

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

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

Série :

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de
Doctorat en sciences
Spécialité: Chimie Organique
Option: Phytochimie

Par

M^{me} Tidjani Soukaina

**Etude Phytochimique et Evaluation Biologique
de L'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl.**

Devant le jury:

Pr. Abdelmadjid Debache	U. Des Frères Mentouri Constantine	Président
Pr. Salah Rhouati	U. Des Frères Mentouri Constantine	Directeur de thèse
Pr. Amar Zellegui	U. Larbi Benmhidi- Oum El-Bouaghi	Examineur
Pr. Touhami Lanez	U. Echahid Hamma Lakhdar El-Oued	Examineur
Pr. Hocine Dendougui	U. Kasdi Merbah de Ouargla	Examineur
Pr. Salah AKKAL	U. Des Frères Mentouri Constantine	Examineur

Soutenue le 30/10/2016

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ ◊ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ ◊ مَالِكِ يَوْمِ الدِّينِ

إِيَّاكَ نَعْبُدُ وَإِيَّاكَ نَسْتَعِينُ ◊ اهْدِنَا الصِّرَاطَ الْمُسْتَقِيمَ ◊ صِرَاطَ

الَّذِينَ أَنْعَمْتَ عَلَيْهِمْ غَيْرِ الْمَغْضُوبِ عَلَيْهِمْ وَلَا الضَّالِّينَ ◊

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

Dédicaces

A la mémoire de mon père

A ma très chère mère, mon amie, mon modèle et mon héroïne, c'est elle qui a fait de ma vie une épreuve agréable que dieu te garde pour nous tous.

A mon cher mari pour ta présence ton écoute ta gentillesse ton soutien et pour avoir beaucoup donné de ton temps

A mes chers enfants, ma chair, mon sang, ma force, mon combat et ma raison de vivre à

Oumaima, Abdelaziz et Fatma Ezzahra.

A Sidna cheikh sidi el- Aïd

À mes chers **frères** Ahmed **Chaouki** et **Mohamed**

A mes chères **sœurs** **Dady** et **Faiza**

Ainsi qu'à leurs petites familles je cite Abdelrahim Ghallia Amina

Mouna Baya Safia Imène Abdelatif Elghali Mahmoud

Dora et Khadoudja

A la Haloum et Bahidja pour leur soutien durant mes absences et à toute ma belle famille.

A tous ceux qui m'aiment et qui m'estiment.

Remerciements

Je suis reconnaissante au Professeur Salah Rhouati, directeur de thèse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir offert tant d'opportunités et sa grande patience qui ont permis de mener à bon terme ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur A. Zellegui, Professeur à l'université d'Oum El-Bouaghi, pour son aide et pour la récolte de l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier le Professeur Debache Abdelmadjid de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude au Professeur Touhami Lanez pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire VTRS à l'université d'El-Oued et pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont aux professeurs, Monsieur Salah AKKAL de l'université de Constantine, Monsieur Dendougui Hocine de l'université de Ouargla pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude au Professeur Pierre Duez pour m'avoir accueillie au sein de son service de Pharmacognosie, de Bromatologie et Nutrition Humaine à l'université libre de Bruxelles, durant mes cours stages en Belgique et pour avoir mis à ma disposition des conditions matérielles favorables. Ma reconnaissance va aussi à toute l'équipe: particulièrement au professeur Philippe Okusa pour son aide malgré ses multiples occupations, au Professeur Caroline Stévigny à Olivier Vaillant pour leur disponibilité.

Je remercie également M^{me} le Professeur Benayache Fadila (Université des frères Mentouri de Constantine) de m'avoir permis de réaliser les analyses Spectrométrie UV-Visible.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Zahia KABOUCHE, ainsi que le professeur Ahmed Kabouche du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) (Université des frères Mentouri de Constantine) de m'avoir aidé à réaliser l'Hydrolyse acide.

Mes remerciements vont également à monsieur le Professeur R. KHAMIS (NRC, Le Caire, Egypte), pour m'avoir bien accueillie dans son laboratoire ainsi qu'au docteur Imène Ademelkhi la syrienne dont je n'ai plus aucune nouvelle qui m'a beaucoup appris sur les méthodes de séparation qu'elle trouve ici ma sincère gratitude.

Je remercie mes amies du laboratoire physinor: Rofia, Fairouz, Ahlem, Narimene, qui ont rendu cette belle aventure plus agréable. Un grand merci pour les bons moments partagés, votre bonne humeur, votre disponibilité, votre aide et soutien moral.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTÉRATURE	
I. 1. Etude Phytochimique	4
I. 1. 1. Le métabolisme secondaire chez les végétaux	4
I. 1. 2. La famille des Astéraceae	5
I. 2. Le genre <i>Senecio</i>	6
I. 2. 1. Caractéristiques botaniques	6
I. 2. 2. Place à la systématique	7
I. 2. 3. Utilisation en médecine traditionnelle	8
I. 2. 4. Toxicité	8
I. 3. Principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Senecio</i>	9
I. 3. 1. Les Terpènes	9
I. 3. 1. 1. Les sesquiterpènes	10
I. 3. 1. 2. Les Eremophylanes et les Furanoeremophilanes	10
I. 3. 2. Les Alcaloïdes	12
I. 3. 2. 1. Généralités sur les alcaloïdes	12
I. 3. 2. 2. Définition	13
I. 3. 2. 3. 1. Classement des alcaloïdes d'après leurs origines biosynthétiques	14
I. 3. 2. 3. 2. Classement des alcaloïdes d'après leur structure chimique	15
I. 3. 2. 4. État naturel, distribution des alcaloïdes	15
I. 3. 2. 5. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes	17
I. 3. 2. 6. Détection et extraction des alcaloïdes	18
6. 2. 1. Extraction par un solvant en milieu alcalin	18
6. 2. 2. Extraction par un solvant en milieu acide	20
I. 3. 2. 7. Structures des alcaloïdes pyrrolizidiniques isolés des espèces du genre <i>Senecio</i>	20
I. 3. 2. 8. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques	24
8. 1. Définition et répartition	24
8. 2. Structure des alcaloïdes pyrrolizidiniques	25
8. 3. Toxicologie et métabolisation des APs	27
8. 3. 1. Cas des APs insaturés en position C ₁ – C ₂	27
8. 3. 2. Cas des APs saturés en position C ₁ – C ₂	30
8. 3. 3. Toxicité chez l'homme	31
8. 3. 4. Toxicité chez les animaux	32
8. 4. Méthodes d'identification des alcaloïdes pyrrolizidiniques	33
8. 4. 1. Indice de rétention (IR)	33
8. 4. 2. Identification des APs par Spectrométrie de masse	35
8. 4. 2. 1. Les spectres de masse par impact électronique (IE)	
I. 3. 3. Les composés phénoliques	38

TABLE DES MATIERES

I. 3. 3. 1. Généralités	38
I. 3. 3. 2. Les flavonoïdes isolés du genre <i>Senecio</i>	39
I. 3. 3. 3. Rôle des flavonoïdes dans les plantes	41
I. 3. 3. 4. Intérêts pharmacologiques des flavonoïdes	41
I. 3. 3. 5. Flavonoïdes et radicaux libres	42
I. 3. 3. 6. L'étude chimique des flavonoïdes	43
I. 3. 3. 6. 1. Solubilité et extraction	43
I. 3. 3. 6. 2. Les méthodes de séparation et de purification	43
I. 3. 3. 6. 3. Méthodes d'analyses Spectrales	45
I. 4. Evaluation biologique	55
I. 4. 1. Effet antioxydant et piègeur de radicaux libres	55
I. 4. 2. L'activité antimicrobienne	57
I. 4. 3. Effet cytotoxique	58

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODE

II. 1 : Etude phytochimique de <i>Senecio delphinifolius</i> Vahl	61
II. 1. 1 Place à la systématique	61
II. 1. 2. Description botanique de l'espèce <i>Senecio delphinifolius</i> Vahl	62
II. 1. 3. Habitat et répartition géographique	63
Travail personnel	
II. 1. 4. Récolte du matériel végétal	63
II. I. 5. Screening phytochimique	64
II. 2. Les alcaloïdes	70
II. 2. 1. Méthode utilisée pour l'extraction des alcaloïdes pyrrolizidiniques	70
II. 2. 2. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse	72
II. 2. 3. Analyse par GC-MS	77
II. 2. 4. Identification par GCMS	78
II. 2. 5. Indice de rétention	79
II. 2. 6. Analyse quantitative par GC-FID	79
II. 2. 7. Analyse Thermoionique par le détecteur (NPD)	81
II. 3. Extraction et purification des flavonoïdes	82
II. 3. 1. Extraction générale	82
II. 3. 2. Analyse chromatographique	84
II. 3. 3. Isolement et purification des composants	90
II. 3. 4. Hydrolyse acide	95
II. 4. Méthodes utilisées pour l'évaluation biologique	96
4. 1. Activité antibactérienne	96

TABLE DES MATIERES

4. 2. Activité antioxydante.	97
4. 3. Effet cytotoxique	98

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. 1. Etude phytochimique	102
III. 2. Détermination structurale des alcaloïdes	104
2. 1. Analyse par GCMS	104
2. 2. Résultats de la GC-MS de l'extrait alcaloïdiques	106
- Détermination structurale de la Sénécionine	106
- Détermination structurale de la Sénéciphylline	111
- Détermination structurale de l'Intégerrimine	112
- Détermination structurale de la Senkirkine	113
- Détermination structurale de la Déhydrosenkirkine	114
- Détermination structurale de la Néosenkirkine	116
III. 2. 3. Interprétation générale des spectres GCMS	118
III. 2. 4. Les structures des alcaloïdes pyrrolizidiniques identifiés par GCMS	119
III. 3. Analyse quantitative par GC-FID	121
III. 3. 1. Quantification des APs dans <i>Senecio delphinifolius</i> Vahl et potentiel tumorigène et hépatotoxicité	121
III. 3. 2. Discussion des résultats	121
III. 4. Détermination structurale des composés isolés de <i>Senecio delphinifolius</i> Vahl	123
4. 1. Détermination structurale du composé FV1	123
4. 2. Détermination structurale du composé FV2	135
4. 3. Détermination structurale du composé A	147
III. 5. Evaluation des propriétés biologiques de <i>Senecio delphinifolius</i> Vahl	151
5. 1. Activité antibactérienne	151
5. 2. Activité antioxydante	151
5. 3. Effet cytotoxique	154
Références bibliographiques	158
Conclusion générale	177
Résumé	179
Annexe	
article	

Appareillage

Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

- Les spectres RMN ont été enregistrés sur les spectromètres Bruker DRX 300 MHz pour ^1H et 75 pour ^{13}C du département de chimie de l'université Es Sénia Oran. Les spectres DEPT, ainsi que les expériences bidimensionnelles HSQC, HMBC et HSQC, ont été enregistrés à l'aide de séquences impulsionsnelles spécifiques fournies par Bruker. Les solvants deutérés utilisés sont précisés, selon la solubilité des composés, DMSO ou CD_3OD . Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne.
- Appareil à transformée de Fourier avance DPX 250 BRUKER (250MHz pour le proton) du département de chimie de l'université Constantine I. Le solvant deutéré utilisé CD_3OD

Spectrométrie de masse

Bruker Daltonics HCT ultra PTM Discovery system: method ESI

Spectrométrie UV-Visible

Les spectres UV-visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un Spectrophotomètre Thermo electron corporation evolution 300.

GC/MS

Pour la GC-MS, le chromatographe utilisé était le Hewlett-Packard 5890 A équipé d'une colonne ZB-1 (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) 30 m x 0.32 mm (ft 0.25 μm). La colonne capillaire était directement couplée à un spectromètre de masse TSQ 700 (Finnigan, Bremen, Germany).

Centrifugeuse: Centrifuge 4226

Ultrason: Eurosonic 44

Les abréviations

APs	Alcaloïdes pyrrolizidiniques
IC ₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
EOR	Espèce oxygénée reactive
ADN	Acide desoxyribonucléique
GSH	glutathionyl
G	Glutathion
IE	Impact Electronique
GC- MS	Chromatographie Gazeuse Coupleé à la Spectrométrie de Masse
C ₁₈	Silice greffée
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
GC	Chromatographie Gazeuse
m/z	masse/charge d'un ion
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte de silice
FIOH	Flavonoïde
(O ₂ ⁻)	anion radical superoxyde
RO·	radical alkoxyde
BAW	<i>n</i> -butanol / Acide acétique/ Eau
CCM	chromatographie sur couche mince
ATCC	American type culture collection
R.M.N.	Résonance Magnétique Nucléaire
SM	spectrométrie de masse
UV-Visible	Ultra-Violet
ESI	ElectroSpray Ionization (ionisation par électrospray)
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization
MTT	tetrazolium [3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)]
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
CMI	concentration minimale d'inhibition
rpm	Rotation par minute
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
IR	Indice de retention
t _R	Temps de retention
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ULB	Université Libre de Bruxelles



Introduction générale

Au cours de l'évolution, les plantes ont adapté divers mécanismes structuraux et chimiques pour se protéger et pour interagir avec leur environnement. Les mécanismes chimiques sont en grande partie basés sur les métabolites secondaires. Plusieurs fonctions biologiques qui peuvent être attribuées aux produits naturels des plantes, en grande partie à cause de leur énorme diversité structurale.

Le genre *Senecio* qui appartient à la tribu des Senecioneae est le genre le plus important et le plus complexe de la famille des Asteraceae, il comprend plus de 1500 espèces. Une large variété de produits naturels caractérise les espèces du genre *Senecio*: les alcaloïdes, les sesquiterpenoides, les flavonoïdes, les monoterpénoides, les diterpénoides, les triterpénoides, et des coumarines et d'autres métabolites secondaires tels que les acides chlorogéniques, des huiles essentielles etc.... [1]. Les Alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs), les eremophilanes sont particulièrement caractéristiques des espèces de ce genre [2]. Certaines espèces *Senecio* ont un impact négatif dans de nombreux pays agricoles, parce que ces plantes sont responsables de plus de décès chez le bétail que n'importe quelle autre plante vénéneuse. La toxicité présentée par ces plantes a été attribuée à leur teneur en APs et certains furanoeremophilanes [3]. Les espèces *Senecio* ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des plaies et préparations antiémétiques, anti-inflammatoire et vasodilatateur [4]. Certains composés isolés du genre *Senecio* et même des extraits bruts sont connus pour posséder une activité antimicrobienne y compris les activités antibactériennes, antifongiques et antituberculeux.

Le genre *Senecio* est représenté en Algérie par plusieurs espèces, notre étude porte essentiellement sur l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl, une plante trouvée en Sicile (Italie) et dans le Nord de l'Afrique; son nom vernaculaire en Algérie est "Hachichettolba"[5].

Plusieurs critères ont guidés notre choix, parmi lesquels:

Le but de notre travail s'inscrit donc dans le cadre de la continuation des recherches dans ce domaine en essayant d'identifier les alcaloïdes pyrrolizidiniques contenus dans *Senecio delphinifolius* Vahl poussant en Algérie et d'évaluer leurs toxicités. D'autre part, aucune activité biologique n'a été rapportée sur cette espèce. Les vertus médicinales traditionnellement reconnues à certains représentants du genre *Senecio*, sont à l'origine de l'intérêt manifesté par les centres de recherche de Phytochimie pour la prospection et la sélection de nouvelles molécules

aux propriétés pharmacologiques intéressantes. Ainsi on cherche à isolé des substances naturelles de l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl qui peuvent trouver une utilisation en thérapeutique.

- ✓ Dans un premier chapitre, nous présenterons une étude bibliographique sur les connaissances botaniques et phytochimiques de la famille Asteraceae et sur le genre *Senecio*. Nous aborderons largement les alcaloïdes pyrrolizidiniques principaux constituants du genre, on donne également un aperçu général sur les flavonoïdes.
- ✓ Le second chapitre sera consacré au travail personnel qui commencera par un screening phytochimiques de l'espèce étudiée *Senecio delphinifolius* Vahl, la suite de l'étude consistera à l'identification et à la séparation et la purification des composés obtenus. Nous présenterons également dans ce chapitre l'évaluation biologique des différents extraits de l'espèce.
- ✓ L'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés isolés seront

détaillés dans le troisième chapitre.

À la fin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.



Revue de la littérature

I.1.1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE

I.1.1.1. Le métabolisme secondaire chez les végétaux:

Les plantes sont des organismes autotrophes qui se nourrissent d'éléments simples (carbone, oxygène, azote) et synthétisent des composés organiques pour leur métabolisme, à la fois primaire et secondaire. Les métabolites primaires, comme les protéines, les acides nucléiques, les acides/esters gras et les carbohydrates, sont des polymères construits à partir d'unités moléculaires simples (acides aminés, nucléotides, acides maloniques et sucres, respectivement). Ils se retrouvent dans toutes les espèces et ont un rôle essentiel pour le métabolisme ainsi que le développement végétal. Par contre, les métabolites secondaires, qui dérivent de ces métabolites [6], sont des composés qui ne participent pas directement au développement de la plante, bien qu'ils participent pleinement à l'efficacité de sa photosynthèse ou de sa reproduction, ils interviennent principalement dans les relations que la plante a avec son environnement [7, 8]. Contrairement aux métabolites primaires, les produits du métabolisme secondaire ne sont pas indispensables à la survie de l'individu mais à la survie de la population végétale dans son ensemble au sein de son biotope [9].

Le métabolisme secondaire présente une certaine spécificité car la nature des composés varie fortement d'une famille botanique à l'autre. En effet, les plantes se distinguent des autres organismes vivants par cette expansion du métabolisme secondaire qui aboutit à la synthèse d'une multitude de molécules aux propriétés et fonctions diverses. De même, il est utile de rappeler que la biosynthèse de ces métabolites secondaires, ou plutôt « non primaires », est souvent associée ou même essentielle aux processus de défense de la plante. Leur synthèse peut être constitutive, c'est à dire présente durant tout le cycle de vie de la plante, même en absence d'agression, ou induite lorsque la synthèse est déclenchée en réponse à la prédation. Prises dans leur ensemble, les plantes produisent plus de 200 000 métabolites secondaires et on peut en identifier au moins trois grandes classes: les alcaloïdes (qui dérivent des acides aminés), les molécules phénoliques (qui dérivent de la voie des phénylpropanoïdes, issues de l'acide shikimique et de l'acide malonique) et les terpénoïdes (qui dérivent de l'isopentényl pyrophosphate, issu du méthylérythritol-4-phosphate ou de l'acide mévalonique) [6, 10].

I. 1. 2. La famille des Astéraceae:

1. 2. 1. Généralités:

Les Asteraceae constituent une importante famille des dicotylédones, le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. Plusieurs espèces de cette famille sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, la laitue, la Camomille, etc.) ou en horticulture: chrysanthèmes (*Dendranthema*), dahlias, œillet d'inde (*Tagetes*), soucis (*Calendula*), mais aussi ageratums, gazanias, gerberas), elle fournit de nombreux légumes: par exemple sifis (*Tragopogon porrifolius*), scorsonère (*Scorzonera hispanica*) [11].

De nombreuses espèces jouissent d'une réputation médicinale [12], et peuvent, sur la base de la tradition, entrer dans la formulation de phytomédicaments, Camomille (*Chamaemelum nobile*) et matricaire (*Chamomilla recutita*), sont les plus connues. Il a été rapporté également que les fleurs et les feuilles de certaines de ces plantes possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales et anti-inflammatoires [13].

1. 2. 2. Distribution:

Les Astéraceae constituent l'une des plus vastes familles du règne végétal avec au moins 21000 espèces réparties en 1300 genres, ce sont surtout des plantes herbacées affectionnant les régions semi-arides, elles sont présentes sur tous les continents, sauf en Antarctique [11].

1. 2. 3. Caractéristiques morphologiques des Astéraceae [14]:

Les Astéraceae sont caractérisés par leur inflorescence en capitule. Les capitules sont constitués du regroupement de fleurs sessiles sur un même réceptacle.

On peut diviser les capitules des Astéraceae en trois groupes :

- les liguliflores (chicorée, pissenlit, laitue ...), composées uniquement de fleurs ligulées.
- les tubuliflores (chardon, cirse, centaurée ...), dont le capitule n'est composé que de fleurs tubulées (ou fleurs tubulaires).
- les radiées, aux fleurs périphériques ligulées entourant un disque de fleurs tubulées ou fleurons (marguerite, aster, séneçon ...).

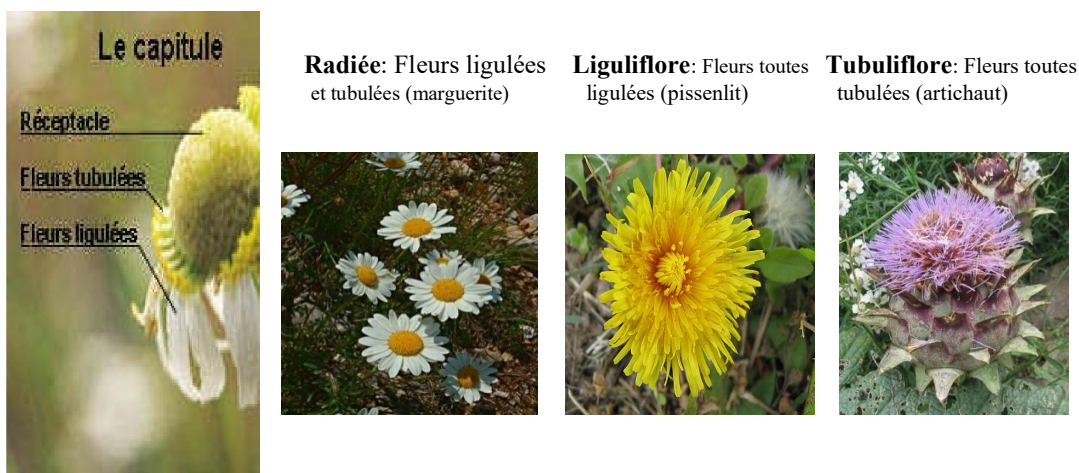


Figure I. 1: Type de fleurs des Asteraceae [15].

Fleurs : Petites fleurs individuelles généralement formées d'une corolle de 5 pétales soudés en tube étroit, de 5 étamines insérées sur le tube de la corolle, et soudées en tube autour du style au niveau des anthères, déhiscentes à l'intérieur du tube, d'un style à deux stigmates pubescents ou papillés sur la face externe, réceptifs uniquement sur la face interne et d'un ovaire infère à une loge et ovule basal.

Les feuilles : les feuilles sont le plus souvent alternes. Elles peuvent aussi être en rosette principale (Pâquerette).

Les fruits : les fruits sont des akènes généralement surmontées d'une aigrette de poils (Pappus) apparaissent sous la forme d'écailles, de soies, d'arêtes ou d'une couronne.

I. 2. Le genre *Senecio*

I. 2. 1. Caractéristiques botaniques:

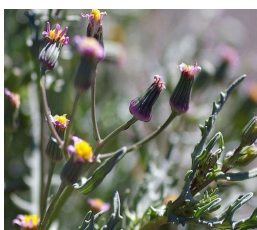
Le nom générique des séneçons vient du latin senex, senis: vieillard. Il établit un parallèle entre la chevelure blanche de l'un et les fines soies du Pappus des autres. Genre particulièrement vaste, assurément l'un des plus vastes de tous les genres d'Angiospermes qui compterait 1500 espèces, dont quelques-unes ont développé une succulence des tiges, feuilles, tronc ou racines [11, 15].

Ce sont des plantes herbacées annuelles et vivaces, arbustes (voire très rarement arbres) à canaux résinifères.

Feuilles: Elles sont alternes et spiralées, généralement simples, lobées ou dentées, sans stipules, caduques ou persistantes, parfois réduites à de simples écailles chez certaines espèces à tiges succulentes, à aisselle glabre.

Fleurs: Inflorescence simple ou ramifiée à capitules. Capitules en coupe assez large à involucre de bractées vertes libres disposées sur 1-2 rangs. Les Fleurs sont tubulées hermaphrodites, blanches, jaunes, rouges ou pourpres.

Fruit: Il s'agit à la base d'un fruit à une graine sec et indéhiscent, ou akène, côtelé, pourvu d'une aigrette de soies raides, ou pappus, multi-sérié et caduque, formée par le calice modifié, qui permet une dispersion par le vent [16].



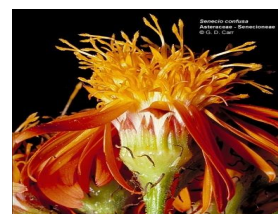
Senecio hoggariensis



Senecio flavus



Senecio flaccidus var



Senecio Confusa

Figure I. 2: Type de fleurs du genre *Senecio* [15].

I. 2. 2. Place à la systématique [14]:

Le genre *Senecio* appartient à la famille des Asteraceae, tribu des Senecioneae:

Royaume	Plante
Embranchement	Spermatophytes (plantes à graines)
Division	Magnoliophita ou Angiospermes
Classe	Dicotylédones (Magnoliopsida)
Sous classe	Asteridae
Ordre	Astérales
Famille	Asteraceae
Tribu	Senecioneae
Genre	<i>Senecio</i>

I. 2. 3. Utilisation en médecine traditionnelle:

Plusieurs espèces du genre *Senecio* sont utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde pour certaines propriétés thérapeutiques, anti-inflammatoires, entérite, hépatite, douleur d'estomac, etc...[17, 18], Illustrées par le **Tableau I. 1.**

Tableau I. 1: Exemple d'utilisation de quelques espèces du genre *Senecio* en médecine traditionnelle.

Plante	But de l'utilisation en médecine traditionnelle	Références
<i>S. argunensis Turcz</i>	Dysenteries.	[17]
<i>S. chrysanthemoides DC</i>	Blessures	[17]
<i>S. nemorensis</i>	Entérite, l'hépatite et les furoncles	[17]
<i>S. scandens</i>	Infection orale et du pharynx	[17]
<i>S. brasiliensis</i>	Inflammations, douleur d'estomac, ulcère.	[18, 19]

I. 2. 4. Toxicité:

Le problème majeur que posent les Asteraceae réside sans aucun doute dans l'existence, chez les Senecioneae et quelques Eupatorieae, d'espèces renfermant des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Ils sont largement étudiés, non pas pour une certaine application thérapeutique quelconque mais plutôt pour leur toxicité que ce soit chez les humains que chez les animaux. En effet, environ 3% des plantes à fleurs du monde, réparties en six familles différentes, contiennent des APs hépatotoxiques. De plus, de nombreuses intoxications (chez les humains et les animaux) causées par la consommation de ces plantes ont été observées ces dernières années, et beaucoup de rapports les ont attribuées à ces substances [11]. Depuis le début des années 1960, quelques articles publiés dans la littérature chinoise signalaient la découverte d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les plantes médicinales chinoises [20- 23]. Roeder et ses collègues ont largement contribué à l'étude de plantes contenant ce genre de composés [17, 24]. Lin et al, ont rapporté que deux alcaloïdes pyrrolizidiniques de type

otonecine, clivorine et ligularine, identifiés dans *Ligularia hodgsonii*, une plante médicinale chinoise (famille des Composeae), sont tumorigènes [24]. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs) forment un grand groupe de métabolites secondaires qui peuvent devenir hépatotoxiques [25], certains d'entre eux se sont révélés génotoxiques et cancérigènes [26]. Les espèces du genre *Senecio* sont, un peu partout dans le monde, mis à contribution pour des propriétés médicinales supposées: cette pratique a, dans quelques cas, conduit à de sévères et parfois fatales intoxications [11].

En tant que tel, le risque pour la santé humaine posé par la consommation d'alcaloïde pyrrolizidinique à base de plantes médicinales ou la contamination de la chaîne alimentaire, par du lait, des œufs ou du miel produits par les animaux ayant consommé des plantes contenant des APs est une préoccupation sérieuse [27].

I. 3. Principaux métabolites secondaires isolés du genre *Senecio*:

Les données phytochimiques du genre *Senecio* ont été rapidement développées pendant les 20 dernières années. Des centaines d'espèces de ce genre ont déjà fait l'objet d'études, et des centaines de composés ont été identifiées dont la majorité appartient aux dérivés des alcaloïdes pyrrolizidiniques, aux terpenoïdes, plus précisément aux dérivés sesquiterpéniques et aux flavonoïdes. Les molécules des principales classes isolées du genre *Senecio* au cours des dernières décennies sont listées [28].

I. 3. 1. LES TERPENES

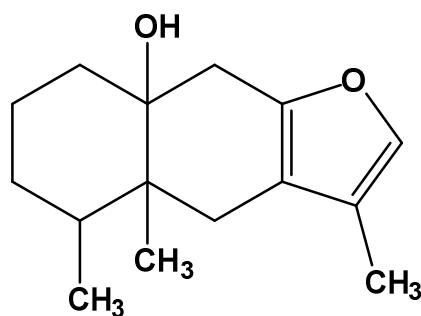
Les terpènes constituent un large groupe de métabolites secondaires issus de la condensation d'un nombre variable d'unités isoprène. Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les constituants habituels des huiles essentielles. Ils sont largement distribués chez les végétaux supérieurs, surtout dans certaines familles ou ordres, chez les plantes dites « à huile essentielle » : Lamiales, Astérales, Laurales, ect....

La classification des terpénoïdes repose sur le nombre d'unités isopréniques. On parle d'hémiterpènes (C5), de mono-(C10), sesqui-(C15), di-(C20), tri-(C30) et de tétra-(C40) terpènes notamment. Ils interviennent dans les mécanismes de défense contre les bactéries et dans la signalisation mise en place lors des interactions plantes-insectes (mono-, sesqui- et di-terpènes). Ces substances sont exploitées industriellement comme colorants, arômes

alimentaires et cosmétiques (monoterpènes, tétraterpènes), en thérapeutique pour leurs effets anti-inflammatoires, antibactériens (monoterpènes), et anticancéreux (taxoïdes diterpéniques) [29, 30].

I. 3. 1. 1. Les sesquiterpènes:

Très fréquents dans la famille des Asteraceae, les sesquiterpènes existent surtout sous forme de lactone [31]. Également, ils peuvent parfois être furaniques: c'est le cas du tétradymol, un furano éremophilane qui serait responsable de la toxicité hépatique et de la phototoxicité des *Tetradymia* [32].



tetradymol

La majorité des produits isolés des espèces du genre *senecio* appartiennent au groupe des dérivés sesquiterpéniques. Ces derniers peuvent principalement être divisés en 17 groupes: Eremophilanes, cacalols, bisabolanes, eudesmanes, oplopanes, germacrane, phoma-lairdanes, caryophyllanes, humulanes, presilphiperfolanes, aromadendranes, himachlane, africananes, pentalenanes, bakkane, valeranes, et benzofuranes [28, 33, 34].

I. 3. 1. 2. Les Eremophylanes et les Furanoeremophilanes

Les eremophylanes et les furanoeremophilanes sont décrits comme constituants majeurs des plantes du genre *senecio* [28, 33]. Plus de 100 furanoeremophilanes sont décrits comme composants dans les végétaux supérieurs principalement des espèces *Senecio* [34].

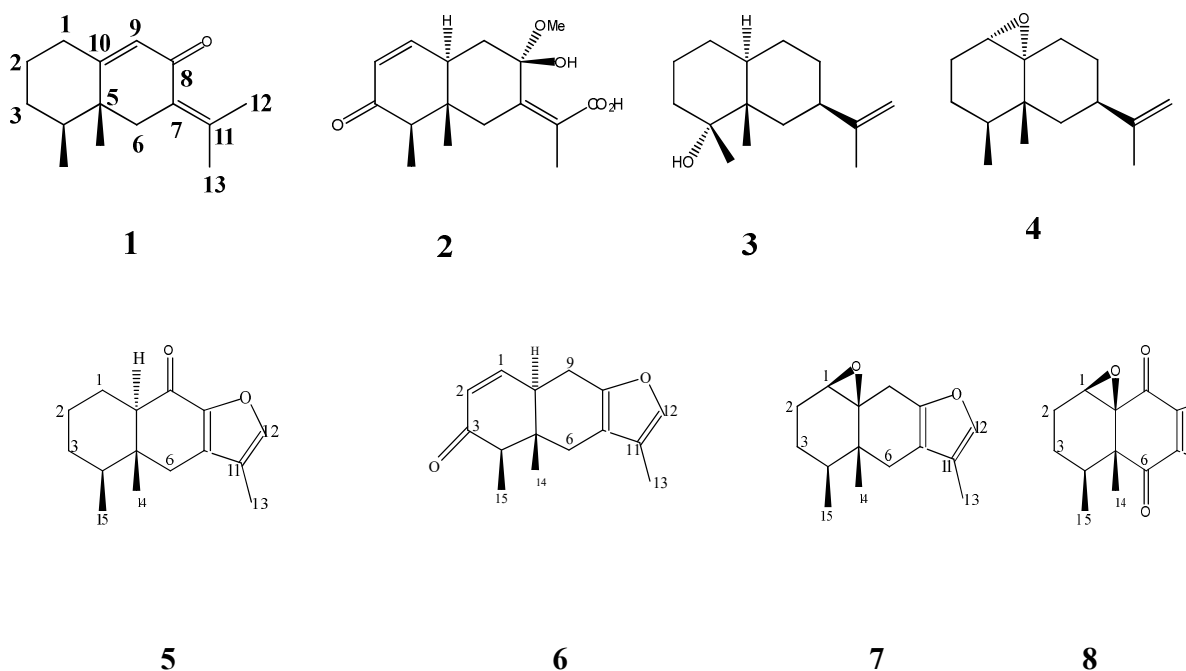


Figure I. 3: Structures des eremophylanes et des furanoeremophylanes composants typiques isolés à partir de plantes du genre *Senecio*.

Le furanoeremophilan-9-one (5) isolé à partir de la plante séchée de *Senecio. aureus*, le (+)-furanoeremophil-1-en-3-one (6) isolé à partir de *Senecio. flavus*, (-)-1,10-époxyfuranoeremophilane (7) de *Senecio. glastifolius*, et le (-)-1,10-époxyfuranoeremophilan-6,9-dione (8) de *Senecio. smithii* représentent des exemples typiques [33].

Tableau I. 2: Des exemples d'eremophylanes et de furanoeremophylanes constituants majeurs des plantes du genre *Senecio*:

N°	Nom	Espèce	Réf
1	9, 10-Dehydrofukinone	<i>S. aureus</i>	[35]
2	8β- Hydroxy-8α-methoxy-3-oxoeremophila-1, 7(11)-di- en -12- oic acid	<i>S. pseudoorientalis</i>	[36]
3	10αH-Eremophil-11-en-4-ol	<i>S. amplexicaulis</i>	[37]
4	Mairetin	<i>S. mairetianus</i>	[38]
5	Furanoeremophilan-9- one	<i>S. aureus</i>	[35]
6	(+)-furanoeremophil-1-en-3-one	<i>S. Flavus</i>	[39]
7	(-)-1, 10-époxyfuranoeremophilane	<i>S. glastifolius</i>	[33]
8	(-)-1, 10-époxyfuranoere mophilan-6, 9-dione	<i>S. smithii</i>	[40]

I. 3. 2. LES ALCALOÏDES:

I. 3. 2. 1. Généralités sur les alcaloïdes:

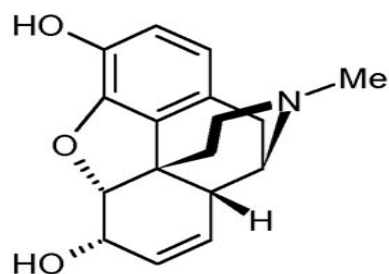
Les alcaloïdes représentent le groupe de substances naturelles d'intérêt thérapeutique le plus important, en terme de nombre, de diversité structurale et de leurs activités pharmacologiques. Ils sont au cœur des phénomènes d'adaptation et de défense face aux pressions biotiques (herbivore microorganisme) [41]. Ils ont été particulièrement étudiés, du fait des intérêts thérapeutiques et économiques qui y sont associés. On retrouve des molécules exploitées par l'industrie pharmaceutique comme la quinine, des stupéfiants (la morphine, la cocaïne), des anticancéreux (la colchicine, la vincristine, la camptothécine, le taxol,...), des molécules utilisées comme poisons (la strychnine..) ou des stimulants (la caféine..) ou encore comme antibiotiques du type pénicilline [42].



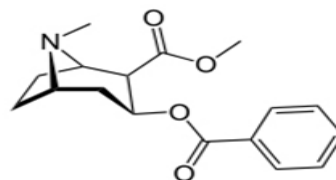
a) *papaver somniferum*



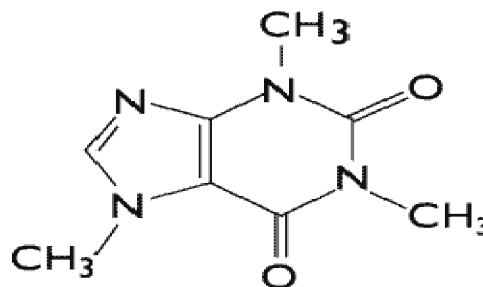
b) *Erythroxylum coca*



Structure de la morphine



Structure de la cocaïne

c) *Coffea arabica*

Structure de la caféine

Figure I. 3: Quelques exemples d'alcaloïdes : a) *Papaver somniferum* et morphine
 b) *Erythroxylum coca* et cocaïne. c) *Coffea arabica* et caféine.

Certains alcaloïdes existent dans plusieurs genres appartenant à des familles différentes, parfois très éloignées taxonomiquement comme pour le cas de la caféine retrouvée dans le café (*Rubiaceae*), le thé (*Ternstroemiaceae*), le kolatier (*Sterculiaceae*), le maté (*Aquifoliaceae*), le guarana (*Sapindaceae*). D'autres sont caractéristiques d'un nombre limité de genres à l'intérieur d'une famille (hyoscyamine - famille des *Solanaceae*) ou d'un groupe d'espèces à l'intérieur d'un genre (thébaïne – genre *Papaver*) ; certains sont étroitement spécifiques (morphine de *Papaver somniferum* Linné). La teneur en alcaloïdes varie dans de larges limites : de quelques ppm comme dans le cas des alcaloïdes antitumoraux de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* Linné), à plus de 15% pour les écorces de tronc du quinquina (*Cinchona ledgeriana* Moens). Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde, elles livrent, le plus souvent, un mélange complexe, éventuellement dominé par un composé majoritaire. Il n'est pas rare que plusieurs dizaines d'alcaloïdes soient présents dans une même plante [43].

I. 3. 2. 2. Définition:

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. MEISNER au début du XIX^e siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des alcalis (de l'arabe al kaly, la soude et du grec eidos, l'aspect). Selon Bruneton 2009, Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes, il propose cependant que les alcaloïdes sont des composés organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétale, azotés, plus ou moins basiques et dotés, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marqués. A forte dose ce sont des composés toxiques et il est parfois difficile de situer les frontières qui

séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels. D'un point de vue biosynthétique, il existe une multitude de sous-familles d'alcaloïdes, qui ont été classées en fonction de leurs origines biosynthétiques et de la nature des hétérocycles azotés [44].

I. 3. 2. 3. 1. Classement des alcaloïdes d'après leurs origines biosynthétiques:

On distingue, les alcaloïdes « vrais » qui possèdent un azote intra-cycle, ce sont des substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure souvent complexe et de caractère basique. Ils existent dans la plante sous forme de sels, ont pour origine biosynthétique un acide aminé et sont dotées d'une activité pharmacologique significative. Les proto-alcaloïdes proviennent d'acides aminés dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, (L-phénylalanine, acides aminés aliphatiques). Et enfin les pseudo-alcaloïdes qui sont des métabolites présentant les caractéristiques des alcaloïdes vrais, excepté leur origine biosynthétique. Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes et du métabolisme de l'acétate (dérivés xanthiques, terpéniques, stéroïdiens, pipéridiniques) [45, 46].

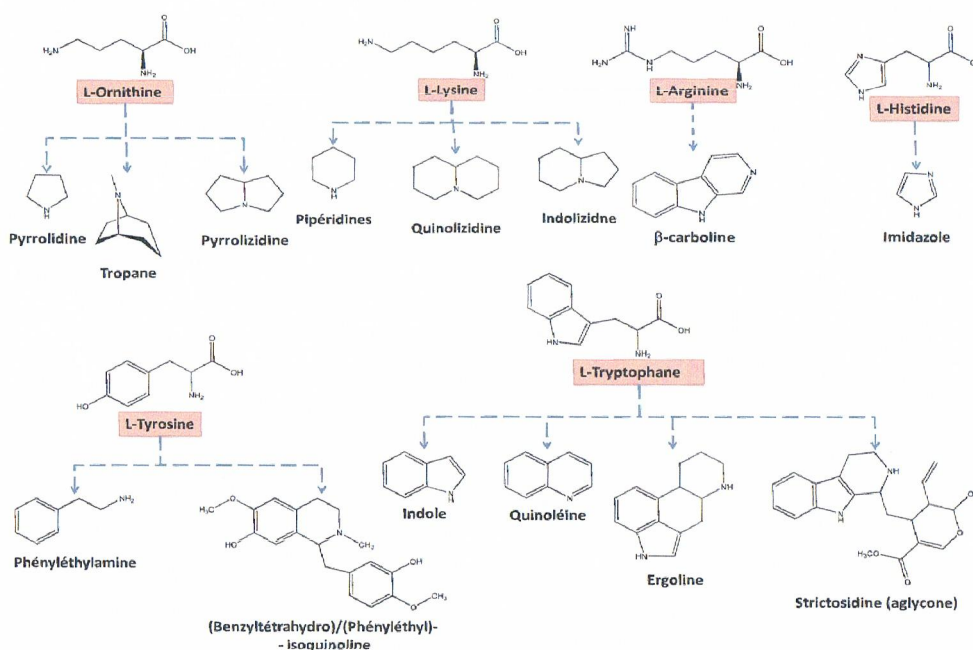


Figure I. 4 : Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes. Les noyaux de base de ces différents alcaloïdes dérivent des acides aminés du métabolisme primaire.

I. 3. 2. 3. 2. Classement des alcaloïdes d'après leur structure chimique:

Les alcaloïdes sont aussi catégorisés en fonction de leur structure chimique : Ainsi, on peut distinguer 12 principales classes d'alcaloïdes comme suit [44]:

1. Les alcaloïdes tropaniques,
2. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques,
3. Les alcaloïdes quinolizidiniques,
4. Les alcaloïdes indolizidiniques,
5. Les alcaloïdes pipéridiniques,
6. Les alcaloïdes pyridiniques,
7. Les alcaloïdes isoquinoléiques,
8. Les alcaloïdes indoliques,
9. Les alcaloïdes quinoléiques,
10. Les alcaloïdes imidazoliques,
11. Les alcaloïdes terpéniques, et
12. Les bases puriques.

I. 3. 2. 4. État naturel, distribution des alcaloïdes

Pendant longtemps, les alcaloïdes ont été considérés comme des produits du métabolisme des seuls végétaux. En fait, les structures alcaloïdiques existent également chez les animaux.

- **Règne végétal**

Les alcaloïdes, sont rares chez les bactéries (pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*, Les alcaloïdes sont donc des composés essentiellement présents chez les Angiospermae. Certaines familles ont une tendance marquée à les élaborer: c'est vrai aussi bien chez les Monocotyledonae (Amaryllidaceae, Colchicaceae) que chez les Dicotyledonae (Annonaceae, Apocynaceae, Lauraceae, Loganiaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae, Asteraceae, etc [44]. Le tableau I. 3 illustre la distribution dans le règne végétal ou chez les bactéries de ces composés.

Tableau I. 3 : Répartition des alcaloïdes dans le règne végétal.

6%	Bactéries	Pyocyanine de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
16%	Monocotylédones	Amariyllidaceae Colchicaceae
78%	Dicotylédones	Annonaceae, Apocynaceae, Lauraceae, Loganiaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae, Asteraceae, etc.

- **Règne animal**

- Dans certains cas ce sont des produits formés à partir des alcaloïdes contenus dans les végétaux inclus dans la ration alimentaire de l'animal : c'est le cas de la castoramine issue de la métabolisation des alcaloïdes des nénuphars que consomme le castor,
- des alcaloïdes pyrrolizidiniques présents dans les ailes de certains papillons pour éloigner les prédateurs.
- Dans d'autres cas, les alcaloïdes issus du métabolisme propre des animaux: c'est en particulier le cas chez des Amphibiens Urodèles (salamandres), ou Arthropodes, Hyménoptères, Coléoptères, Neuroptères, Myriapodes... [44]

La Figure I. 5 illustre des exemples d'alcaloïdes issus du métabolisme propre des animaux:

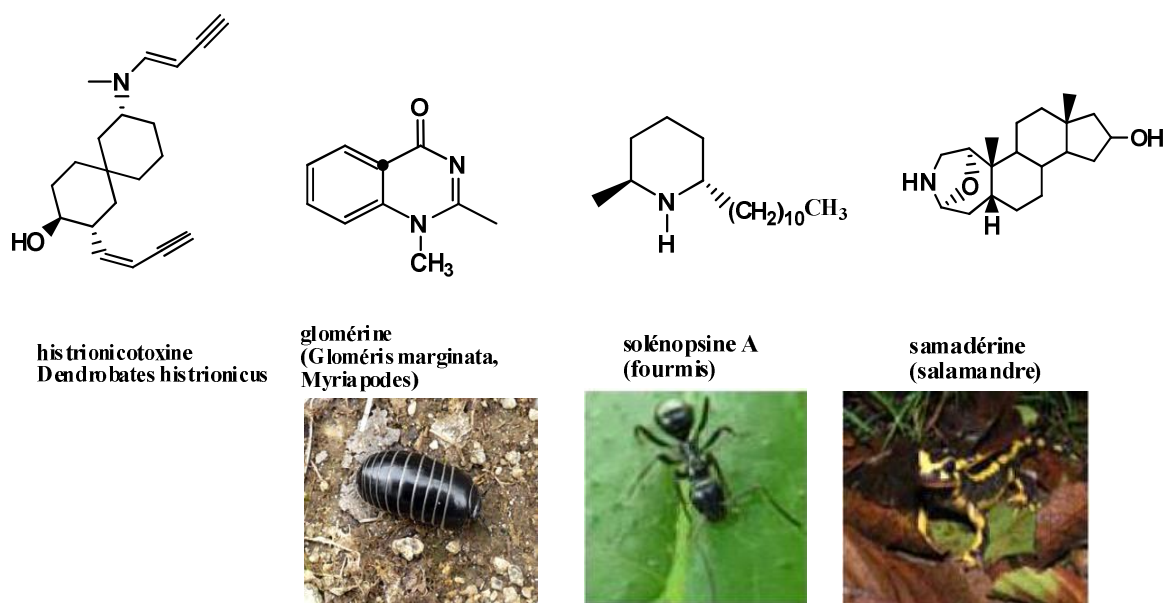


Figure I. 5 : Exemple d'alcaloïdes issus du métabolisme animal [44].

I. 3. 2. 5. Propriétés physico-chimiques des alcaloïdes:

Les alcaloïdes ont des masses moléculaires variant de 100 à 900. Si la plupart des bases non oxygénées sont liquides à température ordinaire (Ex : nicotine), celles qui comportent dans leur formule de l'oxygène sont des cristaux blancs en général (exception de la berbérine jaune). Presque toujours capables de dévier la lumière polarisée, les bases cristallisées donnent des points de fusion nets, sans décomposition surtout au-dessous de 200 °C. En règle générale, les alcaloïdes bases sont insolubles ou très peu solubles.

5. 1. Solubilité:

Naturellement dans la plante les alcaloïdes, c'est sous forme de sels qu'on les retrouve, mais on peut déplacer les sels en bases et vice-versa, pour cela on joue sur le Ph. En règle générale, les alcaloïdes bases sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires, solubles dans les alcools de titre élevé [94].

Tableau I. 4. Solubilité des alcaloïdes:

Bases	Insolubles ou très peu solubles	Eau
	Soluble	Solvants organiques apolaires ou peu polaires
	Solubles	Alcool de titre élevé
Sels	Solubles	Eau
	Solubles	Solvants organiques polaire
	Insolubles	Solvants organiques apolaires
	Solubles	Alcool de titre élevé

5. 2. Basicité

Caractère variable selon la biodisponibilité du doublet libre de l'azote :

- groupements électro-attracteurs adjacents à l'azote: diminue la basicité
- groupements électro-donneurs adjacents à l'azote: augmente la basicité.

Adapter le pH en fonction du type de base auquel on a affaire.

Base primaire: la mescaline (proto-alcaloïde qui se cyclise quand il est absorbé dans l'organisme).

Bases secondaires: l'éphédrine et la cocaïne

Bases tertiaires: la papavérine, azote inclus dans le cycle aromatique

Bases quaternaires : muscarine.

Pyrrolidine : hétérocycle insaturé donc la basicité est forte.

Pyridine, quinoléine, isoquinoléine: Le doublet de l'azote est disponible donc la basicité est nette.

Pyrrole, indole: doublet de l'azote participe à l'aromaticité du cycle et la basicité est nulle.

La basicité est également influencée par des contraintes stériques, elle est un facteur d'instabilité pour ces molécules qui, à l'état de base et en solution, sont sensibles à la chaleur, à la lumière, à l'oxygène [44].

I. 3. 2. 6. Détection et extraction des alcaloïdes:

6. 1. Détection des alcaloïdes:

Les méthodes de détection actuellement employées sont précédées d'une extraction et consistent en une macération dans un alcool évaporée et le résidu repris par de l'eau acidifiée ; après filtration les alcaloïdes sont recherchés dans le filtrat. Ces derniers ont la capacité de se combiner avec les métaux et les métalloïdes, et c'est sur cette dernière propriété que l'on se base pour les détecter, le principe est d'obtenir une précipitation en milieu acide, en présence de réactifs appropriés.

Les plus utilisés sont les suivants:

- Réactif de Mayer : solution de tétraiodomercurate de potassium qui donne un précipité blanc jaunâtre en présence des alcaloïdes.
- Réactif de Dragendorff : solution de tétraiodobismuthate de potassium formant un précipité orangé à rouge une fois en contact avec ces substances.

Il faut noter que la spécificité de ces réactifs n'est pas absolue, en effet, des protéines, des α -pyrones, certaines coumarines et des hydroxy-flavones, des lignanes et autres composés peuvent donner des réactions faussement positives avec le réactif de Dragendorff [44, 47, 48].

6. 2. Extraction des alcaloïdes:

6. 2. 1. Extraction par un solvant en milieu alcalin

La plante au départ est mise en poudre, pulvérisée pour faciliter l'extraction. Naturellement sous forme de sels. On rajoute de la potasse, du carbonate de sodium ou de la soude et on extrait les alcaloïdes bases dans un solvant où ils seront bien dissous comme par exemple le dichloroéthane. On agite. Ensuite on filtre pour aboutir à une

solution extractive organique qui renferme tous les alcaloïdes. On concentre la solution et on la met dans une ampoule à décanter. On rajoute de l'eau avec une goutte d'acide sulfurique ou chlorhydrique. On agite de façon adaptée et on récupère dans la phase aqueuse les alcaloïdes sels. On obtient une solution aqueuse acide. Toutes les impuretés apolaires sont éliminées dans le solvant épuisé. On réutilise un solvant organique non miscible à l'eau, on change le pH, on rebascule en milieu alcalin donc les alcaloïdes sels redeviennent des bases et passent dans la phase organique. On concentre la phase organique pour récupérer le mélange d'alcaloïdes bases [44].

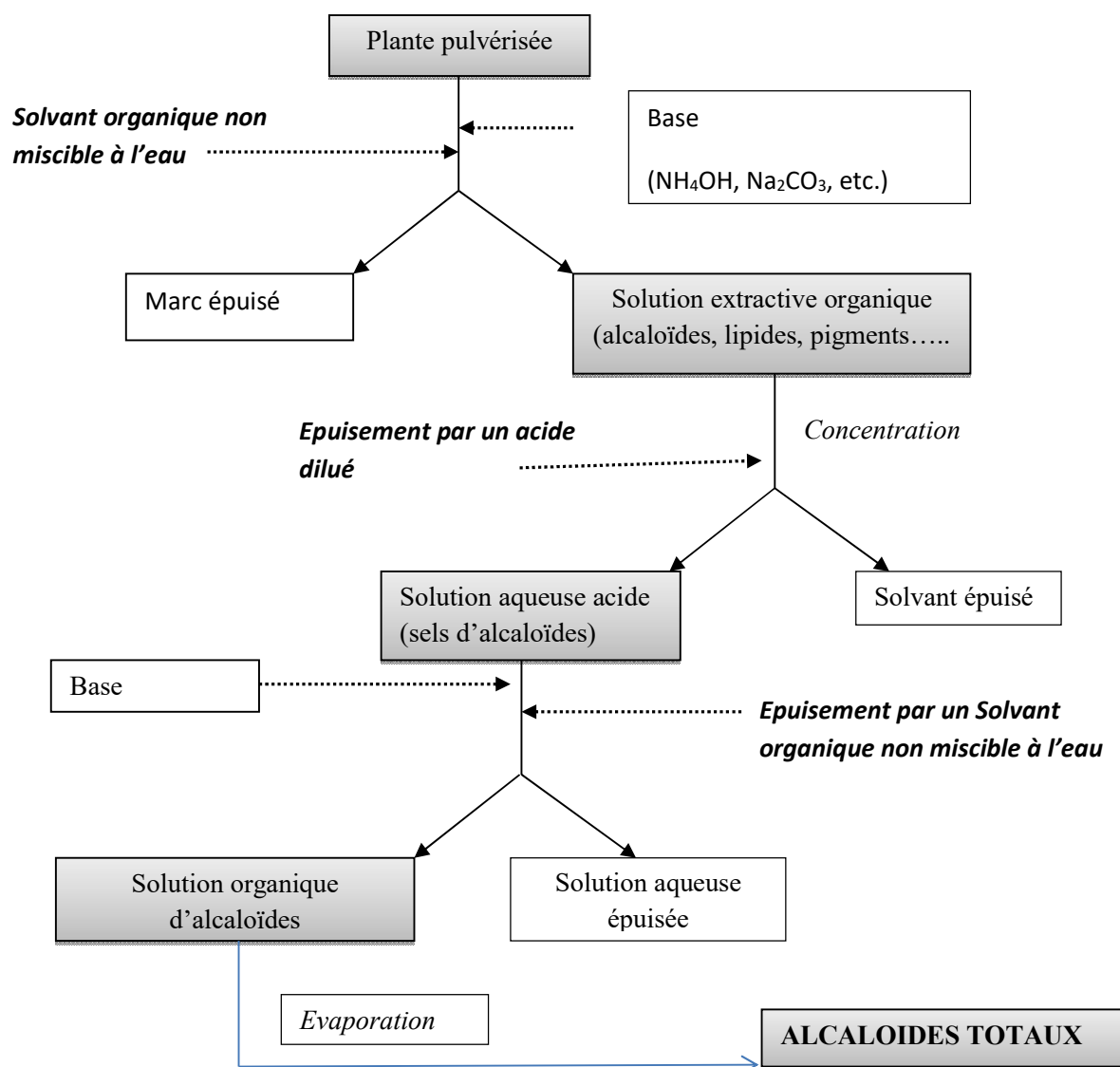


Figure I. 6: Principe de l'extraction des alcaloïdes en milieu alcalin [44].

6. 2. 2. Extraction par un solvant en milieu acide:

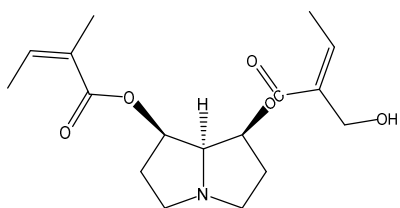
Deux cas peuvent se présenter: dans le premier, la plante ou partie de la plante pulvérisée est directement épuisée par de l'eau acidifiée; dans le second cas, c'est avec une solution alcoolique ou hydro-alcoolique acidifiée qu'est réalisé l'épuisement, Dans ce cas de figure, l'extraction est suivie d'une distillation sous vide qui élimine l'alcool et laisse une solution aqueuse acide de sels d'alcaloïdes.

Dans les deux cas, on a donc une solution aqueuse de sels d'alcaloïdes qu'il faut purifier. On peut :

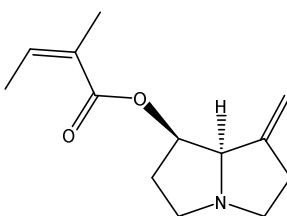
- alcaliniser la solution et extraire les bases par un solvant organique non miscible ;
- fixer sélectivement les alcaloïdes contenus dans la solution sur une résine échangeuse d'ions puis les éluer à l'aide d'un acide fort ;
- précipiter les alcaloïdes sous la forme d'iodomercurates. Le complexe formé est récupéré par filtration, solubilisé dans un mélange hydro-alcool-acétonique et décomposé par passage sur une résine échangeuse d'ions.

Quelle que soit la méthode choisie pour extraire les alcaloïdes, ce ne sont pas des produits purs qui sont obtenus mais des alcaloïdes totaux, mélanges complexes de bases qu'il est nécessaire de déterminer [44].

