

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen**  
**Faculté de Médecine Dr B. Benzerdjeb**

## **THÈSE**

Pour l'obtention du  
**DOCTORAT EN SCIENCES MÉDICALES**  
Spécialité: Pharmacognosie

# **ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE BIOGUIDÉE DE PLANTES AROMATIQUES SAHARIENNES**

Soutenue publiquement le 30 Septembre 2017

**Le Docteur DALI YAHIA Mustapha Kamel**

Maître Assistant en Pharmacognosie

Devant le Jury

### **Président**

Pr. ABED Lahouari

Faculté de médecine d'Alger

### **Membres**

Pr. BOUTEFNOUCHET Sabrina

Faculté de pharmacie de Paris

Pr. AMOURA-BOUGHANDJIOUA Nadia

Faculté de médecine d'Annaba

Pr. KAJIMA MULENGI Joseph

Faculté des sciences de Tlemcen

Pr. AZZI Rachid

Faculté des sciences de la nature et de  
la vie, sciences de la terre et de  
l'univers (Université de Tlemcen)

### **Directeur de thèse**

Pr. BENMANSOUR Mustapha

Faculté de médecine de Tlemcen

*À la mémoire de mes grands-parents*

*À mes parents que Dieu les protège*

*À ma femme pour son soutien indéfectible et pour  
son rôle dans l'initiation de ce projet de thèse*

*À ma fille Selma*

*Je dédie ce travail,  
Kamel.*

## REMERCIEMENTS

*Mes chaleureux remerciements et ma profonde gratitude vont à mon Maître le Professeur L. ABED qui a eu la bienveillance de présider le jury de cette thèse, Mesdames les Professeures S. BOUTEFNOUCHET et N. AMOURA-BOUGHANDJIOUA, Messieurs les Professeurs J. KAJIMA MULENGI et R. AZZI qui ont accepté d'examiner et de juger cette thèse.*

*Mon Maître et Directeur de thèse Monsieur le Professeur M. BENMANSOUR Chef de service de Néphrologie au CHU Dr Tidjani Damerdji de Tlemcen. Je le remercie d'avoir accepté d'encadrer et de corriger ce travail de thèse, aussi je lui exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude.*

*Je souhaite vivement remercier un à un tous les membres du Laboratoire de Pharmacognosie de Paris-Descartes et à leur tête Madame la Professeure S. MICHEL, d'avoir accepté de m'accueillir dans l'enceinte de l'UMR-CNRS 8638 COMETE. Je remercie particulièrement Madame S. BOUTEFNOUCHET d'avoir accepté de diriger mes recherches dans le cadre du programme boursier algéro-français PROFAS durant l'année 2015 ; sans oublier son doctorant S. ORTIZ avec qui, j'ai partagé beaucoup de connaissances et de savoir-faire, notamment lors de l'étude de *Pentzia monodiana*.*

*Mes remerciements vont également à :*

*Monsieur le Professeur P. GRELLIER de m'avoir accueilli au niveau de l'UMR 7245 CNRS du Muséum National d'Histoire Naturelle, le temps d'effectuer les tests *in vitro* sur *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei brucei*.*

*Monsieur A. AOUALI Directeur de l'Office National du Parc Culturel de l'Ahaggar (ONPCA), pour son appui matériel et logistique dans le cadre de la convention d'échange et de coopération.*

Monsieur M. BELGHOUL chef de Département des Études et de Développement du Patrimoine Naturel (ONPCA) pour sa disponibilité continue et sa précieuse contribution dans la connaissance des plantes de la région.

Monsieur B. EBABER chauffeur et guide à l'ONPCA.

Tous mes amis, spécialement le Docteur N. CHEIKHI, pharmacien d'officine à Tamanrasset pour son amabilité et pour son immense hospitalité.

Mes collègues, particulièrement le Docteur D. BOUKHALFA qui a eu le mérite d'organiser toutes nos sorties sur le terrain pour les collectes des échantillons de plantes. Il devait à chaque fois faire les démarches auprès du Ministère de la Culture et de la Communication pour obtenir les autorisations de mission sur le terrain, jusqu'à l'établissement d'une convention d'échange et de coopération avec l'ONPCA dans le cadre de la recherche sur la flore de l'Ahaggar.

Mes remerciements et ma reconnaissance s'adressent également à tout le personnel administratif de la Faculté de Médecine de Tlemcen et à leur tête Monsieur le Professeur N. BERBER, doyen actuel, et aussi à Monsieur le Professeur K. MEGUENNI, ex. doyen qui m'avait encouragé à m'inscrire en thèse.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour notre regretté F. ABDELAZIZ ex. photographe à l'Office du Parc National de l'Ahaggar (ancienne désignation de l'ONPCA) avec qui j'avais partagé ma passion pour la macrophotographie des végétaux et des insectes.

Merci du fond du cœur à tous ceux que j'ai oublié de citer et qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

## SOMMAIRE

Liste des abréviations.....	XI
Glossaire des termes scientifiques.....	XIII
Liste des tableaux.....	XVII
Liste des figures.....	XIX
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
1. État de la question .....	1
2. Objectifs .....	3
<b>Chapitre I : Synthèse Bibliographique.....</b>	<b>5</b>
I.1. Rappels sur le paludisme et sur les autres protozooses humaines graves.....	5
I.1.1. Paludisme.....	5
I.1.1.1. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> .....	8
I.1.1.2. Rôle de l'hème et de l'hémozoïne dans le paludisme.....	11
I.1.1.3. Principaux médicaments antipaludiques et résistance du <i>Plasmodium</i> .....	12
I.1.2. Leishmanioses.....	15
I.1.3. Trypanosomiase humaine africaine.....	18
I.2. Plantes à activité antipaludique.....	22
I.2.1. Plantes à alcaloïdes.....	22
I.2.1.1. Quinquinas ( <i>Cinchona</i> ).....	22
I.2.1.2. Ménispermacées à alcaloïdes benzyloquinoléiques.....	23
I.2.1.2.1. <i>Triclisia patens</i> .....	23
I.2.1.2.2. <i>Cyclea barbata</i> .....	24
I.2.2. Plantes à terpénoïdes.....	24
I.2.2.1. Astéracées à lactones sesquiterpéniques.....	24
I.2.2.1.1. <i>Artemisia annua</i> .....	24
I.2.2.1.2. <i>Artemisia afra</i> .....	24
I.2.2.1.3. <i>Arnica montana</i> .....	25
I.2.2.1.4. <i>Neurolaena lobata</i> .....	25
I.2.2.1.5. <i>Parthenium hysterophorus</i> .....	25
I.2.2.1.6. <i>Tithonia diversifolia</i> .....	26
I.2.2.1.7. <i>Vernonia colorata</i> .....	26
I.2.2.2. Diterpènes du <i>Laetia procera</i> .....	27
I.2.2.3. Simaroubacées à quassinoïdes.....	28
I.2.3. Plantes à flavonoïdes.....	29

I.2.3.1. Flavonoïdes prénylés.....	29
I.2.3.1.1. <i>Artocarpus champeden</i> .....	30
I.2.3.1.2. <i>Erythrina fusca</i> .....	30
I.2.3.1.3. <i>Erythrina subumbrans</i> .....	30
I.2.3.1.4. <i>Artemisia indica</i> .....	30
I.2.3.2. Chalcones oxygénées.....	32
I.2.3.2.1. <i>Glycyrrhiza uralensis</i> .....	32
I.2.3.2.2. <i>Micromelum tephrocarpum</i> .....	32
I.2.3.3. Plantes à flavonoïdes méthoxylés.....	32
I.2.4. Plantes à coumarines.....	33
I.2.4.1. <i>Grewia bilamellata</i> .....	33
I.2.4.2. <i>Zanthoxylum flavum</i> .....	33
I.2.5. Plantes à xanthones.....	34
I.2.5.1. <i>Cratoxylum cochinchinense</i> .....	34
I.2.5.2. Clusiacées à hydroxyxanthones.....	34
I.2.5.2.1. <i>Allanblackia monticola</i> .....	34
I.2.5.2.2. <i>Garcinia polyantha</i> .....	35
I.2.5.2.3. <i>Symphonia globulifera</i> .....	35
I.2.6. Plantes à phloroglucinols polycycliques polyprénylés.....	35
I.2.7. Dérivés phénoliques des Pipéracées.....	37
I.2.7.1. <i>Piper tricuspe</i> .....	37
I.2.7.2. <i>Pothomorphe peltata</i> .....	37
I.3. Méthodes de recherche sur les médicaments antipaludiques.....	38
I.3.1. Investigations par détection de l'activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> .....	38
I.3.2. Investigation par détection en spectroscopie de masse des composés se liant à l'hème.....	39
I.4. Aperçu géobotanique du Hoggar.....	40
I.4.1. Notion d'"étage tropical".....	40
I.4.2. Notion d'"étage méditerranéen inférieur".....	41
I.4.2. Notion d'"étage méditerranéen supérieur".....	41
I.5. Données botaniques concernant les plantes aromatiques étudiées.....	41
I.5.1. Origine phylogénétique de la famille des Astéracées.....	42
I.5.1.1. Embranchement des Embryophytes.....	42
I.5.1.2. Sous-embranchement des Trachéophytes.....	42
I.5.1.3. Super-classe des Spermatophytes.....	43
I.5.1.4. Classe des Angiospermes.....	43
I.5.1.5. Clade des Eudicotylédones.....	44

I.5.1.6. Clade des Astéridées.....	45
I.5.1.7. Ordre des Astérales.....	45
I.5.1.8. Famille des Astéracées.....	46
I.5.2. Place des plantes aromatiques collectées dans la systématique des Astéracées.....	48
I.5.2.1. Genre <i>Artemisia</i> .....	49
I.5.2.2. Genre <i>Pentzia</i> .....	49
I.5.2.3. Genre <i>Pulicaria</i> .....	50
I.6. Données phytochimiques concernant les plantes étudiées.....	51
I.6.1. Métabolites secondaires des Astéracées.....	51
I.6.1.1. Flavonoïdes.....	51
I.6.1.2. Lactones sesquiterpéniques.....	54
I.6.2. Phytochimie du genre <i>Artemisia</i> .....	55
I.6.2.1. Phytochimie de l'espèce <i>Artemisia campestris</i> .....	61
I.6.2.1.1. Les terpénoïdes volatils.....	61
I.6.2.1.2. Les composés aromatiques.....	63
I.6.2.2. Phytochimie de l'espèce <i>Artemisia judaica</i> .....	66
I.6.3. Phytochimie de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> .....	67
I.6.4. Phytochimie de l'espèce <i>Pulicaria incisa</i> .....	69
I.7. Données pharmacologiques concernant les plantes étudiées.....	69
I.7.1. Composés bioactifs isolés de l' <i>Artemisia campestris</i> .....	70
I.7.2. Composés bioactifs isolés de l' <i>Artemisia judaica</i> .....	70
I.7.3. Composés bioactifs isolés de <i>Pentzia monodiana</i> .....	71
I.7.4. Composés bioactifs isolés de <i>Pulicaria incisa</i> .....	71
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>73</b>
II.1. Matériel végétal.....	73
II.1.1. Critères de choix des espèces à collecter.....	73
II.1.2. Conditions d'échantillonnage des plantes sélectionnées.....	73
II.1.2.1. Identification botanique des espèces collectées.....	73
II.1.2.2. Protocole de collecte.....	74
II.1.2.3. Zone de collecte.....	74
II.1.2.4. Stations de collecte.....	74
II.1.2.5. Périodes de collecte.....	76
II.1.3. Préparation des échantillons de plantes pour l'extraction.....	77
II.1.3.1. Séchage.....	77
II.1.3.2. Broyage.....	77

II.1.3.3. Technique d'observation des caractères microscopiques des poudres végétales.....	77
II.2. Solvants et réactifs utilisés.....	78
II.2.1. Solvants.....	78
II.2.2. Réactif de Gazet du Chatelier.....	78
II.2.3. Réactifs généraux utilisés dans le criblage phytochimique.....	79
II.2.3.1. Réactif de Bouchardat.....	79
II.2.3.2. Réactif de Dragendorff.....	79
II.2.3.3. Réactif de Lieberman.....	79
II.2.3.4. Réactif de Stiasny.....	80
II.2.4. Réactifs utilisés comme révélateurs en chromatographie sur couche mince.....	81
II.2.4.1. Réactif de Dragendorff dilué.....	80
II.2.4.2. Réactif à la vanilline sulfurique.....	80
II.2.4.3. Réactif de Neu.....	81
II.3. Méthode d'extraction.....	81
II.3.1. Extraction sous pression.....	81
II.3.1.1. Principe et appareillage.....	81
II.3.1.2. Mode opératoire.....	82
II.3.1.2.1. Préparation des cellules d'extraction.....	82
II.3.1.2.2. Programme des extractions.....	83
II.3.2. Concentration des extraits bruts et des fractions.....	84
II.4. Méthodes chromatographiques.....	85
II.4.1. Chromatographies analytiques utilisées.....	85
II.4.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique.....	85
II.4.1.2. Chromatographie en phase liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse (ou UPLC-MS).....	86
II.4.1.2.1. Principe.....	86
II.4.1.2.2. Appareillage et mode opératoire.....	87
II.4.2. Chromatographies préparatives utilisées.....	88
II.4.2.1. Chromatographie éclair sur colonne de gel de silice.....	88
II.4.2.1.1. Mode opératoire adopté lors du fractionnement de lot D issu de la CPC de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	90
II.4.2.1.2. Mode opératoire adopté lors du fractionnement des lots regroupés EFGH issus de la CPC de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	90
II.4.2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	91
II.4.2.3. Chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	92



II.4.2.3.1. Principe.....	92
II.4.2.3.2. Appareillage.....	94
II.4.2.3.3. Optimisation des conditions de séparation.....	95
II.4.2.3.4. Sélection du système biphasique de solvants.....	95
II.4.2.3.5. Fractionnement de l'extrait AcOET de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> à l'aide de la CPC.....	96
II.5. Méthodes d'analyse spectrométrique.....	97
II.5.1. Spectrométrie de masse à temps de vol (ou TOF-MS).....	97
II.5.1.1. Principe.....	97
II.5.1.2. Appareillage et mode opératoire.....	98
II.5.2. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	98
II.5.2.1. Principe.....	99
II.5.2.2. Appareillage et mode opératoire.....	99
II.6. Méthodes de recherche de l'activité antiparasitaire.....	100
II.6.1. Test de fixation à l'hème.....	100
II.6.1.1. Principe.....	100
II.6.1.2. Appareillage et mode opératoire.....	100
II.6.2. Evaluation de l'activité antiparasitaire <i>in vitro</i> .....	101
II.6.2.1. Evaluation de l'activité antiplasmodiale sur <i>Plasmodium falciparum</i> .....	101
II.6.2.1.1. Principe.....	101
II.6.2.1.2. Souche parasitaire et milieu de culture.....	102
II.6.2.1.3. Technique de mesure de l'activité.....	102
II.6.2.2. Evaluation de l'activité antileishmaniale sur <i>Leishmania infantum</i> .....	102
II.6.2.2.1. Souche parasitaire et milieu de culture.....	102
II.6.2.2.2. Technique de mesure de l'activité.....	103
II.6.2.3. Evaluation de l'activité antitrypanosomiale sur <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	103
II.6.2.3.1. Souche parasitaire et milieu de culture.....	103
II.6.2.3.2. Technique de mesure de l'activité.....	104
<b>Chapitre III : Résultats et Interprétations.....</b>	<b>105</b>
III.1. Résultats de l'étude microscopique des poudres issues des parties aériennes des plantes collectées.....	105
III.1.1. Caractères microscopiques de la poudre de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	105
III.1.2. Caractères microscopiques de la poudre de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	106

III.1.3. Caractères microscopiques de la poudre de l' <i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i> .....	107
III.1.4. Caractères microscopiques de la poudre de <i>Pentzia monodiana</i> .....	108
III.1.5. Caractères microscopiques de la poudre de <i>Pulicaria crista</i> .....	109
III.1.6. Caractères microscopiques de la poudre de <i>Pulicaria incisa</i> .....	110
III.2. Résultats de l'étude phytochimique bioguidée menée sur les extraits AcOEt des végétaux collectés.....	112
III.2.1. Rendement des extractions par l'acétate d'éthyle (AcOEt) sous pression.....	112
III.2.2. Criblage biologique des extraits bruts obtenus.....	113
III.2.2.1. Résultats de l'analyse de l'activité antiparasitaire <i>in vitro</i> .....	113
III.2.2.2. Résultats du test de fixation à l'hème.....	114
III.3. Résultats du criblage phytochimique des extraits bruts sélectionnés pour leur activité antiplasmodiale notable.....	115
III.3.1. Résultats avec les réactifs généraux.....	115
III.3.2. Résultats de l'analyse en CCM.....	116
III.3.2.1. Résultats avec l'extrait de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	117
III.3.2.2. Résultats avec l'extrait de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	119
III.3.2.3. Résultats avec l'extrait de <i>Pentzia monodiana</i> .....	121
III.3.2.4. Résultats avec l'extrait de <i>Pulicaria incisa</i> .....	123
III.3.3. Résultats de l'analyse en UPLC-MS.....	125
III.4. Résultats complémentaires concernant l'étude phytochimique bioguidée de l'extrait de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	130
III.4.1. Rendement du fractionnement à l'aide de la CPC.....	130
III.4.2. Fractionnement par CC flash des lots D, E, F, G et H issus de la CPC de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	131
III.4.2.1. Résultats avec le lot D.....	132
III.4.2.2. Résultats avec les lots EFGH.....	133
III.4.3. Résultats de l'analyse en RMN des fractions à composé majoritaire.....	134
III.4.3.1. Produit issu de la fraction ACG-d5.....	134
III.4.3.2. Produit issu de la fraction ACG-d8.....	135
III.4.3.3. Produit issu de la fraction ACG-e11.....	135
III.4.4. Résultats de l'analyse de l'activité antiparasitaire des fractions issues de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	136
III.5. Composés purs isolés de l'extrait de <i>Pentzia monodiana</i> .....	136
III.5.1. Résultats du préfractionnement à l'aide de la CC Flash.....	137

III.5.2. Résultats de la purification par HPLC préparative du lot F26-28, fractions issues de la CC de l'extrait de <i>Pentzia monodiana</i> .....	137
III.5.3. Résultat du fractionnement à l'aide de la CPC.....	138
III.5.3.1. Fractionnement de l'extrait brut AcOEt de <i>Pentzia monodiana</i> .....	138
III.5.3.2. Fractionnement du lot F26-28 issu de la CC de l'extrait de <i>Pentzia monodiana</i> .....	138
III.5.4. Résultats de l'analyse en RMN des composés isolés.....	139
III.5.4.1. Composé 44B (Kétopélénolide B).....	139
III.5.4.2. Composé FR1T-G (5-βH-Sécotanapartholide).....	139
III.5.4.3. Composé CL-F24 (Sécotanapartholide A).....	139
III.5.4.4. Composé CPC-S1-F16-20 (Iso-sécotanapartholide).....	140
III.5.4.5. Composé CPC-S2-F17 (Artécanine).....	140
III.5.4.6. Composé COL-155-L (3'-O-méthyleupatorine).....	140
III.5.4.7. Composé COL-155-F (Artémétine).....	140
III.5.4.8. Composé COL-155-K (Cirsilinéol).....	141
III.5.4.9. Composé COL-155-I (Chryso splénétine).....	141
III.5.5. Résultats de l'activité antiparasitaire des composés isolés.....	141
<b>Chapitre IV : Discussion.....</b>	<b>143</b>
IV.1. Diagnose des parties aériennes issues des espèces végétales étudiées.....	143
IV.1.1. <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	143
IV.1.2. <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	144
IV.1.3. <i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i> .....	145
IV.1.4. <i>Pentzia monodiana</i> .....	146
IV.1.5. <i>Pulicaria crispa</i> .....	146
IV.1.6. <i>Pulicaria incisa</i> .....	147
IV.2. Bilan de l'analyse phytochimique des espèces végétales sélectionnées.....	147
IV.2.1. Analyse par l'approche de déréplication.....	148
IV.2.1.1. <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	149
IV.2.1.2. <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	150
IV.2.1.3. <i>Pentzia monodiana</i> .....	151
IV.2.1.4. <i>Pulicaria incisa</i> .....	151
IV.2.2. Analyse par RMN.....	153
IV.3. Bilan de l'analyse de l'activité antiparasitaire des espèces végétales étudiées.....	154
IV.3.1. <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	155
IV.3.2. <i>Pulicaria incisa</i> .....	156
IV.3.3. <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	157

IV.3.4. <i>Pentzia monodiana</i> .....	159
<b>Conclusion et Perspectives</b> .....	<b>161</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>165</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>183</b>
Annexe 1 : Clés d'identification des espèces collectées selon la flore d'Ozenda et la flore de Quezel & Santa.....	183
A.1.1. Détermination de la famille <i>Asteraceae</i> .....	183
A.1.1.1. Détermination du genre <i>Artemisia</i> .....	183
A.1.1.1.1. Détermination de la sous-espèce <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> ..	183
A.1.1.1.2. Détermination de la sous-espèce <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> ....	183
A.1.1.2. Détermination du genre <i>Asteriscus</i> .....	183
A.1.2.1. Détermination de la sous-espèce <i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i>	184
A.1.1.3. Détermination du genre <i>Pentzia</i> .....	184
A.1.1.3.1. Détermination de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> .....	184
A.1.1.4. Détermination du genre <i>Pulicaria</i> .....	185
A.1.1.4.1. Détermination de l'espèce <i>Pulicaria crispa</i> .....	185
A.1.1.4.2. Détermination de l'espèce <i>Pulicaria incisa</i> .....	185
Annexe 2 : Monographies simplifiées des plantes aromatiques collectées.....	187
A.2.1. <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	187
A.2.2. <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	189
A.2.3. <i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i> .....	190
A.2.4. <i>Pentzia monodiana</i> .....	191
A.2.5. <i>Pulicaria crispa</i> .....	192
A.2.6. <i>Pulicaria incisa</i> .....	193
Annexe 3 : Chromatogrammes UPLC-MS.....	195
Annexe 4 : Exemple de table Excel utilisée pour le calcul de masse moléculaire à partir d'adduits observés dans les spectres de masses ESI.....	199
Annexe 5 : Spectres de masses correspondants aux principaux pics observés sur les chromatogrammes UPLC-MS.....	201
Annexe 6 : Spectres RMN.....	215
Annexe 6.1. Spectres RMN des fractions à composé majoritaire obtenues à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	215

Annexe 6.2. Spectres RMN des composés isolés de l'extrait AcOEt des parties aériennes de <i>Pentzia monodiana</i> .....	221
Annexe 7 : Autorisation de l'ONPCA (ex. OPNA) pour le prélèvement des échantillons de plantes.....	231
Annexe 8 : Publication en rapport avec la thèse.....	233



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- <sup>1</sup>H-RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire de Proton
- <sup>13</sup>C-RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
- AcOEt** : Acétate d'éthyle
- ACT** : Artemisinin-based Combination Therapy
- ATU** : Autorisation Temporaire d'Utilisation
- APG** : Angiosperm Phylogeny Group
- BPI** : Base Peak Intensity
- BPS** : Phosphate Buffered Saline
- CC** : Colonne Chromatographique de gel de silice
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- CDCl<sub>3</sub>** : Chloroforme deutéré
- CI<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice médiane
- CMF** : Concentration Minimale Fongicide
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CPC** : Chromatographie de Partage Centrifuge
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DNP** : Dictionary of Natural Products
- d** : doublet
- δ** : Déplacement chimique
- EIMS+** : Electron ionized mass spectrometry positif
- ESI** : Electrospray Ionization (ionisation par électronébuliseur)
- ES+** : Electrospray ionization en mode positif
- ES-** : Electrospray ionization en mode négatif
- FBS** : Fetal Bovine Serum
- FWHM** : Full Width at Half Maximum
- g** : gramme
- g/mol** : gramme par mole (masse molaire)
- HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
- HPLC** : High Performance Liquid Chromatography
- HREIMS** : High-Resolution Electron Ionization Mass Spectrometry
- GPS** : Global Positioning System
- K<sub>D</sub>** : Coefficient de partage
- LC-MS** : Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry
- LCR** : Liquide Céphalo-Rachidien
- MeOH** : Méthanol
- MS** : Mass Spectrometry (Spectrométrie de Masse)

- µg** : microgramme
- m** : multiplet
- min** : minutes
- ml** : millilitre
- mM** : millimolaire
- m/z** : Rapport masse sur charge
- NCBI** : National Center for Biotechnology Information
- ng** : nanogramme
- nM** : nanomolaire
- nm** : nanomètre
- NP/PEG** : Natural Products/ Polyéthylène Glycol
- OAc** : Acétate
- OMe** : Méthoxyle
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- ONPCA** : Office National du Parc Culturel de l'Ahaggar
- PBS** : Phosphate Buffred Saline
- PPAPs** : Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols
- PCA** : Parc Culturel de l'Ahaggar
- PLE** : Pressurized Liquid Extraction
- psig** : pound-force per square inch gauge (pression par pouce carré)
- PTFE** : Polytétrafluoroéthylène
- REMA** : Resazurin Microtiter Assay
- Rf** : Rapport frontal = Distance parcourue par la substance/Distance parcourue par le front de l'éluant
- RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium
- s** : singlet
- SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate
- t** : triplet
- THF** : Tétrahydrofurane
- TMS** : Tétraméthylsilane
- TOF-MS** : Time of Flight Mass Spectrometry
- $t_R$**  : Temps de rétention d'une substance correspondant au temps écoulé entre le début de l'injection et la sortie de la substance.
- UPLC-MS** : Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry
- WHO** : World Health Organisation



## GLOSSAIRE DES TERMES SCIENTIFIQUES

- Actinomorphe** : Se dit d'une fleur à symétrie axiale. Synonyme de fleur régulière.
- Adduit** : En spectrométrie de masse, l'ionisation d'une molécule conduit à une réaction d'addition entre elle et un ion selon sa charge. L'adduit est le produit de cette réaction.
- Anisocytique** : terme qualifiant un stomate dont les cellules de garde sont entourées par trois cellules épidermiques annexes de tailles différentes.
- Anomocytique** : terme qualifiant un stomate dont les cellules de garde sont entourées par des cellules épidermiques annexes sans morphologie particulière.
- Aperture** : Ouverture sur l'enveloppe du pollen permettant la germination du tube pollinique.
- Bractée** : Pièce florale en forme de feuille faisant partie de l'inflorescence.
- Capitule** : Type d'inflorescence regroupant des fleurs sans pédoncules sur un réceptacle, lui-même entouré de bractées.
- Clade** : (du grec *clados*, qui signifie « branche ») est un groupe monophylétique d'organismes, vivants ou ayant vécu, comprenant un organisme particulier et la totalité de ses descendants.
- Efflux** : mécanisme par lequel les cellules rejettent à l'extérieur des composés toxiques
- Exine** : Paroi externe du grain de pollen.
- Involucre** : Désigne une collerette de bractées libres ou soudées ensemble à la base d'une inflorescence.
- Isoprène** : Isomère du pentadiène (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) possédant deux doubles liaisons conjuguées ; c'est un carbure très réactif dont la polymérisation aboutit au caoutchouc.
- Obdiplostémonie** : Concerne les fleurs dont l'androcée est constitué de 2 cycles d'étamines, celles du verticille externe étant opposées aux pétales.

- Obové** : Qui a la forme d'un œuf renversé.
- Oosphère** : Gamète femelle.
- Onchocercose** : ou « cécité des rivières » est une pathologie de l'œil, causée par le ver filaire *Onchocerca volvulus* qui se transmet par la simulie, un insecte diptère.
- Orophile** : Qui est adapté à la haute montagne.
- Pappus** : (ou aigrette) est une petite touffe ou un faisceau de poils ou de soies qui équipent certains akènes afin de permettre une dispersion optimale par le vent.
- Paracytique** : terme qualifiant un stomate dont les cellules de garde sont entourées par des cellules épidermiques annexes parallèles.
- Scabre** : Se dit d'une surface ou arête d'un toucher rugueux, ou rude.
- Scarieux** : Se dit d'une matière végétale membraneuse, sèche et translucide.
- Sclértite** : Grande cellule scléreuse isolée dans des tissus végétaux non sclérifiés.
- Sesquiterpène** : Nom générique d'hydrocarbures  $C_{15}H_{24}$  appartenant à la classe des terpènes formés de trois unités isopréniques.
- Spin** : Propriété physique quantique d'une particule responsable entre autres du moment magnétique de certains noyaux atomiques.
- Stomate** : Orifice de petite taille présent dans l'épiderme des organes aériens des végétaux permettant les échanges gazeux entre la plante et l'air ambiant, ainsi que la régulation de la pression osmotique.
- Tépale** : Nom donné aux pièces du périanthe lorsqu'elles se ressemblent toutes par la forme et la couleur, et qu'on ne peut distinguer les sépales (calice) des pétales (corolle).
- Ténuinucellé** : Se dit d'un ovule dont le nucelle est peu épais.
- Tomenteux** : Se dit d'un végétal ou d'une partie du végétal recouverte de poils très serrés donnant une impression feutrée.

**Transformée de Fourier** : Lorsqu'une fonction représente un état du champ électromagnétique en un point, on l'appelle signal et sa transformée de Fourier s'appelle son spectre.

**Vulnéraire** : Du latin *vulnerarius* (de *vulnus*, blessure) désigne de manière générale ce qui est propre à la guérison des plaies ou des blessures.

**Zygomorphe** : Se dit des fleurs qui ont un seul plan de symétrie, généralement vertical.



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Prix Nobel de médecine et lutte contre le paludisme.....	8
<b>Tableau 2</b>	Dates d'apparition des résistances aux antipaludiques.....	13
<b>Tableau 3</b>	Activités biologiques <i>in vitro</i> des quassinoïdes antipaludiques.....	29
<b>Tableau 4</b>	Sources de flavonoïdes méthoxylés à activité antipaludique <i>in vitro</i> .....	33
<b>Tableau 5</b>	Taxonomie des genres d'Astéracées aromatiques rencontrés au Hoggar...	49
<b>Tableau 6</b>	Principales classes chimiques de polyphénols.....	52
<b>Tableau 7</b>	Principales sous-classes de flavonoïdes <i>stricto sensu</i> .....	53
<b>Tableau 8</b>	Lactones sesquiterpéniques isolées de quelques espèces du genre <i>Artemisia</i> .....	56
<b>Tableau 9</b>	Méthoxyflavones isolées chez le genre <i>Artemisia</i> .....	59
<b>Tableau 10</b>	Méthoxyflavonols isolés chez le genre <i>Artemisia</i> .....	59
<b>Tableau 11</b>	Dérivés hydroxy-acétophénoniques isolés de l' <i>Artemisia campestris</i> .....	64
<b>Tableau 12</b>	Méthoxyflavones isolées de l' <i>Artemisia judaica</i> .....	67
<b>Tableau 13</b>	Coordonnées GPS des principales stations de collecte.....	75
<b>Tableau 14</b>	Dates et lieux de collecte des plantes aromatiques étudiées.....	76
<b>Tableau 15</b>	Quantité de silice par rapport au diamètre de la colonne et au poids de l'échantillon à fractionner.....	89
<b>Tableau 16</b>	Composition de l'éluant utilisé lors du fractionnement par CC du lot D...	90
<b>Tableau 17</b>	Composition de l'éluant utilisé au cours du fractionnement par CC des lots regroupés EFGH.....	91
<b>Tableau 18</b>	Résultats de l'extraction à l'aide de l'acétate d'éthyle (AcOEt) sous pression.....	112
<b>Tableau 19</b>	Résultats de l'évaluation de l'activité antiparasitaire <i>in vitro</i> des extraits	113
<b>Tableau 20</b>	Adduits molécule-hème obtenus pour chacun des extraits testés.....	114
<b>Tableau 21</b>	Réactions physico-chimiques observées entre les différents extraits des plantes sélectionnées et les réactifs généraux utilisés en pharmacognosie.	116
<b>Tableau 22</b>	Résultats de l'analyse par CCM de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	118
<b>Tableau 23</b>	Résultats de l'analyse par CCM de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	120
<b>Tableau 24</b>	Résultats de l'analyse par CCM de l'extrait AcOEt de <i>Pentzia monodiana</i> .....	122
<b>Tableau 25</b>	Résultats de l'analyse par CCM de l'extrait AcOEt de <i>Pulicaria incisa</i> ....	124

<b>Tableau 26</b>	Temps de rétention, données MS et composés présumés à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	126
<b>Tableau 27</b>	Temps de rétention, données MS et composés présumés à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	127
<b>Tableau 28</b>	Temps de rétention, données MS et composés présumés à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de <i>Pentzia monodiana</i> .....	128
<b>Tableau 29</b>	Temps de rétention, données MS et composés présumés à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de <i>Pulicaria incisa</i> .....	129
<b>Tableau 30</b>	Résultats du fractionnement par CPC de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	131
<b>Tableau 31</b>	Résultats du fractionnement par CC flash du lot D des fractions issues de la CPC de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	132
<b>Tableau 32</b>	Résultats du fractionnement par CC flash des lots regroupés EFGH issus de la CPC de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	133
<b>Tableau 33</b>	Résultats de l'évaluation de l'activité antiparasitaire <i>in vitro</i> de quelques fractions issues de l'extrait AcOEt d' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	136
<b>Tableau 34</b>	Résultats du fractionnement par CC flash de l'extrait de <i>Pentzia monodiana</i> .....	137
<b>Tableau 35</b>	Résultats de l'évaluation de l'activité antiparasitaire <i>in vitro</i> des composés isolés de l'extrait AcOEt de <i>Pentzia monodiana</i> .....	142
<b>Tableau 36</b>	Exemple de table Excel utilisée pour le calcul de la masse moléculaire à partir d'adduits observés dans les spectres de masse ESI positif et ESI négatif.....	199
<b>Tableau 37</b>	Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	201
<b>Tableau 38</b>	Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	205
<b>Tableau 39</b>	Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de <i>Pentzia monodiana</i> .....	209
<b>Tableau 40</b>	Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de <i>Pulicaria incisa</i> .....	212

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Repas sanguin de l'anophèle femelle.....	5
<b>Figure 2</b>	Répartition géographique de l'endémie paludique.....	6
<b>Figure 3</b>	Répartition de la mortalité due au paludisme à l'échelle mondiale.....	6
<b>Figure 4</b>	Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> .....	10
<b>Figure 5</b>	Frottis sanguin révélant la présence de <i>Plasmodium</i> .....	10
<b>Figure 6</b>	Structure de l'hémozoïne.....	11
<b>Figure 7</b>	Structures des principaux schizonticides lysomotropes.....	14
<b>Figure 8</b>	Repas sanguin du phlébotome femelle.....	15
<b>Figure 9</b>	Répartition de l'exposition aux leishmanioses en Afrique du Nord.....	16
<b>Figure 10</b>	Cycle biologique du <i>Leishmania sp.</i> .....	17
<b>Figure 11</b>	Structures des principaux leishmanicides.....	18
<b>Figure 12</b>	La mouche tsé-tsé, vecteur de la maladie du sommeil.....	18
<b>Figure 13</b>	Frottis sanguin révélant la présence de trypanosomes.....	19
<b>Figure 14</b>	Cycle biologique du <i>Trypanosoma brucei</i> .....	21
<b>Figure 15</b>	Structures des principaux trypanosomicides.....	21
<b>Figure 16</b>	Écorces de quinquina rouge.....	23
<b>Figure 17</b>	Alcaloïdes benzylisoquinoléiques à activité antiplasmodiale.....	23
<b>Figure 18</b>	Principales lactones sesquiterpéniques à activité antiplasmodiale.....	27
<b>Figure 19</b>	Diterpènes de clérodane à activité antiplasmodiale.....	28
<b>Figure 20</b>	Principaux quassinoides à activité antiplasmodiale.....	29
<b>Figure 21</b>	Structures des principaux flavonoïdes à activité antiplasmodiale.....	31
<b>Figure 22</b>	Coumarines à activité antiplasmodiale.....	34
<b>Figure 23</b>	Structures des principales xanthonnes à activité antiplasmodiale.....	36
<b>Figure 24</b>	PPAPs à activité antiplasmodiale.....	36
<b>Figure 25</b>	Dérivés phénoliques des Pipéracées antipaludiques.....	37
<b>Figure 26</b>	Position des Angiospermes par rapport au règne <i>Plantae</i> .....	44
<b>Figure 27</b>	Position des Astéracées par rapport à la classe des Angiospermes.....	48

<b>Figure 28</b>	Structure de base des flavonoïdes.....	51
<b>Figure 29</b>	Relations entre les sept groupes de lactones sesquiterpéniques.....	55
<b>Figure 30</b>	Principales lactones sesquiterpéniques du genre <i>Artemisia</i> .....	30
<b>Figure 31</b>	Flavanones isolées à partir des différentes espèces du genre <i>Artemisia</i> .....	31
<b>Figure 32</b>	Composés aromatiques isolés de quelques espèces du genre <i>Artemisia</i> .....	60
<b>Figure 33</b>	Monoterpènes présents dans l'huile essentielle de l' <i>Artemisia campestris</i> .....	62
<b>Figure 34</b>	Sesquiterpènes présents dans l'huile essentielle de l' <i>Artemisia campestris</i> .....	63
<b>Figure 35</b>	Quelques composés aromatiques isolés de l' <i>Artemisia campestris</i> .....	65
<b>Figure 36</b>	Structures des principaux terpénoïdes de l' <i>Artemisia judaica</i> .....	66
<b>Figure 37</b>	Lactones sesquiterpéniques élaborées par les espèces du genre <i>Pentzia</i> .....	68
<b>Figure 38</b>	Terpénoïdes présents dans l'huile essentielle de <i>Pentzia monodiana</i> .....	68
<b>Figure 39</b>	Composés du métabolisme secondaire isolés du <i>Pulicaria incisa</i> .....	69
<b>Figure 40</b>	Situation géographique de la zone de collecte.....	75
<b>Figure 41</b>	Broyeur à couteaux Fritsh®.....	77
<b>Figure 42</b>	Appareil d'extraction sous pression, Büchi Speed Extractor E-914.....	82
<b>Figure 43</b>	Étapes de chargement d'une cellule d'extraction.....	83
<b>Figure 44</b>	Étapes d'un cycle d'extraction.....	44
<b>Figure 45</b>	Rotavapor R3 avec Vacuum controller V-700, modèle BÜCHI.....	85
<b>Figure 46</b>	Montage d'une chromatographie sur colonne "flash".....	89
<b>Figure 47</b>	Représentation schématique de cellules de partage, détail d'un des disques constitutifs d'une colonne de CPC.....	92
<b>Figure 48</b>	Représentation schématique des deux modes d'élution en CPC.....	93
<b>Figure 49</b>	Armen instrument SCPC-250+1000-B et collecteur de fractions BÜCHI.....	95
<b>Figure 50</b>	Principales étapes du fonctionnement d'un spectromètre de masse.....	98
<b>Figure 51</b>	Spectromètre de RMN Bruker Avance III HD 400 MHz.....	99
<b>Figure 52</b>	Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	106
<b>Figure 53</b>	Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	107
<b>Figure 54</b>	Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de l' <i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i> .....	108



<b>Figure 55</b>	Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de <i>Pentzia monodiana</i> .....	109
<b>Figure 56</b>	Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de <i>Pulicaria crispa</i> .....	110
<b>Figure 57</b>	Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de <i>Pulicaria incisa</i> .....	111
<b>Figure 58</b>	CCM de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	117
<b>Figure 59</b>	CCM de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	119
<b>Figure 60</b>	CCM de l'extrait AcOEt de <i>Pentzia monodiana</i> .....	121
<b>Figure 61</b>	CCM de l'extrait AcOEt de <i>Pulicaria incisa</i> .....	123
<b>Figure 62</b>	CCM récapitulative des 18 lots de fractions issues de la CPC de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	130
<b>Figure 63</b>	CCM récapitulative des fractions regroupées obtenues lors de la CC flash du lot D ( <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> ).....	132
<b>Figure 64</b>	CCM récapitulative des fractions obtenues lors de la CC flash des lots regroupés EFGH ( <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> ).....	133
<b>Figure 65</b>	Structures probables des dérivés hydroxyacétophénoniques isolés lors du fractionnement de l'extrait AcOEt d' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	134
<b>Figure 66</b>	Quelques métabolites présents dans l'extrait AcOEt des parties aériennes de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	150
<b>Figure 67</b>	Quelques métabolites présents dans l'extrait AcOEt des parties aériennes de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	151
<b>Figure 68</b>	Quelques métabolites présents dans l'extrait AcOEt des parties aériennes de <i>Pentzia monodiana</i> .....	152
<b>Figure 69</b>	Quelques métabolites présents dans l'extrait AcOEt des parties aériennes de <i>Pulicaria incisa</i> .....	152
<b>Figure 70</b>	Schéma représentant les étapes suivies lors de notre étude phytochimique bioguidée.....	154
<b>Figure 71</b>	<i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	188
<b>Figure 72</b>	Inflorescences de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	188
<b>Figure 73</b>	<i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	189
<b>Figure 74</b>	<i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i> .....	190
<b>Figure 75</b>	<i>Pentzia monodiana</i> .....	191
<b>Figure 76</b>	<i>Pulicaria crispa</i> .....	192

<b>Figure 77</b>	<i>Pulicaria incisa</i> .....	193
<b>Figure 78</b>	Chromatogrammes UPLC-MS en mode positif et en mode négatif de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> .....	195
<b>Figure 79</b>	Chromatogrammes UPLC-MS en mode positif et en mode négatif de l'extrait AcOEt de l' <i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> .....	196
<b>Figure 80</b>	Chromatogrammes UPLC-MS en mode positif et en mode négatif de l'extrait AcOEt de <i>Pentzia monodiana</i> .....	197
<b>Figure 81</b>	Chromatogrammes UPLC-MS en mode positif et en mode négatif de l'extrait AcOEt de <i>Pulicaria incisa</i> .....	198
<b>Figure 82</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé ACG-d5.....	215
<b>Figure 83</b>	Spectre <sup>13</sup> C-RMN du composé ACG-d5.....	216
<b>Figure 84</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé ACG-d8.....	217
<b>Figure 85</b>	Spectre <sup>13</sup> C-RMN du composé ACG-d8.....	218
<b>Figure 86</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé ACG-e11.....	219
<b>Figure 87</b>	Spectre <sup>13</sup> C-RMN du composé ACG-e11.....	220
<b>Figure 88</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé 44B.....	221
<b>Figure 89</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé FR-1T-G.....	222
<b>Figure 90</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé CL-F24.....	223
<b>Figure 91</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé CPC-S1-F16-20.....	224
<b>Figure 92</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé CPC-S1-F17.....	225
<b>Figure 93</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé COL-155-L.....	226
<b>Figure 94</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé COL-155-F.....	227
<b>Figure 95</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé COL-155-K.....	228
<b>Figure 96</b>	Spectre <sup>1</sup> H-RMN du composé COL-155-I.....	229

## INTRODUCTION

### 1. État de la question :

Les maladies parasitaires ou parasitoses constituent un grave problème de santé à l'échelle mondiale, puisque près de la moitié de la population mondiale vit sous leur menace. Ces maladies infectieuses sont responsables de millions de décès chaque année, principalement dans les pays pauvres. Le paludisme demeure la première endémie parasitaire et la plus meurtrière. Il sévit dans la zone intertropicale. Cette parasitose est au premier rang des priorités de l'OMS tant par ses ravages directs que par ses conséquences socio-économiques. Même s'il est en forte régression depuis une décennie grâce à l'action du Fonds Mondial<sup>1</sup>, chaque année le paludisme touche encore plus de 200 millions de personnes. Cette maladie a encore tué entre 235 000 et 639 000 personnes en 2015, principalement en Afrique subsaharienne où, le paludisme est l'une des principales causes de mortalité infantile (1).

Quelques médicaments ont été développés pour lutter contre ces parasitoses, mais devant les nombreux cas d'échecs thérapeutiques, les industries pharmaceutiques tardent à développer de nouvelles thérapies, principalement pour des raisons économiques. Le peu de molécules antiparasitaires mises sur le marché donne lieu -en plus d'une iatrogénèse importante- à l'apparition de résistances qui souvent ne peuvent être traitées avec les moyens thérapeutiques actuels. La recherche de nouvelles molécules actives et la découverte de mécanismes d'action pharmacologique contre les protozoaires responsables de ces parasitoses graves demeurent un défi sanitaire majeur pour la recherche pharmaceutique académique.

En pharmacie, les produits naturels et leurs dérivés hémisynthétiques, ont toujours pris une part importante dans la découverte de médicaments majeurs (2). En effet, de nombreuses sources naturelles (champignons, micro-organismes, organismes marins) sont à l'origine de nouveaux principes actifs "chef de file", mais les plantes sont historiquement les plus utilisées : on estime que parmi les 303 000 espèces de plantes terrestres connues (3), à peine 1% d'entre elles ont fait l'objet d'études pharmacologiques. Il reste donc potentiellement de nombreux principes actifs à découvrir.

---

<sup>1</sup> Le Fonds mondial (the Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria) a été créé en 2002 pour augmenter très fortement le financement global pour les interventions contre le VIH / sida, la tuberculose et le paludisme. <https://www.theglobalfund.org/fr/>

La flore algérienne compte plus de 5000 taxons (4) entre espèces, sous-espèces, variétés et hybrides ; sur les 3139 espèces de trachéophytes déjà décrites (5), plus de 900 d'entre elles sont rares, très rares ou endémiques, dont certaines n'ont pratiquement jamais fait l'objet d'études phytochimiques poussées et encore moins d'études pharmacologiques, comme c'est le cas du *Pentzia monodiana* que nous avons abordé dans cette étude. Parmi les familles botaniques les mieux représentées en Algérie, on distingue les *Asteraceae* avec plus de 400 espèces, suivies par les *Lamiaceae* et les *Apiaceae*. Or, c'est parmi ces trois familles que sont inventoriées la majorité des plantes aromatiques utilisées en médecine traditionnelle algérienne. La flore du Sahara central est estimée à 480 espèces de plantes vasculaires, plus de la moitié d'entre elles sont rencontrées dans le massif du Hoggar (6), dont une trentaine sont des plantes aromatiques.

Sachant que la recherche de composés actifs au sein des extraits végétaux est souvent laborieuse et onéreuse, nous avons opté pour une démarche qui combine screening phytochimique et screening biologique *in vitro*, pour ne retenir que les extraits les plus prometteurs. Dans un second temps nous avons tenté -par des approches innovantes- de détecter dans ces extraits les métabolites qui seraient à l'origine de l'activité antiparasitaire. Ainsi, l'application de la spectroscopie de masse pour la détection d'adduits à l'hème dans les extraits bruts, nous a orientés vers les composés susceptibles d'avoir une activité antiplasmodiale.

Avant de procéder aux techniques classiques de la phytochimie aboutissant à l'isolement et à l'identification d'un métabolite intéressant, nous avons envisagé une approche par déréplication basée sur la technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution. Cette approche nécessitant une banque de données complète en produits naturels connus, peut se révéler à la fois précise et surtout rapide pour établir un profil en métabolites pour extrait donné.

Ces expérimentations, réalisées en grande partie au sein du laboratoire de pharmacognosie (UMR-CNRS 8638 COMETE) de la Faculté de Pharmacie de Paris, s'inscrivent dans l'une des thématiques portant sur l'investigation de lactones sesquiterpéniques à activité antiparasitaire et/ou cytotoxique. Ce qui explique les raisons de l'intitulé de notre thèse bien que nous ne pouvons avoir la prétention d'aborder ici, toute l'étude phytochimique des plantes aromatiques du Hoggar encore moins celles de tout le Sahara algérien.

Notre travail est présenté en trois chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique de la problématique des protozooses en général et du paludisme en particulier. Les antimalariques naturels ainsi que les connaissances actuelles concernant les plantes sélectionnées pour cette étude sont également abordés.

Dans le deuxième chapitre intitulé "Matériel et Méthodes" sont mentionnés tous les détails concernant toutes les expériences que nous avons menées.

Dans le troisième chapitre intitulé "Résultats et Interprétations" sont présentées toutes nos données expérimentales ainsi que leurs interprétations.

Enfin dans le quatrième chapitre intitulé "Discussion" sont traités tous les résultats obtenus par rapport aux données de la littérature scientifique.

## **2. Objectifs :**

Notre travail vise principalement à valoriser une bioressource originale de l'extrême sud algérien en démontrant le potentiel thérapeutique de quelques espèces de plantes aromatiques sahariennes. Collectées au niveau du parc culturel de l'Ahaggar, six espèces sont présélectionnées sur un critère chimiotaxonomique ; il s'agit ici des Astéracées à lactones sesquiterpéniques, celles-là mêmes qui sont à l'origine de l'actuelle thérapie antimalarique à base de dérivés de l'artémisinine (7).

En second objectif, nous essayerons -grâce à une investigation phytochimique bioguidée- de découvrir chez ces mêmes espèces végétales, de nouvelles voies au traitement du paludisme en particulier.

*N.B. :*

- *Toutes les figures ne comportant pas de référence ont été réalisées par l'auteur.*
- *Toutes les structures chimiques développées ont été référencées par un numéro en gras et en italique.*



## Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1. Rappels sur le paludisme et sur les autres protozooses humaines graves

#### I.1.1. Paludisme

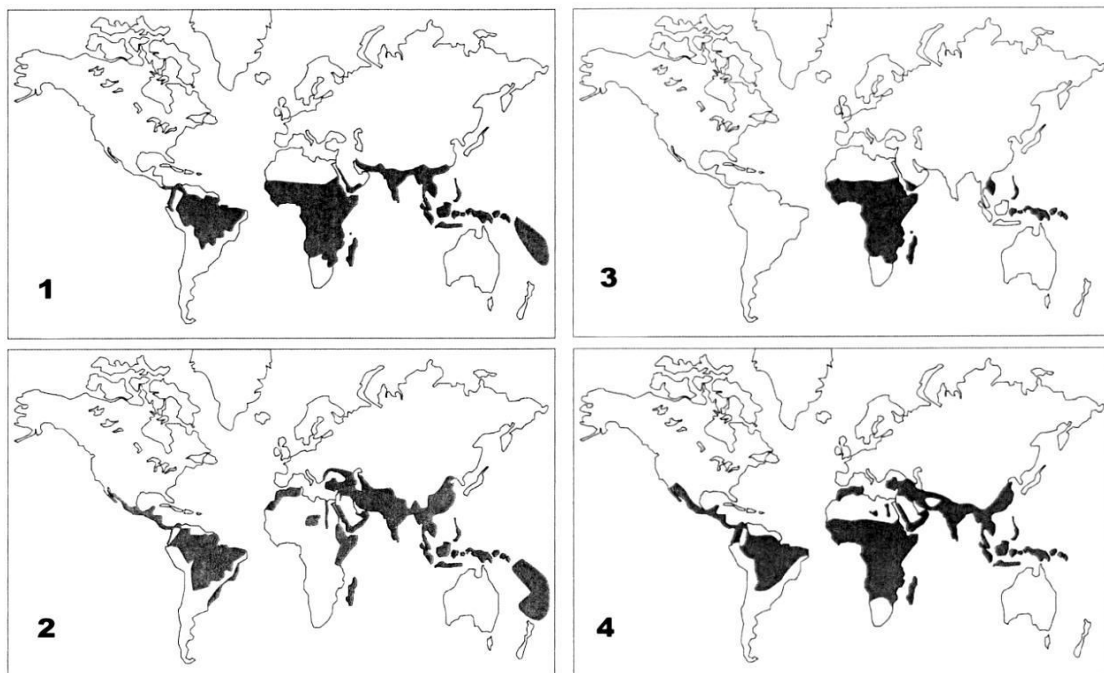
Le paludisme (du latin *paludis*, marais) ou malaria (de l'italien *mal'aria*, mauvais air) est une maladie infectieuse due à des hématozoaires du genre *Plasmodium*. Parmi les cinq espèces pathogènes pour l'homme, le *P. falciparum* est le plus répandu et le plus redoutable. Ces parasites sont transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique culicidé du genre *Anopheles* au cours de son repas sanguin. Seule la femelle, hématophage, transmet la maladie (**Figure 1**). Parmi les nombreuses espèces d'anophèles, seules quelques-unes sont capables de transmettre le paludisme, tel que les espèces anthropophiles et/ou endophiles.



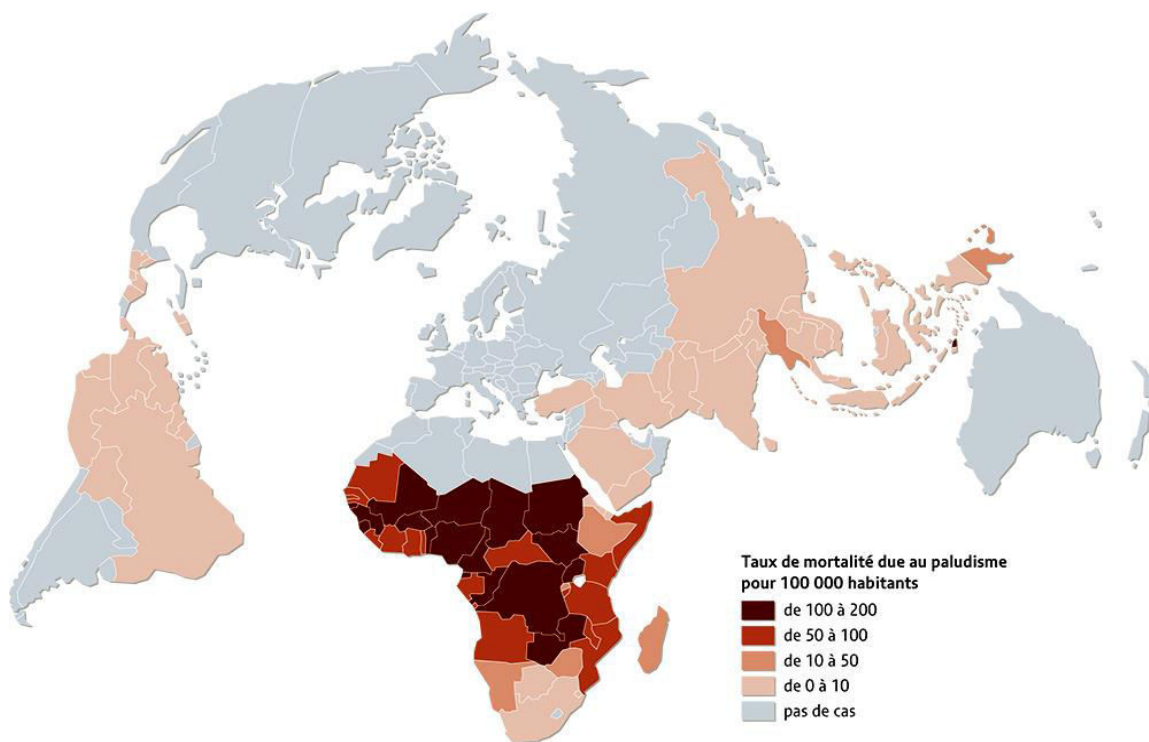
**Figure 1** : Repas sanguin de l'anophèle femelle (8)

De nombreux pays aux climats tropicaux sont touchés (**Figure 2**) dont tout particulièrement l'Afrique subsaharienne, qui représente à elle seule, plus de 90% des décès liés au paludisme (**Figure 3**). Cette mortalité est étroitement liée à la pauvreté des populations et touche principalement des enfants de moins de 5 ans.

Cette infection parasitaire grave a pour conséquences la destruction des cellules hépatiques et des hématies. Du point de vue clinique, elle se manifeste par les symptômes suivants : de fortes anémies, des insuffisances rénales, des œdèmes pulmonaires, des fatigues extrêmes et des atteintes neurologiques (délires, pertes de connaissances, convulsions et comas)



**Figure 2 : Répartition géographique de l'endémie paludique (9)**  
 1- Paludisme à *Plasmodium falciparum* 2- Paludisme à *Plasmodium vivax*  
 3- Paludisme à *Plasmodium ovale* 4- Paludisme à *Plasmodium malariae*



**Figure 3 : Répartition de la mortalité due au paludisme à l'échelle mondiale (10)**



Les principaux axes proposés par l'OMS pour lutter contre cette maladie sont :

↳ D'une part, la lutte vectorielle par l'utilisation d'insecticides. Cependant, le contrôle des populations de moustiques par les insecticides devient de plus en plus difficile en raison de l'apparition rapide et mondiale de résistances multiples aux insecticides chez l'anophèle (11). La découverte des propriétés insecticides du DDT par Müller, premier chimiste lauréat du prix Nobel de Médecine ou de Physiologie (**Tableau 1**), a contribué à l'éradication complète du paludisme en Europe, en Amérique du Nord, au Brésil et en Égypte. L'épandage de DDT est une méthode standard de protection contre les moustiques. Cependant, en raison de son impact environnemental, le DDT est de moins en moins utilisé (12).

↳ D'autre part, la chimiothérapie. Là aussi, le *Plasmodium falciparum* devient de plus en plus résistant aux antipaludiques. L'artémisinine et ses dérivés sont considérés comme le traitement le plus efficace et le plus sûr contre le paludisme. Cependant une résistance à ce traitement a été observée en Asie du sud-est (**cf. Tableau 2**). Désormais, l'artémisinine et ses dérivés sont prescrits avec d'autres antipaludiques. Ces combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine et dérivés (Artemisinin-based combination therapy ou ACT) sont la solution mise en avant par l'OMS faute de trouver un moyen pour empêcher cette résistance (13). Si cette résistance aux antipaludéens venait à se propager en Afrique, la plupart des progrès jusque ici, réalisés en matière de contrôle du paludisme seront inversés.

**Tableau 1 : Prix Nobel de médecine et lutte contre le paludisme**

Année	Lauréat(s)	Nationalité	Spécialité	Travaux récompensés
1902	Ronald Ross (1857-1932)	Royaume- Uni	Médecin militaire bactériologiste et entomologiste	Pour son travail sur la malaria, par lequel il parvint (1897) à montrer que cette maladie était transmise par un moustique, posant ainsi, les bases de la recherche et de la lutte contre le paludisme.
1907	Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922)	France	Médecin militaire et parasitologiste (pionnier de la médecine tropicale)	En reconnaissance de son travail sur le rôle joué par les parasites protozoaires responsables du paludisme. Il découvre (1880) que le <i>Plasmodium</i> se nichait dans les globules rouges.
1948	Paul Hermann Müller (1899-1965)	Suisse	Chimiste (1 <sup>er</sup> prix Nobel de médecine décerné à une personne autre qu'un biologiste ou médecin)	Pour sa découverte (1939) de la haute efficacité du DDT comme poison de contact contre plusieurs arthropodes. Le DDT comme puissant insecticide permis de lutter contre diverses maladies transmises par des insectes, comme le paludisme.
2015	Tu Youyou (1930-)	Chine	Pharmacologue	Co-lauréate pour ses travaux sur une nouvelle thérapie contre le paludisme. En 1970, elle réussit à isoler l'artémisinine à partir de l' <i>Artemisia annua</i> , plante de la médecine traditionnelle chinoise.

#### I.1.1.1. Cycle biologique du *Plasmodium*

Quelle que soit l'espèce de *Plasmodium*, le cycle évolutif du parasite est complexe, nécessitant deux hôtes successifs (**Figure 4**). Chez l'homme (hôte intermédiaire), le cycle asexué ou schizogonique est lui-même divisé en deux phases :

↳ La phase hépatique ou schizogonie exo-érythrocytaire correspond à la phase d'incubation (cliniquement asymptomatique). Lors d'un repas sanguin, le moustique infesté injecte à l'homme le parasite sous la forme de sporozoïtes. Ces derniers gagnent rapidement le foie et pénètrent dans les hépatocytes pour devenir des trophozoïtes. En quelques jours se forment des schizontes contenant des milliers de noyaux, déformant ainsi les hépatocytes. À maturité, les hépatocytes éclatent et

libèrent de nombreux mérozoïtes. L'hépatocyte ne pouvant être infecté que par les sporozoïtes, la schizogonie hépatique est unique dans le cycle.

↳ La phase sanguine ou schizogonie érythrocytaire correspond à la phase clinique de la maladie. Dans le sang, chaque mérozoïte pénètre dans une hématie et s'y transforme en trophozoïte, qui progressivement grossit et se divise pour donner un schizonte. Le schizonte mûr contient de 6 à 24 mérozoïtes (**Figure 5**). Son éclatement libère les mérozoïtes qui vont parasiter les hématies vierges amplifiant ainsi le cycle, dont la durée devient peu à peu synchrone et détermine la survenue des accès palustres : cycle de 48h (fièvre tierce) pour *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, et *P. ovale* et cycle de 72h (fièvre quarte) pour *Plasmodium malariae*. Pour *P. falciparum*, la schizogonie érythrocytaire a lieu non pas dans le sang périphérique comme les autres mais dans les capillaires viscéraux profonds provoquant des troubles de la microcirculation et une anoxie des organes vitaux, ce qui explique la gravité de l'accès pernicieux. Après plusieurs cycles érythrocytaires, certains mérozoïtes donnent naissance à des formes sexuées : les gamétocytes mâles ou femelles.

Chez l'anophèle femelle (hôte définitif), le cycle sexué ou sporogonique débute lors d'un repas sanguin chez un paludéen. Le moustique absorbe les gamétocytes qui deviennent des gamètes dans son estomac. La fécondation du gamète femelle par un gamète mâle aboutit à la formation d'un ookinète (œuf mobile) qui traverse la paroi de l'estomac pour se fixer sur sa face externe formant ainsi l'oocyste. Après maturation, celui-ci éclate et libère des sporozoïtes qui gagnent les glandes salivaires du moustique. Les sporozoïtes pénètrent chez l'homme à l'occasion d'une nouvelle piqûre par régurgitation salivaire. Le parasite peut également être transmis aux fœtus par l'intermédiaire de la femme enceinte induisant de fortes anémies chez les enfants.

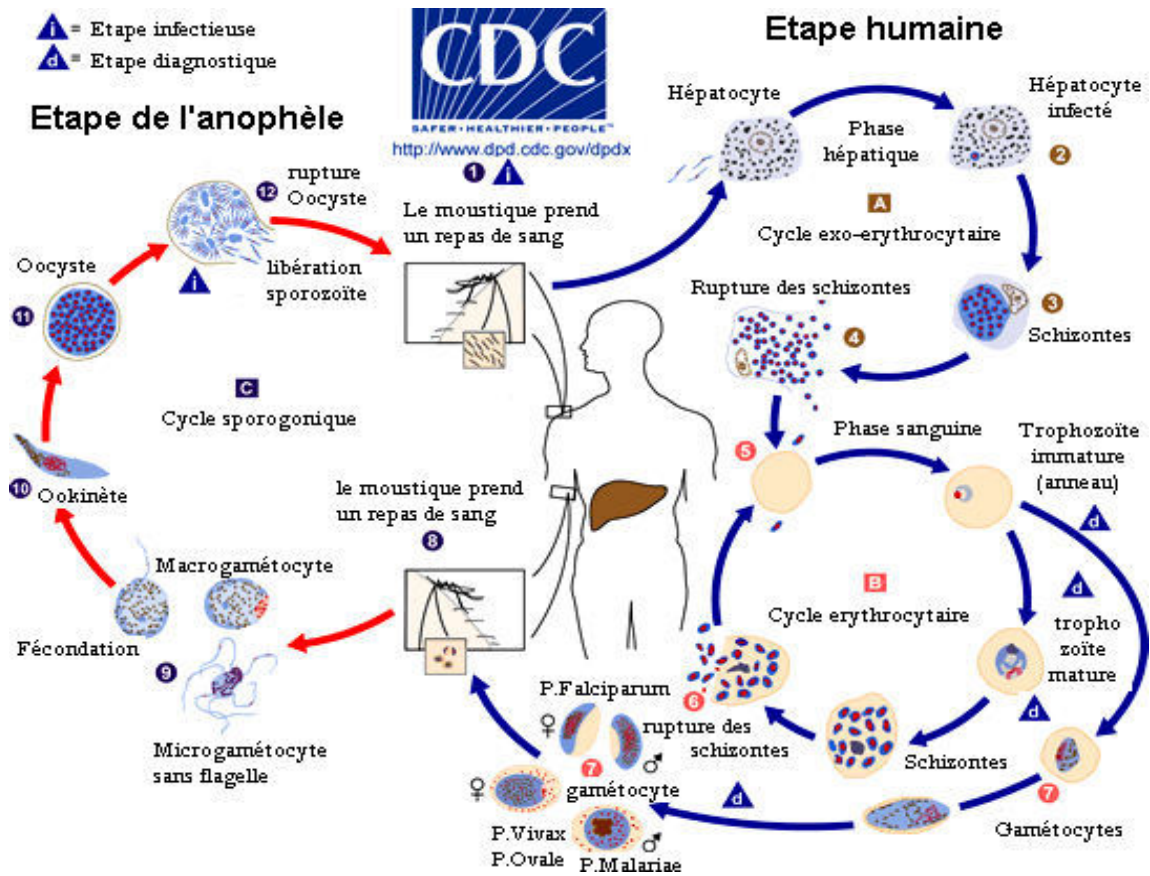


Figure 4 : Cycle biologique du *Plasmodium* (14)

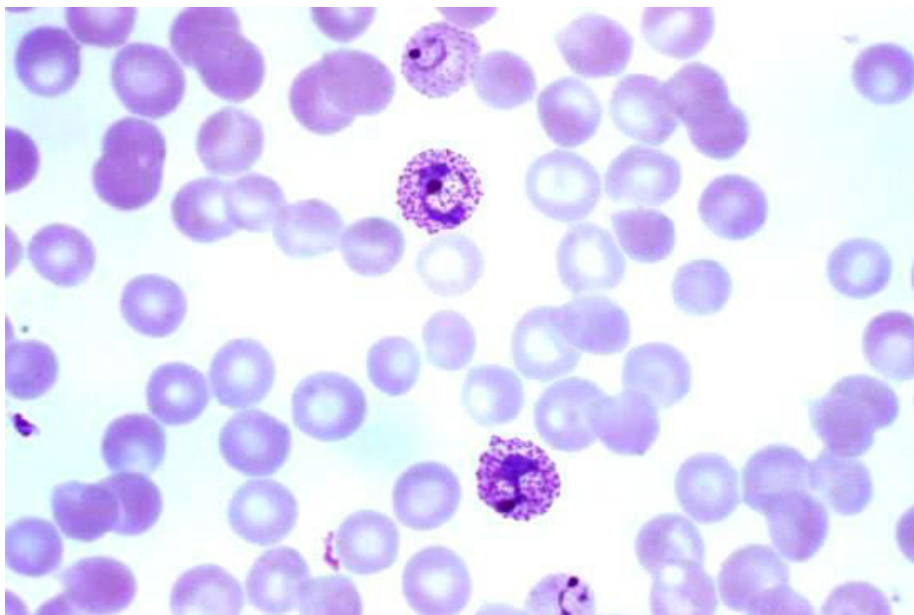


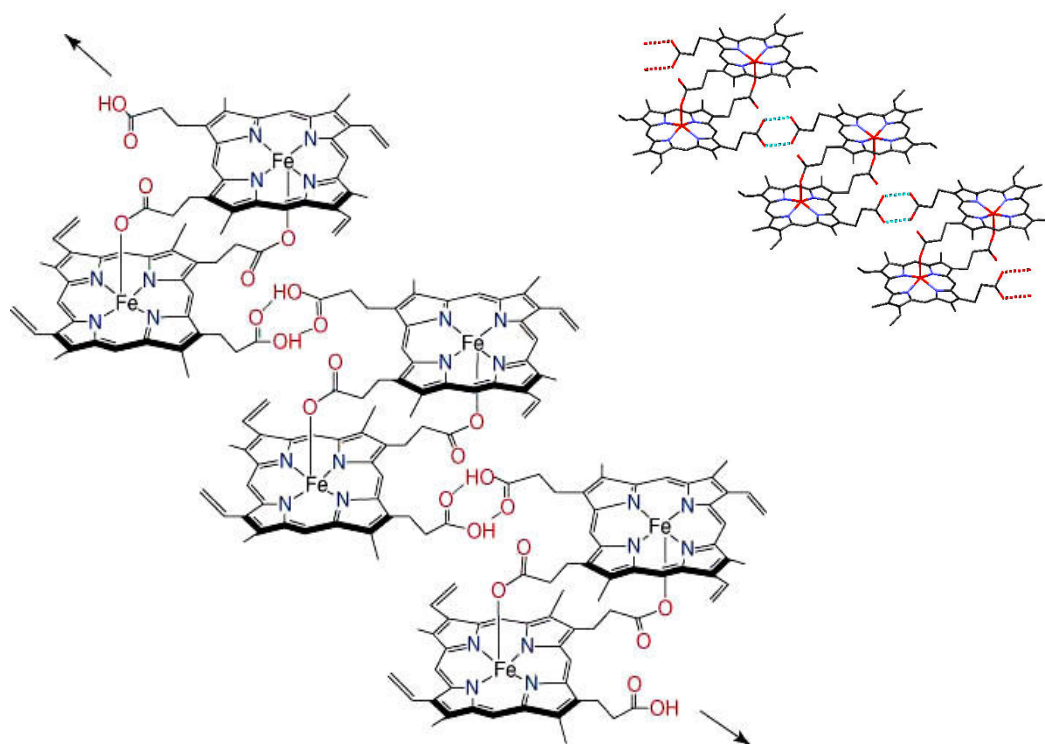
Figure 5 : Frottis sanguin révélant la présence de *Plasmodium* (15)

### I.1.1.2. Rôle de l'hème et de l'hémozoïne dans le paludisme

Pendant sa croissance intra-érythrocytaire, le *Plasmodium* dégrade jusqu'à 80% de l'hémoglobine grâce à sa vacuole digestive à contenu acide (16). La dégradation de l'hémoglobine libère l'hème-fer(II) et fournit la globine, principale source des acides aminés nécessaires au parasite (17). Or, l'hème-fer(II) est capable de réduire l'oxygène moléculaire entraînant ainsi la formation d'espèces réactives oxygénées telles que le superoxyde et l'eau oxygénée. Ce processus initie un "stress oxydant" hautement toxique pour le parasite.

Ne possédant pas d'hème oxygénase pour dégrader l'hème-fer(II) libéré par cette digestion, le *Plasmodium* est capable néanmoins, de l'agréger sous forme de microcristaux d'hémozoïne dans lesquels le fer est oxydé en fer(III) non toxique (18).

Tel que c'est représenté dans la **figure 6**, l'hémozoïne serait un polymère composé d'unités dimériques d'hème (ferriprotoporphyrine) reliées entre elles par des liaisons hydrogènes. Selon Pagola *et al.* la chaîne latérale d'une première molécule d'hème coordonne l'atome de fer d'une seconde molécule d'hème et réciproquement formant ainsi un dimère (19). L'hémozoïne est à l'origine du pigment malarique, responsable des fortes fièvres qui accompagnent la malaria.



**Figure 6** : Structure de l'hémozoïne (20)

### I.1.1.3. Principaux médicaments antipaludiques et résistance du *Plasmodium*

Parmi les différentes classes d'antipaludiques, citons celle des schizonticides lysosomotropes (**Figure 7**), regroupant les médicaments capables d'agir rapidement pour détruire les formes intra-érythrocytaires du *Plasmodium* ; la quinine **1**, premier antimalarique ainsi que son analogue synthétique la chloroquine **2**, étant les représentants historiques de cette classe pharmacologique.

L'utilisation trop massive de la chloroquine en monothérapie notamment, a donné lieu à l'apparition de résistances dans de nombreuses régions du monde. En effet, l'étude des souches de *P. falciparum* chloroquino-résistantes a montré un déficit de concentration du médicament dans la vacuole digestive du parasite, qui serait dû à un phénomène d'efflux de la chloroquine (21) lié à des mutations au niveau du gène *PfCRT* (*Plasmodium falciparum* Chloroquine Resistance Transporter) [22] dont le produit d'expression est une protéine transmembranaire (23) directement impliquée dans les processus d'acidification du contenu vacuolaire, ce qui a pour effet d'altérer le flux de chloroquine ou de réduire la fixation du médicament à ferriprotoporphyrine (24).

Actuellement, les trioxanes (ou dérivés de l'artémisinine) constituent l'essentiel de l'arsenal thérapeutique contre l'accès palustre à *P. falciparum* dans la plupart des zones d'endémies ; cela a permis de pallier aux premières vagues de résistance aux antipaludiques, notamment au couple quinine/chloroquine (**Tableau 2**). L'artémisinine **3** ainsi que ses dérivés hémisynthétiques (dihydroartémisinine **4**, artésunate **5**, artéméter **6** et artéether **7**) ne doivent pas être utilisés seuls mais associés à une amino-4-quinoléine (amodiaquine **8**, pipéraquine **9**) ou à un arylméthanol (l'halofantrine **10** n'est plus utilisée). À titre d'exemple, nous pouvons indiquer certaines spécialités comme Coartem<sup>®</sup> et Riamet<sup>®</sup>, qui combinent l'arthéméter avec la luméfantrine **11**. Par contre, l'Artequin<sup>®</sup> combine quant à lui l'artesunate et la méfloquine **12**.

Malgré les recommandations des ACT (Artemisin Combined Therapy) limitant l'apparition de multirésistances, dans certaines régions du monde comme l'Asie, 10% des cas de paludisme sont en échec thérapeutique (11).

Par leur tropisme vis-à-vis de la vacuole digestive du *Plasmodium*, tous les schizonticides lysosomotropes sont capables de perturber le processus de détoxification de l'hème-fer(II) en empêchant sa biocristallisation en hémozoïne, ce qui peut avoir des conséquences néfastes pour la survie du parasite.

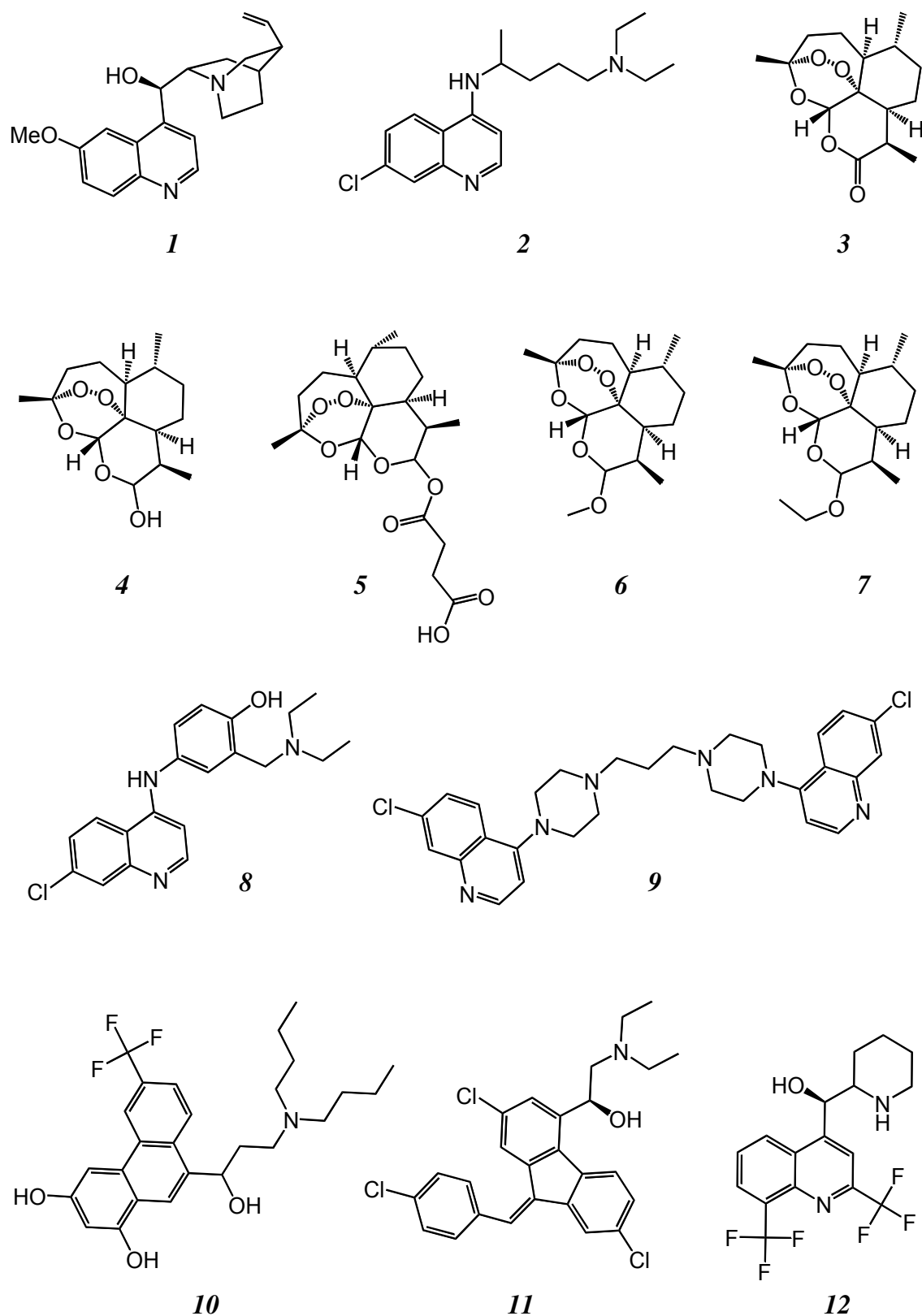
Les médicaments quinoléiques (quinine, chloroquine, méfloquine) et les arylméthanoliques (halofantrine, luméfantrine), présentent une forte affinité pour la

ferriprotoporphyrine donnant par interaction de type  $\pi$ - $\pi$  stacking des adduits médicament-hème-fer(II) dont l'accumulation au sein du parasite, initiera les réactions toxiques en catalysant la réduction de l'oxygène moléculaire (25).

Les médicaments trioxanes (artémisinine et ses dérivés actifs) possèdent des propriétés alkylantes vis-à-vis de la ferriprotoporphyrine donnant là aussi, des adduits avec hème-fer(II) ne permettant pas le processus de dimérisation, d'où le mode d'action de l'artémisinine à l'origine du "stress oxydant" dû à des espèces réactives de l'oxygène (26). Ainsi l'hème est à la fois activateur et cible des trioxanes.

**Tableau 2** : Dates d'apparition des résistances aux antipaludiques (27)

<b>Antipaludique</b>	<b>Année d'introduction</b>	<b>Année d'apparition de la résistance</b>
Quinine	1830	1910
Chloroquine	1945	1957
Méfloquine	1977	1982
Halofantrine	1988	1992
Artémisinine	1971	1980
Artésunate	1975	2008
Artésunate + Méfloquine	2000	2009



**Figure 7 :** Structures des principaux schizonticides lysosomotropes  
 Quinine *1*, Chloroquine *2*, Artémisinine *3*, Dihydroartémisinine *4*, Artésunate *5*, Artéméthér *6*,  
 Artééthér *7*, Amodiaquine *8*, Pipéraquline *9*, Halofantrine *10*, Luméfantrine *11*, Méfloquine *12*



### I.1.2. Leishmanioses

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues à des protozoaires du genre *Leishmania*. Il en existe une vingtaine d'espèces en fonction des zones géographiques, toutes transmises à l'homme par les piqûres de phlébotomes femelles infectées (**Figure 8**), diptères appartenant aux genres *Lutzomyia*, *Phlebotomus*, *Psychodopygus*. La leishmaniose viscérale (ou kala-azar), provoquée par *Leishmania donovani* et *L. infantum*, est généralement mortelle dans les deux ans en l'absence de traitement. Après traitement, la leishmaniose viscérale évolue parfois vers une forme cutanée appelée leishmaniose dermique post-kala-azar, dont les cas peuvent servir de sources d'infection pour les phlébotomes et entretenir ainsi la transmission (28). La leishmaniose cutanée est la forme la plus courante, responsable d'ulcères qui guérissent spontanément ; plusieurs espèces de *Leishmania* en sont responsables notamment *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*. La forme cutanéomuqueuse envahit les muqueuses des voies respiratoires supérieures, causant de terribles mutilations en détruisant les tissus mous du nez, de la bouche et de la gorge. Elle est surtout le fait de *Leishmania braziliensis*.



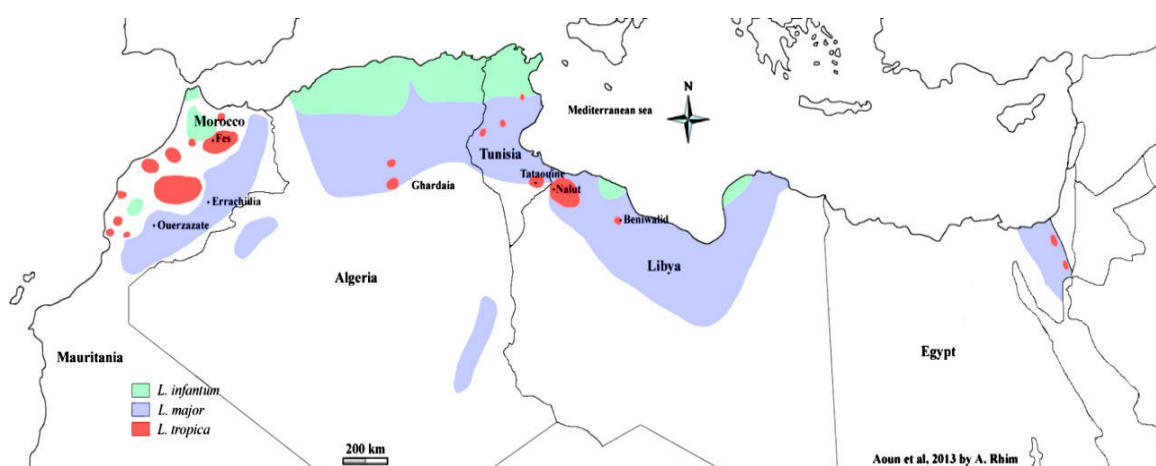
**Figure 8** : Repas sanguin du phlébotome femelle (29)

Les leishmanioses sont prévalentes dans 98 pays des cinq continents. Quelque 1,3 million de nouveaux cas se produisent chaque année, répartis ainsi :

- ↳ 300 000 cas de leishmaniose viscérale, pour la plupart au Bangladesh et au Brésil.
- ↳ Pour le reste, environ 1 million de cas ; il s'agit :

- ♦ Soit de cas de leishmaniose cutanée rencontrée surtout en Afghanistan, en Afrique du Nord (**Figure 9**), en Arabie saoudite et au Brésil,
- ♦ Soit de cas de leishmaniose cutanéomuqueuse localisés principalement au Brésil et en Bolivie (30).

La distribution des leishmanioses s'est étendue depuis 1993, et le nombre de cas enregistrés a augmenté (31). L'infection à VIH semble accroître la sensibilité à la forme viscérale de la maladie et affecte son épidémiologie. En 2012, 35 pays d'endémie avaient déclaré des cas de co-infection à HIV et à la leishmaniose viscérale (32). Le nombre de décès annuels dus à la leishmaniose viscérale est estimé entre 20 000 et 40 000 (30).



**Figure 9** : Répartition de l'exposition aux leishmanioses en Afrique du Nord (33)

Le cycle du *Leishmania* est un peu plus simple que celui du *Plasmodium*. Les parasites sous forme promastigote s'introduisent dans la circulation sanguine lors du repas sanguin du phlébotome et infestent les macrophages. Il se forme dans ces macrophages une vacuole parasitophore, où les parasites peuvent se différencier en amastigotes et se multiplier jusqu'à éclatement du macrophage. Les parasites contaminent d'autres macrophages et amplifient ainsi le cycle. Lors d'un futur repas la femelle phlébotome, ré-ingérera les macrophages infectés où les parasites continueront leur cycle de vie pour se transformer en promastigotes dans l'intestin, avant de s'accumuler dans les trompes du phlébotome pour être réinjectés dans un nouvel hôte (**Figure 10**).

