

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique  
**UNIVERSITE Ferhat ABBAS SETIF -1-**  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة فرحات عباس سطيف - 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Ferhat Abbas Sétif-1**  
**Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de biologie et écologie végétales**

# **Polycopié de cours**

**Master I**

**Spécialité : Biodiversité et physiologie végétale**

## *Métabolismes secondaires des plantes*

**Élaboré par :**

**Dr AMOR Loubna**

**Année Universitaire : 2019/2020**

## Sommaire

### Chapitre 1 : Utilisation traditionnelle des plantes

I. Utilisation en médecine .....	01
II. Utilisation en cosmétologie.....	02
II.1. Eclaircissement de la peau et dépigmentation volontaire .....	02
II.2. Bénéfices cosmétiques des huiles essentielles.....	03
II.2.1. Apaiser les peaux sensibles.....	03
II.2.2. Anti-âge.....	04
II.2.3. Aider à la réparation de la peau.....	04
III. Utilisation en agroalimentaire.....	04
III.1. Complément alimentaire.....	04
III.2. Compléments alimentaires contenant des plantes ayant des propriétés pharmacologiques...05	
III.2.1. Les CAHH sont des médicaments.....	05

### Chapitre 2: Les métabolites secondaires

I. Définition .....	06
II. Biosynthèse.....	07
III. Les grandes familles structurales de produits naturels.....	11
<b>III.1. Les alcaloïdes</b>	
III.1.1. Définition.....	11
III.1.2. Classification.....	12
III.1.3. Biosynthèse.....	20
III.1.4. Diversité des squelettes.....	25
III.1.5. Applications des alcaloïdes.....	32

III.1.5.1. Les applications médicales.....	33
III.1.5.2. Les applications agricoles.....	35
III.1.5.3. Biotechnologie.....	36
<b>III.2. Les composés phénoliques</b>	
III.2.1. Définition.....	37
III.2.2. Biosynthèse .....	37
III.2.2.1. La voie de shikimate (acide shikimique).....	38
III.2.2.2. La voie d'acétate.....	40
III.2.3. Les différentes formes chimiques.....	41
III.2.3.1. Les phénols simples .....	41
III.2.3.2. Les formes condensées.....	51
<b>III.3. Les terpénoïdes</b>	
III.3.1. Introduction.....	53
III.3.2. Classification .....	53
III.3.3. Biosynthèse.....	53
III.3.3.1. Formation de l'unité de base C5.....	56
III.3.3.2. Assemblage d'unités C5.....	59
III.3.4. Les fonctions des terpénoïdes.....	61
IV. Métabolisme et régulation.....	66
IV.1. Les métabolismes secondaires et les stratégies de défense .....	66
IV.2. Le rôle écologique des métabolites secondaires .....	66
V. Organisation spatiale et compartimentation du métabolisme.....	68
VI. Ingénierie métabolique.....	73

VI.1. Les tannins condensés dans les fourrages.....	73
VI.2. Ingénierie métabolique par transformation plastique en tant que stratégie pour moduler le rendement en isoprénoïdes dans les plantes.....	75
VI.3. Ingénierie de hauts rendements de métabolites secondaires dans les cultures de cellules Rubia grâce à la transformation avec des gènes Rol.....	76
VI.4. Fusion avec des protéines fluorescentes pour la localisation subcellulaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse des alcaloïdes végétales.....	77

### **Chapitre 3 : Métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique**

#### **I. Criblage biologique**

I.1. Choix/définition des cibles thérapeutiques.....	79
I.2. Matériel végétal.....	79
I.3. Méthodologie d'évaluation.....	80
I.3.1. Les planticorps .....	80
I.3.2. L'If et le Taxol dans le traitement du cancer du sein.....	80
II. Identification des produits naturels.....	81
II.1. La spectroscopie ultraviolet-visible.....	81
II.1.1. La présentation d'un spectre UV-visible.....	82
II.1.2. Application.....	82
II.2. La spectroscopie infrarouge (IR).....	83
II.2.1. Principe.....	83
II.2.2. Applications de la spectroscopie infrarouge.....	84
II.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	85
II.3.1. Généralités.....	85
II.3.2. Les noyaux qui peuvent être étudiés par RMN.....	86

II.4. Spectrométrie de masse (SM).....	86
II.4.1. Principe de base.....	87
II.4.2. Le spectre de masse.....	89
II.5. Techniques chromatographiques.....	89
II.5.1. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM).....	90
II.5.2. La chromatographie liquide (HPLC).....	91
III. Exemples de molécules bioactives isolées de quelques espèces végétales en Algérie.....	93
Références .....	94

## Liste des figures

<b>Figure 01(a)</b> : Les voies principales menant aux métabolites secondaires.....	09
<b>Figure 01(b)</b> : Les voies principales menant aux métabolites secondaires dérivés de la voie de shikimate.....	10
<b>Figure 02</b> : Un exemple d'un véritable alcaloïde.....	14
<b>Figure 03</b> : Un exemple de proto-alcaloïde.....	15
<b>Figure 04</b> : Un exemple de pseudo-alcaloïde.....	16
<b>Figure 05</b> : Blocages du métabolite secondaire et dérivation des acides aminés.....	21
<b>Figure 06</b> : Dérivation de pyruvate et synthèse d'acétyl-CoA.....	22
<b>Figure 07</b> : Schéma général de la synthèse des alcaloïdes.....	24
<b>Figure 08</b> : Les noyaux dérivés de la L-lysine.....	25
<b>Figure 09</b> : Les noyaux et les squelettes d'alcaloïdes izidine.....	26
<b>Figure 10</b> : La source et les formes du cycle pyrrolidine.....	27
<b>Figure 11</b> : La L-histidine et les noyaux des alcaloïdes imidazole et manzamine.....	28
<b>Figure 12</b> : Les noyaux produits par l'acide anthranilique dans les alcaloïdes.....	29
<b>Figure 13</b> : Le noyau des alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique.....	30
<b>Figure 14</b> : Les noyaux dérivés de la l-phénylalanine dans la biosynthèse des alcaloïdes.....	30
<b>Figure 15</b> : Noyaux fournis aux alcaloïdes par la l-tyrosine dans le processus de synthèse...	31
<b>Figure 16</b> : Le noyau fourni par le l-tryptophane pendant la synthèse.....	32
<b>Figure 17</b> : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques.....	38
<b>Figure 18</b> : La voie de shikimate.....	39
<b>Figure 19</b> : Biosynthèse des composés phénoliques les plus largement distribués par la voie de shikimate.....	40

<b>Figure 20:</b> Les principaux acides phénoliques.....	43
<b>Figure 21 :</b> L'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels.....	44
<b>Figure 22 :</b> Exemples de formes combinées des acides hydroxy-cinnamiques.....	45
<b>Figure 23 :</b> Biosynthèse du monolignol.....	46
<b>Figure 24 :</b> Structures des coumarines, des furano-coumarines linéaires et des furano-coumarines angulaires.....	47
<b>Figure 25 :</b> Les principales classes des flavonoïdes.....	50
<b>Figure 26 :</b> Les structures des tannins.....	52
<b>Figure 27 :</b> Vue d'ensemble de la biosynthèse des terpénoïdes chez les plantes.....	55
<b>Figure 28 :</b> La voie de mévalonate pour la formation de l'IPP.....	57
<b>Figure 29 :</b> La voie du phosphate de glycéraldéhyde / pyruvate pour la formation d'unités isoprénoïdes C5.....	59
<b>Figure 30 :</b> Formation de diméthylallyle pyrophosphate à partir de l'IPP.....	60
<b>Figure 31 :</b> Mode d'élongation des processus terpéniques à partir du chaînon élémentaire, le diphosphate d'isopentényle (IPP).....	61
<b>Figure 32 :</b> Compartimentation de la biosynthèse et séquestration.....	69
<b>Figure 33 :</b> Compartiments de stockage pour composés hydrophiles et lipophiles.....	70
<b>Figure 34 :</b> Spectre UV-visible typique.....	82
<b>Figure 35 :</b> Présentation conventionnelle d'un spectre de RMN des atomes d'hydrogène d'un composé organique .....	86
<b>Figure 36 :</b> Spectre de fragmentation et spectre de masse présentés sous forme graphique ou tabulaire.....	88

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Nombre de métabolites secondaires connus des plantes supérieures.....	08
<b>Tableau II:</b> Classification des alcaloïdes selon Tadeusz Aniszewski.....	15
<b>Table III :</b> Les plus importants alcaloïdes utilisés dans les médicaments.....	33
<b>Tableau IV :</b> Les principales classes des composés phénoliques.....	42
<b>Tableau V:</b> Classification des terpenoïdes.....	54
<b>Tableau VI :</b> Exemple de transport des métabolites secondaires par xylème et phloème.....	72



## Liste d'abréviations

**CAHH** : Compléments alimentaires à base de plantes contenant des hétérosides hydroxyanthracéniques.

**DMAPP** : diphosphate de diméthylallyle

**FPP** : le farnésyl diphosphate

**GGPP** : le géranylgeranyl diphosphate

**GPP** : le géranyl diphosphate

**HE** : les huiles essentielles

**IPP** : Le diphosphate d'isopentényle

**MDR** : protéine de résistance multiple aux médicaments

**MEP** : phosphate de méthylérythritol

**MS** : Métabolite secondaire

**NPAA** : les acides aminés non protéiques

**RE** : le réticulum endoplasmique

**SNC** : le système nerveux central

**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

# Chapitre 1 : Utilisation traditionnelle des plantes

La phytothérapie est une ancienne discipline médicale. Elle a été utilisée sur toute la planète. Mais c'est aussi une médecine actuelle. Cette médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de nombreuses maladies, continue à être utilisée, et au cours de ces dernières années sa popularité n'a fait qu'augmenter.

Les pratiques de la médecine traditionnelle varient grandement d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre. Elles sont influencées par des facteurs connus : la culture, l'histoire et les philosophies personnelles. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie. Ainsi, l'utilisation des remèdes à base de plantes connaît dernièrement un engouement sans précédent. De plus en plus de gens sont à la recherche de médicaments "naturels" et il semblerait même que les cosmétiques et les produits d'entretien à base de plantes soient aujourd'hui de plus en plus utilisés. Selon l'OMS, près de 80% des populations des pays en voie de développement de la région d'Afrique ont recours à la médecine traditionnelle (OMS, 2000).

## I. Utilisation en médecine

En tant que médicament pour l'homme ; exemple :

- En urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux.
- Systèmes cardiovasculaires, ex : Flavocoe est un médicament constitué par la flavone non substitué en combinaison avec la rutine et l'isoquercétine est utile dans le traitement de l'athérosclérose (Narayana et *al.*, 2001).
- Drogues immunostimulantes, antispasmodiques et anti-inflammatoires (*Melaleuca alternifolia*, *Echinacea angustifolia*, *Chrysanthemum parthenium*, *Achillea millefolium*...) (Amjad Hossain, 2005).
- Contre le diabète (*Azadirachta indica*) (Amjad Hossain, 2005).
- Les maladies du stress, des activités antioxydantes ; tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composés phénoliques, parmi lesquels theaflavine, le resveratrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine, très étudiés en raison de leur rôle en tant qu'agent chemopréventifs basés sur leurs capacités antioxydantes (Lee et *al.*, 2003). D'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été mises en évidence

pour les huiles essentielles de romarin, sauge, thym, origan, sarriette, clou de girofle, gingembre et curcuma (Cuvelier et *al.*, 1996).

- Activité antimicrobienne, antivirale et antiparasitaire : les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ex : la quinine obtenue à partir du quinquina « *Cinchona* » a été avec succès employée pour traiter le malaria (Dastidar et *al.*, 2004), l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) est renommé pour ses propriétés : antibactériennes, anti-infectieuses, antifongiques, antivirales (*Azadirachta indica*, *Aloe vera*, *Andrographis paniculata*, *Withania somnifera*, *Astragalus membranaceus*, *Curcuma longa*...) (Amjad Hossain, 2005 ; Lyons et Nambiar, 2005) mais aucune plante n'est aussi efficace que les médicaments antirétroviraux pour arrêter la répllication du VIH (Lyons et Nambiar, 2005), antibactériens (*Azadirachta indica*), antifongiques (*Adenocalyma alleaceum*, *Allium ampeloprasum*, *Allium ramosum*, *Allium sativum*, *Tulbaghia violacea*, *Capsicum annum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*)(Wilson et *al.*, 1997).

## II. Utilisation en cosmétologie

### II.1. Eclaircissement de la peau et dépigmentation volontaire

Une compréhension des avantages des extraits naturels et botaniques offre des occasions de développer de nouveaux produits pour résoudre les problèmes de pigmentation. Les composés actifs isolés des plantes, tels que l'arbutine, l'aloésine, l'acide gentsique, les flavonoïdes, l'héspéridine, la réglisse, le niacinamide (nicotinamide ou vitamine B3 autrefois), les dérivés de levure et les polyphénols, inhibent la mélanogénèse sans mélanocytotoxicité par différents mécanismes (Zhu et Gao, 2008). L'aloésine est un composé actif des plantes du genre *Aloe*. Des études ont prouvé que l'application topique de l'aloésine chez l'Homme (quatre fois par jour pendant 15 jours) a montré une suppression de la pigmentation de manière dose-dépendante, en inhibant de façon compétitive l'activité tyrosinase (Jones et *al.*, 2002). La tyrosinase est une glycoprotéine située dans la membrane des vésicules qui transportent des polymères de mélanine appelés «mélanosomes».

Les extraits de *Glycyrrhiza glabra* (Réglisse) est riche en la glabridine, l'isoliquiritigénine licuraside, l'isoliquiritine et la licochalcone A. les composés inhibent l'activité de la tyrosinase dans les cellules de mélanome murine B16 cultivées, sans affecter la synthèse de l'ADN (Nerya et *al.*, 2003). La liquiritine n'a aucun effet sur la tyrosinase ;

cependant, cela provoque une dépigmentation par d'autres mécanismes et des études démontrent qu'une crème de 20% de liquiritine appliquée à 1 g de jour-1 pendant 4 semaines est thérapeutiquement efficace dans le melasma (Amer et *al.*, 2000).

Les extraits des feuilles de *Ginkgo biloba* (L'arbre aux quarante écus) ont montré une activité puissante de piégeage des radicaux libres lorsqu'ils sont appliqués sur la peau. Les flavones glycosides de *Ginkgo biloba*, principalement les dérivés de la quercétine, peuvent inhiber l'activité de la tyrosinase par la chélation du cuivre dans l'enzyme (Xie et *al.*, 2003).

Concernant les plantes utilisées pour éclaircir la peau, *Oryza sativa* (Riz asiatique) a montré un intérêt dans la dépigmentation volontaire de la peau. Certains composés phénoliques, isolés d'*Oryza sativa*, ont montré un fort effet d'inhibition sur la production de mélanine dans les cellules de mélanome B16-F10 cultivées *in vitro* et sur l'activité tyrosinase (Cho et *al.*, 2015). Les composés bioactif d'*Oryza sativa* possèdent aussi des activités antioxydantes et effets hydratants sur la peau. Les formulations topiques à base de riz ont également montré des effets antiviellissement marqués.

*Lavandula angustifolia* (Lavande) et *Rosmarinus officinalis* (Romarin) possèdent des effets antioxydants significatifs, ces effets antioxydants pourraient être impliqués dans la limitation de la pigmentation cutanée. Récemment, les effets photo-protecteurs et antiviellissement du romarin pris par voie orale, ont été démontrés (Nobil et *al.*, 2016). Cependant, des études manquent pour confirmer ces éventualités pour la lavande, ainsi que pour les autres plantes moins utilisées : *Rosa damascena* (Rosier de damas), *Prunus dulcis* (Amandier) et *Zea mays* (Maïs).

## **II.2. Bénéfices cosmétiques des huiles essentielles**

Notons que les extraits naturels (HE, absolues, hydrolats, macérats huileux) ne représentaient qu'une petite proportion des ingrédients utilisés en parfumerie, cosmétique et hygiène. Ce n'est que ces dernières années que ce sont des actifs de plus en plus prisés, tant pour les produits « naturels & bio » que pour les produits conventionnels, notamment pour leur impact positif d'un point de vue marketing produit.

### **II.2.1. Apaiser les peaux sensibles**

L'acétate de linalyle est un anti-inflammatoire présent dans les huiles essentielles de Lavande vraie (*Lavandula angustifolia*) et de Lavandin (*Lavandula intermedia*). Cela leur

permet d'être de bons actifs apaisants pour la peau, tout comme les HE de Camomille Romaine (*Chamaemelum nobile*) et de Camomille Allemande (*Matricaria recutita*). (Faucon, 2015 ; De la Charie, 2019)

### **II.2.2. Anti-âge**

Parmi les HE d'intérêt citons l'HE de Géranium (*Pelargonium asperum*), de Ciste (*Cistus ladaniferus*), d'Immortelle (*Helichrysum italicum*), de Rose de Damas (*Rosa damascena*) et de Carotte (*Daucus carota*). (Faucon, 2015 ; De la Charie, 2019)

### **II.2.3. Aider à la réparation de la peau**

Citons les HE de Ciste (*Cistus ladaniferus*), d'Immortelle (*Helichrysum italicum*), de Lavande aspic (*Lavandula latifolia*), réputées pour leur pouvoir cicatrisant. Elles pourront être utilisées dans des produits « réparateurs » pour peaux ou lèvres sèches, sujettes aux petites craquelures superficielles, ou bien dans des produits pour les vergetures. (Franchomme, 2015 ; Faucon, 2015 ; De la Charie, 2019)

## **III. Utilisation en agroalimentaire**

Les plantes médicinales présentant des vertus pour la santé humaine sont fortement implantées dans le domaine du complément alimentaire. D'usage traditionnel, ces plantes bénéficient néanmoins d'une surveillance toute particulière, du fait de leur nature.

**III.1. Complément alimentaire** est défini comme étant une denrée alimentaire qui complète l'alimentation. En vertu de cette définition, est différencié trois familles d'ingrédients pouvant intégrer les compléments alimentaires :

- **Les nutriments** : les vitamines, les minéraux, les substances vitaminiques et minérales comme le bêta-carotène ou encore la riboflavine ;
- **Les substances à visées nutritionnelles ou physiologiques** comme les omégas 3, les probiotiques ou le glucosamine ;
- **Les plantes et préparations de plantes** comme le radis noir, l'aubépine ou le ginseng.

## **III.2. Compléments alimentaires contenant des plantes ayant des propriétés pharmacologiques**

L'arrêté du 24 juin 2014 listant les plantes dont l'emploi est autorisé dans les compléments alimentaires comporte une catégorie spécifique de plantes qui semble particulièrement à risque, en raison de leurs effets secondaires, des conditions usuelles de leur emploi. Il s'agit des plantes botaniquement très différentes mais contenant toutes des hétérosides hydroxyanthracéniques : aloès (suc), bourdaine (écorce), cascara (écorce), rhubarbes (racines) et séné (fruit, foliole), qui sont des plantes médicinales laxatives stimulantes. S'y ajoutent le cassier (canéfier ; « pulpe » du fruit) et le nerprun, qui contiennent ces composés en moindre quantité, mais dont des préparations spécifiques peuvent générer des apports importants.

### **III.2.1. Les CAHH sont des médicaments**

- Il est important de signaler que les plantes à dérivés hydroxyanthracéniques ont jusqu'alors toujours été utilisées comme médicament compte tenu de leur action pharmacologique marquée entraînant une irritation de la muqueuse colique et une fuite d'eau et d'électrolytes (Bruneton, 2009). Cette activité pharmacologique explique que ces plantes n'aient jamais été utilisées dans l'alimentation. Au contraire, ce sont des plantes emblématiques de la phytothérapie qui sont utilisées comme laxatifs stimulants (Boutefnouchet et *al.*, 2014).
- Les CAHH sont particulièrement préoccupants. En effet, ils contiennent des principes actifs bien connus de médicaments de la classe des laxatifs stimulants.

## Chapitre 2: Les métabolites secondaires

### I. Définition

Les MS des plantes, souvent appelés produits naturels, comprennent un large éventail de molécules non protéiques, souvent de poids moléculaire relativement faible, qui se produisent dans certains taxons et ne sont pas essentielles à la croissance et au développement de base, mais sont fréquemment impliquées dans l'adaptation environnementale, aux stress biotiques et abiotiques. Les MS jouent également un rôle important dans la pollinisation et la dispersion des graines, ainsi que dans l'interaction entre les plantes et les espèces mutualistes de bactéries et de champignons. De plus, les interactions chimiques avec d'autres plantes (par exemple, l'allélopathie), la reconnaissance de l'hôte par les herbivores et la défense indirecte basée sur l'attraction des parasites et des prédateurs des herbivores (interactions tri-trophiques) impliquent souvent des MS (Hartmann, 2007). Par conséquent, l'importance adaptative et évolutive des MS des plantes est incontestée.

Du point de vue humain, nombre de ces milliers de molécules ont des applications intéressantes en pharmacologie, industrie chimique, nouveaux matériaux, agriculture et foresterie. Même avec une connaissance limitée et fragmentaire des MS des plantes, principalement centrés sur quelques corps médicinales, agricoles et forestières, ce type de produits chimiques naturels a eu un impact énorme sur la vie humaine. Prenons l'exemple de la quinine comme antipaludéen. Sans ce remède, il est fort probable que la colonisation des Amériques aurait eu un résultat différent. La découverte et le développement de médicaments dérivés du MS, tels que le taxol antitumoral d'if et la vincristine antileucémique de *Vinca*, ont rendu possible la continuité de nombreuses vies humaines (Croteau et *al.*, 2000). En raison de leur complexité structurale, comprenant souvent plusieurs centres chiraux, les MS des plantes sont très difficiles à synthétiser chimiquement avec des rendements adéquats, faisant des plantes ou des cellules et des tissus qui en dérivent les seules sources commercialement viables de ces molécules (Wu et Chappell, 2008).

### II. Biosynthèse

Malgré l'énorme variété de MS, le nombre de voies de biosynthèse de base correspondantes est restreint et distinct. Les précurseurs proviennent généralement de voies métaboliques de base, telles que la glycolyse, le cycle de Krebs ou la voie du shikimate. Un

aperçu schématique est présenté dans les figures 01a et b. Des hypothèses plausibles pour la biosynthèse de la plupart des MS ont été publiées (Dewick, 2002).

De plus, les outils génétiques pour éliminer les gènes deviennent importants pour disséquer les voies secondaires des plantes (Memelink, 2005). Pour les voies menant aux glycosides cyanogènes, aux glucosinolates, à certains alcaloïdes et acides aminés non protéiques (NPAA), aux amines, aux flavonoïdes et à plusieurs terpènes, les enzymes qui catalysent les étapes individuelles ont été identifiées. Dans les voies menant à l'isoquinoline, l'indole, la pyrrolidine, la pyrrolizidine et les alcaloïdes tropaniques, les flavonoïdes, les coumarines, les NPAA, les mono-, sesqui- et triterpènes, certains des gènes codant pour les enzymes biosynthétiques, ont déjà été isolés et caractérisés (Tab I) (Petersen, 2007; Zenk et Juenger, 2007; Schäfer et Wink, 2009).

Alors que, au début de ce siècle, on a fait valoir que les MS surviennent spontanément ou à l'aide d'enzymes non spécifiques, nous avons maintenant de bonnes preuves que les enzymes biosynthétiques sont très spécifiques dans la plupart des cas et la plupart ont été sélectionnées pour cette tâche spéciale (bien qu'elles souvent dérivent de pro-géniteurs communs ayant une fonction dans le métabolisme primaire ou de gènes procaryotes importés dans les cellules végétales via les chloroplastes et les mitochondries). En conséquence d'une synthèse enzymatique spécifique, les produits finaux ont presque toujours une stéréochimie distincte. Seules les enzymes impliquées dans la dégradation des MS, telles que les glucosidases, les estérases et autres hydrolases, ne sont pas spécifiques du substrat. La biosynthèse de MS est un processus hautement coordonné, qui comprend la formation de métabolite et la canalisation métabolique. La canalisation peut impliquer différents types de cellules et la compartimentation cellulaire. Ces processus garantissent une biosynthèse spécifique et évitent les interférences métaboliques (Winkel, 2004; Jorgensen et *al.*, 2005).

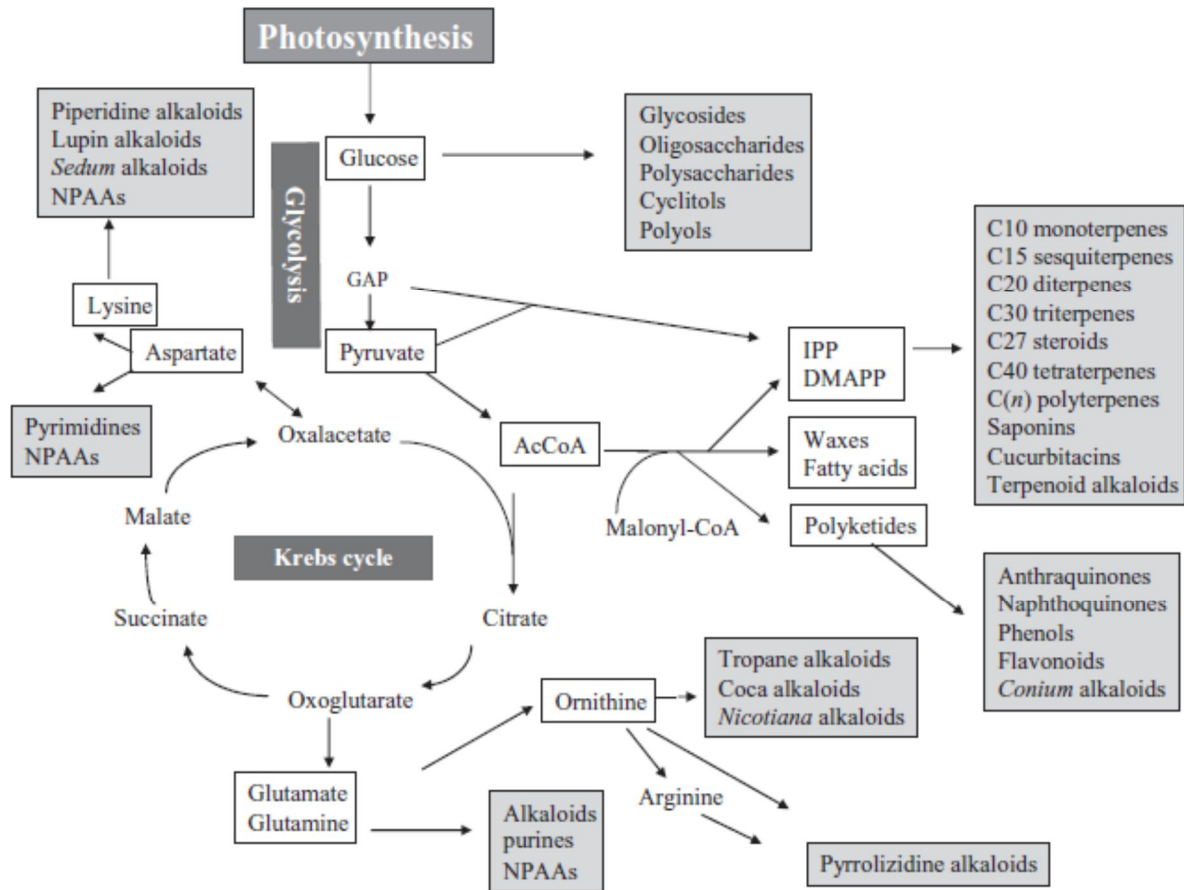


**Tableau I** : Nombre de métabolites secondaires connus des plantes supérieures (Wink, 2010).

<b>Les types des métabolites secondaires</b>	<b>Nombre <sup>a</sup></b>
<b>Les composés azotés</b>	
Alcaloïdes	21000
Acides aminés non protéiques (NPAA)	700
Amines	100
Glycosides cyanogéniques	60
Glucosinolates	100
Alkamides	150
Lectines, peptides, polypeptides	2000
<b>Les composés non azotés</b>	
Monoterpènes (C10) <sup>b</sup>	2500
Sesquiterpènes C15) <sup>b</sup>	5000
Diterpènes (C20) <sup>b</sup>	2500
Triterpènes, stéroïdes, saponines (C30, C27) <sup>b</sup>	5000
Tétraterpènes (C40) <sup>b</sup>	500
Flavonoïdes, tanins	5000
Phénylpropanoïdes, lignine, coumarines, lignanes	2000
Polyacétylènes, acides gras, cires	1500
Polycétides	750
Glucides, acides organiques	200

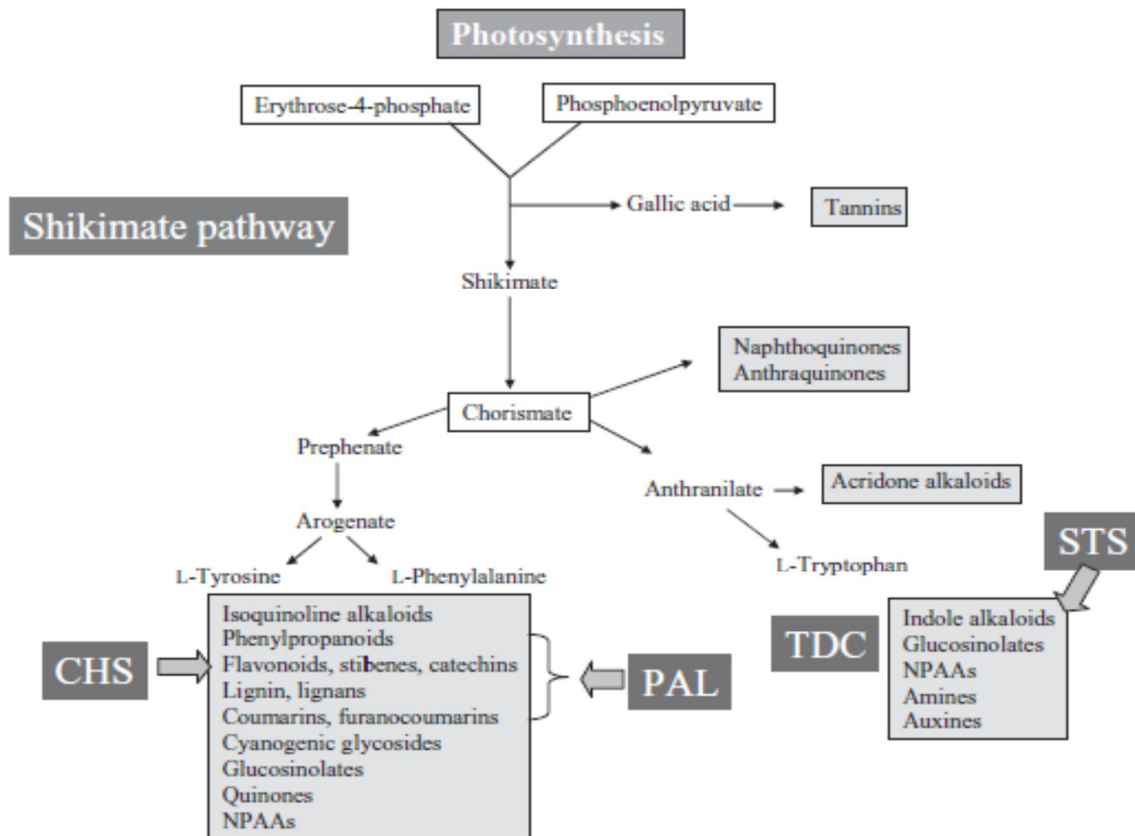
<sup>a</sup> Nombre approximatif de structures connues. <sup>b</sup> Le nombre total de terpénoïdes dépasse actuellement 22 000.

Certains MS sont produits dans tous les tissus, mais leur formation est généralement spécifique aux organes, tissus, cellules et souvent au développement. Bien que, dans la plupart des cas, les détails n'aient pas été élucidés, on peut supposer que les gènes du MS sont également régulés de manière spécifique aux cellules, aux tissus et au développement (comme la plupart des gènes végétaux qui ont été étudiés jusqu'à présent). Cela signifie qu'une batterie de facteurs de transcriptions spécifiques doit coopérer pour activer et transcrire les gènes du MS. Des régulateurs maîtres (facteurs de transcription par nature) sont apparemment présents, qui contrôlent l'ensemble des mécanismes des voies de biosynthèse, le transport et le stockage. Les sites de biosynthèse sont compartimentés dans la cellule végétale.



**Figure 01(a) :** Les voies principales menant aux métabolites secondaires (Wink, 2010).

Alors que, la plupart des voies de biosynthèse se déroulent dans le cytoplasme, il est prouvé que certains alcaloïdes (tels que la coniine, les quinolizidines et la caféine), les furano-coumarines et certains terpènes (tels que les monoterpènes, les diterpènes, le phytol et les caroténoïdes qui se forment dans le pyruvate / voie du phosphate de glycéraldéhyde) sont synthétisés dans le chloroplaste (Kutchan, 2005). Les sesquiterpènes, stéroïdes et dolichols sont produits dans le réticulum endoplasmique (RE) ou le compartiment cytosolique. Un aperçu schématisé est présenté à la Figure 02. La formation de coniine et d'amine a été localisée dans les mitochondries et les étapes de la biosynthèse de la proto-berberine dans les vésicules (Kutchan, 2005; Zenk et Juenger, 2007). Les étapes d'hydroxylation sont souvent catalysées par des enzymes liées à la membrane et le RE est le compartiment correspondant. Le RE lisse est aussi probablement le site de synthèse d'autres composés lipophiles. Les différentes étapes d'une biosynthèse peuvent se dérouler dans un réseau canalisé dans un compartiment ; dans d'autres cas, différents organes végétaux, types de cellules ou organites sont impliqués. Une translocation intra- et intercellulaire étendue de MS ou d'intermédiaires en serait une conséquence.



**Figure 01(b) :** Les voies principales menant aux métabolites secondaires dérivés de la voie de shikimate (Wink, 2010). NPAAAs, non-protein-amino-acids; PAL, phenylalanine ammonia lyase; TDC, tryptophan decarboxylase; STS, strictosidine synthase; CHS, chalcone synthase.