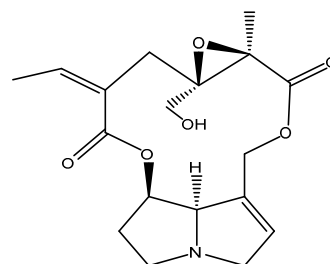
I. 3. 2. 7. Structures des alcaloïdes pyrrolizidiniques isolés des espèces du genre *Senecio*:



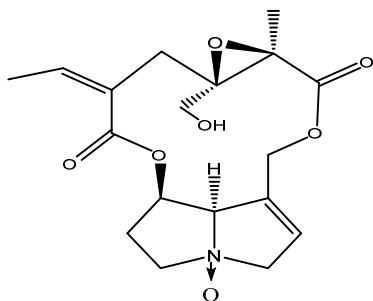
(1) Sarracine



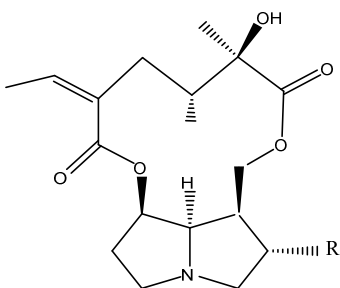
(2) 7β-(Angeloyloxy)-1-méthylidene-8α-pyrrolizidine



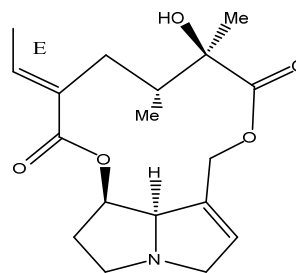
(3) Erucifoline



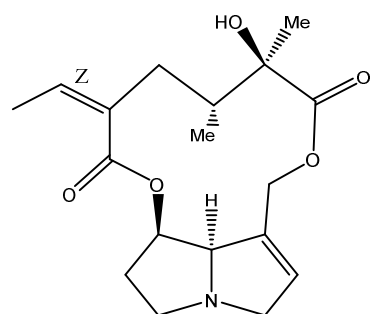
(4) Erucifoline N-oxide



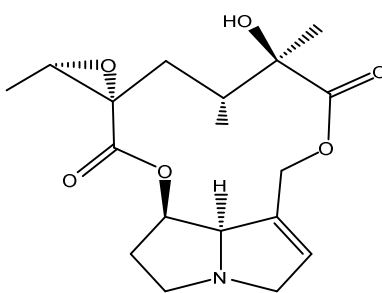
(5) R = H Playtyphylline



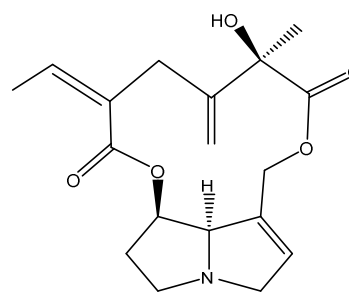
(7) Integerrimine



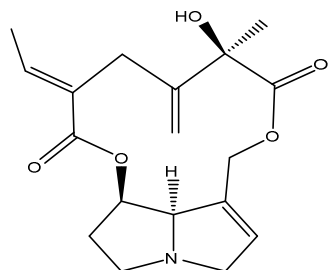
(8) senecionine



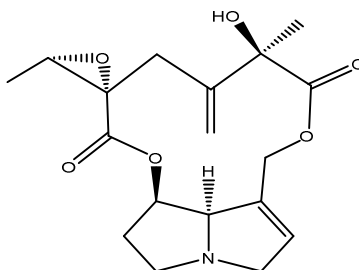
(9) Jacobine



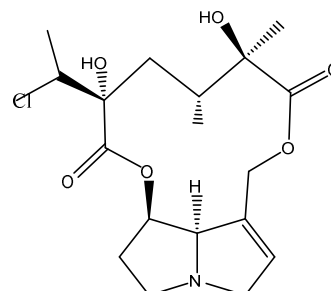
(10) Seneciphylline



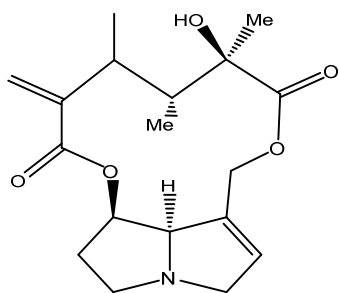
(11) Spartioidine



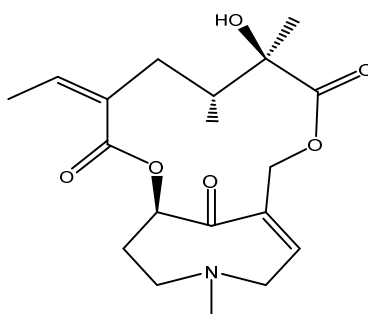
(12) Jacosine



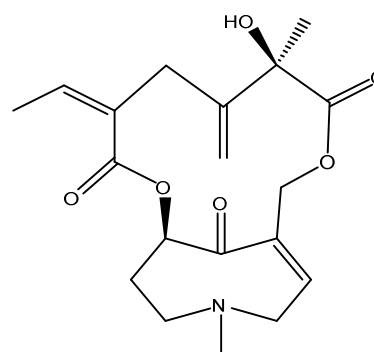
(13) Jaconine



(14) Senecivernine



(15) Senkirkine



(16) dehydrosenkirkine

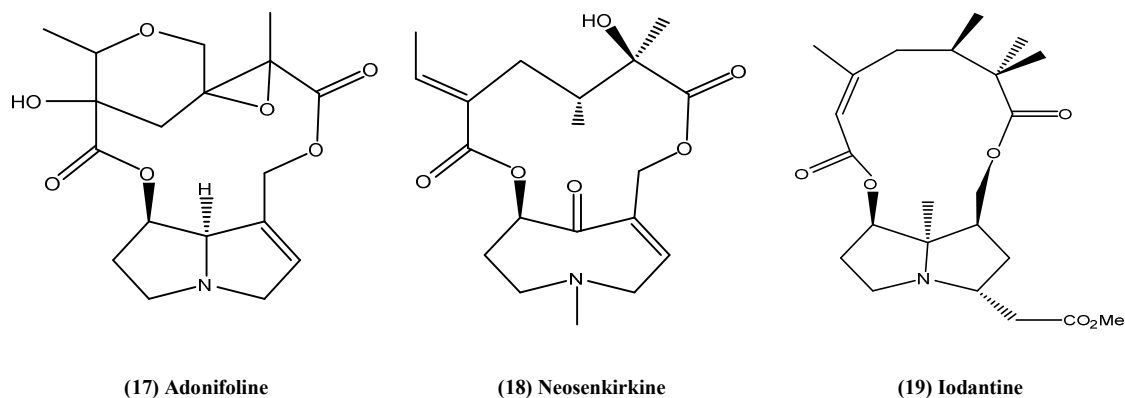


Figure I. 7 : alcaloïdes pyrrolizidiniques typiques isolés des espèces du genre *Senecio*:

Tableau I.5. Certains alcaloïdes pyrrolizidiniques typiques isolés des espèces du genre *Senecio*:

N°	APs	Espèces	Partie	Réf.
1	Sarracine	<i>S. doratophyllus</i>	les feuilles et les racines	[49]
		<i>S. chrysocoma</i>	-	[50]
2	7β-(Angeloyloxy)-1-methylidene-8α-pyrrolizidine	<i>S. doratophyllus</i>	-	[49]
		<i>S. chrysocoma</i>	plante entière	[51]
3	Erucifoline	<i>S. aquaticus</i>	parties aériennes	[52]
4	Erucifoline N-oxide	<i>S. persoonii</i>	plante entière	[53]
5	Platyphylline	<i>S. granatensis</i>	-	[54]
		<i>S. polypodioides</i>	-	[55]
		<i>S. tournefortii</i>	-	[56]
		<i>S. jacalensis</i>	parties aériennes	[57]
6	Rosmarinine	<i>S. runcinatus</i>	plante entière	[55]
		<i>S. rosmarinifolius</i>	-	[58]
		<i>S. pterophorus</i>	-	[59]
		<i>S. syringifolius</i>	parties aériennes	[60]
		<i>S. hadiensis</i>	-	[60]
7	integerrimine	<i>S. miser</i>	-	[61]
		<i>S. malacitanus</i>	plante entière	[54]
		<i>S. brasiliensis</i>	parties aériennes	[19]
		<i>S. faberi</i>	plante entière	[62]
		<i>S. durieui</i>	plante entière	[63]
		<i>S. madagascariensis</i>	-	[64]
		<i>S. argunensis</i>	-	[65]
		<i>S. glabellus</i>	-	[66]
		<i>S. longilobus</i>	-	[66]
		<i>S. jacobaea</i>	-	[67]
	<i>S. samnitum</i>	parties aériennes	[68]	

N°	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Espèces	Partie	Réf.
8	Senecionine	<i>S. malacitanus</i>	plante entière	[54]
		<i>S. brasiliensis</i>	parties aériennes	[19]
		<i>S. madrensis</i>	Racines	[55]
		<i>S. aquaticus</i>	parties aériennes	[52]
		<i>S. jacalensis</i>	parties aériennes	[57]
		<i>S. madagascariensis</i>	plante entière	[64]
		<i>S. pterophorus</i>	–	[59]
		<i>S. argunensis</i>	–	[65]
		<i>S. gallicus</i>	plante entière	[69]
		<i>S. glabellus</i>	–	[66]
		<i>S. longilobus</i>	–	[66]
		<i>S. jacobaea</i>	–	[67]
		<i>S. gilliesiano</i>	Racines	[70]
9	Jacobine	<i>S. aquaticus</i>	parties aériennes	[52]
		<i>S. jacobaea</i>	-	[67]
10	Seneciphylline	<i>S. aquaticus</i>	-	[52]
		<i>S. lorenthii</i>	-	[71]
		<i>S. oxiphyllus</i>	-	[72]
		<i>S. pterophorus</i>	-	[59]
		<i>S. personii</i>	Plante entière	[53]
		<i>S. argunensis</i>	-	[65]
		<i>S. longilobus</i>	-	[66]
		<i>S. jacobaea</i>	-	[67]
		<i>S. samnitum</i>	parties aériennes	[68]
11	Spartioidine	<i>S. aquaticus</i>	-	[52]
		<i>S. pterophorus</i>	-	[59]
12	Jacozine	<i>S. aquaticus</i>	-	[52]
		<i>S. jacobaea</i>	-	[67]
13	Jaconine	<i>S. jacobaea</i>	-	[67]
14	Senecivernine	<i>S. madagascariensis</i>	Plante entière	[64]
15	Senkirkine	<i>S. madagascariensis</i>	-	[64]
		<i>S. gallicus</i>	parties aériennes	[69]
16	1,2-Dihydrosenkirkine	<i>S. integrifolius var. faurivi</i>	-	[73]
17	Adonifoline	<i>S. adonidifolius</i>	Fleurs	[74]
18	Neosenkirkine	<i>S. auricula</i>	Feuilles	[75]
19	odanthine	<i>S. iodanthus</i>	parties aériennes	[76]
		<i>S. bracteatus</i>	racines	[76]

Nous présentons dans cette section les alcaloïdes pyrrolizidiniques, car l'espèce faisant l'objet de notre travail, *Senecio delphinifolius* Vahl, appartient à la famille botanique des Asteraceae et au genre *Senecio*, principales sources de ces alcaloïdes.

I. 3. 2. 8. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques:

8. 1. Définition et répartition:

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques comprennent un hétérocycle pyrrolizidine. Compte tenu de toutes les combinaisons chimiques possibles de ces structures, il pourrait y avoir une multitude de molécules différentes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques, et jusqu'à présent plus de 350 ont été identifiées dans les plantes du monde entier, à l'exclusion des N-oxydes il est supposé que près de la moitié d'entre eux sont hépatotoxiques. Même si plus de 6000 espèces de plantes produisent des alcaloïdes pyrrolizidiniques, très peu de familles botaniques les produisent. C'est essentiellement chez les Asteraceae et les Boraginaceae qu'ont été isolés des alcaloïdes pyrrolizidiniques [77].

Dans les deux cas, de nombreux genres sont concernés : *Adenostyles*, *Cineraria*, *Doronicum*, *Erechtites*, *Eupatorium*, *Farfugium*, *Gynuria*, *Kleinia*, *Ligularia*, *Petasites*, *Senecio*, *Tussilago*, etc... (Asteraceae), *Alkanna*, *Amsickia*, *Anchusa*, *Borago*, *Cynoglossum*, *Echium*, *Heliotropium*, *Lithospermum*, *Myosotis*, *Nonea*, *Rindera*, *Symphytum*, *Trichodesma*, etc... (Boraginaceae). Ils ont également été caractérisés, plus sporadiquement, dans une dizaine d'autres familles: Fabaceae (*Crotalaria*), Apocynaceae, Euphorbiaceae, Orchidaceae, Poaceae, Santalaceae, etc... Chez les Asteraceae (Compositae), On les trouve dans les sous-tribus Senecioneae (24 genres dont *Senecio* comprend environ 1450 espèces) [44, 78- 83].

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques présentent un moyen de défense des plantes qui les produisent et donnent des effets répulsifs pour les insectes. Plusieurs de ces insectes ont cependant développé des mécanismes d'appropriation des APs afin qu'ils agissent également pour leur propre bénéfice comme répulsifs contre les mites, les papillons et les coléoptères, leurs prédateurs potentiels [84]. En outre, la composition et la concentration des APs peuvent fluctuer en fonction de l'âge et la partie de la plante, des conditions climatiques et environnementales [85].

Ainsi, tous les APs connu d'une plante les contenant ne sont pas nécessairement trouvés ensemble en même temps. En effet, les mêmes espèces qui poussent dans des endroits différents ou à différentes saisons peuvent contenir des alcaloïdes différents [86].

8. 2. Structure des alcaloïdes pyrrolizidiniques:

La plupart des alcaloïdes pyrrolizidiniques résultent de l'estérification entre des nécines et un ou deux acides aliphatiques carboxyliques (Figure I. 8) [44, 86].

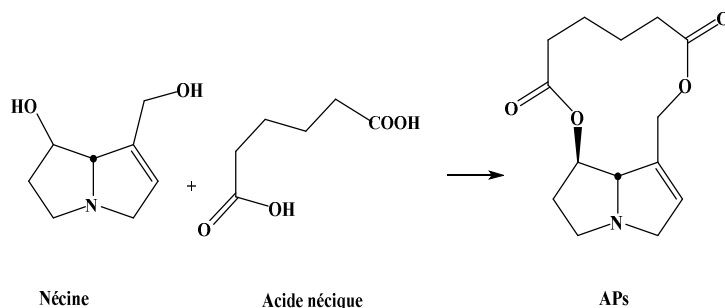


Figure I. 8: Formation des alcaloïdes pyrrolizidiniques.

Les nécines, sont des dérivés de la pyrrolizidine, c'est-à-dire de l'azabicyclo [3, 3,0] octane. La configuration en C-8 est variable, le plus souvent H-8 α [78].

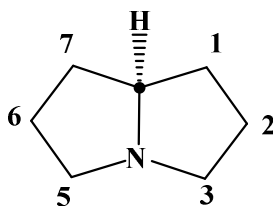


Figure I. 9: Structure du noyau pyrrolizidine

Cela conduit à la formation soit des esters d'acides mono (di) carboxyliques (intermédiaire, symphytine), soit des diesters macrocycliques (sénécionine, senkirikine) (Figure I. 10) [87]. Les nécines peuvent être de deux grands types à savoir les APs type rétronécines et otonécines [88]. Dans le cas des nécines de type rétronécine, le cycle est toujours substitué par un groupe hydroxyméthyle en C-1 et avec parfois une fonction alcool secondaire en C-7 (platynécine) ou en C-2 (rosmarinécine) ou en C-6 (crotanécine).

Les nécines de type otonécines quant à eux sont obtenus lorsqu'il y a une oxydation en C-8 conduisant ainsi à une ouverture de l'édifice bicyclique avec une méthylation au niveau de l'azote (N-méthylation) [78].

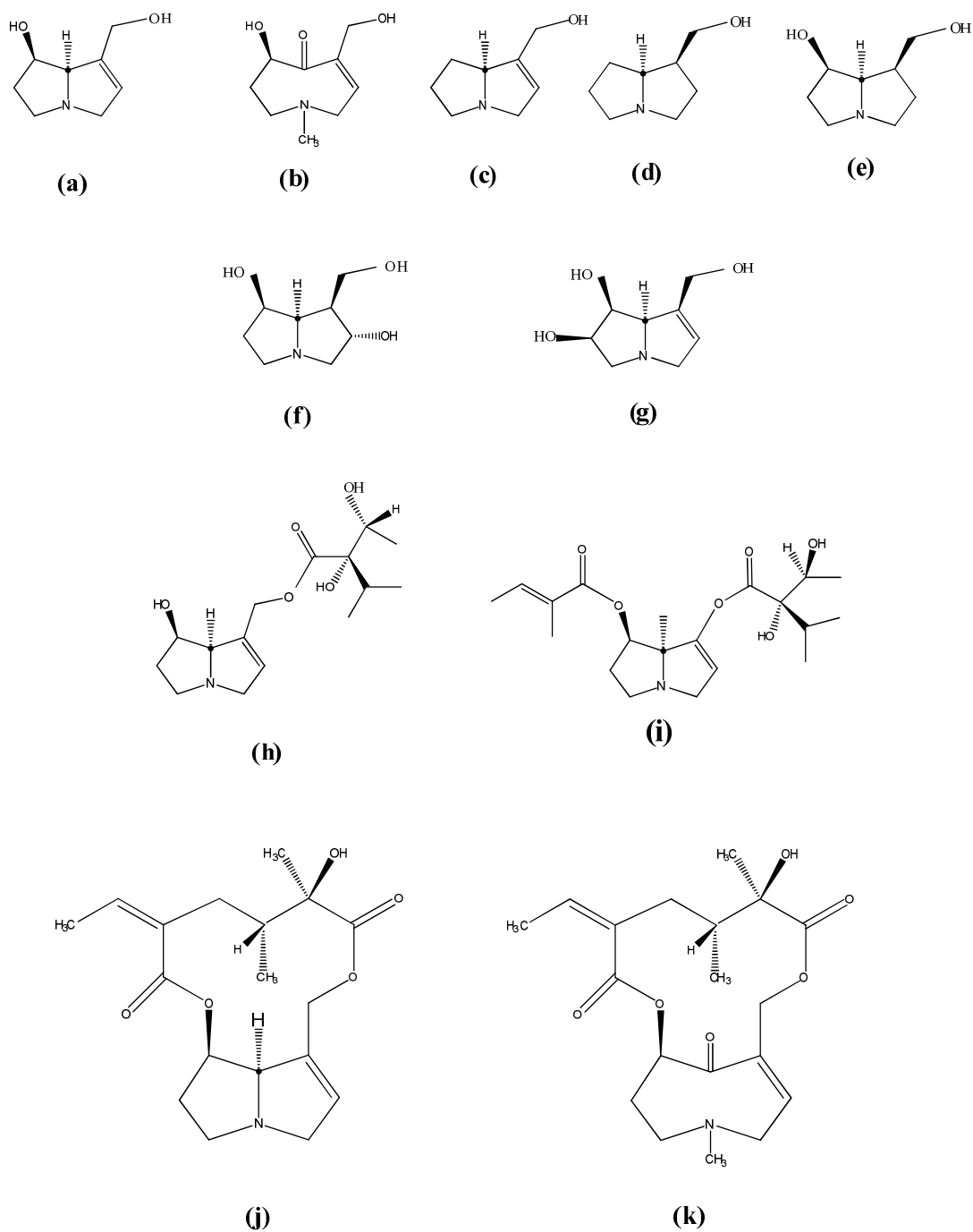


Figure I. 10: Quelques exemples de nécines et d'APs :

- (a) – Rétronécine ; (b) – Otonécine ; (c) supinidine ; (d) – isorétronécatoïl ; (e) – platynécine ;
 (f) – rosmarinécine ; (g) – crotanécine ; (h) – intermidine ; (i) – symphytine.
 (j) sénécionine ; (k) senkirkine.

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent exister sous deux formes moléculaires, les bases libres (forme tertiaire réduite) et les N-oxydes non-toxiques (forme oxydée) [81, 89]. A l'exception des alcaloïdes de types otonécines, tous les autres APs connus dans les plantes peuvent former des dérivés N-oxydes [86] par la réaction de N-oxydation (Figure I. 11) [90]. Signalons que dans la plupart des plantes, on y trouve les APs sous la forme N-oxyde principalement [91, 92]. Les alcaloïdes de cette dernière forme sont hydrosolubles alors que les bases libres sont organosolubles [80, 86, 87].

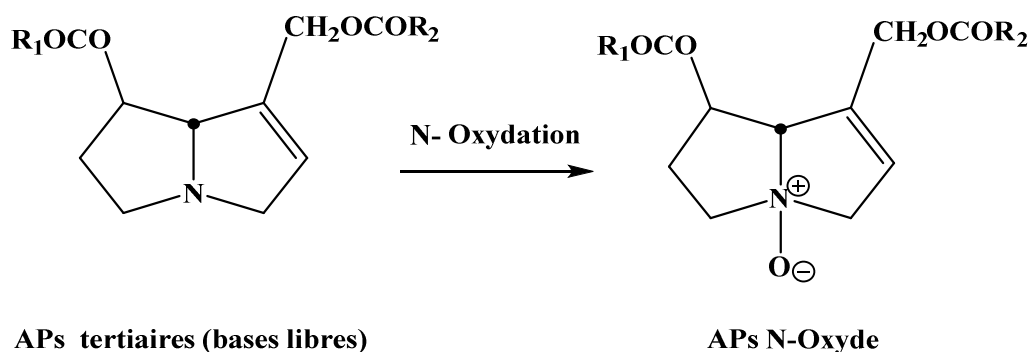


Figure I. 11. Les bases libres et les N-oxydes.

8. 3. Toxicologie et métabolisation des APs

8. 3. 1 Cas des APs insaturés en position C₁ – C₂

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs) forment un grand groupe de métabolites secondaires produits par certaines plantes qui peuvent devenir hépatotoxiques.

Pour être toxique, la structure des APs doit présenter:

- 1) Une insaturation en position 1 – 2 du noyau pyrrole.
- 2) Un ou deux hydroxyles attachés au noyau pyrrol par un carbone.
- 3) Présence d'une chaîne ramifiée dans la partie acide;
- 4) Au moins un de ces hydroxyles doit être estérifié, les diesters étant plus toxiques que les monoesters.

Les caractéristiques détaillées que doivent avoir les APs pour être toxiques sont résumées sur la figure I. 12:

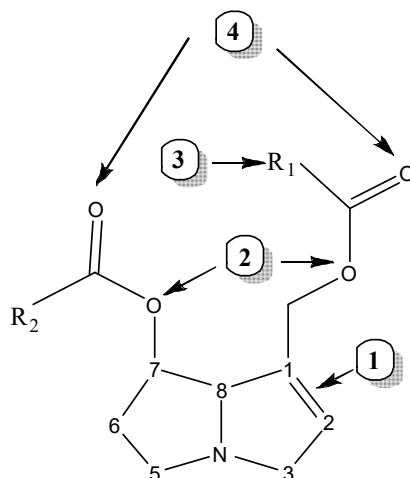


Figure I. 12: Eléments structuraux indispensables pour la toxicité des APs [93].

Pour être toxique, l'alcaloïde doit être déshydrogéné en 1, 2 et, au moins, mono estérifié. Comme le montre la figure I. 12, les APs sont irréversiblement convertis par les enzymes microsomiales hépatiques en ester pyrrolique qui sont les vrais responsables de la toxicité: les structures pyrroliques se comportent comme des agents alkylants à l'encontre de ces nucléophiles biologiques que sont les macromolécules nucléiques et protéiques [78, 94].

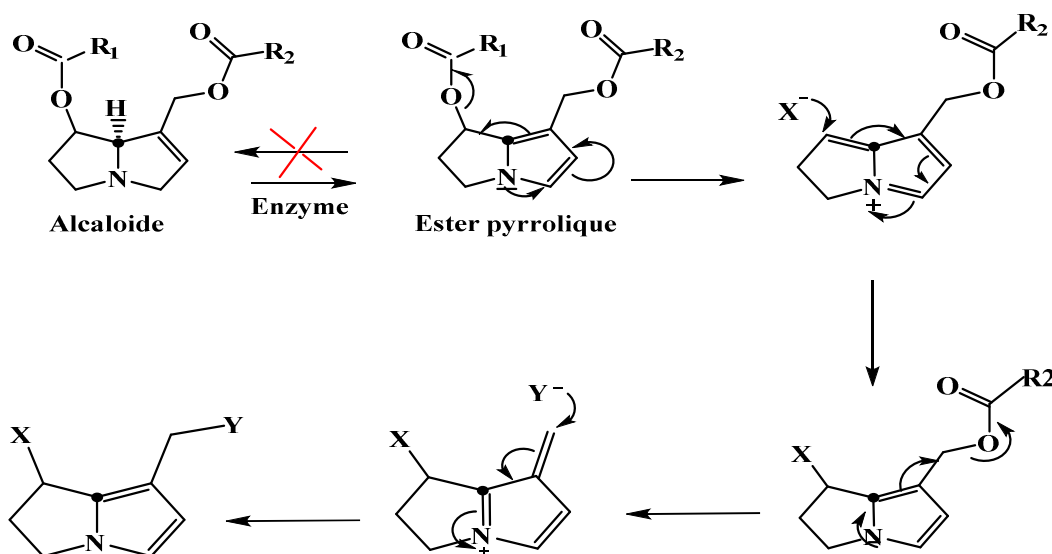


Figure I. 13: Formation des pyrroles impliqués dans la toxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques [78, 94].

X et Y représentent des molécules ayant des groupements nucléophile (tels que – OH, – NH et – SH) qui réagissent avec ces dérivés pyrroliques (agents alkylants bifonctionnels). On obtient finalement un pyrrole lié par covalence au nucléophile. Les groupements hydroxy-, amino- ou thiol- qui réagissent avec les dérivés pyrroliques (très électrophiles) proviennent des macromolécules cellulaires comme des protéines, l'ADN, les acides aminés, les enzymes, les globulines, l'hémoglobine et les bases puriques et pyrimidiques [95- 97]. Ils peuvent ainsi être très toxiques pour certains organes comme le foie, les reins, le cœur et le système respiratoire [98].

Dans les cellules hépatiques, les pyrroles peuvent réagir également avec des molécules comme le glutathion produisant ainsi des produits solubles (glutathionyl pyrroles) qui peuvent ensuite être excrétés dans la bile et l'urine. Dans ce cas, la conjugaison avec le glutathion peut constituer un mécanisme de protection contre la formation de pyrroles réactifs dans les cellules hépatiques [99].

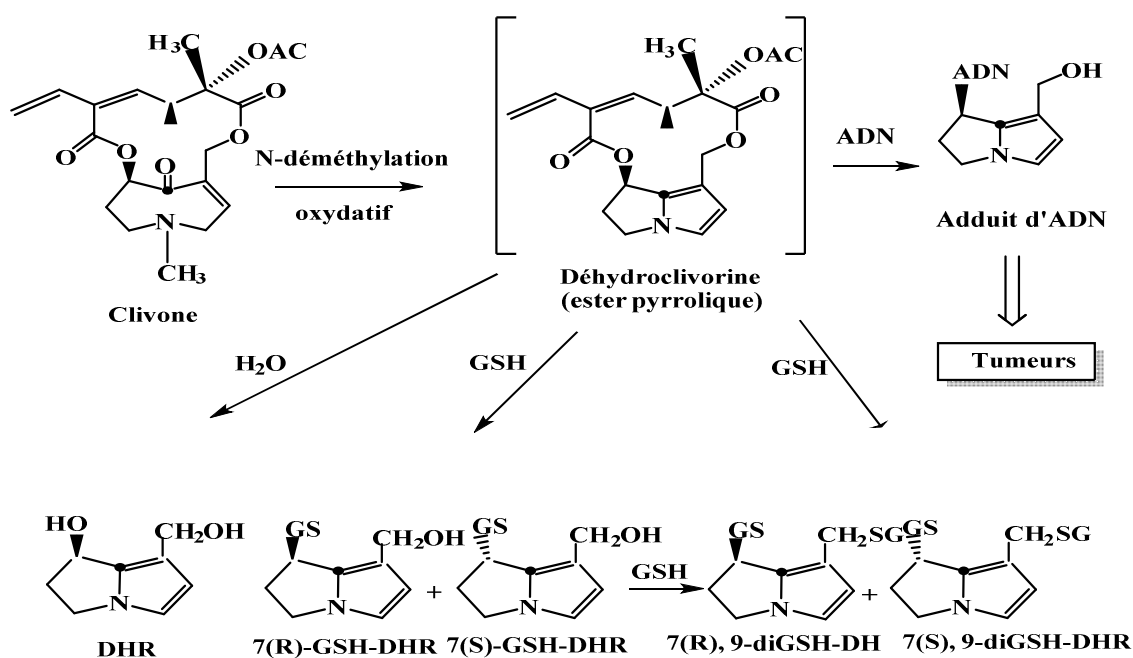


Figure I. 14: Les principales voies métaboliques des alcaloïdes pyrrolizidiniques: métabolisme de détoxication et d'activation de la clivorine, représentant des APs de type otonécine (Adapté selon Fu. P et al [97]).

Tous ce qui vient d'être élucidé affirme que les alcaloïdes pyrrolizidiniques peuvent montrer un potentiel dangereux pour les hommes et les animaux. Ils peuvent agir comme agents cancérrogènes, mutagènes, hépatotoxioque [100]. Le tableau I.6 illustre quelques exemples typiques de toxicités d'APs.

Tableau I. 6 : Quelques exemples de toxicités d'alcaloïdes pyrrolizidiniques dans certaines espèces du genre *senecio*:

Plante	APs	Toxicité	Références
<i>Senecio. argunensis Turcz.</i> <i>Senecio .scandens</i>	Sénécionine	Mutagène, Tumorigène hépatotoxique	[97,101, 102]
<i>Senecio .argunensis Turcz.</i> <i>Senecio .scandens</i>	Sénéciophylline	Mutagène, Tumorigène hépatotoxique	[97,101, 102]
<i>Senecio . madagascariensis</i>	Senkirkine	Mutagène, Tumorigène hépatotoxique	[97,101, 102]

8. 3. 2 Cas des APs saturés en position C₁ – C₂

Les APs non hépatotoxiques se retrouvent essentiellement dans les familles de plantes suivantes :

- les Boraginaceae, dont les principaux genres sont *Heliotropium*, *Lindelofia*, *Macrotomia*, *Paracaryum*, *Tournefortia* et *Trachelantus*
- les Compositae, dans les genres *Cacalia*, *Kleinia*, *Notonia* et *Senecio*
- les Leguminosea dont le seul genre concerné est *Crotalaria*
- et dans peu d'autres familles comme les Orchidaceae.

Ces APs saturés ne sont pas en fait transformés en métabolites toxiques et sont immédiatement excrétés avec les urines sans effets négatifs. En effet, les métabolites pyrroliques formés avec ce genre d'alcaloïdes sont différents de ceux provenant d'APs hépatotoxiques. Cela est dû au fait que, dans les alcaloïdes insaturés, c'est le cycle de droite qui est converti en pyrrole contrairement aux alcaloïdes saturés (comme la rosmarinine et la platyphylline) où c'est le cycle de gauche qui est déshydrogéné avec perte du groupe ester secondaire associé. Chimiquement, on peut expliquer la non-toxicité de ce type de dérivés pyrroliques par le fait que le groupe ester restant sur le cycle de droite n'est pas activé par

conjugaison avec l'azote et ainsi, le produit formé ne peut pas agir comme agent alkylant et n'est donc pas cytotoxique [86, 103].

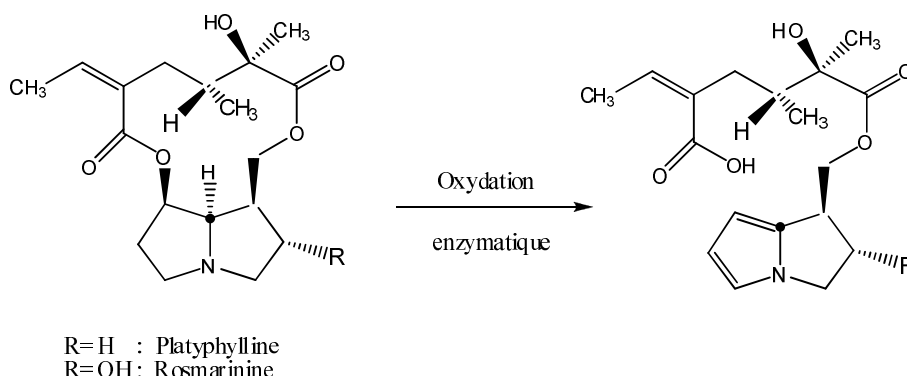


Figure I. 15: Exemple d'APs saturés en position C₁-C₂.

8.3.3. Toxicité chez l'homme :

Chez l'homme, la contamination se fait par l'ingestion des aliments contenant des APs [80]. Ce sont surtout les céréales, le miel, le lait et les œufs, la contamination de la chaîne alimentaire, cas de lait produit par des animaux ayant consommé des plantes contenant des APs, les poules peuvent aussi transférer les APs aux œufs après avoir ingéré des grains contaminés des fortes concentrations en APs peuvent également être trouvées dans le miel [104].

Les APs sont oxydés par le foie en dérivés pyrroliques qui provoquent une nécrose des cellules endothéliales des veines centrolobulaires, ce qui conduit à l'infiltration et à l'œdème de leurs parois. Il en résulte une hypertension portale et, secondairement, une fibrose: c'est la maladie veino-occlusive. On a signalé un grand nombre de cas d'empoisonnements de gravité variable liés à la consommation de thés médicinaux provenant d'herbes qui produisent ces substances. Il y a également eu des épidémies d'intoxications aux APs dues au fait que plusieurs espèces productrices d'alcaloïdes envahissent les cultures comme le maïs et le soja et les contaminants. Des cas liés à l'allaitement d'êtres humains et d'animaux ont également été signalés avec des symptômes de la maladie, vu que les APs passent dans le lait maternel et dans celui des vaches. L'intoxication chronique se traduit par une perte d'appétit, des douleurs, une distension abdominale, une augmentation du volume du foie. Certains d'entre eux se sont révélés génotoxiques et cancérigènes [78, 79, 93, 97].

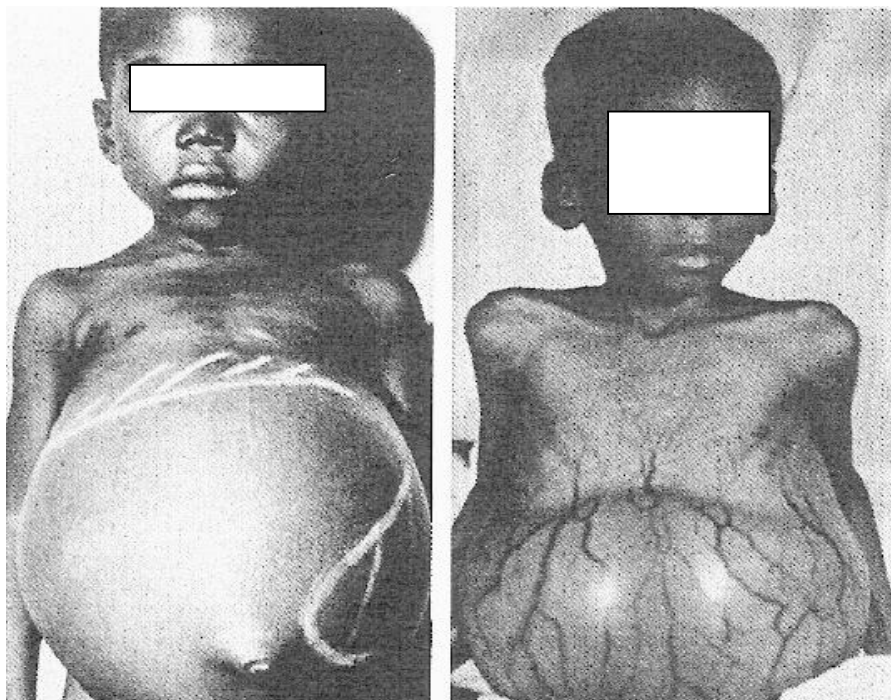


Figure I. 16: Ascites associées au syndrome veino-occlusif en Indes occidentales chez les enfants de 5 et 7 ans [105].

8. 3. 4. Toxicité chez les animaux

Les intoxications sont fatales pour les bovins et les chevaux. Ceux-ci sont en effet beaucoup plus sensibles que les autres espèces ces intoxications chroniques peuvent se produire suite à une consommation des foins contaminés par des tiges fleuries desséchées, ou dues aux feuilles encore en rosette ce qui provoque la mort du bétail domestique en raison de la toxicité hépatique; et induisent des tumeurs du foie et des lésions pulmonaires chez les animaux de laboratoire. Particulièrement chez le cheval et la vache, on remarque une perte d'appétit, agitation et mouvements désordonnés. La certitude de l'implication d'alkaloïdes pyrrolizidiniques est apportée par la mise en évidence chromatographique de leurs métabolites pyrroliques dans le sang et le foie de l'animal atteint [106].



Figure I. 17: Des chevaux broutent l'herbe au pâturage fortement infesté de *Senecio madagascariensis* sur l'île d'Hawaii [64].

8. 4. Méthodes d'identifications des alcaloïdes pyrrolizidiniques

Pour l'identification et la quantification des alcaloïdes pyrrolizidiniques, la GC- MS et HPLC-MS sont les méthodes d'analyse les plus intéressantes [97, 107-110].

La GC-MS est en effet fréquemment utilisée pour l'analyse des mélanges complexes des alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs), ainsi les informations structurales pouvant être déduites à partir des similarités des spectres de masse avec des APs connus et ce afin de faciliter la détection des APs de structures inconnues [110, 111].

8. 4. 1. Indice de rétention IR :

Les indices de rétention ont été définis par Kovats en 1958. A chaque produit (X) est associé un indice de rétention $I(X)$, Par définition: $I(n\text{-alcane}) = 100 \times (\text{nombre d'atomes de carbone})$ cet indice est basé sur un système d'étalonnage par des hydrocarbures linéaires [112].

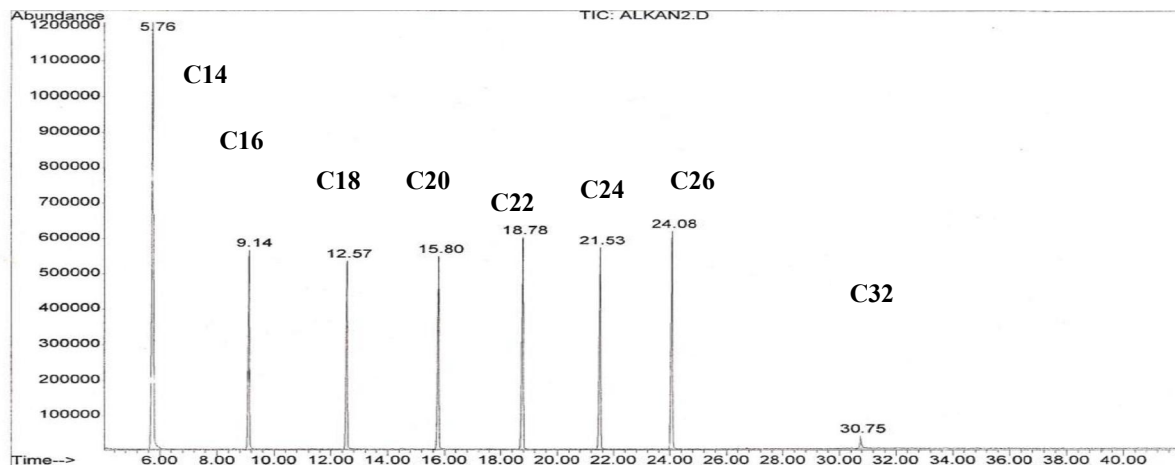


Figure I. 18. Chromatogramme d'une série d'alcane linéaires.

Les indices de Kovats sont les temps de rétention relatifs des substances analysées par rapport à celles des alcanes. En mode isotherme, on injecte sur la colonne à une température et à une pression d'entrée données, les alcanes linéaires de formule C_nH_{2n+2} avec $n \geq 5$ pour calculer les indices de rétention par extrapolation linéaire comme décrit [112].

$$I_x^s = 100N + 100n \left(\frac{\log t_{R,x} - \log t_{R,N}}{\log t_{R,(N+n)} - \log t_{R,N}} \right)$$

Les calculs précédents des indices de rétention impliquent que les mesurent soient effectuées dans des conditions isothermes.

En programmation de température, ils donnent encore de bons résultats en substituant, les temps de rétention aux logarithmes correspondants [113].

En parallèle, une expression mathématique générale selon Van den dool et al qui donne une meilleure approximation des indices de rétention, est la suivante [114]:

$$I = 100.n \left[\frac{t_r(x) - t_r(z)}{t_r(z+n) - t_r(z)} \right] + 100.z$$

La formule ci-dessus décrit le calcul des indices de rétention à partir des temps de rétentions des composés cibles et ceux des alcanes :

Où I: indice de rétention d'une substance X.

z = nombre d'atomes de carbone de l'alcane qui sort avant le composé inconnu

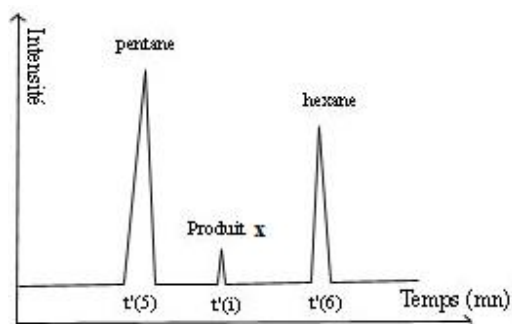
t_r = temps de rétention, X = molécule inconnue,

$t_r(X)$: temps de rétention du composé étudié.

$t_r(Z)$: temps de rétention de l'alcane à (Z) atomes de carbone précédant X.

$t_r(Z+n)$ = temps de rétention de l'alcane à (Z+n) atomes de carbone qui suit X.

n : différence du nombre de carbone



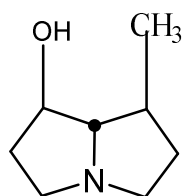
D'autre part l'emploi d'un programme standard est presque obligatoire pour des calculs de cette nature; il peut apporter une standardisation plus précise pour la détermination d'indices de rétention, qui sont réalisés dans des laboratoires différents, Il existe également quelques tables des indices de rétention de nombreux produits chimiques courants afin d'identifier un composé inconnu [115].

8. 4. 2. Identification des APs par Spectrométrie de masse:

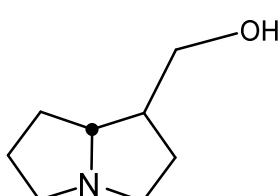
Les données de la spectrométrie de masse et les différentes fragmentations spécifiques des alcaloïdes pyrrolizidiniques sont répertoriés [86].

8. 4. 2. 1. Les spectres de masse par impact électronique (IE):

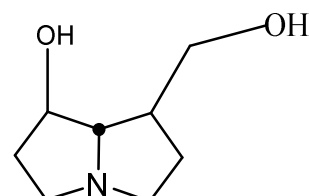
Les nécines saturés tel que retronecanol, laburnine, et platynecine donnent des fragmentations typiques à m/z 95-97, 122-123, 138-140. Il ya un pic de base caractéristique à $m/z = 82$ [116, 117].



retronecanol

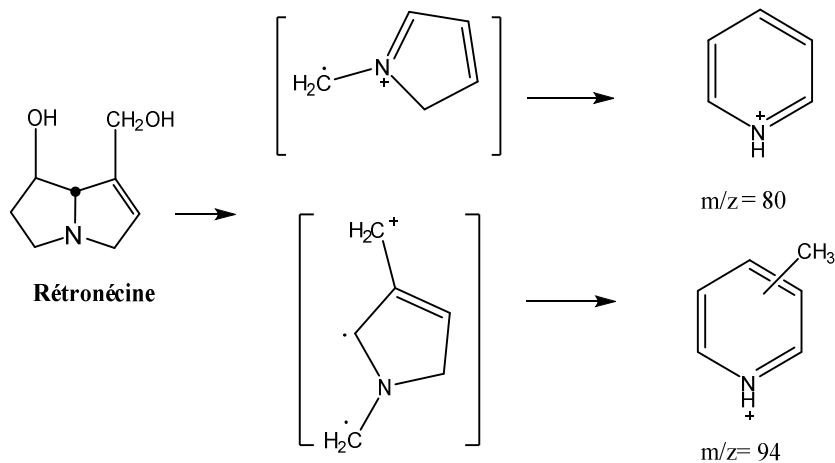


laburnine

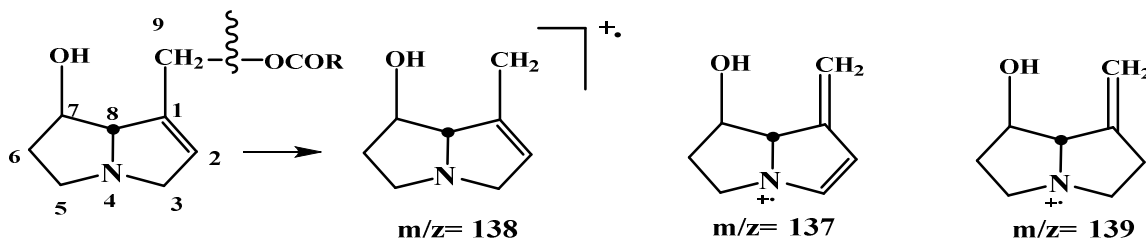


platynecine

La partie nécine des APs saturés comme la platyphylline donnent des fragmentations similaires [116]. Les fragments des nécines insaturés correspondants sont à 2 unités de masse inférieur; ainsi le spectre de masse de la rétronécine est identique aux fragments majeurs et au pic de base mais à $m/z = 80$ [86, 117].



Les 9_monoesters des nécines insaturés donnent des fragments hydroxylés spécialement $m/z = 138$ qui résulte de la coupure C-9-O [117]:



Le fragment nécine des diesters pyrrolizidiniques insaturés donne des groupes de fragmentations à m/z : 93-95, 119-121, et 136-139 [117].

Le schéma suivant reprend tous ceux qui s'observe chez les diesters macrocycliques insaturés de type sénécionine et devrait être également valable pour les molécules estérifiées différemment ou non estérifiées.

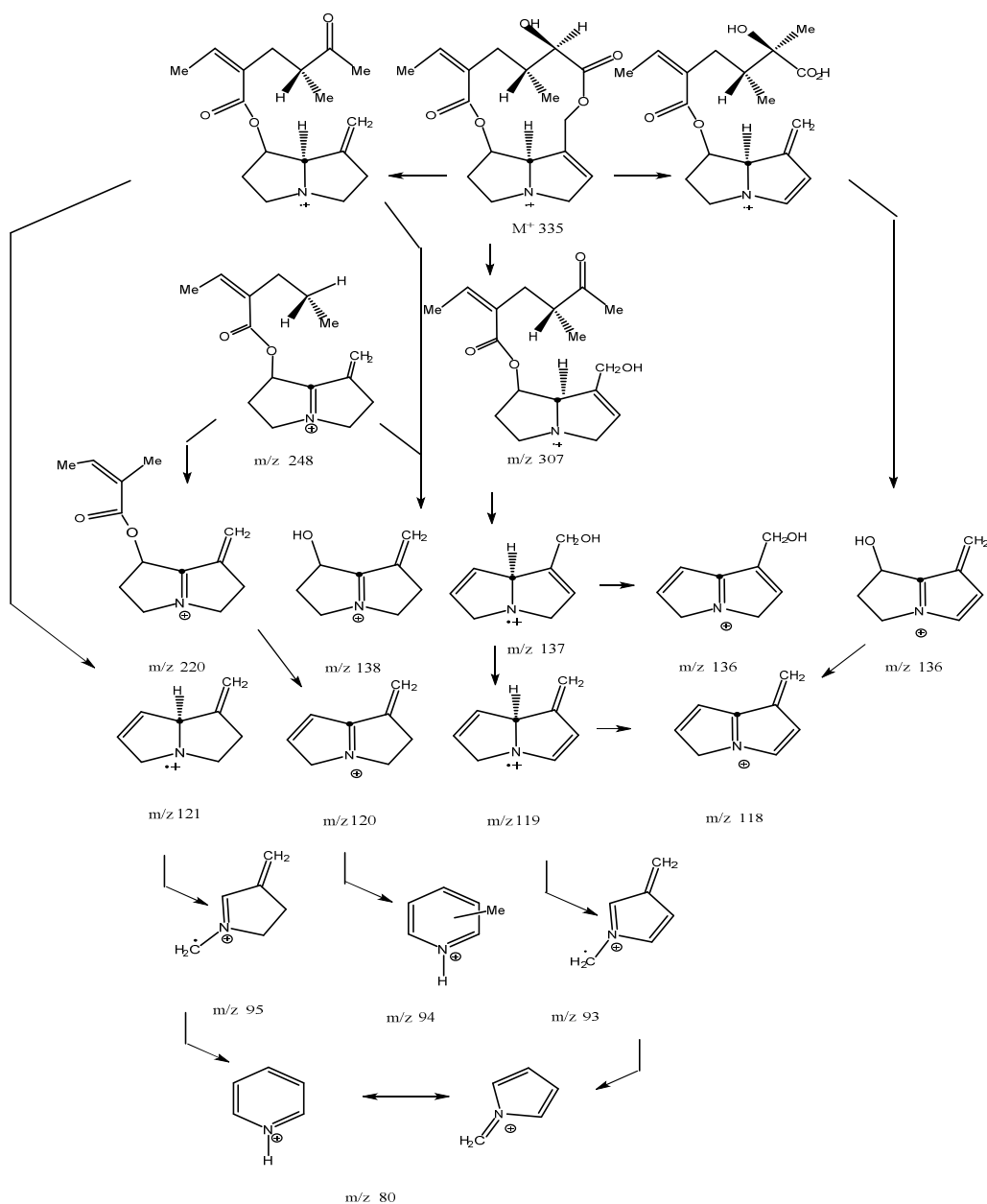


Figure I.19 Fragmentations des diesters macrocycliques d'APs insaturés en spectrométrie de masse [115].

I. 3. 3. Les composés phénoliques:

I. 3. 3. 1. Généralités

Les composés phénoliques constituent une vaste famille qui regroupe des composés non azotés présentant des cycles aromatiques hydroxylés. Ils regroupent plusieurs types de composés impliqués dans les différents mécanismes de défense des plantes. D'un point de vue biosynthétique, la majeure partie des composés aromatiques retrouvés dans les plantes appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes, qui dérivent de la phénylalanine ou de la tyrosine [118]. Elle comprend :

✓ **Des dérivés simples de l'acide cinnamique**

certaines sont utilisés dans des domaines alimentaires et cosmétiques (vanilline, eugénol...), mais aussi en industrie pharmaceutique (l'acide salicylique) [119].

✓ **Des coumarines**

Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation comme étant des lactones cycliques. Plus d'un millier de coumarines ont été décrites et les plus simples d'entre elles sont largement distribuées dans tout le règne végétal. Certaines familles d'Angiospermes élaborent des structures très variées : Asteraceae, Fabaceae, Apiaceae et Rutaceae [120].

✓ **Des flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent en eux même une famille de composés extrêmement vaste. La variété des composés est essentiellement liée au degré d'hydroxylation, de méthylation et/ou de glycosylation de chacun des trois cycles des molécules de base. De nombreux flavonoïdes, présents dans les aliments, présentent un intérêt du point de vue de la santé humaine, particulièrement de par leurs activités biologiques (hespéridine utilisé pour son effet sur les vaisseaux sanguins et isoflavones comme phytoestrogènes dans la ménopause) et leur caractère antioxydant, mais aussi comme colorants alimentaires (anthocyanes) [121 - 123].

Chez les Angiospermes la diversité structurale des flavonoïdes est maximale : ainsi, une trentaine de type flavonoïdiques ont pu être identifiés chez les Asteraceae [124]. Plus de

4700 flavonoïdes ont été inclus dans un système de calcul spécialement conçu à des fins chimiotaxonomiques. Ce système a été appliqué par Emerenciano et al [125] sur les tribus et les sous-tribus de la famille Asteraceae. La forte tendance des plantes taxonomiquement proches à produire les mêmes types de flavonoïdes, ont fait des flavonoïdes des marqueurs chimiotaxonomiques de choix pour la classification végétale [126, 127].

I. 3. 3. 2. Les flavonoïdes isolés du genre *Senecio* :

Les flavonoïdes identifiés dans la plupart des espèces du genre *Senecio* sont essentiellement des dérivés de flavonols, le kaempférol 3-glucosides, la quercétine, l'apigénine 7-glucoside , la rutine et autres etc ... [128] dont quelques uns sont représentés sur le tableau ci-dessous:

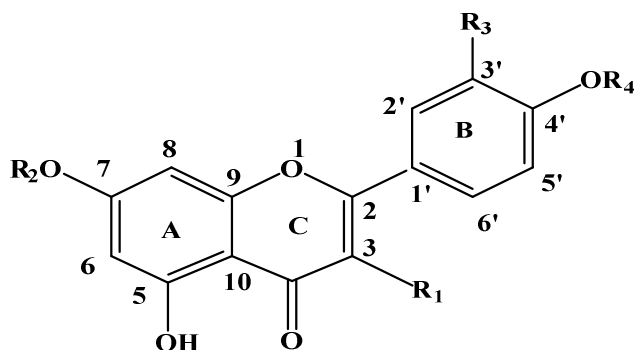
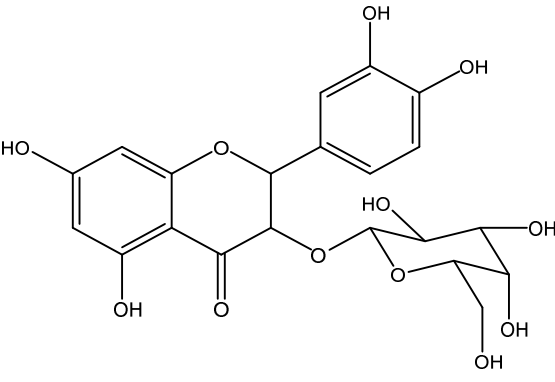
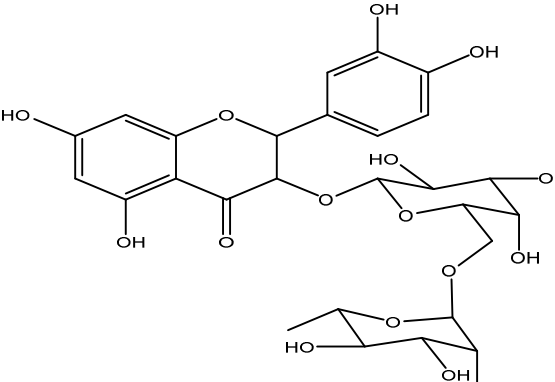
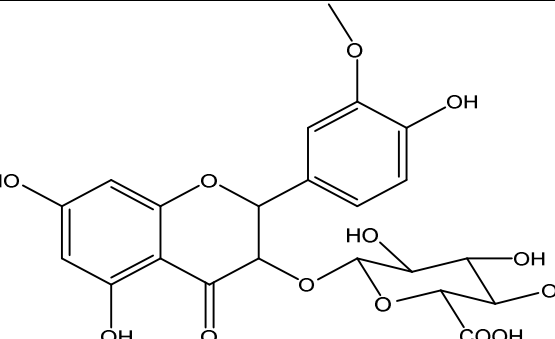
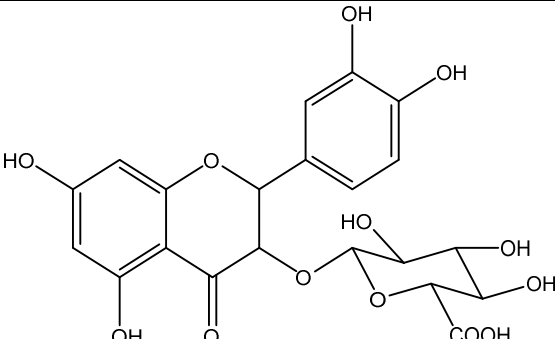
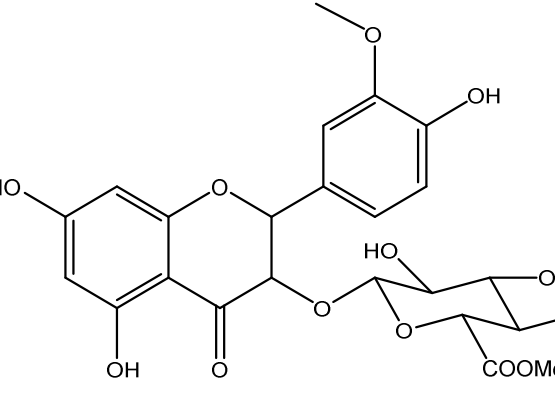
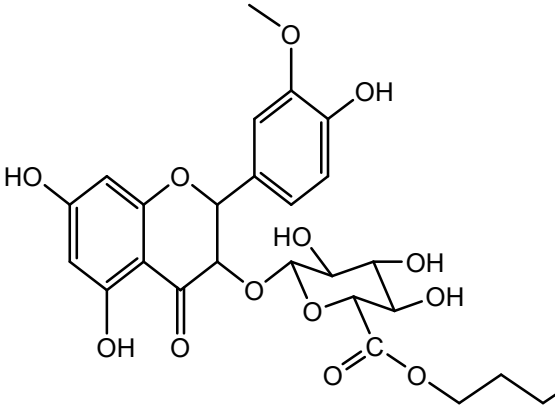


Tableau 1. 7: Exemples de Flavonoïdes isolés des espèces du genre *Senecio*:

N°	Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Réf
1	Quercétine	OH	H	OH	H	[128, 129]
2	Rutine	O-rutinoside	H	OH	H	[129, 130]
3	Isorhamnétine -O-β-glucoside	O-β-glucose	H	OCH ₃	H	[131]
4	Astragalin (kaempferol 3-glucoside)	O-glu	H	H	H	[128]
5	Quercetin 3-O-rhamnoside	O-rha	H	OH	H	[132]

L'utilisation de nouvel outil chromatographique telle que la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) a mené à la séparation de six flavonoïdes dont la plus part sont nouveaux dans le genre et sont illustrés dans le tableau 1. 8. de l'extrait butanolique des fleurs de *Senecio giganteus* Desf., plante endémique Algérienne [133, 134, 135].

Tableau 1. 8: Flavonoïdes isolés de *Senecio giganteus* Desf., plante endémique Algérienne:

	
<p align="center">Quercétine-3-O- -galactopyranoside</p>	<p align="center">Quercétine-3-O- -robinobioside</p>
	
<p align="center">Isorhamnétine-3-O- -glucuronide.</p>	<p align="center">Quercétine-3-O- -glucuronide</p>
	
<p align="center">Isorhamnétine-3-O- -glucuronide-6''- méthyle ester.</p>	<p align="center">Isorhamnétine-3-O- -glucuronide-6''- butyle ester</p>

I. 3. 3. 3. Rôle des flavonoïdes dans les plantes

Les flavonoïdes sont les pigments colorés des fleurs, la variation de couleurs des fleurs est due à l'accumulation dans les cellules de pigment capables d'absorber sélectivement la lumière visible. Dans d'autres cas, les pigments végétaux peuvent jouer un rôle répulsif vis-à-vis de pollinisateurs, par exemple les abeilles préfèrent les fleurs bleues et jaunes, les papillons préfèrent le rose et le blanc. De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes [136]. Ils disposent d'un système de défense efficace contre toute agression parasitique ou abiotique [137]. Ces molécules présentent une zone d'absorption dans l'UV et font écran à ces rayons qui endommagent l'ADN, molécule support du patrimoine génétique [138]. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogenèse, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes [139, 140].

I. 3. 3. 4. Intérêts pharmacologiques des flavonoïdes :

La lecture des traités classiques de pharmacologie indique le peu d'importance accordée à leur valeur thérapeutique. Ce n'est que depuis quelques années que certaines propriétés pharmacologiques ont pu être mises en évidence. Leur étude a alors pris un nouvel essor [141]. Les techniques modernes d'isolement de molécules et d'exploitation médicale montrent que beaucoup de propriétés thérapeutiques reposent sur les produits du métabolisme secondaire. De plus, il existe une relation directe entre les propriétés physico-chimiques de ces composés et leur activité biologique et/ou pharmacologique. Actuellement, on s'intéresse surtout à l'interaction des flavonoïdes avec les radicaux libres.

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être veino-actifs [142], c'est à dire capable de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et renforcer leur résistance. Les flavonoïdes sont aussi des piègeurs de radicaux libres [143]. Biochimiquement, les radicaux libres seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et de mutations, d'initiation et de promotion du processus de cancérisation, ainsi que de dégradations cellulaires du fait de leur réaction avec les phospholipides membranaires [142].

I. 3. 3. 5. Flavonoïdes et radicaux libres :

Les Flavonoïdes (FIOH) sont capables de réduire les radicaux libres comme l'anion radical superoxyde (O_2^-), le radical alkoyle $RO\cdot$ et le $OH\cdot$ par transfert d'hydrogène dans divers circonstances [103]:

- Anoxie, qui bloque le flux d'électrons en amont des cytochromes oxydases et engendre la production de l'anion radical superoxyde (O_2^-)
- Inflammation, qui correspond, entre autres, à la production d'anion superoxyde (O_2^-) par la NADPH-oxydase membranaire des leucocytes activés. Mais aussi par dismutation de peroxyde d'oxygène lequel en présence d'ions ferreux. Engendre le très réactif radical hydroxyle $OH\cdot$.

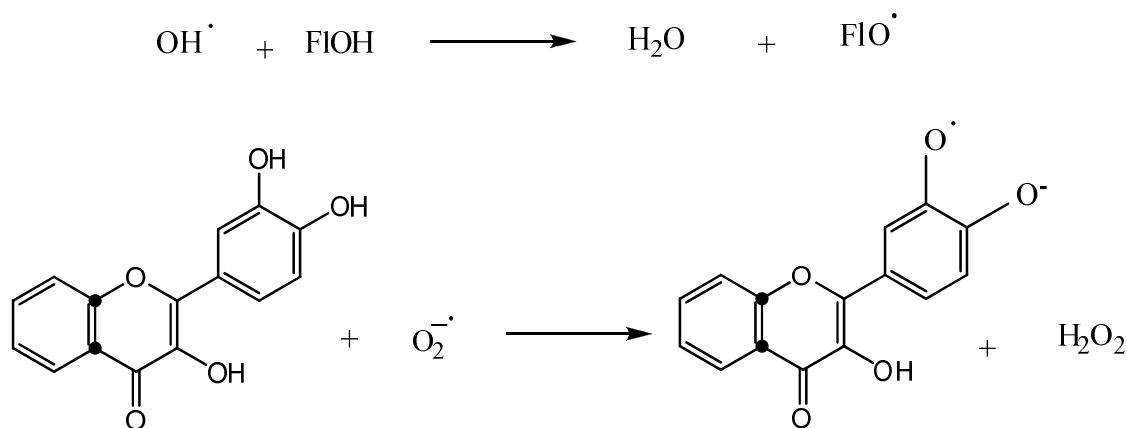


Figure I. 20: réaction des flavonoïdes avec les EOR.

D'après Densiov et al [144].

Les données de la littérature montrent une mise en évidence un certain rapport entre la structure chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres [145, 146]. Ces derniers ont une part de responsabilité dans la genèse des lésions athéromateuses, dans l'apparition de certains cancers. C'est sur cette base que se sont développés de nombreux travaux sur le rôle que pourraient jouer des molécules antioxydantes (capables de piéger les radicaux) comme les flavonoïdes.

Les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants:

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃ [147].

I. 3. 3. 6. L'étude chimique des flavonoïdes

I. 3. 3. 6. 1. Solubilité et extraction

Il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [124, 148].

Selon Bruneton tous les flavonoïdes n'ont pas la même propriété de solubilité, les hétérosides sont hydrosolubles et solubles dans les alcools, les génines sont, pour la plupart, solubles dans des solvants organiques apolaires ainsi les flavonoïdes sont en règle générale extraits par des solvants moyennement polaire (dichlorométhane) on peut certes laver d'abord à l'hexane pour les séparer des cires et des graisses. De ce fait le principe utilisé pour l'extraction des flavonoïdes est basé sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques [124, 148].

