

Université de POITIERS
Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année 2014

Thèse n°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 septembre 2014 à POITIERS

Par Mademoiselle MILADI Ines

Née le 14 août 1986

Etude phytochimique de *Nitraria retusa* Asch.
Recherche de composés azotés

Composition du jury :

Président : Monsieur le Professeur LEVESQUE Joël

Membres : Madame MARIVINGT-MOUNIR Cécile, Maître de conférences

Monsieur BENIDDIR Mehdi, Maître de conférences

Directeur de thèse : Madame MARIVINGT-MOUNIR Cécile



PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- JOUANNETAUD Marie-Paule, Chimie Thérapeutique
- LEVESQUE Joël, Pharmacognosie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwine, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- LILWALL Amy

Remerciements

Cette thèse d'exercice a été effectuée à la suite de travaux qu'il m'a été possible de réaliser lors de mon stage de master 2 au sein du laboratoire BioCIS-CNRS. Je remercie à ce titre le Docteur Bruno Figadere, le Professeur Erwan Poupon et le Professeur Pierre Champy pour m'avoir permis de réaliser ce projet.

Je remercie le Professeur Joël Levesque pour l'honneur qu'il me fait de présider cette thèse en ce jour.

En témoignage de ma gratitude pour les enseignements en pharmacognosie qu'il m'a été possible de recevoir.

Veillez trouver l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Cécile Marivingt-Mounir, qui me fait l'honneur d'être ma directrice de thèse, pour son engagement infailible, ses conseils et sa bienveillance à toute épreuve.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie le Docteur Mehdi Beniddir qui m'a encadré et me fait le plaisir d'être membre de ce jury, pour son total investissement, ses conseils et sa patience. Il est de ces hommes qui donnent confiance, façonnent l'excellence et transmettent le savoir.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde admiration.

Je remercie également mes professeurs et mes encadrants de stages, pour vos enseignements et le partage de votre savoir tout au long de mes études.

Veillez trouver l'expression de mon profond respect.

Je tiens à remercier affectueusement mon entourage :

Mon compagnon, Jérémy. Toi qui me portes et me supports à travers les épreuves et ce depuis le début de mes études de Pharmacie. Ton amour fait ma force.

Mes amis, présents dans les moments de joie comme de peine. A tous, présents aujourd'hui par le corps ou par l'âme. Votre amitié m'a permis d'avancer.

Ma famille, ma grand-mère et mes proches disparus qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici.

Enfin, je dédie ce modeste travail à ma mère. Mon air, ma terre, mon feu et mon eau, tu es l'élément de ma vie.

Tables des matières

Remerciements	
Tables des matières	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	3
Liste des abréviations	4
Introduction générale	5
I. Partie bibliographique : Extraction et produits naturels des plantes du genre <i>Nitraria</i>.	7
Introduction	7
<i>Nitrariaceae</i> Lindl	7
Répartition géographique	9
Morphologie de <i>Nitraria retusa</i>	9
1 Phytochimie des espèces étudiées	11
1.1 Les polyphénols	11
1.2 Les alcaloïdes	13
1.2.1 Alcaloïdes de <i>Nitraria tangutorum</i>	14
1.2.2 Alcaloïdes de <i>Nitraria sibirica</i>	14
1.2.3 Alcaloïdes de <i>Nitraria schoberi</i>	15
1.2.4 Alcaloïdes de <i>Nitraria komarovii</i>	16
2 Méthodes d'extractions relatives au genre <i>Nitraria</i> (2008 à 2013)	18
2.1 Extraction des Polyphénols	18
2.2 Extraction alcaloïdique	18
3 Etudes biologiques et utilisations médicinales	19
3.1 Activités biologiques	19
3.2 Utilisations en médecine traditionnelle	20
Conclusion	21
II. Etude chimique de <i>Nitraria retusa</i>	22
Introduction	22
1 Extractions, isollements et purifications	22
1.1 Matériel végétal	22
1.2 Extraction et isolement	22
2 Travaux personnels	24
2.1 Détermination structurale	24
2.1.1 Composé 1 : (+)- <i>epi</i> -syringarésinol	24
2.1.2 Composé 2 : acide <i>para</i> aminobenzoïque	29
2.1.3 Composé 3 : acide 4-amino 3-méthoxybenzoïque	32
2.2 Fiches produits	35
Discussion	38
Conclusion et perspectives	39

III. Partie expérimentale	41
1 Procédures générales	41
1.1 Solvants	41
1.2 Fractionnements, purifications et suivi d'extractions	41
1.2.1 Chromatographie sur couches minces (CCM)	41
1.1.1 Chromatographie sur colonne (CC)	41
1.1.2 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	41
1.1.2.1 CLHP en phase inverse	41
1.1.1.1 CLHP-SM	42
1.2 Analyses physiques et spectrales	42
1.2.1 Spectrométrie de masse (SM)	42
1.2.2 Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$	42
1.2.3 Spectrométrie ultra-violet (UV)	43
1.2.4 Spectrométrie infra-rouge (IR)	43
1.2.5 Résonance magnétique nucléaire (RMN)	43
2 Protocoles d'extractions, purifications de <i>Nitraria retusa</i> Asch.	43
2.1 Extractions	43
2.2 Purifications	45
2.2.1 Purifications de l'extrait brut alcaloïdique	45
2.2.2 Purifications de l'extrait brut dichloro-butanolique	46
Références bibliographiques	48
Annexes	52
Glossaire	58
Résumé	60
Mots clés	60
Serment de Galien	61

Liste des figures

Figure 1: Arbre Phylogénétique des Nitrariaceae Lindl. selon la classification APGIII (2009)	8
Figure 2 : carte de la répartition mondiale des Nitrariaceae [48]	9
Figure 3: gravure de <i>Nitraria retusa</i> [49]	9
Figure 4: photo de Philippe Geniez	10
Figure 5: diagramme floral de <i>Nitraria retusa</i> [50]	10
Figure 6 : chromatogramme CLHP de F7'	23
Figure 7 : spectre de masse de F7'	24
Figure 8: Structure du composé 1, epi-syngarésinol (37)	24
Figure 9 : Spectre RMN 1H du composé 1 (37) (CD3OD-d4, 400 MHz)	25
Figure 10 : Spectre RMN 13C JMOD du composé 1 (37) (CD3OD-d4, 100 MHz)	26
Figure 11 : Principales corrélations HMBC et COSY du composé 1 (37)	27
Figure 12 : principales corrélations NOESY du composé 1 (37)	28
Figure 13 : Structure du composé 2, acide para aminobenzoïque (38)	29
Figure 14 : spectre RMN 1H du composé 2 (38) (CD3OD-d4, 300 MHz)	30
Figure 15 : spectre RMN 13C JMOD du composé 2 (38) (CD3OD-d4, 100 MHz)	30
Figure 16 : Principales corrélations HMBC et COSY du composé 2 (38)	31
Figure 17 : Structure du composé 3 : acide 4-amino 3-méthoxybenzoïque (39)	32
Figure 18 : spectre RMN 1H du composé 3 (39) (D3O-d4, 300 MHz)	33
Figure 19 : spectre RMN 13C JMOD du composé 3 (39) (D3O 100 MHz)	33
Figure 20 : Principales corrélations HMBC et COSY du composé 3 (39)	34
Figure 21 : gradient CLHP-préparative F.7	42
Figure 22 : gradient CLHP-préparative F.7'	42
Figure 23 : schéma d'extraction de <i>Nitraria retusa</i>	44
Figure 24 : schéma de purifications de l'extrait alcaloïdique	45
Figure 25 : Chromatogramme CLHP-préparative de la fraction F5	45
Figure 26 : Chromatogramme CHLP-préparative de la fraction F7	46
Figure 27 : Schéma de purification de la fraction F7'	46
Figure 28 : Chromatogramme CLHP-préparative de F7'	47
Figure 29 : schéma d'extractions et purifications de <i>Nitraria retusa</i> , voir annexe 3	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : récapitulatif des Flavonoïdes présents dans chaque espèce de <i>Nitraria</i>	11
Tableau 2 : récapitulatif des Alcaloïdes présents dans chaque espèce de <i>Nitraria</i>	13
Tableau 3 : Données RMN du composé 1 (37) (CD3OD-d4, 400 MHz)	26
Tableau 4 : Données RMN composé 2 (38) (CD3OD-d4, 400 MHz)	31
Tableau 5 : Données RMN du composé 3 (39) (D2O-d2, 400 MHz)	34
Tableau 6 : déplacements chimiques des solvants utilisés	43

Liste des abréviations

Ara	arabinose
CC	chromatographie sur colonne
COSY	COrrrelated spectroscopY (Corrélations homonucléaires)
D	doublet
DCM	Dichlorométhane
Dd	Doublet dédoublé
Gal	galactose
Glc	glucose
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
Hz	Hertz
L/L	liquide/liquide
MAO	Monoamine oxydase
MeOH	méthanol
MHz	méga Hertz
Min	minutes
n-BuOH	n-butanol
NO	monoxyde d'azote
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (corrélations hétéronucléaires)
PKDO	Diamine oxydase du rein de porc
Rdt	rendement
Rha	rhamnose
RMN	résonance magnétique nucléaire
Rut	rutoside
S	singulet
Sl	singulet large
Xyl	xylose

Introduction générale

L'histoire de l'Humanité a toujours été en étroite relation avec la nature et ses 2 produits. L'Homme évolue dans son environnement en s'appuyant sur les végétaux qui l'entourent et ce depuis ses premiers balbutiements. L'utilisation et les connaissances associées aux plantes ont permis de subvenir aux besoins primaires de l'Homme mais aussi à la construction des civilisations.

Les plantes se révèlent être la base de l'alimentation et du soin, depuis les débuts de l'agriculture Néolithique (9000-7000 avant J. C.), période de sédentarisation de l'Homme nomade, à nos jours, ère de consommation et de médecine moderne.

Les premiers vestiges relatant d'une pharmacopée remontent au troisième millénaire avant notre ère, avec les tablettes sumériennes retrouvées à Nippur, en Mésopotamie. Ces recueils de plantes médicinales, relatés par un médecin, livrent plus de mille remèdes ainsi que leur préparation dont certains perdurent à notre époque ¹.

Aux tablettes de céramiques mésopotamiennes succédèrent des textes égyptiens comme les papyrus Eber, du nom de l'égyptologue Georg Eber les ayant acquis (1873), datant de 1500 avant J.C. et décrivant plus de sept cents plantes dans plus de huit cents formules réparties sur vingt mètres de papyrus ².

Ainsi des plantes comme l'aloès (*Aloe vera* L.) ou encore le fenouil (*Anethum foeniculum* L.) étaient déjà connus par ces peuples antiques et utilisés pour leurs propriétés thérapeutiques ³.

D'autres civilisations ont marqué l'histoire de la médecine et la pharmacopée. Ainsi les premières traces d'écrits consacrés aux traitements des maladies ont été découvertes en Chine en 1973. Le Wu Shi Er Bing Fang (Prescriptions pour Cinquante-deux maladies) datant d'environ 1100 avant J. C. est la première compilation de *materia medica* chinoise. Il décrit cinquante-deux ordonnances pour autant de maladies et deux cent quarante-sept remèdes ⁴.

Les avancées majeures se poursuivent durant l'Antiquité gréco-romaine. En effet, Discoride, médecin grec, nous livre vers soixante après J. C. des écrits de références, les cinq livres de « *De Materia Medica* ». Il y relate l'utilisation médicale de quelques neuf cents substances. Il fait une description précise de six cents plantes médicinales, en ajoutant leurs méthodes de récolte, leurs vertus et finalise son analyse par des essais sur des soldats ou sur lui-même ⁵.

Galien quant à lui est considéré comme l'un des pères de la pharmacie, il est le disciple d'Hippocrate et reprend ses travaux sur les humeurs. Il nous laisse « *Des Médicaments* », un ouvrage de référence où il cite de nombreux médicaments analgésiques d'origine végétale.

¹ J. K. Borchardt, "The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine.," *Drug News Perspect.*, vol. 15, no. 3, pp. 187–192, Apr. 2002.

² E. Kremers and G. Sonnedecker, *Kremers and Urdang's History of Pharmacy*. 1986, p. 571.

³ J. Fleurentin, J.-M. Pelt, and G. Mazars, "Pharmacopée du Proche-Orient Antique," in *Des sources du savoir aux médicaments du futur*, S. française d'ethnopharmacologie IRD Éditions, Ed. IRD Éditions, 2002, pp. 55–56.

⁴ [https://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/v1-499.html#Wu Shi Er Bing Fang](https://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/v1-499.html#Wu%20Shi%20Er%20Bing%20Fang)
A. Y. Leung, « Chinese medicals », 1990.

⁵ <http://www.medarus.org/Medecins/MedecinsTextes/dioscoride.htm>, 20/08/2014.

L'impact du monde arabe sur la médecine moderne et le développement des remèdes n'est pas négligeable.

En effet la transmission du savoir de gréco-romain a été possible par la traduction des textes en Arabe au moyen-âge. Ainsi Avicennes (980-1038), grand médecin de l'époque arabo-musulmane se servira de cet héritage et le l'enrichira ⁶.

Ibn al Baytar, botaniste et médecin herboriste du 13^e siècle, centre son traité des simples sur la botanique et la pharmacologie. Dans la lignée des Textes de Galien et de Discoride, il relate mille quatre cents drogues dont plus de trois cents nouvellement décrites ⁷.

De nos jours, vingt mille plantes sont reconnues pour leurs vertus médicinales dont environ mille deux cents répertoriées dans la pharmacopée courante parmi les deux cent cinquante mille espèces végétales recensées. On estime que 60 % des médicaments présents sur le marché sont issus ou dérivés de matières végétales. Malgré cela, seulement deux mille à trois mille espèces ont fait l'objet d'études phytochimiques et pharmacologiques. Le monde végétal reste donc un vaste domaine prometteur sur le plan thérapeutique.

La pharmacognosie est une discipline qui s'attache à l'étude et à l'enseignement des sources des drogues naturelles d'origine végétale, animale et minérale et de leurs principes actifs.

L'étude des plantes médicinales et la recherche de nouveaux principes actifs requièrent de nombreuses connaissances allant de la botanique à la phytochimie en passant par la chimiotaxonomie.

Cette quête est orientée par l'étude des médecines traditionnelles et empiriques des peuples autochtones. Ces informations sont recueillies par l'ethnopharmacologue aidé de l'ethnobotaniste pour la reconnaissance des plantes. La zoopharmacologie permet d'affiner les recherches en observant le comportement, souvent révélateur, des animaux face à certaines plantes. L'étude des interactions entre les plantes et leur environnement ou entre les plantes et les insectes donne aussi de nombreuses indications.

Mais le chemin est long pour trouver une substance d'intérêt puisqu'on estime qu'une molécule est retenue pour dix mille composés criblés.

C'est dans ce cadre ethnopharmacologique que s'inscrit ce manuscrit. Il propose une étude phytochimique d'une plante égyptienne reconnue empiriquement pour ces propriétés médicinales.

Cette étude comporte une première partie bibliographique faisant l'état des lieux des connaissances actuelles du genre *Nitraria* aussi bien du point de vue phytochimique que du point de vue thérapeutique.

La seconde partie, décrit des procédures expérimentales générales et des protocoles utilisés pour l'étude phytochimique de *Nitraria retusa* Asch.

La troisième partie expose les résultats des travaux personnels et se termine par une conclusion dressant l'apport de ces travaux et les perspectives associées.

⁶ G. Lazothes, *Sciences humaines et sociales. l'homme, la société et la médecine*. 2004, pp. 177–179.

⁷ A. M. Cabo Gonzalez, "Ibn al-Baytār et ses apports à la botanique et à la pharmacologie dans le Kitāb al-Ġāmī," *Medievales*, vol. 16, no. 33, pp. 23–39, 1997.

I. Partie bibliographique : Extraction et produits naturels des plantes du genre *Nitraria*.

Introduction

Nitrariaceae Lindl

Etablir un arbre phylogénétique est souvent complexe car les classifications sont discutées et les débats sont nombreux à ce sujet. Plusieurs méthodes de construction de ces arbres se confrontent et donnent naissance à des classifications divergentes.

Avec le temps les critères morphologiques et génétiques utiles à cette classification s'affinent et par conséquent bouleversent l'ordre établi.

Ainsi les *Nitrariaceae* appartenaient auparavant à la famille des *Zygophyllaceae* selon la classification de Cronquist (1981) qui prenait en compte des critères morphologiques, anatomiques et chimiques. Ils sont désormais classés dans l'ordre des Sapindales, d'après l'APGIII (Angiosperms Phylogeny Group III de 2009) qui se base principalement sur des critères génétiques. L'APG est désormais la classification de référence. [1]

D'autres méthodes comme l'UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), technique se basant sur un algorithme mathématique, propose une classification regroupant dans un même phénon les genres *Peganum*, *Nitraria* et *Seetzenia* et éclatant ainsi les *Zygophyllaceae* en trois phénons. [2]

Le système adopté par J. L. Reveal place les *Nitrariaceae* and *Tetradiclidaceae* dans l'ordre des Sapindales. [3] Néanmoins, il remet en question l'APG III, la jugeant peu précise au niveau de certains clades et rangs et propose une réorganisation en rangs taxonomiques. Ainsi, les *Peganaceae* se retrouve dans la famille des *Tetradiclidaceae* rendant plus étroite la famille des *Nitrariaceae*.

Selon L'APG III, la famille des *Nitrariaceae* est une petite famille qui inclut les *Peganaceae* Tiegh. et *Tetradiclidaceae* Takht. Ce changement d'ordre se fonde sur des données morphologiques, anatomiques et génétiques confirmant la proximité de cette famille avec les Sapindales.

La famille des *Nitrariaceae* se divise en quatre genres, *Peganum* L., *Malacocarpus* Fisch & C.A. Mey., *Tetradiclis* Steven et *Nitraria* L..[1][4]

On dénombre dans le genre *Nitraria* seize espèces, toutes sont de petits arbustes succulents souvent épineux et halophytes. Notons que *Nitraria sericea* Jaub. et Spach. est parfois pris comme synonyme de *Nitraria retusa* Asch.

La Figure 1 illustre la classification que propose actuellement l'APG III pour les *Nitrariaceae*.

Arbre Phylogénétique des
Nitrariaceae Lindl. selon APGIII

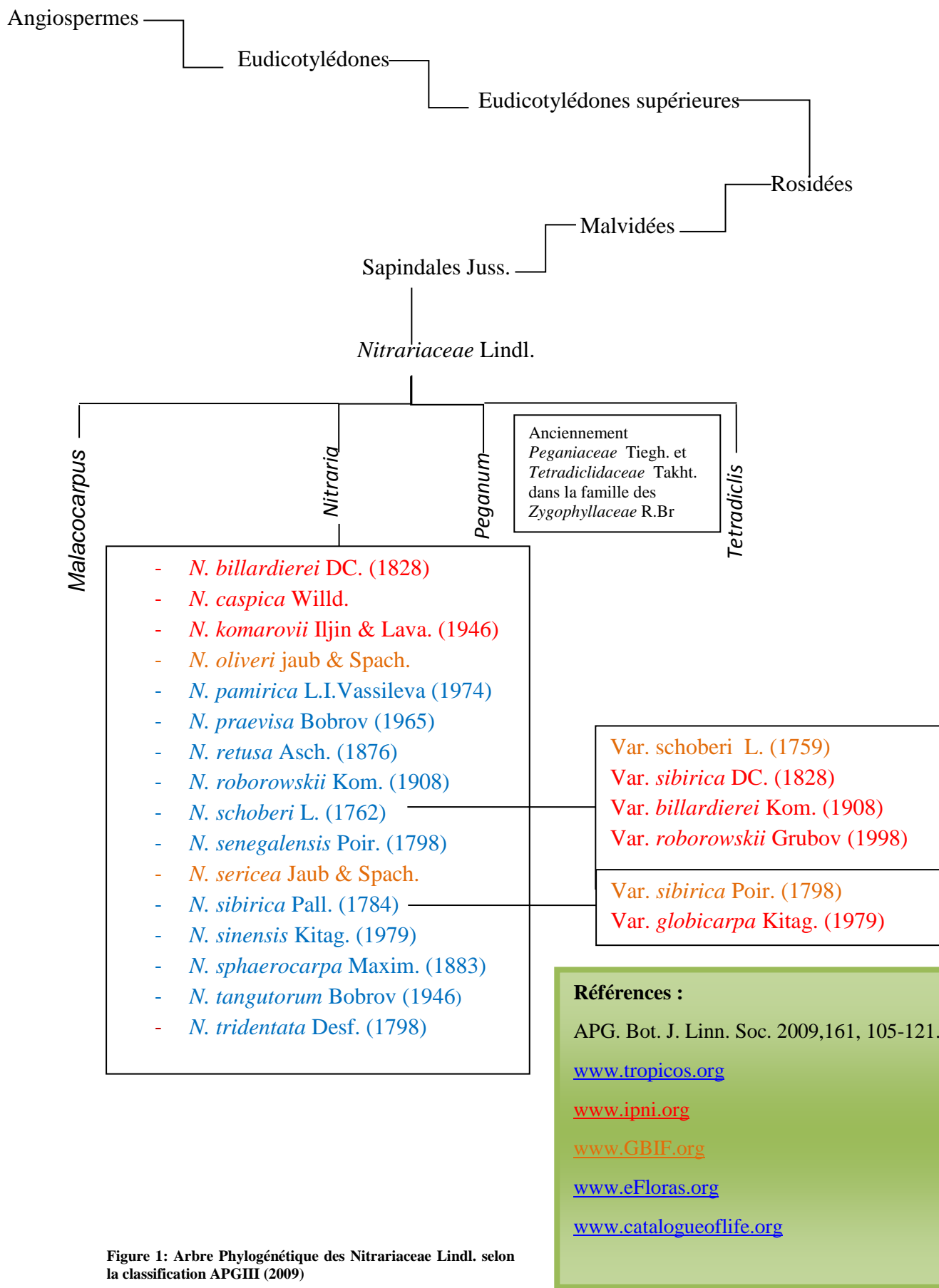


Figure 1: Arbre Phylogénétique des *Nitrariaceae* Lindl. selon la classification APGIII (2009)

Répartition géographique

Cette famille d'arbustes et d'herbacées xérophytes se distribue dans les zones tropicales et subtropicales du Nord de l'Afrique à la Péninsule Arabique, du Sud- Est de l'Europe à l'Asie Centrale, du Sud- Est du Texas au Nord de Mexico et se retrouve aussi au Sud de l'Australie. Leur répartition botanique s'étend donc sur les régions Holarctique, Paléotropicale et Australienne comme le présente la Figure 2.[4][5]



Figure 2 : carte de la répartition mondiale des *Nitrariaceae* [48]

Morphologie de *Nitraria retusa*

Le genre *Nitraria* se compose de petits arbustes et d'herbacées xérophytes, phanéropytes poussant dans les déserts salins. Ce sont des plantes hermaphrodites (monoïques monoclines) au feuillage caduc.