## III. Les grandes familles structurales de produits naturels

### III.1. Les alcaloïdes

#### III.1.1. Définition

L'alcaloïde est un produit naturel pur et parfait. Du point de vue biologique, l'alcaloïde est tout composé chimique biologiquement actif et hétérocyclique qui contient de l'azote et peut avoir une activité pharmacologique et, dans de nombreux cas, un usage médicinal ou écologique (Aniszewski, 1994 b). Cette définition, relativement large basée sur l'application, peut être critiquée comme inexacte. Cependant, il présente une image générale des types de composés envisagés. La nature biologique et chimique de ce groupe de composés conduit à la conclusion que chaque définition des alcaloïdes est soit trop large, soit trop étroite. Une définition courte et exacte n'est pas possible sans une longue liste d'exceptions. Parfois, pour éviter de présenter cette liste d'exceptions, les caractéristiques de base des alcaloïdes sont données dans la définition. Winterstein et Tieront souligné que ces composés avaient des caractéristiques telles que :

1. Une toxicité plus ou moins grande, qui agit principalement sur le système nerveux central (SNC),
2. Le caractère de base d'une construction chimique,
3. L'azote hétérocyclique en tant qu'ingrédient,
4. Une synthèse à partir d'acides aminés ou de leurs dérivés immédiats
5. Une distribution limitée dans la nature.

Dans une autre définition, Waller et Nowacki (1978) ont mentionné de nombreuses caractéristiques des alcaloïdes. Ils ont particulièrement attiré l'attention sur le fait que les alcaloïdes contiennent de l'azote dans la molécule et sont liés à au moins deux atomes de carbone. De plus, ce composé possède au moins un cycle dans la molécule, et son cycle n'est pas nécessairement hétérocyclique. Les auteurs ont également déclaré que les alcaloïdes ne pouvaient pas être des unités structurales de substances cellulaires macromoléculaires, de vitamines ou d'hormones. Plus récemment, Sengbush a simplement souligné que les alcaloïdes sont un groupe de bases azotées et que la plupart d'entre eux sont des médicaments.

### III.1.2. Classification

Les alcaloïdes peuvent être classés en fonction de leur :

1. Activité biologique et écologique ;
2. Structures chimiques ;
3. Voie de biosynthèse.

Du point de vue de l'activité biologique (Pelletier, 1983), il est possible de diviser les alcaloïdes en :

1. Molécules neutres ou faiblement basiques (par exemple, lactames comme la ricinine, certains N-oxydes comme l'indicine),
2. Alcaloïdes d'origine animale (par exemple, anoures, mammifères et arthropodes),
3. Alcaloïdes marins,
4. Alcaloïdes de mousse,
5. Alcaloïdes fongiques et bactériens,
6. Alcaloïdes non naturels (structurellement modifiés ou analogues).

Les alcaloïdes sont généralement classés par leurs précurseurs moléculaires communs, en fonction de la voie biologique utilisée pour construire la molécule. D'un point de vue structurel, les alcaloïdes sont divisés selon leurs formes et leurs origines. Il existe trois principaux types d'alcaloïdes :

- (1) Les vrais alcaloïdes,
- (2) Les proto-alcaloïdes,
- (3) Les pseudo-alcaloïdes.

Les vrais alcaloïdes et proto-alcaloïdes sont dérivés des acides aminés, alors que les pseudo-alcaloïdes ne sont pas dérivés de ces composés (tableau III).

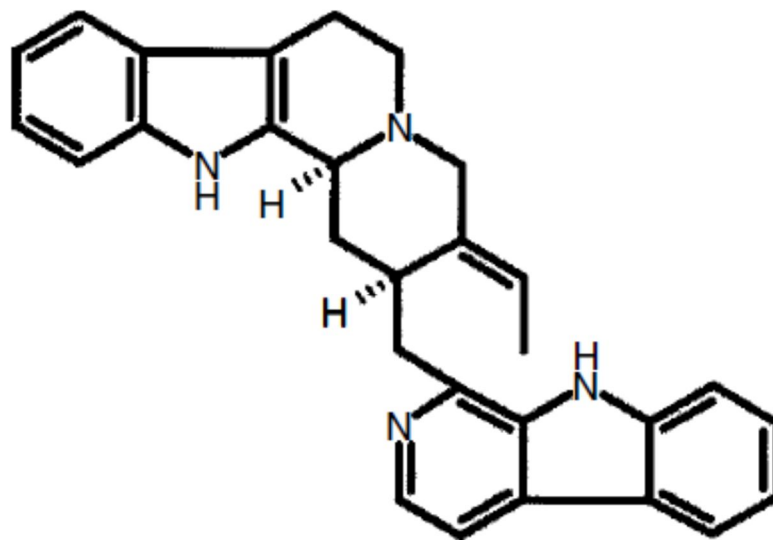
#### III.1.2.1. Vrais alcaloïdes

Les vrais alcaloïdes dérivent d'acides aminés et partagent un hétérocycle avec l'azote. Ces alcaloïdes sont des substances hautement réactives avec une activité biologique même à faibles doses. Tous les vrais alcaloïdes ont un goût amer et se présentent sous la forme d'un solide blanc, à l'exception de la nicotine qui a un liquide brun. Les vrais alcaloïdes forment des sels solubles dans l'eau. De plus, la plupart d'entre eux sont des substances cristallines

bien définies qui s'unissent aux acides pour former des sels. Les vrais alcaloïdes peuvent être présents dans les plantes

- (1) À l'état libre,
- (2) Sous forme de sels
- (3) Sous forme de N-oxydes.

Ces alcaloïdes se trouvent dans un nombre limité d'espèces et de familles, et sont ces composés dans lesquels des acides aminés décarboxylés sont condensés avec un fragment structurel non azoté. Les principaux précurseurs des vrais alcaloïdes sont des acides aminés tels que la L-ornithine, la L-lysine, la L-phénylalanine / L-tyrosine, le L-tryptophane et la L-histidine (Pelletier, 1983 ; Dewick, 2002). Des exemples de vrais alcaloïdes comprennent des alcaloïdes biologiquement actifs comme la cocaïne, la quinine, la dopamine, la morphine et l'usambarensine (figure 02). Une liste plus complète d'exemples apparaît dans le tableau II.

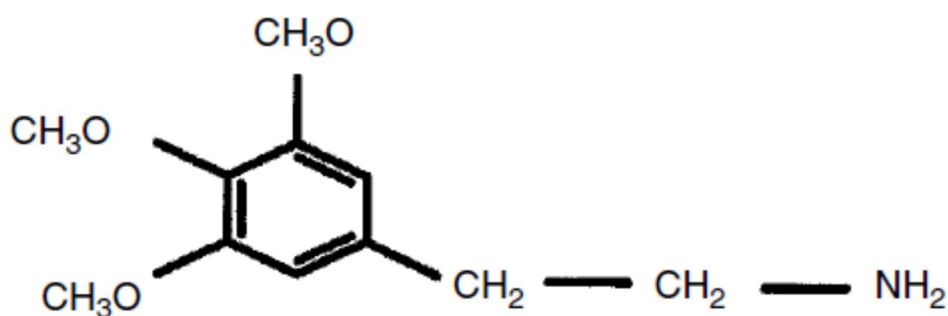


Usambarensine

**Figure 02 :** Un exemple d'un véritable alcaloïde. L'usambarensine, alcaloïde dérivé de la L-tyrosine, possède un fort potentiel antipaludique. L'usambarensine a été extraite de l'écorce de racine de *Strychnos usambarensis* africain, un petit arbre en Afrique de l'Est et du Sud et un petit buisson en Afrique de l'Ouest (Aniszewski, 2007).

### III.1.2.2. Proto-alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes sont des composés dans lesquels l'atome N dérivé d'un acide aminé ne fait pas partie de l'hétérocyclique. Ces types d'alcaloïdes comprennent des composés dérivés de la L-tyrosine et du l-tryptophane (voir le tableau II). Les proto-alcaloïdes sont ceux avec un anneau fermé, étant des alcaloïdes parfaits mais structurellement simples. Ils forment une minorité de tous les alcaloïdes. L'hordénine, la mescaline (fig 3) et la yohimbine sont de bons exemples de ces types d'alcaloïdes. Chini et *al.*(1992) ont trouvé de nouveaux alcaloïdes, la stachydrine et la 4-hydroxystachydrine, dérivés de *Boscia angustifolia*, une plante appartenant à la famille des Cappariaceae. Ces alcaloïdes ont un noyau pyrroline et sont des alcaloïdes basiques du genre *Boscia*. Les espèces de ce genre ont été utilisées en médecine populaire en Afrique de l'Est et du Sud. *Boscia angustifolia* est utilisé pour le traitement des maladies mentales et occasionnellement pour combattre la douleur et la névralgie.



Mescaline

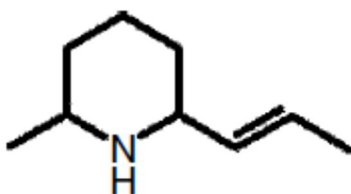
**Figure 03:** Un exemple de proto-alcaloïdes. La mescaline est l'alcaloïde dérivé de la L-tyrosine et extrait du cactus Peyote (*Lophophora williamsii*) appartenant à la famille des Cactus (Cactaceae). La mescaline a de fortes propriétés psychoactives et hallucinogènes. Le cactus Peyote pousse dans les zones désertiques du Nord du Mexique et du Sud des États-Unis. Cette plante était utilisée en Amérique précolombienne dans la pratique chamanique des tribus locales (Aniszewski, 2007).

### III.1.2.3. Pseudo-alcaloïdes

Les pseudo-alcaloïdes sont des composés dont les squelettes carbonés basiques ne sont pas dérivés d'acides aminés (Jakubke et *al.*, 1994). En réalité, les pseudo-alcaloïdes sont liés aux voies des acides aminés. Ils sont dérivés des précurseurs ou postcurseurs (dérivés du processus de dégradation) des acides aminés. Ils peuvent également résulter des réactions

d'amination et de transamination (Dewick, 2002) des différentes voies liées aux précurseurs ou postcurseurs d'acides aminés.


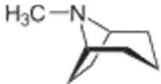
Ces alcaloïdes peuvent également être dérivés de précurseurs non-acides aminés. L'atome N est inséré dans la molécule à un stade relativement tardif, par exemple dans le cas de squelettes stéroïdiens ou terpénoïdes. Certes, l'atome N peut également être donné par une source d'acides aminés à travers une réaction de transamination, s'il existe un aldéhyde ou une cétone appropriée. Les pseudo-alcaloïdes peuvent être dérivés d'acétate et phénylalaninés ou terpénoïdes, ainsi que des alcaloïdes stéroïdiens. Des exemples de pseudo-alcaloïdes comprennent des composés tels que la coniine, la capsaïcine, l'éphédrine, la solanidine, la caféine, la théobromine et la pinidine (figure 04). D'autres exemples figurent dans le tableau II.



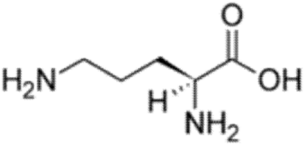
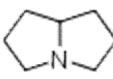
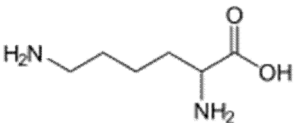
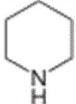
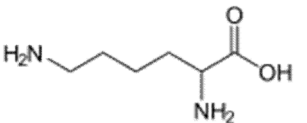
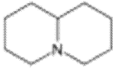
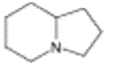
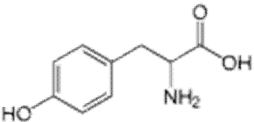
Pinidine

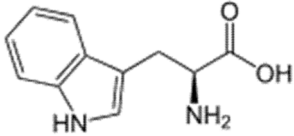
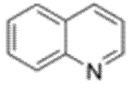
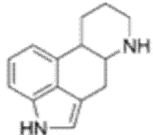
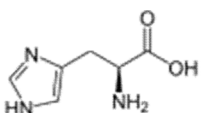
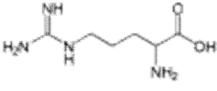
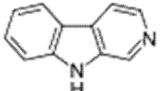
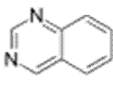
**Figure 04 :** Un exemple de pseudo-alcaloïde. La pinidine alcaloïde dérivée d'acétate est extraite de l'espèce Pinus, par exemple de *Pinus ponderosa* (Aniszewski, 2007).

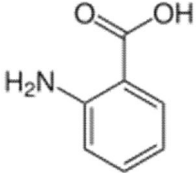
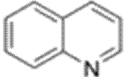
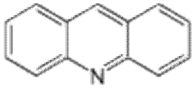
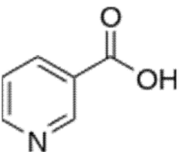


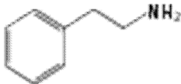
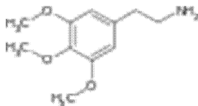
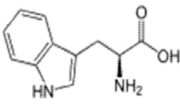
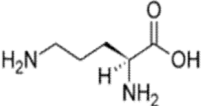
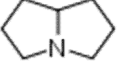
**Tableau II :** Classification des alcaloïdes selon Tadeusz Aniszewski (Aniszewski, 2007).

ALCALOÏDES VRAIS			
Précurseur	Groupe d'alcaloïdes	Noyau caractéristique	Exemples
<b>L-ornithine</b>	Alcaloïdes pyrrolidiniques	Pyrrolidine 	Cuscohygrine, Hygrine
	Alcaloïdes tropaniques	Tropane 	Atropine, Cocaïne, Hyoscyamine, Scopolamine



	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Pyrrolizidine 	Acétyl-lycopsamine, Homospermidine, Mételoidine, Rétronécine Europine, Ilamine
<b>L-lysine</b> 	Alcaloïdes pipéridiniques	Pipéridine 	Anaférine, Conine, Lobélanine, Lobéline, Pelletièreine, Pipéridine, Pipérine, Sédamine
	Alcaloïdes quinolizidiniques	Quinolizidine 	Cytisine, Lupinine, Spartéine
	Alcaloïdes indolizidiniques	Indolizidine 	Castanospermine, Swansonine
<b>L-tyrosine</b> 	Alcaloïdes tétrahydroisoquinoliniques  Simples	Benzyltétrahydroisoquinoline	Codéine, Morphine, Norcoclaurine, Papavérine, Tétrandine, Thébaïne, Tubocurarine
<b>L-tyrosine ou L-phénylalanine</b>	Alcaloïdes phényléthylisoquinoliniques	Alcaloïdes des Amaryllidacées	Crinine, Floramultine, Galantamine, Lycorine

<p><b>L-tryptophane</b></p> 	Alcaloïdes indoliques	Indole	Arundacine, Psilocine, Sérotonine, Tryptamine, Zolmitriptan  - Elaeagnine, Harmine  - Ajmalicine, Catharantine, Tabersonine
	Alcaloïdes quinoléiniques	Quinoléine 	Chloroquinine, Cinchonidine, Quinine, Quinidine
	Alcaloïdes pyrroloindoliques	Indole	A-yohimbine, Chimonanthéine, Corynanthéidine
	Alcaloïdes de l'ergot de seigle	Ergoline 	Ergotamine, Ergokryptine
<p><b>L-histidine</b></p> 	Alcaloïdes imidazoliques	Imidazole	Histamine, Pilocarpine, Pilocarpine
	Alcaloïdes manzaminiques	Xestomanzamine	Xestomanzamine A et B
<p><b>L-arginine</b></p> 	Alcaloïdes marins	$\beta$ -carboline 	Saxitoxine, Tétrodotoxine
<p><b>Acide anthranilique</b></p>	Alcaloïdes quinazolíniques	Quinazoline 	Péganine

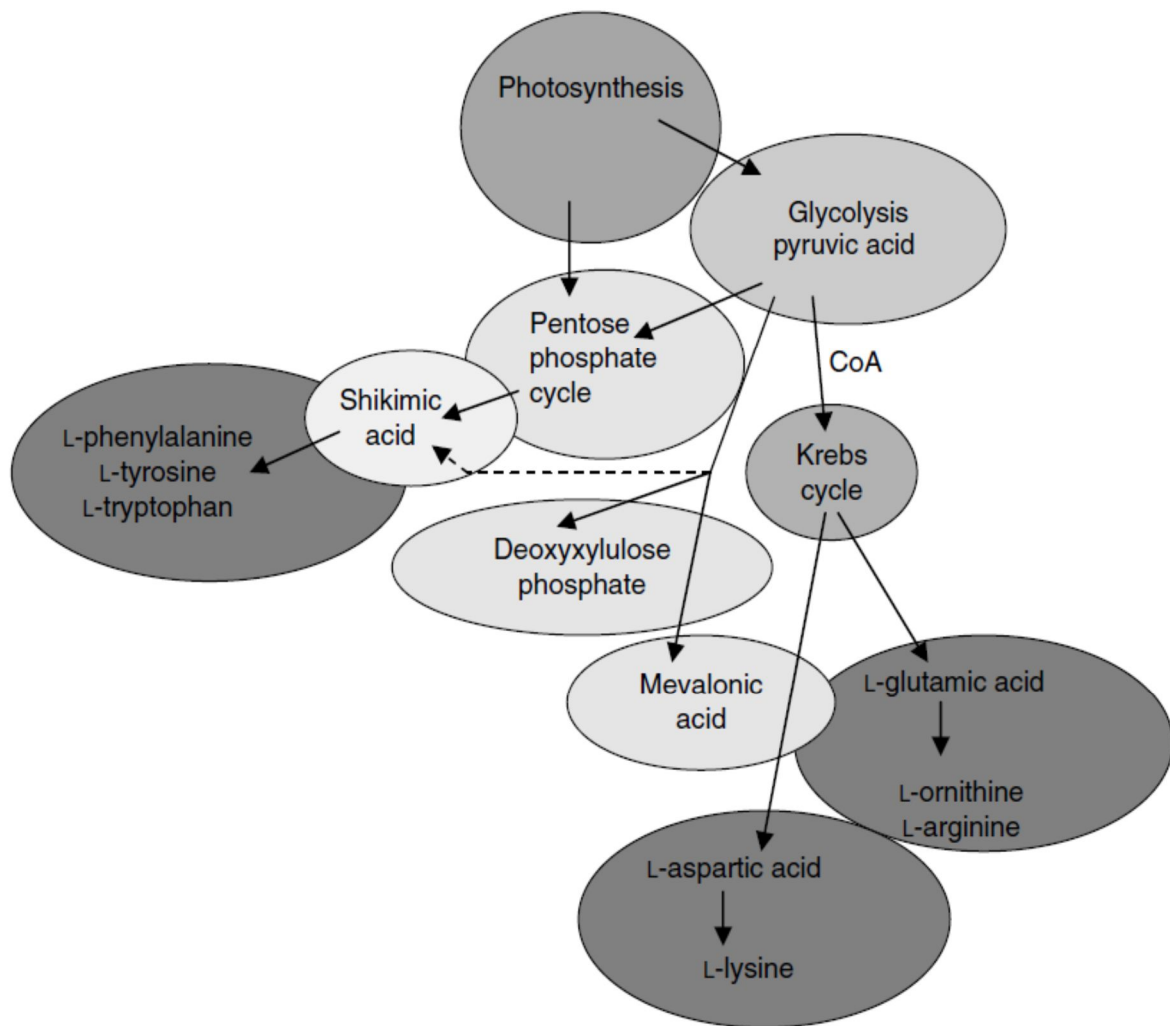
	Alcaloïdes quinoléiniques	Quinoléine 	Acutine, Bucharine, Dictamine, Foliodine, Perforine, Skimmianine
	Alcaloïdes acridoniques	Acridine 	Acronycine, Rutacridone
<b>Acidenicotinique</b> 	Alcaloïdes pyridiniques	Pyridine  Pyrrolidine 	Anabasine, Cassinine, Evoline, Nicotine, Wilforine
<b>PROTO-ALCALOÏDES</b>			
<b>Précurseur</b>	<b>Groupe d'alcaloïdes</b>	<b>Noyau caractéristique</b>	<b>Exemples</b>
<b>L-tyrosine</b>	Alcaloïdes phényléthylaminés	Phényl- éthylamine 	Adrénaline, Anhalamine, Dopamine, Noradrénaline, Hordenine, Mescaline 
<b>L-tryptophane</b> 	Alcaloïdes indoloterpéniques	Indole	Yohimbine
<b>L-ornithine</b> 	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Pyrrolizidine 	4-hydroxy-stachydrine, Stachydrine

<b>PSEUDO-ALCALOÏDES</b>			
<b>Précurseur</b>	<b>Groupe d'alcaloïdes</b>	<b>Noyau caractéristique</b>	<b>Exemples</b>
<b>Acétate</b>	Alcaloïdes pipéridiniques	Pipéridine	Coniine, Conicéine, Pinidine
	Alcaloïdes sesquiterpéniques	Sesquiterpène	Cassinine, Évonine, Maymysine, Wilforine
<b>Acide pyruvique</b>	Alcaloïdes de l'Ephédra	Phényle C	Cathine, Cathinone, Éphédrine, Noréphédrine
<b>Acide férulique</b>	Alcaloïdes aromatiques	Hényle	Capsaïcine
<b>Géraniol</b>	Alcaloïdes terpéniques	Terpénoïdes	Aconine, Aconitine, Méthyllycaconitine, Actinidine, Atisine, Gentianine
<b>Saponines</b>	Alcaloïdes stéroïdiques		Cholestane, Conessine, Jervine, Etioline, Prégénolone, Solanidine

### III.1.3. Biosynthèse

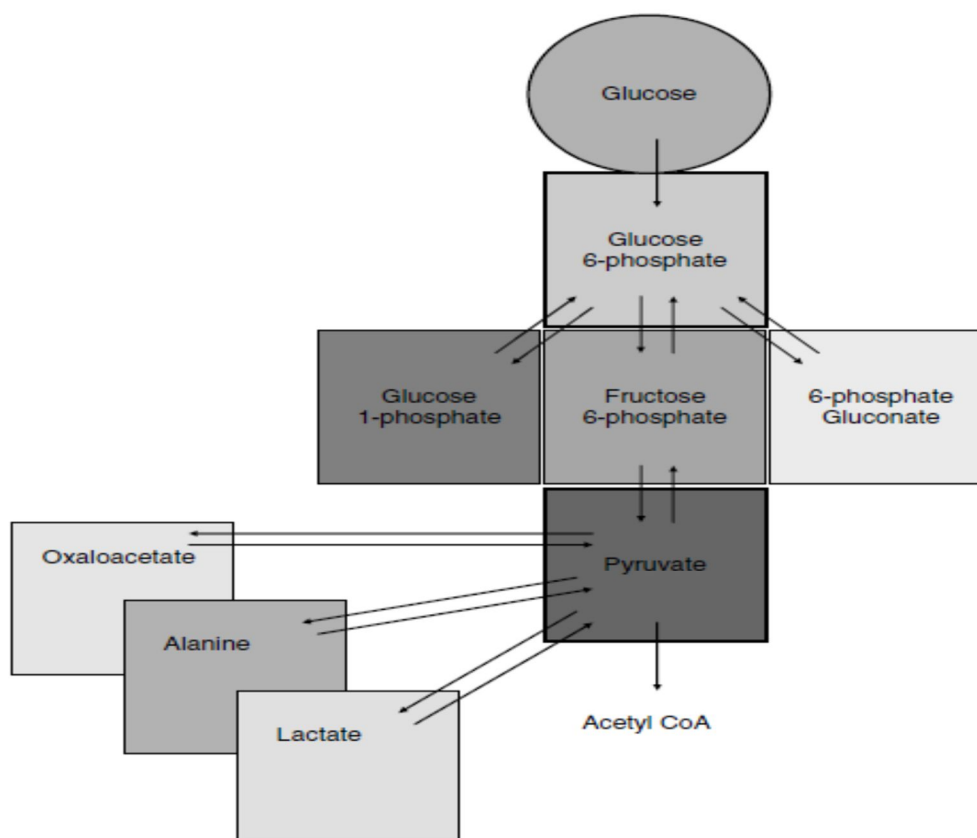
À l'origine, on pensait que les alcaloïdes étaient essentiellement des produits végétaux ; cependant, ces composés basiques sont également présents dans les micro-organismes et les animaux. Bien qu'à l'heure actuelle, la majorité des alcaloïdes connus soient dérivés d'acides aminés, on découvre de plus en plus d'alcaloïdes provenant d'insectes et d'organismes marins, d'origine terpénoïde ou polycétide.

La biosynthèse des alcaloïdes a besoin du substrat. Les substrats sont des dérivés des éléments constitutifs du métabolisme secondaire : l'acétyl-CoA, l'acide shikimique, l'acide mévalonique et le 1-désoxyxylulose 5-phosphate (fig 05). La synthèse des alcaloïdes à partir des voies : acétate, shikimate, mévalonate et désoxyxylulose. La voie d'acétyl CoA (voie de l'acétate) est la source de certains alcaloïdes et de leurs précurseurs (par exemple, les alcaloïdes pipéridiniques ou l'acide anthranilique sous forme d'ester de CoA aromatisé (antraniloyl-CoA)). L'acide shikimique est un produit des voies glycolytique et pentose phosphate, une construction facilitée par des parties de phosphoénol pyruvate et d'érythrose 4-phosphate. La voie d'acide shikimique est la source d'alcaloïdes tels que la quinazoline, la quinoléine et l'acridine. La voie du mévalonate est basée sur l'acide mévalonique (trois molécules d'acétyl-CoA) qui est étroitement liée à la voie de l'acétate, tandis que la voie du phosphate de désoxyxylulose est basée sur une combinaison d'acide pyruvique et de glycéraldéhyde 3-phosphate (tous deux issus de la voie glycolytique). Ensemble, les voies du mévalonate et du phosphate de désoxyxylulose produisent des composés terpénoïdes et stéroïdes.



**Figure 05 :** Blocages du métabolite secondaire et dérivation des acides aminés. Notez que l'acide shikimique peut être dérivé directement de la photosynthèse et de la glycolyse à travers le cycle du pentose phosphate, ou encore comme postcureur d'acide pyruvique (Aniszewski, 2007).

Cependant, il est important de noter que la voie cyclique de Krebs est également la clé de nombreux précurseurs d'alcaloïdes. L'ornithine, un postcureur de l-arginine chez les animaux et du l-glutamate chez les plantes, et, par exemple, la l-lysine, un acide aminé protéique principal, dérivant du composé de la voie cyclique de Krebs, sont des exemples utiles du rôle du cycle de Krebs pour les précurseurs d'alcaloïdes (fig 06).



**Figure 06 :** Dérivation de pyruvate et synthèse d'acétyl-CoA. Observez que le pyruvate, et par la suite la voie de l'acétyl CoA, a des racines en chaîne dans le métabolisme primaire. Le pyruvate peut également être synthétisé par des réactions de conversion. L'acétyl CoA secondaire est construit comme un élément constitutif du pyruvate et de la glycolyse (Aniszewski, 2007).

De plus, il existe d'autres sources de substrats d'alcaloïdes, en particulier dans les alcaloïdes puriques. La figure 08 représente la portée générale de la synthèse d'alcaloïdes dans le système métabolique des organismes et leur production d'énergie. L'activité enzymatique est très importante dans le métabolisme primaire de la glycolyse et le cycle de Krebs.

L'acide pyruvique et le CoA sont des composés clés dans la synthèse des précurseurs d'alcaloïdes. De plus, ces précurseurs (acides aminés) peuvent être dérivés de différents points dans les cycles de glycolyse et de Krebs. Par conséquent, la synthèse d'alcaloïdes en tant qu'activité métabolique secondaire est un sujet de recherche très difficile.

D'une manière générale, il est reconnu dans la littérature que le métabolisme des alcaloïdes chez les animaux, et en particulier chez les mammifères, est étroitement lié à celui

des plantes (Brossi, 1991; Xe et *al.*, 1991). Cependant, certaines exceptions existent. La figure 07 montre deux moyens de synthèse de la L-ornithine.

Les précurseurs des vrais alcaloïdes et proto-alcaloïdes sont des acides aminés (à la fois leurs précurseurs et leurs postcurseurs), tandis que les réactions de transamination précèdent les pseudo-alcaloïdes (tableaux II). Il n'est pas difficile de voir que parmi tous les acides aminés, seule une petite partie est connue sous le nom de précurseurs d'alcaloïdes (tableau II). Les vrais- et proto-alcaloïdes sont synthétisés principalement à partir des acides aminés aromatiques, de la phénylalanine, de la tyrosine (alcaloïdes de l'isoquinoline) et du tryptophane (alcaloïdes d'indole). La lysine étant à l'heure actuelle relativement bien comprise du point de vue de la chimie organique, il reste de nombreuses questions relatives à la nature biologique de la synthèse des alcaloïdes. Mahler et Cordes ont examiné et discuté trois exemples généraux de la synthèse d'alcaloïdes à partir d'acides aminés :

1. Synthèse du cycle pyrroline et des alcaloïdes dérivés de l'ornithine ;
2. Synthèse du cycle pipéridine et des alcaloïdes dérivés de la lysine ;
3. Synthèse des alcaloïdes isoquinolizidine à partir de la tyrosine (Aniszewski, 2007).



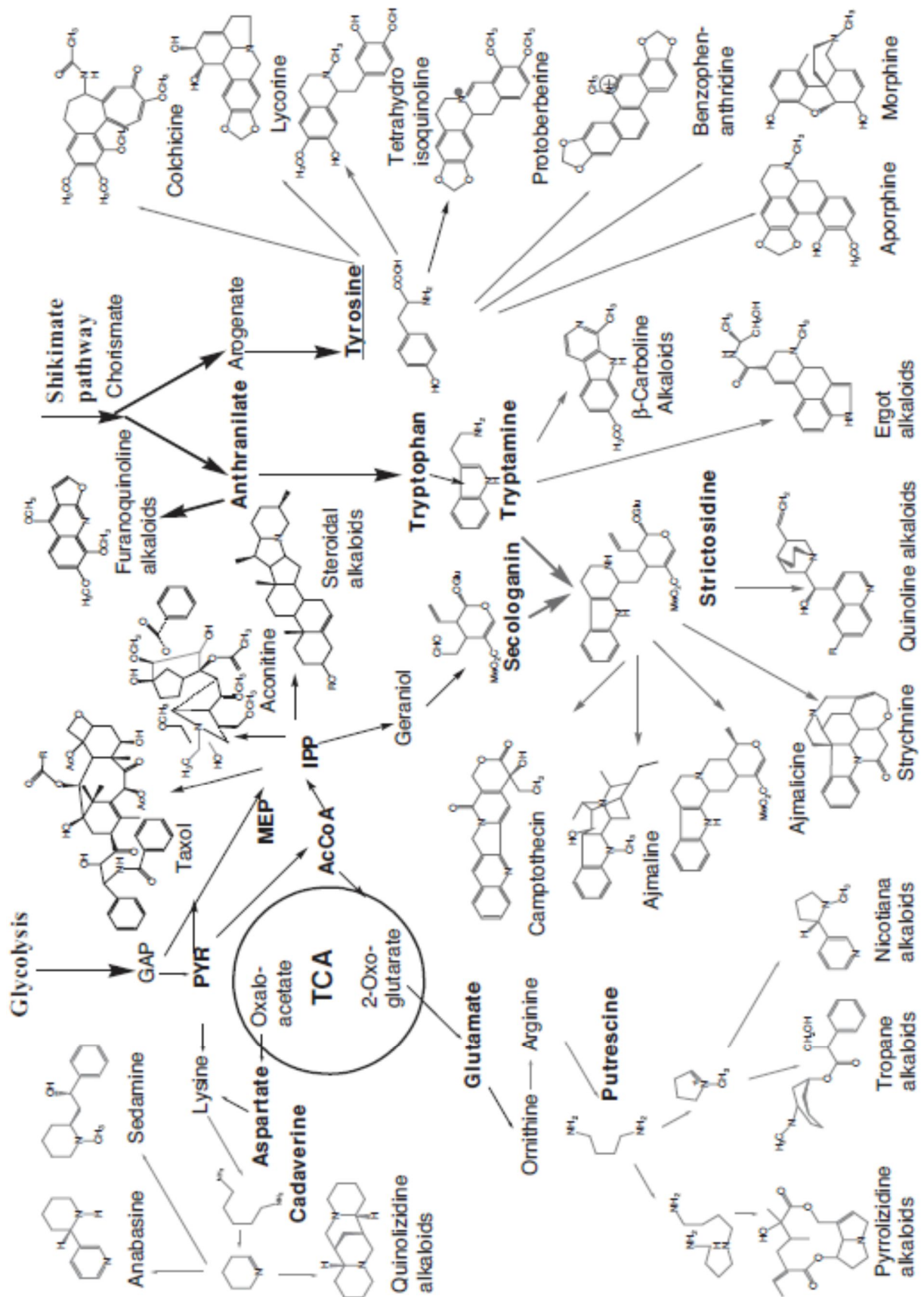
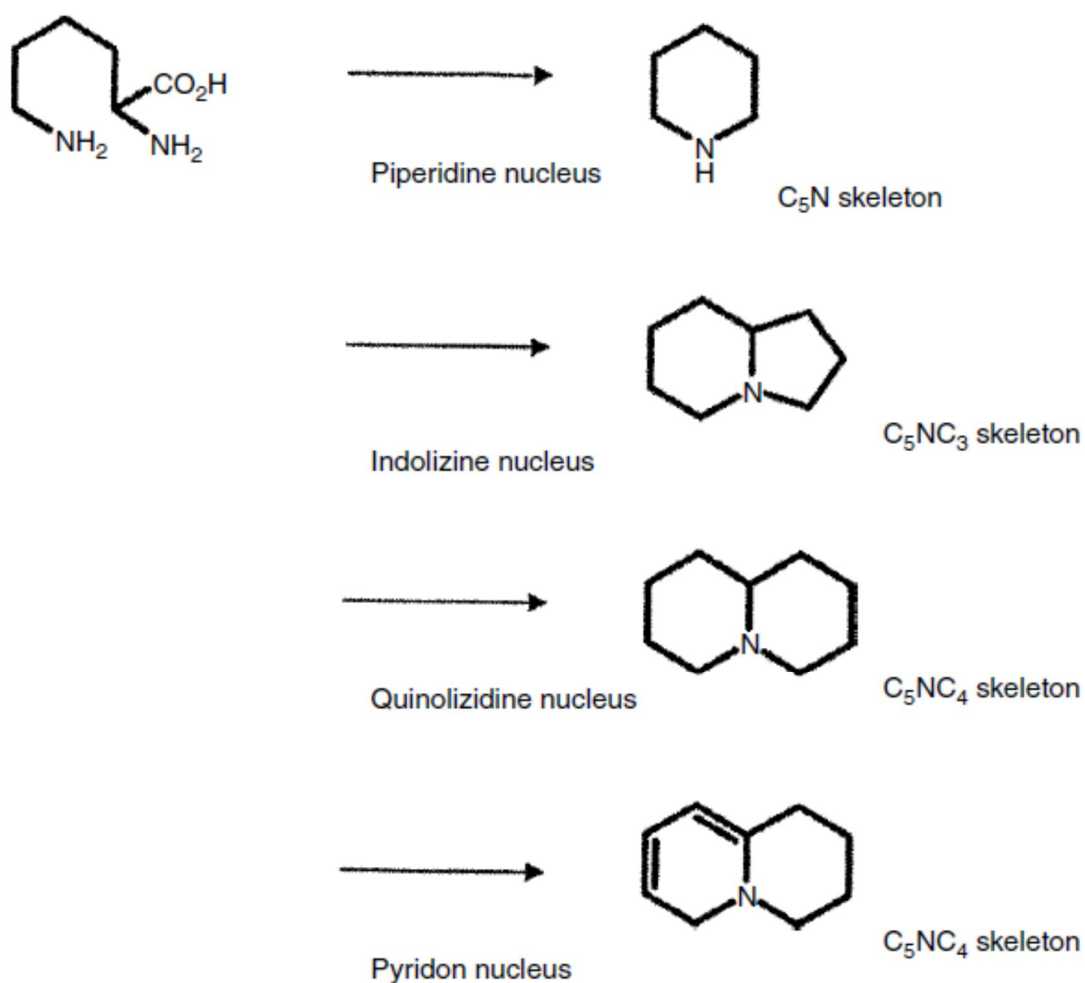


Figure 07 : Schéma général de la synthèse des alcaloïdes (Wink, 2010).

