

Université d'Angers

**Année 2011
N° d'ordre 1156**

Marqueurs phénotypiques de la diversité des ressources génétiques du genre *Hydrangea*

**Thèse de doctorat
Spécialité : Chimie analytique
Ecole doctorale VENAM**

**Présentée et soutenue publiquement le 22 septembre 2011
à la Faculté de Sciences Pharmaceutique et Ingénierie de la Santé
d'ANGERS**

par Amélie Dulac

Devant le jury ci-dessous :

Mme Claire ELFAKIR,
Professeur, Université d'Orléans

Rapporteur

M. Thierry ROBERT
Maître de conférences, Université d'Orsay

Rapporteur

M. David GUILLET
Maître de conférences, Université d'Angers

Examineur

Mme Sophie TOMASI
Professeur, Université de Rennes I

Examineur

Directeur de thèse : M. Pascal RICHOMME
Professeur, Université d'Angers

Co-encadrement : Mme Claudie LAMBERT
Maître de conférences, Agrocampus Ouest, INHP

**Laboratoire Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux
(SONAS, UPRES EA 921, IFR 149)
UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénierie de la Santé
16, boulevard Daviers-49100 ANGERS**

*A Jacqueline Ropivia disparue trop tôt
Au petit garçon qui grandit dans mon ventre
A Benjamin, mon compagnon*

Remerciements

Dans ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de cette thèse.

En premier lieu, il convient de remercier la région Pays de la Loire, représentée par l'organisme Univaloire, pour les aides financières grâce auxquelles j'ai pu mener mes trois premières années en toute indépendance. Je remercie l'ITEIPMAI, notamment Denis Bellenot, pour m'avoir permis d'effectuer une mission doctorat-conseil très enrichissante dans son laboratoire. Je remercie aussi l'Université d'Angers, particulièrement le département Biologie de l'IUT, pour leur accueil en tant qu'ATER d'octobre 2009 à Août 2010. Et enfin, je remercie l'université d'Orléans et l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) pour leur accueil en tant qu'ATER lors de cette dernière année de thèse.

Je remercie sincèrement le Professeur Pascal Richomme, directeur du SONAS, de m'avoir acceptée au sein de son laboratoire, de sa confiance, ses encouragements et de ses conseils tout en me laissant une grande liberté. Sans oublier ses qualités humaines, sa bonne humeur, son calme et sa patience. Merci aussi pour tout ce temps passé à corriger et recorriger chaque partie de ce manuscrit.

Mes plus chaleureux remerciements vont à Claudie Lambert pour son encadrement, ses encouragements, sa gentillesse, ses qualités humaines, son soutien et sa patience. Je tiens aussi à la remercier pour son réconfort dans les moments difficiles. Je n'oublierai pas non plus toute l'attention qu'elle a portée à ma rédaction et ses précieux conseils lors de la correction de ce manuscrit.

Je remercie le Professeur Claire Elfakir, de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) de l'Université d'Orléans et M. Thierry Robert du Laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution de l'Université d'Orsay, de me faire l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Je suis très reconnaissante envers le Professeur Sophie Tomasi de la faculté de pharmacie de Rennes I, Claudie Lambert Maître de Conférences à l'Institut National d'Horticulture et du paysage (INHP) et David Guilet, Maître de conférences à la faculté de pharmacie d'Angers d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie Jean-François Gonnet du laboratoire de Phytochimie et Valorisation Industrielle, Université Claude-Bernard-Lyon 1, pour les travaux préliminaires qu'il a effectués sur le sujet, qui ont permis que cette thèse soit possible et qui ont servi de base à ma

réflexion. Je le remercie aussi pour ses précieux conseils, sa gentillesse, sa disponibilité et pour la relecture de ma publication.

Je remercie Besnik Pumo, de l'INHP, Caroline West et Luc Morin-Allori de l'Université d'Orléans pour leurs précieux conseils en ce qui concerne le traitement de données et les statistiques.

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire GenHort et de l'INHP qui ont pu contribuer à l'accomplissement de ce travail de thèse. En particulier :

Daniel Relion, technicien, pour l'entretien des plantes des ombrières de l'INHP, ainsi que les services de l'espace vert de la ville d'Angers, pour l'entretien de la collection de l'arboretum Gaston Allard, sans laquelle cette thèse n'aurait pas eu lieu.

Hélène Bertrand et Claudie Lambert pour l'identification des plantes étudiées et pour tout ce que j'ai appris auprès d'elles en botanique.

Danielle Daury et Maria Dolores Perez-Garcia, techniciennes à l'INHP, ainsi que Claudie Lambert et Hélène Bertrand, pour les heures passées en chambre froide à trier et broyer les fleurs. Mon travail n'aurait pas été aussi complet sans leur aide.

Je remercie le personnel du laboratoire SONAS, de la PIAM et de la faculté de Pharmacie et en particulier :

Les techniciennes de la faculté de pharmacie d'Angers, Marie Fontaine, Anne Marie Guillaneuf, Patricia Planchenault et Isabelle Servant, pour leur accueil dans les salles de travaux pratiques et pour toute l'aide apportée lors des extractions.

Marie Lavault pour ses conseils, sa gentillesse, sa bonne humeur et ses longues discussions enrichissantes.

Anne-Marie Leray-Richomme, pour ses conseils, sa gentillesse, sa bonne humeur et sa joie de vivre. Grâce à elle, j'ai découvert le chant et participé à la chorale, très bonne activité pour s'échapper, penser à autre chose et tenir le coup pendant 5 ans.

Anne Landreau m'a beaucoup appris dans le domaine de la botanique, je la remercie pour ses conseils, sa gentillesse, sa bonne humeur et son amitié qui m'est précieuse.

David Guilet et Sabine Mallet pour leurs précieux conseils dans le domaine de la chromatographie liquide.

Isabelle Baglin et Sabine Mallet pour la relecture de ce manuscrit.

Samuel Bertrand, ancien thésard du laboratoire SONAS, pour son aide dans l'apprentissage de Word et Excel durant cette thèse, ce qui a bien facilité ma rédaction.

Jacqueline Quémard et Gérard Suaudeau pour leur patience et leur gentillesse. Merci de m'avoir si souvent attendue le soir pour fermer le laboratoire.

Sylvie Fournier, Marie Lagrée et Indrid Freuze qui se sont succédé au poste de spectrométrie de masse de la PIAM pour leur aide dans les manipulations et leurs conseils avisés concernant la technique, ainsi que pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je pense aussi, à Jean-Jacques, Gilles, Denis, Olivier, Séverine, Julia, Marie-Christine, Clarisse, Sylvie, Peter, et j'en oublie, pour leur accueil, leur gentillesse et la bonne ambiance. Ce fût un plaisir de travailler parmi eux.

Je remercie les stagiaires qui ont travaillé avec moi durant cette thèse, Annaëlle, Yann et Nguyen. Ils m'ont bien aidée d'un point de vu technique et il a été agréable de travailler avec des étudiants souriants.

Je remercie tous les thésards, post-doctorants et stagiaires qui sont passés au laboratoire pour leurs conseils, leur gentillesse, leur amitié, l'ambiance et les soirées passées ensemble.

Enfin un merci tout particulier pour mon compagnon Benjamin Siegler qui m'a accompagné durant ces cinq années. Tout d'abord pour tout ce qu'il m'a apporté d'un point de vu scientifique, ses conseils en chromatographie, spectrométrie de masse, RMN... et surtout pour l'identification de la tricaféoylspermidine. Je le remercie pour toutes les relectures de ce manuscrit et le prie de m'excuser pour mes fautes d'orthographe. Merci aussi pour toutes ses qualités humaines (eh oui ! il en a de cachées parmi ses défauts !) : sa patience, durant toutes ces soirées et tous ces week-ends où j'ai travaillé au lieu de passer du temps avec lui, son soutien et ses encouragements durant ces cinq années, son écoute. Je le remercie pour tout l'amour et tout le réconfort qu'il a pu m'apporter. Sans lui, j'aurais abandonné depuis longtemps. Il m'a permis de tenir et d'aller jusqu'au bout.

Je remercie aussi l'ensemble de ma famille et particulièrement mes parents, ainsi que mes sœurs, pour le soutien et les encouragements qu'ils m'ont apportés durant ces cinq longues années et même bien avant. Merci d'avoir cru en moi, d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir permis de réussir.

Enfin, je remercie tout particulièrement et je rends hommage à Jacqueline Ropivia mon amie, disparue subitement et trop tôt, pour tout ce qu'elle était, une femme généreuse, souriante, forte, pleine de vie. Son sourire, sa bonne humeur et sa force étaient agréablement contagieux et ensoleillaient tout le laboratoire. Elle nous manque à tous et restera à jamais dans mon cœur.

Table des matières

TABLE DES FIGURES

TABLE DES TABLEAUX

ABREVIATIONS

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE I. TRAVAUX ANTERIEURS 3

I. Le genre *Hydrangea* L. 5

I. 1. Données botaniques 5

I. 1. 1. Répartition géographique 5

I. 1. 2. Classifications et phylogénie 6

I. 1. 3. Description botaniques du genre 6

I. 2. Caractérisation des Ressources génétiques du genre 9

I. 3. Caractérisation phytochimique 11

II. Métabolites secondaires du genre *Hydrangea* L. 12

II. 1. Généralités 13

II. 1. 1. Flavonoïdes 13

II. 1. 2. Anthocyanes 14

II. 1. 3. Dérivés d'acides cinnamiques 15

II. 2. Biosynthèse 16

II. 2. 1. Flavonoïdes 17

II. 2. 2. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées 21

II. 3. Généralités sur la coloration des fleurs 22

II. 3. 1. Anthocyanes et pH 22

II. 3. 2. Co-pigmentation 22

II. 3. 2. 1. Auto-association..... 23

II. 3. 2. 2. Co-pigmentation intramoléculaire 24

II. 3. 2. 3. Co-pigmentation intermoléculaire 25

II. 3. 2. 4. Complexes métalliques 26

II. 4. Analyse structurale 28

II. 4. 1. Spectroscopie UV-visible 28

II. 4. 1. 1. Flavones et flavonols 28

II. 4. 1. 2. Isoflavones, flavanones et dihydroflavonols 29

II. 4. 1. 3. Anthocyanes 29

II. 4. 1. 4. Dérivés d'acides cinnamiques 30

II. 4. 2. Spectrométrie de masse..... 30

II. 4. 2. 1. Flavonoïdes 30

II. 4. 2. 2. Dérivés d'acides cinnamiques, esters de l'acide quinique 37

II. 4. 3. RMN 40

II. 4. 3. 1. Flavonoïdes 40

II. 4. 3. 2. Dérivés d'acides cinnamiques, esters de l'acide quinique 41

BIBLIOGRAPHIE 43

CHAPITRE II. IDENTIFICATION STRUCTURALE	60
I. Anthocyanes	63
I. 1. Spectroscopie UV-Visible	63
I. 2. Spectrométrie de masse.....	64
II. Flavonoïdes	65
II. 1. Spectroscopie UV-Visible	65
II. 2. Spectrométrie de masse	66
II. 2. 1. Structure des aglycones	66
II. 2. 2. Identification des sucres.....	67
II. 2. 2. 1. Dérivés monoglycosylés	68
II. 2. 2. 2. Dérivés diglycosylés	70
II. 2. 2. 3. Dérivés triglycosylés	73
II. 3. Identification par RMN	74
II. 3. 1. Composé 35	74
II. 3. 2. Composé 40	75
II. 3. 3. Composé 42	76
II. 3. 4. Composé 52	77
III. Dérivés d'acides cinnamiques	77
III. 1. Dérivés monoacylés	79
III. 1. 1. Dérivés de poids moléculaire 354	79
III. 1. 2. Dérivés de poids moléculaire 338	81
III. 1. 3. Dérivés de poids moléculaire 368	81
III. 2. Dérivés diacylés	81
IV. Amines polyacylées.....	82
IV. 1. Composé 56	82
IV. 2. Analyse du spectre de masse du composé 56	86
IV. 3. Identification des composés 57 à 60	87
BIBLIOGRAPHIE	90

CHAPITRE III. STRUCTURATION DE LA DIVERSITE DES COMPOSES

PHENOLIQUES DANS LE GENRE <i>HYDRANGEA</i>	93
I. Introduction	95
II. Analyse de la diversité interspécifique des composés phénoliques	96
II. 1. Classification selon la teneur en dérivés d'acides cinnamiques et en flavonoïdes	96
II. 1. 1. Dérivés d'acides cinnamiques	97
II. 1. 2. Flavonoïdes : flavonols, flavones et flavanones.....	98
II. 1. 3. Glycosylations	100
II. 2. Structuration de la diversité	101
III. Analyse de la variabilité intraspécifique	104
III. 1. <i>H. macrophylla</i>	107
III. 1. 1. Dérivés d'acides cinnamiques	109
III. 1. 2. Flavonols	110
III. 2. <i>H. aspera</i> et <i>H. involucrata</i>	112
III. 2. 1. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées	113
III. 2. 2. Flavonols	113
III. 3. Analyse de la diversité chez les autres espèces	115
III. 3. 1. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées	117
III. 3. 2. Flavonols	117

III. 4. Détermination de l'espèce et de la sous-espèce d'une accession à partir de la composition chimique de ses inflorescences	120
IV. Discussion	121
IV. 1. Diversité phytochimique au sein du genre <i>Hydrangea</i>	121
IV. 2. Variation intraspécifique dans l'espèce <i>H. macrophylla</i>	125
IV. 3. Amines polyacylées, marqueurs de la fertilité	126
BIBLIOGRAPHIE	127
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 130
 CHAPITRE IV. MATERIELS ET METHODE	 131
I. Matériel végétal	133
II. Extraction du mélange flavonique	133
III. Méthodes de séparation analytique et préparative des composés phénoliques.....	134
III. 1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	134
III. 1. 1. Analyse des acides cinnamiques, flavonoïdes et amines polyacylées.....	134
III. 1. 2. Analyse des anthocyanes	135
III. 2. Purification des dérivés phénoliques	136
III. 2. 1. Purification sur gel de Séphadex LH20	136
III. 2. 2. Purification par CLHP préparative.....	138
IV. Méthode d'identification structurale	138
IV. 1. Spectrométrie de masse (SM)	138
IV. 2. Spectrométrie Infrarouge (IR)	139
IV. 3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	139
V. Données spectrales des composés phénoliques identifiés.....	141
VI. Quantification des composés phénoliques du genre Hydrangea	170
VII. Analyses multivariées	171
BIBLIOGRAPHIE	172
 ANNEXES.....	 173

Table des figures

Figure I 1 : Répartition géographique des principales espèces du genre <i>Hydrangea</i> sur les différents continents	5
Figure I 2 : Classifications dans la sous-section <i>Asperae</i>	8
Figure I 3 : Enchaînement 2-phénylchromane.....	13
Figure I 4 : Structures des différents flavonoïdes.....	13
Figure I 5 : Substitution et couleur des anthocyanes les plus communs sous forme de cation flavylium (pH<2)	14
Figure I 6 : La voie des shikimates	16
Figure I 7 : Diversification des voies de biosynthèse à partir du <i>p</i> -coumaroyl CoA.....	16
Figure I 8 : Biosynthèse des flavonoïdes	17
Figure I 9 : Biosynthèse des acides cinnamoylquiniques et des amines polyacylées	21
Figure I 10 : Comportement des anthocyanes en solution.....	22
Figure I 11 : Réaction de dégradation des anthocyanes.....	23
Figure I 12 : Phénomène de co-pigmentation	23
Figure I 13 : structure de la gentiodelphine.....	24
Figure I 14 : Formation d'un métalloanthocyane par assemblage de six molécules d'anthocyane, six molécules de flavone et deux cations métalliques.....	27
Figure I 15 : Structure du complexe impliqué dans la couleur bleue chez <i>H. macrophylla</i>	27
Figure I 16 : Nomenclature simplifiée utilisée pour désigner les fragments de flavonoïdes.....	32
Figure I 17 : Nomenclature et principales fragmentations des flavonoïdes en mode positif, exemple du kaempférol	32
Figure I 18 : Ruptures homolytique et hétérolytique de la liaison osidique, exemple de la quercitrine.....	35
Figure I 19 : Mécanisme possible pour la formation de l'ion Y* par CID de l'ion [M+H] ⁺ exemple de la naringénine-7- <i>O</i> -neohesperidoside (103)	36
Figure I 20 : Méthodologie pour la différenciation des flavonoïdes rutinosides (rut) et neohesperidosides (nhes) basée sur les spectres UV et les ions produits par la fragmentation MS ² de [M+H] ⁺	37
Figure I 21 : Structure des fragments dérivés de l'acide quinique et des acides cinnamiques.....	39
Figure II 1 : Exemples de spectre UV pour les trois types de composés phénolique détectés effectué dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%A) Flavonols ; B) anthocyanes ; C) acides cinnamiques.....	62
Figure II 2 : Spectre UV (A) Type quercétine ; (B) Type kaempférol.....	65
Figure II 3 : Spectres UV des composés 19 (A), 43 (B), 33 (C) et 44 (D) effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%.....	66
Figure II 4 : Structures des génines ([M-H] ⁻ /[M+H] ⁺) identifiées dans les extraits d' <i>Hydrangea</i>	66

Figure II 5 : Fragmentations préférentielles des flavonoïdes diglycosylés selon l'enchaînement 1-6 ou 1-2 des sucres.....	72
Figure II 6 : Fragmentation du composé 14	73
Figure II 7 : Spectres de RMN ^1H (270 MHz, A) et ^{13}C (67,5 MHz, B) du composé 35 (CD ₃ OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm)	74
Figure II 8 : Spectre HMBC du composé 35 (500 MHz, CD ₃ OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm).....	75
Figure II 9 : Structure du composé 35	75
Figure II 10 : Structure du composé 40	75
Figure II 11 : Spectre de RMN ^1H (500 MHz, A) et ^{13}C (125 MHz, B) du composé 42 (CD ₃ OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm)	76
Figure II 12 : Spectre HMBC du composé 42 (500 MHz, CD ₃ OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm)	77
Figure II 13 : Structure du composé 42	77
Figure II 14 : Structure du composé 52	77
Figure II 15 : Spectre de masse (ESI ⁺) et fragmentation de l'acide chlorogénique (8) ...	79
Figure II 16 : Spectres UV de 1 (rouge) et 2 (bleu) effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%.....	80
Figure II 17 : Spectre de RMN- ^1H de 2 (500 MHz, CD ₃ OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm)	80
Figure II 18 : Spectre NOESY de 2 (500 MHz, CD ₃ OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm)	81
Figure II 19 : Spectres UV de 5 (rouge) et 7 (bleu) effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%.....	81
Figure II 20 : Spectre de RMN- ^1H (500 MHz, CD ₃ OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56	83
Figure II 21 : Spectres de RMN- ^1H (500MHz, DMSO-d ₆ , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56 : A) 20°C ; B) 50°C et C) 80°C.....	84
Figure II 22 : Spectres de RMN- ^1H (500MHz, DMSO-d ₆ , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56 à 50°C....	84
Figure II 23 : Expansion de la région aromatique du spectre de RMN- ^1H (500MHz, DMSO-d ₆ , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56 à 50°C.....	85
Figure II 24 : Spectre de RMN- ^{13}C (500MHz, DMSO-d ₆ , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56 à 20°C.	85
Figure II 25 : Attribution des signaux RMN ^1H de la chaîne spermidine.....	86
Figure II 26 : Fragmentation MS ² de la tricaféoylspermidine 56	87
Figure II 27 : Fragmentation MS ³ de la tricaféoylspermidine 56	87
Figure II 28 : Prédiction de fragmentation en MS ² des 3 dérivés de type coumaroyldicaféoylspermidine R = H (masse observée en rouge et masse perdue en vert) et des 3 feruoyldicaféoylspermidine R= OMe (masse observée en rose et masse perdue en bleu)	88
Figure II 29 : Prédiction de fragmentation en MS ³ des 3 dérivés de type coumaroyldicaféoylspermidine (masse observée en rouge et masse perdue en vert)...	89
Figure III 1 : Proposition de schéma de biosynthèse pour les composés présents dans les inflorescences du genre <i>Hydrangea</i>	95
Figure III 2 : Distribution des composés phénoliques des inflorescences du genre <i>Hydrangea</i> : teneurs en dérivés d'acides cinnamiques (bleu), flavonoïdes (vert) et amines polyacylées (rouge) (μmol/g d'extrait)	96

Figure III 3 : Distribution des composés phénoliques des inflorescences du genre <i>Hydrangea</i> : teneurs en dérivés d'acides cinnamiques, flavonoïdes, amines polyacylées et anthocyanes ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait)	97
Figure III 4 : Distribution des acides cinnamiques majoritaires dans les inflorescences du genre <i>Hydrangea</i> : acide 3-caféoylquinique (2), 5-caféoylquinique (8) et 1,5 dicaféoylquinique (48) ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	97
Figure III 5 : Distribution des flavonoïdes dans les inflorescences du genre <i>Hydrangea</i> : teneurs en flavonols, flavones et flavanones ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait)	98
Figure III 6 : Distribution des flavonols dans les inflorescences du genre <i>Hydrangea</i> : teneurs en dérivés de la quercétine, du kaempférol, de la myricétine et de l'isorhamnétine ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).	98
Figure III 7 : Distribution des composés phénoliques dans les inflorescences du genre <i>Hydrangea</i> (classement par teneurs décroissantes en dérivés de la quercétine) ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait)	99
Figure III 8 : Différents types de glycosylation des flavonols des inflorescences du genre <i>Hydrangea</i>	100
Figure III 9 : Distribution des hétérosides flavonoliques selon la nature du sucre directement lié en position 3 de la génine (teneurs en $\mu\text{mol/g}$ d'extrait).	100
Figure III 10 : Distribution des flavonols glycosylés par un hexose en position 3 ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait)	101
Figure III 11 : Analyse en composantes principales des teneurs en composés phénoliques dans le genre <i>Hydrangea</i> A : Représentation graphique du plan 1-2 de l'ACP. B : Cercle de corrélation des variables dans le plan 1-2 de l'ACP.....	102
Figure III 12 : Analyse factorielle discriminante (plan 1-2) des teneurs globales en composés phénoliques des espèces du genre <i>Hydrangea</i> . A : Représentation graphique, B : Cercle de corrélation des variables.....	104
Figure III 13 : Analyse factorielle discriminante (plan 1-2) des teneurs en composés phénoliques des espèces du genre <i>Hydrangea</i> . A : Représentation graphique, B : Cercle de corrélation des variables.....	105
Figure III 14 : Analyse factorielle discriminante (plan 2-3) des teneurs en composés phénoliques des espèces du genre <i>Hydrangea</i> . A : Représentation graphique, B : Cercle de corrélation des variables.....	106
Figure III 15 : A : Inflorescences de l'accession 'Merveille' (59) et B : de sa forme mutante 'Merveille Sanguinea' (60) (<i>H. macrophylla</i> ssp. <i>macrophylla</i>)	109
Figure III 16 : Classification des critères pour l'identification des <i>Hydrangea</i> . A : Dérivés d'acides cinnamiques ;	120
Figure III 17 : Schéma récapitulatif de l'expression de la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans le genre <i>Hydrangea</i>	122
Figure IV 1 : Période de floraison des différentes espèces.....	133
Figure IV 2 : Fleur stérile d' <i>H. macrophylla</i> au stade bouton (A) et avancée (B).....	133
Figure IV 3 : Fleurs stériles et fertiles d'une inflorescence d' <i>H. aspera</i> ssp. <i>aspera</i> groupe Villosa.....	133
Figure IV 4 : Colonne S8 540 <i>H. macrophylla</i>	136

Figure IV 5 : Colonne S9 Extrait 250 <i>H. macrophylla</i>	136
Figure IV 6 : Colonne S10 188 <i>H. aspera</i> ssp. <i>Sargentiana</i>	136
Figure IV 7 : Colonne S11 154 <i>H. aspera</i> ssp. <i>Sargentiana</i>	137
Figure IV 8 : Colonne S12 347 <i>H. anomala</i> ssp. <i>petiolaris</i>	137
Figure IV 9 : Chromatogramme de la séparation en CLHP préparative de la fraction S8-f19-22.....	138

Tables des tableaux

Tableau I 1 : Classification du genre <i>Hydrangea</i>	7
Tableau I 2 : Maxima d'absorbance et spectre UV de quelques flavonoïdes représentatifs des principales classes	29
Tableau I 3 : Ions fragments observés en mode positif pour les différentes classes de flavonoïdes	33
Tableau I 4 : Ions fragments observés en mode négatif pour les différentes classes de flavonoïdes	34
Tableau I 5 : Fragmentation MS ² de l'ion [M-H] ⁻ des flavonoïdes O-glycosylé par deux glucoses: sophorosides, gentiobiosides et X,Y-diglucosides	37
Tableau I 6 : Schéma hiérarchique d'identification par LC-MS ⁿ de dérivés d'acide quinique mono et diacylés	38
Tableau I 7 : Déplacements chimiques des protons H-2' et -6' en fonction du type de flavonoïdes.....	40
Tableau I 8 : Déplacements chimiques des différents types de protons présents dans les flavonoïdes.....	40
Tableau I 9 : Déplacements chimiques des différents types de carbones présents dans les flavonoïdes	41
Tableau I 10 : Déplacements chimiques des carbones du cycle C des différents types de flavonoïdes	41
Tableau II 1 : Liste des témoins utilisés.....	63
Tableau II 2: Spectres UV-Visible ($\lambda_{\max}$) et spectres de masse (m/z) des anthocyanes détectés dans les extraits des 3 espèces colorées du genre <i>Hydrangea</i>	64
Tableau II 3 : Spectres UV ($\lambda_{\max}$ en nm) des flavonoïdes détectés dans les extraits du genre <i>Hydrangea</i> dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%.....	65
Tableau II 4 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par un hexose (17, 29, 30, 33, 37, 40, 43 et 44).....	67
Tableau II 5 : Fragments observés en SM des oses.....	68
Tableau II 6 : Flavonoïdes monoglycosylés.....	68
Tableau II 7 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes monoglycosylés 39, 41, 45, 47 49, 50, 52, 54 et 55.	69
Tableau II 8 : Flavonoïdes diglycosylés.....	70

Tableau II 9 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par 2 hexoses (4 , 6 , 15 et 23)	70
Tableau II 10 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par un hexose et un rhamnose (16 , 25 , 28 , 35 et 36)	71
Tableau II 11 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par un hexose et un pentose (20 , 22 , 26 , 31 et 32)	72
Tableau II 12 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par un hexose et un pentose (38 , 42 et 51)	72
Tableau II 13 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes triglycosylés.....	73
Tableau II 14 : récapitulatifs des flavonoïdes isolés.....	74
Tableau II 15 : Spectre UV des dérivés d'acide cinnamique effectué dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%.....	78
Tableau II 16 : Fragmentation MS^2 et MS^3 en modes positif et négatif des dérivés d'acides cinnamiques monoacylés ; [m/z (intensité relative)]	79
Tableau II 17 : spectres UV (λ_{max} en nm) effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3% et spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des dérivés d'acide chlorogénique diacylés.....	82
Tableau II 18 : Spectre infrarouge de 56	83
Tableau II 19 : Spectres de masse MS^n [m/z (intensité relative des fragments)] des composés 56-60	89
Tableau III 1 : Répartition des espèces du genre <i>Hydrangea</i> selon les indicateurs : teneurs en dérivés d'acides cinnamiques, du kaempférol et de la quercétine, rapport entre les acides cinnamiques (2) et (8) et dérivés glycosylés par un rhamnose en position 3 (en rouge).101	
Tableau III 2 : Matrice de confusion de l'AFD des teneurs globales en composés phénoliques des espèces du genre <i>Hydrangea</i>	103
Tableau III 3 : Teneurs par classe de composés phénoliques dans les fleurs stériles de l'espèce <i>H. macrophylla</i> ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	108
Tableau III 4 : Teneurs en anthocyanes et acides cinnamiques des fleurs stériles d' <i>H. macrophylla</i> ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	109
Tableau III 5 : Teneurs en flavonols des fleurs stériles d' <i>H. macrophylla</i> ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	110
Tableau III 6 : Teneurs par classe des composés phénoliques dans les fleurs d' <i>H. aspera</i> et <i>H. involucrata</i> ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	112
Tableau III 7 : Teneurs en dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées dans les fleurs d' <i>H. aspera</i> et <i>H. involucrata</i> ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait)	113
Tableau III 8 : Teneurs en dérivé du kaempférol et de la quercétine dans les fleurs d' <i>H. aspera</i> et <i>H. involucrata</i> ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	114
Tableau III 9 : Synthèse des données cytogénétiques de la sous-section <i>Asperae</i> : quantité d'ADN, nombre de chromosomes, formule chromosomique et localisation des <i>loci</i> par FISH.....	115
Tableau III 10 : Teneurs par classe chimique, des composés phénoliques dans les espèces à inflorescences blanches ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	116

Tableau III 11 : Teneurs en dérivé d'acides cinnamiques et amines polyacylées dans les espèces à inflorescences blanches ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait)	117
Tableau III 12 : Teneurs en dérivés du kaempférol dans les espèces à inflorescences blanches ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	118
Tableau III 13 : Teneurs en dérivés de la quercétine dans les espèces à inflorescences blanches ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).....	119
Tableau III 14 : Spécificité de chaque espèce, sous-espèces ou groupe.....	120
Tableau IV 1 : Nombres de clones récoltés par espèce sous espèces et groupe.....	134
Tableau IV 2 : Gradient d'élution pour le profil flavonique.....	135
Tableau IV 3 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse CLHP des anthocyanes.....	135
Tableau IV 4 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse CLHP-SM des anthocyanes.....	135
Tableau IV 5 : Conditions opératoires de purification par CLHP préparative.....	138
Tableau IV 6 : Répartition des composés phénoliques par classe chimique et molécules témoins utilisées pour leur dosage.....	166
Tableau IV 7 : Récapitulatif coefficient dosage.....	166
Tableau IV 8 : Fiabilité des dosages évaluée à partir des molécules témoins.....	166
Tableau IV 9 : Calcul des coefficients pour le dosage des composés phénoliques détectés dans les inflorescences du genre <i>Hydrangea</i>	167

Abréviation

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

4CL	: 4-coumaroyl CoA ligase
ACQ	: Acide caféoyl-quinique
AFQ	: Acide féruloyle-quinique
ANS	: anthocyanidin synthétase
APCI	: ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric pressure chemical Ionisation)
ApCoQ	: acide <i>p</i> -coumaroyl-quinique
AQ	: Acide quinique
Ara	: arabinose
C3H	: cinnamate-3-hydroxylase ou <i>p</i> -coumarate 3-hydroxylase
C4H	: cinnamate-4-hydroxylase
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CCoAOMT	: caféoyl-CoA O-méthyltransferase
CHI	: chalcone isomérase
CHS	: chalcone synthétase
CI	: ionisation chimique (Chemical ionisation)
CID	: dissociation induite par collision (Collision Induced Dissociation)
CLHP	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
δ_C	: déplacement chimique du carbone (en ppm)
δ_H	: déplacement chimique du proton (en ppm)
d	: doublet
Da	: Dalton (unité de masse moléculaire)
diACQ	: acide dicaféoylquinique
DCI	: ionisation chimique par désorption (Direct Chemical Ionisation)
DCM	: dichlorométhane
dd	: doublet dédoublé
ddd	: doublet dédoublé dédoublé
DFR	: dihydroflavanol 4-réductase
DMSO-d6	: diméthylsulfoxyde deutérié
EI	: ionisation par impact électronique (Electronical Impact Ionisation)
ESI	: ionisation par électrospray (ElectroSpray Ionisation)
EtOH	: éthanol
F3'H	: flavonoid 3',5'-hydroxylase
F3'5'H	: flavonoid 3',5'-hydroxylase
FAB	: ionisation par bombardement d'atomes rapides (Fast Atom Bombardement)
FD	: désorption de champ (Field Desorption)
FHT	: flavanone-3-hydroxylase
FLS	: flavonol-synthase
FNSI et II	: flavone-synthases
Gal	: galactose
GalT	: galactose transferase
Glu	: glucose
Gluc	: glucuronide
GluT	: glucose transferase

3GT	: flavonoid-3-glycosyltransferase
H₂O	: eau distillée
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	: chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
HQT	: hydroxycinnamoyl CoA quinate transferase
Hz	: Hertz
IC	: ionisation chimique
IE	: impact électronique
IT	: spectromètre à trappe d'ions (Ion trap)
J	: constante de couplage
m	: multiplet
m/z	: masse / charge atomique
matK	: gène chloroplastique (mégakaryocyte-associated tyrosine kinase)
MeCN	: acétonitrile
MeOH	: méthanol
MeOH-d₄	: méthanol tétradeutééré (RMN)
n.d.	: non déterminé
NOESY	: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PAL	: phenylalanine ammonia lyase
ppm	: partie par million
PT	: pentose transferase
q	: quintuplet
q.s.p.	: quantité suffisante pour
rbcl	: gène chloroplastique codant pour la sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
RDA	: rétro Diels-Alder
Rha	: rhamnose
RMN	: résonance magnétique nucléaire
RMN-13C	: résonance magnétique nucléaire du carbone
RMN-1H	: résonance magnétique nucléaire du proton
RT	: rhamnose transferase
s	: singulet
sh	: shoulder, désigne un épaulement sur un pic
SHT	: spermidine hydroxycinnamoyl transférases
SM	: spectrométrie de masse
sp	: espèces
ssp	: sous-espèces
t	: triplet
TAL	: tyrosine ammonia lyase
TFA	: acide trifluoroacétique (trifluoroacetic acid)
TMS	: Tétraméthylsilane
Tr	: temps de rétention
u	: unité de masse atomique
UV	: Ultra-violet
UV(DAD)	: détecteur ultraviolet à barrettes de diodes (Diode Array Detector)
V/V	: rapport volume / volume
Xyl	: xylose
XylT	: xylose transferase

Introduction

Contexte

La diversité actuelle des espèces végétales sauvages ou cultivées est le résultat de l'évolution biologique et de l'adaptation à la diversité des environnements physiques. Pour l'humanité c'est une des ressources pour satisfaire ses besoins élémentaires, d'abord alimentaires et médicaux, mais aussi esthétiques. Les activités humaines jouent un rôle dans cette évolution, d'autant plus fort que les connaissances et les techniques se développent. Les échanges et l'introduction d'espèces d'origines lointaines ont été d'autant plus importants que les possibilités de voyage se sont amplifiées. L'acclimatation des plantes et la sélection naturelle ou artificielle ont représenté des facteurs déterminants qui marquent aujourd'hui notre environnement paysager. Ce patrimoine constitué au cours d'une longue évolution est la source des évolutions futures. Mais le développement intensif des activités humaines a un impact encore mal évalué mais plutôt négatif sur cette diversité des espèces et des variétés cultivées. La prise de conscience des conséquences et les volontés d'agir pour conserver, gérer et valoriser ce patrimoine au niveau mondial ont été inscrites dans le cadre plus large de la convention sur la biodiversité à Rio en 1992. Dans ce contexte, les ressources phytogénétiques sont constituées par l'ensemble des variétés cultivées et leurs espèces sauvages apparentées. Elles se trouvent soit dans les aires d'origines des espèces soit dans des collections rassemblées par des professionnels ou des amateurs. La France ayant signée la convention sur la biodiversité a mis en place une politique de conservation et de gestion des ressources génétiques avec la création du Bureau des Ressources Génétiques (BRG), aujourd'hui fusionné avec l'Institut Français de la Biodiversité (IFB) dans la Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB).

Le genre *Hydrangea* est originaire des continents d'Asie et d'Amérique et quelques échantillons ont été introduits et acclimatés en Europe à partir du 18^{ème} siècle. En France dès le début du 20^{ème} siècle, des professionnels sont les premiers à créer des variétés nouvelles à partir des introductions japonaises d'*H. macrophylla* et des centaines de variétés sont obtenues et diffusées par des horticulteurs de renom comme Mouillère. Cette activité créatrice durera jusqu'en 1970 mais aujourd'hui seule la production de plants par multiplication végétative reste une activité importante.

La collection du genre *Hydrangea* implantée à Angers depuis 1975, est riche de plus de 800 taxons répartis en treize espèces introduites d'Amérique ou d'Asie. Le réseau de ressources génétiques, constitué sous l'égide du BRG en 1999, regroupe cinq conservateurs

publics et privés. L'objectif est de caractériser la diversité introduite et créée en Europe pour définir des stratégies raisonnées de gestion et de valorisation des ressources.

La majorité des accessions appartiennent à l'espèce *H. macrophylla* et sont des sélections anciennes. L'identification de ces variétés est un des problèmes dans la gestion des collections parce que les dénominations sont fantaisistes et les généalogies sont souvent inconnues. La plupart des autres espèces sont méconnues tant sur le plan génétique et physiologique qu'horticole.

Problématique

Dans ce contexte la caractérisation de la collection est abordée à plusieurs niveaux. En premier lieu, l'identification morphologique est réalisée sur des critères botaniques et des caractères discriminants entre variétés. Puis l'identification génétique est effectuée à l'aide de marqueurs moléculaires mais aussi cytogénétiques (quantité d'ADN, nombre de chromosomes, niveau de ploïdie, caryotypes). C'est enfin la caractérisation de la diversité biochimique au niveau des composés phénoliques en lien avec la couleur des inflorescences qui constitue l'un des caractères ornementaux les plus attractifs.

La problématique de ce travail est liée à l'origine sauvage des espèces introduites et à l'histoire de la sélection. D'une part, par rapport à la diversité interspécifique, quelles sont les bases chimiques des pigments et co-pigments dans le genre ? Existe-t-il une diversité importante, comment est-elle structurée ? Et d'autre part, au niveau de la variabilité intraspécifique d'*H. macrophylla*, quel est l'effet de la sélection artificielle : la création par hybridation et sélection de génotypes a-t-elle participé à augmenter la variabilité ?

Ce manuscrit se divise en trois parties. Après avoir présenté le genre *Hydrangea* avec les données botaniques, la caractérisation de ses ressources génétiques et sa caractérisation phytochimique, le premier chapitre apporte des informations concernant les métabolites secondaires du genre. Nous y découvrirons notamment leur biosynthèse et la régulation de cette dernière, ainsi que l'implication de ces métabolites dans la coloration des fleurs. Ce chapitre sera aussi l'occasion de présenter la synthèse bibliographique effectuée sur l'analyse structurale de ces métabolites. Cette synthèse a permis la caractérisation structurale des métabolites détectés dans les inflorescences du genre, qui fait l'objet du second chapitre. Le troisième chapitre, quant à lui, a pour objectif d'analyser la diversité des composés phénoliques détectés dans les inflorescences du genre. Dans un premier temps, la structuration de la diversité interspécifique sera étudiée en s'appuyant sur les voies de biosynthèse et, dans un second temps, la diversité intraspécifique sera analysée

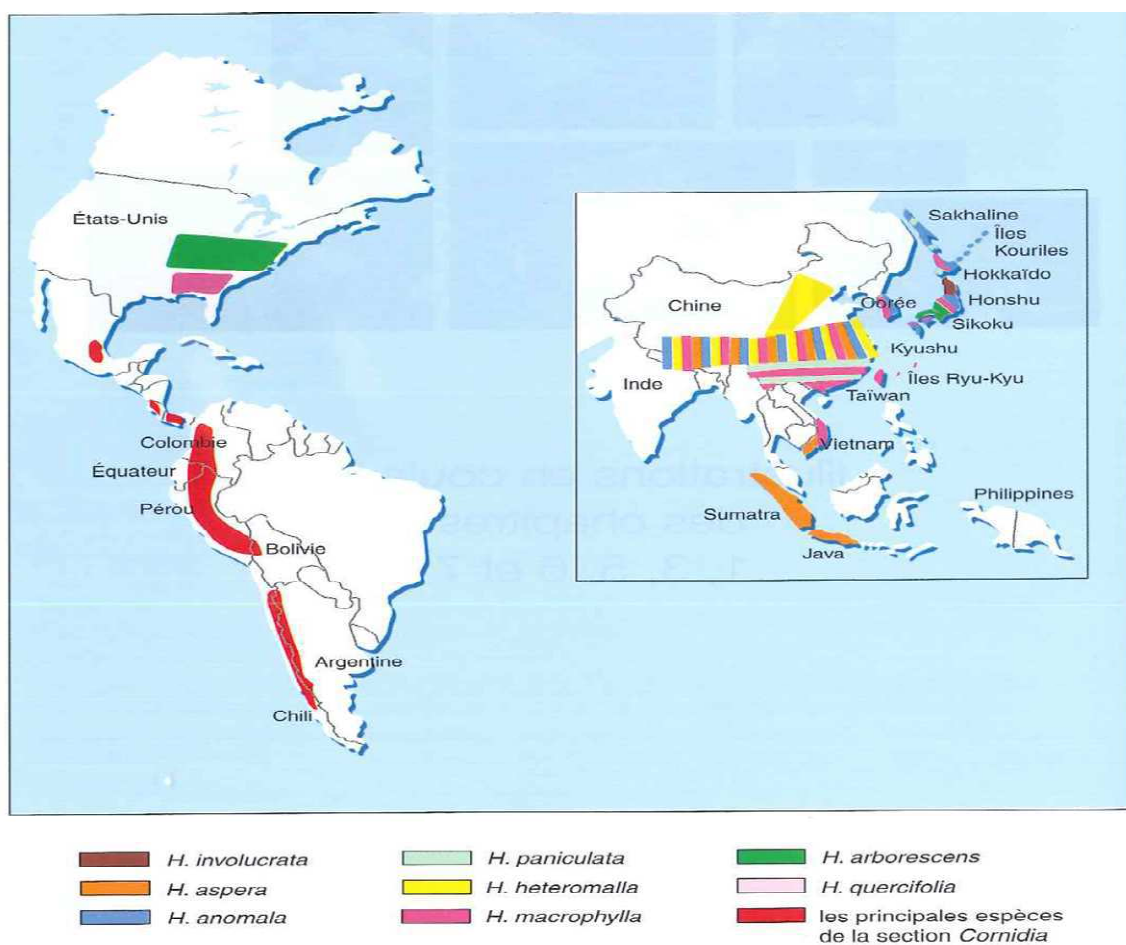
Chapitre I. Travaux antérieurs

CHAPITRE I. TRAVAUX ANTERIEURS	3
I. Le genre <i>Hydrangea</i> L.	5
I. 1. Données botaniques.....	5
I. 1. 1. Répartition géographique.....	5
I. 1. 2. Classifications et phylogénie.....	6
I. 1. 3. Description botaniques du genre	6
I. 2. Caractérisation des Ressources génétiques du genre	9
I. 3. Caractérisation phytochimique	11
II. Métabolites secondaires du genre <i>Hydrangea</i> L.	12
II. 1. Généralités	13
II. 1. 1. Flavonoïdes	13
II. 1. 2. Anthocyanes	14
II. 1. 3. Dérivés d'acides cinnamiques.....	15
II. 2. Biosynthèse	16
II. 2. 1. Flavonoïdes	17
II. 2. 2. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées	21
II. 3. Généralités sur la coloration des fleurs.....	22
II. 3. 1. Anthocyanes et pH.....	22
II. 3. 2. Co-pigmentation	22
II. 3. 2. 1. Auto-association	23
II. 3. 2. 2. Co-pigmentation intramoléculaire.....	24
II. 3. 2. 3. Co-pigmentation intermoléculaire.....	25
II. 3. 2. 4. Complexes métalliques	26
II. 3. 2. 4. 1. Métalloanthocyanes.....	26
II. 3. 2. 4. 2. Complexes métalliques « flous » (Fuzzy metal complex pigments)	27
II. 4. Analyse structurale.....	28
II. 4. 1. Spectroscopie UV-visible	28
II. 4. 1. 1. Flavones et flavonols.....	28
II. 4. 1. 2. Isoflavones, flavanones et dihydroflavonols.....	29
II. 4. 1. 3. Anthocyanes.....	29
II. 4. 1. 4. Dérivés d'acides cinnamiques	30
II. 4. 2. Spectrométrie de masse	30
II. 4. 2. 1. Flavonoïdes	30
II. 4. 2. 1. 1. Techniques d'ionisation.....	30
II. 4. 2. 1. 2. Couplage chromatographie-spectrométrie de masse	31

II. 4. 2. 1. 3. Identification des flavonoïdes par spectrométrie de masse	32
II. 4. 2. 1. 3. a. Nomenclature	32
II. 4. 2. 1. 3. b. Masse moléculaire	32
II. 4. 2. 1. 3. c. Structure de l'aglycone	32
– Ionisation positive	33
– Ionisation négative	33
– Aglycones méthoxylées	34
– Anthocyanes	34
II. 4. 2. 1. 3. d. Flavonoïdes <i>O</i> -glycosylés	35
– Nombre et types de sucres	35
– Liaison génines-ose(s)	35
– Lien interglycosidique	36
II. 4. 2. 2. Dérivés d'acides cinnamiques, esters de l'acide quinique	37
II. 4. 2. 2. 1. Dérivés monoacylés	38
II. 4. 2. 2. 2. Dérivés diacylés	39
II. 4. 3. RMN	40
II. 4. 3. 1. Flavonoïdes	40
II. 4. 3. 2. Dérivés d'acides cinnamiques, esters de l'acide quinique	41

BIBLIOGRAPHIE.....	43
---------------------------	-----------

Figure I-1 : Répartition géographique des principales espèces du genre *Hydrangea* sur les différents continents (Becue 1999) dans (Guérin 2002)



I. Le genre *Hydrangea* L.

Le genre *Hydrangea* L. comprend en une vingtaine d'espèces dont les centres d'origine sont répartis sur les continents asiatique et américain. Il est bien décrit d'un point de vue botanique avec cependant plusieurs classifications qui pour certaines espèces laissent des ambiguïtés sur les niveaux taxonomiques. Les acquis dans le domaine de la génétique sont très récents et encore relativement partiels.

I. 1. Données botaniques

I. 1. 1. Répartition géographique

Le genre est réparti sur deux continents, dans les zones tempérées et subtropicales, à des altitudes pouvant atteindre 4000 m (Figure I-1, Annexe 1). Sur le continent américain au nord se trouvent deux espèces : *H. arborescens* L. à l'est des Etats-Unis et *H. quercifolia* Bartr. au sud-est. En Amérique Centrale et du Sud se trouvent les plupart des espèces à feuillage persistant et à port grimpant. Dans l'Est du continent asiatique, les espèces sont plus diversifiées et leur répartition est plus ou moins large. Elles se trouvent au Japon, en Chine, au nord de l'Inde, au Népal et au Bhoutan, et plus au sud, au Vietnam, aux Philippines et en Indonésie.

La première espèce introduite est *H. arborescens* L. depuis la Pennsylvanie vers l'Angleterre par Peter Collinson en 1736. Le nom *Hydrangea* a été utilisé pour la première fois pour désigner cette espèce par Gronovius en 1739 et plus tard repris par Linné dans *Species Plantarum* en 1753 (McClintock 1957). Les premières introductions d'Asie sont celles de l'espèce *H. macrophylla* Ser. aux jardins botaniques de Kew en Angleterre par Sir Joseph Banks en 1789. Ce n'est qu'au milieu du 19^{ème} siècle que d'autres espèces sont introduites en Europe après des collectes dans l'Himalaya, en Chine sous forme de graines ou de boutures. Ces introductions ont été diffusées dans toute l'Europe. La sélection d'*H. macrophylla* a commencé d'abord en Chine et au Japon bien avant l'Europe. En Europe, les horticulteurs ont acclimaté une dizaine d'introductions d'*H. macrophylla* puis, à la fin du 19^{ème} et surtout au début du 20^{ème} siècle, la sélection s'est développée grâce aux avancées des connaissances sur la reproduction et la génétique. Les horticulteurs français comme Lemoine à Nancy, Mouillère à Vendôme, et Cayeux au Havre, ont été les premiers à créer de nouvelles variétés par hybridations intraspécifiques et sélections phénotypiques dans les descendances, en recherchant des tiges moins souples et des coloris plus soutenus que celle des introductions. Entre 1900 et 1970, de l'ordre de 250 cultivars ont été diffusés par trois

générations d'horticulteurs. En Allemagne et aux Pays Bas surtout mais aussi en Angleterre puis plus tard en Suisse, les horticulteurs ont créé de nombreuses variétés pour les jardins puis pour le forçage de plantes en pots avec des ports moins hauts et des tiges plus rigides (Bertrand and Lambert 2002).

Quelques autres espèces ont fait l'objet d'une sélection pour leur utilisation paysagère, comme *H. paniculata* Sieb. et *H. quercifolia* Bart., mais aussi dans une moindre mesure *H. arborescens* L..

La sélection classique a été abandonnée en France depuis trente ans mais se poursuit aujourd'hui au Pays-Bas, en Allemagne, au Japon, surtout sur l'espèce *H. macrophylla* Ser.. La maîtrise de la régénération de bourgeons par la culture *in vitro* à partir de feuilles et de la transgénèse obtenues chez *H. macrophylla* ouvre pour cette espèce de nouvelles stratégies (Hamama *et al.* 2011).

I. 1. 2. Classifications et phylogénie

Le genre *Hydrangea* L. est rattaché à la famille des Hydrangeaceae et non plus à celle des Saxifragaceae, cette ancienne classification ayant été très contestée par plusieurs botanistes mais aussi contredite par les analyses biochimiques et par les marqueurs moléculaires. Les analyses à l'aide de séquences *rbcL*¹ (Xiang *et al.* 1993; Soltis *et al.* 1995) et *matK*²³ (Xiang *et al.* 2002) en particulier ont confirmé l'existence de cette famille à part entière. La sous famille des *Hydrangeoideae* comprend deux tribus, celles des *Cardiandreae* et *Hydrangeae* qui comportent respectivement deux et neuf genres.

I. 1. 3. Description botaniques du genre

Ce sont des arbustes à port érigé ou grimpant dont les feuilles simples, caduques ou persistantes, sont opposées ou plus rarement verticillées⁴ par trois. Les feuilles peuvent être

¹ *rbcL* : gène codant pour la grande sous-unité de l'enzyme photosynthétique ribulose 1-5 diphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO)

² *matK* : gène chloroplastique codant pour une maturase impliquée dans l'épissage des ARN de transfert.

³ Oboval : présentant la forme d'un ovale dont la plus grande largeur est située vers le sommet.

⁴ Verticillé : disposé en verticille. Verticille : ensemble de pièces, feuilles par exemple, implantées sur un axe au même niveau.

Tableau I-1 : Classification du genre *Hydrangea* (McClintock 1957)

Section 1 : **HYDRANGEA**

Sous section 1 : **Americanae**

- Hydrangea arborescens* L.
- Hydrangea arborescens* L. ssp *arborescens* McClintock
- Hydrangea arborescens* L. ssp *discolor* (Seringe)
- Hydrangea arborescens* L. ssp *radiata* (Walter) McClintock
- Hydrangea quercifolia* Bartram

Sous section 2 : **Asperae**

- Hydrangea sikokiana* Maximowicz
- Hydrangea involucrata* Siebold
- Hydrangea aspera* D.Don
- Hydrangea aspera* D.Don ssp *aspera* McClintock
- Hydrangea aspera* D.Don ssp *strigosa* (Rehder) McClintock
- Hydrangea aspera* D.Don ssp *robusta* (Hooker f. et Thomson) McClintock
- Hydrangea aspera* D.Don ssp *sargentiana* (Rehder) McClintock

Sous section 3 : **Calyptanthae**

- Hydrangea anomala* D.Don
- Hydrangea anomala* D.Don ssp *anomala* McClintock
- Hydrangea anomala* D.Don ssp *petiolaris* (Sieb. et Zucc.) McClintock

Sous section 4 : **Petalanthe**

- Hydrangea hirta* (Thun.) Sieb.
- Hydrangea scandens* (L.f.) Ser.
- Hydrangea scandens* (L.f.) Ser. ssp *scandens* McClintock
- Hydrangea scandens* (L.f.) Ser. ssp *liukiuensis* (Nakai) McClintock
- Hydrangea scandens* (L.f.) Ser. ssp *chinensis* (Maximowicz) McClintock
- Hydrangea scandens* (L.f.) Ser. ssp *kwangtungensis* (Merrill) McClintock

Sous section 5 : **Heteromallae**

- Hydrangea paniculata* Sieb.
- Hydrangea heteromalla* D.Don

Sous section 6 : **Macrophyllae**

- Hydrangea macrophylla* (Thun.) Ser.
- Hydrangea macrophylla* (Thun.) Ser. ssp *macrophylla* McClintock
- Hydrangea macrophylla* (Thun.) Ser. ssp *serrata* (Thun) Makino
- Hydrangea macrophylla* (Thun.) Ser. ssp *stylosa* (Hooker f. et Thomson) McClintock
- Hydrangea macrophylla* (Thun.) Ser. ssp *chungii* (Rehder) McClintock

Section 2 : **CORNIDIA**

Sous section 1 : **Monosegia**

- Hydrangea seemannii* Riley
- Hydrangea asterolasia* Diels.
- Hydrangea integrifolia* Hayata
- Hydrangea oerstedii* Briquet
- Hydrangea peruviana* Moricand
- Hydrangea diplostemonia* (Donnell Smith) Standley
- Hydrangea preslii* Briquet
- Hydrangea steyermarkii* Standley

Sous section 2 : **Polysegia**

- Hydrangea serratifolia* (Hooker et Arnott) Philippi f.
- Hydrangea tarapotensis* Briquet
- Hydrangea jelskii* Szyszlowicz
- Hydrangea mathewsii* Briquet

ovales, obovales ou elliptiques, à bord entier ou denté, lobées⁵ ou non, épaisses ou fines, glabres ou pubescentes⁶.

Les inflorescences sont formées de cymes⁷ groupées soit en corymbe⁸ aplati ou globuleux, soit en panicule⁹. Les fleurs, colorées ou non, sont actinomorphes¹⁰, hermaphrodites, et différenciées en fleurs stériles, dont les sépales pétaloïdes¹¹ sont largement développés, et en fleurs fertiles. Les fleurs stériles, situées en générale à la périphérie, ont 4 sépales pétaloïdes, 4 pétales, 8 étamines fertiles, 2 à 4 styles et un ovaire supère¹², mais les ovules ne produisent pas de graines. Les fleurs fertiles sont formées de 5 sépales, 5 pétales libres colorés ou non, 8 à 10 étamines. Les styles¹³ sont libres ou soudés à leur base selon que l'ovaire est infère¹⁴ ou semi-supère. Le fruit est une capsule, les graines très petites (0,1 à 1mm, 2,5 pour les plus grandes) et très nombreuses sont globuleuses ou en fuseau avec ou sans appendice.

La classification du genre *Hydrangea* proposée par McClintock en 1957 est basée essentiellement sur l'étude d'échantillons d'herbiers et prend en compte de nombreux taxons regroupés en 23 espèces. Elle est de ce fait la plus synthétique, par comparaison avec les classifications antérieures. Plus récemment, des études chinoises et japonaises ont proposé de

⁵ Lobé : pourvu de lobes. Lobe : division d'une feuille ou d'un autre organe, dans le premier cas, en principe lorsque l'échancrure n'atteint pas le milieu de chaque moitié du limbe.

⁶ Pubescent : Caractère d'un organe qui possède des poils fins plus ou moins espacés, qui est duveteux

⁷ Cyme : inflorescence simple, dans laquelle l'axe principal se termine par une fleur qui est la fleur centrale de l'inflorescence, les axes secondaires sont également terminés par une fleur et ainsi de suite.

⁸ Corymbe : masculin, inflorescence simple, ressemblant à une ombelle car toutes les fleurs se trouvent au même niveau ou dans un même plan, mais dont les pédoncules sont insérés sur la tige de façon étagée.

⁹ Panicule : inflorescence complexe, en forme de grappe composée, dont les éléments sont soit des grappes, soit des cymes.

¹⁰ Actinomorphe : se dit d'une fleur régulière, à symétrie axiale.

¹¹ Sépale pétaloïde : Chacune des pièces, normalement verte, du calice d'une fleur angiosperme. On les dit pétaloïdes lorsqu'ils revêtent les couleurs vives et attractives si familières pour les pétales.

¹² Supère : Qualifie l'ovaire d'une fleur lorsque celui-ci est situé au-dessus du niveau d'insertion sur le réceptacle des pièces florales.

¹³ Style : Partie du gynécée qui, chez les angiospermes, surmonte le gynécée et se termine par le stigmate ou surface réceptrice du pollen.

¹⁴ Infère : Qualifie l'ovaire d'une fleur. L'ovaire est situé au dessous du niveau d'insertion sur le réceptacle des pièces florales.

Chun (1954)	McClintock (1957)	Wei and Bartholomew (2001)
	<u><i>H. aspera</i> D. Don</u>	
<u><i>H. fulvescens</i> Rehder</u> <u><i>H. villosa</i> Rehder</u> <u><i>H. glabripes</i> Rehder</u> <u><i>H. aspera</i> D. Don</u> <u><i>H. kawakami</i> Hayata</u>	ssp. <i>aspera</i> McClintock	<u><i>H. aspera</i> D. Don</u> <u><i>H. kawakami</i> Hayata</u>
<u><i>H. strigosa</i> Rehder</u>	ssp. <i>strigosa</i> (Rehder) McClintock	<u><i>H. strigosa</i> Rehder</u>
<u><i>H. longipes</i> Franchet</u> <u><i>H. rosthornii</i> Diels</u>	ssp. <i>robusta</i> (Hooker & Thomson) McClintock	<u><i>H. longipes</i> Franchet</u> <u><i>H. robusta</i> Hooker & Thomson</u>
<u><i>H. sargentiana</i> Rehder</u> <u><i>H. involucrata</i> Sieb.</u>	ssp. <i>sargentiana</i> (Rehder) McClintock	<u><i>H. sargentiana</i> Rehder</u>
	<u><i>H. involucrata</i> Sieb</u>	<u><i>H. involucrata</i> Sieb.</u> <u><i>H. longifolia</i> Hayata</u>

Figure I-2 : Classifications dans la sous-section *Asperae* selon (Chun 1954), (McClintock 1957) et (Wei and Bartholomew 2001).

classifications plus détaillées sur les espèces asiatiques (Iwatsuki *et al.* 2001; Wei and Bartholomew 2001).

Dans la classification de McClintock (Tableau I-1), qui est notre référence pour la collection, les 23 espèces sont divisées en 2 sections : *Hydrangea* et *Cornidia*. Ces deux sections se différencient par le caractère caduc ou persistant du feuillage. La clé de détermination (Annexe 2) dans la section *Hydrangea*, qui comprend 11 espèces, est basée sur 6 caractères principaux : la position de l'ovaire (infère, semi-supère), la forme de la capsule à l'apex¹⁵ (tronquée ou conique), puis celle des graines avec ou sans ailes¹⁶, les pétales tombant ensemble (calyptra¹⁷) ou séparément et enfin les graines avec ou sans appendices, l'inflorescence plate ou pyramidale. Dans cette section, la sous-section *Calyptranthe* est caractérisée par un port grimpant, et deux des six sous-sections se distinguent par des espèces à inflorescences colorées, *Asperae* et *Macrophyllae*, les autres sont à inflorescences blanches.

McClintock (1957) a regroupé sous l'espèce *H. macrophylla* 4 espèces, qu'elle met au rang de sous-espèces, en se basant principalement sur la couleur des fleurs (blanches, bleus ou rose), l'ovaire infère à l'anthèse¹⁸ puis semi-supère sur le fruit, la longueur des styles et la forme des graines. Cette classification est confortée par les données sur les quantités d'ADN et sur la présence d'hybrides fertiles entre les sous-espèces *serrata* et *macrophylla* (Demilly *et al.* 2000; Zonneveld 2004).

La sous-section *Asperae* comprend trois espèces, *H. sikokiana*, *H. involucrata* et *H. aspera*, elle-même constituée de quatre sous-espèces : *aspera*, *strigosa*, *robusta* et *sargentiana*. Ce sont la forme et la taille des feuilles aussi l'aspect et la taille du trichome¹⁹ qui permettent de distinguer ces sous-espèces. Cette partie de la classification se distingue des classifications chinoises et japonaises de Chun (1954) et Wei et Bartholomew (Iwatsuki *et al.* 2001; Wei and Bartholomew 2001), dans lesquelles ces sous-espèces se trouvent au rang d'espèces (Figure I-2). De plus, dans la sous-espèce *aspera* sont rassemblées en cinq espèces de la classification de Chun (1954), alors que plus récemment Wei et Bartholomew (Iwatsuki

¹⁵ Apex : extrémité d'une racine ou d'une tige.

¹⁶ Aile : Partie marginale, plus ou moins mince, d'une tige, d'un fruit, ou d'une graine, facilitant la dispersion par le vent.

¹⁷ Calyptra : sorte de capsule caduque formée par les pétales soudés entre eux jusqu'à leur apex et tombant tous ensemble.

¹⁸ Anthèse : synonyme de floraison ou, de façon plus restrictive, ouverture des boutons floraux.

¹⁹ Trichomes : ensemble de poils tapissant la surface d'un organe végétal.

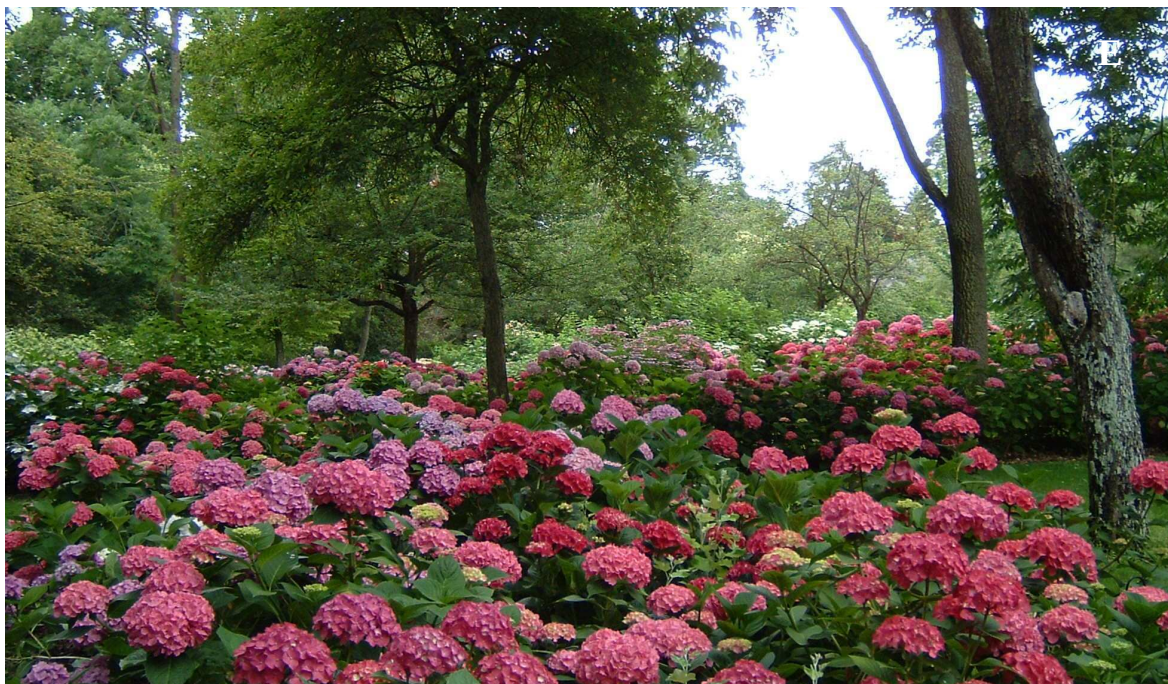


Planche photos I-1 : Espèces du genre *Hydrangea*, *H. macrophylla* ssp *macrophylla* ‘Mariesi’ 325 (A), ‘Maman’ 54 (B), *H. macrophylla* ssp *serrata* ‘Yesoensis’ 353 (C), ‘Belladonna’ 258 (D), collection à l’Arboretum Gaston Allard (E)

et al. 2001; Wei and Bartholomew 2001) en distinguent deux, d'où une forte ambiguïté à ce niveau.

Dans la section *Cornidia*, les 12 espèces sont séparées en deux sous-sections *Monosegia* et *Polysegia*. La clé de détermination concerne essentiellement 5 caractères : l'inflorescence avec une ou plusieurs ombelles²⁰, plate, arrondie ou en grappe, avec ou sans fleurs stériles, puis le nombre de sépales et pétales (4 ou 5), les feuilles ovales ou obovales.

I. 2. Caractérisation des Ressources génétiques du genre

Les collections du genre *Hydrangea* L. sont réparties en Europe dans des jardins botaniques, Arboretum ou des jardins privés, dont le rôle est de maintenir les plantes introduites à partir de leur aire d'origine et de conserver des cultivars souvent anciens. La collection qui rassemble plus de 800 accessions à l'Arboretum Gaston Allard à Angers est la plus importante en Europe non seulement par son grand nombre d'accessions, mais surtout par les travaux de caractérisations qui ont conduit d'une part à l'identification fiable des plantes par marquage moléculaire et d'autre part à l'acquisition de connaissances plus fondamentales par analyses cytogénétiques.

Les accessions de la collection sont décrites par 35 critères morphologiques et les informations sont rassemblées dans une base de données, établie par H. Bertrand (Bertrand *et al.* 2007). L'analyse phénotypique montre qu'il existe une diversité intra et interspécifique très importante et peu exploitée en dehors de l'espèce *H. macrophylla* (planche photo I-1, I-2 et I-3).

Les travaux sur la caractérisation de la diversité génétique ont été conduits en particulier sur l'organisation génomique par l'approche cytogénétique (Cerbah *et al.* 2001). Il existe une variation interspécifique de la quantité d'ADN (de 2 à 5 pg/noyau), mais il existe aussi une variation intraspécifique importante au sein de l'espèce *H. aspera* (3 à 4,8 pg/noyau). D'autres particularités ont été mises en évidence. Le nombre de chromosomes est $2x = 36$ pour la majorité des espèces sauf dans la sous-section *Asperae* où il est de 30 chez *H. involucrata*, et 34 chez *H. aspera* avec une exception pour les accessions Kawakami à 36 chromosomes. Les caryotypes et le marquage des chromosomes par fluorochrome banding et par FISH (fluorescent in situ hybridisation) avec deux sondes ADN ribosomiques, révèlent des différences interspécifiques mais surtout intraspécifiques, entre les quatre sous-espèces

²⁰ Ombelles : inflorescence où tous les pédoncules sont insérés au même point de la tige, les fleurs sont toutes disposées sur une même surface plane ou sphérique.



Planche photos I-2 : Espèces du genre *Hydrangea*, *H. aspera* ssp *robusta* 441(A), 396 (B), *H. aspera* ssp *sargentiana* 188 (C), *H. aspera* ssp *aspera* groupe *Villosa* 343 (D), groupe *Kawakami* 352(E), *H. aspera* ssp *strigosa* (F), *H. involucrata* 355 (G et H).

d'*H. aspera* (Mortreau *et al.* 2010). Ces données conduisent à reconsidérer la classification de McClintock pour cette espèce et à émettre l'hypothèse d'un complexe d'espèces.

Par ailleurs, le taux de polyploïdes est particulièrement élevé dans l'espèce *H. macrophylla* (17% de triploïdes) et lié à l'impact de la sélection. Il en est de même chez *H. paniculata* avec une majorité de tétraploïdes (Mortreau *et al.* 2003).

L'identification variétale et la structuration de la diversité génétique, réalisées à l'aide des marqueurs moléculaires Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), révèlent un polymorphisme suffisamment important pour distinguer les cultivars proches, mais aussi pour détecter les clones doublons et les mutants dans la collection. Les distances génétiques ont été évaluées entre 380 clones d'*H. macrophylla*, avec 67 marqueurs. Les clones introduits présentent une variabilité génétique importante, en particulier au sein de la sous-espèce *serrata*. Sur le dendrogramme²¹, les clones se répartissent en trois groupes qui rassemblent d'une part les variétés anciennes à coloris pâles, d'autre part les variétés plus modernes à coloris foncés et les polyploïdes, et enfin les introductions et cultivars anciens. L'impact de la sélection est très marqué dans cette structuration (Mortreau *et al.* 2003)

Chez *H. aspera* et *H. involucrata* (45 clones), le dendrogramme, établi à partir de 163 marqueurs, montre une forte structuration correspondant aux deux espèces et dans les quatre sous-espèces à deux sous-groupes, le premier avec *sargentiana* et *robusta*, et le second avec *strigosa* et *aspera*. Au sein de la sous-espèce *aspera*, les clones à 34 ou 36 chromosomes sont séparés en une subdivision bien claire (Mortreau 2003). Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par l'analyse cytogénétique.

La diversité morphologique et génétique est importante dans cette collection tout en mentionnant que ce n'est qu'un faible échantillonnage, non entièrement représentatif. Un autre niveau d'analyse, celui de la biochimie avec le métabolisme secondaire, présente le plus grand intérêt. D'une part, les travaux publiés indiquent que dans ce genre existent des composés pouvant avoir des applications médicinales. D'autre part, il s'agit de connaître la diversité des composés phénoliques dans les inflorescences colorées ou non.

La diversité génétique a été étudiée au niveau du genre à l'aide de 14 marqueurs microsatellites sur 74 cultivars par Rinehart *et al.* (2006). Il en ressort que la structuration est

²¹ Dendrogramme : diagramme fréquemment utilisé pour illustrer l'arrangement de groupes générés par un regroupement hiérarchique. Les dendrogrammes sont souvent utilisés en biologie pour illustrer des regroupements de gènes.



Planche photos I-3 : Espèces du genre *Hydrangea*, *H. arborescens* (A), *H. quercifolia* (B), *H. anomala* (C), *H. heteromalla* (D), *H. paniculata* (E), *H. scandens* (F), *H. seemannii* (G), *H. integrifolia* (H).

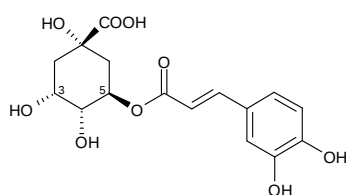
en adéquation avec la classification de McClintock (1957). Entre les sous-sections *Macrophyllae* et *Petalanthe*, comme entre *Asperae* et *Calyptanthae*, la distance génétique est relativement faible (0.38 et 0.33) comparée aux autres sous-sections (entre à 0.54 et 0.90). La diversité intraspécifique moyenne, évaluée sur 23 espèces, est faible (0.28) mais la diversité moyenne entre espèces est plus élevée (0.45). La diversité est essentiellement due à la différenciation entre les espèces (0.62).

I. 3. Caractérisation phytochimique

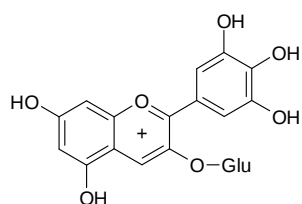
Dans le genre *Hydrangea* L., seule l'espèce *H. macrophylla* Ser. a été bien étudiée d'un point de vue phytochimique, notamment afin de comprendre les phénomènes physico-chimiques impliqués dans la coloration des sépales pétaloïdes. Les premiers travaux phytochimiques sur les facteurs pouvant influencer la couleur des fleurs d'*H. macrophylla* remontent aux années 1930 (Allen 1931; Chenery 1937). Plus tard, Allen est le premier à s'intéresser à l'influence de l'aluminium sur la couleur (Allen 1943). Puis Asen *et al.* ont étudié particulièrement la variété 'Merveille' de la sous espèce *macrophylla* et ont montré la présence d'anthocyanes, de flavonols et d'acides phénoliques dans les sépales pétaloïdes (Asen and Siegelman 1957; Asen *et al.* 1957). Par ailleurs, des travaux plus récents ont porté sur les feuilles. Murakami *et al.* ont ainsi mis en évidence la présence de dérivés de la quercétine, du kaempférol et de l'isorhamnétine dans *Hydrangea Dulcis Folium* (feuilles fermentées et séchées de *Hydrangea macrophylla* Ser. var. *thunbergii* Makino') (Murakami *et al.* 2001). Une autre équipe a rapporté la présence de dérivés du kaempférol dans les feuilles et les racines d'*H. macrophylla* (Subha and Sukumar 2007).

Depuis les années 1980, les études se sont principalement tournées vers la compréhension de la couleur. L'équipe de Takeda a étudié les complexes impliqués dans la couleur bleue des sépales et en particulier aux co-pigments. Parmi les acides phénoliques présents dans les sépales, seuls les dérivés d'acide quinique acylés en position 3 (acide 3-caféoylquinique **2**) et les dérivés *cis* et *trans* de l'acide 3-*p*-coumaroylquinique **7**), donnent une coloration bleue en mélange avec la delphinidine-3-glucoside et l'aluminium. L'acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique **8**), également présent dans les sépales, ne semble pas être impliqué dans la coloration bleue (Takeda *et al.* 1985; Takeda *et al.* 1985).

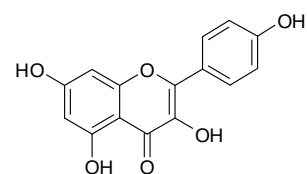
Les publications traitant des autres espèces du genre sont rares. Bohm *et al.* ont étudié les flavonoïdes de la famille des *Hydrangeaceae* (Bohm *et al.* 1985). Ils ont mis en évidence une différence de composition entre les genres et même au niveau des espèces. Quatre espèces du genre *Hydrangea* ont été analysées : *H. macrophylla*, *H. anomala*, *H. heteromalla* et *H.*



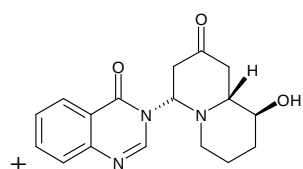
Acide 5-caféoylquinique (8)



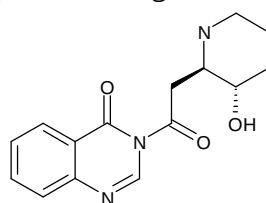
Delphinidine-3-glucoside (68)



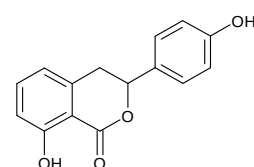
Kaempférol (81)



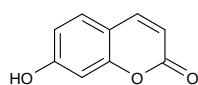
Hydrachine A (82)



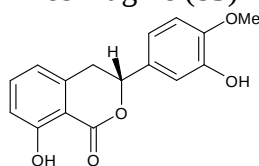
Febrifugine (83)



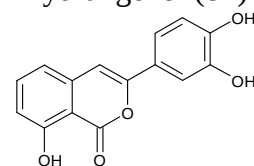
Hydrangénol (84)



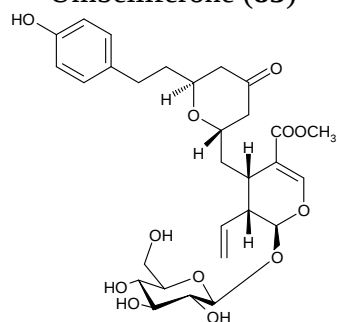
Umbelliferone (85)



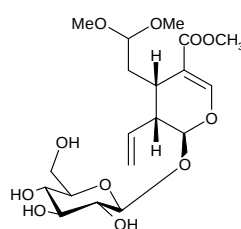
Phyllodulcine (86)



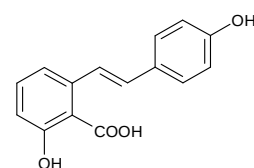
Thunberginol A(87)



Hydrangenoside C(88)



Macrophyllanoside D (89)



Acide hydrangeique (90)

quercifolia. Des hétérosides du kaempférol et de la quercétine sont présents dans ces quatre espèces sous formes mono, di et triglycosylées toujours en position 3. Les sucres mis en évidence sont variés : glucose, galactose, rhamnose et xylose. Seules trois publications traitent de l'étude phytochimique de l'espèce *H. paniculata* ; la rutine (**25**) y est retrouvée dans les fleurs (Couch and Naghski 1945) et dans les feuilles (Cacig *et al.* 2006; Lupea *et al.* 2008).

D'autres types de composés, n'intervenant pas dans la coloration, sont aussi présents dans le genre :

- des terpénoïdes : triterpènes (Yoshikawa *et al.* 1994) et stéroïdes (Patnam *et al.* 2001).
- des alcaloïdes ont été détectés pour la première fois en 1952 (Ablondi *et al.* 1952). Certain d'entre eux, isolés de *H. macrophylla* ou *H. chinensis*²², ont été largement étudiés pour leur activité antimalariale comme l'hydrachanine A (**82**) (Patnam *et al.* 2001), la febrifugine (**83**) et l'isofebrifugine (Ishih *et al.* 2003; Ishih *et al.* 2003; Khalil *et al.* 2003; Ishih *et al.* 2004; Ishih *et al.* 2007).
- des coumarines et isocoumarines, comme l'hydrangénol (**84**), l'umbelliférone (**85**), la phyllodulcine (**86**), les thunberginols A (**87**), B, C, D, E, F et leur dérivés (Asen *et al.* 1960; Suzuki *et al.* 1977; Yagi *et al.* 1977; Yoshikawa *et al.* 1992; Yoshikawa *et al.* 1992; Yoshikawa *et al.* 1994; Khalil *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2007; Kurume *et al.* 2008).
- des secoiridoides glycosylés ayant une structure nouvelle et spécifique des *Hydrangea* ont été découverts pour la première fois dans les années 1980 (Inouye *et al.* 1980) : les hydrangenosides A, B et C (**88**) (Sakai *et al.* 2007; Nakamura *et al.* 2009) et les macrophyllanosides A-D (**89**) (Kikuchi *et al.* 2008)
- des stilbènes comme l'acide hydrangéique (**90**) (Zhang *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2009).

II. Métabolites secondaires du genre *Hydrangea* L.

Des généralités sur chaque type de composés ayant un rôle dans la coloration des inflorescences d'*Hydrangea* (flavonoïdes, anthocyanes, acides phénoliques) sont ici présentées. Les principaux métabolites secondaires du genre ont une origine biosynthétique commune, la voie shikimate qui conduit au *p*-coumaroyl-CoA. A partir de ce précurseur la voie de biosynthèse se scinde pour former les trois familles de molécules majoritairement

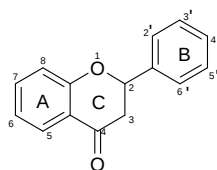


Figure I-3 : Enchaînement 2-phénylchromane

Anthocyanes	Aurones	Chalcones
Dihydroflavonols	Flavanones	Flavones
Flavonols	Isoflavonoïdes	Proanthocyanidines
Flavane-3-ols	Flavan-3,4-diols	

Figure I-4 : Structures des différents flavonoïdes

présentes dans les inflorescences du genre. Ces voies sont ici détaillées ainsi que leur régulation. Enfin est exposée l'implication de ces composés dans la couleur des fleurs *via* les différents mécanismes physicochimiques de la coloration, en insistant sur le cas unique relativement bien étudié d'*H. macrophylla*.

II. 1. Généralités

II. 1. 1. Flavonoïdes

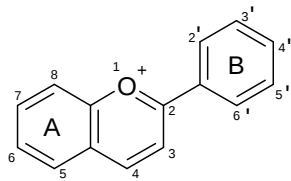
Les flavonoïdes (de *flavus*, jaune en latin) sont des métabolites secondaires ubiquitaires des végétaux. Plus de 10000 flavonoïdes naturels ont été décrits à ce jour et leurs rôles sont très diversifiés. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, l'enchaînement 2-phénylchromane (Figure I-3). Cet enchaînement consiste en deux cycles phénoliques A et B, connectés par un pont à trois carbones communément cyclisé pour former le cycle C.

Les onze classes de flavonoïdes (Figure I-4) se distinguent par la présence ou l'absence, le degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C (Harborne 1988; de Rijke *et al.* 2006). Dans toutes les classes de flavonoïdes, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en position 5, 7 et 4' de la génine. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés.

Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous formes C- ou O-glycosylées, ces dernières apparaissent de loin le plus fréquemment (Bruneton 2010). Plus de 80 sucres différents peuvent être liés aux génines. Parmi eux, le D-glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, mais d'autres hexoses, le D-galactose, le D-mannose et le L-rhamnose (seul désoxyhexose), ainsi que des pentoses, le D-xylose, le L-arabinose et le D-apirose sont fréquents. Des acides uroniques (le plus souvent l'acide D-glucuronique) sont aussi décrits. On rencontre également une quarantaine de disaccharides dont les plus courants sont le rutinose et le néohesperidose, des trisaccharides et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate (Hollman and Arts 2000). La glycosylation rend les flavonoïdes moins réactifs et plus hydrosolubles, souvent concentrés dans les cellules de l'épiderme des fleurs, fruits et feuilles (Harborne 1988).

Les flavonoïdes ont des fonctions diverses, notamment dans la protection contre les rayons ultraviolets, dans les interactions environnementales, avec les stress abiotiques ou avec

²² *H. chinensis* : dans la classification de McClintock *H. scandens ssp chinensis*



Structure du cation flavylum

Anthocyanes	Position des substituants							couleur
	Noyau A				Noyau B			
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Pelargonidine	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Rouge
Cyanidine	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Magenta
Péonidine	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H	Violet
Delphinidine	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Violet
Pétunidine	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH	Violet
Malvidine	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Violet

Figure I-5 : Substitution et couleur des anthocyanes les plus communs sous forme de cation flavylum (pH<2)

les insectes et pathogènes. Il semblerait notamment que les flavonoïdes antioxydants aient un effet protecteur contre le stress attribué à la sécheresse. Ils pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium (Harborne and Williams 2000).

Les flavonoïdes de défense peuvent être soit préformés, soit synthétisés par réponse à un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent jouer le rôle de molécules de signalisation au niveau des interactions symbiotiques avec, par exemple, des bactéries fixatrices de N₂ ou des champignons permettant de transférer les minéraux (Shirley 1996). A l'inverse, Beaucoup de flavonoïdes possèdent des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (Treutter 2005).

Le rôle des flavonoïdes dans les interactions plantes-insectes est aussi très largement accepté. Il existe des insectes qui peuvent séquestrer des flavonoïdes synthétisés par les plantes dans leur cuticule pour s'en servir comme défense contre les prédateurs. Les flavonoïdes peuvent aussi avoir un effet négatif comme nourriture dissuasive, comme réducteurs de la digestion, et comme toxines (Treutter 2005).

Les flavonoïdes semblent aussi avoir un rôle dans la fertilité végétale, comme par exemple c'est le cas chez le maïs ou le pétunia. Les plantes déficientes en flavonoïdes produisent un pollen qui ne germe pas ou éclate pendant la formation du tube pollinique. Une addition exogène de flavonols, au pollen déficient, restore la fertilité (Shirley 1996).

II. 1. 2. Anthocyanes

Les anthocyanes absorbent dans le visible et sont associés à la coloration des différentes parties d'une plante (feuilles, fleurs, fruits, graines, tiges, racines). Ils jouent un rôle important dans l'attraction des animaux comme pollinisateurs et facteurs de dispersion des graines car ils constituent la base chimique de la coloration des fleurs chez les angiospermes (Strack and Wray 1994).

Les anthocyanes présentent une structure de base commune, le cation flavylum, forme stable et colorée, observable en milieu acide seulement (Figure I-5). Ils sont le plus souvent penta- ou hexasubstitués par des hydroxyles et/ou des méthoxyles. Le nombre de groupements hydroxyles a un effet sur la couleur de la molécule en solution acide. En effet, ces groupements sont dits auxochromes. Leur présence sur le noyau aromatique provoque un effet bathochrome, c'est-à-dire un déplacement du spectre d'absorption vers les grandes longueurs d'onde. Donc plus le nombre de groupements hydroxyles est important, plus la couleur de la solution sera violacée.

Si la diversité structurale des anthocyanes les plus communs réside essentiellement dans des différences de substitution en positions 3' et 5' du noyau B (Figure I-5), il existe environ 300 structures différentes à l'état naturel.

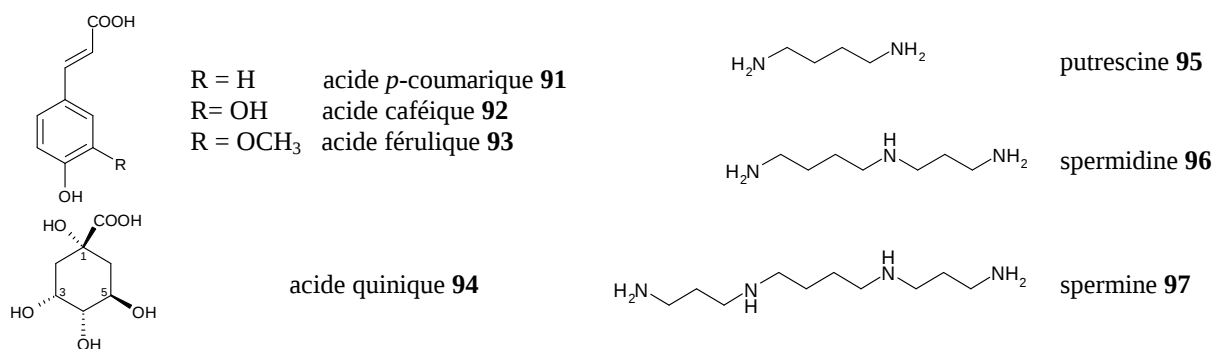
Dans la nature, les anthocyanes sont presque toujours hydroxylés ou glycosylés en position 3, ce qui entraîne une meilleure solubilité et une grande stabilité de la molécule. Il est également possible de trouver des anthocyanosides diglycosylés en 3 et 5 ; les autres hydroxyles (en 7, 3'ou4') sont beaucoup plus rarement substitués. Les substituants glycosydiques les plus fréquents sont des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose, xylose et arabinose) ou des di- et trisaccharides formés par des combinaisons des monosaccharides précédents (Brouillard 1982; Bruneton 2010).

De nombreux anthocyanosides peuvent également être acylés par un ou plusieurs acides organiques de plusieurs types :

- acides aliphatiques mono- ou di-carboxyliques (acide malique, malonique, oxalique, succinique).
- acides phénylpropanoïques (acide *p*-coumarique, caféique, férulique, sinapique).
- acides benzoïques (acide gallique).

II. 1. 3. Dérivés d'acides cinnamiques

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique. Les dérivés d'acides cinnamiques (**91**, **92**, **93**) sont très présents dans le monde végétal. Ils sont aussi associés à d'autres molécules sous forme d'esters, par exemple avec l'acide quinique (**94**) (cas de l'acide chlorogénique **8**) ou sous forme d'amides, par exemple avec des dérivés de la spermidine (Bruneton 2010).



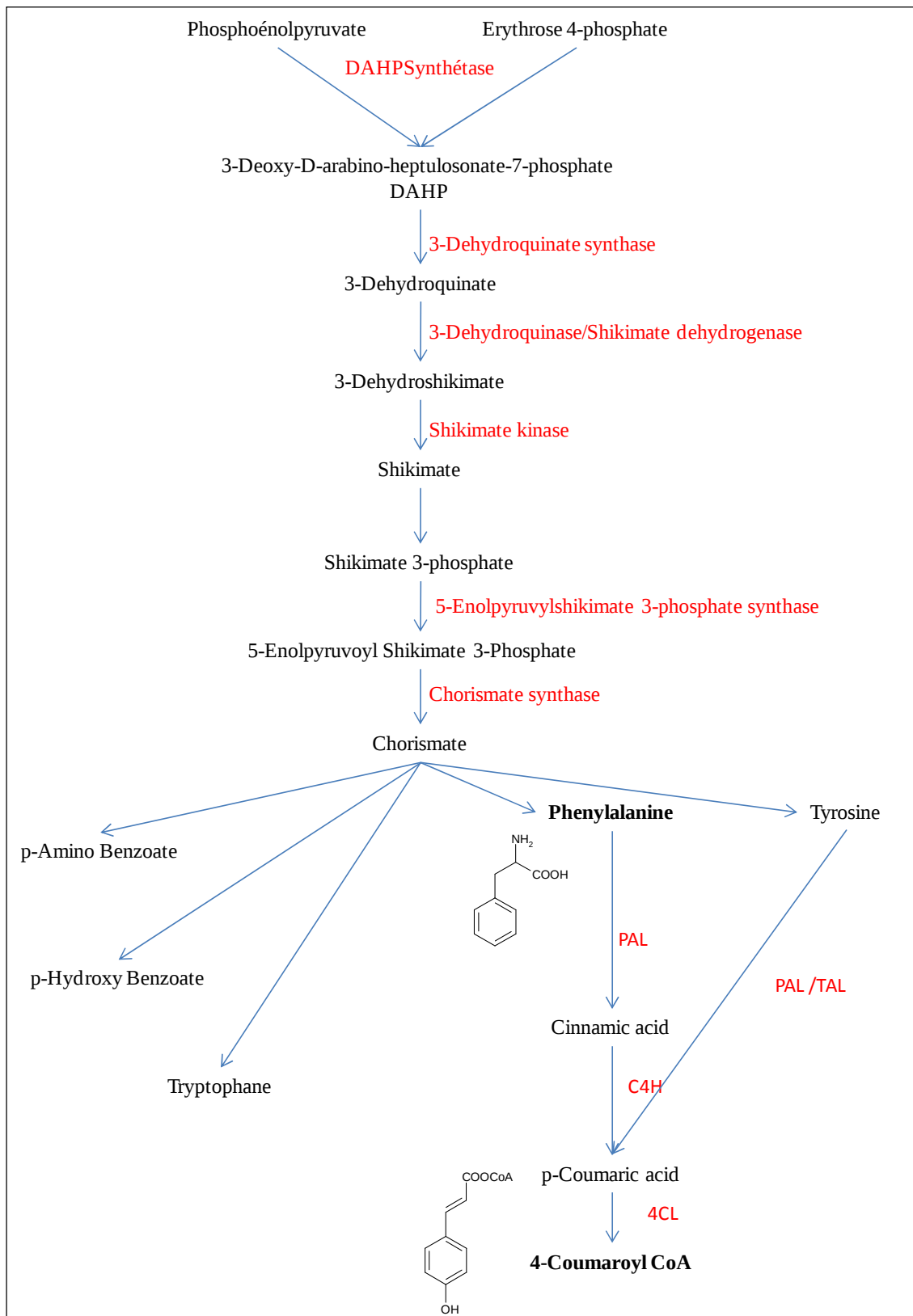


Figure I-6 : la voie des shikimates d'après (Herrmann 1995; Weaver and Herrmann 1997; Robbins 2003; Vogt 2010)

II. 2. Biosynthèse

Les acides cinnamiques et flavonoïdes sont des composés très largement répandus chez les végétaux et pour notre cas, dans les inflorescences du genre *Hydrangea*. Ils ont un précurseur commun le 4 coumaroyl CoA, synthétisé par la voie du shikimate (Figure I-6). C'est aussi la voie de tous les phénylpropanoïdes. La séquence métabolique consiste en la conversion de métabolites primaires, tels que le phosphoénolpyruvate et l'erythrose-4-phosphate en chorisamate, le précurseur commun des trois principaux acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) et des *p*-amino- et *p*-hydroxy-benzoate (Herrmann 1995; Weaver and Herrmann 1997).

La phenylalanine ammonia lyase (PAL) et la tyrosine ammonia lyase (TAL), catalysent la désamination non-oxydative de la phénylalanine en *trans*-cinnamate. Le cytochrome P-450 cinnamate-4-hydroxylase (C4H), permet ensuite d'ajouter une fonction hydroxyle en position 4 du noyau aromatique. L'ester de Co-enzyme A est synthétisé via l'action de phénylpropanoyl-CoA ligases, telles que la 4-coumaroyl CoA ligase (4CL), qui conduit au *p*-coumaroyl CoA carrefour de plusieurs voies métaboliques en particulier, acides cinnamiques, flavonoïdes et amines polyacylées. (Figure I-7) (Vogt 2010).