Les hétérosides peuvent être extraits le plus souvent par des alcools (éthanol, méthanol) additionnés d'eau (20 à 50%) permettant ainsi l'obtention d'un extrait hydro-alcoolique. Il est possible de procéder ensuite à une évaporation sous vide et lorsque le milieu ne contient plus que de l'eau, de mettre en œuvre une extraction liquide- liquide par des solvants non miscibles à l'eau [124].

I. 3. 3. 6. 2. Les méthodes de séparation et de purification :

La séparation des produits flavoniques est essentiellement réalisée par des méthodes chromatographiques :

- Chromatographie sur colonne.
- Chromatographie préparative sur papier.
- Chromatographie préparative sur couche mince

1. Chromatographie sur colonne:

Le but de la chromatographie sur colonne est d'effectuer une première purification et de parfaire la sélectivité des produits isolés. Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le silicagel, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélanges importantes et complexes [149]. Par exemple, le polyamide SC₆ "polycaprolactame» permet de séparer des produits phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier, et cela par sa "fonction carbonyl- amide" qui donne lieu à de fortes liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles des composés flavoniques [150-151].

Le choix de la taille de la colonne (longueur et diamètre) est fonction de la quantité de l'extrait brut à étudier. Selon la nature des flavonoïdes, deux systèmes de solvants peuvent être utilisés : toluène enrichi de méthanol ou eau enrichie de méthanol.

Les différentes fractions obtenues sont contrôlées par chromatographie sur couches, suivies sous lumière UV indiquent les changements de la polarité du mélange éluant d'un gradient à un autre. Celles qui se ressemblent sont rassemblées, évaporées à sec et reprises dans du méthanol.

2. Chromatographie préparative sur papier :

C'est la méthode chromatographique la plus ancienne pour séparer les mélanges des composés polaires comme les glycosides flavoniques [152]. Le support utilisé est le papier Whatman n° 3 (46 cm x 57 cm), les systèmes de solvants les plus utilisés dans cette technique sont [153]:

- L'acide acétique **15** et **30 %** constitue le système aqueux.
- Le *n*-butanol/ Acide acétique/ Eau (BAW) **4 /1/ 5** constitue le système organique.

3. Chromatographie préparative sur couche mince :

La chromatographie préparative sur couche mince (CCM), très simple et très rapide, elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification en utilisant les diverses phases stationnaires, le gel de silice, la cellulose ou le polyamide DC6 (support de choix) en solution dans l'éthanol (10 g de DC6 pour 50 ml d'éthanol pour 5 plaques de verre 20 x 20 cm).

- Les systèmes de solvant les plus utilisés pour les C.C.M préparatives sur polyamide DC6 sont :

S1 : 4 / 3 / 3 : toluène / méthyléthylcétone / méthanol.

S2 : 60 / 26 / 7 / 7 : toluène / éther de pétrole / méthyléthylcétone / méthanol.

S3 : 13 / 3 / 3 / 1 : eau / méthanol / méthyléthylcétone / acétylacétone.

S4 : 18 / 1 / 1 : méthanol / acide acétique / eau.

- Pour les C.C.M préparatives sur silice, les systèmes de solvant les plus utilisés sont :

S1' : Chloroforme/Méthanol où $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ avec des proportions variables

S2' : $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ avec des proportions variables

S3' : $\text{CH}_3\text{COC}_2\text{H}_5/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{HCOOH}$ 100/10/5/5

Enfin pour les C.C.M préparatives de Cellulose microcristalline, les systèmes utilisés ont été souvent des solutions à base de CH_3COOH et la phase organique du mélange butanol/acide acétique/Eau (BAW) dans les proportions respectives 4/1/5 (S5) [154].

- **Purification sur colonne :**

Deux techniques sont utilisées :

- Filtration sur gel de sephadex LH-20 ; à l'inverse des autres colonnes, celle-ci fonctionne en terme de tamis moléculaire et c'est en fonction de leur poids moléculaire que les produits sont élués. Cette technique est utilisée généralement en dernier lieu. Elle permet de bien purifier les produits isolés éluant : méthanol enrichi en eau par gradient de polarité croissante.
- Filtration sur polyamide SC6, éluant : toluène enrichi de méthanol par gradient d'éluion de polarité croissante).

I. 3. 3. 6. 3. Méthodes d'analyses Spectrales:

- **Généralités :**

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) avec ses

différents modes (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, etc...), la spectrométrie de masse (SM) avec différents types d'ionisation: impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés [153, 155].

Une fois que les produits isolés sont purifiés, les techniques suivantes sont utilisées pour déterminer la structure des composés flavoniques:

1. Fluorescence sous lumière UV:

La fluorescence sous lumière UV (lumière de Wood) représente l'étape primaire et fondamentale de l'analyse structurale d'un flavonoïde. Il existe une relation étroite entre la fluorescence du composé, sa nature et son mode de substitution, le tableau I.9 résume les différentes interprétations des fluorescences sous UV des flavonoïdes [149, 153].

Tableau I. 9: Relation entre la fluorescence sous lumière UV et les structures flavoniques.

La fluorescence	Type de flavonoïdes possibles
Violette noire	Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 trihydroxy flavone Flavonol avec 3-OR. Certaines Chalcones.
Brun noir	3 – OH absent ou 3 – OH substitué.
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3 – OH libre. Aurones, Chalcones, Flavonones
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

2. Le rapport frontal R_f :

La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{La distance entre l'origine et la tâche du produit.}}{\text{La distance entre l'origine et le front du solvant.}}$$

Cette valeur permet d'avoir une idée sur la nature du flavonoïde et ainsi que la nature et le nombre de substituants [156]. Elle dépend des conditions expérimentales de chromatographie tel que: la nature du solvant et la concentration de l'échantillon [157, 158].

L'analyse des propriétés spectrales UV-Visible d'un flavonoïde complète les premières informations apportées par son comportement chromatographique et sa propriété de fluorescence.

3. Les règles de la spectrophotométrie UV-Visible:

La spectrophotométrie UV-Visible est une méthode très sensible à la nature et la position des substituants. Elle est basée sur le principe suivant : en milieu alcoolique chaque flavonoïde a un spectre d'absorption caractéristique, susceptible d'être modifié par l'addition de réactifs. La nature du réactif et l'effet qu'il produit sur le spectre d'absorption apporte des indications sur la structure des flavonoïdes, qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales comme l'ont décrit Jurd et al [159], (figure I-21).

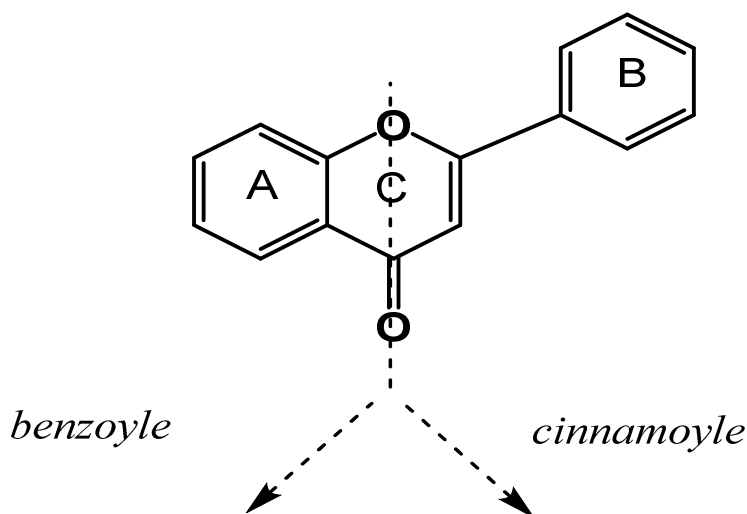


Figure I-21: Les bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.

Bande I: présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C₂-C₃) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

Bande II: présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [149].

Les spectres sont réalisés en trois séries de deux ou trois étapes. La quantité totale de flavonoïde nécessaire pour leur réalisation est de l'ordre de quelque dixième de milligrammes. Les séries d'enregistrement des spectres en présence de réactif sont effectuées selon les étapes suivantes :

1. **première série :** On enregistre le spectre d'absorption dans le méthanol neutre, puis immédiatement après l'addition d'une goutte de solution aqueuse de soude (0.5 N), ensuite on enregistre après 5 minutes.
2. **deuxième série :** On enregistre une première fois le spectre d'absorption dans le méthanol, puis à cette solution méthanolique on ajoute du AlCl₃ 1%. Après cette étape on rajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (6N) puis on enregistre le spectre de cette nouvelle solution.
3. **Troisième série :** On enregistre le spectre de la solution méthanolique puis on additionne NaOAc (sec) et on enregistre après réaction du produit avec l'acétate de sodium, après cette opération on rajoute à cette solution quelques gouttes de solution saturée d'acide borique puis on enregistre le spectre de la solution en présence de NaOAc + H₃BO₃.

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonique donc, la position précise et les intensités relatives de ces deux bandes donnent la nature du flavonoïde ainsi que son mode d'oxygénation. En règle générale l'addition d'un hydroxyle libre provoque un effet bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'ondes).

Pour une méthylation ou glycosylation des groupements 3, 5 et 4' hydroxylés, provoque un effet hypsochrome (déplacement vers des longueurs d'onde plus faibles pour la bande I [160]).

a) Absorption dans le méthanol

Le tableau I-10 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Tableau I. 10: Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes.

Bande I	Bande II	Type de flavonoïde
310-350	250-280	flavone
330-360	250-280	Flavonol (3 -OH substitué)
350-385	250-280	Flavonol (3 -OH libre)
310-330	245-275	isoflavone
340- 490 380-430	230-270 Intensité faible	Chalcone Aurone
465-560	270-280	Anthocyanes et anthocyanidines

b) Absorption en présence de réactifs

L'addition de réactifs tels que NaOH, NaOAc, AlCl₃, H₃BO₃ et HCl, réagissent avec les groupements hydroxyles du flavonoïde par formation de complexes qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques, le spectre méthanolique sera modifié, permettant la localisation des substituants sur le squelette de base du flavonoïde.

b. 1 NaOH :

NaOH une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la bande I. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'.

Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [149].

L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7.

Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et / ou 4' et 7.

b. 2. NaOAc:

L'acétate de sodium, anhydre, ionise les hydroxyles les plus fortement acides en position 7, 3 et 4', les autres hydroxyles ne sont pas affectés [161]. L'ionisation de l'hydroxyle en position 7 entraîne un effet bathochrome sur la bande II de l'ordre de 5 à 20 nm. Ce réactif est utilisé pour savoir si l'hydroxyle en 7 est libre ou substitué.

b. 2. 1. NaOAc + H₃BO₃:

En présence d'acétate de sodium, l'acide borique chélate les hydroxyles en position ortho. Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (H₃BO₃) est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système orthodihydroxyle sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) suite à la formation des chélates, il se produit un effet bathochrome sur bande I du spectre UV de 12 à 36 nm [153].

b. 3. AlCl₃ et AlCl₃/ HCl :

Les propriétés chélatantes du chlorure d'aluminium à l'égard des flavonoïdes se situent à deux niveaux :

1. Formation des complexes labiles avec deux hydroxyles libres en position ortho (6,7) ; (7,8) ou (3', 4').
2. Formation des complexes stables avec le carbonyle en 4 et l'hydroxyle en 5 ou/ et 3.

L'interprétation des spectres nécessite deux comparaisons :

1. Comparaison des spectres relevés en présence de (AlCl₃/ HCl) par rapport à celui dans le méthanol.

2. Comparaison des spectres relevés en présence de (AlCl₃/ HCl) par rapport à AlCl₃.

La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl₃ et les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl [164], par contre, ceux formés entre AlCl₃ et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande I. par rapport au spectre après addition de AlCl₃ et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le MeOH [162, 163].

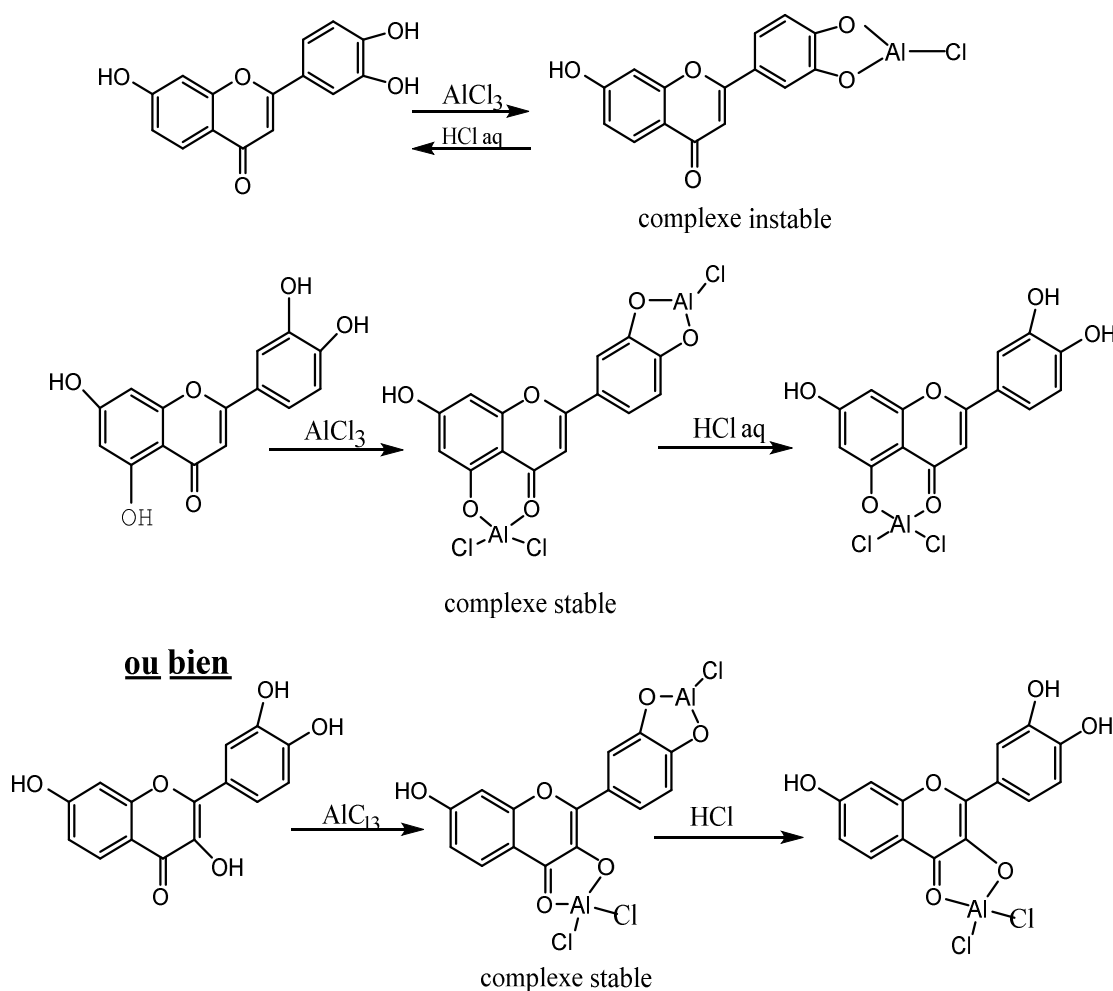


Figure I-22: Formation des différents types de complexes après addition de AlCl₃ et en présence de HCl [149].

Les interprétations des déplacements en UV avec addition de réactifs sont résumées dans le tableau I. 11 [149,153]

Tableau I. 11: Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II avant et après addition des réactifs :

Réactifs	Déplacement (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350	250-280	Flavone
	330-360	250-280	Flavonol (3-OR)
	350-385	250-280	Flavonol (3-OH)
NaOH	+45 à +65 de la bande I sans diminution d'intensité optique		4'-OH
	+45 à +60 de la bande I avec diminution d'intensité optique		3-OH, 4'-OR
	Apparition d'une nouvelle bande entre 320-335 nm		7-OH
	Décomposition lente		3, 4' di-OH ou orthodi-OH sur le noyau A (6, 7 ou 7, 8)
NaOAc	+5 à +20 de la bande II		7-OH
	Déplacement faible de la bande II		7-OH avec substitution en 6 ou 8
NaOAc + H ₃ BO ₃	+12 à +36 de la bande I		3', 4' di-OH
	Faible déplacement bathochromique de la bande I		Orthodi-OH sur le noyau A
AlCl ₃	+20 à +40 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ +HCl		Orthodi-OH sur le noyau B
	+20 à +25 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ + HCl		Orthodi-OH sur le noyau A + Orthodi-OH sur le noyau B
AlCl ₃ + HCl/MeOH	+35 à +55 de la bande I		5-OH
	+17 à +20 de la bande I		5-OH (avec 6-oxygénation)
	+50 à +60 de la bande I		3-OH avec ou sans 5-OH

On conclue que l'entraînement des déplacements produit par ces réactifs permet la localisation de la plupart des groupements hydroxyles de la molécule, si bien qu'il est possible de prévoir la substitution des hydroxyles chez les flavones et les flavonols. Si ces derniers sont méthylés ou glycosylés, il n'y a pas de déplacement. Donc, on utilise d'autres techniques pour déterminer la nature, le site d'attachement des sucres.

- **L'hydrolyse acide des hétérosides:**

Cette manipulation concerne dans un premier temps les flavonoïdes O-glycosylés, elle renseigne sur la position et la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des échantillons authentiques. Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés [149]. Le tableau I. 12 illustre les Rf de quelques sucres connus [164].

Tableau I. 12: Les valeurs des Rf de quelques sucres connus:

Sucre	Rf
α (L) Rhamnose	0.88
D (+) xylose	0.79
L (+) arabinose	0.66
β (+) glucose	0.53
D (+) galactose	0.33

4. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) :

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale du squelette flavonoïque ainsi que les différents substituants [165, 166]. Cette méthode renferme plusieurs techniques telles que :

a) RMN monodimensionnelle:

1. La RMN du proton (RMN ^1H): elle informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonent généralement entre 6 et 8 ppm elle permet de connaître [166- 168]:

- La position et le nombre de divers protons porté par le flavonoïde,
- Le nombre de substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique,
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

2. La RMN du carbone 13 (RMN ^{13}C) : donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [169]:

- le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement,
- la connaissance de type des liaisons $-\text{C}$ et / ou $-\text{O}$ sucres,

b) RMN bidimensionnelles

Les expériences de RMN bidimensionnelles reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage [169].

Corrélations homonucléaires

- **COSY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J et ^3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- **NOESY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

Corrélations hétéronucléaires

- **HSQC** ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.
- **HMBC** ($^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance $^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

I. 4. Evaluation biologique

- Introduction

Depuis l'antiquité, les produits naturels ont été une source importante dans le maintien de l'intégrité de la vie humaine. Cragg et al 1997, ont découvert que plus de 60 % des médicaments approuvés sont dérivés des produits naturels [170].

De ce fait, la découverte de nouvelles molécules possédant une activité biologique serait plus qu'appréciable. Une des stratégies possibles consiste en la recherche à partir des plantes supérieures, des composés ayant une activité supplémentaire ainsi le criblage biologique est une première étape indispensable de cette stratégie.

4. 1. Effet antioxydant et piègeur de radicaux libres:

Une production excessive de radicaux libres peut provoquer de profonds dégâts tissulaires (au niveau du matériel génétique). Parmi celles-ci, on pourra citer : l'inflammation chronique, les complications diabétiques, l'athérosclérose, le cancer et la démence sénile. Aux côtés de l'acide ascorbique, de la vitamine E, du β -carotène ou du sélénium, les flavonoïdes peuvent agir comme de puissants antioxydants [171]. Certaines méthodes utilisées pour déterminer le pouvoir antioxydant d'une substance consistent à mesurer l'inhibition d'espèces radicalaires engendrées par la peroxydation lipidique enzymatique ou non enzymatique.

D'autres méthodes utilisent la stimulation de phagocytes (leucocytes) qui libèrent des radicaux libres variés et l'inhibition est mesurée par la méthode de chimioluminescence. Des méthodes physicochimiques comme la résonance paramagnétique électronique (RPE) permettent de mesurer le potentiel redox d'une substance.

Parmi ces techniques, nous citons :

- la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) [172].
- la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants [173].
- la méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) [174].

- la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- dimethyl-phenylenediamine) [175].
- la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) [176].
- la méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) [177].
- la méthode photochimiluminescence (PCL) [178].
- la méthode d'hémolyse [179].
- La Méthode électrochimiques [180].

4. 1. 1. La méthode du radical DPPH.

Cette méthode de mesure du pouvoir antioxydant repose sur la capacité d'un composé à le réduire. La molécule de 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH) est un radical libre stable en vertu de la délocalisation de son électron libre sur la molécule. Cette délocalisation donne lieu à une coloration mauve. Lorsque la solution de DPPH est mise en contact avec une substance pouvant donner un atome d'hydrogène, il ya formation de la forme réduite avec perte de la coloration mauve et apparition de la coloration jaune.

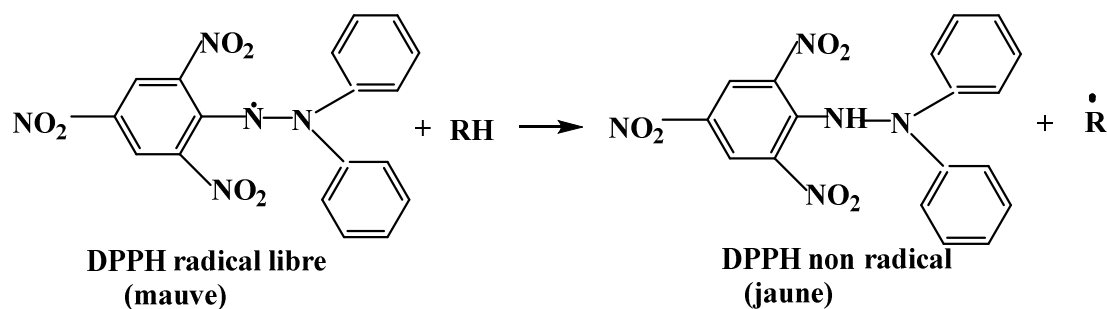


Figure I. 23: Réaction entre le DPPH et un donneur d'atome d'hydrogène.

Les mesures de l'absorbance du DPPH, des différentes substances oxydantes permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition PI en appliquant la formule suivante :

$$PI(\%) = [A_0 - (A_i - A_b) / A_0] \times 100$$

Où, A_0 : absorbance du radical seul (contrôle).

A_i : absorbance du radical après 30 minutes de contact à l'obscurité avec l'antioxydant.

A_b : absorbance (blanc seul).

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés, permettent de calculer la valeur du paramètre IC_{50} qui représente la concentration de l'extrait nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres dans le milieu, graphiquement par la régression linéaire [181].

Des fonctions mathématiques descriptives sont développés afin d'ajuster les courbes aux points expérimentaux. L'utilisation d'algorithme par une méthode développée et modifiée par (Dubois et al 1989) présente de nombreux avantages par rapport à la méthode des moindres carrés vu qu'elle assure la convergence vers la meilleure solution et donc vers une valeur plus précise et plus exacte [182]. L'efficacité de cet algorithme a déjà été montrée auparavant dans la détermination de paramètres pharmacocinétiques [183, 184]. Ce mécanisme itératif conduit dans tous les cas vers la meilleure solution, la convergence vers la meilleure solution est alors assurée, quels que soient la dispersion et le nombre de points expérimentaux et ce, indépendamment de l'initialisation des paramètres [182- 185].

Les points de toutes les expériences positives sont ajustés à un modèle sigmoïde simple non linéaire de la forme:

$$N = N^{\circ} \cdot e^{-k \cdot C}$$

Dans laquelle C représente la concentration testée, N le pourcentage de DPPH restant à la concentration C, N° le pourcentage de DPPH à la concentration 0 et k un paramètre [185].

4. 2. L'activité antibactérienne

Depuis leur découverte au 20^{ème} siècle, les antimicrobiens (antibiotiques et médicaments apparentés) ont permis de réduire considérablement la menace de maladies infectieuses. Ils ont également contribué à la grande progression de l'espérance de vie observée dans la dernière partie du 20^{ème} siècle (OMS, 2002) [186].

Cependant, ces progrès ont été remis en question suite à l'émergence d'un phénomène de résistance au sein des populations bactériennes. Ce phénomène naturel consécutif à l'utilisation de ces médicaments mais il est accéléré par une utilisation inappropriée. (OMS, 2005) [187].

Dans la pratique médicale moderne, l'incidence mondiale alarmante de résistance aux antibiotiques cause un besoin croissant de découverte de nouveaux composés antibactériens.

Les plantes représentent une source inestimable et quasiment inépuisable pour découvrir ce genre de composés [188].

4. 2. 1. Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules d'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique, qui arrêtent la croissance des microorganismes ou les tuent. Les antibiotiques qui stoppent la croissance des microbes sont bactériostatiques, ceux qui tuent les microbes sont bactéricides. Certains antibiotiques peuvent être bactériostatiques dans certaines circonstances et concentrations, et bactéricides dans d'autres [189].

D'où l'intérêt sans cesse croissant de chercher de nouveaux composés pouvant agir soit directement sur les microorganismes, soit indirectement en inhibant un ou plusieurs mécanismes de résistance.

Une stratégie alternative dans la recherche de nouvelles molécules oriente vers les composés inhibant les mécanismes de résistance aux antibiotiques. Cette stratégie a déjà donné de bons résultats tels que le développement des inhibiteurs de bêta-lactamases (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam), qui sont co-administrés avec des bêta-lactames (amoxicilline) donnant une combinaison de composés comme Augmentin®. De même, l'étude des pompes à efflux a donné la tigecycline qui est issue des modifications chimiques de la tétracycline en vue d'en réduire la résistance [189].

4. 3. Effet cytotoxique :

4. 3. 1. Le principe du test colorimétrique MTT :

Le test colorimétrique MTT est un test qui permet d'évaluer la croissance globale d'une lignée cellulaire donnée. Il est basé sur la réduction du bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) en formazan par la succinate déshydrogénase présente dans la membrane interne des mitochondries. Les cellules métaboliquement actives réduisent un dérivé de tétrazolium, dans notre cas le 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium, en bleu de formazan insoluble dans l'eau (Figure I.24). La dissolution des cristaux de formazan dans le DMSO donne alors une solution dont la coloration bleu-violet est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes [190].

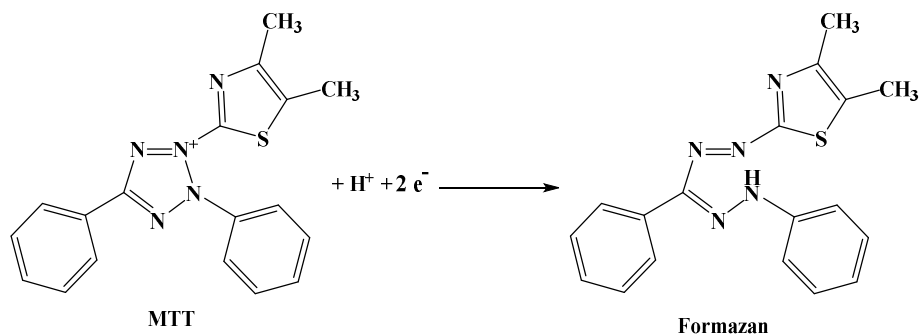


Figure I. 24. Schéma de la transformation du bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) en formazan par les cellules métaboliquement actives.

MATERIEL ET METHODE

II. 1. Etude phytochimique de *Senecio delphinifolius* Vahl

II. 1. 1 Place à la systématique [5, 14, 15]:

<u>Royaume</u>	<u>Plante</u>
Embranchement	Spermatophytes
Division	Magnoliophita ou Angiospermes
Classe	Dicotylédones (Magnoliopsida)
Sous classe	Asteridae
Ordre	Astérales
<i>Famille</i>	Asteraceae
Genre	Senecio
Espèce	<i>Senecio delphinifolius</i> Vahl

Synonymes Homotypique [191]:

Senecio delphinifolius Vahl (1791)

Jacobaea delphiniifolia (Vahl) Pelsler.



Figure II. 1 Herbier de *Senecio delphinifolius* Vahl.

II. 1. 2 Description botanique de l'espèce *senecio delphinifolius* Vahl [192]:

C'est une plante d'environ 20-50 cm.

Akènes: les akènes sont couverts de poils glanduleux et brillants, très petits (1-1,5 mm de long), ellipsoïdes.

Tiges : dressées, pubescentes.

Feuilles: les feuilles inférieures sont pétiolées, obovées-dentées (rapidement caduques); les médianes et supérieures 1-2 pinnatifides, pubescentes en dessous et généralement à lanières étroitement linéaires.

Capitules en corymbes denses, à ligules égalant deux fois le diamètre du disque et étroites. Les bractées de l'involucre linéaires non tachées de noir.

Calicule : indistinct Terres argileuses, broussailles.



Figure II. (2, 3) Photos de *Senecio delphinifolius* Vahl.

II. 1. 3 : Habitat et répartition géographique

L'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl, est présente dans la région du Maghreb Figure II. 4. Son nom vernaculaire en Algérie est "*Hachichetettolba*". **Figures II. (2, 3)** : Elle est répondeue dans les endroits pierreux et au bord des routes [193]:

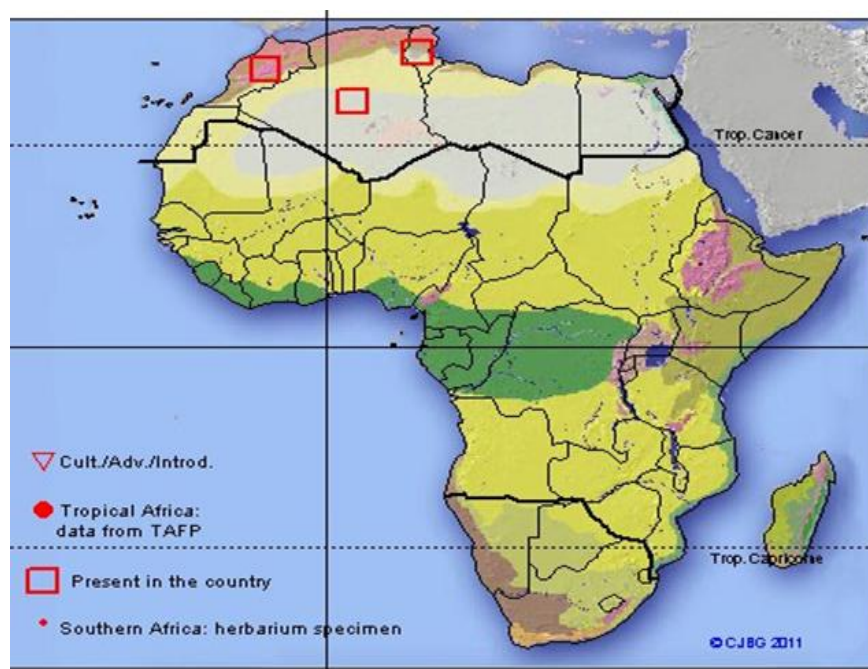


Figure II. 4. Répartition géographique de *Senecio delphinifolius* Vahl [191]:

Travail personnel

II. 1. 4. Récolte du matériel végétal:

En pleine floraison, les différentes parties de la plante *Senecio delphinifolius* Vahl ont été recueillies en avril 2010 au bord de la route de Grareme Mila (région de Constantine) au nord-est de l'Algérie par le professeur A. Zellegui de l'université Larbi Benmehdi- Oum El-Bouaghi et authentifiées par le Professeur M. Kaabache département de biologie (Université de Sétif), confirmé par le Professeur Lejoly de l'université libre de Bruxelles. Un spécimen a été déposé à l'institut de chimie Université de Constantine sous le numéro de code ZA 117 et à l'Herbarium du jardin botanique national de Meise, Belgique sous le numéro de code (BR0000005333899).

II. I. 5. Screening phytochimique [193] :

25g de plante séchée réduits en poudre subissent une première extraction à l'éther de pétrole dans un appareil Soxhlet. L'extrait étheré a été filtré et concentré jusqu'à 40-50 ml. Le résidu est ensuite extrait trois fois avec chauffage à reflux par du méthanol à 80 % pendant 20 à 40 minutes, les fractions de chaque macération sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite. Le résidu du produit végétal est alors extrait avec de l'eau chaude pendant 20 minutes:

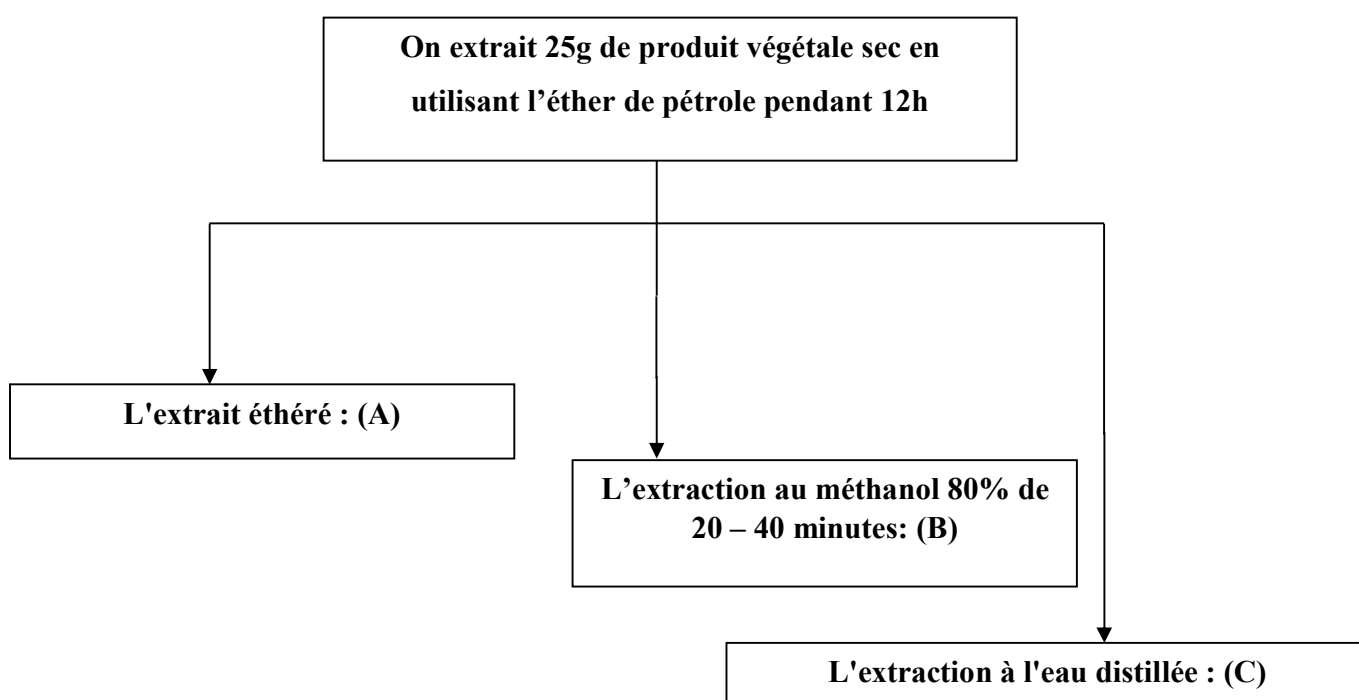


Figure II. 5. Schéma de l'extraction pour la détection des groupes chimiques de *Senecio delphinifolius* Vahl.

Détection des groupes chimiques [193]:

Les constituants ont été identifiés comme suit :

Extrait éthéré :

- **Identification des huiles volatiles et des acides gras :**

L'extrait à l'éther a été évaporé à sec ensuite on ajoute 20 ml d'alcool. Une partie du filtrat qui a été évaporée elle a une odeur agréable caractéristique des huiles volatiles, le produit végétal est distillé avec de l'eau dans un appareil de Néo-Clevenger pour les extraire.

Pour l'identification des acides gras, au reste de l'extrait dissout dans l'alcool on ajoute 10 ml de KOH 0.5 N le tout est mis au bain marie pour évaporer l'alcool, ensuite on ajoute 20 ml d'eau distillée et on transfère la solution obtenue dans une ampoule à décanter puis on ajoute de l'éther pour identifier les stérols les triterpènes et les caroténoïdes.

- **Identification des stérols et triterpènes:**

10 ml de l'extrait à l'éther a été évaporé à sec, et dissous dans 0,5 ml d'anhydride acétique ensuite dans 0,5 ml de chloroforme, puis 1 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté (réaction de Libermann-Burchards). L'apparition d'un anneau brunâtre indique la présence de stérols et triterpènes.

- **Identification des caroténoïdes:**

10 ml de l'extrait à l'éther est évaporé à sec et 3 gouttes de solution saturée de trichlorure d'antimoine dans du chloroforme ont été ajoutés (réaction de Carprices). Le changement de couleur des pigments du bleu au rouge, indique la présence des caroténoïdes.

- **Identification des acides gras :**

Une solution aqueuse alcaline épuisée par l'éther est acidifiée par HCl (pH = 4-3). la solution aqueuse acide devient opalescente. Les acides gras sont extraits par l'éther éthylique et évaporés. Si le filtrat est huileux, les acides gras sont présents.

- **Identification des alcaloïdes :**

On évapore 10 ml de l'extrait éthéré à sec, on le dissout dans 1.5 ml d'acide HCl 2% , on verse la solution obtenue dans deux tubes à essai à volume égal 0.5 ml chacun. On ajoute 2 à 3 gouttes du réactif de Dragendorff dans l'un des tubes et on laisse le deuxième comme référence. L'apparition d'un précipité jaunâtre indique l'éventuelle présence des alcaloïdes.

- **Identification des flavones aglycones :**

L'extrait étheré est dissous dans 2 ml de méthanol à 50% dans un bain marie, du magnésium métallique et 5 gouttes d'HCl concentré ont été ajoutés. Une couleur rouge ou orange indique la présence de flavones aglycones (réaction de Shibatas).

- **identification des coumarines :**

L'extrait à l'éther ou l'extrait d'alcool est évaporé à sec, après on dissout dans de l'eau chaude. La solution est divisée en deux parties égales : dont l'une reste comme référence, et le second est alcalinisée avec 0,5 ml d'une solution d'ammoniaque à 10%. L'apparition d'une fluorescence sous lumière UV intense indique la présence de coumarines et dérivés.

Extrait à l'alcool :

- **Identification des tanins :**

L'extrait à l'alcool (1 ml) a été dilué avec de l'eau (2 ml) et une solution diluée de chlorure ferrique (3 gouttes) a été ajoutée. L'apparition d'une couleur bleu noirâtre ou vert noirâtre indique la présence des tanins.

- **Identification des flavones glycosides :**

L'extrait à l'alcool est dissous dans 5 ml de méthanol à 50% dans un bain marie, du magnésium métallique et 5 gouttes d'HCl concentré ont été ajoutés. Une couleur rouge ou orange indique la présence de flavones glycosides.

- **Identification des anthocyanosides:**

L'extrait d'alcool a été acidifié. La solution acide est rouge à pH = 7, et ne change pas au vert ou au violet en milieu alcalin pH = 11 indique la présence d'anthocyanosides.

Extrait à l'eau :

- **Identification des Saponines :**

On mélange 2ml de la solution aqueuse avec 2 ml d'eau distillée pendant 15 mn apparition d'une mousse indique la présence des saponines.

- **Identification des tanins :**

L'extrait à l'eau (1 ml) a été dilué avec de l'eau (2 ml) et une solution diluée de chlorure ferrique (3 gouttes) a été ajoutée. L'apparition d'une couleur bleu noirâtre ou vert noirâtre indique la présence de tanins.

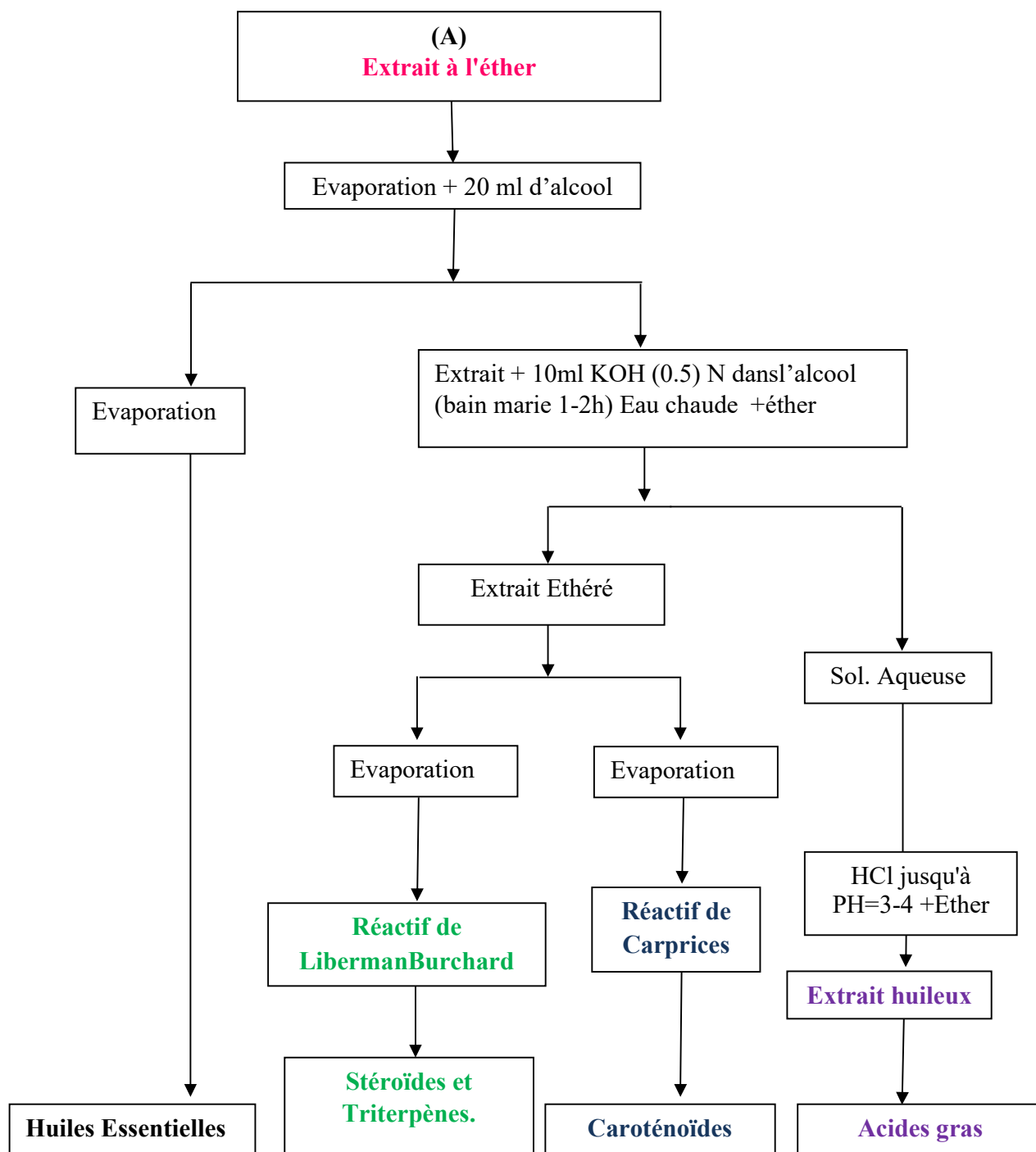


Figure II.6. Les méthodes de détection des produits naturels dans l'extrait à l'éther.

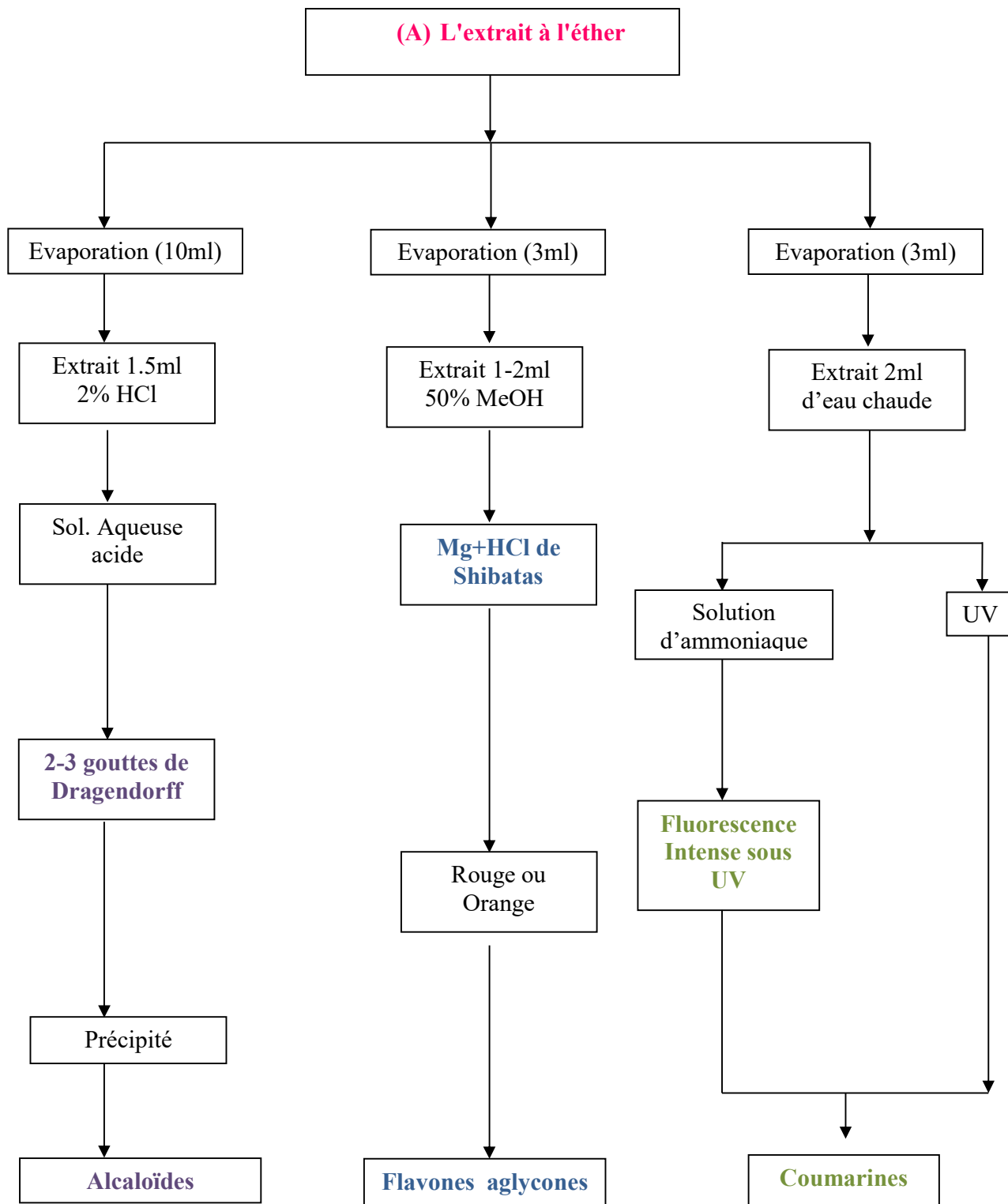


Figure II.7. Les méthodes de détection des produits naturels dans l'extrait à l'éther.

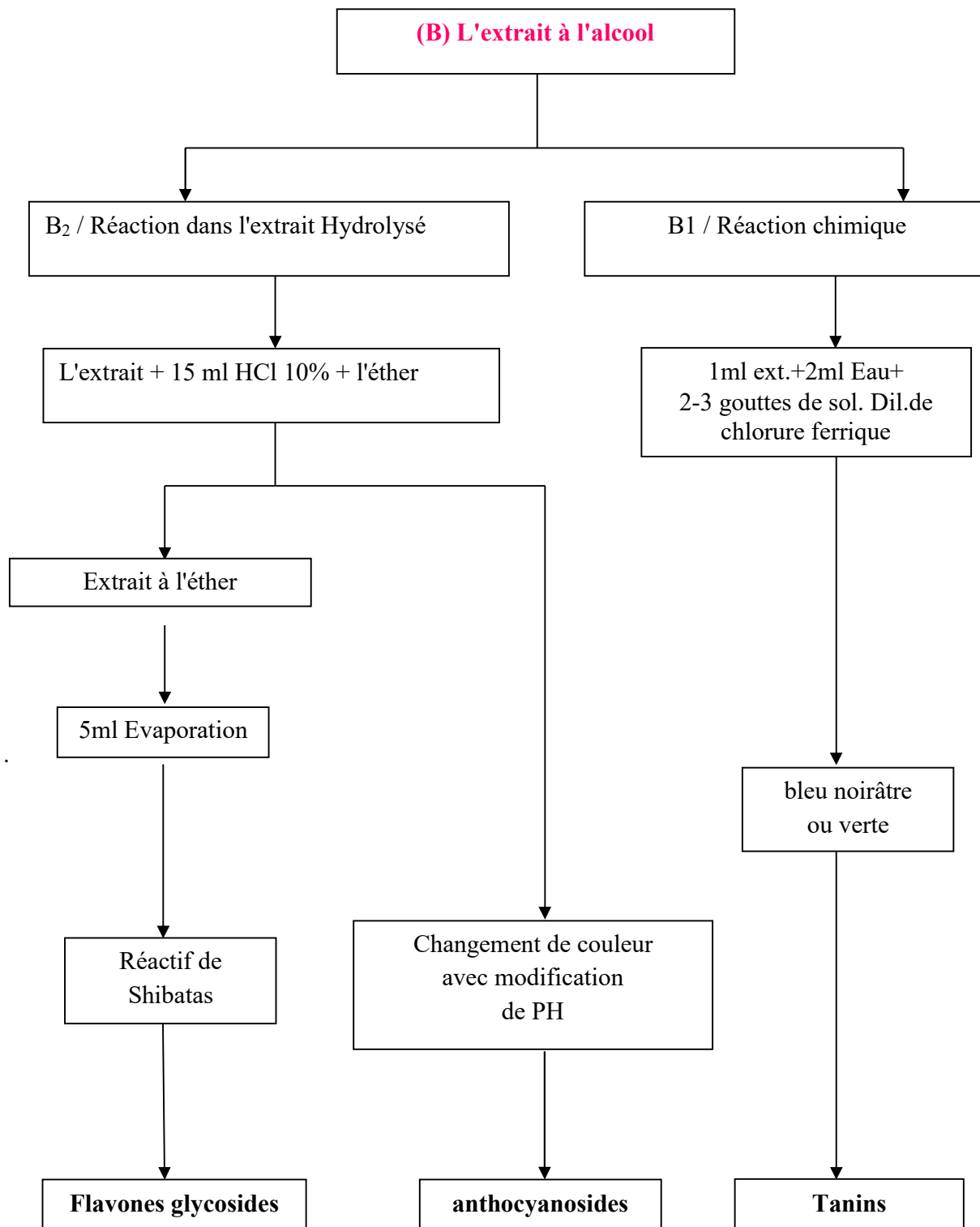


Figure II.8. Les méthodes de détection des produits naturels dans l'extrait à l'alcool.

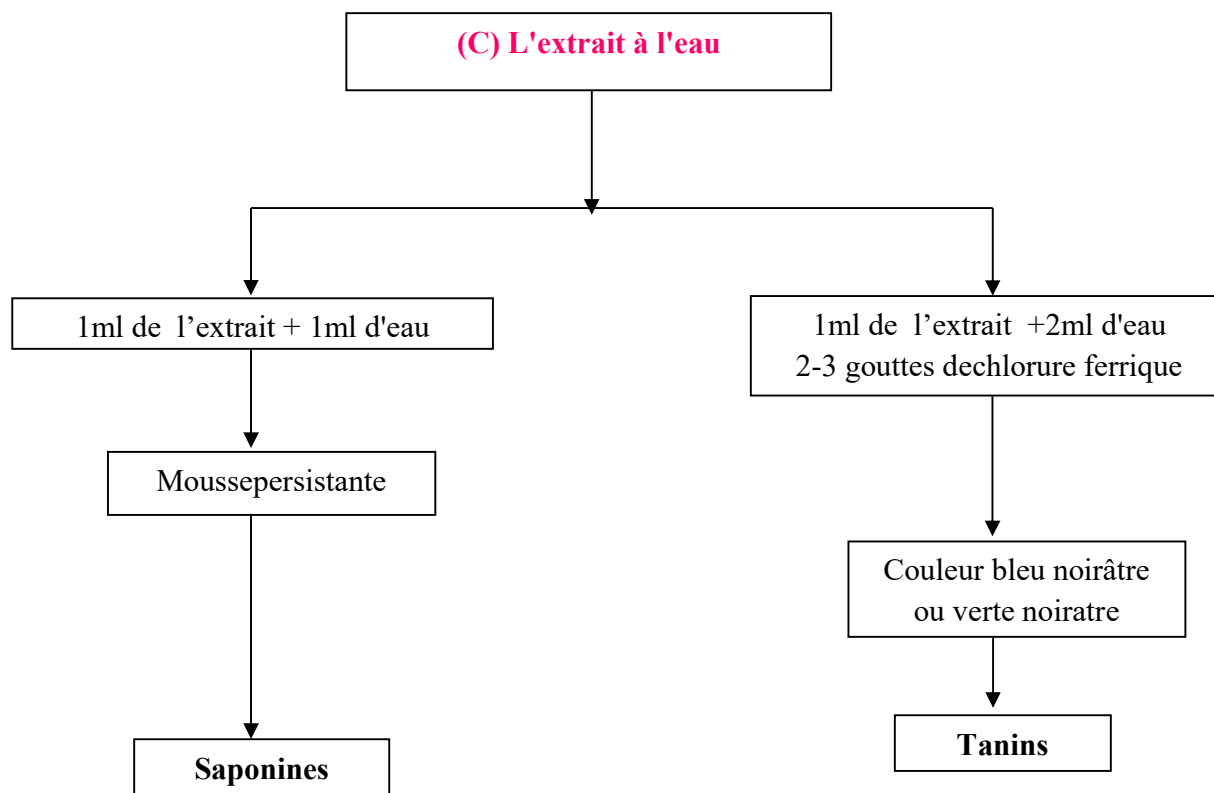


Figure II.9. Les méthodes de détection des produits naturels dans l'extrait à l'eau.

II. 2. Les alcaloïdes:

II. 2. 1. Méthode utilisée pour l'extraction des alcaloïdes pyrrolizidiniques:

Une quantité d'environ 0,5 g de matériel végétal a été homogénéisée par agitation rotative avec 2 x 10 ml de HCl 1 M pendant 10 min, laissée à reposer pendant 30 min à température ambiante et filtrée sur papier filtre. La moitié de l'extrait a été rendue basique avec NH_4OH à 25%, jusqu'à pH 10, appliquée sur une colonne Extrelut® (1 ml d'extrait / g Extrelut®) et éluée par 40 ml de CH_2Cl_2 qui a été évaporé sous pression réduite à 30°C jusqu'à sec. L'extrait dichlorométhane obtenu contient les APs présents dans la plante sous forme base. L'autre moitié de l'extrait acide a été réduite par traitement avec du Zn pendant 4 h et extraite de manière similaire pour obtenir l'ensemble des APs présents dans la plante (formes bases et formes N-oxydes réduites par le Zn). Les extraits obtenus sont analysés par GC-FID et GC-MS, comme décrit [194].

Les différentes étapes de l'extraction sont représentées sur la Figure II. 10 :

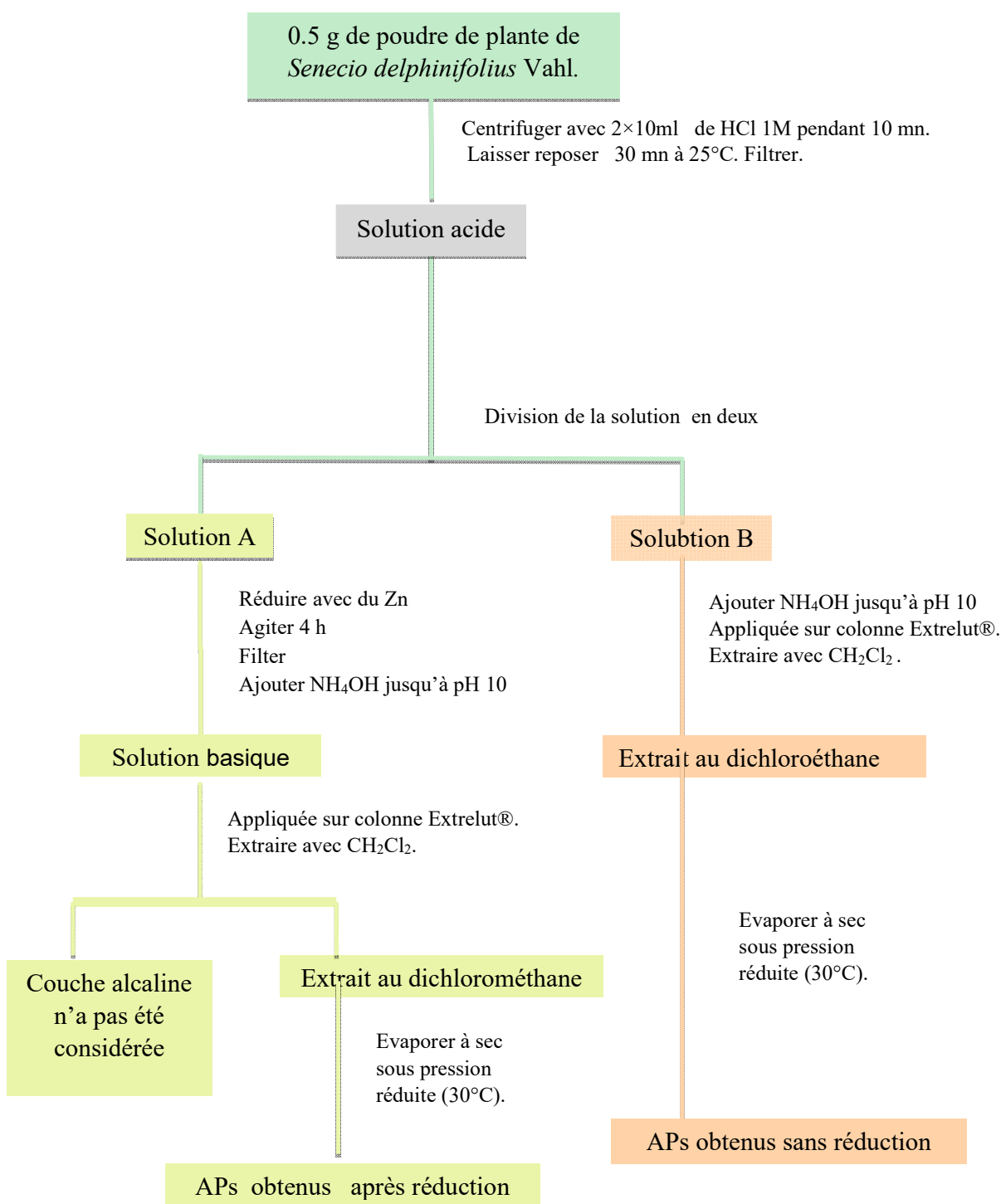
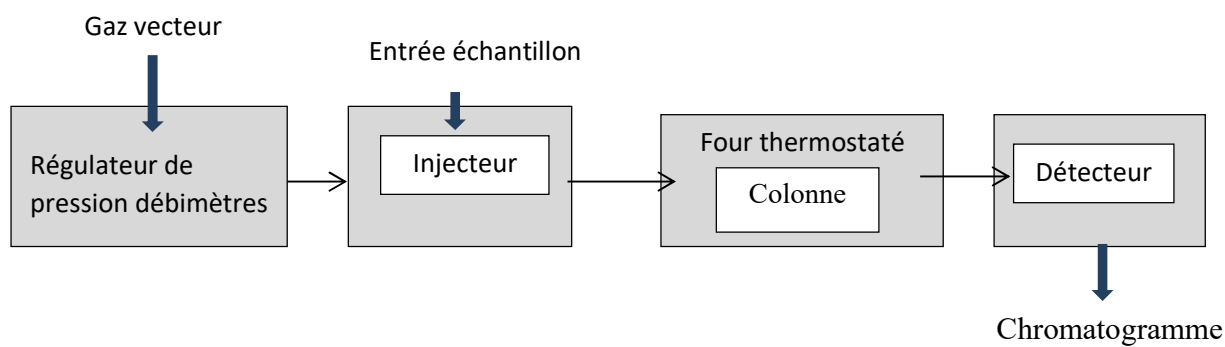


Figure II. 10: Schéma de la méthode utilisée pour l'extraction des alcaloïdes; APs = alcaloïdes pyrrolizidiniques

II. 2. 2. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse:

La chromatographie en phase gazeuse (GC), est une technique chromatographique couramment utilisée pour l'analyse des produits à base de plantes. Couplée à la spectrométrie de masse, elle offre une grande capacité de séparation, des informations structurales, et avec les bases de données spectrales existantes une possible identification des composés. En outre, la grande sélectivité des colonnes capillaires permet la séparation de nombreux composés simultanément en très peu de temps. En chromatographie en phase gazeuse, l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La fonction de la phase mobile est de transporter l'analyte dans la colonne. Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules: un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur [195, 196].