Nitraria retusa (Figure 3) est un arbuste épineux, très rameux de couleur vert-glaucque mesurant entre 0,5 et 1,5 m mais pouvant mesurer jusqu'à 4-5 m de hauteur.

Il croît principalement dans les régions désertiques sablonneuses du bassin méditerranéen et de la péninsule arabique. [5]

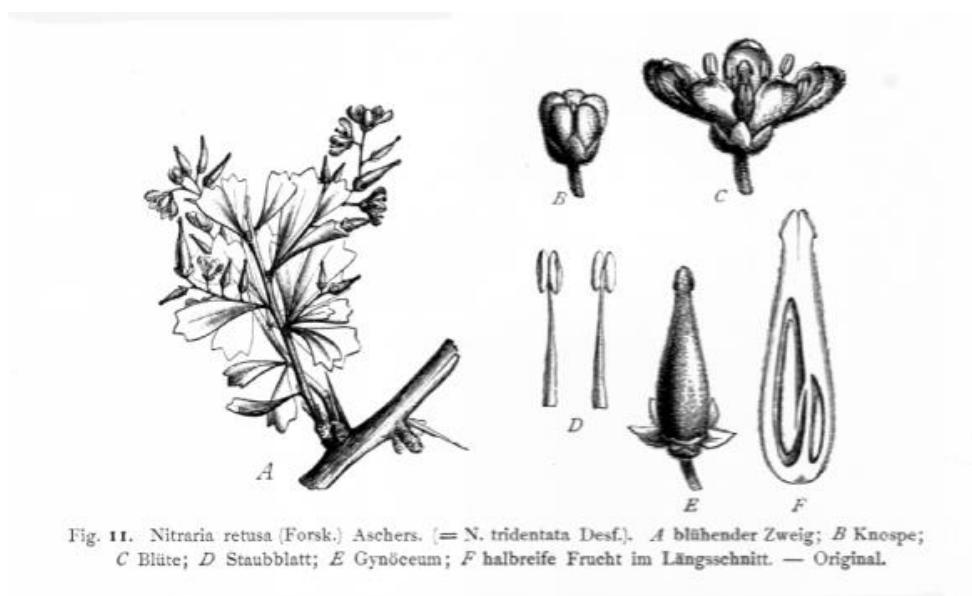


Fig. 11. *Nitraria retusa* (Forsk.) Aschers. (= *N. tridentata* Desf.). A blühender Zweig; B Knospe; C Blüte; D Staubblatt; E Gynöceum; F halbreife Frucht im Längsschnitt. — Original.

Figure 3: gravure de *Nitraria retusa* [49]

Ses feuilles succulentes sont alternes sur les jeunes rameaux, en touffes sur les plus anciens et subsessiles avec un limbe simple dentelé en son sommet prenant la forme d'une spatule.

Sa floraison a lieu au printemps avec des fleurs blanches tirant sur le vert formant des inflorescences composées en panicule au calice persistant. Le gynécée de ses fleurs est formé d'un ovaire supère trilobulaire à placentation axile (Figure 4).

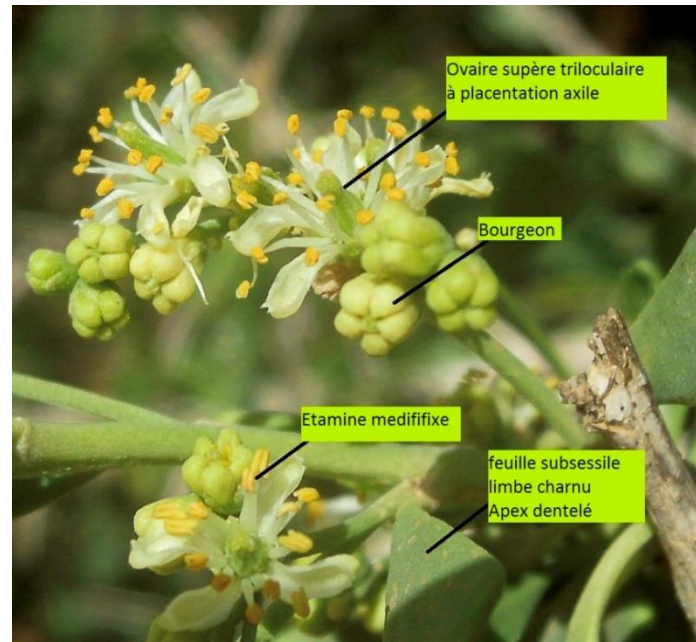


Figure 4: photo de Philippe Geniez

La fleur de *Nitraria retusa*, comme l'illustre la Figure 5, est composée de bractées, d'un calice persistant composé de 5 sépales, d'une corolle rotacée composée de 5 pétales, de 15 étamines médifixes (10 extérieures antépétales et 5 intérieures antésépales) et 3 carpelles (5 S + 5 P + 15 E + 3 C). [6]



Légende figure 4 :

De l'extérieur vers l'intérieur

- (Sépales
- (Pétales
- Etamines externes
- Etamines internes
- Nectaires
- ⊔ Carpelles

Figure 5: diagramme floral de *Nitraria retusa* [50]

1 Phytochimie des espèces étudiées

Le genre *Nitraria* voit cinq de ses espèces étudiées pour leur intérêt phytochimique : *Nitraria retusa* (Forssk) Asch., *Nitraria tangutorum* Bobrov, *Nitraria sibirica* Pall., *Nitraria schoberi* L. et *Nitraria komarovii* Iljin. & lava..

Les molécules isolées faisant l'objet de recherche et de développement sont des polyphénols et particulièrement des flavonoïdes ainsi que des alcaloïdes.

1.1 Les polyphénols

Les polyphénols retrouvés dans les plantes du genre *Nitraria* sont des tanins, des anthocyanes mais surtout des flavonoïdes et ce de façon constante dans les différentes espèces.

La majorité des flavonoïdes isolés dans *Nitraria* est glycosylée. C'est d'ailleurs dans l'espèce *retusa* qu'a été décrite le plus de flavonoïdes, comme le montre le Tableau 1. Ils sont au nombre de 12 et sont des dérivés de l'apigénine, de la lutéoline, du kaempférol et surtout de l'**isorhamnétine (1)**.

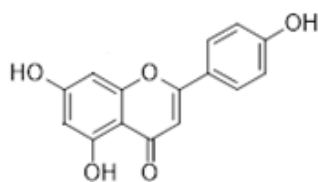
Tableau 1 : récapitulatif des Flavonoïdes présents dans chaque espèce de *Nitraria*

Flavonoïdes	<i>Nitraria tangutorum</i>	<i>Nitraria komarovii</i>	<i>Nitraria retusa</i>	<i>Nitraria sibirica</i>	<i>Nitraria schoberi</i>
Acacétine					
Apigénine 6,8-di-glucoside					
Apigénine 6-C-arabinoside 8-C-glucoside					
Apigénine 7-O-rutinoside					
Chrisoeriol 7-O-rutinoside					
Isorhamnétine					
Isorhamnétine 3-O-[xyl-(1→2)-rha-(1→6)-gal]					
Isorhamnétine 3-O-galactoside					
Isorhamnétine 3-O-glucoside					
Isorhamnétine 3-O-rhamnoside-7-O-glucoside					
Isorhamnétine 3-O-robinoside					
Isorhamnétine 3-O-rutinoside					
Isorhamnétine 3-O-4rhm galactosyl robinobioside					
Isorhamnétine 7-O-glucoside					
Isorhamnétine 7-O-rhamnoside					
Kaempférol 3-O-[xyl-(1→2)-rha-(1→6)-gal]					
Kaempférol 3-O-rutinoside					
Kaempférol 7-O-rhamnoside					
Lutéoline 7-O-glucoside					
Lutéoline 7-O-xylosylglucoside					
Quercétine					
Quercétine 7-O-rhamnoside					
rutine					

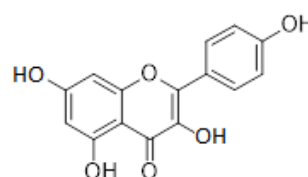
Non renseigné

Non renseigné

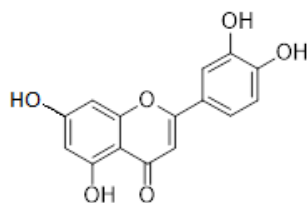
 Molécule présente dans l'espèce



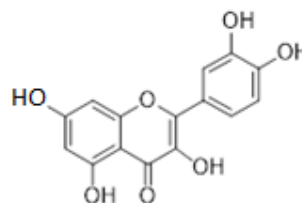
apigénine



kaempférol

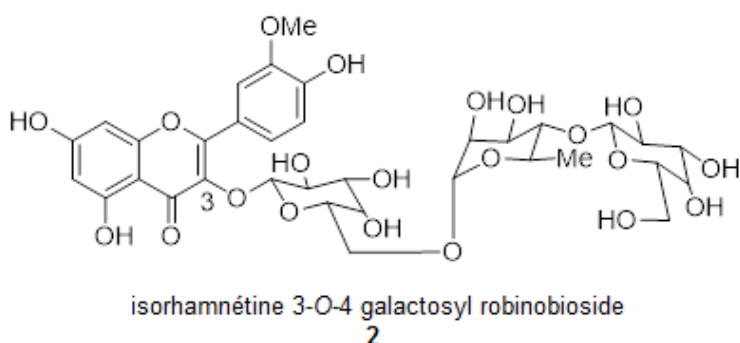
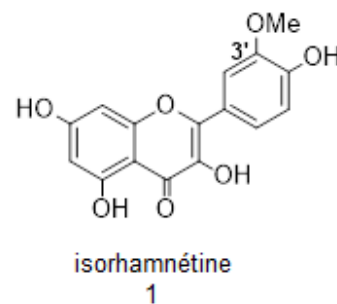


lutéoline



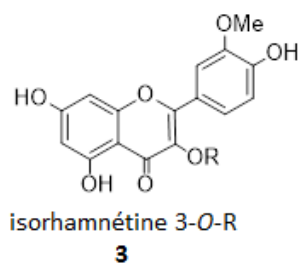
quercétine

L'**isorhmanétine (1)** est un flavonol *O*-méthylé en position 3'. Ce flavonoïde a été isolé dans *Nitraria retusa* en 1975.

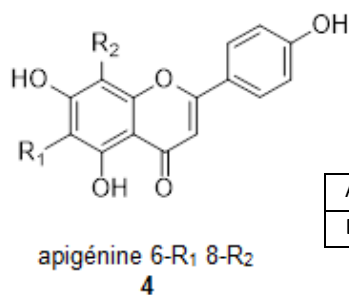


Le flavonol glycosylé, ci-contre **(2)**, dérivant de l'**isorhmanétine (1)**, a été isolé pour la première fois dans *Nitraria retusa*. [5]

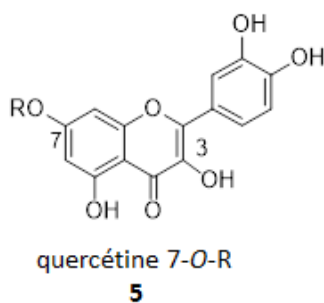
L'**isorhmanétine 3-O-[xylopyranosyl-(1→2)-rhamnopyranosyl-(1→6)-galactopyranoside] (3E)** et l'**isorhmanétine 3-O-rhamnopyranosyl-7-O-glucopyranoside (3F)** ont eux aussi été isolés pour la première fois de *Nitraria retusa*. [6]



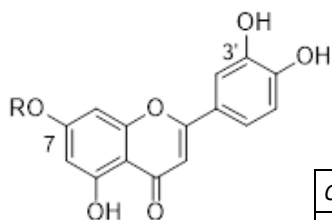
A	R= Gal	isorhmanétine 3-O-Galactopyranoside
B	R= Glc	isorhmanétine 3-O-Glucopyranoside
C	R= Rutinoside	isorhmanétine 3-O-Rutinopyranoside
D	R= Robinopyranoside	isorhmanétine 3-O-Robinopyranoside
E	R= Xyl-(1 → 2)-Rha-(1 → 6)-Gal	isorhmanétine 3-O-[Xylopyranosyl-(1 → 2)-Rhamnopyranosyl-(1 → 6)-Galactopyranoside]
F	R= Rha-7-O-gGlc	isorhmanétine 3-O-Rhamnopyranosyl-7-O-Glucopyranoside



A	R ₁ = C-Ara R ₂ =C-Glc	apigénine 6-C-Arabinopyranoside 8-C-Glucopyranoside
B	R ₁ = C-Glc R ₂ = C-Glc	apigénine 6,8-di-C-Glucopyranoside



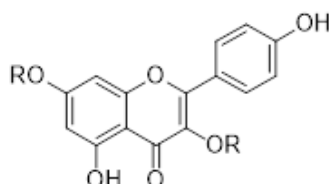
A	R= H	quercétine
B	R= H O-rutoside en 3	rutine
C	R= Rha	quercétine 7-O-rhamnoside



lutéonine 7-O-R

6

	O-rut en 7 OCH ₃ en 3'	chrisoeriol 7-O-rutinoside
A	R= Glc	lutéoline 7-O-Glucoside
B	R= Xyl-Glc	lutéoline 7-O-XylosylGlucoopyranoside



kaempférol 3-O-R

7

R= Xyl-(1 --> 2)-Rha-(1 --> 6)-Gal	Kaempférol 3-O-[Xylopyranosyl-(1 --> 2)-Rhamnopyranosyl-(1 --> 6)-Galactopyranoside]
------------------------------------	--

1.2 Les alcaloïdes

L'étude des alcaloïdes dans le genre *Nitraria* a été focalisée sur quatre espèces, à savoir *tangutorum*, *sibirica*, *schoberi* et *komarovii*.

Comme l'indique le *Tableau 2* les alcaloïdes retrouvés sont de type indolique, spiro ou tripipéridinique. Le squelette indolique est dérivé du L-tryptophane tandis que les squelettes spiraniques et tripipéridiniques sont dérivés de la L-lysine.

Notons que la quasi-totalité des alcaloïdes isolés dans le genre se retrouvent aussi dans *Nitraria komarovii*

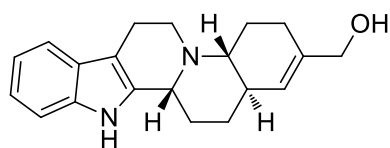
Concernant *Nitraria retusa*. La littérature actuellement ne fait pas état d'isolement d'alcaloïdes.

Tableau 2 : récapitulatif des Alcaloïdes présents dans chaque espèce de *Nitraria*

Classe	molécules	<i>Nitraria tangutorum</i>	<i>Nitraria sibirica</i>	<i>Nitraria schoberi</i>	<i>Nitraria komarovii</i>
Alcaloïdes Tripipéridine	dihydroschoberine				
	Nitraramine				
	nitramidine				
	schoberine				
Spiro alcaloïdes	isonitramine				
	nitrabirine				
	nitramine				
	nitroxine				
	sibirine				
	sibirinine				
Alcaloïdes indoliques	dihydronitraraine				
	komarine				
	komaroïne				
	komarovicine				
	komarovidine				
	komarovidinine				
	komarovine				
	komarovinine				
	komavicine				
	komavine				
	nazlinine				
	nitramarine				
	nitramidine				
	nitraraidine				
	nitraraine				
	nitraridine				
nitrarine					
schobericine					
schoberidine					
tangutorine					
A part	sibiridine				

 Molécule présente dans l'espèce

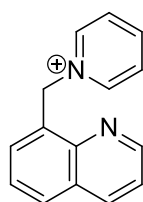
1.2.1 Alcaloïdes de *Nitraria tangutorum*



tangutorine
8

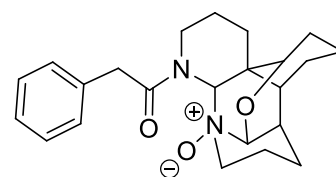
La **tangutorine (8)** est un alcaloïde indolique, de façon plus précise c'est un alcaloïde de type β -carboline. Il a été isolé pour la première fois en 1999 dans les feuilles séchées de *Nitraria tangutorum*. [7]

1.2.2 Alcaloïdes de *Nitraria sibirica*

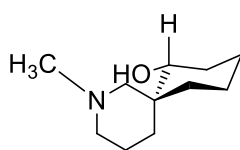


sibiridine
9

La **sibiridine (9)** et la **nitraramidine (10)** ont respectivement été isolées en 2003 et 2002 de *Nitraria sibirica*. [8][9]

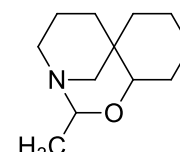


nitraramidine
10

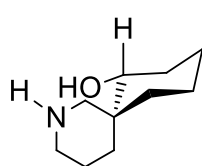


sibirine
11

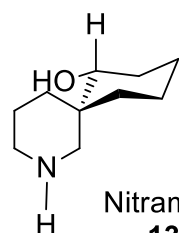
La **sibirine (11)** et la **sibirinine (12)** sont classées dans les spiro-alcaloïdes et ont été isolées en 1982. [10]



sibirinine
12



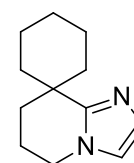
isonitramine
13



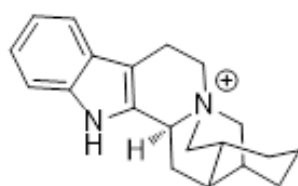
Nitramine
13'

Isonitramine (13) isolement en 1977. [11]

Nitrabirine (14) isolement en 1983. [12]



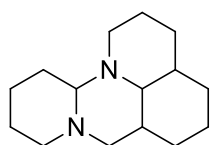
nitrabirine
14



nitraraidine
15

Nitraraidine (15) isolement en 1985. [9]

1.2.3 Alcaloïdes de *Nitraria schoberi*



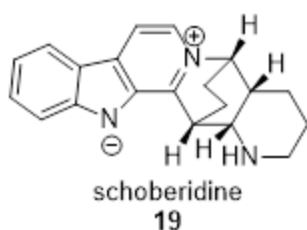
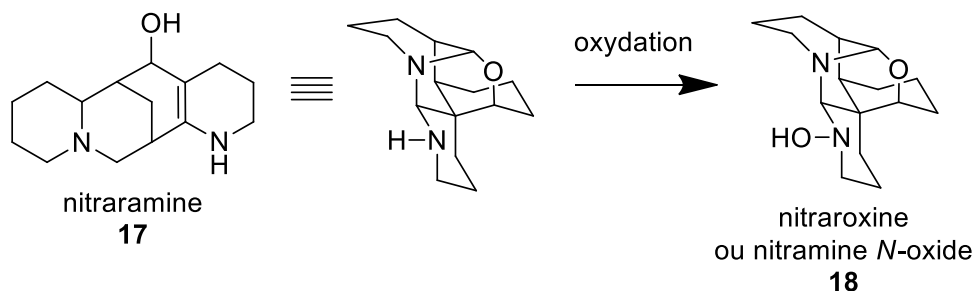
schoberine
16

La **schoberine (16)** est un alcaloïde isolé en 1975 à partir des parties aériennes de *Nitraria schoberi*. [13]

La **sibiridine (9)** a aussi été isolée de *Nitraria schoberi*.

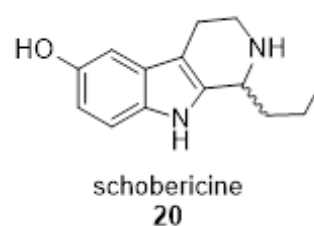
La **nitramine (17)** est un alcaloïde tripipéridinique, retrouvé dans plusieurs espèces de *Nitraria* mais isolé pour la première fois en 1975 de *Nitraria schoberi*.

La **nitroxine (18)** quant à elle est aussi un alcaloïde tripipéridinique et a été isolée en 1986. [9]

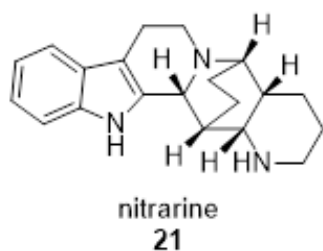


schoberidine
19

Ces deux alcaloïdes font partie de la classe des indoliques. La **schoberidine (19)** a été isolée en 1975 et la **schobericine (20)** en 2006. [14]



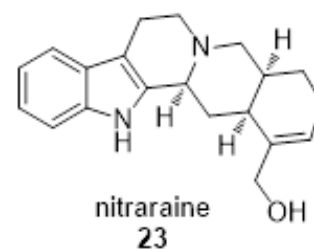
schobericine
20



nitrarine
21



nitramidine
22

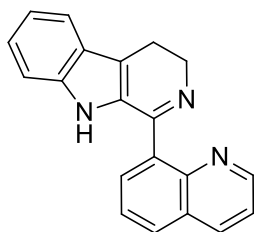


nitraraine
23

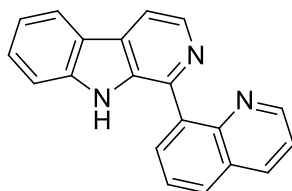
Isolement en 1968 de la **nitrarine (21)**, en 1975 de la **nitramidine (22)** et en 1985 de la **nitraraine (23)**. [15]

1.2.4 Alcaloïdes de *Nitraria komarovii*

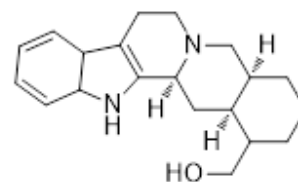
La plupart des alcaloïdes de *Nitraria* ont été isolés dans *Nitraria komarovii* et une très grande partie de ces alcaloïdes se retrouve exclusivement dans l'espèce *komarovii*. C'est le cas des alcaloïdes indoliques suivants.



komarovidine
24

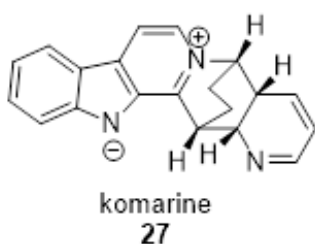


komarovine
25



dihydronitraraine
26

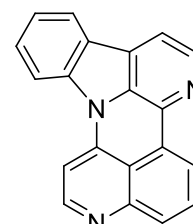
Respectivement isolés en 1980, 1981 et 1985. [16]



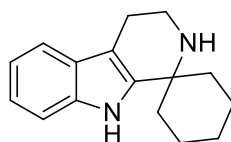
komarine
27

La **Komarine (27)** et la **Komarovidine (28)**

ont été isolées en 2000 de *Nitraria komarovii*. [17]

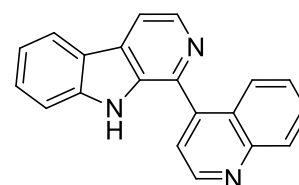


komarovidine
28



komavine
29

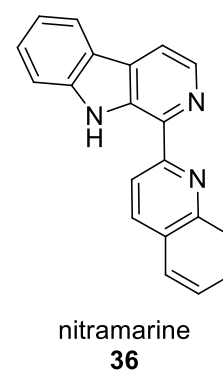
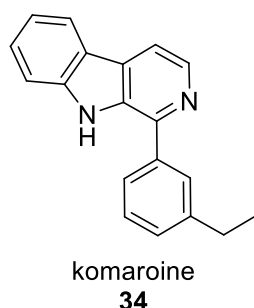
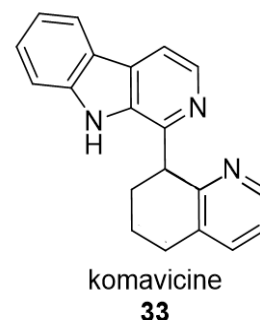
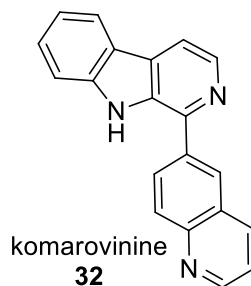
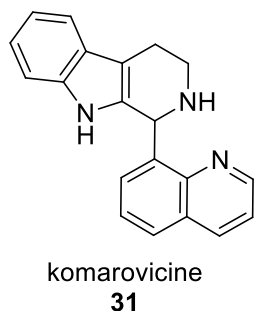
La **Nitraridine (30)** a été isolée de *Nitraria komarovii* en 2006. [18]



nitraridine
30

Isolement en 2001 de la **Komavine (29)**. [19]

De nombreux autres alcaloïdes indoliques ont été isolés de *Nitraria komarovii*. [20]



Les alcaloïdes indoliques précédemment présentés peuvent être classés en différents groupes. [20] Ainsi, on différenciera :

- La **schoberidine (19)**, la **komarovine (25)**, la **komarine (27)** et la **komavicine (33)** sont des β -carboline.
- La **nitraridine (30)** est une β -carboline aromatique avec une quinoléine attachée en C-4.
- La **komarovinine (32)** est β -carboline aromatique avec une quinoléine attachée en C-6.
- La **nitramarine (36)** est β -carboline aromatique avec une quinoléine attachée en C-2.
- La **komarovidine (28)** β -carboline aromatique avec une quinoléine attachée en C4 et C-5.
- les indoles monopipéridiniques ou tétrahydro- β -carboline comme la **schobericine (20)**, la **komavine (29)** ou encore la **nazlinine (35)**.
- La **nitramidine (22)** est une dihydro- β -carboline.
- La **komarovidine (24)** ainsi que la **komarovicine (31)** sont des dihydro- β -carboline avec une quinoléine attachée en C-8.
- Les indoles dipipéridiniques comme la **tangutorine (8)**, la **nitraraine (23)** et la **dihydroneitraraine (26)**, la **nitrarine (21)** est un indole tripipéridinique.