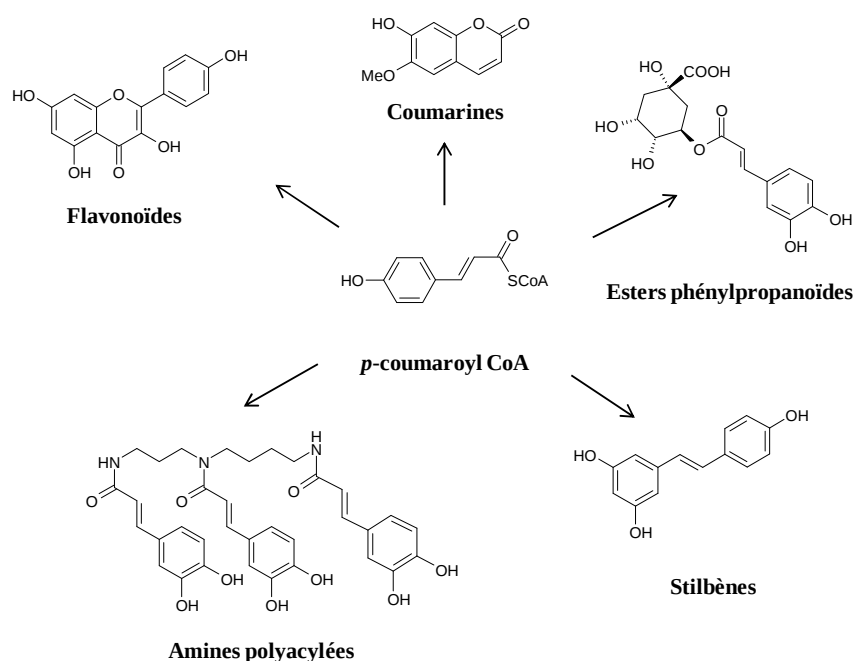


Figure I-7 : Diversification des voies de biosynthèse à partir du *p*-coumaroyl CoA (Vogt 2010)

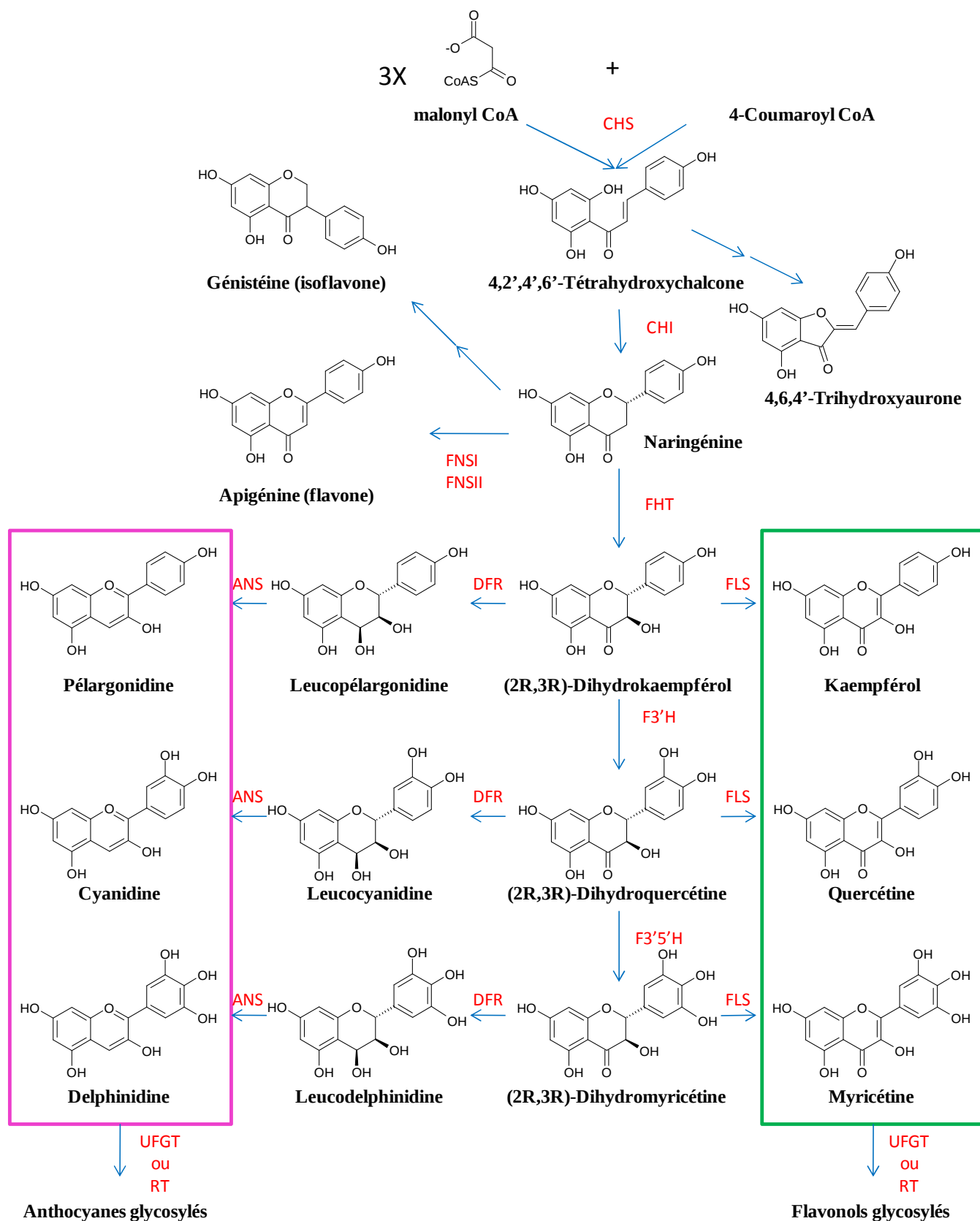


Figure I-8 : Biosynthèse des flavonoïdes (Martens *et al.* 2010).

II. 2. 1. Flavonoïdes

La voie des flavonoïdes est la plus étudiée dans le métabolisme secondaire, pour l'intérêt de ses métabolites impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques. L'un des principaux modèles est *Arabidopsis thaliana* avec, comme outils d'analyse, toutes les technologies de la biochimie et de la génétique moléculaire. Plus de 35 gènes ont été identifiés et classés comme gènes de structure codant pour des enzymes, gènes de régulation (facteurs de transcription) ou gènes de compartimentation (Yonekura-Sakakibara *et al.* 2008). D'autres espèces comme le maïs, le tabac sont aussi utilisées dans cette approche, mais malgré tout il reste encore beaucoup d'inconnues.

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau des chloroplastes. La chalcone synthase (CHS) est la première enzyme de cette voie de biosynthèse, c'est un complexe multienzymes qui catalyse la condensation de 3 molécules de malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner une chalcone : la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Mais si cette condensation a lieu en présence d'une polyacétate-réductase à NADPH, c'est une 6'-desoxychalcone : la 4, 2',4'-trihydroxychalcone qui est alors formée. En 1999, une enzyme homologue de la chalcone synthétase, a été caractérisée chez *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (Akiyama *et al.* 1999). Les avancées sur la connaissance des enzymes impliquées dans cette voie sont présentées dans la publication récente de Martens *et al.* (2010), dont le schéma général de biosynthèse est présenté Figure I-8.

La structure caractéristique des flavonoïdes est due à la transformation stéréospécifique, catalysée par une chalcone-isomérase (CHI), de la chalcone néoformée en 2S-flavanone (naringénine) (Fowler and Koffas 2009; Bruneton 2010). Les flavanones, comme la naringénine représente le carrefour métabolique de la synthèse de différentes classes de flavonoïdes : flavones, isoflavones et dihydroflavonols, dont les enzymes ont été caractérisés (Figure I-8).

Les flavone-synthases (FNSI et FNSII) introduisent une double liaison entre les carbones en positions 2 et 3 pour donner une flavone : l'apigénine. Seul la flavone synthase FNSI est spécifique des Apiacées, par contre, FNSII est décrit dans plusieurs familles de plantes (Martens *et al.* 2001; Martens and Mithofer 2005). Les isoflavones sont formées par l'isoflavone synthase (IFS synonyme HIS) se retrouvant aussi dans de nombreuses familles de plantes (Martens *et al.* 2001; Martens and Mithofer 2005).

Le contrôle du flux des flavanones est tenu par la flavanone-3-hydroxylase (FHT) qui est en compétition avec FNS I ou II (Owens *et al.* 2008). Elle catalyse l'hydroxylation en

position 3 d'une 2S-flavanone pour donner un (2-R, 3-R)-dihydroflavonol (dihydrokaempférol). Le dihydrokaempférol est le carrefour vers les autres dihydroflavonols (Figure I-8), il peut être hydroxylé par la flavonoïde 3'-hydroxylase (F3'H) pour donner la dihydroquercétine ou par la flavonoïde 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) pour donner la dihydromyricétine. La flavonol synthase (FLS) introduit une double liaison entre les carbones en positions 2 et 3 des différents dihydroflavonols pour donner des flavonols : kaempférol, quercétine, myricétine (Winkel-Shirley 2001; Winkel 2006). Cette enzyme est en compétition avec les deux enzymes associées dans la voie des anthocyanes : la dihydroflavonol 4-réductase (DFR), qui réduit les dihydroflavonols en flavan-3,4-*cis*-diols (leucoanthocyanidines) et la leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX synonyme anthocyanidine synthase ANS) qui est responsable de l'oxydation et la déshydratation des différentes leucoanthocyanidines (Winkel-Shirley 2001; Davies *et al.* 2003; Winkel 2006; Davies and Schwinn 2007). La dernière étape est la glycosylation par une flavonoïde-3-glycosyltransferase (3GT) qui stabilise les molécules formées. Par exemple la UDP-glucose:flavonoïde O-glucosyltransférase (UFGT) produit les anthocyanes correspondants : la pelargonidine-3-O-glucoside, la cyanidine-3-O-glucoside et la delphinidine-3-O-glucoside (Davies *et al.* 2003).

Dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes, la majorité des enzymes et des gènes correspondants ont été isolés et caractérisés à partir de plusieurs espèces que ce soit dans le maïs, *Arabidopsis*, les fleurs de pétunia et d'*Antirrhinum majus*, les fruits de tomate, pomme, et raisin (Grotewold 2005; Grotewold 2006). Cependant seulement quelques-uns des enzymes de la voie des flavonoïdes ont été étudiés au niveau biochimique et moléculaire. Quatre d'entre eux appartiennent à la famille nombreuse des 2-oxoglutarate dépendante dioxygénases (2-ODDs) : FHT hydroxylating, FLS desaturating, LDOX/ANS (hydroxylating/dehydrating) sont largement distribués alors que FNS I (desaturating) ne se trouve que chez les *Apiacées*. FNS II est une Cyt P450 monooxygénase beaucoup plus largement distribuée que FNS I (Martens and Mithofer 2005) mais qui remplit une fonction équivalente. FLS a une spécificité large alors que FHT et FNS I montrent une spécificité beaucoup plus étroite pour le substrat.

Dans les plantes les fonctions des flavonoïdes sont diverses (pigments, molécules de signalisation, protecteurs contre les stress biotique et abiotique, régulateurs de fertilité et de la biosynthèse d'auxines. La biosynthèse des flavonoïdes est régulée dans l'espace et dans le temps pendant le développement et par des stimuli de l'environnement tel que la lumière, les

attaques de pathogènes, les stress régulateurs de croissance. Chaque branche de la voie de biosynthèse est sous le contrôle de régulateurs spécifiques.

Les gènes de régulation qui contrôlent directement la transcription des gènes de structure ont été identifiés à partir de plusieurs espèces (Mol *et al.* 1998; Koes *et al.* 2005). Dans toutes les espèces analysées, trois familles de facteurs de transcription appelés R2R3 MYB, The basic-helix-loop-helix (bHLH) et WD40, régulent les gènes de la voie de biosynthèse des anthocyanes. D'abord découverts chez le maïs (Paz *et al.* 1987; Ludwig *et al.* 1989; Radicella *et al.* 1991), ces facteurs ont «également été trouvés dans toutes les espèces déjà citées que ce soit dans les graines, les fruits (Quattrocchio *et al.* 1993; Quattrocchio *et al.* 1998; Borevitz *et al.* 2000; Nesi *et al.* 2000; Payne *et al.* 2000; Mathews *et al.* 2003; Deluc *et al.* 2006; Espley *et al.* 2007; Deluc *et al.* 2008; Cultrone *et al.* 2009), ou les fleurs d'*Antirrhinum majus* (Martin *et al.* 1991), de pétunia (de Vetten *et al.* 1997), et de gentiane (Nakatsuka *et al.* 2008) etc.... La régulation des anthocyanes est liée à l'action combinée de ces facteurs de transcription MYB et basic helix-loop-helix (bHLH) très conservés chez les plantes, et bien illustrée par l'exemple d'*Arabidopsis thaliana* (Martin *et al.* 1991).

Chez *Arabidopsis thaliana* le profil est simple avec les dérivés glucosylés du kaempférol, quercétine et isorhamnétine qui s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques. Mais dans les tissus la répartition varie, la quercétine prédomine dans les graines et le kaempférol dans les fleurs, cependant dans les étamines les deux dérivés sont présents (Pelletier *et al.* 1997).

Pour cette espèce la production d'anthocyanes et de proanthocyanidines est sous le contrôle transcriptionnel d'un complexe MBW, formé par l'association de facteur WD repeat et de protéines MYB et bHLH (Baudry *et al.* 2004). Des combinaisons particulières entre ces éléments sont associées à la production spécifique de l'une ou l'autre branche. De même les flavonols sont sous le contrôle de trois facteurs de transcription R2R3-MYBs spécifiques, nommés PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDE (PFG1/MYB12, PFG2/MYB11, PFG3/MYB111). Ces régulateurs activent en parallèle les gènes *CHS*, *CHI*, *FHT/F3H*, *FLS1* ((Mehrtens *et al.* 2005; Stracke *et al.* 2007)). Ces quatre gènes peuvent être co-régulés (Hartmann *et al.* 2005). L'analyse de différents mutants touchés dans ces séquences, montre que l'accumulation spécifique de flavonols glycosylés dans les feuilles, les tiges, les inflorescences et les jeunes siliques²³ dépend de ces régulateurs (Stracke *et al.* 2007;

²³ Silique : fruit sec, plus de trois fois aussi long que large, s'ouvrant en principe en deux valves séparées par une cloison sur les bords de laquelle sont attachées les graines.

Yonekura-Sakakibara *et al.* 2008; Stracke *et al.* 2010). Mais dans ces mutants, certains autres dérivés de kaempférol et quercétine sont présents dans les inflorescences et les siliques adultes, ce qui montre que cette synthèse est indépendante dans ces organes (Routaboul *et al.* 2006; Stracke *et al.* 2010). C'est le cas du pollen où les deux flavonols glycosides kaempférol-3-O-diglucoside et quercétine-3-O-diglucoside s'accumulent dans le triple mutant comme dans le témoin, il existe donc au moins un autre régulateur encore inconnu ou une autre voie de glycosylation.

L'accumulation de flavonols glycosides spécifiques pourrait dépendre de différents régulateurs dans divers organes. Par exemple, la formation de kaempférol-3-O-rhamnoside-7-O-O-rhamnoside est dépendante de MYB111 dans les feuilles mais de MYB 111 et MYB 12 dans les tiges, inflorescences et siliques. La question est de savoir si l'accumulation est régulée simultanément par les deux régulateurs ou indépendamment. L'indépendance serait plus probable si on considère l'exemple des jeunes germinations où l'accumulation des flavonols dans les différentes parties est contrôlée par l'expression différentielle des régulateurs.

La biosynthèse des flavonoïdes est localisée dans le cytosol et plus précisément au niveau du réticulum endoplasmique, puis ces molécules se trouvent stockées dans les vacuoles. Certains dérivés peuvent être synthétisés aussi dans les vacuoles, qui sont aussi le siège d'échanges avec le cytosol, d'ions métalliques et de métabolites. La biosynthèse de dérivés glycosylés de kaempférol et de quercétine est possible aussi dans les chloroplastes (Hernández *et al.* 2009). La connaissance des enzymes impliquées dans le transport et sa régulation est très limitée, cependant il existe au moins trois mécanismes, présentés dans un article de synthèse par Zhao et Dixon (2009). Les flavonoïdes sont transportés dans des vésicules entourées d'une membrane d'après les observations réalisées au microscope. Les glutathione S-transférases (GST) seraient impliquées dans l'accumulation d'anthocyanes dans les vacuoles. Aucune forme conjuguée anthocyane-glutathione n'est décrite chez les plantes, mais GST peut se lier à l'anthocyane ou au flavonol pour former un complexe les protégeant de l'oxydation et/ou les guidant vers la vacuole. Les transporteurs MATE sont également impliqués dans le transfert de cations, d'acides organiques et de métabolites secondaires. Ils sont des transporteurs secondaires qui dépendent des H⁺-ATPases puisqu'ils utilisent un gradient électrochimique (H⁺) pour transporter des molécules à travers les membranes. Dans cette famille certains ont été caractérisés comme étant des transporteurs d'anthocyanes acylés, chez *Vitis vinifera* (vigne) et *Solanum lycopersicum* (tomate) (Mathews *et al.* 2003; Gomez *et*

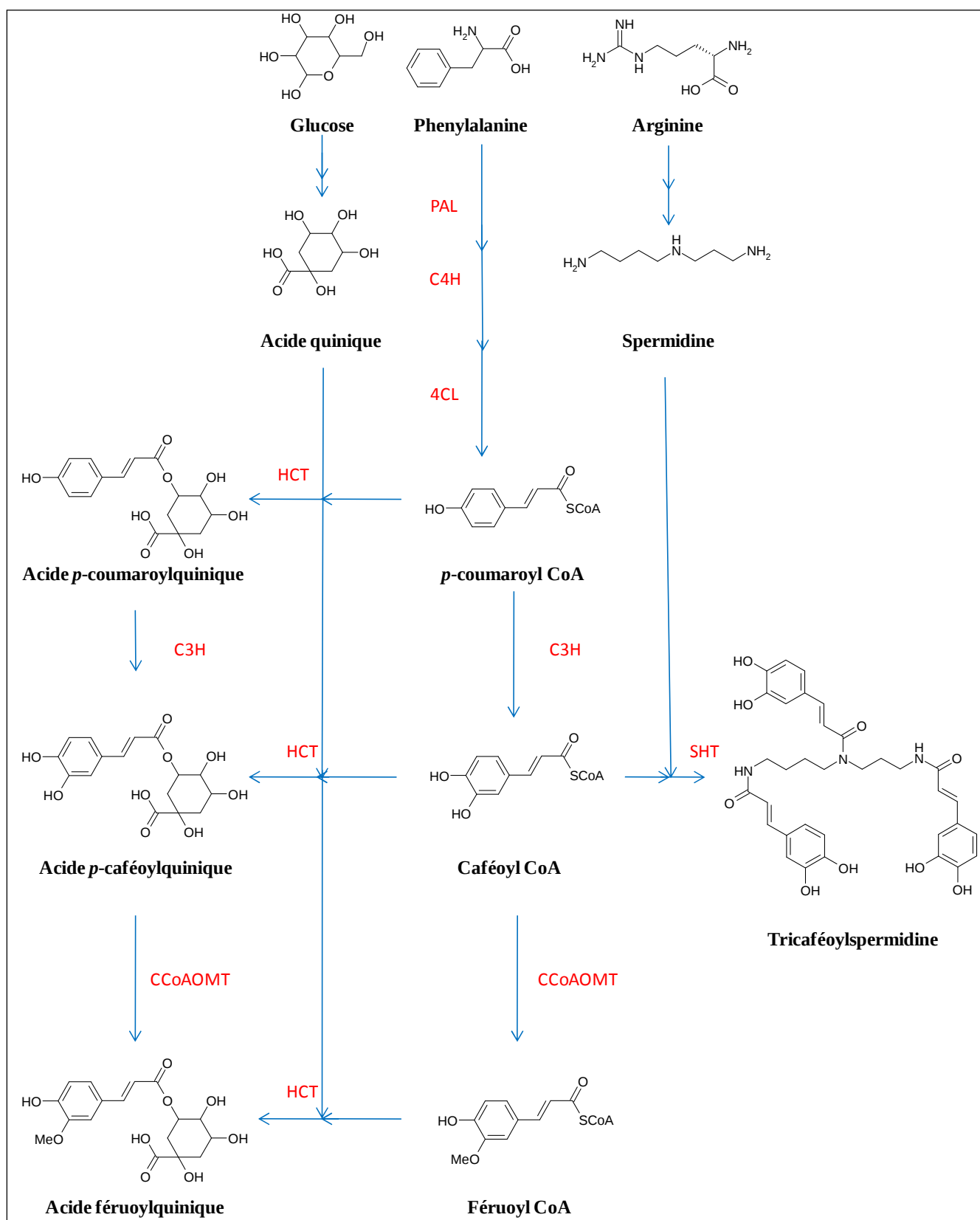


Figure I-9 : Biosynthèse des acides cinnamoylquiniques (Hoffmann *et al.* 2004) et des amines polyacétylées (Fellenberg *et al.* 2009)

al. 2009). Leur spécificité vis à vis du substrat est relativement stricte. La glycosylation est essentielle pour l'importation dans les vacuoles. Les transporteurs peuvent jouer un rôle important dans la régulation des flux et la couleur des fleurs en particulier.

II. 2. 2. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées

La biosynthèse dans les vacuoles commence par la réaction de condensation d'un acide quinique, sur un acide *p*-coumarique catalysée par la hydroxycinnamoyl CoA quinate transferase (HCT) (Figure I-9). Le degré d'hydroxylation du noyau aromatique de l'acide formé peut être modifié avant ou après couplage. L'action de *p*-coumarate 3-hydroxylase (C3H) va conduire à l'acide chlorogénique **8** tandis que l'action de la caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase (CCoAOMT) conduira à l'acide féruloylquinique (Hoffmann *et al.* 2004; Luo *et al.* 2008).

La régulation de la voie de biosynthèse de ces dérivés est encore mal connue. Cependant, le facteur de transcription AtMYB12, originellement identifié comme responsable de l'accumulation de flavonols chez *Arabidopsis thaliana*, semble aussi être impliqué dans la biosynthèse des acides caféoylquiniques chez la tomate. En effet, une surexpression de ce facteur induit l'expression de gènes en amont de la voie de biosynthèse comme ceux codant pour PAL, C4H et 4CL, mais aussi celle de gènes impliqués uniquement dans la voies de biosynthèse des acides caféoylquiniques comme HCT, C3H et HQT. Ce facteur induit aussi une augmentation des acides di et tricaféoylquiniques chez la tomate, suggérant que des gènes supplémentaires, requis pour la biosynthèse de ces composés mais encore inconnus, sont aussi induits par l'expression de AtMYB12 (Luo *et al.* 2008).

Ces acides cinnamiques peuvent aussi s'assembler avec les polyamines pour former des polyamines acylées présentes en particulier dans les parties sexuées des fleurs (Meurer *et al.* 1986; Meurer *et al.* 1988; Bokern *et al.* 1995; Werner *et al.* 1995; Nimtz *et al.* 1996; Lin and Mullin 1999; Fellenberg *et al.* 2009).

Les dérivés de polyamines comme la putrescine (**95**), la spermidine (**96**) ou la spermine (**97**), sont formés à partir d'un même acide aminé : l'arginine. Plusieurs études ont mis en évidence des acyltransférases responsables de la formation d'amides à partir d'acides hydroxycinnamiques. En l'occurrence, des spermidine hydroxycinnamoyl transférases (SHT) ont été mises en évidence chez *Arabidopsis thaliana* (Fellenberg *et al.* 2009; Luo *et al.* 2009). La Figure I-9 illustre le schéma de biosynthèse proposé de ces dérivés des jeunes boutons floraux de *Arabidopsis thaliana*.

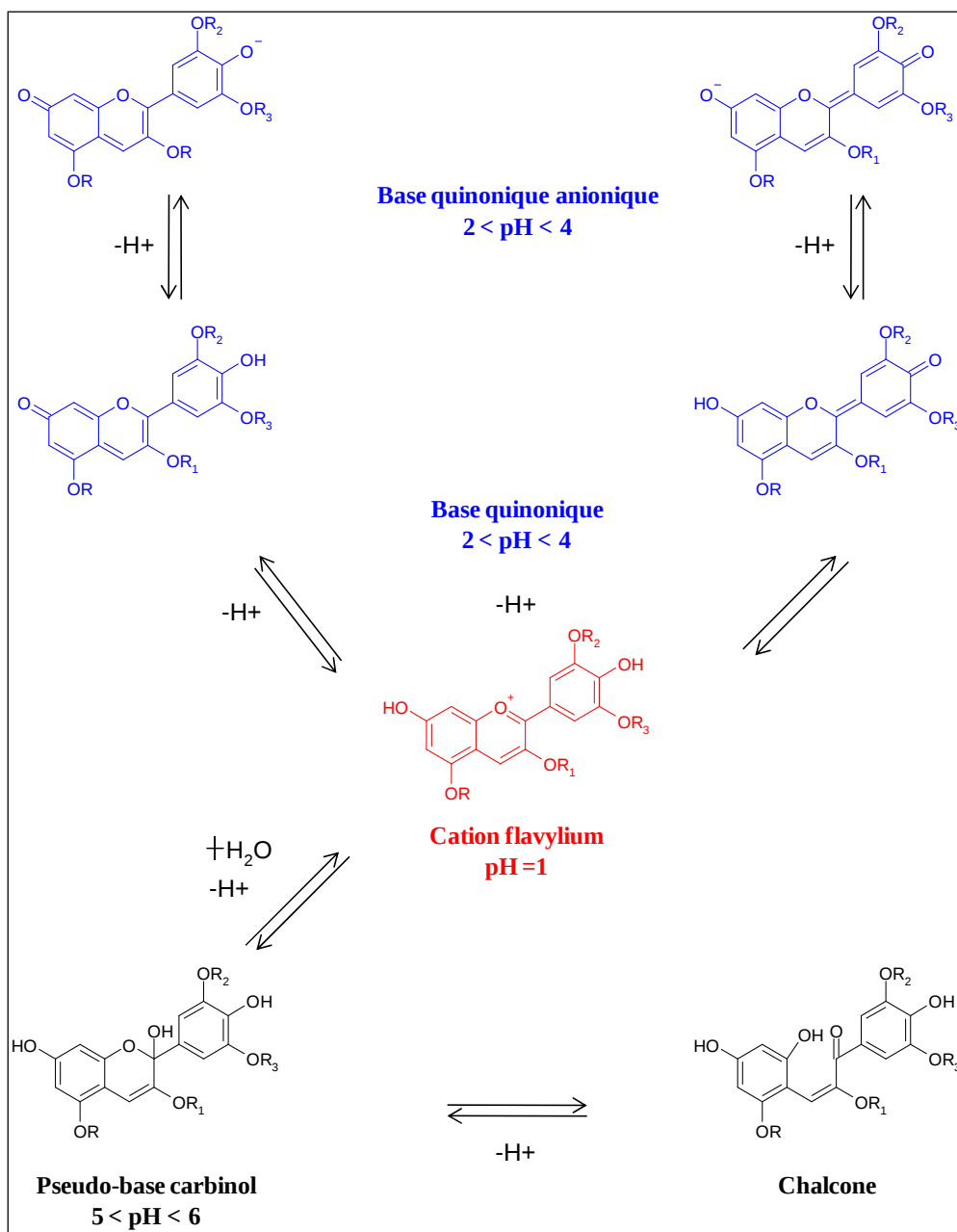


Figure I-10 : Comportement des anthocyanes en solution

II. 3. Généralités sur la coloration des fleurs

La coloration rose, rouge, violette ou bleue des fleurs, des fruits ou d'autres parties des plantes est généralement due aux anthocyanes. Ces molécules offrent un panel de couleur assez large en fonction des conditions de pH en milieu aqueux, mais aussi en fonction de leur environnement chimique dans la cellule vacuolaire. De nombreuses études ont été menées afin de comprendre les différents mécanismes physico-chimiques responsables de la couleur chez les plantes, notamment le phénomène de co-pigmentation.

II. 3. 1. Anthocyanes et pH

En milieu aqueux, le pH a des effets extrêmement importants sur la structure des anthocyanes, eux-mêmes associés à des changements importants de la couleur du chromophore (Figure I-10) (Castañeda-Ovando *et al.* 2009).

Le cation flavylum est à la fois un diacide faible et un bon électrophile. En milieu acide fort (pH = 1), la forme cationique, colorée en rouge, est stable. En milieu acide faible, c'est-à-dire pour des pH compris entre 2 et 4, le cation peut perdre successivement deux protons ce qui conduit à une base quinonique neutre (-1H) puis anionique (-2H), stabilisées par résonance; ces formes quinoniques sont colorées en bleu. Par ailleurs, à des pH compris entre 5 et 6, l'hydratation de la molécule en position 2 conduit à une pseudo-base carbinol, incolore. Cette forme est en équilibre avec celle de la chalcone correspondante, également incolore. (Figure I-10). Pour des pH supérieurs à 7, les anthocyanes peuvent être dégradés, si la fonction hydroxyle en position 3 est libre, en acide phénolique et aldéhyde correspondants (Figure I-11).

La stabilité des anthocyanes est aussi influencée par la substitution du noyau aromatique B. La présence de fonction hydroxyle ou méthoxyle sur ce noyau diminue la stabilité en condition neutre et, par conséquent, la pélagonidine apparaît comme l'anthocyane le plus stable, la delphinidine le moins stable. Par contre, les dérivés mono et diglycosylés sont plus stables dans des conditions de pH neutre. En effet, la présence d'un sucre en position 3 empêche la dégradation de l'intermédiaire instable (Figure I-11).

II. 3. 2. Co-pigmentation

Chez les plantes, les pigments comme les anthocyanes se situent généralement dans la vacuole. Le pH vacuolaire est le plus souvent compris entre 4 et 6 (il n'est que très rarement inférieur à 3). À ce pH les anthocyanes existent donc sous quatre formes structurales en équilibre : cation flavylum, base quinonique, base carbinol et chalcone. De plus, certaines de

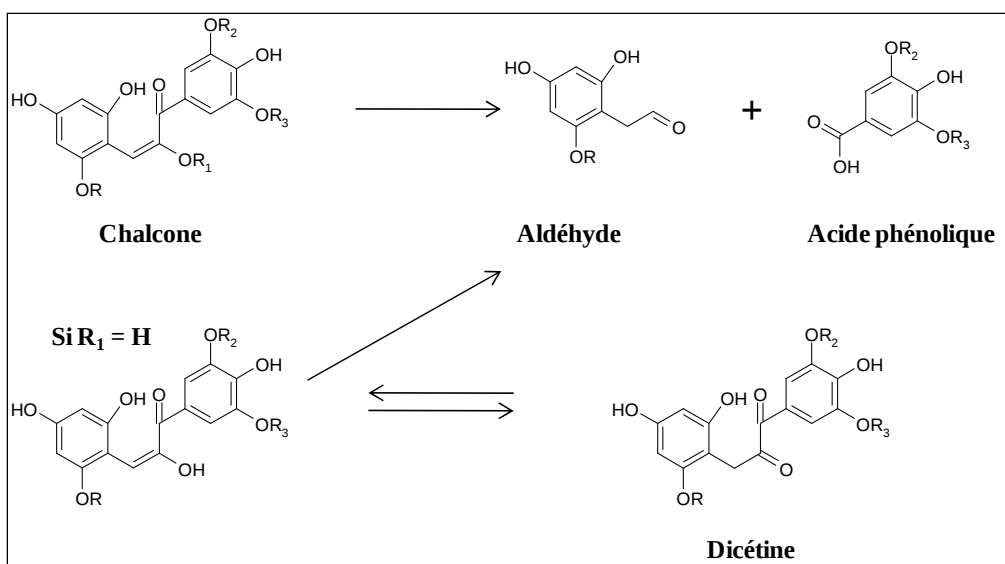


Figure I-11 : Réaction de dégradation des anthocyanes

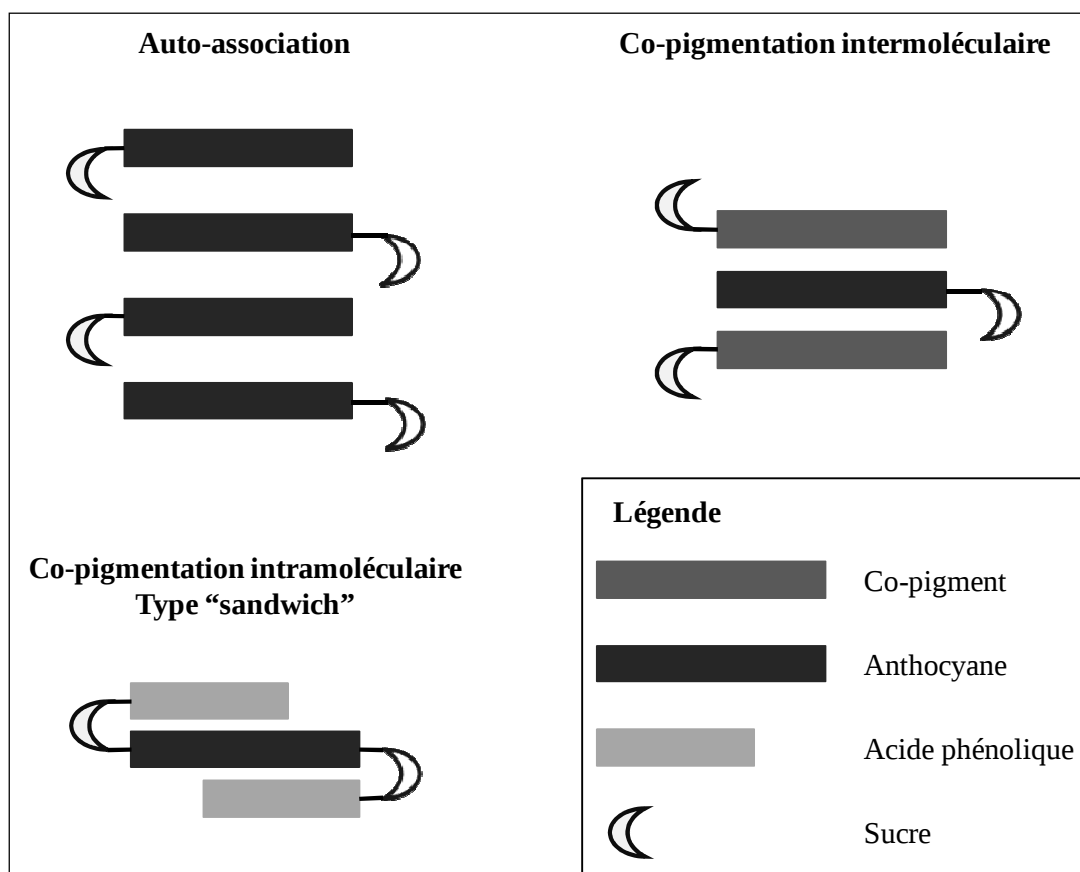


Figure I-12 : Phénomène de co-pigmentation d'après (Goto *et al.* 1986).

ce formes sont instables et peu colorées, voire incolores. La co-pigmentation est le principal mécanisme de stabilisation des anthocyanes sous forme colorée dans la vacuole. Robinson et ses collaborateurs ont été parmi les premiers à observer « l'effet de co-pigmentation » (Robinson and Robinson 1931), déjà noté par Willstätter et Zollinger dès 1913 lors de l'addition de molécules phénoliques incolores (flavones, flavonols, tannins,...) à une solution d'anthocyane à des valeur de pH supérieures à 3 (Willstätter and Everest 1913; Willstätter and Zollinger 1916).

La co-pigmentation est un phénomène par lequel les pigments sont liés par association moléculaire ou par complexation avec d'autres molécules incolores, qui peuvent être des composés organiques ou des ions métalliques présents dans la vacuole. Il s'agit du principal mécanisme de stabilisation de la couleur chez les plantes. Les co-pigments peuvent être de différentes natures : flavonoïdes, alcaloïdes, aminoacides, acides organiques, nucléotides, polysaccharides, métaux ou autres anthocyanes. Les co-pigments organiques sont des systèmes riches en électron π qui sont capables de s'associer avec le cation flavylum, lui-même appauvri en électrons. Cette association apporte à la molécule une protection vis-à-vis d'attaques nucléophiles de molécules d'eau sur la position 2 du cation.

Le phénomène de co-pigmentation est dit intramoléculaire si le co-pigment est lié de façon covalente au chromophore et intermoléculaire si l'interaction a lieu entre deux molécules libres. Un phénomène d'auto-association peut aussi avoir lieu entre les molécules d'anthocyanes (Figure I-12) (Goto *et al.* 1986).

II. 3. 2. 1. Auto-association

Les structures correspondant aux formes colorées des anthocyanes (cation flavylum et bases quinoniques), peuvent interagir entre elles de manière non covalente. Cette auto-association a été suggérée pour la première fois par Asen *et al.* (1972), qui ont démontré une augmentation du coefficient d'absorption du spectre visible se produisant avec l'augmentation de la concentration d'une solution d'anthocyanes. Les complexes d'auto-association sont formés par l'empilement vertical des molécules d'anthocyanes et sont stabilisés principalement par les interactions hydrophobes qui ont lieu entre leurs noyaux aromatiques (Hoshino *et al.* 1980; Hoshino *et al.* 1981; Goto *et al.* 1986; Goto and Kondo 1991; González-Manzano *et al.* 2008). La formation de ce complexe induit un effet hypsochrome de la longueur d'onde maximale d'absorption (Hoshino *et al.* 1981).

II. 3. 2. 2. Co-pigmentation intramoléculaire

L'élaboration de techniques d'extraction et de purification dans des conditions plus douces permet de mettre en évidence des anthocyanes complexes et extrêmement stables à des pH faiblement acides. Ces anthocyanes présentent un type de substitution complexe, caractérisé par des séquences de sucres et de groupements acylés, aliphatiques et/ou aromatiques, liées à un chromophore flavylum central. Au moyen de techniques de RMN, comme la NOESY, des empilements de type « sandwich » ont été mis en évidence. Les saccharides flexibles peuvent jouer le rôle de « linker » et permettent un repliement des groupements acylés sur la partie plus ou moins plane du chromophore. Ces liaisons intramoléculaires bloquent la formation des formes hydratées du chromophore (Goto *et al.* 1986; Figueiredo *et al.* 1996). La couleur de ces pigments dépend de plusieurs facteurs dont le pH vacuolaire. Ainsi, chez *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue, la couleur des pétales passe du rose au bleu durant la période de floraison tandis que le pH augmente de 6,6 à 7,7. Cette variation de pH est due à l'expression d'un gène (*ItNHX1*) codant pour une protéine d'échange K^+/H^+ qui entraîne une accumulation d'osmolytes ioniques durant le stade final d'ouverture de la fleur (Yoshida *et al.* 2009).

Honda *et al.* ont répertorié plus d'une centaine d'anthocyanes polyacylés (Honda and Saito 2002). Certains d'entre eux ont été isolés de fleurs bleues, permettant ainsi de nouvelles observations sur les mécanismes de stabilisation de cette couleur par interactions hydrophobiques. L'équipe de Yoshida explique la stabilité de la couleur bleue par la contribution des deux résidus caféiques de la gentiodelphine (Figure I-13) pour la stabilité de la couleur bleue. L'acylation sur le cycle B contribue plus au développement de la couleur bleue que celle du cycle A. (Yoshida *et al.* 2000).

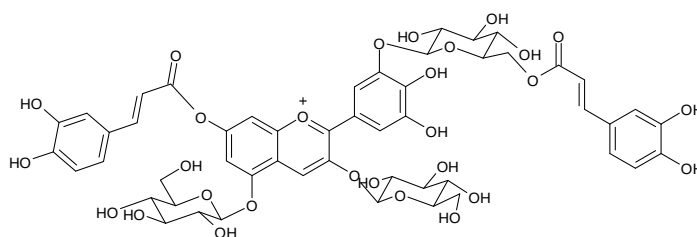


Figure I-13: structure de la gentiodelphine

La co-pigmentation intermoléculaire peut aussi s'ajouter à l'association intramoléculaire, comme c'est le cas dans les pétales de *Ceanothus papillosus*. Bloor (1997) observe ainsi que l'addition, à pH 5.5 de 8 équivalents de kaempférol-3-glucoside (**40**) à deux delphinidines, l'une monoacylée et l'autre diacylée, conduit à une coloration bleue de la

solution obtenue, parfaitement identique à celle des pétales de *Ceanothus papillosus*. Sa conclusion est donc que les deux phénomènes (co-pigmentation intra et intermoléculaire) contribuent de façon également importante à l'établissement de cette coloration (Bloor 1997).

Depuis la fin des années 1980, des pigments constitués d'anthocyanes liés de façon covalente à d'autres flavonoïdes ont été isolés (Yoshida *et al.* 2009). Les anthocyanes peuvent être liés à différents types de flavonoïdes, principalement flavones (Fossen *et al.* 2007) et flavonol (Fossen *et al.* 2000) par diesterification avec les acides oxalique (Strack *et al.* 1989), malonique (Fossen *et al.* 2000) ou succinique (Bloor and Falshaw 2000). Figueiredo *et al.* ont montré dès 1996 que la stabilité de ces associations anthocyane-flavone était due, comme pour les anthocyanes polyacylés, à des interactions intramoléculaires entre noyaux aromatiques (Figueiredo *et al.* 1996).

II. 3. 2. 3. Co-pigmentation intermoléculaire

Quand le co-pigment est un autre composé phénolique, des interactions non-covalentes peuvent se former. Ce comportement résulte d'un phénomène chimique connu sous le nom de formation de complexe par transfert de charge ou interaction π - π (Da Silva *et al.* 2005). Ce phénomène apparaît quand deux entités de charges opposées interagissent. Ainsi, dans l'association de noyaux par des liaisons faibles, la densité électronique est transférée du noyau riche vers le noyau pauvre. Le cation flavylium des anthocyanes étant chargé positivement, il constitue un bon candidat pour la formation de complexes par transfert de charge avec des composés de grandes densités électroniques. Une étude par spectroscopie infrarouge a montré l'existence de liaisons hydrogènes dans le complexe co-pigmentaire cyanidine-quercétine (Dimitric Markovic *et al.* 2005). La formation de ce type de complexe engendre un changement dans les propriétés spectrales du cation flavylium, traduit par des effets bathochrome et hyperchrome marqués. L'intensité de ces effets est tributaire de différents facteurs tels que le pH, la température, la nature du chromophore anthocyanique et celle du co-pigment, le *ratio* molaire co-pigment/pigment et leurs concentrations (Baranac *et al.* 1996). L'amplitude de ces effets reste faible aux valeurs de pH basses pour lesquelles l'anthocyane est sous la forme de cation flavylium mais augmente ensuite très rapidement pour être la plus intense vers pH 4,5-5. Chez les géraniums, la principale différence entre les fleurs bleues et magenta est le pH vacuolaire qui est plus élevé pour les fleurs bleues, ce qui favorise donc le déplacement de l'équilibre vers la forme quinonique des anthocyanes (Markham *et al.* 1997). Pour ce qui est de l'influence de la nature de l'anthocyane, l'effet augmente avec le degré de glycosylation de celui-ci, la co-pigmentation étant plus intense

pour les anthocyanes diglycosylés en position 3 et 5 que monoglycosylés en 3. Le nombre de groupements hydroxyles et méthoxyles sur le noyau aromatique B influe aussi largement sur la couleur des complexes formés. Par exemple, chez la tulipe, les pétales violets contiennent de la delphinidine alors que les pétales rouges, oranges ou roses contiennent des dérivés de cyanidine ou de pélagonidine (Nakayama *et al.* 2004; Torskangerpoll *et al.* 2005). Chez les fleurs de *Anagallis monelli* L., plus la proportion de malvidine par rapport à la delphinidine est importante dans les pétales, et plus la couleur des fleurs tend vers le bleu (Quintana *et al.* 2007). Des cultivars de *Gladiolus* violets contiennent des dérivés de pétunidine et de malvidine alors que les cultivars rouges contiennent uniquement des dérivés de pélagonidine (Takatsu *et al.* 2008).

Enfin, pour une concentration donnée en pigment, les effets co-pigmentaires augmentent d'une manière spectaculaire avec l'augmentation du rapport co-pigment/pigment. Par exemple, l'augmentation du *ratio* acide phénolique/malvidine en solution induit un déplacement de la λ_{max} vers le bleu, accompagné d'une augmentation de l'absorbance (Dimitric Markovic *et al.* 2000). La nature du co-pigment peut aussi influencer sur la couleur du complexe co-pigmentaire (Gomez-Miguez *et al.* 2006). Cette publication donne l'exemple de la complexation malvidine-3-*O*-glucoside (**98**) avec la (+)-catechin (**99**), l'(-)-epicatechin (**100**), la procyanidin B2 (**101**), l'acide caféique (**92**) l'acide p-coumarique (**91**), la quercitrine (**41**) ou la myricitrine (**102**). La complexation avec l'un des deux flavonols (**41** et **102**) va induire un changement de couleur de la solution de malvidine-3-*O*-glucoside vers les rouge-violets alors que les autres molécules plutôt vers les rouge-oranges.

II. 3. 2. 4. Complexes métalliques

Shibata fut l'un des premiers auteurs à proposer l'existence de complexes magnésium/anthocyane, s'appuyant sur le fait que la couleur bleue des fleurs était en contradiction avec le pH vacuolaire des cellules (Shibata *et al.* 1919). Les anthocyanes possédant deux groupement hydroxyles en *ortho* sur le noyau B, (cyanidines, delphinidines et pétunidines) sont capables de former des complexes par chélation d'ions métalliques à forte charge positive. Plusieurs types de complexes sont envisageables.

II. 3. 2. 4. 1. **Métalloanthocyanes**

Le terme de métalloanthocyane se réfère à un complexe pigmentaire métallique supramoléculaire auto-assemblé. Ce complexe est composé d'anthocyanes, de flavones et de cations métalliques dans des proportions stœchiométriques respectivement fixée à 6 : 6 : 2

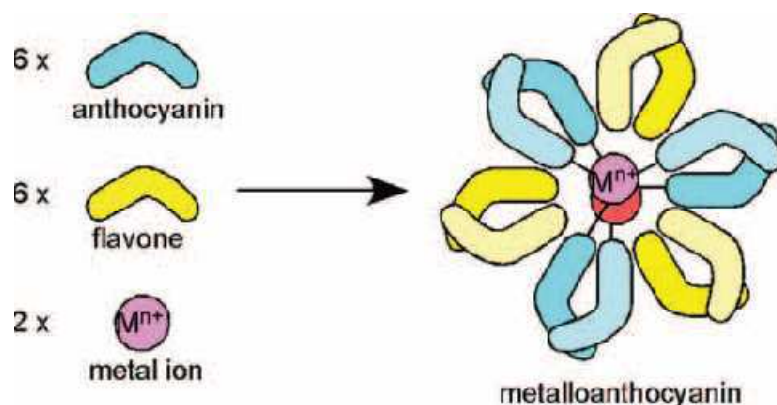


Figure I-14 : Formation d'un métalloanthocyane par assemblage de six molécules d'anthocyane, six molécules de flavone et deux cations métalliques (Yoshida *et al.* 2009)

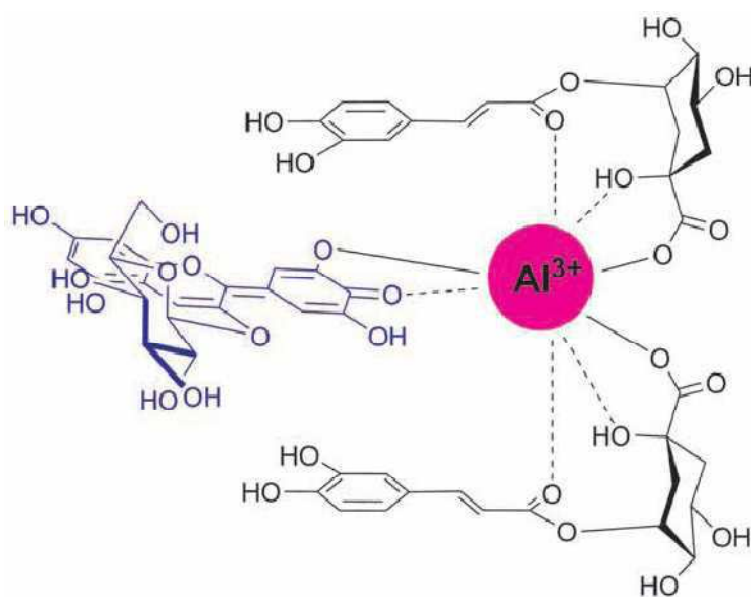


Figure I-15 : Structure du complexe impliqué dans la couleur bleue chez *H. macrophylla* d'après (Yoshida *et al.* 2009)

(Figure I-14). Dans une récente revue de Yoshida cinq de ces métalloanthocyanes isolés de fleurs et responsables de leur couleur bleue sont décrits: la commélinine (*Commelina communis*), la protocyanine (*Centaurea cyanus*), la protodelphine (*Salvia patens*), la cyanosalvianine (*Salvia uliginosa*) et la nemophiline (*Emophila menziesii*) (Yoshida *et al.* 2009).

II. 3. 2. 4. 2. Complexes métalliques « flous » (Fuzzy metal complex pigments)

Dans les fleurs bleues, les métalloanthocyanes sont relativement inhabituels. Cette coloration bleue résulte le plus souvent de complexes pigmentaires métalliques non-stœchiométriques stabilisés par co-pigmentation. Ces pigments sont moins stables, ne sont bleus qu'en solution aqueuse et leur coloration disparaît pendant l'isolement ou la cristallisation des composés. C'est pourquoi l'explication du mécanisme donnant lieu à la couleur bleue dans ce type de complexe est difficile. Pour résoudre ce problème, l'équipe de Yoshida a proposé une nouvelle méthodologie consistant à combiner l'analyse de la vacuole colorée intacte avec la reconstitution *in vitro* de la couleur (Yoshida *et al.* 2009).

Cette méthode a été employée pour étudier la coloration bleue des sépales pétaloïdes d'*Hydrangea macrophylla*. Yoshida *et al.* ont ainsi préparé des mélanges de protoplastes desquels ils ont collecté et analysé uniquement les cellules colorées (Yoshida *et al.* 2003). Ils ont montré que le pH vacuolaire des cellules était plus élevé dans les cellules bleues que dans les cellules rouges. Cependant cette étude a été réalisée sur deux cultivars : 'Narumi blue' et 'Kasterin', il n'est donc pas certain que cette différence soit due à la couleur des cellules. Il aurait fallu comparer les cellules bleues et rouges du même cultivar ayant poussé sur deux sols différents, l'un favorisant le bleuissement et l'autre non. Ito *et al.* ont analysé la composition de ces deux variétés d'*H. macrophylla* cv. Kasterin (rouge) et cv. Narumi (bleue) et ont montré que le *ratio* molaire entre les acides quinique-3-acylé (2 et 7) et la delphinidine-3-glucoside (68) était plus élevé dans les cellules bleues que dans les cellules rouges, mais que la différence principale résidait dans la présence en plus grande quantité des ions aluminium Al^{3+} dans les cellules bleues (Ito *et al.* 2009). Ce résultat diffère de celui obtenu par l'équipe de Toyama-Kato sur les sépales entiers (Toyama-Kato *et al.* 2003), ce qui montre l'importance d'isoler et d'analyser uniquement les cellules colorées. Kondo *et al.* ont synthétisé plusieurs analogues de co-pigments afin de reconstituer *in vitro* la couleur des sépales pétaloïdes de *H. macrophylla* (Kondo *et al.* 2005; Toyama-Kato *et al.* 2007). Ils en concluent que pour obtenir une couleur bleue stable, il est nécessaire d'ajouter, par rapport à la delphinidine-3-glucoside (68), 3 équivalents d'acide quinique-3-acylé (2 et/ou 7) et un

équivalent d' Al^{3+} (Figure I-15). Le complexe formé entre la delphinidine-3-glucoside (**68**) et Al^{3+} est bleu mais insoluble dans l'eau. L'addition de co-pigments permet de solubiliser ce complexe pour donner une solution bleue stable (Kondo *et al.* 2005). L'aluminium se coordonne à la delphinidine au niveau de deux groupements hydroxyles en *ortho* du noyau B, et avec les atomes d'oxygène des co-pigments. La partie aromatique du co-pigment peut ainsi exercer avec le chromophore une action réciproque par des interactions hydrophobes entraînant sa stabilisation (Yoshida *et al.* 2009; Schreiber *et al.* 2010).

La présence du chromophore delphinidine est très importante dans la coloration du complexe. Yoshida a expliqué le changement de couleur du bleu au rouge des inflorescences au cours du vieillissement par la transformation des dérivés de delphinidine en cyanidine. Le mécanisme de cette transformation est encore inconnu à ce jour (Yoshida *et al.* 2008).

Ce type de complexe métallique non-stœchiométrique se retrouve aussi chez d'autres fleurs bleues. Les pétales bleu-nuit de *Meconopsis grandis* contiennent des dérivés de cyanidine ainsi que des flavonols glycosylés jouant le rôle de co-pigments (Tanaka *et al.* 2001). L'équipe de Yoshida a montré l'implication des ions Fe^{3+} et Mg^{2+} dans le complexe responsable de la couleur bleue chez *Meconopsis*, ce complexe étant composé d'un équivalent de dérivé de cyanidine, de deux ou plus équivalents de dérivés de kaempférol, 1/6 équivalent de Fe^{3+} et d'un excès de Mg^{2+} (Yoshida *et al.* 2006). Les pétales de *Tulipa gesneriana* cv. 'Murasakizuisho' sont généralement pourpres mais bleus au centre de la fleur. Shoji *et al.* ont montré que cette différence entre les cellules pourpres et bleues des pétales est due à la quantité d'ion Fe^{3+} . Les autres facteurs pouvant éventuellement influencer sur la couleur, comme le pH vacuolaire, la structure et la quantité des anthocyanes et des flavonols glycosylés, restent inchangés (Shoji *et al.* 2007). Momonoi *et al.* ont cloné un gène de la tulipe responsable du transport du fer et ont montré que ce transporteur joue un rôle important dans le bleuissement des pétales par l'accumulation de fer (Momonoi *et al.* 2009).

II. 4. Analyse structurale

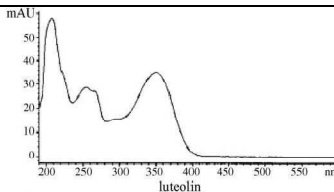
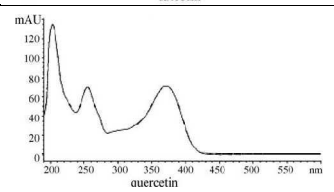
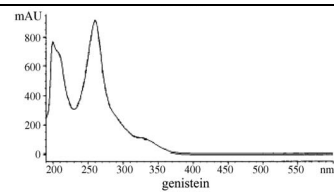
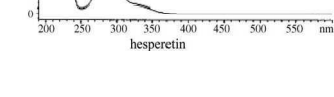
II. 4. 1. Spectroscopie UV-visible

II. 4. 1. 1. Flavones et flavonols

Les spectres UV-visibles des flavones et des flavonols présentent généralement deux maxima d'absorption (Mabry *et al.* 1970) :

- la bande II entre 240 et 280 nm associée à l'absorbance du cycle A.
- la bande I entre 300 et 380 nm associée à l'absorbance du cycle B.

Tableau I-2 : Maxima d'absorbance et spectre UV de quelques flavonoïdes représentatifs des principales classes d'après (de Rijke *et al.* 2006)

Flavonoïde	OH	OMe	O-glycosyl	λmax	Spectre UV
Flavones					
5-Hydroxyflavone	5			272, 337	
Apigénine	5, 7, 4'			268, 337	
Lutéoline	5, 7, 3', 4'			253, 347	
3-Methylquercétine	5, 7, 3', 4'	3		255, 355	
Flavonols					
Fisetine	3, 7, 3', 4'			253, 370	
Morine	3, 5, 7, 2', 4'			263, 380	
Quercétine	3, 5, 7, 3', 4'			250, 370	
Myricétine	3, 5, 7, 3', 4', 5'			255, 378	
Isoflavones					
Génistéine	5, 7, 4'			260, 328 (sh)	
Biochanine A	5, 7	4'		261, 326 (sh)	
Daidzéine	7, 4'			250, 302 (sh)	
Formononétine	7	4'		249, 302	
Flavanones					
Naringine	5, 4'		7	284, 330 (sh)	
Naringénine	5, 7, 4'			288, 325 (sh)	
Hesperetine	5,7, 3'	4'		289, 330 (sh)	
Flavan-3-ols					
3'-Hydroxy-5,7,4'-trimethoxy-flavan-3-ol	3, 3'	5, 7, 4'		225, 290	
Flavan-3-ol	3, 5, 7			279	

La position de la bande I sur le spectre UV est caractéristique du type de flavonoïde considéré et de son degré d'oxygénation. Pour les flavones, cette bande se situe ainsi entre 304 et 350 nm, tandis que pour les flavonols, elle se situe entre 352 et 385 nm (Tableau I-2). Cependant dans le cas des flavonols substitués en position 3 par un méthoxyle ou un glycosyle, la bande 1 se situe entre 328 et 357 nm, soit aux mêmes valeurs que la bande I des flavones.

Lorsque le degré d'oxygénation du cycle B des flavones et des flavonols augmente, un effet bathochrome²⁴ apparaît avec chaque fonction additionnelle. La bande II peut être dédoublée selon le degré d'oxygénation du cycle B. Par exemple, pour les flavones et flavonols portant 2 ou 3 hydroxyles respectivement en position 3', 4' ou en 3', 4' et 5', un dédoublement ou un épaulement de la bande II peut apparaître. Si le cycle B porte une seule fonction hydroxyle en 4', la bande II est par contre constituée d'un seul maximum. L'augmentation du degré d'oxygénation du cycle A des flavones et des flavonols produit un effet bathochrome notable sur la bande II et léger sur la bande I. Lorsque les fonctions hydroxyles en position 3, 5 ou 4' d'une flavone ou d'un flavonol sont méthylés ou glycosylés, un effet hyperchrome²⁵ est observé en particulier sur la bande I.

II. 4. 1. 2. Isoflavones, flavanones et dihydroflavonols

Les isoflavones, flavanones et dihydroflavonols se distinguent des flavones et des flavonols par un spectre UV qui comporte une bande II très intense avec seulement un épaulement et un pic de faible intensité représentant la bande I.

Le maximum d'absorption des isoflavones se situe entre 245 et 270 nm, alors que celui des flavanones et des dihydroflavonols se situe entre 270 et 295 nm (Tableau I-2). Le degré d'oxygénation du cycle B des isoflavones n'affecte pas le spectre UV tandis que dans le cas du cycle A, l'augmentation de celui-ci produit un effet bathochrome (Mabry *et al.* 1970).

II. 4. 1. 3. Anthocyanes

Les spectres UV-visibles des anthocyanes (sous forme de cation flavylum en condition acide dans le méthanol-HCl) possèdent deux maxima d'absorption:

- la bande I entre 465 et 560 nm de forte intensité associée à l'absorbance du cycle B.

²⁴ Effet bathochrome : déplacement du spectre d'absorption vers les grandes longueurs d'onde

²⁵ Effet hyperchrome : augmentation de l'intensité d'absorption d'une molécule

- la bande II entre 265 et 280 nm d'intensité moyenne associée à l'absorbance du cycle A.

La longueur d'onde maximum de la bande I en condition acide dépend de la substitution du noyau B, les dérivés de la pélargonidine absorbant entre 498-513 nm, les dérivés de la cyanidine à 520 nm et les dérivés de la delphinidine à environ 532 nm.

Le spectre UV des anthocyanes dépend aussi du solvant ; par exemple la cyanidine-3-O-rutinoside a un maximum d'absorbance à 533 nm dans l'éthanol acide, à 523 nm dans le méthanol acide et à 507 nm en solution aqueuse acide (Bohm 1998).

II. 4. 1. 4. Dérivés d'acides cinnamiques

Les acides phénoliques présentant un squelette de type acide benzoïque, montrent une longueur d'onde d'absorbance maximum comprise entre 200 et-290 nm. Les dérivés d'acides cinnamiques possèdent une deuxième bande d'absorption entre 270 et 360 nm, due à la conjugaison supplémentaire (Robbins 2003).

II. 4. 2. Spectrométrie de masse

II. 4. 2. 1. Flavonoïdes

Devant l'importance biologique considérable des flavonoïdes, leur séparation, leur identification et leur quantification dans divers milieux représentent un véritable enjeu. A ce jour, plus de 2000 études en spectrométrie de masse (SM) des flavonoïdes ont été publiées. L'application, ces dix dernières années, des avancées de cette technique aux flavonoïdes a fait faire un gigantesque bond en avant à l'étude de ces composés (Stobiecki 2000). Nous ferons ici un bilan rapide des différentes techniques utilisées avant de nous pencher sur les éléments d'identification que procure la SM.

Dans cette partie, nous nous intéresserons essentiellement aux flavonoïdes O-glycosylés de types flavone, flavonol, flavanone ou anthocyane, classes les plus fréquemment rencontrées dans le cadre de nos travaux personnels.

II. 4. 2. 1. 1. Techniques d'ionisation

Les études des flavonoïdes en SM, effectuées par impact électronique (EI : Electronical Impact) ou ionisation chimique (CI : Chemical ionisation), ont apporté par le passé de nombreuses informations structurales mais nécessitaient l'analyse en phase gazeuse des composés préalablement purifiés et donc la dérivation des groupements hydroxyles de ces composés polaires (méthylation, triméthylsilylation ou acétylation) (Ma *et al.* 1997; Stobiecki 2000).

Avec l'introduction des techniques d'ionisation par désorption, l'analyse des flavonoïdes glycosylés sans dérivation au préalable est devenue possible. La première de ces techniques, la désorption de champ (FD : Field Desorption), a été développée par Beckey et Shulten (1975), mais les inconvénients liés à la préparation de l'échantillon ont restreint son application. D'autres techniques telles que l'ionisation chimique directe (DCI : Direct Chemical Ionisation), développée en 1977 (Hunt 1977) ou l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB : Fast Atom Bombardement) développée en 1982 (Barber 1982), ont également été appliquées avec succès aux flavonoïdes (Stobiecki 2000). L'inconvénient de ces techniques est l'impossibilité d'un couplage avec la chromatographie liquide (CLHP).

L'electrospray (ESI : ElectroSpray Ionisation) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) sont des techniques d'ionisation douces qui génèrent principalement des ions quasimoléculaires ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M-H]^-$,...). (Wolfender *et al.* 2000). Elles sont devenues ces dix dernières années, les plus adaptées et les plus populaires pour l'analyse des flavonoïdes. En effet, grâce à ces techniques, une dérivation préalable n'est plus nécessaire et l'analyse, peut être effectuée par infusion ou en couplage à la CLHP (de Rijke *et al.* 2003; Prasain *et al.* 2004).

En ESI deux modes d'ionisation sont possibles: le mode d'ionisation négatif où un proton est arraché à la molécule et le mode d'ionisation positif où un proton ou adduit métallique est ajouté à la molécule. Ces deux modes sont complémentaires et apportent des informations différentes lors de la fragmentation des ions quasimoléculaires formés.

II. 4. 2. 1. 2. Couplage chromatographie-spectrométrie de masse

L'introduction de la LC-MS pour l'analyse d'extraits végétaux représente un grand bond en avant dans l'identification en ligne des produits naturels. Depuis que l'ionisation par electrospray et l'ionisation chimique à pression atmosphérique ont été développées et combinées à la chromatographie liquide (CLHP-SM), le nombre de travaux exploitant ces méthodes n'a cessé d'augmenter d'années en années. Ces techniques plus sensibles et faciles à mettre en œuvre sont utilisées dans de nombreux laboratoires de phytochimie pour le criblage et pour la « deréplication » d'extraits végétaux. La « deréplication » est un procédé où des composés connus sont identifiés en ligne sans avoir à les isoler de nouveau (Constant *et al.* 1997; Wolfender *et al.* 2000; Cuyckens and Claeys 2004; Prasain *et al.* 2004). Il existe de nombreux exemples d'application de cette technique pour l'analyse de mélanges de produits naturels complexes, et en particulier de mélanges de flavonoïdes (Lee *et al.* 2005; de

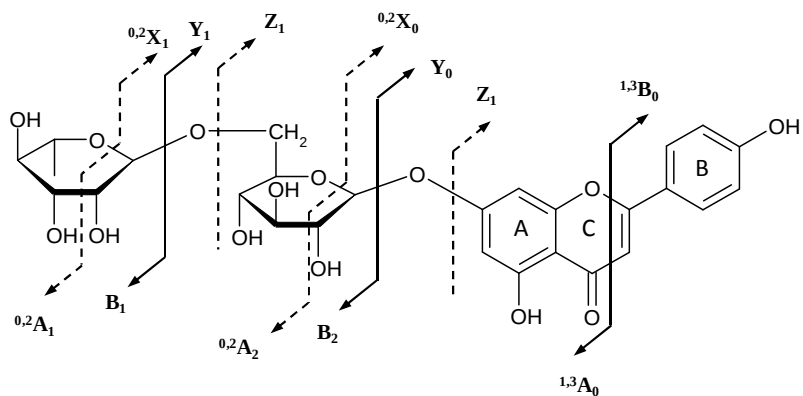


Figure I-16 : Nomenclature simplifiée utilisée pour désigner les fragments de flavonoïdes d'après (Domon and Costello 1988; Ma et al. 1997; Cuyckens and Claeys 2004)

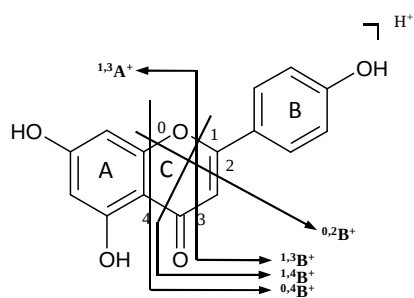


Figure I-17 : Nomenclature et principales fragmentations des flavonoïdes en mode positif, exemple du kaempférol (March and Brodbelt 2008)

Rijke *et al.* 2006; Lhuillier *et al.* 2007; Xing *et al.* 2007; Rosenberg 2008; Plazoni *et al.* 2009; Truchado *et al.* 2009).

II. 4. 2. 1. 3. Identification des flavonoïdes par spectrométrie de masse

II. 4. 2. 1. 3. a. Nomenclature

Pour décrire les fragments des aglycones des flavonoïdes obtenus par spectrométrie de masse, le système de nomenclature proposé par Ma *et al.*, désormais communément utilisé, sera employé (Ma *et al.* 1997). Les notations $^{ij}A^+$ et $^{ij}B^+$ distinguent ainsi les ions primaires produits conservant les cycles A et B intacts, les indices i et j indiquant la liaison C-C qui a été scindée. Dans le cas des flavonoïdes O-glycosylés, la nomenclature précédente est complétée par celle de Domon et Costello (Domon and Costello 1988). Y_0 y désigne l'ion de la génine et Y_n , l'ion de la génine portant n glycosides (Figure I-16). Dans certains cas, la position du clivage osidique sera indiquée par un exposant. Par exemple, Y_0^7 désigne l'ion résultant du clivage d'un sucre fixé en position 7 sur la génine (Domon and Costello 1988; Cuyckens and Claeys 2004).

II. 4. 2. 1. 3. b. Masse moléculaire

La première information que nous apporte la spectrométrie de masse concerne la masse de l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ (mode positif) ou $[M-H]^-$ (mode négatif). Les adduits sodium et potassium ($[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$) ou des complexes moléculaires ($[2M+H]^+$ ou $[2M-H]^-$) sont aussi souvent observés. La masse moléculaire seule n'est pas suffisante pour la caractérisation des flavonoïdes, et différents types de fragmentation à partir de l'ion moléculaire existent et sont nécessaires afin d'obtenir des informations sur la structure de la génine, l'enchaînement des sucres et leur position sur la structure (Wolfender *et al.* 2000).

II. 4. 2. 1. 3. c. Structure de l'aglycone

Une approche détaillée de la caractérisation de la partie génine d'un flavonoïde consiste à faire subir une fragmentation MS/MS à l'ion moléculaire de la molécule (fragmentation par dissociation induite par collision ou CID) puis de sélectionner l'ion Y_0 (Y_0^+ ou Y_0^-) de la génine pour, à nouveau, lui faire subir une fragmentation par CID (MS/MS/MS ou MS^3) (Wolfender *et al.* 2000).

Les variations les plus importantes dans la structure des aglycones sont le degré d'oxygénation (fonctions hydroxyles ou méthoxyles) et la position en 2 ou en 3 du noyau B (flavonoïdes ou isoflavonoïdes).

Tableau I-3 : Ions fragments observés en mode positif pour les différentes classes de flavonoïdes (de Rijke *et al.* 2006)

Composés	Substituants		Ions fragments										
	-OH	-OCH ₃	[M+H] ⁺	^{0,2} A ⁺	^{0,2} B ⁺	^{1,3} A ⁺	^{1,3} B ⁺	^{1,4} A ⁺	^{0,4} B ⁺	[M+H-15] ⁺ (-CH ₃)	[M+H-56] ⁺ (-CO-CO)	[M+H-42] ⁺ (-C ₂ H ₂ O)	[M+H-46] ⁺ (-H ₂ O-CO)
Flavones													
Apigénine	5,7,4'		271	-	121	153	119	-	163	-	-	229	225
Lutéoline	5,7,3',4'		287	-	137	153	135	-	179	-	-	245	241
Acacétine	5.7	4'	285	-	135	153	133	-	177	270	-	243	239
Chrysoériol	5,7,4'	3'	301	-	151	153	149	-	-	286	-	259	-
Flavonols													
Kaempférol	5,7,4'		287	165	121	153	-	-	-	-	231	245	213
Quercétine	5,7,3',4'		303	165	137	153	-	-	-	-	247	262	229
Myricétine	5,7,3',4',5'		319	165	153	153	-	-	-	-	263	277	245
Isorhamnétine	5,7,4'	3'	317	165	151	153	-	-	-	302	261	275	-
Galangine	5.7		271	165	-	153	-	-	-	-	215	229	225
Flavanones													
Naringénine	5,7,4'		273	-	-	153	119	147	-	-	-	231	227
Isoxanthohumol	7,4'	5	355	-	-	235	-	-	-	-	-	-	-
8-Prényl-naringénine	5,7,4'		341	-	-	221	-	-	-	-	-	-	-
6-Prényl-naringénine	5,7,4'		341	-	-	221	-	-	-	-	-	-	-
Isoflavones													
Daidzéine	7,4'		255	-	-	137	119	-	-	-	199	-	-
Génistéine	5,7,4'		271	-	-	153	119	-	-	-	215	-	-
Formononétine	7	4'	269	-	-	137	133	-	-	254	213	-	-
Biochanine A	5.7	4'	285	-	-	153	133	-	-	270	229	-	-

En ce qui concerne l'identification de la génine, les fragments de Y_0 les plus informatifs résultent d'un clivage C-C sur le cycle C. L'analyse des ions résultant de ces réactions de type rétro Diels-Alder (RDA), révèle alors le nombre et le type de substituants portés par les cycles A et B (Cuyckens and Claeys 2004).

– Ionisation positive

La voie de fragmentation menant aux ions A et B nécessite une coupure des liaisons C-C en position 1/3, 0/2, 0/3, 0/4, ou 2/4 du cycle C. Le schéma de fragmentation dépend fortement de la classe du flavonoïde et de la substitution du cycle C. La Figure I-17 résume les différentes possibilités de rupture et la nomenclature des fragments obtenus (ESI⁺).

Les réactions de Retro Diels-Alders (RDA) générant les ions fragments $^{1,3}A^+$ et $^{1,3}B^+$ sont la voie de fragmentation la plus importante pour les flavanones, flavones et flavonols. L'ion $^{1,3}A^+$ est dans la plupart des cas le fragment le plus abondant.

Pour les flavones et les flavonols, la coupure en position 0/2 est commune au niveau du cycle C. L'ion fragment $^{0,2}B^+$ est formé avec des intensités relatives variant de 1 à 90% selon la nature du flavonoïde. Cet ion est généralement plus intense chez les flavonols, moins chez les flavones). L'ion correspondant $^{0,2}A^+$ est quant à lui caractéristique des seuls flavonols (Ma *et al.* 1997). Des fragments moins informatifs, communs à tous les flavonoïdes, peuvent se former par la perte de H₂O (18 u), de CO (28 u), de C₂H₂O (42 u) ainsi que les pertes successives de H₂O et CO (46 u). Dans le cas de ces dernières, il faut toutefois noter qu'elles ne sont pas observées chez les isoflavones. La production du cation radical [(M+H)-15]⁺, formé par la perte d'un radical méthyle, est prédominante pour un grand nombre de flavonoïdes-O-méthylés. Le Tableau I-3 récapitule les ions fragments obtenus en mode positif d'ionisation pour les différentes classes de flavonoïdes (de Rijke *et al.* 2006).

– Ionisation négative

Le mode de détection négatif est plus sensible pour l'analyse des flavonoïdes et le schéma de fragmentation étant légèrement différent, il apporte des informations supplémentaires et complémentaires sur la structure de la génine. Le Tableau I-4 récapitule les fragmentations observées dans ce cas selon le type de flavonoïde considéré (de Rijke *et al.* 2006). La rupture du cycle C par Rétro Diels-Alders successifs mène aux ions $^{i,j}A^-$ et $^{i,j}B^-$ en fournissant des informations sur le nombre et le type de substituants présents sur les cycles A et B (Cuyckens and Claeys 2004). Comme dans le cas du mode positif de détection, la fragmentation la plus importante résulte de la coupure des liaisons C-C en position 1/3. En mode négatif, le fragment $^{1,3}A^-$ est ainsi pour la plupart des flavonoïdes le fragment

Tableau I-4 : Ions fragments observés en mode négatif pour les différentes classes de flavonoïdes (de Rijke *et al.* 2006)

Composés	Substituants		Ions fragments														
	-OH	-OCH ₃	[M-H] ⁻	^{0,3} A ⁻	^{0,3} B ⁻	^{0,4} A ⁻	^{0,4} B ⁻	^{1,2} A ⁻	^{1,2} B ⁻	^{1,3} A ⁻	^{1,3} B ⁻	^{1,4} A ⁻	^{1,4} B ⁻	[M-H-15] ⁻ (-CH ₃)	[M-H-56] ⁻ (-CO-CO)	[M-H-72] ⁻ (-CO ₂ -CO)	
Flavones																	
Flavone			221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7-Hydroxyflavone	7		237	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	165	
4'-Hydroxyflavone	4'		237	-	-	-	-	-	-	-	117	-	-	-	-	-	
6,4'-Dihydroxyflavone	6,4'		253	-	134	-	-	-	-	-	117	-	-	-	-	-	
Genkwanine	4'	7	283	-	-	-	-	-	-	151	-	-	-	268	-	-	
Apigénine	5,7,4'		269	-	-	107	-	-	-	151	117	-	149	-	-	-	
Chrysine	5.7		253	-	-	-	-	-	-	151	101	-	-	-	-	181	
Acacétine	5.7	4'	283	-	-	107	-	-	-	151	133	-	-	268	-	-	
Lutéoline	5,7,3',4'		285	-	-	107	-	-	-	151	133	-	-	-	-	213	
Flavonols																	
Galangine	5.7		269	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	213	197	
Kaempférol	5,7,4'			135		107	-	-	-	151	-	-	161	-	-	-	
Kaempféride	5.7	4'	299	-	-	-	-	-	-	151	132	-	-	284	228	212	
Quercétine	5,7,3',4'		301	-	-	107	-	179	121	151	-	-	-	-	-	229	
Morine	5,7,2',4'		301	-	-	107	-	-	-	151	-	-	-	-	-	-	
Rhamnétine	5,3',4'	7	315	-	-	121	-	-	-	165	-	-	-	300	-	-	
Isorhamnétine	5,7,4'	3'	315			107	-	-	-	151	-	-	-	300	-	-	
Fiséatine	7,3',4'		285	-	-	-	-	163	121	-	-	-	-	-	229	213	
Flavanones																	
Naringénine	5,7,4'		271	-	-	107	-	-	-	151	119	-	-	-	-	-	
Hespérétine	5,7,3'	4'	301	-	-	107	-	-	-	151	-	-	-	286	-	-	
Eriodictyol	5,7,3',4'		287	-	-	107	-	-	-	151	135	125	-	-	-	-	
Isosakuramétine	5.7	4'	285	-	-	-	-	-	-	151	-	125	-	270	-	-	
8-Prényl-naringénine	5,7,4'		-	-	-	-	-	-	-	219	119	-	-	-	-	-	
6-Prényl-naringénine	5,7,4'		-	-	-	-	-	-	-	219	119	-	-	-	-	-	
Isoflavones																	
Daidzéine	7,4'-		253	-	133	-	-	-	-	-	117	-	-	-	197	181	
Génistéine	5,7,4'-		269	-	133	107	163	-	-	-	-	-	-	-	-	197	
Formononétine	7	4'	267	-	-	-	177	213	-	254	-	-	-	252	-	195	
Biochanine A	5.7	4'	283	-	-	107	177	229	-	270	-	-	-	268	-	211	
3'-Méthyl daidzéine	7,4'-	3'	283	135	148	-	-	-	-	-	-	-	-	268	-	-	

majoritaire. Les isoflavonones font exception avec un ion $^{0,3}\text{B}^-$ majoritaire caractéristique (Hughes *et al.* 2001). Le degré d'hydroxylation du cycle B a un impact sur la fragmentation. Par exemple, pour les flavonols portant 2 hydroxyles ou plus sur le noyau B (quercétine, fisétine et myricétine), les ions $^{1,2}\text{A-H}^-$ et $^{1,2}\text{B-H}^-$ peuvent être aisément observés, alors que dans le cas d'un cycle B non substitué, l'énergie de collision nécessaire à la formation de ces ions est beaucoup plus élevée (Cuyckens *et al.* 2000; Fabre *et al.* 2001). La perte de petite molécules neutres comme CO (-28 u) et CO₂ (-44 u) due à la contraction du cycle C est caractéristique des flavones (Fabre *et al.* 2001). Enfin, La perte d'H₂O, $[\text{M-H-18}]^-$, indique la présence de 2 groupements OH, en *ortho* l'un de l'autre, sur l'un des cycle A ou B (Wu *et al.* 2004).

– Aglycones méthoxylées

La fragmentation d'un flavonoïde méthoxylé entraîne la formation d'un ion radicalaire caractéristique $[\text{M-H-15}]^{\bullet}$ (- CH₃) associé au pic de base du spectre de masse (Hvattum and Ekeberg 2003). Justesen *et al.* ont étudié très précisément la fragmentation de 10 flavonoïdes méthoxylés en mode négatif : les fragments $[\text{M-H-28}]^{\bullet}$ et $[\text{M-H-29}]^-$ sont caractéristiques des flavonoïdes monométhoxylés, alors que $[\text{M-H-15}]^{\bullet}$, $[\text{M-H-30}]^-$ et $[\text{M-H-28-30}]^{\bullet}$ sont prédominants dans le cas de flavonoïdes polyméthoxylés (Justesen 2001). Comme la fragmentation des isomères est différente selon la position des groupements méthoxyles, il est également possible de déduire la position de ces groupements, en comparant la fragmentation des flavonoïdes méthoxylés avec celle de témoins également méthoxylés

– Anthocyanes

Les anthocyanes étant chargés positivement aux faibles valeurs de pH, leur détection en électrospray est facile à des faibles voltages pour lesquels d'autres composés ne sont pas ionisés. L'électrospray produit dans un premier temps l'ion pseudomoléculaire, celui-ci peut être fragmenté en modifiant les conditions d'ionisation (Giusti *et al.* 1999).

La fragmentation des anthocyanes O-glycosylés débute par un clivage de la liaison osidique. Les masses (m/z) observées pour les 6 anthocyanes les plus communs sont de 271 (pélargonidine), 287 (cyanidine), 301 (péonidine), 303 (delphinidine), 317 (pétunidine) et 331 (malvidine). Comme pour les autres flavonoïdes, la fragmentation de ces génines apporte des informations sur leur structure. Oliveira *et al.* ont décrit la fragmentation de quatre d'entre eux (cyanidine, péonidine, delphinidine et malvidine) en spectrométrie de masse électrospray et CID et Cette étude a mis en évidence les différences dues à la substitution du cycle B (Oliveira *et al.* 2001).

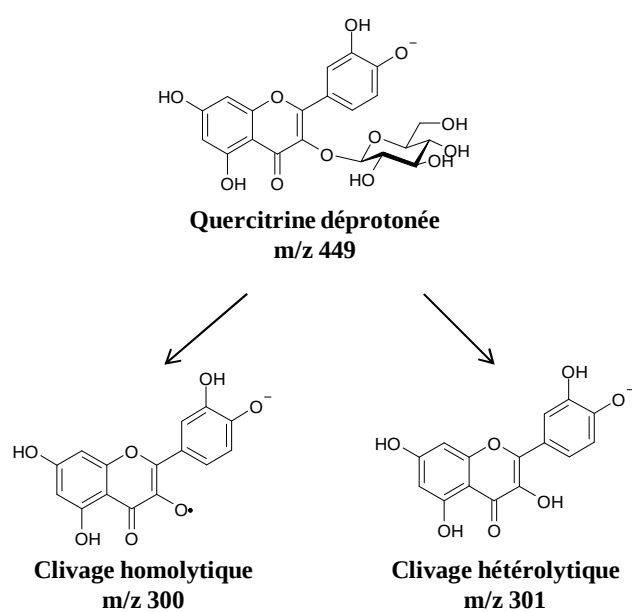


Figure I-18 : Ruptures homolytique et hétérolytique de la liaison osidique, exemple de la quercitrine

II. 4. 2. 1. 3. d. Flavonoïdes O-glycosylés

La fragmentation des flavonoïdes O-glycosylés commence toujours par un clivage hétérolitique de la liaison glycosidique menant à l'ion Y_0 par l'élimination du sucre et rétention de la charge sur l'aglycone (Plazoni *et al.* 2009). La fragmentation des flavonoïdes en mode positif ou négatif permet de déduire les positions des glycosylations, le type de liaison interglycosidique et/ou la nature du sucre terminal.

– Nombre et types de sucres

Les fragments liés aux saccharides sont rarement observés sur les spectres de masse des flavonoïdes car, lors de la fragmentation, la charge reste généralement associée à l'aglycone. Lors de la fragmentation de l'ion pseudo moléculaire, les pertes successives doivent être analysées afin de déterminer le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone. L'élimination d'un monosaccharide s'illustre ainsi par la perte de 162 u pour un hexose, 146 u pour un rhamnose, 132 u pour un pentose et 176 u pour un acide glucuronique. Ces observations permettent alors de déterminer la nature et le nombre de sucres présents au sein de la molécule (Wolfender *et al.* 1992; Cuyckens and Claeys 2004).

– Liaison génines-ose(s)

Plusieurs sites de O-glycosylation sont possibles pour les flavonoïdes, ce qui rend la localisation de cette liaison génine-ose délicate. La majorité des substituants osidiques se situe au niveau des positions 3, 7 ou 4' de l'aglycone. La substitution en position 5 est très rare dans la mesure où cet hydroxyle présente une faible réactivité pour la glycosylation en raison de son engagement dans une liaison hydrogène intramoléculaire avec le groupement carbonyle en position 4 (Cuyckens and Claeys 2004).

Le site de glycosylation a une influence significative sur la fragmentation des flavonoïdes O-glycosylés. En effet, en mode négatif, en plus du clivage hétérolytique menant à l'ion Y_0^- , un clivage homolytique de la liaison osidique est possible, produisant l'ion radical de la génine $[Y_0-H]^{\bullet}$ noté $Y_0^{\bullet}$ (Figure I-18). La nature et la position du sucre affectent aussi le clivage de la liaison osidique. Le radical provenant de la quercétine-3-O-glucoside ou galactoside est beaucoup plus abondant que celui provenant de la quercétine-3-O-rhamnoside ou rutinoside. Pour les flavones et les flavonols, l'abondance relative du radical par rapport à l'ion de la génine dépend du degré d'hydroxylation du cycle B et de la position de la glycosylation. Pour les flavonols 3-O-glycosylés, le rapport $Y_0^{\bullet}/Y_0^-$ augmente avec le nombre de groupements hydroxyles portés par le cycle B tandis que l'inverse se produit chez les flavones 7-O-glycosylées (Hvattum and Ekeberg 2003). En outre, ce radical n'est observé ni

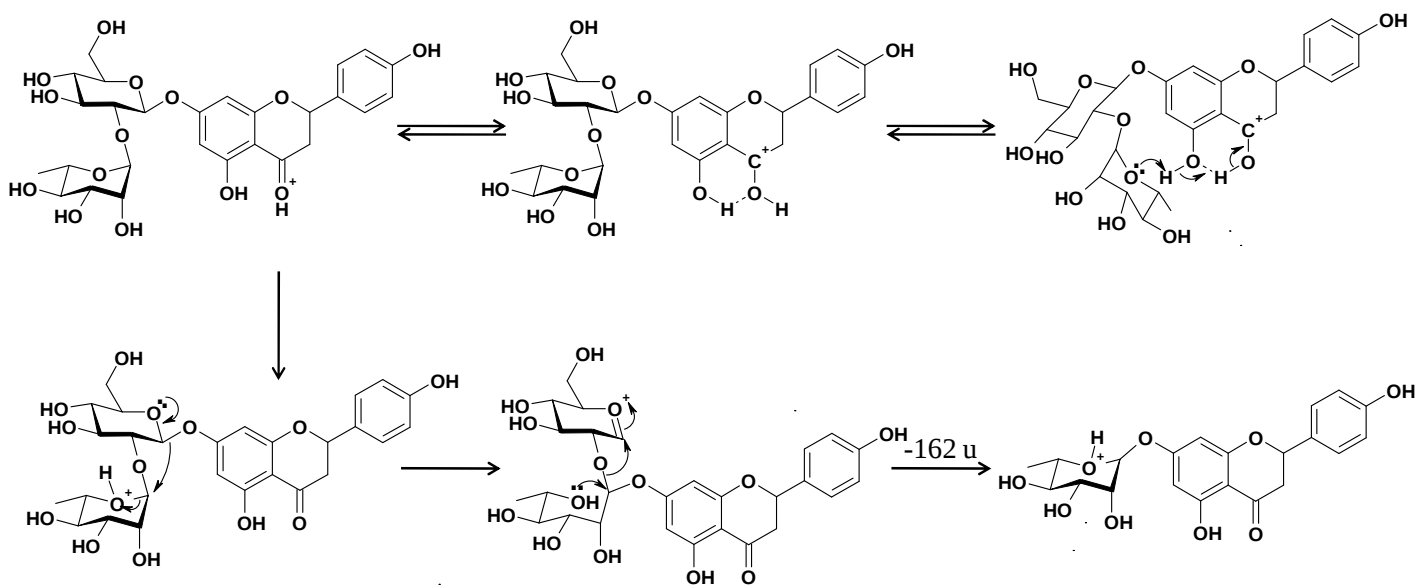


Figure I-19 : Mécanisme possible pour la formation de l'ion Y* par CID de l'ion $[M+H]^+$ exemple de la naringénine-7-O-neohesperidoside (103) d'après (Ma *et al.* 2000).

dans le cas des flavanones ni dans celui des dihydrochalcones, ce qui indique qu'une double liaison en 2/3, adjacente donc au carbonyle en position 4 est requise pour la formation d'un radical stable de la génine. Ce radical n'est pas non plus observé dans le cas de flavonoïdes 3-méthoxylés (Cuyckens and Claeys 2004).

La fragmentation de ce radical peut aussi apporter des informations, puisqu'en fonction du site de glycosylation, il est localisé à des endroits différents de la molécule. La fragmentation du radical génine requiert une forte énergie de dissociation. Cette fragmentation présente des différences avec la fragmentation de l'ion génine : les ions $^{m,n}B^-$ produits sont plus abondants dans le cas d'une 7 O-glycosylation alors que pour les 4'O-glycosylations, les ions $^{m,n}A^-$ sont relativement plus abondants (Cuyckens and Claeys 2005).

En mode positif, Cuyckens et Claeys se sont penchés sur la fragmentation, dans des conditions hautement énergétiques, de l'ion adduit $[M+Na]^+$. Les adduits sodium peuvent être très communs et très abondants quand la solution étudiée a été stockée dans des récipients en verre mais leur présence dépend également de la source d'ionisation employée et de la géométrie de celle-ci. La fragmentation de cet ion adduit permet de localiser de façon certaine la position du groupement osidique. En effet, la présence d'un ion du cycle B contenant le résidu osidique indique une liaison osidique en position 4'; alors que les pertes successives du sucre et du cycle B sont caractéristiques d'une liaison en position 3 ; enfin, la perte du cycle B à la fois à partir de l'ion $[M+Na]^+$ et de l'ion de la génine est le signe d'une liaison en position 7 (Cuyckens and Claeys 2005). Lors de la fragmentation de l'adduit sodium, il est possible d'observer l'élimination de la génine et donc la formation d'un ion saccharide. Cette fragmentation peut confirmer, dans le cas de flavonoïdes polyglycosilés, la présence d'une chaîne de sucres située sur une seule position (Satterfield and Brodbelt 2001).

– Lien interglycosidique

Les rutinosides (rhamnosyl-(1 α $\rightarrow$ 6)-glucose) et les neohesperosides (rhamnosyl-(1 α $\rightarrow$ 2)-glucose), sont les disaccharides les plus communément liés aux flavonoïdes (Abad-Garcia *et al.* 2009). De nombreuses études ont été menées ces 10 dernières années afin de les différencier.

En ESI⁺ et FAB⁺, la caractérisation des deux isomères est basée sur les intensités des fragments $Y_1 : [M+H-Rha]^+$, $Y_0 : [M+H-Rha-Glu]^+$, et sur la présence d'un ion « inattendu » appelé Y^* , formé par la « perte d'un glucose interne ». La présence de cet ion Y^* peut induire en erreur quant à la séquence des sucres. En effet, cet ion apparait à $m/z [M+H]-162u$, ce qui pourrait correspondre à la perte d'un glucose terminal (Figure I-19). De ce fait, Y^* pourrait

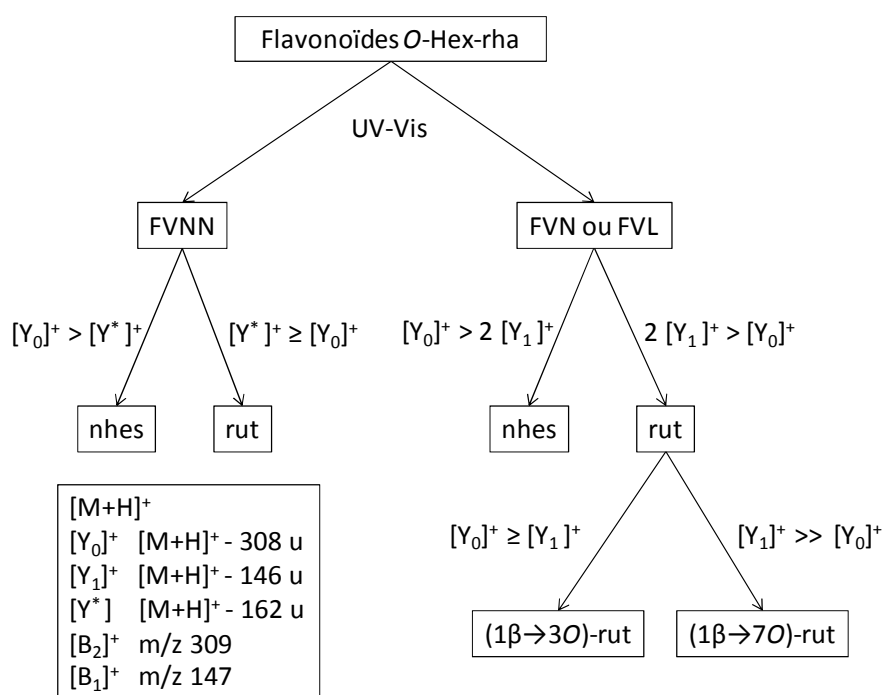


Figure I-20 : Méthodologie pour la différenciation des flavonoïdes rutinosides (rut) et neohesperidosides (nhes) basée sur les spectres UV et les ions produits par la fragmentation MS² de [M+H]⁺ (flavone : FVN, flavanone : FVNN, flavonol : FVL) (Abad-Garcia *et al.* 2009)

Tableau I-5 : Fragmentation MS² de l'ion [M-H]⁻ des flavonoïdes O-glycosylé par deux glucoses: sophorosides, gentiobiosides et X,Y-diglucosides (Ferrerres *et al.* 2004)

Composés	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² [M-H] ⁻ (m/z) (%)			
		(-120) ^{0,2} X ₀ ⁻	(-162) Y ₁ ⁻	(-180) Z ₁ ⁻	(-324) Y ₀ ⁻
Sophorosides (Glc(1→2)Glc)					
Kaempférol 3-	609		448 (3)	429 (28)	285 (100)
Quercétine 3-	625	505 (10)	463 (9)	445 (31)	301 (100)
Hypolaétine 7- (8OH lutéoline)	625		463 (15)	445 (23)	301 (100)
8-OMe-kaempférol 3-	639			459 (79)	315 (100)
Gentiobiosides (Glc(1→6)Glc)					
Kaempférol 3-	609		447 (1)		285 (100)
Isorhamnétine 3-	639		477 (1)		315 (100)
Patulétine 3-	655		493 (3)		331 (100)
Spinacétine 3-	669				345 (100)
X,Y-di-Glucosides					
Kaempférol 3,7-	609	489 (7)	447 (100)		285 (23)
Quercétine 3,4'-	625		463 (100)		301 (33)
Quercétine 7,4'-	625	505 (2)	463 (100)		301 (29)

être associé à l'ion Y_1 d'un isomère dont la séquence serait Glu-Rha au lieu de Rha-Glu (Ma *et al.* 2000; Cuyckens *et al.* 2001; Ma *et al.* 2001).