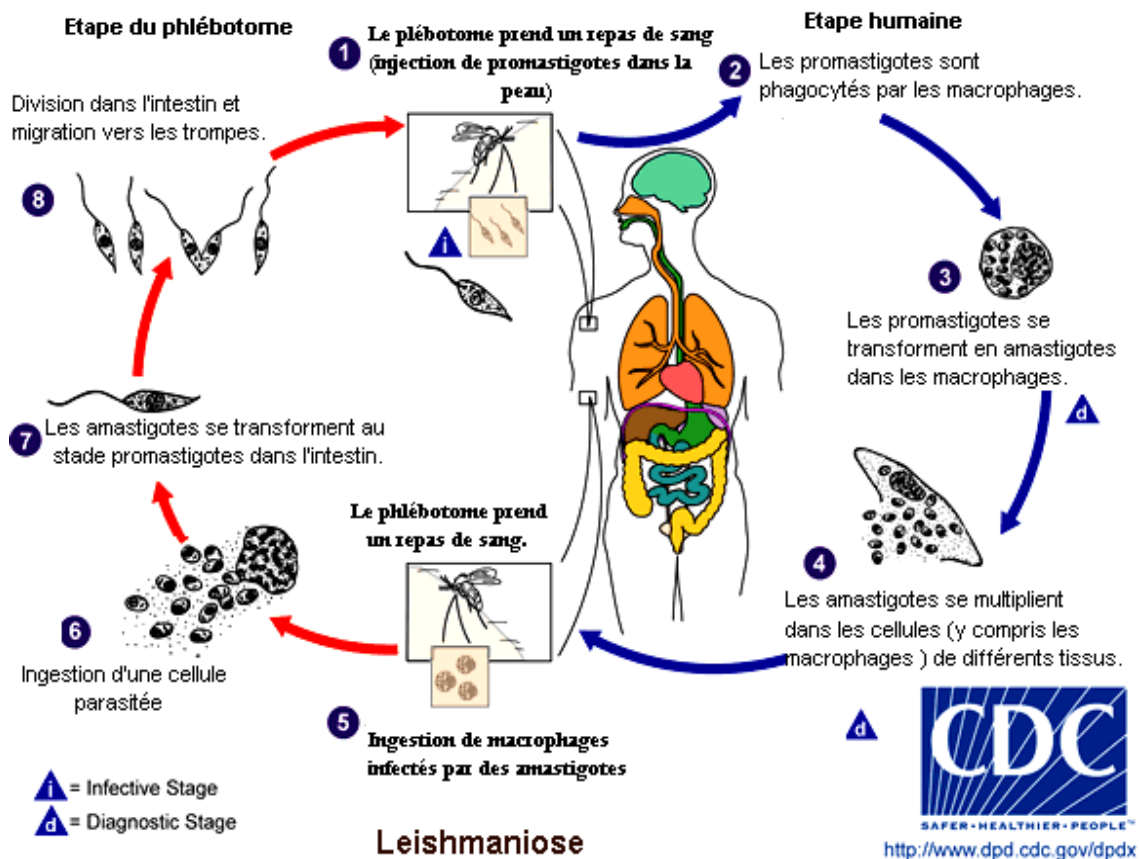
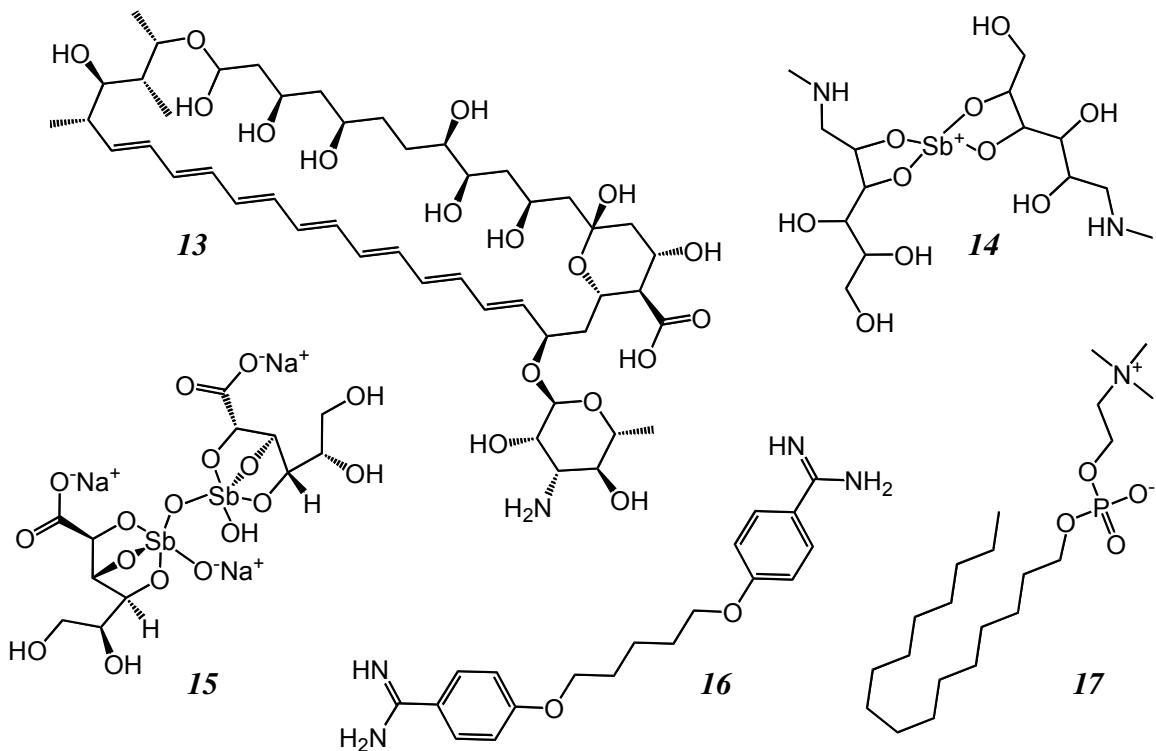


Figure 10 : Cycle biologique du *Leishmania* sp. (34)

Dans le traitement classique des formes graves de leishmaniose sont indiqués en première intention :

- ↳ Soit l'amphotéricine B **13** (Fugizone<sup>®</sup> ou sa formulation liposomiale, Ambisome<sup>®</sup>),
- ↳ Soit l'un des deux antimoniés pentavalents :
  - ♦ L'antimonié de méglumine **14** (Glucantime<sup>®</sup>) en France.
  - ♦ Le stibogluconate de sodium **15** (Pentostam<sup>®</sup>) dans les pays anglo-saxons.

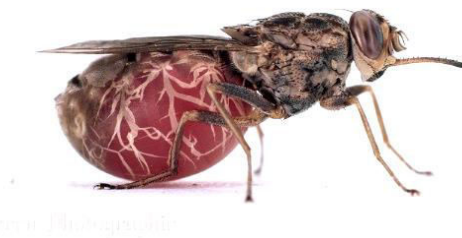
La toxicité des antimoniés est importante et de nombreux cas de résistance à ces médicaments sont signalés en Inde. La pentamidine **16** (Pentacarinat<sup>®</sup>) est utilisée en cure courte dans le traitement de certaines formes de leishmaniose cutanée. Elle peut induire des effets secondaires immédiats (crises d'asthme, hypoglycémie, hypotension) et de nombreuses toxicités. La miltéfosine **17** (Impavido<sup>®</sup>) est utilisée en seconde intention sous ATU, notamment en cas de chimiorésistance (**Figure 11**). Elle est abortive et tératogène (9).



**Figure 11** : Structures des principaux leishmanicides  
 Amphotéricine B **13**, Antimoniote de méglumine **14**,  
 Stibogluconate de sodium **15**, Pentamidine **16**, Miltéfosine **17**

### I.1.3. Trypanosomiase humaine africaine (maladie du sommeil)

La trypanosomiase humaine africaine, ou maladie du sommeil, est une infection parasitaire due à un protozoaire flagellé du genre *Trypanosoma*. L'incidence de cette protozoose pourrait avoisiner les 20 000 cas par an, selon des estimations datant de 2011 (35). La maladie est transmise par des mouches hématophages ; les parasites pénétrant dans l'organisme par les piqûres de la mouche tsé-tsé, *Glossina sp.* (**Figure 12**).



**Figure 12** : La mouche tsé-tsé, vecteur de la maladie du sommeil (36)

À défaut d'un diagnostic précoce et d'un traitement rapide, la maladie est généralement mortelle : les parasites se multiplient dans l'organisme, franchissent la barrière hémato-encéphalique et envahissent le système nerveux central. Deux sous-espèces du *T. brucei* génèrent chez l'humain des pathologies différentes :

- ↳ *Trypanosoma brucei* ssp. *gambiense* (en Afrique de l'Ouest),
- ↳ *Trypanosoma brucei* ssp. *rhodensiense* (en Afrique de l'Est).

La forme chronique de la trypanosomiase humaine africaine, due à l'infection par *Trypanosoma brucei* ssp. *gambiense*, est endémique dans 24 pays, et représente 98% des cas déclarés. La région africaine de l'OMS déclare la plus forte proportion de cas de maladie du sommeil (96,5%) ; les 3,5% restants sont déclarés par la région de la méditerranée orientale.

La forme aiguë de la trypanosomiase humaine africaine, due à l'infection par *T. brucei* ssp. *rhodensiense*, est endémique dans 13 pays, et elle représente 2% de tous les cas de la maladie déclarés de 2009 à 2011. Le cycle parasitaire est relativement comparable à celui des *Leishmania*. Les parasites pénètrent sous forme trypomastigote métacyclique dans l'hôte humain par la piqûre de la glossine et se multiplient par scissiparité dans les différents fluides (sang, lymphe, LCR). Les trypomastigotes circulants (**figure 13**), seront ré-ingérés par une glossine lors d'un repas sanguin et se transformeront en trypomastigotes procycliques dans l'intestin de la mouche.



**Figure 13** : Frottis sanguin révélant la présence de trypanosomes (37)

Lors de leurs migrations vers les glandes salivaires ils se transformeront en promastigote métacyclique pour infester de nouveaux hôtes humains (**figure 14**). Du point de vue symptomatologie, la maladie évolue en deux phases :

↳ Au cours de la première phase (lymphatico-sanguine), les trypanosomes se multiplient dans les tissus sous-cutanés, dans le système sanguin et lymphatique. Elle se caractérise par des poussées de fièvre, des céphalées, des douleurs articulaires.

↳ Au cours de la seconde phase (neurologique), le parasite franchit la barrière hémato-encéphalique et envahit le système nerveux central. Les troubles du sommeil, sont le résultat de modification du comportement, d'état confusionnel, de troubles sensoriels et de mauvaise coordination.

Les trypanosomicides (**figure 15**) prescrits en première intention (dans la première phase de la maladie du sommeil) sont la pentamidine **15**, contre le *Trypanosoma brucei* ssp. *gambiense* et la suramine **18** (Moranyl<sup>®</sup>) contre le *T. brucei* ssp. *rhodensiense*. Le mélarsoprol **19** est réservé pour les phases neurologiques plus avancées. Ces traitements présentent des effets secondaires trop prononcés tels que l'effet hypoglycémiant de la pentamidine et la toxicité de l'arsenic présent dans le mélarsoprol. Depuis 2009, l'OMS encourage l'adoption de traitements exempts de mélarsoprol en fournissant aux programmes de lutte nationaux un médicament associant le nifurtimox **20** et l'éflornithine **21** (38). Le coût élevé de ce traitement pourrait empêcher son maintien à l'avenir ; aussi est-il important de poursuivre la recherche de médicaments sûrs et efficaces, plus simples à administrer et moins chers.

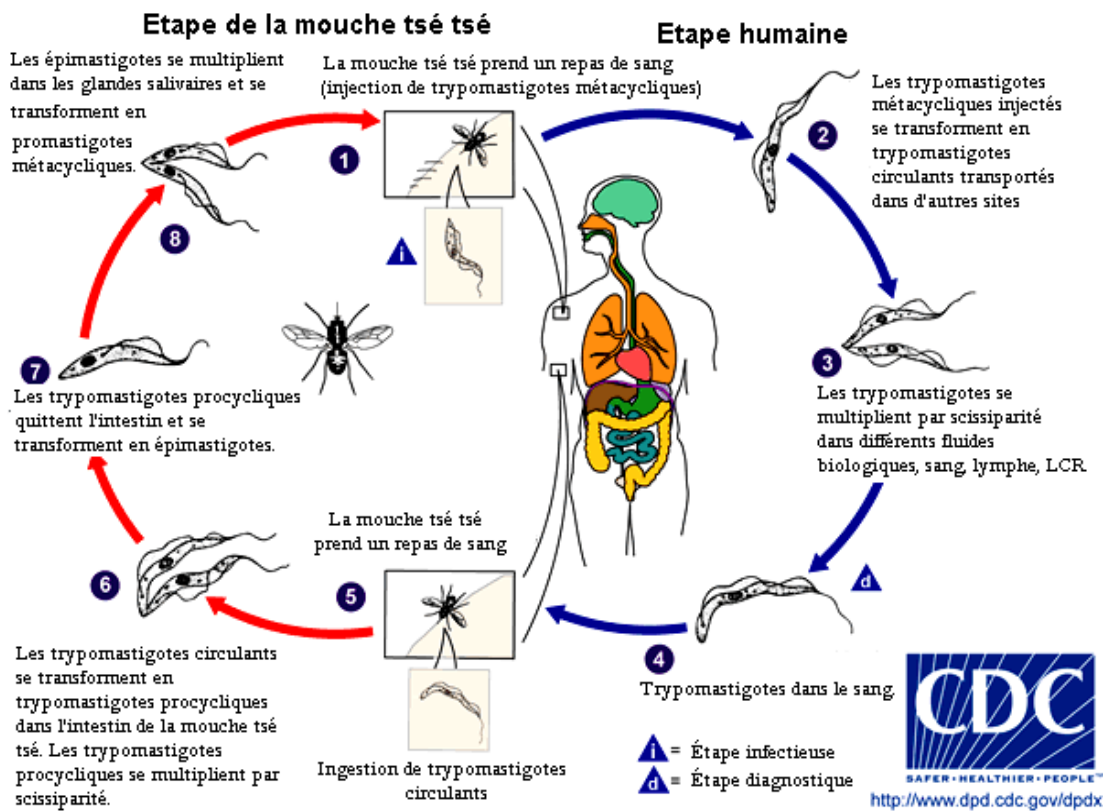


Figure 14 : Cycle biologique du *Trypanosoma brucei* (39)

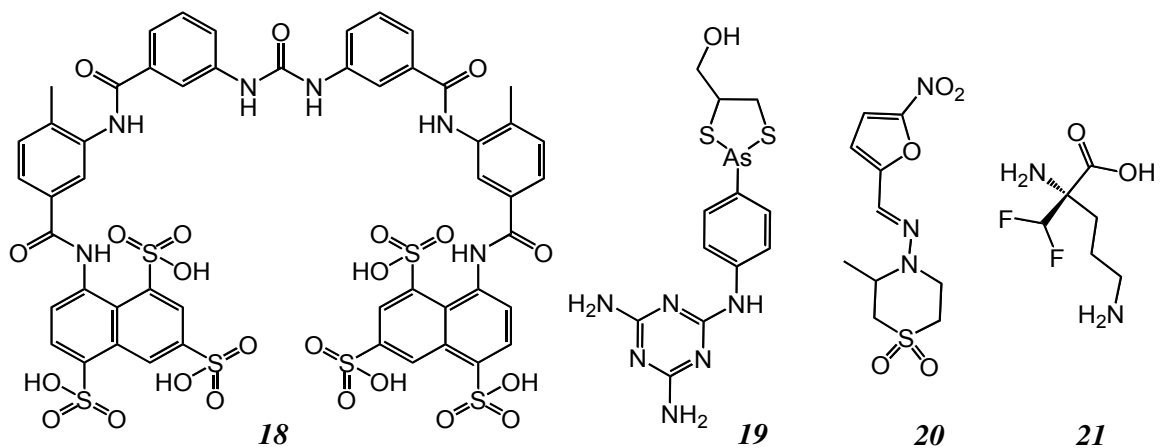


Figure 15 : Structures des principaux trypanosomicides  
Suramine 18, Mélsarsoprol 19, Nifurtimox 20, Éflornithine 21

## I.2. Plantes à activité antipaludique

### I.2.1. Plantes à alcaloïdes

#### I.2.1.1. Quinquinas (*Cinchona*)

Le genre *Cinchona* de la famille des Rubiacées comprend une vingtaine d'espèces d'arbustes ou d'arbres tous originaires d'Amérique du Sud, où ils croissent à l'état sauvage le long du versant oriental de la Cordillère des Andes. Jusqu'en 1890, toutes les écorces de quinquinas du commerce (**Figure 16**) provenaient seulement de la cueillette organisée par les "cascarilleros" qui, après avoir abattu les arbres en pleine forêt, procédaient à leur écorçage, les branches donnant les quinquinas "roulés", le tronc les quinquinas "plats". Les écorces ainsi récoltées sont séchées au soleil, avant d'être emballées en paquets. Les drogues étaient désignées selon la coloration des écorces (quinquina gris, jaune ou rouge) ou selon le centre d'exportation (quinquina de Carthagène, de Guayaquil, de Lima). Actuellement quelques espèces sont acclimatées et cultivées dans diverses régions tropicales du monde (Afrique, Asie) pour les besoins de l'industrie. Le quinquina gris (*Cinchona officinalis* L.), plus aromatique, moins amer est utilisé pour la préparation de boissons toniques et apéritives, alors que le quinquina rouge (*Cinchona pubescens* Vahl), le quinquina jaune (*C. calisaya* Wedd.) et surtout sa variété *ledgeriana* sont destinés à l'industrie de l'extraction de la quinine. La quinine est un alcaloïde quinoléique isolé en 1820 par Pierre Joseph Pelletier et Joseph Bienaimé Caventou, pharmaciens français. La structure chimique de la quinine **I** est élucidée par Zdenko Skraup et Wilhelm Königs à la fin du 19<sup>e</sup> Siècle, après qu'Adolph Strecker ait pu établir sa formule brute en 1845. La quinine reste un antipaludique de choix, notamment dans le traitement du neuropaludisme (40). L'écorce de *Remijia peruviana* Standl. (Rubiaceae) est également une source potentielle de quinine (41).

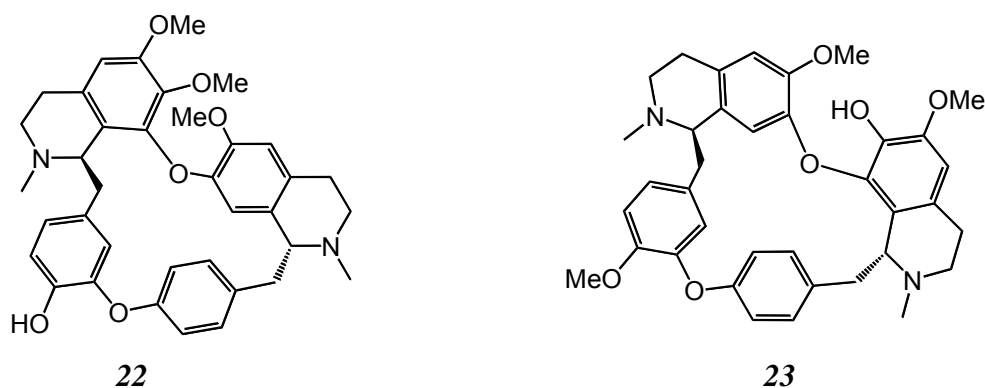




**Figure 16** : Écorces de quinquina rouge

### I.2.1.2. Ménispermacées à alcaloïdes benzyloquinoléiques

Quelques alcaloïdes benzyloquinoléiques ont montré une activité antimalarique. Ils ont été isolés pour la plupart de deux espèces de Ménispermacées (**Figure 17**).



**Figure 17** : Alcaloïdes benzyloquinoléiques à activité antiplasmodiale  
Pycnamine **22**, Cycléapeltine **23**

#### I.2.1.2.1. *Triclisia patens* Oliv.

Liane dioïque de la zone forestière tropicale de l'Afrique occidentale. La décoction de la racine est utilisée en Côte d'Ivoire pour le traitement du paludisme (42)]. Un de ses alcaloïdes la pycnamine **22** ( $CI_{50}=0,15 \mu\text{g/ml}$ ) possède une activité *in vitro* équivalente à celle de la quinine sur la souche chloroquine-résistante du *Plasmodium falciparum*. Elle

contient également d'autres alcaloïdes présentant une assez bonne activité antiplasmodiale : la phaeantine et l'aromoline (43).

#### **I.2.1.2.2. *Cyclea barbata* Miers**

Autre liane dont les racines sont utilisées en Thaïlande pour les fièvres associées au paludisme. Parmi les cinq alcaloïdes isolés de cette espèce, la cycléapeltine **23** présente une importante activité *in vitro* sur la souche chloroquine-résistante du *Plasmodium falciparum* (CI<sub>50</sub> = 0,04 µg/ml) [44].

### **I.2.2. Plantes à terpénoïdes**

#### **I.2.2.1. Astéracées à lactones sesquiterpéniques**

Les structures chimiques des principales lactones sesquiterpéniques à activité antiplasmodiale sont représentées dans la **figure 18**.

##### **I.2.2.1.1. *Artemisia annua* L.**

L'armoise annuelle ("qinghao" en chinois) est une plante aromatique rencontrée dans les régions tempérées et subtropicales de l'hémisphère nord, principalement dans le continent asiatique. En Chine, le qinghao est utilisé en médecine depuis des millénaires pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques, antipaludiques notamment. Actuellement, l'armoise annuelle fait l'objet de cultures intensives (45) en Chine, au Vietnam, en Europe et dans certains pays d'Afrique de l'Est, pour couvrir les besoins de la production de dérivés hémisynthétiques de l'artémisinine **3** (ou qinghaosu en chinois), une lactone sesquiterpénique antipaludique (46,47).

Les études phytochimiques effectuées sur les parties aériennes d'*Artemisia annua* ont mis en évidence des lactones sesquiterpéniques localisées surtout au niveau des poils sécréteurs de l'inflorescence (48). Elles appartiennent à la série amorphe et possèdent un squelette cis-décalin et un groupe isopropyl en position *trans* par rapport à l'hydrogène placé à la jonction des cycles. Seule l'artémisinine **3** possède une activité antiplasmodiale avec une CI<sub>50</sub> = 0,1 ng/ml (49).

##### **I.2.2.1.2. *Artemisia afra* Jacq. ex Willd.**

Sous-arbrisseau en touffe rencontré dans presque toutes les régions orientales et australes de l'Afrique ; se caractérisant par des tiges ridées portant des feuilles, dont

l'aspect et la texture, sont proches de ceux d'une feuille de fougère. La plante dégage une forte odeur aromatique, piquante, devenant douce après récolte et séchage. Localement, les parties aériennes de la plante sont utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques et insecticides. Les propriétés antipaludiques de la plante sont dues à des lactones sesquiterpéniques, notamment la rupicoline A-8-O-acétate **24** dont l'activité antiplasmodiale a été confirmée *in vitro* et évaluée à une  $CI_{50} = 10,8 \mu\text{g/ml}$  (50).

#### **I.2.2.1.3. *Arnica montana* L.**

Petite herbe rare des régions montagneuses de l'Europe, où elle est protégée. Les capitules séchés sont inscrits à la pharmacopée française pour leur propriété "vulnéraire" en usage externe. Ils servent à la préparation de spécialités pharmaceutiques.

La drogue renferme des lactones sesquiterpéniques, dont 0,2 à 0,5 % d'hélénaline responsables de sa toxicité (51). L'hélénaline **25** s'est révélée très active *in vitro* ( $CI_{50} = 0,06 \mu\text{g/ml}$ ) contre une souche de *Plasmodium falciparum* (52).

#### **I.2.2.1.4. *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. ex Cass.**

Grande herbe érigée, originaire des Antilles et d'Amérique centrale, à feuilles lancéolées, irrégulièrement dentées, laissant une trace jaune quand on les touche. Les inflorescences sont des panicules terminales de petites fleurs jaunes. Le fruit est un akène brunâtre à aigrette.

En médecine traditionnelle, les feuilles sont utilisées dans le traitement du cancer, des ulcères, des dermatoses, du diabète. Leurs puissantes propriétés anti-infectieuses sont connues dans certaines régions où elles sont utilisées dans le traitement des maladies parasitaires. Récemment une étude phytochimique des parties aériennes de *N. lobata* à aboutit à l'isolement de lactones sesquiterpéniques dont la neurolénine B **26** qui possède une puissante activité antiplasmodiale *in vitro* ( $CI_{50} = 0,26 \mu\text{g/ml}$ ) (53,54).

#### **I.2.2.1.5. *Parthenium hysterophorus* L.**

Cette herbe originaire des régions tropicales d'Amérique, s'est acclimatée dans certains pays d'Asie, d'Afrique et en Australie, où elle est considérée comme mauvaise herbe difficile à éradiquer, car occasionnant des allergies respiratoires, des dermatites chez les humains et le bétail. En médecine traditionnelle, *Parthenium hysterophorus* est indiqué comme antimalarique (55). Cette activité antiparasitaire est attribuée à la parthénine **27**,

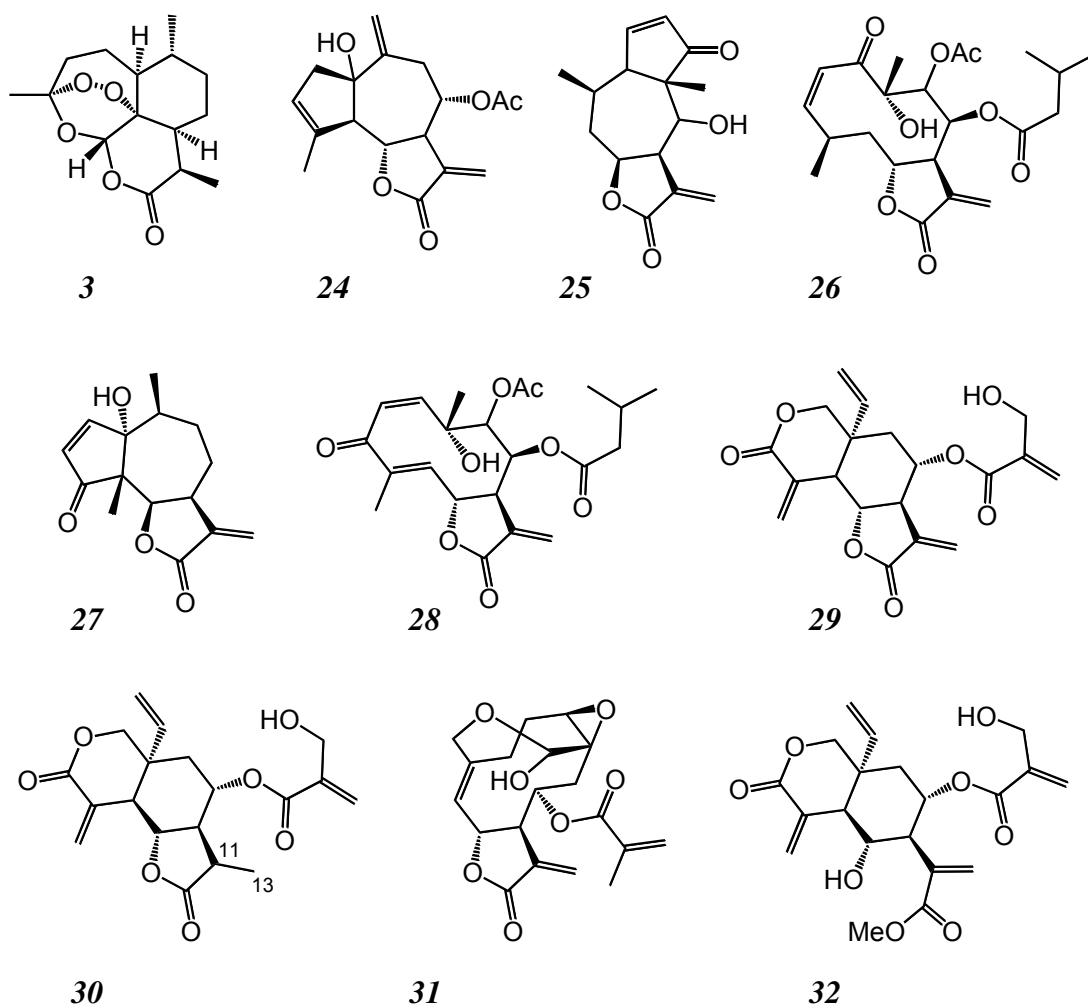
lactone sesquiterpénique dont l'activité antiplasmodiale *in vitro* a été évaluée (CI<sub>50</sub> = 1,29 µg/ml) par rapport à une souche chloroquine-résistante du *Plasmodium falciparum* (56).

#### **I.2.2.1.6. *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray**

Le tournesol mexicain est une grande herbe vivace originaire d'Amérique centrale qui s'est acclimaté dans diverses régions du monde, en Asie du Sud-est et en Afrique notamment. Au Nigeria, les feuilles de *Tithonia diversifolia* servent comme remède antimalarique (57). Une étude phytochimique bioguidée effectuée sur un extrait des parties aériennes de *Tithonia diversifolia* a abouti à l'isolement de la tagitinine **C 28**, un époxy-germacrolide doué d'une puissante activité antiplasmodiale *in vitro* dont la CI<sub>50</sub> = 0,33 µg/ml (58).

#### **I.2.2.1.7. *Vernonia colorata* (Willd.) Drake**

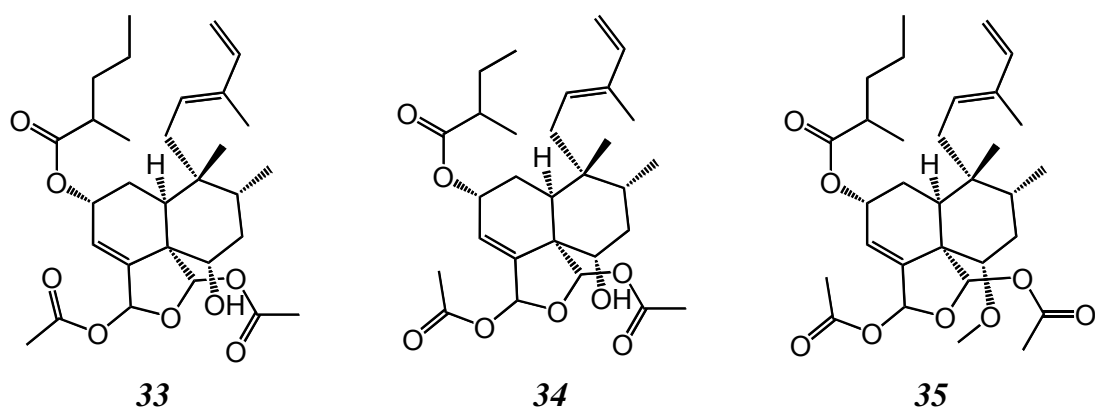
Petit arbuste des régions tropicales et australes de l'Afrique dont les feuilles en décoction constituent un remède traditionnel contre les diarrhées, les dysenteries et les vers intestinaux. Elles entrent dans diverses préparations à base de plantes destinées au traitement de l'hypertension, du diabète et du paludisme (59). Les propriétés antipaludiques des feuilles du *Vernonia colorata* sont attribuées à un groupe de lactones sesquiterpéniques tel que la vernodaline **29**, la 11,13-dihydrovernodaline **30**, le vernolide **31** et le vernodalol **32** dont les activités antiplasmodiales *in vitro* ont donné respectivement les CI<sub>50</sub> suivantes : 0,52 ; 1,1 ; 1,87 et 4,8 µg/ml (60,61).



**Figure 18** : Principales lactones sesquiterpéniques à activité antiplasmodiale  
 Artémisinine **3**, Rupicoline A-8-O-acétate **24**, Hélénaline **25**, Neurolénine B **26**, Parthénine **27**,  
 Tagitinine C **28**, Vernodaline **29**, 11,13-Dihydrovernodaline **30**, Vernolide **31**, Vernodalol **32**

### I.2.2.2. Diterpènes du *Laetia procera* (Poepp.) Eichler

Arbre de la famille des Flacourtiacées originaire des forêts équatoriales de l'Amérique du Sud, dont les écorces de tronc ont montré une activité antiplasmodiale *in vitro* significative. Un fractionnement bioguidé effectué sur un extrait des écorces de *Laetia procera* a abouti à l'isolement de 6 diterpénoïdes de clérodane dont la casearlucine A **33**, le casamembrol A **34** et la laetiaprocérines A **35** (**Figure 19**). Ces composés présentent de fortes activités inhibitrices sur des souches chloroquine-résistantes de *P. falciparum*, avec respectivement des  $CI_{50}$  de 0,28  $\mu\text{g/ml}$ , 0,30  $\mu\text{g/ml}$  et 0,35  $\mu\text{g/ml}$ . Ils présentent également une activité marquée sur *Leishmania amazonensis* (62).



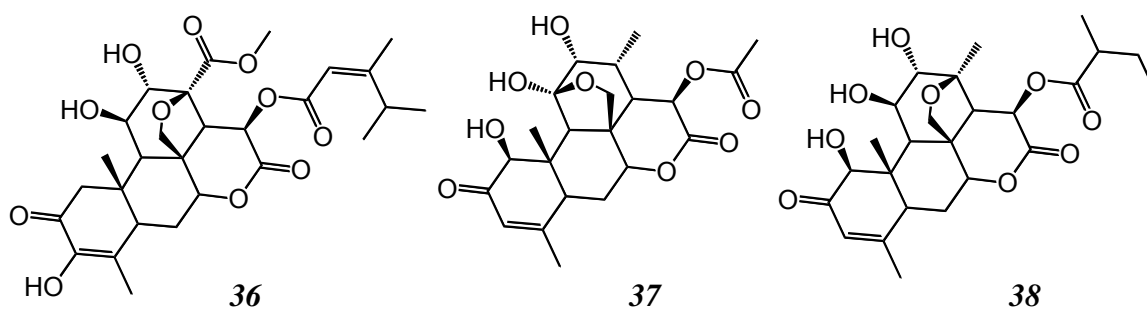
**Figure 19** : Diterpènes de clérodane à activité antiplasmodiale  
 Casearlucine A **33**, Casamembrol A **34**, Laetiaprocerines A **35**

### I.2.2.3. Simaroubacées à quassinoides

Quelques espèces de Simaroubacées sont traditionnellement utilisées pour leurs vertus antipyrétiques et antimalariques (63), comme :

- ↪ *Brucea javanica* (L.) Merr., en Thaïlande.
- ↪ *Quassia amara* L., en Guyane française.
- ↪ *Simaba cedron* Planch., au Mexique.
- ↪ *Simarouba amara* Aublet, en Amazonie.

Ce sont des arbustes connus pour leurs principes amers ; ce n'est qu'en 1960 que la structure du principal constituant de *Quassia amara*, la quassine a été déterminée (64). Par la suite, un grand nombre d'autres principes amers de simaroubacées ont été isolés et leurs structures élucidées. Ils forment une famille de composés naturels appelés quassinoides, en raison de leur parenté avec la quassine. Ce sont des lactones triterpéniques oxygénées, divisées en cinq groupes dont les  $\delta$ -lactones (quassinoides en C20) qui pour la plupart sont doués de puissantes propriétés cytostatiques et antipaludiques *in vitro* (51). Seuls la brucéantine **36**, l'holacanthone **37** et la similikalactone D **38** peuvent être considérés comme antipaludiques potentiels (**Figure 20**). En effet, ces trois quassinoides sont beaucoup moins cytotoxiques (**Tableau 3**).



**Figure 20** : Principaux quassinoïdes à activité antiplasmodiale  
Brucéantine **36**, Holacanthone **37**, Simalikalactone D **38**

**Tableau 3** : Activités biologiques *in vitro* des quassinoïdes antipaludiques (65)

Composé	Source	Activité sur <i>Plasmodium falciparum</i> , souche K1 multirésistante (CI <sub>50</sub> = ng/ml)	Activité cytotoxique (CI <sub>50</sub> = ng/ml)
Brucéantine <b>36</b> (66)	<i>Brucea javanica</i>	0,8	7
Holacanthone <b>37</b> (67)	<i>Simarouba amara</i>	7	200
Simalikalactone D <b>38</b> (68)	<i>Quassia amara</i>	0,9	3

### I.2.3. Plantes à flavonoïdes

Les propriétés antimalariques de certaines plantes médicinales sont attribuées à des flavonoïdes (69), même si leur mécanisme moléculaire antiplasmodial n'est pas totalement élucidé. Certains flavonoïdes (**figure 21**) seraient capables d'inhiber soit la biosynthèse des acides gras (FAS II) du *Plasmodium* (70), soit l'afflux de L-glutamine et de myoinositol dans les érythrocytes infectés (71), empêchant ainsi la multiplication du parasite.

#### I.2.3.1. Flavonoïdes prénylés

Les flavonoïdes prénylés se caractérisent par une distribution botanique relativement restreinte (72). La prénylation leur confère un caractère fortement lipophile qui se traduit par une grande affinité pour les membranes biologiques, pouvant perturber leur perméabilité (73). Certains auteurs leur attribuent des propriétés anti-tumorales, antibactériennes, antivirales et antiparasitaires (74).

#### **I.2.3.1.1. *Artocarpus champeden* Spreng [= *Artocarpus integer* (Thunb.) Merr.]**

Arbre de la famille des Moracées originaire de l'Asie tropicale, dont le fruit (cempedak) est consommé pour sa pulpe très sucrée. L'écorce est traditionnellement utilisée en Indonésie comme remède antimalarique. Parmi les 8 flavonoïdes prénylés isolés de l'écorce de l'*A. champeden*, ce sont la cyclohétérophylline **39** et l'hétéroflavanone C **40** qui se révèlent les plus actifs *in vitro* contre une souche chloroquine-sensible de *Plasmodium falciparum* ; avec respectivement des  $CI_{50}$  égales à 0,1 et 0,04  $\mu\text{g/ml}$  (75).

#### **I.2.3.1.2. *Erythrina fusca* Lour.**

Cet arbre de la famille des Fabacées est répandu dans les régions côtières de l'Afrique australe, de l'Amérique centrale, de l'Amérique du Sud, des Caraïbes et de l'Asie du sud-est. Il fournit des graines toxiques renfermant un alcaloïde curarisant, l'érythraline. Les propriétés antipyrétiques et antimalariques de son écorce épineuse se sont confirmées grâce à l'isolement du lonchocarpol A **41**, un flavonoïde prénylé présentant une  $CI_{50}$  = 1,6  $\mu\text{g/ml}$  par rapport à une souche multirésistante de *Plasmodium falciparum* (76).

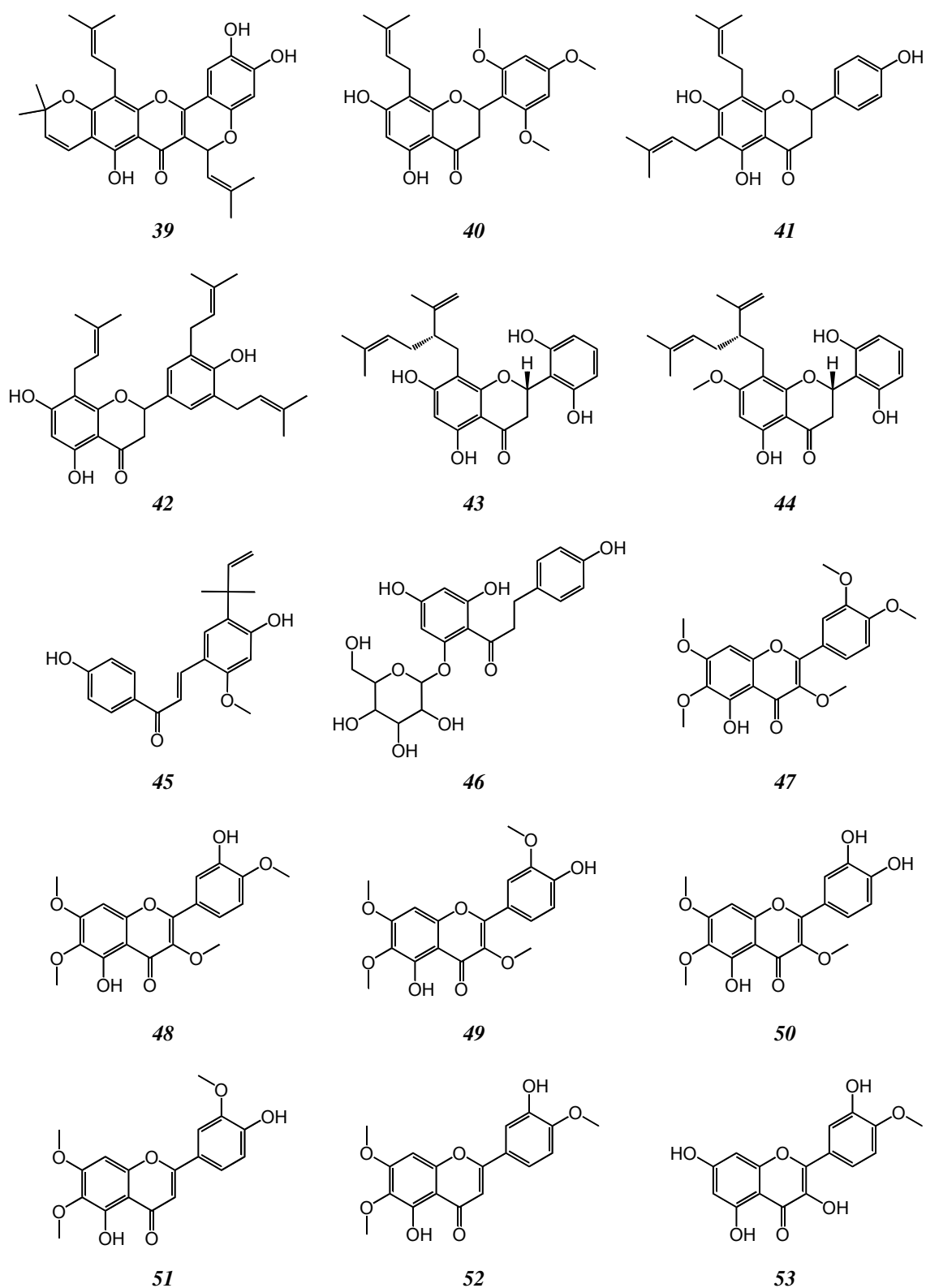
#### **I.2.3.1.3. *Erythrina subumbrans* (Hassk.) Merr.**

Une étude phytochimique de l'extrait des tiges de cet arbre originaire des régions tropicales de l'Asie (Inde, Sri Lanka, Malaisie, Thaïlande, Indonésie) a conduit à l'isolement de la 5-hydroxysophoranone **42** dont l'activité antiplasmodiale *in vitro* est évaluée par une  $CI_{50}$  égale à 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (77).

#### **I.2.3.1.4. *Artemisia indica* Willd.**

Les parties aériennes de cette armoise de l'Asie du Sud-est sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques (78). Elles ont fait l'objet d'une étude phytochimique bioguidée qui a conduit à l'isolement des exiguaflavones A **43** et B **44** présentant chacune, une activité *in vitro* modérée sur une souche multirésistante de *Plasmodium falciparum* avec respectivement des  $CI_{50}$  de 4,6 et 7,1  $\mu\text{g/ml}$  (79). L'extrait éthanolique des feuilles de l'*A. indica* a montré également une activité antileishmaniale *in vitro*, avec une  $CI_{50}$  située entre 0,21 et 0,58  $\text{mg/ml}$  (80).





**Figure 21** : Structures des principaux flavonoïdes à activité antiplasmodiale  
 Cyclohétophylline **39**, Hétéroflavanone C **40**, Lonchocarpol A **41**, 5-Hydroxysophorane **42**,  
 Exiguaflavone A **43**, Exiguaflavone B **44**, Licochalcone A **45**, Phlorizine **46**, Artémétine **47**, Casticine **48**,  
 Chrysoflavone **49**, Chrysoflavone D **50**, Cirsilinéol **51**, Eupatorine **52**, Tamarixétine **53**

### I.2.3.2. Chalcones oxygénées

#### I.2.3.2.1. *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

Les parties souterraines des différentes espèces de réglisse notamment la réglisse chinoise renferment la licochalcone A **45**, une chalcone oxygénée douée d'importantes activités antimalariques et antileishmaniennes. Testée *in vitro*, à la fois sur des souches chloroquine-sensibles et chloroquine-résistantes de *Plasmodium falciparum*, la licochalcone A donne dans les deux cas une CI<sub>50</sub> voisine de 0,6 µg/ml, alors que son activité *in vivo* évaluée sur un modèle murin infesté par *Plasmodium yoelii* s'est révélée prometteuse (81). La licochalcone A est également capable d'inhiber fortement la croissance de *Leishmania major* et de *L. donovani*, notamment sous leurs formes amastigotes (82).

#### I.2.3.2.2. *Micromelum tephrocarpum* Turcz.

Arbre appartenant à la famille des Rutacées, originaire de l'Asie du Sud, est souvent cultivé comme ornemental dans les régions tropicales (Inde, Nigéria, Floride). Les propriétés antimalariques de ces feuilles sont attribuées à la phlorizine **46**, dihydrochalcone glycosylée modérément active (CI<sub>50</sub> = 7 ± 3 µg/ml) sur *Plasmodium falciparum* en culture (83).

### I.2.3.3. Plantes à flavonoïdes méthoxylés

Malgré leur activité antiplasmodiale modérée, les flavonoïdes méthoxylés **47-52** (84) isolés de l'*Artemisia annua* contribuent grandement dans l'activité antimalarique globale de la plante, par synergie avec l'artémisinine **3** (85,86). Ce type de flavonoïdes particulièrement fréquents chez les Astéracées sont représentés dans le **tableau 4** à côté de la tamarixétine **53** (quercétine-4'-méthylether), un méthoxyflavonol dont l'activité inhibitrice sur une souche chloroquine-résistante de *Plasmodium falciparum* est significative (87).

## I.2.4. Plantes à coumarines

### I.2.4.1. *Grewia bilamellata* Gagnep.

Arbuste appartenant à la famille des Tiliacées, originaire de l'Asie du Sud-est, dont les parties aériennes ont servi à l'isolement de la grewine **53**. Ce coumarinolignane (**Figure 22**) s'est montré actif sur des souches chloroquine-sensibles et chloroquine-résistantes de *Plasmodium falciparum*, en donnant respectivement des CI<sub>50</sub> de 4,17 et 2,05 µg/ml (88).

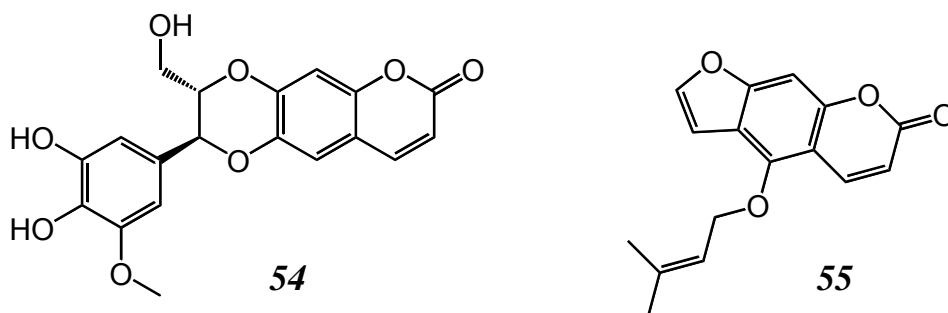
**Tableau 4** : Sources de flavonoïdes méthoxylés à activité antipaludique *in vitro*

Flavonoïde méthoxylé	Activité antiplasmodiale CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Source végétale
Artémétine <b>47</b>	10,1	<i>Achillea alpina</i> (89), <i>Achillea millefolium</i> (90), <i>Artemisia annua</i> (91,92)
Casticine <b>48</b>	8,9	<i>Achillea millefolium</i> (90), <i>Artemisia annua</i> (91,92), <i>Artemisia judaïca</i> , <i>Artemisia monosperma</i> , <i>Artemisia herba-alba</i> (93), <i>Vitex agnus-castus</i> (94)
Chrysosplénétine <b>49</b>	8,6	<i>Achillea alpina</i> (89), <i>Artemisia annua</i> (91,92), <i>Artemisia hispanica</i> (95), <i>Chamomilla recutita</i> (96)
Chrysosplénol D <b>50</b>	11,5	<i>Artemisia annua</i> (93), <i>Artemisia hispanica</i> (95), <i>Vitex agnus-castus</i> (94)
Cirsilinéol <b>51</b>	12,4	<i>Artemisia annua</i> (91,92), <i>Artemisia hispanica</i> (95), <i>Pulicaria crispa</i> (97)
Eupatorine <b>52</b>	22,4	<i>Achillea alpina</i> (89), <i>Artemisia annua</i> (91,92), <i>Eupatorium altissimum</i> (98)
Tamarixétine <b>53</b>	6,74 <sup>(*)</sup>	<i>Chromolaena odorata</i> (87)

\*souche chloroquine-résistante

### I.2.4.2. *Zanthoxylum flavum* Vahl.

Ce petit arbre de la famille des Rutacées est originaire de l'Amérique centrale et des Antilles. Le fractionnement bioguidé de l'extrait méthanolique de ces racines a conduit à l'isolement de l'isoimpératorine **55**. Cette furanocoumarine prénylée (**Figure 23**) a été testée simultanément sur des souches chloroquine-sensibles et chloroquine-résistantes de *P. falciparum*. Les résultats ont donné respectivement des CI<sub>50</sub> de 1,49 et 0,73 µg/ml (99).



**Figure 22** : Coumarines à activité antiplasmodiale  
Grewine **54**, Isoimpératorine **55**

### I.2.5. Plantes à xanthones

Au début des années 2000, Kelly et Riscoe ont étudié les hydroxyxanthones et leurs propriétés antipaludiques. Par leur grande affinité avec l'hème, ces xanthonoïdes empêcheraient la formation de l'hémozoïne nécessaire à la survie du *Plasmodium* (100).

#### I.2.5.1. *Cratogeomys cochinchinense* (Lour.) Blume

Arbre appartenant à la famille des Hypericacées, originaire des forêts de l'Asie du Sud-est, dont la racine a servi à l'isolement de la 5-O-méthylcelebixanthone **56**. Cette hydroxyxanthone prénylée (**Figure 23**) s'est montrée active ( $CI_{50} = 3,17 \mu\text{g/ml}$ ) sur une souche multirésistante de *Plasmodium falciparum* (101).

#### I.2.5.2. Clusiacées à hydroxyxanthones

##### I.2.5.2.1. *Allanblackia monticola* Mildbr. [= *Allanblackia gabonensis* (Pellegr.) Bamps]

Arbre des forêts équatoriales d'Afrique de l'Ouest, dont la graisse (beurre de Boanjo) contenue dans ces graines est comestible au Cameroun (102). De ces écorces est isolée pour la première fois l'allanxanthone C **57**, une xanthénédione prénylée (**Figure 23**) possédant une activité antiplasmodiale marquée. Le test *in vitro* effectué simultanément sur des souches chloroquine-sensibles et chloroquine-résistantes de *P. falciparum* a donné respectivement des  $CI_{50}$  de 3,2 et 0,6  $\mu\text{g/ml}$  (103). Une autre investigation phytochimique a également conduit à l'isolement de l'allanxanthone C à partir de l'extrait méthanolique des feuilles de l'*Allanblackia monticola* (104).

#### **I.2.5.3.2. *Garcinia polyantha* Oliv.**

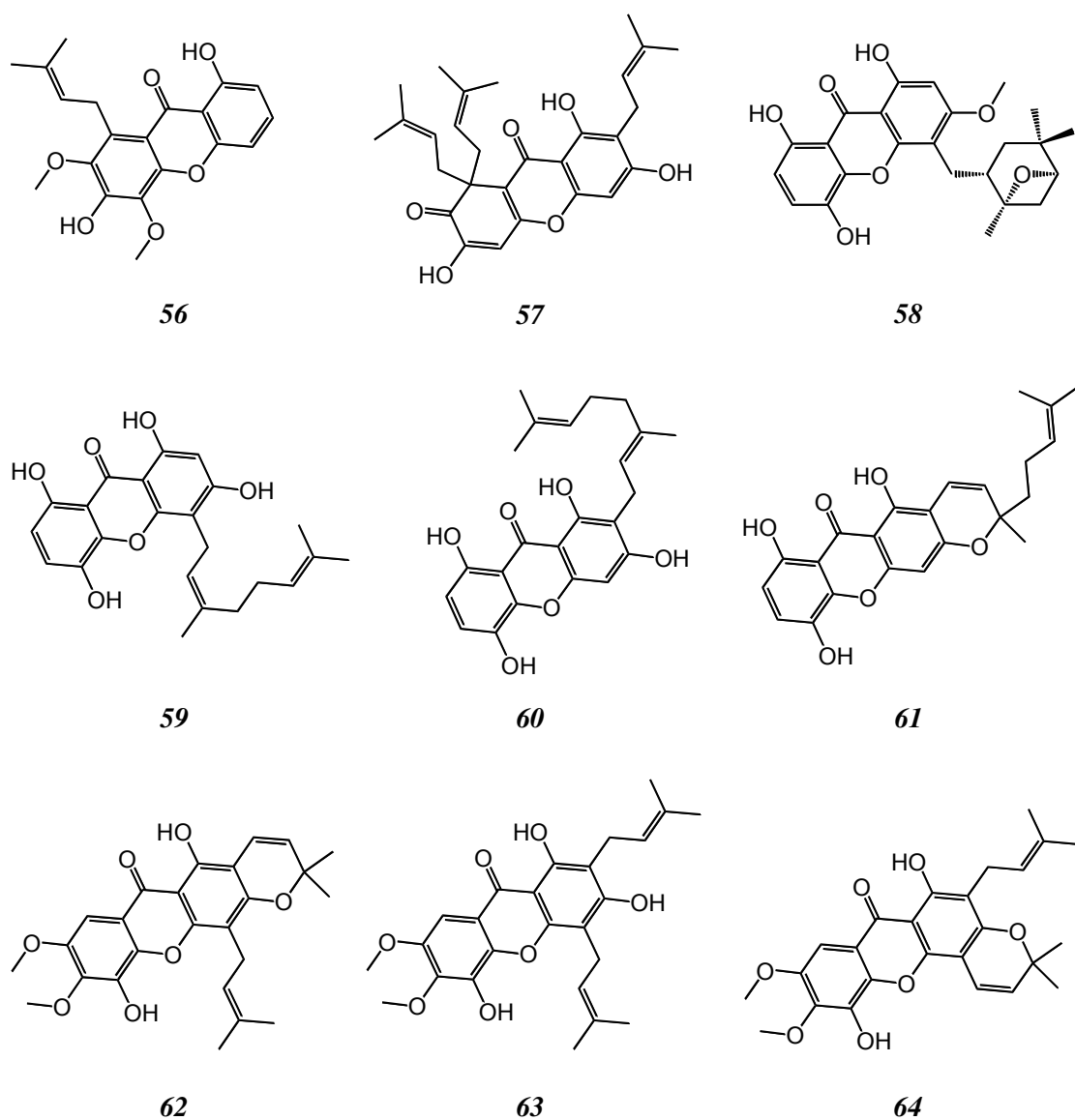
Arbre originaire des régions bordant le golfe de Guinée, dont les racines ont servi à l'isolement de quatre polyhydroxyxanthones, la garciniaxanthone **58**, la chefouxanthone **59**, la smeathxanthone A **60** et la smeathxanthone B **61**. Testés *in vitro* sur une souche chloroquine-sensible de *P. falciparum*, ces composés (**Figure 23**) ont donné des valeurs de CI<sub>50</sub> comprises entre 0,96 et 1,62 µg/ml (105).

#### **I.2.5.3.3. *Symphonia globulifera* L.f.**

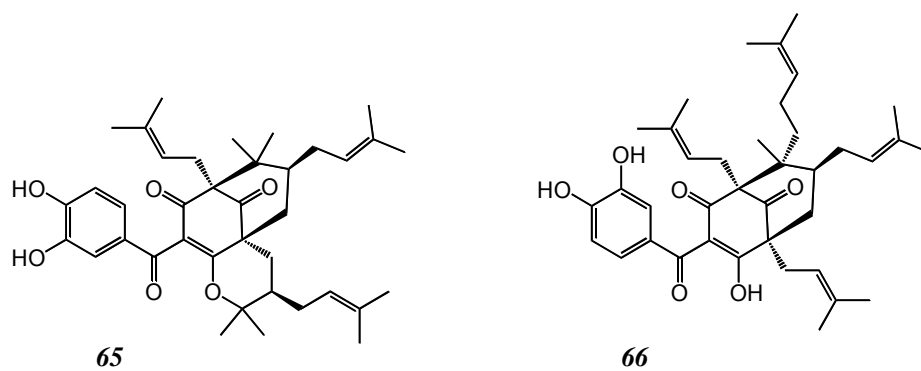
Arbre des terrains marécageux d'Afrique tropicale, d'Amérique du Sud et des Caraïbes, où il constitue des peuplements importants. Au Ghana, un extrait d'écorce de *Symphonia globulifera* sert comme remède traditionnel contre l'onchocercose (106). À partir de la coque des graines ont été isolées trois xanthones prénylées (**Figure 23**), la gaboxanthone **62**, la symphonine **63**, et la globuliférine **64**. Testés *in vitro* sur une souche chloroquine-résistante de *P. falciparum*, ces composés ont donné des valeurs de CI<sub>50</sub> comprises entre 0,57 et 1,71 µg/ml (107).

#### **I.2.6. Plantes à phloroglucinols polycycliques polyprénylés**

En plus des hydroxyxanthones, les racines de *Garcinia polyantha* et les coques de graines de *Symphonia globulifera* (cf. **I.2.5.3.2** et **I.2.5.3.3**) renferment respectivement de l'isoxanthochymol **65** et de la guttiférone A **66**. L'activité antiplasmodiale *in vitro* de ces composés appartenant à la classe chimique des PPAPs (**Figure 24**) a été évaluée : CI<sub>50</sub> = 1,33 µg/ml pour l'isoxanthochymol par rapport à une souche chloroquine-sensible *Plasmodium falciparum* (108) et CI<sub>50</sub> = 1,93 µg/ml pour la guttiférone A par rapport à une souche chloroquine-résistante *P. falciparum* (109).



**Figure 23 :** Structures des principales xanthonnes à activité antiplasmodiale  
 5-O-Méthylcelebixanthonne **56**, Allanxanthonne C **57**, Garciniaxanthonne **58**, Chefouxanthonne **59**,  
 Smeathxanthonne A **60**, Smeathxanthonne B **61**, Gaboxanthonne **62**, Symphonine **63**, Globuliférine **64**



**Figure 24 :** PPAPs à activité antiplasmodiale  
 Isoxanthochymol **65**, Guttiférone A **66**

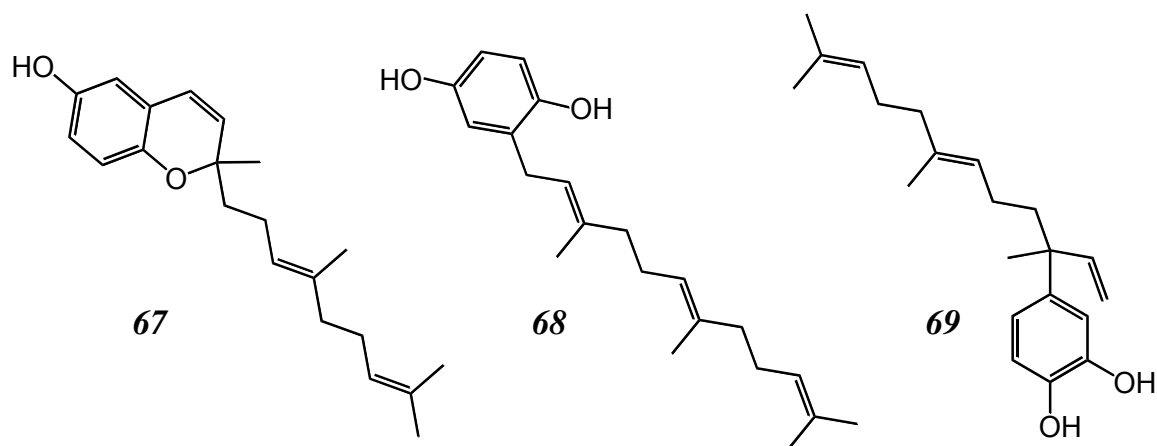
## I.2.7. Dérivés phénoliques des Pipéracées

### I.2.7.1. *Piper tricuspe* (Miq.) C. DC.

En Colombie, l'usage traditionnel de cette espèce de poivrier contre les morsures de serpents et contre la malaria (110) s'est justifié en partie, puisque l'extrait éthéro-pétrolique de la plante entière a servi à l'isolement de composés actifs sur une souche chloroquine-résistante de *Plasmodium falciparum*, le dictyochroménol **67** et le 2-farnesyl-hydroquinone **68** (**Figure 25**), leur  $CI_{50}$  respective étant 2,99 et 0,43  $\mu\text{g/ml}$  (111).

### I.2.7.2. *Pothomorphe peltata* (L.) Miq.

Cet arbuste originaire des Caraïbes est utilisé au Brésil pour ses vertus antimalariques (112). Ses racines renferment le 4-nérolidylcatéchol **69** (**Figure 26**), qui s'est montré aussi actif que la quinine et la chloroquine. Son activité antiplasmodiale ( $CI_{50} = 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) a été évaluée sur une souche multirésistante de *Plasmodium falciparum* (113,114).



**Figure 25** : Dérivés phénoliques des Pipéracées antipaludiques  
Dictyochroménol **67**, 2-Farnesyl-hydroquinone **68**, 4-Nérolidylcatéchol **69**

### I.3. Méthodes de recherche de composés potentiellement antipaludiques

Pour l'identification des nouveaux composés antipaludiques tête de file, deux méthodes peuvent être envisagées pour la détection et la quantification d'une activité antiplasmodiale.

#### I.3.1. Investigations par détection de l'activité antiplasmodiale *in vitro*

Elles sont basées sur des tests *in vitro* mesurant la réplification du parasite dans les hématies, on distingue :

↳ Les méthodes qui utilisent des isolats cultivés de *Plasmodium* ou des clones de *Plasmodium*. Elles permettent d'évaluer l'activité antiplasmodiale d'un composé sans connaître sa cible. Deux variantes existent :

♦ L'incorporation de [3H]-hypoxanthine dans l'ADN du parasite et la détection par un compteur bêta de la quantité du marqueur incorporé. Néanmoins, cette méthode nécessite un produit radioactif et un compteur de scintillation trop cher pour être disponible dans tous les laboratoires (115).

♦ L'autre variante, le DELI-microtest (Double-site Enzyme-Linked Lactate deshydrogenase enzyme Immunodetection assay) est une méthode de microdosage colorimétrique basée sur la culture du *P. falciparum* en présence de concentrations croissantes d'antimalariques. La croissance parasitaire est évaluée par immunodosage de la LDH spécifique libérée par le parasite. Bien que plus sensible et moins lent que le précédant, ce test nécessite des réactifs coûteux (116).

↳ Les méthodes qui détectent l'activité antiplasmodiale sur des cibles spécifiques telle que la voie de détoxification de l'hème. Ainsi l'inhibition de la formation de l'hémozoïne est considérée comme une indication indirecte d'une activité antipaludique d'un composé. L'évaluation de cette inhibition peut être effectuée selon différentes variantes :

♦ Celles qui sont basées soit sur la quantification de l'hématine monomère (libre) , soit sur la quantification des agglomérats de  $\beta$ -hématine (la  $\beta$ -hématine



étant la forme synthétique de l'hémozoïne, sans qu'aucune différence entre les deux formes n'ait été détectée à ce jour) [117].

- ♦ Celles qui sont adaptées à un criblage haut débit, mais de façon générale la cristallisation *in vitro* de l'hématine implique des protocoles longs et difficilement reproductibles (118).

Aucune de ces méthodes qui testent l'inhibition de la formation d'hémozoïne en présence d'un composé, ne peut détecter les molécules présentant un mécanisme d'action de type covalent comme celui de l'artémisinine. En effet, l'hème sous sa forme réduite ne cristallise pas. De ce fait, il est nécessaire de trouver une autre technique fiable, rapide, reproductible et capable de détecter des inhibiteurs ciblant les deux formes de l'hème.

### **I.3.2. Investigation par détection en spectroscopie de masse des composés se liant à l'hème**

L'équipe chimiothérapie antiparasitaire de l'UMR 8076 (Université Paris-Sud) a développé une méthode originale visant à détecter par spectrométrie de masse, des composés présentant une affinité pour l'hème, applicable aussi bien à des extraits naturels (plantes ou insectes) qu'à des produits purs. Dans cette méthode, le mélange molécule-hème ou extrait-hème est injecté dans le spectromètre. Si la molécule présente une affinité pour l'hème, une espèce de  $m/z$  correspondant à la somme des masses hème + molécule est identifiée. La dissociation de ces adduits par dissociation induite par collision peut donner un ordre de grandeur de la force de cette liaison de type covalent (comme pour l'artémisinine) ou non-covalent (comme les quinoléines).

#### **I.4. Aperçu géobotanique du Hoggar**

Le Hoggar (ou Ahaggar) est un massif volcanique situé au centre du Sahara, approximativement à 1600 km de la mer Méditerranée. Terrain de parcours des Touareg Kel-Ahaggar, il couvre environ 450 000 km<sup>2</sup>. D'importants reliefs sont situés à peu près au milieu du Hoggar ; vers le Nord existe un double massif encadrant la haute vallée de l'oued Igharghar, c'est la Tefedest qui dépasse les 2000 mètres d'altitude ; plus au Sud s'étend une vaste région très accidentée, l'Atakor dont le point culminant est le mont Tahat, près de 3000 mètres d'altitude. Les montagnes sont généralement des dômes ou des pitons disséminés. Les oueds sont de simples lits profondément encaissés, avec des gorges étroites et des dénivellations brusques. Ces torrents des étages supérieurs sont collectés vers l'extérieur du massif par les grands oueds qui se perdent dans les étages inférieurs. Avec le Tassili et le Tibesti, le Hoggar est parmi les seuls massifs montagneux sahariens qui aient suffisamment d'altitude pour exercer une influence sur la végétation. En effet le Hoggar, moins chaud et moins aride que la plaine désertique, a servi de refuge à des plantes qui sont exclues de celle-ci, et notamment à des reliques de souches méditerranéennes ou tropicales qui, autrefois, ont atteint ces massifs à la faveur des périodes plus humides. Actuellement, la végétation observée dans le paysage du Hoggar est naturelle et confinée dans des lits d'oueds et les rocailles qui les bordent.

En 1911, la première liste de la flore du Hoggar fut dressée par Battandier et Trabut qui ont recensé 161 espèces (119,120); cet inventaire fut quasiment achevé par Maire, qui publia en 1933 un mémoire où plus de 350 espèces sont citées (dont onze décrites pour la première fois) et qu'il paracheva avec une description des groupements végétaux en 1940 (121). D'autres auteurs lui succédèrent pour tenter d'apporter une analyse de la végétation du Hoggar. Nous citerons principalement Paul Ozenda qui distingue trois étages de végétation au Hoggar, tout en y observant un taux d'endémisme élevé, qui croît avec l'altitude (6).

##### **I.4.1. Notion d'"étage tropical"**

Ce niveau constitue la base du massif du Hoggar jusqu'à 1800 m d'altitude, où la végétation de type saharo-tropical est confinée dans les stations aquifères, formant tantôt une forêt-galerie de *Tamarix* dans les oueds à fond sableux ou limoneux, tantôt une savane d'*Acacia* et de *Panicum* occupant les lits d'oueds rocailleux (6). D'autres essences tropicales y sont présentes comme le *Balanites aegyptiaca*, le *Calotropis procera*, le *Ficus salicifolia*, le *Maerua crassifolia*, le *Salvadora persica*, auxquelles s'ajoutent des

sous-arbrisseaux tels que l'*Artemisia judaïca*, le *Pulicaria crispa*, le *Marrubium deserti*, ainsi que des espèces herbacées annuelles (*Ammodaucus leucotrichus*, *Pulicaria incisa*) ou vivaces (*Pergularia tomentosa*, *Senna alexandrina*, *Solenostemma argel*, *Hyoscyamus falezlez*).

#### **I.4.2. Notion d'"étage méditerranéen inférieur"**

À partir de ce niveau se situant entre 1800 et 2300 m d'altitude apparaît une végétation sensiblement différente de celle des étendues sahariennes inférieures. Elle est plus permanente, s'étendant progressivement vers les plateaux rocheux formant une steppe très lâche composée en partie de l'*Asteriscus graveolens* et du *Senna italica*. L'élément tropical disparaît laissant place à une végétation orophile constituée d'espèces de souche méditerranéenne. Ainsi, dans les lits d'oueds rocailleux les arbres tropicaux sont remplacés par une brousse à *Myrtus nivellei*, à *Olea lappirini*, tandis les oueds à fond limoneux sont occupés par une formation buissonnante de l'*Artemisia campestris*, de l'*Atriplex halimus* ou du *Salvia chudaei*. Aux bords des oueds peuvent s'ajouter des espèces comme le *Capparis spinosa*, le *Deverra scoparia*, le *Periploca laevigata* ou le *Rhus tripartitus* (6).

#### **I.4.3. Notion d'"étage méditerranéen supérieur"**

Se situant au-delà de 2300 m jusqu'aux plus hauts sommets, cet étage se caractérise par une baisse relative de l'aridité du fait de la fraîcheur de ces altitudes, ce qui se traduit par un couvert végétal permanent et assez dense où prédominent des espèces telles que l'*Artemisia herba-alba*, *Pentzia monodiana* et *Ephedra major*. La proportion des reliques méditerranéennes n'est plus négligeable, et on y trouve en plus de l'olivier sauvage et le myrte (cf. I.4.2), une lavande (*Lavandula antineae*), deux sous-espèces de germandrée tomenteuse (*Teucrium polium* ssp. *geyrii* et *Teucrium polium* ssp. *helichrysoïdes*), une ballote (*Ballota hirsuta*), une globulaire (*Globularia arabica*) et une molène (*Verbascum granatense*) (6).

#### **I.5. Données botaniques concernant les plantes aromatiques étudiées**

La systématique des végétaux supérieurs est actuellement basée sur les données phylogénétiques des taxons étudiés. Cette taxonomie moderne est bien établie dans des sites Web spécialisés, comme Angiosperm Phylogeny Website (122) hébergé par le site web du Missouri Botanical Garden (123), Global Compositae Checklist (124), The

International Plant Names Index (125), The Plant List (126), Tropicos (127), Tela Botanica (128) et NCBI (129).

### **I.5.1. Origine phylogénétique de la famille des Astéracées**

La position phylogénétique de cette famille monophylétique est aujourd'hui bien établie. Cela s'explique par de nombreuses synapomorphies moléculaires (biosynthèse de l'inuline) et morphologiques (inflorescence en capitule).

#### **I.5.1.1. Embranchement des Embryophytes**

C'est l'embranchement des plantes terrestres même s'il comprend des espèces aquatiques qui s'opposent ici aux algues. Le nom de Cormophytes (du latin *cormus*, tige) donné également à ces plantes désigne leur l'appareil végétatif qui les caractérise. L'adaptation à l'habitat terrestre s'est traduite chez ces plantes par l'apparition :

- ↳ D'organes de reproduction tels que l'antheridie, l'archégone et l'embryon.
- ↳ De molécules protectrices : les cutines, les sporopollénines et les anthocyanes.

#### **I.5.1.2. Sous-embranchement des Trachéophytes**

Également appelés Rhizophytes (du grec *rhiza*, racine), les Trachéophytes (du grec *trakheia*, conduit raboteux) regroupent toutes plantes possédant des racines et un appareil conducteur assurant la circulation des sèves ; il est constitué :

↳ De vaisseaux du xylème (du grec *xulon*, bois) réunis en faisceaux vasculaires pour conduire l'eau puisée du sol (sève brute) des parties souterraines vers les parties aériennes de la plante. Ces vaisseaux présentent des épaisissements de lignine (du latin *lignum*, bois), biopolymère de composés aromatiques, à la fois très résistant à la traction et hydrophobe. La synthèse de la lignine par les plantes vasculaires est une étape fondamentale de l'évolution du règne végétal (130).

↳ Des tubes criblés du phloème (du grec *Phloios*, écorce) réunis en faisceaux criblés pour conduire la sève élaborée des parties assimilatrices (feuilles) vers toutes les autres parties de la plante. La formation de feuilles est donc une conséquence de l'acquisition d'un appareil conducteur chez ce groupe de plantes.

### I.5.1.3. Super-classe des Spermatophytes

Les Spermatophytes (du grec *sperma*, graine), appelés également Phanérogames (du grec *phaneros*, apparent) comprennent la majorité des espèces de plantes terrestres, dont la reproduction comporte deux innovations majeures chez les Trachéophytes :

↳ Le gamétophyte reste inclus à l'intérieur de la spore. Cette endoprothalie est à l'origine du grain de pollen et de l'ovule. La graine étant le résultat de la transformation de l'ovule après la fécondation : les téguments ovalaires se lignifient, l'oosphère fécondée donne le zygote, puis un embryon.

↳ La fécondation n'est plus tributaire de l'eau extérieure, puisqu'elle devient un processus interne à la plante grâce au développement du tube pollinique.

### I.5.1.4. Classe des Angiospermes

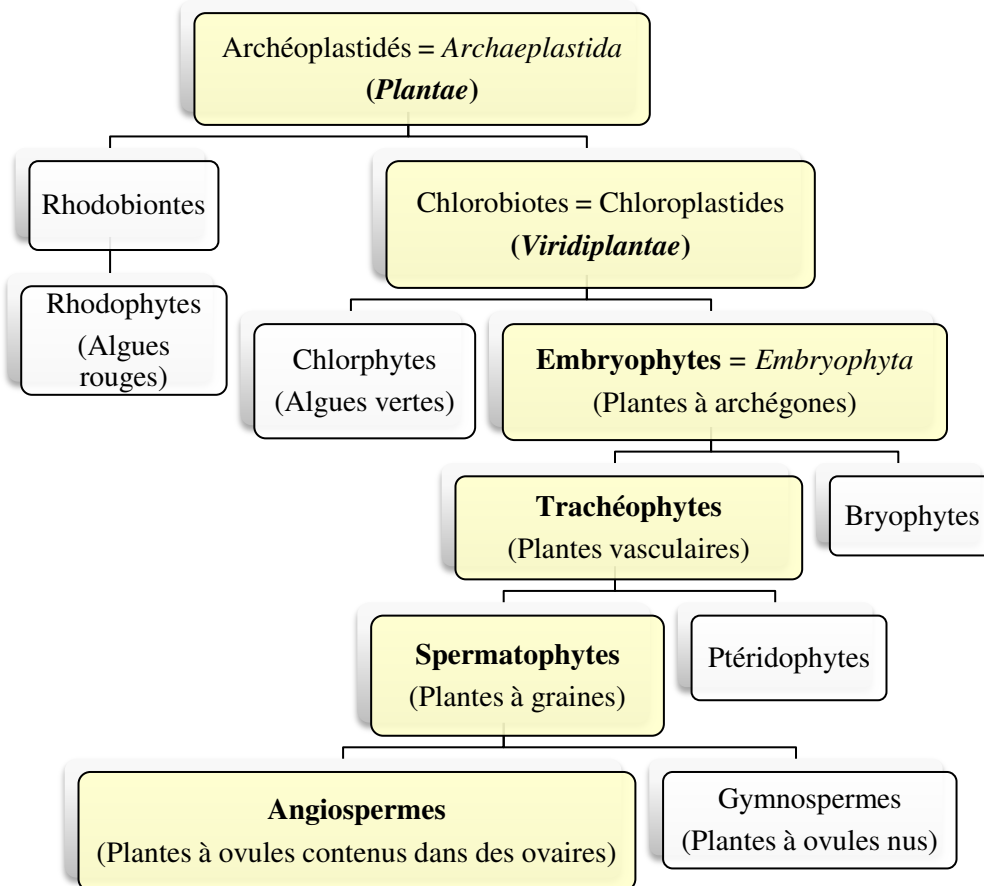
Depuis 2009, APG propose de considérer les Angiospermes (du grec *aggeion*, petite urne) comme une classe et non plus comme un embranchement, malgré l'immensité de cette classe comprenant 266 800 espèces connues, incluses dans 410 familles et réparties en 58 ordres (3, 131). La position de cette classe par rapport au règne des *Plantae* est représentée dans la **figure 26**. Trois caractères fondamentaux définissent cette classe :

↳ Les organes reproducteurs groupés en fleurs hermaphrodites, elles-mêmes groupées en inflorescences dont on distingue deux types :

- ♦ La grappe et ses variétés (épis, corymbe, ombelle et capitule) dont l'axe principal ne porte pas en général de fleur (inflorescence indéfinie) ;
- ♦ La cyme où une fleur termine l'axe principal (inflorescence définie).

↳ L'ovaire et le fruit : les carpelles (du grec *karpos*, fruit) forment un ovaire recouvrant les ovules et, après la fécondation, se transforment en fruit ;

↳ Le sac embryonnaire qui correspond au gamétophyte femelle est situé dans l'ovule, siège d'une double fécondation : l'une classique, à l'origine de l'embryon, l'autre à l'origine de l'albumen, tissu de réserve des graines.



**Figure 26** : Position des Angiospermes par rapport au règne *Plantae* (132)

#### I.5.1.5. Clade des Eudicotylédones (Dicotylédones vraies)

195 000 espèces réparties en 302 familles et en 43 ordres, sont groupées dans ce vaste ensemble de la classification phylogénétique APG IV (2016), également appelé clade des Triaperturées (ou Triporées). Ce sont les plantes à fleurs pourvues de deux cotylédons et d'un pollen à trois ouvertures (3). Alors que leur appareil végétatif est très diversifié, ces végétaux présentent un appareil reproducteur caractérisé par l'apparition chez les fleurs :

↳ De pièces périnthaires enveloppant étamines et carpelles, issues de la modification des tépales :

- ♦ Le calice généralement vert, est l'ensemble des sépales issus des tépales inférieurs et dont le rôle est protecteur. S'il y a soudure des sépales, la fleur est dite gamosépale. Dans le cas où les sépales restent libres, la fleur est dite dialysépale.

- ♦ La corolle souvent colorée, est l'ensemble des pétales issus des tépales supérieurs et dont le rôle est d'attirer les insectes pollinisateurs. S'il y a soudure des pétales, la fleur est dite gamopétale ; dans le cas contraire, la fleur est dialypétale.

↳ Du mécanisme de la "pentamérisation", qui aboutit à la formation d'une courte hélice de pièces florales par fusion de deux cycles trimères. La fleur se stabilise généralement à 5 cycles avec le diagramme floral suivant : 5S, 5P, (5+5)E, 5C. Chez les dicotylédones les plus évoluées, on ne trouve que 4 cycles, par disparition d'un des verticilles d'étamines. Cette post-obdiplostémonie (fleur à 4 cycles) sera la règle chez les Astéridées.

#### **I.5.1.6. Clade des Astéridées**

Avec les Rosidées, ce groupe constitue l'un des deux principaux clades des Dicotylédones vraies. Selon la classification APG IV (2016), ce clade descend des Superastéridées. Les Astéridées contiennent deux clades importants : celui des Lamiidées (ou Euastéridées I) et celui des Campanulidées (ou Euastéridées II), lui-même comprenant l'ordre des Astérales.

#### **I.5.1.7. Ordre des Astérales**

L'ordre des Astérales (Lindley, 1833) réunit environ 26000 espèces (3, 133) présentant certains nombres de caractères communs :

- ↳ Biochimiques puisqu'ici, l'inuline remplace l'amidon,
- ↳ Étamines ayant tendance à s'associer pour former un manchon entourant le style,
- ↳ Le pollen sera expulsé de ce tube par un processus spécifique, dit "à piston",
- ↳ Les ovules sont toujours unitégumentés et ténuinucellés.

Selon la classification classique (Cronquist, 1981), cet ordre ne comprend qu'une seule famille, celle des *Asteraceae* ; alors que la classification phylogénétique inclut 11 familles botaniques :

- ↳ *Asteraceae* (Martinov, 1820) comprenant plus de 23000 espèces,
- ↳ *Goodeniaceae* (Robert Brown, 1810) comprenant 400 espèces,
- ↳ *Stylidiaceae* (Robert Brown, 1810) comprenant 156 espèces,
- ↳ *Calyceraceae* (Robert Brown ex L. Richard, 1820) comprenant 55 espèces,
- ↳ *Menyanthaceae* (Berchol & J. Presl, 1820) comprenant 39 espèces,
- ↳ *Rousseaceae* (A.P. de Candolle, 1839) ne comportant qu'une seule espèce,
- ↳ *Pentaphragmataceae* (J. Agardh, 1858) comprenant 25 espèces,

- ↳ *Alseuosmiaceae* (Airy Shaw, 1965) comprenant 8 espèces,
- ↳ *Phellinaceae* (Takhtadjan, 1967) comprenant 12 espèces,
- ↳ *Argophyllaceae* (Takhtadjan, 1987) comprenant 11 espèces,
- ↳ *Campanulaceae* (A.L. de Jussieu, 1789), comprenant 2200 espèces en incluant les *Lobeliaceae* (Jussieu ex Bonpland, 1813).

#### **I.5.1.8. Famille des Astéracées (Martinov, 1820)**

Appelée aussi *Compositae* (Giseke, 1792), est la plus importante famille botanique des Angiospermes (**Figure 27**) regroupant environ 1500 genres. C'est l'une des familles botaniques des plus cosmopolites ; particulièrement adaptée aux régions semi-arides de la région méditerranéenne, de l'Afrique australe, du Mexique, du sud-ouest des États-Unis et des régions arides d'Amérique du Sud. Les Astéracées sont caractérisées par un appareil reproducteur comportant une inflorescence en capitule de fleurs très singulières toutes sessiles et groupées sur un réceptacle court et bombé, devenant aplati chez les espèces les plus évoluées. Parfois isolés au sommet des tiges, les capitules sont généralement eux-mêmes rassemblés en grappe, en cyme ou en corymbe. Du point de vue anatomique, le capitule est constitué d'un réceptacle sur lequel s'insèrent en spirale, de la base au sommet 2 sortes de bractées : d'abord stériles et vertes -en écailles, en crochets ou en épines- formant l'involucre ; ensuite de petites bractées fertiles, en paillettes, axillant chacune une fleur. Les fleurs sont petites et portent des anthères soudées entre elles d'où l'ancienne appellation de "Synanthérées" pour cette famille. L'ovaire est infère uniloculaire dont le style se termine par 2 stigmatés en "brosse". Le calice très réduit est représenté par un assortiment annulaire d'écailles ou de soies. La corolle est soit régulière et tubuleuse, soit zygomorphe bilabée ou ligulée. Chez les Astéracées le fruit est un akène couronné ou non d'un pappus (3). Selon la classification phylogénétique les Astéracées peuvent être subdivisées en cinq sous-familles :

- ↳ Barnadésioïdées (*Barnadesioideae*) et Mutisioïdées (*Mutisioideae*) regroupant des espèces de lianes ou d'arbustes spontanés des Andes (Amériques du Sud) qui seraient des Astéracées archaïques. Ces deux sous-familles se caractérisent respectivement par des espèces à corolle bilabée 1/4 et espèces à corolle bilabée 2/3.

- ↳ Carduoïdées (*Carduoideae*) -appelées également Tubuliflores ou Tubulées- comprennent les espèces à fleurs régulières dont les corolles sont roses, pourpres ou



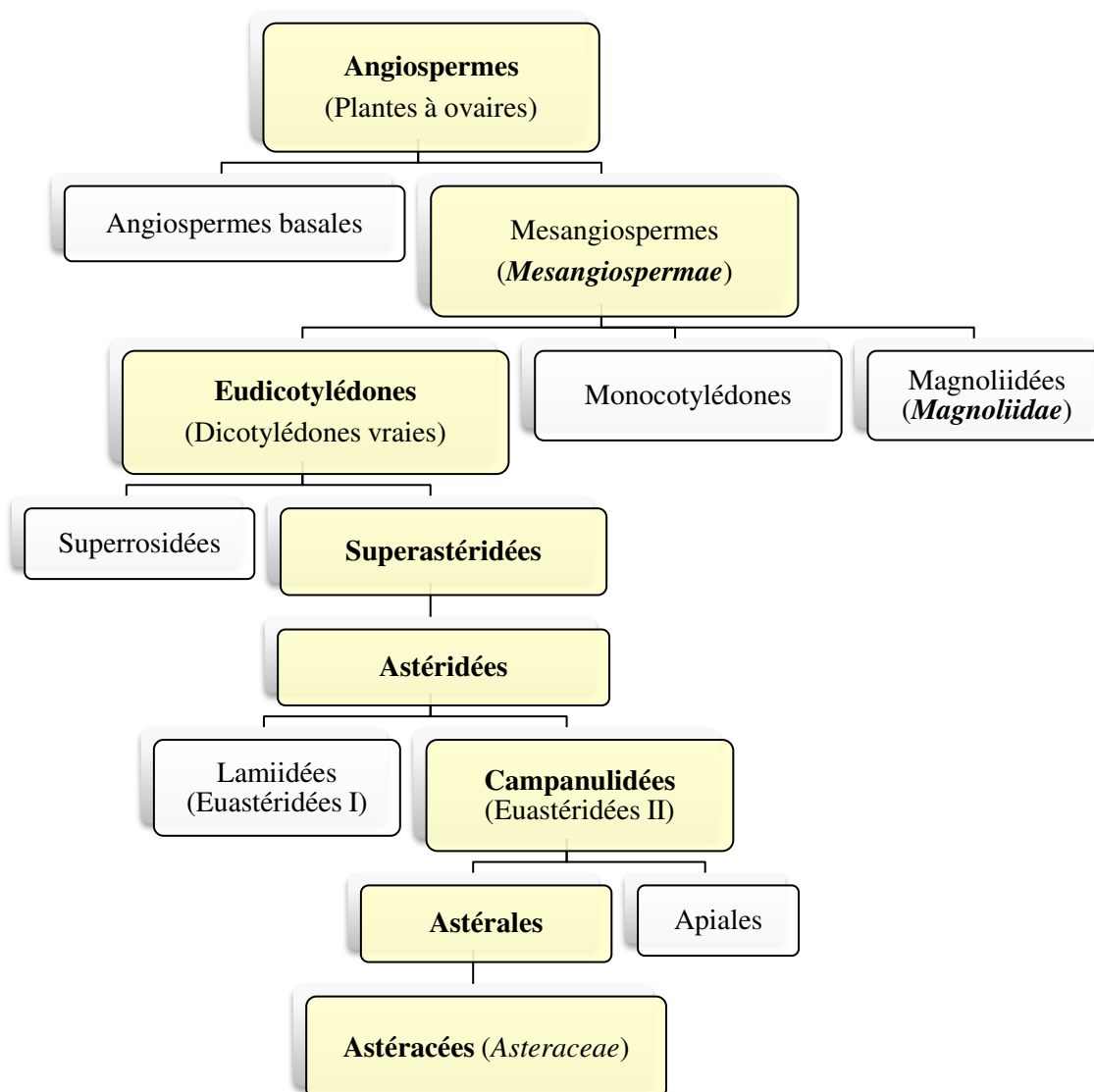
bleues. C'est le cas des nombreuses Astéracées épineuses des régions méditerranéennes et eurasiennes notamment les genres *Atractylis*, *Cynara*, *Echinops*, *Silybum*.

↳ Cichorioïdées (*Cichorioideae*) -appelées également Liguliflores ou Ligulées- correspondent aux espèces à latex dont les capitules ne portent que des fleurs ligulées terminées par cinq dents. La corolle est jaune (*Lactuca*, *Scolymus*, *Taraxacum*) ou parfois bleue (*Cichorium*).

↳ Astéroïdées (*Asteroideae*) -appelées également Radiées- regroupent plus de 60% des espèces d'Astéracées qui ne possèdent pas de laticifères et qui partagent toutes le caractère "radié" de leur capitule. Celui-ci, comporte au centre des fleurs tubulées habituellement jaunes et à la périphérie des fleurs à ligules tridentées blanches ou jaunes. Secondairement, ces fleurs ligulées peuvent être absentes chez quelques espèces appartenant à cette sous-famille, comme c'est le cas chez le genre *Artemisia* (3).

