



HAL
open science

Contribution à l'étude de la flore Tunisienne et recherche d'inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase

Rym Attia

► **To cite this version:**

Rym Attia. Contribution à l'étude de la flore Tunisienne et recherche d'inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase. Pharmacologie. Université Bourgogne Franche-Comté; Université de Carthage (Tunisie), 2020. Français. NNT : 2020UBFCE019 . tel-03353890

HAL Id: tel-03353890

<https://theses.hal.science/tel-03353890>

Submitted on 24 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE SCIENCES DE LA SANTE**

Ecole doctorale n°554

Ecole Doctorale Environnement-Santé

Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Madame ATTIA Rym

Contribution à l'étude de la flore Tunisienne et recherche d'inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 14 décembre 2020

Composition du Jury :

Monsieur, FREDERICH, Michel	PU, Université de Liège	Président du jury et rapporteur
Monsieur, ABIDI, Ferid	MCU-HDR, Université de Carthage	Rapporteur
Madame, DERBRÉ, Séverine	MCU-HDR, Université d'Angers	Examinatrice
Madame, ZAOUALI, Yosr	MCU-HDR, Université de Carthage	Examinatrice
Madame, GIRARD, Corine	PU, Université de Bourgogne Franche-Comté	Directrice de thèse
Monsieur, MESSAOUD, Chokri	PU, Université de Carthage	Directeur de thèse

Dédicaces

Je dédie cette thèse

À mes très chers parents *Salah* et *Ibtissem*

Dont le mérite, les sacrifices, les qualités humaines m'ont permis de vivre ce jour.
Les mots me manquent pour vous exprimer ma reconnaissance, ma fierté et mon amour.
Que vous trouviez ici le témoignage de mon attachement, gratitude et respect.

À mes deux frères *Skander* et *Moataz*

Je vous remercie pour le soutien moral et l'encouragement que vous m'avez accordé.
J'espère avoir atteint le seuil de vos espérances.
Que ce travail soit l'expression de ma profonde affection.
Je vous souhaite un brillant avenir.

À *Yann*

Qui a su m'apporter aide et soutien aux moments propices. Qui a été toujours à mes côtés.
Tous mes sentiments de reconnaissance pour toi !

À mes cousins *Khalil* et *Jasser*

À la mémoire de ma tante *Intidhar*

À la mémoire de mes grands-parents *Khalifa* et *Ghalia*

À toute la famille *ATTIA* et *LENGLIZ*

À ma *Nina* d'amour

« S'armer de patience, combien l'expression est juste ! La patience est effectivement une arme, et qui s'en munit, rien ne saurait l'abattre. Sans elle, on est automatiquement livré au caprice ou au désespoir ».

Emil Michel Cioran

بقدر الكد تكتسب المعالي *** ومن طلب العلا سهر الليالي
ومن رام العلا من غير كد *** اضاع العمر في طلب المحال
تروم العز ثم تنام ليلا *** يغوص البحر من طلب اللآلي
محمد بن إدريس الشافعي

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à l'assistance de nombreuses personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à ma directrice de thèse, le Professeur **Corine GIRARD** pour sa gentillesse, son sourire indélébile et ses précieux conseils. Je la remercie chaleureusement pour m'avoir toujours permis de réaliser mes travaux dans les meilleures conditions, depuis mon premier stage en 2015 jusqu'à ma dernière année de thèse. Je lui suis également très reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner la pharmacognosie au sein de l'université de Franche Comté.*

*Je remercie très cordialement mon directeur de thèse, le Professeur **Chokri MESSAOUD** pour sa bienveillance, son dynamisme et sa rigueur pour la recherche de plantes médicinales qui ont permis de mener à bien ce projet. Merci pour tout le savoir théorique et pratique que vous m'avez transmis durant mes cinq années de cycle ingénieur à l'INSAT.*

*Au Professeur **Michel FREDERICH**, je vous exprime ma reconnaissance d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant que rapporteur malgré vos impératifs et le temps imparti.*

*Au docteur **Ferid ABIDI**, je vous témoigne toute ma gratitude pour votre soutien, pour avoir cru en moi et m'avoir soutenue durant mes années d'études. J'espère avoir été digne de la confiance que vous m'avez accordée. Merci d'avoir aussi accepté d'être rapporteur de cette thèse.*

*Je souhaite particulièrement remercier, le docteur **Séverine DERBRE**, qui m'a accueillie au sein de L'EA 921 "Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux" (SONAS). Durant trois mois de stage, elle a supervisé mes travaux au jour le jour, elle était toujours réactive à mes questions et m'a prodiguée de précieux conseils. Ce stage fut l'occasion d'approfondir mes compétences dans le domaine des produits naturels. Merci également d'avoir montré de l'intérêt à mes travaux en acceptant de faire partie de mon jury de soutenance de thèse.*

*Au Docteur **Yosr ZAOUALI**, merci de votre disponibilité, d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit et pour l'intérêt que vous avez porté à son contenu.*

Une mention spéciale au Professeur **Céline DEMOUGEOT**, directrice de l'EA 4267 « Pathologies et épithéliums : prévention, innovation, traitements, évaluation » (PEPITE) de m'avoir acceptée et bien accueillie au sein de l'équipe. Merci pour sa sérénité, ses précieux conseils et pour l'ambiance excellente et animée qui règne au bâtiment Socrate.

Je tiens à exprimer, particulièrement, ma profonde gratitude au Professeur **Pascal RICHOMME**, directeur de L'EA 921 "SONAS" (SONAS) d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son équipe et de m'avoir permis de bénéficier de ses grandes compétences en RMN pendant mon Master 2 «Sciences du médicament » à Angers.

Je témoigne toute ma gratitude à mon comité de suivi scientifique de la thèse, le professeur **Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA** et le professeur **Pierre CHAMPY** pour leurs recommandations pertinentes et constructives et pour leur évaluation soigneuse de mes travaux.

Je ne saurais également remercier assez **Andy ZEDET**, pour ses remarques constructives, pour sa gentillesse, son dynamisme, son implication, son soutien et sa complicité durant nos activités communes en recherche et en enseignement.

Je tiens, par ailleurs, à adresser mes plus vifs remerciements au docteur **Marc PUDLO**, pour tous les sujets de discussions intéressants qu'on a pu aborder ensemble, pour ses encouragements chaleureux, sa bonne humeur et d'avoir toujours été prêt à se mobiliser pour m'apporter conseil.

Je tiens à exprimer ma gratitude au professeur **Samir HAMZA**, directeur de l'INSAT, pour son appui et sa bonne humeur, j'espère que ce travail sera à la hauteur de ses espérances.

J'ai également une pensée pour tous mes collègues enseignants-chercheurs de l'UFR Santé de Besançon, **Arnaud BEDUNEAU, Frederic MUYARD, Perle TOTOSON, Sylvie DEVAUX, Hélène MARTIN, Johnny MORETTO, Lhassane ISMAILI...**

J'adresse mes remerciements à tout le personnel technique que j'ai côtoyé tout au long de ma thèse en particulier **Lydie** pour sa gentillesse, **Vincent** pour sa joie de vivre, **Alexandre** pour son aide pendant les séances de travaux pratiques et **Maude** pour avoir régulièrement égayé l'ambiance dans le laboratoire et pour avoir organisé d'agréables moments de convivialité.

J'adresse mes plus sincères remerciements aussi à mes anciens enseignants de l'INSAT qui demandent toujours de mes nouvelles, le docteur **Inès BEN REJEB** et le docteur **Saïd GALAI**.

*Un grand merci au professeur **Naceur Saber**, directeur de l'école doctorale à l'INSAT pour sa diligence et sa bienveillance.*

*J'aimerais de même remercier le docteur **Mona ABDELMOTTALEB** pour sa gentillesse et son amabilité mais aussi pour ses relectures soigneuses.*

*Je n'oublie pas de remercier le docteur **GARNIER Delphine** et le docteur **Ingrid FREUZE** pour la réalisation des analyses en LC/MS.*

*À Madame **Stéphanie BOULLANGER**, pour ses compétences pour la réalisation des analyses en RMN.*

*À Madame **Martine GAUTHERON**, secrétaire de l'école doctorale Environnements-Santé à l'Université de Franche-Comté, qui m'a accompagnée dans toutes les démarches administratives durant ma thèse.*

*Aux stagiaires que j'ai co-encadrés et qui ont participé à l'avancement de mes projets en particulier **Marie-Lou, Eva, Flavie, Gastella et Eya**, je vous souhaite bonne continuation.*

A tous mes collègues bénévoles de l'association Petits Frères des Pauvres à Besançon. Merci pour cette belle expérience.

*A vous tous un grand merci : **Cyrine, Faten, Vincent, Marion** et sa petite **Adèle, Omar, Othman, Dany, Danielle** et **Farah**.*

*À tous les doctorants avec qui j'ai passé d'agréables moments : **Raphael** le plus gentil, **Romain** le prince amusant, **Jason** le plus organisé, **Thomas** qui prend soin de mon régime alimentaire, **Alvaro** le bienveillant et **Mert** l'attentionné.*

*Je ne peux oublier ma jolie **Claire** qui m'a grandement soutenue et encouragée. Merci pour tes petites attentions et pour nos discussions nocturnes interminables.*

Productions scientifiques

Publications à comité de lecture international

- R. Attia, C. Messaoud, K. Arraki, A. Zedet, C. Demougeot, M. Boussaïd, C. Girard. Phytochemical screening and arginase inhibitory activity of extracts from several Tunisian medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.*, 2019, 313-318.
- R. Attia, A. Zedet, M. Bourjot, E. Skhiri, C. Messaoud, C. Girard, Thin-layer chromatography-bioautographic method for the detection of arginase inhibitors. *J Sep Sci.*, 2020,1-10.
- K. Arraki, P. Totoson, R. Attia, A. Zedet, M. Pudlo, C. Messaoud, C. Demougeot, Corine Girard, Arginase inhibitory properties of flavonoid compounds from the leaves of Mulberry (*Morus alba*, Moraceae). *J Pharm Pharmacol.*, 2020, 1269-1277.

Communications

Orales

- Thin-layer chromatography-bioautographic method for the detection of arginase inhibitors in medicinal plants, 21st international conference on Pharmacognosy, Phytochemistry and Natural Products (ICPPNP 2019), 2019, London, UK.
- Phytochemical approach for identification of arginase inhibitors from medicinal Tunisian plants, 30th International Congress of Biological Sciences and Biotechnologies, 2019, Sousse, Tunisia.
- Drug discovery strategies based on traditional medicine and natural products, Forum des jeunes chercheurs, 2018, Besançon, France.

Flash posters

- HPTLC-bioautographic assay for the detection of arginase inhibitors in plants, 3rd International Symposium AFERP-STOLON, 2018, Rennes, France.
- Bioassay-guided fractionation of *Retama raetam* stem extracts with arginase inhibitory activity, The 5th AFERP International Conference, 2017, Angers, France.

Posters

- Screening of plants used in Tunisian folk medicine for inhibition of arginase activity, ICSN-UPSACLAY Natural Products Symposium (15th ICSN Symposium), 2017, Paris, France.
- *In vitro* arginase inhibitory effect of two Tunisian *Artemisia* species, 9th Joint Natural Products Conference, 2016, Copenhagen, Denmark.
- Optimization of a colorimetric assay for high throughput screening of natural arginase inhibitors, 2nd International Symposium AFERP– STOLON, 2015, Lyon, France.

Table des matières

Table des matières	I
Liste des abréviations	III
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	XIII
Liste des annexes	XV
Introduction générale	1
Partie I : Travaux antérieurs et Contexte de l'étude	5
Chapitre 1 : L'arginase : Rôles et implication dans diverses pathologies	7
1. Introduction.....	9
2. Distribution, structure et mécanisme de la réaction catalysée par l'arginase	9
3. Rôle de l'arginase : Voie arginase-ornithine.....	17
4. Compétition entre l'arginase et la NOS sur la L-arginine	19
5. Implication de l'Arginase dans les maladies cardiovasculaires	24
6. Implication de l'arginase dans les maladies rénales.....	32
7. Implication de l'arginase dans le cancer.....	33
8. Implication de l'arginase dans les maladies neurovasculaires	37
9. Implication de l'arginase dans les maladies infectieuses	43
10. Conclusion	44
Chapitre 2 : Inhibition de l'arginase	45
1. Premiers acides α -aminés inhibiteurs de l'arginase	47
2. Pharmacomodulation à partir de la L-arginine.....	49
3. Modification de la chaîne latérale de l'acide α -aminé	53
4. Produits divers.....	60
5. Substances actives disponibles sur le marché	62
6. Extraits de plantes et molécules isolées.....	63
7. Tests connus pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'arginase.....	86
8. Conclusion	93
Chapitre 3 : Stratégies de découverte de nouveaux composés actifs à partir de plantes	95
1. Sélection des espèces végétales candidates pour le criblage	97
2. Criblage biologique primaire	103
3. Fractionnement bioguidé	105
4. Quelques outils permettant l'accélération de la recherche de produits naturels actifs	108
5. Conclusion	128
Chapitre 4 : Données bibliographiques recueillies sur les espèces sélectionnées	129
1. <i>Crataegus azarolus</i> L.	131
2. <i>Retama raetam</i> (Forssk.) Webb	135
3. <i>Myrtus communis</i> L.	141
4. <i>Rhus tripartita</i> (Ucria) Grande	145
5. <i>Rubus ulmifolius</i> shott.	147
6. <i>Hertia cheirifolia</i> (L.) Kuntze	150
7. <i>Thymus algeriensis</i> Boiss. et Reut.....	153
8. <i>Artemisia campestris</i> L.	155

9. <i>Artemisia herba-alba</i> Asso.	158
10. <i>Pistacia lentiscus</i> L.	161
11. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	164
12. <i>Laurus nobilis</i> L.	168
Partie II : Travaux expérimentaux	171
Chapitre 1 : Obtention d'extraits bruts et Criblage biologique sur l'arginase	173
1. Extraction	176
2. Criblage biologique.....	180
Chapitre 2 : Analyses phytochimiques préliminaires des extraits actifs	191
1. Analyse quantitative des composés phénoliques	193
2. Analyse chromatographique par CLHP-DAD	196
3. Analyse spectroscopique par RMN ¹ H et ¹³ C.....	199
4. Pré-purification des extraits méthanoliques	201
5. Conclusion	203
Chapitre 3 : Investigation phytochimique sur les extraits sélectionnés	205
1. Étude de l'extrait méthanolique des boutons floraux de <i>Crataegus azarolus</i>	207
2. Étude de l'extrait chlorométhylénique des tiges de <i>Crataegus azarolus</i>	252
3. Etude de l'extrait chlorométhylénique des tiges de <i>Retama raetam</i>	275
4. Discussion et conclusion.....	305
Chapitre 4 : Développement d'un test de CCM-bioautographique	309
1. Introduction.....	311
2. Principe de la technique	311
3. Essais préliminaires	312
4. Limite de détection de l'urée	312
5. Optimisation des tests.....	313
6. Test de détection des faux positifs.....	315
7. Linéarité et sensibilité	316
8. Sélectivité en présence d'une matrice complexe	317
9. Applicabilité au criblage d'inhibiteurs naturels dans l'extrait de <i>Cannabis sativa</i>	319
10. Conclusion	322
Conclusion générale et perspectives	323
Partie III : Matériel et méthodes	327
1. Matériel végétal	329
2. Techniques extractives	331
3. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés	332
4. Techniques analytiques	333
5. Techniques préparatives	342
6. Évaluation de l'activité inhibitrice de l'arginase.....	346
7. Analyse statistique des données	351
8. Techniques spectroscopiques	352
9. Données spectrales des composés isolés.....	353
Bibliographie	365
Annexes	393

Liste des abréviations

ACN : Acétonitrile

AF : Acide formique

ARG I : Arginase type I

ARG II : Arginase type II

BSA : Albumine de sérum bovin

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CI₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

COSY : *CORrelated SpectroscopY*

D : deutéré

Da : dalton

DAD : *Diode Array Detector*

DCM : Dichlorométhane

DEPT : *Distortionless Enhanced Polarization Transfer*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

EA : Equipe d'accueil

EAG : Équivalent acide gallique

EB : Extrait brut

EC : Équivalent catéchine

EP : Éther de pétrole 40-60 °C

ER : Équivalent rutine

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ESI : *ElectroSpray Ionization*

EtOAc : Acétate d'éthyle

EUP : Eau ultrapure

HEX : Hexane

HMBC : *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*

HR : Haute Résolution

HSQC : *Heteronuclear single quantum coherence*

J : constante de couplage

K_i : Constante d'inhibition

L-ARG : Arginase de *Leishmania amazonensis*

LC-MS : Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse

LOD : *Limit of detection*

m : multiplet

m/z : Rapport masse sur charge

MeOH : Méthanol

MM : Masse molaire

MS : Spectrométrie de masse

MS/MS ou MSⁿ : Spectrométrie de masse en tandem

n.d. : Non déterminée

NO : *Nitric Oxyde* (Monoxyde d'azote)

NOHA : N^o-hydroxy-L-arginine

nor-NOHA : N^o-hydroxy-nor-L-arginine

NOS : NO-Synthase

ppm : partie par million

R_f : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

s : singulet

SDF : *Standard Data File*

SPE : *Solid Phase Extraction*

t_R : temps de Rétention

UV : Ultraviolet-Visible

δ : déplacement chimique

λ : longueur d'onde

Liste des figures

FIGURE 1: RÉACTION CATALYSÉE PAR L'ARGINASE	9
FIGURE 2 : A. DIAGRAMME DE TOPOLOGIE DE L'ARG I DE RAT.....	11
FIGURE 3: A. ILLUSTRATION SCHÉMATIQUE DU SITE ACTIF DE L'ARG DU FOIE DE RAT.	12
FIGURE 4: MODÈLES DES MÉCANISMES DE RÉACTION UTILISÉS PAR LES MÉTALLOHYDROLASES MONO- ET DIMÉTALLIQUES.....	15
FIGURE 5 : SCHÉMA DE CATABOLISME DE LA L-ARGININE EN L-ORNITHINE / URÉE OU L- CITRULLINE / NO	18
FIGURE 6 : SCHÉMA DE LA RÉGULATION DE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE ENDOTHÉLIALE (NOS3).....	21
FIGURE 7: A. L'ARGINASE ET LA NOS SONT EN CONCURRENCE POUR LEUR SUBSTRAT COMMUN LA L-ARGININE.....	22
FIGURE 8: MÉTABOLISME DE LA L-ARGININE ET VOIES ASSOCIÉES IMPLIQUÉES DANS LE CANCER.	34
FIGURE 9: EFFET IMMUNOSUPPRESSEUR DE L'ARGINASE SUR LES LYMPHOCYTES T DANS LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL	36
FIGURE 10: ACIDES AMINÉS NATURELS INHIBITEURS DE L'ARGINASE	47
FIGURE 11: HOMOLOGUES DE LA L-ARGININE, DIAMINO-ACIDES, DÉRIVÉS NITRO ET HYDROXY DE LA L-ARGININE	48
FIGURE 12: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA LIAISON NOR-NOHA À L'ARG I HUMAINE.	50
FIGURE 13 : DÉRIVÉS HYDROXYLÉS D'ACIDES A-AMINÉS	51
FIGURE 14: DIVERS ACIDES A-AMINÉS.....	52
FIGURE 15: STRUCTURE DE L'ACIDE (2)S-AMINO-6-HEXANOIQUE (ABH) ET DE LA S-(2- BORONOÉTHYL) -L-CYSTÉINE (BEC).....	53
FIGURE 16: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA LIAISON DE L'ABH À L'ARGINASE I HUMAINE.	55
FIGURE 17: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA LIAISON DU BEC À L'ARGINASE I HUMAINE	55
FIGURE 18: DÉRIVÉS A, A-DISUBSTITUÉS DE L'ABH.....	56
FIGURE 19: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA LIAISON DU COMPOSÉ (M) À L'ARG II HUMAINE.....	57
FIGURE 20: CHAÎNE LATÉRALE D'ACIDE A-AMINÉ MODIFIÉE PAR UN GROUPE DE LIAISON MÉTALLIQUE	58
FIGURE 21: LIAISON DE L'ANH DANS LE SITE ACTIF DE L'ARG I HUMAINE	59
FIGURE 22: COMPOSÉS À BASE DE PURINE ET DE PYRIMIDINE	61
FIGURE 23: RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ DES FLAVONOÏDES COMME INHIBITEURS DE L'ARG	66
FIGURE 24: STRUCTURE DU PICÉATANNOL-3'-O-B-D-GLUCOPYRANOSIDE.....	76
FIGURE 25 : RÉACTIONS PROPOSÉES PAR OZER POUR LE DOSAGE DE L'ACTIVITÉ ARGINASE	87
FIGURE 26 : RÉACTION PROPOSÉE PAR GARGANTA ET BOND POUR LE DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE L'ARGINASE	87
FIGURE 27 : RÉACTION DE LA NINHYDRINE AVEC UN ACIDE AMINÉ POUR PRODUIRE LE POURPRE DE RUHEMANN	88

FIGURE 28 : RÉACTION COLORIMÉTRIQUE DE MISE EN ÉVIDENCE DE L'URÉE AVEC L'ISONITROSOPROPIOPHÉNONE	89
FIGURE 29 : RÉACTION GÉNÉRALE DE L'URÉE AVEC LE P-DIMÉTHYLAMINO BENZALDÉHYDE (DMAB)	89
FIGURE 30 : PREMIÈRE ÉTAPE SUGGÉRÉE DANS LA RÉACTION DE JUNG POUR LA DÉTECTION DE L'URÉE	90
FIGURE 31 : DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE L'ARGINASE AVEC UTILISATION DE ¹⁴ C	91
FIGURE 32 : APERÇU DES PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES ESSAIS REPOSANT SUR LA L-[GUANIDINO- ¹⁴ C].....	91
FIGURE 33 : RÉACTION CATALYSÉE PAR L'ARGINASE EN UTILISANT LE 1-NITRO-3-GUANIDINOBENZÈNE (NGB) COMME SUBSTRAT	92
FIGURE 34 : EXEMPLE DE PROCESSUS DE DÉCOUVERTE DE MÉDICAMENTS À PARTIR DE PRODUITS NATURELS BASÉ SUR L'APPROCHE BIOGUIDÉE	106
FIGURE 35 : CINQ STRATÉGIES DE DÉRÉPLICATION DIFFÉRENTES DANS LA RECHERCHE SUR LES PRODUITS NATURELS	111
FIGURE 36 : A. <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> ; B. FLEURS DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> ; C. FRUITS DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	132
FIGURE 37 : A. INDIVIDU DE <i>RETAMA RAETAM</i> EN FLORAISON, B. FLEURS ET C. FRUITS DE <i>RETAMA RAETAM</i>	136
FIGURE 38: A. <i>MYRTUS COMMUNIS</i> , B. TIGES PORTANT DES FLEURS SOLITAIRES, C. DES FRUITS NOIR-BLEUTÉ OU D. DES FRUITS JAUNES.	143
FIGURE 39 : A. FEUILLES ET B. FRUITS DE <i>RHUS TRIPARTITA</i>	145
FIGURE 40 : A. FLEURS ET B. FRUITS DE <i>RUBUS ULMIFOLIUS</i>	148
FIGURE 41 : A. <i>HERTIA CHEIRIFOLIA</i> ; B. INFLORESCENCES ET C. FRUITS	151
FIGURE 42 : A. <i>THYMUS ALGERIENSIS</i> ET B. RAMEAUX FEUILLÉS PORTANT DES INFLORESCENCES.	153
FIGURE 43 : A. <i>ARTEMISIA CAMPESTRIS</i> ; B. INFLORESCENCES	156
FIGURE 44 : A. <i>ARTEMISIA HERBA-ALBA</i> ET B. RAMEAUX EN FLORAISON	159
FIGURE 45 : A. <i>PISTACIA LENTISCUS</i> EN FRUCTIFICATION ; B. FLEURS MÂLES ET C. FRUITS	162
FIGURE 46 : A. <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> ; B. RAMEAUX EN FLORAISON	165
FIGURE 47 : <i>LAURUS NOBILIS</i> L. EN FLORAISON (A) ET EN FRUCTIFICATION (B)	168
FIGURE 48 : ILLUSTRATION DE LA RÉACTION PLUS OU MOINS IMPORTANTE DE PRODUCTION D'URÉE DANS DES PUIITS AVEC OU SANS INHIBITEUR.	180
FIGURE 49 : EFFET IN VITRO DES EXTRAITS BRUTS SUR L'ARGINASE HÉPATIQUE BOVINE I.....	187
FIGURE 50 : PROFIL CLHP (3D PLOT) DES EXTRAITS BRUTS ACTIFS.....	198
FIGURE 51: SPECTRES RMN ¹ H DES EXTRAITS ACTIFS SUR L'ARGINASE.....	200
FIGURE 52: SPECTRES RMN ¹³ C DES EXTRAITS ACTIFS SUR L'ARGINASE.....	202
FIGURE 53: CHROMATOGRAMME CLHP-UV (DÉTECTION À 280 NM) DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	209
FIGURE 54: SPECTRES UV DES COMPOSÉS MAJORITAIRES DÉTECTÉS DANS L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	210
FIGURE 55: SCHÉMA FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH.....	222
FIGURE 56 : POURCENTAGE D'INHIBITION DE L'ARGINASE I BOVINE PAR LES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH À PARTIR DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	222

FIGURE 57: COMPARAISON DES PROFILS CHROMATOGRAPHIQUES (UV À 280 NM) DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH À CELUI DE L'EXTRAIT BRUT DES BOUTONS FLORAUX DE <i>C. AZAROLUS</i>	226
FIGURE 58: DÉREPLICATION PAR RMN DU ¹³ C POUR L'IDENTIFICATION DES CONSTITUANTS D'UN MÉLANGE COMPLEXE.	228
FIGURE 59: UN APERÇU SUR QUELQUES COMPOSÉS PROPOSÉS À L'ISSUE DE L'ANALYSE DÉREPLICATIVE PAR RMN ¹³ C DE LA F6_FLASH.	229
FIGURE 60: STRUCTURE ET SPECTRE RECONSTITUÉ PAR LE LOGICIEL MIXONAT DU COMPOSÉ MAJORITAIRE DE LA F6_FLASH	229
FIGURE 61: UN APERÇU SUR QUELQUES COMPOSÉS PROPOSÉS À L'ISSUE DE L'ANALYSE DÉREPLICATIVE PAR RMN ¹³ C DE LA F6_FLASH.	230
FIGURE 62: STRUCTURE ET SPECTRE RECONSTITUÉ PAR LE LOGICIEL MIXONAT DU COMPOSÉ MAJORITAIRE DE LA F7_FLASH.	230
FIGURE 63: SCHÉMA DE L'ISOLEMENT DES COMPOSÉS PURS À PARTIR DE L'EXTRAIT BRUT DES BOUTONS FLORAUX DE <i>C. AZAROLUS</i> PAR CLHP PRÉPARATIVE.....	233
FIGURE 64: STRUCTURE DU COMPOSÉ BCA-28	235
FIGURE 65: STRUCTURE DU COMPOSÉ BCA-35	236
FIGURE 66: STRUCTURE DU COMPOSÉ BCA-40	237
FIGURE 67: STRUCTURE POSSIBLE DU COMPOSÉ BCA-48	239
FIGURE 68 : ACTIVITÉ DES SOUS-FRACTIONS OBTENUES PAR CLHP À PARTIR DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>C. AZAROLUS</i>	240
FIGURE 69 : SPECTRES UV DU N ¹ , N ⁵ , N ¹⁰ -TRI- <i>P</i> -(EEE)-COUMAROYLSPERMIDINE (E) ET SES PHOTOISOMÈRES	247
FIGURE 70 : UN APERÇU SUR QUELQUES COMPOSÉS PROPOSÉS À L'ISSUE DE L'ANALYSE DÉREPLICATIVE PAR RMN ¹³ C DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	254
FIGURE 71 : CHROMATOGRAMMES CLHP-UV (DÉTECTION À 254 NM ET 280 NM) DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	256
FIGURE 72 : SPECTRES UV DES COMPOSÉS MAJORITAIRES DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	257
FIGURE 73 : FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DCM DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> ET ACTIVITÉ INHIBITRICE DE L'ARGINASE DES FRACTIONS OBTENUES.....	268
FIGURE 74-1 : CHROMATOGRAMMES DES FRACTIONS ISSUES DE L'EXTRAIT DE TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> FRACTIONNÉ PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH.	269
FIGURE 75-1 : FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS DE L'EXTRAIT DCM DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> PAR CLHP PRÉPARATIVE.....	272
FIGURE 76: UN APERÇU SUR QUELQUES COMPOSÉS PROPOSÉS À L'ISSUE DE L'ANALYSE DÉREPLICATIVE PAR RMN ¹³ C SUR L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAM</i>	277
FIGURE 77: CHROMATOGRAMMES CLHP-UV AVEC UNE DÉTECTION À 280 ET 210 NM DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DE <i>RETAMA RAETAM</i>	280
FIGURE 78: SPECTRES UV DES COMPOSÉS MAJORITAIRES DÉTECTÉS DANS L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DE <i>RETAMA RAETAM</i>	281
FIGURE 79 : COMPOSÉ MAJORITAIRE CIBLÉ DANS L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLINIQUE DE <i>RETAMA RAETAM</i>	288
FIGURE 80 : FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DCM DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAM</i> ET ACTIVITÉ INHIBITRICE DE L'ARGINASE DES FRACTIONS OBTENUES	290

FIGURE 81 : PROFILS CLHP DES PRODUITS PURS ET DE LA F3-CLHP ISSUS DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAMA</i> .	291
FIGURE 82 : FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION F3-CLHP ISSUE DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DE <i>RETAMA RAETAMA</i> PAR CLHP PRÉPARATIVE.	292
FIGURE 83 : FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAMA</i> PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH.	294
FIGURE 84 : CHROMATOGRAMMES DES FRACTIONS ISSUES DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DE <i>RETAMA RAETAMA</i> FRACTIONNÉ PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH.	296
FIGURE 85-1 : FRACTIONNEMENT DES FRACTIONS LES PLUS ACTIVES ISSUES DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAMA</i> PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH.	297
FIGURE 86 : STRUCTURE DU COMPOSÉ RR-9 ISOLÉ DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAMA</i> .	302
FIGURE 87: STRUCTURE DU COMPOSÉ RR-13 ISOLÉ DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAMA</i> .	304
FIGURE 88 : COMPARAISON DE LA MONOTÉSONE B (À GAUCHE) À LA (2S)-5,2',5'-TRIHYDROXY-7,8-DIMÉTHOXYFLAVANONE (À DROITE).	306
FIGURE 89 : DÉTECTION DE L'URÉE SUR UNE PLAQUE DE GEL DE SILICE CCM 60 F254 DE 10 × 20 CM, PULVÉRISÉE EN QUANTITÉS DÉCROISSANTES [1-100 mM]. LA PLAQUE A ÉTÉ PHOTOGRAPHIÉE SOUS LUMIÈRE VISIBLE.	312
FIGURE 90 : OPTIMISATION DES CONCENTRATIONS D'ARGINASE	314
FIGURE 91 : CRIBLAGE DES FAUX POSITIFS	316
FIGURE 92 : INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DE L'ARGINASE DÉTECTÉE SUR UNE COUCHE DE CCM EN FONCTION DES QUANTITÉS DÉCROISSANTES DE NOR-NOHA.	317
FIGURE 93 : ANALYSE CCM DE L'INHIBITEUR DE L'ARGINASE NOR-NOHA EN PRÉSENCE D'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DE FRUIT DE <i>MYRTUS COMMUNIS</i> (MC).	318
FIGURE 94 : ANALYSE PAR CCM-BIOAUTOGRAPIQUE DE L'INHIBITEUR NOR-NOHA EN PRÉSENCE DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DE FRUIT DE <i>MYRTUS COMMUNIS</i> .	319
FIGURE 95 : CRIBLAGE DES INHIBITEURS DE L'ARGINASE DES TOURTEAUX DE CHANVRE (<i>CANNABIS SATIVA</i> L.).	320
FIGURE 96: ANALYSE CCM DE LA N-TRANS-CAFÉOYLTYRAMINE	321
FIGURE 97: ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ INHIBITRICE DE L'ARGINASE DE LA N-TRANS-CAFÉOYLTYRAMINE	321
FIGURE 98: DILUTIONS EN SÉRIES DE LA SUBSTANCE À TESTER POUR LA DÉTERMINATION DE LA CI ₅₀	347
FIGURE 99: PLAN DE PLAQUE UTILISÉ POUR LE TEST DE CRIBLAGE.	348
FIGURE 100: PLAN DE PLAQUE UTILISÉ POUR LA DÉTERMINATION DE LA CI ₅₀	349
FIGURE 101: STRUCTURE (A), SPECTRE UV (MeOH) (B) ET SPECTRE HRMS-ESI (C) DU COMPOSÉ BCA-28	353
FIGURE 102: STRUCTURE (A), SPECTRE UV (MeOH) (B) ET SPECTRE HRMS-ESI (C) DU COMPOSÉ BCA-35	355
FIGURE 103: STRUCTURE (A), SPECTRE UV (MeOH) (B) ET SPECTRE HRMS-ESI (C) DU COMPOSÉ BCA-40	357
FIGURE 104: STRUCTURE (A), SPECTRE UV (MeOH) (B) ET SPECTRE HRMS-ESI (C) DU COMPOSÉ BCA-48	359
FIGURE 105: STRUCTURE (A), SPECTRE UV (MeOH) (B) ET SPECTRE HRMS-ESI (C) DU COMPOSÉ RR-9	360

FIGURE 106: STRUCTURE (A), SPECTRE UV (MeOH) (B) ET SPECTRE HRMS-ESI (C) DU COMPOSÉ RR- 13	362
--	-----

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PRINCIPAUX COMPOSÉS NATURELS AYANT MONTRÉ UNE ACTIVITÉ INHIBITRICE DE L'ARGINASE	78
TABLEAU 2. MASSES ET RENDEMENTS DES EXTRAITS OBTENUS PAR MACÉRATION DES DIFFÉRENTS ORGANES DES PLANTES SÉLECTIONNÉES	176
TABLEAU 3. EFFET DES EXTRAITS (À 10 ET 100 µG/ML) SUR L'ACTIVITÉ INHIBITRICE DE L'ARGINASE	182
TABLEAU 4. ACTIVITÉ INHIBITRICE DE L'ARGINASE ET VALEURS DES CI ₅₀ DES CINQ EXTRAITS BRUTS LES PLUS ACTIFS.....	188
TABLEAU 5. TENEUR EN POLYPHÉNOLS TOTAUX, EN FLAVONOÏDES ET EN TANINS CONDENSÉS DES EXTRAITS LES PLUS ACTIFS SUR L'ARGINASE.....	194
TABLEAU 6. DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES DES COMPOSÉS DÉTECTÉS DANS L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	211
TABLEAU 7 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES DES COMPOSÉS DÉTECTÉS DANS LA SF ₁ _CLHP ISSUE DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>C. AZAROLUS</i>	243
TABLEAU 8 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES DES COMPOSÉS DÉTECTÉS DANS LA SF ₂ _CLHP ISSUE DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>C. AZAROLUS</i>	246
TABLEAU 9. DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES DES COMPOSÉS DÉTECTÉS DANS LA SF ₃ _CLHP ISSUE DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>C. AZAROLUS</i>	250
TABLEAU 10-A : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES DES COMPOSÉS DÉTECTÉS DANS L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> EN MODE ESI-NÉGATIF	260
TABLEAU 11-B : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES DES COMPOSÉS DÉTECTÉS DANS L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> EN MODE ESI-POSITIF	263
TABLEAU 12. DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES DES COMPOSÉS DÉTECTÉS DANS L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAM</i>	283
TABLEAU 13: DONNÉES DE COLLECTE DES PLANTES SÉLECTIONNÉES POUR L'ÉTUDE.....	329
TABLEAU 14 : ÉLUANTS UTILISÉS POUR LES CCM ANALYTIQUES	335
TABLEAU 15 : MÉTHODES SÉPARATIVES EN CLHP	337
TABLEAU 16: GRADIENT D'ÉLUTION DE L'EXTRAIT MeOH DES BOUTONS FLORAUX DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> AU COURS DE LA CHROMATOGRAPHIE FLASH.....	343
TABLEAU 17: GRADIENT D'ÉLUTION DE L'EXTRAIT DCM DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> AU COURS DE LA CHROMATOGRAPHIE FLASH.....	343
TABLEAU 18: GRADIENT D'ÉLUTION DE L'EXTRAIT DCM DES TIGES DE <i>RETAMA RAETAM</i> AU COURS DE LA CHROMATOGRAPHIE FLASH.....	345
TABLEAU 19: RMN- ¹ H (400.13 MHz), RMN- ¹³ C (100.6 MHz) ET RMN-2D DU COMPOSÉ BCA- 28	353
TABLEAU 20: RMN- ¹ H (400.13 MHz), RMN- ¹³ C (100.6 MHz) ET RMN-2D DU COMPOSÉ BCA- 35	355

TABLEAU 21: RMN- ¹ H (400.13 MHz), RMN- ¹³ C (100.6MHz) ET RMN-2D DU COMPOSÉ BCA- 40	357
TABLEAU 22 : RMN- ¹ H (400.13 MHz), RMN- ¹³ C (100.6 MHz) ET RMN-2D DU COMPOSÉ RR- 9	360
TABLEAU 23: RMN- ¹ H (400.13MHz), RMN- ¹³ C (100.6 MHz) ET RMN-2D DU COMPOSÉ TRR- 13	362

Liste des annexes

ANNEXE 1: CHROMATOGRAMMES CLHP DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES TIGES DE <i>RHUS TRIPARTITA</i> AVANT ET APRÈS FILTRATION SUR CARTOUCHES SPE EN POLYAMIDE	395
ANNEXE 2: CHROMATOGRAMMES CLHP DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES TIGES DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i> AVANT ET APRÈS FILTRATION SUR CARTOUCHES SPE EN POLYAMIDE	396
ANNEXE 3: CHROMATOGRAMMES CLHP DES FRACTIONS OBTENUES PAR FLASH CHROMATOGRAPHIE À PARTIR DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	397
ANNEXE 4: CHROMATOGRAMMES CLHP DES SOUS-FRACTIONS DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES BOUTONS FLORAUX DE <i>CRATAEGUS AZAROLUS</i>	398
ANNEXE 5 : SPECTRES DE RMN DE L'HYPEROSIDE	399
ANNEXE 6: SPECTRE RMN DU 8-MÉTHOXYKAEMPFÉROL-3-O-B-GLUCOPYRANOSIDE	402
ANNEXE 7: SPECTRE RMN DU 8-MÉTHOXYKAEMPFÉROL-3-O-B(6'' ACÉTYL-GLUCOPYRANOSIDE)	406
ANNEXE 8: SPECTRES DE RMN DE TRICOUMAROYLSPERMIDINE.....	409
ANNEXE 9: SPECTRES RMN DU COMPOSÉ MAJORITAIRE DE L'EXTRAIT CHLOROMÉTHYLÉNIQUE DES TIGES DE <i>C.AZAROLUS</i>	412
ANNEXE 10 : SPECTRES DE RMN DE L'ALPNUMISOFLAVONE.....	413
ANNEXE 11: SPECTRES DE RMN DE LA MONOTESONE B	417

Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires représentent aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde et le nombre de décès annuels a été estimé à 17,9 millions de personnes, soit 31% de la mortalité mondiale totale [1]. La deuxième cause principale de décès dans le monde était, en 2015, le cancer [2]. Malgré les avancées significatives de l'arsenal thérapeutique ces dernières années, ces pathologies restent des problèmes majeurs de santé publique.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux médicaments pour la prise en charge de ces pathologies, une nouvelle cible thérapeutique a été identifiée. Il s'agit d'une enzyme clé du cycle de l'urée appelée arginase. En effet, un intérêt particulier est porté à cette enzyme, principalement en raison de l'implication de sa suractivité dans la dysfonction endothéliale, souvent associée à des pathologies cardiovasculaires (par exemple l'hypertension artérielle) ou inflammatoires (par exemple la polyarthrite rhumatoïde), les cancers et les maladies parasitaires telles que la leishmaniose [3], qui touche 700 000 à 1 million de nouveaux cas chaque année [4].

L'inhibition de l'arginase pourrait, par conséquent, constituer un traitement prometteur pour ces maladies. À ce jour, plusieurs inhibiteurs synthétiques de cette cible thérapeutique ont été développés. Toutefois, ces molécules sont difficilement utilisables en clinique en raison de leur coût élevé, de leur manque de sélectivité, de leurs paramètres pharmacocinétiques non optimaux et de l'absence d'étude toxicologique [5]. Jusqu'à aujourd'hui, un seul inhibiteur de l'arginase (CX-1158-101) est arrivé en phase clinique I / II pour le traitement du cancer [6]. L'ensemble de ces constatations font que ces composés synthétiques, n'ont pu, jusqu'à maintenant, constituer de sérieux candidats médicaments.

La découverte de nouveaux inhibiteurs à partir de sources naturelles et notamment végétales, pourrait par conséquent constituer une autre piste particulièrement intéressante puisque de nombreux médicaments ont une origine naturelle. En effet, sur 1881 médicaments approuvés entre janvier 1981 et septembre 2019, 75,4% de ces médicaments ont un lien avec des produits naturels dont 18,9% sont des produits hémisynthétiques [7]. Par exemple, dans le domaine du cancer, depuis les années 1980, 174 nouveaux composés ayant une indication pour le traitement du cancer ont été approuvés pour la commercialisation. Quatre-vingt-treize molécules soit 53% des anticancéreux étaient des produits naturels ou dérivés de ceux-ci [8].

Malgré la pertinence de cette piste de recherche, jusqu'aujourd'hui, peu d'équipes se sont orientées vers le développement d'inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase. La plupart des molécules naturelles décrites, pour leur potentiel inhibiteur, appartient à la classe des polyphénols dont les CI_{50} sont de l'ordre de quelques dizaines de micromolaires. Parmi eux, le picéatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside et l'acide chlorogénique sont les plus efficaces sur l'arginase mammifère [9]. Le motif catéchol est la caractéristique structurelle récurrente de ces inhibiteurs naturels [10].

La Tunisie est un pays disposant d'une grande diversité floristique, à laquelle s'ajoute un savoir-faire millénaire liés à l'exploitation traditionnelle des plantes médicinales. C'est pourquoi une collaboration a été initiée entre l'équipe d'accueil EA 4267 PEPITE « Pathologies et Épithéliums : Prévention, Innovation, Traitements, Évaluation » de l'Université de Franche-Comté et le « Laboratoire de Biotechnologie Végétale » de l'Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, rattaché à l'Université de Carthage. Ce partenariat s'est concrétisé par un projet « PHC Utique » (numéro 18G0816) qui a donné lieu à cette thèse réalisée en co-tutelle. Le projet a eu pour double objectifs : l'apport d'une contribution à la valorisation des phytoressources Tunisiennes et la recherche d'inhibiteurs d'arginase.

Dans ce contexte, douze plantes médicinales pouvant avoir une activité régulatrice du dysfonctionnement endothélial avec un intérêt particulier pour celles aux vertus hypotensives et régulatrices des troubles cardiovasculaires ont été sélectionnées. Il s'agit de *Crataegus azarolus*, *Artemisia campestris*, *Artemisia herba-alba*, *Rhus tripartitum*, *Myrtus communis*, *Rubus ulmifolius*, *Hertia cheirifolia*, *Thymus algeriensis*, *Pistacia lentiscus*, *Rosmarinus officinalis*, *Laurus nobilis*. *Retama raetam*.

Ce manuscrit rapporte l'ensemble des travaux réalisés en définissant, tout d'abord, le contexte de l'étude en quatre points clefs. Le premier chapitre s'intéresse aux rôles de l'arginase et son implication dans diverses pathologies. Le deuxième chapitre présente les données bibliographiques relatives aux inhibiteurs synthétiques et d'origine naturelle de l'arginase. Le troisième chapitre de cette partie développe les différentes stratégies de découverte de nouveaux composés naturels bioactifs. Le quatrième chapitre décrit les données bibliographiques recueillies sur les différentes espèces végétales sélectionnées pour notre étude.

L'ensemble des travaux expérimentaux est ensuite exposé sous forme de quatre chapitres. Ces différents chapitres traitent plus particulièrement des études phytochimiques conduites sur trois extraits d'intérêt, issus des espèces *Crataegus azarolus* et *Retama raetam*. Différentes

classes de métabolites secondaires sont abordées à travers l'étude de ces deux espèces, dont certains ont été isolés et évalués pour leur activité inhibitrice de l'arginase. En outre, cette deuxième partie est clôturée par la description du développement d'une nouvelle technique CCM-bioautographique, établie dans le but d'accélérer l'identification de nouveaux inhibiteurs de l'arginase au sein de notre équipe.

Partie I : Travaux antérieurs et Contexte de l'étude

Chapitre 1 : L'arginase : Rôles et implication dans diverses pathologies

1. Introduction

L'arginase ARG (L-arginine-urée hydrolase ou amidinohydrolase – EC 3.5.3.1) est une métalloenzyme qui a été décrite pour la première fois en 1904 par Kossel et Dakin dans des échantillons de foie de mammifères [11]. Il a été établi par la suite que cette protéine est largement distribuée dans le règne du vivant, et retrouvée dans plusieurs organismes tels que les bactéries, les levures, les plantes, les invertébrés et les vertébrés. Il est supposé que l'arginase soit apparue en premier dans les bactéries et que le transfert du gène de l'arginase des bactéries aux cellules eucaryotes s'est produit *via* les mitochondries.

Il s'agit d'une métalloenzyme trimérique associée à des ions manganèse. Chaque unité active du trimère possède deux ions Mn^{2+} . La présence des ions Mn^{2+} est indispensable à l'action catalytique de cette enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la L-arginine en L-ornithine et en urée (Figure 1).

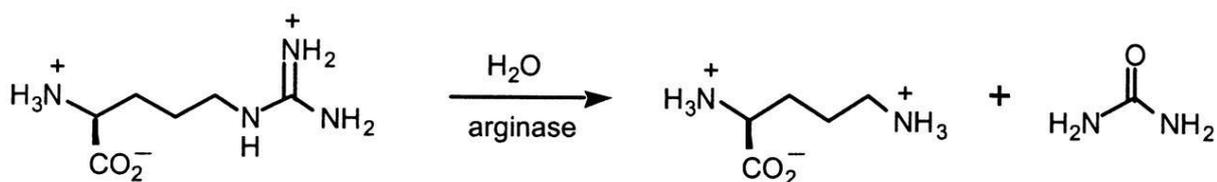


Figure 1: Réaction catalysée par l'arginase

2. Distribution, structure et mécanisme de la réaction catalysée par l'arginase

Depuis 1965, différentes isoformes d'ARG ont été observées notamment dans les tissus humains. La plupart des plantes, des bactéries, des levures et des invertébrés possèdent uniquement une isoforme d'arginase, l'ARG II. Chez les vertébrés deux isoformes sont fréquemment reportées dans la littérature, à savoir l'ARG I et l'ARG II. Ces deux isoformes d'ARG catalysent la même réaction et sont codées par des gènes homologues qui sont cartographiés sur des chromosomes distincts. Chez l'homme, le gène de l'ARG I est situé sur le chromosome 6q23 alors que celui de l'ARG II est situé sur le chromosome 14q24.

Bien que les deux isoformes présentent des propriétés cinétiques et physico-chimiques similaires, elles diffèrent par leur localisation subcellulaire : l'ARG I est une enzyme cytosolique, tandis que l'ARG II est une enzyme mitochondriale. L'ARG, quelle que soit l'isoforme, est aussi présente dans les fluides extracellulaires (comme le plasma, les plaies, la lumière intestinale, le microenvironnement tumoral, la salive, etc...). En outre, dans certaines circonstances, l'ARG II peut être transférée de la mitochondrie au cytosol, ce qui entraîne une augmentation de son activité, comme le montrent les cellules endothéliales humaines après exposition à des lipoprotéines de basse densité oxydées [12, 13]. L'ARG I est souvent appelée arginase « hépatique », car elle se trouve à des niveaux élevés dans le foie. Cependant, elle est également exprimée dans de nombreux autres organes dépourvus du cycle complet de l'urée, tels que les globules rouges et certaines populations de cellules immunitaires [3]. L'ARG II, bien qu'exprimée à de faibles concentrations dans le foie, est, quant à elle, largement exprimée dans presque toutes les cellules extra-hépatiques contenant des mitochondries, avec des taux élevés dans les cellules rénales et prostatiques, mais également dans les vaisseaux sanguins, les intestins, les globules rouges, les cellules immunitaires, le cerveau et la rétine [3]. La présence de ces isoformes peut être induite par diverses conditions physiologiques.

Le rôle physiologique de la compartimentation subcellulaire différente des deux isoformes d'arginases est difficile à élucider. Bien que l'ARG I et l'ARG II partagent la même fonction dans le métabolisme de la L-arginine, l'impact fonctionnel des deux isoformes semble être identique ou différent selon les organes ou les types cellulaires. Par exemple, une activité et / ou une expression accrue de l'ARG I ou de l'ARG II dans les cellules endothéliales altère la production endothéliale du NO, alors que dans les macrophages, l'ARG I et l'ARG II sont susceptibles de jouer un rôle opposé comme décrit à la [Partie I : Chapitre 1 : 5.5](#). En outre, les schémas d'expression de l'ARG I et de l'ARG II dans les tissus extra-hépatiques sont très variables selon les espèces, les organes et même le sexe. De nombreux tissus expriment les deux isoformes, mais leurs gènes sont régulés indépendamment. En outre, dans un tissu donné, l'expression d'une isoforme peut être modulée pour compenser le changement d'expression de l'autre isoforme tel qu'observé dans le déficit en ARG I humaine [3]. Ajoutant à cette complexité, la modulation post-traductionnelle semble être également différente entre les deux isoformes. En effet, Santhanam et ses collaborateurs [14] ont signalé que la S-nitrosylation de l'arginase augmente l'activité de l'ARG I mais pas celle de l'ARG II. Ainsi, il est très difficile de déterminer quelle forme d'arginase est essentielle dans un tissu donné pour une fonction donnée dans un organisme donné.

L'ARG I humaine comprend 322 acides aminés par monomère quant à l'ARG II humaine, elle en possède 354 par monomère. Le séquençage génétique réalisé sur les cellules rénales humaines a détecté que la séquence de l'ARG II était homologue à 58% à celle de l'ARG I et que cette dernière présente 87% d'homologie avec l'arginase de foie de rat [5]. Une analyse cristallographique à haute résolution a montré que les deux isoformes de l'ARG, ont des structures presque identiques, et présentent pour la fonction enzymatique une homologie à 100% [3].

La structure globale de chaque monomère de l'ARG I de rat a pour dimensions approximatives 40 x 50 x 50 Å [15]. La conformation de ce segment est stabilisée par de nombreuses interactions inter-monomériques de type van der Waals et des liaisons hydrogènes et ioniques [16]. Ces auteurs ont démontré que chaque sous-unité d'arginase est constituée de huit brins parallèles en feuillets plissés α/β (ordre 21387456) entourés par plusieurs hélices α (A1, A2, B, C, D, E, F1, F2, G, H1, H2) (Figure 2 A).

Dans le site actif de chaque sous-unité, les chaînes latérales d'acides aminés qui coordonnent les deux ions manganèse Mn^{2+} sont situées sur le bord du feuillet β central dans des segments de boucle à proximité de l'hélice C et les brins 8, 7, 4 (Figure 2 A).

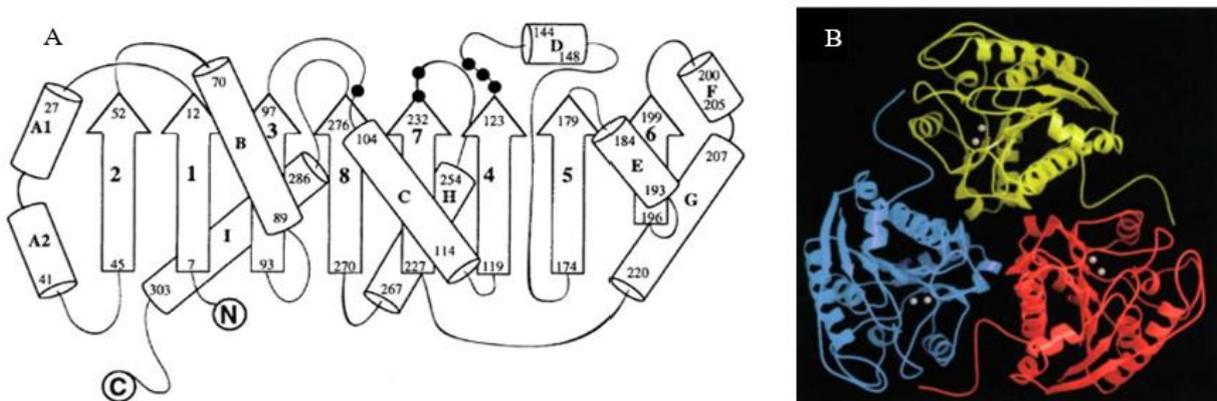


Figure 2 : A. Diagramme de topologie de l'ARG I de rat. Les emplacements relatifs des ligands métalliques sont indiqués par des cercles pleins. B. Représentation schématique en mode ruban du trimère d'ARG ; le cluster $Mn^{2+}-Mn^{2+}$ dans le site actif de chaque monomère est représenté par une paire de sphères [16].

Le cluster binucléaire de manganèse se situe au fond d'une fente de 15 Å de profondeur (Figure 2 B). Ce cluster peut comporter deux ions Mn^{2+} séparés de 3,36-3,57 Å dans la structure cristalline sans ligand. Ces ions Mn^{2+} sont pontés symétriquement par un hydroxyde (OH^-) [16]. La structure de l'ARG I de rat montre que le Mn^{2+} A, situé en position la plus profonde dans le site actif et chélaté par les acides aminés His101, Asp128, Asp124, Asp232, et un ion

hydroxyde, crée une géométrie pyramidale à base carrée (Figure 3 A). En revanche, la structure cristalline de l'ARG I humaine présente une molécule d'eau supplémentaire liée à $Mn^{2+}A$, ce qui forme un polyèdre de coordination métallique octaédrique déformé [17]. Le $Mn^{2+}B$, quant à lui, est coordonné par His126, Asp234, Asp124, Asp232 et l'ion hydroxyde (Figure 3 A), formant également une géométrie octaédrique déformée chez le rat et chez l'Homme [16, 17].

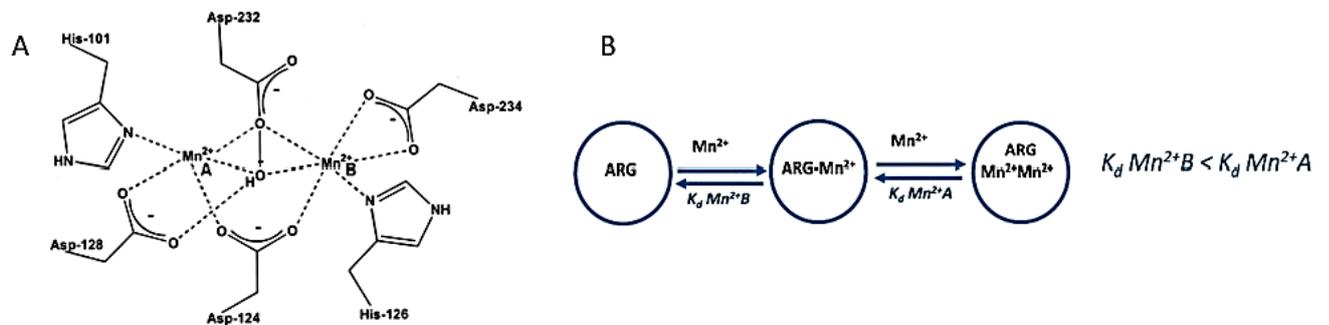


Figure 3: A. Illustration schématique du site actif de l'ARG du foie de rat. L'enzyme peut accueillir deux ions Mn^{2+} étroitement espacés dans ses sites actifs, en utilisant des chaînes latérales d'acides aminés hautement conservées. B. Besoins en ions métalliques de l'arginase [18].

L'arginase la plus étudiée est celle du rat [15] mais d'autres auteurs se sont intéressés aux arginases d'*Helicobacter pylori* [19], de *Leishmania amazonensis* [20], de *Leishmania mexicana* [21], de *Plasmodium falciparum* [15] et de *Shistosoma mansoni* [22]. Ces protéines ont montré des degrés variables d'homologie avec l'arginase humaine [17, 23]. En revanche, dans toutes ces structures, les six résidus d'acides aminés cités précédemment sont hautement conservés et fournissent le site de liaison pour deux ions Mn^{2+} dans le site actif d'ARG [18].

À l'entrée de la cavité, dans sa partie supérieure se trouve la zone de liaison aux acides aminés qui constitue la base structurelle de la spécificité au substrat. Sous la poche de reconnaissance des acides aminés et 4,5 Å en haut du groupe bimanganèse se trouvent deux résidus importants, à savoir Glu277 et His141 (Figure 4 C).

Les mutations d'acides aminés sur la poche de reconnaissance compromettent l'affinité du substrat avec un impact faible sur l'hydrolyse, tandis que la mutation ou la modification chimique de His141 réduisent fortement l'activité avec un effet moindre sur l'affinité. Par conséquent, la poche de reconnaissance des acides aminés est clairement impliquée dans l'affinité de liaison alors que le His141 est impliqué dans la catalyse sans intervenir dans la liaison.

Peu de métallohydrolases avec une préférence nette pour le Mn^{2+} sont connues [18]. Les premières études sur les besoins en Mn^{2+} des ARG remontent au début des années 1970. Hirsch-

Kolb et ses collègues [24] ont observé que pendant le processus de purification ou de dialyse de l'ARG de foie natif de rat, l'activité enzymatique a diminué de 50% avec une diminution concomitante de la teneur en Mn^{2+} de 50%. L'activité arginase complète a été récupérée après une incubation avec le Mn^{2+} pendant 8 à 10 h à température ambiante. À partir de ces observations, il a été conclu que l'ARG peut contenir deux sites de liaison de Mn^{2+} , l'un avec une affinité élevée et l'autre avec une affinité faible pour cet ion métallique (Figure 3 B).

De plus, la dissociation du Mn^{2+} faiblement lié semble s'accompagner d'un changement structural qui diminue la capacité de l'enzyme à se lier au cation ; ce n'est qu'à une température plus élevée (55 °C pendant 5 minutes) que ce changement structural est facilement inversé et que l'affinité pour le Mn^{2+} est améliorée. L'ion métallique fortement lié n'a pas pu être éliminé par des traitements comprenant la dialyse, l'électrophorèse ou le traitement avec des chélateurs (EDTA par exemple) sans provoquer une perte irréversible de l'activité enzymatique. En conclusion, tant que l'activité résiduelle représente au moins 50% de son activité enzymatique maximale, elle peut être entièrement reconstituée par incubation avec un excès de Mn^{2+} . Ce cluster de métaux binucléaires observé dans les structures cristallines des ARG mammifères et procaryotes est communément trouvé dans la famille des métallohydrolases.

Les études de cristallographie en présence de l'ARG recombinante de foie de rat, en contact avec un chélateur de métaux, ont montré que le Mn^{2+} résiduel était situé dans le site $Mn^{2+}B$, indiquant que le Mn^{2+} faiblement lié réside dans le site $Mn^{2+}A$ (Figure 3 B).

Les constantes d'affinité (valeurs K_d) de l'ARG pour les deux ions Mn^{2+} ont été estimées avec diverses méthodologies [10]. À partir des mesures de résonance magnétique, les valeurs de K_d pour les $Mn^{2+}A$ et $Mn^{2+}B$ d'ARG de foie de rat ont été estimées à 50 μM et 0,03 μM , respectivement, à pH 7,5. En suivant le renforcement de l'activité enzymatique lors de l'ajout de l'ion métallique, l'ARG extraite d'un homogénat brut de foie de souris et dialysée contre un tampon contenant du Chelex, a montré une K_d pour le Mn^{2+} de l'ordre de 300 nM à pH 6,8 et de 80 nM à pH 7,7. Cette méthode n'était pas suffisamment sensible pour distinguer deux événements de liaison distincts, et par conséquent la valeur K_d obtenue ne peut pas être attribuée sans ambiguïté au site $Mn^{2+}A$ ou $Mn^{2+}B$. Une expérience de titrage similaire avec l'ARG du foie humain montre que le Mn^{2+} à liaison faible dans le site ($Mn^{2+}A$) peut avoir une K_d de 80 nM [18].

Ces études ont montré ainsi la possibilité que l'ARG puisse être active à la fois sous sa forme mono- et di-métallique mais l'activité catalytique maximale nécessite un cluster dinucléaire de Mn^{2+} intact ce qui pourrait expliquer l'ajout de Mn^{2+} dans les milieux réactionnels pour étudier l'activité enzymatique. L'activité enzymatique étant cation divalent

dépendante, deux mécanismes sont rapportés dans la littérature selon la présence d'un ou deux Mn^{2+} (Figure 4).

Le mécanisme d'action dinucléaire de l'arginase a été décrit pour la première fois par Kanyo et ses collaborateurs en 1996 [16]. Ce mécanisme comprend plusieurs étapes (Figure 4 A et C) décrites comme suit : d'abord, la réaction débute par la fixation de la L-arginine sur le site actif de l'enzyme par des liaisons hydrogènes entre son groupe guanidine et le glutamate 227 (Glu 277) de l'arginase ; la chaîne latérale du Glu 277 joue un rôle important dans la reconnaissance du complexe enzyme substrat. Dans un deuxième temps, l'orientation de la L-arginine permet l'attaque nucléophile du groupe hydroxyde couplé au cluster de manganèse sur le groupe guanidine de la L-arginine. L'Asp 128 stabilise l'ion hydroxyde lié au Mn^{2+} par une liaison hydrogène au cours de l'attaque nucléophile sur le carbone du groupement guanidinium de la L-arginine. Ensuite, un intermédiaire tétraédrique neutre est formé et stabilisé par le centre binucléaire de Mn^{2+} . Plus tard, l'intermédiaire tétraédrique formé s'effondre suite à un transfert de proton, probablement réalisé par le résidu Asp128, pour le groupement amino de la L-ornithine. Ensuite, le résidu His141 transporte un proton de la molécule d'eau au groupement ϵ -amino de la L-ornithine avant la dissociation du produit. Au cours de cette dissociation, une molécule d'eau remplace l'urée. Par la suite, la coordination du métal facilite l'ionisation de cette molécule d'eau pour régénérer un ion hydroxyde nucléophile. Ici, le proton transféré dans le milieu du solvant peut être régénéré à nouveau par le biais de His141 [16]. Ce premier modèle proposé de la réaction catalysée par l'ARG, montre la nécessité des deux Mn^{2+} pour l'activation de la molécule d'eau de pontage du métal agissant comme nucléophile pour initier l'hydrolyse du substrat. Ici, les deux Mn^{2+} de l'ARG peuvent aussi jouer un rôle important dans la stabilisation de l'état de transition. Le mécanisme utilisé par l'ARG ressemble, dans ce cas, à celui de diverses autres métallohydrolases, y compris les phosphatases acides violettes (PVA) et les hydrolases dégradant les organophosphates.

Cependant, étant donné que l'ARG peut être active en l'absence d'un Mn^{2+} dans le site $Mn^{2+}A$, un modèle alternatif pour le mécanisme de réaction a été récemment proposé [18] (Figure 4 B).

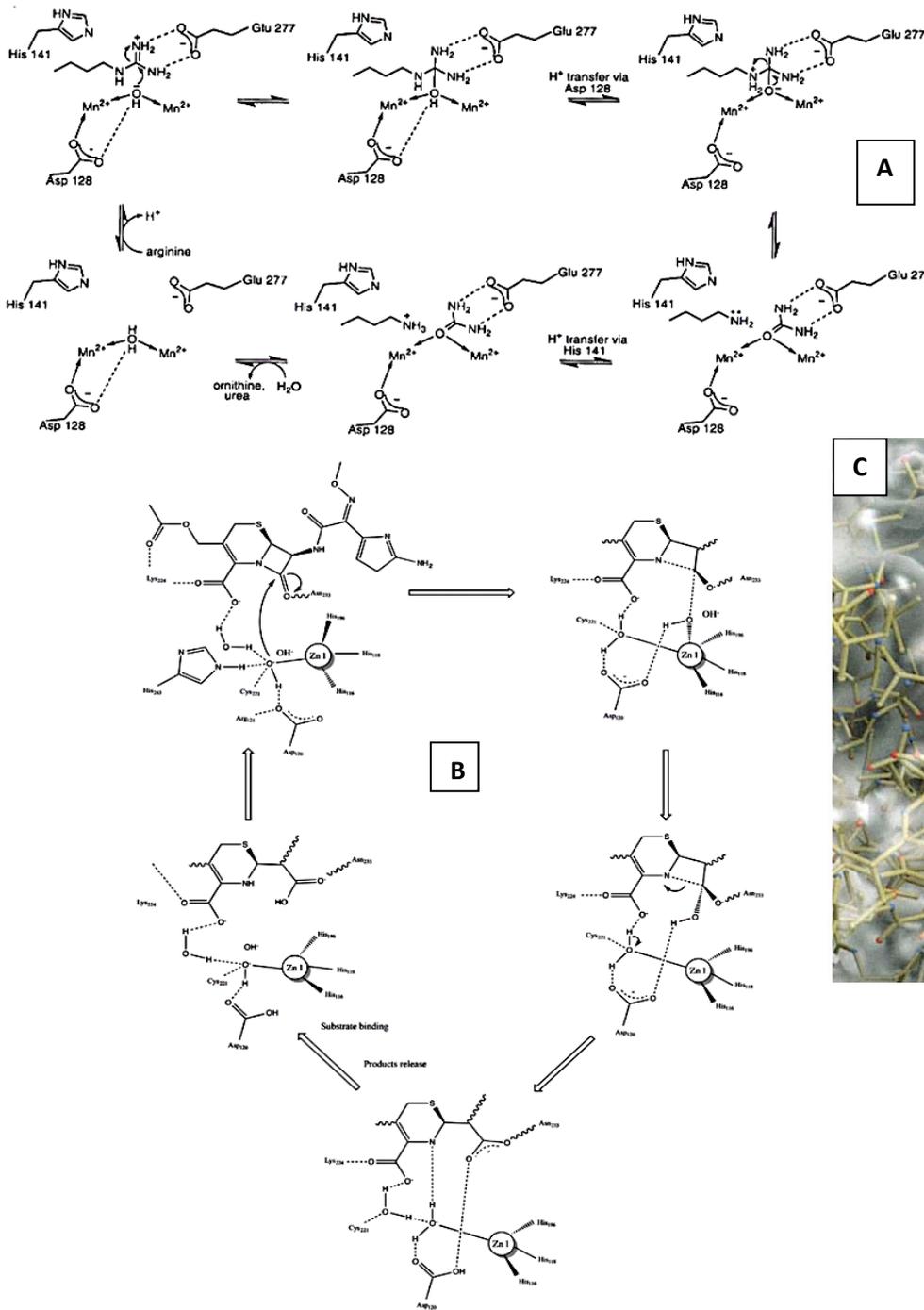


Figure 4: Modèles des mécanismes de réaction utilisés par les métallohydrolases mono- et dimétalliques. A. Modèle du mécanisme de réaction dinucléaire basé sur la structure de l'ARG. L'hydroxyde nucléophile, déclenchant la réaction, est situé entre les deux ions manganèse dans le site actif [16]. B. Modèle du mécanisme de réaction mononucléaire basé sur la réaction du MBL BclI de *Bacillus cereus* avec le substrat céfotaxime [25]. L'hydroxyde nucléophile, déclenchant l'hydrolyse, est lié au seul ion métallique du site actif. Cet hydroxyde est orienté en position idéale pour attaquer la liaison β -lactame du substrat. Alternativement, l'hydroxyde nucléophile réside dans la deuxième sphère de coordination, activée via des liaisons hydrogène [18]. A. Modèle de liaison de l'arginine.

Une comparaison peut être faite avec des metallo-bêta-lactamases (MBL) pour lesquels des mécanismes de réaction pour les systèmes dinucléaires et mononucléaires ont été proposés (Figure 4). Dans le mécanisme dinucléaire, l'hydroxyde coordonné aux deux ions métalliques agit comme nucléophile dans la réaction, tandis que dans le mécanisme mononucléaire, l'hydroxyde nucléophile est soit directement coordonné avec l'ion métallique unique dans le site actif, soit réside dans la deuxième sphère de coordination, activée *via* une liaison hydrogène avec un résidu d'aspartate conservé (Figure 4 B) [25]. Le nombre très important de liaisons hydrogènes existantes entre l'enzyme et son substrat, la L-arginine, font du site actif de l'arginase un site très particulier. Une modification de la structure et/ou de la stéréochimie de la L-arginine diminue la cinétique de l'enzyme [26].

Toutes ces observations confirment que le Mn^{2+} est essentiel pour l'activité de l'ARG. Le site actif de l'enzyme contient deux sites de liaison pour l'ion métallique avec des affinités très différentes (Figure 3 B). La majorité des données disponibles indiquent que l'exigence minimale pour une forme active de l'enzyme est monométallique, et la liaison d'un second Mn^{2+} semble conduire à une augmentation de l'activité d'un facteur deux environ. Cependant, certaines variations peuvent exister quant à l'endroit où l'ion métallique dans les formes catalytiques monométalliques peut se lier et des facteurs tels que des mutations dans la première sphère de coordination et / ou des modifications post-traductionnelles peuvent influencer le mécanisme précis de l'enzyme. Compte tenu de l'intérêt de l'ARG comme cible potentielle, une élucidation supplémentaire des interactions enzyme-ion métallique serait très bénéfique pour la conception d'inhibiteurs spécifiques et puissants.

Bien que l'activité de l'ARG puisse être régulée au niveau de la transcription, la présence de deux sites de liaison aux ions métalliques avec des affinités différentes dans les centres catalytiques de l'ARG indique également que l'activité de ces enzymes *in vivo* peut être régulée par des changements dans la concentration de Mn^{2+} . Le manque actuel de compréhension de la façon dont l'activité de cette enzyme peut être régulée et sous quelle forme (c.-à-d. mono- ou di-nucléaire) est présente dans certaines conditions métaboliques, interfère avec les tentatives de conception d'inhibiteurs spécifiques qui peuvent devenir cliniquement utiles. Dans la mesure où, dans l'ARG, la puissance des inhibiteurs pouvant dépendre du nombre d'ions métalliques présents dans le site actif, souligne la nécessité d'une compréhension approfondie du mécanisme de réaction de cette enzyme.

Mis à part les cations divalents du manganèse, d'autres métaux tels que le cobalt, le nickel ou le fer, peuvent également activer l'arginase dans une moindre mesure [18]. L'activité de

l'arginase est modulée en fonction du pH avec un pH optimal se situant entre 9,5 et 10,5. Par exemple, concernant l'arginase humaine le pH optimal est estimé à 9,4 [5].

Des études ont démontré que les événements de signalisation intracellulaire, entraînant une augmentation de l'expression / de l'activité de l'arginase, comprennent l'activation de la Rho kinase, de la protéine kinase activée par un facteur mitogène et de la protéine kinase A ; la production de cytokines multiples [telles que l'interleukine (IL) -13, IL-4, IL-6, IL-8 et le facteur de nécrose tumorale (TNF)] ; la formation d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote et l'hypoxie. Les facteurs de transcription régulant l'expression de l'ARG I comprennent le transducteur de signal et l'activateur de la transcription (STAT)-6 / STAT-3, le facteur de transcription foxhead box (Fox) O4, le facteur inductible par l'hypoxie (HIF) -1, la protéine C/EBP ("*CCAAT-box/Enhancer Binding Protein*"), et d'activation du facteur de transcription (ATF)-2, tandis que les facteurs de transcription pour l'ARG II incluent la kinase extracellulaire à signal régulé (ERK) 5 / la CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*), le facteur de transcription HIF-2 et le facteur de régulation de l'interféron (IRF)-3. Un contrôle épigénétique de l'expression d'ARG II par une activité altérée de l'histone désacétylase 2 a été également rapporté [3].

3. Rôle de l'arginase : Voie arginase-ornithine

L'arginase a deux fonctions physiologiques principales : la détoxification de l'ammoniac dans le cycle de l'urée et la production d'ornithine nécessaire à la synthèse de la proline et des polyamines (Figure 5). La proline est produite par l'activité de l'ornithine aminotransférase (OAT) et est nécessaire à la formation de collagène. Les polyamines sont produites par l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC), suivie de celles des spermidine et spermine synthèses. Les polyamines peuvent également être générées à partir d'agmatine par l'activité de l'arginine décarboxylase (ADC). Elles ont un rôle essentiel dans la prolifération et la croissance des cellules. Elles sont impliquées dans le syndrome inflammatoire, la réparation tissulaire et le développement neuronal.

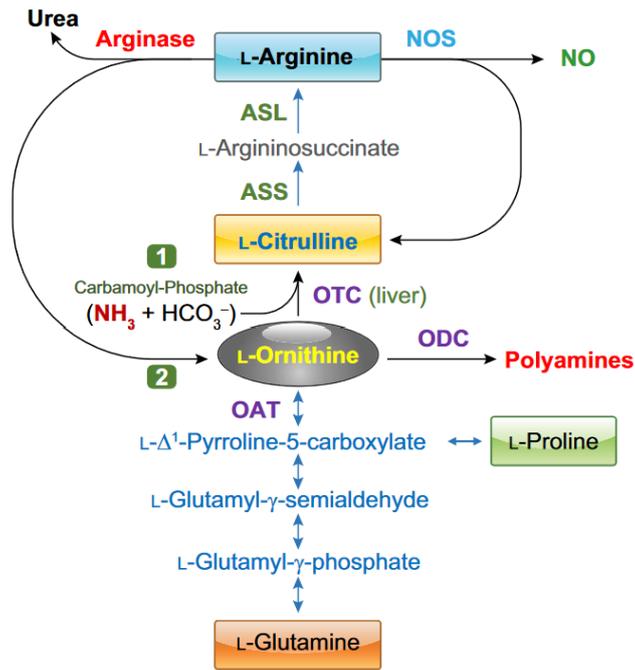


Figure 5 : Schéma de catabolisme de la L-arginine en L-ornithine / urée ou L-citrulline / NO, production de polyamines et anabolisme et catabolisme de la proline. Sont également présentés la voie de synthèse de la L-arginine à partir de la L-glutamine, la voie réversible entre la L-ornithine et la L-glutamine, et le recyclage de la L-citrulline en L-arginine. ASL, argininosuccinate lyase ; ASS, argininosuccinate synthase ; NOS, oxyde nitrique synthase ; OAT; ornithine aminotransférase; ODC, ornithine décarboxylase; OTC, transcarnamylase d'ornithine. L'arginase est l'enzyme finale du cycle de l'urée dans le foie, qui redémarre le cycle par la synthèse de L-citrulline à partir de carbamoyl-phosphate (1) et de L-ornithine (2) par l'OTC. Il convient de noter que toutes ces réactions ne se produisent pas dans une cellule donnée. En particulier, le cycle de l'urée est indépendant des autres réactions, c'est-à-dire que la L-arginine produite dans le cycle de l'urée n'est pas un substrat pour la NOS et la L-ornithine produite dans le cycle de l'urée n'est pas un substrat pour l'OAT ou l'ODC [3].

Dans la plupart des types cellulaires, la L-citrulline est convertie en L-arginine grâce à l'activité de l'argininosuccinate synthase (ASS) et de l'argininosuccinate lyase (ASL) (Figure 5). L'ASS et l'ASL font partie du cycle de l'urée. Une fonction défectueuse des enzymes du cycle de l'urée dans le foie peut entraîner une accumulation toxique d'ammoniac. S'ils ne sont pas traités, les troubles du cycle de l'urée peuvent provoquer des troubles mentaux, des convulsions et la mort. Le traitement des patients présentant des défauts d'activité de l'ARG I implique de diminuer leur apport en protéines et de compléter leur alimentation avec des acides aminés essentiels. Dans les cas les plus graves, une transplantation hépatique peut s'avérer nécessaire. Chez l'Homme, les effets des défauts d'activité de l'ARG II ne sont pas encore connus. Cependant, bien que viables, les souris *knockout* pour l'ARG II développent une hypertension. De plus, la présence de l'allèle rare ARG II : rs742869 a été associée à une

augmentation du risque de maladie d'Alzheimer chez les hommes et à un âge d'apparition de la maladie plus précoce [27]. Le lien entre le risque accru de la maladie d'Alzheimer et la fonction du cycle de l'urée n'a pas encore été établi, mais les auteurs suggèrent que l'induction du cycle de l'urée peut être protectrice dans le contexte de cette maladie. Malgré les soupçons de l'implication de l'ARG II dans cette pathologie, les souris déficientes en ARG II ne présentent pas de phénotypes observables en conditions normales.

L'arginase est aussi impliquée dans la réparation tissulaire. En conditions physiologiques, la cicatrisation se caractérise par une phase aiguë pendant laquelle les macrophages activés expriment des niveaux élevés de l'isoforme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS ou NOS2) et de l'isoforme phagocytaire de la NADPH oxydase, la NOX2. Les NOS2 et NOX2 produisent respectivement de l'oxyde nitrique (NO) et l'ion superoxyde à des niveaux nocifs. Les deux sont importants pour éradiquer les agents pathogènes. Cette réponse aiguë à la blessure est suivie d'une phase de réparation qui commence dans les 3 à 5 jours suivants. Au cours de cette phase, l'infiltration des cellules myéloïdes et l'expression de l'arginase sont augmentées. L'équilibre entre la consommation de la L-arginine par l'arginase (pour la production de collagène et de polyamines) et par la NOS2 (pour la production de NO) est déterminant pour la cicatrisation, l'arginase contrôlant le processus de guérison et la NOS2 régulant les événements cytotoxiques [28].

La production de polyamines est également importante pour la croissance, le développement et la régénération des cellules neuronales. Après la transection de la moelle épinière, le traitement des greffes nerveuses avec un facteur de croissance des fibroblastes acides s'est révélé favoriser l'augmentation de l'expression/de l'activité de l'ARG I ainsi que l'élévation de la formation de spermine dans les motoneurones, ce qui améliore la fonction locomotrice [3].

4. Compétition entre l'arginase et la NOS sur la L-arginine

En plus des rôles importants de la L-arginine dans le cycle de l'urée et la formation de polyamines et de proline, la L-arginine est également le substrat de la NO synthase (NOS) ce qui conduit à la formation de NO participant à la régulation de l'homéostasie du corps. Le NO, en tant que molécule de signalisation majeure pour de nombreuses fonctions physiologiques, a été exploré, dans les années 80, ce qui a conduit à la découverte de la NOS, qui utilise comme

substrat exclusif la L-arginine pour former du NO et de la citrulline. Les mécanismes d'équilibre entre ces deux voies de métabolisation ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique.

Il existe trois isoformes de NOS : la NOS neuronale (nNOS ou NOS1), la NOS2 et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3). Deux d'entre elles, les NOS1 et NOS3, sont exprimées de manière constitutive et nécessitent une activation. En revanche, la NOS2 (NOS inducible ou iNOS) est principalement régulée au niveau de l'expression par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels.

L'expression et la fonction normales de la NOS3 dans les cellules endothéliales vasculaires permet de maintenir un flux sanguin correct en catalysant la conversion de la L-arginine en NO et en L-citrulline (Figure 6). Les mécanismes mis en jeu, afin que la NOS3 puisse assurer son rôle essentiel dans la physiologie vasculaire, ont fait l'objet d'études approfondies. La NOS, appartenant à la famille des oxygénases, est présente dans les cellules sous forme de monomère inactif. La forme active dimérique catalyse la réaction de formation de NO à partir de la L-arginine et du dioxygène (O₂), en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), de tétrahydrobioptérine (BH₄), de flavine mononucléotide (FMN), de flavine adénine dinucléotide (FAD) et d'un groupement hème (FAD) (Figure 6). Dans une première étape, la L-arginine est oxydée en N^ω-hydroxy-L-arginine, qui dans une deuxième étape, est transformée en L-citrulline et NO.

La localisation de la NOS3 dans la membrane plasmique est rendue possible suite à la modification post-traductionnelle de la protéine par ajout de chaînes aliphatiques. La myristoylation et la palmitoylation subséquente la dirigent vers les cavéoles membranaires. La localisation subcellulaire de la NOS3 dans les cavéoles est importante pour son activité en raison de la proximité du transporteur-1 d'acides aminés cationiques (CAT-1) (transporteur de la L-arginine) et des enzymes de recyclage de la L-arginine, l'ornithine transcarbamylyase (OTC), l'argininosuccinate synthase (ASS), et l'argininosuccinate lyase (ASL), qui soutiennent la production du NO (Figure 6).

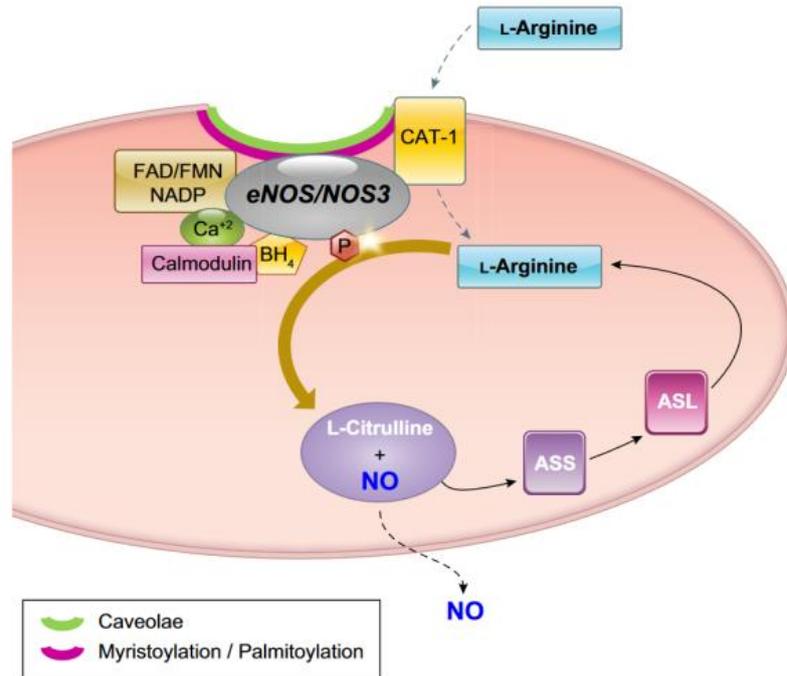


Figure 6 : Schéma de la régulation de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (NOS3) et du catabolisme de la L-arginine en NO et en L-citrulline, et le recyclage de la L-citrulline en L-arginine. ASL, argininosuccinate lyase ; ASS, argininosuccinate synthase ; BH₄ tétrahydrobioptérine ; CAT-1, transporteur d'acide aminé cationique-1 ; FAD, flavine adénine dinucléotide ; FMN, flavine mononucléotide ; NADP, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate [3].

La production du NO par les NOS3 et NOS1 se fait à des taux faibles à modérés. En revanche, la NOS2 produit du NO à des taux élevés. Ce NO dérivé de la NOS2 est nécessaire pour d'autres mécanismes de signalisation et de défense antimicrobienne. Le NO dérivé de la NOS3 diffuse vers les cellules musculaires lisses vasculaires où il se lie à la guanylate cyclase soluble (sGC) afin de l'activer. Cette activation de la sGC déclenche la production de GMPc, l'efflux de K⁺ et la relaxation des cellules musculaires lisses. Ainsi, le NO dérivé de la NOS3 régule le tonus vasculaire. La NOS3 maintient également une bonne circulation sanguine en empêchant l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales vasculaires et en inhibant l'agrégation plaquettaire. Les autres rôles du NO comprennent la défense de l'hôte contre les micro-organismes et les tumeurs malignes, la signalisation par les cellules neuronales, le remodelage des synapses neuronales et la modification post-traductionnelle des protéines par nitrosylation [3].

Dans des conditions où la quantité de L-arginine nécessaire pour la production de NO est insuffisante ou si le cofacteur BH₄ n'est pas disponible, la NOS produit moins de NO et utilise plus d'oxygène moléculaire pour générer l'ion superoxyde (O₂⁻) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par le transfert d'électrons du NADPH à l'O₂ *via* l'hème. Ce phénomène est nommé « découplage de la NOS », puisqu'il intervient principalement lorsque la NOS n'est pas couplée à son cofacteur ou son substrat. Lorsque le NO et l'O₂⁻ se forment simultanément, ils réagissent pour produire un oxydant toxique, le peroxynitrite (ONOO⁻) (Figure 7).

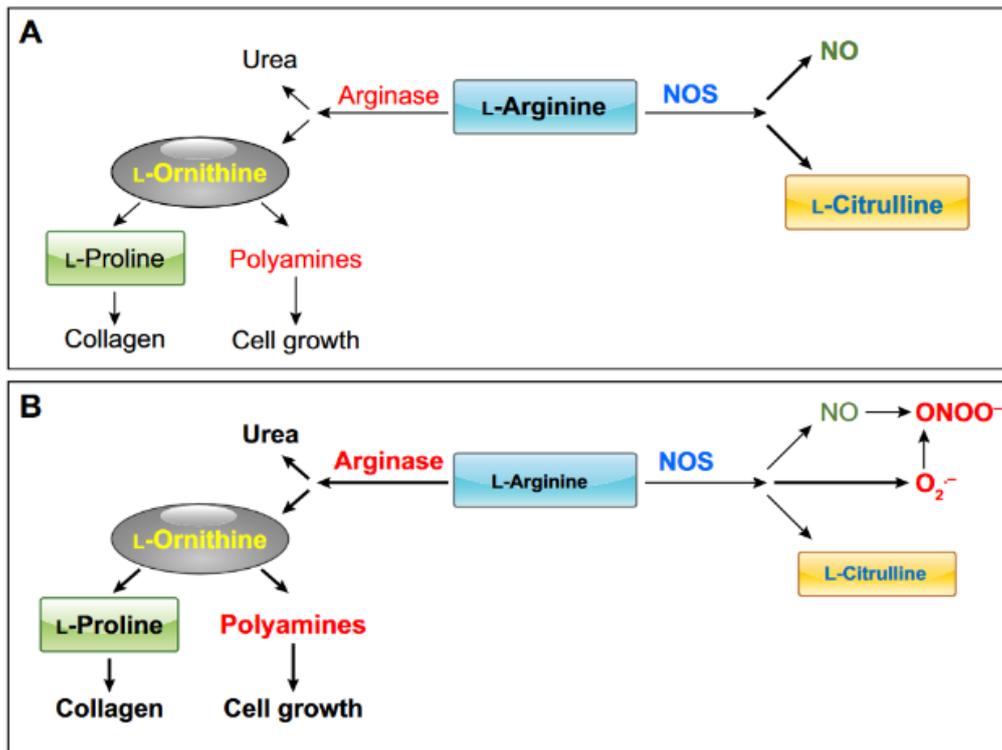


Figure 7: A. l'arginase et la NOS sont en concurrence pour leur substrat commun la L-arginine pour la formation de leurs produits. B. l'élévation de l'activité de l'arginase en réduisant la disponibilité de la L-arginine pour la NOS peut réduire la formation de NO et dissocier la NOS, ce qui produit plus d'ion superoxyde (O₂⁻), qui réagit rapidement avec le NO pour produire un autre oxydant puissant, l'ONOO⁻. Des niveaux élevés de L-ornithine provoquent une plus grande production de polyamines et de proline [3].

La réaction du NO avec le O₂⁻ se produit beaucoup plus rapidement que toutes autres réactions enzymatiques. Par ailleurs, l'O₂⁻ et l'ONOO⁻ peuvent oxyder la BH₄ pour former le BH₂, ce qui peut également provoquer le découplage de la NOS3. La combinaison de la diminution du NO et de l'augmentation d'O₂⁻ et d'ONOO⁻ peuvent entraîner un dysfonctionnement des cellules endothéliales vasculaires. Les rôles divergents du NO et de l'ONOO⁻ ont été mis en évidence dans la stimulation ou l'inhibition de l'immunité anti-tumorale [3].

Dans les années 90, des travaux pionniers menés sur des cultures de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses de pénis, ou de macrophages activés ont démontré que l'arginase pouvait limiter la disponibilité du substrat pour la NOS. De plus, l'interaction complexe entre l'arginase et la NOS a été illustrée par la capacité de la N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA), intermédiaire dans la synthèse du NO, à inhiber l'activité de l'arginase. La compétition entre l'arginase et la NOS s'est révélée d'autant plus forte aux faibles concentrations en L-arginine [29].