En 2009, Abad-Garcia *et al* ont développé une méthodologie en mode d'ionisation positive pour déterminer la liaison interglycosidique en utilisant un triple quadripôle. (Abad-Garcia *et al.* 2009) Cette méthode est basée, comme les références précédentes, sur la fragmentation MS^2 de l'ion pseudomoléculaire. L'élimination du disaccharide (formation de l'ion Y_0^+) est plus favorable pour les isomères liés en 1→2, à cause des répulsions stériques entre le rhamnose terminal et l'aglycone (plus proche l'un de l'autre que lorsque la liaison est 1→6).

Dans le cas des flavonols et des flavones, l'intensité de l'ion Y_1^+ est plus faible pour les neohesperidosides. La formation de l'ion Y^* est également visible.

Le spectre de masse des flavanones est plus complexe. L'ion Y^* est beaucoup plus abondant que dans le cas des flavonols ou des flavones où il ne dépasse pas 5 % d'intensité relative. Il est possible de différencier les rutinosides et neohesperidosides de flavanones en comparant l'intensité des ions Y^* et Y_0^+ . Pour les rutinosides, Y^* représente le pic de base alors que pour les neohesperosides, l'intensité de Y^* est plus faible que celle de Y_0^+ (Figure I-20).

Ferreres *et al* ont proposé leurs propres règles pour différencier en mode d'ionisation négative la liaison interglycosidique au moyen d'une trappe ionique en se basant sur les ions Y_0^- , Y_1^- et Z_1^- . Ils appliquent ces règles à d'autres types de diglycosides. Ils comparent la fragmentation de flavonoïdes substitués par deux glucoses, soit sous forme de O-diglycosides comme les sophorosides (glucosyl-(1α → 2)-glucose) et les gentiobiosides (glucosyl-(1α → 6)-glucose), soit sous forme de di-O-glucosides (deux sucres sur deux hydroxyles différents). Dans le cas des O-diglycosides le fragment majoritaire obtenu par CID est l'ion Y_0^- , après une perte de 324 u (disaccharide complet). Pour différencier le lien interglycosidique il faut s'intéresser à la présence du fragment Z_1^- , qui est caractéristique de la liaison 1 → 2 (23 à 79% d'intensité relative pour les sophorosides), ce fragment est absent lors d'une liaison 1 → 6 (gentiobiosides). Dans le cas flavonoïdes di-O-glucosides, le fragment majoritaire est différent, il s'agit de l'ion Y_1 (perte de 162 u, un seul glucose), l'ion Y_0^- est aussi présent (23 à 33% d'intensité relative) et l'ion Z_1^- n'est pas détecté (Tableau I-5) (Ferreres *et al.* 2004).

II. 4. 2. 2. Dérivés d'acides cinnamiques, esters de l'acide quinique

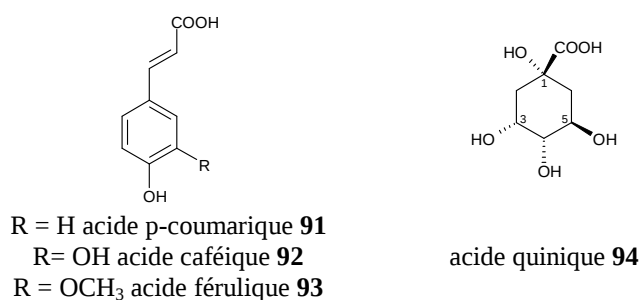
La difficulté dans l'analyse structurale de esters de l'acide quinique (**94**) réside dans l'identification de la (ou des) hydroxyle(s) engagé(s) dans une (des) liaison(s) ester(s) avec un

Tableau I-6 : Schéma hiérarchique d'identification par LC-MSⁿ de dérivés d'acide quinique mono et diacylés d'après (Clifford *et al.* 2003; Clifford *et al.* 2005).

Etapes	Ions	Identification	Abréviation	Action
1	ion parent m/z 337 ion parent m/z 353 ion parent m/z 367 ion parent m/z 515 ion parent m/z 529	acide <i>p</i> -coumaroylquinique acide caféoylquinique acide féruloylelquinique acide dicaféoylquinique acide caféoylféruloylelquinique	(ApCoQ) (ACQ) (AFQ) (diACQ)	voir 2 voir 3 voir 4 voir 5 voir 8
2	pic de base en MS ² m/z 163 pic de base en MS ² m/z 173 pic de base en MS ² m/z 191	acide 3- <i>p</i> -coumaroylquinique acide 4- <i>p</i> -coumaroylquinique acide 5- <i>p</i> -coumaroylquinique	(A 3-pCoQ) (A 4-pCoQ) (A 5-pCoQ)	
3	pic de base en MS ² m/z 191, pic secondaire m/z 179 (50% du pic de base) pic de base en MS ² m/z 173 pic de base en MS ² m/z 191, pic secondaire m/z 179 (<5% du pic de base)	acide 3-caféoylquinique acide 4-caféoylquinique acide 5-caféoylquinique	(A 3-CQ) (A 4-CQ) (A 5-CQ)	
4	pic de base en MS ² m/z 193 pic de base en MS ² m/z 173 pic de base en MS ² m/z 191	acide 3-féruloylelquinique acide 4-féruloylelquinique acide 5-féruloylelquinique	(A 3-FQ) (A 4-FQ) (A 5-FQ)	
5	MS ² m/z 353, pic de base en MS ³ m/z 173 MS ² m/z 353, pic de base en MS ³ m/z 191	acide 4,x-dicaféoylquinique acide dicaféoylquinique sauf en 4		voir 6 voir 7
6	MS ³ m/z 173, MS ² : pics intenses (50%) à m/z 299 et 203 MS ³ m/z 173, MS ² : pic moyen (15%) à m/z 335, MS ² : pic intense (>50%) à m/z 179 MS ³ m/z 173, MS ² : pic à m/z 335 indétectable, MS ² : pic intense (>50%) à m/z 179	acide 1,4-dicaféoylquinique acide 3,4-dicaféoylquinique acide 4,5-dicaféoylquinique	(A 1,4-diCQ) (A 3,4-diCQ) (A 4,5-diCQ)	
7	MS ³ m/z 191, MS ¹ : pic moyen (>30%) à m/z 335, MS ² : pic intense (>50%) à m/z 179 MS ³ m/z 191, MS ¹ : pic faible (<10%) à m/z 335, MS ² : pic faible (<10%) à m/z 179 MS ³ m/z 191, MS ¹ : pic m/z 335 indétectable, MS ² : pic intense (>50%) à m/z 179	acide 1,3-dicaféoylquinique acide 1,5-dicaféoylquinique acide 3,5-dicaféoylquinique	(A 1,3-diCQ) (A 3,5-diCQ) (A 3,5-diCQ)	
8	pic de base en MS ³ m/z 173 pic de base en MS ³ différent à m/z 173	acide 4,x-caféoylféruloylelquinique acide 3,5-caféoylféruloylelquinique		voir 9 voir 12
9	MS ³ m/z 173, MS ² : pic secondaire 335 et 349 avec une intensité de 40% MS ³ m/z 173, MS ² : pic secondaire 335 et 349 avec une intensité de 20%	acide 3,4-caféoylféruloylelquinique acide 4,5-caféoylféruloylelquinique		voir 10 voir 11
10	pic de base en MS ² m/z 367, MS ³ : pic secondaire m/z 193 pic de base en MS ² m/z 353 ou 367 (intensité proche), MS ³ pic secondaire m/z 179	acide 3-caféoyl,4-féruloylelquinique acide 3-féruloyl,4-caféoylquinique		
11	pic de base en MS ² m/z 367, MS ³ : pic secondaire intense (>50%) m/z 193 pic de base en MS ² m/z 353, MS ³ pic secondaire intense (>50%) m/z 179	acide 4-féruloyl,5-caféoylquinique acide 4-caféoyl,5-féruloylelquinique		
12	pic de base en MS ² m/z 367, pic de base MS ³ m/z 193 pic de base en MS ² m/z 353, MS ³ pic secondaire intense (>50%) m/z 179	acide 3-féruloyl,5-caféoylquinique acide 3-caféoyl,5-féruloylelquinique		

(des) dérivés cinnamique(s). En effet, quatre hydroxyles différents peuvent être impliqués dans cette (ces) liaison(s). Cependant, les différents isomères de position ont un mécanisme de fragmentation distinct en mode d'ionisation négative, ce qui permet leur distinction. L'ionisation positive n'apportant aucune information sur ce point ne sera pas détaillée ici.

Clifford *et al.* proposent ainsi un schéma hiérarchique permettant d'identifier les dérivés d'acides cinnamiques par LC-MS (Clifford *et al.* 2003; Clifford *et al.* 2005). Ce schéma est basé sur les différences de fragmentation des différents isomères (Tableau I-6).



II. 4. 2. 2. 1. Dérivés monoacylés

En mode d'ionisation négative, tous les dérivés monoacylés d'acide quinique donnent uniquement l'ion moléculaire [M-H]⁻. La masse de cet ion nous renseigne sur la nature de l'acide greffé sur l'acide quinique (5AQ) : acide caféique (**92**) (C) 353; acide férulique (**93**) (F) 367, acide *p*-coumarique (**91**) (pCo) 337. Lors de la fragmentation en MS², des différences dans la masse des fragments et dans leur intensité peuvent être observées selon l'emplacement de la fonction ester. La Figure I-21 résume la structure des différents fragments pouvant être obtenus.

Tout d'abord, il est facile de distinguer une acylation sur l'hydroxyle en position 4, lors de l'observation d'un pic de base à m/z 173, correspondant au fragment déshydraté Q₂ (Figure I-21). De plus, la MS³ confirme cette position, par l'importance de l'intensité des pics à m/z 93 et 111. Les dérivés acylés en position 5 et l'acide 3-caféoylquinique (A 3-CQ) donnent tous des pics de base à m/z 191 (Q₁) en MS² et des ions à m/z 85 (Q₅), 127 (Q₇) et 172 (Q₃) en MS³. L'acide 3-*p*-coumaroylquinique (A3-pCoQ) et l'acide 3-feruoylquinique (A 3-FQ) se distinguent par des fragments en MS² respectivement à m/z 163 (A₃) et 193 (A₂). Les acides 3 et 5-caféoylquinique donnent le même pic de base en MS², mais ils peuvent être différenciés par le pic à m/z 179 (A₁) dont l'intensité relative est très supérieure pour l'isomère 5 par rapport à l'isomère 3 (49% vs. 5%) (Clifford *et al.* 2003).

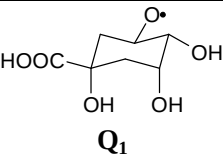
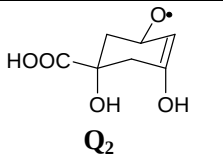
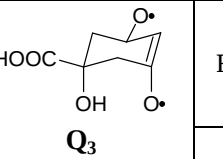
 Q₁	 Q₂	 Q₃	Fragments	R	Acide cinnamique	Masse exacte
			Q ₁			191,6
			Q ₂			173,04
			Q ₃			172,04
			Q ₄	OH	caféique	335,08
				OCH ₃	féruleique	349,08
			Q ₄			
			Q ₅			85,03
			Q ₆			111,04
			Q ₇			127,04
			A ₁	OH	caféique	179,04
			A ₂	OCH ₃	féruleique	193,04
			A ₃	H	<i>p</i> -coumarique	163,04
			B ₁	OH	caféique	135,04
			B ₂	OCH ₃	féruleique	149,04
			B ₃	H	<i>p</i> -coumarique	119,04
			C		féruleique	134,04

Figure I-21 : Structure des fragments dérivés de l'acide quinique et des acides cinnamiques

Le spectre de fragmentation du A 1-CQ est presque identique à celui du A 5-CQ. Ils peuvent être cependant différenciés selon leur ordre d'élution en phase inverse (Clifford *et al.* 2005), ou par comparaison avec des témoins commerciaux ou synthétiques clairement identifiés (la synthèse du A 1-CQ est possible par hydrolyse partielle du A 1,3-diCQ) (Clifford *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007).

II. 4. 2. 2. 2. Dérivés diacylés

Il s'agit toujours ici d'études réalisées par l'équipe de Clifford. En 2003.

Position 1 libre : Comme dans le cas des dérivés monoacylés, la substitution en position 4 est caractérisée par la présence d'un pic de base à m/z 173 en MS^3 . Cet ion n'est pas détectable dans la fragmentation du A 3,5-diCQ, qui conduit par contre au fragment majoritaire Q_1 (m/z 191) en MS^3 , ainsi qu'aux fragments secondaires à m/z 85 (Q_5), 127 (Q_7) et 172 (Q_3), précédemment observé pour les 3-et 5-ACQ.

Afin de différencier les acides 3,4 du 4,5 dicaféoylquinique, on peut mesurer l'intensité relative du fragment Q_4 (m/z 335) en MS^2 . Ce fragment est en effet nettement plus intense dans le cas du A 3,4-diCQ (16% contre moins de 5% pour le A 4,5-diCQ). De plus, le A 3,4-diCQ produit les fragments Q_1 (m/z 191) en MS^3 et Q_6 (m/z 111) en MS^4 , dans des proportions deux fois plus grandes par rapport au composé A 4,5-diCQ (Clifford *et al.* 2003).

Cas des dérivés 1,x-diacylés : Si les molécules sont déjà acylées en position 1, il reste 3 possibilités pour une deuxième acylation : en position 3, 4 ou 5. Comme pour les dérivés monoacylés, le A 1,4-diCQ est différenciable du A 1,3-diCQ et A 1,5-diCQ par la présence d'un pic de base à m/z 173 en MS^3 . Les composés A 1,3-diCQ et A 1,5-diCQ se distinguent par l'intensité relative du fragment Q_4 en MS^2 (m/z 335), voisine de 35 % pour le A 1,3-diCQ et de 7% pour le A 1,5-diCQ (Clifford *et al.* 2005).

Cas des diacylés mixtes : les dérivés diacylés mixtes sont des esters d'acide quinique comportant deux groupements esters avec deux acides cinnamiques différents. Un exemple de détermination structurale de ces molécules est donné par Clifford avec les acides caféoylféruoylquinique (Clifford *et al.* 2003), mais en raison de l'absence de ce type de composé dans notre étude, leur analyse structurale ne sera pas détaillée ici.

Malgré les avancées de la spectrométrie de masse au cours des dernières années, cette technique n'est souvent pas suffisante pour identifier de nouvelles structures de composés phénoliques. Elle constitue cependant un préalable indispensable aux techniques de RMN mono et bidimensionnelles.

Tableau I-7 : Déplacements chimiques des protons H-2' et -6' en fonction du type de flavonoïdes

Flavonoïdes oxygénés en 4'	H-2',-6' (δ, ppm)
Flavanones	7.1-7.3
Dihydroflavonols	7.2-7.4
Isoflavones	7.2-7.5
Chalcones	7.4-7.6
Aurones	7.6-7.8
Flavones	7.7-7.9
Flavonols	7.9-8.1

Tableau I-8 : Déplacements chimiques des différents types de protons présents dans les flavonoïdes

¹ H	δ en ppm
5-OH	12-14
cycle B	6.5-8.1
cycle A	5.7-6.9
H-4 anthocyanes	6.0-8.0
H-2 isoflavones	7.5-8
H-3 flavones	6.3 environ
H-2 flavanones	5.0-6
H-3 flavanones	2.5-3
protons anomériques des sucres	4-6
autres protons des sucres	3-4
méthoxyles	3.5-4
CH ₃ du rhamnose	0.85 environ

II. 4. 3. RMN

II. 4. 3. 1. Flavonoïdes

En général, le cycle A des flavonoïdes est hydroxylé en position 5 et 7. Les protons H-6 et H-8 apparaissent sous forme de doublets ($J = 2.5\text{Hz}$) entre 5.7 et 6.5 ppm. Le signal du H-8 est toujours légèrement plus déblindé que celui du H-6. La présence d'une glycosylation en position 7 déplace les deux signaux d'environ + 0.2 ppm. Dans le DMSO, le déplacement chimique du proton d'une fonction hydroxyle en 5 se situe entre 12 et 14 ppm, ce fort déblindage étant dû à la une liaison hydrogène contractée avec la fonction carbonyle en position 4.

Les protons du cycle B présentent habituellement des déplacements chimiques entre 6.5 et 8.1 ppm. Ces signaux peuvent apporter des informations sur le degré d'oxygénation des cycles B et C. Si le cycle B est oxygéné uniquement en position 4', on observera alors deux doublets ($J = 8.5\text{Hz}$). Le doublet des protons équivalents H-3' et H-5' est toujours plus blindé (déplacement chimique compris entre 6.5 et 7.1 ppm) que celui des protons H-2' et H-6', quelque soit le type de flavonoïde. Par contre, le déplacement chimique du doublet associé aux H-2' et H-6' dépend du degré d'oxydation du cycle C (Tableau I-7). Le spectre de RMN des flavonoïdes oxygénés en position 3' et 4' est plus complexe car le cycle B comporte alors trois protons non-équivalents. Pour les flavones et flavonols, le H-5' apparait sous forme de doublet ($J = 8.5\text{Hz}$) entre 6.7 et 7.1 ppm, le H-6' sous forme de doublet dédoublé ($J = 2.5$ et 8.5 Hz) et le H-2' sous forme de doublet ($J = 2.5\text{ Hz}$). Ces deux derniers ont souvent des déplacements chimiques proches voire identiques, entre 7.2 et 7.9 ppm. Dans le cas des flavonoïdes trihydroxylés sur le cycle B, les protons H-2' et H-6' sont magnétiquement équivalents. Il en résulte un unique singulet entre 6.5 et 7.5 ppm (Mabry *et al.* 1970; Agrawal and Markham 1989).

Certains déplacements chimiques sont caractéristiques du type de flavonoïde étudié (Tableau I-8). Par exemple, le proton H-2 d'une isoflavone apparait sous forme de singulet entre 7.5 et 8.0 ppm, alors que le proton H-3 d'une flavone est en général plus blindé (environ 6.3 ppm). Le spectre de RMN- ^1H des flavanones montre, des signaux caractéristiques résultant des interactions entre H-2, H-3_{trans} et H-3_{cis}. Le proton H-2 apparait comme un doublet dédoublé entre 5 et 6 ppm et les deux protons en position 3 apparaissent sous la forme d'un multiplet entre 2.5 et 3 ppm. La situation des dihydroflavonols est plus simple puisque seuls deux hydrogènes sont présents sur ces positions, chacun apparaissant sous la forme d'un doublet : H-2 à environ 5.2 ppm et H-3 à environ 4.2 ppm. Les protons des cycles A et B des

Tableau I-9 : Déplacements chimiques des différents types de carbones présents dans les flavonoïdes d'après (Harborne 1988)

¹³ C	δ (ppm)
carbonyle	210-170
aromatique	
oxygéné	165-155 (sans oxygénation en <i>o/p</i>) 150-130 avec oxygénation en <i>o/p</i> ; environ 135 pour C-3-OH
non oxygéné	144-135 C-4 anthocyanes 135-125 (sans oxygénation en <i>o/p</i>) 129-90 avec oxygénation en <i>o/p</i> ; 110-102 pour C-3
aliphatique	
oxygéné (sucre)	105-55
non oxygéné (C-2, 3 flavanones)	80-40 (épicatéchine C-4,28 ppm)
Méthylènedioxy	environ 100
O-CH ₃ aromatique	55-60 (59-64 pour les <i>orthodisubstitués</i>)
C-CH ₃ aromatique CO-CH ₃	environ 20
C-CH ₃ aliphatique	environ 17

Tableau I-10 : Déplacements chimiques des carbones du cycle C des différents types de flavonoïdes (Harborne 1988)

Type aglycone	C-2	C-3	>C=O
Chalcones	136.9-145.4 (C α)	116.6-128(C β)	188.6-194
Flavanones	75.0-80.3	42.8-44.6	189.5-195.5
Flavones	160.5-165	103-111.8	176.3-184
Flavonols	145-150	136-139	172-177
Isoflavones	149.8-155.4	122.3-125.9	174.5-181
Aurones	146.1-147.7	111.6-111.9(=CH-)	182.5-182.7
Anthocyanes	155-168	136-158	135-144

aurones présentent des déplacements chimiques similaires à ceux des autres flavonoïdes. La seule différence provient du proton =C-H, résonnant entre 6.4 et 6.9 ppm. Sur le spectre de RMN-¹H des chalcones, les protons α et β de la double liaison apparaissent sous forme de doublets ($J = 14-17$ Hz), respectivement entre 6.7 - 7.4 et 7.3 - 7.7 ppm.

La RMN du proton est aussi très utile dans la détermination des structures de flavonoïdes glycosylés. Par exemple, le proton anomérique du glucose a un déplacement chimique (environ 5.85 ppm) bien différent de celui du rhamnose (environ 4.2 ppm). De plus, la configuration relative du carbone C-1'' du sucre peut être déterminée par la mesure du couplage entre les deux protons H-1'' et H-2''. Dans le cas du β -glucose, H-1'' et H-2'' sont orientés de façon axiale ($J = 6$ Hz), alors que pour les α -glucosides, le proton H-1'' est orienté de façon équatoriale et sa constante de couplage avec le proton H-2'' est par conséquent plus faible. Pour les dérivés de rhamnose, on observe un singulet à 0.85 ppm intégrant pour 3 protons, caractéristique du CH₃ en position 6.

Le spectre de RMN-¹³C des flavonoïdes peut aussi être utile dans leur détermination structurale, le Tableau I-9 résume les différents δ_C observés chez les flavonoïdes.

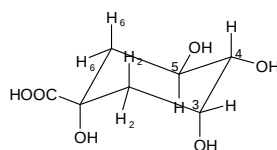
Les différents types d'aglycones ne sont pas distinguables sur la base des déplacements chimiques des carbones aromatiques des cycles A et B, par contre les déplacements chimiques des 3 carbones du cycle C sont souvent distinctifs. Le Tableau I-10 résume les déplacements chimiques de ces 3 carbones pour les différents types d'aglycones.

II. 4. 3. 2. Dérivés d'acides cinnamiques, esters de l'acide quinique

Le spectre de RMN-¹H des acides phénoliques de type acide cinnamique, est, la somme des spectres de l'acide quinique (**94**) et de l'acide cinnamique [*p*-coumarique (**91**), caféique (**92**), ou férulique (**93**)].

Les deux méthylènes de l'acide quinique (**94**) présentent un déplacement chimique situé entre 1.8 et 2.6 ppm. Ils apparaissent souvent sous forme de multiplets. Les signaux correspondant aux H-3, H-4 et H-5 étant généralement mieux résolus, leur attribution peut se faire grâce à leurs constantes de couplage. En effet, celles-ci dépendent de l'angle de liaison entre les protons voisins. Par exemple, la constante de couplage $J_{4,5}$ entre le proton H-4 (axial) et le proton H-5 (axial) sera plus élevée que $J_{3,4}$ (axial-équatorial) (Morishita *et al.* 1984). Les déplacements chimiques de ces protons (compris entre 3.2 et 5.6 ppm) sont directement liés à la substitution des groupements hydroxyles et dépendent donc de la position du ou des acides cinnamiques sur l'acide quinique, les protons des carbones portant les liaisons esters étant les plus déblindés (Corse *et al.* 1962; Pauli *et al.* 1998).

La partie acide cinnamique est reconnaissable par les deux signaux de la double liaison *trans* qui ont des constantes de couplage caractéristiques comprises entre 15 et 17 Hz. Leurs déplacements chimiques varient de 6.1 à 6.4 ppm pour H-8 et de 7.4 à 7.7 ppm pour H-7. Le nombre et l'appartenance des autres signaux aromatiques dépendent du type d'acide cinnamique. Deux doublets, intégrant chacun pour deux protons, sont observés dans le cas d'un acide *p*-coumarique et un système ABX dans le cas des acides caféique et férulique. Un singulet correspondant à un méthoxyle est observé dans le cas de l'acide férulique vers 4 ppm.



Forme chaise de l'acide quinique (**94**)

Bibliographie

Abad-Garcia B., Garmon-Lobato S., Berrueta L., Gallo B. and Vicente F. (2009). "Practical guidelines for characterization of O-diglycosyl flavonoid isomers by triple quadrupole MS and their applications for identification of some fruit juices flavonoids." Journal of Mass Spectrometry **44**: 1017–1025.

Ablondi F., Gordon S., Morton II J. and Williams J. H. (1952). "An antimalarial alkaloid from *Hydrangea*. II. Isolation." Journal of Organic Chemistry **17**(1): 14-18.

Agrawal P. K. and Markham K. R. (1989). Carbon-13 NMR of Flavonoids. Amsterdam, Elsevier.

Akiyama T., Shibuya M., Liu H.-M. and Ebizuka Y. (1999). "p-Coumaroyltriacytic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from *Hydrangea macrophylla* var. "thunbergii"." European Journal of Biochemistry **263**(3): 834-839.

Allen R. C. (1931). "Factors influencing the color of *Hydrangea*." Proceedings of the American Society for Horticultural Science **28**: 410-412.

Allen R. C. (1943). "Influence of aluminum on the flower color of *Hydrangea macrophylla* DC." Boyce Thompson Institute **13**: 221-242.

Asen S., Cathey H. and Stuart N. (1960). "Enhancement of Gibberellin Growth-Promoting Activity by Hydrangenol Isolated from Leaves of *Hydrangea Macrophylla*." Plant Physiology **35**(6): 816-819.

Asen S. and Siegelman H. W. (1957). "Effect of aluminum on absorption spectra of the anthocyanin and flavonols from sepals of *Hydrangea macrophylla* var. Merveille." Proceedings of the American Society for Horticultural Science **70**: 478–481.

Asen S., Siegelman H. W. and Stuart N. W. (1957). "Anthocyanin and other phenolic compounds in red and blue sepals of *Hydrangea Macrophylla* var. Merveille." Proceedings of the American Society for Horticultural Science **69**: 561–569.

Asen S., Stewart R. N. and Norris K. H. (1972). "Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color." Phytochemistry **11**(3): 1139-1144.

Baranac J. M., Petranovic N. A. and Dimitric-Markovic J. M. (1996). "Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(5): 1333-1336.

Barber M. (1982). "Fast atom bombardment mass spectrometry." Analytical Chemistry **54**(4).

Baudry A., Heim M. A., Dubreucq B., Caboche M., Weisshaar B. and Lepiniec L. (2004). "TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal **39**(3): 366-380.

Beckey H. D. and Shulten H.-R. (1975). "Field desorption mass spectrometry." Angewandte Chemie (International Edition in English) **14**: 403-415.

Becue I. (1999). Mise en fonctionnement du reseau de ressources génétiques de l'*Hydrangea*. Mémoire de fin d'études ENSH-ENITHP: 58 p.

Bertrand H., Becue I. and Relion D. (2007). Ressources génétiques du genre Hydrangea Paris, France, Ed. BRG.

Bertrand H. and Lambert C. (2002). Le genre *Hydrangea*. Hydrangea : acquisitions nouvelles et applications. INRA Editions. Paris: 1-55.

Bloor S. J. (1997). "Blue flower colour derived from flavonol-anthocyanin co-pigmentation in *Ceanothus papillosus*." Phytochemistry **45**(7): 1399-1405.

Bloor S. J. and Falshaw R. (2000). "Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue *Agapanthus* flowers." Phytochemistry **53**(5): 575-579.

Bohm B. A. (1998). Introduction to Flavonoids. Amsterdam, Harwood Academic.

Bohm B. A., Nicholls K. W. and Bhat U. G. (1985). "Flavonoids of the *Hydrangeaceae Dumortier*." Biochemical Systematics and Ecology **13**(4): 441-445.

Bokern M., Witte L., Wray V., Nimtz M. and Meurer-Grimes B. (1995). "Trisubstituted hydroxycinnamic acid spermidines from *Quercus dentata* pollen." Phytochemistry **39**(6): 1371-1375.

Borevitz J. O., Xia Y., Blount J., Dixon R. A. and Lamb C. (2000). "Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis." The Plant Cell Online **12**(12): 2383-2394.

Brouillard R. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. Anthocyanins as Food Colors. Pericles Markakis, Academic Press: 1-6.

Bruneton J. (2010). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Paris, DOC et TEC.

Cacig S., Radu F., Lupea A. X. and Ifrim I. (2006). "Analysis of flavonoids in *Hydrangea paniculata* and *Ziziphus jujuba* extracts using flash chromatography and HPLC." Revista De Chimie **57**(12): 1197-1201.

Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M. d. L., Páez-Hernández M. E., Rodríguez J. A. and Galán-Vidal C. A. (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." Food Chemistry **113**(4): 859-871.

Cerbah M., Mortreau E., Brown S., Siljak-Yakovlev S., Bertrand H. and Lambert C. (2001). "Genome size variation and species relationships in the genus *Hydrangea*." TAG Theoretical and Applied Genetics **103**(1): 45-51.

Chenery E. M. (1937). "The problem of the blue *Hydrangea*." Journal of the Royal Horticultural Society **62**: 320-604.

Chun W. Y. (1954). "A census and preliminary study of the Chinese Hydrangeoideae." Acta Phytotaxonomica Sinica **2**: 10-203.

Clifford M. N., Johnston K. L., Knight S. and Kuhnert N. (2003). "Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(10): 2900-2911.

Clifford M. N., Knight S. and Kuhnert N. (2005). "Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(10): 3821-3832.

Constant H. L., Slowing K., Graham J. G., Pezzuto J. M., Cordell G. A. and Beecher C. W. W. (1997). "A general method for the dereplication of flavonoid glycosides utilizing high performance liquid chromatography/mass spectrometric analysis." Phytochemical Analysis **8**(4): 176-180.

Corse J., Sondheimer E. and Lundin R. (1962). "3-feruloylquinic acid. A 3'-methyl ether of chlorogenic acid." Tetrahedron **18**(11): 1207-1210.

Couch J. F. and Naghski J. (1945). "Isolation of rutin from *Hydrangea paniculata*, var. *Grandiflora sieb.*" Journal of the American Chemical Society **67**(8): 1419.

Cultrone A., Cotroneo P. S. and Recupero G. R. (2009). "Cloning and molecular characterization of R2R3-MYB and bHLH-MYC transcription factors from *Citrus sinensis*." Tree Genetics & Genomes **6**(1): 101-112.

Cuyckens F. and Claeys M. (2004). "Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids." Journal of Mass Spectrometry **39**(1): 1-15.

Cuyckens F. and Claeys M. (2005). "Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules." Journal of Mass Spectrometry **40**(3): 364-372.

Cuyckens F., Ma Y., Pocsfalvi G. and Claeys M. (2000). "Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides." Analisis **28**: 888.

Cuyckens F., Rozenberg R., De Hoffmann E. and Claeys M. (2001). "Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **36**(11): 1203-1210.

Da Silva P. F., Lima J. C., Freitas A. A., Shimizu K., Maçanita A. L. and Quina F. H. (2005). "Charge-Transfer Complexation as a General Phenomenon in the Copigmentation of Anthocyanins." Journal of Physical Chemistry A **109**: 7329-7338.

Davies K. M. and Schwinn K. E. (2007). Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications. O.M. Andersen, Markham, K.R. (Eds.), Taylor and Francis Group, Boca Raton 143-218.

Davies K. M., Schwinn K. E., Deroles S. C., Manson D. G., Lewis D. H., Bloor S. J. and Bradley J. M. (2003). "Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase." Euphytica **131**(3): 259-268.

de Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C. and Brinkman U. A. T. (2006). "Analytical separation and detection methods for flavonoids." Journal of Chromatography A **1112**(1-2): 31-63.

de Rijke E., Zappey H., Ariese F., Gooijer C. and Brinkman U. A. T. (2003). "Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments." Journal of Chromatography A **984**(1): 45-58.

de Vetten N., Quattrocchio F., Mol J. and Koes R. (1997). "The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals." Genes & Development **11**(11): 1422-1434.

Deluc L., Barrieu F., Marchive C., Lauvergeat V., Decendit A., Richard T., Carde J.-P., Merillon J.-M. and Hamdi S. (2006). "Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway." Plant Physiology **140**(2): 499-511.

Deluc L., Bogs J., Walker A. R., Ferrier T., Decendit A., Merillon J. M., Robinson S. P. and Barrieu F. (2008). "The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries." Plant Physiology **147**(4): 2041-2053.

Demilly D., Lambert C. and Bertrand H. (2000). "Diversity of nuclear DNA contents of *Hydrangea*. Poster, 19th International Symposium Eucarpia : improvement of ornamental plants, Angers 26-29 juillet 1998." Acta Horticulturae(508): 281-284.

Dimitric Markovic J. M., Baranac J. M. and Brdaric T. P. (2005). "Electronic and infrared vibrational analysis of cyanidin-quercetin copigment complex." Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy **62**(1-3): 673-680.

Dimitric Markovic J. M. D., Petranovic N. A. and Baranac J. M. (2000). "A Spectrophotometric Study of the Copigmentation of Malvin with Caffeic and Ferulic Acids." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(11): 5530-5536.

Domon B. and Costello C. E. (1988). "A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates." Glycoconjugate Journal **5**(4): 397-409.

Espley R. V., Hellens R. P., Putterill J., Stevenson D. E., Kutty-Amma S. and Allan A. C. (2007). "Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10." Plant Journal **49**(3): 414-427.

Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E. and Quetin-Leclercq J. (2001). "Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **12**(6): 707-715.

Fellenberg C., Böttcher C. and Vogt T. (2009). "Phenylpropanoid polyamine conjugate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* flower buds." Phytochemistry **70**(11-12): 1392-1400.

Ferreres F., Llorach R. and Gil-Izquierdo A. (2004). "Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **39**(3): 312-321.

Figueiredo P., Elhabiri M., Toki K., Saito N., Dangles O. and Brouillard R. (1996). "New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss?" Phytochemistry **41**(1): 301-308.

Fossen T., Rayyan S., Holmberg M. H., Nimtz M. and Andersen Ø. M. (2007). "Covalent anthocyanin-flavone dimer from leaves of *Oxalis triangularis*." Phytochemistry **68**(5): 652-662.

Fossen T., Slimestad R., Øvstedal D. O. and Andersen Ø. M. (2000). "Covalent anthocyanin-flavonol complexes from flowers of chive, *Allium schoenoprasum*." Phytochemistry **54**(3): 317-323.

Fowler Z. and Koffas M. (2009). "Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives." Applied Microbiology and Biotechnology **83**(5): 799-808.

Giusti M. M., Rodriguez-Saona L. E., Griffin D. and Wrolstad R. E. (1999). "Electrospray and Tandem Mass Spectroscopy As Tools for Anthocyanin Characterization." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(11): 4657-4664.

Gomez-Miguez M., Gonzalez-Manzano S., Escribano-Bailon M. T., Heredia F. J. and Santos-Buelga C. (2006). "Influence of Different Phenolic Copigments on the Color of Malvidin 3-Glucoside." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(15): 5422-5429.

Gomez C., Terrier N., Torregrosa L., Vialet S., Fournier-Level A., VerriÃ's C., Souquet J.-M., Mazauric J.-P., Klein M., Cheynier V. r. and Ageorges A. s. (2009). "Grapevine MATE-Type Proteins Act as Vacuolar H⁺-Dependent Acylated Anthocyanin Transporters." Plant Physiology **150**(1): 402-415.

González-Manzano S., Santos-Buelga C., Dueñas M., Rivas-Gonzalo J. and Escribano-Bailón T. (2008). "Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins." European Food Research and Technology **226**(3): 483-490.

Goto T. and Kondo T. (1991). "Structure and molecular stacking of anthocyanins - Flower color variation." Angewandte Chemie (International Edition in English) **30**(1): 17-33.

Goto T., Tamura H., Kawai T., Hoshino T., Harada N. and Kondo T. (1986). "Chemistry of Metalloanthocyanins." Annals of the New York Academy of Sciences **471**(International Symposium on Bioorganic Chemistry): 155-173.

Grotewold E. (2005). "Plant metabolic diversity: a regulatory perspective." Trends in Plant Science **10**(2): 57-62.

Grotewold E. (2006). "The genetics and biochemistry of floral pigments." Annual Review of Plant Biology **57**: 761-780.

Guérin V. (2002). Planche 1 figure 1.1: Répartition géographique des principales espèces du genre *Hydrangea* sur les différents continents *Hydrangea : acquisitions nouvelles et applications*. Paris, INRA Editions.

Hamama L., Voisine L., Peltier D. and Boccon-Gibod J. (2011). "Shoot regeneration and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* of *Hydrangea macrophylla* Ser. leaf discs." Scientia Horticulturae **127**(3): 378-387.

Harborne J. B. (1988). The Flavonoids, Advances in Research since 1986. London, Chapman and Hall.

Harborne J. B. and Williams C. A. (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." Phytochemistry **55**: 481-504.

Hartmann U., Sagasser M., Mehrrens F., Stracke R. and Weisshaar B. (2005). "Differential combinatorial interactions of *cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes." Plant Molecular Biology **57**(2): 155-171.

Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F. and Munné-Bosch S. (2009). "How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?" Trends in Plant Science **14**(3): 125-132.

Herrmann K. (1995). "The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism." Plant Physiology **107**(1): 7-12.

Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B. and Legrand M. (2004). "Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis." Plant Cell **16**(6): 1446-1465.

Hollman P. and Arts I. (2000). "Flavonols, flavones and flavanols: nature, occurrence and dietary burden." Journal of the Science of Food and Agriculture **80**(7): 1081-1093.

Honda T. and Saito N. (2002). "Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigments." Heterocycles **56**(1-2): 633-692.

Hoshino T., Matsumoto U. and Goto T. (1980). "The stabilizing effect of the acyl group on the co-pigmentation of acylated anthocyanins with C-glucosylflavones." Phytochemistry **19**(4): 663-667.

Hoshino T., Matsumoto U. and Goto T. (1981). "Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution." Phytochemistry **20**(8): 1971-1976.

Hughes R. J., Croley T. R., Metcalfe C. D. and March R. E. (2001). "A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids." International Journal of Mass Spectrometry **210-211**: 371-385.

Hunt D. F. (1977). "Chemical Ionization Mass Spectrometry of Salts and Thermally Labile Organics with Field Desorption Emitters as Solids Probes." Analytical Chemistry **49**(8): 1160-1163.

Hvattum E. and Ekeberg D. (2003). "Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **38**(1): 43-49.

Inouye H., Takeda Y., Uesato S., Uobe K., Hashimoto T. and Shingu T. (1980). "A novel type secoiridoid glucoside, hydrangenoside a from *Hydrangea macrophylla*." Tetrahedron Letters **21**(11): 1059-1062.

Ishih A., Miyase T., Ohori K. and Terada M. (2003). "Different responses of three rodent Plasmodia species, *Plasmodium yoelii* 17XL, *P. berghei* NK65 and *P. chabaudi* AS on treatment with febrifugine and isofebrifugine mixture from *Hydrangea macrophylla* var. *Otaksa* leaf in ICR mice." Phytotherapy Research **17**(6): 650-656.

Ishih A., Miyase T., Suzuki T., Muregi F. and Terada M. (2007). "Seasonal variation in the content of a febrifugine and isofebrifugine alkaloid mixture in aerial parts of *Hydrangea macrophylla* var. *Otaksa*, with special reference to its antimalarial activity." Journal of Natural Medicines **61**(2): 213-216.

Ishih A., Miyase T. and Terada M. (2003). "Comparison of antimalarial activity of the alkaloidal fraction of *Hydrangea macrophylla* var. *Otaksa* leaves with the hot-water extract in ICR mice infected with *Plasmodium yoelii* 17 XL." Phytotherapy Research **17**(6): 633-639.

Ishih A., Nagata T., Kobayashi F., Miyase T. and Terada M. (2004). "Cytokine and antibody production during the course of resolution in *Plasmodium yoelii* 17XL-infected BALB/c mice treated with febrifugine and isofebrifugine mixture from leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *Otaksa*." Parasitology Research **94**(3): 176-182.

Ito D., Shinkai Y., Kato Y., Kondo T. and Yoshida K. (2009). "Chemical Studies on Different Color Development in Blue-and Red-Colored Sepal Cells of *Hydrangea macrophylla*." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **73**(5): 1054-1059.

Iwatsuki K., Yamazaki T., Boufford D. and Ohba H. (2001). Flora of Japan. Kodansha, Tokyo.

Justesen U. (2001). "Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **36**(2): 169-178.

Khalil A. T., Chang F. R., Lee Y. H., Chen C. Y., Liaw C. C., Ramesh P., Yuan S. S. F. and Wu Y. C. (2003). "Chemical constituents from the *Hydrangea chinensis*." Archives of Pharmacal Research **26**(1): 15-20.

Kikuchi M., Kakuda R. and Yaoita Y. (2008). "Macropyllanosides A - D, Secoiridoid Glycosides from *Hydrangea Macrophylla* Subsp *Serrata*." Heterocycles **76**(1): 313-320.

Koes R., Verweij W. and Quattrocchio F. (2005). "Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways." Trends in Plant Science **10**(5): 236-242.

Kondo T., Toyama-Kato Y. and Yoshida K. (2005). "Essential structure of co-pigment for blue sepal-color development of *Hydrangea*." Tetrahedron Letters **46**(39): 6645-6649.

Kurume A., Kamata Y., Yamashita M., Wang Q., Matsuda H., Yoshikawa M., Kawasaki I. and Ohta S. (2008). "Synthesis of 3-Substituted Isocoumarins and Their Inhibitory Effects on Degranulation of RBL-2H3 Cells Induced by Antigen." Chemical & Pharmaceutical Bulletin **56**(9): 1264-1269.

Lee J. S., Kim D. H., Liu K.-H., Oh T. K. and Lee C. H. (2005). "Identification of flavonoids using liquid chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with an MS/MS library." Rapid Communications in Mass Spectrometry **19**(23): 3539-3548.

Lhuillier A., Fabre N., Moyano F., Martins N., Claparols C., Fourasté I. and Moulis C. (2007). "Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (*Ericaceae*) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1160**(1): 13-20.

Lin S. and Mullin C. (1999). "Lipid, polyamide, and flavonol phagostimulants for adult western corn rootworm from sunflower (*Helianthus annuus* L.) pollen." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(3): 1223-1229.

Ludwig S. R., Habera L. F., Dellaporta S. L. and Wessler S. R. (1989). "Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region." Proceedings of the National Academy of Sciences **86**(18): 7092-7096.

Luo J., Butelli E., Hill L., Parr A., Niggeweg R., Bailey P., Weisshaar B. and Martin C. (2008). "AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol." Plant Journal **56**(2): 316-326.

Luo J., Fuell C., Parr A., Hill L., Bailey P., Elliott K., Fairhurst S. A., Martin C. and Michael A. J. (2009). "A Novel Polyamine Acyltransferase Responsible for the Accumulation of Spermidine Conjugates in Arabidopsis Seed." Plant Cell **21**(1): 318-333.

Lupea A. X., Pop M. and Cacig S. (2008). "Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids from Ziziphus and Hydrangea extracts." Revista De Chimie **59**(3): 309-313.

Ma Y.-L., Vedernikova I., Van den Heuvel H. and Claeys M. (2000). "Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **11**(2): 136-144.

Ma Y., Cuyckens F., Heuvel H. and Claeys M. (2001). "Mass spectrometric methods for the characterisation and differentiation of isomeric-O-diglycosyl flavonoids." Phytochemical Analysis **12**(3): 159-165.

Ma Y. L., Li Q. M., Van den Heuvel H. and Claeys M. (1997). "Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **11**(12): 1357-1364.

Mabry T. J., Markham K. R. and Thomas M. B. (1970). the Systematic Identification of Flavonoids. Berlin-Heidelberg-New York.

March R. and Brodbelt J. (2008). "Analysis of flavonoids: Tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR." Journal of Mass Spectrometry **43**(12).

Markham K. R., Mitchell K. A. and Boase M. R. (1997). "Malvidin-3-O-glucoside-5-O-(6-acetylglucoside) and its colour manifestation in 'Johnson's Blue' and other 'Blue' geraniums." Phytochemistry **45**(2): 417-423.

Martens S., Forkmann G., Matern U. and Lukacin R. (2001). "Cloning of parsley flavone synthase I." Phytochemistry **58**(1): 43-46.

Martens S. and Mithofer A. (2005). "Flavones and flavone synthases." Phytochemistry **66**(20): 2399-2407.

Martens S., Preuß A. and Matern U. (2010). "Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L." Phytochemistry **71**(10): 1040-1049.

Martin C., Prescott A., Mackay S., Bartlett J. and Vrijlandt E. (1991). "Control of Anthocyanin Biosynthesis in Flowers of *Antirrhinum-Majus*." Plant Journal **1**(1): 37-49.

Mathews H., Clendennen S. K., Caldwell C. G., Liu X. L., Connors K., Matheis N., Schuster D. K., Menasco D. J., Wagoner W., Lightner J. and Wagner D. R. (2003).

"Activation Tagging in Tomato Identifies a Transcriptional Regulator of Anthocyanin Biosynthesis, Modification, and Transport." The Plant Cell Online **15**(8): 1689-1703.

McClintock E. (1957). "A monograph of the genus *Hydrangea*." Proceedings of the California Academy of Science **29**: 147–255.

Mehrtens F., Kranz H., Bednarek P. and Weisshaar B. (2005). "The Arabidopsis Transcription Factor MYB12 Is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis." Plant Physiology **138**(2): 1083-1096.

Meurer B., Wray V., Grotjahn L., Wiermann R. and Strack D. (1986). "Hydroxycinnamic acid spermidine amides from pollen of *corylus avellana* L." Phytochemistry **25**(2): 433-435.

Meurer B., Wray V., Wiermann R. and Strack D. (1988). "Hydroxycinnamic acid-spermidine amides from pollen of *Alnus glutinosa*, *Betula verrucosa* and *Pterocarya fraxinifolia*." Phytochemistry **27**(3): 839-843.

Mol J., Grotewold E. and Koes R. (1998). "How genes paint flowers and seeds." Trends in Plant Science **3**(6): 212-217.

Momonoi K., Yoshida K., Mano S., Takahashi H., Nakamori C., Shoji K., Nitta A. and Nishimura M. (2009). "A vacuolar iron transporter in tulip, TgVit1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation." The Plant Journal **59**(3): 437-447.

Morishita H., Iwahashi H., Osaka N. and Kido R. (1984). "Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry." Journal of Chromatography A **315**(C): 253-260.

Mortreau E. (2003). Etude de la variabilité génétique et de l'organisation génomique au sein d'une collection de ressources génétiques du genre *Hydrangea*. Biologie et Agronomie. Rennes, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.

Mortreau E., Bertrand H. and Lambert C. (2003). "Collection of *Hydrangea*: Genetic resources characterisation." Acta Horticulturae **623**: 231-238.

Mortreau E., Lambert C., Relion D., Demilly D., Cerbah M. and Bertrand H. (2003). Evaluation des ressources génétiques du genre *Hydrangea*. Actes du colloque AFCEV de Troyes « La biodiversité végétale- Des plantes pour l'avenir », 13-15 novembre 2003.

Mortreau E., Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., Brown S. C., Bertrand H. and Lambert C. (2010). "Cytogenetic characterization of *Hydrangea involucrata* Sieb. and *H. aspera* D. Don complex (Hydrangeaceae): genetic, evolutionary, and taxonomic implications." Tree Genetics & Genomes **6**(1): 137-148.

Murakami N., Mostaqul H. M., Tamura S., Itagaki S., Horiib T. and Kobayashia M. (2001). "New Anti-Malarial Flavonol Glycoside from *Hydrangeae Dulcis Folium*." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **11**: 2445-2447.

Nakamura S., Wang Z., Xu F., Matsuda H., Wu L. and Yoshikawa M. (2009). "The absolute stereostructures of cyanogenic glycosides, hydracyanosides A, B, and C, from the leaves and stems of *Hydrangea macrophylla*." Tetrahedron Letters **50**(32): 4639-4642.

Nakatsuka T., Haruta K. S., Pitaksutheepong C., Abe Y., Kakizaki Y., Yamamoto K., Shimada N., Yamamura S. and Nishihara M. (2008). "Identification and Characterization of R2R3-MYB and bHLH Transcription Factors Regulating Anthocyanin Biosynthesis in Gentian Flowers." Plant and Cell Physiology **49**(12): 1818-1829.

Nakayama M., Okada M., Taya-Kizu M., Urashima O., Kan Y., Fukui Y. and Koshioka M. (2004). "Coloration and anthocyanin profile in tulip flowers." Japan Agricultural Research Quarterly **38**(3): 185-190.

Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M. and Lepiniec L. c. (2000). "The TT8 Gene Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Domain Protein Required for Expression of DFR and BAN Genes in Arabidopsis Siliques." The Plant Cell Online **12**(10): 1863-1878.

Nimtz M., Bokern M. and Meurer-Grimes B. (1996). "Minor hydroxycinnamic acid spermidines from pollen of *Quercus dentata*." Phytochemistry **43**(2): 487-489.

Oliveira M. C., Esperança P. and Almoester Ferreira M. A. (2001). "Characterisation of anthocyanidins by electrospray ionisation and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **15**(17): 1525-1532.

Owens D. K., Alerding A. B., Crosby K. C., Bandara A. B., Westwood J. H. and Winkel B. S. J. (2008). "Functional Analysis of a Predicted Flavonol Synthase Gene Family in Arabidopsis." Plant Physiology **147**(3): 1046-1061.

Patnam R., Chang F.-R., Chen C.-Y., Kuo R.-Y., Lee Y.-H. and Wu Y.-C. (2001). "Hydrachine A, a Novel Alkaloid from the Roots of *Hydrangea chinensis*." Journal of Natural Products **64**(7): 948-949.

Pauli G., Poetsch F. and Nahrstedt A. (1998). "Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques." Phytochemical Analysis **9**(4): 177-185.

Payne C. T., Zhang F. and Lloyd A. M. (2000). "GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1." Genetics **156**(3): 1349-1362.

Paz A., J, Ghosal, D, Wienand, U, Peterson, P A., Saedler and H (1987). The regulatory cl locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. London, ROYAUME-UNI, Nature Publishing Group.

Pelletier M. K., Murrell J. R. and Shirley B. W. (1997). "Characterization of Flavonol Synthase and Leucoanthocyanidin Dioxygenase Genes in Arabidopsis (Further Evidence for Differential Regulation of "Early" and "Late" Genes)." Plant Physiology **113**(4): 1437-1445.

Plazoni A., Bucar F., Maleš Ž., Mornar A., Nigovi B. and Kujundži N. (2009). "Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry." Molecules **14**: 2466-2490.

Prasain J. K., Wang C.-C. and Barnes S. (2004). "Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples." Free Radical Biology & Medicine **37**(9): 1324-1350.

Quattrocchio F., Wing J. F., Leppen H. T. C., Mol J. N. M. and Koes R. E. (1993). "Regulatory Genes Controlling Anthocyanin Pigmentation Are Functionally Conserved among Plant Species and Have Distinct Sets of Target Genes." The Plant Cell Online **5**(11): 1497-1512.

Quattrocchio F., Wing J. F., Va K., De, Woude, Mol J. N. M. and Koes R. (1998). "Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes." The Plant Journal **13**(4): 475-488.

Quintana A., Albrechtová J., Griesbach R. J. and Freyre R. (2007). "Anatomical and biochemical studies of anthocyanidins in flowers of *Anagallis monelli* L. (*Primulaceae*) hybrids." Scientia Horticulturae **112**(4): 413-421.

Radicella J. P., Turks D. and Chandler V. L. (1991). "Cloning and nucleotide-sequence of a cDNA-encoding B-PERU, a regulatory protein of the anthocyanin pathway in maize." Plant Molecular Biology **17**(1): 127-130.

Rinehart T. A., Scheffler B. E. and Reed S. M. (2006). "Genetic diversity estimates for the genus *Hydrangea* and development of a molecular key based on SSR." Journal of the American Society for Horticultural Science **131**(6): 787-797.

Robbins R. J. (2003). "Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(10): 2866-2887.

Robinson G. M. and Robinson R. (1931). "A survey of anthocyanins. I." Biochemical Journal **25**(5): 1687-1690.

Rosenberg E. (2008). "Characterisation of historical organic dyestuffs by liquid chromatography–mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **391**(1): 33-57.

Routaboul J.-M., Kerhoas L., Debeaujon I., Pourcel L., Caboche M., Einhorn J. and Lepiniec L. (2006). "Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*." Planta **224**(1): 96-107.

Sakai H., Kakuda R., Yaoita Y. and Kikuchi M. (2007). "Secoiridoid glycosides from the leaves of *Hydrangea macrophylla* subsp. *serrata*." Journal of Natural Medicines **61**(2): 226-228.

Satterfield M. and Brodbelt J. S. (2001). "Structural characterization of flavonoid glycosides by collisionally activated dissociation of metal complexes." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **12**(5): 537-549.

Schreiber H. D., Swink A. M. and Godsey T. D. (2010). "The chemical mechanism for Al³⁺ complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals." Journal of Inorganic Biochemistry **104**(7): 732-739.

Shibata K., Shibata Y. and Kasiwagi I. (1919). "Studies on anthocyanins: Color variation in anthocyanins." Journal of the American Chemical Society **41**(2): 208-220.

Shirley B. W. (1996). "Flavonoid biosynthesis: `new' functions for an `old' pathway." Trends in Plant Science **1**(11): 377-382.

Shoji K., Miki N., Nakajima N., Momonoi K., Kato C. and Yoshida K. (2007). "Perianth bottom-specific blue color development in tulip cv. Murasakizuisho requires ferric ions." Plant and cell physiology **48**(2): 243.

Soltis D. E., Xiang Q. Y. and Hufford (1995). "Relationship and evolution of *Hydrangeaceae* based on rbcL sequence data." American Journal of Botany **82**: 504-514.

Stobiecki M. (2000). "Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides." Phytochemistry **54**(3): 237-256.

Strack D., Busch E. and Klein E. (1989). "Anthocyanin patterns in european orchids and their taxonomic and phylogenetic relevance." Phytochemistry **28**(8): 2127-2139.

Strack D. and Wray V. (1994). The Anthocyanins. The Flavonoids, Advances in Research since 1986. J. B. Harborne. London: 1-22.

Stracke R., Ishihara H., Huep G., Barsch A., Mehrtens F., Niehaus K. and Weisshaar B. (2007). "Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls

flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling." The Plant Journal **50**(4): 660-677.

Stracke R., Jahns O., Keck M., Tohge T., Niehaus K., Fernie A. R. and Weisshaar B. (2010). "Analysis of production of flavonol glycosides-dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation." New Phytologist **188**(4): 985-1000.

Subha V. and Sukumar D. (2007). "Phytochemical and pharmacological studies on *Hydrangea macrophylla*." Journal of the Indian Chemical Society **84**: 1026-1026.

Suzuki H., Ikeda T., Matsumoto T. and Noguchi M. (1977). "Isolation and identification of hydrangenol and umbelliferone from cultured cells of amacha (*Hydrangea macrophylla* seringe var. Thunbergii Makino)." Agricultural and Biological Chemistry **41**(1): 205-206.

Takatsu Y., Kasumi M., Marubashi W. and Iwashina T. (2008). "Anthocyanins of Gladiolus Cultivars and their Contribution to Flower Colors." Journal of the Japanese Society for Horticultural Science **77**(1): 80-87.

Takeda K., Kariuda M. and Itoi H. (1985). "Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*." Phytochemistry **24**(10): 2251-2254.

Takeda K., Kubota R. and Yagioka C. (1985). "Copigments in the blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*." Phytochemistry **24**(6): 1207-1209.

Tanaka M., Fujimori T., Uchida I., Yamaguchi S. and Takeda K. (2001). "A malonylated anthocyanin and flavonols in blue *Meconopsis* flowers." Phytochemistry **56**(4): 373-376.

Torskangerpoll K., Nørbæk R., Nodland E., Øvstedal D. O. and Andersen Ø. M. (2005). "Anthocyanin content of Tulipa species and cultivars and its impact on tepal colours." Biochemical Systematics and Ecology **33**(5): 499-510.

Toyama-Kato Y., Kondo T. and Yoshida K. (2007). "Synthesis of designed acylquinic acid derivatives involved in blue color development of hydrangea and their co-pigmentation effect." Heterocycles **72**: 239-254.

Toyama-Kato Y., Yoshida K. and al a. (2003). "Analysis of metal elements of *Hydrangea* sepals at various growing stages by ICP-AES." Biochemical Engineering Journal **14**: 237-241.

Treutter D. (2005). "Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis." Plant Biology **7**(6): 581-591.

Truchado P., Ferreres F. and Tomas-Barberan F. A. (2009). "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers." Journal of Chromatography A **1216**(43): 7241-7248.

Vogt T. (2010). "Phenylpropanoid Biosynthesis." Molecular Plant **3**(1): 2-20.

Weaver L. M. and Herrmann K. M. (1997). "Dynamics of the shikimate pathway in plants." Trends in Plant Science **2**(9): 346-351.

Wei C. and Bartholomew B. (2001). "Hydrangea. Flora of China." Beijing and Missouri Botanical Garden Press **8**: 145-157.

Werner C., Hu W., Lorenzi-Riatsch A. and Hesse M. (1995). "Di-coumaroylspermidines and tri-coumaroylspermidines in anthers of different species of the genus *Aphelandra*." Phytochemistry **40**(2): 461-465.

Willstätter R. and Everest A. E. (1913). "Über den Farbstoff der Kornblume." Justus Liebigs Annalen der Chemie **401**: 189-232.

Willstätter R. and Zollinger E. H. (1916). "XI. Über die farbstoffe der weintraube und der heidelbeere, II." Justus Liebigs Annalen der Chemie **412**: 195-216.

Winkel-Shirley B. (2001). "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology." Plant Physiology **126**(2): 485-493.

Winkel B. S. J. (2006). Biosynthesis of Flavonoid. The science of flavonoids. Erich Grotewold. Columbus, Ohio, USA, Springer: 71-95.

Wolfender J.-L., Maillard M., Marston A. and Hostettmann K. (1992). "Mass spectrometry of underivatized naturally occurring glycosides." Phytochemical Analysis **3**(5): 193-214.

Wolfender J., Waridel P., Ndjoko K., Hobby K., Major H. and Hostettmann K. (2000). "Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts." Analusis **28**(10): 895-906.

Wu W., Yan C., Li L., Liu Z. and Liu S. (2004). "Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1047**(2): 213-220.

Xiang Q.-Y., Moody M. L., Soltis D. E., Fan C. z. and Soltis P. S. (2002). "Relationships within Cornales and circumscription of *Cornaceae*--matK and rbcL sequence data and effects of outgroups and long branches." Molecular Phylogenetics and Evolution **24**(1): 35-57.

Xiang Q. Y., Soltis D. E., Morgan D. R. and Soltis P. S. (1993). "Phylogenetic relationships of *Cornus-L sensu-lato* and putative relatives inferred from rcb1 sequences data." Annals of the Missouri Botanical Garden **80**(3): 723-734.

Xing J., Xie C. and Lou H. (2007). "Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **44**(2): 368-378.

Yagi A., Ogata Y., Yamauchi T. and Nishioka I. (1977). "Metabolism of phenylpropanoids in *Hydrangea serrata* var. thunbergii and the biosynthesis of phyllodulcin." Phytochemistry **16**(7): 1098-1100.

Yonekura-Sakakibara K., Tohge T., Matsuda F., Nakabayashi R., Takayama H., Niida R., Watanabe-Takahashi A., Inoue E. and Saito K. (2008). "Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene metabolite correlations in *Arabidopsis*." Plant Cell **20**(8): 2160-2176.

Yoshida K., Ito D., Shinkai Y. and Kondo T. (2008). "Change of color and components in sepals of chameleon hydrangea during maturation and senescence." Phytochemistry **69**(18): 3159-3165.

Yoshida K., Kitahara S., Ito D. and Kondo T. (2006). "Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*." Phytochemistry **67**(10): 992-998.

Yoshida K., Miki N., Momonoi K., Kawachi M., Katou K., Okazaki Y., Uozumi N., Maeshima M. and Kondo T. (2009). "Synchrony between flower opening and petal-color change from red to blue in morning glory, *Ipomoea tricolor* cv. Heavenly Blue." Proceedings of the Japan Academy, Series B **85**(6): 187-197.

Yoshida K., Mori M. and Kondo T. (2009). "Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology." Natural Product Reports **26**(7): 884-915.

Yoshida K., Toyama-Kato Y., Kameda K. and Kondo T. (2003). "Sepal Color Variation of *Hydrangea macrophylla* and Vacuolar pH Measured with a Proton-Selective Microelectrode." Plant Cell Physiology **44**(3): 262-268.

Yoshida K., Toyama Y., Kameda K. and Kondo T. (2000). "Contribution of each caffeoyl residue of the pigment molecule of gentiodelphin to blue color development." Phytochemistry **54**(1): 85-92.

Yoshikawa M., Harada E., Naitoh Y., Inoue K., Matsuda H., Shimoda H., Yamahara J. and Murakami N. (1994). "Development of bioactive functions in *Hydrangeae dulcis folium*. III.) on the antiallergic and antimicrobial principles of *Hydrangeae dulcis folium*. (1) Thunberginols A, B, and F." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **42**(11): 2225-2230.

Yoshikawa M., Uchida E., Chatani N., Kobayashi H., Naitoh Y., Okuno Y., Matsuda H., Yamahara J. and Murakami N. (1992). "Thunberginols C, D, and E, antiallergic and antimicrobial dihydroisocoumarins, and thunberginol G 3'-O-glucoside and (-)-hydrangenol 4'-O-glucoside, new dihydroisocoumarin glycosides, from *Hydrangeae Dulcis Folium*." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **40**(12): 3352-3354.

Yoshikawa M., Uchida E., Chatani N., Murakami N. and Yamahara J. (1992). "Thunberginols A, B, and F, new antiallergic and antimicrobial principles from *Hydrangeae dulcis folium*." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **40**(11): 3121-3123.

Zhang H., Matsuda H., Kumahara A., Ito Y., Nakamura S. and Yoshikawa M. (2007). "New type of anti-diabetic compounds from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. thunbergii (*Hydrangeae Dulcis Folium*)." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **17**(17): 4972-4976.

Zhang H., Matsuda H., Yamashita C., Nakamura S. and Yoshikawa M. (2009). "Hydrangeic acid from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. thunbergii as a new type of anti-diabetic compound." European Journal of Pharmacology **606**(1-3): 255-261.

Zhang Y., Shi P., Qu H. and Cheng Y. (2007). "Characterization of phenolic compounds in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **21**(18): 2971–2984.

Zhao J. and Dixon R. A. (2009). "The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport." Trends in Plant Science **15**(2): 72-80.

Zonneveld B. J. M. (2004). Genome size in *Hydrangea*. encyclopedia of Hydrangeas. C.J. van Gelderen and D.M. van Gelderen (eds.). Portland, Ore, USA, Timber Press: 245-255.

Chapitre II. Identification structurale

CHAPITRE II. IDENTIFICATION STRUCTURALE.....	60
I. Anthocyanes.....	63
I. 1. Spectroscopie UV-Visible.....	63
I. 2. Spectrométrie de masse.....	64
II. Flavonoïdes.....	65
II. 1. Spectroscopie UV-Visible.....	65
II. 2. Spectrométrie de masse.....	66
II. 2. 1. Structure des aglycones.....	66
II. 2. 2. Identification des sucres.....	67
II. 2. 2. 1. Dérivés monoglycosylés.....	68
II. 2. 2. 2. Dérivés diglycosylés.....	70
II. 2. 2. 3. Dérivés triglycosylés.....	73
II. 3. Identification par RMN.....	74
II. 3. 1. Composé 35	74
II. 3. 2. Composé 40	75
II. 3. 3. Composé 42	76
II. 3. 4. Composé 52	77
III. Dérivés d'acides cinnamiques.....	77
III. 1. Dérivés monoacylés.....	79
III. 1. 1. Dérivés de poids moléculaire 354.....	79
III. 1. 2. Dérivés de poids moléculaire 338.....	81
III. 1. 3. Dérivés de poids moléculaire 368.....	81
III. 2. Dérivés diacylés.....	81
IV. Amines polyacylées.....	82
IV. 1. Composé 56	82
IV. 2. Analyse du spectre de masse du composé 56	86
IV. 3. Identification des composés 57 à 60	87
BIBLIOGRAPHIE.....	90

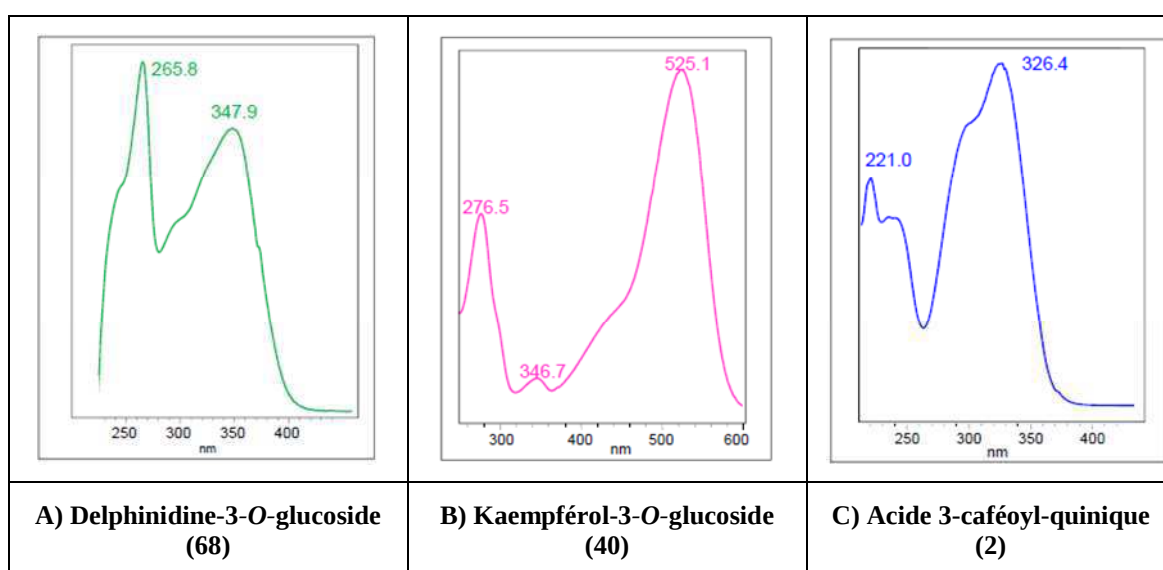


Figure II-1 : Exemples de spectre UV pour les trois types de composés phénolique détectés effectué dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3% A) Flavonols ; B) Anthocyanes ; C) Acides cinnamiques

Afin d'étudier la diversité des composés phénoliques présents dans les inflorescences du genre *Hydrangea*, il est nécessaire de développer une méthode permettant de les séparer, de les quantifier et de les identifier. Des méthodes en chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplées à une détection UV-Visible ont donc été mises au point (cf. partie expérimentale). L'analyse des 99 extraits alcooliques des différentes espèces, par ces méthodes, nous a permis de détecter et de quantifier 80 composés phénoliques. Des exemples de chromatogrammes sont représentés dans les Annexes 3 à 5. Des analyses structurales en ligne (CLHP-UV et CLHP-SM) ont ensuite été réalisées dans le but d'identifier ces composés.

La première étape de l'identification a été l'exploitation des différents spectres UV-visible enregistrés après analyses CLHP-UV des extraits bruts. Les maxima d'absorptions relevés ont en effet pu être rattachés à trois catégories de composés phénoliques (cf. chapitre 1. II. 4. 1 p 28) :

- Les anthocyanes, qui présentent une absorbance intense et caractéristique entre 465 et 560 nm (bande I) et une absorbance moyenne entre 265 et 280 nm : composés **61-80** (Figure II-1 A).
- Les flavonoïdes, qui présentent un massif à deux pics (pic II entre 240 et 270 nm et pic I entre 320 et 380 nm) : composés **4, 6, 12-45, 47, 49-52, 54 et 55** (Figure II-1 B).
- Les dérivés d'acides cinnamiques dont le maximum d'absorption se situe aux alentours de 320 nm : composés **1-3, 5, 7-11, 46, 48, 53 et 56-60** (Figure II-1 C).

En vue d'obtenir des informations structurales plus complètes sur les molécules présentes dans les extraits d'*Hydrangea*, nous avons entrepris un certain nombre d'analyses par LC-MSⁿ, dans les mêmes conditions chromatographiques. L'électrospray (ESI) a été utilisé comme technique d'ionisation tandis qu'un système dispersif de type trappe ionique a permis l'analyse des différentes espèces ioniques produites et de leurs éventuelles filiations. Grâce à cette technique, une quatrième classe de molécule a pu être identifiée dans les extraits d'*Hydrangea*. Ce sont des dérivés spermidino-cinnamiques. Ce type de composé n'avait précédemment jamais été identifié dans le genre.

Après analyse des données UV-visible et MS de nos extraits, des échantillons témoins choisis parmi ceux disponibles au sein de notre unité de recherche ont été analysés dans les mêmes conditions chromatographiques. Ces témoins sont de plusieurs sources : échantillons

Tableau II-1 : Liste des témoins utilisés

Composé	Structure	Tr en min	$\lambda_{\max}$ en nm	m/z [M+H] ⁺	m/z [M-H] ⁻	Source
8	Acide 5-caféoylquinique : acide chlorogénique	16,0	300 (sh)-326	355	353	Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France)
25	Quercétine-3-O-rutinoside ; rutine	30,5	256-266 (sh)-354	611	609	Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France)
29	Quercétine- 3-O-galactoside ; hypéroside	33,1	254-267 (sh)-353	465	463	Extrasynthese (Genay, France)
30	Quercétine-3-O-glucoside ; isoquercétine	33,7	256-266(sh)-354	465	463	Extrasynthese (Genay, France)
33	Lutéoline-7-O--glucoside	34,7	268-254-349	449	447	Extrasynthese (Genay, France)
98	Naringénine-7-O- neohespéridoside ;naringin	38,68	283-327	581	579	Extrasynthese (Genay, France)
39	Quercétine-3-O-glucuronide	38,8	256-347	479	477	SONAS*
41	Quercétine-3-O-rhamnose quercitrine	39,2	255-266 (sh)-349	449	447	Extrasynthese (Genay, France)
44	Apigénine-7-O-glucoside	39.9	267-336	433	431	Extrasynthese (Genay, France)
48	Acide 1,5-dicaféoylquinique	40,8	300-327	499	515	ITEIPMAI
99	Cynarine ou acide 1,3 dicaféoylquinique	26.6	300-327	499	515	ITEIPMAI
68	Delphinidine-3-O-glucoside	23,3**	524	465	-	Extrasynthese (Genay, France)
73	Cyanidine-3-O-rutinoside	29,2**	515	593	-	Extrasynthese (Genay, France)

***isolée au laboratoire à partir de *Senecio giganteus* (Mezache et al. 2009), **temps de rétention obtenus dans les conditions expérimentales utilisé pour la séparation CLHP-UV des anthocyanes**

Sh = shoulder : épaulement

commerciaux, produits isolés au laboratoire ou composés majoritaires déjà identifiés dans d'autres extraits végétaux. Leurs temps de rétention (CLHP), spectres UV et spectres de masse ont été directement comparés à ceux des composés présents dans les extraits. Ces témoins ont ainsi permis d'identifier 11 composés des extraits d'*Hydrangea* (Tableau II-1).

L'analyse CLHP/DAD/MS a finalement été complétée, en cas de nécessité, par isolement des composés suivie d'analyses par RMN mono et bidimensionnelle de ces derniers.

L'analyse structurale des composés phénoliques sera présentée par classe chimique en commençant par les anthocyanes puis les flavonoïdes, les acides cinnamiques et enfin les dérivés de la spermidine.

I. *Anthocyanes*

Les anthocyanes étant présents en faibles quantités en comparaison avec les autres composés phénoliques, leur analyse en CLHP à 350 nm est difficile en milieu neutre. En milieu acide, ils sont facilement distinguables des autres composés (absorption à 530 nm), mais le fait qu'ils soient chargés positivement rend leur séparation malaisée. Le pH est un facteur relativement important dans la séparation des anthocyanes. En effet, à pH inférieur à 3.2, ils existent sous deux formes distinctes : le cation flavylum (rouge) et la base quinonique (bleue). Plus précisément, à pH 1.5 un anthocyane est à 96% sous sa forme cation flavylum, contre seulement 67% à pH 2.5 (da Costa *et al.* 2000). A pH supérieur à 2, l'élargissement important des pics chromatographiques résulte de l'interconversion entre ces deux formes, entraînant une faible résolution et une réduction des limites de détection (da Costa *et al.* 2000). La polarité de l'aglycone est le facteur majeur affectant la rétention des anthocyanes. Dans des conditions usuelles, l'ordre d'élution est : dérivés de la delphinidine, suivis par ceux de la cyanidine, pétunidine, pélargonidine, péonidine et malvidine. En phase inverse, la présence d'un ou plusieurs sucres diminue la rétention des anthocyanes et les diglycosylés sont généralement élués avant les monoglycosylés (da Costa *et al.* 2000).

I. 1. Spectroscopie UV-Visible

Pour les anthocyanes, la position du λ_{max} dépend de plusieurs paramètres : le solvant, le pH et le degré d'hydroxylation du cycle B (Bohm 1998). L'analyse CLHP en condition acide (2% de TFA) permet aux anthocyanes d'être sous leur forme cation flavylum et donc d'absorber dans le visible. Les λ_{max} observés pour nos 20 composés détectés varient de 515 à 527 nm. Le solvant dans lequel sont mesurés les spectres UV-Visible est le solvant d'élution.

Tableau II-2: Spectres UV-Visible (λ_{max}) et spectres de masse (m/z) des anthocyanes détectés dans les extraits des 3 espèces colorées du genre *Hydrangea*

Composés	Temps de rétentions moyen LC/DAD (min.)	Spectre UV-Visible λ_{max} en nm	Temps de rétentions moyen LC/MS (min.)	Masse de l'ion moléculaire m/z	Masse des fragments m/z	Structure
61	11,3	520				Dérivé de delphinidine
62	13,6	520				Dérivé de delphinidine
63	17,3	524				Dérivé de delphinidine
64	17,6	524				Dérivé de delphinidine
65	18,4	525				Dérivé de delphinidine
66	21,2	526	10,2	597	303	Delphinidine-3-sambubioside
67	23,2	524				Dérivé de delphinidine
68	23,3	524	11,36	465	303	Delphinidine 3-glucoside
69	25,2	521				Dérivé de delphinidine
70	27,0	522				Dérivé de delphinidine
71	27,3	524	9,9	669	507-303	Delphinidine + hexose + acétyl hexose
72	27,6	524				Dérivé de delphinidine
73	29,2	515				Cyanidine-3-rutinoside
74	31,4	522				Dérivé de delphinidine
75	33,5	523				Dérivé de delphinidine
76	36,3	521				Dérivé de delphinidine
77	37,1	527				Dérivé de delphinidine
78	38,4	522				Dérivé de delphinidine
79	39,6	527				Dérivé de delphinidine
80	42,7	527				Dérivé de delphinidine

Dans les conditions classiques (eau/acétonitrile ou eau/méthanol), les dérivés de la cyanidine ont un λ_{max} de 515-517 nm et les dérivés de la delphinidine de 520-523 nm (Hong and Wrolstad 1990). Un seul de nos composés, ayant un λ_{max} inférieur à 520 nm, peut être identifié comme étant un dérivé de la cyanidine : **73** ($\lambda_{\text{max}} = 515$ nm). Les autres composés, ayant des λ_{max} compris entre 520 à 527 nm, peuvent être identifiés comme étant des dérivés de la delphinidine. Le spectre UV des anthocyanes nous permet aussi de déterminer la position des glycosylations. En effet, le rapport d'absorbance $A_{440\text{nm}}/A_{\lambda_{\text{max}}}$ est différent si la position 5 est occupée ou non (Hong and Wrolstad 1990). Si la position 5 est occupée en plus de la position 3, ce rapport sera beaucoup plus faible que si seule la position 3 est occupée.

I. 2. Spectrométrie de masse

L'analyse des anthocyanes par CLHP couplée à la spectrométrie de masse est délicate. En effet, la bonne séparation de ceux-ci nécessite des conditions fortement acides, alors que la source electrospray du spectromètre de masse ne tolère pas ces conditions trop acides et trop chargées en ions. Il a donc fallu adapter la méthode d'analyse CLHP à l'analyse en spectrométrie de masse pour obtenir un compromis entre une bonne séparation et des conditions acides pas trop drastiques qui ne risquent pas d'endommager l'appareil.

La structure et donc l'ordre d'élution des anthocyanes est beaucoup influencée par le pH, comme nous l'avons vu précédemment. Dans les conditions mises au point lors de l'analyse UV-Visible, une bonne séparation a été obtenue, mais pour des pH faibles (2% de TFA). Pour le couplage CLHP-MS, les conditions chromatographiques ont été modifiées pour se situer dans une zone de pH plus compatible avec l'appareillage. Dans ces dernières conditions, le nombre de pics chromatographiques observés est plus faible et leur résolution bien inférieure (il y a certainement des coélutions). Il est par conséquent difficile de faire correspondre un pic de la première méthode avec son homologue de la deuxième. La structure des deux composés majoritaires de l'espèce *H. macrophylla* étant connue (Yoshida *et al.* 2008), leur identification dans les deux méthodes a été aisée (**66** et **68**). Les espèces *H. aspera* et *H. involucrata* présentent un composé largement majoritaire **71**. L'identification des temps de rétention de ce composé dans les deux méthodes a donc pu être réalisée. En observant les temps de rétention de ces 3 composés dans les deux conditions chromatographiques, on peut constater une inversion dans l'ordre d'élution (Tableau II-2). Les trois anthocyanes ayant des glycosylations différentes, l'équilibre entre le cation flavylum et la base quinonique de l'anthocyane ne s'effectue pas forcément au même pH. Les deux formes peuvent avoir des polarités différentes et donc des temps de rétention différents à des pH différents.

Tableau II-3 : Spectres UV(λ_{max} en nm) des flavonoïdes détectés dans les extraits du genre *Hydrangea* dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%

	Structure	Tr min	Bande I	Epaulement 300 nm	Bande II
4	Quercétine -3- <i>O</i> -hexose,-7- <i>O</i> -hexose	13.39	349	-	255-265(sh)
6	Quercétine -3- <i>O</i> -hexose,-7- <i>O</i> -hexose	14.85	353	-	255-265(sh)
12	Quercétine-3- <i>O</i> -(rhamnose-rhamnose-hexose)	25.35	353	297	255-265(sh)
13	Dérivé du Kaempférol	26.15	348	-	262
14	Quercétine-3- <i>O</i> -(hexose-(1-2)-pentose-(1-6)-rhamnose)	26.36	355	301	256-265(sh)
15	Quercétine-3- <i>O</i> -hexose-(1-2)-hexose	26.62	354	296	256-266(sh)
16	Myricétine-3- <i>O</i> -rhamnose-(1-6)-hexose	26.75	354	296	256-266(sh)
17	Myricétine-3- <i>O</i> -hexose	27.69	355	-	255-265(sh)
18	Kaempférol-3- <i>O</i> -(rhamnose-rhamnose-hexose)	28.00	348	298	266
19	Dérivé de la naringénine	28.61	330 (sh)		290
20	Quercétine 3- <i>O</i> -pentose-(1-2)-hexose	28.50	355	300	255-264 (sh)
21	Dérivé du Kaempférol	28.56	350	nd	266
22	Quercétine 3- <i>O</i> -pentose-(1-2)-hexose	28.74	356	300	255-266 (sh)
23	Kaempférol 3- <i>O</i> -hexose-(1-2)-hexose	29.44	347	296	266
24	Dérivé de la quercétine	29.81	355	-	255
25	Quercétine-3- <i>O</i> -(rhamnose-(1-6)-glucose)	30.54	354	299	256-266(sh)
26	Isorhamnétine 3- <i>O</i> -pentose-(1-2)-hexose	31.75	354	300	255-266(sh)
27	Dérivé de la myricétine	32.32	354	nd	255-266(sh)
28	Kaempférol 3-rhamnose-(1-2)-hexose	32.38	345	297	265
29	Quercétine-3- <i>O</i> -galactoside	33.06	353	297	254-267(sh)
30	Quercétine-3- <i>O</i> - α -glucoside	33.71	355	301	256-266(sh)
31	Kaempférol 3-rhamnose-(1-2)-hexose	34.18	348	298	266
32	Kaempférol 3-rhamnose-(1-2)-hexose	34.04	348	298	266
33	Lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside	34.78	349	nd	355-366
34	Dérivé de la quercétine	36.82	349		254-268(sh)
35	Kaempférol-3- <i>O</i> -(rhamnose-(1-6)-glucose)	36.92	349	297	266
36	kaempférol-3- <i>O</i> -(rhamnose (1-6) galactose)	37.86	349	300	266
37	Kaempférol-3- <i>O</i> -galactoside	38.12	348	298	266
38	Quercétine-3- <i>O</i> -(pentose-rhamnose)	38.47	354	298	255-266(sh)
39	Quercétine-3- <i>O</i> -glucuronide	38.78	355	299	256
40	Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside	38.83	347	298	266
41	Quercétine-3- <i>O</i> -rhamnoside	39.14	350	300	255-266(sh)
42	Quercétine-3- <i>O</i> -(xylose-(1-2)-rhamnose)	39.31	350	304	255-365(sh)
43	Naringénine-7- <i>O</i> -glucoside	39.56	329		286
44	Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside	39.95	336	-	267
45	Quercétine-3- <i>O</i> -acétylhexose	39.97	356	296	251-269(sh)
47	Kaempférol 3- <i>O</i> -pentose	40.73	348	296	266
49	Kaempférol-3- <i>O</i> -glucuronide	41.12	349	298	265
50	Quercétine-3- <i>O</i> -acétylhexose	41.84	356	299	256-265(sh)
51	Kaempférol-3- <i>O</i> -(pentose-rhamnose)	42.14	345	nd	265
52	Kaempférol-3- <i>O</i> -rhamnoside	42.76	344	297	265
54	Kaempférol 3- <i>O</i> -malonyl-hexose	43.71	348	297	266
55	Kaempférol-3- <i>O</i> -acétylhexose	46.11	332	294	266

nd = non déterminé ; sh = shoulder : épaulement ; Tr : temps de rétention en CLHP

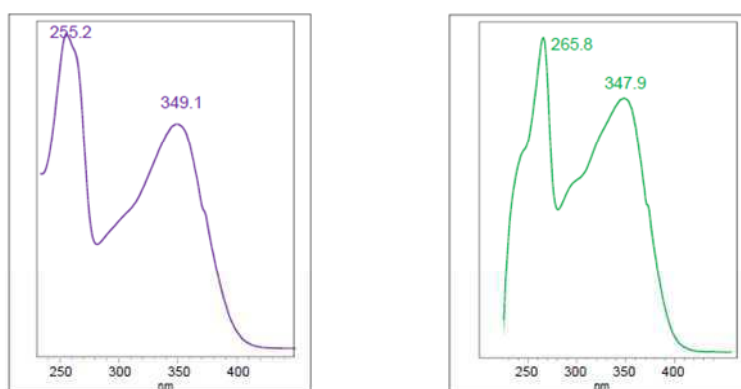
Si ce changement de l'ordre d'élution, selon les conditions chromatographiques, est facilement observable pour ces composés majoritaires, ce n'est pas le cas pour les composés minoritaires dont la structure est encore inconnue.

L'analyse de ces dérivés ayant été réalisée à la fin de cette thèse, le manque de temps a empêché l'approfondissement de ces analyses et la résolution des problèmes rencontrés. La mise au point plus approfondie d'une méthode chromatographique suffisamment résolutive, compatible avec la spectrométrie de masse, est à envisager. De plus, les anthocyanes sont des composés fragiles qui se dégradent facilement, et certains extraits, ayant été analysés 3 ans après l'extraction, ont tout à fait pu se dégrader durant ce laps de temps, même conservés à -20°C. Une étude de la stabilité des anthocyanes dans la matrice dans ces conditions de stockage devra donc être entreprise.

II. Flavonoïdes

II. 1. Spectroscopie UV-Visible

Pour ce qui est des flavonoïdes, la position du λ_{max} de la bande I nous indique que la majorité des composés flavoniques appartient probablement à la classe des flavonols. Pour ceux-ci, la forme de la bande II nous permet de préciser s'il s'agit d'hétérosides de type kaempférol (pic unique, Figure II-2 B, cas des composés **13**, **18**, **21**, **23**, **28**, **31**, **32**, **35-37**, **40**, **47**, **49**, **51**, **52**, **54** et **55**) ou bien de type quercétine ou myricétine (présence d'un épaulement sur le flanc du pic II, Figure II-2A, cas des composés **4**, **6**, **12**, **14-17**, **20**, **22**, **24**, **25**, **27**, **29**, **30**, **34**, **38**, **39**, **41**, **42**, **45** et **50**).



(A) quercétine 3-O-rhamnoside (41) (B) kaempférol-3-O-glucoside (40)

Figure II-2 : spectres UV effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3% (A) Type quercétine ; (B) Type kaempférol

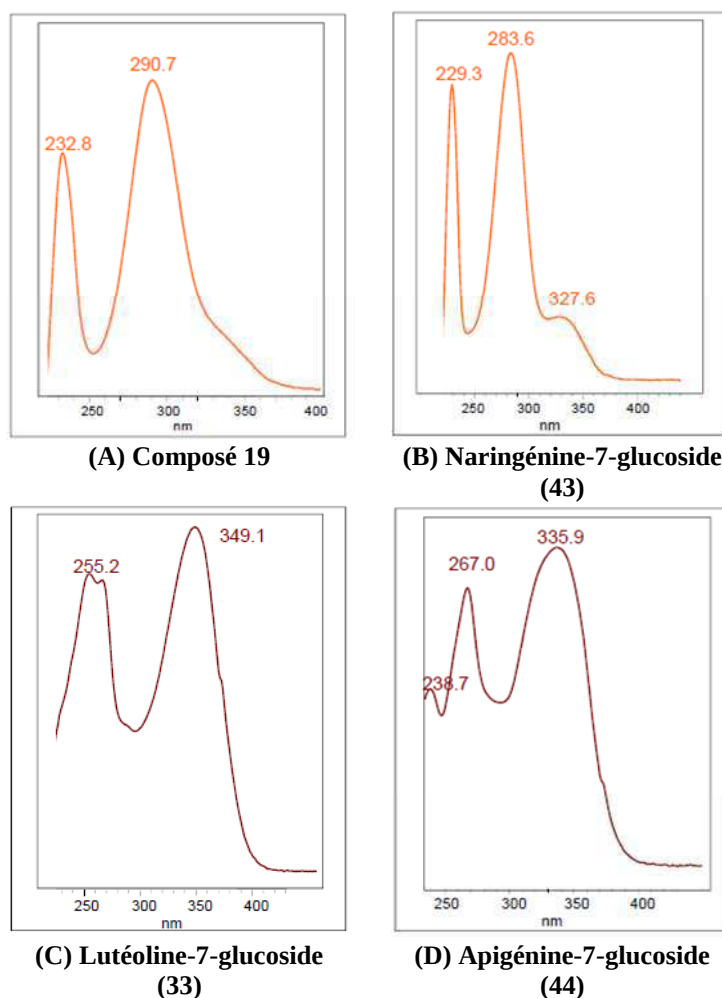


Figure II-3 : Spectres UV des composés 19 (A), 43 (B), 33 (C) et 44 (D) effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%

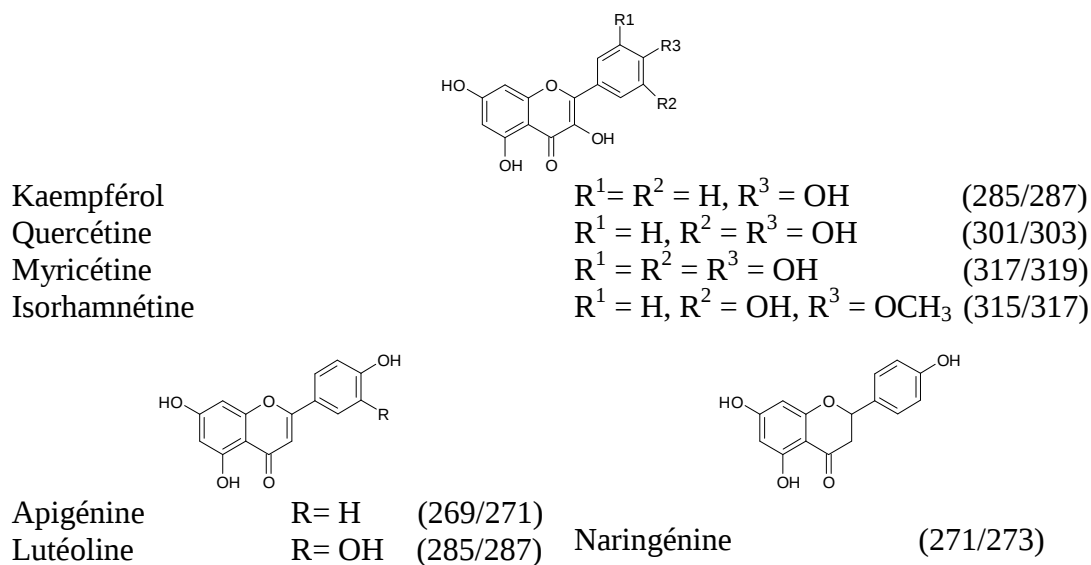


Figure II-4 : Structures des génines ($[M-H]^-/[M+H]^+$) identifiées dans les extraits d'*Hydrangea*

La position du $\lambda_{\max}$ de la bande I peut aussi nous renseigner sur le site de glycosylation du flavonoïde considéré. En effet, lorsqu'un flavonol est glycosylé en position 3, un effet, hypsochrome de 10 à 15 nm est observé par rapport au spectre UV de la génine libre. Pour les dérivés du kaempférol, ce $\lambda_{\max}$ varie de 344 à 350 nm (kaempférol non glycosylé 367 nm) et pour les dérivés de la quercétine ou de la myricétine, de 349 à 356 nm (quercétine non glycosylée 370 nm) (Mabry *et al.* 1970). Les flavonols de nos extraits sont donc tous glycosylés en position 3. L'absence d'un épaulement aux alentours de 300 nm peut aussi indiquer la double glycosylation en position 3 et 7 des flavonols (Kite and Veitch 2009), ce qui est le cas pour les composés **4**, **6**, **13** et **24** (Tableau II-3). Certains composés sont présents en faible quantité dans nos extraits et la présence de cet épaulement n'a pas pu être déterminée car leurs spectres UV-Visible sont mal définis (**17**, **21**, **27** et **51**).

Quatre composés ont un spectre UV différent de celui des flavonols (Figure II-3). En effet, les spectres UV de **19** et **43** présentent un maximum d'absorption à 290 et 283 nm respectivement, accompagné d'un épaulement vers 330 nm (Figure II-3 A et B). Ce type de spectre est caractéristique des flavanones (Chapitre 1. II. 4. 1. 2. p 29). La bande II de **33** est constituée d'un double pic bien défini centré sur 260 nm (Figure II-3 C). Ce double pic est caractéristique d'une flavone dihydroxylée sur le cycle B. La bande I de **44** est centrée sur 336 nm et sa bande II sur 267 nm, longueurs d'onde caractéristiques d'une flavone monohydroxylée sur le cycle B (Figure II-3 D).