2 Méthodes d'extractions relatives au genre *Nitraria* (2008 à 2013)

2.1 Extraction des Polyphénols

Les flavonoïdes présents dans les graines de *Nitraria tangutorum* ont été extraits par ultrasons (40 KHz, 200 W). Les conditions optimales sont:

- solvant d'extraction composé de 65 % éthanol
- temps d'extraction de 68 min
- température d'extraction de 42°C

Cette méthode a permis l'obtention d'un rendement de 1,20 % (m/m). [21]

L'utilisation des ultrasons est une méthode qui améliore la pénétration du solvant extractif puisqu'ils permettent de briser les membranes en évitant l'utilisation d'une température trop importante. Ce sont donc des conditions douces qui évitent la dégradation des principes actifs.

De *Nitraria tangutorum* a aussi été extrait le totum phénolique, à partir des fruits ou feuilles secs. L'extraction a été effectuée avec une solution aqueuse d'éthanol 50-100 %, un volume extractif représentant 5 à 15 fois le volume de la matière végétale. Le temps d'extraction nécessaire a été évalué entre 1 et 5 h avec plusieurs répétitions de la méthode. [22]

L'extraction des anthocyanes de *Nitraria tangutorum* à partir du fruit s'est faite en présence de cellulase dans l'eau à une température contenue entre 20 et 40°C pendant 8 à 14 min avec un pH de 3 à 4,6. L'extraction s'est déroulée avec 30 à 40 % d'éthanol et sous ultrasons (45-55°C, pendant 15-25 min). Le rendement obtenu était de 80 % par rapport à la masse de matière première sèche. [23]

2.2 Extraction alcaloïdique

La **tangutorine (8)** est la β -carboline isolée de *Nitraria tangutorum*. Cette molécule a été obtenue à partir d'une partition entre l'eau et l'éther de pétrole sur un extrait. La phase aqueuse a été alcalinisée à pH 10 avec NH_4OH puis contre-extraite avec du chloroforme. Le rendement de l'extraction est de 0,072 % par rapport à la masse de matière première sèche. [7]

Dans l'espèce *sibirica*, retrouvée dans les steppes de l'Asie centrale, on observe principalement des alcaloïdes tripipéridiniques et des spiro-alcaloïdes.

La **sibiridine (9)** ainsi que la **sibirine (11)** ont été isolées de fractions benzéniques d'extraits obtenus à partir des parties aériennes de *Nitraria sibirica*. La **sibiridine (9)** a aussi été isolée de *Nitraria schoberi*. Le protocole d'extraction a débuté par une alcalinisation avec de l'ammoniaque 8 % pendant deux heures (dit en crotin de cheval) avec à la suite une extraction solide/liquide au chloroforme (répétée dix fois). Après une contre-extraction liquide/liquide par une solution aqueuse d'acide sulfurique (10 %), la solution aqueuse a été alcalinisée par de la potasse (10 %) puis extraite, dans un premier temps, par du benzène puis, dans un second temps, par du chloroforme. [24]

L'espèce *Nitraria komarovii* regroupe presque tous les alcaloïdes retrouvés dans le genre. L'alcaloïde le plus représentatif de l'espèce est la **Komarine (27)**. Cette molécule a été isolée en 2000 à partir des parties aériennes de la plante en utilisant le chloroforme comme solvant d'extraction. [17]

La **nazlinine (35)**, quant à elle, a été isolée en 1991 par le biais d'une extraction alcaloïdique classique alternant phase organique alcaline et phase aqueuse acide. Néanmoins un dégraissage de l'extrait méthanolique a été préalablement nécessaire. Pour cela, cet extrait méthanolique brut a été soumis à une extraction liquide/liquide par une solution aqueuse acide puis une contre-extraction par du chloroforme. L'extraction alcaloïdique, à proprement parler, débute à partir d'une phase méthanolique dégraissée qui va être acidifiée et contre-extraite avec du chloroforme.[25]

De *Nitraria schoberi* ont été isolées la **nitrarine (21)** [26] et la **schobericine (20)** à partir d'un extrait chloroforme des parties aériennes. [14]

3 Etudes biologiques et utilisations médicinales

3.1 Activités biologiques

De nombreuses études sur l'activité biologique des espèces du genre *Nitraria* sont retrouvées dans la littérature. Les polyphénols ont tout particulièrement été mis en lumière durant la dernière décennie et principalement ceux extraits de *Nitraria retusa*. En effet, les propriétés antioxydante, antibactérienne et antiproliférative de cette espèce ont fait l'objet de nombreuses publications.

Des propriétés antiprolifératives ont été mises en exergue sur des extraits (hexane, méthanol et chloroforme) biologiquement actifs de feuilles de *Nitraria retusa*. Il a été démontré que les tanins, les coumarines et les flavonoïdes, retrouvés dans les différents extraits, ont une action antiproliférative par induction de la voie extrinsèque de l'apoptose par activation des caspases 3 et 8. Cette action se traduit alors par un effet proapoptotique et donc antiprolifératif. [27]

L'activité antioxydante des flavonoïdes aglycones de *Nitraria retusa*, comme l'**isorhamnétine (1)**, a été jugée supérieure à celle des dérivés glycosylés et à la **quercétine (5A)**. Elle serait de l'ordre des flavonoïdes du ginkgo. Cette propriété provient de son action inhibitrice de la xanthine oxydase.[28]

Les propriétés antibactériennes des fruits de *Nitraria retusa* ont été évaluées par la mesure de la CMI (Concentration minimale d'inhibition) sur cinq souches bactériennes responsables de TIAC (Toxi-infections alimentaires collectives). Un effet inhibiteur contre *Salmonella. thyphimurium*, *Klebsiella pneumonia* et *Bacillus thuringiensis* a été démontrée, ce qui élargit le domaine d'utilisation des fruits de l'arbuste et envisage un emploi en tant que conservateur alimentaire. [29]

Les activités biologiques d'autres espèces ont été étudiées, ainsi l'extrait hydroalcoolique des fruits de *Nitraria sibirica* aurait une action hypotensive. Cette activité serait due à l'induction de la vasorelaxation des endothélium vasculaires par l'activation de la NO synthétase. [30] De même, une action en faveur de la diminution de la glycémie, de la protection hépatique et de la protection face aux radicaux libres a été mise en avant dans des extraits anthocyaniques de *Nitraria tangutorum*. [23]

Concernant les extraits alcaloïdiques, on retrouve peu de publications rapportant leurs effets biologiques. Néanmoins, les alcaloïdes indoliques et plus spécifiquement les squelettes β -carboline sont connus pour être fréquemment des inhibiteurs de la monoamine oxydase et des molécules interagissant avec la sérotonine. Des études ont aussi démontré les larges propriétés pharmacologiques des β -carboline, notamment sédative, anxiolytique, hypnotique, anticonvulsivante, antitumoral, antiviral, antiparasitaire et antimicrobiennes. [31]

Ainsi, la **nazlinine (35)**, alcaloïde isolé de *Nitraria schoberi*, a une activité inhibitrice enzymatique avérée. Son action a été testée sur la diamine oxydase du rein de porc (PKDO) qui permet l'oxydation de certains acides aminés comme l'histamine, la putrescine ou la cadaverine. Son activité sérotoninergique a aussi été révélée. Un mauvais fonctionnement de la diamine oxydase provoque une accumulation d'histamine dans l'organisme et des troubles *pseudo*-allergiques alimentaires dus à la toxicité de l'histamine. [32]

La **nazlinine (35)** est un alcaloïde à activité sérotoninergique ce qui lui a valu des études sur son activité contractile et vasorelaxante des vaisseaux sanguins. [25]

3.2 Utilisations en médecine traditionnelle

Les arbustes du genre *Nitraria* sont des plantes de climats arides et salins. Ils grandissent et résistent dans ces zones où la rudesse du climat restreint l'Homme à se nourrir et se soigner avec les matières premières qui l'entourent.

Ces plantes ligneuses sont, pour ces raisons, consommées et utilisées par les animaux et les Hommes de ces régions du monde.

Le fruit rouge-orangé et charnu de *Nitraria retusa* est consommé en jus rafraichissant, ses feuilles sont utilisées en infusion ou en cataplasme. Les cendres de l'arbuste servent pour la détersion de plaies infectées.

En médecine traditionnelle marocaine, les feuilles de *Nitraria retusa* sont consommées en décoction contre les maux d'estomac, les ulcères, les gastrites ou encore les coliques. [27]

De plus, associées aux feuilles de *Zygophyllum gaetulum*, elles sont utilisées comme suppositoire dans les traitements des hémorroïdes. [5]

Nitraria sibirica que l'on retrouve essentiellement dans les steppes d'Asie centrale, est utilisée par l'ethnie Uyghur (groupe ethnique turc d'Asie centrale) dans le traitement de l'hypertension. [30]

En médecine traditionnelle chinoise les feuilles de *Nitraria tangutorum* sont utilisées comme antispasmodique, anti-diarrhéique et dans les traitements des neuropathies. *Nitraria schoberi* est aussi recommandée comme antispasmodique. [7]

Conclusion

Le genre *Nitraria* est représenté par des arbustes adaptés au climat rude et salin. De tout temps, il a fait partie des médecines traditionnelles des ethnies peuplant ces régions hostiles. Toutes les parties aériennes de ces plantes se révèlent avoir une application thérapeutique.

De récentes études ont été faites pour déterminer la valeur nutritive des fruits sauvages de *Nitraria retusa* afin d'évaluer leur utilisation comme source alimentaire et pharmaceutique. Il en ressort des teneurs en protéines, glucides et lipides coïncidant avec des valeurs rapportées de fruits cultivés. [33]

Les plantes du genre *Nitraria* intéressent pour leurs propriétés antioxydantes, antiprolifératives et pour leur qualité nutritive. En effet, ce sont des plantes résistantes, ne consommant pas beaucoup d'eau et s'acclimatant aux sols pauvres. Elles seraient donc une source de nutriments importante et de molécules thérapeutiques disponible facilement car nécessitant un minimum d'intervention humaine et d'énergie.

Les travaux expérimentaux qui vont suivre portent sur *Nitraria retusa*, sur la présence d'alcaloïdes dans cette plante et le cas échéant sur sa composition en alcaloïdes. Cette étude a été orientée par la diversité des alcaloïdes retrouvés dans le genre *Nitraria*. Le choix s'est porté sur l'espèce *retusa* qui n'avait pas fait l'objet d'investigations dans ce sens auparavant. Les alcaloïdes indoliques retrouvés dans le genre *Nitraria* ont une activité biologique liée à leur noyau indole qui est un motif présent dans la structure de la sérotonine. La sérotonine est une hormone et un neurotransmetteur impliqué dans de nombreuses voies physiologiques. En cela, elle est une cible thérapeutique de choix et montre tout l'intérêt que présentent les molécules à noyau indolique comme les alcaloïdes indoliques retrouvés dans le genre *Nitraria*.

La propriété d'inhiber la MAO est utilisée dans une classe thérapeutique d'antidépresseurs. Les IMAO (inhibiteur de la monoamine oxydase) sont représentés par l'iproniazide et le moclobémide.

De plus l'ellipticine, isolée d'*Apocyanaceae*, est une molécule possédant une structure à rapprocher du squelette β -carboline. C'est un antinéoplasique ayant des propriétés d'agent intercalant.[34] D'autres anticancéreux, comme la vinblastine et la vincristine isolées de *Catharanthus roseus*, présentent des motifs indoliques.

Les propriétés des alcaloïdes indoliques isolés du genre *Nitraria* pourraient être à rapprocher de ces classes et molécules thérapeutiques.

II. Etude chimique de *Nitraria retusa*

Introduction

Le genre *Nitraria* regroupe des espèces riches en molécules d'intérêt comme les polyphénols et les alcaloïdes. On retrouve ainsi des alcaloïdes spiraniques, indoliques et tripipéridiniques dans les différentes espèces du genre comme l'illustre précédemment le Tableau 2.

Les travaux proposés sont une étude phytochimique de la composition en alcaloïdes de *Nitraria retusa* orientée par la chimiotaxonomie de son genre. En effet, actuellement aucune étude phytochimique de *Nitraria retusa* ne fait état de sa composition alcaloïdique, malgré la diversité de son genre à ce sujet.

1 Extractions, isolements et purifications

Une extraction alcaloïdique est basée sur les propriétés basiques et les solubilités différentielles des alcaloïdes.

Le principe repose donc sur le passage des alcaloïdes d'une phase aqueuse acide à une phase organique après alcalinisation.

Les alcaloïdes sont sous forme de sels dans les plantes et sont, à ce titre, solubles dans les phases aqueuses à pH acide. Une alcalinisation à pH = 10 permet leur solubilisation dans une phase organique et donc leur extraction.

1.1 Matériel végétal

La matière végétale utilisée est constituée des parties aériennes de *Nitraria retusa* récoltées en mai 2009 pendant sa fructification. Néanmoins, les fruits ne sont pas présents dans cet échantillon de plante séchée et pulvérisée. La plante a été récoltée à Wadi Rishrash à 2 heures du Caire dans une zone désertique le long de la route Korymat.

La plante a été séchée à l'ombre à température ambiante et conservée en laboratoire sans conditionnement particulier mais à l'abri de l'humidité.

1.2 Extraction et isolement

Une étude préalable a été réalisée sur 1 g de plante afin d'optimiser l'extraction alcaloïdique et de déterminer les solvants adéquats.

Il a ainsi été déterminé qu'une première étape permettant l'élimination des substances lipophiles était nécessaire.

Cette étape a été réalisée sur 420 g de matière première. Cette masse de plante pulvérisée a été soumise à une extraction solide/liquide par du méthanol sous ultrason afin de permettre une meilleure pénétration du solvant à travers les membranes végétales et d'éviter

la dégradation des principes actifs.

Le filtrat méthanolique recueilli a été acidifié a pH = 1, ce qui a permis le passage des alcaloïdes sels dans la phase aqueuse et l'élimination des molécules lipophiles dans la phase organique, après contre-extraction.

L'extraction alcaloïdique, à proprement parler, a donc débuté par une acidification et s'est poursuivie par une alcalinisation à pH = 10 pour permettre la contre-extraction des alcaloïdes sous forme base dans la phase organique.

Dans un second temps, une extraction dichloro-butanolique liquide/liquide sur la phase aqueuse alcaline résiduelle a été réalisée. Cette seconde méthode avait pour but l'extraction des composés azotés ayant des propriétés basiques moindre et une solubilité intermédiaire.

De ces extractions successives ont résulté deux extraits bruts, un alcaloïdique et l'autre dichlorobutanolique. Ces extraits ont été fractionnés sur CC de silice puis purifiés par CLHP-préparative.

Trois composés (1-3) ont été isolés. Les composés 2 (m = 2 mg ; Rdt = 0,0048 ‰) et 3 (m = 2,3 mg ; Rdt = 0,0055 ‰) ont été isolés de l'extrait dichlorobutanolique et le composé 1 (m = 6,5 mg ; Rdt = 0,015 ‰) de l'extrait alcaloïdique.

La purification, et par conséquent l'isolement des molécules, ont été masse guidée. En effet, la CLHP-SM a permis le suivi massique des fractions et de rechercher soit des masses impaires connues ou inconnues préfigurant un azote, soit des masses paires importantes pouvant éventuellement être synonyme d'une molécule à nombre pair d'azotes.

Pour exemple, le chromatogramme (Figure 6) et le spectre de masse (Figure 7) de la fraction F7' qui a permis de repérer grâce au spectre le pic pseudo moléculaire $[M + H]^+$ du composé 3 et d'établir les conditions opératoire pour son isolement par CLHP sur colonne préparative.

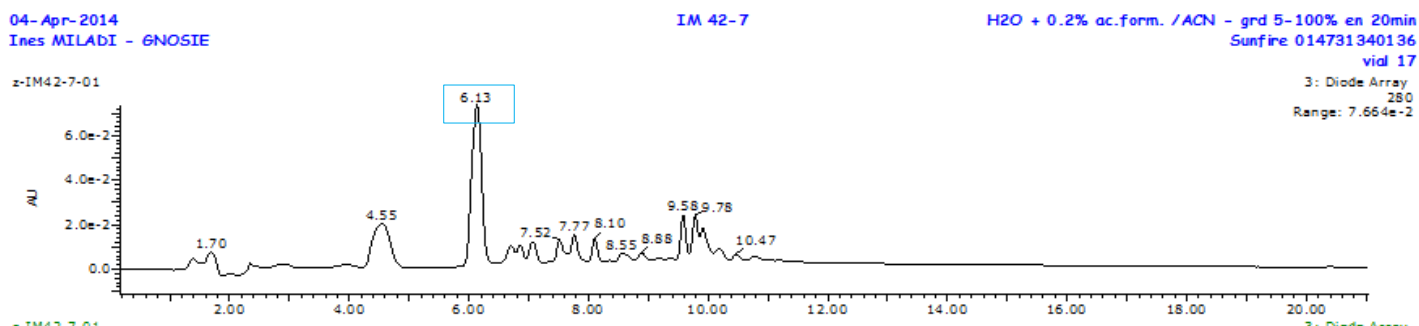


Figure 6 : chromatogramme CLHP de F7'

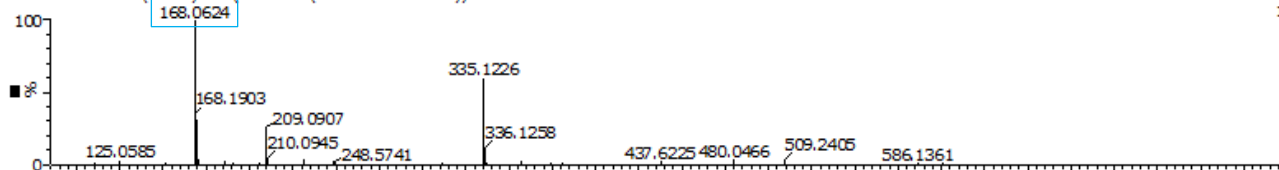


Figure 7 : spectre de masse de F7'

2 Travaux personnels

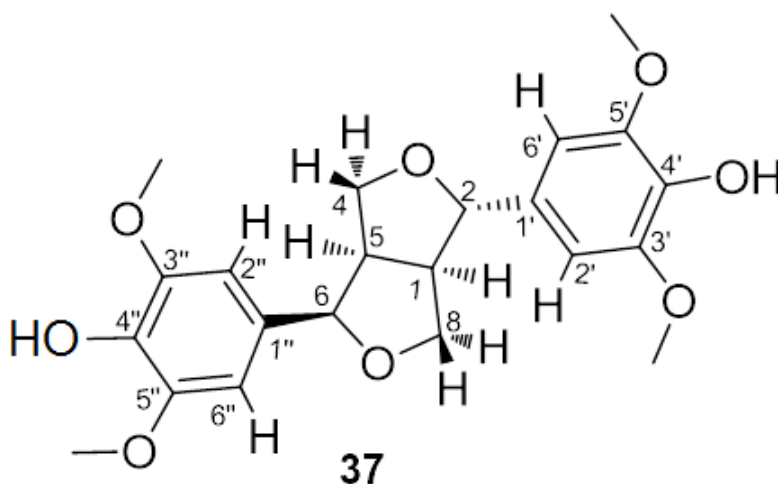
Les travaux personnels, exposés ci-après, font état de la caractérisation des composés 1, 2 et 3.

2.1 Détermination structurale

Les plantes du genre *Nitraria* ont une diversité alcaloïdique importante (Tableau 2). Les travaux expérimentaux se sont donc orientés vers une extraction alcaloïdique, de par la chimiotaxonomie de ce genre, avec un intérêt particulier pour les molécules de masse moléculaire impaire. Néanmoins, les substances isolées se sont avérées être de type furophénolique.

Dans la présente section l'élucidation structurale, des molécules isolées, sera détaillée.

2.1.1 Composé 1 : (+)-*epi*-syringarésinol

Figure 8: Structure du composé 1, *epi*-syringarésinol (37)

- Spectre de masse

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES +) montre un pic pseudo moléculaire $[M + Na]^+$ à $m/z = 441,1526$ correspondant à la formule brute $C_{22}H_{26}O_8$. Le composé présente donc 10 insaturations selon la formule : $(2 n_C + 2 - n_H + n_N - n_X)/2$.

