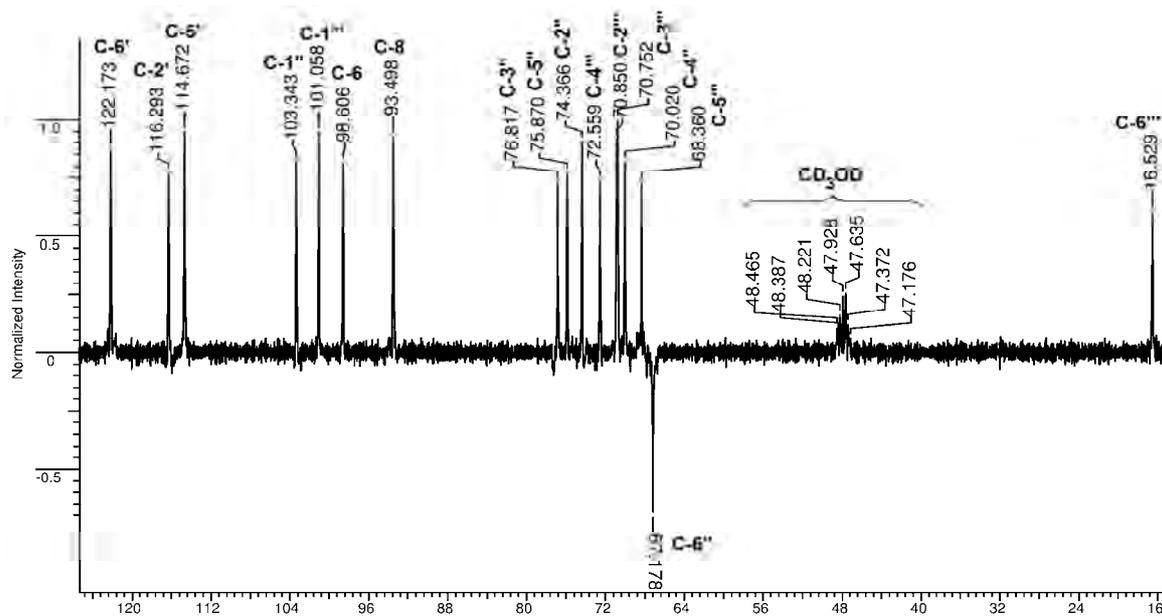
**Figure III.71.** Spectre de masse ESI-MS/MS en mode négatif et structures des principaux fragments du composé **EMGqZ(III.5.3)**.

Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif de ce composé sont indiqués sur le **Tableau III.18**. A ce stade de notre investigation, on peut dire que **EMGqZ(III.5.3)** est un dérivé 3-di-*O*-glycosylé de la quercétine.

**Tableau III.18.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMGqZ(III.5.3)**.

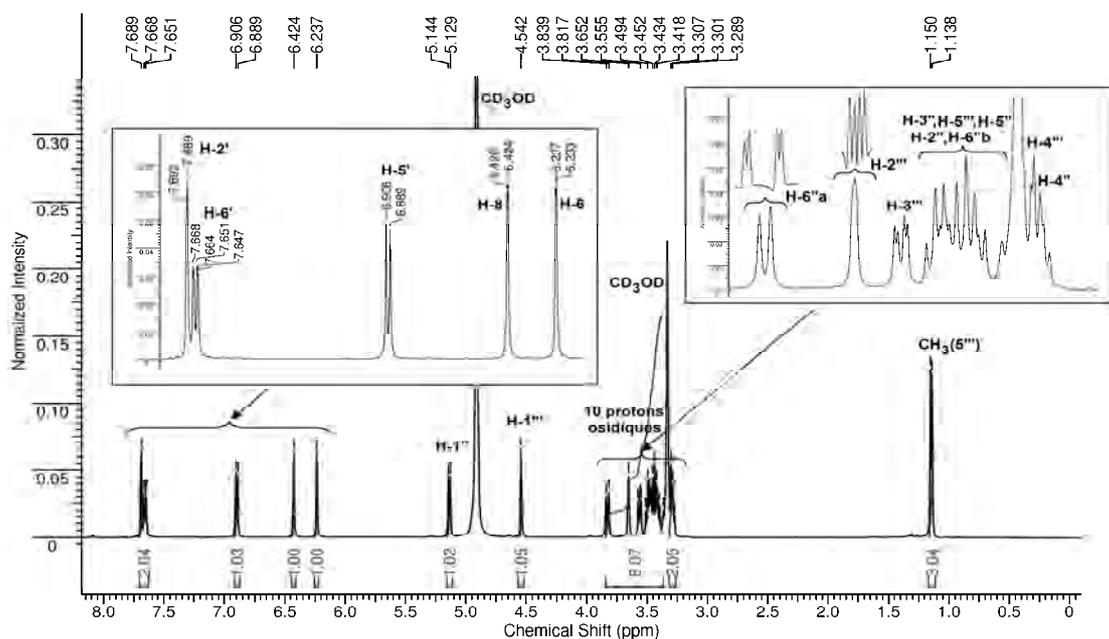
Formule	ESI (-) (m/z, %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	609(100), 300(20), 301(12), 463(9), 193(2), 151(1), 163(<1)	300(100), 301(96), 343(13), 271(12), 255(6), 179(4), 227(<1), 243(<1)

Afin de compléter l'identification structurale de ce composé, on a effectué des analyses des données RMN 1D et 2D. Ainsi, grâce au spectre RMN <sup>13</sup>C DEPT 135 (**Fig.III.72**), on a pu distinguer 17 carbones, parmi lesquels un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) à δ<sub>c</sub> 16.53, un groupement méthylène (CH<sub>2</sub>) à δ<sub>c</sub> 67.18 et quinze groupements méthines (CH). Cela nous a permis de déduire l'existence de dix carbones quaternaires dans la molécule.



**Figure III.72.** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMGqZ(III.5.3)**.

Dans la zone de l'aglycone  $\delta_{\text{H}}$  6.5–7.9 ppm (Mabry, 1970) du spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Fig.III.73**), les signaux de résonance  $\delta_{\text{H}}$  7.69 [1H, d,  $J = 1.6$  Hz, H-2'], 7.66 [1H, dd,  $J = 8.5, 1.8$  Hz, H-6'], et 6.90 [1H, d,  $J = 8.3$  Hz, H-5'] indiquent la présence de trois protons de type ABX sur un noyau aromatique trisubstitué. Ceci est caractéristique d'un noyau B 3',4'-dihydroxylé. Le proton H-6' présente un couplage *ortho* avec le proton H-5' et un couplage *mé*ta avec le proton H-2'.

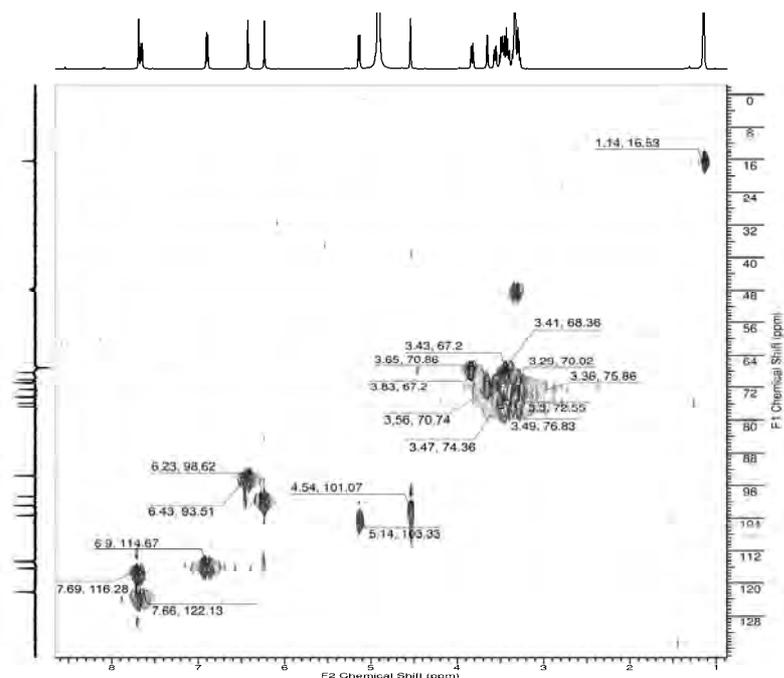


**Figure III.73.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMGqZ (III.5.3)**.

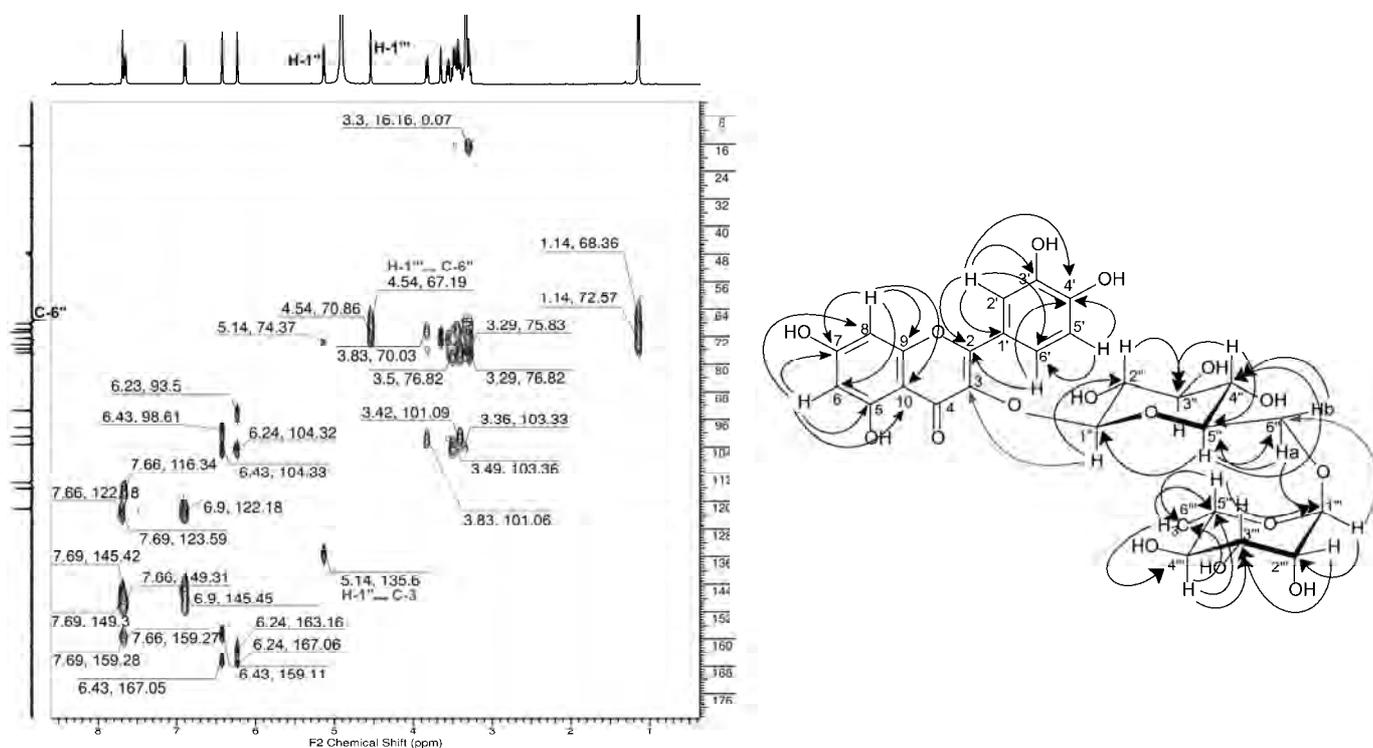
L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  nous a permis de mettre en évidence une substitution de type hydroxyle en position C-5 et C-7 du cycle A, en constatant des couplages *mé*ta des protons H-6 et H-8 respectivement à  $\delta_{\text{H}}$  6.24 et 6.43 ppm. En plus, la présence des sucres est détectée par les trois signaux résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  1.14 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz), typiques du groupement méthyle du

rhamnose et des deux protons anomériques à  $\delta_H$  4.54 (H-1<sup>m</sup>) et 5.14 (H-1<sup>r</sup>) ppm attribués respectivement au rhamnose et à un hexose (glucose ou galactose). La nature du second sucre est déduite du signal H-3<sup>r</sup> qui apparaît sous forme de triplet ( $J = 9.0$  Hz) à  $\delta_H$  3.49 ppm indiquant des couplages di-axiaux H-3<sup>r</sup> /H-2<sup>r</sup> et H-3<sup>r</sup> /H-4<sup>r</sup>, caractéristiques du glucose (**Tableau III.19**).

L'attribution des signaux aux différents noyaux repose sur une analyse approfondie des spectres RMN-2D HSQC (**Fig.III.74**) et HMBC (**Fig.III.75**).



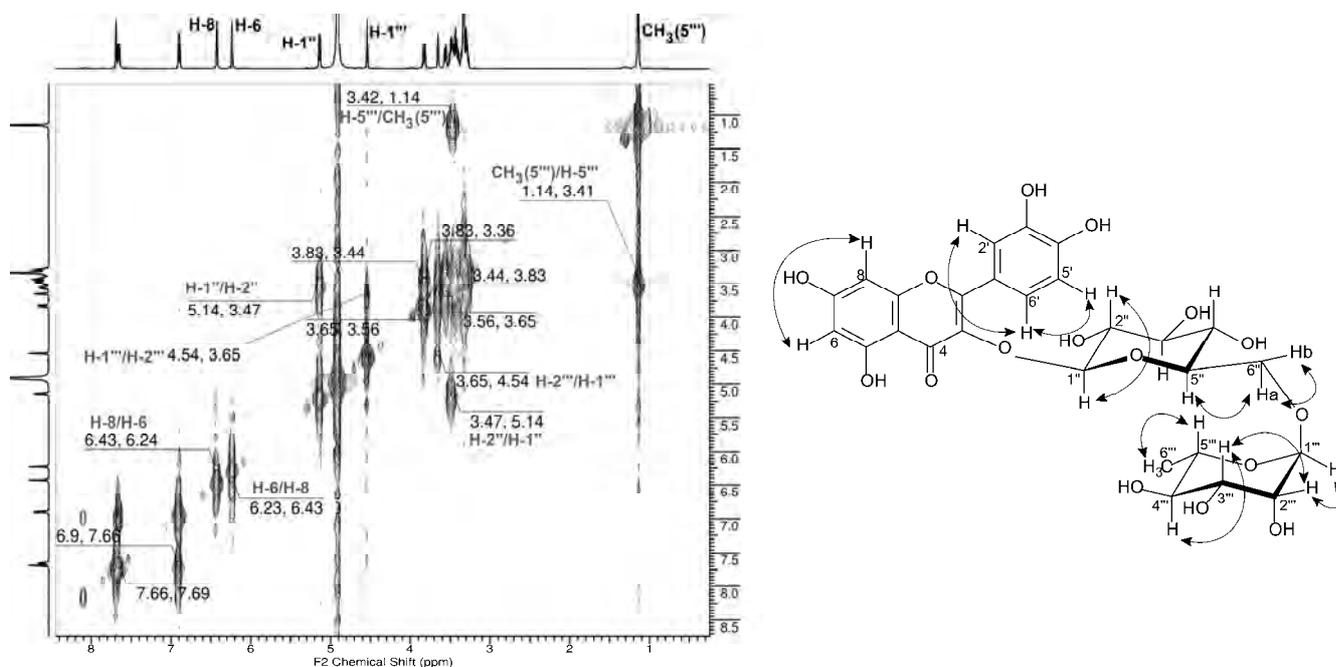
**Figure III.74.** Spectre RMN-2D HSQC  $C-H$  du composé **EMGqZ (III.5.3)**.



**Figure III.75.** Spectre RMN-2D HMBC et les corrélations hétéronucléaires  $^2J - ^3J$  du composé **EMGqZ (III.5.3)**.

Sur le spectre HMBC (**Fig.III.75**), nous observons une corrélation entre le proton anomérique du glucose à  $\delta_H$  5.14 (H-1'') et le carbone à  $\delta_C$  à 135.6 (C-3) indiquant une substitution de l'hydroxyle en position C-3 de la quercétine par ce sucre. Nous avons pu constater également que le rhamnose terminal est lié au glucose à travers une liaison 1'''  $\rightarrow$  6'' et cela grâce au déblindage du signal de C-6'' du glucose à  $\delta_C$  67.2 ppm, sachant que la résonance de ce carbone serait située vers 60 ppm dans le cas où il était libre (Markham, 1982). Ceci est confirmé par le spectre HMBC qui révèle une nette corrélation entre le proton H-1''' à  $\delta_H$  4.54 et le carbone C-6'' à  $\delta_C$  à 67.2. De plus, la configuration  $\beta$ -glucopyranoside est affectée en considérant la constante de couplage 7.6 Hz qui indique un couplage di-axial entre les protons H-1'' et H-2'' du glucose (**Tableau III.19**). D'autre part, le fait que le proton anomérique du rhamnose H-1''' montre un couplage di-équatorial avec le proton H-2''' ( $J = 1.8$  Hz), établit une configuration de type  $\alpha$  pour le sucre.

Le spectre de corrélations homonucléaires COSY (**Fig.III.76**) nous a permis de confirmer les attributions précédentes en montrant en particulier les couplages H-6/H-8, H-1''/H-2'', H-1'''/H-2''', et H-5'''/H-6'''.



**Figure III.76.** Spectre COSY et les principales corrélations homonucléaires du composé **EMGqZ (III.5.3)**.

L'hydrolyse acide nous a permis de confirmer l'authenticité des deux sucres comme étant le L-rhamnose et le D-glucose, et celle de l'aglycone comme étant la quercétine, et cela par co-chromatographie sur CCM en présence d'échantillons authentiques.

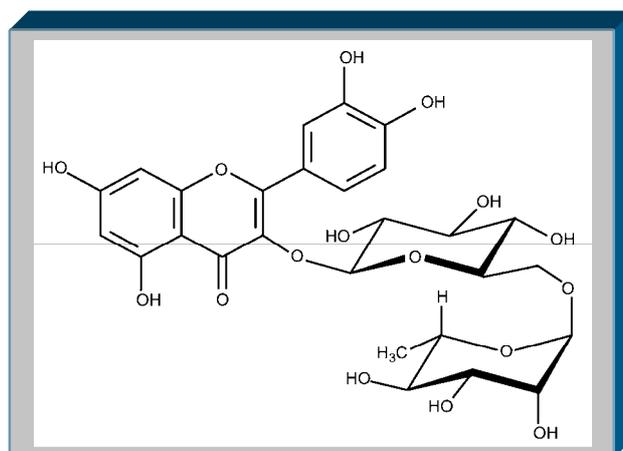
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone ainsi que les différentes corrélations hétéronucléaires HMBC et homonucléaires COSY sont rassemblés dans le **Tableau III.19**.

**Tableau III.19.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC et COSY du composé **EMGqZ (III.5.3)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	COSY (corrélations $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )	
<b>Aglycone (quercétine)</b>	2		159.3			
	3		135.6			
	4		177.2			
	5		163.2			
	6	6.24, <i>d</i> , (1.6)		98.6	C-5, C-7, C-8, C-10	H-8
	7		167.1			
	8	6.42, <i>d</i> , (1.6)		93.5	C-6, C-7, C-9, C-10	H-6
	9		159.1			
	10		104.3			
	1'		123.6			
	2'	7.59, <i>d</i> , (1.8)		116.3	C-2, C-1', C-3', C-4', C-6'	H-6'
	3'		145.4			
4'		149.3				
5'	6.9, <i>d</i> , (8.3)		114.7	C-4', C-6'	H-6'	
6'	7.66, <i>dd</i> , (8.5 et 1.8)		122.2	C-2, C-2', C-4'	H-2', H-5'	
<b>Glucose</b>	1''	5.14, <i>d</i> , (7.6)		103.3	C-3, C-2''	H-2''
	2''	3.47, <i>dd</i> , (9.0 et 7.6)		74.4	C-1'', C-3''	H-1''
	3''	3.49, <i>t</i> , (9.0)		76.8	C-4''	
	4''	3.29, <i>t</i> , (9.0)		70.0	C-3'', C-5''	
	5''	3.36, <i>m</i>		75.9	C-1'', C-4'', C-6''	
	H-6a	3.83, <i>dd</i> , (11.1 et 1.5)		67.2	C-1'', C-5''	H-5'', H-6b
	H-6b	3.44, <i>dd</i> , (10, 0 et 4.5)		67.2	C-4'', C-5''	H-6a
<b>Rhamnose</b>	1'''	4.54, <i>d</i> , (1.8)		101.1	C-6''', C-2'''	H-2'''
	2'''	3.65, <i>dd</i> , (3.4 et 1.6)		70.9	C-3''', C-4'''	H-1''', H-3'''
	3'''	3.56, <i>dd</i> , (9.4 et 3.4)		70.8	C-2''', C-4'''	H-2''', H-4'''
	4'''	3.30, <i>t</i> , (9.5)		72.6	C-3''', C-5''', C-6'''	H-3'''
	5'''	3.41, <i>m</i>		68.4	C-1''', C-6'''	H-6'''
	6''' (CH <sub>3</sub> )	1.14, <i>d</i> , (6.2)		16.5	C-4''', C-5'''	H-5'''

*s* : singulet; *d* : doublet; *dd* : doublet de doublet; *t* : triplet ; *m* : multiplet.

L'ensemble des données précédentes qui sont compatibles avec celles reportées dans la littérature (Moniava, 1971b; Kazuma, 2003; Cuyckens, 2004) a permis d'attribuer au composé **EMGqZ (III.5.3)** la structure quercétine-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside (rutine).



Structure du composé **EMGqZ (III.5.3)**:

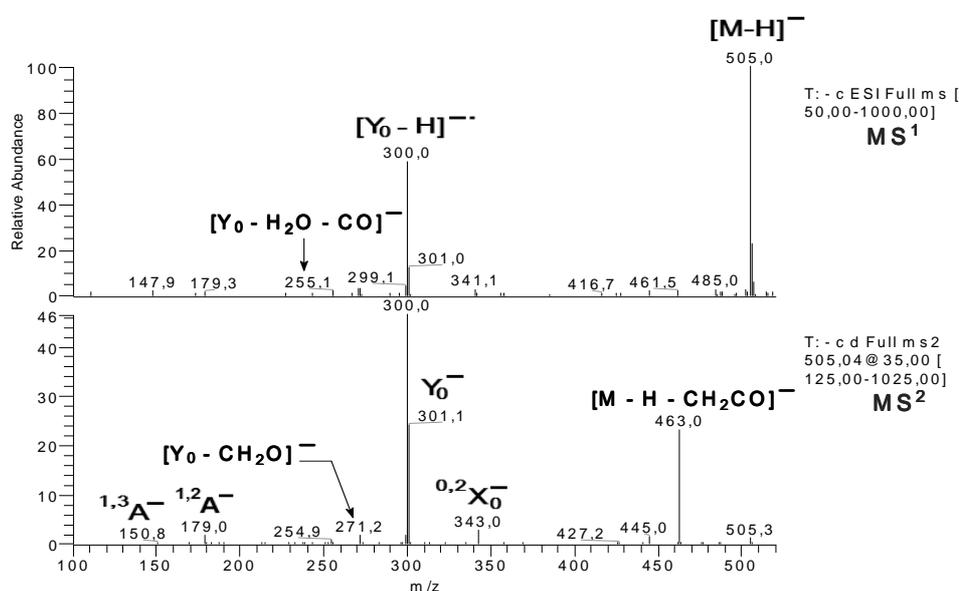
**Quercétine-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (rutine)**

### III.5.1.4. Identification structurale du composé **EMF16(III.5.4)**

Le composé **EMF16(III.5.4)** se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des fleurs de *C. tricolor* (cf. II.5.2.12). Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) à 256 et 356 nm et deux épaulements à 266 et 302 nm (**Fig.II.32**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 99.1 à 254 nm.

L'enregistrement du spectre de masse réalisé en ESI(-)MS/MS<sup>2</sup> (**Fig.III.77**) présente sur le spectre MS<sup>1</sup> un ion quasi-moléculaire d'un mono-*O*-glycosyl flavonol à  $m/z$  505 [M-H]<sup>-</sup> qui suggère une masse moléculaire de 506 uma correspondant à la formule brute C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub> avec un degré d'insaturation de 13.

En comparant les données de masse obtenues avec celles du composé **EMTF4(III.5.1)**, on peut en déduire qu'on est également en présence d'une quercétine-3-*O*-glycosylée. Cependant, sur le spectre MS<sup>2</sup> du composé **EMF16(III.5.4)** la fragmentation de l'ion [M-H]<sup>-</sup> à  $m/z$  505 conduisant à la formation de l'ion déprotoné à  $m/z$  463 [M-H-CH<sub>2</sub>CO]<sup>-</sup> indique la perte de (-42 uma) révélant par conséquent la présence d'un groupement acétyle. En plus, l'existence de l'ion Y<sub>0</sub><sup>-</sup> à  $m/z$  301 témoin de la présence de l'aglycone quercétine est obtenu suite à la perte d'une unité hexose (glucose ou galactose) et d'un acétyle (42-162 uma). De plus, la présence du fragment <sup>0,2</sup>X<sub>0</sub><sup>-</sup> à  $m/z$  343 [M-H-42-120]<sup>-</sup> indique une rupture des liaisons 0,2 (**Fig.III.57**) au niveau d'un sucre de type hexose.



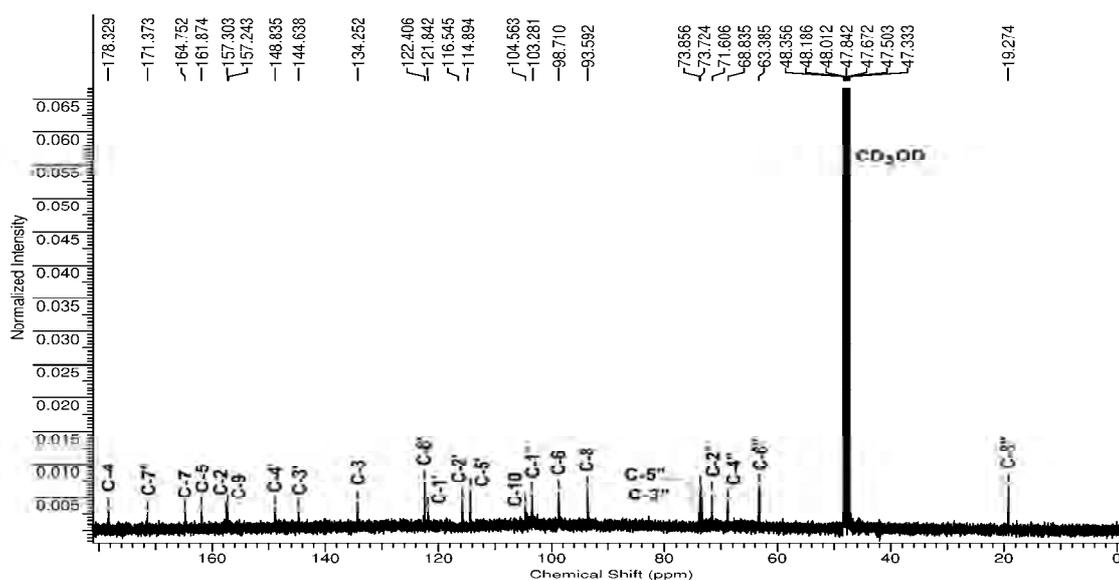
**Figure III.77.** Spectre de masse ESI-MS/MS en mode négatif du composé **EMF16(III.5.4)**.

**Tableau III.20.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMF16(III.5.4)**.

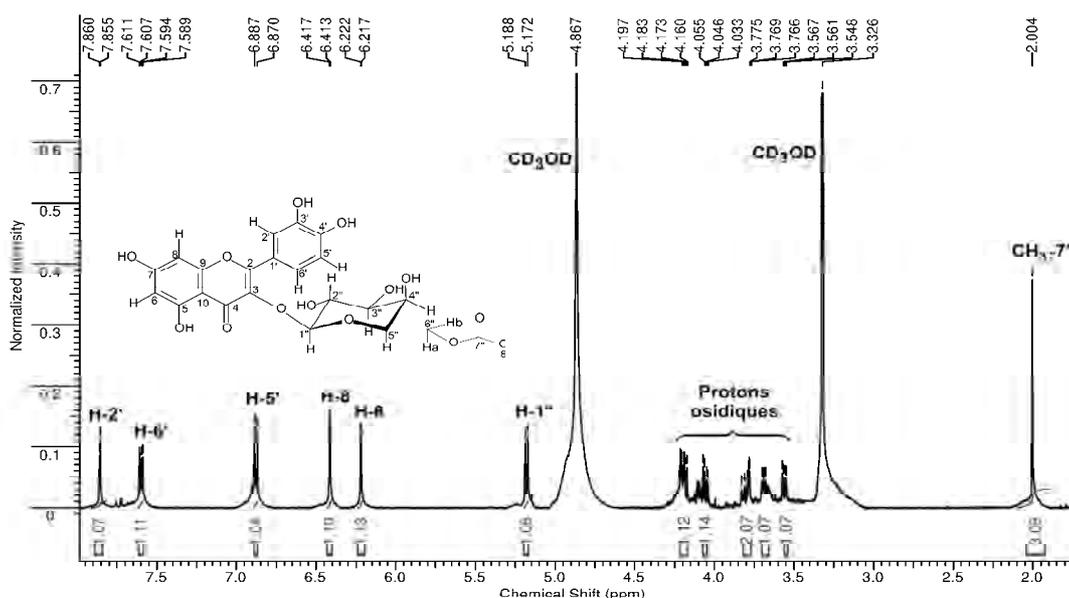
Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	505(100), 300(59), 301(12), 255(2), 179(1)	300(100), 301(52), 463(49), 343(6), 271(4), 179(3), 505(2), 255(1), 151(<1)

Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif de ce composé sont indiqués sur le **Tableau III.20**. A ce stade de notre analyse, on peut en déduire que ce composé est une quercétine-3-*O*-glycosylée avec un hexose acétylé.

Le spectre RMN <sup>13</sup>C (**Fig.III.78**), révèle les signaux des 23 carbones dans la molécule, parmi lesquels, on distingue ceux appartenant au groupement acétyle. Ainsi, on perçoit le signal du carbonyle (C=O) à δ<sub>c</sub> 171.4 ppm et celui du méthyle (COCH<sub>3</sub>) à δ<sub>c</sub> 19.3 ppm. On remarque aussi qu'au niveau du sucre, le signal du carbone C-6'' de ce composé a subi un déblindage comparé à celui du composé EMF4(III.5.1) (cf. **Tableau III.15**) et cela de 60.8 à 63.4 ppm alors que le signal du carbone adjacent C-5'' a subi un blindage de 76.0 à 73.7 ppm suggérant par conséquent une acétylation en position C-6'' du sucre galactose (Markham, 1982).



**Figure III.78.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMF6(III.5.4)**.



**Figure III.79.** Spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMF6(III.5.4)**.

Le spectre proton (**Fig.III.79**) confirme la présence du groupement acétyle en présentant un singulet intégrant pour trois protons à  $\delta_H$  2.00 ppm attribuable au groupement méthyle. D'autre part, la nature du sucre est confirmée en considérant particulièrement le signal du proton osidique H-3'' (3.59 ppm,  $J = 9.7$  et 3.4 Hz) qui apparait sous la forme d'un doublet de doublet spécifique du galactose. En considérant la constante de couplage du proton anomérique du galactose résonnant à  $\delta_H$  5.18 (H-1'', d,  $J = 7.8$  Hz), la configuration  $\beta$  est attribuée au sucre indiquant un couplage di-axial entre les protons H-1'' et H-2''.

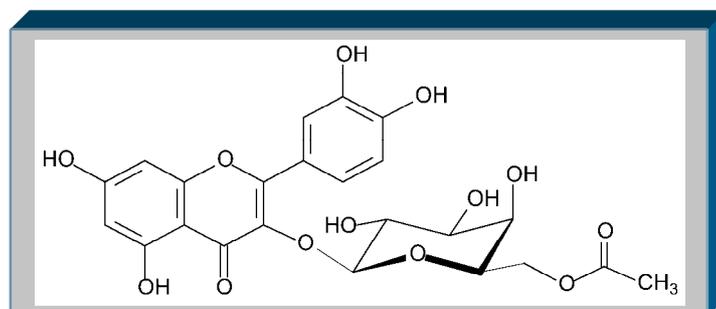
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone sont rassemblés dans le **Tableau III.21**.

**Tableau III.21.** Données spectrales RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  du composé **EMF16(III.5.4)**.

	Position	$^1H$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}C$ $\delta$ (ppm)
<b>Aglycone (Quercétine)</b>	2		157.3
	3		134.3
	4		178.3
	5		161.9
	6	6.22, <i>d</i> , (2.4)	98.7
	7		164.8
	8	6.41, <i>d</i> , (2.0)	93.6
	9		157.2
	10		104.6
	1'		121.8
	2'	7.86, <i>d</i> , (2.4)	116.5
3'		144.6	
4'		148.8	
5'	6.88, <i>d</i> , (8.3)	114.9	
6'	7.60, <i>dd</i> , (8.6 et 2.2)	122.4	
<b>Galactose</b>	1''	5.18, <i>d</i> , (7.8)	103.3
	2''	3.80, <i>dd</i> , (9.7 et 8.0)	71.6
	3''	3.59, <i>dd</i> , (9.7 et 3.4)	73.9
	4''	3.77, <i>dd</i> , (2.9 et 1.4)	68.8
	5''	3.68, <i>ddd</i> , (6.5, 4.3 et 1.4)	73.7
	H-6a	4.18, <i>dd</i> , (11.5 et 6.7)	
	6''		63.4
	H-6b	4.04, <i>dd</i> , (11.3 et 4.4)	
OCOCH <sub>3</sub>	7''		171.4
OCOCH <sub>3</sub>	8''	2.00, <i>s</i>	19.3

*s*: singulet; *d*: doublet; *dd*: doublet de doublet; *ddd*: doublet de doublets de doublet.

Selon toutes les analyses précédentes appuyées par une comparaison avec la littérature (Foo, 2000; An, 2013), on a pu attribuer au composé **EMF16(III.5.4)** la structure quercétine-3-O- $\beta$ -D-(6''-acétyl)-galactopyranoside.



Structure du composé composé **EMF16(III.5.4)**:

**Quercétine-3-O- $\beta$ -D-(6''-acétyl)-galactopyranoside**

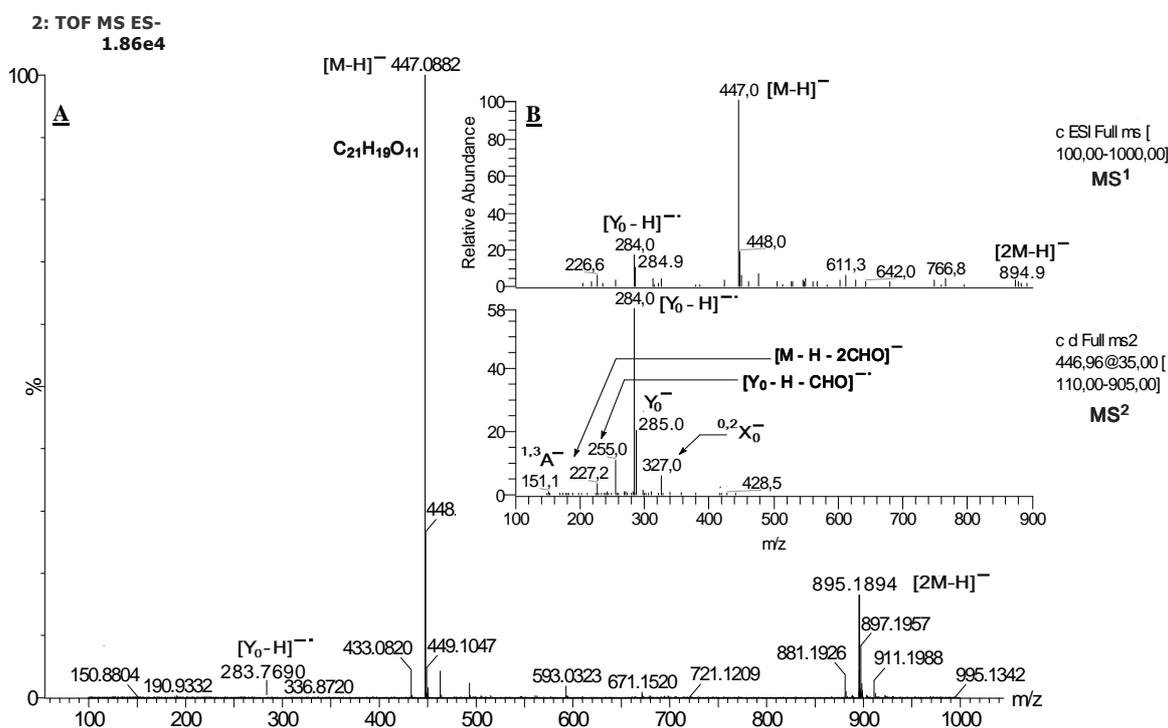
### III.5.2. Dérivés du kaempférol

Les dérivés du kaempférol présentent une fluorescence jaune-vert à 365 nm après révélation au réactif de Neu suggérant la présence d'un flavonoïde avec un noyau B ayant un seul hydroxyle libre (Wagner, 1996).

#### III.5.2.1. Identification structurale du composé **EMTF6(III.5.5)**

Le composé **EMTF6(III.5.5)** se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes (tiges+feuilles) de *C. tricolor* (cf. II.5.2.10). Le spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 264 et 350 nm et un épaulement à 300 nm (**Fig.II.30**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). D'autre part, sachant que la bande II associée à l'absorption du système benzoyle du noyau A permet aussi de connaître le nombre de substituants sur le noyau B. L'apparition d'une bande unique à 264 nm indique une monosubstitution du noyau B en position 4' (Mabry, 1970). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 98.5 à 254 nm.

Le spectre de masse ESI-TOF-MS(-) (**Fig.III.80.A**) de ce composé en mode négatif présente un ion quasi-moléculaire indiquant un flavonol mono-*O*-glycosyle à  $m/z$  447.0882  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 448 uma correspondant à la formule brute  $C_{21}H_{19}O_{11}$  avec un degré d'insaturation de 12.



**Figure III.80.** Spectres de masse HR/MS (**A**) et ESI-MS/MS (**B**) en mode négatif du composé **EMTF6(III.5.5)**.

L'analyse du spectre de masse réalisé en ESI(-)MS/MS (**Fig.III.80.B**) révèle les principaux fragments établis pour les flavonols; leur nomenclature est faite selon les règles de Domon (1988),

et Ma (1997) (**Fig.III.57**). La fragmentation MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  447 entraîne la perte d'un hexose (-162 uma) caractérisée par le fragment  $Y_0^-$  à  $m/z$  285. En plus, les deux spectres  $MS^1$  et  $MS^2$  présentent un ion-radical à  $m/z$  284  $[Y_0-H]^-$  plus intense que l'ion  $Y_0^-$  à  $m/z$  285 indiquant, une substitution préférentielle en position 3 de l'aglycone (Cuyckens, 2004; Ablajan, 2006). D'autre part, la valeur du fragment  $Y_0^-$  à  $m/z$  285 nous a orientés vers l'aglycone kaempférol. L'ion  $^{1,3}A^-$  à  $m/z$  151, issu de la fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA) indique une fragmentation typique d'un flavonol (Fabre, 2001). On constate également que l'ion  $Y_0^-$  est précurseur des fragments  $[Y_0-H-CHO]^-$  et  $[Y_0-2CHO]^-$  à respectivement  $m/z$  255 et 227. Par ailleurs, on repère sur le spectre la présence du fragment  $^{0,2}X_0^-$  à  $m/z$  327 suite à la perte du fragment  $C_4H_8O_4$  (-120 uma), indiquant une rupture des liaisons 0,2 au niveau d'un sucre de type hexose (glucose ou galactose).

Les principaux fragments donnés par les spectres  $MS^1$  et  $MS^2$  en mode *electrospray* négatif de ce composé sont présentés dans le **Tableau III.22**.

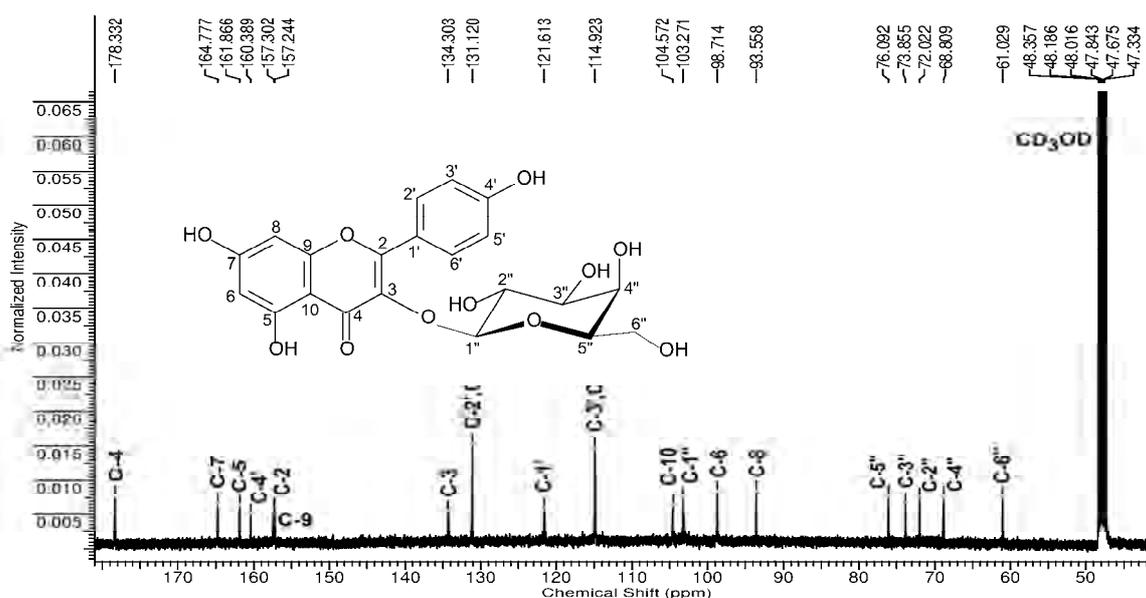
**Tableau III.22.** Données ESI-MS/ $MS^2$  du composé **EMTF6(III.5.5)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
$C_{21}H_{20}O_{11}$	$MS^1$	$MS^2$
	447(100), 284(16), 285(8), 227(5), 327(5), 895(1)	284(100), 285(34), 255(18), 327(10), 227(6), 151(1)

L'hydrolyse acide nous a permis d'identifier le D-galactose comme sucre et le kaempférol comme aglycone par CCM comparatives avec des échantillons authentiques.

Suite à cela, la structure de ce composé est proposée comme étant le kaempférol-3-O-glycosylé par le sucre galactose.

Afin de confirmer cette structure, on a eu recours à la RMN. Ainsi, grâce au spectre RMN  $^{13}C$  (**Fig.III.81**), on a pu distinguer les signaux des 21 carbones de la molécule.



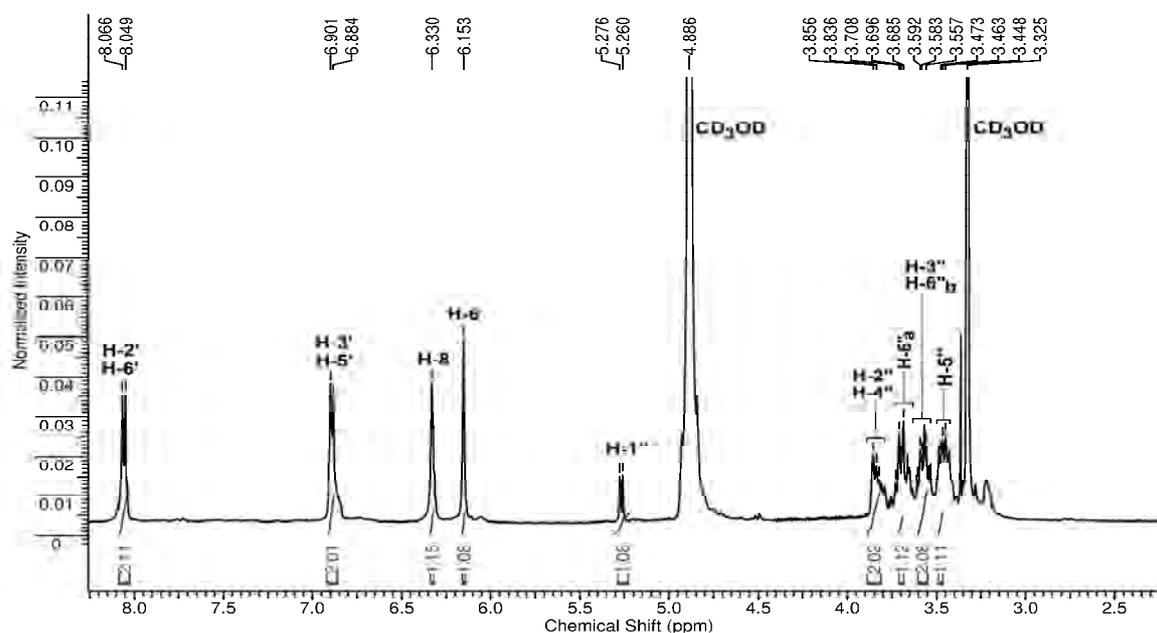
**Figure III.81.** Spectre RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CD_3OD$ ) du composé **EMTF6(III.5.5)**.

Parmi les carbones attribués au kaempférol, on distingue d'une part les signaux des carbones C-3 et C-2 respectivement à  $\delta_c$  134.3 et 157.3 ppm. Ceci est en faveur d'une glycosylation de l'hydroxyle en position C-3 qui se reflète par un blindage de 135.6 à 134.3 ppm du carbone portant l'hydroxyle glycosylé, et un déblindage de 146.8 à 157.3 ppm du carbone C-2 en position *ortho*. Ces comparaisons ont été faites par rapport aux données RMN  $^{13}C$  de la molécule kaempférol reportées dans la littérature (Markham, 1978).

Le spectre RMN  $^1H$  (**Fig.III.82**) présente les signaux essentiels qui ont permis d'identifier l'aglycone comme étant le kaempférol à travers la présence des protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' couplés en *ortho* de résonance respective  $\delta_H$  8.06 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz) et 6.89 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz), signifiant par conséquence une symétrie sur le noyau B.

On a pu également mettre en évidence des hydroxylations dans les positions C-5 et C-7 du cycle A, et cela en constatant des couplages *mé*ta des protons H-6 et H-8 à respectivement  $\delta_H$  6.15 et 6.33 ppm.

Nous y observons également le signal du proton anomérique du galactose sous la forme d'un doublet à  $\delta_H$  5.27 ppm avec  $J = 7.8$  Hz, ce qui indique la configuration  $\beta$  du sucre. D'autre part, la nature du sucre est déduite en considérant particulièrement le signal du proton osidique H-3'' ( $\delta_H = 3.58$  ppm,  $J = 9.5$  et 3.9 Hz) qui apparait sous la forme d'un doublet de doublet spécifique du sucre galactose, indiquant un couplage di-axial H-3''/H-2'' et axial-équatorial H-3''/H-4''.



**Figure III.82.** Spectre RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) du composé **EMTF6(III.5.5)**.

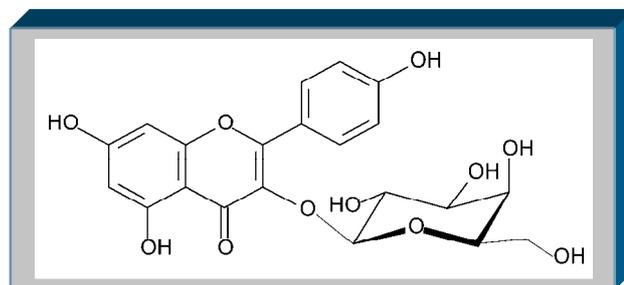
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone sont rassemblés dans le **Tableau III.23**.

**Tableau III.23.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **EMTF6(III.5.5)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
<b>Aglycone (Kaempférol)</b>	2		157.3
	3		134.3
	4		178.3
	5		161.9
	6	6.15, <i>d</i> , (1.9)	98.7
	7		164.8
	8	6.33, <i>d</i> , (1.9)	93.6
	9		157.2
	10		104.6
	1'		121.6
	2'	8.06, <i>d</i> , (8.3)	131.1
3'	6.89, <i>d</i> , (8.3)	114.9	
4'		160.4	
5'	6.89, <i>d</i> , (8.3)	114.9	
6'	8.06, <i>d</i> , (8.3)	131.1	
<b>Galactose</b>	1"	5.27, <i>d</i> , (7.8)	103.3
	2"	3.83, <i>dd</i> , (9.3 et 7.8)	72.0
	3"	3.58, <i>dd</i> , (9.5 et 3.9)	73.9
	4"	3.86, <i>d</i> , (3.5)	68.8
	5"	3.46, <i>ddd</i> , (5.7, 4.3 et 1.5)	76.1
	H-6a	3.69, <i>dd</i> , (11.3 et 5.7)	
	H-6b	3.60, <i>dd</i> , (11.0 et 4.3)	61.0

*d*: doublet; *dd*: doublet de doublet; *ddd*: doublet de doublets de doublet.

Ces données, qui sont comparables à celles reportées dans la littérature (Zapesochnaya, 1966; Foo, 2000), nous ont permis d'attribuer au composé **EMTF6(III.5.5)** la structure correspondant au kaempférol-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside (trifoline).



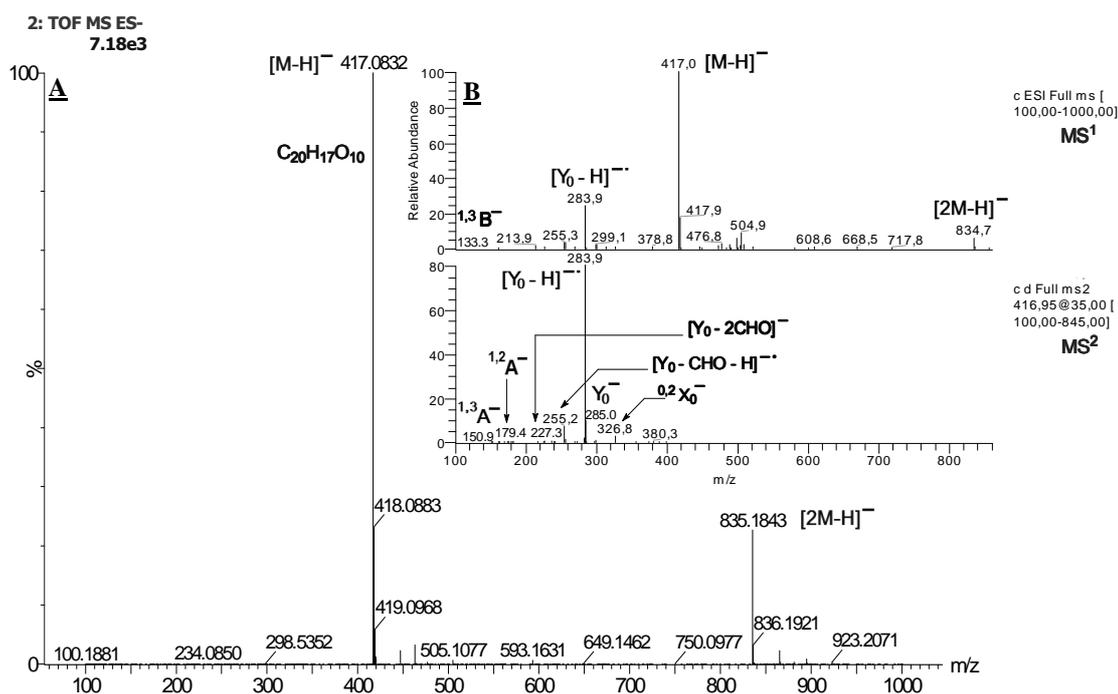
Structure du composé **EMTF6(III.5.5)**:  
**Kaempférol-3-*O*- $\beta$ -D-galactopyranoside** (trifoline).

### III.5.2.2. Identification structurale du composé **EMTF8(III.5.6)**

Le composé **EMTF8(III.5.6)** se présente sous la forme d'une poudre jaune. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes (tiges+feuilles) de *C. tricolor* (cf. II.5.2.10). Le profil du spectre UV-DAD montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) à 266 et 350 nm et un épaulement à 298 nm (**Fig.II.30**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 91.9 à 254 nm.

Le spectre de masse ESI-TOF-MS(-) (**Fig.III.83.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire indiquant un mono-*O*-glycosyl flavonol à  $m/z$  417.0832  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 418 uma correspondant à la formule brute  $C_{20}H_{18}O_{10}$  avec un degré d'insaturation de 12.

En comparant les données obtenues du spectre de masse réalisé en ESI(-)MS/MS (**Fig.III.83.B**) avec celles du composé précédent, on peut en déduire qu'on est également en présence d'un 3-*O*-glycoside de kaempférol avec pour différence la nature du sucre. En effet, le spectre MS<sup>2</sup> montre le fragment  $Y_0^-$  à  $m/z$  285 qui caractérise l'aglycone kaempférol, sachant que ce fragment a été obtenu par la fragmentation MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  417 en entraînant la perte d'un pentose (-132 uma).



**Figure III.83.** Spectres de masse HRMS-TOF (A) et ESI-MS/MS (B) en mode négatif du composé **EM7F8(III.5.6)**.

On constate également la présence d'autres pics indiquant des fragmentations typiques d'un flavonol (Fabre, 2001). Ainsi, on observe les ions  $^{1,3}A^-$  et  $^{1,3}B^-$  issus de la fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA) à respectivement  $m/z$  151 et 133 et la formation de l'ion  $^{1,2}A^-$  à  $m/z$  179 issu d'une rupture des liaisons 1,2 au niveau du cycle C. Par ailleurs, on repère sur le spectre la présence du fragment  $^{0,2}X_0^-$  à  $m/z$  327 indiquant une rupture des liaisons 0,2 (**Fig.III.57**) au niveau d'un sucre de type pentose (arabinose ou xylose) suite à la perte du fragment  $C_3H_6O_3$  (-90uma).

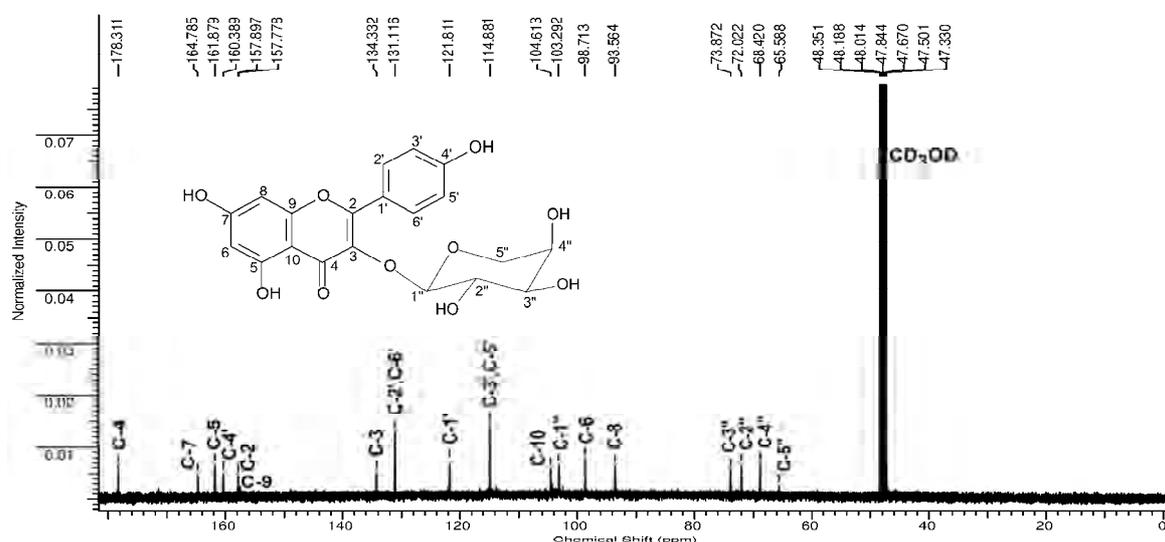
L'hydrolyse acide nous a permis d'identifier le L-arabinopyranose comme sucre et le kaempférol comme aglycone par CCM comparatives avec des échantillons authentiques. Suite à cela, la structure de ce composé est proposée comme étant le kaempférol-3-*O*-glycosylé par l'arabinose.

Les principaux fragments caractéristiques de ce composé sont présentés dans le **Tableau III.24**.

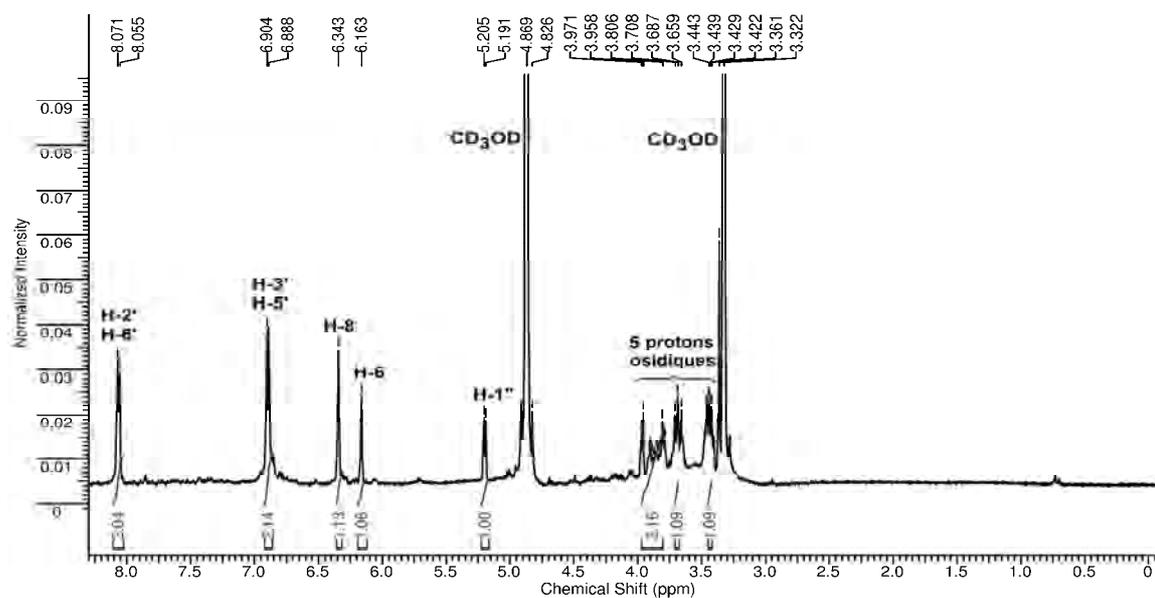
**Tableau III.24.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMTF8(III.5.6)**.

Formule	ESI (-) ( <i>m/z</i> , %)	
C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
	417(100), 284(25), 285(8), 835(6), 255(4), 133(<1)	284(100), 285(15), 255(9), 327(3), 227(2), 179(1), 151(<1)

En ayant recours à la RMN, nous avons pu confirmer la structure proposée pour ce composé. Ainsi, grâce au spectre RMN <sup>13</sup>C (**Fig.III.84**) on a pu distinguer les signaux des 20 carbones de la molécule. Parmi ceux attribués au kaempférol, on distingue les signaux des carbones C-3 et C-2 à respectivement δc 134.3 et 157.9 ppm. Ceci est en faveur d'une glycosylation de l'hydroxyle en position C-3 qui se reflète par un blindage du carbone portant l'hydroxyle glycosylé et un déblindage du carbone C-2 en position *ortho*.



**Figure III.84.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMTF8(III.5.6)**.



**Figure III.85.** Spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMTF8(III.5.6)**.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Fig.III.85**) montre des similitudes avec celui du composé précédent, ce qui nous permet également de déduire la présence du kaempférol. Nous y observons le signal du proton anomérique de l'arabinose sous la forme d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  5.20 ppm ayant une constante de couplage de 6.8 Hz (**Tableau III.25**) indiquant la configuration  $\alpha$  du sucre.

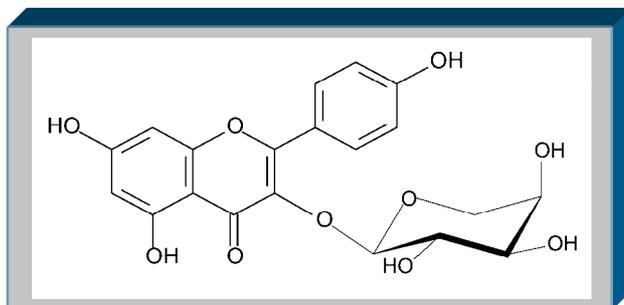
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone sont rassemblés dans le **Tableau III.25**.