II. 2. Spectrométrie de masse

II. 2. 1. Structure des aglycones

Les spectres de masse en mode d'ionisation positive et négative des flavonoïdes de nos extraits ont été enregistrés ainsi que les spectres de fragmentation MS^2 dans ces deux modes. La masse de l'ion quasimoléculaire y est observée. Lors de la fragmentation MS^2 de cet ion, il se forme un ion correspondant à la génine - H (Y_0^-) en mode négatif et + H (Y_0^+) en mode positif. Le rapport m/z de ces ions est caractéristique du degré d'oxygénation de la génine (Figure II-4).

Pour les composés **13**, **21**, **24** et **34**, aucun spectre de masse interprétable n'a pu être obtenu.

Les ions Y_0 caractéristiques des dérivés du kaempférol (à m/z 287 en positif et 285/284 en négatif) se retrouvent dans les spectres de masse de 15 composés parmi les 17 dont le spectre UV correspond à un dérivé du kaempférol (**18**, **23**, **28**, **31**, **32**, **35-37**, **40**, **47**, **49**, **51**, **52**, **54** et **55**). Contrairement à la spectrométrie UV-Visible, la spectrométrie de masse permet

Tableau II-4 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par un hexose (17, 29, 30, 33, 37, 40, 43 et 44)

Composés	17	29	30	33	37	40	43	44
Identification	Myricétine- 3- <i>O</i> -hexose	Quercétine- 3- <i>O</i> -galactoside	Quercétine- 3- <i>O</i> -glucoside	Lutéoline- 7- <i>O</i> -glucoside	Kaempférol- 3- <i>O</i> -galactoside	Kaempférol- 3- <i>O</i> -glucoside	Naringénine- 7- <i>O</i> -glucoside	Apigénine- 7- <i>O</i> -glucoside
Y_0^+/Y_0^-	0.8	0.16	0.13		0.95	0.64		
$[M-H]^-$	479	463	463	447	447	447	433	431
Y_0^-	317 (100)	300.6 (100)	300.6 (100)	285 (100)	285 (100)	285 (100)	271 (100)	269 (100)
$Y_0^\bullet$	316 (80)	299.8 (16)	299.6 (13)		284 (95)	284 (64)		
$[Y_0^- H- CO]^-$				257 (13)				
$[Y_0^- H C_2H_2O]^-$				243 (53)				227 (27)
$[Y_0^- H- CO_2]^-$				241 (82)				225 (100)
$Y_0^- H C_3O_2]^-$				217 (49)				201 (19)
$[Y_0^- H- CO_2-CO]^-$				213 (21)				197 (35)
$[Y_0^- H-C_2H_2O-CO_2]^-$				199 (83)				183 (35)
$[M- H- 2CO_2]^-$				197 (24)				181 (19)
$[Y_0^- H C_3O_2- C_2H_2O]^-$				175 (100)				159 (18)
$^{1,3}A^-$				151 (44)				151 (31)
$^{1,4}B^-+2H$				149 (12)				149 (55)
$^{1,4}B^-$				133 (14)				117 (23)
$[M+H]^+$	481	465	465	449	449	449	435	433
Y_0^+	319 (100)	303 (100)	303 (100)	287 (100)	287 (100)	287 (100)	273 (100)	271 (100)
$[M+Na]^+$		487	487		471	471		
Y_0+Na		325 (74)	325 (100)		309 (48)	309 (100)		
$[B_1+Na]^+$		185 (100)	185 (60)		185 (100)	185 (51)		

en plus de distinguer la quercétine de la myricétine. Les données récoltées en UV et SM ont permis d'identifier 16 composés comme étant des dérivés de la quercétine (Y_0 à m/z 303 en positif et 301/300 en négatif): **4**, **6**, **12**, **14**, **15**, **20**, **22**, **25**, **29**, **30**, **38**, **39**, **41**, **42**, **45** et **50**. Parmi les autres composés ayant le même spectre UV que ces dérivés de la quercétine, 3 ont pu être identifiés comme étant des dérivés de la myricétine (Y_0 à m/z 319 en positif et 317/316 en négatif): **16**, **17** et **27**, et un autre, le composé **26**, comme étant un dérivé de la méthylquercétine (Y_0 à m/z 317 en positif et 315/314 en négatif). Pour ce dernier composé, la détermination de la position de la fonction méthyle sur les cycles A ou B n'est possible qu'en mode négatif. Lors de la fragmentation MS^3 de **26** (fragmentation de Y_0^- à m/z 315), un fragment largement majoritaire à m/z 300, correspondant à la perte du méthyle, est en effet observé. La perte prédominante de ce fragment est caractéristique du méthyle en position 4' du cycle B (Justesen 2001).

Dans le cas des flavones et flavanones, le rapport m/z des ions Y_0^+ et Y_0^- correspondant à la génine en mode positif et négatif est en accord avec les hypothèses proposées grâce à la spectrométrie UV-Visible. Le composé **33** est bien un dérivé de la lutéoline (m/z 285/287), **43** un dérivé de la naringénine (m/z 271/273) et **44** un dérivé de l'apigénine (m/z 269/271). Pour le composé **19**, la fragmentation MS^2 n'a pas pu être obtenue, et la génine ne peut pas être clairement identifiée. La fragmentation MS^3 en mode négatif des composés **33** et **44** (Tableau II-4) est caractéristique des flavones [les pertes de CO (-28 u) et CO₂ (-44 u) sont dues à la contraction du cycle C (Fabre *et al.* 2001)] et confirme donc leur structure. La fragmentation en MS^3 de **43** n'a pas pu être obtenue afin de confirmer la structure naringénine.

II. 2. 2. Identification des sucres

Comme nous l'avons vu au chapitre 1. II. 4. 2. 1. 3. (page 32), la spectrométrie de masse peut apporter différentes informations sur la structure des flavonoïdes-*O*-glycosylés.

- La masse des fragments perdus lors de la fragmentation MS^2 des ions quasimoléculaires nous renseigne sur la nature et le nombre de sucres présents sur la génine : sucre à 6 ou 5 carbones, désoxyhexose... (Tableau II-5)
- La présence du radical Y_0^* en mode d'ionisation négatif et son abondance par rapport à l'ion génine ($ratio Y_0^*/Y_0^-$) peut nous renseigner sur le site de glycosylation. Un $ratio$ très supérieur à 1 peut suggérer que le site de glycosylation est sur la position 3 de la génine, mais ce n'est pas suffisant pour l'affirmer (Cuyckens and Claeys 2005).

Tableau II-5 : Fragments observés en SM des oses

Type de sucre	Cas le plus fréquent (exemple)	Masse du fragment perdu
Acétylhexose	Acétylglucose Acétylgalactose	204
Acide uronique à 6 carbones	Glucuronide	176
Hexose	Glucose Galactose	162
Pentose	Arabinose Xylose	132
Désoxyhexose	Rhamnose	146
Malonylhexose	Malonylglucose Malonylgalactose	86 et 162

Tableau II-6 : Flavonoïdes monoglycosylés

Numéro	Identité
17	Myricétine-3-O-hexose (glucose ou galactose)
29	Hyperoside; Quercétine-3-O-galactoside
30	Isoquercitrine ; Quercétine-3-O- α -glucoside
33	Lutéoline-7-O-glucoside
37	Kaempférol-3-O- α -galactoside
39	Miquelianine ; Quercétine-3-O- β -glucuronide
40	Kaempférol-3-O- α -glucoside
41	Quercitrine ; Quercétine-3-O- α -rhamnoside
43	Naringenine-7-O-hexose (glucose ou galactose)
44	Apigénine-7-O-glucoside
45	Quercétine acétylhexose (galactose ?)
47	Kaempférol 3-O-pentose (xylose ou arabinose)
49	Kaempférol-3-O- β -glucuronide
50	Quercétine acétylhexose (glucose ?)
52	Afzeline ; Kaempférol-3-O- α -rhamnoside
54	Kaempférol malonyl-hexose
55	Kaempférol-3-O-acétylhexose (glucose ?)

- La fragmentation de l'ion adduit $[M+Na]^+$ peut apporter des informations utiles à la caractérisation des flavonoïdes. En effet, elle permet, après analyse de la perte du cycle B, de localiser de façon certaine la position du groupement osidique (Cuyckens and Claeys 2005). De plus, lors de la fragmentation de cet adduit, il est possible d'observer l'élimination de la génine et donc la formation d'un ion saccharide. Cette fragmentation peut confirmer, dans le cas de flavonoïdes polyglycosylés, la présence d'une chaîne de sucres située sur une seule position (Satterfield and Brodbelt 2001).
- la présence de certains fragments ($^{0,2}X_0^-$, Z_1^- , Y_0^* à partir de $[M-H]^-$ et Y_1^- , Y^* à partir de $[M+H]^+$, cf. chapitre 1. II. 4. 2. 1 .3a. Figure I-16 et 17 page 29 pour la nomenclature) ainsi que leur abondance peut nous renseigner sur l'enchaînement des sucres dans le cas de flavonoïdes polyglycosylés.

II. 2. 2. 1. Dérivés monoglycosylés

Dans les extraits d'*Hydrangea*, 17 flavonoïdes monoglycosylés ont été détectés (Tableau II-6).

Le composé **17** a été identifié partiellement grâce à son spectre de masse. Il s'agit d'une génine de type myricétine (Y_0 à m/z 319 en mode positif et à m/z 317/316 en mode négatif) glycosylée en position 3 par un hexose (perte de 162 u). Les deux hexoses les plus répandus chez les végétaux sont le glucose et le galactose (Bruneton 2010). Il s'agit donc très probablement de la myricétine-3-*O*-glucoside ou 3-*O*-galactoside. Ces deux molécules ont d'ailleurs déjà été identifiées dans la famille des Hydrangeaceae et plus particulièrement chez *Decumaria berbera* L. (Bohm et al. 1985).

Les composés **29** et **30** possèdent une génine de type quercétine (Y_0 à m/z 303 en mode positif et à m/z 301/300 en mode négatif), glycosylée en position 3 par un hexose (perte de 162 u). Or, pour une génine et une position du sucre identique, les dérivés de galactose sont plus polaires que les dérivés de glucose, donc en phase inverse leur temps de rétention est plus faible (Kite and Veitch 2009). Ces composés sont donc identifiés comme la quercétine-3-*O*-galactoside (**29**) et la quercétine-3-*O*-glucoside (**30**), ce que confirme une comparaison directe avec des témoins commerciaux.

Le composé **33** et **44** sont des flavones possédant respectivement une génine de type lutéoline et apigénine (Y_0^+/Y_0^- à m/z 287/285 et 271/269 respectivement) glycosylée par un hexose (perte de 162 u) qui peut être placé en 5, 7 ou 4'. Le glucose étant plus fréquent que le galactose, et la position 7 étant la plus fréquemment glycosylée (Bruneton 2010), ces composés sont par hypothèse identifiés à la lutéoline-7-*O*-glucoside (**33**) et à l'apigénine-7-*O*-

Tableau II-7 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes monoglycosylés 39, 41, 45, 47 49, 50, 52, 54 et 55.

Composés	41	52	47	39	49	45	50	55	54
Identification	Quercétine-3-O- α -rhamnoside	Kaempférol-3-O-rhamnoside	Kaempférol 3-O-pentose	Quercétine-3-O-glucuronide	Kaempférol-3-O-glucuronide	Quercétine-3-O-acétylhexose	Quercétine-3-O-acétylhexose	Kaempférol-3-O-acétylhexose	Kaempférol-3-O-malonylhexose
Y_0^+/Y_0^-	0.17	0.23	0.71	5.88	4.55	0.38	0.60	0.65	
$[M-H]^-$	447	431	417	477	461	505	505	489	533
$[M-H-C_2H_2O]^-$						463 (32)	463 (87)		
$[M-H-CO_2]^-$									489 (100)
Y_0^-	301 (100)	285 (100)	285 (100)	301 (17)	285 (22)	301 (100)	301 (100)	285 (100)	
Y_0^+	300 (17)	284 (23)	284 (71)	300 (100)	284 (100)	300 (38)	300 (60)	284 (65)	
$[M+H]^+$	449	433	419	479	463	507	507	491	535
$[M+H-C_2H_2O_2]^+$						449 (100)	449 (100)		
Y_0^+	303 (100)	287 (100)		303 (100)	287 (100)	303 (21)	303 (20)	287 (100)	287 (100)
$[M+Na]^+$	471	455			485				
Y_0+Na	325 (100)	309 (100)			309 (100)				
$[B1+Na]^+$	169 (6)	169 (5)							

glucoside (**44**). Ici aussi, l'analyse de témoins commerciaux confirme ces hypothèses de structure

Les composés **37** et **40** possèdent une génine de type kaempférol (Y_0 à m/z 287 en mode positif et à m/z 285/284 en mode négatif), glycosylée en position 3 par un hexose. Comme pour **29** et **30**, l'ordre d'élution en phase inverse et l'occurrence des sucres chez les végétaux, nous permettent d'émettre des hypothèses structurales : kaempférol-3-*O*-galactoside (**37**) et kaempférol-3-*O*-glucoside (**40**). Ces deux composés sont d'ailleurs déjà décrits chez *H. macrophylla* (Subha and Sukumar 2007).

Le composé **43** possède une génine de type naringénine (Y_0 à m/z 273 en mode positif et à m/z 271 en mode négatif) glycosylée par un hexose (perte de 162 u) qui peut être placé en 5, 7 ou 4'. Le glucose étant plus fréquent que le galactose, et la position 7 étant la plus fréquemment glycosylée, ce composé est par hypothèse identifié à la naringénine-7-*O*-glucoside.

Lors de la fragmentation MS^2 de l'ion $[M+H]^+$ des composés **41** et **52**, une perte de 146 u est observée (Tableau II-7), ce qui est caractéristique de la perte d'un désoxyhexose, le plus fréquent étant le rhamnose (Bruneton 2010). Les ions Y_0^+ formés ont des m/z respectif à 303 et 287. Ces composés pourraient donc être la quercétine-3-*O*-rhamnoside (**41**) et le kaempférol-3-*O*-glucuronide (**52**). L'analyse d'un témoin commercial de quercétine-3-*O*-rhamnoside dans des conditions identiques confirme l'hypothèse de structure pour **41**.

Le composé **47** possède une génine de type kaempférol (Y_0 à m/z 287 en mode positif et à m/z 285/284 en mode négatif), glycosylée en position 3 par un pentose (perte de 132 u). Les deux pentoses les plus répandus dans les plantes sont le xylose et l'arabinose (Bruneton 2010). Il pourrait donc s'agir du kaempférol-3-*O*-xyloside ou 3-*O*-arabinoside. Ces deux molécules ont déjà été identifiées dans la famille des Hydrangeaceae, particulièrement dans l'espèce *Phylladelphus coronarius* L (Bohm *et al.* 1985). Cette publication montre aussi l'absence de dérivé d'arabinose dans les espèces étudiées, mais au vue de l'ancienneté de ces travaux et du manque d'explications justifiant cette caractérisation structurale, nous ne pouvons totalement exclure la présence de ce sucre dans notre composé.

Lors de la fragmentation MS^2 de l'ion $[M+H]^+$ des composés **39** et **49**, une perte de 176 u est observée (Tableau II-7), ce qui est caractéristique de la perte d'un acide uronique à 6 carbones, le plus fréquent étant l'acide glucuronique (Bruneton 2010). Les ions Y_0^+ formés ont des m/z respectifs à 303 et 287. Ces composés pourraient donc être la quercétine-3-*O*-

Tableau II-8 : Flavonoïdes diglycosylés

Numéro	Identité
4	Quercétine-3- <i>O</i> -hexose,-7- <i>O</i> -hexose
6	Quercétine-3- <i>O</i> -hexose,-7- <i>O</i> -hexose
15	Quercétine-3- <i>O</i> -hexose-(1-2)-hexose
16	Myricétine-3- <i>O</i> -rhamnose-(1-6)-hexose
20	Quercétine-3- <i>O</i> -pentose-(1-2)-hexose
22	Quercétine-3- <i>O</i> -pentose-(1-2)-hexose
23	Kaempférol-3- <i>O</i> -hexose-(1-2)-hexose
25	Rutine ; Quercétine-3- <i>O</i> -β-rutinoside (rhamnose-(1-6)-glucose)
26	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -pentose-(1-2)-hexose
28	Kaempférol-3- <i>O</i> -rhamnose-(1-2)-hexose
31	Kaempférol-3- <i>O</i> -pentose-(1-2)-hexose
32	Kaempférol-3- <i>O</i> -pentose-(1-2)-hexose
35	Nicotiflorine; Kaempférol-3- <i>O</i> -β-rutinoside (rhamnose-(1-6)-glucose)
36	kaempférol-3- <i>O</i> -(rhamnose (1-6) galactose)
38	Quercétine-3- <i>O</i> -(pentose- rhamnose)
42	Quercétine-3- <i>O</i> -(xylose-(1-2)-rhamnose)
51	Kaempférol-3- <i>O</i> -(pentose- rhamnose)

Tableau II-9 : Spectres de masse [*m/z* (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par 2 hexoses (4, 6, 15 et 23)

Composés	4	6	15	23
Identification	Quercétine-3- <i>O</i> -hexose,-7- <i>O</i> -hexose	Quercétine-3- <i>O</i> -hexose,-7- <i>O</i> -hexose	Quercétine-3- <i>O</i> -(hexose-(1-2)-hexose)	Kaempférol-3- <i>O</i> -(hexose-(1-2)-hexose)
Y_0^-/Y_0^-	0.10		0.88	0.20
Y_0^+/Y_1^+	0.3	0.3	1.1	
$[M-H]^-$	625	625	625	609
$^{0,2}X_0^-$	505 (4.4)	505 (3.3)	505 (32)	
Y_1^-	463 (100)	463 (100)	463 (33)	
Z_1^-			445 (49)	429 (37)
Y_0^-	301 (18.6)	301 (20.8)	301 (100)	285 (100)
Y_0^-	300 (1.8)		300 (88)	284 (20)
$[M+H]^+$	627	627	627	611
Y_1^+	465 (100)	465 (100)	465 (89)	449 (100)
Z_1^+			447 (10)	
Y_0^+	303 (31.1)	303 (29)	303 (100)	287 (15)
$[M+Na]^+$			649	
$[B_2+Na]^+$			347 (100)	

glucuronide (**39**) et le kaempférol-3-*O*-glucuronide (**49**). L'analyse d'un témoin de quercétine-3-*O*-glucuronide permet alors de confirmer ces deux hypothèses structurales.

Les composés **45** et **50** présentent le même spectre de masse. Ce sont deux dérivés de la quercétine (Y_0 à m/z 303 en mode positif et à m/z 301/300 en mode négatif). Des pertes successives de 42 u et 162 u sont observées lors de la fragmentation de l'ion $[M-H]^-$ en MS^2 correspondant respectivement à une perte de CH_2O et d'un hexose. La différence entre ces deux composés peut résider dans la nature de l'hexose (glucose ou galactose) ou dans la position de l'acétyle sur le sucre.

Le composé **55** est un dérivé du kaempférol (Y_0 à m/z 287 en mode positif et à m/z 285/284 en mode négatif). Une perte de 204 u est observée, correspondant à la perte d'un acétylhexose dont la structure exacte ne peut être déterminée comme précédemment.

Le composé **54** est un dérivé du kaempférol (Y_0 à m/z 287 en mode positif). Lors de la fragmentation de l'ion $[M-H]^-$ en MS^2 , seule une perte de 44 est observée, elle peut correspondre à la décarboxylation d'une partie acide malique. Cette perte est majoritaire pour les flavonoïdes glycosylés malonylés (Kachlicki *et al.* 2008). En mode d'ionisation positive la fragmentation de l'ion quasimoléculaire génère uniquement l'ion génine Y_0^+ . La perte de 248 observée peut correspondre à la perte d'un malonyl hexose. Des pertes successives de 86 u et 162 u sont observées, correspondant respectivement à un groupement malonyl et à un hexose. La position du malonyl et la nature de l'hexose ne peuvent être déterminées.

II. 2. 2. 2. Dérivés diglycosylés

Dans les différents extraits d'*Hydrangea* analysés, 18 flavonoïdes diglycosylés ont été détectés (Tableau II-8). Parmi ceux-ci, 3 furent caractérisés sans ambiguïté par comparaison avec des témoins, ou par purification suivie d'une analyse fine par RMN. Pour les autres, nous proposons les hypothèses structurales nous apparaissant les plus plausibles, celles-ci étant basées sur un certain nombre de paramètres objectifs (temps de rétention, analyse fragmentométrique en MS, occurrence des oses...).

Les composés **4**, **6** et **15** sont des quercétines substituées par deux hexoses (Y_0 à m/z 625/627 et perte de 2 x 162 u donnant des ions à m/z 301/303) (Tableau II-9). Lors de la fragmentation de l'ion quasimoléculaire $[M-H]^-$, le fragment majoritaire observé est l'ion Y_1^- (m/z 463) pour les composés **4** et **6**, et l'ion Y_0^- (m/z 301) pour le composé **15**. Les composés **4** et **6** sont donc des quercétines di-*O*-hexose et le composé **15** une quercétine-*O*-dihexose (Ferrerres *et al.* 2004). Pour les deux premiers, l'absence d'un épaulement sur le spectre UV aux alentours de 300 nm nous indique un double site de glycosylation en position 3 et 7. Ces

Tableau II-10 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par un hexose et un rhamnose (16, 25, 28, 35 et 36)

Composés	16	25	28	35	36
Identification	Myricétine-3-O-rhamnose-(1-6)-hexose	Quercétine-3-O-(rhamnose-(1-6)-glucose)	Kaempférol-3-O-(rhamnose-(1-2)-hexose)	Kaempférol-3-O-(rhamnose-(1-6)-glucose)	Kaempférol-3-O-(rhamnose (1-6)-galactose)
Y_0^+/Y_1^+	1.7	1.7	2.0	1.8	1.8
$2*Y_1^+/Y_0^+$	1.2	1.2	1.0	1.1	1.1
$[M-H]^-$	625	609	593	593	593
$[M-H_2O-H]^-$	607 (56)				
$^{0,2}X_0^-$			473 (10)		
Y_1^-			447 (18)		
Z_1^-			429 (56)		
Y_0^-	317 (100)	301 (100)	285 (65)	285 (14)	285 (15)
Y_0^-	316 (93)	300 (17)	284 (100)	284 (100)	284 (100)
$[M+H]^+$	627	611	595	595	595
Y_1^+	481 (60)	465 (59)	449 (51)	449 (55)	449 (57)
Y^*	465 (7)	449 (8)	433 (5)		433 (5)
Y_0^+	319 (100)	303 (100)	287 (100)	287 (100)	287 (100)
$[M+Na]^+$		633	617		617
$[Y_1+Na]^+$		487 (40)	471 (17)		471 (29)
$[B_2+Na]^+$		331 (100)	331 (100)		331 (100)
$[Y_0+Na]^+$			309 (6)		309 (8)
$[B_1+Na]^+$			185 (6)		

deux composés peuvent donc être identifiés comme étant des quercétines-3 et 7-*O*-hexose, les deux hexoses pouvant être des galactoses ou des glucoses. Pour le composé **15**, la fragmentation de l'ion $[M+Na]^+$ formant l'ion $[B_2+Na]^+$ à m/z 347 (162+162+23) confirme l'hypothèse d'une quercétine substituée par un disaccharide (Satterfield and Brodbelt 2001). L'enchaînement 1-2 des deux hexoses se traduit par la présence des ions Z_1^- à m/z 445 et $^{0,2}X_0^-$ à m/z 505 en quantités non négligeables lors de la fragmentation de l'ion quasimoléculaire après ionisation négative (Ferrerres *et al.* 2004). Le composé **15** peut donc être partiellement identifié comme étant une quercétine-3-*O*-(hexose-(1-2)-hexose).

Lors de la fragmentation de l'ion quasimoléculaire $[M-H]^-$ du composé **23**, le pic de base observé est celui de l'ion Y_0^- (m/z 285). Il s'agit donc d'un kaempférol-*O*-dihexose (Tableau II-9). L'enchaînement 1-2 des deux hexoses se traduit, comme attendu, par la présence d'un ion Z_1^- intense à m/z 429 issu de $[M-H]^-$ (Ferrerres *et al.* 2004). **23** est donc un kaempférol-3-*O*-(hexose-(1-2)-hexose).

La fragmentation MS^2 des ions $[M+H]^+$ des composés **16**, **28**, **25**, **35** et **36** engendre les ions fragments $[M+H-146]^+$, correspondant à l'ion Y_1^+ (perte d'un rhamnose), $[M+H-162]^+$ correspondant à l'ion Y^* (perte d'un « glucose interne ») $[M+H-146-162]^+$ correspondant à l'ion Y_0^+ (perte d'un hexose par rapport à Y_1). Les ions Y_0^+ formés ont des m/z respectifs à 317, 287, 303, 287 et 287 (Tableau II-10). Les *ratios* Y_0^+/Y_1^+ étant compris entre 1.7 et 2.0 pour ces cinq composés, le groupement glycosylé doit être situé en position 3. Le composé **25** est donc une quercétine-3-*O*-(rhamnose-hexose), **16** une myricétine-3-*O*-(rhamnose-hexose) et les composés **28**, **35** et **36**, des kaempférol-3-*O*-(rhamnose-hexose). Pour les composés **25**, **28** et **36**, la fragmentation de l'adduit sodium $[M+Na]^+$ conduisant principalement à l'ion disaccharide ($[B_2+Na]^+$ à m/z 317) confirme la présence de ce dernier (Satterfield and Brodbelt 2001). Lors de la fragmentation de l'ion quasimoléculaire $[M-H]^-$, on observe les ions $^{0,2}X_0^-$, Y_1^- et Z_1^- (respectivement à m/z 473, 447 et 429) uniquement pour le composé **28**, ce qui suggère un enchaînement 1-2 des sucres pour ce composé et 1-6 pour les autres (Cuyckens *et al.* 2001). De plus, le *ratio* $2xY_1/Y_0$ est tout juste égal à 1 pour **28** et est supérieur à 1 pour **16**, **25**, **35** et **36** ce qui confirme l'enchainements des sucres (Abad-Garcia *et al.* 2009). Il est à noter que l'ordre d'élution des composés **28**, **35** et **36** corrobore cette hypothèse [les composés 3-*O*-rhamnose-(1-2)-hexose sont plus polaires que les composés 3-*O*-rhamnose-(1-6)-hexose (Kite and Veitch 2009)]. Le composé **28** peut donc être partiellement identifié comme étant le kaempférol-3-*O*-(rhamnose (1-2) hexose), l'hexose pouvant être un glucose ou un galactose (il pourrait même s'agir d'un mélange des deux

Tableau II-11 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par un hexose et un pentose (20, 22, 26, 31 et 32)

Composés	20	22	26	31	32
Identification	Quercétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	Quercétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	Isorhamnétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	Kaempférol-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	Kaempférol-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)
$Y_0^{\bullet}/Y_0^{-}$	1.85	2.17	0.6	0.54	0.54
Y_0^{+}/Y_1^{+}	1.5	2.0	1.9	1.1	1.8
$2*Y_1^{+}/Y_0^{+}$	1.32	1.02	1.08	1.84	1.14
$[M-H]^{-}$	595	595	609	579	579
$[M-H-OCH_3]^{-}$			578 (10)		
$^{0,2}X_0^{-}$	475 (12)	475 (14)	489 (10)	458 (6)	458 (6)
Y_1^{-}	463 (21)	463 (23)	477 (6)	447 (14)	447 (14)
Z_1^{-}	445 (35)	445 (46)	459 (51)	429 (17)	429 (17)
Y_0^{-}	301 (54)	301 (46)	315 (100)	285 (100)	285 (100)
$Y_0^{\bullet}$	300 (100)	300 (100)	314 (60)	284 (54)	284 (54)
MS^3			300 (100) 299 (55)		
$[M+H]^{+}$	597	597	611	581	581
Y_1^{+}	465 (66)	465 (51)	479 (54)	449 (92)	449 (57)
Y_0^{+}	303 (100)	303 (100)	317 (100)	287 (100)	287 (100)
$[M+Na]^{+}$	619	619	633		
$[B_2+Na]^{+}$	317 (100)	317 (100)	317 (100)		

Tableau II-12 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes substitués par un hexose et un pentose (38, 42 et 51)

Composés	38	42	51
Identification	Quercétine-3-O-(pentose-rhamnose)	Quercétine-3-O-(xylose-(1-2)-rhamnose)	Kaempférol-3-O-(pentose-rhamnose)
$Y_0^{\bullet}/Y_0^{-}$	0	0.2	1.7
Y_0^{+}/Y_1^{+}	0.2	0.1	0.1
$2*Y_1^{+}/Y_0^{+}$ dxccx2éééééééé	12	20	17
$[M-H]^{-}$	579	579	563
Y_1^{-}			431 (26)
Z_1^{-}			413 (29)
Y_0^{-}	301 (100)	301 (100)	285 (60)
$Y_0^{\bullet}$		300 (22)	284 (100)
$[M+H]^{+}$	581	581	565
Y_1^{+}	449 (100)	449 (100)	433 (100)
Z_1^{-}			415 (11)
Y_0^{+}	303 (17)	303 (10)	287 (12)

puisque'ils ne sont pas facilement séparables (Kite and Veitch 2009)). L'analyse d'un témoin commercial, dans des conditions chromatographiques identiques, nous permet d'identifier **25** comme étant la quercétine-3-O-(rhamnose-(1-6)-glucose) ou rutoside. **35** et **36** peuvent être ainsi identifiés comme étant des kaempférol-3-O-(rhamnose-(1-6)-hexose), l'hexose pouvant être un glucose ou un galactose.

Lors de la fragmentation MS^2 de l'ion $[M+H]^+$ des composés **20**, **22**, **26**, **31** et **32**, des pertes successives de 132 u et 162 u sont observées (Tableau II-11). Les ions Y_0^+ formés ont des m/z respectifs à 303, 303, 317, 287 et 287. Les composés **20** et **22** sont donc des quercétine-3-O-(pentose-hexose), **26** une isorhamnétine-3-O-(pentose-hexose) et les composés **31** et **32** des kaempférol-3-O-(pentose-hexose). Pour les trois premiers composés, la fragmentation de l'adduit sodium $[M+Na]^+$ conduisant principalement à l'ion disaccharide ($[B_2+Na]^+$ à m/z 317) confirme la présence de ce dernier (Satterfield and Brodbelt 2001). Pour ces 5 dérivés, on peut également remarquer la présence caractéristique des ions $^{0,2}X_0^-$ et Z_1^- lors de la fragmentation de l'ion $[M-H]^-$. Dans le cas des dérivés substitués par un disaccharide hexose-rhamnose ou hexose-hexose, la présence de ces ions implique l'enchaînement 1-2 des deux sucres (Cuyckens *et al.* 2001; Ferreres *et al.* 2004). On peut supposer qu'il en est de même pour les dérivés substitués par un disaccharide hexose-pentose (Figure II-5). Les composés **20** et **22** sont donc partiellement identifiés comme étant des quercétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose), le composé **26** comme étant l'isorhamnétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose) et les composés **31** et **32** comme étant des kaempférol-3-O-(pentose-(1-2)-hexose), les pentoses pouvant être des arabinoses ou des xyloses, et les hexoses des glucoses ou des galactoses.

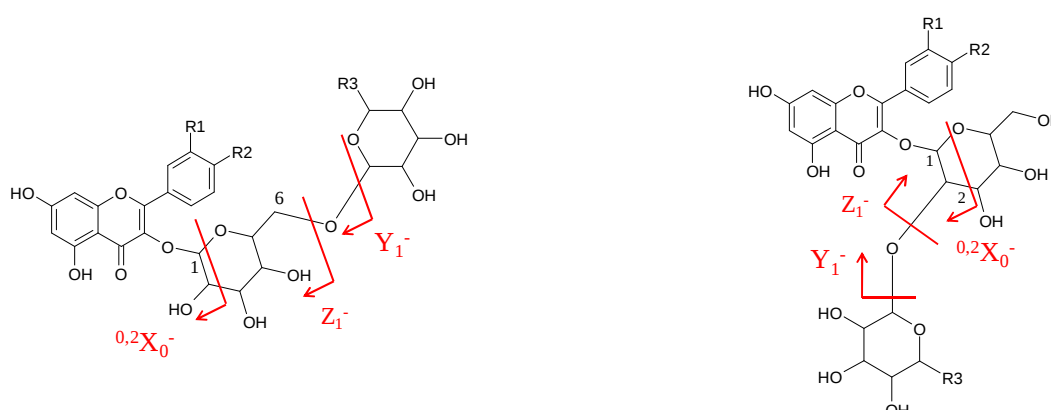


Figure II-5 : Fragmentations préférentielles des flavonoïdes diglycosylés selon l'enchaînement 1-6 ou 1-2 des sucres

Tableau II-13 : Spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des flavonoïdes triglycosylés

Composés	12	14	18
Identification	Quercétine-3-O-(rhamnose-rhamnose-hexose)	Quercétine-3-O-(hexose-(1-2)-pentose-(1-6)-rhamnose)	Kaempférol-3-O-(rhamnose-rhamnose-hexose)
Y_0^-/Y_0^-	1.9	1.4	1.4
Y_0^+/Y_1^+	2.3	5.0	2.4
$2*Y_1^+/Y_0^+$			
$[M-H]^-$	755	741	739
Y_2^-	609 (48)	609 (62)	593 (30)
Z_2^-		591 (86)	575 (100)
$^{0,2}X_0^-$		475 (28)	
Y_1-			
Y_0^-	301 (53)	301 (73)	285 (14)
$Y_0^\bullet$	300 (100)	300 (100)	284 (19)
$[M+H]^+$	757	743	741
$Y_2^+(-132)$		611 (17)	
$Y_2^+(-146)$	611 (79)	597.2 (20)	595 (77)
$Y_1^+(Y_2^+-146)$	465 (43)	465 (37)	449 (41)
$Y^*(Y_2^+-162)$	449 (21)	449 (9)	433 (20)
Y_0^+	303 (100)	303 (100)	287 (100)
$[M+Na]^+$	779		763
$[Y_2+Na]^+$	633 (30)		617 (23)
$[B_3+Na]^+$	477 (100)		477 (100)
$[B_2+Na]^+$	331 (15)		331 (19)

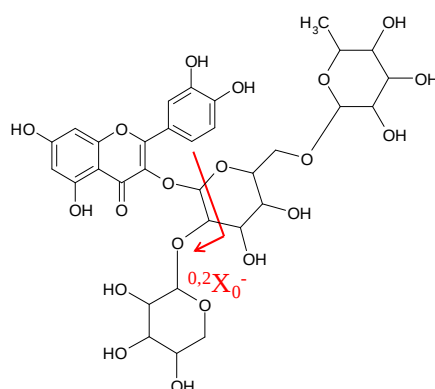


Figure II-6 : Fragmentation du composé 14

Lors de la fragmentation MS² de l'ion [M+H]⁺ des composés **38**, **42** et **51**, des pertes successives de 132 u et 146 u sont observées (Tableau II-12). Les ions Y₀⁺ formés sont associés à des pics apparaissant respectivement à *m/z* 303, 303 et 287. Les spectres de fragmentation des composés **38** et **42** sont quasiment identiques. Seul le pourcentage de l'ion [M+H-168]⁺ est légèrement différent (34 contre 12%). Lors de la fragmentation du composé **51**, des fragments supplémentaires sont observés par rapport aux composés **38** et **42** : Y₁⁻ et Z₁⁻ lors de la fragmentation de [M-H]⁻, et Z₁⁻ lors de la fragmentation de [M+H]⁺. Le radical Y₀[•] est aussi beaucoup plus abondant. Nous ne pouvons pas actuellement expliquer ces différences et donc la détermination structurale de ces trois composés n'est donc que partielle : quercétine-O-(pentose-rhamnose) pour **38** et **42**, kaempférol-O-(pentose-rhamnose) pour **51**.

II. 2. 2. 3. Dérivés triglycosylés

Le composé **12** est un dérivé de la quercétine (Y₀ à *m/z* 303 en mode positif et à *m/z* 301/300 en mode négatif) (Tableau II-13). Lors de la fragmentation de l'ion [M+H]⁺, on observe la perte successive de trois unités osidiques : deux rhamnoses (-146 u x 2), puis un hexose (-162u). On observe aussi la perte d'un « glucose interne » Y^{*} (-162u par rapport à Y₂). Lors de la fragmentation de l'adduit sodium [M+Na]⁺, le fragment majoritaire est la partie osidique à *m/z* 477 ce qui correspond au trisaccharide [B₃+Na]⁺ ou [rha+rha+hex+Na]⁺. Le fragment disaccharide [B₂+Na]⁺ est aussi observé. Plusieurs possibilités sont envisageables pour l'enchaînement des sucres : une chaîne ramifiée (les deux rhamnoses sont accrochés en position 2 et 6 de l'hexose), ou bien un enchaînement linéaire (un rhamnose accroché sur l'autre rhamnose, lui-même accroché sur l'hexose en position 2 ou 6).

Le composé **18** est un dérivé du kaempférol (Y₀ : *m/z* 287 en positif et 285/284 en négatif) (Tableau II-13). Il présente la même fragmentation des ions [M+H]⁺ et [M+Na]⁺ que le composé **12**. Le spectre de fragmentation de l'ion [M-H]⁻ est par contre différent, ce qui pourrait être expliqué par une modification dans l'enchaînement différent des sucres.

Le composé **14** est un dérivé de la quercétine (Y₀ à *m/z* 303 en mode positif et à *m/z* 301/300 en mode négatif) (Tableau II-13). En UV, la présence d'un épaulement à 301 nm exclut une double glycosylation en position 3 et 7. On est donc en présence d'une quercétine-3-O-triglycosylée. Lors de la fragmentation de l'ion [M+H]⁺, deux ions pouvant être associés à Y₂⁺ sont observés : un premier dû à la perte d'un pentose à *m/z* 611 ([M+H-132]⁺) et un deuxième, à la perte d'un rhamnose à *m/z* 597 ([M+H-146]⁺). Cette fragmentation exclut un enchaînement linéaire des 3 sucres. Un ion associé à Y₁ est observé à *m/z* 465 indiquant que le

Tableau II-14 : Récapitulatifs des flavonoïdes isolés

Composé	Extrait	Masse en mg	Pureté à 350 nm	pureté à 250 nm
35	188	55,7	80	79
40	540	35,6	83	82
	154	16,0	86	80
42	347	10,3	81	83
52	540	66,2	71	66

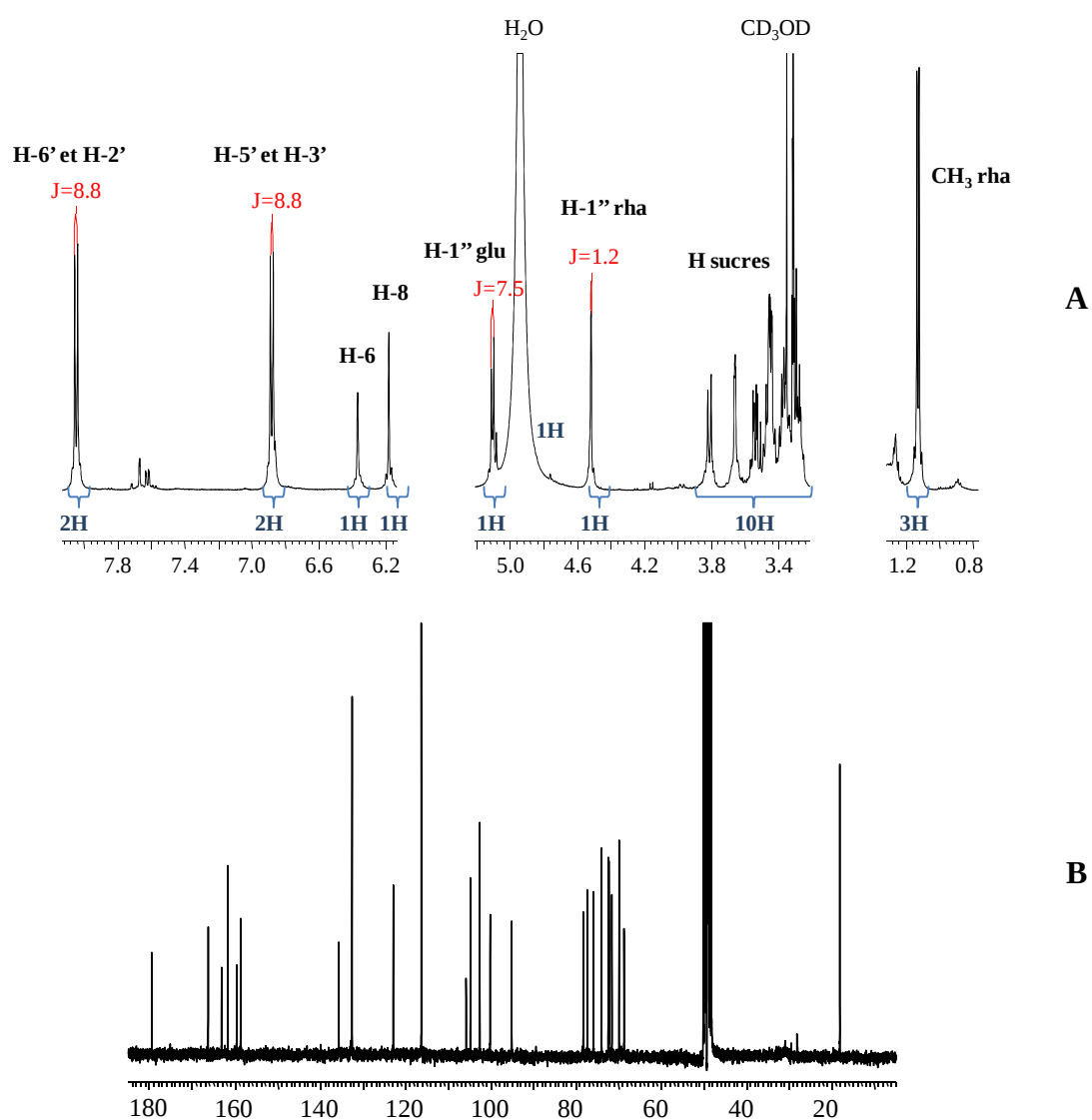


Figure II-7 : Spectres de RMN ^1H (270 MHz, A) et ^{13}C (67,5 MHz, B) du composé 35 (CD_3OD , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm).

troisième sucre est un hexose ($[Y_0+162]^+$). La présence d'un ion à m/z 449 correspondant à Y^* (perte d'un « glucose interne ») indique que le rhamnose se situe sur l'hexose. L'ion à m/z 475 lors de la fragmentation de l'ion quasimoléculaire $[M-H]^-$, provient de la coupure [0, 2] de l'hexose. La perte observée correspond à la perte du sucre en position 6, additionnée de la perte d'une partie de l'hexose. Ici, la masse perdue est de 266 u ce qui correspond à 146+120 u, c'est à dire la perte du rhamnose (Figure II-6). Le rhamnose est donc situé en position 6 de l'hexose et le pentose en position 2. **14** est donc une quercétine-3-*O*-(hexose-(1-2)-pentose-(1-6)-rhamnose).

II. 3. Identification par RMN

Afin de compléter l'identification des flavonoïdes du genre *Hydrangea*, quatre flavonoïdes ont été isolés et analysés par RMN (Tableau II-14).

II. 3. 1. Composé 35

La spectrométrie UV-Visible et la spectrométrie de masse nous ont permis de montrer que le composé **35** possède une structure de type kaempférol-3-*O*-rhamnose-(1-6)-hexose.

En RMN- 1H , les protons du cycle A d'un flavonoïde apparaissent entre 6 et 6.5 ppm (Mabry *et al.* 1970). Dans cette zone du spectre de **35** (Figure II-7), nous observons deux protons aromatiques ayant la même constante de couplage et formant deux doublets à δ_H 6.18 et 6.36 ppm ($J = 2.1$ Hz), typiques d'un couplage en *meta*. Ces signaux sont caractéristiques du cycle A d'un flavonoïde substitué en position 5 et 7 et peuvent être attribués aux protons H-6 et H-8 respectivement (Mabry *et al.* 1970). Les protons du cycle B d'un flavonoïde sont visibles sur un spectre de RMN- 1H entre 6.7 et 7.9 ppm (Mabry *et al.* 1970). Sur le spectre de RMN- 1H du composé **35**, nous observons deux doublets intégrant chacun pour deux protons et couplant en *ortho* à δ_H 8.05 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2' et H-6') et 6.88 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3' et H-5'). Ce système AA'BB' sur le cycle B nous permet de placer le groupement hydroxyle en position 4'. Ces données semblent confirmer les hypothèses formulées grâce à la spectrométrie de masse quant à la présence de la génine kaempférol. Nous observons les signaux de deux protons anomériques à δ_H 5.12 (d, $J = 7.5$ Hz) et 4.52 ppm (d, $J = 1.2$ Hz) confirmant la présence de deux sucres.

Le spectre de RMN- ^{13}C du composé **35** présente 27 signaux distincts dont 15 correspondent aux signaux de la génine d'un flavonoïde. Parmi ceux-ci, nous distinguons un signal à 179.3 ppm correspondant au carbonyle en position 4 et un signal à 135.5 ppm

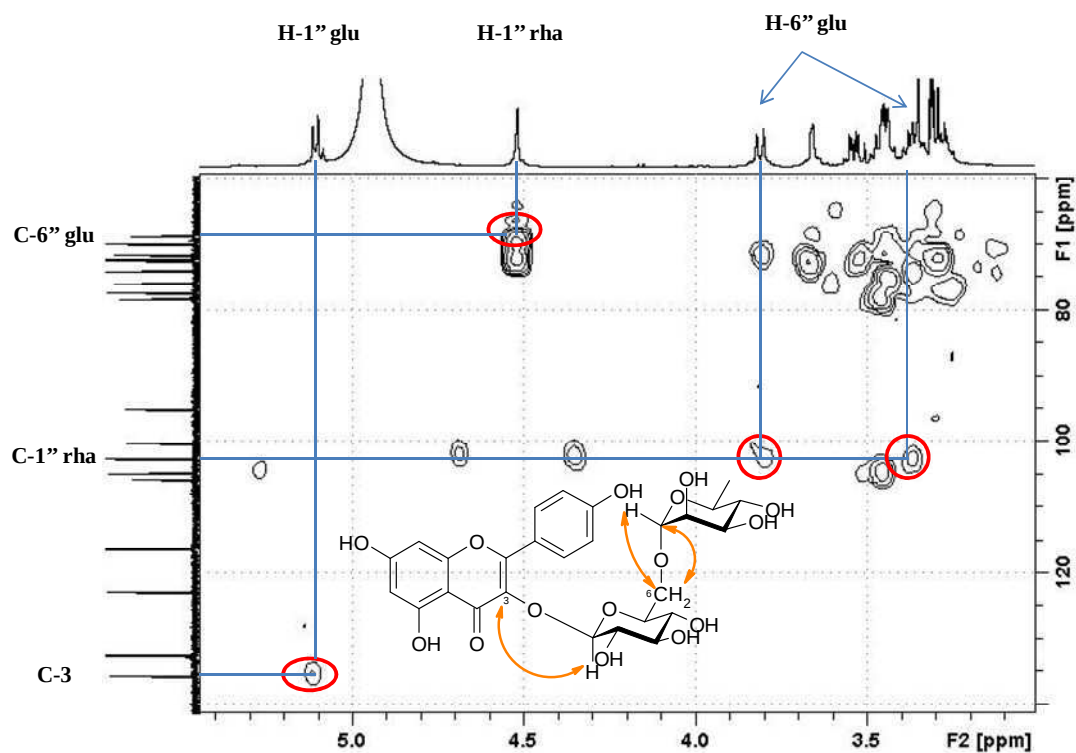


Figure II-8 : Spectre HMBC du composé 35 (500 MHz, CD₃OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm).

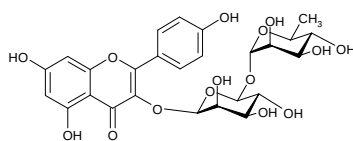


Figure II-9 : Structure du composé 35

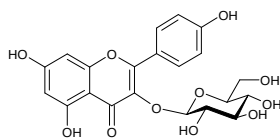


Figure II-10 : Structure du composé 40

caractéristique du carbone en position 3 d'un flavonol. Les deux signaux à 100.0 et 94.9 ppm sont caractéristiques des carbones en positions 6 et 8 du cycle A.

Parmi les autres signaux, nous observons les déplacements chimiques de 9 carbones aliphatiques oxygénés (entre 68 et 79 ppm), de 2 carbones pouvant correspondre à des carbones anomériques (δ_C 102.4 et 104.6 ppm) et d'un carbone d'un groupement méthyle (δ_C 18.0 ppm). Ces déplacements sont caractéristiques, d'une part, d'un glucopyranose (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' respectivement à δ_C 75.8, 78.1, 71.4, 77.2 et 68.6 ppm) dont on note (en RMN- 1H) la configuration β grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique ($J=7.5$ Hz) et, d'autre part, d'un rhamnopyranose (C-2''', C-3''', C-4''', C-5''' et C-6''' respectivement à δ_C 72.1, 72.3, 73.9, 69.7 et 18.0 ppm) en configuration α (constante de couplage du proton anomérique H-1''' $J = 1.2$ Hz) (Agrawal 1992; Senatore *et al.* 2000; Kazuma *et al.* 2003).

Par ailleurs, les corrélations HMBC observées entre le proton à δ_H 4.52 ppm (H-1''rha) et le carbone situé à δ_C 68.6 ppm (C-6''glu), et celle entre les protons à δ_H 3.36 et 3.81 ppm (H-6''glu) et le carbone situé à δ_C 104.6 ppm (C-1''rha) ont permis de montrer que les deux sucres sont liés en 1-6, et d'identifier le diglycoside au rutinose (rhamnopyranosyl-(α 1-6)-glucopyranoside). Le rutinose est fixé sur la génine kaempférol en position 3 comme l'atteste la corrélation HMBC entre le carbone C-3 et le proton anomérique H-1''(Figure II-8). Le composé **35** peut ainsi être clairement identifié comme étant le kaempférol 3-O-rutinoside (Figure II-9).

II. 3. 2. Composé 40

La spectroscopie UV-Visible et la spectrométrie de masse nous ont permis de montrer que le composé **40** possède une structure de type kaempférol-3-O-hexose.

Les signaux de RMN- 1H de la zone correspondant aux protons de la génine sont identiques à ceux du composé **35**, ce qui confirme l'hypothèse formulée grâce à la spectrométrie de masse quant à la présence de la génine kaempférol. Nous observons un signal de proton anomérique à δ_H 5.26 ppm (d, $J = 7.1$ Hz).

Le spectre de RMN- ^{13}C du composé présente 21 signaux distincts dont six correspondent à des CH aromatiques (DEPT 135). Les déplacements chimiques de ces signaux sont sensiblement les mêmes que ceux du composé **35**. Parmi les autres signaux, nous observons les signaux de 5 carbones aliphatiques oxygénés (entre 63 et 79 ppm) dont un est un CH_2 et un signal à 105.74 ppm correspondant à un carbone anomérique. Ces déplacements en RMN- ^{13}C sont caractéristiques d'un glucopyranose (C-2'', C-3'', C-4'', C-

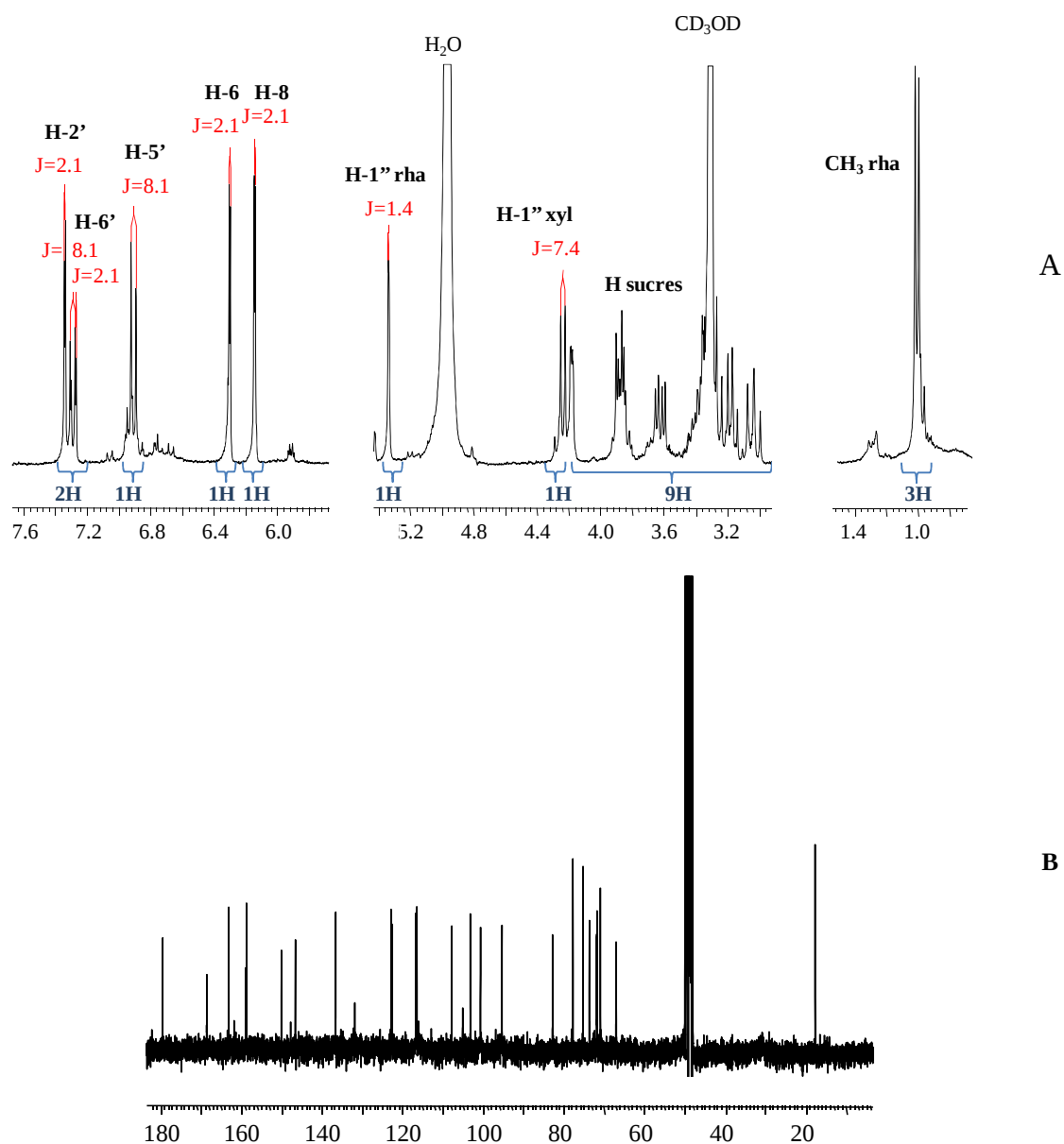


Figure II-11 : Spectre de RMN ^1H (500 MHz, A) et ^{13}C (125 MHz, B) du composé 42 (CD_3OD , $\delta_{\text{TMS}} = 0$ ppm).

5'' et C-6'' respectivement à δ_C 76.3, 78.9, 72.1, 78.8 et 63.6 ppm) dont on note (RMN- 1H) la configuration β ($J = 7.1$ Hz) (Agrawal 1992; Senatore *et al.* 2000; Kazuma *et al.* 2003).

L'hypothèse sur la structure de **40**, émise grâce à l'ordre d'élution et à l'occurrence des sucres est donc vérifiée, il s'agit bien du kaempférol-3-O-glucoside (Figure II-10).

II. 3. 3. Composé 42

La spectroscopie UV-Visible et la spectrométrie de masse nous ont permis de montrer que le composé **42** possède une structure de type quercétine-3-O-pentose-rhamnose.

L'étude des signaux de RMN- 1H de la zone correspondant aux protons de la génine (Figure II-11) met en évidence la présence de substituants hydroxyles en position 5 et 7 sur le cycle A, grâce à l'identification d'un couplage *meta* ($J = 2.1$ Hz) des protons H-6 et H-8 à δ_H 6.14 et 6.30 ppm. La substitution du noyau B est indiquée par la présence de trois protons aromatiques à δ_H 7.34 (d, $J = 2.1$ Hz), 7.29 (dd, $J = 2.1$, $J = 8.1$ Hz) et 6.90 ppm (d, $J = 8.1$ Hz) dont les constantes de couplages indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B et que celui-ci est donc 3', 4'-disubstitué. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'. Le spectre de RMN- ^{13}C du composé **42** présente 26 signaux distincts dont quinze sont attribuables à la génine flavonoïque. Parmi ceux-ci, nous distinguons un signal à δ_C 179.3 ppm correspondant au carbonyle (C-4) et un signal à δ_C 136.6 ppm caractéristique du C-3 d'un flavonol. Les deux signaux à δ_C 100.7 et 95.4 ppm sont, quant à eux, caractéristiques des C-6 et 8 du cycle A. A ce stade, nous pouvons donc formellement identifier cette génine de type flavonol comme étant la quercétine.

Les signaux de deux protons anomériques sont observés à δ_H 5.33 (d, $J = 2.1$ Hz) et 4.24 ppm (d, $J = 7.4$ Hz), confirmant la présence d'un disaccharide. La faible constante de couplage du doublet à δ_H 5.33 ppm ($J = 1.4$ Hz) est caractéristique d'une configuration en α d'un rhamnose. Le spectre HMQC nous révèle la présence de deux signaux à δ_H 3.33 et 3.39 ppm qui sont masqués sur le spectre 1D par le signal du solvant (CHD $_2$ OD) à δ_H 3.31 ppm.

Sur le spectre de RMN- ^{13}C , 11 signaux de type osidique sont observés. Les deux signaux à δ_C 103.2 et 107.8 ppm correspondent à des carbones anomériques et confirment la présence de deux sucres. Le signal à δ_C 17.8 ppm correspond à un méthyle et est caractéristique d'un rhamnose. Les 8 autres signaux, observés entre δ_C 67 et 83 ppm correspondent à des carbones aliphatiques oxygénés. La corrélation HMBC entre le carbone à δ_C 136.6 ppm et le proton anomérique H-1'' à δ_H 5.33 ppm confirme l'attachement du disaccharide en position 3 de la génine (Figure II-12). Le signal à δ_C 83 ppm correspond au carbone qui porte la liaison interglycosidique (déplacement chimique plus élevé). Les

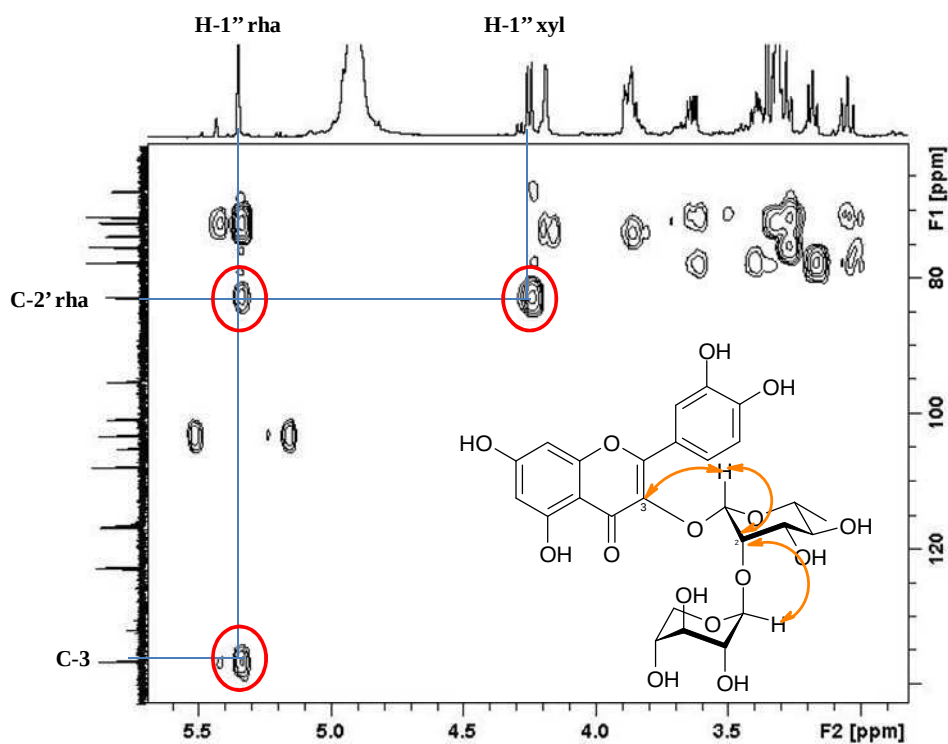


Figure II-12 : Spectre HMBC du composé 42 (500 MHz, CD_3OD , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm).

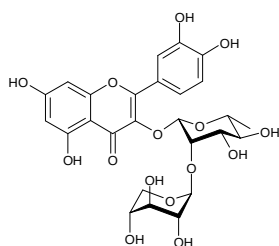


Figure II-13 : Structure du composé 42

corrélations HMBC observées entre ce carbone et les 2 protons anomériques à δ_H 5.33 et 4.24 ppm nous indiquent une liaison 1-2 des deux sucres (Figure II-12). Deux structures sont envisageables pour ce composé : la quercétine-3-O-(2''-O-arabinopyranosyl-rhamnopyranoside) et la quercétine-3-O-(2''-O-xylopyranosyl-rhamnopyranoside). Les spectres 1H et ^{13}C obtenus dans le méthanol deutéré pour notre composé ont été comparés à ceux de ces deux structures présentées dans la littérature (Nielsen *et al.* 2005). La présence d'un signal à δ_C 78 ppm permet alors d'identifier le composé **42** comme étant la quercétine-3-O-(2''-O- α -L-xylopyranosyl- α -L-rhamnopyranoside) (Figure II-13).

II. 3. 4. Composé 52

La spectroscopie UV-Visible et la spectrométrie de masse nous ont permis de montrer que le composé **52** possède une structure de type kaempférol-3-O-rhamnose

La région aromatique du spectre de RMN- 1H du composé **52** est identique à celle des composés **35** et **40**, ce qui confirme une structure de type kaempférol de la génine. Les signaux du sucre situés entre δ_H 0.94 et 5.34 ppm sont caractéristiques d'un rhamnopyranoside (désoxyhexose le plus commun chez les plantes): le proton anomérique est observable à δ_H 5.37 ppm et forme un doublet de constante de couplage $J = 1.4$ Hz attestant de la configuration α de la liaison anomérique. Ce proton est couplé avec le doublet dédoublé à δ_H 4.21 ppm ($J = 1.4, 3.2$ Hz) correspondant donc au H-2''. Celui-ci est couplé avec le doublet dédoublé à δ_H 3.72 (1H, dd, $J = 3.2; 9.2$ Hz) correspondant au H-3''. Le signal à δ_H 0.94 ppm intégrant pour trois protons est caractéristique du CH_3 d'un rhamnose. Après comparaison du spectre de RMN avec les données de la littérature (Braca *et al.* 2003), ce composé peut être identifié sans ambiguïté comme étant le kaempférol-3-O- α -rhamnoside (Figure II-14).

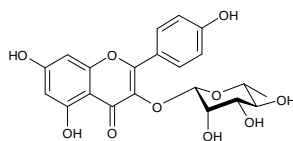


Figure II-14 : Structure du composé 52

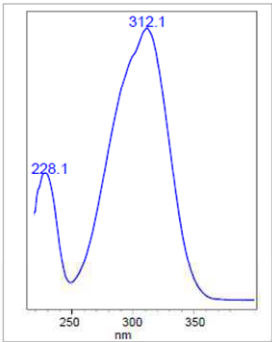
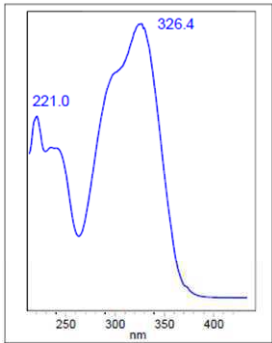
III. Dérivés d'acides cinnamiques

Dans les extraits d'*Hydrangea*, 12 composés présentent un spectre UV caractéristique de dérivés cinnamiques (Tableau II-15). Les spectres de masse en mode positif et négatif des différents composés ont été enregistrés, ainsi que leurs spectres de fragmentation en MS^2 et MS^3 . Ces données spectrales sont toutes caractéristiques d'esters de l'acide quinique. Le

mode positif nous permet d'obtenir le nombre d'acylations sur l'acide quinique (AQ) ainsi que leur nature (caféique : C, coumarique : pCo et férulique : F). En revanche, ce mode ne permet pas de déterminer l'emplacement des acylations. Par contre, en mode négatif, le spectre de fragmentation de l'ion moléculaire est caractéristique de la position de l'acylation de l'acide quinique (Clifford *et al.* 2003; Clifford *et al.* 2005).

Les composés **1**, **2**, **5** et **7-9** sont des dérivés monoacylés, **46**, **48** et **53** des dérivés diacylés. Aucun spectre de masse interprétable n'a pu être obtenu pour les composés **3**, **10** et **11**.

Tableau II-15 : Spectres UV des dérivés d'acides cinnamiques effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3% (ACQ : acide caféoylquinique ; ApCoQ : acide *p*-coumaroylquinique ; AFQ acide féruloylequinique ; AdiCQ acide dicaféoylquinique

	Tr en min	$\lambda_{\max}$ en nm	
1 ACQ?	8.8	319	 Spectre UV de 2
2 A 3-CQ	9.5	325-300(sh)	
3	11.1	327-300(sh)	
5 ApCoQ?	14.1	307	
7 A 3- pCoQ	14.9	312	
8 A 5-CQ	16.0	326-300(sh)	 Spectre UV de 7
9 A 3-FQ	18.0	326	
10	22.4	319	
11	23.9	319	
46 A 3,5-diCQ	40.1	322-300(sh)	
48 A 1,5-diCQ	40.8	327-300(sh)	
53 A x,4-diCQ	8.8	320-300(sh)	

Sh = shoulder : épaulement ; Tr : temps de rétention en CLHP-UV

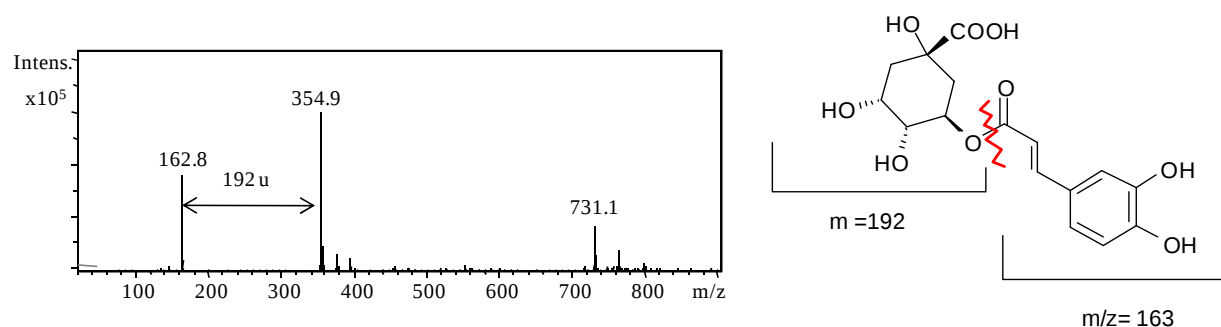


Figure II-15 : Spectre de masse (ESI^+) et fragmentation de l'acide chlorogénique (8)

Tableau II-16 : Fragmentation MS^2 et MS^3 en modes positif et négatif des dérivés d'acides cinnamiques monoacylés ; [m/z (intensité relative)]

Composés	1	2	5	7	8	9
Identification	A x-CQ ?	A 3-CQ	A x-pCoQ ?	A 3-pCoQ	A 5-CQ	A 3-FQ
$[\text{M}+\text{H}]^+$	355	355	339	339	355	369
	335 (31)	335 (4)				
	179 (100)					
	163 (66)	163 (100)			163 (100)	177 (100)
$[\text{M}-\text{H}]^-$	353	353	337	337	353	367
A	179 (34)	179 (36)	163 (100)	163 (100)	179 (2)	193 (100)
Q1	191 (100)	191 (100)	191 (10)	191 (4)	191 (100)	
Q2			173 (4)	173 (4)		173 (4)
B	135 (4)	135 (6)	119 (5)	119 (3)		
C						134 (12)
MS^3	191	191	163	163	191	193
Q2	173 (77)	173 (72)			173 (87)	
B			119 (100)	119 (100)		
C						134 (100)
Q7	127 (100)	127 (100)			127 (100)	
Q6	111 (40)	111 (37)			111 (37)	
Q5	85 (57)	85 (57)			85 (83)	

ACQ : acide caféoylquinique ; ApCoQ : acide *p*-coumaroylquinique ; AFQ acide féruloylquinique ; AdiCQ acide dicaféoylquinique

III. 1. Dérivés monoacylés

Lors de la fragmentation de l'ion $[M+H]^+$ des composés **1**, **2**, **5** et **7-9**, une perte de 192 u, correspondant à la perte d'acide quinique, est observée. La masse du pic de base observé correspond à celle de la partie cinnamique (177 : acide férulique, 163 : acide caféique, 147 : acide coumarique).

Le Tableau II-16 résume les fragmentations de ces composés en MS^2 et MS^3 dans les deux modes d'ionisation (*cf.* chapitre I II. 42. 2. Figure I-21 p 39 pour la nomenclature des fragments).

III. 1. 1. Dérivés de poids moléculaire 354

Les composés **1**, **2** et **8** présentent un ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ à m/z 355, ce qui correspond à des dérivés caféoylquiniques. L'ion fragment à m/z 163 correspond à $[M+H-192]^+$, c'est-à-dire l'ion moléculaire moins l'acide quinique. L'ion à 731 correspond à l'adduit sodium du dimère $[2M+Na]^+$. La fragmentation de l'acide chlorogénique est présentée en exemple sur la Figure II-15.

Les temps de rétention, spectre UV et spectre de masse du composé **8** correspondent à ceux du témoin d'acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique) présent au laboratoire. La fragmentation en mode négatif de l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 353 donne un pic de base de masse 191, avec un pic secondaire de masse 179 d'intensité légèrement inférieure à 5 % de celle du pic de base, ce qui correspond bien à l'ester caféique en position 5 (Clifford *et al.* 2003; Clifford *et al.* 2005). Le spectre de fragmentation MS^3 confirme cette position. De plus, ce composé a été isolé de l'extrait 540 et son spectre de RMN- 1H correspond parfaitement à celui de la littérature (Pauli *et al.* 1998; Nakatani *et al.* 2000; Choi *et al.* 2006). Ce composé est connu pour être majoritaire chez l'espèce *H. macrophylla*.

Les composés **1** et **2** ont la même fragmentation en mode d'ionisation négatif MS^2 : un pic de base à m/z 191 et un pic secondaire à m/z 179 dont l'intensité correspond à plus de 50% du pic de base. Selon Clifford *et al.* (Clifford *et al.* 2003; Clifford *et al.* 2005), cette fragmentation est caractéristique d'un ester en position 3. Le spectre de fragmentation MS^3 confirme cette position.

Néanmoins, les spectres de fragmentation en mode d'ionisation positif de ces deux composés diffèrent. L'ion moléculaire du composé **2** se fragmente majoritairement en donnant un ion à m/z 163, ce qui correspond, comme pour l'acide chlorogénique, à l'ion $[M+H-192]^+$, c'est-à-dire l'ion formé par la coupure entre l'oxygène de l'acide quinique et le carbonyle de la partie caféique. Ce fragment est aussi observé pour le composé **1**, mais le

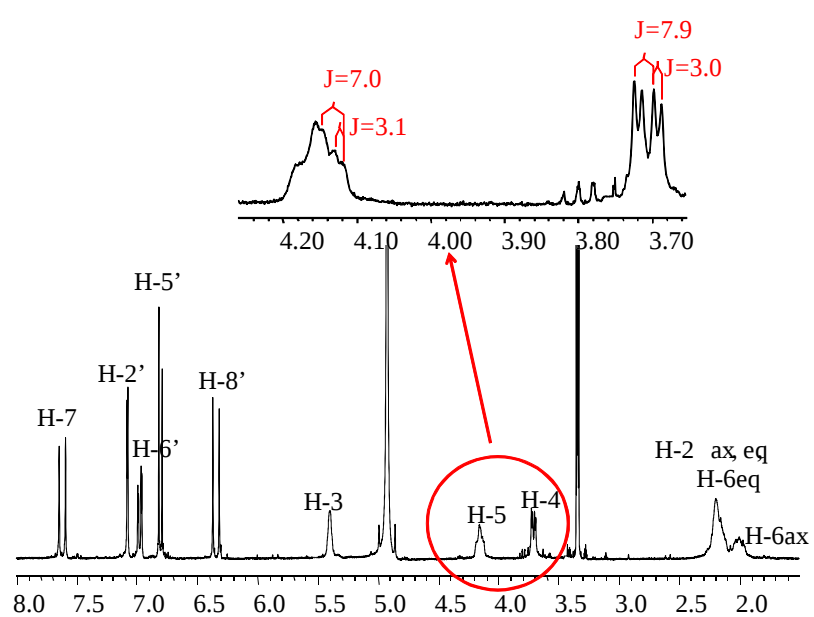


Figure II-17 : Spectre de RMN- ^1H de **2 (500 MHz, CD_3OD , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm).**

fragment majoritaire pour ce composé apparaît à m/z 179, ce qui correspond à un atome d'oxygène en plus par rapport au fragment de masse 163. Ce fragment pourrait donc correspondre à une coupure entre l'oxygène de l'acide quinique et le C-3 de la partie acide quinique.

Les spectres UV de ces deux composés sont également légèrement différents (Figure II-16). Pour le composé **2**, on observe un maximum avec épaulement à 326 nm alors que pour le composé **1**, le maximum sans épaulement est centré sur 319 nm.

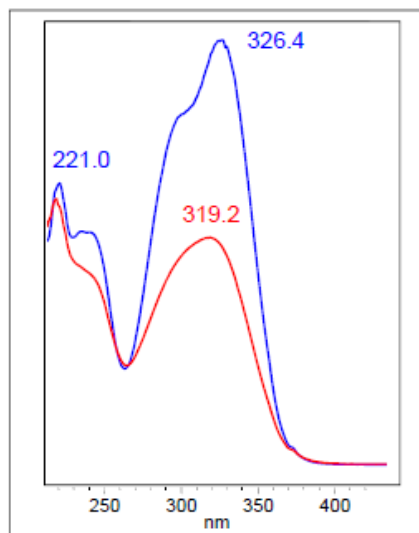


Figure II-16 : Spectres UV de 1 (rouge) et 2 (bleu) effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%

Ces deux composés ont été isolés par chromatographie d'exclusion et CLHP préparative à partir de l'extrait des sépales de l'accession 250 d'*Hydrangea macrophylla* (S9 fractions 19-22 et 23-24). Seul le composé **2** a pu être identifié, le composé **1** s'étant dégradé au cours des différentes analyses de RMN.

Le spectre de RMN- ^1H de **2** est représenté à la Figure II-17. Une comparaison de ce dernier avec les données de la littérature (Pauli *et al.* 1998; Nakatani *et al.* 2000; Choi *et al.* 2006) montre qu'il s'agit de l'acide 3-caféoylquinique. La partie caféique de la molécule est en effet représentée par 5 signaux se situant dans la zone aromatique entre 6 et 8 ppm. Les signaux à δ_{H} 7.59 et 6.31 ppm correspondent aux protons de la double liaison en 7' et 8'. Les trois autres signaux à δ_{H} 7.04 (d, $J = 2.0$ Hz), 6.77 (dd, $J = 2.0$ et 8.2 Hz) et 6.94 ppm (d, $J = 8.0$ Hz) caractérisent un système ABX. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'. Le signal à δ_{H} 5.54 ppm correspond au méthine portant la fonction ester. Le signal à δ_{H} 4.08 ppm est un faux triplet dédoublé. Les valeurs de J mesurées (3.0 et 7.9 Hz) correspondent à des conformations de type axial-équatorial et axial-axial. Ce proton se trouve

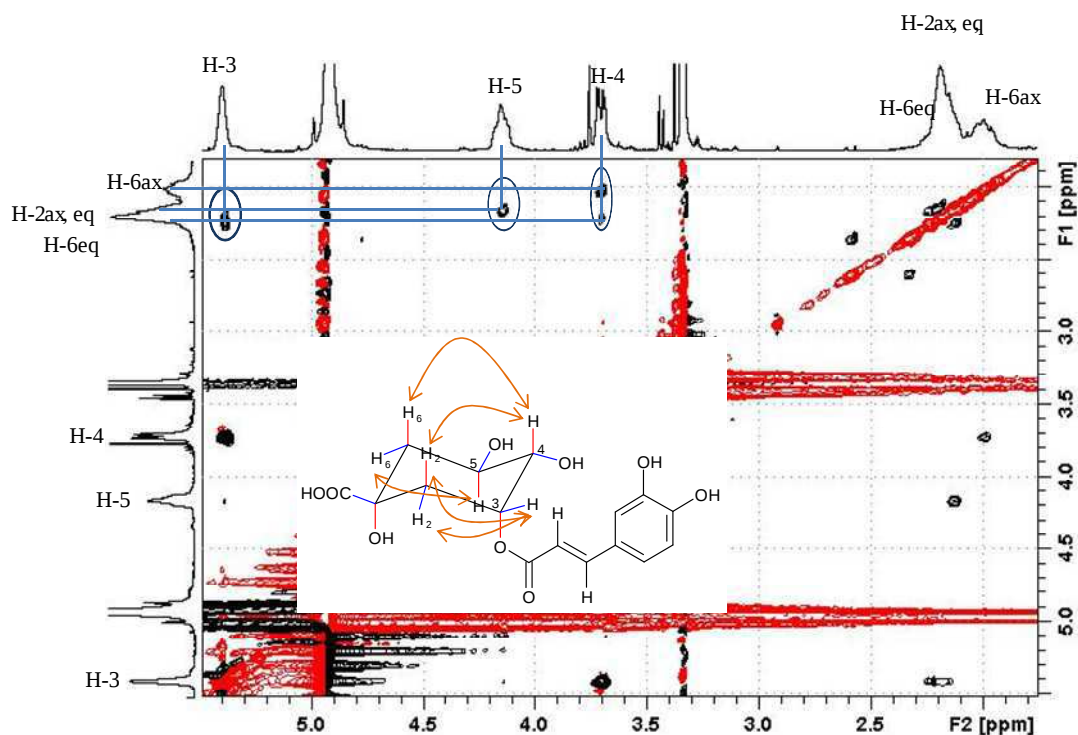


Figure II-18 : Spectre NOESY de 2 (500 MHz, CD₃OD, $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm).

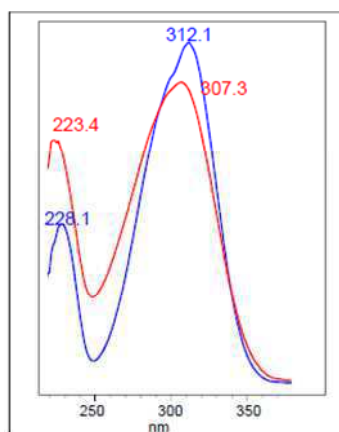


Figure II-19 : Spectres UV de 5 (rouge) et 7 (bleu) effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3%

donc en position axiale. Il est par ailleurs couplé avec deux protons en position axiale et un autre en position équatoriale. Il s'agit donc du H-5. Le doublet dédoublé à δ_H 3.67 ppm correspond au proton en position 4.

Sur le spectre NOESY de ce composé (Figure II-18), plusieurs interactions sont observées entre : H-4 et H-6ax / H-2ax, H-3 et H-2ax / H2eq et H-5 et H6eq, ce qui confirme la structure.

III. 1. 2. Dérivés de poids moléculaire 338

Les composés **5** et **7**, à m/z 339 en mode d'ionisation positive et à m/z 337 en mode d'ionisation négative, correspondent à des acides coumaroylquiniques.

En mode d'ionisation négative, le pic de base en MS^2 est à m/z 163 ce qui correspond à la perte de la partie acide quinique et est caractéristique d'un ester en position 3. Le spectre de fragmentation en MS^3 confirme cette position (Clifford *et al.* 2003; Clifford *et al.* 2005).

Comme pour les composés **1** et **2**, les spectres UV de ces deux produits sont légèrement différents : il y a un léger décalage du maximum d'absorbance (312 nm pour le composé **7** et 307 nm pour le composé **5** (Figure II-19).

Ces deux dérivés n'ayant pas été isolés, seules des hypothèses structurales peuvent être émises après une comparaison avec les composés **1** et **2**.

Le composé **7** présente ainsi un temps de rétention légèrement plus élevé que le composé **5** et son maximum d'absorbance est légèrement plus élevé. Il s'agit certainement de l'acide 3-coumaroylquinique qui, par ailleurs, est présent chez *H. macrophylla* (Takeda *et al.* 1985; Kondo *et al.* 2005). Quant au composé **5** qui n'a pas pu être identifié, il pourrait s'agir d'un homologue du composé **1**.

III. 1. 3. Dérivés de poids moléculaire 368

Le composé **9** a un $[M+H]^+$ de 369 en mode d'ionisation positive et un $[M-H]^-$ de 367 en mode d'ionisation négative, ce qui correspond à un acide féruloylquinique. En mode d'ionisation négative, le pic de base en MS^2 à m/z 193 est associé à la perte de la partie acide quinique et est caractéristique d'un ester en position 3. Le spectre de fragmentation en MS^3 confirme cette position (Clifford *et al.* 2003; Clifford *et al.* 2005).

III. 2. Dérivés diacylés

Les composés **46**, **48** et **53** sont diacylés, la masse de l'ion moléculaire en mode positif et sa fragmentation nous indiquent qu'il s'agit de dérivés de type dicaféoylquinique (Tableau

Tableau II-17 : Spectres UV (λ_{max} en nm) effectués dans les conditions d'analyse CLHP-UV : acétonitrile/eau/acide formique 0,3% et spectres de masse [m/z (intensité relative des fragments)] des dérivés d'acide chlorogénique diacylés

Composés	46	48	53
Identification	A 3,5-diCQ	A 1,5-diCQ	A x,4diCQ
Temps de rétention en min	40,1	40,8	43,6
UV	319-300 (sh)	327-300 (sh)	327-300 (sh)
[M+H] ⁺	499	499	499
		319 (84)	319 (74)
		163 (100)	163 (100)
		145 (8)	
[M-H] ⁻	515	515	515
	353 (100)	353 (100)	353 (100)
			335 (3)
			317 (3)
			299 (6)
			255 (4)
			203 (10)
Q1	191 (1)	191 (3)	191 (1)
A	179 (3)	179 (2)	179 (5)
			173 (8)
MS3 sur 353			
Q1	191 (100)		
A	179 (45)		
Q2	173 (4)		
B	135 (6)		

Sh = shoulder : épaulement

II-17). L'identification de ces composés peut être entreprise en utilisant la clé hiérarchique proposée Clifford *et al* (2005) (cf. Chapitre I. II. 2. 2. 2. Tableau I-6 p 38).

Le composé **46** présente un ion quasimoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 515. Lors de la fragmentation de cet ion en MS^3 (515->353); le fragment majoritaire à m/z 191, exclut une acylation en position 4. Le spectre MS^2 ne présente pas d'ion à m/z 335 et le fragment à m/z 179 correspond à 45% du pic de base en MS^3 . Le composé **46** peut donc être identifié comme étant l'acide 3,5-dicaféoylquinique.

Le composé **48** a été identifié comme étant l'acide 1,5-dicaféoylquinique, en comparant son temps de rétention, son spectre UV et son spectre de masse avec les composés contenus dans un extrait éthanolique d'artichaut *Cynara scolimus* (Romani *et al.* 2006).

La fragmentation MS^3 du composé **53** n'a pas pu être réalisée et nous ne pouvons donc pas caractériser sa structure de façon certaine. Néanmoins, la fragmentation MS^2 se rapproche de celle des acides x,4-dicaféoylquiniques observée par Clifford *et al* (2005), l'ion à m/z 173 étant plus particulièrement présent pour les dérivés acylé en position 4. Cependant, l'intensité relative des autres fragments ne correspond pas exactement aux données de la littérature. Nous ne pouvons donc pas conclure avec certitude sur la position de la deuxième acylation. En tout état de cause, aucun de ces dérivés ne correspond à la cynarine (acide 1,3 dicaféoylquinique **99**), ce que démontre une comparaison directe (CLHP-UV) avec un échantillon commercial.

IV. Amines polyacylées

Les composés **56** à **60** présentent un spectre UV de dérivé d'acides cinnamiques mais un spectre de masse traduisant la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote intramoléculaires. Le composé **56** a été isolé des extraits 154 et 352 et a pu être identifié par analyse en spectrométrie de masse et RMN. Par analogie avec **56**, les composés **57-60** furent ensuite directement identifiés par spectrométrie de masse.

IV. 1. Composé 56

En mode d'ionisation positif, des ions à m/z 632 et 654 correspondant respectivement à $[M+H]^+$ et à $[M+Na]^+$ ont été observés. La masse paire de ces ions nous indique la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote. L'analyse en spectrométrie de masse haute résolution nous conduit à la formule brute $C_{34}H_{37}N_3O_3$. La fragmentation MS^2 de l'ion $[M+H]^+$ donne majoritairement un ion fragment à m/z 470 correspondant à la perte de 162 u. Ce fragment perdu peut correspondre à un sucre à 6 carbones ou à un acide caféique. Un second fragment,

Tableau II-18 : Spectre infrarouge de 56

$\bar{\mu}$ en cm^{-1}	origine
1653	Elongation C=O amide secondaire ou tertiaire
1645	Elongation C=C conjuguée à un C=O
1600	Elongation C=C aromatique
1580	Elongation C=C aromatique
1510	Déformation N-H amide

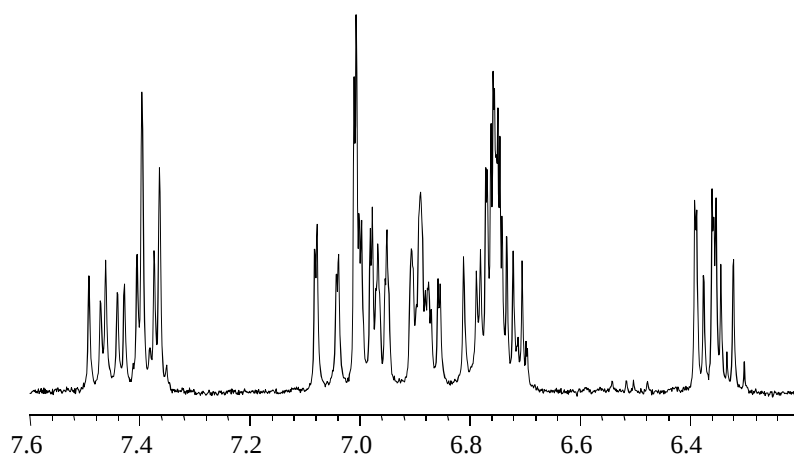


Figure II-20 : Spectre de RMN- ^1H (500 MHz, CD_3OD , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56

plus petit, est observé à m/z 452, correspondant à une perte de 18 u par rapport à l'ion à m/z 470, ce qui pourrait correspondre à une perte d'eau ou de NH_4 . Le spectre infrarouge nous révèle la présence de 5 bandes très intenses à 1653, 1645, 1600, 1580 et 1510 cm^{-1} . Ces bandes sont caractéristiques d'un cycle aromatique, d'une double liaison conjuguée et d'une fonction amide (Tableau II-18). Aucune bande du spectre ne correspond à une fonction amine primaire, secondaire ou tertiaire ni à une fonction ester. Les acides caféiques seraient donc liés au reste de la molécule par des fonctions amides secondaires ou tertiaires. Afin de vérifier la présence d'un ou plusieurs acides phénoliques sur la molécule, l'analyse par RMN du composé purifié a été entreprise.

Une première analyse dans le méthanol deutéré est présentée Figure II-20. Ce spectre de RMN- ^1H est très complexe, ceci étant peut être dû à la présence de conformères. En effet, la présence d'un atome d'azote dans une molécule peut induire un équilibre dû à la rotation des groupements portés par ce dernier, si la vitesse des échanges est inférieure à celle de la fréquence d'observation (ici 500 M cycles par seconde). Plus la molécule contient d'atomes d'azote et plus le nombre de conformères sera important. Le spectre de RMN- ^1H de la molécule sera alors d'autant plus complexe.

Afin d'accélérer l'interconversion des conformères et donc de simplifier le spectre de RMN- ^1H correspondant, une série d'analyse a été réalisée dans le DMSO- d_6 à différentes températures (Figure II-21). Lorsque la température augmente, on peut remarquer une diminution du nombre de signaux ainsi qu'un affinement de ceux-ci (Figure II-21). Le spectre réalisé à 50°C étant le plus « interprétable » (signaux aromatiques mieux définis), nous nous baserons sur celui-ci. L'analyse dans le DMSO- d_6 nous permet également d'observer les signaux correspondant aux fonctions hydroxyles et éventuellement amines ou amides.

Les signaux à δ_{H} 9.0, 8.7 et 7.8 ppm (Figure II-22), intégrant respectivement pour 3, 3 et 2 protons, sont absents du spectre de RMN- ^1H enregistré dans le méthanol deutéré. Ils correspondent par conséquent à des protons échangeables.