Avant les années 90, la capacité de l'arginase à concurrencer la NOS vis-à-vis de la L-arginine était considérée comme improbable sur la base des propriétés cinétiques des deux enzymes. En fait, la concentration de L-arginine dans les cellules est de 100–800 μM, bien supérieure aux niveaux nécessaires pour soutenir l'activité maximale de la NOS. Néanmoins, il a été démontré que l'ajout de L-arginine extracellulaire améliore la relaxation endothélium-dépendante dans divers états pathologiques caractérisés par un dysfonctionnement vasculaire. En exemple, la constante de Michaelis (K_m) de la NOS3 est de K_m 3 μM, la NOS3 serait donc saturée dans les conditions physiologiques. La K_m de l'arginase pour la L-arginine est de 2 mM, soit environ 1 000 fois plus faible que celle de la NOS3. Par conséquent, l'arginase ne devrait pas être en mesure d'entrer en compétition avec la NOS3 pour le substrat. En revanche, la vitesse maximale (V_{max}) de l'arginase est environ 1 000 fois supérieure à celle de la NOS3, ce qui pourrait contrebalancer sa capacité à métaboliser la L-arginine disponible. Cela explique leur capacité à être en compétition pour le substrat [3]. De plus, la compartimentation subcellulaire de la L-arginine peut jouer un rôle important dans la disponibilité de ce substrat pour les deux enzymes. Plusieurs études indiquent que les niveaux plasmatiques ou extracellulaires de la L-arginine et son transport intracellulaire déterminent la production du NO par la NOS3 dans l'ensemble des cellules endothéliales. Le transport de la L-arginine est donc un maillon essentiel dans la régulation du taux de NO. Toute altération fonctionnelle ou d'expression sur le transporteur CAT-1 limitera la disponibilité de la L-arginine pour les NOS. La compétition entre les ligands de la CAT-1 tels que la L-ornithine, qui a une affinité similaire à celle de la L-arginine, peuvent moduler la quantité intracellulaire de L-arginine [3]. La régulation de la concentration en NO intracellulaire ne se résume pas à la simple compétition de 2 enzymes pour la L-arginine mais de nombreux autres facteurs peuvent intervenir, tels que la concentration extracellulaire du substrat et son passage à travers la membrane.

En condition non physiologique, l'arginase module la fonction immunitaire comme dans des conditions de traumatisme, d'infections, de transplantation, de maladies auto-immunes ou de cancer. En effet, dans ces conditions, les effets biologiques proviennent d'un déséquilibre

entre les 2 enzymes soit dû à une altération de la fonction de la NOS2 soit à une expression / activité accrue de l'arginase qui limite l'expression de la NOS2 dans les cellules immunitaires [30].

En exemple, l'activité excessive de l'arginase dans les cellules myéloïdes présentes dans les tumeurs peut réduire la quantité de L-arginine nécessaire à la production du NO par la NOS2, ce qui peut altérer la réponse antitumorale des cellules T et permettre aux cellules tumorales de se développer. La démonstration de cet équilibre entre l'arginase et la NOS pour la métabolisation de leur substrat commun, la L-arginine (Figure 7), a ouvert de nouvelles pistes d'études sur le rôle de cette régulation dans de nombreuses maladies.

5. Implication de l'Arginase dans les maladies cardiovasculaires

La compréhension progressive du rôle prépondérant du NO dans l'homéostasie du corps et la maladie a montré que l'arginase, en hyperactivité, serait en concurrence avec la NOS. Ce dernier élément a renforcé l'étude du rôle de l'arginase dans le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. En effet, la production réduite de NO par les cellules endothéliales vasculaires entraîne une altération de la vasorelaxation et une augmentation de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. L'augmentation de la concentration en L-ornithine est fortement impliquée dans l'hyperplasie des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que dans la fibrose vasculaire et le raidissement de la paroi des vaisseaux. Dans la section suivante, les preuves récentes du rôle de ces voies de métabolisation de la L-arginine dans les maladies cardiovasculaires seront exposées.

5.1. Hypertension artérielle systémique et pulmonaire

5.1.1. Hypertension artérielle systémique

L'hypertension est un des facteurs de risque majeurs des maladies cardiovasculaires. Elle s'accompagne d'anomalies structurelles et fonctionnelles de l'endothélium vasculaire et notamment de la vasomotricité des vaisseaux. La résistance vasculaire élevée a été associée à une expression/activité accrue de l'arginase avec des niveaux intracellulaires réduits de NO, combinée à une augmentation de la production d'ion superoxyde et à une diminution de la L-

arginine et de la BH₄. Les études basées sur de nombreux modèles expérimentaux d'hypertension systémique ont lié l'augmentation de l'expression vasculaire de l'ARG I et de l'activité des ARG à l'augmentation de la pression artérielle [31]. En effet, les rats spontanément hypertendus présentent une activité ARG vasculaire élevée et une vasorelaxation endothélium-dépendante altérée pouvant être inversées par un inhibiteur d'arginase aboutissant à un abaissement de la pression artérielle. Il a été aussi démontré que l'hypertension angiotensine II-induite, les fibroses et rigidité vasculaires peuvent être prévenues ou réduites par la suppression partielle de l'ARG I ou par un traitement par des inhibiteurs d'arginase. De plus, cette implication de l'arginase a été confirmée par le biais d'inhibiteurs de la Rho kinase, connue pour éviter la hausse d'expression d'ARG I [31].

5.1.2. Hypertension artérielle pulmonaire

L'implication de l'arginase dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) a été également mise en évidence au travers de sa surexpression et de son activité élevée. Contrairement à l'hypertension systémique qui implique principalement une régulation à la hausse de l'ARG I, la HTAP a été principalement associée à une augmentation de l'expression de l'isoforme ARG II. Grâce à un modèle expérimental d'embolie pulmonaire, il a été démontré que la diminution de la production de NO est liée à une augmentation de l'expression/activité de l'arginase II qui limite la vasodilatation endothélium-dépendante des segments pulmonaires. L'administration d'un inhibiteur de l'arginase a pu atténuer l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'hypoxie [32]. Un maintien de l'approvisionnement en L-arginine, une réduction de la résistance pulmonaire et une limitation du dépôt de collagène à l'origine de la fibrose ont été observées. Une étude postérieure a mis en évidence que l'hypoxie est associée à l'augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses pulmonaires humaines par un mécanisme impliquant une induction de l'ARG II par l'AMPK α 1 [33]. Toutefois, le facteur induit par l'hypoxie-2 (L'HIF-2 α), observé dans un modèle murin d'HTAP induite par l'hypoxie, semble moduler l'HTAP, *via* une augmentation de l'expression et de l'activité de l'ARG I endothéliale pulmonaire et non pas l'ARG II [34].

En conclusion, l'augmentation de l'activité/de l'expression des isoformes de l'arginase semblent jouer un rôle indéniable et prépondérant dans la dysfonction endothéliale et l'augmentation de la pression artérielle. Les mécanismes sous-jacents à l'implication différentielle des isoformes ARG I et ARG II dans ces conditions ne sont pas clairs, mais impliquent probablement des différences au niveau de la distribution cellulaire et subcellulaire.

Une étude plus approfondie serait nécessaire pour clarifier ces mécanismes et définir l'implication de chaque isoforme et leur interdépendance.

5.2. Drépanocytose

La drépanocytose est causée par une mutation récessive autosomique de l'hémoglobine (Hb), qui entraîne une déformation en forme de faucille des globules rouges et une probabilité accrue de leur rupture. Suite à cette hémolyse intravasculaire, les globules rouges libèrent des quantités importantes d'ARG I, entraînant une réduction des niveaux de L-arginine plasmatique, une diminution du NO tissulaire et une augmentation des taux de L-ornithine. La libération d'hémoglobine, qui est un puissant piègeur de NO, s'ajoute à la réduction du taux de NO. De plus, l'augmentation de la L-ornithine produite par l'arginase peut entraîner une prolifération cellulaire accrue et une fibrose. La restauration de la biodisponibilité de la L-arginine par une supplémentation en L-arginine ou L-citrulline (précurseur de la biosynthèse de L-arginine) s'est révélée être un moyen pour réduire les effets cliniques de la drépanocytose [35]. La L-citrulline pourrait être plus efficace sur le plan clinique car elle n'induit pas l'expression de l'arginase. Le traitement à l'aide des inhibiteurs de l'arginase est également une stratégie thérapeutique prometteuse. Les symptômes liés à la drépanocytose comprennent l'anémie, les accidents vasculaires cérébraux, les épisodes de douleur vaso-occlusive sévère, les attaques ischémiques, le syndrome thoracique aigu, les ulcères de jambe, ainsi que l'hypertension pulmonaire. Une étude récente rapporte que le traitement oral, pendant 4 semaines, de souris drépanocytaires transgéniques avec un inhibiteur de l'arginase, l'ABH, a amélioré la disponibilité du NO et rétablit les symptômes liés à la drépanocytose [36].

5.3. Diabète de type I et II - Hyperglycémie

Dans le cas du diabète, maladie qui se caractérise par une hyperglycémie chronique, il a été démontré qu'un certain nombre de complications cardiovasculaires apparaissent chez les patients diabétiques et qu'elles contribuent à une morbidité et une mortalité importante. Les patients atteints de diabète de type 1 ou 2 souffrent généralement d'une variété de pathologies vasculaires qui incluent une vasorelaxation endothélium-dépendante détériorée, un remodelage pathologique des cellules musculaires lisses et de la paroi vasculaire, une fibrose accrue et une compliance vasculaire réduite [3]. Des niveaux réduits de L-arginine ont été observés dans le

plasma prélevé sur des patients diabétiques mais aussi *in vivo* dans les tissus vasculaires prélevés sur des rats diabétiques. L'augmentation de l'activité de l'arginase semble être à l'origine de cette carence. Des études sur l'aorte ainsi que sur les artères coronaires et rétiniennes, issues de modèles animaux diabétiques, ont montré que l'augmentation de l'expression de l'ARG I et de l'activité de l'arginase sont impliquées dans le dysfonctionnement vasculaire [37].

L'atteinte des coronaires étant une caractéristique majeure de la dysfonction vasculaire associée au diabète, une étude sur les artères coronaires isolées de patients diabétiques a révélé qu'elles expriment des niveaux accrus d'ARG I avec une altération de la vasorelaxation endothélium-dépendante. Cette dysfonction a d'ailleurs été améliorée par un traitement avec un inhibiteur d'arginase, la L-NOHA [38]. Les résultats de cette étude se corrélaient à ceux réalisés sur un modèle de diabète de type 2 chez le rat qui a montré que l'inhibiteur de l'arginase, nor-NOHA, améliore la fonction microvasculaire coronaire en augmentant l'apport en L-arginine et en améliorant la biodisponibilité du NO [39]. Afin de confirmer le lien entre maladie coronarienne et arginase chez l'Homme, l'analyse du flux sanguin de l'avant-bras de patients atteints de maladie coronarienne a montré que l'administration de nor-NOHA en perfusion améliore localement la vasorelaxation endothélium-dépendante avec des effets bénéfiques particulièrement évidents chez les patients atteints de diabète de type 2 [40].

5.4. Obésité – Troubles métaboliques

L'obésité et les troubles métaboliques associés, communs au diabète de type 2, ont également des effets dévastateurs sur la fonction cardiovasculaire et sont des déterminants essentiels de l'augmentation du risque cardiovasculaire. Dans l'obésité, l'expansion et l'inflammation du tissu adipeux viscéral jouent un rôle clé dans le dysfonctionnement cardiovasculaire ce qui implique une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, d'adipokines et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'expression de l'arginase dans les cellules vasculaires, hépatiques et immunitaires, a été examinée *in vivo* dans des modèles de diabète et d'obésité induite par des graisses.

En exemple, une étude a soumis des souris de type sauvage et des souris ARG I *knockout* (KO) uniquement dans les cellules endothéliales à un régime riche en graisses et en saccharose pendant 6 mois. Une altération de la relaxation vasculaire ainsi qu'une augmentation de la fibrose, de la rigidité et du stress oxydatif vasculaires ont été observées chez les souris sauvages et ont pu être associées à une élévation de l'expression/ activité de l'arginase. Aucune de ces

altérations n'a été retrouvée chez les souris KO et chez les souris sauvages traités par l'acide amino-6-borono-héxanoïque (ABH), un inhibiteur de l'arginase. Cette absence d'effets a été associée au défaut d'expression d'ARG I dans les cellules endothéliales vasculaires des souris KO ou à l'inhibition systémique de l'activité de l'arginase par l'ABH chez les souris sauvages [41]. Dans le cas d'une obésité induite par l'alimentation, le tissu adipeux périvasculaire a également été signalé comme présentant des niveaux élevés d'ARG I et ARG II, de faibles taux en L-arginine et en NO et un découplage de la NOS3, qui étaient associés à une altération de la vasorelaxation. Cette altération pourrait être inversée par une supplémentation en L-arginine ou une inhibition de l'arginase [3]. Une autre étude sur un modèle de souris diabétiques ayant un régime riche en matières grasses/riche en saccharose, a observé une expression et une activité ARG I élevées dans le tissu osseux et la moelle osseuse ainsi que des atteintes osseuses telles que des réductions de la densité osseuse, du volume osseux et de l'épaisseur trabéculaire. Un traitement avec l'ABH administré pendant la durée du régime a évité ces changements structuraux [42].

Par ailleurs, d'autres études récentes axées sur l'inflammation du tissu adipeux viscéral induite par l'obésité (régime riche en graisses/en saccharose) ont rapporté que les inhibiteurs de l'arginase (nor-NOHA ou ABH) ou le défaut d'expression d'ARG I endothéliale empêchent ou réduisent les augmentations en monocytes inflammatoires circulants et l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux viscéral [43].

5.5. Athérosclérose

Le dysfonctionnement endothélial est un événement précurseur de l'athérosclérose. Il se caractérise par une inflammation, une vasoconstriction et la formation d'un thrombus. Une fonction endothéliale vasculaire altérée entraîne la formation de plaques d'athérome et un remodelage pathologique de la paroi artérielle. Des études montrent qu'une corrélation existe entre l'élévation des lipoprotéines de basse densité oxydées (OxLDL) et les niveaux accrus d'expression et d'activité de l'arginase dans l'athérosclérose. Il est supposé que cette régulation à la hausse de l'arginase soit médiée par l'activation du récepteur aux lipoprotéines oxydées de basse densité de type lectine" (LOX-1) et de la RhoA/Rho kinase (ROCK), entraînant une augmentation de l'expression de l'ARG II. Cette activation de l'ARG II médiée par le LOX-1 provoque une réduction de la génération de NO en raison du découplage de la NOS3. Il a été constaté que le blocage de ces deux récepteurs LOX-1 et ROCK atténuait l'augmentation de l'activité de l'arginase. De plus, il a été démontré que la suppression d'ARG II chez des souris

déficientes en apolipoprotéines E limite le développement de plaques athéromateuses, réduit les niveaux de stress oxydatif et augmente la biodisponibilité en NO. Ces constatations confirment le rôle de l'ARG II dans cette pathologie. Ici l'hyperactivité enzymatique de l'arginase induite par les OxLDL dans les cellules endothéliales vasculaires a été liée à la translocation de la protéine ARG II des mitochondries dans le cytosol. Ce transfert entre les deux compartiments s'effectue par le biais d'un processus impliquant l'activité des peptidases MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*). À l'appui de ce concept, la délétion des MPP s'est révélée empêcher la translocation cytosolique de l'ARG II et par conséquent, bloquer le découplage de la NOS3 et améliorer ainsi, la fonction vasculaire dans ce modèle. Les OxLDL ont également été signalés comme pouvant diminuer les niveaux d'histone désacétylase 2, un facteur qui supprime la transcription d'ARG II [13]. Le niveau d'expression de l'ARG II macrophagique a été également fortement impliqué dans le développement de l'athérosclérose mais il a été constaté que l'augmentation d'expression de l'ARG I des macrophages joue un rôle bénéfique dans la régression de la plaque athérosclérotique [44]. Néanmoins, cette théorie est controversée dans la littérature. En effet, les macrophages, utilisés pour les différentes études, ont des origines très différentes. Il semblait qu'il existe des différences importantes entre les espèces et que les macrophages humains ne sont pas en mesure de produire du NOS2/NO ou de l'arginase/L-ornithine. Cependant, les études récentes sur les macrophages de patients atteints de tuberculose ont confirmé que les macrophages, comme d'autres cellules myéloïdes humaines, expriment l'ARG I et que l'expression de l'ARG I est impliquée dans la progression ou la régression des pathologies [45]. En conséquence, le ciblage sélectif d'une isoforme de l'arginase pourrait offrir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour limiter les pathologies vasculaires associées à l'athérosclérose.

5.6. Lésion ischémique-reperfusion myocardique

Les lésions ischémiques du myocarde causées par l'occlusion des artères coronaires, sont une cause majeure de morbidité et de décès, en particulier chez les patients atteints de diabète et d'athérosclérose. Cependant, la reperfusion peut elle-même induire des dommages myocardiques supplémentaires accompagnés d'une induction des espèces réactives de l'oxygène (ERO), de facteurs pro-inflammatoires et de la mort des cardiomyocytes. Une vasodilatation endothélium-dépendante altérée due à une réduction de la biodisponibilité du NO est un des principaux mécanismes de lésion due à l'ischémie/reperfusion (I/R). Le rôle critique de l'augmentation de l'expression et de l'activité de l'arginase dans les lésions I/R du

myocarde a été démontré dans plusieurs modèles animaux. Il a été mis en évidence que l'administration de la nor-NOHA, inhibiteur de l'arginase, avant l'ischémie, au cours de l'ischémie tardive et au début de la reperfusion restaure la biodisponibilité du NO et diminue considérablement la taille des lésions cardiaques [46, 47]. Cependant, il est important de noter que la fonction normale de l'arginase dans les macrophages M2 « cicatrisants » est également importante pour la réparation des tissus ce qui renforce l'utilité d'une inhibition ciblée à un type cellulaire.

Comme les lésions I/R, l'infarctus du myocarde (IM) déclenche une réponse inflammatoire impliquant l'activation des cellules endothéliales et l'adhésion des neutrophiles, ce qui peut, en outre, entraîner la mort des cellules myocardiques. Une étude récente a rapporté que des souris ayant des cellules endothéliales *knockout* pour le facteur de transcription FoxO4, qui active la transcription de l'ARG I, sont protégées contre la perte de fonction cardiaque induite par l'IM, l'accumulation de neutrophiles et l'élévation de l'expression de l'ARG I. La réduction d'expression de FoxO4 dans les cellules endothéliales empêcherait la réduction des niveaux de NO induite par l'hypoxie et l'adhésion des monocytes ; ces effets ont été inversés par l'expression ectopique de l'ARG I [48].

5.7. Vieillessement et sénescence cellulaire

Une activité excessive de l'arginase a été liée à la sénescence des cellules endothéliales chez l'Homme et les rongeurs [3]. Les analyses menées chez les rats âgés ont révélé une augmentation de l'activité de l'arginase en association avec une diminution du NO et une augmentation de la formation d'ion superoxyde par rapport aux jeunes rats. Il a été également noté qu'une accélération de la sénescence des cellules endothéliales ainsi qu'une diminution de la production de NO se produisaient avec une supplémentation en L-arginine [49]. Ici la supplémentation en L-arginine n'a pas amélioré l'activité de la NOS mais a plutôt impliqué des mécanismes provoquant une suractivité de l'arginase. Le rôle de l'arginase a été confirmé grâce à l'effet, sur des rats âgés, des inhibiteurs de l'arginase qui ont empêché le découplage de la NOS3 et réduit la formation d'ion superoxyde. Le vieillissement cellulaire est probablement dû à une régulation à la hausse de l'arginase suite à une surexpression de l'ARG II [50].

5.8. Dysfonction érectile

L'érection du pénis et le processus de flaccidité sont principalement régulés par un événement neurophysiologique impliquant la relaxation et la contraction des cellules musculaires lisses présentes dans le corps caverneux (CC). Des études [51] ont montré que le NO est un médiateur clé de la relaxation des muscles lisses du corps caverneux et pourrait donc être impliqué dans les troubles de l'érection. Le NO, libéré par la NOS3 dans les cellules endothéliales ou par la NOS1 dans les nerfs nitrergiques, provoque la relaxation du muscle lisse du CC. L'activité de l'arginase modulerait le tonus du CC en inhibant la production de NO par un déséquilibre dans la métabolisation de l'arginine par ces deux enzymes. Bien que l'ARG I et l'ARG II soient exprimées dans le CC, une augmentation de l'expression de l'ARG II serait le principal médiateur de la dysfonction érectile. Du point de vue clinique, une expression/activité élevée de l'arginase et une synthèse de NO réduite associée à une diminution de la relaxation caverneuse sont observées chez les patients diabétiques atteints de dysfonction érectile [52]. L'inhibition de l'arginase maintient les concentrations cellulaires en L-arginine, ce qui, à son tour, améliore l'activité de la NOS et augmente la relaxation NO-dépendante des muscles lisses dans le CC du pénis humain et du rat. De plus, Il a été observé que la suppression du gène ARG II chez les souris diabétiques améliore la relaxation des nerfs nitrergiques du CC [53]. En parallèle, l'étude de la voie RhoA/ROCK, qui augmente l'expression de l'arginase, a montré son rôle dans les mécanismes de relaxation vasculaire médiés par les cellules endothéliales ou par les nerfs nitrergiques [31]. Ces derniers résultats suggèrent que l'inhibition directe de l'activité de l'arginase ou indirecte, en bloquant la voie RhoA/ROCK, pourrait offrir des stratégies importantes pour le traitement de la dysfonction érectile.

En conclusion, l'implication de l'arginase dans les maladies cardiovasculaires est une évidence mais le rôle des isoformes est parfois contradictoire et tissu dépendant. L'utilisation des inhibiteurs d'arginase est une alternative thérapeutique intéressante comme le montrent les différents exemples présentés. Toutefois, il semble nécessaire de vérifier les effets biologiques résultant de l'inhibition des différentes isoformes ce qui nécessitera, probablement, le développement d'inhibiteurs sélectifs. Comme la quasi-totalité des études ont été menées chez l'animal, il sera nécessaire de vérifier l'intérêt de l'inhibition spécifique chez l'Homme pour minimiser le risque de survenue d'effets secondaires.

Une autre alternative pourrait être la supplémentation en L-arginine, considérée comme un acide aminé semi-essentiel qui provient du renouvellement des protéines et de l'alimentation.

En raison de son rôle bien établi dans l'amélioration de la production du NO par la NOS3, la L-arginine est un supplément populaire pour les athlètes et les amateurs de fitness. De plus, les études précliniques ont montré qu'un apport thérapeutique supplémentaire en L-arginine peut prévenir ou inverser la dysfonction endothéliale associée à diverses pathologies cardiovasculaires.

6. Implication de l'arginase dans les maladies rénales

L'augmentation de l'activité de l'arginase semble jouer un rôle clé dans la néphropathie diabétique, la néphropathie hypertensive et la glomérulonéphrite [54]. Il est donc important d'identifier le rôle spécifique de l'arginase dans la progression de ces pathologies qui aboutissent à l'insuffisance rénale.

6.1. Néphropathie diabétique

Dans la néphropathie diabétique, un dysfonctionnement endothélial associé à une activité excessive de l'arginase a été observé. L'isoforme ARG II est fortement exprimée dans les cellules rénales, tandis que l'ARG I, est à peine détectée. L'inhibition pharmacologique de l'ARG II ou le blocage de l'expression du gène de l'ARG II chez l'animal diabétique a abouti à une albuminurie, à un taux sanguin en azote uréique faible et à une réduction du recrutement des macrophages dans le tissu rénal. De plus, de légères modifications histologiques du rein ont été observées [54]. L'ARG II semble ainsi être impliquée dans de nombreux mécanismes de régulation au niveau du rein qui font émerger de nouvelles fonctionnalités.

Comme décrit précédemment, il a été suggéré que l'hyperexpression/hyperactivité de l'ARG II rénale génère un déficit en L-Arginine qui s'associe à un dysfonctionnement de la NOS3 et par conséquent à une production réduite de NO dans les reins. La supplémentation orale en L-arginine ou en L-citrulline pourrait être une des modalités potentielles pour restaurer les concentrations plasmatiques en L-arginine et améliorer ainsi le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire [3]. Malheureusement, l'étude de You et col. a montré que la supplémentation en L-arginine ou L-citrulline n'a pas réussi à augmenter la biodisponibilité du NO et à prévenir et/ou inverser les marqueurs des lésions rénales chez les souris diabétiques de type 1 malgré l'augmentation réussie des niveaux de L-arginine dans le plasma et les reins [55]. Il n'a pas pu être exclu que l'absorption de la L-arginine soit altérée dans une sous-population

de cellules qui expriment la NOS3. Une autre possibilité est que le diabète puisse entraîner des altérations de la compartimentation subcellulaire des protéines ou des enzymes de la voie arginine/NO. Cela pourrait conduire à un manque de réponse à l'augmentation de la L-arginine extracellulaire. En revanche, Romero et son équipe [56] ont montré que la supplémentation orale en L-citrulline protège contre les lésions rénales, améliore le profil anti-inflammatoire et préserve la fonction néphronique pendant le diabète. La supplémentation en L-citrulline augmente non seulement la synthèse de la L-arginine, mais inhibe également l'ARG I cytosolique contrairement à la L-arginine.

6.2. Néphropathie hypertensive

Comme vu précédemment, l'arginase joue un rôle important dans la dysfonction endothéliale et par conséquent dans l'hypertension artérielle. Dans le cas d'hypertension rénale, les mécanismes de la pathologie ne sont pas clairs. Dans un modèle de rats uni-néphrectomisés, une augmentation de la pression artérielle systolique et une albuminurie progressive associées à une augmentation de l'activité de l'arginase rénale et à une expression excessive de l'ARG I dans les glomérules ont été observées [57]. Cependant, aucun changement dans l'activité/l'expression de l'arginase n'a été remarqué dans les tissus rénaux d'un modèle de rats spontanément hypertendus. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour définir l'implication spécifique de l'arginase et ses isoformes dans la néphropathie hypertensive.

7. Implication de l'arginase dans le cancer

7.1. Voie Arginase / Polyamines

Comme précédemment décrit, la L-ornithine, deuxième produit de l'hydrolyse catalysée par l'arginase, est ensuite métabolisée en polyamines (putrescine, spermidine et spermine) *via* la voie de l'ornithine décarboxylase (ODC) (Figure 8). Le lien entre l'augmentation de la production de polyamines, la croissance cellulaire et le développement du cancer a été observé depuis les années 60. En effet, un niveau élevé de polyamines pourrait être associé à une prolifération cellulaire, au développement d'une angiogenèse, à une diminution de l'apoptose et à une régulation positive des gènes affectant le développement du cancer et des métastases. Alternativement à l'action de l'arginase, l'arginine peut être métabolisée en NO par la NOS

avec la production de la N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) comme produit intermédiaire (Figure 8) [58]. La NOHA a une action inhibitrice sur l'activité de l'arginase et le NO a la même action sur l'ODC par S-nitrosylation de la cystéine 360 présente dans le site actif de l'enzyme [59].

Par conséquent, l'inhibition de l'arginase pourrait contribuer à empêcher la synthèse de polyamines en diminuant la production d'ornithine et en favorisant la synthèse de NO. Dans ce contexte, les traitements avec des inhibiteurs de l'arginase se sont révélés réduire le niveau de polyamines dans le tissu tumoral, réduisant ainsi la croissance des cellules tumorales [58].

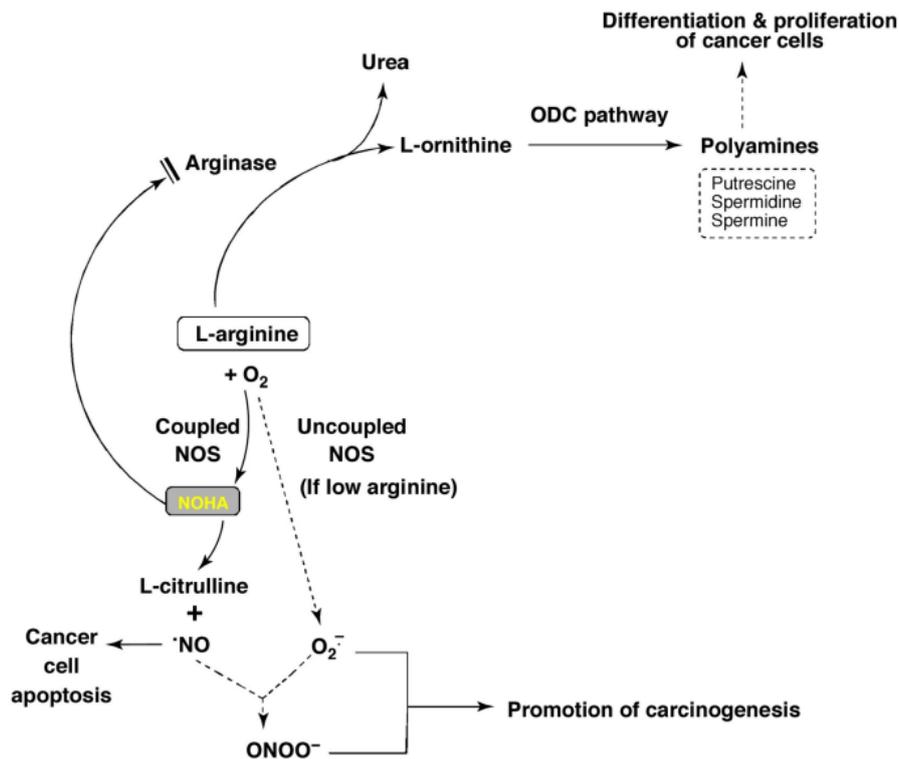


Figure 8: Métabolisme de la L-arginine et voies associées impliquées dans le cancer. La N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) est un produit intermédiaire de la catalyse par la NOS. Lorsque l'activité de l'arginase est normale, la disponibilité de la L-arginine pour la NOS est adéquate et la NOS produit du NOHA, un inhibiteur endogène de l'arginase, et l'oxyde nitrique (NO). En cas d'augmentation de l'activité de l'arginase conduisant à une carence en L-arginine, la NOS se dissocie, ce qui entraîne la production de O₂⁻ et ONOO⁻ (lignes pointillées). ODC, ornithine décarboxylase ; NOS, oxyde nitrique synthase ; NOHA, N^ω-hydroxy-L-arginine [58].

7.2. Voie de la NOS

La production de NO peut être impliquée dans de nombreux états physiopathologiques. Le rôle du NO dans le contexte du cancer est complexe. En effet il peut avoir des rôles antagonistes en favorisant la cancérogenèse ou en inhibant la croissance tumorale. Les effets

pro- ou anti-néoplasiques du NO sont dépendants de la concentration de ce dernier [60]. À de faibles concentrations de NO (c'est-à-dire après sa synthèse par la eNOS), il provoque l'angiogenèse par l'accumulation de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), de facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) [60]. Ces facteurs conduisent à la prolifération, l'invasion puis à la dissémination des cellules cancéreuses et enfin à des métastases. À des niveaux élevés en NO (c'est-à-dire après sa production par l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) présente dans diverses cellules, y compris les cellules cancéreuses), il agit comme un agent antinéoplasique en générant une cytotoxicité qui se traduit par l'apoptose de nombreuses cellules cancéreuses humaines (par exemple cancers de la prostate, du pancréas, du sein, de la vessie et du côlon) [58].

L'activité accrue de l'arginase, réduit les quantités de L-arginine disponible conduisant au découplage de la NOS qui produit de grandes quantités d'anions superoxydes (O_2^-) au lieu de NO, ce qui favorise ainsi la cancérogenèse (Figure 8). Ce phénomène réduit encore la disponibilité du NO car, dans ces conditions, il réagit avec l' O_2^- pour former du peroxyde d'azote ($ONOO^-$) connu sous le nom d'espèces réactives de l'azote (ERA). Des niveaux élevés d'ERO et d'ERA endommagent non seulement directement l'ADN, mais régulent à la baisse l'expression des gènes nécessaires à la réparation des cassures d'ADN double brin par recombinaison homologue haute-fidélité, conduisant ainsi à la mutagenèse et à la cancérogenèse [58]. Par conséquent, dans le microenvironnement tumoral, l'inhibition de l'arginase pourrait limiter la prolifération des cellules tumorales en réduisant la synthèse des polyamines mais aussi en générant une cytotoxicité tumorale, médiée par le NO, en augmentant sa production par la voie iNOS dans les macrophages. L'inhibition de l'arginase pourrait contribuer à restaurer un état normal de la NOS, et empêcher la formation d'ERO. Tous ces mécanismes sont donc favorables pour une limitation de la prolifération des cellules cancéreuses.

7.3. Arginase / Voie de réponse immunitaire

Outre les rôles de l'arginase dans la promotion de la progression du cancer par la voie des polyamines ou la régulation négative du NO, la recherche, au cours de ces dernières décennies, a fourni de nombreuses preuves pour confirmer le rôle prépondérant de l'arginase dans l'immunobiologie tumorale.

Le système immunitaire, par le biais des cellules T, reconnaît et élimine les cellules cancéreuses. La L-arginine est essentielle pour la signalisation des récepteurs des lymphocytes T et la prolifération ultérieure des lymphocytes T. La dégradation enzymatique de la L-arginine altère la croissance et les fonctions des cellules T, comme l'ont rapporté Rodriguez et ses collaborateurs [61]. Ils ont montré que, dans un modèle murin de carcinome pulmonaire, le manque en arginine facilite l'échappement des cellules tumorales à la surveillance immunitaire médiée par les cellules T (Figure 9).

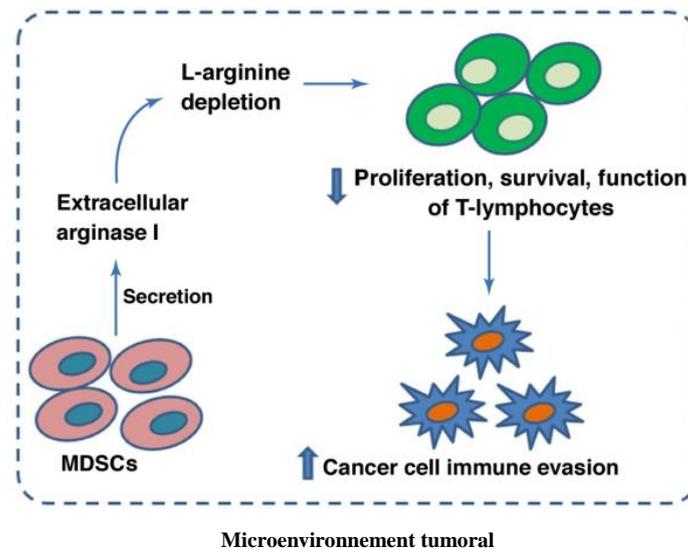


Figure 9: Effet immunosuppresseur de l'arginase sur les lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral. L'ARG sécrétée par les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) perturbe la prolifération et la fonction immunitaire des cellules T cytotoxiques par la privation en L-arginine. [58]

En effet, dans le microenvironnement tumoral, l'ARG I est produite et libérée, au niveau extracellulaire, par les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC), les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et les cellules tumorales. L'ARG II est aussi exprimée par de nombreuses cellules de tumeurs solides, les blastes de leucémie myéloïde aiguë et les cellules stromales associées au cancer [62]. Par conséquent, la forte expression de l'arginase épuise les concentrations locales et éventuellement systémiques d'arginine. Cette privation en arginine perturbe les fonctions immunitaires des lymphocytes T et empêche leur prolifération ce qui favorise l'anergie et l'apoptose des lymphocytes T. Les effets immunosuppresseurs de l'arginase sur les lymphocytes T ont également été démontrés *in vitro* [63].

En préclinique, les traitements avec un inhibiteur de l'arginase seul ou en combinaison avec d'autres thérapies, telles que les inhibiteurs de point de contrôle [64, 65], diminuent et contrôlent la croissance tumorale *in vivo* chez la souris atteinte d'un cancer du poumon de Lewis. Ces

effets antitumoraux des inhibiteurs de l'arginase étaient essentiellement le résultat d'une amélioration de la réponse immunitaire.

8. Implication de l'arginase dans les maladies neurovasculaires

La présence de deux isoformes d'arginase dans le cerveau a été observée et les auteurs ont constaté que l'ARG I et l'ARG II sont toutes les deux exprimées dans les neurones. Les niveaux de l'ARG I sont supérieurs à ceux de l'ARG II mais que l'ARG II est généralement coexprimée avec l'ARG I [66]. L'expression de l'arginase était particulièrement élevée dans les neurones du cortex cérébral, du cervelet, des pons, de la médulla et de la moelle épinière. Les cellules rétinienne expriment également ces deux isoformes. L'analyse d'immunolocalisation a montré une immunoréactivité de l'ARG I dans les neurones rétinien, la glie et les cellules vasculaires et une expression abondante de l'ARG II dans les segments internes des photorécepteurs et des cellules horizontales [67, 68].

L'effet d'une activité arginase élevée provoquant une augmentation de la formation de polyamines est connu pour avoir un impact bénéfique sur la neuroprotection et la régénération neuronale dans les maladies et les blessures du système nerveux central (SNC). Cependant, de nombreuses études ont lié la régulation à la hausse de l'arginase à diverses maladies du SNC, notamment la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques, les accidents vasculaires cérébraux, les lésions cérébrales traumatiques, la maladie de Parkinson et plusieurs maladies de la rétine [3].

Par ailleurs, le NO est un élément essentiel de la signalisation par les cellules neuronales et vasculaires et est particulièrement important pour maintenir un bon flux sanguin dans le SNC. La perturbation de la signalisation du NO est une composante majeure de l'apparition des lésions cérébrales. Il a été démontré que le NO, produit par les différentes isoformes de NOS, influe sur la progression des lésions des cellules neuronales de différentes manières. Des niveaux élevés de NO produit par l'activité de la NOS2 dans des conditions inflammatoires ou par la NOS1 peuvent favoriser le stress nitrosatif, ce qui peut entraîner la mort des cellules neuronales. Cependant, le NO de la NOS3 est nécessaire pour maintenir un flux sanguin correct

et inhiber l'agrégation des plaquettes et la fixation des leucocytes à la paroi vasculaire, limitant ainsi le stress oxydatif et l'inflammation [3].

Une activité excessive de l'arginase peut augmenter le stress oxydatif et l'inflammation en réduisant l'apport de L-arginine conduisant au découplage de la NOS. D'un autre côté, les médiateurs inflammatoires et le stress oxydatif sont connus pour provoquer une augmentation de l'expression de l'arginase. L'implication de l'activité de l'arginase dans les lésions du SNC n'a été envisagée que récemment et son effet bénéfique par le biais des polyamines et néfaste en générant un déficit en arginine rend son rôle complexe. Dans le propos qui suit, nous explorerons l'implication des voies de l'arginase dans les lésions neurovasculaires du cerveau et de la rétine.

8.1. AVC ischémique

Les perturbations de la signalisation du NO sont fortement associées aux lésions tissulaires consécutives à un AVC ischémique. L'implication de l'arginase dans cette pathologie est très probable. En effet, des études sur un modèle de rongeur d'AVC ischémique ont montré que des augmentations de l'activité de l'arginase et de l'expression de l'ARG I accompagnent la lésion cérébrale [69]. En contrepartie, l'expression de l'ARG II n'a pas été modifiée. Les augmentations de l'expression de l'ARG I étaient localisées à la zone de la lésion et étaient corrélées à une régulation positive précoce et durable de l'ARG I dans l'astroglie et les macrophages activés. Les augmentations d'activité de l'ARG I ont été associées aux augmentations de la concentration en protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), un marqueur de l'activation des cellules gliales. Par contre, des diminutions retardées de l'ARG I ont été notées dans les neurones situés à proximité de la zone de lésion. De plus, il a été observé que le schéma de distribution de l'ARG I était similaire à celui du facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF). Ce recouvrement pourrait suggérer un rôle potentiel de l'ARG I dans la neuroplasticité [3]. Une étude sur les échantillons de sang de patients ayant subi un AVC ischémique aigu a montré une association positive entre les niveaux d'expression de l'ARG I, le rapport neutrophile/lymphocyte et la gravité de l'AVC [70]. Étant donné le rôle supposé de l'ARG I dans la fonction de réparation médiée par les macrophages de type M2, il est possible que l'augmentation de l'expression de l'ARG I représente aussi un mécanisme de réparation. La complexité des mécanismes mis en jeu nécessite des études plus approfondies pour élucider le rôle spécifique de l'expression et de l'activité de l'ARG I dans la lésion induite par l'ischémie

et la réparation tissulaire ultérieure. De plus, à l'heure actuelle, l'implication de l'isoforme ARG II dans les accidents vasculaires cérébraux est peu connue mais Ahmad, Shah et Doré ont rapporté un rôle éventuellement protecteur de l'ARG II dans l'ischémie cérébrale [71]. Ils ont constaté que la suppression du gène de l'ARG II entraînait des volumes d'infarctus plus élevés et des déficits neurologiques dans un modèle d'occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne distale. Les mécanismes moléculaires de la neuroprotection médiée par l'ARG II restent encore à explorer.

8.2. Traumatisme craniocérébral

Dans le cas de lésions cérébrales traumatiques, une altération de la fonction de la NOS et une production réduite de NO ont également été observées. En effet, quelques minutes après la blessure, les niveaux de NO dans les tissus cérébraux endommagés augmentent. Peu de temps après, les niveaux de NO diminuent et restent inférieurs aux valeurs de référence pour des périodes allant de quelques heures à plusieurs jours. Cette diminution de NO est corrélée de manière significative à une diminution des activités des NOS2 et NOS3 et une réduction du flux sanguin cérébral. Par ailleurs, il a été démontré qu'une supplémentation en L-arginine augmente le flux sanguin cérébral et réduit les signes de blessure, ce qui suggère que la déplétion en L-arginine serait due à une activité excessive de l'arginase [72]. Dans le cadre d'un modèle de traumatisme craniocérébral chez le rat, il est intéressant de noter que l'altération de la production de NO ainsi que l'activité accrue de l'arginase seraient corrélées au dysfonctionnement endothélial des artères mésentériques 24 heures après les lésions cérébrales traumatiques, ce qui suggère que les vaisseaux sanguins ont une « mémoire moléculaire du neurotraumatisme » [73]. De plus, un sous-ensemble de macrophages positifs à l'ARG I s'est révélé induit et a été localisé près de la lésion, 1 jour après la blessure. L'ARG I est probablement impliquée dans la réponse pathologique aux lésions cérébrales traumatiques soit directement soit au travers de la disponibilité en L-arginine pour les NOS [74].

Dans un modèle de lésions cérébrales traumatiques chez la souris *KO* à l'ARG II, une amélioration du flux sanguin cérébral a été observée suggérant l'implication de l'ARG II dans le dysfonctionnement vasculaire induit par les lésions cérébrales traumatiques [75]. De plus une étude utilisant un modèle de lésions cérébrales traumatiques chez le rat a montré une augmentation du catabolisme des polyamines après la blessure [76]. L'implication de la voie ornithine/polyamine a été confirmée par son blocage pharmacologique et son inhibition a limité

les troubles cognitifs après les lésions cérébrales traumatiques [77]. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de l'activation de la voie arginase/polyamine et du catabolisme des polyamines dans les lésions cérébrales traumatiques.

8.3. Maladie d'Alzheimer

Des altérations du métabolisme de la L-arginine peuvent également jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Cependant, des études sur la relation entre l'expression de l'arginase et la maladie d'Alzheimer ont conduit à des résultats contradictoires. Un groupe a signalé que les niveaux d'ARNm de l'ARG I étaient augmentés dans le cortex frontal des patients atteints de cette maladie, mais que ceux de l'ARG II étaient inchangés [78]. Une autre étude menée par Hansmann et ses collaborateurs [27] a rapporté que les niveaux d'ARNm de l'ARG II étaient augmentés dans le cortex frontal tandis que ceux de l'ARG I étaient inchangés. De plus, ils ont décrit la présence d'un allèle d'ARG II rare qui était lié à une augmentation du risque de survenue précoce de la maladie d'Alzheimer chez les sujets masculins. Ainsi, l'augmentation de l'activité de l'arginase semble être liée à la pathogenèse de cette maladie. Un rapport récent [79] a noté que l'expression soutenue de l'ARG I était protectrice dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer et que l'épuisement conditionnel de l'ARG I dans les cellules myéloïdes a entraîné une aggravation de la pathologie. Cette dernière observation est cohérente avec les résultats d'une autre étude qui suggèrent que la microglie ARG I positive est impliquée dans la réduction de la plaques β amyloïdes (A β) pendant la neuroinflammation soutenue et dépendante de l'IL-1 β . Ces travaux ouvrent de nouvelles voies pour le traitement immunomodulateur de la maladie d'Alzheimer. Des recherches supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour définir le rôle spécifique de l'arginase dans la maladie d'Alzheimer et pour déterminer sa valeur potentielle en tant que biomarqueur de cette maladie.

8.4. Sclérose en plaques

L'implication de l'arginase et du NO dans la pathogenèse de la neuroinflammation aiguë semble très probable. Des études sur le modèle expérimental d'encéphalomyélite auto-immune de la sclérose en plaques chez le rat ont rapporté que l'expression et l'activité de l'ARG I étaient augmentées à la fois dans le cerveau et la moelle épinière. Chez les patients atteints de sclérose

en plaques, une production accrue d'ERO et une expression accrue de NOS2 ont été observées parallèlement à une augmentation de l'activité de l'ARG dans le liquide céphalorachidien [80, 81]. Ces résultats suggèrent que l'arginase et le NO pourraient être utiles comme biomarqueurs pour la progression de la maladie. Les dernières investigations montrent que les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) joueraient un rôle modulateur et effecteur important aussi bien dans les modèles animaux que chez les patients atteints de sclérose en plaques. Une diminution du niveau d'ARG I dans ces cellules a été observée chez des patients atteints de sclérose en plaques par rapport aux témoins sains [82]. Des études dans un modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale ont démontré que le traitement à la spermidine pouvait supprimer la réponse auto-immune et atténuer les signes cliniques dans ce modèle en régulant l'infiltration des cellules T CD4+ et des macrophages dans le système nerveux central [83]. Au travers de ces études, l'expression de ARG I s'est révélée être régulée à la hausse dans les macrophages en réponse au traitement par la spermidine. En outre, les macrophages de souris traitées avec de la spermidine pourraient également inverser la progression de l'encéphalomyélite auto-immune dans le modèle expérimental, tandis que le prétraitement de ces macrophages avec un inhibiteur de l'arginase a abrogé l'effet thérapeutique. Une étude récente utilisant des modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale et de lésions de la moelle épinière a révélé que l'ARG I est exprimée dans les cellules myéloïdes filtrantes mais pas dans la microglie [84].

8.5. Lésion neurovasculaire rétinienne

Dans le cadre de la rétinopathie de la prématurité, une maladie neurovasculaire se produisant en réponse à des conditions d'hyperoxie dans la rétine des bébés prématurés, un lien entre les lésions neurovasculaires et l'activité des voies NOS et arginase a été démontré [67, 85]. L'exploration de ces voies a montré, dans un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène, l'implication de l'ARG II dans la lésion neurovasculaire induite par l'hyperoxie. Une expression accrue de l'ARG II a été observée dans les cellules rétiniennes horizontales et les cellules photoréceptrices des souris traitées par hyperoxie [79]. Ces observations ont permis aux auteurs de supposer que la suppression du gène de l'ARG II inhiberait la mort des cellules neuronales et vasculaires et améliorerait la fonction rétinienne. Ils ont aussi suggéré qu'une régulation du métabolisme des polyamines pourrait être impliquée. Toutefois, une étude antérieure [86] avait suggéré que l'activité de l'arginase pourrait avoir un rôle protecteur dans la réduction des lésions rétiniennes. Il est important de noter que ces deux études

contradictoires, menées sur des souris souffrant de rétinopathie induite par l'oxygène, impliquent deux modèles différents (souris déficientes en TNF α VS souris *KO* à l'ARG II).

Pour les premiers travaux, il s'agissait de souris déficientes en TNF α . Une diminution de la mort des cellules rétiniennes et une amélioration de la survie des astrocytes ont été rapportées [86]. Les cellules de rétines présentaient des taux diminués en NOS2 avec une augmentation de l'activité de l'arginase et de l'expression de l'ARNm de l'ARG II. Pour les seconds travaux, des souris *KO* à l'ARG II ont été utilisées et une réduction significative des lésions neuronales et vasculaires a été observée [68, 85]. Ces effets protecteurs de la délétion du gène de l'ARG II étaient accompagnés d'une préservation de la fonction neuronale rétinienne et d'une protection vasculaire des rétines [67]. Une amélioration de la fonction de la NOS en combinaison avec une diminution de la production, induite par l'hyperoxie, des ions superoxyde et peroxyde ont été notées, ce qui suggère que, dans la lésion, un découplage de la NOS induite par l'hyperactivité de l'ARG II a lieu et s'associe à un stress nitratif. Comme expliqué ci-dessus, l'expression de l'isoforme ARG II est impliquée de manière certaine dans la lésion vasculaire médiée par l'hyperoxie mais le ou les mécanismes mis en jeu doivent être élucidés [85].

Parallèlement, des recherches récentes utilisant un modèle murin de lésions I/R rétiniennes ont montré [87] que la suppression du gène ARG II a inhibé de manière marquée la dégénérescence des cellules ganglionnaires rétiniennes induite par l'ischémie-reperfusion, empêché la dégénérescence microvasculaire et préservé la fonction rétinienne par inhibition de la formation des ERO et de la nécrose programmée (nécroptose) [87]. Cette corrélation entre une activité arginase élevée et une dysfonction/lésion rétinienne a été observée dans d'autres modèles tels que la maladie inflammatoire oculaire et le diabète de type I [88–91]. L'augmentation de l'activité de l'arginase et l'expression de l'ARG I s'accompagnaient d'une élévation du stress oxydatif et de l'expression des gènes inflammatoires ainsi que d'une fixation accrue des leucocytes aux vaisseaux rétiniens. Par contre, les souris à double *KO*, dépourvues d'une copie du gène de l'ARG I ainsi que des deux copies de l'ARG II étaient protégées de ces altérations. Dans le cas des souris diabétiques, une diminution de la biodisponibilité du NO était aussi présente. Ce dernier point indique qu'une altération de la vasorelaxation endothélium-dépendante vient s'ajouter au tableau clinique. Une étude *ex vivo* complémentaire utilisant des artérioles rétiniennes de souris diabétiques a confirmé cette altération qui a été nettement atténuée chez les souris dépourvues d'une copie du gène de l'ARG I. La confirmation du rôle de l'ARG I a été obtenue par le biais du traitement des souris diabétiques par un

inhibiteur spécifique de l'activité de l'arginase qui a inhibé la détérioration de la fonction endothéliale [88].

En conclusion, l'ensemble de ces résultats montrent que l'augmentation de l'expression/activité de l'arginase joue un rôle essentiel dans l'élévation du stress oxydatif, dans l'inflammation et dans les dysfonctionnements vasculaires associés à la rétinopathie mais que les mécanismes de régulation impliquant les deux isoformes ARG I et ARG II restent à explorer afin de comprendre leur implication dans la protection ou la guérison du tissu rétinien.

9. Implication de l'arginase dans les maladies infectieuses

Divers agents pathogènes, notamment les *Helicobacter*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Schistosoma*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Candida*, codent leur propre arginase et modulent son activité/expression au cours du processus infectieux. D'une part, l'arginase module la réponse immunitaire de l'hôte au cours du processus infectieux et, d'autre part, l'arginase de l'agent pathogène infectieux, est nécessaire à sa croissance [92]. Parmi la plupart des études menées sur l'arginase parasitaire, celles conduites sur les espèces de *Leishmania*, parasites intracellulaires des macrophages [93] sont intéressantes en raison de leur interaction avec la cellule hôte. Chez ces espèces, leur arginase sert à produire les polyamines nécessaires à leur développement. En plus de permettre la prolifération des parasites, la voie des polyamines produit de la spermidine, un composant essentiel du trypanothione (N1, N8-bisglutathionylspermidine), utilisé par les parasites protozoaires, tels que la *leishmania*, dans le maintien de leur équilibre thiol-redox. Il joue, par conséquent, un rôle clé dans la défense contre les espèces réactives de l'oxygène. Les macrophages de l'hôte peuvent contrôler l'infection à la *Leishmania* par le biais d'une réponse Th1 conduisant à une surexpression induite de la NOS et par conséquent, à la production d'un grand taux de NO, qui est à l'origine de l'action antiparasitaire. Dans un modèle murin, l'inhibition spécifique de l'ARG I de l'hôte par la nor-NOHA a diminué la charge parasitaire indiquant que le parasite utilise également les polyamines produites par l'arginase de l'hôte. De plus, l'inhibition spécifique de l'arginase de *Leishmania* n'a pas complètement éradiqué le parasite mais a retardé l'infectivité [94]. Il a donc été démontré que l'infection à *Leishmania* conduisait à l'induction de l'expression d'ARG I dans les macrophages de l'hôte, favorisant ainsi sa propre croissance [5].

Même si des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux déterminer la contribution relative de l'arginase de l'hôte par rapport à l'arginase du pathogène dans le processus infectieux, la preuve que l'induction de l'arginase de l'hôte soit un facteur crucial pour la survie des agents parasitaires de l'Homme a encouragé les recherches pour le développement d'inhibiteurs de l'arginase dans ce contexte de maladies infectieuses.

10. Conclusion

Le mécanisme de fonctionnement de l'arginase et sa dépendance aux ions Mn^{2+} ont été clairement établis. Il a été observé que l'arginase existe sous différentes isoformes. Les deux isoformes d'arginase sont à 100% homologues dans les zones critiques pour leur activité. Cependant, les ARG I et ARG II sont codées par différents gènes et localisées dans différents compartiments intracellulaires. Les deux isoformes sont largement exprimées dans de nombreux types de cellules, et toutes deux sont impliquées dans de multiples fonctions cellulaires.

Bien que, de nombreuses preuves justifient un rôle positif de l'activité de l'ARG I dans le maintien de la croissance cellulaire normale, de la synthèse de collagène et du développement neuronal ainsi que la cicatrisation à la suite d'une blessure, de nombreuses études montrent que les deux isoformes sont clairement impliquées dans la dérégulation de la fonction de la NOS. L'implication d'une activité excessive de la voie arginase/ornithine dans le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire des vaisseaux alimentant un tissu pathologique ou traumatique a été bien documentée au travers d'investigations sur des modèles expérimentaux ou en clinique. La participation de ces voies dans les maladies cardiovasculaires ou du SNC et le cancer a également été clairement démontrée. Les études menées chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires ont montré que l'inhibition locale de l'arginase avait un réel potentiel thérapeutique. Il apparaît, par conséquent, que des inhibiteurs spécifiques de l'arginase pourraient constituer une alternative thérapeutique intéressante pour traiter la dysfonction endothéliale et les maladies impliquant l'arginase et la production de NO comme agent cytotoxique.

Chapitre 2 : Inhibition de l'arginase

Ce chapitre présente les différents inhibiteurs et les stratégies mises en place pour développer une inhibition spécifique de l'arginase au travers de ces dernières années.

1. Premiers acides α -aminés inhibiteurs de l'arginase

L'hydrolyse de la fonction guanidine par une enzyme a été observée pour la première fois avec la découverte de l'arginase. La L-arginine est hydrolysée avec un haut rendement tandis que la guanidine est hydrolysée à faible rendement et les dérivés aliphatiques de la guanidine ne sont pas hydrolysés par l'arginase. Par conséquent, la présence du fragment α -aminoacide dans la structure du substrat est d'une importance fondamentale pour la spécificité de la reconnaissance du substrat par l'arginase. Une étude de mutagenèse a confirmé la domination du réseau d'interaction du fragment α -aminoacide dans la reconnaissance moléculaire [95]. Suite à ces observations, les effets des α -aminoacides naturels sur l'activité de l'arginase ont été systématiquement évalués. D'une manière générale, les acides α -aminés aliphatiques, tels que la glycine, la L-alanine, la L-valine, la L-leucine et la L-isoleucine, sont de faibles inhibiteurs de l'arginase (Figure 10) [5]. L'activité la plus intéressante de ces molécules a été obtenue avec la L-cystéine avec une inhibition de 87,3% à 10 mM sur l'arginase de rat. La configuration naturelle L des acides α -aminés est déterminante pour l'activité biologique. Certains dérivés désaminés ou décarboxylés restent actifs mais la présence de la fonction acide aminée complète donne de meilleurs résultats. Ceci montre l'importance significative de cette dernière pour l'inhibition enzymatique [5].

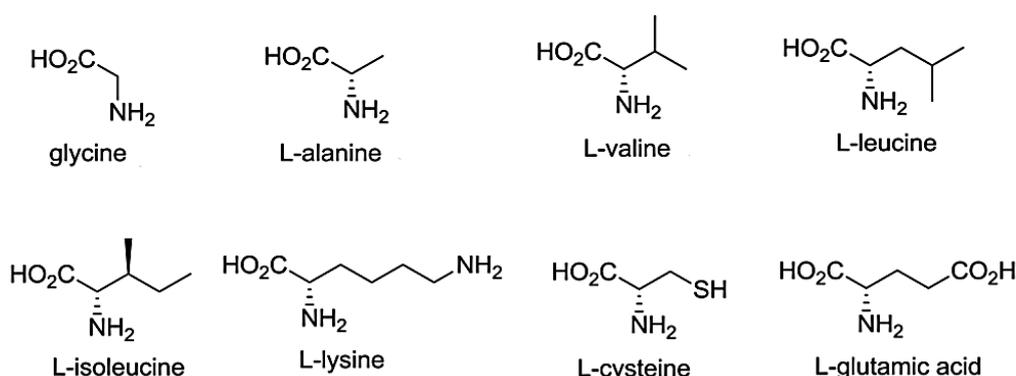


Figure 10: Acides aminés naturels inhibiteurs de l'arginase [5]

La taille de la chaîne latérale des acides α -aminés affecte clairement l'interaction avec l'arginase. Ceci est observé avec la L-homoarginine (4 CH₂) qui réagit lentement avec cette

enzyme et la dinor-arginine (1 CH₂) qui n'est pas hydrolysée et s'est donc avérée être un inhibiteur faible (Figure 11). Une diffraction aux rayons X d'inhibiteurs complexés avec l'arginase montre clairement que la dinor-L-arginine (Figure 11) révèle un réseau de liaison hydrogène analogue aux dérivés plus longs mais la fonction guanidine est trop éloignée pour interagir avec le cluster bimanganèse. Parmi les acides α-aminés naturels, ceux possédant un résidu de chaîne latérale terminé par un acide carboxylique ou une amine ont un bon niveau d'inhibition. Par conséquent, la question de la taille optimale du résidu de chaîne latérale a aussi été soulevée. En ce qui concerne les inhibiteurs acide diaminés, l'inhibition la plus élevée est observée avec la L-ornithine (3 carbones sur la chaîne latérale) (Figure 11) agissant comme inhibiteur compétitif avec une K_i de 1,02 mM sur l'ARG hépatique bovine et une inhibition plus faible est donnée par la L-lysine (4 carbones sur la chaîne latérale) (Figure 11). L'inhibition est nulle pour un résidu de chaîne latérale de plus de six atomes de carbone. [5].

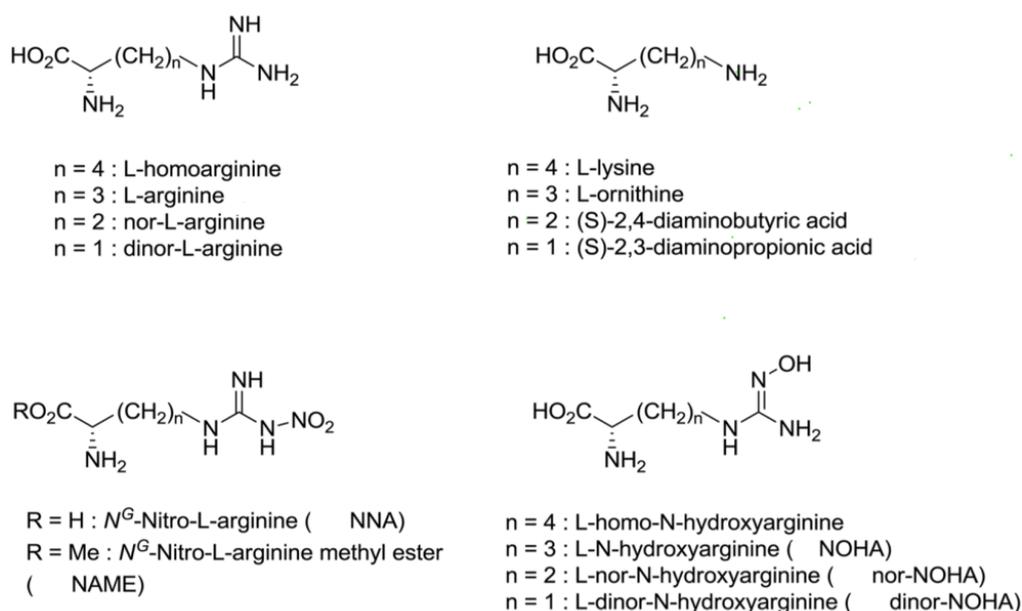


Figure 11: Homologues de la L-arginine, diamino-acides, dérivés nitro et hydroxy de la L-arginine [5].

2. Pharmacomodulation à partir de la L-arginine

2.1. Dérivés nitrés et hydroxylés de l'arginine

2.1.1. Dérivés nitrés de l'arginine : NNA et NAME

La N^G-Nitro-L-arginine (NNA) et la N^G-Nitro-L-arginine méthyl ester (NAME) (Figure 11) sont des inhibiteurs bien connus de la NO synthase. Sur l'arginase, ils présentent une inhibition de l'ordre du millimolaire [5].

2.1.2. Dérivés hydroxylés de l'arginine : NOHA et nor-NOHA

La NOS en catalysant la production du NO et de la L-citrulline en passant par l'intermédiaire stable la N-hydroxyarginine (NOHA). Elle est aussi impliquée dans la régulation de l'activité de l'arginase car la L-citrulline et la NOHA sont deux inhibiteurs de l'arginase. L'inhibition de l'arginase par la L-citrulline est proche de l'activité de la L-ornithine alors que la NOHA s'est révélée être le premier inhibiteur compétitif avec une CI_{50} dans la gamme du micromolaire. En exemple, la K_i de ce composé sur l'ARG II humaine a été évaluée à 1,6 μ M à pH 7,5 et sur l'ARG I humaine cette dernière a été estimée entre 10 et 42 μ M au même pH [96].

Depuis la découverte de l'effet inhibiteur de la NOHA en 1994, la liaison hydroxyle au cluster bimanganèse de l'arginase a été postulée, considérant que le N-hydroxyle de la NOHA remplacerait l'ion hydroxyde de pontage de l'arginase. La comparaison de la NOHA et de l'état de transition d'hydrolyse de l'arginine a conduit à la conclusion que la NOHA a besoin d'une liaison supplémentaire pour être correctement fixée au site actif de l'arginase. En effet, l'affinité d'un dérivé plus petit : la N-hydroxy-nor-arginine (nor-NOHA) (Figure 11) se situe dans la gamme du nanomolaire, la K_i de ce dernier sur l'ARG II humaine a été estimée à 51 nM à pH 7.5 alors que la K_i de la NOHA sur l'ARG II humaine a été évaluée à 1,6 μ M [96]. L'effet inhibiteur de la NOHA et la nor-NOHA est plus puissante sur l'ARG II que sur l'ARG I. Contrairement à la NOHA, l'intermédiaire dans la synthèse de NO par la NOS, la nor-NOHA n'est ni un substrat ni un inhibiteur de la NOS. De plus, comme l'inhibition fluctue légèrement avec le pH, la nor-NOHA semblerait être l'un des inhibiteurs les plus puissants de l'ARG II au pH physiologique [5].

La pharmacocinétique de la nor-NOHA se caractérise par une biodisponibilité élevée, proche de 100% après plusieurs doses et une élimination rapide avec un $t_{1/2}$ de 15 à 30 min après administration intraveineuse et intrapéritonéale chez le rat. Des déterminations de la structure cristalline aux rayons X ont été effectuées sur le complexe ARG I–nor-NOHA (Figure 12). Aucun changement dans la conformation de l'ARG I ne s'est produit suite à la formation du complexe. La partie acide α -aminé présente trois liaisons hydrogènes directes (carboxylate avec Ser137 et Asn130 et ammonium avec Asp183) et quatre liaisons hydrogène *via* une molécule d'eau (Figure 12). Il faut noter que les études systématiques de diffraction des rayons X des inhibiteurs complexés à l'arginase montrent des réseaux de liaison hydrogène invariants entre la partie acide aminé des ligands et l'arginase.

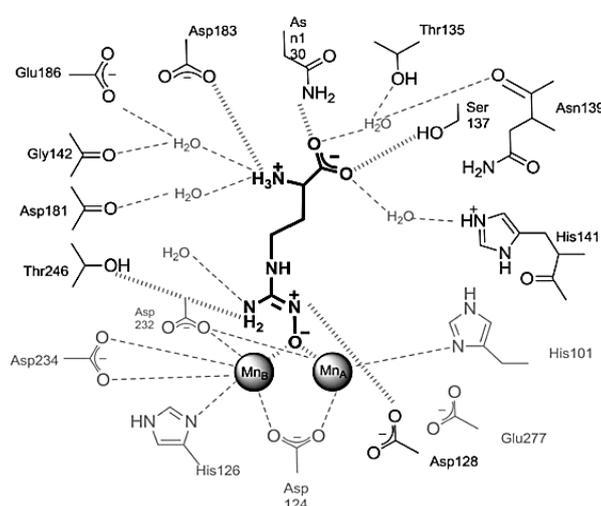


Figure 12: Représentation schématique de la liaison nor-NOHA à l'ARG I humaine. Les liaisons H directes et les liaisons H à médiation aqueuse sont représentées, respectivement, par des lignes pointillées verticales (|||) et horizontales (---). Les résidus impliqués dans la liaison du manganèse sont présentés en gris [5]

La modification des parties α -aminoacides entraîne une forte diminution de l'inactivité. La désamino nor-NOHA présente une CI_{50} supérieure à 500 μ M sur l'arginase de foie de rat tandis que la décarboxy-nor-NOHA conserve à peu près son activité d'inhibition. Dans le même cadre, la NOHA à fonctions amino ou carboxy protégées sont inactifs [5]. La dinor-NOHA (Figure 11) affiche les mêmes interactions que la NOHA et la nor-NOHA, sauf pour le substituant hydroxyle qui est trop éloigné du cluster manganèse de l'arginase. Ces constatations sont encore une fois en cohérence avec la dominance du réseau de liaisons H de la partie α -aminoacide. Les interactions de l'hydroxyle de la NOHA et de la nor-NOHA avec le cluster de bimanganèse ont été confirmées par diffraction aux rayons X. De plus, il faut noter que le guanidinium de

l'arginine est situé à 4 Å du cluster de manganèse alors que le guanidinium de la nor-NOHA est situé à 2,3 Å du cluster de manganèse. L'hydroxyle du NOHA et du nor-NOHA est, respectivement, éloigné de 1,3 Å et 0,7 Å de l'hydroxyle natif de l'ARG I. Ainsi, la NOHA semble repousser le cluster de manganèse au fond du site actif de l'arginase. Le guanidinium de la nor-NOHA présente deux liaisons H avec les Asp128 et Thr246 (Figure 12) et une autre avec une molécule d'eau qui ne semble interagir avec aucun acide aminé d'ARG [5]. Ainsi, alors que le réseau de liaisons H entre la partie α -aminoacide des inhibiteurs prévaut dans l'affinité avec l'arginase, le site de coordination avec le manganèse est un site indispensable pour l'activité des inhibiteurs à liaison étroite.

Les relations structure-activité ont également été étudiées par la synthèse d'analogues. La rigidification de la chaîne aliphatique par un cyclohexane ou un cycle aromatique entraîne une forte diminution de l'activité. Seule la 4-hydroxyamindino-D, L-phénylalanine (Figure 13) reste à activité modérée. L'implication du N-hydroxyle dans l'activité puissante de la nor-NOHA est démontrée par la perte de l'activité suite à la substitution par des N-méthyle, N-nitro, N-amine, N-méthoxy ou N-allyle. De la même manière, le NH^α impliqué dans la liaison ne peut pas être remplacé par un méthyle (conduisant à une fonction cétoxime $\text{R-C}(=\text{NOH})\text{Me}$) ou un hydrogène (conduisant à la fonction aldoxime $\text{R-C}(=\text{NOH})\text{H}$). Cependant, la substitution du NH^ϵ de la NOHA et du NH^δ de la nor-NOHA, qui ne sont pas impliqués dans la liaison, par un groupement méthylène, donnant respectivement la N^α -hydroxy-indospicine et la nor- N^α -hydroxy-indospicine (Figure 13) conserve ou augmente l'activité [5].

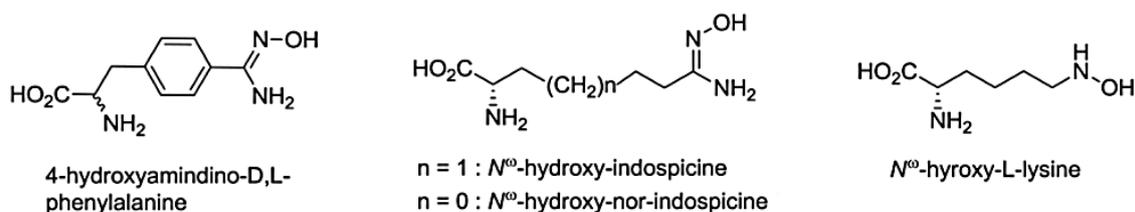


Figure 13 : Dérivés hydroxylés d'acides α -aminés [5].

2.2. Acides aminés divers

Les résultats prometteurs des dérivés hydroxylés de la L-arginine ont conduit au développement d'autres dérivés mais malheureusement moins actif que la nor-NOHA. La N-hydroxylysine (Figure 14) a été testée et bien que la taille de la chaîne latérale soit équivalente

à la nor-NOHA, elle affiche une activité plus faible, similaire à l'inhibition observée par la NOHA. La canavanine (Figure 14), un analogue de l'arginine, inhibe l'arginase de foie bovin de l'ordre du millimolaire mais avec une efficacité plus élevée que l'ornithine. L' α -difluorométhylornithine (DMFO) est un dérivé de l'ornithine substitué au niveau de l'atome C α de la fonction α -aminoacide par un difluorométhyle. Ce composé a présenté une K_i de 3,9±1,0 mM pour l'arginase des cellules du cancer du côlon humain [97] mais il s'agit d'un inhibiteur non spécifique de l'ARG puisqu'il inhibe irréversiblement et de manière puissante l'ornithine décarboxylase (ODC), provoquant une accumulation d'ornithine et donc une inhibition de l'arginase par rétrocontrôle. Ainsi, les effets du DMFO, qui augmente la production de NO dans les modèles où l'activité arginase est élevée, sont probablement dus à cette accumulation accrue d'ornithine [98].

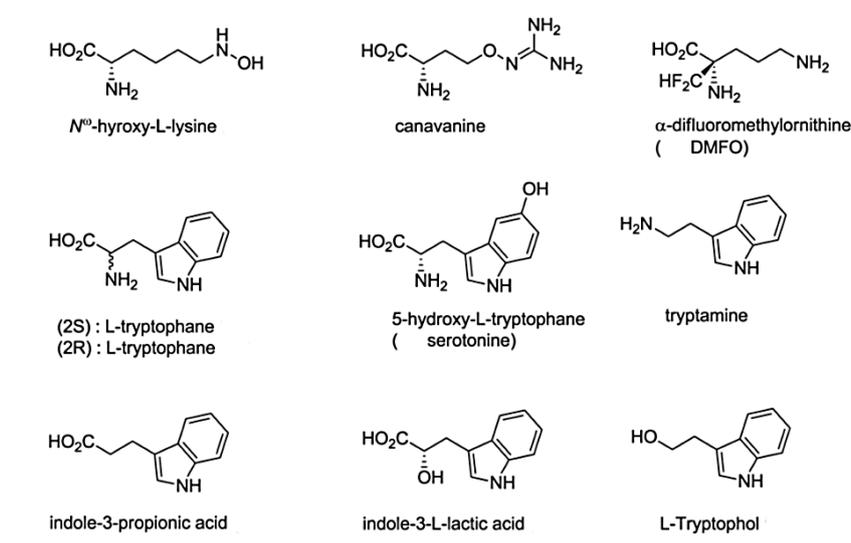


Figure 14: Divers acides α -aminés [5].

Les CI₅₀ de ces différents composés sur l'ARG I bovine étaient de l'ordre de quelques millimolaires, néanmoins seule la N^ω-Hydroxylysine avait une inhibition de 11 ± 2 μ M sur le même modèle. Le L-tryptophane et ses dérivés se sont révélés être des inhibiteurs non compétitifs qui se lient à un site allostérique [5].

3. Modification de la chaîne latérale de l'acide α -aminé

3.1. Dérivés du bore

3.1.1. Acide borique et borate

L'acide borique est connu depuis 1945 comme inhibiteur de l'arginase. Avec une K_i de 0,25 mM (sur l'arginase hépatique bovine), ce dernier est un inhibiteur irréversible non compétitif avec une spécificité d'activité contre l'arginase. Dans les solutions aqueuses, l'acide borique existe sous forme de mélange composé de borate ($B(OH)_4^-$) et d'acide borique ($B(OH)_3$) et chaque forme se lie à l'arginase de manière différente. L'acide borique se lie au site actif et est ensuite attaqué par l'hydroxyde du complexe bimanganèse-hydroxyde, tandis que le borate déplace le groupe hydroxyde de l'arginase et se lie en tant qu'analogue d'état de transition. Comme la K_i diminue pour des pH supérieurs à la valeur du pKa de l'acide borique (9,2), le borate est présumé être la forme de liaison avec l'affinité la plus élevée [5].

3.1.2. Substitution de la chaîne latérale de l'acide α -aminé par l'acide boronique : ABH et BEC

Le borate et l'ornithine peuvent se combiner dans un complexe ternaire ornithine-borate-arginase qui inhibe l'activité enzymatique de l'arginase. Cette dernière constatation a été le point de départ de l'élaboration de nouveaux inhibiteurs : l'acide 2 (S) -amino-6-borohexanoïque (ABH) et la S- (2-boronoéthyl)-L-cystéine (BEC) présentés ci-dessous (Figure 15) [5].

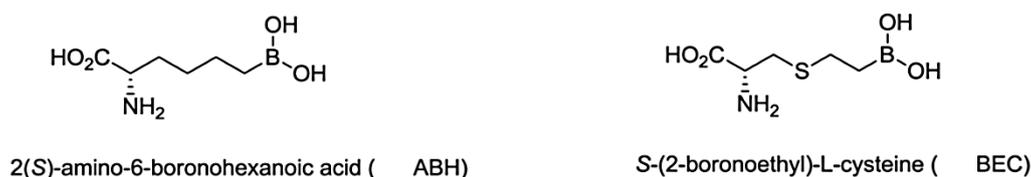


Figure 15: Structure de l'acide (2)S-amino-6-hexanoïque (ABH) et de la S-(2-boronoéthyl)-L-cystéine (BEC) [5].

L'ABH s'est avéré être un inhibiteur compétitif avec une activité intéressante évaluée à 800 nM sur l'ARG I humaine et 1920 nM sur l'ARG II humaine et contrairement à la NOHA, l'ABH n'affiche aucune activité sur la NOS [96]. La S- (2-boronoéthyl)-L-cystéine (BEC) est un analogue de l'ABH à base de cystéine (Figure 15) qui a montré une CI_{50} , sur l'arginase I bovine, de l'ordre de 3.3 μ M [99].

Tout comme l'acide borique, le type et la qualité des inhibitions par les acides boroniques ABH et BEC dépendent des niveaux de pH. À pH 9,5, les composés à base d'acide boronique sont principalement sous une forme ionique tétraédrique ($R-B(OH)_3^-$) qui se lie rapidement de manière réversible, entraînant un changement conformationnel de l'arginase. Le déplacement de l'ion hydroxyde par l'inhibiteur et le changement de conformation pour adapter le borate en tant qu'analogue d'état de transition sont conformes à la théorie de l'inhibiteur de liaison lente. A un pH inférieur à 9, une courbe cinétique d'inhibition classique est observée. En effet, à ces pH bas, la forme trigonale non ionique ($R-B(OH)_2$) est supposée se lier à l'arginase. Cette forme est attaquée par le groupe hydroxyde de l'arginase selon son mode d'action habituel, il est supposé qu'aucun changement conformationnel de l'arginase n'est requis dans ce cas [5].

Les réseaux de liaison de l'ABH et du BEC sont similaires mais diffèrent entre les ARG I et II (Figure 16 et Figure 17). La partie α -aminoacide présente trois liaisons H directes et quatre liaisons H avec l'eau coordonnée de l'ARG I, alors qu'elle n'affiche que deux liaisons H directes mais cinq liaisons H avec l'eau coordonnée de l'ARG II. Une telle différence de liaison peut expliquer, au moins en partie, la faible sélectivité de l'ABH pour l'ARG I par rapport à l'ARG II. Les parties boroniques se lient au cluster de manganèse de façon à ce qu'un groupe hydroxyle boronate forme un pont avec le cluster de bimanganèse au lieu de l'ion hydroxyde de l'arginase, conduisant à une sorte de coordination bidentée. Un second hydroxyle est coordonné avec l'un des deux manganèses et affiche deux liaisons H avec les Glu277 et His141 (ARG I) ou les Glu296 et His160 (ARG II), ce qui correspond au η -NH₂ de l'état de transition de l'arginine lors de la réaction enzymatique. Le troisième groupe hydroxyle boronique présente une liaison H avec l'Asp232 (ARG I) ou l'Asp251 (ARG II) et une autre liaison H médiée par l'eau (Figure 17).

La conception de l'ABH et de la BEC repose sur le complexe ternaire ornithine-acide borique-arginase. La taille des chaînes latérales est censée être optimisée et un groupe méthylène plus court ou un analogue plus long est moins actif. Là encore, la restriction conformationnelle en introduisant une double liaison ou un cycle aromatique dans la chaîne latérale alkyle supprime l'activité. De façon assez particulière, un changement de la position de l'atome S dans un analogue de la BEC entraîne une diminution significative de l'activité. Cela

a été attribué à une proximité étroite de l'atome S de la BEC avec l'His141 qui active une interaction stérique dans une autre position. Une ramification du méthyle en position α de l'atome S ou B perturbe l'affinité [5].

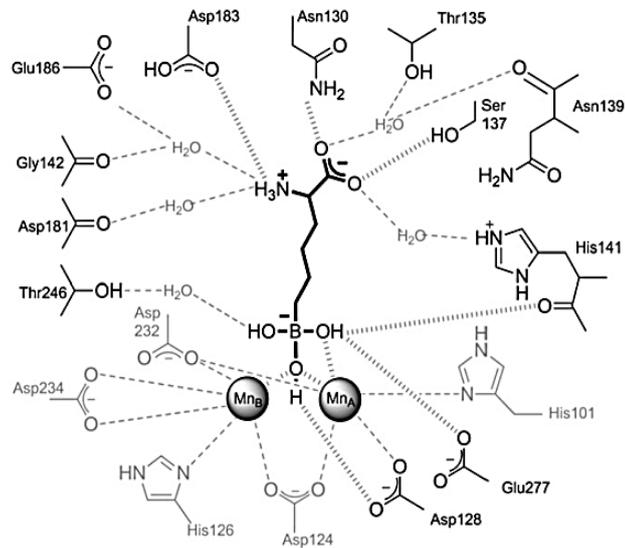


Figure 16: Représentation schématique de la liaison de l'ABH à l'arginase I humaine. Les liaisons H directes et les liaisons H à médiation par l'eau sont représentées, respectivement, par des lignes pointillées verticales (|||) et horizontales (---). Les résidus impliqués dans la liaison du manganèse sont présentés en gris [5].

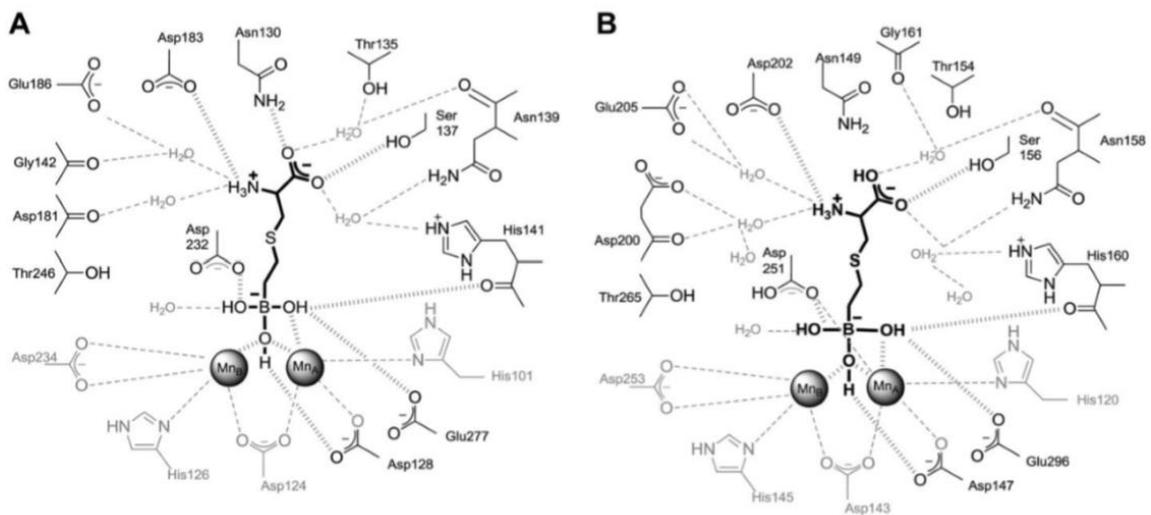


Figure 17: Représentation schématique de la liaison du BEC à l'arginase I humaine (A) et à l'arginase II (B). Les liaisons H directes et les liaisons H à médiation par l'eau sont représentées, respectivement, par des lignes pointillées verticales (|||) et horizontales (---). Les résidus impliqués dans la liaison du manganèse sont présentés en gris [5].

La substitution de l'ABH au niveau de la fonction C α de l' α -aminoacide par un méthyle ou un difluorométhyle provoque une diminution de la K_i de 26 à 200 fois par rapport à celle de

l'ABH. Malgré ces résultats, des tentatives de synthèse ont été effectuées sur des dérivés d'ABH substitués en C α (Figure 18), les pourcentages d'inhibition variaient entre 21 et 520 nM sur l'ARG I humaine. Une amine tertiaire liée par une chaîne alkyle à deux atomes de carbone augmente l'inhibition. Une affinité améliorée résulte d'une liaison hydrogène médiée par l'eau du groupe ammonium. La molécule d'eau est coordonnée avec la fonction carboxylate de l'Asp200 (ARG II) ou l'Asp181 (ARG I) pour les composés (A), (B), (C) présentés ci-dessous (Figure 18) et avec ces acides aminés associés à l'Asp202 (ARG II) ou l'Asp183 (ARG I) pour les composés (D), (E) et (F) (Figure 18). De plus, l'ABH et le composé (D) ont été explorés dans un essai fonctionnel cellulaire (cellules CHO transfectées avec de l'ARG I humaine). Les CI₅₀ étaient moins intéressantes dans ce modèle (ABH : 19 μ M et composé (D) : 8 μ M) ce qui peut être attribué à une faible diffusion passive de ces composés. Les dérivés de pipéridine (G), (H) et (I) (Figure 18) se lient à une molécule d'eau coordonnée à l'Asp200 et l'Asp202 (ARG II) ou l'Asp181 et l'Asp183 (ARG I) comme les composés avec une chaîne latérale alkyle flexible. Par conséquent, l'augmentation de l'activité n'a été attribuée qu'à une diminution de l'entropie [5].

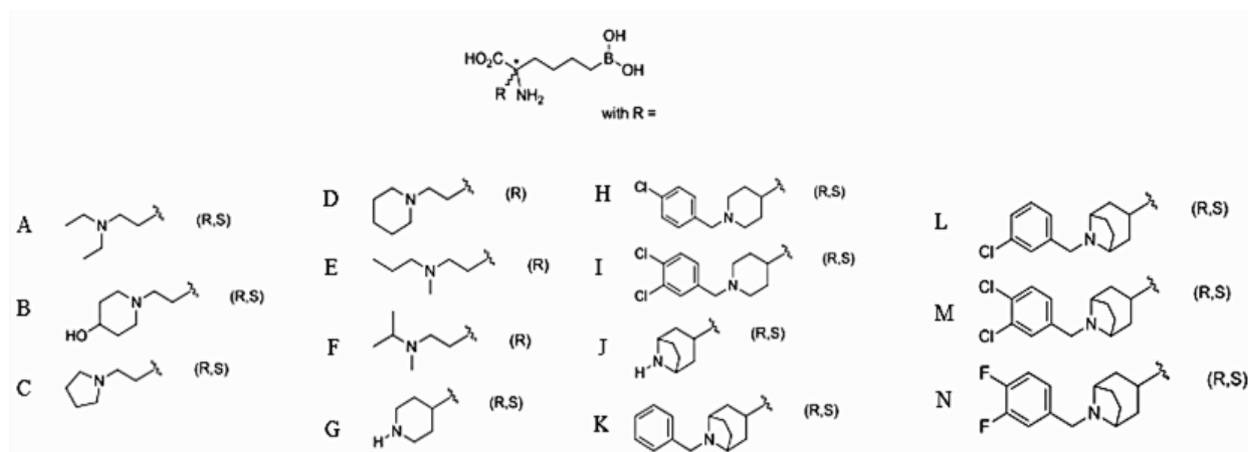


Figure 18: Dérivés α , α -disubstitués de l'ABH [5].

La conformation bateau impliquée par le tropane cyclique des composés (J-N) rapproche le N-tropane de l'Asp202 (ARG II) ou de l'Asp183 (ARG I) (Figure 19). Les composés tropaniques (L) et (M) présentent une activité dix fois plus importante que celle de leurs homologues pipéridiniques (H) et (I). Les composés tropaniques (L) et (M) sont à ce jour les composés les plus actifs sur l'ARG I (17 nM et 21 nM, respectivement) et l'ARG II (30 nM et 23 nM, respectivement). L'amélioration de l'activité est due à la diminution de l'entropie et également à une interaction directe entre l'ammonium et l'Asp202 (ARG II) ou l'Asp183 (ARG I).

Malheureusement, la biodisponibilité orale des composés (I) et (M) a été évaluée et est inférieure à 5% (4,8% et 0,25% respectivement).

La détermination des CI_{50} sur l'ARG I et l'ARG II a permis l'observation d'une sélectivité de l'ABH et ses dérivés α , α -disubstitués pour l'ARG I contre l'ARG II. Cette sélectivité peut s'expliquer par la distance de la liaison hydrogène médiée par l'eau du groupe ammonium avec l'Asp202 (ARG II) ou l'Asp183 (ARG I) [5].

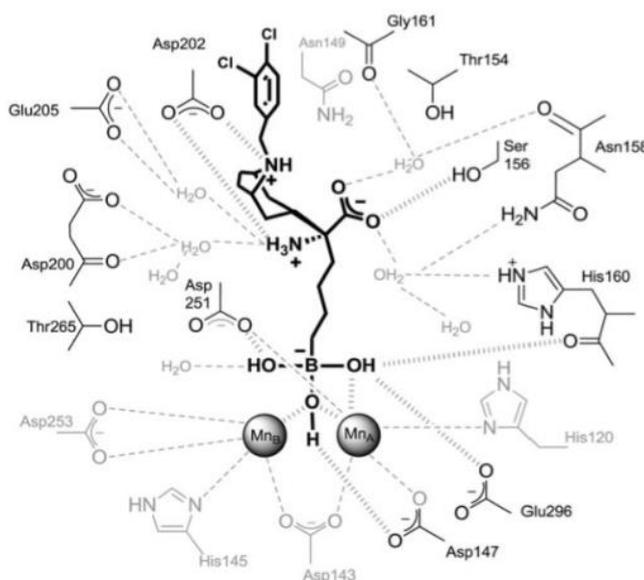


Figure 19: Représentation schématique de la liaison du composé (M) à l'ARG II humaine. Les liaisons H directes et les liaisons H à médiation par l'eau sont représentées, respectivement, par des lignes pointillées verticales (|||) et horizontales (---). Les résidus impliqués dans la liaison du manganèse sont présentés en gris sans liaison [5].

3.2. Chaîne latérale d'acide α -aminé modifiée par un groupe de liaison métallique : sulfonamide, imidazole et nitro

L'acide boronique est une fonction inhabituelle dans le domaine pharmaceutique, aussi, le profil toxicologique est un sujet à débattre. De plus, la publication des derniers dérivés boroniques, inhibiteurs de l'arginase, s'accompagne d'évaluations pharmacocinétiques qui montrent une mauvaise biodisponibilité orale. Par conséquent, des efforts ont été menés pour trouver de nouveaux groupes de liaison au manganèse efficaces dans l'inhibition de cette enzyme.