**Tableau III.25.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **EMTF8(III.5.6)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
<b>Aglycone (Kaempférol)</b>	2		157.9
	3		134.3
	4		178.3
	5		161.9
	6	6.16, <i>d</i> , (2.0)	98.7
	7		164.8
	8	6.34, <i>d</i> , (2.0)	93.6
	9		157.8
	10		104.6
	1'		121.8
	2'	8.06, <i>d</i> , (7.8)	131.1
	3'	6.90, <i>d</i> , (8.3)	114.9
4'		160.4	
5'	6.90, <i>d</i> , (8.3)	114.9	
6'	8.06, <i>d</i> , (7.8)	131.1	
<b>Arabinose</b>	1"	5.20, <i>d</i> , (6.8)	103.3
	2"	3.94, <i>dd</i> , (8.3 et 6.4)	72.0
	3"	3.69, <i>dd</i> , (8.4 et 2.6)	73.9
	4"	3.80, <i>ddd</i> , (5.7, 3.5, 2.4)	68.4
	5"	H-5" <sub>ax</sub> 3.89, <i>dd</i> , (11.5 et 5.8) H-5" <sub>eq</sub> 3.45, <i>dd</i> , (11.5 et 3.4)	65.6

*d*: doublet; *dd*: doublet de doublet; *ddd*: doublet de doublets de doublets; ax : axial; eq : équatorial.

L'ensemble des données précédentes qui sont comparables à celles reportées dans la littérature (Lhuillier, 2007; Wang, 2007), nous permettent d'établir la structure du composé **EMTF8(III.5.6)** comme étant le kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (juglaline).

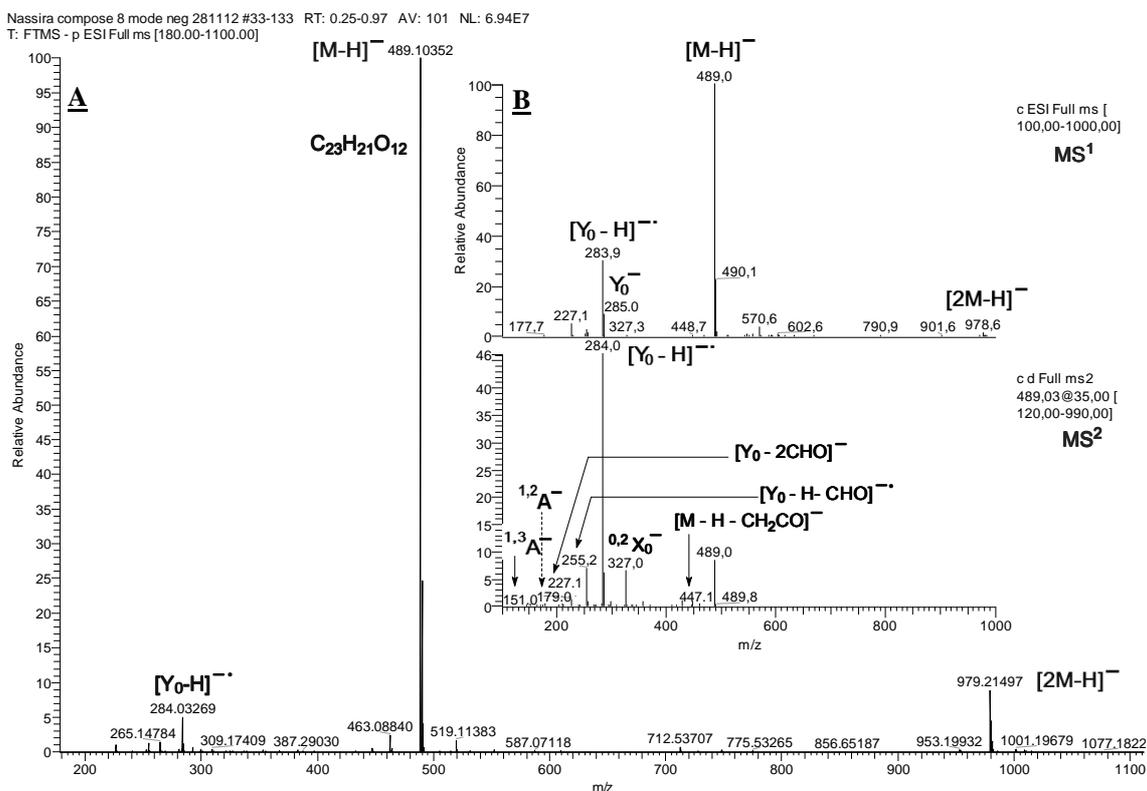


Structure du composé **EMTF8(III.5.6)**:  
**Kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranoside** (juglaline)

### III.5.2.3. Identification structurale du composé **EMFIZ(III.5.7)**

Le composé **EMFIZ(III.5.7)** se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des fleurs de *C. tricolor* (cf. II.5.2.12). Le profil du spectre UV montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) à 266 et 350 nm et un épaulement à 300 nm (**Fig.II.32**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 99.8 à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution (**Fig.III.86.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire d'un flavonol mono-*O*-glycosylé à  $m/z$  489.10352 (calculée 489.10385)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 490 uma correspondant à la formule brute  $C_{23}H_{22}O_{12}$  avec un degré d'insaturation de 13.



**Figure III.86.** Spectres de masse HR/MS (A) et ESI-MS/MS (B) en mode négatif du composé **EMFIZ(III.5.7)**.

Sur le spectre  $MS^2$  (**Fig.III.86.B**), la fragmentation de l'ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  489 conduit à la formation d'un ion déprotoné à  $m/z$  447  $[M-H-CH_2CO]^-$  qui indique la perte de (-42 uma) révélant par conséquent la présence d'un groupement acétyle. Le spectre  $MS^2$  indique également l'existence de l'ion  $Y_0^-$  à  $m/z$  285 ce qui nous oriente vers l'aglycone kaempférol pouvant être obtenu suite à la perte d'une unité hexose (glucose ou galactose) et d'un acétyle (42-162 uma). On repère sur le spectre la présence du fragment  $^{0,2}X_0^-$  à  $m/z$  327  $[M-H-CH_2CO-C_4H_8O_4]^-$  indiquant une rupture des liaisons 0,2 (**Fig.III.57**) au niveau d'un sucre de type hexose.

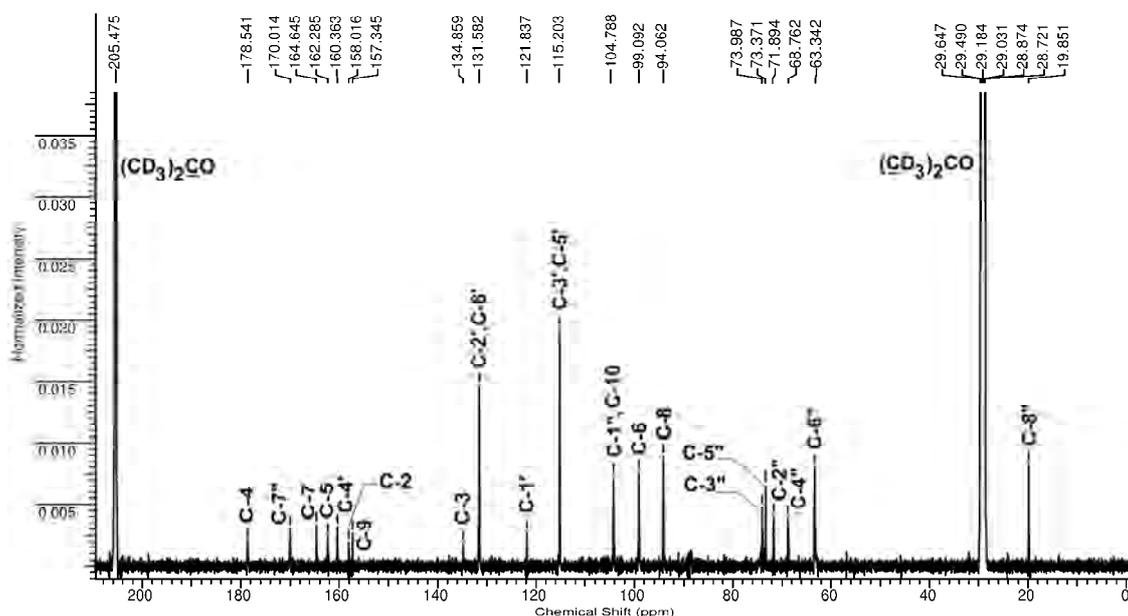
Les principaux fragments caractéristiques de ce composé sont présentés dans le **Tableau III.26**.

**Tableau III.26.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMFIZ(III.5.7)**.

Formule	ESI (-) ( <i>m/z</i> , %)	
C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
	489(100), 284(30), 285(8), 227(5), 255(2), 979(1)	284(100), 489(18), 285(15), 255(9), 327(3), 447(2), 227(2), 179(1), 151(<)

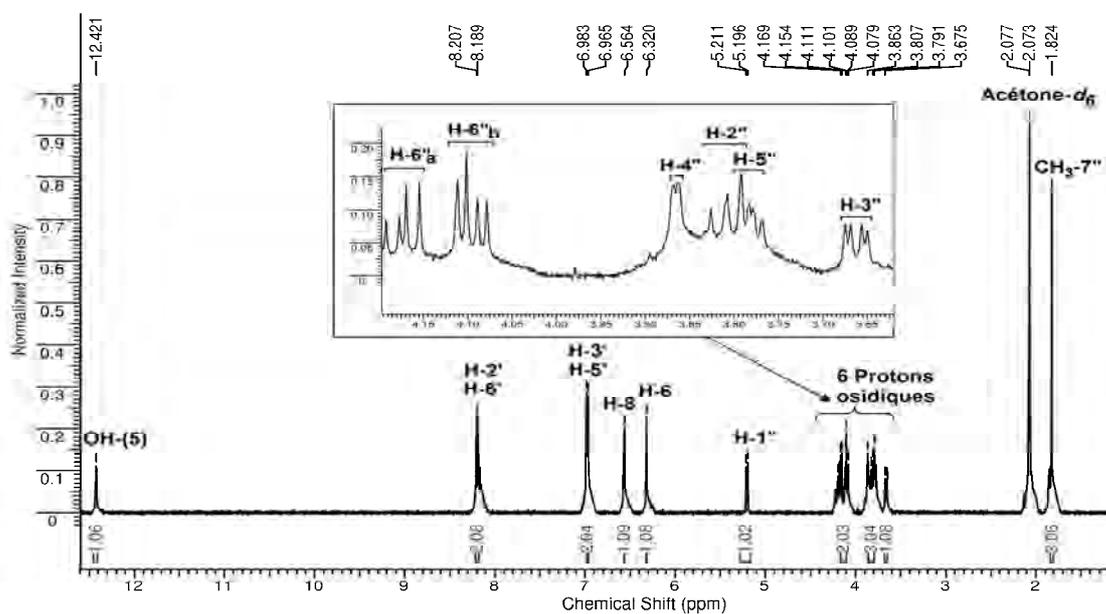
Suite à cela, la structure de ce composé est proposée comme étant du kaempférol-3-*O*-glycosylé par un sucre de type hexose (glucose ou galactose) acétylé.

L'analyse du spectre RMN <sup>13</sup>C (**Fig.III.87**) a permis de distinguer les 23 carbones de la molécule. Parmi ceux attribués à l'aglycone kaempférol, on distingue les signaux des carbones C-3 et C-2 à respectivement δ<sub>c</sub> 134.9 et 158.0 ppm. Ceci est en faveur d'une glycosylation de l'hydroxyle en position C-3 qui se reflète par un blindage du carbone portant l'hydroxyle glycosylé et un déblindage du carbone C-2 en position *ortho*. En plus, on retrouve le signal du carbonyle (C=O) à δ<sub>c</sub> 170.0 ppm et celui du méthyle à δ<sub>c</sub> 19.9 ppm appartenant au groupement acétyle révélé précédemment par la spectrométrie de masse. On remarque aussi qu'au niveau du sucre, le signal du carbone C-6'' de ce composé a subi un déblindage comparé à celui du composé **EMTF6(III.5.5)** (cf. Tableau III.23) et cela de 61.0 à 63.3 ppm alors que le signal du carbone adjacent a subi un blindage de 76.1 à 73.4 ppm suggérant en conséquence une acétylation en position C-6'' du sucre (Markham, 1982).

**Figure III.87.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) du composé **EMFIZ(III.5.7)**.

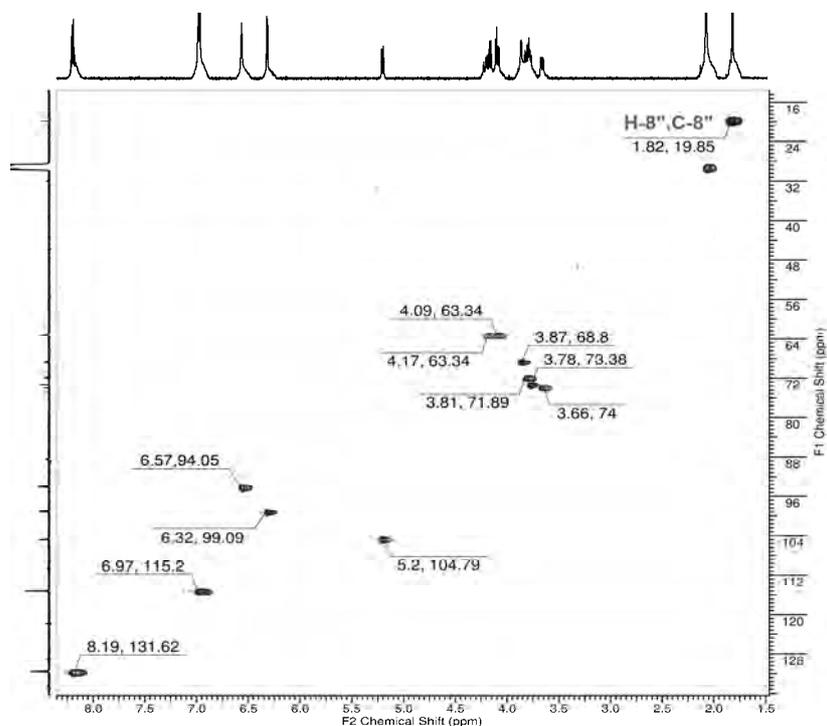
Le spectre proton (**Fig.III.88**) de ce composé présente les mêmes signaux caractéristiques de l'aglycone kaempférol que les deux composés précédents. On distingue sur le spectre un singulet intégrant pour trois protons à δ<sub>H</sub> 1.82 ppm attribuable à un groupement méthyle. D'autre part, la nature du sucre est confirmée en considérant le signal du proton osidique H-3'' (3.66 ppm, *J* = 9.3 et 3.4 Hz) qui apparaît sous la forme d'un doublet de doublets spécifique du galactose.

En considérant la constante de couplage du proton anomérique du galactose résonnant à  $\delta_H$  5.20 (H-1'', d,  $J = 7.9$  Hz), la configuration  $\beta$  est assignée au sucre indiquant un couplage di-axial entre les protons H-1'' et H-2''.



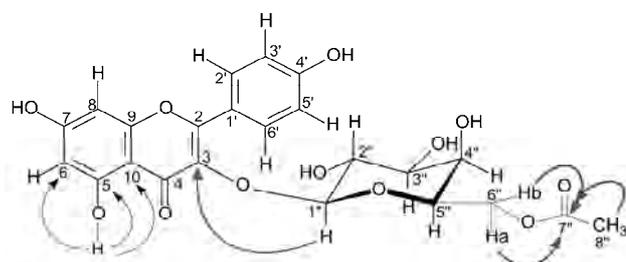
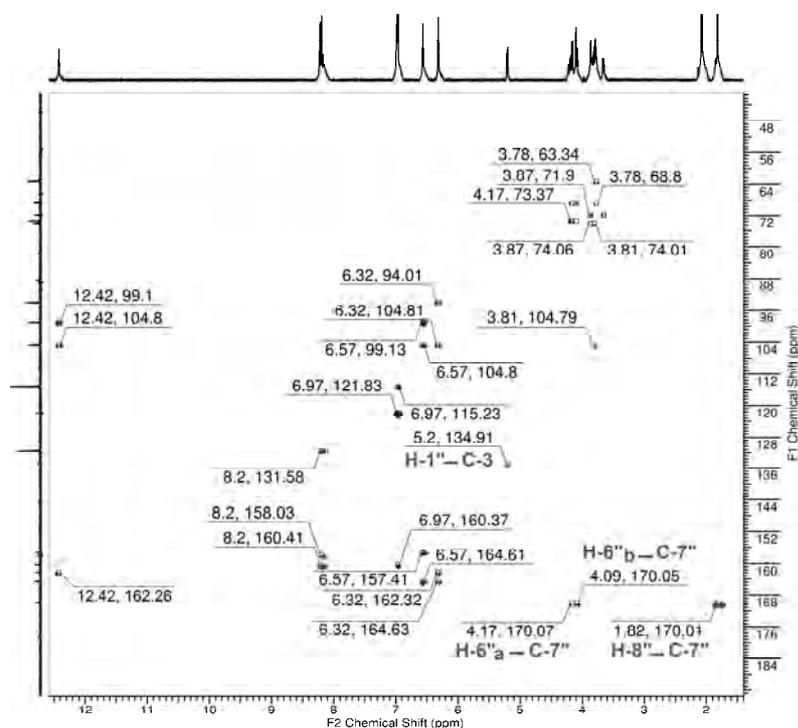
**Figure III.88.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) du composé **EMFIZ(III.5.7)**.

Par ailleurs, le spectre de corrélations hétéronucléaires à courtes distances HSQC (**Fig.III.89**) a permis d'attribuer les protons aux carbones correspondants. On distingue en particulier la présence d'un méthyle ( $\delta_H$  1.82,  $\delta_C$  19.9) du groupement acétyle.



**Figure III.89.** Spectre RMN-2D HSQC  $^{\text{C}}\text{H}$  du composé **EMFIZ(III.5.7)**.

La position du sucre est indiquée par le spectre de corrélation hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  à longues distances HMBC (**Fig.III.90**) dans lequel nous observons une nette corrélation  $^3J$  entre le proton anomérique H1'' ( $\delta_{\text{H}}$  5.2 ppm) du galactose et le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  à 134.9 (C-3) indiquant une glycosylation de l'hydroxyle en position 3 de l'aglycone kaempférol. En plus, la présence du groupement acétyle est indiquée par la corrélation  $^2J$  entre les protons du méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  1.82 ppm et le carbone C-7'' à  $\delta_{\text{C}}$  170 ppm du carbonyle ( $\text{C=O}$ ) de l'acétyle. On a pu également déduire l'acétylation de l'hydroxyle en position C-6'' du sucre en considérant les corrélations  $^3J$  entre les protons du galactose H6''<sub>a</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  4.17 ppm) et H-6''<sub>b</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  4.09 ppm) et le carbone C-7'' de l'acétyle. L'hydrogène de l'hydroxyle en position 5 présente sur le spectre HMBC une corrélation  $^2J$  avec le carbone C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  = 162.3 ppm) et des corrélations  $^3J$  avec les carbones C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  = 99.1 ppm) et C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  = 104.8 ppm). Ceci témoigne de la présence d'un hydroxyle libre en position 5 de l'aglycone.



**Figure III.90.** Spectre RMN-2D HMBC et principales corrélations hétéronucléaires  $^2J$  -  $^3J$  du composé **EMFIZ(III.5.7)**.

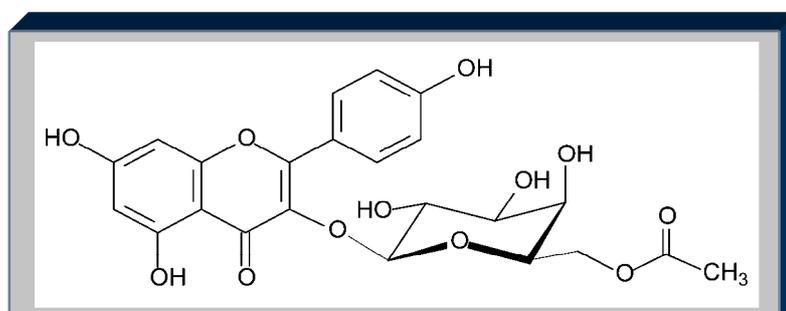
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone ainsi que les différentes corrélations hétéronucléaires HMBC sont rassemblés dans le **Tableau III.27**.

**Tableau III.27.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , et HMBC du composé **EMFIZ(III.5.7)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, J(Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>Aglycone (Kaempférol)</b>	2		158.0	
	3		134.9	
	4		178.5	
	5		162.3	
	6	6.32, <i>d</i> , (2.0)	99.1	C-5, C-7, C-8, C-10
	7		164.6	
	8	6.57, <i>d</i> , (2.0)	94.1	C-6, C-7, C-9, C-10
	9		157.4	
	10		104.8	
	5-OH	12.42, <i>s</i>		C-5, C-6, C-10
	1'		121.8	
	2'	8.20, <i>d</i> , (9.1)	131.6	C-2, C-4', C-6'
	3'	6.97, <i>d</i> , (9.1)	115.2	C-1', C-4', C-5'
4'		160.4		
5'	6.97, <i>d</i> , (9.1)	115.2	C-1', C-3', C-4'	
6'	8.20, <i>d</i> , (9.1)	131.6	C-2, C-2', C-4'	
<b>Galactose</b>	1"	5.20, <i>d</i> , (7.9)	104.8	C-3
	2"	3.81, <i>dd</i> , (9.3 et 8.1)	71.9	C-1", C-3"
	3"	3.66, <i>dd</i> , (9.3 et 3.4)	74.0	C-2"
	4"	3.87, <i>dd</i> , (3.2 et 1.6)	68.8	C-2", C-3"
	5"	3.78, <i>ddd</i> , (6.9, 4.9, et 1.2)	73.4	C-1", C-4", C-6"
	6" H-6a	4.17, <i>dd</i> , (11.5 et 6.9)		C-4", C-5", C-7"
	6" H-6b	4.09, <i>dd</i> , (11.0 et 4.9)	63.3	C-4", C-7"
OCOCH <sub>3</sub>	7"		170.0	
OCOCH <sub>3</sub>	8"	1.82, <i>s</i>	19.9	C-7"

*s* : singulet; *d* : doublet; *dd* : doublet de doublet; *ddd* : doublet de doublets de doublet.

Toutes ces données appuyées par une comparaison avec celles de la littérature (Foo, 2000; Goupy, 2013) nous permettent d'attribuer au composé **EMFIZ(III.5.7)** la structure correspondant au kaempférol-3-O- $\beta$ -D-(6"-acétyl)-galactopyranoside.



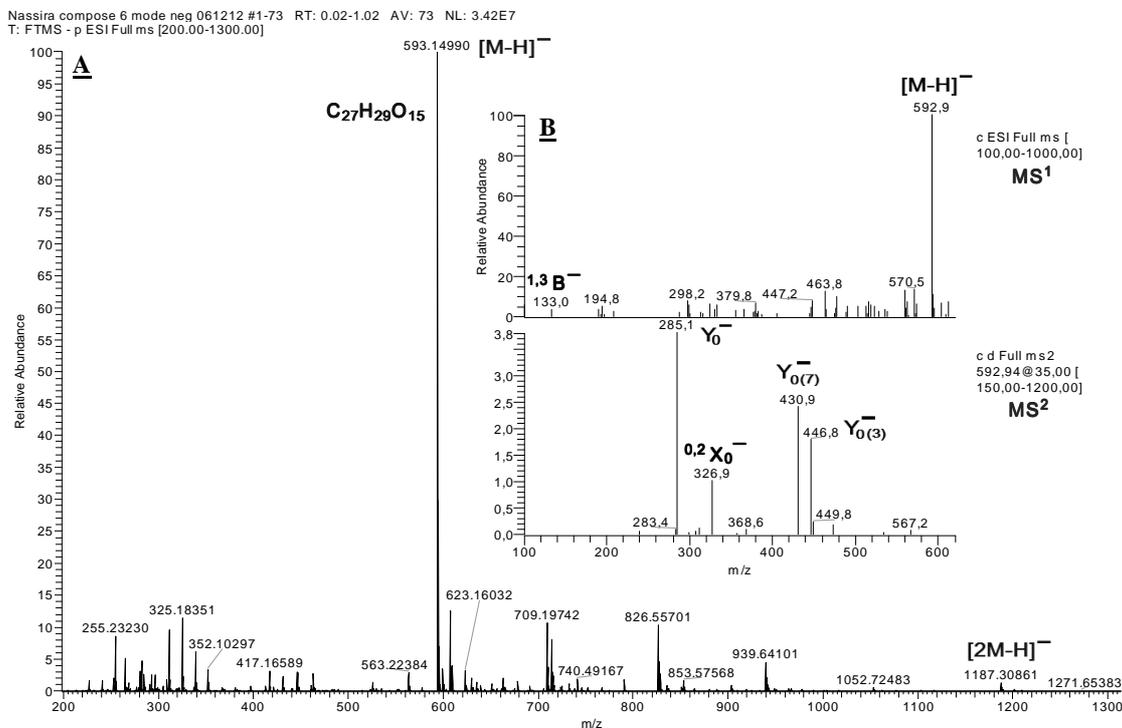
Structure du composé composé EMFIZ(III.5.7):

**Kaempférol-3-O- $\beta$ -D-(6"-acétyl)-galactopyranoside**

**III.5.2.4. Identification structurale du composé EMTF2(III.5.8)**

Le composé **EMTF2(III.5.8)** se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre. Il est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes (tiges+feuilles) de *C. tricolor* (cf. II.5.2.10). Le profil de son spectre UV montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) à 264 et 346 nm avec un épaulement à 318 nm (**Fig.II.30**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 98.4 à 254 nm.

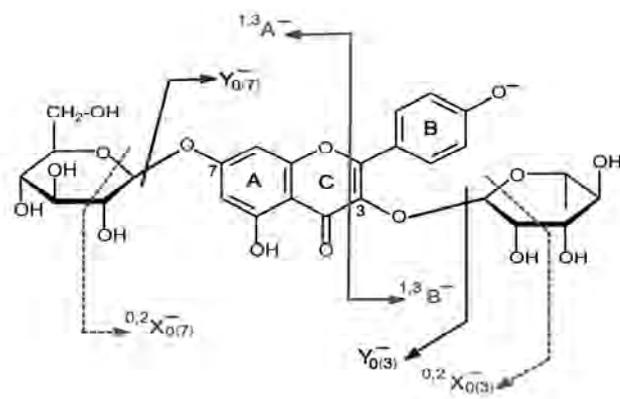
Le spectre de masse haute résolution (**Fig.III.91.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire d'un flavonol di-*O*-glycosylé à  $m/z$  593.14990 (calculée 593.15010)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 594 uma correspondant à la formule brute  $C_{27}H_{30}O_{15}$  avec un degré d'insaturation de 13.



**Figure III.91.** Spectres de masse HR/MS (**A**) et ESI-MS/MS (**B**) en mode négatif du composé **EMTF2(III.5.8)**

L'analyse du spectre de masse réalisé en ESI(-)MS/MS (**Fig.III.91.B**) révèle les principaux fragments établis pour les flavonols; leur nomenclature a été faite selon les règles de Domon (1988) et Ma (1997) (**Fig.III.92**).

Sur le spectre  $MS^2$ , la fragmentation de l'ion précurseur  $[M-H]^-$  à  $m/z$  593 donne les deux fragments  $Y_{0(3)}^-$  à  $m/z$  447  $[M-H-146]^-$  et  $Y_{0(7)}^-$  à  $m/z$  431  $[M-H-162]^-$  correspondant respectivement à la perte d'un rhamnose et d'un glucose (ou galactose). Cependant, la présence concomitante de ces deux fragments sur le spectre indique que les deux sucres sont localisés dans des positions différentes de l'aglycone (Sakushima, 1988). Sachant que l'intensité relative du fragment  $Y_{0(7)}^-$  étant plus importante que celle du fragment  $Y_{0(3)}^-$ , ceci est en faveur d'une localisation du rhamnose en position 3 et le glucose (ou galactose) en position 7 de l'aglycone (Ablajan, 2006). De plus, la présence du fragment  $Y_0^-$  à  $m/z$  285 témoigne d'une part de la perte de deux unités sucres (-146-162 uma), et d'autre part nous oriente vers l'aglycone kaempférol. Par ailleurs, on repère sur le spectre la présence d'un fragment  $^{0,2}X_0^-$  à  $m/z$  327 correspondant à des ruptures des liaisons 0,2 au niveau du rhamnose  $[M-H-162-104]^-$  et du glucose (ou galactose)  $[M-H-146-120]^-$  (Cuyckens, 2004). On constate également la présence d'un pic indiquant une fragmentation typique d'un flavonol à  $m/z$  133 ( $^{1,3}B^-$ ), issu de la fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA) (Fabre, 2001).



- 593 : [M-H]<sup>-</sup>
- 447 : [M-H-146]<sup>-</sup> : Y<sub>0(3)</sub><sup>-</sup>
- 431 : [M-H-162]<sup>-</sup> : Y<sub>0(7)</sub><sup>-</sup>
- 327 : [M-H-146-120]<sup>-</sup> : <sup>0,2</sup>X<sub>0(7)</sub><sup>-</sup>
- : [M-H-162-104]<sup>-</sup> : <sup>0,2</sup>X<sub>0(3)</sub><sup>-</sup>
- 285 : [M-H-162-146]<sup>-</sup> : Y<sub>0</sub><sup>-</sup>
- 133 : [Y<sub>0</sub>-152]<sup>-</sup> : <sup>1,3</sup>B<sup>-</sup>

**Figure III.92.** Fragmentation ESI-MS/MS de l'ion quasi-moléculaire à  $m/z$  593 [M-H]<sup>-</sup> du composé **EMTF2(III.5.8)**.

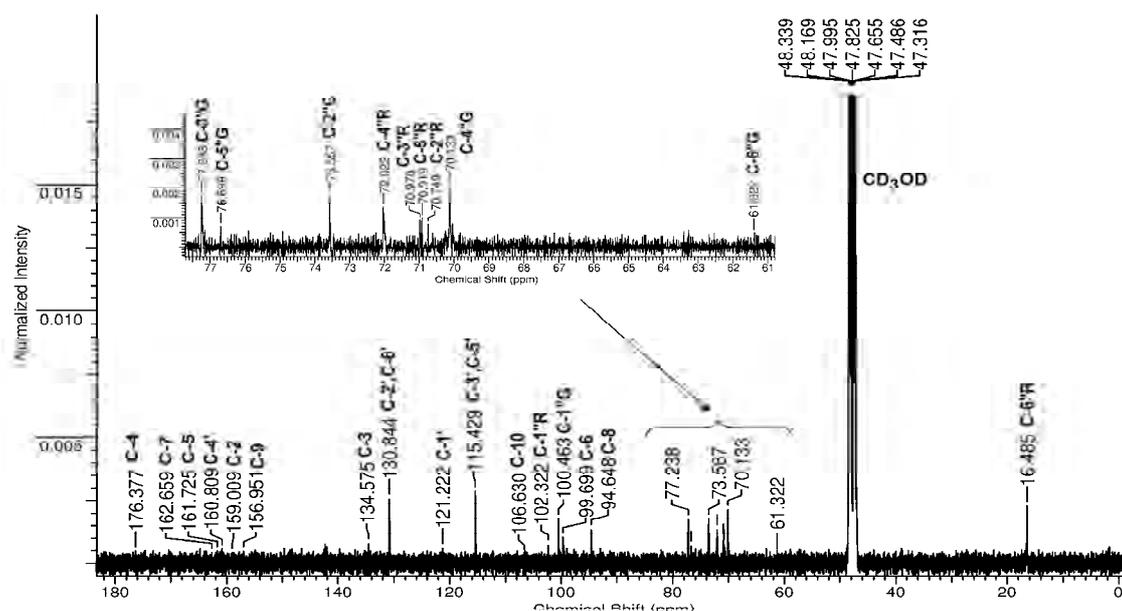
Les principaux fragments caractéristiques de ce composé sont présentés dans le **Tableau III.28**.

**Tableau III.28.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMTF2(III.5.8)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
	593(100), 447(8), 133(3)	285(100), 431(63), 447(47), 327(27), 284(3), 283(2)

L'hydrolyse acide de ce composé a permis d'identifier les sucres D-glucopyranose et L-rhamnopyranose par co-chromatographie sur CCM en présence de témoins. De même, nous avons pu prouver la présence du kaempférol par une chromatographie comparative de l'aglycone avec des échantillons authentiques.

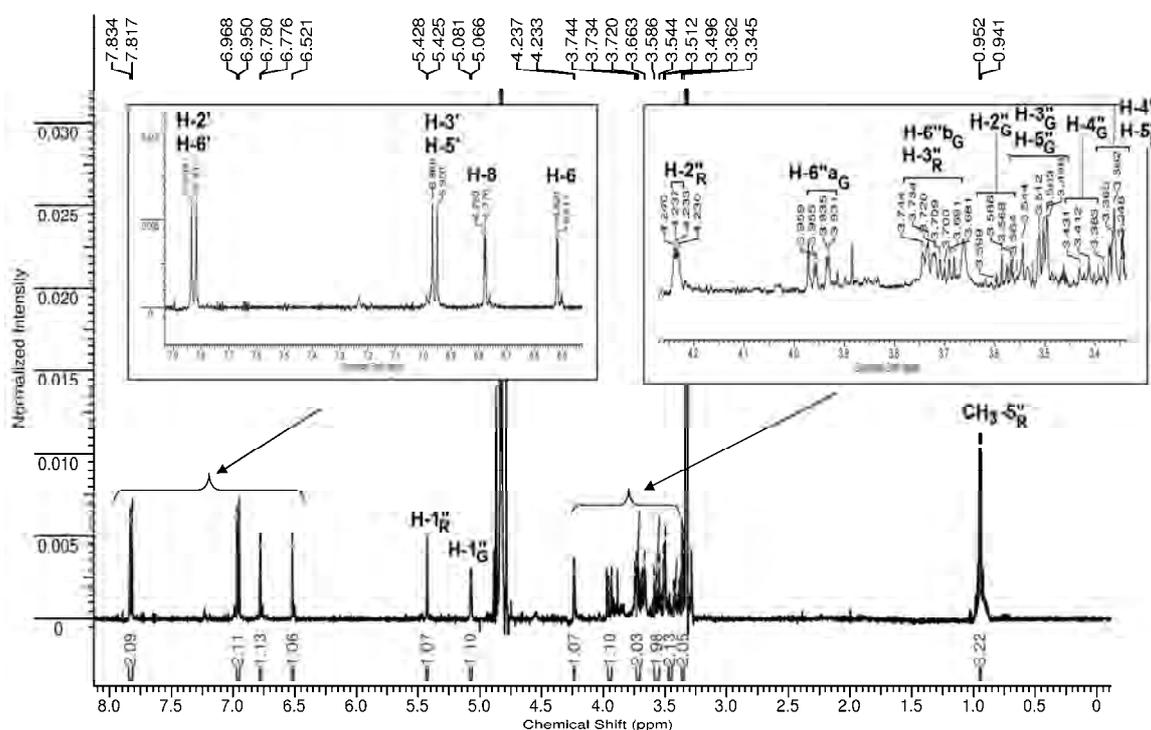
Grâce au spectre RMN <sup>13</sup>C (**Fig.III.93**), on a pu retrouver les signaux appartenant aux 27 carbones de la molécule.



**Figure III.93.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMTF2(III.5.8)**.

Parmi les carbones attribués au kaempférol, on distingue d'une part les signaux des carbones C-3 et C-2 à  $\delta_c$  134.6 et 159.0 ppm, respectivement. Ceci est en faveur d'une glycosylation de l'hydroxyle en position C-3 qui se reflète par un blindage ( $\Delta = -1.0$  ppm) du carbone portant l'hydroxyle glycosylé et un déblindage ( $\Delta = +12.2$  ppm) du carbone C-2 en position *ortho*. D'autre part, on a fait la même constatation par rapport aux carbones C-7, C-6, et C-8 à  $\delta_c$  162.7 et 99.7, et 94.6 ppm, respectivement. Une glycosylation de l'hydroxyle en position C-7 est indiquée par un blindage ( $\Delta = -1.2$  ppm) du carbone portant l'hydroxyle glycosylé ainsi que par les déblindages ( $\Delta = +1.5$  ppm) et ( $\Delta = +1.1$  ppm) des carbones C-6 et C-8 en positions *ortho*, respectivement. Ces comparaisons ont été faites par rapport aux données RMN  $^{13}\text{C}$  de la molécule kaempférol reportées dans la littérature (Markham, 1978)

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Fig.III.94**) présente les signaux essentiels qui ont permis d'identifier l'aglycone comme étant le kaempférol pareillement que pour les dérivés de cet aglycone identifiés précédemment. La présence des sucres est détectée par les trois signaux résonnant à  $\delta_H$  0.95 (3H, d,  $J = 5.9$  Hz) typique du groupement méthyle du sucre rhamnose, et des deux protons anomériques à  $\delta_H$  5.43 H-1''<sub>(3)</sub> et 5.07 H-1''<sub>(7)</sub> ppm attribués aux sucres rhamnose et glucose, respectivement. En plus, la configuration  $\beta$ -glucopyranoside est affectée en considérant la constante de couplage 7.3 Hz (**Tableau III.29**) qui indique un couplage di-axial entre les protons H-1''<sub>(7)</sub> et H-2''<sub>(7)</sub> du glucose. D'autre part, ayant une constante de couplage de 1.5 Hz (**Tableau III.29**) le proton anomérique du rhamnose H-1''<sub>(3)</sub> montre un couplage di-équatorial avec le proton H-2''<sub>(3)</sub> établissant ainsi la configuration  $\alpha$  pour le sucre.



**Figure III.94.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMF2(III.5.8)**.

L'analyse du spectre de corrélation HSQC a permis d'attribuer les protons aux carbones correspondants (**Fig.III.95**).

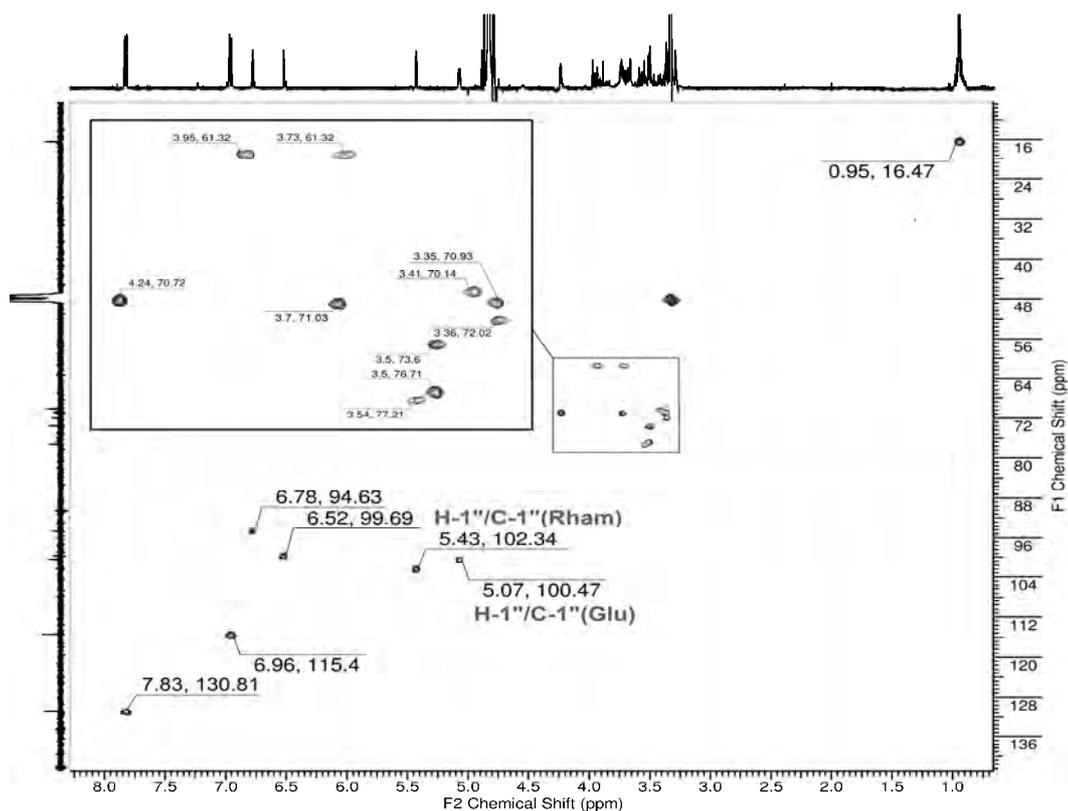


Figure III.95. Spectre RMN-2D HSQC  $^C\text{-}^H$  du composé **EMTF2(III.5.8)**.

Les positions des sucres indiquées précédemment par l'analyse des spectres de masse sont confirmées par le spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC (Fig.III.96) dans lequel nous observons la corrélation entre le proton anomérique du rhamnose résonnant à  $\delta_H$  5.43 et le carbone C-3 à  $\delta_C$  à 134.6 et celle du proton anomérique du glucose résonnant à  $\delta_H$  5.07 et le carbone C-7 à  $\delta_C$  à 162.7.

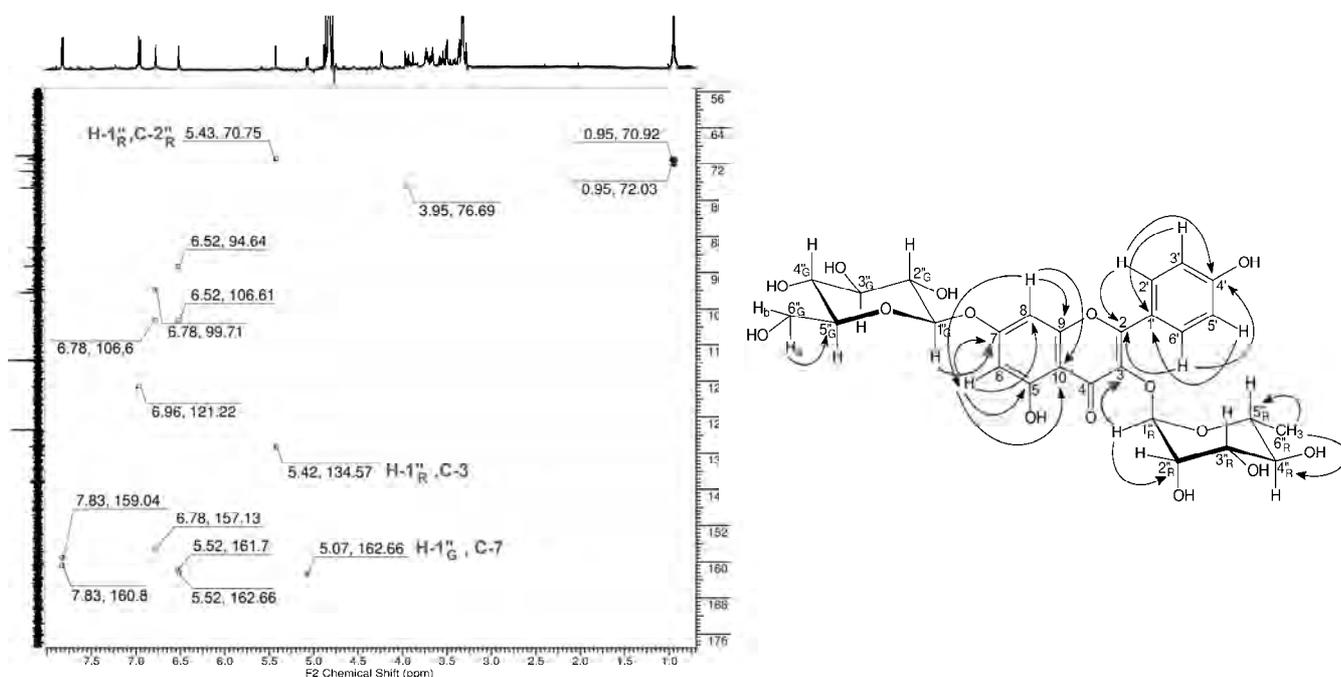


Figure III.96. Spectre RMN-2D HMBC et corrélations hétéronucléaires  $^2J_{-3}J$  du composé **EMTF2(III.5.8)**.

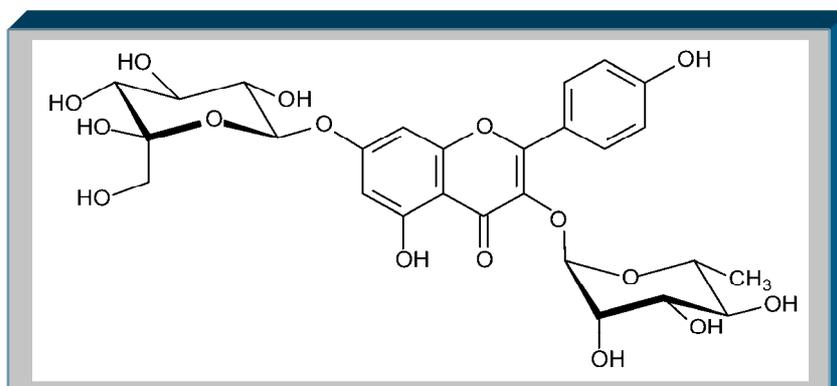
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone ainsi que les différentes corrélations hétéronucléaires HMBC sont rassemblés dans le **Tableau III.29**.

**Tableau III.29.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HMBC du composé **EMTF2(III.5.8)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>Aglycone (Kaempférol)</b>	2		159.0	
	3		134.6	
	4		176.4	
	5		161.7	
	6	6.52, <i>d</i> , (2.0)	99.7	C-5, C-7, C-8, C-10
	7		162.7	
	8	6.78, <i>d</i> , (2.0)	94.6	C-6, C-9, C-10
	9		157.0	
	10		106.6	
	1'		121.2	
	2'	7.83, <i>d</i> , (8.8)	130.8	C-2, C-4'
	3'	6.96, <i>d</i> , (8.8)	115.4	C-1'
4'		160.8		
5'	6.96, <i>d</i> , (8.8)	115.4	C-1'	
6'	7.83, <i>d</i> , (8.8)	130.8	C-2, C-4'	
<b>Glucose</b>	1'' <sup>(7)</sup>	5.07, <i>d</i> , (7.3)	100.5	C-7
	2'' <sup>(7)</sup>	3.59, <i>dd</i> , (10.0 et 7.4)	73.6	
	3'' <sup>(7)</sup>	3.54, <i>t</i> , (10.0)	77.2	
	4'' <sup>(7)</sup>	3.41, <i>t</i> , (10.1)	70.1	
	5'' <sup>(7)</sup>	3.50, <i>ddd</i> , (9.8 et 5.2, 2.3)	76.7	
	6'' <sup>(7)</sup> H-6a	3.95, <i>dd</i> , (12.2, 2.0)		C-5'' <sup>(7)</sup>
	6'' <sup>(7)</sup> H-6b	3.73, <i>dd</i> , (12.2, 5.4)	61.3	
<b>Rhamnose</b>	1'' <sup>(3)</sup>	5.43, <i>d</i> , (1.5)	102.3	C-3, C-2'' <sup>(3)</sup>
	2'' <sup>(3)</sup>	4.23, <i>dd</i> , (3.4 et, 1.5)	70.7	
	3'' <sup>(3)</sup>	3.70, <i>dd</i> , (9.5 et 4.6)	71.0	
	4'' <sup>(3)</sup>	3.36, <i>t</i> , (9.5)	72.0	
	5'' <sup>(3)</sup>	3.35, <i>dq</i> , (9.5, 5.5)	70.9	
	6'' <sup>(3)</sup> (CH <sub>3</sub> )	0.95, <i>d</i> , (5.9)	16.5	C-4'' <sup>(3)</sup> , C-5'' <sup>(3)</sup>

*d*: doublet; *dd*: doublet de doublet; *ddd*: doublet de doublets de doublet; *t*: triplet; *dq*: doublet de quadruplet.

Toutes ces données appuyées par une comparaison avec celles de la littérature (Sakushima, 1988; Sharaf, 1997), nous permettent d'attribuer au composé **EMTF2(III.5.8)** la structure correspondant au kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside 7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside.



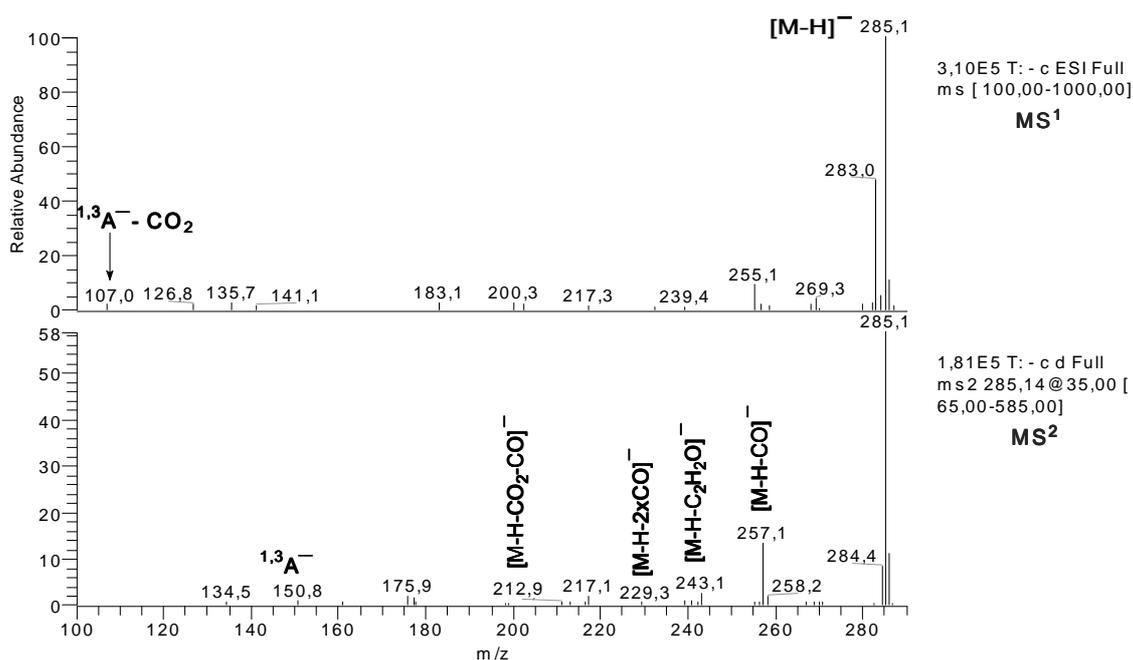
Structure du composé **EMTF2(III.5.8)**:

**Kaempférol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside 7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside**

### III.5.2.5. Identification structurale du composé **EMGq12(III.5.9)**

Le composé **EMGq12(III.5.9)** se présente sous la forme d'une gomme jaune amorphe. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique de *G. quadriflora* (cf. II.4.2.3.3). Le profil du spectre UV de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 264 et 375 nm avec un épaulement à 312 nm (**Fig.II.18**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 libre (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC montre que la pureté de ce composé est de 64.3 à 254 nm.

Le spectre de masse (**Fig.III.97**) de ce composé en mode négatif présente un ion quasi-moléculaire indiquant un flavonol à  $m/z$  285.1  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 286 uma correspondant à la formule brute  $C_{15}H_{10}O_6$  avec un degré d'insaturation de 11.



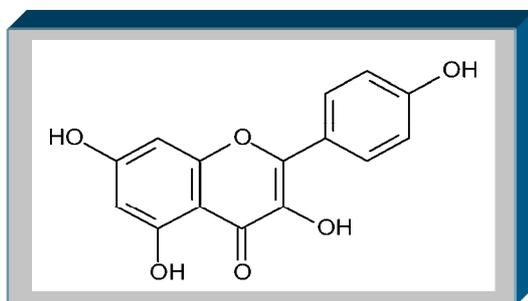
**Figure III.97.** Spectre de masse ESI-MS/MS en mode négatif du composé **EMGq12(III.5.9)**.

Le spectre  $MS^2$  présente l'ion à  $m/z$  285  $[M-H]^-$  comme précurseur des fragments  $[M-H-CO]^-$ ,  $[M-H-C_2H_2O]^-$ ,  $[M-H-2CO]^-$ , et  $[M-H-CO_2-CO]^-$  issus des pertes de petites molécules neutres à respectivement  $m/z$  257, 243, 229, et 213. La fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA) engendre la formation de l'ion  $^{1,3}A^-$  à  $m/z$  151 témoignant de l'existence d'un noyau A dihydroxylé. Puis, subissant une perte d'une molécule de dioxyde de carbone (- 44 uma), ce dernier fragment engendre l'ion à  $m/z$  107 ( $^{1,3}A^- - CO_2$ ). Les principaux fragments donnés par les spectres  $MS^1$  et  $MS^2$  en mode *electrospray* négatif de ce composé sont indiqués dans le **Tableau III.30**.

**Tableau III.30.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMGq12(III.5.9)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	$MS^1$	$MS^2$
$C_{15}H_{10}O_6$	285(100), 255(9), 269(4), 107(2)	285(100), 257(23), 243(4), 217(3), 241(2), 151(1), 213(1), 135(1), 299(<1)

Les données précédentes du composé **EMGq12(III.5.9)** appuyées par une comparaison avec celles de la littérature (Mabry, 1970; Fabre, 2001) sont caractéristiques de l'aglycone 3,5,7,4'-tétrahydroxyflavone (kaempférol).



Structure du composé **EMGq12(III.5.9)**:  
**3,5,7,4'-Tétrahydroxyflavone** (kaempférol)

### III.5.3. Dérivés de l'isorhamnétine

Les dérivés de l'isorhamnétine présentent une fluorescence jaune-vert à 365 nm après révélation au réactif de Neu suggérant la présence d'un flavonoïde avec un noyau B ayant un seul hydroxyle libre (Wagner, 1996).

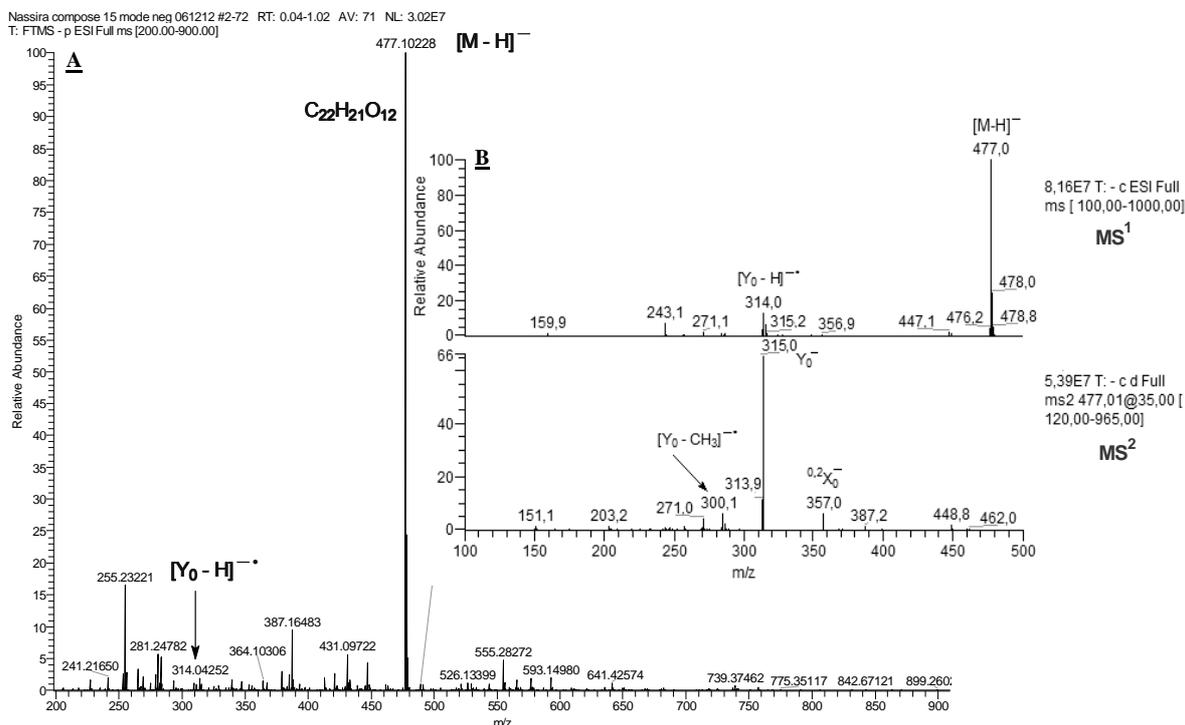
#### III.5.3.1. Identification structurale du composé **EMEG5(III.5.10)**

Le composé **EMEG5(III.5.10)** se présente sous la forme d'une poudre jaunâtre. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des écorces de graines de *C. tricolor* (cf. II.5.2.6). Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 255 et 354 nm et deux épaulements à 262 et 302 nm (**Fig.II.25**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle substitué en position 3 (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 93.5 à 254 nm.

Le spectre de masse haute résolution enregistré en HR-MS(-) (**Fig.III.98.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire indiquant un mono-*O*-glycosyl flavonol à  $m/z$  477.10228 (calculée pour 477.10275)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 478 uma correspondant à la formule brute  $C_{22}H_{22}O_{12}$  qui admet un nombre d'insaturation  $i = 12$ .

L'analyse du spectre de masse réalisé en ESI(-)/MS<sup>n</sup> (**Fig.III.98.B**) de ce composé révèle les principaux fragments établis pour les flavonols; leur nomenclature a été faite selon les règles de Domon (1988), et Ma (1997) (**Fig.III.57**). Sur le spectre MS<sup>1</sup>, la présence de l'ion-radical à  $m/z$  314  $[Y_0-H]^-$  plus intense que l'ion  $Y_0^-$  à  $m/z$  315 indique une substitution préférentielle en position 3 de l'aglycone (Cuyckens, 2004; Ablajan, 2006). Sur le spectre MS<sup>2</sup>, la fragmentation de l'ion  $m/z$  477 conduit à la formation du fragment  $Y_0^-$  à  $m/z$  315 obtenu à la suite d'une perte d'un hexose (-162 uma). Ceci nous a également orientés vers l'aglycone isorhamnétine. Cette hypothèse est supportée par la présence de l'ion-radical à  $m/z$  300  $[Y_0-CH_3]^-$  traduisant la perte d'un méthyle de l'aglycone (Fabre, 2001). En plus, le fragment  $^{0,2}X^-$  à  $m/z$  357 qui indique une

différence de (14 uma) avec celui du composé **EMTF4(III.5.1)** (quercétine-3-O-β-galactopyranoside) dont la valeur est à  $m/z$  343 (**Fig.III.58**).



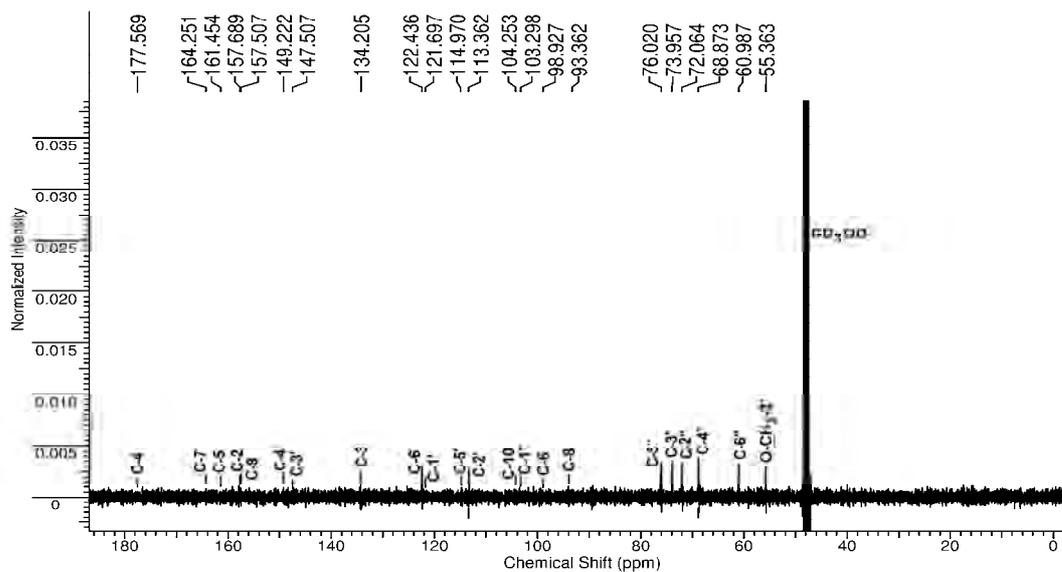
**Figure III.98.** Spectres de masse HR-MS (A) et ESI-MS/MS<sup>2</sup> (B) en mode négatif du composé **EMEG5(III.5.10)**.

Les principaux fragments indiquant la structure de l'isorhamnétine-O-glycosylé sont présentés dans le **Tableau III.31**.