Calcul du nombre d'insaturations
 $(2 n_C + 2 - n_H + n_N - n_X)/2$.
 n_C : nombre d'atomes de carbone
 n_H : nombre d'hydrogène
 n_N : nombre d'atome d'azote
 n_X : nombre d'atome d'halogène

- Spectre IR et spectre UV

Le spectre UV du composé a montré des bandes d'absorption à 240 et 271 nm suggérant la présence d'un motif aromatique (bandes généralement observées dans la série des lignanes).

Le spectre IR présente des bandes de vibration de forte intensité à :

- 1610 et 1500 cm^{-1} correspondant aux bandes de vibration du noyau aromatique.
- 3400 cm^{-1} correspondant à la bande de vibration de ν_{O-H} (polymère).

- Spectre RMN 1H et ^{13}C

Le spectre RMN 1H (Figure 9) indique la présence de deux singulets aromatiques à δ_H 6.67 et 6.66 ppm intégrant pour deux protons chacun, ce qui indique la présence de deux cycles aromatiques 1,3,4,5-tétrasubstitués. De plus, on peut également noter la présence de deux signaux pour quatre groupes méthoxy à δ_H 3.85 ppm (interchangeables).

Enfin, on distingue aisément six protons déblindés à δ_H 3,30 ; 3,82 ; 3,87 ; 4.15 ; 4,44 et 4,87 révélant leur liaison à un atome d'oxygène.

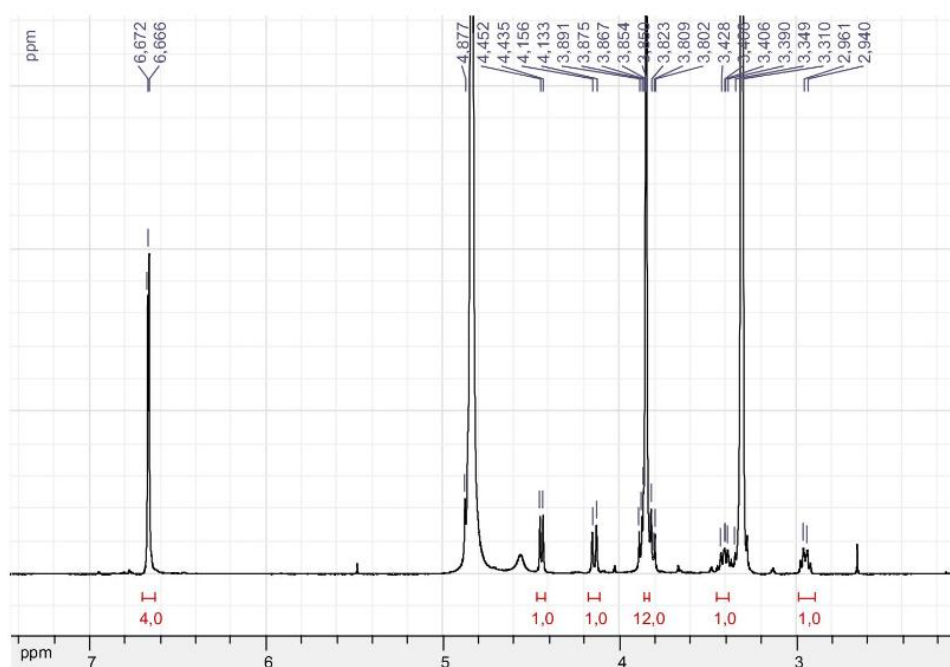


Figure 9 : Spectre RMN 1H du composé 1 (37) (CD_3OD-d_4 , 400 MHz)

Le spectre RMN ^{13}C JMOD (Figure 10) indique la présence de 12 carbones aromatiques, dont 8 carbones quaternaires et 4 méthines. Il nous indique aussi la présence de 10 carbones d'hybridation sp^3 dont 4 méthines, 2 méthylènes et 4 groupements méthoxy.

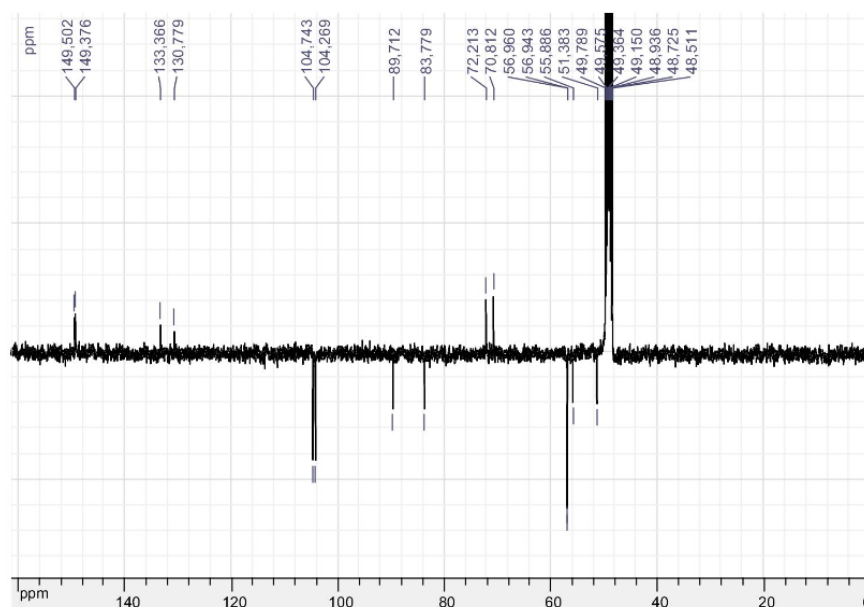


Figure 10 : Spectre RMN ^{13}C JMOD du composé 1 (37) ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 100 MHz)

Tous ces signaux sont en faveur d'un squelette de type furofurano lignane.

- Attribution des protons aux carbones spectres HSQC :

Les corrélations hétéronucléaires 1J proton-carbone (HSQC), ont permis d'attribuer les protons à chaque carbone comme l'illustre le tableau Tableau 3.

Tableau 3 : Données RMN du composé 1 (37) ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, 400 MHz)

C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) (multiplicité, J en Hz)
1	55,88	2,95 (<i>dd</i> , 15 ; 6,2)
2	89,71	4,44 (<i>d</i> , 6,7)
4	70,8	3,30 (<i>m</i> *) 3,81 (<i>m</i> *)
5	51,88	3,41 (<i>dd</i> , 7,6)
6	83,77	4,87 (<i>d</i> , 6,0)
8	72,21	3,88 (<i>m</i> *) ; 4,15 (<i>d</i> , 9,4)
1'	130,7	
2'	104,2	6,66 (<i>s.l</i>)
4'	133,36	
6'	104,7	6,66 (<i>s.l</i>)
1''	130,7	
2''	104,26	6,67 (<i>s.l</i>)
4''	133,3	
6''	104,2	6,67 (<i>s.l</i>)
3'-5'-OMe	149,3	3,85 (<i>s</i>)
3''-5''-OMe	149,5	3,85 (<i>s</i>)

* Constante non déterminée, le doublet se trouve inclus dans le pic du $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$

- Analyse des spectres 2D

La construction du noyau tétrahydrofuro[3,4-*c*]furane a été réalisée à l'aide des corrélations homonucléaires COSY ^1H - ^1H , en suivant les corrélations proton-proton de proche en proche.

Les deux systèmes aromatiques 1,3,4,5-tétrasubstitués ont été reliés au noyau furofuranique en se basant sur l'analyse des corrélations hétéronucléaires HMBC. La corrélation HMBC observée entre les protons H-2' et H-6' et le carbone C-2 permet de placer le premier noyau aromatique en C-2. Le second noyau aromatique a été localisé par l'intermédiaire de la corrélation observée entre les protons H-2'' et H-6'' et le carbone C-6.

Enfin les quatre groupements méthoxy ont pu être reliés aux groupements aromatiques par les corrélations HMBC observées entre les protons à δ_{H} 3,85 ppm et les carbones C-3', C-5' (δ_{C} 149,3 et 149,5 ppm).

Toutes ces observations sont en adéquation avec la structure de l'*épi*-syringarésinol (**37**) comme l'illustre la Figure 11.

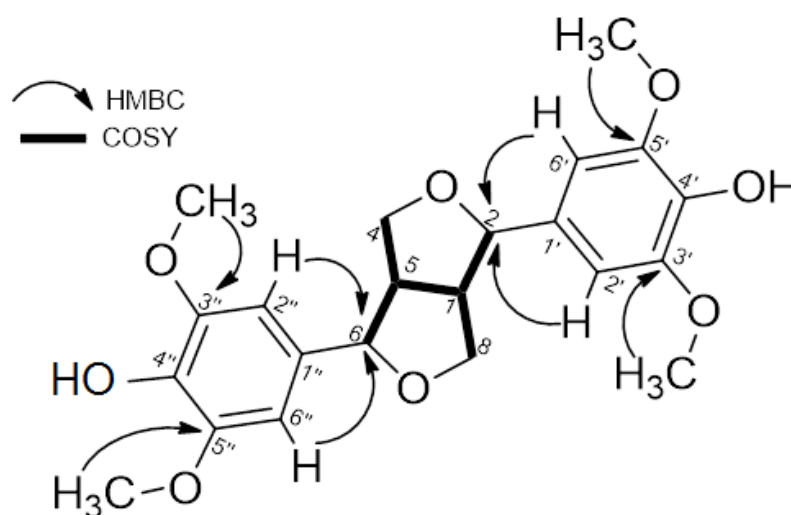




Figure 11 : Principales corrélations HMBC et COSY du composé 1 (**37**)

- Etude de la stéréochimie du composé 1 (**37**)

La configuration relative du composé 1 (**37**) a été déterminée à l'aide du spectre NOESY (Figure 12). En effet, les corrélations observées entre H-2 (δ_{H} 4,44 ppm), H-8b (δ_{H} 4,15 ppm) et H-8a (δ_{H} 3,88 ppm) indiquent que ces protons ont la même orientation à savoir une orientation β . Par conséquent, les corrélations NOESY H-1/H-5, H-2', H-6', H-2'', H-6'' suggèrent que ceux-ci sont orientés en α .

La configuration absolue du composé 1 (**37**) a pu être déterminée en comparant la valeur et le signe du pouvoir rotatoire aux données de la littérature. De ce fait, le composé 1 (**37**) correspond au (+)-*epi*-syringarésinol [35].

 corrélations NOESY au-dessus du plan
 corrélations NOESY en-dessous du plan

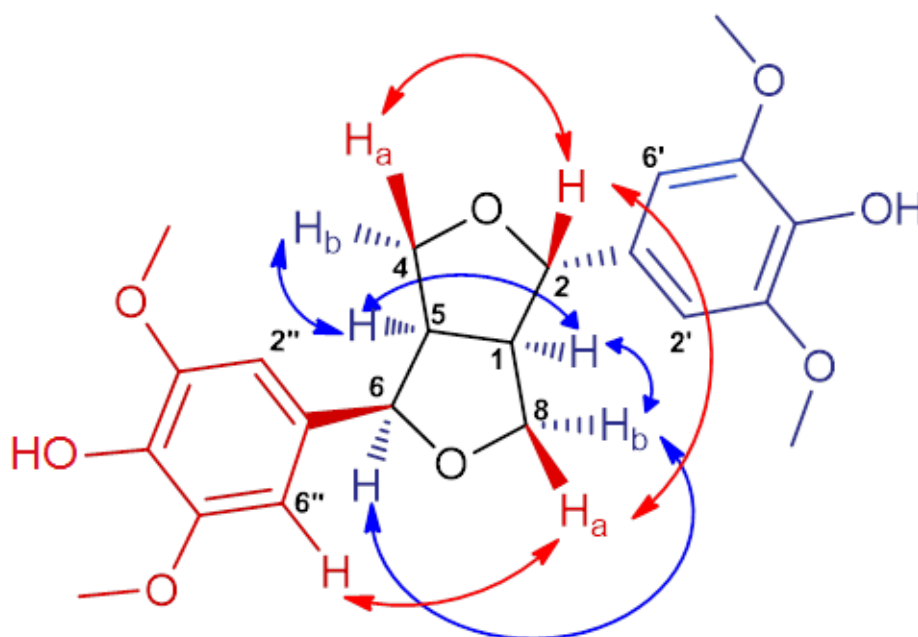


Figure 12 : principales corrélations NOESY du composé 1 (**37**)

2.1.2 Composé 2 : acide *para* aminobenzoïque

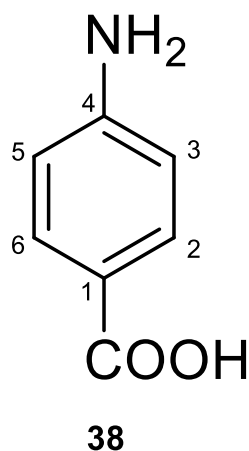


Figure 13 : Structure du composé 2, acide *para* aminobenzoïque (38)

- Spectre de masse

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES +) montre un pic pseudo moléculaire $[M + H]^+$ à $m/z = 168,0663$. Ce pic correspond à la formule brute $C_7H_7NO_2$ pour le composé 2 (38). Le degré d'insaturation de ce composé est de 5.

- Spectre IR et spectre UV

Le spectre UV du composé a montré des bandes d'absorption à 355 et 278 nm correspondant au motif anilique (Règles de Woodward-Fieser). [36]

Le spectre IR présente des bandes de vibration de forte intensité à :

- 1690 cm^{-1} correspondant à la bande de vibration du groupement CO de l'acide carboxylique.
- 3434 et 3502 cm^{-1} correspondant aux bandes de vibration d'une fonction amine primaire.

- Spectre RMN ^1H et ^{13}C

Le spectre RMN ^1H (Figure 14) indique la présence de deux doublets aromatiques à δ_H 6,82 et 7,75 ppm intégrant pour deux protons chacun, ce qui indique une symétrie au niveau d'un cycle aromatique 1,4-disubstitué.

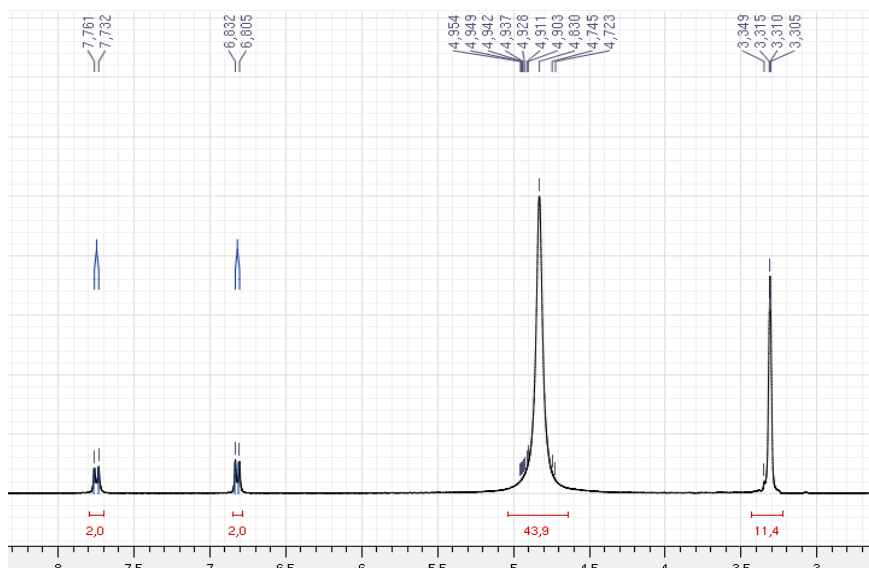


Figure 14 : spectre RMN ^1H du composé 2 (38) ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, 300 MHz)

Le spectre RMN ^{13}C JMOD (Figure 15) indique la présence de deux carbones aromatiques à δ_C 116 et 130 ppm.

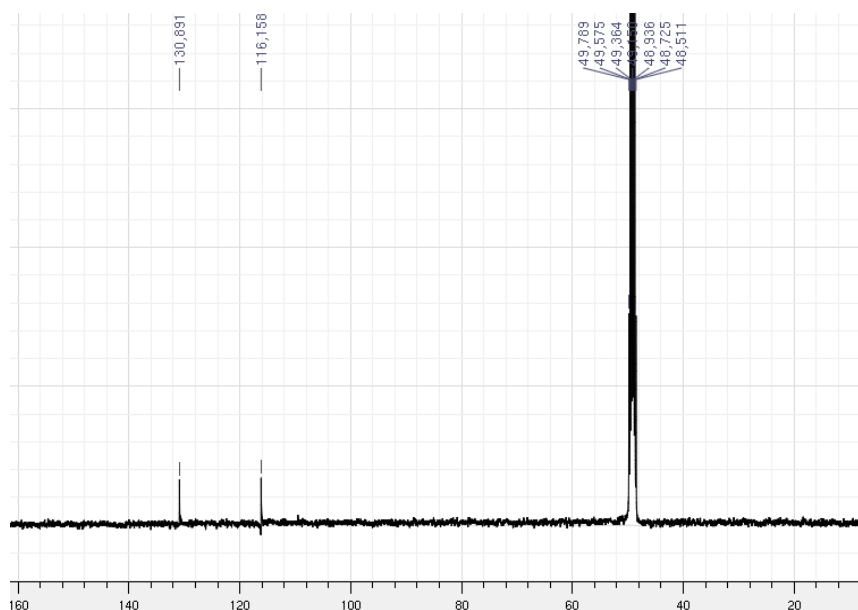


Figure 15 : spectre RMN ^{13}C JMOD du composé 2 (38) ($\text{CD}_3\text{OD-d}_4$, 100 MHz)

- Attribution des protons aux carbones spectres HSQC :

Les corrélations hétéronucléaires 1J proton-carbone (HSQC), ont permis d'attribuer les protons à chaque carbone (Tableau 4).

Tableau 4 : Données RMN composé 2 (38) (CD3OD-d4, 400 MHz)

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (multiplicité, J en Hz)
1	162	
2 ; 6	130	7,75 (d, 8,6)
3 ; 5	116	6,82 (d, 8,4)
4	125	
1-COOH	172	

- Analyse des spectres 2D

Toutes ces observations sont en adéquation avec la structure du **composé 2** comme l'illustre la Figure 16.

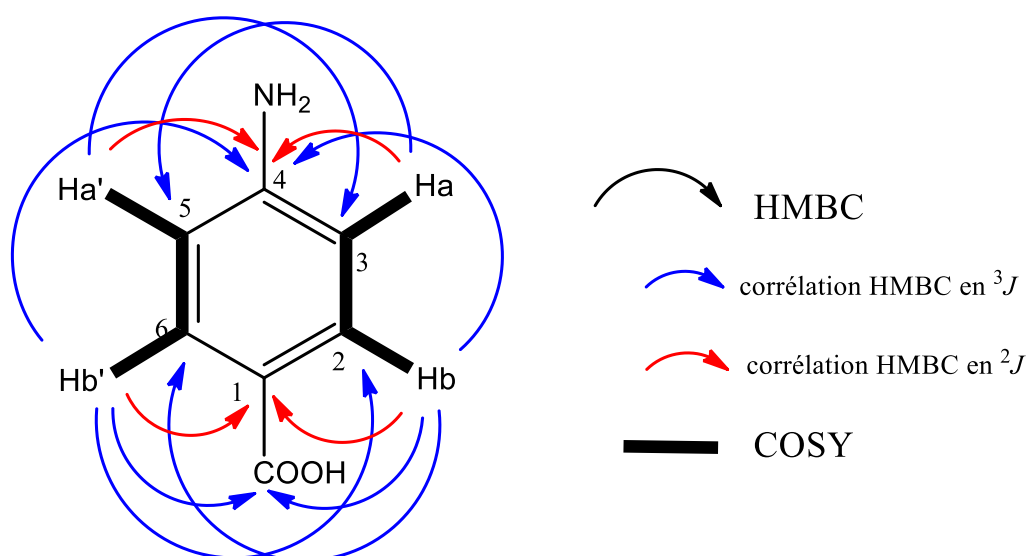
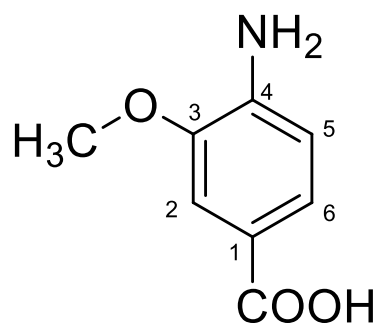


Figure 16 : Principales corrélations HMBC et COSY du composé 2 (38)

2.1.3 Composé 3 : acide 4-amino 3-méthoxybenzoïque



39

Figure 17 : Structure du composé 3 : acide 4-amino 3-méthoxybenzoïque (39)

- Spectre de masse

Le spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (SMHRES +) montre un pic pseudo moléculaire $[M + H]^+$ à $m/z = 168,0663$. La formule brute $C_8H_{10}NO_3$ du composé 3 (**39**) a pu ainsi être déterminée. Ce composé présente un degré d'insaturation de 5.

- Spectre IR et spectre UV

Le spectre UV du composé a montré des bandes d'absorption à 280 nm ce qui correspond à un motif aromatique.

Le spectre IR présente des bandes de vibration de forte intensité à :

- 1694 cm^{-1} correspondant à la bande de vibration du groupement carbonyle.
- 3406 et 3498 cm^{-1} correspondant aux bandes de vibration d'une fonction amine primaire.

- Spectre RMN ^1H et ^{13}C

Le spectre RMN ^1H (Figure 18) indique la présence d'un singulet aliphatique déblindé à $\delta_H 3,94$ ppm intégrant pour trois protons, ce qui indique la présence d'un méthoxy.

Trois multiplets sont visualisés dans la zone aromatique un doublet $\delta_H 7,01$ ppm ($J_{ortho} = 8,3$ Hz), un doublet épais à $\delta_H 7,48$ ppm ($J_{méta} = 2$ Hz) et enfin un doublet dédoublé à $\delta_H 7,43$ ppm avec une constante *ortho* et *méta*. Ces observations suggèrent la présence d'un noyau aromatique 1,3,4-trisubstitué.