1. L'injecteur:

L'injecteur est une zone chauffée où l'échantillon est introduit en solution au moyen d'une seringue puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Le gaz vecteur en GC/MS classiquement utilisé est l'hélium, il constitue la phase "mobile". Son rôle consiste à véhiculer les analytes depuis l'injecteur jusqu'au détecteur via la colonne analytique. La viscosité d'un gaz variant avec la température, la plupart des injecteurs sont aujourd'hui équipés d'un régulateur électronique de débit. Ce dernier ajuste la pression du gaz en fonction de la température, de manière à ce que le débit gazeux dans la colonne soit constant, ce qui améliore considérablement les performances du chromatographe. Il existe deux familles d'injecteurs [195- 197].

- La première regroupe les injecteurs dits "à fuite".

Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en "split" ou injection avec "division de flux", il est utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température et l'échantillon est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. L'injection "split" présente néanmoins des problèmes de discrimination, lorsque la solution à analyser contient des composés dont les volatilités sont très hétérogènes (les produits "légers" auront tendance à s'échapper par la fuite alors que les produits "lourds", mal vaporisés, resteront majoritairement dans l'injecteur). Elle est donc peu adaptée pour l'analyse des mélanges complexes.

- La seconde famille regroupe les injecteurs "sans fuite"

L'injection "splitless", ou "sans division de flux", est utilisée pour introduire des analytes en solution diluée. L'électrovanne est fermée pendant les quelques dizaines de secondes qui suivent l'injection, de manière à ce qu'une quantité maximum d'analyte pénètre dans la colonne. Elle est ensuite ouverte pour purger l'injecteur d'éventuels résidus. L'échantillon est injecté à une température telle que solvant et solutés sont instantanément vaporisés à l'entrée de la colonne. Pendant l'injection, la température du four est inférieure de 20 à 30°C à la température d'ébullition du solvant afin de condenser ce dernier en tête de colonne et de piéger les molécules. Dans un premier temps, le solvant joue le rôle de phase stationnaire vis-à-vis des différents constituants du mélange. Sa polarité doit donc être compatible avec celle de la phase stationnaire de manière à ce que le solvant se répartisse de façon homogène en tête de colonne. En raison de son pouvoir de rétention important, cette phase condensée permet de ralentir les molécules volatiles jusqu'à ce qu'elle soit entraînée par le gaz vecteur.

2. Colonne et four

Les colonnes les plus utilisées en GC sont des colonnes dites "capillaires". La colonne capillaire est constituée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est recouverte d'un film chimique nommé "phase stationnaire". La paroi externe est gainée d'un revêtement en polyimide qui confère souplesse et robustesse à la colonne. La phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice (si elles sont constituées de chaînes alcanes ou groupements phényles, la colonne est dite "peu polaire" ; si ce sont des polyéthylènes glycols, la

colonne est dite "polaire"). Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité et volatilité si la phase stationnaire est polaire, et seulement de leur volatilité si cette dernière est apolaire. Pour l'analyse d'un mélange complexe, on privilégie souvent le choix des colonnes peu polaires, généralement plus robustes et thermiquement plus stables que leurs homologues polaires [195, 196].

En plus de la nature de la phase stationnaire, la colonne capillaire est caractérisée par trois paramètres géométriques: sa longueur (10 à 100 m), son diamètre interne (0,1 à 0,5 mm), l'épaisseur de sa phase stationnaire (0,1 à 5 µm); chacun exerce une influence déterminante sur la qualité de la séparation.

- Phase stationnaire

Les phases les plus répandues sont les polymères siliconés dérivés du diméthylpolysiloxane :

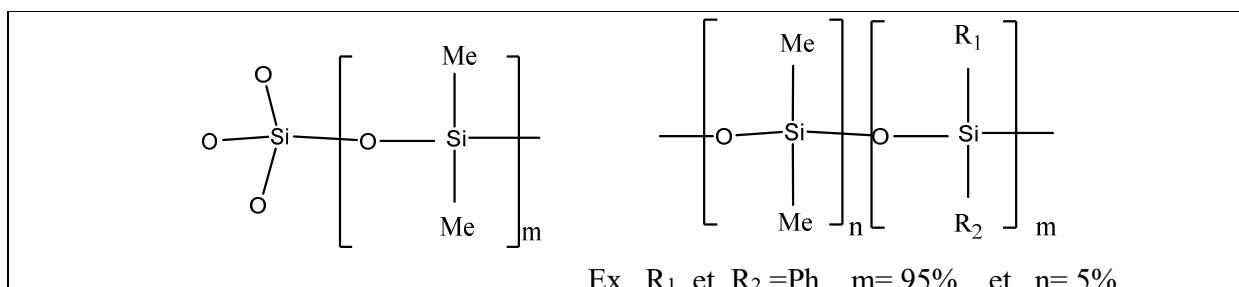


Figure II.11 Phase stationnaire dérivée du diméthylpolysiloxane

Cette phase est greffée sur la colonne en silice par l'intermédiaire une liaison -O-Si-O-.
Suivant le pourcentage de groupement **R** par rapport aux groupes CH₃, on peut modifier la polarité de la colonne et donc ses propriétés en chromatographie [198].

- Si **R** = CH₃, la colonne est complètement apolaire (noms commerciaux : DB-1, OV-101, ZB-1, SE-30...).
- Si le % de **R** = Phényle est égal à 5%, on a la colonne la plus utilisée en CPG, elle est répertoriée sous les noms commerciaux suivants: (DB-5, CPsil5, OV-5...).
- Si on incorpore un substituant cyanopropyle (**R** = -CH₂-CH₂-CH₂-CN) la polarité augmente beaucoup (à cause du fort moment dipolaire du groupe -CN).

- Phases mobiles

La phase mobile est un gaz de faible viscosité, trois gaz sont exclusivement employés, l'azote, l'hydrogène et l'hélium. Ce dernier est le seul gaz vecteur utilisé en GC/MS, car les ions He^+ résultant de l'EI n'interfèrent pas avec ceux de l'analyte en raison de leur faible rapport m/z l'hydrogène est proscrit en raison de la présence d'un filament chauffé dans la source.

- Ionisation électronique(EI) :

L'ionisation électronique (EI) consiste à "bombarder" les molécules par un faisceau d'électrons de haute énergie. La source EI est maintenue à une température importante entre 100 à 250 °C afin d'éviter la condensation des analytes. L'impact d'un électron sur la molécule M a pour effet d'arracher un électron à cette dernière, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire M^+ . L'énergie des électrons incidents est telle que l'ion M^+ acquiert une grande quantité d'énergie interne qui l'amène généralement à se fragmenter spontanément en ions plus petits nommés "ions-fragments". Les électrons sont produits par le chauffage d'un filament métallique (tungstène ou rhénium, le plus souvent) et accélérés par une différence de potentiel de 70 V, ce qui leur confère une énergie cinétique de 70 eV [196, 199].

3. Détecteur

En aval de la colonne, le chromatographe comporte un dernier dispositif, appelé détecteur, destiné à fournir un signal dont l'exploitation conduira au chromatogramme. Basés sur des principes de détection très variés, en effet, certains détecteurs dit universels, sont sensibles à tous les solutés alors que d'autres dits spécifiques ne détectent que des catégories particulières de composés [200].

Nous présenterons ci-dessous les détecteurs utilisés au cours de notre étude.

➤ Détecteur à ionisation de flamme (FID) :

Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques, c'est le détecteur par excellence de la CPG. Les composés sont brûlés dans une flamme air-hydrogène. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables du

passage d'un courant ioniques extrêmement faible (10- 12 μA) entre deux électrodes (ddp de 100 à 300V).

Après amplification, on obtient un signal proportionnel au débit-masse du soluté. Ils ont une large gamme de linéarité et détectent des quantités de substance de l'ordre de 20 μg . L'air du pic reflète donc la masse du composé élué (dm/dt) intégré entre les instants du début et de fin de pic dont la masse totale est m) [200].

➤ **Détecteur Thermoionique (NPD):**

Ce détecteur est spécifique, utilisé pour les composés azotés (N) ou phosphoré (P). Les composés azotés minéraux ne sont pas détectés. Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex : sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma (800°C) alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène ; Il est couramment utilisé dans les secteurs de la pharmacie, de l'agroalimentaire et de l'environnement [200].

➤ **Détecteur conduisant à des données structurales (couplage CPG/MS) :**

Les détecteurs précédents ne donnent pas d'informations sur la nature des composés élués. L'identification repose donc sur un étalonnage préalable des temps de rétention ou sur l'utilisation des indices de rétention. Pour y remédier, on associe des détecteurs permettant d'avoir des informations spectrales. On dispose alors à la fois de l'indices de rétention et de caractéristiques propres aux composés. Ainsi la GCMS est devenu très utile et indispensable car le détecteur de masse (spectromètre de masse) conduit au spectre de fragmentation de chacun des composés élué, donc à leurs identifications. A partir d'un courant ionique total (TIC), on obtient le chromatogramme représentatif des composés élués et en sélectionnant un ion particulier, on obtiendra un chromatogramme sélectif. La GCMS est une des meilleures méthodes d'analyse des mélanges quand on dispose que d'infimes quantités d'échantillons complexes. La figure II. 12 illustre bien tout le montage d'un appareil GC-MS [200].

II. 2. 3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses GC-FID, GC-NPD et GC-MS ont été effectuées au Laboratoire de Biochimie Médicale de l'Institut de Pharmacie de l'ULB et au laboratoire de Pharmacognosie, Bromatologie et Nutrition humaine Faculté de Pharmacie; Université Libre de Bruxelles (ULB).

Les conditions opératoires

Les extraits obtenus sont analysés par GC-FID et GCMS pour quantifier et identifier les Aps selon la méthode décrite par Witte et al [194]. L'héliotrine a été utilisée comme étalon. Les indices de rétention (IR), les ions moléculaires et les schémas de fragmentation MS ont été utilisés pour l'identification des Aps. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé était de marque Hewlett-Packard 5890A équipé d'une colonne analytique (ZB-1, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) de 30 m de long, 0.32 mm de diamètre interne et de 0.25 µm d'épaisseur de film. La colonne capillaire était directement couplée à un détecteur TSQ 700 (Finnigan, Bremen, Germany) spectromètre de masse.

Les conditions appliquées étaient les suivantes: le gaz vecteur était l'hélium, le volume d'injection était de 1 µl avec un rapport de division de 1: 20; le débit du gaz vecteur (hélium) était 1,6 ml/min. les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert ont été fixées à 250°C; la température de la colonne a été programmée à partir de 100°C (3 min) jusqu'à 310°C à 6°C/min avec maintien de 310°C (3 min) et les spectres de masse ont été enregistrés à 70 eV.

Après extraction et évaporation on ajoute au résidu sec 200 µl de méthanol et 200 µl d'une solution d'héliotrine (1 mg /ml dans du méthanol) comme standard interne. On injecte 1 µl de

cette solution à la GC-MS. A la fin de l'injection, la seringue a été successivement rincée avec le méthanol. De même des solutions d'alcane ($C_{12} - C_{32}$) ont été injectées pour nous permettre de calculer les indices de rétention.

Température de l'injection	250° C
Température de l'interface	250° C
Température initiale	100° C (3min)
Montée en température	6° C/min
Température finale	310° C (3min)

Une CG-FID et une GC-PND ont été effectuées en utilisant une colonne DB-1, J&W Scientific 15 m de long, 0.25 mm de diamètre interne et de 0.32 μm d'épaisseur du film, toutes les autres conditions GC ont été les mêmes que celles mentionnées pour l'analyse GCMS.

Les détecteurs FID et PND et les analyses quantitatives ont été réalisées en ajoutant l'héliotrine aux extraits en tant qu'étalon.

Un mélange d'hydrocarbures (nombres pairs de carbones ($C_{12} - C_{32}$)) a été utilisé pour calculer les indices de rétention par extrapolation linéaire. Le spectromètre de masse a été exploité en mode impact électronique (70 eV). L'acquisition de données a été effectuée en mode SCAN avec l'intégration des chromatogrammes d'ions extraits entre 4 et 42 minutes. La portée du scan a été de m/z 79 à 500.

II. 2. 4 Identification par GCMS :

D'un point de vue analytique, d'important progrès ont été réalisés en couplant la GC avec un spectromètre de masse (SM). Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse GCMS est une technique d'analyse qui possède plusieurs atouts : le chromatogramme en phase gazeuse permet de séparer les constituants d'un mélange. Le spectromètre de masse associé permet d'obtenir le spectre de masse de chacun des constituants et bien souvent de les identifier. L'association de la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse permet de disposer d'un outil analytique très performant. L'identification de produits est réalisable pour des quantités de l'ordre du nano gramme, la détection par

fragmentométrie est possible jusqu'au pictogramme. Il réclame peu d'échantillon, la quantité injectée est de l'ordre du microlitre. Il est rapide, le temps d'acquisition du spectre est identique à celui de l'analyse chromatographique.

L'identification des alcaloïdes pyrrolizidiniques par GC-MS a été fondée sur les masses des ions spécifiques de m/z 93-95, 119-121, 136-139 correspondant aux différents fragments des esters macrocycliques insaturés et par comparaison des indices de rétention obtenus avec ceux cités dans la littérature par (witte et al 1993) et par (Pelser et al 2005) [199, 206]:

On a pu donc identifier six alcaloïdes Pyrrolizidiniques par GCMS:

- La sénécionine, intégerrimine, sénéciphylline, la senkirkine, la néosenkirkine et la déhydrosenkirkine.

II. 2. 5. Indice de rétention:

L'identification des alcaloïdes Pyrrolizidiniques a été facilitée par la connaissance des indices de rétention qui sont des valeurs caractéristiques pour une phase stationnaire donnée. En effet, un mélange d'hydrocarbures (nombre pairs de carbone (C12- C32) a été utilisé pour calculer ces indices par interpolation linéaire en mode de programmation de température selon Van Den Dool et Kratz [114] et dans des conditions expérimentales (nature de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne, etc....) bien données et comparer ensuite avec ceux de la littérature [194, 84]

II. 2. 6. Analyse quantitative par GC-FID:

La chromatographie gazeuse GC est une méthode de séparation mais aussi d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Ainsi selon la méthode de Watanabe et al, la concentration de chaque alcaloïde a été calculée en (mg/g) par rapport au standard interne Héliotrine qui a été analysé en parallèle dont la concentration est connue et égale à 0.5 mg/ ml [202].

Tableau II. 1 Données de l'analyse quantitative de l'extrait des alcaloïdes pyrrolizidinique réduit de *Senecio delphinifolius* Vahl déterminés par GC-FID :

Quantité de la poudre pesée (gr)	0.250
Volume de l'échantillon préparé (ml)	0.04
Concentration de l'héliotrine, standard interne (mg/ ml)	0.5
Aire du pic héliotrine	385.2
Aire du pic à doser	Variable

Le chromatogramme obtenu avec le détecteur FID (Figure II. 13) nous donne le profil de six alcaloïdes pyrrolizidiniques, le standard (héliotrine) a été aussi analysé est constaté ci-après:

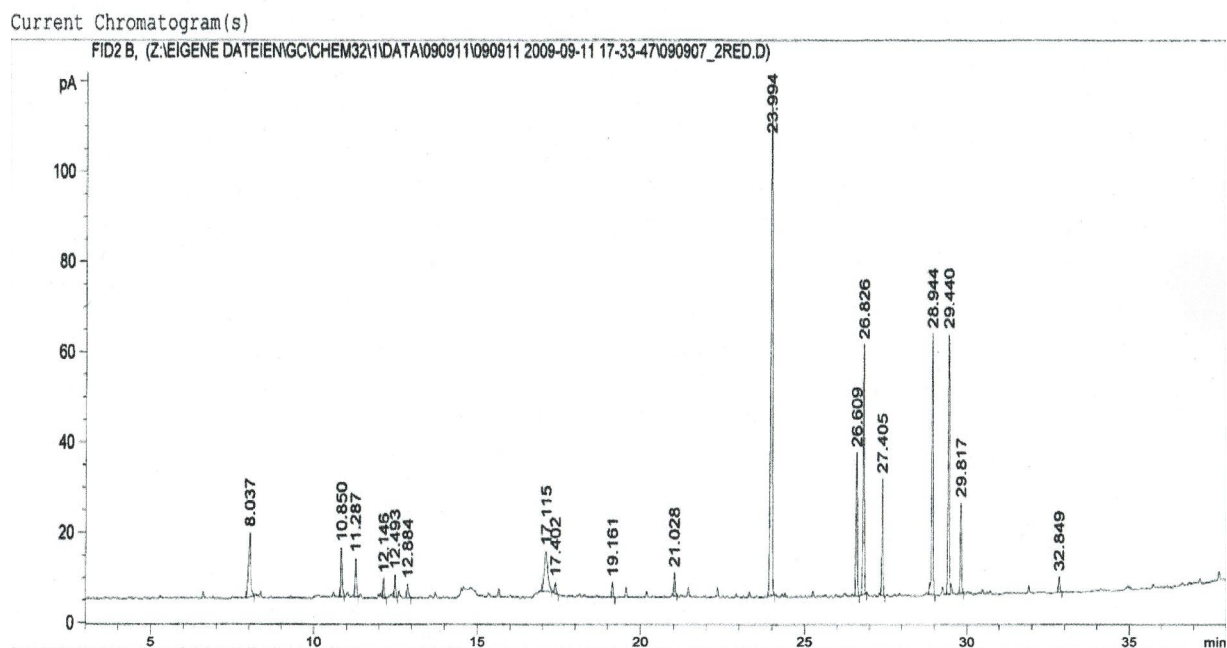


Figure II. 13 Chromatogramme obtenu avec le détecteur FID.

II. 2. 7. Analyse Thermoionique par le détecteur (NPD):

Le chromatogramme obtenu avec le détecteur spécifique NPD sensible aux composés azotés, ainsi les APs identifiés avec leurs RI et avec le FID doivent être détectés au NPD car ce sont des composés azotés, afin de confirmer les résultats obtenus.

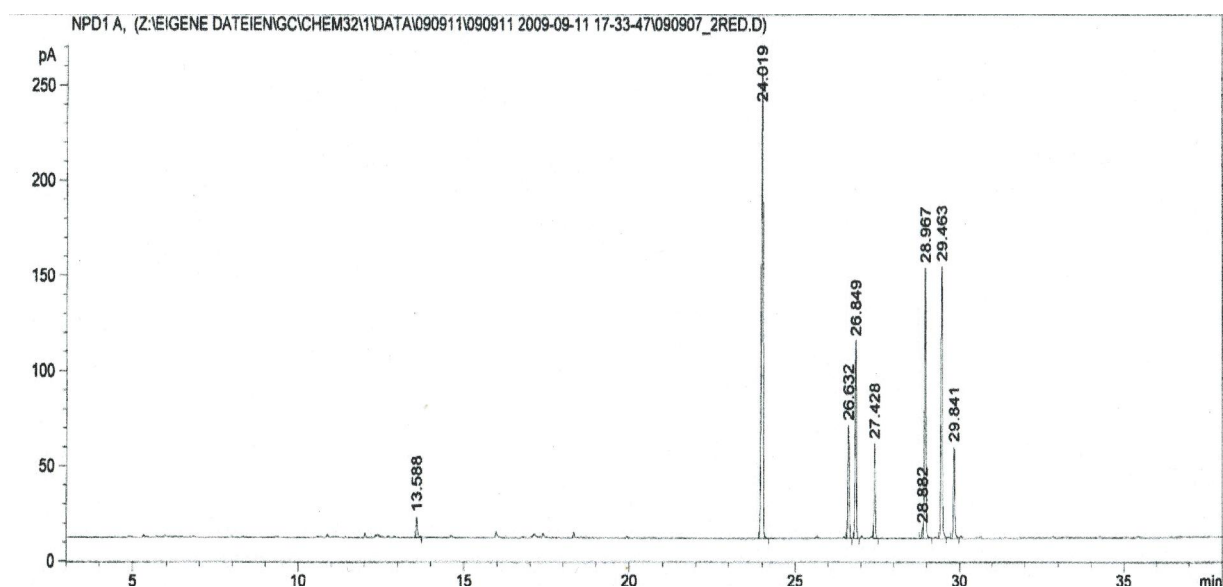


Figure II. 14 Chromatogramme obtenu avec le détecteur spécifique NPD sensible aux composés azotés.

Ces analyses nous ont permis d'avoir le profilage des composés contenus dans notre échantillon avec le pic du standard Hélioitrine et nous laisse prévoir que ce sont des composés azotés, d'autre part les tests positifs avec le réactif de Dragendorff (chapitre précédent), laissent penser à l'alternative que ce sont des alcaloïdes et les détails des spectres de masse c'est-à-dire les chromatogramme sélectif obtenus par la GCMS nous permettrons de le confirmer par la suite.

II. 3. Extraction et purification des flavonoïdes

II. 3. 1. Extraction générale

L'extraction se fait selon le protocole préconisé par Mezzache [203] et décrit par Bruneton [124]. 600 g des feuilles et de fleurs sèches de *Senecio delphinifolius* Vahl sont réduits en poudre et extraits par macération trois fois dans le n-hexane (5 L), trois fois dans le dichlorométhane (5 L), et trois fois dans le mélange méthanol-eau 7:3 (8 L) à chaud. Les fractions de chaque macération sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite pour obtenir respectivement, 26,14 g d'extrait au n-hexane, 35 g d'extrait au dichlorométhane et l'extrait hydrométhanolique. Ce dernier est repris par la suite avec de l'eau bouillante. Une décantation pendant une nuit permet l'élimination de la chlorophylle.

Le mélange filtré est extrait par du n- butanol plusieurs fois pour obtenir après concentration à sec, un extrait d'environ 47,8 g des feuilles et fleurs.

De façon similaire 364 g de tiges et branches et 144g des racines sèches de *Senecio delphinifolius* Vahl en poudre sont extraits par macération trois fois (24 h) avec respectivement 3L et 2L dans le n-hexane et subissent les mêmes étapes d'extraction.

L'extraction à l'hexane donne respectivement 1,66 g et 0,295 g. Les résidus obtenus sont épuisés successivement 3 fois (24 h) avec respectivement 3L et 2L de dichlorométhane pour donner respectivement après concentration à sec 1.26 g et 0.42 g. Enfin les résidus obtenus sont épuisés successivement 3 fois (24 h) avec le mélange 7: 3 méthanol – eau (6L et 4 L).

Les extraits hydrométhanolique de chaque macération sont réunies et évaporées non à sec sous pression réduite est repris par la suite avec de l'eau bouillante. Une décantation pendant une nuit permet l'élimination de la chlorophylle.

Les mélanges filtrés sont extraits plusieurs fois au n- butanol pour donner respectivement après concentration à sec, 16,66 g d'extrait des branches et tiges et enfin 4, 33 g d'extrait des racines.

Les différentes étapes de l'extraction sont représentées sur la **Figure II. 15**.

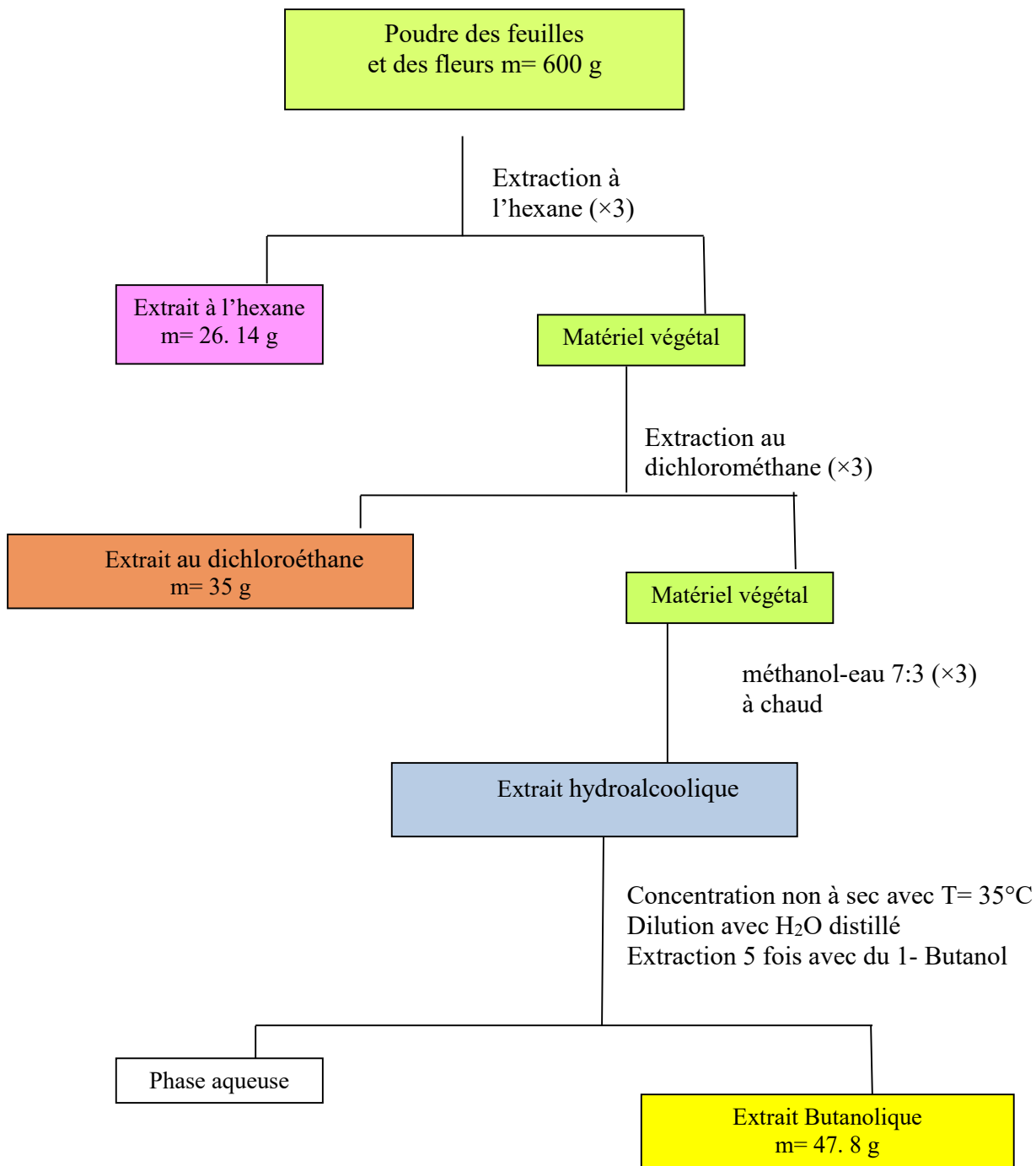


Figure II. 15 Les différentes étapes de l'extraction générale.

II. 3. 2. Analyse chromatographique

1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

- Préparation des solutions pour CCM

a. Extraction à partir des différentes parties de la plante *Senecio delphinifolius* Vahl

À 0,4 g de la poudre des feuilles et fleurs, des branches et tiges et de racines de plante *Senecio delphinifolius*, on ajoute 15 ml d'hexane, on traite aux ultrasons dans un appareil de marque Eurosonic 44 pendant 10 min. Ensuite, centrifugation à 3500 rpm dans une centrifugeuse de marque Centrifuge 4226 pendant 5 min. le surnageant est aspiré et on ajoute 15ml de méthanol à 50 % V/V. On traite aux ultrasons pendant 10 min et centrifugation à 3500 rpm pendant 5min. Les extraits obtenus sont concentré dans un rotavapeur.

Tableau II. 2: Liste des poudres utilisées

Numéro d'injection	Les poudres
12	feuilles et fleurs
10	branches et tiges
8	racines

b. Préparation des solutions des extraits n- butanol

Dans les extraits concentrés nous avons rajouté pour l'équivalent de 0,4 g de poudre 15 ml de méthanol 50%. Boucher et mis dans un appareil à ultrason pendant 10min, centrifuger à 3500 rpm pendant 5min.

Tableau II. 3: Liste des extraits n- butanol

Numéro d'injection	les extraits n- butanol
6	feuilles et fleurs
4	branches et tiges
2	Racines

c. Solutions témoins

Les standards ont été préparés à la concentration de 1mg/ml dans du méthanol à 50 %. Les standards utilisés sont classés sur le tableau II. 4 :

Tableau II. 4 Liste des standards utilisés

Numéro d'injection	Nom de composé
1	Acide chlorogénique
3	Rutine
5	Quercétine
7	Naringénine
9	Kaempférol
11	Apigénine 7-glucoside

- Dépôt et révélation :

Les extraits n- butanol, les poudres des feuilles et fleurs, des branches et tiges et des racines de plante *S. delphinifolius* ainsi que les standards sont testés par chromatographie sur couche mince avec support de gel de Silice, 60 F₂₅₄ sur plaque de verre de 20 × 10 cm et 0.5 mm d'épaisseur. On dépose 20 µl d'extraits, et de standards sur la plaque. L'appareil qui permet cette opération est de marque Camagautomatic TLC sampler III et il est piloté par un logiciel appelé Wincat dans le système de solvant : Acétate d'éthyle (AcOEt)-acide formique anhydre (HCOOOH) -eau ultra pure (H₂O) aux proportions (90: 6 : 6 V/V/V).

Après migration et séchage à 110°C, la plaque est examinée sous UV, l'observation en UV ne paraît pas suffisante, les flavonoïdes ont été détectés sous la lampe UV à 365 nm et à 254 nm. La révélation des flavonoïdes a été effectuée en pulvérisant la plaque avec une solution méthanolique de diphenylborate d'aminoéthanol (1%), puis avec le PEG 400 (polyéthylène glycol).

- **Profil des différents composants par chromatographie sur couche mince (CCM):**

Les figures suivantes montrent le profil des flavonoïdes contenus dans les extraits n-butanol.

Plaque 1: Prise de vue sous lumière UV à 365 nm après révélation au réactif de Neu.

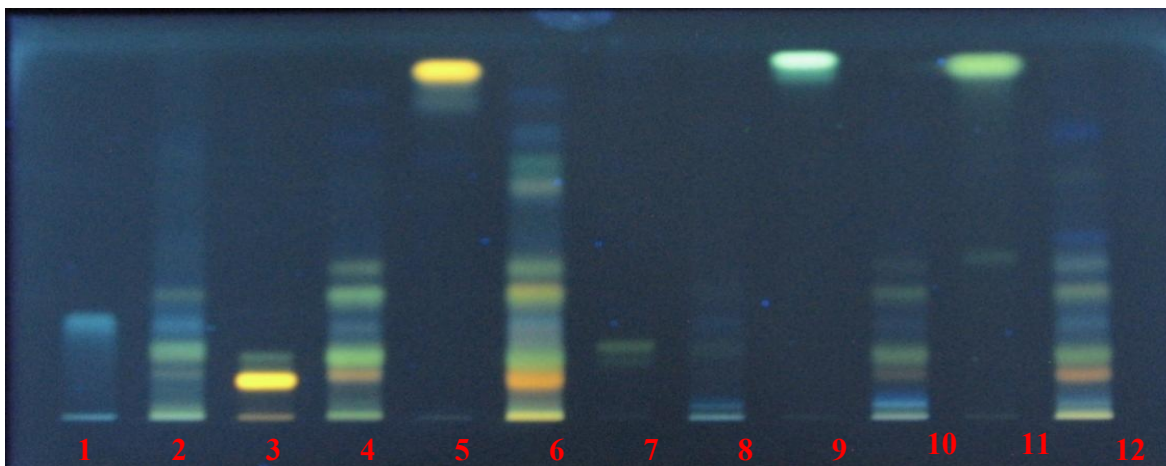


Figure II. 16: (1) Acide chlorogénique ; (2) Extrait (nBut) racines; (3) Rutine ; (4) Extrait (nBut) tiges et branches (5) Quercetine(6) Extrait (nBut) feuilles et fleurs (7) Naringénine(8) Ext poudre. racines(9) Kaempférol (10) Extpoudre tiges et branches (11) Apéginine -7-glucoside(12)Ext poudre. feuilles et fleurs.

Plaque 1 : Prise de vue sous lumière UV à 254nm après révélation au réactif de Neu :

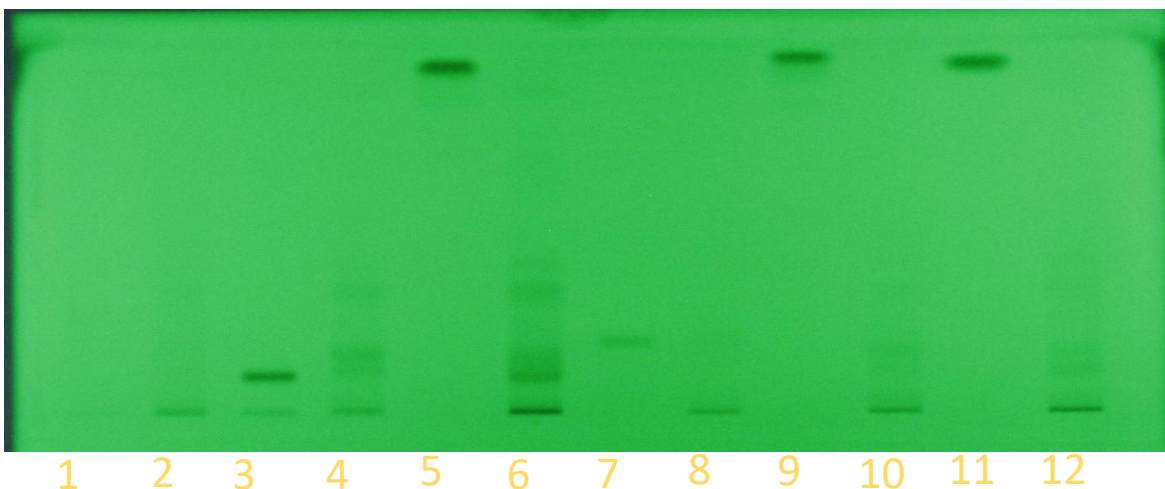


Figure II. 17 : (1) Acide chlorogénique ; (2) Extrait (nBut) racines; (3) Rutine ; (4) Extrait (nBut) tiges et branches (5) Quercetine(6) Extrait (nBut) feuilles et fleurs (7) Naringénine(8) Extpoudre racines (9) Kaempférol (10) Extpoudre tiges et branches (11) Apéginine -7-glucoside (12) Ext poudre feuilles et fleurs.

Le système de solvant : Acétate d'éthyle (AcOEt)-acide formique anhydre (HCOOOH) -eau ultra pure (H₂O) aux proportions (90: 6 : 6 V/V/V).

Plaque 1 : Prise de vue sous lumière UV à 365 nm avant révélation.

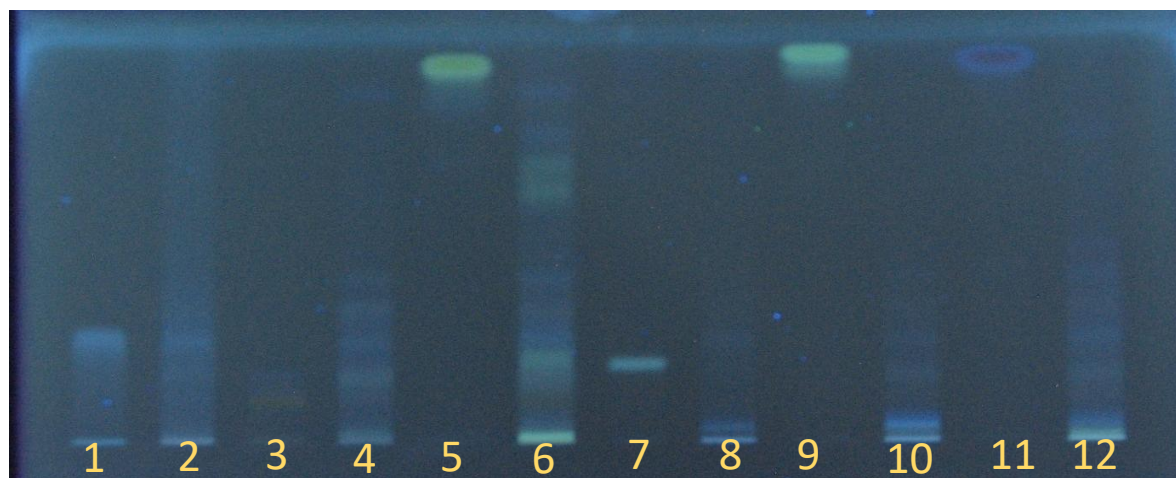


Figure II. 18 : (1) Acide chlorogénique ; (2) Extrait (nBut) racines; (3) Rutine ; (4) Extrait (nBut) tiges et branches (5) Quercetine(6) Extrait (nBut) feuilles et fleurs (7) Naringénine(8) Ext poudre racines (9) Kaempférol (10) Extpoudre tiges et branches (11) Apéginine -7- glucoside (12) Ext poudre feuilles et fleurs.

Des prises de vue ont été réalisés au visible et à l'UV (254 et 365 nm). Observés en lumière UV à 365 nm, les taches fluorescentes jaunes, vertes ou orange indiquent la présence des flavonoïdes [204].

2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolet/visible (HPLC-UV/VIS).

Une étude chromatographique analytique par CLHP a été réalisée au laboratoire VTRS de l'université d'El Oued.

La littérature, nous a permis de sélectionner un système de solvant convenable, vu la distance entre les constituants des différents extraits de l'espèce *Senecio. delphinifolius* Vahl en utilisant comme éluant un gradient (H₂O /méthanol) [205].

- Appareillage

L'analyse a été effectuée sur un appareil de CLHP, Shimadzu LC 20 AT équipé d'un injecteur Rheodyne 7725 stainless steel, et muni d'un détecteur UV-VIS SPD 20A (Shimadzu). La longueur d'onde non variable $\lambda = 254$ nm, la colonne: phase inverse Shim-pack VP- ODS, C18 (MeOH, H₂O), le débit est fixé à 2 ml/ min pendant 41 mn: La figure ci-dessus illustre bien l'appareil HPLC utilisé :



Figure II. 19 Appareil de CLHP Shimadzu LC 20 AT, laboratoire VTRS
Université d'El Oued.

La température de la colonne a été maintenue au niveau de la température ambiante et le volume d'injection était de 20 μ L. Avant l'injection de substance à analyser, la colonne a été équilibrée pendant 40 à 50 min avec la phase mobile.

Le gradient de la phase mobile est indiqué sur le Tableau II. 5.

Tableau II. 5 Le programme du gradient d'élution

Temps (mn)	H ₂ O	méthanol
0	75	25
35.00	20	80
40.00	75	25
41.00	75	25

On obtient les chromatogrammes suivants :

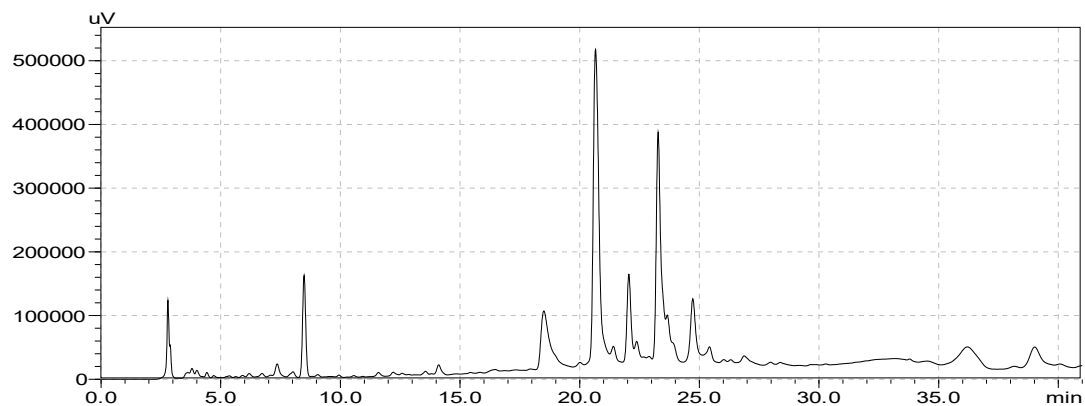


Figure II. 20 Chromatogramme CLHP donne le profilage de l'extrait 1- butanol des feuilles et des fleurs

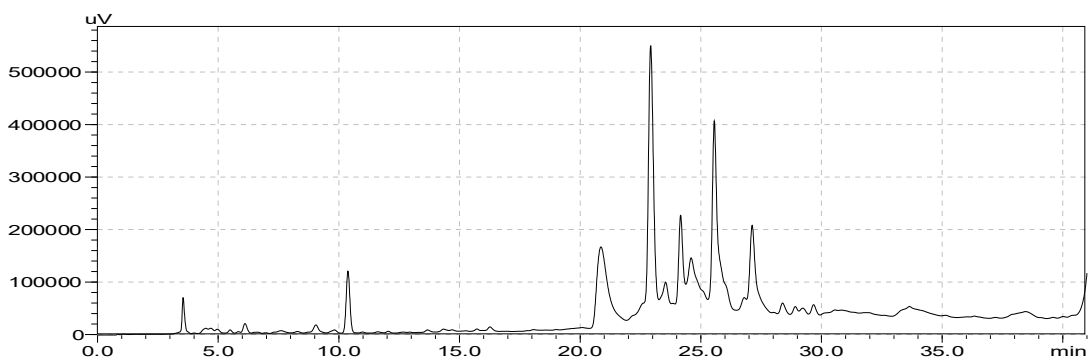


Figure II. 21 Chromatogramme CLHP donne le profilage de l'extrait 1- butanol des branches et tiges.

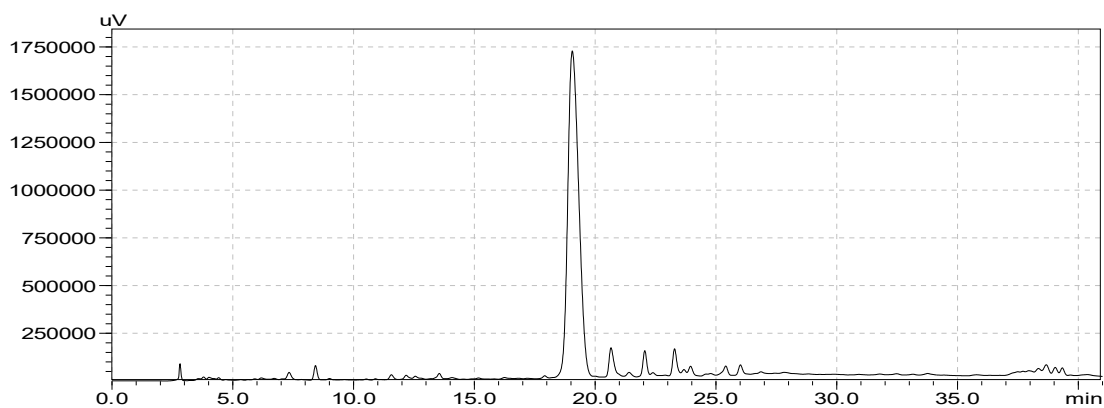


Figure II. 22 Chromatogramme CLHP donne le profilage de l'extrait 1- butanol des racines.

II. 3. 3. Isolement et purification des composants

- Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

a. Etude de l'extrait n-butanol des branches et tiges de *S. delphinifolius*. Vahl :

Les résultats des tests biologiques positifs nous ont conduits à travailler sur l'extrait 1-butanol des branches et tiges.

a. 1 : Séparation sur colonne de polyamide

Une masse d'environ 12 g de l'extrait n-butanol des branches et tiges est déposée sur une colonne de polyamide SC6 (0,05-0,16 mm) préparée dans le toluène. L'élution est réalisée par gradient de polarité croissante du système Toluène - MeOH.

Le suivi des fractions obtenues, est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice (SiO₂ 60 F254, Merck) sur support Aluminium, visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). Pour les fractions les moins polaires on a choisi le système de solvant CH₂Cl₂/ AcOEt (9 :1) alors que pour les fractions les plus polaires on a opté pour les systèmes de solvants suivants:

S1: Chloroforme/Méthanol où CHCl₃/CH₃OH : avec des proportions variables.

S2: CH₃COC₂H₅/H₂O/CH₃COOH/HCOOH: 100/10/5/5.

S3: CH₃COC₂H₅/ CH₃COOH/ H₂O : 8/1/1.

Les plaques sont examinées sous UV à 254 et à 365 nm, les fractions qui présentent la même composition ou présentent peu de différence sont réunies. Les 180 fractions de cette colonne sont regroupées en 21 lots relativement homogènes.

La progression de cette colonne est rassemblée dans le Tableau II. 6.

Tableau II. 6 : Séparation par chromatographie sur colonne de polyamide SC6 (0,05-0,16mm) de l'extrait 1-butanol des branches et tiges de *Senecio delphinifolius* Vahl:

Fractions	Toluène - CH ₃ OH	Masse en (mg)	Observation
F1	Toluène 100 %	117	Mélange (trainé)
F2	Toluène - CH ₃ OH 3 %	535	Mélange complexe
F3	Toluène - CH ₃ OH 5%	203	Plusieurs taches
F4	Toluène - CH ₃ OH 10 %	238	Plusieurs taches
F5	Toluène - CH ₃ OH 15%	377	Mélange complexe
F6	Toluène - CH ₃ OH 15%	445	Mélange complexe
F7	Toluène - CH ₃ OH 20 %	207	Mélange
F8	Toluène - CH ₃ OH 20 %	537	Mélange Séparable + précipité
F9	Toluène - CH ₃ OH 25 %	465	Mélange complexe
F10	Toluène - CH ₃ OH 25 %	125	Mélange Séparable
F11	Toluène - CH ₃ OH 25%	101	Mélange Séparable
F12	Toluène- CH ₃ OH 30 %	122	Mélange Séparable
F13	Toluène - CH ₃ OH30 %	138	Mélange complexe
F14	Toluène- CH ₃ OH 30 %	1000	Mélange complexe
F15	Toluène - CH ₃ OH 35 %	380	Mélange complexe
F16	Toluène - CH ₃ OH 40 %	332	Mélange complexe (trainé)
F17	Toluène - CH ₃ OH 50 %	868	Mélange complexe
F18	Toluène - CH ₃ OH 60 %	223	Mélange complexe
F19	Toluène - CH ₃ OH 80 %	278	Mélange complexe
F20	CH ₃ OH 100 %	128	Mélange complexe
F21	CH ₃ OH-H ₂ O 50%	80	Mélange complexe

L'examen des résultats de l'analyse par CCM sur gel de silice relatif aux 21 fractions issus de la colonne sur support polyamide SC₆ des branches et tiges de l'extrait n-butanol a laissé entrevoir la possibilité d'isoler des composés non correctement séparé. On a procédé à la séparation

des fractions F₃, F₈, F₁₀, F₁₁, F₁₂ soit pour leur simplicité soit pour leur poids relativement important ou les deux.

- **Purification de la fraction F₃ :**

Une masse de 203 mg de la fraction F₃ est purifiée au départ, sur colonne de gel de silice 60 (0.063-0.2 mm, Merck) préparée dans le dichlorométhane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité croissante du système CH₂Cl₂-ACOEt – MeOH. Le tableau II. 7 représente les lots des fractions selon le pourcentage de l'élution.

Tableau II. 7 : Fractions issues de la purification par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait n-butanol de *S. delphifolius* Vahl.

Fractions	CH ₂ Cl ₂ %	ACOET %	MeOH%
0-30	100	0	0
31-60	99	1	0
61-90	98	2	0
91-180	97	3	0
181-210	95	5	0
211-270	90	10	0
271-300	80	20	0
301-330	70	30	0
331-360	50	50	0
361-390	30	70	0
391-396	0	100	0
397-406	0	50	50
407-408	0	0	100

Le suivi des fractions obtenues est réalisé par chromatographie sur plaque CCM de gel de silice, visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). Les fractions présentant des similitudes sont rassemblées on obtient 28 fractions.

Tableau II. 8. Les fractions présentant des similitudes sont rassemblées.

Fractions	lots	Masse en (mg)
F1	1-6	2
F2	7-13	4
F3	14-24	3
F4	25-38	9
F5	39	4
F6	40	10
F7	41-55	0.5
F8	56-58	1
F ₉	59-99	0.5
F ₁₀	100-154	7
F ₁₁	155-164	1
F ₁₂	165-178	2
F ₁₃	179-192	5
F ₁₄	193-221	6
F ₁₅	222-238	3
F ₁₆	239- 250	5
F ₁₇	251-252	2
F ₁₈	253-264	0.4
F ₁₉	265-273	3.5
F ₂₀	274-290	24
F ₂₁	291-363	5
F ₂₂	303-340	4
F ₂₃	341-390	25
F ₂₄	391-395	11
F ₂₅	396	4
F ₂₆	397-399	101
F ₂₇	400-405	24
F ₂₈	406-408	7

La sous fraction F₁₀ à 3 %, de masse 7 mg a été purifiée par la suite sur plaque préparative de gel de silice GF₂₅₄, en utilisant le système de solvant CH₂Cl₂-AcOEt 9:1 pour donner 3 mg d'un produit pur. C'est le composé A.

- **Purification de la sous fraction F₈ :**

La fraction F8 de masse 587 mg issue de colonne de polyamide SC6 se présente sous forme d'un mélange et un précipité, on récupère le précipité en forme de cristaux de couleur jaune pale on les lave au méthanol on obtient un produit pur FV2 de masse égale à 11 mg

- **Purification des sous fractions F₁₀ F₁₁ et F₁₂ :**

Ces sous fractions présentent un mélange séparable, vu leurs grande similitude figure II. 23, on les rassemble, ils donnent une masse de 348 mg , après plusieurs essais avec différents système de solvants on procède à une séparation sur plaque préparative sur support de gel de silice GF 254, en utilisant le système d'éluant CH₃COC₂H₅/ CH₃COOH/ H₂O 8.1.1, On a donc pu isolé deux produits, le composé FV₁ et un autre composé FV₃.

On purifie ces deux produits isolés sur colonne de Sephadex LH 20. On obtient 28 mg du produit FV₁ pur. Le second produit purifié FV₃ de masse égale à 5 mg est identique à FV₂.

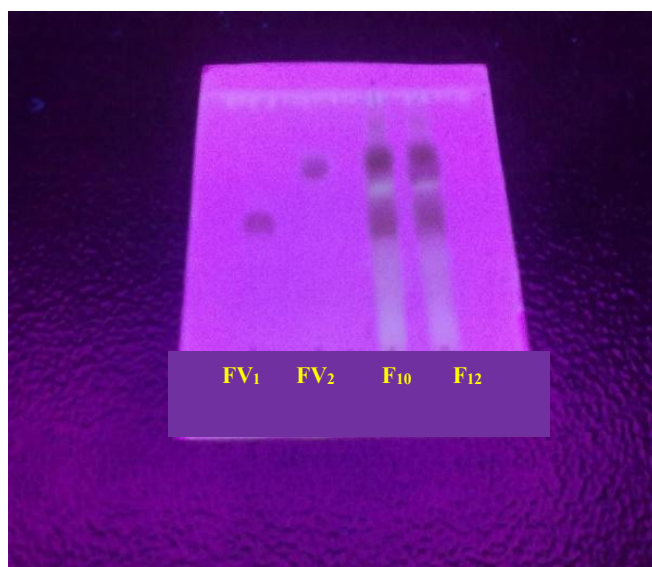


Figure II. 23 : Observation sous lumière UV 365 de la plaque CCM sur gel de silice des deux produits isolés FV₁ et FV₂, ainsi que des sous fractions F₁₀ et F₁₂.

II. 3. 4. Hydrolyse acide :

- L'hydrolyse acide des hétérosides :

L'hydrolyse acide du flavonoïdes – O – glycosides nous renseigné sur la nature de l'aglycone et celle de l'ose une fois détaché. L'extrait pur est chauffé en présence d'acide chlorhydrique (2N) dans un bain- marie pendant une heure. Après refroidissement, l'aglycone est récupéré par affrontement à l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle ou le n-butanol est identifié par analyse spectrophotométrique UV et par Co – chromatographie en présence des substances témoins. La phase aqueuse résiduelle est concentrée, et l'identification du ou des sucre(s) est obtenue par CCM en présence des sucres témoins. La Co – chromatographie (CCM) est effectuée sur plaques de gel de silice qui ont été préalablement activées à 100° C pendant une heure. Le développement des plaques est réalisé dans le système acétone / eau (90 / 10). La révélation des sucres est faite par pulvérisation de la plaque CCM d'une solution de malonyl d'aniline. Après séchage (10 min) à 100 ° C. La plaque, laisse apparaître des taches brunes dans le visible figure II. 24 qu'on comparera (valeurs des Rf) avec celles des sucres témoins [149]:

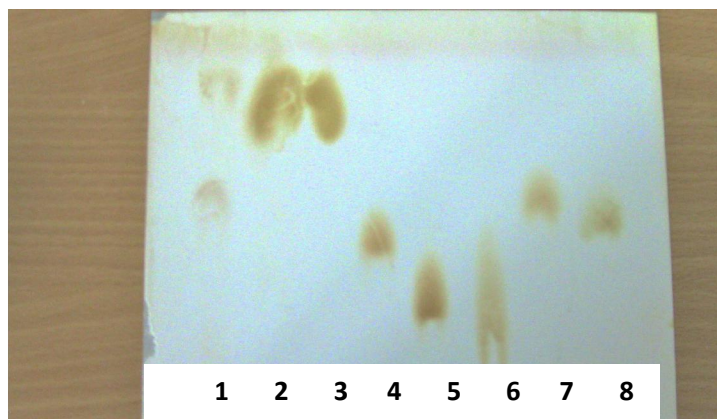


Figure II. 24 Analyse spectrophotométrique UV et par Co – chromatographie en présence des sucres témoins. 1. FV1 ; 2. FV2 ; 3. Rhamnose ; 4. Glucose ; 5. Galactose ; 6. Saccharose ; 7. Mannose ; 8. Fructose.

La phase aqueuse est concentrée et l'identification du ou des sucre(s) est obtenue par CCM sur plaques de gel de silice, avec le système acétone / eau (90 / 10). D'autre part l'aglycone obtenu dans la phase organique est ensuite analysé par spectrophotométrie UV avec différents proportions dans le système CHCl_3 / MeOH.

II. 4. Méthodes utilisées pour l'évaluation biologique

4. 1. Activité antibactérienne

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Pharmacognosie, Bromatologie et Nutrition humaine Faculté de Pharmacie; Université Libre de Bruxelles (ULB).

L'activité antibactérienne est aisément investiguée par la méthode de microdilutions sur plaques 96 puits, qui permet en fait de déterminer la CMI des extraits.

Extrait végétal + bactéries → Inhibition de la croissance ou mort des bactéries.

Cette méthode permet de rechercher des substances possédant une activité antibactérienne propre, à l'encontre de souches bactériennes diverses et les extraits sont qualifiés d'actifs (CMI < 500 µg/ml), faiblement actif (500 µg/ml < CMI < 1000 µg/ml) et inactif (CMI > 1000 µg/ml).

La CMI correspond à la concentration minimale de l'extrait qui inhibe complètement la croissance des microorganismes dans les puits [206].

Étant donné que certaines espèces du genre *Senecio* sont traditionnellement utilisées contre les maladies infectieuses, les extraits du *S. delphinifolius* au n-hexane, dichlorométhane et n-butanol ont été étudiés pour leur activité contre :

Les Souches bactériennes :

- Bactéries Gram positif: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- Bactéries Gram négatif: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Ces souches ont été obtenues de l'American Type Culture Collection.

4. 1. 1. Méthode :

La CMI est évaluée par une méthode de micro dilution en milieu liquide décrite par Okusa et al [207]. Les extraits du *S. delphinifolius* au n-hexane, dichlorométhane et n-butanol sont dissous dans le DMSO (20 mg/250 µl) et dilués à 5ml de milieu Mueller Hinton. La concentration en DMSO dans la solution finale est de 5%. Cette solution est transférée dans une plaque à 96-puits (100 µl / puits) et diluée d'un facteur 2 à chaque colonne par du milieu Mueller Hinton.

Une suspension de bactéries de 0,5 Mc Farland est préparée à partir des cultures microbiennes stock à l'aide d'eau physiologique stérile (NaCl à 0,9%). Une telle suspension

contient environ 10^8 UFC/ml (bactéries). Cette suspension est diluée d'un facteur 100 pour atteindre 10^6 cellules / ml et chaque puits est inoculé avec 100 μ l de cette suspension diluée. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 24h. L'inhibition est détectée à l'œil nu [207, 208].

Tableau II. 9 Disposition de la plaque pour le test antibactérien

Rangées		Colonnes											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T ₁	A à C	Sm ₁	1/2	1/4	1/8	C _D	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	C+	C-
T ₂	D à F	Sm ₂	1/2	1/4	1/8	C _D	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	C+	C-
T ₃	G et H	Sm ₃	1/2	1/4	1/8	C _D	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	C+	C-

Légende: T₁= test du premier extrait testé réalisé en triplicat (rangées A, B, et C), T₂= test du second extrait testé réalisé en triplicat (rangées D, E, et F), T₃= test du composé antibiotique tétracycline de référence réalisé en duplicat (rangées G et H), Sm= solution mère; C+ = contrôle positif (100%); C-=contrôle négatif (blanc optique); CD= contrôle DMSO.

4. 2. Activité antioxydante.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Pharmacognosie, Bromatologie et Nutrition humaine ; Faculté de Pharmacie; Université Libre de Bruxelles (ULB).

Le But de notre travail est la détermination *in vitro* du pouvoir antioxydant des extraits n-hexane, dichlorométhane et n- butanol de la plante *Senecio delphinifolius* Vahl, la méthode utilisée est la réduction du radical organique 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Cette méthode repose sur la dissolution des extraits secs n-hexane, dichlorométhane et n-butanol du *Senecio delphinifolius* dans le méthanol de façon à obtenir une concentration de 10,5 mg/ ,ml (solution mère) pour chaque extrait. Ces dilutions en série d'extraits dissous dans du méthanol ont été mélangés avec 200 μ l de méthanol 0,004% DPPH dans 96 puits de plaques de microtitration et laissés pendant 30 minutes dans l'obscurité, les absorbances ont été mesurées avec un lecteur de plaques multipuits (Labsystems, Finlande) à 540 nm, en utilisant du méthanol comme vierge. Pour déterminer la CI₅₀ (concentration de composé végétal qui inhibe 50% de DPPH), tous les résultats expérimentaux obtenus à partir de trois expériences séparées en quatre exemplaires ont été ajustées à une fonction paramétrique :

$$N = N_0 \exp(-kc)$$

C est la concentration et N le pourcentage restant de DPPH à la concentration C, N_0 , le pourcentage de DPPH à concentration 0, et k un paramètre.

La quercétine a été utilisé comme référence et les résultats exprimés en équivalent quercétine (QE) : calcul du rapport entre IC_{50} quercétine/ IC_{50} extrait de plante [207].

Tableau II. 10 : Disposition de la plaque pour le test au DPPH

Rangées		Colonnes											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T ₁	Aà C	Bl	E ₁	1/2	1/4	Ctr	1/8	1/16	1/32	Ctr	1/64	1/128	1/256
T ₂	Dà E	Bl	Q	1/2	1/4	Ctr	1/8	1/16	1/32	Ctr	1/64	1/128	1/256
T ₃	FetH	Bl	E ₂	1/2	1/4	Ctr	1/8	1/16	1/32	Ctr	1/64	1/128	1/256

Bl : Blanc (méthanol) ; Ctr : contrôle négatif ; E₁ : extrait de plante ; E₂ : extrait de plante ; Q : quercetine

4.3. Effet cytotoxique

Ce travail fut réalisé avec l'équipe du Professeur Robert Kiss (Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles (ULB), Brussels, 1050, Belgium). L'effet cytotoxique des extraits étudiés repose sur la méthode décrite par Mosmann1983 [209], il est déterminé par le test MTT. Ce test basé sur l'estimation du taux de croissance globale des cellules permet de déterminer la viabilité cellulaire par colorimétrie.

Les lignées cellulaires de cancers humains utilisées comprennent:

- la lignée cellulaire d'oligodendrogliome Hs683 (ATCC code HTB-138),
- la lignée cellulaire de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) A549 (DSMZ code ACC107
- et la lignée cellulaire de cancer du côlon HT29 (ATCC code HTB-38).

Toutes ces lignées cellulaires cancéreuses furent cultivées dans du RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgique) complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) inactivé à la chaleur auquel fut ajouté de 4 mM de glutamine, 100 µg / ml de gentamicine et un mélange d'antibiotiques penicilline-treptomycine (200 UI/ml et 200 µg/ml respectivement).