**Tableau III.31** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMEG5(III.5.10)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
$C_{22}H_{22}O_{12}$	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
	477(100), 314(13), 315(6)	315(100), 314(19), 285(9), 357(9), 300(6), 271(5)

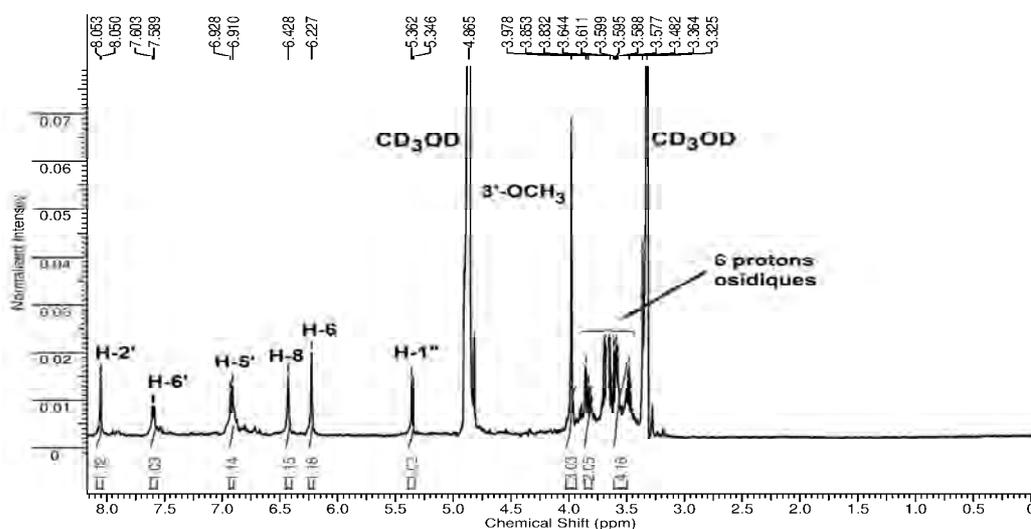
En comparant les données spectrales en RMN de ce composé avec celles de la quercétine-3-O-β-galactopyranoside (**EMTF4(III.5.1)**), on peut en déduire une similitude dans la nature du sucre qui est le galactose lié à l'aglycone en position 3. Cependant les 22 carbones dont les signaux sont apparus sur le spectre RMN <sup>13</sup>C (**Fig.III.99**) indiquent une nature différente de l'aglycone. Nous observons en particulier le signal caractéristique d'un groupement méthoxyle à  $\delta_c$  55.4 ppm.



**Figure III.99.** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMEG5(III.5.10)**.

Par ailleurs, la nature du sucre ainsi que celle de l'aglycone sont confirmées par l'hydrolyse acide. En effet, une co-chromatographie sur CCM faite en présence de témoins authentiques a révélé la présence du D-galactopyranose et de l'isorhamnétine.

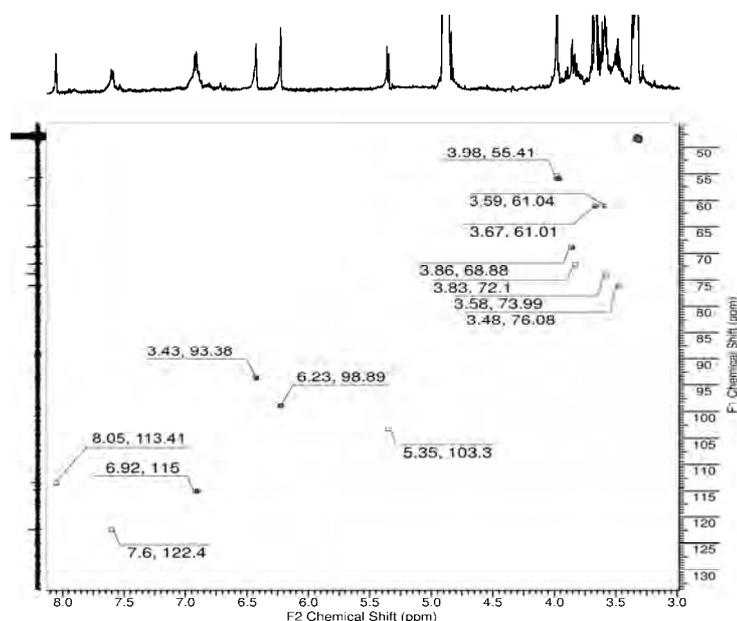
Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Fig.III.100**) présente les couplages *mé*ta des protons H-6 et H-8 à respectivement  $\delta_{\text{H}}$  6.23 et 6.43 ppm qui confirment la présence des hydroxyles en position C-5 et C-7 du cycle A. D'autre part, les signaux des protons de résonance  $\delta_{\text{H}}$  8.05 [1H, d,  $J = 1.5$  Hz, H-2'], 7.60 [1H, dd,  $J = 8.3, 1.5$  Hz, H-6'], et 6.92 [1H, d,  $J = 8.8$  Hz, H-5'] de type ABX sont caractéristiques du noyau B 3',4'-di-substitué de l'isorhamnétine. Le spectre montre également un singulet intégrant pour trois protons à  $\delta_{\text{H}}$  3.98 ppm attribuable au groupement méthoxyle. Enfin, on distingue clairement que la position du signal du proton en C-2' est relativement plus déblindée que celle du proton porté par C-6', ceci qui est en faveur d'un 3'-méthoxy-4'-hydroxy flavonol (Mabry, 1970).



**Figure III.100.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMEG5(III.5.10)**.

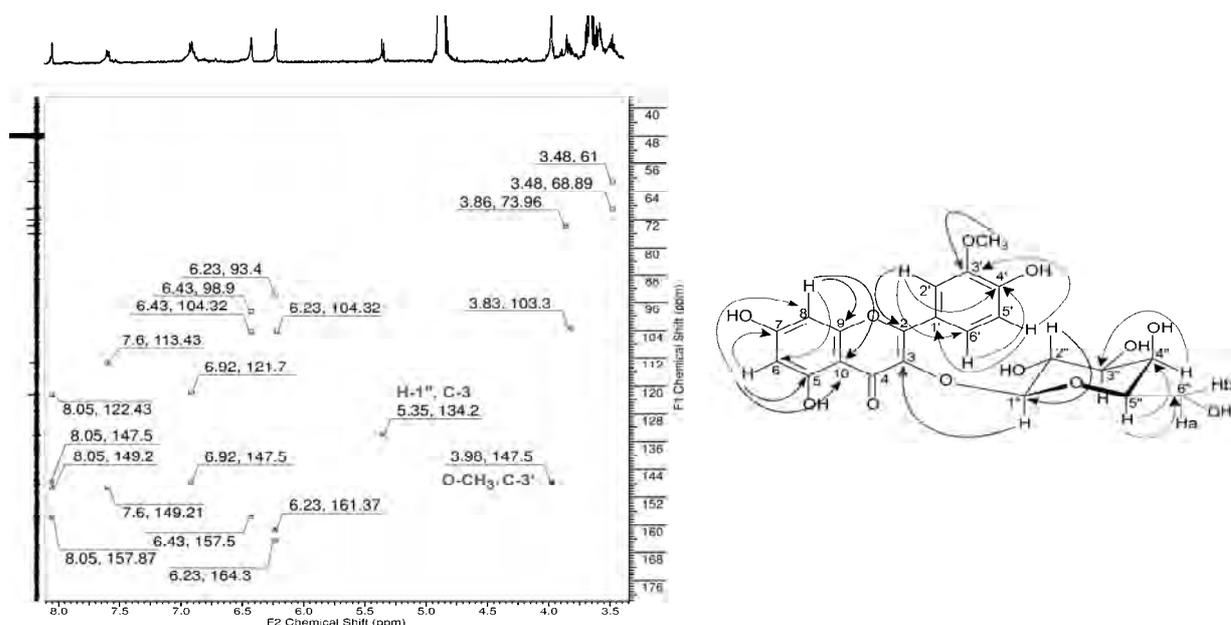
La nature du sucre est déduite en considérant notamment le signal du proton osidique H-3'' (3.58 ppm,  $J = 9.5$  et  $3.5$  Hz) qui apparaît sous la forme d'un doublet de doublet spécifique du sucre galactose. Nous y observons également le signal du proton anomérique du sucre sous la forme d'un doublet à  $\delta_H$  5.35 ppm avec  $J = 7.8$  Hz, affectant au galactose une configuration  $\beta$ .

L'analyse du spectre de corrélations hétéronucléaires à courtes distances HSQC a permis d'attribuer les protons aux carbones correspondants (**Fig.III.101**).



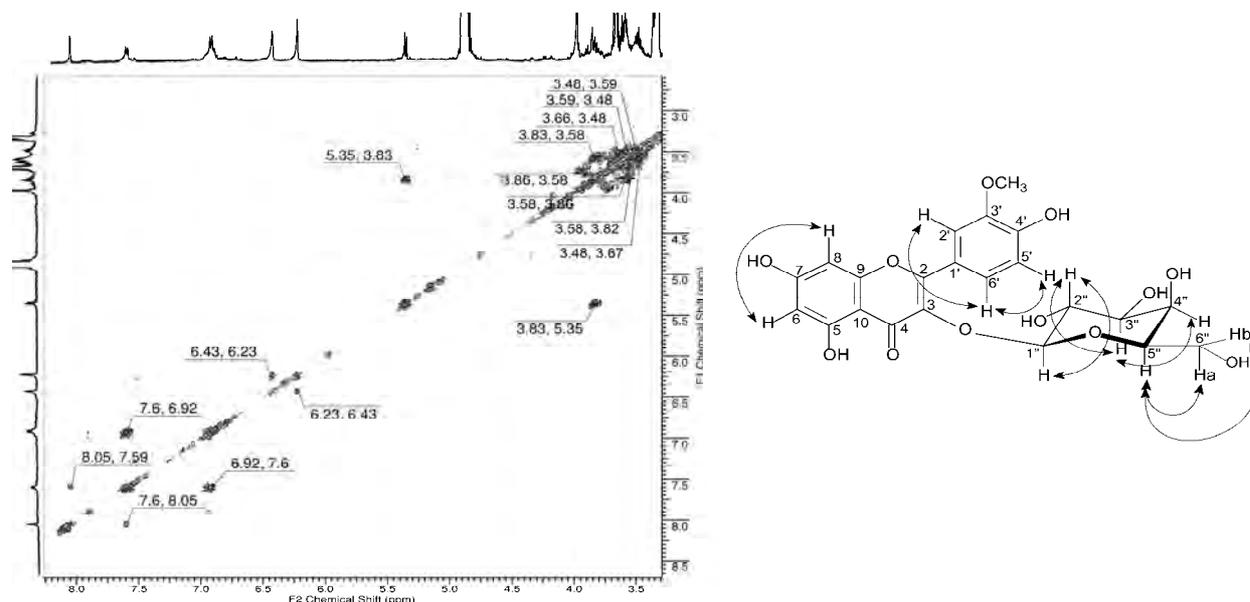
**Figure III.101.** Spectre RMN-2D HSQC  $C-H$  du composé **EMEG5(III.5.10)**.

L'analyse du spectre de corrélations hétéronucléaires à longues distances HMBC (**Fig.III.102**) montre une nette corrélation entre les protons du groupement  $OCH_3$  et le carbone C-3' de l'aglycone.



**Figure III.102.** Spectre RMN-2D HMBC et corrélations hétéronucléaires  ${}^2J-{}^3J$  du composé **EMEG5(III.5.10)**.

Le spectre de corrélations homonucléaires COSY (**Fig.III.103**) parvient à confirmer les attributions précédentes en montrant en particulier les couplages H-6/H-8, H-2'/H-6', et H-5'/H-6' confirmant la présence d'un aglycone ayant d'une part le noyau A di-hydroxylé en position 5 et 7, et d'autre part le noyau B 3',4'-disubstitué. Nous y observons également des corrélations spécifiques des protons du sucre tels que H-1''/H-2'', H-2''/H-3'', H-3''/H-4'', H-5''/H-6''a et H-5''/H-6''b (**Tableau III.32**).



**Figure III.103.** Spectre COSY et les principales corrélations homonucléaires du composé **EMEG5(III.5.10)**.

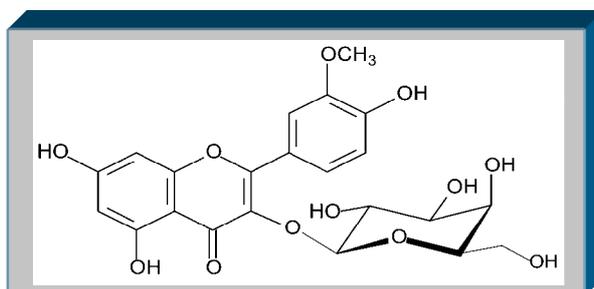
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone ainsi que les différentes corrélations hétéronucléaires HMBC et homonucléaires COSY sont rassemblés dans le **Tableau III.32**.

**Tableau III.32.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HMBC du composé **EMEG5(III.5.10)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )	COSY (corrélations $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ )
<b>Aglycone (Isorhamnétine)</b>	2		157.9		
	3		134.2		
	4		177.6		
	5		161.4		
	6	6.23, <i>d</i> , (1.9)	98.9	C-5, C-7, C-8, C-10	H-8
	7		164.3		
	8	6.43, <i>d</i> , (1.9)	93.4	C-6, C-9, C-10	H-6
	9		157.5		
	10		104.3		
	1'		121.7		
2'	8.05, <i>d</i> , (1.5)	113.4	C-2, C-3', C-4', C-6'	H-6'	
3'		147.5			
4'		149.2			
5'	6.92, <i>d</i> , (8.8)	115.0	C-1', C-3'	H-6'	
6'	7.60, <i>dd</i> , (8.3 et 1.5)	122.4	C-2', C-4'	H-2', H-5'	
3'-OCH <sub>3</sub>	3.98, <i>s</i>	55.4	C-3'		
<b>Galactose</b>	1''	5.35, <i>d</i> , (7.8)	103.3	C-3	H-2''
	2''	3.83, <i>dd</i> , (9.5 et 7.8)	72.1	C-1''	H-1'', H-3''
	3''	3.58, <i>dd</i> , (9.5 et 3.5)	74.0		H-2'', H-4''
	4''	3.86, <i>d</i> , (3.4)	68.9	C-3''	H-3''
	5''	3.48, <i>dd</i> , (6.0 et 4.8)	76.0	C-4'', C-6''	H-6a, H-6b
	H-6a	3.67, <i>m</i>			H-5''
	H-6b	3.59, <i>dd</i> , (11.0 et 4.9)	61.0		H-5''

*s* : singulet; *d* : doublet; *dd* : doublet de doublet; *m* : multiplet.

L'ensemble des données précédentes qui sont comparées avec celles reportées dans la littérature (Moniava, 1971a; Schieber, 2002), permet d'établir la structure du composé **EMEG5(III.5.10)** comme étant l'isorhamnétine-3-O-β-D-galactopyranoside (cacticine).



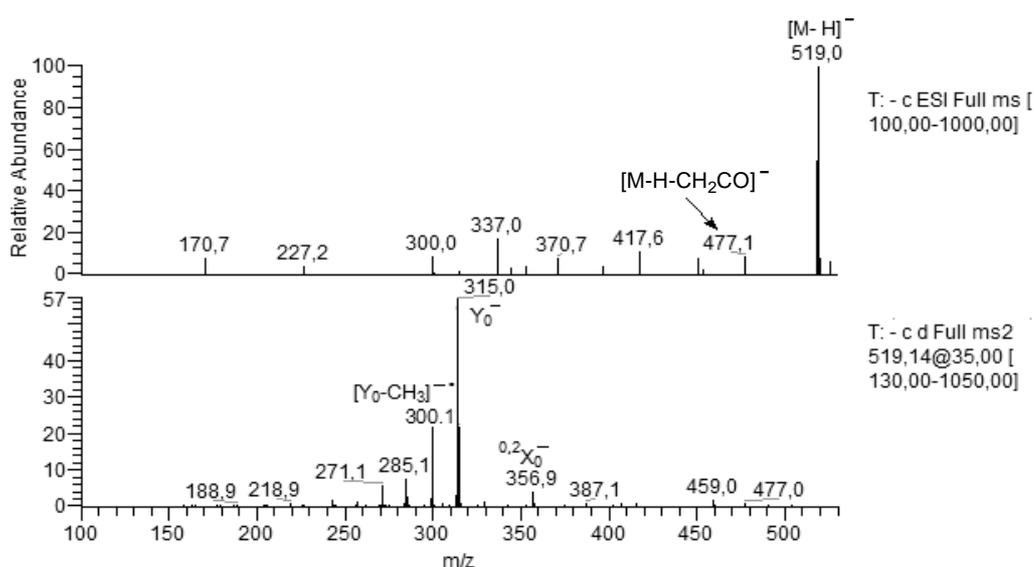
Structure du composé **EMEG5(III.5.10)**:

**Isorhamnétine-3-O-β-D-galactopyranoside** (cacticine)

### III.5.3.2. Identification structurale du composé **EMTF9(III.5.11)**

Le composé **EMTF9(III.5.11)** se présente sous la forme d'une poudre jaune. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes (tiges+feuilles) de *C. tricolor* (cf. **II.5.2.10**). Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 253 et 356 nm et deux épaulements à 264 et 298 nm (**Fig.II.30**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 substitué (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 92.4 à 254 nm.

Le spectre MS<sup>1</sup> enregistré par la méthode ESI(-) MS/MS (**Fig.III.104**), présente un ion quasi-moléculaire de  $m/z$  519 [M-H]<sup>-</sup> qui suggère une masse moléculaire de 520 uma correspondant à la formule brute C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>13</sub> avec un degré d'insaturation de 13. Ce spectre montre également la présence d'un fragment à  $m/z$  477 [M-H-CH<sub>2</sub>CO]<sup>-</sup> qui indique la perte de (-42 uma) correspondant à un groupement acétyle.



**Figure III.104.** Spectre de masse ESI-MS/MS en mode négatif du composé **EMTF9(III.5.11)**.

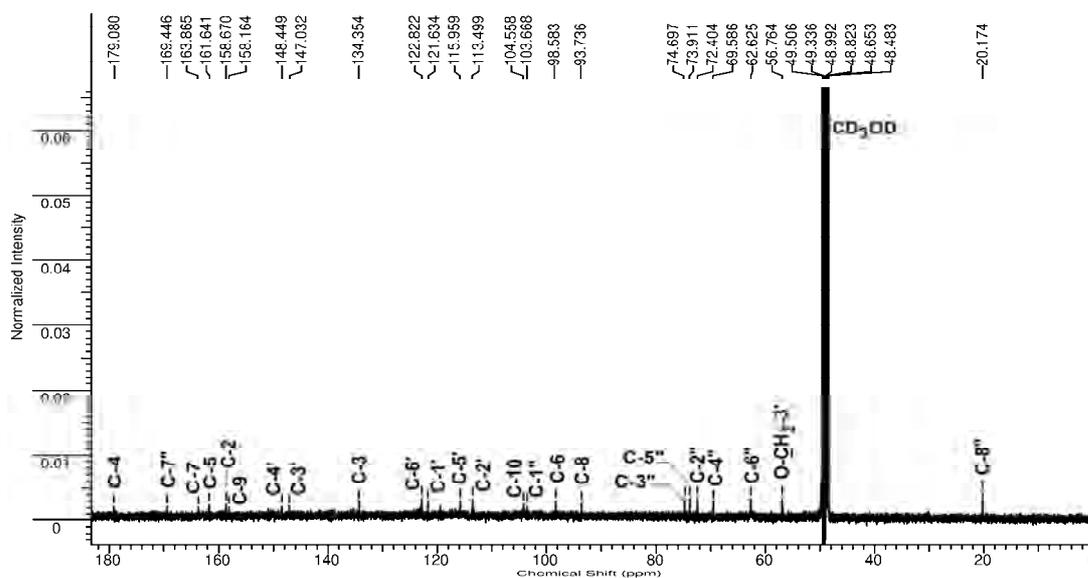
La fragmentation MS/MS de l'analyse LC/ESI-MS indique l'existence de l'ion  $Y_0^-$  à  $m/z$  315 ce qui nous oriente vers l'aglycone isorhamnétine pouvant être obtenu suite à la perte d'une unité hexose (glucose ou galactose) et d'un acétyle (42-162 uma). Par ailleurs, on observe sur le spectre MS<sup>2</sup> un ion-radical à  $m/z$  300 [ $Y_0-CH_3$ ]<sup>-</sup> supportant l'hypothèse de l'existence d'un méthyle sur l'aglycone (Fabre, 2001). On constate aussi la présence du fragment  $^{0,2}X_0^-$  à  $m/z$  357 [ $M-H-CH_2CO-C_4H_8O_4$ ]<sup>-</sup> indiquant une rupture des liaisons 0,2 (**Fig.III.57**) au niveau d'un sucre (Cuyckens, 2004) de type hexose.

Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif du composé **EMTF9(III.5.11)** sont indiqués dans le **Tableau III.33**. A ce stade de notre analyse, on peut dire que ce composé est un flavonol de type isorhamnétine-*O*-glycosylé avec un hexose acétylé.

**Tableau III.33.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMTF9(III.5.11)**.

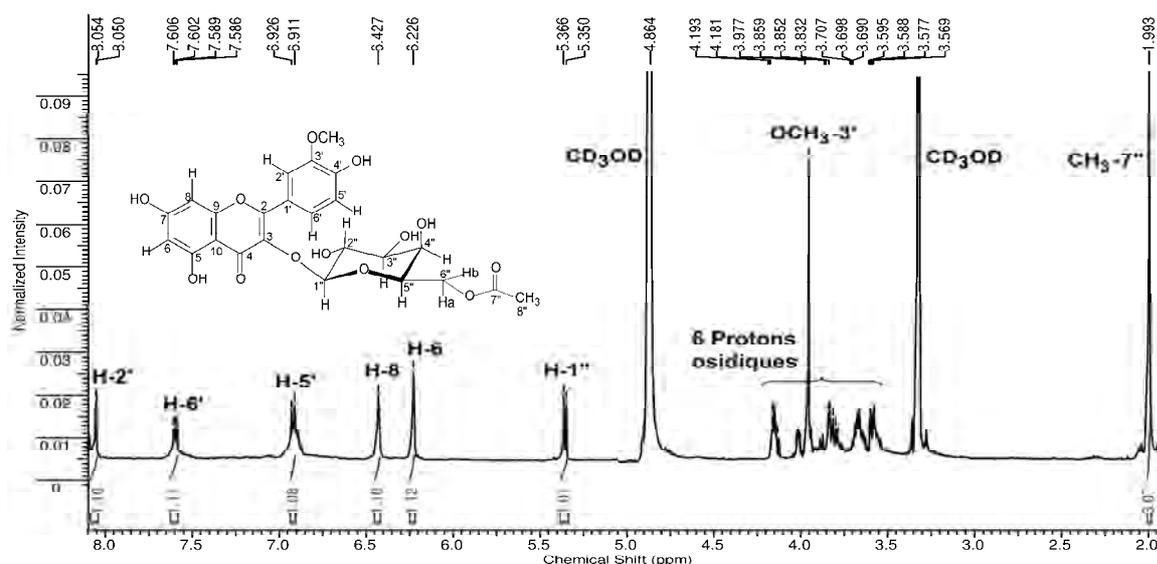
Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
$C_{24}H_{24}O_{13}$	519(100), 477(9), 300(8), 315(2)	315(100), 300(31), 314(22), 285(13), 271(10), 299(9), 357(8), 300(3), 243(2), 477(2)

Les données spectrales en RMN de ce composé sont similaires à celles du composé précédant, l'isorhamnétine-3-*O*-β-D-galactopyranoside. Ainsi, cette analogie nous a permis de formuler l'hypothèse de la présence de l'aglycone isorhamnétine lié au sucre via l'hydroxyle en position C-3. Cependant, ce composé présente sur le spectre RMN <sup>13</sup>C (**Fig.III.105**) les signaux de 24 carbones parmi lesquels ceux appartenant au groupement acétyle. Ainsi, on perçoit le signal du carbonyle (C=O) à  $\delta_c$  169.4 ppm et celui du méthyle (COCH<sub>3</sub>) à  $\delta_c$  20.2 ppm. On remarque également qu'au niveau du sucre, le signal du carbone C-6'' a subi un déblindage comparé à celui du composé précédant et cela de 61.0 à 62.6 ppm alors que le signal du carbone adjacent C-5'' a subi un blindage de 76.0 à 73.9 ppm suggérant en conséquence une acétylation en position C-6'' du sucre (Markham, 1982).



**Figure III.105.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMTF9(III.5.11)**.

D'autres confirmations sont apportées par le spectre proton (**Fig.III.106**) qui montre un singulet intégrant pour trois protons à  $\delta_H$  3.98 ppm attribuable au groupement méthoxyle de l'aglycone isorhamnétine. Ce spectre confirme également la présence du groupement acétyle en présentant un singulet intégrant pour trois protons à  $\delta_H$  1.99 ppm attribuable au groupement méthyle. D'autre part, la nature du sucre est confirmée par le signal du proton osidique H-3'' (3.60 ppm,  $J = 9.3$  et  $3.8$  Hz) (**Tableau III.34**) qui apparaît sous la forme d'un doublet de doublet spécifique du galactose. En considérant la constante de couplage du proton anomérique du galactose résonnant à  $\delta_H$  5.36 (H-1'',  $d$ ,  $J = 7.9$  Hz), la configuration  $\beta$  est attribuée au sucre indiquant un couplage di-axial entre les protons H-1'' et H-2''.



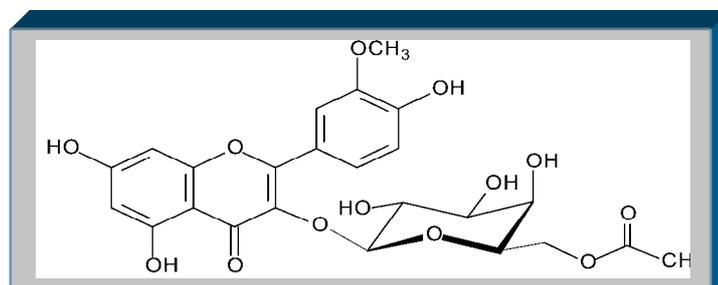
**Figure III.106.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMTF9**(III.5.11).

**Tableau III.34.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **EMTF9**(III.5.11).

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
<b>Aglycone (Isorhamnétine)</b>	2		158.7
	3		134.4
	4		179.1
	5		161.6
	6	6.23, <i>d</i> , (1.9)	98.6
	7		163.9
	8	6.43, <i>d</i> , (1.9)	93.7
	9		158.2
	10		104.6
	1'		121.6
2'	8.05, <i>d</i> , (2.0)	113.5	
3'		147.0	
4'		148.4	
5'	6.92, <i>d</i> , (8.4)	116.0	
6'	7.59, <i>dd</i> , (8.3 et 1.8)	122.8	
3'-OCH <sub>3</sub>	3.98, <i>s</i>	56.8	
<b>Galactose</b>	1''	5.36, <i>d</i> , (7.9)	103.7
	2''	3.82, <i>dd</i> , (9.5 et 7.5)	72.4
	3''	3.60, <i>dd</i> , (9.3 et 3.8)	74.7
	4''	3.86, <i>dd</i> , (3.5 et 1.4)	69.6
	5''	3.69, <i>m</i>	73.9
	6''		62.6
	H-6a	4.18, <i>dd</i> , (11.1 et 5.8)	
	H-6b	4.03, <i>dd</i> , (11.4 et 4.1)	
OCOCH <sub>3</sub>	7''		169.4
OCOCH <sub>3</sub>	8''	1.99, <i>s</i>	20.2

*s* : singulet; *d* : doublet; *dd* : doublet de doublets ; *m* : multiplet.

De ces données qui sont comparables à celles indiquées par la littérature (Zapesochnaya, 1978; Gudej, 2001), nous en déduisons que le composé **EMTF9(III.5.11)** correspond à l'isorhamnétine-3-O-β-D-(6"-acétyl)-galactopyranoside.



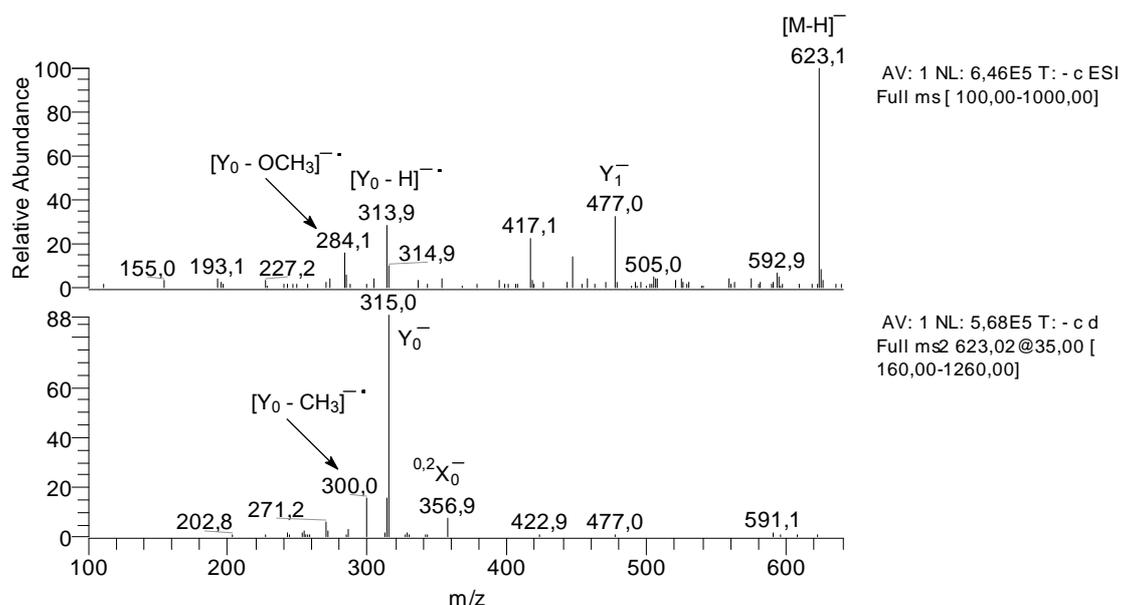
Structure du composé composé EMTF9(III.5.11):

**Isorhamnétine-3-O-β-D-(6"-acétyl)-galactopyranoside**

**III.5.3.3. Identification structurale du composé EMAEG2(III.5.12)**

Le composé **EMAEG2(III.5.12)** se présente sous la forme d'une poudre jaune-verdâtre. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique-aqueux des écorces de graines de *C. tricolor* (cf. II.5.2.8). Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{max}$  (MeOH) à 255 et 355 nm, et deux épaulements à 266 et 301 nm (**Fig.II.27**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle substitué en position 3 (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 89.1 à 254 nm.

L'analyse du spectre de masse MS<sup>1</sup> réalisé en ESI(-) MS/MS (**Fig.III.106**) de ce composé révèle un ion quasi-moléculaire d'un flavonol di-O-glycosylé à  $m/z$  623 [M-H]<sup>-</sup> qui suggère une masse moléculaire de 624 uma correspondant à la formule brute C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>16</sub> avec un degré d'insaturation de 13.



**Figure III.107.** Spectre de masse ESI-MS/MS en mode négatif du composé **EMAEG2(III.5.12)**.

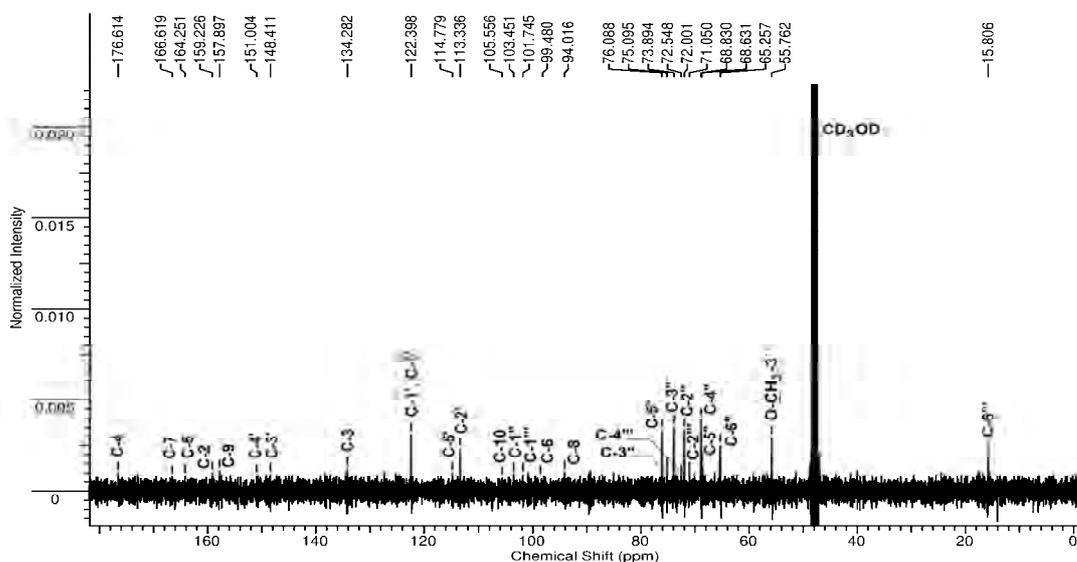
Sur le spectre MS<sup>1</sup>, on distingue également la présence du fragment Y<sub>1</sub><sup>-</sup> à m/z 477 obtenu suite à la perte d'un rhamnose (-146 uma). Le spectre présente un ion-radical à m/z 314 [Y<sub>0</sub>-H]<sup>-</sup> plus intense que l'ion Y<sub>0</sub><sup>-</sup> à m/z 315 indiquant une substitution préférentielle en position 3 de l'aglycone. D'autre part, la présence de l'ion Y<sub>0</sub><sup>-</sup> à m/z 315 nous oriente vers l'aglycone isorhamnétine pouvant être obtenu suite à la rupture de deux unités hexoses (146-162 uma). Par ailleurs, on observe sur le spectre MS<sup>2</sup> un ion-radical à m/z 300 [Y<sub>0</sub>-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> indiquant la perte d'un méthyle de l'aglycone. Concernant les sucres attachés à l'aglycone, le fragment <sup>0,2</sup>X<sup>-</sup> [M-H-146-120]<sup>-</sup> à m/z 357 indique la perte d'un rhamnose terminal suivie d'une rupture des liaisons 0,2 (**Fig.III.57**) au niveau du sucre intermédiaire de type hexose (glucose ou galactose). Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif de ce composé sont indiqués dans le **Tableau III.35**.

**Tableau III.35.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMAEG2(III.5.12)**.

Formule	ESI (-) (m/z, %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	623(100), 477(32), 314(28), 284(15), 315(10), 193(4), 227(3)	315(100), 300(17), 314(17), 357(8), 271(6), 299(3), 255(2), 243(1)

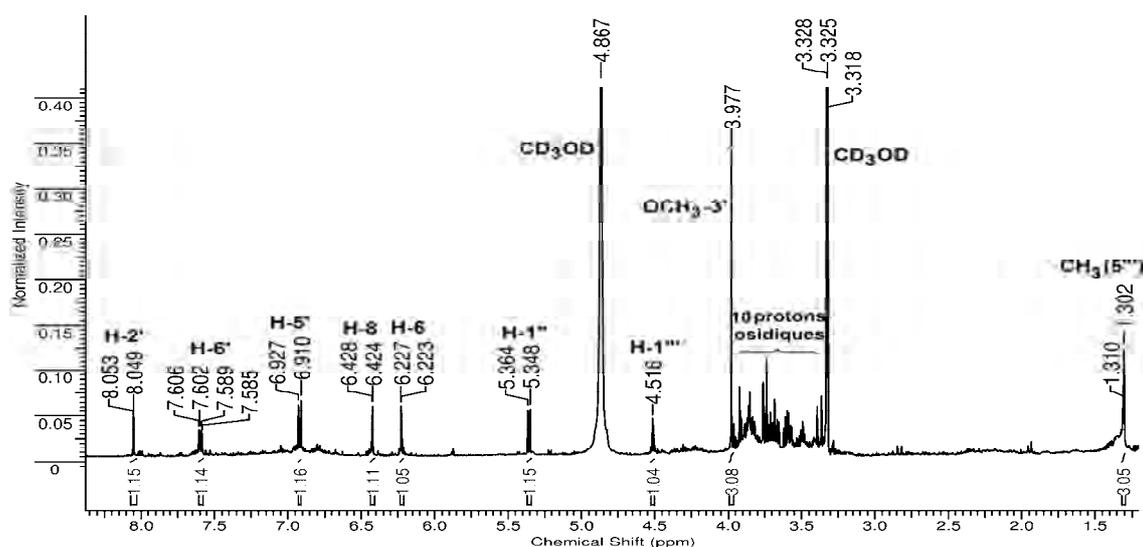
L'hydrolyse acide nous a permis d'identifier d'une part le L-rhamnose et le D-galactose et d'autre part l'isorhamnétine par analyse co-chromatographique sur CCM en présence d'échantillons authentiques. Par conséquent, on peut en conclure que ce composé est un dérivé 3-di-O-glycosylé de l'isorhamnétine

Grâce au spectre RMN <sup>13</sup>C (**Fig.III.108**), on a pu distinguer 28 carbones parmi lesquels ceux attribuables à l'isorhamnétine. On distingue en particulier les signaux des carbones C-3 et C-2 à respectivement δ<sub>c</sub> 134.3 et 157.9 ppm qui sont en faveur d'une glycosylation de l'hydroxyle en position C-3 de l'isorhamnétine (Markham, 1982; Agrawal, 1989). Nous avons également pu constater que le sucre terminal rhamnose est lié au galactose à travers une liaison 1''' → 6'' et cela grâce au déblindage du signal de C-6'' du galactose de 61.0 à δ<sub>c</sub> 65.3 ppm.



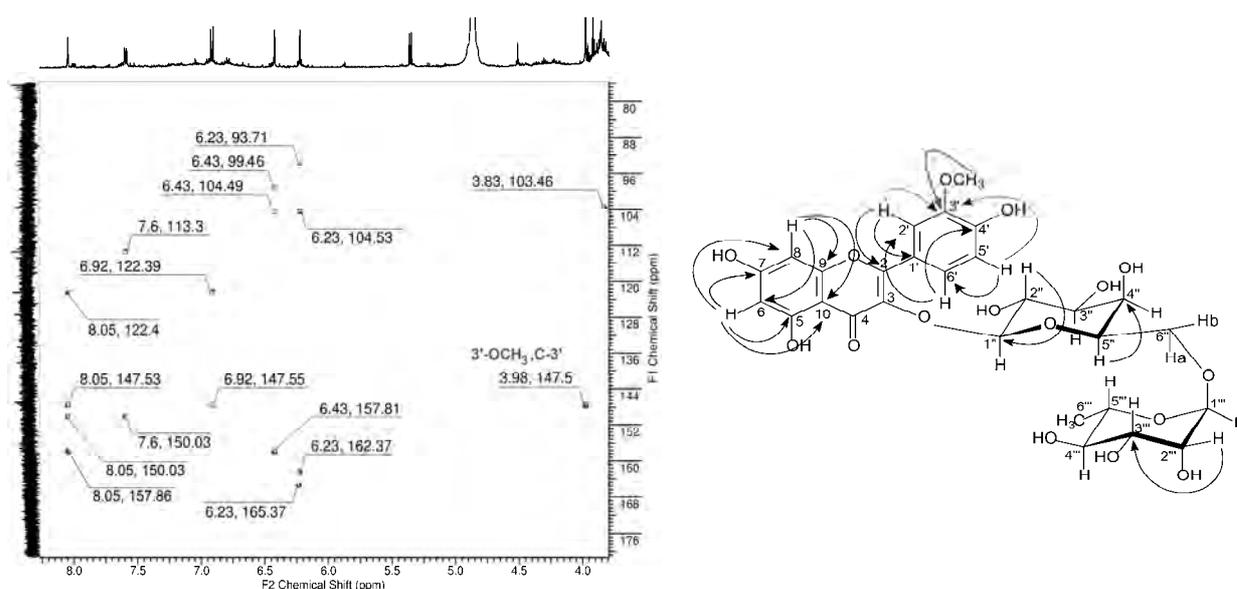
**Figure III.108.** Spectre RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMAEG2(III.5.12)**.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (**Fig.III.109**) présente les signaux essentiels qui ont permis d'identifier l'aglycone comme étant l'isorhamnétine pareillement que pour les dérivés de cet aglycone identifiés précédemment. La présence des sucres est détectée par les trois signaux résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  1.31 (3H, d,  $J = 5.0$  Hz) typique du groupement méthyle du sucre rhamnose, et des deux protons anomériques à  $\delta_{\text{H}}$  5.36 H-1'' et 4.51 H-1''' ppm attribués respectivement aux sucres galactose et rhamnose. En plus, la configuration  $\beta$ -galactopyranoside est attribuée en considérant la constante de couplage 7.8 Hz (**Tableau III.36**) qui indique un couplage di-axial entre les protons H-1'' et H-2'' du galactose. D'autre part, ayant une constante de couplage de 1.5 Hz, le proton anomérique du rhamnose H-1''' montre un couplage di-équatorial avec le proton H-2''' établissant ainsi la configuration  $\alpha$  pour le sucre.



**Figure III.109.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) du composé **EMAEG2(III.5.12)**.

Le spectre de corrélations hétéronucléaires à longues distances HMBC (**Fig.III.110**) montre également une nette corrélation entre les protons du groupement  $\text{OCH}_3$  et le carbone C-3'.



**Figure III.110.** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC et corrélations hétéronucléaires  $^2J$  -  $^3J$  du composé **EMAEG2(III.5.12)**.

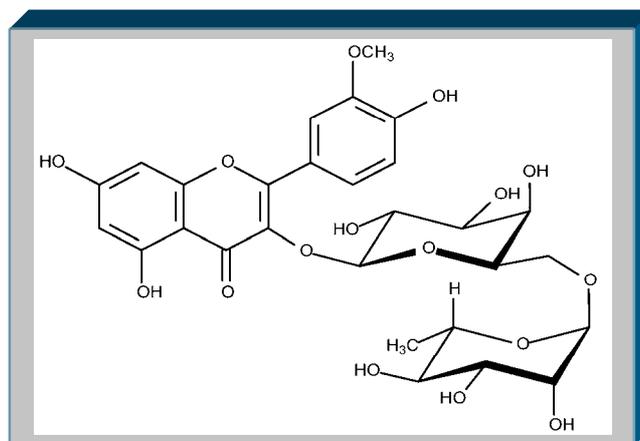
Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone ainsi que les différentes corrélations hétéronucléaires HMBC sont rassemblés dans le **Tableau III.36**.

**Tableau III.36.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HMBC du composé **EMAEG2(III.5.12)**.

	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J(\text{Hz})$	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>Aglycone (Isorhamnétine)</b>	2		157.9	
	3		134.3	
	4		176.6	
	5		162.4	
	6	6.22, <i>d</i> , (2.0)	99.5	C-5, C-7, C-8, C-10
	7		165.4	
	8	6.43, <i>d</i> , (2.0)	94.0	C-6, C-9, C-10
	9		157.8	
	10		104.5	
	1'		122.4	
	2'	8.05, <i>d</i> , (2.0)	113.3	C-2, C-1', C-3', C-4'
	3'		147.5	
	4'		150.0	
	5'	6.92, <i>d</i> , (8.3)	114.8	C-3', C-6'
6'	7.60, <i>dd</i> , (8.3 et 2.0)	122.4	C-2', C-4'	
3'-OCH <sub>3</sub>	3.98, <i>s</i>	55.8	C-3'	
<b>Galactose</b>	1''	5.36, <i>d</i> , (7.8)	103.5	
	2''	3.83, <i>dd</i> , (9.7 et 7.8)	72.0	C-1''
	3''	3.58, <i>dd</i> , (9.0 et 4.2)	75.1	
	4''	3.86, <i>d</i> , (3.9)	68.8	
	5''	3.48, <i>m</i>	76.1	C-4''
	6'' H-6a	3.67, <i>dd</i> , (11.0 et 5.6)	65.3	C-4'', C-5''
	6'' H-6b	3.50, <i>dd</i> , (9.0 et 4.0)		C-5''
<b>Rhamnose</b>	1'''	4.51, <i>d</i> , (1.5)	101.7	
	2'''	3.87, <i>dd</i> , (3.5 et, 1.5)	71.0	C-3'''
	3'''	3.60, <i>dd</i> , (10.0 et 3.9)	73.9	
	4'''	3.28, <i>m</i>	72.5	
	5'''	3.58, <i>m</i>	68.6	
	6''' (CH <sub>3</sub> )	1.31, <i>d</i> , (5.0)	15.8	

*s* : singulet; *d* : doublet; *dd* : doublet de doublet; *m* : multiplet.

Par conséquent, l'ensemble des analyses précédentes et une comparaison avec les données de la littérature (Buschi, 1982; Rastrelli, 1995; De Leo, 2010), nous a conduit à accorder au composé **EMAEG2(III.5.12)** la structure isorhamnétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-galactopyranoside.



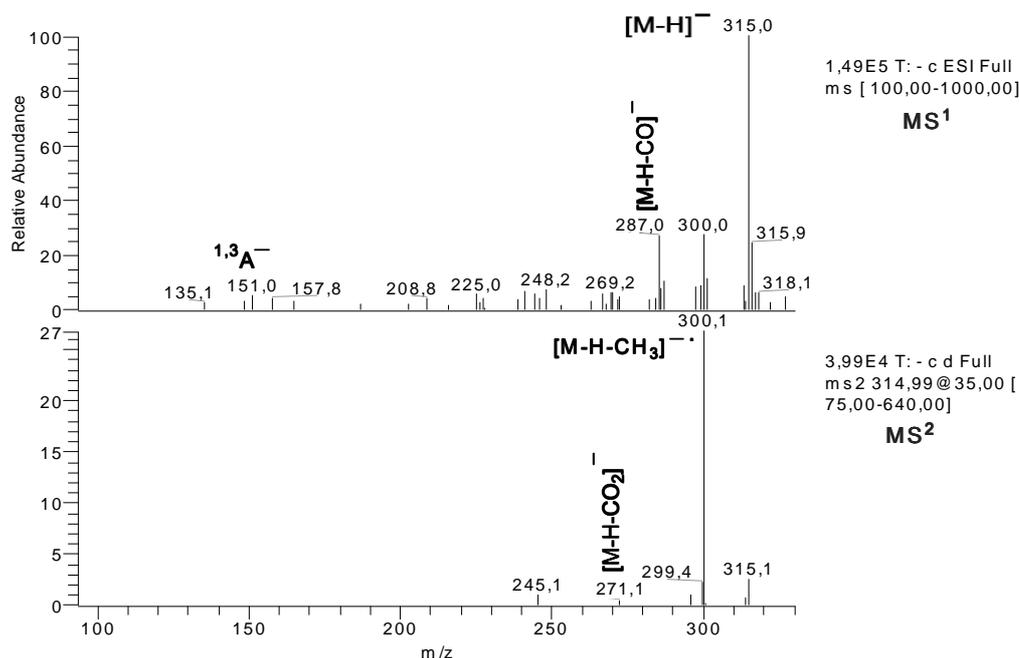
Structure du composé composé EMAEG2(III.5.12):

**Isorhamnétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopyranoside**

### III.5.3.4. Identification structurale du composé **EMGq11(III.5.13)**

Le composé **EMGq11(III.5.13)** se présente sous la forme d'une gomme jaunâtre amorphe. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique de *G. quadriflora* (cf. II.4.2.3.3). Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 256 et 362 nm et trois épaulements à 264, 304, et 322 nm (**Fig.II.18**) spécifiques des flavonols avec l'hydroxyle en position 3 libre (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 53.5 à 254 nm.

Le spectre de masse MS<sup>1</sup> réalisé en ESI(-) MS/MS (**Fig.III.111**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire indiquant un flavonol à  $m/z$  315.0  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 316 uma correspondant à la formule brute C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> avec un degré d'insaturation de 11.



**Figure III.111.** Spectre de masse ESI-MS/MS en mode négatif du composé **EMGq11(III.5.13)**.

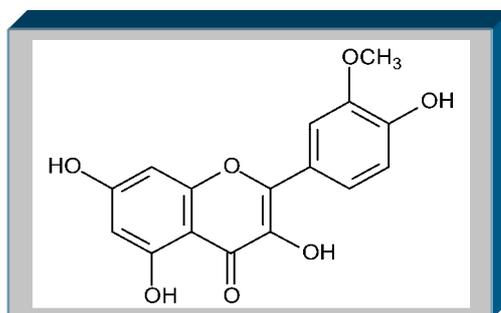
D'autre part, le spectre MS<sup>2</sup> montre un ion-radical majoritaire à  $m/z$  300  $[M-H-CH_3]^- \cdot$  indiquant la perte d'un méthyle de l'aglycone (Fabre, 2001). Ceci nous a orientés vers l'aglycone isorhamnétine. De plus, l'ion à  $m/z$  315  $[M-H]^-$  se révèle être le précurseur des fragments  $[M-H-CO]^-$  et  $[M-H-CO_2]^-$  issus des pertes de petites molécules neutres à respectivement  $m/z$  287, et 271. La fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA) engendre la formation de l'ion  $^{1,3}A^-$  à  $m/z$  151 témoignant de l'existence d'un noyau A dihydroxylé.

Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif du composé **EMGq11(III.5.13)** sont indiqués dans le **Tableau III.37**.

**Tableau III.37.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMGq11(III.5.13)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	315(100), 300(27), 287(27), 269(6), 225(5), 151(5)	300(100), 315(9), 299(8), 245(3), 271(1)

Les données du composé **EMGq11(III.5.13)** comparées à celles de la littérature (Mabry, 1970; Schieber, 2002,) sont caractéristiques de l'aglycone 3,5,7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone (isorhamnétine).



Structure du composé EMGq11(III.5.13):

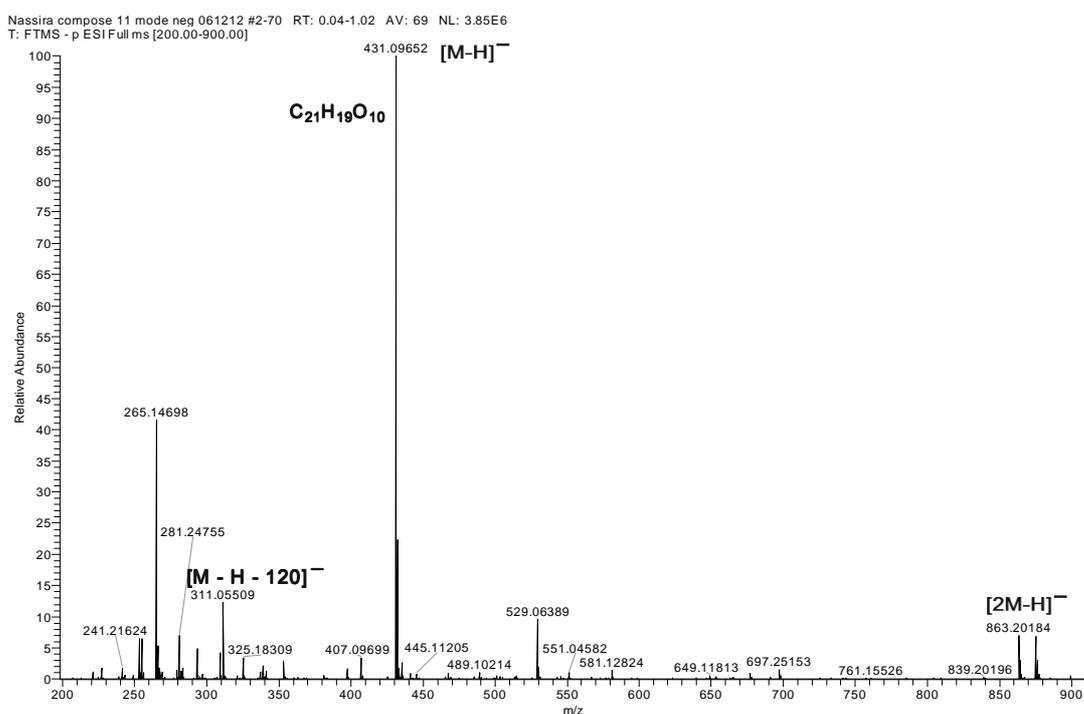
**3,5,7,4'-Tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone** (isorhamnétine)

### III.5.4. Dérivés de l'apigénine

Les dérivés C-glycosides de l'apigénine présentent une fluorescence verte à 365 nm après révélation au réactif de Neu (Wagner, 1996).

#### III.5.4.1. Identification structurale du composé EMGq5(III.5.14)

Le composé **EMGq5(III.5.14)** se présente sous la forme d'une poudre jaune. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique de *G. quadriflora* (cf. II.5.2.3.3). Le profil du spectre UV-DAD montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 272 et 336 nm (**Fig.II.18**) spécifiques des flavones (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 94.1 à 254 nm.

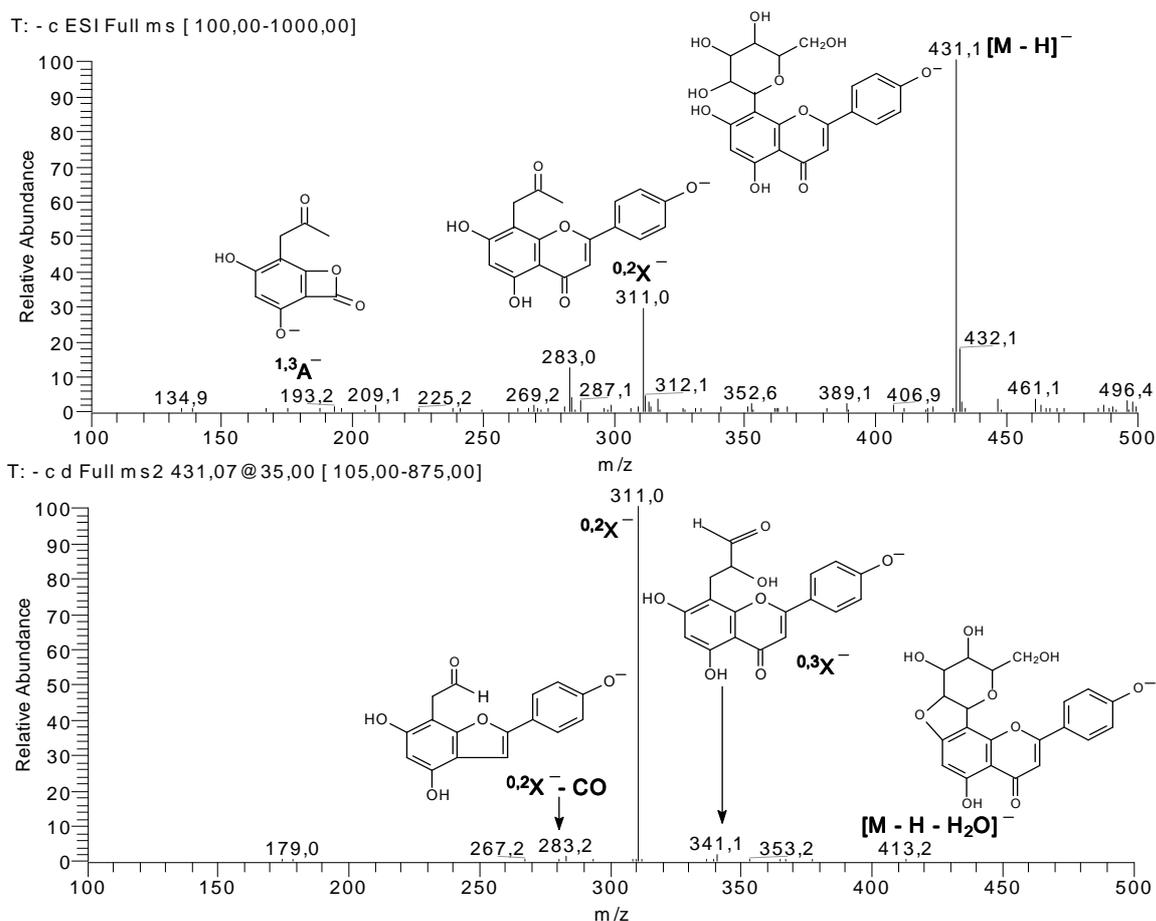


**Figure III.112.** Spectres de masse HR-ESI-MS(-) du composé **EMGq5(III.5.14)**.

Le spectre de masse haute résolution (**Fig.III.112**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire d'une flavone mono-C-glycosylée à  $m/z$  431.09652 (calculée 431.09727)  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 432 uma correspondant à la formule brute  $C_{21}H_{20}O_{10}$  avec un degré d'insaturation de 12.

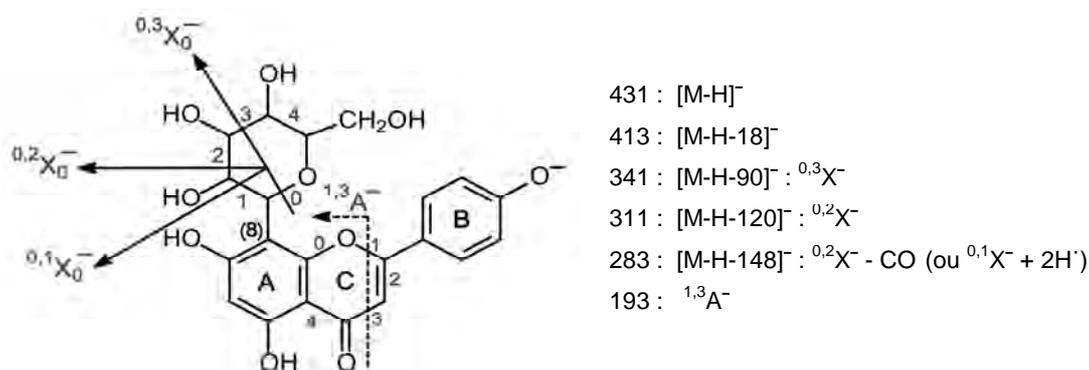
D'autre part, le spectre de masse obtenu par LC/ESI-MS/MS (**Fig.III.113**) donne également l'ion déprotonné  $[M-H]^-$  à  $m/z$  431 ainsi qu'une fragmentation caractéristique des flavonoïdes C-glycosylés (Wu, 2004). Dans les flavonoïdes C-glycosylés, le sucre est lié à l'aglycone via une liaison C-C résistante à la fragmentation. Par conséquent, les spectres de masse fournissent un nombre limité d'informations structurales excepté pour l'ion moléculaire. Cependant, les ruptures au niveau du sucre engendrent des fragments avec des différences en intensité permettant de distinguer les isomères 8-C- des 6-C-glycosides.

Pour le composé **EMGg5(III.5.14)**, on distingue tout d'abord sur le spectre MS<sup>2</sup> un pic de faible intensité relative à  $m/z$  413  $[M-H-18]^-$  (2%) correspondant à la perte d'une molécule d'eau. Cette faible intensité caractérise les composés 8-C-glycosides et s'explique par la réaction d'élimination qui se produit entre l'hydrogène du groupement 2''-hydroxyle du sucre et le groupement 7-hydroxyle de l'aglycone uniquement. Alors qu'elle serait possible via les hydroxyles en positions 5 et 7 de l'aglycone conduisant à la formation d'un ion d'intensité relative plus importante à  $m/z$  413 pour les isomères 6-C-glycosides (Becchi, 1989; Li, 1992).



**Figure III.113.** Spectre de masse ESI-MS/MS en mode négatif et structures des principaux fragments du composé **EMGg5(III.5.14)**.

Parmi les fragments présents sur le spectre MS<sup>2</sup>, on repère le pic de base <sup>0,2</sup>X<sup>-</sup> à m/z 311 [M-H-120]<sup>-</sup> correspondant à une rupture de la liaison 0,2 au niveau du sucre (**Fig.III.114**). Les ruptures des liaisons 0,1 et 0,3 au niveau du sucre conduisent à la formation de fragments faibles en intensités relatives caractérisant les isomères 8-C-glycosides (Waridel, 2001) à respectivement 283 (<sup>0,2</sup>X<sup>-</sup> - CO ou <sup>0,1</sup>X<sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup>) et 341 (<sup>0,3</sup>X<sup>-</sup>). De plus, on observe l'ion <sup>1,3</sup>A<sup>-</sup> à m/z 193 issu de la fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA).



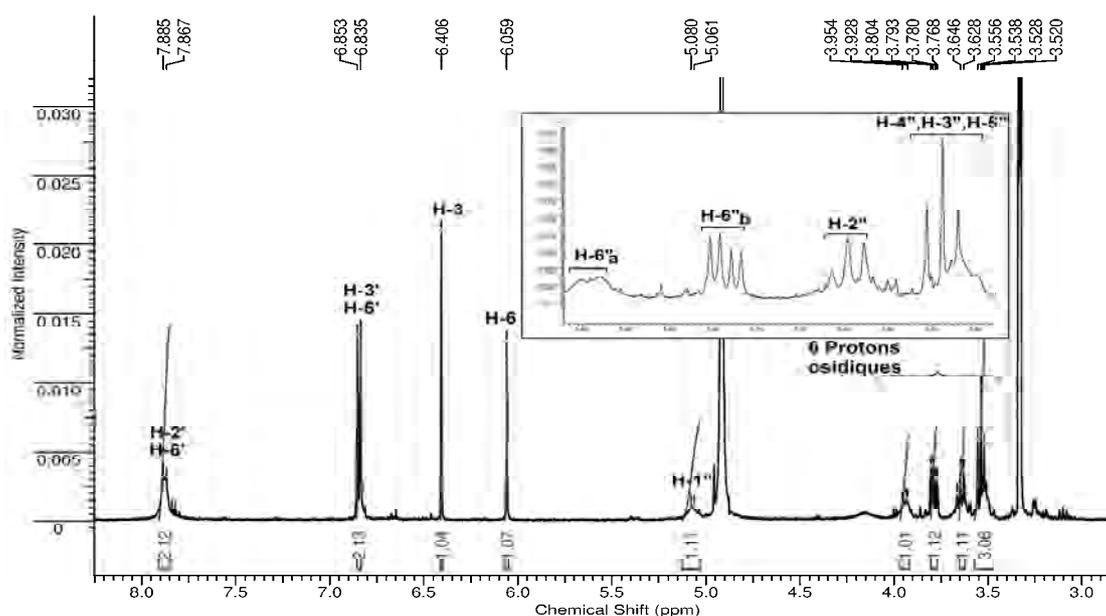
**Figure III.114.** Fragmentation ESI-MS/MS de l'ion à m/z 431 [M-H]<sup>-</sup> du composé **EMGg5(III.5.14)**.