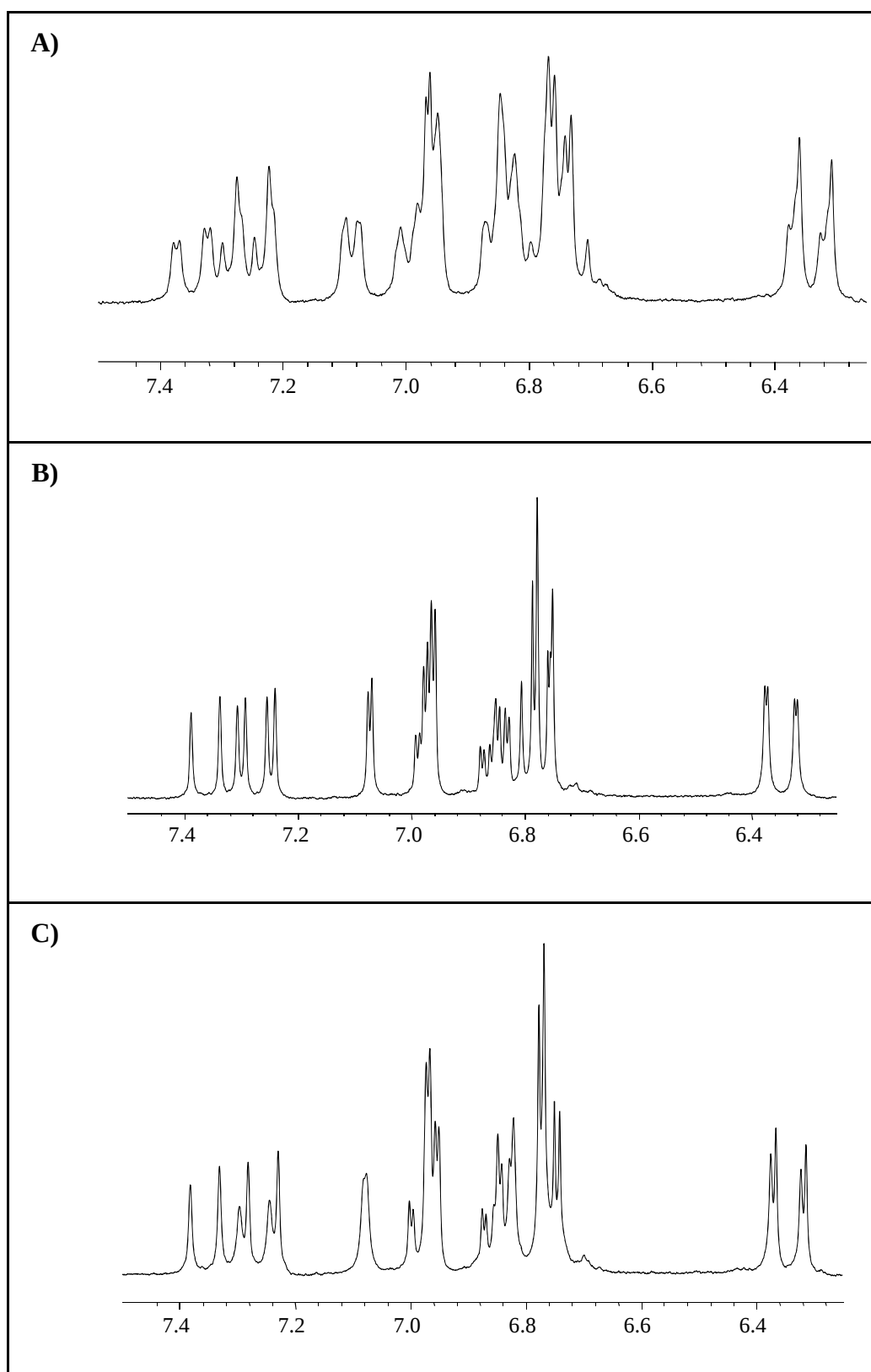


Figure II-21 : Spectres de RMN- ^1H (500MHz, DMSO- d_6 , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56 : A) 20°C ; B) 50°C et C) 80°C

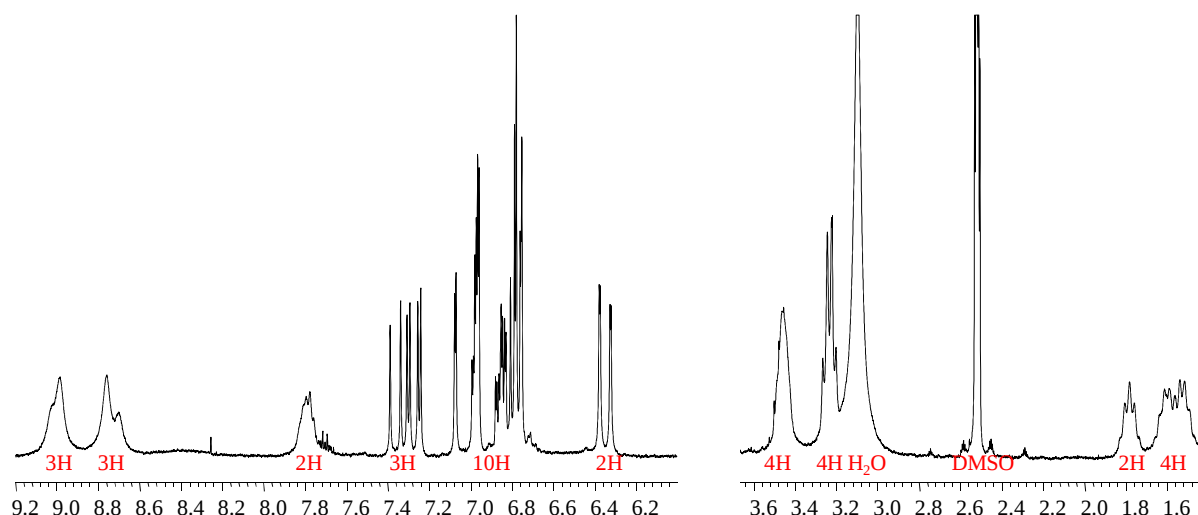


Figure II-22 : Spectres de RMN- ^1H (500MHz, DMSO- d_6 , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56 à 50°C

Les signaux entre δ_{H} 6.2 et 7.4 ppm correspondent à des protons aromatiques (Figure II-23). Le massif entre δ_{H} 7.2 et 7.4 ppm, intégrant pour 3 protons, est la superposition de 3 doublets ayant des constantes de couplage de 15.3, 15.6 et 15.7 Hz respectivement. Il caractérise donc 3 doubles liaisons *trans*. Les signaux centrés sur δ_{H} 6.3 ppm, intégrant pour deux protons, correspondent à deux autres doublets de doubles liaisons *trans* ($J = 15.7$ et 15.6 Hz).

Le signal à δ_{H} 7.07 ppm, intégrant pour 1 proton, est un doublet ayant une constante de couplage de 2.0 Hz. Il correspond à un proton aromatique ayant un voisin en *méta*. Le signal entre δ_{H} 6.95 et 7.00 ppm intégrant pour 3 protons est la superposition de plusieurs signaux dont la multiplicité n'est pas interprétable. Le massif entre δ_{H} 6.82 et 6.88 ppm, intégrant pour 2 protons, est la superposition de deux doublets dédoublés ayant des constantes de couplage de 2.0 et 8.1 Hz. Ils correspondent à deux protons ayant chacun un voisin en *ortho* et un voisin en *para*.

Le signal entre δ_{H} 6.75 et 6.81 ppm, intégrant pour 4 protons, est en fait la superposition de 3 doublets :

- le premier, correspondant à 2 protons équivalents, est centré sur δ_{H} 6.76 ppm avec une constante de couplage de 8.1 Hz. Il s'agit d'un proton aromatique ayant un voisin en *ortho*.
- un deuxième, centré sur δ_{H} 6.77 ppm avec une constante de couplage de 15,3 Hz. Il s'agit du signal de la double liaison.
- un dernier, également centré sur δ_{H} 6.77 ppm avec une constante de couplage de 8,11 Hz. Il s'agit d'un proton aromatique ayant un voisin en *ortho*.

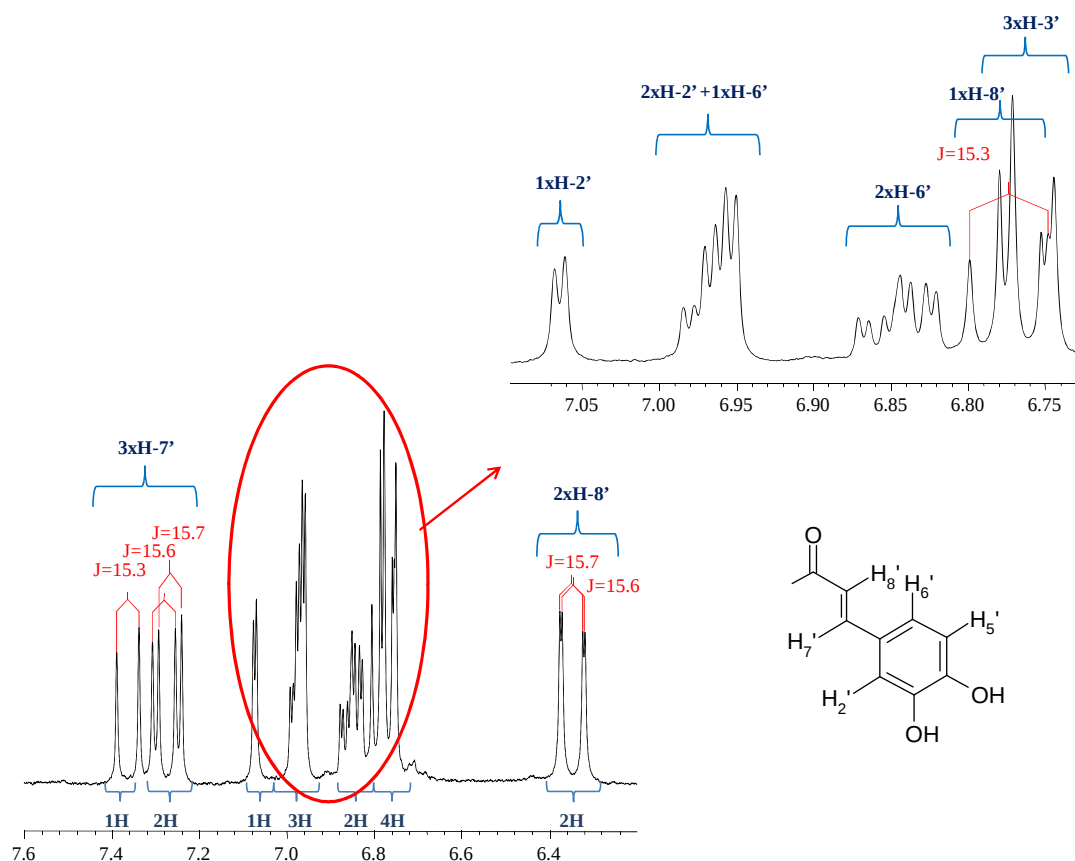


Figure II-23 : Expansion de la région aromatique du spectre de RMN- ^1H (500MHz, DMSO- d_6 , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56 à 50°C

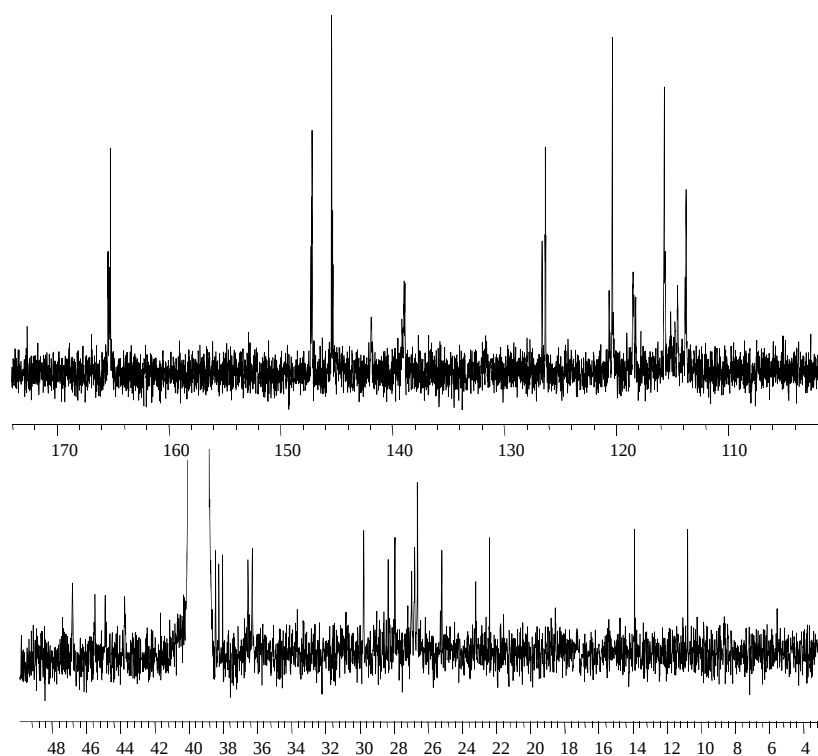


Figure II-24 : Spectre de RMN- ^{13}C (500MHz, DMSO- d_6 , $\delta_{\text{TMS}}=0$ ppm) de 56 à 20°C

Au final, on est en présence de 3 doubles liaisons *trans* et de 6 protons aromatiques. Parmi ces 6 protons, 1 possède un voisin en *mé*ta, 2 possèdent 2 voisins en *ortho* et *mé*ta et 3 possèdent 1 voisins en *ortho*. Il ne manque donc plus que les 3 protons dont la multiplicité est indéterminée pour former 3 systèmes ABX distincts.

Il pourrait donc s'agir des signaux partiellement superposés de 3 acides caféiques. Les 2 signaux échangeables intégrant chacun pour 3 protons à δ_H 9.0 et 8.7 ppm seraient alors associés aux 6 fonctions hydroxyles de ces acides. Parmi les signaux restants, on distingue :

- 2 autres protons échangeables à δ_H 7.8 ppm pouvant correspondre aux protons de deux groupements NH de fonctions amides.
- 4 signaux à δ_H 1.40, 1.78, 3.23 et 3.45 ppm, intégrant respectivement pour 4, 2, 4 et 4 protons, pouvant correspondre à 7 groupements CH_2 dont certains seraient équivalents.

En RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 20°C) (Figure II-24), les signaux autour de δ_C 165 ppm correspondent à des carbonyles, certainement ceux des groupements caféiques précédemment identifiés.

Les signaux à δ_C 110-145 ppm peuvent être associés aux cycles aromatiques et aux doubles liaisons et correspondent donc aux signaux des 3 groupements caféiques. Aucun signal n'est observé entre δ_C 60 et 80 ppm. La molécule ne possède donc pas de carbone aliphatique porteur d'oxygène sous la forme de fonction hydroxyle ou ester. Les 7 CH_2 apparaissent entre δ_C 27 et 45 ppm.

Nous sommes donc en présence d'une molécule comportant 3 groupements caféiques, 7 CH_2 et un nombre impair d'azotes, deux sont sous la forme d'amides secondaires et un sous forme d'amide tertiaire.

Dans les généralités du premier chapitre, nous avons observé que les acides cinnamiques pouvaient se trouver naturellement sous forme d'amides tels que certains dérivés de la spermidine (Bruneton 2010). Le composé **56** pourrait donc être la tricaféoylspermidine. Dans la bibliographie, seulement deux publications mentionnent cette molécule (Bokern *et al.* 1995; Walters *et al.* 2001)..

En ce qui concerne les signaux correspondant à la chaîne spermidine, l'attribution des protons a été effectuée par comparaison de notre spectre avec celui décrit par Bokern *et al.* (1995) et celui de la triféruoylspermidine (analyse plus récente et effectuée dans le DMSO- d_6 à 60°C donc dans des conditions plus proche des nôtres) (Zamble *et al.* 2006). Dans cette dernière publication sont aussi disponibles les données de RMN- ^{13}C . On peut remarquer que

les déplacements chimiques des protons et des carbones de la chaîne spermidine ne varient quasiment pas selon les substituants (caféique, coumaroyl ou féruloyle) et nous pouvons donc aisément les comparer aux nôtres.

Les quatre signaux à δ_H 1.2-1.6, 1.78, 3.23 et 3.45 ppm, intégrant respectivement pour 4, 2, 4 et 4 protons, correspondent aux protons de la chaîne carbonée (Figure II-25) (Bokern *et al.* 1995; Zamble *et al.* 2006).

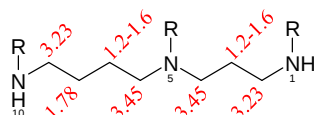


Figure II-25 : Attribution des signaux de RMN 1H de la spermidine trisubstituée

En ce qui concerne les protons aromatiques, il est précisé que les signaux d'un groupement féruloyle ou coumaroyl en position 5 sont légèrement plus déblindés que ceux des groupements situés en bout de chaîne dans le cas de la triféruloyspermidine (Zamble *et al.* 2006) ou de la tricoumaroylspermidine (Sobolev *et al.* 2008). Nous observons ce même phénomène pour le composé **56** (Figure II-23) que nous pouvons, ainsi, identifier comme étant la tricaféoylspermidine.

Les composés **57-60** sont des composés présentant une structure proche de celle du composé **56** (même spectre UV, masse moléculaire impaire, fragmentations en SM similaires). Nous avons entrepris une étude fine de la fragmentation MS/MS du composé **56**, d'une part pour en confirmer la structure et, d'autre part, afin d'identifier les composés **57-60**.

IV. 2. Analyse du spectre de masse du composé 56

En mode d'ionisation positif, les ions à m/z 632 et 654 correspondant respectivement à $[M+H]^+$ et à $[M+Na]^+$ ont été observés. Les fragmentations en MS^2 et MS^3 conduisent au même ion à m/z 145 correspondant à la spermidine, après la perte successive de 3 fois 162 u et donc de 3 unités caféiques. Le spectre de fragmentation de ce composé est similaire à celui de la N^1, N^5, N^{10} -tricaféoylspermidine préalablement décrit (Bokern *et al.* 1995).

Lors de la scission de l'ion $[M+H]^+$, 2 fragments à m/z 470 et 452 sont formés. Le fragment à m/z 470, correspondant à une perte de 162 u, peut être attribué à la rupture d'une liaison amide entre la spermidine et une molécule d'acide caféique (cette coupure pouvant avoir lieu au niveau des 3 azotes). Lorsque la coupure se produit sur un azote terminal, il peut alors y avoir un départ d'une molécule de NH_4 , ce qui explique la présence de l'ion à m/z 452.

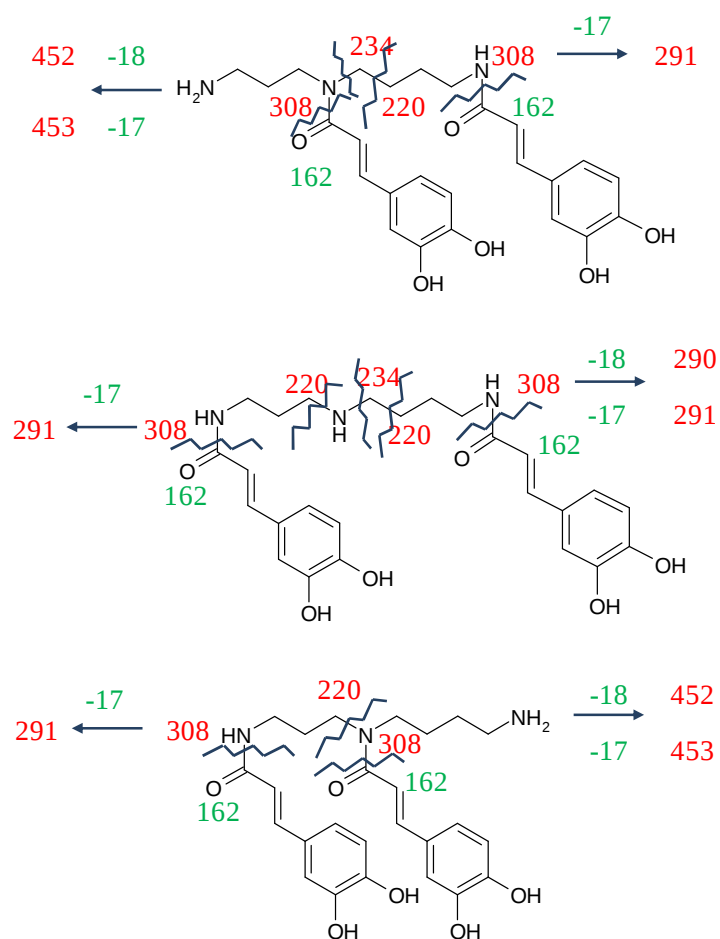


Figure II-27 : Fragmentation MS³ de la tricaféoylspermidine 56

La Figure II-26 résume la fragmentation du composé **56** en MS² (en rouge la masse des ions observés, en vert la masse des fragments perdus).

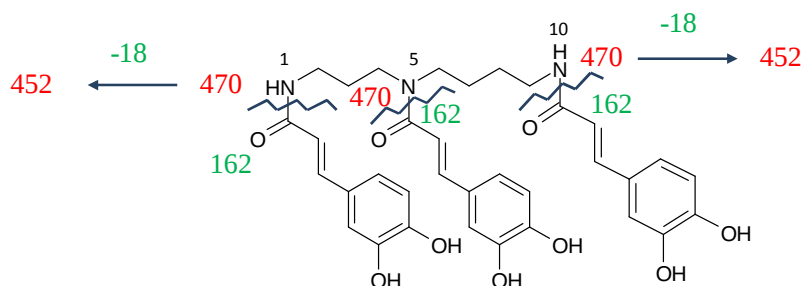


Figure II-26 : Fragmentations MS² de la tricaféoylspermidine 56

Lors de la fragmentation MS³ de l'ion à m/z 470 (Figure II-27), l'ion fragment majoritaire ayant un m/z de 220 correspond à une coupure entre l'azote en position 5 et la chaîne propyle. Cet ion peut aussi provenir d'une coupure de la chaîne butyle après rupture de la liaison C6-C7. La perte d'une seconde unité caféique est aussi observée avec l'ion à m/z 308, qui donne ensuite 291 par la perte de 17 u (NH₃) lorsque la coupure se fait au niveau d'un azote terminal. Le pic minoritaire à m/z 234 correspond à une coupure entre l'azote en position 5 et la chaîne butyle. Un fragment à m/z 163 est aussi observé et correspond à l'ion caféique et, comme précédemment, la spermidine (non conjuguée) donne un ion à m/z 145. L'ensemble de ces éléments permettent d'identifier **56** à la tricaféoylspermidine

IV. 3. Identification des composés **57** à **60**

Les spectres ESI⁺ des composés **57** et **59** présentent un ion pseudo-moléculaire [M+H⁺] à m/z 616 et ceux des composés **58** et **60** à m/z 646. Les spectres de fragmentation de ces ions en MS² et MS³ sont comparables à ceux du composé **56**, indiquant qu'il s'agit de composés de la même famille (Tableau II-19). Lors de la fragmentation MS² de ces composés, on observe les pertes de 162 et 146 u (**57** et **59**) d'une part, 162 et 176 u (**58** et **60**) d'autre part. Ces pertes montrent la présence d'acide caféique (C), coumarique (pCm) et férulique (F). Les composés **57** et **59** sont des coumaroyldicaféoylspermidines et les composés **58** et **60** des féruiyldicaféoylspermidines.

Afin de déterminer l'emplacement des acides (C, pCo, F), les spectres de masse des 4 composés ont été comparés aux spectres de masse MS² et MS³, obtenus dans les mêmes conditions, de la tricaféoylspermidine (**56**). La Figure II-28 représente ainsi les fragmentations attendues dans les trois cas possibles.

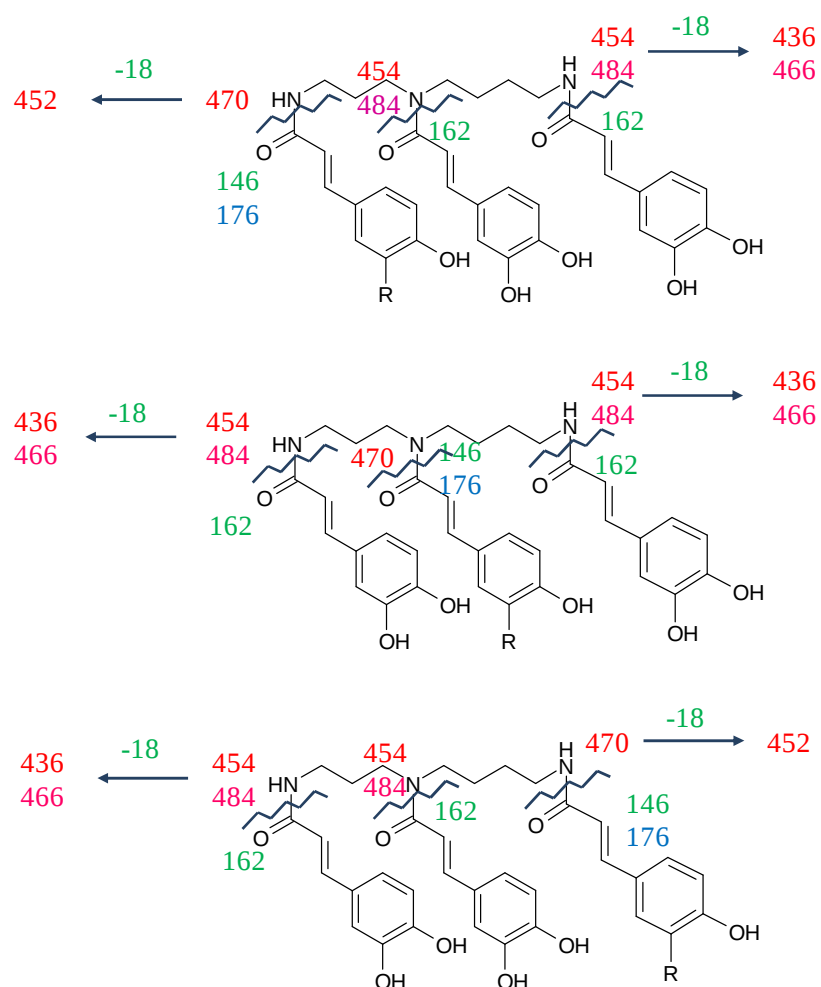
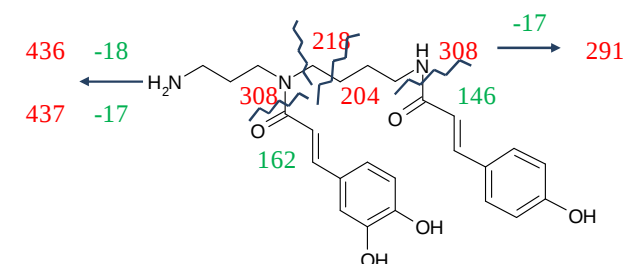
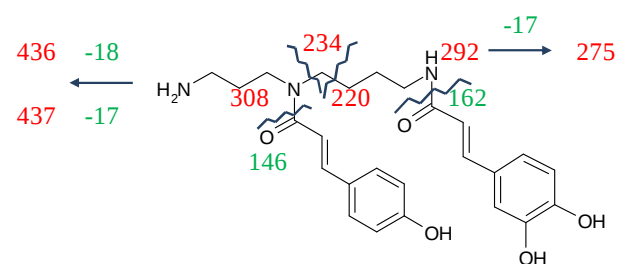
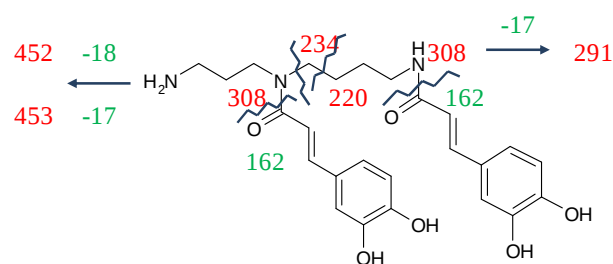
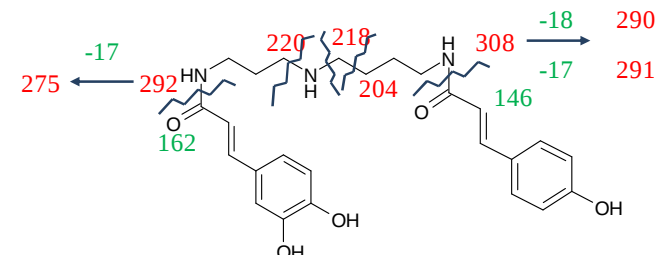
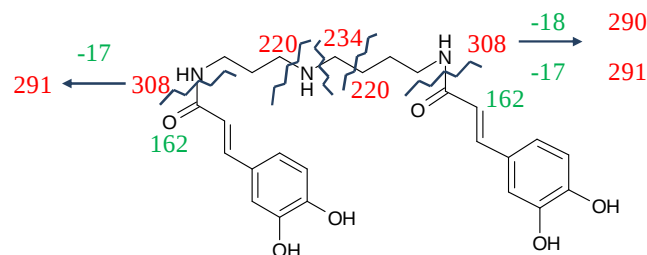
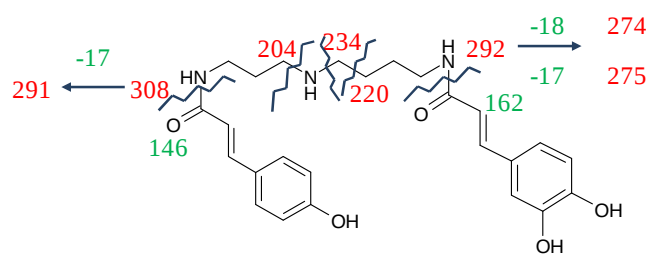
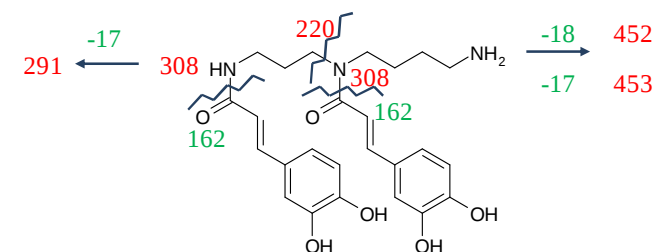
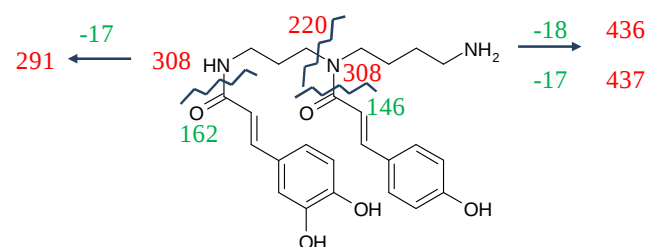
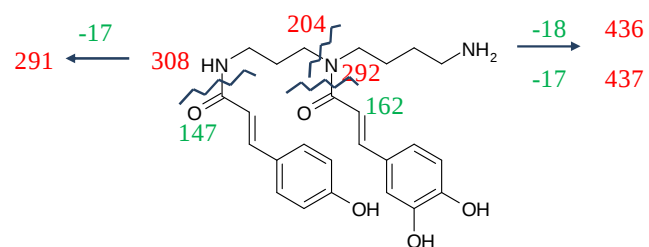


Figure II-28 : Prédiction de fragmentation en MS^2 des 3 dérivés de type coumaroyldicaféoylspermidine $R = H$ (masse observée en rouge et masse perdue en vert) et des 3 feruoyldicaféoylspermidine $R = OMe$ (masse observée en rose et masse perdue en bleu)

Pour le composé **57**, l'ion majoritaire lors de la fragmentation MS^2 de l'ion quasimoléculaire à m/z 454, correspond à la perte d'un résidu caféique $[M+H-162]^+$. 3 autres fragments de masse 470, 452 et 436 sont observés, ils correspondent respectivement aux ions $[M+H-pCm]^+$, $[M+H-pCm-NH_4]^+$ et $[M+H-C-NH_4]^+$. Comme nous le montre la Figure II-28, lorsque l'acide coumarique est placé en position 5, le fragment $[M-pCm-NH_4]^+$ ne peut pas se former, car le NH_4^+ ne peut être éliminé que lorsque l'une des positions terminales de la chaîne est libre. Ceci confirme la présence d'un résidu caféique en position centrale. Lors de la fragmentation MS^3 de l'ion $[M+H-C]^+$ à m/z 454, le fragment majoritaire observé présente un m/z de 204 u qui peut correspondre soit au fragment formé par la coupure entre C-4 et le N-5, dans le cas N^1 -coumaroyl- N^5 , N^{10} -dicaféoylspermidine, soit par celui formé par la rupture de la liaison C6-C7 dans le cas de la N^{10} -coumaroyl- N^1 , N^5 -dicaféoylspermidine (Figure II-29). La première rupture décrite prédomine très largement chez ce type de composé, il s'agit de la- N^1 -coumaroyl- N^5 , N^{10} -dicaféoylspermidine (**57**) (Bokern *et al.* 1995).

Pour le composé **59**, lors de la fragmentation MS^3 de l'ion $[M+H-C]^+$ à m/z 454, le fragment majoritaire observé se situe à m/z 220. Ce fragment peut correspondre soit au fragment formé par la rupture entre le C-4 et N-5 dans le cas N^5 -coumaroyl- N^1 , N^{10} -dicaféoylspermidine ou de la N^{10} -coumaroyl- N^1 , N^5 -dicaféoylspermidine, soit par celui formé par la rupture de la liaison C6-C7 dans le cas de la N^1 -coumaroyl- N^5 , N^{10} -dicaféoylspermidine (Figure II-29) La première rupture décrite prédominant très largement chez ce type de composé, le composé **59** possède très probablement un résidu caféique sur N-1. Les fragments à m/z 204 et 218 correspondent respectivement à l'ion formé par la rupture de la liaison C6-C7 et à l'ion formé par celle de la liaison N5-C6 dans le cas de N^{10} -coumaroyl- N^1 , N^5 -dicaféoylspermidine. Ces masses ne correspondent à aucun fragment possible dans le cas de la N^5 -coumaroyl- N^1 , N^{10} -dicaféoylspermidine. Le composé **59** peut donc être identifié comme étant la N^{10} -coumaroyl- N^1 , N^5 -dicaféoylspermidine.

Le spectre de fragmentation MS^2 de l'ion quasimoléculaire à m/z 646 des composés **58** et **60**, présente 4 ions à m/z 484 $[M+H-C]^+$, 466 $[M+H-C-NH_4]^+$, 470 $[M+H-F]^+$, et 452 $[M+H-F-NH_4]^+$. La présence de ce dernier n'est possible que lorsque le résidu férulique est positionné sur l'azote en position 1 ou 10. Ces deux composés étant de même nature que **57** et **59**, leur ordre d'élution, en fonction de la position du résidu cinnamique qui les distingue, doit être le même. De plus, le spectre de fragmentation MS^2 du composé **58** est proche de celui du composé **57**, et il en est de même pour **60** et **59**. Ces deux composés peuvent donc être



N^1 -coumaroyl- N^5,N^{10} -dicafeoylspermidine

N^5 -coumaroyl- N^1,N^{10} -dicafeoylspermidine

N^{10} -coumaroyl- N^1,N^5 -dicafeoylspermidine

Figure II-29 : Prédictions de fragmentation en MS^3 des 3 dérivés de type coumaroyldicafeoylspermidine (masse observée en rouge et masse perdue en vert)

identifiés comme étant respectivement la N¹-féruoyl-N⁵, N¹⁰-dicaféoylspermidine **58** et la N¹⁰-féruoyl-N¹, N⁵-dicaféoylspermidine **60**.

Tableau II-19 : Spectres de masse MSⁿ [*m/z* (intensité relative des fragments)] des composés 56-60

		56	57	59	58	60
Substituant (pCm ou F) en position :			1	10	1	10
MS ¹	[M+H] ⁺	632	616	616	646	646
MS ²	[M+H-C] ⁺	470 (100)	454 (100)	454 (100)	484 (57)	484 (100)
	[M+H -C-NH ₄] ⁺	452 (14)	436 (6)	436 (14)	466 (4)	466 (13)
	[M+H -pCm] ⁺ ou [M+H -F] ⁺		470 (73)	470 (1)	470 (57)	470 (3)
	[M+H -pCm-NH ₄] ⁺ ou [M+H -F-NH ₄] ⁺		452 (92)	452 (1)	452 (100)	452 (5)
MS ³	[M+H-C] ⁺	470	454	454		
	[M+H -C-NH ₃] ⁺	453 (23)	437 (25)	437 (28)		
	[M+H -C-NH ₄] ⁺	452 (10)	436 (12)	436 (14)		
	[M+H-2xC] ⁺	308 (69)	292 (58)	292 (44)		
	[M+H-C-pCm] ⁺		308 (29)	308 (16)		
	[M+H-2xC-NH ₃] ⁺	291 (20)	275 (11)	275 (9)		
	[M+H-2xC-NH ₄] ⁺		274 (3)			
	[M+H-C-pCm-NH ₃] ⁺		291 (6)	291 (7)		
	[M+H-C-pCm-NH ₄] ⁺			290 (6)		
	coupure 4 /5	220 (100)	204 (100)	220 (100)		
	coupure en 5/6	234 (9)	234 (11)	218 (10)		
	coupure en 6/7	220 (100)	220 (75)	204 (67)		
	[C+H] ⁺	163 (33)	163 (37)	163 (37)		
	[pCm+H] ⁺		147 (30)	147 (29)		
	[spermidine +H]	145 (4)	145 (4)	145 (5)		
MS ³	[M+H-pCm] ⁺		470			
	[M+H-C-pCm] ⁺		308 (51)			
	[M+H-C-pCm- NH ₃] ⁺		291 (20)			
	coupure en 6/7		220 (100)			
	[C+H] ⁺		163 (52)			

Bibliographie

Abad-Garcia B., Garmon-Lobato S., Berrueta L., Gallo B. and Vicente F. (2009). "Practical guidelines for characterization of O-diglycosyl flavonoid isomers by triple quadrupole MS and their applications for identification of some fruit juices flavonoids." Journal of Mass Spectrometry **44**: 1017–1025.

Agrawal P. (1992). "NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides." Phytochemistry **31**(10): 3307-3330.

Bohm B. A. (1998). Introduction to Flavonoids. Amsterdam, Harwood Academic.

Bohm B. A., Nicholls K. W. and Bhat U. G. (1985). "Flavonoids of the *Hydrangeaceae* Dumortier." Biochemical Systematics and Ecology **13**(4): 441-445.

Bokern M., Witte L., Wray V., Nimtz M. and Meurer-Grimes B. (1995). "Trisubstituted hydroxycinnamic acid spermidines from *Quercus dentata* pollen." Phytochemistry **39**(6): 1371-1375.

Braca A., Politi M., Sanogo R., Sanou H., Morelli I., Pizza C. and De Tommasi N. (2003). "Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(23): 6689-6695.

Bruneton J. (2010). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Paris, DOC et TEC.

Choi Y. H., Kim H. K., Linthorst H. J. M., Hollander J. G., Lefebvre A. W. M., Erkelens C., Nuzillard J.-M. and Verpoorte R. (2006). "NMR Metabolomics to Revisit the Tobacco Mosaic Virus Infection in *Nicotiana tabacum* Leaves." Journal of Natural Products **69**(5): 742-748.

Clifford M. N., Johnston K. L., Knight S. and Kuhnert N. (2003). "Hierarchical Scheme for LC-MSⁿ Identification of Chlorogenic Acids." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(10): 2900-2911.

Clifford M. N., Knight S. and Kuhnert N. (2005). "Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(10): 3821-3832.

Cuyckens F. and Claeys M. (2005). "Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-O-glycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules." Journal of Mass Spectrometry **40**(3): 364-372.

Cuyckens F., Rozenberg R., De Hoffmann E. and Claeys M. (2001). "Structure characterization of flavonoid O-diglycosides by positive and negative nano-electrospray ionization ion trap mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **36**(11): 1203-1210.

da Costa C. T., Horton D. and Margolis S. A. (2000). "Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis." Journal of Chromatography A **881**(1-2): 403-410.

Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E. and Quetin-Leclercq J. (2001). "Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **12**(6): 707-715.

Ferreres F., Llorach R. and Gil-Izquierdo A. (2004). "Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **39**(3): 312-321.

Hong V. and Wrolstad R. E. (1990). "Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**(3): 708-715.

Justesen U. (2001). "Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **36**(2): 169-178.

Kachlicki P., Einhorn J., Muth D., Kerhoas L. and Stobiecki M. (2008). "Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling." Journal of Mass Spectrometry **43**(5).

Kazuma K., Noda N. and Suzuki M. (2003). "Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*." Phytochemistry **62**(2): 229-237.

Kite G. C. and Veitch N. C. (2009). "Assigning glucose or galactose as the primary glycosidic sugar in 3-O-mono-, di- and triglycosides of kaempferol using negative ion electrospray and serial mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **23**(19): 3125-3132.

Kondo T., Toyama-Kato Y. and Yoshida K. (2005). "Essential structure of co-pigment for blue sepal-color development of *Hydrangea*." Tetrahedron Letters **46**(39): 6645-6649.

Mabry T. J., Markham K. R. and Thomas M. B. (1970). the Systematic Identification of Flavonoids. Berlin-Heidelberg-New York.

Mabry T. J., Markham K. R. and Thomas M. B. (1970). the Systematic Identification of Flavonoids. Berlin-Heidelberg-New York.

McClintock E. (1957). "A monograph of the genus *Hydrangea*." Proceedings of the California Academy of Science **29**: 147–255.

Mezache N., Derbre S., Akkal S., Laouer H., Seraphin D. and Richomme P. (2009). "Fast Counter Current Chromatography of n-Butanolic Fraction from *Senecio giganteus* (Asteraceae)." Natural Product Communications **4**(10): 1357-1362.

Nakatani N., Kayano S., Kikuzaki H., Sumino K., Katagiri K. and Mitani T. (2000). "Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(11): 5512-5516.

Nielsen A., Olsen C. and Møller B. (2005). "Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoë blossfeldiana* varieties." Phytochemistry **66**(24): 2829-2835.

Pauli G., Poetsch F. and Nahrstedt A. (1998). "Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques." Phytochemical Analysis **9**(4): 177-185.

Romani A., Pinelli P., Cantini C., Cimato A. and Heimler D. (2006). "Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.)." Food Chemistry **95**(2): 221-225.

Satterfield M. and Brodbelt J. S. (2001). "Structural characterization of flavonoid glycosides by collisionally activated dissociation of metal complexes." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **12**(5): 537-549.

Senatore F., D'Agostino M. and Dini I. (2000). "Flavonoid glycosides of *Barbarea vulgaris* L.(Brassicaceae)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(7): 2659-2662.

Sobolev V., Sy A. and Gloer J. (2008). "Spermidine and Flavonoid Conjugates from Peanut (*Arachis hypogaea*) Flowers." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(9): 2960-2969.

Subha V. and Sukumar D. (2007). "Phytochemical and pharmacological studies on *Hydrangea macrophylla*." Journal of the Indian Chemical Society **84**: 1026-1026.

Takeda K., Kubota R. and Yagioka C. (1985). "Copigments in the blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*." Phytochemistry **24**(6): 1207-1209.

Walters D., Meurer-Grimes B. and Rovira I. (2001). "Antifungal activity of three spermidine conjugates." FEMS Microbiology Letters **201**(2): 255-258.

Yoshida K., Ito D., Shinkai Y. and Kondo T. (2008). "Change of color and components in sepals of chameleon hydrangea during maturation and senescence." Phytochemistry **69**(18): 3159-3165.

Zamble A., Sahpaz S., Hennebelle T., Carato P. and Bailleul F. (2006). "N1, N5, N10-Tris (4-hydroxycinnamoyl) spermidines from *Microdesmis keayana* Roots." Chemistry & Biodiversity **3**(9).

Chapitre III. Structuration de la diversité des composés phénoliques dans le genre *Hydrangea*

CHAPITRE III. STRUCTURATION DE LA DIVERSITE DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LE GENRE <i>HYDRANGAEA</i>	93
I. Introduction	95
II. Analyse de la diversité interspécifique des composés phénoliques	96
II. 1. Classification selon la teneur en dérivés d'acides cinnamiques et en flavonoïdes	96
II. 1. 1. Dérivés d'acides cinnamiques	97
II. 1. 2. Flavonoïdes : flavonols, flavones et flavanones	98
II. 1. 3. Glycosylations	100
II. 2. Structuration de la diversité	101
III. Analyse de la variabilité intraspécifique	104
III. 1. <i>H. macrophylla</i>	107
III. 1. 1. Dérivés d'acides cinnamiques	109
III. 1. 2. Flavonols	110
III. 2. <i>H. aspera</i> et <i>H. involucrata</i>	112
III. 2. 1. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées	113
III. 2. 2. Flavonols	113
III. 3. Analyse de la diversité chez les autres espèces	115
III. 3. 1. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées	117
III. 3. 2. Flavonols	117
III. 4. Détermination de l'espèce et de la sous-espèce d'une accession à partir de la composition chimique de ses inflorescences	120
IV. Discussion	121
IV. 1. Diversité phytochimique au sein du genre <i>Hydrangea</i>	121
IV. 2. Variation intraspécifique dans l'espèce <i>H. macrophylla</i>	125
IV. 3. Amines polyacylées, marqueurs de la fertilité	126
BIBLIOGRAPHIE	127

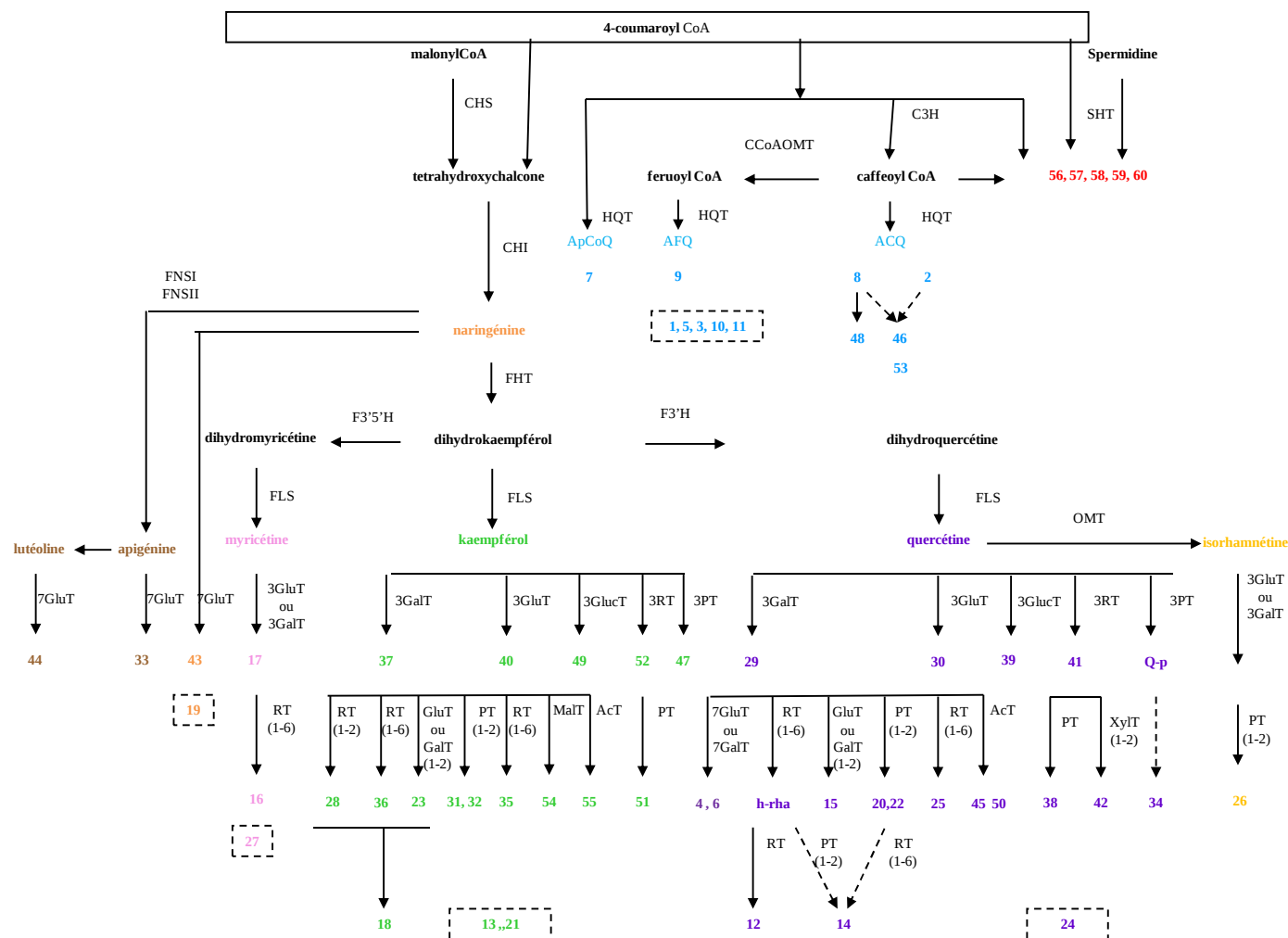


Figure III-1 : Proposition de schéma de biosynthèse pour les composés présents dans les inflorescences du genre *Hydrangea*. CHS, chalcone transférase; CHI, chalcone isomérase; FNSI, flavone synthase; FHT, flavanone-3-hydroxylase; F3'H, flavonoïde 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoïde 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; OMT, O-méthyltransférase; GluT, glucose transférase; GalT, galactose transférase; PT, pentose transférase; RT, rhamnose transférase; AcT, acétyl transférase; MalT, malonyl transférase; GlucT, glucuronide transférase; HQT, hydrocinnamoyl CoA quinate transférase; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase; CCoAOMT, caféoyl-CoA O-méthyltransférase; SHT, spermidine hydrocinnamoyl transférase.

I. Introduction

A partir de la voie de biosynthèse connue des phénylpropanoïdes (*cf.* chapitre I. II. 2. p 16), un schéma a été établi regroupant les filiations des 60 composés phénoliques détectés dans nos extraits (Figure III-1). Trois familles de composés, ayant comme précurseur commun le *p*-coumaroyl-CoA, sont représentées sur cette figure : les acides cinnamiques (en bleu), les amines polyacylées (dérivés de la spermidine, en rouge) et les flavonoïdes qui sont majoritairement des flavonols divisés en quatre catégories. Les dérivés du kaempférol (en vert) et les dérivés de la quercétine (en violet) sont largement répandus. Un seul dérivé de l'isorhamnétine (en marron) est présent ainsi que trois dérivés de la myricétine (en rose). Les voies des flavones (en orange) et des flavanones (en jaune) sont très minoritaires. Dans les espèces à inflorescences colorées, les anthocyanes (non représentés Figure III-1) sont principalement des dérivés de la delphinidine.

La glycosylation des flavonols se situe toujours en position 3. Seuls deux dérivés de la quercétine (**4** et **6**) possèdent une glycosylation supplémentaire en position 7. En ce qui concerne le degré de glycosylation, trois possibilités sont observées : des dérivés mono, di, et plus rarement, triglycosylés (**12**, **14**, **18** et **24**). La nature des sucres identifiés est variée et peut être de type hexose (glucose, galactose, rhamnose), ou pentose (xylose, arabinose). D'autres réactions apparaissent, comme des acylations d'hexose par un malonyle (**54**) ou un acétyle (**45**, **50** et **55**), et l'oxydation du glucose pour former l'acide glucuronique (**39** et **49**).

Pour les flavonols diglycosylés, les liaisons interglycosidiques les plus fréquentes sur un hexose sont les positions 2 et 6 (Bruneton 2010). L'enchaînement 1-2 est observé pour les dérivés hexose-rhamnose, hexose-hexose et hexose-pentose, l'enchaînement 1-6 uniquement pour les dérivés hexose-rhamnose.

Dans ce schéma général de biosynthèse, il s'agit d'analyser la répartition des espèces et sous-espèces, définies selon la classification de McClintock (1957), en fonction des caractéristiques spécifiques liées à ces trois familles de composés.

Les deux principales voies métaboliques, dérivés d'acides cinnamiques et dérivés des flavonoïdes, ont été le fil conducteur d'une première analyse globale des résultats qualitatifs et quantitatifs au niveau interspécifique, puis d'une seconde analyse au niveau intraspécifique, pour rechercher les composés discriminants.

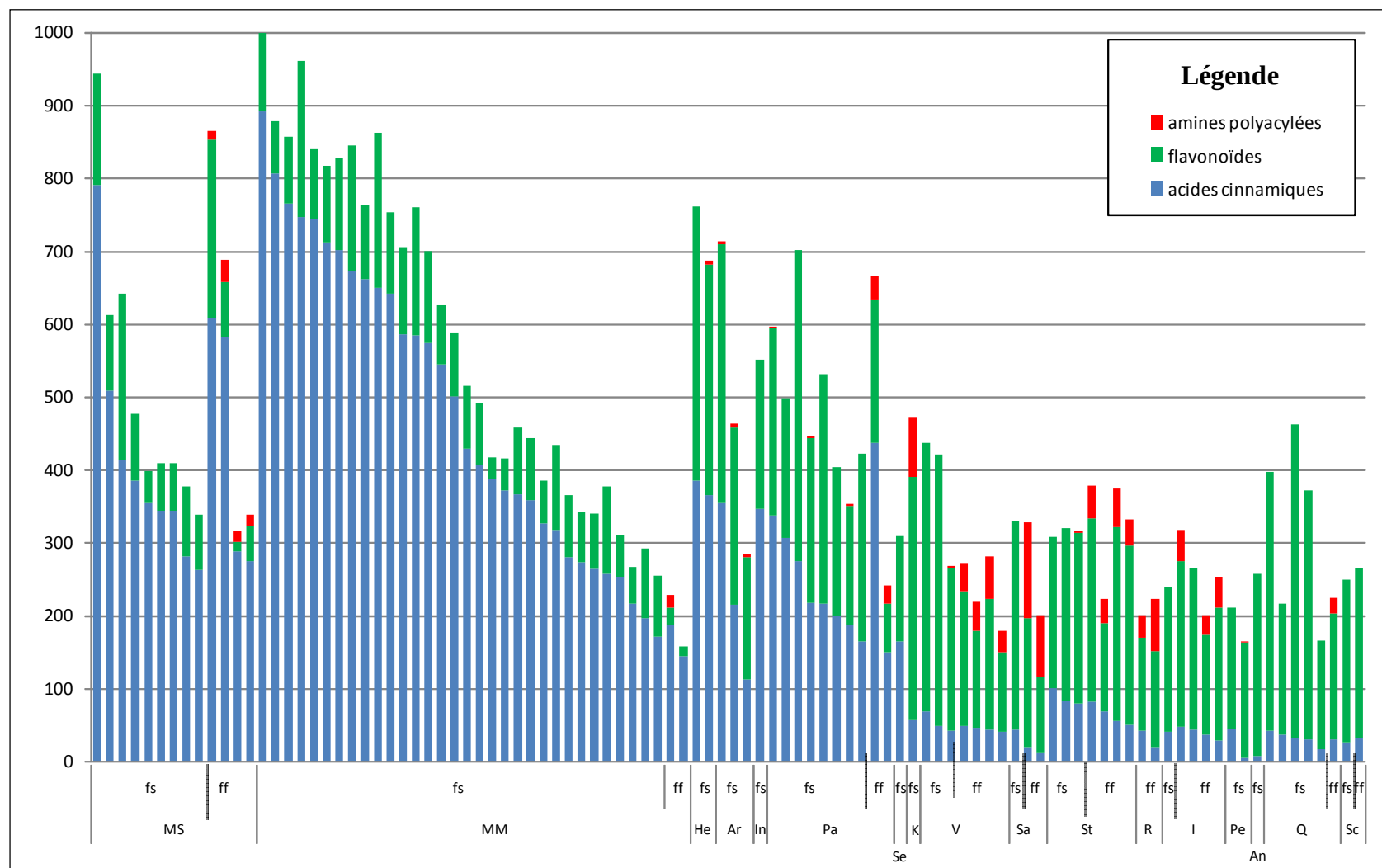


Figure III-2 : Distribution des composés phénoliques des inflorescences du genre *Hydrangea*: teneurs en dérivés d'acides cinnamiques (bleu), flavonoïdes (vert) et amides polyacylées (rouge) ($\mu\text{mol/g}$ d'extract) An, *H. anomala* ssp. *anomala*; Pe, *H. anomala* ssp. *petiolaris*; Ar, *H. arborescens*; K, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Kawakami; V, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Villosa; R, *H. aspera* ssp. *robusta*; Sa, *H. aspera* ssp. *sargentiana*; St, *H. aspera* ssp. *strigosa*; He, *H. heteromalla*; In, *H. integrifolia*; I, *H. involucrata*; MM, *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*; MS, *H. macrophylla* ssp. *serrata*; Pa, *H. paniculata*; Q, *H. quercifolia*; Sc, *H. scandens*; Se, *H. seemannii*; fs, fleur fertiles; ff, fleurs fertiles.

II. Analyse de la diversité interspécifique des composés phénoliques

II. 1. Classification selon la teneur en dérivés d'acides cinnamiques et en flavonoïdes

L'analyse des teneurs en polyphénols des espèces montre une première dichotomie entre acides cinnamiques et flavonoïdes. Le classement des espèces puis des accessions selon la teneur décroissante en acides cinnamiques, met en évidence la diversité très importante au niveau interspécifique mais aussi la variabilité intraspécifique (Figure III-2). Toutes les espèces synthétisent acides cinnamiques et flavonoïdes mais à des teneurs et dans des proportions très différentes qui conduisent à les répartir en deux groupes. Pour les six espèces du groupe 1, les teneurs en acides cinnamiques sont supérieures à 100 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait (*H. macrophylla*, *H. arborescens*, *H. heteromalla*, *H. paniculata*, *H. integrifolia* et *H. seemannii*). Pour les cinq espèces du groupe 2, les teneurs en acides cinnamiques sont faibles, nettement inférieures à 100 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait (*H. aspera*, *H. involucrata*, *H. quercifolia*, *H. anomala* et *H. scandens*).

La représentation en pourcentage de chaque classe permet de s'affranchir des différences de teneur totale en polyphénols et de mieux visualiser les rapports entre les familles de composés et les voies de biosynthèses prédominantes (Annexe 6). Dans le groupe 1, l'espèce *H. macrophylla* se distingue par une forte accumulation d'acides cinnamiques (>65%) au détriment des flavonoïdes. Ce rapport est compris entre 40 et 60% pour les autres espèces du groupe (*H. arborescens*, *H. heteromalla*, *H. paniculata*, *H. integrifolia* et *H. seemannii*). Dans le groupe 2 (*H. aspera*, *H. involucrata*, *H. quercifolia*, *H. anomala* et *H. scandens*), c'est la voie de biosynthèse des flavonoïdes qui est privilégiée. Les pourcentages d'acides cinnamiques sont beaucoup plus faibles, se situant entre 2 et 30%.

Les amines polyacylées, dérivés de la spermidine, sont minoritaires mais se révèlent être de bons marqueurs pour distinguer les fleurs fertiles des fleurs stériles dans lesquelles elles sont absentes ou présentes en très faibles quantités (Figure III-2).

Les différences de teneurs constatées entre les deux types de fleurs ne sont pas plus importantes que la variabilité intraspécifique et ne modifient pas l'analyse générale de la diversité.

La voie de biosynthèse de la delphinidine, principal anthocyane dans le genre, est associée à celles des flavonols. Les dérivés anthocyaniques sont minoritaires dans les inflorescences colorées, leurs teneurs ne dépassent pas 6% de la teneur totale en composés

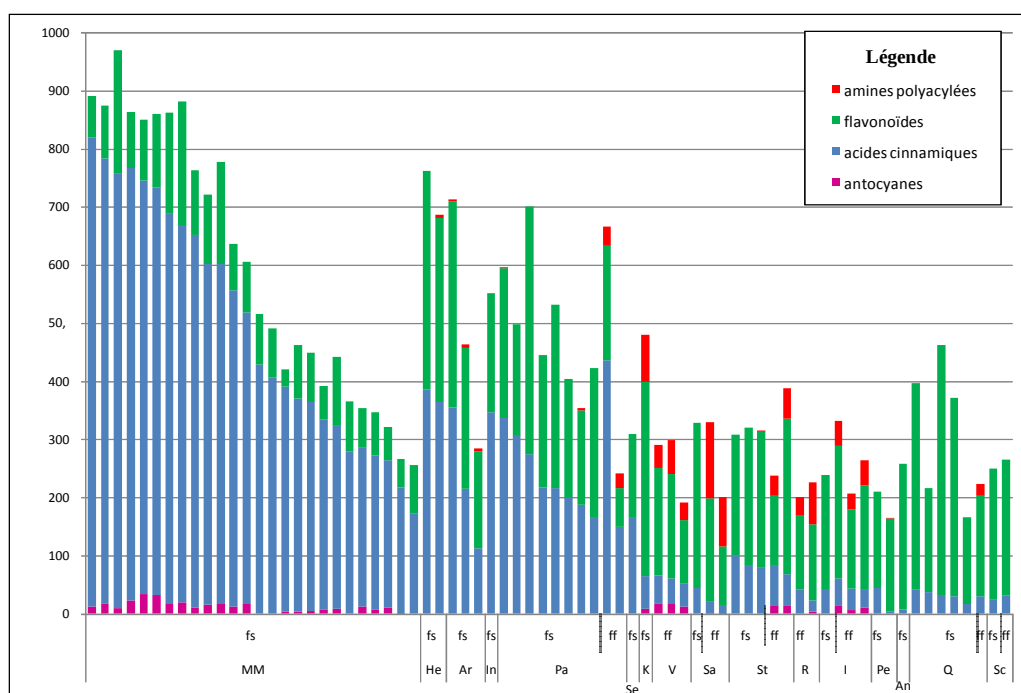


Figure III-3 : Distribution des composés phénoliques des inflorescences du genre *Hydrangea*: teneurs en dérivés d'acides cinnamiques, flavonoïdes, amines polyacylées et anthocyanes (µmol/g d'extrait)

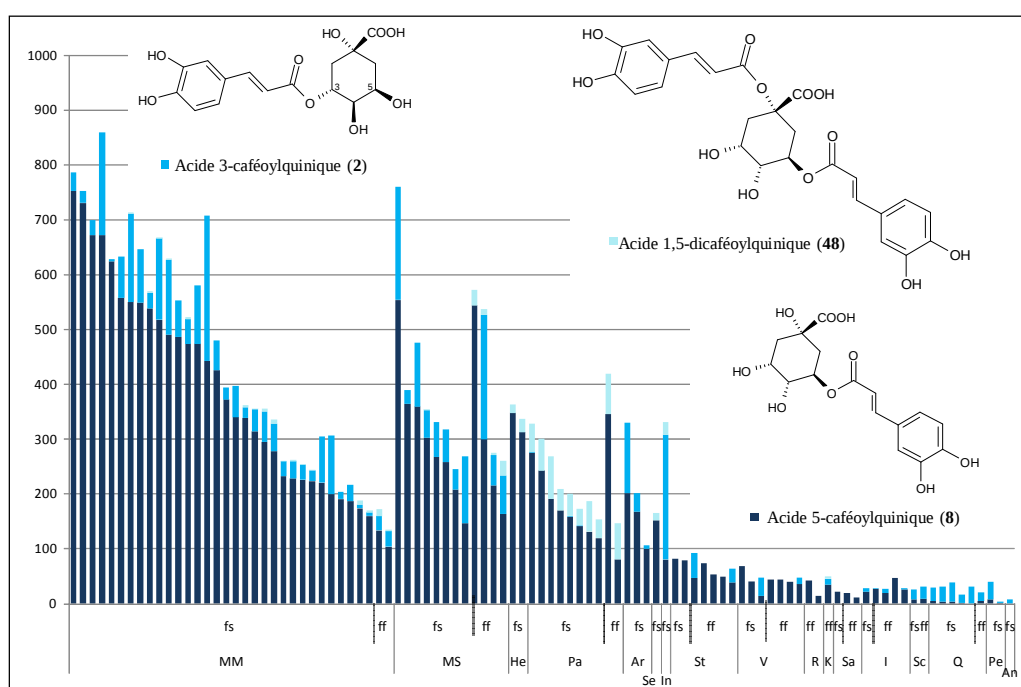


Figure III-4 : Distribution des acides cinnamiques majoritaires dans les inflorescences du genre *Hydrangea*: acide 3-caféoylquinique (2), 5-caféoylquinique (8) et 1,5 dicaféoylquinique (48) (µmol/g d'extrait)

An, *H. anomala* ssp. *anomala*; **Pe**, *H. anomala* ssp. *petiolaris*; **Ar**, *H. arborescens*; **K**, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Kawakami; **V**, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Villosa; **R**, *H. aspera* ssp. *robusta*; **Sa**, *H. aspera* ssp. *sargentiana*; **St**, *H. aspera* ssp. *strigosa*; **He**, *H. heteromalla*; **In**, *H. integrifolia*; **I**, *H. involucrata*; **MM**, *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*; **MS**, *H. macrophylla* ssp. *serrata*; **Pa**, *H. paniculata*; **Q**, *H. quercifolia*; **Sc**, *H. scandens*; **Se**, *H. seemannii*; **fs**, fleur fertiles; **ff**, fleurs fertiles.

phénoliques (Figure III-3). Leur présence n'a que peu d'incidence sur les teneurs ou les proportions des autres dérivés.

En conclusion, il existe une forte structuration au sein du genre. La voie des dérivés d'acides cinnamiques est majoritaire dans le groupe 1 et celle des flavonoïdes dans le groupe 2, qui est aussi celui où les teneurs en composés phénoliques sont globalement inférieures. La répartition selon ces critères sépare les espèces colorées avec d'une part *H. macrophylla*, et d'autre part *H. aspera* et *H. involucrata*, marquant ainsi une première différenciation. Pour les autres espèces, la séparation existe aussi pour d'autres critères morphologiques importants dans la classification botanique. Par exemple, celles à port grimpant, avec les espèces à feuillage persistant *H. integrifolia* et *H. seemannii* (section *Cornidia*) dans le groupe 1 et celle à feuillage caduc *H. anomala* dans le groupe 2. Les deux espèces d'origine nord-américaine rassemblées dans la sous-section *Americanae*, sont séparées, avec *H. arborescens* dans le groupe 1 et *H. quercifolia* dans groupe 2.

II. 1. 1. Dérivés d'acides cinnamiques

Parmi les acides cinnamiques (Figure III-4), seul l'acide 5-caféoylquinique (acide chlorogénique **8**) est présent dans toutes les espèces du genre, mais les teneurs sont très différentes entre les deux groupes d'espèces. Un second composé, l'acide 3-caféoylquinique (**2**), est plus discriminant. Il est toujours présent chez deux espèces du groupe 1, *H. macrophylla* et *H. integrifolia*, mais il est totalement absent chez *H. heteromalla*, *H. paniculata* et *H. seemannii*. Le rapport entre ces deux acides, 3- et 5- caféoylquinique, montre que l'acylation en position 3 est privilégiée par rapport à celle en position 5 de l'acide quinique pour *H. integrifolia* dans le groupe 1, et *H. quercifolia*, *H. scandens*, *H. anomala* dans le groupe 2. Un troisième composé, l'acide 1,5-dicaféoylquinique (**48**) est caractéristique de trois espèces : on le rencontre chez *H. paniculata* où il représente de 10 à 40% des acides cinnamiques totaux mais aussi chez *H. heteromalla* et *H. seemannii*. Ces espèces se distinguent aussi par l'absence d'acide 3-caféoylquinique (**2**), comme souligné précédemment.

En résumé, les trois dérivés d'acides cinnamiques **2**, **8** et **48** sont de bons indicateurs de la diversité interspécifique. La différenciation est qualitative avec l'absence de **2** et la présence de **48** pour les trois espèces *H. paniculata*, *H. heteromalla* et *H. seemannii* dans le groupe 1. La différenciation est quantitative avec la prédominance de **2** pour trois espèces *H. quercifolia*, *H. anomala*, *H. scandens* du groupe 2, et *H. integrifolia* du groupe 1.

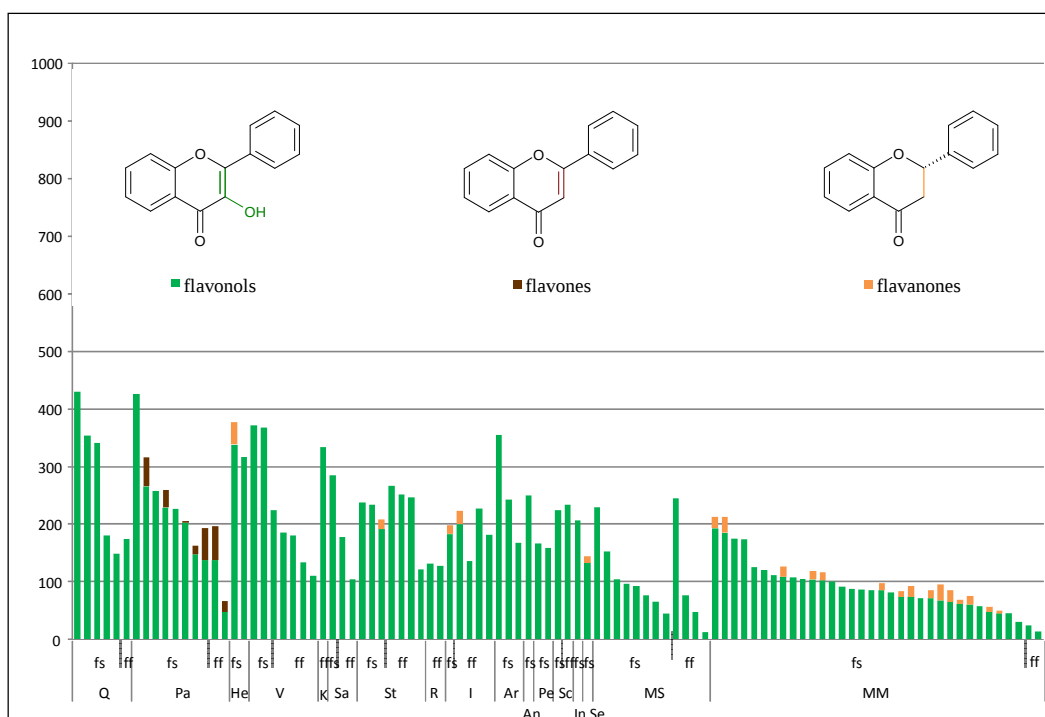


Figure III-5 : Distribution des flavonoïdes dans les inflorescences du genre *Hydrangea* : teneurs en flavonols, flavones et flavanones ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait)

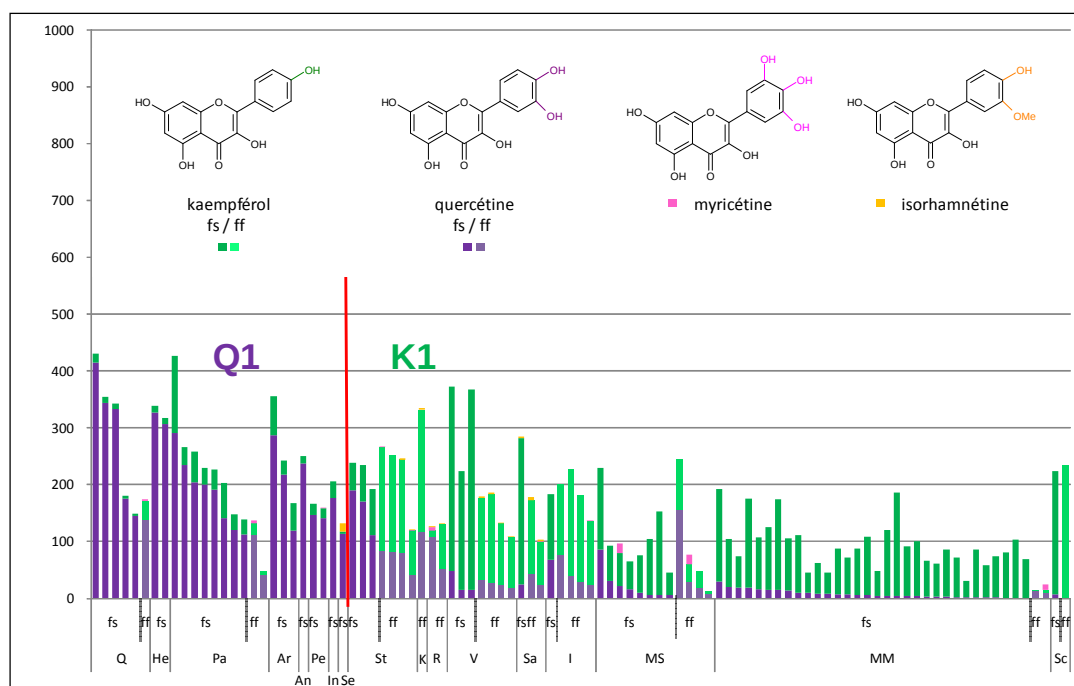


Figure III-6 : Distribution des flavonols dans les inflorescences du genre *Hydrangea* : teneurs en dérivés de la quercétine, du kaempférol, de la myricétine et de l'isorhamnétine ($\mu\text{mol/g}$ d'extrait).

An, *H. anomala* ssp. *anomala*; **Pe**, *H. anomala* ssp. *petiolaris*; **Ar**, *H. arborescens*; **K**, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Kawakami; **V**, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Villosa; **R**, *H. aspera* ssp. *robusta*; **Sa**, *H. aspera* ssp. *sargentiana*; **St**, *H. aspera* ssp. *strigosa*; **He**, *H. heteromalla*; **In**, *H. integrifolia*; **I**, *H. involucrata*; **MM**, *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*; **MS**, *H. macrophylla* ssp. *serrata*; **Pa**, *H. paniculata*; **Q**, *H. quercifolia*; **Sc**, *H. scandens*; **Se**, *H. seemannii*; **fs**, fleur fertiles; **ff**, fleurs fertiles.

II. 1. 2. Flavonoïdes : flavonols, flavones et flavanones

Dans cette famille, les flavonols sont majoritaires dans le genre, tandis que les flavones et flavanones (dérivés de la naringénine) sont peu représentées (Figure III-5). Cependant, les flavones (**33** et **44**) sont spécifiquement synthétisées chez *H. paniculata*. Les deux flavanones (**19** et **43**) sont réparties plus souvent chez *H. macrophylla*, et chez *H. heteromalla*, *H. aspera*, *H. involucrata* et *H. seemannii*.

Dans la principale catégorie, les flavonols, les dérivés de la quercétine et du kaempférol sont prédominants (Figure III-6). Les deux autres flavonols, dérivés de la myricétine et de l'isorhamnétine, sont rarement présents, mais le dérivé de l'isorhamnétine **26** apparaît à des teneurs plus importantes chez *H. seemannii* ou très faibles chez *H. aspera*.

Classées par teneurs décroissantes en dérivés de la quercétine, les espèces se répartissent à nouveau en deux groupes :

- le groupe Q1, défini par une prédominance en dérivés de la quercétine, rassemble des espèces telles que *H. quercifolia*, *H. heteromalla*, *H. paniculata*, *H. arborescens*, *H. anomala*, *H. integrifolia* et *H. seemannii*. En dehors de *H. scandens*, ce groupe rassemble toutes les espèces à inflorescences blanches.
- le groupe K1 est caractérisé par une prédominance des dérivés du kaempférol et rassemble *H. scandens* et les espèces colorées : *H. macrophylla*, *H. involucrata* et *H. aspera*.

La synthèse de ces analyses conduit au classement des espèces selon leurs principales caractéristiques chimiques : d'une part la teneur en acides cinnamiques et d'autre part la prédominance des voies de biosynthèse des dérivés du kaempférol ou de la quercétine (Tableau III-1 et Figure III-7). Un troisième critère, le rapport entre les deux acides cinnamiques **2** et **8**, complète le classement. La structuration est forte et assez proche de la classification botanique puisque la plupart des espèces se trouvent rassemblées par sous-sections. Seules les espèces de la sous-section *Americanae* et de la section *Cornidia* sont séparées selon ces trois critères.

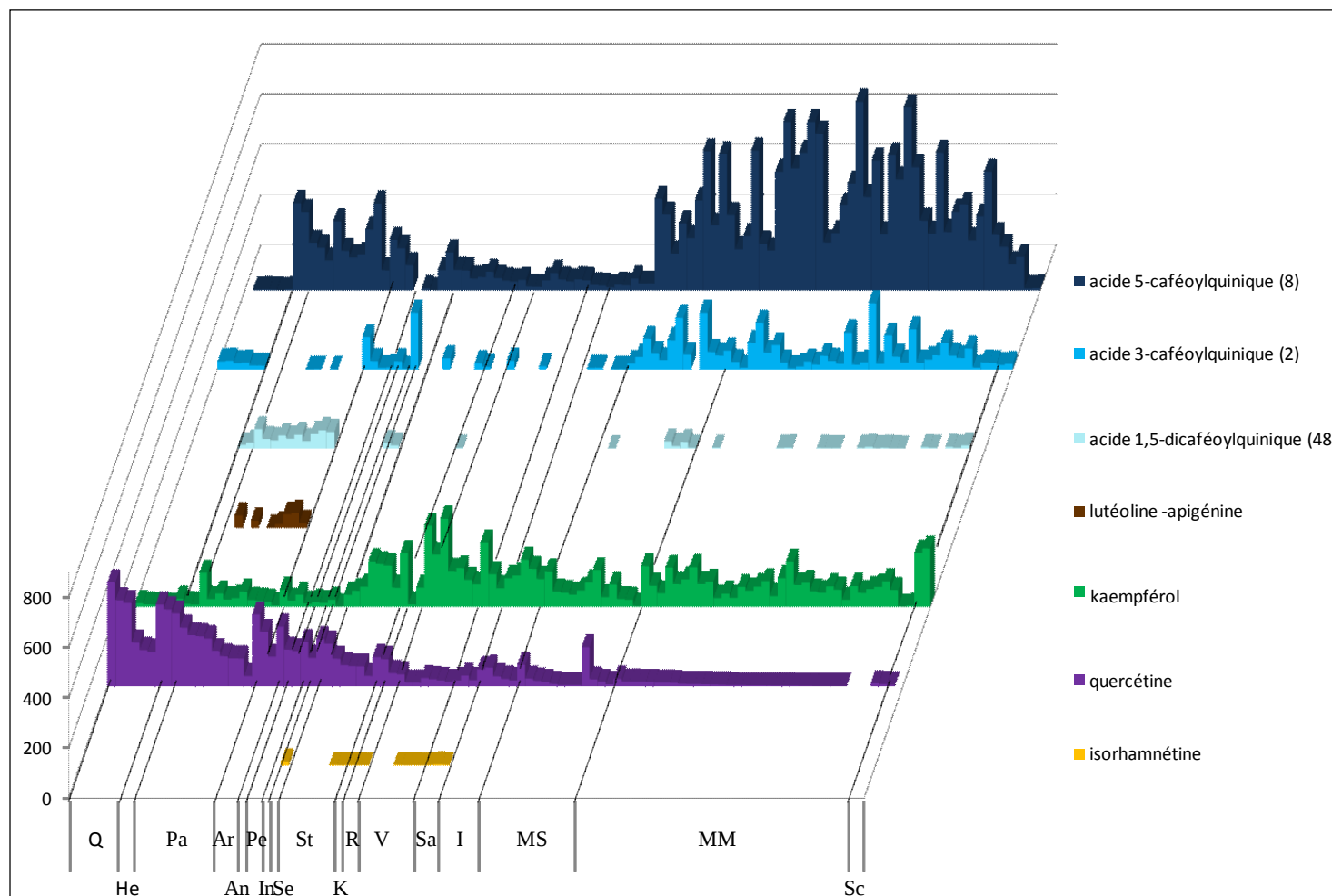


Figure III-7 : Distribution des composés phénoliques dans les inflorescences du genre *Hydrangea* (classement par teneurs décroissantes en dérivés de la quercétine) (µmol/g d'extrait). An, *H. anomala* ssp. *anomala*; Pe, *H. anomala* ssp. *petiolaris*; Ar, *H. arborescens*; K, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe *Kawakami*; V, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe *Villosa*; R, *H. aspera* ssp. *robusta*; Sa, *H. aspera* ssp. *sargentiana*; St, *H. aspera* ssp. *strigosa*; He, *H. heteromalla*; In, *H. integrifolia*; I, *H. involucrata*; MM, *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*; MS, *H. macrophylla* ssp. *serrata*; Pa, *H. paniculata*; Q, *H. quercifolia*; Sc, *H. scandens*; Se, *H. seemannii*; fs, fleur fertiles; ff, fleurs fertiles.

II. 1. 3. Glycosylations

Dans le genre *Hydrangea*, les glycosylations des flavonols sont de natures diverses. Ces composés, en effet, sont toujours glycosylés en position 3 mais par des sucres différents (Figure III-8). Un même sucre peut aussi se trouver lié à des génines différentes. Dans le cas des composés présentant une glycosylation identique, nous utiliserons le terme d'homologue glycosidique. Par exemple le kaempférol-3-*O*-glucoside (**40**) et la quercétine-3-*O*-glucoside (**30**) sont deux homologues glycosidiques. Pour les flavonols polyglycosylés, les réactions enzymatiques se font en plusieurs étapes. Un premier sucre est lié à la génine, puis un second se lie au premier, *etc.* L'analyse de cette diversité est donc d'abord basée sur le type de sucre attaché en position 3 de la génine, lors de la première glycosylation (Figure III-9). La distribution des hétérosides flavonoliques montre alors la prédominance des hexoses, qui se trouvent dans toutes les accessions.

La glycosylation des flavonols par un rhamnose est un critère de différenciation entre espèces. En effet, celle-ci concerne uniquement *H. aspera*, *H. involucrata* et *H. quercifolia* dont les composés majoritaires sont des dérivés monoglycosylés par un rhamnose (**41** et **52**). Les dérivés glycosylés par un hexose acylé ou oxydé sont eux aussi plutôt rares, mais sont présents à des teneurs relativement importantes chez les espèces *H. integrifolia* et *H. heteromalla*. Les flavonols glycosylés directement par un pentose en position 3 sont rarement présents et à de faibles teneurs, il en est de même pour ceux dont la glycosylation n'a pas pu être déterminée (c'est d'ailleurs la raison de l'incertitude sur leur structure).

L'association avec un second sucre, lié en général au premier hexose, constitue la base d'une deuxième analyse (Figure III-10). Les dérivés diglycosylés sont très discriminants au niveau interspécifique. Seul *H. anomala* synthétise majoritairement trois dérivés diglycosylés par un rhamnose-pentose (**38**, **42** et **51**). La deuxième glycosylation sur l'hydroxyle en position 7 de la génine (**4** et **6**) est spécifique de *H. paniculata* et *H. arborescens*. De même, les dérivés hexose-(1-2)-hexose (**15** et **23**) se trouvent à des teneurs plus importantes chez *H. paniculata*. Les dérivés pentose-(1-2)-hexose (**20**, **22**, **26**, **31** et **32**) sont souvent présents à des teneurs plus importantes chez *H. macrophylla*, *H. integrifolia* et *H. paniculata*. Les dérivés rhamnose-(1-6)-hexose (**16**, **25**, **35** et **36**) sont peu discriminants au niveau interspécifique. Parmi eux, seuls **25** et **35** sont présents à des teneurs plus importantes dans la plupart des espèces et notamment chez *H. arborescens*. Les dérivés triglycosylés sont plutôt rares. Seule une accession de *H. aspera* (**154**) en contient à des teneurs importantes.

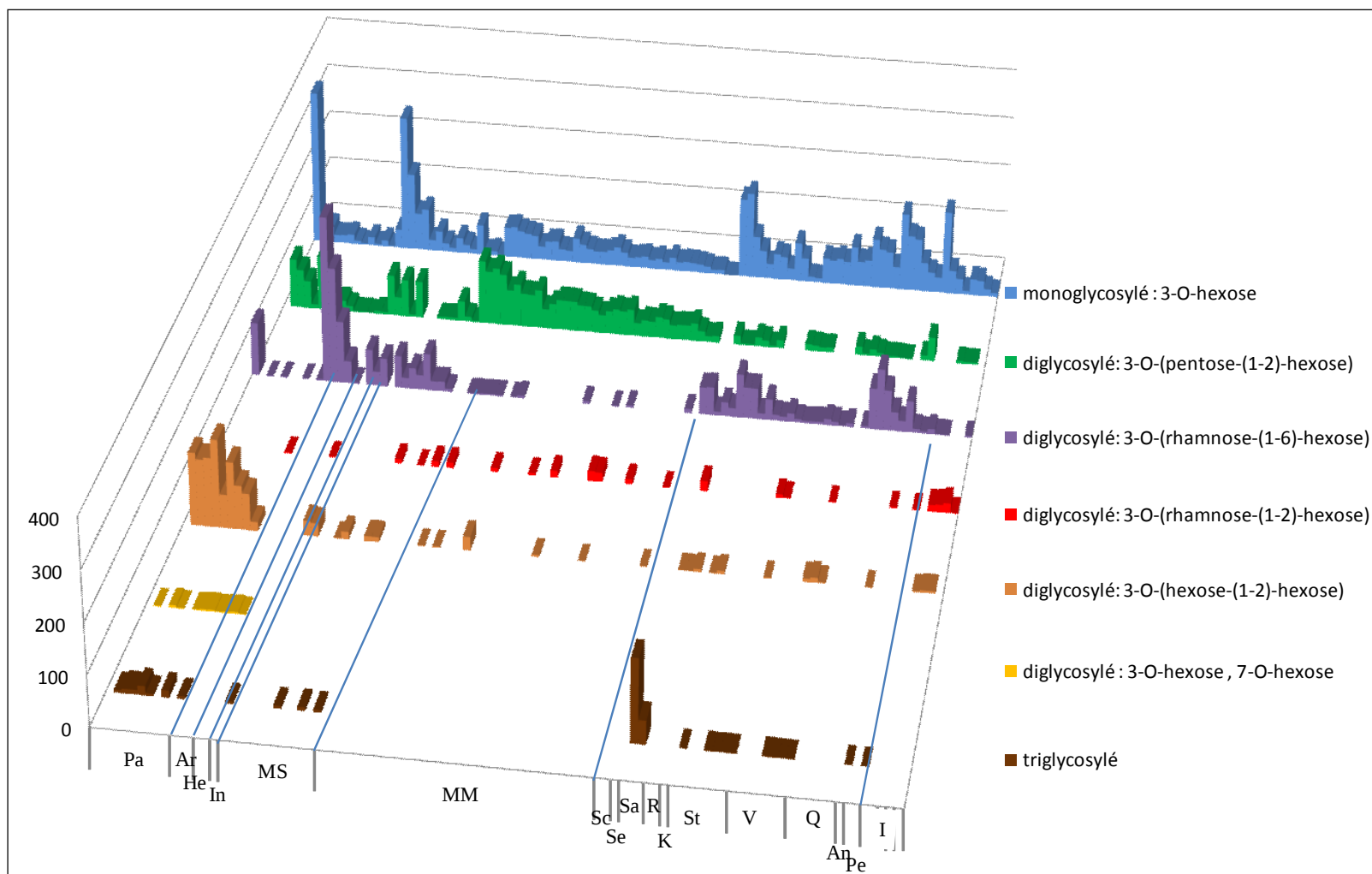


Figure III-10 : Distribution des flavonols glycosylés par un hexose en position 3 ($\mu\text{mol/g}$ d'extract) An, *H. anomala* ssp. *anomala*; Pe, *H. anomala* ssp. *petiolaris*; Ar, *H. arborescens*; K, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Kawakami; V, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Villosa; R, *H. aspera* ssp. *robusta*; Sa, *H. aspera* ssp. *sargentiana*; St, *H. aspera* ssp. *strigosa*; He, *H. heteromalla*; In, *H. integrifolia*; I, *H. involucrata*; MM, *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*; MS, *H. macrophylla* ssp. *serrata*; Pa, *H. paniculata*; Q, *H. quercifolia*; Sc, *H. scandens*; Se, *H. seemannii*.

En conclusion, les dérivés glycosylés directement par un rhamnose en position 3 (**41** et **52**) sont un critère de distinction très clair dans les sous-sections *Asperae*, *Americanae*, *Calyptanthae* (Tableau III-1). La présence d'une deuxième glycosylation, sur une autre position de la génine (**4** et **6**), permet aussi de distinguer deux espèces comme *H. paniculata* et *H. arborescens*.

Tableau III-1 : Répartition des espèces du genre *Hydrangea* selon les indicateurs : teneurs en dérivés d'acides cinnamiques, du kaempférol et de la quercétine, rapport entre les acides cinnamiques (2) et (8) et les dérivés glycosylés par un rhamnose en position 3 (en rouge).

	Kaempférol majoritaire	Quercétine majoritaire
Acides cinnamiques teneur > 100 µmol/g d'extrait		Cornidia (2) > (8) <i>H. integrifolia</i>
	Macrophyllae (2) < (8) <i>H. macrophylla</i>	Cornidia (2) < (8) <i>H. seemannii</i> Heteromallae (2) < (8) <i>H. paniculata</i> <i>H. heteromalla</i> Americanae (2) < (8) <i>H. arborescens</i>
		Americanae (2) > (8) <i>H. quercifolia</i> Calyptanthae (2) > (8) <i>H. anomala</i>
Acides cinnamiques teneur < 100 µmol/g d'extrait	Petalanthe (2) > (8) <i>H. scandens</i>	
	Asperae (2) < (8) <i>H. aspera</i> <i>H. involucrata</i>	

II. 2. Structuration de la diversité

Deux types de méthodes statistiques peuvent être utilisés pour analyser la structuration de la diversité chimique au sein du genre :

- des méthodes supervisées où l'on cherche à produire automatiquement des règles à partir d'une base de données contenant des exemples de cas déjà traités [analyse factorielle discriminante (AFD), arbres de décision...].
- des méthodes non supervisées sans sortie *a priori* où le programme traite ces données comme des variables aléatoires pour mettre en évidence des similitudes et différences au sein de la base de données [Classification hiérarchique, analyse en composantes principales (ACP)...].

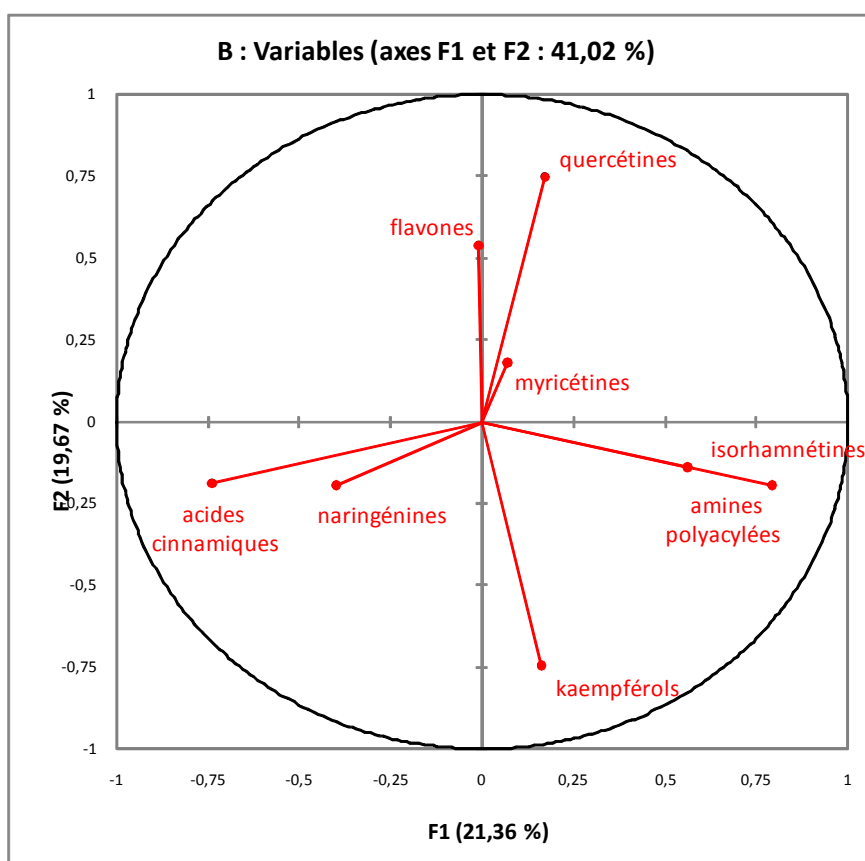
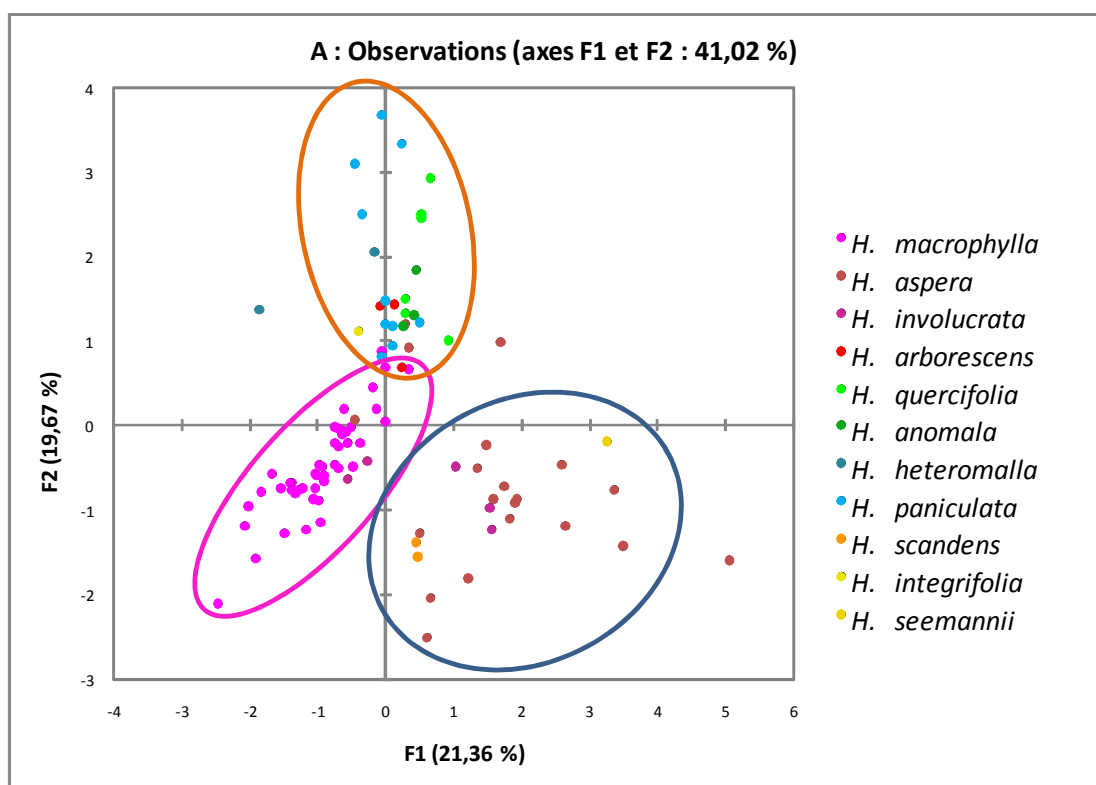


Figure III-11 : Analyse en composantes principales des teneurs en composés phénoliques dans le genre *Hydrangea* A : Représentation graphique du plan 1-2 de l'ACP. B : Cercle de corrélation des variables dans le plan 1-2 de l'ACP

Nous avons ainsi employé deux méthodes, ACP et AFD, puis comparé les résultats obtenus.