### III.1.4. Diversité des squelettes

Le noyau squelettique d'alcaloïde est le principal critère de détermination des précurseurs d'alcaloïdes. De nombreux squelettes sont produits au cours du processus de synthèse d'alcaloïdes. La figure 08 illustre certains noyaux et squelettes fournis dans la synthèse. Alcaloïde ne concerne que les réactions de cette étape de la synthèse. De plus, les squelettes peuvent changer de forme lors de la synthèse. Un exemple typique est la synthèse de la quinine, où le noyau indole est reconstruit pour former le noyau quinoléine.



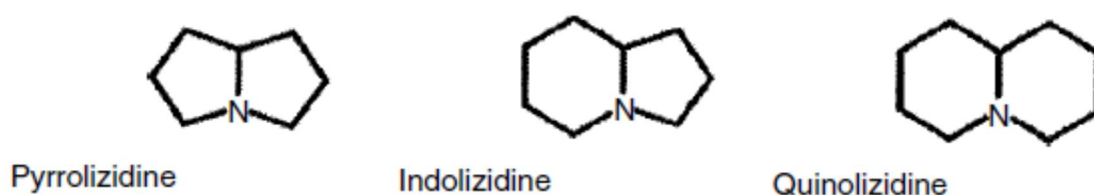
**Figure 08 :** Les noyaux dérivés de la L-lysine (Aniszewski, 2007).

• Au cours des processus de biosynthèse, la **L-lysine** peut produire au moins 4 squelettes avec différents noyaux alcaloïdiques :

1. Noyau pipéridine (squelette  $C_5N$ ),
2. Noyau indolizine (squelette  $C_5NC_3$ ),
3. Noyau quinolizidine (squelette  $C_5NC_4$ ),

#### 4. Noyau pyridon (avec noyau quinolizidine varié et noyau C<sub>5</sub>NC<sub>4</sub> squelette).

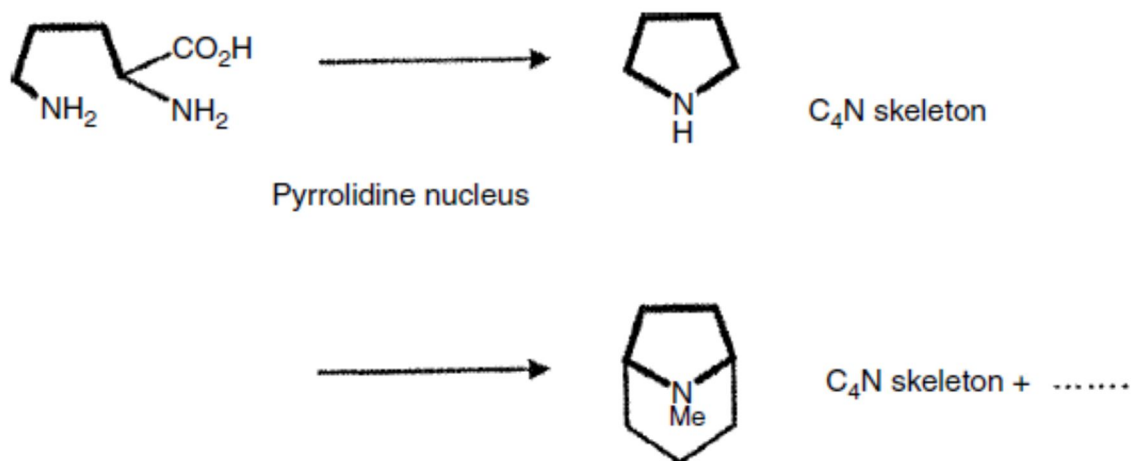
- La capacité de la **L-lysine** à fournir les différents noyaux alcaloïdiques est liée au rôle d'ADN de cet acide aminé dans les organismes végétaux et animaux. Chez les plantes, cet acide aminé est d'origine endogène qui est utilisée dans les métabolismes primaires et secondaires. Dans le règne animal, la lysine est principalement un acide aminé exogène, principalement d'origine alimentaire.
- Les alcaloïdes avec différents types de squelettes ont un impact biologique très différent sur les organismes. Les alcaloïdes pipéridine, indolizine, quinolizidine et pyridon ont des effets différents sur les systèmes digestif et nerveux des herbivores. Leur toxicité aiguë et leur capacité à modifier temporairement ou définitivement le nombre de cellules ou le métabolisme fonctionnel diffèrent considérablement. De plus, la structure du squelette influence également le goût. À cet égard, la position de l'atome N est importante. Dans tous les squelettes dérivés de la L-lysine, la position de N est la même que dans le substrat.
- Dans le cas **des alcaloïdes izidine** (fig 09), la position de l'atome d'azote est la même, mais le nombre d'atomes de carbone doit être différent. La différence réside dans les anneaux de ces alcaloïdes. Ils représentent différents groupes structuraux d'alcaloïdes, bien qu'ils aient deux cycles et soient deux composés cycliques. Ce point structurel est essentiel à leur activité biologique. Les anneaux pyrrol-, indol- et quinolizidine présentent des similitudes structurelles mais une diversité à la fois dans leur origine et, ce qui est très important, dans leur bio-impact. Même de petites différences dans le noyau peuvent entraîner d'énormes changements dans l'activité des alcaloïdes (Wysocki, 2001).



**Figure 09:** Les noyaux et les squelettes d'alcaloïdes izidine (Aniszewski, 2007).

- La **L-ornithine** produit le noyau pyrrolidine (squelette C<sub>4</sub>N). Ce noyau est également construit au sein d'alcaloïdes tropaniques (squelette C<sub>4</sub>N<sup>+</sup>) (fig 10). Les alcaloïdes qui contiennent les noyaux de pyrrolidine et de tropane sont très vigoureux dans leur activité biologique. Les alcaloïdes communs du noyau de la pyrrolidine comprennent l'hygrine,

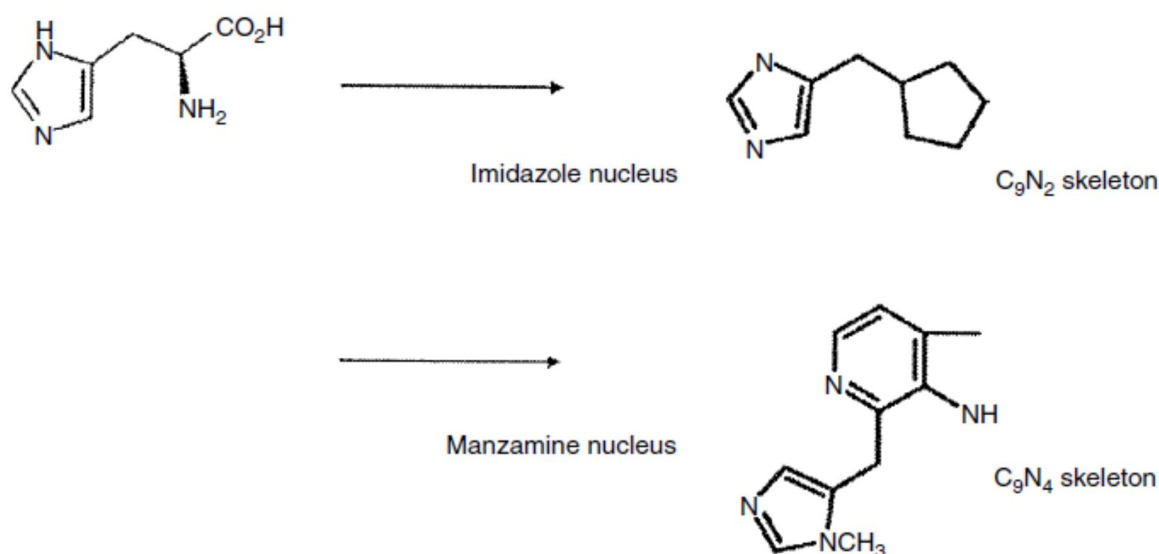
l'hyoscyamine, la cocaïne, la cuscohygrine et ainsi de suite. Les alcaloïdes végétaux les plus connus avec des noyaux de pyrrolidine sont la jusquiame (*Hyoscyamus niger*), la morelle mortelle (*Atropa belladonna*) et la mauvaise herbe de Jamestown (*Datura stramonium*).



**Figure 10:** La source et les formes du cycle pyrrolidine (Aniszewski, 2007).

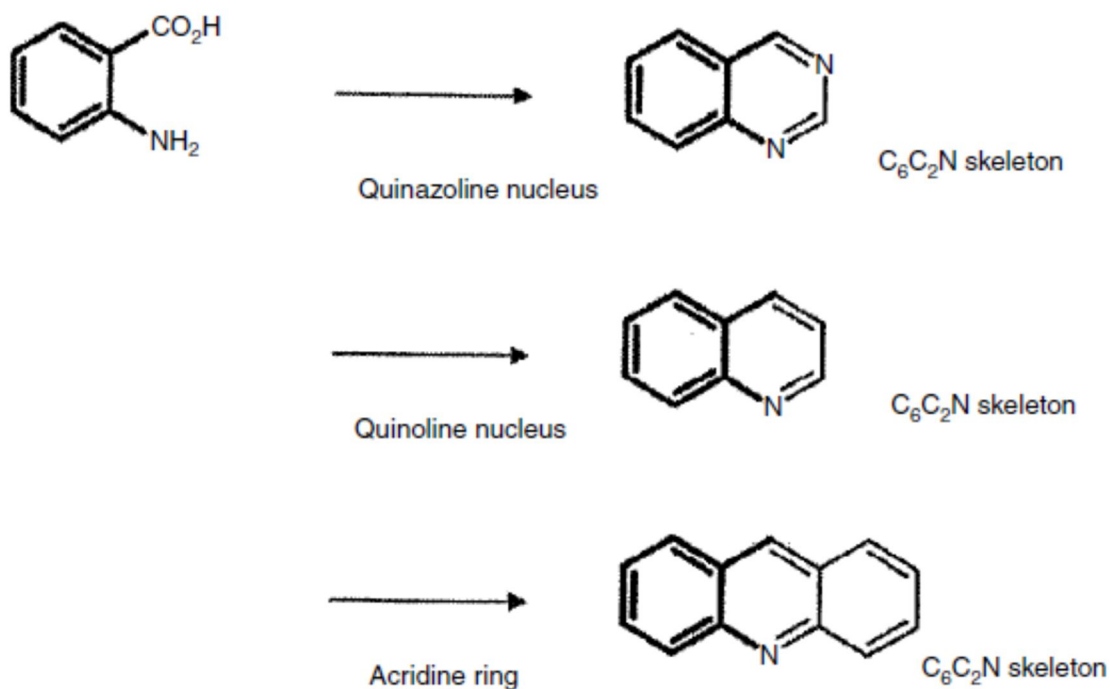
- Le **noyau imidazole** (fig 11) est fourni lors de la biosynthèse des alcaloïdes par la **L-histamine**. Les alcaloïdes typiques avec le noyau imidazole comprennent l'histamine, l'histidine, la procarpine et la pilosine. On les trouve sous forme d'alcaloïdes basiques dans deux familles principales, les Cactaceae et les Rutaceae.

Au cours de la synthèse des alcaloïdes, la L-histidine peut produire le noyau de la manzamine (fig 11). Ces alcaloïdes sont assez répandus, bien qu'ils aient été isolés pour la première fois à la fin des années 1980 dans des éponges marines (Rao et *al.*, 2003 ; Yousaf et *al.*, 2004; Rao et *al.*, 2004 ; Coldham et *al.*, 2005 ; Winkler et *al.*, 2006). Ils ont un système polycyclique inhabituel et une très large gamme de bioactivités. Les alcaloïdes courants avec ce noyau comprennent la manzamine A, la manzamine B, la manzamine X, la manzamine Y, la sextomanzamine A et ainsi de suite.



**Figure 11** : La L-histidine et les noyaux des alcaloïdes imidazole et manzamine (Aniszewski, 2007).

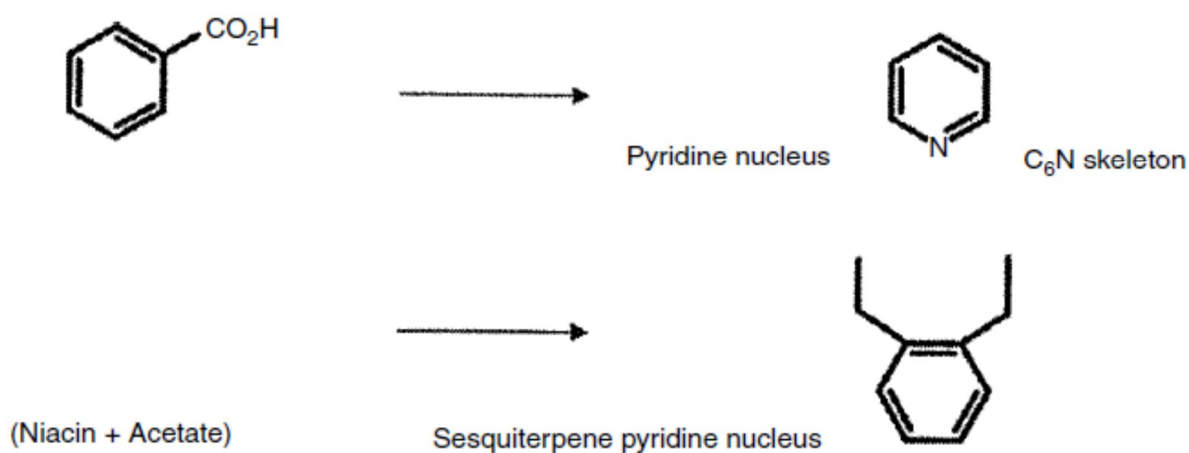
- Dans le cas des squelettes  $C_6C_2N$  (fig 12) convertis de **l'acide antranilique** en alcaloïdes **quinazoline**, **quinoléine** et **acridine**, les noyaux sont construits à l'intérieur du système cyclique. Seule cette partie est dérivée du précurseur, tandis que le reste du système d'anneau provient d'autres sources (Dewick, 2002). Les alcaloïdes avec le squelette  $C_6C_2N$  sont présents dans de nombreuses espèces, telles que *Peganum harmala*, *Dictamus albus*, *Skimmia japonica* et *Ruta graveolens*. Les alcaloïdes les plus connus contenant ces noyaux sont la peganine (vasicine), la dictamine, la skimmianine, la mélicopine, l'acronycine et la rutacridone.
- Tous les alcaloïdes avec le squelette  $C_6C_2N$  sont bioactifs; comme ils constituent un très grand groupe de composés, ils présentent des propriétés différentes. Comme déjà indiqué, l'acide anthranilique fournit à ces alcaloïdes un noyau (fig 12) mais le reste du squelette provient d'autres donneurs. Cela peut simplement avoir une influence sur les activités caractéristiques des alcaloïdes.



**Figure 12** : Les noyaux produits par l'acide anthranilique dans les alcaloïdes (Aniszewski, 2007).

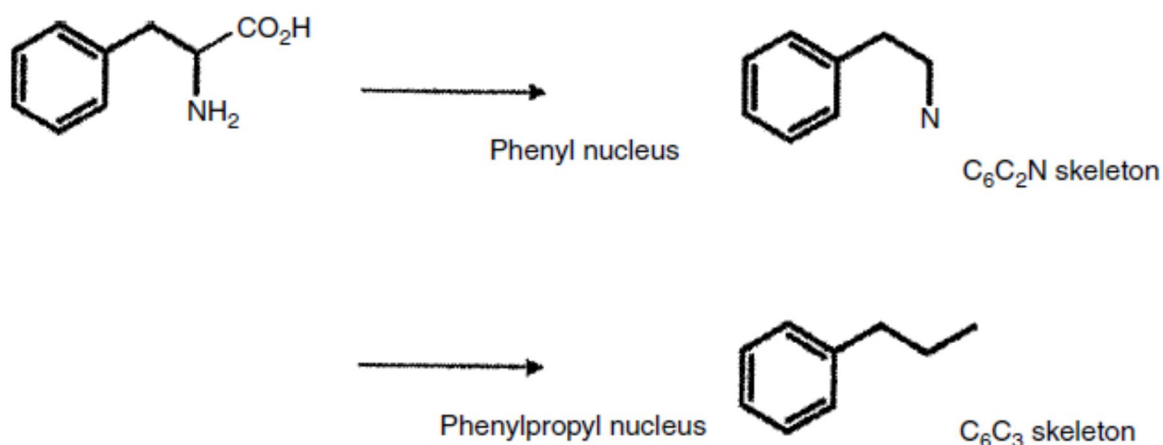
- **L'acide nicotinique** (fig 13) fournit des **alcaloïdes pyridiniques**. Le noyau pyridine apparaît dans des alcaloïdes tels que l'anabasine, l'anatabine, la nicotine, la nor nicotine, la ricine et l'arécoline. De plus, de nombreux alcaloïdes contiennent ce noyau dans le cadre de leur squelette total. Par exemple, l'anabasine est dérivée de l'acide nicotinique et de la lysine. Les alcaloïdes pyridiniques se trouvent dans des plantes telles que le tabac (*Nicotiana tabacum*), le ricin (*Ricinus communis*) et les noix de bétel (*Areca catechu*). Le noyau sesquiterpène pyridine dérive en partie de l'acide nicotinique et en partie de la voie de l'acétate. Il existe plus de 200 alcaloïdes connus dans ce groupe (Zhu et *al.*, 2002 ; Furukawa et *al.*, 2002 ; Lião, 2003; Shirota et *al.*, 2004)

Nicotinic acid = Niacin = Vitamin B<sub>3</sub>



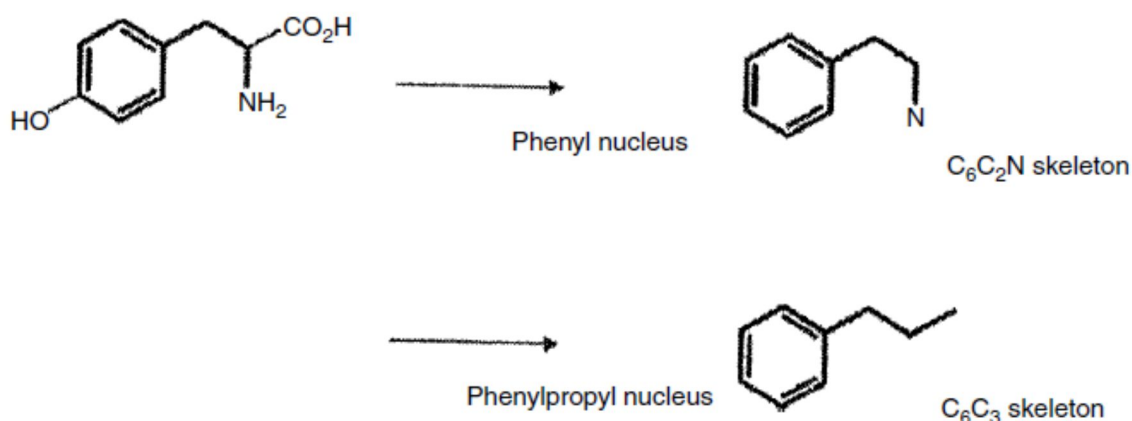
**Figure 13 :** Le noyau des alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique (Aniszewski, 2007).

- Dans la synthèse des alcaloïdes, **L-phénylalanine** (fig 14) fournit le noyau phényle ou phénylpropyle. Ces types de noyaux se produisent dans la cathionine, la cathine, l'éphédrine, la pseudoéphédrine et la norpseudoéphédrine. Ces alcaloïdes se trouvent en particulier dans de nombreuses espèces d'éphédra. Les molécules d'alcaloïdes naturels de ces plantes ont des propriétés similaires à celles des composés synthétiques utilisés comme stupéfiants (par exemple, l'amphétamine).



**Figure 14 :** Les noyaux dérivés de la L-phénylalanine dans la biosynthèse des alcaloïdes (Aniszewski, 2007).

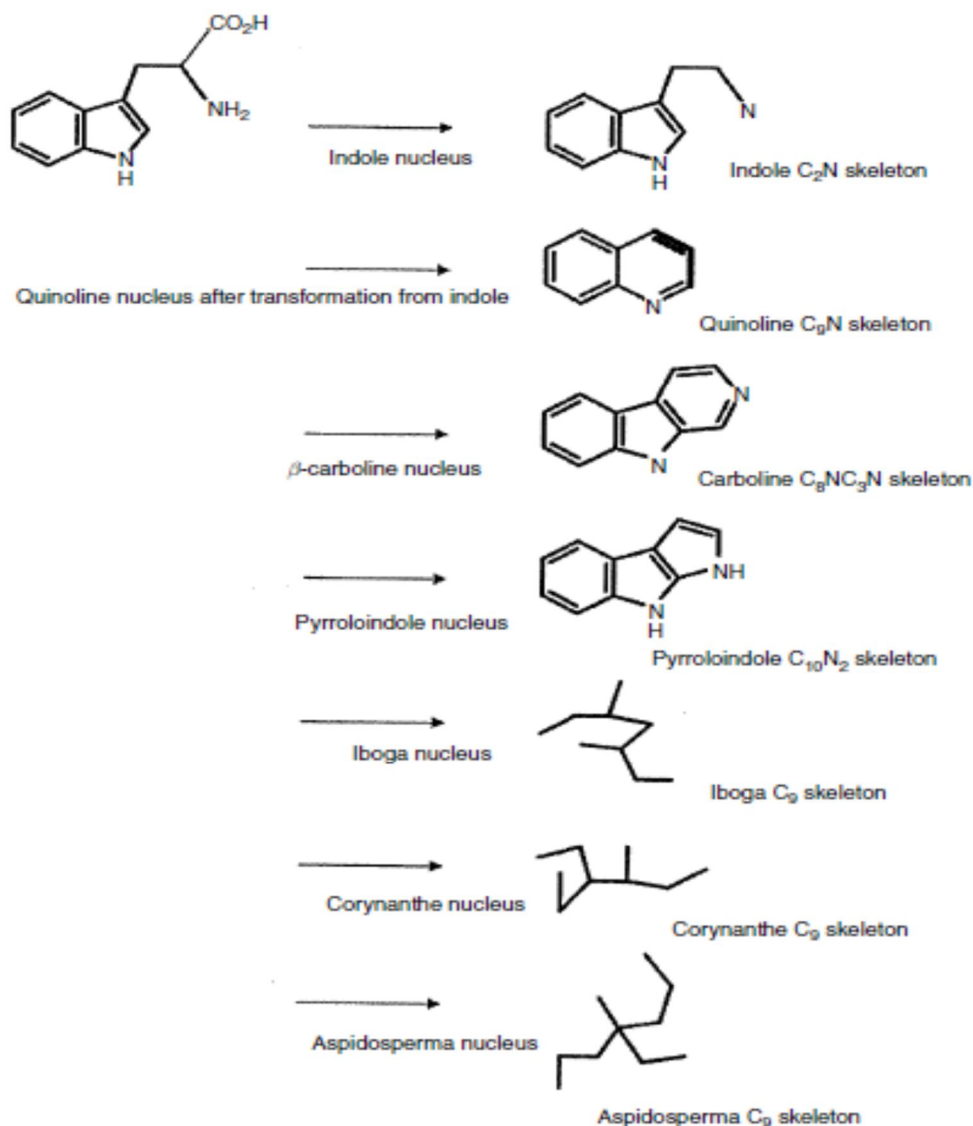
- **La L-tyrosine** (fig 15) est un acide aminé aromatique (similaire en composé de la L-phénylalanine) qui fournit également des noyaux phényle et phényl-propyle (figs 14 à 15) pour les alcaloïdes. Les molécules contenant des noyaux de la L-tyrosine comprennent, par exemple, la mescaline, l'anhalamine, la papavérine, le curare et la morphine. Ce sont des composés naturels biologiquement très forts et se produisent relativement largement dans le règne végétal (tableau II).



**Figure 15 :** Noyaux fournis aux alcaloïdes par la L-tyrosine dans le processus de synthèse (Aniszewski, 2007).

- Un autre acide aminé aromatique, le **L-tryptophane** (fig 16), contient le noyau indole. Ce noyau est synthétisé dans un grand nombre d'alcaloïdes, tels que la psilocine, la psilocybine, l'harmine, la catharanthine, la réserpine, l'ajmalicine, la vindoline, la vincristine, la strychnine, la quinine, l'ergotamine et d'autres alcaloïdes de l'ergot. Le noyau d'alcaloïde en tant que fragment de structure du précurseur donné à la nouvelle molécule lors de sa synthèse est très intéressant et relativement méconnu. Le donneur original évident de chaque carbone dans le cycle d'alcaloïde n'est toujours pas exactement compris. Cependant, le long des voies des alcaloïdes, des éléments de base secondaires à la synthèse des alcaloïdes, il y a une longue chaîne de réactions. La translocation du noyau dans la molécule d'alcaloïde est l'étape la plus importante de cette synthèse d'alcaloïdes.





**Figure 16 :** Le noyau fourni par le L-tryptophane pendant la synthèse (Aniszewski, 2007).

### III.1.5. Applications des alcaloïdes

Les applications des alcaloïdes peuvent être trouvées dans différents domaines de l'économie, l'industrie, le commerce. Les caractéristiques applicables des alcaloïdes sont à la fois chimiques et leur capacité à être isolées sous forme de molécules pures ou à être modifiées. L'activité et l'utilisation spécifiques constituent la base des applications. Les alcaloïdes ont été utilisés tout au long de l'histoire en médecine populaire dans différentes régions du monde. Ils font partie des plantes utilisées en phytothérapie.

### III.1.5.1. Les applications médicales

Certains alcaloïdes sont encore utilisés en médecine aujourd'hui. Ils sont utilisés comme composés naturels ou modifiés. L'application d'alcaloïdes dans la pratique clinique est liée à l'activité biologique dans les corps humains et animaux (Tab III).

**Tableau III :** Les plus importants alcaloïdes utilisés dans les médicaments (Aniszewski, 2007).

Les noms des alcaloïdes	Exemple des sources naturelles
Aconitine	<i>Aconitum napellus</i>
Ajmaline	<i>Catharanthus roseus</i>
Atropine	<i>Atropa belladonna</i>
Berberine	<i>Berberis vulgaris</i>
Boldine	<i>Peumus boldo</i>
Caffeine	<i>Coffea</i> spp., <i>Cola</i> spp.
Cathine	<i>Catha edulis</i>
Cocaine	<i>Erythroxylon coca</i>
Codeine	<i>Papaver somniferum</i>
Colchicine	<i>Colchicum autumnale</i>
Emetine	<i>Cephaelis acuminata</i>
Ephedrine	<i>Ephedra sinica</i>
Ergotamine	<i>Claviceps purpurea</i>
Eserine <sup>a</sup>	<i>Physostigma venenosum</i>
Galanthamine	<i>Galanthus nivalis</i>
Hydrastine	<i>Hydrastis canadensis</i>
Hyoscine	<i>Duboisia</i> , <i>Datura</i> , <i>Hyoscyamus</i> spp.
Hyoscyamine <sup>b</sup>	<i>Atropa belladonna</i>
Lobeline	<i>Lobelia inflata</i>
Morphine	<i>Papaver somniferum</i>
Narceine	<i>Papaver somniferum</i>
Nicotine	<i>Nicotiana</i> spp.
Noscapine <sup>c</sup>	<i>Papaver somniferum</i>
Papaverine	<i>Papaver somniferum</i>
Pilocarpine	<i>Pilocarpus</i> spp.
Quinidine	<i>Cinchona</i> spp.
Quinine	<i>Cinchona</i> spp.
Rescinnamine	<i>Rauvolfia</i> spp.
Reserpine	<i>Rauvolfia serpentina</i>
Sanguinarine	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Sparteine	<i>Cytisus scoparius</i> *
Strychnine	<i>Strychnos nux-vomica</i>
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>

Theobromine	<i>Theobroma cacao</i>
Theophylline	****
Tubocurarine	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Vinblastine	<i>Catharanthus roseus</i>
Vincamine	<i>Vinca minor</i>
Vincristine	<i>Catharanthus roseus</i>
Yohimbine	<i>Rauwolfia spp.</i>

**Remarques :** a une Physostigmine comme nom synonyme ; b Scopolamine comme nom synonyme ; c Narcotine comme nom synonyme ; \* En petites concentrations chez de nombreuses espèces, en particulier chez *Lupinus spp.* Le principal alcaloïde de *Cytisus scoparius*; \*\* Faibles concentrations dans les sources naturelles. La théophylline synthétique est utilisée.

### a) Régulation des ions et des canaux Na<sup>+</sup>

L'un de ces rôles importants de certains alcaloïdes est leur influence sur les canaux Na<sup>+</sup> et leur interaction avec les récepteurs. L'aconitine, l'ajmaline, la sanguinarine et la spartéine ont des utilisations cliniques à cet égard. L'aconitine provoque un afflux d'ions Na<sup>+</sup> à travers les membranes. Par conséquent, l'aconitine peut d'abord activer et dans les stades ultérieurs également bloquer le nerf du récepteur. Cet alcaloïde régule l'activité des canaux Na<sup>+</sup> et par conséquent l'activité du récepteur et l'activité enzymatique régulée par le récepteur. Les applications de cet alcaloïde sont liées à la régulation des défauts dans les perturbations neuro et locales de la signalisation et de l'activité nerveuse des récepteurs. Bien que l'ajmaline influence également les canaux Na<sup>+</sup>, son activité est de bloquer ces canaux. Cela influe sur la phase de réfraction du cœur et diminue également la fréquence cardiaque. L'ajmaline peut être utilisée pour corriger les défauts arythmiques. La sanguinarine influence également les ions Na<sup>+</sup> et inhibe en particulier l'activité estérase (Aniszewski, 2007).

### b) Régulation de l'acétylcholine estérase

Les alcaloïdes qui influencent sur l'activité de l'acétylcholine estérase sont l'ésérine, la galanthamine, la nicotine, la lobéline et la tubocurarine. Tous ces alcaloïdes sont très actifs (Aniszewski, 2007).

### c) Régulation des récepteurs de la glycine

La strychnine, un alcaloïde très toxique pour les animaux, se lie aux récepteurs de la glycine. Les applications de strychnine ne peuvent être envisagées qu'à des doses cliniques.

Leur but est d'activer les neurotransmetteurs de la moelle épinière, qui sont généralement supprimés par la glycine. La strychnine n'est en concurrence qu'avec la glycine dans le récepteur. Cet alcaloïde peut être utilisé pour stimuler la respiration et la circulation en cas de faiblesse physique. De plus, les produits à base de strychnine sont utilisés dans le traitement des troubles oculaires et du nerf optique. Des doses plus élevées sont mortelles (Aniszewski, 2007).

### **III.1.5.2. Applications agricoles**

Les alcaloïdes sont connus dans les productions alimentaire et agricole. De nombreuses cultures contiennent ces composés. Dans les cultures vivrières, ces molécules sont un problème et un sujet de discussion en raison des risques potentiels pour la santé et du fait qu'elles doivent être éliminées des plantes par sélection et surtout par hybridation. Des cultivars riches en alcaloïdes (amers) et pauvres en alcaloïdes (doux) sont ainsi développés. Les deux types de cultivars sont nécessaires à des fins différentes. L'élimination totale des alcaloïdes par reproduction n'est pas possible actuellement. Cependant, il est possible de réduire la teneur en alcaloïdes à des niveaux tels que la matière végétale est appropriée pour une utilisation dans le butinage et l'alimentation. L'autre moyen d'éliminer les alcaloïdes de la matière végétale est le traitement industriel. Il est possible d'éliminer complètement les alcaloïdes de la matière première végétale par des moyens technologiques. Ces types de traitement industriel peuvent être trouvés dans l'industrie alimentaire. Les alcaloïdes ne sont plus problématiques dans le cas des aliments transformés ou des fourrages. Cependant, des problèmes persistent lorsque des matières premières fraîches ou non transformées sont utilisées.

La possibilité de développer des aliments physiologiquement fonctionnels à l'aide de plantes est actuellement un point de discussion majeur dans de nombreux pays. Les alcaloïdes en tant que tels végétaux sont des composés difficiles uniquement en raison de leur forte bio-activité. D'autre part, cette bio-activité peut être utilisée dans le développement d'aliments pour animaux et de denrées alimentaires. Cependant, les aliments physiologiquement fonctionnels ne doivent pas être trop forts chimiquement et les doses doivent être beaucoup plus faibles que les doses cliniques. De plus, l'une des possibilités d'utilisation potentielle des alcaloïdes dans les aliments est le développement des «vaccins naturels à base de plantes». Le développement de ces types d'applications est remarquable. Les plantes génétiquement modifiées (PGM) peuvent contenir des gènes supplémentaires et produire de nouvelles

protéines. Les alcaloïdes en tant que plantes peuvent donc être produits dans les plantes dans lesquelles ils n'existent généralement pas. Dans le traitement de maladies telles que le cancer ou le SIDA, il est raisonnable de développer des vaccins végétaux (alimentaires) (Aniszewski, 2007).

### **III.1.5.3. Biotechnologie**

Les alcaloïdes utilisés comme molécules fortement bioactives sont indispensables en biotechnologie pour le développement de nouvelles méthodes de production. Il est possible de produire des alcaloïdes plus efficaces via la biotechnologie, et également possible de les produire à très grande échelle.