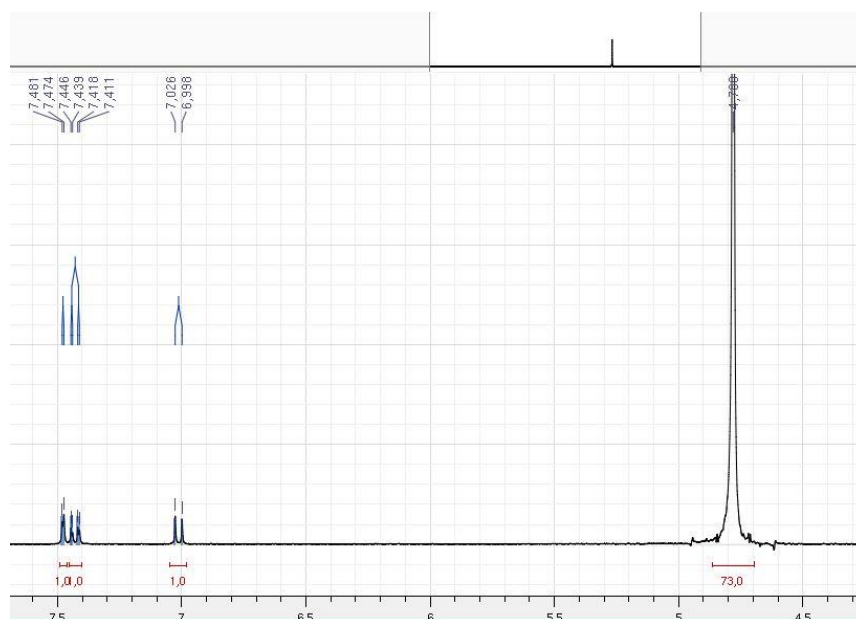


Figure 18 : spectre RMN 1H du composé 3 (39) (D3O-d4, 300 MHz)

Le spectre RMN ^{13}C JMOD (Figure 19) n'indique la présence que cinq carbones dont 3 carbones aromatiques représentant des méthines d'hybridation sp^2 , un carbone d'hybridation sp^3 et un carbone quaternaire très déblindé préfigurant d'un acide carboxylique.

Néanmoins la formule brute nous indique que le **composé 3** est constitué de huit carbones.

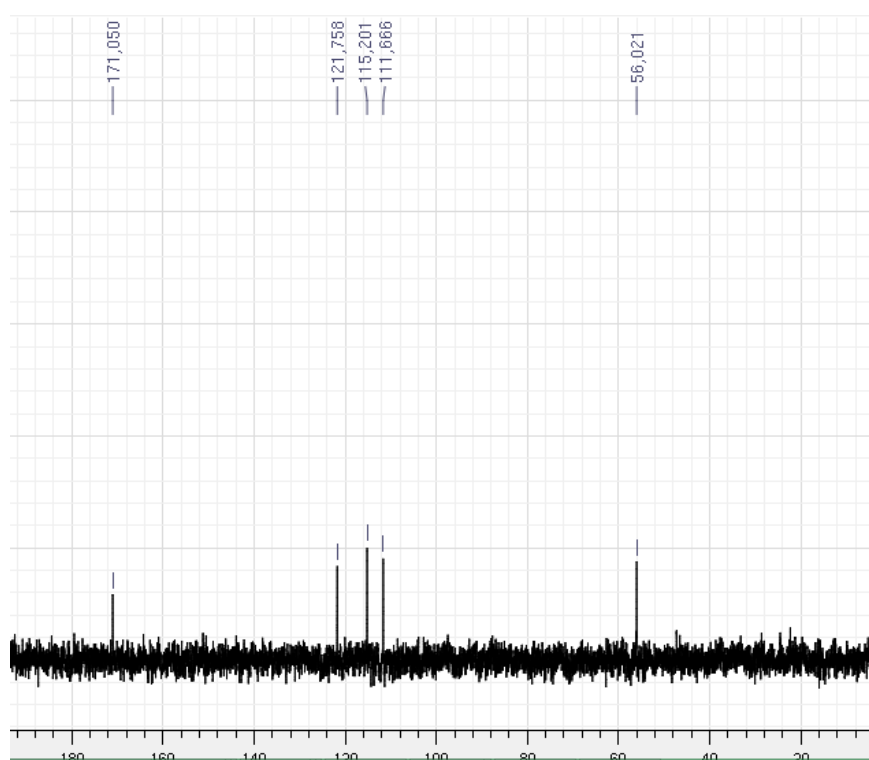


Figure 19 : spectre RMN ^{13}C JMOD du composé 3 (39) (D3O 100 MHz)

- Attribution des protons aux carbones, spectre HSQC et révélation des carbones quaternaires, spectre HMBC.

Les corrélations hétéronucléaires 1J proton-carbone (HSQC) et les corrélations 3J proton-carbone (HMBC) ont permis de définir la structure du **composé 3**.

En effet le spectre HMQC a permis d'attribuer les protons à chaque carbone et le spectre HMBC a révélé 3 carbones quaternaires que le spectre RMN ^{13}C JMOD ne montrait pas, à cause d'un temps de relaxation insuffisant (Tableau 5).

Tableau 5 : Données RMN du composé 3 (39) (D2O-d2, 400 MHz)

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (multiplicité, J en Hz)
1	149	
2	111	7,48 (d, 2)
3	147	
4	125	
5	115	7,01 (d, 8,3)
6	121	7,43 (dd, 2 ; 8,2)
1-COOH	171	
3-OMe	56	3,94 (s)

- Analyse des spectres 2D

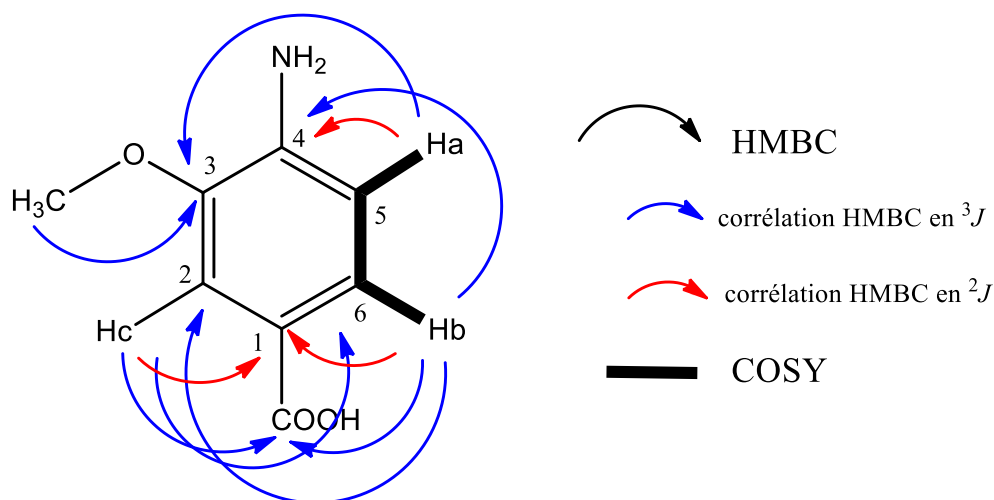
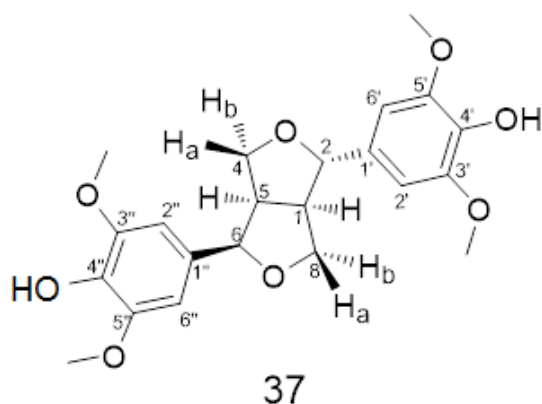


Figure 20 : Principales corrélations HMBC et COSY du composé 3 (39)

Toutes ces observations sont en adéquation avec la structure du **composé 3**, comme l'illustre la Figure 20, ce qui conclut à l'isolement d'un nouveau composé de type acide *para* aminobenzoïque substitué en *mé*ta par un méthoxy.

Composé 1 : (+) *epi*-syringarésinol



$$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8,$$

$$M = 418,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Aspect : poudre blanche

SM-ESIHR : $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z = 441,1526$ (calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{Na}$, 441,1525)

UV, λ_{max} (MeOH) (log ϵ) : 273 nm (4,08), 235 nm (4,16), 210 nm (4,12)

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 3400, 1610, 1500

$[\alpha]_{\text{D}}$: + 103° (*c* 0,08, CHCl_3)

RMN ^1H (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$)

δ (ppm) :

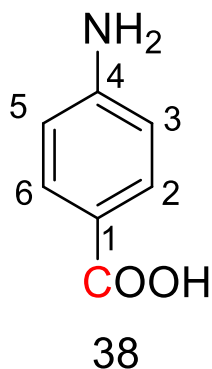
2,95 (1H, <i>m</i> , H-1) ;	3,30 (1H, <i>m</i> , H-4b) ;	3,41 (1H, <i>m</i> , H-5) ;
3,81 (1H, <i>m</i> , H-4a) ;	3,85 (12H, <i>s</i> , $-\text{OCH}_3-3'-5'-3''-5''$) ;	3,88 (1H, <i>m</i> , H-8a) ;
4,15 (1H, <i>d</i> , $J = 9,4 \text{ Hz}$, H-8b) ;	4,44 (1H, <i>d</i> , $J = 6,7 \text{ Hz}$, H-2) ;	4,87 (1H, <i>d</i> , $J = 6,0 \text{ Hz}$, H-6) ;
6,66 (2H, <i>sl</i> , H-2'-6') * ;	6,67 (2H, <i>sl</i> , H-2''-6'') *	

* Protons interchangeables

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$)

δ (ppm) :	51,3 (C-5) ;	55,8 (C-1) ;	70,8 (C-4) ;	72,2 (C-8) ;
	83,7 (C-6) ;	89,7 (C-2) ;	104,2 (C-2'-6'') ;	104,2 (C-2'') ;
	104,7 (C-6')	130,7 (C-1'-1'') ;	133,3 (C-4'') ;	133,3 (C-4') ;
	149,3 (C-5'-5'') ;	149,5 (C-3'-3'') ;		

Composé 2 : acide *para* aminobenzoïque



$$M = 137,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Aspect : solide amorphe incolore

SM-ESIHR : $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z = 160,0374$ (calculée pour $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2\text{Na}$, 160,0374)

UV, λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$) : 278 (4,5); 355 (3,5) nm

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 777, 1690, 3434, 3502

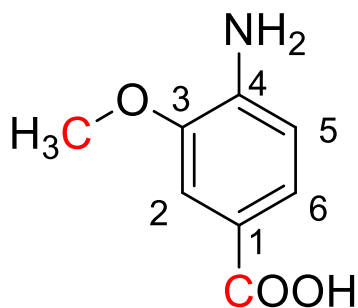
RMN ^1H (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$)

δ (ppm) : 6,82 (2H, *d*, $J = 8,4$ Hz, H-3, H-5)
7,75 (2H, *d*, $J = 8,6$ Hz, H-2, H-6)

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$)

δ (ppm) : 116 (C-3, C-5) ; 125 (C-4) ;
130 (C-2, C-6) ; 162 (C-1) ;
172 (COOH)

Composé 3 : acide 4-amino 3-méthoxybenzoïque



$$M = 167,06 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

39

Aspect : solide amorphe incolore

SM-ESIHR : $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z = 168,0663$ (calculée pour $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_3$, 168,0661)

UV, λ_{max} (MeOH) ($\log \epsilon$) : 278 (4,5); 355 (3,5) nm

IR, ν_{max} en cm^{-1} : 777, 1694, 3406, 3498.

RMN ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}-d_2$)

δ (ppm) : 3,94 (3H, s, OCH₃) ; 7,01 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5) ;

7,43 (1H, dd, $J_o = 8,2$ Hz, $J_m = 2$ Hz, H-6) ; 7,48 (1H, d.e, $J_m = 2$ Hz, H-2)

RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{D}_2\text{O}-d_2$)

δ (ppm) : 56 (OCH₃) ; 111 (C-2) ; 115 (C-5) ;

121 (C-6) ; 125 (C-4) ; 147 (C-3) ;

149 (C-1) ; 171 (COOH) ;

Discussion

L'étude phytochimique de *Nitraria retusa* a conduit à l'isolement de trois molécules, Le (+)-*epi*-syringarésinol (**37**), un lignane, l'acide *para* aminobenzoïque (**38**) et l'acide 4-amino-3-méthoxybenzoïque (**39**) molécules qui sembleraient être issues du métabolisme primaire de la plante.

Le (+)-*epi*-syringarésinol (**37**) et l'acide *para* aminobenzoïque (**38**) sont pour la première fois décrits dans le genre *Nitraria*. L'acide 4-amino-3-méthoxybenzoïque (**39**) est décrit pour la première fois comme substance naturelle isolée d'un végétal.

L'étude des spectres RMN 2D combinée aux spectres de masse, UV, IR et au pouvoir rotatoire a permis la détermination de la structure de ces trois composés et leur configuration absolue.

Etonnamment, malgré la chimiotaxonomie du genre *Nitraria* faisant preuve d'une impressionnante diversité alcaloïdique, les travaux expérimentaux n'ont pas abouti à l'isolement d'alcaloïdes.

Plusieurs hypothèses, répondant à cette absence, peuvent être avancées.

En effet, la littérature sur le sujet montre que les extractions alcaloïdiques débutent sur une masse de matériel végétal de plusieurs kilogrammes. Les rendements rapportés sont de l'ordre du 10^{-2} , 10^{-3} pourcent. [19] De plus, une grande partie des alcaloïdes se retrouvent dans les fruits en période de fructification. Les fruits ne faisaient pas partie de la matière végétale extraite.

En outre, les extractions alcaloïdiques sont pH-dépendantes et la solubilité des alcaloïdes dans les solvants dépend aussi de la basicité des molécules. Celle-ci varie selon disponibilité du doublet de l'azote. Ainsi, la présence d'ammoniums quaternaires ou encore d'hétérocycles azotés, comme la pyridine, diminue la mobilité de ce doublet non liant et donc la basicité de la molécule. Il est alors plus difficile d'extraire ces molécules par le biais de méthodes classiques.

Ces différents paramètres sont donc à prendre en compte dans les résultats et peuvent expliquer les faibles rendements d'extractions.

Conclusion et perspectives

Les composés 1 (**37**) et 2 (**38**) ont déjà fait l'objet de plusieurs publications particulièrement sur leurs activités biologiques respectives.

En effet, l'acide *para*-aminobenzoïque (*p*ABA) ou vitamine B10 fait partie intégrante de la biosynthèse de l'acide folique (vitamine B9) dans les plantes. Il intervient aussi dans l'oxydation permettant d'aboutir à la production de mélanine.

Il est ainsi utilisé dans certaines spécialités pharmaceutiques particulièrement dermatologiques dans certains écrans totaux et spécialités préventives des lucites (PABASUN®). [37]

De plus, le *p*ABA est une des molécules qui constitue l'acide folique. Son rôle dans la biosynthèse de l'acide folique et donc dans l'acide tétrahydrofolique, l'implique dans la synthèse des bases puriques.

Des études ont ainsi montré qu'un régime alimentaire dépourvu d'acide para aminobenzoïque [38] ou que la prise d'inhibiteur de cette molécule supprimait la parasitémie de *Plasmodium berghei* et de *Plasmodium vinckei*. En effet, *p*ABA est un antagoniste compétitif de certains antimalariques. Son inhibition permet la pleine action des sulfonamides et triméthoprime et donc l'arrêt de la synthèse de l'acide folique. La synthèse des acides puriques est altérée, la maturation du parasite du stade trophozoïte immature au stade schizonte ne se produit plus. [39]

Le (+)-*epi*-syringarésinol est un lignane, souvent retrouvé en mélange diastéréoisomérique avec le (+)-syringarésinol dans l'enveloppe des graines oléagineuse telles que les graines de sésame ou de lin. L'*epi*-syringarésinol a ainsi été isolé dans *Synsepalum dulcificum* Daniell. (1852), de la famille des Sapotaceae et dans *Annona cherimola* qui est une Annonaceae. [40][41]

De plus, quelques-uns de ses dérivés glycosylés (comme l'*epi*-syringaresinol-4"-*O*-*D* -glucopyranoside et le 6-*epi*-syringaresinol (1→2)-β-*D*-apiofuranosyl-(1→2)-β-*D*-glucopyranoside) ont été retrouvés dans *Pedicularis torta* de la famille des Orobanchaceae ou encore dans *Albizia myriophylla* de la famille des Fabaceae. [42][43]

Le (+)-syringarésinol a été isolé dans de très nombreuses espèces (*Prunus mume* Sieb. & Zucc, de la famille des Rosaceae [44], *Magnolia thailandica* Noot. & Chalermglin, une Magnoliaceae [45], *Parthenium hysterophorus* L., classé dans les Compositae [35] et *Lyonia ovalifolia* var. *elliptica* Sieb. & Zucc., de la famille des Ericaceae).

Des études, traitant de l'activité biologique de l'*epi*-syringarésinol, rapportent l'activité antioxydante, anti-vieillessement et un effet inhibiteur sur les cellules cancéreuses de la peau. [40]

La plupart des références relatent de l'activité biologique du syringarésinol et décrivent son effet vasodilatateur par le biais de l'augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO). [46] Cette molécule, outre ces propriétés vasoprotectrices, posséderait une activité antifongique, anti-inflammatoire, antimalarique et antileucémique [35], ainsi qu'une activité inhibitrice de la motilité d'*Helicobacter pylori* démontrée lors

d'études sur le fruit de *Prunus mume* qui est un abricot utilisé en médecine traditionnelle chinoise. [44]

Ces propriétés thérapeutiques imputables au syringarésinol pourraient être attribuées à l'*epi*-syringarésinol par extrapolation. Néanmoins, des tests biologiques sur des modèles biologiques (champignons, bactéries, plasmodium, caspases) pourraient confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Les multiples références faisant état de l'activité biologique et de l'utilisation thérapeutique des composés 1 (**37**) et 2 (**38**) incitent à poursuivre cette étude phytochimique par une étude biologique des extraits bruts et des produits isolés.

Les domaines d'activité testés vont être orientés selon les propriétés biologiques déjà reconnues de la plante et des molécules isolées. Ainsi, des tests sur le paludisme, des tests sur les caspases pour l'activité proapoptotique et des tests sur les propriétés antioxydantes et anti-radicalaires seront effectués dans un proche avenir.

III. Partie expérimentale

1 Procédures générales

1.1 Solvants

Les extractions et les fractionnements par chromatographie sur colonne ont été réalisés avec des solvants (Sigma-Aldrich et CarloErba) de pureté 99 %.

Des solvants qualité CLHP ou à 100 % de pureté ont été utilisés pour les séparations ultérieures et la déréplication. Lors de ces mêmes procédures de l'eau milliQ, filtrée avec l'appareil Millipore® Synergy UV, a été employée.

1.2 Fractionnements, purifications et suivi d'extractions

1.2.1 Chromatographie sur couches minces (CCM)

L'avancée des différentes séparations chromatographiques et ainsi le fractionnement ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques aluminium de gel de silice 60 F de 0.2 mm d'épaisseur (Merck KGaA). La visualisation des plaques s'est faite sous UV (254 nm) puis elles ont été révélées par pulvérisation de réactif de Dragendorff sans chauffage.

- Réactif de Dragendorff : 1,7 g de nitrate de bismuth, 20 mL d'acide acétique dans 80 mL d'eau, 72 g d'iodure de potassium dans 180 mL d'eau.

1.1.1 Chromatographie sur colonne (CC)

Les chromatographies sur colonne (CC) ont été réalisées dans des colonnes en verre de 2,5 cm et 3 cm à pression atmosphérique. Le support chromatographique utilisé était de la silice de granulométrie fine (6-35 μm).

1.1.2 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

1.1.2.1 CLHP en phase inverse

Les purifications des fractions ont été réalisées par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse, sur colonnes analytiques ou préparatives et sur différents appareils.

- Une chaîne CLHP Waters 1525 binary pump
 - Un injecteur Waters 717plus Autosampler
 - Un détecteur à barrette de diode (190-600 nm) Waters 2996
 - Une colonne analytique Synergy 4u fusion-RP C₁₈ (PHENOMENEX) (80Å, 150 x 4,6 mm)

- Logiciel Empower pro
- Une chaîne CLHP Waters Delta Prep
 - Un détecteur à barrette de diode (190-600 nm) Waters 2996
 - Une colonne préparative X-Bridge C₁₈ (5 μm, 19 x 150 mm)
 - Logiciel Empower pro[®]

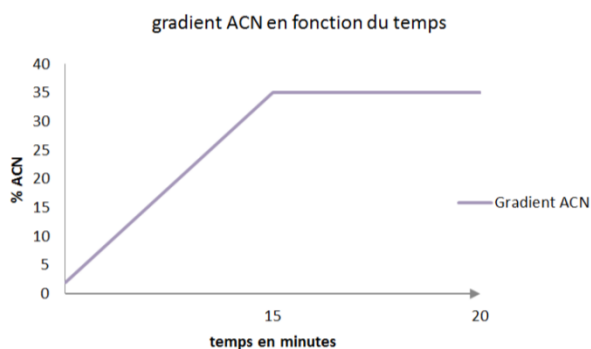


Figure 21 : gradient CLHP-préparative F.7

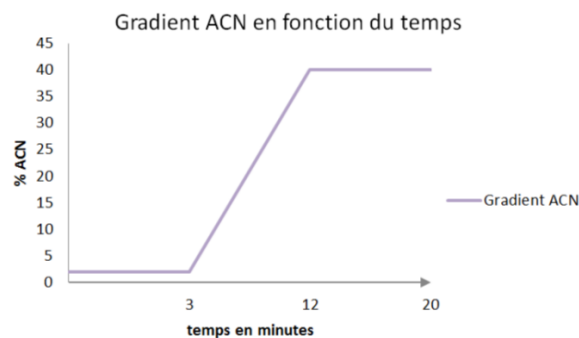


Figure 22 : gradient CLHP-préparative F.7'

L'élution des produits a été faite avec des mélanges H₂O + 0,2 % acide HCOOH/Acétonitrile à différents gradients (Figure 21 et Figure 22).

1.1.1.1 CLHP-SM

Les chromatographies liquides hautes performances couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM) ont été réalisées sur une chaîne Alliance Waters 2695 munie d'un détecteur à barrette de diode (190-600 nm, Waters 2996) et couplée à un spectromètre TOF (Time Of Flight) LCT-Premier Waters. Les données sont traitées par le logiciel Masslynx[®].

1.2 Analyses physiques et spectrales

1.2.1 Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masse haute résolution ESI (Electro Spray Ionisation) ont été obtenus par ionisation positive sur un spectromètre de masse ESI TOF LCT-Premier Waters.

1.2.2 Pouvoir rotatoire [α]_D

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Polaar 32. Les expériences ont été réalisées dans une cuve de 1 dm et les composés ont été solubilisés dans le chloroforme.

1.2.3 Spectrométrie ultra-violet (UV)

Les spectres ultra-violet (UV) ont été mesurés dans une cuve en quartz de 1 cm, avec un spectromètre Varian Cary 100 scan. Les composés ont été solubilisés dans le méthanol.

1.2.4 Spectrométrie infra-rouge (IR)

Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer® type 257 (ν en cm^{-1}).

1.2.5 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisées sur des appareils Bruker 300, 400 MHz et 400 MHz micro-sonde en utilisant le méthanol- d_4 ou l'oxyde de deutérium comme solvant.

Les déplacements chimiques, en ppm (partie par million), sont étalonnés par rapport au TMS (tétraméthylsilane) qui est le solvant de référence (Déplacement chimique, $\delta = 0$ ppm).