4. 3. 1. Méthode:

Au jour 0, les cellules sont décrochées de leur support par trypsinisation, le nombre de cellules présentes dans la suspension cellulaire fut déterminé par comptage au compteur Coulter (Backman Coulter, USA), permettant de déterminer le volume de la suspension cellulaire à prélever afin d'obtenir le bon taux d'ensemencement. Les cellules sont ensemencées à un taux de 1200 cellules par puits dans des plaques 96 puits (Sarstedt, Essen, Belgium).

Au jour 1, les cellules sont cultivées en présence d'une concentration croissante d'extraits secs n-hexane, dichlorométhane et n- butanol du *Senecio delphinifolius* Vahl solubilisés dans du DMSO (max 5% (V/V)). Les concentrations testées vont de 0.01 µg/mL à 100 µg/mL.

Au jour 4, le milieu de culture des cellules est éliminé et remplacé par 100 µL d'une solution à 0.5 mg/ml de réactif MTT dans du RPMI blanc (Lonza, Belgium). Après 3h30 d'incubation (37°C et 5% (v/v) CO₂), temps nécessaire à la réduction par les mitochondries du MTT en cristaux de formazan, la plaque est centrifugée pendant 10 minutes à 1500 rpm. La solution de réactif MTT est éliminée et les cristaux de bleu de formazan sont dissous par 100 µl de DMSO (diméthylsulfoxyde); La plaque fut ensuite agitée délicatement afin d'obtenir une solution homogène de couleur violette et de permettre la mesure de l'intensité de la coloration par spectrophotométrie visible au moyen d'un lecteur de plaque modèle 680XR Biorad,(Biorad, Nazareth, Belgique) à 540 nm

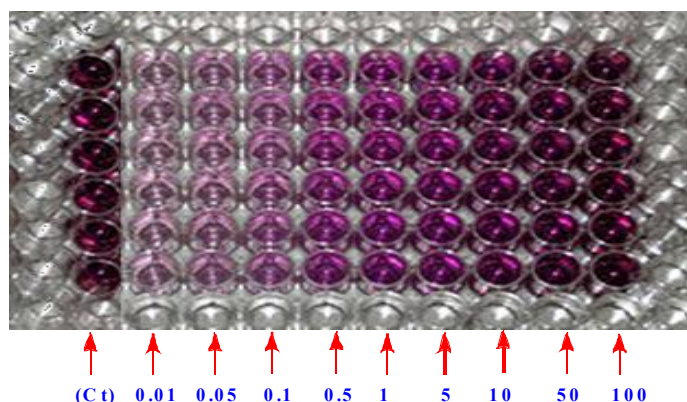
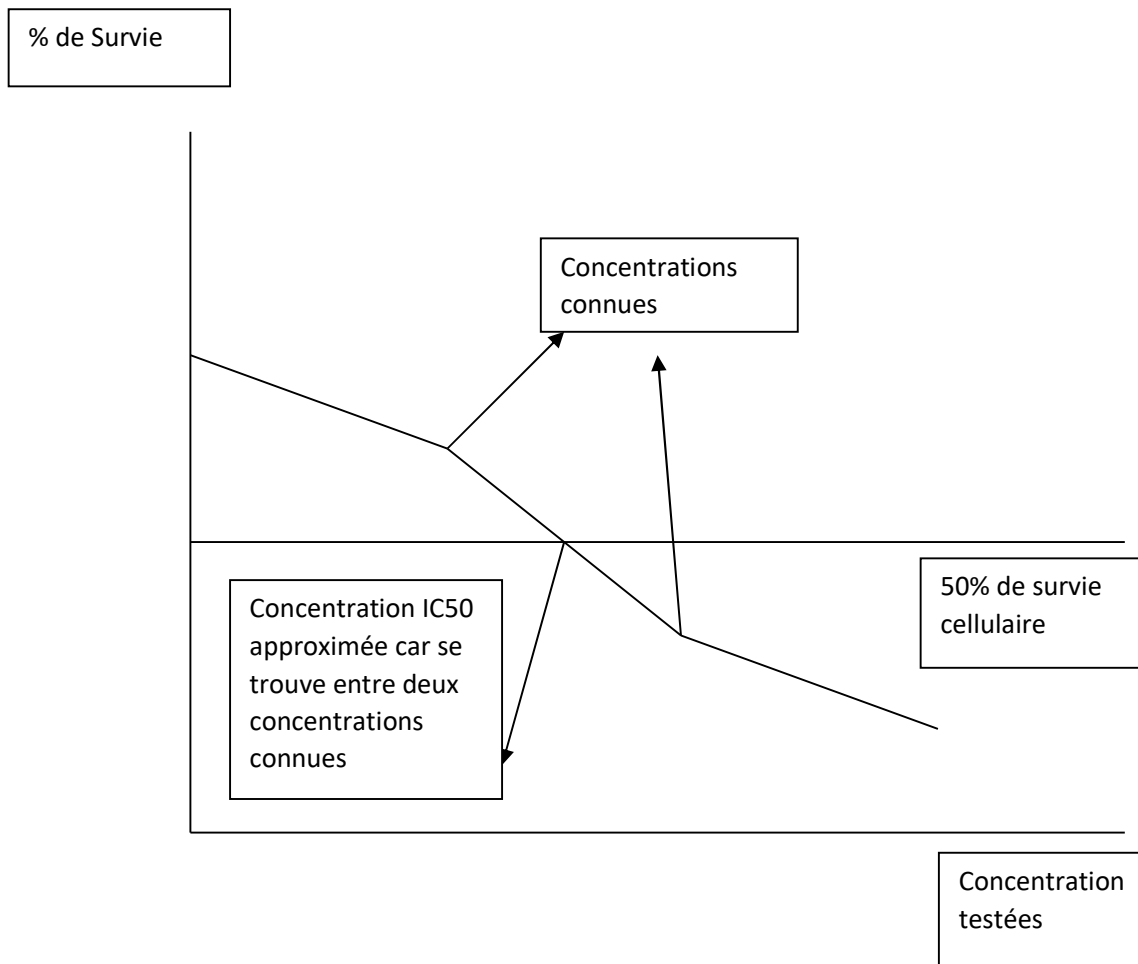


Figure II. 25: Illustration d'une plaque 96 puits dans laquelle le test fut réalisé. Les cellules furent incubées avec une solution de concentration croissante en extrait (de 0.01 à 100 µg/ml), chaque colonne correspond à une condition expérimentale ; Ct : conditions contrôles,

Des courbes ont été tracées, le pourcentage de survie en fonction des concentrations testées pour tous les extraits testés, les valeurs des IC_{50} pour chaque lignée cellulaire ont été déterminées graphiquement pour les obtenir, nous extrapolons entre deux concentrations connues qui encadrent l' IC_{50} [210].



Les extraits végétaux présentant une bonne activité peuvent être soumis à un fractionnement bio-guidé dans le but d'isoler les composés responsables de cette activité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette partie présente les résultats des différentes investigations menées dans le cadre de l'analyse phytochimique et de l'évaluation de certaines propriétés biologiques de l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl (Asteraceae).

III. I. Etude phytochimique

1. 1. Screening phytochimique qualitatif de l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl:

Le Screening phytochimique de *S. delphinifolius* Vahl a permis de noter l'absence des flavonoïdes aglycones, anthocyanosides, coumarines, et des saponines. Néanmoins, les flavonoïdes glycosides, les stérols ou les triterpènes, les tanins, les caroténoïdes et les alcaloïdes sont présents dans toutes les parties de la plante. On remarque que l'étude expérimentale donne des résultats presque analogues à ceux donnés par la littérature [28, 193], ils sont rassemblés dans le tableau ci-dessous:

Tableau III.1 Résultats du screening phytochimique

Extrait	Les groupes chimiques					
		R	F	Tr	Fl	F&G
A	Stérol et triterpène		+	+	+	+
	Caroténoïde	-	+	-	±	-
	Acide gras	±	±	±	±	±
	Alcaloïde	-	-	-	-	-
	Flavonoïde	-	-	-	-	-
	Coumarine	-	-	-	-	-
B	Tanins	+	+	+	+	+
	Alcaloïde	-	-	-	-	-
	Coumarine	-	-	-	-	-
	Flavone Glycosides	-	-	++	-	-
	Anthocyanoside	-	-	-	-	-
C	Saponine	-	-	-	-	-
	Tanins	+	+	+	+	+
	Alcaloïde	+	++	±	+	+
	Coumarine	-	-	-	-	-
	Flavone Glycosides	-	+	-	+	+
	Anthocyanoside	-	-	-	-	-

(+): positive. (-) : négative. (±) : traces.

R : racine. F : feuilles. Tr: tronc. Fl: fleures. F&G: fruits et graines.

A : Extrait à l'éther. B:Extrait à l'alcool. C: Extrait à l'eau.

I. 2. Chromatographie sur couche mince (CCM):

L'étude des extraits par CCM : **Figures II (16, 17, 18)**, montre le profilage des composés contenus dans les extraits n-butanol. En effet des prises de vue ont été réalisées au visible et à l'UV (254 et 365 nm). Sous lumière UV à 365 nm, avant et après révélation au réactif de Neu, nous ont permis d'observer des taches fluorescentes jaunes, vertes ou oranges indiquant la présence des flavonoïdes [204].

Ces CCM visualisés sous lumière UV à 365 nm nous permettent de remarquer que la tache bleu du standard N° 1(témoin) présente dans les différents extraits nous laisse prévoir la présence de l'acide chlorogénique qu'on retrouve dans les plantes du genre *senecio* [28].

On peut également remarquer la similitude entre la tache de la rutine standard n° 3 et la tache au même niveau jaune orange de l'extrait n-Butanol des tiges et branches et de l'extrait n-butanol des feuilles et des fleurs sur la même plaque d'autre part la tache de la Naringenine n°7 semble présente dans ces mêmes extraits. On peut entrevoir l'absence de la quercétine, Kaempférol et de l'Apéginine -7- glucoside dans les différents extraits sur la même plaque par co-chromatographie avec des standards, mais tout ceci reste à confirmer. En effet le choix des standards a été établi sur la base d'une recherche bibliographique sur les flavonoïdes du genre *senecio* [28, 128-132].

1. 3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie ultraviolet/visible (HPLC-UV/VIS):

Les chromatogrammes obtenus au chapitre II (matériel et méthode) montrent d'une part une composition assez riche de ces extraits notamment en composés polaires et d'autre part, que ces composés polaires ont une bonne absorbance à la longueur d'onde utilisée en particulier ceux de l'extrait 1- butanol des feuilles et des fleurs et de l'extrait 1- butanol des branches et tiges. Ces données laissent prévoir une bonne composition de type flavonoïdes.

III. 2. DETERMINATION STRUCTURALE DES ALCALOIDES

III. 2. 1. Analyse par GCMS:

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé, couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS), nous a permis d'identifier les APs présents dans nos échantillons. En effet, le détecteur de masse a conduit au spectre de fragmentation de chacun des composés élués, qui nous a facilité l'identification. A partir d'un courant ionique total, nous avons pu obtenir un chromatogramme représentatif des molécules contenues dans nos échantillons tandis qu'un chromatogramme sélectif a été obtenu en sélectionnant les ions particuliers de m/z 93-95, 119-121, 136-139. Ces ions correspondent aux différentes étapes de la fragmentation des nécines insaturées des APs de type rétronécine [212, 213]. D'autre part nous avons obtenu également des ions de m/z 96, 110, 122, 123, 150, 151, 168 qui correspondent aux différentes étapes de la fragmentation des nécines insaturées des APS de type otonecine [214].

La GC-MS est en effet fréquemment utilisée pour l'analyse des mélanges complexes des APs, identifiant les composés à l'aide des indices de rétention (IR) et des fragments spécifiques retrouvés dans leurs spectres de masse. La combinaison de ces deux paramètres permet d'une part d'avoir suffisamment d'informations pour une identification sans équivoque de la plupart d'APs de sources connues et d'autre part d'avoir des informations structurales d'autres APs. En effet, le spectre de masse est dominé par la base nécine, ce qui résulte en une fragmentation typique, particulièrement pour les APs 1,2-insaturés qui sont toxiques [115]. Au niveau chromatographique, nous avons utilisé des indices de rétention, des grandeurs relatives permettant de caractériser les différents composés [112].

Pour cela, nous avons injecté dans la colonne une solution d'alcane linéaires ayant entre 12 et 32 atomes de carbones. **La Figure III. 1.** montre le chromatogramme obtenu pour ces neuf alcanes.

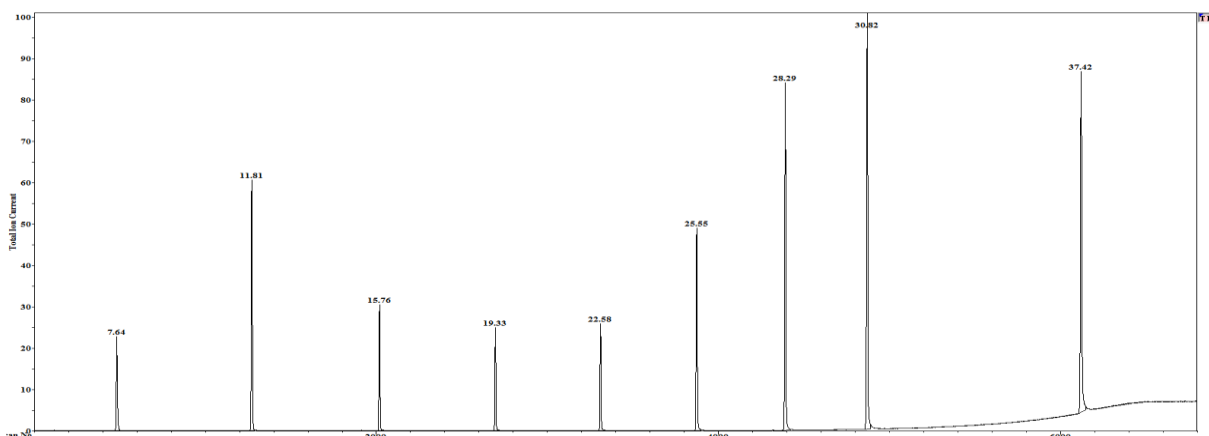


Figure III.1 Chromatogramme en phase gazeuse d'une série d'alcane linéaires (C₁₂-C₃₂).

Ces alcanes sortent logiquement dans une séquence en fonction de leur nombre d'atome de carbone. Pour s'assurer des résultats de la GC-MS, le standard (Héliotrine) a été aussi analysé. Le chromatogramme et le spectre relatif au standard utilisé est consigné ci-après:

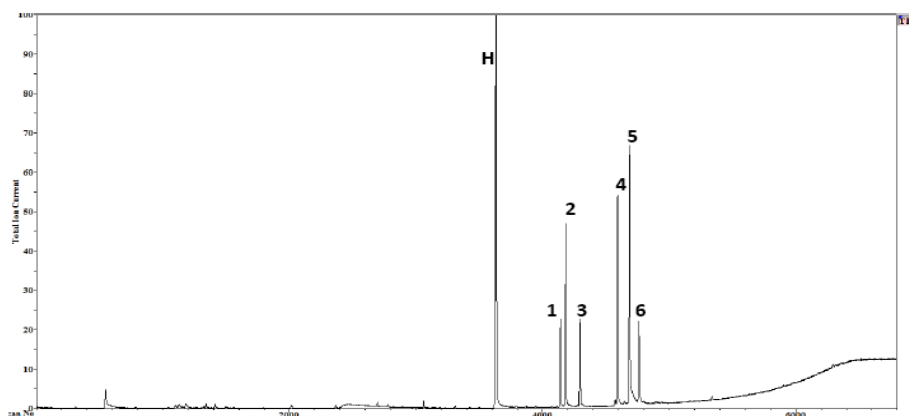


Figure III. 2 Chromatogramme ionique total de l'extrait des alcaloïdes après réduction.

H : Héliotrine (étalon), **1** : Sénécionine ($M^+ \pm 335$), **2** : Sénéciphylline ($M^+ 333$),
3: Intégerrimine ($M^+ 335$), **4**: Senkirkine ($M^+ 365$), **5**: Déhydrosenkirkine ($M^+ 363$),
6: Néosenkirkine ($M^+ 365$).

Ce chromatogramme total nous donne le profil de six alcaloïdes pyrrolizidiniques, L'IR trouvé selon Van Den Dool [114] a été comparé en suite avec les données de la littérature pour en déduire l'Alcaloïde Pyrrolizidinique probable [194]. On verra par la suite les spectres GCMS pour chacun des pics.

- Spectre GC-MS du pic de l'Héliotrine (H), étalon.

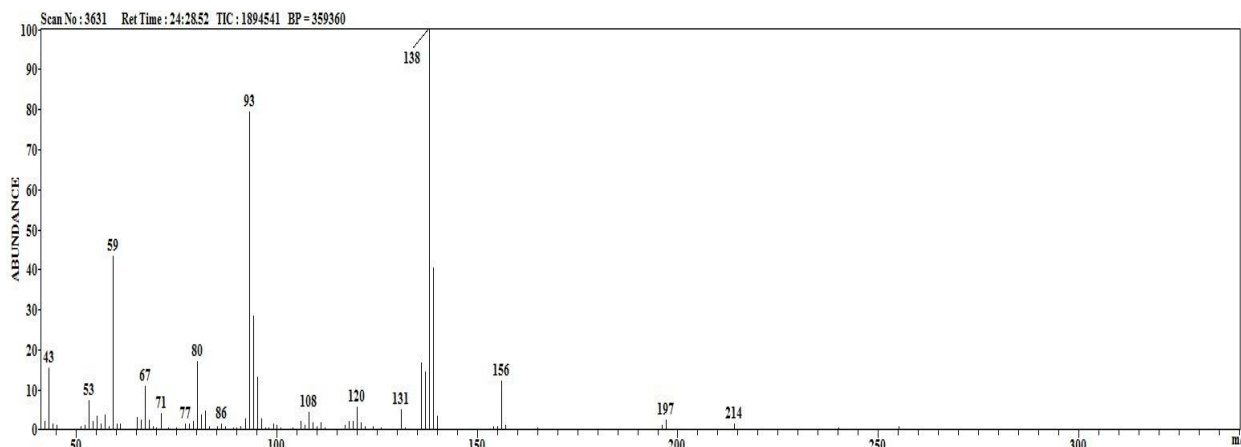


Figure III. 3 : Spectre GC-MS du pic de l'Héliotrine $t_R = 24, 28$ min.

Nous remarquons que les ions signatures des APs de m/z 93-95, 120, 136-139 sont présents dans notre étalon. Le bon fonctionnement de l'appareil étant assuré, nous passons maintenant à l'analyse de nos extraits alcaloïdiques totaux après réduction.

III. 2. 2. Résultats de la GC-MS de l'extrait alcaloïdiques:

Cette section présente les différents spectres GC-MS pour chacun des pics du chromatogramme ionique total obtenu pour l'extrait après réduction.

1. Sénécionine ($M^+ \pm 335$),

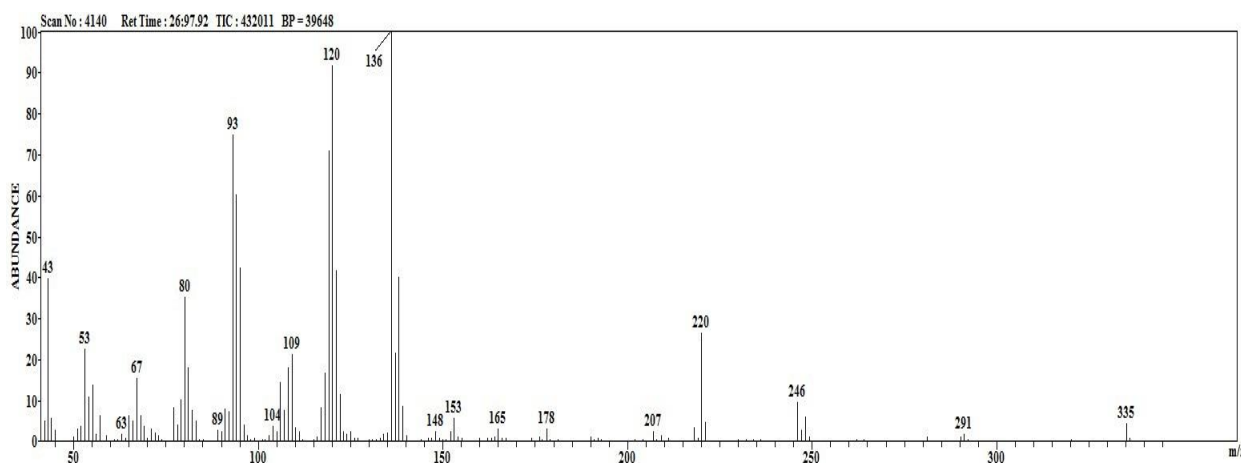


Figure III. 4 : Spectre GC-MS du pic de la sénécionine à $t_R = 26,97$ min ($[M]^+ 335$).

Le spectre GCMS obtenu qui sort à $t_R = 26,97$ min montre un pic pour l'ion -moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 335$. Nous remarquons que les ions signatures des diesters pyrrolizidiniques insaturés de type rétronécine, la sénécionine et ses dérivés, une "triade de triplets" avec des fragments à m/z 93-95, 119-121, 136-139 sont présents sur le spectre. Ces ions correspondent aux différentes étapes de la fragmentation des nécines insaturés schéma III. 1 [215].

La partie nécine des APs insaturés issue de la coupure homolytique au niveau de l'ester allylique C-9-O conduit à une séquence d'intermédiaires illustrée sur le schéma III. 1, séquence (a) [215].

D'après Crout 1969 [216] des fragmentations majoritaires à m/z 80, 93, 119, 120, et 136 sont caractéristiques des diesters macrocycliques d'APs insaturés. Atal et al 1966 [217] suggèrent la senecionine et ses dérivés qui sont des esters macrocycliques de la rétronécine le schéma III.1 illustre bien les différentes fragmentations de la senecionine.

Les trois séquences résultent de la perte d'un électron soit du centre $1, 2 \pi$ ou de l'atome d'oxygène de l'ester allylique soit par impact électronique de l'atome d'azote qui peut conduire au fragment de la séquence b schéma III. 1. [215].

Les diesters pyrrolizidiniques insaturés de type rétronécine, la sénécionine et ses dérivés, donnent une "triade de triplets" avec des fragments à m/z 93-95, 119-121, 136-139 qui résultent par le transfert de l'atome hydrogène de la base rétronécine et conduit à des réarrangements Mc Lafferty à six ou huit membres [215] comme illustré sur le schéma III. 1.

Un réarrangement Mc Lafferty à huit membres est illustré sur le schéma III. 2 ou l'atome d'hydrogène est transféré de la partie nécine à la partie acide nécique et ainsi conduit à des fragmentations typiques: les trois pics de plus faible m/z : séquence b schéma III. 1 (93, 119, 136).

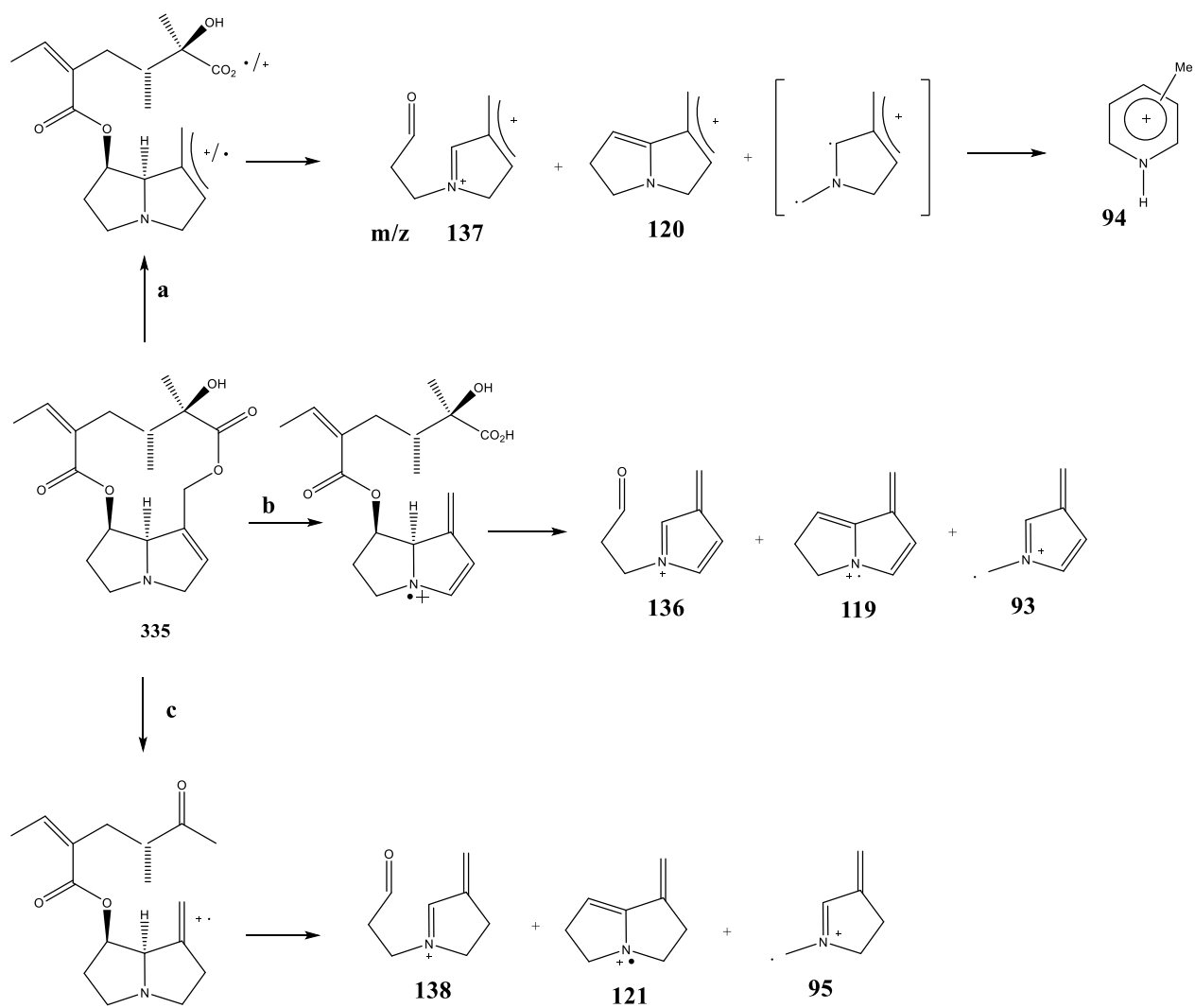


Schéma III. 1. [215]

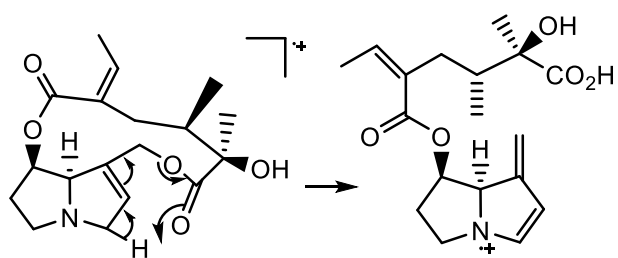


Schéma III. 2[215]

Un autre réarrangement Mc Lafferty à six membres pour le transfert d'hydrogène à partir de la partie nécine, comme représenté dans le **schéma III. 3** [215]:

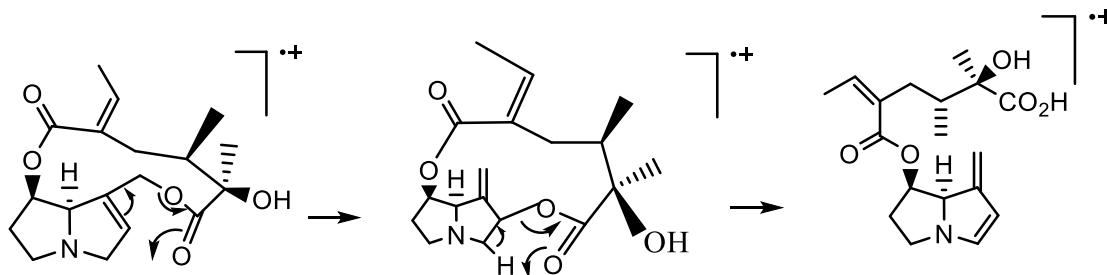


Schéma III. 3

D'autre part un réarrangement Mc Lafferty à huit membres **Schéma III. 4** où l'atome d'hydrogène est transféré de l'acide nécique à la nécine suivi de coupures et aboutissant ainsi aux plus grandes masses des trois triades séquence c dans le **schéma III. 1**: 138, 121, 95 [215].

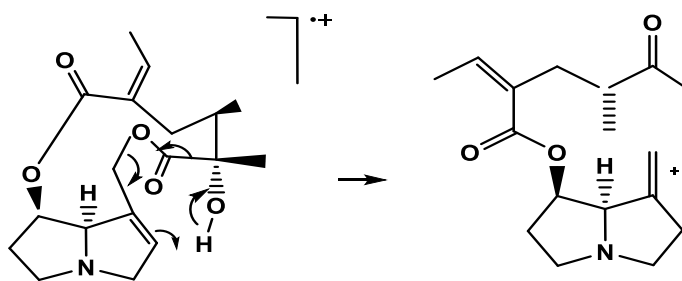


Schéma III. 4.

L'impact d'électrons sur l'atome d'azote peut conduire au fragment séquence b via une voie qui commence par la fission de l'ester α, β -insaturé **schéma III. 5** [215].

Une différence entre les spectres des diesters 1,2 non macrocyclique et des lactones macrocycliques des alcaloïdes pyrrolizidiniques insaturés, est la faible importance des pics à m/z 95, 137, 138 dans le spectre des premiers tandis que ces mêmes pics sont souvent importants dans les spectres des derniers. Le pic à m/z 136- 138 est solide et est généralement le pic de base [215].

Une grande similitude entre les données de la littérature et nos résultats, ce qui est confirmé sur nos spectres. La grande probabilité serait en faveur de la senecionine, qui a déjà été isolée du genre *Senecio* [201]. Les différentes fragmentations sont identiques à ceux données par la littérature [201, 215]. En plus l'indice de rétention donné par la littérature est de 2296 [201] qui est suffisamment proche de celui calculé (IRC) 2304 **Tableau III.1**, en plus du pic de masse qui correspond à celui de la senecionine m/z 335. Toutes ces données réunies nous permettent de conclure que le spectre GC-MS du pic N°1 sur le Chromatogramme ionique total de l'extrait des alcaloïdes qui sort à $t_R = 26,97$ min avec $[M]^+ = 335$ et $IR = 2304$ Correspond bien à la Sénécionine.

2. Sénéciphylline ($M^+ 333$),

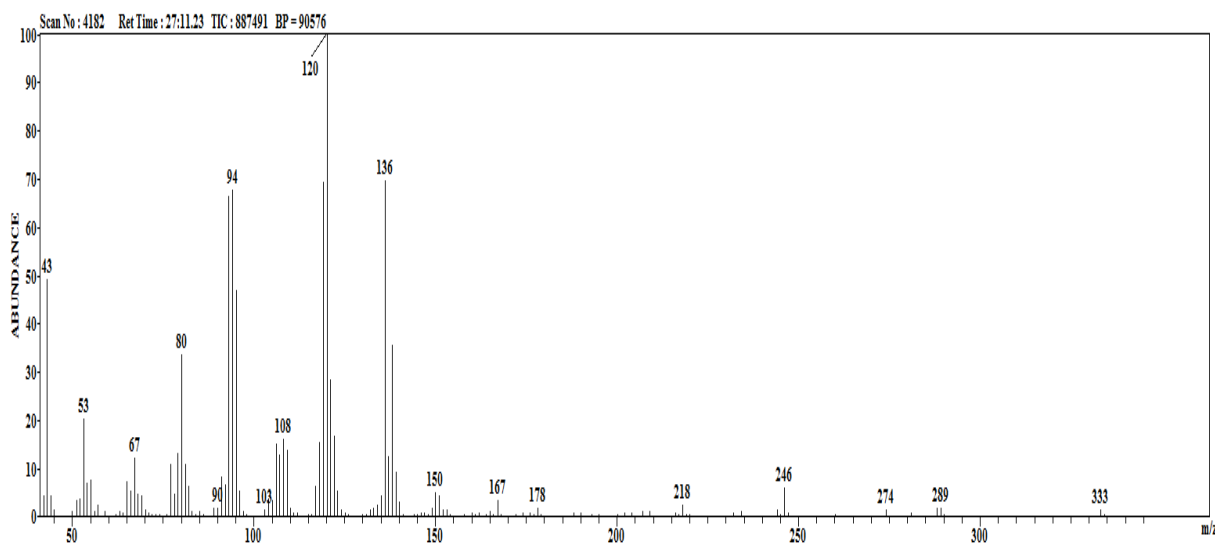


Figure III. 5 Spectre GC-MS du pic de la Sénéciphylline à t_R 27,11 min ($[M]^+333$).

Le spectre GCMS obtenu qui sort à $t_R = 27.11$ min montre un pic pour l'ion -moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 333$. Nous remarquons que les ions signatures des diesters pyrrolizidiniques insaturés de type rétronecine, une "triade de triplets" avec des fragments à m/z 93-95, 119-

121,136-139 sont présents sur le spectre.

La grande probabilité serait en faveur de la Sécéciphylline, qui a déjà été isolée du genre *Senecio* [201], les différentes fragmentations sont identiques à ceux donner par la littérature [194, 201]. Son indice de rétention donné par la littérature est de 2312 [201], il est proche de celui calculé (IRC) 2320 **Tableau III.1**, en plus du pic de masse qui correspond à celui de la Sécéciphylline m/z 333. On peut conclure que le Spectre GC-MS du pic n°2 sur le Chromatogramme ionique total de l'extrait des alcaloïdes qui sort à $t_R = 27,11$ min avec $[M]^+ = 333$ et IR = 2320 Correspond bien à la **Sécéciphylline**.

3. Intégerrimine ($M^+ 335$)

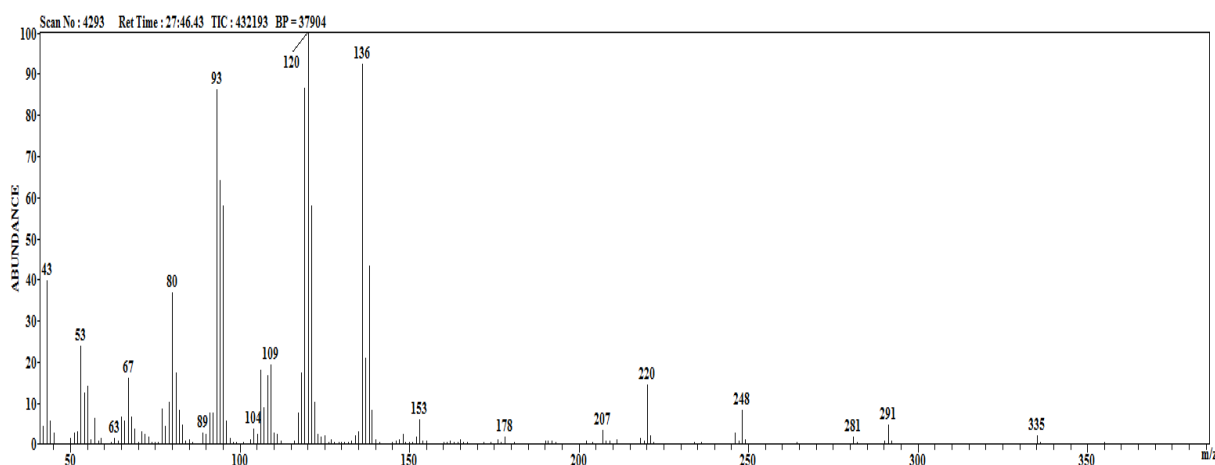


Figure III. 6: Spectre GC-MS du pic de l'Intégerrimine à t_R 27,46 min ($[M]^+ 335$).

Le spectre GCMS obtenu qui sort à $t_R = 27,46$ min montre un pic pour l'ion -moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 335$. Nous remarquons également que les ions signatures des diesters pyrrolizidiniques insaturés de type rétronecine, la sénécionine et ses dérivés, une "triade de triplets" avec des fragments à m/z 93-95, 119-121,136-139 sont présents sur le spectre.

On remarque que ce spectre GC-MS est presque similaire a celui de la senecionine, sauf que son indice de rétention (IRC) 2362 est différent de celui de la senecionine IRL qui est de 2296 mais plutôt proche de celui donné par la littérature de l'intégerrimine qui est de 2355 [201], Tableau III.1.

Conformément à la littérature Witte et al 1993 [194], Gardner et al 2006, ont aisément identifié par analyse GCMS les diastéréoisomères : la senecionine (1) $[M^+]$, m/z 335, 136 (100%); et l'Integerrimine (3) $[M^+]$, m/z 335 ; 120 (100%) et nos résultats MS et RI sont compatibles avec ces données.

La grande probabilité serait en faveur de l'Intégerrimine qui est un diastéréoisomère de la senecionine, qui a déjà été isolée du genre *Senecio*, les différentes fragmentations sont identiques à ceux donner par la littérature [194, 201]. Ces interprétations sont appuyées par Cheng-Hong Hsieha et al qui ont identifié ces deux distéréoisomères *d'Emilia sonchifolia* [219] et qui sont en accord avec les données de witte et al [194] et avec nos résultats.

On peut conclure que le Spectre GC-MS du pic n°3 sur le Chromatogramme ionique total de l'extrait des alcaloïdes qui sort à $t_R = 27,46 \text{ min}$ avec $[M]^+ = 335$ et $IR = 2362$ Correspond bien à l'Intégerrimine.

4. Senkirkine (M^+ 365)

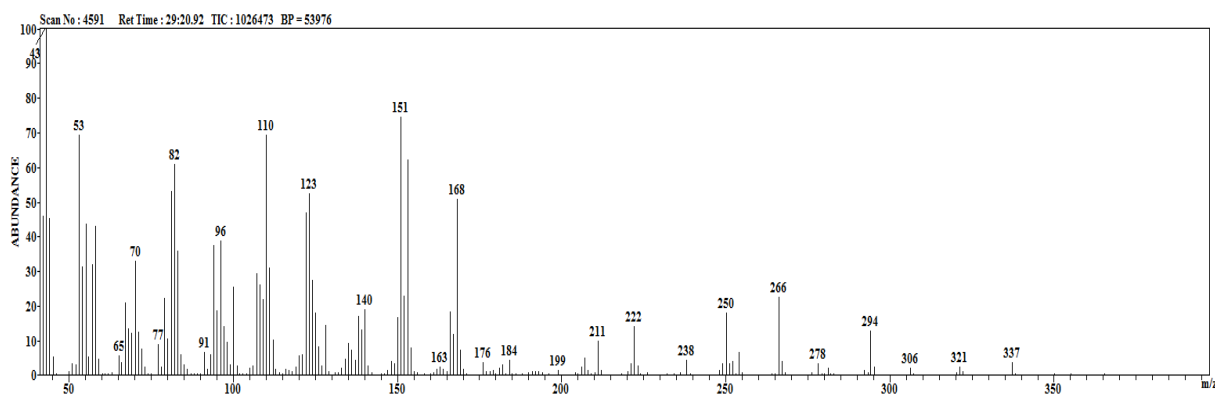


Figure III.7 Spectre GC-MS du pic de la **senkirkine** à t_r 29,20 min ($[M]^+ 365$).

Le pic moléculaire est à peine visible de m/z 365, Nous remarquons et d'après (cava et al 1968) [214], que les ions signatures des APs de type otonecine de m/z 168, 151, 150, 123, 122, 110, 96, 94 sont présents sur le spectre GCMS.

Les principaux fragmentations commencent avec fission de l'ester allylique comme décrit précédemment, suivi de la perte de CO_2 , fournissant l'ion $M^+ - 44$ qui correspond au pic de m/z 321. L'ion $M^+ - 15$ est également présent m/z 350 et été attribuée à la perte du groupe méthyle. La présence d'ions de m/z 337 qui correspond $M^+ - 28$ c'est-à-dire la perte de CO affirme ce principe et ces résultats sont conformes à la littérature Crout et al [216].

La grande probabilité serait en faveur de la Senkirkine, qui a déjà été isolée du genre *Senecio* et les différentes fragmentations sont identiques à ceux donné par la littérature [194, 201, 220]. Son indice de rétention donné par la littérature est de 2477 [201], qui est proche de celui calculé (IRC) 2484 **Tableau III.1** en plus du pic de masse qui correspond à celui de la Senkirkine m/z 365. On peut conclure que le Spectre GC-MS du pic n°4 sur le chromatogramme ionique total de l'extrait des alcaloïdes qui sort à $t_R= 29.20$ min avec $[M]^+ = 365$ et $IR = 2484$ correspond bien à la Senkirkine.

5. Déhydrosenkirkine ($M^+ 363$)

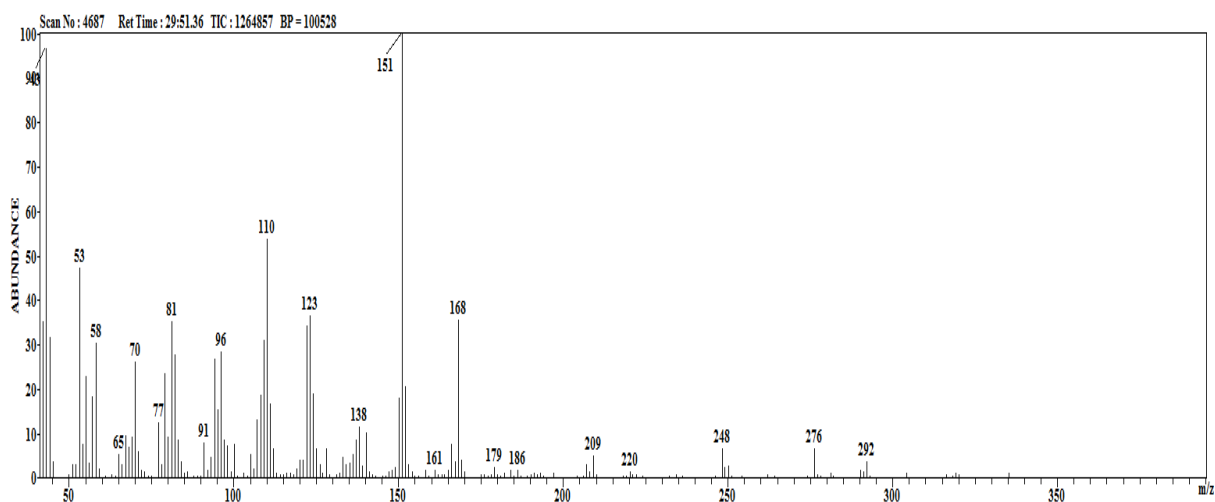


Figure III.8 Spectre GC-MS du pic de la déhydrosenkirkine à t_r 29,51 min, $[M]^+ 363$

Nous remarquons que les ions signatures des APs de type otonecine de m/z 168, 151, 150, 123, 122, 110, 96, 94 qui correspondent aux fragments de la partie nécine [214] sont présents sur le spectre GCMS. D'autre part les autres ions fragments qui correspondent aux modes d'attachement de la partie acide nécique 335, 319, 168, ont deux unités de masse moins que la senkirkine, et sont similaires aux fragments donnés par la littérature de la déhydrosenkirkine qui est dérivé de la senkirkine, l'ion $M^+ - 44$ qui correspond au pic de m/z 319 et l'ion $M^+ - 28$ c'est-à-dire la perte de CO correspond au pic de m/z 335 [218].

La séquence de fragmentation de la floridarine représente bien les alcaloïdes de type otonecines, on observe sur le **Schéma III. 7** les fragments caractéristiques m/z 168, 151, 150, 123, 122, 110, 96, 94 [215].

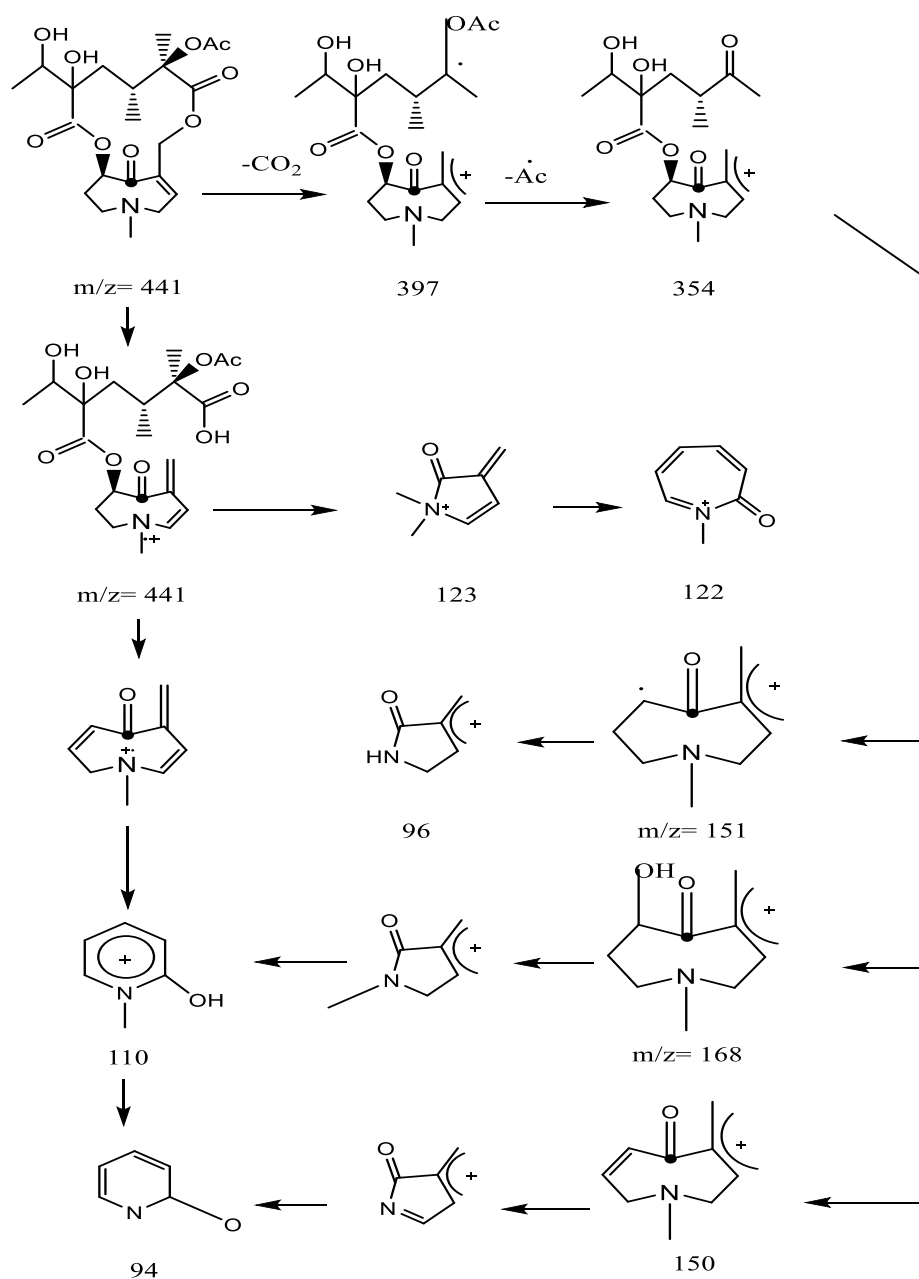


Schéma III. 7 fragmentation d'un alcaloïde de type otonecine la floridarine [215].

En effet on confirme notre interprétation en s'appuyant sur l'indice de rétention effectivement celui donné par la littérature est de 2516 [201] qui est proche de celui calculé (IRC) 2524 **tableau III. 1** le pic de masse n'apparaît pas mais la présence des pics 319 et 335 est largement suffisante pour les APs de ce type [218], on peut le déduire à deux unités de masse en moins de la Senkirkine m/z 365 c'est-à-dire à m/z 363. On peut conclure que le Spectre GC-MS du pic n°5 sur le chromatogramme ionique total de l'extrait des alcaloïdes qui sort à $t_R = 29.51$ min avec $[M]^+ = 363$ et $IR = 2524$ Correspond bien à la déhydrosenkirkine.

6. Néosenkirkine ($M^+ 365$)

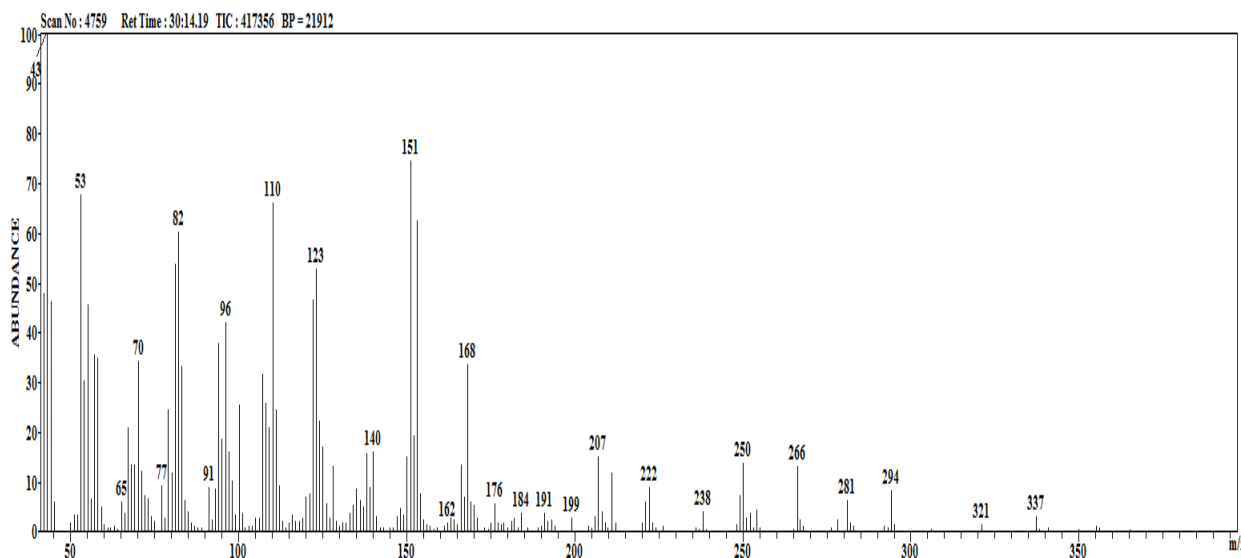


Figure III.9 Spectre GC-MS du pic de la néosenkirkine à t_R 30,14 min ($[M]^+ 365$).

Le pic moléculaire est à peine visible de m/z 365, Nous remarquons que les ions signatures des APs de type otonecine de m/z 168, 151, 150, 123, 122, 110, 96, 94 sont présents sur le spectre GCMS [214].

Les principales fragmentations qui suivent la fission de l'ester allylique sont présentes : l'ion $M^+ - 44$ qui correspond au pic de m/z 321. L'ion $M^+ - 15$ est également présent m/z 350. On note aussi la présence d'ions de m/z 337 qui correspond $M^+ - 28$ c'est-à-dire la perte de CO. Ces principales ions signatures des APs de type otonecine sont conformes à la littérature [220]. Par contre son indice de rétention calculé (IRC) 2554 **tableau III. 1** diffère de la senkirkine mais il est plutôt proche de l'indice de rétention donné par la

littérature de la néosenkirkine 2549 qui avec la senkirkine forment une paire de stéréoisomères géométriques Z/E [219]. En plus du pic de masse qui est égale à celui de la Senkirkine m/z 365.

La grande probabilité serait en faveur de la néonkirkine, qui a déjà été identifier dans le genre *Senecio* par GCMS, les différentes fragmentations sont identiques à ceux donnés par la littérature [201].

On peut conclure que le Spectre GC-MS du pic n°6 sur le chromatogramme ionique total de l'extrait des alcaloïdes qui sort à $t_r = 30.14$ min avec $[M]^+ = 365$ et $IR = 2554$ Correspond bien à la néoenkirkine.

En définitive, six APs ont pu être identifiés par leurs indices de rétention et leurs spectres de masse. Ils sont repris dans le tableau récapitulatif ci-après:

Tableau III.1: Les alcaloïdes pyrrolizidiniques identifiés dans les parties aériennes de *Senecio delphinifolius* Vahl récoltés en Algérie.

N°	Nom des APs Identifiés	t_r min	IRC	IRL	$[M]^+$ (m/z)	Fragments majeurs (m/z)
1	Sénécionine	26,97	2304	2296	335	80, 93, 109, 119, 120, 136, 220, 246, 248, 335
2	Sénéciophylline	27,11	2320	2312	333	80, 93, 109, 119, 120, 136, 246, 289, 333
3	Intégerrimine	27,46	2362	2355	335	80, 93, 109, 120, 136, 220, 248, 335
4	Senkirkine	29,20	2484	2477	365	82, 96, 122, 123, 140, 151, 168, 250, 266, 294
5	Déhydrosenkirkine	29,51	2524	2516	363	81, 96, 122, 123, 140, 151, 168, 220, 248, 276, 292
6	Néosenkirkine	30,14	2554	2549	365	82, 96, 122, 123, 140, 151, 153, 168, 222, 250, 266, 294
	t_r : temps de rétention ; IRC : indice de rétention calculé ; IRL : indice de rétention selon la littérature ; m/z : rapport masse/charge des ions, $[M]^+$: ion moléculaire.					

III. 2. 3. Interprétation générale des spectres GCMS:

Les APs sont caractérisés par des structures très similaires, souvent différant seulement par les chaînes latérales, les substitutions sur les nécines ou par la stéréochimie; les informations structurales pouvant être déduites à partir des similarités des spectres de masse avec des APs connus. D'après Witte et al (1993), des résultats établis dans différents laboratoires donnent une meilleure comparaison en analyse GCMS et c'est quasiment obligatoire pour l'identification, il est recommandé de standardiser les méthodes, en particulier, avec l'utilisation de phases stationnaires équivalentes et de l'IR à la place des temps de rétention absolus [194].

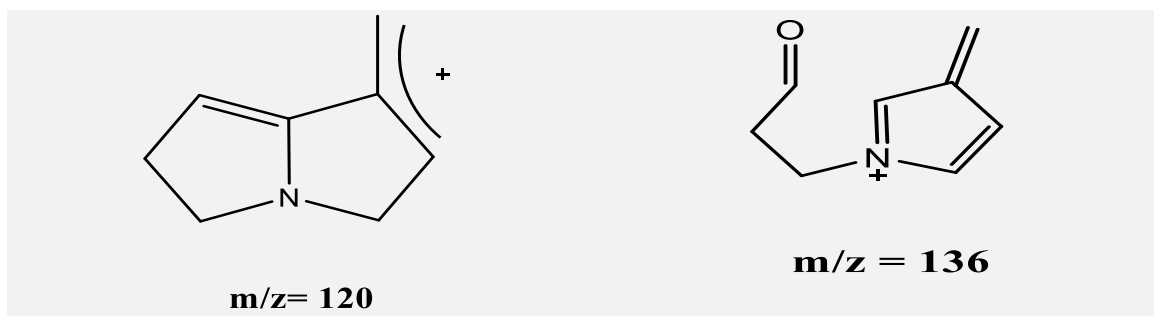
A l'issue de l'analyse par GC-MS, nous pouvons dégager des spectres ce qui suit:

- ✓ Tous les APs identifiés par GC-MS sont sortis de la colonne entre 26,97 et 30,14 minutes correspondant ainsi aux indices de rétention compris entre 2304 et 2554.
- ✓ Le chromatogramme ionique total (TIC) des extraits obtenus a été analysé en utilisant les indices de rétention (IR) et les fragments caractéristiques des APs en tant que paramètres indicatifs.

Deux types d'APs ont été identifiés dans *Senecio delphinifolius* Vahl, des APs de type- rétronécine et des APs de type- otonecine :

Les diesters pyrrolizidiniques insaturés de **type rétronécine** la sénécionine et ses dérivés, intégrimine et sénéciphylline donnent une "triade de triplets" avec des fragments à m/z : 93-95, 119-121 et 136-139.

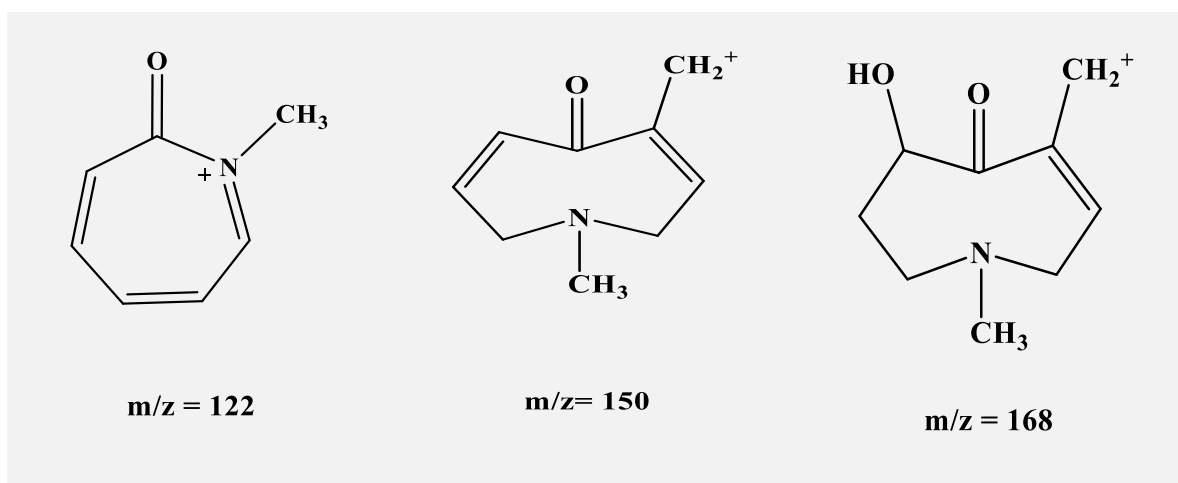
Type- Rétronécine :



Le pic de base caractéristique de la senecionine sort à m/z 136 (Figure III. 5). D'autre part le pic de base distinctif à m/z 120, correspondant à l'intégerrimine (Figure III. 6). Ces résultats sont conformes à la littérature [194, 201, 219].

Les APs de **type otonécine**, la senkirkine et ses dérivés, la néosenkirkine et le déhydrosenkirkine montrent des fragments d'ions caractéristiques à m/z 150- 151, 122, 168.

Type- Otonécine :



Ces fragmentations sont conformes à celles décrites dans la littérature. L'identification de chacun de ces APs a été facilitée non seulement par leurs IR respectifs mais aussi par leurs pics moléculaires respectifs $[\text{M}^+]$ (m/z) avec les fragmentations caractéristiques des APs macrocycliques insaturés [115, 219, 201].

III. 2. 4. Les structures des alcaloïdes pyrrolizidiniques identifiés par GCMS:

L'analyse GCMS a permis d'identifier deux diastèreoisomères de type retronecine: la senecionine (**1**) $[\text{M}^+]$, m/z 335, 136 (100%); et l'intégerrimine (**3**) $[\text{M}^+]$, m/z 335, 120 (100%). Ainsi que la paire de stéréoisomères géométriques *Z/E* de type otonécine a été identifié par analyse GCMS, la senkirkine (**4**) et la néosenkirkine (**6**) ont des spectres de masse similaires mais différent par leurs IR: **2304/2362**; **2484/2554** respectivement, nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Pelsler et al qui ont identifié ces alcaloïdes pyrrolizidiniques par analyse GCMS de *Senecio delphinifolius* Vahl récolté en Tunisie [201].