L'ACP est une méthode linéaire de changement de variables qui permet une réduction de la dimensionnalité de l'espace pour ainsi obtenir une représentation simplifiée d'un espace complexe. Dans notre cas, les 99 accessions d'*Hydrangea* sont représentées par 58 composés quantifiés. L'espace est donc initialement à 58 dimensions. Une projection de l'espace à 58 dimensions sur un ou plusieurs plans à deux dimensions permet d'observer plus aisément les différences entre les espèces. C'est ce qui est réalisé avec cette ACP.

Une première analyse en composantes principales (non représentée ici) a été réalisée sur l'ensemble des 58 variables et a produit 55 composantes, ce qui signifie que l'information se répartit dans un espace à 55 dimensions. Les trois composantes les plus informatives (F1, F2 et F3), ne représentent que 28% de l'information totale. Afin d'augmenter ce pourcentage de représentation, une diminution du nombre de variables de départ a été envisagée. Une nouvelle ACP a alors été effectuée en ne choisissant que les 8 teneurs globales suivantes : acides cinnamiques, amines polyacylées, flavones, dérivés de la naringénine, dérivés du kaempférol, dérivés de la quercétine, dérivés de la myricétine et dérivés de l'isorhamnétine (Figure III-11). Cette ACP a produit 8 composantes principales, l'information se répartissant donc dans un espace à 8 dimensions. Comme il y avait 8 variables, cela signifie également que ces dernières, définies en utilisant les teneurs globales, ne sont pas corrélées entre elles et qu'il est donc pertinent de les employer conjointement pour décrire les échantillons. Les deux composantes les plus informatives (F1 et F2), ne représentent que 41% de l'information totale. L'observation des figures selon ce plan de projection est donc insuffisamment explicite, mais quelques remarques peuvent néanmoins être faites.

Dans le cercle de corrélations, les variables les plus représentatives de la diversité se répartissent dans toutes les directions de l'espace. Les teneurs en dérivés d'acides cinnamiques sont représentées par la partie négative de l'axe 1 et de l'axe 2, celles des dérivés du kaempférol par la partie négative de l'axe 2, en opposition avec celles des dérivés de la quercétine et des flavones représentées par la partie positive de cet axe.

Dans la répartition graphique, la majorité des accessions d'*H. macrophylla* se situe dans la partie négative du plan mais plusieurs sont dispersées dans la partie positive montrant la diversité intraspécifique. Les accessions d'*H. aspera*, *H. involucrata*, *H. scandens* et *H. seemannii* de la section *Cornidia*, dans la partie inférieure droite du plan, se distinguent par des teneurs faibles en acides cinnamiques et fortes en dérivés du kaempférol. Dans la partie

Tableau III-2 : Matrice de confusion de l'AFD des teneurs globales en composés phénoliques des espèces du genre *Hydrangea*.

de \ Vers	<i>H. macrophylla</i>	<i>H. aspera</i>	<i>H. involucrata</i>	<i>H. arborescens</i>	<i>H. quercifolia</i>	<i>H. anomala</i>	<i>H. heteromalla</i>	<i>H. paniculata</i>	<i>H. scandens</i>	Total	% correct
<i>H. macrophylla</i>	46	0	0	0	0	0	0	0	0	46	100,00%
<i>H. aspera</i>	0	12	3	0	0	2	0	0	3	20	60,00%
<i>H. involucrata</i>	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	100,00%
<i>H. arborescens</i>	0	0	0	2	0	1	0	0	0	3	66,67%
<i>H. quercifolia</i>	0	0	0	0	3	3	0	0	0	6	50,00%
<i>H. anomala</i>	0	0	0	0	1	2	0	0	0	3	66,67%
<i>H. heteromalla</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	50,00%
<i>H. paniculata</i>	0	0	0	3	1	0	0	6	0	10	60,00%
<i>H. scandens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	100,00%
Total	46	12	8	5	6	8	1	6	5	97	81,44%

supérieure du plan, les six autres espèces à inflorescences blanches ne forment pas de sous-groupes bien identifiés. Par exemple, *H. paniculata* est bien caractérisé par les dérivés de la quercétine et les flavones mais les points sont dispersés tout au long de l'axe 2.

Cette méthode non supervisée montre une structuration relativement faible basée sur la prédominance des voies des acides cinnamiques, de la quercétine ou du kaempférol. Elle n'est pas assez représentative des variables choisies. Une autre méthode a donc été testée et comparée à celle-ci : l'analyse factorielle discriminante (AFD).

Le principe de l'AFD est très similaire à celui de l'ACP, mais avec deux différences importantes : (i) la définition *a priori* de classes et (ii) la projection réalisée de telle sorte que l'on maximalise les distances entre les classes (et non plus les distances entre individus) afin de mettre en évidence les facteurs expliquant les différences entre les classes définies *a priori*. La qualité de l'AFD est évaluée par la matrice de confusion. Elle représente le pourcentage d'observations bien classées, c'est-à-dire le pourcentage d'observations qui ont été classées *a posteriori* dans la classe proposée *a priori* par l'opérateur.

L'analyse comporte 97 observations réparties en 9 classes définies comme étant les espèces d'*Hydrangea*. Le calcul nécessitant au moins deux individus par groupe, les deux espèces de la section *Cornidia*, *H. integrifolia* et *H. seemannii*, n'ont pas été retenues. L'AFD est alors réalisée avec les mêmes variables quantitatives que l'ACP et comme variable qualitative l'espèce. La matrice de confusion évalue la qualité de l'analyse (Tableau III-2). Dans notre cas, il est bien sûr nécessaire que les espèces soient reclassées en large proportion dans leur classe d'origine. Si ce n'est pas le cas, cela signifie que les variables choisies (la composition chimique) ne sont pas pertinentes ou sont insuffisantes pour distinguer les espèces. Dans cette analyse, le pourcentage total d'accessions bien classées est de 81%. La discrimination observée entre les espèces est donc correcte. *H. macrophylla*, *H. involucrata* et *H. scandens* ont des pourcentages de classement de 100%. Ces trois espèces contiennent donc des molécules caractéristiques permettant de bien les différencier. On observe des pourcentages plus faibles pour les espèces contenant moins d'échantillons, ce qui est normal car l'AFD est une analyse statistique : plus les échantillons sont nombreux dans une classe, mieux les contours de la classe peuvent être définis.

Dans le plan des axes F1 et F2, 86% des variables explicatives sont représentées (Figure III-12). Cette représentation est donc plus fiable que celle qui résulte de l'ACP, où la perte d'information est nettement plus importante. Dans le cercle des corrélations, les trois familles les plus représentatives de la diversité dans ce plan sont les teneurs en acides

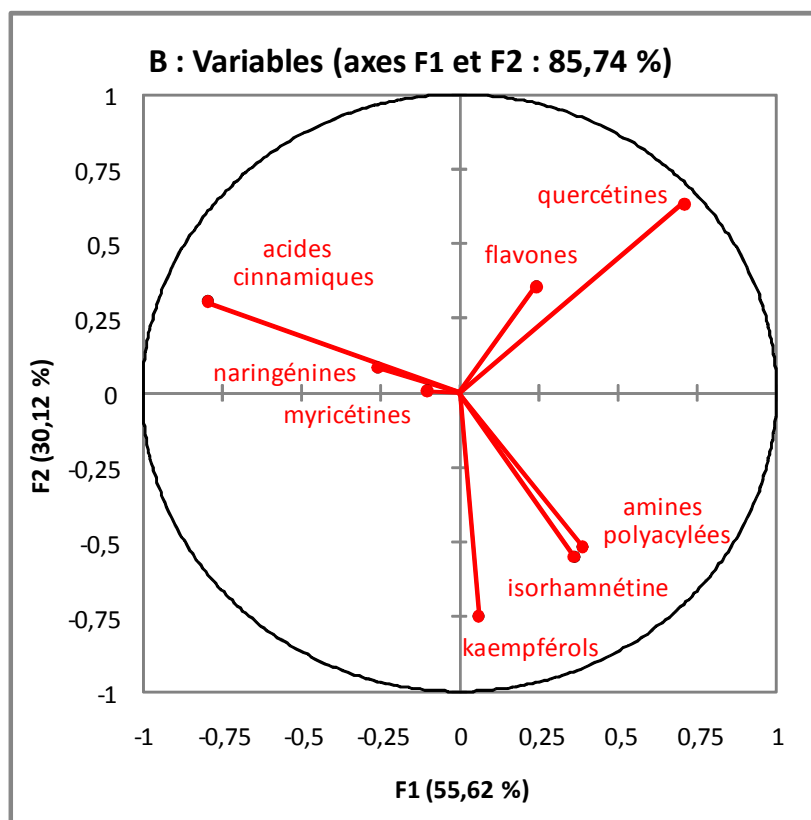
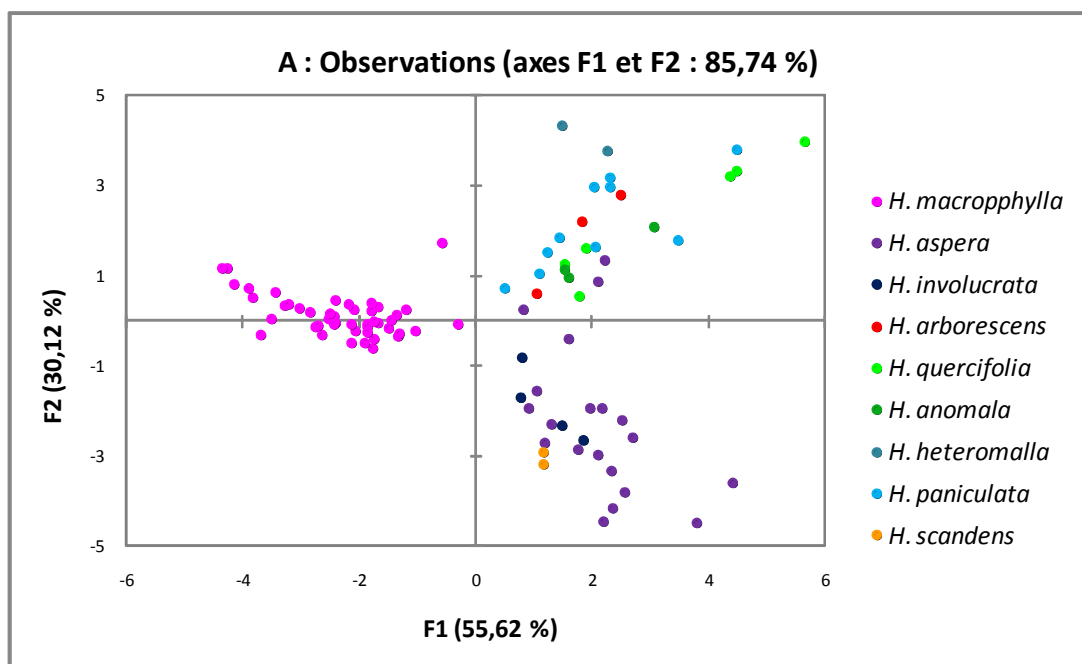


Figure III-12 : Analyse factorielle discriminante (plan 1-2) des teneurs globales en composés phénoliques des espèces du genre *Hydrangea*. A : Représentation graphique, B : Cercle de corrélation des variables.

cinnamiques dans la partie négative de l'axe 2, celles en dérivés du kaempférol dans la partie négative de l'axe 1, et celles de la quercétine dans la partie positive des deux axes. Ceci signifie que les acides cinnamiques, ainsi que les dérivés du kaempférol et de la quercétine sont les composés qui présentent les plus grandes différences entre les espèces d'*Hydrangea*. Dans la représentation graphique, les espèces forment trois groupes bien distincts (Figure III-12):

- un premier groupe homogène dans la partie négative de l'axe 2 du plan, constitué uniquement des accessions de *H. macrophylla*, est caractérisé par des teneurs fortes en acides cinnamiques,
- un deuxième groupe dans la partie supérieure droite, constitué des trois espèces *H. aspera*, *H. involucrata* et *H. scandens*, est caractérisé par des teneurs faibles en acides cinnamiques et la présence plus ou moins importante suivant l'axe 2 de dérivés du kaempférol et de la quercétine,
- un troisième groupe dans la partie supérieure droite du plan, constitué des cinq autres espèces (*H. paniculata*, *H. heteromalla*, *H. arborescens*, *H. anomala*, et *H. quercifolia*) est caractérisé par des teneurs plus importantes en dérivés de la quercétine, en opposition aux dérivés du kaempférol.

Cette AFD illustre graphiquement une structuration de la diversité interspécifique, avec une première séparation entre les espèces blanches et colorées due aux teneurs différentes en dérivés de la quercétine et du kaempférol. Une seule espèce parmi les blanches, *H. scandens*, se distingue des autres par son profil général. Une seconde séparation est très nette au sein des espèces colorées, en liaison avec la particularité d'*H. macrophylla* à synthétiser préférentiellement des acides cinnamiques.

Comparée à l'ACP, cette analyse offre ainsi une bien meilleure représentation de la variabilité. En effet, le pourcentage de représentation des variables, soit 86%, est beaucoup plus élevé comparé aux 41% obtenus par l'ACP. Cette valeur est très nettement supérieure au seuil de 70% généralement admis comme seuil raisonnable de représentativité des espaces complexes. Sur la représentation en AFD, les points dans chaque groupe sont plus regroupés que sur celle de l'ACP et la structuration est plus forte.

III. Analyse de la variabilité intraspécifique

Dans le but d'affiner les résultats obtenus lors de l'analyse globale et d'introduire l'analyse de la variabilité intraspécifique, une seconde AFD a été conduite avec les 58

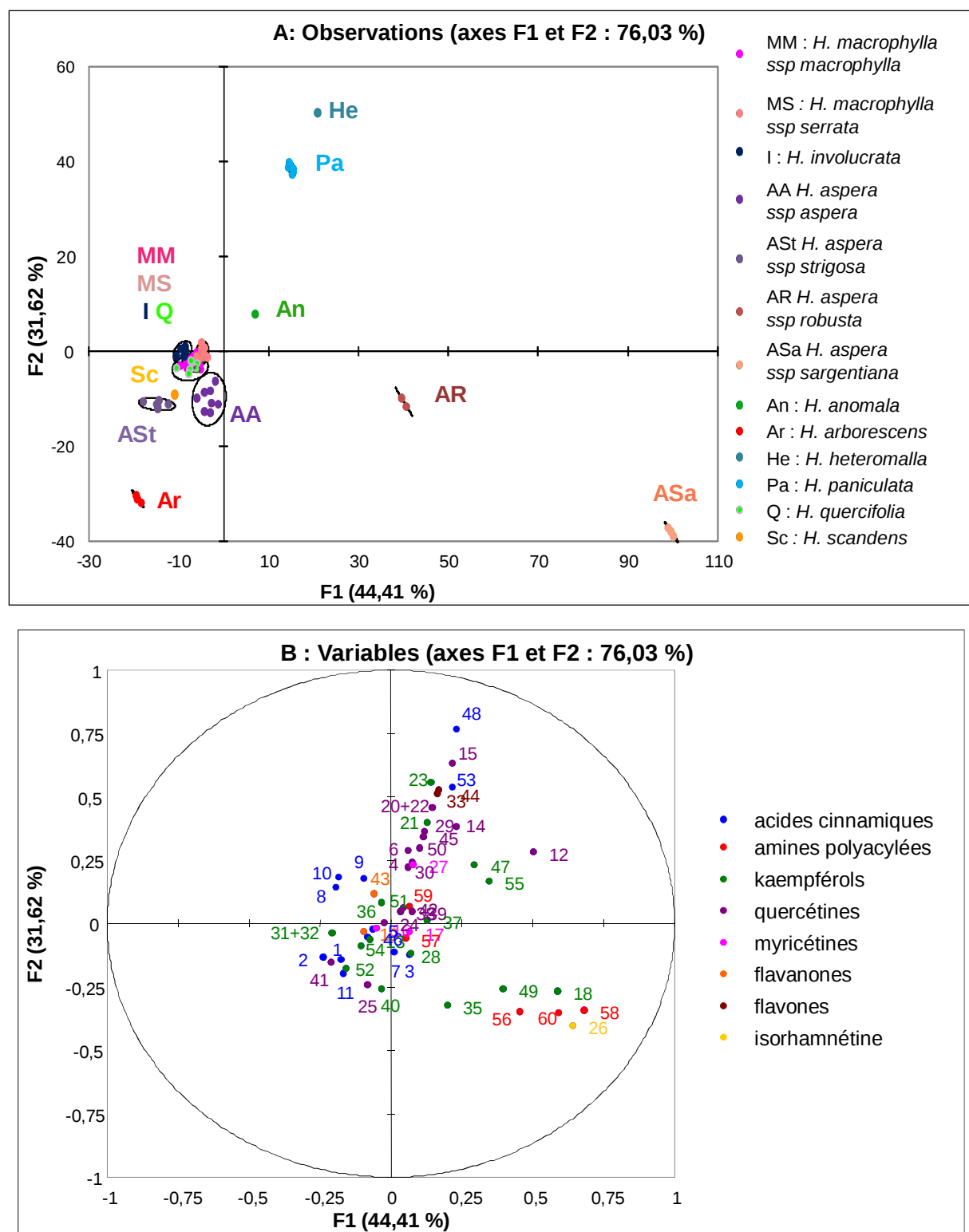


Figure III-13 : Analyse factorielle discriminante (plan 1-2) des teneurs en composés phénoliques des espèces du genre *Hydrangea*. A : Représentation graphique, B : Cercle de corrélation des variables.

variables descriptives afin d'en rechercher les plus pertinentes (Figure III-13). En effet, le regroupement des variables selon leur famille chimique engendre une perte d'information, notamment sur les différences de glycosylation. Une information complémentaire indiquant l'appartenance des accessions aux sous-espèces a été introduite dans l'analyse. Les accessions d'*H. macrophylla* sont divisées selon les sous-espèces *serrata* et *macrophylla* et l'espèce *H. aspera* est divisée en 4 selon les sous-espèces *aspera*, *strigosa*, *robusta* et *sargentiana*. *H. anomala* n'a par contre pas été divisée en ses deux sous-espèces, *anomala* et *petiolaris*, la première n'ayant qu'un seul représentant. Dans cette analyse, *H. integrifolia* et *H. seemannii*, représentées chacune par une seule accession, n'ont pas comme précédemment été retenues.

Cette AFD a produit 12 composantes, les trois premières représentant 86 % de la variabilité. Nous étudierons les plans 1-2 (Figure III-13) et 2-3 (Figure III-14). L'association de ces deux représentations nous montre bien une structuration forte des accessions selon les espèces ou les sous-espèces botaniques. La matrice de confusion nous indique un pourcentage d'observations bien classées de 100%, ce qui implique que les variables analysées permettent de caractériser correctement les groupes définis, c'est-à-dire, les espèces et sous-espèces botaniques.

Plusieurs espèces sont nettement séparées des autres dans les deux plans.

- *H. paniculata* se situe dans la partie supérieure droite du plan 1-2 et n'est pas bien représentée par l'axe 3. Les accessions de cette espèce sont caractérisées par l'association de quatre composés issus des trois voies métaboliques principales : l'acide 1,5-dicaféoylquinique (**48**), l'acide x,4-dicaféoylquinique (**53**), la quercétine-3-O-(hexose-(1-2)-hexose (**15**) et le kaempférol-3-O-hexose-(1-2)-hexose (**23**). En complément, dans le profil, les deux flavones **33** et **44** sont spécifiques mais ne se trouvent que dans cinq des neuf accessions.
- *H. heteromalla* est relativement proche de *H. paniculata* dans les deux plans, ce qui n'est pas surprenant puisque ces deux espèces appartiennent à la même sous-section *Heteromallae*. Cette espèce est caractérisée principalement par deux acides : l'acide 1,5-dicaféoylquinique (**48**) et l'acide x,4-dicaféoylquinique (**53**) dans les deux plans. Les autres composés, présents dans cette zone du plan, qui caractérisent *H. paniculata* (**15**, **23**, **33** et **44**) sont absents chez *H. heteromalla* (Tableau III-10, Tableau III-12 et Tableau III-13). L'axe 4 permet de mieux différencier ces deux espèces. *H. heteromalla* est caractérisée par la partie positive de l'axe en opposition à *H. paniculata* représentée par la partie négative.

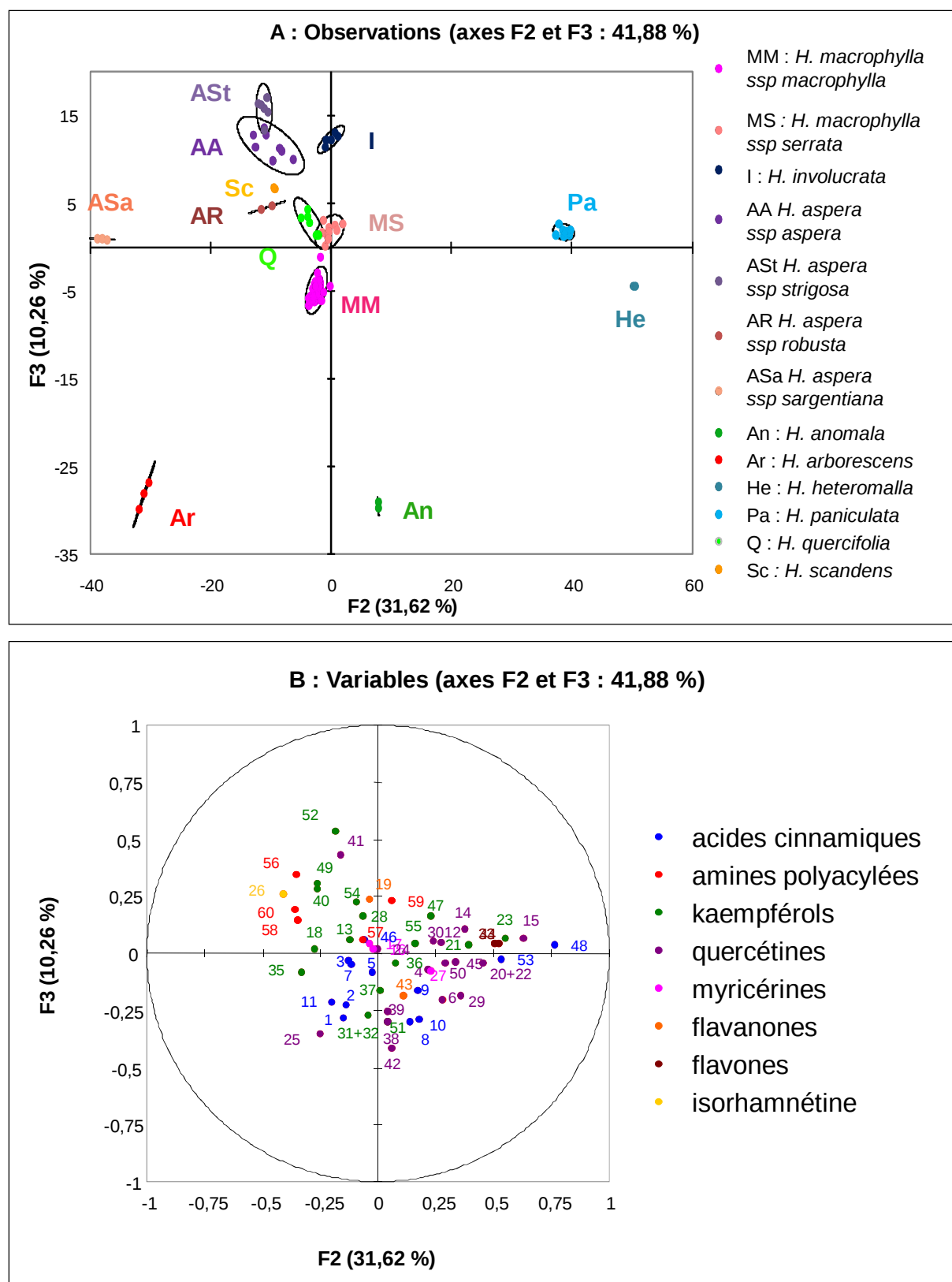


Figure III-14 : Analyse factorielle discriminante (plan 2-3) des teneurs en composés phénoliques des espèces du genre *Hydrangea*. A : Représentation graphique, B : Cercle de corrélation des variables.

La partie positive de l'axe 4 est définie par les composés caractéristiques d'*H. heteromalla* : l'acide x,4 dicaféoyl quinique (**53**), le kaempférol-3-O-(rhamnose (1-6) galactose) (**36**), la quercétine-3-O-galactoside (**29**) et les deux quercétine-3-O-acétylhexose (**45** et **50**).

- *H. arborescens* est située dans la partie inférieure gauche du plan 1-2 et du plan 2-3. Elle est caractérisée par l'association de sept composés des trois familles : la quercétine-3-O-(rhamnose-(1-6)-hexose) (**25**), les acides cinnamiques **1**, **2** et **11** dans les deux plans et la quercétine-3-O-rhamnoside (**41**), le kaempférol-3-O- α -glucoside (**40**) et le kaempférol-3-O-rhamnoside (**52**) uniquement dans le plan 1-2.
- *H. anomala* est située proche du centre dans le plan 1-2 et il est donc difficile d'identifier les composés caractérisant cette espèce dans ce plan. Par contre, dans le plan 2-3, elle se distingue dans la partie négative de l'axe 3, définie par trois composés ayant une glycosylation similaire : la quercétine-3-O-(pentose-(1-2)-rhamnose) (**38**) et la quercétine-3-O-(xylose-(1-2)-rhamnose) (**42**), qui sont spécifiques de la sous-espèce *petiolaris*, et le kaempférol-3-O-(pentose-(1-2)-rhamnose) (**51**).
- les deux sous-espèces d'*H. aspera*, *sargentiana* et *robusta*, se situent dans la partie inférieure droite du plan 1-2. Elles se détachent nettement de l'ensemble, et en particulier des deux autres sous-espèces. Elles sont caractérisées par les amines polyacylées **56**, **58** et **60**, les dérivés du kaempférol **18**, **35** et **49** et l'isorhamnétine **26**. Ces deux sous-espèces ne sont pas caractérisées par l'axe 3.
- Les deux sous-espèces d'*H. aspera*, *aspera* et *strigosa*, sont toujours proches dans ces deux plans mais sont mieux caractérisées dans le plan 2-3 par les deux dérivés kaempférol-3-O-rhamnoside (**52**) et quercétine-3-O-rhamnoside (**41**).
- *H. involucrata* se trouve au centre du plan 1-2 et ne peut être distingué de *H. quercifolia* et *H. macrophylla*. Dans le plan 2-3, cette espèce se retrouve proche des deux sous-espèces d'*H. aspera*, *aspera* et *strigosa*. Elle est caractérisée uniquement par l'axe 3 dans ce plan et donc par les mêmes composés que les deux sous-espèces d'*H. aspera*. Pour réussir à différencier clairement ces espèces, il faut s'intéresser à l'axe 6 qui ne représente que 2% de la variabilité. On peut donc en conclure que les différences sont très faibles.

- *H. scandens*, dans les deux plans, se trouve proche du centre. Cette espèce a un profil extrêmement simple, marqué surtout par un seul dérivé, le kaempférol-3-O-glucoside (**40**), qui est aussi présent chez de nombreuses autres espèces.

Les deux autres espèces, *H. macrophylla* et *H. quercifolia*, ont une position très centrale ce qui rend l'analyse des composés discriminants plus difficile :

- *H. quercifolia* est très riche en dérivés de la quercétine et majoritairement en quercétine-3-O-rhamnoside (**41**). La quercétine-3-O-(rhamnose-(1-6)-hexose) (**25**), la quercétine-3-O-galactoside (**29**), la quercétine-3-O-glucoside (**30**) et la quercétine-3-O-glucuronide (**39**) sont présentes à des teneurs importantes chez cette espèce d'après l'étude des tableaux de données (Tableau III-12 et Tableau III-13). La dispersion de ces variables dans chacun des quarts du plan peut expliquer la position centrale de cette espèce.
- Les deux sous-espèces d'*H. macrophylla* ne peuvent être distinguées que dans le plan 2-3 et sont très proches du centre, tout comme *H. quercifolia*. Il est donc difficile de conclure sur les différences de composition. Toutefois, la sous-espèce *serrata* est caractérisée par la partie positive de l'axe 3, alors que la sous-espèce *macrophylla* est caractérisée par la partie négative du même axe.

Cette analyse montre une différenciation au niveau spécifique et sous-spécifique. L'espèce *H. aspera* est subdivisée nettement en trois sous-groupes et *H. macrophylla* en deux. L'analyse fine des données est présentée dans les paragraphes suivants, par espèce ou groupe d'espèces, dans le but de déterminer les spécificités de chacune d'entre elles.

III. 1. *H. macrophylla*

Cette espèce est représentée par quarante accessions choisies parmi les deux sous-espèces *macrophylla* et *serrata*, pour représenter la variabilité qui existe dans la collection. Ce choix est basé essentiellement, pour la sous-espèce *macrophylla*, sur la gamme de couleur des inflorescences, résultat de la sélection menée par les horticulteurs depuis l'introduction de cette espèce en Europe. Les variétés introduites ou anciennes sont, en général, de couleur rose pâle ou clair et les variétés modernes présentent des coloris beaucoup plus foncés tirant vers le rouge pourpre. Les coloris sont indiqués en référence à la charte de la Royal Horticultural Society, RHS, utilisée dans la description des variétés (Tableau III-3).

L'analyse de la variabilité intraspécifique a pour objectif de comprendre quel a été l'effet de la sélection : la variabilité actuelle est-elle quantitative ou qualitative, autrement dit les coloris intenses ont-ils une base chimique différente ? Existe-t-il des différences entre les

Tableau III-3 : Teneurs par classe de composés phénoliques dans les fleurs stériles de l'espèce *H. macrophylla* (µmol/g d'extrait).

Sous-espèce	Numéros accession	Coordonnées RHS*	Somme par classe de composés							A/F**	K/Q***
			Anthocyanes	Acides cinnamiques	Kaempférol	Quercétine	Myricétine	Naringénine	Flavonoïdes totaux		
							17	43			
macrophylla	1	62A 63C	nd	371.5	36.6	7.8	-	-	44.5	8.4	4,7
	11	72D	8,2	317.1	103.0	-	-	13.4	116.5	2.7	-
	13	73C	7,5	327.0	56.1	1.4	-	-	57.6	5.7	40,1
	26	63A	19,2	649.4	162.7	29.5	-	20.4	212.6	3.1	5,5
	28	64D	11,7	544.7	80.6	-	-	-	80.6	6.8	-
	33	58C	7,2	264.7	57.0	3.0	-	14.5	74.5	3.6	19,0
	45	63B	11,5	273.9	52.8	8.6	-	6.8	68.2	4.0	6,1
	46	BC	0.0	171.6	55.0	18.7	-	10.2	83.8	2.0	2,9
	54	58C	10,0	747.1	181.1	3.9	-	28.1	213.1	3.5	46,4
	59	58C	10,2	253.9	43.1	4.6	-	8.9	56.6	4.5	9,4
	60	59C	31,9	701.5	103.5	4.9	-	17.6	126.0	5.6	21,1
	65	BC	0.0	406.2	83.8	1.4	-	-	85.2	4.8	59,9
	76	BC	0.0	429.0	81.6	5.0	-	-	86.5	5.0	16,3
	106	63B	16,6	671.9	158.4	14.9	-	-	173.3	3.9	10,6
	108	60A	16,6	584.8	157.2	18.4	-	-	175.5	3.3	8,5
	115	60A 60B	33,3	711.8	91.5	13.5	-	-	105.0	6.8	6,8
	127	59D	22,9	743.3	82.6	2.4	-	12.6	97.6	7.6	34,4
	129	63B	nd	574.1	110.3	15.0	-	-	125.3	4.6	7,4
	137	75D 61D	nd	196.8	67.9	-	-	27.4	95.3	2.1	-
	157	57B 58B	12,3	806.9	65.4	6.3	-	-	71.7	11.3	10,4
	212	69A	4,9	359.0	62.1	3.1	-	19.9	85.1	4.2	20,0
	269	53D 59C	32,0	764.9	87.7	3.7	-	-	91.4	8.4	23,7
	292	70D 73B	10,1	641.9	101.1	9.7	-	-	110.7	5.8	10,4
	309	65A	3,6	366.3	72.2	1.2	-	19.1	92.5	4.0	60,2
	325	65D	0.0	279.6	68.7	1.8	-	14.8	85.4	3.3	38,2
	433	73B 73D	0,4	216.8	35.4	9.2	-	5.1	49.7	4.4	3,8
	439	80D 72D	nd	661.8	96.7	3.4	-	-	100.1	6.6	28,4
	540	68C 68D	nd	891.8	90.8	16.4	-	-	107.2	8.3	5,5
	541	63A 61B	16,7	501.3	80.3	7.0	-	-	87.3	5.7	11,5
	544	62B 62A	3,2	387.0	28.6	1.5	-	-	30.1	12.9	19,1
	570	63A 63B	16,1	586.0	115.4	4.2	-	-	119.6	4.9	27,5
	591	68B	nd	257.6	84.7	19.6	-	14.8	119.0	2.2	4,3
serrata	193	61C 64C	nd	412.9	142.5	85.7	-	-	228.2	1.8	1,7
	258	68B	nd	509.2	98.2	5.4	-	-	103.5	4.9	18,2
	349	59D 60D	nd	354.3	39.1	5.3	-	-	44.4	8.0	7,4
	383	59D 60D	nd	343.6	49.1	15.7	-	-	64.9	5.3	3,1
	408	157D	nd	385.1	61.6	30.6	-	-	92.2	4.2	2,0
	444	73D	nd	280.8	56.9	21.8	17.6	-	96.2	2.9	2,6
	511	nd	nd	790.0	147.5	5.3	-	-	152.8	5.2	27,8
	583	70D	nd	262.7	66.3	9.4	-	-	75.6	3.5	7,1

*RHS : Charte de la Royal Horticultural Society ** A/F : Rapport des teneurs en dérivés d'acide cinnamique et de flavonoïdes *** K/Q Rapport des teneurs en dérivés du kaempférol et de la quercétine.

deux sous-espèces ? La variabilité est analysée en s'intéressant d'abord au rapport entre les classes de composés, puis plus précisément à la composition pour chacune d'elle. Elle porte sur les composés des fleurs stériles, les fleurs fertiles étant souvent très rares pour les variétés issues de sélections.

Les 33 composés présents dans l'espèce *H. macrophylla* se répartissent entre les trois classes chimiques majeures (Tableau III-3) : acides cinnamiques (14 composés), dérivés du kaempférol (19 composés), dérivés de la quercétine (8 composés), et entre deux autres classes mineures : les dérivés de la myricétine (myricétine-3-*O*-hexose **17**) et les flavanones (naringénine-7-*O*-hexose **43**).

Comme nous l'avons vu précédemment, les acides cinnamiques sont toujours présents à des teneurs plus importantes que les flavonoïdes, mais entre accessions, les rapports varient de 2 (accessions 46, 137, 591, 193) à plus de 12 (157, 544). Toutefois, les teneurs totales en dérivés d'acides cinnamiques ou en flavonoïdes sont indépendantes, aucune corrélation significative entre celles-ci n'étant observée ($R^2 = 0,23$ pour la sous-espèce *macrophylla* et 0,19 pour *serrata*).

Dans la classe des flavonols, les dérivés du kaempférol sont majoritaires avec des teneurs qui varient de 28 (accession 544) à 181 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait (accession 54), soit dans un rapport de 1 à 6. Les dérivés de quercétine sont présents à des teneurs souvent faibles ou même nulles (11, 28, 137). Le rapport entre ces deux catégories peut être plus équilibré avec des valeurs autour de 2, par exemple dans les accessions 46 ou 193, 408, 444 (*serrata*). Cependant, aucune corrélation n'existe entre les teneurs de ces deux types de flavonols ($R^2 = 0,17$ pour la sous-espèce *macrophylla* et 0,18 pour *serrata*). Les composés mineurs comme les dérivés de la naringénine ne sont synthétisés que dans un tiers des accessions de la sous-espèce *macrophylla* et ceux de la myricétine dans une seule accession (444) de la sous-espèce *serrata*.

Les teneurs en anthocyanes sont, comme attendues, très fortement corrélées ($R = 0,84$) à l'intensité de la couleur des accessions classées en 5 catégories : blanc, rose pâle, rose clair, rose, rose foncé et pourpre. Les teneurs sont comprises entre 0.4 et 33 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait et sont du même ordre de grandeur que celles des dérivés de la quercétine mais elles restent très inférieures aux autres classes. Dans cet échantillonnage, l'accession 60 est un mutant spontané à inflorescences pourpres, isolé d'une ramification de l'accession 59 (Figure III-15). La comparaison de ces deux variétés indique que les principales voies métaboliques sont concernées par cette mutation : les teneurs en anthocyanes sont, d'une variété à l'autre, trois

Tableau III-4 : Teneurs en anthocyanes et acides cinnamiques des fleurs stériles d'*H. macrophylla* (µmol/g d'extrait)

Sous- espèce	Numéro d'accession	Anthocyanes		Acides cinnamiques											
				Monoacylés						Diacylés			Indéterminés		
		66	68	1	2	5	7	8	9	46	48	53	3	10	11
macrophylla	1	nd	nd	-	19.0	-	-	338.7	3.5	-	4.2	-	-	6.2	-
	11	0,9	7,3	2.9	83.3	-	2.6	221.2	-	-	-	-	-	7.1	-
	13	0,6	6,9	3.6	106.9	-	2.6	199.5	5.6	2.1	-	-	-	6.7	-
	26	2,3	14,1	-	75.2	-	-	557.9	-	-	-	-	2.6	8.3	5.4
	28	1,0	10,7	-	45.8	-	1.9	473.6	6.2	-	3.3	-	1.7	10.2	1.9
	33	0,6	6,6	-	27.3	-	-	225.8	2.9	1.9	1.9	-	-	4.9	-
	45	1,0	10,5	-	31.6	-	1.6	228.1	2.8	-	2.6	-	1.5	5.8	-
	46	0.0	0.0	-	6.8	-	-	159.5	1.1	-	4.2	-	-	-	-
	54	0,5	8,8	3.4	264.8	1.3	12.3	442.5	15.8	-	-	-	2.3	4.8	-
	59	0,5	8,2	-	18.8	-	-	223.6	-	2.9	2.1	-	-	6.5	-
	60	4,3	23,9	2.5	147.0	-	2.9	518.2	14.2	-	2.9	-	1.9	10.0	1.9
	65	0.0	0.0	-	56.4	-	-	340.3	5.3	-	-	-	-	4.2	-
	76	0.0	0.0	-	22.7	-	22.5	371.8	1.4	-	-	-	-	10.6	-
	106	0,8	15,8	1.5	97.0	-	4.5	548.9	8.4	-	-	-	2.3	9.4	-
	108	0,9	15,7	-	107.2	-	-	473.1	-	-	-	-	-	4.5	-
	115	1,4	26,3	-	26.9	-	-	672.2	-	-	-	-	-	12.7	-
	127	2,0	20,9	2.5	160.9	-	6.4	549.5	10.4	-	3.8	-	2.8	7.1	-
	129	nd	nd	-	66.2	1.9	4.2	486.6	4.2	-	-	-	2.9	8.1	-
	137	nd	nd	-	7.2	-	-	173.4	-	2.8	7.1	-	-	6.3	-
	157	1,0	10,5	-	33.8	-	4.5	752.4	6.0	-	-	-	-	10.3	-
	212	0,1	4,1	1.9	50.7	-	1.2	277.7	4.9	4.2	7.3	-	-	11.1	-
	269	1,9	26,5	-	22.5	-	-	730.3	-	-	-	-	-	12.1	-
	292	0,9	8,3	-	4.1	-	4.9	624.2	-	-	-	-	-	8.6	-
	309	0,2	2,8	1.6	54.8	-	-	294.9	-	1.8	5.9	-	-	7.3	-
	325	0.0	0.0	1.1	26.5	-	3.5	232.6	2.8	1.9	1.5	-	-	9.8	-
	433	0,0	0,3	-	11.9	-	-	191.3	2.1	3.6	-	-	-	8.0	-
	439	nd	nd	2.4	135.8	-	2.6	490.6	14.0	-	2.9	-	3.3	10.2	-
	540	nd	nd	-	187.0	-	17.6	671.7	8.2	-	-	-	-	7.3	-
	541	2,1	14,5	1.2	54.4	-	3.9	426.1	4.3	-	-	-	3.1	8.2	-
	544	0,3	2,9	-	39.9	4.0	15.2	314.1	4.4	-	1.1	-	-	7.3	1.1
	570	1,7	14,3	-	28.0	-	1.8	538.7	2.7	-	2.2	-	3.0	9.6	-
	591	nd	nd	-	30.0	6.2	23.3	186.4	3.3	-	-	-	-	4.6	3.8
serrata	193			-	24.5	-	-	365.2	14.8	-	-	-	-	8.3	-
	258			2.8	116.8	-	19.5	359.0	2.9	-	-	-	-	8.1	-
	348			5.9	58.9	-	1.4	258.9	3.2	-	-	-	-	25.9	-
	383			-	62.4	-	-	268.0	6.2	-	-	-	-	7.1	-
	408			1.1	49.9	-	12.7	302.5	4.1	-	1.5	2.8	2.1	7.4	1.2
	444			3.8	122.7	-	1.8	146.2	3.1	-	-	-	-	3.4	-
	511			4.1	206.1	-	3.7	554.4	13.3	-	-	-	-	8.4	-
	583			2.3	37.5	-	3.8	208.2	-	-	-	-	-	10.8	-

fois plus importantes (10 et 32 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait) comme celle des acides cinnamiques (254 et 701 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait). Les teneurs des dérivés du kaempférol sont 4 fois plus élevées (43 et 181 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait) et celle des dérivés de la naringénine deux fois (9 et 18 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait), tandis que celles des dérivés de quercétine sont constantes et faibles.

En résumé, les profils des accessions, sur ces critères globaux, montrent une grande variabilité liée à l'indépendance des critères analysés, que ce soient les teneurs en dérivés d'acides cinnamiques, en flavonoïdes, en dérivés du kaempférol ou de la quercétine. Mais, plus précisément, comment s'exprime la variabilité intraspécifique au sein de chaque classe de composés ?

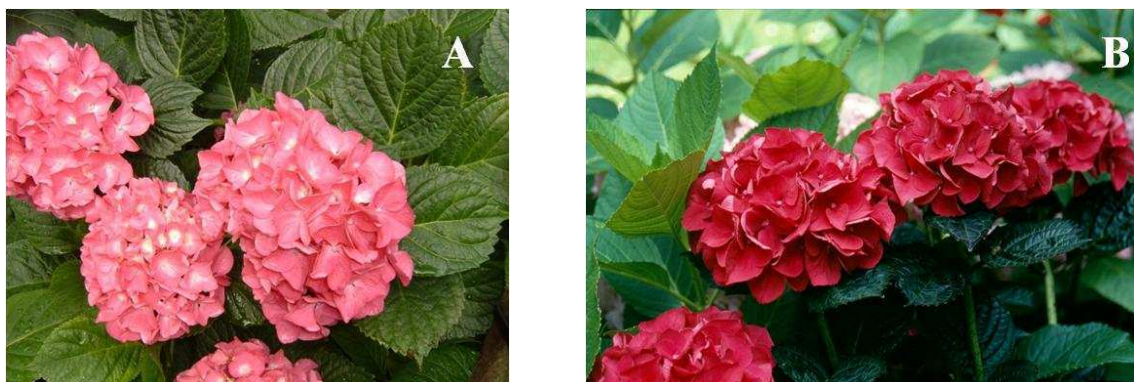


Figure III-15 : A : Inflorescences de l'accession 'Merveille' (59) et B : de sa forme mutante 'Merveille Sanguinea' (60) (*H. macrophylla* ssp. *macrophylla*)

III. 1. 1. Dérivés d'acides cinnamiques

Dans la catégorie des acides cinnamiques (Tableau III-4), l'acide chlorogénique (**8**) est très majoritaire dans toutes les accessions. En particulier, 157 et 269 atteignent des *maxima* de plus de 700 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait et se différencient par un facteur 5 des accessions 46, 137 et 444 qui ont les teneurs les plus faibles, autour de 150 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait. Pour l'acide 3-caféoylquinique (**2**), copigment de la delphinidine, les différences entre profils sont très importantes, entre un maximum de 265 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait pour l'accession 54 et des valeurs inférieures à 10 pour les variétés 46, 137, 292. Le composé **10** est présent dans toutes les accessions (excepté 46) mais en plus faibles teneurs (de 3.4 à 26 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait).

Parmi les composés minoritaires, l'acide 3-*p*-coumaroylquinique (**7**), autre copigment connu, et l'acide 3-féruoylquinique (**9**), sont présents dans une majorité d'accessions. Les autres (**1**, **3**, **5**, **11**, **46**, **48**, **53**) apparaissent toujours en faibles quantités (inférieure à 5 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait) et dans un nombre réduit d'accessions.

Tableau III-5 : Teneurs en flavonols des fleurs stériles d'*H. macrophylla* (µmol/g d'extract)

Sous- espèce	Numéro accession	Dérivés du kaempférol								Dérivés de la quercétine						
		Monoglycosylés			Diglycosylés					Monoglycosylés			Diglycosylés			Tri
		37	40	52	23	28	31-32	35	36	29	30	41	15	20-22	25	12
<i>macrophylla</i>	1	-	8.0	-	-	-	28.7	-	-	-	-	-	-	7.8	-	-
	11	3.3	47.5	-	-	-	52.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	3.2	15.4	-	-	10.4	27.1	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-
	26	11.3	48.8	-	-	-	102.5	-	-	-	1.9	-	-	27.7	-	-
	28	4.8	24.2	-	-	14.0	37.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33	1.4	18.7	-	-	-	36.9	-	-	-	-	-	-	3.0	-	-
	45	3.0	14.9	-	-	-	34.9	-	-	-	-	-	-	8.6	-	-
	46	2.8	17.1	-	-	-	35.1	-	-	-	1.7	-	-	17.0	-	-
	54	7.7	56.9	-	-	11.3	105.2	-	-	-	-	-	-	3.9	-	-
	59	1.6	15.5	-	-	-	26.1	-	-	-	-	-	-	4.6	-	-
	60	5.4	35.5	-	-	-	62.6	-	-	-	-	-	-	4.9	-	-
	65	3.8	27.8	-	-	-	52.2	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-
	76	2.5	24.7	-	-	5.3	49.1	-	-	-	-	-	-	5.0	-	-
	106	11.5	40.8	-	1.9	11.5	90.2	2.4	-	-	-	-	-	14.9	-	-
	108	8.1	48.5	-	-	-	98.7	1.8	-	-	-	-	-	18.4	-	-
	115	4.1	20.9	-	-	-	65.0	1.4	-	-	-	-	-	13.5	-	-
	127	2.8	36.2	-	-	-	43.5	-	-	-	-	-	-	2.4	-	-
	129	4.7	42.8	-	-	-	59.9	2.9	-	1.5	-	-	-	13.5	-	-
	137	1.2	14.3	-	-	18.1	34.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	157	2.7	15.0	-	-	-	47.7	-	-	-	-	-	-	6.3	-	-
	212	3.0	23.6	-	1.2	-	29.3	4.9	-	-	-	-	-	3.1	-	-
	269	3.2	27.2	-	-	-	57.4	-	-	-	-	-	-	3.7	-	-
	292	6.7	32.7	-	-	-	59.1	2.6	-	-	-	-	-	9.7	-	-
	309	3.4	20.9	-	-	-	47.8	-	-	-	-	-	-	1.2	-	-
	325	3.0	18.7	-	-	20.3	25.0	1.7	-	-	-	-	-	1.8	-	-
	433	1.6	12.2	-	-	-	21.7	-	-	-	-	-	-	9.2	-	-
	439	5.5	33.1	-	-	-	58.1	-	-	-	-	-	-	3.4	-	-
	540	-	19.3	25.4	4.2	-	36.0	-	6.0	-	-	5.4	-	10.9	-	-
	541	5.3	21.2	-	-	-	53.8	-	-	-	-	-	-	7.0	-	-
	544	1.7	7.3	-	-	-	19.6	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-
	570	5.2	22.2	-	2.5	-	82.5	2.9	-	-	-	-	-	4.2	-	-
	591	-	23.1	-	24.2	8.8	23.3	1.6	3.8	-	-	-	3.2	16.4	-	-
<i>serrata</i>	193	-	61.7	-	10.7	-	17.6	52.4	-	-	24.9	-	19.0	21.0	20.8	-
	258	2.2	37.9	-	-	-	4.4	53.7	-	-	1.7	-	-	-	3.7	-
	349	1.5	8.0	-	-	-	5.5	24.2	-	-	-	-	-	-	5.3	-
	383	2.2	11.6	-	-	-	5.1	30.3	-	-	3.6	-	-	-	12.1	-
	408	1.5	15.5	-	-	-	44.6	-	-	-	-	-	-	30.6	-	-
	444	-	9.5	16.5	15.0	-	-	15.9	-	-	3.7	7.2	-	-	5.3	5.5
	511	-	21.9	-	24.1	-	72.8	19.8	8.9	-	-	-	2.1	3.2	-	-
	583	-	8.6	-	-	-	-	57.7	-	-	-	-	1.6	-	7.7	-

Quelques profils se distinguent particulièrement de l'ensemble par leurs caractères qualitatifs et surtout quantitatifs : l'accession 54 est riche en acide 3-caféoylquinique (**2**) mais aussi en acides 3-*p*-coumaroylquinique (**7**) et 3-féruoylquinique (**9**). L'accession 269 se distingue par son profil très simple mais des teneurs fortes, alors que la variété 46 a un profil également simple mais des teneurs en acides sont très faibles. Cependant, en ce qui concerne les profils des acides cinnamiques, aucune différence ne ressort entre sous-espèces.

III. 1. 2. Flavonols

Les profils flavonoliques des deux sous-espèces se différencient par contre aisément (Tableau III-5). Dans la sous-espèce *macrophylla*, les composés majoritaires sont le kaempférol-3-*O*-(pentose-(1-2)-hexose (**31** et **32**) et le kaempférol-3-*O*-glucose (**40**). Leurs différences quantitatives varient d'un facteur 5 (de 20 à 105 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait) ou même 7 (8 à 57 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait). La sous-espèce *serrata* est plus hétérogène et se distingue souvent par le kaempférol-3-*O*-rutinoside (**35**). Les autres composés minoritaires ne sont pas spécifiques : le kaempférol-3-*O*-galactoside (**37**) est présent en assez faible teneur (maximum de 11.5 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait) chez la majorité des accessions et le kaempférol-3-*O*-(rhamnose-(1-2)-hexose) (**28**) n'est présent que dans huit accessions. Les composés **52**, **36** et **23** sont détectés dans un nombre réduit d'accessions et différencient les profils: 540 et 591 (*macrophylla*), 444 et 511 (*serrata*). Les accessions 540 et 511 sont en fait des hybrides entre les deux sous-espèces. L'accession 511 a un profil particulier se rapprochant de *macrophylla* par sa teneur en composés **31** et **32** et de *serrata* par les teneurs plus fortes en composé **35**. L'accession 540 se démarque par la présence des deux homologues glycosidiques **41** et **52** comme c'est le cas de l'accession 444 de la sous-espèce *serrata*. L'accession 408 a un profil de type *macrophylla*. Son identification sur des critères botaniques est douteuse. A travers ces deux exemples, l'analyse du profil des composés phénoliques peut certainement aider à l'identification lorsqu'il y a ambiguïté au niveau des critères morphologiques.

Les profils en dérivés de la quercétine dans la sous-espèce *macrophylla* sont extrêmement simples, avec les seules quercétine-3-*O*-(pentose-(1-2)-hexose (**20** et **22**) qui sont les homologues glycosydiques des composés majoritaires de type kaempférol (**31** et **32**) décrits précédemment. La quercétine-3-*O*-(rhamnose-(1-6)-glucose) (**25**) différencie les deux sous-espèces : présente dans 6 accessions de la sous-espèce *serrata* (3.7 à 20.8 $\mu\text{mol/g}$ d'extrait), elle est totalement absente chez la sous-espèce *macrophylla*. Le rutinose (rhamnose-(1-6)-glucose), commun aux deux homologues glycosidiques (**25**) et (**35**), pourrait être une caractéristique de la sous-espèce *serrata*.

Des profils attirent l'attention par leur différence qualitative. C'est le cas des accessions 540 et 444 qui se distinguent par la synthèse des homologues kaempférol-3-O-rhamnoside (52) et quercétine-3-O-rhamnoside (41). Le profil de l'accession 193 est remarquable parce qu'il est particulièrement riche en quercétine. Il associe quatre composés : quercétine-3-O-glucoside (30), (25), (20 et 22), et quercétine-3-O-hexose-(1-2)-hexose (15). De plus, dans ce profil, se trouvent tous les dérivés glycosylés homologues du kaempférol et de la quercétine à des teneurs importantes : 40 et 30, 35 et 25, 23 et 15 mais aussi (31 et 32) avec (20 et 22).

La seule delphinidine-3-O-glucoside (68) représente en moyenne 85% de la teneur totale en anthocyanes de cette espèce. La delphinidine-3-O-sambubioside (66) est détectée à des teneurs environ dix fois moindres dans la plupart des cas. D'autres dérivés de la delphinidine sont présents mais minoritaires dans l'espèce. Comme il est précisé précédemment (cf. chapitre II. I. p 63), il est difficile de les quantifier et de les identifier dans nos extraits compte tenu de l'avancée de nos travaux à ce sujet et des problèmes rencontrés.

À travers cette analyse, il ressort, pour la sous-espèce *macrophylla*, que la variabilité des profils polyphénoliques est forte au niveau quantitatif mais faible au niveau qualitatif. La sélection réalisée par les horticulteurs à partir des variétés à inflorescences roses, souvent pâles, avait pour objectif d'obtenir des coloris plus soutenus, rouges ou pourpres. Ces variétés plus récentes ont les mêmes caractéristiques moléculaires que les accessions anciennes, les différences étant essentiellement quantitatives, par l'enrichissement en delphinidine-3-O-glucoside (68) bien connue dans cette espèce.

La sélection a porté sur une base génétique étroite à partir d'un nombre réduit d'introductions comme le 212 'Joseph Banks' originaire de Chine et introduit en 1789 ou le 325 'Mariesi' introduit en 1880. A partir de semis de 'Mariesi', Lemoine obtient en 1904 'Mariesi Perfecta' (292) qui est choisie dans la descendance pour son coloris rose vif inhabituel. Sans connaître le géniteur mâle qui était sans doute très pâle, la comparaison des profils peut quand même être intéressante. L'augmentation des teneurs est constatée pour la plupart des composés que ce soient les anthocyanes mais aussi les dérivés du kaempférol ou de la quercétine. Seul l'acide cinnamique (2) marque une nette diminution dans le profil de 292. Le même type de résultat est constaté en comparant les profils de 59 'Merveille', rose foncé, obtenu par Cayeux en 1928, et son mutant pourpre, le 60 'Merveille Sanguinea',

Tableau III-6 : Teneurs par classe des composés phénoliques dans les fleurs d'*H. aspera* et *H. involucrata* (µmol/g d'extrait). fs : Fleurs stériles, ff : Fleurs fertiles

Espèce	Sous-espèce/ groupe	Numéro accession	fs /ff	Anthocyanes	Acides cinnamiques	Flavonoïdes	Kaempférol	Quercétine	Myricétine		Isorhamnétine	Flavanones	Amines polyacylées	A/F*	K/Q **
									16	17					
<i>H. aspera</i>	<i>robusta</i>	396	ff	0.75	42,4	124,4	10,8	105,7	0	5,8	2,1	0	30,9	0,34	0,10
		441	ff	0.0	19,3	128,2	77,7	49,2	0	0	1,3	0	71,8	0,15	1,58
	<i>sargentiana</i>	154	ff	2.0	12,1	95,3	74,9	16,4	0	1,1	3,0	0	85,3	0,13	4,57
		154	fs	0.0	44,0	284,6	258,0	23,8	0	0	2,8	0	0,0	0,15	10,84
		188	ff	3.9	19,4	177,2	130,3	42,4	0	0	4,5	0	130,7	0,11	3,07
	<i>strigosa</i>	413	ff	14.0	68,4	120,0	77,2	40,0	1,3	0	1,5	0	34,0	0,57	1,93
		413	fs	0.0	100,3	205,6	81,3	108,2	0	0	0	16,1	0,0	0,49	0,75
		463	ff	nd	50,4	237,9	164,7	70,9	0	0	2,3	0	35,5	0,21	2,32
		481	ff	13.4	55,2	257,0	181,4	74,5	1,1	0	0	0	53,2	0,21	2,44
		481	fs	0.0	79,2	234,3	64,8	169,5	0	0	0	0	1,9	0,34	0,38
		483	ff	nd	81,7	248,4	171,3	77,0	0	0	0	0	45,9	0,33	2,22
		483	fs	0.0	82,7	237,5	48,5	189,1	0	0	0	0	0,0	0,35	0,26
	<i>aspera / Kawakami</i>	352	ff	8.3	56,6	321,8	214,1	104,7	0	0	2,9	0	81,5	0,18	2,05
	<i>aspera / Villosa</i>	343	ff	12.0	40,3	109,7	90,5	17,9	0	0	1,4	0	29,4	0,37	5,07
		371	ff	nd	45,8	133,1	108,2	23,2	0	0	1,6	0	39,8	0,34	4,67
		371	fs	nd	41,5	224,1	209,1	15,0	0	0	0	0	2,7	0,19	13,91
		613	ff	22.3	48,5	177,8	155,1	21,1	0	0	1,7	0	39,1	0,27	7,35
		613	fs	nd	48,6	371,8	324,2	47,6	0	0	0	0	0,0	0,13	6,81
		343A	ff	17.3	43,6	179,5	143,6	32,9	0	0	2,9	0	58,7	0,24	4,36
		343A	fs	nd	69,3	367,0	352,7	14,3	0	0	0	0	0,0	0,19	24,62
<i>H. involucrata</i>		164	ff	11.0	29,3	181,2	152,1	29,1	0	0	0	0	43,2	0,16	5,23
		355	ff	14.0	46,9	228,0	188,8	39,2	0	0	0	0	42,7	0,21	4,81
		372	fs	nd	50,5	201,9	108,3	93,6	0	0	0	0	0,0	0,25	1,16
		418	fs	nd	60,5	255,6	195,8	41,3	0	0	0	18,5	0,0	0,24	4,74
		419	ff	nd	43,2	222,7	125,5	74,6	0	0	0	22,5	0,0	0,19	1,68
		419	fs	nd	41,2	197,4	115,1	67,6	0	0	0	14,8	0,0	0,21	1,70
		485	fs	nd	108,3	107,7	70,4	37,3	0	0	0	0	0,0	1,01	1,89
		623	ff	6.2	37,0	136,5	111,7	23,6	0	1,1	0	0	26,8	0,27	4,73

* A/F : Rapport des teneurs en dérivés d'acides cinnamiques et de flavonoïdes ** K/Q : Rapport des teneurs en dérivés du kaempférol et de la quercétine

obtenu par Truffault en 1938. Tous les composés augmentent dans des proportions de 2 ou 3 fois mais pour l'acide **2**, il l'est de 7 fois.

Les différences qualitatives se trouvent entre les deux sous-espèces avec les composés glycosylés **25** et **35** associant la quercétine et le kaempférol au rutinose qui caractérise *serrata*. Malgré le faible effectif analysé, cette sous-espèce montre une plus forte variation qualitative, comme par exemple l'accession 193 qui est très originale de par son profil en flavonols. Cette sous-espèce a été très peu soumise à la sélection et offre des possibilités de diversification par des hybridations entre ces deux sous-espèces.

III. 2. *H. aspera* et *H. involucrata*

Ces deux espèces ont été introduites, acclimatées et conservées dans des collections mais n'ont jamais été sélectionnées ni diffusées à grande échelle. Contrairement aux variétés d'*H. macrophylla*, les inflorescences sont de type sauvage et constituées d'une majorité de fleurs fertiles colorées et de quelques fleurs stériles blanches, sauf dans le groupe *Villosa* où l'ensemble est coloré. Les analyses ont été réalisées sur les deux types de fleurs dans huit des vingt accessions et les différences qui peuvent exister entre les deux types sont soulignées dans chaque cas.

L'un des principaux objectifs de ce travail était d'évaluer la variabilité biochimique entre les quatre sous-espèces d'*H. aspera* et de la comparer à la variabilité cytogénétique. En effet, des différences importantes ont été révélées par l'analyse des quantités d'ADN, des caryotypes et de l'organisation des génomes à travers l'étude des *loci* codant pour les ARN ribosomiques (Mortreau *et al.* 2010). La question étant de savoir si la variabilité génétique et la variabilité biochimique, à travers l'analyse des composés phénoliques, convergent ou non.

Au sein d'*H. involucrata*, l'objectif est de comparer les accessions dont trois sont des mutants de couleur des inflorescences (372, 418 et 485) qui ne synthétisent pas de dérivés de delphinidine, et une (419) qui est un mutant viridescent¹.

La majorité des composés détectés au sein du genre est synthétisée par ces deux espèces (47 sur 60). Contrairement à l'espèce *H. macrophylla*, une des caractéristiques de ces deux espèces est la prédominance de flavonoïdes (F) comparés aux acides cinnamiques (A) (Tableau III-6). Le rapport A/F est en moyenne de 0.25 mais deux accessions se démarquent : 485 (*H. involucrata*), pour laquelle $A/F \approx 1$ et 413 (*H. aspera* ssp *strigosa*) dont le rapport est

¹ Viridescent : l'inflorescence garde une coloration verte ou légèrement verte due à la persistance de la chlorophylle dans les cellules.

Tableau III-7 : Teneurs en dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées dans les fleurs d'*H. aspera* et *H. involucrata* (µmol/g d'extrait). Fs : Fleurs stériles, ff : Fleurs fertiles

Espèce	Sous-espèce / groupe	Numéro accession	fs /ff	Dérivés d'acides cinnamiques											Amines polyacylées				
				Monoacylés					Diacylés			Indéterminés							
				1	2	7	8	9	46	48	53	3	10	11	56	57	58	59	60
H. aspera	robusta	396	ff	-	-	-	42,4	-	-	-	-	-	-	17,4	6,2	1,3	1,6	4,4	
		441	ff	-	-	-	15,0	-	1,5	-	2,8	-	-	-	44,6	11,6	2,2	13,4	-
	sargentiana	154	ff	-	-	-	12,1	-	-	-	-	-	-	53,3	12,1	4,0	4,3	11,6	
		154	fs	-	-	18,1	21,8	-	-	-	-	-	4,1	-	-	-	-	-	
		188	ff	-	-	-	19,4	-	-	-	-	-	-	-	88,4	17,6	3,8	6,6	14,3
		413	ff	-	24,7	-	39,2	2,5	-	-	-	2,0	-	-	24,8	2,0	1,6	3,7	1,9
	413	fs	1,7	44,3	-	47,4	2,3	-	-	-	2,5	-	2,1	-	-	-	-	-	
	463	ff	-	-	-	49,2	-	-	-	-	1,2	-	-	24,8	1,3	-	9,5	-	
	481	ff	-	-	-	53,3	-	1,9	-	-	-	-	-	39,9	2,0	1,3	10,1	-	
	481	fs	-	-	-	79,2	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-	-	
	483	ff	-	-	-	74,4	-	4,4	-	-	-	-	2,9	32,3	1,8	2,8	6,6	2,5	
	483	fs	-	-	-	81,4	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	
	aspera / Kawakami	352	ff	-	10,4	-	35,6	-	7,1	3,6	-	-	-	-	64,3	5,4	2,4	3,3	6,2
	aspera / Villosa	343	ff	-	-	-	40,3	-	-	-	-	-	-	-	23,4	-	1,2	-	4,8
		371	ff	-	-	-	44,5	-	-	-	-	1,4	-	-	32,2	-	-	-	7,6
		371	fs	-	-	-	40,1	-	-	-	-	1,4	-	-	2,7	-	-	-	-
		613	ff	-	12,5	-	36,0	-	-	-	-	-	-	-	28,9	2,3	1,4	4,1	2,4
		613	fs	-	34,7	-	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		343A	ff	-	-	-	43,6	-	-	-	-	-	-	-	43,7	3,5	1,9	6,7	3,0
		343A	fs	-	-	-	69,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. involucrata		164	ff	-	1,6	1,2	26,6	-	-	-	-	-	-	10,9	-	-	32,3	-	
		355	ff	-	-	-	46,9	-	-	-	-	-	-	-	8,0	-	-	34,7	-
		372	fs	-	17,2	7,3	26,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		418	fs	-	26,4	-	34,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		419	ff	-	7,3	11,9	20,0	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-	
		419	fs	-	6,0	5,9	22,7	-	-	-	-	3,0	3,5	-	-	-	-	-	
		485	fs	-	-	-	108,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		623	ff	-	1,6	-	27,4	-	-	-	-	8,0	-	-	7,0	-	-	19,7	-

de 0.5. Les deux types de flavonoïdes prédominants sont des flavonols : dérivés du kaempférol (K) et dérivés de la quercétine (Q). Le rapport K/Q entre ces deux classes est compris entre 2 et 5 dans les fleurs fertiles, mais peut être très supérieur dans les fleurs stériles (10 à 25) ou même inversé dans le cas de la sous-espèce *strigosa* (0.1-0.7). L'accession 396 (*robusta*), avec très peu de dérivés du kaempférol et au contraire une forte teneur en dérivés de la quercétine, a un profil tout à fait particulier.

Le dérivé de la naringénine **19** est caractéristique de trois profils, 413 (*strigosa*), 418 et 419 (*H. involucrata*). Les amines polyacylées, dérivés de la spermidine, sont un bon indice de la fertilité des fleurs car elles sont quasiment absentes dans les fleurs stériles.

Les anthocyanes extraites des fleurs fertiles sont présentes à plus faibles teneurs dans les sous-espèces *sargentiana* (154 et 188) et *robusta* (441). Mais sur l'ensemble ces teneurs sont comparables à celle d'*H. macrophylla*.

Sur ces critères globaux, il existe peu de différenciation entre les quatre sous-espèces mais l'analyse fine de la répartition des composés dans chaque classe apporte des informations très intéressantes sur les variations intraspécifiques.

III. 2. 1. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées

Parmi les dérivés d'acides cinnamiques (Tableau III-7), l'acide chlorogénique (**8**) est majoritairement présent dans toutes les accessions. L'isomère 3-caféoylquinique (**2**) et le 3-coumaroylquinique (**7**) sont souvent minoritaires ou même absents. Cependant trois accessions d'*H. aspera* se démarquent par leur teneur en ce composé **2** : 352 et 613 (*aspera*) et 413 (*strigosa*). Il en est de même des deux accessions 372 et 418 (*H. involucrata*).

Les amines polyacylées sont associées aux profils interspécifiques (Tableau III-7). *H. aspera* synthétise majoritairement **56** alors que *H. involucrata* synthétise majoritairement **59**. Des dérivés féruloyl **58** et **60** sont absents chez *H. involucrata*.

III. 2. 2. Flavonols

Les deux espèces sont caractérisées par la présence de deux dérivés du kaempférol monoglycosylés, le kaempférol-3-O-rhamnoside (**52**) et le kaempférol-3-O-glucoside (**40**) (Tableau III-8). Les profils des sous-espèces *sargentiana* et *robusta* se distinguent nettement des deux autres par l'absence de **52** mais aussi par la plus forte teneur en dérivé diglycosylé kaempférol-3-O-glucose-(6-1)-rhamnose (**35**). Au sein de ce groupe le kaempférol triglycosylé **18** a une teneur remarquable dans la seule accession (154). Le profil de

Tableau III-8 : Teneurs en dérivé du kaempférol et de la quercétine dans les fleurs d'*H. aspera* et *H. involucrata* (µmol/g d'extrait). fs : Fleurs stériles, ff : Fleurs fertiles

Espèce	Sous-espèce/ groupe	Numéro accession	fs /ff	Dérivés du kaempférol													Dérivés de quercétine											
				Monoglycosylés							Diglycosylés					Tri glycosylés	Monoglycosylés				Diglycosylés					Tri glycosylés		
				37	40	47	52	49	54	55	28	23	31+32	35	36	18	13	29	30	41	39	15	20+22	25	42	34	12	14
H. aspera	robusta	396	ff	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	5,9	-	-	-	2,5	16,2	1,1	29,3	1,4	1,4	56,3	-	-	-	-	
		441	ff	5,9	29,4	-	-	6,3	-	1,3	-	-	-	34,8	-	-	-	3,2	9,4	-	-	-	11,8	27,9	-	-	-	-
	sargentiana	154	ff	1,9	19,7	4,1	-	-	-	-	-	-	11,5	-	37,6	-	7,8	-	-	-	1,1	-	6,2	-	-	6,6	2,5	
		154	fs	6,8	44,1	-	-	9,5	-	-	20,4	-	-	22,6	-	154,5	-	-	6,4	-	-	1,2	-	5,7	-	-	10,5	-
		188	ff	3,4	45,4	-	-	9,9	-	2,0	-	-	-	69,5	-	-	-	-	4,0	-	-	5,7	13,8	19,0	-	-	-	-
	strigosa	413	ff	-	43,5	-	19,0	-	5,3	-	-	-	-	8,2	-	-	1,4	1,1	7,8	9,4	-	-	11,8	7,8	1,1	-	-	2,1
		413	fs	1,5	24,9	-	36,1	-	8,5	-	-	-	-	10,3	-	-	-	2,1	20,1	49,2	-	-	-	32,1	5,3	-	-	1,4
		463	ff	2,0	31,6	1,5	123,2	2,4	-	-	-	-	-	2,3	-	1,8	-	8,3	6,7	53,8	-	-	7,8	2,6	-	-	-	-
		481	ff	2,1	31,3	1,7	131,2	2,4	-	-	7,3	-	-	3,7	-	1,6	-	9,4	6,1	55,0	-	-	11,3	2,1	-	-	-	-
		481	fs	-	6,8	-	52,2	1,4	-	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-	2,0	162,8	-	-	-	4,7	-	-	-	-
		483	ff	-	42,9	-	120,3	1,4	-	-	2,4	-	-	2,8	-	1,6	-	2,7	8,4	56,3	-	2,2	8,9	1,3	-	-	-	-
		483	fs	-	5,2	-	39,4	-	-	-	-	-	-	-	3,9	-	-	-	5,4	175,9	-	-	-	7,8	-	-	-	-
	aspera / Kawakami	352	ff	7,0	47,5	-	152,3	-	-	-	-	-	-	7,4	-	-	-	11,9	13,4	66,7	-	6,6	13,5	4,5	-	-	-	-
	aspera / Villosa	343	ff	-	42,5	-	39,9	3,7	-	-	-	-	-	-	3,4	1,0	-	-	3,7	6,8	-	-	6,1	1,4	-	-	-	-
		371	ff	1,2	70,3	-	31,7	3,8	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	4,9	4,1	-	2,3	12,0	-	-	-	-	-
		371	fs	2,1	48,5	1,8	142,2	8,5	-	-	-	-	-	6,0	-	-	-	-	4,7	8,7	-	-	-	1,6	-	-	-	-
		613	ff	1,9	72,0	-	66,0	2,5	-	-	2,3	2,9	-	5,7	-	1,8	-	7,0	-	10,3	-	7,0	2,0	1,8	-	-	-	-
		613	fs	2,2	42,4	-	264,9	6,0	-	-	-	-	-	-	8,6	-	-	-	6,4	37,6	-	-	-	3,6	-	-	-	-
		343A	ff	-	94,2	-	42,4	3,1	-	-	-	-	-	1,8	-	2,1	-	-	6,9	5,3	-	6,6	14,3	-	-	-	-	-
343A		fs	-	77,5	-	258,6	11,2	-	-	-	-	-	5,3	-	-	-	-	3,6	10,7	-	-	-	-	-	-	-	-	
H. involucrata		164	ff	1,9	21,7	3,3	101,5	-	-	-	15,1	4,7	3,9	-	-	-	-	7,7	21,4	-	-	-	-	-	-	-	-	
		355	ff	-	13,1	-	144,7	2,7	-	-	19,5	4,8	4,1	-	-	-	-	-	1,6	37,6	-	-	-	-	-	-	-	
		372	ff	1,8	20,6	-	80,0	3,5	-	-	-	-	-	-	2,6	-	-	3,0	12,7	77,1	-	-	-	3,8	-	-	-	
		418	fs	-	14,5	-	174,5	2,6	-	-	-	-	1,6	1,6	1,0	-	-	-	-	32,2	-	-	-	2,1	-	7,0	-	
		419	ff	-	4,3	-	116,9	1,2	-	-	1,3	-	-	-	1,8	-	-	-	3,5	69,7	-	-	-	1,4	-	-	-	
		419	fs	-	4,3	-	108,3	1,0	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	3,3	64,3	-	-	-	-	-	-	-	
		485	fs	-	10,0	-	60,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	4,9	30,1	-	-	-	2,3	-	-	-	
		623	ff	1,9	23,0	-	58,6	7,5	-	-	13,4	2,1	5,4	-	-	-	-	-	7,5	15,1	-	-	-	1,1	-	-	-	

l'accension 396 (*robusta*) est aussi remarquable par sa pauvreté en dérivés monoglycosylés du kaempférol, contrairement à l'ensemble.

Le profil général d'*H. involucrata* se distingue très peu d'*H. aspera*, seule la présence des deux dérivés kaempférol-3-O-(pentose-(1-2)-hexose) (**31** et **32**) marque une petite différence. Les mutants 372, 418, 419 et 485 ne synthétisent pas les dérivés diglycosylés **28** et **23**.

Les différences entre fleurs fertiles et stériles sont à noter : dans les deux sous-espèces *aspera* et *strigosa*, un déficit du composé **40** est constaté dans les fleurs stériles. Chez la sous-espèce *strigosa*, la même chose est observée pour le composé **52**, alors qu'au contraire, une forte augmentation de la teneur de ce composé est observée chez pour la sous-espèce *aspera* groupe Villosa. Ce groupe est caractérisé par des fleurs stériles colorées, mais l'hypothèse d'un lien possible avec ces différences chimiques ne peut être confirmée.

Dans les profils des deux espèces, deux composés qui prédominent **41** et **30** sont des homologues glycosidiques des dérivés du kaempférol **52** et **40**. La quercétine-3-O-rhamnoside (**41**) se trouve à des teneurs importantes, mais comme précédemment pour le composé homologue kaempférol (**52**), le groupe *sargentiana robusta* en est dépourvu. L'autre composé est la quercétine-3-O-glucoside (**30**), présente dans toutes les sous-espèces. Le dérivé diglycosylé (**25**), comme son homologue (**35**), renforce la singularité des sous-espèces *sargentiana* et *robusta* vis à vis des deux autres. De plus, le profil 396 se distingue là encore par la synthèse de la quercétine-3-O-glucuronide (**39**). Le dérivé triglycosylé **12**, comme pour son homologue (**18**) précédemment, rend unique le profil de 154 (*sargentiana*).

L'espèce *H. involucrata* se distingue par l'absence des dérivés quercétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose) (**20** et **22**) à l'inverse de leur homologue kaempférol. Le dérivé de la quercétine **34** est uniquement présent dans le profil du mutant 418.

A travers cette analyse, la variabilité qualitative conduit à séparer l'espèce *H. aspera* en deux sous-ensembles sur des critères qualitatifs et quantitatifs. Le premier est constitué par les sous-espèces *sargentiana* et *robusta*, caractérisées par l'absence des composés homologues **52** et **41** et les teneurs plus importantes en composés homologues **35** et **25**. Le second est formé par les sous-espèces *aspera* et *strigosa* qui sont en opposition par rapport à ces composés.

Dans le premier groupe, les deux accessions (154) et (396) possèdent des profils singuliers : 154 est caractérisé par les dérivés triglycosylés **18** et **12**, 396 quant à lui est

Tableau III-9 : Synthèse des données cytogénétiques de la sous-section *Asperae* : quantité d'ADN, nombre de chromosomes, formule chromosomique et localisation des loci par FISH (Mortreau *et al.* 2010)

Espèces et sous-espèces /groupe	Quantité ADN pg/2C	Nombre de chromosomes 2n	Formule chromosomique*	Nombre et position des locus	
				locus 5S	locus 18S-5,8-S26S
<i>H. involucrata</i>	4,9	30	2 st + 7sm + 6m	1 paracentromérique	1 télomérique
<i>H. a. sargentiana</i>	3,0	34	0 st + 8sm + 9m	1 télomérique	2 télomériques
<i>H. a. robusta</i>	3,0	34	2 st + 8sm + 7m	1 paracentromérique	2 télomériques
<i>H. a. strigosa</i>	3,4	34	2 st + 8sm + 7m	1 paracentromérique	2 télomériques
<i>H. a. aspera</i> Villosa	3,4	34	2 st + 8sm + 7m B chromosomes	1 paracentromérique	2 télomériques
<i>H. a. aspera</i> Kawakami	4,7	36	3 st + 9sm + 6m	1 paracentromérique	2 télomériques

*st subtélocentrique, sm submétacentrique, m métacentrique

caractérisé par la quasi absence de dérivés monoglycosylés du kaempférol et au contraire une richesse en dérivés monoglycosylés de la quercétine **39**.

Dans le second groupe, la sous-espèce *strigosa* est plus riche en composés **52** et **41** que la sous-espèce *aspera*, en ne considérant que le groupe Villosa. Le profil de l'accèsion **413** (*strigosa*) est original par la présence de l'acide 3-caféoylquinique (**2**) et de composés mineurs comme le **54**. Le profil de **352** (*aspera* Kawakami) est plus proche de la sous-espèce *strigosa* sur ces critères quantitatifs.

H. involucrata est plus riche en dérivés du kaempférol **28**, **23**, **31** et **32** et au contraire ne synthétise pas les dérivés de la quercétine **15**, **20** et **22** qui le différencient d'*H. aspera*. Les mutants **372**, **418**, **419** et **485** se distinguent des accessions sauvages par l'absence de ces mêmes composés (**28**, **23**, **31** et **32**).

Chez l'espèce *H. aspera*, l'analyse cytogénétique, résumée dans le Tableau III-9, a montré une variabilité intraspécifique importante qui conduit à émettre l'hypothèse qu'il s'agirait d'un complexe d'espèces (Mortreau *et al.* 2010). Seules les sous-espèces *strigosa* et *aspera* groupe Villosa sont proches par la quantité d'ADN et le caryotype. Les sous-espèces *sargentiana* et *robusta* ont la même quantité d'ADN mais l'organisation des génomes est différente comme le montre les caryotypes et l'hybridation *in situ*². Le génotype **352** est très différent pour tous les critères évalués, que ce soit le nombre de chromosomes, $2n = 36$ et non 34 chromosomes comme les autres génotypes, la plus forte quantité d'ADN et le caryotype. La similarité entre les deux niveaux d'analyse est remarquable. En effet, la structuration de la diversité au niveau biochimique est proche de celle observée au niveau cytogénétique. Dans les deux approches, une séparation marquée ressort entre les deux sous-espèces *sargentiana* et *robusta* d'une part, *strigosa* et *aspera* groupe Villosa d'autre part. Mais le génotype **352** Kawakami, très différent par ses caractéristiques cytogénétiques, a cependant les mêmes caractéristiques en composés phénoliques que ce dernier groupe.

Finalement dans cette collection les quelques représentants de cette sous-section *Asperae* offrent une variabilité relativement importante, même si l'effectif réduit est un facteur limitant nos possibilités d'interprétation.

III. 3. Analyse de la diversité chez les autres espèces

L'analyse globale a déjà montré que, comparées aux espèces dites colorées, celles à inflorescences blanches sont toutes caractérisées par des teneurs élevées en dérivés de la

² Hybridation *in situ* : technique permettant de visualiser la localisation des gènes.

Tableau III-10 : Teneurs par classe chimique, des composés phénoliques dans les espèces à inflorescences blanches (µmol/g d'extrait. fs : Fleurs stériles, ff : Fleurs fertiles

Section	Sous-section	Espèce	Sous-espèce	Numéro accession	fs ff	Acides	Flavonoïdes	Kaempférol	Quercétine	Myricétine		Isorhamnétine	Naringénine		Flavones		Amines polyacylées	A/F*	K/Q**
										27	16	26	19	43	44	33			
Hydrangea	Americanae	<i>arborescens</i>		345	fs	215.0	242.5	26.0	216.6	-	-	-	-	-	-	-	6.0	0.9	0,12
				370	fs	112.7	167.0	48.9	118.1	-	-	-	-	-	-	-	4.7	0.7	0,41
				166	fs	354.6	354.7	68.5	286.2	-	-	-	-	-	-	-	4.1	1.0	0,24
		<i>quercifolia</i>		93	fs	16.4	149.1	4.7	144.4	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0,03
				94	fs	42.5	353.9	10.7	343.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0,03
				205	fs	36.6	180.2	5.8	174.4	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	0,03
				206	fs	31.8	430.2	15.7	414.6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0,04
				393	ff	29.8	173.1	33.0	137.8	-	2.3	-	-	-	-	-	21.0	0.2	0,24
				393	fs	30.0	341.4	9.1	332.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0,03
	Calyptranthe	<i>anomala</i>	<i>anomala</i>	344	fs	7.8	250.2	13.0	237.2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	0,05
			<i>petiolaris</i>	347	fs	44.6	166.0	20.2	145.7	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	0,14
				140	fs	4.3	159.1	16.6	140.7	1.9	-	-	-	-	-	-	1.2	0.03	0,12
	Petalanthe	<i>scandens</i>		145	ff	31.6	233.8	233.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-
				145	fs	25.5	223.6	217.5	6.1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	35,66
	Heteromallae	<i>heteromalla</i>		537	fs	385.4	376.3	12.3	325.5	-	-	-	-	38.5	-	-	-	1.0	0,04
				354	fs	364.6	316.4	9.6	306.8	-	-	-	-	-	-	-	5.2	1.2	0,03
		<i>paniculata</i>		151	ff	436.3	196.7	20.8	111.1	5.5	-	-	-	-	4.2	55.2	33.0	2.2	0,19
				424	fs	336.7	258.4	30.0	199.4	-	-	-	-	-	4.4	24.7	1.2	1.3	0,15
				425	fs	217.7	226.2	35.8	190.4	-	-	-	-	-	-	-	1.9	1.0	0,19
				426	fs	216.4	315.4	31.6	233.9	-	-	-	-	-	3.6	46.3	-	0.7	0,14
				434	fs	164.8	257.9	54.0	203.9	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0,26
				445	ff	149.5	66.7	7.0	40.7	-	-	-	-	-	3.9	15.1	25.2	2.2	0,17
				445	fs	306.3	192.0	25.9	111.9	-	-	-	-	-	8.2	46.0	-	1.6	0,23
				446	fs	199.6	204.4	61.0	141.0	-	-	-	-	-	2.4	-	-	1.0	0,43
				450	fs	187.1	162.8	28.0	119.8	-	-	-	-	-	-	15.0	3.8	1.2	0,23
				495	fs	275.3	426.3	136.0	290.2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7	0,47
Cornidia		<i>integrifolia</i>		143	fs	346.1	205.6	28.9	176.7	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	0,16
		<i>seemannii</i>		155	fs	164.6	144.3	3.0	113.4	-	-	15.5	12.3	-	-	-	-	1.1	0,03

* A/F : Rapport des teneurs en dérivés d'acides cinnamiques et de flavonoïdes ** K/Q : Rapport des teneurs en dérivés du kaempférol et de la quercétine

quercétine (Tableau III-1), à l'exception d'*H. scandens* qui ne suit pas cette règle et se distingue de l'ensemble avec le profil le plus simple en nombre de composés. Le critère majeur qui scinde ce groupe, est la teneur en acides cinnamiques. En complément, l'AFD réalisée sur l'ensemble des espèces a aussi fait ressortir des spécificités fortes pour quatre espèces : *H. paniculata* et *H. heteromalla*, *H. arborescens* et *H. anomala* (Figures III. 13 et III.-14). Dans le panel, deux espèces sont mieux représentées que les autres, *H. quercifolia* et *H. paniculata* pour lesquelles seules des variétés pour jardin ont été sélectionnées. Les variétés améliorées d'*H. paniculata* de la collection sont toutes polyploïdes, la plupart tétraploïdes, seule 495 est diploïde sans doute du fait de son origine sauvage. Il s'agit de rechercher les composés les plus discriminants entre ces espèces.

Les huit espèces à inflorescences blanches se répartissent en deux grands groupes, selon la teneur en acides cinnamiques et le rapport A/F entre ces acides et les flavonoïdes totaux (Tableau III-10) :

- Un premier groupe est constitué par les trois espèces à faible teneur en acides cinnamiques totaux ($<100\mu\text{mol/g}$ d'extrait) et un rapport A/F inférieur à 0.5: *H. quercifolia*, *H. anomala* et *H. scandens*.
- Un deuxième groupe est constitué par les cinq autres espèces à forte teneur en acides cinnamiques totaux ($>100\mu\text{mol/g}$ d'extrait) et un rapport A/F supérieur à 0.5: *H. arborescens*, *H. heteromalla*, *H. paniculata*, *H. integrifolia* et *H. seemannii*.

Dans ce second groupe *H. paniculata* se distingue spécifiquement par la présence des flavones : lutéoline-7-O-glucoside (**33**) et apigénine-7-O-glucoside (**44**).

Le rapport entre dérivés de kaempférol et de quercétine (K/Q) est particulièrement faibles, de l'ordre de 3%, pour *H. quercifolia*, *H. anomala* ssp *anomala*, *H. heteromalla* et *H. seemannii*. A l'opposé celui d'*H. scandens* montre un déficit quasi total de quercétine. Dans *H. paniculata* les deux accessions 446 et 495 se démarquent avec des rapports plus équilibrés, dus à des teneurs en dérivés du kaempférol plus fortes.

Les dérivés de myricétine, d'isorhamnétine et de naringénine ne se retrouvent que dans quelques accessions. *H. seemannii* se démarque par la présence des dérivés de l'isorhamnétine **26** et de la naringénine **19**. Une seule accession, 537 (*H. heteromalla*) synthétise le dérivé **43**.

Ces données confirment que c'est la voie des dérivés de la quercétine qui prédomine dans la biosynthèse des flavonols.

Tableau III-11 : Teneurs en dérivé d'acides cinnamiques et amines polyacylées dans les espèces à inflorescences blanches (µmol/g d'extrait) fs : Fleurs stériles, ff : Fleurs fertiles

Section	Sous-section	Espèce	Sous-espèce	Numéro accession	fs ff	Dérivés d'acides cinnamiques										Amines polyacylées		
						Monoacylé					Diacylé			Indéterminés		56	57	59
						1	2	7	8	9	46	48	53	10	11			
Hydrangea	Americanae	<i>arborescens</i>		345	fs	1.3	33.2	-	167.8	3.3	-	-	-	4.5	4.8	-	-	6.0
				370	fs	-	5.7	-	100.1	-	-	-	-	4.1	2.7	-	-	4.7
				166	fs	7.7	128.5	-	201.3	9.3	-	-	-	7.8	-	-	-	4.1
		<i>quercifolia</i>		93	fs	-	15.3	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				94	fs	2.8	34.5	-	4.0	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-
				205	fs	2.9	26.9	1.5	4.2	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-
				206	fs	-	31.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				393	ff	-	15.1	4.6	5.6	4.5	-	-	-	-	-	-	-	21.0
				393	fs	-	25.0	-	4.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Calyptranthe	<i>anomala</i>	<i>petiolaris</i>	344	fs	-	7.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				347	fs	3.7	32.3	-	8.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				140	fs	-	2.8	-	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2
	Petalanthe	<i>scandens</i>		145	ff	-	22.2	-	9.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				145	fs	-	18.0	-	7.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Heteromallae	<i>heteromalla</i>		537	fs	-	-	-	348.4	-	-	14.7	7.9	14.4	-	-	-	-
				354	fs	-	-	-	313.0	4.5	-	24.4	11.3	11.3	-	-	-	5.2
		<i>paniculata</i>		151	ff	-	-	-	345.6	3.4	2.7	73.3	7.0	4.3	-	4.4	-	28.6
				424	fs	-	1.1	-	275.6	-	-	52.2	-	7.8	-	-	-	1.2
				425	fs	-	1.7	-	157.8	12.8	-	40.1	-	5.3	-	-	-	1.9
				426	fs	-	-	-	170.0	-	-	39.2	1.8	5.3	-	-	-	-
				434	fs	-	-	-	120.0	11.4	-	33.5	-	-	-	-	-	-
				445	ff	-	-	-	80.1	-	-	66.8	2.5	-	-	5.6	2.7	17.0
				445	fs	-	-	-	243.3	-	-	57.9	-	5.1	-	-	-	-
				446	fs	-	-	-	131.6	12.7	-	55.3	-	-	-	-	-	-
				450	fs	-	1.6	-	141.2	11.3	-	30.4	-	2.6	-	-	-	3.8
				495	fs	-	-	-	190.3	-	-	78.0	2.5	4.5	-	-	-	-
Cornidia		<i>integrifolia</i>		143	fs	4.5	227.3	3.6	80.4	7.4	-	22.9	-			-	-	-
		<i>seemannii</i>		155	fs	-	-	-	151.7	-	-	13.0	-			-	-	-

III. 3. 1. Dérivés d'acides cinnamiques et amines polyacylées

Il existe une opposition forte entre les deux groupes définis par leurs teneurs en acides cinnamiques qui se traduit aussi par la répartition des dérivés majeurs **2** et **8** (Tableau III-11). Dans le premier groupe à faible teneur en acides cinnamiques (*H. quercifolia*, *H. anomala* et *H. scandens*), l'acide 3-caféoylquinique (**2**) est majoritaire et dans le second groupe c'est l'acide 5-caféoylquinique ou acide chlorogénique (**8**) qui est le dérivé principal, avec une exception : *H. integrifolia*. Pour ce groupe, l'acide 1,5-dicaféoylquinique (**48**) est aussi caractéristique des profils, excepté chez *H. arborescens*. Les autres composés tels que **10**, **9** ou **53** par exemple sont minoritaires dans ce groupe.

En ce qui concerne les amines polyacylées, seul le N¹⁰-coumaroyl-N¹, N⁵-dicaféoylspermidine (**59**) est à teneur plus élevée dans les fleurs fertiles d'*H. quercifolia* et *H. paniculata*. Les composés **56** et **57** sont minoritaires.

III. 3. 2. Flavonols

La voie des dérivés du kaempférol est souvent faiblement active (Tableau III-12), excepté chez *H. scandens* qui se distingue par la teneur la plus forte des dérivés mono-, le kaempférol-3-*O*-glucoside (**40**) et diglycosylé, le kaempférol-3-*O*-rutinoside (rhamnose-(1-6)-glucose) (**35**). Les profils d'*H. arborescens* sont aussi simples et ce sont les deux mêmes composés (**40** et **35**) qui sont les seuls dérivés du kaempférol présents mais dans des proportions différentes.

Dans *H. paniculata*, l'accession de type sauvage 495 se distingue très nettement des accessions polyploïdes par l'identification de ces deux mêmes dérivés (**40** et **35**). De plus la présence du kaempférol-3-*O*-galactoside (**37**) et l'absence du kaempférol-3-*O*-hexose-(1-2)-hexose (**23**) complètent l'opposition marquée entre ces profils. La variabilité est faible entre les polyploïdes, seules les accessions 434 et 446 ont deux autres dérivés diglycosylés (**31** et **32**).