La biotechnologie peut être définie de manière générale comme l'application d'organismes, de biomatériaux et de systèmes ou de procédés dans la fabrication et la production. Dans le cas des alcaloïdes, la biotechnologie est un processus de production efficace d'alcaloïdes *in vitro* et *in vivo*. La biotechnologie peut être divisée en biotechnologie chimique et industrielle en fonction de la méthode utilisée. De plus, il peut être pensé dans un sens biomédical et pharmaceutique lorsqu'il s'agit d'objectifs médicaux. Enfin, la biotechnologie génomique et protéomique utilise le génie génétique et protéique. La biotechnologie tente de produire des cellules et des molécules d'animaux, de plantes et de micro-organismes. Les alcaloïdes sont un groupe de molécules qui peuvent être produites par des moyens biotechnologiques. Les plantes sont à la base de ce type de production ; cependant, les alcaloïdes peuvent également être produits dans des cellules animales ou dans celles de micro-organismes. La manipulation génétique ou d'organe est nécessaire dans cette production. D'une manière générale, les meilleurs résultats dans la production d'alcaloïdes par des méthodes biologiques sont actuellement obtenus en utilisant des organes végétaux. Cependant, il est également possible à partir de micro-organismes ainsi que de cellules et tissus animaux (Aniszewski, 2007).

## III.2. Les composés phénoliques

### III.2.1. Définition

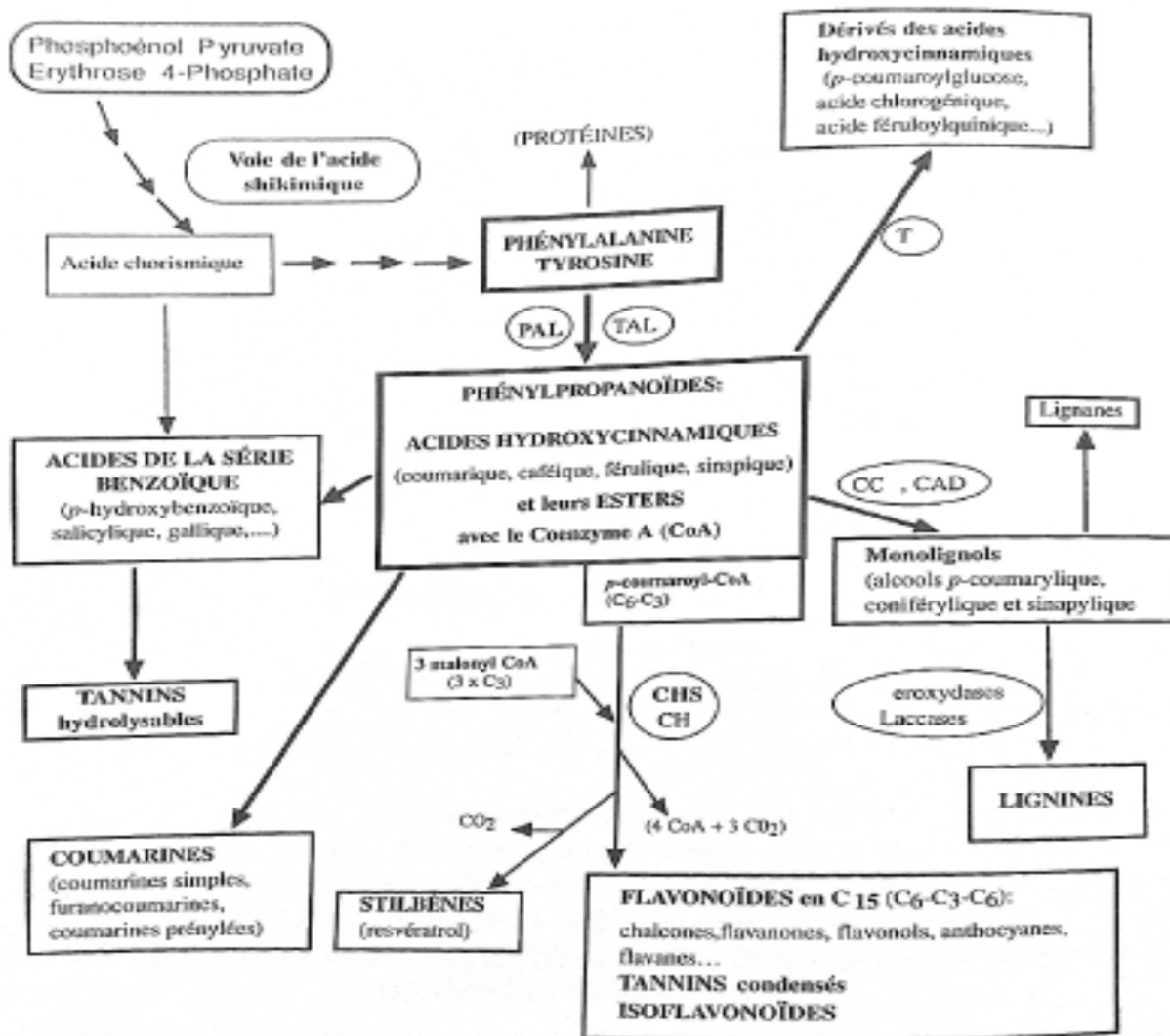
Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2009).

### III.2.2. La biosynthèse

Dans la nature, la synthèse du noyau aromatique est le fait des seuls végétaux et micro-organismes. Les organismes animaux sont en effet presque toujours tributaires soit de leur alimentation, soit d'une symbiose, pour élaborer les métabolites qui leur sont indispensables et qui comportent cet élément structural.

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse (fig 17):

- **La voie de shikimate** : la voie la plus courante, conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés.
- **La voie d'acétate** : conduit à des poly- $\beta$ -cétoesters de longueur variable –les polyacétates—qui engendrent, par cyclisation (réaction de Claisen ou condensation aldolique), des composés souvent polycyclique (Bruneton, 2009).



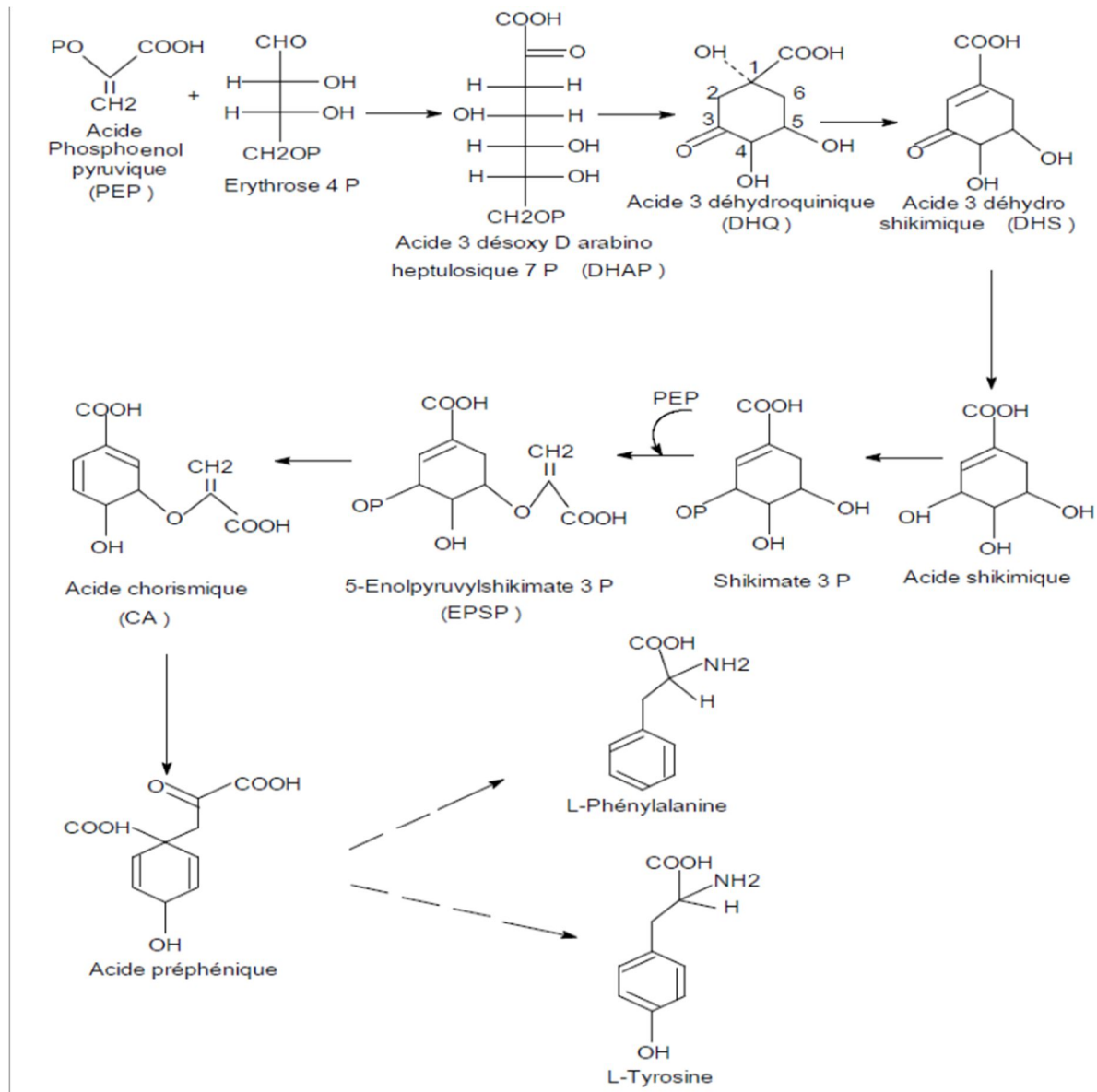
**Figure 17:** Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques. **PAL** : phénylalanine ammonialyase ; **TAL** : tyrosine ammonialyase ; **CCR** : cinnamate CoA réductase ; **CAD** : cinnamyl alcool déshydrogénase ; **CHS** : chalconesynthase ; **CHI** : chalcone flavanone isomérase ; **TR** : transférases (Macheix, 1996)

### III.2.2.1. La voie de shikimate (acide shikimique)

La voie de shikimate est à l'origine de la formation de la phénylalanine et de la tyrosine et la désamination de ces acides aminés conduit aux acides cinnamiques dont les esters CoA sont à leur tour à l'origine de la plupart des classes de composés phénoliques. Le principal mode de la formation du noyau aromatique (cyclogénèse) emprunte l'acide shikimique (acide en C6-C1) lequel donne naissance à l'acide phényl-pyruvique (acide en C6-C3). La voie de shikimate débute par la condensation de l'acide phosphoénol pyruvique avec l'érythro

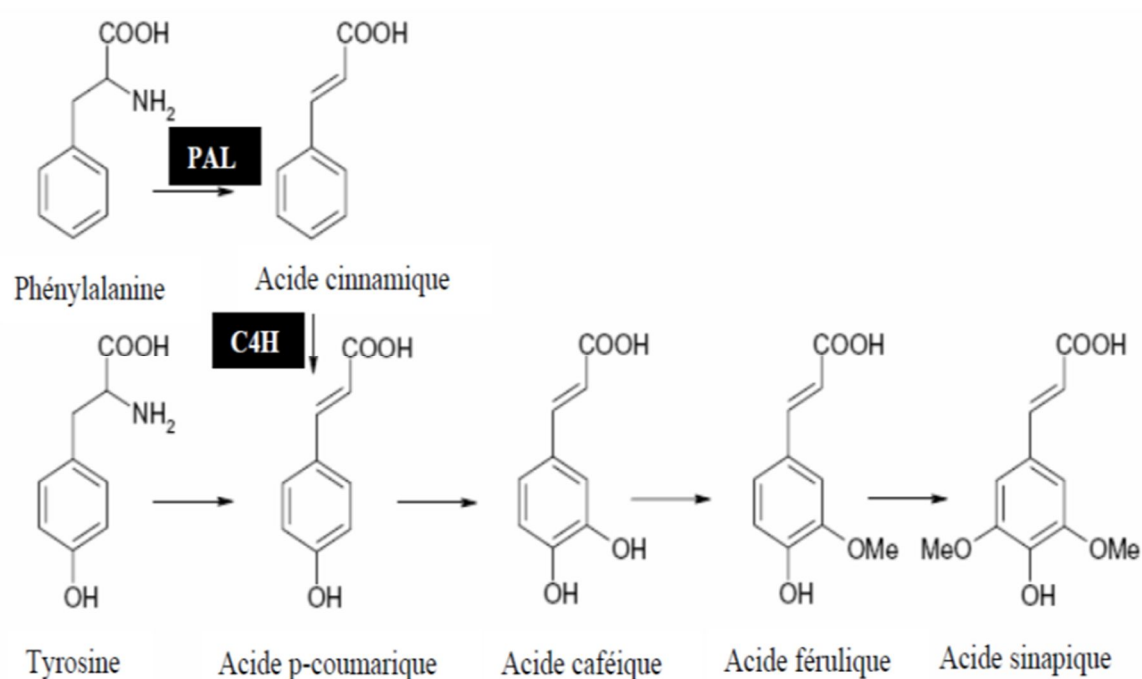
phosphate. Les réactions suivantes (**figs 18, 19**) conduisent à la formation de l'acide shikimique et de chorismate.

La cyclogénèse aurait lieu au niveau du réticulum endoplasmique. Un complexe multi enzyme interviendrait (Richter, 1993).



**Figure 18 :** La voie de shikimate (Macheix *et al.*, 2005).





**Figure 19:** Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribués par la voie de shikimate. **PAL** : phénylalanine ammonia-lyase ; **C4H** : cinnamate 4-hydroxylase (Macheix *et al.*, 2005).

### III.2.2.2. La voie d'acétate

Une seconde voie de biosynthèse, consiste à réaliser non plus un seul noyau benzénique, mais un ensemble de noyaux aromatiques par cyclisation de chaînes polycétoniques, elles-mêmes obtenues par condensation de groupements acétate. Par exemple, l'éléuthérinol, une chromone provient de la condensation de groupements acétates.

Chez les végétaux supérieurs, cette voie des polyacétates concerne un petit nombre de composés. En revanche cette seconde voie intervient pour réaliser un second noyau benzénique chez les végétaux supérieurs pour de nombreux composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie du shikimate : ce sont les composés mixtes dont les représentants les plus importants sont les flavonoïdes.

C'est la malonyl-CoA qui fournit, par décarboxylation, les unités en C2 pour allonger le complexe acyl-CoA. L'acide polycétonique formé se referme en un cycle portant une chaîne latérale. Le cycle A de la structure flavane est construit sur ce principe ; il est ensuite complété à l'aide de dérivés de l'acide cinnamique, par un hétérocycle central, puis par un

second cycle aromatique (cycle B). Ainsi, les deux voies responsables de la biosynthèse des composés phénoliques se rejoignent (Bruneton, 2009).

### **III.2.3. Les différentes formes chimiques**

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'aujourd'hui chez les végétaux (Macheix *et al.*, 2005). Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.


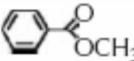
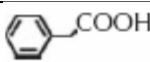
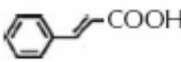
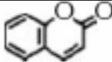
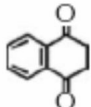
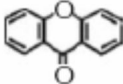
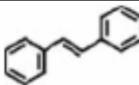
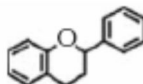
Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes ( tab IV) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> à des forme très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de bases avec d'autres molécule(glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques.....).

Il est impossible de rendre compte d'une manière exhaustive dans un espace restreint de la complexité des différents composés phénoliques présents chez les végétaux. Nous nous en tiendrons donc à quelques grandes lignes, en signalant de place en place des exemples significatifs, importants d'un point de vue biologique ou technologique (Macheix *et al.*, 2005).

#### **III.2.3.1. Les phénols simples**

Les phénols simples (catéchol, guaiacol, phloroglucinol) sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae), le plus souvent à l'état de glucoside du diphénol (arbutoside) ou de son monoéthyléther. Les alkylphénols et leur depsides, issus du métabolisme d'un poly- $\beta$ -cétol, sont caractéristiques des Lichens. On connaît également des alcénylphénols (urushiol) et des monoterpènes phénoliques (thymol) (Bruneton, 2009).

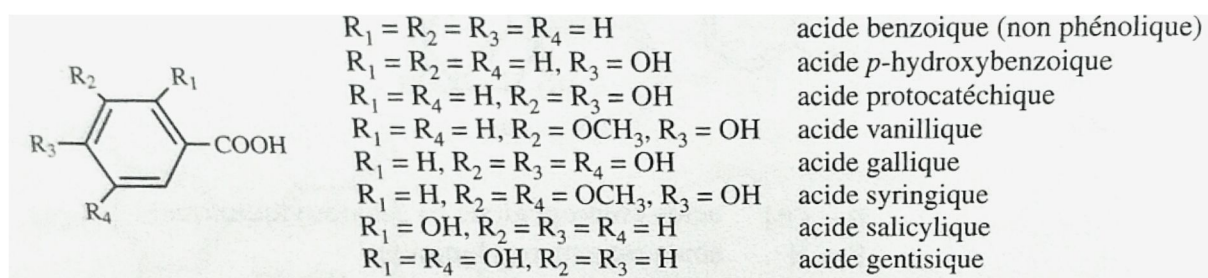
**Tableau IV** : Les principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).

Squelette carboné	Classification	Exemple	Origine	Structure de Base
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénols	Acide gallique		
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénones	Gallacetophénone		
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acide phénylacétique	Acide p-Hydroxyphénylacétique		
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinamiques	Acide caféique, férulique	Pomme de terre, pomme	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarines	Esculetine	Citrus	
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones	Juglone	Noix	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones	Mangiférine		
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resveratrol	Vigne	
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonols</li> <li>• Anthocyanes</li> <li>• Flavanols</li> <li>• Flavanons</li> </ul> Isoflavonoïdes	Ex <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quercétine</li> <li>• Cyanidine</li> <li>• Catéchine</li> <li>• Paringénine</li> </ul> Daidzéine	Ex Fruits, légume Fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Pin	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyau des fruits	
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanins		Raisin rouge, kaki	

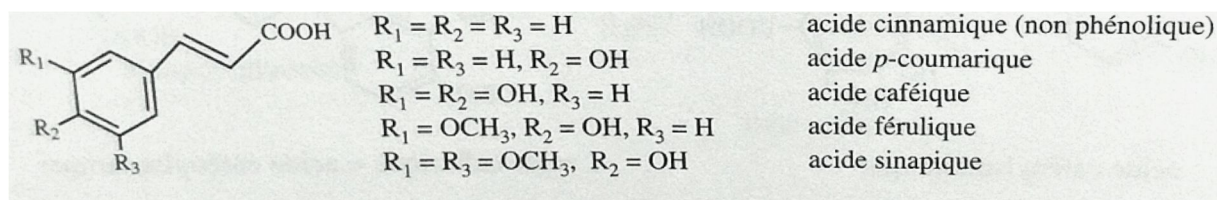
### a) Acides hydroxy-benzoïques

Les acides hydroxy-benzoïques (*p*-hydroxy-benzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, gentisique...) sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1 (fig 20). Ils sont particulièrement bien représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, en particulier de la lignine et de certains tannins. Les acides hydroxy-benzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides, à l'exemple de l'acide salicylique dont le glucoside ou les esters méthylique ou glucosylé (fig 21) représentent vraisemblablement des formes de stockage ou de circulation dans la plante.

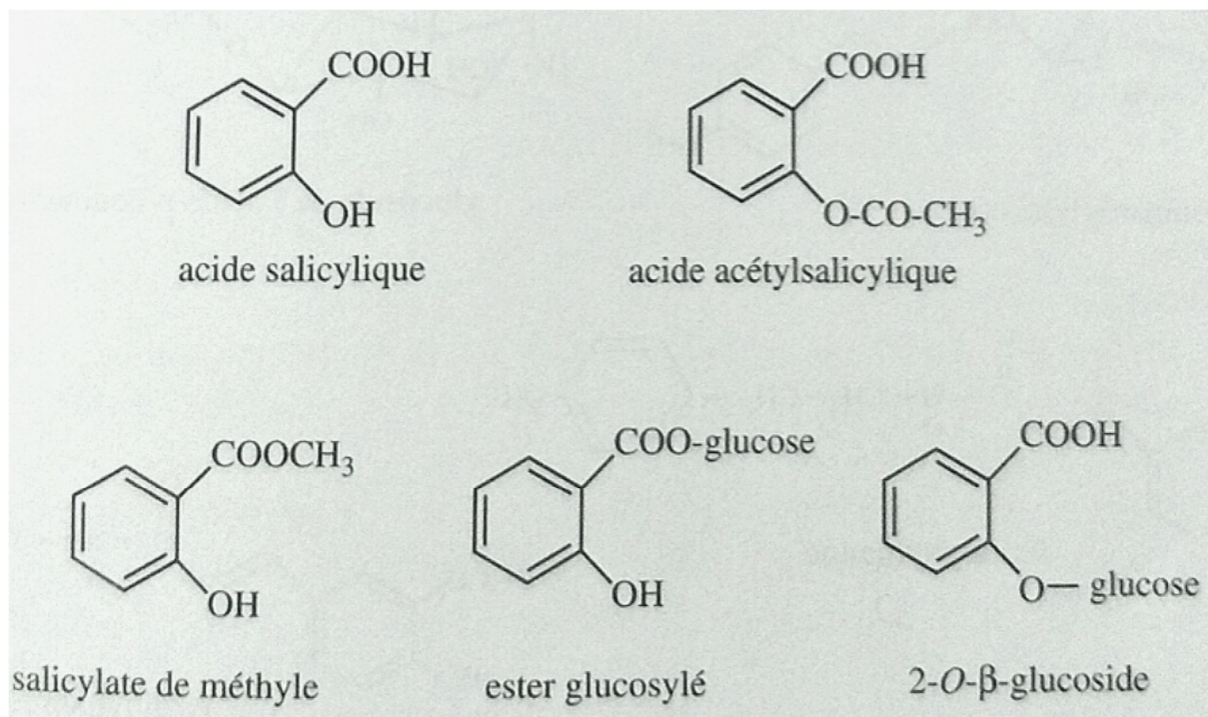
#### Acides hydroxy-benzoïques



#### Acides hydroxy-cinnamiques (phénylpropanoïdes)



**Figure 20:** Les principaux acides phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).



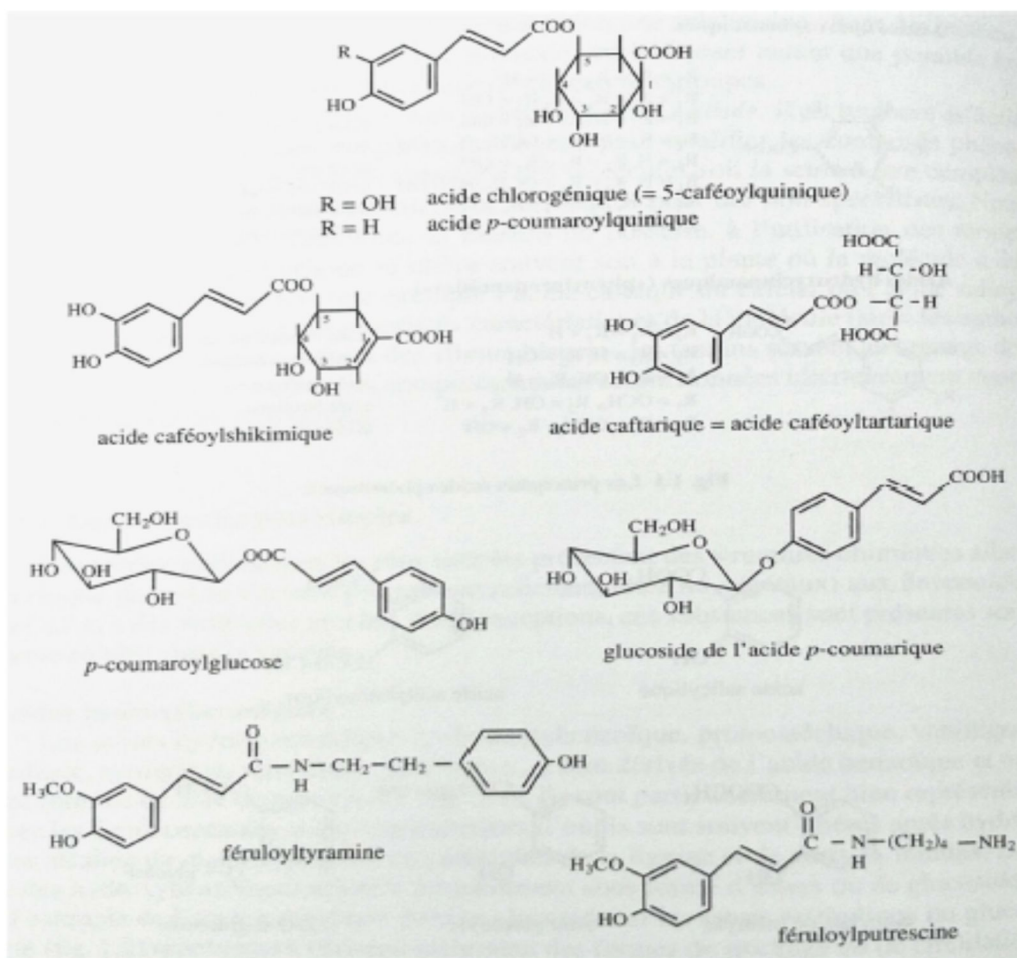
**Figure 21** : L'acide salicylique et ses principaux dérivés naturels (Macheix *et al.*, 2005).

### b) Acides hydroxy-cinnamiques

Les acides hydroxy-cinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez les acides férulique ou sinapique) sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules.

Les molécules de base de la série hydroxy-cinnamique l'acide *p*-coumarique (et ses isomères, les acides *o*- et *m*-coumarique), l'acide caféique, l'acide férulique et son dérivé 5 hydroxylé, et enfin l'acide sinapique (fig 20). L'ensemble est souvent rapporté sous le vocable commun de **phénylpropanoïdes**.

Ces acides sont rarement présents à l'état libre et ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques (Clifford, 1999) (fig 22). Les liaisons impliquent souvent la fonction carboxylique conduisant alors à des esters (avec le glucose ou avec différents alcools-acides : comme les acides quinique, tartrique, shikimique, malique...) ou à des phénol-amides (avec des mono- ou des di-amines : tyramine, putrescine, spermidine...). Les liaisons avec les sucres peuvent également se faire par l'intermédiaire de l'une des fonctions phénoliques, conduisant alors à des glucosides (par exemple le glucoside de l'acide *p*-coumarique).



**Figure 22 :** Exemples de formes combinées des acides hydroxy-cinnamiques (Macheix *et al.*, 2005).

### c) Les lignanes

Le terme de lignane désigne habituellement des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones  $\beta$  des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane.

Les lignanes proprement dits, il est habituel de distinguer six groupes structuraux fondamentaux. Les plus simples sont des dibenzylbutanes (liaison 8-8') qui, par cyclisation, peuvent engendrer trois types de lignanes monofuraniques (cyclisation 9-O-9', 7-O-9' ou 7-O-7') : et des butyrolactones : la cyclisation peut impliquer un carbone aromatique (arylnaphtalènes) ou deux (dibenzocyclooctanes). La double cyclisation 7-O-7' et 9-O-9' conduit aux lignanes furano-furaniques.

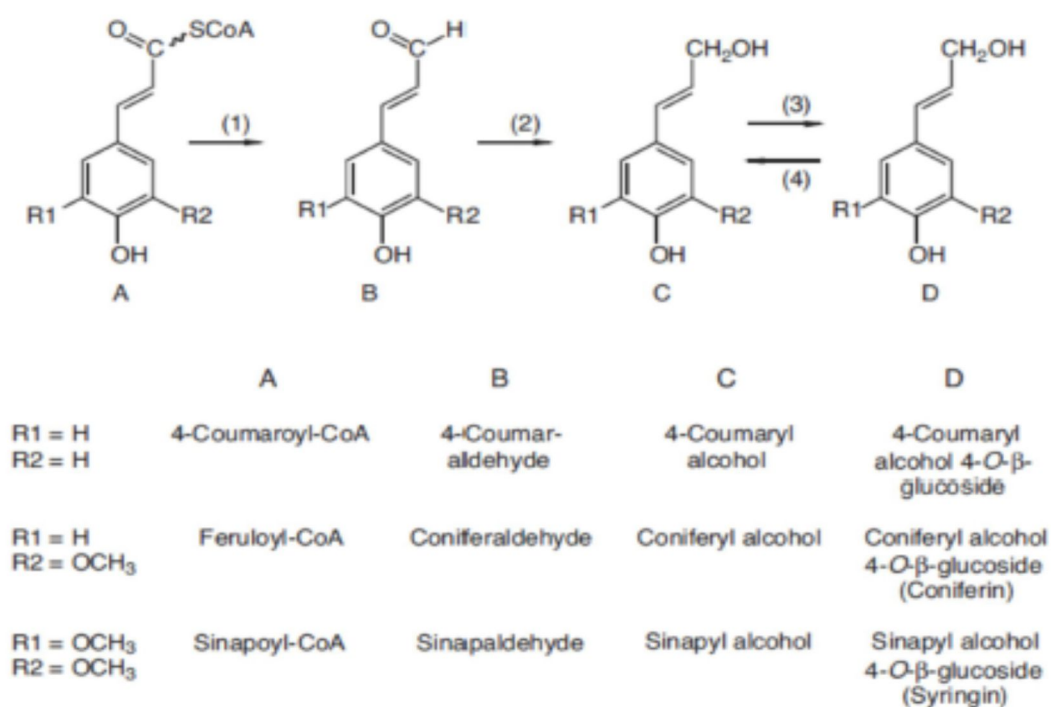
La distribution botanique des lignanes est large : plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Chez les Gymnospermes, ils sont surtout rencontrés



dans les bois alors que chez les Angiospermes ils ont été identifiés dans tous les tissus (Bruneton, 1999 ; Suzuki et Umezawa, 2007).

### c.1) Origine biosynthétique

Les lignanes étant optiquement actifs, ils résultent d'un couplage stéosélectif enzymo-catalysé (cela a d'ailleurs été démontré chez des *Forsythia* spp.). En théorie, il est possible de concevoir que l'oxydation d'un précurseur conduit à un radical qui peut exister sous quatre formes mésomères ce qui, en théorie, implique un grand nombre de couplages possibles parmi lesquels cinq sont fréquents (8-8', 8-1', 8-3', 8-O-4', 3-3') (Fig 23).



**Figure 23 :** Biosynthèse du monolignol. Les enzymes impliquées sont cinnamoyl-CoA: NADPH oxydoréductase (CCR; (1)), alcool cinnamyl déshydrogénase (CAD; (2)), UDP-glucose: alcool cinnamylique 4-O-glucosyltransférase (3), alcool cinnamylique 4-O-glucoside glucosidase (4) (Wink, 2010).

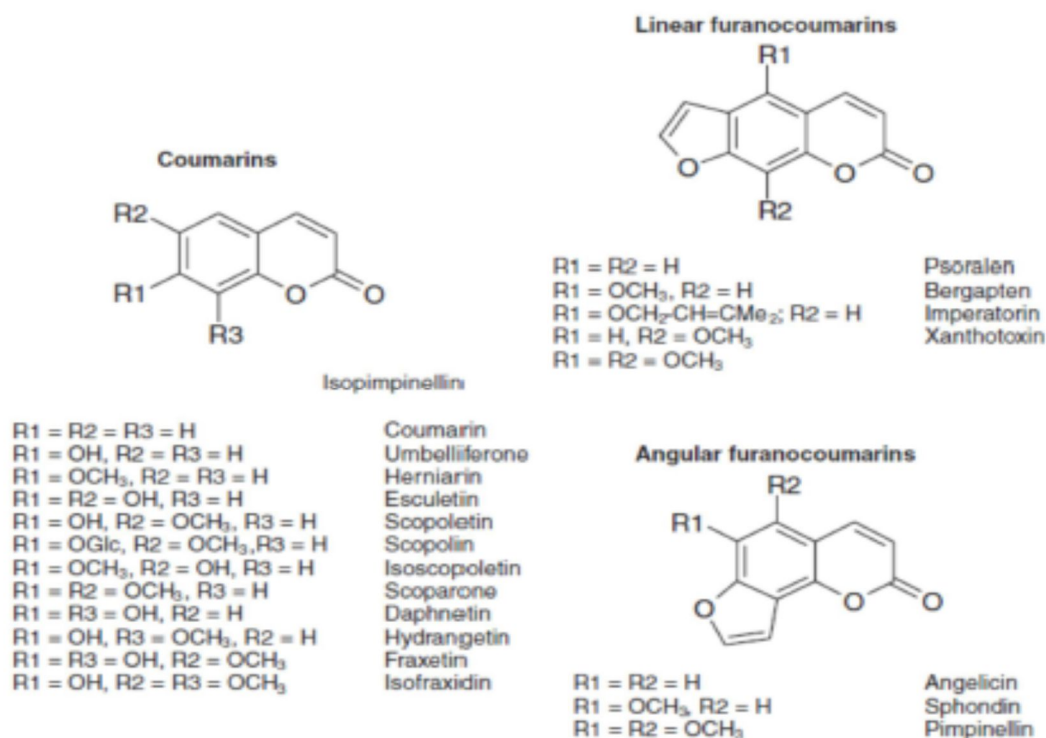
### C.2) L'intérêt biologique des lignanes

Chez les plantes, lignanes jouent un rôle important pour leur défense : des propriétés antibactériennes, antifongiques et antinutritives ont été décrites pour de nombreuses molécules de ce groupe.

Si des nombreux lignanes possèdent des propriétés antimitotiques, seuls les dérivés hémisynthétiques de la podophyllotoxine font l'objet d'une exploitation dans un but thérapeutique. Parmi les composés apparentés aux lignanes, les flavanolignanes des akènes du chardon-Marie leur confèrent des propriétés hépatoprotectrices démontrées *in vitro* et chez l'animal. La médecine chinoise utilise plusieurs drogues à lignanes, en particulier les fruits d'une Schizandraceae qui contiennent des molécules considérées comme hépatoprotectrices (Bruneton, 1999).