Les valeurs des δ des solvants utilisées sont celles publiées par le département de chimie de Bar-Ilan rapportées dans le Tableau 6. [47]

Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes : s (singulet), sl (singulet large), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), q (quadruplet). L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D : ^1H , ^{13}C , associées aux expériences 2D ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, en utilisant le logiciel NMR NoteBook®.

Tableau 6 : déplacements chimiques des solvants utilisés

Solvant	δ_c (ppm) (multiplicité)	δ_H (ppm) (multiplicité)
D_2O		4,79 (1)
CD_3OD	49,00 (7)	3,31 (5)
		4,87 (1)

2 Protocoles d'extractions, purifications de *Nitraria retusa* Asch.

2.1 Extractions

La plante entière, sans les fruits, a été séchée puis pulvérisée pour obtenir 420 g de matière végétale. Dans un premier temps, une extraction solide/liquide méthanolique (3 x 300 mL) sous sonication à 30°C a été effectuée.

L'extrait méthanolique a été filtré sous vide et évaporé à 36°C à l'évaporateur rotatif afin d'éliminer le marc épuisé ainsi que les limons et évaporé à 36°C à l'évaporateur rotatif.

Le résidu organique obtenu a été repris par une solution aqueuse d'HCl 10 % (pH=1, 400 mL) puis contre-extrait par du dichlorométhane (6 x 200 mL) ce qui a permis l'élimination des produits lipophiles tels que la chlorophylle. La phase organique est éliminée après séparation de la phase aqueuse acide par l'utilisation d'une ampoule à décanter.

L'extraction alcaloïdique *stricto sensu*, comme l'illustre la Figure 23, commence par l'alcalinisation à pH=10 de la phase aqueuse acide (600 mL). Cette alcalinisation a été réalisée avec une solution de soude (250 mL NaOH (5N)) afin d'obtenir une phase aqueuse alcaline qui a été contre-extraite par un volume v/2 de dichlorométhane (5 x 500 mL). Il en résulte une phase aqueuse alcaline et une phase organique finale. La dernière a été récupérée par le biais d'une ampoule à décanter et évaporée à l'évaporateur rotatif à 39° C. La masse obtenue de l'extrait brut alcaloïdique était de 126,9 mg.

Dans un second temps, la phase aqueuse alcaline (700 mL) a été reprise lors d'une contre-extraction liquide/liquide par un volume v/2 d'un mélange de dichlorométhane et de butanol dans des proportions 7 : 3 (315 mL DCM, 135 ml BuOH). Cette extraction a été faite en ampoule à décanter et répétée 6 fois. La phase organique obtenue a été récupérée et évaporée à 39°C, sa masse pondérale est de 330 mg.

Au final, ces multiples extractions ont mené à deux extraits bruts, un extrait alcaloïdique et un dichloro-butanolique.

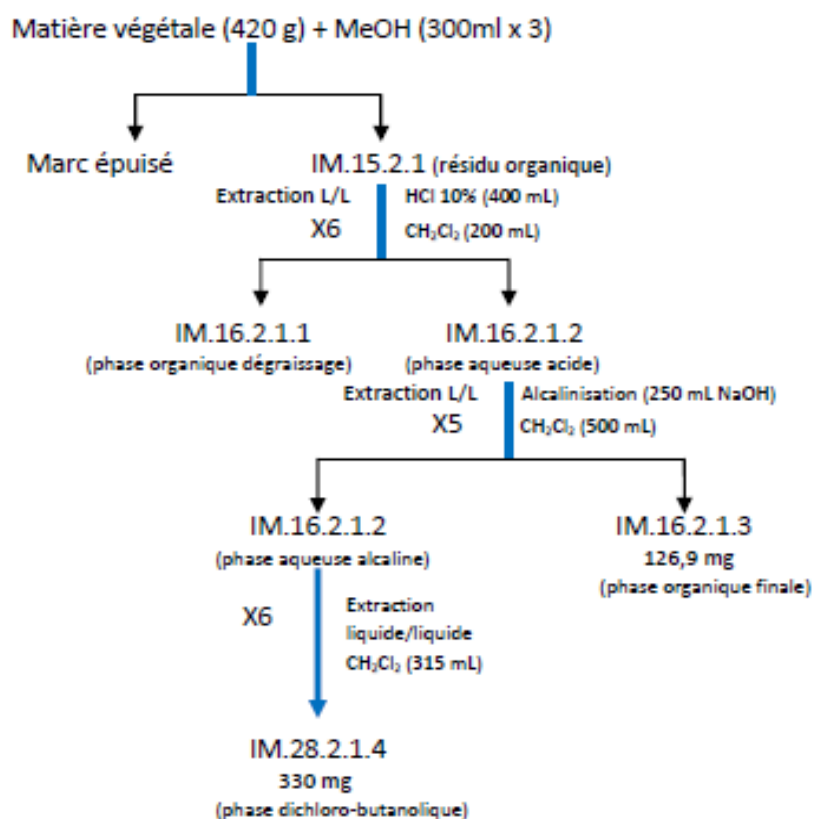


Figure 23 : schéma d'extraction de *Nitraria retusa*

Evaporateur rotatif 39° C

2.2 Purifications

2.2.1 Purifications de l'extrait brut alcaloïdique

L'extrait brut alcaloïdique, après solubilisation dans du DCM, a été soumis à une CC sur gel de silice en utilisant un gradient DCM : MeOH de polarité croissante (100 : 0 jusqu'à 85 : 15) avec 2 % de NH₄OH dans la phase éluante. Cette séparation sur colonne a mené à dix fractions (F1- F10) constituées selon leurs profils CCM (Figure 24).

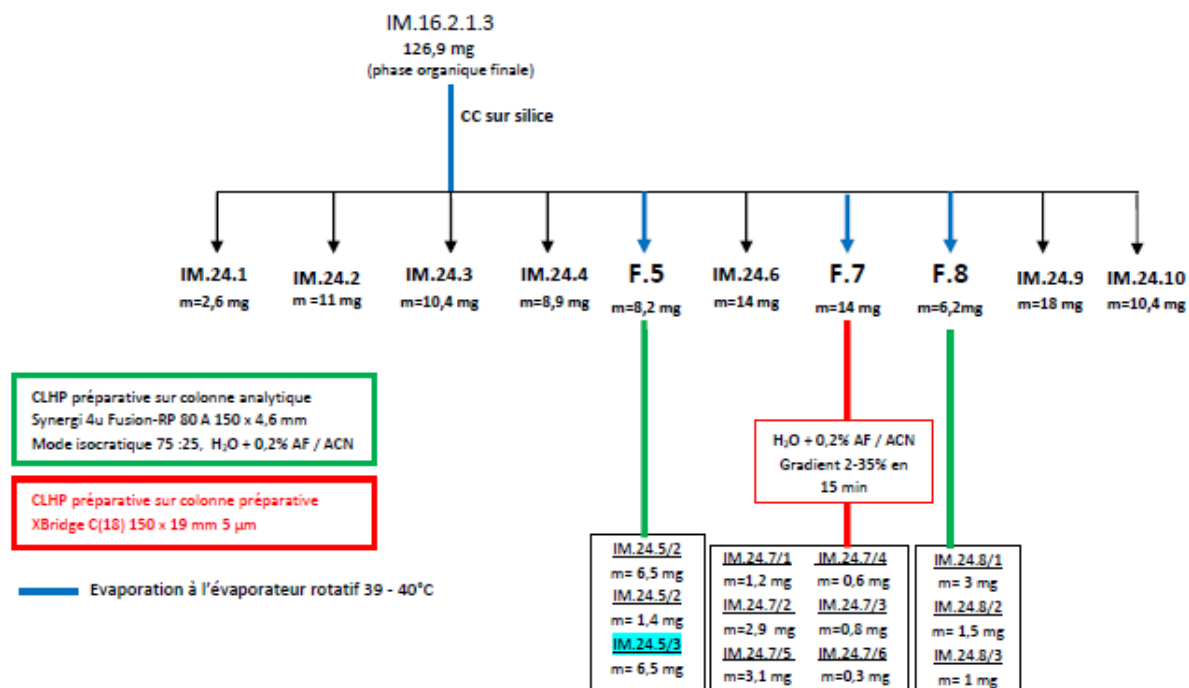


Figure 24 : schéma de purifications de l'extrait alcaloïdique

Les fractions F5 à F8 ont été analysées en CLHP-SM dans un but de déréplication, afin de détecter des masses molaires d'alcaloïdes précédemment décrites dans la littérature.

La fraction F5 (m = 8,2 mg) (encadré violet Figure 25) a été soumise à une CLHP préparative sur colonne analytique C₁₈ en utilisant une phase mobile H₂O + 0,2 % acide formique/ACN (75 : 25) en mode isocratique, à un débit de 1 mL/min durant 20 minutes pour obtenir le composé 1 (m = 6,5 mg, Rdt = 0,015 %) (Profil CLHP-SM de F5, voir annexe 1).

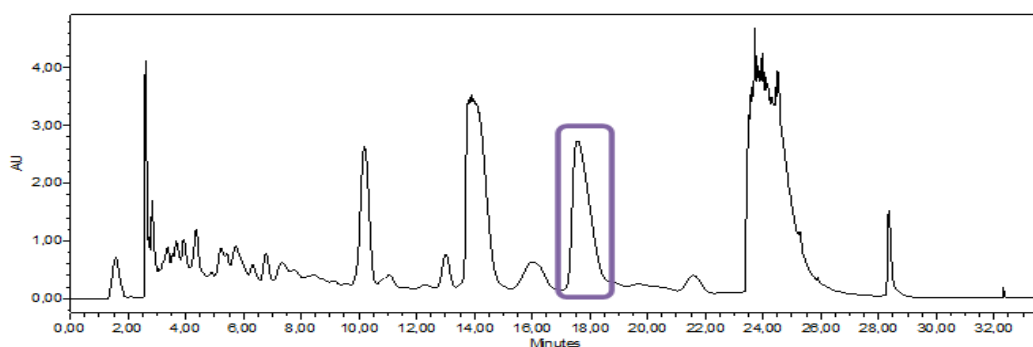


Figure 25 : Chromatogramme CLHP-préparative de la fraction F5

La fraction F7 (m = 20,7 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une colonne préparative C₁₈ en utilisant un gradient H₂O + 0,2 % acide formique/ACN (98 : 2 à 65 : 35 en 15 minutes) (Figure 21), avec un débit de 17 mL/min pendant 25 minutes, afin d'obtenir le composé 4 (Pic rouge Figure 26) (m = 2,9 mg, Rdt = 0,007 %) qui est en court de détermination.

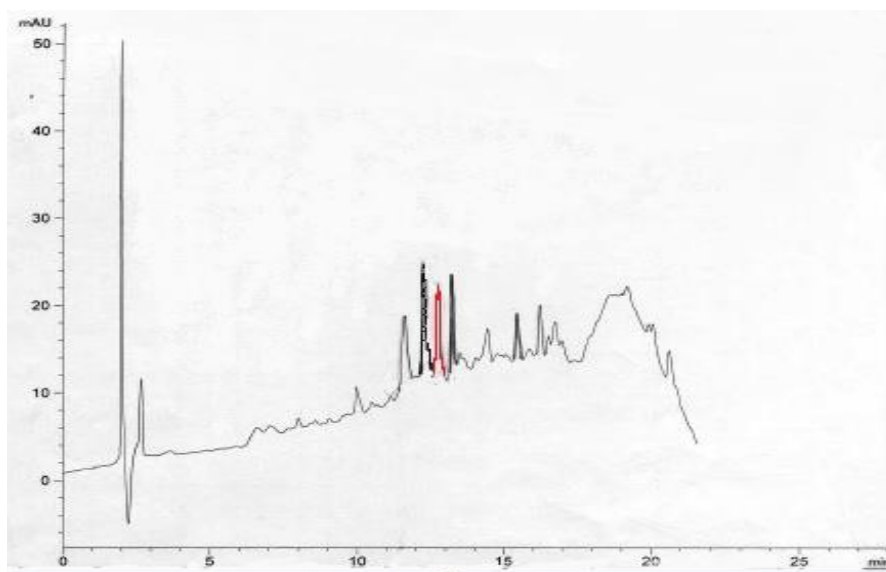


Figure 26 : Chromatogramme CHLP-préparative de la fraction F7

2.2.2 Purifications de l'extrait brut dichloro-butanolique

L'extrait brut dichloro-butanolique, après solubilisation dans du DCM, a été soumis à une CC sur gel de silice en utilisant un gradient DCM : MeOH de polarité croissante (100:0 jusqu'à 80 : 20) avec 1 % de triéthylamine dans la phase éluante. Afin d'éluer de la colonne les derniers composés, une phase mobile terminale constituée d'un mélange MeOH/HCOOH/acétone dans des proportions 4 :0,1 :6 a été utilisée. Cette séparation sur colonne a mené à dix fractions (F.1' - F.10') (Figure 27) constituées selon leurs profils CCM (Profil CLHP-SM de F7', annexe 2).

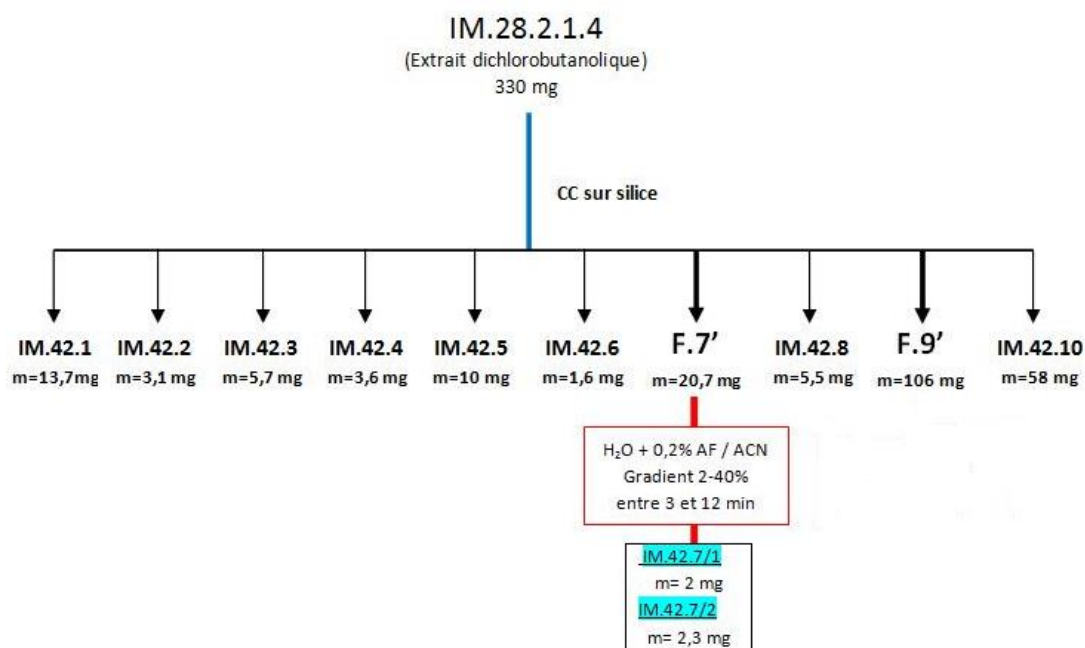


Figure 27 : Schéma de purification de la fraction F7'

La fraction F.7' (m = 20 mg) a été soumise à une CLHP préparative sur une colonne préparative C₁₈ en utilisant un gradient H₂O + 0,2 % acide formique/ACN (Figure 22). Durant les trois premières minutes, le mélange éluant a été utilisé en mode isocratique (98 : 2), puis en gradient (98 : 2 à 65 : 35) de 3 à 12 minutes, pour finir par en mode isocratique (65 :35) de 12 à 25 minutes, avec un débit de 17 ml/min pendant 25 min.

De cette purification ont été isolés deux composés. Le composé 2 de masse m = 2 mg et de rendement Rdt = 0,0048 % (Figure 28, Pic 1) et le composé 3 de masse m = 2,3 mg et de rendement Rdt = 0.007 % (Figure 28, Pic 2).

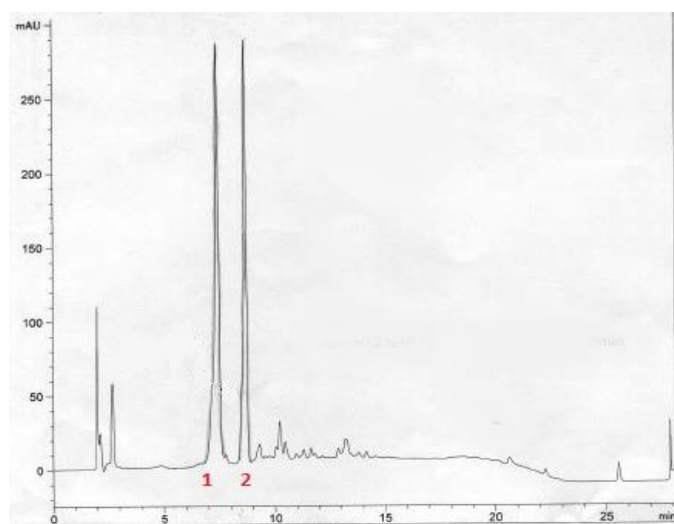


Figure 28 : Chromatogramme CLHP-préparative de F7'

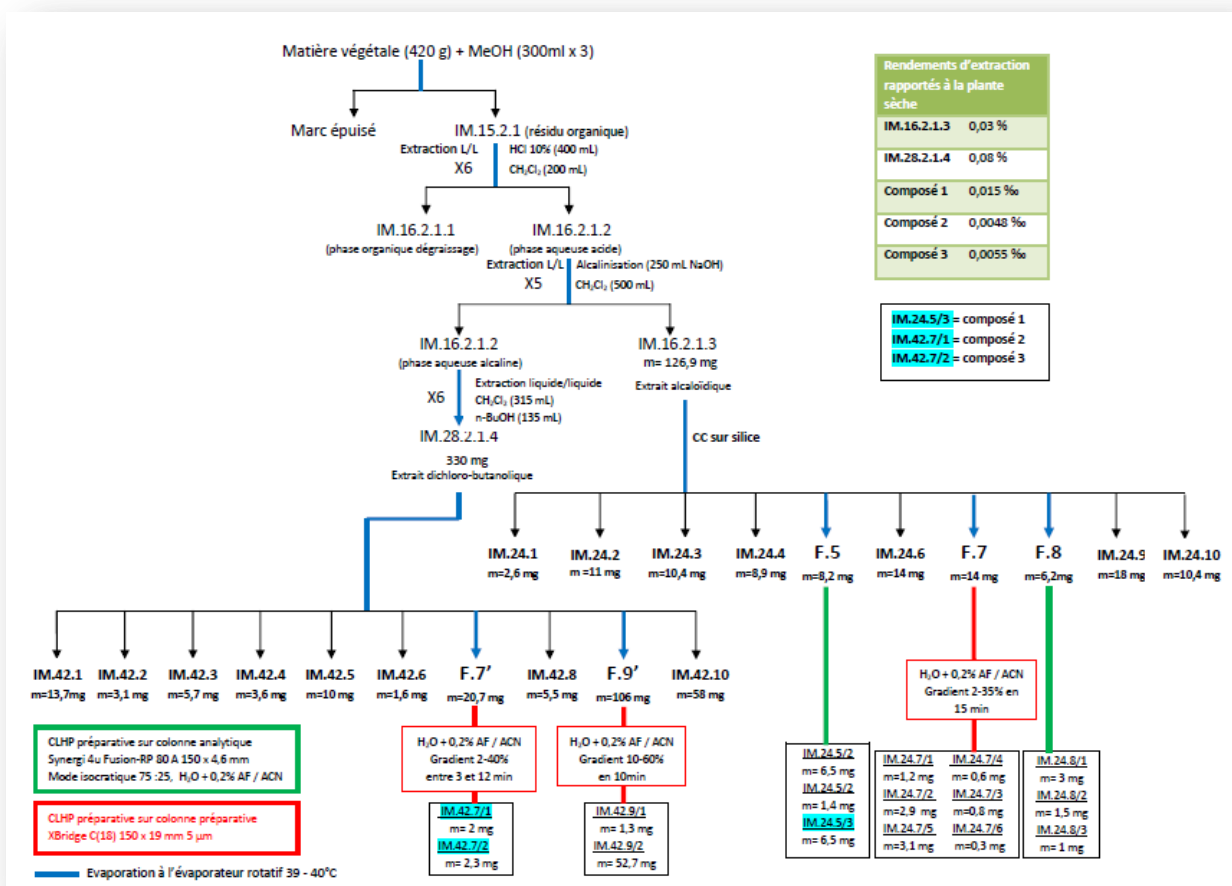


Figure 29 : schéma d'extractions et purifications de *Nitraria retusa*, voir annexe 3

Références bibliographiques

- [1] K. B. B. Bremer, P. S. S. and P. F. M. W. Chase, M. F. Fay, J. L. Reveal, D. E. Soltis, and Stevens, "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III," *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 161, no. 2, pp. 105–121, Oct. 2009.
- [2] E. Shamsou, S. Rabei, and R. Hamdy, "Identification keys and numerical studies of Zygophyllaceae (S. STR.) and allied families in Egypt," *Assiut Univ. J. Bot.*, vol. 42, no. 2, pp. 79–106, 2013.
- [3] J. L. Reveal, "An outline of a classification scheme for extant flowering plants," *Phytoneuron*, no. 37, pp. 1–221, 2012.
- [4] L. Watson and M. J. Dallwitz, "The families of flowering plants." 1992.
- [5] J. Hadj Salem, "Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique," Nancy-Université, 2009.
- [6] N. A. M. S. S. R. Hussein, S. A. Kawashty, M. E. Tantawy, "Chemosystematic studies of *Nitraria retusa* and selected taxa of Zygophyllaceae in Egypt," *Plant Syst. Evol.*, vol. 277, pp. 251–264, 2009.
- [7] J.-A. Duan, I. D. Williams, C.-T. Che, R.-H. Zhou, and S.-X. Zhao, "Tangutorine: A novel β -carboline alkaloid from *Nitraria tangutorum*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 40, no. 13, pp. 2593–2596, Mar. 1999.
- [8] F. K. T. S. Tulyaganov and Allaberdiev, "ALKALOIDS FROM PLANTS OF THE *Nitraria* GENUS . STRUCTURE OF SIBIRIDINE," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 39, no. 3, pp. 228–229, 2003.
- [9] T. S. Tulyaganov, "ALKALOIDS OF *Nitraria sibirica* . STRUCTURES OF NITRARAMIDINE AND NITRARADINE," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 38, no. 6, pp. 479–481, 2002.
- [10] S. Y. Y. Z. Osmanov, A. A. Ibragimov, "Structure of Sibirine," *plenum Publ. Corp.*, pp. 1981–1983, 1982.
- [11] A. Deyine, J.-M. Poirier, L. Duhamel, and P. Duhamel, "Synthesis of racemic nitramine, isonitramine and sibirine," *Tetrahedron Lett.*, vol. 46, no. 14, pp. 2491–2493, Apr. 2005.
- [12] A. A. Ibragimov, Z. Osmanov, M. R. Yagudaev, and S. Y. Yunusov, "Alkaloids from *Nitraria sibirica*. Structure of nitrabirine.," *Khimiya Prir. Soedin.*, no. 2, pp. 213–216, 1983.
- [13] A. A. Ibragimov, S. K. Maekh, and S. Y. Yunusov, "Structure of schoberidine.," *Khimiya Prir. Soedin.*, vol. 11, no. 2, pp. 275–276, 1975.
- [14] T. S. Tulyaganov, N. M. Kozimova, and F. K. Allaberdiev, "Alkaloids from plants of the genus *Nitraria*," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 42, no. 2, pp. 198–200, Mar. 2006.