Pour les autres espèces : *H. quercifolia*, *anomala*, *heteromalla*, *integrifolia* et *seemannii*, les teneurs sont extrêmement faibles. Cependant dans l'accession 393, les fleurs fertiles ont une teneur un peu plus forte pour les composés kaempférol-3-*O*-glucuronide (**49**) et kaempférol-3-*O*-(rhamnose (1-6) galactose) (**36**).

La voie de biosynthèse des dérivés de la quercétine est au contraire très active comme le montrent les teneurs élevées comprises entre 100 et 400 (µmol/g d'extrait) dans toutes les

espèces à inflorescences blanches (Tableau III-13), excepté chez *H. scandens* comme cela a déjà été souligné.

Pour *H. arborescens* le composé monoglycosylé quercétine-3-O-glucoside (**30**) et son dérivé diglycosylé quercétine-3-O-(rhamnose-(1-6)-glucose (**25**), homologues des dérivés du kaempférol **40** et **35**, déjà présents dans ce profil, sont majoritaires. La présence de ces homologues met en évidence la similitude des réactions enzymatiques, celles de la rhamnose transférase en position 1-6, indépendamment du substrat kaempférol ou quercétine.

Dans *H. quercifolia* les profils sont plus complexes, caractérisés par l'association de quatre dérivés monoglycosylés : la quercétine-3-O-rhamnoside (**41**) majoritaire, la quercétine-3-O-galactoside (**29**), la quercétine-3-O-glucoside (**30**) et la quercétine-3-O-glucuronide (**39**). Le seul dérivé diglycosylé important est la quercétine-3-O- β -(rhamnose-(1-6)-glucose (**25**) déjà mentionné précédemment. La variabilité entre accessions est quantitative : par exemple entre 93 et 206 la teneur totale est trois fois plus forte, cette différence se retrouve au niveau de chaque composé dans des proportions qui varient de 2 à 4.

Les deux sous-espèces d'*H. anomala* ont en commun les dérivés monoglycosylés quercétine-3-O-galactoside (**29**) et quercétine-3-O-glucuronide (**39**) mais se distinguent par la teneur en **29** et surtout par les dérivés diglycosylés. Les composés **20** et **22** sont absents dans la sous-espèce *petiolaris* qui synthétise spécifiquement la quercétine-3-O-(xylose-(1-2)-rhamnose) (**42**). L'accession 347 synthétise les deux dérivés quercétine-3-O-(xylose-(1-2)-rhamnose (**42**) et quercétine-3-O-(pentose- rhamnose) (**38**), à partir du même composé **41**.

L'espèce *H. heteromalla* est l'une des plus riches en dérivés de la quercétine essentiellement monoglycosylés : quercétine-3-O-galactoside (**29**), très majoritaire, et quercétine-3-O-glucoside (**30**). Il existe entre les deux accessions une différence qualitative importante avec le composé **50** qui est un dérivé acétylhexose, dont la nature n'est pas complètement identifiée. L'accession 354 est la seule à synthétiser ce composé (**50**), mais aussi le quercétine acétylhexose (**45**) qui est structuralement très proche du premier. Les dérivés diglycosylés **25**, **20** et **22** sont aussi présents à moindre teneur.

Pour *H. paniculata*, l'accession 495 présente des particularités similaires à celles observées précédemment dans la voie des dérivés du kaempférol (Tableau III-13). Le parallèle entre les deux voies est évident avec la présence de **30** et de son dérivé diglycosylé **25**, comme des homologues **40** et **35**, mais aussi la plus forte teneur en composé **29**, couplée à l'absence du composé diglycosylé **15**, comme c'est le cas pour les dérivés homologues du kaempférol **37** et **23**. Il en est de même dans les profils des accessions polyploïdes, qui

Tableau III-13 : Teneurs en dérivés de la quercétine dans les espèces à inflorescences blanches (µmol/g d'extrait) fs : Fleurs stériles, ff : Fleurs fertiles

Section	Sous-section	Espèce	Sous-espèce	Numéro accession	fs ff	Dérivés de la quercétine															
						Monoglycosylés						Diglycosylés						Tri			
						29	30	41	39	45	50	15	20+22	25	42	38	4	6	12	14	
Hydrangea	Americanae	arborescens		345	fs	-	2.0	-	-	-	-	-	2.1	208.7	-	-	-	3.8	-	-	
				370	fs	-	27.2	-	-	-	-	-	1.3	88.3	-	-	1.3	-	-	-	
				166	fs	-	5.8	-	-	-	-	-	1.6	276.0	-	-	-	2.8	-	-	
		quercifolia		93	fs	32.3	8.2	71.1	12.4	-	-	-	-	20.3	-	-	-	-	-	-	
				94	fs	65.9	40.9	146.7	11.7	-	-	-	-	1.6	76.5	-	-	-	-	-	
				205	fs	34.7	23.9	70.9	8.7	-	-	-	-	1.0	35.2	-	-	-	-	-	
				206	fs	127.4	32.1	145.3	33.1	-	-	-	-	2.8	73.7	-	-	-	-	-	
				393	ff	4.4	26.7	51.2	2.6	-	-	-	-	10.2	42.6	-	-	-	-	-	
				393	fs	51.8	62.5	58.1	39.7	-	-	-	-	3.3	117.0	-	-	-	-	-	
	Calyptranthe	anomala		344	fs	166.9	-	3.6	17.9	-	-	-	48.9	-	-	-	-	-	-		
			petiolaris		347	fs	33.8	3.6	-	19.3	-	-	-	-	-	73.9	15.1	-	-	-	
			140	fs	15.5	16.3	-	41.2	-	-	-	-	-	5.2	62.4	-	-	-	-		
	Petalanthe	scandens		145	ff	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
				145	fs	-	-	5.0	-	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-		
	Heteromallae	heteromalla		537	fs	244.2	33.5	2.7	5.9	-	-	-	6.0	33.2	-	-	-	-	-	-	
				354	fs	123.5	25.9	-	6.7	27.7	115.2	-	4.6	3.2	-	-	-	-	-	-	
		paniculata		151	ff	6.3	7.2	1.9	-	7.1	-	-	63.9	21.1	-	-	-	3.5	-	-	-
				424	fs	9.0	5.5	-	-	-	-	-	113.6	56.7	-	-	-	1.3	4.3	4.6	4.4
				425	fs	8.8	5.3	-	-	-	-	-	145.9	8.4	2.1	-	-	-	1.9	12.7	5.3
				426	fs	2.8	3.2	-	-	-	-	-	120.1	100.1	-	-	-	-	2.0	3.8	2.0
				434	fs	15.2	11.2	-	-	-	-	-	101.7	65.2	1.9	-	-	-	-	5.2	3.6
				445	ff	2.0	1.6	-	-	-	-	-	15.2	11.1	3.4	-	-	-	1.7	4.8	1.0
				445	fs	2.6	-	-	-	-	-	-	68.6	21.3	2.0	-	-	-	3.3	11.4	2.7
				446	fs	5.2	9.4	-	-	-	-	-	51.1	70.8	-	-	-	-	-	2.7	1.8
				450	fs	2.9	3.8	-	-	-	-	-	109.7	1.4	-	-	-	-	1.9	-	-
				495	fs	29.3	179.7	-	-	-	-	-	-	-	81.2	-	-	-	-	-	-
Cornidia	integrifolia		143	fs	33.6	34.3	-	38.5	-	-	-	70.3	-	-	-	-	-	-	-		
	seemannii		155	fs	34.5	48.4	-	20.1	-	-	-	-	2.9	7.6	-	-	-	-	-		

accumulent les dérivés diglycosylés **15**, **20** et **22** eux-mêmes issus des monoglycosylés **29** et **30**. Cependant si la situation est équivalente pour le dérivé **15** et son homologue **23**, il n'en est pas tout à fait de même pour **20** et **22**, leurs homologues **31** et **32** ne se retrouvant que dans les deux profils 434 et 446.

Ce qui différencie les polyplœides du 495 sont respectivement les activités (1,-)-galactose ou glucose transférase [(1-2galT) ou (1-2glulT)] et (1,6)-rhamnose transférase (1-6RT). Les composés triglycosylés **12** et **14** formés *via* cette dernière activité sont présent uniquement chez les polyplœides.

Dans la section *Cornidia*, les deux espèces *H. integrifolia* et *H. seemannii* contiennent les mêmes dérivés monoglycosylés **29**, **30** et la quercétine-3-O-glucuronide (**39**) et ne se différencient vraiment que par la teneur en dérivés diglycosylés **20**, **22** et **25**. En comparaison avec la voie kaempférol, l'activité de la (1,2)-pentose transférase (1-2PT) est plus importante chez *H. integrifolia* dans les deux cas.

Il ressort de cette analyse que la biosynthèse du kaempférol est très réduite chez *H. quercifolia* et *H. heteromalla* comparée celle de la quercétine 30 fois supérieure. Cette répression peut être due à une régulation de l'activité de F3'H ou à une différence d'affinité de la FLS vis-à-vis des deux substrats dihydrokaempférol et dihydroquercétine. La voie de biosynthèse des dérivés de la quercétine est extrêmement diversifiée avec de nombreux dérivés mono et diglycosylés. Le même schéma est valable dans le groupe des espèces à port grimpant soit caduc (*H. anomala*) soit persistant (*H. integrifolia* et *seemannii*).

Dans l'espèce *H. paniculata* les deux voies de biosynthèse s'expriment, celle des dérivés du kaempférol et celle des dérivés de la quercétine. La comparaison entre une accession sauvage et les 9 variétés améliorées polyplœides montre une différence marquante. La réaction liée à la (1-6)-rhamnose transférase, entre les dérivés du kaempférol **40** et **35** comme entre les dérivés de la quercétine **30** et **25**, caractérise l'accession 495. Les polyplœides sont eux caractérisés par les activités galactose ou glucose transférase et pentose transférase en position 1-2 qui les séparent nettement du sauvage. L'échantillonnage sauvage est trop restreint pour en tirer des conclusions définitives et l'hypothèse d'un effet de la polyplœidie sur l'expression des gènes correspondants reste à vérifier.

Tableau III-14 : Spécificité de chaque espèce, sous-espèces ou groupe

Groupe 1 quantité acide phénol>100 et A/F*> 0.5						Groupe 2 quantité acide phénol>100 et A/F*> 0.5					
	Acides cinnamiques	Kaempférol	Quercétine	Autres	K/Q**		Acides cinnamiques	Kaempférol	Quercétine	Autres	K/Q**
<i>H. macrophylla</i> <i>ssp. macrophylla</i>	8 ++ 48 ; 9 ; 7	31+32 ++		43	>1	<i>H. aspera</i> <i>ssp. aspera</i> <i>groupe villosa</i>		52 ++ (fs) ; 40 ++ 18 ; 47	15	26	>1
<i>H. macrophylla</i> <i>ssp. serrata</i>	8 ++ ; 48 ; 53 ; 9 ; 7 ;	35 ++	12 ; 14 ; 15	24	>1	<i>H. aspera</i> <i>ssp. aspera</i> <i>groupe kawakami</i>	48	52 ++ ; 40 +	41 ++ 15 ;	26	?
<i>H. arborescens</i>	9	52	25 ++ ; 4 et 6 ; 41		<1	<i>H. aspera</i> <i>ssp. strigosa</i>	9	52 ++ ; 40 + 54 ; 13 (413) 18 ; 47 ;	41 ++ 14 ; 42 ;	26 ; 19	<1
<i>H. heteromalla</i>	48 ++ ; 53 ; 9 ; 2	52	29 ++ ; 45 50 (354)		<1	<i>H. aspera</i> <i>ssp. sargentiana</i>	7	18 ++ (154) ; 40 + ; 55 ; 47 ; 52	12 ; 14 ; 15 41	26 ; 19	>1
<i>H. paniculata</i>	48 ++ ; 53 ; 9	21 ; 47 31+32 ; 55 ;	15 ++ 4 et 6 ; 12 ; 14 ; 45(151)	33 ; 44 27	<1	<i>H. aspera</i> <i>ssp. robusta</i>	53 ; 2	55 52	25 +	26	?
<i>H. integrifolia</i>	2>8 ; 48 ++ ; 9 ; 7	31+32 ; 18 ; 40 ; 52	20 et 22 ++ 41		<1	<i>H. involucrata</i>	7	52 ++ 31+32 ; 47 ;	34		>1
<i>H. seemannii</i>	48 ++ ; 2	40 ; 52	41 ; 30 ++	26 ; 19 ; 27 ; 43	<1	<i>H. quercifolia</i>	2>8 ; 9 ; 7	40	25 ++ ; 29 ++ ; 41 ++		<1
légende	en rouge	composés totalement absents				<i>H. petiolaris</i>	2>8	51 ; 18	42 ++ ; 38 20 et 22 41		<1
	en vert	composés spécifiques				<i>H. anomala</i>	2>8 ; 8	18 ; 52	29 ++		<1
	++	composé est majoritaire				<i>H. scandens</i>	2>8	40 ++	20 et 22		>1

* A/F : Rapport des teneurs en dérivés d'acide cinnamique et de flavonoïdes ** K/Q Rapport des teneurs en dérivés du kaempférol et de la quercétine dans les fleurs stériles

III. 4. Détermination de l'espèce et de la sous-espèce d'une accession à partir de la composition chimique de ses inflorescences

Le Tableau III-14 résume les analyses précédentes. Grâce à cette analyse de la diversité, il serait possible d'identifier une accession à partir de son profil polyphénolique. Les critères sont choisis en considérant les particularités de chaque espèce ou groupe d'espèces décrites tout au long de ce chapitre. D'abord, les critères globaux comme les rapports A/F et K/Q permettent de scinder le genre en 4 groupes d'espèces comme nous l'avons vu en première partie de ce chapitre. Ensuite, l'absence, la présence spécifique ou la présence majoritaire de certains composés sont utilisées comme critères pour aboutir à la détermination de l'espèce ou de la sous-espèce. Les critères d'identification et la classification en résultant sont présentés Figure III-16.

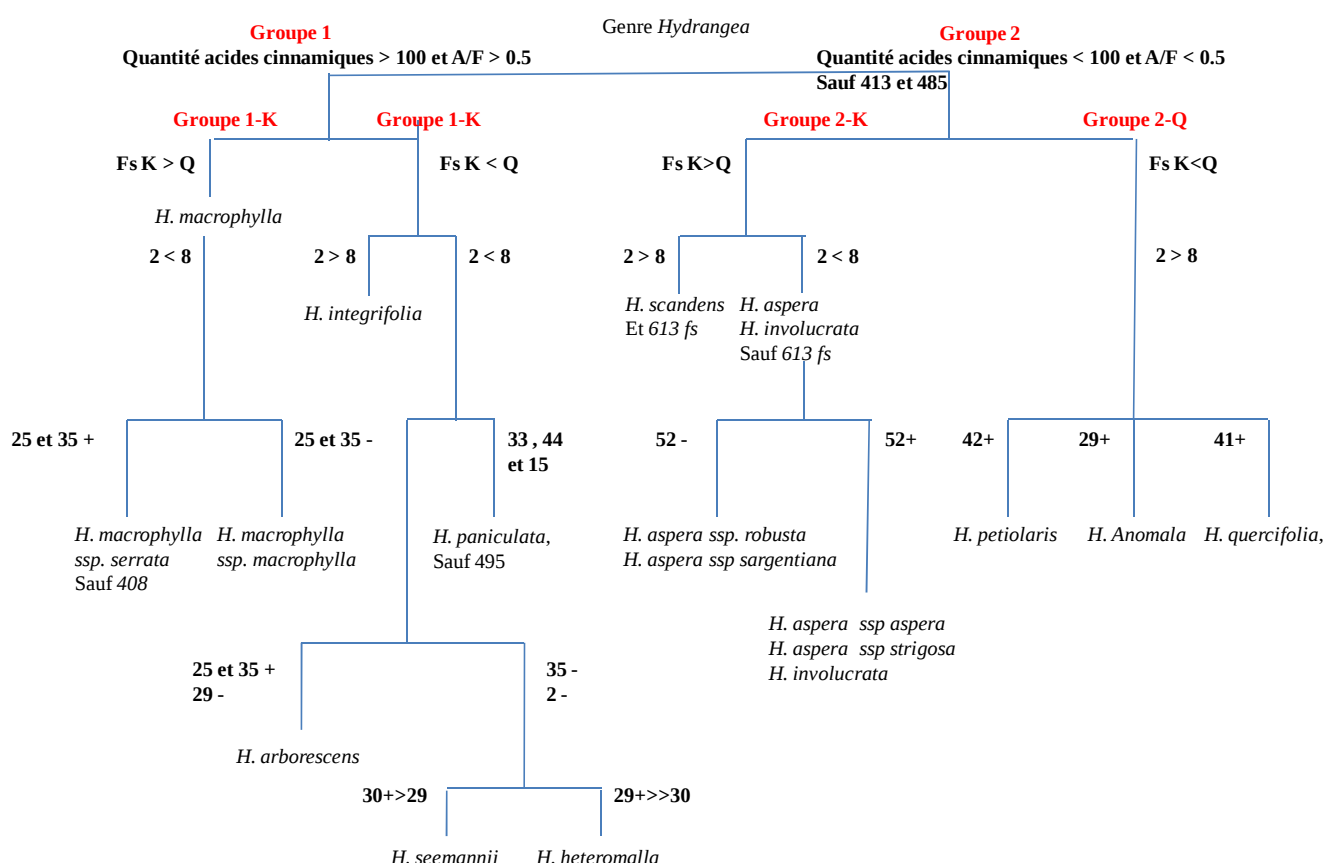


Figure III-16 : Classification des critères pour l'indentification des espèces d'*Hydrangea*.
A : Dérivés d'acides cinnamiques ; **F** : Flavonoïde ; **K** : Dérivés du kaempférol ; **Q** : Dérivés de la quercétine ;
Fs : Fleurs stériles ; **+** : Présent à des teneurs importante ; **-** : Absent.

IV. Discussion

Cette analyse de la diversité des composés phénoliques dans le genre *Hydrangea* est la première à être réalisée de façon aussi approfondie. Seulement une référence bibliographique datant de 1985, s'intéressant à quelques espèces de la famille des Hydrangeaceae, a été trouvée (Bohm *et al.* 1985). Il s'agit d'une étude peu détaillée des composés phénoliques, insistant surtout sur les différences entre 9 genres. Notre travail apporte donc des connaissances nouvelles pour ce genre, sur les voies de biosynthèse et les composés phénoliques présents dans les fleurs des 11 espèces étudiées. Il permet aussi d'évaluer le niveau de différenciation qui existe entre espèces et sous-espèces par la présence de composés spécifiques et de profils originaux. Il complète les données botaniques et génétiques acquises et permet des comparaisons sur la structuration de la diversité à ces différents niveaux. Ces connaissances participent à une meilleure gestion des ressources génétiques mais aussi à développer des stratégies raisonnées de valorisation.

IV. 1. Diversité phytochimique au sein du genre *Hydrangea*

La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est très étudiée et largement répandue chez les végétaux. Les composés qui ont été caractérisés dans le genre *Hydrangea* sont connus et se retrouvent dans un grand nombre d'autres familles d'Angiospermes (Harborne and Mabry 1982; Harborne 1988; Harborne and Williams 1994; Williams 2007; Bruneton 2010).

La caractérisation phytochimique des fleurs stériles des 11 espèces et 8 sous-espèces étudiées montre une forte diversité qualitative et quantitative dans les deux familles de dérivés, acides cinnamiques et flavonoïdes. Cette caractérisation conduit à faire l'analyse de la diversité dans ces voies métaboliques et d'établir les niveaux de différenciation entre espèces et sous-espèces. Les composés d'une troisième famille, des amines polyacylées, sont liés à la fertilité des fleurs, les fleurs stériles n'en synthétisant pas ou très peu. La comparaison entre espèces sur l'éventuelle spécificité de ces composés ne peut être faite étant donné que l'étude a porté sur les fleurs stériles chez la plupart d'entre elles, hormis *H. aspera*.

La différenciation entre espèces se traduit qualitativement par la présence ou l'absence de composés détectés au stade de début de floraison. Au niveau quantitatif, seules les différences très importantes sont considérées être liées aux caractéristiques génétiques, puisque une part de la variation est due à l'environnement, ces conditions n'étant que partiellement contrôlées en situation de culture extérieure comme c'est le cas à l'Arboretum.

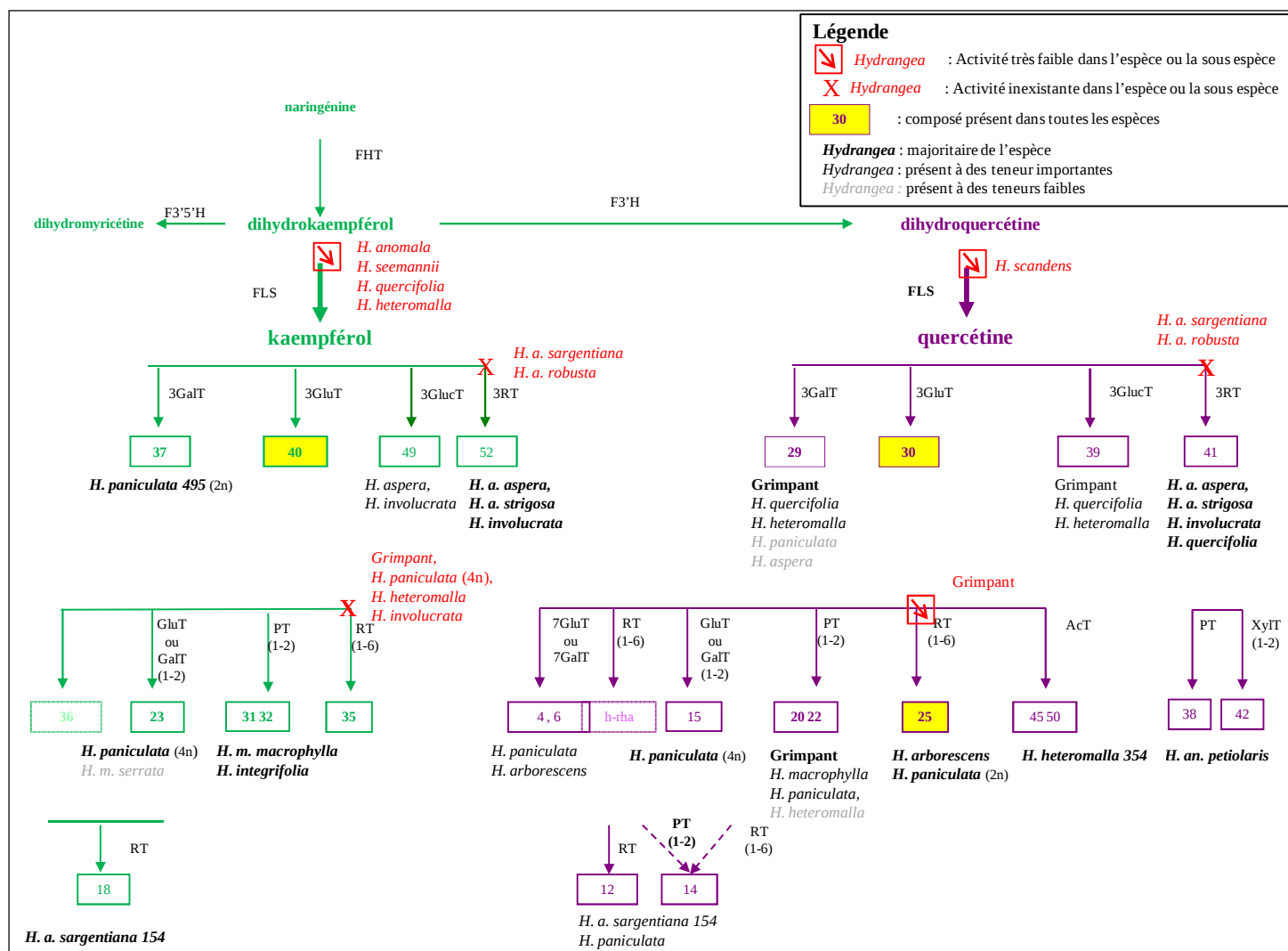


Figure III-17 : Schéma récapitulatif de l'expression de la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans le genre *Hydrangea*. FHT, flavanone-3-hydroxylase; F3'H, flavonoïde 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavonoïde 3',5'-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; GluT, glucose transférase; GalT, galactose transférase; PT, pentose transférase; RT, rhamnose transférase; AcT, acétyl transférase; GlucT, glucuronide transférase; (2n), diploïde; (4n), tétraploïdes.

Selon les études de Zidorn *et al.* (2001 et 2002), les variations saisonnières sont moins prononcées dans les inflorescences qui sont retenus pour les études de chimiotaxonomie chez Lactuceae

Dans la voie des acides cinnamiques, sur le plan qualitatif, deux des trois principaux composés sont discriminants. L'acide 3-caféoylquinique (**2**) est absent dans quatre espèces *H. heteromalla*, *H. paniculata*, *H. seemannii* et les deux sous-espèces *sargentiana* et *robusta* d'*H. aspera*. L'acide 1,5-dicaféoylquinique (**48**), caractérise les trois espèces déjà citées *H. heteromalla*, *H. paniculata*, *H. seemannii* ainsi que l'espèce *H. integrifolia*. Les enzymes responsables de la synthèse de ces composés sont mal connues. L'acide 3-caféoylquinique (**2**) semble être formé par *trans*-estérification de l'acide 5-caféoylquinique (**8**), mais les enzymes et les gènes impliqués dans cette réaction sont encore méconnus (Joët *et al.* 2010).

En ce qui concerne les flavonoïdes, la voie de biosynthèse des flavonols est largement majoritaire, et la flavanone-3-hydroxylase (FHT) est de ce fait la principale enzyme, transformant la naringénine en dihydrokaempférol. Seule *H. paniculata* synthétise des flavones via l'activité d'un cytochrome P450, la flavone synthase II (FNSII), qui est la plus répandue dans le règne végétal (Martens and Mithofer 2005).

Les deux flavonols majoritaires (kaempférol et quercétine) ont comme précurseur commun le dihydrokaempférol (Figure III-17). Il peut y avoir compétition entre ces deux voies via les deux enzymes clés, la flavonoïde 3'-hydroxylase (F3'H) et la flavonol synthase (FLS). L'importance relative des deux voies de biosynthèse et la prédominance possible de l'une sur l'autre pourrait être aussi due à la régulation de l'activité de la F3'H et/ou à une différence d'affinité de la FLS vis-à-vis du substrat (Davies and Schwinn 2007; Stracke *et al.* 2010).

En ce qui concerne les glycosylations des flavonols, ce sont les mêmes fonctions enzymatiques qui conduisent à la formation des dérivés monoglycosylés, que le substrat soit le kaempférol ou la quercétine (Figure III-17). Les deux voies de biosynthèse sont tout à fait parallèles, avec la formation, pour chacune, de quatre groupes de dérivés homologues, qui sont respectivement : **40** et **30**, **37** et **29**, **52** et **41**, **49** et **39**. Les glycosyltransférases spécifiques ajoutent en position 3 de la génine soit un glucose (3GluT), soit un galactose (3GalT), soit un rhamnose (3RT), soit un acide glucuronique (3GlucT) (Vogt and Jones 2000; Bowles *et al.* 2005).

Pour les dérivés diglycosylés, de la même façon, les deux voies de biosynthèse sont parallèles, avec pour chacune, trois groupes de dérivés homologues principaux : **35** et **25**, **31**-

32 et **20-22** qui dépendent bien sûr de la synthèse des précurseurs mais aussi de l'activité et de la régulation des transférases. Il s'agit de la (1-6)-rhamnose transférase (1-6RT) et de la (1-2)-pentose transférase (1-2PT).

Partant de ce schéma général, la structuration de la diversité génétique peut être présentée comme des variantes entre ces différentes composantes, qualitatives avec la présence ou l'absence d'activités enzymatiques et quantitatives avec la prédominance ou non de la voie de biosynthèse du kaempférol sur celle de la quercétine (Figure III-17).

La biosynthèse dans la voie du kaempférol est très faible pour les espèces grimpantes (*H. anomala*, *H. seemannii*, *H. integrifolia*) ainsi qu'*H. quercifolia* et *H. heteromalla*. Au contraire chez *H. scandens*, c'est la voie de biosynthèse de la quercétine qui est quasi-inexistante, laissant supposer un déficit au niveau des activités F3'H ou FLS. Dans les autres espèces l'une des voies est plus active quantitativement : celle du kaempférol chez *H. aspera*, *H. involucrata* et *H. macrophylla*, celle de la quercétine chez *H. paniculata* et *H. arborescens*.

Parmi les quatre enzymes qui catalysent la formation des composés monoglycosylés, seule la 3GluT est présente dans toutes les espèces. *H. scandens* et *H. arborescens*, qui ont le profil le plus simple, ne présentent que cette activité. Les deux autres sont discriminantes :

- l'activité 3RT est très peu fréquente dans le genre et très discriminante au niveau spécifique mais aussi intraspécifique. Elle ne concerne que trois espèces : *H. aspera*, *H. involucrata* et *H. quercifolia*. Elle sépare nettement les deux sous-espèces *aspera* et *strigosa* des deux autres *sargentiana* et *robusta* qui en sont dépourvues. Chez le premier groupe, l'activité de cette enzyme conduit aux composés **41** et **52**.
- l'activité 3-GluT est caractéristique des espèces grimpantes, caduques (*H. anomala*) ou persistantes (*H. seemannii*, *H. integrifolia*), d'*H. quercifolia* et *H. heteromalla*. Dans les autres espèces, des traces des composés **49** et **39** laissent penser qu'elle peut être très faiblement active.

Pour les diglycosylations, l'activité 1-6RT n'est absente que dans le groupe des espèces grimpantes. L'activité 1-2PT est aussi une caractéristique de ce même groupe. Ces deux catalyses enzymatiques sont présentes chez *H. macrophylla*, mais la première prédomine nettement dans la sous-espèce *serrata* et la seconde dans *macrophylla*.

Ces six activités sont les plus importantes pour comprendre la diversité qualitative de la voie des flavonols au niveau spécifique.

Les deux autres voies des flavonols minoritaires dans le genre sont très spécifiques. La voie dérivée de l'isorhamnétine est spécifique d'*H. seemannii* avec l'activité de la O-méthyltransférase (OMT) et les deux activités des glycosyltransférases : 3 GluT ou GalT suivie de 1-2PT pour aboutir au dérivé diglycosylé **26**. L'absence d'autres dérivés de l'isorhamnétine pourrait impliquer une spécificité de certaines glycosyltransférases vis-à-vis du substrat. La voie de biosynthèse des dérivés de la myricétine avec l'activité F3'5'H, 3GluT ou GalT donne le dérivé monoglycosylé **17** dans l'accèsion 444 (*H. macrophylla*).

L'activité 7GluT est commune aux trois voies dérivées de la naringénine : celle des flavonols, en particulier pour les dérivés de la quercétine, avec les composés **4** et **6** qui sont spécifiques d'*H. paniculata* et d'*H. arborescens*, celle des flavones, avec les composés **33** et **44**, est spécifique d'*H. paniculata*, et celle des flavanones, avec **43**, est spécifique d'*H. macrophylla* et d'*H. heteromalla* (537). Le composé **19**, non identifié, n'est présent que dans trois accèsions 155 (*H. seemannii*) et 418, 419 (*H. involucrata*).

La différenciation phytochimique entre ces onze espèces est importante. Cependant les espèces et sous-espèces appartenant aux mêmes sous-sections sont souvent proches. C'est le cas d'*H. heteromalla* et *H. paniculata*, des espèces grimpantes caducues et persistantes. Au contraire dans la sous-section *Americanae* les deux espèces *H. arborescens* et *H. quercifolia* sont très différentes par leurs profils. Les deux sont riches en quercétine mais celui de la première est extrêmement simple tandis que celui de la seconde est au contraire très complexe. Ces deux espèces ont été classées par rapport à leur origine géographique qui est l'Amérique du Nord (McClintock 1957). De récentes études de phylogénie, basées sur cinq séquences chloroplastiques, montre que ces deux espèces sont séparées dans deux groupes bien distincts (Samain *et al.* 2010). Les auteurs proposent alors de modifier la classification de McClintock et de créer une sous-section pour l'espèce *H. arborescens* selon le code de nomenclature. Les données phytochimiques obtenues sont ainsi en accord avec cette analyse phylogénétique.

Dans la sous-section *Asperae*, *H. involucrata* et les deux sous-espèces d'*H. aspera*, *strigosa* et *aspera* ont des profils très proches, mais les deux sous-espèces *sargentiana* et *robusta* se distinguent nettement de cet ensemble. La diversité phytochimique au sein de l'espèce *H. aspera* est à rapprocher des résultats obtenus par l'analyse cytogénétique qui montrent des différences importantes en nombre de chromosomes et formule caryotypiques entre ces sous-espèces (Mortreau *et al.* 2010). L'analyse de la diversité par les marqueurs

moléculaires ISSR montre aussi la présence de deux sous-groupes, avec *sargentiana* et *robusta* d'une part et *strigosa aspera* d'autre part. L'analyse phytochimique confirme cette subdivision en deux groupes au sein de cette espèce. Mais dans la sous-espèce *aspera*, Kawakami (352) ne se distingue pas des autres d'un point de vue phytochimique alors qu'il se différencie nettement par les analyses cytogénétiques (la quantité d'ADN, le nombre chromosomique bien supérieurs mais aussi le caryotype).

IV. 2. Variation intraspécifique dans l'espèce *H. macrophylla*

Dans l'espèce *H. macrophylla*, l'effet de la sélection dans la sous-espèce *macrophylla* se traduit par un coloris plus intense qui n'est lié qu'à l'accumulation de delphinidine-3-O-glucoside (68) et non à la diversité des anthocyanes. Les profils en dérivés d'acides cinnamiques ou en kaempférol présentent essentiellement des différences quantitatives. Le cas du mutant 'Merveille Sanguinea' 60 comparé à 'Merveille' 59 montre une augmentation de 2 à 4 fois des teneurs des dérivés analysés hormis ceux de la quercétine. Le feuillage est aussi plus foncé avec des tons pourpres. Il s'agit probablement d'une mutation au niveau de la régulation en amont des voies des acides cinnamiques et flavonols non spécifique des tissus floraux. Il peut s'agir de l'activation de la phénylalanine ammonia-lyase, PAL, enzyme clé qui catalyse la première étape de la voie des phenylpropanoïdes et qui contrôlerait le flux de l'ensemble des voies (Howles *et al.* 1996). Les facteurs R2R3-MYB contrôlent la transcription des gènes de la voie de biosynthèse des flavonols chez *Arabidopsis thaliana* (Mehrtens *et al.* 2005; Stracke *et al.* 2010). Cette fonction a été confirmée par des expériences de transgénèse montrant que l'expression constitutive de AtMYB12 chez le tabac augmente les teneurs en dérivés glycosylés de quercétine et kaempférol mais aussi l'activation de la voie des acides cinnamiques dans les feuilles et dans les fleurs (Luo *et al.* 2008). Par contre dans ce cas le niveau des anthocyanes est plus faible que chez le témoin, montrant la compétition entre les deux voies, flavonols et anthocyanes.

Seuls quelques hybrides entre les deux sous-espèces ont des profils en flavonols plus complexes alliant les caractéristiques des deux origines. La voie des dérivés de quercétine est extrêmement pauvre et faible dans la sous-espèce *macrophylla*. Par contre chez *serrata* elle est plus diversifiée et est une source de variabilité importante à exploiter pour la création variétale comme en témoignent les quelques hybrides analysés. Les anthocyanes dérivés de la cyanidine ne sont synthétisées qu'après la floraison dans les sépales pétaloïdes de plusieurs cultivars et leur confèrent un avantage ornemental intéressant (Yoshida *et al.* 2008). Il est certainement possible de diversifier la gamme des couleurs en introduisant par hybridation

dirigée le- ou les- gènes de la voie de biosynthèse des dérivés de cyanidine qui s'exprimeraient au moment de la floraison. C'est une des voies de valorisation des ressources génétiques pour l'espèce *H. macrophylla*. Les autres passent par l'hybridation interspécifique ou la transgénèse.

IV. 3. Amines polyacylées, marqueurs de la fertilité

En ce qui concerne les amines polyacylées, leur présence ou absence est en lien avec le type des fleurs, fertiles ou stériles. Les fleurs dites stériles ne se distinguent que par les sépales pétaloïdes très développés et l'ovaire supère. Au centre tous les organes reproducteurs sont présents, le pollen est fertile mais malgré la présence d'ovules, il n'y a pas formation de graines. L'analyse phytochimique étant globale, il est difficile de savoir si l'absence d'amines polyacylées est liée à cette différence de fertilité femelle ou à des différences au niveau des sépales pétaloïdes ou encore à des différences quantitatives entre organes. En effet, dans certains cas ces molécules ont été détectées mais à des teneurs très faibles dans les fleurs stériles de plusieurs accessions, comme c'est le cas par exemple pour 481 et 371 (*H. aspera* Tableau III-6) ou 424, 425, et 450 (*H. paniculata*, Tableau III-10).

La présence d'amines polyacylées est souvent associée à la croissance des plantes, en particulier le développement de la fleur. Leur accumulation est clairement corrélée avec l'initiation et le développement floral (Martin-Tanguy 1985; Kakkar and Rai 1993; Bassard *et al.* 2010). Il existe des types de dérivés associés aux organes floraux et considérés être des marqueurs de fertilité. Par exemple chez le tabac, les caféoylputrécine et caféoylspermidine s'accumulent dans les organes femelles alors que les di-*p*-coumaroylputrécine, di-*p*-coumaroylspermidine et *p*-coumaroyltyramine apparaissent en abondance dans les anthères (Cabanne *et al.* 1981).

La stérilité mâle a été beaucoup plus étudiée et de nombreux exemples montrent qu'elle est le plus souvent associée à une réduction de la quantité des polyamines et de leur conjugués (Martin-Tanguy *et al.* 1982; Aribaud and Martin-Tanguy 1994; Aribaud and Martin-Tanguy 1994) mais des contre-exemples existent aussi (Rastogi and Davies 1990). Des dérivés conjugués de spermidine et de putrécine ont été trouvés dans les anthères ou le pollen chez une grande partie des Angiospermes, mais avec une grande diversité dans les degrés de substitution. Les amines polyacylées semblent être essentielles pour la formation du pollen, sa viabilité ou sa germination (Bassard *et al.* 2010). Dans le cas de l'accession 433 (*H. macrophylla*), l'absence de dérivés dans les fleurs fertiles est justifiée par le fait qu'elle ne forme pas d'anthères, ni de pollen par conséquent.

Bibliographie

- Aribaud M. and Martin-Tanguy J. (1994). "Polyamine Metabolism in Normal and Sterile *Chrysanthemum-Morifolium*." Phytochemistry **37**(4): 927-932.
- Aribaud M. and Martin-Tanguy J. (1994). "Polyamine Metabolism, Floral Initiation and Floral Development in Chrysanthemum (*Chrysanthemum-Morifolium* Ramat)." Plant Growth Regulation **15**(1): 23-31.
- Bassard J.-E., Ullmann P., Bernier F. and Werck-Reichhart D. (2010). "Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism." Phytochemistry **71**(16): 1808-1824.
- Bohm B. A., Nicholls K. W. and Bhat U. G. (1985). "Flavonoids of the *Hydrangeaceae* *Dumortier*." Biochemical Systematics and Ecology **13**(4): 441-445.
- Bowles D., Isayenkova J., Lim E.-K. and Poppenberger B. (2005). "Glycosyltransferases: managers of small molecules." Current Opinion in Plant Biology **8**(3): 254-263.
- Bruneton J. (2010). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Paris, DOC et TEC.
- Cabanne F., Dalebroux M. A., Martin-Tanguy J. and Martin C. (1981). "Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* var. xanthi n.c." Physiologia Plantarum **53**(4): 399-404.
- Davies K. M. and Schwinn K. E. (2007). Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications. O.M. Andersen, Markham, K.R. (Eds.), Taylor and Francis Group, Boca Raton 143-218.
- Harborne J. B. (1988). The Flavonoids, Advances in Research since 1986. London, Chapman and Hall.
- Harborne J. B. and Mabry T. J. (1982). The Flavonoids, Advances in Research. London, Chapman and Hall.
- Harborne J. B. and Williams C. A. (1994). "Recent Advances in the Chemosystematics of the Monocotyledons." Phytochemistry **37**(1): 3-18.
- Howles P. A., Sewalt V. J. H., Paiva N. L., Elkind Y., Bate N. J., Lamb C. and Dixon R. A. (1996). "Overexpression of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase in Transgenic Tobacco Plants Reveals Control Points for Flux into Phenylpropanoid Biosynthesis." Plant Physiology **112**(4): 1617-1624.
- Joët T., Salmona J., Laffargue A., Descroix F. and Dussert S. (2010). "Use of the growing environment as a source of variation to identify the quantitative trait transcripts and

- modules of co-expressed genes that determine chlorogenic acid accumulation." Plant, Cell & Environment **33**(7): 1220-1233.
- Kakkar R. K. and Rai V. K. (1993). "Plant Polyamines in Flowering and Fruit Ripening." Phytochemistry **33**(6): 1281-1288.
- Kondo T., Toyama-Kato Y. and Yoshida K. (2005). "Essential structure of co-pigment for blue sepal-color development of *Hydrangea*." Tetrahedron Letters **46**(39): 6645-6649.
- Luo J., Butelli E., Hill L., Parr A., Niggeweg R., Bailey P., Weisshaar B. and Martin C. (2008). "AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol." Plant Journal **56**(2): 316-326.
- Martens S. and Mithofer A. (2005). "Flavones and flavone synthases." Phytochemistry **66**(20): 2399-2407.
- Martin-Tanguy J. (1985). "The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants." Plant Growth Regulation **3**(3): 381-399.
- Martin-Tanguy J., Perdrizet E., Prevost J. and Martin C. (1982). "Hydroxycinnamic acid amides in fertile and cytoplasmic male sterile lines of maize." Phytochemistry **21**(8): 1939-1945.
- McClintock E. (1957). "A monograph of the genus *Hydrangea*." Proceedings of the California Academy of Science **29**: 147-255.
- Mehrtens F., Kranz H., Bednarek P. and Weisshaar B. (2005). "The Arabidopsis Transcription Factor MYB12 Is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis." Plant Physiology **138**(2): 1083-1096.
- Mortreau E., Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., Brown S. C., Bertrand H. and Lambert C. (2010). "Cytogenetic characterization of *Hydrangea involucrata* Sieb. and *H. aspera* D. Don complex (Hydrangeaceae): genetic, evolutionary, and taxonomic implications." Tree Genetics & Genomes **6**(1): 137-148.
- Rastogi R. and Davies P. J. (1990). "Polyamine Metabolism in Ripening Tomato Fruit .1. Identification of Metabolites of Putrescine and Spermidine." Plant Physiology **94**(3): 1449-1455.
- Samain M. S., Wanke S. and Goetghebeur P. (2010). "Unraveling Extensive Paraphyly in the Genus *Hydrangea* s. l. with Implications for the systematics of Tribe Hydrangeae." Systematic Botany **35**: 593-600.

- Stracke R., Jahns O., Keck M., Tohge T., Niehaus K., Fernie A. R. and Weisshaar B. (2010). "Analysis of production of flavonol glycosides-dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation." New Phytologist **188**(4): 985-1000.
- Toyama-Kato Y., Kondo T. and Yoshida K. (2007). "Synthesis of designed acylquinic acid derivatives involved in blue color development of hydrangea and their co-pigmentation effect." Heterocycles **72**: 239-254.
- Vogt T. and Jones P. (2000). "Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family." Trends in Plant Science **5**(9): 380-386.
- Williams C. A. (2007). Flavone and flavonol O-glycosides. Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications. O.M. Andersen, Markham, K.R. (Eds.), Taylor and Francis Group, Boca Raton 749-856.
- Yoshida K., Ito D., Shinkai Y. and Kondo T. (2008). "Change of color and components in sepals of chameleon hydrangea during maturation and senescence." Phytochemistry **69**(18): 3159-3165.
- Zidorn C., Gottschlich G. and Stuppner H. (2002). "Chemosystematic investigations on phenolics from flowerheads of Central European taxa of *Hieracium* sensu lato (Asteraceae)." Plant Systematics and Evolution **231**(1-4): 39-58.
- Zidorn C. and Stuppner H. (2001). "Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae)." Taxon **50**(1): 115-133.

Conclusion et perspectives

Cette étude a permis dans un premier temps la caractérisation structurale et la quantification de 60 composés phénoliques présents dans les inflorescences de 99 génotypes répartis dans 11 espèces du genre *Hydrangea*. La plupart des espèces étudiées le sont pour la première fois d'un point de vue phytochimique. Vingt-cinq composés ont pu être identifiés totalement, grâce à des témoins commerciaux, à l'analyse en ligne (couplage CLHP-UV et CLHP-SM) ou la purification et l'analyse par RMN. Pour les autres, l'identification n'est que partielle, mais elle reste suffisante pour l'analyse de la diversité effectuée lors de ce travail. Certains composés, comme les amines polyacylées, sont des composés originaux puisqu'ils sont identifiés ici pour la première fois dans la famille des Hydrangeaceae voire même dans le règne végétal en ce qui concerne la N¹-p-coumaroyl,N¹,N⁵-dicaféolyspermidine (**59**) et la N¹-férooyl,N¹,N⁵-dicaféolyspermidine (**60**).

En termes de caractérisation de la diversité des ressources génétiques du genre, l'analyse de la diversité phytochimique à partir d'un échantillonnage de 11 espèces, 8 sous-espèces et 99 génotypes apporte des connaissances nouvelles sur le genre *Hydrangea*. Ces connaissances sont extrêmement intéressantes car elles révèlent des différences importantes aussi bien entre les espèces qu'entre les sous-espèces. Ce travail nous amène à l'étude de l'expression de la voie de biosynthèse des composés phénoliques dans les différentes espèces. En effet, l'analyse globale selon le type de composés (acide cinnamique, kaempférol, quercétine...) nous montre une première structuration interspécifique. Cette structuration résulte de régulations et d'expressions différentes en amont de la voie de biosynthèse des composés phénoliques. L'analyse plus fine des teneurs de chaque composé nous amène à une structuration elle aussi plus fine qui nous montre la diversité à un niveau intraspécifique, correspondant à l'expression des gènes responsables de l'activité enzymatique dans la partie terminale de la voie de biosynthèse.

Les différences phytochimiques entre les espèces et sous-espèces et donc la structuration de la diversité inter et intraspécifique est en accord avec les résultats de cytogénétiques précédemment obtenues, notamment en ce qui concerne la sous-section des *Asperae*, où l'on retrouve les deux mêmes groupes bien différents *sargentiana-robusta* et *aspera-strigosa*.

Malgré l'échantillonnage restreint, limitant l'interprétation, ces résultats donnent des informations importantes sur la diversité des composés phénoliques au sein des *Hydrangea* et

sur les potentialités de valorisation de ces ressources, en fonction des possibilités d'hybridations ou du développement de biotechnologies adaptées.

Perspectives

En ce qui concerne la caractérisation structurale des composés phénoliques des inflorescences du genre *Hydrangea*, la mise au point d'une méthode d'analyse des anthocyanes a été débutée au laboratoire. L'optimisation de cette méthode est à envisager afin d'identifier les anthocyanes responsables de la coloration dans les espèces colorées du genre. L'analyse structurale de ces composés ainsi que leur purification est indispensable pour la suite des recherches, notamment en ce qui concerne la compréhension de la couleur des sépales. Des tests *in vitro* sur la coloration des deux espèces colorées *H. aspera* et *involucrata* pourraient être réalisés, comme l'a déjà fait l'équipe de Kondo pour *H. macrophylla* (Kondo *et al.* 2005; Toyama-Kato *et al.* 2007), afin d'identifier la composition des complexes moléculaires responsables de la coloration de ces deux espèces. D'autres paramètres pouvant jouer un rôle dans la coloration, comme le pH vacuolaire et la composition en ions métalliques des cellules, devront également être considérés afin de comprendre les différences de coloration entre la sous-section *Macrophyllae*, largement étudié, et *Asperae*, très peu développé d'un point de vue ornemental et donc très peu étudié.

Ces connaissances fondamentales devraient conduire à une meilleure exploitation des ressources génétiques pour innover dans la création variétale, en dehors des standards des variétés d' *H. macrophylla*.

La valorisation des ressources génétiques passe par des stratégies d'hybridations intra et interspécifique à partir des espèces qui ont des caractères originaux en particulier la couleur et les floraisons estivales. Mais les barrières de reproduction entre espèces sont importantes. L'étude de ces barrières fait actuellement l'objet de travaux au laboratoire GenHort. Des hybrides interspécifiques ont été obtenus qui présentent des caractères très originaux. L'analyse chimique de ces hybrides et la comparaison de leurs profils avec ceux de leurs parents devrait permettre de mieux orienter les stratégies de sélection.

Chapitre IV. Matériels et méthode

CHAPITRE IV. MATERIELS ET METHODE.....	131
I. Matériel végétal	133
II. Extraction du mélange flavonique.....	133
III. Méthodes de séparation analytique et préparative des composés phénoliques.....	134
III. 1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	134
III. 1. 1. Analyse des acides cinnamiques, flavonoïdes et amines polyacylées	134
III. 1. 2. Analyse des anthocyanes.....	135
III. 2. Purification des dérivés phénoliques	136
III. 2. 1. Purification sur gel de Séphadex LH20	136
III. 2. 2. Purification par CLHP préparative.....	137
IV. Méthode d'identification structurale	138
IV. 1. Spectrométrie de masse (SM)	138
IV. 2. Spectrométrie Infrarouge (IR)	139
IV. 3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	139
V. Données spectrales des composés phénoliques identifiés.....	140
VI. Quantification des composés phénoliques du genre Hydrangea	166
VII. Analyses multivariées.....	167
BIBLIOGRAPHIE.....	168



Figure IV-1 : Période de floraison des différentes espèces

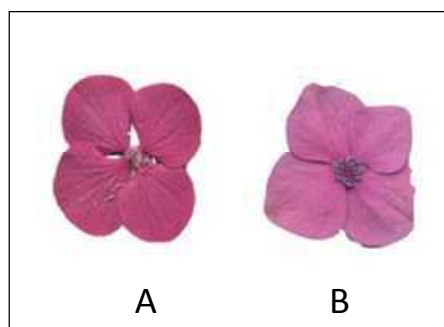


Figure IV-2 : Fleur stérile d'*H. macrophylla* au stade bouton (A) et avancée (B)

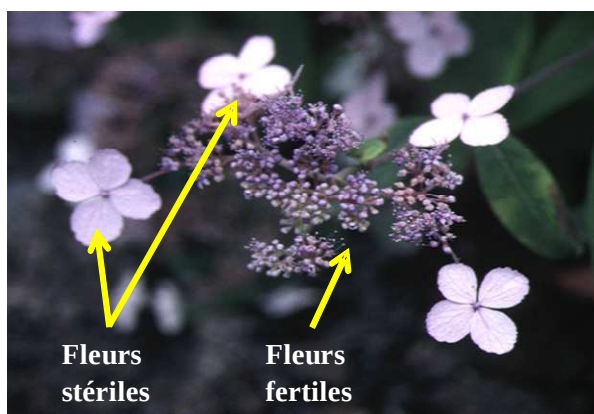


Figure IV-3 : Fleurs stériles et fertiles d'une inflorescence d' *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Villosa

I. *Matériel végétal*

Le matériel végétal est constitué par 99 accessions qui représentent onze espèces et 8 sous-espèces dans la collection implantée à l'arboretum Gaston Allard à Angers. Le matériel végétal a été récolté entre juin et septembre selon la période de floraison de chaque espèce (Figure IV-1). La récolte des inflorescences a été effectuée au stade début de floraison quand les boutons floraux sont colorés ou blancs juste avant ou au moment de leur ouverture, (Figure IV-2). Les fleurs fertiles et les fleurs stériles ont été analysées séparément mais pas sur l'ensemble des échantillons (Figure IV-3).

Certaines accessions avaient déjà été récoltées lors des travaux préliminaires réalisés par Jean-François Gonnet au Laboratoire de Phytochimie et Valorisation Industrielle, Université Claude-Bernard-Lyon 1 (données non publiées). Ces extraits ont servi à la caractérisation des profils de quelques accessions.

Après la récolte, les inflorescences ont été triées en chambre froide pour garantir une meilleure conservation. Les sépales et les boutons floraux ont été séparés des tiges à la main. Le matériel végétal a ensuite été congelé à l'azote liquide puis broyé à l'aide d'un mixeur. La poudre obtenue a ensuite été placée dans des sacs de congélation et stockée à -80°C en attente d'extraction.

II. *Extraction du mélange flavonique*

L'extraction a été effectuée pour la majorité des accessions sur environ 20 g de pétales congelés par 3x150 mL d'un mélange méthanol/éthanol : 1/1. Celle-ci a été réalisée extemporanément pour éviter toute dégradation des pigments. Pour certains échantillons, la matière fraîche congelée n'a pas pu être pesée et le volume de solvant nécessaire à leur extraction a donc été choisi de façon à recouvrir la totalité de la poudre. Pour les très petites quantités, un minimum de 100 mL de solvant a été utilisé afin d'obtenir un volume suffisamment important dans le ballon.

Le mélange a été porté à ébullition (70°C) pendant une vingtaine de minutes. Le matériel végétal a ensuite été filtré et soumis à une seconde extraction identique à la première. L'extraction a été répétée une troisième fois afin de bien extraire tous les pigments et copigments. Les échantillons en grosses quantités ont même été extraits jusqu'à cinq fois, l'extrait étant toujours coloré après 3 extractions. Après filtration du solvant, le matériel végétal a été récupéré et mis à déshydrater à l'étuve à 70°C pendant 24 heures, en vue de déterminer la masse de matière florale sèche extraite. Le filtrat contenant les pigments a été

Tableau IV-1 : Nombres de clones récoltés par espèce sous espèces et groupe.

Section	Sous-sections	Espèces	Sous-espèces	Groupe	Abréviation	nombre de clones récolté	
						fs	ff
Hydrangea	Americanae	<i>H. arborescens</i>			Ar	3	
		<i>H. quercifolia</i>			Q	5	1
		<i>H. involucrata</i>			I	4	4
	Asperae		<i>aspera</i>	Kawakami	AAk		1
				Villosa	AAv	3	4
		<i>H. aspera</i>	<i>strigosa</i>		ASt	3	4
			<i>robusta</i>		AR		2
			<i>sargentiana</i>		ASa	1	2
	Calyptranthe	<i>H. anomala</i>	<i>H. anomala</i>		An	1	
			<i>H. petiolaris</i>		Pe	2	
	Petalanthe	<i>H. scandens</i>			Sc	1	1
	Heteromallae	<i>H. heteromalla</i>			He	2	
		<i>H. paniculata</i>			Pa	8	2
	macrophylla	<i>H. macrophylla</i>	<i>macrophylla</i>		MM	32	2
			<i>serrata</i>		MS	8	4
Cornidia	Monosegia	<i>H. seemannii</i>			Se	1	
		<i>H. integrifolia</i>			In	1	

concentré sous vide à 40°C et son volume a été ajusté en fiole jaugée avec du méthanol puis conservé au congélateur.

Les extraits n'ont jamais été évaporés à sec pour cause de risque de dégradation. Afin de déterminer la masse d'extrait obtenue, nous avons prélevé, évaporé puis pesé 3 fois 1 ml de chaque extrait. En faisant la moyenne de ces 3 masses, la concentration massique de l'extrait en mg/mL a été déterminée. En multipliant cette concentration par le volume total de l'extrait, la masse totale extraite a été calculée.

99 extraits ont été réalisés (Tableau IV-1). Toutes les données concernant ces extractions sont représentés Annexes 7 à 10.

Pour les extraits réalisés à Lyon, nous ne disposons pas de toutes les informations, à savoir le volume de solvant utilisé lors de l'extraction, la masse de matière sèche résiduelle et le volume de l'extrait.

III. Méthodes de séparation analytique et préparative des composés phénoliques

III. 1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est une technique de séparation analytique présentant un haut pouvoir de résolution, permettant une quantification précise des molécules et pouvant être automatisée. Une méthode couplant la CLHP avec un détecteur à barrette de diodes (DAD) ou un spectromètre de masse à ionisation électrospray a été mise au point, afin d'optimiser la séparation, la quantification et l'identification des composés phénoliques contenus dans les extraits d'*Hydrangea*.

III. 1. 1. Analyse des acides cinnamiques, flavonoïdes et amines polyacylées

La phase stationnaire choisie pour la séparation est une phase inverse constituée de silice greffée avec un ligand en C6 et un groupement phényle. Des études réalisées sur la sélectivité de ce type de colonne montrent que les composés aromatiques ont une meilleure rétention sur les colonnes phénylhexyl par rapport aux alcanes. Ce phénomène est dû aux interactions orbitales π - π entre la phase et l'analyte. (Snyder *et al.* 2004; Croes *et al.* 2005; Marchand *et al.* 2005)

Lors de la mise au point des conditions chromatographiques, il a été observé que le pH de la phase mobile avait beaucoup d'influence sur la résolution des composés,

Tableau IV-2 : Gradient d'élution pour le profil flavonique

Temps en min	% de A	% de B	remarque
0	90	10	
18	90	10	
19	82	18	
33	82	18	
34	75	25	
41	75	25	
42	70	30	
50	70	30	
52	10	90	lavage
62	10	90	lavage
64	90	10	rééquilibrage
72	90	10	rééquilibrage

Tableau IV-3 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse CLHP des anthocyanes

Temps en min	% de A	% de B	Remarque
0	80	20	
3	80	20	
23	55	45	
27	55	45	
44	10	90	lavage
46	10	90	lavage
48	80	20	rééquilibrage
58	80	20	rééquilibrage

Tableau IV-4 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse CLHP-SM des anthocyanes

Temps en min	% de A	% de B	Remarque
0	80	20	
26	80	20	
29	40	60	
32	40	60	
33	0	100	lavage
43	0	100	lavage
44	80	20	rééquilibrage
54	80	20	rééquilibrage

particulièrement pour les acides phénoliques. L'acide formique a été choisit pour acidifier la phase mobile car il est volatil et compatible avec les analyses en CLHP couplée à la spectrométrie de masse. Une concentration forte en acide améliore la séparation des composés mais diminue la durée de vie des colonnes et peut affecter l'ionisation en electrospray. Une valeur intermédiaire a donc été choisie afin d'obtenir une séparation optimale dans des conditions convenables pour le matériel.

L'appareil utilisé pour la séparation est un chromatographe Alliance 2695 (waters) comprenant : une pompe quaternaire, un injecteur automatique et un détecteur multi-longueur d'onde à barrette de diodes Waters 996. La séparation a été effectuée sur une colonne Phenomenex gemini C6-Phenyl (diamètre interne : 4,6 mm ; longueur : 100 mm ; taille des particules : 3,5 μ m).

L'extrait a été dilué dans le mélange de solvant eau/acétonitrile (90/10) et a été placé dans un vial de 2 mL. La séparation a été réalisée grâce à un gradient (Tableau IV-2), le solvant A étant de l'eau acidifié avec 0,3 % d'acide formique et B de l'acétonitrile. Le débit utilisé a été de 1 mL/min et le volume d'injection de 10, 20 ou 50 μ L selon la concentration des échantillons.

La détection a été effectuée entre 195 et 900 nm et pour ce type de composé les chromatogrammes à 350 nm ont été interprétés.

Sur la totalité des 99 échantillons étudiés, 60 composés ont été détectés à 350 nm. Les composés ont été numérotés selon leur ordre d'élution de **1** à **60** pour les acides phénoliques et flavonoïdes.

Les Annexes 3 à 5 donnent un exemple de profil flavonique par espèce, sous espèce ou groupe.

III. 1. 2. Analyse des anthocyanes

La séparation des composés a été effectuée sur un appareil Alliance 2695 (Waters) sur colonne Waters X-Terra MS C18 de longueur 150 mm, diamètre 2,1 mm et taille de particule 3,5 μ m. La séparation a été réalisée grâce à un gradient (Tableau IV-3), le solvant A étant eau/acide trifluoroacétique (98/2) et B eau /acétonitrile/acide trifluoroacétique (70/30/2). Le débit utilisé a été de 0,25 mL/min. La CLHP a été couplée à un détecteur de spectrophotométrie à barrette de diodes et la détection des anthocyanes a été enregistrée à 530 nm. Cette détection permet d'observer dans l'extrait uniquement les dérivés de type anthocyane. A cette longueur d'onde spécifique, les autres métabolites secondaires des extraits appartenant à d'autres classes chimiques, en particulier les flavonoïdes, ne sont plus

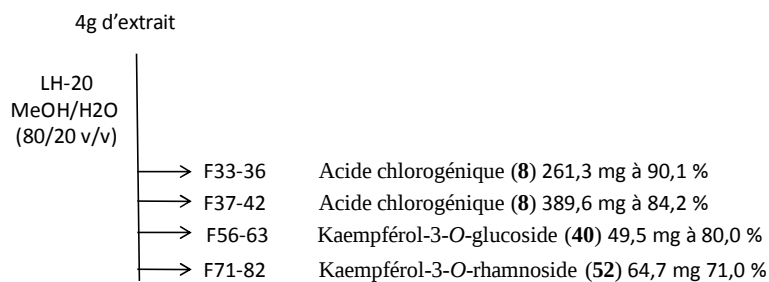


Figure IV-4 : Colonne S8 540 *H. macrophylla*

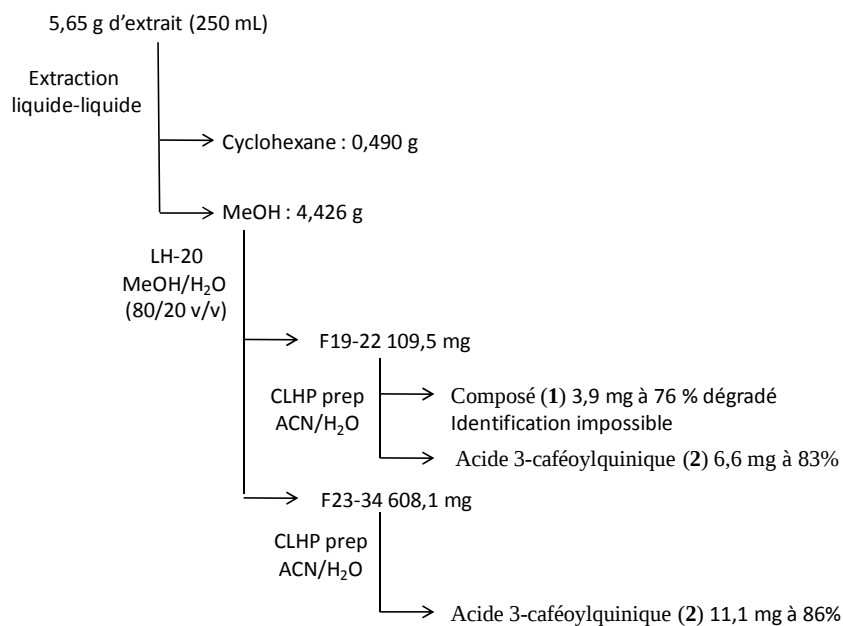


Figure IV-5 : Colonne S9 Extrait 250 *H. macrophylla*

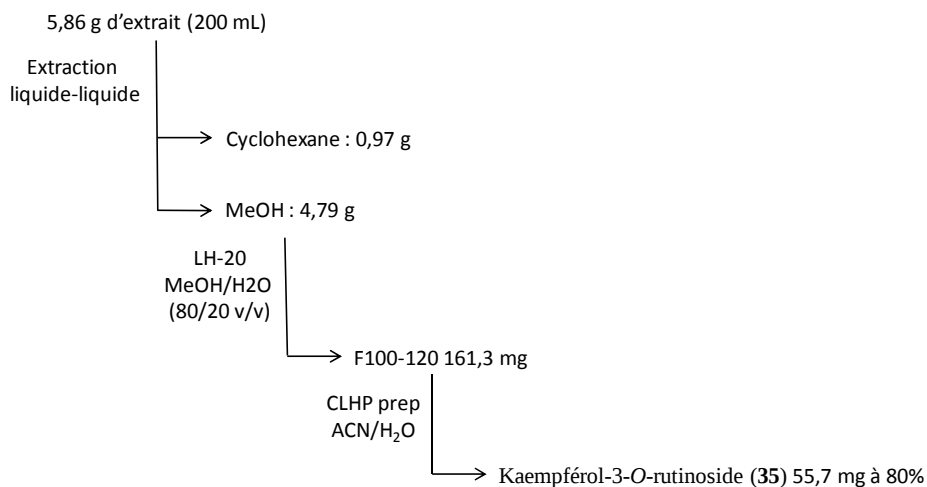


Figure IV-6 : Colonne S10 188 *H. aspera* ssp. *Sargentiana*

détectés. Les échantillons sont préparés de la manière suivante : un aliquote de 400 µl d'extrait est dilué dans 2 ml de mélange eau/acétonitrile (90:10) + 20 µl d'acide chlorhydrique 0,5N. La solution est filtrée s'il apparaît un précipité. Les volumes d'échantillons injectés sont de 20 µl.

Sur la totalité des 99 échantillons étudiés, 20 composés ont été détectés à 350 nm. Les composés ont été numérotés selon leur ordre d'élution de **61 à 80** pour ces anthocyanes.

La méthode analytique utilisée pour la quantification des anthocyanes n'a pas pu être transposée en couplage avec la spectrométrie de masse, l'éluant comportant trop d'acide. La séparation a donc été effectuée sur une autre colonne en accord avec une référence bibliographique (Chandra *et al.* 2001) : Hypersil HP ODS, de longueur 250 mm, diamètre 4 mm et taille de particule 5 µm. L'extrait de 200 µL a été dilué dans 2 mL de mélange eau/acétonitrile (90 :10), sont ensuite ajoutés 200 µl d'acide chlorhydrique 0,1%. La séparation a été réalisée grâce à un gradient, le solvant A étant : eau/ acide trifluoroacétique 99,9/0,1 (v/v) et B : eau/ acétonitrile/ acide acétique/ acide trifluoroacétique 50,4/48,5/1/0,1 (v/v/v/v) (Tableau IV-4). Le débit des pompes de solvants a été réglé sur 0,8 ml par minute et un volume de 20 µl a été injecté. La détection des anthocyanes a été réalisée par le détecteur UV à la longueur d'onde de 530 nm. Un split a été utilisé entre la sortie du détecteur UV et le spectromètre de masse pour obtenir un débit de 80 µl/min entrant dans le spectromètre de masse.

III. 2. Purification des dérivés phénoliques

III. 2. 1. Purification sur gel de Séphadex LH20

L'analyse en ligne ne permettant pas une identification complète des composés, la purification de certains d'entre eux a été réalisée.

L'extrait hydro-alcoolique a, dans un premier temps, été débarrassé de sa chlorophylle par extraction liquide/liquide en ampoule à décanter par ajout de 30 ml de dichlorométhane, de chloroforme ou d'hexane pour 100 ml d'extrait. L'opération a été renouvelée deux fois. Les phases aqueuses ont ensuite été rassemblées et évaporées à sec sous vide. Le résidu ainsi obtenu a ensuite été repris par 10 ml d'un système MeOH/H₂O à 60/40 (v/v) avant la purification sur gel.

Le gel de Séphadex est une phase d'exclusion stérique qui sépare les composés selon leur taille. Cette méthode a été choisie afin de séparer les dérivés d'acide chlorogénique (plus petits : par exemple MM=354) des flavonoïdes mono et diglycosylés (plus volumineux : par exemple MM=432-610). En chromatographie d'exclusion, les molécules de grande taille sont

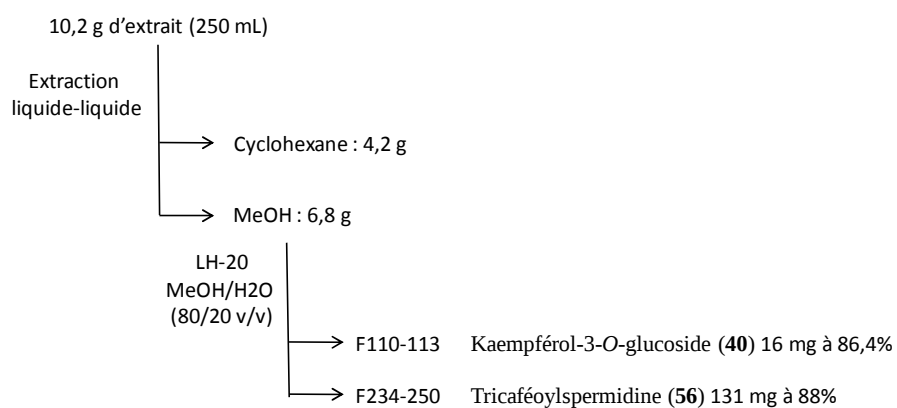


Figure IV-7 : Colonne S11 154 *H. aspera* ssp. *Sargentiana*

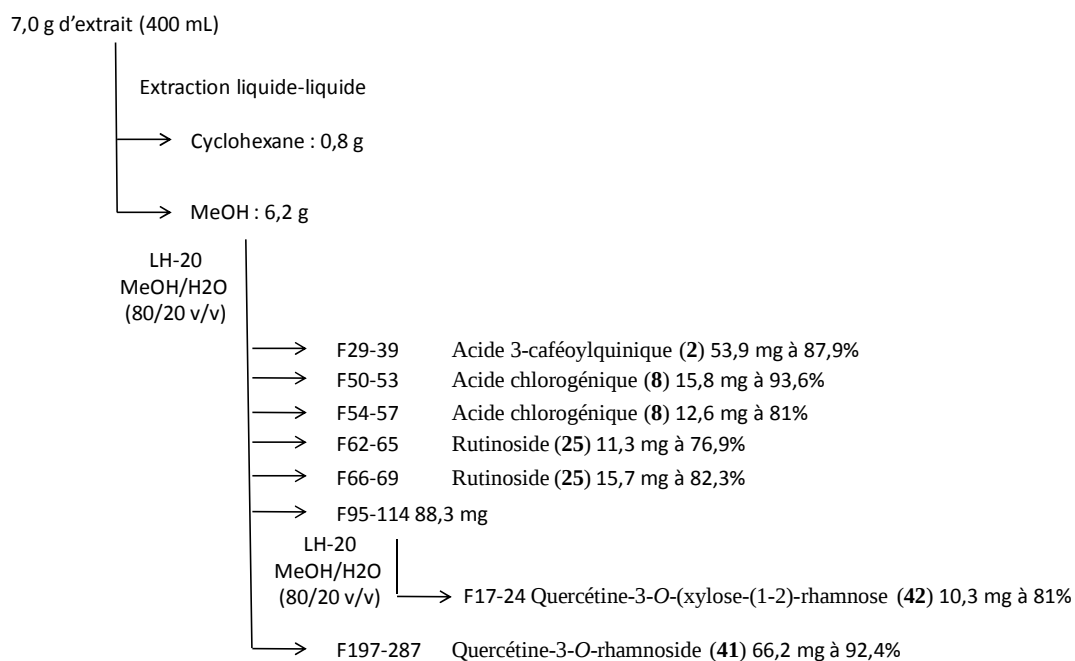


Figure IV-8 : Colonne S12 347 *H. anomala* ssp. *petiolaris*

trop volumineuses et ne pénètrent pas dans les pores des billes du gel. Elles devraient par conséquent être éluées plus rapidement que les petites molécules retenues plus longtemps dans le gel. L'ordre d'élution observé n'est pas totalement en accord avec la taille de nos molécules. Les acides phénoliques (plus petits) ont été élués en premier, suivis par les flavonoïdes monoglycosylés puis diglycosylés. Enfin, le rinçage au méthanol a permis d'éluer les composés **56** à **60** qui sont des dérivés de la spermidine. L'ordre d'élution semble suivre ici la polarité des molécules et non leur taille. Le gel de Séphadex LH-20 peut être apparenté ici à une phase stationnaire apolaire, la chromatographie se déroulant alors comme une chromatographie en phase inverse.

La mise au point de cette méthode a été faite sur des extrait *d'Hydrangea macrophylla* (157 et 540 : colonnes S1 à S7). Après plusieurs essais, les conditions suivantes ont été retenues :

- colonne en verre (45,0 x 3,0 cm)
- 80 g de gel de Séphadex LH-20
- éluant : méthanol/eau 60/40 (v/v)
- dépôt de 4 g d'extrait sur 100 g de phase
- fraction de 15 mL environ

L'analyse des fractions a été réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice avec pour éluant : acétate d'éthyle/eau/acide formique 8/1/1 (v/v/v). L'observation des taches a été effectuée sous une lampe UV à 254 nm et à 366 nm puis après l'ajout des réactifs de NEU dans le visible et à 366 nm (Brasseur and Angenot 1986) Ce révélateur est constitué de deux réactifs :

- Le diphenylborate d'aminoéthanol, dont le but est de révéler les taches présentes.
- Le polyéthylène 400 à 5% dans le méthanol, qui permet de conserver la révélation des plaques et donc de pouvoir observer de façon permanente la coloration des taches.

Plusieurs purifications ont été réalisées (S8 à S12 *cf.* Figure IV-4 à 8) et ont permis de purifier 7 composés directement (l'acide chlorogénique **8**, le rutoside **35**, le kaempférol-3-O-glucoside **40**, la quercétine-3-O-rhamnoside **41**, la quercétine-3-O-(xylose(1-2)rhamnose) **42**, le kaempférol-3-O-rhamnoside **52** et la tricaféoylspermidine **56**). Certaines fractions obtenues n'étant pas pures, la purification par CLHP préparative s'est imposée.

III. 2. 2. Purification par CLHP préparative

La purification par CLHP préparative a été réalisée pour 3 fractions des colonnes LH-20, sur une colonne Kromasil-C18 (5µm, 250x20 mm) avec l'éluant eau/acétonitrile/acide

Tableau IV-5 : Conditions opératoires de purification par CLHP préparative

fractions	Quantité injectée	Eluant
S9-f19-22	100 mg en 4 injections	eau/acétonitrile 90/10
S9-23-24	75 mg en 3 injections	eau/acétonitrile 90/10
S10-f100-120	100 mg en 4 injections	eau/acétonitrile 80/20

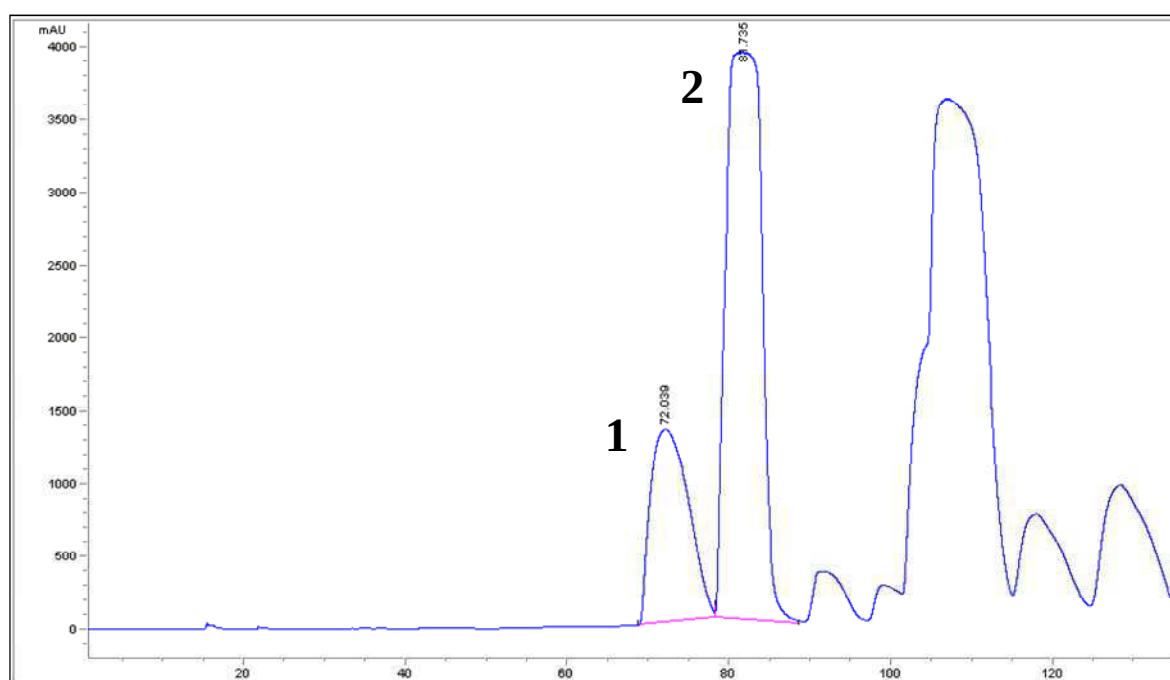


Figure IV-9 : Chromatogramme de la séparation en CLHP préparative de la fraction S8-f19-22

formique (0,3%) à un débit de 4 mL /min. le Tableau IV-5 résume les conditions opératoires utilisées pour chaque fractions. La Figure IV-9 nous montre le chromatogramme obtenu pour la fraction S9-19-22. La collecte des fractions a été effectuée grâce à un collecteur GILSON.

La première séparation (S9-19-22 Figure IV-5) avait pour but de purifier le composé **1**. L'analyse en RMN ne donnant rien, la pureté du composé a été revérifiée par CLHP analytique et il s'est avéré que le composé s'était dégradé, sans doute à cause du traitement des fractions après la purification CLHP (évaporation du solvant par exemple). Cette purification a tout de même permis l'isolement du composé **2**. Ce composé a aussi été isolé grâce à la deuxième séparation S9-23-24 (Figure IV-5). La troisième séparation (S10-f100-120 (Figure IV-6) a permis l'isolement du composé **35**. Ces deux composés ont ensuite été analysés par RMN afin de déterminer leur structure.

IV. *Méthode d'identification structurale*

IV. 1. Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse a été mise en œuvre en couplage avec une séparation en CLHP, en vue d'obtenir des informations structurales sur les molécules présentes dans l'extrait. L'identification des composés est réalisée en analysant les ions formés par fragmentation.

La chromatographie liquide et la spectrométrie de masse utilisent des conditions opératoires différentes. la chromatographie nécessite des débits de solvant importants, de fortes pressions et une phase liquide à température ambiante, alors que la spectrométrie de masse nécessite des débits faibles, un vide poussé et une phase gazeuse à haute température. En electrospray, le débit maximum utilisé est de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Aussi, un split est souvent utilisé afin de réduire le débit. L'interface utilisée doit nébuliser et vaporiser l'éluant, ioniser les analytes, enlever l'excès de vapeur de solvant et acheminer les ions ainsi formés vers le détecteur de masse (He 2000).

A l'intérieur du spectromètre a lieu la volatilisation du produit, la formation des ions en phase gazeuse ainsi que la séparation des ions selon le rapport masse M sur charge Z . La formation des ions a lieu dans une chambre d'ionisation. A cet effet, plusieurs méthodes sont utilisées. Le choix d'une méthode est fonction de l'état physique et de la volatilité du produit ainsi que de la stabilité thermique des molécules. Dans cette étude, la méthode d'ionisation par électrospray est choisie. C'est un mode d'ionisation à pression atmosphérique qui permet d'ioniser de très grosses molécules en phase liquide en induisant très peu de fragmentations et

est particulièrement bien adapté aux entités polaires. Les valeurs de masses et l'intensité relative des pics correspondant à l'ion moléculaire et aux ions fragments sont ensuite étudiées pour définir et assembler les éléments constitutifs de l'architecture du composé.

La séparation de ces composés a été réalisée dans les conditions CLHP décrites précédemment en utilisant une chaîne CLHP-UV waters 2790 couplée avec un spectromètre de masse de type trappe d'ions, Esquire 3000 PLUS (Bruker). Lors du couplage, un split est utilisé en sortie de colonne afin de diminuer le débit d'entrée dans la source à 100 μ L/min pour les dérivés d'acides cinnamiques, les amines polyacylées et les flavonoïdes et 80 μ L/min pour les anthocyanes.

Les analyses CLHP-MS sont réalisées en utilisant une source d'ionisation électrospray (ESI) en modes positif et négatif. Les conditions d'ionisation ont été optimisées et les paramètres suivants ont été retenus : température du capillaire, 365°C ; pression dans le nébuliseur, 40 psi ; débit du gaz de nébulisation (azote), 9 L/min ; différence de potentiel aux bornes du capillaire, 3,6kV et fenêtre de scan, 150-1000 m/z.