Selon NCBI (129), vingt tribus constituent cette sous-famille : *Anthemideae*, *Astereae*, *Athroismeae*, *Bahieae*, *Calenduleae*, *Chaenactideae*, *Coreopsideae*, *Doroniceae*, *Eupatorieae*, *Gnaphalieae*, *Helenieae*, *Heliantheae*, *Inuleae*, *Madieae*, *Neurolaeneae*, *Perityleae*, *Plucheeae*, *Polymnieae*, *Senecioneae* et *Tageteae*.

Certaines espèces aromatiques appartenant à ces tribus sont pourvues de cellules et des poils glanduleux à huiles essentielles ou parfois de canaux sécréteurs d'oléorésine (3).



**Figure 27** : Position des Astéracées par rapport à la classe des Angiospermes (134)

### I.5.2. Place des plantes aromatiques collectées dans la systématique des Astéracées

La flore algérienne comprend plus de 400 espèces d'Astéracées groupées en 109 genres, dont 50 sont localisés au Sahara (5). Sur les 95 espèces d'Astéracées sahariennes, 46 sont présentes au Sahara central ; alors qu'au Hoggar une vingtaine d'espèces ont été signalées (6). Parmi les plantes aromatiques les plus fréquentes au Parc Culturel de l'Ahaggar, nous avons observé et collecté des échantillons de deux sous-espèces d'*Artemisia*, de deux espèces de *Pulicaria*, d'une sous-espèce d'*Asteriscus* et d'une espèce de *Pentzia* (**Tableau 5**).

**Tableau 5** : Taxonomie\* des genres d'Astéracées aromatiques rencontrés au Hoggar

Famille	<i>Asteraceae</i>			
Sous-famille	<i>Asteroideae</i>			
Tribu	<i>Anthemideae</i> (135)		<i>Inuleae</i> (136)	
Sous-tribu	<i>Artemisiinae</i>	<i>Pentziinae</i>	<i>Inulinae</i>	
Genre	<i>Artemisia</i>	<i>Pentzia</i>	<i>Asteriscus</i>	<i>Pulicaria</i>

\* Selon NCBI (129)

#### I.5.2.1. Genre *Artemisia* (L., 1753)

(De la mythologie grecque *Artemis*, déesse de la Chasse et de la Lune.), c'est le premier représentant de la tribu des *Anthemideae* et de la sous-tribu des *Artemisiinae* ; l'un des genres les plus grands et des plus évolués de la famille des Astéracées. Il regroupe environ 400 espèces d'armoises parfaitement adaptées aux terres arides, des steppes asiatiques, du nord-ouest de la région himalayenne, de l'ouest des USA, de l'Amérique du sud, de l'Afrique du sud et de la région méditerranéenne (137). Plantes aromatiques vivaces, suffrutescentes ou ligneuses, elles portent habituellement de petits capitules discoïdes groupés en panicules. Le réceptacle plan ou convexe porte des fleurs actinomorphes, vertes, jaunes, rouges ou brunes. Les fleurs centrales hermaphrodites pouvant devenir stériles, les fleurs périphériques hermaphrodites ou femelles. Involucre à bractées imbriquées et disposées sur peu de rangs, scarieuses sur les bords. Akènes homomorphes, obovés, chauves et lisses.

#### I.5.2.2. Genre *Pentzia* (Thunb., 1800)

Carl Peter Thunberg (1743-1828) a dédié ce genre à Hendrik Christian Pentz, herboriste suédois ayant vécu de 1738 à 1803. *Pentzia* est le principal genre de la sous-tribu des *Pentziinae* qui en compte sept. Il comprend environ 27 espèces de sous-arbrisseaux aromatiques pour la plupart localisées en Afrique australe (138) ; alors que quatre autres espèces sont signalées ailleurs, telles que *Pentzia arabica* au sud du Yémen, *P. somalensis* en Somalie (139), *P. hesperidum* au Maroc (140), *P. monodiana* (141) en Algérie et au Tchad, dans les plus hautes montagnes du Sahara central.

### **I.5.2.3. Genre *Pulicaria* (Gaertn., 1791)**

(Du latin *pulicarius*, puce) ; c'est l'un des principaux genres de la sous-tribu des *Inulinae* qui en compte une trentaine comme les genres *Inula* et *Blumea*. À côté de *Pulicaria*, d'autres genres de la sous-tribu *Inulinae* sont rencontrés au Sahara algérien, tels qu'*Anvillea*, *Asteriscus*, *Lifago*, *Palinis*, *Rhanterium* et *Varthemia* (6). Le genre *Pulicaria* comprend soixante trois espèces (126) réparties pour la plupart dans les zones à climat chaud telles que la région méditerranéenne, le Sahara, la péninsule arabe, l'Afrique de l'est et l'Amérique du Nord, notamment dans sa partie orientale. Généralement tomenteuses, les espèces du genre *Pulicaria* sont, soit des herbes vivaces, soit de petits sous-arbrisseaux qui possèdent des feuilles alternes, sessiles, plus ou moins lancéolées et à marge entière, dentée ou déchiquetée. Elles portent des capitules constitués de fleurs jaunes, les unes centrales hermaphrodites tubuleuses, à anthères renflées à la base, souvent ramifiées, les autres périphériques femelles ligulées, dont les ligules sont, soit bien marquées et étalées, soit dressées et dépassant à peine l'involucre. L'involucre est formé des bractées étroites sur peu de rangs, les extérieures courtes et foliacées, les intérieures parfois scarieuses. Les akènes du genre *Pulicaria* sont cylindriques ou comprimés, sans côtes ou à quatre côtes, possédant un double pappus. L'aigrette extérieure courte, cupuliforme, est constituée par des paillettes plus ou moins cornées à la base, libres ou plus ou moins soudées avec l'aigrette interne ; celle-ci est composée de soies longues et scabres.

## I.6. Données phytochimiques concernant les plantes étudiées

### I.6.1. Métabolites secondaire des Astéracées

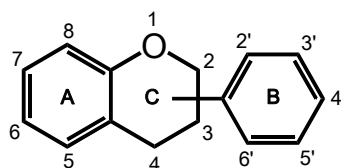
Chez les espèces de cette famille botanique évoluée, la biosynthèse de métabolites secondaires capables de les prémunir efficacement contre les prédateurs semble s'orienter de plus en plus vers les lactones sesquiterpéniques, les diterpènes et les dérivés polyacétyléniques, abandonnant la voie des alcaloïdes classiques (3). Pratiquement seuls les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont synthétisés chez quelques espèces d'Astéracées comme *Eupatorium cannabinum*, *Senecio jacobaea*, *Senecio vulgaris* et *Tussilago farfara* (51). L'autre caractéristique phytochimique de cette grande famille botanique est son aptitude à élaborer plus de 800 flavonoïdes différents, regardés par certains auteurs comme des marqueurs chimiotaxonomiques pertinents dans la classification des espèces au sein des Astéracées (142,143), au même titre que les lactones sesquiterpéniques (144).

#### I.6.1.1. Flavonoïdes

On connaît actuellement, plus de 8000 structures polyphénoliques comprenant toutes un noyau benzénique substitué au moins par un hydroxyle (145). Les principales classes chimiques de polyphénols sont regroupées dans le **tableau 6**.

Malgré leur grande diversité (environ 4000 structures connues), les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Chez les Angiospermes, les flavonoïdes ne sont localisés que dans les parties aériennes des plantes, précisément dans les tissus superficiels des feuilles, des fleurs et des fruits.

Les composés flavoniques possèdent tous, le même squelette de base en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (**Figure 28**) : deux noyaux benzéniques (A) et (B) reliés par une chaîne de 3 carbones, pouvant selon le cas, aboutir à un troisième cycle (C). L'état d'oxydation de la chaîne des 3 carbones, la position du noyau benzénique (B), la nature de la substitution par des groupements OH, OCH<sub>3</sub> et/ou glycosyle, enrichissent la molécule du point de vue diversité structurale (51).



**Figure 28** : Structure de base des flavonoïdes

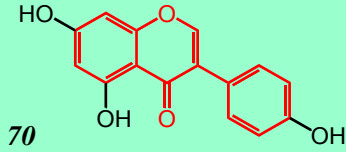
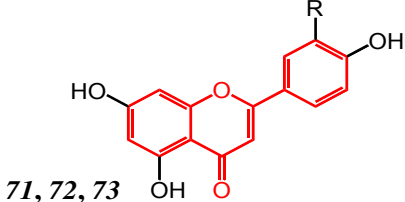
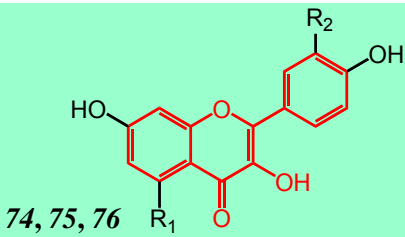
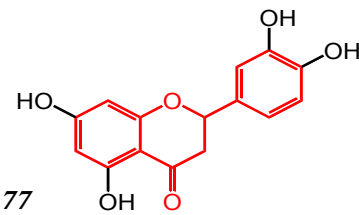
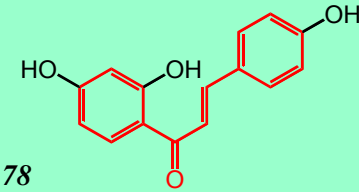
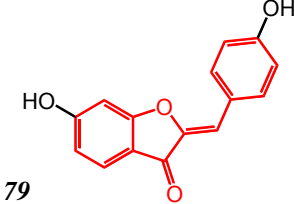
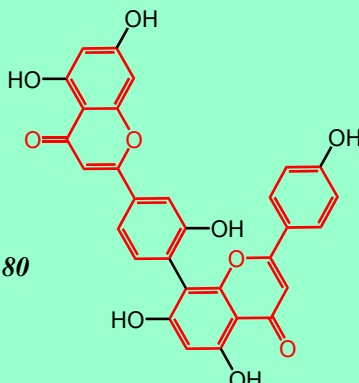
**Tableau 6** : Principales classes chimiques de polyphénols

Nombre de carbone	Structure de base	Classe
6	C6	Phénols simples, benzoquinones
7	C6-C1	Acides phénoliques
8	C6-C2	Acétophénone, acide benzoïque
9	C6-C3	Acide hydroxy-cinnamique, polypropène, coumarines, isocoumarines
10	C6-C4	Naphtoquinones
13	C6-C1-C6	Xanthones
14	C6-C2-C6	Stilbène
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes, isoflavonoïdes
18	(C6-C3) 2	Lignanes, néolignanes
30	(C6-C3-C6) 2	Biflavonoïdes
> 30	(C6-C3-C6) n	Tanins condensés
	(C6-C3) n	Lignines

Une douzaine de sous-classes chimiques de composés flavoniques peuvent être distinguées dont les plus fréquentes sont représentées dans le **tableau 7**. Les sous-classes des anthocyanidines, des leucoanthocyanidines et des flavanols ne faisant pas partie des flavonoïdes *stricto sensu*.

Chez les Astéracées, ce sont surtout les sous-classes des flavones et des flavonols qui sont fréquentes, principalement leurs dérivés polyhydroxylés : apigénine **70** et lutéoline **71** pour les flavones ; kaempférol **73** et quercétine **74** pour les flavonols. Des dérivés méthoxylés ou glycosylés issus de ces hydroxyflavones et hydroxyflavonols sont également fréquents chez de nombreuses espèces d'Astéracées. La sous-classe des flavanones est aussi présente à travers l'ériodictyol **76**, un dérivé 2,3-dihydrogéné de l'apigénine (143).

**Tableau 7** : Principales sous-classes de flavonoïdes *stricto sensu*

Sous-classe	Squelette chimique	Exemples d'aglycones
Isoflavones		Génistéine <b>70</b>
Flavones		R = H, Apigénine <b>71</b> R = OH, Lutéoline <b>72</b> R = OMe, Scoparol <b>73</b>
Flavonols		R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = H, Kaempférol <b>74</b> R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = OH, Quercétine <b>75</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = OH, Fisétine <b>76</b>
Flavanones		Ériodictyol <b>77</b>
Chalcones		Isoliquiritigénine <b>78</b>
Aurones		Hispidol <b>79</b>
Biflavonoïdes		Amentoflavone <b>80</b>

### I.6.1.2. Lactones sesquiterpéniques

Ce sont des terpénoïdes présentant un noyau sesquiterpénique ayant subi par la suite des modifications de structure par cyclisations et oxygénations (51). Ces sesquiterpènes à fonction lactone représentent une classe importante de métabolites secondaires non seulement du point de vue quantitatif, mais aussi du fait de leur grande diversité structurale. En 2006, une étude a recensé au moins 5000 structures différentes ; ce chiffre pourrait bien être plus supérieur aujourd'hui du fait du nombre sans cesse croissant d'études phytochimiques menées sur le sujet (146). Sporadiquement présentes dans les règnes *Fungi* et *Plantae*, les lactones sesquiterpéniques ont notamment été isolées à partir d'Angiospermes telles les Apiacées, Euphorbiacées, Lauracées, Ménispermacées, Rutacées ; mais c'est au sein de la famille des Astéracées qu'elles sont très majoritairement retrouvées. Sauf quelques exceptions telles que la lactucine de *Cichorium intybus*, l'hélénine d'*Inula helenium*, isolées des racines de ces plantes, les lactones sesquiterpéniques ne sont localisées que dans les téguments de fruits et dans poils sécréteurs des parties aériennes des plantes, notamment les inflorescences (51). A l'état pur, les lactones sesquiterpéniques sont généralement décrites comme des substances incolores, amères, faiblement volatiles, lipophiles et thermolabiles (147).

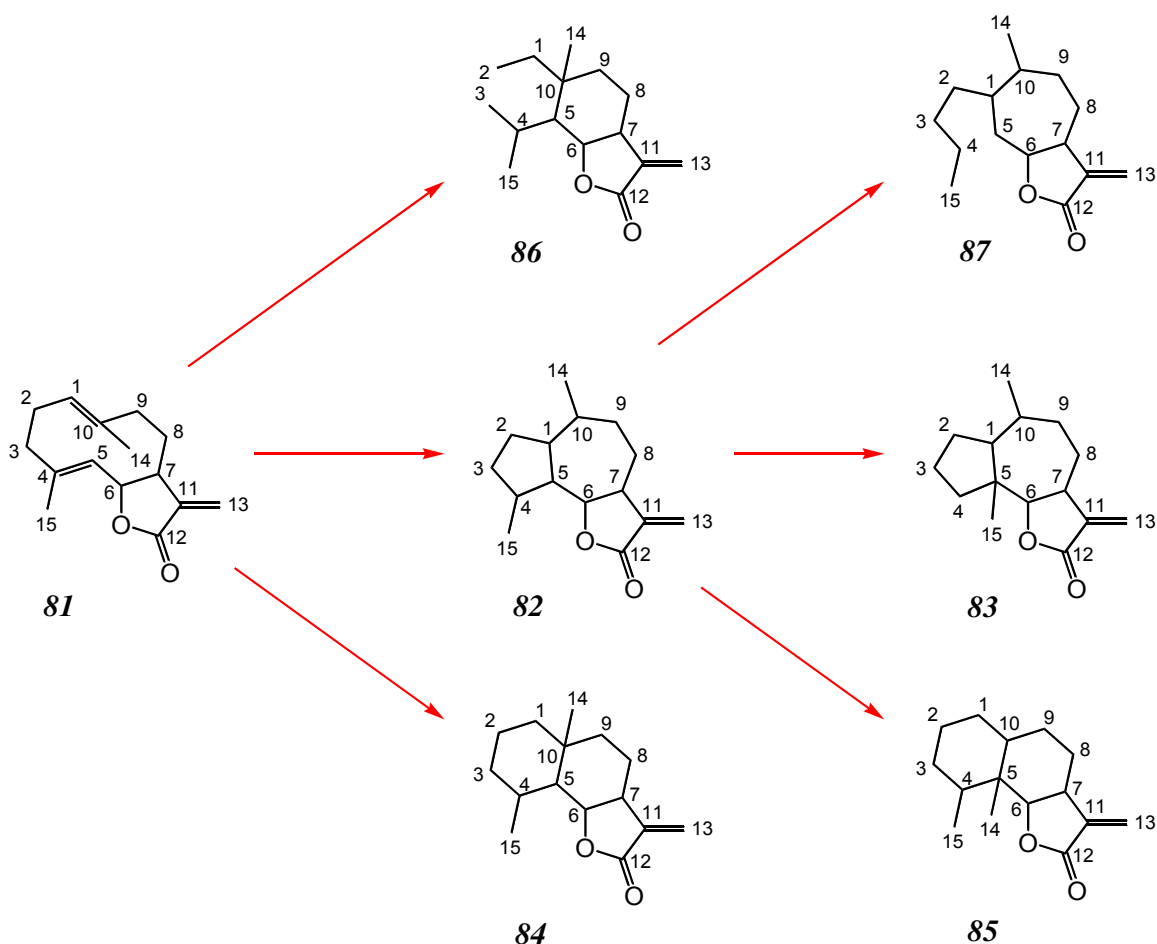
La nomenclature des lactones sesquiterpéniques consiste à ajouter le suffixe "olide" au nom du squelette sesquiterpénique pour indiquer la présence d'une fonction lactone. La plupart des lactones sesquiterpéniques dériveraient de 7 groupes structuraux principaux (**figure 29**). Le groupe du germacranolide **81**, très majoritaire serait le précurseur des six autres groupes : guaianolide **82**, pseudoguaianolide **83**, eudesmanolide **84**, érémosphilanolide **85**, élémanolide **86** et xanthane **87** (148). Sur ces squelettes de base de nombreuses variations structurales secondaires sont à l'origine de la grande diversité des lactones sesquiterpéniques et qui portent notamment sur :

↳ La configuration de la lactone qui est habituellement *trans*-12,8 ; parfois *cis*-12,6 ; *cis*-12,8 ou *trans*-12,8 ;

↳ Les groupes méthyle sont généralement fonctionnalisés en alcools ou en carboxyle ;

↳ Les insaturations peuvent être réduites ou oxydées en époxydes ou en hydroxyles. En général, les fonctions alcools sont estérifiées.





**Figure 29** : Relations entre les sept groupes de lactones sesquiterpéniques (146,149) Germacranolide **81**, Guaianolide **82**, Pseudoguaianolide **83**, Eudesmanolide **84**, Érémophilanolide **85**, Élémanolide **86**, Xanthane **87**

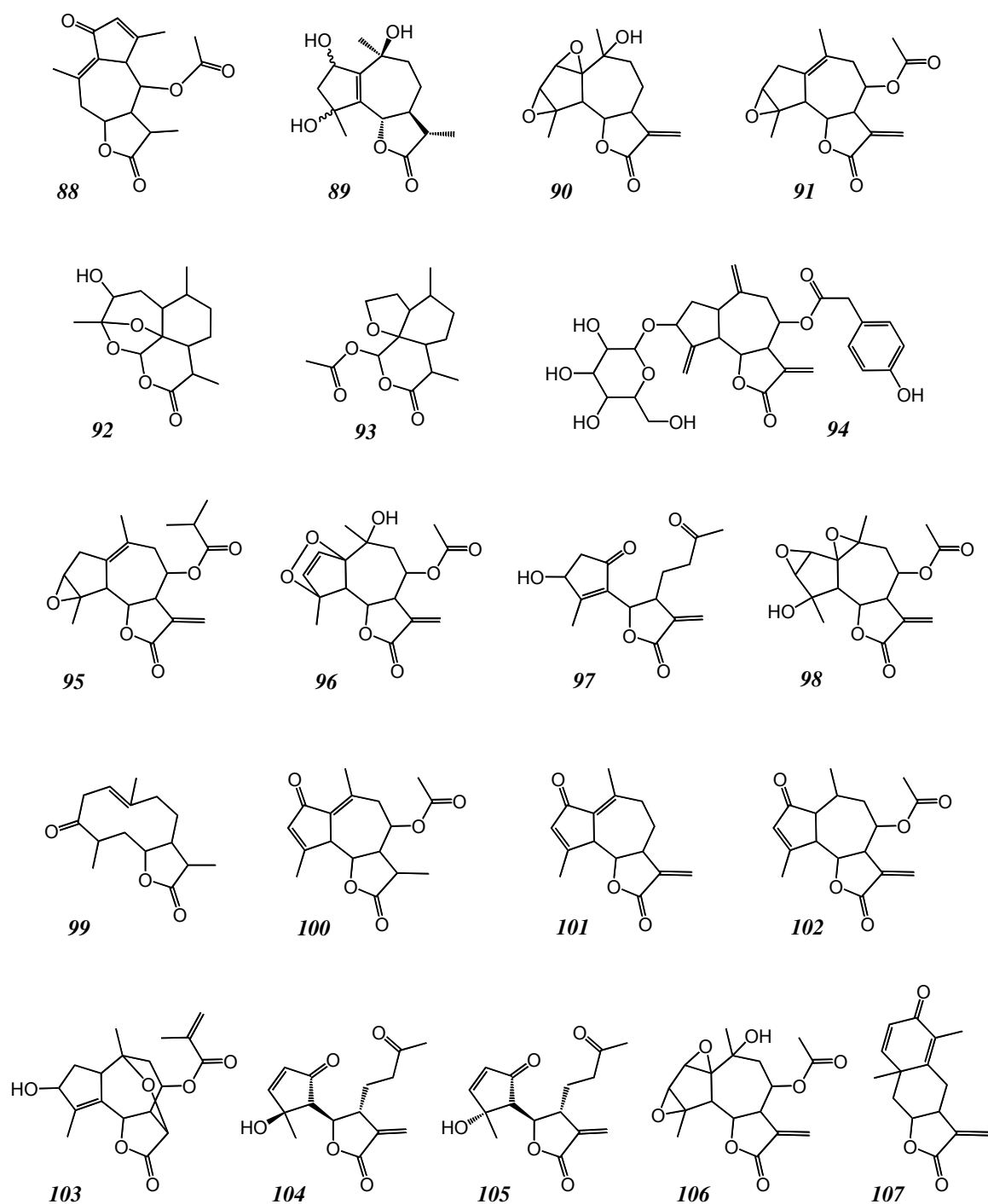
### I.6.2. Phytochimie du genre *Artemisia*

Etant des plantes aromatiques, quelques espèces d'*Artemisia* sont exploitées pour leur huile essentielle (150). Chez les armoises les lactones sesquiterpéniques sont très oxygénées et appartiennent surtout aux groupes eudesmanolide et guaianolide, alors que les germacranolides sont minoritaires ; la plus connue d'entre elles est vraisemblablement l'artémisinine **3**, un endoperoxyde de cadinanolide isolé d'*Artemisia annua*. Elle est également présente en très faible teneur chez *Artemisia apiacea*, *Artemisia lancea* et *Artemisia scoparia* (151). Une recherche sur le dictionnaire des produits naturels (152) nous a permis de réaliser le **tableau 8**, donnant un aperçu sur les différentes lactones sesquiterpéniques rencontrées chez les armoises ; leurs structures chimiques sont également présentées dans la **figure 30**.

**Tableau 8** : Lactones sesquiterpéniques isolées de quelques espèces du genre *Artemisia*

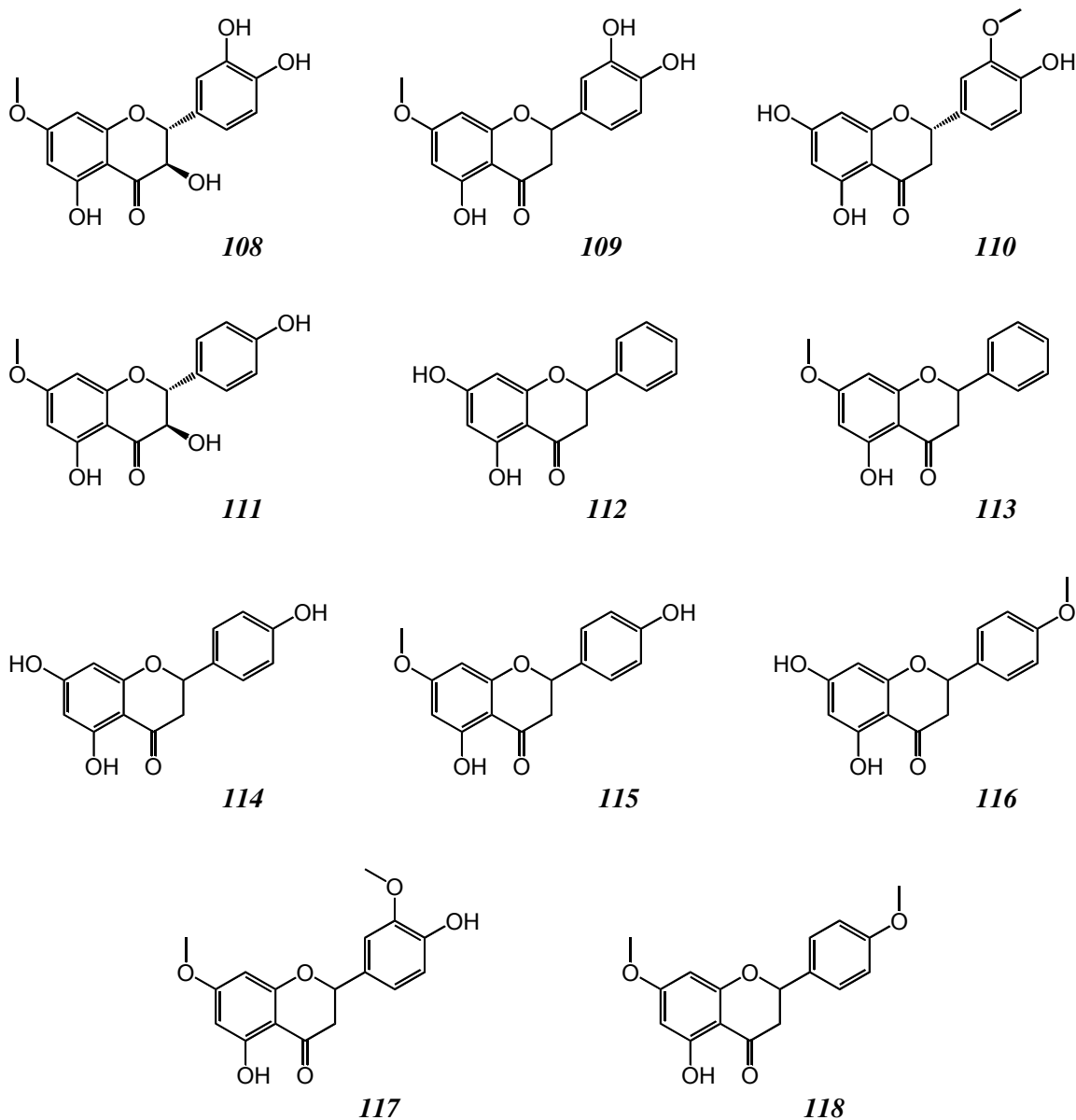
Lactone sesquiterpénique	<i>Artemisia</i> (espèce source)*
6-Acétylférulidine <b>88</b>	<i>A. lanata</i>
Artabsinolides C et D <b>89</b>	<i>A. absinthium</i>
Artécanine <b>90</b>	<i>A. gmelinii</i>
Artéglasine A <b>91</b>	<i>A. douglasiana</i>
Artémisinine <b>3</b> , Artémisinine D <b>92</b> (= Qinghaosu IV), Artémisinine G <b>93</b>	<i>A. annua</i>
Artémofriginoside A <b>94</b>	<i>A. frigida</i>
Carlaolide A <b>95</b>	<i>A. princeps</i>
Ezomontanine <b>96</b>	<i>A. montana</i>
Iso-sécotanapartholide <b>97</b>	<i>A. xanthochroa</i>
Iwayoside B <b>98</b>	<i>A. iwayomogi</i>
Kétopélénolide B <b>99</b>	<i>A. absinthium</i> <i>A. glabella</i>
Matricarine <b>100</b>	<i>A. tilesii</i>
Mésatlantine E <b>101</b>	<i>A. tridentata</i> , <i>A. mesatlantica</i>
Montanone <b>102</b>	<i>A. montana</i>
Rotundopontilide E <b>103</b>	<i>A. pontica</i>
Sécotanapartholide A <b>104</b> , Sécotanapartholide B <b>105</b>	<i>A. xerophytica</i> <i>A. rutifolia</i>
Yomogiartémine <b>106</b>	<i>A. tripartita</i> <i>A. montana</i>
Yomogine <b>107</b>	<i>A. princeps</i>

\* Selon Dictionary of Natural Products on DVD, 2014



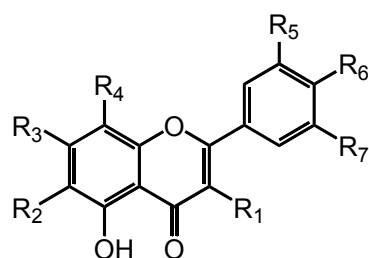
**Figure 30** : Principales lactones sesquiterpéniques du genre *Artemisia*  
 6-Acétyleférulidine **88**, Artabsinolides C et D **89**, Artécanine **90**, Artéglasine A **91**,  
 Artémisinine D **92**, Artémisinine G **93**, Artémofriginoside A **94**, Carlaolide A **95**,  
 Ezomontanine **96**, Iso-sécotanaparholide **97**, Iwayoside B **98**, Kétopélénolide B **99**,  
 Matricarine **100**, Mésatlantine E **101**, Montanone **102**, Rotundopontilide E **103**,  
 Sécotanaparholide A **104**, Sécotanaparholide B **105**, Yomogiartémine **106**, Yomogine **107**

Parmi les nombreux flavonoïdes présents chez le genre *Artemisia*, nous citerons en particulier les dérivés méthoxylés de flavones (**Tableau 9**) et de flavanols (**Tableau 10**). Les flavanones (**Figure 31**) sont représentées à travers la padmatine **108**, la sternbine **109** et des dérivés 2,3-dihydrogénés de la lutéoline (152,153,154).



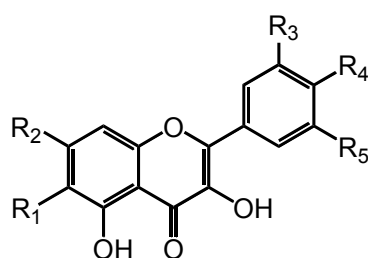
**Figure 31** : Flavanones isolées à partir des différentes espèces du genre *Artemisia*  
 Padmatine **108**, Sternbine **109**, Homoeriodictyol **110**, 7-O-méthylaromadendrine **111**, Pinocembrine **112**,  
 Pinostrombine **113**, Naringénine **114**, Sakuranétine **115**, Iso-sakuranétine **116**,  
 Ériodictyol-7,3'-diméthylether **117**, Ériodictyol-7,4'-diméthylether **118**

**Tableau 9** : Méthoxyflavones isolées chez le genre *Artemisia*



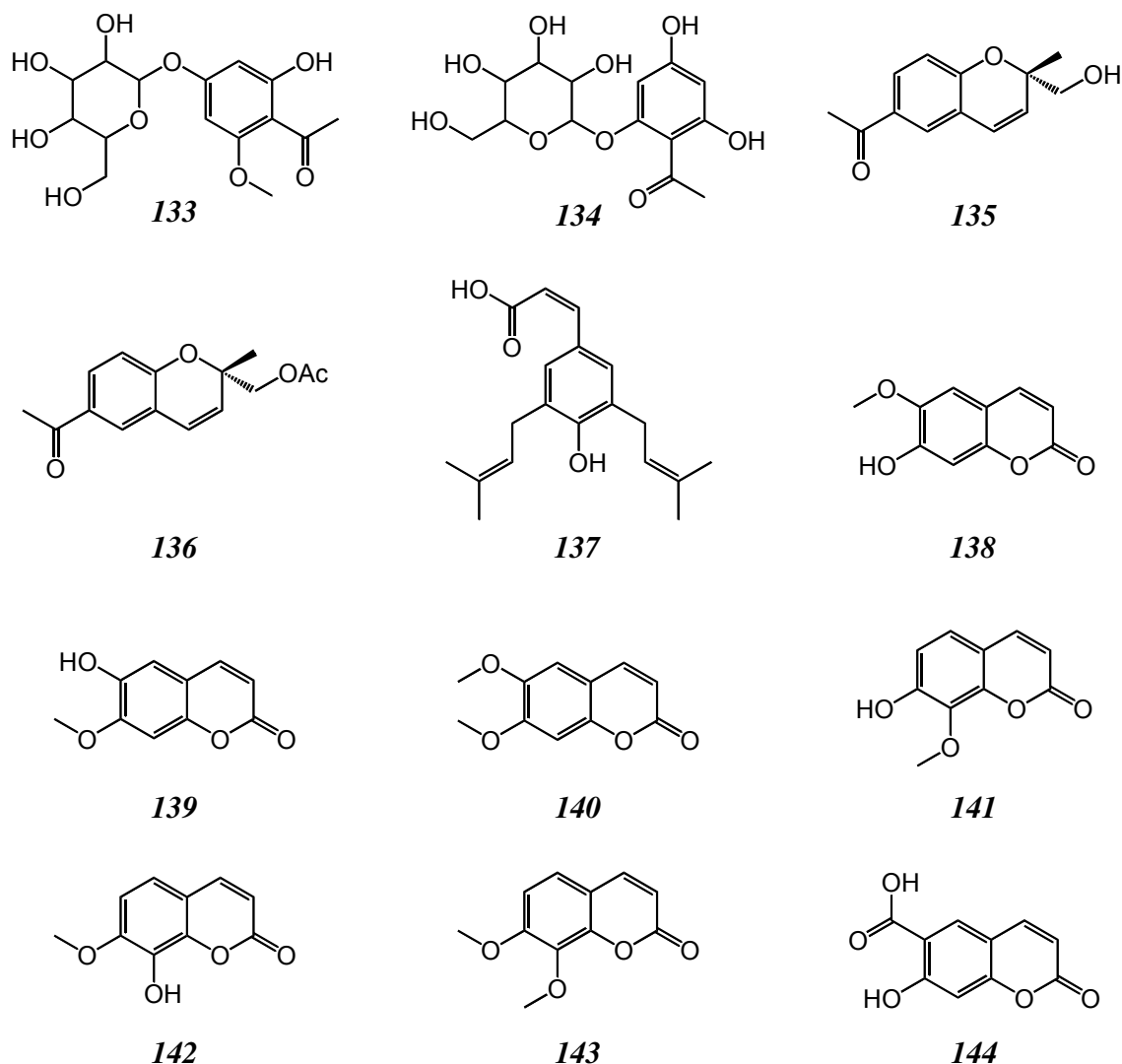
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>
<b>Arnéosol 119</b>	OMe	OMe	OH	OMe	H	OMe	H
Artéanoflavone <b>120</b>	H	OMe	OH	H	OMe	OMe	OMe
<b>Artéméxistine 121</b>	OMe	H	OH	H	OMe	OH	OH
Bonanzine <b>122</b>	OMe	OMe	OH	H	OMe	OMe	H
<b>Cirsiliol 123</b>	H	OMe	OMe	H	OH	OH	H
Diosmétine <b>124</b> (Vitamine P)	H	H	OH	H	OH	OMe	H
<b>Hispiduline 125</b>	H	OMe	OH	H	H	OH	H
Oxyamine B <b>126</b>	OMe	OH	OMe	H	OH	OMe	H
<b>Quercétine-3,3'-diméthylether 127</b>	OMe	H	OH	H	OMe	OH	H
Salvétine <b>128</b>	H	H	OMe	OH	H	OH	H

**Tableau 10** : Méthoxyflavonols isolés chez le genre *Artemisia*



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>
<b>Apicine 129</b>	OMe	OMe	OH	H	OMe
Eupatorine <b>130</b>	OMe	OMe	H	OH	H
<b>Rhamnétine 131</b>	H	OMe	OH	OH	H
Isorhamnétine <b>132</b>	H	OH	OMe	OH	H

D'autres composés aromatiques sont également présents chez les espèces du genre *Artemisia* (**Figure 32**).



**Figure 32** : Composés aromatiques isolés de quelques espèces du genre *Artemisia*  
 Anphénone **133**, Myrciaphénone A **134**, Artémisérol **135**, Acétyl-artémisérol **136**, Artépilline C **137**,  
 Scopolétine **138**, Isoscopolétine **139**, Scoparone **140**, Daphnéline **141**, Daphnéline 7-méthyléther **142**,  
 Daphnéline diméthylether **143**, Acide ombelliférone 6-carboxylique **144**.

Ils sont de natures les plus diverses :

↳ Des dérivés acétophénoniques plus ou moins prénylés, appartenant généralement au groupe des para-hydroxyacétophénones. Certaines d'entre-elles peuvent être glycosylée comme pour les cas de l'anphénone **133** et de la myrciaphénone A **134** ;

↳ Des dérivés du chromène comme l'artémiséanol **135** et l'acétyl-artémiséanol **136** (155);

↳ Des dérivés de l'acide cinnamique tels que l'artépilline C **137** ;

↳ Des hydroxycoumarines telles que la scopolétine **138**, l'isoscopolétine **139** (156), la scoparone **140**, la daphnétine **141**, la daphnétine 7-méthyléther **142**, la daphnétine diméthylether **143** (157,158), l'acide ombelliférone 6-carboxylique **144** (159).

### **I.6.2.1. Phytochimie de l'espèce *Artemisia campestris***

Une recherche effectuée sur SciFinder<sup>®</sup> (160), avec les mots clés "Artemisia+campestris" nous a donné quatre-vingt-douze références, dont dix-neuf avec précision de la sous-espèce. En effet, sur la dizaine de sous-espèces d'*Artemisia campestris* déjà décrites (126), seules trois ont suscité l'intérêt des phytochimistes. Ne s'agissant que de la sous-espèce *glutinosa* nous en avons relevé onze publications ; alors que les sous-espèces *campestris* et *maritima* sont citées respectivement trois et cinq fois. Mis à part quelques hydrocarbures oxygénés tels que les alcools gras et une cétone polyacétylénique, la déhydrofalcarindione (161); les autres métabolites secondaires isolés de l'*Artemisia campestris* peuvent être rangés dans deux grandes catégories : celle des terpénoïdes volatils et celle des dérivés aromatiques.

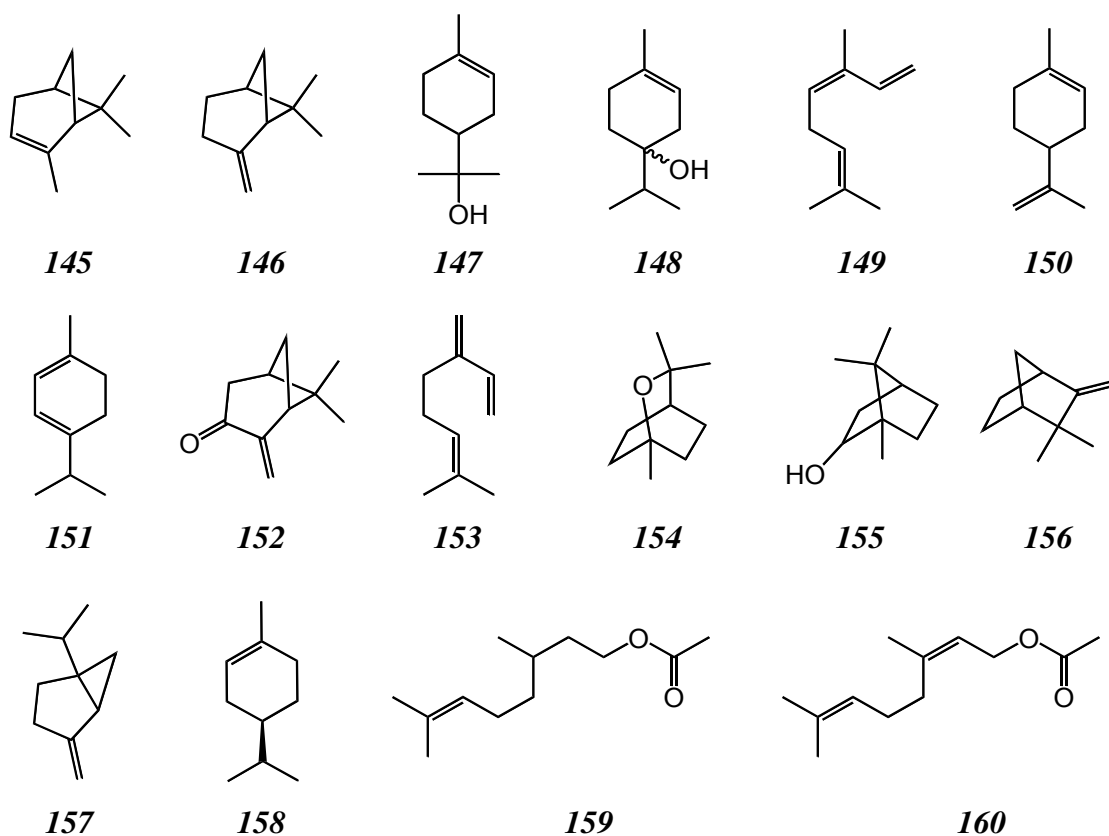
#### **I.6.2.1.1. Les terpénoïdes volatils**

Hormis le p-cymène **176** et l'ar-curcumène **177** qui ne sont pas des terpénoïdes, les autres constituants de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* (162,163), sont :

↳ Soit des monoterpènes (**Figure 33**) :  $\alpha$ -pinène **145**,  $\beta$ -pinène **146**,  $\alpha$ -terpinéol **147**, terpinène-4-ol **148**,  $\beta$ -ocimène **149**, limonène **150** (164),  $\alpha$ -terpinène **151**, pinocarvone **152**, myrcène **153** (165), 1,8-cinéole **154**, bornéol **155**, camphène **156** et sabinène **157** (166). Tout récemment Boukhalfa D. (167), dans sa thèse dédiée en partie à l'étude des trois armoises présentes dans le Hoggar, identifie dans l'huile essentielle de l'*A. campestris* ssp. *glutinosa*, une quarantaine de monoterpènes, les composés majoritaires étant par ordre décroissant l' $\alpha$ -pinène **145**, le  $\beta$ -pinène **146**, le

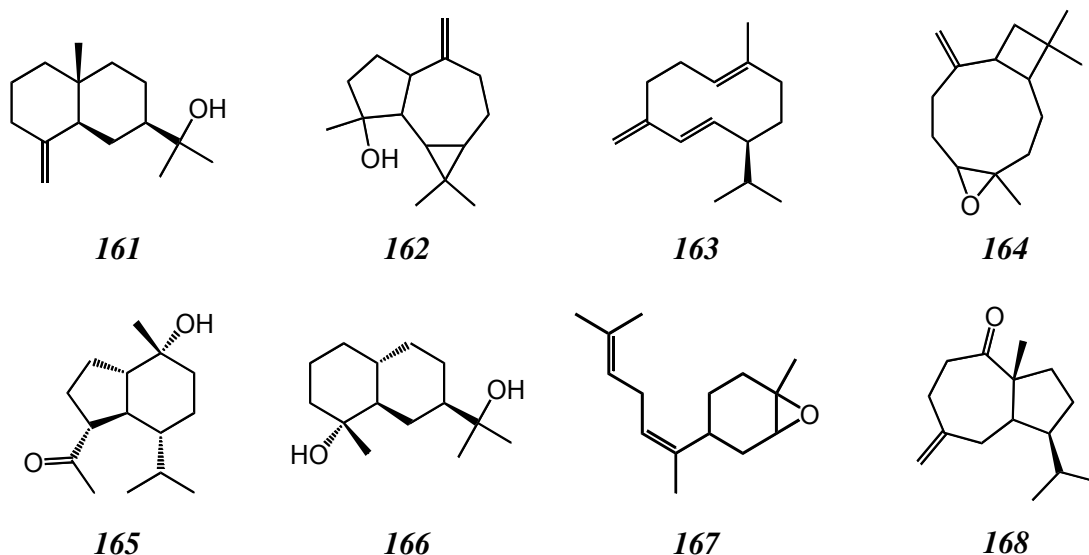
limonène **150**, le (+)-carvomenthène **158** suivis d'esters monoterpéniques tels que l'acétate de citronellyle **159** et l'acétate de géranyle **160**.

↳ Soit des sesquiterpènes (**Figure 34**) : le  $\beta$ -eudesmol **161** étant majoritaire, il est accompagné du spathuléol **162** (168), du germacrène D **163**, du caryophyllène oxide **164** (169), d'oplopanone **165**, de cryptomériol **166** (170). Dans les travaux de Boukhalfa D. (167), vingt-cinq sesquiterpènes sont signalés dont le spathuléol **162** est très majoritaire. Il est suivi du  $\beta$ -eudesmol **161**, du trans-Z-.alpha.-bisabolène époxyde **167** et du salvialénone **168**.



**Figure 33** : Monoterpènes présents dans l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris*  
 $\alpha$ -pinène **145**,  $\beta$ -pinène **146**,  $\alpha$ -terpinéol **147**, Terpinène-4-ol **148**,  $\beta$ -ocimène **149**, Limonène **150**,  
 $\alpha$ -terpinène **151**, Pinocarvone **152**, Myrcène **153**, 1,8-cinéole **154**, Bornéol **155**, Camphène **156**,  
Sabinène **157**, (+)-carvomenthène **158**, Acétate de citronellyle **159**, Acétate de géranyle **160**





**Figure 34** : Sesquiterpènes présents dans l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris*  
 $\beta$ -eudesmol **161**, Spathuléol **162**, Germacrène D **163**, Caryophyllène oxide **164**, Oplopanone **165**,  
 Cryptomériol **166**, Trans-Z. $\alpha$ -bisabolène époxyde **167**, Salvialénone **168**

#### 1.6.2.1.2. Les composés aromatiques

Dans le **tableau 11** sont regroupés les dérivés de l'hydroxy-acétophénone identifiés chez l'*Artemisia campestris* (152).

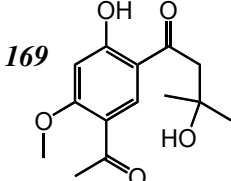
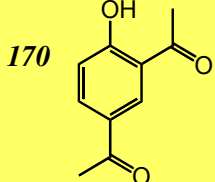
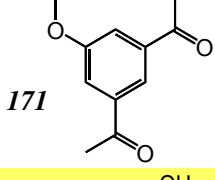
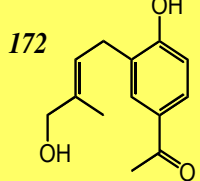
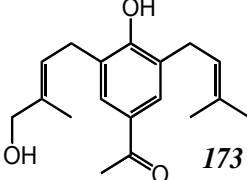
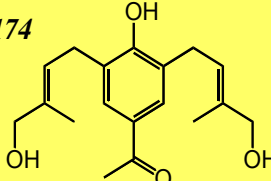
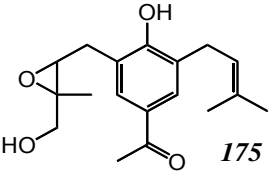
Dans la **figure 35** sont représentés les structures chimiques de la plupart des dérivés aromatiques isolés de l'*Artemisia campestris*, tels que le capillène **178**, le 1-phényl-2,4-pentadiyne **179**, le méthyleugénol **180**, l'acide di-O-caffeoylquinique **181** (171) ; des dérivés isocoumariniques notamment l'artémidine **182**, époxy-artémidine **183** et artémidinal **184** (172). Sont également représentés les dérivés du chromène (artémiséol **135**, acétyl-artémiséol **136**) et les dérivés du chromone tels que le 5-hydroxy-7-méthoxychromone **185**, le 5,7-diméthoxychromone **186** et le 6-acétyl-2,2-diméthylchroman-4-one **187** (170,173). Chez *Artemisia campestris*, les hydroxycoumarines sont représentées par l'artémiséol **135**, l'acétyl-artémiséol **136** (155) et la scopolétine **138** (173).

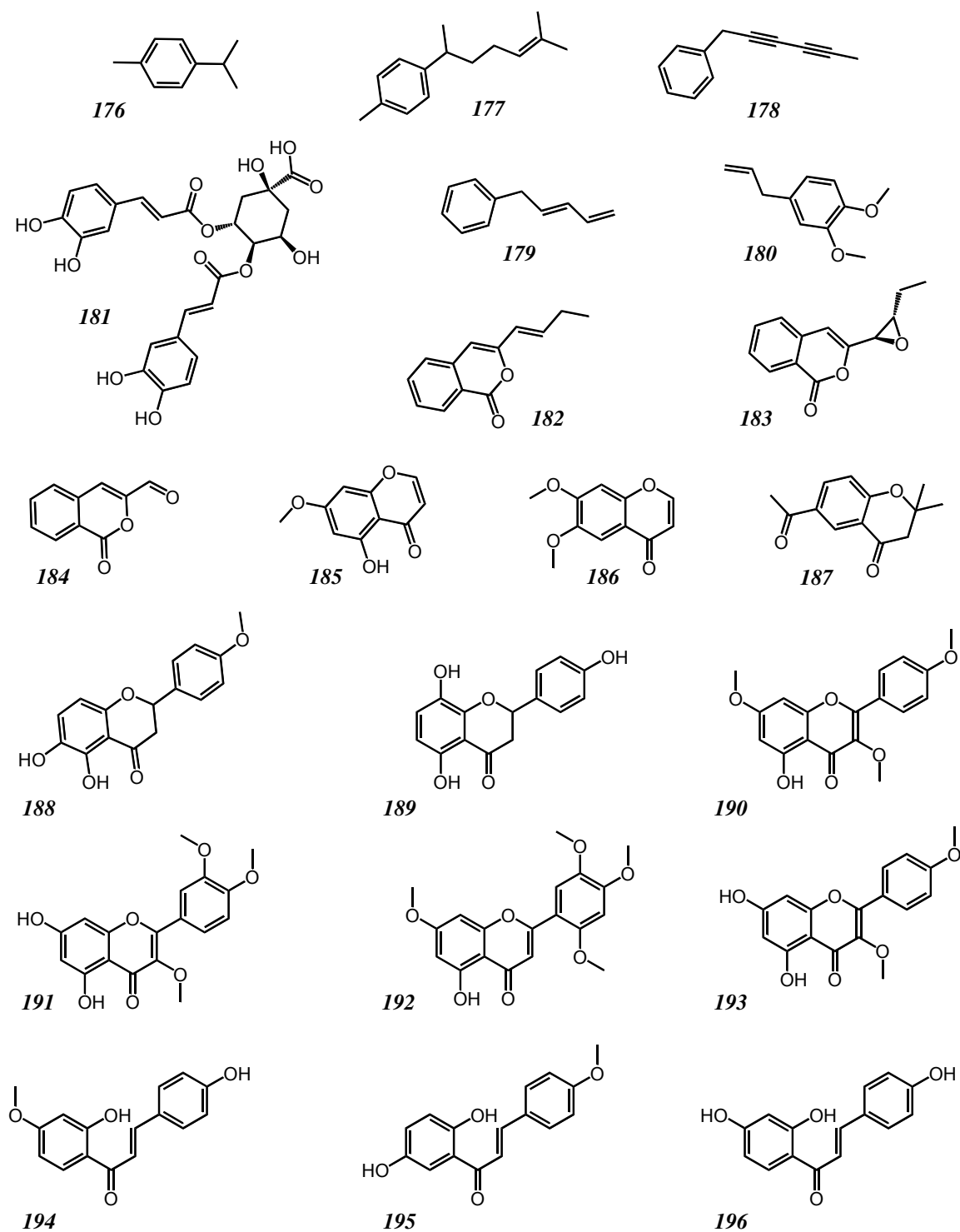
À l'exception de la 5,6-dihydroxy-4'-méthoxyflavanone **188** et de la 4',5,8-trihydroxyflavanone **189** (152), l'ensemble des flavanones isolées de l'*A. campestris* sont représentées dans la **figure 31** ; il s'agit de la padmatine **108**, la sternbine **109**, l'homoeriodictyol **110**, la 7-O-méthylaromadendrine **111** (174), la pinocembrine **112**, la pinostrombine **113**, la naringénine **114**, la sakuranétine **115**, l'isosakuranétine **116**, l'ériodictyol-7,3'-diméthylether **117** et l'ériodictyol-7,4'-diméthylether **118**. Certaines méthoxyflavones présentes chez *A. campestris* sont également représentées dans la

**figure 32** ; il s'agit du cirsiolol **123**, de l'hispiduline **125** et de la salvétine **128** (175). Nous citons d'autres méthoxyflavones tel que le kœmpférol-3,7,4'-triméthyléther **190** (176), la 3,3',4'-triméthoxy-quercétine **191** (177), la 5-hydroxy-7,2',4',5'-tétraméthoxyflavone **192** (178), la 5,7-dihydroxy-3,4'-diméthoxyflavone **193** (177).

La sous-classe des chalcone est présente chez *A. campestris*, représentée par au moins trois méthoxychalcones : la 4,2'-dihydroxy-4'-méthoxychalcone **194**, la 2',5'-dihydroxy-4-méthoxychalcone **195** et l'isoliquirigénine **196** (177).

**Tableau 11** : Dérivés hydroxy-acétophénoniques isolés de l'*Artemisia campestris* (152)

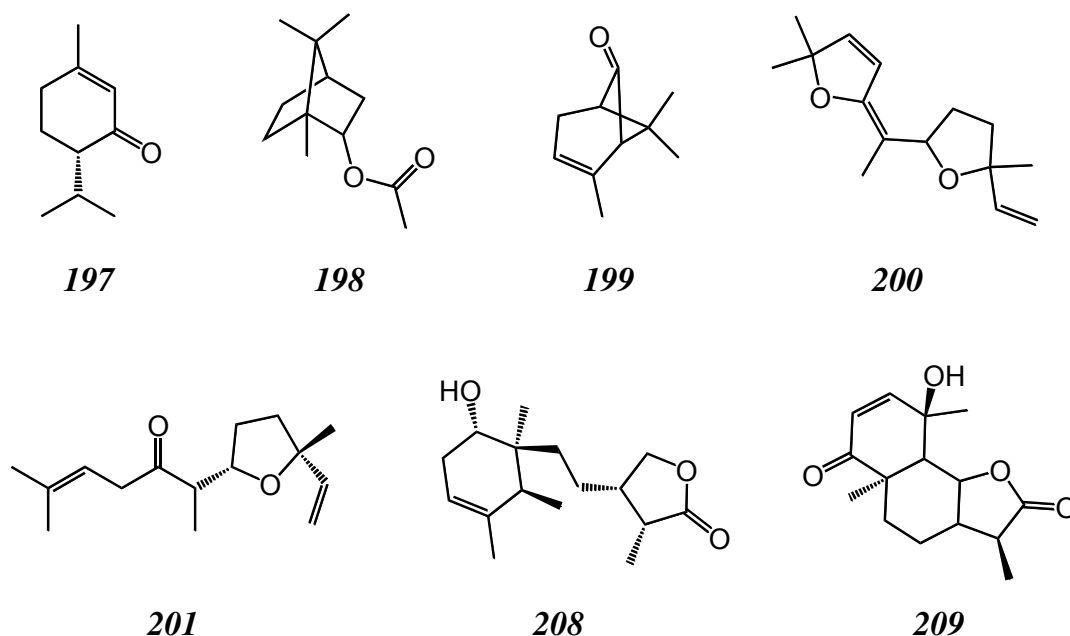
Glutinosol <b>169</b>	
2,4-diacétylphénol <b>170</b>	
2,4-diacétylanisole <b>171</b>	
4-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-méthyl-2-butenyl) acétophénone <b>172</b>	
4-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-méthyl-2-butenyl)-5-(3-méthyl-2-butenyl) acétophénone <b>173</b>	
4-hydroxy-3,5-bis (4-hydroxy-3-méthyl-2-butenyl) acétophénone <b>174</b>	
3-(2,3-époxy-3-méthylbutyl)-4-hydroxy-5-(4-hydroxy-3-méthyl-2-butenyl) acétophénone <b>175</b>	



**Figure 35 :** Quelques composés aromatiques isolés de l'*Artemisia campestris*  
 p-Cymène **176**, Ar-curcumène **177**, Capillène **178**, 1-phényl-2,4-pentadiène **179**, Méthyleugénol **180**,  
 Acide di-O-caffeoylquinique **181**, Artémidine **182**, Époxy-artémidine **183**, Artémidinal **184**,  
 5-hydroxy-7-méthoxychromone **185**, 5,7-diméthoxychromone **186**,  
 6-acétyl-2,2-diméthylchroman-4-one **187**, 5,6-dihydroxy-4'-méthoxyflavanone **188**,  
 4',5,8-trihydroxyflavanone **189**, Kæmpférol-3,7,4'-triméthyléther **190**,  
 3,3',4'-triméthoxy-quercétine **191**, 5-hydroxy-7,2',4',5'-tétraméthoxyflavone **192**,  
 5,7-dihydroxy-3,4'-diméthoxyflavone **193**, 4,2'-dihydroxy-4'-méthoxychalcone **194**,  
 2',5'-dihydroxy-4-méthoxychalcone **195**, Isoliquirigénine **196**

### I.6.2.2. Phytochimie de l'espèce *Artemisia judaica*

La recherche sur SciFinder® (160), avec les mots clés "Artemisia+judaica" nous a donné quarante-quatre références abordant pour la plupart, l'étude chimique et pharmacologique de l'huile essentielle de l'*A. judaica*. La pipéritone **197** étant le constituant majoritaire de l'huile essentielle, elle est accompagnée de nombreux monoterpènes notamment du terpinène-4-ol **148**, de l'acétate de bornyle **198**, de l' $\alpha$ -terpinéol **147** et du chrysanthénone **199**. Les sesquiterpènes sont également présents en proportions conséquentes, c'est le cas du spathuléol **162** et surtout, du davana éther **200** (179,180,181). Les structures chimiques des principaux terpénoïdes volatils de l'*Artemisia judaica* sont représentées dans la **figure 36**.



**Figure 36** : Structures des principaux terpénoïdes de l'*Artemisia judaica*  
Pipéritone **197**, Acétate de bornyle **198**, Chrysanthénone **199**, Davana éther **200**,  
Davanone D **201**, Dihydrosantamarine **208**, Judaïcine **209**

Les résultats des récents travaux menés par Boukhalifa D. (167) sur l'*A. judaica ssp. sahariensis* du Hoggar confirment la richesse de l'huile essentielle en monoterpènes (83,52 %), avec la pipéritone **197** comme le composé majoritaire (73,65 %), suivie par un sesquiterpène, la cis-davanone ou davanone D **201** (2,84 %).

Selon une étude publiée en 1987, dix-sept flavonosides ont été isolés de l'*A. judaica*, tels que le schaftoside, l'isoschaftoside, le néoschaftoside et le néoisoschaftoside. Les aglycones sont la casticine **48**, le cirsilinéol **51**, l'apigénine **71**, la lutéoline **72**,

hispiduline **125**, l'acacétine **202**, le chrysoériol **203**, la cirsimaritrine **204**, la jacéosidine **205** et la péctolinarigénine **206** et la 5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-triméthoxyflavone **207** (182). Les structures chimiques de ces méthoxyflavones de l'*Artemisia judaica* sont regroupées dans le **tableau 12**.

Des lactones sesquiterpéniques (**Figure 36**) ont également été isolées des parties aériennes de l'*Artemisia judaica*, il s'agit de germacranolides, d'eudesmanolides, de séco-eudesmanolides et de glaucolide-like lactones (183,184). Nous citons la dihydrosantamarine **208** (185) et la vulgarine ou judaicine **209** (186,187).

**Tableau 12** : Méthoxyflavones isolées de l'*Artemisia judaica*

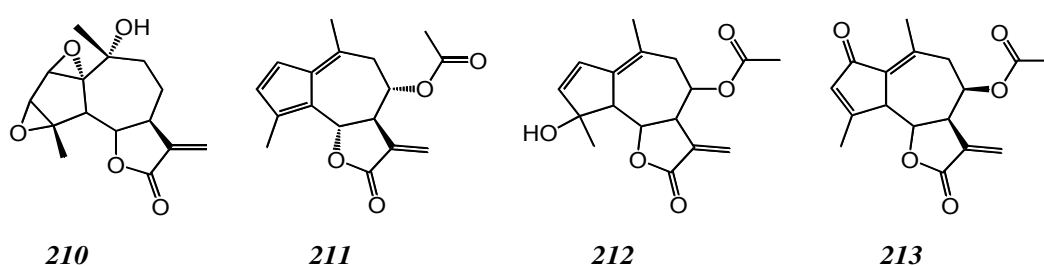
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
Acacétine <b>202</b>	H	H	OH	H	OMe	H
Chrysoériol <b>203</b>	H	H	OH	OMe	OH	H
Cirsimaritrine <b>204</b>	H	OMe	OMe	H	OH	H
Jacéosidine <b>205</b>	H	OMe	OH	OMe	OH	H
Péctolinarigénine <b>206</b>	H	OMe	OH	H	OMe	H
5,7,3'-trihydroxy-6,4',5'-triméthoxyflavone <b>207</b>	H	OMe	OH	OH	OMe	OMe

### 1.6.3. Phytochimie de l'espèce *Pentzia monodiana*

La recherche sur SciFinder<sup>®</sup> (160), avec les mots clés "Pentzia" nous a donné cinq références, alors qu'avec le mot clé "Pentzia+monodiana" nous n'avons eu qu'une seule référence (188). Celle-ci semble erronée car il y'a un doute quant à l'identité du taxon ayant fait l'objet de cette étude. En effet, cet échantillon de plante a été collecté hors de la zone de distribution de *Pentzia monodiana*, espèce endémique des hautes montagnes du Sahara central.

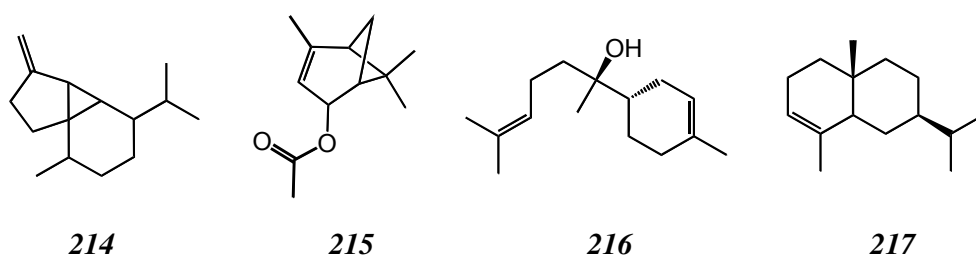
Les dérivés acétyléniques sont des métabolites très fréquents chez le genre *Pentzia* ; au point de constituer de véritables marqueurs chimiotaxonomiques (189). Comme chez la plupart des Astéracées, les espèces du genre *Pentzia* synthétisent des flavonoïdes tels que l'artémétine **47**, la chryso splénétine **49** et l'ériodictyol **77** (92,190).

De nombreuses lactones sesquiterpéniques ont été identifiées, appartenant notamment aux groupes des glaucolidés, des fulvénoguaianolidés, des guaianolidés et des germacranolidés. Nous indiquerons en particulier l'artécanine **90**, la mésatlantéine E **101** (191), dans la **figure 37** sont représentées les structures chimiques de la canine **210**, du penziafulvéno lide **211** (190), de l'athamontanolide **212** (192) et de la déhydromatricarine **213** (193).



**Figure 37** : Lactones sesquiterpéniques élaborées par les espèces du genre *Pentzia*  
Canine **210**, Penziafulvéno lide **211**, Athamontanolide **212**, Déhydromatricarine **213**

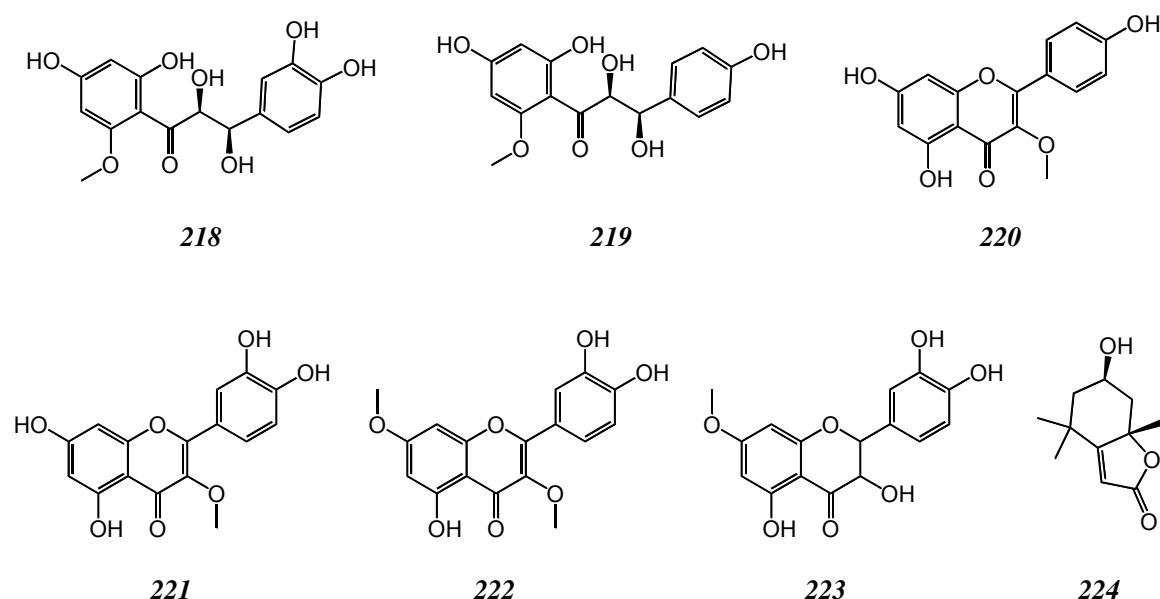
D'après Boukhalfa D. (167) le rendement des parties aériennes de *Pentzia monodiana* en huile essentielle est faible (0,80 à 0,88 ml/100g de poids sec), celle-ci est majoritairement constituée de monoterpènes oxygénés notamment en chrysanthénone **199** (36,36 %). Les sesquiterpènes qui constituent 37,39 % de l'huile essentielle sont représentés principalement par le  $\beta$ -cubébène **214** (11,73 %) et par l'acétate de verbéno l **215** (7,43 %). D'autres sesquiterpènes ont été détectés en quantités notables dans l'huile essentielle de *P. monodiana*, il s'agit du caryophyllène oxide **164**, du bisabolol **216** et de l' $\alpha$ -séliène **217**, leurs structures chimiques sont développées dans la **figure 38**.



**Figure 38** : Terpénoïdes présents dans l'huile essentielle de *Pentzia monodiana* (167)  
 $\beta$ -cubébène **214**, Acétate de verbéno l **215**, Bisabolol **216**,  $\alpha$ -séliène **217**

#### I.6.4. Phytochimie de l'espèce *Pulicaria incisa*

La recherche sur SciFinder® (160), avec les mots clés " *Pulicaria+incisa* " ne nous a donné que sept références ; les plus récentes concernant la détection par spectroscopie de nouvelles chalcones aux propriétés antioxydantes et neuroprotectrices. Il s'agit du pulichalcanoïde B **218** et du pulichalcanoïde C **219** (194). Les autres flavonoïdes du *Pulicaria incisa* sont le kœmpférol 3-méthyléther **220**, la quercétine 3-méthyléther **221**, la quercétine 3,7-diméthyléther **222** et la dihydroquercétine 7-méthyléther **223** (195). Les lactones sesquiterpéniques sont représentées par le loliolide **224**, un xanthanolide et des guaianolides. Des glycosides de diterpènes ont également été isolés (196).



**Figure 39** : Composés du métabolisme secondaire isolés du *Pulicaria incisa*  
Pulichalcanoïde B **218**, Pulichalcanoïde C **219**, Kœmpférol 3-méthyléther **220**,  
Quercétine 3-méthyléther **221**, Quercétine 3,7-diméthyléther **222**,  
Dihydroquercétine 7- méthyléther **223**, Loliolide **224**

#### I.7. Données pharmacologiques concernant les plantes étudiées

Des trois genres botaniques abordés ici, seul le genre *Artemisia* intéresse l'industrie pharmaceutique, puisque l'espèce *Artemisia annua* fait l'objet de cultures intensives en vue de l'extraction de l'artémisinine **3**, un antipaludéen majeur (cf. I.2.2.1.1).

Quelques espèces d'armoises sont également cultivées :

↳ Pour les besoins de la parfumerie telle que l'*Artemisia pallens* dont les sommités fleuries, fournissent une huile essentielle très appréciée connue sous l'appellation

commerciale d'huile davana. Cette armoise étroitement liée à la pratique de l'hindouisme est cultivée dans diverses régions de l'Inde.

↳ Pour les usages alimentaires ; soit pour la distillation de la "liqueur d'absinthe", boisson alcoolisée à base de sommités fleuries d'*Artemisia absinthium* ; soit comme ingrédient pour la préparation de condiments, tels que les feuilles d'estragon (*Artemisia dracunculus*) qui font partie des "fines herbes", de la "sauce béarnaise" et de la "sauce gribiche".

D'autres espèces d'armoises sont habituellement cueillies pour leur usage en phytothérapie, notamment pour traiter diverses affections de l'appareil digestif. Nous citerons à titre d'exemple l'armoise commune (*Artemisia vulgaris*) réputée pour ses propriétés emménagogues (197), alors que l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) bien connue en Algérie sous le nom vernaculaire de "chih", est souvent indiquée comme antidiabétique en médecine traditionnelle (198,199).

### **I.7.1. Composés bioactifs isolés de l'*Artemisia campestris***

Les dérivés aromatiques possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes notables (200,201,202). Ce pouvoir antioxydant expliquerait non seulement les propriétés anti-inflammatoires mais aussi le potentiel antitumoral des extraits de la plante, une étude suggère même l'utilisation d'*Artemisia campestris* dans la chimioprévention et le traitement du cancer du côlon (203). L'huile essentielle montre une forte activité antimicrobienne notamment contre des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli* (204,205).

Les résultats biologiques obtenus par Boukhalfa D. (167) concernant l'activité bactériologique de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* du Hoggar sont très modérés à l'inverse de l'activité antifongique testée sur une souche de *Candida albicans* qui est importante.

### **I.7.2. Composés bioactifs isolés de l'*Artemisia judaïca***

En Egypte, l'usage traditionnel des parties aériennes d'*Artemisia judaïca* contre le diabète est justifié par la mise en évidence de l'activité hypoglycémiante des extraits hydro-alcooliques de la plante (206). L'huile essentielle où prédomine la pipéritone possède des activités insecticides et antifongiques notables ; elle montre également une



activité antimicrobienne très intéressante, notamment vis-à-vis du *Staphylococcus aureus* (207,208). L'huile essentielle de l'*A. judaica* de Lybie aurait une activité antifongique supérieure à celle du kétoconazole (209).

Cette puissante propriété antifongique (attribuée à la pipéritone) a été confirmée sur une souche de *Candida albicans* (CMF = 0,25 mg/ml) lors des tests biologiques effectués sur l'huile essentielle de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* du Hoggar ; selon Boukhalfa D. (167) cette huile essentielle se montre active contre l'ensemble des bactéries cocci gram (+) telles que le *Staphylococcus aureus* (CMI = 0,06 mg/ml) et les bacillus gram (-) comme l'*Escherichia coli* et le *Pseudomonas aeruginosa* (CMI respectives = 0,125 et 0,5 mg/ml). Les entérobactéries sont beaucoup moins sensibles à l'huile essentielle de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*.

La judaïcine, lactone sesquiterpénique isolée de l'*Artemisia judaica* est potentiellement cardiotoxique (210).

### **I.7.3. Composés bioactifs isolés de *Pentzia monodiana***

Les études pharmacologiques concernant le genre *Pentzia* sont très rares. Une certaine activité antiparasitaire a été décelée chez divers extraits de *Pentzia globosa*, une des espèces du genre rencontrées en Afrique du Sud (211).

Selon une investigation phytochimique et biologique récente, l'extrait aqueux des parties aériennes de *Pentzia monodiana* présenterait un pouvoir antioxydant modéré en corrélation avec la présence de flavonoïdes (212).

Les activités antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de *P. monodiana* sont faibles à modérées (167).

### **I.7.4. Composés bioactifs isolés de *Pulicaria incisa***

Les propriétés antioxydantes et astroprotectives d'une infusion de *Pulicaria incisa* ont été mises en évidence (213, 214). Par la suite une autre étude phytochimique bioguidée a permis d'attribuer cette activité anti-neurodégénérative aux pulichalcanoïdes, particulièrement au pulichalconoïde B (215).



## Chapitre II : MATÉRIEL & MÉTHODES

### II.1. Matériel végétal

Six espèces d'Astéracées aromatiques sahariennes ont été collectées au niveau du Parc Culturel de l'Ahaggar. Elles sont présentées sous forme de monographies en **annexe 2**.

#### II.1.1. Critères de choix des plantes à collecter

Trois critères ont conditionné notre choix pour les espèces de plantes aromatiques retenues pour cette étude :

↳ Critère géobotanique et organoleptique : Afin de valoriser une flore originale située à l'extrême sud algérien, telles que les plantes aromatiques du Hoggar, massif d'origine volcanique situé au Sahara central, entre 1000 et 3000 m d'altitude.

↳ Critère chimiotaxonomique : Cette méthode de collecte vise à sélectionner préférentiellement certaines plantes en fonction des indications fournies par la pharmacognosie. Si l'on connaît le type de métabolites recherchés (ici les lactones sesquiterpéniques), les données de la chimiotaxonomie pourront nous renseigner sur les familles botaniques, les genres ou les espèces de plantes au sein desquels il est possible de les trouver (216).

↳ Critère pharmacologique : Enfin, par des méthodes de criblage *in vitro* orienté, nous n'avons sélectionné finalement que quatre espèces dont les extraits bruts présentent d'emblée des activités antiplasmodiales significatives.

#### II.1.2. Conditions d'échantillonnage des plantes sélectionnées

##### II.1.2.1. Identification botanique des espèces collectées

Dès les premières sorties sur le terrain, des spécimens de plantes aromatiques ont été collectés, pour être conservés sous forme d'herbier de référence. Nous tenons à remercier particulièrement monsieur M. Belghoul, chef du Département des Études et de Développement du Patrimoine naturel, de l'Office National du PCA, pour non seulement son aide à la détermination des espèces végétales dans leur milieu, mais aussi de nous avoir permis de comparer nos échantillons avec des spécimens appartenant à l'herbier de l'Office National du PCA. Nous avons également comparé nos spécimens par rapport à

ce qui est décrit dans la littérature botanique, telles que la flore d'Ozenda (217) et la flore de Quezel & Santa (218). Ces ouvrages de référence proposent des "clés" d'identification permettant de rattacher les caractères morpho-anatomiques de la plante aux données botaniques théoriques. Ces "clés" d'identification sont reportées en **annexe 1**.

#### **II.1.2.2. Protocole de collecte**

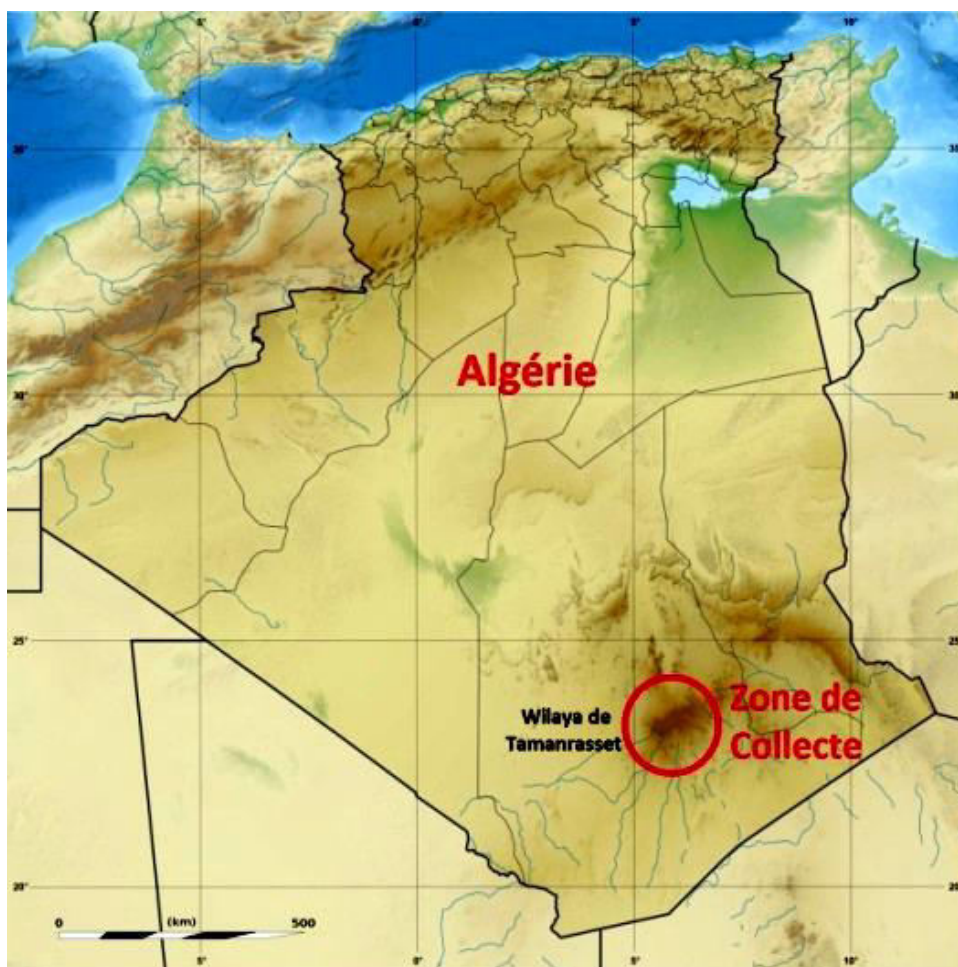
Avant de procéder à la récolte des échantillons, la position spatiale du site est relevée grâce au GPS et des photos sont prises pour conserver des données visuelles concernant les groupements végétaux, l'aspect morphologique des espèces présentes. La récolte ne s'effectuera que sur les parties aériennes des plants arrivés à maturité (de préférence fleuris), parfaitement identifiables, ne comportant aucun signe de nécrose, ni de dessèchement. La faune et la flore étant protégées dans le PCA, nous ne prélèverons que 10 à 15% de parties aériennes par plant. Enfin pour les espèces collectées, nous avons obtenu une autorisation de prélèvement de la part des autorités du parc (**Annexe 7**).

#### **II.1.2.3. Zone de collecte**

Parc National de l'Ahaggar (PNA) jusqu'en 2011, le Parc Culturel de l'Ahaggar (219) est un immense territoire centré sur le massif du Hoggar, couvrant une superficie de 633 887 km<sup>2</sup>, dépassant même les limites administratives de la grande Wilaya de Tamanrasset (220). Il est situé à l'extrême sud de l'Algérie (**Figure 40**).

#### **II.1.2.4. Stations de collecte**

Pour des raisons pratiques d'accessibilité notamment, nous avons réduit l'étendue de la zone de collecte aux seuls lieux autorisés par les agents du parc culturel de l'Ahaggar dont l'aide a été précieuse pour localiser les différentes stations où abondent les plantes aromatiques et médicinales. Ces stations sont pour la plupart des lits d'oueds, plus ou moins proches du versant sud de l'Atakor, massif montagneux d'origine volcanique dont le sommet (mont Tahat) culmine à près de 3000 m. Tous nos prélèvements d'échantillons de plantes ont donc été effectués dans une zone au nord-est de la ville de Tamanrasset, située entre 22° 47' et 23° 21' de latitude Nord, entre 5° 8' et 5° 49' de longitude Est et dont l'altitude varie de 1000 à 2300 mètres. Les coordonnées GPS des 14 stations de collecte ainsi que leur distance par rapport au centre-ville de Tamanrasset, sont reportées dans le **tableau 13**.



**Figure 40** : Situation géographique de la zone de collecte (221)

**Tableau 13** : Coordonnées GPS\* des principales stations de collecte

Station	Latitude Nord	Longitude Est	Altitude (m)	Distance de Tamanrasset (Km)
1	22° 49' 50"	5° 35' 29"	1422	8
2	22° 53' 5"	5° 37' 28"	1537	15
3	23° 8' 40"	5° 43' 46"	2019	45
4	23° 10' 30"	5° 42' 47"	2085	47
5	23° 10' 49"	5° 43' 4"	2078	48
6	23° 11' 45"	5° 42' 47"	2091	49
7	23° 14' 36"	5° 40' 26"	2284	53
8	22° 47' 22"	5° 48' 40"	1407	29
9	22° 55' 4"	5° 26' 2"	1380	17
10	22° 57' 57"	5° 22' 41"	1335	25
11	22° 59' 16"	5° 24' 59"	1431	25
12	23° 10' 4"	5° 27' 16"	1849	43
13	23° 10' 57"	5° 28' 12"	1884	44
14	23° 20' 12"	5° 8' 16"	1035	73

\* la géolocalisation a été effectuée grâce à un appareil photo de marque Sony Cyber-Shot DSC-HX200V

### II.1.2.5. Périodes de collecte

Les échantillons de plantes ayant servi dans notre étude sont issus du regroupement des nombreux prélèvements effectués sur le terrain, lors des trois missions accomplies durant les années 2011, 2012 et 2013. La durée de chaque mission était d'une semaine et la date d'arrivée au niveau des stations de collecte devait coïncider avec la période de floraison. D'ailleurs, c'est bien à ce stade végétatif que les plantes aromatiques sont couramment récoltées pour leurs usages traditionnels. De plus, le prélèvement en période de floraison permet de s'assurer d'une identification botanique précise. Contrairement aux autres régions du nord de l'Algérie, ici la floraison a lieu, non pas au printemps, mais le plus souvent à la fin de l'été. En effet, de par sa position géographique particulière, notre zone de collecte se caractérise par un climat de type "tropical", où les précipitations se produisent généralement de mai à septembre, suite à la remontée du front intertropical (FIT) sur cette région de l'extrême sud algérien (222). C'est au cours de ces précipitations que les cours des oueds se réalimentent, favorisant ainsi la régénération rapide de la flore locale. Les dates des prélèvements en fonction des stations et des espèces collectées sont reportées dans le **tableau 14**.

**Tableau 14** : Dates et lieux de collecte des plantes aromatiques étudiées

Date	Espèce collectée	Station de collecte
2011/10 (première semaine)	<i>Pentzia monodiana</i>	4, 5
	<i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i>	5, 6, 12, 13
	<i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i>	1, 9, 11
2012/9 (première semaine)	<i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i>	3, 4, 7
	<i>Pentzia monodiana</i>	3, 4
	<i>Pulicaria crispa</i>	9, 10, 11
	<i>Pulicaria incisa</i>	1, 2, 3, 8, 11
2013/9 (dernière semaine)	<i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i>	5, 6, 12, 13
	<i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i>	1, 9, 11
	<i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i>	3, 4, 7
	<i>Pentzia monodiana</i>	3, 4
	<i>Pulicaria crispa</i>	9, 10, 11, 14
	<i>Pulicaria incisa</i>	1, 2, 3, 8, 10

### II.1.3. Préparation des échantillons pour l'extraction

#### II.1.3.1. Séchage

Les différentes parties aériennes des plantes collectées ont été rapidement séchées à température ambiante, à l'ombre et à l'abri de l'humidité avant d'être acheminées au laboratoire de pharmacognosie à Paris (UMR8638).

#### II.1.3.2. Broyage

Préalablement séchés, les différents échantillons de plantes collectées ont été pulvérisés séparément à l'aide d'un broyeur à couteaux Fritsh® pulvirisette 19 avec un tamis de 1 mm (**Figure 41**). Sachant que certains constituants chimiques des plantes sont facilement dégradés par les températures élevées, nous avons procédé par des temps de broyage brefs, mais répétés jusqu'à obtention d'échantillons découpés. Les poudres grossières ainsi obtenues sont conservées à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité.



**Figure 41** : Broyeur à couteaux Fritsh®

#### II.1.3.3. Technique d'observation des caractères microscopiques des poudres végétales

À l'aide d'une petite spatule, nous prélevons un échantillon de poudre végétale sur une lame que nous délayons dans une goutte du réactif de Gazet du Chatelier avant de le recouvrir d'une lamelle. La poudre ainsi montée entre lame et lamelle est examinée au microscope photonique au grossissement 10x40.

## II.2. Solvants et réactifs utilisés

### II.2.1. Solvants

Tous les solvants utilisés dans notre étude sont fournis par la société Carlo Erba. Les solvants de consommation courante (cyclohexane, acétate d'éthyle, méthanol) utilisés pour les extractions et les chromatographies sont de qualité technique et sont distillés avant usage. Les solvants de qualité analytique (acétonitrile, chloroforme deutéré, DMSO) sont réservés aux autres usages tels que la LC-MS, la RMN et les tests biologiques. L'eau est désionisée avant d'être distillée.

### II.2.2. Réactif de Gazet du Chatelier

Sous l'action de ce réactif, tous les éléments des poudres végétales deviennent transparents et prennent une teinte particulière ; les particules lignifiées (vaisseaux de bois, fibres, cellules scléreuses) se colorent en jaune par le sulfate d'aniline ; les particules subérifiées (suber, subéroïde) sont colorées en rouge brun par le Soudan III ; les lipides, huiles essentielles, résines, latex sont colorés en rouge orangé par le Soudan III ; l'amidon se colore en bleu sous influence de l'iode. Le réactif de Gazet du Chatelier (223) est ainsi préparé :

Acide lactique pur.....	60 ml
Acide lactique saturé de Soudan III.....	45 ml
Sulfate d'aniline.....	1,1 g
Iode bisublimé.....	0,1 g
Iodure de potassium.....	1 g
Alcool à 95°.....	10 ml
HCl concentré.....	6 ml
Eau distillée.....	80 ml

Mélangez les deux acides lactiques dans une fiole conique de 250 ml. Faites dissoudre à part le sulfate d'aniline dans 70 ml d'eau distillée chaude ; laissez refroidir. Mélangez cette solution à la solution acide. Faites dissoudre l'iodure de potassium dans l'eau distillée ; ajoutez l'alcool puis l'iode ; mélangez. Ajoutez l'HCl pur. Mélangez les différentes solutions et filtrez.



### II.2.3. Réactifs généraux utilisés dans le criblage phytochimique

Le screening phytochimique a nécessité divers réactifs. Quelques gouttes d'une solution alcoolique de chlorure ferrique à 2 % ont permis la caractérisation des polyphénols dans un millilitre d'une solution d'extrait, en développant une coloration verte à bleu noirâtre en leur présence. Un millilitre d'acide chlorhydrique et quelques rognures de magnésium au contact d'un même volume d'une solution d'extrait ont servi comme réactif coloré pour la recherche des flavonoïdes (réaction de Shinoda). La détection de coumarines par observation d'une fluorescence intense à 365 nm quand un volume de solution de l'extrait est additionnée d'un même volume d'une solution d'ammoniaque à 25%.