#### d) Les coumarines

Les coumarines d'origine naturelle sont classées par leur noyau benzopyran-2-on (fig 24) et ont été isolées à partir de nombreuses plantes, en particulier parmi les Apiacées, les Rutacées et les Ficacées ainsi que chez certains genres des Fabacées. Les coumarines végétales proviennent des voies shikimate et phénylpropanoïdes générales donnant l'acide cinnamique comme produit immédiat qui est dérivé de diverses manières, et le modèle des coumarines ont été proposées occasionnellement comme paramètre d'identification taxonomique. De plus, le type de glucosidation des coumarines pourrait être une caractéristique d'une famille de plantes (Nasipuri et Ramstad, 2006).



**Figure 24 :** Structures des coumarines, des furano-coumarines linéaires et des furano-coumarines angulaires (Wink, 2010).



## e) Les flavonoïdes

L'ensemble des flavonoïdes, de structure générale en C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes (Harborne, 1988) dont certaines ont une très grande importance biologique et technologique : les anthocyanes, pigments rouges ou bleus, les flavones et les flavonols, de couleur crème ou jaune claire, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tannins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine.

C'est d'abord la structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation (fig 25) qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. Le cas extrême d'oxydation de l'hétérocycle central correspond aux anthocyanidines, toujours présentes en milieu acide sous forme d'un cation de couleur rouge, dit cation flavylum. Au contraire, dans le cas des flavanes (flavane-3-ols comme la catéchine ; flavane-3,4-diols quelquefois dénommés leucoanthocyanes car ils peuvent donner des anthocyanes rouges sous l'action d'un acide), le cycle central est très fortement réduit. On trouve des situations intermédiaires chez les flavanones, les flavones, les flavonols et d'autres groupes. Exceptionnellement, le noyau central de la molécule peut ne pas être totalement cyclisé ou se présenter sous forme d'un cycle ne présentant que 5 sommets (Macheix *et al.*, 2005).

### e.1) L'intérêt des flavonoïdes

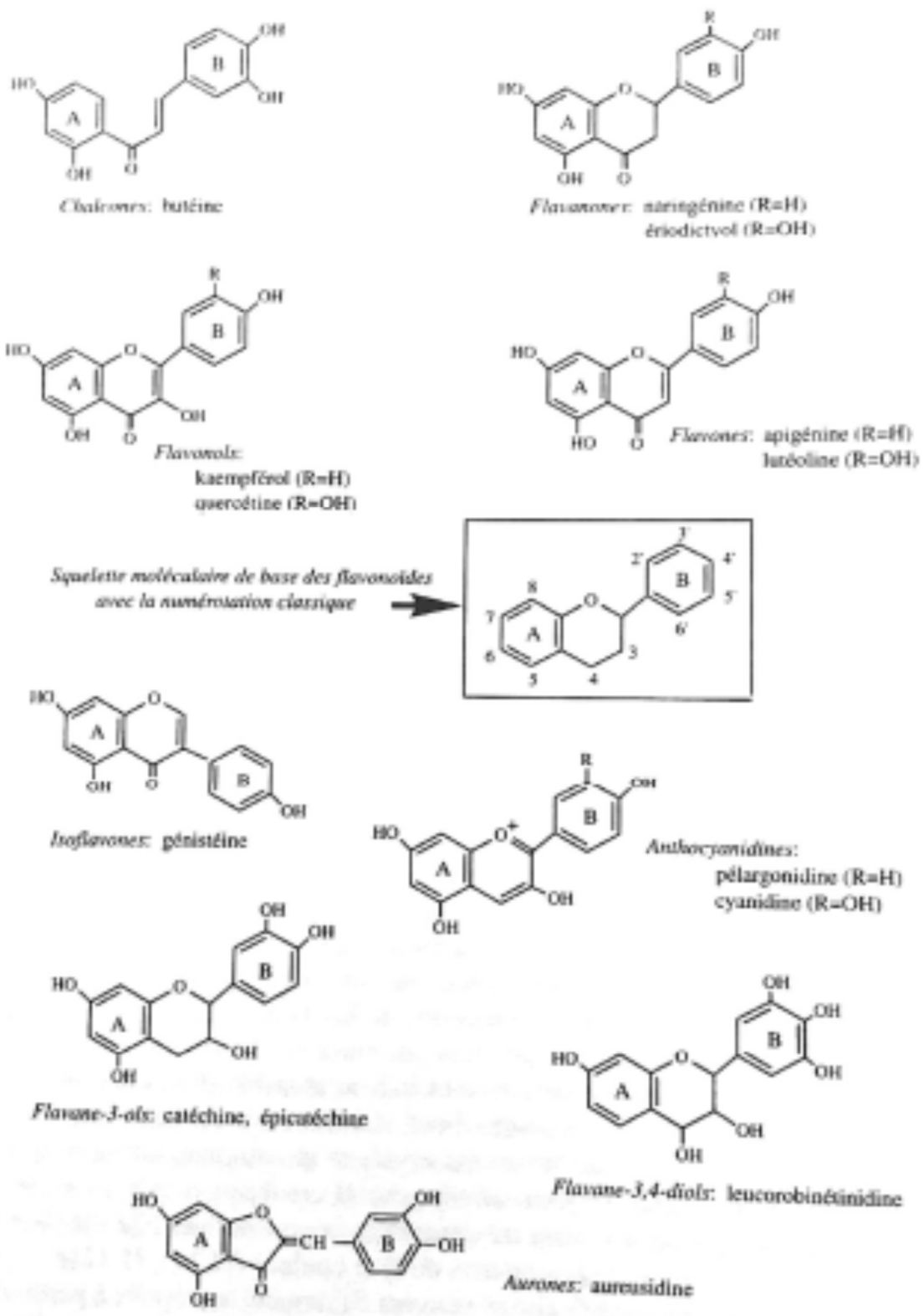
Les flavonoïdes donnent le pigment jaune orangé et bleu aux fleurs. D'une manière générale, ils sont antispasmodiques.

Il y a plusieurs sous-groupes de flavonoïdes :

- les *mono et biflavonoïdes* qui ont une action vitaminique B. Ils sont protecteurs vasculaires. Activeurs hépatocellulaires, ils agissent sur la cellule hépatique. Ils ont des propriétés diurétiques et inhibitrices de la peroxydation des lipides (ils empêchent les graisses de l'organisme de trop s'abîmer). Ils agissent comme frein du catabolisme des protéoglycanes (qui sont des substances au niveau articulaire) ;
- les *isoflavonoïdes*. Ils ont une action antitumorale. Puis, à partir de ces sous-groupes, nous allons trouver des dérivés flavonoliques et des anthocyanes.

Les *dérivés flavonoliques* se subdivisent en :

- rutosides : ce sont d'excellents protecteurs vasculaires. Ils présentent toutefois un « inconvénient », leur contenance importante en tanins ;
- les pecapitosides : ils ont une action diurétique et azotémique, ce qui leur permet d'agir de manière efficace sur l'acide urique, les crises de goutte, les rhumatismes inflammatoires, l'excès d'azote. Nous les trouvons soit dans les parties aériennes des plantes, soit dans les bourgeons floraux ;
- silymarines : excellents protecteurs hépatiques (contre toutes les formes d'intoxication), ils limitent notamment (et ce n'est pas négligeable) l'empoisonnement de la cellule hépatique par la chimiothérapie ;
- flavanones : ce sont des protecteurs vasculaires ;
- déflavones : ils agissent principalement sur les capillarités ;
- scoparosides : ce sont des diurétiques (Verbois, 2015).



**Figure 25** : Les principales classes des flavonoïdes. Un (ou deux) exemple(s) précis a été donné dans chacun des cas. La numérotation classique des différents sommets des cycles est rappelée sur le squelette moléculaire de base (Macheix *et al.*, 2005).

### **III.2.3.2. Les formes condensées**

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées. Selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, on obtient des composés plus ou moins complexes pouvant encore présenter une hydrosolubilité suffisante pour être présents dans la vacuole (tannins, certains produits de brunissement) ou au contraire acquérir un caractère lipophile marqué et s'accumuler alors dans les structures pariétales (lignine, formes présentes dans la cutine et la subérine...).

#### **a) Les tannins**

Utilisés depuis l'Antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tannins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et des produits qui en sont dérivés (vin, thé, bière...). En première approximation, on peut considérer que les tannins sont les formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. Aussi les premières estimations quantitatives des tannins ont-elles utilisées la condensation avec des protéines modèles : gélatine, albumine, hémoglobine...

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tannins (Santos-Buelga et Scalbert ; 2000) différant à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

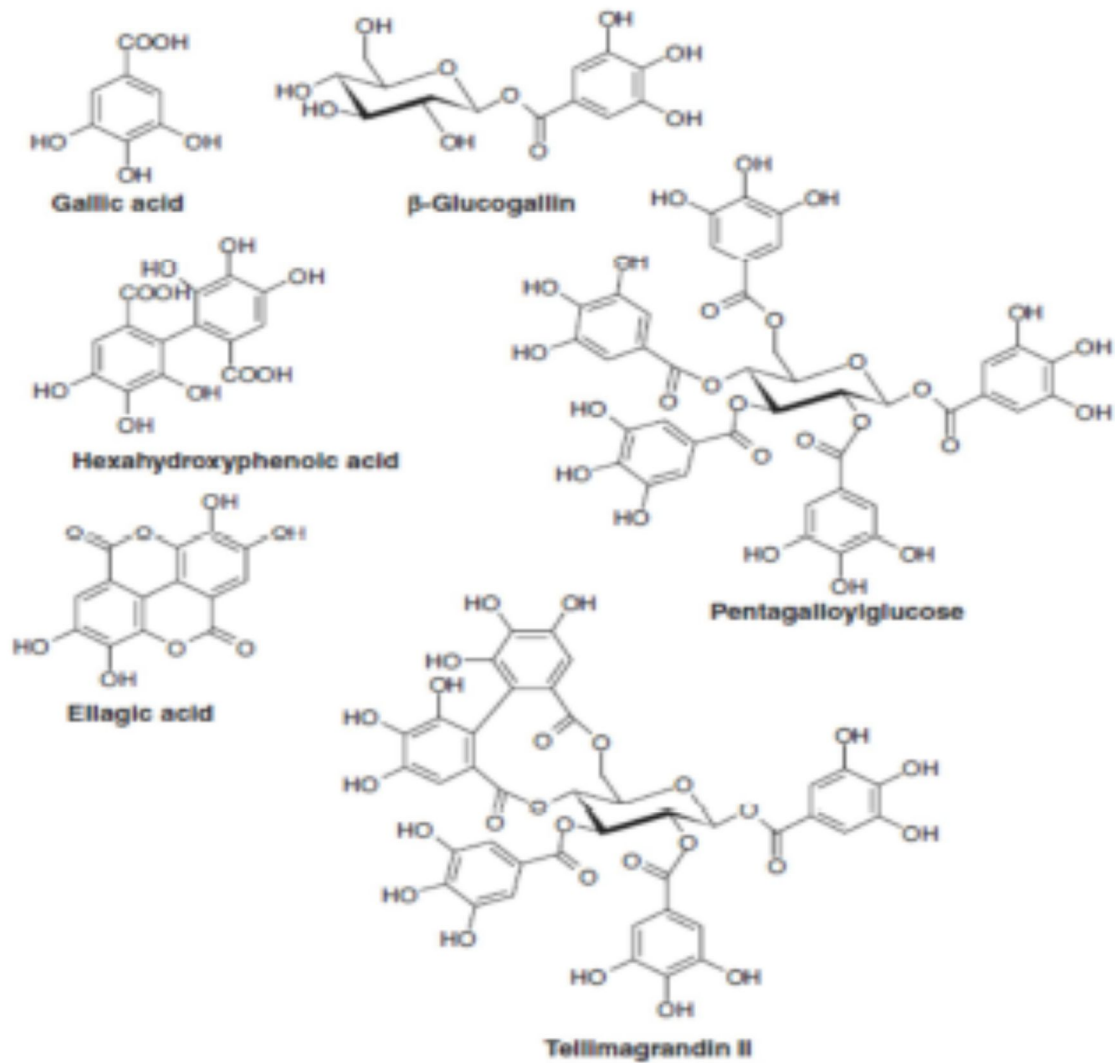
##### ***a.1) Les tannins hydrolysables***

Ils sont abondants chez les Dicotylédones et certains arbres. Ils sont d'abord caractérisés par la fois qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique. Une forme simple de tannins hydrolysables est le pentagalloyglucose (fig 26).

##### ***a.2) Les tannins condensés***

Les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols dérivés de la (+)-catéchine ou de ses nombreux isomères. Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour

cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées « proanthocyanidines ». Les proanthocyanidines dimères présentent déjà une affinité pour les protéines et des propriétés tannantes mais ces deux paramètres augmentent avec la taille moléculaire des polymères qui sont formés par adjonction de nouveaux monomères aux dimères initiaux (fig 26).



**Figure 26 :** Les structures des tannins (Wink, 2010).

## III.3. Les terpénoïdes

### III.3.1. Introduction

La classe la plus importante de métabolites secondaires végétaux est des terpénoïdes ou isoprénoïdes. Plus de 36 000 membres individuels de cette classe ont été signalés (Buckingham, 2007) et de nouvelles structures sont actuellement ajoutées au rythme d'environ 1 000 chaque année. Les terpénoïdes sont non seulement nombreux, mais aussi de structure extrêmement variable, présentant des centaines de squelettes carbonés différents et un large assortiment de groupes fonctionnels. Malgré une telle diversité, tous les terpénoïdes sont unifiés par un mode commun de biosynthèse : la fusion d'unités C5 avec une structure isopenténoïde.

Depuis les origines de la chimie organique, les terpénoïdes ont été une source de fascination pour de nombreux praticiens de cette discipline. Cependant, l'unité structurale de base des terpénoïdes n'a été appréciée que depuis la fin du siècle dernier, lorsque des pionniers, comme l'allemand Otto Wallach, ont découvert que certains membres de cette classe pouvaient être pyrolysés pour donner de l'isoprène, un diène C5 avec un isopenténoïde squelette. Ces études ont donné lieu à la règle dite de l'isoprène, qui stipule que tous les terpénoïdes sont dérivés de la jonction ordonnée tête-bêche des unités isoprène. Des chercheurs plus récents ont affiné le concept original, reconnaissant que des condensations non-tête-à-queue d'unités isoprène se produisent également dans quelques métabolites secondaires (pyréthrines) qui semblent se limiter presque exclusivement aux membres de la famille des astéracées. Des réarrangements structuraux importants ou une perte de carbone au cours de la biosynthèse ont été observés (Dewick, 2002). Néanmoins, la règle originale de l'isoprène était un concept très utile pour déterminer les structures de nombreuses substances inconnues et évaluer leur origine biogénétique. Dans ce contexte, les terpénoïdes ont souvent été appelés isoprénoïdes, et les termes isoprénoïdes, terpénoïdes et terpènes sont maintenant utilisés de manière interchangeable.

### III.3.2. Classification

La classification des terpénoïdes est basée sur le nombre d'unités isoprénoïdes présentes dans leur structure. Les plus grandes catégories sont celles constituées de composés à deux unités isoprénoïdes (monoterpènes), trois unités isoprénoïdes (sesquiterpènes), quatre unités

isoprénoïdes (diterpènes), cinq unités isoprénoïdes (sesterterpènes), six unités isoprénoïdes (triterpènes) et huit unités isoprénoïdes (tétraterpènes)) (Tab V).

**Tableau V:** Classification des terpenoïdes

Nom	N° unité 5 x C	Exemple de molécule
<b>Emiterpènes</b>	1	Isoprène
<b>Monoterpènes</b>	2	Aromes volatiles, parfums
<b>Sesquiterpènes</b>	3	Phytoalexines
<b>Diterpènes</b>	4	Phytol, gibberellines, Phytoalexines
<b>Triterpènes</b>	6	Brassinostéroïdes, stéroïdes de membranes, certaines toxines
<b>Tétraterpènes</b>	8	Caroténoïdes
<b>Polyterpènes</b>	>8	Plastoquinones, ubiquinones, polymère (latex)

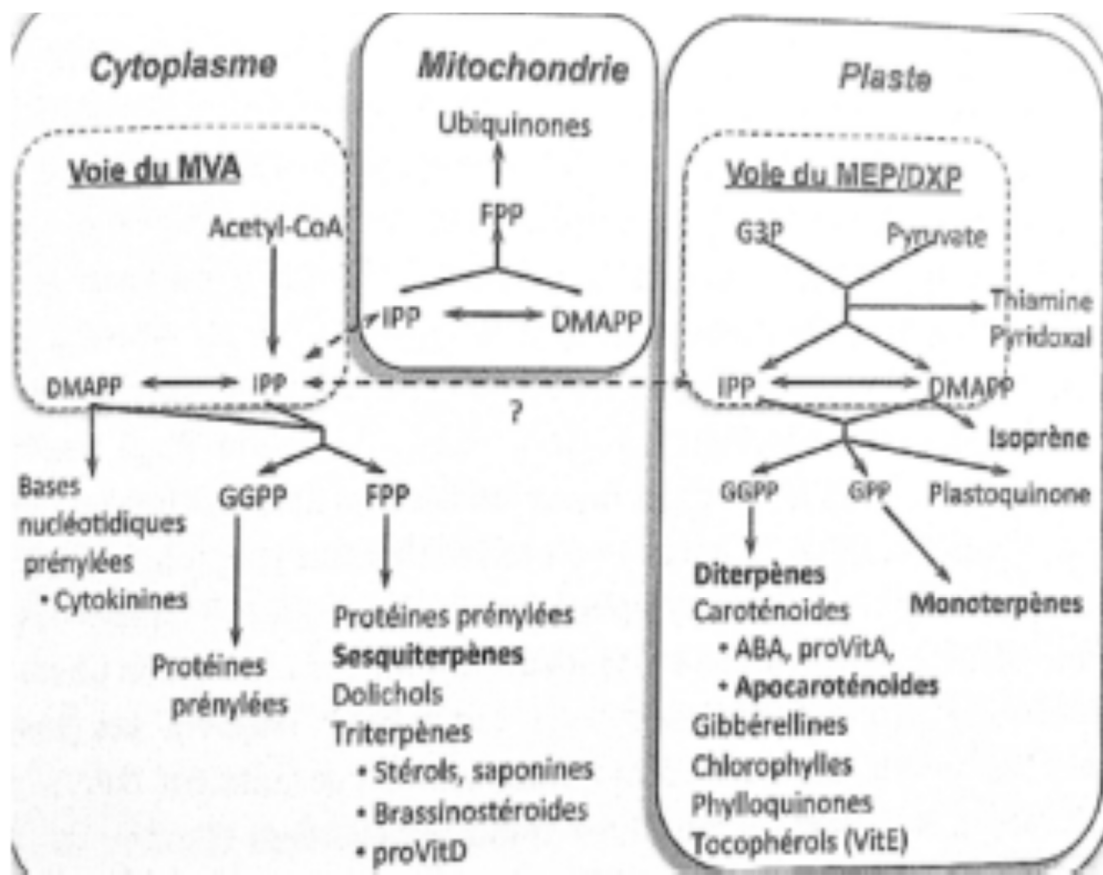
Bien que la biosynthèse soit basée sur une unité de cinq atomes de carbone, la nomenclature des terpénoïdes est basée sur une unité de dix atomes de carbone puisque les terpénoïdes C10 étaient autrefois considérés comme les plus petits représentants naturels de cette classe. La désignation des terpénoïdes C10 comme mono - (un) - terpènes a rendu nécessaire de nommer les terpènes C5 décrits ultérieurement comme hémi - (moitié) - terpènes, les terpènes C15 comme sesqui - (moitié) - terpènes et ainsi de suite.

### III.3.3. Biosynthèse

La voie de biosynthèse vers les terpénoïdes (fig 27) est convenablement traitée comme comprenant quatre étapes,

1. **Dont la première** implique la formation de l'IPP, l'unité isoprène C5 biologique. Les plantes synthétisent l'IPP et son isomère allylique, le DMAPP, par l'une des deux voies suivantes : la voie bien connue de *l'acide mévalonique* ou la voie nouvellement découverte du phosphate de méthylérythritol (MEP).
2. **Dans la deuxième étape**, les unités de base C5 se condensent pour générer trois prényl diphosphates plus gros, le géranyl diphosphate (GPP, C10), le farnésyl diphosphate (FPP, C15) et le géranylgéranyl diphosphate (GGPP, C20).

3. **Dans la troisième étape**, les diphosphates C10 – C20 subissent une large gamme de cyclisations et de réarrangements pour produire les squelettes de carbone parent de chaque classe de terpènes. GPP est converti en *monoterpènes*, FPP est converti en *sesquiterpènes* et GGPP est converti en *diterpènes*. FPP et GGPP peuvent également se dimériser en tête-à-tête pour former les précurseurs des terpénoïdes C30 et C40, respectivement.
4. **La quatrième et dernière étape** englobe une variété d'oxydations, d'isomérisations de réductions, de conjugaisons et d'autres transformations par lesquelles les squelettes parents de chaque classe de terpènes sont convertis en milliers de métabolites terpéniques distincts. Cette section présente les dernières découvertes concernant chacune des quatre étapes de la biosynthèse des terpénoïdes chez les plantes.



**Figure 27 :** Vue d'ensemble de la biosynthèse des terpénoïdes chez les plantes, montrant les étapes de base de ce processus et les principaux groupes de produits finaux. CoA, coenzymeA; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate.



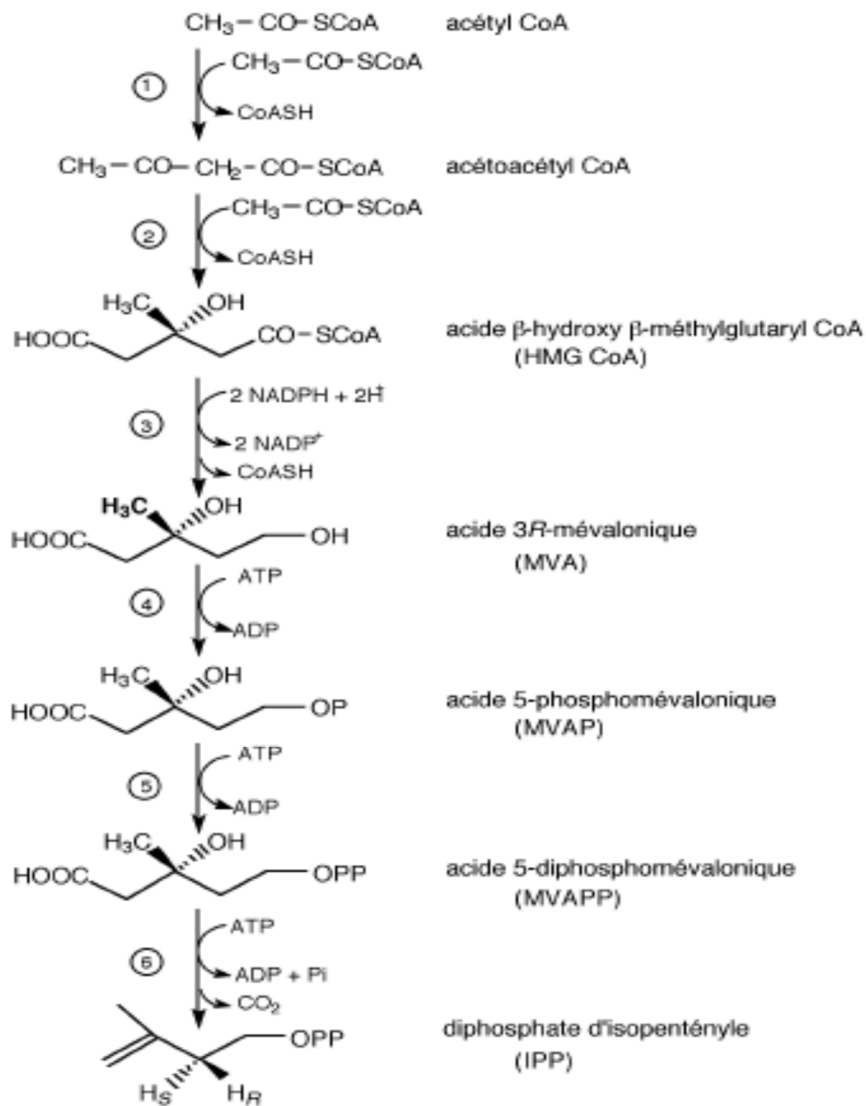
### III.3.3.1. Formation de l'unité de base C5

#### a) La voie du mévalonate

La voie classique pour la formation des éléments constitutifs C5 de la biosynthèse des terpénoïdes chez les plantes passe par les réactions de la voie du mévalonate, d'abord démontrée chez les levures et les mammifères. Cette séquence bien caractérisée (fig 28) implique la condensation par étapes de deux molécules d'*acétyl-CoA* (AcCoA) réagissent sous l'influence d'une  $\beta$ -cétotiolase pour donner de l'acétoacétyl-CoA, lequel, en présence d'une enzyme condensante, fixe une troisième molécule l'acétyl-CoA avec formation de  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -méthylglutaryl- CoA.

La réduction de carboxyle en alcool par une hydroxy-méthyl-glutaryl réductase (HMG réductase) conduit au mévalonate (MVA). Cette réduction se fait en trois étapes : dans un premier temps, il se forme un aldéhyde qui n'apparaît pas à l'état libre mais reste fixé sur l'enzyme assurant la réduction.

Le mévalonate est alors phosphorylé par l'ATP qui lui cède, en deux étapes, deux groupements phosphate formant un pyrophosphate. Ainsi activé, et en présence d'une nouvelle molécule d'ATP, le mévalonate est converti en pyrophosphate d'isopentényle avec perte de CO<sub>2</sub>, libération de phosphate et d'ADP.



**Figure 28 :** La voie de mévalonate pour la formation de l'IPP, le composé de base à 5 atomes de carbones pour la biosynthèse des terpénoïdes ; la synthèse de chaque unité IPP nécessite trois molécules d'acétyl-CoA (Lamarti *et al.*, 1994).

1 : acétoacétyl CoA thiolase

4 : mévalonate kinase

2 : HMG CoA synthétase

5 : mévalonate 5-phosphate kinase

3 : HMG CoA réductase

6 : mévalonate 5-diphosphatedécarboxylase

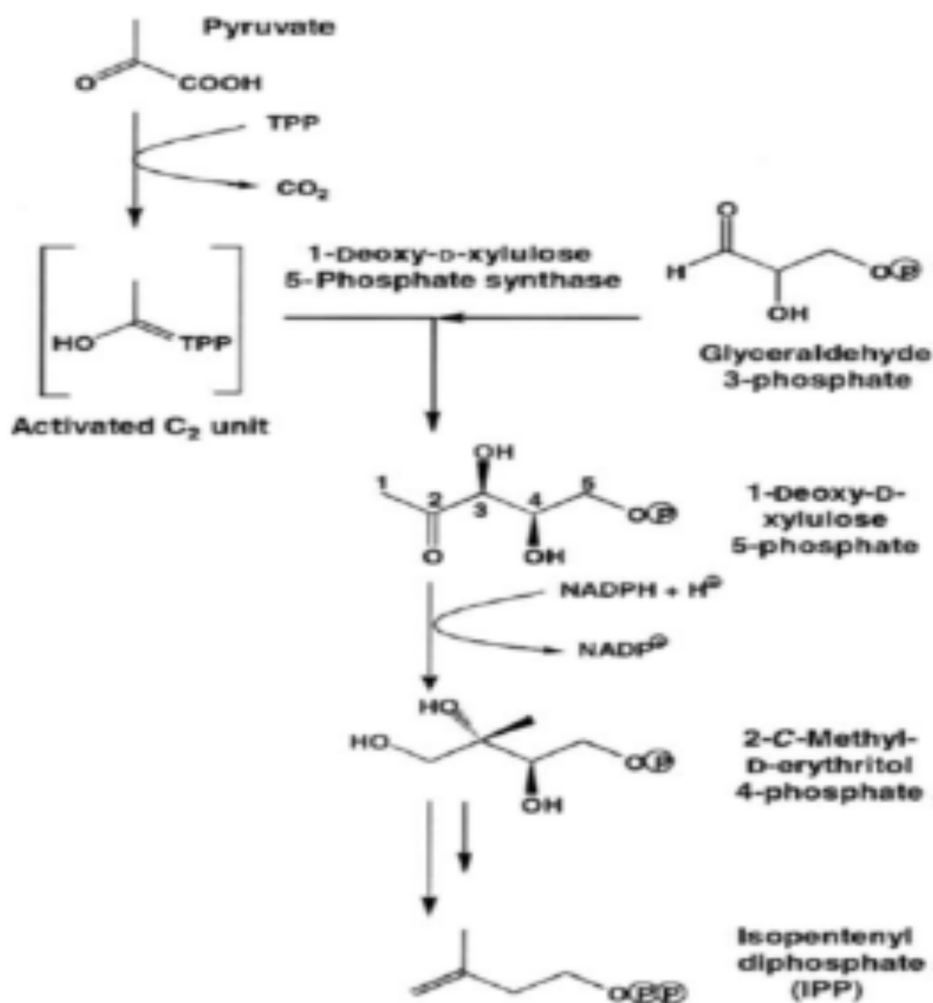
### b) La voie du phosphate de méthylérythritol MEP

L'avancée la plus excitante dans le domaine de la biosynthèse des terpénoïdes végétaux est la découverte d'une deuxième voie pour fabriquer le bloc de base C5 des terpènes, complètement distinct de la voie du mévalonate (Lichtenthaler, 2000). Cette nouvelle voie,

qui part du phosphate de glycéraldéhyde et du pyruvate (fig 29), a également été détectée dans des bactéries et d'autres microorganismes.

L'existence d'une voie similaire non-mévalonate vers les terpénoïdes dans les plantes a été signalée pour la première fois en 1994. Lorsque Duilio Arigoni et ses collègues ont nourri différentes formes de glucose marquées au  $^{13}\text{C}$  à des embryons de *Ginkgo biloba*, les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)  $^{13}\text{C}$  des diterpènes résultants n'étaient pas ce à quoi on aurait pu s'attendre du fonctionnement normal de la voie du mévalonate (Cartayrade *et al.*, 1994), mais ont montré un schéma d'incorporation identique à celui observé avec les terpénoïdes *d'E.coli*. Des études ultérieures employant une méthodologie similaire ont démontré qu'un assortiment de terpénoïdes d'angiospermes, de gymnospermes et de bryophytes, y compris des monoterpènes (Adam *et al.*, 1998), des diterpènes (Jennewein et Croteau, 2001), les caroténoïdes et les chaînes latérales de la chlorophylle (phytol) et des quinones se forment de manière non mévalonate, tandis que le marquage des sesquiterpènes et des stérols était cohérent avec leur origine dans la voie du mévalonate (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Adam *et al.*, 1998).

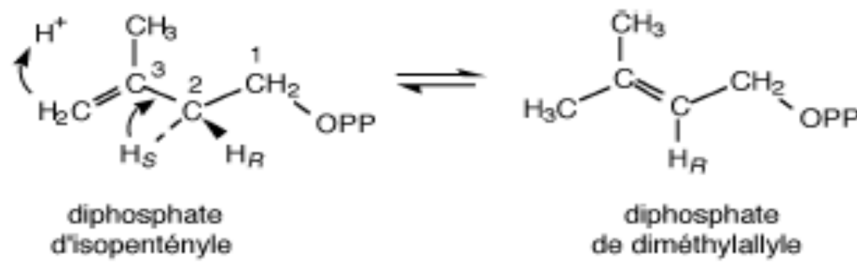
Les précurseurs, issus de la photosynthèse, sont glyceraldéhyde 3-phosphate (AGP) (C3) et le pyruvate (C3) qui, par une réaction de type transacétylation, donnent un ose en C5, le 1-désoxyxylulose 5-P. Ce composé grâce à un arrangement, conduit à un ose en C4, le 2méthylérythritol 4-P (MEP), puis par des réactions intermédiaires, à l'IPP.



**Figure 29 :** La voie du phosphate de glycéraldéhyde / pyruvate pour la formation d'unités isoprénoïdes C5. Aucun des intermédiaires après le 2-C-méthyl-d-érythritol 4-phosphate n'est connu. P indique un fragment phosphate. TPP, pyrophosphate de thiamine ; NADP, phosphate de nicotinamide adénine dinucléotide (Wink, 2010).

### III.3.3.2. Assemblage d'unités C5

La deuxième étape de la biosynthèse des terpènes implique la fusion des éléments de base du C5 pour produire des intermédiaires métaboliques plus importants. L'IPP et son isomère allylique plus réactif, le DMAPP, se condensent dans une orientation tête-queue pour former des prényl diphosphates en C10, C15 et C20 (Fig 30). Le DMAPP requis est dérivé directement de l'IPP par l'action de l'IPP isomérase, qui est également capable de catalyser la réaction inverse (fig 30).