Le sulfamide est la fonction clé des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique et leur mécanisme implique un déplacement de l'ion hydroxyde se liant aux métaux. La transposition au Mn a été envisagée et les analogues à base de sulfamide de l'ABH et du BEC, l'ASH et la SEC respectivement (Figure 20), présentent bien une inhibition et une affinité à l'arginase mais dans une gamme micromolaire qui reste insuffisante. L'explication de ce manque d'activité peut être présentée comme suit : premièrement, comme le sulfonamide anionique (R-SO₂NH⁻) est nécessaire pour déplacer l'ion hydroxyde ponté par un métal, la faible acidité de l'alkylsulfonamide peut expliquer la portion réduite de molécules susceptibles de se lier à l'enzyme. Deuxièmement, une étude de diffraction des rayons X du complexe SEC– ARG I révèle que le sulfamide anionique est si fortement coordonné au cluster de bimanganèse que le réseau d'interaction de la partie acide aminé est perturbé. Le SEC perd deux liaisons H directes et une liaison H médiée par l'eau par rapport au BEC [5].

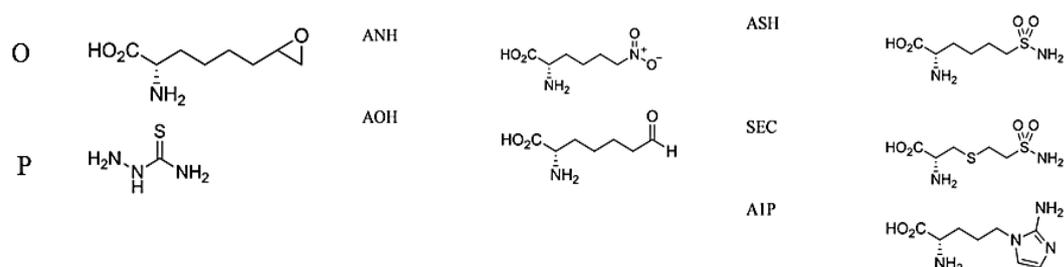


Figure 20: Chaîne latérale d'acide α-aminé modifiée par un groupe de liaison métallique [5].

L'imidazole est un autre ligand métallique bien connu, l'analogue de l'arginine qui en découle correspond à la molécule AIP (Figure 20). Il a été préparé avec une fonction guanidine incluse dans un cycle 2-aminoimidazole. L'affinité micromolaire suggère une interaction de coordination du 2-aminoimidazole avec le cluster de manganèse binucléaire mais le complexe AIP–ARG n'a pas pu être obtenu et les études sur les interactions au sein de l'enzyme n'ont pas pu être approfondies [5].

Le groupe nitro est inhabituel dans la coordination des métaux, néanmoins l'analogue nitro de l'ABH, l'ANH (Figure 20) a été testé. Il se lie à l'ARG I avec une K_d de 60 μM. Comme l'ABH et son nitroanalogue ANH se chevauchent dans l'étude de *docking*, les deux fragments d'acides aminés affichent le même réseau de liaison H. L'oxygène zwitterionique du groupe nitro déplace l'ion hydroxyde natif et se coordonne avec le cluster de manganèse binucléaire de l'arginase. L'autre oxygène interagit avec le deuxième manganèse et une nouvelle liaison H se

produit avec le carboxylate du Glu277 (ARG I). Une interaction électrostatique inattendue semble se produire entre l'azote du groupe nitro et l'oxygène carboxylate de l'Asp128 (Figure 21) [5].

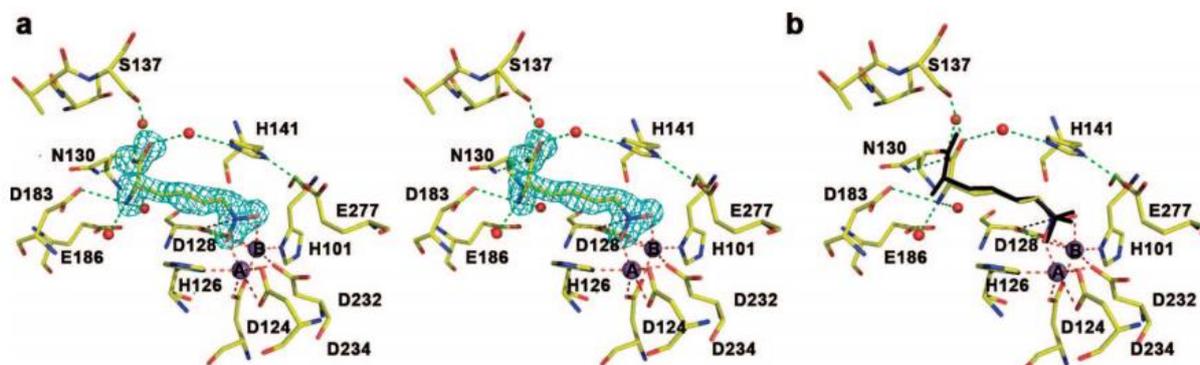


Figure 21: Liaison de l'ANH dans le site actif de l'ARG I humaine (monomère A). Les lignes pointillées en rouge indiquent la coordination du manganèse, liaison hydrogène (vert) et interactions électrostatiques (gris foncé). Codes de couleur des atomes : carbone (jaune), oxygène (rouge), azote (bleu), manganèse (violet). (b) Superposition du complexe arginase I-ANH et ABH (noir) comme observé dans le complexe ARG I humaine-ABH [100].

3.3. Modification de la chaîne latérale d'acide α -aminé conduisant à des inhibiteurs analogues de l'état de transition

Des études se sont intéressés à des inhibiteurs qui sont des analogues de substrat (à caractère électro-déficient) soumis à une attaque nucléophile comme la partie guanidinium de l'arginine ou la fonction acide boronique neutre [5].

Parmi ces inhibiteurs, nous pouvons citer l'aldéhyde d'acide aminé AOH (Figure 20) qui présente une faible affinité avec une K_i de $60 \pm 8 \mu\text{M}$ (ARG I de rat à pH 9,5). L'aldéhyde hydraté (gem-diol) est la forme de liaison la plus pertinente telle que révélée par l'étude de diffraction des rayons X. Les tentatives pour augmenter le rapport de l'aldéhyde hydraté en augmentant le caractère électrophile du carbonyle avec l'analogue de trifluorométhylcétone ont échoué. La faible affinité (par rapport à l'ABH) a été attribuée à la coordination monodentée du manganèse tandis que deux des hydroxydes de boronate font une sorte de coordination bidentée et le troisième une liaison H supplémentaire médiée par l'eau.

L'analogue époxyde (composé O, [Figure 20](#)) a été conçu pour être activé par le manganèse, puis lié par covalence à un résidu d'arginase. L'oxygène de l'époxyde est ponté par le cluster de manganèse de manière stable mais aucune liaison covalente ne s'est formée [5].

Le thiosemicarbazide (composé P, [Figure 20](#)) révèle également une liaison inhabituelle au cluster de manganèse, car l'atome de soufre est ponté à l'ion manganèse. Aucun acide aminé contenant un groupement thiosemicarbazide n'a été rapporté. Cependant, cette fonction s'est révélée être le substituant le plus efficace sur le pharmacophore trifluorométhyltriazolopyrimidine dans une série de composés testés sur l'arginase de *leishmania* [101]. La CI_{50} était de $16,5 \pm 0,5 \mu M$ et la K_i était estimée à $17 \pm 1 \mu M$ et l'inhibition est obtenue selon un mécanisme non compétitif.

4. Produits divers

4.1. Dérivés de purines et de pyrimidines

L'inosine, l'adénosine, l'adénine et l'acide urique, purines naturelles, sont de faibles inhibiteurs compétitifs de l'arginase [102]. La cytosine et la cytidine sont des inhibiteurs non compétitifs de cette enzyme avec une meilleure affinité ([Figure 22](#)).

Des dérivés du [1,2,4] triazolo [1,5-a] pyrimidine ont été testés sur l'arginase de *Leishmania* [101]. Le 2-(5-méthyl-2-(trifluorométhyl)-[1,2,4] triazolo [1,5-a] pyrimidin-7-yl) hydrazinecarbothioamide ([Figure 22](#)) était le plus actif par un mécanisme non compétitif avec des valeurs de K_i et CI_{50} estimées à 17 et $16,5 \mu M$ respectivement. Ces résultats pourraient guider le développement de nouveaux produits à base de dérivés de [1,2,4] triazolo [1,5-a] pyrimidine ciblant l'arginase impliquée dans la leishmaniose.

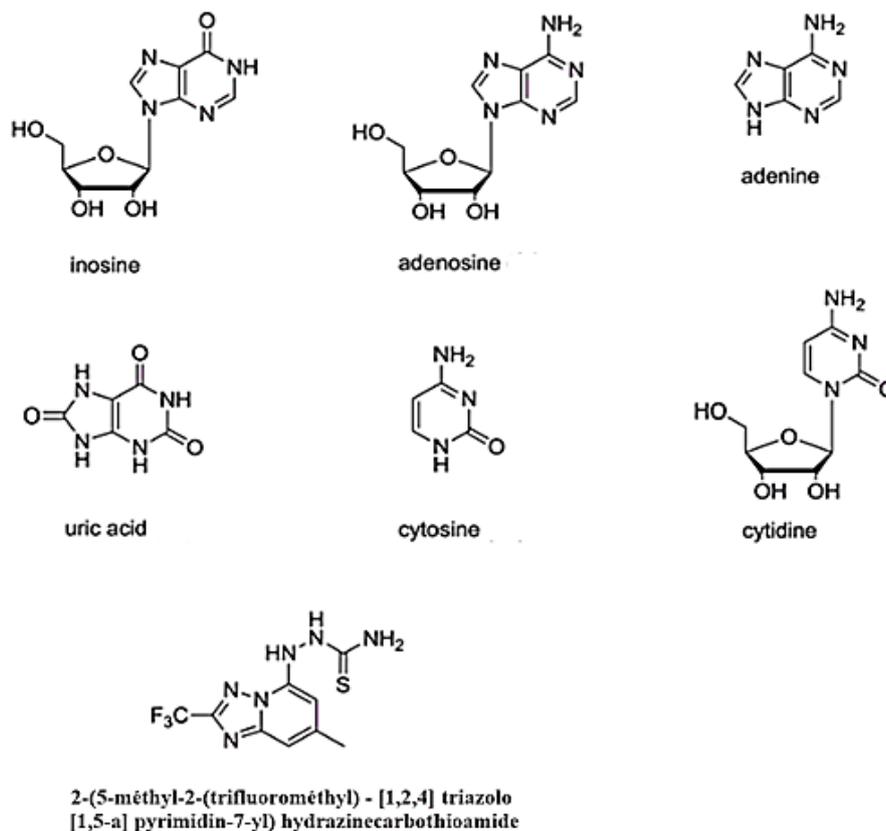


Figure 22: Composés à base de purine et de pyrimidine [5].

4.2. Ions

Avant qu'une preuve convaincante du cluster de bimanganèse ne soit établie, un panel d'ions métalliques a été utilisé pour tester l'activation et la stabilité de cette enzyme. Les résultats dépendent de la source de l'enzyme, de l'isoforme et des conditions d'évaluation. La préincubation de l'ARG I de rat avec du cobalt II, du nickel II, du fer II, du cadmium II ou du zinc II est efficace pour activer l'enzyme. L'addition de cobalt II ou de nickel II augmente légèrement l'activité mais après 15 min de préincubation avec ces derniers, l'activité diminue ce qui est attribué à une conformation inappropriée de l'arginase. L'ARG II de rat a un profil d'activation similaire, mais est inactivée après 20 h (à 5 °C) par le cobalt II, le fer II, le nickel II, le cadmium II et le mercure à 10 mM. Les ions cuivrique, mercurique et plomb inhibent les deux ARG I et II. Il est supposé que le site de liaison des ions cuivrique et mercurique est allostérique pour l'ARG II et à la fois allostérique et dans le site actif pour l'ARG I. Le cadmium inhibe l'arginase de rat mais la CI_{50} de l'arginase du foie de rat est de 16 mM tandis que la CI_{50} de l'arginase rénale de rat, elle est estimée à 92 μ M par un mécanisme mixte non compétitif

pour les deux isoformes. Cette différence a été attribuée à une plus grande quantité de résidus de cystéine et d'histidine dans l'arginase rénale. Les effets des ions métalliques divalents sur l'ARG II humaine sont surprenants. Le manganèse II, le zinc II, le cuivre II et le cadmium II sont incapables d'activer l'arginase. Alors que cette dernière était inactivée par le fer II et le nickel II. Un échantillon traité au cobalt était plus actif que l'ARG II humaine activée par le manganèse II. Cela a été attribué à la substitution partielle du cluster binucléaire de manganèse par le cobalt, ce qui a entraîné une valeur de pK plus faible de la molécule d'eau pontée avec le cluster mixte Co II-Mn II ou le cluster bi Co II. L'ARG I humaine peut être activée par le nickel II ou le cobalt II, dans une moindre mesure par le manganèse II mais beaucoup moins que par le zinc II [5].

Les anions (N_3^- , NO_2^- , BO_4^{3-} , SCN^- , CH_3CO_2^- , SO_4^{2-} , ClO_4^- , $\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$, CN^- , I, Br, Cl^-) n'ont pas affecté l'activité de l'arginase hépatique de rat. Le fluorure de potassium (KF) inhibe l'arginase hépatique de rat avec une K_i de $1,3 \pm 0,5$ mM (à pH 7,4 et une CI_{50} d'environ 2 mM) et l'arginase rénale de rat avec une K_i d'environ 0,4 mM. L'inhibition des arginases hépatiques et rénales dans ce cas est réversible et non compétitive. Les effets sont indépendants des contre-ions mais sont clairement réduits lorsque le pH augmente (K_i (NaF) à pH 7 = $1,2 \pm 0,2$ mM et 19 ± 3 mM à pH 10). L'activité plus élevée à pH neutre est attribuée au remplacement plus facile de l'ion hydroxyde ponté conduisant à l'interaction du fluorure avec le cluster de bimanganèse [5].

5. Substances actives disponibles sur le marché

Il existe des molécules, actuellement sur le marché, qui présentent aussi une activité sur l'arginase [5].

La chloroquine est utilisée dans le cadre de maladies inflammatoires en raison de son activité immunorégulatrice. Le mécanisme n'étant pas encore élucidé, une étude a mis en évidence son rôle inhibiteur de l'arginase, par un mécanisme compétitif. L'évaluation de l'inhibition de l'arginase hépatique bovine est encourageante car la chloroquine possède une CI_{50} d'environ 10 μM . L'utilisation de cette molécule pourrait être aussi intéressante dans le traitement de la drépanocytose [103].

Plus récemment, certains médicaments antirétroviraux ont été testés suite à l'observation d'une corrélation entre la charge virale chez les patients HIV⁺ et le taux d'arginase dans les cellules mononuclées du sang. Parmi les inhibiteurs testés, le darunavir et l'atazanavir ont montré une activité inhibitrice de l'ordre de 50% à 100 pM sur l'arginase extraite des cellules microgliales humaines. En outre, l'éfavirenz et la nevirapine ont été testés et bien qu'ils soient moins actifs, ces produits ont montré des CI₅₀ intéressantes, estimées à 1nM et 1μM respectivement [5].

Les deux premières stratégies consistant à s'inspirer du substrat de l'arginase ou à remplacer les ions Mn²⁺ de l'arginase n'ont, à l'heure actuelle, pas atteint les phases cliniques en raison d'une biodisponibilité insuffisante en préclinique ou de problèmes de toxicité. Toutefois, un dérivé de l'ABH (CX-1158-101) a été évalué en phase clinique I et est actuellement en phase clinique II. L'élucidation de la place de l'arginase dans la physiopathologie des maladies permettra de mettre en avant le rôle inhibiteur de molécules existantes et ouvrira probablement de nouvelles voies pour le développement d'inhibiteurs.

6. Extraits de plantes et molécules isolées

Les plantes ont toujours constitué une réserve de molécules thérapeutiques inspirées de leur utilisation en médecine traditionnelle. L'ensemble des études se sont appuyées sur le rôle des plantes en médecine traditionnelle pour le traitement de maladies cardiovasculaires (hypertension, hémorroïdes, troubles de la circulation, de l'érection) ou de maladies rénales, métaboliques (diabète, dyslipidémie) ou sur leurs propriétés neuroprotectrice, hépatoprotectrice, antiinflammatoire, anticancéreuse et antiparasitaire. Ces activités ont été reliées à différentes molécules appartenant notamment à la classe des polyphénols ce qui a permis d'élargir l'investigation à des plantes dont la composition chimique est assez proche. L'évaluation des extraits bruts ou de composés isolés sur l'activité de l'arginase a été rassemblée dans cette section. Les modèles d'évaluation de l'activité anti-arginase, dans la majorité des cas, ont été choisis en fonction de l'utilisation de la plante (Arginase de *leishmania* pour l'activité antiparasitaire, Arginase murine, bovine, humaine pour une action sur la dysfonction endothéliale ou hépatique ou rénale).

6.1. Inhibiteurs et Arginase leishmanienne

La leishmaniose est une maladie tropicale très répandue dans ce secteur géographique. Beaucoup de plantes telles que *Byrsonima coccolobifolia* et *Stachytarpheta cayennensis* sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner cette parasitose et ont permis l'identification de composés actifs sur l'arginase de ce protozoaire.

L'étude phytochimique de l'extrait EtOAc de feuilles et de tiges de *Byrsonima coccolobifolia* [104] a permis d'identifier les dérivés de l'acide gallique comme composés majeurs de l'activité antiparasitaire avec des CI_{50} proche du μM et des K_i s'échelonnant de 0,10 à 0,68 μM . Ils ont démontré une inhibition non compétitive ou mixte sur l'arginase. L'acide 5-*O*-galloylquinique possède la meilleure CI_{50} (= 0,13 μM) attribuée au groupement galloyle car l'acide quinique seul n'a pas d'activité significativement importante [105].

Par ailleurs, l'utilisation des plantes du genre *Verbascum* comme antimicrobien et anti-tuberculeux [106] a permis d'isoler le verbascoside qui est un glycoside de caféoyl phényléthanoïde. Ce composé a été retrouvé au cours de l'étude phytochimique de *Stachytarpheta cayennensis*, plante de la famille des *Verbenaceae* utilisée en médecine traditionnelle en Amérique latine pour traiter les Leishmanioses. Ce composé a été identifié comme un inhibiteur compétitif de l'arginase de *Leishmania* avec une faible sélectivité pour l'ARG I humaine [107]. Suite à ces travaux, les composés possédant un groupement acide hydroxycinnamique (ou acide coumarique) ont été étudiés afin de vérifier leur activité antileishmanienne. Les acides caféique, rosmarinique, chlorogénique, cryptochlorogénique et l'isoverbascoside ont été testés. Tous les composés ont inhibé l'arginase de *L. amazonensis* avec des CI_{50} entre 1,5 à 11 μM . L'acide caféique a démontré la meilleure activité probablement en raison de sa capacité à atteindre et interagir avec les 2 ions métalliques ce qui ne serait pas le cas pour l'arginase humaine en raison de la structure différente du site de fixation du substrat [108]. Cette étude a aussi montré que les acides caféique, rosmarinique et chlorogénique étaient des inhibiteurs compétitifs de l'arginase de *L. amazonensis*. De surcroît, contrairement au verbascoside, l'isoverbascoside est un inhibiteur non compétitif tout comme l'acide cryptochlorogénique [108]. La position du groupement acide hydroxycinnamique sur la molécule semble donc jouer un rôle déterminant dans le mode d'interaction avec l'arginase. Toutefois, les effets antiparasitaires observés au cours de cette étude [108] n'ont pas pu être corrélés aux effets inhibiteurs de l'arginase des différents composés. En effet, bien que l'isoverbascoside ait présenté l'activité inhibitrice de l'arginase la plus faible, il a pu fournir la

meilleure activité antiparasitaire. L'implication de l'arginase dans divers mécanismes pourrait être à l'origine de cette différence.

Parmi les molécules naturelles identifiées pour leur activité antileishmanienne impliquant l'arginase, nous pouvons retrouver également les flavonoïdes qui sont en grande majorité des inhibiteurs non compétitifs, incompétitifs ou mixtes de l'arginase de *Leishmania* [109]. Reis et col. [110] ont testé la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine, les CI_{50} de ces composés ont été évaluées à 0,77 et 1,8 μ M respectivement (Tableau 1). Par ailleurs, Manjolin et col. ont caractérisé l'inhibition de l'arginase recombinante de *Leishmania amazonensis* par la quercétine, la quercitrine, l'isoquercitrine, l'orientine, l'isoorientine, la fisétine, la lutéoline, le kaempférol et la galangine (Tableau 1). Les valeurs des CI_{50} de ces molécules ont été comprises entre 1,4 et 100 μ M [111]. La quercétine est un inhibiteur mixte, tandis que la quercitrine et l'isoquercitrine sont des inhibiteurs non compétitifs de l'arginase de *L. amazonensis*. La quercétine interagit avec le substrat L-arginine et le cofacteur Mn^{2+} à pH 9,6, tandis que la quercitrine et l'isoquercitrine n'interagissent pas avec le cofacteur ou le substrat de l'enzyme [20].

6.2. Relation structure-activité des flavonoïdes sur l'arginase de *Leishmania*

Concernant les dérivés de la classe des flavonoïdes, la diminution de l'inhibition de l'arginase de *Leishmania* (Tableau 1) dans l'ordre suivant : la myricétine (substituée par trois hydroxyles sur le cycle B), la quercétine (catéchol sur le cycle B), le kaempférol (un hydroxyle sur le cycle B) et la galangine (pas d'hydroxyle sur le cycle B) démontre l'importance de la présence d'hydroxyle sur le cycle B (Figure 23). Plus particulièrement l'hydroxyle en C5' est indispensable pour le maintien de l'activité [20, 104, 111]. En effet, il a été montré, suite à une analyse en *docking*, que le groupe catéchol de la quercétine, la quercitrine et l'isoquercitrine interagit avec l'Asp129, qui est impliqué dans la formation d'un pont métallique pour les cofacteurs Mn^{2+} A et Mn^{2+} B dans le site actif de l'arginase [20].

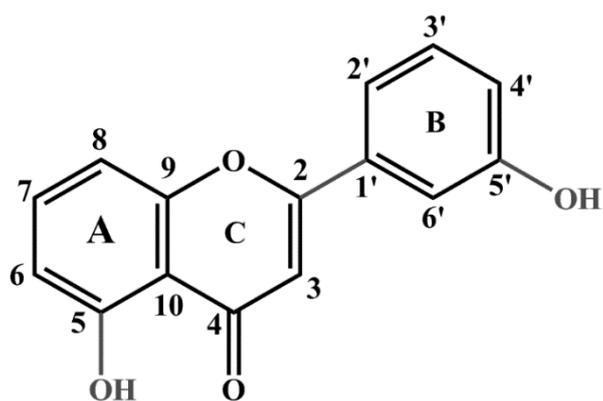


Figure 23: Relations structure-activité des flavonoïdes comme inhibiteurs de l'ARG d'après Minozzo et col. [9]. Le groupe hydroxyle (-OH) en C5' et C5 et la liaison α entre C2-C1' sont indispensables à l'activité.

Sur le cycle A des flavonoïdes, le nombre d'hydroxyle semble être moins important car la fisétine (un hydroxyle sur le cycle A) présente une activité élevée avec une valeur de CI_{50} de 1,4 μ M. Sur le cycle C, la présence d'un hydroxyle semble préférable car la lutéoline (H en position 3 sur le cycle C) est deux fois moins active que la quercétine (OH en position 3 sur le cycle C). De plus, la (+) catéchine et la (-)-épicatéchine, possédant une liaison saturée en position 2 et 3 sont parmi les flavonoïdes les plus actifs, avec des valeurs de CI_{50} de 1,7 et 1,6 μ M, respectivement (Tableau 1) [20, 104, 111]. Un hydroxyle en position 3 sur le cycle C peut être substitué par un rhamnose (quercitrine) ou du glucose (isoquercitrine) sans perte ou avec une diminution seulement modérée de l'activité tandis que le glucose en position 6 (isoorientine) et 8 (orientine) limite clairement l'activité. Récemment, un criblage virtuel reposant sur le modèle d'homologie de l'arginase de *Leishmania* a suggéré le potentiel des dérivés glycosylés et des esters galliques des flavonoïdes [112]. De plus, la méthylation des hydroxyles réduit significativement l'activité tandis que l'acétylation conduit à des résultats contradictoires car la péracétylquercétine est peu active et la triacétylcatéchine est, de manière inattendue, très active (Tableau 1). D'autre part il a été prouvé que la présence du groupe carbonyle en C4 a une influence peu significative et que l'hydroxyle en C5 est essentiel à l'activité inhibitrice ainsi que la liaison α entre C2-C1' qui augmente l'activité [105].

En conclusion, ces données aident à élucider le mécanisme d'action des composés naturels sur l'arginase de *leishmania*. Il serait intéressant de vérifier si ces relations structure-activité, restent valables pour l'arginase de mammifères.

6.3. Inhibiteurs et Arginase de mammifères

L'activité sur l'arginase de mammifères des extraits ou de composés naturels, issus de végétaux, a été évaluée dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* pour évaluer leur potentiel thérapeutique dans le traitement de pathologies en lien avec les tissus hépatique et rénal, l'endothélium vasculaire et le cancer. L'implication d'ARG I et II dans la dysfonction endothéliale (artérielle, rénale, pénienne) donne lieu à différents modèles cellulaires *in vitro* et *in vivo* impliquant soit l'isoforme ARG I ou II afin d'évaluer des composés ou des extraits issus d'extractions par des solvants polaires contenant majoritairement des polyphénols. Cette classe de composés fera ensuite l'objet d'une étude bibliographique plus poussée.

6.3.1. Extraits

André et col. [113] ont évalué un extrait de l'écorce de tige de *Ficus glomerata* Roxob enrichi en procyanidine. Dans ce cadre, il a été démontré que les polyphénols peuvent jouer un rôle important en raison de leur capacité à altérer la conformation active des enzymes. Toutefois l'extrait méthanolique de feuilles de *Ficus exasperata* n'a pas montré, *in vitro*, d'inhibition de l'arginase cardiaque [114]. Néanmoins, ces mêmes chercheurs ont testé les effets des extraits méthanoliques des espèces africaines *Artocarpus altilis* (écorce de tige), et *Kigelia africana* (Fruits). Les résultats *in vitro* ont indiqué que *A. altilis*, testée à 500 et 700 µg/mL, a inhibé l'activité enzymatique à hauteur de 63 et 67% respectivement [114]. En revanche, l'extrait de *Kigelia africana* n'a pas présenté d'activité inhibitrice.

Préparés à partir de feuilles de *Sterculia macrophylla*, des extraits, obtenus par du n-Hexane, de l'acétate d'éthyle et du méthanol, ont été testés sur l'arginase comparativement à la nor-NOHA. Seul l'extrait méthanolique a présenté une activité inhibitrice avec une CI₅₀ de 115 µg/mL [115]. Cet extrait méthanolique est composé d'alkaloïdes, de flavonoïdes, de tanins, de terpènes et de glycosides et cette activité inhibitrice sur l'arginase pourrait être attribuée aux flavonoïdes, en particulier la quercétine vu sa teneur élevée au sein de cette fraction.

Syzygium cumini a été étudiée pour son utilisation traditionnelle dans le diabète et sa composition riche en flavonoïdes, terpènes et tanins. Les feuilles de cette plante provenant de différentes régions d'Indonésie ont été collectées et testées *in vitro* sur l'arginase hépatique bovine. À une concentration de 50 µg/mL, tous les extraits ont présenté une inhibition

supérieure à 80% comparée à l'activité du resvératrol dont la CI_{50} était estimée à 18 μ M. L'extrait des feuilles de *S. cumini* le plus actif avait la teneur phénolique la plus importante en équivalent d'acide gallique mais la corrélation n'a pas pu être statistiquement mise en évidence [116].

Sembiring et col. ont étudié l'effet inhibiteur sur l'ARG I des extraits éthanoliques de différentes parties de *Melastoma malabathricum* [117] obtenus par macération. L'extrait de feuilles de *M. malabathricum* à 100 μ g/mL s'est révélé présenter l'inhibition la plus élevée ($81,26 \pm 5,27\%$), suivi par les fleurs ($73,39 \pm 9,39\%$), les fruits ($67,63 \pm 7,61$) puis les tiges ($61,61 \pm 4,56\%$). La valeur de la CI_{50} de l'extrait le plus actif était à 62,43 μ g/ml. Cet extrait de feuilles a présenté la composition phytochimique la plus complexe avec la présence de saponines en plus des alcaloïdes, des flavonoïdes et des tanins. L'analyse statistique entre le contenu phénolique et l'inhibition de l'arginase n'a montré aucune corrélation.

Le genre *Caesalpinia* a fait l'objet de nombreuses études pour déterminer son activité inhibitrice sur l'arginase en raison de l'utilisation, dans la culture asiatique, de *Caesalpinia sappan* pour favoriser une meilleure circulation sanguine et pour prévenir la stase sanguine [118]. L'étude de cette plante a montré une inhibition de l'activité de l'ARG II de 70% à 50 μ g/mL obtenue avec un extrait à l'acétate d'éthyle du bois qui a démontré une CI_{50} de 37 μ g/mL. Cet effet a été associé à l'augmentation de la sécrétion de NO dans les cellules endothéliales d'aorte de souris et de veine ombilicale humaine. Bien que l'effet inhibiteur sur l'ARG I n'ait pas été exploré, l'activité de cet extrait a été associée à une augmentation dose-dépendante de la production de NO [118]. Deux autres études, se sont quant à elles intéressées à l'inhibition de l'activité de l'ARG I de foie bovin, de trois extraits d'écorces de tiges de *Caesalpinia pulcherrima* [119] et de *Caesalpinia coriaria* [120] obtenus à partir de n-hexane, d'acétate d'éthyle et de méthanol. Ces extraits ont été testés *in vitro* et comparés à la nor-NOHA. Les extraits au MeOH à 100 μ g/mL ont montré, respectivement, une inhibition de 79% et 34% alors que les extraits à l'EtOAc ont eu une activité à 24% et 14% et ceux au n-Hexane n'en ont montré aucune [119, 120]. L'extrait méthanolique de *Caesalpinia pulcherrima*, qui est le plus actif, a révélé une CI_{50} de 21,969 μ g/mL. De surcroît, Atikasari et col. [121] ont étudié l'activité inhibitrice de l'arginase après fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Caesalpinia turtuosa* selon un kit enzymatique identique à celui des deux études précédentes. Deux fractions avaient une forte activité avec une inhibition de 90,72% et 91,41% à 100 μ g/mL (comparativement à la nor-NOHA) [121]. Dans deux de ces études [119, 120], l'analyse phytochimique des extraits les plus actifs a montré la présence de flavonoïdes, de tanins et de

saponines dans les extraits. La différence concerne la présence de triterpénoïdes pour l'extrait méthanolique de *Caesalpinia pulcherrima* [119] et de stéroïdes pour l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Caesalpinia coriaria* [120]. Toutefois, l'analyse statistique de la composition en polyphénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait de *Caesalpinia turtuosa* [121] n'a pas démontré que l'activité était liée à leur teneur mais à d'autres métabolites secondaires qui pourraient être responsables de l'activité biologique de cette plante.

Récemment, une équipe roumaine [122] a étudié la plante *Crataegus pentagyna* sur l'ARG I bovine purifiée. Tous les extraits (de fleurs, fruits et feuilles) issus de cette plante ont montré une activité > à 80% à une concentration de 100 µg/mL. Les activités observées avec ces extraits ont été attribuées à la richesse de cette plante en composés phénoliques couramment retrouvés dans le genre *Crataegus*.

6.3.2. Composés naturels

Afin de définir la capacité des polyphénols à inhiber l'arginase et à générer des effets biologiques intéressants, une revue de la littérature a été réalisée sur ces composés.

a- Fonctions vasculaire et rénale

- Polyphénols

Parmi les polyphénols, les stilbènes ont démontré des propriétés cardioprotectives au travers de l'étude des propriétés vasorelaxantes de *Rheum undulatum* [123, 124]. Inspirés par ces résultats, les effets du resvératrol et du picéatannol sur l'arginase obtenu à partir d'un lysat de cellules endothéliales aortiques bovines exposées à des concentrations élevées de glucose (25 mM) ont été étudiés [125]. Aucune inhibition de l'arginase n'a été observée en présence du resvératrol à 10 µM ou du picéatannol à 1 µM. En condition normale, l'ARG I et II issus de foie et de rein ont été inhibées de 25 et 17% respectivement à une concentration de 50 µM de resvératrol et de 29 et 26% pour une concentration à 10 µM en picéatannol [126]. Les CI₅₀ de ces deux composés sur l'ARG I bovine sont de 18 et 12 µM [99]. Au regard de ces données, il est raisonnable de supposer que les concentrations testées par Frombaum et col. [125] n'étaient probablement pas suffisantes pour générer une inhibition. Toutefois, une amélioration de la fonction endothéliale a été observée après administration intraveineuse de 30 mg/kg de poids corporel/j de picéatannol pendant 4 jours à des rats âgés [127]. Une réduction de la pression

sanguine a aussi été observée et elle était associée à une diminution des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à une augmentation dose-dépendante des niveaux de NO. Un dérivé du picéatannol a été aussi étudié, le picéatannol -3'-O-β-D-glucopyranoside (PG) par l'équipe de Ryoo [128]. Ce composé a montré une action inhibitrice *in vitro* sur l'ARG I et l'ARG II avec une CI₅₀ de 11 μM pour le lysat hépatique et rénal. En outre, une capacité antioxydante par une diminution des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et une augmentation dose-dépendante des niveaux de NO ont été observées *ex vivo* sur des cellules humaines de cordon ombilical [128]. Le PG se comporte comme un inhibiteur non sélectif de l'ARG I et II chez les souris (Tableau 1). Ces effets ont été confirmés *in vivo* dans un contexte d'athérosclérose. En effet, le PG a montré des effets bénéfiques (amélioration de la fonction vasculaire, diminution des dépôts athéromateux) sur un modèle de souris ApoE^{-/-} ayant reçu un régime riche en cholestérol et une dose journalière de PG (500 μg/souris/j pendant 6 semaines), administrée par l'eau de boisson [129]. Dans la poursuite de l'exploration des dérivés glycosylés du stilbène, Yi et col. [130] ont identifié une nouvelle substance, le 2,3,5,4'-tétrahydroxystilbène-2-O-β-D-glucoside (THSG), issu du rhizome de *Polygonum multiflorum*. Cette molécule a aussi démontré une activité inhibitrice de l'ARG I et II de 25% et 38% respectivement pour une concentration de 50 μM. Cet inhibiteur non compétitif améliore la fonction et la réactivité vasculaire avec des effets *in vivo* similaire au PG [130]. D'autres stilbènes ont été isolés à partir de trois espèces de Cyperaceae (*Cyperus eragrostis*, *Carex appressa* et *Carex cuprina*) et testés sur l'ARG I bovine purifiée et sur un modèle *ex vivo* d'anneaux aortiques de rat. 8 composés ont été isolés dont le resvératrol diglucoside, le picéatannol, la ε-viniférine, la scirpusine B, le cyperusphénol B, le carexinol A, le kobophénol A et un nouveau composé : le virgatanol [131]. Ces derniers ont montré une inhibition de l'arginase, avec un pourcentage d'inhibition allant de 45% à 95% à 100 μM. Le resvératrol diglucoside et le kobophénol A étaient les moins actifs. Les CI₅₀ des 6 composés les plus efficaces étaient comprises entre 12,2 et 182,1 μM. Le cypérusphénol B et le picéatannol sont les plus efficaces (CI₅₀=12 μM) alors que virgatanol s'est révélé être le moins intéressant (182 μM) (Tableau 1).

L'effet des flavonoïdes a aussi été exploré, chez des volontaires sains, au travers d'une supplémentation par une poudre de cacao riche ou non en flavanols (<90 mg vs 985 mg). Les érythrocytes prélevés présentaient une activité de l'arginase réduite après 24h [132]. La composition plasmatique en flavanols a été analysée 2h après la consommation de la poudre riche en flavanols et a été reconstituée artificiellement pour évaluer le rôle de ses composés sur des cultures de cellules ombilicale humaines et *in vivo*. Ce mélange se compose de l'(-) - épicatechine (0,1 μM) et la catéchine (0,4 μM) mais aussi des métabolites épicatechine-7-β-

glucuronide (0,25 μM), 4'-O-méthyl-épicatéchine (0,2 μM) et 4'-O-méthyl-épicatéchine-7- β -glucuronide (1,7 μM) pour une concentration de 2,6 μM de flavonoïdes. Les auteurs ont pu mettre en évidence une réduction de l'expression et de l'activité de l'arginase [132]. Ces conclusions viennent compléter les observations de l'effet du chocolat noir riche en flavonoïdes sur la dilatation médiée par le flux de l'artère brachiale (méthode non invasive) chez des volontaires sains. Après 2 semaines de régime, une amélioration de la dilatation a été notée parallèlement à l'augmentation de l'épicatéchine plasmatique [133]. Ces deux dernières études s'ajoutent aux résultats publiés par Nikolić et col. [134]. Dans le cadre d'un modèle d'insuffisance rénale aiguë induite par l'injection intramusculaire de glycérol chez le rat, l'administration préventive (2 h avant l'induction) d'une dose de 20 mg/kg de quercétine en sous-cutanée a permis de diminuer l'urémie et la créatinémie par rapport au groupe témoin (glycérol uniquement). Parallèlement, une diminution de l'activité de l'arginase hépatique a été notée. Selon les chercheurs, l'action antioxydante établie de la quercétine, combinée à l'inhibition de la consommation de la L-arginine par l'arginase, pourrait avoir contribué à la mise à disposition du substrat pour la synthèse du NO, dont le pouvoir vasorelaxant a contribué à la diminution de la résistance vasculaire et la restauration de la fonction rénale.

D'autres chercheurs [135] ont testé huit flavonoïdes isolés d'un extrait méthanolique de *Scutellaria indica* sur l'ARG II d'homogénat de rein de souris. Uniquement deux composés ont montré des activités intéressantes : la (2S)-5,7-dihydroxy -8,2'-diméthoxyflavanone (DDF) et la (2S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8 -diméthoxyflavanone (TDF) avec des CI_{50} de 25,1 et 11,6 μM respectivement comparées à une CI_{50} de 1,0 μM pour le picéatannol -3'-O- β -D-glucopyranoside (PG) utilisé ici comme contrôle positif.

De surcroît, l'isolement des acides phénols afin d'étudier leur activité sur des modèles cellulaires ou *in vivo* n'a pas encore été réalisé mais ils ont été retrouvés dans de nombreux extraits actifs de plantes. *Hunteria umbellata* est une plante qui possède de multiples actions pharmacologiques comme analgésique, antipyrétique mais elle est aussi utilisée dans le traitement de l'hypertension, l'obésité et le diabète. L'analyse chromatographique d'une décoction de poudre de graines a montré la présence d'acides-phénols (acides ellagique, gallique, et chlorogénique) représentant approximativement 2/3 des composés phénoliques [136] ainsi que des flavonoïdes (quercétine et apigénine). Cet extrait a montré une réduction de l'activité basale de l'arginase sérique et du tissu pénien d'environ 60 et 67 % respectivement pour une dose de 100 mg/kg de poids corporel/jour pendant 28j. Cette diminution s'est associée à une augmentation du niveau du NO et à une amélioration du comportement sexuel des rats

mâles en raison de l'effet anti-anxiété de cette plante [136]. Ces mêmes acides-phénols associés aux flavonoïdes suivants : catéchine, épicatechine, isoquercitrine, quercétine, quercitrine, rutine et kaempférol ont été retrouvés dans un extrait de feuilles de *Moringa oleifera*. Ils ont inhibé l'arginase des homogénats de pénis de rat de manière dose-dépendante (CI₅₀ de 159,59 µg/mL) [137]. Cette même combinaison acides-phénols/flavonoïdes a été retrouvée dans les fruits de *Cornus mas* (1), *Sorbus aucuparia* (2) et *Viburnum opulus* (3) qui sont utilisés pour traiter l'inflammation chronique (1 ; 2), les troubles hépatiques (1), les maladies rénales (3) ou l'hypertension (3). Les extraits ont été obtenus, après délipidation, avec un mélange acide d'acétone et d'eau (80 :19,5). Ils ont montré des activités inhibitrices sur l'ARG I bovine de 37%, 28% et 68% respectivement pour une concentration de 100 µg/mL [138]. L'extrait de fruit de *V. opulus* a présenté la meilleure activité inhibitrice avec une CI₅₀ de 71 µg/mL avec une activité vasorelaxante la plus élevée dans un modèle *ex vivo* d'anneaux aortiques de rat précontracturés à la phényléphrine (CE₅₀ = 6,31 ± 1,61 µg / mL). Pour tous les extraits, les études HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS ont révélé un profil métabolique très complexe mais la présence d'acide chlorogénique représente 30,89 ; 0,72 et 2,03 mg/g dans les extraits de fruits de *V. opulus*, *C. mas* et *S. aucuparia*, respectivement. Bien que l'activité semble être corrélée à la concentration en acide chlorogénique dans les extraits, il est à noter que leur composition qualitative sont très différentes avec notamment la présence de catéchine et d'épicatechine exclusivement dans l'extrait le plus actif ce qui pourrait expliquer ces différences d'activité. Ces observations confirment les suppositions des auteurs sur l'implication des composés phénols-acides (acides caféique et gallique) et des flavonoïdes (catéchine, épicatechine, kaempférol, lutéoline, quercétine, quercitrine, rutine) issus des rhizomes de gingembre, *Zingiber officinale*, et de safran, connu sous le nom de gingembre rouge *Curcuma longa*, dans l'inhibition de l'arginase [9]. En effet, les rats ayant un régime riche en cholestérol (2%) pendant 14 jours et recevant un traitement par ces extraits ont montré une réduction significative de l'activité de l'arginase plasmatique et hépatique par rapport au contrôle [9].

L'acide salvianolique B, acide-phénol isolé de *Salvia miltiorrhiza* a montré une inhibition de 29 et 15 % sur l'ARG I et II respectivement à 100 µM mais en présence de lipopolysaccharides, l'action est inversée [139]. Ce dernier exemple démontre la complexité de l'utilisation d'inhibiteurs naturels qui peuvent avoir des rôles différents en fonction de l'environnement de l'arginase.

La sauchinone et la 7-hydroxysauchinone, 2 lignanes isolées des parties aériennes de *Saururus chinensis* ont aussi un effet inhibiteur de l'ARG II avec une CI_{50} de 61 et 90 μM respectivement [140].

Les composés phénoliques représentent une classe importante avec de nombreux inhibiteurs d'ARG I et II qui ont montré des effets dans la dysfonction endothéliale. La diversité de composition des extraits ne permet pas d'attribuer une activité spécifique de l'extrait à une seule molécule car elles ont presque toutes des CI_{50} entre 1 et 100 μM . Toutefois, il est possible que des actions synergiques aient lieu en raison de la combinaison d'inhibiteurs compétitifs et non compétitifs au sein d'un même extrait.

- Alcaloïdes et terpénoïdes

Deux autres classes de molécules naturelles, que sont les saponines et les alcaloïdes, ont été explorées, mais le nombre de molécules ayant un rôle inhibiteur est moins important. Une première étude comparative entre une fraction saponidique et non saponidique a été réalisée *in vivo*. Des rats Wistar (mâles, adultes) ont eu accès à volonté à des régimes alimentaires complétés par 400 μL (200 mg/kg) d'extrait aqueux de *Yucca schidigera*, de la fraction extractible au butanol (fraction saponidique) ou de la fraction non-extractible au butanol (fraction non saponidique). À la fin des 76 jours de l'expérience, une diminution significative de l'activité de l'arginase hépatique a été observée chez les animaux traités avec l'extrait aqueux total de *Y. schidigera* et avec sa fraction butanolique (riche en saponines) [9]. L'intérêt de ces composés a été confirmé par l'étude du ginseng rouge coréen, *Panax ginseng* employé pour ses effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire, notamment comme antihypertenseur, cardioprotecteur et hypolipémiant. L'activité inhibitrice de l'extrait aqueux de *P. ginseng* a été évaluée à 33% d'inhibition du niveau basal de l'ARG I à une concentration de 25 $\mu g/mL$. L'évaluation, chez la souris *KO* au récepteur des LDL soumis à un régime riche en cholestérol, a montré une amélioration de la vasorelaxation après administration de l'extrait dans l'eau de boisson correspondant à une dose journalière de 10 mg pendant 4 à 6 semaines. Ces effets ont été associés à une inhibition de l'activité arginase, à une augmentation de la dimérisation de la eNOS et donc à une augmentation conséquente des niveaux de NO [141]. Deux composés actifs du ginseng rouge coréen, le ginsénoside Rb1 et Rg3 (Saponosides à structure stéroïdienne), ont été liés à une production accrue de NO dans les cellules endothéliales aortiques humaines par une action directe sur la NOS. Il est possible que l'activité de cet extrait résulte des effets sur l'arginase mais aussi sur d'autres voies de signalisation menant à une libération de NO.

Concernant les alcaloïdes, des extraits alcaloïdiques ont été préparés à partir de deux plantes (*Vernonia amygdalina* et *Solanum nigrum*) afin d'évaluer les effets de cette classe de métabolites secondaires sur l'arginase. Les feuilles de la vernonie commune (*V. amygdalina*), connue pour ses propriétés aphrodisiaques, et de la morelle noire (*S. nigrum*), pour ses vertus cardioprotectives, ont été utilisées. Le potentiel inhibiteur de ces extraits sur l'activité de l'arginase du tissu pénien du rat a été déterminé *in vitro*. Ces fractions ont inhibé l'activité de l'arginase de manière concentration-dépendante avec des CE₅₀ de l'ordre de 30,51±1,2 et 26,92±1,1 µg/mL respectivement. La caractérisation GC-MS a révélé plus de 20 alcaloïdes [142] au sein de ces extraits.

L'obacunone, un tétranortriterpène : trouvé dans les fruits du genre *Citrus*, a également été testée [143] et a présenté une activité modérée sur les ARG I et II sans sélectivité. En effet, le traitement à l'obacunone a diminué l'activité de l'arginase II issue de lysat rénal de 30% à 50 µM et de 32 % dans le lysat hépatique à la même concentration. Cette molécule, testée sur l'arginase des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, l'a inhibée de 35% à une concentration de 30 µM (Tableau 1). Ces données ont montré que l'obacunone est un inhibiteur non compétitif de l'arginase [143].

La multiplicité des modèles *in vitro* et *in vivo* rend difficile la comparaison des inhibiteurs naturels de l'arginase impliquée dans la dysfonction endothéliale. Toutefois, il n'apparaît pas de réelle sélectivité pour une isoforme et la majorité d'entre eux sont des inhibiteurs compétitifs. Le mécanisme, étudié par les différents auteurs, met en jeu l'inhibition de l'arginase mais il existe d'autres mécanismes indirects qui ont une action sur l'arginase et concourent aux effets biologiques positifs des extraits. En exemple, la génistéine, une isoflavone, réduirait l'expression d'ARG I et II en tant qu'inhibiteur du récepteur de l'EGF [144].

b- Effets sur le cancer

Dans le cadre du traitement du cancer, l'inhibition de l'arginase a montré un intérêt dans la réduction tumorale et dans la stimulation du système immunitaire (cf § 7. Rôles de l'arginase dans le cancer).

L'inhibition de l'arginase par des composés naturels a été évaluée *in vitro* sur des cellules cancéreuses. L'équipe de Stolarczyk [145] a étudié les effets sur l'arginase des cellules

cancéreuses de la prostate (LNcaP) des extraits aqueux et à l'acétate d'éthyle (parties aériennes) de trois espèces d'*Epilobium* : *Epilobium angustifolium*, *Epilobium parviflorum* et *Epilobium hirsutum*, ainsi que des polyphénols isolés de ces espèces. Ils ont démontré que presque tous les extraits (à 50 et 70 µg/mL) et les composés phénoliques testés, dont la quercétine-3-O-glucuronide et l'œnothéine B (à 10, 20 et 40 µM), étaient en mesure d'inhiber de manière significative l'action enzymatique. En outre, ces mêmes auteurs ont fourni des données intéressantes concernant la recherche d'inhibiteurs d'arginase : il a été prouvé que les ellagitanins de l'extrait d'*E. hirsutum* étaient transformés par le microbiote intestinal humain en urolithines (A, B et C). L'urolithine C a montré la plus forte activité d'inhibition de l'arginase (réduction de $65,2 \pm 1,1$ mU urée/mg de protéine à $27,9 \pm 3,3$ mU urée/mg de protéine). La quantité d'ellagitanines dans la circulation systémique et les tissus est pratiquement indétectable, tandis que les urolithines et leurs conjugués ont été trouvés à des niveaux plus élevés (µM) et peuvent maintenir leur activité inhibitrice de l'arginase (Tableau 1) [145]. L'implication des polyphénols dans l'inhibition de l'arginase a aussi été démontré dans un modèle animal de carcinome hépatocellulaire. L'administration orale d'acide ellagique (50 mg/kg/jour), 7 jours avant et 14 jours après l'induction de la tumeur induite au N-nitrosodéthylamine et CCl₄, fournissait 23,6% d'inhibition de l'activité de l'arginase par rapport au groupe témoin négatif (rats sains) [9]. Les polyphénols dans ce contexte ont aussi un rôle préventif par rapport aux effets toxiques des xénobiotiques. Dans ce contexte de prévention des effets toxiques, une étude a évalué l'effet de *Bryophyllum pinnatum* sur l'activité de l'ARG II et sa prévention contre les dommages oxydatifs rénaux provoqués par le CCl₄ chez le rat. Cette étude a montré que le prétraitement du rat avec l'extrait aqueux des feuilles de cette plante (25 ou 50 mg/kg de poids corporel) inhibe les activités de l'ARG II chez les rats traités au CCl₄, empêchant ainsi les dommages oxydatifs rénaux provoqués par ce produit toxique [146].

Bien que peu de composés naturels aient été testés dans des modèles de cancers, il semble qu'ils aient aussi un rôle protecteur limitant l'effet de composés cancérigènes.

6.3.3. Relation structure-activité des composés phénoliques sur l'arginase de mammifères

Une première étude, s'intéressant à un ensemble de composés phénoliques sur l'ARG I bovine, a permis d'identifier l'importance du groupement caféoylé (3,4-dihydroxycinnamoyle) dans l'activité inhibitrice de cette famille de métabolites secondaires puisque l'acide chlorogénique et le picéatannol, possédant en commun cette fonction, ont fourni les activités

inhibitrices les plus élevées ($CI_{50}=10,6$ et $12,1 \mu M$ respectivement) [99]. Le dérivé glycosylé du picéatannol (picéatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside, [Figure 24](#)) a une meilleure inhibition que le picéatannol, avec des $CI_{50}= 11,22 \mu M$ sur les ARG I et II d'un modèle murin [128], ce qui montre que le remplacement du groupement hydroxyl en position 3' par un glucopyranoside peut probablement renforcer le pouvoir inhibiteur de l'arginase mammifère. Une autre étude s'intéressant aux stilbènes [131], a confirmé l'importance du groupement catéchol au sein de cette classe de composés pour l'inhibition de l'activité de l'arginase mammifère puisque deux oligomères de resvératrol : le cyperusphénol B et la scirpusine B, possédant 3 et 2 catéchols respectivement ont montré les activités inhibitrices de l'ARG I bovine les plus intéressantes ([Tableau 1](#)). En revanche, le remplacement des groupements hydroxyles en position 3 et 5 ([Figure 24](#)) par des sucres provoque une perte drastique de l'inhibition comme le prouve l'absence d'activité du diglucoside de resvératrol sur l'ARG I bovine ($< 20\%$ à $10 \mu M$) comparé au resvératrol ($CI_{50} = 18,2 \mu M$) [131].

Les résultats observés sur l'ARG I bovine corroborent ceux obtenus avec l'ARG I humaine [10] en précisant que la partie caféoyle pouvait pénétrer dans la poche du site actif de l'arginase et que la fonction catéchol pouvait interagir avec le cofacteur Mn^{2+} et plusieurs résidus d'acides aminés cruciaux (Asp234, Thr246, His141 et His126) impliqués dans le mécanisme d'hydrolyse de l'arginase humaine.

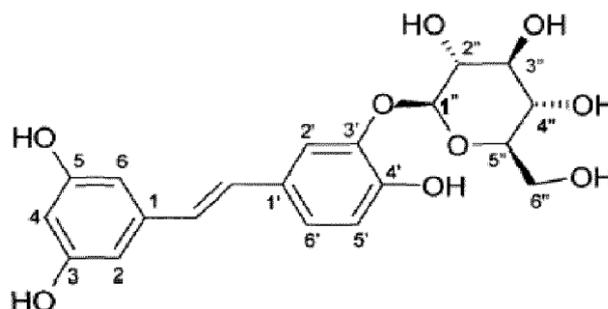


Figure 24: Structure du picéatannol-3'-O- β -D-glucopyranoside.

Concernant les différentes classes des flavonoïdes, le groupement catéchol reste de même indispensable. En effet, l'activité inhibitrice de l'ARG I bovine, d'une série de flavonoïdes portant (épicatéchine, taxifoline, quercétine, fisétine) ou pas le groupement catéchol (kaempférol) a été comparée en présence de l'ARG I bovine. Les résultats ont prouvé que

l'absence de ce groupement est associée à une diminution de l'activité inhibitrice (CI_{50} kaempférol = 179 μ M vs CI_{50} s'échelonnant de 20 à 83 μ M pour les autres flavonoïdes) [99].

Remarque : Les polyphénols avec une activité inhibitrice d'arginase ont une faible biodisponibilité par voie orale. Le passage de ces molécules à travers la muqueuse intestinale n'est pas le facteur limitant mais un effet de premier passage, probablement hépatique, serait à l'origine de la faible biodisponibilité orale. Environ la moitié des polyphénols actifs sur l'arginase se trouvent à l'état libre dans la circulation (faiblement liés aux protéines plasmatiques) et ils peuvent être distribués au niveau des tissus périphériques pour y exercer leur activité inhibitrice. Outre cela, parmi les polyphénols testés sur l'arginase, seulement deux (l'acide méso-dihydroguaiarétique et la guaiacine dont les CI_{50} sont peu intéressantes puisqu'elles sont supérieures à 200 μ M sur ARG II du rein de souris C57BL / 6) ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique, ce qui pourrait entraîner des effets toxicologiques. Par ailleurs, une seule substance inhibitrice d'arginase viole les règles de Lipinski, il s'agit de la (2S)-5,5'-dihydroxy-7,8-diméthoxyflavanone -2'-O- β -D-glucopyranoside [9].

Le **Tableau 1** ci-dessous résume l'ensemble des produits naturels purs issus des plantes, testés sur différents modèles d'arginase.

Tableau 1 : Principaux composés naturels ayant montré une activité inhibitrice de l'arginase

Composés	Modèle du test	Résultats :			Référence
		% inhibition % activité	CI ₅₀ (μM)	K _i (μM)	
Flavonoïdes					
Myricétine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	2,1	1,2	[5]
Myricétine-3- <i>O</i> -rhamnoside	ARG des cellules humaines du cancer de la prostate (LNcaP)	30 % à 40 μM	ND	ND	[145] [147]
	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	2,4	ND	
Quercétine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	4,0 ± 0.5 4.31	8 ± 1	[5] [99]
	ARG I bovine	/	31,2	ND	
Quercétine-3- <i>O</i> -glucoronide	ARG des cellules humaines du cancer de la prostate (LNcaP)	23 % à 40 μM	ND	ND	[145]
Taxifoline	ARG I bovine	/	23,2	ND	[99]
Kaempférol	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	55 ± 4	ND	[111] [99]

	ARG I bovine	/	179,1	ND	
Galangine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	≈ 100	ND	[111]
Fiséline	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	1,4 ± 0,3	1,9 ± 0,5	[111] [99]
	ARG I bovine	/	82,9	ND	
Lutéoline	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	9 ± 1	8 ± 1	[111]
(+)-Catéchine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	1,7 ± 0,1	0,6	[5]
		/	0,77 ± 0,01	12 ± 2,5	[110]
(-)-Epicatéchine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	1,6 ± 0,2	0,2	[110][5]
		/	1,8 ± 0,5	3,0 ± 0,4	[99]
	ARG I bovine	/	19,9	ND	

(-)-Epigallocatechine-3-gallate (flavanol)	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	3,8 ± 0,1	4,0 ± 0,5	[110]
	Arginase de foie de rat (ARG1)	29 % à 1 000 µM	ND	ND	
Quercitrine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	12,2 ± 1,8	7,9	[111]
			10,0 ± 0,08	6,99	
Isoquercitrine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	2,0 ± 0,1	2,65	[111]
			3,8 ± 0,04		
Myricitrine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	2,4 ± 0,2	ND	[5]
Orientine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	16 ± 2	24 ± 2	[111]
Isoorientine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	9 ± 1	22 ± 2	[111]
Péracétyl quercétine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	120,8 ± 12,1	ND	[5]
Penta-acétyl catéchine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	4,8 ± 0,5	ND	[5]
Monoacétyl catéchine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	3,7	ND	[147]
3,5,7-Triacétyl catéchine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	0,9 ± 0,1	0,9	[5]
3-O-rhamnopyranoside catéchine	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	35,1	ND	[147]
(2S)-5,7-dihydroxy-8,2'-diméthoxyflavanone	ARG II de souris	/	25,1 ± 2,6	ND	[5]

(2S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-diméthoxyflavanone	ARG II de souris	/	11,6 ± 1,2	ND	[5]
(2R,4S)-4,5,6,7,8,4'-Hexaméthoxyflavane	ARG 2 du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
Wogonine	ARG 2 du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
Apigénine	ARG 2 du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
	<i>Leishmania amazonensis</i>	< 50 % à 125 µM	ND	ND	[147]
Isovitexine	<i>Leishmania amazonensis</i>	< 50 % à 125 µM	ND	ND	[147]
Vitexine	<i>Leishmania amazonensis</i>	< 50 % à 125 µM	ND	ND	[147]
Naringénine	ARG 2 du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
Naringénine-5-O-β-D-glucopyranoside	ARG 2 du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
(2S)-5,5'-Dihydroxy-7,8-diméthoxyflavanone-2'-O-β-D-glucopyranoside	ARG 2 du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
7,8 Dihydroxyflavone	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	12	ND	[147]
Produits naturels divers					
Acide gallique	ARG de <i>Leishmania</i>	/	2,2 ± 0,2	7,2 ± 1,4	[110]
			0,13 ± 0,01		[5]

				0,10 ± 0,03	
Acide chlorogénique	ARG de <i>Leishmania</i>	/	8,3 ± 0,2	ND	[108]
					[5]
					[10]
					[99]
	ARG I bovine (compétitif)	/	10,6	ND	
Acide cryptochlorogénique	Arginase de <i>Leishmania</i>	/	11 ± 1	12,3 ± 0,1	[108]
Acide caféique	Arginase de <i>Leishmania</i>	/	1,5 ± 0,3	0,5 ± 0,1	[108]
					[99]
	ARG I bovine	/	86,7	ND	
Acide rosmarinique	Arginase de <i>Leishmania</i>	/	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,3	[108]
Isoverbascoside	Arginase de <i>Leishmania</i>	/	2,3 ± 0,3	1,0 ± 0,1	[108]
Acide quinique	ARG I bovine	18,3 ± 5,9 % à 100 μM	3060,0	ND	[99]

Acide 5- <i>O</i> -galloylquinique	ARG de <i>Leishmania</i>	/	0,44 ± 0,04	0,43 ± 0,0 1	[5]
Acide 5- <i>O</i> -(3-méthylgalloyl)-quinique	ARG de <i>Leishmania</i>	/	0,49 ± 0,04	0,16 ± 0,0 1	[5]
Acide 3,5-di- <i>O</i> -galloylquinique	ARG de <i>Leishmania</i>	/	0,46 ± 0,04	0,57 ± 0,0 3	[5]
Acide 3,4,5-tri- <i>O</i> -galloylquinique	ARG de <i>Leishmania</i>	/	0,31 ± 0,02	0,68 ± 0,0 2	[5]
Verbascoside	ARG de <i>Leishmania</i>	/	ND	0,7	[5]
Picéatannol	ARG I bovine (Compétitif)	/	12,1	ND	[131] [99]
(<i>E</i>)- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-3,4-dihydroxycinnamide	ARG I bovine	/	6,9 ± 1,3	5,5 ± 1,0	[10]
Picéatannol-3'- <i>O</i> -β-D-glucopyranoside (PG)	ARG I de lysat de foie murin	/	11,22	ND	[5]
	ARG II de lysat de rein murin	/	11,06	ND	
	HUVEC	56 % à 3 μM	ND	ND	
Sauchinone	ARG II de lysat de rein murin	/	61,4 ± 5,4	ND	[5]
7β-Hydroxysauchinone	ARG II de lysat de rein murin	/	89,6 ± 5,8	ND	[5]

Resvératrol	ARG I bovine	/	18,2	ND	[99]
Acide méso-dihydroguaiarétique	ARG II du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
Guaiacine	ARG II du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
(7S,8R)-4-Hydroxy-3,7-diméthoxy- 1',2',3',4',5',6',7'-heptanorlign-8'-one	ARG II du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
(E)-7-(4-Hydroxy-3-méthoxyphenyl)-7- méthylbut-8-èn-9-one	ARG II du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
Licarine A	ARG II du rein de souris C57BL / 6	/	> 200	ND	[9]
2,3,5,4'-tétrahydroxystilbène-2-O-β-D- glucoside (THSG)	ARG I de lysats hépatique de souris	25% à 50 μM	ND	ND	[130]
	ARG II, de lysats rénaux de souris	38% à 50 μM	ND	ND	
Obacunone	ARG I de lysat de foie murin	67,9 ± 1,6 % à 50 μM	ND	ND	[5]
	ARG II de lysat de rein murin	32,1 ± 3,8 % à 50 μM	ND	ND	
	HUVEC	65,3 % à 30 μM	ND	ND	

Acide salvianolique B	ARG I de lysat de foie murin	71 ± 2 % à 100 µM	ND	ND	[139]
	ARG II de lysat de rein murin	85 ± 3% à 100 µM	ND	ND	[5]
Scirpusine B	ARG I bovine	/	22,6 ± 3,0	ND	[131]
ε-viniférine	ARG I bovine	/	27,8 ± 2,3	ND	[131]
Cyperusphénol B	ARG I bovine	/	12,2 ± 0,9	ND	[131]
Carexinol A	ARG I bovine	/	25,3 ± 2,3	ND	[131]
Virgatanol	ARG I bovine	/	182,1 ± 19,4	ND	[131]
Urolithine A	ARG des cellules humaines du cancer de la prostate (LNcaP)	39 % à 40 µM	ND	ND	[145]
Urolithine C	ARG des cellules humaines du cancer de la prostate (LNcaP)	57 % à 40 µM	ND	ND	[145]
Oenothéine B	ARG des cellules humaines du cancer de la prostate (LNcaP)	2 % à 40 µM	ND	ND	[145]
(+)-Syringarésinol	<i>Leishmania amazonensis</i>	/	13,7	ND	[147]

6.4. Conclusion

Dans le cadre de l'étude de l'arginase et du développement de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme, les plantes peuvent représenter une source très polyvalente de molécules, compte tenu de la diversité structurale des substances qu'elles produisent (généralement de faible toxicité), qui peuvent agir comme inhibiteurs directs/indirects ou servir de modèle moléculaire pour la synthèse de produits hémi-synthétiques ou synthétiques. Cependant, à ce jour, encore peu de plantes ou de composés naturels ont été testés sur l'arginase. En effet, les composés étudiés font partie, dans la quasi-totalité, de la famille des polyphénols. Des travaux complémentaires seraient intéressants à mener afin d'explorer l'activité inhibitrice d'arginase d'autres structures de métabolites végétaux, tels que les alcaloïdes, les saponines ou les terpénoïdes. En outre plusieurs études ont établi des relations structure-activité (RSA) utilisant l'arginase parasitaire donnant des informations intéressantes, cependant de telles évaluations sur l'arginase mammifère restent peu nombreuses.

7. Tests connus pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'arginase

Depuis la découverte de l'arginase et de son rôle crucial, plusieurs méthodes ont été établies afin d'évaluer l'activité de cette enzyme. Ces méthodes reposent : soit sur le suivi de la diminution de la concentration des substrats : la L-arginine ou le 1-nitro-3-guanidinobenzène (NGB), soit sur l'augmentation de la concentration des produits de la réaction enzymatique : la L-ornithine, ou l'urée suite à la dégradation de la L-arginine par l'arginase.

7.1. Substrat : L-Arginine

7.1.1. Méthodes enzymatiques pour le dosage des produits de l'arginase

Weil et Russel [148] furent les pionniers pour l'établissement de protocoles d'évaluation de l'activité de l'arginase en utilisant une procédure gazométrique. L'arginase décompose

l'arginine en ornithine et en urée puis de l'uréase est ajoutée pour hydrolyser l'urée. Le pourcentage de CO₂ libéré à partir de l'urée est ensuite mesuré de façon manométrique dans l'appareil de Warburg. Par la suite, Van Slyke et Archibald [149] ont utilisé le même principe mais la quantité de CO₂ a été déterminée à l'aide d'un appareil à gaz sanguin Van Slyke-Neill.

Ozer a décrit une méthode spectrophotométrique [150] mettant en jeu 3 enzymes (**Figure 25**) : l'arginase, l'uréase et la glutamate déshydrogénase. L'activité de l'arginase est alors reliée, par cette cascade enzymatique, à l'oxydation du NADPH par la diminution de l'absorbance à 340 nm du NADP⁺. La méthode est rapide, sensible, économique et permet une surveillance continue.

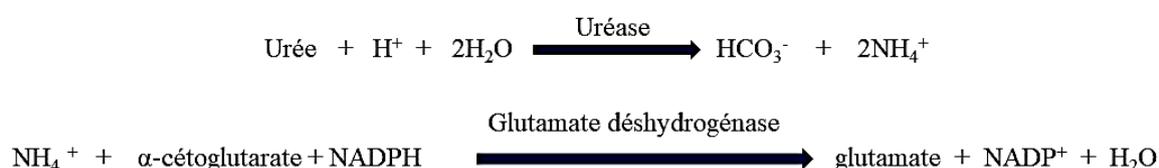


Figure 25 : Réactions proposées par Ozer pour le dosage de l'activité arginase [150].

Garganta et Bond ont également suivi l'urée, produite par l'arginase, qui est ensuite hydrolysée en ammoniac par l'uréase. À la différence des méthodes précédentes, la production d'ammoniac est suivie par une réaction avec du phénol pour obtenir de l'indophénol (**Figure 26**) dont le dosage s'effectue par mesure de l'absorbance à 570 nm (couleur pourpre). [151]

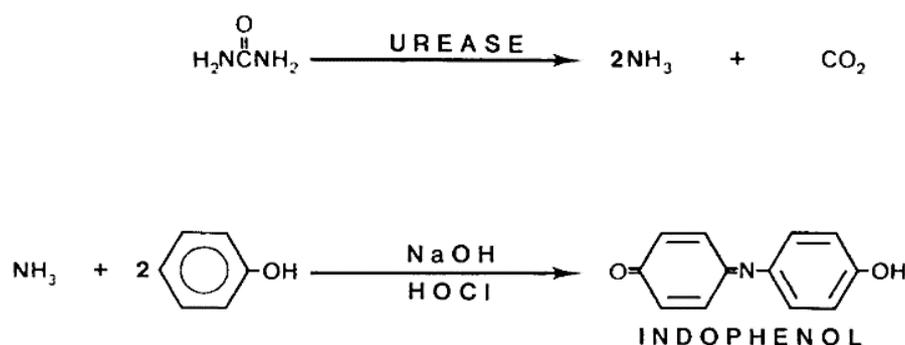


Figure 26 : Réaction proposée par Garganta et Bond pour le dosage de l'activité de l'arginase [151].

Ces techniques mettent en jeu au minimum deux enzymes ce qui nécessite d'adapter les conditions opératoires notamment le pH (9,5 pour l'arginase et 6,8 pour l'uréase). De plus, l'utilisation d'enzymes dans ces réactions nécessite de vérifier l'absence de phénomènes d'inhibition ou de compétition des composés présents dans les milieux biologiques complexes.

7.1.2. Méthodes non enzymatiques pour le dosage des produits de l'arginase

a. Réaction chimique avec l'ornithine

Des chercheurs [152] ont mis au point un test colorimétrique simple à haut débit pour la détermination de l'activité de l'arginase sur la base de la réaction ornithine-ninhydrine décrite pour la première fois par Chinard [153].

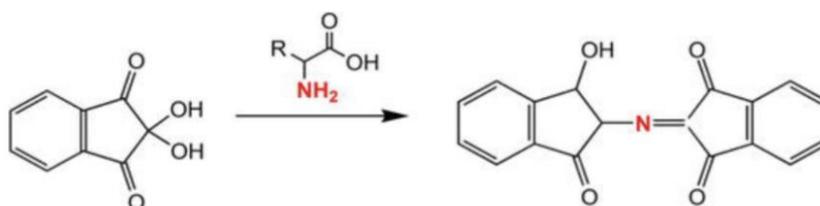


Figure 27 : Réaction de la ninhydrine avec un acide aminé pour produire le pourpre de Ruhemann [154].

Le dosage de l'ornithine par la méthode de Chinard peut être affecté par des concentrations relativement élevées d'autres acides aminés chromogènes, tels que la lysine, la proline et la citrulline dans des échantillons complexes comme le plasma et l'urine. L'élimination de ces composés, en amont de la réaction enzymatique, par des colonnes de centrifugation contenant un gel de Sephadex [155] ou encore par une simple chromatographie d'échange d'ions [156] a été proposée. En général, la ninhydrine produit un chromophore violet de Ruhemann ($\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$, Figure 27) pour les acides α -aminés et un produit jaune avec des amines secondaires ($\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$) comme la proline et l'hydroxyproline.

b. Réaction chimique avec l'urée

La procédure, décrite par Van Slyke et Archibald [149] consiste en une mesure photométrique de l'urée qui repose sur la formation d'un produit coloré en rose, le 6-méthyl-5-phényl-1,2,4-triazine-3-ol formé après la réaction de l'urée avec l' α -isonitrosopropiophénone

(ARCHIBALD's reagent) à 100°C (Figure 28). Cette méthode photométrique est particulièrement pratique lorsque de nombreuses déterminations simultanées de l'activité de l'arginase sont effectuées. Mais évidemment, elle ne peut pas être utilisée pour réaliser des mesures quantitatives sur des préparations contenant de l'uréase. Des optimisations de ces techniques de détection ont ensuite été développées [157–159] afin d'améliorer la sensibilité de la technique.

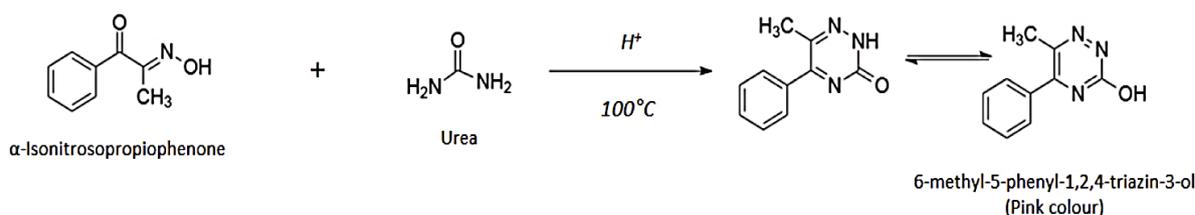


Figure 28 : Réaction colorimétrique de mise en évidence de l'urée avec l'α-isonitrosopropiophénone [160].

Hagan et Dallan [161] ont décrit l'utilisation du réactif d'ERLICH pour le dosage de l'activité de l'arginase : L'urée formée et le *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (réactif d'ERLICH) réagissent dans du H₂SO₄ dilué, pour former la N- (*p*-diméthylamino) benzalurée, qui est très stable (≥ 1j). Le produit de condensation ainsi formé est mesuré par spectrophotométrie à 450 nm. Le réactif d'ERLICH a l'avantage de réagir avec l'urée à température ambiante, contrairement à la technique d'Archibald. Un chromogène, émettant une couleur jaune-vert, est ainsi formé. La réaction générale (Figure 29) montre la formation et la structure du chromogène qui correspond à une imine et une base de Schiff qui absorbe l'énergie dans le spectre UV-Vis [162].

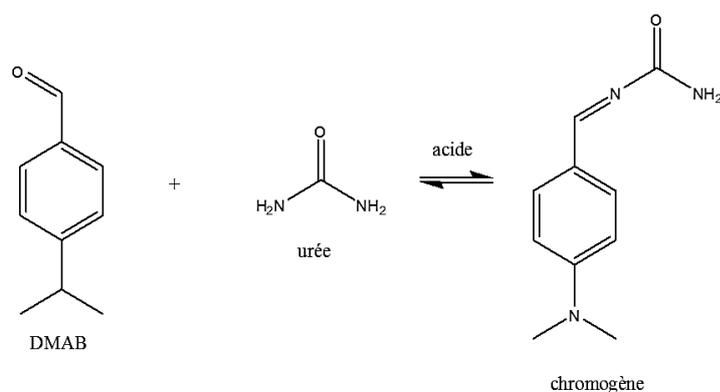


Figure 29 : Réaction générale de l'urée avec le *p*-diméthylaminobenzaldéhyde (DMAB) [162].

Jung et son équipe [163] ont également décrit une réaction colorimétrique, en deux étapes, entre l'urée et de l'*O*-phthalaldéhyde puis avec la N-(1-naphtyl)éthylènediamine (NED). Ces deux réactions ne nécessitent pas d'élévation de la température pour le développement de la couleur et utilise des réactifs stables et non volatils. La première étape de la réaction implique la condensation de l'urée avec l'*O*-phthalaldéhyde pour former, soit la 1,3-dihydroxy-isoindoline (A), soit le 1-uréido-3-hydroxyphthalane (B) (Figure 30). Lorsque le composé isoindoline (A) réagit avec la NED dans les conditions de l'analyse, un développement rapide de la couleur rouge-orangée se produit en raison de l'apparition du dérivé isoindoline par l'implication d'un carbonium dans cette réaction de substitution aromatique typique. Le dérivé phthalogénique (B) ne peut cependant pas être éliminé comme intermédiaire, car les deux composés sont en équilibre. Le produit coloré de la réaction de dosage possède une absorbance maximale à 505 nm, mais le pic d'absorbance est assez large et peut être mesuré à une longueur d'onde comprise entre 480 à 540 nm.

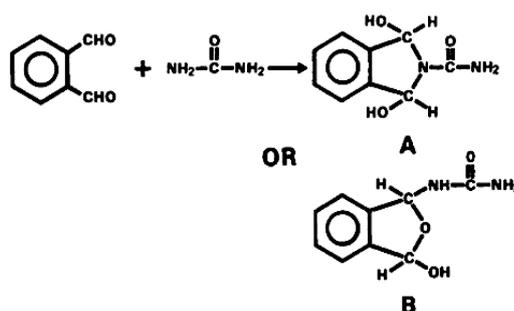


Figure 30 : Première étape suggérée dans la réaction de Jung pour la détection de l'urée [163].

Certaines molécules comme la citrulline pouvant interférer avec cette méthode, Zawada et ses collaborateurs [164] ont optimisé la réaction précédemment décrite et ont suggéré l'emploi du bisphosphate de primaquine à la place de la N-(1-naphtyl) éthylènediamine. Le produit de la réaction, de couleur jaune-vert, possède un maximum d'absorption à 430 nm. Cette modification du test de Jung permet une détermination quantitative, sensible et robuste de l'urée dans des milieux de culture cellulaire.

c. Marquage au ^{14}C

L'utilisation du ^{14}C pour la détection de l'activité de l'arginase a été développée avec la L- [*guanido*- ^{14}C] arginine [165]. L'arginine marquée non hydrolysée doit être séparée du produit de la réaction. Cette séparation peut être réalisée par une résine échangeuse d'ions et le produit urée- ^{14}C est déterminé quantitativement dans le surnageant. Le test, assez sensible, nécessite 5 min et est effectué en tube. D'autres protocoles séparent l'urée- ^{14}C de la L- [*guanidino*- ^{14}C] arginine par une incubation avec de l'uréase pour générer du $^{14}\text{CO}_2$ (Figure 31), qui peut être volatilisé par acidification de la réaction et piégé sur des filtres imbibés de NaOH sous forme de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ pour une quantification par comptage à scintillation.

Réaction de l'arginase: L- [*guanidino*- ^{14}C] arginine \implies L-ornithine + urée- ^{14}C

Réaction à l'uréase : urée- ^{14}C + H_2O + 2H^+ \implies $^{14}\text{CO}_2$ + 2NH_4^+

Figure 31 : Dosage de l'activité de l'arginase avec utilisation de ^{14}C [165]

Les caractéristiques et différences essentielles entre les deux protocoles sont décrites dans la Figure 32. Les deux tests ont une sensibilité et une spécificité similaires.

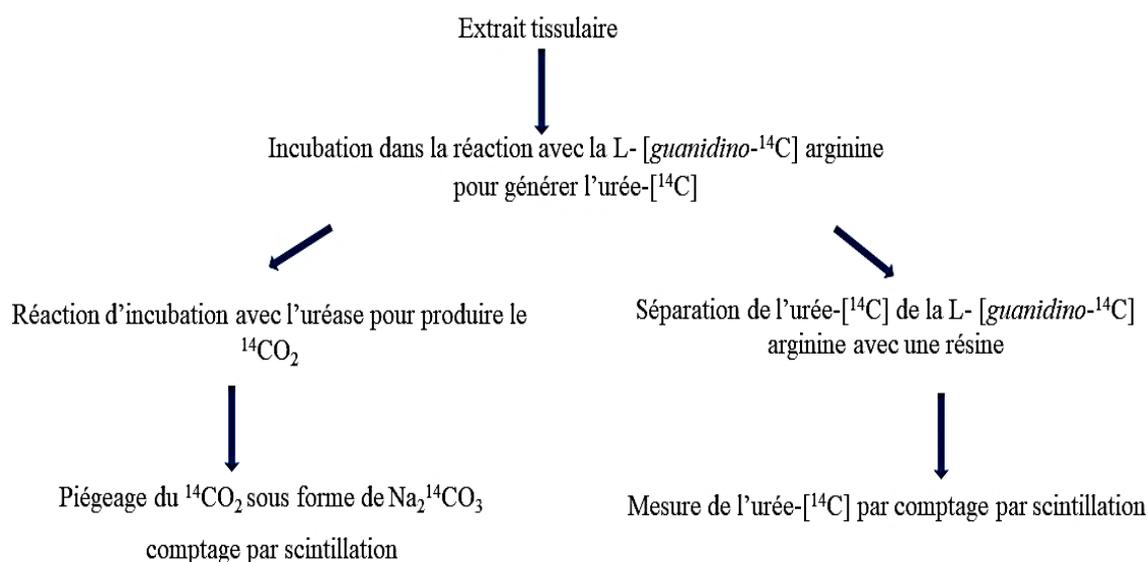


Figure 32 : Aperçu des principales caractéristiques des essais reposant sur la L- [*guanidino*- ^{14}C] [166].

Si la L- [guanidino-¹⁴C] arginine n'est pas disponible, la L- [U-¹⁴C] arginine peut être utilisée dans certains modèles mais une attention particulière devra être portée à la présence des ornithine ou arginine décarboxylases [166].

La technique de dosage au ¹⁴C nécessite une séparation du substrat non dégradé du produit de la réaction enzymatique. Cette contrainte ajoute des étapes intermédiaires qui peuvent être moins performantes dans les milieux complexes (action sur l'uréase, saturation de la résine échangeuse d'ions).

7.1.3. Autre Substrat

L'utilisation du 1-nitro-3-guanidinobenzène (NGB) comme substrat pour l'arginase, permet d'obtenir de l'urée et le chromophore *m*-nitro-aniline caractérisé par un maximum d'absorption à 372 nm (Figure 33) [167]. Il est intéressant de noter que la valeur de la K_m du NGB est presque identique à celle du substrat biologique, l'arginine, bien que le NGB ne possède pas les groupes α -amino et α -carboxylate de l'arginine qui s'engagent dans le réseau de liaison hydrogène enzyme-substrat.

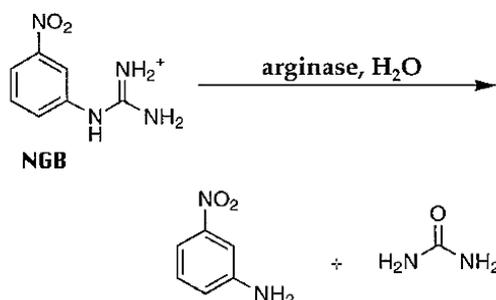


Figure 33 : Réaction catalysée par l'arginase en utilisant le 1-nitro-3-guanidinobenzène (NGB) comme substrat 27/12/2020 14:28:00 [167].

7.2. Méthode séparative

André et son équipe [113] ont décrit l'utilisation d'un réacteur enzymatique d'arginase dans un système chromatographique liquide haute performance (CLHP). Ces auteurs ont immobilisé l'enzyme de manière covalente sur un disque de milieu d'interaction convectif (CIM) monolithique d'éthylènediamine (EDA) préalablement dérivatisé avec du glutaraldéhyde. Ce réacteur de digestion enzymatique (IMER) a ensuite été inséré dans un système CLHP. L'effet des inhibiteurs de l'arginase a été évalué par l'injection simultanée de

chaque inhibiteur avec le substrat : nitroguanidino benzène (NGB). Les valeurs relatives de CI_{50} ont été trouvées en accord avec celles données par la méthode spectrométrique conventionnelle démontrant la conservation de l'activité enzymatique de l'arginase dans ce réacteur.

Ces différentes méthodes doivent être choisies en fonction du contexte du dosage (tests d'inhibition par des composés chimiques ou naturels) ou pour des dosages d'activités dans des modèles cellulaires ou tissulaires. Une interférence avec la ou les enzymes surajoutées au milieu réactionnel représente un risque non négligeable de sélectionner des faux-positifs dans un contexte de criblage de composés naturels. Bien que les méthodes non enzymatiques semblent plus attractives, une attention toute particulière devra être aussi portée aux interactions entre les réactifs de la détection du produit de la réaction enzymatique et les échantillons à tester ainsi qu'aux chromophores propres à ces derniers.

8. Conclusion

L'arginase a été découverte depuis plus d'un siècle et le développement de nouveaux inhibiteurs de l'arginase représente une stratégie très prometteuse en ce qui concerne le traitement des maladies causées par des dommages dans la production de NO. Le nombre d'indications potentielles de ces inhibiteurs est large et comprend les troubles cardiovasculaires, pulmonaires, métaboliques et neurologiques ainsi que la dysfonction érectile, les parasitoses à *leishmania* et, plus récemment, le traitement du cancer. Les premiers inhibiteurs synthétiques de cette enzyme reposaient sur des modifications de la chaîne latérale d'acides α -aminés. Cette voie a été approfondie puisqu'elle a conduit à des composés très efficaces, tels que les acides α -aminés terminés par une hydroxyguanidine, la N-hydroxy-nor-arginine (nor-NOHA), ou une fonction acide boronique, l'acide 2 (S) -amino -6-borono-hexanoïque (ABH), et la S- (2-boronoéthyl) -L-cystéine (BEC). Les tentatives de remplacement de cette partie ont donné des résultats peu satisfaisants. La partie acide α -aminée des inhibiteurs est sans doute prédominante et bien que le groupe de liaison au bimanganèse soit important dans les molécules, il ne doit pas perturber le réseau de liaisons des acides α -aminés. Une optimisation supplémentaire par substitution de la position α de la partie α -aminoacide de l'ABH a conduit aux composés tropaniques qui donnent à ce jour la meilleure activité inhibitrice [5]. Malheureusement, ces composés présentent de mauvais profils pharmacocinétiques et la sécurité des dérivés

boroniques est un sujet de débat. De plus, une faible sélectivité entre l'ARG I et l'ARG II a été observée dans cette série. Les produits d'origine naturelle peuvent être une autre piste prometteuse pour la découverte d'inhibiteurs de l'arginase. En revanche, à nos jours, malgré le nombre important de composés naturels testés, aucun d'entre eux n'a montré de réelle sélectivité sur les arginases. Le développement de produits qui inhibent sélectivement chaque arginase reste un défi pour ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension du rôle des isoformes d'arginase. L'évaluation de l'activité de l'arginase a nécessité le développement de techniques telles que la spectrophotométrie, la radiométrie et la fluorimétrie en utilisant divers modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Certaines expériences ont été réalisées *in vitro* en utilisant, par exemple, des lysats hépatiques et rénaux de rats et de souris, des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine et des macrophages ou *ex vivo* en employant des anneaux aortiques de souris. D'autres recherches ont été réalisées *in vivo* chez la souris et le rat mais aussi en clinique. Chaque modèle correspond à une pathologie, mettant en jeu une inhibition directe ou indirecte de l'arginase ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre eux. La multiplicité des modèles nécessite une standardisation des tests au moins *in vitro* afin de pouvoir comparer les composés sur les différents types d'arginases (origine, isoforme) et identifier clairement les groupements d'atomes indispensables à l'inhibition. De surcroît, dans la majorité des études publiées les auteurs ne décrivent pas clairement les contrôles mis en place pour vérifier que l'inhibition observée n'est pas due à une interférence avec la technique de mesure de l'activité afin de s'assurer de l'absence de faux positifs ou faux négatifs dans les résultats obtenus.

Chapitre 3 : Stratégies de découverte de nouveaux composés actifs à partir de plantes

La diversité structurelle et l'activité biologique des produits naturels en font les sources les plus précieuses de têtes de série. L'Homme a toujours compté sur les produits naturels et a continuellement exploré leurs applications pour améliorer divers aspects de la vie.

Pour un travail classique orienté vers la découverte de nouvelles substances actives à partir de plantes, trois étapes fondamentales doivent être prises en compte : 1) la sélection appropriée des plantes pour le criblage biologique 2) le développement de techniques quantitatives pour mesurer l'activité biologique et 3) le fractionnement bioguidé des extraits de plantes et l'élucidation des structures des produits biologiquement actifs. Ces trois étapes principales vont être développées dans la suite de ce travail.

1. Sélection des espèces végétales candidates pour le criblage

Les plantes nous ont déjà fourni et continueront à nous fournir de nouveaux agents pharmaceutiques pour le développement de médicaments. Le succès de l'identification d'un nouveau produit naturel biologiquement actif à partir de plantes nécessite un choix judicieux des espèces végétales à explorer et une approche bien réfléchie. Il a été estimé que moins de 10%, des 300 000 à 500 000 espèces de plantes dans le monde, ont été étudiées pour une ou plusieurs bioactivités [168]. Avec tant de plantes à tester, il est essentiel pour les chercheurs de limiter leur champ d'investigation. Ainsi, plusieurs techniques/critères sont utiles pour sélectionner les plantes à étudier.

1.1. Sélection aléatoire des plantes

Dans le cas d'une sélection aléatoire de plantes, la collecte est faite sans posséder de connaissances, ni d'expérience sur les plantes sélectionnées. Cette approche ne doit pas être négligée car compte-tenu du grand nombre de plantes qui n'ont pas encore fait l'objet d'une étude approfondie, des choix aléatoires d'espèces végétales pourraient déboucher sur de nouvelles découvertes intéressantes. De nombreuses maladies et affections médicales émergentes auxquelles les chercheurs n'étaient pas préparés font désormais partie de notre vie. Les tests aléatoires peuvent fournir de nouvelles informations ou de meilleurs traitements pour ces maladies et affections. Des preuves de réussite de cette approche, sont celles du paclitaxel

et de la camptothécine élaborés par l'institut national du cancer (NCI), aux États-Unis, qui a étudié environ 35 000 espèces végétales pour une activité anticancéreuse, pendant plus de deux décennies de 1960 à 1980 [169]. Cependant, le coût énorme en temps et en ressources nécessaires à la sélection d'un grand nombre de plantes choisies au hasard, avec un taux de réussite faible, a conduit de nombreux chercheurs à préconiser une sélection reposant sur diverses approches non aléatoires.