Les structures des différents APs identifiés sont les suivantes:

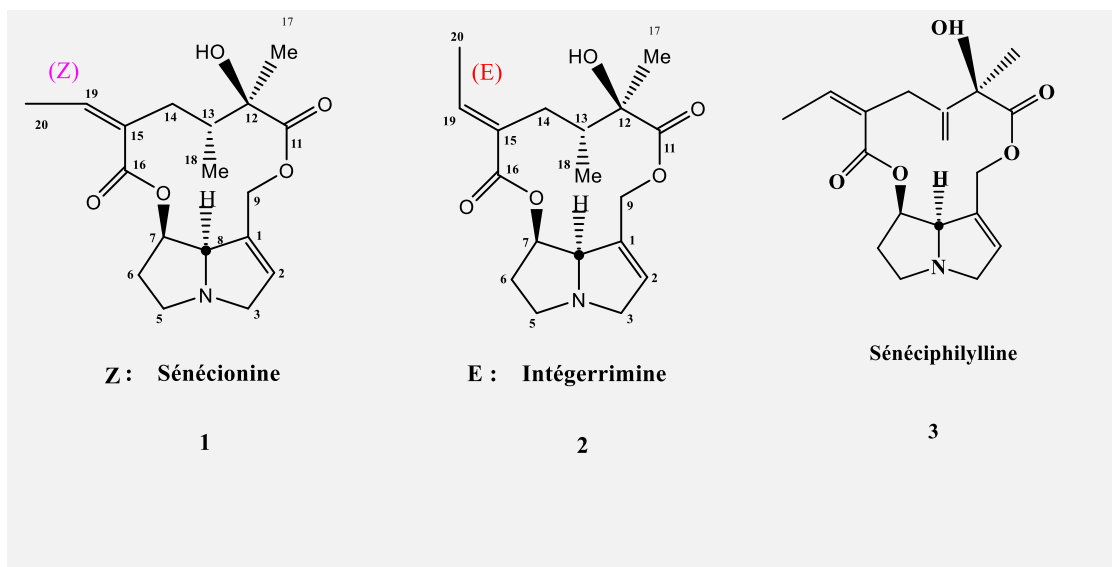


Figure III.10: Structures chimiques des différents APs *type rétronécine* identifiés par GC-MS dans les échantillons de *Senecio. delphinifolius* récoltés en Algérie.

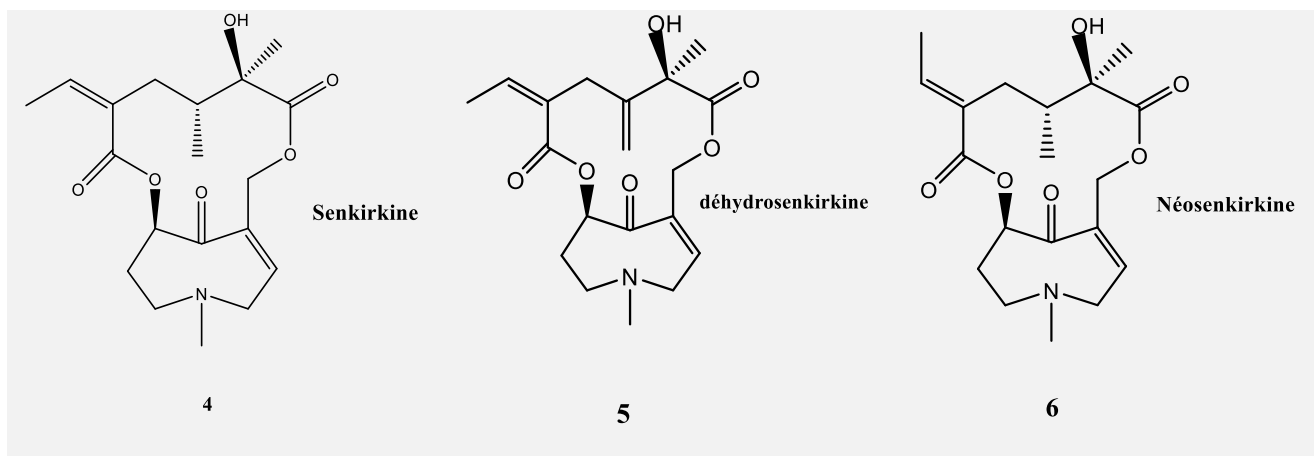


Figure III.11: Structures chimiques des différents APs *type otonécine* identifiés par GC-MS dans les échantillons de *Senecio delphinifolius* récoltés en Algérie.

III. 3. Analyse quantitative par GC-FID:

III. 3. 1. Quantification des APs dans *Senecio delphinifolius* et potentiel tumorigène et hépatotoxicité:

Le chromatogramme obtenu avec le détecteur FID a servi à la quantification des alcaloïdes pyrrolizidiniques **Tableau III. 2** nous donne les résultats de l'analyse de l'extrait des alcaloïdes pyrrolizidinique réduits.

Tableau III.2: Résultats de l'analyse quantitative de l'extrait des alcaloïdes pyrrolizidiniques réduit de *Senecio delphinifolius* Vahl déterminés par GC-FID :

	mg/ g	Aire du pic à doser	Quantité en µg	Pourcentage calculé	Littérature Pelsler et al
Pic 1: Sénécionine	0.016	82.3	4.3	12%	≥ 5%
Pic 2: Sénéciphylline	0.031	156.1	8.1	22%	≥ 5%
Pic 3: Intégerrimine	0.014	68.6	3.6	10%	Traces
Pic 4: Senkirkine	0.033	163.7	8.5	24%	≥ 25%
Pic 5: Déhydrosenkirkine	0.034	168.8	8.8	24%	≥ 25%
Pic 6: Néosenkirkine	0.011	57	3.0	8%	
SOMME	Σ= 0.140	Σ= 696.5	36.3	Σ=100%	–

III. 3. 2. Discussion des résultats:

Les parties aériennes de l'espèce *S. delphinifolius* Vahl ont montré la présence d'alcaloïdes pyrrolizidiniques à une concentration totale estimée à 140 ppm (calculé par rapport au standard héliotrine comme décrit par Watanabe et al [202]. L'analyse qualitative et quantitative de l'extrait des alcaloïdes montre que la dehydrosenkirkine et la senkirkine étaient les alcaloïdes les plus abondants (24% chacun), suivis par la seneciphylline (22%), sénécionine (12%), integerrimine (10%) et neosenkirkine (8%). Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par Pelsler et al [201], qui ont identifié ces six APs dans la poudre de la plante *S. delphinifolius* Vahl récolté en Tunisie et presque dans les mêmes proportions.

Il est intéressant de noter que toute plante contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques ayant une teneur en ces derniers supérieure à $1\mu\text{g/g}$ doit être bannis de l'utilisation en médecine traditionnelle comme c'est le cas en Allemagne et aux états unis [219].

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques n'ont pas une toxicité aiguë, mais peuvent le devenir après avoir subies une activation du métabolisme d'intoxication par les enzymes microsomiales (cytochrome P 450) au niveau du foie qui les transforment en dérivés pyrroliques (très réactives avec les nucléophiles cellulaires) [97, 221]. La réaction de ces dérivés pyrroliques avec l'ADN et les protéines peut générer des adduits à l'ADN, des adduits aux protéines et des pontages ADN - Protéines. C'est pour cela que la formation de ces dérivés pyrroliques (Chapitre I) a été considéré comme l'activation primaire de la génotoxicité et de la cancérogénicité des APs [97, 99]. Trois processus de métabolismes d'intoxication de différents types d'APs ont été étudiés in vitro et in vivo par Fu, P et al 2007 [222], traités avec une faible dose de Senkirkine génère des adduits de l'ADN formés dans le foie de rats. D'autres études menées par Xia, Q et al 2013 [223] ont démontré que la senkirkine est fortement impliquée dans la formation de tumeurs du foie. la mutagénicité de la sénécionine(1), seneciphylline (2), et senkirkine (4) de *S. typhimurium* TA 100 a été démontrée par pré-incubation de l'APs avec un mélange de bactéries dans un milieu liquide (Yamanata et al., 1979; Candrian et al., 1984) [224, 225]. Les alcaloïdes contenus dans une plante provoquant une hépatotoxicité devrait dépendre des types et de la quantité d'APs.

Dans notre étude, tous les alcaloïdes identifiés dans les parties aériennes de *Senecio. delphinifolius* Vahl ont des caractéristiques communes ce sont des diesters macrocycliques insaturés en positions 1,2 qui peuvent ainsi devenir hépatotoxiques, causant ainsi une génotoxicité qui peut se traduire par un cancer [221].

En plus, dans le classement de la toxicité des APs, ce sont les diesters macrocycliques qui sont les plus toxiques, suivis des diesters acycliques, eux-mêmes plus toxiques que les monoesters [221].

Ainsi, tout ce qui précède montre combien il faudrait faire attention avec l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl car elle renferme pas mal d'alcaloïdes tous toxiques et la bannir de l'utilisation en médecine traditionnelle.

III. 4. Détermination structurale des composés isolés de *Senecio delphinifolius* Vahl:

Les composés isolés ont été identifiés par les analyses spectroscopiques, particulièrement la RMN ^1H , la RMN ^{13}C , UV et par spectrométrie de masse.

III. 4. 1. Détermination structurale du composé FV₁:

Le composé FV₁ se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. En plus de la coloration violette noire sous la lampe UV, il réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde confirmée par les deux maxima à **257** et **359** nm du spectre d'absorption UV, après hydrolyse on observe une tache jaune après révélation caractéristiques des bandes I et II d'un flavonol [153].

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de 51 nm pour la bande I, avec une augmentation des intensités lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande dans le mêmes spectre indique la présence d'un OH libre en position 7.

L'addition de NaOAc provoque un déplacement bathochromique de la bande II par rapport au spectre MeOH confirmant ainsi la présence d'un OH libre en position 7.

Le déplacement bathochromique de la bande I de 35nm, observé lorsque le spectre UV est enregistré dans un milieu de AlCl_3 comparativement au spectre enregistré dans le $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$, atteste la présence du système ortho dihydroxy sur le noyau B. Ceci est confirmé par le déplacement bathochrome (23 nm) de la bande I dans le spectre NaOAc + H_3BO_3 par rapport au spectre MeOH.

On a réalisé l'hydrolyse acide pour avoir une idée sur la position du sucre et sa nature qui peut être étudié une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. Dans notre cas la coloration violette noire sous la lampe UV devient jaune après hydrolyse.

L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des échantillons authentiques, toutes ces données sont en accord avec celles rapportées par la littérature pour la quercétine substituée en position 3[149].

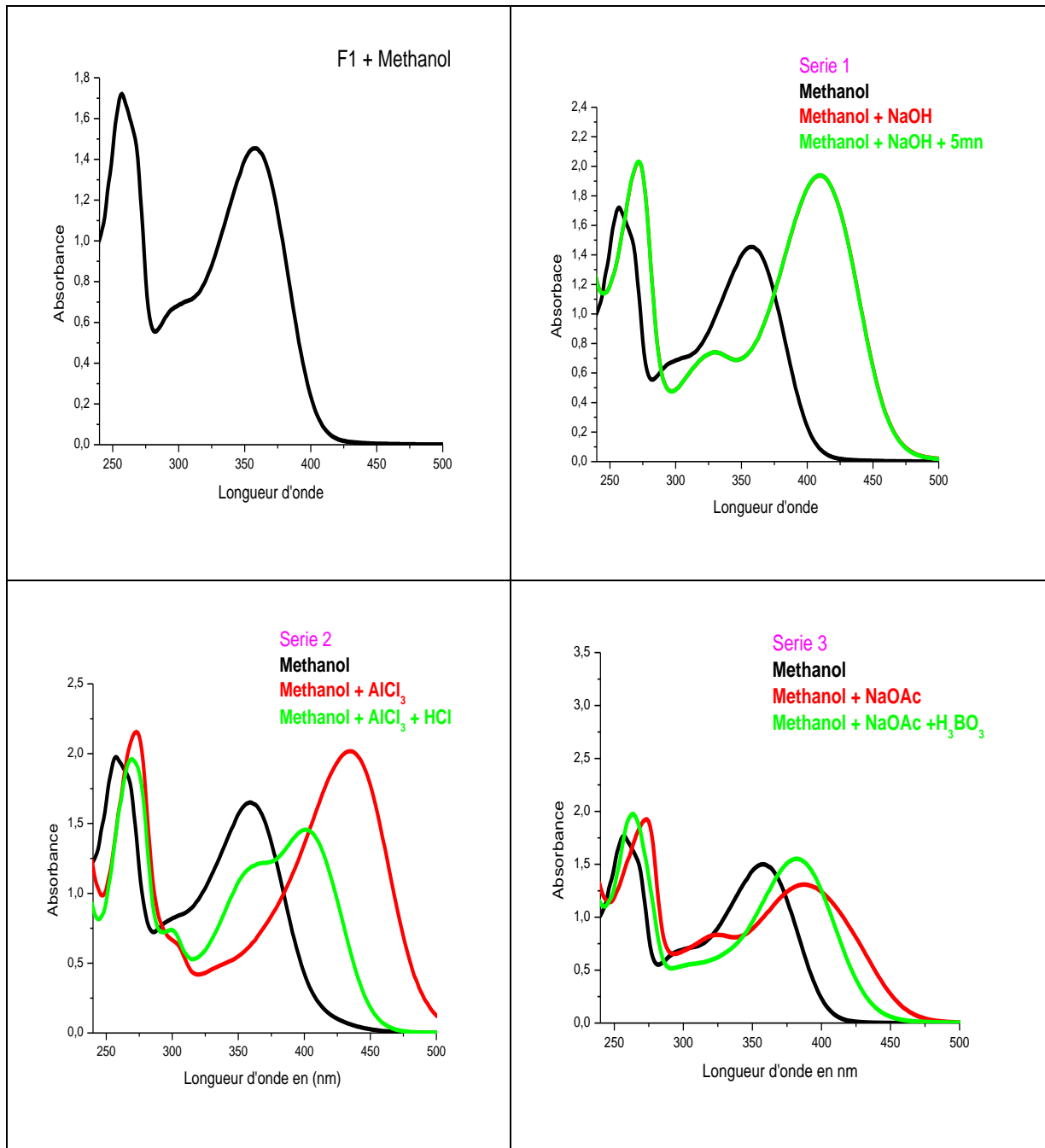
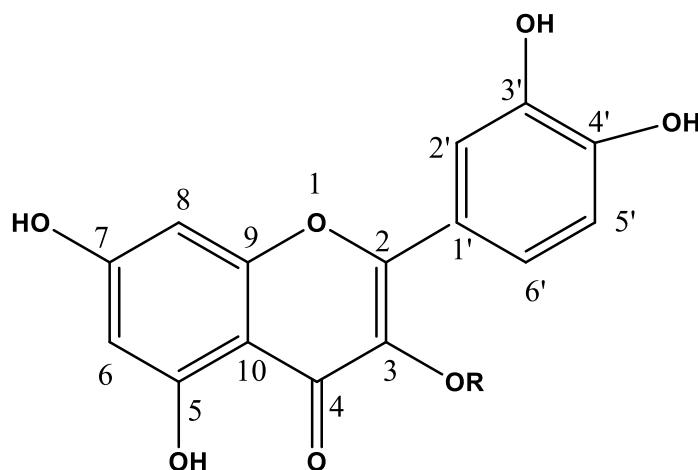


Figure III. 12 Spectres UV du composé FV1.

Tableau III. 3 Observation et interprétation des Spectres UV du composé FV1 seul, avec NaOH, AlCl₃, AlCl₃+HCl, NaOAc,NaOAc+H₃BO₃ dans le MeOH :

Réactif de déplacement	λ max (nm)				Interprétation
	Bande I	Autresbandes	Bande II	Déplacement (Δλ)	
F ₁ + MeOH	359	302	257	-	Flavonol (3-OR)
F ₁ + NaOH	410	330	272	+51 de la bande I Apparition d'une nouvelle bande	4'-OH 7- OH
F ₁ + AlCl ₃	435	300	273	+ 35 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ + HCl	o- diOH sur le noyau B
F ₁ + (AlCl ₃ + HCl)	401	299, 364	269	+42 de la bande I/ Au spectre MeOH	5-OH
F ₁ + NaOAc	388	326	273	Un déplacement bathochromique de la bande II de 16nm	7- OH
F ₁ + (NaOAc + H ₃ BO ₃)	382	-	263	+23 de la bande I	Orthodi-OH sur le noyau B



Allure de la structure proposée pour FV1.

- **Spectrométrie de masse:**

Le spectre en ESI montre un ion *quasi*-moléculaire [M-H] à m/z 609 suggérant une masse atomique de 610 uma (figure III. 13) en accord avec la formule brute $C_{27}H_{30}O_{16}$.

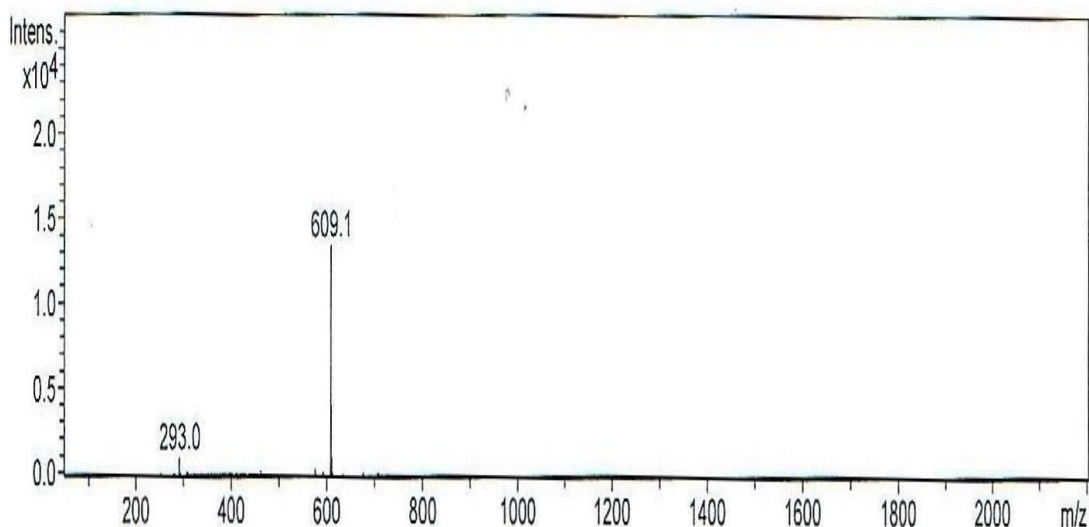


Figure III 13: Spectre de masse ESI-MS du composé FV1.

- **Spectrométrie de RMN:**

Le spectre de RMN- 1H Figure III. 14 du composé FV1 montre les cinq protons aromatiques caractéristiques de la quercétine [149]:

En effet, ses spectres RMN 1H (300 MHz dans le DMSO-d6), et l'étalement de l'RMN 1H (250 MHz) dans le DMSO-d6 Figure III. 16 présentent des signaux caractéristiques de protons aromatiques. Les protons H-8 et H-6 respectivement à δ 6,38 ppm (1H, d, $J = 2$ Hz) et à δ 6,2 ppm (1H, d, $J = 2$ Hz) couplent en système AX, caractéristique du cycle A des flavonoïdes.

Au niveau du cycle B, le signal du proton H-6' à δ 7,54 ppm, révélant le couplage en ortho avec le proton H-5' à δ 6,83 ppm, dont le signal est un doublet ($J = 9,0$ Hz) et le couplage en méta avec le proton H-2' à δ 7,53 ppm (d, $J = 2,4$ Hz).

L'analyse du spectre RMN- ^{13}C montre les signaux caractéristiques de la génine quercétine : le signal à δc 177.8.0 ppm du groupement carbonyle et les carbones des cycles aromatiques entre 100 et 170 ppm [229].

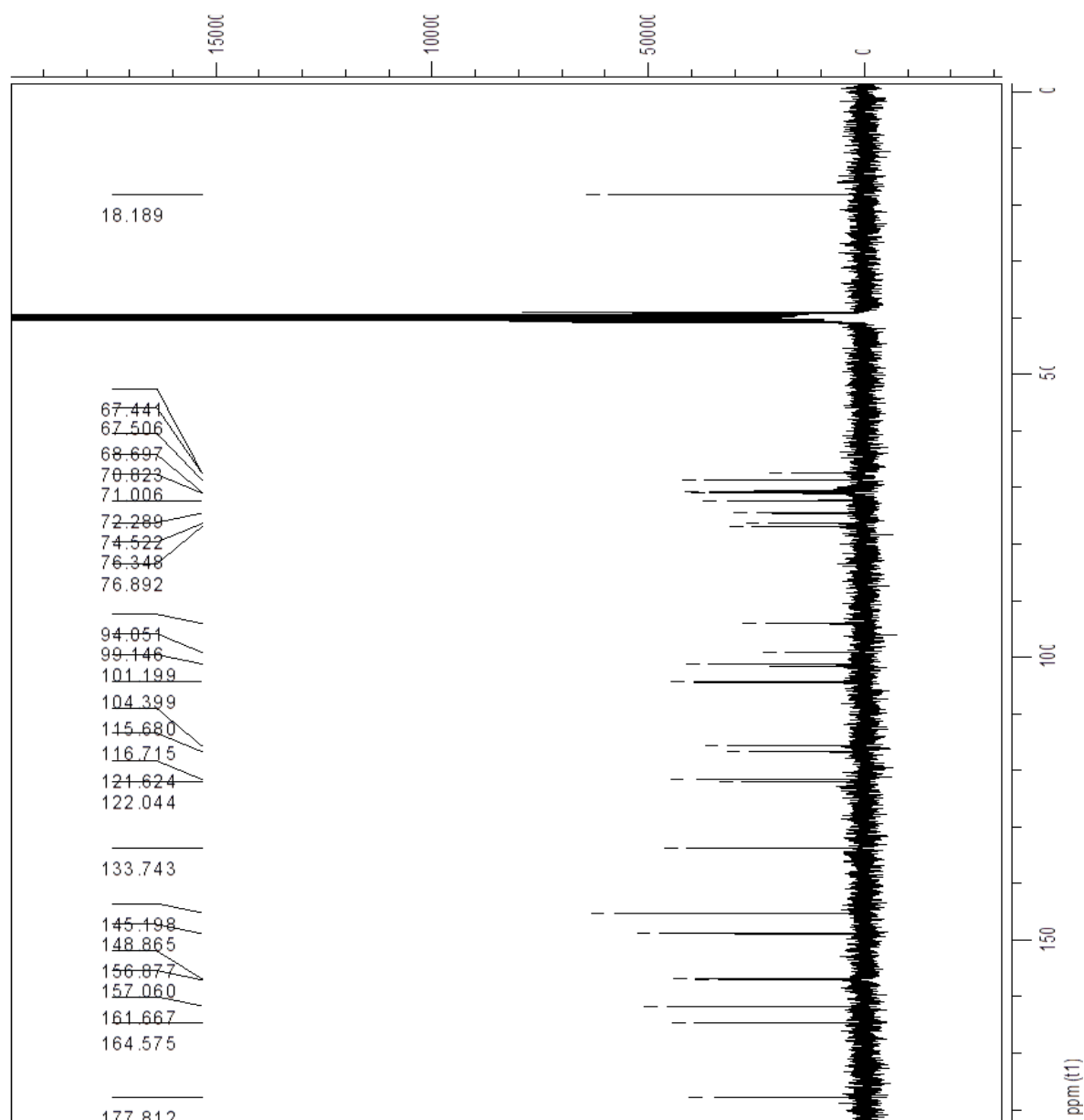


Figure III. 17 Spectre de RMN- ^{13}C (300 MHz) du composé FV1 dans DMSO- d_6 .

D'autre part, les données des spectres RMN ^1H et ^{13}C , **Tableau III. 4** indiquent que FV1 est un flavonoïde diglycosylés.

Sur le spectre RMN ^{13}C (75 MHz), le blindage du signal du carbone C-3 (δ 133,4 ppm) et le déblindage pour les carbones C-2 (δ 156,7 ppm) et C-4 (δ 177,4 ppm) montrent que C-3 est la position d'attachement des sucres à l'aglycone [229].

Les spectres HMQC et HSQC de FV1 nous indiquent que parmi les carbones qui ne correspondent pas à la génine, on a C-1''' à δ_{C} 101.2 et C-1'' à 102 ppm qui corrélient respectivement avec les protons anomériques H-1''' à δ_{H} 4.38 et H-1'' à δ_{H} 5.34 ppm à figure III. 18 et figure III. 19.

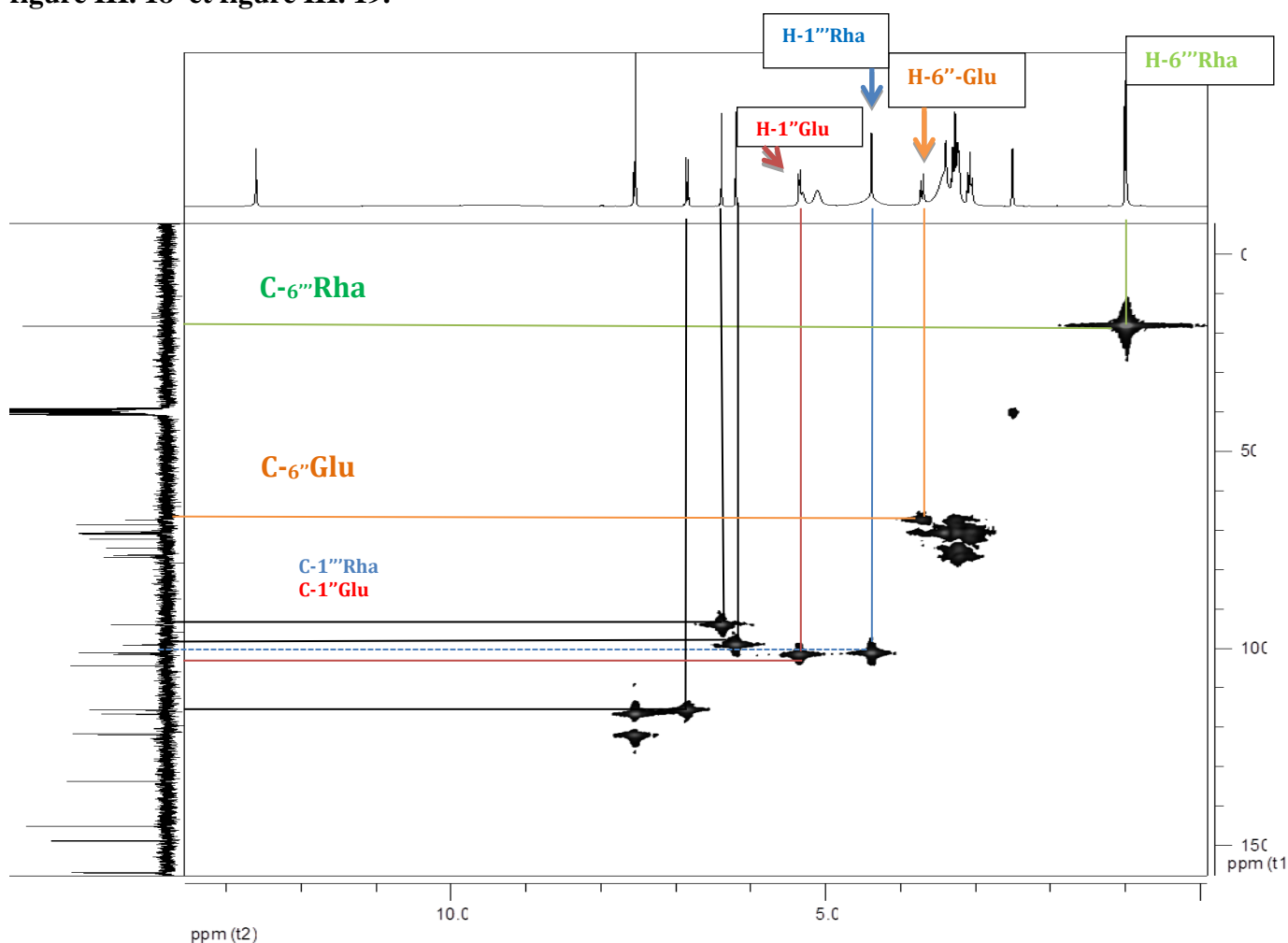


Figure III. 18 Spectre HMQC de FV1.

La valeur élevée de la constante de couplage observée pour le signal du proton anomérique d'un des sucres centré à δ 5,34 ppm (d, $J = 6.9$ Hz) suggère que ce sucre est sous

D'autre part, le déplacement en champ faible de C-6'' à 67.44 ppm indiquerait que le rhamnose est lié en position 6'' du glucose [226-228].

Par ailleurs, les corrélations HMBC observées entre les protons à δ H 4.38 ppm (H-1''') et le carbone situé à δ 67.44 ppm (C-6'') **Figure III. 21** ont permis de montrer que les deux sucres sont liés en 1_6 et d'identifier le diglycoside comme étant du rutinose (rhamnopyranosyl-(1_6)-glucopyranoside)

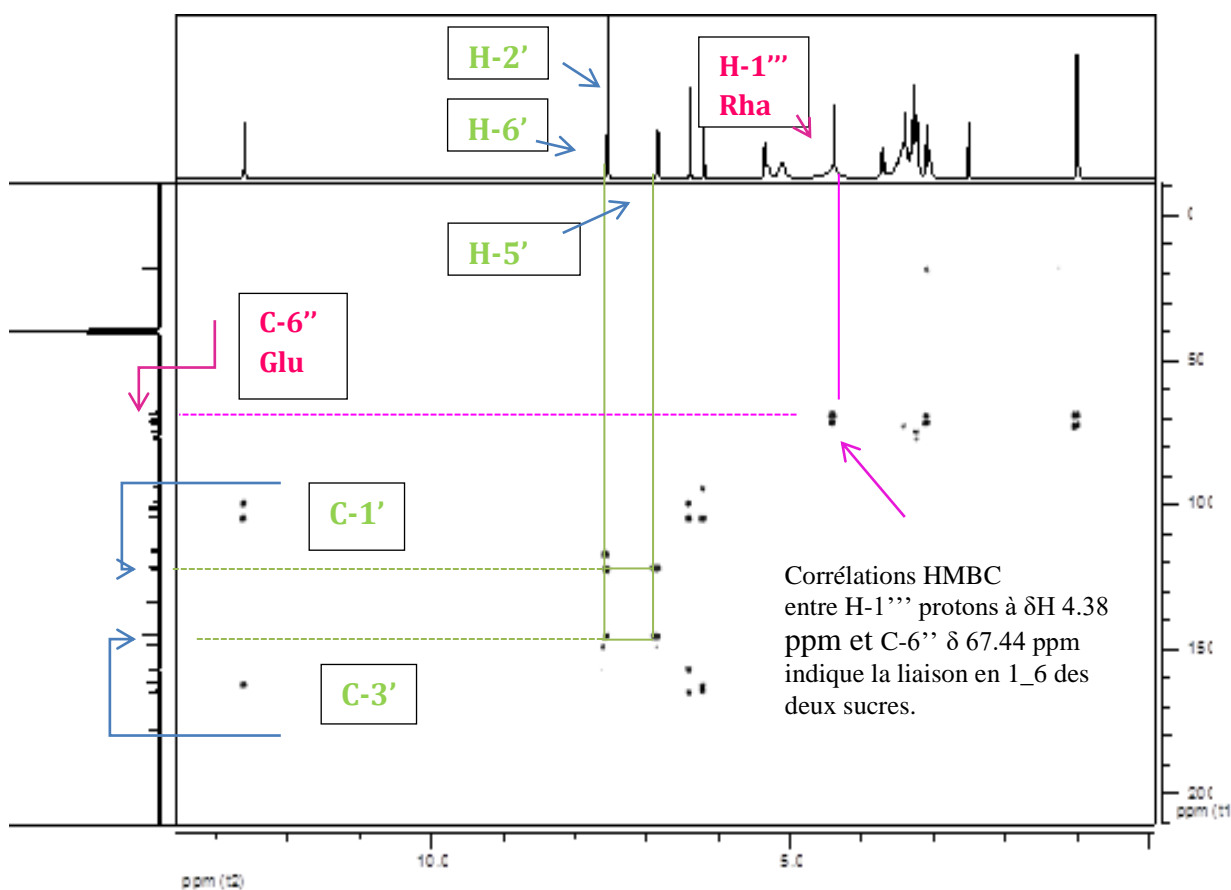


Figure III. 21 : Spectre HMBC du composé FV1

L'attribution des déplacements chimiques RMN ^{13}C et ^1H est favorisée par l'étude des spectres HSQC, HMQC puis confirmée par les corrélations lointaines apportées par le spectre HMBC.

Sur le spectre HSQC, on observe les corrélations H-6/C-6, H-8/C-8, H-2'/C-2', H-6'/C-6', H-5'/C-5' pour l'aglycone et H-1''/C-1'' et H-1'''/C-1''' pour la partie sucre.

En HMBC, on observe les cascades de corrélations suivantes : (H-1''') \rightarrow (C-6''), (H-2') \rightarrow (C-1') \rightarrow (C-3'), (H-5') \rightarrow (C-1') \rightarrow (C-3'), (H-8) \rightarrow (C-10) \rightarrow (C-9) \rightarrow (C-7), (H-6) \rightarrow (C-10) \rightarrow (C-5) \rightarrow (C-7). Il est difficile de déterminer exactement les déplacements chimiques de protons de sucres sur le spectre RMN ^1H parce qu'ils sont partiellement cachés par l'eau présente à 3.36 ppm dans le DMSO.

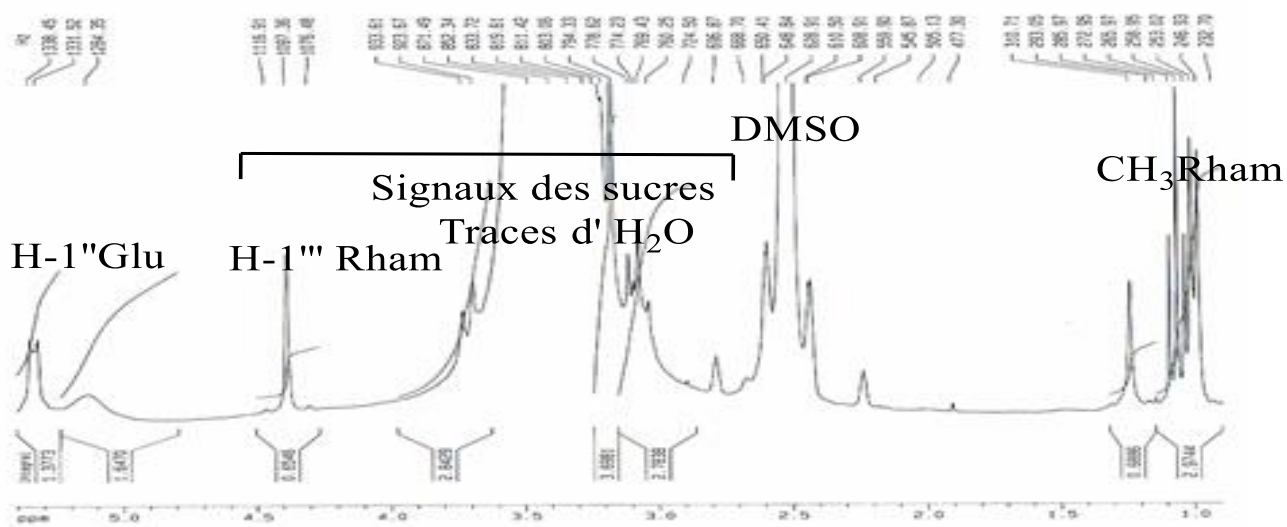


Figure III. 22 : Etalonnage du spectre RMN ^1H à 250 MHz.

Tableau III. 4 Données RMN ^1H et ^{13}C du composé FV1

Atome	^1H , d (ppm), m					^{13}C , d (ppm)		
	Littérature 300MHz	J(Hz)	Exp 300MHZ	J(Hz)	Exp 250 MHz	J(Hz)	Littérature 75 MHz	Exp 75 MHz
2							156.7	157
3							133.4	133.74
4							177.4	177.8
5							161.3	161.66
6	6,19 (d)	1,9	6.2	2			98.7	99.1
7							164.1	164.5
8	6.38(d)	1.9	6.38	2			93.7	94
9							156.5	156.8
10							104.0	104.3
1'							121.3	121.6
2'	7.52(d)	2.2	7.53				116.4	116.7
3'							144.8	145.1
4'							148.4	148.8
5'	6.83(d)	9	6.83	9			115.2	115.6
6'	7.53(dd)	9,0/2,2	7.54(dd)	9/2.4			121.7	122
1''	5.34(d)	7.1	5.34(d)		5.34 (d)	6.9	102.0	102.
2''	3.21(s)						74.9	74.5
3''	3.3						77.4	76.8
4''	3.31						70.5	70.8
5''	3.31						76.0	76.34
6''	3,7. 3.28(d)	9.8	3.7(d)				69.3	67.44
1'''	4.38(d)	1.1	4.38				101.6	101.1
2'''	3.28(d)						70.7	71
3'''	3.28(s)						70.5	70.8
4'''	3.08(s)		3.07				71.9	72.2
5'''	3.25(s)						68.4	68.6
6'''	0.98(d)		0.98(d)	6			17.3	18.1

Tous nos résultats sont rassemblés sur le **tableau III. 4** et sont conformes à la littérature [226]. Ces données permettent d'identifier la structure de FV1 à celle de la rutine (3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] quercétine) [153].

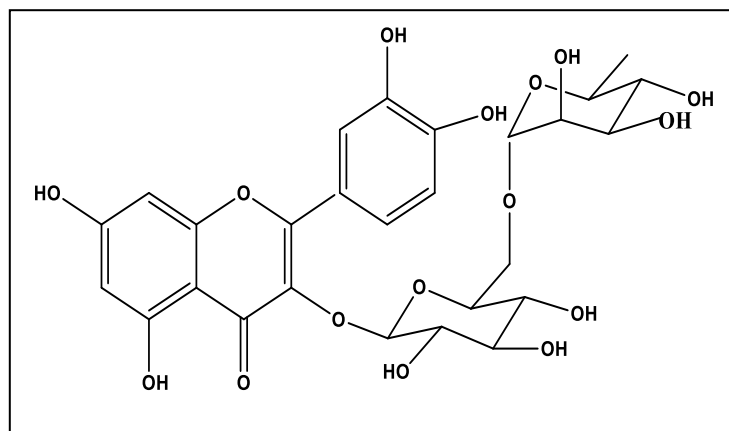


Figure III. 23 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl] quercétine.

Le composé **FV1** a donc été identifié comme étant la quercétine-3-O- β -rutinoside, aussi appelé rutine [230]. Cette molécule a été identifiée pour la première fois dans *Rutagraveolens* (d'où son nom) et est présente dans plus de trente familles de plantes principalement dicotylédones. Elle est également très connue pour ses nombreuses propriétés biologiques notamment antioedémateuse, anti-inflammatoire, anti-thrombotiques, anti-hypotensive, spasmolytique et antihémorragique [231].

III. 4. 2. Détermination structurale du composé FV2 :

Le spectre UV du composé FV 2 (Figure III. 24), enregistré dans le MeOH montre deux maxima à 344 et 265 nm relatifs respectivement à la bande I et II], en plus de la coloration violette noire sous la lampe UV (Chapitre II : matériel et méthode).

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de $\Delta\lambda = 40$ nm pour la bande I, avec une augmentation de son intensité lumineuse indiquant la présence d'un OH libre en position 4'.

L'absence d'une nouvelle bande dans ce même spectre à 325 nm révèle l'absence d'un OH libre en position 7.

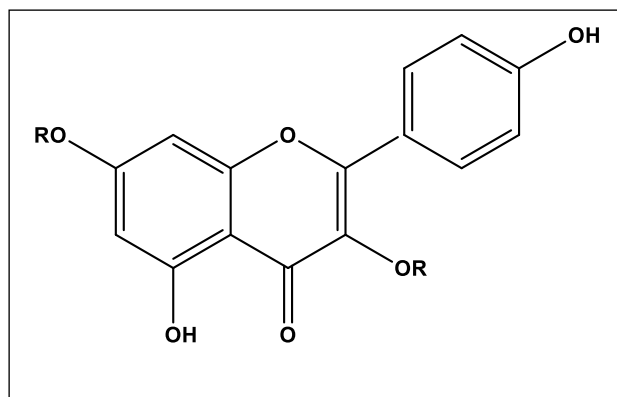
Par ailleurs, on ne remarque pas de déplacement bathochrome de la bande II de 12 nm, après addition de NaOAc comparativement au spectre enregistré dans le méthanol, ceci confirme l'absence d'un OH libre en position 7.

Le déplacement bathochrome de la bande I de 48 nm, observé après addition de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ comparativement à celui enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en 5.

L'absence d'un effet hypsochrome après addition de HCl au système ($\text{MeOH} + \text{AlCl}_3$) suggère l'absence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B.

Ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande I, après addition de H_3BO_3 au système ($\text{MeOH} + \text{NaOAc}$).

Ces données sont en accord avec celle du kaempferol disubstitués en position 3 et 7 [232].



Structure proposée pour FV2

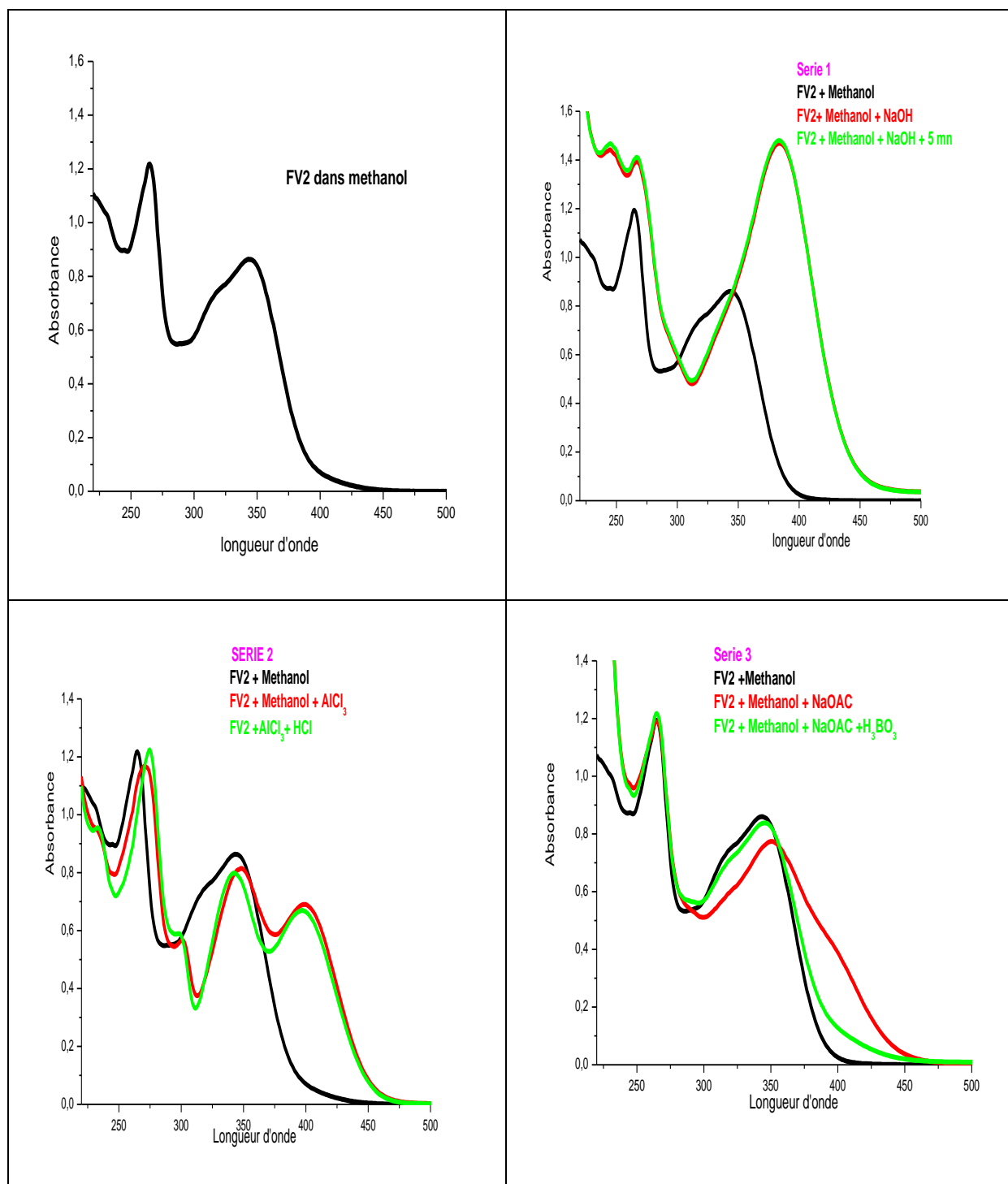


Figure III. 24 Spectre UV du composé FV2.

Tableau III. 5 : Observation et interprétation des spectres UV du composé FV₂ seul, avec NaOH, AlCl₃, AlCl₃+HCl, NaOAc, NaOAc+H₃BO₃ dans le MeOH, observation et interprétation.

Réactif de déplacement	λ max (nm)				Interprétation
	Bande I	Autres bandes	Bande II	Déplacement (Δλ)	
F ₂ + MeOH	344	322	265	-	Flavonol (3-OR)
F ₂ + NaOH	384	245	267	+ 40 de la bande I	OH libre en position 4'
F ₂ + AlCl ₃	400	348, 301	271		
F ₂ + (AlCl ₃ +HCl)	392	342, 298	275	+49 de la bande I /à celui du méthanol. l'absence d'effet hypsochrome après addition de HCl.	présence d'un OH libre en 5. l'absence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B.
F ₂ + NaOAc	351	-	265	pas de déplacement bathochrome de la bande II de 12 nm	absence d'un OH libre en position 7.
F ₂ + (NaOAc + H ₃ BO ₃)	345	-	265	l'absence d'effet bathochrome de la bande I/ NaOAc	l'absence d'un système 3',4'-dihydroxy sur le cycle B.

- Spectrométrie de masse:

Le spectre en ESI montre un ion *quasi*-moléculaire [M-H] à m/z 577 suggérant une masse atomique de 578 uma (figure III. 25) en accord avec la formule brute C₂₇H₃₀O₁₄.

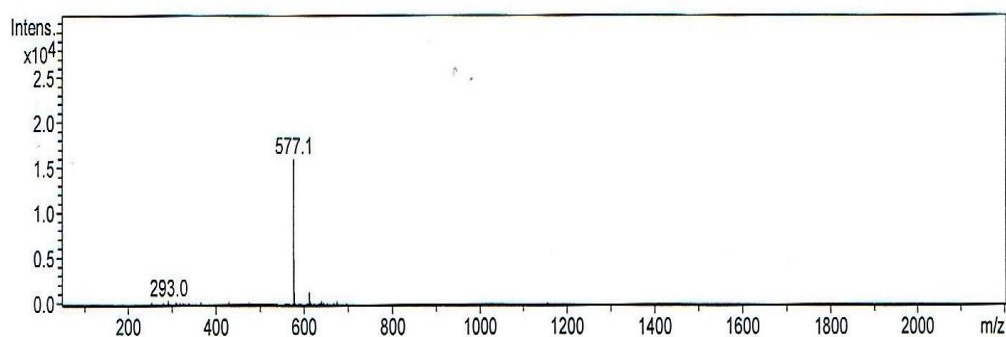


Figure III. 25: Spectre de masse ESI-MS du composé FV₂.

- Spectrométrie de RMN:

L'étude du spectre UV du composé FV₂ nous laisse prévoir un flavonoïde de type kaempferol disubstitués en position 3 et 7.

Sur le spectre RMN du proton enregistré dans le DMSO-*d*₆ de ce composé (**Figure III. 26**), on observe de nombreux pics entre $\delta_H = 6.3$ ppm et $\delta_H = 8.0$ ppm, ce qui laisse présager la présence de plusieurs noyaux aromatiques dans la molécule.

L'étude des signaux RMN-¹H de la zone correspondant aux protons de la génine a permis de mettre en évidence la présence de substituants en C-5 et C-7 sur le cycle A, grâce à l'identification d'un couplage méta des protons H-6 et H-8 du cycle A à $\delta_H 6.50$ ppm (d, J=2.14Hz) et $\delta_H=6.76$ ppm (d, J=2.14Hz).

D'autre part en RMN-¹H les signaux des protons H-6 et H-8 sont plus déplacés vers les champs faibles ceci montre que C-7 est la position d'attachement d'un sucre à l'aglycone [145].

Ces interprétations sont appuyées par le spectre UV du composé FV₂ qui indique l'absence d'un OH libre en position 7. Par contre on note sur le même spectre la présence d'un OH libre en position 5.

L'étude des signaux RMN-¹H (300 MHz) indique la présence de deux couples de doublets couplant en position ortho sur le noyau B à $\delta_H = 7.79$ (1H, d, J = 8.7 Hz) et 7.79 (1H, d, J = 8.7 Hz) attribués à H-2' et H-6' et à $\delta_H 6.92$ (1H, d, J = 8.7 Hz) et 6.92 (1H, d, J = 8.7 Hz) pour H-3' et H-5'. Ce système 2H AA', 2H XX' nous permet de placer le groupement hydroxyle en position 4' sur le cycle B.

Ces données de la spectrométrie RMN-¹H confirment quant à la présence de la génine kaempférol. Ceci est réaffirmé sur le spectre de RMN-¹³C du composé FV₂ qui a permis de mettre en évidence la présence des signaux caractéristiques.

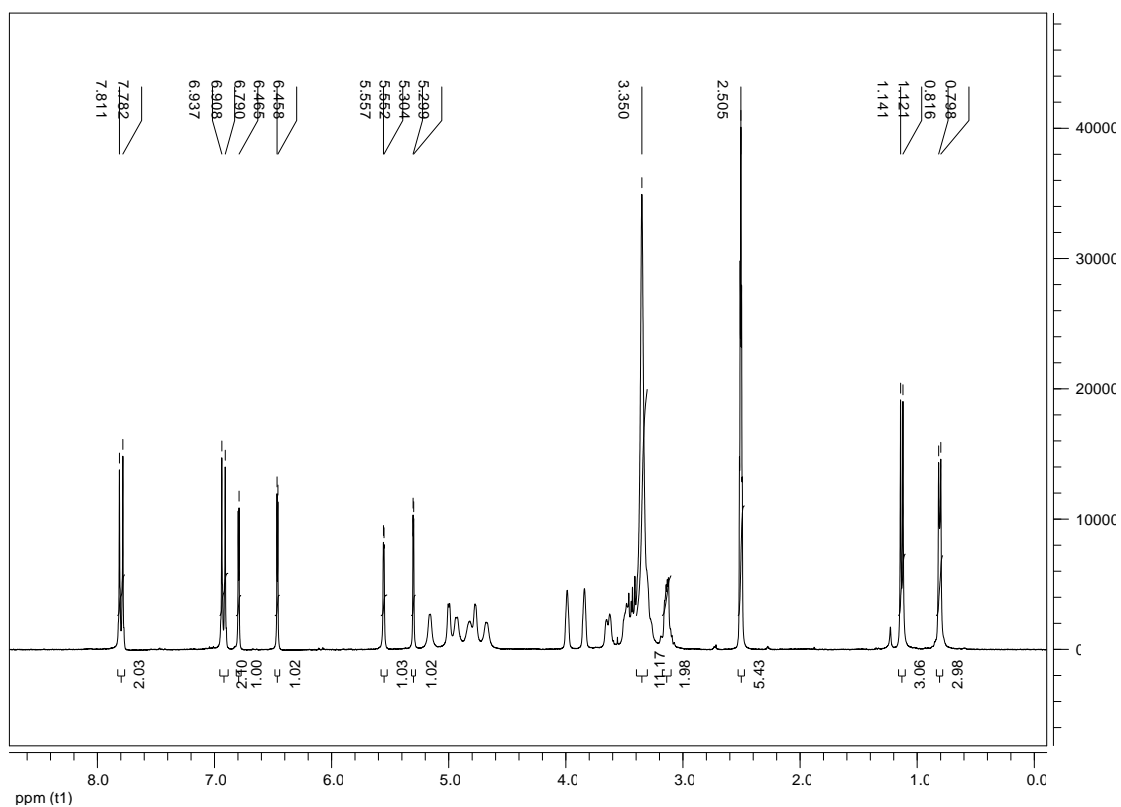


Figure III. 26 A Spectre de RMN-¹H (300 MHz) du composé FV2 dans DMSO-*d*₆.

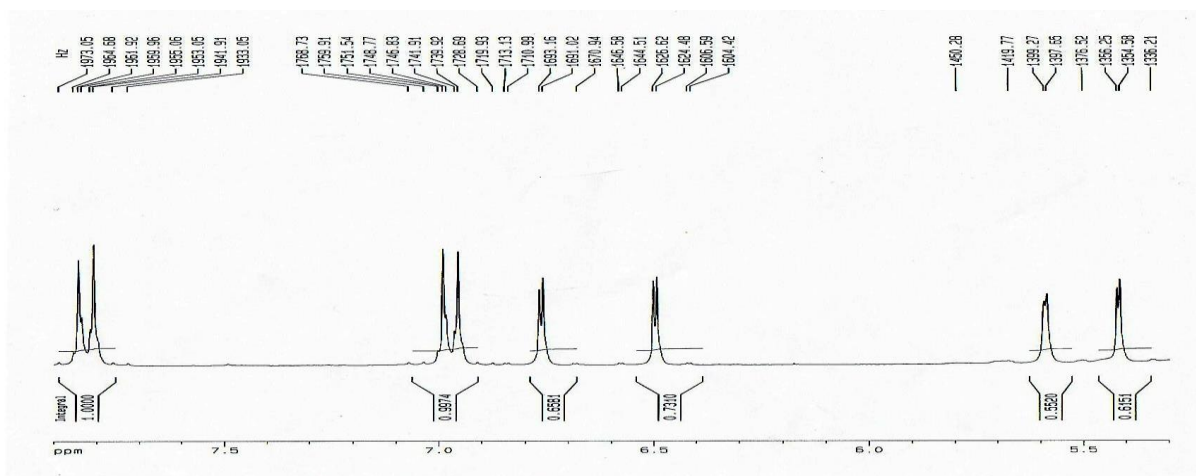


Figure III.26 B Etalement du spectre RMN ¹H à 250 MHz du composé FV2 dans CD₃OD.

En effet, les déplacements chimiques des signaux attribuables au cycle B de la génine (différents de ceux du composé FV_1) nous permettent d'indiquer la présence d'un carbone quaternaire aromatique (δC 120.76 ppm) correspondant au C-1', d'un carbone quaternaire aromatique portant un groupement hydroxyle (δC 160.68 ppm) correspondant au C-4' et de quatre CH aromatiques deux à deux superposés à δC 131.18 et 115.9 ppm. L'équivalence des signaux confirme que le groupement hydroxyle se situe en position 4' (Figure III. 27 Spectre de RMN- ^{13}C).

L'analyse du spectre RMN- ^{13}C montre les signaux caractéristiques de la génine kaempférol : le signal à δc 178.39 ppm du groupement carbonyle et les carbones des cycles aromatiques entre 100 et 170 ppm [226].

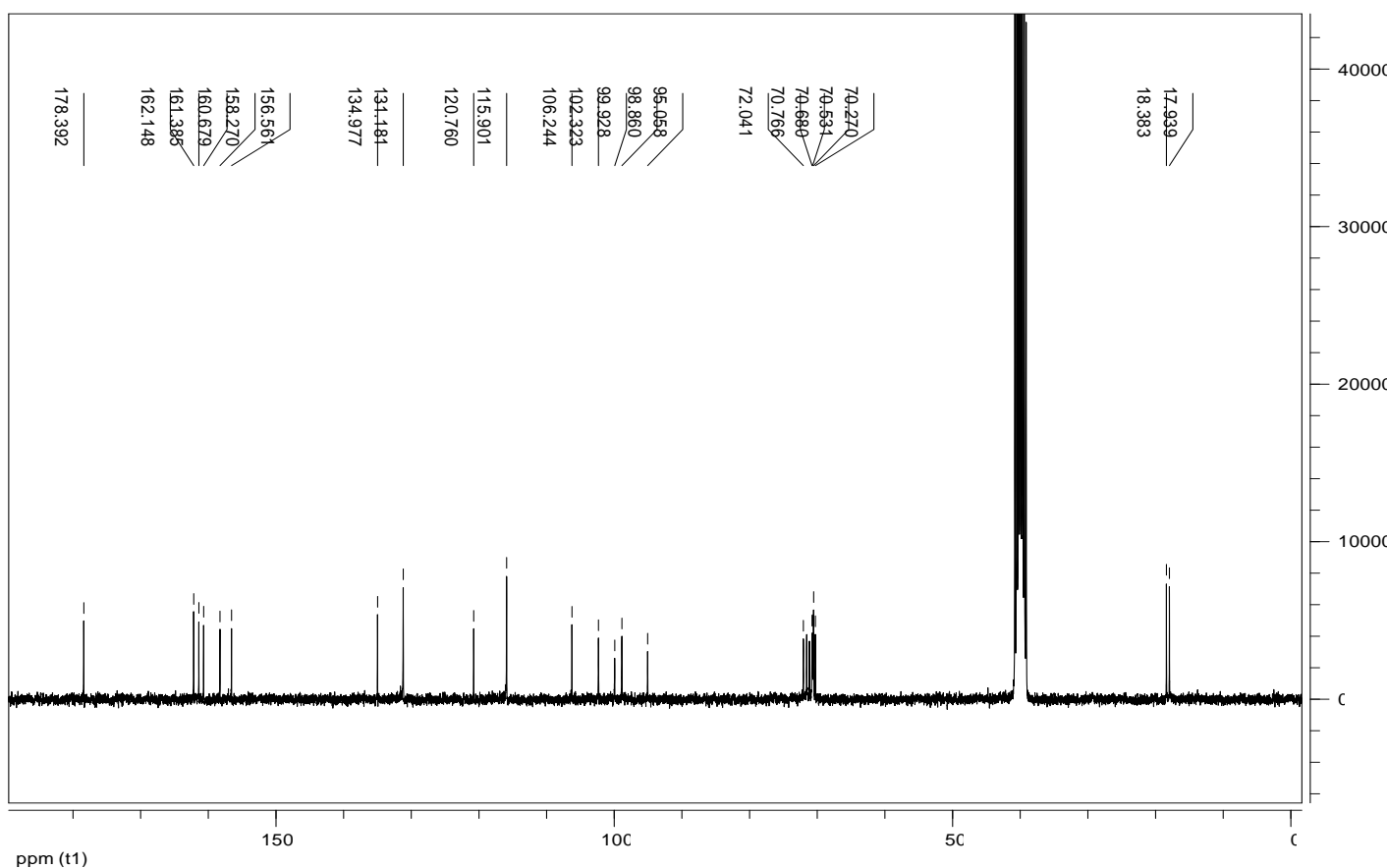


Figure III. 27 Spectre de RMN- ^{13}C (300 MHz) du composé FV_2 dans $DMSO-d_6$.

Tableau III. 6: Données RMN du composé FV2 [J en (Hz) et δ en (ppm)].

Position	RMN- ¹ H dans CD ₃ OD Litt	RMN- ¹ H dans DMSO Exp	Position	RMN- ¹³ C dans CD ₃ OD Litt	RMN- ¹³ C dans DMSO Exp
6	6.46 (d, J=1.8)	6.50 (d, J=2.14)	2	159	158.27
8	6.71 (d, J=1.8)	6.76 (d, J=2.14)	3	136.5	134.97
2'	7.79 (d, J=9.0)	7.79 (d, J = 8.8)	4	179.7	178.39
3'	6.95 (d, J=9.0)	6.9 (d, J = 8.7)	5	162.8	162.14
5'	6.95 (d, J=9.0)	6.9 (d, J = 8.7)	6	99.9	99.93
6'	7.79 (d, J=9.0)	7.79 (d, J = 8.8)	7	163.8	161.38
1''	5.58(s)	5.30 (d, J= 1.5)	8	95.6	95.058
2''	4.05(s)	4.25(m)	9	158.0	156
3''	3.86 (dd, J=3.0, 9.5)	4.02(m)	10	107.6	106.24
4''	3.51 (dd, J=9.5, 10.0)	3.84(m)	1'	122.4	120.76
5''	3.62 (dd, J=4.5, 10.5)	3.88(m)	2'	132.0	131.18
6''	1.29 (d, J=6.0)	0.8 (d, J=6.0)	3'	116.6	115.9
1'''	5.41(s)	5.55 (d, J=1.5)	4'	161.7	160.68
2'''	4.25(s)		5'	116.6	115.9
3'''	3.75 (dd, J=8.5, 3.0)		6'	132.0	131.18
4'''	3.33(m)		1''	100.5	102.32
5'''	3.37(m)		2''	71.3	70.27
6'''	0.96 (d, J=5)	1.13(d, J=6.0)	3''	72.1	70.76
			4''	73.6	72
			5''	71.9	70.68
			6''	17.7	18.38
			1'''	103.5	98.86
			2'''	71.7	70.53
			3'''	72.1	70.76
			4'''	73.2	72.04
			5'''	72.1	70.76
			6'''	18.1	17.94

- Les signaux caractéristiques des deux rhamnopyranosides :

les signaux des groupements méthyles (H-6'', H-6''') formant deux doublets respectivement à $\delta_{\text{H}} = 0.8$ ppm (d, $J = 6.0$ Hz), $\delta_{\text{H}} = 1.13$ ppm (d, $J = 6.0$ Hz), les protons anomériques sont observables à $\delta_{\text{H}} = 5.30$ ppm et à $\delta_{\text{H}} = 5.55$ ppm, formant deux doublets de constante de couplage $J = 1.5$ Hz attestant de la configuration α de la liaison anomérique pour les deux sucres en position C-3 et C-7 et indiquent que ce sont deux rhamnosides. Ces interprétations sont appuyées par les données de l'hydrolyse acide, confirmant ainsi la présence de deux rhamnosides par co-chromatographie avec des sucres témoins.