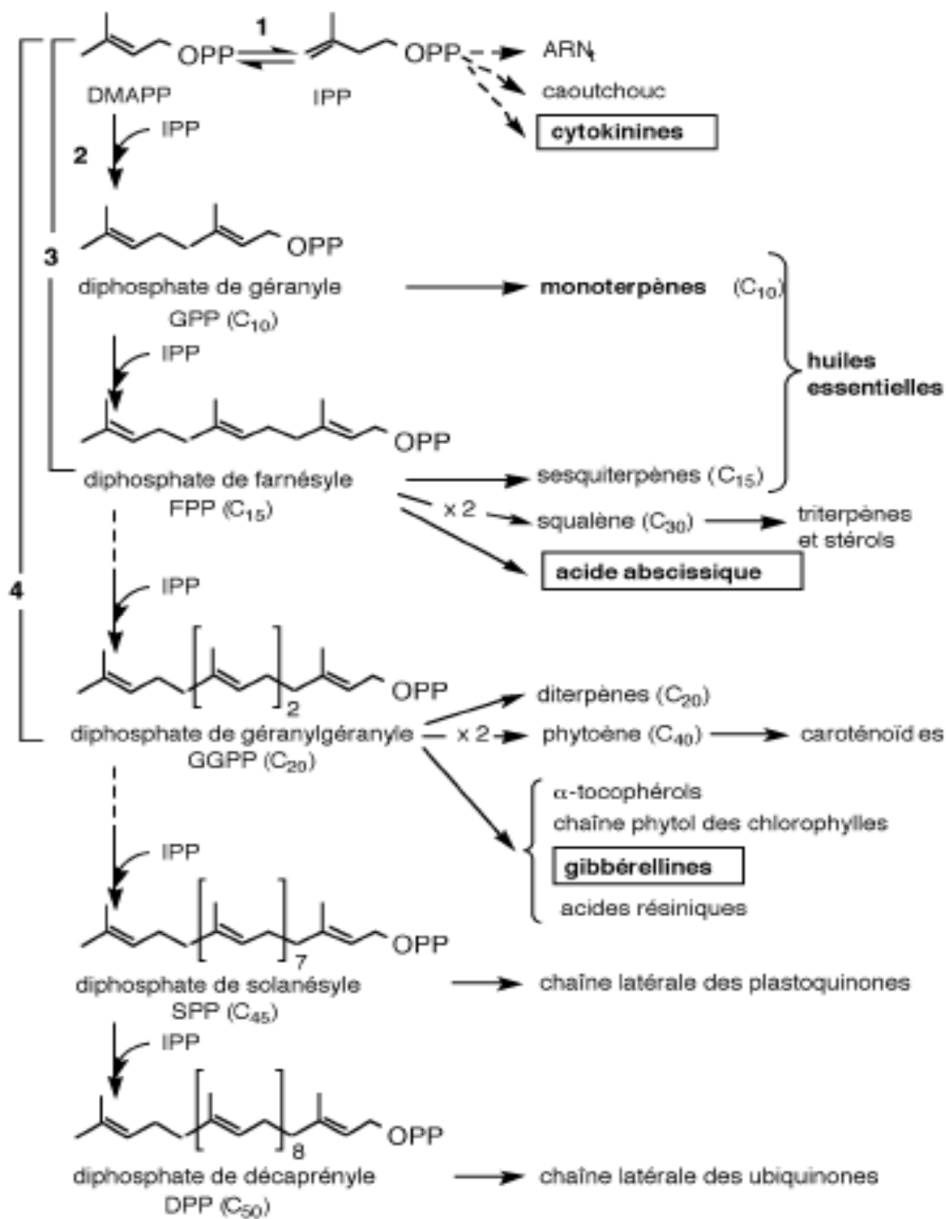


**Figure 30 :** Formation de diméthylallyle pyrophosphate à partir de l'IPP (Lamarti *et al.*, 1994).

Le substrat (IPP) et le DMAPP de l'IPP isomérase sont tous deux impliqués dans les réactions fondamentales par lesquelles les unités isopenténoïdes C5 sont réunies. Les enzymes connues sous le nom de prényl-transférases ajoutent un nombre variable d'unités IPP à une amorce DMAPP dans des étapes d'élongation de chaîne séquentielles (Fernandez et Chemat, 2012).

La condensation initiale tête-à-queue (1-4) d'IPP et de DMAPP donne le diphosphate allylique en C10, *pyrophosphate de géranyle (GPP)*. De plus 1 à 4 condensations d'IPP avec la chaîne diphosphate allylique agrandie donnent le diphosphate allylique en C15, le *diphosphate de farnésyle (FPP)* et le diphosphate allylique en C20, GGPP. Chez les plantes, FPP et GGPP sont produits par des enzymes bien caractérisées, spécifiques au produit qui catalysent des séquences d'élongation en deux ou trois étapes en commençant par IPP et DMAPP (Fig 31). Par exemple, la GGPP synthase convert DMAPP et IPP directement en GGPP (Laskaris *et al.*, 2000).

Au niveau des chloroplastes, la polymérisation de l'IPP se limite à la formation de mono-, sesqui- et de diterpènes, lesquels, par dimérisation tête à tête, sont à l'origine des caroténoïdes. L'IPP du chloroplaste, non utilisé, migre dans le réticulum endoplasmique au niveau de diverticules spécialisés. Dans ces diverticules, la polymérisation de l'IPP va jusqu'aux polyterpènes (Guignard, 2000).



**Figure 31** : Mode d'élongation des processus terpéniques à partir du chaînon élémentaire, le diphosphate d'isopentényle (IPP) (Singh *et al.*, 1990).

1 : isopentényl diphosphate isomérase

2 : géranyl diphosphate synthétase

3 : farnésyl diphosphate synthétase

4 : géranylgéranyl diphosphate synthétase

### III.3.4. Les fonctions des terpénoïdes

La diversité structurale des terpénoïdes correspond presque à leur variabilité fonctionnelle. Les terpénoïdes jouent un rôle bien établi dans presque tous les processus

végétaux de base, y compris la croissance, le développement, la reproduction et la défense. Parmi les terpènes inférieurs (C5 – C20) les plus connus, on trouve les gibbérellines, un grand groupe d'hormones végétales diterpéniques impliquées dans le contrôle de la germination des graines, de l'élongation des tiges et de l'induction florale (Thomas *et al.*, 2005). Une autre hormone terpénique, le composé C15, l'acide abscisique (ABA), n'est pas correctement considérée comme un terpénoïde inférieur, car il est formé à partir du clivage oxydatif d'un précurseur de caroténoïde C40 (Schwartz *et al.*, 1997).

Plusieurs groupes importants des composés végétaux, y compris les cytokinines, les chlorophylles et les porteurs d'électrons à base de quinone (les plastoquinones et les ubiquinones), ont des chaînes latérales terpéniques attachées à un noyau non terpénique. Ces chaînes latérales facilitent l'ancrage ou le mouvement à l'intérieur des membranes. Au cours de la dernière décennie, on a également découvert que les protéines avaient des chaînes latérales terpéniques attachées. En fait, toutes les cellules eucaryotes semblent contenir des protéines qui ont été modifiées post-traduction par l'attachement de chaînes latérales terpéniques C15 et C20 via une liaison thioéther.

L'hydrocarbure le plus abondant émis par les plantes est l'hémiterpène (C5) isoprène, le 2-méthyl-1,3-butadiène. Émis par de nombreux taxons, en particulier les espèces ligneuses, l'isoprène a un impact majeur sur l'équilibre redox de l'atmosphère, affectant les niveaux d'ozone, de monoxyde de carbone et de méthane (Lerdau *et al.*, 1997). Le rejet d'isoprène par les plantes est fortement influencé par la lumière et la température, les taux de rejet les plus élevés se produisant généralement dans des conditions de lumière et de température élevées (Lichtenthaler, 2007). Bien que la fonction directe de l'isoprène dans les plantes elles-mêmes soit un mystère depuis de nombreuses années, il y a maintenant des indications qu'il pourrait servir à prévenir les dommages cellulaires à des températures élevées, peut-être en réagissant avec des radicaux libres pour stabiliser les composants de la membrane (Sasaki *et al.*, 2007). Au lieu de l'isoprène, certaines espèces végétales émettent de grandes quantités d'hydrocarbures monoterpéniques (C10), qui peuvent fonctionner de manière similaire (Loreto *et al.*, 1998).

La plupart des milliers de terpénoïdes des plantes n'ont aucun rôle perceptible dans la croissance et le développement et sont donc souvent classés comme métabolites «secondaires». Bien que relativement peu de ces substances aient été étudiées en profondeur, on pense qu'elles jouent principalement un rôle écologique, fournissant une défense contre les

herbivores ou les agents pathogènes (Wink, 2007) et agissant comme attractifs pour les animaux qui dispersent le pollen ou les graines. Ou comme inhibiteurs de la germination et de la croissance des plantes voisines (Wink, 2010).

L'un des exemples les plus connus d'un terpène inférieur impliqué dans la défense des plantes est le polygodial, un dialdéhyde sesquiterpénique de type drimane trouvé dans *Polygonum hydropiper*. Parmi les moyens de dissuasion les plus puissants connus contre l'alimentation des insectes, le polygode inhibe l'alimentation d'un assortiment diversifié d'insectes herbivores (Moreno-Osorio *et al.*, 2008). L'effet dissuasif semble être le résultat direct de l'action du polygodial sur les récepteurs du goût. Chez les larves de lépidoptères, les dialdéhydes polygodes et autres drimane bloquent les effets stimulants du glucose et du saccharose sur les cellules réceptrices chimio-sensorielles présentes sur les pièces buccales (Jansen et de Groot, 2004). Les groupes aldéhyde peuvent se lier de manière covalente avec le groupe amino libre des protéines dans des conditions physiologiques ; une telle modification peut changer la structure tridimensionnelle des protéines et donc altérer leur bioactivité (Wink, 2008).

Bien que quelques terpènes inférieurs aient été étudiés avec autant de détails que les polygodes, de nombreux autres membres de ce groupe servent de toxines, de dissuasifs alimentaires ou de dissuasifs de ponte pour les herbivores, et sont donc également censés fonctionner dans la défense des plantes. En tant que toxines ou dissuasives, ces substances possèdent de nombreux modes d'action divers sur les herbivores. Par exemple, la cétone monoterpénoïde, la pulegone, est une toxine hépatique chez les mammifères; les pyréthrine, esters monoterpéniques, fonctionnent comme des poisons nerveux des insectes en interagissant avec les protéines du canal sodium voltage-dépendant présentes dans les membranes des cellules nerveuses des insectes, conduisant à la paralysie et à la mort éventuelle et le diterpène, l'atactyloside, inhibe la translocation de l'ADP / ATP dans les mitochondries (Wink, 2010).

Ces dernières années, un nouveau rôle pour les terpènes inférieurs dans la défense des plantes est apparu. Certaines espèces végétales répondent aux attaques des herbivores en émettant des terpènes volatils qui attirent les ennemis des herbivores. Par exemple, les plantes de haricot de Lima (*Phaseolus lunatus*) endommagées par le tétranyque, *Tetranychusurticae*, émettent un mélange de monoterpènes, d'homoterpènes C11 et C16 et de salicylate de méthyle, qui attire un acarien carnivore, *Phytoseiulus persimilis*, qui se nourrit de tétranyques.



Lorsque le maïs ou le coton est nourri par des larves de lépidoptères, un mélange de monoterpènes, de sesquiterpènes, d'homoterpènes et d'autres composés est libéré, ce qui attire les guêpes parasites qui pondent sur les larves. La majorité de ces substances volatiles sont émises uniquement par les plantes endommagées par les arthropodes et non par les plantes non attaquées ou artificiellement endommagées. Les terpénoïdes libérés sont en grande partie synthétisés de novo suite à une attaque d'herbivore initiale et sont libérés de manière systémique dans toute la plante. L'utilisation de terpénoïdes volatils pour attirer les ennemis des herbivores peut être un complément précieux aux modes plus directs de défense anti-herbivore (Wink, 2010).

Les fonctions des terpènes inférieurs ne se limitent pas au monde naturel. Beaucoup jouent un rôle important dans la société humaine, comme la myriade d'arômes et d'agents de parfum monoterpène et sesquiterpène qui sont ajoutés aux aliments, boissons, parfums, savons, dentifrice, tabac et autres produits. Certains terpènes inférieurs sont utilisés dans l'industrie comme matières premières dans la fabrication d'adhésifs, de revêtements, d'émulsifiants et de produits chimiques de spécialité, tandis que d'autres, comme le limonène et les pyréthrinés, revêtent une importance commerciale croissante en tant qu'insecticides en raison de leur faible toxicité pour les mammifères et du manque de persistance dans l'environnement. L'importance pharmaceutique des terpènes inférieurs des plantes n'a cessé d'augmenter au cours de la dernière décennie. En plus des rôles bien connus du camphre et du cinéole dans les préparations destinées à soulager la douleur des brûlures, des foulures et autres inflammations, ces dernières années ont vu l'acceptation de l'artémisinine, un endoperoxyde sesquiterpénique dérivé de la plante médicinale chinoise, *Artemisia annua*, en tant que composé antipaludique précieux, et le développement du paclitaxel, un diterpène hautement fonctionnalisé de l'if (*Taxus spp.*), en tant que nouveau médicament pour le traitement du cancer de l'ovaire et du sein (Kingston et Newman, 2007).

Récemment, et après les recherches approfondies menées par Thomas Efferth et ses collègues, il a été prouvé que l'artémisinine et ses dérivés d'artéméther semi-synthétiques ont non seulement une activité antipaludique, mais aussi des activités antivirales et cytotoxiques contre différentes cellules cancéreuses (Youns *et al.*, 2009). Ces médicaments sesquiterpène lactone avec le pont endoperoxyde hautement actif peuvent se lier de manière covalente à l'ADN et aux protéines, conduisant à l'inactivation permanente de nombreuses cibles moléculaires (Wink, 2008). Le paclitaxel, également connu sous le nom de taxol, améliore la polymérisation de la tubuline, un composant protéique des microtubules du fuseau mitotique,

entraînant des tubules stabilisés et non fonctionnels et bloquant le cycle cellulaire. Le potentiel d'autres terpènes inférieurs dans la thérapie et la prévention du cancer fait actuellement l'objet de recherches actives. Plusieurs lactones sesquiterpéniques ont des groupes méthylène exocycliques qui sont hautement réactifs. Ils peuvent facilement établir des liaisons covalentes avec des groupes SH de protéines ou de glutathion et ainsi modifier leur bioactivité (Wink, 2008). Ces interactions peuvent expliquer l'activité de plusieurs lactones sesquiterpéniques contre l'inflammation et comme anti-infectieux.

## IV. Métabolisme et régulation

### IV.1. Les métabolismes secondaires et les stratégies de défense

Les stratégies de défense basées sur les MS peuvent varier entre les espèces végétales et avec des interactions impliquant des types spécifiques d'agresseurs, à la fois les herbivores et les pathogènes. En général, les métabolites de défense des plantes peuvent être préexistants ou constitutifs (phytoanticipines) ou leur biosynthèse peut être induite lors d'une provocation (phytoalexines). Un cas particulier de défense constitutive correspond à l'accumulation de composés précurseurs souvent stockés dans des vacuoles; en cas de dommage, ces métabolites sont libérés et modifiés par des enzymes qui sont soit Co-activées dans ces circonstances, soit rendues disponibles par décroissance (par exemple, les glucosinolates) (Hartmann, 2007). De nombreuses espèces, cependant, ont des profils intermédiaires dans lesquels les composés de défense peuvent être accumulés à des niveaux basaux et induits en outre lors de défis spécifiques. Des exemples de ceci peuvent être trouvés dans la production d'alcaloïdes indole monoterpéniques de *Psychotria sp.* (Pasquali et al., 2006). Bien que les stratégies décrites ci-dessus aient été classées en fonction des réponses aux stress biotiques, elles pourraient facilement être étendues pour décrire les profils d'accumulation de MS en réponse aux stress abiotiques.

### IV.2. Le rôle écologique des métabolites secondaires

La biosynthèse des MS présente une complexité remarquable. Les enzymes sont spécifiques à chaque voie et sont fortement régulées en termes de compartimentation, de temps et d'espace.

Il est le même pour les mécanismes d'accumulation ou le site et l'heure de stockage. En général, nous constatons que les tissus et organes qui sont importants pour la survie et la multiplication, tels que les tissus épidermiques et d'écorce, les fleurs, les fruits et les graines, ont des profils distinctifs de MS, et des composés secondaires y sont stockés en grandes quantités.

Tous ces processus et les moyens et structures correspondants nécessaires pour exprimer ces traits sont coûteux en termes d'ATP et de NAD (P) H, il serait donc hautement improbable que les MS soient des déchets ou n'aient aucune fonction du tout, comme cela a été suggéré dans la littérature plus ancienne. Les caractères coûteux sans fonction ni avantage ne

survivent généralement pas dans l'évolution, car les plantes exprimant ces caractéristiques devraient moins bien fonctionner que les plantes sans elles. Parce que ces métabolites sont maintenus et diversifiés de façon étonnante, il faut supposer que ces traits sont en effet importants, même si leurs fonctions ne sont pas directement évidentes.

Au cours des dernières décennies, des preuves expérimentales et circonstanciées ont montré clairement que les MS ont en effet des fonctions vitales pour l'aptitude d'une plante qui les produits. Leurs principaux rôles sont :

- a) Défense contre les herbivores (insectes, vertébrés)
- b) Défense contre les champignons et les bactéries
- c) Défense contre les virus
- d) Défense contre les autres plantes en compétition pour la lumière, l'eau et les nutriments
- e) Composés de signalisation pour attirer les animaux pollinisateurs et disperseurs de graines
- f) Signaux de communication entre les plantes et les microorganismes symbiotiques (*rhizobia* fixatrices d'azote ou champignons *mycorhiziens*)
- g) Protection contre les rayons UV ou autre stress physique
- h) Fonctions physiologiques sélectionnées

Afin de remplir ces fonctions, les structures de MS ont été façonnées au cours de l'évolution, de sorte qu'elles peuvent interagir étroitement avec des cibles moléculaires dans les cellules et les tissus ou d'autres caractéristiques physiologiques chez les animaux ou les microorganismes. Très souvent, les structures de MS ressemblent à des substrats endogènes, des hormones ou des neurotransmetteurs et peuvent ainsi imiter une réponse au niveau des cibles moléculaires correspondantes. Le processus menant à ces similitudes de structure pourrait être appelé « modélisation moléculaire évolutive ».

Il n'y a guère de cible chez les animaux ou les microorganismes pour lesquels un produit naturel n'existe pas. Ainsi, les plantes fournissent un large éventail de substances bioactives. C'est la raison pour laquelle tant de produits naturels peuvent être utilisés de tant de façons en

biotechnologie, pharmacie, médecine et agriculture. En utilisant des substances déjà connues ou à la recherche, des composés encore inconnus ou les gènes correspondants codant les enzymes pour leur biosynthèse peuvent être découverts dans des plantes vivant dans les déserts ou les forêts tropicales (stratégie appelée bioprospection ou prospection génétique).

Les MS interfèrent souvent avec plus d'une seule cible moléculaire (substances multi-cibles), ce qui est avantageux pour le producteur, car une toxine peut être plus efficace si elle élimine deux cibles au lieu d'une. De plus, les MS sont toujours produits sous forme de mélanges de plusieurs substances, souvent de classes différentes ; par exemple. Les polyphénols sont souvent accompagnés de terpénoïdes. En conséquence, il sera plus difficile pour un herbivore ou un microbe de développer une résistance à un tel cocktail, car une résistance concomitante à plusieurs cibles serait nécessaire.

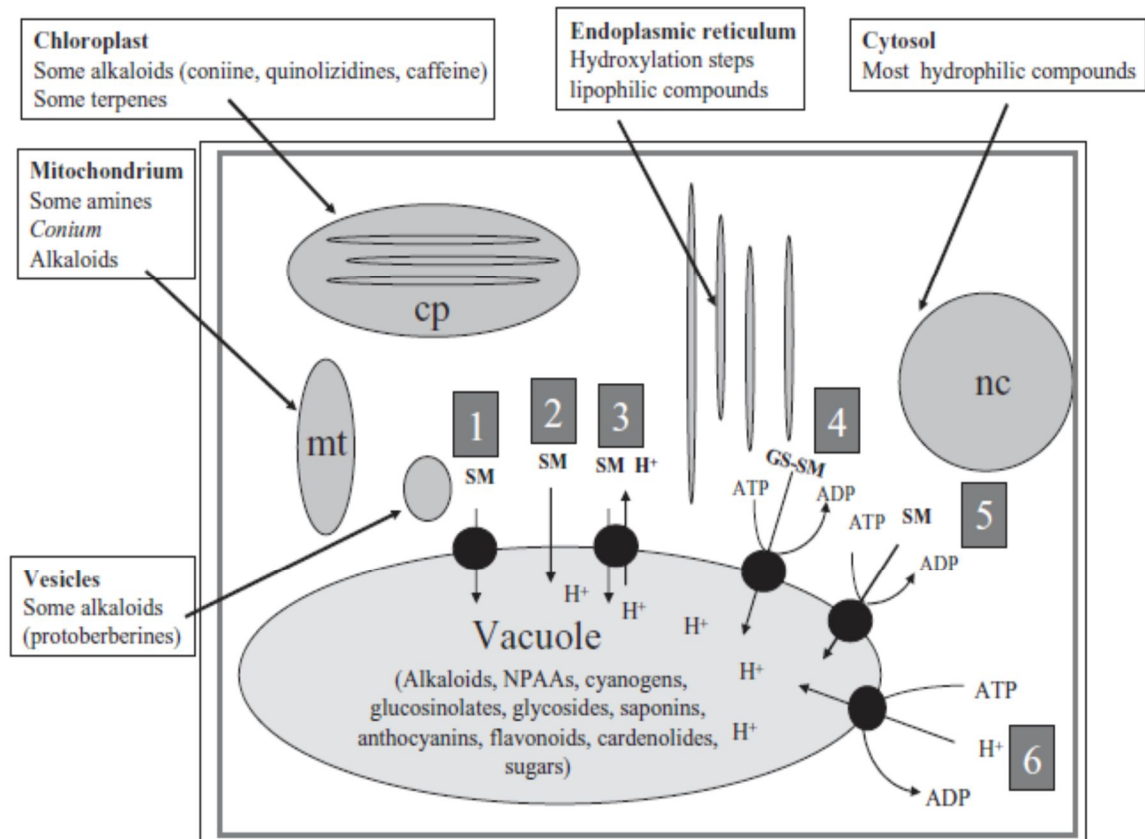
De plus, l'activité des métabolites individuels dans les mélanges peut être additive ou même synergique. On peut postuler que les mélanges contiennent des substances qui pourraient faciliter l'absorption de MS polaires à travers les biomembranes, pour lesquelles les biomembranes constituent normalement une barrière de perméation. Ces propriétés rendent ces mélanges encore plus puissants comme moyens de défense et de protection que les substances mono-cibles (Wink, 2008 a, b).

En raison de cette logique évolutive, la plupart des plantes sont capables de résister à diverses menaces provenant des herbivores, des microbes et de l'environnement physique. Les exceptions sont de nombreuses cultures agricoles qui ont été optimisées pour le rendement et, bien souvent, leurs lignes de défense d'origine ont été éliminées, car ces métabolites étaient désagréables ou toxiques pour les humains ou leur vie.

## **V. Organisation spatiale et compartimentation du métabolisme**

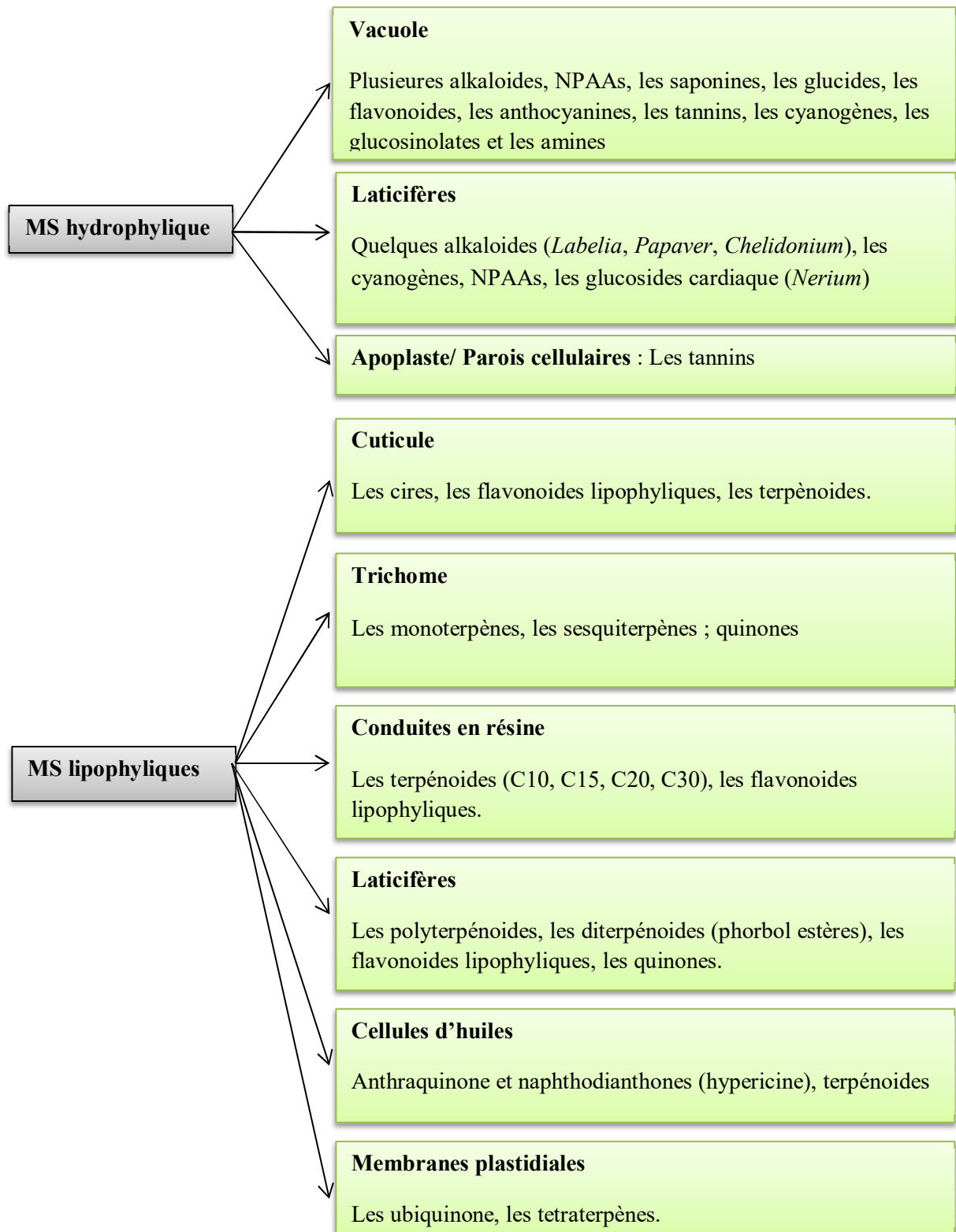
Les composés hydrosolubles sont généralement stockés dans la vacuole (Terasaka et *al.*, 2003; Kutchan, 2005; Yazaki, 2005, 2006), tandis que les substances lipophiles sont séquestrées dans les canaux résineux, les laticifères, les poils glandulaires, les trichomes, les membranes thylacoïdiennes ou sur la cuticule (Kutchan, 2005) (fig 33). Comme mentionné précédemment, la plupart des substances sont synthétisées dans le cytoplasme, le RE ou dans les organites et, si elles sont hydrophiles, elles sont exportées vers la vacuole. Elles doivent passer le tonoplaste, qui est imperméable à la plupart des MS polaires.

Pour certains alcaloïdes et flavonoïdes, un transporteur spécifique a été décrit, qui pompe les composés dans la vacuole (fig 32). Le gradient de protons, qui est construit par l'adénosine triphosphatase (ATPase) résidant dans le tonoplaste, est utilisé comme force motrice (par un mécanisme dit antiport protonique). Alternativement, divers mécanismes de piégeage (par exemple les alcaloïdes d'isoquinoline par l'acide chélidonique ou l'acide méconique dans les vésicules de latex de *Chelidonium* ou *Papaver*, respectivement) peuvent également aider à concentrer un composé particulier dans la vacuole. De plus, la conjugaison du MS avec le glutathion dans le cytoplasme (Martinoia et *al.*, 1993; Li et *al.*, 1995) et le transport ultérieur par un transporteur dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) dans la vacuole ont été proposés pour les xénobiotiques et certains MS qui peuvent être conjugués (Wink, 1997).



**Figure 32 :** Compartimentation de la biosynthèse et séquestration (Wink, 2010). Abréviations: SM, métabolites secondaires; GS-SM, conjugué de SM avec le glutathion; NPAA, acides aminés non protéiques; mt, mitochondrie; cp, chloroplaste; nc, noyau; 1, transport passif; 2, diffusion libre; 3, antiporteur H<sup>+</sup> / SM; 4, transporteur ABC pour SM conjugué au glutathion; 5, transporteur ABC pour MS libre; 6, H<sup>+</sup>-ATPase.

## Stockage des métabolites secondaires



**Figure 33** : Compartiments de stockage pour composés hydrophiles et lipophiles (Wink, 2010).

Au cours des années 2007, il est devenu évident que les plantes contiennent également une grande diversité de transporteurs ABC (Rea, 2007). Ces protéines membranaires, qui peuvent pomper des composés lipophiles à travers les biomembranes, sont entraînées par l'ATP. Les transporteurs sont fréquents dans les cellules animales et importantes pour la résistance multi-drogue observée chez les patients subissant une chimiothérapie (Linton, 2006). Deux types de pompes d'efflux, appartenant à la famille des transporteurs ABC, ont été décrits chez l'homme : **1.** P-glycoprotéine (P-gp) ou la protéine MDR (protéine de résistance multiple aux médicaments) codée par le gène MDR1 (P-gp est une pompe d'efflux dirigée vers la lumière intestinale) et **2.** MRP 1 et 2 (protéine associée à une résistance multiple) qui sont codés par les gènes MRP1 et MRP2. La MRP transporte des médicaments conjugués au glutathion (GSH), ainsi que des cytostatiques non modifiés, généralement dans le système sanguin. Plusieurs des parasites humains pathogènes (*Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*) développent souvent une résistance contre des composés prophylactiques et thérapeutiques, tels que les quinoléines, les naphtho-quinones et les lactones sesquiterpéniques. Les bases sous-jacentes sont des glycoprotéines membranaires qui sont orthologues à la P-gp humaine, qui peuvent être induites et activées (Wink, 2007). Il est devenu évident que le transport intracellulaire de certains alcaloïdes dans les plantes, comme la berbérine, semble également être catalysé par les transporteurs ABC végétaux (Terasaka *et al.*, 2003; Yazaki, 2005; Rea, 2007). Il a été montré plus tôt que de nombreux alcaloïdes sont transportés par des alcaloïdes / antiporteurs H<sup>+</sup> (Wink, 1993). À cette époque, les transporteurs ABC étaient inconnus. Puisque ces antiporteurs étaient dépendants de l'ATP, il pourrait être intéressant de revoir les mécanismes de transport des alcaloïdes dans les plantes (Martinoia *et al.*, 2002; Yazaki, 2005).

Les composés lipophiles interféreront non seulement avec les biomembranes des microbes et des herbivores, mais aussi avec les cellules de la plante productrice. Afin d'éviter l'autotoxicité, les plantes ne peuvent pas stocker ces composés dans la vacuole mais les séquestrent généralement sur la cuticule, dans des canaux ou cellules de résine mortes, qui ne sont pas tapissés par une biomembrane mais par une barrière solide imperméable (fig 33). Dans certains cas, les composés sont combinés avec une molécule polaire, de sorte qu'ils peuvent être stockés sous forme de produits chimiques plus hydrophiles dans la vacuole.

Dans de nombreux cas, le site de biosynthèse est limité à un seul organe, tels que les racines, les feuilles ou les fruits, mais une accumulation des produits correspondants peut être détectée dans plusieurs autres tissus végétaux. Le transport longue distance doit avoir lieu



dans ces cas. Le xylème ou le phloème sont probablement des voies de transport, mais un transport apoplastique peut également être impliqué. Le tableau VI résume les preuves du transport du xylème et du phloème de certains MS.

Le stockage peut également être spécifique aux tissus et aux cellules. Dans un certain nombre de plantes, des idioblastes spécifiques ont été détectés contenant des tanins, des alcaloïdes ou des glucosinolates. Plus souvent, les MS sont concentrées dans les trichomes ou les poils glandulaires (nombreux terpénoïdes chez les Lamiacées, les Asteraceae), les poils urticants (de nombreuses amines à activité neurotransmetteur chez les Urticacées) ou l'épiderme lui-même (de nombreux alcaloïdes, flavonoïdes, anthocyanes, glycosides cyanogéniques, coumarines, etc.) (Wink, 1997 ; Wink et Roberts, 1998). Les fleurs, les fruits et les graines sont généralement riches en MS, en particulier dans les plantes annuelles. Chez les espèces pérennes, de grandes quantités de MS se trouvent dans les bulbes, les racines, les rhizomes et l'écorce des racines et des tiges.

**Tableau VI** : Exemple de transport des métabolites secondaires par xylème et phloème (Wink, 2010).

Les composés	Xylème	Phloème
Les alcaloïdes quinolizidiniques	–	+
Les alcaloïdes pyrrolizidiniques	–	+
Aconitine	–	+
Les polyhydroxy alcaloïdes	–	+
Les glucosinolates	–	+
Les glycosides cardiaques	–	+
Les glycosides cyanogéniques	–	+
Nicotine	+	–

Les alcaloïdes tropanique	+	-
---------------------------	---	---

Plusieurs MS ne sont pas des produits finaux du métabolisme, mais sont retournés à un rythme régulier. Au cours de la germination, en particulier, les MS contenant du N, tels que les alcaloïdes, les NPAA, les glycosides cyanogéniques et les inhibiteurs de protéase, sont métabolisés et servent de source d'azote pour la plante en croissance. Les glucides (par exemple les oligosaccharides et les lipides) sont également retournés pendant la germination. Les concentrations de certains MS, tels que les quinolizidine alcaloïdes, la nicotine, l'atropine, les monoterpènes et les phénylpropanoïdes, varient diurne ; une interaction active entre la synthèse et le renouvellement est impliquée dans ces cas. Le taux de rotation de MS est facilement observé dans les cultures en suspension cellulaire (Wink, 1997).

Il est bien établi que les profils de MS varient avec le temps, l'espace et le stade de développement. Étant donné que les espèces végétales apparentées présentent souvent des similitudes dans les profils de leur MS, ces profils ont été utilisés comme outil taxonomique en systématique végétale. Cependant, les profils de plantes étroitement apparentées ou même entre les organes (comme les graines par rapport aux feuilles ou aux racines) diffèrent assez souvent considérablement ou ceux de groupes de plantes non apparentés montrent de fortes similitudes ; cela montre clairement que les schémas MS ne sont pas des marqueurs systématiques sans ambiguïté mais que l'évolution convergente et l'expression sélective des gènes sont des thèmes communs.

## **VI. Ingénierie métabolique**

### **VI.1. Les tannins condensés dans les fourrages**

Les tannins condensés représentent un biopolymère d'une grande importance agronomique. En effet, ces tannins sont fréquemment présents chez les végétaux consommés par les herbivores et peuvent avoir des effets marqués sur la nutrition animale en raison de leur capacité à se lier aux protéines de la ration alimentaire ou aux enzymes digestives (Carron *et al.*, 1994). Chez les ruminants, les tannins protègent les protéines des attaques bactériennes dans le rumen et ont également un effet anti-météorisation dû à la baisse de la concentration en protéines libres. Cependant, un excès de tannins dans les fourrages où les graines peut entraîner un refus de consommation par l'animal ou diminuer la valeur nutritive de l'aliment. Ceci est particulièrement marqué chez les non-ruminants (porc, poulet...) où la

consommation de tannins conduit à une diminution de la quantité de protéines digestibles et à une baisse de poids de l'animal.