1.2. Approche ethnopharmacologique

Dans l'approche ethnopharmacologique, la sélection repose totalement sur les informations des utilisations médicinales des plantes choisies dans diverses régions. Plus de 120 produits pharmaceutiques actuellement utilisés sont dérivés de plantes [7], et environ 75% de ceux-ci ont été découverts en examinant l'utilisation de ces plantes en médecine traditionnelle [170]. Étant donné le vaste choix de plantes à étudier, un bon point de départ est souvent de commencer par les plantes dont l'histoire est bien documentée par les guérisseurs traditionnels. Les connaissances traditionnelles peuvent constituer un puissant moteur de recherche, permettant aux chercheurs de se concentrer sur les plantes utilisées pour lutter contre les affections médicales qu'ils souhaitent étudier. Dans toutes les régions du monde, les civilisations anciennes ou actuelles utilisent des traitements à base de plantes avec des degrés de documentation variables. La médecine ayurvédique et la médecine traditionnelle chinoise sont particulièrement bien documentées. Il n'est donc pas surprenant qu'une forte proportion des études publiées se concentre sur les plantes dont l'utilisation a été décrite dans ces pays. En revanche, la documentation sur l'utilisation des plantes médicinales dans d'autres régions du monde peut être moins complète et donc moins utile pour la sélection des espèces.

L'approche ethnomédicinale a donné lieu à de nombreuses réussites, les succès les plus notables sont la quinine obtenue à partir d'écorce de *Cinchona pubescens*, la morphine et la codéine du *Papaver somniferum* (pavot à opium), la digoxine des feuilles de *Digitalis lanata* et l'atropine à partir d'espèces de *Solanaceae*.

L'approche ethnomédicinale peut offrir une possibilité accrue de trouver un composé actif mais aussi servir comme moyen de documenter et de préserver les connaissances locales. Ceci devient de plus en plus important avec la mobilité accrue des communautés rurales et la perte de connaissances locales sur l'utilisation des espèces de plantes indigènes.

Les corrélations réussies des utilisations traditionnelles de certaines plantes médicinales avec leurs constituants biologiquement actifs découverts à la suite du suivi scientifique de ces plantes confirment que les plantes médicinales sont des sources valables de substances actives pour les médicaments.

Deux questions importantes doivent être abordées en ce qui concerne cette approche. Premièrement, les droits du pays d'origine, en ce qui concerne toute drogue végétale découverte, doivent être protégés, comme indiqué dans la Convention des Nations Unies sur la diversité biologique [171]. Deuxièmement, la qualité de l'étude de terrain réalisée avant la sélection de la plante est importante et peut avoir un impact sur le succès de la recherche. Le succès de l'approche ethnopharmacologique peut dépendre également de l'efficacité des méthodes d'extraction et de tests utilisés. Les études ethnopharmacologiques approfondies sur le terrain peuvent constituer une plate-forme essentielle à partir de laquelle l'enquête phytochimique d'une espèce végétale peut être lancée. Les informations recueillies lors de cette étude peuvent provenir de diverses sources historiques, notamment des journaux intimes, des récits de voyage et des traités sur les plantes médicinales au cours de plusieurs siècles.

Une approche ethnopharmacologique peut être combinée à d'autres critères de choix décrits dans ce qui suit pour accroître le potentiel de réussite.

1.3. Approche chimiotaxonomique

En raison de preuves controversées sur les caractéristiques morphologiques des plantes, l'idée d'impliquer les constituants chimiques dans la taxonomie a été introduite. Ainsi, le concept selon lequel le règne végétal peut être classé sur la base de ses composants chimiques s'est rapidement développé pour devenir un domaine important dans la classification des plantes [172]. Selon Gottlieb et ses collaborateurs [173], le principe de la chimiotaxonomie est qu'une plante est l'expression externe du génotype et du phénotype conduisant à la formation de métabolites. Par conséquent, les caractères morphologiques d'une plante peuvent être corrélés avec la présence de ses métabolites spécialisés (tels que les flavonoïdes, les triterpènes, les alcaloïdes, les saponines).

Cette approche consiste ainsi à rechercher sur le terrain les plantes en fonction de leur appartenance botanique et de récolter donc préférentiellement certaines plantes dont les familles ou les genres sont déjà connus pour renfermer des constituants biologiquement actifs.

De nombreuses plantes dont la valeur thérapeutique n'est pas connue peuvent être apparentées à d'autres espèces identifiées pour produire des composés phytochimiques intéressants en médecine. Ainsi, l'étude d'espèces étroitement liées à celles ayant des propriétés médicinales reconnues peut permettre de détecter des bioactivités similaires chez ces espèces. Si l'identification du type de structure recherchée a été réalisée, les données de la chimiotaxonomie pourront renseigner sur les familles, les genres ou les espèces au sein desquels il est possible de trouver ce type de composés : à titre d'exemple, les alcaloïdes des Apocynacées ou les quassinoïdes des Simarubacées. De surcroît, la chimiotaxonomie peut avoir un intérêt prédictif lorsque l'on étudie une nouvelle espèce.

Zhu et son équipe [174] ont mené une étude phylogénique sur les médicaments d'origine naturelle mis sur le marché entre 1991 et 2010. Ils ont constaté que les espèces impliquées dans la production de médicaments étaient regroupées dans un espace phylogénique spécifique. Il a été suggéré que le fait de se concentrer sur les espèces inexploitées appartenant à des familles et à des groupes ayant déjà montré des composés actifs qui ont servi à la production de médicaments augmenterait la probabilité de découvrir de nouveaux composés bioactifs. Il serait envisageable de supposer que des espèces étroitement apparentées partageraient une biochimie similaire et la compréhension des relations phylogénétiques entre les espèces végétales pourraient faciliter la sélection des plantes à étudier. Cependant, une telle approche ne s'accompagne pas toujours de bioactivités similaires chez des espèces étroitement apparentées.

1.4. Divers critères écologiques

Une autre stratégie non aléatoire de sélection des plantes fait appel à diverses approches écologiques. Plusieurs auteurs ont examiné différents aspects de l'argument écologique, y compris la relation entre biodiversité et chimiodiversité, l'hypothèse de l'« apparence des plantes », les relations défenses chimiques et herbivores, la théorie de la stratégie de vie et le comportement animal.

En effet, Ramesha et ses collaborateurs [175] ont suggéré que la relation entre biodiversité et chimiodiversité est gérée par deux modèles. Le premier modèle propose que la chimiodiversité augmente de manière linéaire avec la biodiversité : c'est-à-dire qu'avec un accroissement de la diversité biologique parmi les taxons en question, la diversité chimique augmenterait également. Avec le deuxième modèle, une relation linéaire entre la diversité chimique et biologique est initialement observée, puis une stabilisation se produit. Cela

impliquerait que le nombre de structures chimiques découvertes serait terminé. Par exemple, concernant les alcaloïdes malgré leur diversité seulement 22 échafaudages ont été identifiés et la famille des Asteraceae, alors qu'elle englobe la diversité d'espèces la plus élevée (21 000), n'en produit que 14 sur les 22 alors que les Fabacées regroupant 16 400 espèces produisent 17 de ces 22 échafaudages. Le premier modèle suggère donc qu'une prospection de la manière la plus exhaustive possible conduirait à de nouvelles entités chimiques bioactives, tandis que le second modèle suggère que des groupes phylogénétiques spécifiques doivent être étudiés pour augmenter la probabilité d'isoler un type de composé d'intérêt particulier.

L'autre aspect étudié dans ce contexte est l'hypothèse de l'« apparence des plantes » [176]. Cette hypothèse a été proposée par des chercheurs qui étudient les relations insecte-plante. Afin de se défendre contre les attaques herbivores, les plantes ont adopté différentes stratégies. Il a été estimé que les plantes développent deux types de défense chimique contre les herbivores. Elles peuvent donc être classées en plantes « apparentes » et « non apparentes ». Les espèces « apparentes », de grande taille, (plantes plus vulnérables aux attaques des herbivores en raison des caractéristiques de leurs habitudes et de leur cycle de vie) développent des défenses chimiques quantitatives, qui agissent en réduisant leur digestibilité et non par le développement de haute toxicité. Ces plantes sont aussi le plus souvent des arbres et des plantes ayant de longs cycles de vie. Les espèces « non apparentes » accumulent des défenses qualitatives, hautement toxiques en petites quantités, par le biais de composés très actifs. Ces espèces sont le plus souvent des herbes et des plantes dont le cycle de vie est court. Cela suggère que les praticiens traditionnels, ainsi que ceux qui recherchent de nouveaux composés bioactifs, préfèrent les plantes dites « non apparentes ».

D'autres chercheurs s'intéressent à l'hypothèse de la disponibilité des ressources : dans une région riche en ressources, les plantes ont tendance à croître rapidement et ont tendance à investir dans la croissance rapide plutôt que dans la défense chimique. Les plantes dans les régions pauvres en ressources investissent davantage dans les défenses chimiques et cela fait de ces plantes de meilleurs candidats pour la recherche d'activités biologiques. Les propres observations sur le terrain d'un chercheur sont souvent utiles pour sélectionner une espèce de plante à tester. Les plantes qui poussent malgré les stress environnementaux (par exemple, les plantes poussant dans les forêts tropicales humides où abondent les insectes, les champignons et les bactéries) peuvent s'adapter en produisant des produits phytochimiques qui aident à protéger la plante, composés pouvant nous fournir de nouveaux composés actifs.

En outre, l'observation du comportement d'auto-médication propre à certains animaux, nommée zoopharmacognosie, peut parfois donner un aperçu de l'activité potentielle des plantes.

Prenons comme exemple les espèces de *Khaya* qui sont endémiques en Afrique et à Madagascar. Les populations locales utilisent l'écorce amère et les graines pour traiter la fièvre et les états fébriles, ainsi que les infestations microbiennes et vermineuses. Il a été observé que des babouins et des chimpanzés de l'Ouganda occidental mangeaient l'écorce et les graines, qui n'ont aucune valeur nutritive et ont un goût amer. Il semblerait qu'en plus des preuves de l'efficacité de ces plantes utilisées par les guérisseurs traditionnels, les chimpanzés et les babouins utilisaient les graines et l'écorce pour s'auto-traiter. Ces observations ont inspiré une étude scientifique qui a montré que l'extrait éthéropétrolique de *Khaya anthotheca* est doué d'une bonne activité contre *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei rhodesiense* [177].

1.5. La pharmacognosie inverse

La pharmacognosie inverse est un complément à la pharmacognosie. Des décennies de travail dans le domaine de la pharmacognosie ont abouti à une vaste chimiothèque de produits naturels, dont beaucoup n'ont subi que des essais limités. La pharmacognosie inverse vise à trouver de nouvelles cibles biologiques pour les produits naturels en criblage virtuel ou réel, puis de lier ces résultats, soit à leur source végétale originale, soit à une autre source végétale potentielle. Cette méthode inverse commence par la molécule et se termine avec la source végétale. Elle permet de découvrir de nouvelles activités biologiques à partir de composés naturels connus [178].

L'équipe de recherche Greenpharma (France) [179] a démontré le succès de cette technique avec des composés comme la ϵ -viniférine (propriétés anti-inflammatoires), la méranzine (activité COX-1, COX-2 et PPAR γ) et le honokiol (modulation des niveaux de testostérone).

Toutes les approches discutées ci-dessus ont montré un certain succès dans l'identification de plantes contenant des composés biologiquement actifs. Ce succès n'a pas toujours conduit au développement complet d'un nouveau médicament commercial, mais la bonne collaboration entre botanistes, guérisseurs traditionnels, chimistes et entreprises pharmaceutiques, pour s'assurer que les résultats potentiels sont pleinement exploités, est essentielle pour la réussite de l'étude et le choix pertinent de la matière première.

2. Criblage biologique primaire

Le criblage biologique primaire est généralement l'une des premières étapes de la voie de découverte de substances actives. C'est une méthode d'investigation permettant d'effectuer un tri (en anglais, *screening*) parmi les substances naturelles devant être étudiée et dont les propriétés pharmacologiques éventuelles sont ignorées, dans la perspective de l'identification de « touches ». Ce criblage biologique met en œuvre des moyens techniques et technologiques afin de sélectionner, dans une collection d'échantillons, ceux qui sont actifs sur l'entité biologique initialement fixée. Dans le but d'une présélection, l'essai biologique est en général appliqué à un grand nombre d'échantillons. Par la suite, seuls sont présélectionnés les échantillons qui présentent une activité intéressante lors des essais programmés. Quel que soit le format du test choisi, il est nécessaire de prendre en considération les facteurs suivants :

- ✓ Pertinence pharmacologique du test : des études doivent être réalisées en utilisant, si disponibles, des ligands connus ayant une activité déjà identifiée sur la cible à l'étude, pour déterminer si le test est prédictif et pour montrer que ce dernier est capable d'identifier des composés avec la puissance et le mécanisme d'action souhaités.
- ✓ Reproductibilité du test : dans un environnement de criblage complexe, il est nécessaire que le test soit reproductible entre les plaques, entre les différents jours de criblage et sur toute la durée du programme de la recherche scientifique qui peut durer plusieurs années.
- ✓ Coûts d'analyse : les tests de criblage des composés sont généralement effectués dans des plaques de microtitrage à 96 puits ou 384 puits avec des volumes d'essai de l'ordre de quelques microlitres pour minimiser les coûts du test.
- ✓ Qualité du test : la qualité du test peut être contrôlée par l'inclusion de contrôles. Les analyses sont jugées acceptables si la pharmacologie du ou des composés standards se situe dans les limites prédéfinies. La qualité du test peut être affectée par de nombreux facteurs. Généralement, les essais de haute qualité sont créés en mettant en œuvre des protocoles simples, en minimisant les étapes, tout en évitant par exemple les transferts de réactifs d'une plaque à une autre au cours du test et en utilisant des réactifs et des produits stables, ainsi qu'en veillant à ce que toute l'instrumentation utilisée pour effectuer le test fonctionne de manière optimale.

- ✓ Effets des échantillons sur le test : les chimiothèques à tester sont généralement stockées dans des solvants organiques, tels que l'éthanol ou le diméthylsulfoxyde (DMSO). Ainsi, les tests configurés ne doivent pas être sensibles aux solvants utilisés. Des études doivent être réalisées pour établir les taux de faux négatifs et faux positifs du test. Si ces valeurs sont trop élevées, l'essai devra être reconfiguré. Enfin, il convient de fixer les concentrations initiales de criblage auxquelles les échantillons seront testés afin de pouvoir réaliser l'étude comparative entre ces derniers dans les mêmes conditions.

De plus, des considérations spéciales doivent être prises en compte pour le criblage d'extraits de plantes. La méthodologie doit être adaptable aux matériaux très colorés et chimiquement complexes. Outre les exigences générales susmentionnées, telles que la validité, le manque d'ambiguïté, la précision, la reproductibilité, la simplicité et le caractère coût raisonnable, les essais biologiques utilisant les produits naturels doivent être très sélectifs et spécifiques pour éliminer les faux positifs communs aux extraits de plantes et doivent également être très sensibles pour détecter les concentrations faibles de composés actifs. En général, ce sont les tests *in vitro* qui répondent à ces exigences puisqu'ils fournissent assez rapidement des informations préliminaires intéressantes sur le potentiel biologique des extraits de plantes. Les progrès récents de la chimie, de la biologie, de la robotique et de l'informatique ont permis, depuis les années 1990, une augmentation de la cadence des tests pour des criblages dits à haut-débit (en anglais, *high-throughput screening*). Le criblage à haut débit (HTS) fait référence à l'intégration de technologies permettant de doser rapidement des milliers de composés à la recherche d'une activité biologique sur une cible représentative d'une maladie pour la découverte de médicaments. La définition de « criblage à haut débit » fait généralement référence à la réalisation de 10 000 à 100 000 composés par jour. Les débits supérieurs à ce nombre sont considérés comme un criblage à très haut débit (uHTS) [180]. Le HTS implique l'utilisation d'un logiciel de traitement et de contrôle des données et des détecteurs sensibles comme outils indispensables aux chercheurs pour accélérer la phase de test des échantillons. D'autre part, le succès de toute campagne de criblage à haut débit dépend de la qualité de la bibliothèque de produits à tester.

La construction et l'entretien d'une bibliothèque de produits naturels de haute qualité, qu'elle soit basée sur des sources microbiennes, végétales, marines ou autres, sont assez coûteux. Cette bibliothèque peut être composée d'échantillons qui sont des mélanges très complexes, tels que des extraits bruts ou des mélanges pré-fractionnés. Les chimiothèques d'extraits bruts ont des besoins en ressources moindres pour la préparation des échantillons,

mais des exigences élevées pour l'identification des constituants bioactifs. Les chimiothèques d'extraits pré-fractionnés peuvent constituer une stratégie efficace pour atténuer les interférences rencontrées avec les chimiothèques brutes et peuvent raccourcir le temps nécessaire pour identifier le principe actif [181, 182]. Une autre contrainte peut être rencontrée également lors de l'utilisation de mélanges naturels pour le criblage, il s'agit de la solubilité des échantillons naturels et le recours quelquefois à des pourcentages élevés de DMSO pour solubiliser la totalité du mélange ce qui peut constituer un biais pour la qualité des résultats.

Certes les programmes reposant sur le criblage de chimiothèques d'extraits de plantes, sont mis au défi de répondre aux temps de cycles rapides qui sont caractéristiques du HTS moderne mais ces extraits d'origine naturelle ont conduit à diverses réussites dans le domaine thérapeutique [7].

3. Fractionnement bioguidé

Le but d'un processus d'isolement dirigé par l'activité biologique est de cibler les composés bioactifs. Le fractionnement guidé par l'essai biologique est une procédure par laquelle l'extrait biologiquement actif est fractionné par des techniques chromatographiques jusqu'à ce qu'un composé actif pur soit isolé. Chaque fraction produite au cours du processus de fractionnement est évaluée dans un système de bio-essai et seules les fractions actives sont fractionnées de nouveau. Des essais biologiques simples et rapides peuvent servir de point de départ pour la découverte de nouvelles molécules actives [183]. Un exemple de protocole, pour la découverte de médicaments à partir de produits naturels utilisant une approche bio-guidée, est présenté dans la [Figure 34](#) [184].

Pour le fractionnement initial de tout extrait brut, il est conseillé de ne pas générer un grand nombre de fractions de crainte de disperser le ou les composés cibles sur plusieurs fractions qui seraient alors dilués à des concentrations donnant des activités non détectables. Il est plus judicieux de ne collecter que quelques fractions relativement brutes et de retrouver rapidement celles qui contiennent le(s) composé(s) cible(s). Pour une première étape de fractionnement, différentes techniques chromatographiques de fractionnement grossier peuvent être employées, telles que la chromatographie sur colonne ouverte ou la chromatographie Flash. Dans un deuxième temps, pour réaliser un fractionnement plus fin de la(es) fraction(s) active(s),

la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) préparative ou semi-préparative guidé par une technique de détection (UV par exemple) peut être utilisée.

Pour l'isolement bio-guidé, le résultat de la séparation est contrôlé par un essai biologique à chaque étape et une évaluation quantitative de la bioactivité est généralement effectuée par une méthode de dilution en série. L'évaluation quantitative de la bioactivité fournit une idée claire de la récupération du ou des composés actifs et indique également si l'activité résulte d'un seul ou de plusieurs composés.

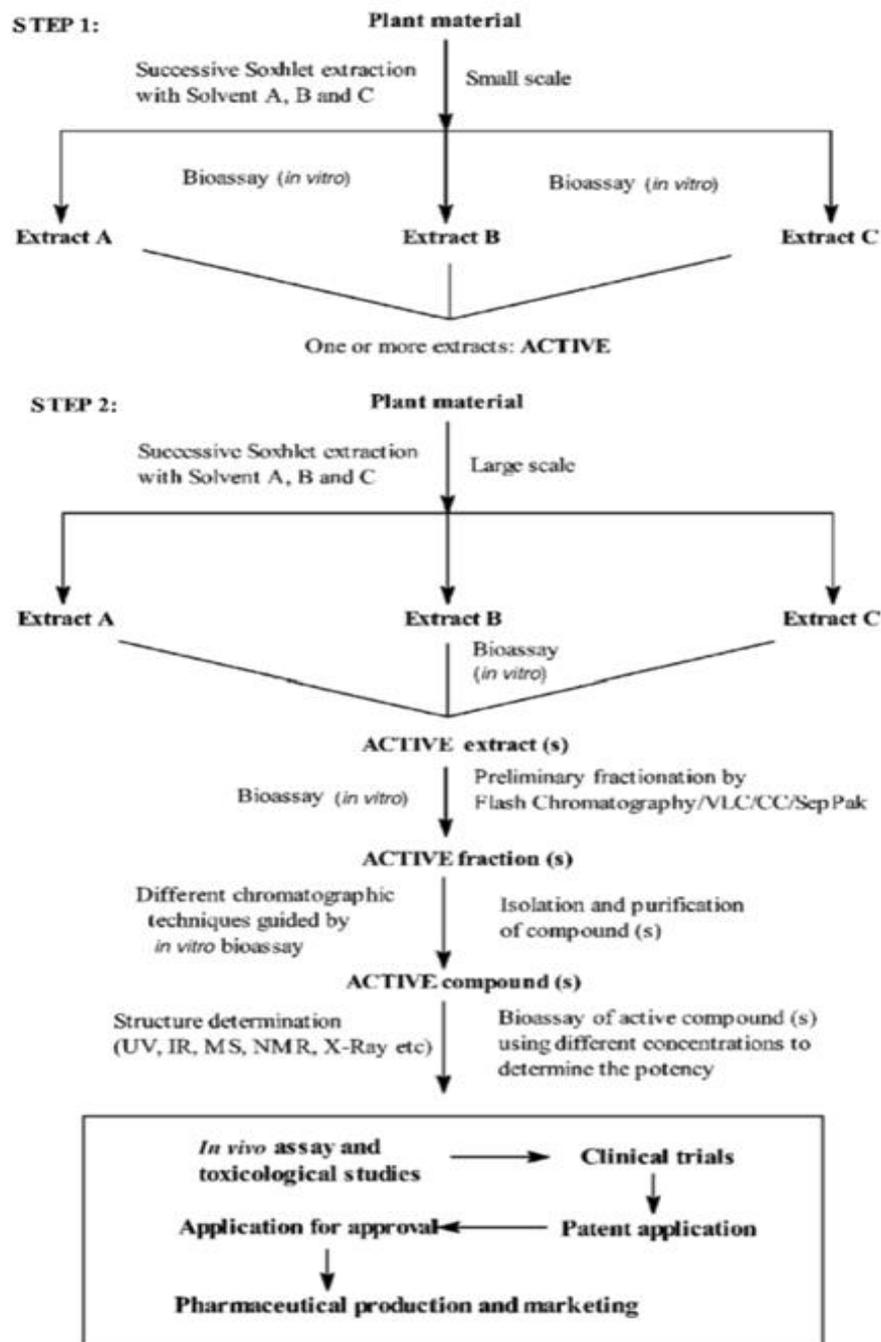


Figure 34 : Exemple de processus de découverte de médicaments à partir de produits naturels basé sur l'approche bioguidée [184].

Pendant le processus d'isolement, si l'activité est perdue ou réduite d'un niveau significatif, les raisons possibles pourraient être les suivantes :

1. Le composé actif possède une grande affinité pour la colonne chromatographique et y est resté accroché.
2. Le composé actif est instable dans les conditions utilisées au cours du processus d'isolement.
3. L'échantillon peut ne pas avoir été préparé dans un solvant compatible avec la phase mobile, de sorte qu'une grande proportion des composés actifs précipite lors du chargement sur la colonne.
4. Les composés actifs se répartissent sur plusieurs fractions, provoquant des quantités faibles des composés et par conséquent des activités indétectables dans les fractions.
5. L'activité de l'extrait est probablement due à la présence d'une synergie entre un certain nombre de composés qui, lorsqu'ils sont séparés, ne sont pas actifs individuellement [184].

À l'heure actuelle, la recherche sur les produits naturels est plus axée sur l'isolement des composés cibles (isolement bio-guidé) plutôt que sur l'isolement de tous les composés présents dans un extrait. Les composés cibles peuvent appartenir à certaines classes chimiques et avoir certaines propriétés physico-chimiques. Par conséquent, des analyses appropriées permettant de suivre le fractionnement doivent être incorporées dans le protocole de purification et d'isolement. Il est essentiel de conserver un échantillon de référence des fractions obtenues après chaque étape de séparation.

Une fois le composé d'intérêt isolé, sa structure peut être établie par des méthodes spectroscopiques, telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie infrarouge (IR) et la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-MS).

Certes le fractionnement reposant sur le criblage biologique possède plusieurs avantages mais ce processus peut aussi avoir des limites [185]. L'un des problèmes communs au fractionnement bio-guidé est la possibilité d'obtenir des faux positifs et des faux négatifs. Les faux positifs se produisent généralement si l'un des composés inactifs de la fraction a la capacité d'interagir de manière non spécifique avec la cible moléculaire du test. À titre d'exemple, dans le cadre de tests d'activité enzymatique, un composé peut être capable de précipiter des protéines et donc de montrer une activité inhibitrice. De même, certains composés inactifs peuvent donner lieu à des résultats positifs en interagissant avec certains composants du système du test autres que la cible ou en interférant avec la méthode de détection du test, comme par exemple les extincteurs d'UV. De plus, de nombreuses entités chimiques intéressantes

pourraient être activées *in vivo* par des enzymes métaboliques, un facteur qui n'est pas pris en compte dans de nombreux systèmes de criblage *in vitro* [184]. Ainsi, le processus de fractionnement ne doit pas toujours reposer uniquement sur le criblage biologique de crainte de négliger plusieurs substances intéressantes.

La démarche classique, décrite précédemment, menant d'un extrait bioactif à des constituants purs pharmacologiquement actifs, peut être un processus long et fastidieux nécessitant du matériel sophistiqué et d'importantes ressources financières et humaines en raison des nombreuses étapes consécutives de séparation et d'évaluation biologique avant d'arriver à un composé pur bien défini. En outre, parfois les masses très faibles obtenues, après ces longues étapes de purification, rendent impossible le test des composés purs isolés.

4. Quelques outils permettant l'accélération de la recherche de produits naturels actifs

Bien que la procédure classique de fractionnement bioguidé ait conduit à l'isolement réussi de nombreuses molécules bioactives, ses faiblesses ne peuvent être négligés. En effet, la performance de la séparation n'est généralement pas satisfaisante, au moins pour les premières étapes de fractionnement et la perte de la bioactivité au cours du processus de purification n'est pas rare. Ainsi, cette approche ne correspond plus à la chronologie et au flux de travail dans la découverte moderne de substances actives d'origine naturelle. Ce besoin impérieux de stratégies plus rapides et plus efficaces pour la découverte de produits naturels actifs a orienté les chercheurs vers le développement d'outils permettant l'accélération des recherches dans ce domaine. La déréplication et la bioautographie peuvent être des techniques permettant d'avancer rapidement l'étude de substances naturelles.

4.1. La déréplication

Historiquement, la première définition du terme « déréplication » a été donnée par Beutler [186] comme un processus d'identification rapide des chimiotypes connus. La définition et la compréhension du terme déréplication se sont élargies depuis sa conception et peuvent maintenant être définies comme étant l'identification des structures des composés connus au sein des mélanges complexes de produits naturels. La déréplication permet de réduire le temps et le coût des phases fastidieuses d'élucidation structurale. Elle implique l'utilisation de

techniques analytiques adaptées aux molécules d'intérêt afin de rassembler leurs données spectroscopiques et/ou biologiques puis de comparer ces dernières aux données de la littérature à l'aide d'outils informatiques. La finalité sera l'identification rapide des composés déjà décrits dans la littérature et la distinction des nouvelles entités avant même un isolement physique long et coûteux. Ainsi, la probabilité de détecter des molécules originales sur un laps de temps donné est plus élevée. Le processus de déréplication fait maintenant partie intégrante des programmes de la recherche scientifique et nous pouvons remarquer l'augmentation continue des articles publiés chaque année utilisant des techniques déréplicatives. Une croissance exponentielle des citations annuelles concernant la déréplication a été constatée. En effet, depuis le début de l'année 2019, à l'aide du moteur de recherche « *google scholar* », nous avons noté l'existence de 2560 publications contenant les termes « *dereplication* » et « *natural products* ».

En fonction des ressources naturelles examinées et des objectifs finaux, la déréplication ne correspond pas à une procédure unique et clairement définie mais certains auteurs [187] révèlent cinq stratégies de déréplication différentes pour atteindre des objectifs spécifiques (Figure 35) :

- ✓ La DEREPI dont le but est l'identification des composés majeurs dans un seul extrait. Elle est réalisée en tant que flux de travail non ciblé pour l'identification rapide des principaux composés, quelles que soient leurs caractéristiques, leurs classes chimiques dans un seul échantillon naturel.
- ✓ La DEREPII dont le but principal est l'accélération du fractionnement bioguidé, elle est fréquemment associée à la (DEREPI) et fait appel à des essais biologiques pour accélérer le fractionnement bioguidé.
- ✓ La DEREPIII dont la finalité est le profilage chimique des collections d'extraits bruts, cette déréplication est entièrement intégrée à des études métabolomiques non ciblées pour le profilage chimique de collections d'extraits naturels.
- ✓ La DEREPIV, son but est le profilage chimique de composés cibles, elle sert pour l'identification ciblée de composés prédéterminés (souhaités ou non) dans des échantillons naturels.
- ✓ Enfin, la DEREPIV est une catégorie distincte de déréplication, cette dernière sert à l'identification taxonomique de souches microbiennes, elle repose principalement sur les analyses de séquences génétiques.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est couramment utilisée comme méthode de premier choix pour la dérégulation car elle permet de comparer les temps de rétention, les poids moléculaires et les profils de fragmentation aux données de référence. De plus, ces données peuvent être utilisées pour construire des réseaux moléculaires. Bien que la LC-MS offre une grande sensibilité, une optimisation de la séparation chromatographique est souvent requise avant l'analyse par la LC-MS. De plus, un protocole d'ionisation standard peut ne pas être adapté à une large gamme de molécules différentes souvent présentes dans les matières végétales. De surcroît, la présence de centres asymétriques et de groupements prénylés / géranylés dans certaines molécules entraînent des schémas de fragmentation parfois très difficiles à distinguer même par LC-MS/MS.

En revanche, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) peut être appliquée à des mélanges complexes sans étapes de séparation. De plus, la RMN peut différencier les stéréoisomères [188]. Concernant, les spectres de RMN ^1H , ils sont rapidement enregistrés mais les déplacements chimiques ^1H (δ_{H}) dépendent fortement du solvant et les mélanges complexes génèrent également des régions d'intenses δ_{H} qui se chevauchent ce qui altère l'interprétation des spectres. Concernant la RMN ^{13}C , elle nécessite un temps d'acquisition plus long, mais les δ_{C} sont moins sensibles aux solvants et le chevauchement des signaux est rarement observé. La RMN 2D peut fournir des informations clés supplémentaires sur la structure spatiale de la molécule, mais pour des raisons pratiques, ces spectres doivent être enregistrés avec une résolution beaucoup plus basse que celle de la RMN 1D [188].

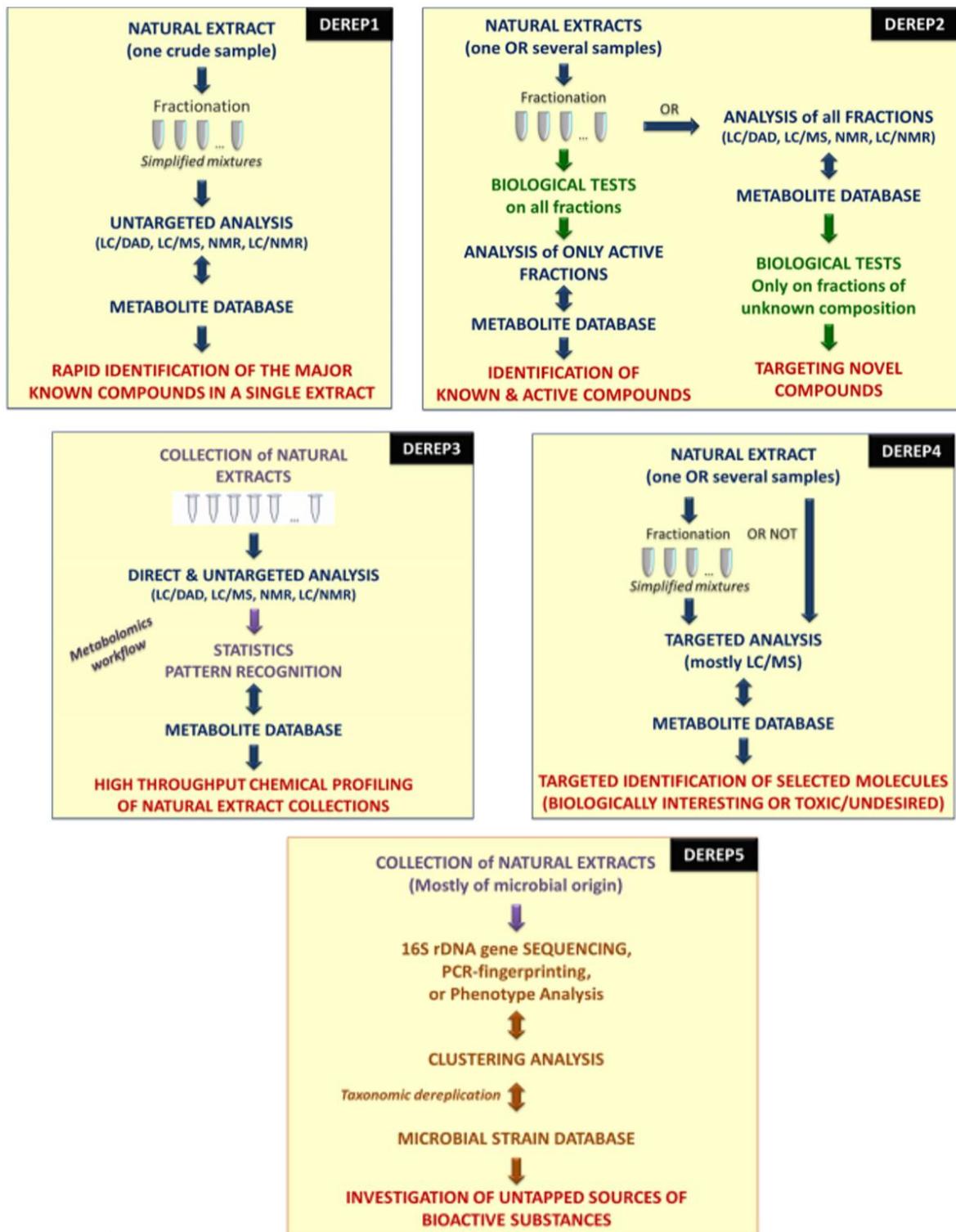


Figure 35 : Cinq stratégies de déréplication différentes dans la recherche sur les produits naturels [187].

Toutes ces méthodes de déréplication génèrent une quantité importante de données qu'il est nécessaire d'analyser avec des outils informatiques qui permettront de les comparer à des bases de données (BD). Différents algorithmes ont été créés afin d'automatiser les comparaisons de données expérimentales aux BDs. Par exemple, un algorithme nommé « X-Hitting » a été développé pour comparer les spectres d'absorption UV. Il permet de comparer la forme de l'intégralité d'un spectre UV inconnu à ceux des composés sortant au même temps de rétention d'une BD [189]. Un autre exemple, la plate-forme GNPS offre un outil d'analyse de réseau moléculaire appelé *Network Annotation Propagation (NAP43)*, dans laquelle l'algorithme de fragmentation *in silico* « MetFrag » est utilisé [190]. « MetFrag » combine la recherche de BD et la prédiction de la fragmentation pour l'identification de petites molécules à partir de données de spectrométrie de masse en tandem. Après une fragmentation *in silico* de manière combinatoire, les candidats sont filtrés et notés sur des critères tels que l'occurrence de certains éléments / sous-structures et les informations sur le temps de rétention [191]. Plus récemment, Bruguière et ses collaborateurs [192] ont établi un logiciel dédié à la déréplication par RMN du ^{13}C . Ces auteurs décrivent le développement d'un algorithme librement accessible en ligne intitulé MixONat (<https://sourceforge.net/projects/mixonat/>) qui aide les chercheurs à étudier des mélanges complexes. Basé sur Python 3.5, MixONat permet d'analyser un spectre RMN du ^{13}C éventuellement combiné avec des informations DEPT (135 et 90) pour distinguer les types de carbone (c'est-à-dire CH_3 , CH_2 , CH et C) ainsi qu'un filtre de masse moléculaire. Le logiciel présente une interface graphique permettant une facilité d'utilisation et une interactivité des résultats grâce à laquelle l'utilisateur peut optimiser les hypothèses faites par le programme [192].

Le succès d'une procédure de déréplication pour atteindre la caractérisation rapide des composés connus dépend fortement de la disponibilité et de la qualité des BD de produits naturels. Plusieurs BD du domaine public, du domaine privé et commerciales ont été développées et constituent une aide dans le processus de déréplication. Parmi les bases de données les plus pertinentes pour la déréplication des produits naturels nous pouvons citer : CAS/SciFinder, CSLS, ChemSpider, PubChem, ZINC, NAPROC-13, NMRShiftDB, Massbank, ReSpect, Metlin, GNPS, NaprAlert, Dictionary NP, Dictionary MNP, MarinLit, AntiBase, AntiMarin [193], ChEMBL, ChemBank, ChEBI, KEGG, MetaCyc, mzCloud, NuBBEDB, MIBiG, DrugBank [194]. En revanche, le nombre limité de produits naturels dans ces bases de données représente toujours une contrainte pour les analyses déréplicatives.

4.2. Bioautographie

La bioautographie peut être considérée comme une technique particulière de déréplication qui s'intéresse plus particulièrement à l'activité biologique des composés dans les mélanges complexes. En effet, bien que l'analyse et l'élucidation structurale de produits naturels aient connu de grandes avancées au cours de la dernière décennie, suivre la bioactivité dans les matrices complexes reste une tâche extrêmement difficile. Il y a donc un besoin continu de développer des méthodes plus rapides et plus fiables afin d'identifier les composés qui interagissent spécifiquement avec les cibles thérapeutiques parmi la multitude de produits présents dans la matrice et avec un minimum d'interférences. Ce qui pourrait être pertinent dans ce contexte, c'est la définition d'une interface simple, comme la bioautographie qui rassemble les deux disciplines : la chimie et la biologie pour corréliser l'analyse chimique avec des données biochimiques. La première tentative d'association d'essais biologiques à la chromatographie sur papier remonte à 1946 pour la détermination de la pénicilline. Des méthodes de détection biologiques liées à la CCM ont ensuite été décrites en 1961, lorsque des agents antibiotiques, tels que les tétracyclines, les pénicillines et les rifamycines, ont été détectés sur des plaques de CCM recouvertes de microorganismes en présence de sels de triphényltétrazolium [195].

La bioautographie offre la possibilité de suivre directement les composés bioactifs dans des mélanges complexes en utilisant des quantités très faibles de matière. Le principe des analyses de bioautographie est simple : une enzyme ou une biomolécule est appliquée sur une plaque de CCM développée sur laquelle les composés d'un mélange ont été séparés. Après incubation appropriée, les zones d'inhibition peuvent soit devenir directement visibles, soit être visualisées après une étape de révélation [196].

Grace à leur simplicité, rapidité avec la possibilité de la détection de la bioactivité consécutivement à une séparation chromatographique, les tests de bioautographie continuent à attirer l'attention des chercheurs dans le domaine des produits naturels. La bioautographie sur CCM est très utile pour le criblage chimique et biologique rapide des extraits de plantes. Une fois qu'une activité a été localisée sur la plaque CCM, l'échantillon peut être analysé par exemple par chromatographie en phase liquide couplée à la MS ou la RMN pour déterminer si des composés et /ou des classes de substances connus ou nouveaux sont impliqués. Les principales applications de la bioautographie sont le criblage rapide d'un grand nombre d'échantillons pour des bioactivités, principalement antibactérienne, antifongique,

antioxydante, et plus récemment l'inhibition enzymatique pour l'isolement ciblé de composés actifs.

Au début, les analyses bioautographiques directes ont été établies pour les études d'activités antifongiques utilisant des champignons sporifères. En raison de leur manipulation assez simple, des champignons phytopathogènes, tels que des espèces du genre *Cladosporium*, ont été particulièrement utilisés pour ces tests. Les développements ultérieurs ont inclus des recherches d'antibactériens et des activités antifongiques anti-*Candida*. Il existe une multitude de composés antimicrobiens qui ont été détectés et isolés par bioautographie [197]. Dans les sections suivantes, nous développerons plus en détails les différentes applications de la bioautographie.

4.2.1. Détection d'agents antimicrobiens

Trois méthodes bioautographiques sont utilisées pour détecter les agents antimicrobiens dans un mélange de composés, à savoir : la bioautographie directe, de contact et par immersion.

a- Bioautographie directe

La bioautographie directe sur CCM implique que la plaque développée soit pulvérisée ou trempée dans une suspension fongique ou bactérienne. Le bioautogramme est ensuite incubé dans des conditions humides afin de maintenir des conditions favorables à la survie/développement des microorganismes [196]. Pour visualiser la croissance des microorganismes, les sels de tétrazolium (p-iodonitrotétrazolium violet est le réactif de détection le plus approprié) en solution sont pulvérisés pour être convertis par les déshydrogénases des micro-organismes vivants en formazan intensément coloré. L'activité antimicrobienne de l'échantillon est identifiée par des zones blanches sur un fond violet. Des méthodes bioautographiques directes ont été décrites pour des champignons produisant des spores, tels que *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium*, ainsi que pour des bactéries, telles que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Un antibiotique cyclopeptide appelé condaline-A a été isolé de l'écorce de *Condalia buxifolia* avec d'autres antibiotiques nommés adoutine-Y', scutianine-B et scutianine-C à l'aide de cette technique [198].

b- Bioautographie de contact

La bioautographie de contact est basée sur le principe de la diffusion sur gélose. Les composés diffusent à partir d'une plaque de CCM développée vers une plaque de gélose inoculée. Le chromatogramme est placé face à la couche de gélose inoculée pendant une période spécifique pour permettre la diffusion. Ensuite, le chromatogramme est retiré et la couche d'agar est incubée. Les zones d'inhibition à la surface de la gélose, correspondant aux tâches des plaques chromatographiques, sont indicatives des substances antimicrobiennes. À titre d'exemple, le sphaerococcenol A, un antibiotique bromoditerpène, trois antibiotiques polyéthers carboxyliques (la monensine, le lasalocide et la salinomycine) ainsi que huit agents antifongiques différents de l'écorce de *Bridelia retusa* ont été isolés grâce à cette méthode [196].

c- Bioautographie par immersion

La bioautographie par immersion ou superposition de gélose est une combinaison de bioautographie directe et de contact. Dans cette méthode, le chromatogramme est recouvert d'un milieu d'agar fondu etensemencé. Après solidification et incubation, les bandes d'inhibition ou de croissance sont révélées selon différentes techniques [196]. Par exemple, une solution d'agar contenant la bactérie de couleur rouge *Serratia marcescens*, bactérie Gram négatif, peut être utilisée. Le gel de couleur rouge est incubé une nuit à la température ambiante et les zones d'inhibition apparaissent sous forme de zones blanches ou jaune pâle sur un fond rouge. Avec d'autres micro-organismes incolores, les zones d'inhibition de la croissance microbienne sont visualisées à l'aide d'un réactif de détection, substrat de la déshydrogénase (sel de tétrazolium). Cette technique a été utilisée pour des levures telles que *Candida albicans* et a également été appliquée à des bactéries telles que *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Des caroténoïdes antimicrobiens ont été caractérisés dans des extraits de graines de *Bixa orellana*. Plusieurs composés antimicrobiens ont été isolés à partir d'écorces, de cotylédons et de tubercules de *Tylosema esculentum* en utilisant la bioautographie en superposition d'agar à l'aide de *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* comme microorganismes [196].

4.2.2. Détection d'agents antioxydants

La détection d'agents antioxydants est réalisée sur un chromatogramme développé sur lequel est pulvérisé un générateur de radicaux ou le radical lui-même. Une solution de DPPH (radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) à 0,2% dans un mélange méthanol / éthanol est pulvérisée sur la plaque. Les piègeurs de radicaux libres apparaissent sous forme de taches jaune crème sur un fond violet par réduction du DPPH. L'intensité de la couleur jaune peut être mesurée avec un chromamètre. Par cette technique, quatre composés antioxydants (l'acide rosmarinique, la lutéoline, l'apigénine et le chrysoériol) ont été isolés des fruits de *Perilla frutescens* [196]. L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), un autre radical de couleur verte, a permis de détecter des piègeurs de radicaux libres tels que l'acide urique, l'indole, le 3,4-diméthoxyphénol et la 3-hydroxyindoline-2-one qui ont donné des taches incolores ou de couleur roses [199]. Le DPPH est toutefois préférable comme révélateur car il est plus stable après pulvérisation sur plaque et donne une coloration des taches plus homogène [196].

L'inhibition du blanchiment du β -carotène induite par l'auto-oxydation de l'acide linoléique a été aussi utilisée pour détecter les antioxydants. Des plaques de CCM sèches sont pulvérisées avec un mélange d'acide linoléique dans l'éthanol et de β -carotène dans le chloroforme. Après exposition de la plaque à la lumière du soleil, l'activité antioxydante est indiquée par la présence de taches orange sur un fond blanc. Grâce à cette méthode, Whittern et col. et Pratt et col. ont montré une puissante activité antioxydante de la quercétine et de la rutine des graines de coton et de la dihydroquercétine à partir d'*Arachia hypogoea* [200, 201].

4.2.3. Détection de composés œstrogéniques

Müller et son équipe [202] ont réalisé le criblage de molécules œstrogéniques grâce à des levures. Les cellules de levure ont été cultivées directement sur des plaques CCM où, en présence de substances œstrogéniques, la production de l'enzyme β -galactosidase a été induite. Ici, le 4-méthyl-umbelliféryl- β -D-galactopyranoside (MUG) a été utilisé comme substrat fluorogène sur lequel agit l'enzyme β -galactosidase et le convertit en 4-méthyl-umbellifénone. Le rouge de chlorophénol- β -D-galactopyranoside peut aussi être utilisé à la place du MUG mais

la sensibilité du test au MUG est meilleure. Grâce à ce test, le ligand naturel 17 β -estradiol a été détecté et une courbe dose-réponse a été obtenue [202].

4.2.4. Détection d'inhibiteurs enzymatiques

Les analyses bioautographiques par CCM basées sur des enzymes sont devenues récemment populaires dans la recherche de métabolites secondaires actifs pouvant être utilisées pour traiter différentes pathologies [203]. Au cours du développement des essais enzymatiques bioautographiques, les chercheurs s'intéressent à l'optimisation de plusieurs paramètres. Il est indispensable de définir les conditions optimales de la réaction enzymatique afin d'obtenir un bon contraste entre la couleur de l'arrière-plan de la plaque CCM (généralement coloré) et la zone d'inhibition (généralement complètement blanche ou plus claire que la couleur de fond de la plaque). Les paramètres clés des procédés se basant sur la CCM bioautographique sont les concentrations en enzyme et en substrat [204] et les conditions de l'incubation durant la réaction enzymatique (soit à l'air libre soit dans une atmosphère saturée en humidité).

Tout d'abord, il est nécessaire de déterminer le type de la phase stationnaire (polyamide, cellulose, silice ou phase inverse) compatible avec l'essai enzymatique. La majorité des auteurs choisissent le gel de silice 60 avec ou sans indicateur fluorescent car les contours des zones d'inhibition sont plus nets. Néanmoins, l'utilisation d'une phase inverse peut s'avérer intéressante pour la séparation des composés polaires [205]. Dans ce cas, l'immobilisation de l'enzyme par un gel à la surface de la plaque peut être envisagée pour assurer le contact entre l'inhibiteur, le substrat et l'enzyme.

Une fois ces paramètres fixés, la seconde partie de l'optimisation va consister en la détermination des concentrations optimales en enzyme (généralement comprises entre 68 mU/ml [206] et 130 U/ml [204] et en substrat afin d'obtenir le meilleur contraste entre le fond et la zone d'inhibition. L'ordre d'ajout des solutions (substrat, enzyme) est variable selon l'enzyme et, en fonction des cas, une incubation en milieu humide est réalisée afin de favoriser l'interaction entre l'inhibiteur et l'enzyme et pour permettre la réaction biologique. La durée d'incubation est dépendante de la cinétique de la réaction de l'enzyme qui est liée au pH et à la température du milieu réactionnel. Afin d'éviter une perte d'activité de l'enzyme, il est parfois

nécessaire d'ajouter de l'albumine de sérum bovin (BSA) afin d'améliorer la stabilité de l'enzyme.

Suivant le cas, soit le produit de la réaction enzymatique est suffisamment coloré, et donc détectable directement sur la plaque CCM, [205] soit il nécessite une révélation qui se fera en réalisant une ou plusieurs réactions consécutives (enzymatiques ou non) pour aboutir à un produit coloré [207, 208].

L'utilisation de plusieurs solutions de réactifs peut provoquer une diffusion des composés de l'échantillon sur la phase stationnaire rendant la zone d'inhibition plus diffuse et par conséquent moins visible ce qui peut diminuer la précision de la technique CCM-bioautographique et augmenter sa limite de détection. Cet effet peut être limité par l'addition d'étapes de séchage de la plaque de CCM après chaque ajout d'une solution de réactif, même si cela peut augmenter la durée de l'analyse. Cependant, il faut noter que le séchage de la plaque de CCM après le dépôt de l'enzyme n'est pas systématique car il peut la dénaturer [204].

Deux techniques d'imprégnation des plaques de CCM sont retrouvées dans la littérature. Elle peut se réaliser par trempage de la plaque dans les solutions qui va parfois nécessiter l'ajout d'un gélifiant comme l'agar [206, 209, 210], l'agarose [206] ou le *Pluronic* [205] afin de former un gel contenant l'enzyme à la surface de la plaque. La seconde technique décrite s'effectue par pulvérisation des solutions à la surface de la plaque ce qui représente un gain de temps à la fois dans le développement de la technique et dans sa réalisation.

Par ailleurs, il faut noter que les phases mobiles utilisées pour la migration semblent influencer l'activité de la majorité des enzymes, un procédé de séchage après migration des composés des échantillons est réalisé et parfois la présence d'acide formique peut nécessiter sa neutralisation par des vapeurs d'ammoniac [211].

La majorité des techniques de bioautographie enzymatique sont utilisées pour détecter des inhibiteurs dans des matrices complexes avec une limite de détection de l'ordre du ng- μ g et une durée d'analyse allant de quelques min à quelques heures. Certaines permettent aussi une analyse quantitative validée selon les lignes directrices de la FDA pour le développement de techniques bio-analytiques [207, 209, 212–216].

a- Test de bioautographie utilisant les cholinestérases

Plusieurs procédures de criblage des inhibiteurs de l'acétylcholinesterase (AChE) s'appuient sur les tests enzymatiques bioautographiques. L'histoire remonte à 1991, où la

procédure de dosage reposant sur la dégradation enzymatique de l'acétylthiocholine en thiocholine et en acétate par l'AChE a été mise en place [217]. La thiocholine produite est révélée par une réaction avec le 5,5'-dithio-bis (acide 2-nitrobenzoïque) (DTNB) pour former un anion jaune (le 5-thio-2-nitrobenzoate). Les substances possédant des propriétés inhibitrices de l'AChE forment des zones blanches sur le fond jaune des plaques CCM. L'équipe de Rhee [218] a examiné différentes espèces d'Amaryllidaceae à l'aide de cette procédure bioautographique, en utilisant la galanthamine comme contrôle positif. En 2002, des tests bioautographiques sur l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase (BChE) ont été réalisés par Marston et ses collaborateurs [219]mar. Les activités des AChE et BChE ont été détectées par la conversion de l'acétate 1-naphtyle en 1-naphtol et la formation subséquente du dérivé de diazonium de couleur pourpre après réaction avec le sel *Fast Blue B* (FBB). Des plaques de CCM contenant les composés séparés ont été pulvérisées avec une solution d'AChE ou de BChE sur la couche de CCM. Après incubation, les plaques ont été pulvérisées avec un mélange de 1-naphtyle acétate et de sel FBB où des taches blanches sur un fond de CCM pourpre indiquent une inhibition de l'activité enzymatique.

Récemment, un essai sur l'AChE compatible avec les plaques de CCM en phase normale et en phase inverse utilisant de l'acétate d'indoxyle comme substrat a été introduit [205]. L'essai proposé repose sur la transformation de l'acétate d'indoxyle non fluorescent par l'AChE pour former le 3-hydroxyindole fluorescent qui est ensuite oxydé en blanc indigo fluorescent, puis en bleu indigo non fluorescent mais coloré. L'inhibition de l'AChE peut être identifiée soit par un changement de fluorescence et/ou une absence de couleur bleue. Le procédé comprend l'utilisation d'un copolymère amphiphile pour immobiliser l'AChE sur le support afin de permettre l'utilisation d'une plaque de CCM en phase inverse. Après optimisation, ce test de bioautographie a permis de détecter la physostigmine à la fois dans un extrait de *Sonchus oleraceus* sur une plaque de phase normale et dans l'huile essentielle de feuille de *Pimenta racemosa* sur une plaque de phase inverse. Le même test sur CCM en phase inverse a été également appliqué pour révéler la présence d'un inhibiteur dans *Cymbopogon citratus* [205].

b- Test de bioautographie sur la dipeptidyl peptidase IV (DPP IV)

Une méthode DPP IV bioautographique semi-quantitative a été introduite, basée sur la réaction du substrat (Gly-pro-p-nitroaniline) catalysé par la DPP IV pour libérer la p-nitroaniline (pNA) [214]. Une étape de révélation ultérieure donne un fond rose-rouge sur les

plaques CCM. Les inhibiteurs de la DPP IV présentaient des taches blanches sur le fond coloré. Les spots des composés inhibiteurs ont été inspectés avec un scanner de CCM pour obtenir l'aire de la bande d'inhibition détectée. La méthode a été validée en ce qui concerne la linéarité, la sensibilité, la précision, la reproductibilité, le recouvrement et la stabilité [214]. Récemment une méthode de CCM-bioautographie-MS couplée à un système de purification contrôlé par LC-MS a été développée et appliquée pour cribler et isoler des inhibiteurs de cette enzyme à partir d'extraits de plantes [220]. Initialement un constituant inconnu, issu de bulbes de *Fritillaria cirrhosa*, a montré une activité inhibitrice intéressante en utilisant la bioautographie-CCM, puis ce composé a été isolé et identifié comme étant la peimisine.

c- Test de bioautographie sur les glucosidases

Un dosage bioautographique de la β -glucosidase a été établi en utilisant l'esculine, un glucoside de coumarine d'origine naturelle, comme substrat [221]. L'enzyme hydrolyse l'esculine en esculetine qui réagit avec le sel de chlorure ferrique et forme un complexe brun foncé. Les composés avec les propriétés d'inhibition de la β -glucosidase apparaissent sous forme de taches blanches sur un fond de plaque de CCM brun foncé. La méthode a été appliquée au criblage d'extraits chimiquement modifiés. L'extrait modifié d'*Urtica urens* a montré une zone d'inhibition et a conduit à l'identification d'un dérivé de dibenzènesulfonyl histamine [222]. L'extrait chimiquement modifié de *Lamium amplexicaule* montrant différentes zones inhibitrices de la β -glucosidase a aussi présenté un intérêt particulier conduisant à l'isolement du *p*-coumarate d'éthyle et de l'apigénine [223].

Un autre essai bioautographique sur les α - et β -glucosidases est connu et repose sur le clivage du 2-naphthyl- α -D-glucopyranoside ou du 2-naphthyl- β -D-glucopyranoside pour former du 2-naphtol pouvant réagir avec le sel de FBB fournissant un produit de couleur violette lorsque les enzymes sont actives [224]. Ces tests ont été appliqués au criblage des thalles de différents lichens. La CCM préparative a conduit à l'isolement des acides salazinique, sékikaique et usnique.

Dans une autre étude, la chromatographie Sepbox couplée à la CCM-bioautographique a été appliquée avec succès pour l'identification des inhibiteurs de l' α -glucosidase à partir de *Phlomis tuberosa*, une plante utilisée dans la médecine traditionnelle asiatique [225]. Grâce à ce test, vingt composés actifs ont été isolés à partir de cette plante, y compris quatre nouveaux diterpénoïdes.

Une étude récente s'est, quant à elle, intéressée à la recherche d'inhibiteurs de l' α -glucosidase chez *Justicia secunda* via la bioautographie [226]. Des extraits de feuilles de cette plante ont été évalués. Deux sous-fractions aqueuses ont révélé des composés actifs qui ont été isolés et identifiés comme étant l'acide 2-caféoyloxy-4-hydroxy-glutarique et les diastéréoisomères secundarellone B et C. En effet les inhibiteurs de l' α -glucosidase ont été visualisés sous forme de zones blanches sur un fond violet de la plaque CCM.

d- Test de bioautographie sur la lipase

Initialement deux méthodes bioautographiques de détection des inhibiteurs de lipase ont été introduites [227, 228]. Ensuite, un test bioautographique avec une spécificité de substrat plus élevée, qui permet une évaluation quantitative des inhibiteurs de lipase, a été développé [215]. Le test repose sur la réaction de la lipase avec le β -naphtyl myristate et la formation ultérieure de colorant violet lorsque le β -naphtol réagit avec le sel de FBB. Par conséquent, les zones présentant une activité inhibitrice de lipase apparaissent blanches ou jaune-brun sur un fond de plaque violet. Les spots actifs sont balayés par un scanner de plaque afin de permettre une étude quantitative. La capacité inhibitrice relative de la lipase a été exprimée en équivalents d'orlistat. À l'aide de cette dernière technique, Tang et col. ont analysé trois extraits alimentaires, qui sont l'extrait de ginseng américain, l'extrait de champignons enoki et l'extrait de champignons de trompette royale et ont montré que ces derniers peuvent être des sources potentielles d'inhibiteurs naturels de lipase [215].

e- Test de bioautographie sur la xanthine oxydase (XO)

Le premier test bioautographique utilisant la XO a été introduit en 2006 [206]. La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique entraînant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent réduire le nitrobleu de tétrazolium en formazan violet, alors que les inhibiteurs de XO et les piègeurs de radicaux apparaissent sous la forme de taches blanches sur la plaque de CCM. L'enzyme a été incorporée dans une solution d'agar tamponnée contenant du nitrobleu de tétrazolium. La solution de coloration a été répartie sur la couche de CCM, solidifiée et immergée dans une solution de xanthine. Le test utilisant cette enzyme a permis l'étude d'*Erycibe obtusifolia*, une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise. L'acide 3,5-dicaféoylquinique, l'acide 3,4-dicaféoylquinique et l'acide

4,5-dicaféoylquinique isolés de cette plante ont montré une activité inhibitrice intéressante de la XO. Cette méthode a subi par la suite de légères modifications ([García et al. 2016](#)) et un inhibiteur hémi-synthétique ((RS) -2-bromo-1- (4-méthoxyphényl) propane-1-one) a été identifié dans l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* modifiée chimiquement avec du brome. Dans une autre étude Chen et col. [210] ont démontré que la plante médicinale *Erycibe obtusifolia* possède des propriétés inhibitrices de la XO en décrivant une stratégie basée sur la combinaison de la MS avec la CCM-bioautographique. Plus récemment un nouveau test bioautographique sans agar sur des plaques de CCM pour chercher des inhibiteurs de la XO a été développé et validé [216]. Quatre inhibiteurs de cette enzyme ont été identifiés dans *Astragalus membranaceus* grâce à ce test.

f- Test de bioautographie sur la glucose-6-phosphate-deshydrogénase

Une seule étude s'est intéressée à la réalisation du test biologique utilisant la glucose-6-phosphate-deshydrogénase (G6PDH) sur des plaques CCM [229]. C'est un essai rapide et quantitatif de l'activité inhibitrice de la G6PDH qui a été mis au point. Le substrat glucose-6-phosphate (G6-P) peut être converti par cette enzyme pour produire du gluconolactone-6-phosphate et du NADPH en utilisant la NADP^+ comme coenzyme. En revanche, cette méthode ne permet pas la séparation des composés de matrices complexes avant le criblage de l'activité, ce n'est donc pas une analyse bioautographique proprement dite. En effet, dans cette méthode, la CCM est utilisée pour la quantification des produits de la réaction et non pas pour la séparation des composés bioactifs. Ce test est basé sur les différents rapports frontaux du substrat, de l'enzyme et des produits.

g- Test de bioautographie sur la phosphoglucose isomérase (PGI)

Un test bioautographique par CCM a été mis en place par Paradowska et ses collaborateurs [208, 230]. La méthode repose sur la conversion du fructose-6-phosphate en glucose-6-phosphate par la PGI. La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), en tant qu'enzyme auxiliaire, catalyse le glucose-6-phosphate en gluconolactone-6-phosphate en réduisant le NADP^+ en NADPH (comme précédemment cité). Le NADPH peut ensuite convertir le phénazinéméthosulfate (PMS) en sa forme réduite, qui joue ensuite le rôle de porteur d'électrons pour convertir le nitrobleu de tétrazolium en formazan violet. Le test se réalise comme suit : la plaque de CCM séchée est pulvérisée par une solution enzymatique de

PGI de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, puis elle est incubée dans des conditions appropriées. Dans une étape suivante, la plaque a été pulvérisée avec la solution de coloration contenant un mélange NADP⁺ / nitrobleu de tétrazolium / PMS avec la solution de G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*. La plaque a ensuite été recouverte d'une feuille d'aluminium et incubée à température ambiante. Après 15 minutes, des taches visiblement plus claires sur un fond violet foncé indiquent des zones d'inhibition de la PGI.

h- Test de bioautographie sur la tyrosinase

Plusieurs études se sont intéressées à la technique de bioautographie utilisant l'enzyme tyrosinase. Une première méthode de détection des inhibiteurs de la tyrosinase des champignons a été introduite en 2007 par Wangthong et ses collaborateurs [204]. Des solutions de tyrosinase et de L-tyrosine sont pulvérisées successivement sur des plaques de CCM contenant les échantillons à tester. Les inhibiteurs de la tyrosinase apparaissent sous forme de taches blanches sur un fond sombre en raison de l'oxydation de la tyrosine en dopaquinone. Cet essai bioautographique a été ensuite appliqué avec des légères modifications pour l'isolement de composés actifs à partir d'extraits de *Sideroxylon inerme*, un arbre côtier sud-africain [231]. Pour cribler les composés actifs dans cette plante, après l'élimination de la phase mobile qui a servi à la séparation des composés de l'échantillon, la plaque a été pulvérisée avec la L-tyrosine en tant que substrat et incubée à température ambiante pendant 10 min. Ensuite, la plaque a été pulvérisée avec la solution de tyrosinase et laissée à température ambiante pendant 30 min. Le fond de la plaque prend une couleur violacée et les composés actifs présents dans l'extrait apparaissent sous forme de zones claires d'inhibition. À l'issue de cette étude, le gallate d'épigallocatechine et la procyanidine B1 ont été isolés et se sont révélés comme de puissants inhibiteurs de la tyrosinase [231]. La même méthode a été appliquée par la suite au cours d'une étude pour le criblage des composés de l'huile de bois de santal [232]

[232]. Ainsi, le sesquiterpénoïde α -santalol était identifié comme un composé actif par pulvérisation parallèle sur une deuxième plaque de CCM d'un mélange de *p*-anisaldéhyde, d'acide sulfurique et d'acide acétique glacial, et en comparant les rapports frontaux des deux plaques de CCM. Dans une autre étude, des plantes médicinales rwandaises, traditionnellement utilisées comme éclaircissant pour la peau ont été étudiées grâce à la bioautographie couplée à la CCM [233]. Le test a été réalisé en pulvérisant de la tyrosinase de champignons puis un mélange de L-DOPA et de L-tyrosine en tant que substrats sur la plaque de CCM. Les taches

blanches sur la plaque de CCM ont montré des propriétés inhibitrices de l'enzyme alors que les taches plus sombres que le fond de la CCM ont été interprétées comme des activateurs de la tyrosinase. Différentes plantes avec des inhibitions puissantes ou des activations de la tyrosinase ont été identifiées au cours de cette étude.

Plus tard, le test bioautographique sur la tyrosinase a été optimisé [234]. La quantité de tyrosinase et de L-tyrosine, ainsi que le temps et la température d'incubation ont été variés afin d'évaluer leurs effets sur la sensibilité et la limite de détection du test. Parmi ces paramètres, la quantité de tyrosinase et de L-tyrosine ont été jugées comme des facteurs significatifs. Pour l'analyse bioautographique, une solution d'agar contenant de la L-tyrosine et de la tyrosinase est versée sur une plaque de CCM. En quelques minutes, le gel vire au brun, alors que des taches blanches sur la plaque indiquent la présence d'un inhibiteur, comme l'acide kojique par exemple. L'applicabilité de l'analyse a été testée sur un extrait brut inactif de *Calamagrostis viridiflavescens* enrichi d'acide kojique. La méthode optimisée a été appliquée pour le criblage d'extraits fluorés hémi-synthétiques [235]. Il a été observé que la fluoration renforçait les propriétés inhibitrices d'*Ocimum basilicum* et d'*Artemisia dracunculus*, qui présentaient des taches d'inhibition bien distinctes, absentes dans les extraits naturels. Le principal composé bioactif dans les deux extraits chimiquement modifiés a été identifié comme étant le 4-allyl-4-fluorocyclohexa-2,5-diénone, qui a été probablement généré à partir du précurseur inactif le méthyl-chavicol présent dans les deux extraits naturels.

Dans une étude ultérieure, le test a été transféré et adapté aux plaques HPTLC utilisant la lévodopa comme substrat pour la tyrosinase, ce qui a permis d'obtenir un meilleur contraste par rapport à la tyrosine [211]. Cette étude s'est intéressée en particulier à la distinction de faux positifs sur les plaques. Les auteurs ont supposé que les faux positifs apparus étaient dus à la faible mouillabilité de certaines zones de la plaque de CCM. Les faux positifs ont été éliminés en ajoutant du Triton X-100 à la solution de lévodopa et en séchant la plaque avec un tamis moléculaire. La validité de la technique de bioautographie sur la tyrosinase a été évaluée en utilisant différents inhibiteurs connus de l'enzyme ainsi que des extraits de plantes actifs et non actifs. La méthode s'est avérée être stable, robuste et reproductible pour le criblage d'extraits de plantes [211].

En 2017, Garcia et son équipe [236] ont développé un test bioautographique pour détecter les inhibiteurs de tyrosinase présents dans des matrices complexes sur des plaques de CCM en phase inverse ce qui n'est pas très commun dans les tests de bioautographie associés au CCM vu la complexité de la réalisation du test enzymatique sur des phases apolaires. Le piégeage du

gel enzymatique avec un copolymère amphiphile a été utilisé pour le développement du test. Les inhibiteurs sont visualisés par des taches claires sur le fond de la plaque de couleur brune. Cet essai a permis de localiser le cinnamaldéhyde dans l'huile essentielle de *Cinnamomum cassia*, en tant que constituant principal avec des propriétés inhibitrices intéressantes. Le test a permis également la détection de l'acide kojique co-déposé avec un extrait méthanolique de *Sphaeralcea bonariensis*.

Plus récemment, Hsu et son équipe [212] ont amélioré un test de bioautographie utilisant la tyrosinase en insistant sur l'intérêt de l'utilisation de la 3, 4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) comme substrat pour mieux distinguer le contraste entre le fond de la plaque et les zones d'inhibition. Les auteurs ont utilisé ce test pour cribler les inhibiteurs d'un extrait mycélien éthanolique de *Ganoderma formosanum*.

i- Test de bioautographie sur la peroxydase

Un test de bioautographie couplée à la CCM pour détecter les inhibiteurs de l'enzyme peroxydase a été développé et validé dans une étude récente [213]. La méthode de bioautographie-CCM développée reposait sur la réaction de la peroxydase avec le peroxyde d'hydrogène et la formation subséquente de couleur bleue par la réaction entre l'oxygène libéré et la benzidine. Les composés, ayant une activité inhibitrice de la peroxydase, sont observés sous forme de taches jaunâtres sur un fond bleu. La méthode développée a été validée selon les directives du conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH). L'estimation quantitative des inhibiteurs de la peroxydase a été obtenue en appliquant des techniques d'analyses d'images, montrant une bonne linéarité, précision intra et inter-journalières ainsi qu'une faible limite de détection et de quantification. La méthode développée a été appliquée à différentes fractions des espèces de *Juniperus*.

j- Test de bioautographie sur l' α -chymotrypsine

Une méthode CCM-bioautographique a récemment été développée [237] pour la détection des inhibiteurs de l' α -chymotrypsine dans les extraits brutes de plantes. Cette méthode repose sur l'hydrolyse du N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BApNA) par l' α -chymotrypsine pour produire de la *p*-nitroaniline (pNA) colorée. La pulvérisation du pNA avec du nitrite de sodium et de la N-(1-naphtyl) éthylènediamine (NPED) conduit à la formation

d'un colorant azoïque rose. Les composés actifs dans le chromatogramme apparaissent sous forme de taches claires sur un fond rose. La méthode développée a été testée pour l'analyse des inhibiteurs dans différents matériaux végétaux, tels que le marc de raisin de *Vitis vinifera*, l'écorce de *Picea abies*, les baies d'*Hippophae rhamnoides*, le son de *Hordeum sativum*, le son de *Triticum aestivum* et le son d'*Avena sativa*. Le grand avantage de cette technique est que les extraits de plantes, qui n'ont pas pu être analysés par la méthode spectrophotométrique en raison d'interférences, ont pu être évalués par cette méthode.

k- Test de bioautographie sur l' α -amylase

Un test de bioautographie associée à la CCM à haute résolution, pour l'évaluation de l'activité α -amylase chez 10 espèces de macroalgues marines (3 *Chlorophyta*, 4 *Phaeophyta* et 3 *Rhodophyta*) de Malaisie, a été établi [238]. Les plaques développées ont été saturées par une solution d' α -amylase. Après incubation, la plaque a été plongée dans une solution d'amidon pour la réaction substrat-enzyme, puis lavée avec une solution d'iode (solution de détection). L'amidon produit une couleur bleu foncé sur la plaque CCM en présence d'iode provenant du complexe amidon-iode formé. Ces zones bleues autour des bandes indiquent une activité α -amylase réduite. Cette coloration est due à l'amidon qui n'a pas été hydrolysé par l' α -amylase en raison de l'inhibition enzymatique par les composés de l'échantillon. Dans cette étude [238], l'activité inhibitrice observée a été attribuée à la richesse en triterpènes et en phytostérols des extraits éthyléniques préparés à partir des macroalgues.

4.2.5. Conclusion

La CCM combinée à des méthodes de détection biologique peut être une technique simple et efficace pour la recherche de produits bioactifs dans des mélanges complexes en particulier les extraits d'origine naturelle riches en composés. En effet, plusieurs extraits peuvent être appliqués sur la couche de CCM en très petites quantités et séparés à l'aide d'une phase mobile appropriée. Des dépôts contenant l'extrait entier, le contrôle négatif ainsi que le contrôle positif à différentes concentrations peuvent également être appliqués sur la même plaque de CCM.

Cependant, concernant les essais réalisés utilisant des enzymes, les tests de bioautographie sur CCM s'avèrent plus compliqués et certaines contraintes peuvent être rencontrées lors du développement de ces méthodes. En effet il a été prouvé que la composition

de la phase mobile, utilisée pour la séparation des composés du mélange, peut affecter le test enzymatique en particulier si le mélange de l'éluant contient de l'acide. Ainsi seules les enzymes relativement robustes conviennent aux tests de criblage par cette technique. En outre, à cause du risque de la perte de la stabilité lorsque les enzymes sont appliquées sur les plaques de CCM, une activité enzymatique élevée est nécessaire, ce qui limite cette technique aux enzymes relativement peu coûteuses [195]. Une solution à ce problème a été proposée. Elle consiste à ajouter de l'albumine de sérum bovin (BSA) dans la solution enzymatique afin de stabiliser la protéine pendant le test, comme indiqué par exemple dans l'analyse bioautographique de l'AChE, la lipase et les α et β -glucosidases [219, 224]. Cependant, il a été rapporté que la BSA peut interagir avec différents produits naturels et être susceptible d'entraîner une modification de l'affinité enzymatique pour les inhibiteurs potentiels [195].

Pour le dépôt des enzymes sensibles et coûteuses sur les plaques de CCM comme la XO, la β -glucosidase ou la tyrosinase, d'autres auteurs proposent l'immobilisation des enzymes sur un gel. Cette procédure permet à la fois de préserver leur activité et de réduire les volumes de solution enzymatique à utiliser [195].

Finalement, certes la combinaison de la CCM avec des tests biologiques offre la possibilité de la localisation rapide des composés actifs dans les matrices complexes et permet ainsi l'isolement ciblé des constituants bioactifs. Mais, les tests classiques spectrophotométriques sur microplaques restent complémentaires à cette technique et sont généralement plus adaptés pour la détermination des CI_{50} des composés. D'autre part il est important de signaler qu'aucune donnée concernant les effets synergiques potentiels dans un extrait ne peut être étudiée avec cette technique.

Des essais de bioautographie-CCM-2D ont été réalisés, les plaques de CCM sont développées une fois avec un solvant polaire, ensuite tournées à 90° et développées à nouveau avec un système de solvants non polaire avant le test biologique. L'avantage de cette méthode est la possibilité de l'utilisation, pour le même échantillon, de solvants de polarités très différentes [239]. La bioautographie-CCM-2D s'est avérée utile pour la détection d'inhibiteurs des agents pathogènes des plantes comme *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* et *C. gloeosporioides* [196].

5. Conclusion

La découverte de produits actifs d'origine naturelle débute par la sélection de la matière première qui peut se baser sur plusieurs critères de choix tels que l'éthnopharmacologie, la chimiotaxonomie, les divers critères écologiques et la pharmacognosie inverse. Viennent ensuite le criblage et la purification des produits naturels qui peuvent se faire suivant une démarche de fractionnement bioguidé afin de caractériser les profils phytochimiques et pharmacologiques des extraits préparés. Ces procédés peuvent paraître complexes, mais l'intérêt autour des produits naturels ne cesse de croître ce qui a conduit à plusieurs succès dans le domaine pharmaceutique au cours de ces dernières années [7]. Le développement de nouvelles techniques analytiques permettant des études déréplicatives a été au centre de l'attention de la communauté scientifique et a permis ainsi de moderniser et d'accélérer les recherches dans ce domaine.

Chapitre 4 : Données bibliographiques recueillies sur les espèces sélectionnées

Dans le cadre de ce projet de thèse, douze plantes médicinales tunisiennes ont été récoltées. Ce quatrième chapitre de l'étude bibliographique, concerne les caractéristiques botaniques, la répartition géographique, les utilisations traditionnelles, la phytochimie et les activités biologiques connues de chaque plante sélectionnée afin de justifier leur choix pour cette étude.

1. *Crataegus azarolus* L.

1.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

Le *Crataegus azarolus* (en France nommé azarolier et en Tunisie « *zaaroura* ») est un arbre à port érigé, touffu et très ramifié à croissance lente et pouvant atteindre 7 à 8 m de hauteur (Figure 36). Le tronc, assez épais souvent tortueux, parfois buissonnant, est à tiges multiples. Les rameaux sont glabres présentant de nombreuses épines. Les feuilles, de couleur vert clair brillant au niveau de la face supérieure et grisâtre pubescentes au niveau de la face inférieure, sont caduques, alternes et pétiolées. Le pétiole est court et pubescent. Le limbe, elliptique ou deltoïde, est entier à sa base puis profondément lobées en 3 à 5 paires de lobes. Les inflorescences (3 à 20 fleurs) sont regroupées en corymbe (Figure 36 B). Les fleurs sont hermaphrodites, nectarifères, pourvue chacune d'un pédoncule duveteux surmonté d'un calice à 5 sépales triangulaires et d'une corolle constituée de 5 pétales odoriférants, blancs à crème. L'androcée est formé de 15 à 20 étamines insérées sur le bord d'un réceptacle brun-vert. Leurs filets portent des anthères introrses de couleur jaune, rose ou pourpre. Le gynécée est représenté par un ovaire infère adhérent à plusieurs carpelles. Leur pistil se termine par 2 à 3 styles. Le fruit (azérole), ovoïde, tronqué au sommet et couronné par les sépales, est pulpeux, recouvert d'une mince cuticule et contenant 2 à 3 graines. Selon la couleur des fruits, *Crataegus azarolus* se présente sous deux variétés : *Crataegus azarolus* var. *aronia* (Wild.) Batt. à fruits jaunes et *C. azarolus* var. *eu-azarolus* Maire à fruits rouges (Figure 36 C).

L'Azarolier est largement répandu en Europe du Nord, dans les régions tempérées d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Nord. En Tunisie, cette plante est principalement répartie dans le nord-ouest, le Cap Bon et la Dorsale tunisienne dans les zones bioclimatiques s'étendant du semi-aride supérieur à l'humide [240, 241].



Figure 36 : A. *Crataegus azarolus* ; B. Fleurs de *Crataegus azarolus* ; C. Fruits de *Crataegus azarolus* (source Chokri Messaoud).

1.2. Utilisations traditionnelles

L'azarolier est un arbre fruitier polyvalent, cultivé dans toute la Méditerranée comme arbre d'ornement ou comme plante médicinale [242].

Plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques ont révélé l'utilisation de cette espèce dans la médecine traditionnelle pour traiter la faiblesse sexuelle ainsi que le cancer [243]. La décoction des feuilles est utilisée pour traiter le diabète, l'angine et la douleur post-partum, ainsi que pour rétablir les rythmes cardiaques, la circulation sanguine, l'hypertension artérielle et soigner le système nerveux et les troubles du sommeil ([244], [245]).

Les fruits et les fleurs ont un effet hypotenseur et agissent comme un tonique cardiaque direct et doux. En outre, ils peuvent être appliqués dans le traitement de l'angine de poitrine et

de l'artériosclérose [246]. Les fruits peuvent être employés en cas d'anémie et de tuberculose et ils peuvent être également utilisés pour traiter la diarrhée sanglante [247]. Ces fruits peuvent être consommés frais ou séchés ou bien utilisés pour la préparation de la confiture, de la marmelade ou du sirop [240].

1.3. Phytochimie

Les principaux composés décrits dans *C. azarolus* sont les acides phénoliques (comme l'acide succinique, citrique, malique, quinique), les flavonoïdes (comme la quercétine, l'isoquercétine, l'hyperoside, le spiraeoside et l'hespéritine) et les tanins condensés [248].

Les boutons floraux sont très riches en polyphénols, flavonoïdes et proanthocyanidines. L'acide phénolique majoritaire dans cette partie de la plante est l'acide chlorogénique, le flavonoïde majoritaire détecté est l'hyperoside [240, 249] et les catéchines majoritaires repérés sont la procyanidine B2 et la (-)-épicatéchine [242]. Les écorces et la pulpe des fruits sont principalement riches en hyperoside et en épicatéchine respectivement [240].

Les feuilles présentent principalement de fortes concentrations en saponines, terpénoïdes, flavonoïdes, acides aminés, lignine et quinones [250]. Mahmud et col. [251] ont isolé de l'extrait brut des feuilles, obtenu par l'EtOAc, des composés phénoliques comme la (-)-épicatéchine, la vitexine, la 4''-O-acétylvitexin-2''-O-rhamnoside, la vitexine-2''-O-rhamnoside, et des triterpénoïdes tels que l'acide éuscaphique, l'acide 2 α ,19 α -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oïque, l'acide 2-oxopomolique, l'acide arjunique et l'acide azarolique. Belkhir et col. [240] ont détecté l'acide néochlorogénique, l'acide cryptochlorogénique, l'isoquercitrine, l'apigénine et le kaempférol 3-O-glucoside.

1.4. Activités biologiques

L'extrait hydroalcoolique de fruits de cette espèce a montré un effet antihypertensif qui peut être expliqué en partie par son activité antioxydante et par l'amélioration de la libération endothélium-dépendante du monoxyde d'azote (NO) [252]. En outre, plusieurs études ont montré le potentiel antioxydant et de protection contre le dommage oxydatif des extraits obtenus à partir de différents organes de cette espèce et ont justifié son utilisation comme remède cardioprotecteur et antihypertenseur [253–255]. Selon Shatoor et col. [256],

l'administration de l'azarole à des doses croissantes a entraîné une diminution dose et temps dépendante de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle moyenne ainsi que la suppression du nœud sinusal et du blocage atrio-ventriculaire progressif. Dizaye et col. [257] ont montré des effets inotropes et diurétiques positifs des procyanidines extraits de *C. azarolus* témoignant d'un bon candidat pour le traitement de l'insuffisance cardiaque congestive. L'extrait aqueux d'azarole est doué aussi d'effets antiplaquettaires chez les rats albinos Wistar [258].

Les extraits de feuilles et de fruits ont présenté une forte activité antibactérienne particulièrement contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus faecalis* [240].

L'huile des graines a montré des activités antioxydante et antibactérienne, en particulier contre *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* (HS), *Enterobacter aerogenes* (HS), *Salmonella enterica* (HS), *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Morganella morganii* (HS) [243].

L'espèce s'est avérée douée d'activités anti-inflammatoires et antiprolifératives intéressantes [250]. L'activité anti-inflammatoire de l'azerolier peut être expliquée en partie par sa capacité antioxydante substantielle et par l'inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires concomitante avec un renforcement de la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires [259].

Une activité antiproliférative contre les cellules de mélanome B16F10 de souris a été observée en présence d'un extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de cette plante. Ce dernier a permis la réduction de la teneur en mélanine en inhibant l'activité de la tyrosinase. L'activité antiproliférative a été détectée également en présence de cellules de cancer colorectal humaines (HT-29 et HCT-116) ceci en favorisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de ces cellules cancéreuses [244, 260].

Les extraits des feuilles de l'azérolier exhibent aussi une activité antidiabétique en diminuant l'hyperglycémie, en régulant le profil lipidique (réduction des taux des lipides totaux, triglycérides, cholestérol total, LDL) et en permettant la restauration des îlots de Langerhans [261–263].

2. *Retama raetam* (Forssk.) Webb

2.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

Retama raetam (en Tunisien « *R'tem* ») de la famille des Fabaceae se présente sous forme d'un arbuste pouvant atteindre 3 mètres de hauteur (Figure 37). L'espèce se caractérise par un tronc trapu et court, portant de nombreux rameaux denses, arqués, flexibles et retombants, fortement sillonnés et peu feuillés (Figure 37). Les feuilles, très caduques, sont pour les inférieures trifoliées et les supérieures simples et unifoliées. Les fleurs blanches et unisexuées sont réparties sur de courts racèmes, avec un petit calice bilabié, à lèvres supérieures profondément bidentées avec des pétales à onglets plus ou moins soudés au tube staminal. L'étendard est dressé avec 10 étamines monadelphes (Figure 37 B). Le fruit est une gousse indéhiscente de moins de 2cm (Figure 37 C), acuminée, avec une extrémité aiguë, portant une à deux graines.

Retama raetam pousse spontanément dans des pays d'Afrique du Nord tels que le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye et l'Égypte, et dans certains pays du Moyen-Orient tels que le Liban, la Palestine et la Jordanie [264]. L'espèce est largement répandue dans les zones arides et désertiques [246] [265].



Figure 37 : A. Individu de *Retama raetam* en floraison, B. Fleurs et C. fruits de *Retama raetam* (source Chokri Messaoud).

2.2. Utilisations traditionnelles

R. raetam a une longue histoire d'utilisation par les Berbères du désert et en médecine traditionnelle juive, où elle est utilisée pour le traitement de plusieurs maladies. Les cladodes, les fleurs, les graines et les racines sont utilisés à l'état de poudre (en infusion ou en décoction), pour des usages externes (cataplasme) et pour les bains.

Au Maroc, les cladodes en poudre de *R. raetam*, mélangés avec du miel, sont administrés par voie orale comme émétique. Une décoction de cladodes peut servir aussi à un lavement utilisé comme purgatif et vermifuge. À Tissint, au Maroc, la poudre des cladodes et des fleurs de *R. raetam* est utilisée pour ses propriétés cicatrisantes lors de la circoncision et pour ses propriétés cicatrisantes, antiseptiques et sédatives dans le traitement local des blessures, des

ulcères cutanés et des boutons infectés. À Marrakech, la plante contusée, avec du lait ou du beurre, est destinée aux mêmes indications thérapeutiques. Quant aux décoctions, elles sont appliquées pour soulager les prurits et la gale humaine et animale [266, 267]. Les racines sont utilisées pour les lavements ou comme abortif par fumigation. Une infusion de cladodes et de fleurs est utilisée également comme abortif, mais il est largement reconnu qu'un risque considérable d'empoisonnement existe.

Au Sahara, les racines sont employées pour la diphtérie et les cladodes comme pointes de feu dans les névralgies, telles que la névralgie sciatique.

À Tata, une province marocaine du sud-est, située à la frontière avec l'Algérie, cette plante est couramment utilisée pour le traitement des morsures de scorpion, des maladies de la peau, le rhumatisme et pour la cicatrisation des blessures.

En Algérie, elle est prescrite pour soigner les yeux enflammés, la fièvre, les maux d'estomac, les maux de dos et la diarrhée [268, 269]. Dans la région d'Ouargla, qui comprend l'oasis la plus populaire du Sahara algérien, la décoction ou l'infusion de fruits et de graines de *R. raetam* est utilisée pour le traitement du diabète [270].

Dans la région libyenne, Al-Jabal Al-Akhdar, cette plante est recommandée pour le traitement du diabète et de la sinusite [271].

En Tunisie, elle est valorisée pour des usages externes comme cataplasme ou emplâtre pour la gale, le traitement des boutons purulents, pour les soins en cas de morsure de serpent, dans la lutte contre l'infection des plaies et dans le sud tunisien elle est broyée et mélangée à du lait pour être employé comme fébrifuge [246].

Au Moyen-Orient, une décoction de cladodes et de fleurs de *R. raetam* est utilisée pour traiter la syphilis et l'infertilité féminine [272]. En Israël, la décoction de cladodes est utilisée comme bain pour les douleurs articulaires, les maux de dos et les ecchymoses [273].

En Jordanie, les habitants de la région du Mujib utilisent *R. raetam* en cataplasme pour soigner les fractures et les brûlures principalement chez les animaux. Pour les brûlures, ils utilisent également des décoctions de cladodes. Au Liban, cette plante est utilisée pour les douleurs articulaires [274].

En Palestine, elle est prescrite pour l'inflammation des yeux, l'irritation de la gorge, le rhumatisme, la stérilité, la paralysie et les maux de l'estomac [275].

Au Yémen, les utilisations de cette plante en médecine traditionnelle ont été introduites par l'Israël et les juifs yéménites ; ces populations utilisent une infusion de cette plante comme remède pour l'hépatite et la jaunisse [276].

2.3. Phytochimie

Des auteurs ont rapporté la présence d'acides phénoliques et d'isoflavones telles que la génistéine, la génistine, la daidzine, la daidzéine, la biochanine A, la 6'-méthoxypseudobaptégénine et la puerarine au sein de cette plante [272].

Dans ce même contexte, Nur-e-Alam et ses collaborateurs [265], en réalisant un fractionnement et une purification chromatographiques, ont isolé trois nouveaux dérivés de flavones prénylés nommés rétamazine C – E, et quatre nouveaux dérivés d'isoflavones prénylés, appelés rétamazine F – I. L'équipe d'Edziri [277] a aussi noté la présence d'isoflavones prénylés, telle que la licoflavone C.

Deux furanoisoflavones ont été également isolés des cladodes de *R. raetam* : il s'agit de la derrone et la 5"-hydroxyl-derrone [278]. Cette espèce peut contenir également des terpénoïdes. En effet des chercheurs ont rapporté la présence de monoterpènes comme le β -linalol, le nonanal, et l' α -humulène comme composés majoritaires de l'huile essentielle des fleurs de *R. raetam* [279]. D'autres chercheurs ont identifié des stéroïdes comme le β -sitostérol et le phytostérol [280].

Cette plante peut aussi contenir des alcaloïdes, en effet A-El-Shazly et ses collaborateurs [281] ont décrit la présence, grâce à la chromatographie gaz/liquide couplé à la spectrométrie de masse (GLC-MS), de 31 alcaloïdes bipipéridiniques, dont l'ammodendrine, et quinolizidiniques, dont la rétamine, dans différentes parties de la plante (cladodes, racines, fruits et graines). Le profil alcaloïdique de cette espèce est typique du genre *Retama* qui se caractérise par la présence de rétamine qui est assez rare chez les autres Fabacées [246]. Les alcaloïdes tétracycliques quinolizidiniques (spartéine, lupanine et rétamine) représentent les composés majoritaires des racines et des cladodes.

Les alcaloïdes α -pyridoniques, tels que la cytisine, la méthylcytisine et l'anagryne, dérivés de l'alcaloïde tétracyclique, la lupanine, ont été détectés à des concentrations élevées dans les fleurs et les graines [272].