Les principaux fragments caractéristiques de ce composé sont présentés dans le **Tableau III.38**.

**Tableau III.38.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMGg5(III.5.14)**.

Formule	ESI (-) (m/z, %)	
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
	431(100), 311(29), 283(12), 269(2), 193(1)	311(100), 341(2), 283(1), 413(<1)

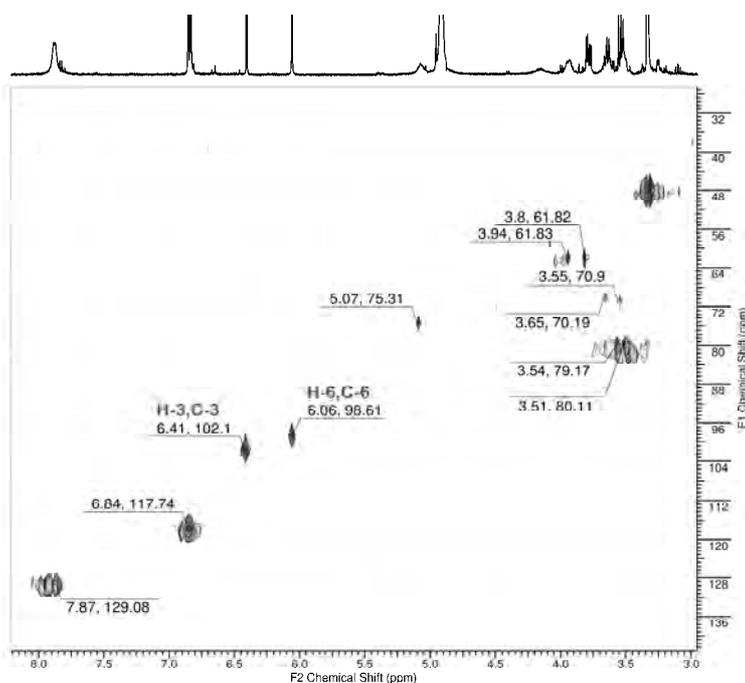
La structure de ce composé a été complétée grâce aux analyses des données RMN 1D et 2D.



**Figure III.115.** Spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du composé **EMGg5(III.5.14)**.

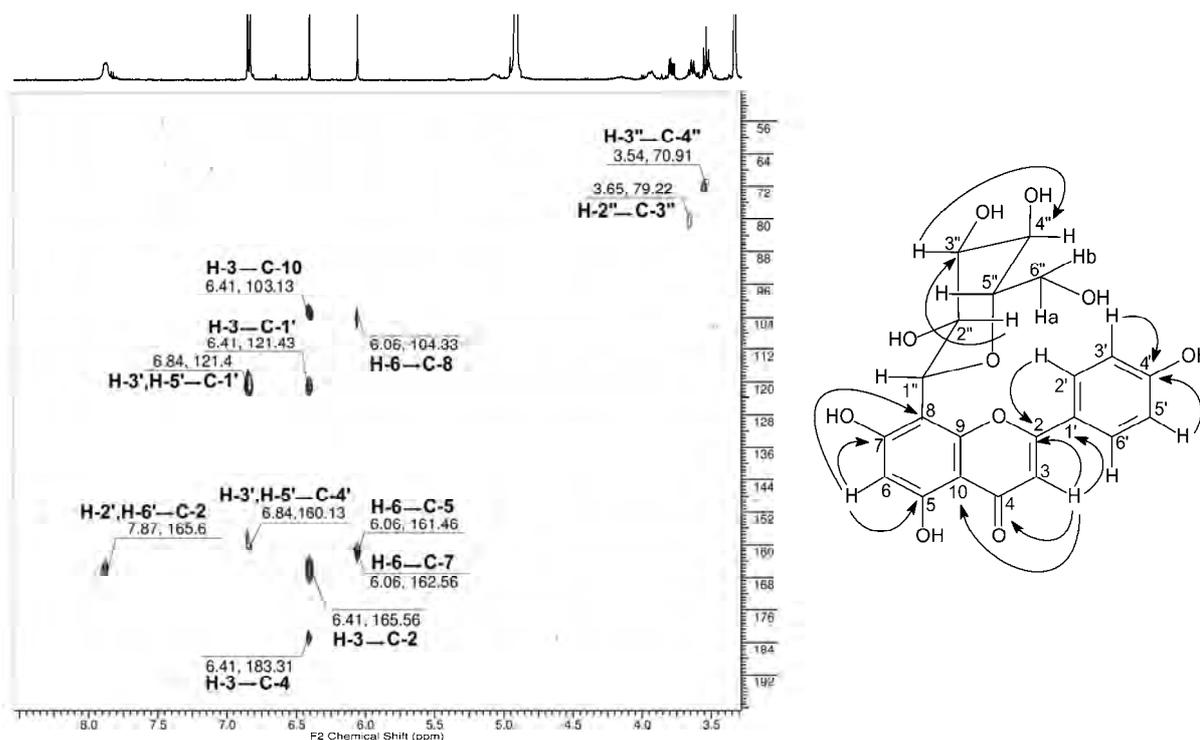
Le spectre proton (**Fig.III.115**) présente les signaux essentiels qui ont permis d'identifier l'aglycone comme étant l'apigénine à travers la présence des protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' couplés en *ortho* de résonance respective  $\delta_H$  7.87 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz) et 6.84 (2H, d,  $J = 8.9$  Hz); ceci signifie une symétrie sur le noyau B de l'aglycone. Les résonances à  $\delta_H$  6.06 (H-6) et 6.41 (H-3) ppm sont en accord avec la structure d'une flavone dont le cycle A est dihydroxylé en positions 5 et 7 alors que le sucre est lié au carbone C-8. La présence du sucre est détectée par le proton  $\beta$ -anomérique à  $\delta_H$  5.07 ppm (H-1'', d,  $J = 9.9$  Hz) (**Tableau III.39**). Les signaux entre 3.5 et 3.9 ppm sont attribués aux protons du sucre, parmi lesquels, on distingue en particulier le signal du proton H-3'' qui apparait sous forme de triplet ( $J = 8.9$  Hz) à  $\delta_H$  3.54 ppm, caractéristique du glucose.

D'autre part, l'attribution des différents signaux aux différents noyaux repose sur une analyse approfondie des spectres HSQC et HMBC. Ainsi, le spectre de corrélations à courtes distances HSQC (**Fig.III.116**) a permis de distinguer le signal du proton H-3 ( $\delta_H$  6.41,  $\delta_C$  102.1) confirmant la présence d'une flavone.



**Figure III.116.** Spectre RMN-2D HSQC  $C-HJ$  du composé **EMGq5(III.5.14)**.

Le spectre de corrélations hétéronucléaire à longues distances HMBC (**Fig.III.17**) montre une corrélation  $^3J$  entre le proton H-6 ( $\delta_H$  6.06 ppm) et le carbone C-8 dont le signal est déblindé de 94 à 104.3 ppm sous l'effet de la C-glycosylation (Markham, 1982). Ce spectre montre également le proton H-3 ( $\delta_H$  6.41 ppm) de l'apigénine en corrélation  $^2J$  avec les carbones C-2 ( $\delta_C$  165.6 ppm) et C-4 ( $\delta_C$  183.3 ppm) et également en corrélation  $^3J$  avec les carbones C-1' ( $\delta_C$  121.4 ppm) et C-10 ( $\delta_C$  103.1 ppm).



**Figure III.117.** Spectre RMN-2D HMBC et corrélations hétéronucléaires  $^2J_{-3J}$  du composé **EMGg5(III.5.14)**.

Les déplacements chimiques relatifs aux atomes d'hydrogène et aux atomes de carbone ainsi que les différentes corrélations hétéronucléaires HMBC sont rassemblés dans le **Tableau III.39**.

**Tableau III.39.** Données spectrales RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HMBC du composé **EMGg5(III.5.14)**.

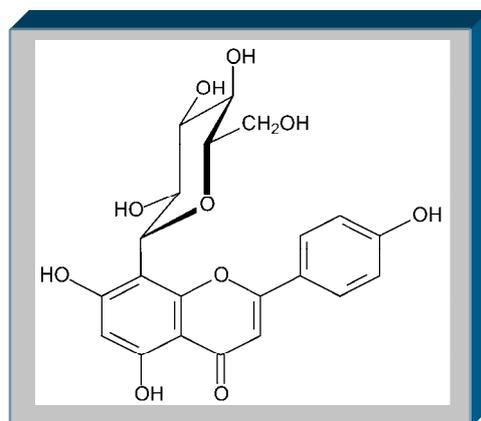
	Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicité, $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}^*$ $\delta$ (ppm)	HMBC (corrélations $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ )
<b>Aglycone (Apigénine)</b>	2		165.6	
	3	6.41, <i>s</i>	102.1	C-2, C-4, C-10, C-1'
	4		183.3	
	5		161.5	
	6	6.06, <i>s</i>	98.6	C-5, C-7, C-8
	7		162.6	
	8		104.3	
	9			
	10		103.1	
	1'		121.4	
2'	7.87, <i>d</i> , (8.7)	129.1	C-2	
3'	6.84, <i>d</i> , (8.9)	117.7	C-1', C-4'	
4'		160.1		
5'	6.84, <i>d</i> , (8.9)	117.7	C-1', C-4'	
6'	7.87, <i>d</i> , (8.7)	129.1	C-2	
<b>Glucose</b>	1''	5.07, <i>d</i> , (9.9)	75.3	
	2''	3.65, <i>t</i> , (9.2)	70.2	C-3''
	3''	3.54, <i>t</i> , (8.9)	79.2	C-4''
	4''	3.55, <i>m</i>	70.9	
	5''	3.51, <i>m</i>	80.1	
	6''	H-6a 3.94, <i>m</i>	61.8	
		H-6b 3.79, <i>dd</i> , (12.1 et 5.7)		

*s* : singulet; *d* : doublet; *dd* : doublet de doublet; *t* : triplet; *m* : multiplet.

\* valeurs obtenues des spectres de corrélations HSQC et HMBC.

Ces données étant comparables à celles de la littérature (Lin, 2000; Sanchez-Rabaneda, 2003), nous en déduisons que le composé **EMGq5(III.5.14)** correspond à l'apigénine-8-C-β-D-glucopyranoside (vitexine).

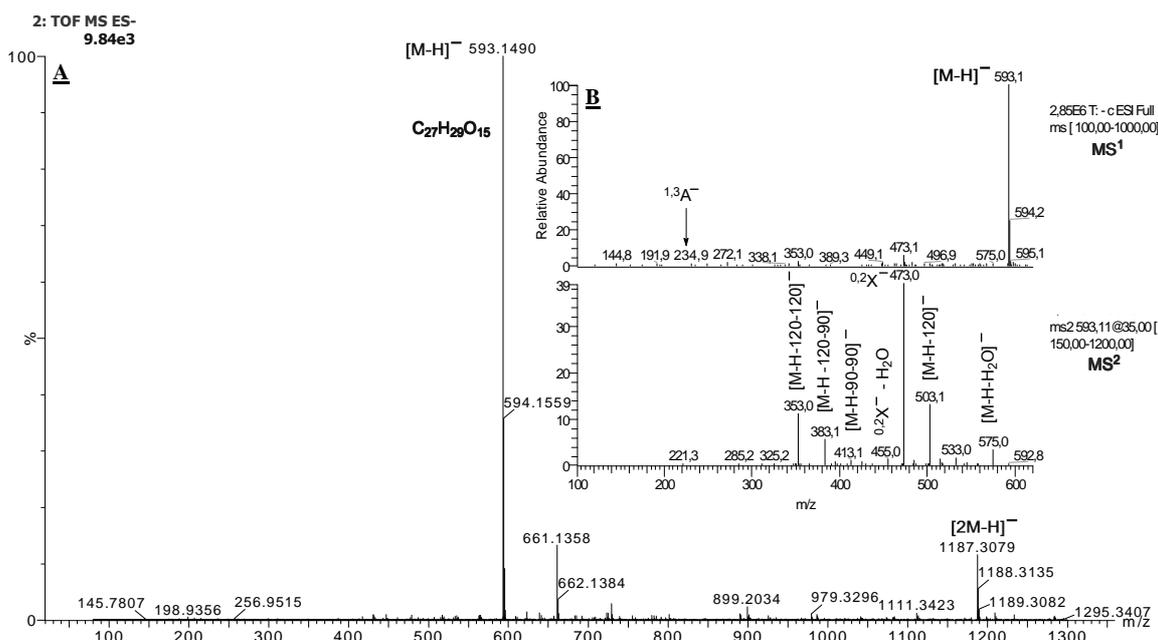
Structure du composé EMGq5(III.5.14):  
**Apigénine-8-C-β-D-glucopyranoside** (vitexine)



### III.5.4.2. Identification structurale du composé EMGq3(III.5.15)

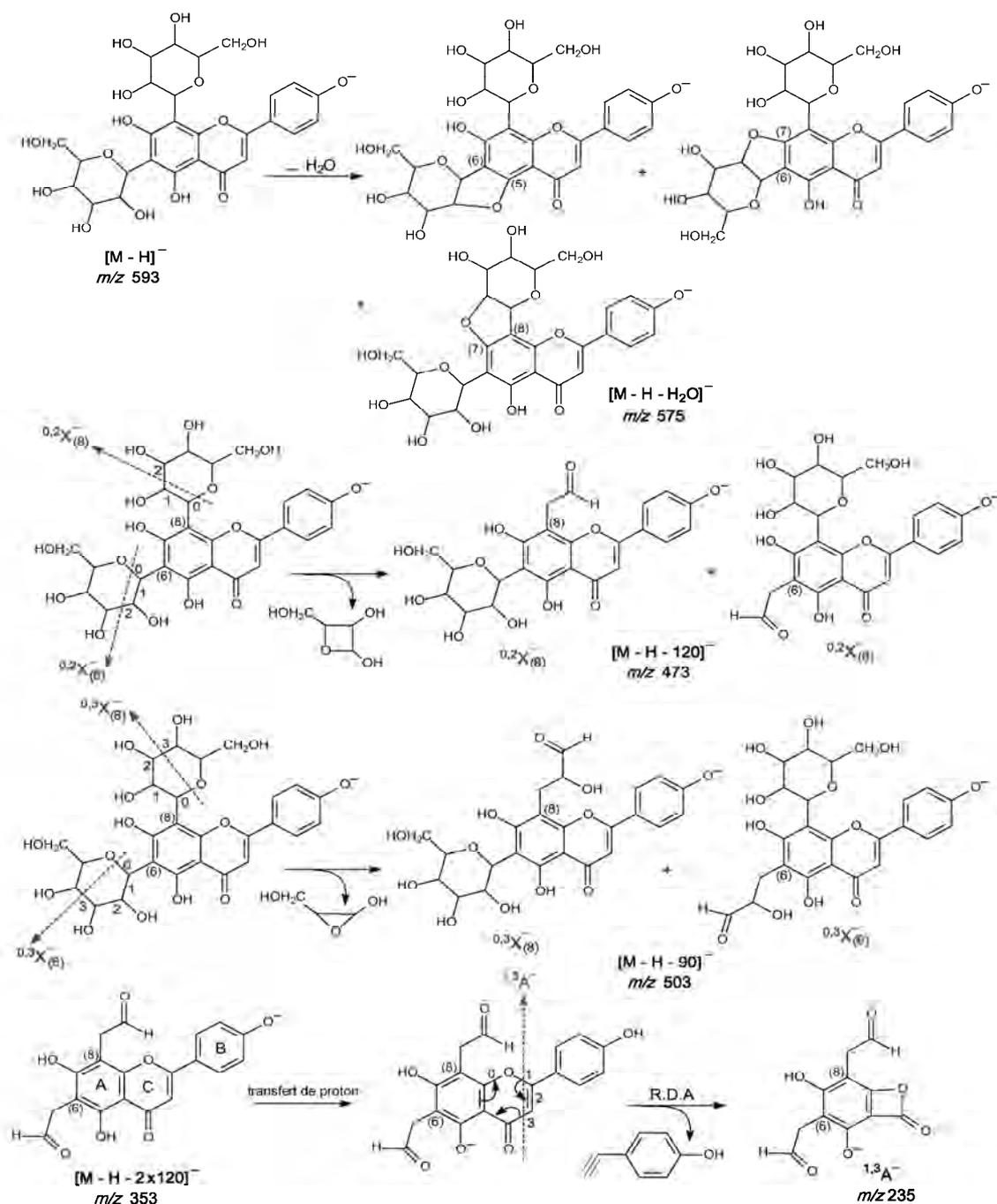
Le composé **EMGq3(III.5.15)** se présente sous la forme d'une gomme brunâtre amorphe. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique de *G. quadriflora* (cf. II.5.2.3.3). Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre des maxima d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 270 et 336 nm (**Fig.II.18**) spécifiques des flavones (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 89.7 à 254 nm.

Le spectre de masse ESI-TOF-MS(-) (**Fig.III.118.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire indiquant une flavone di-C-glycosylée à  $m/z$  593.1490  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 594 uma correspondant à la formule brute  $C_{27}H_{28}O_{15}$  avec un degré d'insaturation de 13.



**Figure III.118.** Spectres de masse HRMS-TOF (**A**) et ESI-MS/MS (**B**) en mode négatif du composé **EMGq3(III.5.15)**.

L'analyse du spectre de masse réalisé en ESI(-)MS/MS (**Fig.III.118.B**) montre également une fragmentation caractéristique des flavonoïdes C-glycosylés. Cependant, le spectre de ce composé présente une différence de masse de 162 uma par rapport au composé précédent indiquant la présence d'un second sucre de type hexose. En plus, on distingue les pics témoignant d'une flavone di-C-glycosylée avec l'apigénine comme aglycone à  $m/z$  503  $[M-H-90]^-$ , 573  $[M-H-120]^-$ , 413  $[M-H-90-90]^-$ , 383  $[M-H-90-120]^-$  et 353  $[M-H-120-120]^-$ . Ces fragments sont obtenus suite à des ruptures des liaisons 0,2 et 0,3 au niveau des deux sucres selon le mécanisme de fragmentation proposé (**Fig.III.119**).



**Figure III.119.** Proposition d'un mécanisme de fragmentation ESI-MS/MS en mode négatif de l'ion  $m/z$  593  $[M-H]^-$  du composé **EMGq3(III.5.15)**.

On remarque également la présence d'un pic à  $m/z$  575  $[M-H-18]^-$  avec une intensité relative plus importante (**Tableau III.40**) que celle du produit précédent. Ceci est expliqué par l'élimination d'une molécule d'eau pour les composés di-C-glycosylés entre les hydrogènes des groupements 2''-hydroxyles des sucres et les groupements hydroxyles en positions 5 et 7 de l'aglycone. De plus, on observe l'ion  $^{1,3}A^-$  à  $m/z$  235 issu de la fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA).

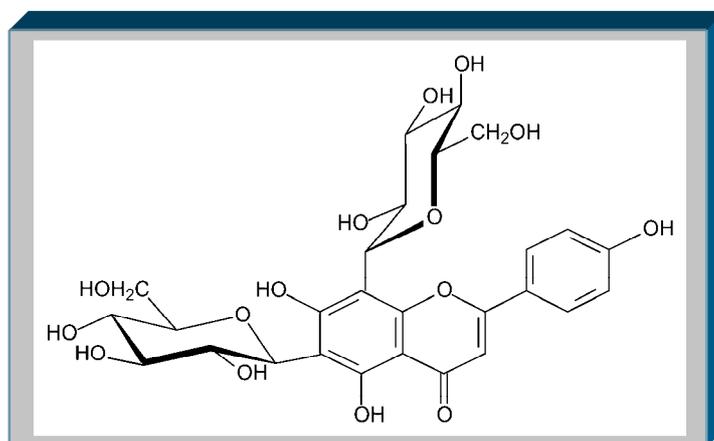
Les principaux fragments caractéristiques de ce composé sont présentés dans le **Tableau III.40**.

**Tableau III.40.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMGg3(III.5.15)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %) MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	593(100), 473(5), 353(2), 483(2), 253(1)	473(100), 503(33), 353(28), 383(14), 575(8), 455(3), 413(3)

Suite à cela, la structure de ce composé est proposée comme étant l'apigénine di-C-glycosylée avec des sucres de types hexoses. Toutefois, une co-chromatographie sur CCM en présence de témoins authentiques a permis d'identifier totalement ce composé comme étant l'apigénine 6,8-di-C-β-D-glucoyranoside.

Ces données appuyées par une comparaison avec celles de la littérature (Mabry, 1970; Negri, 2012), ont permis d'attribuer au composé **EMGg3(III.5.15)** la structure correspondant à l'apigénine 6,8-di-C-β-D-glucoyranoside (vicénine-2).



Structure du composé **EMGg3(III.5.15)**:

**Apigénine 6,8-di-C-β-D-glucoyranoside** (vicénine-2).

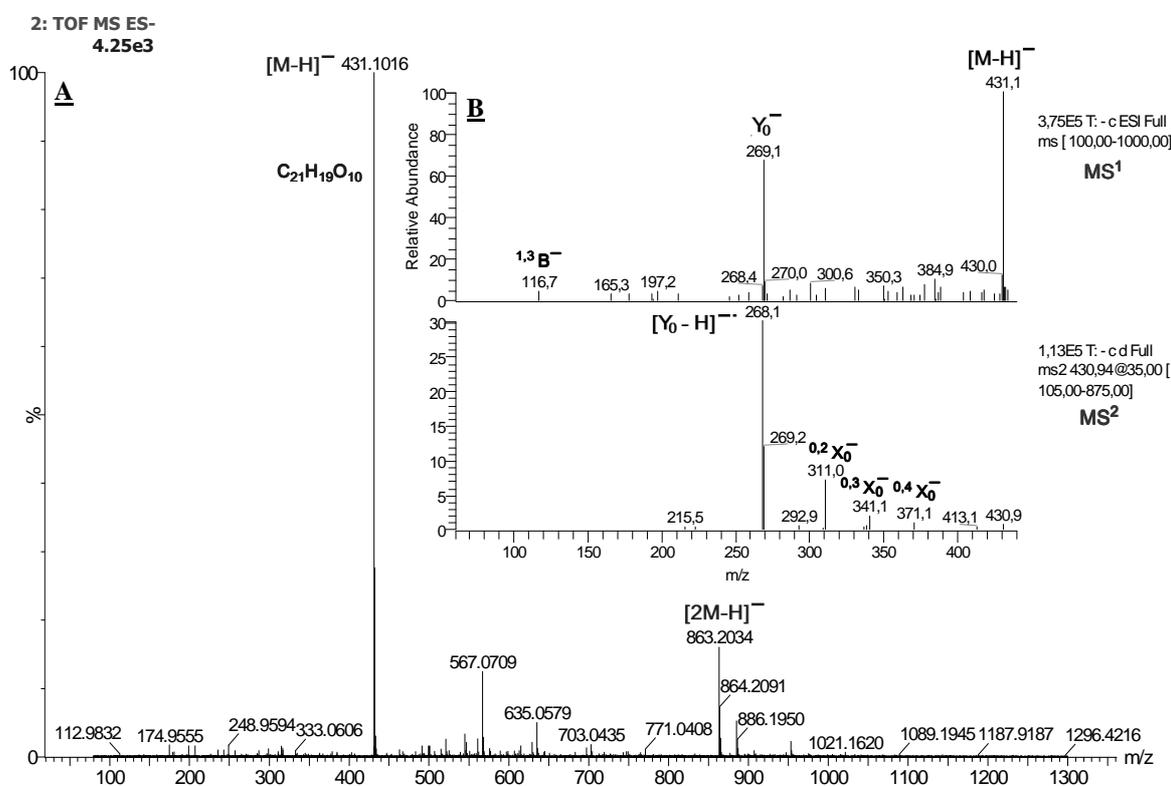
### III.5.5. Composés type isoflavones

Les isoflavones présentent une fluorescence jaune-vert à 365 nm après révélation au réactif de Neu (Wagner, 1996).

### III.5.5.1. Identification structurale du composé **EMGg6(III.5.16)**

Le composé **EMGg6(III.5.16)** se présente sous la forme d'une poudre jaune. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique de *G. quadriflora* (cf. II.5.2.3.3). Le profil du spectre UV-DAD montre un maximum d'absorption  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) à 262 nm et un épaulement à 330 nm (**Fig.II.18**) spécifiques des isoflavones (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 74.7 à 254 nm.

Le spectre de masse ESI-TOF-MS(-) (**Fig.III.120.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire indiquant une isoflavone mono-*O*-glycosylée à  $m/z$  431.1016  $[M-H]^-$  qui suggère une masse moléculaire de 432 uma correspondant à la formule brute  $C_{21}H_{20}O_{10}$  avec un degré d'insaturation de 12.

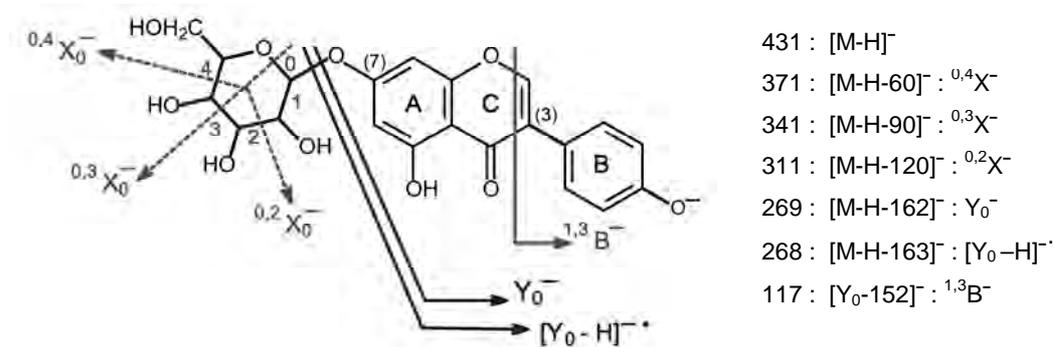


**Figure III.120.** Spectres de masse ESI-TOF-MS (A) et ESI-MS/MS (B) en mode négatif du composé **EMGg6(III.5.16)**.

L'analyse du spectre de masse réalisé en ESI(-)MS/MS (**Fig.III.120.B**) indique la présence de fragments spécifiques d'une isoflavone; leur nomenclature a été faite selon les règles de Domon (1988) et Ma (1997) (**Fig.III.121**). La fragmentation MS/MS de l'ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  431 entraîne la perte d'un hexose (-162 uma) caractérisée par le fragment  $Y_0^-$  à  $m/z$  269, nous orientant vers la génistéine.

En plus, nous remarquons que cette molécule isoflavonique présente peu d'ions issus de la fragmentation de l'aglycone. Par contre, on repère la présence de fragments correspondant à des ruptures des liaisons 0,2; 0,3; et 0,4 au niveau du sucre (**Fig.III.121**) à respectivement  $m/z$  311  $[M-H-120]^-$ , 341  $[M-H-90]^-$ , et 371  $[M-H-60]^-$ . En plus, on observe un ion caractéristique d'un

noyau B mono-hydroxylé à  $m/z$  117 ( $^{1,3}B^-$ ) issu de la fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA).



**Figure III.121.** Fragmentation ESI-MS/MS de l'ion à  $m/z$  431 [M-H]<sup>-</sup> du composé **EMGg6(III.5.16)**.

Les principaux fragments donnés par les spectres MS<sup>1</sup> et MS<sup>2</sup> en mode *electrospray* négatif de ce composé sont indiqués dans le **Tableau III.41**.

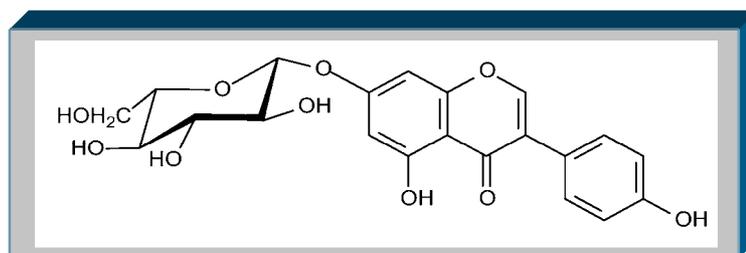
**Tableau III.41.** Données ESI-MS/MS<sup>2</sup> du composé **EMGg6(III.5.16)**.

Formule	ESI (-) ( $m/z$ , %)	
	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>
C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431(100), 269(67), 268(7), 117(4)	268(100), 269(39), 311(23), 341(6), 371(3), 431(2), 413(1)

Suite à cela, la structure de ce composé est proposée comme étant une génistéine-O-glycosylée avec un sucre de type hexose.

Pour connaître la nature du sucre, on a eu recours à l'hydrolyse acide qui nous a permis d'identifier le D-glucose et la génistéine par analyse co-chromatographique sur CCM en présence d'échantillons authentiques. De plus, nous avons réalisé des CCM dans plusieurs systèmes de solvants de ce composé en présence de témoins mono-O-glycosylés de la génistéine afin de confirmer la structure proposée.

Ainsi, ces données appuyées par une comparaison avec celles de la littérature (Mabry, 1970; Ye, 2012), nous permettent d'attribuer au composé **EMGg6(III.5.16)** la structure correspondant à la génistéine-7-O-β-D-glucopyranoside (génistéine).

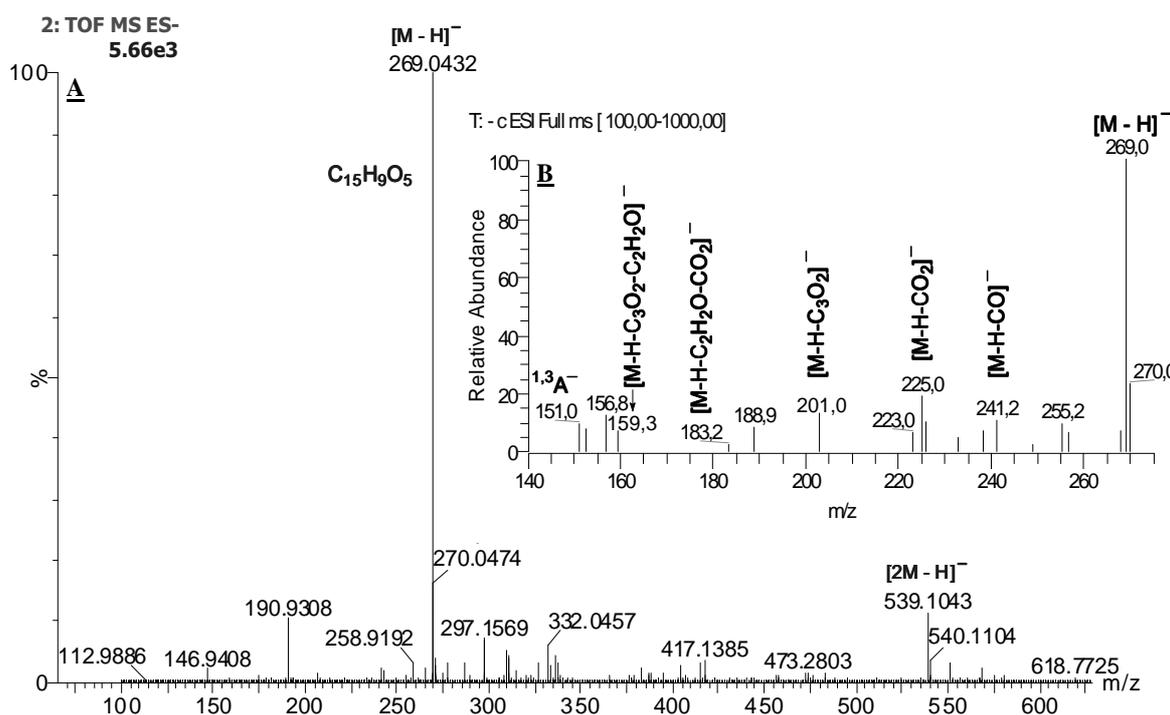


Structure du composé **EMGg6(III.5.16)**:  
**Génistéine-7-O-β-D-glucopyranoside** (génistéine)

### III.5.5.2. Identification structurale du composé **EMGq13(III.5.17)**

Le composé **EMGq13(III.5.17)** se présente sous la forme d'une gomme jaunâtre amorphe. Ce composé est issu du fractionnement de l'extrait méthanolique de *G. quadriflora* (cf. II.5.2.3.3). Le profil du spectre UV-DAD de ce composé montre un maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$  (MeOH) à 260 nm et un épaulement à 328 nm (**Fig.II.18**) spécifiques des isoflavones (**Fig.III.56**). L'analyse HPLC a montré que la pureté de ce composé est de 62.8 à 254 nm.

Le spectre de masse ESI-TOF-MS (**Fig.III.122.A**) de ce composé présente un ion quasi-moléculaire indiquant une aglycone isoflavonique à  $m/z$  269.0432  $[M-H]^-$  de masse moléculaire 270 uma correspondant à la formule brute  $C_{15}H_{10}O_5$  avec un degré d'insaturation de 11.



**Figure III.122.** Spectres de masse ESI-TOF-MS (**A**) et ESI-MS (**B**) en mode négatif du composé **EMGq13(III.5.17)**.

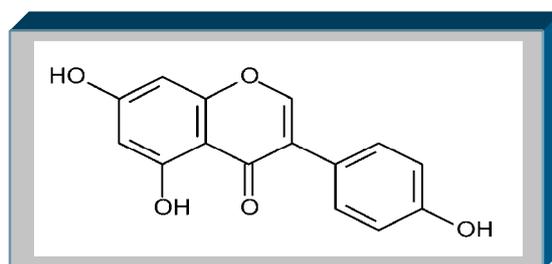
Le spectre ESI-MS(-) (**Fig.III.122.B**) présente l'ion à  $m/z$  269  $[M-H]^-$  comme précurseur des fragments  $[M-H-CO]^-$ ,  $[M-H-CO_2]^-$ ,  $[M-H-C_3O_2]^-$ ,  $[M-H-C_2H_2O-CO_2]^-$  et  $[M-H-C_3O_2-C_2H_2O]^-$  issus des pertes de petites molécules neutres à respectivement  $m/z$  241, 225, 201, 183, et 159. La fragmentation du cycle C par un mécanisme *Retro-Diels-Alder* (RDA) engendre la formation de l'ion  $^{1,3}A^-$  à  $m/z$  151 témoignant de l'existence d'un noyau A dihydroxylé.

Les principaux fragments donnés par le spectre de masse en mode *electrospray* négatif du composé **EMGq13(III.5.17)** sont indiqués dans le **Tableau III.42**.

**Tableau III.42.** Données ESI/MS du composé **EMGq13(III.5.17)**.

Formule	ESI/MS (-) ( $m/z$ , %)
$C_{15}H_{10}O_5$	269(100), 225(19), 201(13), 157(12), 241(10), 151(9), 255(9), 159(7), 189(8), 183(2)

Les données précédentes du composé **EMGq13(III.5.17)** appuyées par une comparaison avec celles de la littérature (Mabry, 1970; Fabre, 2001) sont caractéristiques de l'aglycone 4',5,7-trihydroxyisoflavone (génistéine).



Structure du composé **EMGq13(III.5.17)**:  
**4',5,7-Trihydroxyisoflavone** (génistéine)

### III.6. Discussion

Au terme des parties **III.3**, **III.4**, et **III.5** de notre étude, 22 composés ont été identifiés (**Tableau III.43**).

L'investigation des différents extraits méthanoliques de *C. tricolor* révèle la présence de dérivés d'acides caféoylquiniques comme composés majoritaires particulièrement au niveau des graines. Si l'acide 5-O-[E]-caféoylquinique (**III.3.1**) a déjà été isolé dans le genre (Trumm, 1991), les composés acides 3,5-di-O-[E]-caféoylquinique (**III.3.2**) et 4,5-di-O-[E]-caféoylquinique (**III.3.3**) sont identifiés pour la première fois dans le genre *Convolvulus*.

- L'acide gentisique-5-O- $\beta$ -glucoside (**III.4.1**) est nouvellement identifié et isolé dans le genre.
- D'autre part, l'identification de la coumarine scopolétine (**III.4.2**) confirme sa présence dans le genre (Deshpande, 1969; Khalil, 1981; El- Nasr, 1982).
- Une recherche bibliographique sur les flavonoïdes dans le genre *Convolvulus*, a montré la présence en particulier des glycosides 3-O-glucosides et 3-O-rutinosides de kaempférol et quercétine. Notre travail a confirmé la prédominance des flavonols-3-O-glycosides et cela par l'identification de huit composés nouveaux pour le genre: la quercétine-3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (**III.5.2**), la quercétine-3-O- $\beta$ -D-(6''-acétyl)-galactopyranoside (**III.5.4**), le kaempférol-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside (**III.5.5**), le kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (**III.5.6**), le kaempférol-3-O- $\beta$ -D-(6''-acétyl)-galactopyranoside (**III.5.7**), l'isorhamnétine-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside (**III.5.10**), l'isorhamnétine-3-O- $\beta$ -D-(6''-acétyl)-galactopyranoside (**III.5.11**) et isorhamnétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1'' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -galactopyranoside (**III.5.12**).
- Trois composés déjà reportés dans le genre sont identifiés dans *C. tricolor*: la quercétine-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside (**III.5.1**), la quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1''' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside (**III.5.3**) et le kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**III.5.8**) (Patrikeeva, 1968; Menemen, 2002; Awaad, 2006; Atta, 2007).

**Tableau III.43.** Récapitulatif des composés identifiés dans les différents extraits de *G. quadriflora* et *C. tricolor*.

Composés	Formule brute	HPLC-UV-DAD, $\lambda_{max}(nm)$	ESI-MS/MS (-) ( $m/z$ )	EMG <sub>Q</sub>	EMG <sub>R</sub>	EMEG	EMAE <sub>G</sub>	EMTF	EMFI
1- Acide 5-O-[E]-caféoylquinique	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	222, 244sh, 300sh, 326	MS <sup>1</sup> 353 MS <sup>2</sup> 191		EMG <sub>R1</sub>			EMTF1	
2- Acide 3,5-di-O-[E]-caféoylquinique*	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	224, 246sh, 302sh, 328	515	353	EMG <sub>R2</sub>			EMTF3	
3- Acide 4,5-di-O-[E]-caféoylquinique*	C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	224, 246sh, 300sh, 326	515	353	EMG <sub>R3</sub>				
4- Acide gentisique-5-O- $\beta$ -glucoside*	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	230, 292sh, 320	315	153	EMEG1				
5- 7-Hydroxy-6-méthoxy-coumarine (scopolétine)	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	228, 252sh, 298sh, 344	191	176	EMEG2	EMAE <sub>G1</sub>			
6- Quercétine-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	256, 266sh, 295sh, 356	463	300	EMEG4	EMAE <sub>G3</sub>	EMTF4	EMFI2	
7- Quercétine-3-O- $\alpha$ -L-arabinyopyranoside*	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	256, 266sh, 294sh, 352	433	300	EMG <sub>R2</sub>		EMTF5	EMFI3	
8- Quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 <sup>'''</sup> - $\rightarrow$ 6 <sup>''</sup> )- $\beta$ -D-glucopyranoside (rutine)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	256, 264sh, 300sh, 354	609	300	EMG <sub>R2</sub>	EMG <sub>R4</sub>	EMAE <sub>G4</sub>	EMFI1	
9- Quercétine-3-O- $\beta$ -D-(6 <sup>''</sup> -acétyl)-galactopyranoside*	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	256, 266sh, 302sh, 356	505	300				EMFI6	
10- Kaempférol-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside*	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	264, 300sh, 350	447	284				EMTF6	EMFI4
11- Kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-arabinyopyranoside*	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	266, 298sh, 350	417	284				EMTF8	EMFI5
12- Kaempférol-3-O- $\beta$ -D-(6 <sup>''</sup> -acétyl)-galactopyranoside*	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	266, 300sh, 350	489	284				EMFI2	EMFI2
13- Kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	264, 318sh, 346	593	285					
14- 3,5,7,4'-Tétrahydroxyflavone (kaempférol)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	264, 312sh, 375	285		EMG <sub>R12</sub>				
15- Isorhamnétine-3-O- $\beta$ -D-galactopyranoside*	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	255, 262sh, 302sh, 354	477	315		EMEG5		EMTFZ	
16- Isorhamnétine-3-O- $\beta$ -D-(6 <sup>''</sup> -acétyl)-galactopyranoside*	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	253, 264sh, 298sh, 356	519	315				EMTF9	
17- Isorhamnétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 <sup>'''</sup> - $\rightarrow$ 6 <sup>''</sup> )- $\beta$ -D-galactopyranoside*	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	255, 266sh, 301sh, 355	623	315	EMG <sub>R10</sub>	EMEG6	EMAE <sub>G2</sub>		
18- 3,5,7,4'-Tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone (isorhamnétine)	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	256, 264sh, 304sh, 322sh, 362	315	300	EMG <sub>R11</sub>				
19- Apigénine-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vitexine)	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	272, 336sh	431	311	EMG <sub>R5</sub>				
20- Apigénine 6,8-di-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (vicénine-2)**	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	270, 336sh	593	473	EMG <sub>R3</sub>				
21- Génistéine-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	262, 330sh	431	268	EMG <sub>R6</sub>				
22- 4',5,7-Trihydroxyisoflavone (génistéine)	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	260, 328sh	269		EMG <sub>R13</sub>				

\* molécule nouvelle pour le genre *Convulvulus*; \*\* molécule nouvelle pour le genre *Genista*.

L'étude de l'extrait méthanolique *G. quadriflora* révèle la présence de 2 composés C-glycosylés: la vicénine-2 (**III.5.15**) nouvelle pour le genre et la vitexine (**III.5.14**) déjà reportée dans les espèces *G. morisii* et *G. sessilifolia* (Giachi, 2002; Garritano, 2005; Tosun, 2009).

Six autres composés déjà reportés dans le genre sont identifiés pour la première fois dans *G. quadriflora*:

- Les aglycones kaempférol (**III.5.9**) et isorhamnétine (**III.5.13**)
- Les flavonols di-O-glycosylés quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1<sup>'''</sup>→6<sup>''</sup>)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**III.5.3**) et isorhamnétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1<sup>'''</sup>→6<sup>''</sup>)- $\beta$ -galactopyranoside (**III.5.12**) déjà reportés dans les espèces *G. pechisermollianna* et *G. tenera* (Martins, 2002; Rauter, 2005; Noccioli, 2011).
- Les composés de type isoflavone: génistine (**III.5.16**) et génistéine (**III.5.17**).

Notre étude révèle la présence des hétérosides de l'apigénine, du kaempférol, de la quercétine ainsi que ceux de l'isorhamnétine, mono- et di-O-glycosylés ainsi que C-glycosylés. Les sucres liés aux aglycones sont le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose et le L-arabinose. On constate que d'une part *C. tricolor* se distingue par la présence de flavonoïdes mono-O-glycosides avec un galactose acétylé ce qui nous permet d'envisager ces molécules comme de possibles bio-marqueurs pour cette espèce. D'autre part, *G. quadriflora* de par sa richesse en composés de type isoflavones, identifiés ou en cours d'identification, confirme son appartenance au genre *Genista* dont les molécules isoflavoniques sont considérées comme des bio-marqueurs, autant que les alcaloïdes quinolizidiniques également identifiés au cours de ce travail.

*Chapitre IV*  
*Activités biologiques*

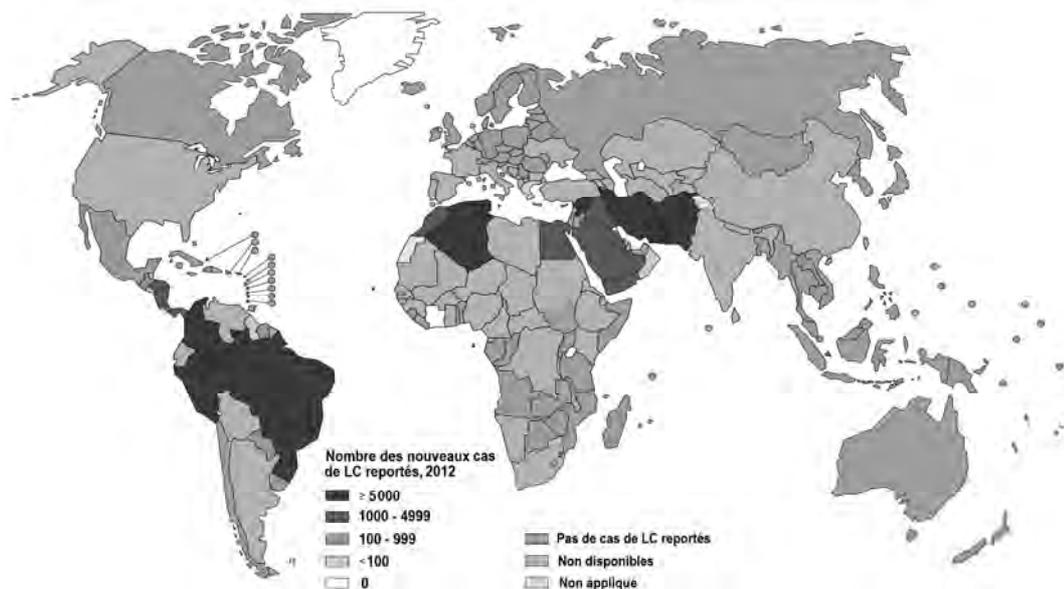
## IV. A. Activité antiparasitaire

### IV.A.1. Activité antileishmanienne

#### IV.A.1.1. Leishmanioses

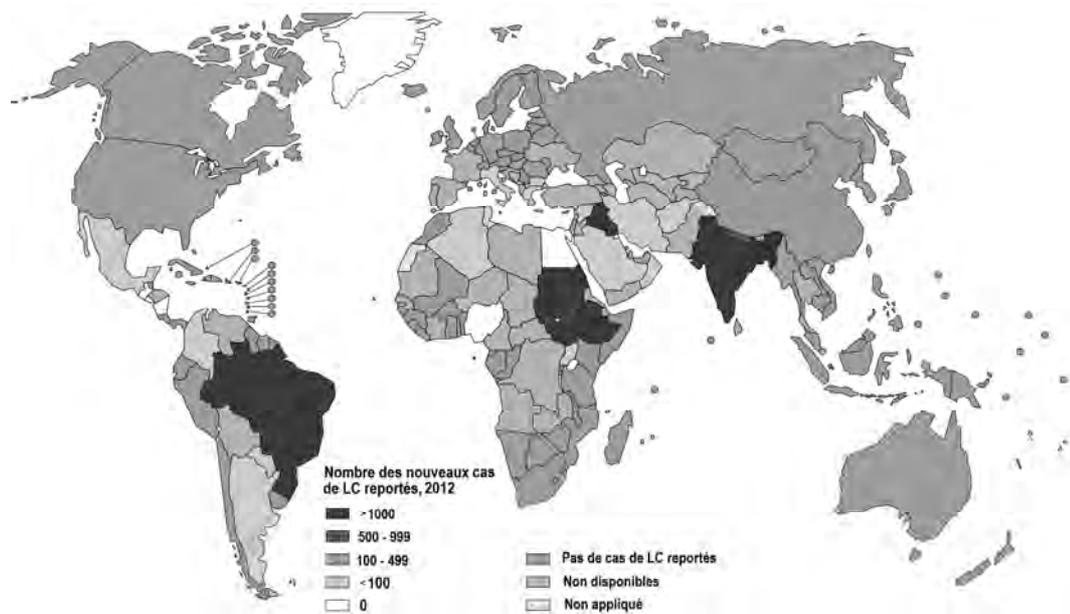
Plus de 350 millions de personnes sont exposées aux leishmanioses endémiques dans 98 pays (OMS(a), 2010). Les leishmanioses sont un groupe hétérogène de maladies provoquées par un parasite protozoaire du genre *Leishmania*. Ce groupe de maladies se décline en trois formes cliniques principales: cutanée (la plus fréquente), viscérale (mortelle en absence de traitement) et cutanéomuqueuse:

- **La leishmaniose cutanée (LC)** provoque des lésions inflammatoires ou des ulcères aux niveaux des membres et de la face, qui guérissent spontanément laissant derrière eux des cicatrices définitives. Environ 95% des cas de (LC) sont enregistrés en Amérique, dans le bassin méditerranéen, au Moyen-Orient et en Asie centrale (**Fig.IV.1**). Plus des deux tiers des cas sont enregistrés dans les pays suivants: l'Afghanistan, l'Algérie, le Brésil, la Colombie, la Syrie, et l'Iran. L'incidence estimative serait de 0.7 à 1.3 millions de nouveaux cas chaque année dans le monde (OMS(b), 2014).



**Figure IV.1.** Distribution de la leishmaniose cutanée dans le monde. (WHO(a), Octobre 2014).

- **La leishmaniose viscérale (LV)** est caractérisée par des poussées irrégulières de fièvres, une perte de poids, une hépatosplénomégalie (augmentation simultanée du foie et de la rate) et une anémie. Elle est fortement endémique en Inde et en Afrique de l'Est (**Fig.IV.2**). D'après les chiffres qui ont été publiés, on estime à 0.5 million le nombre de nouveaux cas et à environ 60 000 le nombre de décès par an dans le monde (Desjeux 2004). Plus de 90% des cas de (LV) surviennent dans les pays suivants: Bangladesh, Brésil, Éthiopie, Inde et Soudan (OMS(b), 2014).



**Figure IV.2.** Distribution de la leishmaniose viscérale dans le monde. (WHO(a), Octobre 2014).

- **La leishmaniose cutanéomuqueuse (LMC)** détruit partiellement ou totalement les muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. Près de 90% des cas de (LMC) se produisent au Brésil, en Bolivie et au Pérou (OMS(b), 2014).

Ces infections parasitaires sont endémiques dans des écosystèmes très hétérogènes. En Afrique et en Asie de l'Ouest, elles se rencontrent plutôt dans les régions désertiques alors qu'en Amérique, elles sont fréquentes dans les forêts tropicales.

L'épidémiologie de la leishmaniose dépend des caractéristiques de l'espèce parasitaire, des caractéristiques écologiques locales des sites de transmission, en plus des modalités très diverses du comportement humain. Dans le bassin méditerranéen, la leishmaniose viscérale (LV) est une zoonose provoquée par l'espèce *Leishmania infantum*. La plupart des habitants de cette région possèdent des chiens qui sont l'hôte réservoir avéré de *L. infantum*, ainsi que d'autres animaux qui attirent les phlébotomes dans les habitations et favorisent la transmission à l'homme. Au Bangladesh, en Inde et au Népal, la (LV) sévit dans les villages d'agriculteurs où les bovins et autres animaux sont hébergés tout près du logement. Le vecteur, *Phlébotome argentipes*, se gorge de sang de manière opportuniste aussi bien sur les bovins que sur les humains. Dans le nouveau monde, la leishmaniose viscérale est aussi à transmission zoonotique de *L. infantum*. La leishmaniose cutanée (LC) est considérée comme une maladie professionnelle liée aux travaux effectués dans des zones à grandes transmissions (microfoyers) au Mexique, au Brésil et en Bolivie.

La pauvreté engendrant de mauvaises conditions de logement et d'hygiène (absence de gestion des déchets, et égouts à ciel ouvert) peuvent augmenter le nombre de gîtes larvaires et de lieux de repos pour les phlébotomes ainsi que leur accès à l'homme. Les migrations pour raisons économiques ou lors des différents conflits peuvent amener des personnes non immunisées à

pénétrer dans des zones de transmission avec une exposition possible à la maladie. D'autre part, un état nutritionnel médiocre sur le plan protéino-énergétique et de l'apport en vitamine A, fer et zinc sont susceptibles de conduire principalement à une défaillance fonctionnelle de la barrière constituée par les ganglions lymphatiques. Ceci se traduit par un envahissement précoce des viscères par le parasite avec un accroissement du risque de progression vers des manifestations cliniques de la leishmaniose viscérale. Aussi, il est estimé qu'une malnutrition protéino-énergétique expose à un risque accru de leishmaniose cutanéomuqueuse.

#### IV.A.1.2. Agent pathogène

L'agent responsable des leishmanioses est un protozoaire flagellé (*leishmania*) transmis à un hôte réservoir (homme, animaux sauvages ou domestiques) par la piqûre d'une mouche. Les seuls vecteurs démontrés de maladie humaine sont du genre *Phlebotomus* dans l'Ancien Monde, et du genre *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde. La relation entre la maladie et le vecteur phlébotome a été établie en 1921 grâce à l'équipe de l'Institut Pasteur d'Algérie par des preuves expérimentales de la transmission de la leishmaniose cutanée (Dedet, 1999).

Les *Leishmania* se présentent sous deux stades morphologiques principaux :

- Les PROMASTIGOTES mesurent de 5 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur, sont munis d'un flagelle atteignant 20  $\mu\text{m}$  de longueur et se déplacent en milieu extracellulaire dans le tube digestif de l'insecte vecteur.
- Les AMASTIGOTES sont des parasites intracellulaires de 4  $\mu\text{m}$  munis d'un flagelle très court et qui se nichent à l'intérieur des macrophages des mammifères.

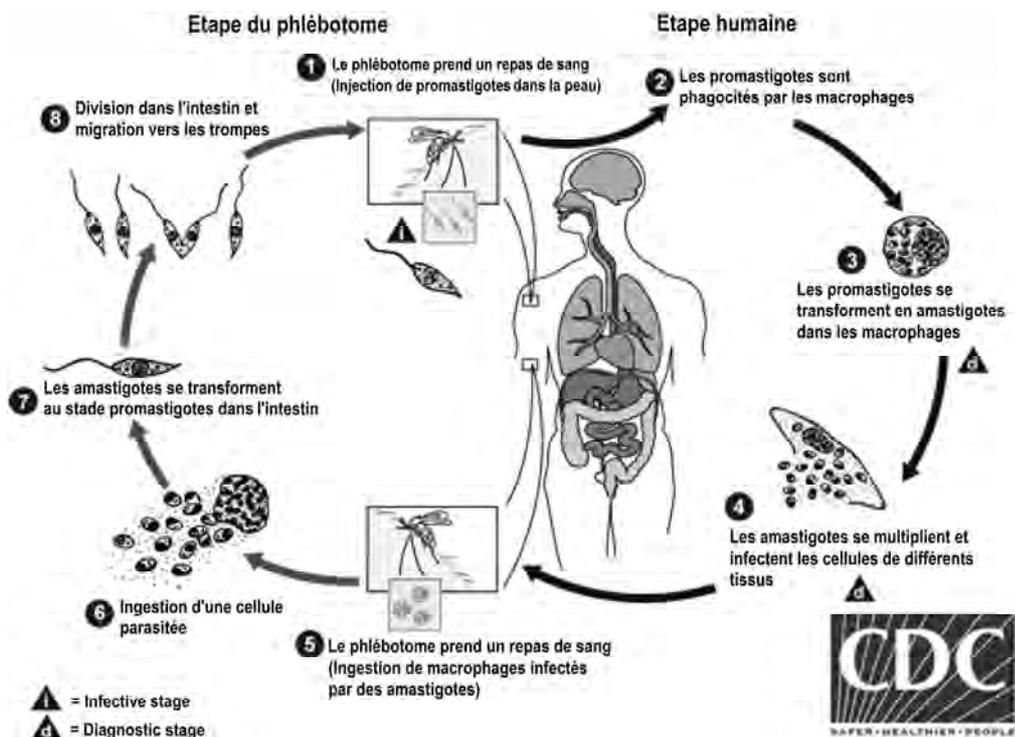


Figure IV.3. Cycle biologique du parasite leishmania. (CDC, octobre 2014)

L'introduction du parasite sous forme de promastigote est faite lorsque l'insecte infecté pique un humain ou un animal vertébré (chien, rongeurs). Puis, au niveau du réticulo-endothélium, les promastigotes sont phagocytés par les macrophages. En perdant leur flagelle, les promastigotes sont transformés en amastigotes qui se multiplient jusqu'à l'éclatement du globule blanc. Les amastigotes libérés pénètrent aussitôt dans d'autres cellules et prolifèrent ainsi. Le cycle est complété une fois que l'insecte, en se nourrissant du sang d'un mammifère infecté, ingère les amastigotes qui vont se modifier en promastigotes qui se multiplient à l'intérieur de l'intestin de l'insecte pour finalement se localiser au niveau des trompes (**Fig.IV.3**).

### **IV.A.1.3. Traitements**

L'infection du macrophage par le parasite provoque un déséquilibre rédox de la cellule hôte. Ainsi, pour se défendre, le macrophage active son système de défense immunitaire par une surproduction de radicaux de l'oxygène et de l'azote. Ces espèces nocives comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ), le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ), et le monoxyde d'azote radicalaire ( $ON^{\cdot}$ ) en s'accumulant provoquent des dommages sur l'ADN (Kocyigit, 2005) sans pour autant éradiquer la maladie puisque le parasite survit (Murray, 1981). De plus, le parasite possède des mécanismes qui lui permettent non seulement de résister aux effets oxydants des différents radicaux dirigés contre lui mais peut se reproduire à l'intérieur du macrophage tout en inhibant plusieurs fonctions de la cellule hôte qui pourraient lui être néfastes (Ribaut, 2008). Par conséquent, une fois le diagnostic confirmé par des examens cliniques associés à des tests parasitologiques, les leishmanioses exigent une prise en charge avec des traitements adéquats selon l'espèce de *Leishmania* en cause.

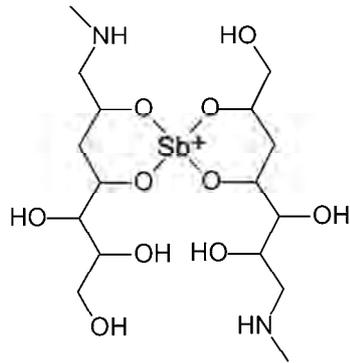
#### **IV.A.1.3.1. Traitements physiques**

Parmi les méthodes utilisées pour le traitement d'une leishmaniose cutanée, on cite la thermothérapie, la cryothérapie et l'électrothérapie. La *thermothérapie* par une ou deux applications locales d'une source de chaleur (50°C pendant 30 secondes) s'est révélée efficace avec des taux de guérison de 70% et cela dans des cas de lésions causées par les espèces *L. tropica* et *L. major* endémiques en Afghanistan. La *cryothérapie* au moyen d'azote liquide (-195°C) ou avec du CO<sub>2</sub> solide, s'est montrée efficace à plus de 95% en Égypte, Palestine et Jordanie, mais moins efficace (77%) en Turquie (OMS(a), 2010). L'*électrothérapie* à l'aide des courants de 5 à 15 mA a conduit dans 92.5% des cas, soit à une guérison totale soit à une nette amélioration (Sharquie, 1998).

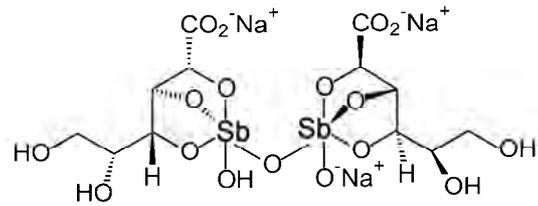
#### **IV.A.1.3.2. Chimiothérapie**

##### **IV.A.1.3.2.1. Dérivés de l'antimoine**

L'antimoine trivalent a été utilisé pour le traitement des leishmanioses mais a été abandonnée à cause de sa toxicité. Cependant les dérivés de l'antimoine pentavalent, l'antimoniote de méglumine (**Glucantime**<sup>®</sup>) et le stibogluconate de sodium (**Pentostam**<sup>®</sup>) sont les médicaments utilisés depuis 60 ans pour le traitement de toutes les formes cliniques de leishmaniose avec une teneur en antimoine de respectivement 8.1% de Sb<sup>5+</sup> (81 mg/mL) et 10% de Sb<sup>5+</sup> (100 mg/mL).