Alors que les principales légumineuses fourragères cultivées en Europe (trèfle blanc et luzerne) ne contiennent pas de tannins, ils sont par contre abondants chez le sainfoin et le lotier. En raison de son génome relativement petit, le lotier est un bon modèle sur lequel se sont penchés plusieurs groupes de généticiens et biochimistes avec un double objectif : d'une part obtenir des données nouvelles sur la régulation de la biosynthèse des tannins condensés et d'autre part, grâce aux méthodes du génie génétique, moduler la teneur du végétal en ces composés (Carron *et al.*, 1994 ; Robbins *et al.*, 1998). Alors que les premières étapes de formation des unités de bases constitutives des tannins condensés sont à peu près bien connues, on ne possède encore que peu d'informations sur gènes et les enzymes contrôlant les étapes terminales et surtout celles conduisant à la polymérisation de ces unités.

La transformation du lotier avec un gène anti-sens de la DFR (l'enzyme permettant la formation des flavane-3,4-diols, précurseurs des anthocyanes et des tannins condensés) peut conduire à une nette diminution de la teneur en tannins condensés ainsi qu'à une modification des sous-unités constitutives (Carron *et al.*, 1994). Ce résultat, attendu *a priori*, doit cependant être considéré avec précaution dans la mesure où, dans le cas de certaines lignées de lotier, la transformation avec des gènes anti-sens de la DFR ou de la CHS peut conduire, contre toute attente, à une augmentation des teneurs en tannins (Robbins *et al.*, 1998). Il semble bien que chacun de ces gènes existe sous forme d'une famille multigénique et que la suppression d'un des membres soit compensée dans ce cas par la surexpression des autres, conduisant alors non pas à une diminution mais à une augmentation de la teneur finale.

Une meilleure compréhension de la régulation de ces phénomènes doit permettre de mieux définir, dans l'avenir, les orientations des essais de transformation concernant les tannins condensés. Dès maintenant, on a montré que leur synthèse est directement régulée par l'intermédiaire de certains facteurs de transcription. La surexpression des gènes codant ces facteurs conduit en effet à accumulation des tannins dans les feuilles du lotier et à une très forte augmentation du nombre de cellules dans lesquelles ils sont présents (Robbins *et al.*, 2003).

## **VI.2. Ingénierie métabolique par transformation plastique en tant que stratégie pour moduler le rendement en isoprénoïdes dans les plantes**

Les isoprénoïdes, qui constituent le groupe le plus diversifié de produits naturels, remplissent de nombreuses fonctions biochimiques chez les plantes. Ils jouent des rôles essentiels comme pigments photosynthétiques (caroténoïdes, chaîne latérale des chlorophylles), comme quinones dans les porteurs d'électrons, composants des membranes (stérols), dans le ciblage et la régulation subcellulaires (prénylation des protéines), et comme hormones (gibbérellines, brassinostéroïdes, acide abscisique, cytokinines). Avec le récent succès du clonage de gènes codant des enzymes de la biosynthèse des isoprénoïdes, des stratégies de génie génétique pour l'amélioration du métabolisme des isoprénoïdes végétaux ont émergé (Barkovich et Liao, 2001).

Les plastes des plantes supérieures ont leur propre génome qui peut être génétiquement modifié par insertion de gènes étrangers. La transformation des plastes offre plusieurs avantages par rapport à la transformation nucléaire et semble être la méthode de choix pour concevoir des voies métaboliques localisées dans le plaste, bien que la technologie ne soit actuellement applicable qu'à quelques cultures (Maliga, 2004 ; Verma et Daniell, 2007). L'expression d'un transgène dans les plastes élimine le besoin d'un transit peptide nécessaire à l'importation de protéines synthétisées dans le cytosol des plastes. De plus, après la translocation à travers les membranes plastiques, le peptide de transit doit être éliminé protéolytiquement pour donner une protéine fonctionnelle mature. Cependant, les transformants nucléaires peuvent accumuler des protéines non traitées qui ne sont pas fonctionnelles et qui peuvent interférer avec les résultats attendus. Ces problèmes peuvent être contournés en utilisant la transformation plastique. De plus, comme le génome des plastes est hautement polyploïde (500 à 10 000 copies du génome par cellule), le niveau d'expression d'un transgène est susceptible d'être élevé car il est présent en nombre de copies élevé et a donc le potentiel de conférer plus niveaux d'accumulation de protéines enzymatiques par rapport à l'expression du transgène nucléaire (Viitannen *et al.*, 2004). Récemment, l'expression d'un gène cyanobactérien de 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate réducto-isomérase (DXR) sous le contrôle du promoteur *psbA* du tabac a provoqué une activité DXR 350 fois plus élevée, ce qui a conduit à une augmentation des niveaux de divers isoprénoïdes tels que la chlorophylle a, la  $\beta$ -carotène, la lutéine, la solanésol et la  $\beta$ -sitostérol (Hasunuma *et al.*, 2008). De plus, nous avons réussi à produire plus de 0,5% (poids sec) de caroténoïde de haute valeur, l'astaxanthine (plus de 70% des caroténoïdes totaux), dans les feuilles de tabac, qui les

rend brun rougeâtre, en exprimant les deux gènes codant pour CrtW ( $\beta$ - carotène cétolase) et CrtZ ( $\beta$ -carotène hydroxylase) de la bactérie marine *Brevundimonas sp.* dans les chloroplastes (Hasunuma *et al.*, 2008). Dans le tabac transplastomique, la teneur totale en caroténoïdes était plus élevée que celle du tabac de type sauvage.

La procédure de transformation des plastes est techniquement exigeante et la construction d'un système de régénération de plantules à partir d'explants de feuilles ou de callosités qui seront endommagés par la manipulation de transfert de gène (par exemple, bombardement de particules et traitement chimique) est nécessaire. Les conditions de croissance tissulaire, y compris la concentration d'agents de sélection dans les cultures, ont une grande influence sur l'efficacité de la régénération des transformants. Jusqu'à récemment, l'application de la transformation des plastes à l'ingénierie des voies métaboliques était limitée aux espèces modèles telles que le tabac, qui peuvent être transformées relativement facilement.

### **VI.3. Ingénierie de hauts rendements de métabolites secondaires dans les cultures de cellules *Rubia* grâce à la transformation avec des gènes Rol**

Parmi les différentes méthodes actuellement utilisées pour améliorer les rendements en métabolites secondaires dans les cellules végétales cultivées, la méthode impliquant la transformation par des gènes Rol représente un exemple de technologie relativement nouvelle. Ces gènes, isolés à partir de plasmides du phytopathogène *Agrobacterium rhizogenes*, sont des activateurs potentiels du métabolisme secondaire dans les cellules transformées des familles des Solanacées, Araliacées, Rubiacées, Vitacées et Rosacées. Dans certains cas, l'effet activateur des gènes Rol individuels était suffisant pour surmonter l'incapacité des cellules végétales cultivées à produire de grandes quantités de MS. La stimulation des caractéristiques de production de cellules végétales cultivées médiée par les gènes rol s'est avérée remarquablement stable sur une culture à long terme.

On sait que les racines velues sont produites en réponse à l'intégration de l'ADN-T de type sauvage d'*A. Rhizogenes* dans le génome de la plante (Cardarelli *et al.*, 1987). L'intérêt pour les gènes Rol provient du fait bien connu que les cultures de racines velues, dérivées de diverses espèces végétales, produisent de manière stable de grandes quantités de métabolites secondaires (Sevon et Oksman-Caldentey, 2002). Parmi les gènes de l'ADN-T, trois gènes Rol, RolA, RolB et RolC ou une combinaison (Rol ABC), semblent être les plus efficaces pour induire la production de métabolites secondaires (Shkryl *et al.*, 2008). Bien que l'on sache que les gènes Rol agissent via l'activation transcriptionnelle des gènes de défense, le

mécanisme d'activation n'est pas clair. Les preuves indiquent que les gènes Rol interviennent dans des voies de transduction de signal rares chez les plantes. Ils agissent sur la production de phyto-alexine indépendamment des hormones de défense des plantes et de la voie NADPH oxydase dépendante du calcium (Bulgakov, 2008).

De même, la production de MS dans les cellules transformées par RolC ne dépend pas d'un sursaut oxydatif. L'ampleur de l'activation du métabolisme secondaire varie entre les espèces végétales étudiées, de 2 à 300 fois selon le groupe de métabolites secondaires et l'espèce végétale. Dans certains cas, la transformation avec les gènes Rol a provoqué un effet biphasique avec suppression initiale et activation ultérieure de la biosynthèse pour des groupes particuliers de MS (Bulgakov *et al.*, 2005 ; Bulgakov, 2008). La transformation avec les gènes Rol est particulièrement utile dans les cas où différentes méthodes couramment utilisées pour augmenter la production de MS (sélection cellulaire, traitements éliciteurs et ajout d'un précurseur biosynthétique) n'améliorent que légèrement la productivité cellulaire.

Les gènes RolB et RolC sont les candidats les plus intéressants pour le génie biochimique des plantes. Une expression élevée du gène RolB dans les cellules transformées de *R. cordifolia* augmente considérablement l'accumulation d'anthraquinones et la transcription d'un gène clé de biosynthèse (ICS) codant pour l'isochorismate synthase. Cependant, une expression excessive du gène RolB inhibe la croissance cellulaire. Par rapport au gène RolB, le gène RolC active dans une moindre mesure la biosynthèse de l'anthraquinone. Cependant, ce gène possède une capacité intéressante à augmenter la croissance cellulaire. Lorsqu'ils sont combinés, les gènes RolA, B et C augmentent la teneur en anthraquinone et ne suppriment pas l'accumulation de biomasse. Les preuves indiquent que chacun des gènes Rol a son propre rôle dans les processus métaboliques des plantes (Bulgakov, 2008 ; Shkryl *et al.*, 2008).

#### **VI.4. Fusion avec des protéines fluorescentes pour la localisation subcellulaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse des alcaloïdes végétales**

Les alcaloïdes constituent un groupe important et diversifié de MS comprenant certains des produits pharmacologiques d'origine végétale les plus remarquables, comme les myorelaxants (+) tubocurarine et papavérine, les agents anticancéreux vinblastine et vincristine, ou encore l'analgésique numéro un, la morphine. Chez les plantes, on pense que les alcaloïdes jouent un rôle de défense contre les herbivores, ce qui expliquerait leur forte activité physiologique chez les animaux. Dans les cellules végétales, les alcaloïdes et de

nombreux autres MS s'accumulent dans la vacuole, séparés d'une grande partie des activités physiologiques cellulaires avec lesquelles ils pourraient interférer. De même, quelques enzymes biosynthétiques d'alcaloïdes se sont révélées localisées dans la vacuole (Bird et Facchini, 2001 ; Facchini ,2001).

En raison de la complexité des voies de biosynthèse des alcaloïdes et des faibles concentrations d'enzymes de biosynthèse des alcaloïdes dans les tissus végétaux, une connaissance approfondie des voies de biosynthèse des alcaloïdes fait encore défaut dans de nombreux cas. Cependant, nous pouvons désormais utiliser de nouvelles stratégies de recherche impliquant la caractérisation de protéines recombinantes produites à partir de gènes candidats sélectionnés par criblage par homologie ou à partir d'analyses transcriptomiques / protéomiques différentielles. Dans ce contexte, la détermination de la localisation subcellulaire des protéines candidates peut être essentielle pour établir fermement leur rôle dans les cellules. Pour aborder cette question, les fusions avec des protéines fluorescentes (FP) peuvent être utilisées comme un outil assez efficace et fiable, à condition que des précautions appropriées soient prises dans la conception des fusions, le choix de la FP et / ou les conditions nécessaires pour obtenir une fluorescence en cas de localisation vacuolaire ou apoplastique (Goossens et Rischer, 2007).

# Chapitre 3 : Métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique

## I. Criblage biologique

### I.1. Choix/définition des cibles thérapeutiques

Le terme de « thérapie ciblée » qualifie les traitements anticancéreux visant à bloquer la croissance et/ou la propagation des cellules cancéreuses en s'attaquant spécifiquement à leurs anomalies moléculaires. En effet, elles ciblent des récepteurs ou des anomalies identifiées dans les voies de signalisation des cellules tumorales (qui contrôlent la prolifération cellulaire, la survie, l'invasion, l'apoptose, ou encore l'angiogenèse).

Le concept de « cible » provient de la découverte des voies de signalisation fortement impliquées dans l'oncogenèse. Ces voies de signalisation ne sont pas spécifiques de la cellule cancéreuse. En effet, elles sont présentes au sein de cellules saines où elles participent à la croissance, la différenciation cellulaire, la régulation de l'homéostasie, .... Cependant certaines d'entre elles sont dérégulées, positivement ou négativement, et jouent ainsi un rôle majeur dans le processus de cancérisation en permettant l'acquisition des compétences nécessaires à la transformation maligne (indépendance vis-à-vis des signaux de croissance, résistance à l'apoptose, phénotype invasif et métastasant, ...) (Hanahan et Weinberg, 2001).

### I.2. Matériel végétal

Les plantes sont encore aujourd'hui au cœur de la pharmacopée humaine. En effet, en 2006, les molécules thérapeutiques d'origine végétale utilisées en médecine humaine représentaient un marché de plus de 30 milliards de dollars et environ 50 % des petites molécules mises sur le marché pour le traitement des cancers étaient extraites ou dérivées de plantes. Il est également intéressant de noter qu'au début du XXI<sup>e</sup> siècle, plusieurs médicaments importants sont issus de médecines traditionnelles d'origine végétale ou de recherches chimiques sur des molécules d'origine végétale. Une démarche systématique consiste aujourd'hui à cribler des familles entières de substances chimiques provenant d'extraits purifiés de substances végétales ou marines, d'isoler la substance qui produit l'effet observé, de la caractériser et de la synthétiser ou de l'extraire en fonction de la difficulté ou du coût de ces opérations (Kraczkowski et *al.*, 2008).



## **I.3. Méthodologie d'évaluation**

### **I.3.1. Les planticorps**

La demande en anticorps recombinants destinés principalement à l'immunothérapie des cancers croît très rapidement. Elle pourrait dépasser prochainement la capacité de production des installations disponibles utilisant des cellules de mammifères cultivées en bioréacteurs. C'est pourquoi, après la démonstration dès 1989, par une équipe californienne, de la possibilité de produire un anticorps dans des feuilles de tabac, de nombreux anticorps ou fragments d'anticorps ont été produits dans différentes plantes génétiquement modifiées (PGM) telles que le tabac, la pomme de terre, la luzerne, l'orge, le blé maïs, l'Arabidopsis, etc. (Gomord *et al.*, 2004). Toutefois, aucun « planticorps » n'a encore été commercialisé en raison de spécificités végétales propres à la maturation de ces molécules. Ainsi, ils ont montré qu'un anticorps produit dans une cellule végétale diffère essentiellement par sa partie sucre (N-glycane) lorsque l'on le compare au même anticorps produit dans une cellule de mammifère. En raison de l'immunogénicité des N-glycanes végétaux, l'utilisation d'un planticorps en thérapie chez l'homme présente des risques. Ainsi, parmi les planticorps en cours d'essais cliniques, le produit le plus avancé, actuellement en phase II, reconnaît la principale protéine d'adhésion de *Streptococcus mutans*, un pathogène oral responsable de la carie dentaire ; il est destiné à une application locale. Les travaux actuels ont pour objectif, grâce au transfert de plusieurs gènes humains dans le tabac et la luzerne, de produire dans ces plantes des planticorps présentant des N-glycanes « humanisés » (Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007). Ainsi, les résultats récents montrent que la co-expression transitoire dans des feuilles de tabac des chaînes lourdes et des chaînes légères constitutives d'un anticorps, et d'une glycosyl-transférase humaine, permet de produire de grandes quantités d'un anticorps dont la glycosylation est compatible avec une utilisation chez l'homme. Les contraintes liées aux maturations post traductionnelles spécifiques des plantes ne sont donc plus un obstacle à l'utilisation des planticorps en thérapie chez l'homme puisque plusieurs systèmes végétaux de production présentant une glycosylation humanisée sont maintenant disponibles.

### **I.3.2. L'If et le Taxol dans le traitement du cancer du sein**

Les substances d'origine naturelle sont le plus souvent des structures moléculaires d'une grande complexité. Elles servent de support aux recherches des chimistes médicaux. Parmi ces molécules, le docétaxel est utilisé dans les schémas thérapeutiques d'un grand nombre de cancers depuis la fin des années 1980. Les chimistes du National Cancer Institute aux États-

Unis, avaient observé l'efficacité d'extraits d'ifs (paclitaxel) de la côte Ouest des États-Unis (*Taxus brevifolia*) dans des tests classiques d'activité utilisant des cellules cancéreuses. Après plusieurs années de travail, cette substance a donné naissance à un médicament important pour le traitement du cancer du sein : le taxol. La grande difficulté, très vite apparue, est que le paclitaxel était extrait de l'écorce d'arbres centenaires et que le prélèvement des écorces tuait ces arbres. C'est ici qu'intervient l'Institut des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette, laboratoire du CNRS, qui a mis au point une méthode semi-synthétique de production du docétaxel, extrait des bourgeons et des aiguilles de *Taxus bacata* dont la cueillette mondiale, bien organisée, permet le renouvellement de ces aiguilles et la pérennité d'une production régulière du médicament anticancéreux. Cette recherche a stimulé un grand nombre d'équipes de chimistes qui ont maintenant produit plusieurs succédanés de ces molécules complexes, très difficiles à produire, mais indispensables.

## **II. Identification des produits naturels**

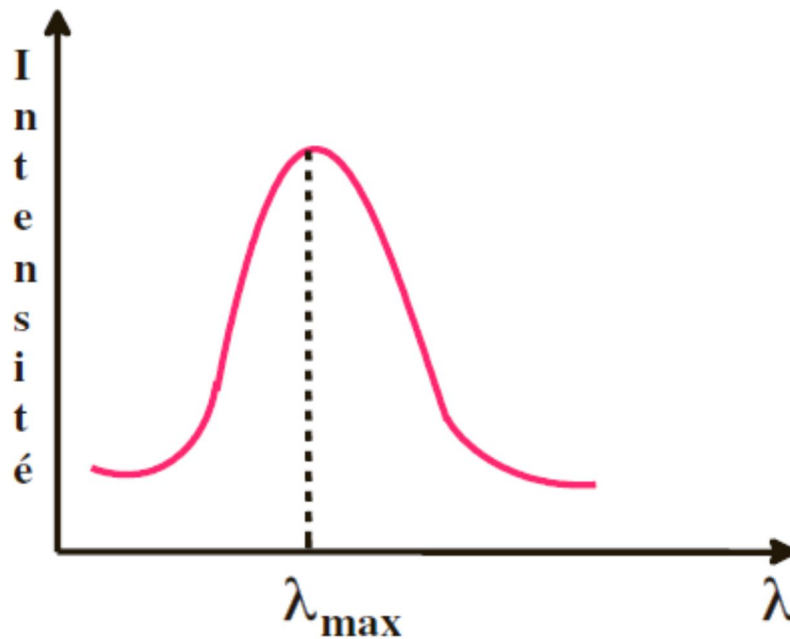
### **II.1. La spectroscopie ultraviolet-visible**

L'absorption des radiations lumineuses par la matière dans la plage spectrale s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1 100 nm, a été abondamment étudiée d'un point de vue fondamental. Cette partie du spectre est désignée par l'« UV/Visible », parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'œil humain. D'une manière générale, elle apporte peu d'informations structurales, mais elle a, en revanche, beaucoup d'applications en analyse quantitative. Les calculs de concentration qui découlent de la loi de Beer et Lambert ont donné naissance à la méthode connue sous le terme général de colorimétrie. Cette méthode apparaît comme le cheval de labour de tout laboratoire d'analyses. Celle-ci s'applique non seulement aux composés qui possèdent un spectre d'absorption dans le visible mais aussi à tous ceux qui conduisent au moyen d'un réactif spécifique à un dérivé permettant une mesure d'absorbance. Les mesures d'absorption peuvent se faire avec tout un choix d'appareils qui vont des comparateurs de couleurs et autres colorimètres visuels simples, aux spectrophotomètres automatiques adaptés à l'analyse multi-composants. De plus, la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire ont favorisé le développement de détecteurs UV/Visible perfectionnés, à l'origine d'un mode très courant d'obtention des chromatogrammes, accompagné de possibilités d'identification et de quantification des composés (Rouessac et Rouessac, 2004).

### II.1.1. La présentation d'un spectre UV-visible

Un spectre est une représentation de l'absorption en fonction de la longueur d'onde (ou du nombre d'onde ou de l'énergie).

D'après ce qui a été décrit précédemment, on s'attendrait à observer un simple signal à la longueur d'onde d'absorption. En fait un spectre UV ou visible dans sa forme la plus simple est une courbe proche d'une gaussienne (fig 34).



**Figure 34** : Spectre UV-visible typique.

Ce spectre présente donc un maximum d'absorption à la longueur d'onde considérée notée  $\lambda_{\max}$  caractéristique d'une transition dans une molécule donnée. Ce phénomène est lié aux vibrations des liaisons de la molécule qui font que la valeur de la différence d'énergie  $\Delta E$  n'est pas fixe mais *oscille autour d'une valeur moyenne* de la longueur d'onde (Krausz et al., 2008).

### II.1.2. Application

La spectroscopie UV-visible permet également de déterminer la concentration d'une famille de molécules dans un extrait tel que le dosage des anthocyanes, polyphénol totaux, flavonoïdes totaux (Giusti et Wrolstad, 2001).

## II.2. La spectroscopie infrarouge (IR)

L'infrarouge analytique met à profit la plage des radiations électromagnétiques comprise entre 1 et 50 mm pour identifier ou doser des composés par des procédés basés sur l'absorption ou la réflexion de la lumière par l'échantillon. Cette bande spectrale est divisée en proche infrarouge (de 1 à 2,5 mm) et en moyen infrarouge (2,5–50 mm). Bien que le domaine du proche infrarouge soit pauvre en absorptions spécifiques, il a pris une grande importance dans les laboratoires de contrôle comme moyen d'analyse quantitative. Le domaine du moyen infrarouge est, par contre, plus riche en informations sur les structures des composés examinés. De ce fait, il est très utilisé comme procédé non destructif pour identifier les composés moléculaires organiques dont il permet de garder une sorte d'empreinte.

Pour effectuer ces analyses, on dispose d'une panoplie d'appareils allant des spectromètres à transformée de Fourier aux divers analyseurs portables de type dispersif ou non, spécialisés dans le dosage de composés prédéfinis (analyse des gaz et des vapeurs) ou qui permettent de faire des mesures en continu avec des sondes à immersion sur les unités de production. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, qui complète la méthode dispersive initiale, offre de nombreuses possibilités de traitement des spectres et permet des applications dans l'analyse de microéchantillons structurés (microanalyse infrarouge. Rouessac et Rouessac, 2004).

### II.2.1. Principe

L'énergie infrarouge (produite, par exemple, par un filament incandescent) se situe pour les spectres utilisés habituellement par les organiciens entre 20  $\mu\text{m}$  et 2,5  $\mu\text{m}$  ou en mesurant en nombre d'onde entre 500  $\text{cm}^{-1}$  et 4 000  $\text{cm}^{-1}$  ce qui correspond à des énergies situées autour de 30  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Une telle énergie ne sera pas suffisante pour permettre une transition électronique comme en spectroscopie UV-visible, mais un balayage entre ces longueurs d'onde va agir sur la vibration et la rotation des molécules (Krausz et *al.*, 2008).

Les molécules ne sont pas rigides et les atomes qui les composent peuvent vibrer les uns par rapport aux autres en constituant des vibrateurs. L'image classique est un ressort qui relie les atomes A et B de masse respective  $m_A$  et  $m_B$  d'une molécule A–B. Si on appelle  $k$  la constante de rappel de ce « ressort », la fréquence  $\nu$  est alors donnée par la loi classique de Hooke démontrée dans les cours de physique élémentaire (Krausz et *al.*, 2008).

Il est cependant important de remarquer, et ceci est le résultat de la théorie, qu'une liaison possédant un moment dipolaire nul ne donnera aucun signal en spectroscopie infrarouge. Ainsi le dioxygène O=O n'aura pas de bandes actives en infrarouge, par contre l'éthène présentera des signaux dus aux liaisons C-H mais la double liaison C=C ne sera pas active son moment dipolaire étant nul en raison de la symétrie de la molécule (Krausz et *al.*, 2008).

## II.2.2. Applications de la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie IR est une méthode utilisée pour la détermination de la structure des composés organiques. En effet, les vibrations moléculaires dépendent des distances interatomiques, des angles de liaison et des forces de liaison plutôt que des propriétés en vrac du composé. Ainsi, la spectroscopie infrarouge est utilisée en chimie organique pour la détection des groupes fonctionnels, la confirmation de l'identité des composés et le suivi des réactions.

- **Détection des groupes fonctionnels**

Tous les groupes fonctionnels absorbent dans une région de fréquence définie. Ainsi, la présence ou l'absence d'une bande dans une région de fréquence définie montre la présence ou l'absence d'un groupe fonctionnel particulier dans le composé.

- **Confirmation de l'identité des composés**

L'identité d'un composé est souvent établie en comparant son spectre IR à celui d'un échantillon authentique. Si les spectres IR, enregistrés dans les mêmes conditions, sont superposables, ils représentent le même composé. Le nombre de bandes, surtout dans la région de l'empreinte digitale, est très utile pour l'identification. Les spectres infrarouges d'échantillons impurs sont habituellement flous et ont de nombreuses bandes qui ne peuvent pas être interprétées alors qu'un composé pur donne un spectre IR clair.

- **Suivi des réactions**

La progression d'une réaction organique peut être suivie à l'aide d'une spectroscopie IR. Ceci se fait en examinant les spectres IR des portions du mélange réactionnel prélevés à certains intervalles de temps (Haman et *al.*, 1990).

## II.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

### II.3.1. GÉNÉRALITÉS

La *résonance magnétique nucléaire* a donné son nom à une méthode exceptionnelle pour résoudre les problèmes de détermination de structure des composés moléculaires organiques et de certains types de matériaux inorganiques. Les spectromètres de RMN sont donc souvent localisés dans les laboratoires de recherche, mais il existe d'autres appareils de mise en œuvre simplifiée faisant appel à ce même phénomène pour des applications de routine.

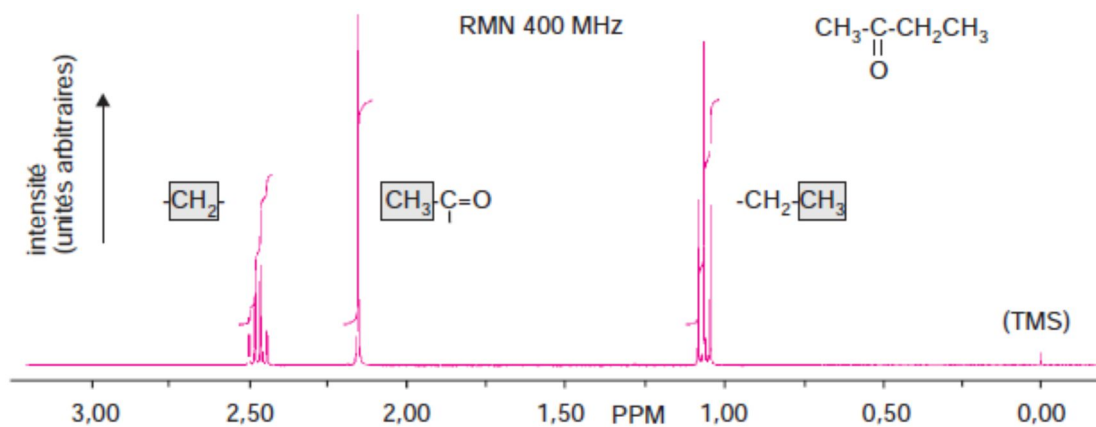
Cette méthode d'étude de la matière peut être décrite en ne choisissant que des exemples relevant du domaine de la chimie organique, l'élucidation des structures moléculaires ayant, en effet, toujours servi de moteur à son développement et aux nombreuses améliorations techniques depuis son origine.

La RMN tire des informations de l'interaction qui peut apparaître entre les noyaux des atomes présents dans l'échantillon quand on le soumet à un champ magnétique intense et constant, produit par un aimant.

Le document de base, fourni par ces appareils, est le *spectre de RMN* (fig 35). Il s'agit d'un diagramme représentant des signaux de résonance. Pour produire ces signaux, on utilise conjointement un second champ environ 10 000 fois plus faible que le précédent, en faisant appel à une source de radiations électromagnétiques du domaine des radiofréquences.

Le spectre de RMN résulte de l'absorption par l'échantillon de certaines des fréquences envoyées par cette source électromagnétique. L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité), conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon, d'autant plus facilement interprétables s'il s'agit d'un composé pur (Rouessac et Rouessac, 2004).

Pour comprendre l'origine de ces spectres, très différents des spectres optiques classiques, il faut faire appel au spin des noyaux.



**Figure 35 :** Présentation conventionnelle d'un spectre de RMN des atomes d'hydrogène d'un composé organique (Rouessac et Rouessac, 2004).

Ici, spectre de la butanone [ $\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ ] avec, en superposition, la courbe d'intégration, qui permet d'évaluer les aires relatives des principaux groupes de signaux repérés sur le spectre. La nature de l'échelle des abscisses sera expliquée plus loin.

### II.3.2. Les noyaux qui peuvent être étudiés par RMN

Un nucléide quelconque représenté par  ${}^A_Z\text{X}$  a un nombre de spin  $I$  non nul si les nombres  $Z$  de protons et  $A$  de nucléons ne sont pas tous les deux pairs.  ${}^1_1\text{H}$ ,  ${}^{13}_6\text{C}$ ,  ${}^{19}_9\text{F}$ ,  ${}^{31}_{15}\text{P}$  ont, par exemple, un nombre de spin  $I = 1/2$  tandis que  $I = 1$  pour  ${}^2_1\text{H}$  (deutérium D) ou  ${}^7_7\text{N}$ . Tous ces noyaux donneront un signal en RMN. En revanche, les noyaux  ${}^{12}_6\text{C}$ ,  ${}^4_2\text{He}$ ,  ${}^{16}_8\text{O}$ ,  ${}^{28}_{14}\text{Si}$ ,  ${}^{32}_{16}\text{S}$  auront un nombre de spin nul et ne pourront pas être étudiés par RMN. Dans l'ensemble, plus de la moitié des nucléides stables connus (au moins un isotope par élément) conduisent à un signal de RMN, mais la sensibilité varie énormément suivant les noyaux. Ainsi le proton, nom commun du noyau  ${}^1_1\text{H}$ , ou bien le  ${}^{19}_9\text{F}$ , sont plus faciles à détecter que le  ${}^{13}_6\text{C}$ , beaucoup moins sensible que le proton et qui ne représente que 1 % de l'élément carbone (Rouessac et Rouessac, 2004).

## II.4. Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode de caractérisation de la matière qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans l'échantillon. Les instruments correspondants sont les spectromètres de masse qui se répartissent en cinq catégories suivant leur conception. Certains dérivent des montages mis au point au début du siècle pour l'étude des particules ou des

atomes ionisés soumis à un champ magnétique, tandis que d'autres font appel aux seuls champs électriques tels les « bench-top » souvent placés en aval d'une technique séparative (chromatographie par exemple). Les perfectionnements de ces appareils, leur miniaturisation ainsi que l'apparition de nouvelles techniques d'ionisation, ont fait de cette méthode celle qui a le plus vaste champ d'application par sa polyvalence et par son extrême sensibilité (Rouessac et Rouessac, 2004).

Elle est présente dans des secteurs très divers : chimie organique et inorganique, biochimie, chimie clinique et environnementale, géochimie. Elle sert à toutes sortes d'analyses dans le but de déterminer la nature, la composition et même la structure éventuellement d'échantillons divers pour le respect des réglementations et dans l'industrie en général.

#### II.4.1. Principe de base

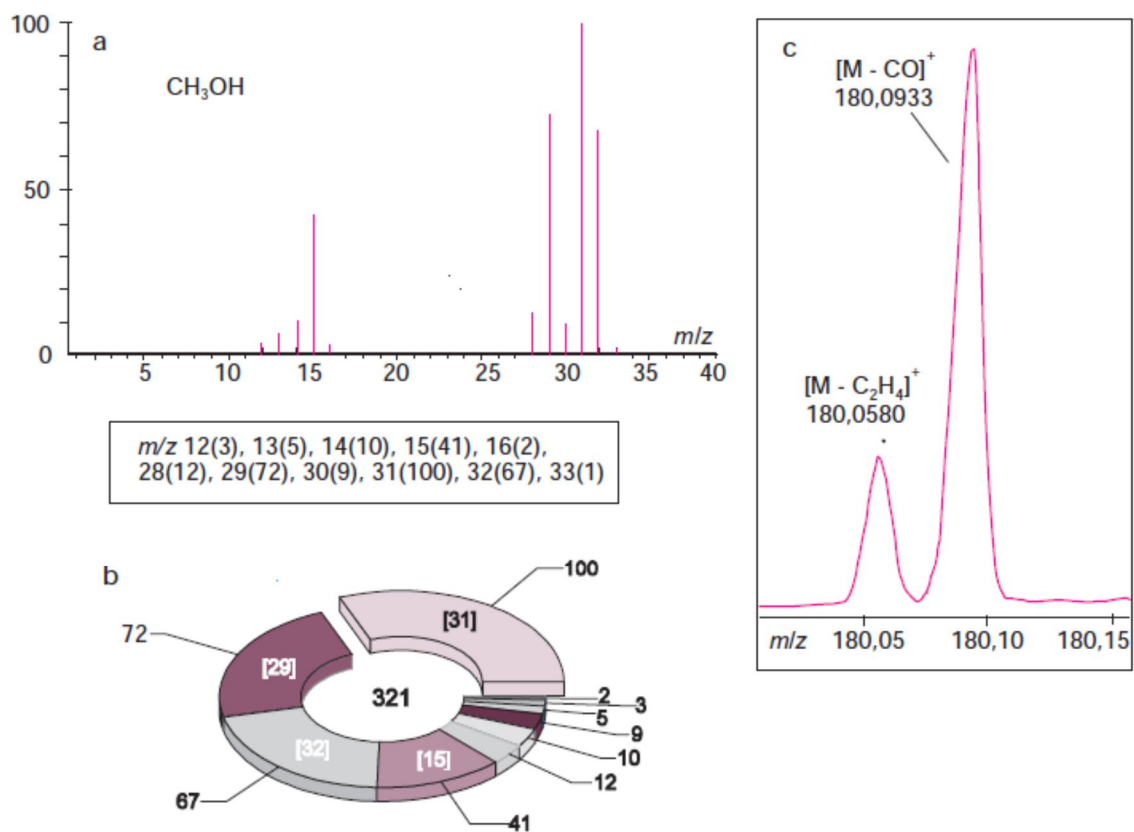
Le principe de cette méthode repose sur l'ionisation préalable de l'échantillon par **impact électronique** (IE) c'est-à-dire par bombardement d'électrons accélérés sur l'échantillon à analyser. L'énergie de l'ordre de 70 eV étant supérieure au potentiel d'ionisation de la molécule on aura *l'arrachement d'un électron* et ionisation du composé.