2.4. Activités biologiques

Plusieurs études ont montré que cette espèce est douée d'activités antibactériennes et antifongiques [282–284]. En effet, les parties aériennes de *R. raetam* possèdent une activité intéressante contre les bactéries Gram-positives dont *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, et les *staphylococcus aureus* résistants ou sensibles à la pénicilline. Cette activité a été corrélée à la concentration élevée de l'extrait en composés phénoliques et en particulier en flavonoïdes. D'autre part l'extrait éthylénique des fleurs de cette plante, caractérisé par sa richesse en tanins est capable d'inhiber l'effet cytopathogène de la souche du cytomégalovirus humain (HCMV) [283]. La licoflavone C et la derrone isolées des fleurs, ont montré une activité antibactérienne intéressante contre *E.Coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et une activité antifongique importante contre des espèces de *Candida* [277]. L'huile essentielle des fleurs de *R.raetam* peut avoir aussi une activité significative contre les agents pathogènes responsables des infections de la peau et des tissus mous, dus à *staphylococcus pyogenes* [285].

D'autre part, il a été constaté que cette plante peut avoir des activités chimio-protective et antioxydante [286, 287]. D'autres auteurs [288] ont remarqué que l'administration de l'extrait des gaines de *R. raetam* répare les troubles hépatiques et rénaux et rétablit les paramètres du sang aux valeurs normales, cet extrait augmente également les taux sanguins des enzymes antioxydantes (la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx) et diminue la peroxydation lipidique (malondialdéhyde (MDA) dans le sang). L'administration de ce même extrait peut aussi réduire significativement la zone de l'ulcère.

R. raetam est caractérisée aussi par des activités anti-inflammatoire et analgésique. En effet, Miguel et col. [289] ont montré que l'extrait de *R. raetam* inhibe significativement la lipoxigénase et que l'activité anti-inflammatoire observée est corrélée avec la capacité de piégeage des radicaux libres. L'effet anti-inflammatoire des extraits de *R. raetam* peut être attribué à la présence des isoflavones, incluant la génistéine, la 6-hydroxygénistéine, la 3'-O-méthylroborol, la pratenséine et la biochanine.

En outre, les extraits aqueux de feuilles de *R. raetam* peuvent présenter des effets antihypertenseurs et diurétiques sur les rats hypertendus, en augmentant l'excrétion de sodium, de potassium et de chlorure, ainsi qu'en améliorant le taux de filtration glomérulaire. D'autre part, l'action diurétique a été également observée chez des rats normaux à la suite d'une

administration intraveineuse des mêmes extraits et une augmentation de la fréquence glomérulaire a été aussi détectée, mais dans ce cas, une diminution significative de l'osmolalité urinaire a été remarquée [272]. Les auteurs suggèrent que les métabolites de *R. raetam* pourraient agir comme inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, d'où la réduction de l'hypertension [272].

R. raetam possède aussi une activité hypoglycémiant. Un extrait aqueux de feuilles de *R. raetam* a pu réduire la glycémie selon un mécanisme extra-pancréatique puisque les taux d'insuline dans le sang n'ont pas changé. Il est suggéré que l'extrait inhibe la réabsorption rénale du glucose [290]. Les mêmes résultats ont été obtenus par l'administration intraveineuse d'une décoction de la plante entière. Il est à noter aussi que cette espèce est riche en pinitol [291] qui possède des propriétés analogues à celles de l'insuline. De plus, récemment, Nur-e-Alam et son équipe [265] ont montré que les rétamazines C, E, F, G, et l'érysubine A avaient une forte stimulation de la libération de l'insuline induite par le glucose dans les îlots pancréatiques. Une étude suivante a rajouté que les rétamazines C, F, G et les érysubine A et B ont présenté, non seulement une activité intéressante sur la stimulation de la sécrétion de l'insuline des cellules des îlots de Langerhans, mais aussi une forte inhibition de l' α -glucosidase [264]. En outre, un extrait aqueux de cette plante, administré par voie orale a permis l'abaissement de la concentration des lipides (cholestérol et triglycérides) ainsi que du poids corporel chez des rats normaux souffrant d'hyperglycémies sévères [292]. L'effet antidiabétique de cette espèce peut être attribué aux alcaloïdes quinolizidiniques comme la méthylcytisine, la lupanine, la spartéine et aux flavonoïdes comme la chryisine et majoritairement la quercétine [293].

Cette plante détient aussi des effets sur le système nerveux. En effet, l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *R. raetam* a une activité dose-dépendante sur les mouvements ambulatoires et non-ambulatoires. En fonction de la dose, l'extrait est anxiolytique à faibles doses, sans effet à doses modérées et anxiogénique à fortes doses. Cette réponse similaire à celle déclenchée par la nicotine indique que les alcaloïdes *R.raetam* sont les métabolites responsables de l'effet de l'extrait sur le système nerveux central. [294].

Cette espèce peut également avoir un effet sur le métabolisme osseux. Il a été constaté que l'extrait des graines de *R. raetam* possède une efficacité dans la protection et le traitement de l'ostéoporose. Plus particulièrement dans cet extrait, la génistéine aide à maintenir la masse

osseuse, prévient l'ostéoporose chez des rattes ménopausées ainsi que la perte osseuse *in vivo* et *in vitro* et augmente la masse osseuse du fémur chez les rats femelles ovariectomisées. Dans une culture d'os cortical de rats femelles, la génistéine et la daidzéine de cette plante ont induit une augmentation des teneurs de calcium et de phosphore et de l'activité de la phosphatase alcaline dans les tissus osseux [295]. Ainsi cette plante peut être utile dans la prévention de perte osseuse chez les femmes ménopausées [272].

R. raetam est aussi connu pour son effet hépatoprotectif. Des auteurs [296] ont constaté qu'un extrait aqueux de graines de *R. raetam* a agi comme agent hépatoprotecteur. Cet extrait a pu également réparer l'augmentation des taux sériques pathologiques d'aspartate et alanine aminotransférases et des phosphatases alcalines. Koriem et son équipe [297] ont trouvé des résultats similaires dans un modèle expérimental de toxicités hépatique, rénale et sanguine induites par la formaline, agent dont les effets, chez l'Homme, sont similaires à ceux de divers polluants.

R. raetam est une espèce douée de plusieurs activités biologiques, mais plusieurs effets toxiques de cette plante ont été rapportés comme l'insuffisance respiratoire et la dépression du système nerveux central [298]. L'administration répétée, à des doses élevées, de l'extrait méthanolique de *R. raetam* pourrait avoir aussi des effets hépatotoxiques, néphrotoxiques et mutagènes [299]. Certains flavonoïdes ont été signalés comme responsables de l'intoxication du bétail par l'ingestion de cette plante [300] et le décès d'une femme à la suite de l'ingestion d'un infusé a été rapporté [246].

3. *Myrtus communis* L.

3.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

Le *Myrtus communis* (en France appelé myrte commun et en Tunisie « *rihan* ») de la famille des Myrtaceae, se présente sous forme d'un arbuste pouvant atteindre 5 mètres de hauteur. La tige principale et les ramifications portent des feuilles brièvement pétiolées, persistantes, vertes et luisantes sur leur face supérieure (Figure 38). Ces feuilles, quand elles sont froissées, émettent une odeur aromatique. Les fleurs, actinomorphes et hermaphrodites, sont solitaires et longuement pédonculées (Figure 38 B). Le calice, pentamère, est formé de cinq sépales ovales et soudés dans leur partie basale. La corolle, dialypétale, est constituée de

5 à 12 pétales blancs (Figure 38 B). Les étamines sont libres et nombreuses. Leurs filets portent des anthères biloculaires introrses. Le gynécée est représenté par un ovaire infère de 2 à 3 carpelles soudés. L'ovaire se termine par un style effilé à un seul stigmate. Le fruit est une baie comestible, de taille et de forme variables, surmontée par les dents du calice et renfermant de nombreuses graines (2 à 20). Il est habituellement de couleur bleu-foncée mais peut être jaune (Figure 38 C et D).

Le Myrte pousse à l'état sauvage tout autour du bassin méditerranéen et au moyen orient, [301]. Il prospère dans les climats doux et préfère les sols sableux. En Tunisie, il fait partie du cortège floristique de la forêt de chêne liège qui constituait un continuum couvrant le Nord-Ouest, le Cap Bon et la Dorsale [302].

3.2. Utilisations traditionnelles

Le Myrte est largement utilisé en médecine traditionnelle mais il est aussi très demandé par les industries pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique pour les effets de ses huiles essentielles.

Les fleurs sont employées en poudre mélangées à quelques autres herbes aromatiques pour préparer des lotions capillaires. Pour le Maghreb en particulier, de nombreux emplois sont notés : La décoction de fleurs s'emploie contre les troubles de la circulation sanguine ; l'infusion de la plante entière est antidiarrhéique ; la macération dans l'eau sucrée ou miellée des baies est utilisée contre la variole ; la fumigation de feuilles est réputée contre les douleurs. La teinture de feuilles et l'extrait liquide sont utilisés dans les soins contre les leucorrhées, les affections pulmonaires et les hémorroïdes. Ces feuilles astringentes peuvent être également utilisées pour traiter les maladies de la peau et les huiles essentielles, extraites à partir des feuilles, sont très exploitées dans la lutte contre l'hyperglycémie [302].

Les fruits du myrte également astringents et aromatiques produisent une huile stimulante et raffermissante. L'essence est aussi utilisée en parfumerie [246]. En Italie, la macération des fruits produit une liqueur nommée "*Mirto Rosso*" [302].



Figure 38: A. *Myrtus communis*, B. Tiges portant des fleurs solitaires, C. des fruits noir-bleuté ou D. des fruits jaunes (source Chokri Messaoud).

3.3. Phytochimie

L'huile essentielle de cette plante a été largement étudiée et sa composition est assez variable selon la région géographique de production, la saison de récolte et la durée de la distillation. Cependant, dans la plupart des régions, les terpénoïdes (1,8-cinéole, α -pinène, acétate de myrtényle, limonène, linalol, α -terpinolène) sont les principaux constituants de l'huile essentielle provenant des feuilles. L'eucalyptol est également signalé comme le principal constituant de l'huile essentielle de feuille de myrte cultivée dans le nord de Chypre.

Les feuilles contiennent également des flavonoïdes (tels que la quercétine, la catéchine et les dérivés de la myricétine), des coumarines, des ellagitannins, des acylphloroglucinols (tels que les myrtucommulones A et B et la semimyrtucommulone) ainsi que des acides-phénols (tels que les acides caféique, gallique et ellagique). L'huile volatile des baies de myrte contient de grandes quantités d'hydrocarbures monoterpéniques et des monoterpènes oxygénés avec l' α -

pinène, le 1,8-cinéole, l'acétate de géranyle et le linoléol comme principaux composés. Les extraits des baies blanches et bleues du myrte tunisien présentent également des pourcentages élevés d' α -terpinéol, de méthyleugénol, de géraniol et d'acétate de pyrényle. La composition polyphénolique des baies était caractérisée par des concentrations élevées de glycosides de flavonols et de flavanols. Les principaux acides gras des baies signalés sont les acides linoléique, palmitique, oléique et stéarique. Les baies contiennent également des tanins, des anthocyanes, du kaempférol, de la quercétine, de la myricétine 3-*O*-glucoside, de la myricétine 3, 3-di-*O*-galactoside et les acides citrique, malique et caféique [303].

3.4. Activités biologiques

Selon les données des études *in vitro* et *in vivo*, le myrte détient plusieurs activités biologiques. Parmi ces activités nous pouvons citer : les effets anti-inflammatoire, analgésique, antioxydant, neuroprotecteur, antimutagène et antidiabétique [303]. Il a été noté également que cette plante participe à l'amélioration de l'efficacité du rétinol dans les produits anti-âges.

Les feuilles de *M. communis* peuvent induire la mort cellulaire de différentes lignées cellulaires cancéreuses par induction de l'apoptose [303].

D'autres activités biologiques ont été constatées tels que des effets antimicrobiens (antibactérien, antifongique et antiviral), antiparasitaires (anti-paludisme, anti-leishmanial, antiprotozoaire) et insecticide [303].

D'autres auteurs ont rapporté l'implication de cette espèce dans le traitement des troubles gastro-intestinaux (traitement des ulcères gastro-duodénaux et de l'hépatite ischémique) [303].

En outre Shariati et son équipe [304] ont montré que les feuilles de *M. communis* peuvent provoquer des modifications de la concentration sérique de la TSH et des hormones thyroïdiennes et que cette plante peut être utilisée pour le traitement de l'impuissance.

D'autres études ont prouvé l'implication de *M. communis* dans le traitement des affections cardiovasculaires et dermatologiques (traitement des brûlures et des lésions d'acné) [303]. Nous pouvons aussi ajouter que l'administration intraveineuse d'extraits, obtenus avec du méthanol et de l'acétate d'éthyle, a pu diminuer la pression artérielle moyenne chez les rats anesthésiés [305].

4. *Rhus tripartita* (Ucria) Grande

4.1. Caractéristiques botaniques et particularités morphologiques

L'espèce *Rhus tripartita* (nommée sumac en France et « jedari » en Tunisie) de la famille des Anacardiaceae, est un arbuste pérenne pouvant atteindre 2 m de haut [306]. Les branches, courtes et épineuses, sont de couleur brun rougeâtre. Les feuilles sont caduques, alternes et composées de trois (rarement cinq) folioles de couleur vert foncé et à bords dentés (Figure 39 A). *Rhus tripartita* est une plante dioïque avec de petites grappes de fleurs blanches jaunâtres. Le fruit, de forme sphérique et de couleur rouge à noire, est une petite drupe avec une seule graine (Figure 39 B).



Figure 39 : A. Feuilles et B. Fruits de *Rhus tripartita* (source Chokri Messaoud).

Rhus tripartita est très abondante en Afrique du Nord, en particulier dans les steppes des zones désertiques, arides et semi-arides. Il existe également en Sicile et dans les steppes asiatiques occidentales [307]. En Tunisie, cette espèce est répandue du centre vers les régions du sud. Elle pousse principalement sur des substrats érodés, sous des précipitations allant de 100 à 600 mm/an et à des altitudes allant de 10 à 500 m [308].

4.2. Utilisations traditionnelles

Rhus tripartita est largement utilisée en médecine traditionnelle tunisienne. Cette espèce est utilisée principalement dans le traitement de la diarrhée et de la dysenterie [309]. L'écorce des racines est la partie de la plante la plus valorisée. La décoction de cette dernière est proposée contre les ulcères gastriques. En Tunisie, l'utilisation des drupes a été signalée pour l'aromatisation de l'eau [310]. Dans les régions d'Ouargla et en Ahaggar (Algérie), les fruits sont consommés crus ou secs (état dans lequel ils sont plus sucrés) ou trempés dans le lait aigre [246]. Dans la pharmacopée traditionnelle, cette espèce en décoction bouillie, est préconisée contre les coliques.

Dans le sud Tunisien (région d'El Hamma), la poudre de l'écorce de la racine est employée pour teindre le cuir en marron clair. Cette partie de plante est utilisée aussi pour teindre la laine et la soie auxquelles elle donne des teintes beiges et brunes très résistantes en particulier au lavage et au frottement.

En Libye, le bois est très apprécié comme bois de chauffage, pour faire du charbon et pour la fabrication de la poudre pyrique dans la région des Beni-Ulid [246].

4.3. Phytochimie

Les parties aériennes de *R. tripartita* (feuilles, tiges et fruits) sont riches en biflavonoïdes (exp. masazino-flavanone) et en isobiflavonoïdes (exp. Calodénone) [311]. Tlili et ses collaborateurs [312] ont montré que les flavones et l'acide bétulinique étaient les principaux composés détectés dans les fruits de *R. tripartita*. Les études phytochimiques de l'extrait d'écorces de racines de *R. tripartita* ont révélé la présence d'une grande quantité de contenu phénolique ainsi que des teneurs importantes de flavonoïdes et de tanins [310].

Une enquête phytochimique sur l'extrait alcoolique de *R. tripartita* a permis d'isoler la gallocatéchine, la quercétine, la myricétine, le kampférol-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, le kampférol-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside et le β -sitostéryl-3-*O*- β -glucopyranoside [313]. L'équipe de Shahat [314] a identifié dans les tiges de *R. tripartita* la gallocatéchine, la taxifoline, la myricétine-3-*O*- β -glucoside, l'épicatéchine et la catéchine.

4.4. Activités biologiques

Les composés phénoliques de *R. tripartita* ont démontré des propriétés antimicrobiennes [309]. Des activités anti-inflammatoire, antioxydante, antihépatotoxique, anti-néphrotoxique, anti-diarrhéique et antifongique ont été de même décrites chez cette plante [315]. Un effet protecteur contre l'ulcère gastrique et la diminution de la cardiotoxicité et du stress oxydatif ont été rapporté en présence de cette plante [315]. De plus, *Rhus tripartita* offre de grands intérêts économiques et écologiques. Elle améliore la stabilité des écosystèmes où elle se trouve, contribue à réduire les risques de désertification et aide à restaurer les écosystèmes dégradés. Cet arbuste est également une ressource alimentaire pour le bétail surtout pendant l'été [316]. Cette espèce peut avoir, en plus, des activités anticancérogène et antithrombotique [317] ainsi que des activités inhibitrices des cyclooxygénases et de l'acétylcholinestérase [314].

5. *Rubus ulmifolius* shott.

5.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

Rubus ulmifolius est une ronce à feuilles d'Orme. Il s'agit d'un arbrisseau épineux sarmenteux vivace, appartenant à la famille des rosacées. C'est une plante à tige arquée, coudée, de 6 à 10 mm de diamètre, à poils simples et touffus [318]. La seule partie pérenne de la plante est son système racinaire qui comprend une couronne boisée, une racine principale verticale et de nombreuses racines secondaires. Les feuilles sont de 3 à 7 folioles dentées et ont une forme elliptique à ovale. Ces feuilles sont discolores [319]. Les fleurs, hermaphrodites et pourvues de 5 pétales, 5 sépales et plusieurs étamines, sont de couleur rose plus ou moins vif exceptionnellement blanche (Figure 40 A). Les sépales sont ovoïdes et tomenteux. Les pétales sont à poils épars sur la marge. La base des pistils est rouge. Les anthères et les carpelles sont généralement poilus. Les fruits sont constitués de nombreuses petites drupes (mûres) d'abord rouges puis noires pourprées à maturité (Figure 40 B). Chaque drupe est disposée sur un réceptacle et ne contient qu'une seule graine.



Figure 40 : A. Fleurs et B. Fruits de *Rubus ulmifolius* (source Chokri Messaoud).

Rubus ulmifolius est largement répandu en Europe, en Asie et en Afrique du Nord. En Tunisie, l'espèce se cantonne essentiellement dans les zones bioclimatiques allant du subhumide à l'humide. C'est une espèce vivace qui pousse dans les sols secs ou sableux [319].

5.2. Utilisations traditionnelles

Largement reconnue comme plante sauvage comestible pour ses baies, *Rubus ulmifolius* est très utilisée en médecine traditionnelle pour ses effets bénéfiques. Elle est employée contre la diarrhée, les maux de gorge et en tant qu'agent antibactérien et antiviral. Les feuilles fraîches sont utilisées dans la médecine traditionnelle italienne contre les abcès, les furoncles et les ulcères ; les décoctions de feuilles sont utilisées en externe pour les yeux rouges, les lavages vaginaux et les aphtes et en interne contre les diarrhées, les hémorroïdes et les inflammations intestinales. Les feuilles et les jeunes pousses sont utilisées en médecine populaire aussi pour leur effet spasmolytique [320]. En Italie, les feuilles fraîches sont appliquées localement avec de la graisse de porc dans le traitement des infections de la peau et des tissus mous et une décoction des racines est utilisée comme shampooing pour éviter la perte de cheveux [321]. Le fruit de cette espèce se consomme cru ou en sirop épais, où il est mêlé au miel [246]. Les fruits peuvent aussi être consommés comme produits dérivés (confitures, jus de fruits, liqueur, marmelade et compléments alimentaires) pour leur saveur et leur goût délicieux. Leur ingestion contribue à une alimentation saine pour prévenir certaines maladies telles que les maladies

cardiovasculaires et le diabète [320]. Les décoctions des boutons floraux sont utilisées pour les douleurs menstruelles, les troubles de la ménopause, les maladies du foie, les aphtes, la gingivite et l'hypertension [322].

5.3. Phytochimie

Les boutons floraux de *R. ulmifolius* sont caractérisés par la présence de composés phénoliques et les dérivés d'ellagitanins sont les plus abondants dans cette partie de plante [322]. Les fruits sont riches en composés phénoliques également, tels que les anthocyanes, les flavonols et les ellagitanins [323]. Ces fruits contiennent des niveaux élevés de flavonoïdes [324]. Dans les feuilles de *R. ulmifolius*, l'acide gallique, l'acide chlorogénique, l'hyperoside, le kaempférol 3-*O*-rutinoside et la naringénine [325] ont été identifiés. Les racines de cette plante contiennent des dérivés de l'acide ellagique et des saponines [321]. Flamini et son équipe [324] ont isolé, des parties aériennes de *R. ulmifolius*, trois nouveaux anthrones, les rubanthrone A, B et C. À partir de la fraction volatile des fleurs et des fruits de *R. ulmifolius*, Reidel et ses collaborateurs [319] ont repéré les composés suivants : l' α -copaène, le β -caryophyllène, le germacrène D, le (E, E)- α -farnésène, le 1,7-octadièn-3-one, le 2-méthyl -6-méthylène, le tridécane, le (E)-2-acétate d'hexénol, le (E)-3-acétate d'hexénol et le cyperène.

5.4. Activités biologiques

Les activités biologiques que nous avons pu répertorier concernant *R. ulmifolius* sont les activités antimicrobienne (contre les souches d'*Helicobacter pylori*) et antifongique *in vitro* d'extraits et de constituants isolés [323, 326, 327]. En effet, les dérivés d'acide ellagique de *R. ulmifolius* inhibent la formation de biofilm de *Staphylococcus aureus* et améliorent la réponse aux antibiotiques [321]. *R. ulmifolius* peut aussi détruire les cellules planctoniques de *Streptococcus pneumoniae* et les biofilms pneumococques [328]. Les feuilles et les baies sont connues par leurs propriétés antioxydantes [326, 329]. De surcroît, les effets anthelminthiques de *R. ulmifolius* contre *Haemonchus contortus* ont été décrits par Akkari et coll. [330]. Les extraits phénoliques de fleurs ont été reconnues comme sources de nutraceutiques par la communauté scientifique [322]. Cette espèce est reconnue aussi pour son effet antipyrétique [327]. À côté de cela, les feuilles ont montré des propriétés anti-inflammatoires [331]. D'autres

part, *R. ulmifolius* possède des activités antihyperglycémiques et antihyperlipidémiques sur des souris albinos [332].

6. *Hertia cheirifolia* (L.) Kuntze

6.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

L'espèce *Hertia cheirifolia* (en France appelée Othonne à feuilles de giroflée et en Tunisie « *Kherchoun* ») est une espèce de la famille des Asteraceae anciennement appelée *Othonna cheirifolia* L. C'est un sous-arbrisseau à souche semi-ligneuse poussant en grosses touffes (Figure 41 A). Les tiges, plagiotropes puis ascendantes, sont très feuillées et de 20 à 40 cm de long. Les feuilles, disposées sur la tige selon une phyllotaxie alterne, sont persistantes et simples. Elles sont épaisses, charnues, oblongues (spatulées) et acuminées. Les fleurs sont réunies en capitules (inflorescence) hermaphrodites, de 2 à 3 cm de diamètre, de couleur jaune citron et solitaires sur des pédoncules nus élargis au sommet (Figure 41 B). Les fleurs femelles sont périphériques. La corolle est limitée à une ligule (fleur ligulée), le calice est réduit à une aigrette de poils (pappus). L'ovaire est infère portant deux carpelles soudés. Les fleurs mâles, occupant le centre de l'inflorescence, sont tubulées avec 5 pétales soudés. Les étamines sont soudées par leurs anthères introrses. Les fruits sont des akènes (fruits secs indéhiscent) surmontés d'aigrettes de soies appelées pappus (Figure 41 C).



Figure 41 : A. *Hertia cheirifolia* ; B. inflorescences et C. fruits (source Chokri Messaoud).

Hertia cheirifolia est une espèce endémique Tuniso-algérienne. En Tunisie, l'espèce se développe essentiellement sur les pâturages argileux et les pentes pierreuses. Elle se cantonne sur les sols pauvres bien drainés avec une préférence aux sols calcaires. Elle est actuellement plus ou moins répandue dans le centre du pays (Sousse, Sidi Bouali, Seliana, Kessra) et certaines régions de la dorsale (Kasserine, Sbeïtla, Thala) [333].

6.2. Utilisations traditionnelles

En Tunisie, les personnes âgées utilisent la partie végétative (tiges et feuilles) de cette plante pour réduire l'hyperglycémie. De plus, la pulpe des feuilles écrasées est utilisée contre les douleurs rhumatismales et l'arthrite du genou [334].

En médecine traditionnelle algérienne, elle est employée comme anti-inflammatoire et antispasmodique. Les infusés des feuilles de cette plante sont utilisés pour traiter les crampes, les douleurs de l'estomac et de l'intestin ainsi que certaines maladies gastro-intestinales telles que la dyspepsie, la diarrhée et pour traiter certaines infections [335].

6.3. Phytochimie

Dans cette espèce, des saponines, des polyphénols, des flavonoïdes et des triterpènes peuvent être retrouvés. Les principaux composés phénoliques identifiés dans un extrait d'acétate d'éthyle de racines de *H. cheirifolia* étaient l'acide trans-cinnamique, l'acide férulique, la rutine, la myricétine, la naringine, la naringénine, la quercétine et l'acide paracoumarique [336]. Des études chimiques antérieures ont révélé aussi que la partie aérienne de cette espèce est riche en érémosphénolides [337, 338].

L'étude réalisée sur les huiles essentielles extraites des feuilles de *H. cheirifolia* au stade végétatif a montré que cette dernière est caractérisée par une forte teneur en terpènes [339]. Principalement, un sesquiterpénoïde (bakkenolide) et deux stéroïdes (stigmastérol et stigmastérol 3 β -glucoside) ont été isolés de *H. cheirifolia* [340].

6.4. Activités biologiques

Les huiles essentielles de la partie aérienne de *H. cheirifolia* peuvent fournir une activité acaricide significative [341]. Ces huiles essentielles peuvent avoir aussi des activités antioxydante, inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE), de l' α -amylase [333] et de l' α -glucosidase [342]. Cette dernière activité a été observée aussi avec les fleurs de la plante [343].

L'extrait au chloroforme de la partie aérienne de cette espèce a montré un effet spasmolytique et anti-inflammatoire significatif [340].

Les racines de *H. cheirifolia* ont démontré des activités anti-inflammatoire et gastroprotectrice (Majouli, Hamdi, et al. 2018).

Kada et ses collaborateurs [335] ont prouvé une activité protectrice des extraits de *H. cheirifolia* contre les dommages de l'ADN, la peroxydation lipidique et l'oxydation des protéines.

7. *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut.

7.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

L'espèce *Thymus algeriensis* (nommée Thym en France et « *Zaater* » en Tunisie) de la famille des lamiacées, est un sous-arbrisseau ascendant de 15 à 50 cm de hauteur, formant souvent des coussinets (Figure 42). Les rameaux sont serrés, grêles, plus ou moins dressés et velus. Les feuilles sont petites (6 à 12 mm de longueur), plus ou moins lancéolées, et étroites. Elles sont insérées selon une phyllotaxie opposée décussée. Elles sont luisantes, obtuses, de couleur verte au-dessus et gris-vert sur la face inférieure.

Les fleurs (10 mm de longueur) sont disposées en glomérules terminales ou axillaires. Elles sont de couleur rose clair, rose foncé ou blanches (Figure 42 B). Le calice est triangulaire, ovoïde et velu. Il présente cinq dents, comprimées latéralement, convergentes et dont les trois supérieures sont larges. La corolle, révolutée et égalant deux fois le calice, est bilobée et présente deux lèvres. La lèvre supérieure est courte et échancrée alors que la lèvre inférieure est divisée en trois lobes inégaux. L'androcée est constitué de quatre étamines, plus au moins didynames, généralement extrorses. Le fruit est un tétrakène. Les akènes (nucules) sont glabres, de forme ovale et de couleur brune. Leur taille ne dépasse pas 2 mm.



Figure 42 : A. *Thymus algeriensis* et B. rameaux feuillés portant des inflorescences (source Chokri Messaoud).

Thymus algeriensis une espèce endémique de l'Algérie, de la Tunisie, de la Lybie et du Maroc [344]. En Tunisie, les populations de cette espèce sont réparties dans les zones

bioclimatiques allant du subhumide à l'aride inférieur. L'espèce pousse sur des sols pauvres en calcaires et fertiles et se produit dans de petites populations dispersées, montrant différents niveaux de destruction, principalement en raison de la surexploitation et du surpâturage [345].

7.2. Utilisations traditionnelles

Dans le sud tunisien, le thym est considéré stomachique [246]. Il est utilisé frais ou séché comme herbe culinaire et en médecine populaire pour ses propriétés antiseptique, antispasmodique et antifongique. Les huiles essentielles de cette espèce sont demandées en parfumerie, en cosmétique et en pharmacie [346]. Cette espèce est consommée pour parfumer certains mets et infusions. Le thym produit aussi une essence [246]. En médecine traditionnelle tunisienne, il est utilisé également en décoction, dans les traitements de l'hypertension artérielle [345].

En Algérie, le *Thymus algeriensis* est considéré comme antispasmodique et stimulant. Les sommâtes et les jeunes rameaux fleuris se préparent en infusion. Ces tisanes réveillent les fonctions digestives surtout chez les affaiblis et évitent les fermentations de l'estomac et de l'intestin. L'infusion est aussi utile contre toutes les maladies infectieuses, comme la grippe, la pneumonie et les affections de l'appareil respiratoire comme le rhume, et l'angine. L'huile essentielle est utilisée également contre la coqueluche.

La plante est employée aussi dans les cas de névralgie et de sciatique et comme odontalgique sur les maux de dents cariées [347].

Nous avons noté aussi l'utilisation de cette plante pour traiter l'adénome de la prostate et pour empêcher l'avortement [344].

7.3. Phytochimie

Les dérivés de flavonol et de flavone glycoside et les acides phénoliques sont les principaux composés des extraits de *T. algeriensis* [348]. L'acide rosmarinique est le principal composé phénolique de cette plante [349].

Au sein de cette espèce, les auteurs ont décrit la présence de l'apigénine-6,8-*C*-dihexoside, l'isomère d'érythictiol-*O*-hexoside, l'apigénine-8-*C*-glucoside, le quercétine-3-*O*-glucuronide, la naringénine-*O*-hexoside, l'hexoside d'acide rosmarinique, la lutéoline-7-*O*-glucuronide, la quercétine-3-*O*-glucoside, la quercétine-*O*-malonyhexoside, l'acide

salvianolique, l'apigénine-7-*O*-glucuronide, le kaempférol-*O*-glucuronide, l'isomère I de l'acide lithospermique A et l'isomère II de l'acide lithospermique A [348].

La distillation des tiges fraîches donne une essence riche en thymol [246]. L'huile essentielle obtenue à partir de la partie aérienne de cette plante est caractérisée par la présence du terpinèn-4-ol, du 1,8-cinéole et du camphre [350].

7.4. Activités biologiques

Les activités les plus décrites de cette plante, que ce soit à partir des extraits organiques ou des huiles essentielles, sont les activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques [349, 351–354]. Ces activités sont corrélées avec la quantité élevée de composés phénoliques [348].

L'extrait méthanolique des feuilles de *T. algeriensis* a montré des activités anti-inflammatoires, antalgique et antipyrétiques *in vivo* [344]. Les extraits méthanoliques de *T. algeriensis* se sont révélés également posséder une activité anti-acétylcholinestérase intéressante [349].

En outre, des activités anticancéreuses contre des lignées cellulaires cancéreuses humaines ont été observées en présence de l'huile essentielle de cette plante [353].

8. *Artemisia campestris* L.

8.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

Artemisia campestris (appelée armoise rouge ou armoise champêtre en France et « *Tgouft* » en Tunisie) de la famille des Asteraceae, est un arbuste à tige ligneuse à la base, striée, rameuse et robuste d'une hauteur de 30 à 80 cm (Figure 43).

Les feuilles jeunes sont de couleur vert clair et soyeuses, les feuilles adultes sont souvent glabrescentes de couleur vert foncé, les inférieures dipennatiséquées, les supérieures pennatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, à segments formant des lanières très étroites et mucronulées.

Cette plante possède une grande panicule avec des feuilles linéaires entières, groupant des capitules très petits, étroits d'environ 2 mm de taille, ovoïdes ou coniques, sessiles ou

subsessiles, dressés ou pendants. Son involucre est glabre et scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurons centraux stériles de couleur jaunâtre bordée de rouge (Figure 43) et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre, à bractées externes plus courtes que les internes vertes avec une marge scarieuse blanche large. Les fruits sont des akènes de forme ovoïde.



Figure 43 : A. *Artemisia campestris* ; B. Inflorescences (source Chokri Messaoud).

Le genre *Artemisia* présente une large répartition géographique et s'étend principalement dans les régions tempérées aux moyennes et hautes latitudes de l'hémisphère nord, peu d'espèces colonisent l'hémisphère sud [355]. Le genre est très répandu en Asie centrale et présente une répartition moindre en région méditerranéenne et au nord-ouest d'Amérique [355, 356].

8.2. Utilisations traditionnelles

L'armoise champêtre est souvent proposée contre diverses affections dont plus particulièrement les diarrhées. On rapporte l'utilisation des graines de cette plante en infusion ou en ingestion contre les diarrhées et les dysenteries. Cette plante en infusion est à la fois un calmant (estomac et dents) et un tonique [246]. En Tunisie, l'espèce s'avère encore très employée, du moins par les populations nomades, pour combattre les effets des morsures de serpents. Cette utilisation est liée à une observation couramment rapportée, selon laquelle, lors de la lutte qui souvent l'oppose au serpent, le varan se protège en mordillant de l'armoise champêtre. Cette protection contre les effets des morsures de serpents et des piqûres de scorpions s'effectue, dans ces populations, soit en utilisant des emplâtres soit en faisant consommer à l'accidenté un décocté ou encore en lui faisant mâcher quelques feuilles de la

plante [246]. Les cataplasmes à partir de cette espèce peuvent soulager les rhumatismes. L'infusion est aussi consommée pour lutter contre la toux ou pour faire baisser la fièvre. Quelques feuilles mâchées sont appliquées sur une petite coupure pour favoriser la cicatrisation. Le macérat de l'armoise champêtre dans l'huile est utilisé comme onguent pour les frictions. Une pommade à base de cette même espèce est également employée contre les boutons et les maux d'oreilles.

On rapporte aussi l'emploi d'*A. campestris* en décoction sucrée, en infusion ou en saupoudrage sur les mets pour lutter contre les coliques, la dysménorrhée et les affections génito-urinaires [246].

On signale en plus que la consommation d'*A. campestris* est recommandée pour la circulation sanguine de la femme enceinte ou venant d'accoucher et pour cette raison, l'espèce est nommée « *oum nefsa* » en Tunisien. Les feuilles, très amères, peuvent être consommées en poudre dans les sauces ou les aliments bouillis. Dans la région d'El Hamma de Gabes en Tunisie, on a relevé la mastication de cette plante pour vivifier les gencives.

Le seul effet nocif signalé est que les pousses vertes de l'*A. campestris* consommées en abondance occasionnent une gastroentérite [246].

En plus de ces usages dans la pharmacopée traditionnelle, la littérature fait état d'emplois divers. Cette espèce est utilisée comme bois de chauffage et pour la confection de balais (Nefzaoua-Tunisie). Le « *dgoft* » sert aussi à aromatiser et conserver le lait, il suffit pour cela d'introduire dans les outres une certaine quantité de cette armoise, qui macère dans le lait et aide à sa conservation. D'autre part, dans le cadre d'un travail sur les teintures végétales, une recette en usage dans la région de Zarzis (Tunisie), a été signalée : il s'agit de faire cuire la plante et de tremper la laine dans l'eau de cuisson pour obtenir une teinture de nuance verte [246].

8.3. Phytochimie

Cette espèce se caractérise par un profil phénolique assez complexe. L'étude de Dib et ses collaborateurs [357] résume l'ensemble des composés identifiés. Les flavonoïdes présents sont des flavones, des flavonols, des flavanones, des dihydroflavonols et leurs éthers de méthyle. L'isolement d'acides phénoliques, de coumarines et d'isocoumarines a été également décrit [357].

D'autre part, l'extrait hexanique des feuilles a montré une grande quantité d'acides gras dont les plus importants sont l'acide linoléique, l'acide α -linoléique et l'acide palmitique. En outre, le pétunidin-3-*O*-acétyl glucoside a été la première et la seule anthocyane contenue dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*A. campestris* de Tunisie [357].

À cela s'ajoutent plusieurs composés trouvés dans la fraction volatile de cette espèce. Les études ont montré que la composition de la fraction volatile varie significativement selon les populations poussant dans diverses localités [357].

8.4. Activités biologiques

A. campestris a démontré plusieurs activités biologiques, nous pouvons citer à ce propos les activités antioxydante, antibactérienne, antifongique, insecticide, anthelminthique, antitumorale, anti-inflammatoire, antirrhumatique ainsi que les effets antihypertenseur [357] et gastroprotectif [315].

L'activité anti-xanthine oxydase de cette plante a été également observée. Le cirsiol isolé de cette plante s'est révélé être très cytotoxique contre plusieurs lignées cellulaires de cancer (OVCAR-3, IGROV-1 et HCT-116) [358]. Il a été décrit également que la plante *A. campestris* est une source prometteuse pour des produits *anti-Leishmania* [359].

9. *Artemisia herba-alba* Asso.

9.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

Artemisia herba-alba (nommée armoise blanche en France et « *Chih* » en Tunisie) est une espèce de la famille des Asteraceae. C'est une plante herbacée, basse et vivace de 30 à 50 cm de hauteur, à tiges ramifiées, nombreuses et tomenteuses (Figure 44). Les feuilles sont alternes, petites, sessiles, pubescentes, ovoïdes, de couleur gris argenté et profondément divisées (2-3 pennatiséquées) à lanières linéaires les caulinaires de plus en plus courtes. Les inflorescences sont rameuses avec de très petits capitules sessiles ou subsessiles, de 3mm de long et de 1,5mm de large (Figure 44). Chaque capitule comporte entre 2 et 5 fleurs jaunâtres hermaphrodites. Les fruits sont des akènes homomorphes, chauves et lisses.



Figure 44 : A. *Artemisia herba-alba* et B. Rameaux en floraison (source Chokri Messaoud).

Artemisia herba-alba est très répandue dans les steppes et les pentes des collines dans les zones arides et semi-arides [360]. Ces plantes sont caractérisées par leur forte adaptabilité aux différents climats allant des zones arctiques alpines, des hautes montagnes jusqu'aux déserts secs [355]. L'espèce est largement répandue depuis les îles Canaries et le Sud-Est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale et à travers l'Afrique du Nord, la péninsule arabique et le Proche-Orient [361].

9.2. Utilisations traditionnelles

Cette espèce est considérée comme l'une des panacées de l'Afrique du Nord, les populations lui reconnaissent de très nombreuses vertus thérapeutiques [246]. Cette plante mêlée au « henné » et délayée dans l'eau est appliquée sur la tête pour combattre les névralgies et autres douleurs. On rapporte aussi que cette espèce s'emploie pour le pansement des blessures ou en infusion bue à jeun dans les cas de gastralgies.

Au Fezzan (Libye), la plante (et plus spécialement les cimes florifères) broyée est utilisée comme stomachique. L'infusion de feuilles et de fleurs sert de vermifuge pour les enfants [246].

Au Maroc, quelques usages de l'espèce ont été rapportés comme en infusion ou en cataplasmes contre les rhumes et la variole ainsi que comme emménagogue [246].

Lors des soins post-partum dans le Souf (Algérie), le deuxième jour après l'accouchement, la cavité vaginale est tamponnée à l'aide d'une boule de laine de mouton, imbibée de beurre, le tout étant bouilli avec des feuilles de thym, des graines de cumin, des oignons et du sel [246].

En plus des usages déjà cités, on rapporte l'utilisation de cette espèce dans les affections digestives, le météorisme abdominal, les coliques et l'insuffisance hépatique. Les autochtones du Sahara algérien attribuent à cette espèce des propriétés très variées comme vermifuge, antidiarrhéique et fébrifuge. En plus, elle sert pour la guérison des troubles nerveux, pour calmer la toux, les maux de tête, les états émotifs, l'insuffisance hépatique et pour soigner la teigne et les plaies hémorragiques [246].

Il a été également noté quelques recettes de la pharmacopée des nomades du Sud tunisien. La décoction d'une poudre de fleurs et de feuilles séchées est employée pour lutter contre le diabète ; l'infusion concentrée a des vertus purgatives alors que l'infusé léger combat l'aérophagie. Il est rapporté que la plante est aussi utilisée dans une pommade avec des oignons cuits dans l'huile pour soigner les traumatismes crâniens ayant donné lieu à des saignements.

Les auteurs révèlent également une action antithermique et contre les coliques de l'infusé. De plus, le « *chih* », pilé avec du beurre, purge les nouveau-nés de leur méconium et aide à la montée du lait [246].

Concernant les emplois non thérapeutiques les notations des auteurs sont moins abondantes. Au Maroc, il est rapporté que butinée par les abeilles, l'armoise fournit un miel blanc comme le camphre. En Tunisie, l'emploi des rameaux pour la confection de balais ou comme combustible a également été souligné [246].

9.3. Phytochimie

Divers métabolites secondaires ont été isolés d'*A. herba-alba*, les plus importants étant les lactones sesquiterpéniques qui sont présentes avec une grande diversité structurale. Les eudesmanolides et les germacranolides semblent être les deux types de lactones les plus abondantes dans cette espèce. D'autres études se focalisant sur les composés phénoliques ont montré la présence d'acides phénoliques, de flavones, d'isoflavones, de flavonols et de flavanones dans cette plante sou[362]. Les flavonoïdes d'*A. herba-alba* sont caractérisés par une grande variation structurale [361]. Les principaux flavonoïdes isolés à partir de cette espèce sont l'hispiduline, la cirsimaritrine et le cirsilinéol [363]. Des flavones glycosylées comme la 3-rutinoside-quercétine et l'isovitexine ont été mis en évidence.

Plusieurs chercheurs ont analysé les huiles essentielles de cette plante. Ces dernières sont très riches en composés dont les principaux sont le *cis*-thujone, le camphre et le chrysanthénone trouvés dans les parties aériennes de l'*A. herba-alba* issue de la Tunisie et l'Algérie ; l'*artemisia*

cétone et le 1,8-cinéole provenant de la plante récoltée en Serbie et le *cis*-chrysanthénol, le *cis*-limonène, l' α -terpinénol et le γ -muurolène provenant de Jordanie, sont les composés majeurs de l'huile essentielle de la plante [364].

9.4. Activités biologiques

L'huile essentielle isolée d'*A.herba-alba* est caractérisée par des activités antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire, antioxydante, anti-acétylcholinestérase et insecticide [365]. En outre, l'activité antileishmaniale des extraits de cette espèce a été particulièrement étudiée [366].

D'autres activités biologiques, d'*A.herba-alba*, ont été largement décrites dans la littérature comme les effets hypotensif, diurétique, cytotoxique, spasmolytique, analgésique, antipyrétique, gastroprotecteur, hypoglycémique et hepatoprotectif [315].

10. *Pistacia lentiscus* L.

10.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

L'espèce *Pistacia lentiscus* (désignée arbre au mastic ou pistachier lentisque en France et « *oum en nas* » en Tunisie) de la famille des Anacardiaceae, est un arbuste ou arbrisseau (Figure 45) résineux à odeur très prononcée buissonnant et touffu de quelques mètres de haut (1 à 6 mètres). Les feuilles persistantes sont paripennées, avec 4 à 10 paires sans foliole terminale. Les folioles, elliptiques et lancéolées sont coriaces, entières, sessiles, vertes foncées lavées de pourpre, luisantes en dessus et mates et pâles en dessous.

Pistacia lentiscus est une espèce dioïque. Les fleurs mâles sont pourvues de 5 petits sépales dont émergent 5 étamines rougeâtres reposant sur un disque nectarifère (Figure 45). Les fleurs femelles de couleur verte jaunâtre se caractérisent par un ovaire supère avec un style court à 3 stigmates et d'un calice à 4 sépales. Le fruit est une drupe de 5mm de long, globuleuse et renferme une seule graine. La couleur des fruits est fortement associée à la viabilité des graines. Les fruits noirs (Figure 45 C) contiennent habituellement des graines viables, tandis que les fruits blancs et rouges contiennent des graines non viables.

Le pistachier lentisque est largement répandu depuis l'Asie Mineure jusqu'aux îles Canaries et sur tout le pourtour du bassin méditerranéen et disparaît sur la côte égyptienne dès

les abords de la mer noire. En Tunisie, *P. lentiscus* a une large répartition géographique et bioclimatique, s'étendant de l'aride supérieur à l'humide inférieur [367].



Figure 45 : A. *Pistacia lentiscus* en fructification ; B. fleurs mâles et C. fruits (source Chokri Messaoud).

10.2. Utilisations traditionnelles

Au Maroc, la résine de cette espèce est mâchée afin de parfumer l'haleine ou ajoutée au pain. Cette résine ou gomme est utilisée aussi en fumigation contre la fièvre. Le fruit renferme 20 à 25% d'une huile grasse employée dans l'alimentation. Les feuilles sont astringentes, diurétiques et emménagogues. En infusion, elles sont réputées pour enlever la mauvaise odeur de la sueur. Le lait, dans lequel on fait bouillir le mastic issu de cette plante, est efficace contre

les maux de gorge. L'écorce est employée en fumigations (à Marrakech) pour faciliter les accouchements. L'huile, extraite après ébullition des graines pilées dans l'eau, est utilisée dans le traitement de la gale et des rhumatismes. L'extrait de l'huile sert aussi à la fabrication de pilules contre la diarrhée [246].

Cette plante est également employée en bandage contre les inflammations cutanées et pour la cicatrisation des plaies mineures [368].

En Libye, les fruits fournissent une huile utilisée pour l'éclairage. Les fruits bouillis avec de l'alun donne une encre indélébile. Les cendres du bois sont employées comme savon. La gomme est un masticatoire, mais est aussi utilisée au Maroc, comme épilatoire et parfum par les gens aisés [246].

10.3. Phytochimie

Les triterpènes (dicycliques, tricycliques, tétracycliques, pentacycliques) constituent le principal groupe chimique dans cette plante. Il est important à noter que seul un petit nombre d'études a été mené, jusqu'à présent, sur l'élucidation de la composition chimique de la résine de cette espèce à cause de la difficulté de manipulation des échantillons en raison de la présence de polymères non solubles et également à cause de la nature de ses triterpènes [368].

L'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* contient la β -caryophylline, le germaerène et le γ -cadinène ainsi que l' α -pinène, le γ -terpène et le terpèn-4-ol [369].

Parmi les composés purs isolés de cette plante, nous pouvons citer aussi : l'acide gallique, l'afzeline, la myricitrine, la 3-O-rutinosyl-myricétine, l'arbutine, le *b*-glucopyranosyl orcinol, l'acide 3,5-O-digalloyl quinique et l'acide 3, 4, 5-trihydroxy-hexylidène acétique [370].

10.4. Activités biologiques

Les propriétés biologiques de *Pistacia lentiscus* ont été étudiées par des expériences *in vitro* et *in vivo* ainsi que par des études cliniques. Plus spécifiquement, des propriétés antioxydante, antimicrobienne, antifongique, anti-inflammatoire, chimiopréventive, anticancéreuse, et hépatoprotectrice ont été attribuées aux composés de cette plante [368]. Les recherches ont

montré que les triterpènes sont responsables, en grande partie, des activités biologiques constatées. En outre, aucun effet indésirable n'a été observé dans les études cliniques après la consommation de cette plante. Les études de pharmacodynamique et de biodisponibilité commencent également à explorer ses modes d'action chez l'Homme [368].

De plus, les chercheurs s'intéressent à l'exploitation de cette plante pour la protection du système cardioprotecteur suite aux résultats intéressants obtenus sur le rétablissement des niveaux de cholestérol et de glucose, *in vitro*, par cette plante [368].

11. *Rosmarinus officinalis* L.

11.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

Le *Rosmarinus officinalis* (dit romarin en France et « *Klil* » en Tunisie) appartenant à la famille des lamiacées, est un sous-arbrisseau pérenne. La plante est constituée de nombreuses tiges feuillées, ascendantes (50 à 200 cm de hauteur) ou prostrées (Figure 46).

Les feuilles, insérées selon une phyllotaxie opposée décussée, sont à bords fortement réfléchis, luisantes sur la face supérieure et blanches, tomenteuses au niveau de la face inférieure. La fleur (Figure 46) montre un calice, pulvérulent, en cloche blanchâtre ou grisâtre présentant un tube à 3 divisions, une corolle tubuleuse à pigmentation qui varie du pourpre au blanc et possédant une lèvre supérieure à deux lobes et une lèvre inférieure trilobée, à lobe médian concave et élargi. L'androcée, glabre, est constitué de deux étamines fertiles saillantes. L'ovaire contient quatre ovules et un seul style éloigné des anthères. Le fruit est un tétrakène. Chaque akène est brun et luisant.



Figure 46 : A. *Rosmarinus officinalis* ; B. Rameaux en floraison (source Chokri Messaoud).

Le romarin se développe spontanément dans le bassin occidental de la Méditerranée. En Tunisie, l'espèce se développe spontanément dans des forêts et garrigues, localisées dans les étages bioclimatiques allant du subhumide à l'aride supérieur [367].

11.2. Utilisations traditionnelles

Fréquemment utilisé comme aromate culinaire, le romarin du fait de ses vertus dépuratives, stimulantes et antiseptiques a de nombreux emplois en thérapeutique traditionnelle et il est l'une des panacées de l'Afrique du Nord. L'infusion des feuilles constitue une boisson contre la toux et les feuilles desséchées, mélangées à l'huile, servent lors des soins des blessures. Cet usage s'ajoute à l'utilisation de cette espèce en infusion contre les maladies de la rate. Il a été noté que les bains aromatiques et les fomentations de romarin sont emménagogues. Le romarin s'emploie aussi comme fortifiant contre l'épilepsie et la paralysie. Pris dans du lait caillé ou dans une pâte faite avec de la farine, du beurre et du citron, le romarin est employé contre les maux d'estomac.

Au sud Tunisien, en infusion sucrée, l'espèce agit contre les maux de cœur, comme fortifiant après une hémorragie, pour les maux de reins et de gorges et pour réduire l'incontinence urinaire. Comme dépuratif, on l'utilise en décoction [246].

À signaler aussi les multiples vertus et usages comme cholagogue, cholérétique et ocytocique. Cette dernière propriété donne lieu à maintes descriptions : en effet, la mère après l'accouchement avale une infusion de feuilles sèches de *R. officinalis* ou bien mange du blé cuit à l'eau et additionné de *R. officinalis* dont elle doit également absorber des infusions durant 7 jours. En décoction, cette espèce peut accélérer le travail des parturientes. D'autres auteurs attestent que l'infusion purifie le sang de la mère.

Dans le M'zab (une région berbérophone du nord du Sahara algérien), la poudre des feuilles de *R. officinalis* sert à recouvrir la plaie après la circoncision.

L'essence de romarin est utilisée surtout comme carminatif, parfum et en combinaison avec d'autres drogues pour préparer des liniments rubéfiants.

Il a été mentionné qu'on emploie cette plante également pour éviter le rancissement du beurre fondu dans les outres et en mélange, broyée avec d'autres espèces, elle est susceptible de procurer la puissance sexuelle [246].

Il a été rapporté également que les huiles essentielles et extraits de romarin obtenus à partir des fleurs sont utilisés pour traiter les maux de tête, les problèmes de circulation sanguine et aussi comme expectorant, diurétique et antispasmodique dans les coliques rénales [371]. Ces huiles essentielles sont également bénéfiques pour le système immunitaire [372].

11.3. Phytochimie

R. officinalis est principalement constitué de composés phénoliques, de di- et triterpènes. Les principaux constituants de l'huile essentielle de romarin sont le camphre, le 1,8-cinéole, l' α -pinène, le β -pinène, le bornéol, le camphène et le limonène dans des proportions qui varient selon le stade végétatif et les conditions bioclimatiques. Il est possible aussi de trouver dans le romarin des terpènes, tels que l'épirosmanol, le carnosol, l'acide carnosique, l'acide ursolique et l'acide oléanolique (triterpènes).

Concernant les extraits organiques, les composés principalement présents sont l'acide rosmarinique, l'acide chlorogénique, le camphre, l'acide caféique, l'acide ursolique, l'acide bétulinique, l'acide carnosique et le carnosol. Chez *R. officinalis*, nous pouvons également noter la présence de l'apigénine, de la diosmine, de la lutéoline et de la genkwanine. Cinq nouveaux

composés ont été identifiés récemment dans un extrait éthanolique de *R. officinalis*, il s'agit des officinoterpénosides A1 et A2 (glycosides diterpénoïdes), des officinoterpénosides B et C (glycosides triterpénoïdes) et de l'officinoterpénoside D (normonoterpénoïde) [371]. Une publication récente a mentionné également la présence du rosmadial, du rosmanol, des rosmaquinones A et B, du secohinokio et de l'eugénol [372].

11.4. Activités biologiques

R. officinalis L. est riche en plusieurs molécules biologiquement actives ayant des effets antitumoraux sur des cellules cancéreuses de foie, sein, prostate, poumon et dans le cas de leucémie. Des effets antimicrobiens, antioxydants et antiprolifératifs ont été rapportés [372]. Des activités analgésiques de cette plante ont été également décrites [371].

En outre, le 1,8-cinéole et l' α -pinène, issus de cette plante, sont associés à une forte activité anti-inflammatoire. D'autres terpènes non volatils du romarin tels que l'acide carnosique, le carnosol, le rosmanol et l'acide rosmarinique sont également connus pour avoir une activité anti-inflammatoire [372].

D'autre part, il a été démontré que le romarin diminue la glycémie dans plusieurs études *in vivo*, dû à sa richesse en acide carnosique et en carnosol.

L'acide rosmarinique de cette plante semble avoir un potentiel contre les maladies neurodégénératives. Il a été constaté que ce composé possède des effets cholinergiques et neuroprotecteurs et inhibe l'acétylcholinestérase [371].

12. *Laurus nobilis* L.

12.1. Caractéristiques botaniques et répartition géographique

L'espèce *Laurus nobilis* (dite Laurier en France et « Rand » en Tunisie) de la famille des Lauracées, est un arbuste mesurant de 2 à 6 m de haut. Les feuilles de forme lancéolées, alternes, coriaces, à bord ondulé, sont de couleur vert foncé sur leur face supérieure et plus clair à la face inférieure (Figure 47). Les fleurs, blanchâtres, sont groupées en petites ombelles. C'est une plante dioïque (fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés). Le fruit est une petite baie ovoïde et noire violacée.



Figure 47 : *Laurus nobilis* L. en floraison (A) et en fructification (B) (Source Chokri Messaoud).

Cette plante est cultivée dans de nombreuses régions tempérées et chaudes du monde, en particulier dans la région méditerranéenne, y compris la Grèce, l'Espagne, le Portugal, le Maroc et la Turquie. En Tunisie, le laurier pousse au bord des rivières, sur les montagnes et sur les falaises humides. Il pousse également dans les zones bioclimatiques humides et sub-humides, en particulier à Ain Draham, Tabarka et Cap-Bon [373].

12.2. Utilisations traditionnelles

En raison de ses qualités gustatives, depuis l'époque des anciens Grecs et Romains, les feuilles de laurier sont utilisées comme herbe aromatique pour assaisonner les mets afin d'ajouter un arôme distinctif à la nourriture. D'autre part, le laurier apparaît comme une solution pour soulager les symptômes de la grippe et la bronchite et pour aider à traiter les problèmes digestifs, l'insomnie et les douleurs menstruelles [374].

Il est connu aussi en médecine traditionnelle pour le traitement de l'asthme, des maladies cardiaques, de la diarrhée et des troubles digestifs. La racine décoctée de cette plante est reconnue pour ses propriétés expectorantes et est également utilisé par la population juive de Jerba (Tunisie) dans le traitement de l'ictère et des douleurs rhumatismales [373]. En Iran, les feuilles servent à traiter l'épilepsie, les névralgies et le parkinsonisme. Les fruits possèdent des propriétés stimulantes et en poudre sous forme d'infusion, ils présentent des propriétés carminatives et diurétiques. De surcroît, l'huile grasse des fruits est utilisée pour traiter les ecchymoses, les furoncles, les entorses et servent comme insectifuge [375]. L'huile essentielle de cette plante, en friction pour un usage local, peut également être valorisée pour traiter la polyarthrite rhumatoïde.

12.3. Phytochimie

L'analyse chromatographique en phase gazeuse de la feuille de Laurier a permis d'identifier 276 molécules différentes, les composés majoritaires étant les monoterpènes : α -pinènes et β -pinènes, les monoterpénols : linalol et α -terpinéol et les oxydes terpéniques principalement le 1,8-cinéole [376, 377]. Une autre étude [378] a signalé la présence, toujours dans les feuilles, de 21 lactones sesquiterpéniques. Parmi elles, nous pouvons citer les laurénoperoxyldes A et B, le sivosinolide, l'altissine et le maroniolide. Frang et ses collaborateurs [379] ont également isolé des lactones sesquiterpéniques qui sont le 10-épigazaniolide, le gazaniolide, le spirafolide et le costunolide. Une importante teneur en polyphénols, incluant des flavonoïdes et des tanins est également présente dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* [380]. Les feuilles peuvent produire des flavonoïdes tels que, le kaempférol-3-*O*- α -L-(3",4"-di-*E-p*-coumaroyl)-rhamnoside, le kaempférol-3-*O*- α -L-(2",4"-di-*E-p*-coumaroyl)-rhamnoside, le kaempférol-3-*O*- α -L-(2"-*E-p*-

coumaroyl) rhamnoside et le kaempférol-3-*O*- α -L-(2", 4"-di-*Z*-*p*-coumaroyl)-rhamnoside [381].

Récemment, deux nouveaux mégastigmane glucosidiques, les laurusides E et F et un nouveau glycoside d'acide abscissique, le lauruside G, ont été isolés d'un extrait méthanolique de feuilles de *Laurus nobilis* [375].

12.4. Activités biologiques

Une revue de littérature récente a détaillé plusieurs vertus des feuilles dont les activités anti-inflammatoire, antimutagène et immunostimulante [382].

Plusieurs études ont montré que l'huile essentielle des feuilles de laurier possède des effets antimicrobien et antiviral et des activités antioxydantes [373].

En raison de ses activités antimicrobiennes, la baie de cette espèce est utilisée dans l'industrie alimentaire comme conservateur.

Le *Laurus nobilis* est également employé dans l'industrie cosmétique pour ses propriétés purifiantes [380]. L'huile de laurier est utilisée pour fabriquer du savon.

En outre, l'extrait méthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* est capable d'inhiber l'élévation du taux d'éthanol sanguin chez le rat exposé à l'éthanol. Les constituants sesquiterpéniques (en particulier le Costunolide) ayant un fragment α -méthylène- γ -butyrolactone sont responsables de cette activité biologique [383].

Partie II : Travaux expérimentaux

Chapitre 1 : Obtention d'extraits bruts et Criblage biologique sur l'arginase

Plusieurs espèces végétales, provenant de différentes familles de plantes (Anacardiaceae, Rosaceae, Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae et Myrtaceae), ont été sélectionnées au début de ce projet de thèse afin de tester leur pouvoir à inhiber l'arginase. Le choix de ces plantes a été, en particulier, guidé par des études ethnobotaniques préalables axées sur celles pouvant avoir une activité régulatrice du dysfonctionnement endothélial avec un intérêt, notamment, pour les plantes aux vertus hypotensives et régulatrices des troubles cardiovasculaires.

Les divers organes de ces plantes ont servi à la préparation de nombreux extraits bruts à partir desquels plusieurs étapes d'extraction exhaustive de leurs métabolites ont été effectuées et suivies par un criblage rapide sur l'arginase hépatique bovine des matrices complexes obtenues afin de retenir les extraits offrant un potentiel inhibiteur de notre cible thérapeutique.

Ainsi dans ce premier chapitre, nous présenterons, tout d'abord, les divers extraits obtenus, puis nous développerons, le principe ainsi que les principaux résultats du criblage biologique réalisé. Le recoupement des données du criblage biologique déterminera les extraits qui subiront, dans un deuxième temps, un criblage phytochimique préliminaire.

1. Extraction

Dans ce travail, 12 plantes sélectionnées ont été récoltées dans différentes régions de la Tunisie. Afin de récupérer de manière exhaustive les métabolites des différents organes des plantes, l'extraction par macération a été retenue comme technique d'extraction. L'épuisement successif des drogues séchées s'est fait en utilisant des solvants de polarité croissante : hexane ou éther de pétrole, dichlorométhane et méthanol. À partir de ces 12 plantes, 81 extraits ont été obtenus avec des rendements d'extraction compris entre 0,23 et 51,5 %. Le [Tableau 1](#) regroupe le résultat de ces extractions.

Les extraits de plantes ont été référencés en utilisant le solvant suivi de la partie de plante [en anglais : Le pour *leaves* (feuilles), St pour *stems* (tiges), Fr pour *fruits* (fruits), Bu pour *buds* (boutons floraux), Fs pour *fruit stones* (noyaux de fruits), Fl pour *flowers* (fleurs), Cl pour *calyx* (calice) et Wp pour *whole plant* (plante entière)], suivis du genre et de l'espèce de la plante ([Tableau 2](#)).

Tableau 2. Masses et rendements des extraits obtenus par macération des différents organes des plantes sélectionnées

Famille	Espèce	Organe	Nature de l'extrait	Référence	Poids (g)	Rendement (%)
Anacardiaceae	<i>Rhus tripartita</i> (Ucria) Grande	Feuilles	Hex	HLeRt	1,00	6,47
			DCM	DLeRt	0,14	0,87
			MeOH	MLeRt	3,31	21,42
		Tiges	EP	EPStRt	0,15	0,76
			DCM	DStRt	0,07	0,33
			MeOH	MStRt	2,11	10,67
		Fruits	EP	PEFrRt	0,40	1,35
			DCM	DFrRt	0,10	0,33
			MeOH	MFrRt	2,70	9,21
		Noyaux	EP	PEFsRt	0,74	3,23

			DCM	DFsRt	0,05	0,23
			MeOH	MFsRt	0,99	4,32
	<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Feuilles	EP	PELePl	10,79	5,17
			DCM	DLePl	1,11	0,53
			MeOH	MLePl	81,20	38,98
		Fruits	EP	PEFrPl	2,74	22,82
			DCM	DFrPl	0,10	0,85
			MeOH	MFrPl	1,27	10,58
Rosaceae		Feuilles	EP	PELeCa	0,63	3,93
	<i>Crataegus azarolus</i> L.		DCM	DLeCa	0,34	2,12
			MeOH	MLeCa	2,33	14,49
		Tiges	EP	PEStCa	0,22	0,98
			DCM	DStCa	0,14	0,61
			MeOH	MStCa	1,56	7,03
		Boutons	EP	PEBoCa	0,35	1,72
			DCM	DBoCa	0,25	1,21
			MeOH	MBoCa	2,83	13,94
	<i>Rubus ulmifolius</i> shott.	Feuilles	Hex	HLeRu	0,78	5,12
			DCM	DLeRu	0,17	1,10
			MeOH	MLeRu	3,63	23,73
		Tiges	Hex	HStRu	0,29	2,22
			DCM	DStRu	0,06	0,48
			MeOH	MStRu	2,11	16,25
Fabaceae	<i>Retama raetam</i> (Forssk.) Webb	Fleurs	EP	PEFIRr	0,64	3,87
			DCM	DFIRr	0,17	1,06
			MeOH	MFIRr	4,39	26,59

		Tiges	EP	PEStRr	0,28	1,67
			DCM	DStRr	0,11	0,66
			MeOH	MStRr	1,06	6,32
		Feuilles	EP	PELeHc	4,71	4,76
			DCM	DLeHc	2,69	2,73
			MeOH	MLeHc	10,94	11,08
Asteraceae	<i>Hertia cheirifolia</i> (L.) Kuntze	Fruits	EP	PEFrHc	2,49	3,03
			DCM	DFrHc	7,91	9,67
			MeOH	MFrHc	18,15	22,18
		Fleurs	EP	PEFlHc	0,43	6,02
			DCM	DFlHc	0,47	6,63
			MeOH	MFlHc	1,73	24,33
		Tiges	EP	PEStHc	0,77	1,86
			DCM	DStHc	4,98	12,14
			MeOH	MStHc	8,33	20,31
		Calices	EP	EPChHc	1,70	4,79
			DCM	DChHc	3,64	10,26
			MeOH	MChHc	6,58	18,54
	<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.	Plante entière	EP	PEWpAha	0,069	1,38
			DCM	DWpAha	0,195	3,91
			MeOH	MWpAha	0,458	9,172
	<i>Artemisia campestris</i> L.	Plante entière	EP	PEWpAc	0,106	2,128
			DCM	DWpAc	0,245	5
			MeOH	MWpAc	0,520	10,40
		Plante entière	EP	PEWpAc	0,080	1,61
			DCM	DWpAc	0,295	6

			MeOH	MWpAc	0,493	10
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Feuilles	EP	PELeRo	0,55	11,06
			DCM	DLeRo	0,082	1,64
			MeOH	MLeRo	0,71	14,20
	<i>Thymus algeriensis</i> Boiss. et Reut.	Plante entière	EP	PEWpTa	0,22	4,44
			DCM	DWpTa	2,58	51,50
			MeOH	MWpTa	0,63	12,65
Lauraceae	<i>Laurus Nobilis</i>	Feuilles	EP	PELeLn	0,479	9,58
			DCM	DLeLn	0,23	4,59
			MeOH	MLeLn	1,26	25,10
Myrtaceae	<i>Myrtus communis</i> L.	Feuilles	EP	PELeMc	0,425	3,5
			DCM	DLeMc	0,271	2,22
			MeOH	MLeMc	0,876	7,18
		Fruits	Hex	PEFrMc	0,952	3,1
			DCM	DFrMc	0,200	0,6
			MeOH	MFrMc	9,540	31
		Tiges	Hex	PEStMc	0,302	0,8
			DCM	DStMc	0,091	0,25
			MeOH	MStMc	2,700	7,45

Tous les extraits ont été récupérés en masses suffisantes pour un premier criblage rapide sur l'arginase dont le test, après optimisation au sein de l'EA 4267, ne nécessite pas une quantité dépassant les 3,5 mg d'extrait brut.

2. Criblage biologique

2.1. Principe du test enzymatique

Le dosage utilisé au sein de notre laboratoire repose sur la détection colorimétrique de l'urée formée au cours du catabolisme de la L-arginine par l'arginase. Ce test d'inhibition d'arginase utilisé dans l'équipe est issu de l'optimisation du test développé par Corraliza et ses collaborateurs [157]. Le réactif utilisé pour mettre en évidence l'urée est l' α -isonitrosopropiophénone qui donne, en milieu acide et à haute température, un produit de réaction coloré en rose et dont la quantité peut être mesurée par spectrophotométrie à 550 nm (Figure 28). Ainsi la quantité de composé coloré formé est proportionnelle à la quantité d'urée formée, elle-même reflétant l'activité de l'arginase (Figure 48).

L'arginase utilisée dans le test développé par notre équipe est l'arginase purifiée de type I extraite de foie bovin. Une unité d'enzyme (1U) est définie comme la quantité d'enzyme qui convertit 1 μ mole de L-arginine en urée par minute à pH 9,5 et à 37°C.

La quantité d'enzyme a été optimisée afin de permettre les expérimentations sur des plaques à 96 puits. La concentration en arginase et de son substrat ont été défini pour un pH à 7,5 pour que les interactions inhibiteurs/enzyme se réalisent dans les conditions physiologiques. Des puits contrôles sont également prévus afin de valider la qualité du test. Ils serviront à la vérification de l'effet du solvant utilisé sur l'activité enzymatique. De même, d'autres puits servent de « blanc » pour vérifier que la coloration de la solution à tester n'interfère pas avec le dosage colorimétrique final.

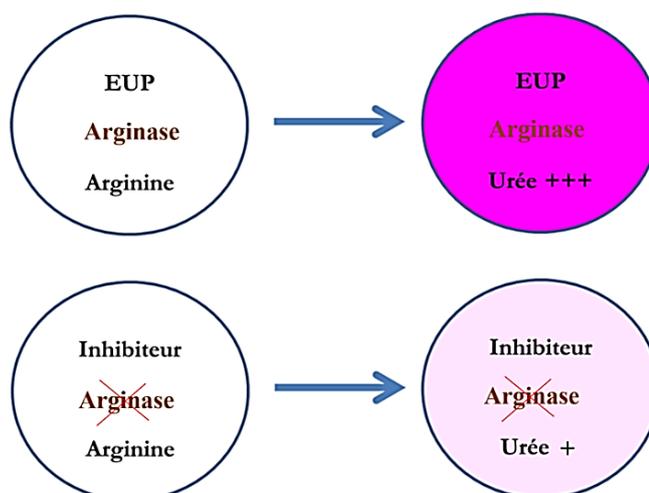


Figure 48 : Illustration de la réaction plus ou moins importante de production d'urée dans des puits avec ou sans inhibiteur.

2.2. Résultats du criblage de l'activité inhibitrice de l'arginase

Les 81 extraits bruts obtenus à partir des douze plantes sélectionnées ont été criblés pour leur activité inhibitrice d'arginase. Ces extraits ont été évalués *in vitro* à deux concentrations (10 et 100 µg/mL) chacune en triplicat. Les résultats du criblage réalisé sont détaillés dans le [Tableau 3](#) et résumés sur la [Figure 49](#)

. Ces résultats montrent que les pourcentages d'inhibition de l'arginase des extraits bruts variaient entre 8 et 90% à 100 µg/mL en fonction du type de l'extrait testé (hexanique, éthylénique, chlorométhylénique ou méthanolique). Certains extraits bruts, tels que l'extrait à l'éther de pétrole de la plante entière d'*Artemisia herba-alba*, l'extrait à l'hexane des tiges de *Rubus ulmifolius*, les extraits chlorométhyléniques des tiges de *Rhus tripartita* et des boutons floraux de *Crataegus azarolus*, ont une inhibition indépendante de la concentration puisque leur activité est presque la même à 10 et 100 µg / mL. Ceci pourrait témoigner d'une activité non spécifique de l'arginase. En revanche, la plupart des extraits ont montré une activité concentration-dépendante.

À partir de ces résultats, il a été constaté que cinq extraits bruts présentent une activité biologique pertinente avec des pourcentages d'inhibition supérieurs à 70% à 100 µg/mL à la concentration de 100 µg/mL. Il s'agit des deux extraits chlorométhyléniques de tiges de *Retama Raetam* ($71,66 \pm 2,94\%$) et de *Crataegus azarolus* ($73,00 \pm 1,18\%$) et des trois extraits méthanoliques de tiges de *Rhus tripartita* ($80,66 \pm 3,69\%$), de boutons floraux ($80,00 \pm 3,21\%$) et de tiges de *Crataegus azarolus* ($90,00 \pm 1,53\%$) ([Tableau 3](#)).

Tableau 3. Effet des extraits (à 10 et 100 µg/mL) sur l'activité inhibitrice de l'arginase

<i>Espèce</i>	<i>Extrait</i>	<i>Activité anti-arginase (% à 10 µg/mL)</i>	<i>Activité anti-arginase (% à 100 µg/mL)</i>
<i>Crataegus azarolus</i>	MStCa	22,00 ± 1,99^{b,c}	90,00 ± 1,53^a
<i>Rhus tripartita</i>	MStRt	33,00 ± 6,72^a	80,66 ± 3,6^b
<i>Crataegus azarolus</i>	MBuCa	25,66 ± 3,07^{a,b}	80,00 ± 3,21^b
<i>Crataegus azarolus</i>	DStCa	15,33 ± 1,57^{b,c}	73,00 ± 1,19^c
<i>Retama raetam</i>	DStRr	14,00 ± 1,30^c	71,66 ± 2,95^c
<i>Rosmarinus officinalis</i>	MLeRo	16,00 ± 5,00	58,33 ± 2,67
<i>Pistacia Lentiscus</i>	MLePl	25,50 ± 4,00	58,00 ± 2,50
<i>Myrtus communis</i>	MStMc	21,66 ± 5,03	56,00 ± 4,35
<i>Artemisia campestris</i>	MWpAc-S	16,66 ± 2,08	53,66 ± 2,08
<i>Thymus algeriensis</i>	MWpTa	18,00 ± 1,00	53,33 ± 3,67
<i>Crataegus azarolus</i>	MLeCa	15,33 ± 2,68	52,66 ± 5,65
<i>Artemisia campestris</i>	MWpAc-G	18,00 ± 5,00	52,33 ± 4,16
<i>Rubus ulmifolius</i>	MLeRu	21,00 ± 5,47	52,00 ± 3,02
<i>Rhus tripartita</i>	PEStRt	26,33 ± 3,20	49,00 ± 3,59
<i>Artemisia herba-alba</i>	MWpAha	19,66 ± 0,57	46,00 ± 5,56

<i>Myrtus communis</i>	MLeMc	25,00 ± 3,60	46,00 ± 3,46
<i>Rhus tripartita</i>	MLeRt	9,67 ± 3,01	45,67 ± 3,01
<i>Artemisia campestris</i>	DWpAc-S	17,00 ± 2,00	45,00 ± 2,00
<i>Thymus algeriensis</i>	DWpTa	21,67 ± 2,00	45,00 ± 2,00
<i>Artemisia herba-alba</i>	DWpAha	7,66 ± 9,01	43,00 ± 5,56
<i>Crataegus azarolus</i>	PEStCa	14,67 ± 3,46	42,67 ± 6,05
<i>Pistacia Lentiscus</i>	MFrPl	21,50 ± 6,00	42,67 ± 4,33
<i>Rhus tripartita</i>	MFrRt	16,33 ± 5,25	38,66 ± 2,02
<i>Pistacia Lentiscus</i>	DFrPl	18,00 ± 7,50	37,67 ± 3,00
<i>Rosmarinus officinalis</i>	PELeRo	19,50 ± 5,00	37,50 ± 3,00
<i>Rubus ulmifolius</i>	MStRu	13,67 ± 3,12	37,00 ± 4,90
<i>Artemisia herba-alba</i>	PEWpTa	23,00 ± 3,00	35,00 ± 3,00
<i>Artemisia campestris</i>	DWpAc-G	7,33 ± 3,78	34,00 ± 2,64
<i>Rosmarinus officinalis</i>	DLeRo	17,00 ± 4,00	33,67 ± 3,33
<i>Laurus nobilis</i>	PELeLn	17,00 ± 0,50	32,50 ± 2,50
<i>Myrtus communis</i>	DLeMc	12,00 ± 3,46	32,33 ± 3,46
<i>Laurus nobilis</i>	DLeLn	15,33 ± 6,00	31,67 ± 4,67
<i>Pistacia Lentiscus</i>	DLePl	15,00 ± 7,00	30,50 ± 3,00

<i>Hertia cheirifolia</i>	PEFIHc	23,50 ± 4,00	28,50 ± 2,50
<i>Crataegus azarolus</i>	PELeCa	15,00 ± 3,05	28,00 ± 5,46
<i>Rhus tripartita</i>	PEFrRt	15,33 ± 3,61	28,00 ± 6,60
<i>Hertia cheirifolia</i>	PELeHc	19,50 ± 2,00	28,00 ± 2,00
<i>Laurus nobilis</i>	MLeLn	13,00 ± 5,50	27,67 ± 2,00
<i>Retama raetam</i>	MStRr	9,00 ± 2,98	27,33 ± 3,20
<i>Hertia cheirifolia</i>	PECIHc	22,50 ± 6,00	27,00 ± 6,00
<i>Hertia cheirifolia</i>	DFIHc	17,50 ± 1,00	26,67 ± 6,50
<i>Rhus tripartita</i>	MFsRt	12,00 ± 2,79	25,33 ± 2,79
<i>Rhus tripartita</i>	PEFsRt	9,00 ± 6,59	24,33 ± 1,99
<i>Hertia cheirifolia</i>	DChHc	14,50 ± 4,00	24,00 ± 4,00
<i>Hertia cheirifolia</i>	MLeHc	17,50 ± 4,00	24,00 ± 4,00
<i>Hertia cheirifolia</i>	MFIHc	21,50 ± 3,00	24,00 ± 5,00
<i>Artemisia campestris</i>	PEWpAc-G	15,00 ± 4,58	23,33 ± 2,51
<i>Retama raetam</i>	MFIRr	7,33 ± 3,86	22,66 ± 6,38
<i>Hertia cheirifolia</i>	DFrHc	13,50 ± 4,00	22,33 ± 5,33
<i>Myrtus communis</i>	PELeMc	18,66 ± 1,52	22,33 ± 3,78
<i>Hertia cheirifolia</i>	DStHc	12,50 ± 5,00	21,67 ± 5,00

<i>Hertia cheirifolia</i>	PEStHc	17,50 ± 6,50	20,50 ± 4,50
<i>Pistacia Lentiscus</i>	PELePl	13,00 ± 4,00	20,00 ± 4,50
<i>Retama raetam</i>	PEStRr	13,67 ± 2,65	20,00 ± 3,70
<i>Hertia cheirifolia</i>	MFrHc	9,00 ± 3,00	19,00 ± 3,50
<i>Rhus tripartita</i>	DStRt	15,00 ± 7,43	18,67 ± 4,90
<i>Hertia cheirifolia</i>	PEFrHc	16,50 ± 5,50	18,50 ± 3,00
<i>Pistacia Lentiscus</i>	PEFrPl	18,00 ± 2,50	18,50 ± 4,00
<i>Myrtus communis</i>	DStMc	5,33 ± 7,37	18,00 ± 5,56
<i>Myrtus communis</i>	MFrMc	16,66 ± 1,52	18,00 ± 6,00
<i>Rubus ulmifolius</i>	DStRu	8,33 ± 5,06	17,67 ± 2,97
<i>Hertia cheirifolia</i>	DLeHc	16,00 ± 2,00	17,50 ± 8,00
<i>Retama raetam</i>	DFIRr	5,67 ± 2,53	17,33 ± 2,53
<i>Crataegus azarolus</i>	DLeCa	10,33 ± 2,25	17,00 ± 5,14
<i>Rhus tripartita</i>	DFrRt	11,00 ± 1,66	16,67 ± 3,91
<i>Artemisia campestris</i>	PEWpAc-S	11,66 ± 5,50	16,66 ± 2,51
<i>Artemisia herba-alba</i>	PEWpAha	16,00 ± 5,56	16,33 ± 6,65
<i>Rubus ulmifolius</i>	HStRu	11,33 ± 3,11	15,00 ± 3,04
<i>Hertia cheirifolia</i>	MStHc	9,00 ± 4,00	14,67 ± 3,67

<i>Myrtus communis</i>	DFrMc	5,66 ± 1,52	14,66 ± 2,30
<i>Crataegus azarolus</i>	DBuCa	12,00 ± 2,87	14,00 ± 5,95
<i>Rubus ulmifolius</i>	DLeRu	5,67 ± 2,28	13,33 ± 6,27
<i>Retama raetam</i>	PEFIRr	10,33 ± 1,36	12,00 ± 6,21
<i>Rhus tripartita</i>	DFsRt	5,33 ± 8,02	11,67 ± 1,83
<i>Hertia cheirifolia</i>	MClHc	7,00 ± 3,00	11,50 ± 4,00
<i>Rhus tripartita</i>	DLeRt	2,00 ± 5,97	10,67 ± 4,09
<i>Rhus tripartita</i>	HLeRt	7,00 ± 5,86	10,33 ± 2,03
<i>Myrtus communis</i>	PEFrMc	2,66 ± 5,56	10,00 ± 5,56
<i>Crataegus azarolus</i>	PEBuCa	6,00 ± 6,03	9,33 ± 5,77
<i>Myrtus communis</i>	PEStMc	8,33 ± 3,05	9,33 ± 3,21
<i>Rubus ulmifolius</i>	HLeRu	5,33 ± 4,74	8,00 ± 2,27

Les valeurs sont données sous forme de la moyenne ± l'erreur standard de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les valeurs dans le tableau suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). L'analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée uniquement sur les cinq extraits les plus actifs.

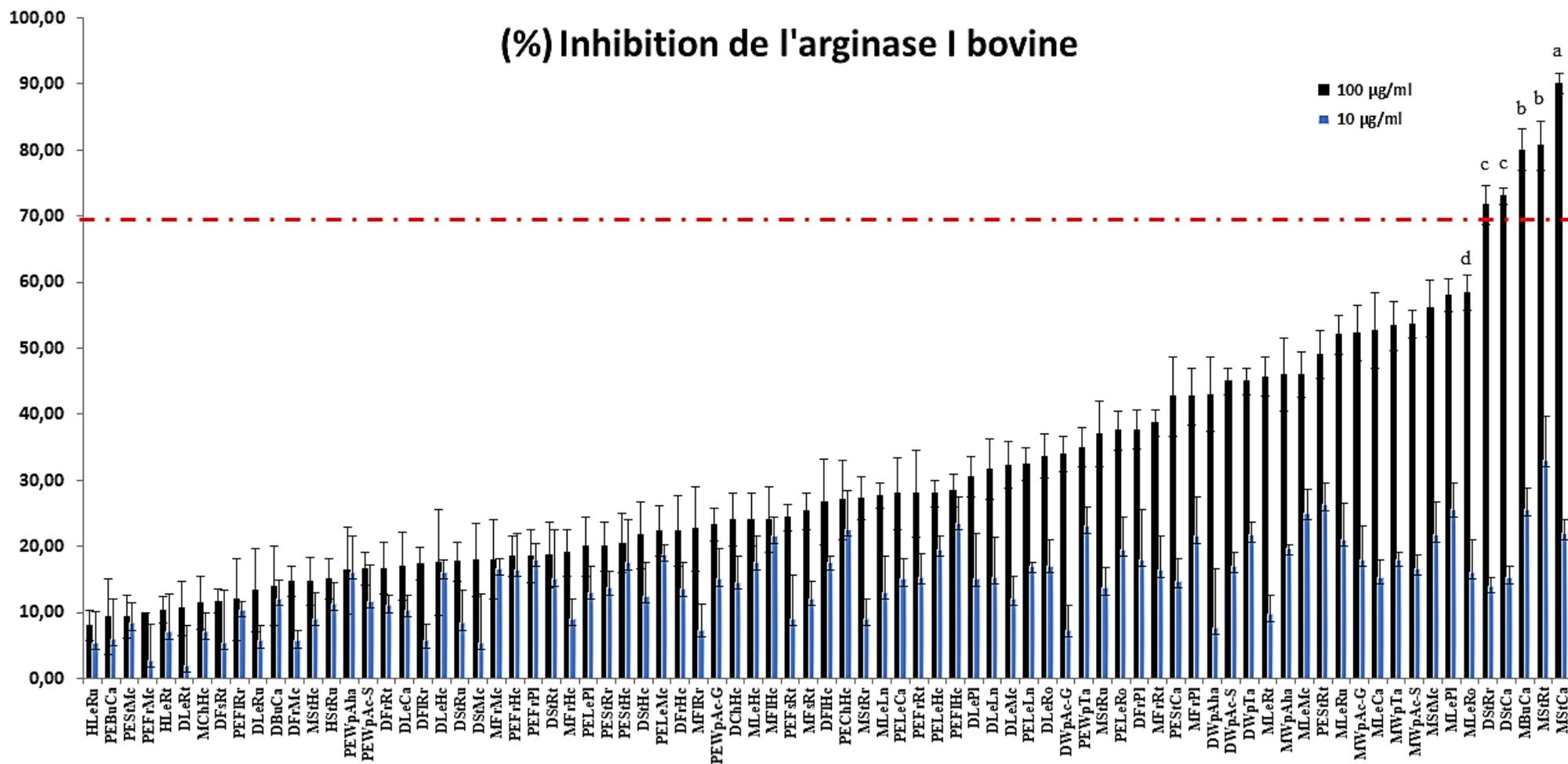


Figure 49 : Effet in vitro des extraits bruts sur l'arginase hépatique bovine I.

Les valeurs sont données sous forme de la moyenne ± l'erreur standard de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Les colonnes associées à une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,05$). L'analyse de la variance (ANOVA) a été réalisée uniquement sur les cinq extraits les plus actifs

Les valeurs des CI_{50} des extraits ayant des activités inhibitrices supérieures à 70% à la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ ont été déterminées (Tableau 4). Toutes les valeurs des CI_{50} se sont révélées être inférieures à 100 $\mu\text{g/mL}$. L'analyse de la variance (ANOVA) a montré que l'activité inhibitrice de l'arginase varie considérablement entre les cinq extraits actifs (Tableau 4). L'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* se caractérise par l'activité la plus faible ($CI_{50} = 96,69 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$) parmi les cinq extraits les plus actifs (Tableau 4). La meilleure activité est obtenue avec l'extrait méthanolique de tiges de *Crataegus azarolus* avec une CI_{50} de $41,99 \pm 5,77 \mu\text{g/mL}$ ce qui constitue une valeur intéressante pour un extrait brut riche en composés si l'on considère les valeurs des CI_{50} des inhibiteurs de référence naturels purs tels que l'acide chlorogénique (3,75 $\mu\text{g/mL}$) ou le picéatannol (2,95 $\mu\text{g/mL}$) [147]. En revanche, les activités inhibitrices de l'arginase, déterminées pour les extraits bruts étudiés, restent inférieures à celles observées avec les inhibiteurs de référence synthétiques tels que la S-(2-boronéthyl)-L-cystéine (BEC) et la N^o-hydroxy-nor-Arginine (nor-NOHA) ($CI_{50} = 0,30$ et 0,66 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectivement) [99].

Tableau 4. Activité inhibitrice de l'arginase et valeurs des CI_{50} des cinq extraits bruts les plus actifs.

<i>Plante</i>	<i>Partie de plante utilisée</i>	<i>Type d'extrait</i>	<i>CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)</i>
<i>C. azarolus</i>	Tiges	MeOH	41.99 ± 5.77^d
<i>R. tripartita</i>	Tiges	MeOH	71.48 ± 6.29^c
<i>C. azarolus</i>	Boutons floraux	MeOH	96.69 ± 0.56^a
<i>C. azarolus</i>	Tiges	DCM	85.84 ± 6.59^b
<i>R. raetam</i>	Tiges	DCM	84.91 ± 4.25^b

Les résultats sont rapportés en la Moyenne \pm erreur standard de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat.

En conclusion, notre criblage a permis d'identifier trois espèces végétales comme nouvelles sources potentielles de molécules inhibitrices de l'arginase. Ces plantes sont *Rhus*

tripartita et *Retama raetam* dont les extraits chlorométhyléniques des tiges étaient actifs sur l'enzyme ainsi que l'espèce *Crataegus azarolus* dont les métabolites des tiges et des boutons floraux étaient extraits respectivement avec du méthanol et du dichlorométhane.

Ces résultats encouragent la poursuite des études phytochimiques sur ces extraits actifs afin d'identifier les molécules naturelles responsables de l'inhibition de l'arginase.

Chapitre 2 : Analyses phytochimiques préliminaires des extraits actifs

Pour resserrer la sélection des matrices végétales à étudier et préférer celles riches en métabolites secondaires à activité spécifique sur l'arginase, une étude phytochimique préliminaire des cinq extraits actifs a été menée. Cette étude débute par la quantification des composés phénoliques des extraits bruts en particulier les flavonoïdes, principaux composés naturels décrits dans la littérature pour leur pouvoir inhibiteur de l'arginase. Elle se poursuit ensuite par des analyses chromatographiques, en utilisant la CLHP analytique comme technique de séparation des métabolites de nos extraits, afin de repérer les extraits, notamment méthanoliques, nécessitant une filtration sur cartouche SPE de polyamide pour éliminer les tanins, pouvant être une source de faux positifs. Finalement, les analyses spectroscopiques par RMN du ^1H et ^{13}C des cinq extraits actifs seront développées dans le but d'évaluer la richesse en métabolites des extraits bruts.

Les résultats obtenus, à l'issue de ces analyses, ont permis de restreindre le nombre d'extraits retenus pour une étude phytochimique approfondie à trois extraits parmi les cinq extraits bruts initialement sélectionnés.