#### II.2.3.1. Réactif de Bouchardat

Solution aqueuse iodo-iodurée préparée en dissolvant 2 g d'iodure de potassium et 2 g iode dans de l'eau distillée en quantité suffisante pour 100 ml. Quelques gouttes du réactif additionnées à 1 ml d'une solution d'extrait légèrement acidifiée avec une solution d'acide sulfurique à 10%, donnent un précipité brun en présence d'alcaloïdes.

#### II.2.3.2. Réactif de Dragendorff

Solution aqueuse d'iodobismuthate de potassium utilisée pour mettre en évidence les alcaloïdes. Quelques gouttes du réactif additionnées à un millilitre d'une solution d'extrait légèrement acidifiée avec de l'acide sulfurique à 10%, donnent un précipité rouge-orangé en présence d'alcaloïdes. Très sensible, ce réactif donne aussi des faux positifs avec les composés aminés. Le réactif de Dragendorff est préparé après chauffage et filtration du mélange suivant :

Sous nitrate basique de bismuth.....	0,85 g
Iodure de potassium.....	8 g
Acide acétique glacial.....	10 ml
Eau distillée.....	70 ml

#### II.2.3.3. Réactif de Lieberman

Réactif à base d'anhydride acétique et l'acide sulfurique concentré permettant de rechercher certains terpénoïdes : Dissoudre l'extrait à tester dans un millilitre d'anhydride acétique avant d'ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique. L'apparition

d'un anneau pourpre indique la présence de triterpènes tandis que le virage en une coloration verdâtre dénote la présence de stéroïdes.

#### **II.2.3.4. Réactif de Stiasny**

Solution de formol chlorhydrique préparée en dissolvant 40 g de formaldéhyde dans 100 ml d'eau distillée avant d'ajouter un volume égal d'acide chlorhydrique concentré. L'extrait à tester est dissout dans 5 ml de réactif. La solution est chauffée pendant 30 minutes au bain-marie à 100°C. La formation d'un précipité indique la présence de tanins condensés (ou tanins catéchiques). Pour vérifier s'il y a présence concomitante de tanins hydrolysables : on procède à une filtration pour ne récupérer que la phase liquide laquelle est neutralisée par un excès d'acétate de sodium avant de lui additionner la solution de chlorure ferrique à 2%. Le développement d'une teinte bleu-noirâtre indique la présence de tanins galliques ou de tanins éllagiques.

#### **II.2.4. Réactifs utilisés comme révélateurs en chromatographie sur couche mince**

##### **II.2.4.1. Réactif de Dragendorff dilué**

Ce révélateur donne des colorations rouge orangé avec les alcaloïdes et les composés aminés. Pour pouvoir utiliser le réactif de Dragendorff comme révélateur de chromatogrammes sur couche mince une dilution préalable du réactif est nécessaire ; elle est effectuée de la manière suivante :

Réactif de Dragendorff.....	1 ml
Acide acétique glacial.....	2 ml
Eau distillée.....	10 ml

##### **II.2.4.2. Réactif à la vanilline sulfurique**

Ce révélateur universel est préparé en dissolvant 1 g de vanilline dans 2 ml d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95° en quantité suffisante pour 100 ml. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés comme les terpénoïdes ou les phénylpropanoïdes.

### II.2.4.3. Réactif de Neu

Également désigné par NP/PEG, ce révélateur très sensible aux flavonoïdes est reconstitué en mélangeant respectivement 10 ml de solution A et 8 ml de solution B. La solution A est préparée en dissolvant 1 g d'acide amino-2-éthyl-diphénylborique dans 100 ml de méthanol, alors que la solution B est obtenue en dissolvant 5 g de polyéthylène glycol (PEG) 4000 dans 100 ml d'éthanol. Le chromatogramme de couche mince est observé en lumière UV à 365 nm après pulvérisation du réactif de Neu et chauffage de la plaque à 110°C pendant 2 minutes. Des spots fluorescents vert, jaune ou orange peuvent être observés selon le type de flavonoïde.

## II.3. Méthode d'extraction

C'est une extraction solide-liquide avec l'acétate d'éthyle (AcOEt) comme solvant d'extraction. L'AcOEt est un solvant très volatil, de polarité moyenne, peu toxique couramment utilisé en phytochimie pour extraire une large gamme de métabolites secondaires peu polaires ; ce qui correspond à notre objectif de rechercher des composés tel que les lactones sesquiterpéniques.

### II.3.1. Extraction sous pression

Nous avons envisagé d'utiliser un système d'extraction sous pression, afin de :

- ↳ Réduire le temps d'extraction,
- ↳ Limiter la quantité de solvant d'extraction.

#### II.3.1.1. Principe et appareillage

L'extraction liquide sous pression (PLE pour Pressurized Liquid Extraction en anglais) est une technique qui utilise un solvant liquide à haute pression, ce qui augmente la performance d'extraction. On peut aussi varier la température. Le premier appareil - permettant d'utiliser cette technologie- fut introduit sur le marché par Dionex sous le nom d'ASE<sup>®</sup> (Accelerated Solvent Extraction Technology) en 1995. L'appareil que nous avons utilisé a été développé par Büchi Speed Extractor E-914 (**Figure 42**), et permet l'extraction de 4 matrices différentes d'un volume de 125 ml en parallèle et peut travailler sur une gamme de température de 30°C à 150°C et sur une gamme de pression de 50 à 150 bars. Ces systèmes permettent de limiter drastiquement la quantité de solvant utilisée et surtout le temps d'extraction. En effet un cycle d'extraction dure entre 5 et 15 min. À la fin des cycles d'extractions, le solvant résiduel est purgé par un gaz inerte. Sous

pression, il est possible de travailler à une température supérieure au point d'ébullition du solvant. Dans ces conditions, la constante diélectrique, la tension de surface et la viscosité du solvant diminuent ce qui permet ainsi une meilleure diffusion du solvant au sein de la matrice. Cette technologie permet d'extraire rapidement des composés sensibles en évitant leur dégradation (224).



**Figure 42** : Appareil d'extraction sous pression, Büchi Speed Extractor E-914

### II.3.1.2. Mode opératoire

Le volume de la cellule d'extraction étant limité à 120 ml, les échantillons des différentes parties aériennes des plantes collectées doivent être préalablement séchés et grossièrement broyés afin d'augmenter leur rendement lors de l'opération d'extraction. A noter que le Speed Extractor E 914 peut traiter quatre de ces cellules à la fois soit un volume total de 4 x 120 ml.

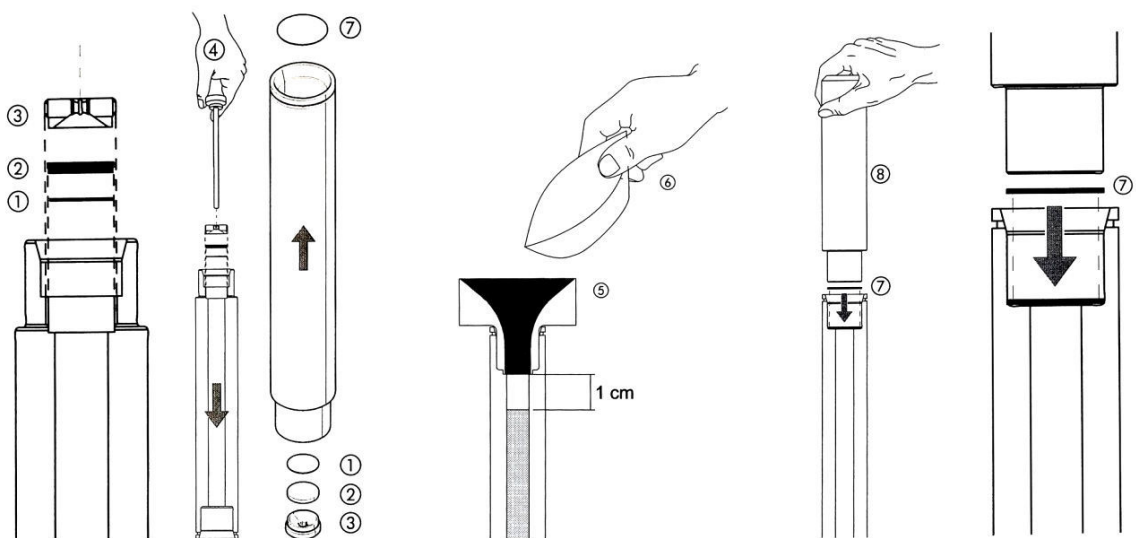
#### II.3.1.2.1. Préparation des cellules d'extraction

Tel que c'est schématisé dans la **figure 43**, le chargement d'une cellule d'extraction comporte trois étapes successives :

↳ Insertion du filtre inférieur, du fritté métallique et du bouchon fileté : Mettre la cellule d'extraction à l'envers et insérer d'abord un filtre de cellulose jetable①. Placer le filtre sur le cylindre intérieur de la cellule. Monter le fritté métallique② sur le filtre et placer le bouchon fileté③ au fond de la cellule avec l'outil④.

↳ Insertion de l'échantillon de poudre végétale : Retourner la cellule d'extraction et insérer l'entonnoir métallique<sup>⑤</sup> dans le cylindre intérieur de la cellule. Il est recommandé de placer les cellules dans le rack avant de les charger en poudre de l'échantillon à l'aide d'une barquette de dosage<sup>⑥</sup>. Il est important de ne pas complètement remplir la cellule, mais de laisser un vide d'environ 1 cm de hauteur entre le lit de l'échantillon et le filtre supérieur.

↳ Insertion du filtre supérieur : Insérer le filtre de cellulose supérieur<sup>⑦</sup> de façon uniforme dans la cellule d'extraction au moyen du plongeur<sup>⑧</sup>.



**Figure 43** : Etapes de chargement d'une cellule d'extraction  
(Manuel d'instructions du Speed Extractor E914)

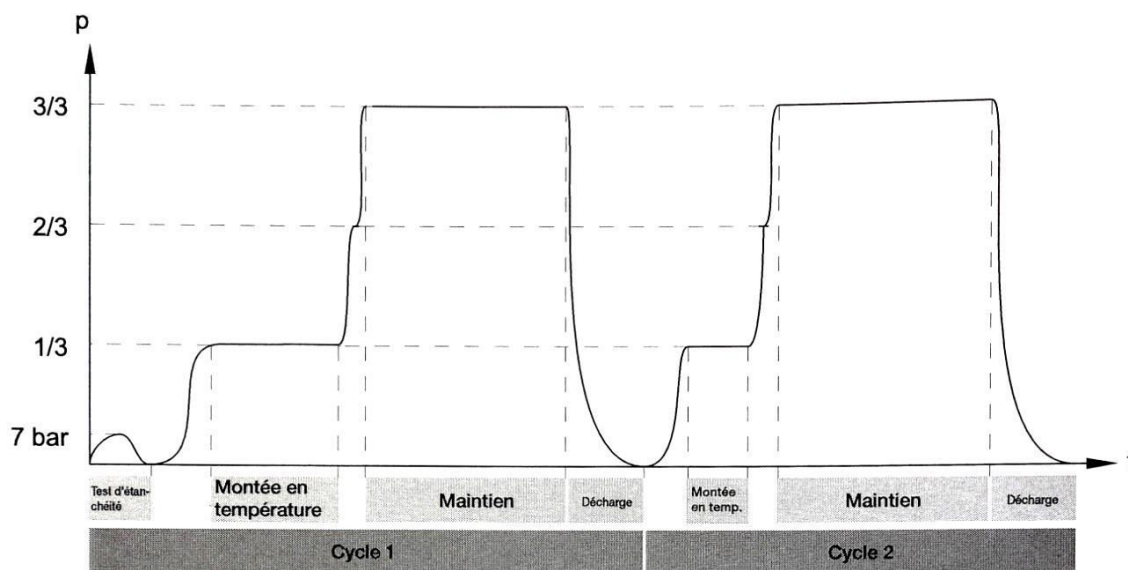
### II.3.1.2.2. Programme des extractions

Les paramètres utilisés pour l'extraction sous pression sont les suivants :

- ↳ Préchauffage à 50°C en une minute.
- ↳ Mise sous pression à 100 bars en 5 minutes, par ajout de l'acétate d'éthyle par paliers,
- ↳ Maintien de la pression pendant 5 minutes,
- ↳ Décharge de l'extrait en 2 minutes dans des vials à 220 ml.

Ce cycle est répété deux fois de suite (**Figure 44**), ce qui nécessite environ 33 minutes pour chaque traitement d'extraction en ajoutant à la fin du deuxième cycle, le temps supplémentaire pour :

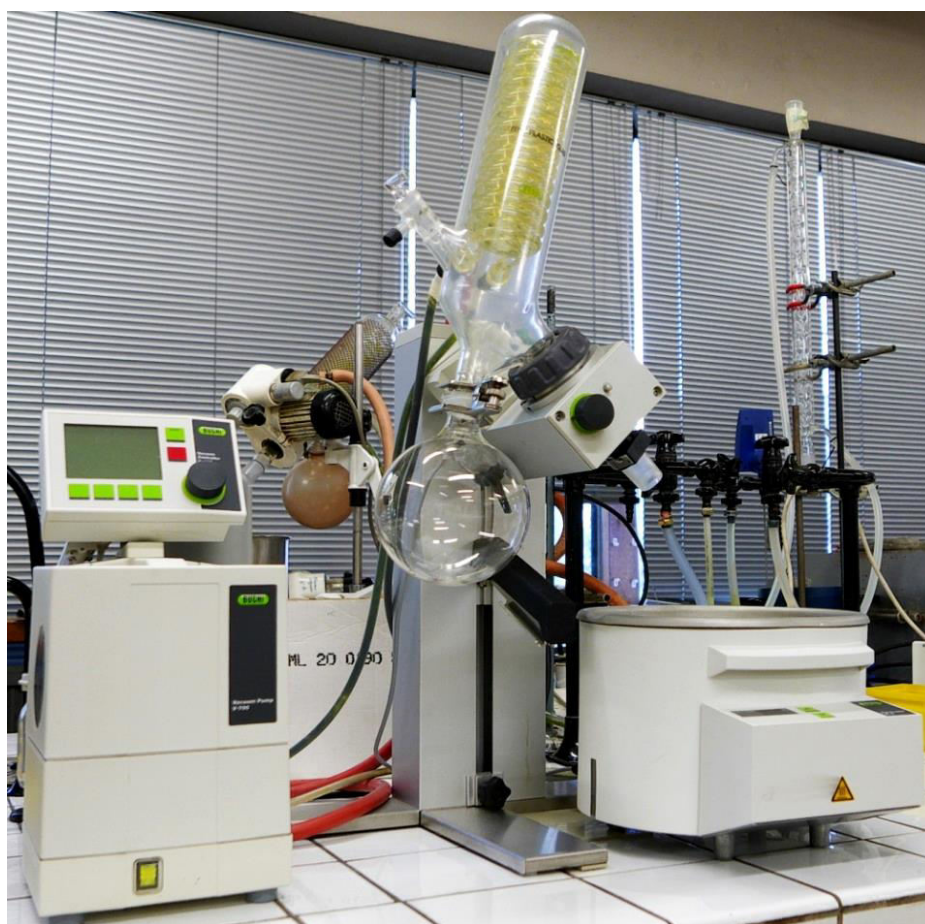
- ↪ Le rinçage (en 2 minutes) de la cellule d'extraction par flux du solvant utilisé ;
- ↪ L'expulsion totale (en 5 minutes) du solvant de la cellule par flux d'azote.



**Figure 44** : Etapes d'un cycle d'extraction  
(Manuel d'instructions du Speed Extractor E914)

### II.3.2. Concentration des extraits bruts et des fractions

Afin d'éviter des détériorations de composés extraits ou purifiés, les solvants organiques ayant servi à leur obtention sont évaporés sous pression réduite à 40°C en utilisant un évaporateur rotatif R3 et une pompe à vide Vacuum controller V-700 de marque BÜCHI (**Figure 45**). Afin de s'assurer de l'assèchement complet de l'échantillon, ce dernier est soumis pendant une demi-heure à l'action d'une pompe à palettes reliée à un système de piégeage à froid du type CentriVap Solvent Concentrator.



**Figure 45** : Rotavapor R3 avec Vacuum controller V-700, modèle BÜCHI

## **II.4. Méthodes chromatographiques**

Qu'elles soient analytiques ou préparatives, les différentes techniques chromatographiques utilisées dans cette étude, sont abordées respectivement dans les sections **II.4.1** et **II.4.2**.

### **II.4.1. Chromatographies analytiques utilisées**

#### **II.4.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) analytique**

Couramment utilisée en phytochimie (225), cette technique d'analyse simple permet le suivi et le contrôle lors des différentes étapes du fractionnement et de purification. Les chromatogrammes couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis ; ce qui permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées.

Les chromatographies sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice de type Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck KGaA). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec

l'éluant approprié. La phase mobile (éluant) est constituée d'un mélange binaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Dans notre cas, le système de solvants est constitué de six volumes de cyclohexane pour quatre volumes d'acétate d'éthyle. Ce système d'éluant est choisi de manière à obtenir la meilleure séparation de la gamme de composés qui intéressent notre investigation phytochimique.

L'examen des chromatogrammes s'effectue en lumière visible et/ou sous lumière ultraviolette (254 et 365 nm), avant et après pulvérisation sur la plaque d'un réactif révélateur approprié. Les réactifs de révélation utilisés pour le présent travail sont les suivants :

- ↳ Réactif à la Vanilline sulfurique (Révélateur universel).
- ↳ Réactif de Neu ou NP/PEG (Révélateur des flavonoïdes).
- ↳ Réactif de Dragendorff (Révélateur des alcaloïdes).

#### **II.4.1.2. Chromatographie en phase liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse (ou UPLC-MS)**

##### **II.4.1.2.1. Principe**

C'est une méthode d'analyse qui associe une variante améliorée de l'HPLC à un spectromètre de masse. Elle est utilisée pour l'élucidation structurale et pour la quantification de produits naturels. Elle comporte deux étapes :

- ↳ La première étape consiste à séparer les composés de l'échantillon à travers une colonne chromatographique ;
- ↳ La seconde étape consiste à détecter ces composés par spectrométrie de masse, technique physique d'analyse donnant avec beaucoup de précision, la masse de chacun des analytes séparés.

Rapide, sélective et surtout très sensible, cette méthode fournit simultanément une information structurale pour chaque pic du chromatogramme à partir de seulement quelques microgrammes d'échantillon. Les couplages entre la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse sont apparus plus tardivement que ceux avec la chromatographie en phase gazeuse en raison des obstacles technologiques liés à leur



réalisation. La principale limitation est la nécessité d'évaporer la phase mobile chromatographique afin de faire passer les analytes en phase gazeuse avant leur entrée dans le spectromètre de masse. Ces problèmes ont été résolus avec le développement de méthodes d'ionisation à pression atmosphérique tel que l'électrospray (ES). La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est aujourd'hui devenue une méthode de choix pour l'analyse des mélanges complexes, tel que le métabolome des extraits végétaux (226,227).

L'UPLC est une variante améliorée de la chromatographie en phase liquide à haute pression. Introduite dès 2004 par Waters corporation, cette technologie est basée sur l'emploi de phase stationnaire composée de particules inférieures à 2  $\mu\text{m}$  (au lieu des particules à 3 à 5  $\mu\text{m}$  habituellement présentes dans les colonnes HPLC). De ce fait, il est possible d'augmenter le débit, et donc la vitesse d'analyse, tout en amplifiant les performances chromatographiques (résolution et sensibilité).

Les possibilités de l'UPLC se trouvent encore renforcées quand elle est couplée à un spectromètre de masse à temps de vol ; ce qui est rendu possible grâce à la technique de l'ionisation par électrospray.

#### **II.4.1.2.2. Appareillage et mode opératoire**

Les expériences de LC-MS ont été effectuées à l'aide d'un système Waters ACQUITY UPLC System (Waters Corp. Milford, USA) dont la colonne est un modèle HSS C18 à phase inversée constituée de microparticules à 1,7  $\mu\text{m}$  de diamètre. La longueur de la colonne est de 100 mm pour un diamètre interne de 2,1 mm. Ce système est couplé à un spectromètre de masse haute définition SYNAPT G2 (Waters Corp. Milford, USA). À chaque expérience LC-MS, 5  $\mu\text{l}$  d'échantillon ont été injectés. Tous les échantillons à analyser ont été préparés de la même manière : Dissolution de 10 mg/ml l'extrait d'acétate d'éthyle dans du méthanol RS pour UHPLC-MS, puis microfiltration à travers une membrane PTFE 0,2  $\mu\text{m}$ . L'élution en mode gradient est réalisée avec deux solvants :

↳ Solvant A : Solution aqueuse d'acide formique à 0,1%

↳ Solvant B : Acétonitrile / Acide formique (99,9:0,1)

L'élution (avec un débit de 0,4 ml/min) a débuté avec le mélange des deux solvants A/B (95:5) pendant six minutes, puis changement par augmentation du solvant B jusqu'à

100% en deux minutes, puis maintient du solvant B pendant deux minutes supplémentaires. Les données spectrales de masse ont été acquises après électronébulisation (ESI) en mode positif et en mode négatif, selon les paramètres suivants :

	ESI positif	ESI négatif
Tension capillaire	3,25 kV	-2,5 kV
Tension du cône source	30 V	-40 V
Tension du cône d'extraction	4 V	4 V
Température de la source et de la désolvatation	120 °C	550 °C

L'azote a été appliqué comme gaz de désintégration à un débit de 900 litres/h. Les spectres de masse ont été acquis sur la gamme  $m/z$  de 100 à 1200 à une résolution de masse de 22000 FWHM (largeur à mi-hauteur).

#### II.4.2. Chromatographies préparatives utilisées

En phytochimie, les chromatographies préparatives sont utilisées comme des procédés de séparation physico-chimique permettant :

- ↳ Dans un premier temps, d'obtenir à partir d'extraits bruts, des fractions simplifiées et enrichies en métabolites voisins, où souvent un composé est majoritaire ;
- ↳ Dans un second temps, d'isoler et de purifier un composé d'intérêt dont l'identité sera établie avec précision grâce aux méthodes d'analyse telles que la RMN et la spectrométrie de masse.

##### II.4.2.1. Chromatographie éclair sur colonne de gel de silice

Cette chromatographie sur colonne (CC) appelée aussi chromatographie "flash" utilise comme phase stationnaire des particules de silice de 35 à 70  $\mu\text{m}$  de diamètre et comme phase mobile un liquide qui s'écoule sous pression d'air comprimé. Cette technique est basée sur le même principe que la CCM, sauf que la silice est placée dans une colonne en verre et non sur une plaque ; ceci dans le but d'isoler des métabolites présents dans une matrice aussi complexe qu'un extrait végétal brut.

Pour nos travaux, nous avons utilisé trois colonnes basse pression en verre de diamètres différents (20, 30 et 60 mm) avec fritté et rodage 29/32 (**Figure 46**). La phase stationnaire est réalisée en introduisant dans la colonne une suspension de silice DAVISIL LC 60A (20-45  $\mu\text{m}$ ) dans du cyclohexane. On laisse s'écouler l'excès du cyclohexane avant de fermer le robinet. La quantité de silice ayant servi à la réalisation de la phase stationnaire est en fonction du poids de l'échantillon à fractionner (**Tableau 15**). On peut alors déposer délicatement l'échantillon à fractionner. La pression au niveau de la colonne est maintenue à  $230 \pm 20$  mbar.

**Tableau 15** : Quantité de silice par rapport au diamètre de la colonne et au poids de l'échantillon à fractionner

Quantité de l'échantillon à déposer (g)	Diamètre de colonne (mm)	Quantité de silice (ml)	Volume de collecte par fraction (ml)
0,2	20	20 ( $\approx 9$ g)	10
0,6	30	40 ( $\approx 18$ g)	20
10	60	700 ( $\approx 315$ g)	50



**Figure 46** : Montage d'une chromatographie sur colonne "flash"

#### II.4.2.1.1. Mode opératoire adopté lors du fractionnement de lot D issu de la CPC de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

La préparation de la CC flash a été effectuée tel qu'il est décrit dans la section II.4.2.1. La quantité de l'échantillon du lot D à déposer est de 218 mg. L'élution est effectuée par gradient de solvants. Les différents mélanges de solvants en fonction de la progression de l'élution sont rapportés dans le **tableau 16**.

**Tableau 16** : Composition de l'éluant utilisé lors du fractionnement par CC du lot D

Fractions	Cyclohexane (ml)	AcOEt (ml)	MeOH (ml)	Fractions	Cyclohexane (ml)	AcOEt (ml)	MeOH (ml)
F <sub>1-10</sub>	100	0	0	F <sub>81-90</sub>	20	80	0
F <sub>11-20</sub>	90	10	0	F <sub>91-100</sub>	10	90	0
F <sub>21-30</sub>	80	20	0	F <sub>101-110</sub>	0	100	0
F <sub>31-40</sub>	70	30	0	F <sub>111-120</sub>	0	90	10
F <sub>41-50</sub>	60	40	0	F <sub>121-130</sub>	0	80	20
F <sub>51-60</sub>	50	50	0	F <sub>131-140</sub>	0	70	30
F <sub>61-70</sub>	40	60	0	F <sub>141-150</sub>	0	60	40
F <sub>71-80</sub>	30	70	0	<b>Total</b>	550 ml	850 ml	100 ml

#### II.4.2.1.2. Mode opératoire adopté lors du fractionnement des lots regroupés EFGH issus de la CPC de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

La préparation de la CC flash a été effectuée tel qu'il est décrit dans la section II.4.2.1. La quantité de l'échantillon à déposer est de 590 mg ; elle correspond au regroupement des lots E, F, G et H. L'élution est effectuée par gradient de solvants. Les différents mélanges de solvants en fonction de la progression de l'élution sont reportés dans le **tableau 17**.

**Tableau 17** : Composition de l'éluant utilisé au cours du fractionnement par  
CC des lots regroupés EFGH

Fractions	Cyclohexane (ml)	AcOEt (ml)	MeOH (ml)	Fractions	Cyclohexane (ml)	AcOEt (ml)	MeOH (ml)
F <sub>1-10</sub>	180	20	0	F <sub>81-90</sub>	20	180	0
F <sub>11-20</sub>	160	40	0	F <sub>91-100</sub>	0	200	0
F <sub>21-30</sub>	140	60	0	F <sub>101-110</sub>	0	180	20
F <sub>31-40</sub>	120	80	0	F <sub>111-120</sub>	0	160	40
F <sub>41-50</sub>	100	100	0	F <sub>121-130</sub>	0	140	60
F <sub>51-60</sub>	80	120	0	F <sub>131-140</sub>	0	120	80
F <sub>61-70</sub>	60	140	0	F <sub>141-150</sub>	0	100	100
F <sub>71-80</sub>	40	160	0	<b>Total</b>	900 ml	1800 ml	300 ml

#### II.4.2.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) préparative

L'HPLC préparatoire du lot F26-28 issu du fractionnement par CC de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana* a été réalisé sur un appareil AP-MOD-100 fourni par Armen Instrument (Saint-Avé, France). L'ensemble des équipements de l'appareil HPLC est constitué :

- ↳ D'un injecteur Vanne Rhéodyne 3725-038 inox ;
- ↳ D'une colonne Pursuit<sup>TM</sup> de Varian avec phase inverse (250 mm × 30 mm, 10µm) ;
- ↳ D'un détecteur Büchi UV/VIS filtre-photomètre ;
- ↳ D'un intégrateur Merck D-2500 ;
- ↳ D'un collecteur de fraction Büchi C-660.

L'échantillon de 10 mg de F26-28 est dissout dans 10 ml d'éluant qui est un mélange MeOH/Eau (60:40, v/v). Avant son injection dans la colonne HPLC, la solution de l'échantillon est filtrée à travers une membrane en nylon (Acrodisc®, 0,45µm). L'élution a été réalisée en mode isocratique avec un débit de 20 ml/min. Le collecteur de fractions est réglé à 15 ml/tube.

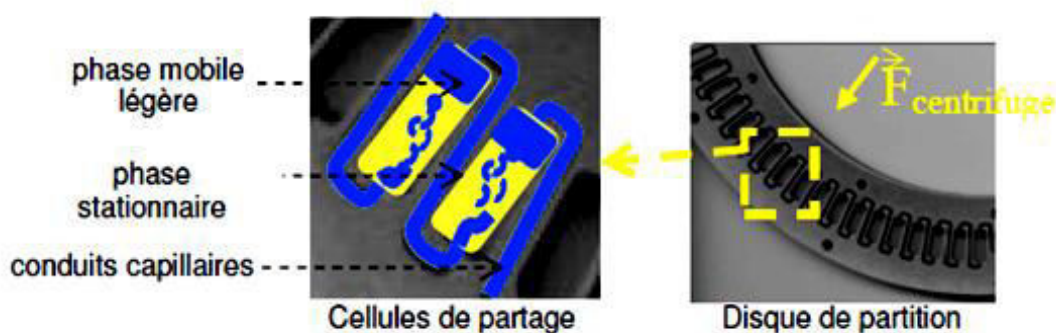
### II.4.2.3. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

Nous avons envisagé une technique de chromatographie liquide/liquide préparative. Bien que moins efficace que l'HPLC préparative, la CPC permet néanmoins :

- ↳ Une forte capacité de charge,
- ↳ D'éviter l'adsorption irréversible,
- ↳ De minimiser la dégradation des molécules,
- ↳ Une récupération intégrale de l'échantillon (par extrusion de la phase stationnaire à la fin de l'expérience).

#### II.4.2.3.1. Principe

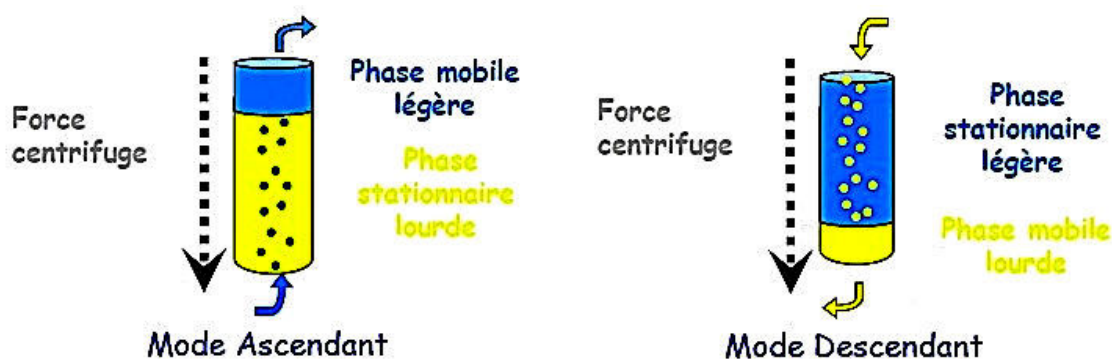
La CPC est une méthode de chromatographie liquide/liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases non miscibles d'un même système biphasique de solvants. Une phase liquide stationnaire est maintenue dans la colonne par un champ de forces centrifuges, généré par la mise en rotation de la colonne chromatographique. L'autre phase liquide mobile est alors pompée au travers de la phase stationnaire. Les solutés se partagent entre les deux phases en fonction de leurs coefficients de partage respectifs (228,229). L'appareil développé en 1982 par la compagnie Sanki Engineering (230), est un rotor mono-axe constitué d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partage (de quelques millilitres) reliées entre elles par des capillaires (**Figure 47**).



**Figure 47** : Représentation schématique de cellules de partage, détail d'un des disques constitutifs d'une colonne de CPC (231)

Quand la colonne est mise en rotation, le champ de force centrifuge maintient la phase stationnaire liquide au sein de la colonne. La pompe permet de faire passer la phase

mobile à travers la phase stationnaire, permettant l'échange entre les deux phases. Lorsque la phase inférieure (souvent la phase aqueuse) est la phase stationnaire, la phase mobile (souvent la phase organique) est pompée en mode ascendant dans la cellule. Inversement lorsque la phase supérieure est la phase stationnaire, la phase mobile est pompée en mode descendant (Figure 48).



**Figure 48** : Représentation schématique des deux modes d'éluion en CPC  
(Grégoire AUDO, manuel d'instructions d'Armen instrument)

Cela permet plusieurs modes de développement, en inversant rapidement le sens de pompage de la phase mobile (dual mode) via une vanne 4 voies située avant la colonne, d'où la versatilité de cette technique. Au niveau de la séparation dans la colonne en mode éluion, les composés présents initialement dans la phase mobile, vont être retenus par la phase stationnaire en fonction de leur coefficient de partage entre les deux phases.

Le coefficient de partage (ou constante de distribution)  $K_D$  est une constante physique caractéristique d'une substance chimique dans un état donné (ionisé, neutre, complexé...), à température donnée et au sein d'un système biphasique de solvants donné.

A l'équilibre, cette constante est régie par la loi de Nernst, 1891 : une substance chimique dissoute se répartit à l'équilibre entre deux phases liquides non miscibles selon un ratio constant et reproductible. Ainsi le  $K_D$  s'exprime comme le rapport de la concentration en composé A dans la phase stationnaire sur la concentration de A dans la phase mobile.

$$K_D = [A]_{\text{stat}} / [A]_{\text{mob}}$$

A partir du  $K_D$ , il est possible de définir le volume de rétention du composé A ( $V_r$ ) comme la somme du volume de phase mobile à l'équilibre ( $V_m$ ) et le volume de la phase stationnaire ( $V_s$ ) à l'équilibre fois le  $K_D$ .

$$V_r = V_m + K_D \cdot V_s$$

Ainsi pour un  $K_D = 1$ , le volume de rétention est égal au volume de la colonne. La différence de  $K_D$  entre les différents composés permet d'avoir des volumes de rétention différents et par là même une séparation des composés. D'après cette relation, un composé de  $K_D = 1$  sera élué de la colonne au bout d'un volume de colonne. Un composé de  $K_D < 1$  (forte affinité pour la phase mobile) sera élué avant un volume de colonne alors qu'un composé de  $K_D > 1$  (forte affinité pour la phase stationnaire) sera au contraire, élué après un volume de colonne.

Le taux de rétention de phase stationnaire  $S_f$  est un paramètre caractéristique des techniques chromatographiques sans support solide. Il représente le volume de phase stationnaire restant dans la colonne une fois l'état d'équilibre atteint. Pour atteindre cet état, la phase mobile est pompée, dans le mode sélectionné ascendant ou descendant pour les techniques hydrostatiques, au travers de la colonne remplie avec la phase stationnaire et mise en rotation, jusqu'à atteindre un état stable. Le remplissage partiel de la colonne qui en découle peut être décrit comme suit : le taux de rétention de la phase stationnaire ( $S_f$ ) est égal au rapport du volume de phase stationnaire ( $V_s$ ) sur le volume total de la colonne ( $V_c$ ).

$$S_f = V_s / V_c$$

#### II. 4.2.3.2. Appareillage

Les appareils disponibles sur le marché sont généralement commercialisés par Sanki Ing. (Japon), P.C. Inc. (USA), Pharmatec (USA), Kromaton et Armen Instruments en France (224). Pour nos expériences nous avons utilisé le matériel (**Figure 49**) suivant :

↳ Appareil Armen instrument SCPC-250+1000-B, fournit par Saint-Avé, France ; équipé de deux rotors de 250 ml et de 1 litre, constitués respectivement de 1953 et de 2016 cellules jumelles. La vitesse de rotation peut être réglée de 0 à 3000 tours/min pour le rotor de 250 ml et de 0 à 1500 tours/mn pour le rotor de 1 litre. Une vanne incorporée à l'appareil CPC a permis de fonctionner en mode ascendant ou descendant. Le système est équipé d'une pompe à gradient, d'une soupape à 6 voies à injection et deux boucles de 10 ml ou 50 ml selon le rotor utilisé.

↳ Collecteur de fractions BÜCHI-684 ;

↳ Racks de collecte pour tubes de 50 ml ;

↳ Ampoule à décanter de 5 litres.



#### II.4.2.3.3. Optimisation des conditions de séparation

Les extraits végétaux sont souvent des mélanges très complexes de nombreux métabolites plus ou moins proches du point de vue propriétés physico-chimiques. Pour une bonne séparation de ces composés par CPC, la première étape consiste en l'évaluation de leur coefficient de partage  $K_D$  dans les systèmes biphasiques testés. Idéalement, les  $K_D$  des composés majoritaires devraient se situer entre 0,5 et 1,5, pour permettre un préfractionnement intéressant. Le taux de rétention de phase stationnaire ( $S_f$ ) conditionne la qualité du préfractionnement, plus il est élevé plus la résolution est meilleure. Il est souvent admis que le taux de rétention de phase stationnaire ( $S_f$ ) doit être au minimum de 50 % pour être considéré comme satisfaisant.



Figure 49 : Armen instrument SCPC-250+1000-B et collecteur de fractions BÜCHI-684

#### II.4.2.3.4. Sélection du système biphasique de solvants

En CPC, la mise au point d'une méthode de fractionnement d'un extrait passe nécessairement par un choix judicieux du système biphasique permettant d'obtenir un nombre satisfaisant de fractions chimiquement simplifiées. Ce choix du système biphasique est similaire à celui qu'on recherche en HPLC pour une colonne et un éluant (232). Les principaux critères de sélection du système biphasique de solvants sont en fonction de :

- ↳ La solubilité complète de l'échantillon,
- ↳ La polarité des métabolites à isoler,
- ↳ L'ajustement des  $K_D$  autour de 1 pour l'ensemble des composés majoritaires.

De nombreux systèmes biphasiques couvrant une large gamme de polarité sont proposés, certains largement utilisés pour le fractionnement de produits naturels, tel que le mélange de cinq solvants Hexane/Acétate d'éthyle/Butanol/Méthanol/Eau, développé par Oka *et al.* (233) et notamment le système ARIZONA mis au point par Margraff (234) constitué par 23 combinaisons de solvants quaternaires de type Heptane/Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau classées de A à Z (excepté E, I, O). Pour chacun des deux extraits d'éthyle acétate, nous avons testé une variante -du système ARIZONA- développée par Berthod (235) qui remplace l'heptane par du cyclohexane, un solvant plus courant et surtout moins toxique.

#### **II.4.2.3.5. Fractionnement de l'extrait AcOET de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* à l'aide de la CPC**

Pour faciliter l'accès aux composés purs, nous avons d'abord opté pour un fractionnement de l'extrait AcOET de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* en utilisant la CPC, une chromatographie préparative rapide permettant l'obtention de fractions chimiquement simplifiées. Le mode opératoire adopté pour cette expérience de CPC a été le suivant :

- ↳ Le système biphasique de solvants est un mélange quaternaire constitué de cyclohexane, d'AcOEt, de MeOH et d'eau distillée (19:34:28:19, v/v) ;

- ↳ Décantation du mélange quaternaire ainsi préparé et les phases (supérieure et inférieure) sont séparées à l'aide d'une grande ampoule à décanter (volume de 5 litres) ;

- ↳ Préparation de la phase stationnaire : Avant la mise en marche du rotor 1, la phase inférieure est pompée dans la colonne du rotor 1 jusqu'à son remplissage (1 litre) ;

- ↳ Mise en marche du rotor 1 et sa vitesse est maintenue à 1000 tours/minute ;

↳ La phase supérieure (phase mobile) est ensuite pompée en mode ascendant avec un débit de 20 ml/minute jusqu'à élimination de l'excès de phase inférieure dans les cellules de la colonne. Cette stabilisation des deux phases dans la colonne-rotor est mesurée dans une éprouvette de 500 ml placée à la sortie. Ainsi le taux de rétention de la phase stationnaire a été évalué à 68% ;

↳ L'échantillon à injecter est préparé en dissolvant 4,75 g de l'extrait brut dans 40 ml de phase inférieure et le débit de l'élution est réglé à 15 ml/minute ;

↳ La sortie de la CPC est connectée au collecteur de fractions programmé à 3 min/tube.

↳ L'extrusion a été réalisée après arrêt de l'élution à la 270<sup>e</sup> minute, en remplaçant le contenu de la colonne par de la phase inférieure fraîche. Celle-ci est pompée en mode ascendant, ce qui a pour conséquence de pousser la phase stationnaire vers la sortie, tout en conservant la séparation des molécules déjà amorcée lors de l'élution.

## **II.5. Méthodes d'analyse spectrométrique**

Deux méthodes d'analyse spectrométrique ont été employées dans cette étude : la spectrométrie de masse à temps de vol (ou TOF-MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) dont le principe, l'appareillage et le mode opératoire sont abordés respectivement dans les sections **II.5.1** et **II.5.2**.

### **II.5.1. Spectrométrie de masse à temps de vol (ou TOF-MS)**

#### **II.5.1.1. Principe**

La spectrométrie de masse appliquée aux produits naturels est basée sur la détermination des masses moléculaires des différents constituants présents dans l'échantillon étudié. Cette détermination n'est obtenue que pour les analytes ayant au préalable subi une ionisation par un bombardement électronique. Les ions ainsi formés sont directement projetés dans un vide, et soumis à l'action d'un champ magnétique. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de calculer leur rapport masse/charge ( $m/z$ ), lui-même en relation directe avec leur nature chimique. L'enregistrement des résultats se présente sous forme d'un spectre de masse sur lequel on reportera l'abondance des ions

formés en les classant par ordre croissant de leur rapport  $m/z$ . Le principe de fonctionnement du spectromètre de masse est schématisé dans la **figure 50**.



**Figure 50** : Principales étapes du fonctionnement d'un spectromètre de masse

Le principe de l'analyse du temps de vol est le suivant : les ions sont accélérés par un champ électrique et tous les ions ont initialement la même énergie cinétique. Soumis à un déplacement important (tube de vol, trajet d'environ 2 m), ils acquièrent une vitesse différente et les ions "lourds" sont plus lents. La corrélation du temps de vol au rapport  $m/z$  permet la mesure de la masse avec une grande sensibilité. Dans la pratique, les phénomènes physiques qui produisent les ions peuvent aussi générer une certaine dispersion en énergie cinétique. Cette dispersion en énergie peut être corrigée avec un réflectron. Le réflectron met en œuvre un champ électrique pour réfléchir le faisceau d'ions vers le détecteur. Les ions avec le même rapport  $m/z$  et la plus grande énergie pénètrent plus profondément dans le réflectron, mais les moins énergétiques pénètrent moins profondément dans leur réflectron. Le réflectron présente également l'avantage d'augmenter la longueur effective de l'analyseur.

### II.5.1.2. Appareillage et mode opératoire

En routine, les analyses MS basse résolution sont effectuées au laboratoire de pharmacognosie de Paris (UMR 8638), à l'aide d'un spectromètre de masse ZQ 2000 Waters (Saint-Quentin, France) équipé d'une interface d'ionisation électrospray. Le mode d'ionisation utilisé est positif ou négatif. Certains spectres de masse haute résolution (HRMS) ont également été enregistrés.

### II.5.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

En 1966, l'invention de Richard R. Ernst de la première spectroscopie RMN par transformée de Fourier, lui a valu le prix Nobel de chimie en 1991 pour cette découverte majeure. En effet, cette technologie a ouvert la voie de la RMN multidimensionnelle.

### II.5.2.1. Principe

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est la propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (par exemple  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ), placés dans un champ magnétique. Lorsqu'ils sont soumis à des impulsions électromagnétiques, ces noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie de ces radiofréquences puis la restituer lors de la relaxation. Par ce phénomène de RMN, il est possible de mesurer par spectrométrie, la fréquence émise par chacun de ces noyaux atomiques en fonction de leurs interactions intramoléculaires, et par conséquent déterminer la structure chimique de la molécule qu'ils composent.

### II.5.2.2. Appareillage et mode opératoire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été réalisés sur un spectromètre Bruker Bruker Avance III HD, Wissembourg, France (400 MHz pour la  $^1\text{H}$ -RMN et 101 MHz pour la  $^{13}\text{C}$ -RMN), avec TMS comme norme interne (**Figure 51**). Le spectromètre est piloté par un logiciel Topspin© (Bruker). Les spectres sont décrits des champs forts vers les champs faibles. Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au pic de solvant résiduel (7,26 ppm en proton et 77,16 ppm en carbone pour le  $\text{CDCl}_3$ ). Les constantes de couplage ( $J$ ) sont indiquées en Hertz (Hz). Les abréviations utilisées pour indiquer la multiplicité des signaux sont : s, d, t, m, dd,... et désignent respectivement un singulet, un doublet, un triplet, un multiplet, un doublet de doublet. Les spectres sont traités avec le logiciel MestReNova© (Mestrelab Research).



**Figure 51** : Spectromètre de RMN Bruker Avance III HD 400 MHz

## **II.6. Méthodes de recherche de l'activité antiparasitaire**

Le test de fixation à l'hème n'a été réalisé que pour les extraits bruts. Les tests de criblage biologique des extraits et des premiers fractionnements bioguidés ont été réalisés sur des modèles de parasites. Pour mettre en évidence l'activité antiparasitaire d'une substance, il faut mesurer sa capacité à inhiber le développement du parasite entier et à bloquer le fonctionnement de celui-ci. Ces tests *in vitro* ont tous été effectués en triplicés après incubation dans des plaques 96 puits.

### **II.6.1. Test de fixation à l'hème**

#### **II.6.1.1. Principe**

Les groupements héminiques étant fortement oxydants, sont potentiellement toxiques pour le *Plasmodium*. Celui-ci doit donc s'en débarrasser grâce à un processus de polymérisation au cours duquel les groupements héminiques sont dimérisés, puis couplés deux par deux en hémazoïne, perdant ainsi leur potentiel toxique.

Une substance capable de bloquer cette polymérisation est donc potentiellement toxique pour le parasite. C'est le mécanisme d'action de certaines molécules utilisées en thérapeutique comme la quinine. En effet, cette dernière en se fixant à l'hème libre se concentre dans la vacuole alimentaire du parasite, bloquant ainsi, la formation de l'hémazoïne (cf. I.1.1.2).

#### **II.6.1.2. Appareillage et mode opératoire**

L'hémine [Fe (III) ferriprotoporphyrine IX] a été dissoute juste avant l'utilisation à raison de 5 mM/ml dans de l'ammoniaque à 25%. La substance à tester (extrait brut, fraction ou composé purifié) a été dissoute dans du DMSO à raison de 5 µg/ml ; le diphosphate de chloroquine a été dissous dans de l'eau (5 mM/ml). Des mélanges ont été préparés de manière à obtenir 100 µl de concentrations équimolaires finales de 250 µM (ou 250µg) pour chaque composé (hémine, médicament ou extrait) dans le méthanol.

Les mélanges ont été incubés à 37 °C, pendant une heure avant d'être analysés (236).

L'enregistrement des spectres de masse a été effectué sur une LC-MS Agilent [LC 1260 Infinity, MS 6530 Q-Tof (Agilent, Les Ulis, France)]. Les paramètres d'ionisation ESI en mode positif étaient comme suit :

Pression du nébuliseur	= 40 psig (= 2,758 bar)
Tension capillaire	= 3500 V
Température de séchage	= 320°C
Débit du gaz de séchage	= 10 L/min
Tension du fragmenteur	= 150 V

Les expérimentations par dissociation induite par collision (CID), ont été effectuées en mode FIA (Analyse par Injection en Flux continu) avec augmentation du voltage de 0 à 16 eV par incréments de 2 eV. Le mode spectrométrie de masse ciblée (largeur d'isolation = 1,3 m/z) a été utilisé. L'échantillon est dissous dans un mélange méthanol/eau (1:1) avant d'être injecté à un débit de 300 µL/min.

## **II.6.2. Évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro***

Ces tests sont réalisés par l'intermédiaire du laboratoire de pharmacognosie (UMR-CNRS 8638 COMETE) de la Faculté de Pharmacie de Paris. Les tests des activités antiplasmodiale et antitrypanosomiale sont pratiqués au niveau du laboratoire d'entomologie du Museum d'Histoire naturelle de Paris ; alors que le test de l'activité antileishmaniale est effectué au laboratoire de pharmacognosie de l'Université de Brasilia au Brésil.

### **II.6.2.1. Évaluation de l'activité antiplasmodiale sur *Plasmodium falciparum***

La première culture de *Plasmodium falciparum* fut réalisée par Trager et Jensen en 1976, ce qui permit un développement considérable de l'étude du parasite et des molécules antipaludiques. Les tests *in vitro* sur *Plasmodium* nécessitent l'accessibilité permanente à une souche cultivée qui fournit les parasites.

#### **II.6.2.1.1. Principe**

Les tests sont réalisés sur une population de parasites de même génération. La synchronisation de la souche repose sur la lyse simultanée de tous les globules rouges parasités par des schizontes. En effet, afin de garantir l'accès aux métabolites plasmatiques, le parasite perméabilise la membrane érythrocytaire mais la rend aussi sensible aux chocs osmotiques. A un stade avancé du parasite, l'ajout de sorbitol dans le milieu lyse les érythrocytes parasités par les schizontes mûrs alors que les autres globules résistent à ce choc. Il ne reste alors que des globules rouges sains ou des globules parasités par des mérozoïtes et des jeunes trophozoïtes (stade anneaux).

*Plasmodium falciparum* est incapable de synthétiser *ex novo* les bases puriques (adénine, guanine) contrairement aux bases pyrimidiques (uracile, thymine, cytosine). Il a donc besoin d'utiliser les purines exogènes pour la synthèse de ses nucléotides puriques. L'hypoxanthine est le précurseur principal utilisé par le parasite pour la synthèse des nucléotides puriques. L'introduction d'hypoxanthine tritiée dans le milieu permet -par suivi de la radioactivité bêta- de quantifier l'incorporation de ce précurseur dans le parasite et ainsi d'évaluer le développement du parasite. L'incorporation étant plus grande dans les schizontes que dans les anneaux, l'hypoxanthine radio-marquée est introduite un jour après la préparation des plaques 96 puits (300 µl).

#### **II.6.2.1.2. Souche parasitaire et milieu de culture**

La souche de *Plasmodium falciparum*, chloroquine-résistante FcB1/Colombia a été cultivée sur globules rouges humains en milieu RPMI 1640, contenant 25 mM d'HEPES à pH 7,3, du glucose, de la pénicilline et de la streptomycine (237). Le milieu a été additionné de 8% (v/v) de sérum humain inactivé par la chaleur à 37 °C sous une atmosphère pauvre en oxygène (3% CO<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub> et 91% N<sub>2</sub>). Les globules rouges et le sérum sont fournis par l'Établissement français du sang. La culture a été effectuée sur un hémocrite de 2% dans des flacons de 25 ml et 75 ml et maintenue à 37 °C. Le milieu de culture a été renouvelé chaque jour.

#### **II.6.2.1.3. Technique de mesure de l'activité**

L'activité antiplasmodiale *in vitro* d'une substance a été évaluée par la méthode radio-isotopique (238). Cette méthode permet de déterminer l'inhibition de la croissance des parasites en culture en présence de diverses concentrations du produit à tester par la mesure de l'incorporation de [<sup>3</sup>H] hypoxanthine dans les acides nucléiques des parasites. Les solutions de produits à tester ont été préparées dans le DMSO, avant d'être diluées en série triple. L'incubation dure 72 h à 37°C.

#### **II.6.2.2. Évaluation de l'activité antileishmaniale sur *Leishmania infantum***

##### **II.6.2.2.1. Souche parasitaire et milieu de culture**

La souche de promastigotes de *Leishmania infantum* MCER/BR/79/M6445 a été cultivée dans le milieu de Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) complété par 10% de sérum bovin fœtal inactivé à 22°C et 40 µg/ml de gentamicine. Les



promastigotes cultivés pendant deux à trois jours ont été lavés quatre fois dans une solution salée tamponnée au phosphate (PBS) par centrifugation successive à 3200 x g pendant 10 minutes à 4°C. Les parasites ont ensuite été comptés dans une chambre Neubauer, et la concentration a été ajustée sur 106 promastigotes/ml.

#### **II. 6.2.2.2. Technique de mesure de l'activité**

La viabilité des promastigotes est déterminée par la mesure de la réduction du MMT (bromure de 3- [4,5-diméthylthiazol-2-yl] -2,5-diphényltétrazolium, Sigma) en cristaux bleus de formazan. Ainsi sous l'action des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes, le MTT est converti en formazan (239).

Une solution MTT est préparée à 10 mg/ml dans le tampon PBS (solution saline tamponnée au phosphate), stérilisé par passage au travers d'un filtre de 0,22 µm et conservé à +4°C à l'abri de la lumière. Au moment du test, la solution MTT est additionnée au milieu de culture Schneider à raison de 20 µl/puits. L'incubation de la plaque a duré 4 h à 37 °C, sous atmosphère humide et en présence de 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub>. La formation des cristaux bleus de formazan est suivie par observation sous microscope. Le milieu de culture est éliminé. Un même volume (100 µl) d'une solution aqueuse de SDS à 10% est ajouté dans chaque puits et la plaque est soumise à une forte agitation permettant la dissolution des cristaux. L'absorbance à 570 nm de la solution obtenue est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Si l'absorbance mesurée est supérieure à une unité d'absorbance, la solution est diluée à l'aide de la solution de SDS.

#### **II.6.2.3. Evaluation de l'activité antitrypanosomiale sur *Trypanosoma brucei brucei***

##### **II.6.2.3.1. Souche parasitaire et milieu de culture**

Les formes sanguines de *Trypanosoma brucei* ssp. *brucei* (souche 93) ont été cultivées dans un milieu HMI-9 supplémenté avec 10% de FBS à 37 °C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Dans toutes les expériences, les cultures de cellules en phase logarithmique ont été récoltées par centrifugation à 3000 xg et utilisées immédiatement. Les solutions mères de chacun des échantillons à tester ont été préparées dans le DMSO. Les formes sanguines de *Trypanosoma brucei* ssp. *brucei* (3 x 10<sup>4</sup> cellules/ml) ont été cultivées dans des plaques à 96 puits (200 µl par puits) soit en l'absence soit en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs et avec une concentration finale de DMSO qui n'a pas dépassé 1%.

Après une incubation de 72 h, on ajoute une solution de résazurine<sup>2</sup> dans chaque puits à la concentration finale de 45 µM.

### **II. 6.2.3.2. Technique de mesure de l'activité**

Les évaluations de l'activité inhibitrice des échantillons à tester ont été basées sur la conversion d'un colorant redox-sensible (REMA) par des cellules viables en un produit fluorescent. La fluorescence a été mesurée à 530 nm d'excitation et 590 nm de longueur d'onde d'émission après une nouvelle incubation de 4 heures. Chaque concentration de l'échantillon a été testée en triple. Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance du parasite a été calculé en comparant la fluorescence de parasites maintenus en présence de médicament à celui de l'absence de la drogue. Le DMSO a été utilisé comme témoin négatif. Les concentrations provoquant une inhibition de croissance de 50 % (IC<sub>50</sub>) ont été déterminées à partir des courbes de concentration-réponse à la drogue. La valeur de IC<sub>50</sub> est la moyenne +/- l'écart-type de trois expériences indépendantes.

---

<sup>2</sup> (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) est utilisée comme indicateur d'oxydo-réduction lors des tests de viabilité cellulaire. C'est un indicateur coloré bleu faiblement fluorescent jusqu'à ce qu'il soit réduit de manière irréversible en résorufine, un indicateur coloré rose fortement fluorescent dans le rouge.

## Chapitre III : RÉSULTATS & INTERPRÉTATIONS

### III.1. Résultats de l'étude microscopique des poudres issues des parties aériennes des plantes collectées

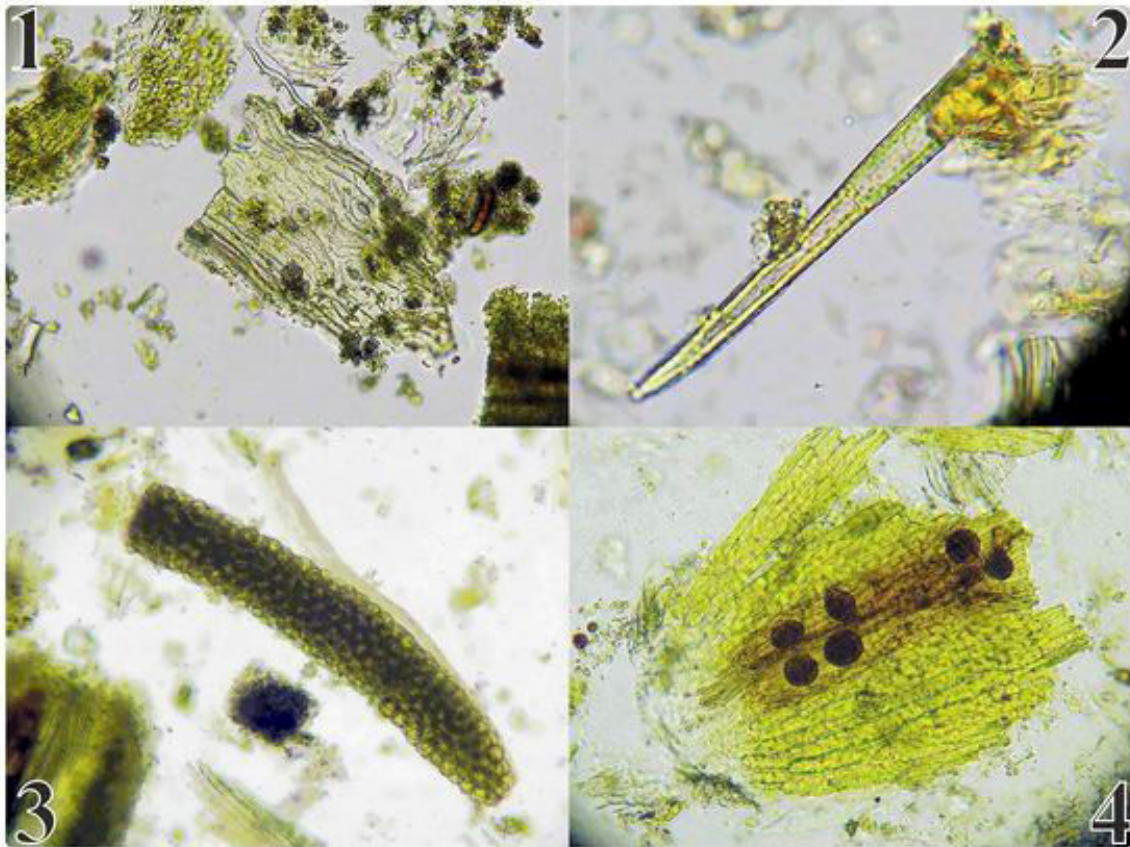
Avant d'aborder les caractères microscopiques des poudres végétales issues du broyage des différents échantillons provenant des plantes collectées, il est utile de signaler l'aspect chromatique de chacune d'elles. Ainsi la couleur est vert amande foncé pour la poudre de l'*Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens*, vert amande pour celle de *Pulicaria incisa*, alors que *Pulicaria crispa* fourni une poudre de teinte vert grisâtre. Les poudres des deux armoises *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* et *A. judaica* ssp. *sahariensis* sont respectivement jaune verdâtre et vert jaunâtre. La poudre de *Pentzia monodiana* se distingue par sa couleur kaki due à l'abondance des capitules dans les échantillons.

Au microscope, ces poudres présentent divers fragments de feuilles, de tiges, de capitules et d'akènes. Des grains de pollen, sphériques, tricolporés, à exine plus ou moins échinulée, sont également présents. Les fragments de feuilles et de tiges montrent des épidermes recouverts par une cuticule plus ou moins striée, portant des poils tecteurs et des stomates. On observe également des poils glandulaires pluricellulaires bisériés caractéristiques des Astéracées. Les fragments de capitules montrent divers éléments correspondants aux bractées, et aux pièces florales (débris de corolles, débris des étamines, débris des ovaires).

#### III.1.1. Caractères microscopiques de la poudre issue des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

L'examen microscopique de la poudre (**Figure 52**) de cette sous-espèce de l'armoise champêtre montre les éléments suivants :

- ↳ Fragments d'épiderme à cuticule ondulée portant de petits stomates anomocytiques ;
- ↳ Fragments de bractées montrant des canaux sécréteurs d'oléorésine entourés de sclérides allongés ;
- ↳ Fragments de parenchyme palissadique ;
- ↳ Poils tecteurs peu nombreux, de deux types, les uns en "navette" à deux branches droites, les autres pluricellulaires unisériés, droits et à extrémité effilée ;
- ↳ Poils glandulaires caractéristiques des Astéracées, pluricellulaires et bisériés ;
- ↳ Sacs polliniques renfermant de nombreux grains de pollen immatures ;
- ↳ Grains de pollen tricolporés à exine légèrement échinulée ;
- ↳ Débris de vaisseau de bois spiralés.



**Figure 52** : Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

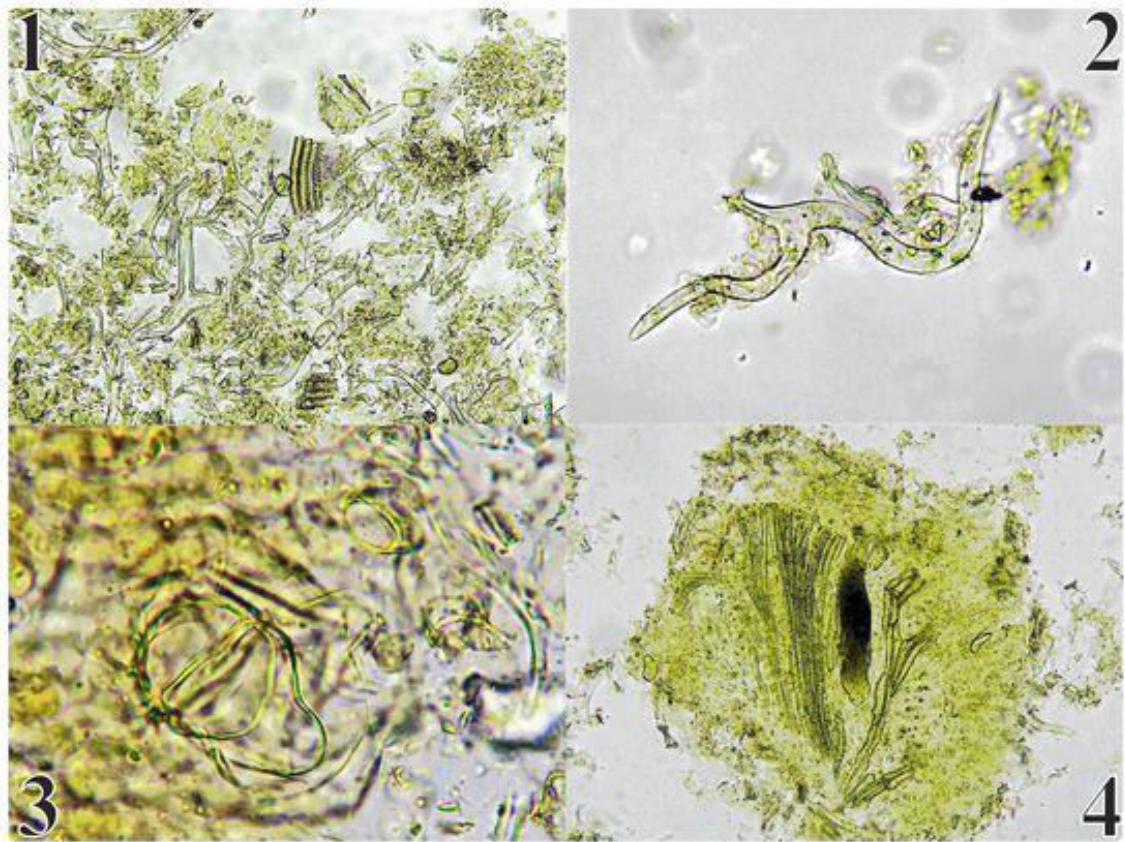
- 1- Poil tecteur "en navette" à côté d'un fragment d'épiderme à cuticule striée portant des stomates anomocytiques. 2- Poil tecteur pluricellulaire unisériel à extrémité effilée, dont les cellules présentent une paroi épaisse et variquée. 3- Sac pollinique renfermant de nombreux grains de pollen immatures. 4- Fragment de bractée constitué de cellules sclérenchymateuses allongées entourant des canaux sécréteurs remplis d'oléorésine de couleur rouge brun.

### III.1.2. Caractères microscopiques de la poudre issue des parties aériennes de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

L'examen microscopique de la poudre (**Figure 53**) de cette sous-espèce d'armoise montre les éléments suivants :

- ↪ Poils tecteurs en "T", à deux branches flexieuses ;
- ↪ Fragments d'épiderme recouvert d'une cuticule portant de nombreuses empreintes circulaires correspondant aux insertions de poils tecteurs ;
- ↪ Poils glandulaires caractéristiques des Astéracées, pluricellulaires et bisériés ;
- ↪ Fragment de parenchyme palissadique avec épiderme ;
- ↪ Fragments de parenchyme comportant des faisceaux conducteurs accompagnés de canaux sécréteurs d'oléorésine de couleur verte olive foncée ;
- ↪ Stomates anomocytiques, peu nombreux ;

- ↪ Grains de pollen tricolporés à exine ondulée ;
- ↪ Débris de vaisseau de bois spiralés.



**Figure 53** : Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

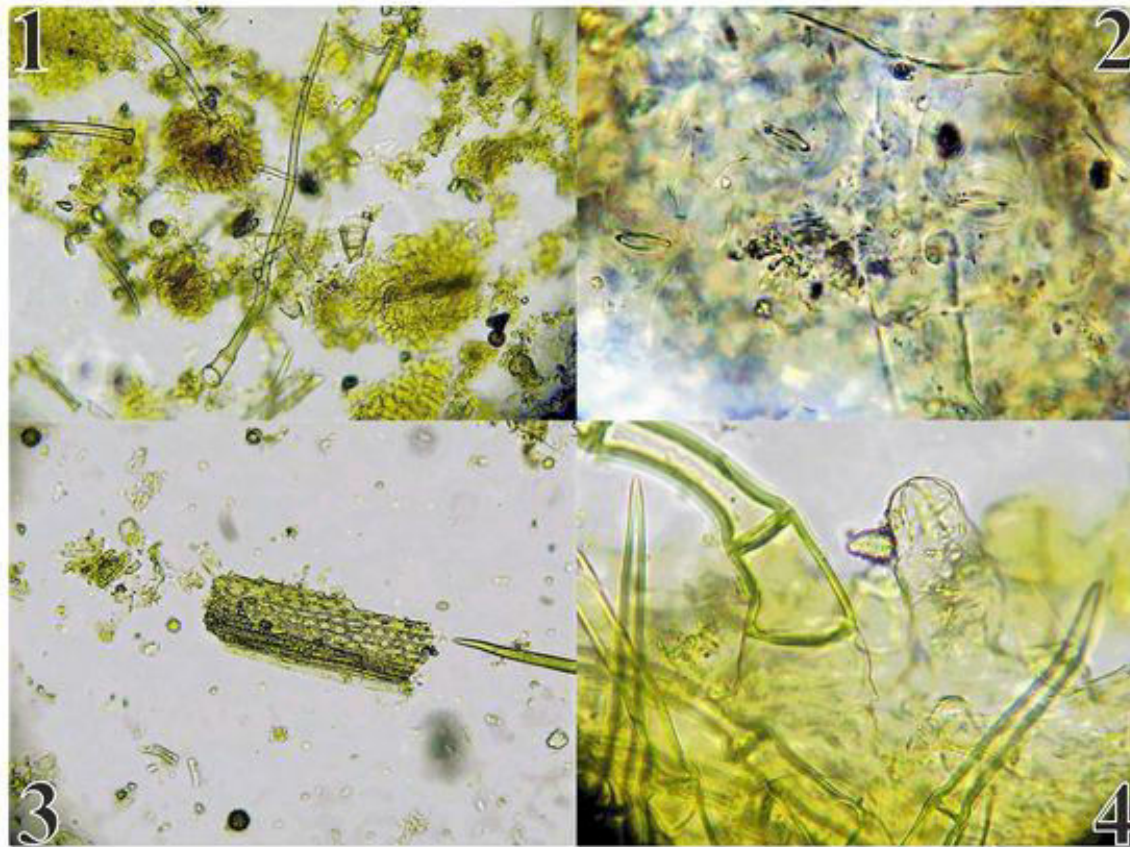
1- Nombreux poils tecteurs "en T" à branches flexueuses. 2- Détail d'un poil tecteur. 3- Fragment d'épiderme portant un poil glandulaire et des empreintes circulaires correspondant aux insertions de poils tecteurs. 4- Fragment du parenchyme avec des faisceaux conducteurs accompagnés de canaux sécréteurs d'oléorésine.

### III.1.3. Caractères microscopiques de la poudre issue des parties aériennes de la poudre de l'*Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens*

L'examen microscopique de cette poudre (**Figure 54**) montre les éléments suivants :

- ↪ Fragments d'épiderme avec des stomates paracytiques ;
- ↪ Fragments de parenchyme ;
- ↪ Fragment de parenchyme palissadique ;
- ↪ Poils tecteurs pluricellulaires unisériés, à article terminal très allongé et effilé ;
- ↪ Poils glandulaires caractéristiques des Astéracées, pluricellulaires et bisériés ;
- ↪ Grains de pollen tricolporés à exine fortement échinulée ;
- ↪ Fragments de style et de stigmate avec nombreuses papilles ;

- ↪ Fragments de filament d'anthère ;
- ↪ Sclérides allongés provenant des bractées.
- ↪ Débris de vaisseau de bois spiralés.



**Figure 54** : Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de *Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens*

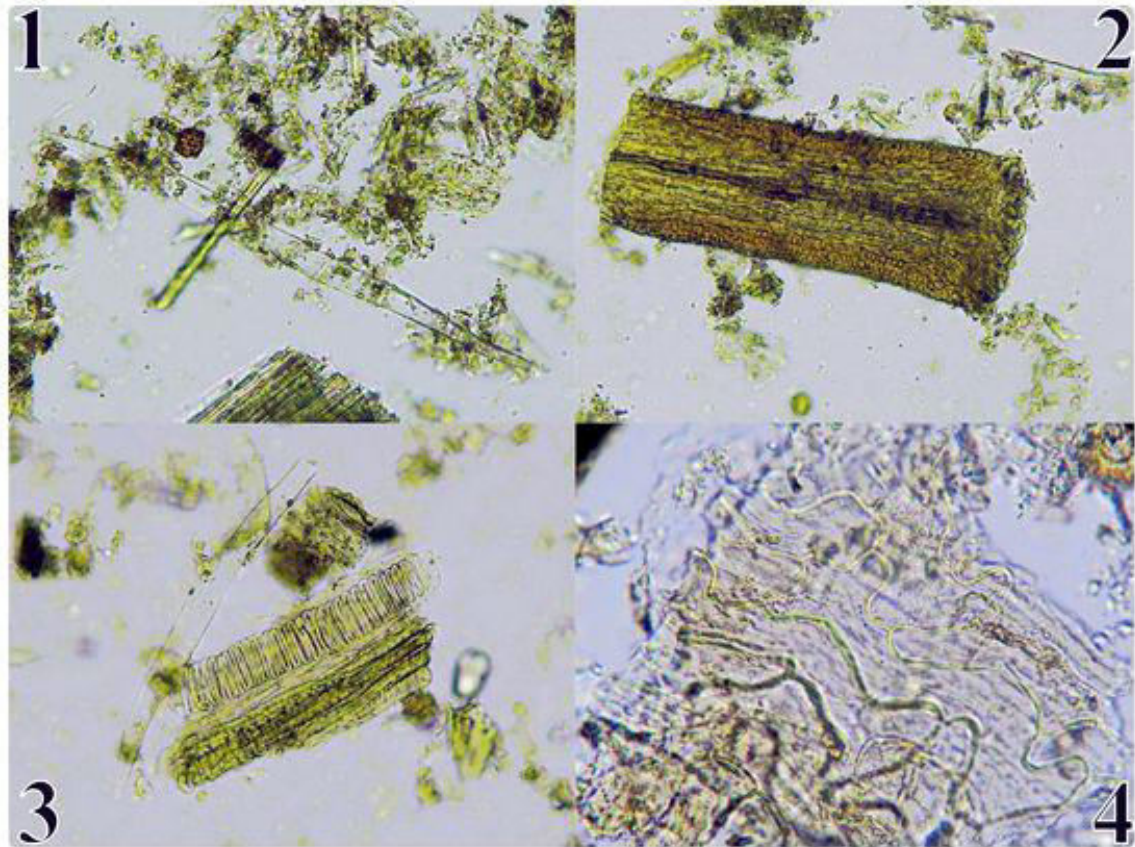
- 1- Poils tecteurs pluricellulaires unisériés, à article terminal très allongé et effilé. 2- Fragment d'épiderme avec des stomates paracytiques à proximité d'un poil tecteur. 3- Fragment de filament d'anthère.  
4- Détail d'un fragment d'épiderme vu de profil, montrant un poil glandulaire à côté de poils tecteurs.

### III.1.4. Caractères microscopiques de la poudre issue des parties aériennes de *Pentzia monodiana*

L'examen microscopique de cette poudre (**Figure 55**) montre les éléments suivants :

- ↪ Fragments d'épiderme formé de cellules à paroi sinueuse avec stomates anomocytiques ;
- ↪ Poils tecteurs "en navette", à pied unicellulaire court et à branches droites lancéolées ;
- ↪ Poils glandulaires caractéristiques des Astéracées, pluricellulaires et bisériés ;
- ↪ Grains de pollen tricolporés à exine fortement échinulée ;
- ↪ Fragments de style et de stigmate avec nombreuses papilles ;

- ↪ Fragments des parois de l'ovaire avec cellules à mucilage ;
- ↪ Fragments de filament d'anthère ;
- ↪ Sclérides provenant des bractées.
- ↪ Débris de vaisseau de bois spiralés.



**Figure 55** : Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de *Pentzia monodiana*

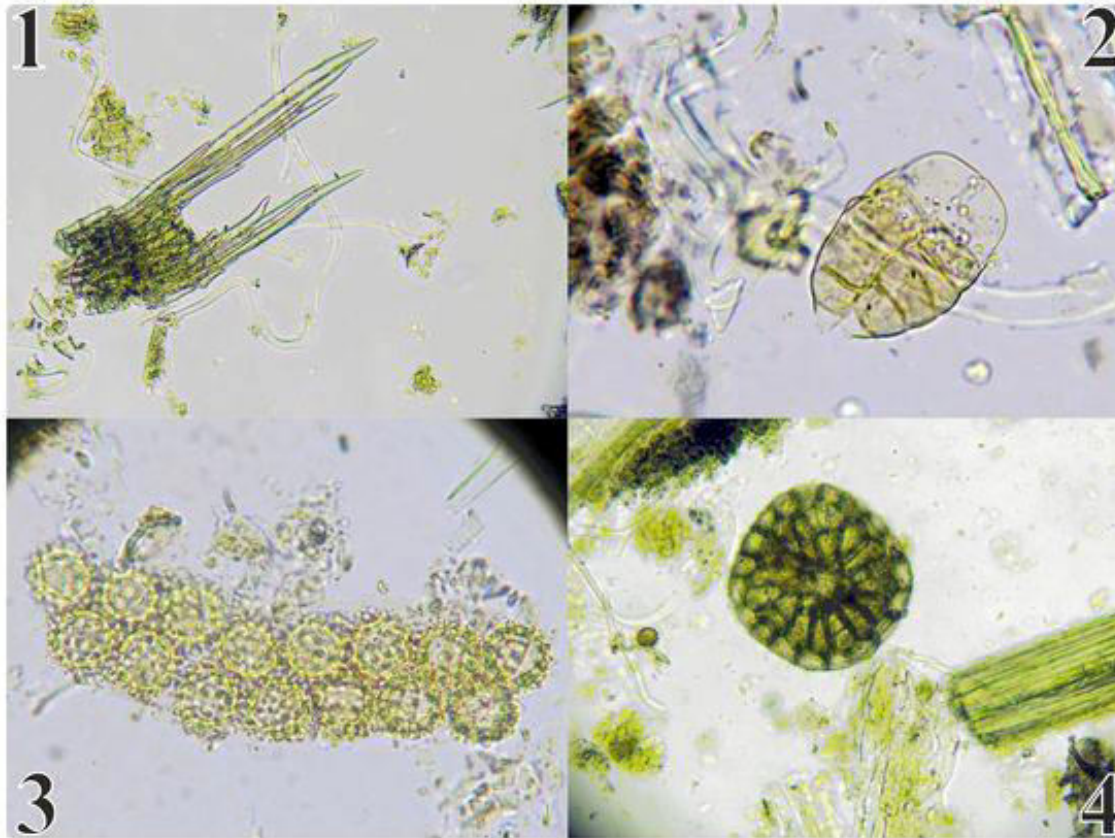
1- Poil tecteur "en navette", à pied court et à branches droites lancéolées. 2- Fragment de style et de stigmate avec nombreuses papilles. 3- Débris de poil tecteur à côté d'un fragment de parois de l'ovaire avec cellules à mucilage. 4- Fragment d'épiderme formé de cellules à paroi sinueuse portant un poil glandulaire.

### III.1.5. Caractères microscopiques de la poudre issue des parties aériennes de *Pulicaria crispa*

L'examen microscopique de cette poudre (**Figure 56**) montre les éléments suivants :

- ↪ Fragments d'épiderme portant des stomates paracytiques et des empreintes circulaires correspondant aux insertions de poils tecteurs ;
- ↪ Fragments d'épiderme à cellules papilleuses provenant des corolles des fleurs ligulées ;
- ↪ Fragment de parenchyme chlorophyllien et amas de cellules palissadiques ;

- ↪ Poils tecteurs "en navette" médifixes, à branches très allongées et flexueuses ;
- ↪ Poils glandulaires caractéristiques des Astéracées, pluricellulaires et bisériés ;
- ↪ Fragments formés de rangées de sclérides, correspondant à la base de l'ovaire ;
- ↪ Sacs polliniques renfermant de nombreux grains de pollen immatures ;
- ↪ Grains de pollen tricolporés à exine fortement échinulée ;
- ↪ Fragments du pappus formés de cellules multisériées ;
- ↪ Fragments de bractées avec sclérides allongés.



**Figure 56** : Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de *Pulicaria crista*

- 1- Fragment du pappus formé de cellules multisériées. 2- Poil glandulaire pluricellulaire et bisérié.  
 3- Sac pollinique renfermant de nombreux grains de pollen immatures. 4- Fragment formé de rangées de sclérides, correspondant à la base de l'ovaire.

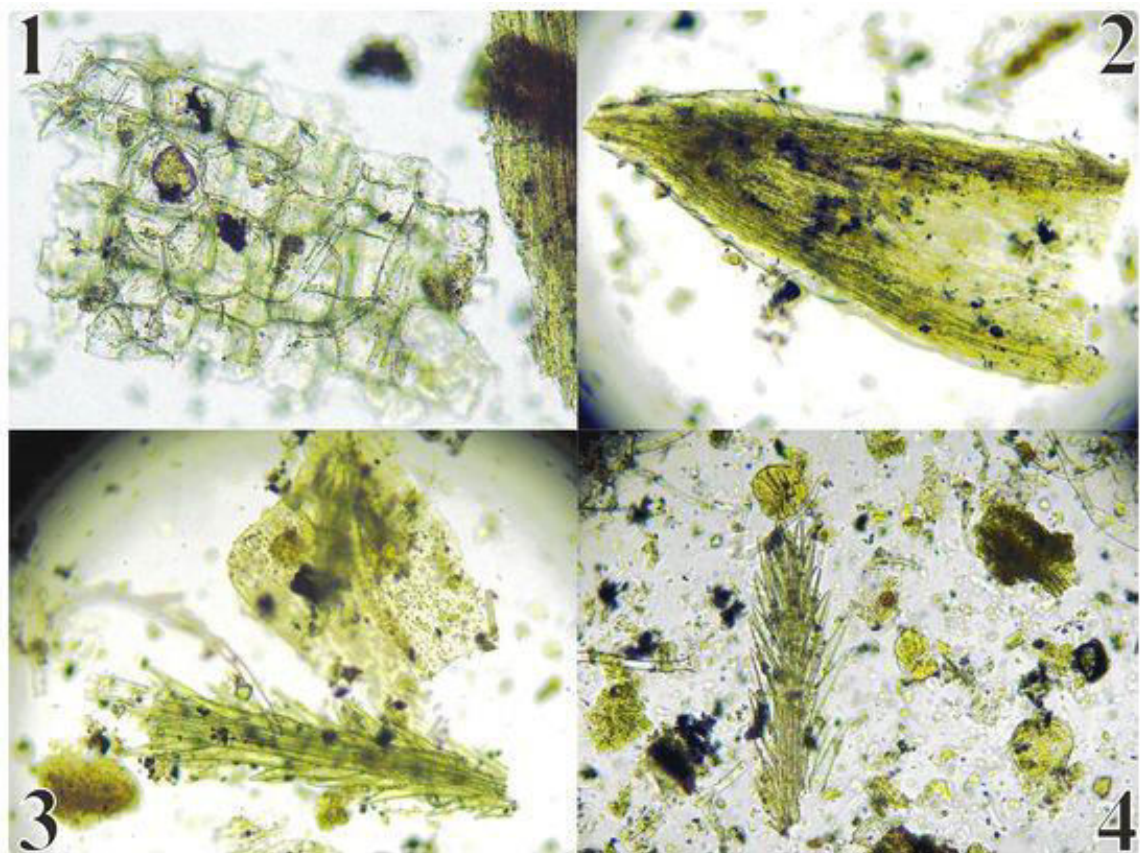
### III.1.6. Caractères microscopiques de la poudre issue des parties aériennes de *Pulicaria incisa*

L'examen microscopique de cette poudre (**Figure 57**) montre les éléments suivants :

- ↪ Fragments d'épiderme avec stomates paracytiques ;
- ↪ Fragments d'épiderme à cellules papilleuses provenant des corolles des fleurs ligulées ;



- ↪ Poils tecteurs pluricellulaires unisériés à articles courts à la base, devenant très allongés et effilés dans leur partie terminale ;
- ↪ Poils glandulaires du type Astéracées, pluricellulaires, bisériés, de grande dimension ;
- ↪ Fragments du parenchyme de ligule ;
- ↪ Grains de pollen tricolporés à exine fortement échinulée ;
- ↪ Fragments du pappus formés de cellules multisériées ;
- ↪ Cellules scléreuses de l'anthère.
- ↪ Fragments de bractées ;



**Figure 57** : Éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de *Pulicaria incisa*

- 1-** Fragment du parenchyme de ligule. **2-** Fragments de bractées. **3-** En haut, fragment de corolle montrant un épiderme formé de stomates paracytiques et de cellules allongées renfermant des mâcles d'oxalate de calcium ; en bas, un fragment du pappus formé de cellules multisériées. **4-** Fragment du pappus accompagné de débris de poils glandulaires, de poils tecteurs et de parenchyme.

## III.2. Résultats de l'étude phytochimique bioguidée menée sur les extraits AcOEt des végétaux collectés

### III.2.1. Rendement des extractions par l'acétate d'éthyle sous pression

Le véritable gain de temps est réalisé lors de l'évaporation du solvant dont la quantité est vingt fois plus faible avec l'extraction liquide sous pression (PLE). Les résultats des extractions à l'aide du SpeedExtractor<sup>®</sup> sont présentés dans le **tableau 18**.

**Tableau 18** : Résultats des extractions à l'aide de l'acétate d'éthyle sous pression

Matériel végétal (Genre/Espèce /Sous-espèce)	Partie aérien. Poids sec (g)	Extrait AcOEt sec (g)	Rend. (%)	Observations
<i>Artemisia campestris</i> <i>ssp. glutinosa</i>	353	53,31	15,10	Extrait solide brun jaunâtre. Odeur aromatique caractéristique.
<i>Artemisia judaica</i> <i>ssp. sahariensis</i>	436	64,92	14,89	Extrait visqueux brun foncé. Odeur aromatique caractéristique.
<i>Asteriscus graveolens</i> <i>ssp. graveolens</i>	282	27,76	9,84	Extrait visqueux vert sapin. Odeur aromatique assez agréable.
<i>Pentzia monodiana</i>	613	47,76	7,79	Extrait solide brun verdâtre. Odeur aromatique, rappelant celle de la camomille.
<i>Pulicaria crispa</i>	147	12,99	8,83	Extrait visqueux brun verdâtre. Odeur faiblement aromatique.
<i>Pulicaria incisa</i>	114	4,72	4,14	Extrait visqueux vert olive. Odeur aromatique caractéristique.

### III.2.2. Criblage biologique des extraits bruts obtenus

#### III.2.2.1. Résultats de l'analyse de l'activité antiparasitaire *in vitro*

Globalement, sur les six extraits bruts testés *in vitro* sur des souches de parasites en culture (**Tableau 19**), c'est bien l'extrait de l'*Artemisia judaica* sp. *sahariensis* qui présente l'activité antiparasitaire la plus élevée. Bien que l'extrait de l'*Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens* s'est montré le plus actif contre le promastigote de la souche de *Leishmania infantum*, ne nous l'avons pas retenu pour la suite de notre étude faute de résultats probants quant à son activité antiplasmodiale. C'est le cas aussi de l'extrait du *Pulicaria crispa* dont l'activité antiplasmodiale est médiocre. Enfin nous n'avons pu évaluer l'activité antirypanosomiale que pour les extraits des armoises.

**Tableau 19** : Résultats de l'évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro* des extraits

	Activité antiplasmodiale Souche FcB1/Colombia <i>Plasmodium falciparum</i> (CI <sub>50</sub> = µg/ml)	Activité antileishmaniale Promastigote, souche MCER/BR/79/M6445 <i>Leishmania infantum</i> (CI <sub>50</sub> = µg/ml)	Activité antirypanosomiale Forme sanguine, souche 93 <i>Trypanosoma brucei brucei</i> (% inhibition pour 10 µg/ml d'extrait)
<i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i> (Extrait AcOEt)	1,21	17,26	89 ± 3
<i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i> (Extrait AcOEt)	<b>1,13</b>	8,93	<b>91,7 ± 3</b>
<i>Asteriscus graveolens</i> ssp. <i>graveolens</i> (Extrait AcOEt)	nd	<b>6,95</b>	nd
<i>Pentzia monodiana</i> (Extrait AcOEt)	3,53	13,63	nd
<i>Pulicaria crispa</i> (Extrait AcOEt)	36,21	14,93	nd
<i>Pulicaria incisa</i> (Extrait AcOEt)	4,57	8,37	nd

### III.2.2.2. Résultats du test de fixation à l'hème

Les données expérimentales du test de fixation à l'hème obtenues pour chacun des extraits AcOEt issus des parties aériennes des plantes sélectionnées sont regroupées dans le **tableau 20**. Douze adduits à l'hème ont été relevés.