On a formation d'un radical cation qui peut lui-même se fragmenter en d'autres ions monochargés appelés **ions fragments**. Tous ces ions sont ensuite accélérés par un champ électrique (condensateur) puis déviés dans un champ magnétique. Il est connu que dans de telles conditions la particule chargée adopte un mouvement circulaire uniforme dont le rayon est proportionnel à  $(m/z)^{1/2}$  où  $m$  est la masse de l'ion et  $z$  son nombre de charges. La déviation est donc proportionnelle au rapport  $m/z$  et c'est la mesure de cette déviation qui permet d'accéder aux masses (Krausz et *al.*, 2008).

À titre d'exemple, si l'on ionise, par un bombardement d'électrons, un échantillon de méthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) passé à l'état de gaz, une petite fraction des molécules est transformée en espèces porteuses de charges, parmi lesquelles les ions positifs  $\text{CH}_3\text{OH}_+^+$ . Ces ions, formés dans un état excité, disposent d'un surplus d'énergie ce qui provoque pour beaucoup d'entre eux leur fragmentation quasi immédiatement. Tous, cependant, ne se dissocient pas de la même façon, si bien qu'il se forme toute une collection d'ions de masses inférieures à celle des molécules de méthanol de départ. D'une manière générale, ces fragments, nés de coupures de liaisons et de réactions de réarrangement subséquentes, sont porteurs d'informations sur la molécule initiale (fig 36).



Les résultats sont présentés au moyen d'un graphe appelé *spectre de masse* sur lequel figurent les abondances des ions formés classés par ordre croissant de leur rapport masse/charge (fig 36). En opérant dans des conditions identiques, la fragmentation est reproductible et de ce fait, caractéristique du composé étudié. Ce dernier est détruit par l'analyse (Rouessac et Rouessac, 2004).



**Figure 36** : Spectre de fragmentation et spectre de masse présentés sous forme graphique ou tabulaire (Rouessac et Rouessac, 2004).

- a) Spectre de fragmentation du méthanol ; b) représentation non conventionnelle du même spectre sous forme d'un diagramme circulaire : statistiquement, pour 321 ions formés, il y en a 100 de masse 31 u (Da), 72 de masse 29, etc. Les divers ions constituent autant de populations différentes ; c) partie d'un enregistrement haute résolution d'un composé M présentant deux ions de masse voisine (l'un par perte de CO et l'autre de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>).

## II.4.2. Le spectre de masse

Sur un spectre de masse classique on porte en abscisse les valeurs des rapports masse/charge ( $m/z$ ) ( $z = 1$  pour une entité monochargée). Et en ordonnée les **abondances relatives** des ions présents.

- On observera en général tout d'abord **la masse M de l'ion moléculaire**. L'examen du spectre montre également des pics de moindre intensité de masse  $M + 1$ ,  $M + 2$ ... Ces résultats sont liés à la contribution des isotopes naturels des atomes composant la molécule à analyser présents en plus ou moins grande abondance ( $^{13}\text{C}$  1,11 % ;  $^2\text{H}$  0,015 % ;  $^{18}\text{O}$  0,20 % ;  $^{15}\text{N}$  0,37 % ;  $^{37}\text{Cl}$  32,5 %). Outre la détermination de la masse moléculaire exacte, la connaissance de ces signaux peut à l'aide de tables (tables de Beynon) permettre d'accéder aux formules brutes.
- La deuxième information accessible par cette méthode est **la masse des ions fragments**.
- Chaînes carbonées (formation préférentielle de cations tertiaires)
- Doubles liaisons (coupures de type allylique favorisées)
- Cycle aromatique à chaîne latérale (la rupture s'effectue préférentiellement sur la liaison située en  $\alpha$ - $\beta$  du cycle pour fournir un benzyle et sans doute un cation tropylium) (Krausz et *al.*, 2008).

## II.5. Techniques chromatographiques

La chromatographie englobe une série de techniques qui ont en commun la séparation des composants d'un mélange. L'échantillon à séparer est entraîné par un courant de phase mobile (gaz ou liquide) le long d'une phase stationnaire (papier ou silice ...). La chromatographie analytique est utilisée pour identifier ou doser les composés chimiques d'un mélange. La chromatographie préparative est utilisée pour séparer ou purifier les composantes d'un mélange (Giddings, 2002).

Le mélange à séparer et analyser peut être un gaz, un liquide ou un solide. Le résultat de cette interaction est la distribution différente des composants de l'échantillon entre les deux phases, entraînant la séparation du composant de l'échantillon en zones ou bandes. Le principe qui régit la séparation chromatographique constitue le fondement de la plupart des méthodes

physiques de séparation, par exemple la distillation et l'extraction liquide-liquide (Grob, 2004; Waksmundzka-Hajnos et *al.*, 2008).

La séparation des composants de l'échantillon peut être réalisée par les techniques suivantes : Chromatographie sur Couche Mince (CCM), chromatographie sur couche mince haute précision (HPTLC), chromatographie liquide haute pression (HPLC) et chromatographie en phase gazeuse (GC). Dans cette partie, nous aborderons la CCM, la HPTLC, la GC et la HPLC.

### **II.5.1. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince (CCM, *Thin Layer Chromatography*, TLC en anglais) est une technique chromatographique apparue en 1938 avec la séparation d'extraits végétales sur une plaque d'oxyde d'aluminium par Ismailov et Schaiber. Depuis, elle s'est rapidement imposée comme méthode d'analyse et de contrôle et a même été adoptée par pharmacopée. Le développement de l'HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) a marqué une avancée majeure. L'utilisation de plaques « haute performance » avec des phases stationnaires de granulométrie plus fine a permis de meilleures séparations tout en augmentant la reproductibilité.

En CCM, un faible volume d'extrait est déposé sur une plaque chromatographique (plaque en verre ou en aluminium sur laquelle est déposé un adsorbant sur 0.1 à 0.25 mm d'épaisseur) dont la partie inférieure est immergée dans un solvant. Celui-ci monte par capillarité le long de la plaque et entraîne les composés du mélange à des vitesses différentes. Les principaux mécanismes mis en jeu sont la partition et l'adsorption. Ces analytes ainsi séparés sont alors rendus visibles par l'emploi d'un révélateur.

L'analyse s'effectue en trois grandes étapes : le dépôt, l'élution, puis la révélation. Le dépôt peut se faire par capillarité en utilisant un simple capillaire ou une seringue, mais on se sert de plus en plus du dépôt par spray. Pour cela, il est nécessaire d'employer un déposeur adapté qui puisse s'automatiser. Il permet la vaporisation d'un échantillon de façon très précise à l'aide d'un courant d'azote.

La phase stationnaire la plus utilisée est la silice (phase normale), mais depuis une trentaine d'années, des phases greffées (alkyle, amino, cyano... phase inverse) se sont développées et commercialisées. A la phase stationnaire est souvent ajouté un pigment fluorescent pour permettre une détection des produits à la lumière UV (254 nm ou 366 nm). A cette longueur

d'onde, la phase émet une lumière (généralement vert), sauf aux endroits où un produit absorbe le rayonnement UV, ce qui provoque l'apparition de taches sombres.

Les systèmes de migration ont aussi beaucoup évolué. Les cuves en verre sont maintenant remplacées par des systèmes de migration automatisés. Ces instruments permettent le contrôle de tous les paramètres jouant sur l'élution : taux d'humidité relative, temps de saturation et de pré-conditionnement, distance de migration, temps de séchage de la plaque. Cela permet des gains d'efficacité et de reproductibilité. Il est même maintenant possible de réaliser des développements séquentiels en utilisant un mode gradient.

Un autre avantage de la chromatographie sur couche mince est le grand nombre de révélateurs pouvant être utilisés. Les composés colorés sont visibles directement et ceux qui ne le sont pas sont révélés par réaction de dérivation. Le résultat obtenu avec plusieurs révélateurs peut être observé à l'œil, ce qui peut être très utile pour les analyses qualitatives. Le développement des scanners spectrodensitométriques permet une détection plus précise. Il est ainsi possible de détecter les composés qui absorbent dans l'UV-visible ou qui fluorescents, et de réaliser des analyses quantitatives (Fernandez et Chemat, 2012).

## **II.5.2. La chromatographie liquide (HPLC)**

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une technique d'analyse et de quantification d'un grand nombre de molécules. La phase mobile est un solvant ; cette technique est donc adaptée à l'analyse des composés thermolabiles et/ou de masse moléculaire élevée et/ou polaire.

La séparation des analytes est effectuée par l'interaction spécifique de l'analyte avec la phase stationnaire. Ces derniers seront plus ou moins retenus en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (taille, polarité, charge...).

La nature de la phase stationnaire et de la phase mobile liquide est dictée par les propriétés des composés cibles. Le mode de séparation est alors choisi entre l'adsorption, le partage, l'échange d'ions, les paires d'ions ou encore l'exclusion stérique.

Ainsi, on distingue :

-Le/les réservoir(s) de solvant(s) (éluant(s)) qui contiennent la/les phase(s) mobiles ;

-Le système de pompage, généralement équipé d'un dégazeur, et muni d'un système de gradient permettant le réglage de la nature du solvant ou du mélange de solvants. Il permet de travailler selon deux modes :

-le mode isocratique : 100% du même éluant est utilisé durant toute l'analyse,

-le mode gradient : variation de la concentration des constituants du mélange de solvant éluant.

Le système d'injection permet l'introduction de l'échantillon, en solution, dans l'instrument. Pour les injections manuelles, on se sert d'une boucle d'injection dont le volume est généralement de l'ordre de 20  $\mu$ l. ce type de dispositif permet une bonne répétabilité des volumes injectés, donc des analyses quantitatives. Cependant, on recourt de plus en plus à des injecteurs automatiques.

La colonne est le centre de la préparation. C'est un cylindre construit dans un matériau inert aux produits chimiques (généralement, de l'inox), de 10 à 30 cm de longueur et d'un diamètre compris entre 4 et 20 mm. Pour des longueurs supérieures à 30 cm, les pertes de charge seraient trop importantes et nécessiteraient des pressions trop élevées.

Plusieurs types de phases stationnaires peuvent être utilisés, mais les plus importantes sont :

-les phases normales : elles sont composées de gel de silice (très polaire). La phase mobile doit être peu polaire, lors de l'élution. Les composés apolaires éluent en premier alors que les composés polaires sont plus fortement retenus ;

-les phases inverses : elles sont essentiellement composées de silices greffées avec des chaînes alkyles de 8 ou 18 atomes de carbone. C'est une phase apolaire, qui nécessite une phase mobile polaire. L'ordre d'élution est inversé par rapport à la phase normale. Ainsi, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Plusieurs types de détecteurs peuvent être utilisés. Ils permettent de visualiser la séparation. Les plus performants peuvent apporter des informations sur les co-élutions ou la structure des solutés. Il en existe de nombreux, fondés sur des principes différents. Néanmoins, contrairement au FID chromatographie en phase gazeuse, il n'existe pas de détecteurs sensibles et universels.

Le système le plus employé est le détecteur UV-visible. Il est basé sur principe de la spectroscopie UV/visible et nécessite donc que les composés doivent absorber à la longueur d'onde sélectionnée. Le détecteur à barrette de diode (DAD) est plus puissant. Il permet de balayer tout le domaine de l'UV/visible. Ainsi, par analyse spectrale, il est possible d'effectuer des calculs de pureté des pics.

Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) de par son universalité est de plus en plus utilisé dans l'analyse des extraits naturels. Il est basé sur l'évaporation partielle de l'effluent de façon à obtenir un brouillard de particules solides ou liquides du soluté qui traverse un faisceau lumineux. La lumière diffusée sous un angle déterminé est détectée par un photomultiplicateur.

La démocratisation du couplage HPLC/MS a conduit à une utilisation plus importante mais qui reste encore peu répandue dans l'analyse des huiles essentielles (Fernandez et Chemat, 2012).

### **III. Exemples de molécules bioactives isolées de quelques espèces végétales en Algérie**

Picéatannol et l'ampelopsine sont des dérivés de stilbène isolés à partir de la vigne (*Vitis vinifera*) par l'utilisation de deux techniques chromatographiques (la chromatographie liquide haute performance et la chromatographie centrifuge de partage), la caractérisation structurale par résonance magnétique nucléaire (Zga, 2010).

L'épicatéchine isolé à partir des feuilles de *Crataegus oxyacantha* récolté dans la région de Sétif (Algérie) ; ce composé possèdent une activité antiproliférative très élevée contre la lignée cellulaire HeLa (Amor, 2018).

*Myrtus communis* L. est une espèce endémique au Sahara Central. L'analyse détaillée d'un échantillon des HE par la combinaison de techniques chromatographiques et spectroscopiques a montré une composition chimique dominée par le 1,8-cinéole et le limonène. Le 1-hydroxy-1-(3-méthylbutoxy)-2-acétoxy-3, 5, 5-triméthyl-3- cyclopentène et le 1-hydroxy-1-(3-méthyl-2-butenoxy)-2-acétoxy-3, 5, 5-triméthyl-3- cyclopentène sont des molécules inconnues présentées dans cette plante. Ils analysé neuf autres échantillons des HE de *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. récoltés dans deux stations dans le Sud algérien. Les deux molécules cyclopenténiques sont présentes dans tous les échantillons. Ces composés sont plus

abondants dans les plantes provenant de Tamanrasset que dans celles du Tassili. Ces deux molécules pourraient être considérées comme des marqueurs de l'espèce *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. (Bouzabata, 2015).

## Référence

1. Adam K.P., Thiel R., Zapp J. and Becker H. (1998). Involvement of the mevalonic acid pathway and the glyceraldehyde-pyruvate pathway in terpenoid biosynthesis of the liverworts *Ricciocarpos natans* and *Conocephalum conicum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **354**, 181–87.
2. Amer M., Metwalli M. (2000). Topical liquiritin improves melasma. *Int J Dermatol*, **39** : 299-301.
3. Amjad Hossain M. (2005). Neem seed oil: Bangladesh. Examples of the development of pharmaceutical products from medicinal plants. *Bangladesh Council of Scientific and Industrial Research (BCSIR)*. **10**: 59-63.
4. Amor L. (2018). Composition chimique et activités biologiques des extraits de *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae). Thèse de Doctorat. Univ Sétif.
5. Aniszewski T. (1994 a). From iodine to enzyme: A critical review of chemical and biological methods of lupine alkaloids analysis. *Science of Legumes*, **1**: 25–36.
6. Aniszewski T. (2007). Alkaloids – secrets of life alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Elsevier.
7. Aniszewski, T. (1994 b). The biological basis of quinolizidine alkaloids. *Science of Legumes*, **1**: 1–24.
8. Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi. (JORF n°0163 du 17 juillet 2014 page 11922-texte n°26). (<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2014/6/24/ERN1406332A/jo/texte>).
9. Barkovich R., and Liao J. C. (2001). Metabolic engineering of isoprenoids. *Metab. Eng.* **3**: 27–39.
10. Bird D. A., and Facchini P. J. (2001). Berberine bridge enzyme, a key branchpoint enzyme in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis, contains a vacuolar sorting determinant. *Planta* **213**: 888–897.
11. Boutefnouchet S, Champy P, Hennebelle T, Maciuk A.(2014). Comments on EFSA's opinion about the health claim “improvement of bowel function” for hydroxyanthracenic derivatives. *Phytomedicine* ; **21**: 928-30.
12. Bouzabata A. (2015) CONTRIBUTION A L'ETUDE D'UNE PLANTE MEDICINALE ET AROMATIQUE *MYRTUS COMMUNIS* L. Thèse présentée pour

- obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences Médicales. Université Badji Mokhtar Annaba.
13. Brossi A. (1991). Mammalian alkaloids: Conversion of tetrahydroisoquinoline-1-carboxylic acids derived from Dopamine. *Planta Medica*, **57**: S93–S100.
  14. Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier, Paris.
  15. Buckingham J. (2007). Dictionary of Natural Products. Chapman and Hall/CRC, London.
  16. Bulgakov V. P. (2008). Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.* **26**: 318–324.
  17. Bulgakov V. P., Veselova M. V., Tchernoded G. K., Kiselev K. V., Fedoreyev S. A., and Zhuravlev Y. N. (2005). Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene on ramboside and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures. *Planta* **221**: 471–478.
  18. Bynum W. F. (1998). A chronology of medicine and related sciences. *Medical History*, **42**: 541–542.
  19. Bynum W. F. and Porter R. (eds) (1994). Companion Encyclopedia of the History of Medicine. Vol. 1. London and New York: Routledge.
  20. Cardarelli M., Mariotti D., Pomponi M., Spanò L., Carone I., and Costantino P. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 475–480.
  21. Carron T.R., Robbins M.P. et Morris P. (1994). Genetic modification of condensed tannin biosynthesis in *Lotus corniculatus*. I. Heterologous antisense dihydroflavonol reductase down-regulates tannin accumulation in “hairy root” cultures, *Theo. Appl. Genet.* **87**: 1006-1015.
  22. Cartayrade A., Schwarz M., Jaun B. and Arigoni D. (1994). Detection of two independent mechanistic pathways for the early steps of isoprenoid biosynthesis in *Ginkgo biloba*, in Second Symposium of the European Network on Plant Terpenoids. Strasbourg, France.
  23. Chini C., Bilia A. R., Keita A. and Morelli I. (1992). Protoalkaloids from *Boscia angustifolia*. *Planta Medica*, **58**: 476.
  24. Cho JG, Huh J, Jeong RH, Cha BJ, Shrestha S, Lee DG. (2015). Inhibition effect of phenyl compounds from the *Oryza sativa* roots on melanin production in murine B16-F10 melanoma cells. *Nat Prod Res.* **29**(11):1052-4.
  25. Clayden J., Greeves N., Warren S. and Wothers P. (2001). Organic Chemistry. Oxford, New York, Oxford University Press.
  26. Clifford M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden, *J.Sci. Food Agric.* **79**: 362-372.
  27. Coldham I., Pih S. M. and Rabot R. (2005). Dipolar cycloaddition and ring-closing metathesis in the synthesis of the tetracyclic ABCE ring system of manzamine A. *Synlett* **11**:1743–1754.



28. Croteau R., Kutchan T. M., and Lewis N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites), in *Biochemistry and molecular biology of plants*, Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L., eds., American Society of Plant Physiologists (ASPP), Rockville, pp. 1250–1318.
29. Cuvelier M-E., Richard H. et Berset C.(1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosmmary. *J.am.oil Chem. Soc.* **73**: 645-652.
30. Dastidar S.G., Manna A., Kumar K.A., Mazumdar K., Dutta N.K., Chakrabatary A.N., Motohashi N. et Shirataki Y. (2004). Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *International Journal of Antimicrobial Agents.* **23**: 99-102.
31. Dde la Charie T. (2019). *Se soigner par les huiles essentielles: Pourquoi et comment ça marche ? Monaco: Editions du Rocher.*
32. Dewick P.M. (2002). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*, 2nd edn. Wiley, New York.
33. Facchini P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **52**: 29–66.
34. Faucon M. (2015). *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : fondements & aide à la prescription.* Sang de la terre; 557 p.
35. Fernandez X., and Chemat F. (2012). *La chimie des huiles essentielles : Tradition et innovation*, Vuibert. Paris.
36. Franchomme P.(2015). *La science des huiles essentielles médicinales.* Guy Trédaniel; 580 p.
37. Furukawa M., Makino M., Uchiyama T., Ishimi K., Ichinone Y. and Fujimoto Y. (2002). Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry*, **59**(7): 767–777.
38. Giddings J.C., (2002). *Dynamics of Chromatography: Principles and Theory.* CRC Press.
39. Giusti M.M. and Wrolstad R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UVvisible spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*
40. Gomord V, Sourrouille C, Fichette AC, *et al.* (2004). Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. *Plant Biotechnol J.*; **2**: 83-100.
41. Goossens, A., and Rischer, H. (2007). Implementation of functional genomics for gene discovery in alkaloid producing plants. *Phytochem. Rev.* **6**: 35–49.
42. Grob R.L., (2004). *Theory of gas chromatography.* Mod. Pract. Gas Chromatogr. 4th Edn Wiley Hoboken 25–65.
43. Guignard J-L. (2000). *Biochimie végétale.* Edition Dunod, Paris. 274p.
44. Haman M., Pellerin F., Guernat M. et Mahuzier G. (1990). *Méthodes spectrales et analyse organique.* 2<sup>e</sup> édition. Masson, Paris.
45. Hanahan D, Weinberg RA. (2001). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **100** : 57-70.
46. Harborne J.B. (1988). *The flavonoids-Advences in research since 1980*, Chapman and Hall, New York, 621p.

47. Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**: 2831–2846.
48. Hasunuma T., Miyazawa S., Yoshimura S., Shinzaki Y., Tomizawa K., Shindo K., Choi S., Misawa N., and Miyake C. (2008). Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J.* **55**: 857–868.
49. Jennewein S. and Croteau, R. (2001). Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**: 13–9.
50. Jones K., Hughes J., Hong M., Jia Q., Orndorff S.(2000). Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of tyrosinase. *Pigment Cell Res*, **15**: 335-340.
51. Jorgensen K., Rasmussen A.V., Morant M., Nielsen A.H., Bjanrholt N., Zagrobelny M., Bak S. and Moller B.L. (2005). Metabolon formation and metabolic channeling " in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**: 280–91.
52. Kingston D.G. and Newman D.J. (2007). Taxoids: cancer-fighting compounds from nature. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **10**, 130–44.
53. Koskinen A. (1993). *Asymmetric Synthesis of Natural Products*. Chichester – NewYork: John Wiley & Sons.
54. Krausz P., Benhaddou R.et Granet R. (2008). Mini manuel de chimie organique. Dunod, Paris.
55. Krzaczkowski L., Wright M., Gairin JE. (2008). Les Bryophytes, source potentielle de médicaments de demain? *Med Sci (Paris)*; **24**: 947-53.
56. Kutchan T.M. (2005). A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**: 292–300.
57. Lamarti A., A. Badoc A. , G. Deffieux G., J.-P. Carde J.P. (1994) BIOGÉNÈSE DES MONOTERPÈNES II - La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **133** : 79 – 99.
58. Laskaris G., Van Der Heijden R. and Verpoorte R. (2000). Purification and partial characterisation of geranylgeranyl diphosphate synthase, from *Taxus baccata* cell cultures. An enzyme that regulates taxane biosynthesis. *Plant Sci.*, **153**: 97–105.
59. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y. (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7292-7295.
60. Lerda M., Guenther A. and Monson R. (1997) Plant production and emission of volatile organic compounds. *Bioscience*, **47**, 373–83.
61. Li Z.-S., Zhao Y. and Rea P.A. (1995) Magnesium adenosine 5 –triphosphate energized transport of glutathione-S-conjugates by plant vacuolar membrane vesicles. *Plant Physiol.*, **107** : 1257–68.
62. Lião L. M. (2003). Sesquiterpene pyridine alkaloids. In: *The Alkaloids*. Vol. 60 (Cordell, G., ed.), pp. 287–343. Elsevier. New York: Elsevier.
63. Lichtenthaler H.K. (2000). Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.*, **28**: 785–9.
64. Lichtenthaler H.K. (2007). Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, alpha-tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynth. Res.*, **92**: 163–79.

65. Lichtenthaler H.K., Schwender J., Disch A. and Rohmer M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.*, **400**: 271–4.
66. Linton K.L. (2006). Structure and function of ABC transporters. *Physiology*, **22**: 122–30.
67. Loreto F., Forster A., Durr M., Csiky O. and Seufert G. (1998). On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* (L.) fumigated with selected monoterpenes. *Plant Cell Environ.*, **21**: 101–7.
68. Lu S., Xu R., Jia J. W., Pang J., Matsuda S. P. T., and Chen X. Y. (2002). Cloning and functional characterization of a beta-pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant Physiol.* **130**: 477–486.
69. Lyons L. et Nambiar D. (2005). Un guide des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH. CATIE. 60P.
70. Macheix J.J. (1996). Les composés phénoliques des végétaux : quelles perspectives à la fin du XX<sup>e</sup> siècle, *Acta Bot. Gallica* **143** : 473-479.
71. Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes.
72. Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P. (2005). Les composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et rôles. In : les polyphénols en agroalimentaire, Cheynier V., Sarni-Manchado P., eds, Tec and Doc, Lavoisier, Paris.
73. Maliga P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **55**: 289–313.
74. Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K. and Amrhein N. (1993). ATP dependent glutathione-S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, **364**: 247–9.
75. Memelink J. (2005). The use of genetics to dissect plant secondary pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**: 230–35.
76. Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R. et Krishana D.R. (2001). Bioflavonoïdes classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. **33**: 2-16.
77. Nasipuri R. and Ramstad E. (2006). Isolation of daphnetin-8-glucoside from *Daphne papyracea*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **62**: 1359–60.
78. Nerya O., Vaya J., Musa R., Izrael S., Ben-arie R., Tamir S. (2003). Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J Agric Food Chem*, **51**:1201-1207.
79. Nobile V., Michelotti A., Cestoune E., Caturla N., Castillo J., Benavente-Garcia O. (2016). Skin photoprotective and antiageing effects of a combination of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and grape fruit (*Citrus paradisi*) polyphenols. *Food Nutr Res.* **1**: 60-31871.
80. OMS (Organisation mondiale de la Santé). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle. WOH/TRM/2000 ; annexe II : 31-35.

81. Pasquali G., Porto D. D., and Fett-Neto A. G. (2006). Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to an old dilemma. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 287–296.
82. Pelletier S. W. (1983). The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids. Chemical and Biological Perspectives. Vol. One* (Pelletier, S. W., ed.), pp. 1–31. New York: John Wiley & Sons.
83. Petersen M. (2007). Current status of metabolic phytochemistry. *Phytochemistry*, **68**: 2847–60.
84. Rao K. V., Kasanah N., Wahyuono S. U., Tekwani B. L., Schinazi R. F. and Hamann M. T. (2004). Three new manzamine alkaloids from a common Indonesian sponge and their activity against infections and tropical parasitic diseases. *Journal of Natural Products*, **67**(8): 1314–1318.
85. Rao K. V., Santarsiero B. D., Mesecar A. D., Schinazi R. F., Tekwani B. L. and Hamann M. T. (2003). New manzamine alkaloids with activity against infectious and tropical parasitic diseases from an Indonesian sponge. *Journal of Natural Products*, **66**(6): 823–828.
86. Rea P.A. (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **58**: 347–75.
87. Richter, G., (1993). *Métabolisme des végétaux: Physiologie et biochimie*. Edition Presses Polytechniques et Universitaires Romandes : 318-338.
88. Robbins M.P., Bavage A.D., Strudwicke C. et Morris P. (1998). Genetic manipulation of condensed tannins in higher plants. *Plant Physiol.* **116**:1133-1144.
89. Robbins M.P., Paolucci F., Hughes J.W., Turchetti V., Allison G., Arcioni S., Morris P. et Damiani F. (2003). Sn, a maize bHLH gene, modulates anthocyanin and condensed tannin pathways in *Lotus corniculatus*, *J. Exp. Bot.* **54**:239-248.
90. Rouessac F. et Rouessac A. (2004) *Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. 6<sup>e</sup> édition, Dunod, Paris.
91. Saint-Jore-Dupas C, Faye L, Gomord V. (2007). From planta to pharma with glycosylation in the toolbox. *Trends Biotechnol*; **25**: 317-23.
92. Santos-Buelga C., Scalbert A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health, *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1094-1117.
93. Sasaki K., Saito T., Lamsa M., Oksman-Caldentey K.M., Suzuki M. and Ohyama K. (2007). Plants utilize isoprene emission as a thermotolerance mechanism. *Plant Cell Physiol.*, **48**: 1254–62.
94. Schafer H. and Wink M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in “ recombinant microorganisms or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnological Journal* **4**: 1684–1703.
95. Schwartz S.H., Tan B.C., Gage D.A., Zeevaart J.A.D. and McCarty D.R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by vp14 of maize. *Science*, **276**: 1872–4.
96. Sevon N., and Oksman-Caldentey K. M. (2002). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med.* **68**: 859–868.

97. Shirota O., Sekita S., Satake M., Morita H., Takeya K. and Hokawa H. (2004). Two new sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chuchuhuasca*. *Heterocycles*, **63**(8): 1981.
98. Shkryl Y. N., Veremeichik G. N., Bulgakov V. P., Tchernoded G. K., Mischenko N. P., Fedoreyev S. A., and Zhuravlev Y. N. (2008). Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnol. Bioeng.* **100**: 118–125.
99. Singh N., Luthra T., Sangwan R.S., Thakur R.S. (1990). Metabolism of monoterpenoids in aromatic plants. *Curr. Res. Med. Aromat. Plants*, **11**: 174-196.
100. Suzuki S. and Umezawa T. (2007). Biosynthesis of lignans and norlignans. *J. Wood Sci.*, **53**: 273–84.
101. Terasaka K., Shitan N., Sato F., Maniwa F., Ueda K. and Yazaki Y. (2003). Application of vanadate-induced nucleotide trapping to plant cells for detection of ABC proteins. *Plant Cell Physiol.*, **44**: 198–200.
102. Thomas S.G., Rieu I. and Steber C.M. (2005). Gibberellin metabolism and signaling. *Vitam. Horm.*, **72**: 289–338.
103. Verbois S. (2015). La phytothérapie. Éditions Eyrolles. Paris.
104. Verma D., and Daniell H. (2007). Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiol.* **145**: 1129–1143.
105. Viitainen P. V., Devine A. L., Khan M. S., Deul D. L., Van Dyk D. E., and Daniell H. (2004). Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Escherichia coli ubiC* gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for *p*-hydroxybenzoic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* **136**: 4048–4060.
106. Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T., (2008). Thin layer chromatography in phytochemistry. CRC Press.
107. Waller G. R. and Nowacki E. K. (1978). Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. New York – London: Plenum Press.
108. Wilson C.L., Solar J.M., El Ghaouth A. et Wisniewski M.E. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis.* **81**: 204-210.
109. Wink M. (1997). Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Adv. Bot. Res.*, **25**: 141–69.
110. Wink M. (2007). Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections, in *Advances in Phytomedicine*, Vol. 3: *Naturally Occurring Bioactive Compounds* (eds C. Rai and M. Carpinella). Elsevier, Amsterdam, pp. 251–68.
111. Wink M. (2007). Molecular modes of action of cytotoxic alkaloids – from DNA intercalation, spindle poisoning, topoisomerase inhibition to apoptosis and multiple drug resistance, in *The Alkaloids* (ed. G. Cordell), Vol. 64. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–48.
112. Wink M. (2008 b). Evolutionary advantage and molecular modes of action of multicomponent mixtures used in phytomedicine. *Curr. Drug Metab.*, **9**: 996–1009.
113. Wink M. (2008a). Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Nat. Prod. Commun.* **3**: 1205–16.

114. Wink M. (2010). *Annual Plant Reviews*, Vol. 39: Function and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites, 2nd edn. Wiley-Blackwell, Oxford.
115. Wink M. (2010). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Second Edition, Wiley-Blackwell.
116. Wink M. and Roberts M.F. (1998). Compartmentation of alkaloid synthesis, transport and storage, in *Alkaloids: Biochemistry, Ecological Functions and Medical Applications* (eds M.F. Roberts and M. Wink). Plenum, New York, pp. 239–62.
117. Winkel B.S.J. (2004). Metabolic channelling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**: 85–107.
118. Winkler J. D., Londregan A. T., Ragains J. R., and Hamann M. T. (2006). Synthesis and biological evaluation of manzamine analogues. *Organic Letters*, **8**(15): 3407–3409.
119. Wu S., and Chappell J. (2008). Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**: 145–152.
120. Wysocki W., Gulewicz P., Aniszewski T., Ciesiołka D. and Gulewicz K. (2001). Bioactive preparations from alkaloid-rich lupin. Relation between chemical composition and biological activity. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Biological Sciences*, **49**: 9–17.
121. Xe X. S., Tadic D., Brzostowska M., Brossi A., Bell M. and Creveling C. (1991). Mammalian alkaloids – Synthesis and O-methylation of (S)-3'-hydroxycoclaurine and R-3'-hydroxycoclaurine and their N-methylated analogs with S-adenosyl-L-[methyl-C-14] methionine in presence of mammalian catechol O-methyltransferase. *Helvetica Chimica Acta*, **74**: 1399–1411.
122. Xie L.P., Chen Q.X., Huang H., Wang H.Z., Zhang R.Q. (2003). Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry (Mosc)*, **68**: 487-491.
123. Yazaki K. (2005). Transporters of secondary metabolites. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**: 301-307.
124. Yazaki K. (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett.*, **580**: 1183–91.
125. Youns M., Efferth T., Reichling J., Fellenberg K., Bauer A. and Hoheisel J.D. (2009). Gene expression profiling identifies novel key players involved in the cytotoxic effect of Artesunate on pancreatic cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 273–83.
126. Yousaf M., Hammond N. L., Peng J. N., Wahyono S., MsIntosh K. A., Charman W. N., Mayer A. M. S. and Hamann M. T. (2004). New manzamine alkaloids from an indolo-pacific sponge. Pharmacokinetics, oral availability, and the significant activity of several manzamines against HIV-I, AIDS opportunistic infections, and inflammatory diseases. *Journal of Medical Chemistry*, **47**(14): 3512–3517.
127. Zenk M.H. and Juenger M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, **68**: 2757–72.

- 128.** Zga N. (2010) Purification et identification de polyphenols stilbeniques presents dans la vigne. Thèse de Doctorat, UNIV BADJI MOKHTAR- ANNABA.
129. Zhu J. B., Wang M. G., Wu W. J., Ji Z. Q., and Hu Z. N. (2002). Insecticidal sesquiterpenepyridine alkaloids from *Euonymus* species. *Phytochemistry* **61**(6): 699–704.
- 130.** Zhu W., Gao J. (2008). The Use of Botanical Extracts as Topical Skin-Lightening Agents for the Improvement of Skin Pigmentation Disorders. *J Investig Dermatol Symp Proc.*; **13**(1): 20-4.