Antimoniato de méglumine  
(**Glucantime®**)



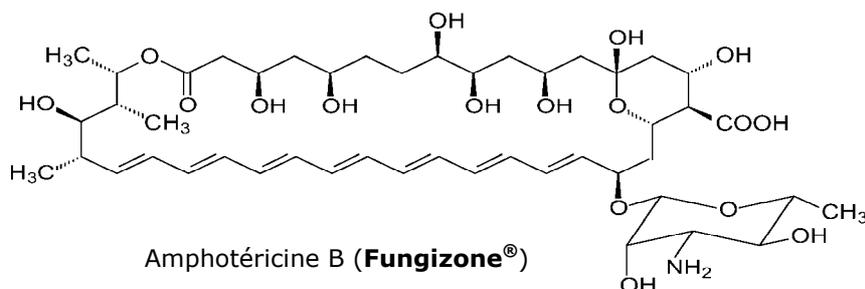
Stibogluconate de sodium  
(**Pentostam®**)

Ces composés ont une action inhibitrice sur les enzymes impliquées dans la synthèse des substances essentielles à la survie du parasite comme l'ATP (Berman, 1987). Ils sont capables de perturber l'ADN du parasite (Lucumi, 1998, 330). Les effets secondaires des antimonies pentavalents sont nombreux et se manifestent par de l'anorexie, des nausées, des douleurs abdominales, de l'arthralgie, des céphalées, une pancréatite, des arythmies cardiaques et une toxicité rénale (Lawn Stephen, 2006).

#### IV.A.1.3.2.2. Amphotéricine B et pentamidine

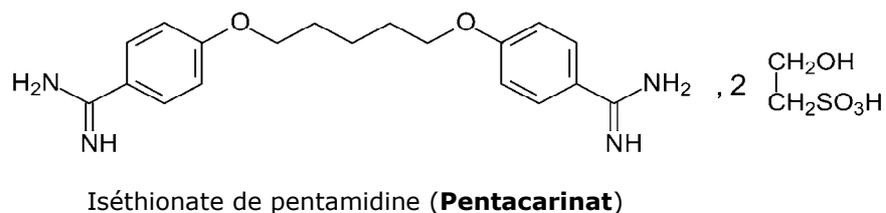
Dans le cas d'une résistance face aux dérivés de l'antimoine pentavalent, les traitements de deuxième intention sont l'amphotéricine B et la pentamidine.

L'amphotéricine B (**Fungizone®**) est un antibiotique et un puissant antifongique utilisé surtout pour le traitement de la (LV). Ce médicament provoque un dysfonctionnement au niveau de la perméabilité de la membrane du protozoaire entraînant la mort de celui-ci. Aucune résistance n'a encore été rapportée avec ce médicament très efficace ayant un taux de guérison de 97% (Thakur, 1996). Cependant, les effets secondaires de l'amphotéricine B menacent la vie du malade à cause de sa forte toxicité rénale et hématologique et du risque de choc anaphylactique. Une formulation en solution lipidique liposomale (**Ambisome®**) est maintenant disponible augmentant l'efficacité de ce médicament en concentrant l'amphotéricine vers les tissus ou organes cibles et réduisant sa toxicité (Dedet, 1999). Son coût est cependant très élevé et le laisse hors de portée des pays en voie de développement.



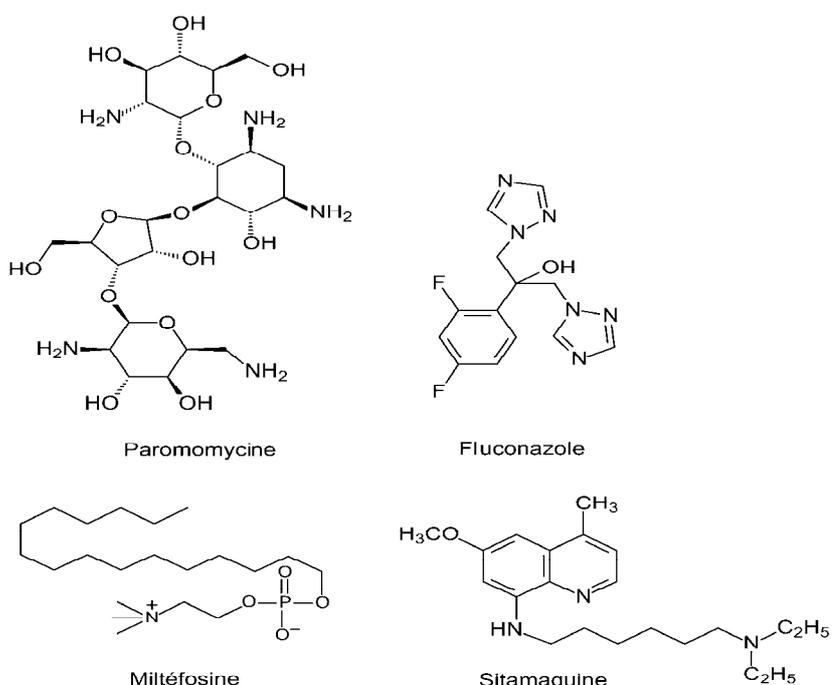
Amphotéricine B (**Fungizone®**)

La pentamidine est une diamine aromatique dont un des sels utilisé pour le traitement des leishmanioses est l'iséthionate de pentamidine (**Pentacarinat**). C'est un composé qui inhibe la synthèse de l'ADN chez le parasite avec un taux de guérison modéré de 74%. Des effets indésirables graves apparaissent au cours du traitement atteignant le rein, le pancréas ou les lignées sanguines, le diabète sucré, et l'hypoglycémie sévère en limitent l'usage au traitement du (LC). L'**allupurinol** est utilisé en alternance avec la pentamidine afin d'atténuer ses effets toxiques, cette combinaison a aussi amélioré le taux de guérison allant jusqu'à 90% (Berman, 2003).



#### IV.A.1.3.2.3. Composés en évaluation clinique

Parmi les molécules qui sont en évaluation clinique, on cite quatre composés (**Fig.IV.4**). La **paromomycine** était initialement utilisée pour traiter les infections bactériennes. Ce médicament a été breveté en Inde en 2007 pour soigner la (LV). Cette molécule agit en inhibant la synthèse des macromolécules et en perturbant les propriétés des membranes du parasite. Des combinaisons entre la paromomycine et les dérivés antimoniés ont montré une plus grande efficacité avec 94% de réussite (Berman, 2003).



**Figure IV.4.** Structures des composés en évaluation clinique pour traiter les leishmanioses.

La **sitamaquine** a été découverte par le Walter Reed Army Institute of Research pendant la deuxième guerre mondiale. Cette molécule dont le mode d'action n'est pas encore bien élucidé, est 708 fois plus active que le **Glucantime**<sup>®</sup> (Mishra, 2007) et elle est administrée oralement. Ce composé est considéré comme prometteur pour le traitement du (LV) en Inde avec 87% de taux de guérison (Jha, 2005) et en Afrique en montrant une efficacité de 83% sur 95 patients atteints (Wasunna, 2005). La **miltéfosine** avait été initialement développée pour traiter les métastases cutanées du cancer du sein puis s'affiche comme le premier médicament cytotoxique contre les leishmanies. Il est administré oralement pour traiter les cas de leishmaniose viscérale. Des effets secondaires modérés sont constatés au niveau des voies digestives (anorexie, nausées, vomissements, et diarrhée). Le **fluconazole** est un antifongique qui agit en inhibant la biosynthèse de l'ergostérol contenu dans la membrane du parasite. Il est également administré oralement. Cette molécule montre une efficacité contre les formes cutanées de leishmaniose.

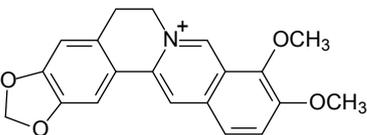
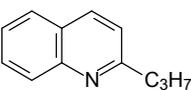
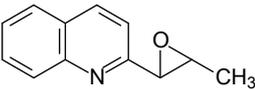
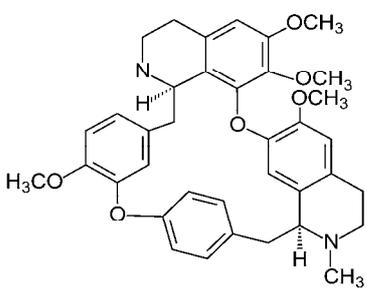
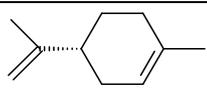
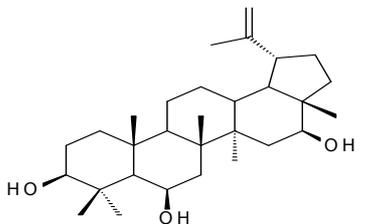
#### **IV.A.1.3.4. Métabolites végétaux en alternatifs thérapeutiques contre les leishmanioses**

Les médicaments employés pour le traitement des leishmanioses (cf. IV.1.3.2), sont onéreux, présentent des effets secondaires importants et nécessitent une hospitalisation et une surveillance par un personnel compétant. Alors que les produits naturels offre une grande diversité de molécules actives, moins toxiques, et surtout moins coûteux. Actuellement, la plupart des substances actives découvertes dans le cadre de la lutte contre les protozoaires responsables des différentes maladies parasitaires sont d'origine naturelle (Kayser, 2003). En plus, le screening de plantes et l'isolement bioguidé nous offre la possibilité de découvrir des molécules originales qui sont à la fois actives et sélectives. Dans un processus d'optimisation, la synthèse totale ou l'hémisynthèse à partir de molécules actives d'origine végétale peut permettre de réduire la toxicité et d'augmenter leur disponibilité.

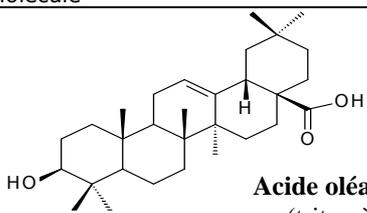
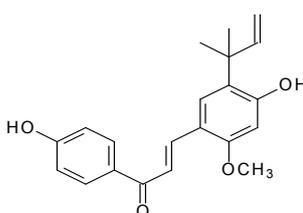
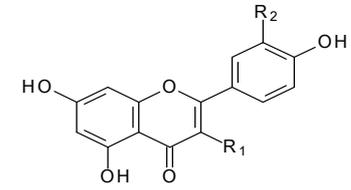
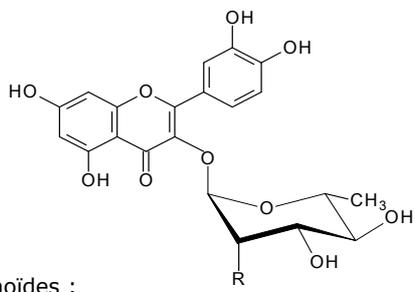
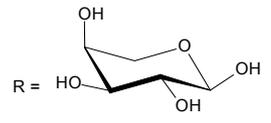
Dans le **Tableau IV.1**, sont cités quelques exemples de molécules décrites dans la littérature en relation avec l'activité antileishmanienne. Plusieurs alcaloïdes quinoléiques ont été décrits comme étant actifs. Parmi ceux-ci la chimanine D et la *n*-propylquinoléine isolées de *Galipea longiflora* (Rutaceae) se sont révélées être plus actives que le médicament de référence, le Glucantime<sup>®</sup>. Ces résultats ont fait l'objet d'un dépôt de brevet. Une autre grande classe de composés naturels largement répandus dans le règne végétal est celle des flavonoïdes. Pourtant, peu de travaux ont été reportés sur l'activité antileishmanienne des composés flavoniques. Néanmoins, certaines investigations reportent des résultats très prometteurs quant à l'utilisation des flavonoïdes comme substances thérapeutiques. La quercitrine, un flavonol monoglycosylé isolé de *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) s'est révélé, dans des tests réalisés *in vitro*, faiblement toxique et ayant une activité supérieure à celle du Pentostam<sup>®</sup> utilisé comme référence (Muzitano, 2006a). Un dérivé diglycosylé de la quercétine, la quercétine-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranose, également isolé de *Kalanchoe pinnata*, a été évalué *in vitro* (Muzitano, 2006b) et *in vivo* sur *L. amazonensis* par voie orale (Muzitano, 2009). Les résultats de ces tests ont indiqué une activité équivalente à celle du Pentostam<sup>®</sup> en terme de réduction de la charge parasitaire et une plus grande efficacité quant au traitement des lésions cutanées.

Ces deux derniers composés potentiellement actifs sur *L. amazonensis*, possèdent la quercétine comme aglycone directement lié au rhamnose. Leurs activités antileishmaniennes sont expliquées en prenant en considération l'affinité démontrée du rhamnose aux membranes des macrophages (Bonzue, 2005).

**Tableau IV.1.** Molécules d'origine naturelle comme alternative thérapeutique contre les leishmanioses.

Molécule	Activité	Réf.*
 <p><b>Berbérine</b> (alcaloïde isoquinoléique)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Active <i>in vitro</i> sur les amastigotes de <i>L. major</i>.</li> <li>- Réductrice de la charge parasitaire pour la forme viscérale causée par <i>L. donovani</i> et la leishmaniose cutanée causée par <i>L. panamensis</i>.</li> </ul>	Kay. Ven.
 <p><b>2-<i>n</i>-Propylquinoléine</b> (alcaloïde quinoléique)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Active <i>in vitro</i> sur <i>L. amazonensis</i> (activité équivalente à celle du Glucantime®).</li> </ul>	Fou.a
 <p><b>Chimanine D</b> (alcaloïde quinoléique)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Active <i>in vitro</i> sur les promastigotes de <i>L. braziliensis</i>, <i>L. amazonensis</i>, et <i>L. donovani</i> (activité supérieure à celle du Glucantime®).</li> </ul>	Fou.a
 <p><b>Isotétrandrine</b> (alcaloïde isoquinoléique)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Active <i>in vivo</i> sur <i>L. braziliensis</i> et <i>L. venezuelensis</i> (efficacité égale ou supérieure au Glucantime®).</li> </ul>	Fou.b
 <p><b>(+)-Limonène</b> (monoterpène)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Active <i>in vivo</i> sur <i>L. amazonensis</i>.</li> </ul>	Arr.
 <p><b>3β,6β,16β-trihydroxylup-20(29)-ène</b> (triterpène)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Active <i>in vitro</i> sur les promastigotes de <i>L. amazonensis</i></li> </ul>	Tel.

**Tableau IV.1** (suite).

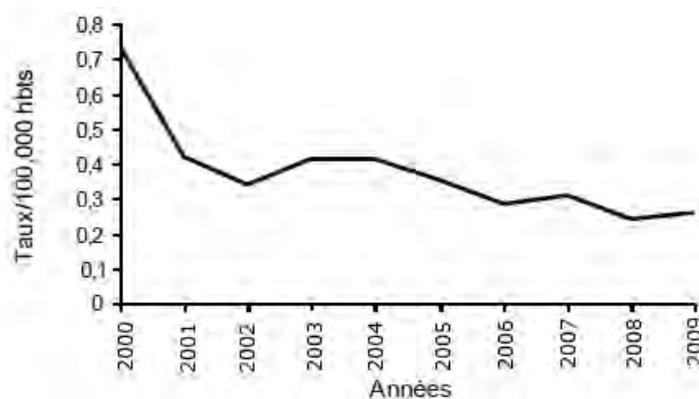
Molécule	Activité	Réf.*															
 <p><b>Acide oléanolique</b> (triterpène)</p>	<p>- Active <i>in vitro</i> sur les amastigotes de <i>L. amazonensis</i> (activité supérieure à celle du Glucantime®).</p>	Tor-San.															
 <p><b>Licochalcone A</b> (chalcone)</p>	<p>- Active <i>in vitro</i> sur les promastigotes de <i>L. major</i> et <i>L. donovani</i></p>	Zha.															
 <table border="1" data-bbox="207 985 574 1187"> <thead> <tr> <th>Flavonoïdes</th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>apigénine</b></td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td><b>chrysoériol</b></td> <td>H</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td><b>lutéoline</b></td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td><b>kaempférol</b></td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>	Flavonoïdes	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	<b>apigénine</b>	H	H	<b>chrysoériol</b>	H	OCH <sub>3</sub>	<b>lutéoline</b>	H	OH	<b>kaempférol</b>	OH	H	<p>- Actives <i>in vitro</i> sur les amastigotes de <i>L. amazonensis</i></p>	Sch.
Flavonoïdes	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>															
<b>apigénine</b>	H	H															
<b>chrysoériol</b>	H	OCH <sub>3</sub>															
<b>lutéoline</b>	H	OH															
<b>kaempférol</b>	OH	H															
 <p>- Flavonoïdes :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Quercitrine</b> (R = OH) (quercétine-3-O-α-L-rhamnopyranose)</li> <li>- <b>Quercétine-O-α-L-arabinopyranosyl (1→2)-α-L-rhamnopyranose</b></li> </ul>  <p>R =</p>	<p>- Actives <i>in vitro</i> sur les amastigotes de <i>L. amazonensis</i></p>	Muz.b															

\* Arr. : Arruda, 2009; Fou.a: Fournet, 1993a; Fou.b: Fournet, 1993b; Kay. : Kayser, 2003; Muz.b: Muzitano, 2006b; Sch. : Schinor, 2007; Tel. : Teles, 2011; Tor-San. : Torres-Santos, 2004; Zha. : Zhai, 1995; Ven. : Vennerstrom, 1990.

#### IV.A.1.4. Situation de la leishmaniose en Algérie

L'Algérie compte parmi les pays les plus touchés et est exposée à quatre formes cliniques de leishmanioses sévissant à l'état endémique, 3 formes cutanées et une forme viscérale.

- **La leishmaniose viscérale (LV):** Elle est provoquée par *Leishmania infantum* transmis et est transmise par le vecteur *Phlebotomus perniciosus*, qui admet le chien comme réservoir (Parrot, 1930). Près de 80% des victimes sont des enfants de moins de 5 ans. La (LV) se répartit sur toute la partie nord du pays, principalement en Kabylie et sa distribution géographique suit celle de la leishmaniose canine (Harrat, 2003). Le taux d'incidence de cette forme clinique selon l'Institut National de Santé Publique d'Algérie, est passé de 0.72 en 2000 à 0.42 en 2003-2004 pour se stabiliser à 0.26 cas pour 100.000 habitants en 2009 (**Fig.IV.5**). Les taux régionaux les plus élevés pour 100.000 habitants sont signalés à Tamanrasset (2.54), Biskra (1.20), Relizane (1.07), et Mila (1.02) (I.N.S.P, 2009).



**Figure IV.5.** Incidence annuelle de la leishmaniose viscérale en Algérie - Années 2000-2009 (I.N.S.P, 2009).

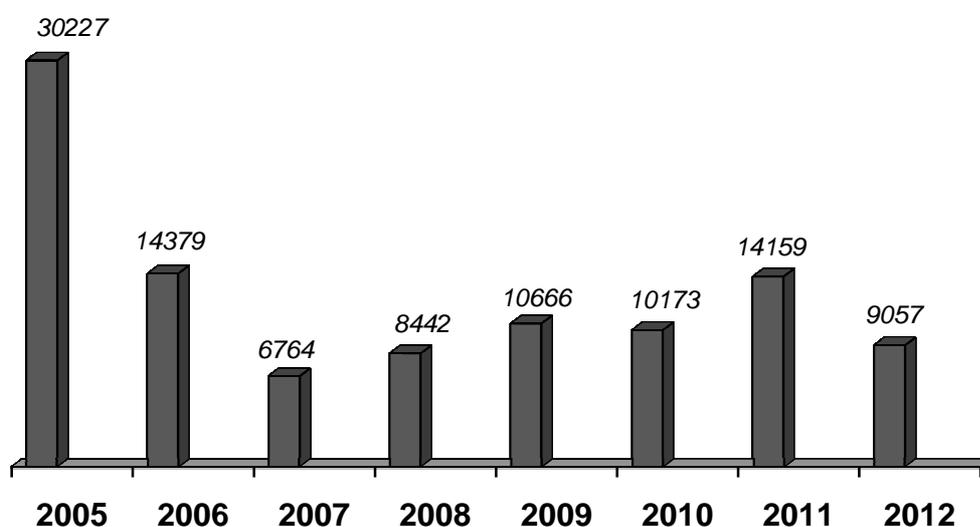
Par ailleurs, l'évolution de cette maladie est aussi reportée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui indique une nette régression de la (LV) en Algérie depuis 2005 à 2012, passant de 112 à 70 cas (WHO(b), 2014).

- **La leishmaniose cutanée (LC):** C'est la forme la plus fréquente avec un pic épidémiologique de 30 227 cas marqués en 2005 (**Fig.IV.6**). Puis, il y a eu une diminution des cas d'infection allant jusqu'à 6764 cas en 2007. Mais par la suite, on a enregistré une recrudescence avec 14 159 cas reportés en 2011 (WHO(c), 2014). Trois formes cliniques sont signalées :

➤ **leishmaniose cutanée du Nord (LCN) :** connue sous le nom de "clou de Mila".

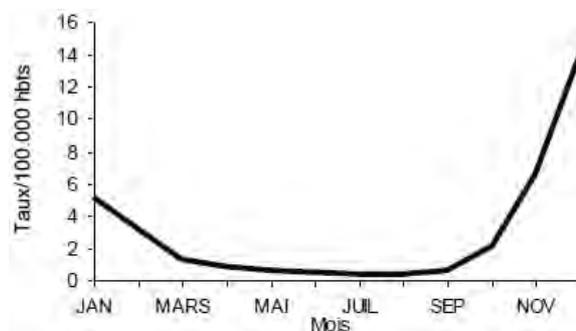
La LCN est provoquée par *Leishmania infantum* transmis par le vecteur *Phlebotomus perfiliewi*. Elle est répandue au Nord, le long du littoral et du Tell Algérien, coexistant avec la forme viscérale. Les foyers les plus touchés sont Tizi-Ouzou, Ténès, Bordj Menaïel, Bouira, Meftah, Constantine et Alger (Bachi, 2006).

- **leishmaniose cutanée zoonotique1 (LCZ1)** : connue sous le nom de "clou de Biskra". La LCZ1 est provoquée par *Leishmania major* et est transmise par le vecteur *Phlebotomus papatasi*, ayant un rongeur, le "rat des sables", comme hôte réservoir. Elle est cantonnée aux deux foyers de Biskra et à l'Abadla. Elle était limitée autrefois aux régions arides et semi-arides mais actuellement la LCZ1 se répand dans tout le pays.
- **leishmaniose cutanée zoonotique2 (LCZ2)** : provoquée par *Leishmania killicki* et est transmise par le vecteur *Phlebotomus sergenti* avec comme hôte réservoir est le rongeur *Massoutiera mzabi*. Cette forme sévit principalement dans la ville de Ghardaïa (Harrat, 2009).



**Figure IV.6.** Nombre de cas reportés de leishmaniose cutanée en Algérie - Années 2005-2012 (WHO(c), 2014).

L'Institut National de Santé Publique d'Algérie reporte une incidence épidémiologique mensuelle très faible pour la LC au cours du printemps et de l'été (**Fig.IV.7**). Cependant, le taux d'incidence montre des valeurs plus élevées en septembre-janvier. Pour l'année 2009, un pic franc a été enregistré en décembre avec 14.06 cas pour 100.000 habitants (I.N.S.P, 2009).



**Figure IV.7.** Incidence mensuelle de la leishmaniose cutanée en Algérie - Année 2009 (I.N.S.P, 2009).

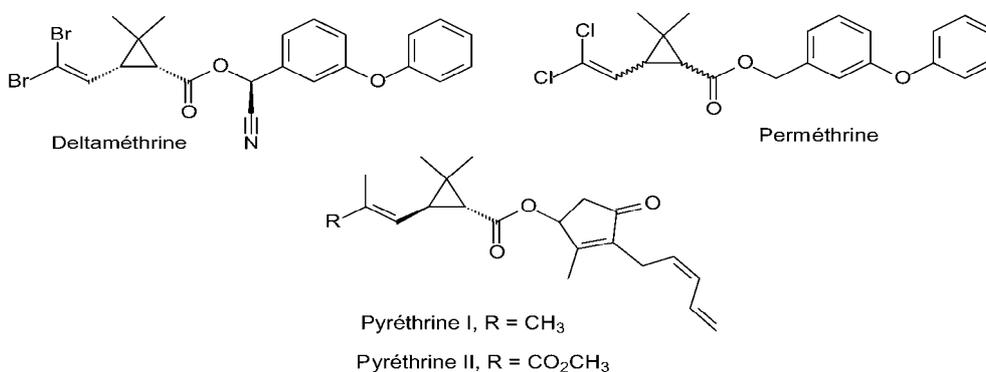
La conduite relative au traitement de la leishmaniose en Algérie selon le Ministère de la Santé de la Population et de la Réforme Hospitalière est comme suit (Ould-Kada, 2014):

- Traitement local (Leishmaniose cutanée):
  - Infiltration intralésionnelle de l'antimoniote de *N*-méthyl glucamine
  - Cryothérapie
  - Eau oxygénée 10 volumes
  - Chirurgie, électrocoagulation
  
- Traitement par voie générale (Leishmaniose cutanée et viscérale): fait appel au médicament de référence: L'**Antimoniote de *N*-méthyl glucamine (Glucantime®)**.

Toutefois, il existe des souches résistantes au dérivé pentavalent de l'antimoine, et l'alternative dans ce cas est l'**Amphotéricine B**.

Parmi les méthodes de lutte, des opérations de démoustication sont effectuées régulièrement selon les directives du Ministère de la Santé, Direction de la Prévention Générale (Ould-Kada, 2014). Les insecticides chimiques utilisés sont l'organochloré **Lindanol®**, et l'organophosphoré **Malatox® 50%** contenant comme matières actives respectivement le *lindane* (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>) et le *malathion* (C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>PS<sub>2</sub>). Les produits utilisés spécifiquement contre le vecteur dans la lutte contre les leishmanioses, appartiennent à la famille des pyréthrinoïdes comme la *deltaméthrine* (C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>Br<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>) et la *perméthrine* (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Cependant, la pulvérisation de ces insecticides chimiques conduit à l'accumulation de molécules toxiques pour la faune et la flore. Leur dégradation totale prend quelques mois voire des années, entraînant une contamination des systèmes terrestres et aquatiques.

Les pyréthrinoïdes sont des hydrocarbures halogénés synthétisés chimiquement et dont la structure générale est similaire aux pyréthrines (**Fig.IV.8**), composés naturels présents dans les fleurs du pyrèthre de Dalmatie (*Tanacetum cinerariifolium*) ou chrysanthème, une plante appartenant à la famille des *Asteraceae*. A faible dose, la pyréthrine a une activité insecticide ou répulsive (Botineau, 2010).



**Figure IV.8.** Structure des molécules synthétiques deltaméthrine et perméthrine et naturelles pyréthrines I (et II).

## IV.A.2. Activité antipaludique

### IV.A.2.1. Paludisme

Le paludisme (ou malaria) est la maladie infectieuse la plus importante au monde avec 219 millions de cas cliniques et 627000 décès sont imputables au paludisme dans le monde (WHO(d), 2013). L'agent pathogène est un parasite du genre *Plasmodium*, propagé par des moustiques anophèles. En 2013, l'Organisation Mondiale de la Santé a recensé plus de 100 pays où le paludisme est considéré comme endémique. L'estimation du nombre de personnes exposées au risque d'une contamination est de 3.4 milliards et la majorité des cas déclarés (80%) et les décès (90%) se produisent en Afrique (**Fig.IV.9**). En plus, la majorité des décès sont des enfants de moins de cinq ans. La maladie sévit sur le mode endémoépidémique et son incidence dépend étroitement de l'écologie du vecteur, donc de la climatologie, de l'aménagement de l'espace (déforestation, hydroagriculture), des migrations de populations et des capacités économiques à entreprendre des travaux d'assainissement.

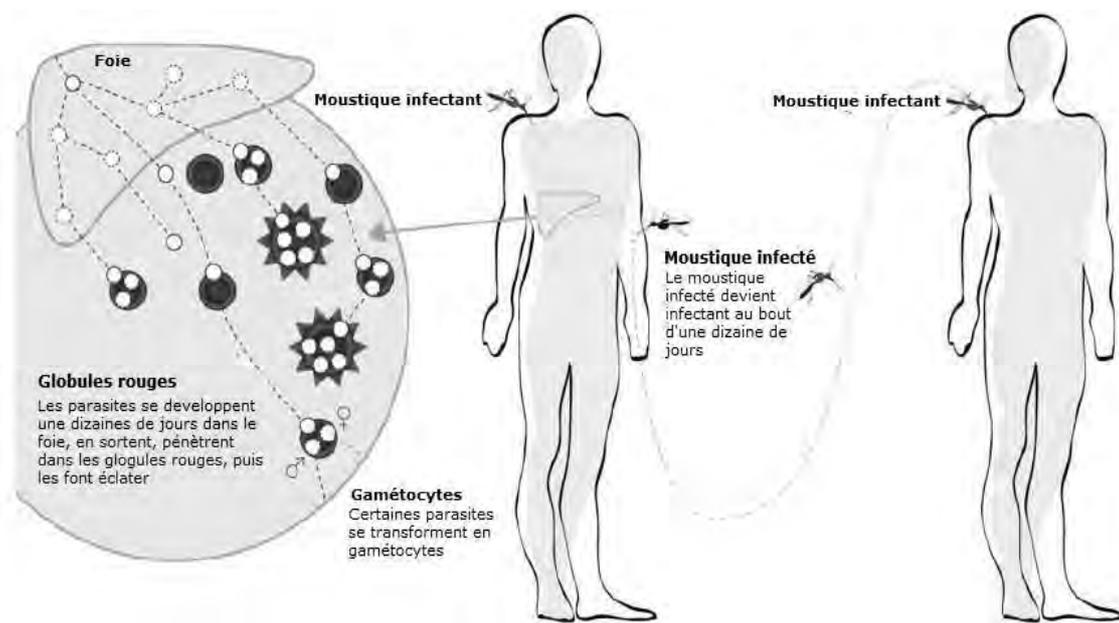


**Figure IV.9.** Pourcentages des populations exposées au paludisme dans le monde, 2011. (WHO(e), novembre 2014).

### IV.A.2.2. Agent pathogène

Cette maladie est provoquée par un parasite protozoaire du genre *Plasmodium* et est transmise par la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle. On retrouve le genre *Plasmodium* (*P.*) chez divers vertébrés. Chez l'homme qui est leur hôte réservoir, quatre espèces sont pathogènes: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. falciparum*. Une cinquième espèce, *Plasmodium knowlesi*, et dont l'hôte naturel est un singe (*Macaca fascicularis*) est également pathogène pour l'homme, (White, 2008).

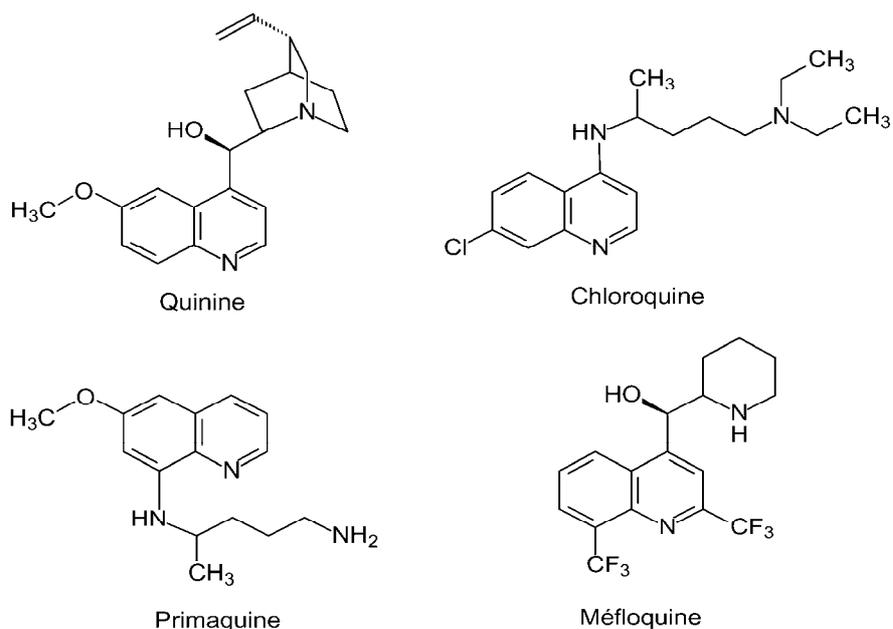
Le cycle du parasite se déroule en deux étapes, l'une chez l'anophèle femelle, l'autre chez l'homme. Chez l'homme, le moustique inocule les formes parasitaires infestantes qui sont transportées par le sang jusqu'au foie où elles se multiplient, engendrant des milliers de nouveaux parasites. Les hépatocytes éclatent, libérant ces parasites qui pénètrent dans de nouveaux globules rouges pour s'y multiplier conduisant à la phase clinique de la maladie. Au cours de cette multiplication, le *Plasmodium* digère une grande quantité d'hémoglobine qui représente sa principale source d'acides aminés tout en libérant des espèces toxiques réactives de l'oxygène et de l'azote. L'hémoglobine est dégradée sous forme de pigments de couleur noire ou brune. A l'intérieur des globules rouges, apparaissent les gamétocytes mâles et femelles. A ce stade, ces formes parasitaires sont ingérées par un nouveau moustique, fermant ainsi le cycle naturel du paludisme (**Fig.IV.10**).



**Figure. IV.10.** Cycle de vie du *Plasmodium*.  
(Bonneville, 2007)

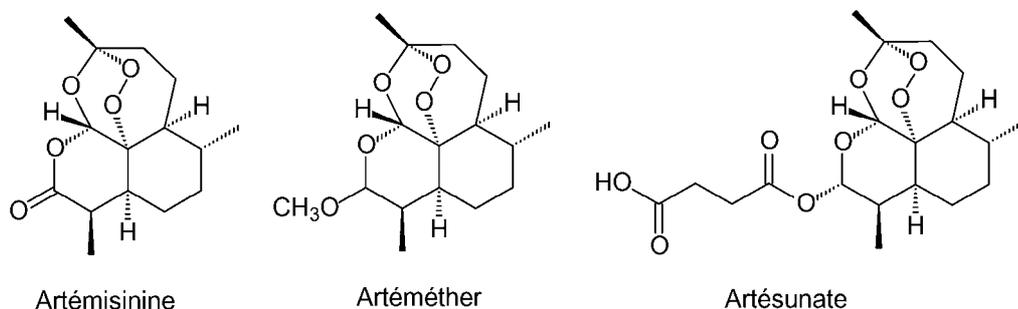
#### IV.A.2.3. Traitements

Le plus ancien des antipaludiques est la quinine, un alcaloïde naturel extrait des écorces de plusieurs espèces de quinquinas (*Cinchona sp.*, Rubiaceae) (Bruneton, 1987). D'autres dérivés quinoléiques synthétiques ont également été utilisés contre cette maladie comme la chloroquine, la primaquine et la méfloquine (**Fig.IV.11**).



**Figure IV.11.** Structures des dérivés quinoléiques.

Une autre classe importante d'antimalariques est celle de l'artémisinine et ses dérivés. L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique avec un pont endoperoxyde, isolée de *Artemisia annua* L. Ses principaux dérivés synthétiques, l'artéméthér et l'artésunate (**Fig.IV.12**) sont pourvus d'un grand pouvoir thérapeutique à action rapide sur le parasite (Malvy, 2000).



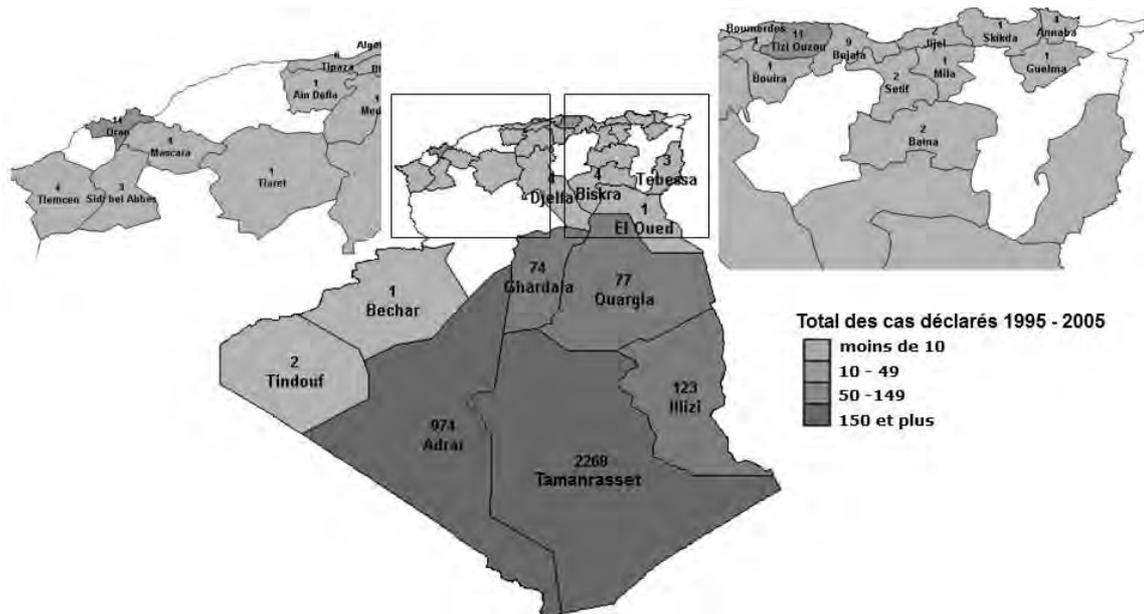
**Figure IV.12.** Structures de l'artémisinine et de 2 dérivés synthétiques.

Certaines souches de paludisme sont devenues résistantes aux monothérapies traditionnelles. A cet effet, différents traitements combinés d'antipaludiques sont proposés afin de mettre à profit l'association synergique ou additive de deux composés. Ceci consiste à améliorer leur efficacité thérapeutique et diminuer le développement de la résistance. On nomme ces associations médicamenteuses à base d'artémisinine (ou dérivés), les ATC: Artemisinin-based-Combination Therapy (WHO(d), 2013). On cite la combinaison artéméthér/luméfántrine (**Fig.IV.13**) comme exemple d'ATC recommandé par l'OMC pour les zones à faible ou moyenne transmission de la malaria. La luméfántrine est toujours utilisée en association avec l'artéméthér dans un rapport (1:6).



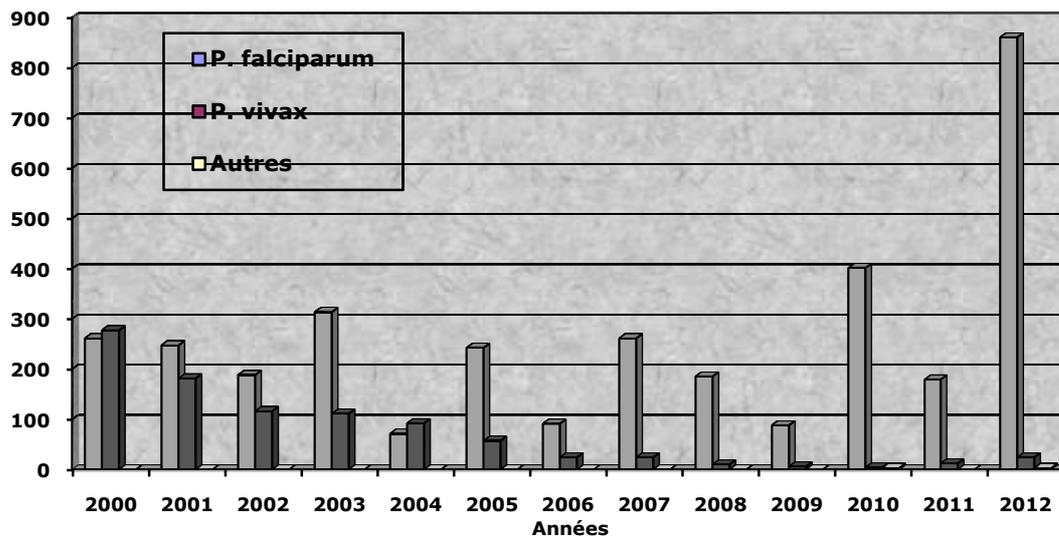
• **Espèces plasmodiales et anophèles vectrices**

Au nord de l'Algérie, le paludisme autochtone n'est plus endémique suite à la campagne nationale qui a été longue et très coûteuse. Cette lutte entraine dans le cadre du programme mondiale de l'éradication du paludisme. Malgré cela, l'analyse de la situation épidémiologique signale qu'il persiste encore quelques micro-foyers autochtones actifs dans les régions sahariennes à Tamanrasset, Adrar, Illizi, Ouargla et Ghardaïa (**Fig.IV.14**), en plus du paludisme d'importation représentant plus de 90% des cas confirmés par le Laboratoire National de Référence du Paludisme de l'INSP (M.S.P.R.H., 2013).



**Figure IV.14.** Répartition des cas de paludisme déclarés de 1995 à 2005. (Achir, 2006)

Les espèces plasmodiales les plus fréquemment rencontrées en Algérie sont *Plasmodium falciparum* (81%), *Plasmodium vivax* (19%) (WHO(d), 2013) et très rarement *Plasmodium malariae* (**Fig.IV.15**). L'analyse de la situation épidémiologique pour l'année 2009 par l'INSP, a révélé que le paludisme d'importation représente 95.7% des cas confirmés. L'origine de l'infection est: le Mali (70%), le Niger (24.4%), le Bénin (2.2%), la Guinée Bissau (1.1%), la Mauritanie (1.1%) et le Nigeria (1.1%) (Hammadi, 2009a).

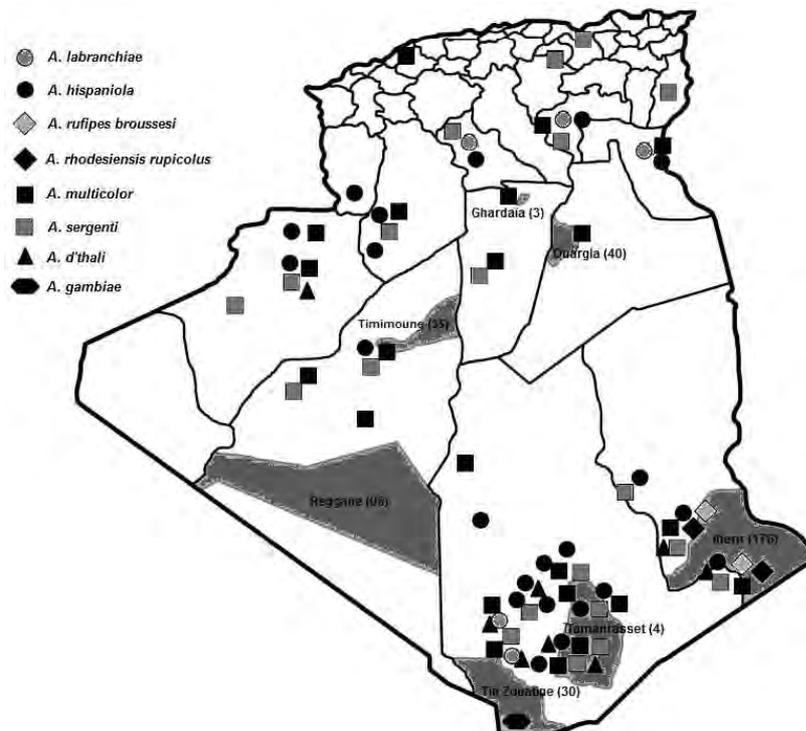


**Figure IV.15.** Nombre de cas reportés en Algérie par espèce plasmodiale de 2000 à 2012. (WHO(d), 2013)

Sep

An.

*multicolor*, *An. d'thali*, *An. hispaniola*, *An. labranchiae*, *An. rhodesiensis rupicolus*, et *An. brousesi* (Hammadi, 2009b). Plus récemment, *An. gambiae mosquitoes*, une huitième espèce a été détectée au niveau de la frontière algéro-malienne (Boubidi, 2010). La figure ci-dessous indique la répartition des foyers du paludisme autochtone (P.A.) et la distribution des anophèles sur tout le territoire algérien. Les chiffres correspondent aux nombres de cas de P.A. enregistrés entre 1980 et 2007 dans les foyers correspondants.



**Figure IV.16.** Répartition des foyers du paludisme autochtone et la distribution des anophèles en Algérie. (Hammadi, 2009b)

## • **Traitement**

L'Algérie suit les nouvelles consignes de l'OMS dans le traitement antipaludique recommandant des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Ainsi, les antipaludéens retenus dans le consensus thérapeutique national sur le traitement du paludisme (M.S.P.R.H., 2014) sont:

- Quinine
- Chloroquine
- Primaquine
- Méfloquine
- Artésunate
- Artéméther – Luméfantrine

### **IV.A.3. Protocoles expérimentaux des tests**

#### **IV.A.3.1. Test effectué au Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Fiocruz, Salvador, Bahia (Brésil)**

##### **IV.A.3.1.1. Activité antiparasitaire contre *Leishmania amazonensis***

L'activité antiparasitaire des extraits a été réalisée sur les promastigotes de la souche *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125). Les parasites sont maintenus dans un milieu Schneider insecte + 10% sérum veau fœtal (SVF) + 50 µg/mL gentamicine. Les tests sont réalisés dans des plaques à 96 puits, avec une contenance de 100 µL/puits de la suspension du parasite (2.10<sup>6</sup> parasites/mL), à 24°C. Les solutions stocks des extraits sont préparées dans du DMSO et sont diluées pour obtenir des concentrations entre 100 µg/mL et 1 µg/mL. L'amphotéricine B est utilisé comme référence. Après 72h d'incubation à 24°C en présence des extraits ou en leur absence, le nombre de parasites viables est déterminé à l'aide d'un microscope. Les résultats sont exprimés en % de réduction de la parasitémie par rapport au contrôle (Barbosa, 2014).

##### **IV.A.3.1.2. Activité antiparasitaire contre *Plasmodium falciparum***

L'activité antiparasitaire des extraits a été réalisée sur la souche de *P. falciparum* (W-2) sensible à la chloroquine. Les parasites sont maintenus dans une culture continue d'érythrocytes humains O<sup>+</sup> en utilisant un milieu RPMI-1640 additionné + 10% de plasma humain sans hypoxanthine. L'activité antipaludique des différents extraits est mesurée par l'incorporation de l' [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine. Les tests sont réalisés dans des plaques à 96 puits, où la culture de *P. falciparum* W2 se fait en présence de 1-2% de parasitémies et de 2.5% d'hématocrites. La méfloquine est utilisée comme référence. Après 24h d'incubation avec les extraits à tester, 25 µL du milieu [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine sont ajoutés dans chaque puits, suivi d'une autre incubation de 24h. Les parasites sont collectés afin d'évaluer l'incorporation [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine en utilisant un compteur à radiations de type β. L'inhibition de la croissance des parasites est déterminée en comparant une prise d' [<sup>3</sup>H]-hypoxanthine non traitée par rapport aux cellules traitées (Barbosa, 2014).

#### **IV.A.3.1.3. Activité antiparasitaire contre *Trypanosoma cruzi***

Les épimastigotes de la souche *T. cruzi* (Y) ont été cultivés dans l'infusion tryptose du foie (LIT) complétée par 10% SVF, 5% d'urine stérile humaine et 50 µg/mL de gentamicine, pH 7.2, à 26°C. Les tests sont réalisés dans des plaques à 96 puits, avec une contenance de 200 µL/puits de la suspension de parasites ( $10^7$  parasites/mL), seuls ou en présence des échantillons analysés à une seule concentration de (100, 10 ou 1 µg/mL). Le benznidazole est utilisé comme référence. Après 24h d'incubation, 50 ng de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) ont été pulvérisés sur les plaques qui sont incubées une seconde fois à 37°C pendant 3h. La viabilité des parasites est déterminée par spectrophotométrie à 570 nm. Les résultats sont exprimés en % de réduction de la parasitémie par rapport au contrôle (Costa, 2007).

#### **IV.A.3.1.4. Activité cytotoxique sur J774**

Les différents extraits sont testés sur les macrophages J774 ( $5.10^4$  cellules/mL) distribués dans des plaques à 96 puits (100 µL/mL) et incubés pendant 24h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les échantillons sont préparés dans du DMSO, puis dilués avec de l'eau déminéralisée jusqu'à ce que la concentration finale en DMSO de soit 1% au maximum. Ces échantillons sont testés à des concentrations variant entre 100 µg/mL et 1 µg/mL. Après une incubation de 72h, 20 µL d'Alamar Blue sont ajoutés dans chaque puits, puis maintenus 24h à l'abri de la lumière. Le violet de gentian est utilisé comme contrôle. L'absorbance est évaluée par spectrophotométrie à 570 et 600 nm. Les résultats sont exprimés en % de réduction de la croissance/viabilité par rapport au contrôle (Barbosa, 2014).

### **IV.A.3.2. Test effectué au Laboratoire de Microbiologie, Parasitologie et Hygiène (LMPH) de l'Université d'Anvers (Belgique)**

#### **IV.A.3.2.1. Activité antiparasitaire contre *Leishmania infantum***

Les évaluations biologiques ont été réalisées *in vitro* sur les amastigotes de la souche *L. infantum* (MHOM/MA(BE)67). Les parasites sont collectés de rates de hamsters infectés et purifiés par centrifugation puis maintenues dans un milieu RPMI-1640 + 5% de SVF. Les cellules infectées, macrophages péritonéaux de souris, sont conservées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub> et 92% N<sub>2</sub>. Les solutions stocks des fractions sont préparées dans du DMSO à 20 mg/mL. Ces solutions sont diluées avec de l'eau déminéralisée jusqu'à ce que la concentration finale en DMSO soit de 1% au maximum. Les amastigotes sont cultivés dans une plaque de 96 puits, chacun contenant 10 µL de la solution aqueuse et 190 µL d'un inoculum de  $3.10^5$  macrophages +  $3.10^6$  parasites/puits. Les fractions sont testées à des concentrations variant de 64 µg/mL à 0.25 µg/mL. La miltéfosine serve de référence. La croissance du parasite est comparée à un inoculum non traité (100% de croissance) et un contrôle non infecté (0% de croissance). Après 5 jours d'incubation à 37°C, les cultures infectées sont colorées avec une solution de May-Grünwald-Giesma à 10%, et le nombre de parasites est calculé à l'aide d'un microscope. Les résultats sont exprimés en % de réduction de la parasitémie par rapport au contrôle (Cos, 2006; Cretton, 2014).

#### **IV.A.3.2.2. Activité antiparasitaire contre *Plasmodium falciparum***

Les fractions sont testées sur la souche *P. falciparum* K1, souche sensible à la chloroquine, pyriméthamine et cycloguanil). Les parasites sont maintenus dans un milieu RPMI-1640 constitué de 0.37 mM d'hypoxanthine, 25 mM d'Hepes, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 10% de sérum humain O<sup>+</sup> et 2% d'érythrocytes humains O<sup>+</sup>. Toutes les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contenant 4% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub> et 93% N<sub>2</sub>. Les tests sont effectués dans des plaques à 96 puits, chacun contenant 10 µL de la solution aqueuse à tester et 190 µL d'un inoculum du parasite (1% de parasitémie). L'artéméther est utilisé comme référence. Après 72h d'incubation à 37°C, les plaques sont congelées et stockées à -20°C. Après décongélation, une prise de 20 µL est transférée de chaque puits dans un autre puits auquel il est additionné 100 µL du réactif Malstat (lactase déhydrogénase) et 20 µL d'un mélange (1:1) de PES (phénazine éthosulfate à 0.1 mg/mL) et de NBT (nitro-blue tétrazoline III à 2 mg/mL) (Makler, 1993). Les plaques sont maintenues pendant une durée de deux heures à l'abri de la lumière et le changement de couleur est mesuré par spectrophotométrie à 655 nm. Les résultats sont exprimés en % de réduction de la parasitémie par rapport au contrôle (Cos, 2006; Cretton, 2014).

#### **IV.A.3.2.3. Activité antiparasitaire contre *Trypanosoma cruzi***

Les évaluations biologiques ont été réalisées *in vitro* sur les amastigotes de la souche *T. cruzi* (Tulahuen LacZ, clone C4) sensible au nifurtimox. Les parasites sont maintenus dans des fibroblastes embryonnaires de poumon humain MRC-5<sub>SV2</sub> dans un milieu MEM (Minimum Essential Medium) additionné à 200 mM de L-glutamine, 16.5 mM de NaHCO<sub>3</sub> et 5% sérum fœtal inactif. Toutes les cultures sont conservées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO<sub>2</sub>. Les tests sont réalisés dans des plaques à 96 puits, chacun contenant 10 µL de la solution aqueuse à tester et 190 µL d'un inoculum de 2.10<sup>4</sup> cellules MRC-5/mL + 2.10<sup>5</sup> parasites/mL. Le benznidazole est utilisé comme référence. Après 7 jours d'incubation à 37°C, la quantité de parasites est déterminée après addition de 20 µL/puits de la solution CPRG (chlorophenolred-β-D-galactopyranoside) (Bruckner, 1996). Puis, après 4h d'incubation à 37°C, le changement de coloration est mesuré à 540 nm. Les résultats sont exprimés en % de réduction de la parasitémie par rapport au contrôle (Cos, 2006; Cretton, 2014).

#### **IV.A.3.2.4. Activité antiparasitaire contre *Trypanosoma brucei***

Les composés sont testés sur les trypomastigotes de la souche *T. brucei brucei* Squib-427 sensible à la suramine. La souche est maintenue dans un milieu HMI-9 additionné de 10% de sérum fœtal inactif. Toutes les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère composée de 5% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub> et 92% N<sub>2</sub>. Les tests sont réalisés dans des plaques à 96 puits, chacun contenant 10 µL de la solution aqueuse à tester et 190 µL d'une suspension de parasites (7.10<sup>4</sup> parasites/mL). La suramine est utilisée comme référence. Après 3 jours d'incubation à 37°C, la quantité de parasites est mesurée après addition dans chaque puits de 50 µL de résazurine (ou Alamar Blue). Après une incubation de 24h à 37°C, la fluorescence est mesurée ( $\lambda_{excitation}$  550 nm,  $\lambda_{émission}$  590 nm) (Raz, 1997). Les résultats sont exprimés en % de réduction de la parasitémie par rapport au contrôle (Cos, 2006; Cretton, 2014).

#### **IV.A.3.2.5. Activité cytotoxique sur MRC-5**

Les différentes fractions sont testées sur des fibroblastes humains MRC-5<sub>sv2</sub> maintenus dans un milieu MEM additionné de 200 mM de L-glutamine, 16,5 mM de NaHCO<sub>3</sub> et 5% de sérum foetal inactif. Toutes les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les tests sont réalisés dans des plaques à 96 puits, chacun contenant 10 µL de la solution aqueuse à tester et 190 µL d'un inoculum de MRC-5<sub>sv2</sub> (10<sup>4</sup> cellules/mL). Le tamoxifène est utilisé comme référence. La croissance des cellules est comparée à un contrôle non traité (100% de croissance) et à un milieu-contrôle (0% croissance). Après 3 jours d'incubation à 37°C, la viabilité des cellules est mesurée après addition de 50 µL de résazurine par puits (McMillian, 2002). Après une incubation de 4h à 37°C, la florescence est mesurée ( $\lambda_{\text{ex}}$  550 nm,  $\lambda_{\text{ém}}$  590 nm). Les résultats sont exprimés en % de réduction de la croissance/viabilité par rapport au contrôle (Cos, 2006; Cretton, 2014).

#### **IV.A.3.3. Test effectué à l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie)**

##### **IV.A.3.3.1. Activité antiparasitaire contre *Leishmania infantum***

Les extraits sont testés sur les formes promastigotes de la souche *L. infantum* (MHOM/DZ/2011/LIPA 284/11). L'activité antileishmanienne a été réalisée suivant le protocole proposé par l'Unité de Culture Cellulaire du service Eco-Epidémiologie Parasitaire de l'Institut Pasteur d'Alger. Ainsi, les parasites sont cultivés dans un milieu RPMI-1640 (contenant de la L-glutamine) + 10% SVF. Les solutions des extraits à tester sont préparées dans du DMSO (1%) et dans du MeOH (100%) à 1 mg/mL. Ces solutions sont ensuite diluées pour obtenir différentes concentrations. Les tests sont effectués dans des plaques à 96 puits, chacun contenant 10 µL de la solution à tester et 90 µL d'un inoculum de parasite (2.10<sup>6</sup> parasites/mL) pour cette souche. Ce test préliminaire a été effectué à la concentration de 100 µg/mL pour tous les extraits méthanoliques et aqueux. Après 3 jours d'incubation pour *L. infantum* à 25°C, les cultures infectées sont colorées par ajout de 100 µL/puits d'une solution de bleu de trypan à 0.4% et une incubation de 10 min à température ambiante. Le dénombrement des parasites est effectué à l'aide d'un microscope en utilisant une cellule de Thomas au grossissement 400x.

##### **IV.A.3.3.2. Activité antiparasitaire contre *Leishmania major***

Les extraits sont testés sur les formes promastigotes de la souche *L. major* (MHOM/DZ/2006/LIPA 32/06). L'activité antileishmanienne a été réalisée suivant le même protocole précédent. Après 2 jours d'incubation pour *L. major* à 25°C, les cultures infectées sont colorées par ajout de 100 µL/puits d'une solution de bleu de trypan à 0.4% et une incubation de 10 min à température ambiante. Le dénombrement des parasites est effectué à l'aide d'un microscope en utilisant une cellule de Thomas au grossissement 400x.

#### IV.A.4. Résultats et discussion

Les extraits méthanoliques de *Convolvulus tricolor* ont été envoyés au "Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia" du Brésil afin d'évaluer leur activité antiparasitaire et les résultats sont présentés ci-dessous (**Tableau IV.2**).

**Tableau IV.2.** Résultats de l'activité antiparasitaire des extraits méthanoliques de l'espèce *C. tricolor* (**Fiocruz**).

Plante	Organe(s)	% Anti- <i>T. cruzi</i>	% Anti- <i>L. amazonensis</i>	% Anti- <i>P. falciparum</i>	% Cytotoxicité
<i>Convolvulus tricolor</i>	Tiges + feuilles	NA	NA	58.42	0
	Fleurs	NA	NA	44.17	0
	Ecorces de graines	92.67	99.51	59.2	0
	Graines	NA	NA	89.38	14.6
	Racines	NA	NA	31.09	36.74

NA : non actif

Cette première évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro* des différents extraits testés à une concentration de 100 µg/mL a montré que l'extrait méthanolique des écorces de graines de *C. tricolor* possède une bonne activité réductrice de la charge parasitaire contre les promastigotes de *Leishmania amazonensis* (99.51%) et également vis-à-vis du *Trypanosoma cruzi* (92.62%,  $CI_{50}$  = 28.5 µg/mL) et à priori nullement cytotoxique.

D'autre part, l'extrait méthanolique des graines se distingue par une activité intéressante contre *Plasmodium falciparum* en exhibant un taux de réduction parasitaire de 89.38% avec une cytotoxicité de 14.6%.

Suite à ces résultats les fractions issues de l'EMEG ont été soumises à un second test réalisé au LMPH de l'Université d'Anvers (Belgique). Le **Tableau IV.3** regroupe les résultats *in vitro* des tests antiparasitaires. Les critères d'évaluation des fractions les plus actives sont basés sur les  $CI_{50}$  mesurées et les indices de sélectivité.

##### • Détermination de l' $CI_{50}$

L' $CI_{50}$  (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire ou parasitaire) est déterminée en fonction du % d'inhibition parasitaire de l'échantillon à tester à différentes concentrations.

##### • Indice de sélectivité (IS)

La détermination de la cytotoxicité des échantillons à tester permet aussi d'évaluer leur sélectivité grâce au calcul de l'indice de sélectivité (IS):

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ cytotoxicité}}{CI_{50} \text{ activité antiparasitaire}}$$

### • Critères d'évaluation de l'activité antiparasitaire

Les critères de l'évaluation de l'activité antiparasitaire indiquent que celle-ci est considérée comme positive pour des valeurs de  $CI_{50}$  inférieurs à 100  $\mu\text{g/mL}$  pour les extraits et inférieurs à 25  $\mu\text{M}$  pour les composés purs (Cos, 2006). Dans d'autres travaux, l'activité antiparasitaire est positive pour des valeurs de  $CI_{50}$  variant entre 0.2 et 1  $\mu\text{g/mL}$  et à indices de sélectivité allant de 20 à 100 (Nwaka, 2006)

Les tests antiparasitaires réalisés à Anvers sont considérés comme positifs pour les extraits à  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$  ( $< 5 \mu\text{g/mL}$  pour *T. brucei*) et à indice de sélectivité  $IS \geq 4$  (Al-Musayeib, 2012). Si la valeur de l'IS est supérieure ou égale à 4, l'échantillon est considéré comme ayant une bonne activité sélective sur le parasite. En revanche, si l'IS est inférieur à 4, l'échantillon est plus cytotoxique qu'antiparasitaire.

D'après les résultats du **Tableau IV.3**, la fraction Fr.6 issue de l'extrait méthanolique des écorces de graines est la plus active contre *Plasmodium falciparum* ( $CI_{50} = 7.99 \mu\text{g/mL}$ ) et *Trypasonoma cruzi* (8.49  $\mu\text{g/mL}$ ). Les tests de cytotoxicité correspondant à cette fraction révèlent une faible cytotoxicité avec des indices de sélectivité bien acceptables. Nous pouvons supposer que l'activité est due au composé majoritaire quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucoopyranoside (**III.5.3**). L'activité antiparasitaire des flavonoïdes di-O-glycosylés en position 3 a déjà été reportée dans la littérature (Muzitano, 2006).