Il est difficile de déterminer exactement les déplacements chimiques de protons de sucres sur le spectre RMN ^1H 300 MHz dans le DMSO. L'étude des signaux RMN- ^1H (250 MHz dans CD_3OD) de FV2 permet d'observer deux multiplets à $\delta_{\text{H}} 4.25$ et 4.02 ppm (respectivement H-2'' et H-3'') et deux signaux formant des doublets dédoublés à $\delta_{\text{H}} 3.84$ ppm (dd, $J = 10$ Hz, $J = 3.39$ Hz) pour H-4'' et 3.88 ppm (dd, $J = 10$ Hz, $J = 3.39$ Hz) pour H-5''.

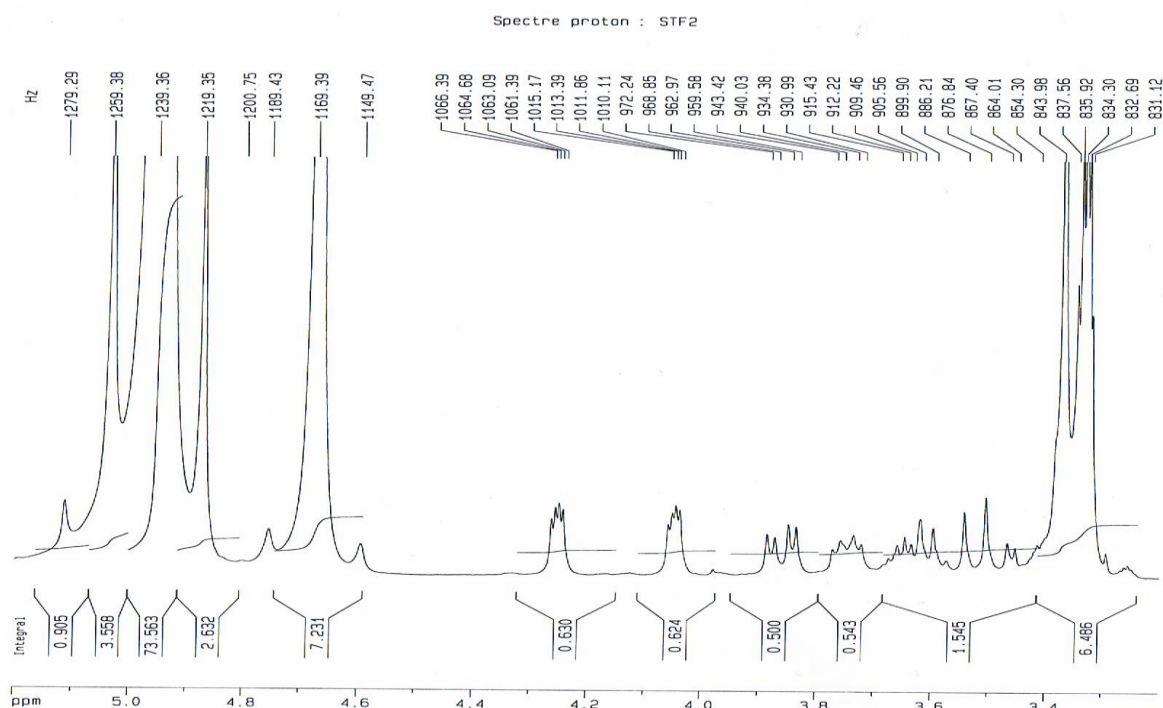


Figure III. 28 signaux RMN- ^1H (250 MHz dans CD_3OD) de FV2.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations hétéronucléaires HSQC et HMBC et par comparaison avec des données de la littérature [233].

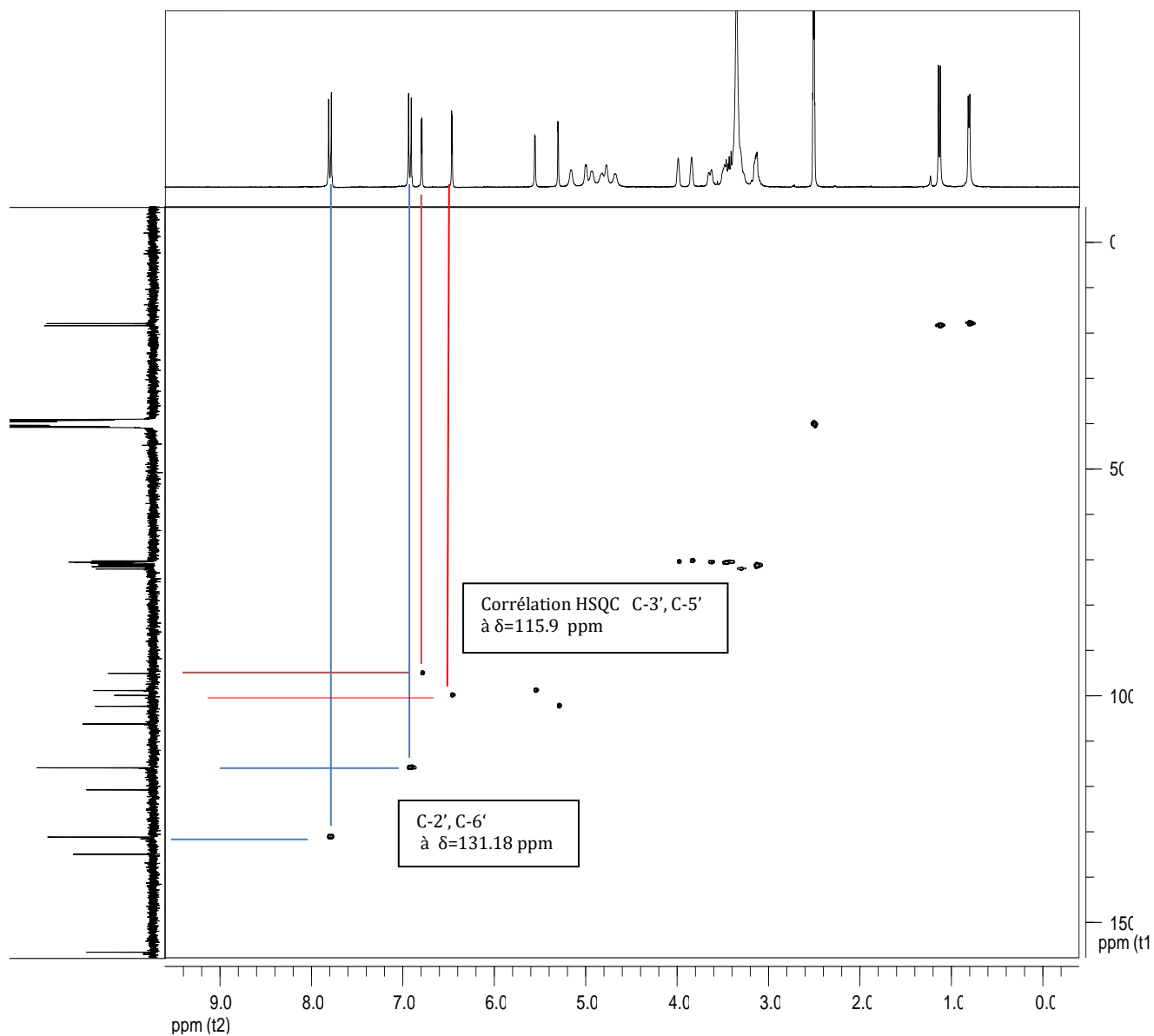


Figure III. 29 Spectre HSQC de FV2.

Le spectre HMBC a, en outre, permis de situer la liaison des sucres sur la génine en montrant clairement le couplage du proton anomérique du **rhamnose** (H-1'') avec le carbone C-3 et du proton anomérique du **rhamnose** (H-1''') avec le carbone C-7 de la génine.

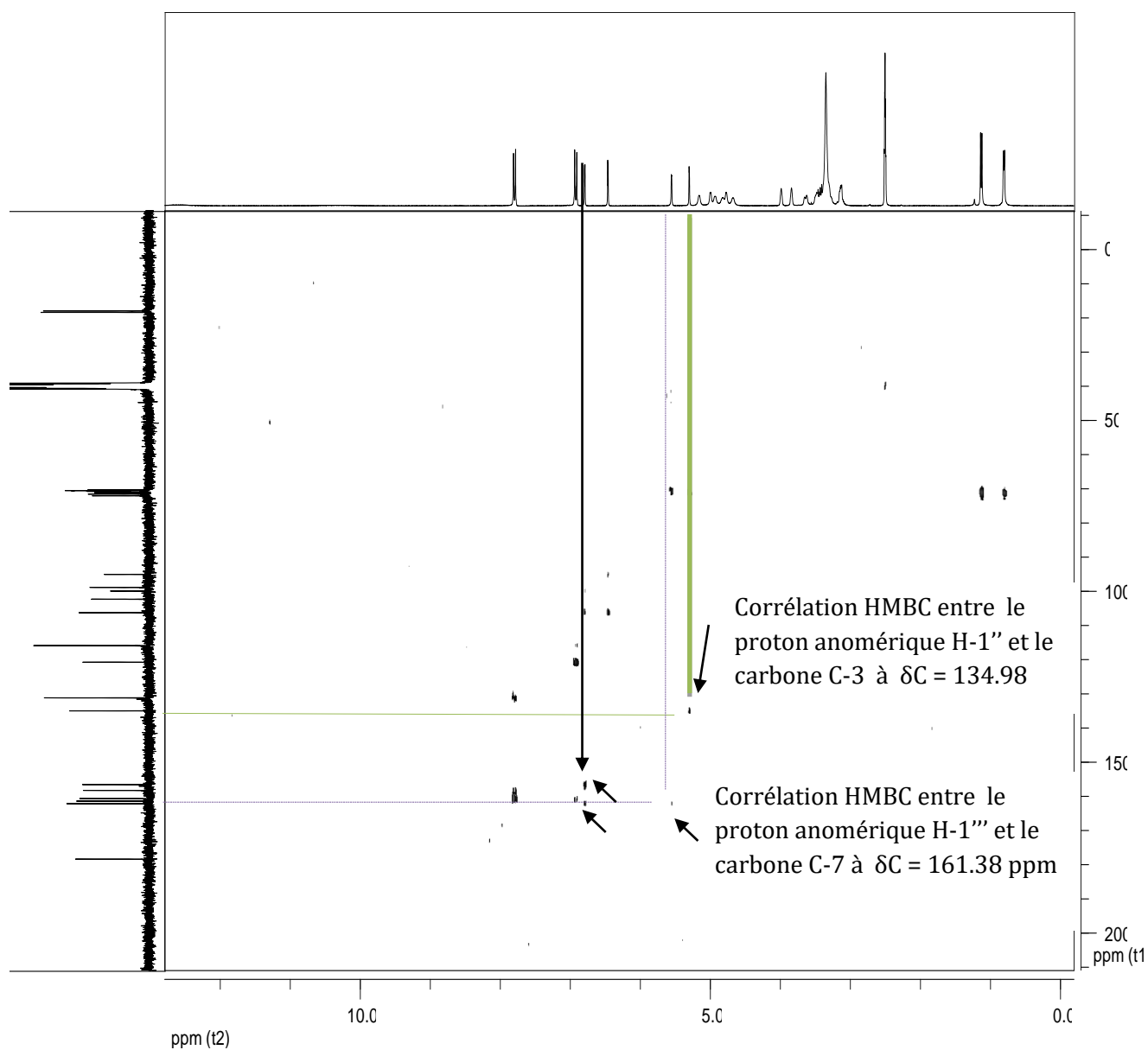


Figure III. 30 Spectre HMBC de FV2.

Les données de FV_2 sont similaires à ceux rapportés pour le kaempferol 3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside (kaempferitrin). Le kaempferitrin possède des propriétés antibactériennes et antioxydantes potentiels et des effets insulinomimétiques [232-236], cette molécule a déjà été isolée de *Lotuscorniculatus*, *lotus lalambensisk* et de *Bauhinia forficata* [232, 234, 235].

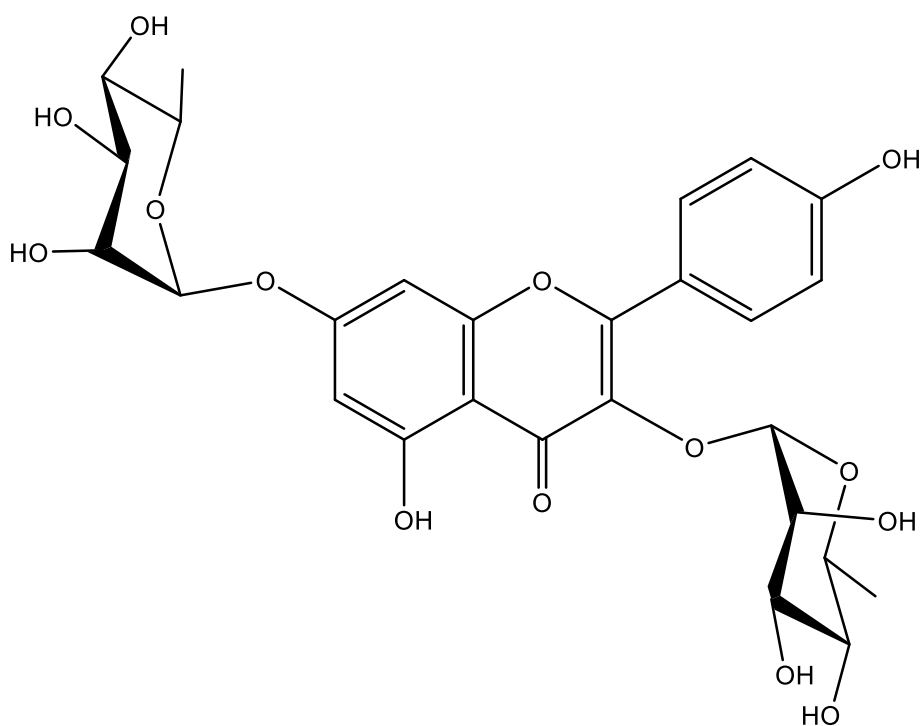


Figure III. 31 Kaempferol 3, 7-di-O- α -L-rhamnopyranoside (Kaempferitrin).

III. 4. 3. Détermination structurale du composé A:

- Spectrométrie de RMN:

L'analyse du spectre RMN ^1H (**Figure III. 32**) montre deux signaux correspondants à des protons éthyléniques d'un cycle aromatique substitué. Deux doublets d'intégration 2 H chacun, le premier à $\delta = 6.962$ ppm ($J = 8.5$ Hz) indicateur d'un couplage ortho et le second à $\delta = 6.212$ ppm ($J = 8.5$ Hz) indicateur d'un couplage ortho correspondant respectivement aux protons vinyliques H-3, H-5 et H-2, H-6.

L'étude des signaux RMN- ^1H a permis de mettre en évidence la présence un singulet d'intensité 3H à $\delta = 3.774$ ppm, caractéristique des 3 protons du groupement méthoxyle. On note également la présence d'un singulet d'intensité 3H à $\delta = 1.267$ ppm caractéristique des 3 protons du groupement méthyle. D'autre part, Un groupement méthylène sous forme d'un singulet d'intensité 2H à $\delta = 2.714$ ppm attribuable au proton H-7.

L'ensemble de ces données est reporté dans le **Tableau III. 7** ci-dessous:

Tableau III. 7 Données RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 du produit A.

Position	δ (ppm), m, J (Hz) A (Exp)	Litt (203)	Intégration
1	-	-	-
2	6.212, d,	6.18	1H
3	6.962, d,	6.94	1H
4	-	-	-
5	6.962, d,	6.94	1H
6	6.212, d,	6.18	1H
7	2.714, s.	2.69	2H
8	-	-	-
OCH₃	3.774, s.	3.69	3H
CH₃	1.267, s.	-	3H

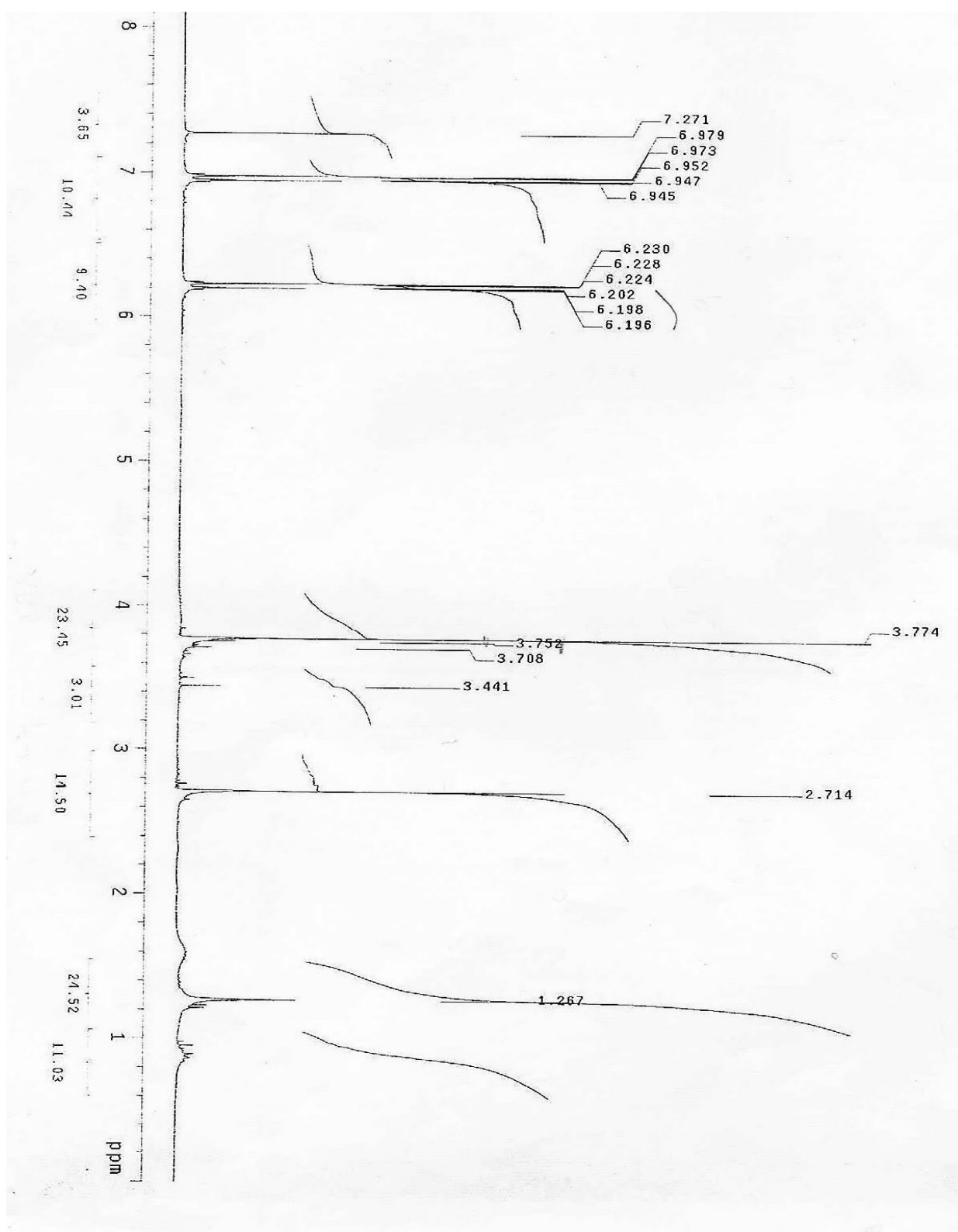


Figure III. 32 Spectre RMN ^1H du composé A

Le spectre RMN¹³C (Figure III. 33) présente les signaux suivants:

- Deux correspondent aux deux groupements carbonyles résonnant à $\delta=184.75$ et $\delta=171.27$ ppm.
- Un signal à $\delta=52.23$ ppm caractéristique du carbone du groupement méthoxyle.
- Un signal à $\delta=29.655$ ppm caractéristique du carbone du groupement méthyle.
- Deux signaux à $\delta=148.64$ ppm, et à $\delta=128.32$ ppm correspondant respectivement aux carbones vinyliques C-3, C-5 et C-2, C-6.
- à $\delta=67.32$ ppm sort le signal correspondant au C-4
- et à $\delta=43.26$ ppm sort le signal correspondant au C-7.

Tableau III. 8 Données RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃ du produit A.

	Produit (A)	Litt (203) jacaranone
1	184.75	184,8
2	128.32	128.4
3	148.64	148.7
4	67.32	67.4
5	148.64	148.7
6	128.32	128.4
7	43.26	43.405
8	171.27	171.421
OCH3	52.23	52.511
CH3	29.655	-

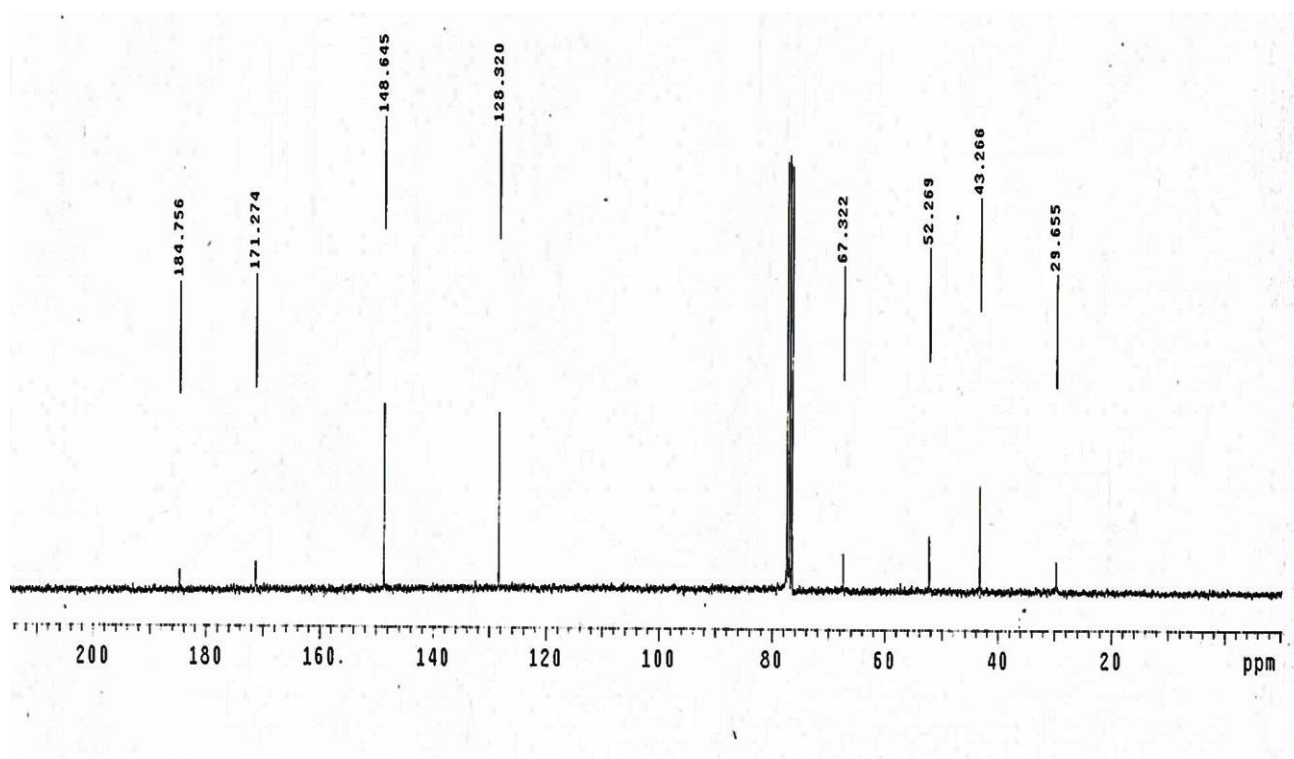


Figure III. 33 : Spectre RMN ^{-13}C (75.4 MHz, CDCl_3) du composé A.

L'ensemble de ces données comparées aux résultats de la littérature [203], mène à la structure suivante :

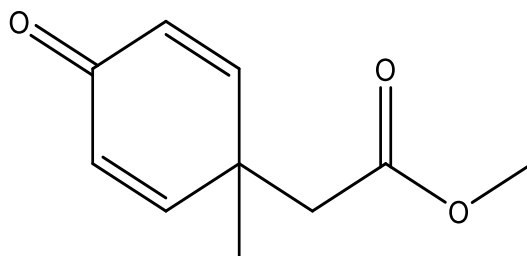


Figure III. 34: methyl 2-(1-methyl-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-yl)acetate.

III. 5 : Evaluation des propriétés biologiques de *Senecio delphinifolius* Vahl

5. 1 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits obtenus après épuisements successifs de la poudre des feuilles et des fleurs, des branches et tiges et des racines de *Senecio delphinifolius* Vahl a été évaluée sur 3 souches de bactéries par les méthodes de microdilution. Les extraits ayant une CMI; de 500 à 1000 µg/ml l'activité était considérée faible ; au-delà de 1000 µg/ml l'extrait était considéré inactif [237].

Étant donné que certaines espèces *senecio* sont traditionnellement utilisés contre les maladies infectieuses [28], les extraits du *S. delphinifolius* Vahl au n-hexane, dichlorométhane et n-butanol ont été étudiés pour leur activité contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*gram* +), *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

L'extrait n-butanol a montré un faible effet contre *E. Coli*, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 1 mg/ ml, mais est resté inactif contre les autres micro-organismes (CMI> 2 mg / ml).

Ces résultats suggèrent que ces extraits ne sont probablement pas favorables pour la recherche de composés antibactériens.

5. 2. Activité antioxydante

Dans l'évaluation des propriétés antioxydantes par un test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de l'espèce *S. delphinifolius*, les extraits au n-hexane et au dichlorométhane de chaque partie de la plante étaient pratiquement inactives (IC₅₀> 500 µg / ml), tandis que les extraits n-butanol ont montré un effet de balayage modeste avec des valeurs IC₅₀ de 55,3, 50,2 et 13,3 µg / ml (0,02, 0,03 et 0,10 équivalent quercétine) pour les racines, les tiges et les feuilles et fleurs, respectivement .

Tableau III. 9 : Evaluation des propriétés antioxydantes des différents extraits n-butanol par un test au DPPH.

Les extraits n-butanol	IC ₅₀ (µg / ml)	Equivalent Quercétine IC ₅₀ Quercétine / IC ₅₀ extraits
Racines	55.3 ± 6.9	0.02
Branches et tiges	50.2 ± 2.3	0.03
Feuilles et fleurs	13.3 ± 2.3	0.10
Quercétine	1.31 ± 0.03	1.00

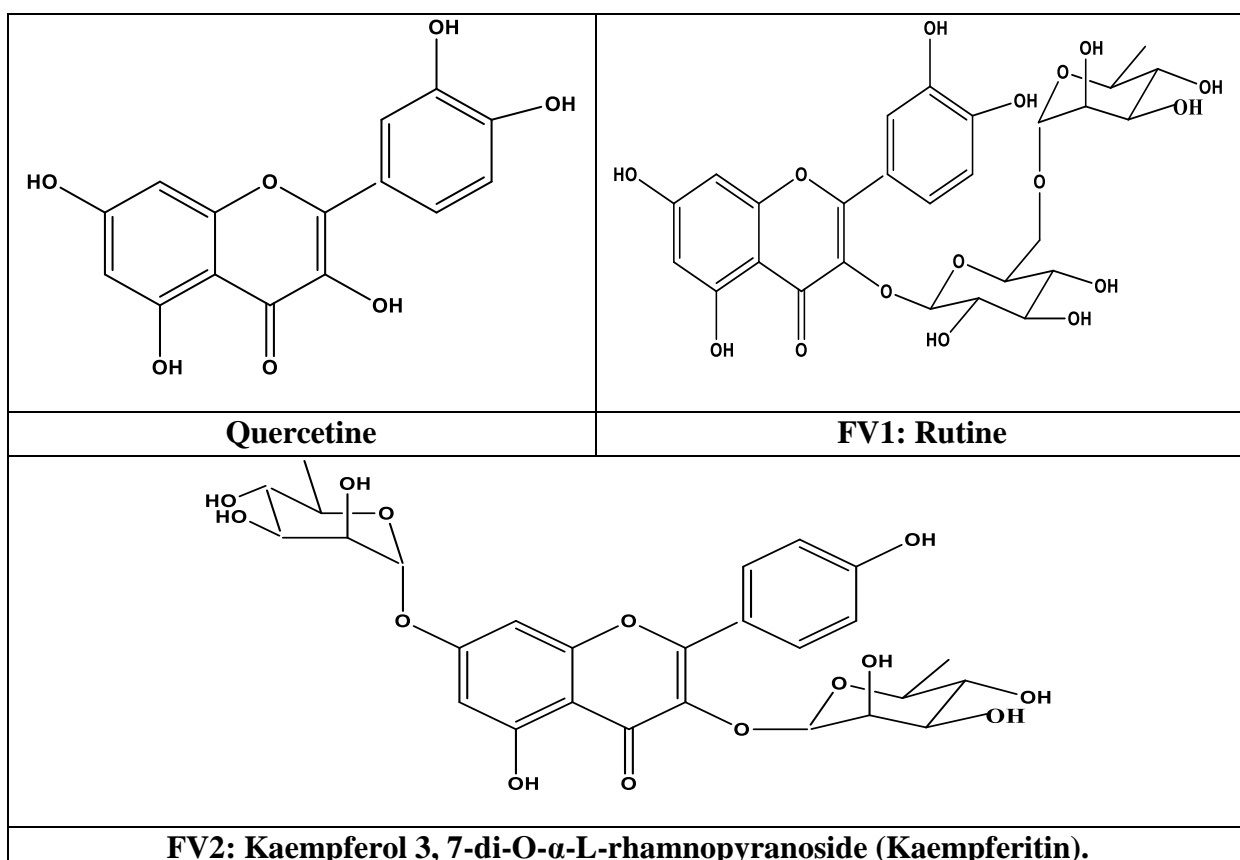
L'extrait butanolique de *S. delphinifolius* Vahl a réagi modestement au test antioxydant avec le DPPH. De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres [238, 239]. Cette activité est probablement due aux flavonoïdes présents dans nos extraits. Ces mêmes travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

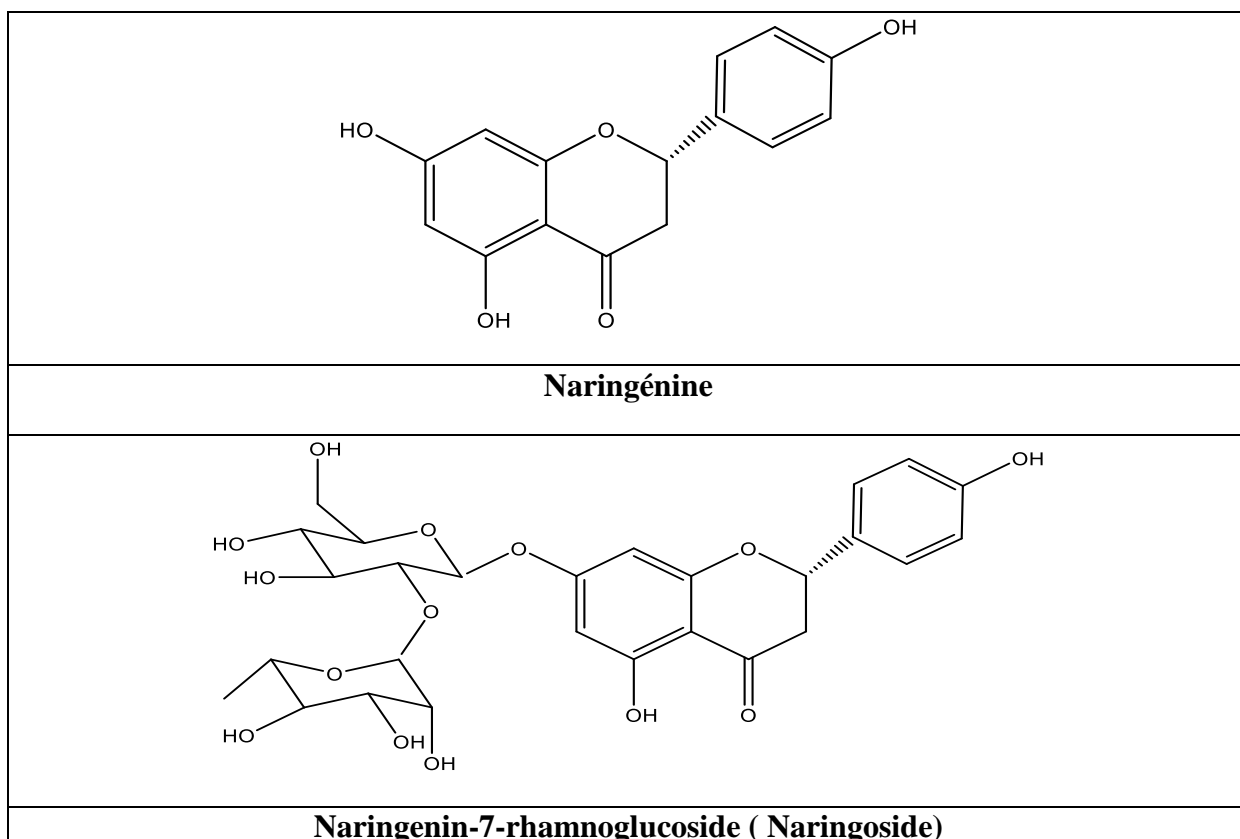
- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons [230, 231].
- La double liaison C2 = C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité radical scavenger des flavonoïdes [231].
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2=C3 augmente également la capacité radical scavenger des flavonoïdes (la substitution du groupement 3- OH conduit à la réduction de l'activité anti-oxydante) [231].

La quercétine satisfait à tous ces critères, elle dérive du motif flavonol. Sa structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'un flavonoïde : le cycle catéchol et l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4. De plus elle possède les trois sites de complexation communément admis pour les flavonoïdes. Elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes. La présence de deux groupements hydroxyles ortho sur le cycle B d'un

flavonoïde (quercétine) lui donne une activité meilleure que celle ou on a deux hydroxyles en position méta, ou un seul hydroxyle. Ce qui montre l'importance de la structure ortho-dihydroxy du cycle B [232].

D'autre part la glycosylation du groupement 3-OH de la quercétine (cas de la **rutine : FV1**) diminue l'activité antioxydante. Ceci démontre l'importance du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃ adjacente à la fonction 4-oxo [232, 233]. La comparaison de la naringénine avec le naringoside, montre que la glycosylation du groupe 7-OH diminue largement l'activité antioxydante [232, 234-246] (cas de la **Kaempferitin : FV2** glycosylation du groupe 7-OH et du groupement 3-OH). Par conséquent, les extraits butanoliques n'ayant pas été débarrassés de leurs sucres il se pourrait que l'activité potentielle soit masquée. Sachant que les flavonoïdes du genre senecio sont substitués en position 3 [28], ceci explique un effet **légèrement** antiradicalaire.





7. 3. Résultats de l'effet cytotoxique:

L'effet cytotoxique des extraits de *Senecio. delphinifolius* Vahl testés sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines suivantes:

- HT29 (ATCC code HTB-38 (cancer du côlon),
- Hs683 (ATCC code HTB-138) glioma,
- et A549 (DSMZ code ACC107) NSCLC.

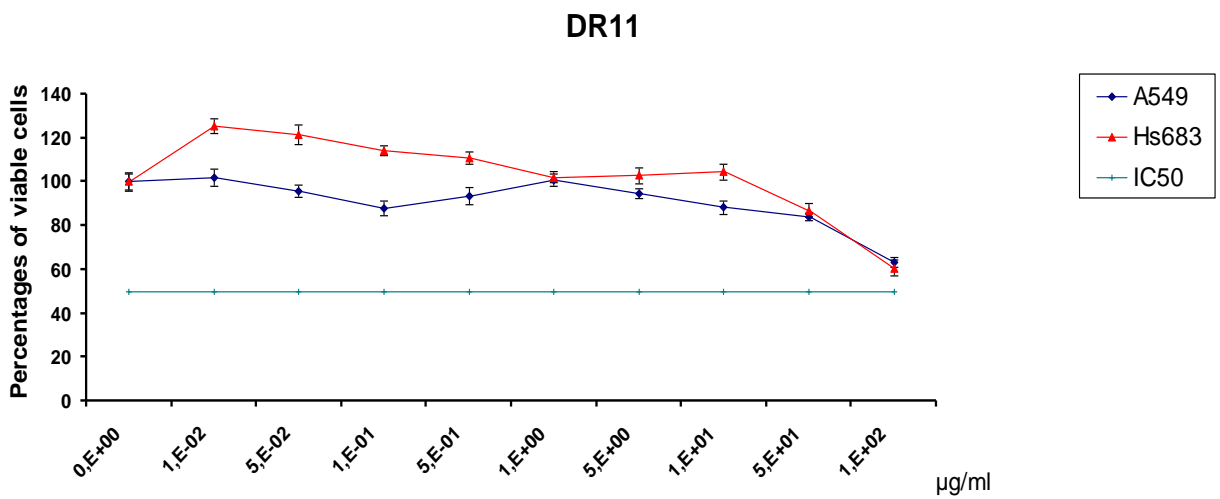
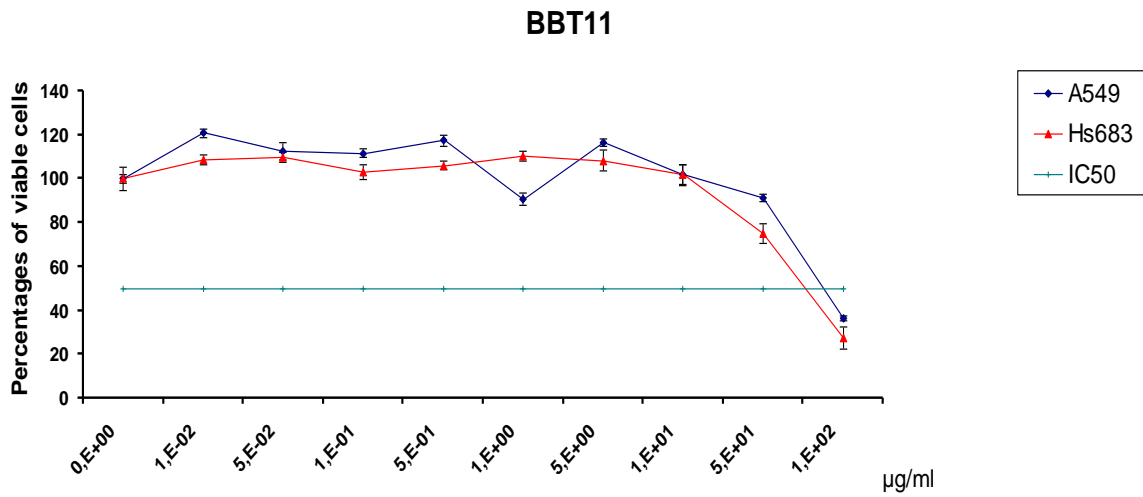
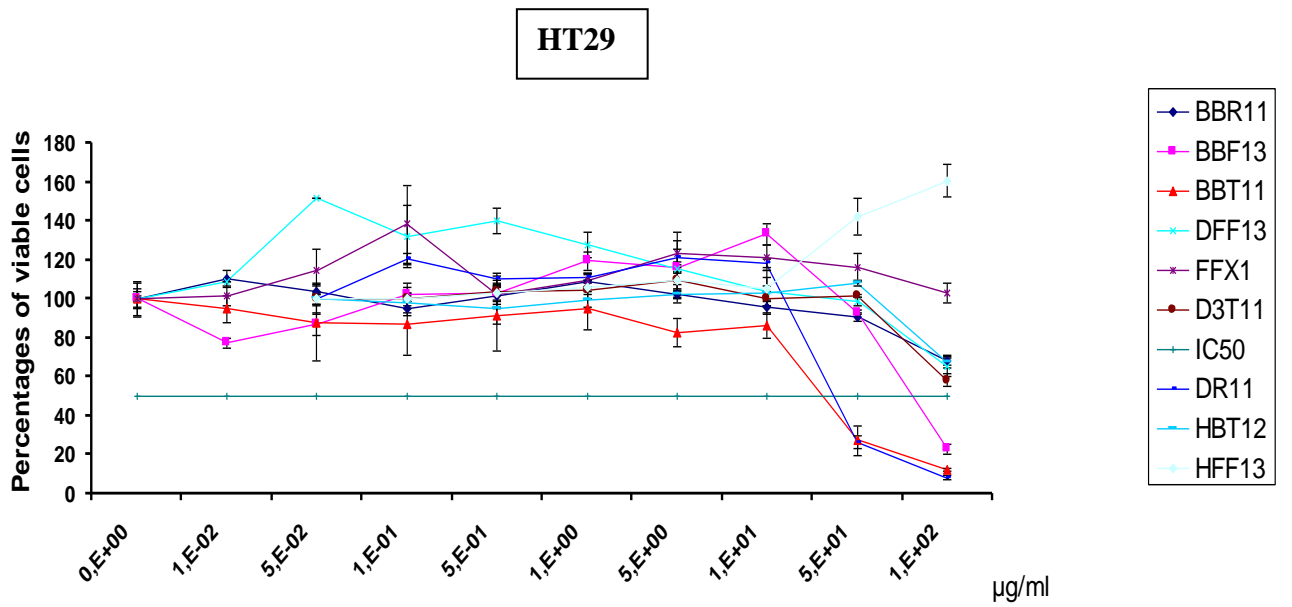
Donne des valeurs de IC_{50} comprises entre 34 et 88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**Tableau III. 10**). Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec d'autres espèces *Senecio* [28]; en effet, les activités cytotoxiques testés sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines ont été observées avec du dichlorométhane et les extraits de n-butanol *S. leucanthemifolius*, et un dérivé de la quinone, jacaranone, a montré une très forte activité [4].

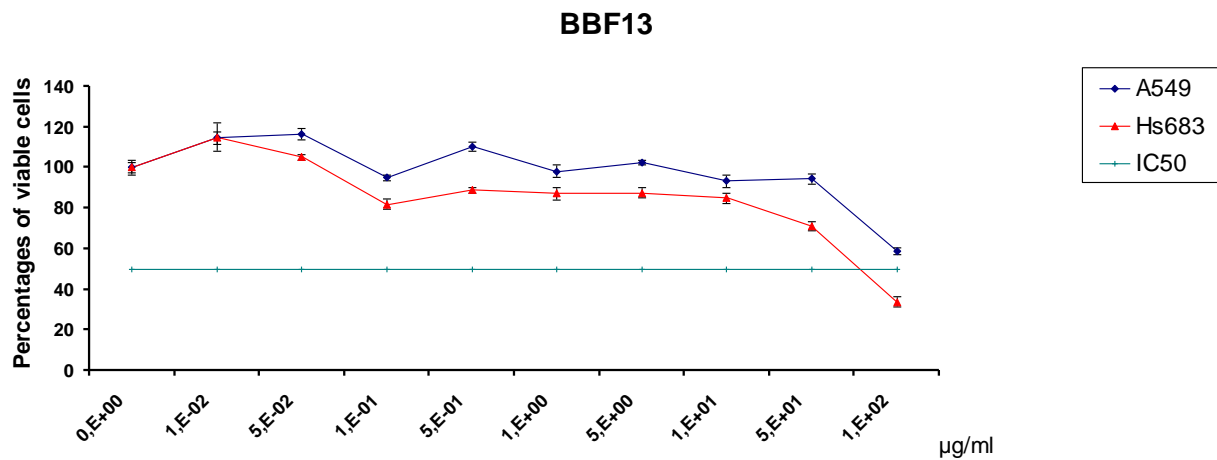
Tableau III. 10: Détermination de l'effet d'inhibition sur la croissance *in vitro* des cellules cancéreuses humaines obtenu par divers extraits de *S. delphinifolius* Vahl.

Extraits	Les lignées cellulaires cancéreuses humaines		
	HT29	Hs683	A549
racines			
<i>n</i> -hexane	n.d.	n.d.	n.d.
dichloromethane	39	> 100	> 100
<i>n</i> -butanol	> 100	n.d.	n.d.
Branches et tiges			
<i>n</i> -hexane	> 100	n.d.	n.d.
dichloromethane	> 100	n.d.	n.d.
<i>n</i> -butanol	34	74	88
Feuilles e fleurs			
<i>n</i> -hexane	> 100	n.d.	n.d.
dichloromethane	> 100	n.d.	n.d.
<i>n</i> -butanol	79	78	> 100

Ainsi, par le biais de fractionnement guidé par essais biologiques, un dérivé de la jacaranone (2, 5-Cyclohexadiene-1-acetic acid, 1-methyl-4-oxo, methyl ester), a été isolé pour la première fois de l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl.

L'activité cytotoxique des extraits étudiés est essentiellement dut au jacaranone ou à ces dérivés constituant présents dans la plus part des espèces *Senecio* [28].





Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Reichling, J., Horz, K.H., Röder, E., (1994), in Hager **5** (6): 674- 680.
2. Burgueño-Tapia, E., Hernández, L. R., Resendiz-Villalobos, A. Y., Joseph-Nathan, P., (2004), *Magn. Reson. Chem* 42: 887.
3. Burgueño-Tapia, E., Joseph-Nathan, P., (2003), *Magn. Reson. Chem* 41, 386.
4. Loizzo, M. R., Statti, G. A., Tundis, R., Conforti, F., Bonesi, M., Autelitano, G., Houghton, P. J., (2005), In-vitro antiproliferation effects on human tumor cell lines of extracts and jacaranone from *Senecio leucanthemifolius* Poirlet, *Journal of pharmacy and Pharmacology* **57**: 897- 901.
5. Quézel, P. & S. Santa (1963), NOUVELLE FLORE DE L'ALGERIE et des régions désertiques méridionales. Paris. France p 961.
6. Aharoni, A. and Galili, G., (2011), Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface, *Current Opinion in Biotechnology* 22: 239–244.
7. Kliebenstein, D. J. and Osbourn, A., (2012), Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants, *Current Opinion in Plant Biology* 15: 415–423.
8. Pavarini, D. P., Pavarini, S. P., Niehues, M., Lopes, N. P., (2012), Exogenous influences on plant secondary metabolite levels, *Animal Feed Science and Technology* 176: 5– 16.
9. Hartmann, T., (2007), From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, *Phytochemistry* 68: 2831–2846.
10. Wink, M., (2003), Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry* 64: 3-19.
11. Bruneton, J., (2005), Plantes toxiques: végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux, 3^e éd, pp. 183- 185.
12. Sarembaud, A., Poitevin, B., (1996), Médicaments à usage homéopathique, Ed Masson, Paris, pp. 256.
13. Matsuda, H., Morikawa, T., Toguchidam, I., Harima, S., Yoshikawa, M., (2002), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 972.
14. Bremer, K., (1994), Asteraceae, Cladistics and Classification. (Timber Press), 752 p., Portland, Oregon.
15. Encyclopédie des plantes grasses: <http://www.cactuspro.com/encyclo/Senecio>, [en line] consulté le 09 Novembre 2013.

Références bibliographiques

16. Ghedira K., Goets P., Lejeune R., Wuyts D., (2008), Echinacea spp. (Asteraceae), *Phytothérapie* 6: 306- 311.
17. Roeder, E. (2000), Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids, *Pharmazie* 55: 711-726.
18. Tomas, W., Trigo, J. R., Bensuaski de Paula, A. C., Monteiro Souza Brito, A. R., (2004), Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats, *Journal of Ethnopharmacology* 95: 345-351.
19. Klitzke, C. F., Trigo, J. R., (2000), *Biochem. Syst. Ecol* 28: 313.
20. Traditional Chinese Dictionary, edited by Jiansu New Faculty of Medicine, published by Shanghai Science and technology, Shanghai, (1979).
21. Zhao, X. G., Wang, Z. T., Lin, G., Cui, Y. Y., Zhang, M., Xu, L. S., Xu, G. J. and Damani, L. A. (1998), Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and transitional Chinese medicines. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 29: 115-119.
22. Xu, S., Yu, G. D. and Lin, G., (2000), Investigation into the Chinese traditional drug, Zi Wan, Chapter 3 in Species Systematization and Quality Evaluation of Commonly Used Chinese Traditional Drugs, South- China Edition, 3: 134-189.
23. Roeder, E., (1995), Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids, *Pharmazie* 50: 83-98.
24. Lin, G., Rose, P., Chatson, K. B., Hawes, E. M., Zhao, X. G. and Wang, Z. T., (2000), Characterization of two structural forms of otonecine-type pyrrolizidine alkaloids from *Ligularia hodgsonii* by NMR spectroscopy, *J. Nat. Prod* 63: 857-860.
25. Chung, W. G. and Buhler, D. R., (1994), The effect of spironolactone treatment on the cytochrome P450-mediated metabolism of the pyrrolizidine alkaloid senecio-nine by hepatic microsomes from rats and guinea pigs, *Toxicol. Appl. Pharmacol* 127: 314-319.
26. Fu, P. P., Chou, M. W., Xia, Q., Yang, Y. C., Yan, J., Doerge, D. R. and Chan, P.C., (2001), Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N- oxides - mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity, *Environ. Carcinogen. Ecotoxicol. Rev* 19: 353 - 386.
27. Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs), (2012), Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) p12.

Références bibliographiques

28. Yang, Y., Zhao, L., Wang, Y., Chang, M., Huo. C., Gu, Y., Shi, Q., Kiyota H., (2011), Chemical and pharmacological research on plants from the genus *Senecio*, *Chemistry & Biodiversity* 8, 13-72.
29. Ramar, P.S., and Ponnampalam, G., (2010), Therapeutic Potential of Plants as Anti- microbials for Drug Discovery, *Evid Based Complement Alternat Med* 7 (3): 283-294.
30. Mazid, M., Khan, T.A., Mohammad, F., (2011), Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants, *Biology and Medicine* 3 (2): 232-249.
31. Ivie, GW, Witzel, DA., (1983), Sesquiterpene lactones: Structure, biological action, and toxicological significance. Handbook of natural toxins (USA), agris.fao.org
32. Johnson, A. E., (1982), Toxicologic aspects of photosensitization in livestock. Journal of the National Cancer Institute, [http:// jnci.oxfordjournals.org](http://jnci.oxfordjournals.org).
33. Eberhard, Breitmaier., (2006), Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones Ed John Wiley & Sons p: 24- 51.
34. Connolly, J. D., Hill, R. A., (1991), Dictionary of Terpenoids, Vol. 1: Mono- and Sesquiterpenoids, Vol. 2: Di- and higher Terpenoids, Vol. 3: Indexes, Chapman& Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
35. Nachman R. J., (1983), *Phytochemistry* 22, 780.
36. Bohlmann, F., Ziesche, J., (1980), *Phytochemistry* 19, 1851.
37. Bohlmann, F., Ziesche, J., (1980), *Phytochemistry* 19, 2681.
38. Perez-Castorena, A.-L., Arciniegas, A., Guzmán, S. L., Villasenor, J. L., Romo de Vivar, A., (2006), *J. Nat. Prod* 69, 14.
39. Torres, P., Ayala, J., Grande, C., Anaya, J., Grande, M., (1999), *Phytochemistry* 52, 1507-1513.
40. Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M., Robinson, H., (1981), *Phytochemistry* 20, 2389.
41. Tiwari R., Awasthi A., Mall M., Shukla A. K., Srinivas K.V.N. S., Syamasundar K.V., Kalra A., (2013), Bacterial endophyte-mediated enhancement of in planta content of key terpenoid indole alkaloids and growth parameters of *Catharanthus roseus*, *Industrial Crops and Products* 43: 306–310.
42. Vollhardt, Schore., (2004), *Traité de chimie organique*, 4^eEd De Boeck, pp 1125- 1126.

43. O'connor, S. E., (2010), Alkaloids. *Comprehensive Natural Products II (Chemistry and Biology)*: 977-1007.
44. Bruneton, J., (2009), *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 4^e éd., Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, pp 937- 954.
45. Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G., (2000), *Natural Products (Secondary Metabolites). Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists.
46. Glenn, W. S., Runguphan, W., S. E O'Connor., (2013), Recent progress in the metabolic engineering of alkaloids in plant systems, *Current Opinion in Biotechnology* 24: 354–365.
47. Wrobel, J. T., (1985), *The Alkaloids: Chemistry and pharmacology* 26: 327-384.
48. Dewick, P. M., (2009), *Medecinal natural products: a biosynthetic approach*. Third edition, pp 539.
49. Perez-Castorena, A.L., Arciniegas, A., Villasenor, J. L., Romo de Vivar, A., (1999), *Biochem. Syst. Ecol.* 27 : 835.
50. Grue, M. R., Liddell, J. R., (1993), *Phytochemistry* 33: 1517.
51. Liddell, J. R., Logie, C. G., (1993), *Phytochemistry* 34 : 1198.
52. Christov, V. S., Mikhova, B. P., Evstatieva, L. N., (2002), *Fitoterapia* 73: 171.
53. Roeder, E., Bourauel, T., Kersten, R., (1993), *Phytochemistry* 32: 1051.
54. Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Najera, F., Lopez-Romero, J. M., Garcia, A. I., (2002), *Biochem. Syst. Ecol* 30 : 981.
55. Perez-Castorena, A. L., Arjciniegas, A. F., Martinez, Villasenor, J. L. Romo de Vivar, A. (2000), *Biochem. Syst. Ecol* 28 : 279.
56. Valverde, S. Panizo, F. M., (1971), *An. Quim* 67: 425.
57. Romo De Vivar, A., Perez, A.-L. Vidales, P. Nieto, D. A. Villasenor, J. L., (1996), *Biochem. Syst. Ecol* 24 : 175.
58. De Waal, H. L., (1940), *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* 15: 241.
59. Liddell, J. R. Logie, C. G., (1993), *Phytochemistry* 34 : 1629.
60. Were, O. Benn, M. Munavu, R. M., (1993), *Phytochemistry* 32: 1595.
61. Reina, M., Gonzalez-Coloma, A., Gutierrez, C., Cabrera, R., Rodriguez, M. L. Fajardo, V. Villarroel, L., (2001), *J. Nat. Prod* 64: 6.

Références bibliographiques

62. Wei, Y. C., Peng, Q. X., Wang, Z. F., Luo, Q. Q., Luo, F. C., Wu, L. J., Zhao, J. L., Ren, W. P., (1982), *Zhongcaoyao* 13: 435.
63. Panizo, F. M. Rodriguez, B. (1974), *An. Quim* 70: 1043.
64. Gardner, D. R. Thorne, M. S. Molyneux, R. J. Pfister, J. A. Seawright, A. A. (2006), *Biochem. Syst. Ecol.*34: 736- 744.
65. Liu, K. Roeder, E., (1991), *Phytochemistry* 30: 1303.
66. Ray, A. C., Williams, H. J. Reagor, J. C., (1987), *Phytochemistry* 26: 2431.
67. Vrieling, K. de Vos, H. Van Wijk, C. A. M., (1993), *Phytochemistry* 32: 1141.
68. Tundis, R. Loizzo, M. R. Statti, G. A. Deguin, B. Amisshah, R. Houghton, P. J. Menichini, F. (2005), *Pharm. Biol* 43: 605.
69. Urones, J. G., Barcala, P. B., Marcos, I. S. Moro, R. F. Lopez Esteban, Fernandez Rodriguez, M. A., (1988), *Phytochemistry* 27: 1507.
70. Guidugli, F. H., Pestchanker, M. J., De Salmeron, M. S. A., Giordano, O. S., (1986), *Phytochemistry* 25: 1923.
71. Noorwala, M., Mohammad, F. V., Ahmad, V. U. Sener, B. Ergun, F. Deliorman, D., (2000), *Fitoterapia* 71: 618.
72. Krebs, H. C., Carl, T., Habermehl, G. G., (1996), *Phytochemistry* 43: 1227.
73. Roeder, E., Liu, K., (1991), *Phytochemistry* 30: 1734.
74. Witte, L. Ernst, L. Wray, V. Hartmann, T., (1992), *Phytochemistry* 31: 1027.
75. Vivar, A. R. D., Perez, A. L., Arciniegas, A., Vidales, P., Gavino, R., Villasenor, J. L., (1995), *Tetrahedron* 51: 12521.
76. Perez-Castorena, A.-L., Arciniegas, A., Perez, R., Gutierrez, H., Toscano, R. A., Villasenor, J. L., Romo de Vivar, A., (1999), *J. Nat. Prod* 62 : 1039.
77. Fu, PP., Xia, Q., Lin, G., Chou, M. W., (2004), Pyrrolizidine alkaloids – genotoxicity, metabolism, enzymes, metabolic activation, and mechanisms, *Drug Metabol Rev* 36: 1–55.
78. Bruneton, J., (2009), Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4^e éd., Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris. pp 985-997.
79. Roeder, E., (1999), Analysis of pyrrolizidine alkaloids, *Current Organic Chemistry* 3: 557-576.
80. International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environment Health Criteria, (1988), Pyrrolizidine alkaloids. World Health Organization, Geneva.

Références bibliographiques

81. Kempf M., Reinhard A., Beuerle T., (2010), Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required, *Molecular and Nutritional Food Research* 54: 158–168.
82. Zalkow L. H., (1988), Separation of a complex alkaloid extract using droplet counter-current chromatography, *Journal of Natural Products* 51: 690-702.
83. Weici, T., (1995), Mutagenic and carcinogenic constituents of Chinese medicinal herbal, *Abstracts of Chinese Medicine* 6: 227-271.
84. Lanzelotti, P.L., Grasso, D., Gonzalez, M.D., (2011), les alcaloïdes des miels. abeilles & cie n°145, 6, 14- 15.
85. Hoogenboom, LAP., Mulder, PPJ., Zeilmaker, MJ., van den Top HJ, Rummelink GJ et al., (2011), Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows, *Food Additives and Contaminants* 28(3): 359- 372.
86. Mattocks, AR., (1986), Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. London, New York, Academic press: 125- 126.
87. Boppré, M., (1989), Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids. Exemplification of Complexity in Chemical Ecology, *Journal of Chemical Ecology* 16: 165-185.
88. Liu, F., Yin, S. W., Zhangjian J., Li Yau S. F., Shi E. O., Osorio J., Castaño C., (2009), Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry, *Talanta* 80: 916–923.
89. Dominguez, D. M., Reina, M., Santos-Guerra A., Santana O., Agullo T., Lopez-Balboa C., Gonzalez-Coloma A., (2008), Pyrrolizidine alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects, *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 153-166.
90. Chen, T., Mei, N., Fu, P. P., (2010), Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids, *Journal of Applied Toxicology* 30: 183–196.
91. Hartmann, T., Ober, D., (2000), Biosynthesis, metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants, specialized insect herbivores. In: Leeper F. J., Vederas J. C. (Eds), Topics in Current Chemistry Springer, Berlin 209: 207-244.

Références bibliographiques

92. Joosten, L., Mulder, P. P. J., Vrieling K., van Veena J. A., Klinkhamera P. G. L., (2010), The Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in *Jacobaea vulgaris*; a Comparison of Extraction and Detection Methods, *Phytochemical Analysis* 21: 197–204.
93. Prakash, AS., Pereira, TN., Reilly PE., Seawright, AA., (1999), Pyrrolizidine alkaloids in human diet, *Mutation Research* 443(1-2): 53-67.
94. Mattocks AR (1986) Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. London, New York, Academic press : 285-286.
95. Ober, D., & Kaltenecker, E., (2009), Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism, *Phytochemistry* 70: 1687–1695.
96. Stegelmeir, B. L., Edgar, J. A., Colegate, S. M., Gardner, D. R., Schoch, T. K., Coulomb, R. A., Molineux, R. J., (1999), Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity, *Journal of Natural Toxins* 8: 95-116.
97. Fu, P. P., Y. Yang, Xia, Q., Chou, M.W., Cui, Y.Y., Lin, G., (2002), Pyrrolizidine alkaloids - tumorigenic components in Chinese herbal medicines and dietary supplements, *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 198-211.
98. Passemard, B. L., (2005), Intoxications du cheval par les séneçons, Thèse de Doctorat, Université Paul-Sabatier de Toulouse, pp 91.
99. Lin G., Cui Y. Y., Liu X. Q., Wang Z. T., (2002), Species differences in the in vitro metabolic activation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid, clivorine. *Chemical Research in Toxicology* 15: 1421–1428.
100. Becerra-Jiminez, J., Kuschak, M., Roeder, E., Wiedenfeld, H., (2013), Toxic pyrrolizidine alkaloids as undesired contaminants in food and feed: degradation of the PAs from *Senecio jacobaea* in silage, *Pharmazie* 68(7): 636-639.
101. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, (1976), Some Naturally Occurring Substances. IARC, Lyon, France, Vol. 10: pp 263-342.
102. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, (1983), Some Food Additives, Feed additives and Naturally Occurring Substances. IARC, Lyon, France, Vol. 31: pp. 207-212, 231-246.