**Tableau 20** : Adduits molécule-hème obtenus pour chacun des extraits testés

	Adduit ( $m/z$ ) [M+Hème] <sup>+</sup>	Ion moléculaire ( $m/z$ ) correspondant
<i>Artemisia campestris</i> <i>ssp. glutinosa</i> (Extrait AcOEt)	930	315 [M+H] <sup>+</sup>
	946	331 [M+H] <sup>+</sup>
	960	345 [M+H] <sup>+</sup>
	952	359 [M+Na] <sup>+</sup>
<i>Artemisia judaica</i> <i>ssp. sahariensis</i> (Extrait AcOEt)	930	315 [M+H] <sup>+</sup>
	960	345 [M+H] <sup>+</sup>
	1036	421 [M+H] <sup>+</sup>
<i>Pentzia monodiana</i> (Extrait AcOEt)	960	345 [M+H] <sup>+</sup>
	974	359 [M+H] <sup>+</sup>
	1004	389 [M+H] <sup>+</sup>
<i>Pulicaria incisa</i> (Extrait AcOEt)	922	329 [M+Na] <sup>+</sup>
	946	331 [M+H] <sup>+</sup>

Sachant que la masse moléculaire de l'hémine utilisée pour ce test est de 616, nous pouvons donner les interprétations suivantes :

↳ Pour l'extrait brut d'*Artemisia campestris ssp. glutinosa* quatre composés de masses moléculaires respectives de 314, 330, 336 et de 344, sont susceptibles de se lier fortement à l'hème. Les structures chimiques probables et les identités présumées de ces composés sont proposées dans le **tableau 26** dans la section **III.3.3**.

↳ De même, l'extrait brut d'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* fournit trois adduits à l'hème correspondant à des composés de masses moléculaires de 314, 344, et de 420. Vraisemblablement, les deux premiers composés seraient les mêmes que ceux retrouvés dans l'extrait d'*A. campestris*, alors que le troisième est probablement un ester d'alcool diterpénique et d'acide isovalérianique (**Tableau 27**).

↳ Bien que huit adduits à l'hème ont été observés pour l'extrait de *Pentzia monodiana* seuls trois peuvent être considérés comme stables, notamment ceux correspondant aux composés de masses moléculaires 358 et 388, identifiés respectivement comme 3'-O-méthyleupatorine **254** et artémétine **47** (**Annexe 8**).

↳ Enfin, l'extrait du *Pulicaria incisa* donne deux adduits impliquant des composés de masses moléculaires de 306 et de 330. La première masse pourrait correspondre à un ester d'alcool sesquiterpénique et d'acide butanoïque dont la structure probable est proposée dans la **figure 69**. La seconde masse peut être attribuée au même composé déjà observé dans l'extrait d'*A. campestris*.

### **III.3. Résultats du criblage phytochimique des extraits bruts sélectionnés pour leur activité antiplasmodiale notable**

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur les composés présents dans les quatre extraits d'acétate d'éthyle issus des parties aériennes des plantes sélectionnées, trois analyses ont été effectuées. D'abord, une analyse chimique à l'aide des réactifs généraux permettant de rechercher la présence de différentes catégories de métabolites secondaires ; ensuite une analyse chromatographique sur couche mince afin d'apprécier les possibilités de fractionnement de l'extrait brut ; enfin une analyse en UPLC-MS nous a permis d'avoir un profil très précis en métabolites pour chacun des quatre extraits bruts.

#### **III.3.1. Résultats avec les réactifs généraux**

Dans le **tableau 21** sont regroupés pour chacun des extraits AcOEt des plantes sélectionnées, les résultats des réactions observées avec les réactifs généraux habituellement utilisés en pharmacognosie pour détecter quelques catégories de métabolites secondaires.

L'interprétation de ces résultats nous amène à constater l'absence de tanins condensés, mais aussi la présence de polyphénols dans tous les extraits mêmes pour celui de *Pentzia monodiana* puisqu'il renferme des flavonoïdes (réaction de Shinoda positive). L'extrait

de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* s'avère riche en composés polyphénoliques notamment en flavonoïdes. L'extrait de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* renferme probablement des composés aminés apolaires puisqu'il donne un faux positif avec le réactif de Dragendorff, sachant que sa réaction avec l'autre réactif des alcaloïdes (réactif de Bouchardat) est négative. Les coumarines ne semblent présentes que dans les extraits de *Pulicaria incisa* et de *Pentzia monodiana*. L'extrait de cette dernière pourrait renfermer en plus des stéroïdes.

**Tableau 21** : Réactions physico-chimiques observées entre les différents extraits des plantes sélectionnées et les réactifs généraux utilisés en pharmacognosie

	<i>Artemisia campestris</i> ssp. <i>glutinosa</i>	<i>Artemisia judaica</i> ssp. <i>sahariensis</i>	<i>Pentzia monodiana</i>	<i>Pulicaria incisa</i>
Réaction avec FeCl <sub>3</sub> alcoolique à 2%	<b>Positive</b>	<b>Positive</b>	Négative	<b>Positive</b>
Réaction avec le réactif de Stiasny	Négative	Négative	Négative	Négative
Réaction de Shinoda	<b>Positive</b>	Négative	<b>Positive</b>	Négative
Réaction avec ammoniacale à 2%	Négative	Négative	<b>Positive</b> (violette)	<b>Positive</b> (jaune)
Réaction avec le réactif de Lieberman	Négative	Négative	<b>Positive</b> (verte)	Négative
Réaction avec le réactif de Bouchardat	Négative	Négative	Négative	Négative
Réaction avec le réactif de Dragendorff	<b>Positive</b>	Négative	Négative	Négative

### III.3.2. Résultats de l'analyse en CCM

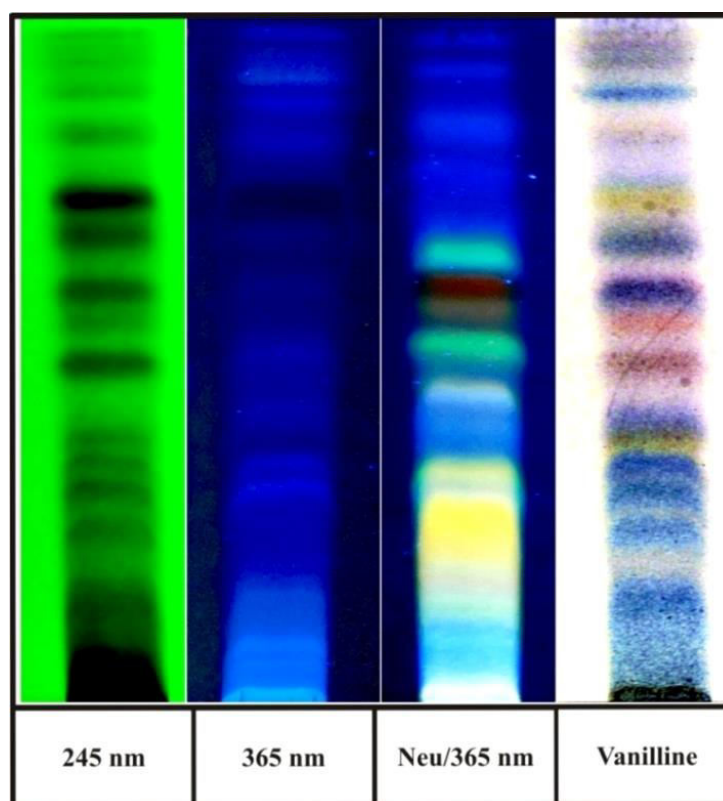
Les extraits bruts obtenus ont été analysés par CCM sur gel de silice, avec comme éluant le mélange cyclohexane/AcOEt (4:6). La visualisation des chromatogrammes est effectuée soit directement sous lumière ultraviolette à 254 nm et à 365 nm, soit après révélation par un des réactifs communément utilisés en CCM :

- ↳ Réactif de Neu à 365 nm (Neu),
- ↳ Réactif à la vanilline sulfurique (Vanilline),
- ↳ Réactif de Dragendorff dilué (Dragendorff).

### III.3.2.1. Résultats avec l'extrait de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

Dans le **tableau 22**, nous avons regroupé les moyennes des Rf correspondant aux principaux spots observés sur les chromatogrammes de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*. Dans la **figure 58** sont représentées les photos des chromatogrammes correspondant respectivement à l'examen sous :

- ↳ Lumière UV à 245 nm, à 365 nm et à 365 nm après révélation par le réactif de Neu ;
- ↳ Lumière visible après révélation par le réactif à la vanilline sulfurique. La révélation par le réactif de Dragendorff dilué ne donne qu'un seul spot avec l'extrait de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* ; les trois autres extraits AcOEt ne donnent aucun résultat.



**Figure 58** : CCM de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

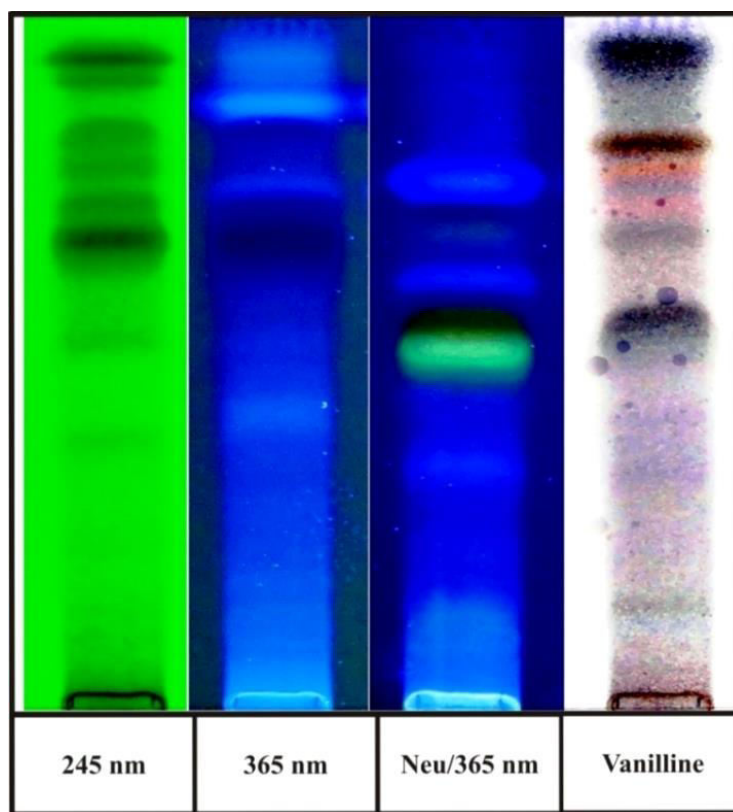
**Tableau 22** : Résultats de l'analyse par CCM de l'extrait AcOEt  
de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

N°	Rf	254 nm	365 nm	Neu/365 nm	Vanilline	Dragendorff
1	0,98	Extinction (faible)	Bleu clair	Bleu clair	Violet	-
2	0,94	Extinction (faible)	Bleu clair	Bleu clair	Violet	-
3	0,88	Extinction (faible)	Bleu clair	Bleu clair	Bleu foncé	-
4	0,82	Extinction (faible)	-	Bleu clair	Violet	-
5	0,76	-	-	-	Bleu	-
6	0,72	Extinction (majoritaire)	-	-	Jaune	-
7	0,68	-	Bleu	-	Bleu foncé	Brun
8	0,67	Extinction	-	Bleu-vert	Bleu	-
9	0,60	Extinction	-	Rouge ocre (majoritaire)	Violet foncé (majoritaire)	-
10	0,55	Extinction	-	Jaune ocre	Orange	-
11	0,50	Extinction	Bleu	Bleu clair	Pourpre	-
12	0,44	-	-	Gris clair	-	-
13	0,40	Extinction	Bleu	Bleu clair	Violet	-
14	0,37	Extinction	Bleu	Bleu clair	Jaune	-
15	0,35	Extinction	Bleu clair	Jaune clair	Bleu	-
16	0,31	Extinction	Bleu clair	Jaune	Bleu	-
17	0,25	Extinction	Bleu	Jaune	Bleu	-
18	0,15	Extinction	Bleu	Gris clair	Bleu	-
19	0,07	Extinction (importante)	Bleu	Bleu	Bleu	-



### III.3.2.2. Résultats avec l'extrait de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

De même que précédemment, le **tableau 23** regroupe les moyennes des Rf correspondants aux principaux spots observés sur les chromatogrammes (**Figure 59**) de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*.



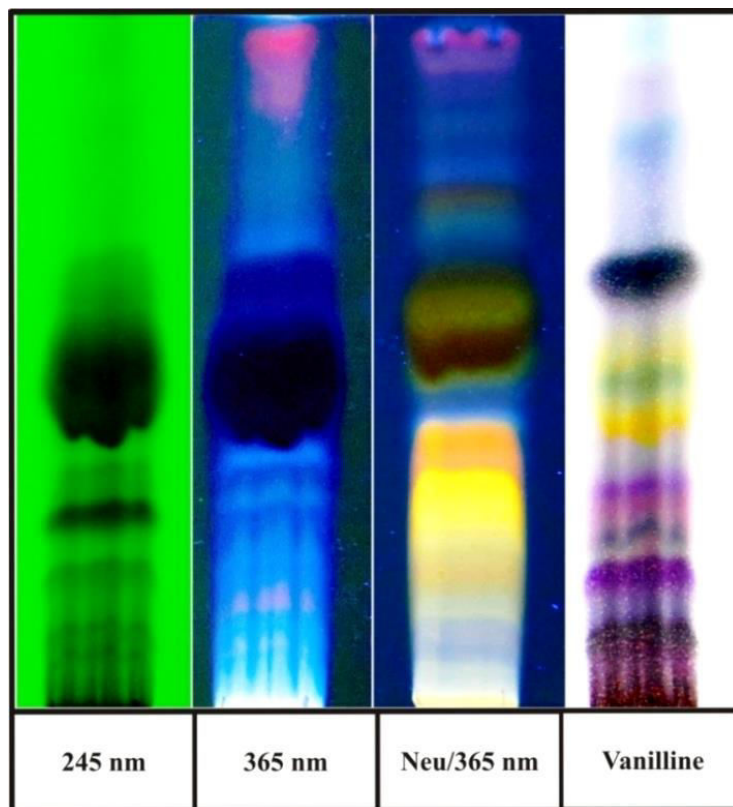
**Figure 59** : CCM de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

**Tableau 23** : Résultats de l'analyse par CCM de l'extrait AcOEt  
de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

N°	Rf	254 nm	365 nm	Neu/365 nm	Vanilline	Dragendorff
1	0,93	Extinction	Bleu clair	-	Violet	-
2	0,90	Extinction (faible)	Bleu clair	-	Violet	-
3	0,87	-	Bleu clair (majoritaire)	-	-	-
4	0,82	Extinction	Bleu	Bleu	Pourpre (majoritaire)	-
5	0,78	Extinction	bleu	Bleu clair	Orange	-
6	0,75	-	Bleu clair	Bleu clair (majoritaire)	Violet	-
7	0,73	Extinction	-	-	Rose	-
8	0,68	Extinction (majoritaire)	Bleu foncé	Bleu clair (majoritaire)	Violet	-
9	0,56	-	-	Vert foncé (majoritaire)	Violet foncé (majoritaire)	-
10	0,53	Extinction	-	Vert clair (majoritaire)	Bleu	-
11	0,42	-	Bleu clair	Bleu	Violet	-
12	0,34	-	Bleu	Bleu clair	Violet	-
13	0,16	-	Bleu clair	Bleu clair	Gris	-
14	0,03	Extinction	Bleu clair	Bleu clair	Pourpre	-

### III.3.2.3. Résultats avec l'extrait de *Pentzia monodiana*

De même que précédemment, le **tableau 24** regroupe les moyennes des Rf correspondants aux principaux spots observés sur les chromatogrammes (**Figure 60**) de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pentzia monodiana*.



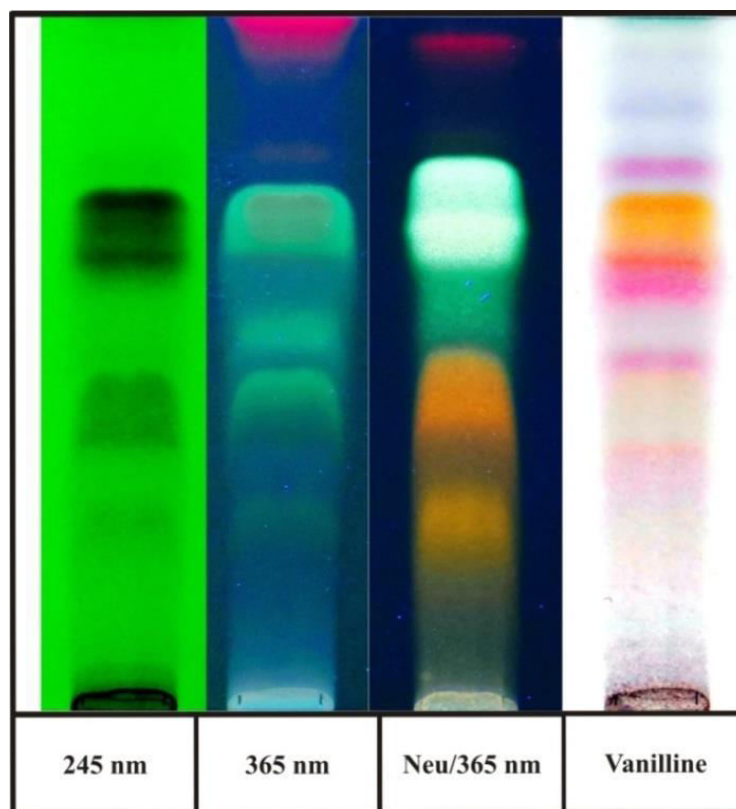
**Figure 60** : CCM de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana*

**Tableau 24** : Résultats de l'analyse par CCM de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana*

N°	Rf	254 nm	365 nm	Neu/365 nm	Vanilline	Dragendorff
1	0,95	-	Rose	Rose	Bleu clair	-
2	0,89	-	Rose	Bleu	Violet clair	-
3	0,81	-	Bleu	Bleu	Bleu clair	-
4	0,76	-	Bleu clair	Bleu clair	-	-
5	0,74	-	Bleu clair	Violet foncé	-	-
6	0,72	-	Bleu clair	Jaune	-	-
7	0,70	-	Bleu clair	Bleu clair	-	-
8	0,64	Extinction (faible)	-	Vert foncé	Bleu violet (majoritaire)	-
9	0,59	Extinction (faible)	Bleu	Jaune	-	-
10	0,51	Extinction (majoritaire)	Bleu foncé (majoritaire)	Rouge brique (majoritaire)	Jaune	-
11	0,47	Extinction (majoritaire)	Bleu foncé (majoritaire)	Jaune	Vert	-
12	0,42	Extinction (majoritaire)	Bleu foncé (majoritaire)	Gris clair	Jaune (majoritaire)	-
13	0,36	Extinction (faible)	Bleu clair	Orange (majoritaire)	Violet	-
14	0,32	Extinction (majoritaire)	Bleu clair	Jaune	Pourpre	-
15	0,30	-	Bleu	Jaune	Rose	-
16	0,26	-	Bleu clair	Jaune clair	Violet foncé	-
17	0,20	Extinction (faible)	Bleu clair	Orange clair	Pourpre (majoritaire)	-
18	0,14	Extinction (faible)	Bleu	Violet clair	Violet foncé (majoritaire)	-
19	0,07	Extinction (faible)	Bleu clair	Gris clair	Pourpre	-

#### III.3.2.4. Résultats avec l'extrait de *Pulicaria incisa*

De même que précédemment, le **tableau 25** regroupe les moyennes des Rf correspondants aux principaux spots observés sur les chromatogrammes (**Figure 61**) de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *P. incisa*.



**Figure 61** : CCM de l'extrait AcOEt de *Pulicaria incisa*

**Tableau 25** : Résultats de l'analyse par CCM de l'extrait AcOEt de *Pulicaria incisa*

N°	Rf	254 nm	365 nm	Neu/365 nm	Vanilline	Dragendorff
1	0,99	-	Rose	-	Bleu	-
2	0,96	-	Rose	Rose	Violet clair	-
3	0,86	-	-	-	Violet clair	-
4	0,80	-	-	Vert clair (majoritaire)	Pourpre	-
5	0,73	Extinction (majoritaire)	Vert clair	Vert clair	Orange	-
6	0,70	Extinction	Vert clair	Vert clair (majoritaire)	Jaune	-
7	0,64	Extinction	Vert	Vert	Rouge orangé	-
8	0,61	-	Bleu	Vert	Rose	-
9	0,57	-	Vert	Vert	Violet clair	-
10	0,50	-	Bleu	Orange	Rose	-
11	0,42	Extinction (faible)	Vert	Orange	Gris clair	-
12	0,35	-	Bleu	Brun orangé	Rose clair	-
13	0,28	Extinction (faible)	Vert clair	Orange	Violet clair	-
14	0,05	Extinction (faible)	Bleu clair	-	Violet	-

### III.3.3. Résultats de l'analyse en UPLC-MS

Les données spectrales acquises lors de l'analyse UPLC-MS ont été toutes traitées par le logiciel MassLynx© v.4.1 (Waters Corporation). Les spectres MS correspondant aux principaux pics ont été regroupés dans des tableaux afin de mieux repérer les ions moléculaires. Ces ions moléculaires sont le plus souvent des adduits protonés ou sodiques quand il s'agit d'une ionisation mode positif (ES+). Les ions moléculaires négatifs sont généralement le résultat d'une déprotonisation. Ainsi, l'ionisation de certains métabolites peut générer à la fois des ions moléculaires positifs et des ions moléculaires négatifs, ce qui a facilité la détermination de leur masses moléculaires.

Dans les **annexes** sont présentés pour chacun des échantillons d'extraits analysés, les chromatogrammes UPLC (**Annexe 3**) et les spectres MS obtenus (**Annexe 5**), qu'ils soient en mode d'ionisation positif (ES+) ou en mode négatif (ES-). Les pics correspondant aux composés capables de donner des adduits avec l'hème ont été repérés en vert. Pour le calcul de masses moléculaires des adduits, nous avons utilisé une table Microsoft Excel (**Annexe 4**) inspirée du Molecular Weight Calculator (240).

L'approche par la déréplication nous a permis de réaliser les **tableaux 26-29** qui présentent avec un niveau de preuve moyen, les métabolites probablement présents dans les extraits bruts analysés par l'UPLC-MS. L'écart de masse (ou erreur de masse) de ces composés présumés avec les masses unitaires à l'origine des ions moléculaires détectés est assez faible. L'erreur de masse (**EM**) est calculée en ppm selon la formule :

$$\text{EM} = (\text{différence entre masse unitaire mesurée et masse exacte du métabolite connu} / \text{masse exacte du métabolite connu}) \times 10^{-6}$$

Il faut rappeler ici qu'il existe plusieurs niveaux de preuves pour la déréplication, la comparaison de masse peut se faire :

↳ Soit avec des masses unitaires (LC-MS et UPLC-MS)

↳ Soit avec des masses unitaires et des fragments obtenus après un passage dans une ou plusieurs cellules de collision (LC-MS/MS, LC-MS/MS/MS, LC-MS4).

Le niveau de preuve passe de faible à moyen avec respectivement la LC-MS et l'UPLC-MS. Le niveau de preuve étant de plus élevé en comparant à la fois les masses unitaires et les fragments.

**Tableau 26** : Temps de rétention, données MS et composés présumés à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

Pic (n°)	t <sub>R</sub> (min)	m/z positif	m/z négatif	Formule moléculaire attribuée	Masse moléculaire exacte	EM (ppm)	Composés présumés	Source biologique connue selon DNP (192)
1	2,76	203,1150	201,0963	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O	202,135765	139	<b>228</b> (cf. Fig.66)	<i>Anthemis saguramica</i>
		243,1058	219,1057	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	220,109945	30	<b>172</b> (cf. Tab.11)	<i>Artemisia campestris</i>
2	2,84	233,0892	231,0719	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	232,073560	36	<b>229</b> (cf. Fig.66)	<i>Artemisia annua</i>
3	3,00	221,1271		C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	198,125595	62	<b>230</b> (cf. Fig.66)	<i>Artemisia herba-alba</i>
4	3,15	319,0907	317,0785	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	318,073955	30	<b>108</b> (cf. Fig.31)	<i>Artemisia</i> sp.
		347,0845	345,0703	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	346,068870	24	<b>121</b> (cf. Tab.9)	<i>Artemisia</i> sp.
6	3,26	287,1704	331,1617	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	286,15689	22	<b>Composé 225</b>	nd
		327,1670	303,1713	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	304,167460	34	<b>174</b> ou <b>175</b> (cf. Tab.11)	<i>Artemisia campestris</i>
		375,1505	373,1355	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	374,100170	115	<b>119, 120</b> ou <b>122</b> (cf. Tab.9)	<i>Artemisia</i> sp.
7	3,42	245,1262	243,1099	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	244,109945	37	<b>101</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia</i> sp.
							<b>107</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia princeps</i>
9	3,50	331,0954 <b>946*</b>	329,0743	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,073955	43	<b>235</b> (cf. Fig.66)	<i>Artemisia</i> sp.
				C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	330,095085	21	<b>233</b> ou <b>236</b> (cf. Fig.66)	<i>Artemisia capillaris</i>
				C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	360,084520	39	<b>134</b> (cf. Fig.32)	<i>Artemisia stolonifera</i>
11	3,64	285,1165		C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	262,120510	26	<b>50</b> (cf. Fig.21)	<i>Artemisia rothrockii</i>
							<b>129</b> (cf. Tab.10)	<i>Artemisia apiacea</i>
12	3,85	315,0943 <b>930*</b>		C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,079040	25	<b>231</b> (cf. Fig.66)	<i>Pulicaria crispa</i>
13	3,95	345,1110 <b>960*</b>		C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	344,089605	41	<b>237</b> (cf. Fig.66)	<i>Artemisia frigida</i>
14	4,12	311,1694	287,1708	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	288,172545	27	<b>51</b> (cf. Fig.21)	<i>Artemisia annua</i>
15	4,18	243,1127		C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	220,109945	62	<b>173</b> (cf. Tab. 11)	<i>Artemisia campestris</i>
18	4,30	359,1263 <b>952*</b>		C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	336,120905	48	<b>96</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia montana</i>
							<b>98</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia iwayomogi</i>
							<b>106</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia tripartita</i>
19	4,42	311,1694	287,1708	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	288,172545	27	<b>173</b> (cf. Tab. 11)	<i>Artemisia campestris</i>
20	4,63	381,1771	357,1817	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	358,178025	28	nd	
24	5,12	245,1262	242,9937	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	244,109945	37	<b>101</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia</i> sp.
							<b>107</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia princeps</i>

\* Adduit à l'hème (masse de l'hémine = 616)



**Tableau 27** : Temps de rétention, données MS et composés présumés à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

Pic (n°)	t <sub>R</sub> (min)	m/z positif	m/z négatif	Formule moléculaire attribuée	Masse moléculaire exacte	EM (ppm)	Composés présumés	Source biologique connue selon DNP (192)
1	2,76	461,2235	459,2034	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	460,209720	14	<b>238</b> (cf. Fig.67)	<i>Inula japonica</i>
2	3,26	311,1153		C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	288,136160	35	<b>239</b> (cf. Fig.67)	<i>Artemisia mesatlantica</i>
3	3,49	301,0845	299,0623	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300,063390	46	<b>124</b> ou <b>128</b> (cf. Tab.9)	<i>Artemisia graveolens</i> , <i>Artemisia campestris</i>
4	3,69	219,111		C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	218,094295	43	<b>135</b> (cf. Fig.32)	<i>Artemisia campestris</i>
5	3,74	275,1683		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	252,172545	26	<b>240</b> (cf. Fig.67)	<i>Artemisia absinthium</i>
6	3,85	315,0943 <b>930*</b>	313,0854	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,079040	25	<b>237</b> (cf. Fig.66)	<i>Artemisia frigida</i>
7	3,93	345,1110 <b>960*</b>	343,0937	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	344,089605	41	<b>51</b> (cf. Fig.21)	<i>Artemisia annua</i>
		153,1318		C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152,120115	29	<b>197</b> (cf. Fig.36)	<i>Artemisia judaica</i>
8	4,10						<b>241</b> (cf. Fig.67)	<i>Artemisia sp.</i>
		269,1087		C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	246,125595	25	<b>242</b> ou <b>243</b> (cf. Fig.67)	<i>Artemisia mexicana</i>
							<b>244</b> (cf. Fig.67)	<i>Artemisia mesatlantica</i>
9	4,26	375,1251		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	374,100170	47	<b>48</b> (cf. Fig.21)	<i>Artemisia annua</i> <i>A. judaica</i> (182)
		315,0943 <b>930*</b>		C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,079040	25	<b>237</b> (cf. Fig.66)	<i>Artemisia frigida</i>
10	4,46	291,1657		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	268,167460	34	nd	
		389,1343		C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	388,115820	29	nd	
11	4,74	291,1657		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	268,167460	34	nd	
15	6,00	305,2593		C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	304,167460	278	<b>174</b> ou <b>175</b> (cf. Tab. 11)	<i>Artemisia campestris</i>
		327,2384		C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	304,240230	29	<b>245</b> ou <b>246</b> (cf. Fig.67)	<i>Pulicaria gnaphaloides</i>
16	6,12	421,3083 <b>1036*</b>		C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	420,287575	32	<b>247</b> , <b>248</b> , <b>249</b> ou <b>250</b> (cf. Fig.67)	<i>Grindelia sp.</i>

\* Adduit à l'hème (masse de l'hémène = 616)

**Tableau 28** : Temps de rétention, données MS et composés présumés  
à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pentzia monodiana*

Pic (n°)	t <sub>R</sub> (min)	m/z positif	m/z négatif	Formule moléculaire attribuée	Masse moléculaire exacte	EM (ppm)	Composés présumés	Source biologique connue selon DNP (192)
		279,1308	277,1169	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	278,115425	29	<b>251</b> (cf. Fig.68)	nd
1	2,19						<b>104</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia rutifolia</i> , <i>Artemisia xerophytica</i> , <i>Tanacetum parthenium</i>
		301,1149		C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	278,115425	37	<b>105</b> (cf. Fig.30)	
2	2,28	301,1149		C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	278,115425	37	<b>97</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia xanthochroa</i> , <i>Chrysanthemum parthenium</i>
3	2,31	301,1149		C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	278,115425	37	<b>90</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia sp.</i> <i>A. gmelinii</i>
5	3,12	305,1445	281,1464	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	282,146725	30	<b>252</b> (cf. Fig.68)	<i>Anthemis melanolepis</i>
							<b>253</b> (cf. Fig.68)	<i>Tanacetum santolinoides</i>
7	3,85	251,1749		C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	250,156895	43	<b>99</b> (cf. Fig.30)	<i>Artemisia absinthium</i> , <i>Artemisia glabella</i>
		315,0943	313,0854	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	314,079040	25	<b>236</b> (cf. Fig.66)	<i>Achillea sp.</i>
8	3,93	345,1110 <b>960*</b>	343,0937	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	344,089605	41	<b>51</b> (cf. Fig.21)	<i>Artemisia annua</i>
9	4,09	375,1166	373,1016	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	374,100170	24	<b>49</b> (cf. Fig.21)	<i>Asteraceae</i> , <i>Chrysosplenium sp.</i>
10	4,30	359,1263 <b>974*</b>		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	358,105255	38	<b>254</b> (cf. Fig.68)	<i>Asteraceae</i>
11	4,49	389,1343 <b>1004*</b>		C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	388,115820	29	<b>47</b> (cf. Fig.21)	<i>Asteraceae</i> , <i>Artemisia sp.</i>
12	4,62	329,1124			328,094669	32	<b>255</b> (cf. Fig.68)	<i>Artemisia sp.</i>

\* Adduit à l'hème (masse de l'hémine = 616)

**Tableau 29** : Temps de rétention, données MS et composés présumés  
à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pulicaria incisa*

Pic (n°)	t <sub>R</sub> (min)	m/z positif	m/z négatif	Formule moléculaire attribuée	Masse moléculaire exacte	EM (ppm)	Composés présumés	Source biologique connue selon DNP (192)
1	2,47	287,0664	285,0494	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286,047740	40	72 (cf. Tab.7)	Asteraceae
							76 (cf. Tab.7)	Artemisia sp.
							260 (cf. Fig.69)	Artemisia capillaris
		305,0756	303,0644	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	304,131075	206	91 (cf. Fig.30)	Artemisia douglasiana
							100 (cf. Fig.30)	Artemisia tilesii, Matricaria chamomilla
						102 (cf. Fig.30)	Artemisia montana	
						212 (cf. Fig.37)	Pentzia eonii	
4	3,15	319,0907	317,0785	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	318,073955	30	108 (cf. Fig.31)	Artemisia sp.
5	3,22	317,0737	315,0593	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	316,058305	26	131 (cf. Tab.10)	Artemisia sp.
							261 (cf. Fig.69)	Artemisia capillaris
							256 (cf. Fig.69)	Artemisia sp.
							257 (cf. Fig.69)	Artemisia tridentata, Eupatorium cuneifolium
7	3,42	273,0854	271,0695	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272,068475	35	258 (cf. Fig.69)	Asteraceae
							259 (cf. Fig.69)	Artemisia campestris
		581,2754	557,2756	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	558,210115	136	94 (cf. Fig.30)	Artemisia frigida
8	3,53	333,1085	331,0900	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	332,053220	145	53 (cf. Fig.21)	Artemisia annua
							95 (cf. Fig.30)	Artemisia princeps, Tanacetum fruticosum
		333,1085	331,0900	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	332,162375	184	103 (cf. Fig.30)	Artemisia pontica
11	3,87	329,1124 922*		C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	306,219495	315	262 (cf. Fig.69) 263 (cf. Fig.69)	Artemisia sieberi
12	3,92	331,0954 946*	329,0823	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	330,073955	43	236 (cf. Fig.66)	Artemisia sp.
							233 (cf. Fig.66)	Artemisia capillaris
		331,0954 946*	329,0823	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	330,095085	21	134 (cf. Fig.32)	Artemisia stolonifera
14	4,28	301,0769	299,0699	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	300,063390	21	73 (cf. Tab.7)	Asteraceae
							124 (cf. Tab.9)	Artemisia graveolens
							128 (cf. Tab.9)	Artemisia campestris
15	4,40	345,1110	343,0937	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	344,089605	41	52 (cf. Fig.21)	Asteraceae
							345,1110	343,0937

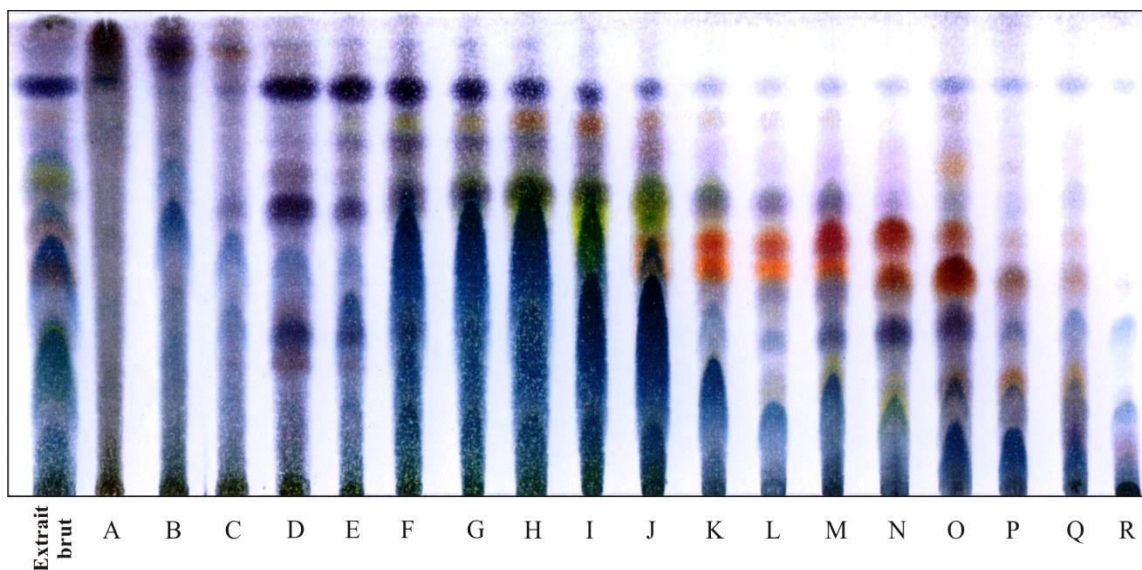
\* Adduit à l'hème (masse de l'hème = 616)

### III.4. Résultats complémentaires concernant l'étude phytochimique bioguidée de l'extrait de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

L'analyse par CCM (cf. III.3.2.1) de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* a montré une complexité en métabolites secondaires plus élevée que ce qui est habituellement observé en phytochimie. En plus de son profil phytochimique particulier, cet extrait présente une activité antiplasmodiale *in vitro* assez intéressante (cf. Tableau 19). Cet extrait donne également des résultats avec le test de fixation à l'hème (cf. Tableau 21).

#### III.4.1. Rendement du fractionnement à l'aide de la CPC

Dans le tableau 30, sont regroupées en 18 lots, les 120 fractions obtenues. La majorité des fractions ont été regroupées en fonction de leur profil chromatographique commun (Figure 62). Les lots C, E, F, G et L ne sont constitués que par une seule fraction ; alors que les deux derniers lots (Q et R) correspondent aux fractions de l'extrusion de la phase stationnaire.



**Figure 62** : CCM récapitulative des 18 lots de fractions issues de la CPC de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*  
Gel de silice type Kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Éluant : Cyclohexane/Acétate d'éthyle (4:6). Révélateur : Vanilline sulfurique

**Tableau 30** : Résultats du fractionnement par CPC de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

Lot	Fractions	Masse (mg)	Rendement (%)
<b>ACG-A</b>	<b>1-27</b>	<b>626</b>	<b>13,2</b>
ACG-B	28-29	135	2,8
<b>ACG-C</b>	<b>30</b>	<b>53</b>	<b>1,1</b>
ACG-D	31-33	218	4,6
<b>ACG-E</b>	<b>34</b>	<b>78</b>	<b>1,6</b>
ACG-F	35	124	2,6
<b>ACG-G</b>	<b>36</b>	<b>137</b>	<b>2,9</b>
ACG-H	37-38	252	5,3
<b>ACG-I</b>	<b>39-41</b>	<b>334</b>	<b>7,0</b>
ACG-J	42-46	406	8,5
<b>ACG-K</b>	<b>47-49</b>	<b>176</b>	<b>3,7</b>
<b>ACG-L</b>	<b>50</b>	<b>49</b>	<b>1,0</b>
<b>ACG-M</b>	<b>51-54</b>	<b>169</b>	<b>3,6</b>
<b>ACG-N</b>	<b>55-68</b>	<b>370</b>	<b>7,8</b>
<b>ACG-O</b>	<b>69-83</b>	<b>334</b>	<b>7,0</b>
ACG-P	84-90	86	1,8
<b>ACG-Q</b>	<b>91-107</b>	<b>208</b>	<b>4,4</b>
ACG-R	108-120	811	17,1

#### III.4.2. Fractionnement par CC flash des lots D, E, F, G et H issus de la CPC de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

Parmi les différentes préfractions obtenues à l'issue de la CPC de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*, seuls le lot D et les lots regroupés EFGH ont fait l'objet d'un fractionnement à l'aide de la chromatographie sur colonne dans le but d'obtenir quelques fractions à composé majoritaire. Deux critères ont conditionné ce choix :

- ↳ Le positionnement plus apolaire de ces lots de fractions CPC ;
- ↳ Le fait que ces lots présentent un profil phytochimique intéressant :

- ♦ Soit par sa simplicité, pouvant conduire rapidement à l'isolement de composés plus ou moins purs. En effet le profile chromatographique du lot D (cf. **figure 63**) montre trois spots majoritaires assez éloignés ( $R_f$  : 0,33 ; 0,59 ; 0,84).

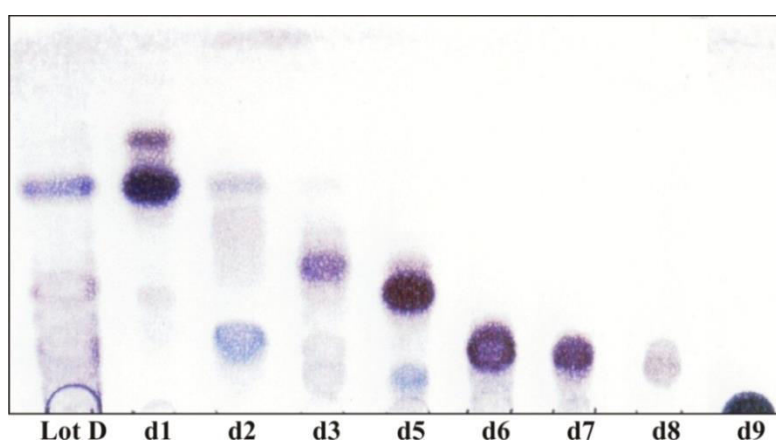
♦ Soit par sa complexité, nécessitant encore un fractionnement afin d'arriver à fractions à composé majoritaire. C'est ainsi que nous avons regroupé les lots E, F, G et H pour mieux séparer les métabolites qu'ils renferment.

### III.4.2.1. Résultats avec le lot D

Dans le **tableau 31**, sont regroupées en 9 lots, les 148 fractions obtenues. Les fractions ont été regroupées en fonction de leur profil chromatographique commun (**Figure 63**).

**Tableau 31** : Résultats du fractionnement par CC flash du lot D des fractions issues de la CPC de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

Lot	Fractions	Masse (mg)	Rendement (%)
ACG-d1	1-25	18	8,3
ACG-d2	26-34	42	19,3
ACG-d3	35-36	3	1,4
ACG-d4	37-39	7	3,2
<b>ACG-d5</b>	<b>40-41</b>	<b>5</b>	<b>2,3</b>
ACG-d6	42-57	28	12,8
ACG-d7	58-63	7	3,2
<b>ACG-d8</b>	<b>64-77</b>	<b>6</b>	<b>2,8</b>
ACG-d9	78-148	89	43,6



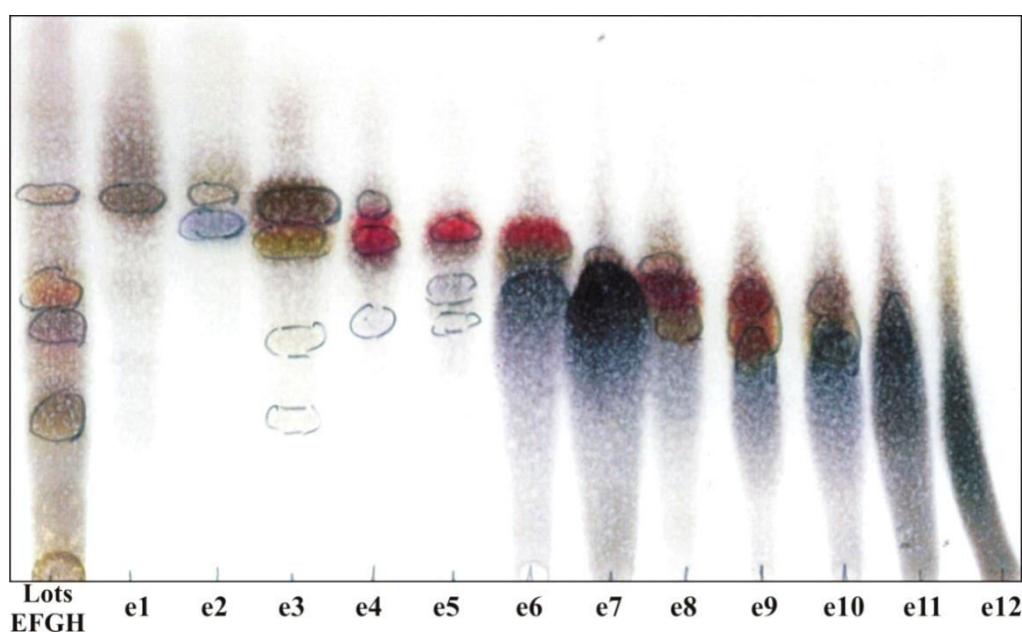
**Figure 63** : CCM récapitulative des fractions regroupées obtenues lors de la CC flash du lot D (*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*)  
Gel de silice type Kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Éluant : Cyclohexane/AcOEt (4:6). Révélateur : Vanilline sulfurique

### III.4.2.2. Résultats avec les lots EFGH

Dans le **tableau 32**, sont regroupées en 13 lots, les 150 fractions obtenues. Les fractions ont été regroupées en fonction de leur profil chromatographique commun (**Figure 64**).

**Tableau 32** : Résultats du fractionnement par CC flash des lots regroupés EFGH issus de la CPC de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

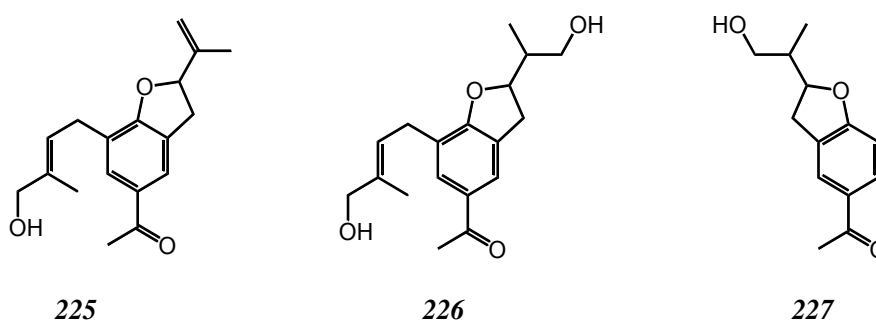
Lot	Fractions	Masse (mg)	Rendement (%)
ACG-e1	1-39	16	2,7
ACG-e2	40-57	9	1,5
ACG-e3	58-66	17	2,9
ACG-e4	67-68	5	0,8
ACG-e5	69-70	9	1,5
ACG-e6	71-74	32	5,4
ACG-e7	75-80	52	8,8
ACG-e8	81-86	38	6,4
ACG-e9	87-92	33	5,6
ACG-e10	93-97	22	3,7
<b>ACG-e11</b>	<b>98-101</b>	<b>49</b>	<b>8,3</b>
ACG-e12	102-117	57	9,7
ACG-e13	118-150	164	27,8



**Figure 64** : CCM récapitulative des fractions obtenues lors de la CC flash des lots regroupés EFGH (*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*)  
Gel de silice type Kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Éluant : Cyclohexane/AcOEt (4:6). Révélateur : Vanilline sulfurique

### III.4.3. Résultats de l'analyse en RMN des fractions à composé majoritaire

Du fait des difficultés rencontrées lors de la purification des fractions ACG-d8 et ACG-e11, les interprétations de leurs spectres RMN ne permettent pas une identification exhaustive des composés majoritaires présents dans ces fractions. Cela ne veut pas dire que les structures chimiques **226** et **227** proposées respectivement pour chacune des fractions n'existent pas. La fraction ACG-d5 ne comporte presque pas d'impuretés pouvant gêner la lecture des spectres  $^1\text{H}$  NMR et  $^{13}\text{C}$  NMR, d'où la facilité avec laquelle la structure chimique **225** [(E)-1-(7-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl)-2-(prop-1-en-2-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl) ethanone] a été élucidée (**Figure 65**).



**Figure 65** : Structures probables des dérivés hydroxyacétophénoniques isolés lors du fractionnement de l'extrait AcOEt d'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*  
Composé ACG-d5 **225**, Composé ACG-d8 **226**, Composé ACG-e11 **227**

#### III.4.3.1. Produit issu de la fraction ACG-d5

L'interprétation du spectre proton de cette fraction (cf. **Annexe 3.1. Figure 83**) nous donne les résultats suivants:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 7,66 (2H, d,  $J = 2,2$  Hz), 7,58 (2H, d,  $J = 2,2$  Hz), 7,26 (1H, s), 5,38 (2H, t,  $J = 7,4$  Hz), 5,30 (1H, s), 5,00 (2H, s), 4,88 (2H, s), 4,40 (2H, d,  $J = 7,3$  Hz), 4,28 (2H, d,  $J = 11,7$  Hz), 4,23 (4H, dd,  $J = 35,0$  Hz et 11,7 Hz), 4,19 (2H, d,  $J = 11,7$  Hz), 3,55- 3,45 (3H, m), 3,41 (2H, dd,  $J = 14,3$  Hz et 7,9 Hz), 2,98 (2H, dd,  $J = 14,7$  Hz et 8,8 Hz), 2,84 (2H, dd,  $J = 14,7$  Hz et 2,1 Hz), 2,53 (7H, s), 1,81 (14H, s).

L'interprétation du spectre carbone de cette fraction (cf. **Annexe 3.1. Figure 84**) nous donne les résultats suivants:

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 197,35 (s), 158,51 (s), 146,41 (s), 135,25 (s), 130,63 (s), 130,18 (s), 129,96 (s), 128,50 (s), 126,58 (s), 125,98 (s), 111,56 (s), 77,94 (s), 77,48 (s), 77,16 (s), 76,84 (s), 62,09 (s), 38,52 (s), 29,79 (s), 26,41 (s), 22,27 (s), 18,28 (s).



### III.4.3.2. Produit de la fraction ACG-d8

L'interprétation du spectre proton de cette fraction (**cf. Annexe 3.1. Figure 85**) nous donne les résultats suivants:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 7,89 (1H, s), 7,79 (1H, s), 7,28-7,24 (4H, m), 5,39-5,32 (1H, m), 4,88 (1H, d,  $J = 2,7$  Hz), 4,51 (2H, dd,  $J = 14,1$  Hz et 7,4 Hz), 4,11 (1H, d,  $J = 11,5$  Hz), 3,60 (1H, dd,  $J = 14,6$  Hz et 9,4 Hz), 3,49 (6H, s), 3,45 (3H, s), 3,22 (1H, dd,  $J = 14,6$  Hz et 6,6 Hz), 2,56 (4H, s), 2,53 (2H, s), 1,89 (1H, s), 1,81 (7H, s), 1,42 (1H, s), 1,32 (3H, s), 1,29 (2H, s), 1,25 (10H, s), 1,10 (3H, s), 0,07 (1H, s).

L'interprétation du spectre carbone de cette fraction (**cf. Annexe 3.1. Figure 86**) nous donne les résultats suivants:

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 131,18 (s), 125,08 (s), 124,78 (d,  $J = 11,4$  Hz), 95,22 (s), 81,17 (s), 77,33 (s), 77,01 (s), 76,69 (s), 71,43 (s), 61,31 (s), 55,59 (s), 50,78 (s), 29,70 (s), 28,61 (s), 26,35 (s), 25,21 (s), 23,71 (s), 21,40 (s).

### III.4.3.3. Produit de la fraction ACG-e11

L'interprétation du spectre proton de cette fraction (**cf. Annexe 3.1. Figure 87**) nous donne les résultats suivants:

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 7,64 (5H, d,  $J = 13,9$  Hz), 7,19 (5H, dd,  $J = 39,1$  Hz et 21,4 Hz), 6,25 (3H, d,  $J = 16,4$  Hz), 5,31 (5H, t,  $J = 15,7$  Hz), 4,92 (5H, d,  $J = 52,2$  Hz), 4,41-4,15 (6H, m), 4,07 (5H, dd,  $J = 36,5$  Hz et 20,3 Hz), 3,77 (4H, s), 3,42 (12H, d,  $J = 32,6$  Hz), 3,10-2,68 (5H, m), 2,52 (5H, s), 1,78 (16H, s), 1,72 (7H, d,  $J = 12,6$  Hz), 1,40 (5H, d,  $J = 16,6$  Hz), 1,35-1,20 (7H, m), 1,04 (5H, d,  $J = 63,7$  Hz).

L'interprétation du spectre carbone de cette fraction (**cf. Annexe 3.1. Figure 88**) nous donne les résultats suivants:

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 171,97 (s), 156,36 (s), 147,14 (s), 146,93 (s), 146,37 (s), 135,03 (s), 130,32 (s), 129,84 (s), 129,43 (d,  $J = 14,2$  Hz), 129,09 (s), 128,52 (s), 127,58-127,19 (m), 126,81-126,52 (m), 126,41 (s), 121,54-121,13 (m), 114,39 (d,  $J = 8,9$  Hz), 111,43 (s), 77,69 (s), 77,42 (d,  $J = 11,5$  Hz), 77,16 (s), 76,84 (s), 68,49 (s), 61,78 (d,  $J = 16,8$  Hz), 61,24 (s), 38,49 (s), 30,04-29,40 (m), 29,02 (s), 28,63 (s), 28,34 (d,  $J = 5,6$  Hz), 26,64-26,15 (m), 25,83 (dd,  $J = 14,0$  Hz et 11,8 Hz), 25,20 (s), 22,27 (d,  $J = 4,1$  Hz), 21,64 (s), 18,26 (s), 17,98 (d,  $J = 10,5$  Hz), 13,93 (s).

### III.4.4. Résultats de l'analyse de l'activité antiparasitaire des fractions issues de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

Dans le **tableau 33** sont reportées les moyennes des valeurs d'inhibition des activités antiplasmodiales et antitrypanosomiales en fonction des concentrations décroissantes de chacun des échantillons testés. Certains lots de fractions obtenues par CPC ont été évalués au même titre que les fractions à composé majoritaire issu de la CC des lots D et EFGH. Globalement l'activité est médiocre ; seule la **fraction d8** présente une activité antiparasitaire *in vitro* intéressante, notamment vis-à-vis de la souche chloroquine-résistante de *P. falciparum*.

**Tableau 33** : Résultats de l'évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro* de quelques fractions issues de l'extrait AcOEt d'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

	Activité antiplasmodiale			Activité antitrypanosomiale		
	<b>Souche FcB1/Colombia <i>Plasmodium falciparum</i></b>			<b>Forme sanguine, souche 93 <i>Trypanosoma brucei brucei</i></b>		
	% d'inhibition pour					
	50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
ACG-B	94,0 ±3,2	61,5 ±6,5	26,1 ±10,0	94,8 ±2,0	90,2 ±1,6	13,1 ±11,0
ACG-I	95,3 ±1,9	38,5 ±5,5	-	92,5 ±3,8	82,8 ±4,4	22,9 ±8,0
ACG-KL	93,7 ±3,0	38,4 ±5,0	-	82,7 ±8,5	78,8 ±4,7	-
ACG-NO	90,5 ±1,0	36,0 ±6,8	10,5 ±4,9	84,8 ±7,2	80,9 ±6,1	-
ACG-d5	95,9 ±0,4	23,6 ±5,3	6,2 ±0,7	93,9 ±5,0	93,5 ±3,8	-
<b>ACG-d8</b>	99,1 ±1,4	80,4 ±16,4	<b>44,3 ±19,6</b>	95,3 ±3,0	91,2 ±7,1	28,0 ±7,1
ACG-e11	96,8 ±1,2	55,7 ±1,4	9,7 ±4,1	93,0 ±3,7	85,3 ±2,4	23,7 ±8,2

### III.5. Composés isolés de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana*

Les données expérimentales de cette partie ont fait l'objet d'un article dans le journal *Fitoterapia* (cf. **Annexe 8**).

### III.5.1. Résultats du préfractionnement à l'aide de la CC Flash

La préparation de la CC flash a été effectuée tel qu'il est décrit dans la section II.4.2.1. Après dépôt de 10 g d'extrait de *Pentzia monodiana* dans la colonne, l'élution a été réalisée par gradient de solvants constitué du mélange cyclohexane /AcOEt (100:0, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, v/v). La collecte nous a fourni 32 fractions (**Tableau 34**).

**Tableau 34** : Résultats du fractionnement par CC flash de l'extrait de *Pentzia monodiana*

Fractions	Masse (mg)	Rendement (%)	Observations
1-12	nd	nd	
13-14	562	5,6	Kétopélénoïde B <b>99</b> (recristallisé dans l'AcOEt)
15-16	nd	nd	
17-22	1000	nd	Purification de l'artécanine <b>90</b> /CPC
23-24	nd	nd	
25	13	0,1	Mélange de Chrysosplénétine <b>49</b> et de Cirsilinéol <b>51</b>
26-28	1000	10	Purification de la 3'-O-méthyleupatorine <b>254</b> et artémétine <b>47</b> /HPLC préparative
29-31	nd	nd	
32	nd	nd	Mélange de Sécotanapartholide A <b>104</b> et de son isomère le 5-βH-Sécotanapartholide <b>251</b>

### III.5.2. Résultats de la purification par HPLC préparative du lot F26-28, fractions issues de la CC de l'extrait de *Pentzia monodiana*

Au total 96 fractions ont été collectées. Les fractions regroupées F68-72 (3,4 mg) et F80-85 (4,1 mg) ont permis d'isoler respectivement la 3'-O-méthyleupatorine **254** et l'artémétine **47**.

### III.5.3. Résultat du fractionnement à l'aide de la CPC

Afin de préparer deux expériences de fractionnement par CPC différentes, deux systèmes biphasiques de solvants ont été préparés :

↳ L'un quaternaire (S1), préparé en mélangeant Cyclohexane/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O dans les proportions suivantes 1/4/1/4 (v/v) ;

↳ L'autre tertiaire (S2), à base du mélange AcOEt/THF/H<sub>2</sub>O dans les proportions suivantes 4/2/5 (v/v).

Les phases résultantes ont été séparées juste avant l'utilisation. Les phases supérieures ont été utilisées comme phases mobiles, tandis que les phases inférieures ont été utilisées comme phases stationnaires. Le rotor 250 ml est utilisé pour les deux expériences. A chaque fois, il a été rempli en mode descendant avec la phase stationnaire correspondante avant sa mise en rotation à 1000 tours/min. Ensuite, la phase supérieure correspondante a été pompée à travers la phase stationnaire en mode ascendant à un débit de 20 ml/min jusqu'à équilibre entre les deux phases. Pendant l'éluion la rotation a été amenée à 1600 tours/min et le débit à 5 ml/min. L'étape d'extrusion a été initiée en mode ascendant en utilisant le solvant de phase inférieure en tant que phase mobile afin de récupérer la totalité de l'échantillon résiduel.

#### III.5.3.1. Fractionnement de l'extrait brut AcOEt de *Pentzia monodiana*

Un échantillon de 400 mg de l'extrait brut a été dissous dans un mélange 1: 1 (v/v) du système biphasique (S1), avant son injection dans la boucle à 10 ml. Un volume total de 1,5 litre de phase mobile a été recueilli dans des fractions de 10 ml ; soit 150 fractions.

Le sécotanapartholide B **105** a été obtenu à partir des fractions regroupées F10-13 (14 mg). L'iso-sécotanapartholide **97** a été isolé entre les fractions 16 et 20 (23 mg).

#### III.5.3.2. Fractionnement du lot F26-28 issu de la CC de l'extrait de *Pentzia monodiana*

De la même manière que précédemment, un échantillon de 434 mg du lot F26-28 a été dissous dans le système biphasique de (S2) avant d'être injecté. L'artécanine **90** a été isolée à partir de la fraction F17 (17 mg).

### III.5.4. Résultats de l'analyse en RMN des composés isolés

#### III.5.4.1. Composé 44B (Kétopélénolide B)

Composé d'aspect cristallin, incolore, donnant des adduits en EIMS<sup>+</sup> : 273 (M+Na<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>Na), 251 (M+H<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>) et en HREIMS m/z 273,1578 (M+Na<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>Na). Le spectre RMN proton (cf. Annexe 6.2. Figure 88) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi:

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 1,10 (3H, d, *J* = 6,7 Hz, H-15), 1,21 (3H, d, *J* = 7,3 Hz, H-13), 1,37 (1H, m, H-8b), 1,57 (1H, t, *J* = 12 Hz, H-5b), 1,64 (3H, s, H-14), 1,77 (1H, m, H-8a), 2,03 (1H, t, *J* = 12 Hz, H-5a), 2,18 (1H, m, H-9b), 2,25 (1H, m, H-7), 2,36 (1H, m, H-9a), 2,84 (1H, m, H-4), 3,02 (1H, m, H-11), 3,09 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H-2), 3,59 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H-6), 5,53 (1H, t, *J* = 8,5 Hz, H-1).

#### III.5.4.2. Composé FR-1T-G (5-βH-Sécotanapartholide)

Huile jaunâtre donnant un adduit en EIMS<sup>+</sup> : 301 (M+Na<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>Na). Le spectre RMN proton (cf. Annexe 6.2. Figure 89) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi :

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 1,58 (3H, s, H-15), 1,90 (2H, m, H-8), 2,21 (3H, s, H-14), 2,60 (2H, m, H-9), 2,69 (1H, d, *J* = 9,98 Hz, H-5), 3,46 (1H, m, H-7), 4,46 (1H, dd, *J* = 9,98 Hz et 2,10 Hz, H-6), 5,78 (1H, d, *J* = 1,42 Hz, H-13a), 6,07 (1H, d, *J* = 5,67 Hz, H-2), 6,37 (1H, d, *J* = 1,43 Hz, H-13b), 7,48 (1H, d, *J* = 5,65 Hz, H-3).

#### III.5.4.3. Composé CL-F24 (Sécotanapartholide A et B)

Huile jaunâtre donnant un adduit en EIMS<sup>+</sup> : 301 (M+Na<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>Na). Le spectre RMN proton (cf. Annexe 6.2. Figure 90) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi :

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 1,55 (3H, s, H-15), 1,96 (2H, m, H-8), 2,19 (3H, s, H-14), 2,58 (2H, m, H-9), 2,59 (1H, d, *J* = 10.7 Hz, H-5), 3,72 (1H, m, H-7), 4,61 (1H, dd, *J* = 10.6, 2,98 Hz, H-6), 5,67 (1H, d, *J* = 1,34 Hz, H-13a), 6,15 (1H, d, *J* = 5,70 Hz, H-2), 6,31 (1H, d, *J* = 1,35 Hz, H-13b), 7,53 (1H, d, *J* = 5,70 Hz, H-3).

#### III.5.4.4. Composé CPC-S1-F16-20 (Iso-sécotanapartholide)

Huile jaunâtre donnant un adduit en EIMS<sup>+</sup> : 301 (M+Na<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>Na). Le spectre RMN proton (cf. Annexe 6.2. Figure 91) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi :

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 1,85 (1H, m, H-8b), 1,94 (1H, m, H-8a), 2,12 (3H, s, H-14), 2,14 (3H, s, H-15), 2,31 (1H, dd, *J* = 17,50 Hz et 1,31 Hz, H-2b), 2,54 (1H, dd, *J* = 17,48, 1,33 Hz, H-9b), 2,59 (1H, dd, *J* = 16,98 Hz et 1,40 Hz, H-9a), 2,82 (1H, m, H-2a), 3,09 (1H, m, H-7), 4,72 (1H, m, H-3), 4,97 (1H, d, *J* = 5,38 Hz, H-6), 5,67 (1H, d, *J* = 1,25 Hz, H-13b), 6,35 (1H, d, *J* = 1,23 Hz, H-13a).

#### III.5.4.5. Composé CPC-S2-F17 (Artécanine)

Solide jaune donnant un adduit en EIMS<sup>+</sup> : 301 (M+Na<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>Na). Le spectre RMN proton (cf. Annexe 6.2. Figure 92) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi :

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 1,13 (3H, s, H-14), 1,55 (3H, s, H-15), 1,65 (1H, m, H-8b), 1,75 (1H, m, H-9b), 1,94 (1H, m, H-9a), 2,09 (1H, m, H-8a), 2,87 (1H, d, *J* = 5,68 Hz, H-5), 3,29 (1H, d, *J* = 2,87 Hz, H-3), 3,30 (1H, m, H-7), 3,55 (1H, d, *J* = 2,74 Hz, H-2), 4,09 (1H, t, *J* = 5,56 Hz, H-6), 5,43 (1H, d, *J* = 1,64 Hz, H-13b), 6,19 (1H, d, *J* = 1,57 Hz, H-13a).

#### III.5.4.6. Composé COL-155-L (3'-O-méthyleupatorine)

Composé donnant des adduits en EIMS<sup>+</sup> : 381 (M+Na<sup>+</sup>, C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>Na), 359 (M+H<sup>+</sup>, C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>O<sub>7</sub>). Le spectre RMN proton (cf. Annexe 6.2. Figure 93) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi:

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 12,76 (1H, s, 5-OH), 7,53 (1H, dd, *J* = 11,2 Hz et 2,4 Hz, H-6'), 7,34 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-2'), 6,98 (1H, d, *J* = 11,2 Hz, H-5'), 6,60 (1H, s, H-8), 6,55 (1H, s, H-3), 3,99 (3H, s, 6-OMe), 3,98 (3H, s, 7-OMe), 3,97 (3H, s, 3'-OMe), 3,93 (3H, s, 4'-OMe).

#### III.5.4.7. Composé COL-155-F (Artémétine)

Composé donnant des adduits en EIMS<sup>+</sup> : 411 (M+Na<sup>+</sup>, C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>Na), 389 (M+H<sup>+</sup>, C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>8</sub>). Le spectre RMN proton (cf. Annexe 6.2. Figure 94) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi:

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 12,61 (1H, s, 5-OH), 7,73 (1H, dd, *J* = 11,2 Hz et 2,4 Hz, H-6'), 7,69 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-2'), 6,99 (1H, d, *J* = 11,2 Hz, H-5'), 6,51 (1H, s, H-8), 3,97 (3H, s, 3-OMe), 3,97 (3H, s, 6-OMe), 3,97 (3H, s, 7-OMe), 3,93 (3H, s, 3'-OMe), 3,86 (3H, s, 4'-OMe).

#### III.5.4.8. Composé COL-155-K (Cirsilinéol)

Le spectre RMN proton (cf. **Annexe 6.2. Figure 95**) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi :

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 12,73 (1H, *s*, 5-OH), 7,50 (1H, *dd*,  $J = 2,2$  Hz et 9,0 Hz, H-6'), 7,32 (1H, *d*,  $J = 2,2$  Hz, H-2'), 6,96 (1H, *d*,  $J = 9,0$  Hz, H-5'), 6,58 (1H, *s*, H-3), 6,53 (1H, *s*, H-8), 4,02 (1H, *s*, 4'-OH), 3,97 (3H, *s*, 3'-OMe), 3,96 (3H, *s*, 7-OMe), 3,95 (3H, *s*, 6-OMe).

#### III.5.4.9. Composé COL-155-I (Chrysosplénétine)

Le spectre RMN proton (cf. **Annexe 6.2. Figure 96**) obtenu avec ce produit a été interprété ainsi :

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) 12,63 (1H, *s*, 5-OH), 7,70 (1H, *d*,  $J = 2,20$  Hz, H-2'), 7,66 (1H, *dd*,  $J = 8,20$  Hz et 2,20 Hz, H-6'), 7,04 (1H, *d*,  $J = 8,20$  Hz, H-5'), 6,50 (1H, *s*, H-8), 3,97 (3H, *s*, -OMe), 3,96 (3H, *s*, -OMe), 3,92 (3H, *s*, -OMe), 3,86 (3H, *s*, -OMe).

#### III.5.5. Résultats de l'activité antiparasitaire des composés isolés

Dans le **tableau 35** sont reportées les moyennes des valeurs d'inhibition des activités antiplasmodiales et antitrypanosomiales en fonction des concentrations décroissantes de chacun des composés testés. Globalement l'activité est médiocre. Les produits FR-1T-G (5- $\beta$ H-séco-tanapartholide) et COL-155-I (chrysosplénétine) se démarquent respectivement, par leur activité antiplasmodiale et antitrypanosomiale, relativement supérieure.

**Tableau 35** : Résultats de l'évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro*  
des composés isolés de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana*

	Activité antiplasmodiale			Activité antitrypanosomiale		
	Souche FcB1/Colombia <i>Plasmodium falciparum</i>			Forme sanguine, souche 93 <i>Trypanosoma brucei brucei</i>		
	% d'inhibition pour					
	50 µM	10 µM	1 µM	50 µM	10 µM	1 µM
<b>44B</b> (Kétopélénoïde B = 250 g/mol)	17,0 ±13,5	5,4 ±10,5	-	95,8 ±3,4	39,5 ±6,8	-
<b>CL-F24</b> (Sécotanaparholide A = 278 g/mol)	99,5 ±0,7	45,2 ±2,1	-	50,8 ±8,1	9,4 ±8,8	-
<b>COL-155-F</b> (Artémétine = 388 g/mol)	88,4 ±0,8	56,1 ±4,6	1,2 ±6,2	98,1 ±4,9	90,5 ±3,0	37,4 ±1,7
<b>COL-155-I</b> (Chryso-splénétine = 374 g/mol)	85,5 ±4,9	69,4 ±7,6	31,7 ±8,4	95,5 ±3,9	82,4 ±4,2	<b>32,2 ±8,4</b>
<b>COL-155-K</b> (Cirsilinéol = 344 g/mol)	48,9 ±4,4	38,8 ±6,0	16,3 ±15,0	88,4 ±7,9	80,6 ±1,7	31,0 ±15,0
<b>COL-155-L</b> (3'-O- méthyleupatorine = 358 g/mol)	62,4 ±6,4	19,7 ±2,8	4,7 ±5,1	96,9 ±2,9	91,8 ±16,0	16,0 ±6,8
<b>CPC-S1-F16-20</b> (Iso- sécotanaparholide = 278 g/mol)	99,7 ±0,8	40,6 ±6,7	3,5 ±4,8	38,7 ±10,8	13,8 ±11,8	-
<b>FR-1T-G</b> (5-βH- Sécotanaparholide = 278 g/mol)	97,0 ±4,9	69,4 ±7,6	<b>31,7 ±8,4</b>	102,4 ±2,7	46,7 ±8,4	24,0 ±3,1
<b>CPC-S1-F10-13</b> (séco-tanaparholide B) (278 g/mol)	99,8 ±0,6	51,6 ±4,6	1,2 ±6,2	67,0 ±9,4	-	-



## Chapitre IV : DISCUSSION

### IV.1. Diagnose des parties aériennes issues des espèces végétales étudiées

Les résultats de l'étude microscopique des poudres issues des parties aériennes des différentes espèces collectées sont en accord avec les quelques données de la littérature rapportées notamment par Boukhalfa D. (167) et par Ouyahia A. (241). La majorité des éléments microscopiques observés dans ces poudres sont des débris provenant des divers organes constituant les sommités fleuries, tels que les tiges, les feuilles et les capitules. La présence d'éléments correspondants aux poils glanduleux pluricellulaires bisériés, aux grains de pollen tricolporés permet de confirmer l'appartenance de ces végétaux à la famille des Astéracées (242).

Les données bibliographiques concernant l'étude microscopique des espèces du genre *Pulicaria* sont quasiment inexistantes. Néanmoins, nous avons pu comparer quelques résultats de l'étude microscopique des poudres issues des parties aériennes de *P. crispa* et de *P. incisa* avec ceux des travaux de Ciccarelli *et al.* (243). Bien que conservant tous les caractères communs aux Astéracées, nous avons pu constater que les poils glanduleux des deux espèces sahariennes étaient nettement moins allongés que ceux de l'espèce européenne *Pulicaria dysenterica*. En effet, les poils glanduleux de *P. crispa* et de *P. incisa* sont plus arrondis et apparemment de plus grande taille (**Figure 56**).

#### IV.1.1. *Artemisia campestris ssp. glutinosa*

Nous avons retrouvé les mêmes caractères microscopiques déjà décrits dans les rares travaux antérieurs (167,241). Les éléments microscopiques fréquemment retrouvés dans la poudre des parties aériennes de l'*Artemisia campestris ssp. glutinosa*, sont représentés par les :

↳ Fragments d'épiderme reconnaissables à leurs cellules polygonales recouvertes d'une épaisse cuticule ondulée. Ces fragments d'épidermes portent également des petits stomates anomocytiques.

↳ Fragments du parenchyme palissadique souvent constitués par deux à trois assises de cellules allongées verticalement ;

↳ Canaux sécréteurs d'oléorésine, plus abondants au niveau des débris de bractées. Ils sont facilement repérables grâce à la présence de résine sous forme de masses sphériques, de couleur brune ;

↳ Poils tecteurs, peu nombreux, généralement du type "navette", formés de deux branches droites allongées horizontalement ;

↳ Poils glanduleux, encore moins nombreux, caractéristiques des Astéracées ;

↳ Sacs polliniques provenant des étamines, remplis de grains de pollen immatures ;

↳ Grains de pollen tricolporés à exine légèrement échinulée.

À la lecture de ces résultats, il se dégage que les éléments microscopiques les plus caractéristiques de cette poudre de l'*A. campestris* ssp. *glutinosa* sont bien les canaux sécréteurs d'oléorésine entourés de cellules scléreuses appartenant aux bractées (cf. **Figure 52**). La présence de microsphères brunes correspondant à l'oléorésine semble également un caractère propre à cette sous-espèce d'armoise.

#### **IV.1.2. *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis***

Les observations microscopiques de cette poudre convergent avec les travaux antérieurs (167,241). Les éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de cette sous-espèce armoise, sont représentés par des :

↳ Fragments d'épiderme recouverts d'une épaisse cuticule portant des stomates anomocytiques et une multitude d'empreintes circulaires correspondant aux insertions des poils tecteurs ;

↳ Très nombreux poils tecteurs "en navette" médifixe, à deux branches flexueuses ; ils sont généralement détachés de l'épiderme ;

↳ Poils glandulaires caractéristiques des Astéracées ; ils sont relativement rares ;

↳ Nombreux débris formés de petites cellules parenchymateuses, de faisceaux conducteurs libéro-ligneux et de canaux sécréteurs d'une oléorésine verdâtre ;

↳ Rares grains de pollen tricolporés à exine ondulée.

À la suite de cette étude microscopique, il semble que les éléments les plus spécifiques de la poudre de sommités d'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* sont la présence de nombreux poils tecteurs unicellulaires en "T" ; ces poils tecteurs sont à l'origine de l'aspect tomenteux des parties aériennes de cette espèce. L'existence de canaux sécréteurs d'oléorésine amorphe, de couleur verdâtre (**Figure 53**) est aussi un élément de diagnose au même titre que l'observation de grains de pollen tricolporés à exine ondulée.

#### **IV.1.3. *Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens***

Les résultats de l'étude microscopique de la poudre issue des parties aériennes de cette sous-espèce sont en accord avec les travaux de Boukhalfa D. (1967). Les principaux éléments microscopiques observés étant des :

↳ Fragments d'épiderme recouvert d'une épaisse couche de cuticule ce qui permet à la plante de réduire considérablement sa perte en eau par évaporation ; les stomates sont du type paracytiques ;

↳ Fragment du parenchyme palissadique constitué de deux à trois assises de cellules chlorophylliennes allongées verticalement ;

↳ Poils tecteurs assez nombreux, pluricellulaires et unisériés, à articles élargis à la base alors que l'article terminal est très allongé et effilé ;

↳ Poils glanduleux sont pluricellulaires bisériés caractéristiques des Astéracées ;

↳ Grains de pollen tricolporés à exine ;

↳ Débris provenant des pièces florales.

L'analyse de ces résultats permet de dégager les éléments microscopiques les plus caractéristiques de la poudre d'*Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens* : il s'agit en premier lieu de la présence de stomates paracytiques au niveau des fragments d'épiderme. De même que l'existence des nombreux poils tecteurs pluricellulaires très allongés constitue un autre élément de diagnose (**Figure 54**).

#### **IV.1.4. *Pentzia monodiana***

Les résultats de l'observation microscopique de cette poudre sont en accord avec le peu de données bibliographiques disponibles (167,244). Les éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes de cette sous-espèce armoise, sont représentés par des :

↳ Poils tecteurs "en navette" de grande dimension, à pied unicellulaire ;

↳ Fragments d'épiderme inférieur portant des stomates anomocytiques et de poils glanduleux pluricellulaires bisériés caractéristiques des Astéracées ;

↳ Fragments formés de cellules papilleuses provenant de l'épiderme des corolles ;

↳ Grains de pollen tricolporés à exine fortement échinulée en concordance avec ce qui est décrit dans la littérature scientifique (245).

#### **IV.1.5. *Pulicaria crispa***

Parmi les éléments microscopiques présents dans la poudre des parties aériennes (cf. III.1.5) quelques-uns peuvent être retenus comme éléments de diagnose pour cette espèce de pulicaria saharienne. Il s'agit notamment des :

↳ Fragments du parenchyme palissadique constitués de cellules "bâtonnet" chargées de chloroplastes d'un vert sombre ;

↳ Fragments de bractée formés de sclérides allongées ;

↳ Fragment d'épiderme portant des stomates paracytiques et dont la cuticule est marquée par la présence d'empreintes correspondant aux insertions des poils tecteurs ;

↳ Poils tecteurs "en navette" médifixes, à branches flexueuses, plus allongées que celles des poils tecteurs de l'*Artemisia judaica* ;

↳ Grains de pollen tricolporés à exine échinulée, mais à épines moins grandes que celles des grains de pollen de *Pentzia monodiana*.

#### IV.1.6. *Pulicaria incisa*

Les caractères microscopiques de la poudre issue des parties aériennes de cette espèce sont similaires à ceux du *P. crisper*, à savoir :

- ↳ Les fragments d'épiderme avec stomates paracytiques ;
- ↳ Les poils glandulaires pluricellulaires bisériés, de grande dimension ;
- ↳ Les grains de pollen à exine fortement échinulée ;
- ↳ Les fragments du pappus.

Les caractères microscopiques différentiels avec *P. crisper* étant principalement la présence de nombreux poils tecteurs pluricellulaires unisériés et la présence de débris de bractée à sommet plus aigu.

#### IV.2. Bilan de l'analyse phytochimique des espèces végétales sélectionnées

À la lecture des rendements d'extraction obtenus avec le SpeedExtractor E-914, il s'avère que cette technique d'extraction solide-liquide pressurisé, est à la fois efficace et rapide, ne nécessitant que peu de solvant pour l'extraction. Contrairement à la méthode d'extraction classique (par Soxhlet), la PLE possède l'avantage d'être automatisable (246). Les rendements les plus élevés ont été obtenus avec l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* et l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*, respectivement 15,10 % et 14,89 % ; alors que le rendement le plus faible est réalisé avec *Pulicaria incisa* (4,14 %).

L'analyse préliminaire (par les réactifs généraux) met en évidence de nombreux composés du métabolisme secondaire au niveau des extraits bruts AcOEt. Diverses catégories de métabolites ont été détectées, notamment les terpénoïdes et les composés phénoliques. Ces derniers en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm au contact du réactif de Neu sont constamment présents dans les extraits AcOEt des parties aériennes des quatre espèces d'Astéracées étudiées. Les profils de la CCM de ces extraits confirment la présence de divers terpénoïdes et de composés aromatiques révélés respectivement par la vanilline sulfurique et par le réactif de Neu (**Figures 58-61**). Notons que le profil CCM de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* se démarque des autres par sa richesse en métabolites donnant de nombreux spots de Rf plus ou moins rapprochés, voir superposés. Concernant le profil CCM de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*, la présence d'une importante tache violette (Rf > 0,9) révélée par la vanilline sulfurique et non par le réactif

de Neu, pourrait s'expliquer par la présence de pipéritone **197**. Le profil CCM de l'extrait de *Pentzia monodiana* montre une tache majoritaire ( $R_f \approx 0,65$ ) révélée en bleu violet par la vanilline sulfurique, correspondant au kétopélé nolide B **99**. Ce dernier qui est une lactone sesquiterpénique du groupe des germacranolides a été rapidement isolé par CPC sous forme de cristaux incolores (cf. **III.5.4.1**).

Lors de l'analyse des extraits bruts par UPLC couplée à la SM, les spectres de masse ESI-TOF ont été enregistrés sous les deux modes : positif et négatif. Les données spectrales obtenues (temps de rétention, pic de masse  $m/z$ ) sont résumées dans les **tableaux 26-29** en fonction des principaux pics observés sur les chromatogrammes (cf. **Annexe 3**) de chacun des extraits.

Les ions  $m/z$  observés sur les spectres correspondants en général à la masse moléculaire protonée  $[M+H]^+$  ou sodée  $[M+Na]^+$  quand il s'agit du mode positif ; alors que pour le mode négatif, seuls les ions déprotonés  $[M-H]^-$  prédominent.

La démarche de déréplication consiste à identifier au sein de mélanges complexes toutes les molécules connues grâce à leurs propriétés physico-chimiques. Pour chacun des extraits bruts des plantes sélectionnées, nous avons adopté ce processus de déréplication pour une interprétation rapide des données UPLC-MS obtenues simultanément sous les deux modes d'ionisation positif et négatif. Ainsi nous avons facilement pu déterminer certains ions moléculaires correspondant aux métabolites présents dans les échantillons de chacun des extraits.

#### **IV.2.1. Analyse par l'approche de déréplication**

Par cette démarche nous pouvons présumer -avec un niveau de preuve moyen- que 80 métabolites secondaires connus sont présents dans les quatre extraits bruts soumis à l'UPLC-MS. Ils sont répartis ainsi :

↳ 26 métabolites identifiés (**Tableau 26**) dans l'extrait de l'*A. campestris* ssp. *glutinosa*, dont 9 en commun avec les autres extraits ;

↳ 22 métabolites identifiés (**Tableau 27**) dans l'extrait de l'*A. judaica* ssp. *sahariensis*, dont 6 en commun avec les autres extraits ;

↳ 15 métabolites identifiés (**Tableau 28**) dans l'extrait de *Pentzia monodiana*, dont 3 en commun avec les autres extraits ;

↳ 30 métabolites identifiés (**Tableau 29**) dans l'extrait de *Pulicaria incisa*, dont 5 en commun avec les autres extraits.

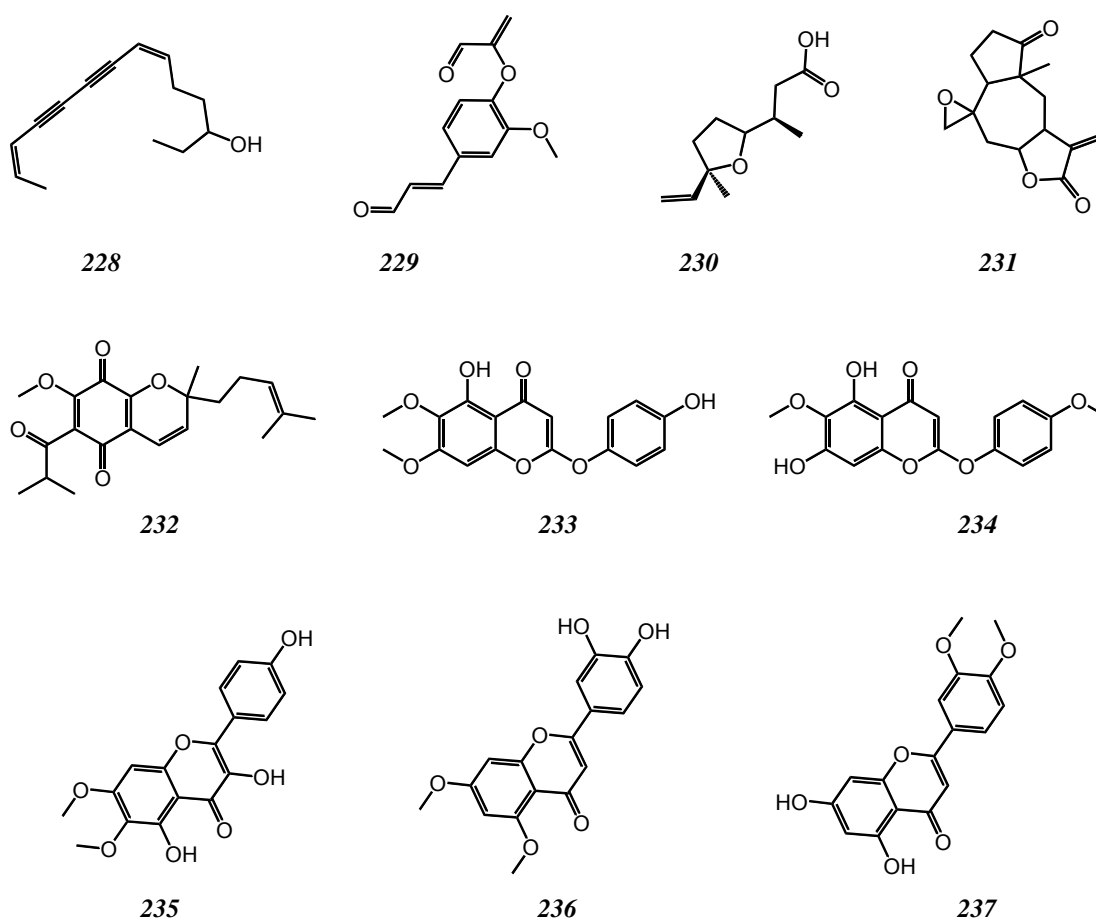
#### **IV.2.1.1. *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa***

Parmi les 26 métabolites identifiés -par la démarche de déréplication- nous citerons particulièrement un alcool gras polyacétylénique **228**, le pulicariolide **231** (une lactone sesquiterpénique), une quinone **232**, deux dérivés de la capillarisine **233-234** et de trois diméthoxyflavones **235-237** (**Figure 66**). Nous avons pu remarquer que certains de ces métabolites sont également retrouvés chez les autres extraits comme :

↳ Le cirsilinéol **51** et deux autres méthoxyflavones **236-237** détectés dans les extraits de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* et de *Pentzia monodiana* ;

↳ Deux hydroxy-acétophénonnes **174-175** détectées dans l'extrait de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* ;

↳ La padmatine **108**, les deux dérivés de la capillarisine **233-234** et la diméthoxyflavone **235** détectées dans l'extrait du *Pulicaria incisa*.