Cependant, nous observons une diminution de l'inhibition contre *Plasmodium falciparum* et *Trypasonoma cruzi* pour la fraction Fr.3 dans laquelle le composé majoritaire est l'isorhamnétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactoside (**III.5.12**). Ceci s'explique par la substitution de l'hydroxyle en 3' du noyau B par le groupement méthoxyle ce qui entraîne une réduction significative de l'activité antiparasitaire (Tasdemir, 2006).

Pour les fractions Fr.2, Fr.4 et Fr.5 qui contiennent comme composés majoritaires des flavonols monoglycosylés en positions 3, leurs activités sont masquées par leur forte cytotoxicité. Citons en particulier le composé kaempférol-3-O- $\beta$ -D-(6''-acétyl)-galactoside (**III.5.7**) qui a des indices de sélectivités  $SI < 1$ .

Selon la littérature, les acides caféoylquiniques exhibent une très faible activité antiparasitaire (Grael, 2005). Nos résultats sont en accord avec ces données. Ainsi les fractions Fr.7 et Fr.8 qui renferment l'acide 5-O-[E]-caféoylquinique (**III.3.1**) et l'acide 4,5-di-O-[E]-caféoylquinique (**III.3.3**) sont bien plus cytotoxiques qu'antiparasitaires.

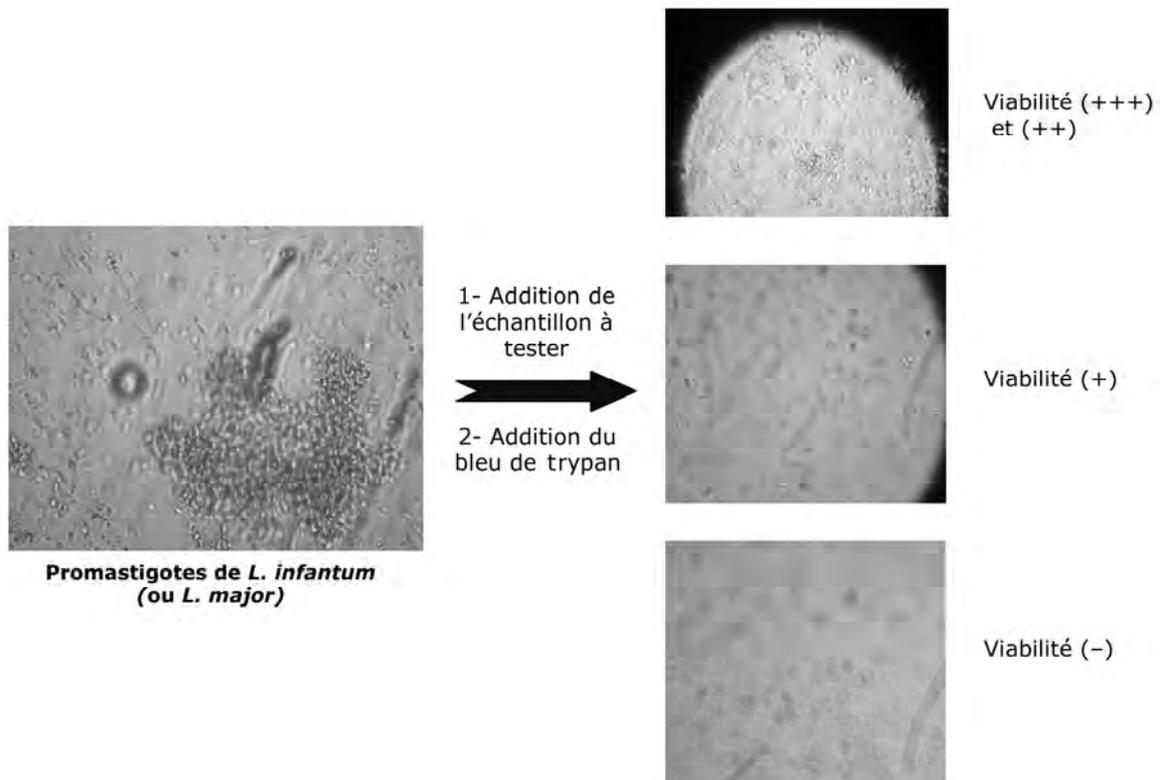
La fraction Fr.1 possède la coumarine scopolétine (**III.4.2**) comme composé majoritaire. Elle se présente comme étant la moins active sauf pour l'inhibition du *trypasonoma cruzi* ( $IC_{50} = 12.32 \mu\text{g/mL}$ ). Cette molécule a déjà été reportée comme inhibitrice de la charge parasitaire *in vitro* de *Leishmania donovani* (Mogana, 2014) et de *Trypasonoma brucei brucei* (Rachid, 2014).

**Tableau IV.3.** Résultats de l'activité antiparasitaire de l'extrait méthanolique des écorces de graines de *C. tricolor* (Anvers).

Plante	Extrait/ fractions	Composés majoritaires	CI-50 (µg/ml)					IS				
			<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i>	<i>T. brucei</i>	Pf-K1	MRC-5	<i>T. cru.</i>	<i>L. inf.</i>	<i>T. br.</i>	Pf-K1	
<i>Convolvulus tricolor</i> (EMEG)	EMEG		12,32	10,36	10,89	10,62	11,14	0,9	1	1	1	
	E(Fr.1)	- Scopolétine	12,32	>32	32,00	18,81	>32	2,6	1	1	1,7	
	H(Fr.2)	- Ka-3-O-ac-gal	13,03	10,36	10,49	11,67	9,01	0,7	0,9	0,8	0,4	
	J(Fr.3)	- Iso-3-O-rob	12,60	>10,36	10,49	9,85	>32	2,5	3,1	3,1	3,2	
	L(Fr.4)	- Quer-3-O-gal	11,58	10,36	10,75	7,90	10,21	0,9	1	1	1,3	
	M(Fr.5)	- Iso-3-O-gal	12,40	10,36	10,62	8,31	16,97	1,4	1,6	1,6	2	
	P(Fr.6)	- Rutine	8,49	>10,36	11,56	7,99	>32	3,8	3,1	2,8	4	
	R(Fr.7)	- Ac 4,5-di-O- caf quin	10,55	10,36	12,66	9,99	9,63	0,9	0,9	0,1	1	
U(Fr.8)	- Ac 4,5-di-O- caf quin - Ac 5-O-caf quin	10,90	10,36	12,16	10,49	9,21	0,7	0,7	0,6	0,3		
<b>Références</b>												
Benznidazole			1,70									
Miltéfosine				6,17								
Suramine					0,02							
Artéméthér						0,02						
Tamoxifène							10,4					

IS: indice de sélectivité; EMEG : extrait méthanolique des écorces de graines; Scopolétine (III.4.2); Ka-3-O-ac-gal : kaempférol-3-O-β-D-(6"-acétyl)-galactoside (III.5.7); Iso-3-O-rob : isorhamnétine-3-O-α-L-rhamnosyl (1-6)-β-D-galactoside (III.5.12); Quer-3-O-gal : quercétine-3-O-β-D-galactoside (III.5.1); Iso-3-O-gal : isorhamnétine-3-O-β-D-galactoside (III.5.10); rutine: quercétine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1-6)-β-D-glucopyranoside (III.5.3); Ac 4,5-di-O- caf quin: acide 4,5-di-O-caféoylquinique (III.3.3); Ac 5-O-c quin: acide 5-O-caféoylquinique (III.3.1).

Afin d'évaluer l'activité antileishmanienne des deux plantes étudiées sur des souches algériennes, différents extraits issus de ces plantes ont été testés sur les formes promastigotes de *L. infantum* et *L. major* par le service Eco-Epidémiologie Parasitaire de l'Institut Pasteur d'Alger. Les résultats sont enregistrés à la concentration de 100 µg/mL pour tous les extraits. L'estimation de la viabilité des leishmanies a été faite par comptage sur une cellule de Thomas en utilisant un microscope (**Fig.IV.17**).



**Figure IV.17.** Estimation de la viabilité des promastigotes de *L. infantum* (et *L. major*) en présence d'un extrait à tester (Institut Pasteur d'Alger, juin 2014).

L'ensemble des résultats de l'activité antileishmanienne sont rassemblés dans le **Tableau IV.4**. On remarque que l'extrait méthanolique des graines de *C. tricolor* est le plus inhibiteur de la charge parasitaire, spécialement vis-à-vis des promastigotes de *L. infantum*, puis à un degré moindre envers ceux du *L. major*. Les extraits méthanoliques des fleurs et des écorces de graines de cette plante exhibent des activités assez intéressantes envers *L. infantum*. Ces tests préliminaires effectués sur des souches algériennes nous ont permis de confirmer l'activité antiparasitaire des extraits méthanoliques obtenus des graines et des écorces de graines de *C. tricolor*. Pour cette même plante, on a aussi découvert une activité potentielle de l'extrait méthanolique des fleurs. On observe un bon résultat concernant *G. quadriflora* dont l'extrait alcaloïdique des parties aériennes, riche en alcaloïdes de types quinolizidiniques et pipéridiniques, est potentiellement actif envers *L. major*. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui accordent aux alcaloïdes diverses activités antiparasitaires (Schmidt, 2012).

**Tableau IV.4.** Résultats de l'activité antileishmanienne des différents extraits issus de *C. tricolor* et *G. quadriflora* (Alger).

Plante	Organe(s)/Extrait	Viabilité <i>L. major</i>		Viabilité <i>L. infantum</i>		
		MeOH (100 µg/mL)	DMSO (1%) (100 µg/mL)	MeOH (100 µg/mL)	DMSO (1%) (100 µg/mL)	
<i>Convolvulus tricolor</i>	1	Tiges + feuilles (Me)	++	++	+++	+++
	2	Fleurs (Me)	++	+++	+	+++
	3	Racines (Me)	+++	+++	++	++
	4	Graines (Me)	+	+	-	-
	5	Ec. graines (Me)	+++	+++	+	++
<i>Genista quadriflora</i>	6	Fleurs (Me)	++	+++	++	++
	7	Tiges + feuilles (Me)	++	++	++	+++
	8	Racines (Me)	++	+++	++	++
	9	Racines (alc.)	++	++	++	+++
	10	Parties aériennes (alc.)	+	++	++	++

(+++): viabilité ≥ 70%; (++): viabilité de 40 à 60%; (+): viabilité < 30%; (-): que des cellules mortes; Ec. graines: écorces de graines; Me: extrait méthanolique; alc.: extrait alcaloïdique.

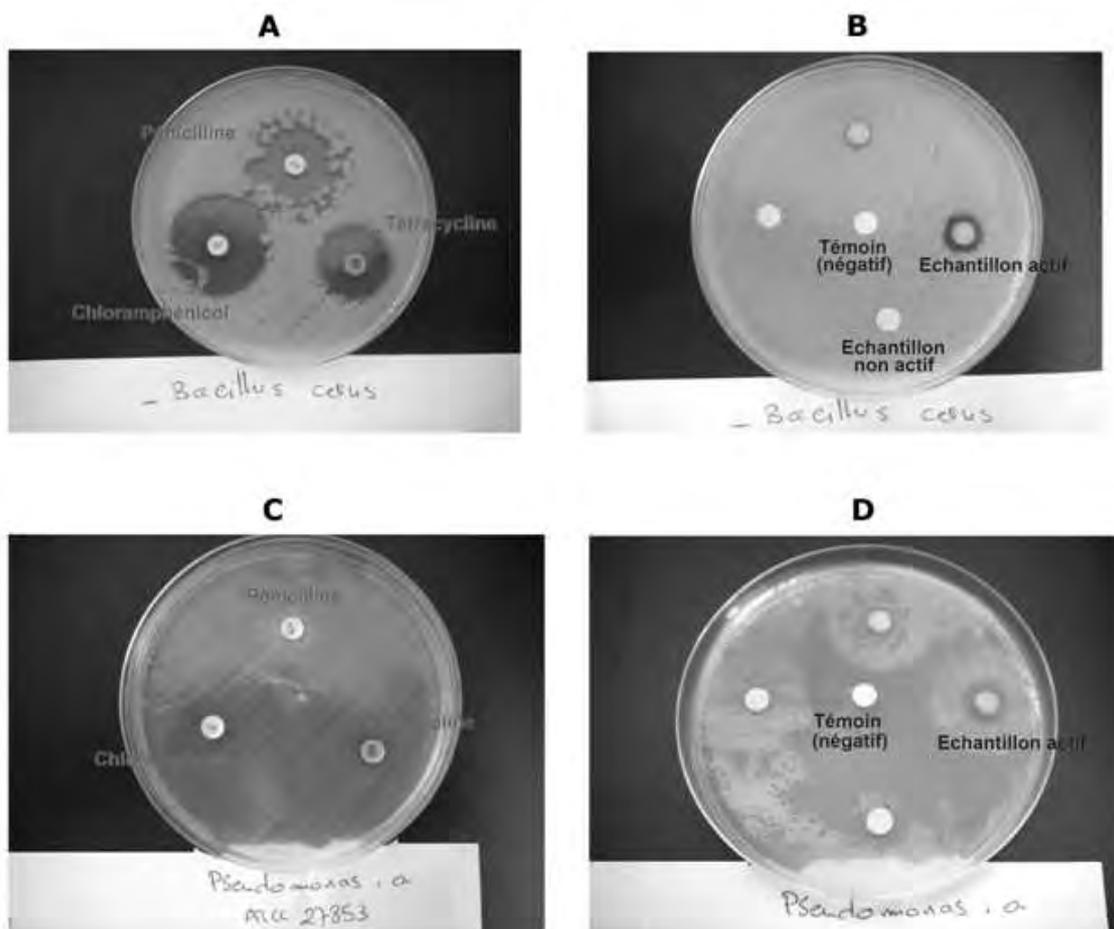
Cette étude représente le premier travail réalisé sur l'activité antiparasitaire, *in vitro*, des extraits des deux plantes algériennes *C. tricolor* (Convolvulaceae) et *G. quadriflora* (Fabaceae). Il est à noter que peu de travaux ont été reportés dans le genre *Convolvulus*, cependant une étude menée sur *C. arvensis* a récemment permis de mettre en évidence une activité inhibitrice vis-à-vis des promastigotes de *L. major* (Mahmoudi, 2014). D'autre part, quelques plantes de la famille des Fabaceae ont fait l'objet de tests antileishmaniens, parmi lesquels on cite les travaux réalisés sur une plante du Nigeria, *Desmodium gangeticum* L., dont l'extrait méthanolique est actif à une concentration de 50 µg/mL contre la forme viscérale de la leishmaniose causée par *L. donovani* (Iwu, 1992). De même, l'extrait éthanolique d'une plante indienne, *Crotalaria barbata* R. Grah., son exhibe une activité antiparasitaire contre cette même espèce de leishmania (Singha, 1992).

Les résultats préliminaires des tests de l'activité antiparasitaire effectués au cours de notre travail, sont bien prometteurs. Plusieurs extraits exhibent des valeurs d'CI<sub>50</sub> ≤ 10 µg/mL indiquant, en générale, un bon potentiel d'activité antiparasitaire. L'activité de ces extraits peut être due à un unique composé ou à la synergie de plusieurs composés. L'activité peut être également due à des composés minoritaires présents dans les extraits et qui n'ont pas encore été identifiés. Par conséquent, un fractionnement bioguidé de tous les extraits nous permettra d'identifier les principes actifs.

## IV.B. Activité antibactérienne et activité antifongique

### IV.B.1. Protocole expérimental de l'activité antibactérienne réalisé au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications (LGMA), Bipôle, Université Constantine1

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été effectuée sur des bactéries obtenues du Laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Constantine. Il s'agit de bactéries standards provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC), Gram (-) (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), Gram (+) (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et d'autres d'origine clinique (*Proteus mirabilis* et *Bacillus cereus*). Cette activité a été réalisée par la méthode de diffusion sur minidisques en papier. Pour chaque bactérie test, un inoculum est préparé à partir d'une culture de 24 heures. La densité cellulaire de cet inoculum est ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile afin d'obtenir une absorbance de 0.1 à 0.2 à 620 nm (Cavalla, 1994). Un ensemencement dense par écouvillon est réalisé par stries serrées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton, et cela pour chaque microorganisme test mis en suspension à  $10^6$  CFU/mL (Isu, 2002).



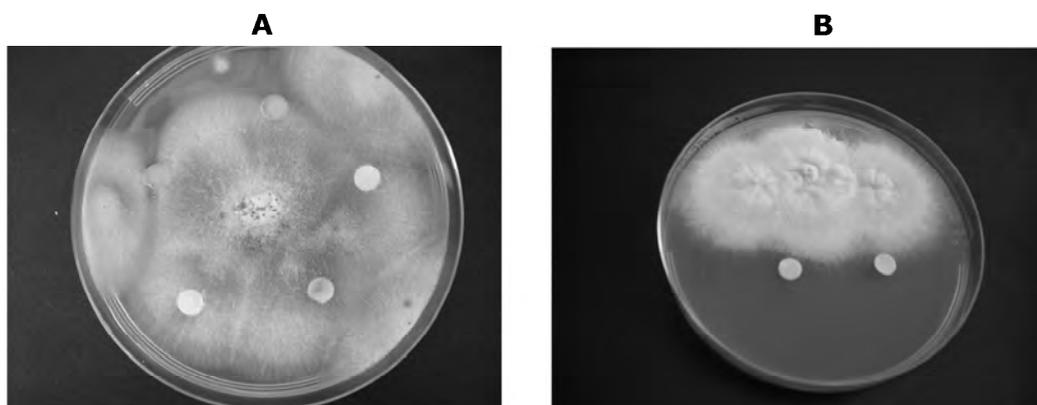
**Figure IV.18.** Activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur minidisques (LGMA-Constantine1, mai et octobre 2014).

**A,B:** Activités sur une bactérie à Gram(+); **C,D:** Activités sur une bactérie à Gram(-).

Des solutions stock des échantillons à tester sont préparées en dissolvant 20 mg dans 1 mL de méthanol. Des disques stériles, de 5 mm de diamètre découpés à partir d'une feuille de papier Whatman N°4, sont imprégnés par 20 µL de la solution à tester à 20, 10, et 5 mg/mL. Parallèlement, des disques jouant le rôle de témoins négatifs reçoivent 20 µL du solvant utilisé. Les antibiotiques chloramphénicol (30 µg/disque), tétracycline (30 µg/disque) et pénicilline (10 µg/disque), sont utilisés comme contrôles positifs. Avant incubation à la température optimale de croissance de chaque souche test, les boîtes de Pétri sont placées dans un réfrigérateur à + 4°C pendant 2 heures afin de permettre une pré-diffusion des substances actives (Tortorano, 1979). Ces boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne se traduit par la formation d'une zone claire autour du disque (**Fig.IV.18**). Les résultats sont enregistrés en mesurant les diamètres des zones d'inhibition (Rahalison, 1991).

#### **IV.B.2. Protocole expérimental de l'activité antifongique réalisé au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications LGMA, Bipôle, Université Constantine1**

L'activité antifongique est également évaluée par la méthode de diffusion sur minidisques en papier (Ouhdouch, 2001). Quatre souches de champignons tests sont obtenues du Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications de l'Université Constantine1 (*Aspergillus niger* CIP 1431, *Fusarium oxysporum* CIP 625.72, *Trichopyton rubrum* CIP 2043.92 et *Alternaria sp.*). Un ensemencement dense par écouvillon est réalisé par stries serrées sur des boîtes de Pétri pour chaque champignon mis en suspension à 10<sup>5</sup> CFU/mL. Des solutions stock des échantillons à tester sont préparées en dissolvant 20 mg dans 1 mL de solvant. Des disques stériles de 5 mm de diamètre découpés à partir d'une feuille de papier Whatman N°4 sont imprégnés par 20 µL de la solution à tester à 20, 10, et 5 mg/mL. Des disques jouant le rôle de témoins négatifs reçoivent 20 µL du solvant utilisé. Avant incubation à la température optimale de croissance de chaque souche test, les boîtes de Pétri contenant le milieu Sabourand sont placées dans un réfrigérateur à + 4°C pendant 2 heures afin de permettre une pré-diffusion des substances actives (Tortorano, 1979). Ces boîtes sont incubées à 28°C. Après trois jours, une zone d'inhibition se développe autour du disque (**Fig.IV.19**) pour les échantillons testés possédant une activité (Rahalison, 1991; Hwang, 2001).



**FigureIV.19.** Activité antifongique par la méthode de diffusion sur minidisques (LGMA-Constantine1, juillet 2014).

**A:** test négatif; **B:** test positif pour quelques échantillons.

### IV.B.3. Résultats et discussion

Les résultats des inhibitions antibactériennes et antifongiques produites par les différents extraits testés figurent dans le **Tableau IV.5**. Ces activités sont exprimées par mesure du diamètre (D) des zones d'inhibition selon trois niveaux: résistant (D = 5 mm), intermédiaire (5 mm < D ≤ 13 mm), sensible (D > 13 mm) (Billerberck, 2002).

*G. quadriflora* est principalement riche en alcaloïdes de type quinolizidinique et pipéridinique dont certains ont pu être identifiés au cours de ce travail (cf. III.1). Le test d'activité antimicrobienne des extraits alcaloïdiques issus des parties aériennes (1) et des racines (2) (**Tableau IV.5**) montrent des inhibitions plutôt modérées vis-à-vis des bactéries Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Proteus mirabilis*). Selon la littérature, des activités antibactériennes ont déjà été signalées dans les espèces *G. vurali* et *G. sandrasica* contre les bactéries Gram (+) (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) (Erdemoglu, 2009), (Küçükboyaci, 2012).

Une bactérie Gram (-), *Pseudomonas aeruginosa* présente en particulier une sensibilité pour l'extrait alcaloïdique issu des parties aériennes à la concentration de 20 mg/mL (D = 15 mm). Sachant que les infections à *P. aeruginosa* sont toujours difficiles à traiter en raison des résistances de ce germe aux antibiotiques utilisés (chloramphénicol, tétracycline, et pénicilline) (**Fig.IV.18.C**), ceci rend notre résultat important et mérite une investigation plus poussée afin d'élucider les molécules actives contre cette bactérie Gram (-).

D'autre part, on constate une activité antifongique modérée des extraits alcaloïdiques (1) et (2) vis-à-vis des champignons *Fusarium oxysporum* et *Trichopyton rubrum*. Une activité antifongique a été déjà reportée pour l'espèce *G. vurali* contre *Candida krusei* (Erdemoglu, 2009).

Pour l'huile essentielle (3) issue de *G. quadriflora*, nous observons que les bactéries Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Proteus mirabilis* sont sensibles à cet extrait. Ceci rejoint ce qui a été publié dans le genre concernant l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *G. microcephala*, *G. saharae*, ainsi que *G. ulicina* et *G. vepres* (Lograda, 2009; 2010; 2012). En plus, une activité antifongique de l'huile essentielle de *G. quadriflora* est constatée contre le *Fusarium oxysporum* (D = 11 mm).

Les extraits méthanoliques des parties aériennes (4) et des racines (5), essentiellement riches en composés flavoniques, sont modérément actifs vis-à-vis des deux bactéries Gram (+) *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Peu de travaux reportent une activité antibactérienne dans le genre *Genista*, mis à part l'activité signalée des flavonoïdes contenus dans les extraits issus des graines de *G. tinctoria* (Boullard, 2001).

Chez *Convolvulus tricolor*, ce sont seulement les extraits méthanoliques des fleurs (7) et des écorces de graines (10) qui présentent une activité antibactérienne très modérée contre *Bacillus cereus*. Dans le même genre, quelques travaux ont déjà signalés des activités antifongiques et antibactériennes d'extraits alcooliques des fleurs de *C. arvensis* (Awaad, 2006). D'autre part, *C. microphyllus* a également été reportée comme ayant une activité antifongique (Kapoor, 1981).

**Tableau IV.5.** Résultats de l'activité antibactérienne et de l'activité antifongique de différents extraits issus de *G. quadriflora* et *C. tricolor* (**Constantine**).

Plante	Echantillons et témoins	[C]	Diamètre de la zone d'inhibition en mm*											
			Bactéries Gram (+)			Bactéries Gram (-)			Champignons					
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichopyton rubrum</i>		
<i>Genista quadriflora</i>	1	Extrait alcaloïdique (parties aériennes)	C C/2 C/4	11 6 -	7 - -	6 - -	15 11 7	- - -	- - -	- - -	- - -	8 - -	7 - -	
	2	Extrait alcaloïdique (racines)	C C/2 C/4	8 - -	11 7 -	6 - -	10 6 -	8 - -	- - -	- - -	- - -	7 - -	7 - -	
	3	Huile essentielle	C C/2 C/4	9 7 6	10 8 6	14 9 7	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	11 8 6	- - -	
	4	Extrait MeOH (parties aériennes)	C C/2 C/4	8 6 -	9 6 -	- - -	- - -	- - -	- - -	NT NT NT	NT NT NT	NT NT NT	NT NT NT	
	5	Extrait MeOH (racines)	C C/2 C/4	11 9 7	10 8 7	- - -	- - -	- - -	- - -	NT NT NT	NT NT NT	NT NT NT	NT NT NT	
<i>Convolvulus tricolor</i>	6	Extrait MeOH (tiges + feuilles)	C	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT
	7	Extrait MeOH (fleurs)	C C/2 C/4	- - -	7 - -	- - -	- - -	- - -	- - -	NT NT NT	NT NT NT	NT NT NT	NT NT NT	
	8	Extrait MeOH (racines)	C	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT
	9	Extrait MeOH (graines)	C	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT
	10	Extrait MeOH (écorces de graines)	C C/2 C/4	- - -	8 - -	- - -	- - -	- - -	- - -	NT NT NT	NT NT NT	NT NT NT	NT NT NT	
	Chloramphénicol (30 µg/disque)		33	30	-	-	-	-	14	-	-	-	-	
	Tétracycline (30 µg/disque)		25	22	-	-	-	-	7	-	-	-	-	
	Pénicilline (10 µg/disque)		24	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

\* Zone d'inhibition (diamètre du disque compris); C: 20 mg/mL ; - : pas d'inhibition; NT : non testé.

En conclusion, on peut dire que les tests d'activité antifongique des extraits des plantes étudiées sont en accord avec ceux de la littérature liée aux genres *Genista* et *Convolvulus*. En plus, nos résultats sont encourageants et méritent une étude plus spécifique des extraits alcaloïdiques et de l'huile essentielle de *G. quadriflora* qui se sont révélés être les plus actifs.

## IV.C. Activité antiradicalaire sur le DPPH

L'oxydation est générée par les radicaux libres, espèces chimiques neutres ou chargés instables qui ne cherchent qu'à récupérer un électron dans leur entourage afin de retrouver un état stable. Parmi les radicaux libres auxquels l'organisme humain est exposé, on cite les espèces réactives de l'oxygène (ERO) tel que le radical anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ), le radical perhydroxyle ( $HO_2^{\cdot}$ ), le radical peroxyde ( $ROO^{\cdot}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La production de ces radicaux est généralement équilibrée par leur élimination à vitesses égales par l'action des systèmes enzymatiques et des antioxydants. Cependant, sous l'action de facteurs déclenchant externes (Radiations UV, pollution, infection parasitaire, etc.). La rupture de l'équilibre production-élimination des (ERO) a été corrélée aux différentes pathologies dégénératives tels que le diabète, l'arthrose, le cancer, l'ulcère gastrique, la neuro-dégénération, la maladie d'Alzheimer (Nelson, 2004; Guidi, 2006). Ainsi, les recherches s'accroissent afin de trouver des substances antioxydantes naturelles à partir de végétaux afin de remplacer les antioxydants synthétiques.

Il existe deux types d'antioxydants:

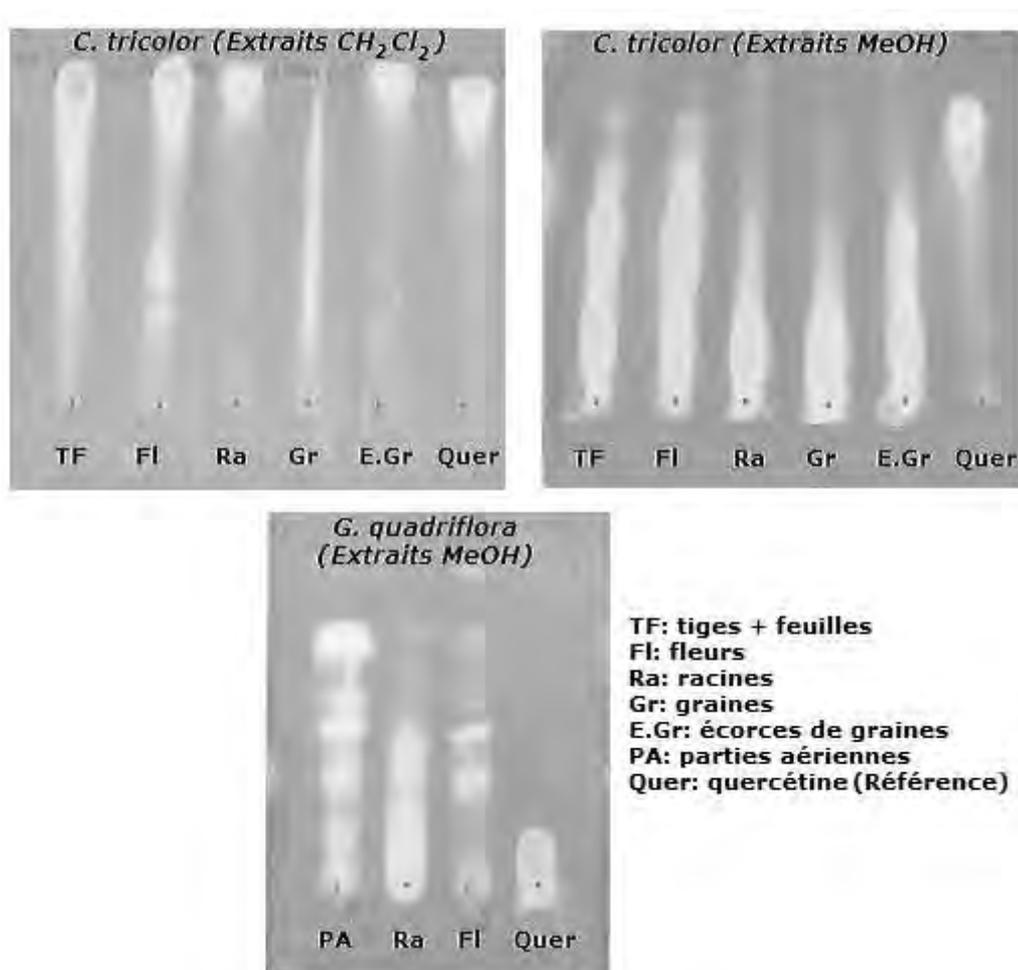
- Les antioxydants primaires qui permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique:  
 $AH + R^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + RH$  (AH est une molécule antioxydante si le radical  $A^{\cdot}$  peut être plus stable).
- Les antioxydants secondaires (préventifs) qui assurent l'inhibition de la production des radicaux.

### IV.C.1. Protocole expérimental de l'activité antiradicalaire réalisé au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie (LPP), Université de Genève, Suisse

L'activité antioxydante des extraits et des composés purs a été évaluée en appliquant la méthode bioautographique selon le protocole usuel suivi au LPP (Cuendet, 1997). Pour détecter l'activité antiradicalaire, on a utilisé le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable et violet en solution présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole suivi repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. Le test a été effectué sur plaques CCM (de gel de silice GF<sub>254</sub> en aluminium) en vaporisant une solution de DPPH en solution méthanolique à 2 mg/mL. Les échantillons 100 µg pour les extraits et 10 µg pour les composés purs sont déposés sur les plaques puis élués dans des systèmes appropriés. Après un temps de réaction optimal de 30 min, les plaques sont révélées au DPPH. Ainsi, les échantillons à propriété antiradicalaire sont détectés par l'apparition de zones jaunes sur fond violet. Le 2,6-di(*tert*-butyl)-4-méthylphénol (butylhydroxytoluène, BHT), un antioxydant de synthèse utilisé dans l'industrie alimentaire, ou la quercétine sont utilisés comme produits de référence.

### IV.C.2. Résultats et discussion

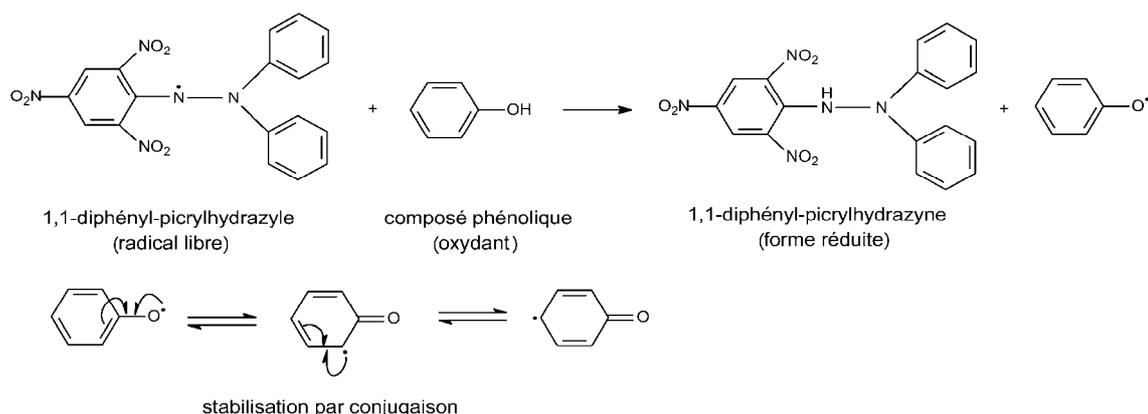
Après un test au DPPH effectués sur les extraits et les composés purs isolés des deux plantes étudiées, nos résultats révèlent de très bons potentiels antiradicalaires (**Fig.IV.20**).



**Figure IV.20.** Activité antiradicalaire (DPPH) par la méthode bioautographique sur CCM des extraits MeOH et  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  des plantes *Convolvulus tricolor* et *Genista quadriflora*. (LPP, Genève 2008 et 2009)

Au cours de ce travail, les deux plantes *C. tricolor* et *G. quadriflora* se sont révélées riches en composés phénoliques (flavonoïdes, acides caféoylquiniques, et coumarines), qui sont très actifs grâce au grand nombre de résidus hydroxylés. Souvent, les flavonoïdes avec des hydroxylations en positions C-3' et C-4' possèdent une activité antioxydante (Pratt, 1990). Ainsi le test au DPPH est un bon choix pour une évaluation préliminaire de l'efficacité des antioxydants contenus dans ces plantes. Selon le schéma réactionnel ci-après (**Fig.IV.21**), les composés phénoliques sont des antioxydants du premier type capables de stopper la réaction autocatalytique en réduisant le radical DPPH et en formant un radical plus stable par conjugaison (Rolland, 2004).

Les résultats obtenus rejoignent les publications déjà reportées dans le genre. Ainsi dans le genre *Convolvulus*, on cite l'activité antioxydante détectée dans *C. alanthaoieds* L. (Tawaha, 2007) et *C. pluricaulis* (Vijayakumar, 2005). Également, cette activité a aussi été signalée dans le genre *Genista*, en particulier dans *G. sessilifolia* et *G. tinctoria* (Rigano, 2009) ainsi que dans *G. sandrasica* et *G. vuralii* (Orhan, 2011).



**Figure IV.21.** Réaction de réduction du radical DPPH par un composé phénolique.

## IV.D. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

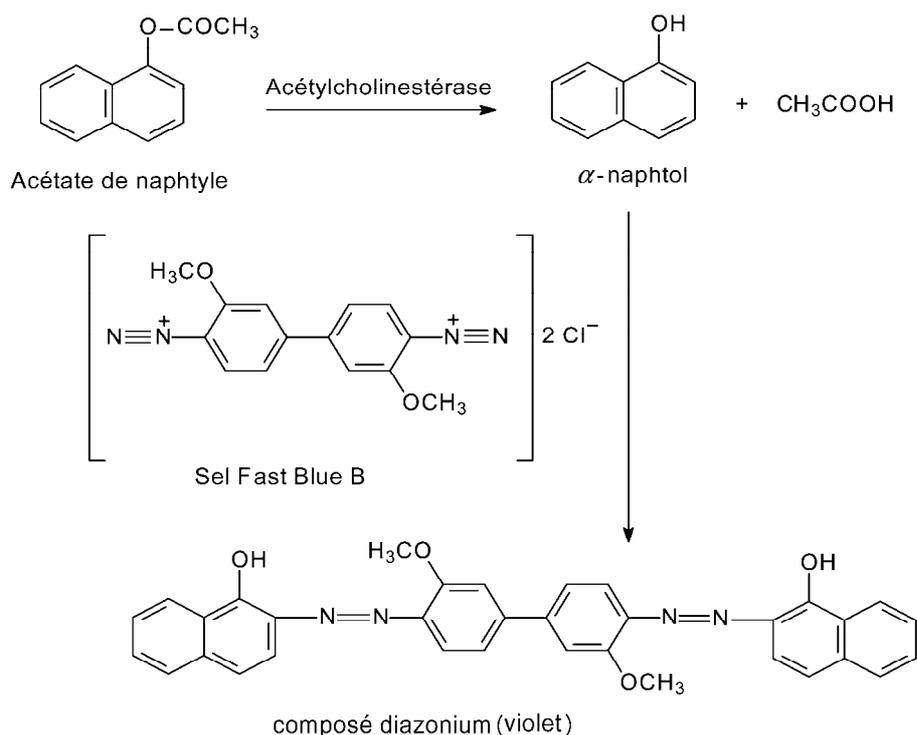
### IV.D.1. Maladie d'Alzheimer

Cette maladie se caractérise par une démence dégénérative avec atrophie du cerveau. Son évolution est progressive, touchant les fonctions intellectuelles telles que l'orientation, la mémoire, la motricité et la capacité d'acquérir de nouvelles connaissances (Alzheimer, 1911). Le diagnostic de cette maladie a révélé des lésions caractéristiques, au niveau du cerveau, qui sont les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire (Alzheimer, 1897). Ces lésions provoquent la mort des neurones dans la partie basale du cerveau antérieur où se trouvent les principales sources d'innervation cholinergique (Schiebs, 2006), ce qui provoque un déficit en acétylcholine chez les personnes atteintes par cette maladie. L'acétylcholine est un neurotransmetteur impliqué dans plusieurs processus intellectuels.

L'acétylcholinestérase est une enzyme présente dans le tissu neuronal permettant la régulation de l'influx nerveux en dégradant l'acétylcholine. Chez les personnes atteintes de cette maladie, le taux de l'acétylcholine est particulièrement bas. L'une des solutions pour augmenter le taux de l'acétylcholine consiste alors à diminuer sa dégradation (hydrolyse) en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Urbain, 2007).

### IV.D.2. Protocole expérimental de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase réalisé au Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Genève, Suisse

L'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE) a été testée par bioautographie sur couche mince selon le protocole proposé par Marston (2002). Ce test enzymatique consiste en une hydrolyse de l'acétate de naphthyle en  $\alpha$ -naphthol par l'AChE. L' $\alpha$ -naphthol réagit avec le sel de Fast Blue B en formant un composé violet (**Fig.IV.22**). La présence d'inhibiteurs va empêcher l'enzyme d'effectuer l'hydrolyse, ainsi il n'y aura pas de coloration avec le sel et les composés à action inhibitrice sont alors détectés sous la forme de taches incolores.



**Figure IV.22.** Réaction colorimétrique en présence du sel Fast Blue B.

Les extraits (10  $\mu\text{g}$ ) et les composés (1  $\mu\text{g}$ ) ont été déposés sur des plaques de gel de silice 60 F254 sur feuilles d'aluminium (Merck). Les échantillons ont été élués avec un système de solvant adéquat. Les plaques préalablement séchées soigneusement, ont été pulvérisées avec une solution d'AChE dans un tampon Tris-HCl 0.05 M à pH 7.8 contenant de l'albumine de sérum de bovin pour stabiliser l'enzyme à 1000 unités/150 mL. Après 10 à 20 min d'incubation à 37°C dans une atmosphère humide, les plaques ont été giclées avec un mélange composé d'une solution éthanolique d'acétate de naphthyle à 2.5 mg/mL et d'une solution aqueuse de sel de Fast Blue B à 2.5 mg/mL dans un rapport 1:4 (V/V). Une coloration violette apparaît sur la plaque après 3 à 4 min sauf dans la région contenant un inhibiteur qui se présente sous forme d'une tache blanche. Une solution d'huperzine A à 1 mg/mL a été utilisée comme substance de référence.

### IV.D.3. Résultats

Cette activité a été testée seulement avec les extraits méthanoliques de *Convolvulus tricolor*. Aucune inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase n'a été observée avec les échantillons testés.

# *Conclusion et perspectives*

Le présent travail a permis l'étude du profil alcaloïdique de l'espèce endémique ***G. quadriflora*** par GC/EIMS aboutissant à l'identification de 20 composés ayant une grande diversité structurale. Les indices de rétention calculés à partir de l'équation de Van Den Dool et Kratz, les fragmentations caractéristiques ainsi que les références bibliographiques ont pu confirmer les structures alcaloïdiques proposées. Ainsi, on a identifié les alcaloïdes quinolizidiniques (QAs) suivants:

- Deux composés bicycliques: la déhydroépilupinine\* (**III.1.1**) et la lusitanine (**III.1.2**).
- Quatre composés tricycliques : la *N*-méthyltétrahydrocytisine\* (**III.1.3**), la tétrahydrocytisine\* (**III.1.4**), la rhombifoline (**III.1.5**) et la pohakuline\* (**III.1.6**).
- Sept composés tétracycliques : la  $\beta$ -isospartéine, (**III.1.7**), la 10 $\alpha$ -hydroxyméthylspartéine (**III.1.8**), l'aphyllidine\* (**III.1.9**), l'anagryne (**III.1.10**), la baptifoline (**III.1.11**), la spartéine (**III.1.19**) et l' $\alpha$ -isospartéine (**III.1.20**).

Les alcaloïdes pipéridiniques dérivant de la lysine, qui est le même précurseur biosynthétique des QAs sont également présents dans cette plante, ils sont représentés par cinq composés:

- La *N*-méthylpelletière\* (**III.1.12**)
- La pelletière\* (**III.1.13**)
- La *N*-méthylanabasine\* (**III.1.14**)
- L'hystrine (**III.1.15**)
- La *N*-méthylammodendrine (**III.1.16**)

Cette investigation nous a également permis d'aboutir à l'intéressante identification de la nicotine\* (**III.1.17**), un alcaloïde peu commun dans le genre *Genista* ainsi qu'un dérivé de l'acide nicotinique: le nicotinate de méthyle\* (**III.1.18**).

Les alcaloïdes quinolizidiniques qui sont des marqueurs chimio-taxonomiques significatifs pour le genre, ont été identifiés comme les principaux composés alcaloïdiques. En plus, les composés indiqués par (\*) sont nouvellement identifiés dans le genre.

D'autre part, au terme de notre investigation sur la composition chimique de l'huile essentielle de ***G. quadriflora***, 222 composés ont été identifiés représentant 77.77 % de la composition globale de l'huile essentielle extraite. Parmi ces composés, 197 sont signalés pour la première fois dans le genre. La quantification à partir du chromatogramme réalisé sur un appareil équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (CPG/FID) nous a permis de déduire que cette huile est principalement composée de terpènes (66.85%) avec une prédominance des sesquiterpènes (65.18%); tandis que les esters, alcools, cétones, aldéhydes, acides et hydrocarbures sont également présents mais en plus faibles proportions.

Au cours du présent travail, l'application des techniques combinées HPLC/UV et HPLC/MS a permis de réunir de nombreuses informations utiles sur la composition des extraits avant de procéder à leurs fractionnements et ainsi gagner du temps. Ainsi, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires présents dans les différents extraits de *C. tricolor* et *G. quadriflora*. Leur purification a été essentiellement faite par la combinaison de différentes méthodes chromatographiques sur différents supports : chromatographie sur colonne ouverte (CC), chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC), chromatographie liquide haute pression semi-préparative (HPLC-semi-prép.) et chromatographie de partage centrifuge (CPC). A l'issue de ces séparations, nous avons pu identifier 22 composés dont la détermination structurale a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques incluant la chromatographie liquide haute pression/spectroscopie ultraviolette avec un détecteur à barrettes de diodes (HPLC-UV-DAD), la spectroscopie de masse (SM) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN).

La HPLC-UV-DAD nous a orientés vers la nature des produits à identifier tout en permettant d'avoir une estimation de la pureté de chaque métabolite.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) et la GC/EI-MS nous ont permis d'effectuer le dosage et l'identification des constituants volatils.

En spectrométrie de masse, les techniques telles que l'*electrospray* ESI/MS, la masse haute résolution HRMS ou l'analyseur à temps de vol HR-MS/TOF ont rendu possible la détermination avec grande précision de la masse moléculaire ainsi que la formule brute des composés étudiés. D'autre part, la spectrométrie de masse haute résolution à plusieurs étapes MS<sup>n</sup> a permis l'interprétation des spectres en donnant une relation de filiation de deux ions, précurseur et produit.

Pour la spectroscopie RMN, les techniques monodimensionnelles (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT) et bidimensionnelles (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY) auxquelles nous avons fait appel, nous ont apportés les renseignements structuraux nécessaires pour réaliser l'identification définitive de la plupart des métabolites secondaires isolés.

L'étude de *C. tricolor* a permis d'isoler 16 composés des extraits méthanoliques issus des différentes parties de la plante. Ces composés sont tous reportés pour la première fois dans cette plante.

Onze composés nouveaux pour le genre *Convolvulus*:

- Acide 3,5-di-O-[E]-cafféoylquinique (**III.3.2**)
- Acide 4,5-di-O-[E]-cafféoylquinique (**III.3.3**)
- Acide gentisique-5-O-β-glucoside (**III.4.1**)
- Quercétine-3-O-α-L-arabinopyranoside (**III.5.2**)
- Quercétine-3-O-β-D-(6"-acétyl)-galactopyranoside (**III.5.4**)
- Kaempférol-3-O-β-D-galactopyranoside (**III.5.5**)
- Kaempférol-3-O-α-L-arabinopyranoside (**III.5.6**)
- Kaempférol-3-O-β-D-(6"-acétyl)-galactopyranoside (**III.5.7**)

- Isorhamnétine-3-O-β-D-galactopyranoside (**III.5.10**)
- Isorhamnétine-3-O-β-D-(6''-acétyl)-galactopyranoside (**III.5.11**)
- Isorhamnétine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1'''→6'')-β-D-galactopyranoside (**III.5.12**)

Cinq composés déjà décrits dans le genre:

- Acide 5-O-[E]-caféoylquinique (**III.3.1**)
- 7-Hydroxy-6-méthoxy-coumarine (scopolétine) (**III.4.2**)
- Quercétine-3-O-β-D-galactopyranoside (**III.5.1**)
- Quercétine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1'''→6'')-β-D-glucopyranoside (**III.5.3**)
- Kaempférol-3-O-α-L-rhamnopyranoside 7-O-β-D-glucopyranoside (**III.5.8**)

De l'extrait méthanolique de *G. quadriflora*, huit composés ont pu être identifiés. Tous ces composés sont reportés pour la première fois pour cette plante endémique.

Un composé nouvellement identifié pour le genre *Genista*:

- Apigénine 6,8-di-C-β-D-glucopyranoside (vicénine-2) (**III.5.15**)

Sept composés déjà décrits dans le genre:

- 3, 5, 7, 4'-Tétrahydroxyflavone (kaempférol) (**III.5.9**)
- 3, 5, 7, 4'-Tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone (isorhamnétine) (**III.5.13**)
- Quercétine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1'''→6'')-β-D-glucopyranoside (**III.5.3**)
- Isorhamnétine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1'''→6'')-β-galactopyranoside (**III.5.12**)
- Apigénine-8-C-β-D-glucopyranoside (vitexine) (**III.5.14**)
- Génistéine-7-O-β-D-glucopyranoside (génistéine) (**III.5.16**)
- 4', 5, 7-Trihydroxyisoflavone (génistéine) (**III.5.17**)

La seconde partie de notre travail a été une évaluation des activités biologiques des différents extraits ainsi que les fractions.

La première activité mesurée a été l'activité leishmanicide. Les tests préliminaires réalisés *in vitro* au Laboratoire de Fiocruz (Brésil) ont montré que l'extrait méthanolique des écorces de graines de *C. tricolor* possédait une bonne activité réductrice de la charge parasitaire envers les promastigotes de *Leishmania amazonensis* (99.51%) et également vis-à-vis de *Trypanosoma cruzi* (92.62%) avec une absence de cytotoxicité. D'autre part, l'extrait méthanolique des graines s'est distingué par une activité intéressante contre *Plasmodium falciparum* en exhibant un taux de réduction parasitaire de 89.38% et une cytotoxicité de 14.6%. Par la suite, les fractions de l'extrait des écorces de graines ont été soumises à une évaluation par la détermination des valeurs CI<sub>50</sub> au niveau du LMPH de l'Université d'Anvers (Belgique).

- La fraction Fr.6 contenant la quercétine-3-O-α-L-rhamnopyranosyl (1→6)-β-D-glucopyranoside (**III.5.3**) comme composé majoritaire, s'est révélée être la plus active contre *Plasmodium falciparum* (CI<sub>50</sub> = 7.99 µg/mL) et *Trypanosoma cruzi* (CI<sub>50</sub> = 8.49 µg/mL). Nos résultats sont en accord avec la littérature reportant une activité antiparasitaire des flavonoïdes di-O-glycosylés en position 3

- D'autre part, nous avons observé une diminution de l'inhibition parasitaire pour la fraction Fr.3 dans laquelle le composé majoritaire est l'isorhamnétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactoside (**III.5.12**). Ceci s'explique par la substitution de l'hydroxyle en 3' du noyau B par le groupement méthoxyle entraînant une réduction de l'activité antiparasitaire.
- Cependant, pour les autres fractions Fr.2, Fr.4 et Fr.5, plus riches en flavonols monoglycosylés en position 3, leurs activités ont été masquées par leur forte cytotoxicité.
- Les Fr.7 et Fr.8 contenant comme composés majoritaires les composés acide 5-O-[E]-caféoylquinique (**III.3.1**), et l'acide 4,5-di-O-[E]-caféoylquinique (**III.3.3**) se sont révélés être bien plus cytotoxiques qu'antiparasitaires.
- La fraction Fr.1 possédant la scopolétine (**III.4.2**) comme composé majoritaire, s'est montrée comme étant la moins active sauf pour l'inhibition de *trypanosoma cruzi* (CI<sub>50</sub> = 12.32  $\mu$ g/mL).

En plus, l'activité antileishmanienne de **C. tricolor** et **G. quadriflora** a été évaluée sur des souches algériennes. Différents extraits issus de ces plantes ont été testés sur les formes promastigotes de *Leishmania infantum* et *L. major* et cela par le service Eco-Epidémiologie Parasitaire de l'Institut Pasteur d'Alger. Ces tests préliminaires ont permis de confirmer l'activité antiparasitaire des extraits méthanoliques obtenus des graines et des écorces de graines de *C. tricolor*. On a également découvert une activité potentielle de l'extrait méthanolique des fleurs de cette plante. En plus, l'extrait alcaloïdique des parties aériennes de *G. quadriflora*, s'est montré comme potentiellement actif envers *L. major*.

En second lieu, on a soumis les différents extraits à des tests relatifs aux activités antibactériennes et antifongiques exprimées par mesure du diamètre des zones d'inhibition selon les protocoles suivis au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications LGMA, Bipôle, Université Constantine1. Au bilan, les résultats obtenus dans la présente étude montrent que:

- Le test d'activité antimicrobienne des extraits alcaloïdiques issus des parties aériennes et des racines aussi bien que les extraits méthanoliques riches particulièrement en molécules flavoniques de **G. quadriflora** montrent des inhibitions plutôt modérées vis-à-vis des bactéries Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Proteus mirabilis*.
- Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* a présenté une sensibilité plus particulière pour l'extrait alcaloïdique issu des parties aériennes de **G. quadriflora** à la concentration de 20 mg/mL (D = 15 mm). Sachant que les infections au *P. aeruginosa* sont toujours difficiles à traiter en raison des résistances de ce germe aux antibiotiques utilisés (chloramphénicol, tétracycline et pénicilline). Le résultat obtenu mériterait une investigation plus poussée afin d'élucider les molécules actives contre cette bactérie Gram (-).
- D'autre part, on a constaté une activité antifongique modérée des extraits alcaloïdiques et méthanoliques de **G. quadriflora** et cela vis-à-vis des champignons *Fusarium oxysporum* et *Trychopyton rubrum*.

- Pour l'huile essentielle extraite de ***G. quadriflora*** (he.Gq), nous avons constaté que les bactéries Gram (+) *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Proteus mirabilis* sont sensibles à l'he.Gq, particulièrement *Proteus mirabilis* (D = 14 mm). En plus, cette huile essentielle a montré une activité antifongique remarquable contre *Fusarium oxysporum* (D = 11 mm).

Pour ***C. tricolor***, c'est exclusivement l'extrait méthanolique des fleurs et celui des écorces de graines qui ont présenté une activité antibactérienne bien que très modérée contre *Bacillus cereus*.

Le troisième test réalisé a été celui de l'activité antioxydante contre le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), des extraits et des composés purs, évaluée par l'application de la méthode bioautographique sur couche mince selon le protocole proposé par le Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Genève. Globalement, nos résultats ont révélé de très bons potentiels antiradicalaires et cela pour tous les échantillons testés.

En quatrième lieu, on a testé les différents extraits méthanoliques de ***C. tricolor*** envers l'enzyme acétylcholinestérase par bioautographie sur couche mince, également selon le protocole élaboré par le Laboratoire de Pharmacognosie et Phytochimie, Genève. Cependant, ce test préliminaire s'est révélé être négatif pour l'ensemble des extraits testés.

En conclusion, cette étude a révélée l'espèce endémique *Genista quadriflora* Munby, comme étant une source d'une grande richesse en composés de types alcaloïdiques, terpéniques, et flavoniques. Parmi les composés caractérisés, les alcaloïdes quinolizidiniques et les molécules isoflavoniques peuvent être considérés comme des bio-marqueurs du genre et nous permettent de confirmer l'appartenance de cette plante au genre *Genista*. D'autre part, beaucoup de molécules alcaloïdiques peu communes comme la pohakuline (**III.1.6**), l'aphyllidine (**III.1.9**), la baptifoline (**III.1.11**), la pelletiérine (**III.1.13**), la *N*-méthylammodendrine (**III.1.16**) ainsi que les diverses molécules terpéniques de l'huile essentielle comme les composés majoritaires salvial-4(14)-èn-1-one (**III.2.115**), germacra-4(15),5,10(14)-trièn-1- $\alpha$ -ol (**III.2.157**), amorpha-4,9-dièn-2-ol (**III.2.159**) et muurolan-4,7-péroxyde (**III.2.178**) peuvent être considérés comme des marqueurs chimio-taxonomiques de l'espèce.

L'originalité de cette étude phytochimique de *Convolvulus tricolor*, réside dans le fait que tous les composés identifiés (flavonoïdes, acides caféoylquiniques, acide phénol et coumarine) n'ont jamais été reportés dans l'espèce. En plus, plusieurs molécules sont également nouvelles pour le genre.

Les différentes activités biologiques testées au cours de ce travail ont aboutit à des résultats prometteurs qui sont en accord avec ceux de la littérature liée aux genres *Genista* et *Convolvulus*.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette contribution phytochimique à l'étude des plantes de la pharmacopée algérienne, nous encouragent à :

- Terminer l'identification structurale des composés originaux obtenus au cours de cette étude en utilisant les techniques modernes hautes résolutions.
- Exploiter la piste des extraits actifs en réalisant des fractionnements bio-guidés afin d'isoler les principes actifs.
- Procéder à une quantification des activités des constituants purs issus des extraits actifs afin de déterminer la relation activité-structure.
- Réaliser des tests *in vivo* afin de confirmer les activités constatées lors de ce travail dans l'ambition de proposer des alternatives thérapeutiques moins coûteuses et peu toxiques.

# *Références bibliographiques*

- Abdel-Halim**, O.B., Abdel-Fatta, H.A., Halaweis, F.T., & Halim, A.F. (2000). Isoflavonoids and Alkaloids from *Spartidium saharae*. *Natural Product Sciences*, 6, 189-192.
- Abdel-Kader**, M.S. (2001). Two pseudoguaianolides from *Convolvulus oleifolius* growing in Egypt. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 113-116.
- Ablajan**, K., Abliz, Z., Shang, X.Y., He, J.M., Zhang, R.P., & Shi, J.G. (2006). Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 41, 352-360.
- Achir**, M., Hammadi, D., Tchicha, B., Guettaï, M., Gasmi, M., Zakour, N., Saber, A., Younes, Y., Khechache, Y., & Adra, D. (2006). Le paludisme en Algérie – Situation – Evolution – Données actuelles. Département Soutien Technique /Service de Parasitologie/Paludisme/INSP Algérie. Institut National de Santé Publique. Ministère de la Santé et de la Réforme Hospitalière.
- Adams**, P.R. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4<sup>th</sup> Ed., Allured Publishing Corporation.
- Adams**, M., Berset, C., Kessler, M., & Hamburger, M. (2009). Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders – A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 343-359.
- Adio**, A.M. (2005). Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from the essential oils of some liverworts (Hepaticae). Dissertation, university of Hamburg.
- Adzet**, T., Batllori, L., & San Martin, R. (1970) *Plantes médicinales et phytothérapie*, tome 4, 21 (1970). *Chemical Abstracts*, 73, 84641.
- Adzet**, T., & Masso, J.L. (1973). *Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier*, 33, 349; *Chemical Abstracts*, 80, 130496 (1974).
- Agelet**, A., & Vallès, J. (2003). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part II. New or very rare uses of previously known medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 211-227.
- Agrawal** P.K. (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo: Elsevier Science Publishers B.V.
- Akiyama**, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., et al. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5592-5595.
- Al-Antaki**, D. (1952). *Tazkarit oli el-albeb*, Elhalaby & Co., Cairo, Vol. 1, p. 19.
- Ali**, M., Siddiqui, N.A., Singh, V., & Mir, S.R. (2004). Chemical constituents of aerial parts of *Convolvulus pluricaulis* Choisy. *Journal of Saudi Chemical Society*, 8(1), 137-144.
- Alibert**, A., Bayle, B., & Berard, B. (1820). *Dictionnaire des sciences médicales, par une société de médecins et de chirurgiens*. C. L. F. Panckoucke, Editeur, Paris, p. 182.
- Alieva**, S.A. (1976). Flavonoids of *Genista transcaucasica*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1, 113-114.
- Al-Musayeib**, N.M., Mothana, R.A., Matheussen, A., Cos, P. & Maes, L. (2012). *In vitro* antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. *Complementary and Alternative Medicine*, 12(49), 1-7.
- Alzheimer**, A. (1897). Beiträge zur pathologischen Anatomie der Hirnrinde und zur anatomischen Grundlage einiger Psychosen. *Monatsschrift für Psychiatrie und Neurologie*, 2, 82-120.
- Alzheimer**, A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 4, 356-385.
- Amirouche**, R, & Misset, M.-T. (2009). Flore spontanée d'Algérie: différenciation écogéographique des espèces et polyploïdie. *Cahiers Agricultures*, 18(6), 474-480.
- An**, H., Wang, H., Lan, Y., Hashi, Y., & Chen, S. (2013). Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids for the quality control of *Apocynum venetum* L. leaves by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS and HPLC-DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 85, 295-304.
- Andarelli**, L. (1952). Première campagne antipaludique par voie aérienne en Algérie. Direction de la santé publique et de la famille en Algérie.
- Andarelli**, L. (1963). Rapports Annuels - campagnes antipaludiques de 1952 à 1963. Direction de la santé publique et de la famille Algérie.
- Anderson**, O.M. (2006). Chemistry, biochemistry and applications, in: *Flavonoids*. Andersen, O.M., & Markham, K.R. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 1129-1197.
- Andrade**, M.S., Sampaio, T.S., Nogueira, P.C.L., Ribeiro, A.S., Bittrich, V., & Amaral, M.C.E. (2007). Volatile compounds of the leaves, flowers and fruits of *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 49-52.

- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105–121.
- Ansorena, D., Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (2001).** Analysis of volatiles compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. *Food Research International*, 34, 67–75.
- Arruda, D.C., Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Katzin, A.M., & Uliana, S.R.B. (2009).** Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63(9), 643-649.
- Asres, K., Phillipson, D., & Mascagni, P. (1986).** Alkaloids of *Bolusanthus speciosus*. *Phytochemistry*, 25(6), 1449-1452.
- Atta, A.H., Mohamed, N.H., Nasr, S.M., & Mouneir, S.M. (2007).** Phytochemical and pharmacological studies on *Convolvulus fatmensis* Ktze. *Journal of Natural Remedies*, 7(1), 109–119.
- Awaad, A.S., Mohamed, N.H., El-Sayed, N.H., Soliman, G.A., & Mabry, T.J. (2006).** Phenolics of *Convolvulus arvensis* L. and their related pharmacological activity. *Asian Journal of Chemistry*, 18(4), 2818–2826.
- Azzioui, O., ES-Sgaouri, A., & Fennane, M. (2000).** Valeur écologique et biogéographique du genre *Genista* L. du Maroc. *Lagascalia*, 21(2), 263-278.
- Bachi F. (2006).** Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. *La lettre de l'Infectiologie*, 21(1), 9-15.
- Bakke, A.L., & Render, & N.D. (1942).** Presence of anti-Hemorrhagic material in roots of European bindweed (*Convolvulus arvensis* L.). *American Journal of Botany*, 29(5), 353–354.
- Balandrin, M.F., Robbins, E.F., & Kinghorn, D. (1982).** Alkaloid distribution in some species of the Papilionaceous tribes Thermopsidae and Genisteeae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 10(4), 307-311.
- Barbosa, M.I.F., Corrêa, R.S., Oliveira, K.M., Rodrigues, C., Ellena, J., Nascimento, O.R., Rocha, V.P.C., Nonato, F.R., Macedo, T.S., Barbosa-Filho, J.M., Milena B.P., Soares, M.B.P., Alzir A., & Batista, A.A. (2014).** Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 136, 33-39.
- Barfield, M., & Chakrabarti, B. (1969).** Long-range proton spin-spin coupling. *Chemical Review*, 69(6), 757–778.
- Battandier, J.A. (1888).** Flore de l'Algérie, Dicotylédones. Paris, Librairie Savy, F., pp. 200-201.
- Becchi, M, & Fraisse, D. (1989).** Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids. *Biomedical. Mass Spectrometry*, 18, 122.
- Benabid, A. (1988).** Contribution à l'étude des groupements non forestiers du Moyen Atlas central (Maroc). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat*, 12, 79–98.
- Bennini, B., Chulia, A.J., Kaouadji, M., & Thomasson, F. (1992).** Flavonoid glycosides from *Erica cinerea*. *Phytochemistry*, 31(7), 2483-2486.
- Berman, J.D., Gallalee, J.V., & Best, J.M. (1987).** Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania Mexicana* amastigotes. *Biochemical Pharmacology*, 36, 197-201.
- Berman, J. (2003).** Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16, 397-401.
- Bermúdez-Torres, K., Herrera, J.M., Brito, R.F., Wink, M., & Legal, L. (2009).** Activity of quinolizidine alkaloids from three Mexican *Lupinus* against the lepidopteran crop pest *Spodoptera frugiperda*. *BioControl*, 54, 459-466.
- Bhakuni, R.S., Tripathi, A.K., Shukla, Y.N., & Singh, S.C. (1996).** Insect antifeedant compounds from *Convolvulus microphyllus* (L.) Sieb. *Phytotherapy Research*, 10, 170–171.
- Billerberck, V.G., Roques, C., Vaniere, P., & Marquier, P. (2002).** Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles, *Hygiènes*, X(3), 248-251.
- Bisht, N.P.S., & Singh, R. (1978-a).** Chemical studies of *Convolvulus microphyllus* Sieb. *Planta medica*, 34(2), 222–223.
- Bisht, N.P.S., Singh, R., Bansal, R.K., & Singh, P. (1978-b).** Isolation of n-triacontane, aliphatic alcohols and sitosterols from *Convolvulus microphyllus* Sieb. *Anorganische Chemie, Organische Chemie*, 33 B(2), 249.
- Boguslavskaya, L.I., Budnikova, T.N., & Kopysheva, I.V. (1991).** A phytochemical study of *Spinacia oleracea*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 5, 719-720.
- Bonneville, J., Defrance, C., & Miklavec, T. (2007).** Guide pratique de lutte contre le paludisme en entreprise. Sanisphere, CFAO, sanofi-aventis et Total.

- Bonzue**, J.A., Parthasarathy, N., Phillips, L.R., Cote, C.K., Fellows, P.F., Mendelson, I., Shafferman, A., & Friedlander, A.M. (2005). Construction of a rhamnase mutation in *Bacillus anthracis* affects adherence to macrophages but not virulence in guinea pigs. *Microbial Pathogenesis*, 38, 1-12.
- Borge** C., Martinh P., Martin A., Raute A.P., & Almoester-ferreir M.A. (2001). Structural characterisation of flavonoids and flavonoid-*O*-glycosides extracted from *Genista tenera* by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15, 1760-1767.
- Bostogonashvili**, V.S. (1967). Tr. Inst. Farmakokhim. Akad. Nauk Gruz. SSR Ser., 1(10), 196.
- Botineau**, M. (2010). Botanique systématique et appliqué des plantes à fleurs. Editions TEC & DOC, Lavoisier, pp. 597-639.
- Boubidi**, S.C., Gassen, I., Khechache, Y., Lamali, K., Tchicha, B., Brengues, C., Menegon, M., Severini, C., Fontenille, D., & Harrat, Z. (2010). *Plasmodium falciparum* Malaria, Southern Algeria, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 16(2), 301-303.
- Bouchonnet**, S. (2009). La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Editions TEC & DOC, Lavoisier.
- Boudonneu**, M. (1990). La détection inverse en RMN, Analysis n°1, Vol. 18.
- Boullard**, B. (2001). Dictionnaire: Plante médicinales du monde: croyances et réalités, Editions ESTEM, Paris, p. 157.
- Boumaza**, O., Mekkiou, R., Seghiri, R., Sarri, D., Benayache, S., Garcia, V.P., Bermejo J., & Benayache, F. (2006). Flavonoids and isoflavonoids from *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(6), 730-731.
- Bruneton**, J. (1987). Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.
- Buckner**, F.S., Verlinde, C.L., La Flamme, A.C., & Van Voorhis, W.C. (1996). Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2592-2597.
- Bush**, L., Hempfling, W.P., & Burton, H. (2002). Biosynthesis of nicotine and related compounds. In: Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites, Gorrod, J.W. & Jacob III, P. (Eds.). Elsevier Science B.V., pp. 13-44
- Buschi**, C.A., & Pomilio, A.B. (1982). Isorhamnetin 3-*O*-robinobioside from *Gomphrena martiana*. *Journal of Natural Products*, 45, 557-559.
- Bunsupa**, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2012). Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 3(239), 1-7.
- Canet**, D. (1991). La RMN: concepts et méthodes. Inter éditions. Paris.
- Charoux**, C., & Rabate J. (1941). *Journal of Pharmaceutical Chemistry*, 1, 404.
- Cavalla**, M., & Eberlin, T. (1994). Isolement des Streptomycetes du sol. L'opéron XIX(4), 13-17.
- CDC**, Center for Disease Control and Prevention, consulté le 10 octobre 2014. [www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology](http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology)
- Cho**, Y.D., Martin, R.O., & Anderson, J.N. (1971). Biosynthesis of lupin alkaloids from carbon-14 dioxide. Evidence for the independent formation of lupanine and sparteine. *Journal of the American of Chemical Society*, 93, 2087-2089.
- Christov**, V., and Evstatieva, L. (2000). Alkaloid profile of Bulgarian species from genus *Genista*. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, 53(11), 25-28.
- Clement**, B.A., Goff, C.M., & Forbes, T.D.A. (1997). Toxic amines and alkaloids from *Acacia berlandieri*. *Phytochemistry*, 46(2), 249-254.
- Clifford**, M.N. (1986). Coffee bean dicaffeoylquinic acids. *Phytochemistry*, 25(7), 1767-1769.
- Clifford**, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Clifford**, M.N., Knight, S., & Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53, 3821-3832.
- Contreras**, J.D.F., Austin, F., & Diaz, J. (1995). Biodiversity of sweetpotato (*Ipomoea batatas*, Convolvulaceae) in south Mexico. *Economic Botany*, 49, 286-296.
- Cos**, P., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 290-302.
- Costa**, J.F.O., Kiperstok, A.C., Lima David, J.P., David, J.M., Giulietti, A.M., Queiroz, L.P., Santos, R.R., & Soares, M.B.P. (2007). Anti-leishmanial and immunomodulatory activities of extracts from *Portulaca hirsutissima* and *Portulaca werdermannii*. *Fitoterapia*, 78, 510-514.

- Coste, H. (1937).** Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Tome 2, Paris, Librairie des Sciences et des Arts.
- Cretton, S., Bartholomeusz, T.A., Mehl, F., Allenbach, Y., Matheeußen, A., Cos, P., Maes, L., & Christen, P. (2014).** Synthesis and *in vitro* evaluation of tropane halogenated-derivatives against malaria, sleeping sickness, Chagas disease and leishmaniasis. *Medicinal Chemistry*, 10, 753-758.
- Croasmun, W.R., & Carlson, R.M.K. (1994).** Two-dimensional NMR spectroscopy: Application for chemists and biochemists. Wiley-VCH.
- Cronquist, A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W. (1997).** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144-1152.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004).** Mass spectrometry in structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1-15.
- Dai, D., He, J., Sun, R., Zhang, R., Aisa, H.A., & Abliz, Z. (2009).** Nuclear magnetic resonance and liquid chromatography-mass spectrometry combined with an incompleting separation strategy for identifying the natural products in crude extract. *Analytica Chimica Acta*, 632, 221-228.
- Dawson, P.H. (1976).** Quadrupole mass spectrometry and its applications. Elsevier Scientific Publishing Company.
- Dechambre, A. (1870).** Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales, Victor Masson et Fils. Paris, Tome 11, p. 768.
- Dedet, J.P. (1999).** Les Leishmanioses. Ellipses Paris, France.
- Deshpande, S.M., & Srivastava, D.N. (1969-a).** Chemical examination of the fatty acids of *Convolvulus puricaulis*. *Indian Oil and Soap Journal*, 34(2), 217-218.
- Deshpande, S.M., & Srivastava, D.N. (1969-b).** Chemical studies of *Convolvulus puricaulis* CHOIS. *Journal of the Indian Chemical Society*, 46(8), 759-760.
- De Leo, M., Bruzual De Abreu, M., Pawlowska, A.M., Cioni, P.L., & Braca, A. (2010).** Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC-PDA-ESI-MS and GC/ESIMS analysis. *Phytochemistry Letters*, 3, 48-52.
- De Natale, A., & Pollio, A. (2007).** Plants species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 295-303.
- Desjeux, P. (2004).** Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27, 305-318.
- Ding, P.L., Huang, H., Zhou, P., & Chen, D.F. (2006).** Quinolizidine alkaloids with anti- HBV activity from *Sophora tonkinensis*. *Planta medica*, 72, 854-856.
- Dixon, R.A., & Ferreira, D. (2002).** Molecule of interest, genistein. *Phytochemistry*, 60, 205-211.
- Dhingra, D., & Valecha, R. (2007).** Evaluation of the antidepressant-like activity of *Convolvulus pluricaulis* Choisy in the mouse forced swim and tail suspension tests. *International Medical Journal of Experimental and Clinical research*, 13(7), 155-161.
- Domon, B., & Costello, C. (1988).** A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate*, 5, 397-409.
- Dräger, B. (1995).** Identification and quantification of calystegines, polyhydroxyl nortropane alkaloids. *Phytochemical Analysis*, 6, 31-37.
- Duraffourd, C., & Lapraz, J.C. (2002).** Traité de phytothérapie clinique, médecine et endobiogénie. Edition Masson, Paris, p. 423-424.
- Eich, E. (2008).** Solanaceae and convolvulaceae: Secondary metabolites. *Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)*. Ed. Springer
- El-Nasr, M.M.S. (1982).** Coumarins of *Convolvulus lanatus* and *C. arvensis*. *Fitoterapia*, 53, 189-190.
- El-Nasr, M.M.S., El-Missiry, M. M., & Soliman, M.A. (1984).** Constituents of *Convolvulus lanatus*. *Fitoterapia*, 55(4), 254.
- Engler, A., & Prantl, K. (1889).** Die natürlichen Pflanzenfamilien. 1st edition, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- El Rhaffari, L., & Zaid, A. (2002).** Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée, dans "Des sources du savoir aux médicaments du futur", IRD éditions, p. 293-318.
- El-Shazly, A., Ateya, A-M.M., & Wink, M. (2001).** Quinolizidine alkaloids profiles of *Lupinus varius orientalis*, *L. albus albus*, *L. hartwegii*, and *L. densiflorus*. *Z. Natureforsch*, 56c, 21-30.
- Erdemoglu, N., Tosun, F., & Eroglu, Y. (2006).** LC-MS analysis of daidzein in the Turkish *Genista* species. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(5), 517-519.

- Erdemoglu**, N., Ozkan, S., Duran, A., & Tosun, F. (2009). GC-MS analysis and antimicrobial activity of alkaloid extract from *Genista vuralii*. *Pharmaceutical Biology*, 47(1), 81-85.
- Evans**, B.A.J., Griffiths, K., & Morton, M. S. (1995). Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *Journal of Endocrinology*, 147 (2), 295-302.
- Fabre**, N., Rustan, I., Hoffmann, E., & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of American Society Mass Spectrometry*, 12, 707-715.
- Faugeras**, G., & Paris, M. (1969a). *Plantes médicinales et phytothérapie*, tome 3, 175.
- Faugeras**, G., & Paris, M. (1969b). Alkaloids and polyphenols from Leguminosae. XV–Alkaloids of *Genista equisetiformis* Spach. Isolation of N-methylcystine and cystine. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 27(4), 269-276.
- Faugeras**, G. (1971). Alkaloids and polyphenols of Leguminosae. XXII– Alkaloids of *Genista cinera* DC. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 29(4), 241-258.
- Ferreres**, F., Llorach, R., & Gil-Izquierdo, A. (2004). Characterization of interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 312-321.
- Fitch**, W.L., Dolinger, P.M., & Djerassi, C. (1974). Alkaloid studies. LXVIII. Novel piperidyl alkaloids from *Lupinus formosus*. *The Journal of Organic Chemistry*, 39(20), 2974-2979.
- Foo**, L.Y., Lu, Y., Molan, A.L., Woodfield, D.R., & McNabb, W.C. (2000). The phenols and prodelphinidins of white clover flowers. *Phytochemistry*, 54, 539-548.
- Fokialakis**, N., Aligiannis, N., Alexi, X., Alexis, M.N., Pratsinis, H., Kalpoutzakis, E., & Skaltsounis, A.L. (2012). Isolation of bioactive compounds from *Genista halacsyi* (Leguminosae) and evaluation of their estrogenic activity. *Planta Medica*, Congress abstract: 78-PI361.
- Fournet**, A., Angelo Barrios, A., Munoz, V., Hocquemiller, R., Cave, A., & Bruneton, J. (1993a). 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(4): 859-863.
- Fournet**, A., Angelo Barrios, A., Munoz, V., Hocquemiller, R., & Cave, A. (1993b). Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on american *Leishmania* sp. in BALB/c mice. *Phytotherapy Research*, 7, 281-284.
- Fraisse**, D., Heitz, A., Carnat, A., Carnat, A.P., & Lamaison, J.L. (2000). Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia*, 71, 463-464.
- Friesen**, J.B., & Leete, E. (1990). Nicotine synthase – An enzyme from *Nicotiana* species which catalyzes the formation of (S)-nicotine from nicotinic acid and 1-methyl- $\Delta'$ -pyrrolinium chloride. *Tetrahedron Letters*, 31(44), 6295-6298.
- Gapparov**, A.M., Razzakov, N.A., & Aripova, S.F. (2007). Alkaloids of *Convolvulus subhirtus* from Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(3), 291-292.
- Garritano**, S., Pinto, B., Giachi, I., Pistelli, L., & Reali, D. (2005). Assessment of oestrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an *in Vitro* short-term test. *Phytomedicine*, 12, 143-147.
- GAYON**, P.R. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*, édition Dunod.
- Genest**, K., & Sahasrabudhe, M.R. (1966). Alkaloids and lipids of *Ipomoea*, *Rivea* and *Convolvulus* and their application to chemotaxonomy. *Economic Botany*, 20(4), 416-428.
- Giachi**, I., Manunta, A., Morelli, I., & Pistelli, L. (2002). Flavonoids and isoflavonoids from *Genista morisii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 801-803
- Gibbs**, P.E. (1966). A revision of the genus *Genista* L. *Notes Royal Botanic Garden, Edinburgh*, 27(1), 11-99.
- Godin**, P. (1954). A new spray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses. *Nature*, 154, 134.
- Goupy**, P., Vian, M.A., Chemat, F., Caris-Veyrat, C. (2013). Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Industrial Crops and Products*, 44, 496-510.
- Grael**, C.F.F., Albuquerque, S., & Lopes, J.L.C. (2005). Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia*, 76, 73- 82.
- Greinwald**, R., Witte, L., Wray, V., & Czygan, F.C. (1991). The alkaloid pattern of *Cytisophyllum sessilifolium* (Fabaceae-Genisteae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 19, 253-258.
- Greinwald**, R., Canto, P., Bachmann, P., Witte, L. & Czygan, F.C. (1992). Distribution and taxonomic significance of alkaloids in the *Genista cinerea* agregat. *Biochemical Systematics and Ecology*, 20(1), 75-81.

- Greinwald, R.,** Van Rensen, I., Veit, M., Canto, P., & Witte, L. (1995a). A chemical dichotomy in quinolizidine alkaloid accumulation within the section *Spartioides* of the genus *Genista* (Fabaceae: Genisteae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(1), 89-97.
- Greinwald, R.,** Henrichs, C., Veen, G., Ross, J.H., Witte, L., & Czygan, F.C. (1995b). A survey of alkaloids in *Templetonia biloba* (Benth.) Polhill (Fabaceae: Brongniartieae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23, 649-654.
- Gudej, J.,** & Nazaruk, J. (2001). Flavonol glycosides from the flowers of *Bellis perennis*. *Fitoterapia*, 72, 839-840.
- Guidi, I.,** Galimberti, D., Lonati, S., Novembrino, C., Bamonti, F., Tiriticco, M., Fenoglio, C., Venturelli E., Baron, P., & Bresolin, N. (2006). Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 27(2), 262-269.
- Guignard, J.L.,** Cosson, L., & Henry, M. (1985). *Abrégé de phytochimie*. Masson, Paris.
- Guilhaus, M.** (1995). A tutorial review of TOF-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 30(11), 1519-1532.
- Gulubov, A.,** & Venkov, A. (1973). *Natura*, 6, 97; *Chemical Abstracts*, 84, 14663 (1976).
- Günther, H.** (1994). *La spectroscopie de RMN*, Masson.
- Guy, Y.** & Gassabi, R. (1967). Les perspectives de l'éradication du paludisme. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, 45, 51-61.
- Hammadi, D.,** Tchicha, B., Guettai, M., Zakour, N., Chaib, Z., Abderrahmane, S., Ait Amara, Y., & Khechache, Y. (2009a). Institut National de Santé Publique. Le paludisme en Algérie. Rapport annuel 2009.
- Hammadi, D.,** Boubidi, S.C., Chaib, S.E., Saber, A., Khechache, Y., Gasmi, M., & Harrat, Z. (2009b). Le paludisme au Sahara algérien. *Le Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 102(3), 185-192.
- Han, J.,** Ye, M., Qiao, X., Xu, M., Wang, B., & Guo, D. (2008). Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 47, 516-525.
- Harborne, J.B.** (1969). Chemosystematics of the Leguminosae flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe *Genisteae*. *Phytochemistry*, 8, 1449-1456.
- Harborne, J.B.,** Baxter, H., & Moss, G.P. (1999). *Phytochemical Dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*, Second Edition, Taylor and Francis, Chapter 28.
- Harley, K.L.S.,** & Thorsteinson, A.J. (1967). The influence of plant chemicals on the feeding behaviour, development, and survival of the two-striped grasshopper, *Melanoplus bivittatus* (Say), *Acrididae*: orthoptera. *Canadian Journal of Zoology*, 45(3), 305-319.
- Harrat, Z.,** et Belkaid M. (2003). Les leishmanioses dans l'Algérois. Données épidémiologiques. *Le Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 96, 3, 212-214.
- Harrat, Z.,** Boubidi, S.C., Pralong, F., Benikhlef, R., Selt, B., Dedet, J.P., Ravel, C., & Belkaid, M. (2009). Description of a dermatropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte et Pralong 1986) in Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(7), 716-720.
- Haston, E.,** Richardson, J.E., Stevens, P.F., Chase, M.W., & Harris, D.J. (2009). The linear angiosperm phylogeny group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 128-131.
- Hazard, R.** (1950). *Précis de thérapeutique et pharmacologie*. Masson, Paris, 9<sup>ème</sup> ed., 969-974.
- Herrera, M.D.,** Marhuend E., & Gibso A. (1992). Effects of Genistein, an isoflavone isolated from *Genista tridentata*, on isolated guinea-pig ileum and guinea-pig ileal myenteric plexus. *Planta Medica*, 58, 314-316.
- Heywood, V.H.** (1996). *Flowering Plants of the World*. 3th edition, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-145, 149-152.
- Hilal, S.H.,** Haggag, M.Y., Soliman, F.M., & El-Kashoury El-Sayeda, A. (1983). Phytochemical study and biological screening of *Convolvulus lanatus* Vahl. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 139-148.
- Hostettmann, K.,** Marston, A., & Hostettmann, M. (1998). *Preparative chromatography techniques, Applications in natural product isolation*. Springer-Verlag, Berlin.
- Houerou, H.N.,** Claudin, J., & Pouget, M. (1977). Etude bioclimatique des steppes Algériennes (avec une carte bioclimatique à 1/1.000.000 ème). *Bulletin de la Société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord*, Alger, tome 68, fascicule 3 et 4.
- Hwang, B.K.,** Lim, S.W., Kim, B.S., Lee, J.W. & Moon, S.S. (2001). Isolation and *in vivo* and *in vitro* antifungal activity of phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3739-3745
- Institut Nationale de Santé Publique.** Relevés épidémiologiques mensuels – Algérie (2009). Situation épidémiologique de l'année 2009 sur la base des cas déclarés à l'I.N.S.P., volume XX, N° 5, 1-18.

- Isu, N.R., & Onyeagba, R.A. (2002).** Basic practicals in Microbiology. Second edition. Fasmen Communication, Okigwe, pp. 25-45.
- Iwu, M.M., Jackson, J.E., Tally, J.D., & Klayman, D.L. (1992).** Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radiorespirometric microtechnique (RAM). *Planta Medica*, 58, 436-441.
- Jahandiez, E., & Maire, R. (1932).** Catalogue des plantes du Maroc (Spermatophytes et Ptéridophytes). Tome 2, (Dicotylédones Archichlamydées). Imprimerie Minerva, Alger, p. 353.
- Jawad, A.M., Al-Nai, b H.J., & Naji, A. (1983).** Antimicrobial activity of sesquiterpene lactone and alkaloids from Iraqi plants. *International Journal of Crude Drugs*, 26(4), 185-188.
- Jenett-Siems, K., Mann, P., Kaloga, M., Siems, K., Jakupovic, J., Witte, L., & Eich, E. (1998).** Tropane alkaloids with a unique type of acyl moiety from two *Convolvulus* Species. *Phytochemistry*, 49(5), 1449-1451.
- Jenett-Siems, K. (1996).** Phytochemische untersuchungen an windengewächsen der gattungen *Calystegia*, *Convolvulus*, *Ipomoea* und *Merremia* unter besonderer berücksichtigung des alkaloidvorkommens. Dissertation Fachbereich Pharmazie, Freie Universität Berlin/Germany.
- Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Felton, J.M., Sabin, A.J. & Horton, J. (2005).** A phase II dose-ranging study of sitamaquine for treatment of visceral leishmaniasis in India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 1005-1011.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., & Stevens, P. (2002).** Botanique systématique, une perspective phylogénétique. University of Missouri, St. Louis, and Missouri Botanical Garden, pp.282-288.
- Ould-Kada, M. (2014).** Recueil de textes réglementaires relatifs à la gestion des établissements publics de santé en Algérie. Hôpital – Prévention, tome 2, fascicule 16.
- Kadooka, M.M., Chang, M.Y., Fukami, H., Scheuer, P.J., Clardy, J., Solheim, B.A., & Springer, J.P. (1976).** Mamanine and pohakuline, two unprecedented quinolizidine alkaloids from *Sophora chrysophylla*. *Tetrahedron*, 32, 919-924.
- Kammerer, D., Carle, R., & Schieber A. (2004).** Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *Sativus* vari. *Atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in mass spectrometry*, 18, 1331- 1340.
- Kapoor, A., Mahar, R., Vaishampayan, N., & Gautam, N. (1981).** Antifungal spectrum of some extracts. *Geobios*, 8, 66-67.
- Kazuma, K., Noda, N., & Suzuki, M. (2003).** Malonylated flavonol glycosides from petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, 62(2), 229-237.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F., & Croft, S.L. (2003).** Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, 90, 55-62.
- Keeler, R.F. (1976).** Lupin alkaloids from teratogenic and nonteratogenic lupins. III. Identification of anagryne as the probable teratogen by feeding trials. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1(6), 887-898.
- Khalil, A.M., El-Tawil, B.A.H., Ashy, M.A., & El Beih, F.K.A. (1981).** Distribution of some coumarins in plants of different plant families grown in Saudi Arabia. *Pharmazie*, 36, 569-571.
- Kinghorn, A.D., & Baladrin, M.F. (1984).** In: Pelletier W. S. (ed.), *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*, Vol.2, Wiley, New York, pp. 105-148.
- Kirch, J., Veit, M., Wätzig, H., Greinwald, R., & Czygan, F.C. (1995).** Alkaloidal variation in *Genista lobelli* s.l. (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(6), 635-643.
- Klein, G. (1933).** *Handbuch der Pflanzenanalyse*. V.4, Julius Springer, Jena.
- Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Cellik, H., & Erel, O. (2005).** Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research*, 585(1-2), 71-78.
- Kojima, R., Fukushima, S., Ueno, A., & Saiki Y. (1970).** Antitumor activity of *Leguminosae* plants constituents. In: *Antitumor activity of constituents of *Sephora subprostrata**. *Chemical Pharmacological Bulletin*, 18(12), 2555-2563.
- Kokou, S.Y. (1982).** Les alcaloïdes quinolizidiniques des graines des *Lupins* : Contribution à une étude pharmacologique et toxicologique comparée de la spartéine et de la lupanine. Thèse de doctorat de troisième cycle, Université François Rabelais Tours.
- Kooiman, P. (1971).** Structures of galactomannans from seeds of *Annona muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor*, and *Sophora japonica*. *Carbohydrate Research*, 20, 329-337.
- Kovats, E. (1958).** Gas chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1. Retention indices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. *Helvetica Chimical Acta*, 41, 1915-1932.

- Krzaczek, T.,** Bogucka-Kocha, A., & Ryn, D. (2004). Chromatographical analysis of phenolic compounds in herb *Convolvulus arvensis* L. *Herba Polonica*, 50(3/4), 17–22.
- Kundakovic, T.,** Fokialakis, N., Kovacevic, N., & Chinou, I. (2007). Essential oil composition of *Achillea lingulata* and *A. umbellata*. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 184-187.
- Küçükboyacı, N.,** Özkan, S., & Tosun, F. (2012). Gas chromatographic determination of quinolizidine alkaloids in *Genista sandrasica* and their antimicrobial activity. *Records of Natural Products*, 6(1), 71-74.
- Lawn Stephen, D.,** Armstrong, M., Chilton, D., & Whitty Christopher, J.M. (2006). Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travellers. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 264-269.
- Leete, E. (1983).** Biosynthesis and metabolism of the tobacco alkaloids. In: Pelletier, S.W. (Ed.) *Alkaloids—chemical and biological perspectives*, vol. 1. Wiley, New York, pp. 85-152.
- Leporatti, M.L.,** & Pavesi, A. (1989). Usi nuovi, rari o interessanti di piante officinali di alcune zone della Calabria. *Webbia*, 43, 269-289.
- Lewis, D.A. (1989).** *Anti-inflammatory drugs from plant and marine sources*. Basel, Boston: Birkhauser, Vol. 27, p. 131.
- Lewis, G.,** Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, M. (2005). *Legumes of the world*. Richmond, U.K.: Royal Botanic Gardens, Kew
- Lhuillier, A.,** Fabre, N., Moyano, F., Martins, N., Claparols, C., Fourasté, I., & Moulis, C. (2007). Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1160, 13-20.
- Li, Q.M.,** Van den Heuvel, H., Dillen, L., & Claeys, M. (1992). Differentiation of 6-C and 8-C-glycosidic flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 21, 213.
- Lin, Y.-L.,** Kuo, Y.-H., Shiao, M.-S., Che, C.-C., & Ou, J.-C. (2000). Flavonoid Glycosides from *Terminalia catappa* L. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 47, 253-256.
- Lograda, T.,** Chaker, A.N., Chalard, P., Ramdani, M., Chalchat, J.C., Silini, H., & Figueredo, G. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Genista numidica* Spach. and *G. saharae* Coss et Dur. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(7), 495-499.
- Lograda, T.,** Chaker, A.N., Chalchat, J.C., Ramdani, M., Silini, H., Figueredo, G., & Chalard, P. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Genista ulicina*. and *G. vepres*. *Natural Product Communications*, 5(5), 835-838.
- Lograda, T.,** Chaker, A.N., Chalchat, J.C., Ramdani, M., & Figueredo, G. (2011). Composition of the essential oil of *Genista tricuspidata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(6), 992-994.
- Lograda, T.,** Ramdani, M., Figueredo, G., Chalchat, J.C., & Chalard, P. (2012). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Genista microcephala* Coss. Et Dur. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 75-79.
- López González, G. (2001).** *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. (Ed.) Mundi Prensa, Madrid, Spain.
- Loutfy, B. (1983).** *Medicinal plants of North Africa*, Reference Publication Inc., p. 68.
- Lucumi, A.,** Robledo, S., Gama, V., & Saravia, N.G. (1998). Sensitivity of *Leishmania panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNAprotein complexes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 1990-1995.
- Luczkiewicz, M.,** & Glod, D. (2003). Callus cultures of *Genista* plants—in vitro material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Science*, 165, 1101-1108.
- Łuczkiwicz, M.,** Glód, D., Bączek, T., & Bucíński, A. (2004). LC-DAD UV and LC-MS for the analysis of isoflavones and flavones from *in vitro* and *in vivo* biomass of *Genista tinctoria* L. *Chromatographia*, 60, 179-185.
- Ma, Y.L.,** Li, Q.M., Van den Heuvel, H., & Claeys, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357–1364.
- Ma, S.C.,** Du, J., But, P.P.H., Deng, X.L., Zhang, Y.W., Ooi, V.E.C., Xu, H.X., Lee, S.H.S., & Lee, S.F. (2002). Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 205-211.
- Mabry, T.J.,** Markham, K.R., & Thomas, M.B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Springer-Verlag.
- Mahmoudi, M.,** Rabe, Sharzad-Z.T., Rabe, Shahin-Z.T., Emami, S.A. (2014). A study to investigate the biological activity of proteoglycan mixture extract from *Convolvulus arvensis*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(4), 265-272.

- Maire, R. (1987).** La flore de l'Afrique du Nord. Les Légumineuses. Lechevalier Ed., Paris, XVI: pp. 123-193.
- Makela, S., Hyder, S.M., & Stancel, G.M. (1999).** Environmental estrogens, in: Oettel M., & Schillinger E. (Eds.), Estrogens and Antiestrogens II. Handbook Exp. Pharm., vol. 135(II), Springer-Verlag, Berlin, pp. 613-663.
- Makler, M.T., Ries, J.M., & Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C. Gibbins, B.L., & Hinrichs, D.J. (1993).** Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drugs sensitivity. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 48, 739-741.
- Malvy, D., Djossou, F., Receveur, M.C., Le Bras, M., (2000).** Plasmodies: Traitement, prévention. Encyclopédie médico-chirurgicale. Paris: Elsevier, 8, 507-525.
- Mann, P. (1997).** Zur phytochemie und chemotaxonomie tropischer und mediterraner Convolvulaceen unter besonderer berücksichtigung des alkaloid-vorkommens. Dissertation Fachbereich Pharmazie, Freie Universität Berlin.
- March, R.E. (1997).** An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 32, 351-369.
- Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., & Mabry, T.J. (1978).** Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. Tetrahedron, 34, 1387-1397.
- Markham, K.R. (1982).** Techniques of flavonoid identification. 1<sup>st</sup> edition, Academic Press INC, London, pp. 36-51.
- Marino, P., Guarino, R., & Bazan, G. (2012).** The Sicilian taxa of *Genista* sect. *Voglera* and their phytosociological framework. Flora Mediterranea, 22, 169-190.
- Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K. (2002).** A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. Phytochemical Analysis, 13, 51-54.
- Martins, A., Almoester-Ferreira, M.A., Borges, C., Rauter, A.P., Brum-Bousquet, M., Tillequin, F., Gonzalez, A.G., & Bermejo, J. (2002).** Flavonoids from *Genista tenera*. Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Application, Rauter et al. (eds.), pp. 111-117.
- Martins, A., Wink, M., Tei, A., Brum-Bousquet, M., Tillequin, F., & Rauter, A.P. (2005).** A phytochemical study of the quinolizidine alkaloids from *Genista tenera* by gas chromatography-mass spectrometry. Phytochemical Analysis, 16, 264-266.
- Matsuda, K., Kimura, M., Komai, K., & Hamada, M. (1989).** Nematicidal activities of (-)-N-methylcytisine and (-)-anagryne from *Sophora flavescens* against Pine wood nematodes. Agricultural and Biological Chemistry, 553(8), 2287-2288.
- Matsumura, A., Ghosh, A., Pope, G.S., & Darbre, P.D. (2005).** Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 94, 431-443.
- McMillian, M.K., Li, L., Parker, J.B., Patel, L., Zhong, Z., Gunnett, J.W., Powers, W.J., & Johnson, M.D. (2002).** An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. Cell Biology and Toxicology, 18, 157-173.
- Mekkiou, R., Touahar, H., Dijoux-franca, M.G., Mariotte, A.M., Benayache, S., & Benayache, F. (2005).** A new isoflavone from *Genista saharae* (Fabaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 33, 635-638.
- Mekkiou, R., Seghiri, R., Boumaza, O., Sarri, D., Chebbah, K., Benayache, S., Bermejo, J., & Benayache, F. (2012).** Secondary metabolites from *Genista ferox*. Chemistry of Natural Compounds, 48(4), 710-711.
- Menemen, Y., Williams, C.A., & Jury, S.L. (2002).** Flavonoid patterns in *Convolvulus* L., (*Convolvulaceae*) species from Morocco. Pakistan Journal of Botany, 34(2), 291-295.
- Meng, X.L., Riordan, N.H., Casciari, J.J., Zhu, Y., Zhong, J., Gonzalez, M.J., Miranda-Massari, J.R., & Riordan, H.D. (2002).** Effects of a high molecular mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis. Puerto Rico Health Science Journal, 21(4), 323-328.
- Merfort, I. (1992).** Caffeoylquinic acids from flower of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. Phytochemistry, 31, 2111-2113.
- Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière (M.S.P.R.H.) (2013).** Instruction N°5 relative à la célébration de la journée mondiale contre le paludisme « Investir dans l'avenir, vaincre le paludisme ».
- Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière (M.S.P.R.H.) (2014).** Instruction N°15 relative aux directives nationales en matière de prise en charge thérapeutique et de chimioprophylaxie du paludisme.
- Mishra, J., Saxena, A., & Singh, S. (2007).** Chemotherapy of Leishmaniasis: past, present and future. Current Medicinal Chemistry, 14, 1153-1169.

- Mogana**, R., Adhikari, A., Debnath, S., Hazra, S., Hazra, B., Teng-Jin, K., & Wiart, C. (2014). The Antiacetylcholinesterase and Antileishmanial Activities of *Canarium patentinervium* Miq. BioMed Research International, ID 903529, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/903529>.
- Moniava**, I.I., & Kemertelidze, É.P. (1971a). Isorhamnetin -3-galactoside from *Onobrychis angustifolia*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 6, 833.
- Moniava**, I.I., & Kemertelidze, É.P. (1971b). Quercetin glycosides from *Onobrychis sosnowskyi* and *O. kachetica*. Khimiya Prirodnikh Soedinenii, 6, 834.
- Montllor**, C.B., Bernays, E.A., & Barbehenn, R.V. (1990). Importance of quinolizidine alkaloids in the relationship between larvae of *Uresiphita reversalis* (Lepidoptera: Pyralidae) and a host plant, *Genista monspessulana*. Journal of Chemical Ecology, 16(6), 1853-1864.
- Murakoshi**, I., Ito, M., Haginiwa, J., Ohmiya, S., Otomasu, H., & Hirano, R.T. (1984). Lupin alkaloids from *Sophora chrysophylla*. Phytochemistry, 23(4), 887-891.
- Muralidhara**, R.B., Saradhi, U.V.R.V., Shobha Rani, N., Prabhakar, S., Prasad, G.S.V., Ramanjaneyulu, G.S., & Vairamani, M. (2007). Identification and quantification of methyl nicotinate in rice (*Oryza sativa* L.) by gas chromatography-mass spectrometry. Food Chemistry, 105, 736-741.
- Murray**, H.W. (1981). Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. The Journal of Experimental Medicine, 153(6), 1690-1695.
- Muzitano**, M.F., Cruz, E.A., Almeida, A.P., Silva, S.A.G., Kaiser, C.R., Guette, C., Rossi-Bergmann, B., & Costa, S.S. (2006a). Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. Planta Medica, 72, 81-83.
- Muzitano**, M.F., Tinoco, L.W., Guette, C., Kaiser, C.R., Rossi-Bergmann, B., & Costa, S.S. (2006b). The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. Phytochemistry, 67, 2071-2077.
- Muzitano**, M.F., Falcao, C.A.B., Cruz, E.A., Bergonzi, M.C., Bilia, A.R., Vincieri, F.F., Rossi-Bergmann, B., & Costa, S.S. (2009). Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous leishmaniasis. Planta Medica, 75(4), 307-311.
- NG**, L.K., Lafontaine, P., & Vanier M. (2004). Characterization of cigarette tobacco by direct electrospray ionization-ion trap mass spectrometry (ESI-ITMS) analysis of the aqueous extract – A novel and simple approach. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7251-7257.
- Negri**, G., de Santi, D., & Tabach, R. (2012). Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 22(5), 1024-1034.
- Nelson**, K. K., & Melendez, J. A. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. Free Radical Biology and Medicine, 37(6), 768-784.
- Neuner-Jehle**, N., Nesvadba, H., & Spitteller, G. (1964). Schlüsselbruchstücke in den Massenspektren von Alkaloiden, 3. Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly, 95, 687-709.
- Noccioli**, C., Meini, L., Loi, M.C., Potenza, D., & Pistelli, L. (2011). A new alpinumisoflavone derivative from *Genista pichisermolliana*. Phytochemistry Letters, 4, 342-344.
- Nowacki**, E.K., & Waller, G.R. (1975a). Comparative biosynthesis of quinolizidine alkaloids from DL-lysine in five species of *Leguminosae*. Phytochemistry, 14(1), 155-159.
- Nowacki**, E.K., & Waller, G.R. (1975b). Use of the metabolic grid to explain the metabolism of quinolizidine alkaloids in *Leguminosae*. Phytochemistry, 14(1), 165-171.
- Nwaka**, S., & Hudson, A. (2006). Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. Drug Discovery, 5, 941-955.
- OMS(a)**. La lutte contre les leishmanioses. Genève: OMS Presse. OMS Série de rapports techniques 2010, 949: 1-212.
- OMS(b)**. Leishmaniose. Centre des médias. Aide-mémoire N°375, Janvier 2014.
- Orhan**, I.E., Tosun, F., Tamer, U., Duran, A., Alan, B., & Kök, A.F. (2011). Quantification of genistein and daidzein in two endemic *Genista* species and their antioxidant activity. Journal of the Serbian Chemical Society, 76(1), 35-42.
- Ouhdouch**, Y., Barakate, M., & Finance, C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. European Journal of Soil Biology, 37, 69-74.
- Ould-Kada**, M. (2014). Recueil de textes réglementaires relatifs à la gestion des établissements publics de santé en Algérie. Hôpital – Prévention, tome 2, fascicule 16.
- Ozenda**, P. (2004). Flore et végétation du Sahara. Troisième édition, (eds.) CNRS, Paris, pp. 279- 307.

- Palmeira**, S.F., Jr., Moura, F.S., Alves, V.L., de Oliveira, F.M., Bento, E.S., Conserva, L.M., & Andrade, E.H.A. (2004). Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 69-71.
- Pardo**, C., Cubas, P., & Tahiri, H. (2004). Molecular phylogeny and systematics of *Genista* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-trnF intergenic spacer). *Plant Systematics and Evolution*, 255, 93-119.
- Paris**, R.R., & Faugeras, G. (1963). *Compte Rendu*, 257(10), 1728; *Chemical Abstract*, 59, 15599 h (1963).
- Paris**, R.R., & Faugeras, G. (1965a). *Ibid*, 4, 4105; *Chemical Abstract*, 63, 843 f (1965).
- Paris**, R.R., & Faugeras, G. (1965b). *Ibid*, 261(7), 1761; *Chemical Abstract*, 64, 799 e (1966).
- Paris**, R.R., & Faugeras, G. (1965c). On flavonoids and alkaloids from *Genista angelica* L. isolation of rutoside. *Les Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 260, 4105-4108.
- Parrot**, L., Donatien A., & Lestoquard, F. (1930). Sur le développement du parasite de la leishmaniose canine viscérale chez *P. major var perniciosus*. *Newstead. Le Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 23, 724-726.
- Patrikeeva**, A. P., & Blinova, K. F. (1968). Phytochemical study of *Convolvulus ammannii* flavonoids. *Zhurnal Biologii Khimii*, 26, 174-178.
- Paul**, W., Reinhart, H.P., & Von Zahn, U. (1958). Das elektrische Massenfilter als Massenspektrometer und Isotopentrenner. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 152, 143-182.
- Pauli**, G.F., Poetsch, F., & Nahrstedt, A. (1998). Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochemical Analysis*, 9, 177-185.
- Pavese**, J.M., Farmer, R.L., & Bergan, R.C. (2010). Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Review*, 29, 465-482.
- Pino**, J.A., Mesa, J., Muñoz, Y., Martí, M.P., & Marbot, R. (2005). Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53, 2213-2223.
- Pinto**, B., Bertoli, A., Noccioli, C., Garritano, S., & Pistelli, L. (2008). Estradiol-antagonistic activity of phenolic compounds from leguminous plants. *Phytotherapy Research*, 22(3), 362-366.
- Perkins**, A.G., & Newbury, F.G. (1899). The colouring matters contained in dyer's broom (*Genista tinctoria*) and heather (*Calluna vulgaris*). *Journal of the Chemical Society*, 75, 830-839.
- Pistelli**, L., Bertoli, A., Giachi, I., & Manunta, A. (1998). Flavonoids from *Genista ephedroides*. *Journal of Natural Products*, 61, 1404-1406.
- Pistelli**, L., Giachi, I., Potenza, D., & Morelli, I. (2000). A new isoflavone from *Genista corsica*. *Journal of Natural Products*, 63(4), 504-506.
- Pistelli**, L., Bertoli, A., Giachi, I., Morelli, I., Rubiolo, P., & Bicchi, C. (2001). Quinilizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 137-141.
- Polhill**, R.M., Raven, P.H., & Stirton, C.H. (1981). Evolution and systematics of the Leguminosae. In *Advances in legume systematics*, part1, Polhill, R.M., & Raven, P.H. (eds.), 1-26. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pratt Dan**, E. (1990). Natural Antioxidants Not Exploited Commercially, in *Food Antioxidants*. Hudson B.J.F. (Ed.), Elsevier Applied Science, London and New York, p. 176.
- Quezel**, P., Santa, S. (1962). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*, tome 1, 463-485, CNRS, Paris.
- Quezel**, P., Santa, S. (1963). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*, tome 2, 752-759, CNRS, Paris.
- Rahalison**, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., & Frenk, E. (1991). A biotographical Agar overlay method for detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2, 199-203.
- Rana**, J., & Robins, D.J. (1986). Application of <sup>13</sup>C N.M.R. spectroscopy to study the biosynthesis of quinilizidine alkaloids lupinine and sparteine. *Journal of Chemical Society Perkin Trans I*, 1133-1137.
- Rashid**, M.U., Ali, S., Alamzeb, M., Igoli, J., Clements, C., Shah, S.Q., Ferro, V.A., Gray, A.I., & Khan, M.R. (2014). Phytochemical and antitrypanosomal investigation of the fractions and compounds isolated from *Artemisia elegantissima*. *Pharmaceutical Biology*, 52(8), 983-987.
- Rastrelli**, L., Saturnino, P., Schettino, O., Dini, A. (1995). Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 43, 2020-2024.
- Rauter**, A.P., Martins, A., Borges, C., Ferreira, J., Justino, J., Bronze, M.R., Coelho, A.V., Choi, Y.H., & Verpoorte, R. (2005). Liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of *Genista tenera*. Structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside. *Journal of Chromatography A*, 1089, 59-64.

- Rauter**, A.P., Martins, A., Lopes, R., Ferreira, J., Serralheiro, L.M., Araújo, M-E., Borges, C., Justino, J., Silva, F.V., Goulart, M., Thomas-Oates, J., Rodrigues, J.A., Edwards, E., Noronha, J.P., Pinto, R., & Mota-Filipe, H. (2009). Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant *Genista tenera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 384-393.
- Raz**, B., Iten, M., Grether-Buhler, Y., Kaminsky, R., & Brun, R. (1997). The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodensiense* and *T.b. gambiense*) in vitro. *Acta Tropica*, 68, 139-147.
- Ribas-Marques**, D.I. (1957). Recientes progresos de la investigación en el campo de los alcaloides de las Papilionaceas. Universidad de Santiago, Spain.
- Ribault**, C. (2008). Elaboration d'un biocapteur cellulaire impédancemétrique pour la mesure des changements physiologiques affectant la cellule parasitée. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse III, Paul Sabatier.
- Rigano**, D., Cardile, V., Formisano, C., Maldini, M.T., Piacente, S., Bevilacqua, J., Russo, A., & Senatore, F. (2009). *Genista sessilifolia* DC. and *Genista tinctoria* L. inhibit UV light and nitric oxide-induced DNA damage and human melanoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*, 180, 211-219.
- Rigano**, D., Russo, A., Formisano, C., Cardile, V., & Senatore, F. (2010). Antiproliferative and cytotoxic effects on malignant melanoma cells of essential oils from the aerial parts of *Genista sessilifolia* and *G. tinctoria*. *Natural Product Communications*, 5(7), 1127-1132.
- Roberto**, C. (1984). The Macdonald encyclopaedia of medicinal plants, MacDonald & Co. Publishers Ltd., London-Sydney, p. 95.
- Rolland**, Y. (2004). Antioxydants naturels végétaux. *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, 11(6), 419-424.
- Saito**, K., Suzuki, H., Takamatsu, S., & Murakoshi, I. (1993). Acyltransferases for Lupin alkaloids in *Lupinus hirsutus*. *Phytochemistry*, 32(1), 87-91.
- Saito**, K., & Murakoshi, I. (1995). Chemistry, Biochemistry and Chemotaxonomy of Lupine Alkaloids in the Leguminosae. In: Aua-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 15, pp. 519-549.
- Sakushima**, A., Nishibe, S., Takeda, T., & Ogihara, Y. (1988). Positive and negative ion mass spectra of flavonoid glycosides by fast atom bombardment. *Mass Spectrometry*, 36(2), 71-80.
- Sakushima**, A., Coşkun, M., & Maoka, T. (1995). Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*. *Phytochemistry*, 40, 257-261.
- Sanchez-Rabaleda**, F., Jauregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Lamuela-Raventos, R.M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 35-42.
- Scarpato**, R., Paganucci, L., Bertoli, A., Fiore, L., Pistelli, L., & Federico, G. (2008). Licoflavone C attenuates the genotoxicity of cancer drugs in human peripheral lymphocytes. *Phytotherapy Research*, 22, 1650-1654.
- Schieber**, A., Keller, P., Streker, P., Klaiber, I., & Carle, R. (2002). Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of Apples (*Malus domestica* cv. "Bretbacher") by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, 13, 87-94.
- Schimming**, T. (2003). Beiträge zur chemotaxonomie und phylogenie der Convolvulaceen auf der basis des alkaloidvorkommens. Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin, Germany.
- Schimming**, T., Jenett-Siems, K., Mann, P., Tofern-Reblin, B., Milson, J., Johnson, R.W., Deroin, T., Austin, D.F., & Eich, E. (2005). Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, 66, 469- 480.
- Schinor**, E.C., Salvador, M.J., Furusho Pral, E.M., Alfieri, C.S., Albuquerque, S., & Dias, D.A. (2007). Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(2), 295-300.
- Schliebs**, R., Arendt, T. (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 113, 1625-1644.
- Schmidt**, T.J, Khalid, S.A., Romanha, A.J., Alves, T.M.A., Biavatti, M.W., Brun, R., Costa, F.B., Castro, S.L., Ferreira, V.F., Lacerda, M.V.G., Lago, J.H.G., Leon, L.L., Lopes, N.P., Amorim, R.C. N., Niehues, M., Ogungbe, I.V., Pohlit, A.M., Scotti, M.T., Setzer, W.N., Soeiro, M.N.C., Steindel, M., & Tempone, A.G. (2012). The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - Part II. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 2176-2228.
- Schrire**, B.D., Lavin, M., & Lewis, G.P. (2005). Global distribution patterns of the Leguminosae: Insights from recent phylogenies. *Biologische Skrifter*, 55, 375-422.
- Schumann**, D., Neuner-Jehle, N., & Spiteller, G. (1968). Schlüsselbruchstücke in den Massenspektren von Alkaloiden, 7. Mitt.: Chinolizidinalkaloide mit lactamfunktion. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 99, 390-408.

- Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004).** Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4090–4096.
- Scott, T.A., & Glynn, J.P. (1967).** The incorporation of [2,3,7-<sup>14</sup>C] nicotinic acid into nicotine by *Nicotiana glauca*. *Phytochemistry*, 6, 505-510.
- Sergent, Ed., & Sergent, Et. (1928).** Vingt-cinq années d'étude et de prophylaxie du Paludisme en Algérie. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*, tome 6(2-3).
- Shahina, A.G. (1994).** Handbook of Arabian medicinal plants, CRC Press, p. 89.
- Shakya, R., & Navarre, D.A. (2006).** Rapid screening of ascorbic acid glycoalkaloids, and phenolics in potato using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5253-5260.
- Sharaf, M., El-Ansari, M.A., & Saleh, N.A.M. (1997).** Flavonoids of four *Cleome* and three *Capparis* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(2), 161-166.
- Sharquie, K.E., Al-Hamamy, H., & El-Yassin, D. (1998).** Treatment of cutaneous leishmaniasis by direct current electrotherapy: The Baghdadin device. *Journal of Dermatology*, 25(4), 234-237.
- Shimoda, K., Yamane, S.Y., Hirakawa, H., Ohta, S., & Hirata, T. (2002).** Biotransformation of phenolic compounds by the cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, 275-281.
- Shoji, T., Winz, R., Iwase, T., Nakajima, K., Yamada, Y., & Hashimoto, T. (2002).** Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible role in secondary metabolism in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 50, 427-440.
- Shütte, H.R. (1969).** *Chinolizidin alkaloids*. In: Mothes K., Schütte H. R. (eds) *Biosynthese der Alkaloide*, VEB-Verlag, Berlin, p. 168.
- Singha, U.K., Guru, P.Y., Sen, A.B., & Tandon, J.S. (1992).** Antileishmanial activity of traditional plants against *Leishmania donovani* in golden hamsters. *International Journal of Pharmacognosy*, 30, 289–295.
- Sina, A.H.I., & Tibb, A.F. (1968).** Vol. 1, Elhalaby & Co., Cairo, p. 385.
- Smith, T.A. (1975).** Review: Recent advances in the biochemistry in plant amines. *Phytochemistry*, 14, 865-890.
- Sowemimo, B.O., & Farnsworth, N.R. (1973).** Phytochemical investigation of *Convolvulus arvensis* (Convolvulaceae). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(4), 678–679.
- Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M., & Jeanmonod, D. (2004).** Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. Troisième édition, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne, pp. 202-207.
- Stark, T., Bareuther, S., & Hofmann, T. (2005).** Sensory-guided decomposition of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) and structure determination of taste-active polyphenols. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53, 5407-5418.
- Steinegger, E., Moser, CH., & Weber, P. (1968).** Konstitution des neuen Alkaloids Hystrin aus *Genista hystrix* LGE-XV. *Phytochemistry*, 7, 849-853.
- Steinegger, V.E., & Schnyder, F. (1970).** Zur Alkaloidbildung bei *Genista hystrix* LGE. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 45(147), 157-163.
- Steinegger, E., & Scheurer, S. (1976).** Chemotaxonomy of *Genista hystrix* Lange. 31. Leguminous alkaloids. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 51(7-8), 203-204.
- Stevens, J.F., Hart, H., Hendriks, H., & Malingré, T.M. (1992).** Alkaloids of some European and Macaronesian Sedoideae and Sempervivoideae (Crassulaceae). *Phytochemistry*, 31, 3917-3924.
- Suzuki, H., Murakoshi, I., & Saito, K. (1994).** A novel O-tigloyltransferase for alkaloid biosynthesis in plants; purification, characterization, and distribution in *Lupinus* plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(3), 15853-15860.
- Tamura, Y., Hattori, M., Konno, K., Kono, Y., Honda, H., Ono, H., & Yoshida, M. (2004).** Triterpenoid and caffeic acid derivatives in the leaves of ragweed, *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales: Asteraceae), as feeding stimulants of *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chemoecology*, 14, 113–118.
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., & Rüedi P. (2006).** Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1352-1364.

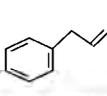
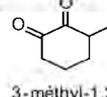
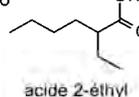
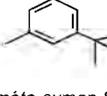
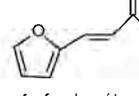
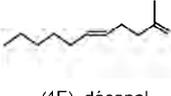
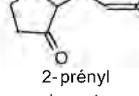
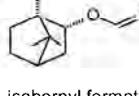
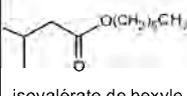
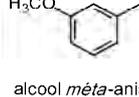
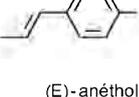
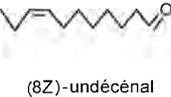
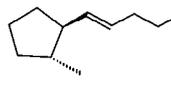
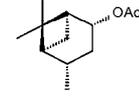
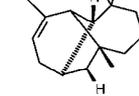
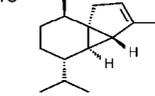
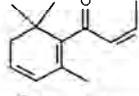
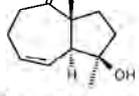
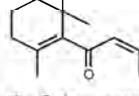
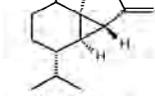
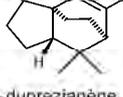
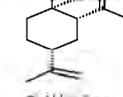
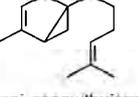
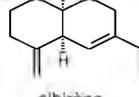
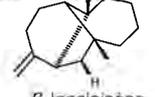
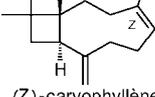
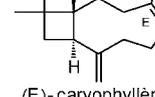
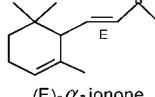
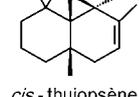
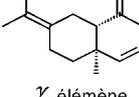
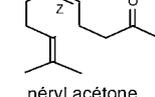
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104, 1372-1378.
- Teles, C.B.G., Moreira, L.S., Silva, A.A.E., Facundo, V.A., Zuliani, J. P., Stábeli, R.G., & Silva-Jardim, I. (2011).** Activity of the Lupane Isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 22(5), 936-942.
- Terada, M., Sano, M., Ishii, A.I., Kino, H., Fukushima, S., & Noro, T. (1982).** Studies on chemotherapy of parasitic helminths (IV). Effects of alkaloids from *Sophora flavescens* on the motility of parasitic helminths and isolated host tissues. *Folia Pharmacologica Japonica*, 79(2), 105-111.
- Thakur, C.P., Sinha, G.P., & Pandey, A.K. (1996).** Comparison of regimens of amphotericin B deoxycholate in kala-azar. *Indian Journal of Medical Research*, 103, 259-263.
- The Legume Phylogeny Working Group (2013).** Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62(2), 217-248.
- Thomas, S.C. (2000).** Medicinal plants: Culture, utilization and phytopharmacology, Publishing Co., Lancaster, p. 15.
- Thorne, R.F. (1992).** An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso*, 13, 365-389.
- Todd, F., Stermitz F.R., Shultheis P., Knight A.P., & Traub-Dargatz, J. (1995).** Tropane alkaloids and toxicity of *Convolvulus arvensis*. *Phytochemistry*, 39(2), 301-303.
- Tolonen, A., Joutsamo, T., Mattila, S., Kämäräinen, T., & Jalonen, J. (2002).** Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and <sup>1</sup>H-NMR methods. *Phytochemical Analysis*, 13, 316-328.
- Torres-Santos, E.C., Lopes, D., Rodrigues Oliveira, R., Carauta, J.P.P., Bandeira Falcao, C.A., Kaplan, M.A.C., & Rossi-Bergmann, B. (2004).** Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, 11, 114-120.
- Tortorano, A.M., Cabrini, E., & Viviani, M.A. (1979).** Sensibilité *in Vitro* des levures à cinq antifongiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bulletin de la Société Française de Mycologie Médicale*, 8, 69-74.
- Tosun, F., Tanker, M., Özden, T., & Tosun, A. (1986a).** Alkaloids of *Genista anatolica*. *Planta Medica*, 52(3), 242-243.
- Tosun, F. (1986b).** Gazi Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi, 3, 99.
- Tosun, F., Tanker, M., & Özden, T. (1987a).** Alkaloids of *Genista burdurensis*. *Planta Medica*, 53(1), 119.
- Tosun, F., Tanker, M., Özden, T., & Tosun, A. (1987b).** Alkaloids of *Genista involucrata* and *Genista albida*. *Planta Medica*, 53(5), 499-500.
- Tosun, A., Tanker, M., Özden, T., & Tosun, F. (1987c).** Alkaloids of *Genista libanotica*. *Planta Medica*, 53(5), 501.
- Tosun, A., Tanker, M., Tosun, F., & Özden, T. (1988).** Alkaloids of *Genista lydia* var. *lydia* and var. *antiochia*. *Panta Medica*, 54(5), 466.
- Tosun, A., Tosun, F., Tanker, M., & Özden, T. (1991).** 10- $\alpha$ - hydroxymethylsparteine, a new type of quinolizidine alkaloid from *Genista sessilifolia*. *Tetrahedron Letters*, 32(42), 5915-5918.
- Tosun, F., Tosun, A., Tanker, M., & Özden, T. (1994).** The alkaloids of *Genista* L. species growing in Turkey. *Journal of Faculty of Pharmacy of Gazi University*, 11(2), 197-203.
- Tosun, F., Akyuz Kizilay, C., & Tosun, A.U. (2009).** Flavonoids and isoflavonoids from *Genista sessifolia* DC. growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(1), 83-84.
- Trumm, S. (1991).** Dem shikimat-weg entstammende niedermolekulare sekundärstoffe der Convolvulaceen. Dissertation, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- Tyski, S., Markiewicz, M., Gulewicz, K., & Twardowski, T. (1988).** The effect of lupine alkaloids and ethanol extracts from seeds of *Lupinus angustifolius* on selected bacterial strains. *Journal of Plant Physiology*, 133, 240-242.
- Ulubelen, A., & Doguc, T. (1974a).** Flavonoid compounds from the flowers of *Genista lydia*. *Planta Medica*, 25, 39-42.
- Ulubelen, A., & Doguc, T. (1974b).** Alkaloids from the flowers of *Genista lydia*. *Planta medica*, 26(8), 338-342.
- Université de Bristol, consulté le décembre 2011.** <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/tof.xhtml>
- Urbain, A. (2007).** Isolement de xanthonés et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de *Gentianella campestris* (L.) Börner et *Gentianella amarella* (L.) Börner ssp. *acuta* (Michx.) J.M.Gillett (Gentianaceae), et *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch (Apiaceae). Thèse de doctorat, Section des Sciences Pharmaceutiques, LPP, Université de Genève, Suisse.