1. Analyse quantitative des composés phénoliques

Étant donné que la majorité des inhibiteurs naturels de l'arginase appartient à la classe des polyphénols et en particulier aux flavonoïdes, tel que détaillé dans la [Partie I, chapitre II, section 6](#) et afin d'établir une corrélation potentielle entre l'activité inhibitrice de l'arginase et le contenu polyphénolique de nos extraits, les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits les plus actifs ont été évaluées.

D'après les résultats obtenus, résumés dans le [Tableau 5](#), il a été constaté que les extraits, en particulier méthanoliques dont les activités inhibitrices de l'arginase dépassent les 80% à 100 $\mu\text{g/mL}$, sont riches en composés phénoliques. Ceci confirme l'intérêt de ce type de métabolites secondaires dans l'inhibition de l'arginase [9, 99].

De plus, des variations significatives ($p < 0,05$) ont été observées entre les cinq extraits de plantes concernant leur composition phénolique ([Tableau 5](#)). Les résultats ont mis en évidence que les extraits méthanoliques des tiges de *Crataegus azarolus* ($161,02 \pm 1,24 \mu\text{g EAG} / \text{mg EB}$) et de *Rhus tripartita* ($127,56 \pm 5,82 \mu\text{g EAG} / \text{mg EB}$) sont les plus riches en composés phénoliques. Concernant les flavonoïdes, la teneur la plus importante ($38,79 \pm 0,34 \mu\text{g ER} / \text{mg EB}$) a été détectée dans l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*.

En outre, nous avons constaté que la variation de l'activité inhibitrice de l'arginase dosée lors du criblage biologique, reflète la différence de composition phénolique entre les échantillons. En fait, une corrélation significative ($r = -0,749$; $p = 0,0013 < 0,05$) a été observée entre la teneur en polyphénols totaux et les valeurs des CI_{50} des extraits. En revanche, la teneur en flavonoïdes est inversement proportionnelle à l'activité inhibitrice de l'arginase ($r = +0,514$; $p = 0,0498$). En effet, bien que les extraits méthanoliques des tiges de *C. azarolus* et de *R. tripartita* soit les plus actifs, avec des CI_{50} de l'ordre de $41,99 \pm 5,77$ et $71,48 \pm 6,29$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement, ces extraits présentent les teneurs en flavonoïdes les plus faibles ($22,32 \pm 0,24$ et $9,82 \pm 0,012$ $\mu\text{g ER/mg EB}$ respectivement) (Tableau 4 et Tableau 5).

Tableau 5. Teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés des extraits les plus actifs sur l'arginase

<i>Espèce</i>	<i>Organe</i>	<i>Extrait</i>	<i>Polyphénols totaux</i> ($\mu\text{g EAG/mg EB}$)	<i>Flavonoïdes</i> ($\mu\text{g ER/mg EB}$)	<i>Tanins condensés</i> ($\mu\text{g EC / mg EB}$)
<i>C. azarolus</i>	Tiges	MeOH	$161,02 \pm 1,24^a$	$22,32 \pm 0,24^c$	$235,94 \pm 8,82^a$
<i>R. tripartita</i>	Tiges	MeOH	$127,56 \pm 5,82^b$	$9,82 \pm 0,012^d$	$163,72 \pm 7,2^b$
<i>C. azarolus</i>	Boutons floraux	MeOH	$79,35 \pm 4,70^c$	$38,79 \pm 0,34^a$	$79,85 \pm 2,38^c$
<i>R. raetam</i>	Tiges	DCM	$38,35 \pm 1,60^d$	$32,79 \pm 0,60^b$	$2,16 \pm 0,79^d$
<i>C. azarolus</i>	Tiges	DCM	$25,96 \pm 0,39^e$	$23,41 \pm 0,41^c$	$28,86 \pm 0,57^e$

EAG : équivalent en acide gallique ; ER : équivalent en rutine ; EC : équivalent en catéchine. Les résultats sont rapportés sous forme de la moyenne \pm l'erreur standard de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Les extraits chlorométhyléniques, bien qu'ils soient les moins riches en polyphénols totaux, sont très riches en flavonoïdes avec des teneur dépassant les 23 $\mu\text{g ER/mg EB}$. Par ailleurs, il semble que les flavonoïdes ne représentent qu'une partie du contenu phénolique total des extraits méthanoliques (Tableau 5). Bien que l'activité des flavonoïdes ait été démontrée dans la littérature tel que nous l'avons détaillé dans le Tableau 1 de la Partie I : Chapitre 2 : 6, ils ne peuvent pas être considérés comme pleinement responsables des activités observées des extraits méthanoliques. En effet, d'autres composés phénoliques, peuvent être probablement impliqués, tels que les stilbènes à activités inhibitrices puissantes de l'arginase [131, 147]. En revanche, la richesse des extraits méthanoliques en polyphénols totaux peut aussi témoigner de la présence, de tanins, composés indésirables dans les extraits de plantes lors des tests

enzymatiques, puisque ces métabolites peuvent être responsables de l'apparition de faux positifs aux cours des essais. En effet, les tanins se fixent préférentiellement aux protéines engendrant leur précipitation et par conséquent la modification de leur activité.

Il est à noter que nos extraits méthanoliques de *C. azarolus* et *R. tripartita*, dont la teneur en polyphénols totaux dépasse les 127 µg EAG/mg EB, proviennent des tiges de plantes, organes où les tanins sont en général présents. Ainsi, il est possible que l'activité observée en présence de nos extraits méthanoliques soit non spécifique à l'arginase, d'où la nécessité de doser ces composés. Les tanins condensés représentent la classe des tanins la plus représentée dans le monde végétal [384] ainsi ces composés ont été dosés. Le [Tableau 5](#) résume les résultats du dosage des tanins condensés effectué sur les cinq extraits les plus actifs sur l'arginase

Une teneur importante en tanins condensés a été constatée au sein des extraits méthanoliques de *C. azarolus* et *R. tripartita* (235,94 et 163,72 µg EC/mg EB, respectivement). L'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus* contient une faible teneur en tanins condensés (79,85 µg EC / mg EB), quant aux extraits chlorométhyléniques, ils sont très pauvres en tanins condensés.

Bien que les extraits chlorométhyléniques proviennent aussi des tiges, il semble que le DCM, employé comme solvant d'extraction, a permis de limiter le passage des tanins condensés dans les extraits préparés. En revanche, le MeOH a extrait une teneur importante en tanins condensés à partir des tiges de plantes. Ceci est cohérent avec la nature de ces métabolites secondaires connus pour être polaires.

Crataegus azarolus et *Rhus tripartita* n'ont pas fait l'objet, dans la littérature, d'investigations approfondies d'un point de vue phytochimique mais quelques études ont rapporté que ces plantes contiennent des polyphénols, parfois associés à d'autres classes de métabolites secondaires. Chez *Crataegus azarolus* par exemple, les triterpènes sont présents en grande quantité [315]. Cette dernière plante a montré, aussi, la meilleure activité sur le test d'inhibition *in vitro* de l'arginase I bovine. De plus, un effet antihypertenseur des fruits de *Crataegus azarolus* a été récemment démontré par Haydari et ses collaborateurs [252]hay. *Retama raetam*, se caractérise par la présence d'alcaloïdes en plus des composés phénoliques. Il serait par conséquent, nécessaire de réaliser une étude plus approfondie de ces plantes afin d'identifier les métabolites responsables de l'activité inhibitrice de l'arginase. Les investigations phytochimiques sur ces plantes peuvent conduire à isolement et l'évaluation, sur l'arginase, de nouvelles structures de produits naturels.

2. Analyse chromatographique par CLHP-DAD

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur les composés présents dans les cinq extraits provenant de *Crataegus azarolus*, *Retama Raetam* et *Rhus tripartita*, des analyses par CLHP-UV-DAD en phase inverse ont été entreprises avec des conditions d'élution variables selon les besoins spécifiques de chaque extrait. La séparation des constituants de ces extraits a fourni les chromatogrammes présentés sur la [Figure 50](#). Ces derniers illustrent la complexité et la richesse des extraits et permettent d'orienter vers la méthode de fractionnement à utiliser par la suite pour l'isolement des composés des extraits pertinents.

Les chromatogrammes des extraits méthanoliques des tiges de *C. azarolus* ([Figure 50 A](#)) et de *Rhus tripartita* ([Figure 50 B](#)) montrent qu'ils se caractérisent chacun par la présence d'un pic majoritaire en UV, élué au volume mort de la colonne. Peu de pics restent détectables comparés à ce pic majoritaire élué vers un t_R de 4 minutes. Ces deux matrices végétales sont pauvres en composés et contiennent principalement des métabolites très polaires. En plus, les profils chromatographiques de ces extraits, obtenus avec un gradient plus polaire, ont montré un groupe de substances, élués entre 10 et 30 minutes pour l'extrait méthanolique des tiges de *Rhus tripartita* et entre 12 et 26 minutes pour celui de *C. azarolus*, qui forment une surélévation de la ligne de base, caractéristique de la présence des tanins ([Annexe 1](#) et [Annexe 2](#)). Ces observations concordent avec les résultats des dosages en tanins condensés de ces extraits ([Tableau 5](#)).

À partir du chromatogramme de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus* ([Figure 50 C](#)), nous pouvons constater que cette partie de la plante est riche en composés de polarité variable. En effet, un nombre important de pics apparaît avec une bonne résolution selon les conditions analytiques fixées et donc aisément isolables de la matrice. Certaines molécules présentes dans l'extrait sont très polaires puisqu'elles ne sont pas retenues sur la colonne et sont caractérisées par un temps de rétention de 4 minutes mais la majorité des composés a un temps de rétention compris entre 30 et 65 minutes, avec un pic majoritaire observable à 65 minutes, caractérisé, au niveau de son spectre UV, par deux bandes d'absorption à λ_{max} d'environ, 220 et 320 nm.

Le chromatogramme CLHP-DAD de l'extrait DCM de Tiges de *R. raetam* ([Figure 50 D](#)) montre nettement la présence d'un composé majoritaire caractérisé par un t_R de 30,0 min et

présentant, sur son spectre UV, trois bandes d'absorption entre 220 et 325 nm. Celui-ci est accompagné d'autres produits minoritaires entre 17 et 45 minutes.

L'extrait chlorométhylénique des tiges de *C. azarolus*, apparaissant sur la [Figure 50 E](#), contient des composés moins polaires caractérisé par des $t_R >$ à 17 minutes. Six pics sont nettement distincts sur ce chromatogramme avec un composé UV-majoritaire apparaissant vers un t_R de 26 minutes et dont le spectre UV présente trois pics d'absorption à 220, 240 et 310 nm.

À ce stade de l'analyse, la détection DAD/UV des extraits chlorométhyléniques des tiges de *Crataegus azarolus* et de *Retama raetam*, ainsi que de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* montrent une composition intéressante de ces extraits avec une séparation des composés suffisante pour la poursuite de l'étude phytochimique. En revanche, les extraits méthanoliques des tiges de *Crataegus azarolus* et de *Rhus tripartita*, qui contiennent une grande proportion de tanins et probablement des composés très polaires non retenus sur la colonne de C18, nécessitent une filtration sur colonnes SPE de polyamide afin de retenir les tanins et les composés de très hauts poids moléculaires.

Il est important de noter que certains composés n'absorbent pas dans le domaine de l'UV, nous pouvons citer à ce propos les sucres, molécules très polaires, ou les triterpènes qui sont des composés apolaires pouvant se retrouver dans les extraits DCM. Nous avons donc opté pour un profilage rapide des cinq extraits actifs par la résonance magnétique nucléaire (RMN) 1D du proton et du carbone (^1H et ^{13}C) dans le but d'apporter des informations sur les squelettes carbonés et les fonctions chimiques des molécules majoritaires des extraits. Les spectres de RMN du proton des cinq extraits actifs sur l'arginase sont présentés sur la [Figure 51](#).

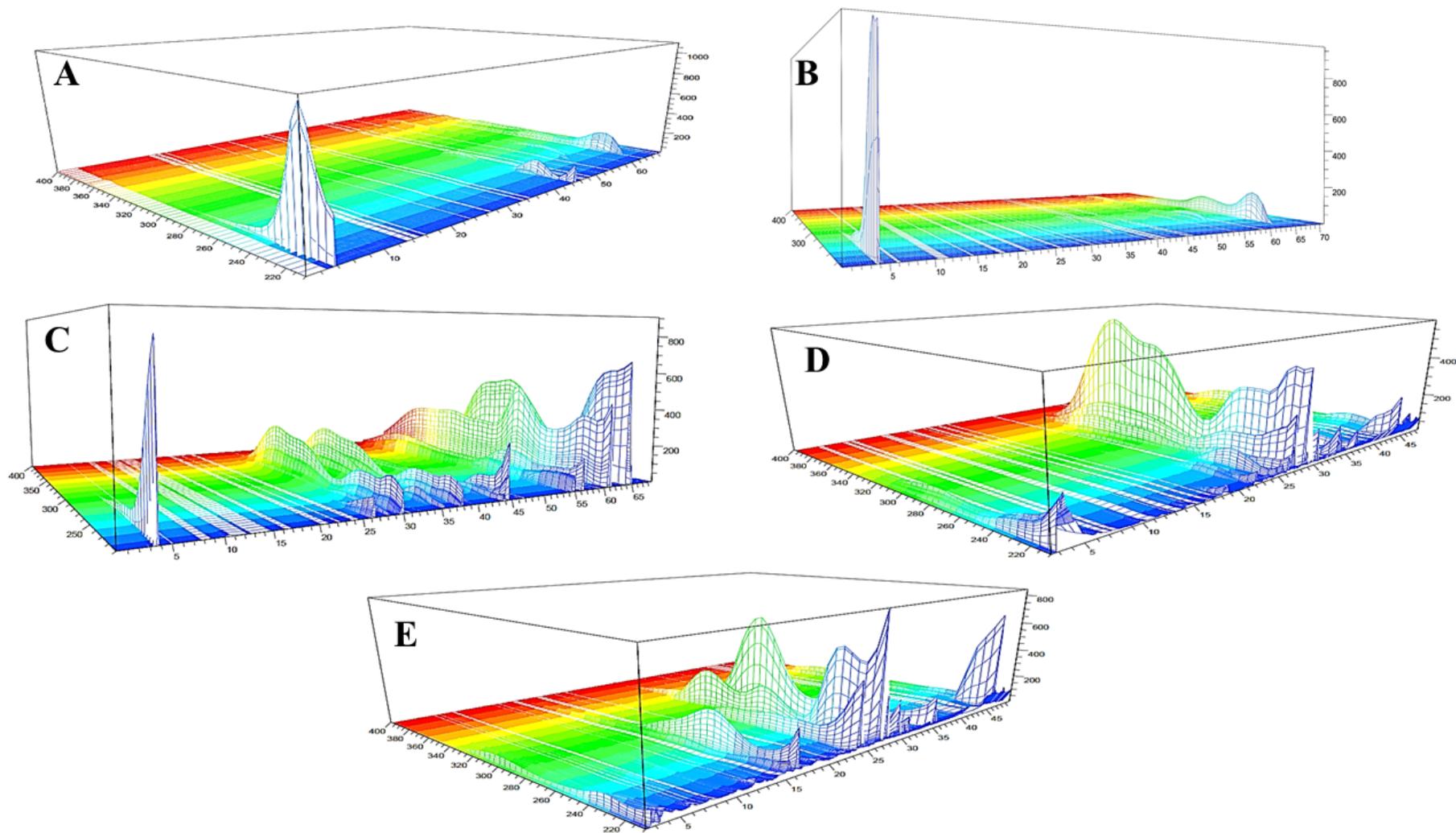


Figure 50 : Profil CLHP (3D plot) des extraits bruts actifs, A. MeOH tiges *Crataegus azarolus*, B. MeOH tiges *Rhus tripartita*, C. MeOH boutons floraux *Crataegus azarolus*, D. DCM tiges *Retama raetam*, E. DCM tiges *Crataegus azarolus* ; axe x : temps en minutes, axe y : longueur d'onde (λ) en nm, z : absorbance en unité arbitraire.

3. Analyse spectroscopique par RMN ^1H et ^{13}C

Les spectres de RMN du proton des cinq extraits actifs sur l'arginase sont présentés sur la [Figure 51](#).

Les spectres protons des extraits méthanoliques des tiges de *Crataegus azarolus* et de *Rhus tripartita* ([Figure 51 A et B](#)) présentent principalement deux zones distinctes : de 0,75 ppm à 2,25 ppm, une première zone qui concentre les alcanes et de 3,43 ppm à 4,82 ppm, une zone qui concerne les protons de sucres, plus abondants sur ces deux spectres. De ces profils, nous pouvons déduire que ces deux extraits comportent principalement des sucres, présentant peu d'intérêt pour notre étude.

L'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* et l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam* affichent quant à eux quatre zones distinctes. Pour ces deux extraits, la présence de groupements méthyles (entre 0,5 et 2 ppm), de groupements méthylènes (entre 2 et 4,5 ppm) et de protons éthyléniques pouvant appartenir à des chaînes prényles (entre 4,5 et 6,5 ppm) a été remarquée. Il n'est pas étonnant de retrouver des chaînes prényles en particulier dans l'extrait de *Retama raetam* puisque cette plante appartient à la famille des Fabaceae qui est bien connue pour sa richesse en flavonoïdes prénylés [385]. La présence de groupements phényles a également été notée dans ces deux extraits ([Figure 51 C et D](#)) en raison de la présence de protons aromatiques situés entre 6,5 et 8,25 ppm.

L'analyse du spectre RMN ^1H réalisé sur l'extrait brut DCM des tiges de *Crataegus azarolus* ([Figure 51 E](#)) montre que ce mélange a la particularité d'afficher des protons déblindés (δH entre 8,5 et 13,5 ppm) ce qui témoigne de la présence de groupements hydroxyles. Au sein de cet extrait, les protons des alcanes sont majoritaires (de 0,5 à 2 ppm) et dans un deuxième lieu apparaissent les protons aromatiques.

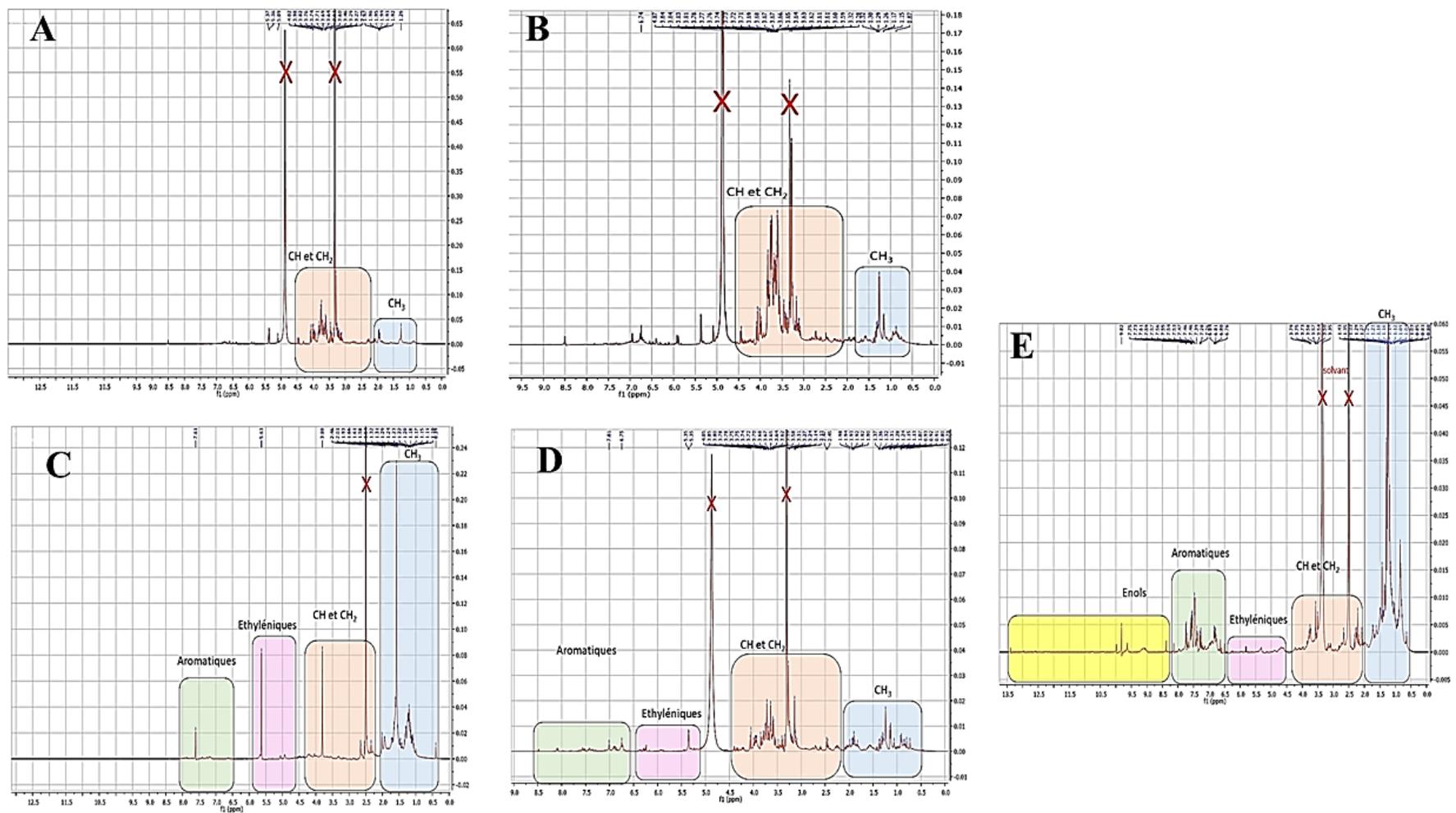


Figure 51: Spectres RMN ^1H des extraits actifs sur l'arginase (mesurés à 400,13 MHz), A. MeOH tiges *Crataegus azarolus*, B. MeOH tiges *Rhus tripartita*, C. MeOH boutons floraux *Crataegus azarolus*, D. DCM tiges *Retama rietam*, E. DCM tiges *Crataegus azarolus* ; les pics barrés correspondent aux solvants résiduels.

Les spectres RMN du carbone des cinq extraits provenant de *Crataegus azarolus*, de *Rhus tripartita* et de *Retama raetam* sont présentés sur la [Figure 52](#). Les extraits méthanoliques des tiges de *Crataegus azarolus* et de *Rhus tripartita* montrent la présence abondante de carbones reliés aux sucres apparaissant entre 60 ppm et 105 ppm ([Figure 52 A et B](#)). Bien que les spectres carbones de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* et l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam* ([Figure 52 C et D](#)) présentent aussi des carbones reliés aux sucres, nous détectons 3 autres zones bien distinctes. Une première zone de 10 ppm à 55 ppm qui correspond aux alcanes, une autre zone de 105 ppm à 165 ppm correspondant aux carbones oléfiniques et une troisième zone signalant la présence de carbonyles (de 165 ppm à 185 ppm). Concernant l'extrait DCM des tiges de *Crataegus azarolus* ([Figure 52 E](#)), il semble que les squelettes de ses composés majoritaires soient dépourvus de sucres puisque l'absence de pics entre 60 ppm et 105 ppm a été notée. Ce dernier extrait paraît, en revanche, riche en alcanes et en carbones oléfiniques.

4. Pré-purification des extraits méthanoliques

Au regard de ces derniers résultats, nous avons opté pour la filtration des extraits méthanoliques sur cartouches SPE (*solid phase extraction*) en polyamide afin d'éliminer la majorité des tanins. Après cette étape de pré-purification, les extraits méthanoliques ont été réinjectés sur la chaîne CLHP-UV et évalués à nouveau sur l'arginase hépatique bovine. Les cartouches SPE en polyamide se sont avérées efficaces pour l'élimination des tanins ([Annexe 1](#) et [Annexe 2](#)). En revanche, cette rétention des tanins s'est accompagnée de la baisse de l'activité biologique. En effet, il a été constaté que l'activité inhibitrice de l'extrait méthanolique des tiges de *Crataegus azarolus* a chuté de 89,2% à 46,56% à 100 µg/mL et celle de *Rhus tripartita* est passée de 80,74% à 39,04% à 100 µg/mL. Cette pré-purification prouve que l'activité biologique de ces extraits est attribuée en grande partie aux tanins et est la conséquence d'une interaction non spécifique tanins-protéine. Cependant, l'activité de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* n'a pas changé (80% à 100 µg/mL) ce qui est en ligne avec sa composition réduite en tanins condensés comparativement aux deux autres extraits méthanoliques.

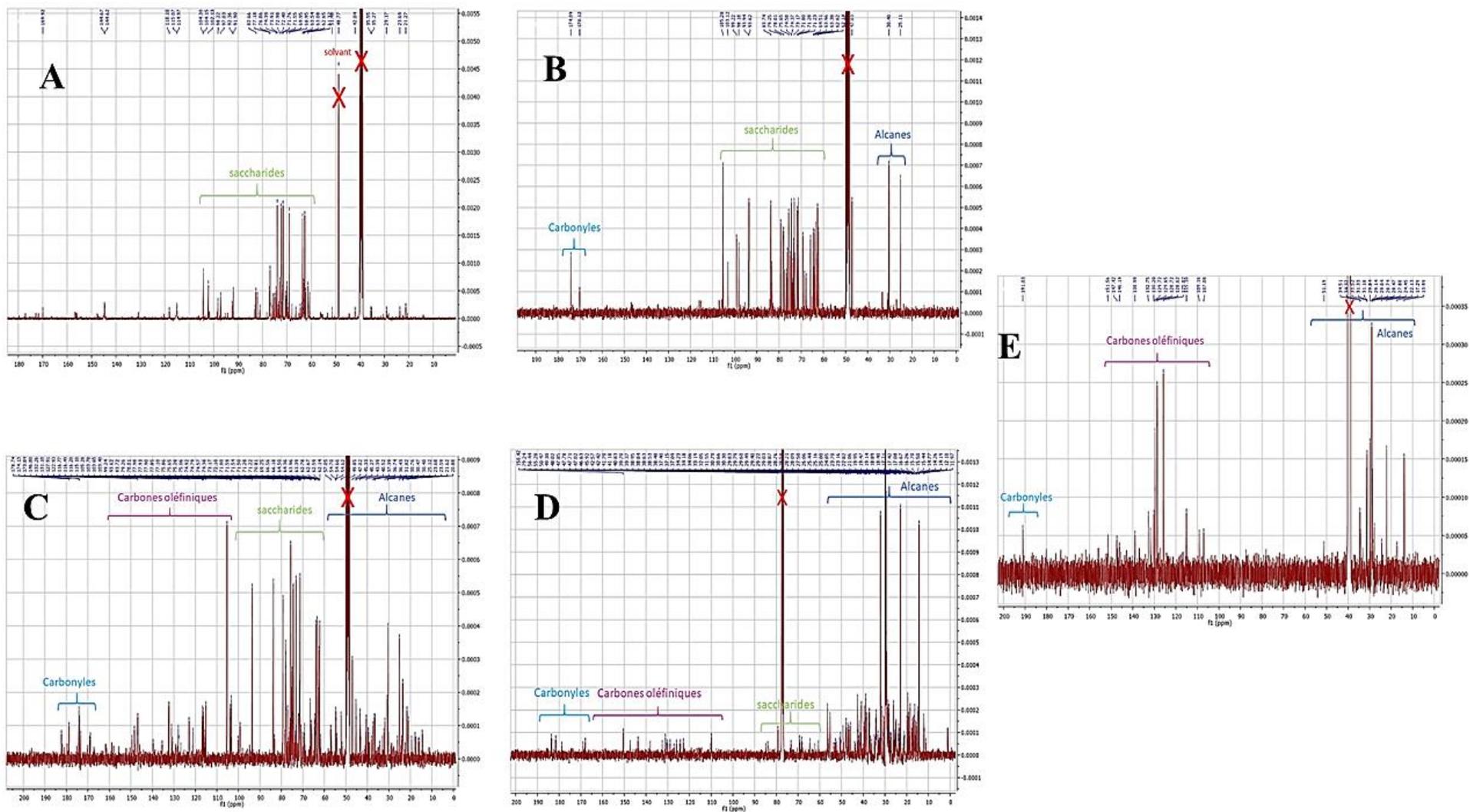


Figure 52: Spectres RMN ^{13}C des extraits actifs sur l'arginase (mesurés à 100,13 MHz), A. MeOH tiges *Crataegus azarolus*, B. MeOH tiges *Rhus tripartita*, C. MeOH boutons floraux *Crataegus azarolus*, D. DCM tiges *Retama raetam*, E. DCM tiges *Crataegus azarolus* les pics barrés correspondent aux solvants résiduels.

5. Conclusion

Lors du criblage biologique des 81 extraits bruts de plantes sur l'arginase, cinq extraits ont montré des activités inhibitrices très intéressantes avec des pourcentages d'inhibition dépassant les 70% à 100 µg/mL. Ces extraits provenant de *Crataegus azarolus*, de *Rhus tripartita* et de *Retama raetam* ont subi, dans un deuxième temps, un criblage phytochimique préliminaire qui a montré que les extraits chlorométhyléniques sont riches en molécules de polarité moyenne, vu leurs profils CLHP/DAD et en particulier en flavonoïdes à la suite du dosage de ces composés dans les extraits. L'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*, riche en polyphénols, bien qu'il contienne des molécules très polaires, éluées rapidement de la colonne en phase inverse, il possède aussi des molécules de polarité moyenne et des molécules apolaires élués vers 65 minutes.

Les extraits méthanoliques des tiges de *Crataegus azarolus* et de *Rhus tripartita* sont les plus riches en polyphénols totaux mais il semble que ces polyphénols se composent principalement de tanins puisque de fortes teneurs de tanins condensés ont été détectées dans ces extraits et leur élimination par SPE a réduit de façon importante l'activité inhibitrice de l'arginase. Les extraits méthanoliques des tiges de *Crataegus azarolus* et de *Rhus tripartita* ont montré la présence principale, d'un composé majoritaire très polaire non retenu sur la colonne. Ces résultats corroborent les données de la RMN ¹H et ¹³C qui ont signalé que les saccharides représentent les composés majoritaires des extraits méthanoliques des tiges de *Crataegus azarolus* et de *Rhus tripartita*.

Le recoupement des données biologiques et phytochimiques nous a conduit à limiter le nombre d'extraits à étudier. En effet, seuls trois extraits, qui sont les extraits chlorométhyléniques des tiges de *Crataegus azarolus* et *Retama raetam* et l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* présentent un intérêt pour une étude phytochimique approfondie.

Chapitre 3 : Investigation phytochimique sur les extraits sélectionnés

Ce troisième chapitre présente l'étude phytochimique des trois extraits sélectionnés à la suite du criblage biologique pour l'activité inhibitrice d'arginase et de l'analyse phytochimique préliminaire.

Nous présenterons dans un premier temps l'investigation phytochimique détaillée de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*. Ensuite, l'étude de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam* sera exposée pour terminer par le travail réalisé sur l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus*.

L'investigation sur chacun de ces trois extraits bruts comporte une étude dérégulative, effectuée au cours de deux stages au sein du laboratoire SONAS de l'EA 921. Nous présenterons aussi le travail de fractionnement bioguidé qui a été établi sur ces extraits ainsi que la purification et l'élucidation structurale des composés purs isolés qui seront éventuellement testés sur l'arginase lorsqu'ils sont purifiés en quantité suffisante.

1. Étude de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*

Afin d'identifier les principaux métabolites secondaires contenus dans l'extrait des boutons floraux de l'azarole tunisien, une étude dérégulative a été conduite, par une méthode optimisée de chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à des détecteurs ultra-violet (UV) et de masse (MS et MSⁿ). Sur la base d'une comparaison à la littérature des profils, notamment spectraux, divers métabolites secondaires ont été identifiés sans isolement à partir du mélange brut initial. Cela permet, d'une part, d'établir des corrélations entre l'activité de l'extrait et les métabolites qui le composent, et, d'autre part, d'éviter les étapes fastidieuses de purification qui mènent parfois à des composés déjà connus. L'objectif de ces études dérégulatives est de cibler les composés possédant des structures originales et/ou ceux qui n'ont jamais été testés sur l'arginase.

1.1. Étude dérégulative par CLHP-UV-DAD et CLHP-ESI-MSⁿ de l'extrait brut

L'extrait a été analysé par CLHP-UV-DAD en phase inverse selon un gradient linéaire allant de 100 % d'eau acide (0,1 % d'acide formique) à 30 % d'ACN en 60 minutes puis avec

100% d'ACN pendant 10 minutes pour éluer les composés peu polaires. Ceci a permis de distinguer, dans un premier temps, les classes chimiques auxquelles appartiennent les composés majoritaires. Ces mêmes conditions de séparation des produits, ont été employées, par la suite, pour une analyse sur une chaîne de CLHP couplée à un détecteur de masse en ionisation électrospray (ESI).

Le chromatogramme CLHP de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* obtenu à 280 nm est présenté sur la [Figure 53](#). Ce chromatogramme témoigne de la richesse, de cette plante, en métabolites secondaires.

La [Figure 54](#) résume les spectres d'absorption des composés majoritairement retrouvés dans cet extrait méthanolique entre 210 et 400 nm. Diverses classes chimiques ont été repérées au sein des boutons floraux. En effet des spectres UV typiques des acides hydroxycinnamiques [386, 387], caractérisés par des λ_{\max} à 215, 240, 300 et 330 nm ont été repérés ([Figure 54 A et B](#)) en particulier le spectre de l'acide *p*-coumarique ($\lambda_{\max} = 230$ et 315 nm, [Figure 54 B](#)) [388]. Les composés élués entre 30,6 et 40,7 minutes se caractérisent par un spectre UV typique des flavanols (λ_{\max} 230, 280, 375(sh) nm) ([Figure 54 D](#)). Ensuite nous remarquons la présence de plusieurs spectres caractéristiques de flavones ayant deux pics d'absorption à λ_{\max} 265 et 340 nm ([Figure 54 E](#)) suivis de ceux des flavonols avec des λ_{\max} 225(sh), 270, 325 (sh) et 360 (sh) nm ([Figure 54 F](#)) [388]. D'autres spectres UV ([Figure 54 C, D](#)) nous semblent atypiques, caractérisés par des λ_{\max} de 215, 240 et 320 ([Figure 54 C](#)) et 285 (sh) et 315 (sh) ([Figure 54 G](#)) respectivement.

L'analyse des boutons floraux de *Crataegus* par LC-MS/MS a permis la séparation de 51 pics, au sein de l'extrait brut ([Tableau 6](#)). L'attribution des structures suggérées aux différents composés a été effectuée selon leurs fragments expérimentaux (m/z) en mode négatif. Les données MSⁿ de chaque composé ont été comparées aux données de la littérature afin de permettre l'identification des pics détectés.

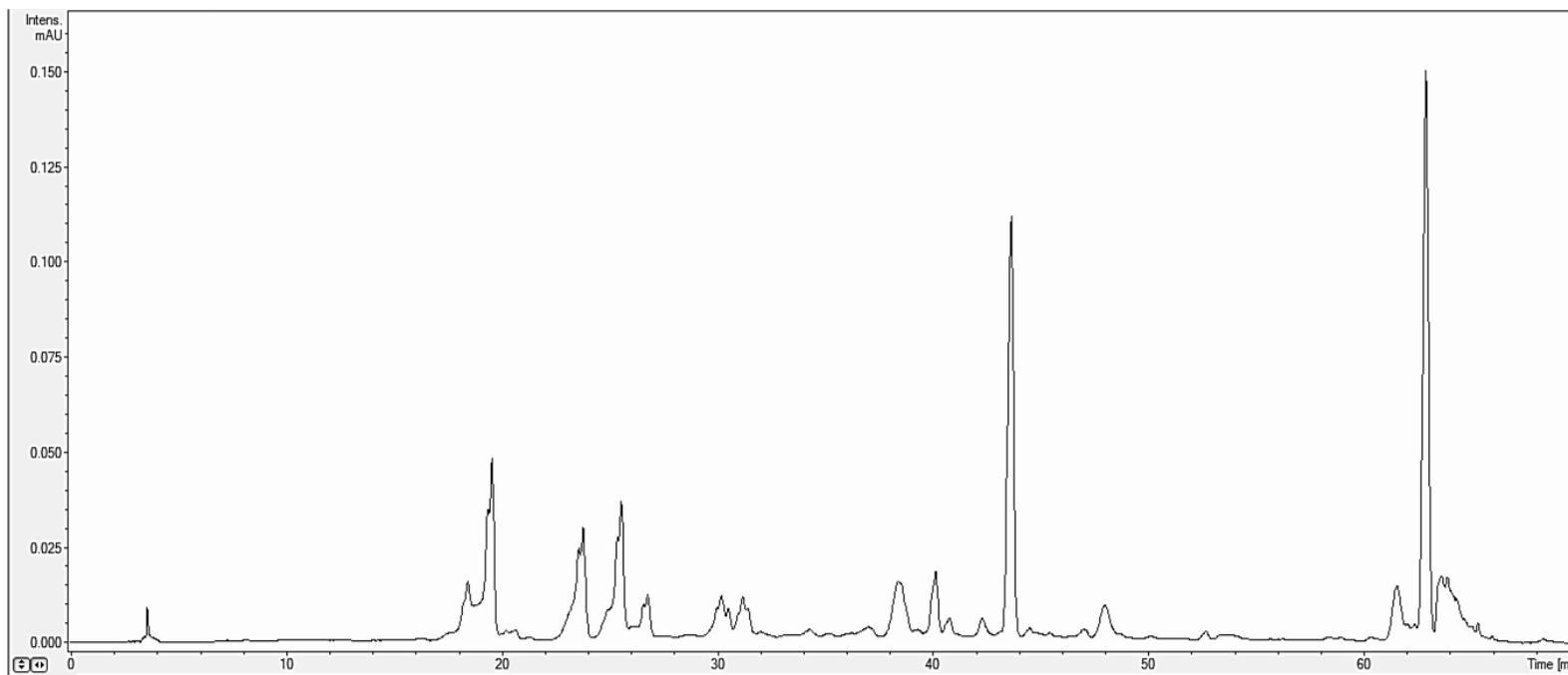


Figure 53: Chromatogramme CLHP-UV (détection à 280 nm) de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*.

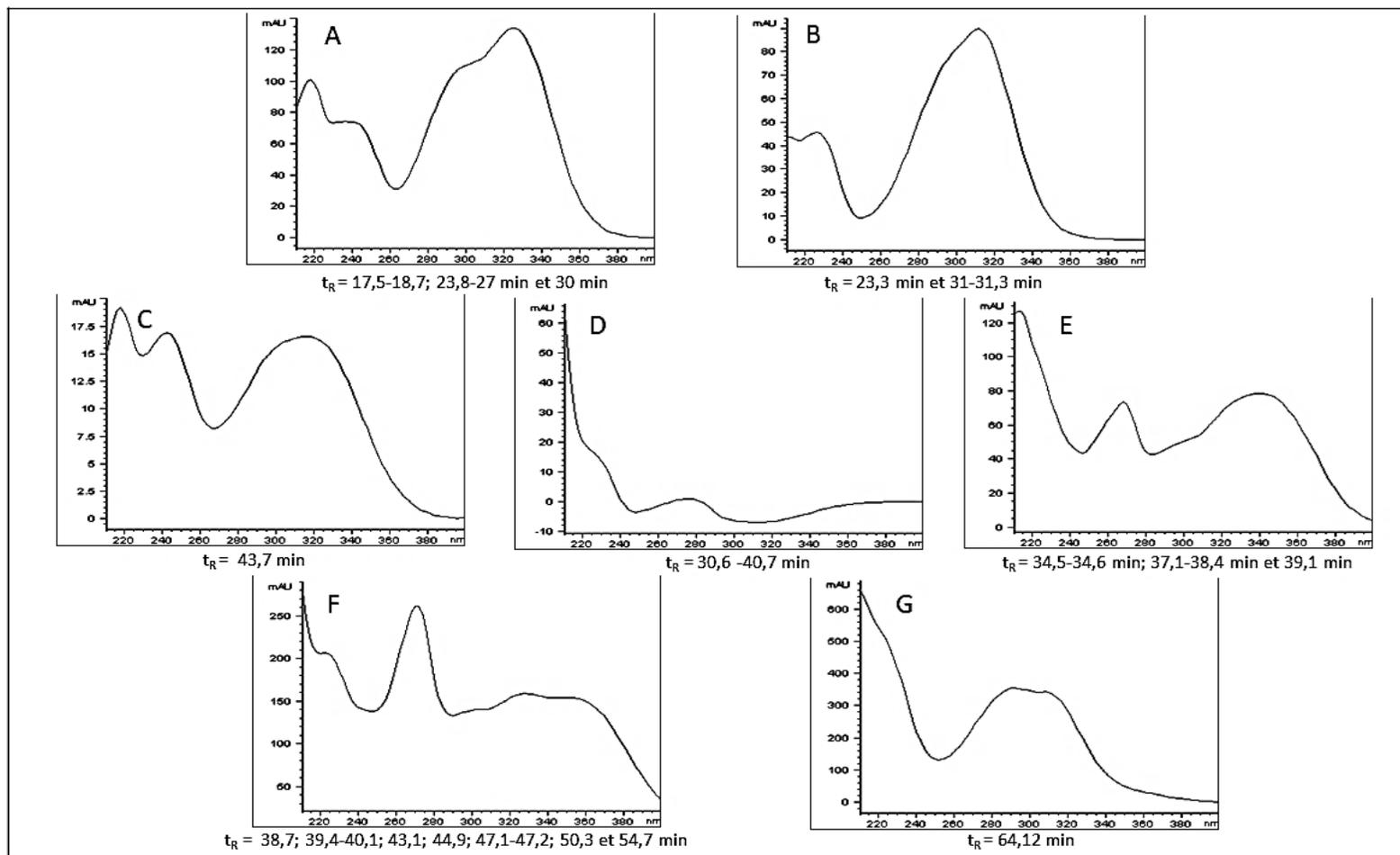


Figure 54: Spectres UV des composés majoritaires détectés dans l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*, A et B : spectres typiques des acides hydroxycinnamiques, D : spectre typique des flavanols, E : spectre typique des flavones, F : spectre des flavonols, C et G : spectres atypiques.

Tableau 6. Données chromatographiques et spectrales des composés détectés dans l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*

Pic	t _R (min)	[M-H] ⁻	Fragments MS ⁿ	Tentative d'identification	Référence
bCa-1	17,6	353	191 , 179, 135	Acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique (acide néochlorogénique)	[389]
bCa-2	18,4	707	467, 413, 353	Dimère d'acide caféoylquinique	[390]
bCa-3	18,7	353	191 , 179, 173, 135	Acide cis-3- <i>O</i> -caféoylquinique (acide cis-néochlorogénique)	[391]
bCa-4	23,3	337	191, 173, 163 , 119, 93	Acide 3- <i>O-p</i> -coumaroylquinique	[391]
bCa-5	23,8	353	191, 179, 173 , 135	Acide 4- <i>O</i> -caféoylquinique (acide cryptochlorogénique)	[392]
bCa-6	25	353	191	Acide 5- <i>O</i> -caféoylquinique (acide chlorogénique)	[391]
bCa-7	25,6	707	353	Dimère d'acide caféoylquinique	[390]
bCa-8	26,9	707	353	Dimère d'acide caféoylquinique	[390]
bCa-9	27,6	577	451, 425, 407 , 289, 287, 203	Procyanidine dimère de type b	[390]
bCa-10	28,5	577	451, 425 , 407, 289, 287	Procyanidine dimère de type b	[390]
bCa-11	29,8	431*	385 , 223, 205, 161, 153	Roséoside	[390]
bCa-12	30,1	353	191 , 173	Acide cis- 5- <i>O</i> -caféoylquinique (acide cis-chlorogénique)	[391]
bCa-13	30,6	289	271, 245 , 205, 179, 161	Epicatéchine	[391]

bCa-14	31,1	337	191 , 173, 163, 127	Acide 5- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroylquinique	[391]
bCa-15	31,3	337	191 , 173, 163	Acide cis-5- <i>p</i> -coumaroylquinique	[392]
bCa-16	31,9	449	287 , 269, 259, 243, 125	DihydroKaempférol- <i>O</i> -hexoside	[393]
bCa-17	32,1	449	287 , 269, 259	Cyanidine-7- <i>O</i> -glucoside	[391]
bCa-18	32,9	865	847, 829, 713, 739, 677 , 543, 531, 525, 407, 405, 399, 287	Procyanidine trimère de type b	[390] [391]
bCa-19	34,5	563	503, 473, 443, 383, 353	Apigénine-6- <i>C</i> -pentosyl-8- <i>C</i> -hexoside	[391]
bCa-20	34,6	563	545, 527, 503, 473, 443, 413, 383 , 353	Apigénine- <i>C</i> -hexoside- <i>C</i> -pentoside (isomère)	[394]
bCa-21	36,3	435	273 , 255, 229	Phlorétine-2'- <i>O</i> -glucoside (phlorizine)	[391]
bCa-22	37,1	593	473, 413 , 293	Apigénine 6,8-di- <i>C</i> -glucoside (vicénine-2)	[391]
bCa-23	38,1	577	413 , 293	Vitexine 2''- <i>O</i> -rhamnoside	[391]
bCa-24	38,4	563	443, 413 , 293	Apigénine- <i>C</i> -hexoside- <i>C</i> -pentoside (isomère)	[394]
bCa-25	38,7	609	301 , 300, 271, 179	Quercétine 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -rhamnosyl-glucoside) (rutine)	[391] [392]
bCa-26	39,1	431	341, 311 , 283	Apigénine 8- <i>C</i> -glucoside (vitexine)	[391]
bCa-27	39,4	623	477, 459, 315, 314, 300, 299 , 271, 243	Isorhamnétine 7- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -rhamnosyl- glucoside)	[391]
bCa-28	40,1	463	301 , 300, 271, 255, 179, 151	Quercétine 3- <i>O</i> -galactoside (hyperoside)	[391]
bCa-29	40,7	577	451, 425, 407 , 289, 255	(Epi)catéchine-4,8'-(epi)catéchine (isomère)	[391]

bCa-30	40,9	577	535, 487, 451, 425 , 413, 407, 299, 287, 281, 245, 179	Procyanidine dimère de type b	[395]	
bCa-31	41	619	413 , 293	Craténacine (isomère)	[391]	
bCa-32	41,4	619	413 , 323, 293	Craténacine (isomère)	[391]	
bCa-33	42,2	619	577, 559, 413 , 293, 207	Craténacine (isomère)	[391]	
bCa-34	43,1	623	357, 315 , 300, 271, 255	Isorhamnétine 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -rhamnosyl-galactoside)	[391]	
bCa-35	43,4	477	315 , 300, 271, 255	Non identifié		—
bCa-36	44,5	507	492 , 345, 329, 315, 301, 285, 166	Non identifié		—
bCa-37	44,9	477	315 , 300, 285, 271, 243	Isorhamnétine 3- <i>O</i> -glucoside	[397]	
bCa-38	45,2	515	353 , 191, 179, 173	Acide 3, 5- di- <i>O</i> -caféoylquinique	[391]	
bCa-39	47,1	463	301 , 300, 179, 151	Quercétine 3- <i>O</i> -glucoside (isoquercitrine)	[391]	
bCa-40	47,2	519	315 , 300, 271, 255	Non identifié		
bCa-41	47,9	619	499, 413 , 293	Craténacine (isomère)	[391]	
bCa-42	49,1	463	417 , 301, 255	Non identifié		—
bCa-43	50,3	519	473, 357, 315 , 300, 299, 271, 255, 243,	Isorhamnétine-hexosyle-acyle	[398]	
bCa-44	52, 8	379	259 , 119	Non identifié		—

bCa-45	54,7	447	399, 325, 315 , 247, 233, 211, 161, 159	Isorhamnétine- <i>O</i> -pentoside	[399]	
bCa-46	57,1	565	329, 253 , 161	Non identifié		—
bCa-47	59,2	598	550, 478, 462 , 452, 342, 332	Non identifié		—
bCa-48	60,7	582	462 , 436, 342	N ¹ , N ⁵ , N ¹⁰ - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]	
bCa-49	61,9	582	462 , 436, 342	N ¹ , N ⁵ , N ¹⁰ - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]	
bCa-50	63,2	582	462 , 436, 342	N ¹ , N ⁵ , N ¹⁰ - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]	
bCa-51	63,6	612	492 , 476, 466, 462, 372	Non identifié		—

Le pic de base pour chaque composé est mentionné en gras ; *Ion détecté en mode négatif sous forme de [M- H+HCOOH]⁻

1.1.1. Caractérisation des acides hydroxycinnamoylquiniques

a- Acides *p*-coumaroylquiniques

Les pics bCa-4, bCa-14 et bCa-15 ont été attribués aux isomères d'acides *p*-coumaroylquiniques (affichant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 337) sur la base de leurs données spectrales UV et MS. Le pic à m/z 191, correspondant à la perte d'un groupement *p*-coumaroyle à partir de l'ion parent, a été détecté chez ces trois isomères. Ce dernier perd à son tour une molécule de H₂O pour donner un fragment à m/z 173 observé également sur le profil de fragmentation des trois acides *p*-coumaroylquiniques détectés dans les boutons floraux. Ces isomères ont été attribués respectivement aux acides 3-*O*-*p*-coumaroylquinique, 5-*p*-*O*-coumaroylquinique et *cis*-5-*p*-*O*-coumaroylquinique (Tableau 6).

b- Acides caféoylquiniques

Les pics bCa-1 (t_R 17,6 min), bCa-3 (t_R 18,7 min), bCa-5 (t_R 23,8 min), bCa-6 (t_R 25 min) et bCa-12 (t_R 30,1 min) générant des ions déprotonés $[M-H]^-$ à m/z 353 ont été identifiés, respectivement, comme étant l'acide 3-*O*-caféoylquinique (acide néochlorogénique), l'acide *cis*-3-*O*-caféoylquinique (acide *cis*-néochlorogénique), l'acide 4-*O*-caféoylquinique (acide cryptochlorogénique), l'acide 5-*O*-caféoylquinique (acide chlorogénique), et l'acide *cis*-5-*O*-caféoylquinique (acide *cis*-chlorogénique) (Tableau 6) par comparaison de leurs profils de fragmentation à la littérature. Ces divers dérivés de l'acide chlorogénique ont été signalés auparavant chez *Crataegus monogyna* [391, 392]. Selon Asamenew et col. [386], c'est la position de l'acylation et l'orientation structurale du groupement quinique qui détermine l'hydrophobicité de ces composés d'où leurs temps de rétention différents.

En outre, un acide dicaféoylquinique (pic bCa-38) a été détecté dans les boutons floraux de *C. azarolus* à m/z 515 caractérisé par un t_R de 45, 2 min. Le pic de base, avec une intensité relative de 100%, de ce composé a été détecté à m/z 353 montrant la perte de l'ion parent d'un fragment caféoyle ($[M-H-Caf]^-$).

Plusieurs dimères d'acide caféoylquinique ont été également détectés à des temps de rétention de 18,4 ; 25,6 et 26,9 min pour un m/z 707. Ces composés sont également caractérisés par des pics de base à m/z 353.

En conclusion, plusieurs dérivés d'acides hydroxycinnamoylquiniques, y compris les acides *p*-coumaroylquiniques et les acides caféoylquiniques, ont été détectés dans les boutons floraux de *C. azarolus*.

1.1.2. Caractérisation du roséoside

La comparaison des résultats spectroscopiques obtenus du pic bCa-11 avec les données de la littérature a permis d'attribuer ce pic au roséoside. Ce dernier est élué à un t_R de 29,8 minutes et présente un ion à m/z 431 $[M-H+HCOOH]^-$, ainsi qu'un pic de base caractéristique à m/z 385 $[M-H]^-$ et un ion fragment à m/z 223 $[M-H-Glc]^-$ [390, 401]. Ce glycoside a été isolé, auparavant, des feuilles de *Crataegus pinnatifida* [402].

1.1.3. Caractérisation des anthocyanidines, des proanthocyanidines et de leurs dérivés

Les anthocyanidines, les proanthocyanidines et leurs dérivés sont des constituants bien connus chez les espèces de *Crataegus*.

a- Caractérisation des dérivés d'épicatéchine

Le pic bCa-13 (t_R 30,6 min) à m/z 289 et le pic bCa-29 (t_R 40,7 min) à m/z 577 (Tableau 6 page 211) ont été identifiés, respectivement, comme étant l'épicatéchine et un dimère d'épicatéchine par comparaison du spectre UV et de leurs profils de fragmentation MS et MSⁿ avec les données décrites dans la littérature [391].

b- Caractérisation des proanthocyanidines de type B et de leurs dérivés

Des oligomères de proanthocyanidines de type B ont été détectés dans l'échantillon de *Crataegus azarolus*. Ils ont montré des spectres UV avec une absorbance maximale à λ_{max} 280 nm, typique des proanthocyanidines. Les dérivés dimériques de flavan-3-ol, ont montré en plus une fragmentation caractéristique des procyanidines du groupe B avec une perte de 152 Da en mode négatif, suivie d'une perte d'eau (18 Da). Ainsi, les pics bCa-9, bCa-10, bCa-30 (Tableau 6 page 211), élués respectivement à 27,6 ; 28,5 et 40,9 min et ayant montré des ions pseudomoléculaires $[M- H]^-$ à m/z 577, correspondent aux proanthocyanidines dimères de type

B [391]. Le pic bCa-18 (t_R 32,9 min), détecté à m/z 865, a été attribué à la proanthocyanidine trimère de type B [390].

c- Caractérisation des dérivés de la cyanidine

Un pic (bCa-17) a été détecté à un temps de rétention de 32,1 min, (Tableau 6 page 211) et caractérisé par un ion $[M-H]^-$ m/z 449. Ce composé a montré une perte neutre de la fraction hexose résultant en un ion fragment à m/z 287 qui correspond à la cyanidine (Tableau 6 page 211). Par conséquent, il a été suggéré que ce composé correspond à une cyanidine *O*-hexoside. Sur la base d'une étude antérieure, ce constituant a été identifié comme étant la cyanidine 7-*O*-glucoside [391].

1.1.4. Caractérisation des flavonoïdes et des glycosides de flavonoïdes

Tous les flavonoïdes *O*-glycosides montrent une perte neutre de la partie glycone. En revanche, les flavonoïdes *C*-glycosides peuvent présenter des fragments caractéristiques de flavonoïdes *C*-glycosylés tels que les fragments à m/z $[M-H-18]^-$, $[M-H-30]^-$, $[M-H-60]^-$, $[M-H-90]^-$, $[M-H-120]^-$, $[M-H-180]^-$ et $[M-H-210]^-$ en raison d'une fragmentation croisée des molécules de glucosides [391]. Ces données ont aidé à l'identification des composés présentés ci-dessous.

a- Caractérisation des dérivés de la quercétine

Les pics bCa-25 et bCa-39 (t_R 38,7 et 47,1 min, Tableau 6 page 211) à ions pseudomoléculaires apparaissant à m/z de 609 et 463 ont été attribués à la quercétine 3-*O*-(6-*O*-rhamnosyl-glucoside) (rutine) et la quercétine 3-*O*-glucoside (isoquercitrine), respectivement, après comparaison de leurs spectres MS^n à la littérature. D'après Schieber et son équipe [397], les flavonoïdes glycosylés avec des unités galactosides sont plus polaires que les flavonoïdes glycosylés avec des unités glucosides et sont, par conséquent, moins retenus sur une colonne en phase inverse. Sur la base de cette constatation le pic bCa-28, élué à un t_R de 40,1 minutes et présentant une fragmentation MS^n très similaire à celle du pic bCa-39 (Tableau 6 page 211), a été attribué à la quercétine 3-*O*-galactoside (hyperoside). La présence de l'hyperoside a été déjà rapportée, dans la littérature, chez l'espèce *Crataegus azarolus* [253]. Ces trois composés (la rutine, l'isoquercitrine et l'hyperoside) montrent un pic de base à m/z 301 caractéristique, en mode négatif, d'une génine de quercétine.

b- Caractérisation des dérivés de l'apigénine

Les pics bCa-19, bCa-20 et bCa-24 (t_R 34,5, 34,6 et 38,4 min, [Tableau 6 page 211](#)) ont montré une fragmentation MS^n caractéristique de flavones di-C-glycosylés avec des m/z à $[M-H-18]^-$, $[M-H-60]^-$, $[M-H-90]^-$, $[M-H-120]^-$, $[M-H-180]^-$ et $[M-H-210]^-$ [391]. Une intensité plus élevée de l'ion à m/z 473 $[M-H-90]^-$ par rapport à l'ion à m/z 443 $[M-H-120]^-$ indique une liaison 6-C-pentosyl-8-C-hexosyle. Ainsi, les pics bCa-20 et bCa-24 ([Tableau 6 page 211](#)) ont été caractérisés comme étant des isomères de l'apigénine-C-hexoside-C-pentoside et le pic 19 a été précisément attribué à l'apigénine 6-C-pentosyl-8-C-hexoside. Plusieurs isomères d'apigénine di-C-glycosides ont été précédemment isolés à partir de *C. monogyna* et de *C. pentagyna* [391]. Le pic bCa-22, montrant un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 593, a été détecté à un temps de rétention de 37,1 min ([Tableau 6 page 211](#)). Ce composé a présenté des ions fragments de flavonoïde C-glycoside à m/z 473 $[M-H-120]^-$ et 413 $[M-H-180]^-$. En comparant avec la littérature ce pic a été proposé comme étant de l'apigénine 6,8-di-C-glucoside (vicénine-2).

En outre, l'Apigénine 8-C-glucoside (vitexine) (pic bCa-26), la vitexine 2''-O-rhamnoside (pic bCa-23) et les isomères de craténacines (pics bCa-31- 33 et pic bCa-41) ont été attribués sur la base des ions fragments produits ([Tableau 6 page 211](#)) et leur comparaison aux données précédemment rapportées. Les craténacines (5,7,4'-trihydroxyflavone 8C-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-monoacétyl-O- α -L-rhamnopyranoside) montrent la présence d'ions fragments m/z 413 $[M-H-146-60]^-$, 293 $[M-H-146-180]^-$ et 499 $[M-H-120]^-$; le fragment à m/z 413 étant le pic de base. Il n'est pas étonnant de retrouver ces composés dans notre plante puisque les dérivés de la vitexine sont des composés bien connus dans les espèces de *Crataegus* [403].

c- Caractérisation des dérivés du kaempférol

Le pic bCa-16 a présenté un ion $[M-H]^-$ à m/z 449. Il a subi la perte neutre de 162 Da, donnant l'aglycone à m/z 287, qui correspond au dihydrokaempférol. Par conséquent, ce composé a été identifié comme étant le dihydrokaempférol-O-hexoside [393]

d- Caractérisation des dérivés de l'isorhamnétine

Les pics bCa-27, bCa-34, bCa-37, bCa-40, bCa-43 et bCa-45 (t_R 39,4 ; 43,1 ; 44,9 ; 47,2 ; 50,3 et 54,7 min, respectivement) ont été attribués, respectivement, à l'isorhamnétine 7-O-(6-

O-rhamnosyl-glucoside), l'isorhamnétine 3-*O*-(6-*O*-rhamnosyl-galactoside), l'isorhamnétine 3-*O*-glucoside, l'isorhamnétine acétylhexoside, l'isorhamnétine-hexosyle-acyle et à l'isorhamnétine-*O*-pentoside [391, 392, 399] (Tableau 6 page 211) suivant leurs données MS et MS/MS et par comparaison de ces dernières aux données de la littérature. Tous ces composés se caractérisent par un pic de base à m/z 315 indiquant la présence de l'aglycone isorhamnétine [391].

Remarque : Les temps de rétention des flavonoïdes (dérivés de la vitexine, de la quercétine et du kaempférol) sont supérieurs à ceux des acides hydroxycinnamiques ; ceci peut être attribué à la présence d'un groupement cétone en position 4 dans ces composés. La fonction 4-cétone forme un cycle plan à six chaînons, non polaire, avec le groupe hydroxyle positionné en 5 [388], ce qui explique l'élution retardée de ces composés. Cependant, une élution précoce de l'épicatéchine à une faible concentration d'ACN peut être expliquée par l'absence de groupement 4-cétone rendant ce composé moins hydrophobe [388].

En résumé, plusieurs composés de différentes classes de flavonoïdes, tels que les flavonols, les flavanols, les flavones, ont été caractérisés et identifiés dans notre échantillon d'aubépine. Ce dernier a montré la présence des flavonoïdes *C*-glycosylés et *O*-glycosylés.

1.1.5. Caractérisation des dérivés de la phlorétine

L'analyse LC-MSⁿ en mode négatif nous a également montré la présence d'un dérivé de la phlorétine chez l'espèce de *C. azarolus*. Le composé élué à un t_R de 36,3 min (pic bCa-21, Tableau 6 page 211) à m/z 435 [M-H]⁻, a été identifié comme étant la phlorétine 2'-*O*-glucoside (phlorizine) sur la base de la comparaison du schéma de fragmentation de ce composé à la littérature [391]. Ce métabolite est caractérisé, comme tout flavonoïde *O*-glycoside par la perte neutre de la partie glycane à l'origine de l'apparition du pic de base à m/z 273 [M-H-162]⁻.

1.1.6. Caractérisation des dérivés de la spermidine

À des temps de rétention assez élevés (60,7- 63,2 minutes) nous avons détecté des ions pseudomoléculaires à m/z 582 ([M - H]⁻). Par comparaison du profil de fragmentation MS² de ces composés avec les données de la bibliographie [400], les pics bCa-48-50 ont été attribués à des isomères de N¹,N⁵,N¹⁰-tricomaroylspermidine. Ces composés présentent des fragments à

m/z 462 ($[M-H]^-$ - OH-C₆H₄-CH=CH), m/z 436 ($[M-H]^-$ - unité *p*-coumaroyl) et m/z 342 ($[M-H]^-$ -OH-C₆H₄-CH=CH-OH-C₆H₄-CH=CH). La N¹,N⁵,N¹⁰-tricoumaroylspermidine a été identifiée auparavant dans les fleurs du genre *Crataegus* [404].

1.1.7. Conclusion sur l'étude déréplicative

Au moyen de la CLHP-UV-DAD et la CLHP-ESI-MSⁿ, 51 composés ont été caractérisés dans l'extrait brut des boutons floraux de *C. azarolus* en comparant leurs données spectroscopiques aux données de la littérature. Les schémas de fragmentation MSⁿ des composés, tout en respectant les intensités relatives pour les ions fragments obtenus à chaque fois, a permis de reconnaître la majorité des composés sans les isoler. Dans ce contexte, les résultats obtenus indiquent que cette espèce est une source riche de constituants phénoliques comprenant des acides phénoliques, des proanthocyanidines et des flavonoïdes simples et glycosylés. La catégorie de flavonoïdes la plus importante quantitativement dans cet extrait est celle des flavonols.

De nombreux métabolites détectés dans notre extrait ont été décrits auparavant pour leur activité inhibitrice puissante de l'arginase, tels que l'acide chlorogénique, l'épicatéchine (CI₅₀= 10,6 μM et 19,9 μM, respectivement sur l'arginase I bovine) et l'acide cryptochlorogénique (CI₅₀= 11±1 μM sur l'arginase de *Leishmania*). Ceci justifie en partie l'effet inhibiteur puissant de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus* sur l'arginase hépatique bovine (CI₅₀ de l'ordre de 97 μM, tel que signalé lors du criblage biologique (Tableau 4 page 188).

En revanche les composés cités ci-dessus ne constituent pas les composés majoritaires de notre extrait (Figure 54) et il est probable que d'autres métabolites comme les dérivés de la vitéxine soient les principaux composés responsables de l'effet biologique observé puisqu'ils sont abondants dans notre extrait. En outre, l'étude déréplicative, par LC-MSⁿ reste insuffisante puisque, à ce stade, plusieurs composés restent inconnus, en particulier un des composés majoritaires de l'extrait élué à un t_R de 43,4 min (pic bCa-35) (Figure 54, Tableau 6), il serait donc nécessaire d'effectuer une étude plus détaillée afin d'élucider les structures de ces composés non identifiés et de les tester par la suite sur l'arginase. Cette étude nécessitera un fractionnement afin de simplifier l'extrait brut complexe et de suivre l'activité biologique dans les fractions obtenues.

1.2. Fractionnement primaire de l'extrait des boutons floraux de *C. azarolus* par chromatographie Flash

Une chromatographie flash en phase inverse a été menée sur une quantité de 300 mg de l'extrait brut des boutons floraux de *Crataegus azarolus* afin de localiser, dans un premier temps, les composés responsables de l'activité inhibitrice d'arginase dans l'ensemble des composés de l'extrait brut et de cibler, ensuite, les composés à isoler et purifier afin de réaliser une élucidation complète de leurs structures chimiques et de les tester à l'état pur sur notre cible thérapeutique.

Le processus de fractionnement par chromatographie flash, a conduit à l'obtention de sept fractions avec des masses comprises entre 1 et 54,6 mg (Figure 55). Ces fractions ont été testées par la suite sur l'arginase I bovine.

Les activités des fractions récupérées ont varié entre 27% (F1_Flash) et 80% (F6_Flash) à 100 µg/mL. Les fractions F5_Flash, F6_Flash et F7_Flash étaient les plus actives avec des pourcentages d'inhibition de 79%, 80% et 78% respectivement à 100 µg/mL. Les autres fractions ont présenté des pourcentages d'inhibition inférieurs à ceux de l'extrait brut initial qui était de l'ordre de 80% à 100 µg/mL. Ainsi, nous pouvons conclure que l'activité de l'extrait brut initial provient plus particulièrement des composés contenus dans les fractions F5_Flash, F6_Flash et F7_Flash (Figure 56) d'où la poursuite de l'étude phytochimique sur ces trois fractions obtenues par chromatographie flash.

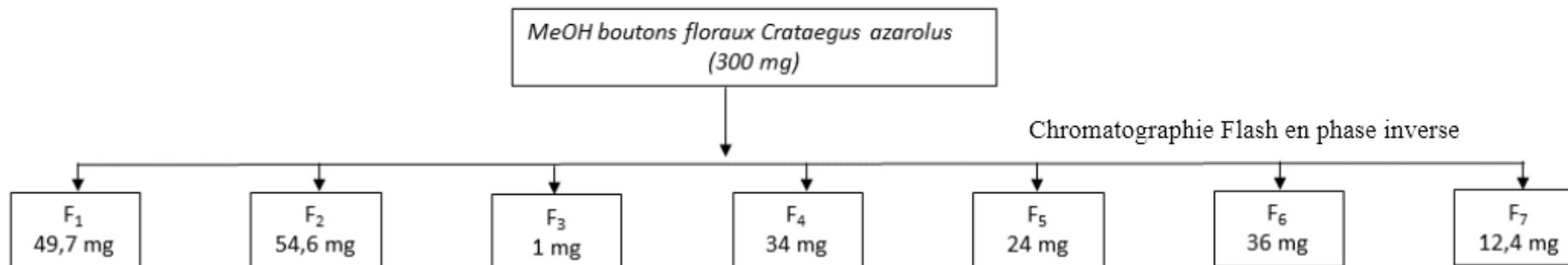


Figure 55: Schéma fractionnement de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* par chromatographie flash.

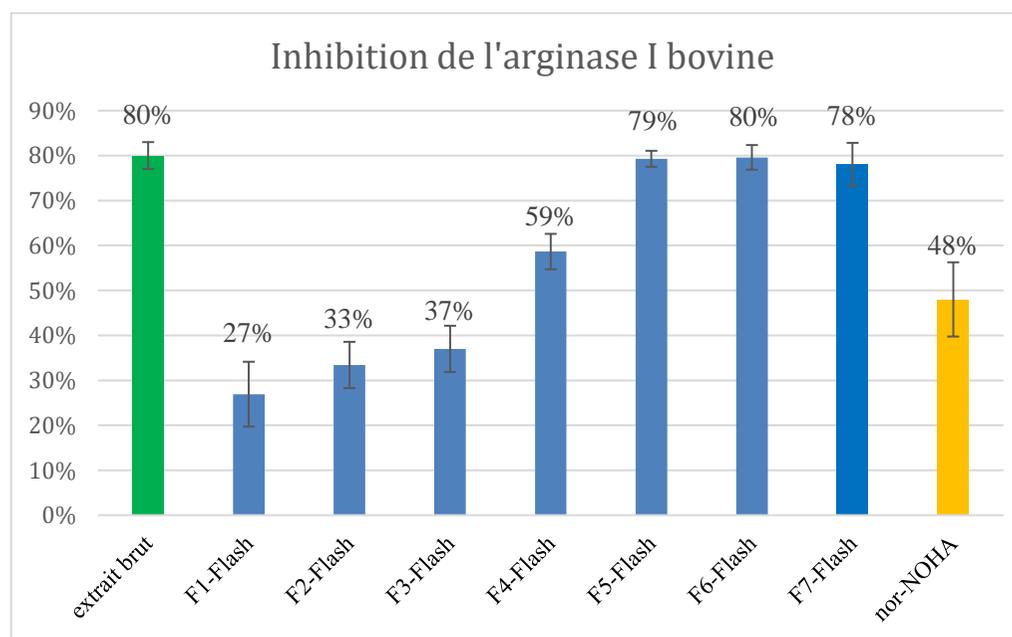


Figure 56 : Pourcentage d'inhibition de l'arginase I bovine par les fractions obtenues par chromatographie Flash à partir de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*. Toutes les fractions sont testées à 100 µg/mL, la nor-NOHA a été testée à 4 µM.

1.3. Étude phytochimique des fractions actives

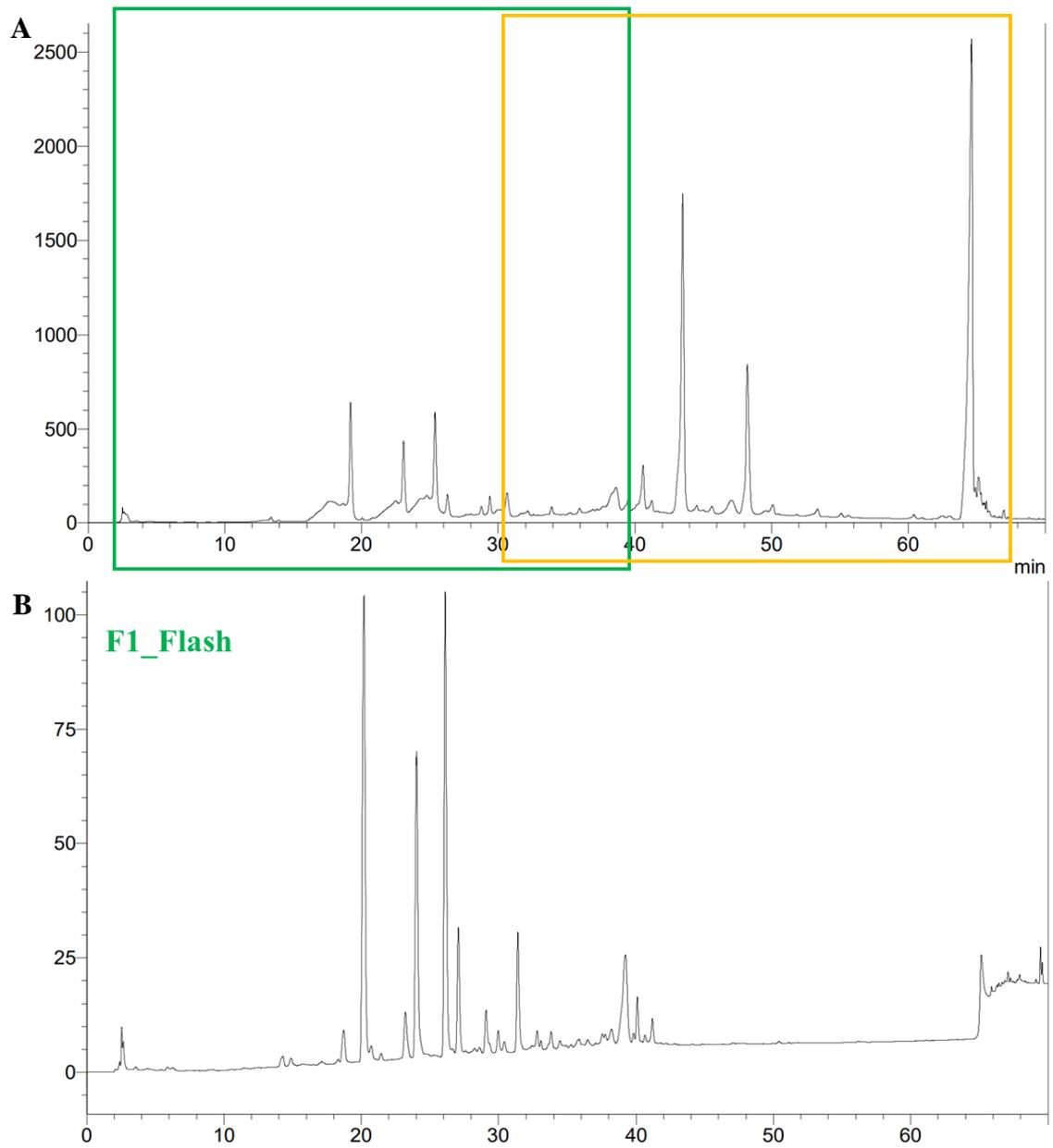
1.3.1. Repérage des produits responsables de l'activité biologique au sein des fractions actives

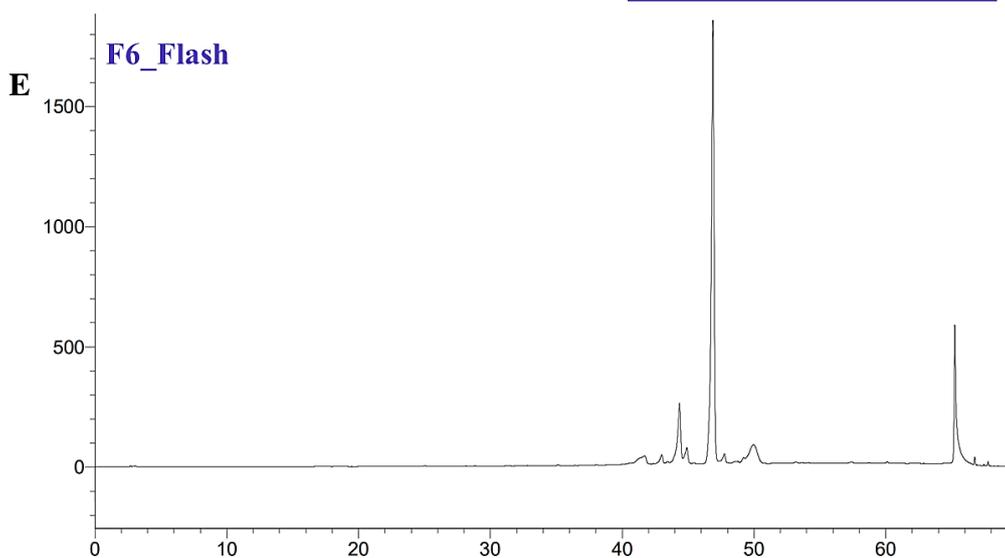
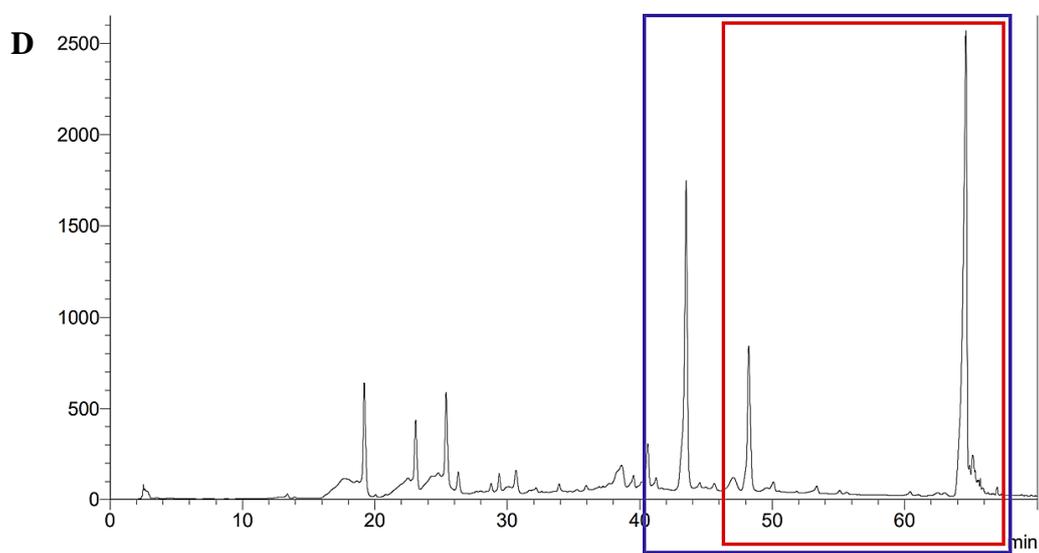
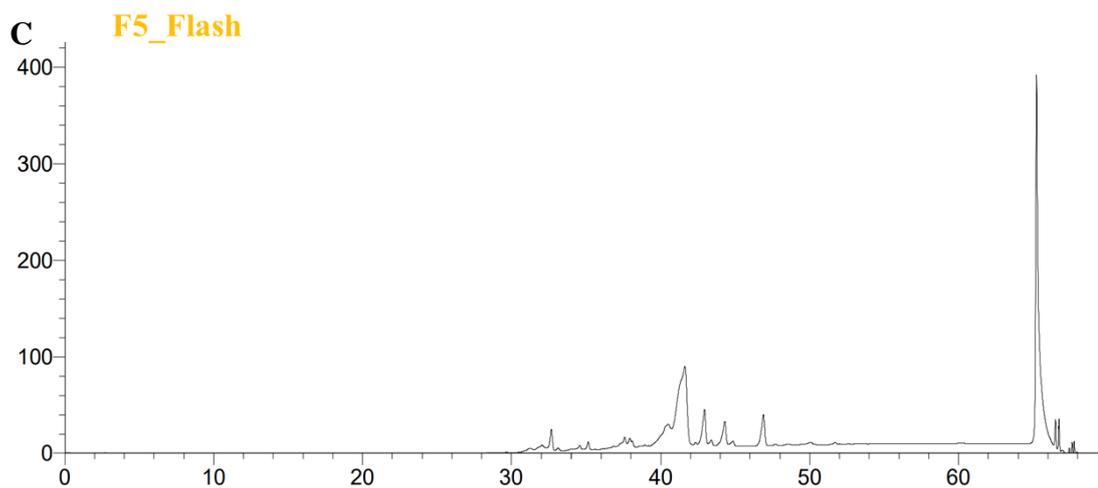
Les fractions obtenues par chromatographie flash à partir de l'extrait brut de *C. azarolus* ont été injectées en CLHP couplée à un détecteur UV dont la longueur d'onde est fixée à 280 nm. Les injections ont été réalisées dans les mêmes conditions chromatographiques que l'extrait brut afin d'effectuer une comparaison précise entre les fractions et l'extrait brut (Figure 57). Certes, ce sont les profils CLHP des fractions les plus actives qui nous intéressent le plus, mais une comparaison avec la fraction la moins active (F1_Flash) servira à détecter la différence de composition entre ces fractions. En effet, des composés apparaissant à la fois dans les fractions actives et la moins active seraient *a priori* moins intéressants, alors que des composés communs entre les fractions actives mais absents dans la fraction la moins active pourraient être responsables de l'activité inhibitrice observée. La comparaison de la composition des fractions entre elles et à l'extrait brut est résumée sur la Figure 57.

La fraction qui n'a fourni que 27% d'inhibition à 100 µg/mL (F1_Flash) comporte principalement les composés de l'extrait brut, élués entre 2 et 40 minutes (cadrés en vert sur le chromatogramme A de la Figure 57. Il semble donc que ces composés ne présentent pas d'intérêt dans l'inhibition de l'arginase. La fraction F5_Flash qui a donné 79% d'inhibition à 100 µg/mL contient les composés de l'extrait brut qui sont élués entre 30 et 65 minutes (cadrés en jaune sur le chromatogramme A de la Figure 57. Ainsi, les constituants élués entre 30 et 40 minutes, communs à la fraction peu active (F1-Flash) et la fraction active (F5-Flash), seraient des composés peu intéressants.

La fraction F6_Flash, la plus active (80% d'inhibition à 100 µg/mL) se compose des composés de l'extrait brut qui sont élués entre 40 et 65 minutes (cadrés en bleu sur le chromatogramme D de la Figure 57. Par ailleurs, la fraction F7_Flash (78% d'inhibition à 100 µg/mL) contient les composés de l'extrait brut élués entre 48 et 65 minutes (cadrés en rouge sur le chromatogramme D de la Figure 57, avec essentiellement un seul pic détecté à 280 nm. À partir de ces constatations, nous pouvons conclure que ce sont précisément les composés de l'extrait élués entre 40 et 65 minutes, présents dans les fractions F6 et F7_Flash, qui portent

l'activité inhibitrice de l'arginase. Ainsi, ces dernières ont subi une étude déréplicative par RMN du ^{13}C .





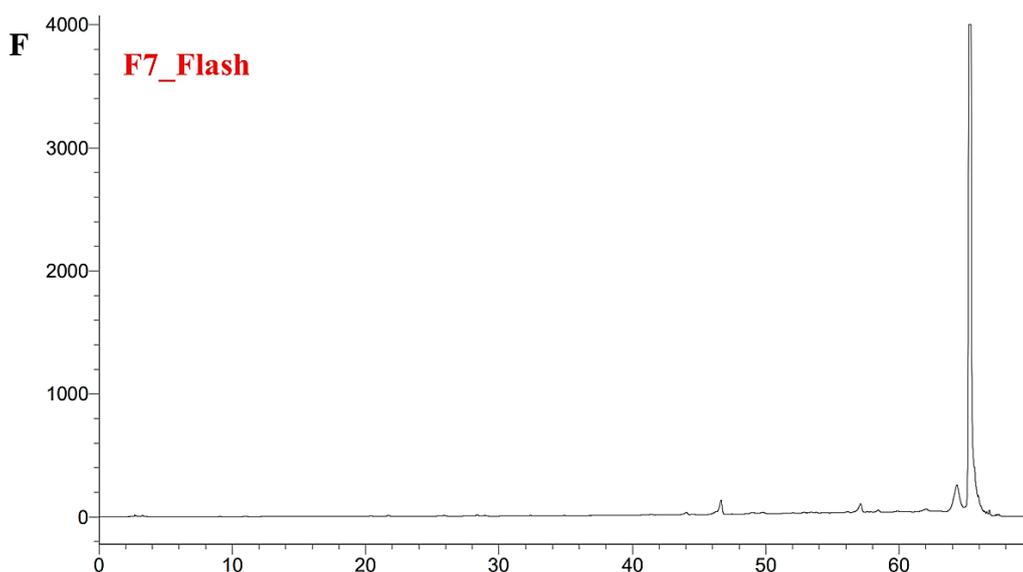


Figure 57: Comparaison des profils chromatographiques (UV à 280 nm) des fractions obtenues par chromatographie Flash à celui de l'extrait brut des boutons floraux de *C. azarolus* ; A et D : extrait brut ; B : F1_Flash ; C : F5_Flash ; E : F6_Flash et F : F7_Flash.

1.3.2. Étude déréplivative par RMN du ^{13}C des fractions d'intérêt

Les deux fractions F6_Flash et F7_Flash ont été soumises à une étude déréplivative utilisant la RMN du ^{13}C . En effet, l'équipe de recherche SONAS a développé un logiciel nommé *MixONat*, disponible gratuitement en ligne et basé sur Python 3.5 (<https://sourceforge.net/projects/MixONat/>) [192], qui représente l'outil clé de cette technique.

a- Principe de la technique déréplivative par RMN du ^{13}C

Le principe de la méthode de déréplication de mélanges de substances naturelles complexes à l'aide de la RMN du ^{13}C , développée au sein du laboratoire SONAS est présenté sur la Figure 58. En utilisant les déplacements chimiques du carbone 13 (δC) ainsi que les données DEPT 135 et 90 obtenues à partir du mélange de composés, le logiciel *MixONat* permet la comparaison des δC expérimentaux triés par type de carbone à des signaux de références regroupées en bases de données (BD). Les BD utilisées pour la comparaison ici contiennent des valeurs prédites [188].

Pour créer une BD de produits naturels contenant des δC utilisables par le programme de déréplication, la première étape est de rassembler les structures des composés d'intérêt (ex : les métabolites précédemment identifiés dans un genre ou une famille botanique), soit en les dessinant avec un logiciel dédié (par exemple *ChemDraw*[®], *ChemSketch*[®]), soit en les

téléchargeant à partir de diverses bases de données accessibles par abonnement (par exemple *SciFinder*, *Dictionary of Natural Products*, etc...). Une fois que les structures sont rassemblées dans un fichier de données de type (.sdf), leurs δC sont prédits à l'aide d'un logiciel de prédiction RMN (par exemple *ACD/Labs Spectrus processor* ou bien *C/H-NMR Predictor*). Le programme *C type Gen* inclus dans le logiciel crée une base de données en triant chaque déplacement chimique par type de carbone. Un nouveau fichier SDF est alors créé et contient, pour chaque composé de la DB, les valeurs de δC prédites organisées en méthyle, méthylène, méthine ou carbones quaternaires. La création d'une telle BD est nécessaire au fonctionnement de l'algorithme *MixONat* [192].

À la fin du processus de comparaison, les molécules ayant atteint un score minimal fixé par l'utilisateur sont affichées par score décroissant. Leur structure, nom, poids moléculaire et score sont indiqués. Sur la structure, les carbones correspondants sont surlignés en rouge (Figure 58).

Ce logiciel, grâce à son interface graphique, offre une interactivité permettant à l'utilisateur d'optimiser les hypothèses faites par le programme [192]. En effet, pour chaque molécule, il est possible d'ouvrir une fenêtre montrant la structure numérotée avec les δ SDF correspondant. Les δ SDF et les intensités correspondants sont également affichés avec différentes couleurs dans une représentation graphique d'un spectre de RMN ^{13}C reconstruit (Figure 58). Les signaux sont numérotés en fonction de la structure et une liste de décalage chimique est affichée. Cela montre facilement si les intensités de carbones appariés sont homogènes et sont donc hypothétiquement des signaux appartenant à la même molécule. Il est ainsi possible pour l'utilisateur de lier les informations recueillies à partir de la structure, du spectre et des déplacements chimiques et de décider, finalement, de supprimer ou d'ajouter des déplacements chimiques, puis de modifier le score de la molécule sélectionnée. Cette fonction peut être, par exemple, utilisée pour supprimer un carbone correspondant à une intensité anormale (c'est-à-dire qu'il appartient probablement à une autre molécule) ou pour ajouter un carbone quaternaire qui n'a pas été apparié car il n'a pas été sélectionné sur le spectre en raison de sa faible intensité, ou prédit un peu trop loin, etc... Si un carbone est ajouté ou retiré, le spectre et les carbones surlignés sur la structure seront par conséquent mis à jour. Il est également possible de supprimer une molécule si nécessaire (par exemple pour des considérations de chimiotaxonomie). Une fois que les résultats ont été vérifiés par l'utilisateur, ils peuvent être enregistrés sous forme de fichier texte et image [192].