- [15] A. A. Ibragimov and S. Y. Yunusov, "Nitraria schoberi alkaloids. Structure of nitrarine.," *Khimiya Prir. Soedin.*, no. 4, pp. 536–544, 1985.
- [16] T. S. Tulyaganov, A. A. Ibragimov, and S. Y. Yunusov, "Alkaloids of Nitraria komarovii. III. Structure of the new alkaloid komarovidine.," *Khimiya Prir. Soedin.*, no. 5, pp. 732–733, 1980.
- [17] T. S. Tulyaganov I and O. E. Makhmudov, "ALKALOIDS OF Nitraria komarovii. STRUCTURES OF KOMARIN AND PEGANOL-N-OXIDE," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 36, no. 1, pp. 60–61, 2000.
- [18] F. K. A. T. S. Tulyaganov, "Alkaloids from Nitraria komarovii. Structures of nitraridine, dihydronitraridine, and tetrahydronitraridine," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 42, no. 4, pp. 459–461, Jul. 2006.
- [19] M. G. T. S. Tulyaganov, O. M. Nazarov, Levkovich and N. D. Abdullaev, "ALKALOIDS OF THE Nitraria GENUS . KOMAVINE AND ACETYLKOMAVINE," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 37, no. 1, pp. 56–58, 2001.
- [20] E. Gravel and E. Poupon, "Biosynthesis and biomimetic synthesis of alkaloids isolated from plants of the Nitraria and Myrioneuron genera: an unusual lysine-based metabolism.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 27, no. 1, pp. 32–56, Jan. 2010.
- [21] N. Hu, R. Yang, Y. He, H. Wang, X. Wang, and Y. Suo, "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total flavonoids from Nitraria tangutorum seed by response surface methodology.," *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, vol. 24, no. 12, pp. 1844–1848, 2012.
- [22] T. Cheng, H. Ma, A. Jia, S. Shi, J. Zhang, and Z. Jiang, "Preparation and application of total-phenol extract of Nitraria tangutorum.," 22-May-2013.
- [23] Y. Shan, S. Li, Y. Suo, B. Ren, N. Ma, H. Liu, L. Yang, Z. Li, A. Li, J. Nian, H. Zhang, and N. Li, "Method for extracting anthocyanin from Nitraria tangutorum fruit residue.," 18-May-2011.
- [24] T. S. Tulyaganov and N. M. Kozimova, "Alkaloids from Nitraria schoberi. O-acetylnitrarine," *Chem. Nat. Compd.*, vol. 41, no. 5, pp. 578–579, Sep. 2005.
- [25] M. C. and A. J. V. G. M. Laekeman, J. Corthout, L. A. C. Pieters, W. Baeten, A. G. Herman, "Chemical characterization and pharmacological activity of nazlinin, a novel indole alkaloid from Nitraria schoberi," *Journal Nat. Prod.*, vol. 54, no. 4, pp. 959–966, Mar. 1991.
- [26] M. Normatov and S. Yu. Yunusov, *A STUDY OF THE ALKALOIDS OF NITRARIA SCHOBERI. THE STRUCTURE OF NITRARINE*, vol. 4, no. 2. 1968, p. 139.
- [27] J. Boubaker, W. Bhouri, M. Ben Sghaier, I. Bouhleb, I. Skandrani, K. Ghedira, and L. Chekir-Ghedira, "Leaf extracts from Nitraria retusa promote cell population growth of human cancer cells by inducing apoptosis," *Cancer Cell Int.*, vol. 11, no. 1, p. 37, 2011.

- [28] J. Hadj Salem, I. Chevalot, C. Harscoat-Schiavo, C. Paris, M. Fick, and C. Humeau, "Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives," *Food Chem.*, vol. 124, no. 2, pp. 486–494, Jan. 2011.
- [29] R. E. G. M. Chaâbane, S. Maktouf, N. Sayari, S. Zouari, N. Zeghal, "Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Nitraria retusa* fruits and their applications to meat product preservation," *Ind. Crops Prod.*, vol. 55, pp. 295–303, Apr. 2014.
- [30] F. Senejoux, C. Girard, H. A. Aisa, M. Bakri, P. Kerram, A. Berthelot, F. Bevalot, and C. Demougeot, "Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae)," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 141, no. 2, pp. 629–634, 2012.
- [31] Z. W. and A. X. R. Cao, W. Peng, "Beta-Carboline Alkaloids Biochemical and Pharmacological Functions," *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 4, pp. 479–500, 2007.
- [32] 1 Gerrit-Jan Koomen a Elisabeth Cheng a, Henk L. Dekker b, Bob F. van Gelder b, "Inhibition of pig kidney diamine oxidase by nazlinin and nazlinin derivatives," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1253, pp. 189–192, 1995.
- [33] A. K. Hegazy, S. L. Al-Rowaily, M. Faisal, A. A. Alatar, M. I. El-Bana, and A. M. Assaeed, "Nutritive value and antioxidant activity of some edible wild fruits in the Middle East.," *J. Med. Plants Res.*, vol. 7, no. 15, pp. 938–946, 2013.
- [34] M. Stiborová, J. Poljaková, E. Martínková, L. Bořek-Dohalská, T. Eckschlager, R. Kizek, and E. Frei, "Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines - a comparative study.," *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 4, no. 2, pp. 98–105, Jun. 2011.
- [35] B. Das, B. Venkataiah, and A. Kashinatham, "(+)-Syringaresinol from *Parthenium hysterophorus*," *Fitoterapia*, vol. 70, no. 1, pp. 101–102, Feb. 1999.
- [36] V. R. More, U. S. Mote, S. R. Patil, and G. B. Kolekar, "Spectroscopic studies on the interaction between norfloxacin and p-amino benzoic acid: analytical application on determination of norfloxacin.," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 74, no. 3, pp. 771–5, Oct. 2009.
- [37] D. générale des produits de santé et des aliments. Gouvernement du Canada, Santé Canada, "Monographie sur les écrans solaires." 26-Jul-2004.
- [38] J. Rodhain, "Diète lactée et acide para aminobenzoïque dans l'infection due au *Plasmodium vinckei* chez la souris," *Ann. Médecine Trop.*, vol. 33, pp. 459–461, 1953.
- [39] D. M. Aviado, "Chemotherapy of *Plasmodium berghei*," *Exp. Parasitol.*, vol. 25, pp. 399–482, Jan. 1969.
- [40] H.-M. Wang, Y.-T. Chou, Z.-L. Hong, H.-A. Chen, Y.-C. Chang, W.-L. Yang, H.-C. Chang, C.-T. Mai, and C.-Y. Chen, "Bioconstituents from stems of *Synsepalum dulcificum* Daniell (Sapotaceae) inhibit human melanoma proliferation, reduce mushroom tyrosinase activity and have antioxidant properties," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 42, no. 2, pp. 204–211, Mar. 2011.

- [41] yang-chang W. chung-yi Chen, tung-ying Wu, fang-rong Chang, "Lignans and Kauranes from the Stems of *Annona cherimola*," *J. Chinese Chem. Soc.*, vol. 45, pp. 629–634, 1998.
- [42] Wang Changzeng and Jia Zhongjian, "Lignan, phenylpropanoid and iridoid glycosides from *Pedicularis torta*," *Phytochemistry*, vol. 45, no. 1, pp. 159–166, May 1997.
- [43] A. Ito, R. Kasai, K. Yamasaki, N. Minh Duc, and N. Thoi Nham, "Lignan glycosides from bark of *Albizzia myriophylla*," *Phytochemistry*, vol. 37, no. 5, pp. 1455–1458, Nov. 1994.
- [44] H. U. Mitsuo MIYAZAWA and T. H. and M. tatematsu INADA Ken-ichi, YAMADA Tomoki, OKUNO Yoshiharu, "Inhibition of *Helicobacter pylori* Motility by (+)-Syringaresinol from Unripe Japanese Apricot," *Biol. pharm. Bull.*, vol. 29, no. 1, pp. 172–173, 2006.
- [45] W. Monthong, S. Pitchuanom, and N. N. and W. Pompimon, "(+)-Syringaresinol Lignan from New Species *Magnolia Thailandica*," *Am. J. Appl. Sci.*, vol. 8, no. 12, pp. 1268–1271, 2011.
- [46] B.-H. Chung, S. Kim, J.-D. Kim, J. J. Lee, Y.-Y. Baek, D. Jeoung, H. Lee, J. Choe, K.-S. Ha, M.-H. Won, Y.-G. Kwon, and Y.-M. Kim, "Syringaresinol causes vasorelaxation by elevating nitric oxide production through the phosphorylation and dimerization of endothelial nitric oxide synthase.," *Exp. Mol. Med.*, vol. 44, no. 3, pp. 191–201, Mar. 2012.
- [47] A. A. N. H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, "NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities," *J. Org. Chem.*, vol. 62, no. 21, 1997.
- [48] Brummitt, "Sapindales," *trop. Afr. Fl Pl Ecol Distr*, 2003. [Online]. Available: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/sapindalesweb.htm>.
- [49] Adolf Engler, "Die Vegetation der Erde, Sammlung," in *pflanzengeographischer Monographien*, 1910, p. vol. 1.
- [50] E. F. S. L. P. Ronse Decraene, J. De Laet, "Morphological Studies in Zygophyllaceae. II. the floral development and vascular anatomy of *Peganum harmala*," *Am. J. Bot.*, vol. 83, no. 2, pp. 201–215, 1996.

ANNEXES

Annexe 1 : Chromatogrammes et spectres CLHP-SM de F5

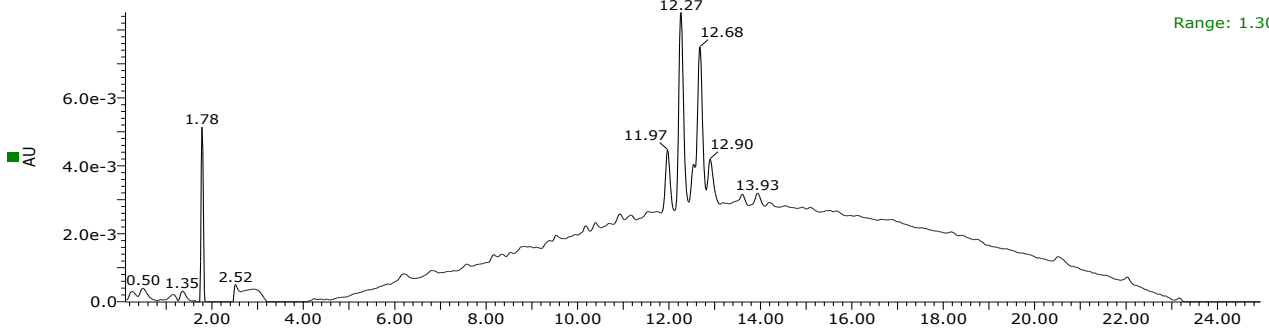
Conditions: H2O + 0.2% ac. form. / ACN gradient 5 - 100% en 20 min

Ines MILADI
GNOSIE

IM 24-5

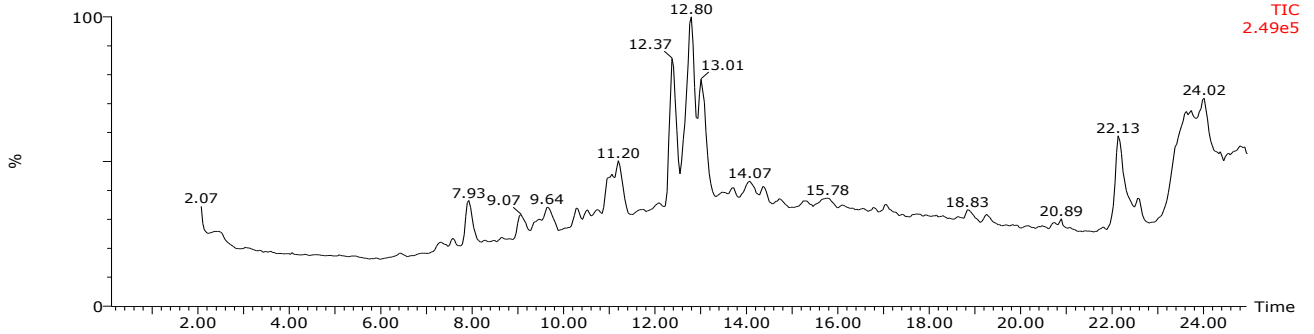
12-Feb-2014
grd H2O +0.1% ac.form. / ACN 5-100% en 20min
colonne Sunfire 014731340136
10

z-IM-24-5-01



3: Diode Array
254
Range: 1.304e-2

z-IM-24-5-01



1: TOF MS ES+
TIC
2.49e5

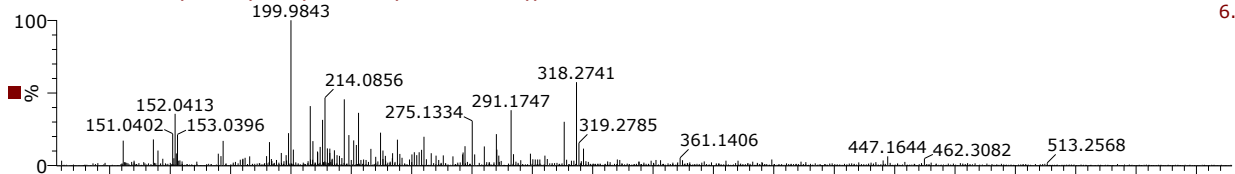
Ines MILADI
GNOSIE

IM 24-5

12-Feb-2014
grd H2O +0.1% ac.form. / ACN 5-100% en 20min

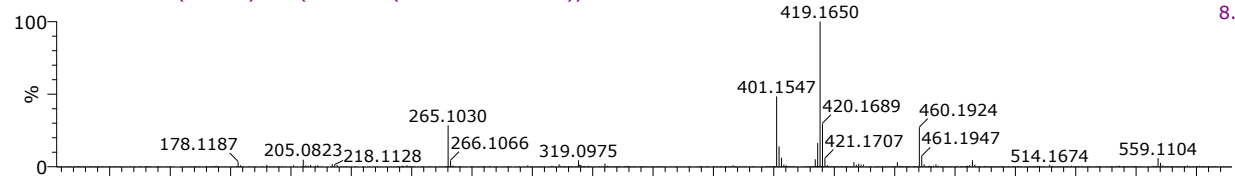
10

z-IM-24-5-01 255 (12.086) Cm (253:257-(247:249+259))



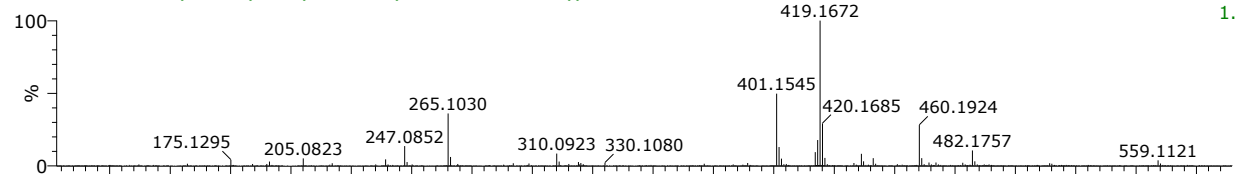
1: TOF MS ES+
6.78e3

z-IM-24-5-01 262 (12.370) Cm (262:266-(255:259+268:270))



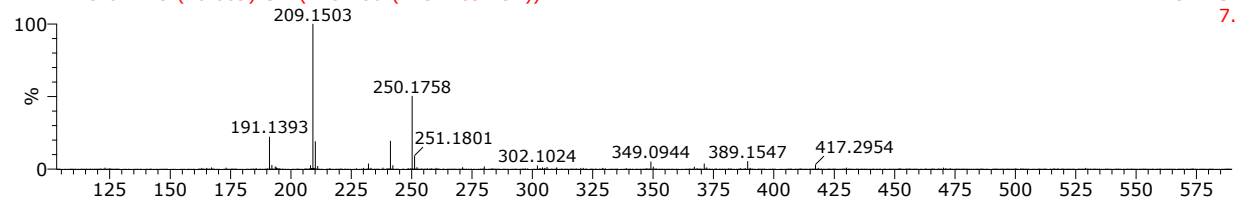
1: TOF MS ES+
8.89e4

z-IM-24-5-01 273 (12.796) Cm (270:275-(266:267+284:292))



1: TOF MS ES+
1.35e5

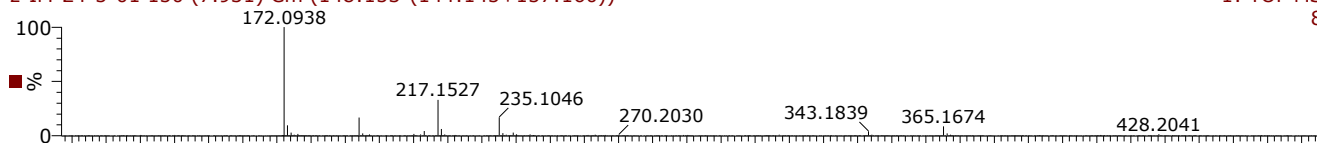
z-IM-24-5-01 279 (13.009) Cm (278:280-(275+289:297))



1: TOF MS ES+
7.08e4

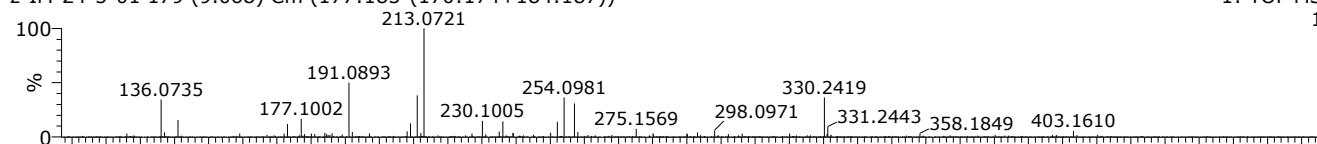
z-IM-24-5-01 150 (7.931) Cm (148:153-(144:145+157:160))

1: TOF MS ES+
8.14e4



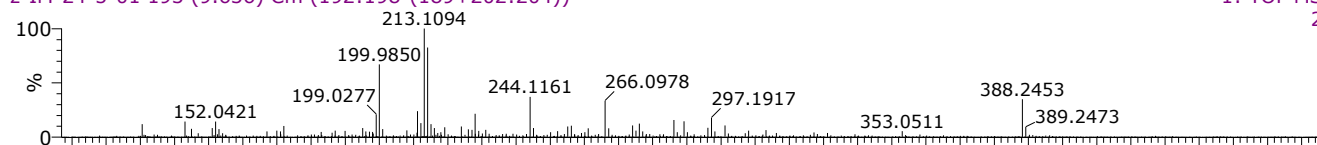
z-IM-24-5-01 179 (9.068) Cm (177:183-(170:174+184:187))

1: TOF MS ES+
1.46e4



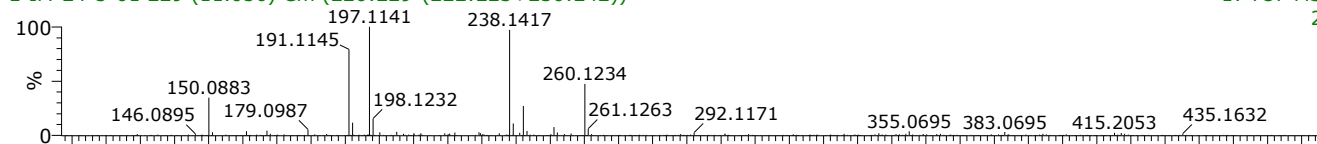
z-IM-24-5-01 193 (9.636) Cm (192:198-(189+202:204))

1: TOF MS ES+
2.26e4



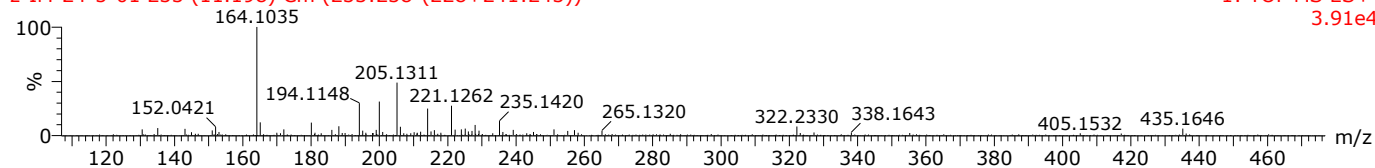
z-IM-24-5-01 229 (11.056) Cm (226:229-(222:223+236:242))

1: TOF MS ES+
2.47e4



z-IM-24-5-01 233 (11.198) Cm (233:238-(228+241:243))

1: TOF MS ES+
3.91e4



Annexe 2 : Chromatogrammes et spectres CLHP-SM de F7'