- Van den Dool**, H., & Kratz, P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463-471.
- Van Rensen**, I., Wray, V., Witte, L., Canto, P., Greinwald, R., Veen, G., Veit, M., & Czygan, F.C. (1994). Ester alkaloids of *Genista cinerea* subspecies *cinerea*. *Phytochemistry*, 35(2), 421-424.
- Van Rensen**, I., Veit, M., Wray, V., & Czygan, F.C. (1995). Genistein-C-glucosides from *Genista cinerea*. *Natural Product Letters*, 6(3), 203-207.
- Van Rensen**, I., Veit, M., Röhner-van Rensen, U., Canto, P., Vogt, H., Greinwald, R., & Czygan, F.C. (1999). Line-scatter plots in chemotaxonomy of *Genista* L. section *Spartioides* Spach in Western Europe. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 687-708.
- Vasconcelos**, J.M.J., Silva, A.M.S., & Cavaleiro, J.A.S. (1998). Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* Supsp. *Maritima*. *Phytochemistry*, 49(5), 1421-1424.
- Veitch**, N.C. (2007). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports*, 24, 417-464.
- Vennerstrom**, J. L., Lovelace, J.K., Waits, V.B., Hanson, W.L., & Klayman, D.L. (1990). Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(5), 918.
- Vershaefelt**, & Stahl. (1915). *K. gl. Ak. Amsterdam, Gertz, Jahr, Wis. Bot.*, 56, p. 536.
- Viars**, P. (1979). Principales substances utilisées pour assurer une hypotension contrôlée. In: *Pharmacologie clinique*. Giroud, J.P., Mathe, G., Meyniel, G. Eds, Tome 2, 2010-2028
- Vijayakumar**, M., Govindarajan, R., Singh, D.P., & Rawat, A.K.S. (2005). Review of some important plants with antioxidant and other biological activities. *Pharmacognosy Magazine*, 1(4), 129-135.
- Vollhardt**, K.P.C., & Schore, N.E. (1994). *Traité de Chimie Organique*. 2<sup>ème</sup> édition, De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles.
- Wagner**, H., & Blatt, S. (1996). *Plant Drug analysis - A thin layer chromatography atlas*. 2<sup>nd</sup> ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Walter**, H.L., Memory, & P.F. (1977). *Medicinal botany plants affecting man's health*, A Wiley Interscience Publication: New York, 194, 257, 329.
- Wang**, K-J., Yang, C-R., & zhang, Y-I. (2007). Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*). *Food Chemistry*, 101, 365-371.
- Waridel**, P., Wolfender, J.-L., Ndjoko, K., Hobby, K.R., Major, H.J. & Hostettmann, K. (2001). Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *Journal of Chromatography A*, 926, 29-41.
- Wasunna**, M.K., Rashid, J.R., Mbui, J., Kirigi, G., Kinoti, D., Lodenyo, H., Felton, J.M., Sabin, A.J. & Horton, J. (2005). A phase II dose-increasing study of sitamaquine for treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 871-876.
- White**, E.P. (1944). Alkaloids of Leguminosae. *New Zealand Journal of Science and Technology*, XI, 146-151.
- White**, E.P. (1957). Alkaloids of Leguminosae. *New Zealand Journal of Science and Technology*, XXV, 712-718.
- White**, N.J. (2008). *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 172-173.
- WHO(a)**, consulté le 25-10-2014. <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>
- WHO(b)**, consulté le 25-10-2014. <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHVNUM?lang=en>
- WHO(c)**, consulté le 25-10-2014. <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>
- WHO(d)**. WHO global malaria programm. *World Malaria Reports 2013*, pp. 1-255.
- WHO(e)**, consulté le 15-11-2014. <http://worldmaliareport.org/node/57#overlay-context=node/57>
- Wikimedia**, consulté le 3 novembre 2014. [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/World\\_map-convolvulaceae.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/World_map-convolvulaceae.jpg)
- Wikipedia**, consulté le 19 décembre 2011. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrom%C3%A9trie\\_de\\_masse](http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrom%C3%A9trie_de_masse)
- Williams**, W., & Harrison, J.E.M. (1983). Alkaloid concentration during development in three *Lupinus* species and the expression of genes for alkaloid biosynthesis in seedlings. *Phytochemistry*, 22(1), 85-90.
- Wink**, M., Hartmann, T., & Schiebel H.M. (1979a). A model mechanism for enzymatic synthesis of lupin alkaloids. *Z. Natureforsch*, 34c, 704-708.
- Wink**, M., & Hartmann, T. (1979b). Cadaverine-pyruvate transamination: The principal step of enzymatic quinolizidine alkaloid biosynthesis in *Lupinus ptyphyllus* cell suspension cultures. *FEBS Letters*, 101(2), 343-346.

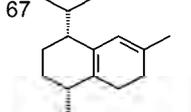
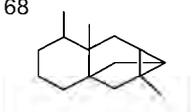
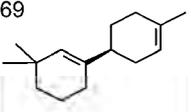
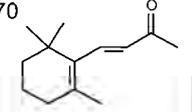
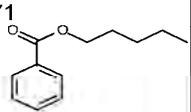
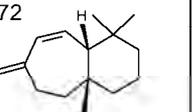
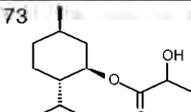
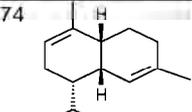
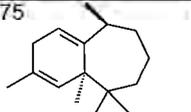
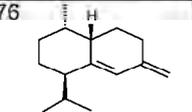
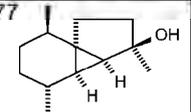
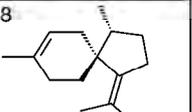
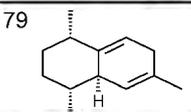
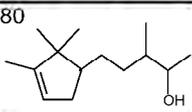
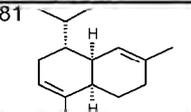
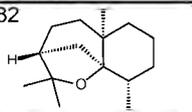
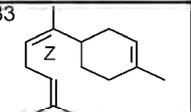
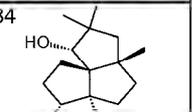
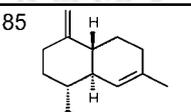
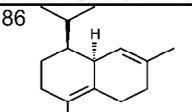
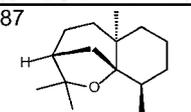
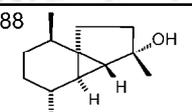
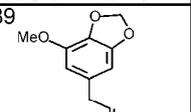
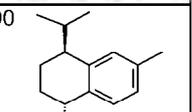
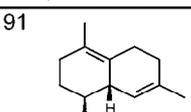
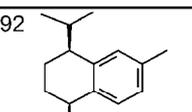
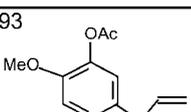
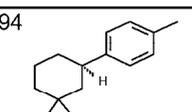
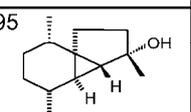
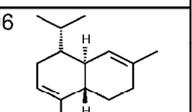
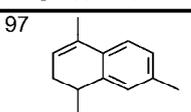
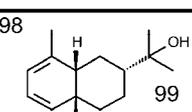
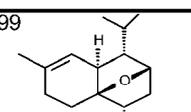
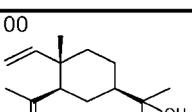
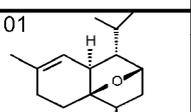
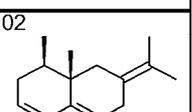
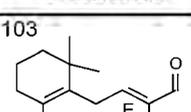
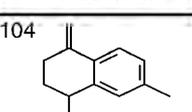
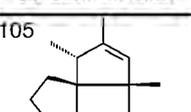
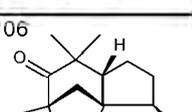
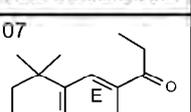
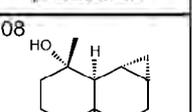
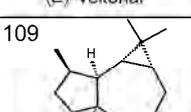
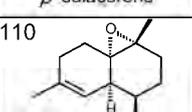
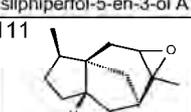
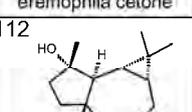
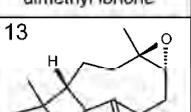
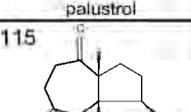
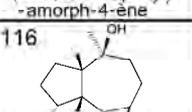
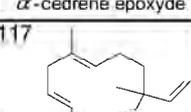
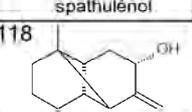
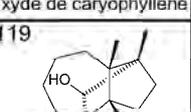
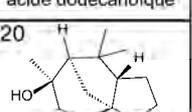
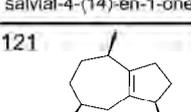
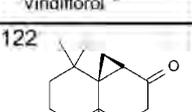
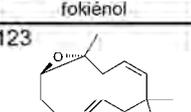
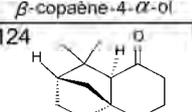
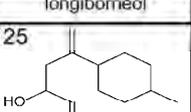
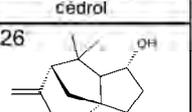
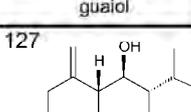
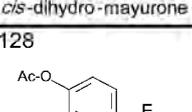
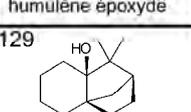
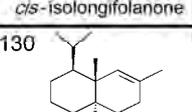
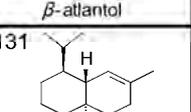
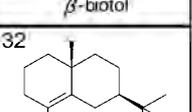
- Wink, M., & Witte, L. (1980).** Enzymatic synthesis of quinolizidine alkaloids in lupin chloroplasts. *Z. Natureforsch*, 35c, 93-97.
- Wink, M., Witte, L., Hartmann, T., Theuring, C., & Volz, V. (1983a).** Accumulation of quinolizidine alkaloids in plants and cell suspension cultures: genera *Lupinus*, *Cytisus*, *Baptisia*, *Genista*, *Laburnum*, and *Sophora*. *Planta Medica*, 48, 253-257.
- Wink, M. (1983b).** Inhibition of seed germination by quinolizidine alkaloids. Aspects of allelopathy in *Lupinus albus* L. *Planta*, 158, 365-368.
- Wink, M. (1984a).** N-Methylation of quinolizidine alkaloids: an S-adenosyl-L-methionine: cytosine N-methyltransferase from *Laburnum anagyroides* plants and cell cultures of *L. alpinum* and *Cytisus canariensis*. *Planta*, 161, 339-344.
- Wink, M., & Witte, L. (1984b).** Turnover and transport of quinolizidine alkaloids. Diurnal fluctuations of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta*, 161, 519-524.
- Wink, M. (1984c).** Chemical defense of *Leguminosae*, Are quinolizidine alkaloids part of the antimicrobial defense system of *Lupins*? *Z. Natureforsch*, 39c, 548-552.
- Wink, M. (1984d).** Chemical defense of *Lupins*. Mollusc-repellent properties of quinolizidine alkaloids. *Z. Natureforsch*, 39c, 553-558.
- Wink, M., & Hartmann, T. (1984e).** Enzymology of quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Natural Products Chemistry. A Collection of Invited Section and Colloquium Lectures*, pp. 511-520.
- Wink, M., & Witte, L. (1985).** Quinolizidine alkaloids as nitrogen source for lupin seedlings and cell cultures. *Z. Natureforsch*, 40c, 767-775.
- Wink, M., & Witte, L. (1986).** Alkaloids in stem roots of *Nicotiana tabacum* and *Spartium junceum* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Z. Natureforsch*, 42C, 69-72.
- Wink, M. (1987).** Quinolizidine alkaloids: Biochemistry, metabolism, and function in plants and cell suspension cultures. *Planta Medica*, 53(6), 509-514.
- Wink, M., & Schneider, D. (1990).** Fate of plant-derived secondary metabolites in three moth species (*Syntomis mogadorensis*, *Syntomeida epilais*, and *Cretonotos transiens*). *Journal of Comparative Physiology B*, 160, 389-400.
- Wink, M. (1993a).** Quinolizidine alkaloids, in: *Alkaloids and sulphur compounds. Methods in plant biochemistry*, Vol. 8, Waterman, P. (Ed.). Academic Press, London, pp. 197-239.
- Wink, M., & Witte, L. (1993b).** Quinolizidine alkaloids in *Genista acanthoclada* and its holoparasite, *Cuscuta palaestina*. *Journal of Chemical Ecology*, 19(3), 441-447.
- Wink, M., Meibner, C., & Witte, L. (1995).** Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38, 139-153.
- Wink, M., Botschen, F., Gosmann, C., Schäfer, H., & Waterman, P.G. (2010).** Chemotaxonomy seen from a phylogenetic perspective and evolution of secondary metabolism, Chapter 7. In: *Annual Plant Reviews*, Vol. 40, *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Second Edition, Willey-Blackwell, 40, pp. 364-433.
- Wippich, C., & Wink M. (1985).** Biological properties of alkaloids. Influence of quinolizidine alkaloids and gramine on the germination and development of powdery mildew, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Experientia*, 41, 1477-1479.
- Wu, W., Yan, C., Li, L., Liu, Z., & Liu, S. (2004).** Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1047, 213-220.
- Xia, Y., Dai, Y., Wang, Q., & Liang, H. (2007).** Determination of scopoletin in rat plasma by high performance liquid chromatographic method with UV detection and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 857, 332-336.
- Ye, M., Yang, W.Z., Liu, K.D., Qiao, X., Li, B.J., Cheng, J., Feng, J., Guo, D.A., & Zhao, Y.Y. (2012).** Characterization of flavonoids in *Millettia nitida* var. *hirsutissima* by HPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(1), 35-42.
- Zapesochnaya, G.G., & Ban'kovskii, A.I. (1966).** Trifolin from *Lespedeza tomentosa*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 2(4), 287-288.
- Zapesochnaya, G.G., Ivanova, S.Z., Medvedeva, S.A., & Tyukavkina, N.A. (1978).** O-Acylated flavonoid glycosides of the needles of *Pinus sylvestris*. I. O-Acetylated derivatives of flavonol glycosides. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 2, 193-196.
- Zellagui, A., Rhouati, S., Creche, J., Toth, G., Ahmed, A.A., & Paré, W. (2004).** Anti-microbial activity of the alkaloid extract of *Genista microcephala*: isolation and complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts assignments of lupanine and S-calycotomine. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 32(3), 109-114.
- Zhai, L., Blom, J., Chen, M., Christensen, B.S., & Kharazami, A. (1995).** The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 39, 2742-2748.
- Zhu, X., Zhang, H., & Lo, R. (2004).** Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7272-7278.

# *Annexes*

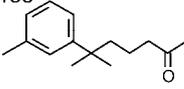
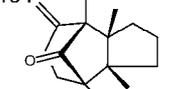
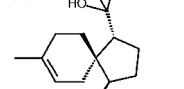
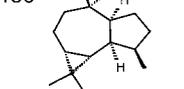
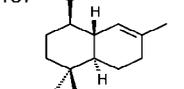
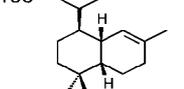
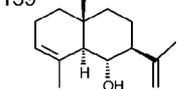
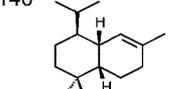
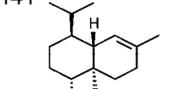
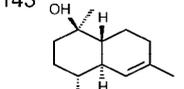
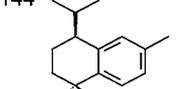
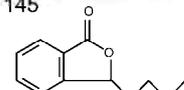
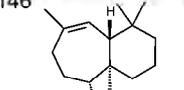
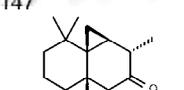
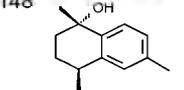
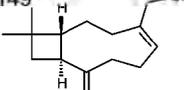
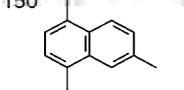
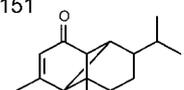
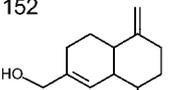
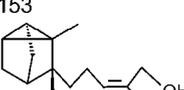
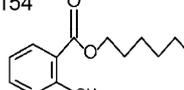
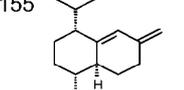
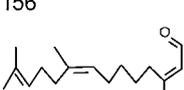
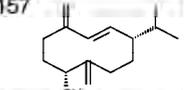
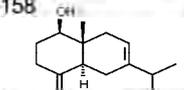
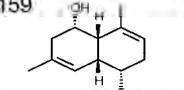
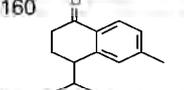
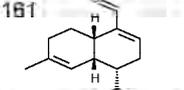
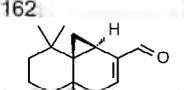
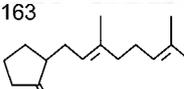
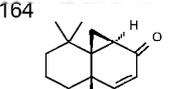
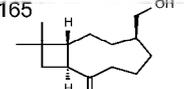
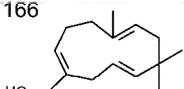
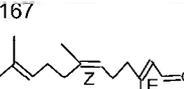
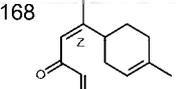
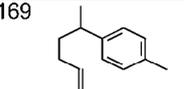
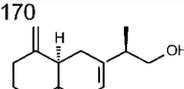
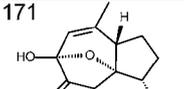
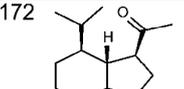
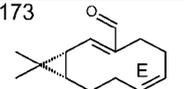
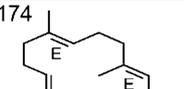
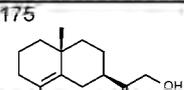
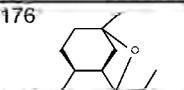
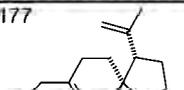
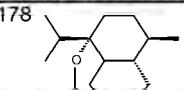
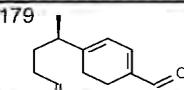
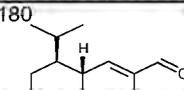
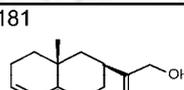
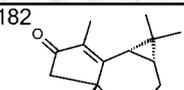
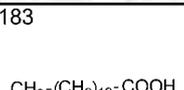
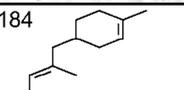
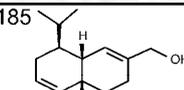
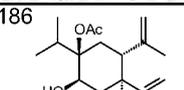
**Tableau A.1.** Formules développées des composés identifiés dans l'huile essentielle de *Genista quadriflora* Munby.

1  benzaldéhyde	2 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ acide hexanoïque	3  1,2,4-triméthyl benzène	4  alcool benzyle	5  phénylacétaldéhyde	6  méthylbenzylalcool
7  acétophénone	8  <i>ortho</i> -tolualdéhyde	9 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$ n-octanol	10 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ acide heptanoïque	11  <i>para</i> -tolualdéhyde	12  3-méthyl-1,2- cyclohexanedione
13  linalool	14  $\alpha$ -oxyde pinène	15 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CHO}$ n-nonanal	16  acide 2-éthyl hexanoïque	17  chrysanthenone	18  néoiso-3-thujanol
19  citronellal	20  2-acétyl-3-éthyl pyrazine	21  lavandulol	22 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{OH}$ n-nonanol	23  pinocamphéol	24 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{COOH}$ acide octanoïque
25  <i>mé</i> ta-cymen-8-ol	26  santalone	27  furfuryl acétone	28  (4E)-décenal	29 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ n-dodécane	30 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CHO}$ n-décanal
31  verbénone	32  iso-dihydro carvéol	33  <i>cis</i> -carvéol	34  2-prényl cyclopentanone	35  isobornyl formate	36  isovalérate de hexyle
37  <i>cis</i> -pipéritone époxyde	38  <i>trans</i> -pipéritone époxyde	39 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ acide nonanoïque	40  alcool <i>mé</i> ta-anisique	41  (E)-anéthole	42  (8Z)-undécenal
43 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ n-tridécane	44  <i>ortho</i> -vanilline	45  <i>trans</i> -(E)-jasmonol	46  acétate de verbanol	47  $\alpha$ -longipinène	48  $\alpha$ -cubébène
49  (Z)- $\beta$ -damascénone	50 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ acide décanoïque	51  cyclosativène	52  $\beta$ -épi-dictamnol	53  (Z)- $\beta$ -damascène	54  $\beta$ -cubébène
55  $\alpha$ -duprezianène	56  $\beta$ -élémente	57  (E)-jasmone	58  7-épi-sesquithujène	59  sibirène	60  $\beta$ -longipinène
61  (Z)-caryophyllène	62  (E)-caryophyllène	63  (E)- $\alpha$ -ionone	64  <i>cis</i> -thujopsène	65  $\gamma$ -élémente	66  néryl acétone

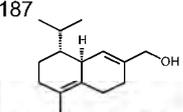
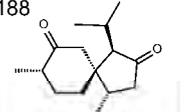
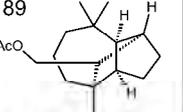
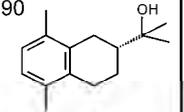
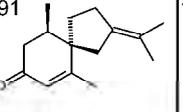
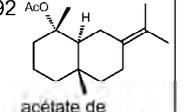
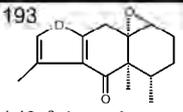
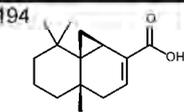
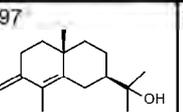
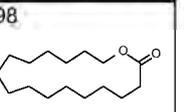
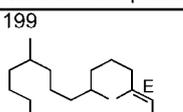
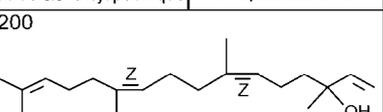
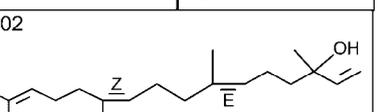
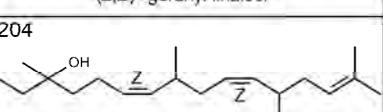
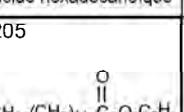
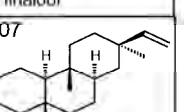
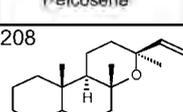
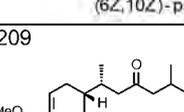
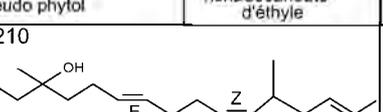
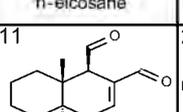
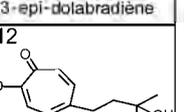
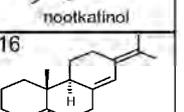
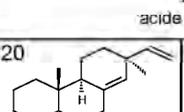
**Tableau A.2.** Formules développées des composés identifiés dans l'huile essentielle de *Genista quadriflora* Munby.

67  <i>cis</i> -cadina-1(6),4-diène	68  ishwarane	69  $\alpha$ -macrocarpène	70  ( <i>E</i> )- $\beta$ -ionone	71  benzoate de pentyle	72  widdra-2,4(14)-diène
73  lactate de menthyle	74  $\alpha$ -amorphène	75  11- $\alpha$ H-himachala-1,4-diène	76  <i>trans</i> -murola-4(14),5-diène	77  epi-cubébol	78  $\beta$ -alaskène
79  <i>cis</i> -cadina-1,4-diène	80  sandalore	81  $\alpha$ -murolène	82  $\beta$ -dihydroagarofurane	83  ( <i>Z</i> )- $\alpha$ -bisabolène	84  cameroonan-7- $\alpha$ -ol
85  $\gamma$ -cadinène	86  $\delta$ -amorphène	87  <i>cis</i> -dihydroagarofurane	88  cubébol	89  myristicine	90  <i>trans</i> -calaménène
91  $\delta$ -cadinène	92  <i>cis</i> -calaménène	93  acétate de chavibétol	94  ar-macrocarpène	95  10-epi-cubébol	96  $\alpha$ -cadinène
97  $\alpha$ -calacorène	98  occidentalol	99  <i>cis</i> -cadinène éther	100  élémol	101  <i>trans</i> -cadinène éther	102  $\beta$ -vétivénène
103  ( <i>E</i> )-veltonal	104  $\beta$ -calacorène	105  silphiperfol-5- $\text{en}$ -3-ol A	106  éremophila cétone	107  diméthyl ionone	108  maaliol
109  palustrol	110  (1- $\alpha$ ,10 $\alpha$ -époxy)-amorph-4-ène	111  $\alpha$ -cédrene époxyde	112  spathuléol	113  oxyde de caryophyllène	114 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$ acide dodécanoïque
115  salvia-4-(14)- $\text{en}$ -1-one	116  viridiflorol	117  fokiéniol	118  $\beta$ -copaène-4- $\alpha$ -ol	119  longibornéol	120  cédrol
121  guaïol	122  <i>cis</i> -dihydro-mayurone	123  humulène époxyde	124  <i>cis</i> -isolongifolanone	125  $\beta$ -atlantol	126  $\beta$ -biotol
127  junéniol	128  acétate de ( <i>E</i> )-isoeugénol	129  isolongifolan-7- $\alpha$ -ol	130  murola-4,10(14)-dièn-1- $\beta$ -ol	131  1-epi-cubébol	132  $\gamma$ -eudésmol

**Tableau A.3.** Formules développées des composés identifiés dans l'huile essentielle de *Genista quadriflora* Munby.

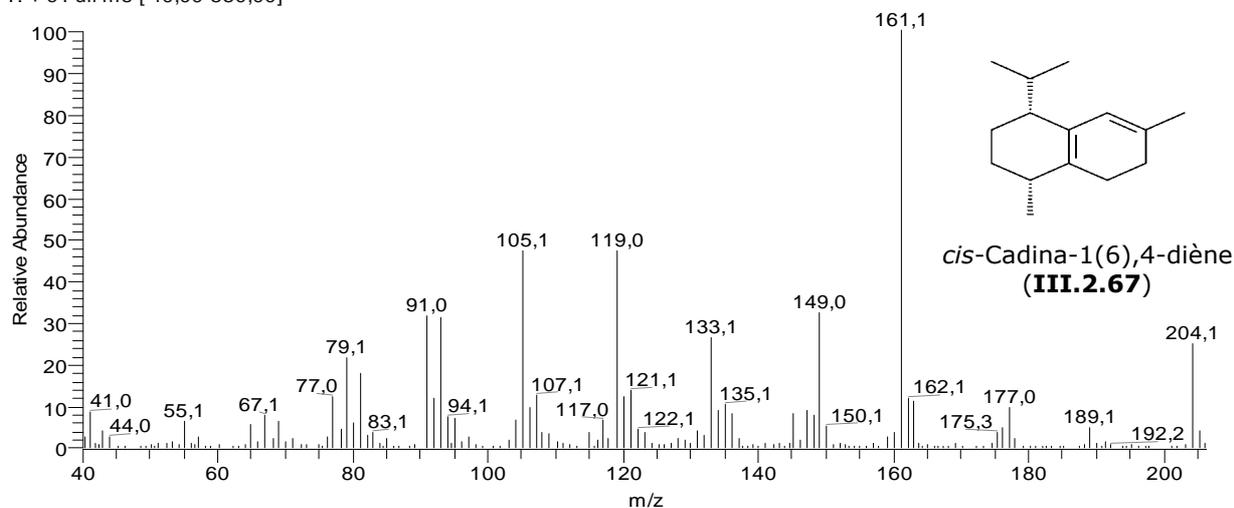
133  6-méthyl-6(3-méthyl phényl)-heptan-2-one	134  gymnomitrone	135  $\alpha$ -acorenol	136  allo-aromadendrene époxyde	137  epi- $\alpha$ -cadinol	138  epi- $\alpha$ -murolol
139  sélina-3,11-dien-6- $\alpha$ -ol	140  $\alpha$ -murolol	141  cubenol	142  3-iso-thujopsanone	143  $\alpha$ -cadinol	144  <i>cis</i> -calamenen-10-ol
145  3-butyl phthalide	146  allohimachalol	147  3-thujopsanone	148  <i>trans</i> -calamenen-10-ol	149  14-hydroxy-9-epi-(E)- caryophyllène	150  cadalène
151  mustakone	152  khusirol	153  (Z)- $\alpha$ -santalol	154  hexyl-2-hydroxy benzoate	155  <i>cis</i> -14-nor-murol- 5-en-4-one	156  (Z,6E)-farnésal
157  germacra-4(15),5,10 (14)-trien-1- $\alpha$ -ol	158  eudesma-4(15),7- dièn-1 $\beta$ -ol	159  amorpha-4.9-dien- 2-ol	160  10-nor-calamenen- 10-one	161  amorpha-4.9-dien- 14-al	162  <i>cis</i> -thujopsenal
163  (E)-apritone	164  mayurone	165  14-hydroxy-4,5-dihydro- caryophyllène	166  14-hydroxy- $\alpha$ - humulène	167  (2E,6Z)-farnésal	168  (Z)- $\alpha$ -allantone
169  (Z)-nuciférol	170  vétisèlinénal	171  curcumenol	172  oplopanone	173  isobicyclogermacrénal	174  (2E,6E)-farnésol
175  $\gamma$ -costol	176  muurolan-4,7-oxyde	177  $\beta$ -acoradiénol	178  muurolan-4,7-peroxyde	179  $\gamma$ -curcumèn-15-al	180  14-oxy- $\alpha$ -murolène
181  $\alpha$ -costol	182  epi-cycloclorénone	183  CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -COOH acide tétradécanoïque	184  (E)- $\alpha$ -allantone	185  14-hydroxy- $\alpha$ - murolène	186  7-acétoxy-éléma-1,3- dièn-8-ol

**Tableau A.4.** Formules développées des composés identifiés dans l'huile essentielle de *Genista quadriflora* Munby.

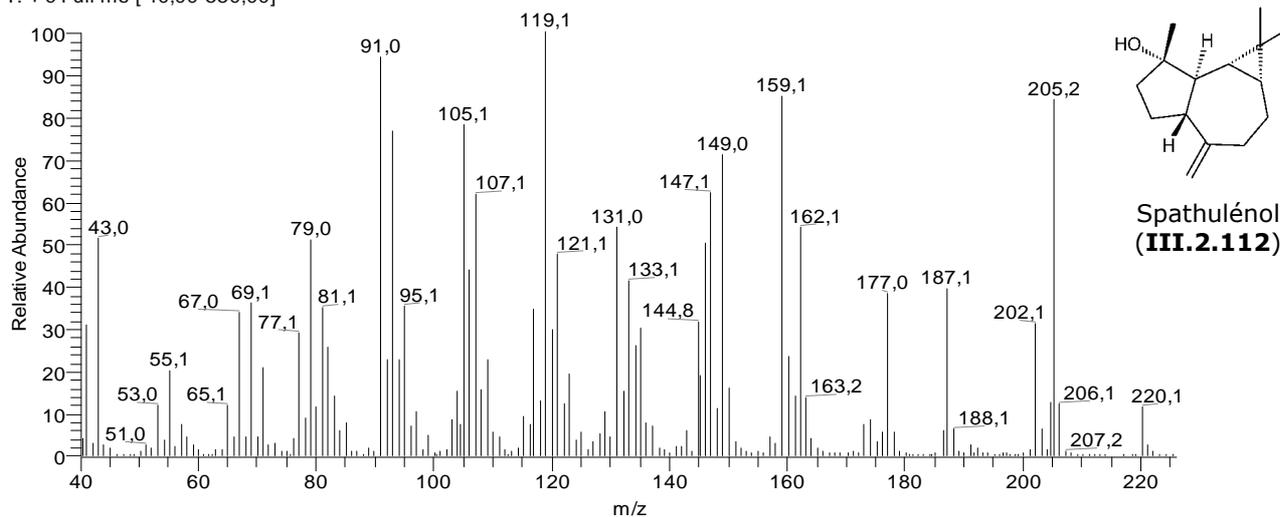
187  14-hydroxy- $\delta$ -cadinène	188  iso-acorone	189  acétate de isolongifolol	190  occidol	191  $\beta$ -vétivone	192  acétate de eudésma-7(11)-én-4-ol
193  1,10- $\beta$ -époxy-6-oxofuranoéremophilane	194  acide <i>cis</i> -thujopsénique	195 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CO}-\text{CH}_3$ 2-heptadécane	196 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ n-nonadécane	197  carissone	198  cyclohexadécanolide
199  phytol	200  (Z,Z)-géranyl linalool	201 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$ acide hexadécanoïque	202  (E,Z)-géranyl linalool		
203 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}=\text{CH}_2$ 1-eicosène	204  (6Z,10Z)-pseudo phytol	205  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$ hexadécanoate d'éthyle	206 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}\text{CH}_3$ n-eicosane	207  13-épi-dolabradiène	
208  oxyde de 13-épi manool	209  jivibione	210  (6E,10Z)-pseudo phytol	211  polygodial	212  nootkafinol	
213 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CH}_3$ n-heneicosane	214 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_7-\text{Z}-\text{Z}-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ acide linoléique	215 $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_7-\text{Z}-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ acide oléique		216  abiéta-(8(14),13(15))-diène	
217 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CH}=\text{CH}_2$ 1-docosène	218 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_2\text{OH}$ n-nonadécanol	219 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CH}_3$ n-docosane	220  pimaraate de méthyle	221 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CH}_3$ n-tricosane	222 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{CH}_3$ n-tétracosane

**Annexe A.5.** Spectres de masse en GC/EI-MS de 12 sésquiterpènes identifiés dans l'huile essentielle du *Genista quadriflora*.

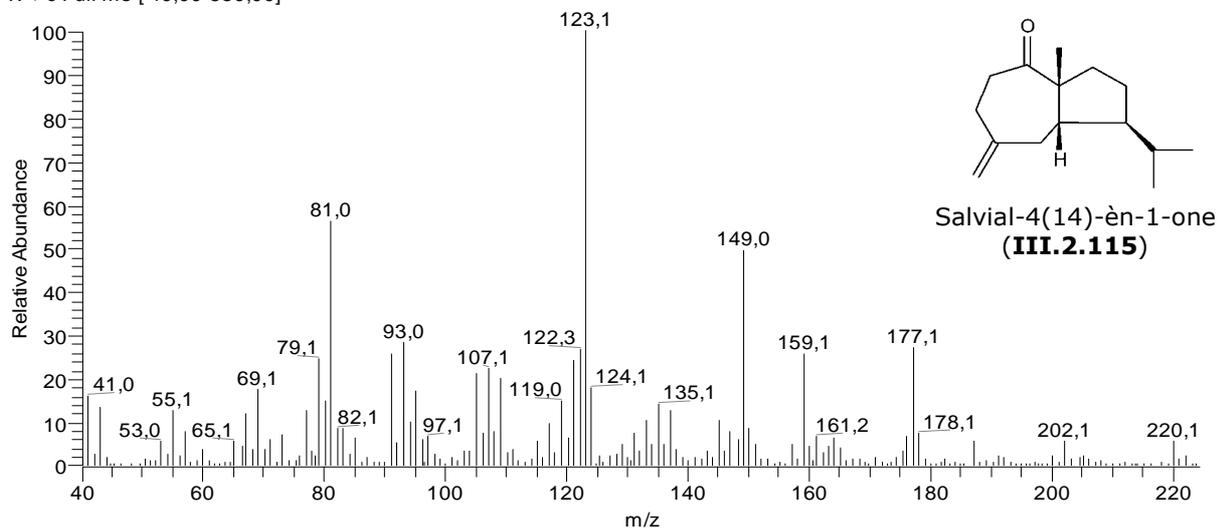
Huileessentielle(5-50) #2799 RT: 51,61 AV: 1 NL: 4,10E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



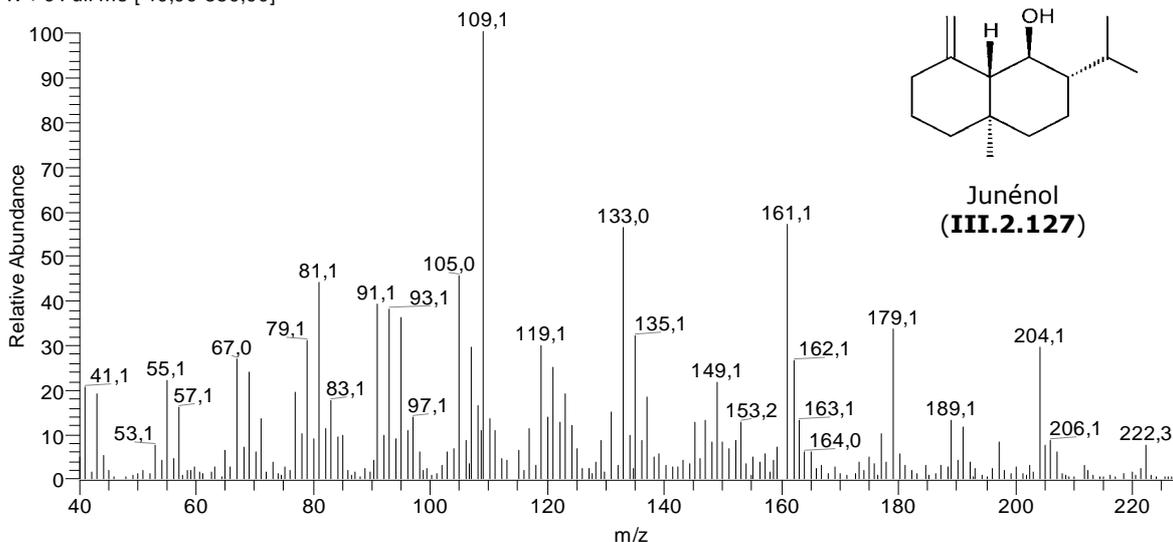
Huileessentielle(5-50) #3015 RT: 55,36 AV: 1 NL: 8,32E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



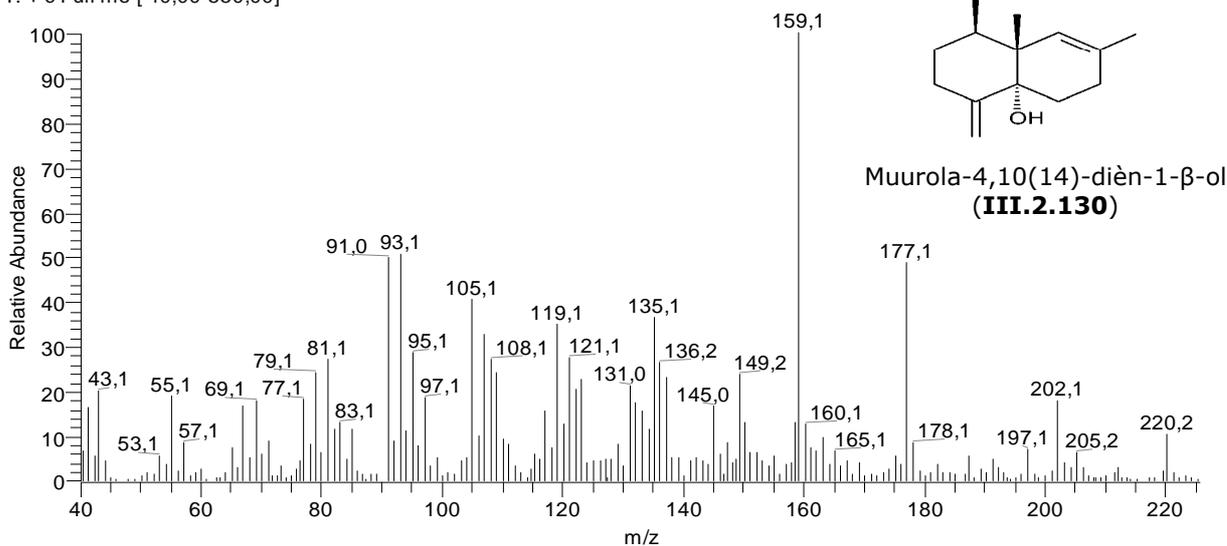
Huileessentielle(5-50) #3042 RT: 55,83 AV: 1 NL: 6,62E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



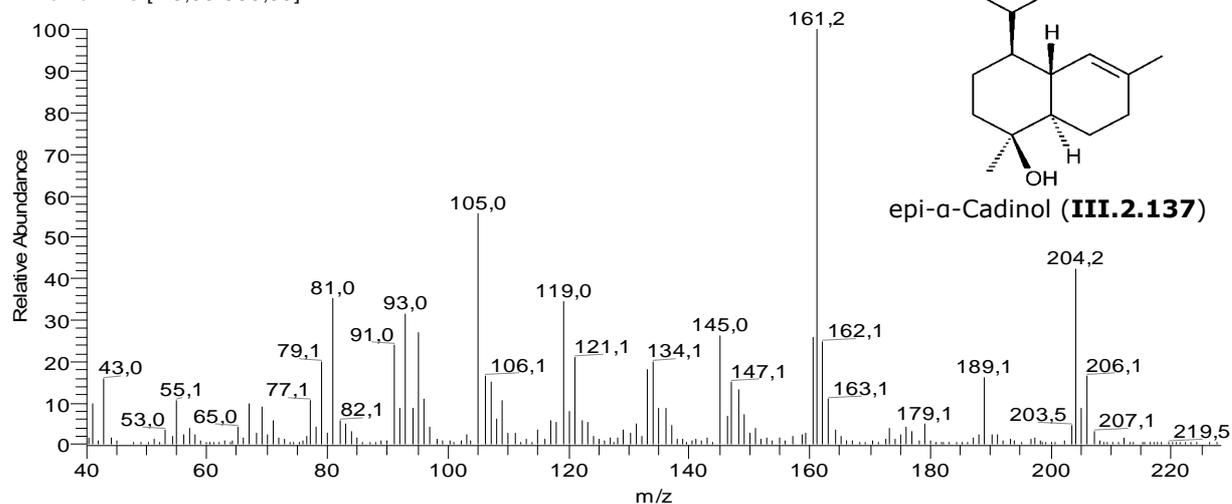
Huileessentielle(5-50) #3092 RT: 56,70 AV: 1 NL: 1,55E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



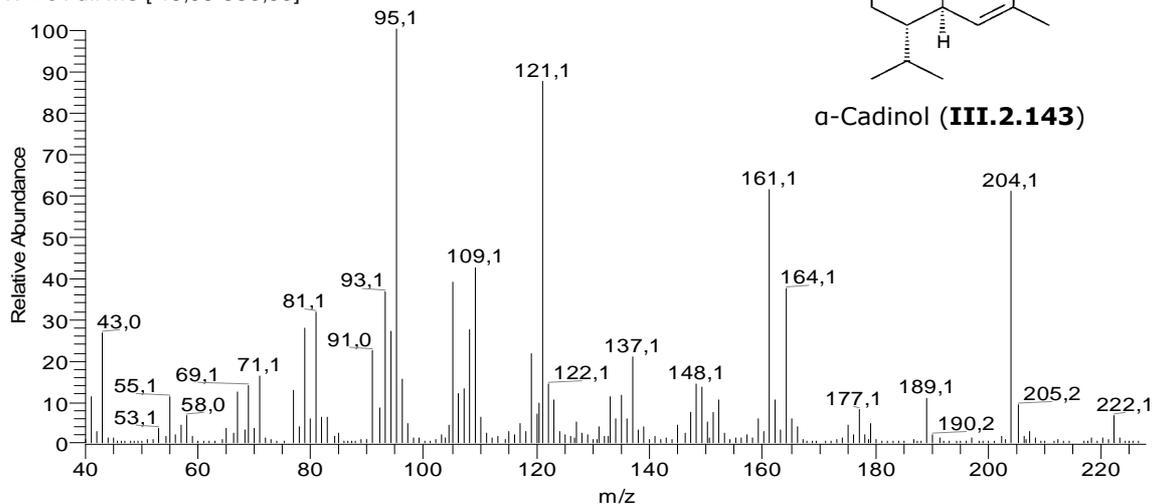
Huileessentielle(5-50) #3102 RT: 56,87 AV: 1 NL: 2,00E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



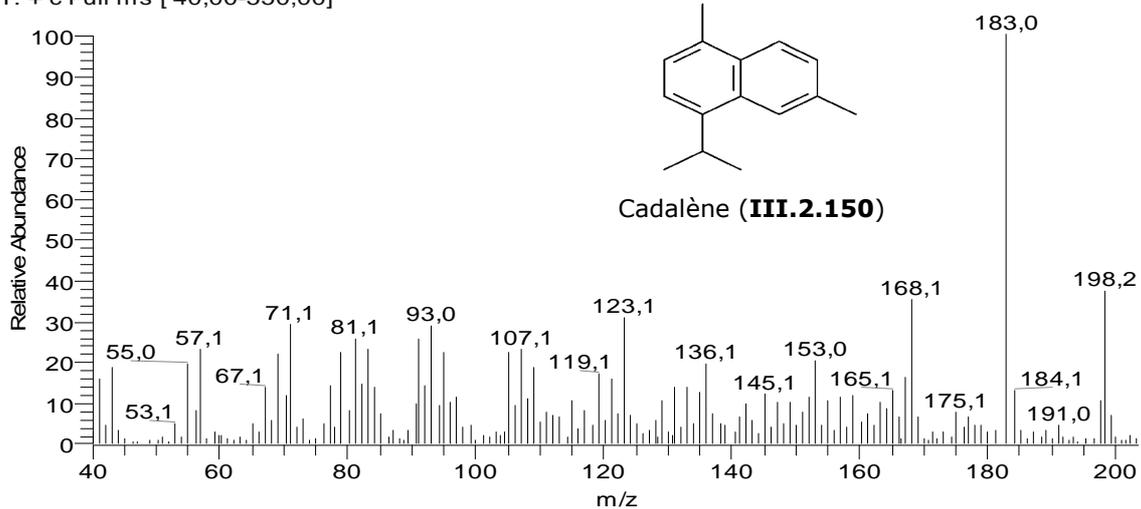
Huileessentielle(5-50) #3132 RT: 57,40 AV: 1 NL: 8,55E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



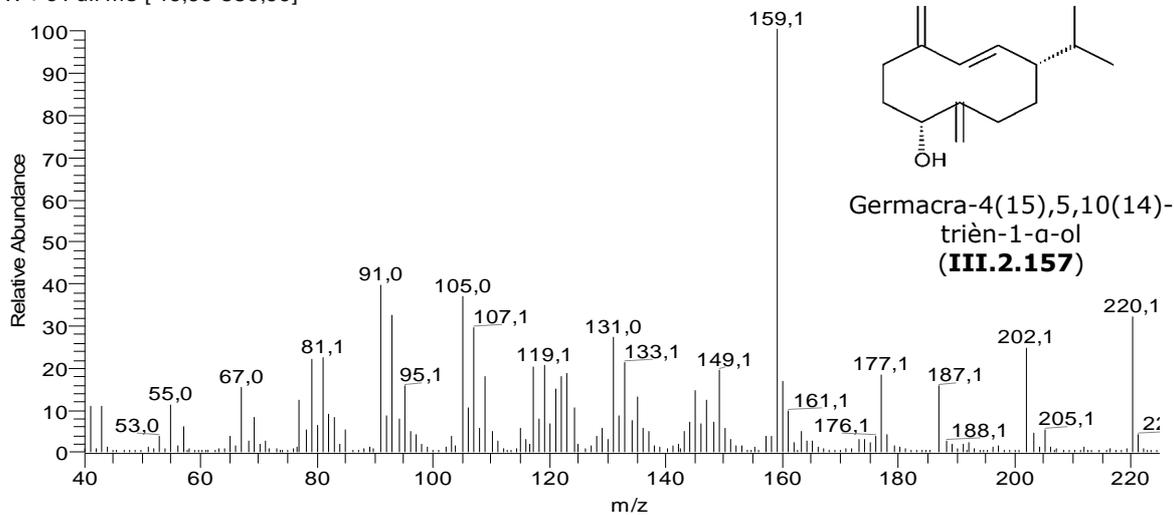
Huilessentielle(5-50) #3153 RT: 57,76 AV: 1 NL: 1,86E6  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



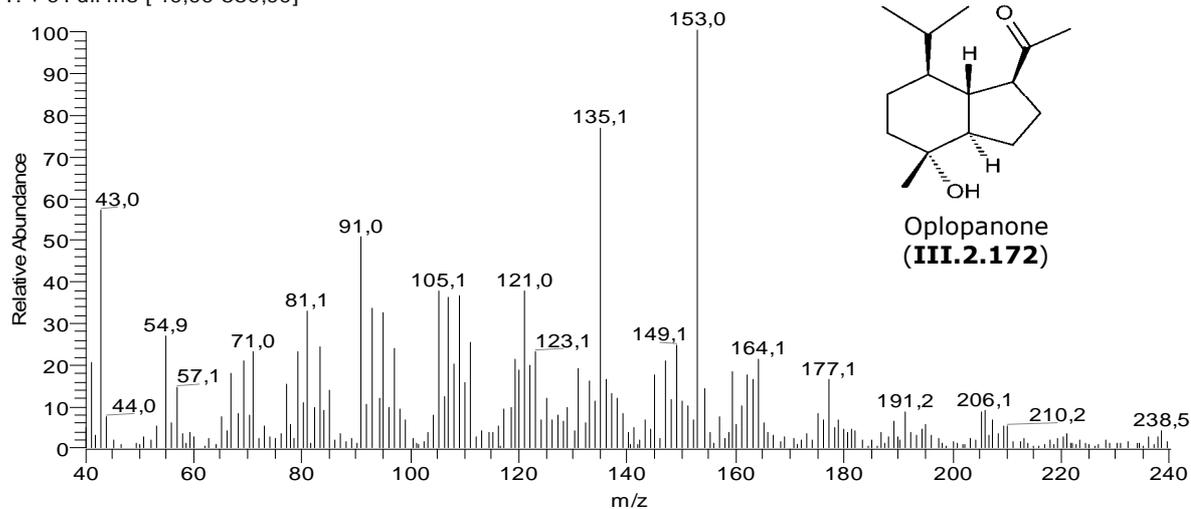
Huilessentielle(5-50) #3177 RT: 58,18 AV: 1 NL: 4,11E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



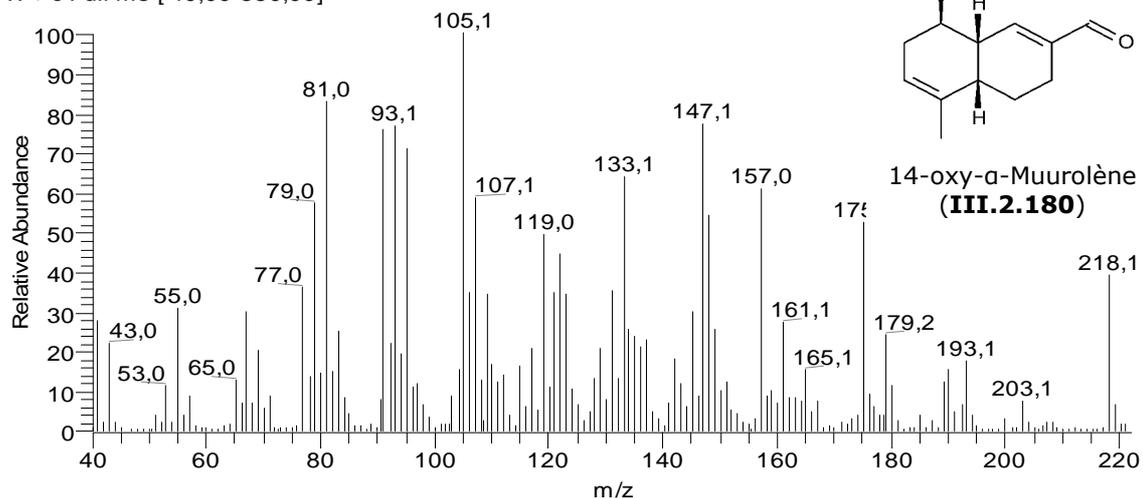
Huilessentielle(5-50) #3206 RT: 58,68 AV: 1 NL: 1,06E6  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



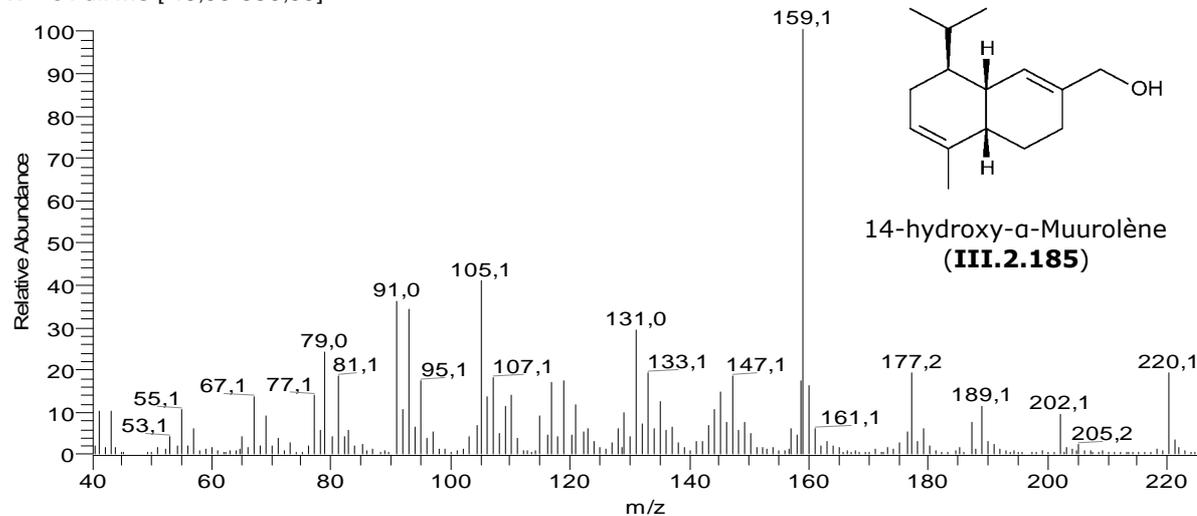
Huileessentielle(5-50) #3269 RT: 59,78 AV: 1 NL: 9,70E4  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



Huileessentielle(5-50) #3311 RT: 60,51 AV: 1 NL: 8,18E5  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



Huileessentielle(5-50) #3326 RT: 60,77 AV: 1 NL: 1,01E6  
T: + c Full ms [ 40,00-550,00]



## ملخص

يرتكز بحثنا على نبتتين، الأولى *Genista quadriflora* وهي نبتة أصلية والثانية *Convolvulus tricolor* . سمحت لنا دراسة المحتوى القلويدي للنبتة الأولى باستعمال GC/EIMS بالتعرف على 20 مركب من ضمنها 10 مركبات سجلت لأول مرة في هذا النوع. توزعت هذه المركبات كما يلي:

- 13 مركبا قلويدي من نوع كينولزدين
- 5 مركبات قلويدية من نوع بيبيريدين
- مركب قلويدي آخر من نوع نيكوتيني، بالإضافة إلى مشتق حمض النيكوتينيك

دراسة محتوى النبتة الأولى من الزيوت الأساسية مكنتنا من تحديد البنية الكيميائية لـ 222 مركبا من ضمنها 197 مركبا تم التعرف عليهم لأول مرة في هذا النوع. مع العلم أن النسبة الغالبة في الزيوت الأساسية من التربينات تقدر بـ 66.85 بالمائة مع سيادة السيسكويتربينات التي من بينها نذكر:

- Salvia-4(14)-èn-1-one; germacra-4(15),5,10(14)-trièn-1-α-ol; amorpho-4,9-dièn-2-ol; muurolan-4,7-peroxyde

إضافة إلى ذلك فإن 22 مركبا قد استخلصوا للمرة الأولى من النبتتين المدروستين هياكلهم الأساسية ممثلة في:

- Acides caféoylquiniques, flavonoïdes, coumarine, acide phénol

تم التعرف على البنية الكيميائية لهذه المركبات باستعمال مطيافيات الكتلة عالية الكفاءة المختلفة، وكذلك أطيف الرنين النووي المغناطيسي أحادي وثنائي البعد.

أما الجزء الثاني من البحث فتناولنا فيه الفعالية البيولوجية لمستخلصات النبتتين التي تمثلت في نشاط مضاد للأكسدة، فعالية ضد ميكروبية، فعالية ضد فطرية، نشاط مضاد للإنزيم اسيتلكولنستغاز، أنشطة مضادة للملاريا وللشمانيا.

التجارب التي أجريت خلال هذا العمل أدت إلي نتائج تستحق الاهتمام خاصة منها :

- مستخلصات النبتة *Convolvulus tricolor* التي أظهرت فعاليات مضادة للملاريا و للشمانيا تتراوح بين 89 و 99 %.
- المستخلص القلويدي للأطراف الهوائية للنبتة *Genista quadriflora* الذي أبدت نحوه البكتيريا من نوع *Pseudomonas aeruginosa* حساسية مميزة.

**الكلمات الهامة:** *Convolvulus*، *Genista*، قلويدات، احماض كافيولكينية، سيسكويتربينات، فلافونيدات، مضاد للأكسدة،

الضد ميكروبية، الضد فطرية، مضاد للإنزيم اسيتلكولنستغاز، مضاد للملاريا، مضاد للشمانيا، HPLC, MPLC, CPC

.ESIMS, GC/EIMS, HR-MS/TOF, Q-TRAP, MS<sup>n</sup>, RMN-2D

# Summary

This work was focused on two Algerian plants, the endemic species *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae) and the species *Convolvulus tricolor* (Convolvulaceae). The study of the alkaloid profile of *G. quadriflora* by GC/EIMS allowed the identification of twenty compounds, among which ten are newly registered for the genus. We indicate the presence of:

- Thirteen quinolizidine alkaloids
- Five piperidine alkaloids
- One nicotinic alkaloid, in addition to a nicotinic acid derivative.

The investigation of the *G. quadriflora* essential oil has led to the identification of 222 compounds, of which 197 are reported for the first time in the genus. This oil is mainly composed of terpenoids (66.85%) with a prevalence of sesquiterpenoids (65.18%). The major compounds are cited as:

- Salvia-4 (14) - in-1-one; germacra-4 (15), 5, 10 (14) - trien-1- $\alpha$ -ol; amorpha-4, 9-dien-2-ol; muurolan-4, 7-peroxide.

Also, twenty two compounds (caffeoylquinic acids, flavonoids, coumarin, phenol acid) were isolated from *C. tricolor* and *G. quadriflora*. All these compounds are reported for the first time in the studied species. The structural determination was carried out by mass spectrometry in electronic impact EIMS, by electrospray ESIMS, by high-resolution mass spectrometry HRMS, by time of flight HR-TOFMS, and by mass spectrometry high-resolution tandem MS<sup>n</sup>. In addition, we used NMR-1D and 2D spectroscopy.

The second part of our work was an *in vitro* evaluation of the biological activities such as:

- antileishmanial activity, antimalarial activity, antifungal and antibacterial activities, antioxidant activity against the DPPH, and the activity towards the enzyme acetylcholinesterase.

The various tests carried out during this work have led to tracks quite interesting especially for:

- Samples of *Convolvulus tricolor* with inhibitions of the parasitic activity going from 89 to 99% by quite low rates of toxicity indicating their good selective activity on the parasites.
- The alkaloids extract resulting from the air parts of *Genista quadriflora* for which the bacteria type *Pseudomonas aeruginosa* had a very particular sensitivity.

**Key words:** *Genista*, *Convolvulus*, alkaloids, caffeoylquinic acids, sesquiterpenoids, flavonoids, HPLC, MPLC, CPC, ESIMS, GC/EIMS, HR-TOFMS, Q-TRAP, MS<sup>n</sup>, NMR-2D, antileishmanial, antimalarial, antibacterial, antifungal, antiradical, acetylcholinesterase.

# Résumé

Dans ce travail nous nous sommes concentrés sur deux plantes algériennes, l'espèce endémique *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae) et l'espèce *Convolvulus tricolor* (Convolvulaceae). L'étude du profil alcaloïdique de *G. quadriflora* par GC/EIMS nous a permis d'identifier une vingtaine de composés, parmi lesquels dix sont nouvellement enregistrés dans le genre. Nous confirmons la présence de:

- Treize alcaloïdes quinolizidiniques
- Cinq alcaloïdes pipéridiniques
- Un alcaloïde de type nicotinique, et un dérivé de l'acide nicotinique.

L'investigation de l'huile essentielle de *G. quadriflora* a abouti à l'identification de 222 composés, dont 197 sont signalés pour la première fois dans le genre. Cette huile est principalement composée de terpènes (66.85%) avec une prédominance de sesquiterpènes (65.18%) en citant comme composés majoritaires:

- Salvia-4(14)-èn-1-one; germacra-4(15), 5, 10(14)-trièn-1- $\alpha$ -ol; amorphe-4, 9-dièn-2-ol; muurolan-4,7-péroxyde.

De même, 22 composés (acides caféoylquiniques, flavonoïdes, coumarine, acide phénol) ont été isolés de *C. tricolor* et de *G. quadriflora*. Tous ces composés sont reportés pour la première fois pour les espèces étudiées. La détermination structurale a été essentiellement réalisée grâce à la spectrométrie de masse en impact électronique EIMS, en *electrospray* ESIMS, la masse haute résolution HRMS ou à l'analyseur à temps de vol HR-TOF, et la spectrométrie de masse haute résolution en tandem MS<sup>n</sup>, en plus de l'utilisation de la spectroscopie RMN-1D et 2D.

La seconde partie de notre travail a été une évaluation *in vitro* des activités biologiques telles que:

- l'activité leishmanicide, l'activité antipaludique, les activités antibactériennes et antifongiques, l'activité antiradicalaire contre le DPPH et l'activité inhibitrice envers l'enzyme acétylcholinestérase.

Les différents criblages effectués au cours de ce travail ont abouti à des pistes bien intéressantes spécialement pour:

- Les échantillons de *Convolvulus tricolor* exhibant des inhibitions de l'activité parasitaire allant de 89 à 99% avec des taux de toxicité bien faibles témoignant de leur bonne activité sélective sur les parasites.
- L'extrait alcaloïdique issu des parties aériennes de *Genista quadriflora* pour lequel les bactéries de type *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté une sensibilité très particulière.

**Mots clés :** *Genista*, *Convolvulus*, alcaloïdes, acides caféoylquiniques, sesquiterpènes, flavonoïdes, HPLC, MPLC, CPC, ESIMS, GC/EIMS, HR-MS/TOF, Q-TRAP, MS<sup>n</sup>, RMN-2D, leishmanicide, antipaludique, antibactérienne, antifongique, antiradicalaire, acétylcholinestérase.