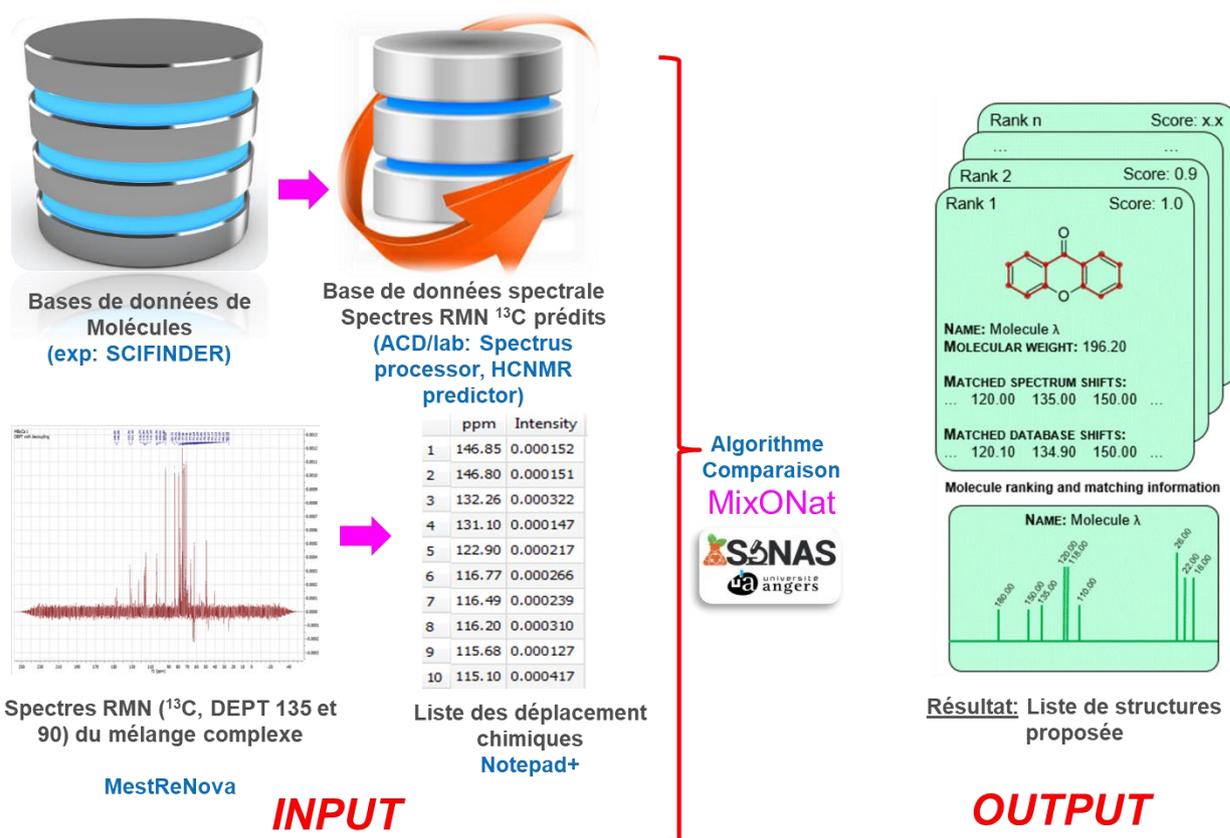


Figure 58: Déreplication par RMN du ¹³C pour l'identification des constituants d'un mélange complexe, inspirée de Bruguère et al. [192].

b- Application de la déreplication par RMN ¹³C à la F6_Flash des boutons floraux de *C. azarolus*

Afin d'appliquer l'étude déreplicative sur notre fraction issue de *C. azarolus*, nous avons créé une base de données prédites de 491 produits naturels précédemment rapportés dans le genre *Crataegus*. La construction de cette BD assez riche en composés pourrait servir non seulement à l'étude de nos mélanges actifs sur l'arginase mais également à de futures études éventuelles de diverses espèces appartenant au genre *Crataegus* voire d'autres espèces découlant de la famille des rosacées.

La F6_Flash a été soumise à des analyses en RMN ¹³C, DEPT 135 et 90 selon un nombre de scans adéquat à la concentration de cette fraction. Les données expérimentales obtenues (déplacements chimiques du carbone 13 (δ C) ainsi que les données DEPT 135 et 90) ont été minutieusement traitées avec le logiciel de RMN MestReNova[®], exportées vers Excel[®] et introduites sous format .csv au logiciel de matching : MixONa.

Comme résultat, le logiciel *MixONat* nous a suggéré la présence du 8-méthoxykaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside (de masse molaire égale à 478 g/mol) comme composé principal de la fraction F6_Flash avec un score de 0,95/1 (Figure 59). Cette hypothèse est cohérente avec les résultats obtenus à l'issue de l'analyse LC-MS, qui ont montré la présence, dans l'extrait, d'un composé élué à partir de 43 min (le bCa-35, Tableau 6 page 211), caractérisé par un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 477. Le spectre RMN ^{13}C reconstitué de ce composé, montrant les δ SDF et leurs intensités correspondantes, est représenté sur la Figure 60.

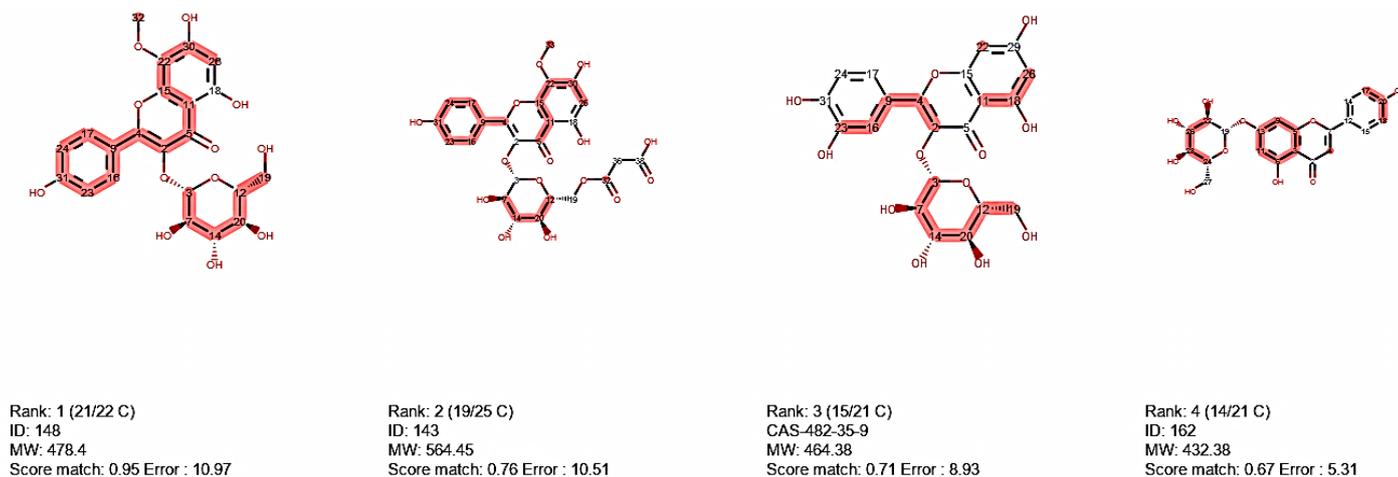


Figure 59: Un aperçu sur quelques composés proposés à l'issue de l'analyse dérépliquative par RMN ^{13}C de la F6_Flash.

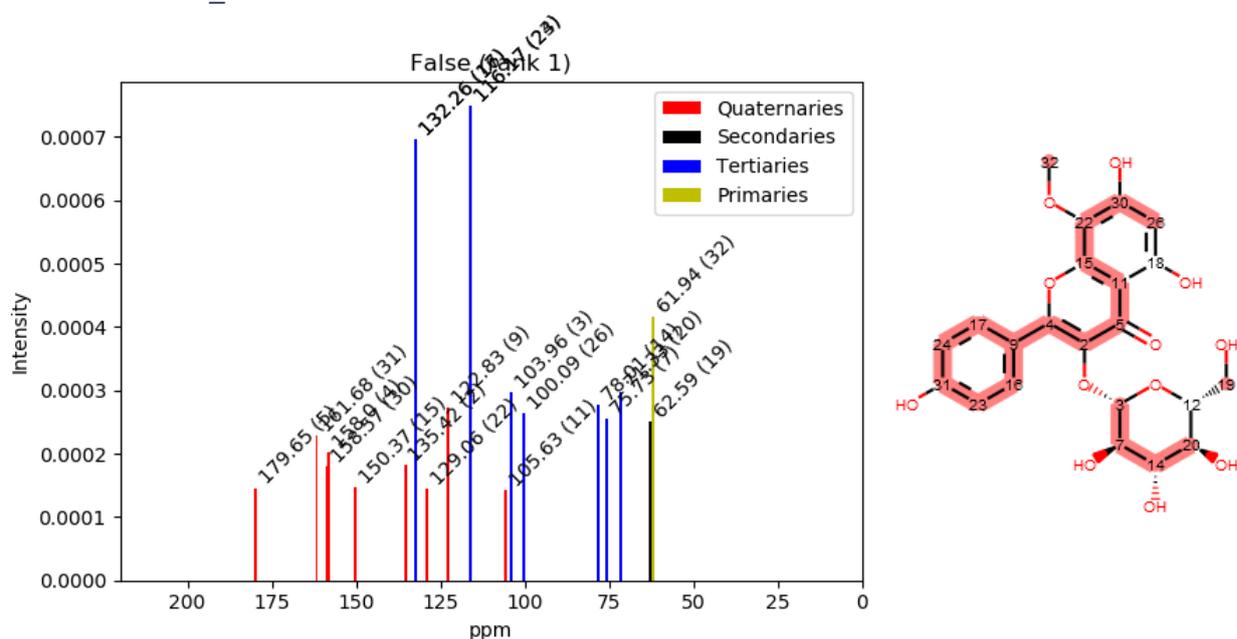


Figure 60: Structure et spectre reconstitué par le logiciel *MixONat* du composé majoritaire de la F6_Flash (le 8-méthoxykaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside).

Ce composé n'a jamais été décrit chez l'espèce *C. azarolus* et n'a jamais été testé sur l'arginase ce qui a encouragé son isolement et sa purification à partir de notre extrait.

c- Application de la déréplication par RMN ^{13}C à la F7_Flash

La fraction F7_Flash, ayant montré une activité inhibitrice de l'arginase de l'ordre de 78 % à 100 $\mu\text{g/mL}$, a été à son tour soumise à une étude déréplicative par RMN du ^{13}C suivant les mêmes étapes appliquées sur la F6_Flash et en utilisant la même BD constituée de 491 molécules. À l'issue de cette étude, le logiciel *MixONat* nous a suggéré la présence d'acide parahydroxycinnamique avec un score de 0,89/1 (Figure 61). Le spectre RMN ^{13}C reconstitué de ce composé, montrant les δ SDF et leurs intensités correspondantes, est représenté sur la Figure 62.

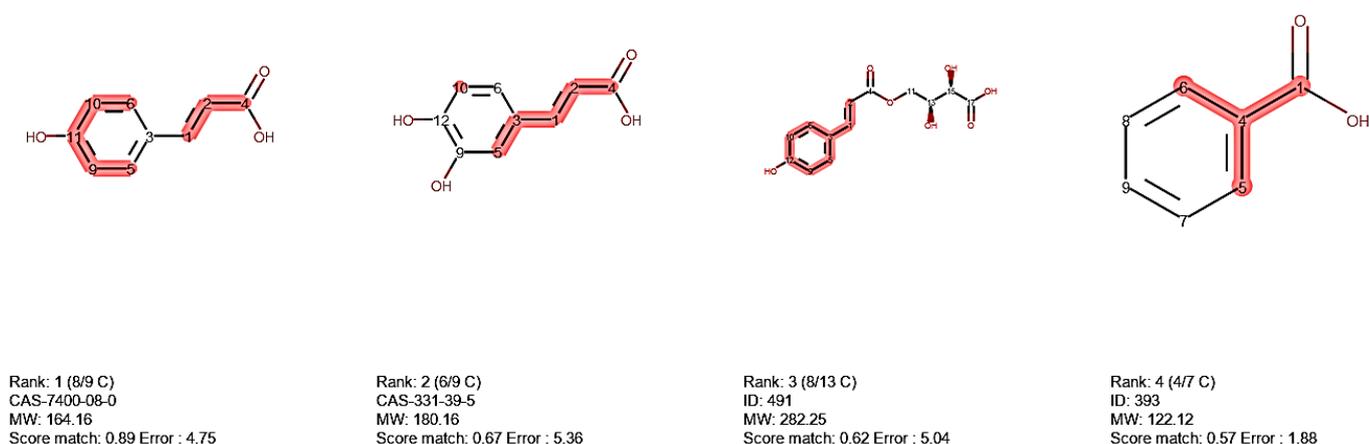


Figure 61: Un aperçu sur quelques composés proposés à l'issue de l'analyse déréplicative par RMN ^{13}C de la F6_Flash.

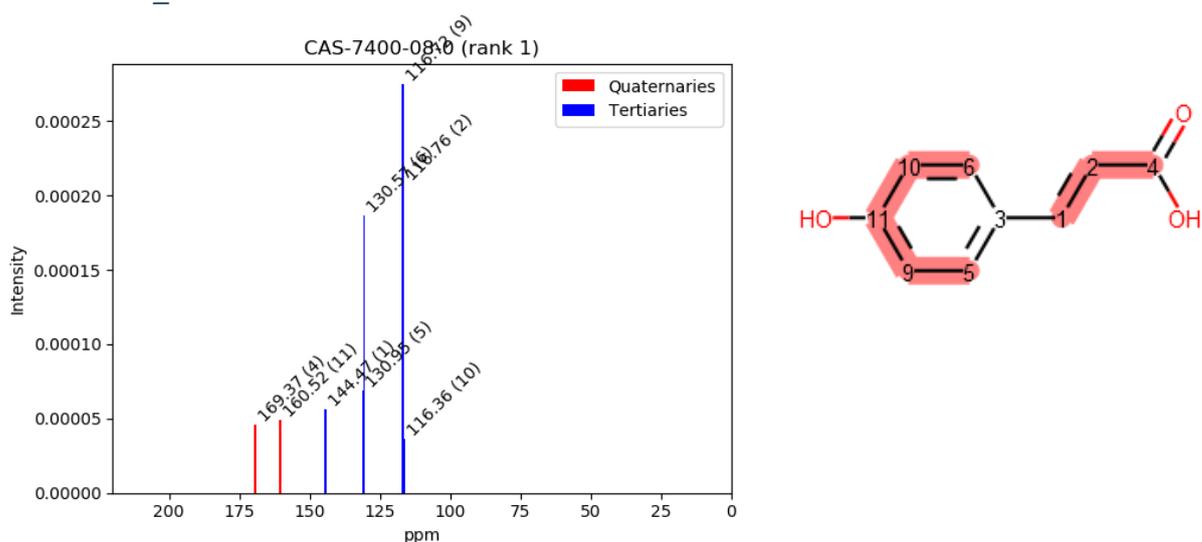


Figure 62: Structure et spectre reconstitué par le logiciel *MixONat* du composé majoritaire de la F7_Flash (l'acide p-coumarique).

Rappelons que la F7_Flash contient les composés élués entre 48 minutes et 65 minutes et que l'analyse par LC-MS de l'extrait brut des boutons floraux de *C. azarolus* (Tableau 6 page 211) a montré que ces composés possèdent des poids moléculaires compris entre 380 et 620 Da, il semble que la fraction F7_Flash contient majoritairement des dérivés de l'acide *p*-coumarique à poids moléculaire dépassant 380 Da. De tels composés n'existent pas dans notre base de données prédite du genre *Crataegus*. Par conséquent, le logiciel ne peut pas proposer la structure complète du composé mais il propose plutôt un fragment de cette dernière. De ce fait, l'isolement de ces molécules serait pertinent afin d'identifier leur structure complète et de les tester sur l'arginase.

1.4. Fractionnement de l'extrait des boutons floraux de *C. azarolus* par CLHP préparative

Il est important à noter que les masses des fractions F6_Flash et F7_Flash obtenues lors du 1^{er} fractionnement, par chromatographie Flash, à partir de l'extrait brut (Figure 55), étaient de l'ordre de 36 mg et 12 mg respectivement, ce qui présente des masses faibles pour isoler des composés naturels qui seront ensuite analysés par des techniques spectroscopiques pour l'élucidation complète de leurs structures et pour les tester par la suite sur l'arginase. Il a donc été nécessaire d'utiliser l'extrait brut initial, dont la masse est plus abondante, pour l'isolement des composés que nous avons repérés comme produits intéressants dans les fractions F6_Flash et la F7_Flash. Les composés cibles pour la purification étaient donc, en priorité, le composé majoritaire de la F6_Flash (le 8-méthoxylkaempférol-3-O- β -glucopyranoside, tel que proposé par le logiciel *MixONat*) puisqu'il n'a jamais été isolé de *C. azarolus*. Ceci permettra de confirmer pleinement sa structure et de le tester ensuite sur l'arginase, de même que le composé majoritaire de la fraction F7_Flash puisque, d'une part la structure complète de ce composé n'a pas été déterminée par la déréplication par RMN du ¹³C, et que d'autre part, ce composé n'a jamais été décrit également chez *C. azarolus*.

La purification des composés cibles a été réalisée par chromatographie CLHP préparative en conservant les mêmes conditions de séparation fixées grâce à la CLHP analytique. La transposition de la méthode de la CLHP analytique vers la CLHP préparative ayant été assez reproductible et répétable, cela nous a permis, grâce à plusieurs purifications successives, de fractionner 425 mg de l'extrait et d'isoler les deux composés majoritaires de l'extrait élués vers

un t_R de 43 minutes et 63 minutes respectivement et nommés bCa-35 et bCa-48 (Figure 63, ci-dessous).

Outre les composés bCa-35 et bCa-48, le fractionnement de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus* nous a permis de récupérer deux autres composés purs nommés bCa-28 et bCa-40 élués respectivement à 40,1 et 47,2 minutes (Figure 63, ci-dessous). Les composés minoritaires intermédiaires ont été également collectés sous formes de « sous-fractions » nommés sf₁_CLHP, sf₂_CLHP et sf₃_CLHP. Les structures des composés bCa-28, bCa-35, bCa-48 et bCa-40 ont été élucidés grâce aux techniques spectroscopiques (RMN 1D et 2D ainsi que la masse à haute résolution HR-MS). Les « sous-fractions » sf₁_CLHP, sf₂_CLHP et sf₃_CLHP, provenant de fractions initialement actives sur l'arginase, ont été analysées par CLHP-MSⁿ.

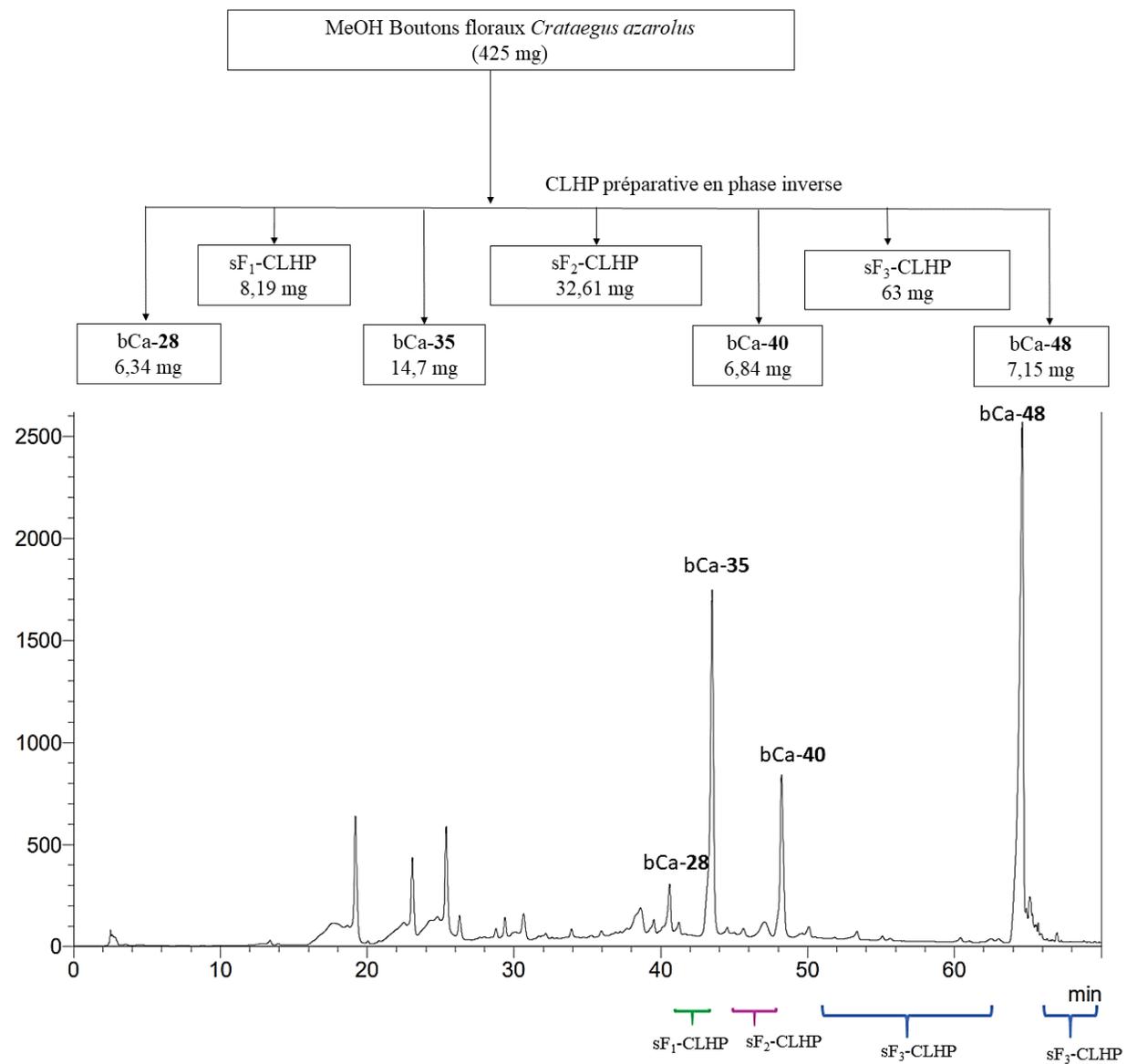


Figure 63: Schéma de l'isolement des composés purs à partir de l'extrait brut des boutons floraux de *C. azarolus* par CLHP préparative.

1.5. Détermination des structures des composés isolés

Dans cette section nous détaillons l'élucidation structurale des quatre composés purs isolés des boutons floraux de l'azarole.

1.5.1. Composé bCa-28 : Hypéroside (quercétine 3-*O*-galactoside)

Le composé bCa-28 (Figure 64) a été isolé à partir de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus* sous forme d'un cristal jaune clair. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode positif, présente un pic pseudomoléculaire à m/z $[M+H]^+ = 465,1027$, ce qui correspond à une formule brute s'établissant en $C_{21}H_{20}O_{12}$ pour une masse calculée de 464,0955 (Figure 101 page 353). Le spectre de masse haute résolution de ce composé montre aussi un pic à m/z $[2M+Na]^+ = 951,1792$ et un ion fragment à m/z $[M+H-162]^+ = 303,0497$ correspondant à la perte d'un hexose. Dans la région aromatique du spectre RMN 1H , plusieurs signaux apparaissent ; nous notons la présence de deux doublets à δ_H 7,55 et 6,80 intégrant chacun pour 1H et un doublet de doublets à δ_H 7,64 qui appartiennent tous au noyau B de la flavone. Deux singulets intégrant pour 1H chacun sont présents également à δ_H 6,15 et 6,37 ppm ; placés sur le noyau A de la flavone. La glycosylation du 3-hydroxyle a été déduite du signal du proton anomérique à δ_H 5,37 (d, $J = 7,2$ Hz) qui corrèle en HMBC avec le carbone en C-3 à δ_C 133,72 ppm (Tableau 19 page 353 et Annexe 5).

Le Hypéroside a été isolé auparavant des feuilles de l'espèce *C. azarolus* [405].

Ce composé a été testé sur l'arginase I bovine et a montré une CI_{50} de 100 μM , ce qui représente une activité inhibitrice intéressante comparativement aux inhibiteurs naturels (Tableau 1 page 78) mais cette valeur reste encore loin de celles des composés synthétiques de référence (tel que la nor-NOHA, $CI_{50} = 1,7 \pm 0,7$ μM sur l'arginase I bovine [406]).

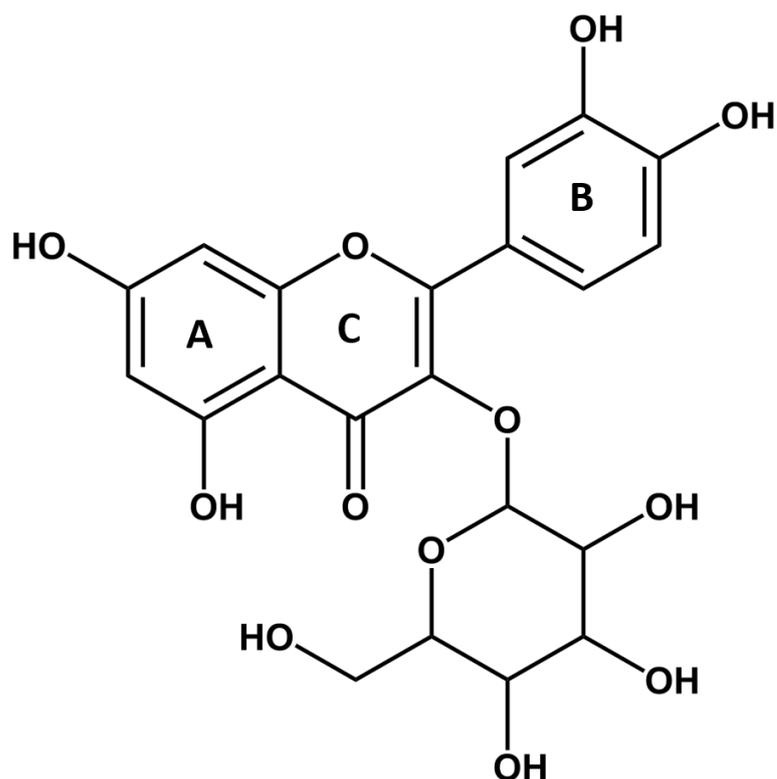


Figure 64: Structure du composé bCa-28.

1.5.2. Composé bCa-35 : 8-Méthoxykaempférol 3-glucoside

Le flavonoïde glycosylé bCa-35 (Figure 65) était le principal composé isolé des boutons floraux de *Crataegus azarolus*. Il est isolé sous forme d'une poudre de couleur marron odorante. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode positif, présente un pic pseudomoléculaire à m/z $[M+H]^+ = 479,1188$, ce qui correspond à une formule brute s'établissant en $C_{22}H_{22}O_{12}$ pour une masse calculée de 478,1111 (

Figure 102 page 355). Le spectre de masse haute résolution de ce composé montre aussi un pic à m/z $[2M+Na]^+ = 979,2122$ et un ion fragment à m/z $[M+H-162]^+ = 317,0658$ correspondant à la perte d'un hexose. Sur le spectre RMN 1H de ce composé, le groupe hydroxyle libre en C-5 est apparu en singulet à δ_H 12,29 (déblindé). Sur ce même spectre, dans la région aromatique, nous remarquons la présence de deux doublets à δ_H 6,91 et 8,06 ppm intégrant chacun pour 2H. Un singulet intégrant pour 1H est présent également à δ_H 6,26 ppm. La glycosylation du 3-hydroxyle a été déduite du signal du proton anomérique à δ_H 5,46 ppm (d, $J = 7,2$ Hz) qui corrèle en HMBC avec le carbone en C-3 à δ_c 133,14 ppm (Tableau 20 page 355, Annexe 6). Sur la base de ces résultats, la molécule nommée bCa-35 a été identifiée comme étant le 8-méthoxykaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside.

Ce composé a été isolé auparavant de la plante *Crataegus monogyna* [407], [408].

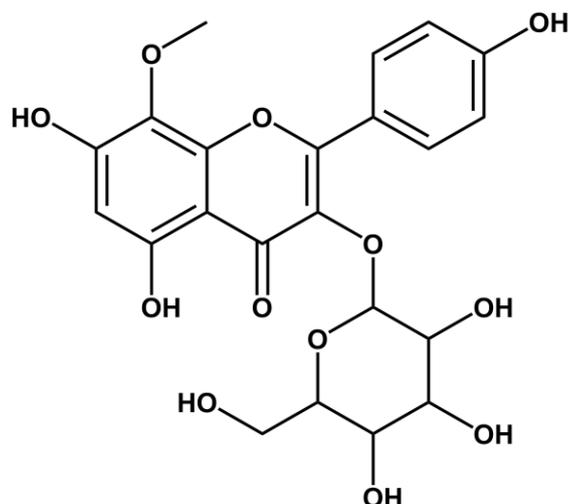


Figure 65: Structure du composé bCa-35.

À notre connaissance, ce composé n'a jamais été testé pour ses activités biologiques. Ainsi, il serait intéressant d'examiner les effets biologiques de ce flavonoïde.

Nous avons testé ce composé sur l'arginase I bovine et il a montré une CI_{50} de 300 μ M, valeur restant encore faible par rapport aux produits synthétique de référence (tel que la nor-NOHA, $CI_{50} = 1,7 \pm 0,7 \mu$ M sur l'arginase I bovine [406]).

1.5.3. Composé bCa-40 : 8-méthoxykaempférol-3-O-(6''-acétyl- β -glucopyranoside)

Le spectre UV du composé bCa-40 était typique d'un flavonol avec un seul groupe hydroxyle sur son cycle B (Figure 103 page 357, Annexe 7). Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode positif, présente un pic pseudomoléculaire à $m/z [M+H]^+ = 521,1299$, ce qui correspond à une formule brute s'établissant en $C_{24}H_{24}O_{13}$ pour une masse calculée de 520,12170. Le spectre HR-MS en électrospray de ce composé, montre aussi un ion à $m/z [2M+Na]^+ = 1063,2337$. Les spectres RMN 1D (1H ^{13}C) et 2D de ce composé ressemblent aux spectres du composé précédent (bCa-35). En revanche, une différence marquée a été observée sur le spectre RMN 1H à des déplacements chimiques assez bas (Annexe 7). En effet, un singulet, qui intègre pour 3H, est détecté à 1,74 ppm, ceci montre la présence d'un CH_3 supplémentaire sur la structure du composé bCa-40. Ce spectre RMN 1H dans le DMSO a révélé

aussi deux doublets (type AA'XX') à δ 8 ppm ($J=8,8$ Hz ; H-2'/6') et à δ 6,9 ($J=8,8$ Hz ; H-3'/5'), un singulet à δ 6,29 (H-6) et un singulet intégrant pour 3 H à δ 3,8 (OCH₃). En outre, un doublet à δ 5,25 ppm ($J = 7,2$ Hz), est apparu ce qui était en accord avec une unité β -glucopyranose (Tableau 21 page 357 et Annexe 7). Quant au spectre ¹³C de ce composé, il se distingue, en plus des signaux repérés pour le composé précédent (bCa-35), par un carbone à 169,8 ppm qui corrèle, en HMBC, avec le singulet à 1,75 et un carbone à 63,15 ppm (Tableau 21 page 357 et Annexe 7). Ces données témoignent de la présence d'un groupement 6''-O-acétyle [409]. Ce composé a été identifié, ainsi, comme étant le 8-méthoxykaempférol-3-O-(6''-acetyl- β -glucopyranoside). Il s'agit d'un nouveau produit.

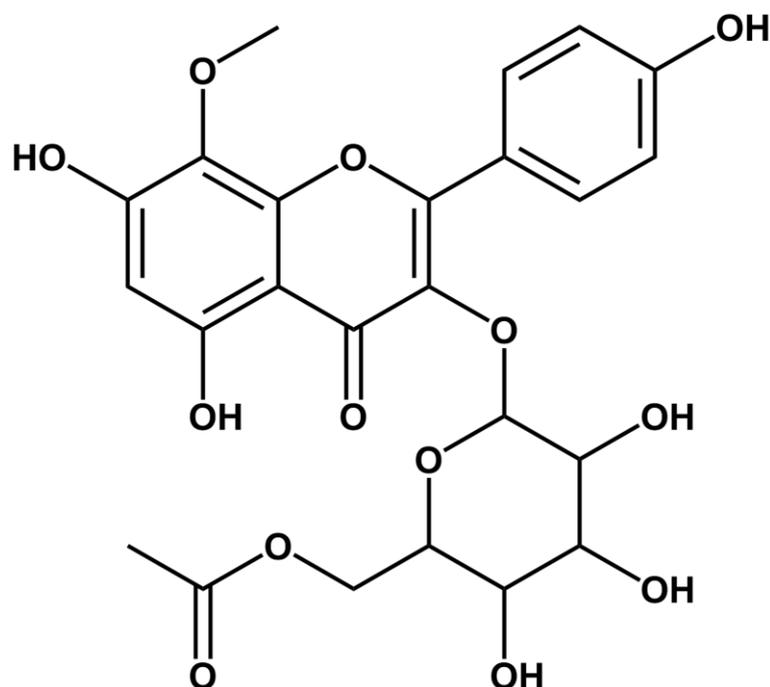


Figure 66: Structure du composé bCa-40.

Un composé, dont la structure est assez proche de notre composé, a été identifié auparavant chez l'espèce *Crataegus monogyna* [408]. Il s'agit du 8-méthoxykaempférol-3-O-(6''-malonyl- β -glucopyranoside) dont des traces ont été repérées sur le spectre ¹³C de notre composé nommé bCa-40.

Ce composé a été isolé malheureusement en faible masse, ne permettant pas de le tester sur l'arginase.

1.5.4. Composé bCa-48: N¹, N⁵, N¹⁰, tricoumaroylspermidine

Le composé bCa-48 (Figure 67) a été isolé à partir de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus* sous forme d'un cristal marron foncé caractérisé par une forte odeur. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode positif, présente un pic pseudomoléculaire à $m/z [M+H]^+ = 584,2762$ ce qui correspond à une formule brute s'établissant en $C_{34}H_{37}N_3O_6$ pour une masse calculée de 583,2682. Le spectre HR-MS en électrospray de ce composé, montre aussi un ion à $m/z [2M+Na]^+ = 1189,5259$ et un ion fragment à $m/z [M+H-146]^+ = 438,2386$ correspondant à la perte d'un groupement *p*-coumaroyle (Figure 104 page 359). Le spectre de RMN ¹H de ce composé est très complexe (Annexe 8), cela étant peut-être dû à la présence de conformères. L'analyse dans le DMSO-d₆ de ce dernier nous a permis d'observer les signaux correspondant aux fonctions hydroxyles et éventuellement amines ou amides. En effet, le signal à δ H 9,83 intégrant pour 3H peut correspondre à trois groupements hydroxyles dans la molécule et les signaux entre 7,91 et 8,12 ppm, intégrant pour 3H également peuvent correspondre aux NH-1, NH-5 et NH-10. Des protons aromatiques peuvent être repérés entre δ H 6,68 et 7,54 ppm. Sur ce spectre RMN ¹H, nous pouvons distinguer aussi deux doublets centrés à 7,54 ppm et 7,49 ppm, avec des constantes de couplage de 8,4 Hz et 8,8 Hz respectivement. Il s'agit de protons aromatiques ayant un voisin en ortho. En ce qui concerne les protons aromatiques, il est précisé, dans le cas de la tricoumaroylspermidine, que les signaux d'un groupement coumaroyle en position 5 sont légèrement plus déblindés que ceux des groupements situés en bout de chaîne de la spermidine [400]. À partir du massif entre δ H 7,28 et 7,55 ppm un doublet est distingué, ayant une constante de couplage de 15,6 Hz. Il caractérise une double liaison en *trans*. Le massif entre 6,76 et 6,79 ppm laisse voir un doublet ayant une constante de couplage $J = 15,2$ Hz ce qui correspond à une autre double liaison *trans*. Le massif entre δ H 6,37 et 6,43 ppm montre un doublet intégrant pour 1 proton avec une constante de couplage de 15,6 Hz. Il caractérise une troisième double liaison en *trans*. Un multiplet centré à 1,54 ppm a été détecté, intégrant pour 6 protons ce qui peut correspondre à 3 groupements CH₂. Un autre multiplet centré à 3,15 ppm a été détecté intégrant pour 8 protons ce qui peut être attribué à 4 groupements CH₂ de la chaîne de spermidine.

En RMN-¹³C (DMSO-d₆), les signaux autour de δ C 165 ppm correspondent aux carbonyles de la molécule. Les signaux à δC 114-116 ppm peuvent être associés aux C3 et C5 des cycles aromatiques et aux C en α de ces derniers, le signal à δC 141,49 ppm est attribué aux C en β de ces noyaux et les signaux aux alentours de 158 ppm sont attribués aux C4 des cycles aromatiques. Par conséquent, tous ces signaux appartiennent aux 3 groupements coumaroyl.

Les signaux entre δC 125-129 ppm peuvent être associés de même aux carbones des cycles aromatiques. Les 7 CH₂ apparaissent entre δC 27 et 49 ppm.

À partir de ces données et en comparant ces résultats avec les données de la littérature, la structure du composé bCa-48 a été proposée comme étant la N¹, N⁵, N¹⁰-tri-*p*-(*EEE*)-coumaroylspermidine.

Bien que ce composé soit identifié auparavant dans le genre *Crataegus* [404], le logiciel *MixONat* n'a pas suggéré sa présence dans la fraction F7_Flash (Partie II : Chapitre 3 : 1.3.2.c) car il n'a pas été intégré dans la base de données prédite. Ceci peut être une limite de l'étude dérèplivative par RMN du ¹³C. En effet, le succès de cette étude dérèplivative est dépendant de la qualité de la base de données construite par le manipulateur.

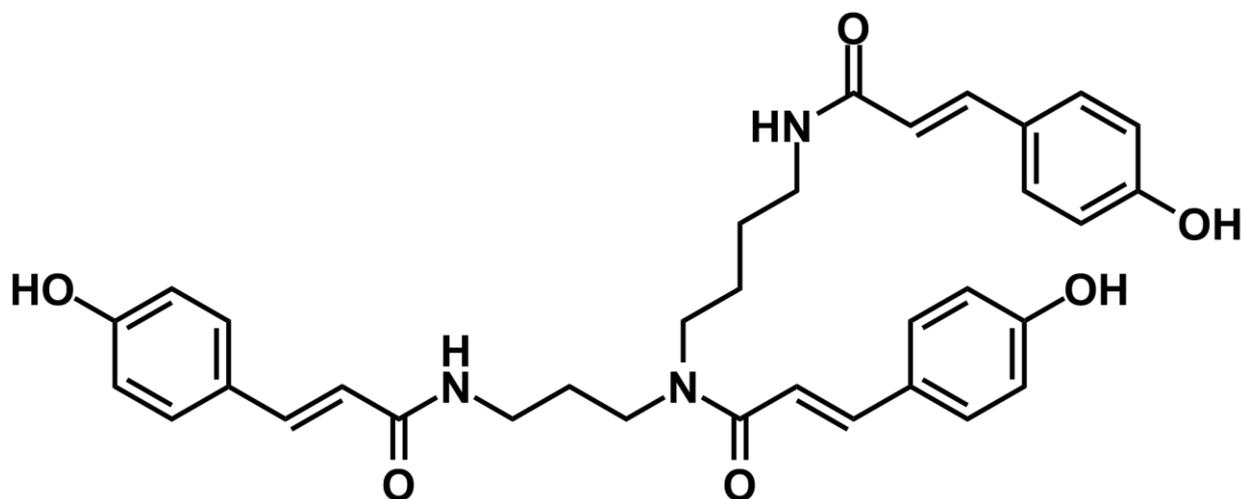


Figure 67: Structure possible du composé bCa-48.

Remarque : d'autres signaux apparaissent sur le spectre RMN-¹H de ce composé, il est donc probable que ce composé soit isolé sous forme d'un mélange de plusieurs isomères.

Ce composé a été isolé malheureusement en faible masse, ne permettant pas de le tester sur l'arginase après les analyses en HR-MS et en RMN.

1.6. Étude des sous-Fractions

Suite au fractionnement de l'extrait MeOH des boutons floraux de *C. azarolus* par CLHP préparative, trois mélanges de composés minoritaires ont été collectés, en plus des composés

purs. Ces mélanges ont été testés sur l'arginase I bovine puis analysés par LC-MS/MS (Figure 63 page 233).

1.6.1. Activité biologique

Les sous-fractions nommées sf₁_CLHP, sf₂_CLHP et sf₃_CLHP, étant récupérées en quantités suffisantes (Figure 63 page 233), ont été testées sur l'arginase. Ces mélanges de constituants ont montré des activités inhibitrices de l'arginase entre 55 et 65% à 100 µg/mL (Figure 68 ci-dessous). Elles représentent des activités biologiques non négligeables pour des mélanges complexes de composés minoritaires dans l'extrait. Ainsi ces sous-fractions ont subi une étude par CLHP-MSⁿ.

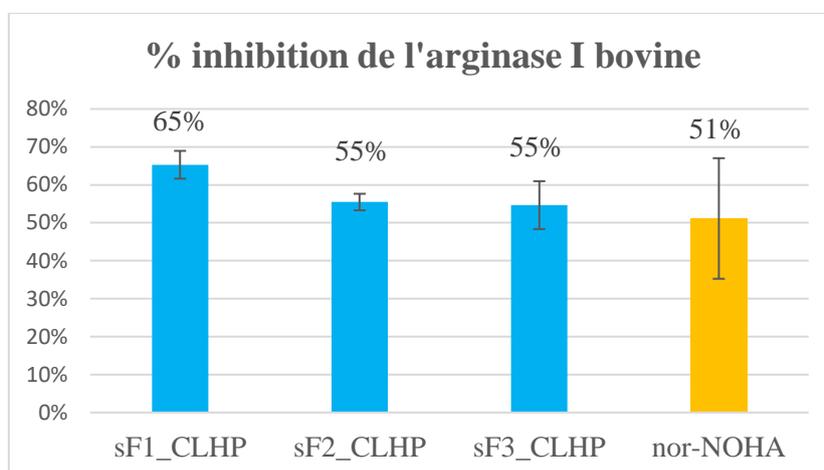


Figure 68 : Activité des sous-fractions obtenues par CLHP à partir de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus* (testées à 100 µg/mL), la nor-NOHA a été testée à 4 µM.

1.6.2. Analyse des sous-fractions par LC-MSⁿ

La séparation des sous-fractions a été optimisée par CLHP analytique avant de réaliser l'analyse en masse basse résolution (Annexe 4). Ceci est opéré dans le but de mieux visualiser les composés de ces mélanges de produits et de détecter éventuellement les composés minoritaires non aperçus lors de l'analyse initiale de l'extrait brut. Ces échantillons, contenant des composés de polarité moyenne, une séparation sur phase inverse a été adoptée avec un gradient d'éluant constitué d'un mélange EUP+0,1% acide formique (A) et ACN (B) et allant de 15% à 40% de (B) pendant 40 minutes. Ensuite 100% de (B) pendant 10 minutes a été appliqué. Ceci a conduit à la détection de plusieurs composés au sein de ces sous-fractions.

a- Étude de la sous-fraction 1 (sf1_CLHP)

L'analyse de la sous-fraction (sf1_CLHP) par LC-MSⁿ a conduit à la détection de 10 pics bien distincts. Certains composés ont été déjà détectés au cours de l'analyse de l'extrait brut initial des boutons floraux de *C. azarolus* tels que l'(épi)catéchine-4,8'-(épi)catéchine), la vitexine 2''-*O*-rhamnoside, le diméthoxy-kaempférol-*O*-hexose, la craténacine (bCa-29, bCa-23, bCa-36 bCa-32, respectivement). En outre, le composé majoritaire de l'extrait, le 8-méthoxykaempférol 3-glucoside (bCa-35) a également été détecté dans cette sous-fraction avec le nouveau composé, le 8-méthoxykaempférol-3-*O*-(6''-acétyl- β -glucopyranoside (bCa-40) (Tableau 7).

Par ailleurs, le composé bCa-36 (Tableau 7) élué à un t_R de 16,8 minutes et détecté à m/z 507, n'a pas été identifié de manière précise. En revanche ce dernier montre un fragment à m/z 285 correspondant à l'aglycone kaempférol. Il présente aussi un ion fragment à m/z 315 détecté chez le 8-méthoxykaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside élué juste avant et possède en plus un poids moléculaire qui dépasse ce dernier de 30 Da pouvant correspondre à un groupement OCH₃ supplémentaire. Il semble ainsi que ce composé correspond à un diméthoxy-kaempférol-*O*-hexose ; il reste donc à déterminer les positions du sucre et des méthoxyles sur ce composé. À notre connaissance, aucun composé possédant ce poids moléculaire n'a été rapporté dans le genre *Crataegus*.

Des composés non détectables dans l'extrait brut initial mais trouvés dans cette fraction ont été également repérés, tels que bCa-52, bCa-53 et bCa-54.

Le pic bCa-52, (t_R 9,1 min) a été détecté à m/z 865. Ce composé a été attribué à une proanthocyanidine trimère de type B avec des unités monomères d'épicatéchine (Tableau 7).

La myricétine 3-*O*-rhamnoside (myricitrine, (bCa-53)) a été élue à un temps de rétention de 13,5 min et a montré un ion [M-H]⁻ à m/z de 463. Ce composé a manifesté la perte neutre de la fraction rhamnoside (146 Da) à m/z 317 et des ions fragments caractéristiques à m/z 316 ; 287 ; 271 ; 179 et 151. Il a été signalé pour la première fois dans *Crataegus monogyna* [391].

Le composé bCa-54 élué à un t_R de 17,1 minutes, a été détecté à m/z 447, ce qui correspond à l'ion pseudomoléculaire [M-H]⁻. Ce composé a exprimé une perte neutre du groupement hexosyle conduisant à un fragment à m/z 285 correspondant à l'aglycone kaempférol. Après comparaison de sa fragmentation à la littérature, ce composé a été attribué au kaempférol 7-*O*-glucoside [391].

L'(épi) catéchine-4,8'-(épi) catéchine-4',8''- (épi)catéchine (bCa-**52**), la myricétine 3-*O*-rhamnoside (bCa-**53**) et le kaempférol 7-*O*-glucoside (bCa-**54**) sont des composés minoritaires trouvés dans les boutons floraux de cette plante.

Tableau 7 : Données chromatographiques et spectrales des composés détectés dans la sF₁_CLHP issue de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus*

Pic	t _R (min)	[M-H] ⁻	Fragments MS ⁿ	Tentative d'identification	Référence
bCa-29	7,6	577	425 , 407, 451	(Épi)catéchine -4,8'-(épi)catéchine (isomère)	[391]
bCa-52	9,1	865	739, 713, 695 , 677, 577, 543, 525, 407, 287	(Épi) catéchine-4,8'- (épi) catéchine-4',8''- (épi)catéchine (isomère)	[391]
bCa-23	12,1	577	413 , 293, 249	Vitexine 2''-O-rhamnoside	[391]
bCa-53	13,5	463	316 , 287, 271, 179, 151	Myricétine 3-O-rhamnoside (myricitrine)	[391]
bCa-35	16,3	477	462, 315 , 300, 271, 255	8-Méthoxykaempférol 3-glucoside*	
bCa-36	16,8	507	492 , 345,329,315, 301, 285	Diméthoxy-kaempférol-O-hexose	
bCa-54	17,1	447	285 , 255, 227	Kaempférol 7-O-glucoside	[391]
bCa-55	17,5	477	357, 314 , 299, 285, 271, 151	Non identifié (dérivé de kaempférol)	
bCa-40	18,7	519	504, 315 , 300, 271, 255	8-méthoxykaempférol-3-O-(6''-acétyl-β-glucoopyranoside) *	
bCa-32	19,2	619	499, 413 , 293	Craténacine (isomère)	[391]

*isolé de l'extrait (voir section 1.5.2 et 1.5.3)

b- Étude de la sous-fraction 2 (sF₂_CLHP)

La sous-fraction 2 (sF₂_CLHP) s'est montrée plus riche avec principalement 15 pics (Tableau 8). Certains composés ont été déjà décrits dans l'extrait brut (Tableau 6 page 211) comme les composés bCa-23, bCa-25, bCa-35, bCa-36, bCa-40, bCa-41 et bCa-48/49/50.

D'autres composés n'ont été repérés que suite au fractionnement de l'extrait brut et à l'obtention de la fraction sF₂_CLHP tels que, les composés bCa-56, bCa-57, bCa-59 et bCa-61.

Le pic bCa-56, ayant un t_R de 17,8 min et un ion [M-H]⁻ à m/z 563, a été attribué au 8-méthoxykaempférol 3-O-(6''-malonyl-β-glucopyranoside) qui a été isolé auparavant des feuilles et de fleurs de *Crataegus* [408].

La fragmentation du pic bCa-57, élué à un t_R de 20,5 min et caractérisé par un [M-H]⁻ à m/z 661 (Tableau 8) a été comparée aux données de la littérature et ce pic peut être attribué à une 2''-O-acétylrhamnosyl-C-acétylhexosyl-apigénine ou à une 2''-O-rhamnosyl-C-diacétylhexosyl- apigénine [392].

À un temps de rétention de 25,5 min, le pic bCa-59 (Tableau 8) a pu être détecté. Il s'agit d'un dérivé d'acide ellagique qui montre un ion pseudomoléculaire déprotoné à m/z 545. Ce composé a produit un pic de base MS² à m/z 315 [M-H-230]⁻ par la perte neutre d'un rhamnosyle et de deux groupements acétyles à partir de l'ion pseudomoléculaire [M-H]⁻. Un autre ion fragment à m/z 300 [M-2H-230-15]⁻ a été détecté suite à la perte neutre d'un groupement méthyle. Ce pic a été attribué à l'acide 3-O-méthylellagique-4'-(2'',3''-di-O-acétyl)-rhamnoside [391] (élué à un t_R de 25,5 min).

À un temps de rétention assez élevé (32,9 minutes, bCa-61, Tableau 8), un acide linoléique a été identifié nommé acide oxo-dihydroxy-octadécénoïque (bCa-61), ce composé se caractérise par un ion pseudomoléculaire à m/z 327 [M-H]⁻ et un pic de base à MS² à m/z 229 [410].

De plus, cette fraction se caractérise par la présence de plusieurs composés montrant des ions pseudomoléculaires [M-H]⁻ à m/z 582 (bCa-48/49/50/60). Un composé azoté possédant une masse moléculaire identique a été isolé de l'extrait brut initial des boutons floraux de l'azarole et a été identifié comme étant la N¹, N⁵, N¹⁰-tri-*p*-(*EEE*)-coumaroylspermidine (Partie II :Chapitre 3 :1.5.4). Comme suggéré précédemment, il semble que plusieurs isomères de ce composé existent au sein de cet extrait. En effet, il a été rapporté dans la littérature [400] qu'en raison de l'asymétrie de la molécule N¹, N⁵, N¹⁰-tri-*p*-coumaroylspermidine (7 - (CH₂) (3- entre

N-1 et N-5 et 4 entre N-5 et N-10)) huit stéréoisomères, ayant différentes géométries des trois doubles liaisons oléfiniques existantes, sont possibles comme suit: *EEE, EEZ, EZE, EZZ, ZEE, ZZE, ZEZ et ZZZ*. Nous avons ainsi essayé de retrouver les isomères existant dans notre fraction en comparant les spectres UV des pics repérés ayant un [M-H]⁻ à m/z 582 aux données de la littérature, ceci est fait à l'aide d'une analyse par CLHP-DAD de cette fraction. Les résultats obtenus ont fourni les spectres UV résumés dans la [Figure 69](#).

Tableau 8 : Données chromatographiques et spectrales des composés détectés dans la sF₂_CLHP issue de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus*

Pic	t _R (min)	[M-H] ⁻	Fragments MS ⁿ	Tentative d'identification	Référence
bCa-23	10,5	577	413, 293	Vitexine 2''-O-rhamnoside	[391]
bCa-25	11,1	609	301, 300, 255, 179	Quercétine 3-O-(6-O- rhamnosyl-glucoside) (rutine)	[391]
bCa-35	15,2	477	462, 315, 300, 271, 255	8-Méthoxykaempférol 3-glucoside*	
bCa-36	16,8	507	492, 345, 329, 315, 301, 285, 257,	diméthoxy-kaempférol-O-hexose	
bCa-40	17,3	519	315, 300, 271, 255	8-méthoxykaempférol-3-O-(6''-acétyl-β- glucopyranoside) *	
bCa-56	17,8	563	519	8-méthoxykaempférol3-O-(6''-malonyl-β- glucopyranoside)*	[408]
bCa-41	18	619	499, 413, 293	Craténacine (isomère)	[391]
bCa-57	20,5	661	601, 541, 455, 395, 293	2''-O-acétylrhamnosyl-C-acétylhexosyl-apigénine ou 2''-O-rhamnosyl-C-diacétylhexosyl- apigénine	[392]
bCa-58	22,8	661	601, 455, 293	2''-O-acétylrhamnosyl-C-acétylhexosyl- apigénine ou 2''-O-rhamnosyl-C-diacétylhexosyl- apigénine	[392]
bCa-59	25,5	545	530, 315, 300, 271, 255	Acide 3-O-Méthylellagique 4'-(2'',3''-di-O-acétyl)- rhamnoside	[391]
bCa-60	27,4	582	462, 436, 342	N ¹ ,N ⁵ ,N ¹⁰ - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]

bCa-48/49/50/60	28,7	582	462, 436, 342	N^1, N^5, N^{10} - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]
bCa-48/49/50/60	29,7	582	462, 436, 342	N^1, N^5, N^{10} - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]
bCa-48/49/50/60	30,9	582	462, 436, 342	N^1, N^5, N^{10} - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]
bCa-61	32,9	327	291, 229, 211, 171	Acide oxo-dihydroxy-octadécénoïque, (DHODE)	[410]

*isolé de l'extrait (voir section 1.5.2 et 1.5.3)

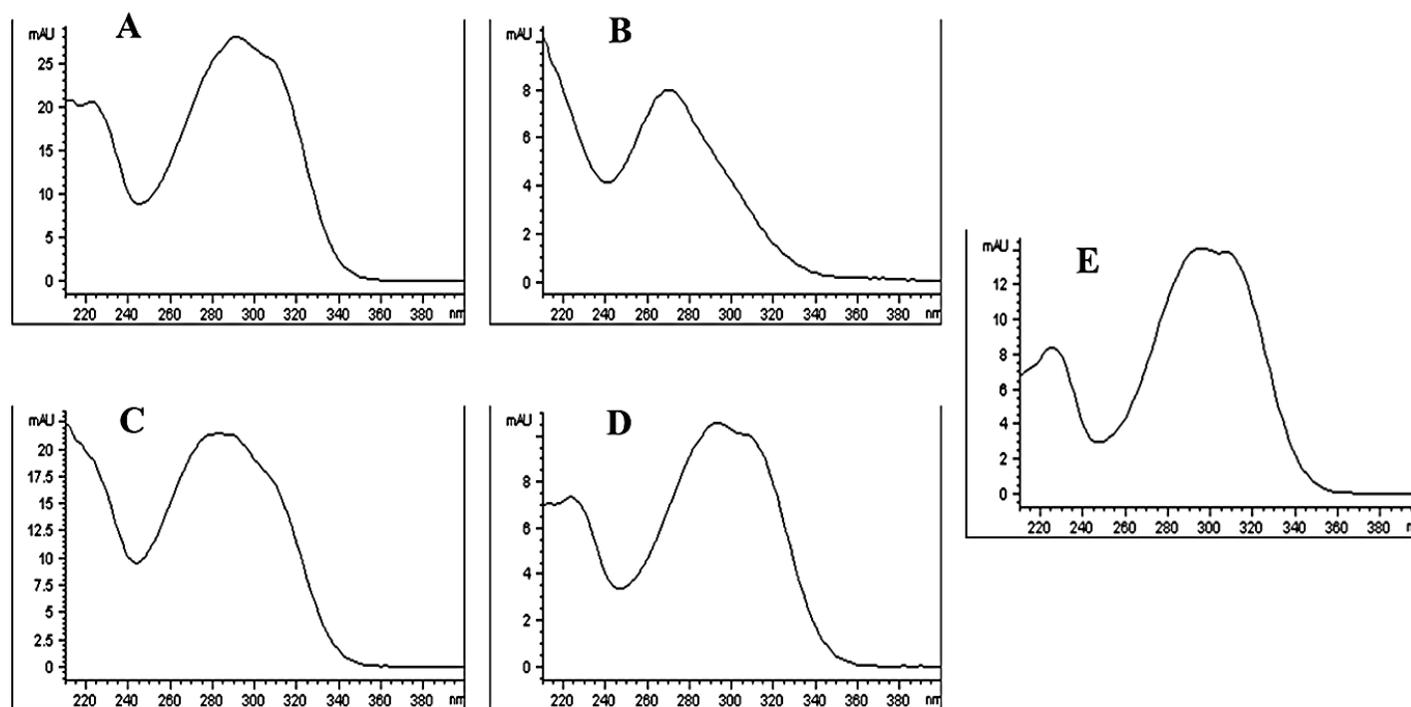


Figure 69 : Spectres UV du N^1, N^5, N^{10} -tri-p-(EEE)-coumaroylspermidine (E) et ses photoisomères ; A et C, mélange d'isomères ZZE/EEZ ; B, N^1, N^5, N^{10} -tri-p-(ZZZ)-coumaroylspermidine ; D, mélange de d'isomères EEZ.

Cinq spectres d'absorption UV ont été obtenus, y compris celui correspondant à l'isomère *EEE* isolé préalablement de l'extrait brut (Figure 69 E).

. Nous retrouvons également dans notre fraction des spectres UV montrant la présence d'un mélange d'isomères *ZZE/EEZ* (Figure 69 A et C), de l'isomère N^1, N^5, N^{10} -tri-*p*-(*ZZZ*)-coumaroylspermidine (Figure 69 B). et d'un mélange d'isomères *EEZ* (Figure 69 D). [400]. En effet, il semble que ce composé est sensible à la lumière, puisqu'après une exposition longue à la lumière l'isomère *EEE* d'origine disparaît et le système arrive à un équilibre sous forme d'un mélange de produits d'isomérisation [400].

Ainsi, la complexité des données RMN observées lors de l'élucidation structurale du composé **bCa-48** (Partie II :Chapitre 3 :1.5.4) peut être due, en plus de la complexité de la molécule, à la présence d'un mélange de photoisomères qui comprend des unités oléfiniques *Z* et *E*, ce qui est cohérent avec l'observation, dans la région oléfinique du spectre RMN 1H du **bCa-48**, de constantes de couplages de l'ordre de 13 et 16 Hz (Annexe 8).

Pour finir, grâce à l'étude de la sous-fraction *sF₂_CLHP* des composés minoritaires ont été repérés et identifiés comme étant : le 8-méthoxykaempférol 3-*O*-(6''-malonyl- β -glucopyranoside) (**bCa-56**) [408], la 2''-*O*-acétylrhamnosyl-*C*-acétylhexosyl-apigénine ou la 2''-*O*-rhamnosyl-*C*-diacétylhexosyl- apigénine (**bCa-57**) [392], l'acide 3-*O*-méthylellagique-4'-(2'',3''-di-*O*-acetyl)-rhamnoside (**bCa-59**) [391] et l'acide oxo-dihydroxy-octadécénoïque (**bCa-61**) [410].

c- Étude de la sous-fraction 3 (*sF₃_CLHP*)

De même la *sF₃_CLHP* obtenue par CLHP à partir de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* a présenté plusieurs composés (Tableau 9).

Certains composés ont été déjà décrits dans l'extrait brut initial ou dans les sous-fractions précédentes (Tableau 9 VS Tableau 8, Tableau 7 et Tableau 6) mais d'autres composés ont été détecté uniquement après l'analyse de la sous-fraction *sF₃_CLHP* comme les composés **bCa-62**, **bCa-63** et **bCa-64**.

Le kaempférol 7-*O*-(6-*O*- rhamnosyl-glucoside) (**bCa-62**), élué à 13,9 min, a présenté un ion déprotoné à *m/z* 593. Le spectre MS^n de ce composé a montré des ions correspondant à l'aglycone kaempférol (*m/z* 285) par la perte neutre du rhamnosyl-hexoside [$M - H - 308$].

La quercétine 3-*O*-rhamnoside (bCa-**63**), dérivée de la lutéoline a été éluée à un t_R de 15,7 min à m/z de 447 $[M-H]^-$ en ESI-négatif. Ce composé a été attribué après comparaison de son schéma de fragmentation MS/MS aux données de la littérature [391].

La diosmétine 7-*O*-rutinoside (bCa-**64**) (t_R 34,8 min) à m/z 607, a montré la perte d'unité rutinoside $[M - H - 308]^-$ pour donner un pic de base à m/z 299 qui peut être référé à la diosmétine déprotonée. D'autres ions fragments sont présents pour ce composé tel que l'ion à m/z 592 qui montre la perte d'un groupement méthoxyle à partir de l'ion parent.

L'acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécénoïque (bCa-**64**), est un acide gras qui est présent dans notre fraction et dont nous avons détecté la présence par l'apparition d'un ion parent à m/z 329 correspondant à $[M-H]^-$. Ce composé est caractérisé par un pic de base en MS^2 à m/z 229.

En outre, comme observé dans la sous-fraction sF₂_CLHP, la sous-fraction sF₃_CLHP montre la présence de plusieurs photoisomères de N¹,N⁵,N¹⁰-tricoumaroylspermidine caractérisés par des ions pseudomoléculaires $[M-H]^-$ à m/z 582 .

Le kaempférol 7-*O*-(6-*O*- rhamnosyl-glucoside) (bCa-**62**) [391], la quercétine 3-*O*-rhamnoside (bCa-**63**) [391], la diosmétine 7-*O*-rutinoside (bCa-**64**) [400] et l'acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécénoïque (bCa-**64**) [410] représentent des composés minoritaires de la sous-fraction sF₃ qui ont été détectés à l'aide de l'analyse LC-MS/MS.

Tableau 9. Données chromatographiques et spectrales des composés détectés dans la sF₃_CLHP issue de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus*

Pic	t _R (min)	[M-H] ⁻	Fragments MS ⁿ	Tentative d'identification	Référence
bCa-1	4,8	353	191, 179, 135	Acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique (acide néochlorogénique)	[389]
bCa-53	12,2	463	316 , 287, 271, 179, 151	Myricétine 3- <i>O</i> -rhamnoside (myricitrine)	[391]
bCa-62	13,9	593	285 , 241	Kaempférol 7- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - rhamnosyl-glucoside)	[391]
bCa-35	14,5	477	462, 315 , 300, 271, 255	8-Méthoxykaempférol 3-glucoside*	
bCa-63	15,7	447	301 , 300, 179, 151	Quercétine 3- <i>O</i> -rhamnoside (quercitrine)	[391]
bCa-40	16,8	519	315 , 300, 285, 271, 255	8-methoxyKaempférol-3- <i>O</i> -(6''-acétyl-β-glucopyranoside) *	
bCa-59	24,3	545	315 , 300, 271, 255	3- <i>O</i> -Méthylellogic acid 4'-(2'',3''-di- <i>O</i> -acétyl)-rhamnoside	[391]
bCa-48/49/50/60	26,5	582	462 , 436, 342	N ¹ ,N ⁵ ,N ¹⁰ - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]
bCa-48/49/50/60	27,7	582	462 , 436, 342	N ¹ ,N ⁵ ,N ¹⁰ - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]
bCa-48/49/50/60	28,9	582	462 , 436, 342	N ¹ ,N ⁵ ,N ¹⁰ - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]
bCa-48/49/50/60	30,3	582	462 , 436, 342	N ¹ ,N ⁵ ,N ¹⁰ - tricoumaroylspermidine (isomère)	[400]
bCa-64	34,8	607	592, 315, 299 , 271, 255	Diosmétin 7- <i>O</i> -rutinoside (diosmin)	[400]
bCa-65	36,4	329	311, 293, 229 , 211, 171	Acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadecenoïque	[410]

*isolé de l'extrait (voir section 1.5.2 et 1.5.3)

1.7. Conclusion

L'étude phytochimique approfondie de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*, réalisée en faisant appel à divers outils chromatographies (CLHP-DAD-UV, chromatographie flash-UV), spectroscopiques (HR-MS, LC-MSⁿ, RMN 1D et 2D) et aussi informatiques (exp. logiciel de traitement des données RMN *MestReNova*, algorithme de déréplication *MixONat*) a conduit à la caractérisation, au total, de 65 composés naturels dans notre plante. Il s'agit de la première étude phytochimique complète de cette espèce. En effet, 46 composés sont décrits pour la première fois dans l'espèce *Crataegus azarolus*.

Parmi les 150 à 1200 espèces recensés dans le genre *Crataegus* [411], la Pharmacopée Européenne référence six espèces (*C. monogyna*, *C. laevigata* ou leurs hybrides ainsi que *C. pentagyna*, *C. nigra* et *C. azarolus*) pour l'amélioration de la fonction cardiaque. Ainsi des espèces bien définies et des données phytochimiques précises sur les espèces de *Crataegus* sont nécessaires. Dans ce contexte, nous avons constaté que d'un point de vue phytochimique, *Crataegus azarolus* est très proche de *Crataegus monogyna*. Par ailleurs, il a été décrit dans la littérature que le 8-méthoxykaempférol-3-*O*-glucoside représente un marqueur pour la différenciation de *Crataegus monogyna* et *Crataegus pentagyna* de l'espèce *Crataegus laevigata* [411]. Ce produit représente le composé majoritaire de notre extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*. Ainsi il semble que le 8-méthoxykaempférol-3-*O*-glucoside pourrait servir également à la distinction de *C. azarolus* de l'espèce *C. laevigata*.

D'autre part, bien que les composés isolés de notre extrait et testés sur l'arginase hépatique bovine ne soient pas très actifs sur cette enzyme, comparés aux composés de référence synthétiques tels que la nor-NOHA, cette étude sur le *Crataegus azarolus* peut contribuer à l'enrichissement des données chimiotaxonomiques des espèces de *Crataegus*.

2. Étude de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus*

2.1. Étude déréplicative de l'extrait brut

2.1.1. Analyse par RMN ^{13}C

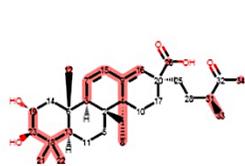
Fondée sur l'analyse des spectres RMN expérimentaux de l'extrait DCM des tiges de *C.azarolus* et après leur comparaison avec les données de la BD du genre *Crataegus*, le logiciel *MixONat* nous a proposés une liste de composés dont ceux présentant les meilleurs scores ont été présentés sur la [Figure 70](#).

Cette étude déréplicative propose la présence majoritaire de terpénoïdes dans l'extrait brut. Le score le plus élevé (0,63/1) a été attribué à l'acide swinhoeïque (MM = 486 Da), suivi de l'ester méthylique de l'acide ursolique avec un score de 0,58/1 (MM = 470 Da). Ensuite plusieurs composés apparaissent avec le même score de 0,57/1 qui sont l'acide 2 α ,3 β ,6 β ,18 β , 23-pentahydroxy-olean-12-en-28-oïque (MM = 520 Da), acide pomolique (MM = 472 Da) et l'acide tormentique (MM = 488 Da). Bien que ces scores soient assez satisfaisants pour une étude sur un extrait brut riche en composés et que cette technique nous a orienté sur le squelette de base des composés majoritaires, cette analyse déréplicative reste insuffisante pour l'élucidation structurale complète des métabolites présents dans l'extrait brut. Les faibles scores obtenus peuvent être dus à la complexité de la matrice utilisée ou à l'absence des composés de cet extrait dans la base de données construite. Cette dernière hypothèse encourage l'étude phytochimique plus poussée de l'extrait des tiges de *C.azarolus*. En effet, la base de données que nous avons construite était assez exhaustive, contenant les composés identifiés dans le genre *Crataegus* jusqu'au mois de juillet 2019. Par conséquent, si les métabolites majoritaires de l'extrait de tiges de *C.azarolus* ne figurent pas dans la base de données cela signifie qu'il s'agit de nouveaux composés dans le genre *Crataegus*.

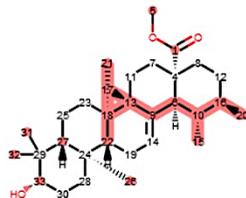
2.1.2. Analyse par CLHP-UV-DAD de l'extrait brut

L'analyse par CLHP-DAD a montré la présence de quatre composés UV-majoritaires à 280 nm, élués après 25 min en utilisant une phase mobile en mode gradient constituée d'un mélange

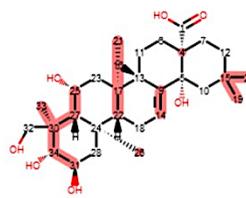
MeOH/eau de 60 % à 100 % de MeOH en 40 minutes sur une phase stationnaire inverse. Des composés plus minoritaires sont également présents dans l'extrait ([Figure 71](#)). Les spectres UV-visible des composés majoritaires de cet extrait sont résumés sur la [Figure 72](#).



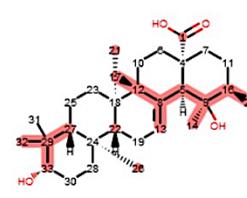
Rank: 1 (19/30 C)
 ID: 252
 MW: 486.68
 Score match: 0.63 Error : 12.74



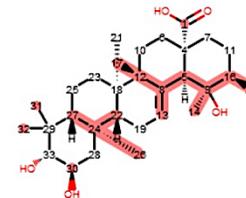
Rank: 2 (18/31 C)
 ID: 150
 MW: 470.73
 Score match: 0.58 Error : 10.87



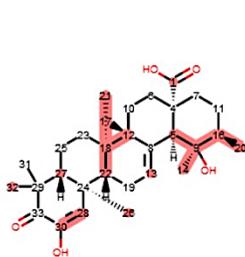
Rank: 3 (17/30 C)
 ID: 473
 MW: 520.7
 Score match: 0.57 Error : 8.82



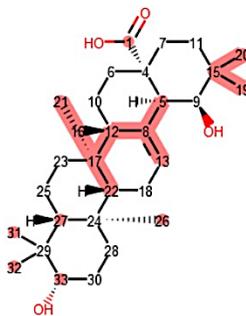
Rank: 4 (17/30 C)
 ID: 462
 MW: 472.7
 Score match: 0.57 Error : 10.22



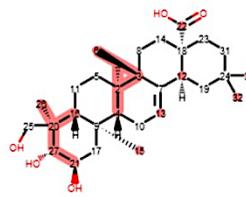
Rank: 5 (17/30 C)
 CAS: 13850-16-3
 MW: 488.7
 Score match: 0.57 Error : 11.84



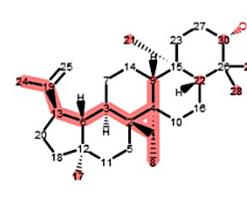
Rank: 6 (16/30 C)
 ID: 439
 MW: 484.67
 Score match: 0.53 Error : 8.5



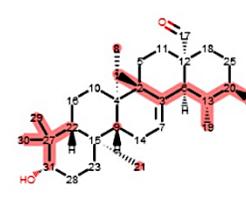
Rank: 7 (16/30 C)
 ID: 487
 MW: 472.7
 Score match: 0.53 Error : 8.89



Rank: 8 (16/30 C)
 ID: 489
 MW: 488.7
 Score match: 0.53 Error : 9.7



Rank: 9 (16/30 C)
 ID: 228
 MW: 426.72
 Score match: 0.53 Error : 10.32



Rank: 10 (16/30 C)
 ID: 460
 MW: 440.7
 Score match: 0.53 Error : 10.4

Figure 70 : Un aperçu sur quelques composés proposés à l'issue de l'analyse déréplicative par RMN 13C de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus*.

Le composé qui fournit le spectre A ne possède, *à priori*, pas de chromophore bien caractéristique d'une classe de composés. La majorité des spectres UV-visible des composés détectés ont montré des spectres typiques des acides hydroxycinnamiques [388]. Effectivement, Les spectres B et C montrent des maxima d'absorption à 215 et 330 nm ainsi que deux épaulements vers 245 et 300 nm. Le spectre D appartient vraisemblablement à une molécule dérivée de l'acide *p*-coumarique [388] caractérisée par un spectre UV-Visible indiquant deux maxima d'absorption à 225 et 320 nm et un épaulement à 310 nm. Le profil des spectres UV-visible E et F de la [Figure 72](#), ainsi que leurs maxima d'absorption, indiquent la présence de flavonoïdes dans l'extrait [412] qui sont caractérisés par deux bandes d'absorbance. Le spectre E se distingue par un épaulement fin à 230 nm et un maximum d'absorption à 275 nm et le spectre F montre un maximum d'absorption à 245 nm ainsi qu'un épaulement assez large vers à 325 nm.

Cette analyse préliminaire par CLHP/DAD-UV a permis d'obtenir des informations concernant la classe de certains composés contenus dans l'extrait DCM de tige de *Crataegus azarolus* à savoir des acides hydroxycinnamiques et des flavonoïdes.

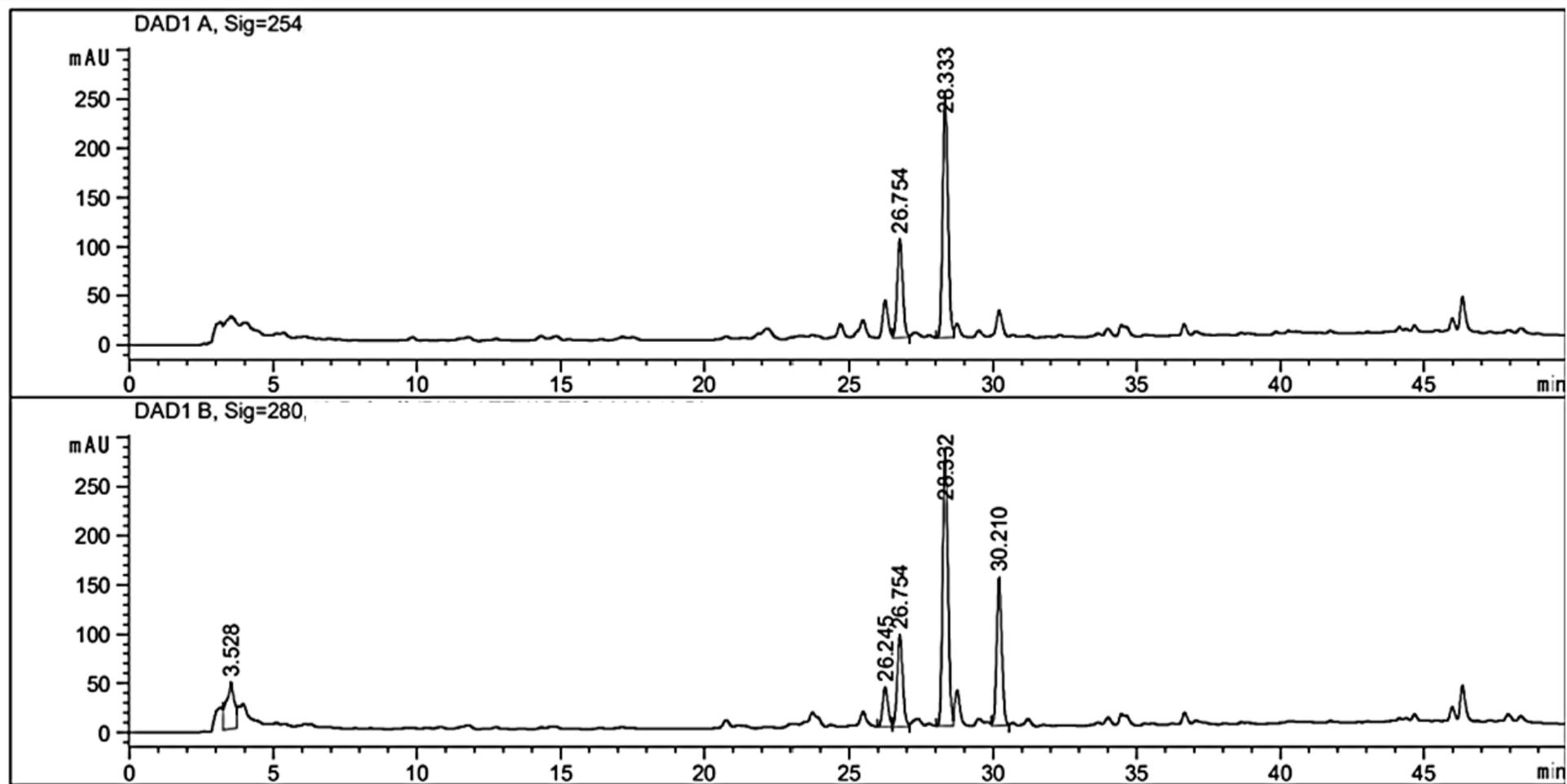


Figure 71 : Chromatogrammes CLHP-UV (détection à 254 nm et 280 nm) de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus*.

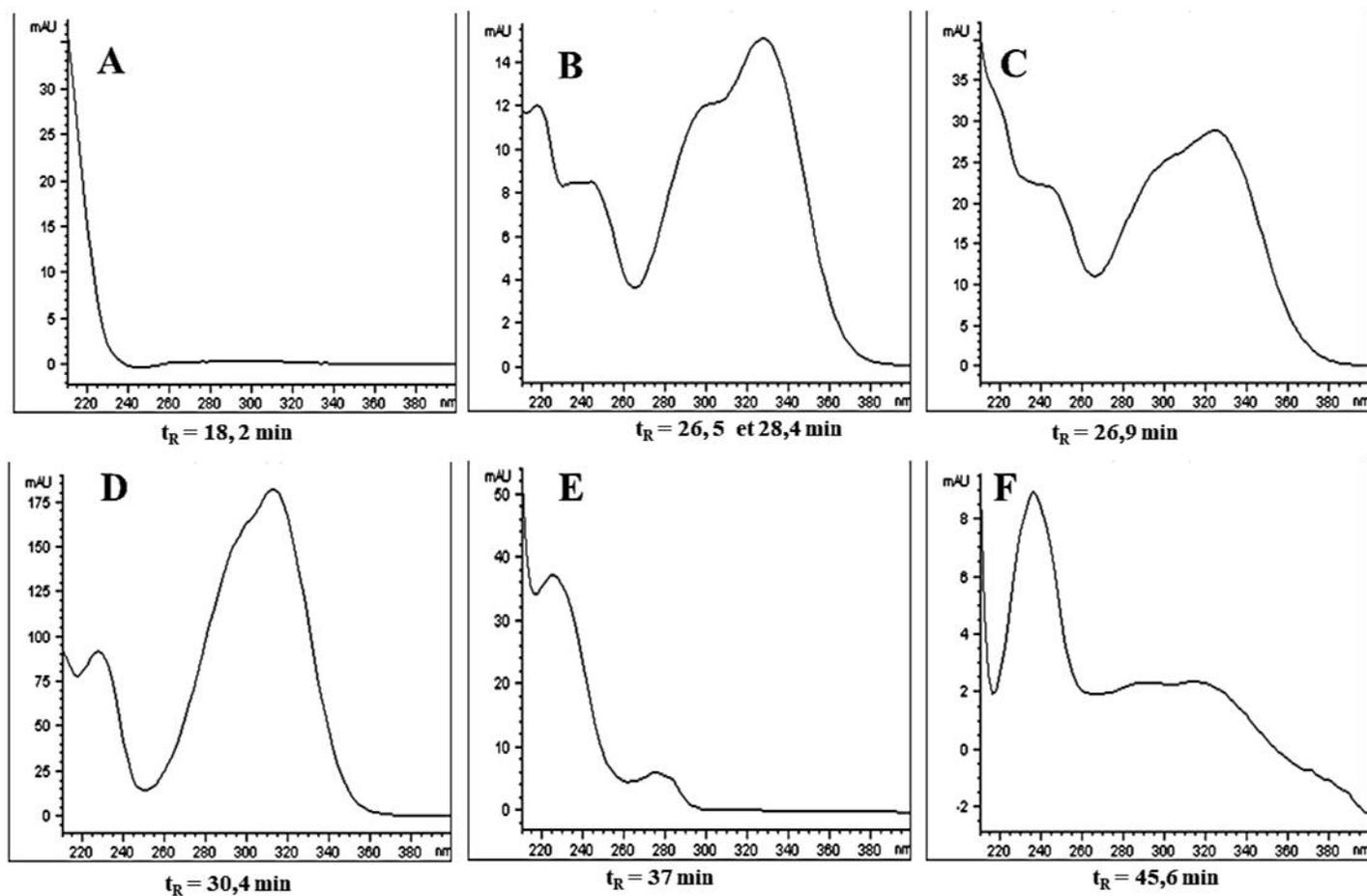


Figure 72 : Spectres UV des composés majoritaires de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus*, B, C et D spectres UV-visible typiques d'acides hydroxycinnamiques, spectres E et F typiques des flavonoïdes.

2.1.3. Analyse par CLHP-ESI-MSⁿ de l'extrait brut

Après optimisation de la séparation des composés de l'extrait brut des tiges de l'azarole, une analyse par CLHP-ESI-MSⁿ a été menée. La majorité des composés de cet extrait se fragmentent mieux en mode ESI-négatif mais quelques composés présentent une meilleure fragmentation en mode ESI-positif. Les spectres de fragmentation des différents pics détectés au sein de l'extrait chlorométhylénique de *C.azarolus* ont été confrontés aux données disponibles dans la littérature. Certaines structures proposées demeurent néanmoins hypothétiques, d'autant que certains composés expriment de nombreux isomères (Tableau 10).

a- Caractérisation des triterpénoïdes

Les acides triterpéniques apparaissent en mode positif sous forme d'ions adduits $[M+Na]^+$, qui sont difficiles à rompre. En mode négatif, ils apparaissent principalement sous forme d'ions moléculaires déprotonés et des fragments pourraient être produits par la perte de H₂O (-18 Da), HCOOH (-46 Da), CO₂ (-44 Da), CH₃OH (-32 Da) ou C₂H₄O₂ (-60 Da) [413]. L'apparition de certains ions caractéristiques sur les spectres MS² des acides triterpéniques peut donner des informations concernant leurs structures. En effet, l'existence d'un 23-OH sur le squelette d'un composé pourrait donner l'ion produit par la perte de 32 Da. L'acide triterpénoïde de type 19-OH uranane pourrait à la fois générer des fragments par la perte de 18 Da et 60 Da. L'acide triterpénoïde de type 19-OH oléanane pourrait à la fois générer les fragments par la perte de 18 Da et 46 Da. Ces éléments peuvent aider à l'identification des acides terpénoïdes [413].

Le pic tCa-4, caractérisé par un t_R de 16,8 min et un ion moléculaire déprotoné à m/z 501 a été attribué à l'acide azarolique avec un pic de base détecté à m/z 483 $[M-H-H_2O]^-$ montrant la perte d'une molécule d'eau (18 Da). Un autre ion fragment a été aperçu à m/z 441 dû à la perte d'un groupement C₂H₄O₂ (60 Da). Ce composé a d'ailleurs été isolé auparavant des feuilles de *Crataegus azarolus* [251].

Le pic tCa-5, élué à un t_R de 17,1 min (Tableau 10 A), a montré un ion pseudomoléculaire à m/z 487, un pic de base à m/z 469 $[M-H-H_2O]^-$ ainsi que des ions fragments à m/z 443 $[M-H-CO_2]^-$, m/z 425 $[M-H-62]^-$ (perte de H₂O + CO₂) et m/z 407 $[M-H-80]^-$. Ce composé a été attribué à l'acide euscaphique [413] isolé auparavant de *C.azarolus* [251].

Un autre composé caractérisé par le même ion pseudomoléculaire à m/z 487 est le composé tCa-8 (t_R 19,8 min) (Tableau 10 A). Ce dernier a été attribué à l'acide arjunique, suite à l'apparition, sur son spectre MS², des ions fragments à m/z 467 [M-H-20]⁻, m/z 441 [M-H-46]⁻ (perte du fragment HCOOH) et m/z 423 [M-H-64]⁻ (perte du fragment HCOOH+ H₂O) [413].

Deux acides 2,3,19-OH triterpénoïdes ont donc été identifiés avec un ion pseudomoléculaire déprotoné à m/z 487 [M-H]⁻, il s'agit de l'acide euscaphique (2,3,19-OH triterpénoïde de type uranane) et l'acide arjunique (2,3,19-OH de type oléanane) correspondant aux pics tCa-5 et tCa-8 respectivement.

Le pic tCa-6 a été élué à un t_R de 18,2 min et a montré un ion adduit sous forme de [M+HCOO]⁻ à m/z 531, son ion moléculaire déprotoné apparaît à m/z 485 [M-H]⁻. Des ions fragments de ce composé ont été détectés à m/z 467 [M-H- H₂O]⁻, m/z 455 [M-H-30]⁻, m/z 437 [M-H-48]⁻ et m/z 411 [M-H-74]⁻. Ainsi ce composé a été attribué à l'acide rotundanonique [414].

Le pic tCa-7 (t_R = 19 min) pourrait correspondre à l'acide 2-oxopomolique ou à l'acide 2 α ,19 α -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oïque. En effet, un ion fragment de ce composé est apparu à m/z 467 [M-H-H₂O]⁻ suite à la perte d'une molécule d'eau à partir de l'ion pseudomoléculaire à m/z 485 [M-H]⁻.

Le pic tCa-9, détecté à un t_R de 21 min (Tableau 10 A), montre un ion adduit à m/z 501 [M+HCOO]⁻. Des ions fragments apparaissent également sur le spectre LC-MSⁿ de ce composé à m/z 455 [M-H-46]⁻ et à m/z 439 [M-H-62]⁻, correspondant aux pertes neutres de HCOOH et de H₂O + CO₂ respectivement. Ce schéma de fragmentation pourrait correspondre à l'acide ursolique [414].

Le pic tCa-10 élué à un t_R de 22,5 min et caractérisé par un ion pseudomoléculaire m/z 471 a présenté deux ions caractéristiques majeurs à m/z 453 de déshydratation et à m/z 411 qui est produit par la perte de C₂H₄O₂ (60 Da), ce pic pourrait être attribué à l'acide pomolique [413].

Les pics tCa-13, tCa-15 (composé majoritaire de l'extrait) et tCa-17 (Tableau 10 A), peuvent représenter des isomères élués à des t_R de 26,8 min, 28,3 min et 29,6 min respectivement et montrent tous des ions parents à m/z 633. Aucun ion fils dérivé de la déshydratation de l'ion moléculaire déprotoné n'a été détecté sur les spectres de fragmentation de ces composés. Ils génèrent plutôt des ions fragments à m/z 497 [M-H-136]⁻ et m/z 589 [M-H-CO₂]⁻. Ainsi, ils peuvent correspondre aux acides *cis/trans* caféoyl-masliniques ou acides *cis/trans* caféoyl-corosoliques [413].

Tableau 10-A : Données chromatographiques et spectrales des composés détectés dans l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus* en mode ESI-négatif

Pic	t_R (min)	[M-H]⁻	Fragments MSⁿ	Tentative d'identification	Référence
tCa-1	8,9	327	291, 229 , 211, 179, 125	Acide oxo-dihydroxy-octadecenoïque	[410]
tCa-2	10,6	329	311, 293, 229 , 211, 183, 125	Acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadecenoïque	[410]
tCa-3	15,1	–	517, 473, 455 , 439	–	–
tCa-4	16,8	501	483 , 441, 409, 391, 355, 337	Acide azarolique	[251]
tCa-5	17,1	487	469 , 443, 425, 407, 371	Acide euscaphique	[413] [251]
tCa-6	18,2	531*	485 , 467, 455, 437, 411	Acide rotundanonique	[414] [415]
tCa-7	19	485	467	Acide 2-Oxopomolique/ Acide 2α,19α-dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oïque	[251]
tCa-8	19,8	487	485, 467, 455, 441 , 423, 393, 381	Acide arjunique	[413]
tCa-9	21	501*	455, 439	Acide ursolique	[414]

tCa-10	22,5	471	453, 411	Acide pomolique	[413]
tCa-11	25	–	295, 277, 195, 171	Dérivé de l'acide hydroxy-octadecadienoïque	[416]
tCa-12	25,8	–	619	–	–
tCa-13	26,8	633	497	Acide <i>cis/trans</i> caféoyl-maslinique/ Acide <i>cis/trans</i> caféoyl-corosolique	[413]
tCa-14	27,7	–	603	–	–
tCa-15	28,3	633	589, 497	Acide <i>cis/trans</i> caféoyl-maslinique/ Acide <i>cis/trans</i> caféoyl-corosolique	[413]
tCa-16	28,9	617	497, 453	Acide <i>cis/trans</i> coumaroyl-maslinique Acide <i>cis/trans</i> coumaroyl-corosolique	[413]
tCa-17	29,6	633	589, 497	Acide <i>cis/trans</i> caféoyl-maslinique/ Acide <i>cis/trans</i> caféoyl-corosolique	[413]

tCa-18	30,2	617	497, 453	Acide <i>cis/trans</i> coumaroyl- maslinique	[413]
				Acide <i>cis/trans</i> coumaroyl- corosolique	
tCa-19	33,6	–	523, 455	–	–
tCa-20	34,4	–	603	–	–
tCa-26	43,6	–	383 , 337	Acide gras (24 :0) α -hydroxylé	[417]
tCa-27	44	487	179, 161 , 135	–	–
tCa-28	45,1	501	457, 401, 307, 179, 161	–	–
tCa-29	45,6	515	471, 179 , 161	Acide dicaféoyl-quinique	[391]
tCa-30	46,8	–	653, 643, 410, 398, 355 , 337, 309, 265	Acide gras (24 :0) α -hydroxylé	[417]
tCa-31	47,5	–	543, 499, 179, 161	–	–
tCa-32	48,9	–	681, 662, 438, 383 , 337, 265	Acide gras (24 :0) α -hydroxylé	[417]
tCa-33	50,1	695	676, 452, 397 , 351, 254	Acide phosphatidique	[418] [419]
tCa-34	50,9	671	535, 433, 409, 391, 279, 255	Acide phosphatidique	[418] [419]
tCa-35	52,5	671	535, 433, 409, 391, 279,	Acide phosphatidique	[418]

			255		[419]
tCa-36	52,9	671	433, 433, 409, 391 , 279, 255	Acide phosphatidique	[418] [419]

* Composés détectés sous forme d'ions adduits [M+HCOO]⁻ contrairement aux autres composés montrant des ions moléculaires déprotonés

Tableau 11-B : Données chromatographiques et spectrales des composés détectés dans l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus* en mode ESI-positif

Pic	t_R (min)	[M+H]⁺	Fragments MSⁿ	Tentative d'identification	Référence
tCa-21	34,6	609	591 , 559, 531	–	–
tCa-22	36,6	804	413	–	–
tCa-23	38,5	607	547 , 461	–	–
tCa-24	41,1	537	503, 415, 299	Linarionoside C	[420]
tCa-25	42,3	611	355 , 269	Bioquercétine	[421]

Les pics tCa-16 (t_R 28,9 min) et tCa-18 (t_R 30,2 min) (Tableau 10 A) sont des isomères à ions pseudomoléculaires $m/z = 617$. Ces composés se caractérisent par des ions fragments à m/z 497 $[M-H-120]^-$ et m/z 453 $[M-H-164]^-$. L'ion fragment à m/z 497 a été obtenu par la perte de 120 Da par le clivage de la liaison carbone-carbone entre la double liaison et le groupement acyl dans la partie coumaroyl. En outre, aucun ion de déshydratation n'a été observé sur les spectres de ces composés. Par conséquent, ils peuvent être attribués aux acides *cis/trans* coumaroyl-maslinique ou *cis/trans* coumaroyl-corosolique [413].