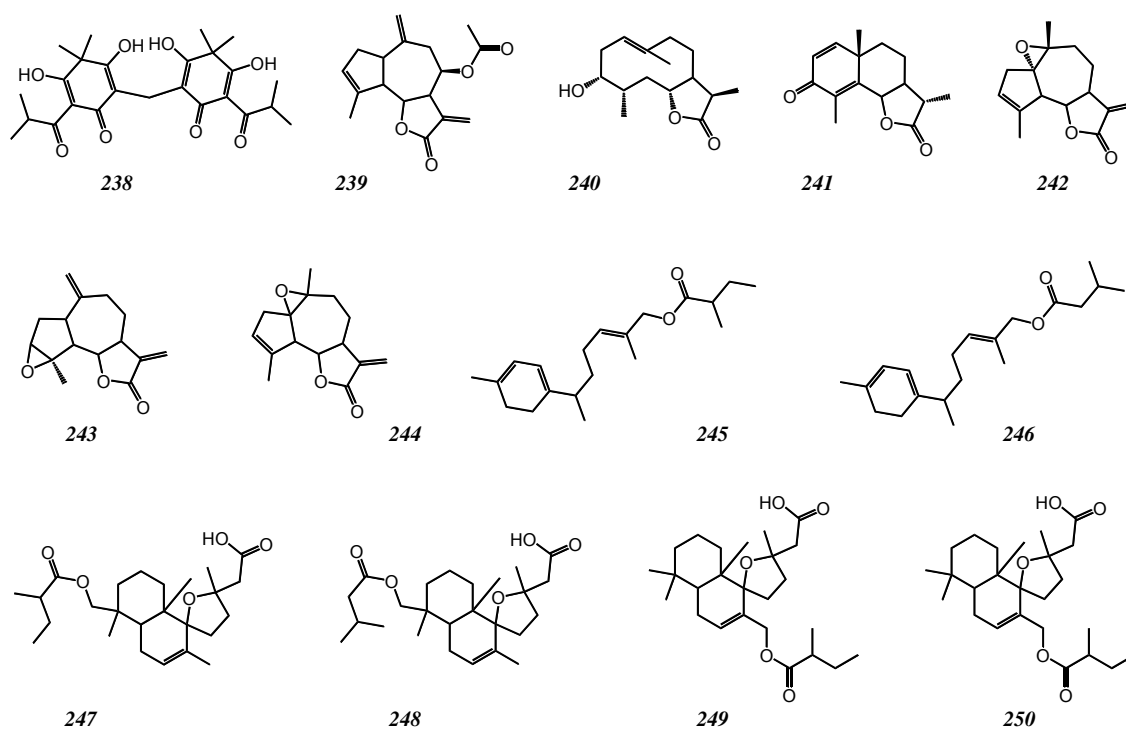


**Figure 66** : Quelques métabolites probablement présents dans l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*  
 6,12-Tétradécadiène-8,10-diyne-3-ol **228** ; O-(2-Propenal) coniféraldéhyde **229** ;  
 3,7-diméthyl-4,7-époxy-8-nonénoïque **230** ; Pulicariolide **231** ; Helinudichromène quinone **232** ;  
 7-O-Méthyl-capillarisine **233** ; 4'-O-Méthyl-capillarisine **234** ; Eupalitine **235** ;  
 3',4'-dihydroxy-5,7-diméthoxy-flavone **236** ; 5,7-dihydroxy-3',4'-diméthoxy-flavone **237**

#### IV.2.1.2. *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

Parmi les 22 métabolites probablement présents dans l'extrait de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*, nous citerons la japonicine A **238** (un phloroglucinol), six lactones sesquiterpéniques **239-244**, deux esters d'alcools sesquiterpéniques **245-246** et tout particulièrement des esters d'alcools diterpéniques et d'acide isovalérianique **247-250** (**Figure 67**). Mise à part les métabolites en commun avec l'extrait de l'*A. campestris* ssp. *glutinosa* et de *Pentzia monodiana*, la salvétine **128** est également présente dans l'extrait du *Pulicaria incisa*.





**Figure 67** : Quelques métabolites probablement présents dans l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

Japonicine A **239** ; Mésatlantine F **239** ; Hydroxypélénolide **240** ; Santonine **241** ; Arglabine **242** ; Estafiatine **243** ; Mésatlantine C **244** ; 3,5,10-bisabolatrien-12-ol; 2-méthylbutanoyl **245** ; 3,5,10-bisabolatrien-12-ol; 3-méthylbutanoyl **246** ; Acide 9,13-époxy-18-hydroxy-7-labden-15-oïque, 18-(2-méthylbutanoyl) **247** ; Acide 9,13-époxy-18-hydroxy-7-labden-15-oïque, 18-(3-méthylbutanoyl) **248** ; Acide 9,13-époxy-17-hydroxy-7-labden-15-oïque, 2-méthylbutanoyl **249** ; Acide 9,13-époxy-17-hydroxy-7-labden-15-oïque, 3-méthylbutanoyl **250**

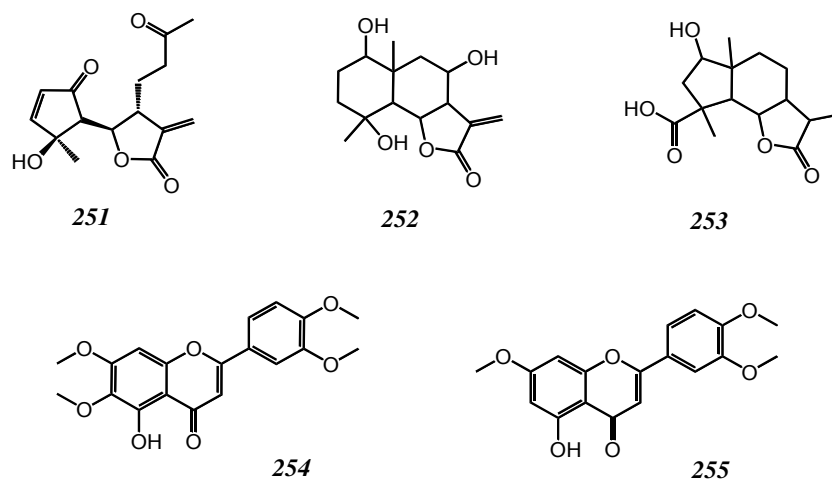
#### IV.2.1.3. *Pentzia monodiana*

Parmi les 15 métabolites identifiés nous citerons particulièrement l'artécanine **90**, l'isosécotanapartolide **97**, le kétopélénolide B **99**, le sécotanapartholide A **104**, le sécotanapartholide B **105** et trois autres lactones sesquiterpéniques **251-253**, les composés polyphénoliques sont représentés par l'artémétine **47**, la chrysosplénétine **49**, et deux polyméthoxyflavones **254-255** (**Figure 68**).

#### IV.2.1.4. *Pulicaria incisa*

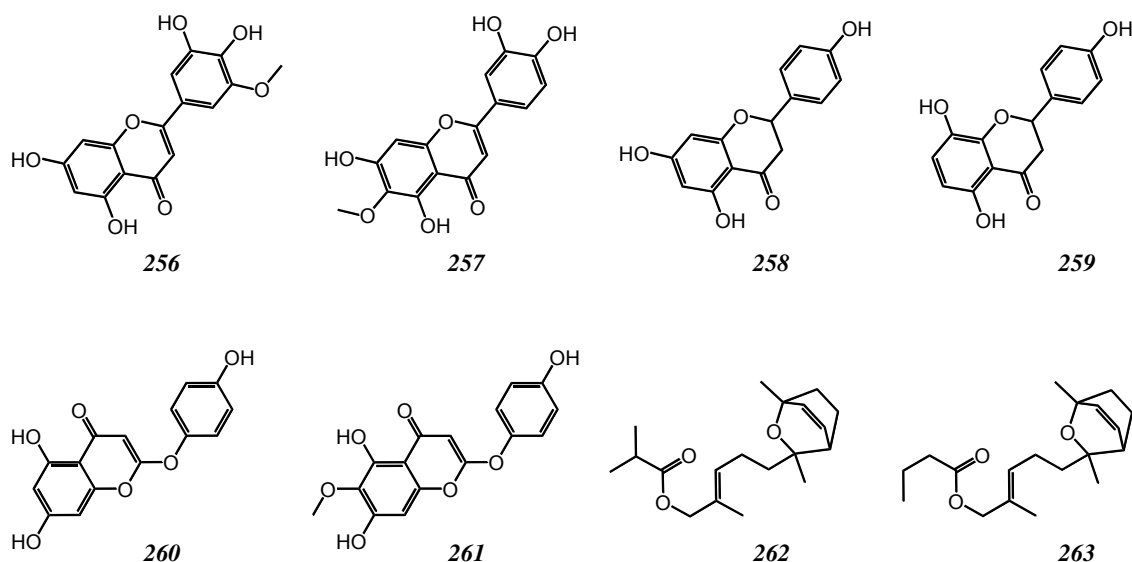
Parmi les 30 métabolites probablement présents dans l'extrait du *P. incisa*, nous signalerons tout particulièrement la neurolénine **26** une lactone sesquiterpénique connue pour son activité antiplasmodiale (cf. I.2.2.1.4), ainsi que six autres lactones sesquiterpéniques : l'artéglasine A **91**, l'artémisinine D **92**, l'artémofriginoside A **94**, le carlaolide A **95**, la matricarine **100**, la montanone **102**, l'athamontanolide **212**.

De nombreux polyphénols ont été détectés tel que l'eupatorine **52**, la tamarixétine **53** (un flavonol à activité antimalarique), la sélagine **256**, l'eupafoline **257**, la capillarisine **261** et la déméthoxy-capillarisine **260**. A noter aussi la présence probable d'esters d'alcools sesquiterpéniques **262-263** (**Figure 69**) qui pourrait être capables de se fixer à l'hème.



**Figure 68** : Quelques métabolites probablement présents dans l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pentzia monodiana*

5-βH-sécotanapartholide **251** ; Mélanolépine B **252** ; Tanacétolide A **253** ; 3'-O-méthyleupatorine **254** ; 5-hydroxy-3',4',7-triméthoxy-flavone **255**



**Figure 69** : Quelques métabolites probablement présents dans l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pulicaria incisa*

Sélagine **256** ; Eupafoline **257** ; 4',5,7-Trihydroxyflavanone **258** ; 4',5,8-Trihydroxyflavanone **259** ; Déméthoxy-capillarisine **260** ; Capillarisine **261** ; 3,7-époxy-1,10-bisaboladien-12-ol; méthylpropanoyl **262** ; 3,7-époxy-1,10-bisaboladien-12-ol; butanoyl **263**

#### IV.2.2. Analyse par RMN

L'interprétation de la plupart des spectres RMN nous a confirmé l'identité des métabolites présumés lors de notre démarche par déréplication. C'est le cas des dix composés isolés de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pentzia monodiana*. De même, le composé élucidé et répertorié sous le numéro **225** est retrouvé dans l'extrait AcOEt de l'*A. campestris* ssp. *glutinosa* lors de son analyse par UPLC-MS. En effet le composé ACG-d5 **225** donne un ion moléculaire  $[M+H]^+$  correspondant à une masse moléculaire égale à 286,1631 au niveau du pic n°6 du chromatogramme (**Tableau 37**). Ainsi l'identité du dérivé de l'hydroxy-acétophénone **225** présumée lors de l'approche par déréplication est confirmée après isolement et analyse en RMN.

### IV.3. Bilan de l'analyse de l'activité antiparasitaire des espèces végétales étudiées

Avant d'établir des corrélations entre les différentes données expérimentales (botaniques, chimiques et biologiques) obtenues à l'issue de cette étude phytochimique bioguidée, nous rappelons par une représentation schématique (**Figure 70**) les différentes étapes de la démarche opérationnelle qui nous ont conduit à l'identification de métabolites potentiellement bioactifs.

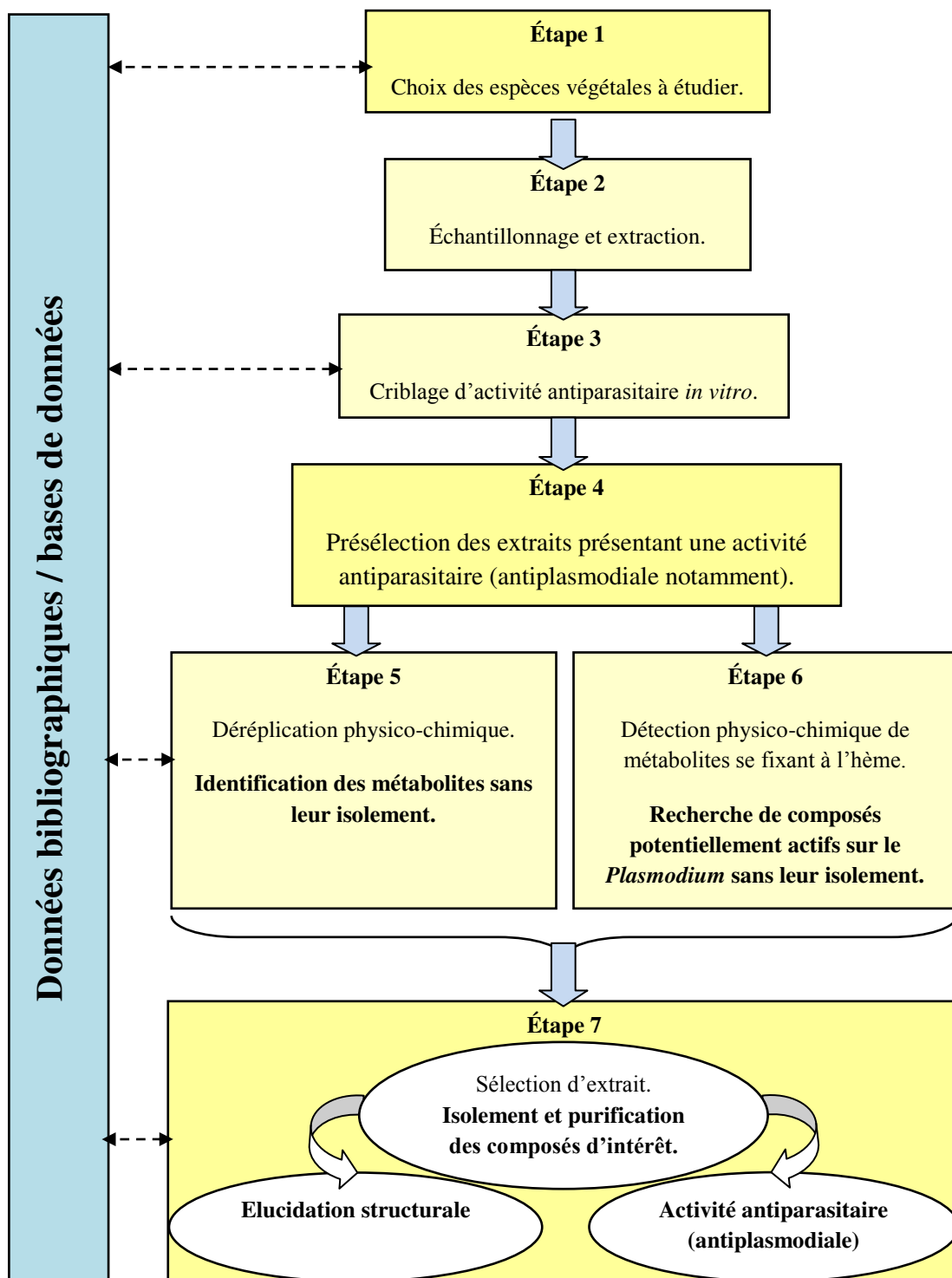


Figure 70 : Schéma représentant les étapes suivies lors de notre étude phytochimique bioguidée

Le criblage d'activité antiparasitaire *in vitro* des extraits AcOEt issus des plantes aromatiques sahariennes choisies selon des critères essentiellement chimiotaxonomiques (cf. II.1.1), nous a orienté vers la présélection de quatre extraits provenant des espèces suivantes :

- ↳ *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* ;
- ↳ *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* ;
- ↳ *Pentzia monodiana* ;
- ↳ *Pulicaria incisa*.

#### IV.3.1. *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

A la lecture de l'ensemble des résultats biologiques obtenus avec les différents extraits bruts testés, nous pouvons affirmer que c'est bien l'extrait d'acétate éthylique des parties aériennes de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* qui présente l'activité antiplasmodiale *in vitro* la plus élevée (CI<sub>50</sub> = 1,13 µg/ml contre la souche FcB1/Colombia du *Plasmodium falciparum*). Comparée à l'activité de la chloroquine **2** sur la même souche de *Plasmodium* (247), cette CI<sub>50</sub> est 16 fois plus faible.

L'activité antileishmaniale *in vitro* de cet extrait ne peut être considérée que modérée puisqu'elle donne un CI<sub>50</sub> = 8,93 µg/ml contre le promastigote de la souche MCER/BR/M6445 de *Leishmania infantum*. Confrontée à l'activité de la miltéfosine **17** sur la même souche de *Leishmania* (247), cette CI<sub>50</sub> n'est que trois fois plus faible.

L'activité antitrypanosomiale *in vitro* n'est pas insignifiante, puisque 10 µg/ml d'extrait AcOEt d'*A. judaica* ssp. *sahariensis* ont pu inhibé jusqu'à 94,7 % de forme sanguine de la souche 93 du *Trypanosoma brucei brucei* en culture, sachant que la CI<sub>50</sub> du benznidazole est d'environ 4,6 µg/ml contre la même souche de *Trypanosoma* (247). Le benznidazole est un médicament essentiel (40) dérivé de l'imidazole utilisé dans le traitement de la trypanosomiase américaine (ou maladie de Chagas).

En mettant en corrélation les résultats du test de fixation à l'hème et les données phytochimiques de l'UPLC-MS tous les deux obtenus avec l'extrait brut de cette espèce, nous pouvons supposer que l'activité antiplasmodiale serait en partie liée à la présence des métabolites suivants :

- ↳ Le cirsilinéol **51** : triméthoxyflavone bioactive, dont l'activité antiplasmodiale est mentionnée dans la littérature scientifique (91,92,95,97) ;

↳ Les dihydroxy-diméthoxyflavone (192):

- ♦ 3',4'-dihydroxy-5,7-diméthoxy-flavone **237** et/ou ;
- ♦ 5,7-dihydroxy-3',4'-diméthoxy-flavone **238** ;

↳ Les dérivés de l'acide grindélique (192):

- ♦ Acide 9,13-époxy-18-hydroxy-7-labden-15-oïque, 18-(2-méthylbutanoyl) **247**;
- ♦ Acide 9,13-époxy-18-hydroxy-7-labden-15-oïque, 18-(3-méthylbutanoyl) **248**;
- ♦ Acide 9,13-époxy-17-hydroxy-7-labden-15-oïque, 2-méthylbutanoyl **249** ;
- ♦ Acide 9,13-époxy-17-hydroxy-7-labden-15-oïque, 3-méthylbutanoyl **250**.

Il est fort probable que ces dérivés de l'acide grindélique soient localisés au niveau de l'oléorésine observée au niveau du parenchyme foliaire de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahriensis* (cf. **Figure 54**). En effet les acides diterpéniques et leurs dérivés sont des constituants fréquents des oléorésines (51).

La pipéritone bien que prédominante dans l'extrait AcOEt de l'*A. judaica* ne semble pas impliquée dans l'activité antiparasitaire de cette espèce d'armoise. La pipéritone est surtout connue pour ses propriétés antimicrobiennes (207,208) et antifongiques (167,209,248,249) ; alors que son activité antitrypanosomiale (CI<sub>50</sub> = 41,12 µg/ml) et son activité antiplasmodiale sont très faibles (250).

#### **IV.3.2. *Pulicaria incisa***

L'activité antileishmaniale de l'extrait AcOEt des parties aériennes de cette plante médicinale connue localement sous le nom de *Tamayut* est légèrement supérieure (CI<sub>50</sub> = 8,37 µg/ml) à celle de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahriensis*. Testé *in vitro* contre la souche FcB1/Colombia du *Plasmodium*, le même extrait de *Pulicaria incisa* a donné une activité modérée à faible, 65 fois plus faible que celle de la chloroquine pour la même souche (247).

La corrélation des données du test de fixation à l'hème avec celles de l'UPLC-MS, nous suggère quelques composés probablement impliqués dans l'activité antiplasmodiale ; il s'agirait de :

↳ La myrciaphénone A **134** : Aucune activité antiplasmodiale n'est rapportée dans la littérature scientifique au sujet de ce glucoside d'hydroxyacétophénone ; alors que

l'activité antileishmaniale y est mentionnée (251). Ainsi, la myrciaphénone A pourrait être impliquée dans l'activité antileishmaniale de l'extrait AcOEt de *Pulicaria incisa*.

↳ Dérivés de la capillarisine 261 :

- ♦ 7-O-méthyl-capillarisine 233 et/ou ;
- ♦ 4'-O-Méthyl-capillarisine 234 ;

Aucune activité biologique concernant ces dérivés de la chromone n'est rapportée dans la bibliographie scientifique, contrairement aux propriétés hépatoprotectrices (252), antiprolifératives, pro-apoptotiques et antimétastatiques de la capillarisine (253).

↳ L'eupalitine 236 : Nous n'avons trouvé aucune donnée bibliographique signalant l'activité antiparasitaire et encore moins l'activité antiplasmodiale pour ce diméthoxyflavonol. Cependant, des activités cytotoxiques et antiprolifératives sur une culture de cellules cancéreuses humaines sont rapportées dans les travaux de Ghalib *et al* concernant l'eupalitine isolée de l'*Asparagus falcatus* (254).

↳ Dérivés sesquiterpéniques :

- ♦ 3,7-époxy-1,10-bisaboladien-12-ol, méthylpropanoyl 262 ;
- ♦ 3,7-époxy-1,10-bisaboladien-12-ol, butanoyl 263.

Aucune donnée bibliographique n'est disponible concernant l'activité antiparasitaire de ces composés.

#### **IV.3.3. *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa***

L'activité antiplasmodiale *in vitro* de l'extrait AcOEt de cette sous-espèce d'armoise champêtre n'est que légèrement inférieure à celle de l'*A. judaica* ; alors que l'activité antileishmaniale du même extrait est sans intérêt puisque sa  $CI_{50}$  est l'une des valeurs les plus faibles enregistrées avec les six extraits testés. L'extrait d'*A. campestris* ssp. *glutinosa* présente également une activité antitrypanosomiale qui est plus faible que celle de l'extrait d'*A. judaica*.

La corrélation des données du test de fixation à l'hème avec celles de l'UPLC-MS, nous oriente vers des composés pouvant être impliqués dans l'activité antiplasmodiale ; il s'agirait de :

↳ Cirsilinéol 50 et les deux dihydroxy-diméthoxyflavone probables 237 et 238 : Composés déjà détectés dans l'extrait AcOEt de l'*A. judaica* ssp. *sahariensis*.

↳ Myrciaphénone A 134, la 7-O-méthyl-capillarisine 233 et/ou la 4'-O-Méthyl-capillarisine 234 et l'eupalitine 236 : Composés déjà détectés dans l'extrait AcOEt de *Pulicaria incisa*.

↳ Une ou plusieurs lactones sesquiterpéniques, probablement :

- ♦ L'ezomontanine **96** et/ou ;
- ♦ L'iwayoside B **98** et/ou ;
- ♦ La yomogiartémine **106**.

Aucune donnée bibliographique n'est disponible concernant une éventuelle activité antiparasitaire pour ces composés.

À la lecture des résultats de l'évaluation *in vitro* des activités antiplasmodiales et antitrypanosomiales des fractions à composé majoritaire (ACG-d5, ACG-d8 et ACG-e11), nous pouvons émettre les observations suivantes :

↳ C'est bien avec la fraction ACG-d8 que les activités les plus élevées ont été enregistrées, notamment l'activité antiplasmodiale avec une  $CI_{50}$  proche du 1  $\mu\text{g/ml}$  ; alors que l'activité antitrypanosomiale est significative, avec une  $CI_{50}$  située entre 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$ .

↳ L'activité antiplasmodiale de la fraction ACG-d8 peut être attribuée au composé **226**, dérivé de l'hydroxyacétophénone majoritaire dont le mode d'action serait différent de celui de la quinine ou de l'artémisinine. En effet, le composé **226** ne s'avère pas capable de se lier à l'hémine.

↳ Étant majoritaire dans la fraction ACG-d5, le composé **225** (un autre dérivé de l'hydroxyacétophénone) semble agir de la même manière que le composé **226**, mais avec une intensité beaucoup plus faible.



↳ Comme les deux dérivés de l'hydroxyacétophénone précédents, le composé **227** majoritaire de la fraction ACG-e11 ne donne pas d'adduits avec l'hème. Il présente néanmoins une activité antiplasmodiale intermédiaire entre celles des deux composés **225** et **226**, avec une  $CI_{50}$  proche de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

#### IV.3.4. *Pentzia monodiana*

L'évaluation de l'activité antiparasitaire de l'extrait AcOEt des parties aériennes de cette espèce endémique du Sahara central a fourni des résultats plus ou moins significatifs. La concentration inhibitrice médiane ( $CI_{50}$ ) obtenue lors du test *in vitro* contre la souche FcB1/Colombia du *Plasmodium falciparum* était d'environ 3,53  $\mu\text{g/ml}$  ; une valeur aussi modérée que celle enregistrée avec l'extrait du *Pulicaria incisa*. L'activité antileishmaniale de l'extrait de *Pentzia monodiana* est peu intéressante ( $CI_{50}$ = 13,63  $\mu\text{g/ml}$ ).

La corrélation des données du test de fixation à l'hème avec celles de l'UPLC-MS, nous suggère des composés pouvant être impliqués dans l'activité antiplasmodiale ; il s'agirait notamment de :

↳ Artémétine 47 : le rôle de cette pentaméthoxyflavone dans la synergie flavonoïdes-artémisinine à l'origine de la propriété antimalarique de l'*Artemisia annua* est connu (91). Seule, l'artémétine ne possède qu'une activité antiplasmodiale modérée. Elle est également anti-inflammatoire (255) et hypotensive (256).

↳ 3'-O-méthyleupatorine 254 : nous n'avons trouvé aucune donnée bibliographique concernant une quelconque activité biologique pour cette tétraméthylflavone.

↳ Cirsilinéol 51 présent également dans les extraits d'armoises (cf. **IV.3.1** et **IV.3.3**) ;

Les résultats de l'évaluation de l'activité antiplasmodiale *in vitro* de ces trois méthoxyflavones (**Tableau 35**) sont en accord avec les données de la littérature scientifique (257), puisque le classement en fonction du pouvoir inhibiteur sur la croissance du *Plasmodium* est respecté. Ainsi la  $CI_{50}$  de la 3'-O-méthyleupatorine **254** se situerait entre celle de l'artémétine (la plus active) et celle du cirsilinéol **51** (la moins

active). Selon les travaux de Liu KC *et al.* (257), l'activité de l'eupatorine **52** est 1,8 fois moins active que celle du cirsilinéol ; alors que le dérivé méthoxylé de l'eupatorine, le 3'-O-méthyleupatorine **254** se retrouve aussi actif, voir légèrement plus actif que le cirsilinéol. Du point de vue de la relation structure-activité, il apparaît que la présence du méthoxyle en position 3' du cycle B renforcerait l'activité antiplasmodiale.

Comme les cinq autres lactones sesquiterpéniques présentes dans l'extrait de *P. monodiana*, le 5-βH-sécotanapartholide **251** est capable de donner des adduits avec l'hémine ; son activité antiplasmodiale *in vivo* comparée à celle de chacun des composés isolés de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana*, s'est bien révélée supérieure. Après le score du 5-βH-sécotanapartholide viendrait celui du sécotanapartholide B **105** avec une CI<sub>50</sub> proche de 10 μM (soit environ 2,8 μg/ml).

Bien que n'ayant pas été testé, nous pouvons supposer que l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pentzia monodiana* serait potentiellement actif contre la souche de *Trypanosoma* au vu des des résultats obtenus avec chacun de ses métabolites isolés. En effet, les méthoxyflavones isolées de l'extrait de *P. monodiana* se sont révélées plus actives que les lactones sesquiterpéniques, avec des CI<sub>50</sub> qui se situeraient entre 1 et 10 μM. Parmi les lactones sesquiterpéniques, seul le 5-βH-sécotanapartholide **251** possède une activité antitrypanosomiale significative avec une CI<sub>50</sub> proche de 10 μM.

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les plantes sahariennes à l'instar des autres végétaux adaptés aux climats extrêmes ont la capacité de biosynthétiser de nombreux métabolites secondaires qu'elles utilisent pour diverses fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'elles peuvent subir. C'est ce que nous avons pu constater à l'issue de cette étude phytochimique des quelques Astéracées aromatiques présentes au niveau du Parc Culturel de l'Ahaggar.

Par ailleurs, nous avons pu mettre en exergue le potentiel pharmacologique de ces plantes à travers la présence de composés bioactifs présents dans leurs extraits d'acétate d'éthyle. Bien que la plupart de ces composés bioactifs soient connus et mentionnés dans la littérature scientifique, certains d'entre eux ont été signalés pour la première fois chez *Pentzia monodiana*.

Par rapport au second objectif, nous avons pu déceler une possible nouvelle voie au traitement du paludisme puisque le criblage phytochimique et le test de fixation à l'hème, tous les deux basés sur la technique relativement récente de la LC-MS, nous ont conduits -par l'approche de la déréplication- à la voie de l'Ezomontanine détectée directement dans l'extrait de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*.

Cette identification par l'approche de la déréplication s'est révélée juste puisque nous l'avons vérifiée en identifiant par RMN :

- Les 10 composés isolés à partir de l'extrait de *Pentzia monodiana* ;
- Le dérivé du benzofurane éthanone (ACG-d5) isolé à partir de l'extrait de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*.

Par son efficacité, la PLE s'est avérée une technique d'extraction innovante et prometteuse ; elle s'inscrit dans une démarche de chimie verte<sup>3</sup>, du fait de son économie en solvants minimisant leurs retraitements pour mieux préserver l'environnement et la santé humaine.

---

<sup>3</sup> Appelée aussi chimie durable ou chimie écologique, est une philosophie de la recherche chimique et du génie chimique qui prévoit la mise en œuvre de procédés chimiques respectueux de l'environnement.

À défaut d'une technique de couplage LC-RMN assez sensible pour la détermination structurale en cours de dérégulation, l'isolement "orienté" du composé bioactif demeure la seule voie qui permet de valider son identité.

Dans la démarche par suivi de l'activité, les tests de bioactivité doivent être simples, rapides, sensibles, sélectifs et reproductibles tout en étant économiques en réactifs. À chaque étape de fractionnement, il est nécessaire de mettre au point une technique chromatographique permettant une séparation optimale. Ainsi, la détermination structurale du composé isolé sera possible, sachant que l'élucidation structurale en spectrométrie RMN exige une pureté de la molécule proche de 100%.

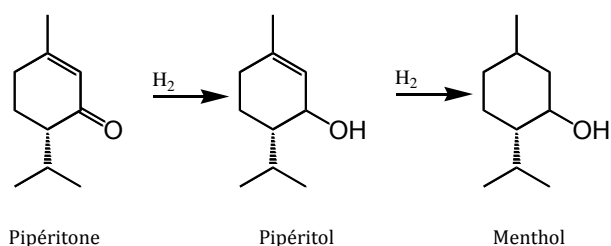
La chromatographie de partage (CPC) appliquée à la séparation semi-préparative, nous a permis d'obtenir des fractions avec des rendements très élevés, dont certaines d'entre elles se sont révélées très enrichies en un composé majoritaire. Cette technique de séparation serait très efficace pour l'isolement rapide d'un composé pur directement d'un mélange aussi complexe qu'un extrait végétal.

Ces techniques innovantes nous ont rapidement fourni des données assez précises concernant les composés bioactifs présents dans les échantillons de plantes étudiées. Contrairement aux techniques classiques, ces nouvelles méthodes appliquées à la phytochimie bioguidée permettent de préserver au maximum l'intégrité des métabolites et de les analyser tels qu'ils se trouvent dans la plante.

La corrélation entre les résultats des tests de bioactivité et du criblage phytochimique nous a amenés à établir une relation entre : activité antiplasmodiale *in vitro* et présence de méthoxyflavones dans l'extrait de *Pentzia monodiana*. De même, l'activité antiplasmodiale de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* pourrait être attribuée aux dérivés de l'hydroxyacétophénone dont le mode d'action serait différent de celui de la quinine ou de l'artémisinine.

La valorisation des produits naturels majoritaires présents dans ces plantes aromatiques sahariennes passe par leur utilisation comme matière première renouvelable pour le développement de médicaments. Ainsi, par sa richesse en pipéritone et par son abondance relative au niveau du PCA, l'*Artemisia judaica* peut constituer une matière première intéressante. En effet, la culture de cette armoise paraît réalisable tant la plante

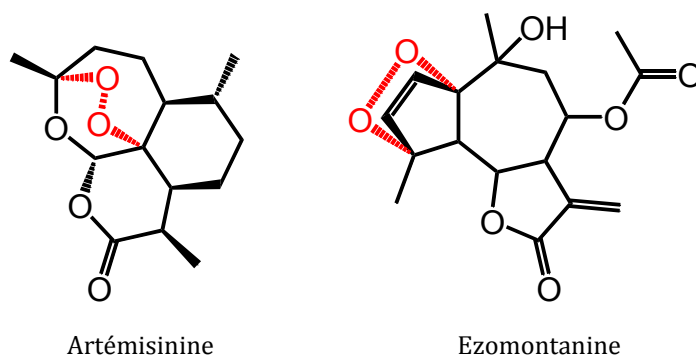
est bien épanouie dans son biotope. Il serait facile d'envisager son exploitation comme matière première pour la production du menthol et du thymol hémisynthétiques.



Les parties aériennes de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* possèdent des propriétés antiparasitaires notables qui pourraient être attribuées en partie à une oléorésine qu'elle produit. Cette résine mériterait d'être mieux étudiée puisqu'elle semble renfermer des dérivés d'acide grindélique capables de se fixer à l'hème de la même manière que les principaux médicaments antipaludiques.

L'Ezomontanine est probablement présente dans l'extrait de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*. Cette lactone sesquiterpénique possède une similitude structurale avec l'artémisinine (présence d'une fonction "dioxy") qui lui permet de se fixer à l'hème et d'exercer ainsi, son activité antiplasmodiale.

L'Ezomontanine et ses éventuels dérivés hémisynthétiques pourraient-ils constituer une nouvelle voie au traitement du paludisme ?



Enfin, il serait intéressant de rechercher dans l'extrait d'*Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens* le ou les métabolites responsables de l'activité antileishmaniale *in vitro*. En effet, l'extrait d'acétate d'éthyle issu des parties aériennes de cette plante médicinale connue localement sous le nom vernaculaire d'*Amayu* s'est montré actif (CI<sub>50</sub> = 6,95 µg/ml) sur le promastigote de la souche de *Leishmania infantum*.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Organisation mondiale de la santé.** World Malaria Report 2016. Genève: WHO; 2016. 186 p.
2. **Newman DJ, Cragg GM.** Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod.* 1 mars 2007;70(3): 461-77.
3. **Dupont F, Guignard J-L, Pelt J-M.** Botanique : les familles de plantes. 15e édition. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2012. 300 p. (Abrégés de pharmacie).
4. **Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.** Quatrième rapport national sur la mise en œuvre de la convention sur la diversité biologique au niveau national [Internet]. Ministère de l'Aménagement du territoire, de l'Environnement et du Tourisme. République Algérienne Démocratique et Populaire; 2009 [cité 8 avr 2016]. Disponible sur: <https://www.cbd.int/doc/world/dz/dz-nr-04-fr.pdf>
5. **Quézel P, Santa S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris: CNRS; 1962. 1170 p.
6. **Ozenda P.** Flore et végétation du Sahara. 3e édition mise à jour et augmentée. Paris: Ed. du Centre national de la recherche scientifique; 1991. 662 p.
7. **Guo Z.** Artemisinin anti-malarial drugs in China. *Acta Pharm Sin B.* 2016; 6(2):115-24.
8. **fr.wikipedia.org.** Anopheles albimanus [Internet]. Wikipédia. [cité 20 nov 2016]. Disponible sur: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ae/Anopheles\\_albimanus\\_mosquito.jpg?uselang=fr](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ae/Anopheles_albimanus_mosquito.jpg?uselang=fr)
9. **Association française des enseignants de parasitologie, éditeur.** Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. 3e édition. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2013. 472 p. (Les référentiels des Collèges).
10. **Philippe Rekacewicz.** Mourir du paludisme en Afrique. Le Monde diplomatique SA. Paris: Le Monde diplomatique SA; 2013.
11. **Organisation mondiale de la santé.** World Malaria Report 2015. Genève: WHO; 2015. 280 p.
12. **Srinivas.** Efforts of Malaria Control – Malaria Site [Internet]. 2015 [cité 9 avr 2016]. Disponible sur: <http://www.malariasite.com/history-control/>
13. **Organisation mondiale de la santé.** WHO position statement: Effectiveness of non-pharmaceutical forms of Artemisia annua L. against malaria. WHO; 2012.
14. **www.cdc.gov.** Malaria - Biology [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. [cité 19 avr 2016]. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
15. **Centers for Disease Control and Prevention.** CDC - Malaria [Internet]. [cité 9 avr 2016]. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/malaria/>

16. **Yayon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H.** Identification of the acidic compartment of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *EMBO J.* 1984; 3(11):2695-700.
17. **Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg DE.** Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Annu Rev Microbiol.* 1997; 51: 97-123.
18. **Slater AF, Swiggard WJ, Orton BR, Flitter WD, Goldberg DE, Cerami A, et al.** An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(2): 325-9.
19. **Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK.** The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature.* 2000; 404(6775): 307-10.
20. **Sandlin RD, Carrell HM, Wright DW.** Hemozoin: Crystal Engineering Survivability. In: *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2011.
21. **Krogstad DJ, Gluzman IY, Kyle DE, Oduola AM, Martin SK, Milhous WK, et al.** Efflux of chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance. *Science.* 1987; 238(4831): 1283-5.
22. **Wellems TE, Plowe CV.** Chloroquine-resistant malaria. *J Infect Dis.* 2001; 184(6): 770-6.
23. **Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al.** Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell.* 2000; 6(4): 861-71.
24. **Djimé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al.** A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med.* 2001; 344(4): 257-63.
25. **Moreau S, Perly B, Biguet J.** Interactions de la chloroquine avec la ferriprotoporphyrine IX. *Biochimie.* 1982; 64(11): 1015-25.
26. **Meshnick SR, Tsang TW, Lin FB, Pan HZ, Chang CN, Kuypers F, et al.** Activated oxygen mediates the antimalarial activity of qinghaosu. *Prog Clin Biol Res.* 1989; 313: 95-104.
27. **Sinha S, Medhi B, Sehgal R.** Challenges of drug-resistant malaria. *Parasite.* 2014; 21.
28. **Comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Organisation mondiale de la Santé.** La lutte contre les leishmanioses: rapport de la réunion du comité OMS d'experts de la lutte contre les leishmanioses, Genève, 22 - 26 mars 2010. Genève: WHO; 2011.
29. **Collins F.** Phlebotomus papatasi [Internet]. 2006 [cité 18 déc 2016]. Disponible sur: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phlebotomus\\_pappatasi\\_bloodmeal\\_continue\\_2.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phlebotomus_pappatasi_bloodmeal_continue_2.jpg)
30. **Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al.** Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Public Libr Sci.* 2012; 7(5): e35671.
31. **Desjeux P.** Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2001; 190(1-2): 77-9.



32. **Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet J-P, et al.** The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(2): 334-359, table of contents.
33. **Aoun K, Bouratbine A.** Cutaneous leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite Paris Fr.* 2014; 21: 14.
34. **www.cdc.gov.** Leishmaniasis - Biology [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. [cité 19 avr 2016]. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
35. **Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Franco JR, Jannin JG.** The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(2): e1007.
36. **Warren Photographic.** Tsetse Fly (*Glossina morsitans*) [Internet]. [cité 18 déc 2016]. Disponible sur: <http://www.warrenphotographic.co.uk/16223-tsetse-fly-excreting-fluid-after-sucking-blood>
37. **Schultz DMG.** *Trypanosoma* sp. [Internet]. 1970 [cité 18 déc 2016]. Disponible sur: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma\\_sp.\\_PHIL\\_613\\_lores.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trypanosoma_sp._PHIL_613_lores.jpg)
38. **Organisation mondiale de la santé.** Trypanosomiase humaine africaine (maladie du sommeil). WHO, Aide-mémoire N°259; 2015.
39. **www.cdc.gov.** African Trypanosomiasis - Biology [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. [cité 19 avr 2016]. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>
40. **Organisation mondiale de la santé.** WHO Model Lists of Essential Medicines. WHO; 2015.
41. **Ruiz-Mesia L, Ruiz-Mesía W, Reina M, Martínez-Díaz R, de Inés C, Guadaño A, et al.** Bioactive Cinchona Alkaloids from *Remijia peruviana*. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(6): 1921-6.
42. **Schmelzer G., Gurib-Fakim A, Arroo R, Lemmens RHM., AGROOH.** Medicinal plants 1. Vol. 1. Wageningen; Leiden: PROTA Foundation; 2008. 790 p.
43. **Marshall SJ, Russell PF, Wright CW, Anderson MM, Phillipson JD, Kirby GC, et al.** In vitro antiplasmodial, antiamoebic, and cytotoxic activities of a series of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(1): 96-103.
44. **Lin L-Z, Shieh H-L, Angerhofer CK, Pezzuto JM, Cordell GA, Xue L, et al.** Cytotoxic and Antimalarial Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Cyclea barbata*. *J Nat Prod.* 1993; 56(1): 22-9.
45. **Organisation mondiale de la santé.** WHO monograph on good agricultural and collection practices (GACP) for *Artemisia annua* L. (archived). WHO; 2006.
46. **Klayman DL.** Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science.* 1985; 228(4703): 1049-55.
47. **Woerdenbag HJ, Lugt CB, Pras N.** *Artemisia annua* L.: a source of novel antimalarial drugs. *Pharm Weekbl Sci.* 1990; 12(5): 169-81.

48. **Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C.** Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(6): 12780-805.
49. **Benoit-Vical F, Robert A, Meunier B.** Potentiation of Artemisinin Activity against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum* Strains by Using Heme Models. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(10): 2555-8.
50. **Kraft C, Jenett-Siems K, Siems K, Jakupovic J, Mavi S, Bienzle U, et al.** In vitro antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytother Res PTR.* 2003; 17(2): 123-8.
51. **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4e édition revue et augmentée. Paris Cachan: Éd. Tec & doc Éd. médicales internationales; 2009. 1269 p.
52. **François G, Passreiter CM.** Pseudoguaianolide sesquiterpene lactones with high activities against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Phytother Res PTR.* 2004; 18(2): 184-6.
53. **François G, Passreiter CM, Woerdenbag HJ, Van Looveren M.** Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Med.* 1996; 62(2): 126-9.
54. **Lajter I, Vasas A, Béni Z, Forgo P, Binder M, Bochkov V, et al.** Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* and Their Antiproliferative and Anti-inflammatory Activities. *J Nat Prod.* 2014; 77(3): 576-82.
55. **Patel S.** Harmful and beneficial aspects of *Parthenium hysterophorus*: an update. 3 *Biotech.* 2011; 1(1): 1-9.
56. **Hooper M, Kirby GC, Kulkarni MM, Kulkarni SN, Nagasampagi BA, O'Neill MJ, et al.** Antimalarial Activity of Parthenin and Its Derivatives. *ResearchGate.* 1990; 25(9): 717-23.
57. **Adebayo JO, Krettli AU.** Potential antimalarials from Nigerian plants: a review. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133(2): 289-302.
58. **Goffin E, Ziemons E, De Mol P, de Madureira M do C, Martins AP, da Cunha AP, et al.** In vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: tagitinin C. *Planta Med.* 2002; 68(6): 543-5.
59. **Bi FT, Irie GM, N'Gaman K, Mahou CHB.** Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire. *Sci Nat.* 2008; 5(1): 39-48.
60. **Kraft C, Jenett-Siems K, Siems K, Jakupovic J, Mavi S, Bienzle U, et al.** In vitro antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytother Res PTR.* 2003; 17(2): 123-8.
61. **Chukwujekwu JC, Lategan CA, Smith PJ, Van Heerden FR, Van Staden J.** Antiplasmodial and cytotoxic activity of isolated sesquiterpene lactones from the acetone leaf extract of *Vernonia colorata*. *South Afr J Bot.* 2009; 75(1): 176-9.
62. **Jullian V, Bonduelle C, Valentin A, Acebey L, Duigou A-G, Prévost M-F, et al.** New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(22): 5065-70.

63. **O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC, Peters W, et al.** Plants as sources of antimalarial drugs: in vitro antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 30(1): 101-4.
64. **Valenta Z, Gray AH, Papadopoulos S, Podešva C.** The structure of quassin. *Tetrahedron Lett.* 1960; 1(41): 25-33.
65. **Muhammad I, Samoilenko V.** Antimalarial quassinoids: past, present and future. *Expert Opin Drug Discov.* 2007; 2(8): 1065-84.
66. **O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Chan KL, Phillipson JD, Warhurst DC, et al.** Plants as sources of antimalarial drugs, Part 4: Activity of *Brucea javanica* fruits against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro and against *Plasmodium berghei* in vivo. *J Nat Prod.* 1987; 50(1): 41-8.
67. **O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, Phillipson JD, Warhurst DC, Peters W, et al.** Plants as sources of antimalarial drugs: in vitro antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 30(1): 101-4.
68. **Bertani S, Houël E, Stien D, Chevolot L, Jullian V, Garavito G, et al.** Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an Amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *J Ethnopharmacol.* 2006; 108(1): 155-7.
69. **Bero J, Frédéricich M, Quetin-Leclercq J.** Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *J Pharm Pharmacol.* 2009; 61(11): 1401-33.
70. **Freundlich JS, Anderson JW, Sarantakis D, Shieh H-M, Yu M, Valderramos J-C, et al.** Synthesis, biological activity, and X-ray crystal structural analysis of diaryl ether inhibitors of malarial enoyl acyl carrier protein reductase. Part 1: 4'-substituted triclosan derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(23): 5247-52.
71. **Elford BC.** L-Glutamine influx in malaria-infected erythrocytes: a target for antimalarials? *Parasitol Today Pers Ed.* 1986; 2(11): 309-12.
72. **Barron D, Ibrahim RK.** Isoprenylated flavonoids—a survey. *Phytochemistry.* 1996; 43(5): 921-82.
73. **Barron D, Balland C, Possety F, Ravanel P, Desfougères A.** Flavonoïdes prénylés et perméabilité membranaire. *Acta Bot Gallica.* 1996; 143(6): 509-20.
74. **Yazaki K, Sasaki K, Tsurumaru Y.** Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry.* 2009; 70(15 - 16): 1739-45.
75. **Widyawaruyanti A, Subehan, Kalauni SK, Awale S, Nindatu M, Zaini NC, et al.** New prenylated flavones from *Artocarpus champeden*, and their antimalarial activity in vitro. *J Nat Med.* 2007; 61(4): 410-3.
76. **Khaomek P, Ichino C, Ishiyama A, Sekiguchi H, Namatame M, Ruangrunsi N, et al.** In vitro antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *J Nat Med.* 2008; 62(2): 217-20.
77. **Rukachaisirikul T, Saekee A, Tharibun C, Watkuolham S, Suksamrarn A.** Biological activities of the chemical constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbrans*. *Arch Pharm Res.* 2007; 30(11): 1398-403.

78. **Narayan P, Manandhar.** Plants and people of Nepal. Timber Press. Portland; 2002. 599 p.
79. **Chanphen R, Thebtaranonth Y, Wanauppathamkul S, Yuthavong Y.** Antimalarial Principles from *Artemisia indica*. *J Nat Prod.* 1998; 61(9): 1146-7.
80. **Ganguly S, Bandyopadhyay S, Bera A, Chatterjee M.** Antipromastigote activity of an ethanolic extract of leaves of *Artemisia indica*. *Indian J Pharmacol.* 2006; 38(1): 64-5.
81. **Chen M, Theander TG, Christensen SB, Hviid L, Zhai L, Kharazmi A.** Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994; 38(7): 1470-5.
82. **Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, et al.** Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(12): 2550-6.
83. **Kutner S, Breuer WV, Ginsburg H, Cabantchik ZI.** On the mode of action of phlorizin as an antimalarial agent in in vitro cultures of *Plasmodium falciparum*. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36(1): 123-9.
84. **Phillipson JD, Wright CW.** Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Med.* 1991; 57(7 Suppl): S53-59.
85. **Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A.** Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Mol Basel Switz.* 2010; 15(5): 3135-70.
86. **Wei S, Ji H, Yang B, Ma L, Bei Z, Li X, et al.** Impact of chrysofenetin on the pharmacokinetics and anti-malarial efficacy of artemisinin against *Plasmodium berghei* as well as in vitro CYP450 enzymatic activities in rat liver microsomes. *Malar J.* 2015; 14.
87. **Ezenyi IC, Salawu OA, Kulkarni R, Emeje M.** Antiplasmodial activity-aided isolation and identification of quercetin-4'-methyl ether in *Chromolaena odorata* leaf fraction with high activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res.* 2014; 113(12): 4415-22.
88. **Cuiying M, Zhang HJ, Tan GT, Hung NV, Cuong NM, Soejarto DD, et al.** Antimalarial Compounds from *Grewia bilamellata*. *J Nat Prod.* 2006; 69(3): 346- 50.
89. **Chen X, Wang M, Zhang X, Guo W, Wu X.** [Study on chemical constituents of *Achillea alpina*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi Zhongguo Zhongyao Zazhi China J Chin Mater Medica.* 2015; 40(7): 1330-3.
90. **de Souza P, Gasparotto Jr. A, Crestani S, Stefanello MÍA, Marques MCA, Silva-Santos JE da, et al.** Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. *Phytomedicine.* 2011; 18(10): 819-25.
91. **Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A.** Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Mol Basel Switz.* 2010; 15(5): 3135-70.
92. **Weathers P, Towler M.** The flavonoids casticin and artemetin are poorly extracted and are unstable in an *Artemisia annua* tea infusion. *Planta Med.* 2012; 78(10): 1024-6.

93. **Saleh NAM, El-Negoumy SI, Abou-zaid MM.** Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. Monosperma* and *A. herba-alba*. *Phytochemistry*. 1987; 26(11): 3059-64.
94. **Allais D.** Le gattilier. *Actual Pharm*. 2008; 47(479): 49-52.
95. **Marco JA, Barberá O, Rodríguez S, Domingo C, Adell J.** Flavonoids and other phenolics from *Artemisia hispanica*. *Phytochemistry*. 1988; 27(10): 3155-9.
96. **Repčák M, Švehlíková V, Imrich J, Pihlaja K.** Jaceidin and chrysosplenetin chemotypes of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Biochem Syst Ecol*. 1999; 27(7): 727-32.
97. **al-Yahya MA, el-Sayed AM, Mossa JS, Kozłowski JF, Antoun MD, Ferin M, et al.** Potential cancer chemopreventive and cytotoxic agents from *Pulicaria crispa*. *J Nat Prod*. 1988; 51(3): 621-4.
98. **Dobberstein RH, Tin-wa M, Fong HH, Crane FA, Farnsworth NR.** Flavonoid constituents from *Eupatorium altissimum* L. (Compositae). *J Pharm Sci*. 1977; 66(4): 600-2.
99. **Ross SA, Krishnaven K, Radwan MM, Takamatsu S, Burandt CL.** Constituents of *Zanthoxylum flavum* and their antioxidant and antimalarial activities. *Nat Prod Commun*. 2008; 3(5): 791-4.
100. **Xu Kelly J, Winter R, Riscoe M, Peyton DH.** A spectroscopic investigation of the binding interactions between 4,5-dihydroxyxanthone and heme. *J Inorg Biochem*. 2001; 86(2-3): 617-25.
101. **Laphookhieo S, Syers JK, Kiattansakul R, Chantrapromma K.** Cytotoxic and antimalarial prenylated xanthenes from *Cratoxylum cochinchinense*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2006; 54(5): 745-7.
102. **Eyog Matig O, Ndoye O, Kengue J, Awono A, Editeurs.** Les fruitiers forestiers comestibles du Cameroun. IPGRI Regional Office for West and Central Africa. Cotonou, Benin: Bioversity International; 2006. 220 p.
103. **Azebaze AGB, Meyer M, Valentin A, Nguemfo EL, Fomum ZT, Nkengfack AE.** Prenylated xanthone derivatives with antiplasmodial activity from *Allanblackia monticola* STANER L.C. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2006; 54(1): 111-3.
104. **Azebaze AGB, Dongmo AB, Meyer M, Ouahouo BMW, Valentin A, Laure Nguemfo E, et al.** Antimalarial and vasorelaxant constituents of the leaves of *Allanblackia monticola* (Guttiferae). *Ann Trop Med Parasitol*. 2007; 101(1): 23-30.
105. **Lannang AM, Louh GN, Lontsi D, Specht S, Sarite SR, Flörke U, et al.** Antimalarial compounds from the root bark of *Garcinia polyantha* Oliv. *J Antibiot (Tokyo)*. 2008; 61(8): 518-23.
106. **Grubben GJH. PROTA.** Wageningen, Pays-Bas: PROTA Foundation - Backhuys Publ.; 2004. 786 p. (Ressources végétales de l'Afrique tropicale; vol. 1).
107. **Ngouela S, Lenta BN, Nougoué DT, Ngoupayo J, Boyom FF, Tsamo E, et al.** Antiplasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. *Phytochemistry*. 2006; 67(3): 302-6.

108. **Lannang AM, Louh GN, Lontsi D, Specht S, Sarite SR, Flörke U, et al.** Antimalarial compounds from the root bark of *Garcinia polyantha* Oliv. *J Antibiot (Tokyo)*. 2008; 61(8): 518-23.
109. **Ngouela S, Lenta BN, Nougoue DT, Ngoupayo J, Boyom FF, Tsamo E, et al.** Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. *Phytochemistry*. 2006; 67(3): 302-6.
110. **Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Núñez V, Evans N, Alzate SP, et al.** Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia: Part I: traditional use of plants. *J Ethnopharmacol*. 2000; 71(3): 493-504.
111. **Vega AS, Rojano B, Blair S, Saez J.** Antimalarials and antioxidants compounds from *piper tricuspe* (Piperaceae). *Pharmacologyonline*. 2008; 1: 1-8.
112. **Amorim CZ, Flores CA, Gomes BE, Marques AD, Cordeiro RS.** Screening for antimalarial activity in the genus *Potomorphe*. *J Ethnopharmacol*. 1988; 24(1): 101-6.
113. **Andrade-Neto VF de, Pohlit AM, Pinto ACS, Silva ECC, Nogueira KL, Melo MR, et al.** In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(3): 359-66.
114. **Rocha E Silva LF, Silva Pinto AC, Pohlit AM, Quignard ELJ, Vieira PPR, Tadei WP, et al.** In vivo and in vitro antimalarial activity of 4-nerolidylcatechol. *Phytother Res PTR*. 2011; 25(8): 1181-8.
115. **Chulay JD, Haynes JD, Diggs CL.** *Plasmodium falciparum*: assessment of in vitro growth by [<sup>3</sup>H]hypoxanthine incorporation. *Exp Parasitol*. 1983; 55(1): 138-46.
116. **Brasseur P, Agnamey P, Moreno A, Druilhe P.** [Evaluation of in vitro drug sensitivity of antimalarials for *Plasmodium falciparum* using a colorimetric assay (DELI-microtest)]. *Med Trop Rev Corps Sante Colon*. 2001; 61(6): 545-7.
117. **Tripathi AK, Garg SK, Tekwani BL.** A physiochemical mechanism of hemozoin (beta-hematin) synthesis by malaria parasite. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290(1): 595-601.
118. **Tekwani BL, Walker LA.** Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro beta-hematin formation assay. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2005; 8(1): 63-79.
119. **Battandier MJ-A, Trabut L.** Contribution à la Flore du pays des Touaregs. *Bull Société Bot Fr*. 1911; 58(6): 623-9.
120. **Battandier MJ-A, Trabut L.** Plantes du Hoggar récoltées par M. Chudeau en 1905. *Bull Société Bot Fr*. 1906; 53(sup2): 13-34.
121. **Maire R.** Étude sur la flore et la végétation du Sahara central. Alger: Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. N.; 1940. 433 p.
122. **Stevens PF.** Angiosperm Phylogeny Website [Internet]. 2017 [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
123. **Missouri Botanical Garden [Internet].** [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.missouribotanicalgarden.org/>

124. **Global Compositae Checklist [Internet]**. 2017 [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: <http://compositae.landcareresearch.co.nz/>
125. The International Plant Names Index.
126. **The Plant List [Internet]**. [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.theplantlist.org/>
127. **Tropicos [Internet]**. [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.tropicos.org/>
128. **Tela Botanica [Internet]**. 2017 [cité 12 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.tela-botanica.org/>
129. **National Center for Biotechnology Information [Internet]**. [cité 15 janv 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
130. **Meyer-Berthaud B, Scheckler SE, Wendt J**. Archaeopteris is the earliest known modern tree. *Nature*. 1999; 398(6729): 700-1.
131. **The Angiosperm Phylogeny Group**. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc*. 2009; 161(2): 105-21.
132. **Lecointre G, Le Guyader H, Visset D**. Classification phylogénétique du vivant. 4e édition revue et augmentée. Vol. 1. Paris: Belin; 2016. 583 p.
133. **Botineau M**. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Paris: Tec & Doc Lavoisier; 2010. 1335 p.
134. **The Angiosperm Phylogeny Group**. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc*. 2016; 181(1): 1-20.
135. **Oberprieler C, Himmelreich S, Vogt R**. A new subtribal classification of the tribe Anthemideae (Compositae). *Willdenowia*. 2007; 37(1): 89-114.
136. **Anderberg AA**. Taxonomy and phylogeny of the tribe Inuleae (Asteraceae). *Plant Syst Evol*. 1991; 176(1/2): 75-123.
137. **UNESCO**. Plantes médicinales des régions arides. Organisation des Nations Unies. Paris; 1960. 99 p. (Recherches sur la zone aride).
138. **Magee AR, Tilney PM**. A taxonomic revision of *Pentzia* (Asteraceae, Anthemideae) I: the *P. incana* group in southern Africa, including the description of the new species *P. oppositifolia* Magee. *South Afr J Bot*. 2012; 79: 148-58.
139. **Thulin M**. *Pentzia* (Asteraceae-Anthemideae) in the Horn of Africa region. *Nord J Bot*. 2001; 21: 249-52.
140. **Maire R**. *Pentzia hesperidum* Maire & Wilczek. *Bull Société Hist Nat Afr Nord*. 1936; (27): 235.
141. **Maire R**. *Pentzia monodiana* Maire n. sp. *Bull Société Hist Nat Afr Nord*. 20(25-26).

142. **Emerenciano VP, Militão JSLT, Campos CC, Romoff P, Kaplan M a. C, Zambon M, et al.** Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem Syst Ecol.* 2001; 29(9): 947-57.
143. **Bohm BA, Stuessy TF.** Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). New York: Springer Science & Business Media; 2001. 831 p.
144. **Hristozov D, Da Costa FB, Gasteiger J.** Sesquiterpene lactones-based classification of the family asteraceae using neural networks and k-nearest neighbors. *J Chem Inf Model.* 2007; 47(1): 9-19.
145. **Macheix J-J, Fleuriot A, Jay-Allemand C.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne: Presses polytechniques et universitaires romandes; 2005. (Collection biologie).
146. **Schmidt TJ.** Structure-Activity Relationships of Sesquiterpene Lactones. In: Atta-ur-Rahman, éditeur. *Studies in Natural Products Chemistry.* Elsevier; 2006. p. 309- 92. (Studies in Natural Products Chemistry; vol. 33, Part M).
147. **Merfort I.** Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *J Chromatogr A.* 2002; 967(1): 115-30.
148. **Schmidt TJ.** Structure-Activity Relationships of Sesquiterpene Lactones. In: Atta-ur-Rahman, éditeur. *Studies in Natural Products Chemistry.* Elsevier; 2006. p. 309-92.
149. **Fischer NH, Olivier EJ, Fischer HD.** The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones. In: Herz DW, Grisebach PDH, D GWKS, éditeurs. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.* Springer Vienna; 1979. p. 47- 320. (Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products).
150. **Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P.** The artemisia L. Genus: a review of bioactive essential oils. *Mol Basel Switz.* 2012; 17(3): 2542-66.
151. **Ivanescu B, Miron A, Corciova A.** Sesquiterpene Lactones from Artemisia Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *J Anal Methods Chem.* 2015; 2015: 247685.
152. **Buckingham J, éditeur.** Dictionary of Natural Products on DVD. 1 Dvdr edition. London: Chapman and Hall/CRC; 2014.
153. **Harborne JB, Baxter H.** The Handbook of Natural Flavonoids. Vol. 1. New York: John Wiley & Son; 1999. 1800 p.
154. **González AG, Bermejo J, Estévez F, Velázquez R.** Phenolic derivatives from Artemisia glutinosa. *Phytochemistry.* 1983; 22(6): 1515-6.
155. **de Pascual JT, Gonzalez MS, Muriel MR, Bellido IS.** 2-Methyl-2-hydroxymethylchromenes from Artemisia campestris subsp. glutinosa. *Phytochemistry.* 1983; 22(11): 2587-9.
156. **Adams M, Efferth T, Bauer R.** Activity-guided isolation of scopoletin and isoscapoletin, the inhibitory active principles towards CCRF-CEM leukaemia cells and multi-drug resistant CEM/ADR5000 cells, from Artemisia argyi. *Planta Med.* 2006; 72(9): 862-4.



157. **Herz W, Bhat SV, Santhanam PS.** Coumarins of *Artemisia dracunculoides* and 3',6-dimethoxy-4',5,7-trihydroxyflavone in *A. arctica*. *Phytochemistry*. 1970; 9: 891-4.
158. **C. Barua N, P. Sharma R, Madhusudanan KP, Thyagarajan G, Herzt W.** Coumarins in *artemisia caruifolia*. *Phytochemistry*. 1980; 19(10): 2217-8.
159. **Ali MY, Jannat S, Jung HA, Choi RJ, Roy A, Choi JS.** Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian Pac J Trop Med*. 2016; 9(2): 103-11.
160. **www.cas.org. SciFinder - A CAS Solution [Internet].** [cité 20 juill 2015]. Disponible sur: <http://www.cas.org/products/scifinder>
161. **Hansen L, Boll PM.** Polyacetylenes in araliaceae: Their chemistry, biosynthesis and biological significance. *Phytochemistry*. 1986; 25(2): 285-93.
162. **Boulanour B, Abdelaziz G, Aazza S, Gago C, Miguel MG.** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind Crops Prod*. 2013; 46: 85-96.
163. **Akrout A, Chemli R, Chreïf I, Hammami M.** Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour Fragr J*. 2001; 16(5): 337-9.
164. **Akrout AA, Chemli R, Simmonds M, Kite G, Hammami M, Chreïf I.** Seasonal Variation of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. *J Essent Oil Res*. 2003; 15(5): 333-6.
165. **Neffati A, Ben Sghaier M, Bouhlef I, Kilani S, Ghedira K, et al.** Chemical Composition, Mutagenic and Antimutagenic Activities of Essential Oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *J Essent Oil Res*. 2008; 20(5): 471-7.
166. **Belhattab R, Boudjouref M, Barroso JG, Figueirido AC.** Essential oil composition from *Artemisia campestris* grown in Algeria. *Adv Environ Biol*. 2011; 5(2): 429-32.
167. **Boukhalifa D.** Contribution à l'étude des plantes aromatiques et médicinales de la région de l'Ahaggar. [Alger]: Université Benyoucef Benkhedda d'Alger centre; 2017.
168. **Akrout A, Chemli R, Simmonds M, Kite G, Hammami M, Chreïf I.** Seasonal Variation of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. *J Essent Oil Res*. 2003; 15(5): 333-6.
169. **Judzentiene A, Budiene J, Butkienė R, Masotti V.** Caryophyllene Oxide-rich Essential Oils of Lithuanian *Artemisia campestris* ssp. *campestris* and Their Toxicity. *Nat Prod Commun*. 2010; 5(12): 1981-4.
170. **de Pascual JT, Gonzalez MS, Muriel MR, Bellido IS.** 2-Methyl-2-hydroxymethylchromenes from *Artemisia campestris* subsp. *glutinosa*. *Phytochemistry*. 1983; 22(11): 2587-9.
171. **Juteau F, Masotti V, Bessière Bessière J-M, Viano J.** Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Biochem Syst Ecol*. 2002; 30(11): 1065-70.
172. **Ferchichi L, Merza J, Landreau A, Richomme P.** Occurrence of isocoumarinic and phenolic derivatives in *Artemisia campestris* L. subsp. *campestris*. *Biochem Syst Ecol*. 2006; 34(11): 829-32.

173. **Vasconcelos JMJ, Silva AMS, Cavaleiro JAS.** Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. *Phytochemistry*. 1998; 49(5): 1421-4.
174. **Hurabielle M, Eberle J, Paris M.** [Flavonoids of *Artemisia campestris*, ssp. *glutinosa*]. *Planta Med*. 1982; 46(2): 124-5.
175. **González AG, Bermejo J, Estévez F, Velázquez R.** Phenolic derivatives from *Artemisia glutinosa*. *Phytochemistry*. 1983; 22(6): 1515-6.
176. **El-Ghazouly MG, Omar AA.** Flavonoid constituents of *Artemisia campestris*. *Fitoterapia*. 1984; 55(2): 115-6.
177. **Ferchichi L, Merza J, Landreau A, Richomme P.** Occurrence of isocoumarinic and phenolic derivatives in *Artemisia campestris* L. subsp. *campestris*. *Biochem Syst Ecol*. 2006; 34(11): 829-32.
178. **Tarhouni MR.** Isolation and characterization of flavonoids from *Artemisia campestris* L. subsp. *glutinosa* plant. *J Société Chim Tunis*. 1996; 3(12): 891-4.
179. **Charchari S.** The Essential Oil of *Artemisia judaica* L. from Algeria. *J Essent Oil Res*. 2011; 14(1): 16-7.
180. **Dob T, Chelghoum C.** Chemical composition of the essential oil of *Artemisia judaica* L. from Algeria. *Flavour Fragr J*. 2006; 21(2): 343-7.
181. **Benmansour N, Benmansour A, El Hanbali F, González-Mas MC, Blázquez MA, El Hakmaoui A, et al.** Antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia judaica* L. from Algeria against multi-drug resistant bacteria from clinical origin. *Flavour Fragr J*. 2016;31(2):137- 42.
182. **Saleh NAM, El-Negoumy SI, Abou-zaid MM.** Flavonoids of *Artemisia judaica*, A. *Monosperma* and A. *herba-alba*. *Phytochemistry*. 1987; 26(11): 3059-64.
183. **Khafagy SM, El-Din AAS, Jakupovic J, Zdero C, Bohlmann F.** Glaucolide-like sesquiterpene lactones from *Artemisia judaica*. *Phytochemistry*. 1988; 27(4): 1125-8.
184. **Metwally MA, Jakupovic J, Youns MI, Bohlmann F.** Eudesmanolides from *Artemisia judaica*. *Phytochemistry*. 1985; 24(5): 1103-4.
185. **Eid FA.** A further hydroperoxide from *Artemisia judaica*. *Pharmazie*. 1986; 41(9): 674-5.
186. **Khafagy SM, Abdel Salam MA, El Ghazooly MG.** A colorimetric method for the estimation of judaicin, bitter principle of *Artemisia judaica*. *Planta Med*. 1976; 30(1):21-4.
187. **González AG, Bermejo J, Zaragoza T.** Eudesmanolides from *artemisia canariensis*. *Phytochemistry*. 1983; 22(6): 1509-10.
188. **Belyagoubi-Benhammou N, Belyagoubi L, Bekkara FA.** Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian plants. *J Med Plants Res*. 2014; 8(40): 1198-207.
189. **Christensen LP.** Acetylenes and related compounds in anthemideae. *Phytochemistry*. 1992; 31(1): 7-49.

190. **Zdero C, Bohlmann F.** Glaucolides, fulvenoguaianolides and other sesquiterpene lactones from *Pentzia* species. *Phytochemistry*. 1990; 29(1): 189-94.
191. **Bohlmann F, Zdero C.** Zwei neue sesquiterpen-lactone aus *lidbeckia pectinata* berg. und *pentzia elegans* DC. *Tetrahedron Lett.* 1972; 13(7): 621-4.
192. **Buckingham J, éditeur.** Dictionary of Natural Products on DVD. 1 Dvdr edition. London: Chapman and Hall/CRC; 2014.
193. **Bohlmann F, Zdero C.** New sesquiterpenes and acetylenes from *Athanasia* and *Pentzia* species. *Phytochemistry*. 1978; 17(9): 1595-9.
194. **Elmann A, Telerman A, Erlank H, Mordechay S, Rindner M, Ofir R, et al.** Protective and antioxidant effects of a chalconoid from *Pulicaria incisa* on brain astrocytes. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013(694398): 1-10.
195. **Mansour RMA, Ahmed AA, Melek FR, Saleh N a. M.** The flavonoids of *Pulicaria incisa*. *Fitoterapia*. 1990; 61(2): 186-7.
196. **Darwish F.** Terpenoids from *Pulicaria incisa*. *Alex J Pharm Sci.* 2001; 15(1): 21-4.
197. **Boullard B.** Plantes médicinales du monde. Croyances et réalités. Paris: Editions Estem; 2001. 636 p.
198. **Boudjelal A, Henchiri C, Sari M, Sarri D, Hendel N, Benkhaled A, et al.** Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): an ethnopharmacology survey. *J Ethnopharmacol.* 2013; 148(2): 395-402.
199. **al-Shamaony L, al-Khazraji SM, Twaij HA.** Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba alba*. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. *J Ethnopharmacol.* 1994; 43(3): 167-71.
200. **Megdiche-Ksouri W, Trabelsi N, Mkadmini K, Bourgou S, Noumi A, Snoussi M, et al.** *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind Crops Prod.* 2015; 63: 104-13.
201. **Boulanouar B, Abdelaziz G, Aazza S, Gago C, Miguel MG.** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Ind Crops Prod.* 2013; 46: 85-96.
202. **Naili MB, Alghazeer RO, Saleh NA, Al-Najjar AY.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab J Chem.* 2010; 3(2): 79-84.
203. **Akrout A, Gonzalez LA, El Jani H, Madrid PC.** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2011; 49(2): 342-7.
204. **Ghorab H, Laggoune S, Kabouche A, Kabouche Z.** Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from Khenchela (Algeria). *Pharm Lett.* 2013; 5(2): 189-92.
205. **Sassi AB, Harzallah-Skhiri F, Aouni M.** Investigation of Some Medicinal Plants from Tunisia for Antimicrobial Activities. *Pharm Biol.* 2007; 45(5): 421-8.

206. **Nofal SM, Mahmoud SS, Ramadan A, Soliman GA, Fawzy R.** Anti-Diabetic Effect of Artemisia judaica Extracts. Res J Med Med Sci. 2009; 4(1): 42-8.
207. **Abdelgaleil SAM, Abbassy MA, Salam H, Abdel Rasoul MAA.** Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of Artemisia judaica L. Bioresour Technol. 2008; 99(13): 5947-50.
208. **Charchari S, Dahoun A, Bachi F, Benslimani A.** Antimicrobial activity in vitro of essential oils of Artemisia herba-alba Asso. and Artemisia judaica L. from Algeria. Riv Ital EPPOS. 1996; (18): 3-6.
209. **Janačković P, Novaković J, Soković M, Vujišić L, Giweli AA, Dajić-Stevanović Z, et al.** Composition and antimicrobial activity of essential oils of Artemisia judaica, A. herba-alba and A. arborescens from Libya. Arch Biol Sci. 2015; 67(2): 455-66.
210. **Campos RR, McAllen RM.** Cardiac inotropic, chronotropic, and dromotropic actions of subretrofacial neurons of cat RVLM. Am J Physiol. 1999; 276(4 Pt 2): R1102-1111.
211. **Hata Y.** Discovery of antiprotozoal compounds from medicinal plants [phd]. University\_of\_Basel; 2014.
212. **Chaib F, Sahki R, Sabaou N, Rached W, Bennaceur M.** Phytochemical Investigation and Biological Activities of Some Saharan Plants from Hoggar. J Agric Sci. 2015; 7(7): 163.
213. **Elmann A, Beit-Yannai E, Telerman A, Ofir R, Mordechay S, Erlank H, et al.** Pulicaria incisa infusion attenuates inflammatory responses of brain microglial cells. J Funct Foods. 2016; 25: 110-22.
214. **Elmann A, Telerman A, Mordechay S, Erlank H, Ofir R.** Antioxidant and astroprotective effects of a Pulicaria incisa infusion. Oxid Med Cell Longev. 2012; 2012: 157598.
215. **Elmann A, Telerman A, Erlank H, Mordechay S, Rindner M, Ofir R, et al.** Protective and antioxidant effects of a chalconoid from Pulicaria incisa on brain astrocytes. Oxid Med Cell Longev. 2013; 2013: 694398.
216. **Reynolds T.** The evolution of chemosystematics. Phytochemistry. 2007; 68(22-24): 2887-95.
217. **Ozenda P.** Flore et végétation du Sahara. 3e édition. CNRS; 2004. 662 p.
218. **Quézel P, Santa S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Éditions du Centre national de la Recherche scientifique; 1963. 1170 p.
219. **Décret exécutif n° 11-87 du 18 Rabie El Aouel 1432 correspondant au 21 février 2011 portant changement de la dénomination du parc national de l'Ahaggar.** Journal officiel de la République algérienne, no 12, ;février 2011, p. 18 23
220. **Décret exécutif n° 12-291 du 2 Ramadhan 1433 correspondant au 21 juillet 2012 fixant le statut de l'office national du parc culturel de l'Ahaggar.** Journal officiel de la République algérienne, no 44, ;juillet 2012, p. 3 29
221. **Carte géographique Algérie, carte algérie [Internet].** [cité 24 janv 2016]. Disponible sur: <http://www.carte-algerie.com/carte-geographique-algerie.html>
222. **Chenoune K.** La flore et la végétation du Hoggar. Bois For Trop-Cirad. 2005; (284): 79-83.

223. **Gazet Du Chatelier G.** [Un nouveau réactif pour l'analyse des poudres et des coupes végétales]. *Ann Pharm Fr.* 1948; 6(1): 35-9.
224. **Lemoine H.** Les sécoiridoïdes d'*Olea europaea* et du *Lonicera tatarica* : matières premières destinées à la conception de nouveaux synthons chiraux pour la synthèse de composés biologiquement actifs et outils pour le développement de nouvelles méthodes d'extraction et de synthèse. [Paris]: Paris 5; 2012.
225. **Wagner H, Bladt S, Rickl V.** *Plant drug analysis : a thin layer chromatography atlas.* 2<sup>e</sup> éd. Berlin Heidelberg New York [etc.]: Springer; 1996. 384 p.
226. **Wu H, Guo J, Chen S, Liu X, Zhou Y, Zhang X, et al.** Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2013; 72: 267-91.
227. **Marston A.** Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry.* 2007; 68(22- 24): 2786-98.
228. **Foucault AP.** Chapter 4 Centrifugal partition chromatography: the story of a company. In: *Chemistry B-CA*, éditeur. Elsevier; 2002 [cité 24 déc 2015]. p. 85-113. (Counter-current Chromatography The Support-Free Liquid Stationary Phase; vol. 38). Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166526X02800071>
229. **Marchal L, Legrand J, Foucault A.** Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field. *Chem Rec.* 2003; 3(3): 133-43.
230. **Murayama W, Kobayashi T, Kosuge Y, Yano H, Nunogaki Y, Nunogaki K.** A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *J Chromatogr A.* 1982; 239: 643-9.
231. **Toribio A.** Développement de nouvelles approches méthodologiques en Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt [Internet]. Reims; 2007 [cité 8 janv 2016]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2007REIMP204>
232. **Foucault AP, Chevlot L.** Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *J Chromatogr A.* 29 mai 1998;808(1-2):3-22.
233. **Oka F, Oka H, Ito Y.** Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 1991; 538(1): 99-108.
234. **Foucault AP.** *Centrifugal Partition Chromatography.* New York: CRC Press; 1994. 432 p.
235. **Berthod A, Hassoun M, Ruiz-Angel MJ.** Alkane effect in the Arizona liquid systems used in counter-current chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 383(2): 327-40.
236. **Muñoz-Durango K, Maciuk A, Harfouche A, Torijano-Gutiérrez S, Jullian J-C, Quintin J, et al.** Detection, Characterization, and Screening of Heme-Binding Molecules by Mass Spectrometry for Malaria Drug Discovery. *Anal Chem.* avril 2012; 84(7): 3324-9.
237. **Trager W, Jensen JB.** Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 1976; 193(4254): 673-5.

238. **Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD.** Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 16(6): 710-8.
239. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
240. **Molecular Weight Calculator | Integrative Omics [Internet].** [cité 27 mai 2017]. Disponible sur: <https://omics.pnl.gov/software/molecular-weight-calculator>
241. **Ouyahia A.** Etude phytodermologique et histologique foliaire de quelques *Artemisia* du Bassin Méditerranéen Occidental. *Acta Bot Malacit.* 1996; 21: 66-77.
242. **Deysson G.** *Eléments d'anatomie des plantes vasculaires.* 2<sup>e</sup> éd. Paris: SEDES; 1964. 345p.
243. **Ciccarelli D, Garbari F, Pagni AM.** Glandular hairs of the ovary: A helpful character for Asteroideae (Asteraceae) taxonomy? *Ann Bot Fenn.* 2007; 44(1): 1-7.
244. **Gast M.** *Alimentation des populations de l'Ahaggar : Étude ethnographique.* Paris: Arts et métiers graphiques; 1968. 456 p. (Mémoires du CNRS en Algérie; vol. VIII).
245. **Guers J, Callen-Lobreau D, Dimon MT, Maley J, Cambon-Bou G.** Palynologie africaine 11. *Bull IFANSérie Sci Nat.* 1971; 33(2): 214-38.
246. **Md. Saleh N, Sanagi MM.** Comparison of pressurized liquid extraction with soxhlet extraction in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Malays J Anal Sci.* 2009; 9(3): 141-5.
247. **Carneiro Albernaz L, Deville A, Dubost L, de Paula JE, Bodo B, Grellier P, et al.** Spiranthenones A and B, tetraprenylated phloroglucinol derivatives from the leaves of *Spiranthera odoratissima*. *Planta Med.* 2012; 78(5): 459-64.
248. **Cárdenas-Ortega NC, Zavala-Sánchez MA, Aguirre-Rivera JR, Pérez-González C, Pérez-Gutiérrez S.** Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* gray. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(11): 4347-9.
249. **Romagnoli C, Bruni R, Andreotti E, Rai MK, Vicentini CB, Mares D.** Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma.* 2005; 225(1-2): 57-65.
250. **Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, et al.** Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol.* 2014; 151(1): 652-9.
251. **Sidana J, Neeradi D, Choudhary A, Singh S, Foley WJ, Singh IP.** Antileishmanial polyphenols from *Corymbia maculata*. *J Chem Sci.* 2013; 125(4): 765-75.
252. **Goetz P, Ghédira K.** *Phytothérapie anti-infectieuse.* Springer Science & Business Media; 2012. 394 p. (Collection Phytothérapie pratique).
253. **Lee JH, Chiang SY, Nam D, Chung W-S, Lee J, Na Y-S, et al.** Capillarisin inhibits constitutive and inducible STAT3 activation through induction of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases. *Cancer Lett.* 2014; 345(1): 140-8.

254. **Ghalib RM, Mehdi SH, Hashim R, Sulaiman O, Foong FHN, Ahamed BMK, et al.** Eupalitin from *Asparagus falcatus* (Linn.) has anti-cancer activity and induces activation of caspases 3/7 in human colorectal tumor cells. *J Med Plants Res.* 2013; 7(20): 1401-5.
255. **Sertié JA, Basile AC, Panizza S, Matida AK, Zelnik R.** Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta Med.* 1990; 56(1): 36-40.
256. **de Souza P, Gasparotto Jr. A, Crestani S, Stefanello MÉA, Marques MCA, Silva-Santos JE da, et al.** Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. *Phytomedicine.* 2011; 18(10): 819-25.
257. **Liu KC, Yang SL, Roberts MF, Elford BC, Phillipson JD.** Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Rep.* 1992; 11(12): 637-40.
258. **Hammiche V, Maiza K.** Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol.* 2006; 105(3): 358-67.
259. **Benarba B, Belabid L, Righi K, Bekkar AA, Elouissi M, Khaldi A, et al.** Ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in Mascara (North West of Algeria). *J Ethnopharmacol.* 2015; 175: 626-37.
260. **Sarri M, Mouyet FZ, Benziane M, Cheriet A.** Traditional use of medicinal plants in M'sila, Algeria. *J Pharm Pharmacogn Res.* 2014; 2(2): 31-5.
261. **González-Tejero MR, Casares-Porcel M, Sánchez-Rojas CP, Ramiro-Gutiérrez JM, Molero-Mesa J, Pieroni A, et al.** Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *J Ethnopharmacol.* 2008; 116(2): 341-57.
262. **Sahki A, Sahki R.** Le Hoggar: promenade botanique. Chamonix, France: Éd. Ésope; 2004. 311 p.
263. **Décret exécutif n° 12-03 du 10 Safar 1433 correspondant au 4 janvier 2012 fixant la liste des espèces végétales non cultivées protégées.** Journal officiel de la République algérienne, no 3, 18 janvier 2012 ; p.12
264. **Hammiche V, Maiza K.** Traditional medicine in Central Sahara : pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol.* 2006; 105(3): 358-67.





**ANNEXE 1 : Clés d'identification des espèces collectées selon les flores d'Ozenda et de Quezel & Santa**

**A.1.1. Détermination de la famille Asteraceae Bercht. & J.Presl (1820)**

Plantes à fleurs réunies en capitule. Fleur à étamine au nombre de 5 et soudées par leurs anthères en un tube au travers duquel passe le style.

**A.1.1.1. Détermination du genre *Artemisia* L.**

Plantes buissonnantes, à tiges ligneuses au moins à la base, à capitules nombreux très petits (moins de 5 mm) ne contenant que quelques fleurs. Fleur non ligulées à la périphérie, de couleur blanche, jaune, jaunâtre, non pourprée. Akène n'ayant pas d'aigrette formée d'une touffe d'écaillés membraneuses blanches roses.

**A.1.1.1.1. Détermination de la sous-espèce *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa***

Buisson de 30 à 150 cm de haut, à rameaux rougeâtres. Feuilles glabres, vert foncé, pétiolées à la base, les autres sessiles ou subsessiles, dressées ou pendantes. Le limbe porte des divisions longues, étroites et espacées. Panicules plus moins amples portant des capitules très petits (1 à 1,5 mm), coniques ou obovales, à involucre scarieux, ne contenant que 3 à 8 fleurs.....*Artemisia campestris* L.

Tiges dressées dès la base, plus robustes, lignifiées, striées, nettement frutescentes inférieurement. Les rameaux supérieurs et ceux de la panicule sont visqueux. Capitules, plus nombreux, allongés ou ellipsoïdes, à bractées involucales visqueuses.....*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* (J.Gay ex Besser) Batt.

**A.1.1.1.2. Détermination de la sous-espèce *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis***

Arbrisseau de 60 à 80 cm, très odorant, à inflorescences en panicules denses ramifiées. Capitules jaunâtres, hémisphériques, d'environ 3 mm de diamètre, l'involucre laineux et contenant 10 à 20 fleurs ; feuilles à lobes courts obtus et rapprochés, laineuses comme les rameaux.....*Artemisia judaica* L.

Détermination de la sous-espèce selon localisation géographique (Sahara central).....*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* (L. Chevall.) Maire

**A.1.1.2. Détermination du genre *Asteriscus* Miller**

Plante buissonnante de 20 à 50 cm de hauteur, à rameaux ligneux à la base, dressés portant de grandes feuilles de 2 à 4 cm de long, d'un vert foncé, dentées sur toute la longueur et très velues. Capitules hétérogame, multiflores, radiés. Fleurs du rayon femelle ligulées, sur 1 à 2 rangs, celles du disque tubuleuses et hermaphrodites. Involucre

hémisphérique ou campanulé, à bractées sur peu de rang, double l'extérieur foliacé et dépassant les ligules ; induré à maturité. Réceptacle paléacé, à paillettes embrassant les fleurs. Akène dimorphe ; ceux du rayon non ailés, ceux du disque obconiques ; tous avec une aigrette formée de quelques paillettes libres, un peu inégales, denticulées ou laciniées. Fleurs jaunes.

#### **A.1.1.2.1. Détermination de la sous-espèce *Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens***

Sous-arbrisseau. Capitule à involucre portant des bractées externes linéaires-aigües, les intérieures oblongues. Fleurs jaunes à ligules à peine plus longues que les fleurons. Akènes arqués à 4 côtes saillantes, en cône renversé, velus, tronqués au sommet. Aigrette comportant quatre écailles déchiquetées et membraneuses. *Asteriscus graveolens* Forssk.

Tige ligneuse d'environ 30 cm de haut portant des rameaux très étalés naissant au dessous des capitules. Présence d'une écorce crevassée et blanche dans les parties âgées des rameaux. Feuilles linéaires, incisées-dentées, velues, d'un vert pâle ; les supérieures presque entières et entourant le capitule qu'elles dépassent longuement. Capitule plus petit que chez l'autre sous-espèce. *Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens* (Forssk.) Less.

#### **A.1.1.3. Détermination du genre *Pentzia***

Plantes franchement herbacées à rameaux blanchâtres portant des feuilles vertes. Les capitules sont isolés à l'extrémité de rameaux grêles. Le réceptacle du capitule est bombé, en hémisphère ou bien en cône. Fleur non ligulées à la périphérie, de couleur blanche, jaune, jaunâtre, non pourprée. Akène n'ayant pas d'aigrette formée d'une touffe d'écailles membraneuses blanches ou roses.....*Pentzia* Thunb.