04-Apr-2014

Ines MILADI - GNOSIE

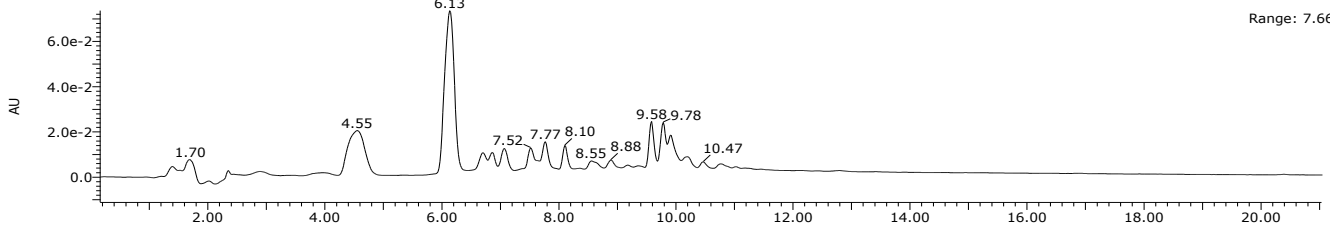
IM 42-7

H2O + 0.2% ac.form. /ACN - grd 5-100% en 20min
Sunfire 014731340136

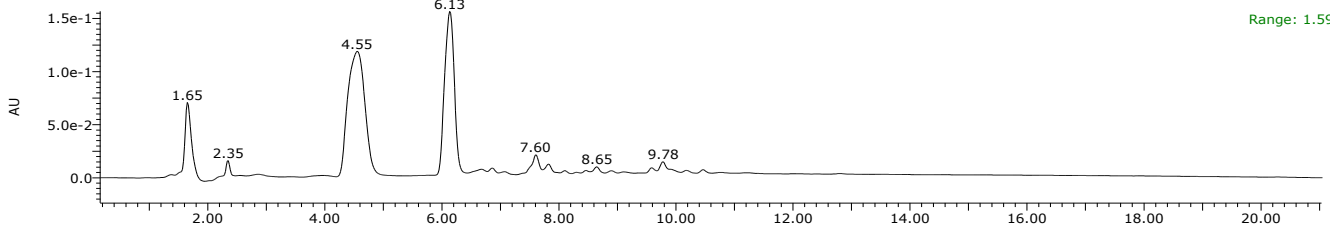
vial 17

3: Diode Array
280
Range: 7.664e-2

z-IM42-7-01

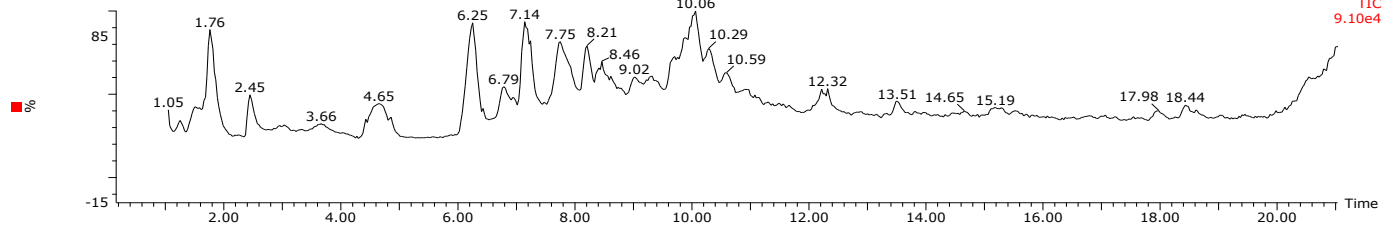


z-IM42-7-01



3: Diode Array
254
Range: 1.599e-1

z-IM42-7-01



1: TOF MS ES+
TIC
9.10e4

04-Apr-2014

Ines MILADI - GNOSIE

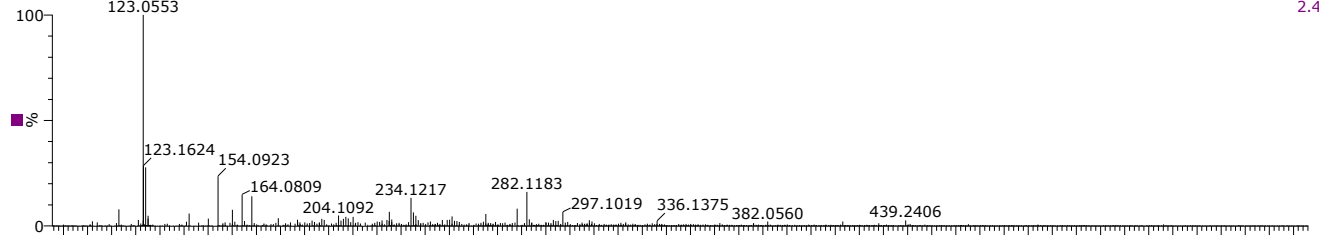
IM 42-7

H2O + 0.2% ac.form. /ACN - grd 5-100% en 20min

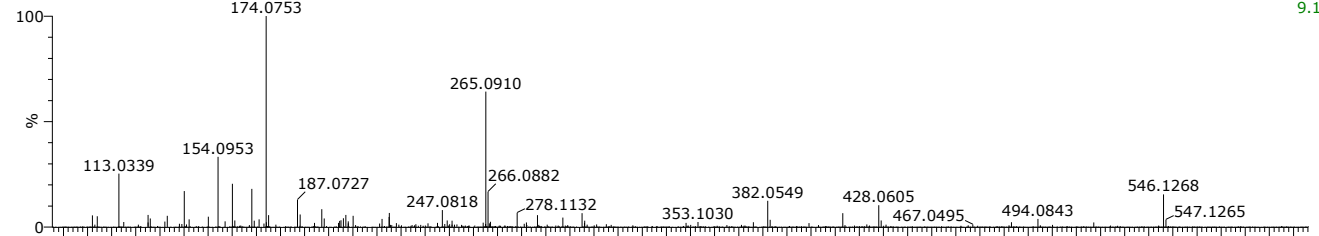
vial 17

1: TOF MS ES+
2.42e4

z-IM42-7-01 27 (1.761) Cm (26:32-(9:18+37:45))

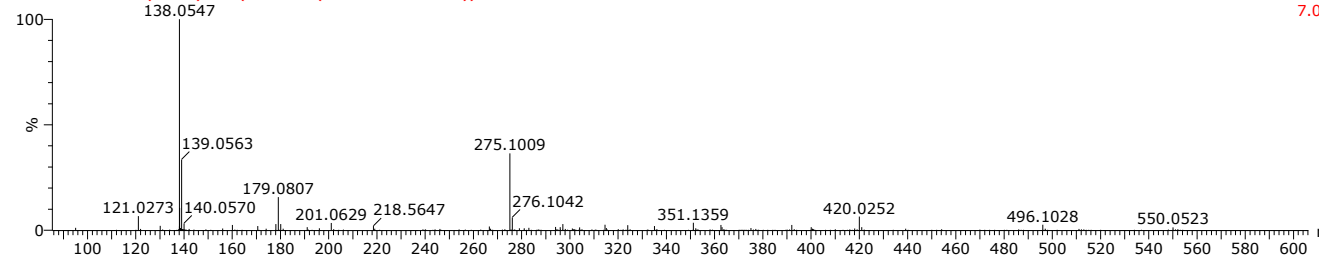


z-IM42-7-01 51 (2.447) Cm (48:56-(35:45+62:72))



1: TOF MS ES+
9.16e3

z-IM42-7-01 129 (4.654) Cm (123:135-(107:116+148:160))



1: TOF MS ES+
7.02e4

04-Apr-2014

IM 42-7

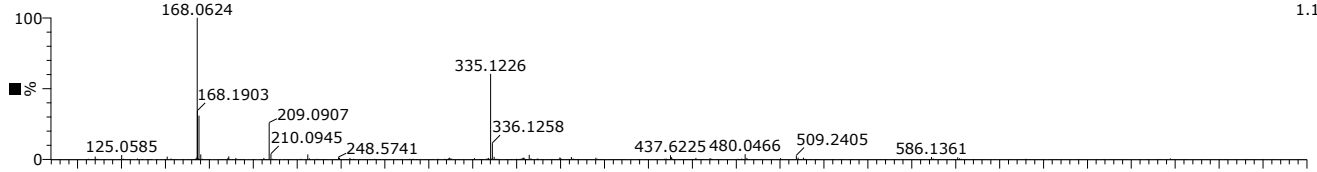
H2O + 0.2% ac.form. /ACN - grd 5-100% en 20min

Ines MILADI - GNOSIE

vial 17

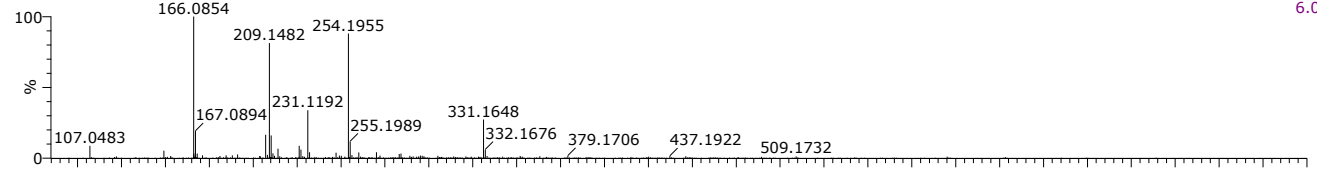
z-IM42-7-01 186 (6.253) Cm (181:190-(171:176+194:199))

1: TOF MS ES+
1.11e5



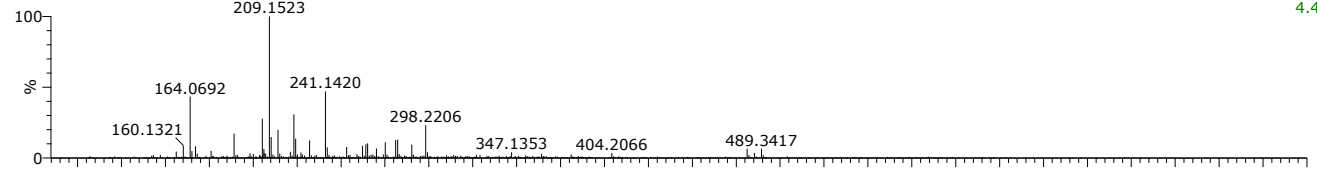
z-IM42-7-01 217 (7.141) Cm (215:225-(211:213+229:234))

1: TOF MS ES+
6.07e4



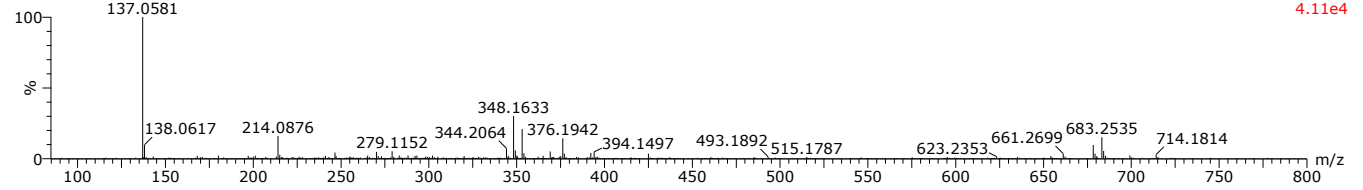
z-IM42-7-01 239 (7.750) Cm (236:246-(228:230+249:252))

1: TOF MS ES+
4.46e4



z-IM42-7-01 255 (8.207) Cm (252:258-(250:251+262:263))

1: TOF MS ES+
4.11e4



04-Apr-2014

IM 42-7

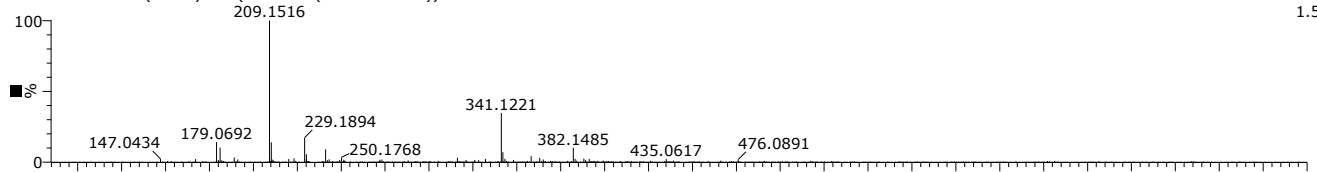
H2O + 0.2% ac.form. /ACN - grd 5-100% en 20min

Ines MILADI - GNOSIE

vial 17

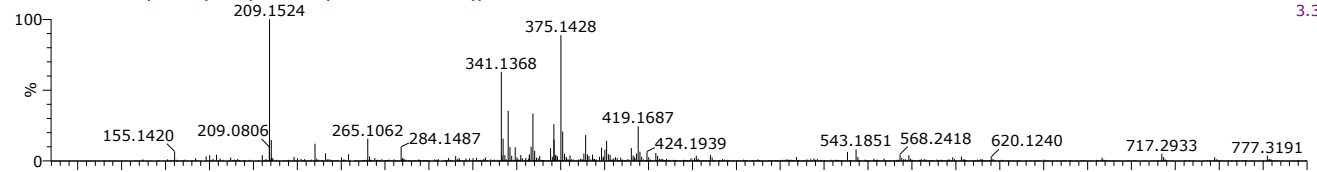
z-IM42-7-01 308 (9.705) Cm (305:308-(300:303+314))

1: TOF MS ES+
1.52e4



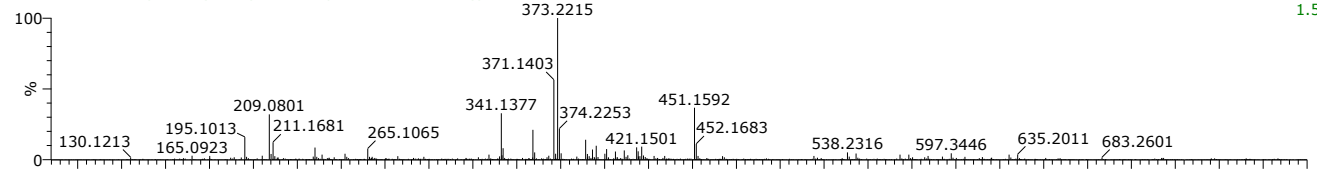
z-IM42-7-01 321 (10.061) Cm (316:324-(298:301+347:351))

1: TOF MS ES+
3.32e4



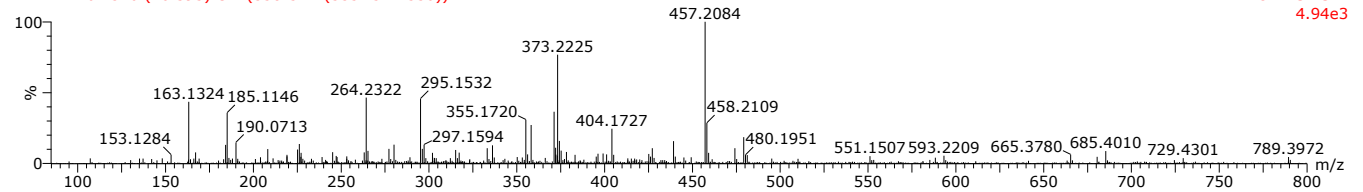
z-IM42-7-01 329 (10.289) Cm (327:333-(322:323+337:341))

1: TOF MS ES+
1.58e4

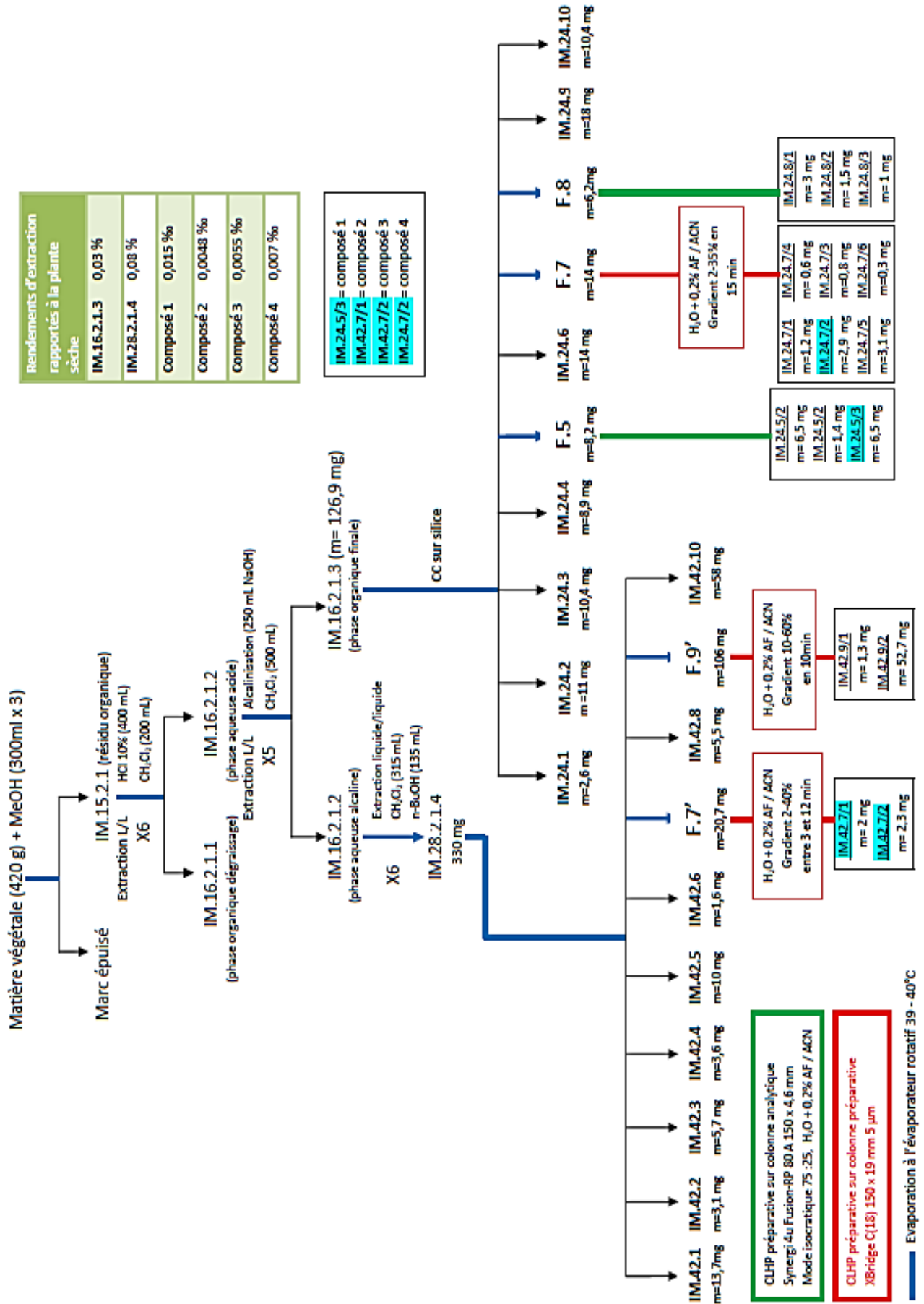


z-IM42-7-01 340 (10.593) Cm (338:342-(333+347:350))

1: TOF MS ES+
4.94e3



Annexe 3 : Schéma d'extractions-purifications de *Nitraria retusa*.



Glossaire

Antépétale	Se dit d'une disposition en face d'un pétale
Antésépale	Se dit d'une disposition en face d'un sépale
Axile	Se dit lorsque les ovules sont implantés dans la partie centrale de l'ovaire.
Bractée	Feuille à la base du pédoncule accompagnant une fleur ou une inflorescence.
Calice	Enveloppe extérieure de la fleur, ensemble des sépales
Carpelle	Elément de la fleur portant les ovules. Correspond à l'ovaire, au style et au stigmate.
Chimiotaxonomie	Etudes des rapports entre la composition chimique des espèces vivantes et leur classification systématique.
Corolle	Ensemble des pétales d'une fleur
COSY	Expérience homonucléaire 2D exprimant les protons liés par un couplage scalaire.
Étamine	Organes mâles de la fleur. Produit le pollen. Constitué d'une partie longue, le filet et d'une partie supérieure renflée, l'anthère.
Feuille subsessile	Feuille ayant une implantation par un pétiole très court.
Gynécée	Synonyme de pistil. Organes femelles, composés des ovules, de l'ovaire, du style et du stigmate.
Halophyte	Plante s'épanouissant en milieu salé.
Hermaphrodite	Se dit des plantes portant les organes des deux sexes (étamine et pistil).
HMBC	Expérience 2D de RMN exprimant les corrélations hétéronucléaires longues distances entre Carbone et proton.
Holarctique	Régions terrestres au nord du tropique du cancer.
HSQC	Expérience 2D de RMN exprimant les corrélations entre un proton et le carbone auquel il est lié.
Médifix	Se dit quand le filet de l'étamine s'insère au milieu de l'anthère.
Monoïque monocline	Synonyme d'hermaphrodite.
NOESY	Expérience 2D de RMN exprimant les corrélations dipolaires. Permet la détermination des orientations relatives des protons proches dans l'espace dans une molécule.
Ovaire	Partie inférieure du gynécée contenant les ovules
Paléotropicale	Zone géographique centrée entre les tropiques de l'ancien monde correspondant de nos jours à l'Afrique et l'Asie.
Panicule	Inflorescence complexe en forme de grappes composées de grappes ou de cymes.

Phanérophyte	Plante dont les bourgeons persistant sont portés à plus de 50 cm de hauteur.
Proapoptotique	Qui promulgue l'apoptose, mort cellulaire programmée.
Schizonte	Stade évolutif du plasmodium, agent du paludisme, correspondant à un stade de division du noyau.
Stigmate	Extrémité terminale renflée du carpelle.
Style	Rétrécissement entre l'ovaire et le stigmate.
Succulente	Se dit d'une plante charnue adaptée pour les sols arides.
Supère	Se dit d'un ovaire qui n'est pas enfoncé dans le réceptacle.
Triloculaire	SE dit d'un organe composé de trois loges
Trophozoïte	Stade de développement du plasmodium, agent du paludisme, où le parasite est dans son cycle asexué érythrocytaire.
Xérophyte	Plante vivant dans les milieux secs.

Résumé

Nitraria retusa Asch. est un arbuste épineux de la famille des *Nitrariaceae* qui fait partie intégrante de l'alimentation et du panel de plantes médicinales des populations du bassin méditerranéen et du proche orient.

Les nombreuses études phytochimiques sur cette plante font état de sa diversité en flavonoïdes. Néanmoins, aucune publication scientifique ne relate sa composition en alcaloïdes malgré la richesse des *Nitrariaceae* en substances azotées. Les squelettes alcaloïdiques retrouvés dans le *Nitraria* et plus particulièrement les alcaloïdes indoliques à noyau β -carboline, ont un intérêt thérapeutique.

Ces travaux proposent une étude phytochimique guidée par la chimiotaxonomie de la famille de *Nitraria retusa*. L'objectif a été de déterminer la composition en molécules azotées de cette plante dans une visée ethnopharmacologique. Pour cela, le protocole d'extractions a été basé sur des méthodes d'extractions alcaloïdiques et les purifications ont été masse-guidées.

Les résultats obtenus ne permettent pas d'infirmer ou de confirmer la présence d'alcaloïdes dans cette plante. Néanmoins, ils conduisent à la détermination de trois composés isolés pour la première fois dans le genre *Nitraria*. Ainsi un lignane, le (+)-*epi*-syringarésinol, l'acide *para* aminobenzoïque et l'acide 4-amino 3-méthoxybenzoïque ont pu être décrit dans *Nitraria retusa* Asch. L'acide 4-amino 3-méthoxybenzoïque a même été décrit pour la première fois en tant que substance naturelle. De plus, le (+)-*epi*-syringarésinol et l'acide *para* aminobenzoïque sont des substances ayant déjà des activités biologiques et thérapeutiques avérées.

Mots clés

Nitrariaceae, *Nitraria retusa*, alcaloïde indolique, isorhamnétine, syringarésinol, *epi*-syringarésinol, *pABA*, acide 4-amino 3-méthoxybenzoïque.

Serment de Galien

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois recouvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.