IV. 2. Spectrométrie Infrarouge (IR)

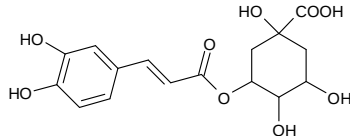
Le spectre infrarouge du composé **56** a été réalisé sur pastille de KBr à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier Brüker IR-FT Vector 22

IV. 3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

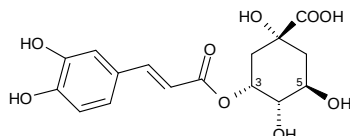
Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un appareil Jeol GSX 270 WB [270 MHz (^1H) et 67,5 MHz (^{13}C)] et sur un appareil Brüker Avance DRX 500 [500 MHz (^1H) et 125 MHz (^{13}C)]. Les déplacements chimiques sont notés δ et exprimés en partie par million (ppm) par rapport à la référence 0 ppm du tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hz

V. *Données spectrales des composés phénoliques identifiés*

Composé 1

Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Structure 
Nom	Dérivé caféoylquinique	
Temps de rétention moyen	8,79 min	
Spectre UV	319 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 353 MS ² : 191(100), 179 (34), 135 (4) MS ³ : 173 (77), 127(100), 111 (40), 85 (57) [M+H] ⁺ : 355 MS ² : 335 (31), 179 (100), 163 (66)	

Composé2

Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Structure 
Nom	Acide 3-caféoylquinique	
Temps de rétention moyen	9,54 min	
Spectre UV	300 (sh)-325 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 353 MS² : 191(100), 179 (36), 135 (6) MS³:173 (72), 127(100), 111 (37), 85 (57) [M+H]⁺ : 355 MS² : 335 (4), 163 (100)	

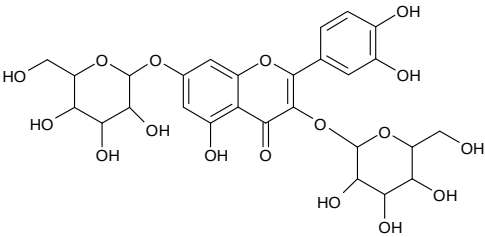
RMN (500 MHz, CD₃OD)

Position	δC en ppm	δH en ppm (multiplicité, constante de couplage)	NOESY	HMBC
1	73,9			
2ax	35,1	2,16 (3H, m)	H-5, H-3	C-3
2eq		2,16 (3H, m)		
3	71,2	5,36 (1H, s,)	H-4, H-8', H-5	C-9'
4	72,8	3,67 (1H, dd, 3,0 ; 7,9)	H-5, H-3, H-6ax	C-5
5	67,0	4,08 (1H, td, 3,1 ; 7,0)	H-6ax, H-4, H-7', H-3, H-2	
6eq	39,4	2,16 (3H, m)	H-5, H-3	
6ax		1,97 (1H, dd, 8,4 ; 13)	H-4, H-5	
7				
1'	126,3			
2'	113,4	7,04 (1H, d, 2,0)		C-6', C-7', C-4'
3'	147,8			
4'	147,8			
5'	114,8	6,77 (1H, d, 8,2)		C-6', C-7', C-1', C-4'
6'	121,3	6,94 (1H, dd, 2,0 ; 8,2)	H-8', H-7' H-5'	C-2', C-7', C-4'
7'	145,1	7,59 (1H, d, 16)	H-5, H-3, H-2', H-6', H-8'	C-6', C-2', C-1'
8'	114,1	6,31 (1H, d, 15,9)	H-7', H-5, H-3, H-2', H-6'	C-1', C-9'
9'	167,3			

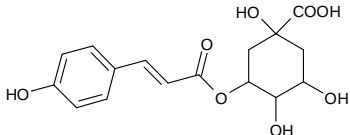
Composé 3

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé d'acide cinnamique	nd
Temps de rétention moyen	11,06 min	
Spectre UV	300 (sh)-327	
Spectre de masse	nd	

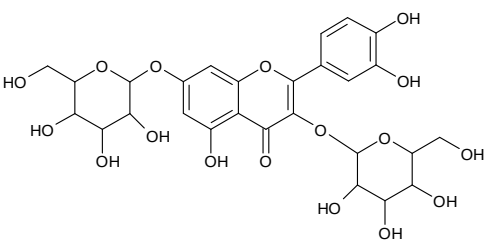
Composé 4

Formule brute	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Structure 
Nom	Quercétine-3- <i>O</i> -hexose,-7- <i>O</i> -hexose	
Temps de rétention moyen	13,39 min	
Spectre UV	255-349 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 625 MS ² : 505 (4,4), 463 (100), 301 (18,6), 300 (1,8) [M+H] ⁺ : 627 MS ² : 465 (100), 303 (31,1)	

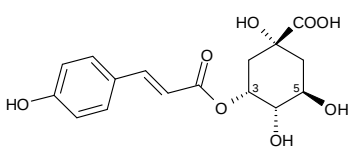
Composé 5

Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Structure 
Nom	Dérivé d'acide coumaroylquinique	
Temps de rétention moyen	14,14 min	
Spectre UV	307 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 337 MS ² : 191 (10), 173 (4), 163 (100), 119 (5) MS ³ : 119 (100) [M+H] ⁺ : 339	

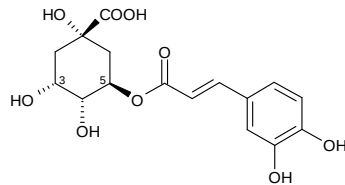
Composé 6

Formule brute	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Structure 
Nom	Quercétine-3- <i>O</i> -hexose,-7- <i>O</i> -hexose	
Temps de rétention moyen	14,85 min	
Spectre UV	255-349 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 625 MS ² : 505 (3,3), 463 (100), 301 (20,8) [M+H] ⁺ : 627 MS ² : 465 (100), 303 (29)	

Composé 7

Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Structure 
Nom	Acide 3-coumaroylquinique	
Temps de rétention moyen	14,92 min	
Spectre UV	312 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 337 MS ² : 191 (10), 173 (4), 163 (100), 119 (3) MS ³ : 119 (100) [M+H] ⁺ : 339	

Composé8

Formule brute	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Structure 
Nom	Acide 5-caféoylquinique ou Acide chlorogénique	
Temps de rétention moyen	16,04min	
Spectre UV	300 (sh)-325 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 353 MS ² : 191 (100), 179 (2) MS ³ : 173 (87), 127 (100), 111 (37), 85 (83) [M+H] ⁺ : 355 MS ² : 163 (100)	

RMN (270 MHz, CD₃OD)

Position	δ _H en ppm (multiplicité, constante de couplage)
1	
2ax	2,0-3,3 (4H, m)
2eq	2,0-3,3 (4H, m)
3	4,16 (1H, m, 3,1 ; 7,8)
4	3,72 (1H, dd, 3,1; 8,8)
5	5,33 (1H, td, 4,6 ; 8,8)
6ax	2,0-3,3 (4H, m)
6eq	2,0-3,3 (4H, m)
7	
1'	
2'	7,04 (1H, d, 2,1)
3'	
4'	
5'	6,76 (1H, d, 8,1)
6'	6,94 (1H, dd, 2,1 ; 8,1)
7'	7,55 (1H, d, 15,9)
8'	6,26 (1H, d, 15,9)
9'	

Composé 9

Formule brute	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Structure
Nom	Acide 3-féruoylquinique	
Temps de rétention moyen	18,02 min	
Spectre UV	300 (sh)-325 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 367 MS² : 193 (100), 173 (4), 134 (12) MS³ : 134 (100) [M+H]⁺ : 369 MS² : 177 (100)	

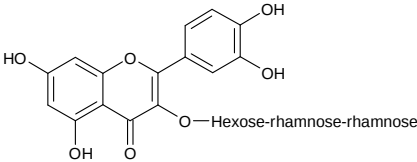
Composé 10

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé d'acide cinnamique	nd
Temps de rétention moyen	22,4 min	
Spectre UV	319 nm	
Spectre de masse	nd	

Composé 11

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé d'acide cinnamique	nd
Temps de rétention moyen	23,9 min	
Spectre UV	319 nm	
Spectre de masse	nd	

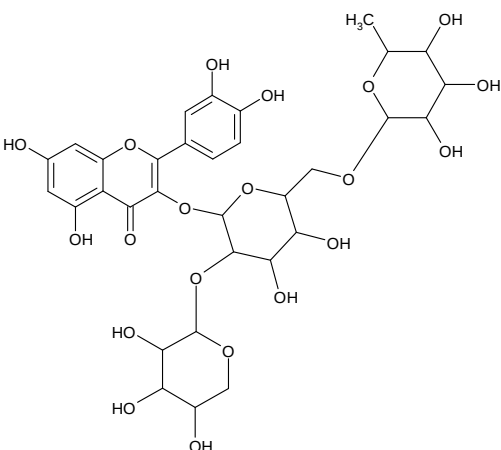
Composé12

Formule brute	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	Structure 
Nom	Quercétine-3-O-(rhamnose-rhamnose-hexose)	
Temps de rétention moyen	25,35 min	
Spectre UV	255 (265sh)-356 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 755 MS² : 609 (47,9), 301 (53), 300 (100) [M+H]⁺ : 757 MS² : 611 (79), 465 (43), 449 (21), 303 (100) [M+Na]⁺ : 779 MS² : 633 (30), 478 (19), 477 (100), 331 (15)	

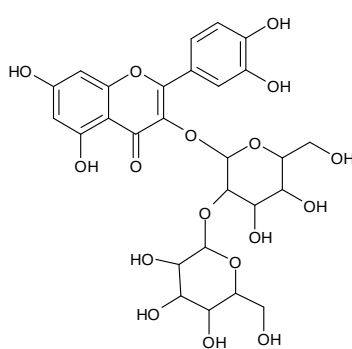
Composé 13

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé du kaempférol	nd
Temps de rétention moyen	26,15 min	
Spectre UV	262-348 nm	
Spectre de masse	nd	

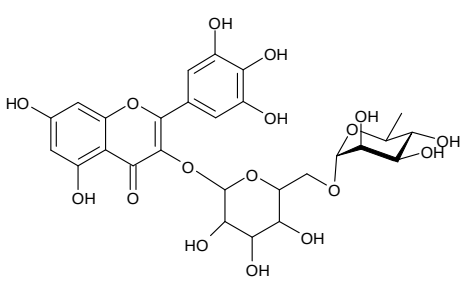
Composé 14

Formule brute	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	Structure
Nom	Quercétine-3-O-(hexose-(1-2)-pentose-(1-6)-rhamnose)	
Temps de rétention moyen	26,36 min	
Spectre UV	256-352 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 741 MS2 : 609 (61,5), 591 (86,2), 475 (28,3), 301 (73,1), 300 (100) [M+H] ⁺ : 743 MS2 : 611 (16,6), 597 (20,2), 465 (37,2), 449 (6,8), 303 (100)	

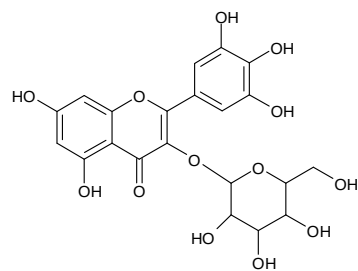
Composé 15

Formule brute	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Structure
Nom	Quercétine-3-O-(hexose-(1-2)-hexose)	
Temps de rétention moyen	26,62 min	
Spectre UV	253-266 (sh)-356 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 625 MS ² : 505 (32), 463 (33), 445 (49), 301 (100), 300 (88) [M+H] ⁺ : 627 MS ² : 465 (89), 447 (10), 303 (100) [M+Na] ⁺ : 649 MS ² : 347 (100)	

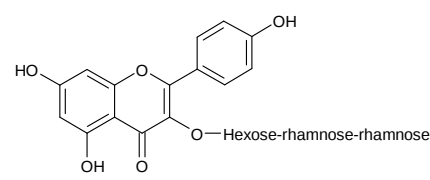
Composé 16

Formule brute	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	Structure
Nom	Myricétine-3-O-rhamnose-(1-6)-hexose	
Temps de rétention moyen	26,75 min	
Spectre UV	256-354 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 625 MS ² : 607(56), 317 (100), 316 (93) [M+H] ⁺ : 627 MS ² : 481(60), 465 (7), 319(100)	

Composé 17

Formule brute	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	Structure 
Nom	Myricétine-3-hexose	
Temps de rétention moyen	27,69 min	
Spectre UV	256-266 (sh)-355 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 479 MS ² : 317 (100), 316 (80) [M+H] ⁺ : 481 MS ² : 319 (100)	

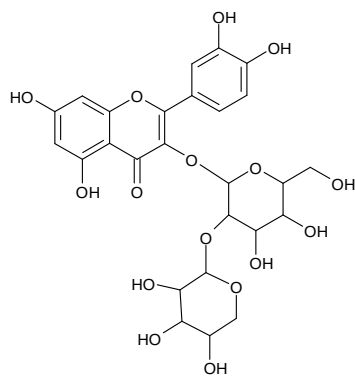
Composé 18

Formule brute	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O-(rhamnose-rhamnose-hexose)	
Temps de rétention moyen	28,00 min	
Spectre UV	266-348 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 739 MS² : 593 (30), 575 (100), 285 (14), 284(19) [M+H]⁺ : 741 MS² : 595 (77), 449 (41), 433 (20), 287 (100) [M+Na]⁺ : 763 MS² : 617 (23), 477 (100), 331 (19)	

Composé 19

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé de la naringénine	nd
Temps de rétention moyen	28,61 min	
Spectre UV	290-330 (sh) nm	
Spectre de masse	nd	

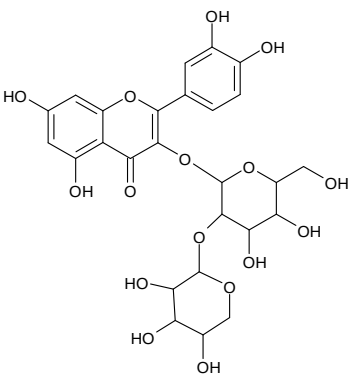
Composé 20

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	Structure 
Nom	Quercétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	
Temps de rétention moyen	28,50 min	
Spectre UV	255-266 (sh)-356 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 595 MS² : 475 (12), 463 (21), 445 (35), 301 (54), 300 (100) [M+H]⁺ : 597 MS² : 465 (66), 303 (100) [M+Na]⁺ : 619 MS² : 317 (100)	

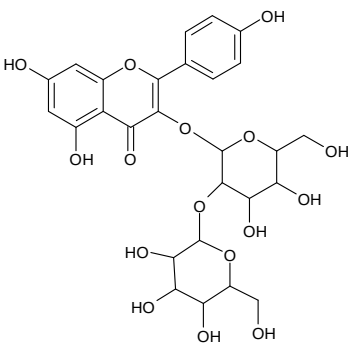
Composé 21

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé du kaempférol	nd
Temps de rétention moyen	28,56 min	
Spectre UV	266-356 nm	
Spectre de masse	nd	

Composé 22

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	Structure
Nom	Quercétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	
Temps de rétention moyen	28,74 min	
Spectre UV	255-266 (sh)-356 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 595 MS ² : 475 (14), 463 (23), 445 (46), 301 (46), 300 (100) [M+H] ⁺ : 597 MS ² : 465 (51), 303 (100) [M+Na] ⁺ : 619 MS ² : 317 (100)	

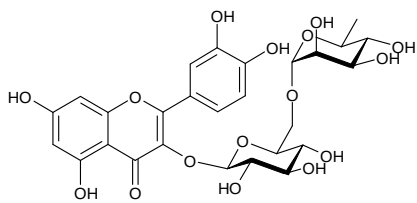
Composé 23

Formule brute	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Structure
Nom	Kaempférol-3-O-(hexose-(1-2)-hexose)	
Temps de rétention moyen	29,44 min	
Spectre UV	266-347 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 609 MS ² : 429 (37), 285 (100), 284 (20) [M+H] ⁺ : 611 MS ² : 449 (100), 287 (15)	

Composé 24

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé de la quercétine	nd
Temps de rétention moyen	29,81 min	
Spectre UV	255-350 nm	
Spectre de masse	nd	

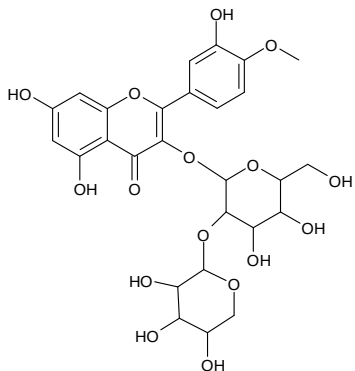
Composé 25

Formule brute	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Structure 
Nom	Rutoside ; Rutine ; Quercétine-3-O-β-rutinoside (rhamnose-(1-6)-glucose)	
Temps de rétention moyen	30,54 min	
Spectre UV	256-266 (sh)-354nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 609 MS² : 301 (100), 300 (20) [M+H]⁺ : 611 MS² : 465 (71), 449 (6), 303 (100) [M+Na]⁺ : 633 MS² : 487 (35), 331 (100)	

RMN (270 MHz, CD₃OD)

Position	δ _C en ppm	δ _H en ppm (multiplicité, constante de couplage)
2	158,4	
3	135,6	
4	179,3	
5	162,9	
6	99,9	6,4 (1H, d, 2,1)
7	166,0	
8	94,8	6,2 (1H, d, 2,1)
9	159,3	
10	105,6	
1'	123,1	
2'	116,0	7,66 (1H, d, 2,1)
3'	145,8	
4'	149,7	
5'	117,6	6,86 (1H, d, 8,1)
6'	123,5	7,62 (1H, dd, 2,1 ; 8,1)
Glu		
1''	104,7	5,1 (1H, d, 7,1)
2''	75,7	3,43 (2H, s)
3''	78,2	
4''	71,4	3,35 (2H, s)
5''	77,2	
6''	68,5	3,27 (1H, d, 9,6) 3,8(1H, d, 10)
Rha		
1'''	102,4	4,5 (1H, d, 1,4)
2'''	72,1	3,63 (1H, dd, 1,4 ; 3,1)
3'''	72,2	3,56 (1H, dd, 3,1 ; 9,5)
4'''	73,9	3,49 (1H, d, 9,2)
5'''	69,7	3,37 (1H, d, 6,3)
6'''	18,0	1,1 (3H, d, 6,3)

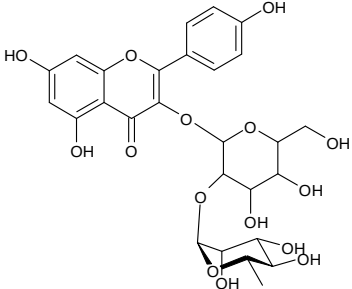
Composé 26

Formule brute	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Structure 
Nom	Isorhamnétine-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	
Temps de rétention moyen	31,75 min	
Spectre UV	255-266 (sh)-356 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 609 MS² : 578 (10,1), 489 (9.8), 477 (5.7), 459 (51.2), 315 (100), 314 (59.6) MS³ : 300 (100), 299 (54,8) [M+H]⁺ : 611 MS² : 479 (54), 317 (100) [M+Na]⁺ : 633 MS² : 317 (100)	

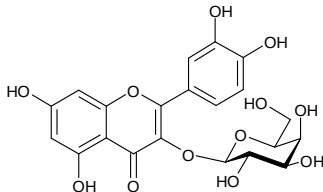
Composé 27

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé de la myricétine	nd
Temps de rétention moyen	32,32 min	
Spectre UV	255-266 (sh)-354 nm	
Spectre de masse	nd	

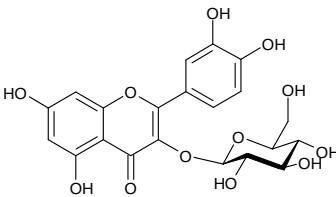
Composé 28

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O-(rhamnose-(1-2)-hexose)	
Temps de rétention moyen	32,38 min	
Spectre UV	265-345nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 593 MS² : 473 (10), 447 (18), 429 (56), 285 (65), 284 (100) [M+H]⁺ : 595 MS² : 449 (51), 433 (5), 287 (100) [M+Na]⁺ : 617 MS² : 471 (17), 331 (100), 309 (6), 185 (6)	

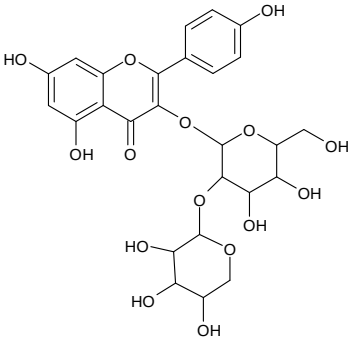
Composé 29

Formule brute	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Structure 
Nom	Hypéroside ou Quercétine-3-O-galactose-	
Temps de rétention moyen	33,06 min	
Spectre UV	254-267 (sh)- 353nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 463 MS² : 301 (100), 300 (15) [M+H]⁺ : 465 MS² : 303 (100) [M+Na]⁺ : 487 MS² : 403 (16), 325 (50), 185 (100)	

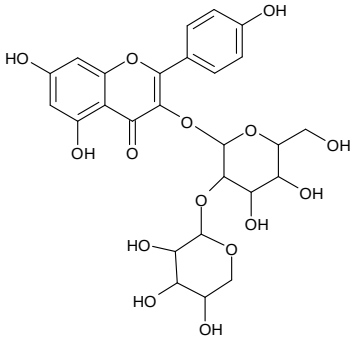
Composé 30

Formule brute	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Structure 
Nom	Isoquercitrine ou Quercétine-3-O-glucoside	
Temps de rétention moyen	33,71 min	
Spectre UV	256-266 (sh)- 354 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 463 MS² : 301 (100), 300 (13) [M+H]⁺ : 465 MS² : 303 (100) [M+Na]⁺ : 487 MS² : 325 (100), 185 (60)	

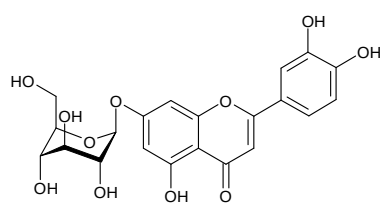
Composé 31

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	
Temps de rétention moyen	34,04 min	
Spectre UV	266-349 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 579 MS² : 458 (6), 447 (14), 429 (17), 285 (100), 284 (54) [M+H]⁺ : 581 MS² : 449 (92), 287 (100)	

Composé 32

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O-(pentose-(1-2)-hexose)	
Temps de rétention moyen	34,18 min	
Spectre UV	266-349 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 579 MS ² : 458 (6), 447 (14), 429 (17), 285 (100), 284 (54) [M+H] ⁺ : 581 MS ² : 449 (57), 287 (100)	

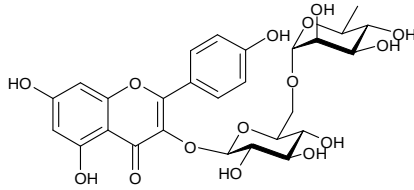
Composé 33

Formule brute	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Structure 
Nom	Lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside	
Temps de rétention moyen	34,78 min	
Spectre UV	255-266-349 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 447 MS² : 285 (100) MS³ : 257 (13,1), 243 (52,8), 241 (82,2), 217 (48,7), 213 (20,7), 199 (82,9), 197 (23,4), 175 (100), 151 (44,9), 149 (12,4), 133 (14,1) [M+H]⁺ : 449 MS² : 287 (100)	

Composé 34

Formule brute	nd	Structure
Nom	Dérivé de la quercétine	nd
Temps de rétention moyen	36,82 min	
Spectre UV	254-268 (sh)-349 nm	
Spectre de masse	nd	

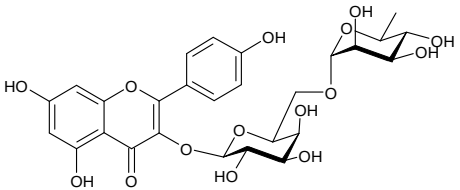
Composé 35

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Structure 
Nom	Nicotiflorine ou Kaempférol-3-O-β-rutinoside (rhamnose-(1-6)-glucose)	
Temps de rétention moyen	37,86 min	
Spectre UV	266-345 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 593 MS ² : 285 (14), 284 (100) [M+H] ⁺ : 595 MS ² : 449 (55), 287 (100)	

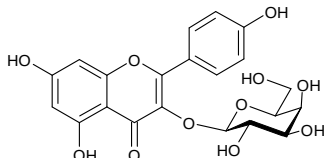
RMN (270 MHz, CD₃OD)

Position	δ _C en ppm	δ _H en ppm (multiplicité, constante de couplage)	HMBC
2	158,5		
3	135,5		
4	179,3		
5	162,9		
6	100,0	6,18 (1H, s)	C-5, C-7, C-8, C -10
7	166,1		
8	94,9	6,37 (1H, s)	C-6, C-7, C-9, C-10
9	159,3		
10	105,6		
1'	122,7		
2'	132,3	8,05 (1H, d, 8,8)	C-4', C-6'
3'	116,1	6,88 (1H, d, 8,8)	C-1', C-3' 5', C-4'
4'	161,4		
5'	116,1	6,88 (1H, d, 8,8)	C-1', C-3' 5', C-4'
6'	132,3	8,05 (1H, d, 8,8)	C-4', C-2'
Glu			
1''	104,6	5,12 (1H; d; 7,6)	C-3
2''	75,8	3,46 m	C-1 _{glu} , C-3 _{glu}
3''	78,1	3,44 m	C-2 _{glu} , C-4 _{glu}
4''	71,4	3,26 (1H; d; 8,7)	C-5 _{glu}
5''	77,2	3,36 m	C-4 _{glu} , C-1 _{rha}
6''	68,6	3,81 (1H; d; 9,9) 3,36 m	C-4 _{glu} , C-1 _{rha}
Rha			
1'''	102,4	4,52 (1H; d; 1,2)	C-6 _{glu} , C-2 _{rha}
2'''	72,1	3,66 (1H; dd; 1,2; 3,2)	C-3 _{rha} , C-6 _{glu}
3'''	72,3	3,54 (1H; dd; 3,2; 9,5)	C-2 _{rha}
4'''	73,9	3,28 (1H; d; 9,2)	C-3 _{rha} , C-6 _{rha}
5'''	69,7	3,44 m	
6'''	18,0	1,13 (3H; d; 6,25)	C-4 _{rha} , C-5 _{rha}

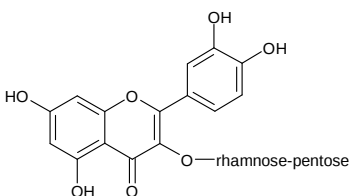
Composé 36

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Structure
Nom	Kaempférol-3-O-(rhamnose-(1-6)-galactose)	
Temps de rétention moyen	36,92 min	
Spectre UV	266-345 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 593 MS ² : 285 (14), 284 (100) [M+H] ⁺ : 595 MS ² : 449 (57), 433 (5), 287 (100) [M+Na] ⁺ : 617 MS ² : 471 (29), 331 (100), 309 (8)	

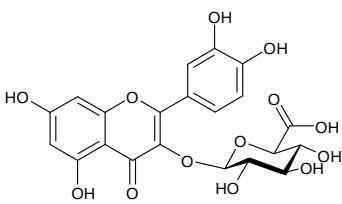
Composé 37

Formule brute	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O-galactoside	
Temps de rétention moyen	38,12 min	
Spectre UV	266-343 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 447 MS² : 285 (100), 284 (95) [M+H]⁺ : 449 MS² : 287 (100) [M+Na]⁺ : 471 MS² : 309 (48), 185 (100)	

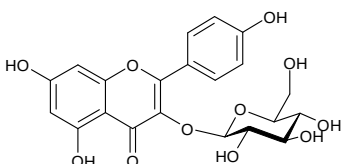
Composé 38

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Structure 
Nom	Quercétine-3-O-(pentose-rhamnose)	
Temps de rétention moyen	38,47 min	
Spectre UV	255-350 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 579 MS ² : 301 [M+H] ⁺ : 581 MS ² : 449 (100), 303 (16,7)	

Composé 39

Formule brute	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	
Nom	Miquélianine ou Quercétine-3-O-glucuronide	
Temps de rétention moyen	38,78 min	
Spectre UV	256-347 nm	
Spectre de masse	$[M-H]^-$: 477 MS ² : 301 (17), 300 (100) $[M+H]^+$: 479 MS ² : 303 (100)	

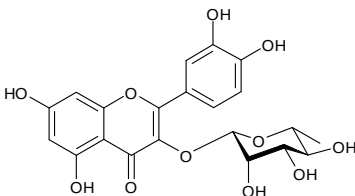
Composé 40

Formule brute	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	
Nom	Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside	
Temps de rétention moyen	38,83 min	
Spectre UV	266-348 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 447 MS ² : 285 (100), 284 (64) [M+H] ⁺ : 449 MS ² : 287 (100) [M+Na] ⁺ : 471 MS ² : 309 (100), 185 (51)	

RMN (270 MHz, (CD₃)₂CO)

position	δ _C en ppm	δ _H en ppm (multiplicité, constante de couplage)
2	159,5	
3	136,3	
4	180,0	
5	163,8	OH 12,41(H, s)
6	100,6	6,51(1H, d, 2,1)
7	166,1	
8	95,6	6,27 (1H, d, 2,1)
9	158,8	
10	106,5	
1'	123,5	
2'	133,1	8,13 (2H, d, 8,8)
3'	116,8	
4'	161,9	6,96 (2H, d, 8,8)
5'	116,8	8,13 (2H, d, 8,8)
6'	133,1	6,96 (2H, d, 8,8)
1''	105,7	5,26(1H, d, 7,1)
2''	76,3	3,2-3,6 (6H, m)
3''	78,9	
4''	72,1	
5''	78,8	
6''	63,7	

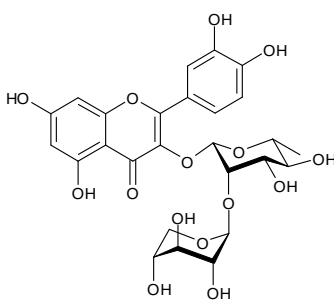
Composé 41

Formule brute	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Structure 
Nom	Quercitrine ou Quercétine-3-O-rhamnoside	
Temps de rétention moyen	39,14 min	
Spectre UV	255-266 (sh)-349 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 447 MS² : 301 (100), 300 (17) [M+H]⁺ : 449 MS² : 303 (100) [M+Na]⁺ : 471 MS² : 325 (100), 169 (6)	

RMN (270 MHz, CD₃OD)

Position	δ _H en ppm (multiplicité, constante de couplage)
2	
3	
4	
5	
6	6,36 (1H, d, 2,1)
7	
8	6,19 (1H, d, 2,1)
9	
10	
1'	
2'	7,32 (1H, d, 8,1)
3'	
4'	
5'	6,89 (1H, d, 8,1)
6'	7,3 (1H, dd, 1,7; 8,1)
1''	5,34 (1H, d, 1,4)
2''	4,22 (1H, dd, 1,4; 3,1)
3''	3,75 (1H, dd, 3,1 ; 9,2)
4''	3,52 (1H, d, 9,2)
5''	3,4 (1H, d, 6,0)
6''	0,94 (3H, d, 6,0)

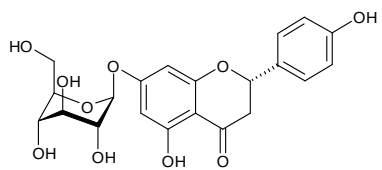
Composé 42

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Structure 
Nom	Quercétine-3-O-rhamnose-(2-1)-xylose	
Temps de rétention moyen	39,31 min	
Spectre UV	255-2656 (sh)-350 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 579 MS² : 301 (100), 300 (22) [M+H]⁺ : 581 MS² : 449 (100), 303(10)	

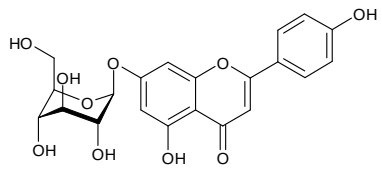
RMN (500 MHz, CD₃OD) (Nielsen *et al.* 2005)

Position	δ _C en ppm	δ _H en ppm (multiplicité, constante de couplage)	HMBC
2	158,8		
3	136,6		
4	179,4		
5	163,0		
6	100,7	6,14(1H, d, 2,1)	C5, C7, C8, C9, C10
7	168,5		
8	95,4	6,3(1H, d, 2,1)	C6, C7, C10
9	158,6		
10	105,1		
1'	122,6		
2'	116,6	7,34(1H, d, 2,1)	C2, C1', C3', C4', C6'
3'	146,5		
4'	150,0		
5'	116,4	6,90(1H, d, 8,1)	C1', C3'
6'	122,8	7,29(1H, dd, 8,3; 2,1)	C2, C2', C4', C5', C6'
Rha			
1''	103,2	5,33(1H, d, 1,4)	C3, C2 _{rha} , C3 _{rha} , C5 _{rha}
2''	82,8	4,18(1H, dd, 1,4; 3,5)	C1 _{xyl}
3''	71,9	3,87(1H, dd, 3,5; 9,5)	C5 _{rha} , C4 _{rha}
4''	73,7	3,33 caché par le méthanol	C3 _{rha} , C5 _{rha}
5''	71,8	3,85(1H, d, 9,5)	C4 _{rha}
6''	17,8	1,03(3H, d, 6,3)	
Xyl			
1'''	107,8	4,24(1H, d, 7,4)	C2 _{rha} , C3 _{xyl}
2'''	75,3	3,17(1H, dd, 7,3; 8,8)	C1 _{xyl}
3'''	77,8	3,25(1H, d, 8,8)	C2 _{xyl} , C4 _{xyl}
4'''	71,0	3,39 caché par le méthanol	C5 _{xyl}
5'''	67,1	3,62(1H, dd, 5,3; 11,3) 3,03(1H, d, 10,9)	C4 _{xyl} , C3 _{xyl} , C1 _{xyl}

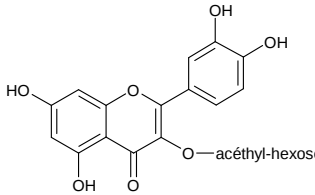
Composé 43

Formule brute	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	Structure 
Nom	Naringénine-7-O-glucoside	
Temps de rétention moyen	39,56 min	
Spectre UV	229-286 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 433 MS ² : 271(100) [M+H] ⁺ : 435 MS ² : 273 (100)	

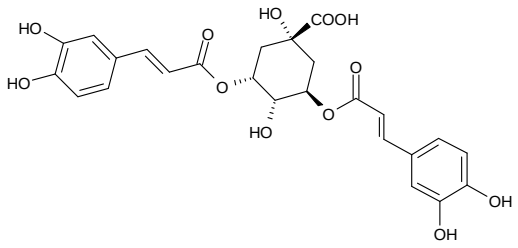
Composé 44

Formule brute	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Structure 
Nom	Apigénine-7-O-glucoside	
Temps de rétention moyen	39,95 min	
Spectre UV	267-333 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 431 MS² : 269 (100) MS³ : 227 (26.9), 225 (100), 201 (19.4), 197 (34.7), 183 (34.8), 181 (19.2), 159 (18.3), 151 (30.6), 149 (55.5), 117 (22.7) [M+H]⁺ : 433 MS² : 271 (100)	

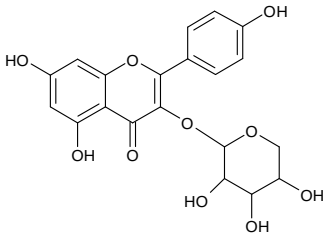
Composé 45

Formule brute	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	Structure 
Nom	Quercétine-3- <i>O</i> -acétylhexose	
Temps de rétention moyen	39,97 min	
Spectre UV	251-269 (sh)-356 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 505 MS² : 463 (32), 301 (100), 300 (38) [M+H]⁺ : 507 MS² : 449 (100), 303 (21)	

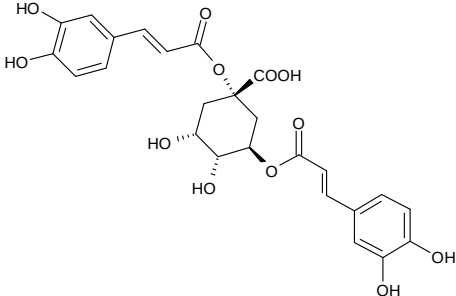
Composé 46

Formule brute	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Structure 
Nom	Acide 3,5-dicaféoylquinique	
Temps de rétention moyen	40,1 min	
Spectre UV	300 (sh)-319 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 515 MS² : 353 (100) ,191 (1), 179 (3) MS³ : 191 (100), 179 (45),173 (4), 135 (6) [M+H]⁺ : 499	

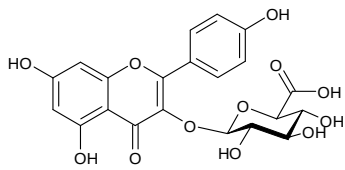
Composé 47

Formule brute	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O-pentose	
Temps de rétention moyen	40,73 min	
Spectre UV	266-348 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 417 MS² : 285 (100), 284 (71) [M+H]⁺ : 419	

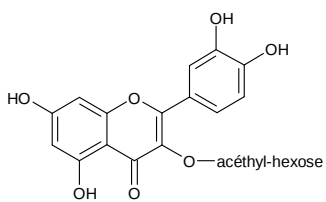
Composé 48

Formule brute	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Structure 
Nom	Acide 1,5-dicaféoylquinique	
Temps de rétention moyen	40,8 min	
Spectre UV	246-327 (300sh) nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 515 MS ² : 353 (100), 191 (3), 179 (2) [M+H] ⁺ : 499 MS ² : 319 (84), 163 (100)	

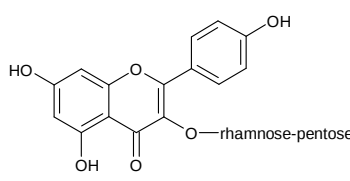
Composé 49

Formule brute	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O -glucuronide	
Temps de rétention moyen	41,12 min	
Spectre UV	265-343nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 461 MS ² : 285 (22), 284 (100) [M+H] ⁺ : 463 MS ² : 287 (100) [M+Na] ⁺ : 485 MS ² : 309 (100)	

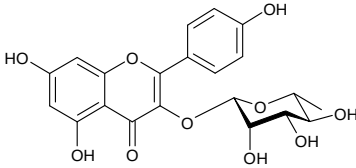
Composé 50

Formule brute	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	Structure 
Nom	Quercétine-3- <i>O</i> -acétylhexose	
Temps de rétention moyen	41,84 min	
Spectre UV	256-265 (sh)-356 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 505 MS² : 463 (87), 301 (100), 300 (60) [M+H]⁺ : 507 MS² : 449 (100), 303 (20)	

Composé 51

Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Structure 
Nom	Kaempférol-3- <i>O</i> -(pentose-rhamnose)	
Temps de rétention moyen	42,14 min	
Spectre UV	265-345 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ :563 MS ² : 431 (26,2), 413 (28,9), 285 (59,8), 284 (100) [M+H] ⁺ : 565 MS ² : 433 (100), 415 (10,9), 287 (11,6)	

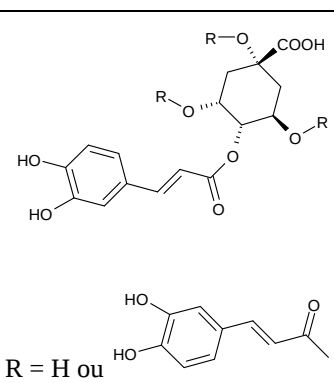
Composé 52

Formule brute	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	Structure 
Nom	Afzéline ou Kaempférol-3-O-α-rhamnopyranoside	
Temps de rétention moyen	42,76 min	
Spectre UV	265-343 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 431 MS² : 285 (100), 284 (25) [M+H]⁺ : 433 MS² : 287 (100) [M+Na]⁺ : 455 MS² : 309 (100), 169 (5)	

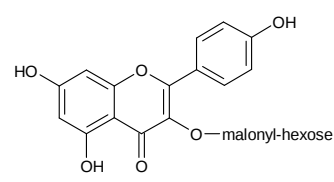
RMN (500 MHz, CD₃OD)

Position	δ_H en ppm (multiplicité, constante de couplage)
2	
3	
4	
5	
6	6,37 (1H, d, 2,1)
7	
8	6,19 (1H, d, 2,1)
9	
10	
1'	
2'	7,76 (1H, d, 8,8)
3'	6,93 (1H, d, 8,8)
4'	
5'	6,93 (1H, d, 8,8)
6'	7,76 (1H, d, 8,8)
1''	5,37 (1H, d, 1,4)
2''	4,21 (1H, dd, 1,7; 3,2)
3''	3,72(1H, dd, 3,5 ; 9,9)
4''	3,35(1H, m)
5''	3,35 (1H, m)
6''	0,94 (3H, m)

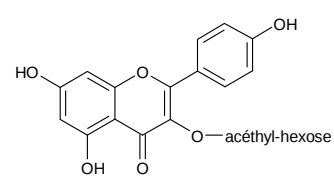
Composé 53

Formule brute	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Structure
Nom	Acide x,4-dicaféoylquinique	
Temps de rétention moyen	43,60 min	
Spectre UV	300 (sh)-327nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 515 MS ² : 353 (100), 335 (3), 317 (3), 299 (6), 203 (12), 191 (1), 179 (5), 173 (8) [M+H] ⁺ : 499 MS ² : 319 (74), 163 (100)	

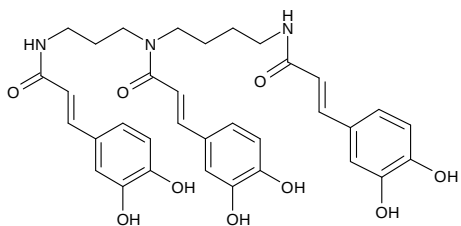
Composé 54

Formule brute	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O-malonylhexose	
Temps de rétention moyen	43,71 min	
Spectre UV	266-348 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 533 MS ² : 489 (100), [M+H] ⁺ : 535 MS ² : 287 (100)	

Composé 55

Formule brute	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	Structure 
Nom	Kaempférol-3-O-acétylhexose	
Temps de rétention moyen	46,11 min	
Spectre UV	266-332 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ :489 MS ² : 285 (100), 284(65) [M+H] ⁺ : 491 MS ² : 287 (100)	

composé 56

Formule brute	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₉	Structure 
Nom	N ¹ , N ⁵ , N ¹⁰ -tricaféoylspermidine	
Temps de rétention moyen	46,52 min	
Spectre UV	294 (sh)-320 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 630 MS ² : 494 (94), 468 (100), 358 (13), 332 (11) [M+H] ⁺ : 632 MS ² : 470 (100), 452 (5) MS ³ : 453 (23), 452 (10), 308 (69), 291 (20), 234 (9), 220 (100), 163 (33), 145 (4)	

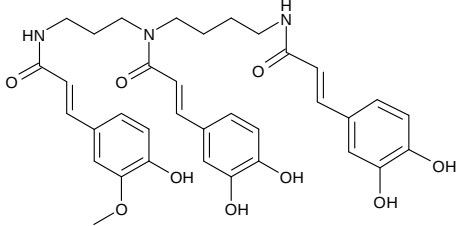
RMN (500 MHz, DMSO-d₆)

Position	δ _C en ppm à température ambiante	δ _H en ppm (multiplicité, constante de couplage) à 50°C
2	36,3 ; 36,5	3,1-3,2 (2H, m)
3	26,6 ; 26,8 ; 26,9 ; 27,9 ; 28,3 ; 29,7	1,7-1,8 (2H, m)
4	43,7 ; 44,9 ; 45,5 ; 46,8	3,4-3,5 (2H, m)
6		
7	26,6 ; 26,8 ; 26,9 ; 27,9 ; 28,3 ; 29,7	1,2-1,6 (4H, m)
8		
9	38,0 ; 38,2 ; 38,4	3,1-3,2 (2H, m)
1'	126,3 ; 126,6	
2'	113,7 ; 113,8 ; 114,5 ; 114,7 ; 115,1 ; 115,7	7,07 (1H, d, 2.0) 6,96 (2H, m)
3'	138,9 ; 139,0 ; 139,1 ; 141,9	
4'	138,9 ; 139,0 ; 139,1 ; 141,9	
5'	113,7 ; 113,8 ; 114,5 ; 114,7 ; 115,1 ; 115,7	6,65-6,81 (3H, m)
6'	120,2 ; 120,3 ; 120,6	6,81-6,88 (2H, m), 6,95-7,00 (1H, m)
7'	145,5 ; 147,2	7,18-7,36 (3H, 3xd, 15)
8'	118,2 ; 118,4 ; 118,5	6,2-6,4 (2H, 2xd, 15,7) 6,65-6,81 (1H, m)
9'	165,2 ; 165,3 ; 165,5	

Composé 57

Formule brute	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₈	Structure
Nom	N¹-coumaroyl- N⁵, N¹⁰-dicaféoylspermidine	
Temps de rétention moyen	48.68 min	
Spectre UV	295 (sh)-315 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 614 MS² : 494 (34), 478 (100), 452 (70), 358 (30) [M+H]⁺ : 616 MS² : 470 (73), 454 (100), 452 (97), 436 (6), 220 (2.5) MS³ (454) : 437 (24.5), 436 (11.8), 308 (29.3), 292 (57.9), 291 (6), 275 (10.8), 274 (3.3), 234 (10.9), 220 (74.9), 204 (100), 163 (36.8), 147 (29.5), 145 (4.1) MS³ (470) : 308 (50.8), 291 (20.2), 220 (100), 163 (52.4)	

Composé 58

Formule brute	C ₃₅ H ₃₉ N ₃ O ₉	Structure 
Nom	N ¹ -feruoyl- N ⁵ , N ¹⁰ -dicaféoylspermidine	
Temps de rétention moyen	48,94 min	
Spectre UV	295 (sh)-320 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 644 [M+H] ⁺ : 646 MS ² : 484 (57), 470 (57), 466 (3.7), 452 (100)	

Composé 59

Formule brute	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₈	Structure
Nom	N ¹⁰ -coumaroyl- N ¹ , N ⁵ -dicaféoylspermidine	
Temps de rétention moyen	49,33 min	
Spectre UV	295 (sh)-315 nm	
Spectre de masse	[M-H]⁻ : 614 MS² : 494 (34)-478 (100)-452 (70)-358 (30) [M+H]⁺ : 616 MS2 : 470 (1.3), 454 (100), 452 (0.6), 436 (14.4) MS³ : 437 (28.4), 436 (14.3), 308 (16.4), 292 (43.5), 291 (6.8), 290 (3.1), 275 (8.7), 220 (100), 204 (64.7), 163 (37.1), 147 (29.3), 145 (4,6)	

Tableau IV-6 : Répartition des composés phénoliques par classe chimique et molécules témoins utilisées pour leur dosage

Classe chimique	Molécule témoin	Composés
Acides cinnamiques	acide chlorogénique 8	1-3, 5, 7-11, 48, 46 et 53
Amines polyacylées	Tricaféoylspermidine 56	56- 60
Delphinidines	delphinidine-3- <i>O</i> -glucoside 68	61-68, 70-72 et 74-80
Cyanidines	cyanidine-3- <i>O</i> -rutinoside 73	69 et 73
Kaempférols	kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside 40	13, 18, 21, 23, 28, 31, 32, 35-37, 40, 47, 49, 51, 52, 54 et 55
Quercétine-myricétine	rutine 25	4, 6, 12, 14-17, 20, 22, 24-27, 29, 30, 34, 38, 39, 41, 42, 45 et 50
Apigénines	apigénine-7- <i>O</i> -glucoside 44	44
Lutéolines	lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside 33	33
Naringénines	naringine : naringénine-7- <i>O</i> -neohesperidoside 98	19 et 43

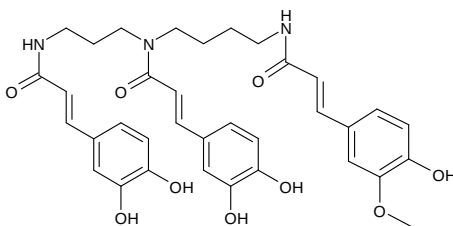
Tableau IV-7 : Récapitulatif coefficient dosage

Molécule	Moyenne coefficient
Acide chlorogénique (8)	458 484 100
Rutoside quercétine-3- <i>O</i> -rutinoside (25)	888 955 767
Lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside (33)	821 091 827
Naringin naringénine-7- <i>O</i> -neohesperidoside (98)	104 981 482
Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside (40)	783 529 681
Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside (44)	1 345 272 179
Tricaféoylspermidine (56)	379 153 452

Tableau IV-8 : Fiabilité des dosages évaluée à partir des molécules témoins

Classe chimique	Molécule témoin	Nombre de répétitions	Pourcentage d'erreur maximum
Acides cinnamiques	acide chlorogénique 8	4	3.38
Amines polyacylée	Tricaféoylspermidine 56	10	4.79
Kaempférols	kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside 40	4	4.05
Quercétines-myricétines	rutine 25	4	7.54
Apigénines	apigénine-7- <i>O</i> -glucoside 44	5	2.14
Lutéolines	lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside 33	4	6.78
Naringénines	naringine 98	3	0.6

Composé 60

Formule brute	C ₃₅ H ₃₉ N ₃ O ₉	Structure 
Nom	N ¹⁰ -feruoyl- N ¹ , N ⁵ -dicaféoylspermidine	
Temps de rétention moyen	49,50 min	
Spectre UV	295 (sh)-320 nm	
Spectre de masse	[M-H] ⁻ : 644 [M+H] ⁺ : 646 MS ² : 484 (100), 470 (3.4), 466 (13.4), 452 (4.8)	

VI. Quantification des composés phénoliques du genre

Hydrangea

Toutes les molécules présentes dans nos extraits ne sont pas disponibles commercialement ou n'ont pas pu être isolées. Afin de les quantifier, elles ont été regroupées par classe chimique et chaque composé a été dosé par étalonnage externe en équivalent d'un composé appartenant à la même classe chimique (Tableau IV-6). Le chromophore étant le même pour le composé à doser et le témoin, leurs coefficients d'absorption est donc voisin à une longueur d'onde donnée. Ne disposant pas de dérivé de la myricétine au laboratoire, les trois dérivés de la myricétine (**16**, **17** et **27**) ont été dosés en équivalent quercétine. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/g}$ d'extrait.

Les dérivés de la quercétine **20** et **22** ont des temps de rétention très proches et sont difficiles à doser dans les extraits faiblement concentrés. Leurs spectres de masse et UV sont identiques et seule la nature des sucres les différencient. De ce fait, leur teneur a été additionnée. Le cas est identique pour les dérivés du kaempférol **30** et **31**.

La quantification des composés phénoliques a été effectuée par étalonnage externe à deux longueurs d'onde selon le maximum d'absorption du type de composé à analyser. Les acides phénoliques et les flavonoïdes ont été analysés à 350 nm et les anthocyanes à 530 nm. Les anthocyanes ayant une polarité forte en comparaison aux deux autres types de composés, deux méthodes de séparation différentes ont été mises au point.

Les témoins commerciaux et les molécules isolées ont été analysés à des concentrations connues afin de quantifier les composés présents dans les extraits d'*Hydrangea*.

Tableau IV-9 : Calcul des coefficients pour le dosage des composés phénoliques détectés dans les inflorescences du genre *Hydrangea*

Composé	Tr en min	Masse mg	Volume ml	Masse molaire g/mol	Concentration en $\mu\text{mol/l}$	Volume injecté en μl	Quantité injectée en μmol	Aire	coefficient	quantité injectée recalculée	% d'erreur
Acide chlorogénique (8)	16.04	12.5	25	354	1412.4	5	0.00706	3128478	442992485	0.0068	3.4
		12.5	25	354	1412.4	10	0.01412	6520615	461659542	0.0142	0.7
		12.5	25	354	1412.4	15	0.02119	9883962	466523006	0.0216	1.8
		12.5	25	354	1412.4	20	0.02825	13072355	462761367	0.0285	0.9
Rutoside Quercétine-3-O-rutinoside (25)	30.54	2.6	10	610	426.2	5	0.00213	1751479	821847838	0.0020	7.5
		2.6	10	610	426.2	10	0.00426	3811085	894139173	0.0043	0.6
		2.6	10	610	426.2	15	0.00639	5870095	918143064	0.0066	3.3
		2.6	10	610	426.2	20	0.00852	7857055	921692990	0.0088	3.7
Lutéoline-7-O-glucoside (33)	34.78	0.8	9	448	198.4	50	0.00992	8698253	876783902	0.0106	6.8
		0.8	9	448	198.4	50	0.00992	8105193	817003454	0.0099	0.5
		0.8	9	448	198.4	50	0.00992	8105193	817003454	0.0099	0.5
		0.8	9	448	198.4	10	0.00198	1534874	773576496	0.0019	5.8
Naringin Naringénine-7-O-neohesperidoside (98)	38.68	1.8	3	580	1034.5	10	0.01034	1092570	105615100	0.0104	0.6
		1.8	3	580	1034.5	10	0.01034	1081405	104535817	0.0103	0.4
		1.8	3	580	1034.5	10	0.01034	1084071	104793530	0.0103	0.2
Kaempférol-3-O-glucoside (40)	38.83	3	10	448	669.6	5	0.00335	2517105	751775360	0.0032	4.1
		3	10	448	669.6	10	0.00670	5212017	778327872	0.0067	0.7
		3	10	448	669.6	15	0.01004	8028238	799255694	0.0102	-2.0
		3	10	448	669.6	20	0.01339	10778033	804759797	0.0138	-2.7
Apigénine-7-O-glucoside (44)	39.95	1.6	5	432	740.7	20	0.01481	19503345	1316475788	0.0145	2.1
		1.6	5	432	740.7	10	0.00741	9924755	1339841925	0.0074	0.4
		1.6	5	432	740.7	10	0.00741	10049787	1356721245	0.0075	0.9
		1.6	5	432	740.7	10	0.00741	10093517	1362624795	0.0075	1.3
		1.6	5	432	740.7	5	0.00370	5002582	1350697140	0.0037	0.4
Tricaffeoyl-spermidine (56)	46.52	4.7	25	631	297.9	50	0.01490	5503626	369445533	0.0145	2.6
		4.7	25	631	297.9	50	0.01490	5862171	393513819	0.0155	3.8
		4.7	25	631	297.9	50	0.01490	5918774	397313446	0.0156	4.8
		0.625	1	631	990.5	20	0.01981	7607966	384050124	0.0201	1.3
		0.625	1	631	990.5	10	0.00990	3730678	376649251	0.0098	0.7
		0.625	1	631	990.5	10	0.00990	3759266	379535495	0.0099	0.1
		0.625	1	631	990.5	10	0.00990	3797425	383388028	0.0100	1.1
		0.625	1	631	990.5	5	0.00495	1800782	363613901	0.0047	4.1
		0.625	1	631	990.5	5	0.00495	1852222	374000666	0.0049	1.4
		0.625	1	631	990.5	5	0.00495	1832529	370024256	0.0048	2.4

Pour l'analyse des acides cinnamiques et des flavonoïdes, les solutions ont été préparées dans du méthanol de qualité CLHP à des concentrations différentes et dans des volumes différents selon la quantité de produit disponible (Tableau IV-9). Pour l'analyse des deux anthocyanes, les solutions de ces témoins ont été préparées dans le méthanol acidifié à des concentrations de 1,3 mg/10 ml pour la cyanidine-3-*O*-rutinoside et 1,4 mg/10 ml pour la delphinidine-3-*O*-glucoside. Une solution contenant les deux témoins a été préparée de la manière suivante : 200 μ l de chaque solution mère ont été mélangés puis ont été ajoutés 200 μ l du système MeOH/H₂O (50:50) et 200 μ l d'acide HCl 0,5N. La dilution au quart ainsi réalisée a permis d'obtenir un échantillon de concentration de 0,0325 g/L pour la cyanidine-3-*O*-rutinoside et de 0,035 g/L pour la delphinidine-3-*O*-glucoside. De cette solution, 20 μ L ont été injectés en CLHP afin de déterminer le facteur de réponse des deux composés. Toutes les solutions ont été analysées de 3 à 10 fois et l'aire sous la courbe de chaque composé a été notée à 350 ou 530 nm. L'aire à une longueur d'onde donnée étant proportionnelle à la quantité injectée, on peut en déduire un coefficient (Tableau IV-9). Pour chaque produit, la moyenne des coefficients obtenus lors des différentes analyses a été calculée et elle sera utilisée pour la quantification des composés selon leur classe chimique (Tableau IV-7).

L'analyse de ces témoins nous a aussi permis de calculer un pourcentage d'erreur sur nos analyses. La moyenne des coefficients a été appliquée aux aires qui ont servi à le calculer, nous donnant la quantité injectée recalculée. Cette quantité a été comparée à la quantité réelle et il en résulte un pourcentage d'erreur pour chaque classe de molécule qui varie de 0,2 à 7,5% (Tableau IV-8). .

VII. *Analyses multivariées*

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLStat 2009 v3.02 (Addinsoft). Les analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées avec le mode de calculs Pearson (n). Pour les analyses factorielles discriminantes (AFD), les matrices de covariance ont été supposées égales et les probabilités *a priori* ont été prises en compte et ont donné un niveau de signification de 5%.

Bibliographie

Brasseur T. and Angenot L. (1986). "Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG 400. Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes." *Journal of chromatography* 351(2): 351-355.

Chandra A., Rana J. and Li Y. (2001). "Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC-MS." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8): 3515-3521.

Croes K., Steffens A., Marchand D. H. and Snyder L. R. (2005). "Relevance of $[\pi]$ - $[\pi]$ and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 1098(1-2): 123-130.

He X.-G. (2000). "On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques." *Journal of Chromatography A* 880(1-2): 203-232.

Marchand D. H., Croes K., Dolan J. W., Snyder L. R., Henry R. A., Kallury K. M. R., Waite S. and Carr P. W. (2005). "Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography: VIII. Phenylalkyl and fluoro-substituted columns." *Journal of Chromatography A* 1062(1): 65-78.

McClintock E. (1957). "A monograph of the genus *Hydrangea*." *Proceedings of the California Academy of Science* 29: 147-255.

Nielsen A., Olsen C. and Møller B. (2005). "Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoë blossfeldiana* varieties." *Phytochemistry* 66(24): 2829-2835.

Snyder L. R., Dolan J. W. and Carr P. W. (2004). "The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity." *Journal of Chromatography A* 1060(1-2): 77-116.

Annexes

Tables des annexes

Annexe 1 : Répartition géographique du genre <i>Hydrangea</i>	170
Annexe 2 : Clé de détermination du genre <i>Hydrangea</i> (McClintock 1957)	171
Annexe 3 : Chromatogrammes à 350 nm : sous-section <i>Asperae</i>	174
Annexe 4 : Chromatogrammes à 350 nm : <i>H. macrophylla</i>	176
Annexe 5 : Chromatogrammes à 350 nm : espèces à inflorescences blanches.....	177
Annexe 6 : Distribution des composés phénoliques des inflorescences du genre <i>Hydrangea</i> : pourcentages en dérivés d'acides cinnamique (bleu), flavonoïdes (vert) et dérivés de la spermidine (rouge).	180
Annexe 7 : Liste des accessions récoltées pour les espèces <i>H. aspera</i> et <i>H. involucrata</i>	181
Annexe 8 : Liste des accessions récoltées pour l'espèce <i>H. macrophylla</i>	182
Annexe 9 : Liste des accessions récoltées pour les espèces à inflorescences blanches	183
Annexe 10 : Liste des accessions récoltées en grosse quantité en vue de purification	184

Annexe 1 : Répartition géographique du genre *Hydrangea*

Cette présentation est la synthèse réalisée à partir des publications de (McClintock 1957; Leconte 1965; Ohwi 1965; Hotta and Shiuchi 1996).

Les espèces du genre *Hydrangea* sont originaires des continents asiatiques et américains. Elles se trouvent généralement en forêt, sur des reliefs variant de 0 à 4 000 m d'altitude.

La section *Hydrangea* regroupe 11 espèces, dont 9 sont originaires d'Asie et 2 d'Amérique du Nord. La section *Cornidia*, est principalement originaire des régions montagneuses d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale, à l'exception d'une espèce asiatique. Elle regroupe des plantes grimpantes à feuillage persistant.

REPARTITION DES ESPECES :

Section *Hydrangea* (11 espèces)

Asie (9 espèces)

- *H. sikokiana* Maximowicz : forêts des îles Honshu, Sikoku et Kyushu (Japon) jusqu'à 1 000 m d'altitude
- *H. involucrata* Siebold : forêts de l'île Honshu, Sikoku, Kyushu, et Ryu-Kyu (Japon) jusqu'à 1 500 m d'altitude
- *H. aspera* D. Don : forêts et bois (Est de l'Himalaya, Chine : de l'Est au centre Ouest, Taiwan, Sumatra, Java, Vietnam)
- *H. anomala* D. Don : Himalaya de l'Est jusqu'à la Chine centrale et de l'Ouest, Japon, Corée, Îles Sakhaline et Kouriles.
- *H. hirta* (Thun.) Sieb. : Japon, forêts de Honshu et de Sikoku.
- *H. scandens* (L.f.) Ser. : Ouest et Sud Ouest de la Chine, Taïwan, Philippines, Japon et îles Ryu-Kyu
- *H. paniculata* Sieb. : Sud Est de la Chine, îles Ryu-Kyu, îles Honshu et Hokkaido, Îles Sakhaline et Kouriles. (Japon)
- *H. heteromalla* D. Don : Chine (du centre Ouest au Nord Est) et Himalaya (Bhoutan, Népal, Tibet, Burma, Inde)
- *H. macrophylla* (Thun.) Ser. subsp. *macrophylla* : Japon
- *H. macrophylla* (Thun.) Ser. subsp. *serrata* : Japon, Corée
- *H. macrophylla* (Thun.) Ser. subsp. *stylosa* : nord Inde, Tibet, nord Vietnam, ouest Chine.
- *H. macrophylla* (Thun.) Ser. subsp. *chungii* : Chine

Amérique du Nord (2 espèces)

- *H. arborescens* L. : Est des Etats-Unis (de la contrée Sud de New York au Sud des Appalaches)
- *H. quercifolia* Bartram : Sud Est des Etats-Unis

Section *Cornidia* (12 espèces)

Asie (1 espèce)

- *H. integrifolia* Hayata : Taïwan et Philippines

Amérique du Sud (11 espèces)

- *H. seemanii* Riley : Mexique : Sierra Madre occidentale
- *H. asterolasia* Diels. : montagnes du centre du Costa Rica, Panama
- *H. oerstедii* Briquet : montagnes du centre du Costa Rica, Panama, Andes (Colombie, Equateur, et Pérou)
- *H. peruviana* Moricand : montagnes du centre du Costa Rica, Panama, Andes (Colombie, Equateur, et Pérou)
- *H. diplostenona* (Donnel Smith) Standley : montagnes du centre du Costa Rica et Nord des Andes
- *H. preslii* Briquet : montagnes du centre du Costa Rica, Panama, Andes (Colombie, Equateur, et Pérou)
- *H. steyermarkii* Standley : centre du Guatemala
- *H. serratifolia* (Hooker et Arnott) Philippi f. : Chili
- *H. tarapotensis* Briquet : Pérou
- *H. jelskii* Szyzslowicz : Andes du Sud de l'Equateur et Nord du Pérou
- *H. mathewsii* Briquet : Andes et Nord du Pérou

Annexe 2 : Clé de détermination du genre *Hydrangea* (McClintock 1957)

1.a. Plante à feuilles caduques, à port érigé ou grimpant, à inflorescence en bouton non enveloppée par de grandes bractées florales ovales (à l'exception de *H. involucrata*)

SECTION *HYDRANGEA*

2.a. Ovaire infère pendant l'anthèse et sur le fruit, capsules tronquées à l'apex, styles séparés à leur base

3.a. Graines entourées d'une aile ronde, pétales tombant ensemble comme un capuchon ou *calyptra*, plantes grimpantes s'accrochant par des racines adventives

Sous-section *Calyptranthe*

H. anomala

3.b. Graines sans ailes rondes, pétales tombant séparément, plantes à port érigé

4.a. Graines munies d'un appendice (plantes de Chine et du Japon)

Sous-section *Asperae*

5.a. Feuilles pennatilobées

H. sikokiana

5.b. Feuilles non lobées

6.a. Bractées largement ovales ou arrondies, peu nombreuses, enveloppant l'inflorescence non ouverte et laissant des cicatrices visibles après leur chute, capsules pubescentes

H. involucrata

6.b. Bractées lancéolées, nombreuses dans toute l'inflorescence, couvrant sans envelopper complètement l'inflorescence non ouverte, capsules glabres

H. aspera

4.b. Graines sans appendice (plantes du Sud Est des Etats-Unis)

Sous-section *Americanae*

7.a. Inflorescence plate, feuilles non lobées

H. arborescens

7.b. Inflorescence pyramidale, feuilles pennatilobées

H. quercifolia

2.b. Ovaire semi-supère pendant l'anthèse et sur le fruit, capsules coniques à leur apex

8.a. Graines munies d'un appendice, pétales tronqués à leur base ; sur le fruit, style plus court que le disque conique de la capsule

Sous-section *Heteromallae*

9.a. Inflorescence pyramidale, lobes du calice de 0,5 à 1 mm de long

H. paniculata

9.b. Inflorescence plate, lobes du calice de 0,8 à 3 mm de long

H. heteromalla

8.b. Graines sans appendice, sur le fruit style plus long que le disque conique de la capsule, pétales à base cunéiforme

Sous-section *Petalanthe*

10.a. Inflorescences composées uniquement de fleurs fertiles, étamines deux à trois fois plus longues que les styles, feuilles profondément dentées (dents de 3 à 8 mm)

H. hirta

10.b. Inflorescences composées de fleurs fertiles et stériles, étamines de même longueur que les styles ou au plus deux fois plus longs, feuilles à bord entier ou denté (dents < 3 mm)
H. scandens

2.c. Ovaire infère pendant l'anthèse devenant semi-supère sur le fruit, capsules coniques à leur apex
Sous-section *Macrophyllae*
H. macrophylla

1.b. Plantes à feuilles persistantes, arbustes ou lianes s'accrochant par des racines adventives, feuilles coriaces, bractées florales largement ovales, peu nombreuses, enveloppant l'inflorescence en bouton, laissant des cicatrices visibles à leur chute (plantes originaires du Mexique, d'Amérique Centrale et du Sud et une espèce des Philippines et de Taiwan)

SECTION *CORNIDIA*

11.a. Inflorescence terminale, composée d'une seule ombelle principale, plate ou arrondie, fleurs roses ou blanches, avec ou sans fleurs stériles
Sous-section *Monosegia*

12.a. 4 ou 5 sépales et pétales

13.a. Feuilles ovales, plus larges en leur milieu, présence de fleurs stériles, lobes des calices largement triangulaires de moins de 0,5 mm de long

14.a. Ramifications des inflorescences glabres (plantes originaires du Sierra Madre Occidental dans l'état de Durango, Mexique)
H. seemanii

14.b. Ramifications de l'inflorescence pubescentes avec des poils étoilés issus de courtes papilles épidermiques (plantes originaires de Taïwan et des Philippines)
H. integrifolia

13.b. Feuilles obovales, plus larges au dessus du milieu, pas de fleurs stériles, lobes du calice triangulaires à semi-orbiculaires, de 1 à 2 mm de long (plantes du Guatemala)
H. steyermarkii

12.b. 4 sépales, 4 pétales (plantes originaires d'Amérique centrale et du Sud, de la côte Sud du Costa Rica jusqu'aux Andes)

15.a. Fleurs blanches, feuilles généralement de 5 à 14 cm de long et de 3 à 5,5 cm de large. Jeunes rameaux, inflorescence et surfaces inférieures des feuilles couverts d'un tomentum rouille formé de poils étoilés qui peuvent être partiellement caduques avec l'âge
H. asterolasia

15.b. Fleurs roses. Feuilles généralement de 10 à 25 cm de long et 4 à 15 cm de large. Jeunes rameaux et inflorescences pubescents avec poils simples ou étoilés de 0,1 à 0,5 mm de long

16.a. Généralement 3 styles, pas de fleurs stériles
H. preslii

16.b. Généralement 2 styles, souvent des fleurs stériles

17.a. Pendant l'anthèse, styles longs de 0.3 à 1 mm et sans papilles stigmatiques apparentes, étamines de 2 à 4,5 mm de
H. oerstedii

17.b. Pendant l'anthèse, styles de 1 à 2 mm de long et avec des papilles stigmatiques apparentes, étamines de 0,4 à 3 mm de long

18.a. Etamines de 0,4 à 1,6 mm de long, plus courtes ou rarement aussi longues que les styles, styles toujours séparés

H. peruviana

18.b. Etamines de 1,5 à 3 mm de long, plus longues que les styles. Styles généralement collés dans le bouton floral et au début de l'anthèse, se séparant plus tard

H. diplostenona

11.b. Inflorescences composées de plusieurs ombelles principales disposées en grappes, fleurs blanches, jamais de fleurs stériles (plantes des Andes d'Amérique du Sud)

Sous-section *Polysegia*

19.a. Styles collés dans le bouton et occasionnellement pendant l'anthèse

H. tarapotensis

19.b. Styles toujours libres entre eux

20.a. Etamines de 1 à 1,5 mm de long, jamais plus longues qu'une à une fois et demi la longueur des styles

H. jelskii

20.b. Etamines de 3 à 7 mm de long, trois à six fois plus longues que les styles

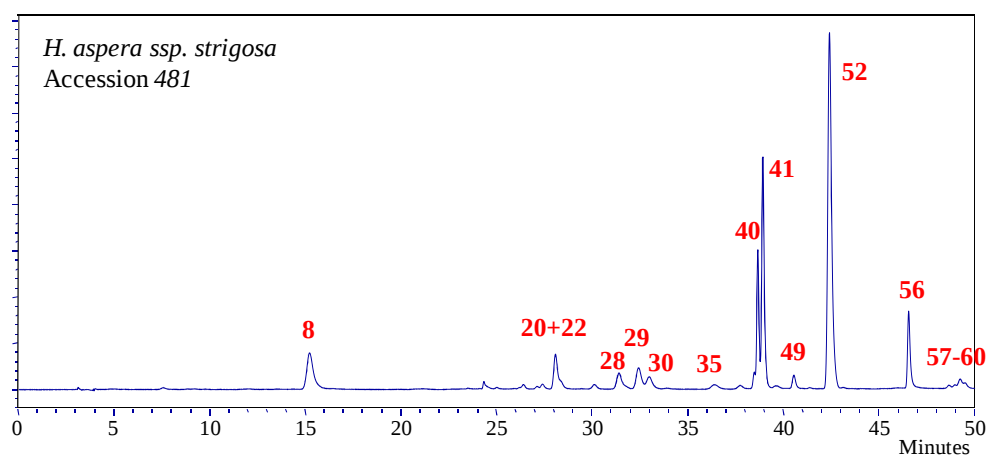
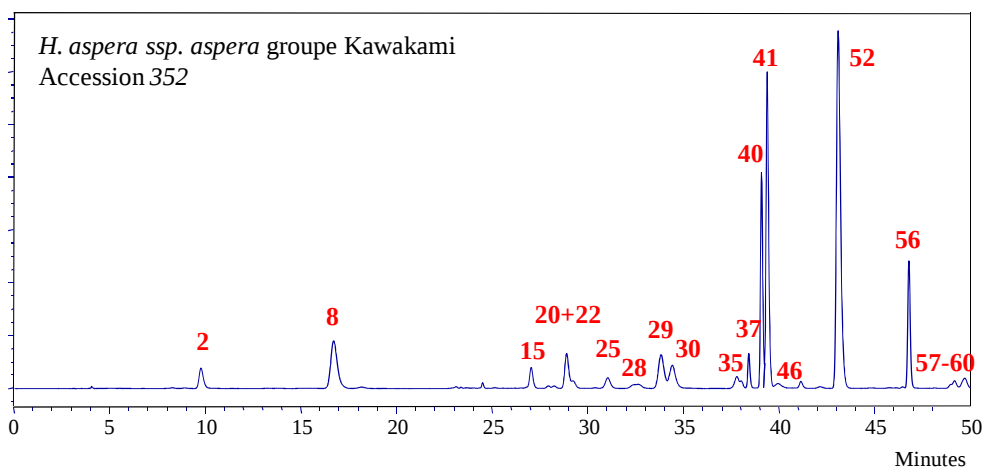
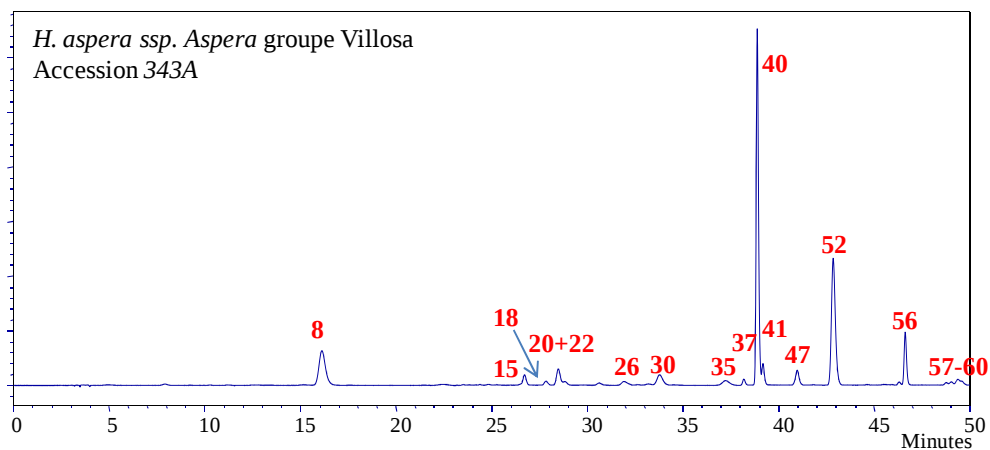
21.a. Inflorescences et face inférieure des feuilles à pubescence dense rouille formée de poils étoilés (plantes originaires du Nord du Pérou)

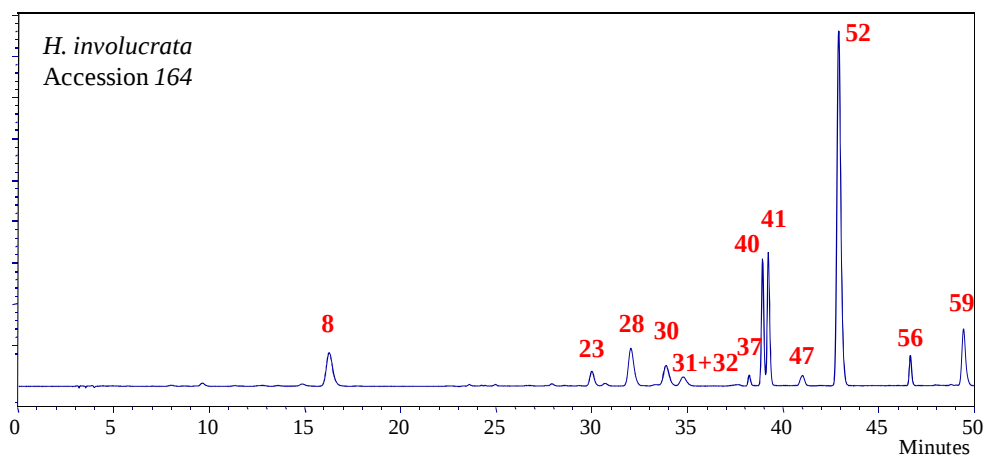
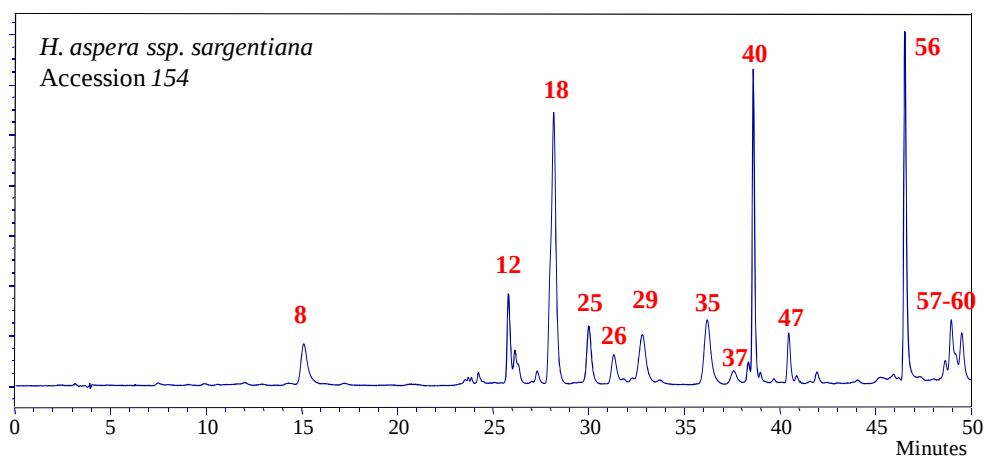
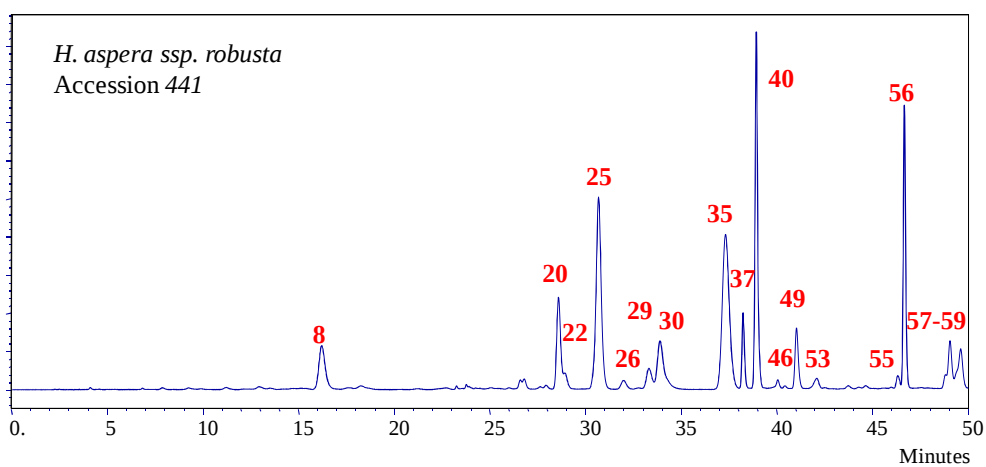
H. mathewsii

21.b. Inflorescence et face inférieure des feuilles glabres ou légèrement pubescente avec des poils simples ou étoilés (plantes originaires du Chili central et de l'Argentine adjacente)

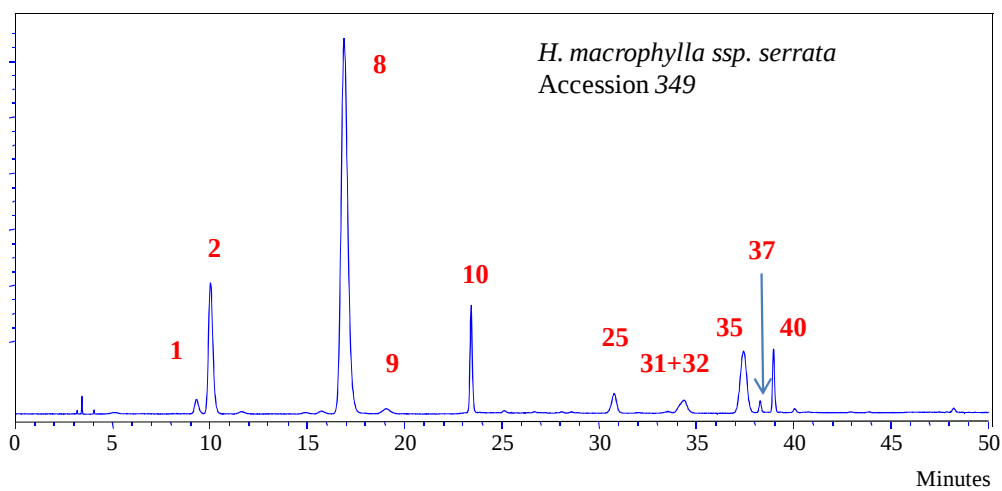
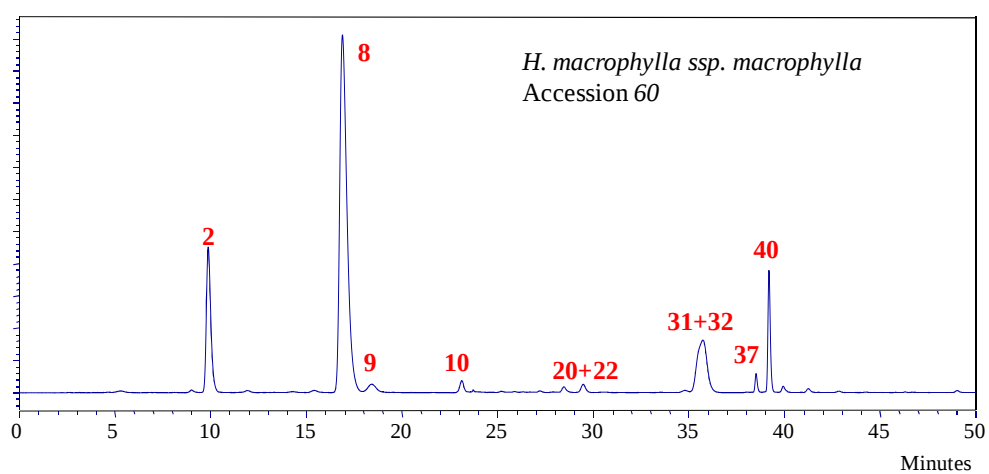
H. serratifolia

Annexe 3 : Chromatogrammes à 350 nm : sous-section *Asperae*

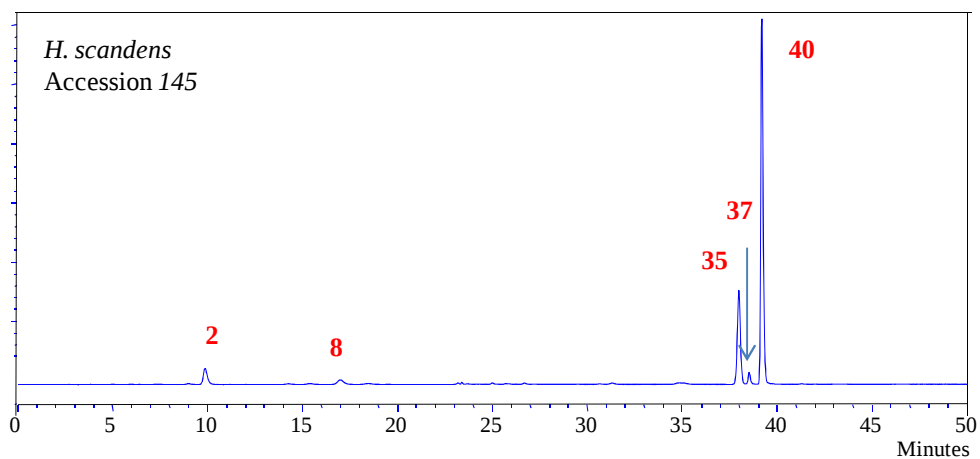
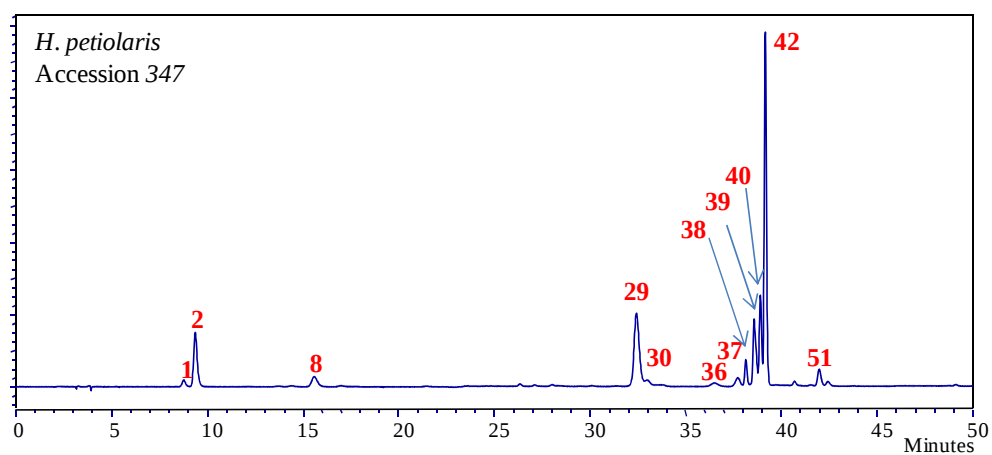
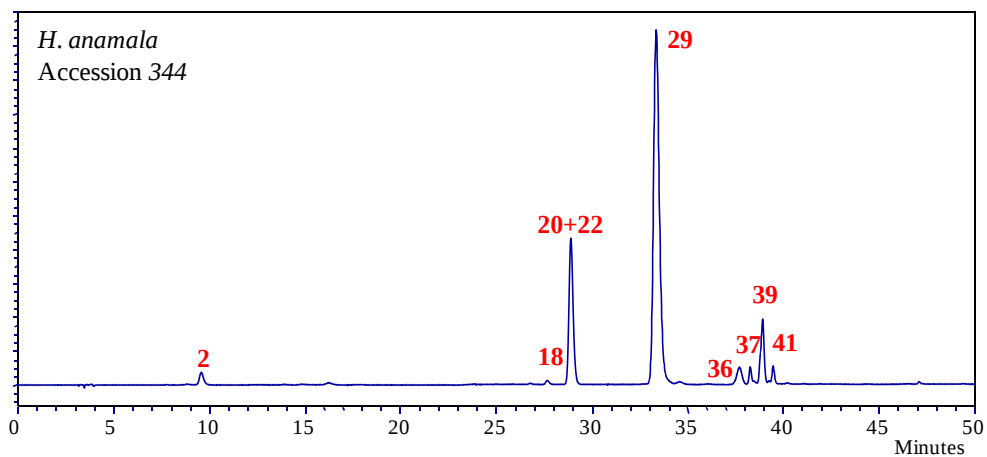


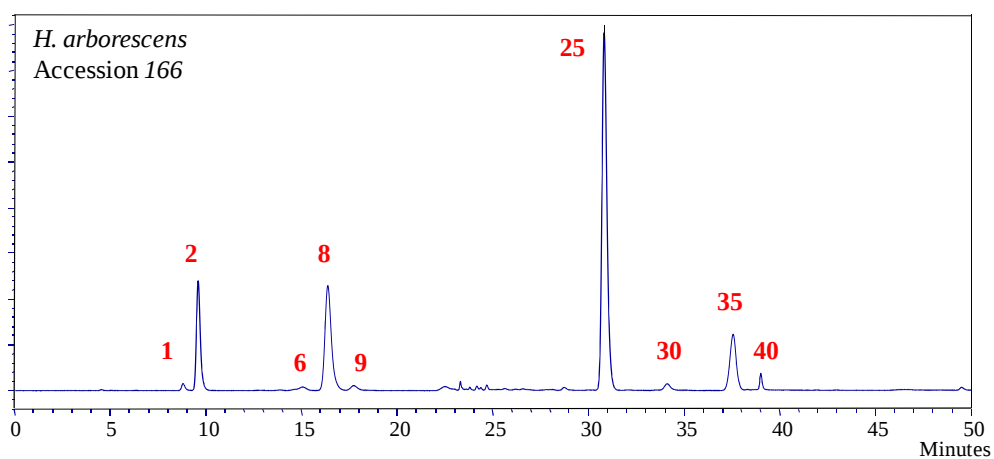
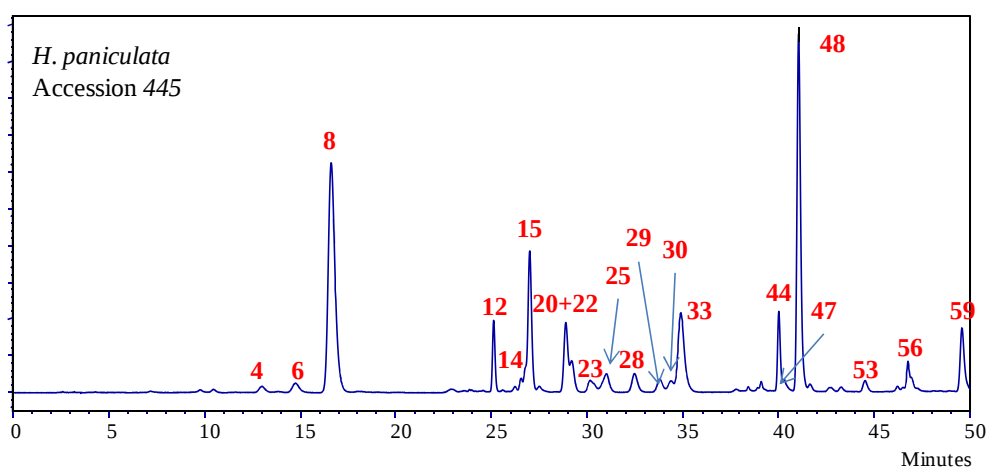
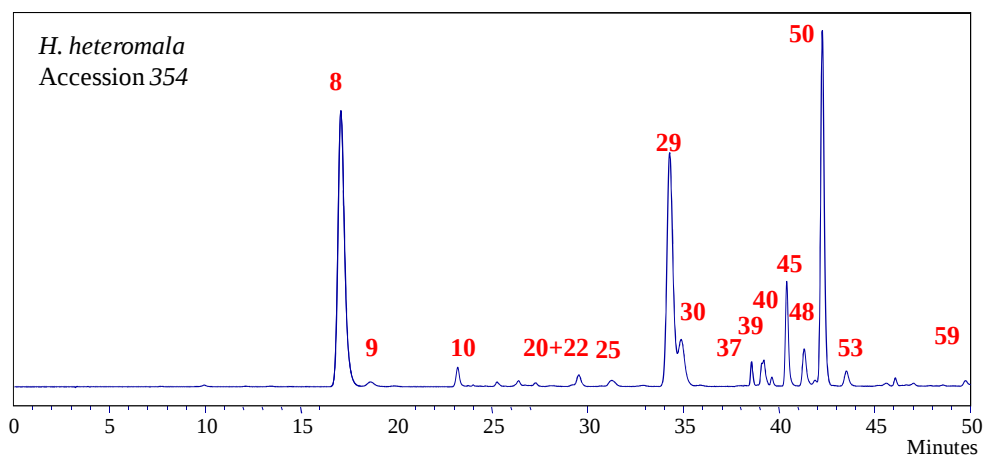


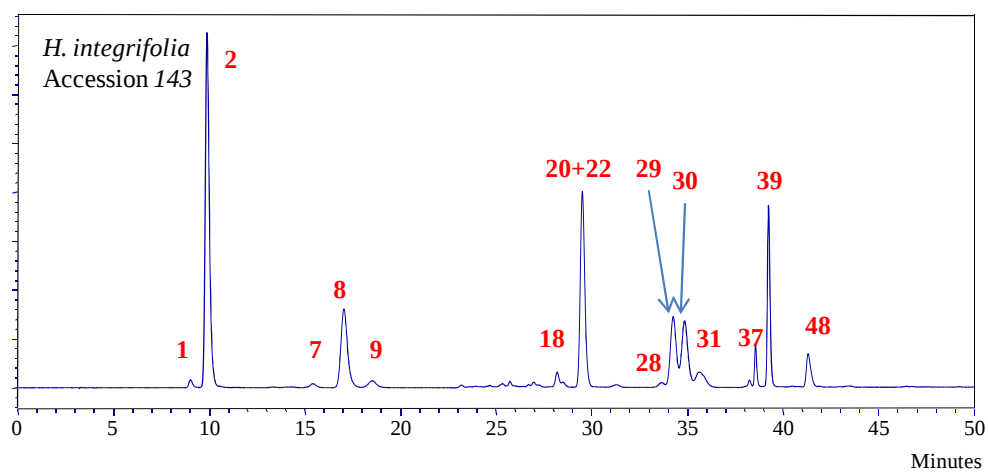
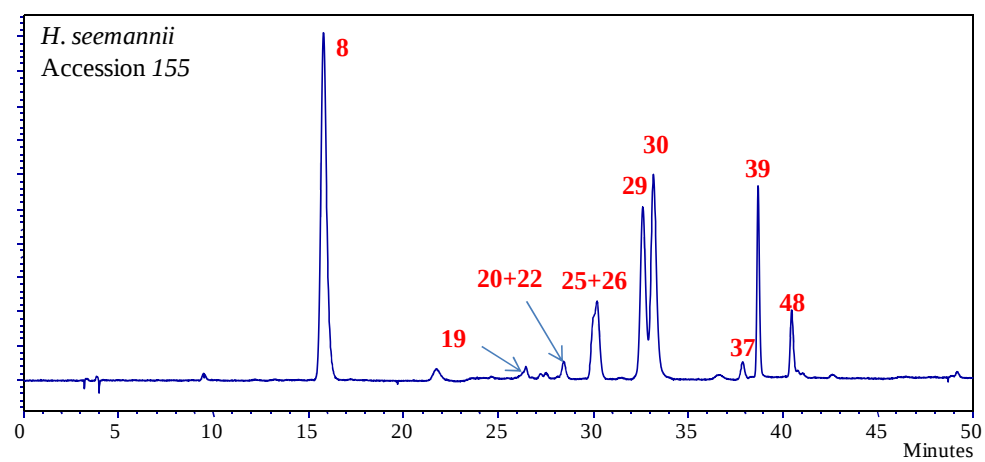
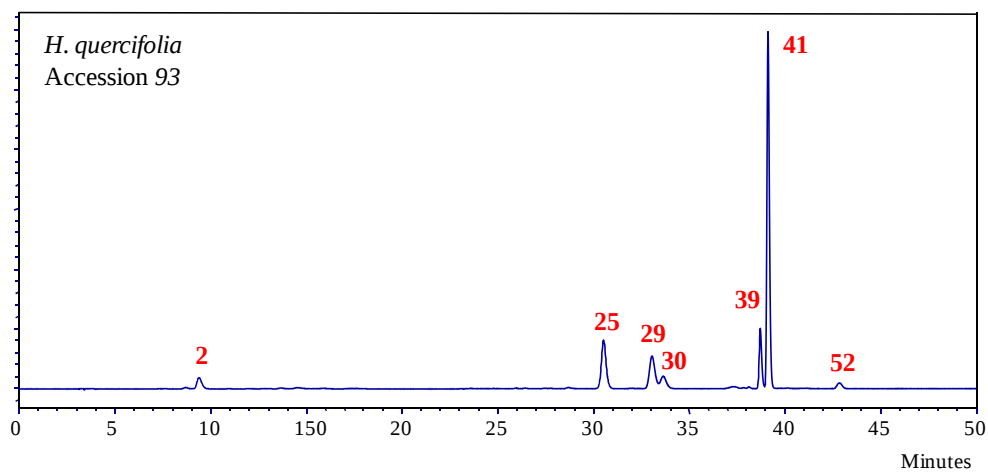
Annexe 4 : Chromatogrammes à 350 nm : *H. macrophylla*

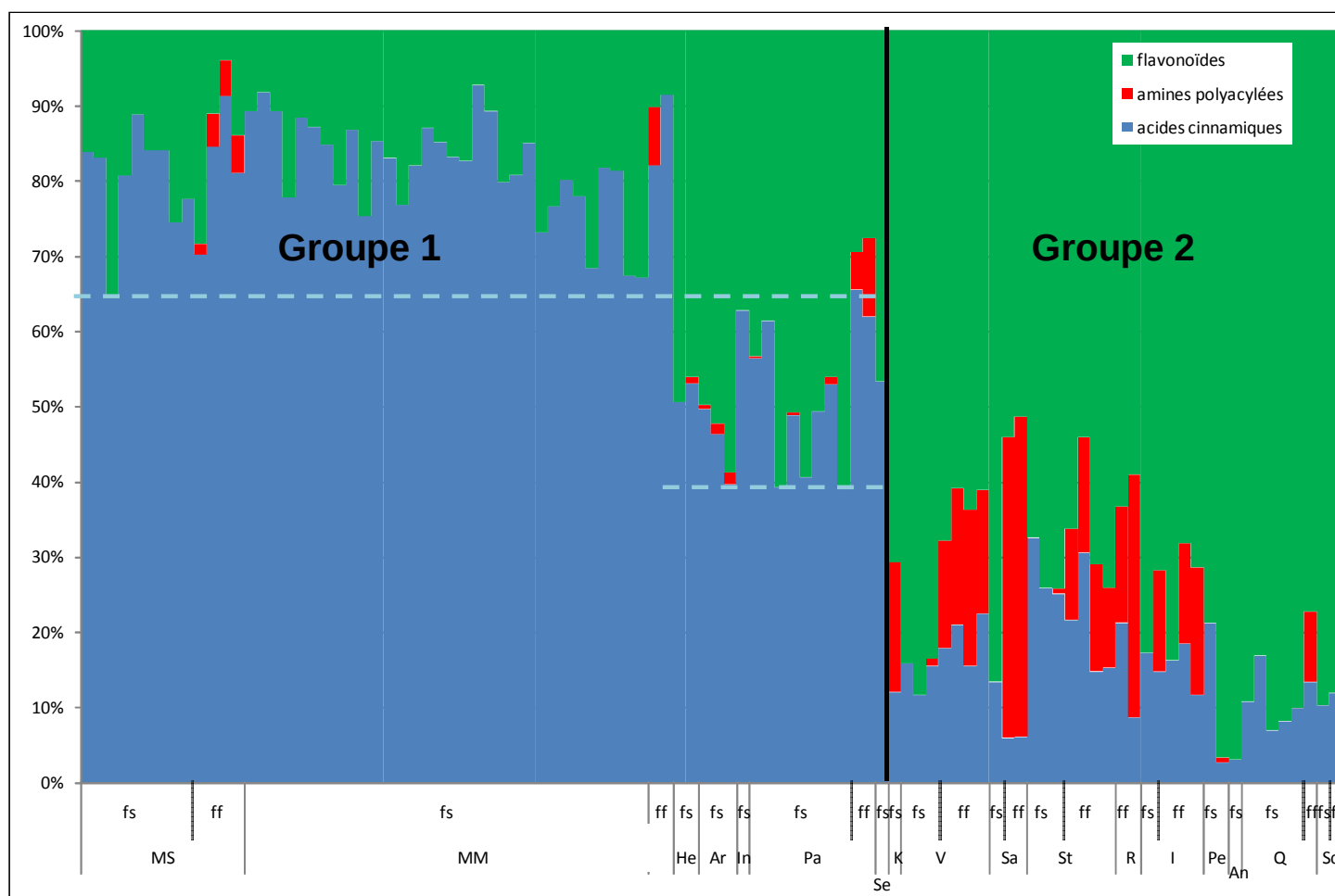


Annexe 5 : Chromatogrammes à 350 nm : espèces à inflorescences blanches









Annexe 6 : Distribution des composés phénoliques des inflorescences du genre *Hydrangea*: pourcentages en dérivés d'acides cinnamique (bleu), flavonoïdes (vert) et dérivés de la spermidine (rouge).

An, *H. anomala* ssp. *anomala*; Pe, *H. anomala* ssp. *petiolaris*; Ar, *H. arborescens*; K, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Kawakami; V, *H. aspera* ssp. *aspera* groupe Villosa; R, *H. aspera* ssp. *robusta*; Sa, *H. aspera* ssp. *sargentiana*; St, *H. aspera* ssp. *strigosa*; He, *H. heteromalla*; In, *H. integrifolia*; I, *H. involucrata*; MM, *H. macrophylla* ssp. *macrophylla*; MS, *H. macrophylla* ssp. *serrata*; Pa, *H. paniculata*; Q, *H. quercifolia*; Sc, *H. scandens*; Se, *H. seemannii*.

Annexe 7 : Liste des accessions récoltées pour les espèces *H. aspera* et *H. involucrata*

Espèce	Sous-espèce/ groupe	Numéro accession	ff/fs	Volume solvant en mL	Masse résidu sec en g	Volume extrait en mL	Concentratio n massique en mg/mL	Masse de l'extrait total en g
<i>H. aspera</i>	<i>robusta</i>	396	ff	650	11.78	100	48.17	4.82
		441	ff	650	11.19	100	38.45	3.85
	<i>sargentiana</i>	154	ff	600	6.26	50	35.03	1.75
		154	fs	340	0.54	50	4.43	0.22
		188	ff	600	10.587	100	27.90	2.79
	<i>strigosa</i>	463	ff	600	4.62	50	31.23	1.56
		483	ff	350	4.80	50	23.17	1.16
		483	fs	350	1.55	50	23.00	1.15
		413	ff	4000	38.36	250	83.27	20.82
		413	fs	320	0.67	50	9.60	0.48
		481	ff	550	8.89	50	28.40	1.42
		481	fs	750	2.20	50	44.73	2.24
	<i>aspera / Villosa</i>	343A	ff	550	2.78	50	17.65	0.88
		343A	fs	500	0.99	50	5.57	0.28
		343	ff	4800	38.50	400	37.23	14.89
		371	ff	900	14.34	200	21.87	4.37
		371	fs	250	0.89	50	10.37	0.52
		613	ff	650	6.13	100	22.83	2.28
		613	fs	450	1.40	50	19.20	0.96
	<i>aspera / Kawakami</i>	352	ff	600	4.06	100	23.60	2.36
<i>H. involucrata</i>		164	ff	330	3.22	100	15.63	1.56
		355	ff	650	4.69	50	29.47	1.47
		372	fs	650	5.38	100	31.85	3.18
		418	fs	290	0.49	50	7.87	0.39
		419*	ff				25.3	
		419*	fs				13.5	
		485	fs	500	2.01	50	17.10	0.85
		623	ff	230	2.45	100	17.70	1.77

*extraits réalisés au Laboratoire de Phytochimie et Valorisation Industrielle, Université Claude-Bernard-Lyon 1

Marqueurs phénotypiques de la diversité des ressources génétiques du genre *Hydrangea*

La valorisation paysagère et horticole des espèces du genre *Hydrangea* est basée sur l'exploitation de leur diversité phénotypique s'exprimant notamment dans les formes architecturales et les coloris. La collection de ressources génétiques, située à Angers, comprend treize espèces introduites en Europe à partir du 18^{ème} siècle. L'analyse de la composition chimique des inflorescences, réalisée pour la première fois sur l'ensemble du genre, permettra de compléter la caractérisation génétique des espèces et des clones. L'objectif de cette étude était ainsi d'analyser les profils phénoliques d'un ensemble de clones ainsi que la diversité intra et interspécifique existant dans la collection. La caractérisation structurale et la quantification de 80 composés phénoliques présents dans les inflorescences de 99 génotypes répartis dans 11 espèces du genre *Hydrangea* ont été réalisées. Ces composés se répartissent parmi 4 grandes classes chimiques : les flavonoïdes, les anthocyanes, les acides cinnamiques et les amines polyacylées. Une diversité importante existe entre les profils aussi bien des espèces que des sous-espèces. La structuration de cette diversité inter et intraspécifique est analysée. Ces connaissances nouvelles devraient permettre d'orienter les stratégies de conservation et de sélection.

Mots clés : *Hydrangea*, flavonoïdes, acides cinnamiques, ressources génétiques

Phenotypic markers of genetic diversity in the genus *Hydrangea*

The development of landscaping and horticultural species of the genus *Hydrangea* is based on the exploitation of their phenotypic diversity, particularly associated with architectural forms and colours. The collection of genetic resources, located in Angers (France) is composed of 13 species which were introduced in Europe in the 18th century. The phytochemical analysis of inflorescences, for the first time studied on the whole genus, should allow to complete the genetic characterization of species and clones. Therefore, the objective of this work was to analyze the phenolic profiles in a set of clones in order to evaluate the intra and interspecific diversities exhibited in the collection. The structural characterization and the quantification of 80 phenolic compounds, present in the inflorescences of 99 genotypes in 11 species of *Hydrangea* were performed. These compounds are divided into four major chemical classes: flavonoids, anthocyanins, cinnamic acids and polyacylated amines. A large diversity exists between the profiles of both species and subspecies. The inter and intraspecific diversity structure is analyzed. This new knowledge should allow to elaborate suitable strategies of conservation and selection.

Keyword: *Hydrangea*, flavonoids, cinnamic acids, genetic resources