#### **A.1.1.3.1 Détermination de l'espèce *Pentzia monodiana***

Herbe suffrutescente d'environ 30 cm, à tige rameuse et un peu ligneuse à la base donnant des rameaux dressés blanchâtres, velus, ciliés et couverts de poils appliqués comme sur les feuilles, celles-ci sessiles, auriculées à la base, les moyennes profondément divisées. Capitules petits, de 5 à 8 mm, sont isolés au sommet des rameaux, à fleurs toutes tubuleuses jaunes d'or ou un peu brunâtres. Akène allongé.....*Pentzia monodiana* Maire

#### **A.1.1.4. Détermination du genre *Pulicaria***

Plantes possédant des feuilles entières ou peu divisées, de nombreux capitules en grappe ramifiée. Capitules hétérogames, multiflores. Fleurs du rayon ligulées, à ligules soit bien marquées et étalées, soit dressées et dépassant à peine l'involucre ; parfois aussi nulles ; femelles et sur un rang. Fleurs du disque tubuleuses et hermaphrodites. Involucre à bractées sur peu de rangs, généralement étroites, les extérieures courtes ou foliacées, les intérieures parfois scarieuses. Réceptacle plan, nu, à épine alvéolé. Akène cylindrique ou comprimés, sans côtes ou à 4 côtes. Aigrette double ; l'extérieure courte, cupuliforme, constituée par des paillettes plus ou moins cônées à la base, libre ou plus ou moins soudée avec l'interne (genre *Francoeuria*) ; l'intérieure composée de soies longues denticulées ou plumeuses. Fleurs jaunes.....*Pulicaria* Gaertn.

##### **A.1.1.4.1. Détermination de l'espèce *Pulicaria crispa***

Sous-arbrisseau à feuilles sinuées-dentées, ondulées, velues-laineuses, sessiles et embarrassantes. Capitules solitaires, généralement de 10 mm. Ligules ne dépassant pas ou dépassant à peine les fleurons. Tiges dressées ou ascendantes, laineuses, ramifiées, à rameaux divariqués. Pédoncules bractéolés. Bractées de l'involucre linéaires-lancéolées, inégales, glabrescentes et acuminées. Akène à aigrettes toutes soudées ensemble en une cupule et caduques ; soies internes plumeuses.....*Pulicaria crispa* (Forssk.) Oliv.

##### **A.1.1.4.2. Détermination de l'espèce *Pulicaria incisa***

Plante parfois suffrutescente, très velue-laineuse et glanduleuse, à rameaux denses, étalé-dressés, portant de nombreuses feuilles alternes, allongées de 3 à 4 cm, à limbe très ondulé sur les bords, d'un vert vif, les inférieures pétiolées, les supérieures sessiles et embarrassantes. Capitules discoïdes, de 1 à 1,5 cm de diamètre, nettement ligulés, de couleur jaune. Akènes velus.....*Pulicaria incisa* (Lam.) DC.



## ANNEXE 2 : Monographies simplifiées des plantes aromatiques collectées

### A.2.1. *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* (J.Gay ex Besser) Batt.

#### Synonymes :

*Absinthium virescens* Juss. ex Besser, *Artemisia jussieana* J.Gay ex Besser,  
*Artemisia glutinosa* J.Gay ex DC., *Artemisia monspeliensis* Nyman  
*Artemisia viscosa* DC.

#### Famille : Asteraceae

Noms vernaculaires : Taguq, Tedjouq (Tamahek). Degouft, Alala (Arabe). Armoise champêtre, Armoise poisseuse, Armoise rouge (Français).

Répartition : Plante des régions méditerranéennes occidentales (**Figures 71, 72**). Commune en Algérie, dans les Hauts-Plateaux, dans le Hoggar ; plus rare au Tassili n'Ajjers et au Tefedest ; manque au Sahara septentrional (6).

Cycle végétatif : Vivace. Floraison de septembre à octobre.

Usage traditionnel : Parties aériennes en décoction comme analeptique, antispasmodique, emménagogue, anthelminthique, sont indiquées contre les affections hépatiques. En usage externe contre les dermatoses (mycoses) et traitement antipelluculaire (258). Elles sont utilisées comme antitussives, contre la bronchite, le goitre (259), contre les troubles digestifs (gastralgie) (211). L'usage comme antidiabétique et comme hypotenseur est signalé (198).



**Figure 71** : *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*



**Figure 72** : Inflorescences de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

### A.2.2. *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis* (L.Chevall.) Maire

Famille : Asteraceae

Noms vernaculaires : Téheréggélé (Tamahek). Bahetseran (Arabe) (218). Armoise judaïque (Français).

Répartition : espèce méditerranéo-saharienne. Commune dans l'extrême sud algérien, surtout dans le Hoggar et dans le Tassili n'Ajjers (**Figure 73**).

Cycle végétatif : Vivace. Floraison selon le régime des précipitations.

Usage traditionnel : Partie aérienne en infusion ou en décoction est indiquée contre les troubles digestifs (gastrites, constipations), la jaunisse (261), comme antipyrétique, sédatif, antiallergique, anthelminthique. Elle sert à traiter les rhumes et les dermatoses.



**Figure 73** : *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*  
À gauche : Plante entière. À droite : Partie aérienne (rameaux)

### A.2.3. *Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens* (Forssk.) Less.

#### Synonymes :

*Nauplius graveolens* ssp. *graveolens* (Forssk.) Wiklund

*Bubonium graveolens* ssp. *graveolens* (Forssk.) Maire

Famille : Asteraceae

Noms vernaculaires : Amayu (Tamahek)

Répartition : Espèce saharo-sindienne, généralement rencontrée dans les dépressions argilo-sablonneuses (**Figure 74**). Fréquente au Hoggar, dans les savanes désertiques, les lits d'oueds, les rocailles des montagnes jusqu'à 2800 m d'altitude (262).

Cycle végétatif : Vivace. Floraison selon le régime des précipitations.

Usage traditionnel : Les parties aériennes en infusion ou en décoction sont indiquées contre les crampes musculaires, la fatigue générale, comme tonique, comme antirhumatismal (258), comme antiémétique (262).



**Figure 74** : *Asteriscus graveolens* ssp. *graveolens*



#### A.2.4. *Pentzia monodiana* Maire

Famille : Asteraceae

Noms vernaculaires : Tehatit (Tamahek)

Répartition : Endémique des massifs volcaniques du Sahara central (Tibesti, Hoggar). Rencontré dans les pentes granitiques, les ravins pierreux et le long des oueds, à partir de 2000 mètres d'altitude (**Figure 75**). C'est une espèce protégée en Algérie (263).

Cycle végétatif : Annuel, pouvant devenir vivace. Floraison selon le régime des précipitations.

Usage traditionnel : Bien qu'apparemment non toxique, cette plante aromatique ne fait l'objet d'aucun intérêt thérapeutique et ne figure pas dans la pharmacopée traditionnelle touareg. C'est une plante fourragère recherchée par les bergers lors de la transhumance.



**Figure 75** : *Pentzia monodiana*

**A.2.5. *Pulicaria crista* (Forssk.) Oliv.**

Synonymes :

*Francoeuria crista* (Forssk.) Cass.

*Francoeuria undulata* (L.) Lack

Famille : Asteraceae

Noms vernaculaires : Tenadfert (Tamahek). Arfedj (Arabe).

Répartition : Espèce saharo-sindienne. Répandue dans tout le Sahara. Présente au Hoggar, où elle croit dans les terrains sablonneux argileux, dans les lits d'oueds et dans les savanes désertiques (**Figure 76**).

Cycle végétatif : Vivace. Floraison selon le régime des précipitations.

Usage traditionnel : Partie aérienne en infusion ou en décoction contre les affections des nourrissons (coliques, vomissements, insuffisance urinaire), contre les troubles du rythme cardiaque (palpitations) comme antidiabétique, diurétique (264).



**Figure 76** : *Pulicaria crista*

**A.2.6. *Pulicaria incisa* (Lam.) DC.**

Synonymes : *Pulicaria undulata* (L.) DC.

Famille : Asteraceae

Noms vernaculaires : Tamayut (Tamahek). Nougd (Arabe). Pulicaire ondulée (Français).

Répartition : Espèce saharo-arabique, très rameuse, fréquente dans le Hoggar, où elle croit dans les lits d'oueds jusqu'à 2500 m d'altitude (**Figure 77**).

Cycle végétatif : Annuel, devenant parfois vivace. Floraison selon le régime des précipitations.

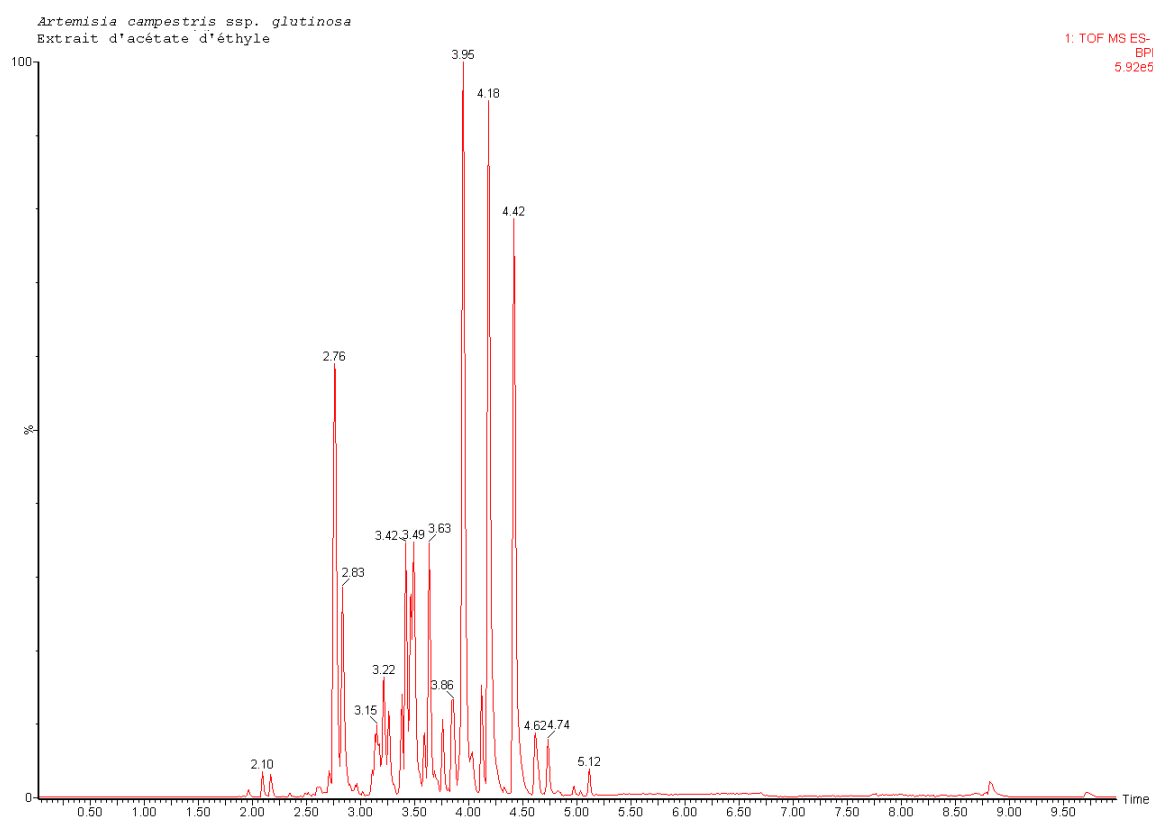
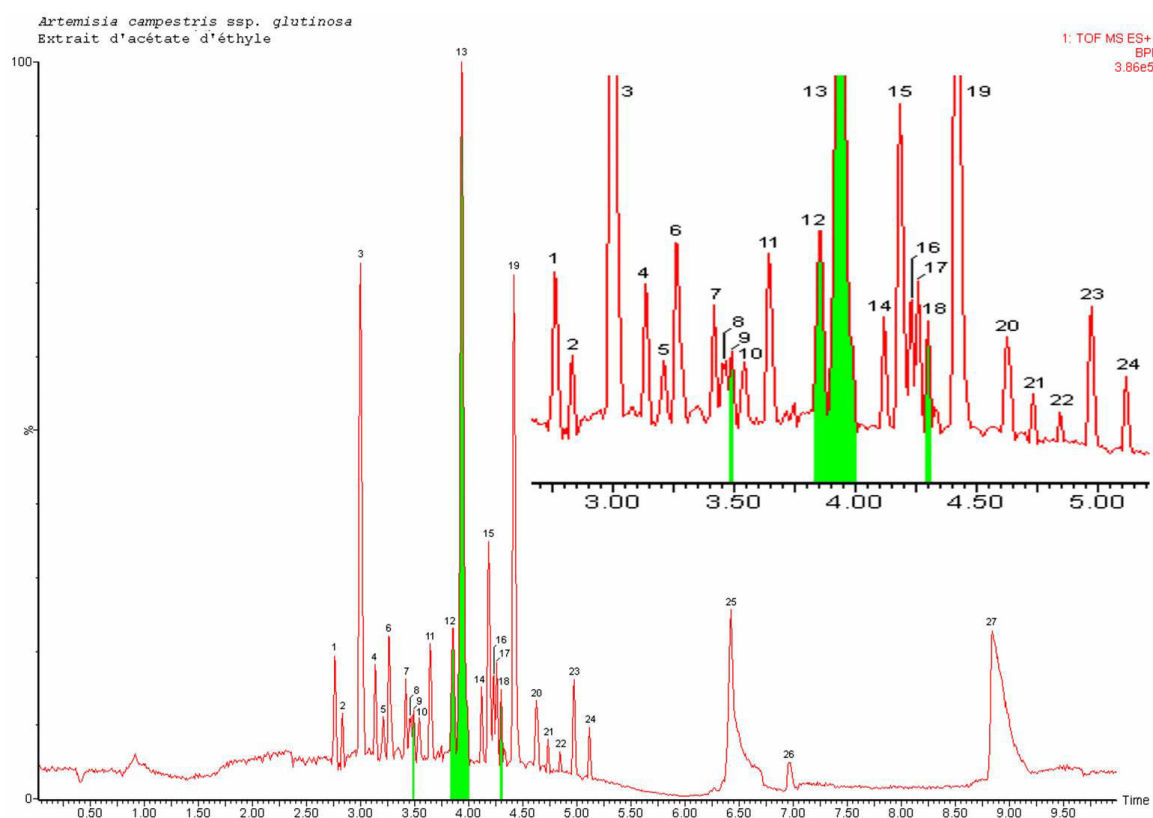
Usage traditionnel : Aromatisant souvent associé au thé. Les parties aériennes en décoction sont indiquées contre les frissons (264), le rhume, les tachycardies. Cette plante serait antidiabétique.



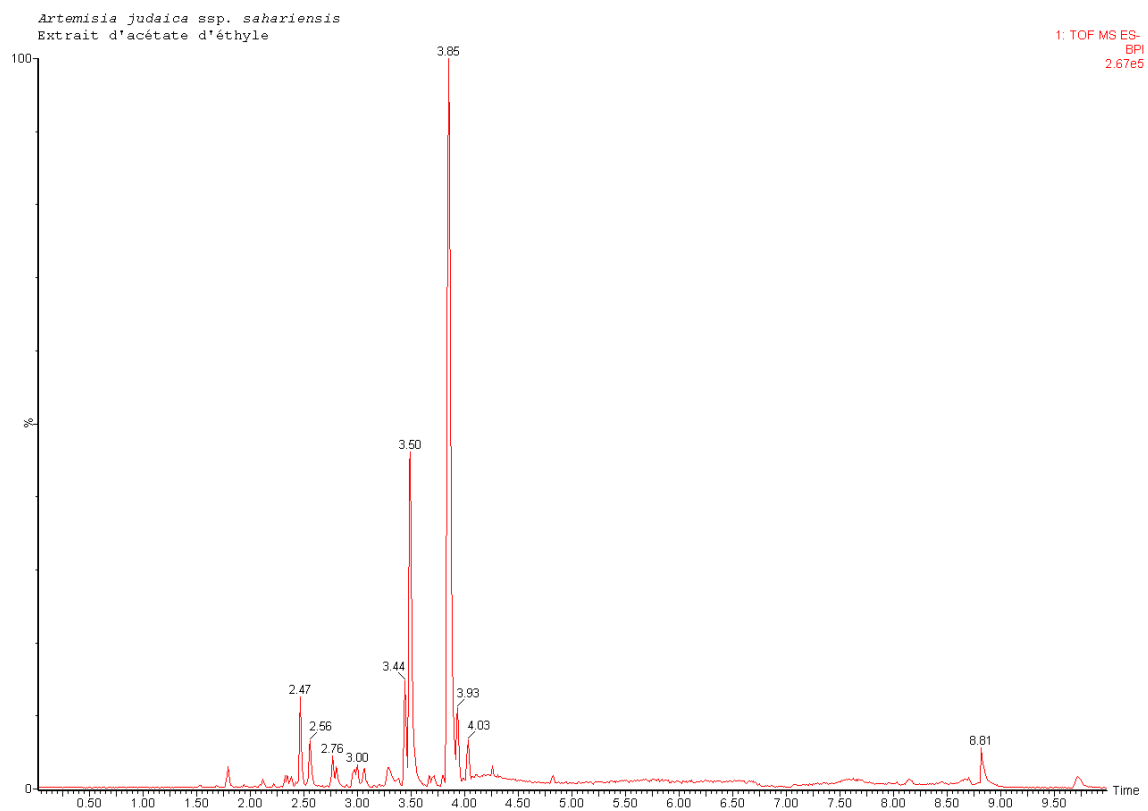
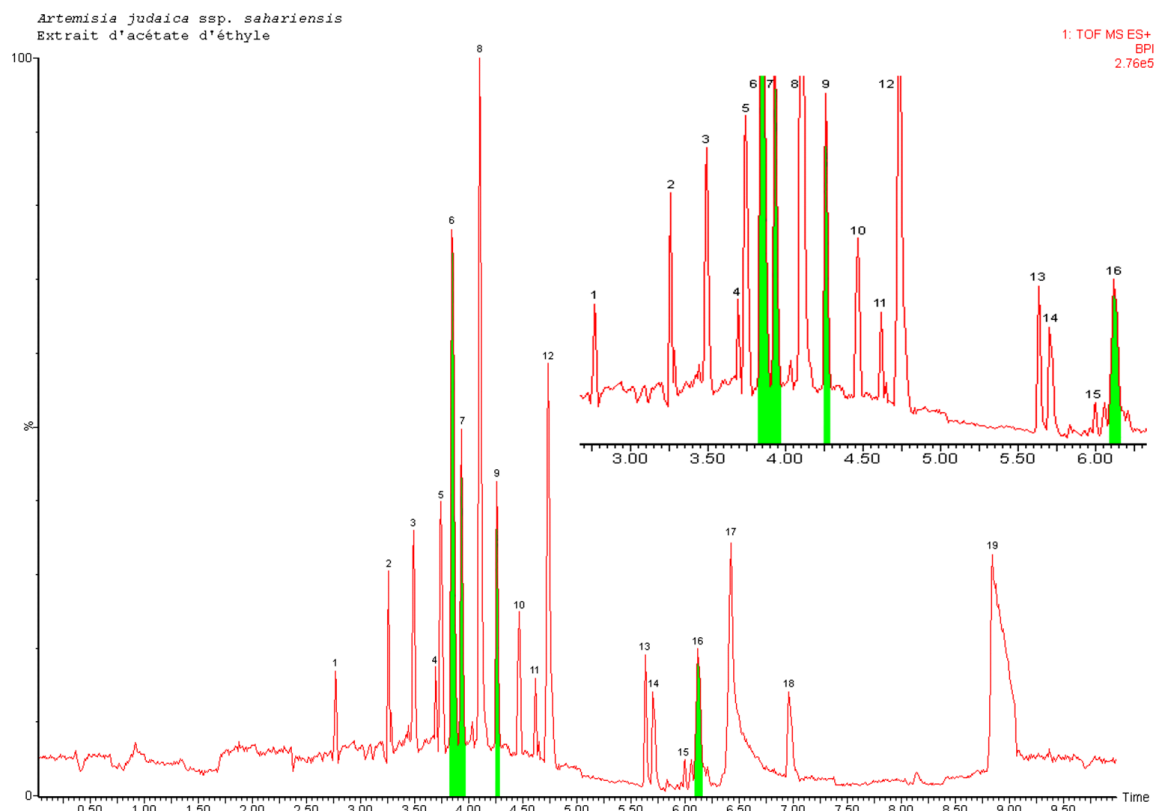
**Figure 77** : *Pulicaria incisa*



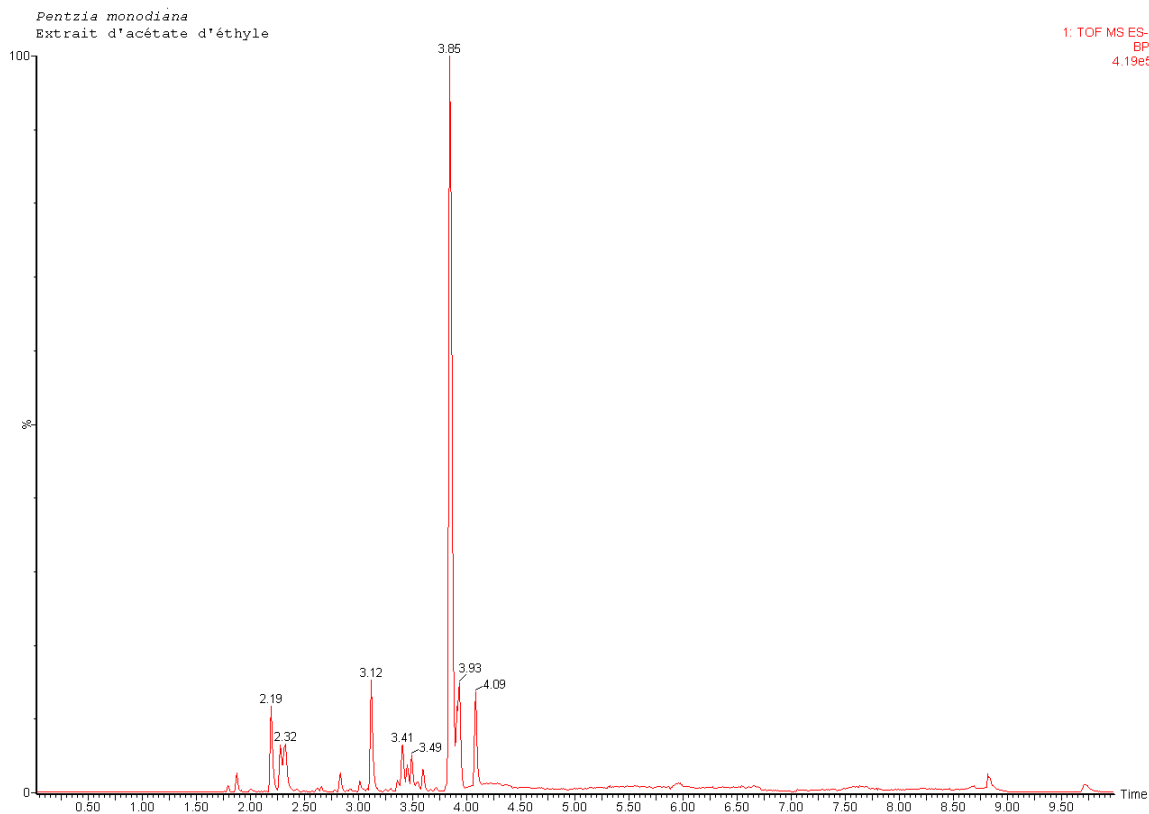
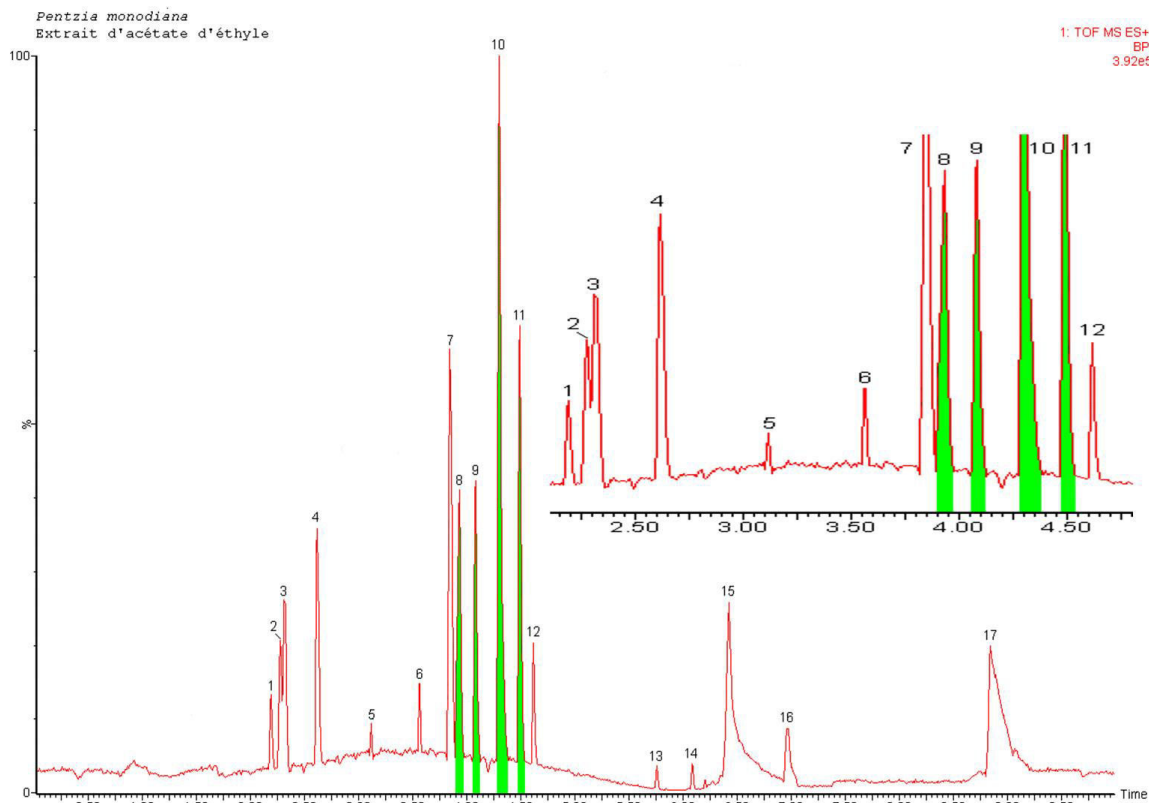
### ANNEXE 3 : Chromatogrammes UPLC-MS



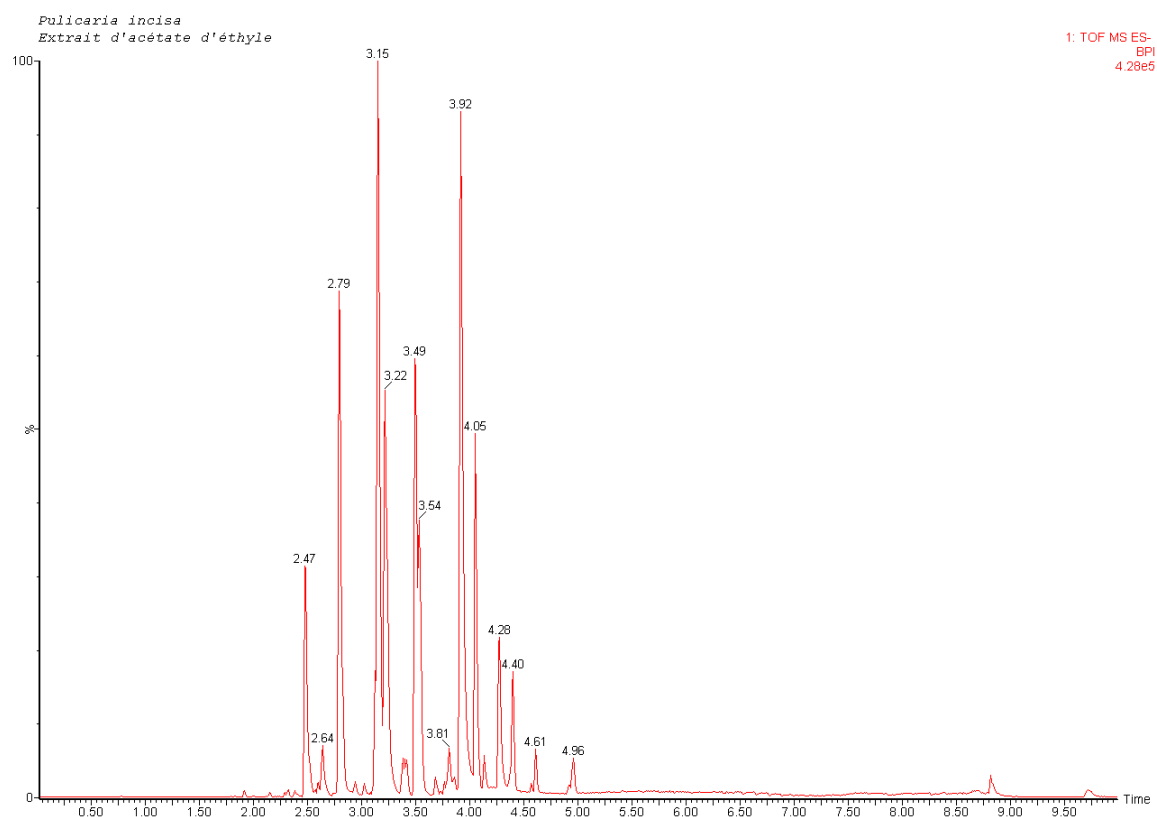
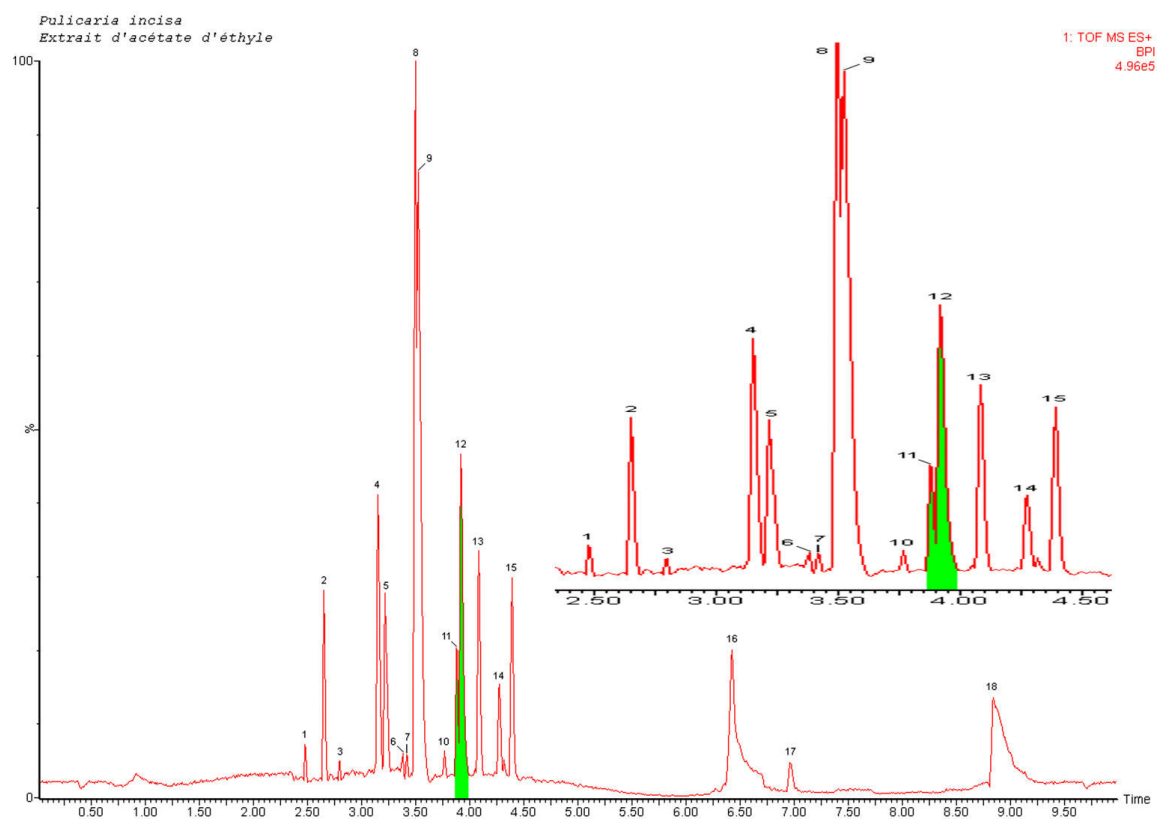
**Figure 78** : Chromatogrammes UPLC-MS en mode positif et en mode négatif de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris ssp. glutinosa*



**Figure 79** : Chromatogrammes UPLC-MS en mode positif et en mode négatif de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia judaica ssp. sahariensis*



**Figure 80** : Chromatogrammes UPLC-MS en mode positif et en mode négatif de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana*




**Figure 81** : Chromatogrammes UPLC-MS en mode positif et en mode négatif de l'extrait AcOEt de *Pulicaria incisa*



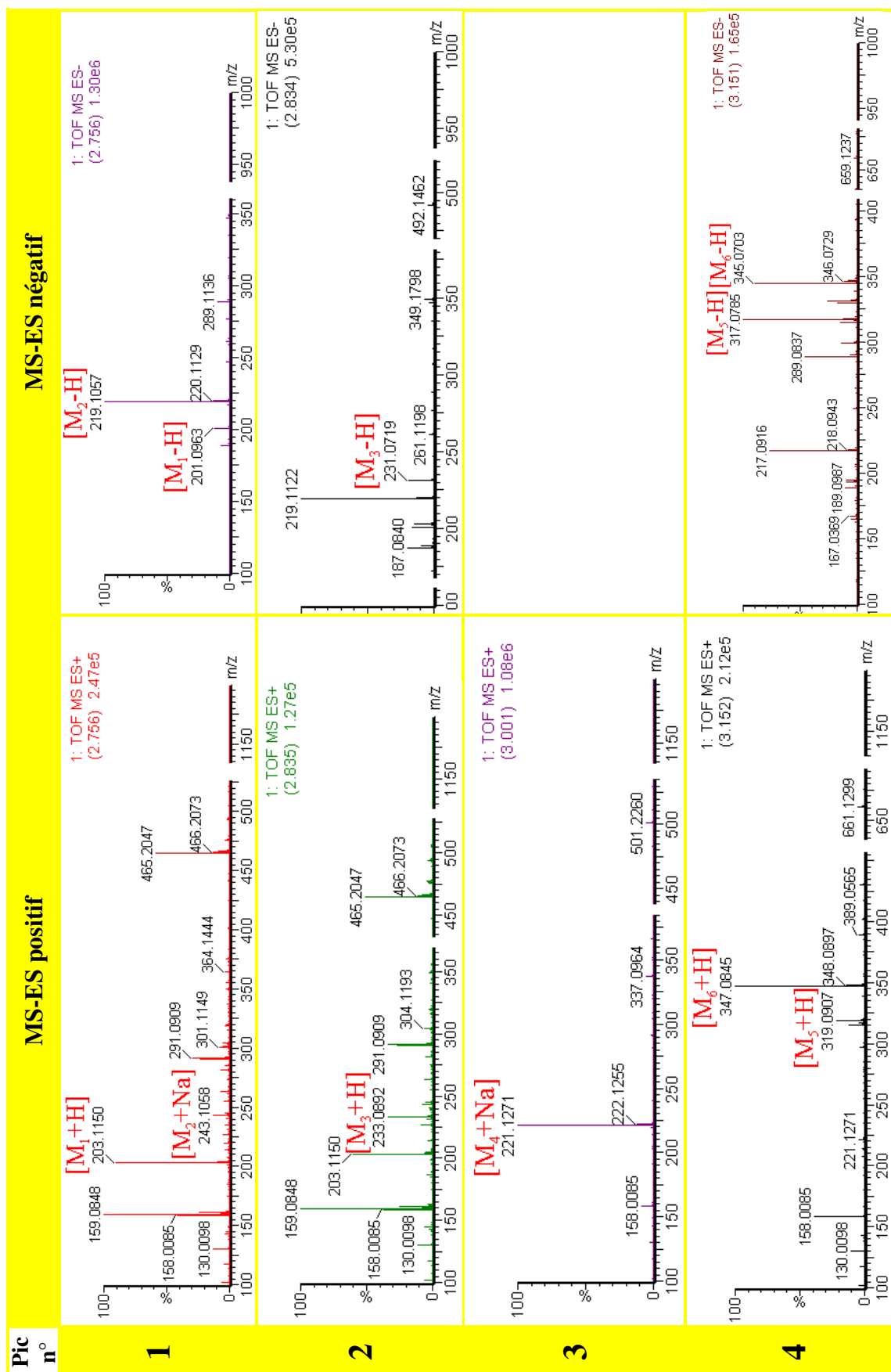
## ANNEXE 4 : Exemple de table Excel utilisée pour le calcul de masse moléculaire à partir d'adduits observés dans les spectres de masses ESI

**Tableau 36** : Exemple de table Excel utilisée pour le calcul de la masse moléculaire à partir d'adduits observés dans les spectres de masse ESI positif et ESI négatif

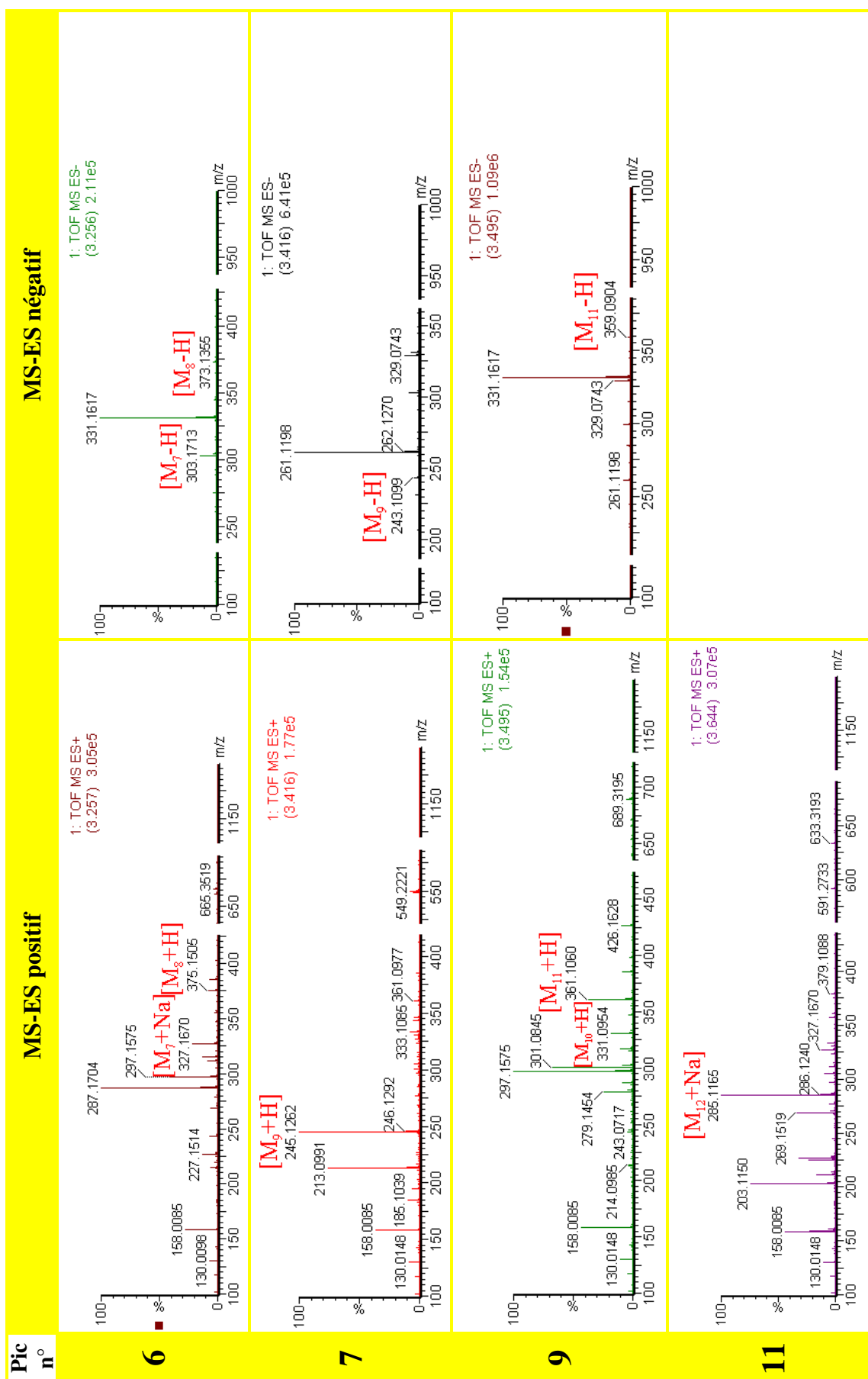
Monoisotopic exact masses of molecular ion adducts often observed in ESI mass spectra					Your M here: 350,00000	 Excel Your M+X or M-X 876,32
Ion name	Ion mass	Charge	Mult	Mass	Result:	Reverse:
<b>1. Positive ion mode</b>						
M+3H	M/3 + 1.007276	3+	0,33	1,007276	117,673943	291,099391
M+2H+Na	M/3 + 8.334590	3+	0,33	8,334590	125,001257	283,772077
M+H+2Na	M/3 + 15.7661904	3+	0,33	15,766190	132,432857	276,340476
M+3Na	M/3 + 22.989218	3+	0,33	22,989218	139,655885	269,117449
M+2H	M/2 + 1.007276	2+	0,5	1,007276	176,007276	437,152724
M+H+Na	M/2 + 11.998247	2+	0,5	11,998247	186,998247	426,161753
M+ACN+2H	M/2 + 21.520550	2+	0,5	21,520550	196,520550	416,639450
M+2Na	M/2 + 22.989218	2+	0,5	22,989218	197,989218	415,170782
M+2ACN+2H	M/2 + 42.033823	2+	0,5	42,033823	217,033823	396,126177
M+H	M + 1.007276	1+	1	1,007276	351,007276	875,312724
M+Na	M + 22.989218	1+	1	22,989218	372,989218	853,330782
M+CH3OH+H	M + 33.033489	1+	1	33,033489	383,033489	843,286511
M+ACN+H	M + 42.033823	1+	1	42,033823	392,033823	834,286177
M+2Na-H	M + 44.971160	1+	1	44,971160	394,971160	831,348840
M+ACN+Na	M + 64.015765	1+	1	64,015765	414,015765	812,304235
2M+H	2M + 1.007276	1+	2	1,007276	701,007276	1751,632724
2M+Na	2M + 22.989218	1+	2	22,989218	722,989218	1729,650782
2M+ACN+H	2M + 42.033823	1+	2	42,033823	742,033823	1710,606177
<b>2. Negative ion mode</b>						
M-3H	M/3 - 1.007276	3-	0,33	-1,007276	115,659391	293,113943
M-2H	M/2 - 1.007276	2-	0,5	-1,007276	173,992724	439,167276
M-H	M - 1.007276	1-	1	-1,007276	348,992724	877,327276
M+Na-2H	M + 20.974666	1-	1	20,974666	370,974666	855,345334
M+Cl	M + 34.969402	1-	1	34,969402	384,969402	841,350598
2M-H	2M - 1.007276	1-	2	-1,007276	698,992724	1753,647276
3M-H	3M - 1.007276	1-	3	1,007276	1051,007276	2627,952724



**Tableau 37 (1/4) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*



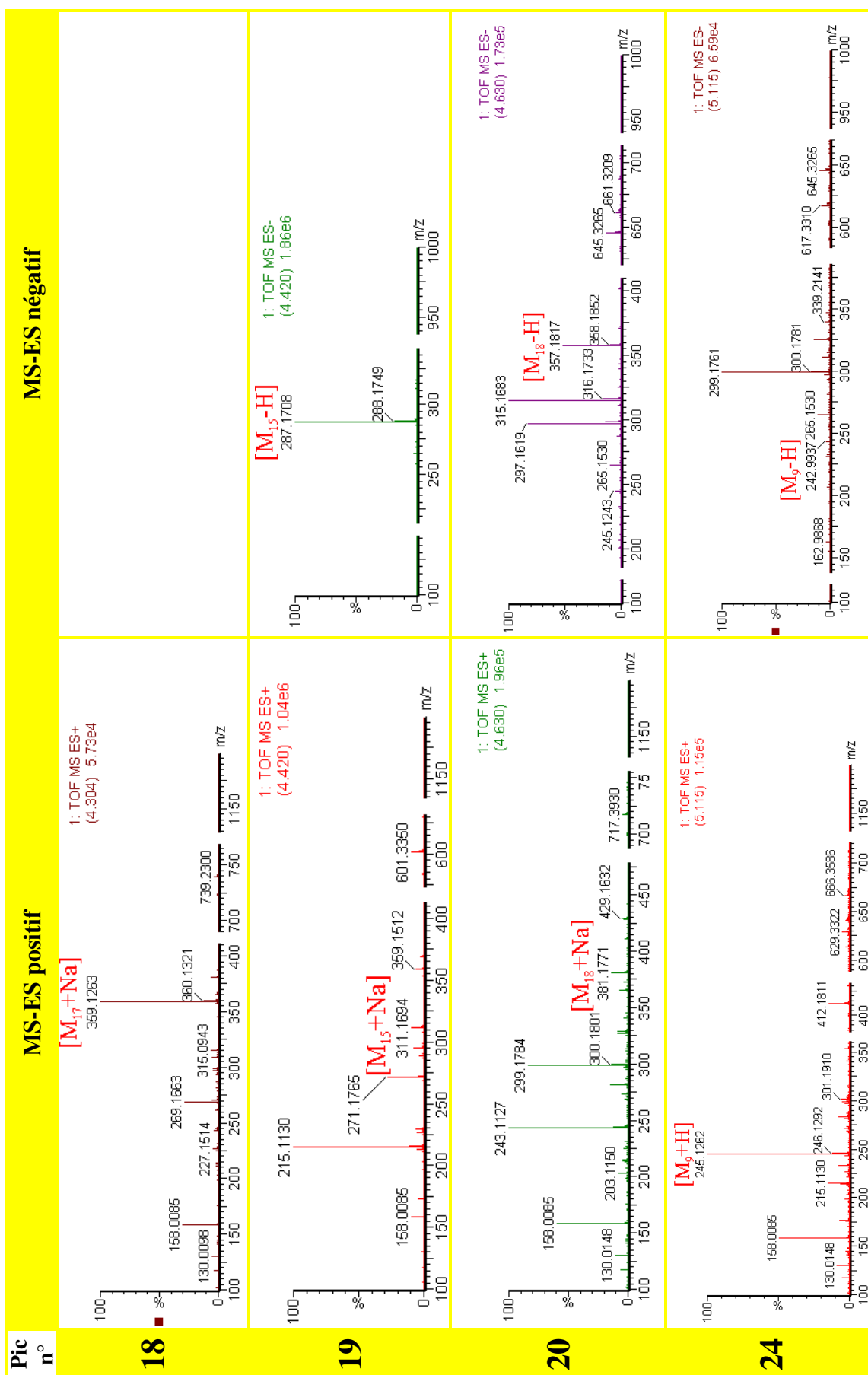
**Tableau 37 (2/4) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*



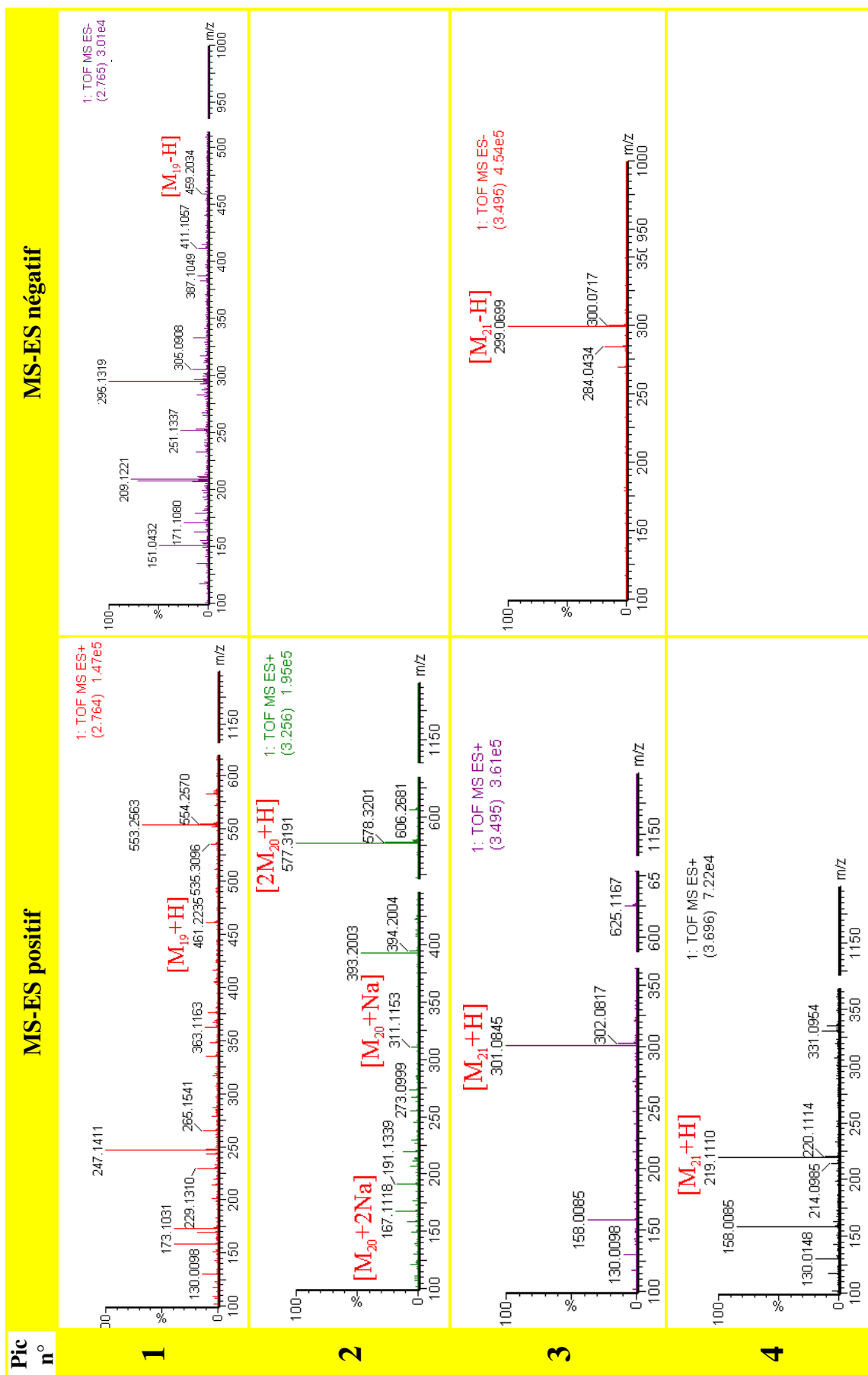
**Tableau 37 (3/4) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*

Pic n°	MS-ES positif	MS-ES négatif
12	<p>1: TOF MS ES+ (3.847) 3.37e5</p> <p>130.0148, 158.0085, 315.0943 <math>[M_{13}+H]</math>, 316.0988</p>	
13	<p>1: TOF MS ES+ (3.952) 1.99e6</p> <p>158.0085, 243.1127, 299.1784, 345.1110 <math>[M_{14}+H]</math>, 346.1133, 633.3634, 713.1726</p>	
14	<p>1: TOF MS ES+ (4.120) 1.82e5</p> <p>130.0098, 158.0085, 215.1130, 271.1765, 311.1694, 369.1805 <math>[M_{15}+Na]</math>, 601.3350</p>	<p>1: TOF MS ES- (4.120) 2.62e5</p> <p>265.1530, 287.1708 <math>[M_{15}-H]</math>, 288.1749, 645.3265</p>
15	<p>1: TOF MS ES+ (4.182) 4.91e5</p> <p>158.0085, 243.1127 <math>[M_{16}+Na]</math>, 299.1708, 369.1805, 428.1830, 973.4998</p>	

**Tableau 37 (4/4) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*



**Tableau 38 (1/4) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*



**Tableau 38 (2/4) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

Pic n°	MS-ES positif	MS-ES négatif
5	<p>1: TOF MS ES+ (3.742) 4.02e5</p>	<p>1: TOF MS ES- (3.847) 1.04e6</p>
6	<p>1: TOF MS ES+ (3.856) 7.71e5</p>	<p>1: TOF MS ES- (3.934) 9.27e4</p>
7	<p>1: TOF MS ES+ (3.934) 4.78e5</p>	<p>1: TOF MS ES- (3.934) 9.27e4</p>



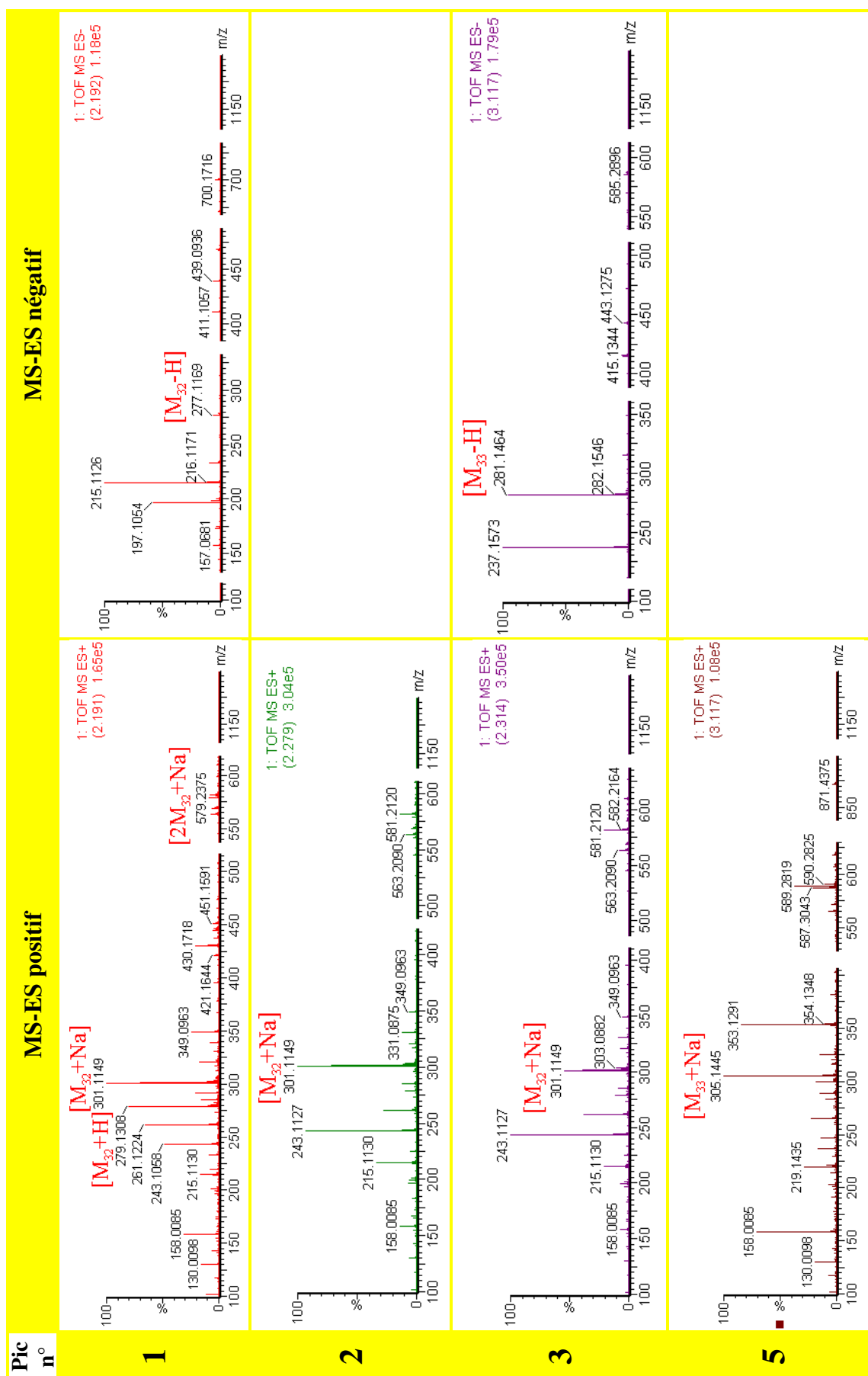
**Tableau 38 (3/4) : Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis***

Pic n°	MS-ES positif	MS-ES négatif
8	<p>1: TOF MS ES+ (4.103) 1.06e6</p>	
9	<p>1: TOF MS ES+ (4.260) 3.83e5</p>	
10	<p>1: TOF MS ES+ (4.464) 2.13e5</p>	

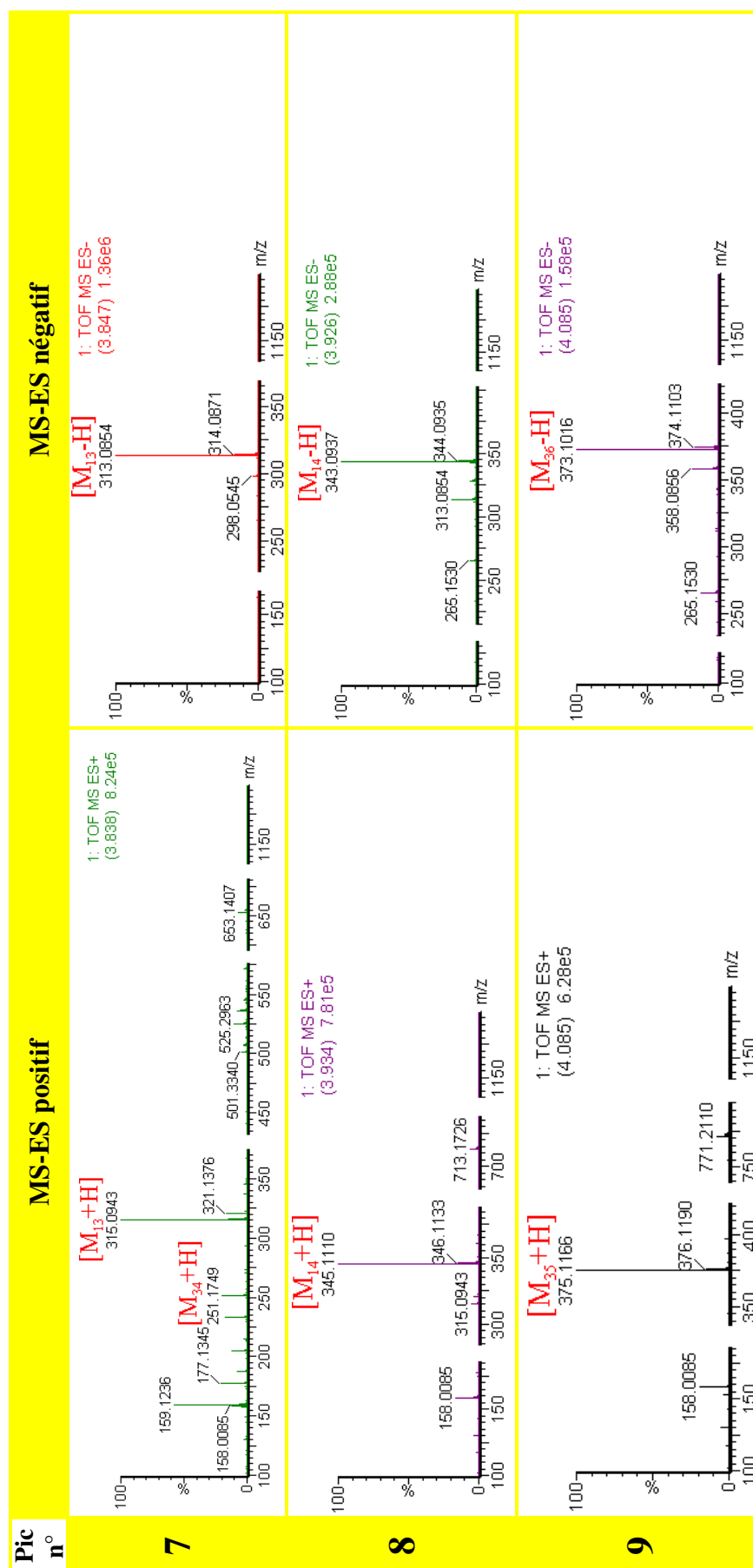
**Tableau 38 (4/4) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de l'*Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*

Pic n°	MS-ES positif	MS-ES négatif
11	<p>1: TOF MS ES+ (4.737) 6.49e5</p>	
15	<p>1: TOF MS ES+ (5.994) 3.94e4</p>	
16	<p>1: TOF MS ES+ (6.119) 3.13e5</p>	

**Tableau 39 (1/3) : Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana***



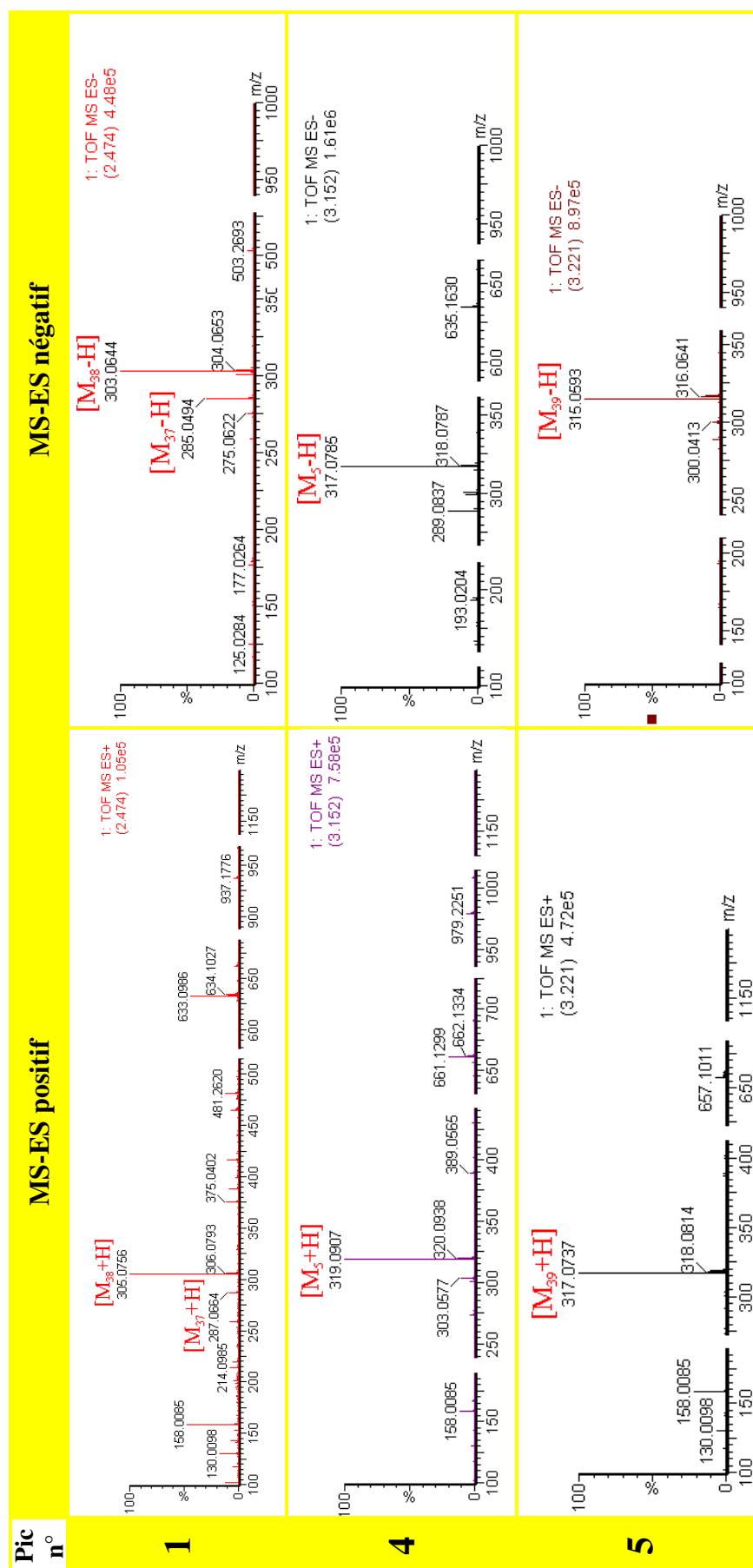
**Tableau 39 (2/3) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana*



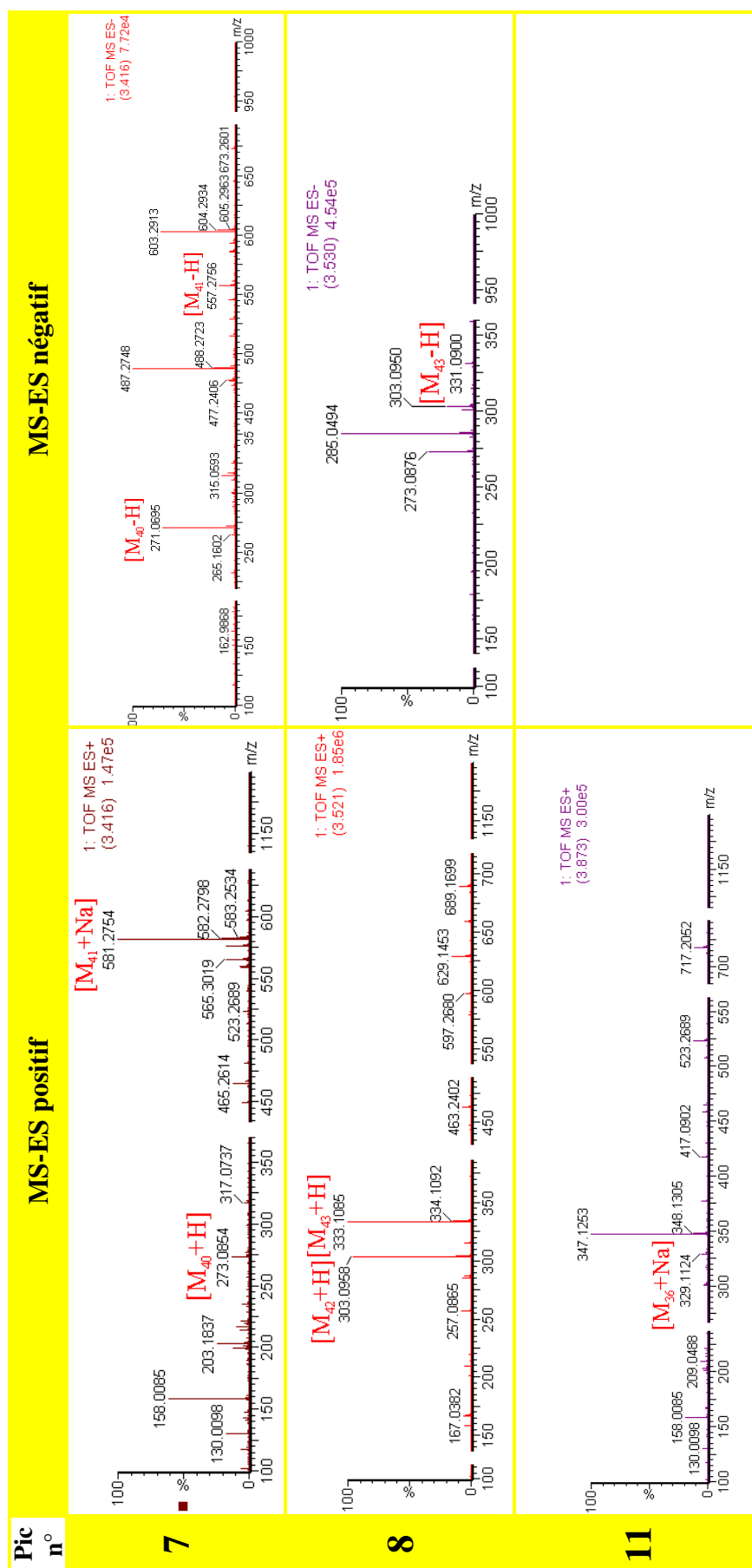
**Tableau 39 (3/3) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de *Pentzia monodiana*

Pic n°	MS-ES positif	MS-ES négatif
<b>10</b>	<p>1: TOF MS ES+ (4.304) 1.59e6</p>	
<b>11</b>	<p>1: TOF MS ES+ (4.490) 9.59e5</p>	
<b>12</b>	<p>1: TOF MS ES+ (4.621) 2.39e5</p>	

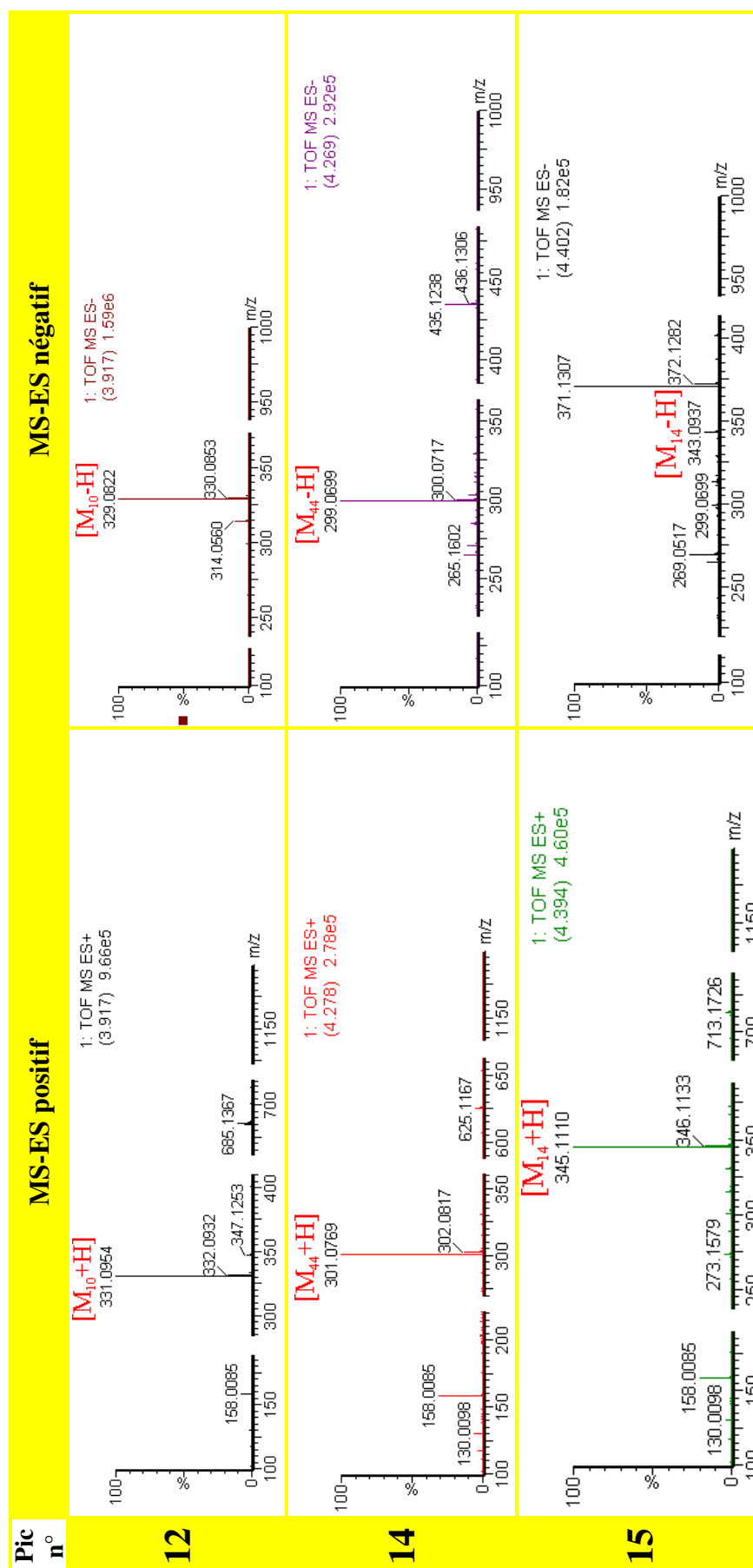
**Tableau 40 (1/3) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de *Pulicaria incisa*



**Tableau 40 (2/3) : Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de *Pulicaria incisa***

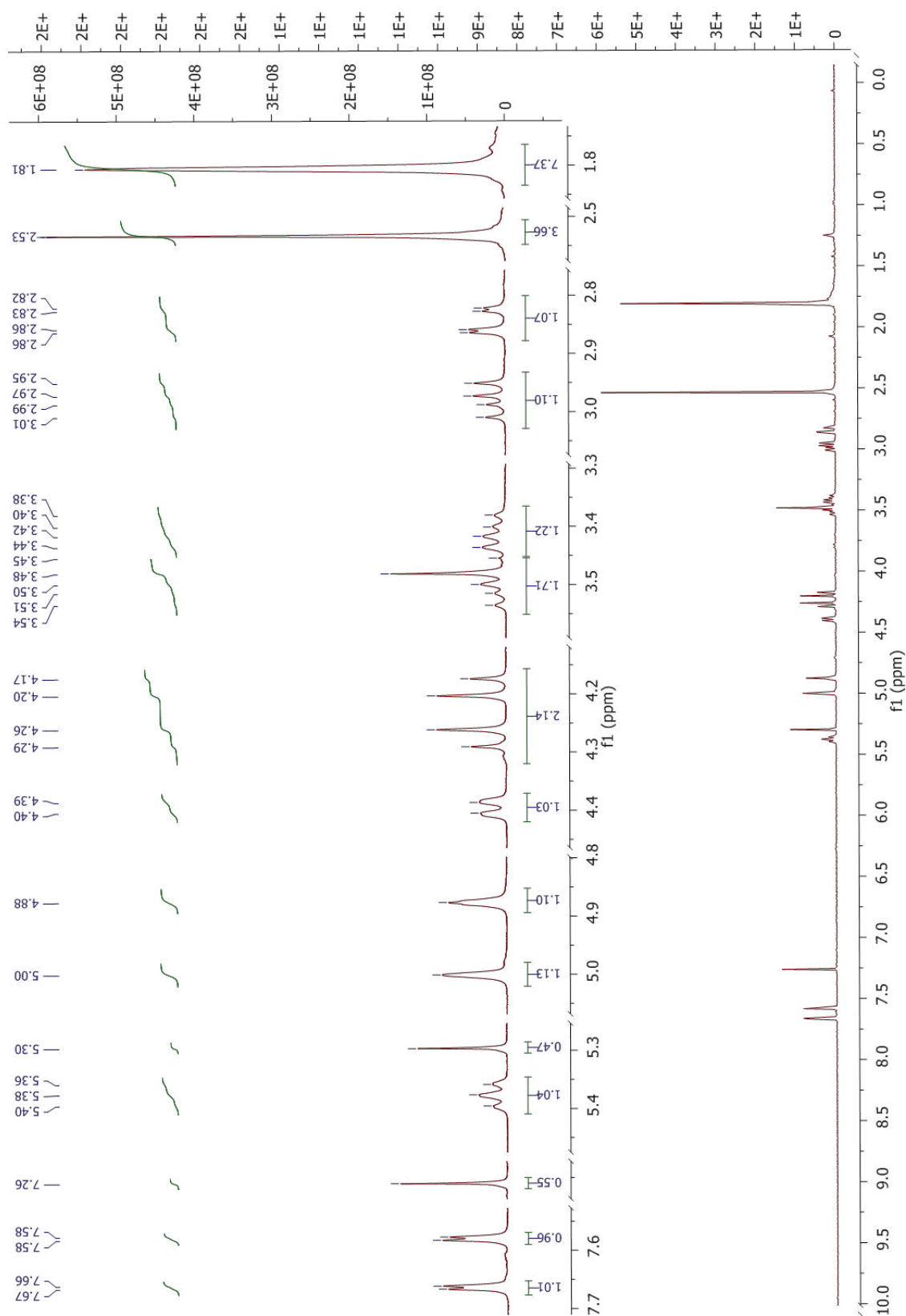


**Tableau 40 (3/3) :** Spectres de masses correspondant aux principaux pics de l'UPLC-MS de l'extrait AcOEt de *Pulicaria incisa*

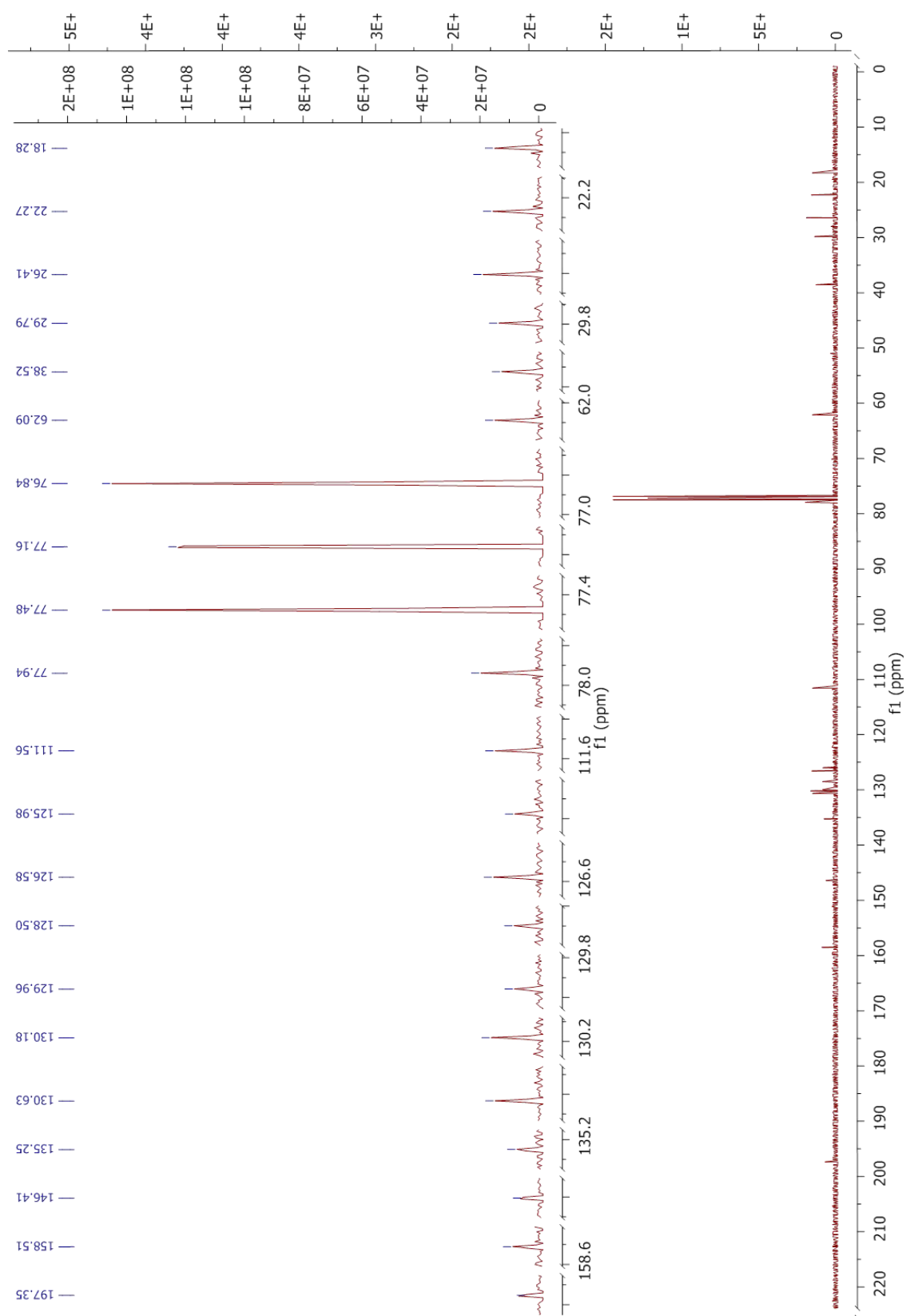




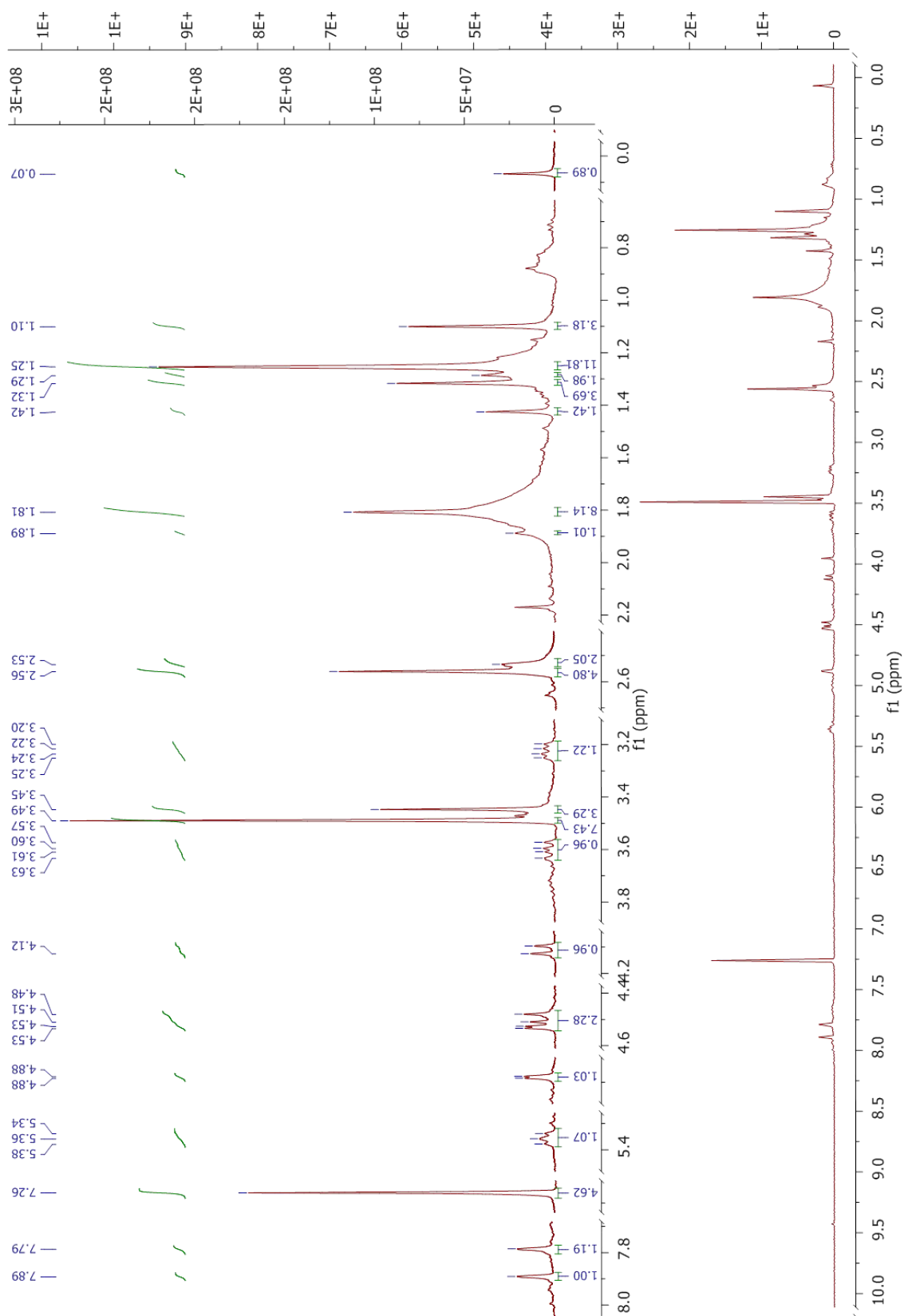
**ANNEXE 6.1 : Spectres RMN des fractions à composé majoritaire obtenues à partir de l'extrait AcOEt des parties aériennes de l'*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa***



**Figure 82 :** Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **ACG-d5** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)



**Figure 83** : Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN du composé **ACG-d5** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS)



**Figure 84** : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **ACG-d8** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