Références bibliographiques

103. Wiedenfeld H., Roeder E., Bourauel T., Edgar J., (2008), Pyrrolizidine alkaloids: structure and toxicity. Bonn University Press, Germany. 143 pp.
104. Australia New Zealand Food Authority (2001), Pyrrolizidine alkaloids in food. A Toxicological Review and Risk Assessment. Technical report series n°2, pp 16.
105. Huxtable, R. J., (1989), Human health implication of pyrrolizidine alkaloids and herbs containing them. In: Cheeke P. R (Ed.). Toxicans of plant origin. Alkaloids. CRC Press, Florida, Volume I: pp 42-86.
106. Wang, Y. P., Yan, J., Beger, R. D., Fu, P. P., Chou, M. W., (2005), Metabolic Activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, retrorsine, leading to DNA adducts formation in vivo. *Cancer Letters* 226: 27–35.
107. Betz, J. M., Eppley, R. M., Taylor, W. C. and Andrzejewski, D., (1994), Determination of pyrrolizidine alkaloids in commercial comfrey products (*Symphytum* sp.). *J. Pharm. Sci.* 83: 649-653
108. Lin, G., Zhou, K. Y., Zhao, X. G., Wang, Z. T. and But, P. P. H., (1998), Determination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids by on-line high performance liquid chromatography-mass spectrometry with an electrospray interface, *Rap. Commun. Mass Spectrom.* 12: 1445-1456.
109. Crews, C., Startin, J. R. and Clarke, P. A., (1999), Determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid-phase extraction and HPLC-MS. *Food Addit. Contamin.* 14: 419-428.
110. Bicchi, C., Rubiolo, P., and Frattini, C., (1989), Capillary gas chromatography-fourier transform infrared spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio inaequidens* DC, *Journal of Chromatography* 473: 161-170.
111. Frolich, C., Hartmann T, Ober, D., (2006), Tissue distribution and biosynthesis of 1, 2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae), *Phytochemistry* 67(14): 1493-1502.
112. Kovats, E., (1958), Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindung, *Helv. Chim. Acta* 41: 1915- 1932.
113. Rouessac, F., Rouessac, A., (2009), Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales 7^e éd. Dunod: 58-59.
114. Van Den Dool, H., Kratz, P.D., (1963), *J. Chromatog* 11: 463- 471.

Références bibliographiques

115. Bernhard, K., (2008), Pyrrolizidine alkaloids in *Arnebiae radix*. European Pharmacopoeia Commission, Monograph N°: 2426.
116. Luthy et al, (1981), *J. Agric. Food. Chem* 29: 302-305.
117. Pedersen, E., Larsen, E., (1970), *Org. Mass Spectrom* 4: 249-256.
118. Bhattacharya et al., (2010), The roles of plant phenolics in defence and communication during agrobacterium and rhizolium infection, *Molecular plant pathology* 11(5): 705- 19.
119. Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. (2000), Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists.
120. Bruneton, J., (1999), *Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales*, 3^e édition: 263-264.
121. Wang, Y., Chen, S., Yu, O., (2011), Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4):949-56.
122. Ferreyra, F., M.L., Rius, S.P., Casati, P., (2012), Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*: 3222.
123. Abdel-Lateif, K., Bogusz, D., Hocher, V., (2012), The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and Frankia bacteria. *Plant Signaling & Behavior* 7(6): 636-641.
124. Bruneton, J., (1999), *Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales*, 3^{ème} édition, Ed. Tec et Doc Lavoisier, Paris, P: 312- 400.
125. Emerenciano V. P., Militão J. S. L. T., Camposa C. C., Romoff P., Kaplan M. A. C., Zambon M., Brant A. J. C., (2001), Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 947-957.
126. Cooper-Driver G.A., and Bhattacharya M B., (1998), Role of phenolics in plant evolution *phytochemistry* 49 (5): 1165 – 1174.
127. Grayer, R. T., Chase M. W., and Simmonds M. S. J., (1999), A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families. An appreciation of Hegnauer's «chemotaxonomie der pflanzen» *Biochemical Systematics and Ecology* 27 (4): 369- 393.
128. Glennie, C. W., Harborne, J. H., et al., (1971), Correlations between flavonoid chemistry and plant geography in the *Senecio radicans* complex, *Phytochemistry* 10: 2413-2417.

Références bibliographiques

129. Ahmed Hamed Mohamed Gaara, N., (2001): Chemical studies on some Egyptian plants belonging to family compositae. Philosophy doctor, Cairo University, faculty of science Gisa Egypt.
130. Dao-peng Tan et al (2010), Phenolic compounds from *Senecio scandens*, *Biochem. Syst. Ecol.* 38: 122-124.
131. Mansour R., Nabil S., (1981), Flavonoids of three local *Senecio* species, *Phytochemistry* 20(5): 1180- 1181.
132. Grace, M. H., Khattab, A. M., (1998), *Egypt. J. Pharm. Sci.*, 39: 253.
133. Rayyan S., Fossen T., Nateland H. S., Andersen Ø. M., (2005), Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug '*Crataegi folium cum flore*' (Hawthorn). *Phytochemical Analysis* 16: 334-341.
134. 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 and Food Chemistry* 43: 2020-2024.
135. MEZZACHE, N., (2010): Détermination structurale et évaluation biologique de substances naturelles de quelques espèces de la famille Asteraceae: *Senecio giganteus Desf. et Chrysanthemum myconis L.* doctorat en science, Institut de chimie, Université des frères Mentouri – Constantine.
136. Harborne J. B, Mabry T. J, Mabry. H, (1975) the flavonoids, tome I, II, Ed Chapman and Hall.
137. Törel. J et al., (1986) antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical, *Phytochemistry* 25: 383- 386.
138. Schmelzer E, et al. (1988), in situ localization of light induced chalcone synthase and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves, *Proc. Natl. Sci. USA* 85, pp 2989- 2993.
139. Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., and Capasso F., (1999) Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65(4):337-353.
140. Pietta, P., (2000), Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7): 1035-1042.
141. Sakagami, H., Sakagami, T., Takeda, M., (1995), Antiviral properties of polyphenols, *Polyphenols actualites* 12: 30-32.
142. Bruneton, J., (1993), Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Techniques et documentation. Edition : Lavoisier (2^{ème} édition) Paris.

Références bibliographiques

143. Pratt Dan, E., (1990), Natural Antioxidants Not Exploited Commercially, in Food Antioxidant. edited by Hudson. B. J.F, Elsevier Applied Science, London and New York, 176.
144. Densiov E. T., Afanas'ev I. B., (2005), IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Ed. Taylor & Francis Group p: 703-861., U.S.A.
145. Javanovic S. V., Steenken S., Tomic M., Marjanovic B., Simic M. J., (1994), Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 116: 4846-4851.
146. Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., lientinck A. V., Berghe D. K., (1998), Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products* 61: 71-76.
147. Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M.E.J.; McDonald, M.S., (1997), Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography *J.Chromatography A.*, 761: 315-321.
148. Ribereau-Gayou, J.B., (1968), The phenolic compounds of vegetals, Edition Dundo, Paris.
149. Markham, K.R. (1982), Technique of flavonoides identification, Academic press, London.
150. J. A. Marco; J. F. Sanz; F. Sancenon; A. Sussana; A. Rustaiyan and M. Saberi, (1992), *Phytochemistry*, 31(10): 3527-3530.
151. Barden. A.; Montanaro S.; Catalan G. A. N.; Diaz J. G. and Herz M., (1993), *Phytochemistry* 34(01): 253-259.
152. Pischen M. T.; Seoane E.; Tortyada A., (1984), *Phytochemistry* 23(09).
153. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., (1970), The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York.
154. Benkiniouar R., (2007), Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie Organique, Université Mentouri Constantine, Algérie, pp 54.
155. Harborne, J.B., (1966), In «Comparative Phytochemistry» (Goodwin, T.W.ed), Academic Press London.
156. Bate-smith, E. C., and Westall, R. G., (1950), Chromatography Behavior and Chemical Structure, Some Naturally Occuring Phenolic Substance, *Bioch, Bioph, Acta* 4: 427 – 440.
157. Lespagnol, A., Coeur, A., Alarey, J., Lespagnol, C., Lesieur, D., (1974), Chimie Des Médicaments, Tec et Doc, Paris.

158. Berthillier, A., (1972), *La chromatographie et ses applications*, Dunod, Paris.
159. Jurd, L. and Horowitz, R., (1962), *Spectral properties of flavonoid compounds*, pergamon press, Oxford, 107-2055.
160. Markham, K.R. and Mabry, T.J., (1968), *Phytochemistry* 7: 1197.
161. Eibi, G., Wagner, H., (1991), A new method for the in Vivo Screening of inhibitors of Angiotensin converting Enzyme (ACE), Using the chromophore Labeled Substrate Dansyltriglycine, *Planta Medica*. 57: 137-141.
162. Horhammer, L. and Hänsel, R., (1952), *Arch. Pharm* 285: 438.
163. Jurd, L. and Geissman, T.A., (1956), *J. Org. Chem* 21: 1395.
164. Gayon, P. R., (1968), *les composés phénoliques des végétaux*, eds Dunod, Paris.
165. Wilson, R.G., Bowie, J.H. Williams, D.H., (1986), *Tetrahedron* 24: 1407.
166. Markham, K.R. and Geiger, H., (1993), *The Flavonoids Advances in research since 1986*. Edited by J. B. HARBORNE, Chapman & Hall. London.
167. Rodriguez, E., Carman, N.J. and Mabry, T.J., (1972), *Phytochemistry* 11: 409.
168. Markham, K.R., (1989), Flavones, flavonols and their glycosides, in *Methods in Plant biochemistry*, P.M. Dey and J.B. Harborne, Academic Press pp. 197-262.
169. Gunther, H., (1994), *La spectroscopie de RMN*, Masson, Paris.
170. Cragg, G.M., Newman, D. J., et Snader, K. M., (1997), Natural products in drug discovery and development: *J. Nat. Prod* 60: 52-60.
171. Bors, W., W. Heller, C. Michel & K. Stettmaier., (1995), Flavonoids and Polyphenols: Chemistry and Biology. In: *Handbooks on antioxydants*. Cadenas E., L. Packer & M. Dekker, Inc. (Eds).
172. Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., (1993), A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84: 407-412.
173. Benzie, I. F. F. et Strain, J. J., (1996), The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay, *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
174. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., (1995), Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food. Sci. Technol* 28: 25-30.

Références bibliographiques

175. Li, C., Oldham, C.D., May, S.W.N., (1994), N-Dimethyl-1, 4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem. J* 300: 31-36.
176. Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A., (1998), A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med* 24: 480–493.
177. Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U. et Locke, S., (1985), Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 187: 33-37.
178. Popov, I., Lewin, G., Baehr, R., (1987), Photochemiluminescent detection of antiradical activity. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta* 46: 775–779.
179. Charfi, D., (1995), Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'El Hajeb (Sfax). Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. de Sfax.
180. Boubekri, C., (2014), Thèse de Doctorat en sciences, Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Université Mohamed Khider – Biskra, Algérie.
181. Abdel-Lateff A., König G. M., Fish K. M., Höller U., Jones P. G., Wright A. D., (2002), New antioxidant Hydroquinone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Acremonium* Sp. *Journal of Natural Products* 65: 1605-1611.
182. Dubois, J., (1989) : Contribution à la compréhension de méthodologie pharmacocinétique. Thèse de doctorat, Institut de pharmacie, Université Libre de Bruxelles.
183. Abikhalil, F., Dubois, J., Hanocq, M., Atassi, G., (1986), A new algorithm for computing the parameters of linear compartment models in pharmacokinetics. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet* 11: 51-59.
184. Abikhalil F., Hanocq M., Dubois J. (1993): A new method to estimate parameters of pharmacokinetics with enterohepatic circulation. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet* 18: 131-139.
185. Pandey, M.M., et al., (2005). Free radical scavenging potential of *Saussurea costus*, *Acta Pharm* 55(3): 297-304.

Références bibliographiques

186. OMS, (2002), Aide-mémoire n°194 : Résistance aux antimicrobiens.
187. OMS, (2005), Endiguer la résistance aux antimicrobiens, in: *Perspectives politiques de l'OMS sur les médicaments* (Vol. 10), Genève.
188. Duez, P. and Stévigny, C., (2007), Concerted efforts of EU and Great Lakes countries in the initial screening for new therapeutic tools to fight infectious diseases.
189. Walsh, C., 2003, Antibiotics: actions, origins, resistance, ASM Press, Washington, pp. 117.
190. Arnould, R., Dubois, J., Abikhalil, F., Libert, A., Ghanem, G., (1990), Comparison of two cytotoxicity assays-tetrazolium derivative reduction (MTT) and tritiated thymidine uptake — on three malignant mouse cell lines using chemotherapeutic agents and investigational drugs 10: 145.
191. Conservatoire et jardin botanique (CBG) ville de Genève [http: www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cbj/africa/results.php](http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cbj/africa/results.php). consulté le 09/01/ 2013 et revue le 01/ 01/ 2016.
192. Quézel. P., Santa. S. (1963). NOUVELLE FLORE DE L'ALGERIE et des régions désertiques méridionales. vol II. éd CNRS, Paris. France; pp 958-964.
193. Zellagui, A., Tidjani, S., Gherraf, N., and Rhouati, S., (2012), *Der Pharma Chemica* 4(5): 2080-2084.
194. Witte, L., Rubiolo, P., Bicchi, C. and Hartmann, T., (1993), Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry, *Phytochemistry* 32: 187-196.
195. Tranchant, J., (1996), Chromatographie en phase gazeuse, Techniques de l'Ingénieur pp1485.
196. Bouchonnet, S., Libong, D., (2004), Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *l'actualité chimique* 275:7-14.
197. Tranchant, J., (1995), Pratique de la Chromatographie en Phase Gazeuse. Manuel Masson.
198. http://www.interchim.fr/cat/PDF_Emailing/1-CatInterchim-C13C14-C19C22-Agilent-Colonnes GC. Consulté le 15/ 10 / 2015.
199. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/GC>. Consulté le 16/ 10/2015.
200. Rouessac, F., Rouessac. A., (2009), Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales 7^eédition Dunod. P : 35- 55.

Références bibliographiques

201. Pelsler, P. B., De Vos, H., Theuring, C., Beuerle, T., Vrieling, K., Hartmann, T., (2005), Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of Senecioideae Jacobaea (Asteraceae). *Phytochemistry* 66 : 1285-1295.
202. Watanabe, T., et al. (2006), Development of a precise method for quantitative analysis of hydrocarbons using post column reaction capillary gas chromatography, *CHROMATOGRAPHY* 27: 49-55.
203. Mezzache.N., Derbré, S., Akkal, S., Louaer. H., Séraphin,D., Richomme, P ., (2009), Fast Counter Current Chromatography of n - Butanolic Fraction from *Senecio giganteus* (Asteraceae) *Natural Product Communications* 4: 1-6.
204. Wagner, H. and Blatt, S., (1996), Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 384 pages Springer, Berlin.
205. Mario D'agostino, Vincenzo De Feo, Francesco De Simone, Cosino Pizz., (1991), Three chalcones from *Senecio pseudotites*, *Phytochemistry* 30: 2440- 2441.
206. Rios, J. L., and Recio, M. C., (2005), Medicinal plants and antimicrobial activity, *J Ethnopharmacol* 100 (1-2): 80- 84.
207. Okusa, P.N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P., (2007), Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 112: 476-481.
208. NCCLS., (2003), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. Approved Standard. Vol. M7-A6. Washington.
209. Mosmann, T., (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferative and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
210. Carmichael, J., and al (1988), Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer* 57(6): 540-547.
211. Tan, D.-P., Chou, G.-X., Wang, Z.-T., (2010), Phenolic compounds from *Senecio scandens*. *Biochemical Systematics and Ecology* 10: 1016.
212. Pedersen, E., and Larsen, E., (1970), Mass spectrometry of some pyrrolizidine alkaloids, *org. Mass Spectrom* 4: 249.
213. Luthy, J. et al., (1981), *J. Agric. Food Chem* 29: 302-305.
214. Cava et al., (1968), The alkaloids of *caicaliafloridana*, *J. Org. Chem* 33: 3570- 3573.

Références bibliographiques

215. Rizk, A. M., (1990), naturally occurring pyrrolizidine alkaloids, CPC Press, Boca Raton, FL, USA.
216. Crout, D, H, G., (1969), *J. Chem. Soc. C* 1379-1385.
217. Atal et al., (1966), *Tetrahedron Lett* 537-544.
218. Gardner, D. R., Thorne, M. S., Molyneux, R. J., Pfister, J. A., Seawright, A. A., (2006), *Biochem. Syst. Ecol* 34: 736- 744.
219. Cheng-Hong Hsieha, Haw-Wen Chenb, Chuan-Chen Leea, Bao-Jey He a, Ya-Chen Yan September (2015), Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in Emilia sonchifolia from Taiwan. *Journal of Food Composition and Analysis* 42: 1–7.
220. Crout, D. H. G., (1972), Pyrrolizidine and seco- pyrrolizidine alkaloids of *Crotalaria laburnifolia* L. Subspecies *eldomae*, *J. Chem. Sec Perkin Trans.1*: 1602.
221. Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M.W., (2002), Genotoxic Pyrrolizidine alkaloids mechanisms leading to DNA adducts formation and tumorigenicity. *International Journal of Molecular Science* 3: 948 – 964.
222. Fu, P. P., Xia, Q., Chou, M. W., Lin, G., (2007), Detection, hepatotoxicity, and tumorigenicity of Pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal medicines and herbal dietary supplements. *Journal of Food and Drug Analysis* 15: 400- 415.
223. Xia, Q., Chou, M. W., Von Tungln, L. S., Doerge, D. R., Lin, G., Cai, L., Fu, P. P., (2013), Pyrrolizidine alkaloids-derived DNA adducts as a common biological biomarker of Pyrrolizidine alkaloids-induced tumorigenicity, *Chemical Recherch in toxicology* 26: 1384-1396.
224. Yamanata, H., et al., (1979), Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the salmonella/mammalian-microsome test, *Mutation research* 68: 211-216.
225. Candrian, U., et al., (1984), Mutagenic activity of the Pyrrolizidine alkaloids seneciphylline and senkirkine in drosophila and their transfer into rat milk, *Food and Chemical Toxicology* 22: 223-225.
226. Ternai, B, and Markham, K.R., (1976), Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I: Flavones and flavonols, *Tetrahedron* 32(5): 565-569.
227. Österdhl, B G, (1978). *Acta Chem. Scand. B* 32 : 93.
228. Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H., Marbry, T.J., (1978), *Tetrahedron* 34: 1384.

Références bibliographiques

229. Niassy, B., Byung-Hun, Um b, Lobstein, A .Weniger,B et al., (2004), Flavonoïdes de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis* C. R. *Chimie* 7: 993–996.
230. Rastrelli, L., Saturnino, P., Schettino, O., and Dini, A., (1995), Studies on the Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) Seeds. Isolation and Characterization of Two New Flavonol Glycosides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(8): 2020-2024.
231. Huillier, L., (2007), Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: thèse de doctorat Institut National Polytechnique de Toulouse.
232. Abdel-Ghani, AE., Hafez, SS., Abdelaziz, EM., El-Shazly, AM., (2001), Phytochemical and biological studies of *Lotus corniculatus* var. *tenuifolius* L. growing in Egypt. *Alex. J. Pharm.Sci.* 15: 103-108.
233. Seif El-Den, AA., Darwish, FA., AbouDonia ,A., (1987), Flavonoids from *Cleome droserifolin* Del . Growing in Egypt. *Egypt. J. Pharm. Sci.* 28: 313-319.
234. Reyanaud, J., Maurice, J., (1982), Flavonoid glycosides of *Lotus corniculatus* (Leguminosae). *Phytochemistry* 21: 2604-05.
235. De Sousa E et al ., (2004), Hypoglycemic effect and antioxidant potential of Kaempferol-3,7-O- α - dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves, *J. Nat. Prod.* 67: 829-32.
236. Jorge, AP., et al., (2004), Insulinomimetic effects of Kaempferitin on glycaemia and on ^{14}C – glucose uptake in rat soleus muscle, *Chem. Biol. Interaction* 149: 89-96.
237. Molina-Salinas, G. M., Perez-Lopez, A., Becerril-Montes, P., Salazar-Aranda, R., Said-Fernandez, S. and de Torres, N. W., (2007), Evaluation of the flora of northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity, *J Ethnopharmacol* 109(3):435-441.
238. Javanovic S. V., Steenken S., Tasic M., Marjanovic B., Simic M. J., (1994), Flavonoids as antioxidants, *Journal of the American Chemical Society* 116: 4846-4851.
239. Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A. V., Berghe D. K., (1998), Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *Journal of natural product* 61: 71-76.
240. Hendrich, A. B., (2006), Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica.* 27: 27- 40.

Références bibliographiques

241. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., (2006), Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food chemistry* 9: 191-203.
242. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., (1996), Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956.
243. Crozier, A., Jensen, E., Lean, M.E.J., McDonald, M.S., (1997), Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J.Chromatography A.*, 761: 315-321.
244. Hahida, F., and Wanasundara, P.K.J.P.D., (1992), Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32 (1): 67-103
245. Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L., (1997), Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.*, 22 (5): 749-760.
246. Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A., Capasso, F., (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review. Life Sci.*, 65.

Conclusion générale

Le screening phytochimique de *S. delphinifolius* Vahl a été effectué et les résultats ont permis de noter: l'absence des flavonoïdes aglycones, anthocianosides, anthracenoside aglycone, coumarines et des saponines. Néanmoins, les flavonoïdes glycosides, des stérols ou des triterpènes, tanins, les caroténoïdes et les alcaloïdes sont présents dans toutes les parties de la plante.

Etant donné que *Senecio delphinifolius* Vahl appartient à la famille des Asteraceae, une famille connue comme une des principales sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs), cette espèce est susceptible de contenir ce type d'alcaloïdes. Les APs sont potentiellement toxiques lorsqu'ils sont ingérés à partir des plantes utilisées comme médicaments ou aliment ou qui peuvent entrer dans la chaîne alimentaire. La recherche de ces alcaloïdes par GC-MS a permis de déceler la présence de six APs dans les parties aériennes de l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl:

- la déhydrosenkirkine 24%
- la senkirkine 24%
- suivis par la sénéciphylline (22%),
- la sénécionine (12%),
- l'intégerrimine (10%)
- et la neosenkirkine (8%).

Tous ces alcaloïdes identifiés rentrent dans la famille des diesters macrocycliques d'APs insaturés en position 1, 2 qui sont réputés être les plus toxiques par rapport à d'autres classes (les diesters acycliques et les monoesters). Ils peuvent aussi être mutagènes, cancérigènes et inducteurs de tumeurs humaines. D'autre part le genre *Senecio* est un grand producteur d'APs, en effet la plupart des espèces de ce genre ont été rapportées comme sources d'APs. L'analyse quantitative par GC-FID a servi à la quantification des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les parties aériennes de l'espèce *S. delphinifolius* à une concentration totale estimée à 140 ppm. Il faut donc faire attention avec cette espèce et la bannir de l'usage en médecine traditionnelle.

D'autre part les poudres de feuilles et des fleurs, des branches et tiges et des racines ont été soumises à des épuisements successifs avec des solvants de polarités croissantes (n-hexane, dichlorométhane, n-butanol), ce qui a permis d'obtenir des extraits dont diverses activités biologiques (antibactériennes directe, antioxydante, cytotoxicité) ont été évaluées. Les extraits du *S. delphinifolius* au n-hexane, dichlorométhane et n-butanol ont été étudiés pour leur activité contre *S. Aureus* (gram +), *E. Coli* et *P. Aeruginosa* (gram -).

L'extrait n-butanol a montré un faible effet contre *E. Coli*, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 1 mg/ ml, mais est resté inactif contre les autres micro-organismes (CMI > 2 mg / ml). Ces résultats suggèrent que ces extraits ne sont probablement pas favorables pour la recherche de composés antibactériens.

L'extrait butanolique de *S. delphinifolius* a réagi modestement au test antioxydant avec le DPPH avec des valeurs IC₅₀ de 55,3, 50,2 et 13,3 µg/ ml (0,02, 0,03 et 0,10 équivalent quercétine).

L'activité cytotoxique des espèces *Senecio* est essentiellement due au jacaranone constituant présent dans la plus part de ces espèces. Ainsi, par le biais de fractionnement guidé par essais biologiques, un dérivé de la jacaranone (2, 5-Cyclohexadiene-1-acetic acid, 1-methyl-4-oxo, methyl ester), a été isolé pour la première fois de l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl et identifié par des analyses spectroscopiques ¹H RMN ¹³C RMN.

L'étude phytochimique de l'espèce *Senecio delphinifolius* c'est avéré très difficile en utilisant les techniques chromatographiques classiques (CC, CCM préparative), voir même impossible. Il faut donc faire appel à différentes méthodes modernes chromatographique. Malgré cela on a pu isolé pour la première fois de l'espèce *Senecio delphinifolius* Vahl : (1) la Quercétine 3-O-α-(rhamnopyranosyl (1-6) glucopyranose), (2) Kaempferol 3, 7-di-O-α-L-rhamnopyranoside (Kaempferitin), (3) 2,5-Cyclohexadiene-1-acetic acid , 1-methyl-4-oxo, methyl ester et (4) un furanoeremophilane dont la structure est en cours d'élucidation .

En définitive, nous osons espérer que notre contribution, si modeste soit-elle, aura son utilité et pourra aider d'autres recherches orientées vers les APs dans différentes espèces de plantes.

ملخص

على الرغم من أن الأنواع من جنس الشيخة (*Senecio*) من العائلة المركبة تعرف كمصدر لقلويدات البيرولزيدنية السامة إلا ان البعض منها يستعمل تقليديا كوسيلة للعلاج. في هذا العمل تم تقييم الأنشطة البيولوجية وتحليل القلويدات البيرولزيدنية للنبته: *Senecio delphinifolius* Vahl وبالتالي تم تحديد ست قلويدات بيرولزيدنية عن طريق تحليل كروماتوغرافيا الطور الغازي (CG) و كروماتوغرافيا الطور الغازي المقرونة بمطيافية الكتلة (CG/SM): (1) sénécionine (2) seneciphylline (3) Integerrimine (4) senkirkine (5) dehydrosenkirkine (6) neosenkirkine . كثيرا ما تستخدم هذه الطرق لمخاليط معقدة من هذه المركبات. وتحتوي النبتة *Senecio delphinifolius* Vahl على 140 ppm من قلويدات بيرولزيدنية السامة يجب العمل على حذف استخدامها في الطب التقليدي. سمح لنا هذا العمل أيضا بفصل مركبان فلافونيديان جليكوزية ,مركب كينونيين و تم تحديد البنى الجزيئية للمركبات المفصولة باستعمال الطرق الفيزيائية : الأشعة فوق البنفسجية – المرئية (UV-VIS)، مطيافية الكتلة ، بالإضافة الى مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ^1H RMN, ^{13}C RMN و ثنائية البعد , HMBC , HSQC , HMQC.

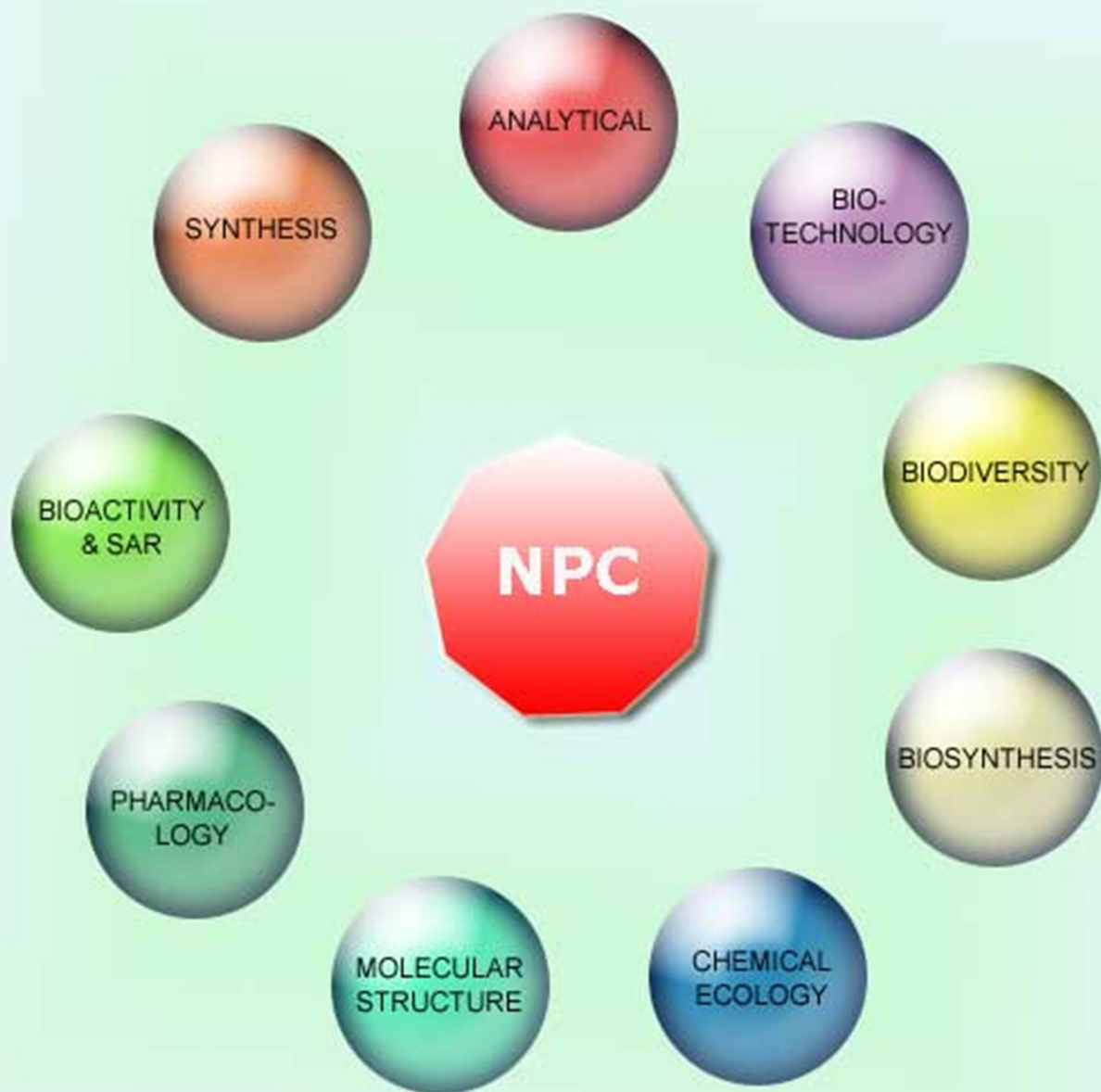
كلمات مفتاحية: *Senecio delphinifolius* Vahl, Asteraceae , قلويدات بيرولزيدنية ,فلافونيديان جليكوزية , كينونات, وكروماتوغرافيا الطور الغازي المقرونة بمطيافية الكتلة (CG/SM), فعالية مضادة للاكسدة , فعالية مضادة للبكتيرية , Cytotoxic .

A decorative horizontal border with a scroll-like appearance on the left and right sides, containing the word ANNEXE in the center.

ANNEXE

NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all
Aspects of Natural Products Research



Volume 8. Issue 4. Pages 427-552. 2013
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)
www.naturalproduct.us

EDITOR-IN-CHIEF**DR. PAWAN K AGRAWAL**

Natural Product Inc.
7963, Anderson Park Lane,
Westerville, Ohio 43081, USA
agrawal@naturalproduct.us

EDITORS**PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO**

Department of Organic Chemistry,
University of Granada,
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain
afbarre@ugr.es

PROFESSOR ALESSANDRA BRACA

Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia,
Università di Pisa,
via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy
braca@farm.unipi.it

PROFESSOR DEAN GUO

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,
School of Pharmaceutical Sciences,
Peking University,
Beijing 100083, China
gda5958@163.com

PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI

School of Pharmacy,
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan
mimakiy@ps.toyaku.ac.jp

PROFESSOR STEPHEN G. PYNE

Department of Chemistry
University of Wollongong
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia
spyne@uow.edu.au

PROFESSOR MANFRED G. REINECKE

Department of Chemistry,
Texas Christian University,
Forts Worth, TX 76129, USA
m.reinecke@tcu.edu

PROFESSOR WILLIAM N. SETZER

Department of Chemistry
The University of Alabama in Huntsville
Huntsville, AL 35809, USA
wsetzer@chemistry.uah.edu

PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA

Institute of Natural Medicine
Institute of Natural Medicine, University of Toyama,
2630-Sugitani, Toyama 930-0194, Japan
tezuka@inm.u-toyama.ac.jp

PROFESSOR DAVID E. THURSTON

Department of Pharmaceutical and Biological Chemistry,
The School of Pharmacy,
University of London, 29-39 Brunswick Square,
London WC1N 1AX, UK
david.thurston@pharmacy.ac.uk

HONORARY EDITOR**PROFESSOR GERALD BLUNDEN**

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,
University of Portsmouth,
Portsmouth, PO1 2DT U.K.
axuf64@dsl.pipex.com

ADVISORY BOARD

Prof. Berhanu M. Abegaz
Gaborone, Botswana

Prof. Viqar Uddin Ahmad
Karachi, Pakistan

Prof. Øyvind M. Andersen
Bergen, Norway

Prof. Giovanni Appendino
Novara, Italy

Prof. Yoshinori Asakawa
Tokushima, Japan

Prof. Lee Banting
Portsmouth, U.K.

Prof. Julie Banerji
Kolkata, India

Prof. Anna R. Bilia
Florence, Italy

Prof. Maurizio Bruno
Palermo, Italy

Prof. César A. N. Catalán
Tucumán, Argentina

Prof. Josep Coll
Barcelona, Spain

Prof. Geoffrey Cordell
Chicago, IL, USA

Prof. Ana Cristina Figueiredo
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera
Murcia, Spain

Prof. Duvvuru Gunasekar
Tirupati, India

Prof. Kurt Hostettmann
Lausanne, Switzerland

Prof. Martin A. Iglesias Arteaga
Mexico, D. F., Mexico

Prof. Leopold Jirovetz
Vienna, Austria

Prof. Vladimir I Kalinin
Vladivostok, Russia

Prof. Niel A. Koobanally
Durban, South Africa

Prof. Karsten Krohn
Paderborn, Germany

Prof. Chiaki Kuroda
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch
Gottingen, Germany

Prof. Marie Lacaille-Dubois
Dijon, France

Prof. Shoei-Sheng Lee
Taipei, Taiwan

Prof. Francisco Macias
Cadiz, Spain

Prof. Imre Mathe
Szeged, Hungary

Prof. Ermino Murano
Trieste, Italy

Prof. M. Soledade C. Pedras
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana
Tahiti, French Polynesia

Prof. Luca Rastrelli
Fisciano, Italy

Prof. Monique Simmonds
Richmond, UK

Dr. Bikram Singh
Palampur, India

Prof. John L. Sorensen
Manitoba, Canada

Prof. Valentin Stonik
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera
Vienna, Austria

INFORMATION FOR AUTHORS

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

To Subscribe: Natural Product Communications is a journal published monthly. 2013 subscription price: US\$2,395 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,395 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,795 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids and Evaluation of Some Biological Activities of Algerian *Senecio delphinifolius* (Asteraceae)

Soukaina Tidjani^a, Philippe N. Okusa^b, Amar Zellaoui^a, Laetitia Moreno Y Banuls^c, Caroline Stévigny^b, Pierre Duez^b and Salah Rhouati^a

^aLaboratory of Natural Products and Organic Synthesis, Department of Chemistry, Faculty of Science, University Mentouri–Constantine, Algeria

^bLaboratory of Pharmacognosy, Bromatology and Human Nutrition, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Brussels, Belgium

^cLaboratory of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Université Libre de Bruxelles (ULB), 1050 Brussels, Belgium

pduiez@ulb.ac.be

Received: August 4th, 2012; Accepted: February 14th, 2013

Although *Senecio* species are known as sources of potentially toxic pyrrolizidine alkaloids (PAs), some species of this genus are traditionally used as remedies, notably in Algeria. In this paper, the evaluation of biological activities and the analysis of PAs of Algerian specimens of *Senecio delphinifolius* Vahl are reported. The *n*-butanolic extract of the herb showed a weak antibacterial effect against *Escherichia coli* with a MIC of 1 mg/mL, but was inactive against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The *n*-butanolic extracts of the roots, stems and herb showed a modest antioxidant activity, scavenging the free radical DPPH with respective IC₅₀ values of 55.3, 50.2 and 13.3 µg/mL. A cytotoxic effect against a series of human tumor cell lines was observed with the *n*-butanolic extract from stems (IC₅₀ ranging between 34 and 88 µg/mL). The herb of the evaluated sample contains 140 ppm of PAs (senecionine, seneciophylline, integerrimine, senkirkine) and PA-related alkaloids (dehydrosenkirkine and neosenkirkine). As the major PAs belong to the toxic series (1,2-unsaturation in the pyrrolizidine cycle and macrocyclic diester), the use of *S. delphinifolius* should be discouraged in traditional medicine.

Keywords: *Senecio delphinifolius*, Asteraceae, Pyrrolizidine alkaloids, Antioxidant, Cytotoxic.

The genus *Senecio*, which belongs to the tribe Senecioneae, is the largest and most complex genus in the family Asteraceae and includes more than 1500 species with a worldwide distribution. *Senecio* species are used all around the world in folk medicine for the treatment of wounds and as an antiemetic, anti-inflammatory, antimicrobial and vasodilator [1]. The genus *Senecio* is represented in Algeria by eighteen species, among which is *S. delphinifolius* Vahl, a plant found endemically in Sicily (Italy) and in North Africa; its vernacular name in Algeria is "*Hachichetolba*".

Given that some *Senecio* species are traditionally used against infectious diseases, the *n*-hexane, dichloromethane and *n*-butanol extracts from *S. delphinifolius* herb were investigated for activity against *S. aureus* (Gram +), *E. coli* and *P. aeruginosa* (Gram -). The *n*-butanol extract showed a weak effect against *E. coli*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 1 mg/mL, but was inactive against the other microorganisms (MIC > 2 mg/mL). These results suggest that the herb of *S. delphinifolius* is probably not a good candidate in the search for antimicrobial compounds.

The antioxidant activity of extracts from *S. delphinifolius* root, stem and herb evaluated by a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay showed that the *n*-hexane and dichloromethane extracts from each plant part were practically inactive (IC₅₀ > 500 µg/mL), whereas the *n*-butanol extracts showed a modest scavenging effect with IC₅₀ values of 55.3, 50.2 and 13.3 µg/mL (0.02, 0.03 and 0.10 quercetin equivalents) for root, stem and herb, respectively. Since phenolic compounds have been reported for the genus *Senecio* [1], the observed antioxidant activity could be attributed to these compounds.

Only the *n*-butanol extract from the stem was active against all tested human tumor cell lines with IC₅₀ values ranging between 34

Table 1: Cytotoxic effect of *S. delphinifolius* extracts on human cancer cell lines (IC₅₀ in µg/mL).

Extracts	Cell lines		
	HT29	Hs683	A549
Root			
<i>n</i> -hexane	n.d.	n.d.	n.d.
dichloromethane	39	> 100	> 100
<i>n</i> -butanol	> 100	n.d.	n.d.
Stem			
<i>n</i> -hexane	> 100	n.d.	n.d.
dichloromethane	> 100	n.d.	n.d.
<i>n</i> -butanol	34	74	88
Herb			
<i>n</i> -hexane	> 100	n.d.	n.d.
dichloromethane	> 100	n.d.	n.d.
<i>n</i> -butanol	79	78	> 100

nd: not determined. Cells lines: HT29 (colon cancer), Hs683 oligodendroglioma and A549 non-small-cell lung cancer. The IC₅₀ values for cell lines Hs683 and A549 were determined only when the IC₅₀ growth inhibitory concentration on HT29 cell line was under 100 µg/mL.

and 88 µg/mL (Table 1). These results agree with those obtained with other *Senecio* species [2]. Pyrrolizidine alkaloids (PAs), composed of a necine base and a necic acid, are divided into two groups, (i) PAs with a saturated necine moiety, which are non-toxic; and (ii) PAs with a 1,2-unsaturated necine base, which are hepatotoxic to mammals and genotoxic [3]. PAs of the macrocyclic senecionine type belong to the second group and are secondary metabolites characteristic of most species of *Senecio*. These PAs are deterrent and toxic to most vertebrates and insects and provide plants with a chemical defense against herbivores [4]. GC-MS analysis showed the presence of PAs at an estimated total concentration of 140 ppm (expressed as heliotrine, as described in [5]). Analysis of the alkaloid extract (Table 2) showed that dehydrosenkirkine and senkirkine were the most abundant (24% each), followed by seneciophylline (22%), senecionine (12%), integerrimine (10%) and neosenkirkine (8%).

Table 2: Identification and profile (%) of pyrrolizidine alkaloids in the reduced alkaloid extract of *Senecio delphinifolius*, as determined by GC and GC-MS.

PAs	RI	EI-MS (M+)	Ratio
Senecionine	2304	335	12
Seneciphylline	2320	333	22
Integerrimine	2362	335	10
Senkirkine	2484	365	24
Dehydrosenkirkine	2524	363	24
Neosenkirkine	2554	365	8

Legend: RI, retention index. EI-MS: Electronic impact mass spectrometry.

These results are in accordance with Pelser *et al* [6], who identified these six PAs in a specimen of *S. delphinifolius* from Tunisia in almost the same proportions. PAs are known to be hepatotoxic to human and animals, and, in particular, genotoxic. Although PA-induced hepatotoxicity significantly varies, depending on necine structures and *N*-oxidation, recommended dose thresholds are quite difficult to estimate and to extrapolate universally to all PAs [7,8]. Fetuses and infants, being particularly susceptible to PA poisoning, pregnant and lactating women should not use PA-containing herbs [9]. Nevertheless, the herb of this plant contains about 140 ppm of unsaturated PAs, potentially hepato- and genotoxic; thus the use of its extracts should be restricted in phytomedicine, despite the observed activities.

Experimental

Plant material: *Senecio delphinifolius* was collected in April 2007 (flowering stage) in Grareme Mila, Algeria. The plant was identified by Dr Kaabache Mohamed, Setif University. A voucher specimen was deposited at the University of Mentouri-Constantine (N° ZA 117) and at the Herbarium of the National Botanical Garden of Meise, Belgium (BR0000005333899).

Extract preparation: One hundred g of root / stem / herb were exhaustively and successively extracted by solvents of increasing polarity; evaporation of the solvents under reduced pressure yielded the extracts: *n*-hexane (yield, 0.2 g / 0.5 g / 4.4 g), dichloromethane (yield, 0.3 g / 0.3 g / 5.8 g) and *n*-butanol (yield, 3.1 g / 4.6 g / 7.9 g).

Analysis of pyrrolizidine alkaloids: About 0.5 g of plant material was homogenized in 20 mL HCl 1 M for 10 min and the homogenate left to stand at room temperature for 30 min. After centrifugation, half of the supernatant was made basic with NH₄OH, applied to an Extrelut[®] column (1 mL extract / g Extrelut[®]) and

eluted with 40 mL of CH₂Cl₂; after evaporation of the solvent, the residue was re-dissolved in 200 µL of methanol. To investigate for the presence of *N*-oxides, the other half of the acidic extract was reduced with Zn dust for 4 h and similarly treated [5]. The obtained extracts were analyzed by GC and GC-MS, as previously described [5]. Heliotrine was used as standard.

Antibacterial activity: The antibacterial activity was evaluated, as previously described [10], by a broth microdilution method using the following strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (10⁵ cells/well)

Antioxidant activity: The antioxidant activity was assessed by colorimetric measurement of the scavenging ability of compounds towards the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), as previously described [10].

MTT cell proliferation assay: The human cancer cell lines included the Hs683 (ATCC code HTB-138) glioma, the A549 (DSMZ code ACC107) NSCLC and the HT29 (ATCC code HTB-38) colon cancer models. The cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 4 mM glutamine, 100 µg/mL gentamicin, 200 U/mL penicillin and 200 µg/mL streptomycin (Lonza, Verviers, Belgium). For the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) reduction assay, cells (12,000 cells/mL culture medium) were seeded in 96-microwell plates. After 24 h, the medium was replaced by medium containing increasing concentrations of the drugs to be analyzed and incubated at 37°C, in 5% CO₂ for 72 h. The medium was removed and 100 µL of MTT solution (0.5 mg/mL in RPMI 1640 without phenol red) was added to each well. The plate was re-incubated for 3h30, the solution was removed and replaced by DMSO (Merck, Hohenbrunn, Germany). The plate was then gently shaken and the intensity of the coloration was measured by spectrophotometry (Biorad model 680XR, Biorad, Nazareth, Belgium) at 570 nm (with a reference of 630 nm) [2].

Acknowledgments – Dr Till Beuerle and Mrs Claudine Theuring (University of Braunschweig, Germany) are gratefully acknowledged for help in PAs analysis. Authors are grateful for partial financial support from the MESRS (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique) Algeria. The technical assistance of Marie Faes is gratefully acknowledged.

References

- Yang Y, Zhao L, Wang Y, Chang M, Huo C, Gu Y, Shi Q, Kiyota H. (2011) Chemical and pharmacological research on plants from the genus *Senecio*. *Chemistry & Biodiversity*, **8**, 13-72.
- Loizzo MR, Tundis R, Statti GA, Menichini F, Houghton PJ. (2005) *In-vitro* antiproliferative effects on human tumour cell lines of extracts and jacaranone from *Senecio leucanthemifolius* Poir. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57**, 897-901.
- Mori H, Sugie S, Yoshimi N, Asada Y, Furuya T, Williams GM. (1985) Genotoxicity of a variety of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture-DNA repair test using rat, mouse, and hamster hepatocytes. *Cancer Research*, **45**, 3125-3129.
- Rosemann GM. (2006) Analysis of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species by HPLC-MS/MS in order to evaluate related food health risks. Thesis, Faculty of Veterinary Science. University of Pretoria, Pretoria.
- Witte L, Rubiolo P, Bicchì C, Hartmann T. (1993) Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry*, **32**, 187-196.
- Pelser PB, De Vos H, Theuring C, Beuerle T, Vrieling K, Hartmann T. (2005) Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of *Senecio* section *Jacobaea* (Asteraceae). *Phytochemistry*, **66**, 1285-1295.
- Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. (2007) Consultation letter mlx 296: proposals to prohibit the sale, supply or importation of unlicensed herbal medicinal products for internal use which contain *Senecio* species, http://www.mhra.gov.uk/home/idcplg?IdcService=GET_FILE&dDocName=CON2030749&RevisionSelectionMethod=LatestReleased (consulted on July 5, 2011).
- Edgar JA, Roeder E, Molyneux RJ. (2002) Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: a potential threat to health. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **50**, 2719-2730.
- German Federal Health Bureau. (1992) G.F.H.B., Bundesanzeiger. *Deutsche Apotheker Zeitung*, **132**, 1406-1408.
- Okusa PN, Penge O, Devleeschouwer M, Duez P. (2007) Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **112**, 476-481.

Volatile Composition of Six Horsetails: Prospects and Perspectives Françoise Fons, Didier Froissard, Jean-Marie Bessière, Alain Fruchier, Bruno Buatois and Sylvie Rapior	509
Chemical Compositions of the Rhizome, Leaf and Stem Oils from Malaysian <i>Hornstedtia leonurus</i> Nor Akmalazura Jani, Hasnah Mohd. Sirat, NorAzah Mohamad Ali and Azrina Aziz	513
Effect on Emotional Behavior and Stress by Inhalation of the Essential oil from <i>Chamaecyparis obtusa</i> Hikaru Kasuya, Erika Hata, Tadaaki Satou, Masaki Yoshikawa, Shinichiro Hayashi, Yoshinori Masuo and Kazuo Koike	515
Chemical Composition and Antibacterial Activity of Rhizome Oils from Five <i>Hedychium</i> Species Ratchuporn Suksathan, Siriwoot Sookkhee, Somboon Anuntalabhochai and Sunee Chansakaow	519
Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Three Essential Oils from <i>Curcuma wenyujin</i> Jingjing Zhu, Agnieszka D. Lower-Nedza, Meng Hong, Song Jiec, Zhimin Wang, Dong Yingmao, Christine Tschiggerl, Franz Bucar and Adelheid H. Brantner	523
Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of Aerial Parts and Ripe Fruits of <i>Echinophora spinosa</i> (Apiaceae) from Italy Daniele Fraternali, Salvatore Genovese and Donata Ricci	527
Composition and <i>in vitro</i> Anticancer Activities of the Leaf Essential Oil of <i>Neolitsea variabilissima</i> from Taiwan Yu-Chang Su, Kuan-Ping Hsu, Eugene I-Chen Wang and Chen-Lung Ho	531
<u>Review/Account</u>	
Natural Products from Marine Algae of the Genus <i>Osmundaria</i> (Rhodophyceae, Ceramiales) Kelvin Osako and Valéria Laneuville Teixeira	533
Phenols, Alkaloids and Terpenes from Medicinal Plants with Antihypertensive and Vasorelaxant Activities. A Review of Natural Products as Leads to Potential Therapeutic Agents Francesco Maione, Carla Cicala, Giulia Musciacco, Vincenzo De Feo, Anibal G. Amat, Armando Ialenti and Nicola Mascolo	539
Diosmin – Isolation Techniques, Determination in Plant Material and Pharmaceutical Formulations, and Clinical Use Anna Bogucka – Kocka, Michał Woźniak, Marcin Feldo, Janusz Kocki and Katarzyna Szewczyk	545

Natural Product Communications

2013

Volume 8, Number 4

Contents

<u>Original Paper</u>	<u>Page</u>
Anti-melanogenesis Constituents from the Seaweed <i>Dictyota coriacea</i> Ryeo Kyeong Ko, Min-Chul Kang, Sang Suk Kim, Tae Heon Oh, Gi-Ok Kim, Chang-Gu Hyun, Jin Won Hyun and Nam Ho Lee	427
Methyl Carnosate, an Antibacterial Diterpene Isolated from <i>Salvia officinalis</i> Leaves Elisa Klimati, Fabio Mastrogiovanni, Maria Valeri, Laura Salvini, Claudia Bonechi, Nilufar Zokirzhonovna Mamadalieva, Dilfuza Egamberdieva, Anna Rita Taddei and Antonio Tiezzi	429
Cytotoxicity of Meroterpenoids from <i>Sargassum siliquastrum</i> against Human Cancer Cells Jung Im Lee, Myoung K. Kwak, Hee Y. Park and Youngwan Seo	431
Isolation of Methyl 27-caffeoyloxyoleanolate – A New Oleanane Triterpenoid from the Roots of <i>Hibiscus vitifolius</i> Duraismy Ramasamy and Ariamuthu Saraswathy	433
Synthesis and Cytotoxic Activity of New Betulin and Betulinic Acid Esters with Conjugated Linoleic Acid (CLA) Barbara Tubek, Pawel Mitula, Natalia Niezgodna, Katarzyna Kempinska, Joanna Wietrzyk and Czeslaw Wawrzenczyk	435
Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids and Evaluation of Some Biological Activities of Algerian <i>Senecio delphinifolius</i> (Asteraceae) Soukaina Tidjani, Philippe N. Okusa, Amar Zellagui, Laetitia Moreno Y Banuls, Caroline Stévigny, Pierre Duez and Salah Rhouati	439
Berbanine: a New Isoquinoline-isoquinolone Alkaloid from <i>Berberis vulgaris</i> (Berberidaceae) Anna Hošťálková, Zdeněk Novák, Milan Pour, Anna Jirošová, Lubomír Opletal, Jiří Kuneš and Lucie Cahliková	441
Dicentrine Production in Callus and Cell Suspension Cultures of <i>Stephania venosa</i> Tharita Kitisripanya, Jukrapun Komaikul, Nirachara Tawinkan, Chuennapha Atsawinkowit and Waraporn Putalun	443
New Flavan and Alkyl α,β-Lactones from the Stem Bark of <i>Horsfieldia superba</i> Nabil Ali Al-Mekhlafi, Khozirah Shaari, Faridah Abas, Ethyl Jeyaseela Jeyaraj, Johnson Stanslas, Shaik Ibrahim Khalivulla and Nordin H. Lajis	447
New Flavonol Triglycosides from the Leaves of Soybean Cultivars Yoshinori Murai, Ryoji Takahashi, Felipe Rojas Rodas, Junichi Kitajima and Tsukasa Iwashina	453
Melitidin: A Flavanone Glycoside from <i>Citrus grandis</i> ‘Tomentosa’ Wei Zou, Yonggang Wang, Haibin Liu, Yulong Luo, Si Chen and Weiwei Su	457
Two New Chalcones from the Flowers of <i>Clerodendrum inerme</i> Shaik Khadar Shahabuddin, Rachakunta Munikishore, Golakoti Trimurtulu, Duvvuru Gunasekar, Alexandre Deville and Bernard Bodo	459
A Novel Phenolic Compound from <i>Phyllanthus emblica</i> Gaimei She, Ruiyang Cheng, Lei Sha, Yixia Xu, Renbin Shi, Lanzhen Zhang and Yajian Guo	461
Anti-austeric Activity of Phenolic Constituents of Seeds of <i>Arctium lappa</i> Yasuhiro Tezuka, Keiichi Yamamoto, Suresh Awale, Feng Li, Satoshi Yomoda and Shigetoshi Kadota	463
Bioactive Lignans from the Leaves and Stems of <i>Schisandra wilsoniana</i> Guang-Yu Yang, Rui-Rui Wang, Zhong-Hua Gao, Yin-Ke Li, Liu-Meng Yang, Xiao-Nian Li, Shan-Zhai Shang, Yong-Tang Zheng, Wei-Lie Xiao and Han-Dong Sun	467
Antioxidative / Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Asteraceae Plants Ivana Generalić Mekinić, Franko Burčul, Ivica Blažević, Danijela Skroza, Daniela Kerum and Višnja Katalinić	471
Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Phenolic Compounds of Selected <i>Inula</i> species from Turkey Alper Gökbulut, Onural Özhan, Basri Satılmış, Kadir Batçoğlu, Selami Günel and Engin Şarer	475
Two New Dihydrostilbenoid Glycosides Isolated from the Leaves of <i>Litsea coreana</i> and their Anti-inflammatory Activity Wenjian Tang, Weili Lu, Xiaoqing Cao, Yilong Zhang, Hong Zhang, Xiongwen Lv and Jun Li	479
Inhibitory Activity of Benzophenones from <i>Anemarrhena asphodeloides</i> on Pancreatic Lipase Yang Hee Jo, Seon Beom Kim, Jong Hoon Ahn, Qing Liu, Bang Yeon Hwang and Mi Kyeong Lee	481
Identification and Quantification of Furanocoumarins in Stem Bark and Wood of Eight Algerian Varieties of <i>Ficus carica</i> by RP-HPLC-DAD and RP-HPLC-DAD-MS Samia Rouaiguia-Bouakkaz, Habiba Amira-Guebailia, Céline Rivière, Jean-Claude Delaunay, Pierre Waffo-Téguo and Jean-Michel Mérillon	485
UPLC-Q-TOF/MS Coupled with Multivariate Statistical Analysis as a Powerful Technique for Rapidly Exploring Potential Chemical Markers to Differentiate Between <i>Radix Paeoniae Alba</i> and <i>Radix Paeoniae Rubra</i> Nian-cui Luo, Wen Ding, Jing Wu, Da-wei Qian, Zhen-hao Li, Ye-fei Qian, Jian-ming Guo and Jin-ao Duan	487
Antimicrobial Activity of Crude Methanolic Extract from <i>Phyllanthus niruri</i> Darah Ibrahim, Lim Sheh Hong and Ninthianantham Kuppan	493
Cellulose Contents of Some Abundant Indian Seaweed Species Arup K. Siddhanta, Sanjay Kumar, Gaurav K. Mehta, Mahesh U. Chhatbar, Mihir D. Oza, Naresh D. Sanandiya, Dharmesh R. Chejara, Chirag B. Godiya and Stalin Kondaveeti	497
Anti-inflammatory Potential of Silk Sericin Pornanong Aramwit, Pasarapa Towiwat and Teerapol Srichana	501
Composition of Essential Oil from Aerial and Underground Parts of <i>Geum rivale</i> and <i>G. urbanum</i> Growing in Poland Aleksandra Owczarek, Jan Gudej and Agnieszka Kice	505

Continued Inside backcover

Summary

Although *Senecio* species are known as sources of potentially toxic pyrrolizidine alkaloids (PAs), some species of this genus are traditionally used as remedies. In this work the evaluation of biological activities and the analysis of PAs of Algerian specimens of *Senecio delphinifolius* Vahl (its vernacular name in Algeria is "Hachichettolba") are reported. Thus it was possible to identify six APs by GC and GC-MS analysis: **(1)** senecionine **(2)** seneciphylline **(3)** integerrimine **(4)** senkirkine **(5)** dehydrosenkirkine and **(6)** neosenkirkine, this technique is frequently used for complex mixtures of such compounds. The species *S. delphinifolius*, contains 140 ppm of PAs belong to the toxic series (1, 2-unsaturation in the pyrrolizidine cycle and macrocyclic diester), the use of *S. delphinifolius* should be discouraged in traditional medicine.

Our research has also led to the isolation by conventional purification techniques of three compounds from the n-butanol extract of the specie *S. delphinifolius* Vahl two of them are glycosylated flavonols, **(7)** Quercetine 3-O- α -(rhamnopyranosyl (1-6) glucopyranose) [rutine], **(8)** Kaempferol 3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside [Kaempferitin], the third is a derivative of 1, 4-benzoquinone that are common in the genus *Senecio* **(9)** 2, 5 Cyclohexadiene-1-acetic acid, 1-methyl-4-oxo, methyl ester. A fourth product was isolated from the dichloromethane extract, the structure is being identified. The structures of the isolated compounds were elucidated through the use of NMR techniques 1D and 2D, mass spectroscopy, UV spectroscopy and acid hydrolysis. **(10)** Chlorogenic acid was identified by co-chromatography with standards.

Keywords: *Senecio delphinifolius* Vahl, Asteraceae, Pyrrolizidine alkaloids, Flavonoïdes, quinone, GCMS, Chromatography, antibacterial, Antioxydant, Cytotoxic.

Résumé

Bien que les espèces du genre *Senecio* soient connues en tant que sources d'alcaloïdes pyrrolizidiniques potentiellement toxiques, certaines d'entre eux sont traditionnellement utilisées comme remèdes.

Dans ce travail ont été rapportées, l'évaluation des activités biologiques et l'analyse des APs de l'espèce Algérienne *Senecio delphinifolius* Vahl (son nom vernaculaire en Algérie est "Hachichettolba"). De ce fait on a pu identifier six APs par analyse GC et GC-MS:

(1) sénécionine **(2)** seneciphylline **(3)** integerrimine **(4)** senkirkine **(5)** dehydrosenkirkine et **(6)** neosenkirkine, ces techniques sont fréquemment utilisées pour les mélanges complexes de ce genre de composés. L'espèce *S. delphinifolius* Vahl, renferme pas mal d'alcaloïdes tous toxiques à une concentration totale estimée à 140 ppm, elle doit être banni de l'utilisation en médecine traditionnelle.

Notre étude a également mené à l'isolement par des techniques de purification classique de trois composés de l'extrait n-butanol des branches et tiges de l'espèce *S. delphinifolius*, deux d'entre eux sont des flavonols diglycosylées, **(7)** Quercetine 3-O- α -(rhamnopyranosyl (1-6) glucopyranose) [rutine], **(8)** Kaempferol 3,7-di-O- α -L-rhamnopyranoside [Kaempferitin], le troisième est un dérivé de la 1, 4-benzoquinone qui sont courants dans le genre *Senecio* **(9)** 2, 5 Cyclohexadiene-1-acetic acid, 1-methyl-4-oxo, methyl ester. Les structures des composés isolés ont été élucidées par l'utilisation de techniques de RMN 1D et 2D, spectroscopie de masse, spectroscopie UV et hydrolyse acide. L'acide chlorogénique **(10)** a été identifié par co-chromatographie avec des standards.

Mots clés: Asteraceae, *Senecio delphinifolius*, Alcaloïdes pyrrolizidiniques, Flavonoïdes, Furanoeremophilane, quinone, CGMS, Chromatographie, activité antioxydante, cytotoxicité, activité antibactérienne.