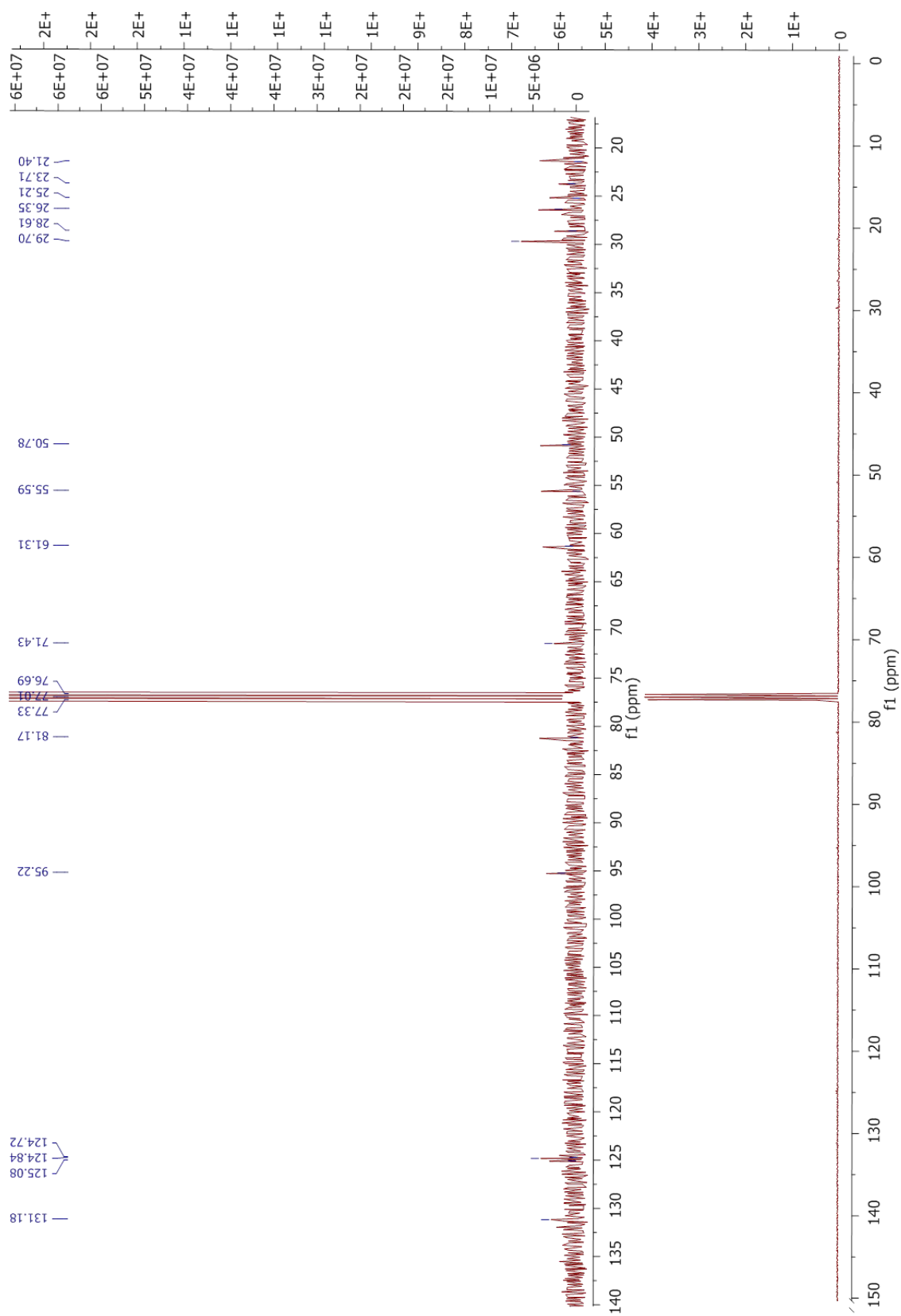
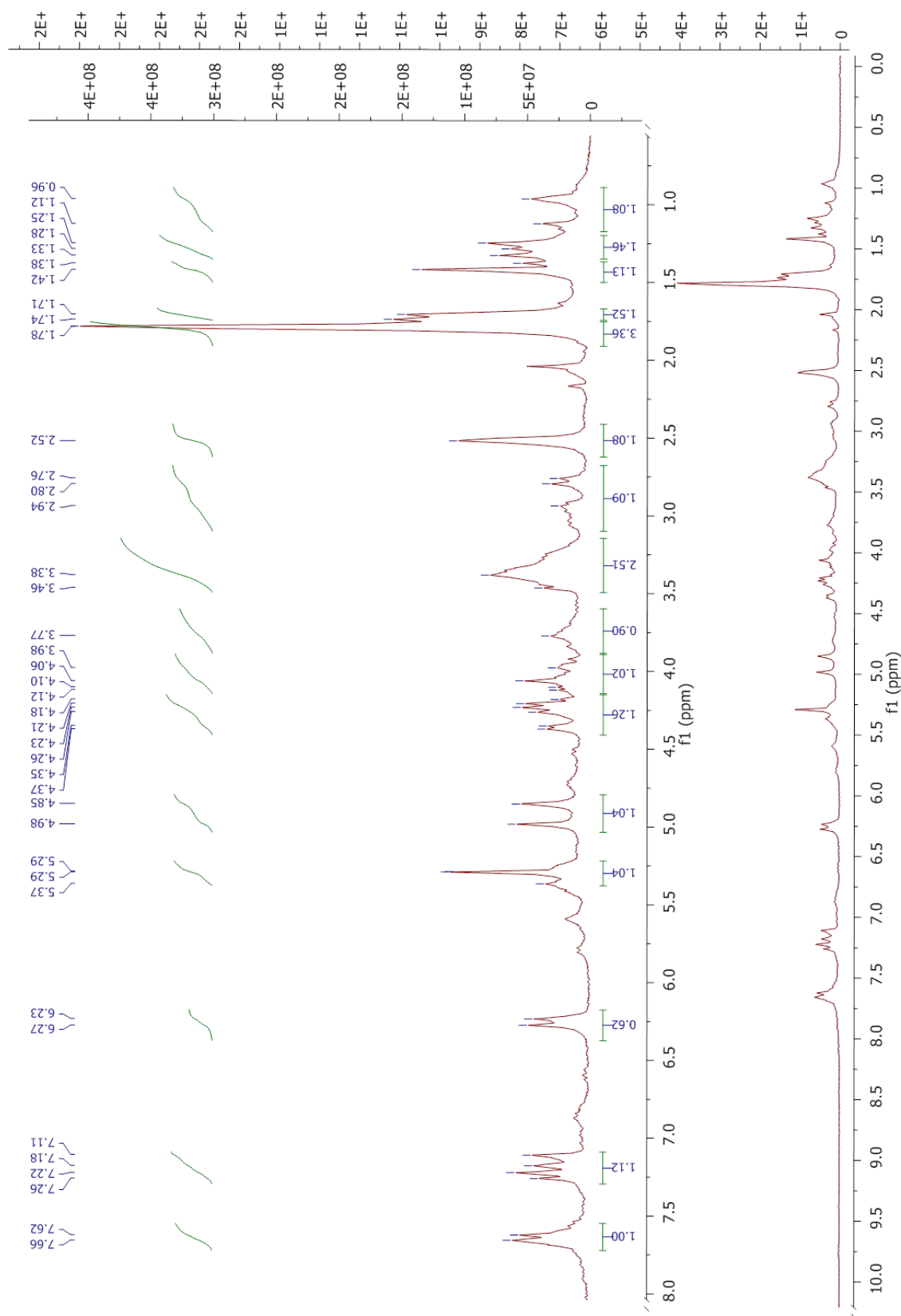
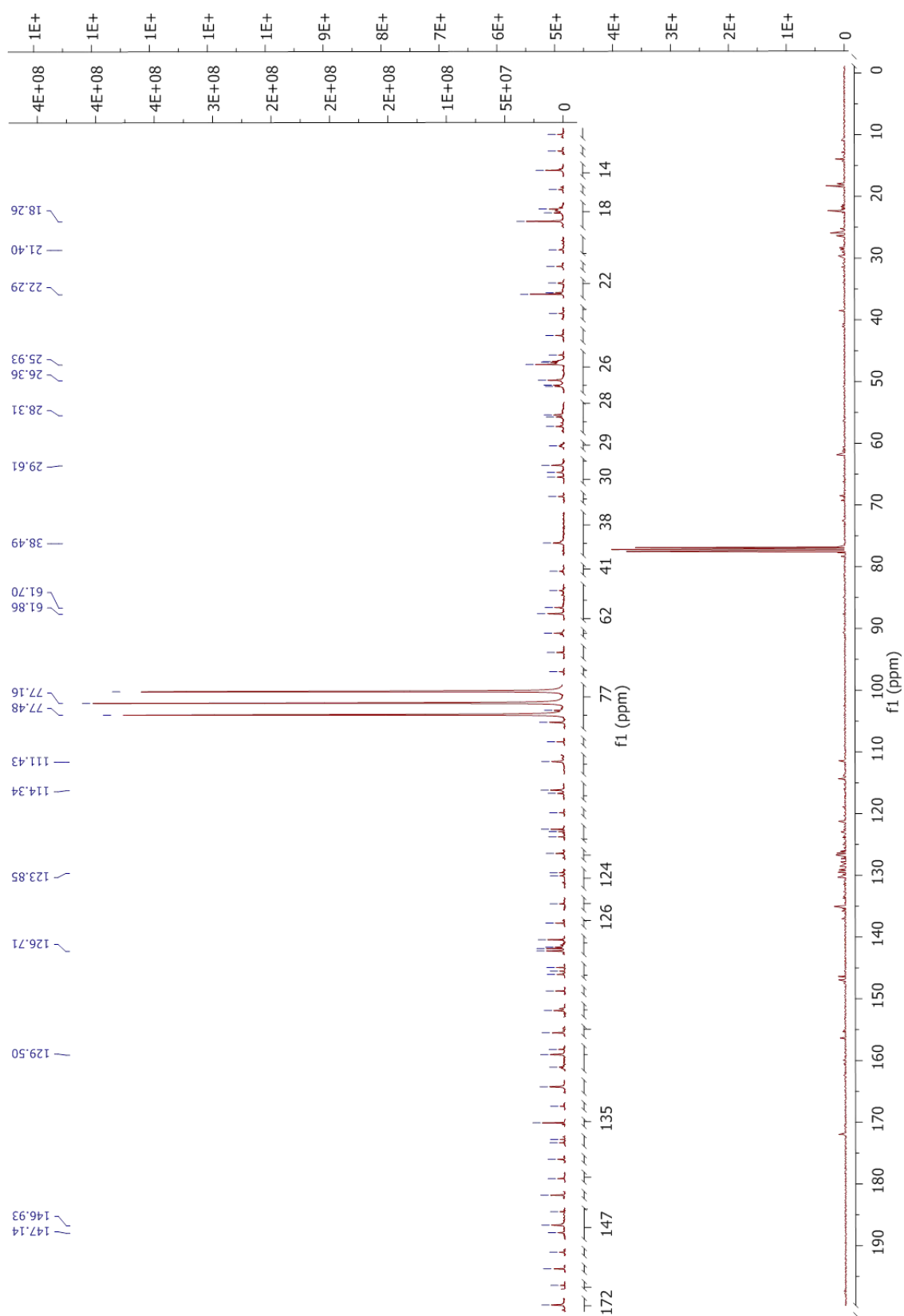


Figure 85 : Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN du composé **ACG-d8** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

**ANNEXE 6.2 : Spectres RMN des composés isolés de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *Pentzia monodiana***



**Figure 86** : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **ACG-e11** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)



**Figure 87** : Spectre  $^{13}\text{C}$ -RMN du composé **ACG-e11** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

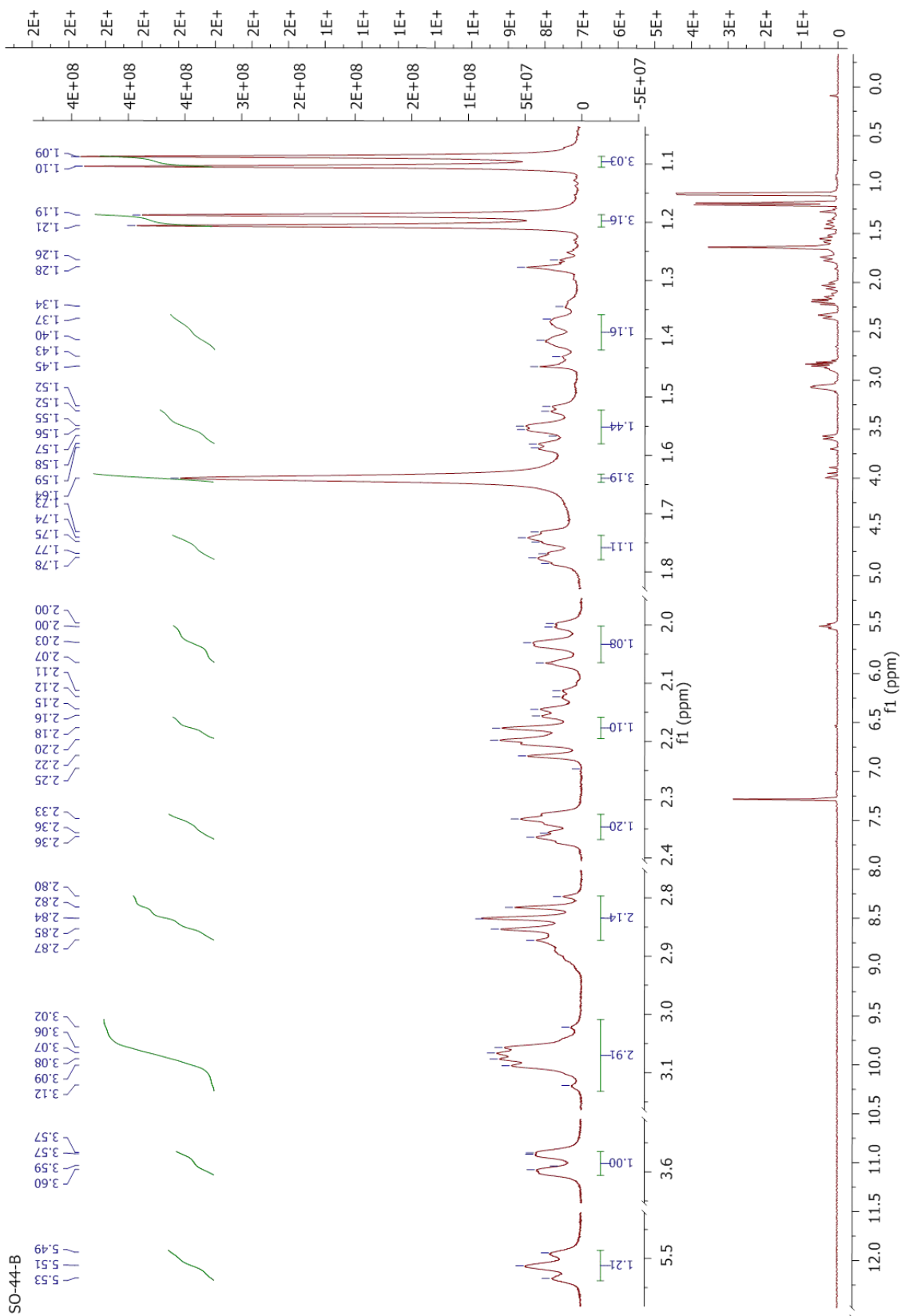


Figure 88 : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **44B** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

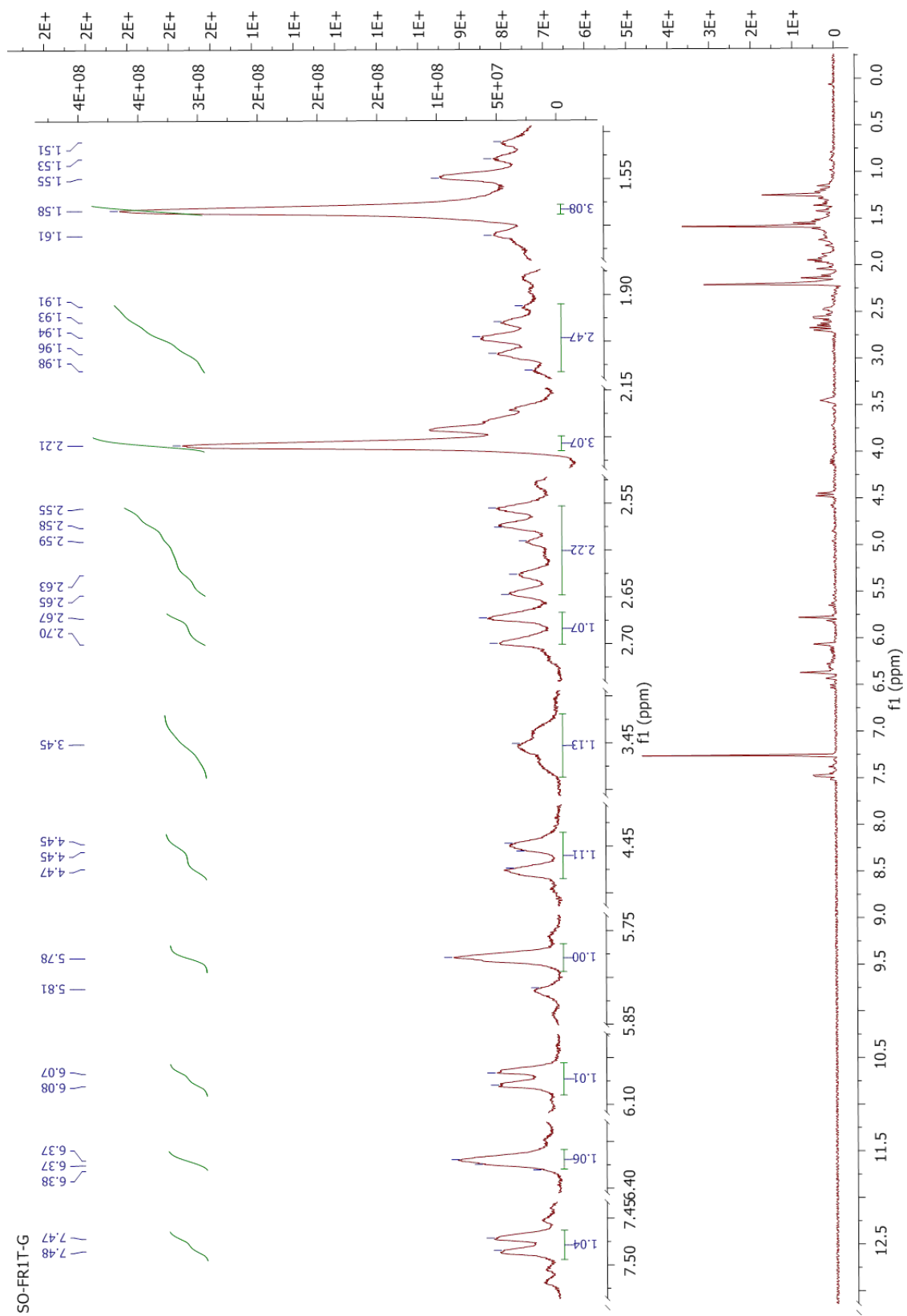


Figure 89 : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **FR-1T-G** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)



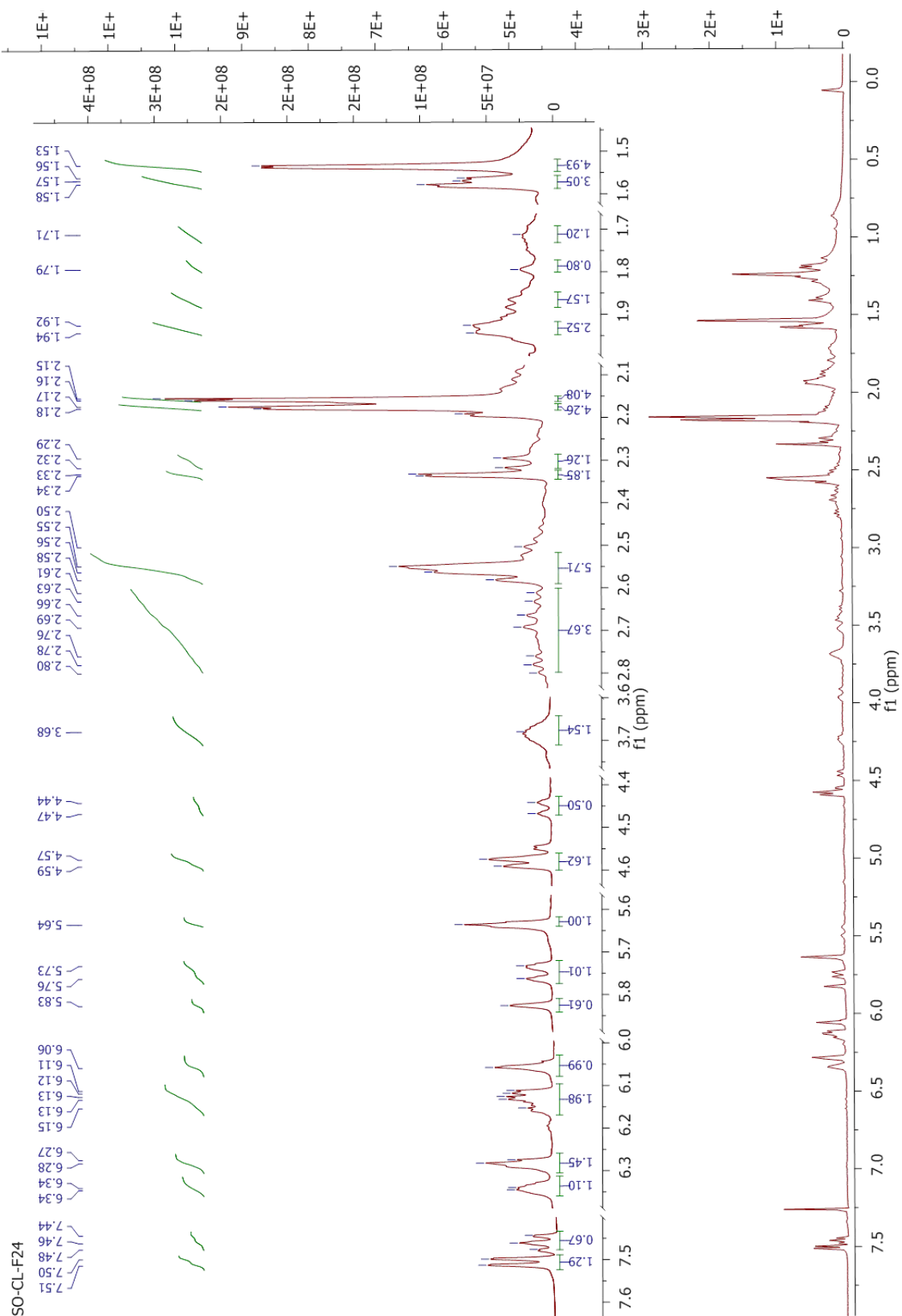
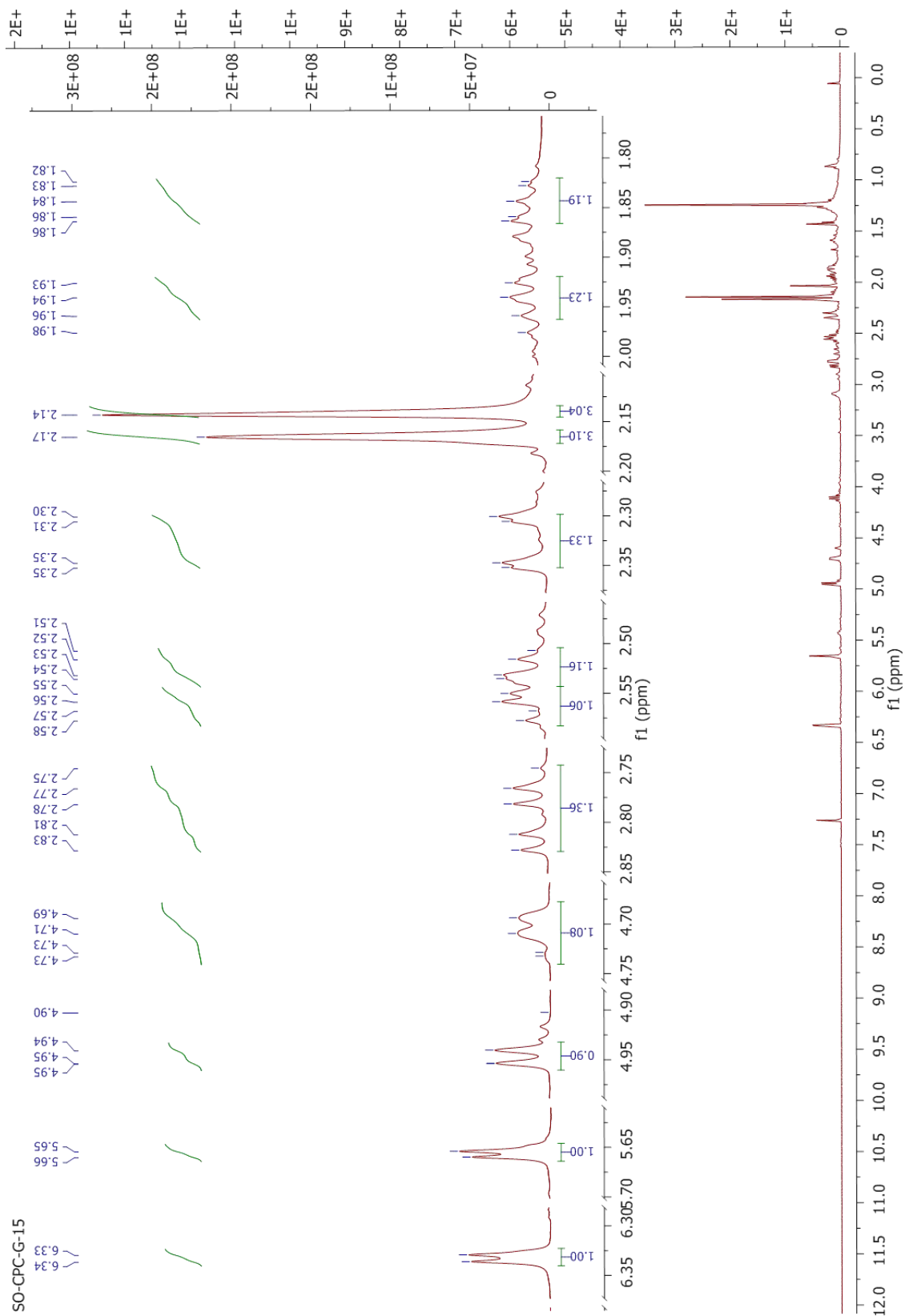


Figure 90 : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **CL-F24** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)



**Figure 91** : Spectre  $^1\text{H-RMN}$  du composé **CPC-S1-F16-20** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)

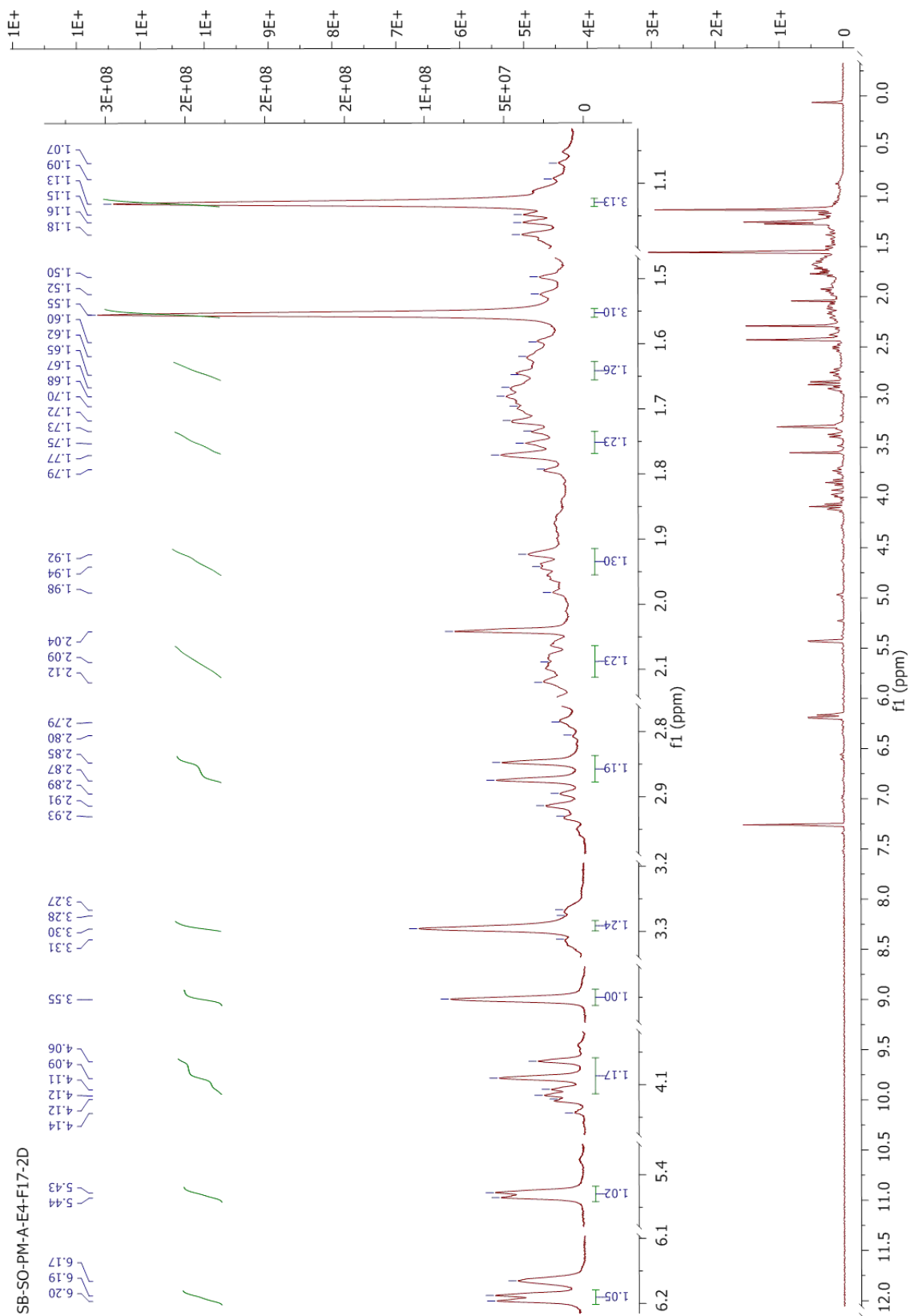
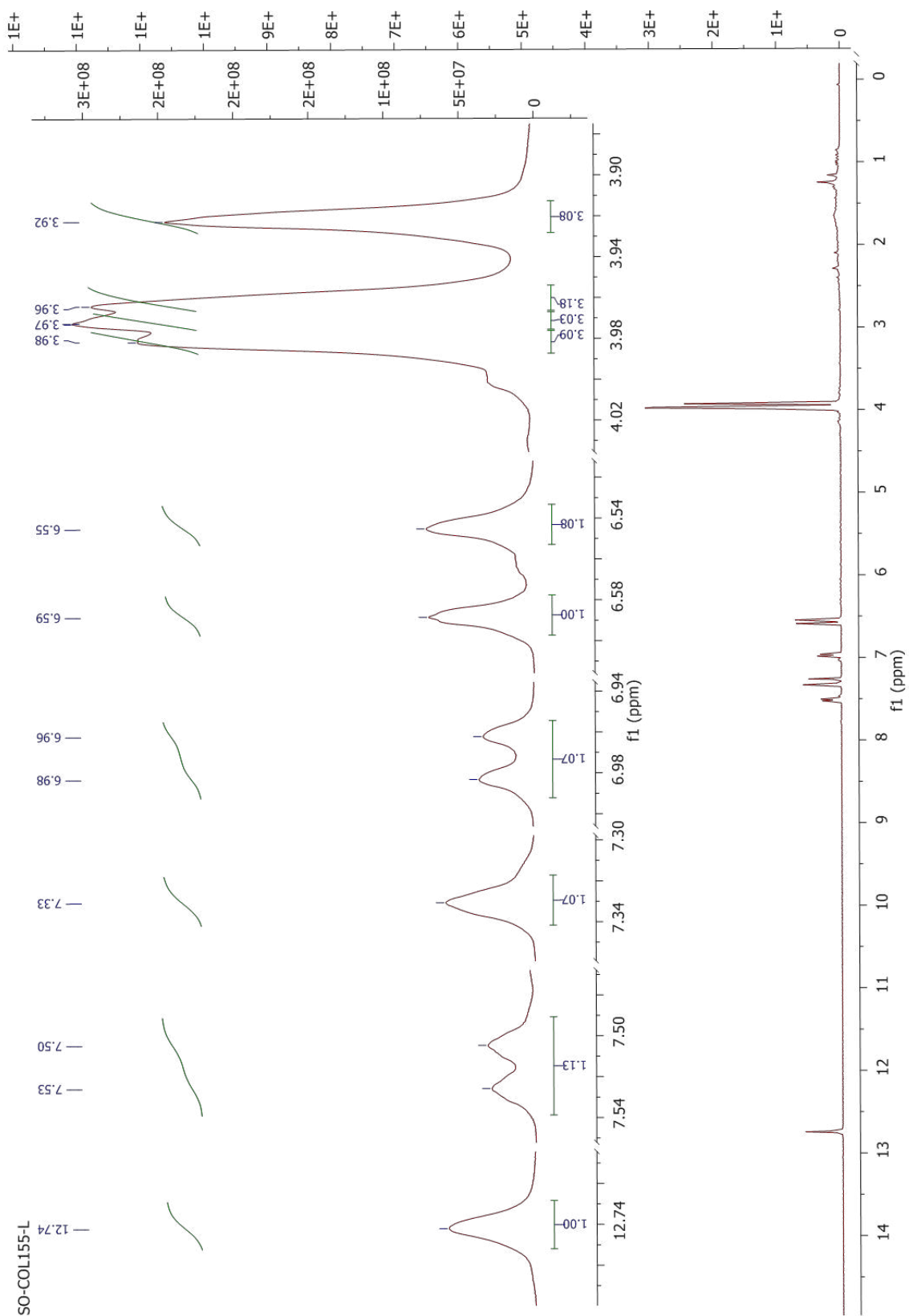
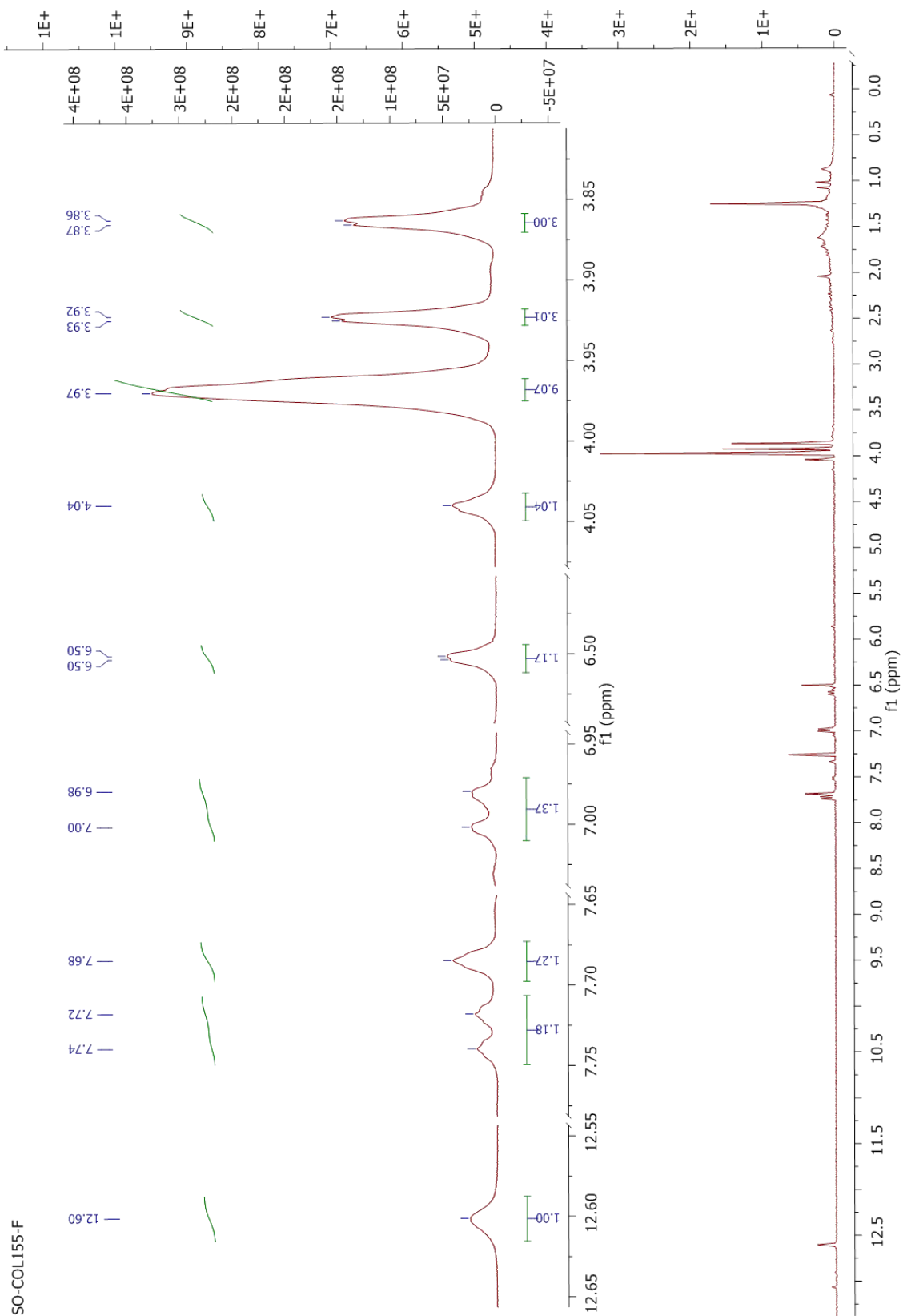


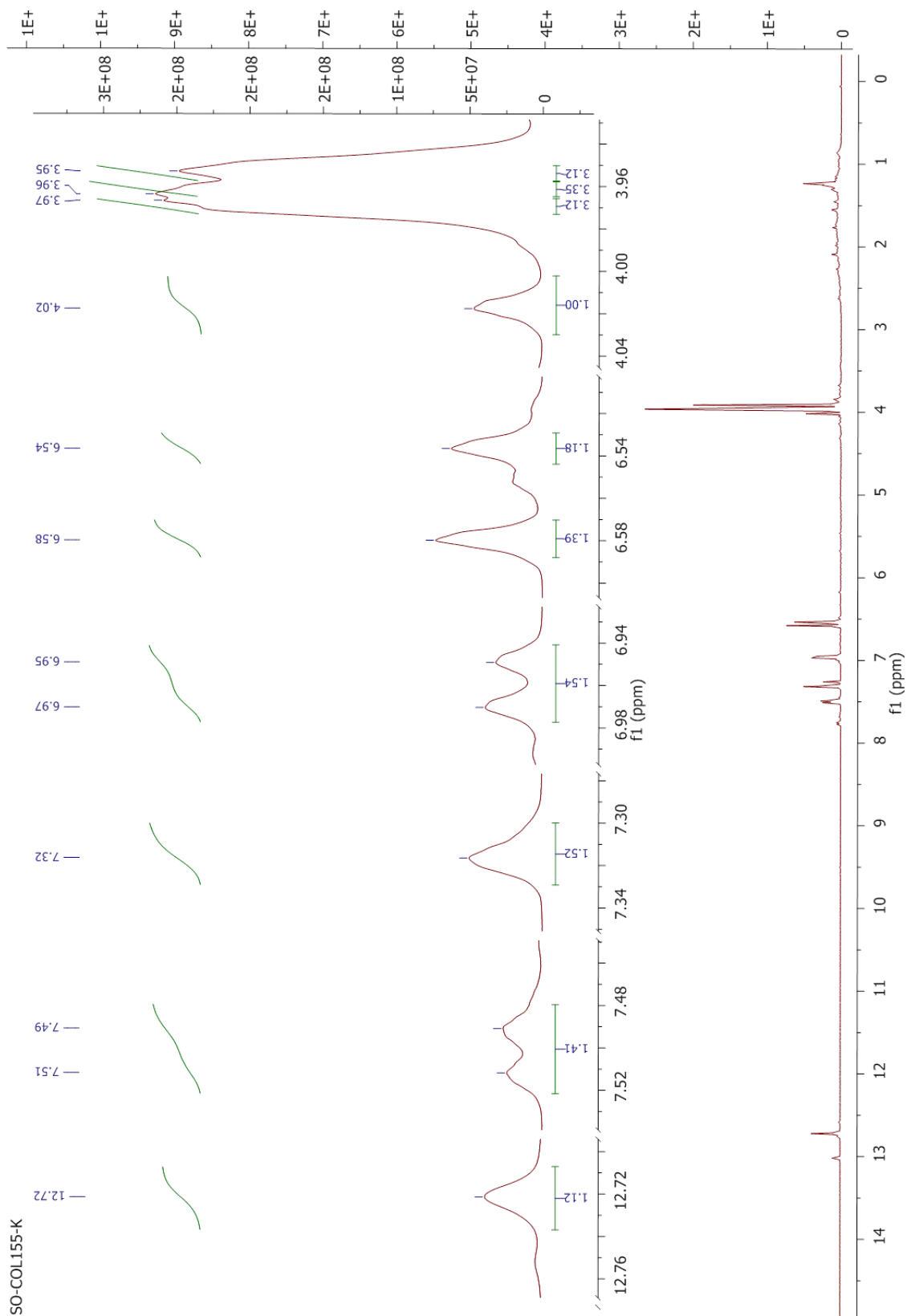
Figure 92 : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé CPC-S2-F17 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)



**Figure 93** : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **COL-155-L** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)



**Figure 94** : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **COL-155-F** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)



**Figure 95** : Spectre  $^1\text{H}$ -RMN du composé **COL-155-K** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)







**ANNEXE 7 : Autorisation de l'ONPCA (ex. OPNA) pour le prélèvement  
d'échantillons de plantes**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE LA CULTURE  
OFFICE DU PARC NATIONAL DE L'AHAGGAR



وزارة الثقافة  
ديوان حظيرة الأهمغار الوطنية

N° 284 / D / OPNA / 2013

Tamanrasset, le

**AUTORISATION**

Considérant l'autorisation n° 965/DPLBCVPC/MC/13 et n° 111/SDV/MC/13 du 19.09.2013 du Ministère de la Culture portant mission de terrain dans le Parc Culturel de l'Ahaggar,

je soussigné, le **Directeur l'Office National du Parc culturel de l'Ahaggar**, autorise MR Dali Mustapha Kamel, enseignant chercheur à la faculté de médecine de Tlemcen, à transporter des échantillons de plantes séchés, à des fins d'analyse au laboratoire. (Voire liste des plantes annexée en tableau ci-dessous)

**DIRECTEUR L'OFFICE NATIONAL DU PARC CULTUREL DE L'AHAGGAR**  
A. AOUALI

Fait à Tamanrasset le 02/10/2013

**Tableau des espèces végétales non cultivées échantillonnées**

N.Scientifique	observation
1) <i>Artemisia campestris var glutinosa</i>	
2) <i>Artemisia judaica ssp saharensis</i>	
3) <i>Balanites aegyptiaca</i>	
4) <i>Salvia chudaecai</i>	
5) <i>Cassia italica sp</i>	
6) <i>Lavandula antinea</i>	
7) <i>Pentzia monodiana</i>	
8) <i>Pulicaria crispa</i>	
9) <i>Pulicaria undulata</i>	
10) <i>Myrtus nivellei</i>	
11) <i>Nauplius graveolens</i>	
12) <i>Teucrium polium ssp seuratianum</i>	
13) <i>Teucrium polium ssp geyrii</i>	
14) <i>Withania adepessa</i>	



OPNA, BP 242. 11000 Tamanrasset. Algérie. E-mail: opnatam@yahoo.fr  
Direction : Tél.: +213 (0)29 34 34 17 - Fax : +213 (0)29 34 41 20

Sous Directions Régionales - Tél. & Fax :

Tamanrasset: +213 (0)29 34 53 26 - Idelès: +213 (0)29 35 22 89 - In Salah: +213 (0)29 36 11 51



## **ANNEXE 8 : Publication en rapport avec la thèse**



## Heme-binding activity of methoxyflavones from *Pentzia monodiana* Maire (Asteraceae)



Sergio Ortiz <sup>a,1</sup>, Kamel Dali-Yahia <sup>b,1</sup>, Pedro Vasquez-Ocmin <sup>d</sup>, Raphaël Grougnet <sup>a</sup>, Philippe Grellier <sup>c</sup>, Sylvie Michel <sup>a</sup>, Alexandre Maciuk <sup>d,\*</sup>, Sabrina Boutefnouchet <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Pharmacognosie, UMR CNRS 8638 COMETE, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4, av. de l'Observatoire, 75006 Paris, France

<sup>b</sup> Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université de Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algérie

<sup>c</sup> Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245), Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Universités, CP52, 57 rue Cuvier, 75005 Paris, France

<sup>d</sup> BioCIS, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 5 rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 December 2016

Received in revised form 20 January 2017

Accepted 29 January 2017

Available online 3 February 2017

### ABSTRACT

A heme-binding assay based on mass spectrometry was performed on *P. monodiana* Maire (Asteraceae) extracts to identify metabolites able to form adducts with hemic part of haemoglobin, as potential antimalarial drugs. Main adducts were characterized and their stability was measured. Isolation of main constituents of *P. monodiana* Maire lead to identification of the two methoxyflavones 3'-*O*-methyleupatorin (**7**) and artemetin (**8**) involved in the adducts formation. Four *seco*-tanaphthalides (**1–4**), a guaianolide (**5**), a germacranolide (**6**) and two other methoxyflavones (**9, 10**) were also characterized. Evaluation of isolated compounds on *P. falciparum* and *T. brucei* showed a moderate antiprotozoal activity of the two methoxyflavones.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Activity of the antimalarial drug artemisinin, as well as quinine derivatives, involves an interaction with the prosthetic group of haemoglobin. Formation of covalent or non-covalent adducts with free heme can inhibit its crystallization into insoluble, non-toxic hemozoin, leading to the parasite death. Such adducts can be characterized by mass spectrometry. An efficient LC/MS *in vitro* assay, described by Muñoz-Durango et al. is based on the identification, in complex mixtures such as plant extracts, of small molecules able to form adducts with heme [1].

In the continuation of our previous investigation of heme-binding molecules, we focused on *P. monodiana* Maire, from the Asteraceae family. *Pentzia monodiana*, "Tehatit" in Tamachek, grows in the southern part of Algeria [2]. Traditional uses of *Pentzia* species are reported for infectious and digestive troubles [3]. Phytochemical studies in the *Pentzia* genus reported occurrence of polymethoxyflavones, sesquiterpene lactones (both from germacranolide and guaianolide type). C-13, C-14 and

C-17 acetylenes have also been isolated together with C14-spiroacetal enol-ethers [4,5].

## 2. Experimental

### 2.1. General

Automatized pressurized extractions were performed on a Speed Extractor E-914 apparatus provided by Büchi (Fawil, Switzerland) equipped with four cells (120 mL) and a collector with four flat bottom vials (220 mL). Maximum pressure and temperature can be adjusted from 50 to 150 bar and from 30 to 200 °C, respectively. Mass spectrometry was performed on a mass spectrometer ZQ 2000 Waters (Saint-Quentin, France). Silica gel 60 0.025–0.04 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co.) was used for column chromatography (CC). Preparative HPLC was performed on an AP-MOD-100 apparatus provided by Armen Instrument (Saint-Avé, France), with a C18 Pursuit™ Varian column (250 mm × 30 mm, 10 μm), Büchi UV/VIS Filter-photometer detector, Merck D-2500 integrator and Büchi C-660 collector. The experiments were conducted at room temperature. CPC was performed on a SCPC-250 + 1000B apparatus provided by Armen Instrument (Saint-Avé, France) fitted with two rotors (total volume: 250 mL or 1 L), containing respectively 1953 or 2016 twin-cells. Rotation speed can be adjusted from 0 to 3000 rpm for the 250 mL rotor and from 0 to 1500 rpm for the 1 L rotor. A valve incorporated in the CPC apparatus allowed operation in ascending or descending mode. The system is

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [sergio.ortiz.aguirre@gmail.com](mailto:sergio.ortiz.aguirre@gmail.com) (S. Ortiz), [kameldali@mail.univ-tlemcen.dz](mailto:kameldali@mail.univ-tlemcen.dz) (K. Dali-Yahia), [pedro.vasquez-ocmin@u-psud.fr](mailto:pedro.vasquez-ocmin@u-psud.fr) (P. Vasquez-Ocmin), [raphael.grougnet@parisdescartes.fr](mailto:raphael.grougnet@parisdescartes.fr) (R. Grougnet), [grellier@mnhn.fr](mailto:grellier@mnhn.fr) (P. Grellier), [sylvie.michel@parisdescartes.fr](mailto:sylvie.michel@parisdescartes.fr) (S. Michel), [alexandre.maciuk@u-psud.fr](mailto:alexandre.maciuk@u-psud.fr) (A. Maciuk), [sabrina.boutefnouchet@parisdescartes.fr](mailto:sabrina.boutefnouchet@parisdescartes.fr) (S. Boutefnouchet).

<sup>1</sup> S.O. and K.D.H. equally contributed to the present work.

equipped with a gradient pump and a 10 mL or a 50 mL loop injection 6-way valve.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR experiments were performed in deuterated chloroform. Spectra were recorded on a Bruker AC 300 MHz or a Bruker 400 MHz spectrometer (Wissembourg, France). All the reagents and solvents were purchased from Carlo Erba-SDS. Cyclohexane and ethyl acetate were distilled before used. Water was distilled from deionized water.

## 2.2. Plant material

Aerial parts of *P. monodiana* were collected in the Algerian Southern Sahara, in Tassili Ahaggar area nearby the Tahat mountain (Wilaya of Tamanrasset,  $23^\circ 8'39.95''$ ,  $5^\circ 43'46.28''$ , alt.: 2019 m), in the Ahaggar National Park (Wilaya of Tamanrasset, Algeria), in September 2013, with the collect agreement delivered by the Ahaggar National Park Office, as *P. monodiana* is an Algerian endemic protected species. The collect agreement was delivered by the director of the Ahaggar National Park Office (OPNA), n°965/DPLBCVPC/MC/13 and 111/SDV/MC/13. Identification was under supervision of M. Belghoul, head of Department of Study of Natural Resources from the Ahaggar National Park. A voucher specimen was deposited in the herbarium of the department of Pharmacognosy, University Paris-Descartes University, France (voucher specimen MKOSB2013KDHPM).

## 2.3. Isolation of metabolites from *P. monodiana* Maire

### 2.3.1. Extraction

A sample of 557 g of aerial part of *P. monodiana* was mixed with sand (1:1). Extraction cells were filled with the mixture and charged in the apparatus. Extraction program consisted in two distinct cycles of 20 min with ethyl acetate. Each cycle comprised a pre-heat period of 5 min, pumping of ethyl acetate through the extraction cell unit at a final pressure of 100 bar and at  $50^\circ\text{C}$ , a hold-on time fixed at 5 min and a final flush of acetate extract into the corresponding vial. The extracts were concentrated under reduced pressure affording 42.72 g (7.67%) of ethyl acetate extract. The residual vegetal material was successively extracted with methanol, using the same extraction procedure, to afford 46.65 g of methanolic extract.

### 2.3.2. Silica gel chromatography

A sample of 10 g of ethyl acetate extract was subjected to a silica gel chromatography with a gradient of cyclohexane/ethyl acetate (100:0 to 10:90 v/v) to give 32 fractions. Compound **6** recrystallized in ethyl acetate from fraction 13 and 14 (562 mg). Fraction 25 was identified as a

mixture of compounds **9** and **10** with 1:1 a ratio (13 mg). Fractions 17 to 22 (F17–22) (1 g) were pooled and submitted to CPC separation, whereas fractions 26 to 28 (F26–28) (400 mg) were submitted to a preparative chromatography (preparative HPLC). Fraction 32 was subjected to a second silica gel CC eluted with cyclohexane/ethyl acetate (50:50, v/v) to afford compound **1**.

### 2.3.3. CPC separation

Solvents systems were determined using shake-flask method followed by UV examination at 254 and 366 nm and vanillin spraying. Two CPC procedures were developed, the first one using the quaternary solvent system S1 (cyclohexane/ethyl acetate/MeOH/H<sub>2</sub>O (1/4/1/4 v/v/v/v)), applied to the ethyl acetate extract, and the second one, using the ternary solvent system S2 (ethyl acetate/THF/H<sub>2</sub>O (4/2/5 v/v/v)), applied to previous silica gel chromatography fraction F17–22. An aliquot of 400 mg of material (ethyl acetate extract or F17–22 fraction) was dissolved in 10 mL of a 1:1 (v/v) mixture of both phases of the biphasic systems S1 and S2 respectively. After injection, separation was performed in ascending mode on the 250 mL rotor, at a flow rate of 5 mL/min and at 1600 rpm. A total volume of 1.5 L of mobile phase was collected in 10 mL fractions. Extrusion step was initiated in ascending mode using the lower phase solvent as the mobile phase to ensure that any residual extract was recovered. Compounds **2** (14 mg), **3** (10 mg) and **4** (23 mg) were isolated from ethyl acetate extract and compound **5** was isolated from F17–22 (17 mg).

### 2.3.4. Preparative HPLC of F26–28

An aliquot of 10 mg of F26–28 was dissolved in 10 mL of a H<sub>2</sub>O/MeOH mixture (40:60 v/v), filtered on Acrodisc® Premium 25 mm 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filters (Pall Life Science, Port Washington, New York, USA), and injected. Subsequently, a linear elution is started using H<sub>2</sub>O/MeOH mixture (40:60 v/v), flow rate: 20 mL/min. Compound **7** (3.4 mg) and **8** (4.1 mg) were isolated.

Identification of isolated compounds was confirmed with  $^1\text{D}$  and  $^2\text{D}$  NMR analysis and comparison with literature data: 5- $\beta$ H-*seco*-tanaparthalide (**1**) *seco*-tanaparthalide A (**2**), *seco*-tanaparthalide B (**3**) [6], *iso*-*seco*-tanaparthalide (**4**) [7], Artemecin (**5**) [8], 3'-*O*-methyleupatorin (**7**) artemetin (**8**) [9], cirsilineol (**9**) [10] and chrysosplenetin (**10**) [11].

## 2.4. Heme binding assay

Hemin (Fe (III) ferriprotoporphyrin IX) was dissolved just before use at 5 mM in aqueous ammonia 25%. Extracts were dissolved in DMSO

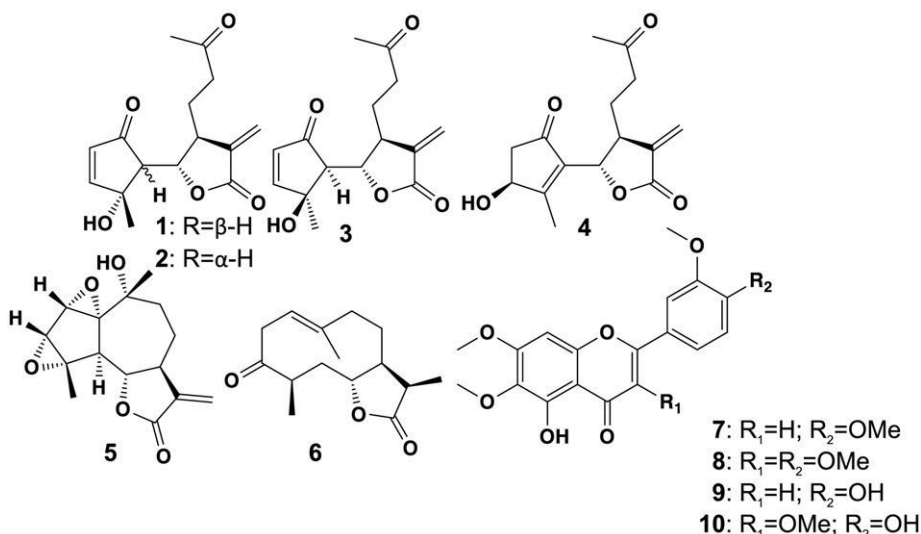


Fig. 1. Structures of compounds 1–10.

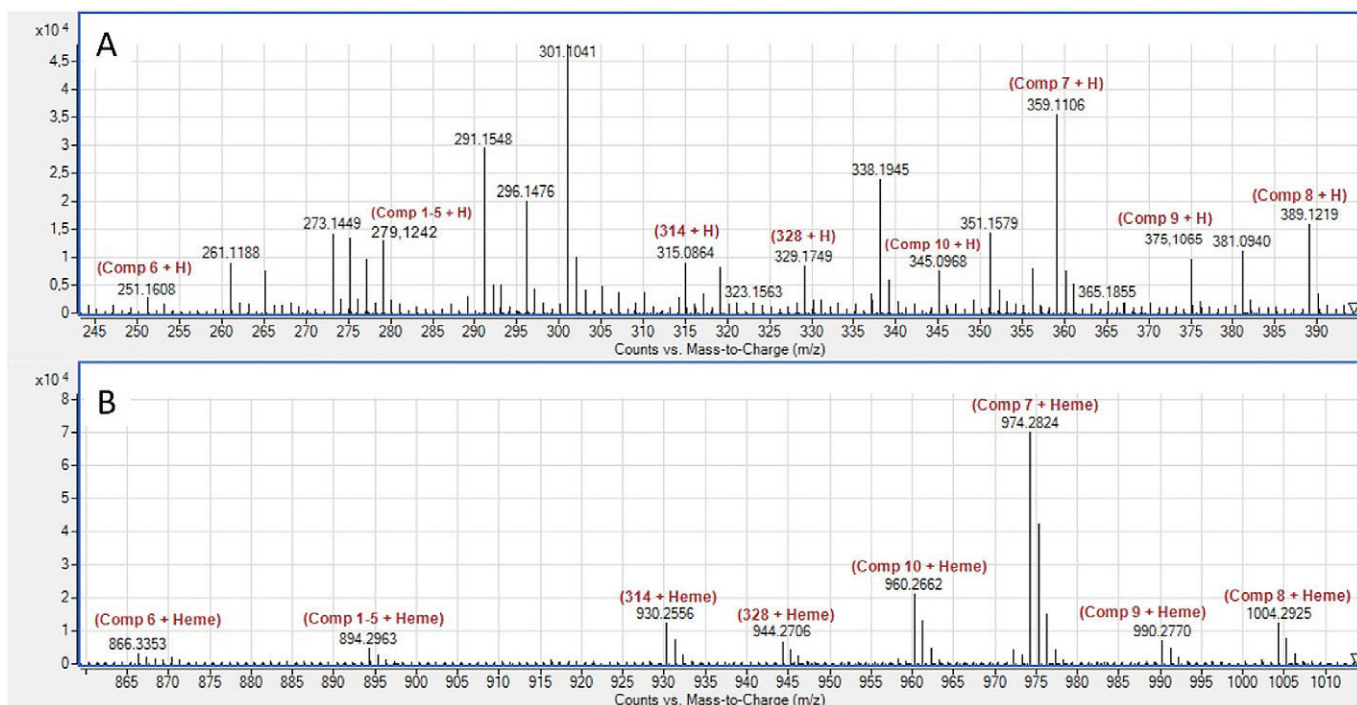


Fig. 2. Spectrum of *P. monodiana* ethyl acetate extract before (2.A) and after (2.B) incubation with hemin.

(5 mM), chloroquine diphosphate was dissolved in water (5 mM). Mixtures were prepared so as to obtain 100  $\mu\text{L}$  of final equimolar concentrations of 250  $\mu\text{M}$  for each compound (hemin, drug or extract) in methanol [1].

#### 2.4.1. Mass spectra acquisition

Mass spectrometry was performed on a LC/MS Agilent (LC 1260 Infinity, MS 6530 Q-ToF (Agilent, Les Ulis, France). The ionization parameter (ESI positive mode) were: nebulizer pressure 40 psig, capillary voltage 3500 V, drying temperature 320  $^{\circ}\text{C}$ , drying gas flow 10 L/min, fragmentor 150 V. Experiments with a collision-induced dissociation (CID) were performed in FIA mode (flow injection analysis) with an voltage increment ranging from 0 to 16 eV with 2 eV increments using MS/MS targeted mode (isolation width = 1.3  $m/z$ ). Injection was done at a flow rate of 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  of methanol/water (1:1).

#### 2.5. Adducts stability

Data from CID experiments were analyzed by GraphPad Prism software. Relative abundance of heme was plotted vs the energy increments and fitted by a sigmoidal dose-response curve.

#### 2.6. Antiprotozoal activity of isolated compounds

Antiplasmodial activity was determined on the FcB1 strain of *P. falciparum*. A modified [ $^3\text{H}$ ]-hypoxanthine incorporation assay was used. Briefly, infected human red blood cells in culture were exposed to serial drug dilutions (50, 10 and 1  $\mu\text{M}$ ) in 96-well microtiter plates. Each compound at each concentration was tested in triplicate. After 48 h of incubation at 37  $^{\circ}\text{C}$  in a reduced oxygen atmosphere, 25 mL of [ $^3\text{H}$ ]-hypoxanthine was added to each well. Cultures were incubated for a further 24 h prior to harvesting on glass-fiber filters and washing with distilled water. Radioactivity was counted using a 1450 Microbeta triluX (Wallac) (liquid scintillation and luminescence counter). The results were recorded as counts per minute per well at each drug concentration and expressed as a percentage of the untreated controls. Antitrypanosomal activity was determined by using the bloodstream

form of *T. brucei brucei*. Briefly, bloodstream forms (10<sup>5</sup> parasites/mL) were exposed to 50 and 1  $\mu\text{M}$  drug concentrations in 96-well microtiter plates. Each compound and each concentration was tested in triplicate. Plates were then incubated for 72 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  under an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . 20 mL of resazurin (45 mM final concentration) was then added to each well. Incubation was continued for 4 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$ , then at room temperature for 22 h. Wells were read at excitation (535 nm), emission (590 nm) on an FL 600 Microplate Fluorescence Reader (Biotek) and results expressed as a percentage of the untreated control.

### 3. Results and discussion

Plant material was extracted using pressurized solvent extraction affording an ethyle acetate and a methanolic extract, which were both evaluated for their antiplasmodial activity on chloroquine-resistant strain FcB1/Colombia of *P. falciparum* ([ $^3\text{H}$ ]-hypoxanthine test). Ethyl acetate extract showed a promising activity with an  $\text{IC}_{50}$  = 3.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , whereas methanolic extract showed no significant activity ( $\text{IC}_{50}$  > 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). This interesting antiplasmodial activity led us to look for heme-binding compounds in the ethyle acetate extract of *P. monodiana* Maire.

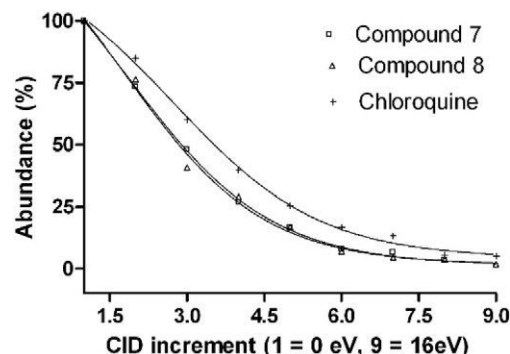


Fig. 3. Comparative stability curves of compounds 7, 8 and chloroquine.

**Table 1**  
Antiprotozoal activity of compounds **1–10** against *P. falciparum* and *T. brucei brucei* (inhibition percentage). nt: not tested.

	Antiplasmodial activity [%]			Antitrypanosomal activity <sup>a</sup> [%]		
	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M
1	97,0 $\pm$ 4,9	69,4 $\pm$ 7,6	31,7 $\pm$ 8,4	102,4 $\pm$ 2,7	46,7 $\pm$ 8,4	24,0 $\pm$ 3,1
2	99,5 $\pm$ 0,7	45,2 $\pm$ 2,1	–	50,8 $\pm$ 8,1	9,4 $\pm$ 8,8	–
3	99,8 $\pm$ 0,6	51,6 $\pm$ 4,6	1,2 $\pm$ 6,2	67,0 $\pm$ 9,4	–	–
4	99,7 $\pm$ 0,8	40,6 $\pm$ 6,7	3,5 $\pm$ 4,8	38,7 $\pm$ 10,8	13,8 $\pm$ 11,8	–
5	nt	nt	nt	nt	nt	nt
6	17,0 $\pm$ 13,5	5,4 $\pm$ 10,5	–	95,8 $\pm$ 3,4	39,5 $\pm$ 6,8	–
7	62,4 $\pm$ 6,4	19,7 $\pm$ 2,8	4,7 $\pm$ 5,1	96,9 $\pm$ 2,9	91,8 $\pm$ 16,0	16,0 $\pm$ 6,8
8	88,4 $\pm$ 0,8	56,1 $\pm$ 4,6	1,2 $\pm$ 6,2	98,1 $\pm$ 4,9	90,5 $\pm$ 3,0	37,4 $\pm$ 1,7
9	48,9 $\pm$ 4,4	38,8 $\pm$ 6,0	16,3 $\pm$ 15,0	88,4 $\pm$ 7,9	80,6 $\pm$ 1,7	31,0 $\pm$ 15,0
10	85,5 $\pm$ 4,9	69,4 $\pm$ 7,6	31,7 $\pm$ 8,4	95,5 $\pm$ 3,9	82,4 $\pm$ 4,2	32,2 $\pm$ 8,4

<sup>a</sup> The IC<sub>50</sub> of pentamidine, reference compound on *Trypanosoma brucei* is 5 nM.

### 3.1. Phytochemical study of *P. monodiana* Maire

The phytochemical study of *P. monodiana* was subsequently initiated and led to isolation and identification of six sesquiterpenes **1–6** and four methoxyflavones **7–10** (Fig. 1). Sesquiterpenes were of seco-guaianolides type (5 $\beta$ -H seco-tanaparthalide (**1**), seco-tanaparthalide A (**2**), seco-tanaparthalide B (**3**), iso-seco-tanaparthalide (**4**)), guaianolide (artecanin **5**), and germacranolide type (ketopelenolide **6**). Both tri-, tetra- and penta-methoxyflavones have been characterized: 3'-O-methyleupatorin (**7**) artemetin (**8**), cirsilineol (**9**) and chrysosplenetin (**10**).

### 3.2. Heme-binding assay

Heme-binding assay protocol consisted in incubation of plant extracts in presence of hemin. Mass spectrometry analysis used an ES-API ionization in positive mode with Q-TOF detection. Peaks arising only in the incubated extracts are assumed to be adducts. Eight peaks of *m/z* > 860 appear following the incubation of ethyl acetate extract with hemin (Fig. 2A), and every compound suspected to form adducts is detected in the extract (Fig. 2B), corresponding to sesquiterpenic lactones **1–6** and methoxyflavones **7–10** (Fig. 1).

### 3.3. Stability of heme-adducts

Stability of observed adducts was subsequently regarded. Previous study showed that adducts stability can be evaluated using mass spectrometry by measuring abundance of an adduct increasing the fragmentor voltage. Dissociation of adducts with increasing fragmentor voltages involves a decrease of detected ion abundance. This can be illustrated by stability curves measuring adduct ion abundance as a function of voltages. Compounds **1–6** and **9–10** would form adducts of very low stability and no curve could be obtained, whereas compounds **7** and

**8** formed more stable adducts. Stability curves of compounds **7** and **8** and chloroquine heme-adducts are presented in Fig. 3. Compounds **7** and **8** showed a lower stability compared to chloroquine, what is in favor of a weak  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction that may be involved in an antimalarial activity.

### 3.4. Antiprotozoal activity of isolated compounds

To corroborate these results, we evaluated antiplasmodial and antitrypanosomal activities of isolated compounds *in vitro* against of *Plasmodium falciparum* (FcB1-Colombia strain) and *Trypanosoma brucei brucei* (Table 1). Methoxyflavones, showed low activity with percentage of growth inhibition not superior to 37% at 1  $\mu$ M. Seco-guaianolides (**1–4**) showed low activity with percentage of inhibition not higher than 50% at 1  $\mu$ M. Thus, no IC<sub>50</sub> were measured. These results suggest that the heme-binding activity of methoxyflavones **7** and **8** is not correlated with a direct toxic effect on parasites.

## 4. Discussion

Screening of heme-binding compounds in *P. monodiana* Maire showed that two methoxy-flavones 3'-O-methyleupatorin (**7**) and artemetin (**8**) present a good affinity for the hemic part of haemoglobin. Such data focused our attention on methoxyflavones as they are known to interact with drug metabolizing enzymes, and by this way, able to enhance drug activity. Several flavonoids have been reported to modulate the drug efflux proteins (P-glycoprotein, breast cancer resistance protein BCRP...), and thus to reverse drug resistance [12]. However, flavonoids can also interact with cytochromes P450, responsible of the phase 1 metabolism of xenobiotics, and consequently, enhance the pharmacokinetic profile of drugs [13]. This undesired effect in case of enhancement of toxicity, may be advantageous to decrease drugs inactivation by cytochromes. For example, the methoxyflavone chrysosplenetin has been reported to inhibit the enzymatic activity of cytochromes CYP1A2 and CYP2C19 *in vitro* and that its co-administration with the antimalarial drug artemisinin is associated to an enhanced antimalarial activity *in vivo*, although the compound showed no antiplasmodial activity [14]. Investigations on the structure-activity relationship of flavonoids regarding inhibition of cytochromes P450 have been reported in several studies [15]. Heterosides are generally poor inhibitors of CYP, as well as 2–3 dihydrogenated flavonoids. An extensive study on the SAR of 33 flavonoids describes the structural requirements for a CYP1A1, 1A2 and 1B1 inhibition. A 5,7-dihydroxy substitution on A ring, associated to a 4'-methoxy group on B ring was observed for the most potent inhibitors [16]. Moreover, the molecular docking studies showed that the B ring of strong inhibitors interacts with the iron center of the heme part of the CYP, and is surrounded by amino-acids residues.

Regarding our results, the two more stables heme-adducts were observed with 3'-O-methyleupatorin (**7**) and artemetin (**8**), bearing a 5-hydroxy,-7-methoxy substitution on A ring, and a 3',4'-dimethoxy

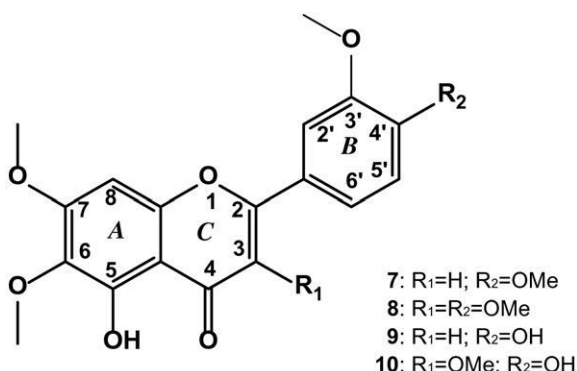


Fig. 4. Structures of methoxyflavones **7–10**.

substitution pattern on B ring (Fig. 4). On the other hand, very transient heme-adducts were observed with chrysoplenetin (**9**), and cirsilineol (**10**), where the 4'-methoxy group is lacking on the B ring, which is in accordance with the importance of the 4'-methoxy substitution. Nevertheless, chrysoplenetin has been reported to inhibit CYP1A2 and CYP2C19 at the micromolar range (4.61 and 6.23  $\mu\text{M}$  respectively), with a subsequent significant biological effect *in vivo*, meaning that surrounding amino-acids may contribute to stabilize the compound in the active site [14].

Thus, despite a weak direct antiparasitic activity, our results are in favor of a good affinity of methoxyflavones for heme, the prosthetic group of hemoproteins such as haemoglobin and cytochromes P450. As a matter of fact, this affinity can lead to two positive effects in case of malaria: the inhibition of haemoglobin crystallization into hemozoin with subsequent plasmodium death, and enhancement of artemisinin activity by inhibition of cytochromes P450. These preliminary data should be investigated more deeply. For a better understanding of a positive effect of methoxyflavones co-administration with antimalarial drugs, further studies should be undertaken to evaluate the adduct formation of methoxyflavones on isolated heme in presence of artemisinin, as artemisinin also binds to the hemic part of haemoglobin. Moreover, evaluation or cytochrome P450 inhibition of methoxyflavones **7–10** alone and in combination with artemisinin should be evaluated for their cytochromes P450 inhibitory activity.

#### Acknowledgements

Financial support was provided by the ChEMBioFight European program (269301) (FP7-People-2010-IRSES) and the Algerian PROFAS research funding.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2017.01.012>.

#### References

- [1] K. Muñoz-Durango, A. Maciuk, A. Harfouche, S. Torijano-Gutiérrez, J.-C. Jullian, J. Quintin, K. Spelman, E. Mouray, P. Grellier, B. Figadère, Detection, characterization and screening of heme-binding molecules by mass-spectrometry for malaria drug discovery, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3324–3329.
- [2] R. Maire, *Pentzia monodiana* Maire, *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord.* 20 (1929) 25.
- [3] P. Ozenda, *Flore et végétation du Sahara*, third ed. CNRS Ed, Paris, 2004 (662p).
- [4] F. Bohlmann, C. Zdero, New sesquiterpenes and acetylenes from *Athanasia* and *Pentzia* species, *Phytochemistry* 17 (1978) 1595–1599, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94650-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94650-8).
- [5] C. Zdero, F. Bohlmann, Glaucolides, fulvenoguaianolides and other sesquiterpene lactones from *Pentzia* species, *Phytochemistry* 29 (1990) 189–194, [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)89035-8](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(90)89035-8).
- [6] K. Kawazoe, Y. Tsubouchi, N. Abdullah, Y. Takaishi, H. Shibata, T. Higuti, H. Hori, M. Ogawa, Sesquiterpenoids from *Artemisia gilvescens* and an anti-MRSA compound, *J. Nat. Prod.* 66 (2003) 538–539, <http://dx.doi.org/10.1021/np020593m>.
- [7] S. Huneck, C. Zdero, F. Bohlmann, Seco-guaianolides and other constituents from *Artemisia* species, *Phytochemistry* 25 (1986) 883–889, [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(86\)80021-8](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(86)80021-8).
- [8] N.R. Bhadane, F. Shafizadeh, Sesquiterpene lactones of sagebrush: the structure of artecanin, *Phytochemistry* 14 (1975) 2651–2653, [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85243-5](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(75)85243-5).
- [9] M. Azizzudin, T. Makhmoor, M.I. Choudary, Radical scavenging potential of compounds isolated from *Vitex agnus-castus*, *Turk. J. Chem.* 34 (2010) 119–126, <http://dx.doi.org/10.3906/kim-0805-46>.
- [10] Z.S. Kikhanova, Z.B. Iskakova, R.I. Dzhalmakhanbetova, T.M. Seilkhanov, S.A. Ross, E.M. Suleimen, Constituents of *Artemisia austriaca* and their biological activity, *Chem. Nat. Compd.* 49 (2013) 967–968, <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-013-0796-5>.
- [11] S.R. Numonov, S.K. Usmanova, H.A. Aisa, A triterpenoid and flavonoids from *Dracocephalum heterophyllum*, *Chem. Nat. Compd.* 48 (2013) 1109–1110, <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-013-0483-6>.
- [12] Y. Li, J.L. Revalde, G. Reid, J.W. Paxton, Interactions of dietary phytochemicals with ABC transporters: possible implications for drug disposition and multidrug resistance in cancer, *Drug Metab. Rev.* 42 (2010) 590–611, <http://dx.doi.org/10.3109/03602531003758690>.
- [13] J. Liu, J. Sridhar, M. Foroozesh, Cytochrome P450 family 1 inhibitors and structure-activity relationships, *Molecules* 18 (2013) 14470–14495, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules181214470>.
- [14] S. Wei, H. Ji, B. Yang, L. Ma, Z. Bei, X. Li, H. Dang, X. Yang, C. Liu, X. Wu, J. Chen, Impact of chrysoplenetin on the pharmacokinetics and anti-malarial efficacy of artemisinin against *Plasmodium bergheias* well as *in vitro* CYP450 enzymatic activities in rat liver microsome, *Malar. J.* 14 (2015) 432–444, <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-015-0929-3>.
- [15] S. Zhai, R. Dai, F.K. Friedman, R.E. Vesta, Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids, *Drug Metab. Dispos.* 26 (1998) 989–992 (doi: 0090-9556/98/2610-0989-992).
- [16] T. Shimada, K. Tanaka, S. Takenaka, N. Murayama, M.V. Martin, M.K. Foroozesh, H. Yamazaki, F.P. Guengerich, M. Komori, Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 flavonoid derivatives, *Chem. Res. Toxicol.* 23 (2010) <http://dx.doi.org/10.1021/tx100286d> (1921–193).

[1] K. Muñoz-Durango, A. Maciuk, A. Harfouche, S. Torijano-Gutiérrez, J.-C. Jullian, J. Quintin, K. Spelman, E. Mouray, P. Grellier, B. Figadère, Detection, characterization



## Summary :

### Introduction :

The search for new active molecules against *Plasmodium falciparum* in particular remains a major health challenge for academic pharmaceutical research, as the pharmaceutical industries are slow to develop new therapies, mainly for economic reasons. Plants have always played an important role in the discovery of major drugs such as quinine and artemisinin. It is estimated that only 1% of the known plant species have been the subject of pharmacological studies. So there are potentially many natural active ingredients to be discovered.

### Objectives :

Our work aims mainly to valorize an original bioresource from the extreme south of Algeria by demonstrating the therapeutic potential of six species belonging to aromatic Asteraceae relatively abundant. The second objective consists to try - through a bioguided phytochemical investigation - to find from extracts of these same plant species, which bioactive metabolites can open new paths to the treatment of malaria.

### Materials and methods :

The choice of these species is based on a chemotaxonomic criterion and the sampling concerned only the aerial parts of the plants ; the collection area being the center of the Ahaggar Cultural Park about forty kilometers north-east of Tamanrasset.

After an *in vitro* biological screening for antiparasitic activity, evaluated on three strains of protozoa (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum* and *Trypanosoma brucei* ssp. *brucei*), four crude extracts are retained (*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*, *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*, *Pentzia monodiana* and *Pulicaria incisa*) to be subjected for an original LC-MS technique for detecting metabolites able to link to the hemic part of hemoglobin. In parallel to this highly relevant process in the investigation of molecules that can prevent the degradation of the heme by *Plasmodium*, we have considered a UPLC-MS-based dereplication approach which, using a database of known natural products , can be both precise and especially fast in establishing a metabolite profile for a given extract. Preparative chromatography techniques (CPC, CC flash, HPLC) were also used for a more complete phytochemical study of *Pentzia monodiana*.

### Results :

The interpretation of the NMR spectra of the compounds isolated from the *P. monodiana* extract confirmed the identity of these presumed metabolites during our dereplication procedure; this is the case of two methoxyflavones, 3'-O-methylupatorine and artemetin which showed increased affinity for the heme. Similarly, the extracts of the two subspecies of *Artemisia* gave very significant antiplasmodial activities, partly due to derivatives of the hydroxyacetophenone, of which a chemical structure was determined by NMR. Myrciaphenone A - a hydroxyacetophenone glucoside - is probably present in the extract of *Pulicaria incisa*; the latter's antiparasitic activity could be assigned to this biomolecule.

### Conclusion :

At the end of this study, we were able to highlight the pharmacological potential of the few aromatic Asteraceae present at the level of the Cultural Park of the Ahaggar through :

- A demonstration of bioactive compounds known and mentioned in the scientific literature; some of them were reported for the first time for *P. monodiana*. The dereplication approach has proved to be particularly appropriate here.
- An *in vitro* biological screening and in particular the heme fixation test, which gave us enough positive results.

---

**Key words :** CPC, Heme-binding test, Natural products, NMR, *Pentzia*, *Plasmodium*, UPLC-MS.

---

## ملخص :

### المقدمة :

لا يزال البحث عن جزيئات نشطة جديدة ضد *Plasmodium falciparum* على وجه الخصوص تحديا صعبا رئيسيا للأبحاث الصيدلانية الأكاديمية، حيث أن شركات صناعة الأدوية بطيئة في تطوير علاجات جديدة، وذلك راجع خاصة لأسباب اقتصادية خاصة. لطالما لعبت النباتات دورا هاما في اكتشاف أدوية أساسية مثل الكينين والأرتيميسينين. وتشير التقديرات إلى أن 1% فقط من أنواع النباتات المعروفة كانت موضوع الدراسات فارماكولوجية. وبالتالي هناك العديد من العناصر النشطة الطبيعية التي يمكن اكتشافها.

### الأهداف :

الهدف الأساسي لهذا العمل هو تمييز مصدر بيولوجي أصله أقصى جنوب الجزائر من خلال إظهار الإمكانيات العلاجية لستة أنواع من عائلة النباتات النجمية *Asteraceae* العطرية المتواجدة بوفرة في المنطقة. كهدف ثان، سنحاول - من خلال دراسة نباتية كيميائية bioguidée - لمستخلصات هذه النباتات إيجاد العناصر النشطة بيولوجيا التي يمكن أن تفتح آفاق جديدة لعلاج الملاريا.

### المواد والأساليب :

اختيار هذه الأنواع النباتية يستند إلى معيار تصنيفي كيميائي و العينات المعنية اقتصر فقط على الأجزاء الجوية من هذه النباتات. المنطقة التي تم فيها جمع هذه العينات هي مركز الحديرة الثقافية بالهقار على بعد حوالي أربعين كيلومترا شمال شرق تمنراست.

بعد إجراء فحص بيولوجي في المختبر للمفعول المضاد للطفيليات على ثلاث سلالات من الحيوانات الأولية

(*Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma brucei* ssp. *brucei*), *Protozoa* تم الاحتفاظ بأربعة مستخلصات خام

(*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*, *A. judaica* ssp. *sahariensis*, *Pentzia monodiana*, *Pulicaria incisa*)

لتحضر لتقنية LC-MS للكشف عن العناصر القادرة على الارتباط بالجزء الهيميل لهيموغلوبين. وبالتوازي مع هذه العملية المثالية للتحقيق في الجزيئات التي يمكن أن تمنع تحطيم الهيم من قبل بلاسموديوم، استعملنا UPLC-MS، التي باستخدام قاعدة بيانات من المنتجات الطبيعية المعروفة، يمكن أن تكون دقيقة و خاصة سريعة في نفس الوقت في إنشاء ملف للعناصر المكونة لمستخلص معين. تما أيضا استخدام تقنيات الكروماتوغرافيا التحضيرية

(CPC, CC flash, HPLC) لدراسة نباتية كيميائية أكثر اكتمالا لمستخلص نبتة *Pentzia monodiana*.

### النتائج :

أكد تفسير أطياف الرنين المغناطيسي النووي RMN للعناصر المعزولة من مستخلص *P. monodiana* هوية هذه المكونات المفترضة أثناء إجراء *déréplication*. وهذا هو حال اثنين من *méthoxyflavones* *artémétine* و *3'-O-méthyleupatorine* ، اللتين أظهرتا انجذابا للهيم. و بالمثل، فإن مستخلصا النوعين من النباتات أظهرتا مفعولا مضادا للطفيليات هاما ، ويرجع ذلك جزئيا إلى المشتقات من *hydroxyacétophénone* و الذي تم تحديد هيكله الكيميائي من قبل الرنين المغناطيسي النووي RMN. يمكن أن يكون *myrciaphénone A* موجودا في مستخلص *Pulicaria incisa* و يمكن أن يلعب دورا في المفعول المضاد للطفيليات لهذا الأخير.

### الاستنتاج :

في نهاية هذه الدراسة، استطعنا تسليط الضوء على مفعول بعض النباتات النجمية *Asteraceae* العطرية الموجودة على مستوى الحديرة الثقافية للهقار من خلال:

- عرض المركبات النشطة حيويًا المعروفة والمذكورة في المؤلفات العلمية. بعضها عرض لأول

مرة في *P. monodiana* بطريقة *déréplication* قد أثبتت نجاعتها.

- الفحص البيولوجي في المختبر وعلى وجه الخصوص اختبار تثبيت الهيم، الذي أعطانا نتائج

إيجابية كافية.

---

**الكلمات المفتاحية:** *CLUP-SM*, *CPC*, *Pentzia*, *Plasmodium*; منتجات طبيعية، RMN، اختبار تثبيت الهيم.

**Résumé :**

Introduction :

La recherche de nouvelles molécules actives contre le *Plasmodium falciparum* en particulier demeure un défi sanitaire majeur pour la recherche pharmaceutique académique, tant les industries pharmaceutiques tardent à développer de nouvelles thérapies, principalement pour des raisons économiques. Les végétaux ont toujours pris une part importante dans la découverte de médicaments majeurs tels que la quinine et l'artémisinine. On estime qu'à peine 1% des espèces végétales connues ont fait l'objet d'études pharmacologiques. Il reste donc potentiellement de nombreux principes actifs naturels à découvrir.

Objectifs :

Notre travail vise principalement à valoriser une bioressource originale de l'extrême sud algérien en démontrant le potentiel thérapeutique de six espèces d'Astéracées aromatiques relativement abondantes. En second objectif, nous essayerons -grâce à une investigation phytochimique bioguidée- de découvrir à partir d'extraits de ces mêmes espèces végétales, quels métabolites bioactifs pouvant ouvrir de nouvelles voies au traitement du paludisme.

Matériels et méthodes :

Le choix de ces espèces est basé sur un critère chimiotaxonomique et l'échantillonnage n'a concerné que les parties aériennes des plantes ; la zone de collecte étant le centre du Parc Culturel de l'Ahaggar à une quarantaine de kilomètres au nord-est de Tamanrasset.

Après un criblage biologique *in vitro* recherchant l'activité antiparasitaire, évaluée sur trois souches de protozoaires (*Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum* et *Trypanosoma brucei* ssp. *brucei*), quatre extraits bruts sont retenus (*Artemisia campestris* ssp. *glutinosa*, *Artemisia judaica* ssp. *sahariensis*, *Pentzia monodiana* et *Pulicaria incisa*) pour être soumis à une technique LC-MS originale permettant de détecter les métabolites capables de se fixer à la partie héminique de l'hémoglobine. Parallèlement à ce procédé très pertinent dans l'investigation de molécules pouvant empêcher la dégradation de l'hème par le *Plasmodium*, nous avons envisagé une approche par déréplication basée sur l'UPLC-MS qui, grâce à une banque de données en produits naturels connus, peut se révéler à la fois précise et surtout rapide pour établir un profil en métabolites pour un extrait donné. Les techniques de chromatographie préparatives (CPC, CC flash, HPLC) ont également été employées pour une étude phytochimique plus complète du *Pentzia monodiana*.

Résultats :

L'interprétation des spectres RMN des composés isolés de l'extrait du *P. monodiana* a confirmé l'identité de ces métabolites présumés lors de notre démarche par déréplication ; c'est le cas de deux méthoxyflavones, la 3'-O-méthyleupatorine et l'artémétine qui ont montré une affinité accrue pour l'hème. De même, les extraits des deux sous-espèces d'*Artemisia* ont donné des activités antiplasmodiales très significatives en partie dues à des dérivés de l'hydroxyacétophénone dont une structure chimique a été déterminée par RMN. La myrciaphénone A -un glucoside d'hydroxyacétophénone- est probablement présente dans l'extrait du *Pulicaria incisa* ; l'activité antiparasitaire de ce dernier pourrait être attribuée à cette biomolécule.

Conclusion :

À l'issue de cette étude, nous avons pu mettre en exergue le potentiel pharmacologique des quelques Astéracées aromatiques présentes au niveau du Parc Culturel de l'Ahaggar à travers :

- Une mise en évidence de composés bioactifs connus et mentionnés dans la littérature scientifique ; certains d'entre eux ont été signalés pour la première fois chez *P. monodiana*. L'approche par déréplication s'est révélée ici particulièrement appropriée.
- Un criblage biologique *in vitro* et notamment le test de fixation à l'hème, qui nous ont donné suffisamment de résultats positifs.

---

**العنوان :** دراسة فيتوكيميائية بيولوجية موجهة لبعض النباتات العطرية الصحراوية

---

**Title :** BIOGUIDAL PHYTOCHEMICAL STUDY OF SAHARIAN AROMATIC PLANTS

---

**Discipline/Spécialité :** Pharmacie/Pharmacognosie

---

**Mots clés :** CLUP-SM, CPC, *Pentzia*, *Plasmodium*, Produits naturels, RMN, Test de fixation à l'hème.

---

**Faculté de rattachement :** Faculté de médecine - Université Abou Bekr Belkaïd, 22 rue Abi Ayad Abdelkrim, Fg Pasteur B.P 119, 13000 Tlemcen - Algérie.