Un terpénoïde glycosylé (pic tCa-24, Tableau 11 B) a été repéré à un t_R de 41,1 min avec une meilleure fragmentation en mode positif. Il possède un ion pseudomoléculaire à m/z 537 $[M+H]^+$. Le pic de base de ce composé a été détecté à m/z 299. Il s'agit du linarionoside C, terpénoïde isolé auparavant de *Crataegus pinnatifida* [422].

b- Caractérisation des acides gras

Le composé tCa-1 (Tableau 10 A) a présenté un ion moléculaire déprotoné $[M-H]^-$ à m/z 327. Les principaux ions fragments de ce composé ont été observés à m/z 291, 229 (pic de base) et 211, qui sont caractéristiques d'un oxylipine. Ce pic a été attribué à l'acide oxo-dihydroxy-octadécénoïque [410].

Le composé tCa-2 a donné l'ion moléculaire déprotoné $[M-H]^-$ à m/z 329, qui a perdu une molécule de H_2O pour produire l'ion fragment m/z 311. Deux autres ions fragments à m/z 229 (pic de base) et m/z 211 apparaissent sur le spectre de ce composé. L'ion à m/z 229 provient de la perte du groupement $[HO-CH=CH(CH_2)_3CH_3]$ (100 Da) de l'ion à m/z 329 et l'ion à m/z 211 est issu de la perte du même fragment à partir de l'ion à m/z 311. Ceci démontre la présence d'une chaîne latérale caractéristique d'une molécule d'oxylipine. Sur la base de ces données et par leur comparaison à la littérature [410], le pic tCa-2 a été attribué à l'acide 9,10,13-trihydroxy-11-octadécénoïque.

Pour le composé tCa-11, des ions fragments MS^2 à m/z 295 ; 277 $[295-H_2O]^-$; 251 $[295-CO_2]^-$; 195 $[295- HO-CH=CH(CH_2)_3CH_3]^-$ et 171 ont été détectés suggérant la présence d'un dérivé d'acide hydroxy-octadécadiénoïque [416].

Les composés tCa-26, tCa-30 et tCa-32 (Tableau 10 A) présentent des ions fragments à m/z 383, 365 et 337. Les ions fragments à m/z 365 et m/z 337 correspondent à des pertes séquentielles de H_2O et de $[H_2+CO_2]$, respectivement, à partir de l'ion fragment m/z 383. Cette fragmentation indique la présence d'acides gras (24: 0) α -hydroxylé [417].

c- Caractérisation des flavonoïdes

L'analyse préliminaire de l'extrait brut par CLHP-DAD, nous a orienté sur la présence de flavonoïdes parmi les métabolites présents dans l'extrait (Figure 78 page 281). Ceci a été confirmé par l'analyse en LC-MSⁿ qui a montré à un t_R de 42,3 min (pic tCa-25) (Tableau 10 B), la présence d'un composé possédant un ion pseudomoléculaire protoné [M+H]⁺ à m/z 611 avec un pic de base à m/z 355. Ce pic peut correspondre à un flavonol qui est la bioquercétine trouvé dans des extraits de feuilles de *C. pinnatifida* et possède des propriétés antithrombotiques *in vitro* et *in vivo* [421].

d- Caractérisation des acides caféoylquiniques

Le pic tCa-29 élué à 45,6 min et affichant un ion pseudomoléculaire à m/z 515 a été attribué à un acide dicaféoyl-quinique [391]. Sur le spectre de ce composé nous observons les ions fragments à m/z 471 obtenu après la perte d'une molécule de CO₂ à partir de l'ion pseudomoléculaire à m/z 515 ainsi que des ions fragments à m/z à 179 [M-H-336]⁻ et 161 [M-H-354]⁻. Ce type de composés retrouvés dans l'extrait des tiges de *C. azarolus* a été retrouvé également, au cours de l'étude précédente, dans les boutons floraux de cette même plante (Partie II :Chapitre 3 :1.1.1 page 215).

e- Caractérisation des acides phosphatidiques

Les ions m/z = 671 et 695 sont les principaux représentants de la série des acides phosphatidiques [418]. Ces ions ont été observés sur les spectres des composés tCa-33, tCa-34, tCa-35 et tCa-36 (Tableau 10 A). Les pics tCa-34, tCa-35 et tCa-36 se caractérisent par un ion fils à m/z 391 qui affiche une perte d'un acide gras (acide linoléique, - C₁₈H₃₂O₂) à partir de l'ion pseudomoléculaire à m/z 671. D'autres ions fragments, montrent sur le spectre MS² la présence d'acides gras, détectés seuls, tels que les ions à m/z 279 (acide linoléique) et m/z 255 (acide palmitique) [418].

2.2. Conclusion sur l'étude déréplicative

Grâce aux techniques chromatographique et spectroscopique (CLHP couplée à des détecteurs (UV) et de masse (MS et MSⁿ) et la RMN ¹³C) ainsi que les outils informatiques (algorithme *MixONat*), la composition chimique des tiges de *C. azarolus* a été révélée. Ces

analyses ont montré que les tiges de cette plante pourraient être une source naturelle riche en triterpénoïdes puisque la majorité des composés détectés, en particulier les composés majoritaires de l'extrait, appartiennent à cette classe de métabolites secondaires. Ces composés : l'acide *cis/trans* caféoyl-maslinique, l'acide *cis/trans* caféoyl-corosolique, l'acide *cis/trans* coumaroyl-maslinique et l'acide *cis/trans* coumaroyl-corosolique, ont été décrits dans la littérature pour être doués de diverses activités biologiques telles que les activités anti-ostéoclastogène [423], anti-hyperglycémiant, [424, 425], antibactérienne, cytotoxique [426] et anti-tumorale [427]. La présence de terpénoïdes dans le genre *Crataegus* a été rapportée dans des études antérieures [420]. En revanche, à notre connaissance, les acides terpénoïdes reliés à des acides hydroxycinnamiques, composés majoritaires de notre extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus*, sont décrits pour la première fois dans le genre *Crataegus*.

Le DCM utilisé pour l'extraction des composés à partir des tiges, a permis également d'extraire plusieurs acides gras hydroxylés ou estérifiés avec un acide phosphorique et un glycérol (acides phosphatidiques). Plusieurs acides gras ont été décrits chez l'espèce *Crataegus azarolus* tels que l'acide palmatique, palmitoléique et linoléique [428]. En revanche, bien qu'ils existent des études qui s'intéressent aux acides phosphatidiques dans le genre *Crataegus* comme par exemples ceux retrouvés dans le péricarpe de *Crataegus turkestanica* [429], la présence de ce type de composés n'a pas été rapporté auparavant dans *Crataegus azarolus*.

D'autres composés restent non identifiables, à l'issue de notre étude déréplicative, tels que les composés nommés tCa-3 (15,1 min), tCa-12 (25,8 min), tCa-19 (33,6 min), tCa-20 (34,4 min), tCa-22 (44 min), tCa-28 (45,1 min), tCa-31 (47,5min). Ainsi, une étude phytochimique plus approfondie est nécessaire afin d'identifier les composés minoritaires de cet extrait et d'isoler des composés potentiellement actifs sur l'arginase.

2.3. Fractionnement de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus*

Le fractionnement bioguidé de 500 mg de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus* a été opéré par chromatographie Flash sur phase stationnaire normale. Ce fractionnement grossier a conduit à l'obtention de 10 fractions nommées F₁-Flash à F₁₀-Flash (Figure 73 A), réunies en fonction de leurs profils chromatographiques obtenus par CCM. Les masses de ces fractions étaient comprises entre 17,3 et 85,4 mg. Selon une première analyse par

CCM, il semble que certaines d'entre elles possèdent une composition simple comme la F₁_Flash ; d'autres fractions étaient riches en composés telles que les fractions F₃-Flash à F₇-Flash (Figure 73 B). Les fractions récupérées ont été testées sur l'arginase hépatique bovine (Figure 73 C). Les activités inhibitrices de l'arginase de ces mélanges de produits étaient comprises entre 24% et 72% à 100 µg/mL. L'activité la plus importante a été détectée en présence de la fraction F₃-Flash, son inhibition étant similaire à l'activité de l'extrait brut (Figure 73 C). Il semble, par conséquent, que les produits responsables de l'activité de l'extrait initial ont été rassemblés dans la fraction F₃-Flash. Les fractions de F₄-Flash à F₇-Flash ont présenté également des activités non négligeables qui dépassent les 44% à 100 µg/mL (Figure 73 C).

L'analyse par CLHP analytique des fractions les plus actives (dont l'inhibition a dépassé 40% à 100 µg/mL) a confirmé leur richesse en composés. En particulier la F₃-Flash (72% à 100 µg/mL) qui était la plus riche en composés de polarité très différentes (Figure 74-1). En effet tout au long de l'analyse en alternant des modes isocratiques et des gradients avec du MeOH et de l'eau, sur une phase inverse C18, nous détectons des pics qui absorbent à 280 nm et 254 nm. Les fractions F₃-Flash (72% d'inhibition de l'arginase) et F₄-Flash (51% d'inhibition), analysées dans les mêmes conditions (Figure 74-1), ont montré des composés communs élués entre 42 et 54 min. Il peut être supposé que ces métabolites participent en partie à l'activité biologique observée.

La composition des fractions montrant des activités s'échelonnant de 44 à 51% d'inhibition de l'arginase à 100 µg/mL (les F₅-Flash à F₇-Flash), semble moins complexes et assez similaire avec une majorité de composés de polarité moyenne (Figure 74-2). Cette similarité dans la composition chimique détectée par CCM et CLHP s'est traduite par une similarité dans les activités biologiques (Figure 73 C).

Les fractions F₃-Flash à F₇-Flash, ayant montré une composition chimique intéressante et une activité dépassant 40% à 100 µg/mL, ont subi un fractionnement bioguidé avec une CLHP préparative en phase inverse dans le but d'identifier des composés actifs sur l'arginase surtout à partir de la F₃-Flash et/ou d'identifier de nouvelles structures de molécules (surtout à partir des F₄-Flash à F₇-Flash).

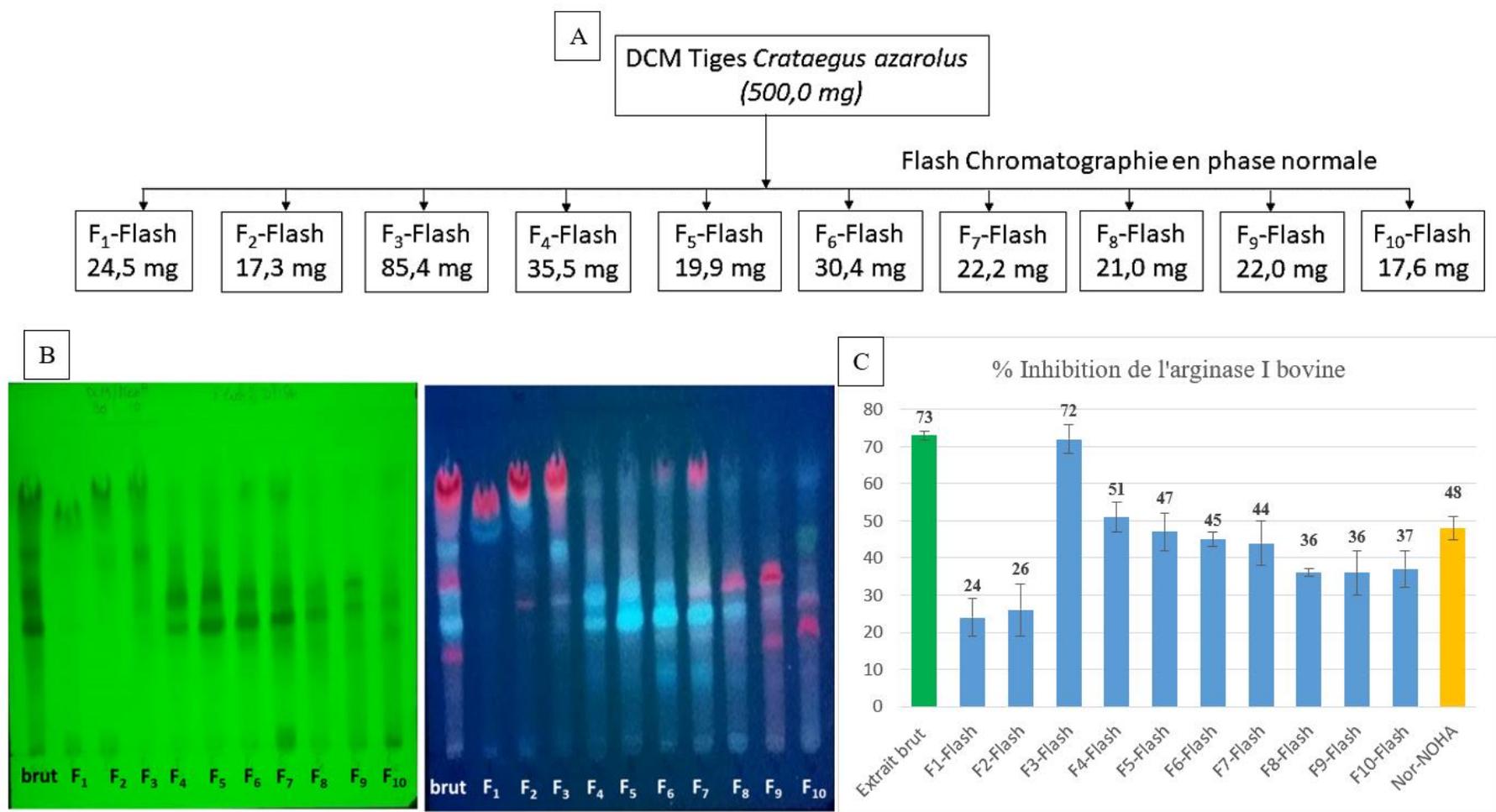


Figure 73 : Fractionnement de l'extrait DCM des tiges de *Crataegus azarolus* et activité inhibitrice de l'arginase des fractions obtenues; A, schéma de fractionnement; B, CCM de l'extrait brut et des fractions; C, activité inhibitrice de l'arginase à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; nor-NOHA testée à 4 μM .

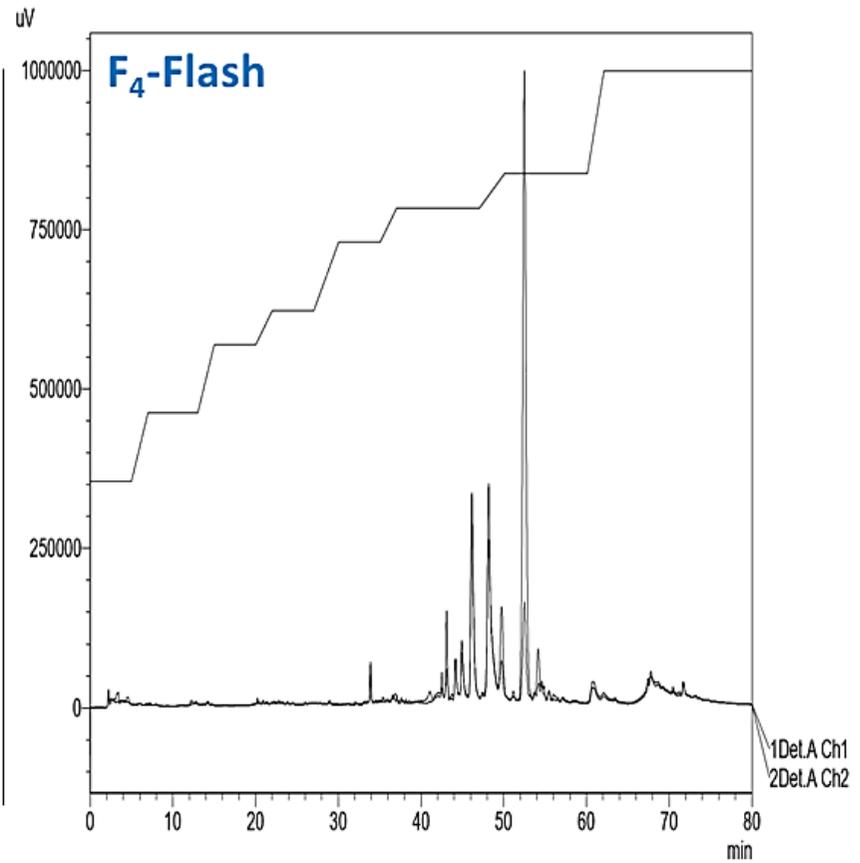
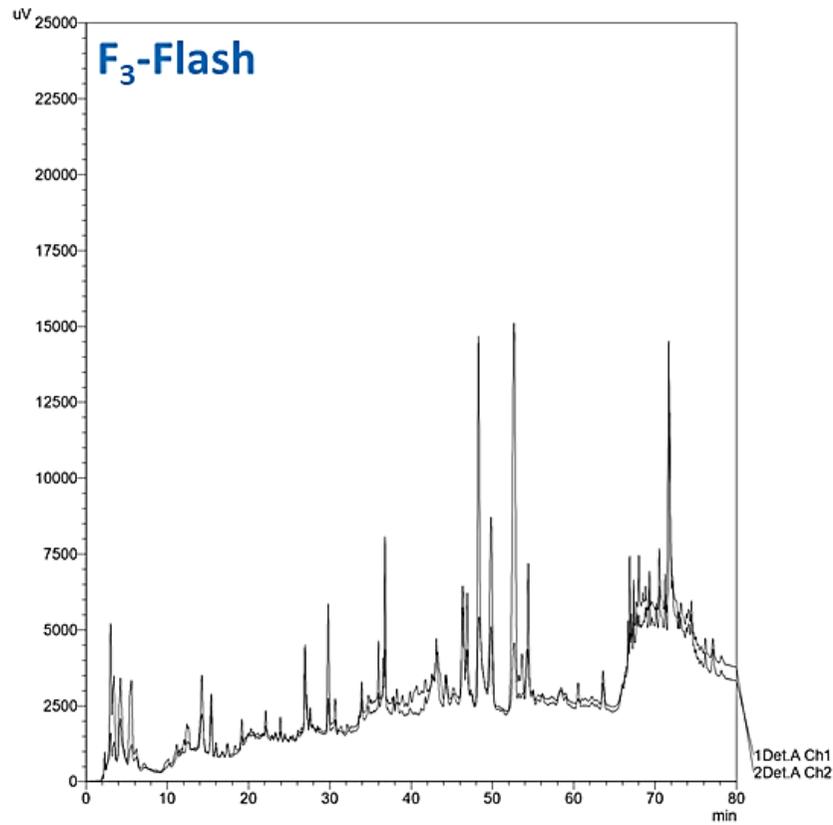


Figure 74-1 : Chromatogrammes des fractions issues de l'extrait de tiges de *Crataegus azarolus* fractionné par chromatographie Flash.

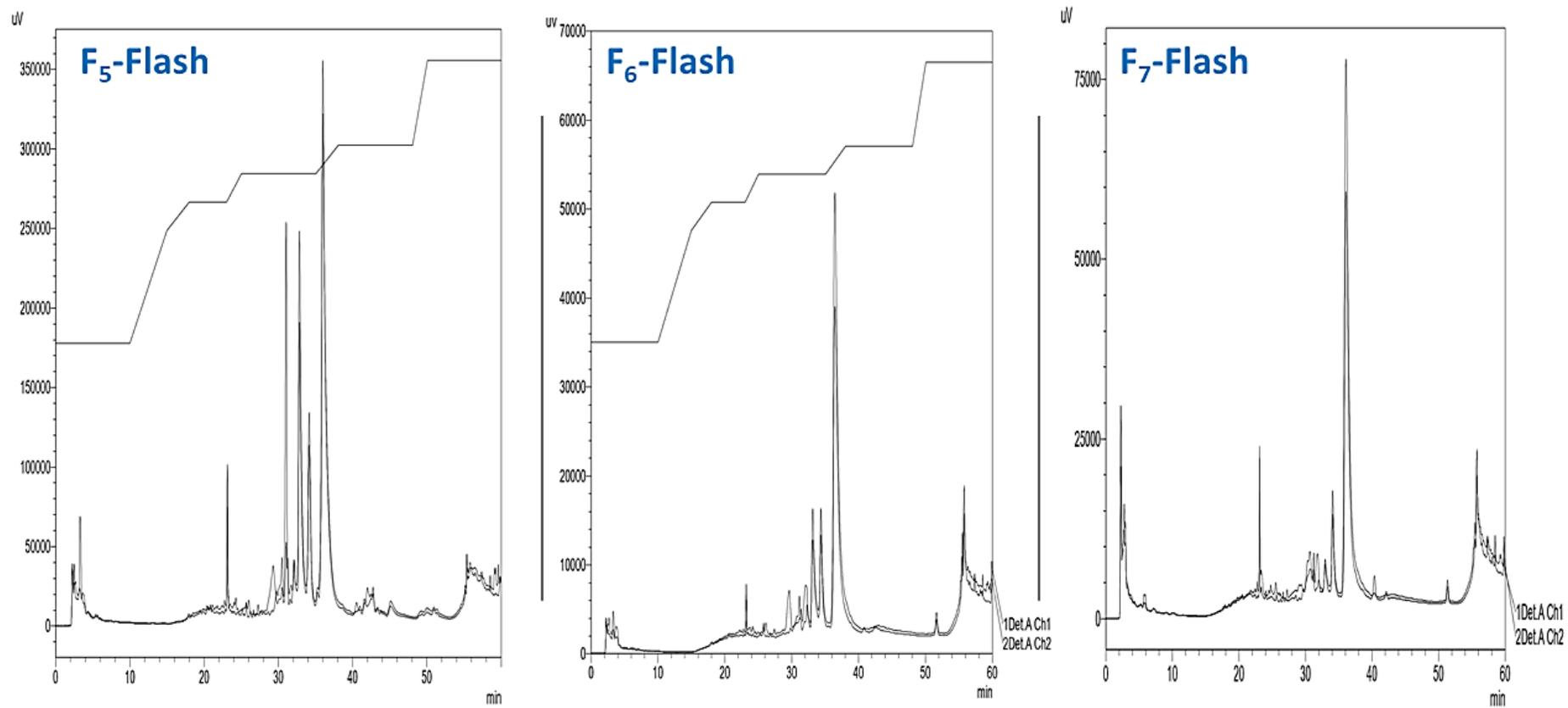


Figure 74-2 : Chromatogrammes des fractions issues de l'extrait de tiges de *Crataegus azarolus* fractionné par chromatographie Flash.

Le fractionnement de la F₃-Flash (85,4 mg) a conduit à l'obtention de quinze sous-fractions avec des masses allant de 0,4 à 2,7 mg (Figure 75-1). D'après les profils chromatographiques sur CCM de ces fractions (Figure 75-1 B), une seule sous-fraction (SF₁₁) présentant une pureté et une masse assez satisfaisantes a pu subir des analyses par RMN.

La F₄-Flash (35,5 mg) a fourni 8 sous-fractions de masses comprises entre 0,1 et 1,7 mg (Figure 75-2). Parmi ces sous-fractions, seules les SF₁ et SF₆ présentent des masses et des puretés suffisantes pour subir des analyses spectroscopiques.

La F₅-Flash (19,9 mg) a livré quatre sous-fractions de masses comprises entre 0,1 mg et 1,8 mg (Figure 75-2). Les sous-fractions ayant présenté les masses les plus importantes n'ont pas présenté un degré de pureté correct pour subir des analyses spectroscopiques à des fins d'élucidation structurale.

La F₆-Flash (30,4 mg) ainsi que la F₇-Flash (22,2 mg) subdivisée chacune en 4 sous-fractions, n'ont pas conduit à des produits de masse et de qualité permettant leur identification structurale (Figure 75-3).

Pour résumer, à partir de ces longues étapes de fractionnement seules trois sous-fractions (SF₁₁, SF₁ et SF₆) peuvent être analysées par RMN et HR-MS. L'élucidation structurale des sous-fractions SF₁₁, SF₁ et SF₆ est en cours. Leurs spectres RMN 1D sont similaires et montrent qu'ils s'agissent d'acides terpéniques (Annexe 9). En revanche aucune sous-fraction ne peut être testée sur l'arginase en raison de l'obtention de produits de masses très faibles.

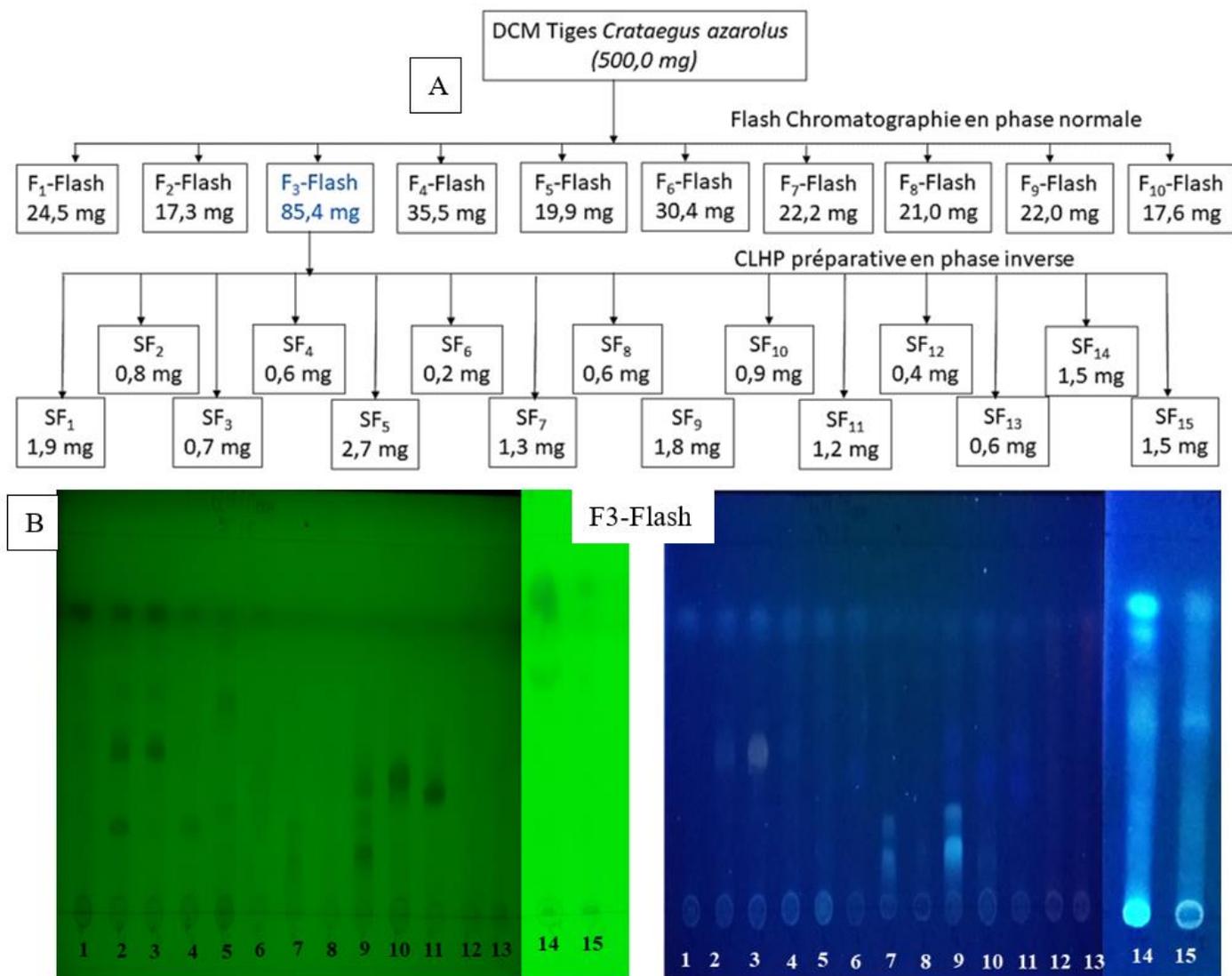


Figure 75-1 : Fractionnement des fractions de l'extrait DCM des tiges de *Crataegus azarolus* par CLHP préparative; A, schéma de fractionnement ; B, CCM des sous-fractions obtenues.

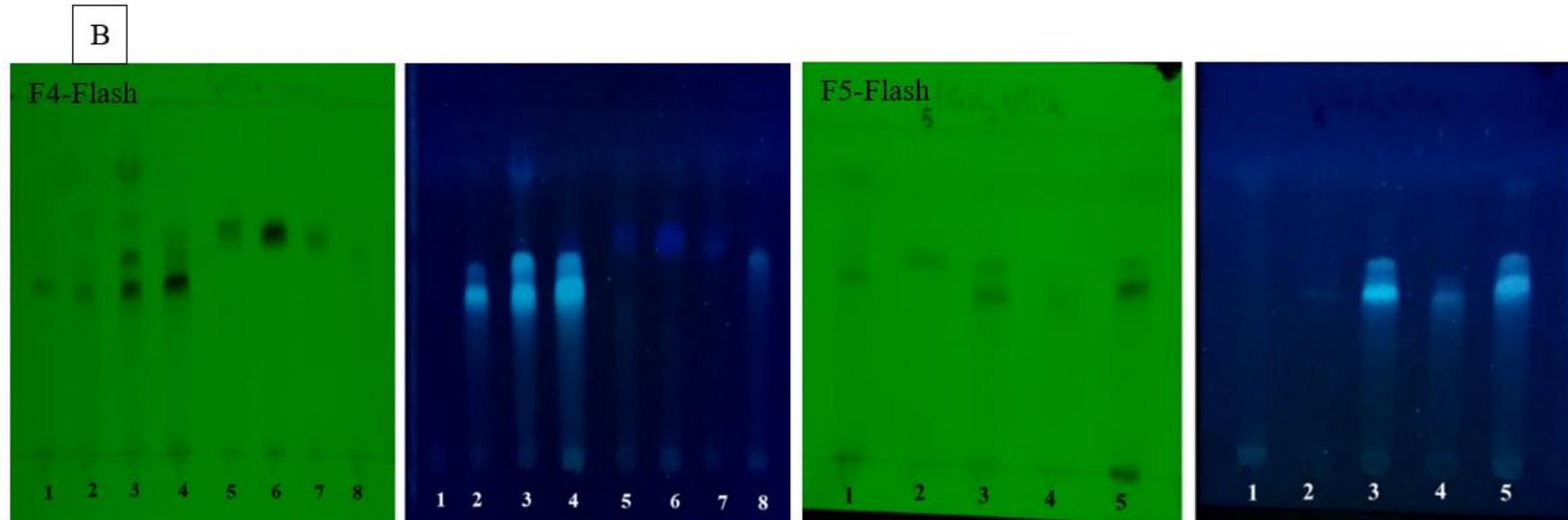
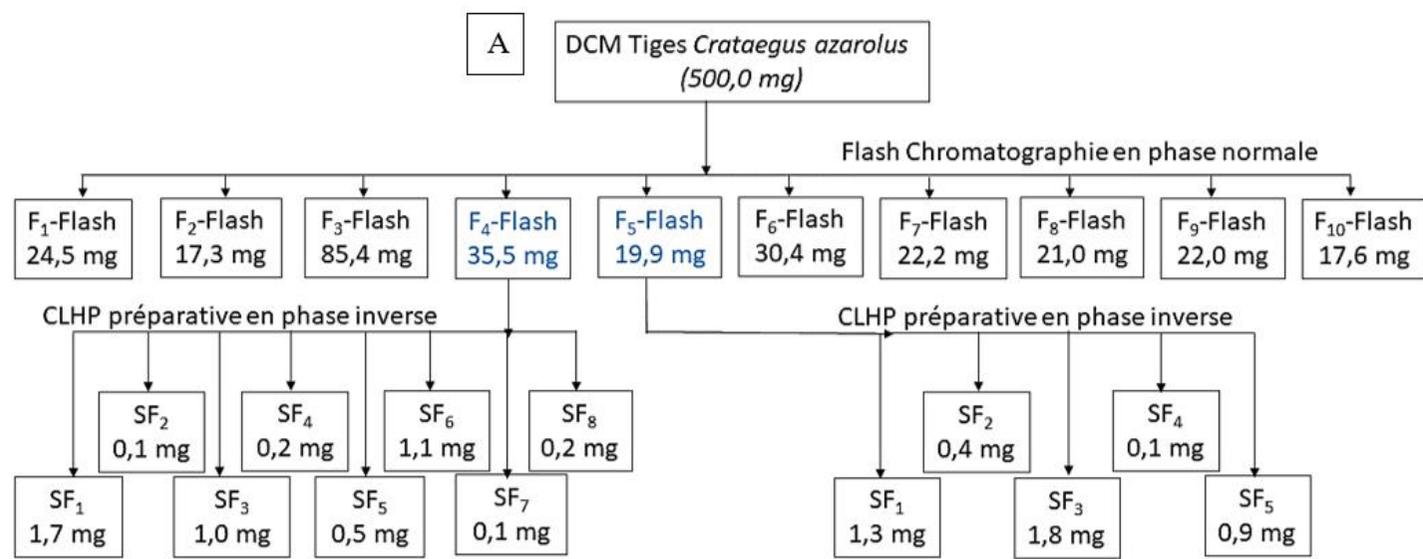


Figure 75-2 : Fractionnement des fractions de l'extrait DCM des tiges de *Crataegus azarolus* par CLHP préparative ; A, schéma de fractionnement ; B, CCM des sous-fractions obtenues.

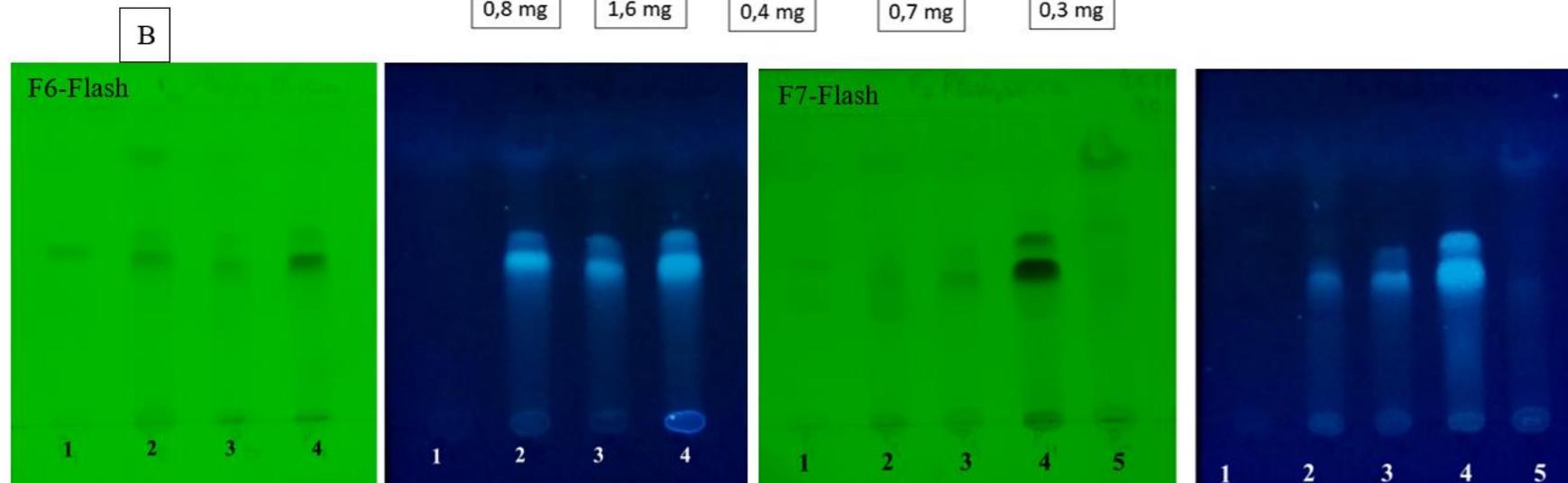
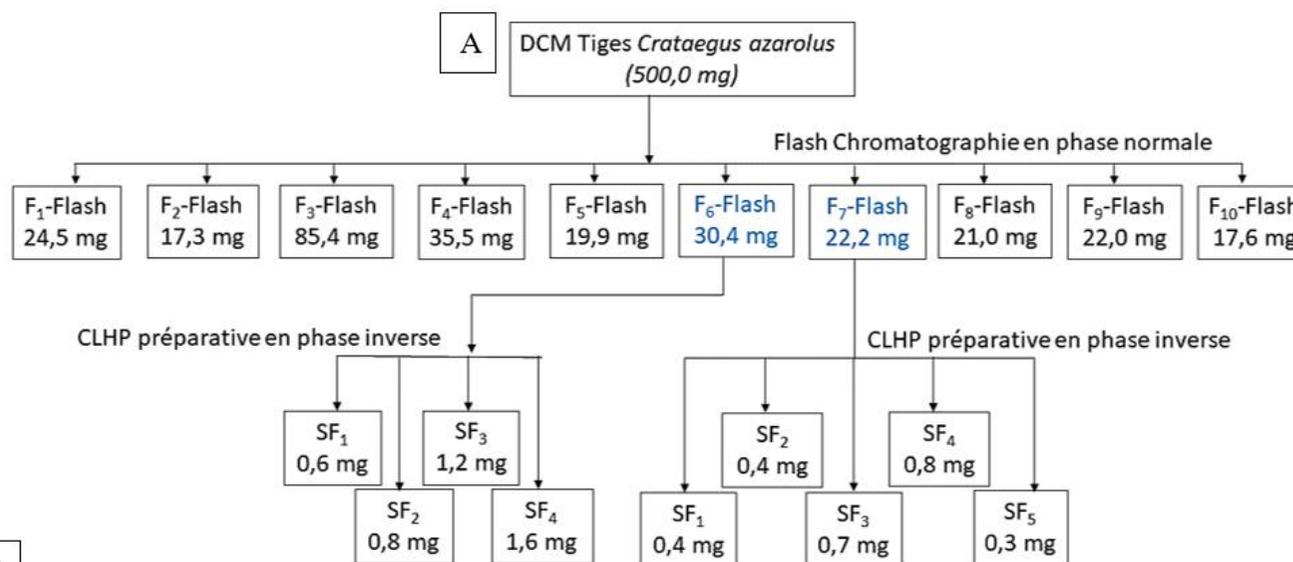


Figure 75-3 : Fractionnement des fractions de l'extrait DCM des tiges de *Crataegus azarolus* par CLHP préparative ; A, schéma de fractionnement ; B, CCM des sous-fractions obtenues.

2.4. Conclusion

Les études antérieures sur l'espèce *Crataegus azarolus* se sont principalement concentrées sur les composés phénoliques et en particulier leur identification par LC-MS [241, 253, 255, 430, 431]. Par ailleurs, quelques études se sont intéressées à d'autres classes de composés naturels bioactifs, tels que les terpènes [251, 428, 432].

Dans notre étude sur les tiges de *Crataegus azarolus*, nous avons détecté principalement des terpénoïdes. Il n'est pas étonnant de retrouver cette classe de composés dans l'azarole tunisien puisque des terpènes comme l'acide oléanolique, l'acide ursolique, l' α -amyrine, la β -amyrine, l'acide azarolique et l'acide euscaphique qui a des effets anti-vasoconstricteurs élevés sur les anneaux aortiques, ont été identifiés auparavant dans *Crataegus azarolus* [251, 428]. En revanche, l'originalité de notre étude consiste en la détection d'acides terpéniques portant des fragments d'acides hydroxycinnamiques sur leurs structures qui, à notre connaissance, sont rapportés pour la première fois dans le genre *Crataegus*.

Chez les végétaux de nombreux isomères de triterpènes ayant des propriétés physico-chimiques similaires, ne différant que par la position du groupe hydroxyle ou méthyle peuvent exister [414]. De plus, certains isomères sont présents à de faibles concentrations, ce qui augmente la difficulté de leur isolement [413]. Cette constatation pourrait expliquer la complexité de la purification et de l'identification des acides triterpéniques isolés de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *C. azarolus*. En revanche, ces molécules semblent être actives sur l'arginase et il serait donc intéressant d'explorer leur potentiel inhibiteur en particulier les terpènes reliés au motif caféoylo, composés majoritaires de notre extrait, puisque l'effet inhibiteur puissant de plusieurs molécules naturelles a été attribué à ce pharmacophore caféoylo (Partie I : Chapitre 2 : 6.3.2 page 69).

3. Etude de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam*

Lors du criblage réalisé sur les différents extraits des espèces retenues, l'extrait dichlorométhanique des tiges de *Retama raetam* a montré une activité inhibitrice de l'arginase assez intéressante avec une CI_{50} de l'ordre de 85 $\mu\text{g/mL}$. De plus cet extrait a montré une teneur importante en flavonoïdes (32.79 ER/mg d'extrait sec, Tableau 5 page 194). Cette matrice a

suscité notre intérêt pour une étude phytochimique qui a débuté par des analyses déréplicatives suivie d'un fractionnement bioguidé conduisant à l'isolement de produits purs qui ont été finalement testés sur l'arginase.

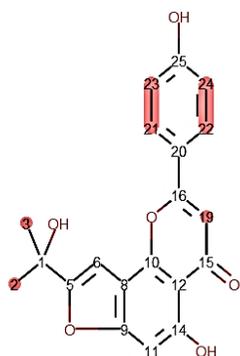
3.1. Étude déréplivative de l'extrait brut

3.1.1. Déréplication par RMN ^{13}C

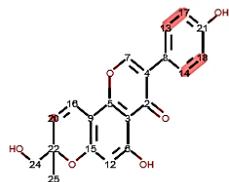
Une base de données contenant les métabolites secondaires identifiés dans le genre *Retama*, jusqu'au mois de juillet 2019, a été élaborée. Cette BD comporte 129 composés décrits dans le genre *Retama*, que nous avons pu constituer à partir des publications retrouvées grâce à des recherches sur les sites *Scifinder*, *Pubmed*, *ScienceDirect* et le « *Dictionary of Natural Products* ». Une revue de la littérature, récemment publiée [272], a été notamment employée pour la construction de cette BD.

Après traitement des spectres RMN ^{13}C , DEPT 135 et DEPT 90 de l'extrait brut des tiges de *Retama raetam* et comparaison des données expérimentales obtenues à celles de notre base de données spectrales prédites, nous avons obtenu les résultats résumés sur la [Figure 76](#). Les scores obtenus à l'issue de l'analyse de l'extrait sont non satisfaisants. En effet, le score du premier composé proposé (rétamasine B) ne dépasse pas 0,35/1, suivis de l'hydroxyderrone (score 0,25/1) et de la daidzine (score 0,24/1). Ces scores peu appropriés peuvent être expliqués par la complexité de l'extrait brut initial. Ainsi une simplification de cette matrice par fractionnement pourrait améliorer les résultats de l'analyse déréplivative par RMN du ^{13}C . L'absence, dans la base de données, des composés présents dans notre extrait pourrait constituer une autre hypothèse.

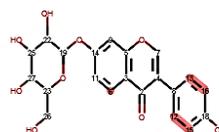
En conséquence, si les métabolites majoritaires de l'extrait de tiges ne figurent pas dans la base de données, cela augmente les chances de retrouver de nouveaux composés qui seront décrits pour la première fois dans le genre *Retama*. Ces constatations renforcent l'intérêt de l'étude phytochimique détaillée de cet extrait chlorométhylénique.



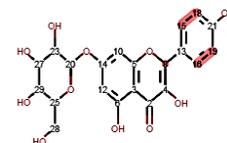
Rank: 1 (7/20 C)
 CAS-1709811-98-2
 MW: 352.34
 Score match: 0.35 Error : 5.0



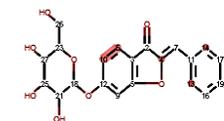
Rank: 2 (5/20 C)
 CAS-1521255-54-8
 MW: 352.34
 Score match: 0.25 Error : 3.47



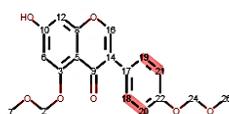
Rank: 3 (5/21 C)
 CAS-552-66-9
 MW: 416.38
 Score match: 0.24 Error : 1.2



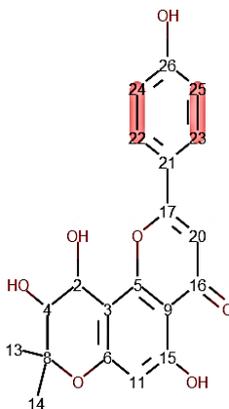
Rank: 4 (5/21 C)
 CAS-16290-07-6
 MW: 448.38
 Score match: 0.24 Error : 2.9



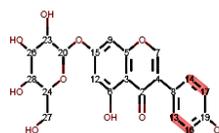
Rank: 5 (5/21 C)
 CAS-20550-08-7
 MW: 416.38
 Score match: 0.24 Error : 4.14



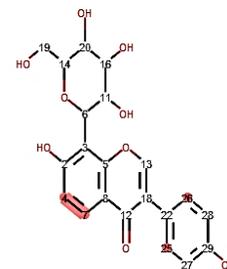
Rank: 6 (4/19 C)
 CAS-251985-68-9
 MW: 358.34
 Score match: 0.21 Error : 1.72



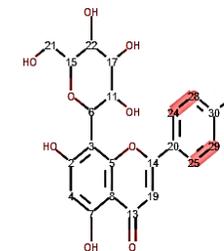
Rank: 7 (4/20 C)
 CAS-329280-30-0
 MW: 370.35
 Score match: 0.2 Error : 4.02



Rank: 8 (4/21 C)
 CAS-529-59-9
 MW: 432.38
 Score match: 0.19 Error : 0.4



Rank: 9 (4/21 C)
 CAS-3681-99-0
 MW: 416.38
 Score match: 0.19 Error : 1.47



Rank: 10 (4/21 C)
 CAS-3681-93-4
 MW: 432.38
 Score match: 0.19 Error : 2.24

Figure 76: Un aperçu sur quelques composés proposés à l'issue de l'analyse déréplicative par RMN 13C sur l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam*.

3.1.2. Déplication par CLHP-UV-DAD

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur les métabolites présents dans l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam*, une analyse LC/DAD-UV a été effectuée. La [Figure 77](#) résume les chromatogrammes LC/UV de cet extrait obtenu à 210 nm et 280 nm. La détection à 210 nm a permis de révéler plus de composés qu'à 280 nm. Une dizaine de pics UV-majoritaires a été enregistrée à cette longueur d'onde ([Figure 77](#)). Selon l'analyse LC/DAD-UV préliminaire de cet extrait, les pics UV-majoritaires sont principalement des flavonoïdes constitués d'isoflavonoïdes (tels que les isoflavones et les isoflavanes) et leurs dérivés tels que les ptérocarpanes ([Figure 78](#)).

Il est important de rappeler que les spectres UV-Visible typiques des flavonoïdes comprennent deux bandes d'absorbance. La bande I se situe dans la gamme entre 310-350 nm pour les flavones, tandis que pour les flavonols, elle est comprise entre 350 et 385 nm pour les flavonols 3-OH libres et 330-360 pour les flavonols 3-OH substitués. La bande II, trouvée dans la gamme 250-290 nm, est sensiblement la même dans les flavones et flavonols [433]. Dans les flavanones et les dihydroflavonols, la bande I est souvent réduite à un épaulement à 300-330 nm et la bande B, dans la gamme de 277-295 nm, est le pic principal. Par conséquent, ces deux sous-groupes ne peuvent pas être distingués par une simple analyse UV-Visible. Les isoflavones se caractérisent par un épaulement entre 310 et 330 nm et une bande II entre 245 et 275. Les chalcones, quant à elles, présentent une bande I entre 340 nm et 390 et une bande II dans l'intervalle 230- 270 nm. Par ailleurs, les aurones ont deux bandes I et II comprises entre 380-430 et 230- 270 nm respectivement. En outre, les anthocyanidines ou anthocyanines montrent une bande I entre 465-560 nm et une bande II entre 270-280 nm [412]. Finalement, les flavanols présentent une absorbance maximale à des longueurs d'onde non spécifiques comprises entre 270 et 290 nm, auxquelles de nombreux composés phénoliques absorbent, ne permettant pas ainsi leur détection sélective [433].

De ce fait, sur les spectres UV des pics détectés dans l'extrait chlorométhylénique des tiges de *R. raetam* ([Figure 78](#)) nous avons constaté la présence de flavones (spectre A de la [Figure 78](#)) caractérisées par un pic à 270 nm et un épaulement à 330 nm. Sur le spectre B et G ([Figure 78](#)), des isoflavones apparaissent en montrant un maximum d'absorption à 260 nm et un épaulement à 320-330 nm [434]. En outre, le spectre L nous oriente vers la présence d'une isoflavane avec un épaulement à 225 nm et un maximum d'absorption (λ_{\max}) à 275nm ([Figure 78](#)). De plus, un groupe particulier de flavonoïdes est distingué, sur les spectres K et N de la

Figure 78, qui peut correspondre à des ptérocarpanes caractérisés par un épaulement à 230 nm et un maximum d'absorption à 285 nm [412]. Ces dérivés des isoflavonoïdes sont caractéristiques de la famille des Fabacées [435]. D'autre part, à des temps de rétention assez élevés, des spectres UV typiques d'acides hydroxycinnamiques apparaissent avec des maxima d'absorption à 220, 245 (ép.), 300 (ép.) et 330 nm (spectre P, Figure 78). Les spectres UV-Visible peuvent être utilisés comme un outil indicatif pour la caractérisation des molécules de l'extrait, mais les spectres MS pourraient fournir des informations supplémentaires importantes. Ainsi une étude par LC MS/MS a été effectuée sur l'extrait de tiges de *R. raetam*.

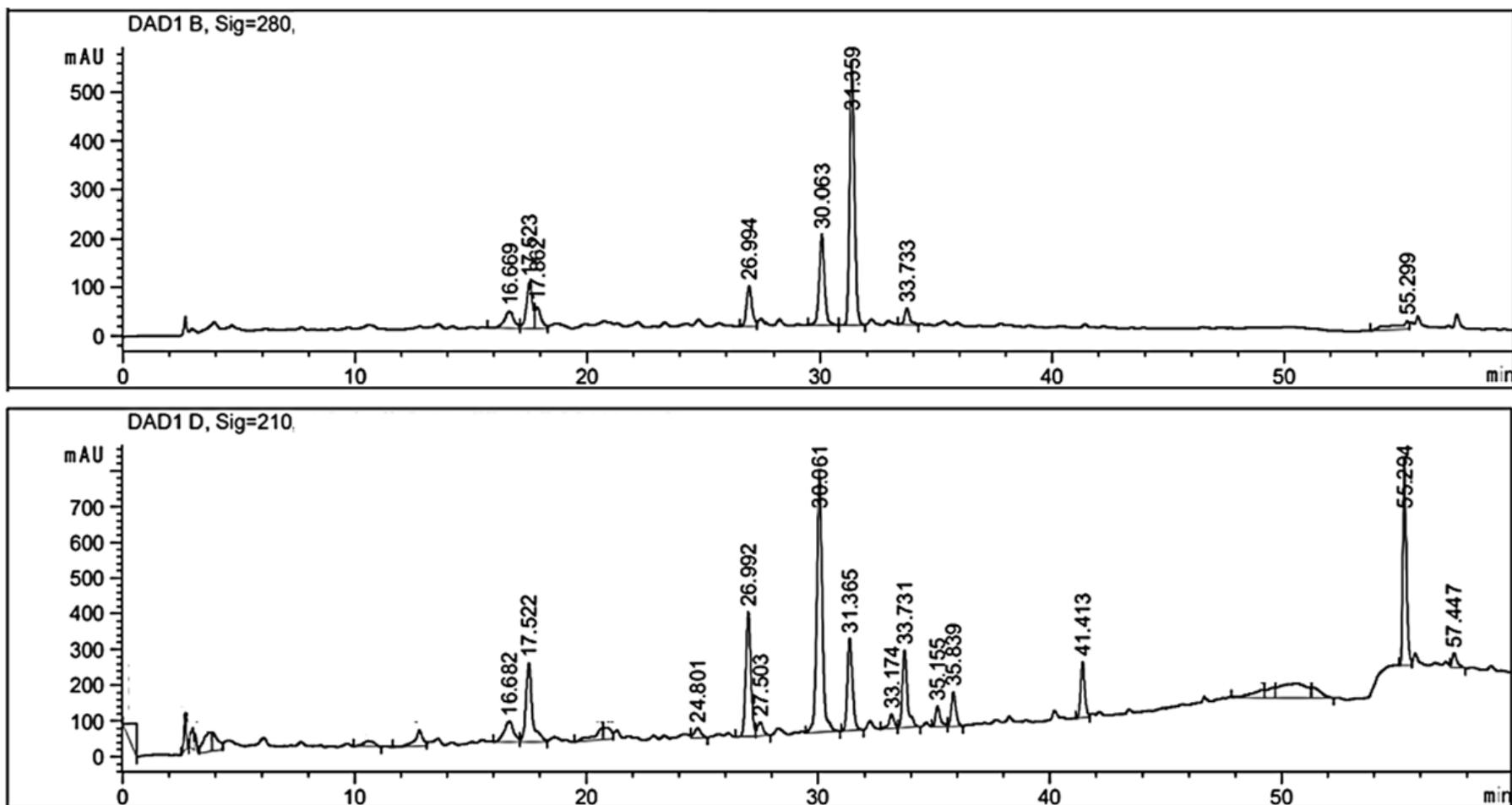


Figure 77: Chromatogrammes CLHP-UV avec une détection à 280 et 210 nm de l'extrait chlorométhylique de *Retama raetam*.

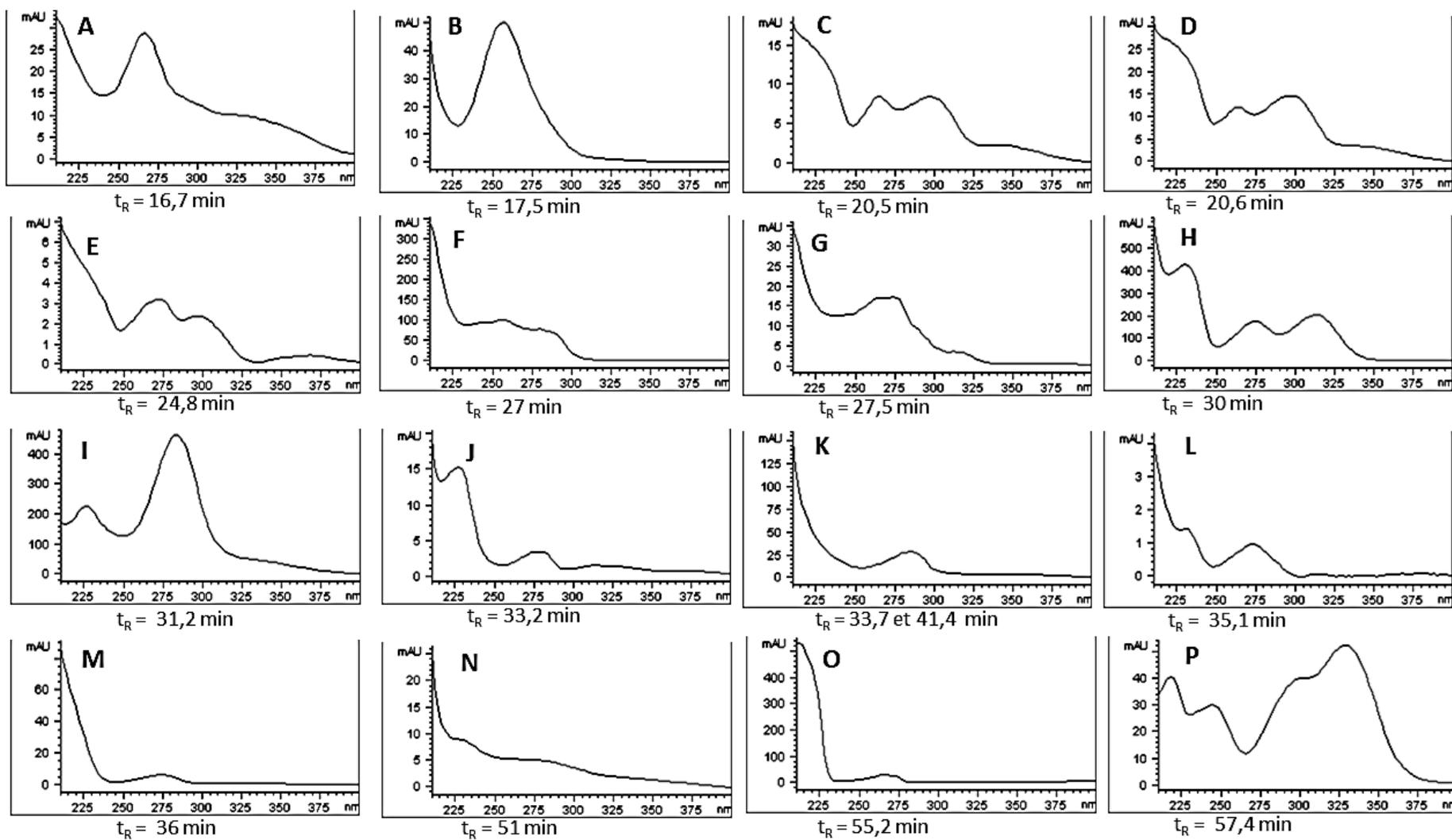


Figure 78: Spectres UV des composés majoritaires détectés dans l'extrait chlorométhylénique de *Retama raetam*.

3.1.3. Déplication par CLHP-ESI-MSⁿ

L'analyse des données de masse basse résolution obtenus par LC/UV/ESI-MSⁿ de l'extrait de *R. raetam* montre essentiellement 19 composés (Rr-1 à 19) qui, dans la majorité, ont une meilleure fragmentation en mode positif (Tableau 12).

Des pertes de petites molécules et/ou radicaux à partir de l'ion [M+H]⁺, caractéristiques des aglycones flavonoïdes, telles que les pertes de 18 Da (H₂O) et 28 Da (CO) [433], ont été observés sur les spectres MSⁿ de plusieurs composés de notre extrait. Ceci corrobore les résultats de l'analyse en CLHP-UV-DAD qui a montré que la majorité des composés de cet extrait appartient à la classe des flavonoïdes.

Remarque : Sur le Tableau 12, les composés présentés dans la colonne « composés proposés » ont été suggérés selon le poids moléculaire détecté de chaque pic et les composés déjà décrits dans le genre *Retama*. Les fragmentations détaillées dans ce même tableau ne correspondent pas forcément aux composés hypothétiques. La difficulté de la déplication des composés de cet extrait par LC-MSⁿ provient de l'absence de données, dans la littérature, qui correspondent à nos résultats obtenus par l'analyse CLHP-ESI-MSⁿ pour la majorité des composés. En effet, concernant le genre *Retama*, seule une étude [436] a considéré l'analyse des métabolites secondaires par UHPLC-DAD-ESI/MSⁿ. Plusieurs composés du genre *Retama* sont nouvellement identifiés et uniquement leurs données spectrales obtenues par RMN ont été décrites dans la littérature. De plus le genre *Retama* peut être riche en flavonoïdes assez particulier, comme les flavones prénylés et isoprénylés ainsi que les furanoisoflavones, difficiles à distinguer par LC-MS [272].

Les composés Rr-1 à Rr-3 de l'extrait (Tableau 12), élués à des temps de rétention de 16,7 ; 17,5 et 20,5 min, respectivement, ainsi que les composés Rr-11 à Rr-13 (t_R= 35,1 ; 36 et 41,4 min, successivement) ont tous perdus une molécule de H₂O (-18 Da) à partir de l'ion pseudomoléculaire [M+H]⁺. À partir de l'ion [M+H]⁺ aussi, le composé Rr-7 (t_R= 29,4 min) a perdu 28 Da correspondant à un CO. Les composés Rr-2, Rr-3 et Rr-7 ont donné des ions fragments montrant des pertes combinées de 46 Da (CO+H₂O) à partir de l'ion [M+H]⁺. Ces pertes peuvent être caractéristiques des chalcones, des flavanones ou des flavones [437].

Tableau 12. Données chromatographiques et spectrales des composés détectés dans l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam*

Pic	tr min	(+) -ESI-MS m/z	(+) -ESI-MS ² m/z	(-) -ESI- MS m/z	(-) -ESI-MS ² m/z	MM suggérée (Da)	Composés proposés (classe)	Référence
Rr-1	16,7	355 [M+H] ⁺	337 [M+H-H ₂ O] ⁺ 283 [M+H-72] ⁺	353 [M-H] ⁻	335 [M-H-H ₂ O] ⁻ 283 [M-H-70] ⁻	354	Ephedroidine (Flavone isoprénylée) / Rétamasines C/D/E (Flavones prénylés)	[265]
Rr-2	17,5	353 [M+H] ⁺	335 [M+H- H ₂ O] ⁺ 307 [M+H-46] ⁺ 283 [M+H-70] ⁺	–	–	352	Rétamasine B (Furanoflavone) Hydroxyderrone (Furanoisoflavone)/ Erysubines A/B (isoflavones)	[278]
Rr-3	20,5	355 [M+H] ⁺	337 [M+H-H ₂ O] ⁺ 309 [M+H-46] ⁺ 283 [M+H-72] ⁺	353 [M-H] ⁻	335 [M-H-H ₂ O] ⁻ 295 [M-H-58] ⁻ 281[M-H-72] ⁻	354	Ephedroidine/ Rétamasines C/D/E	[265]
Rr-4	20,6	401 [M+H] ⁺	315 [M+H-86] ⁺ 237 [M+H-164] ⁺ 159 [M+H-242] ⁺	–	–	400	Campésterol (Stéroïde)	[438]
Rr-5	24,8	287 [M+H] ⁺	270 [M+H-17] ⁺ 226 [M+H-61] ⁺	–	–	286	Scutellaréine/ Lutéoline (Flavones)/ Kaempférol (Flavonol)	[439]

Rr-6	27	375 [M+H] ⁺	358 [M+H-17] ⁺ 343 [M+H-32] ⁺ 319 [M+H-56] ⁺ 263 [M+H-112] ⁺ 211[M+H-164] ⁺ 155 [M+H-220] ⁺	373 [M-H] ⁻	325 [M-H-48] ⁻ 210 [M-H-163] ⁻ 163 [M-H-210] ⁻	374	–	–
Rr-7	29,4	303 [M+H] ⁺	275 [M+H-28] ⁺ 257 [M+H-46] ⁺ 197 [M+H-106] ⁺ 153 M+H-150] ⁺ 105 [M+H-198] ⁺	–	–	302	Morine/ Quercétine (Flavonols)	[440]
Rr-8	30	475 [M+H] ⁺	387 [M+H-88] ⁺	472 [M-H] ⁻	385 [M-H-87] ⁻ 163 [M-H-309] ⁻	474	–	–
Rr-9	31,3	337 [M+H] ⁺	283 [M+H-54] ⁺ 175 [M+H-162] ⁺	335 [M-H] ⁻	317 [M-H-H ₂ O] ⁻ 242 [M-H-93] ⁻ 227 [M-H-108] ⁻	336	Derrone (Furanoisoflavone)/ Atalantoflavone (Furanoflavone)	[441]
Rr-10	33,7	317 [M+H] ⁺	302 [M+H-15] ⁺ 225 [M+H-92] ⁺ 165 [M+H-152] ⁺	–	–	316	Isorhamnétine (Flavonol)	[440] [442]

Rr-11	35,1	529 [M+H] ⁺	511[M+H-H ₂ O] ⁺	–	–	528	–	–
			283 [M+H-246] ⁺					
			177 [M+H-352] ⁺					
			133 [M+H-396] ⁺					
Rr-12	36	499 [M+H] ⁺	481 [M+H-H ₂ O] ⁺	–	–	498	–	–
			393 [M+H-106] ⁺					
			327 [M+H-172] ⁺					
			283 [M+H-216] ⁺					
			221 [M+H-278] ⁺					
			177 [M+H-322] ⁺					
Rr-13	41,4	425 [M+H] ⁺	407 [M+H-H ₂ O] ⁺	–	–	424	–	–
			351 [M+H-74] ⁺					
			255 [M+H-170] ⁺					
			191 [M+H-234] ⁺					
			147 [M+H-278] ⁺					
Rr-14	43,7	855 [2M+Na] ⁺	393 [M+H-24] ⁺	–	–	416	Hispidol-6-glucoside (Aurone)/	[280]
		439 [M+Na] ⁺	297 [M+H-120] ⁺				Puerarine/Daidzine (Isoflavones)	[440]
			191 [M+H-226] ⁺					[443]

Rr-16	54,3	759 [2M+Na] ⁺	699 [2M+H-38] ⁺ 429 [2M+H-308] ⁺ 359 [2M+H-378] ⁺ 299 [M+H-70] ⁺ 269 [M+H-100] ⁺	–	–	368	Rétamasines F/G (Isoflavones prénylées)	[264]
Rr-17	55,3	755 [2M+Na] ⁺	686 [M+H-69] ⁺ 550 [M+H-205] ⁺ 509 [M+H-246] ⁺ 480 [M+H-275] ⁺ 346 [M+H-21] ⁺ 263 [M+H-104] ⁺	–	–	366	Rétamasine H (Isoflavone prénylée)	[264]
Rr-18	56,8	–	–	529 [M-H] ⁻	179 [M-H-350] ⁻ 161 [M-H-368] ⁻	530	Acide caféoylferuloylquinique (acide hydroxycinnamoylquinique)	[444]
Rr-19	57,4	–	–	499 [M-H] ⁻	163 [M-H-336] ⁻ 145 [M-H-354] ⁻	500	Acide caféoyl- <i>p</i> - coumaroylquinique (acide hydroxycinnamoylquinique)	[444]

Le composé Rr-6, qui apparaît à un t_R de 27 min et est caractérisé par une masse molaire de 374 Da, indique une perte de 56 Da (à m/z 319) en mode positif qui montre la présence d'un groupement prényle (acyle) dans cette molécule [445]. Une perte spécifique de 32 Da (CH_3OH) a été également observée, élément qui prouve la présence d'un groupement méthoxyle sur un squelette de flavone [437]. De plus il semble que cette molécule porte un groupement hydroxyle puisqu'une perte de 17 Da ($-OH$) à m/z 358 (pic de base), à partir de l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$, a été détectée sur le spectre MS/MS en mode positif de ce composé. À notre connaissance, aucune molécule possédant cette masse molaire (374 g/mol) n'a été détectée dans le genre *Retama*.

Par ailleurs, d'autres composés sont caractérisés par des masses molaires qui n'ont jamais été détectées dans le genre *Retama* tels que les composés Rr-11 à Rr-13.

Le pic Rr-10, élué à 33,7 min, a perdu 15 Da ($-CH_3$) à partir de l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$. Ceci est caractéristique des flavones portant des groupes méthyles [437].

Le pic Rr-18, élué à un t_R de 56,8 min, a été attribué à un acide caféoyl-féruloylquinique puisque à m/z 529, un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ apparaît.

Quant au pic Rr-19 (t_R de 57,4 min), il a été identifié comme étant un acide caféoyl-*p*-coumaroylquinique avec un ion précurseur à m/z 499 $[M-H]^-$ en mode d'ionisation négative [446].

3.1.4. Conclusion

L'étude dérèplicative menée sur l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam* a permis d'identifier les principales familles chimiques des métabolites constituant cet extrait. Des flavonoïdes, y compris les flavones prénylés et isoprénylés, les furanoflavones, les isoflavones, les furanoisoflavones, et les flavonols ainsi que des acides hydroxycinnamoylquiniques ont été détectés dans l'espèce (Tableau 12). En revanche, l'élucidation structurale des métabolites de l'extrait reste incomplète puisque plusieurs composés n'ont pas pu être attribués à des structures bien définies. Ceci témoigne des limites des études dérèplicatives. En effet, si les données spectrales obtenues ne correspondent pas à celles des données décrites dans les bases données, ceci peut entraver la réussite de l'étude dérèplicative mais d'un autre côté ces résultats restent pertinents puisqu'ils démontrent l'augmentation de la probabilité d'obtenir de nouveaux composés dans ce genre ou cette famille de plante, voire même de nouvelles structures de métabolites secondaires.

3.2. Fractionnement ciblant le composé majoritaire de *Retama raetam*

Deux fractionnements ont été conduits sur l'extrait chlorométhyllénique des tiges de *Retama raetam*. Le premier fractionnement a visé l'isolement et la purification du produit UV-majoritaire de l'extrait (le Rr-9, Figure 79) afin d'élucider sa structure complète et de le tester sur l'arginase hépatique bovine. Le second fractionnement, qui sera décrit dans la section suivante, avait pour but d'isoler les produits minoritaires de l'extrait.

Le 1^{er} fractionnement de l'extrait de *R.raetam* a été opéré par CLHP préparative en phase inverse en utilisant une phase mobile constituée de MeOH et d'eau avec un gradient de 50 à 100% de MeOH en 60 min. Cette opération a conduit à l'obtention de quatre fractions dont les masses sont comprises entre 3 et 94,8 mg, à partir d'un extrait initial de 230 mg (Figure 80 A). De plus, le composé UV-majoritaire (Rr-9) a été obtenu dépourvu d'impureté (Figure 80 B, Figure 81) avec une masse de 2 mg (Figure 80 A). Un autre métabolite a été obtenu lors de ce premier fractionnement sous un état quasi pur (le Rr-13) ayant une masse de 4,1 mg.

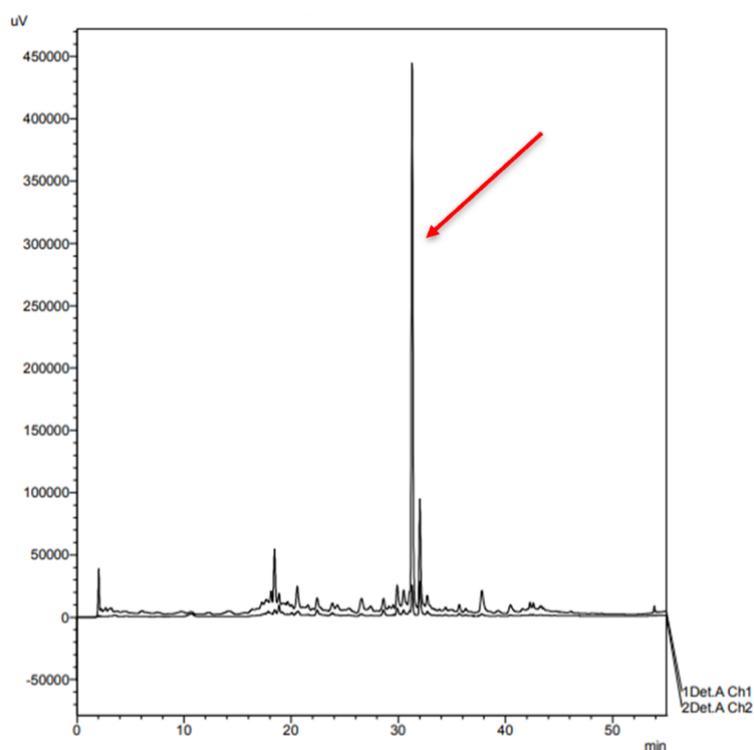


Figure 79 : Composé majoritaire ciblé dans l'extrait chlorométhyllénique de *Retama raetam*.

Ces fractions avec les composés purs isolés ont été testés sur l'arginase pour donner des pourcentages d'inhibition s'échelant de 33% à 83% à 100 µg/L ([Figure 80 C](#)). Le composé UV-majoritaire de l'extrait (Rr-9) a présenté un pourcentage d'inhibition ne dépassant pas les 32% à 100 µg/mL ce qui montre que ce composé ne correspond pas au constituant responsable de l'activité biologique initialement observée de l'extrait brut (72% à 100 µg/mL). Le composé Rr-13, isolé également lors de ce premier fractionnement, a offert une activité de 71% d'inhibition toujours à la même concentration ce qui est très proche de l'activité de l'extrait brut (72% à 100 µg/mL). Il semble ainsi que ce composé participe en grande partie à l'activité biologique remarquée initialement. Les structures de ces deux métabolites (le Rr-9 et le Rr-13) ont été déterminées par des analyses en RMN 1D et 2D (proton et carbone) ainsi que par HR-MS (l'élucidation structurale des composés est détaillée dans la [Partie II :Chapitre 3 :3.4](#) page 301).

De plus, une fraction s'est montrée particulièrement intéressante avec une activité supérieure à celle de l'extrait brut initial. Il s'agit de la fraction F3_CLHP ([Figure 80 C](#)). Cette dernière a inhibé à 80% l'arginase hépatique bovine à une concentration de 100 µg/mL. Par conséquent, il semble que les métabolites responsables majoritairement de l'activité de l'extrait brut aient été concentrés dans cette fraction. Selon le profil chromatographique obtenu par CCM et CLHP de cette fraction ([Figure 80](#) et [Figure 81](#)), il apparaît que cette dernière est constituée de plusieurs composés de polarité différente. Ainsi, cette fraction (F3_CLHP) a subi à son tour un fractionnement par CLHP préparative pour donner douze sous-fractions dont les masses sont comprises entre 0,1 et 9,8 mg ([Figure 82](#)). Ces sous-fractions obtenues étaient toutes constituées de mélange de produits naturels ([Figure 82](#)) ce qui a rendu complexe l'identification de molécules. Par ailleurs, les faibles quantités obtenues ont contrarié la poursuite du processus de purification des composés ainsi que leur évaluation sur l'arginase.

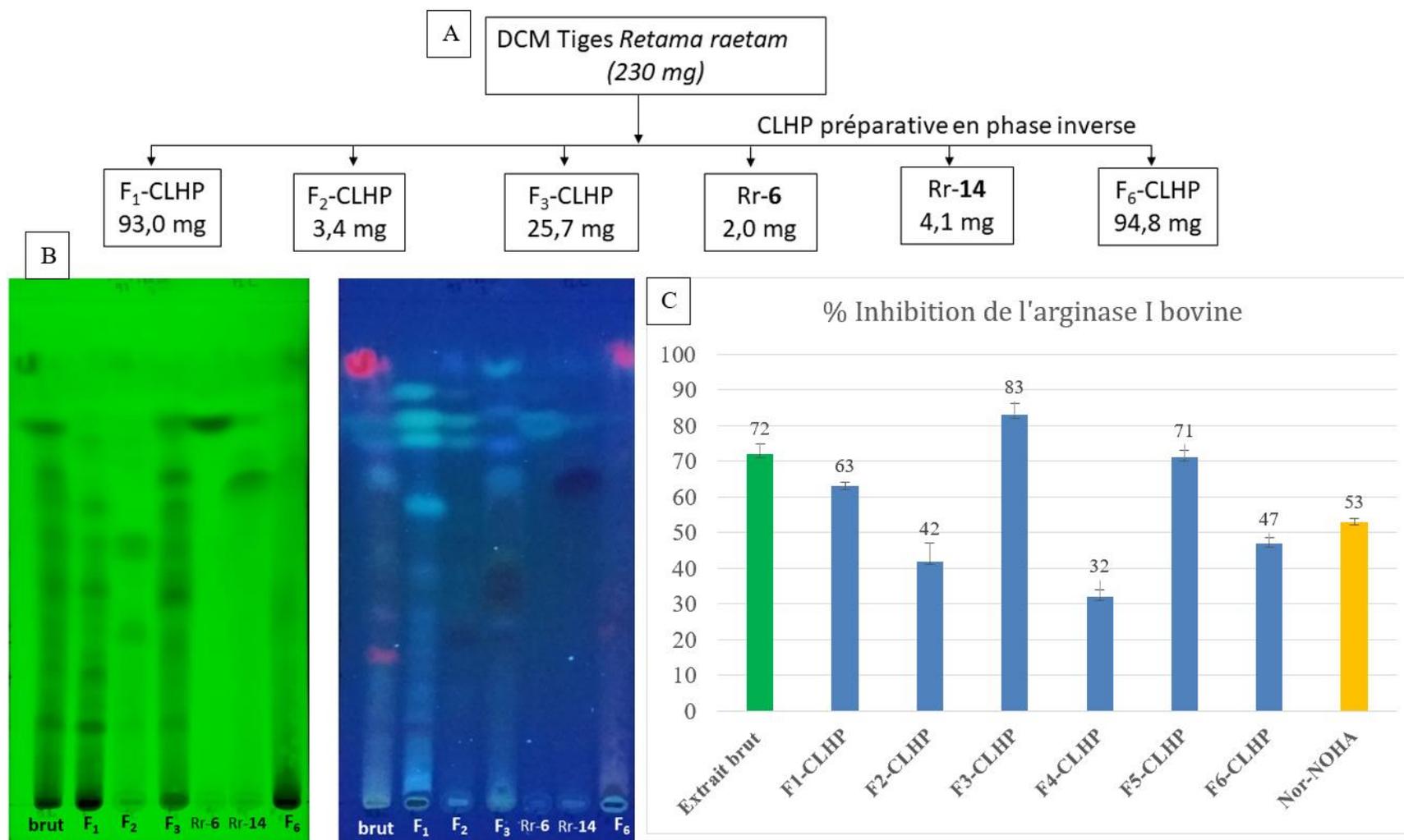


Figure 80 : Fractionnement de l'extrait DCM des tiges de *Retama raetam* et activité inhibitrice de l'arginase des fractions obtenues ; A, schéma de fractionnement ; B, CCM de l'extrait brut et des fractions ; C, activité inhibitrice de l'arginase à 100 µg/mL ; la nor-NOHA a été testée à 4 µM.

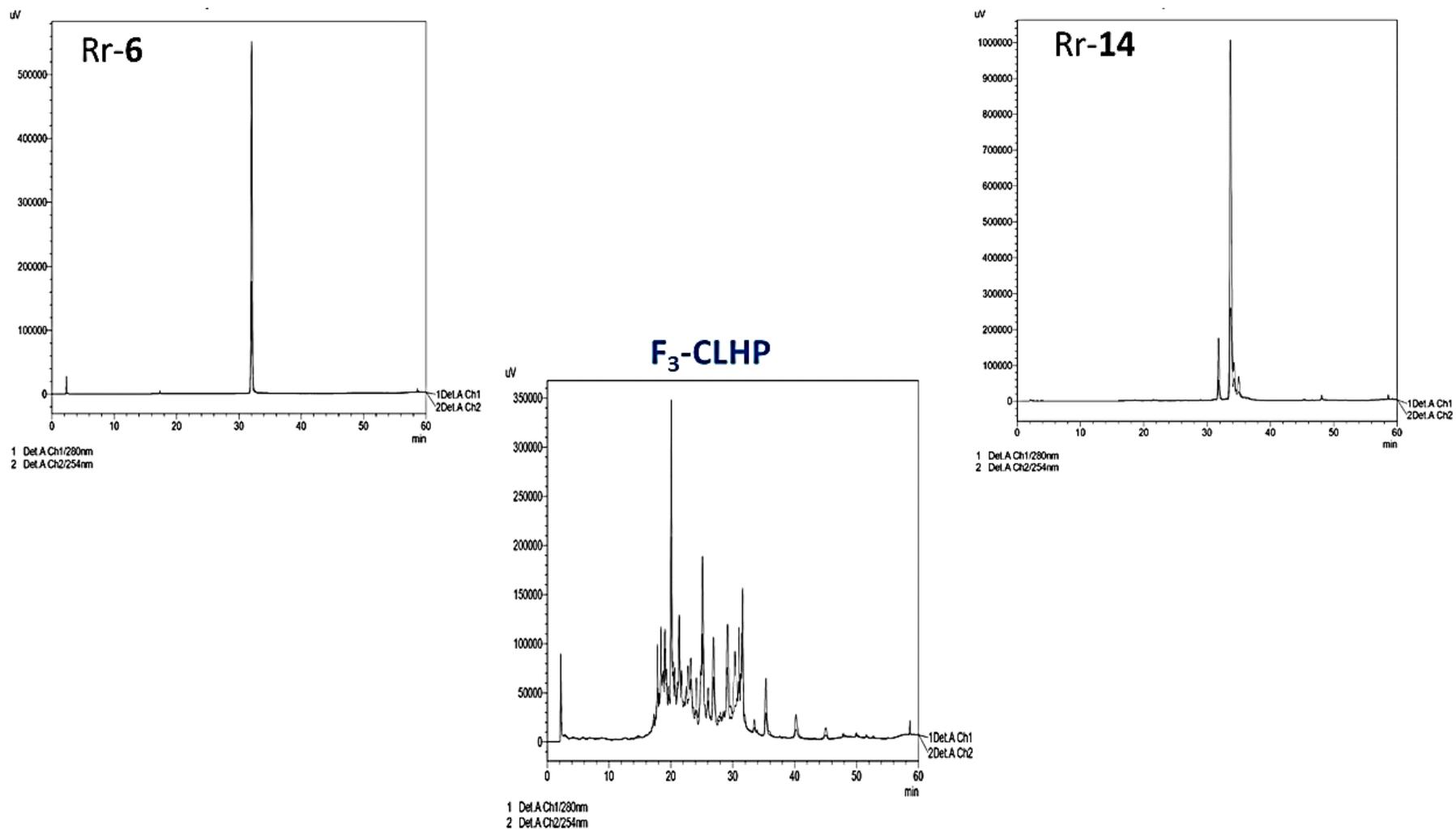


Figure 81 : Profils CLHP des produits purs et de la F₃-CLHP issus de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetama*.

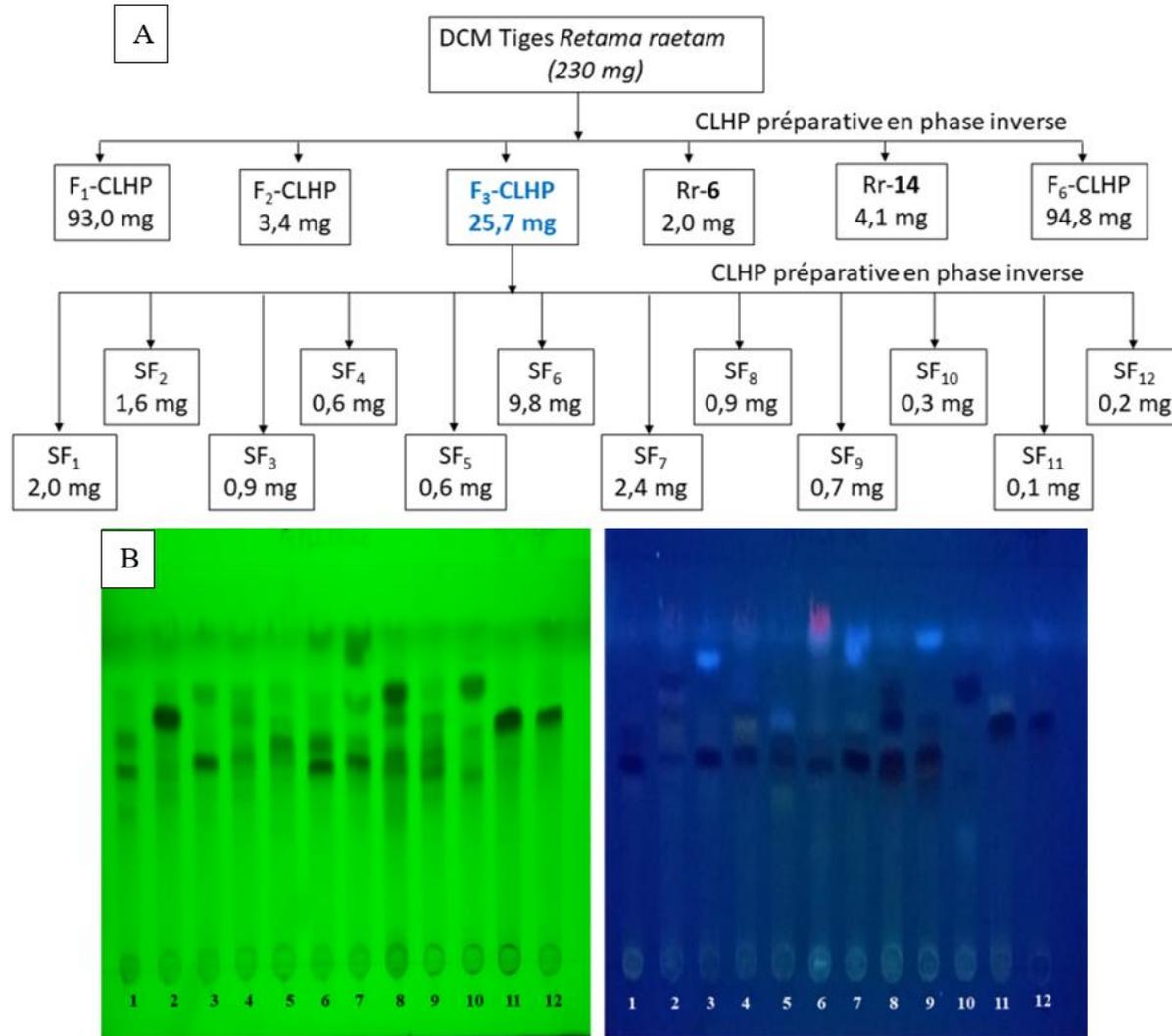


Figure 82 : Fractionnement de la fraction F₃-CLHP issue de l'extrait chlorométhylénique de *Retama raetam* par CLHP préparative, A schéma de fractionnement, B CCM des sous-fractions obtenues.

3.3. 2ème fractionnement de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam* par chromatographie Flash

Un fractionnement par chromatographie flash en phase normale de l'extrait chlorométhylénique de *Retama raetam* a ensuite conduit à l'obtention de sept fractions (F1_Flash à F7_Flash) (Figure 83) regroupées sur la base des similarités de leurs profils en chromatographie sur couche mince (CCM). À partir de 1 g de matière première, comme le montre la Figure 83, nous avons obtenu des fractions dont les masses sont comprises entre 53,6 mg et 167 mg. Ces fractions sont constituées d'un mélange de composés de polarité croissante comme le montre la photographie de la CCM (Figure 83-B) réalisée sur une plaque de silice en phase normale avec un éluant contenant du DCM/MeOH (97 :3).

Les fractions obtenues par chromatographie Flash ont été, par la suite, testées sur l'arginase à la concentration de 100 µg/mL. L'activité la plus élevée a été notée en présence de la fraction F3_Flash avec une inhibition de 57% mL suivie de la fraction F2_Flash et de la fraction F4_Flash avec des valeurs d'inhibition de 55% et 50% respectivement. Ces dernières sont constituées de produits de polarités moyenne (Figure 83 B et Figure 84). Ces trois fractions les plus actives ont en commun le produit à R_f de 0,5 qui semble participer à l'activité inhibitrice de l'arginase de ces fractions. L'activité la plus faible (17%) a été remarquée en présence de la fraction F1_Flash contenant des composés apolaires suivie de la F7_Flash ayant une activité de 35% (Figure 83 C).

Il est important de noter que toutes les fractions obtenues, lors de ce processus de fractionnement, ont présenté des activités inhibitrices en dessous de celle de l'extrait brut initial (Figure 83 C). Ceci peut être expliqué par plusieurs hypothèses. La première est qu'une synergie existe entre les composés de l'extrait et que cette synergie est responsable de l'activité biologique finale observée. Il peut être supposé que les composés actifs possèdent une grande affinité pour la colonne chromatographique en phase normale et ont été ainsi retenus de façon irréversible sur la phase stationnaire conduisant à leur perte lors du fractionnement. La troisième hypothèse est que les composés actifs de l'extrait se sont répartis sur plusieurs fractions, provoquant des quantités de composés insuffisantes pour générer l'effet biologique escompté.

Au vu des profils chromatographiques obtenus par CCM et CLHP analytique (Figure 83 B et Figure 84), il semble que la troisième hypothèse soit la plus plausible.

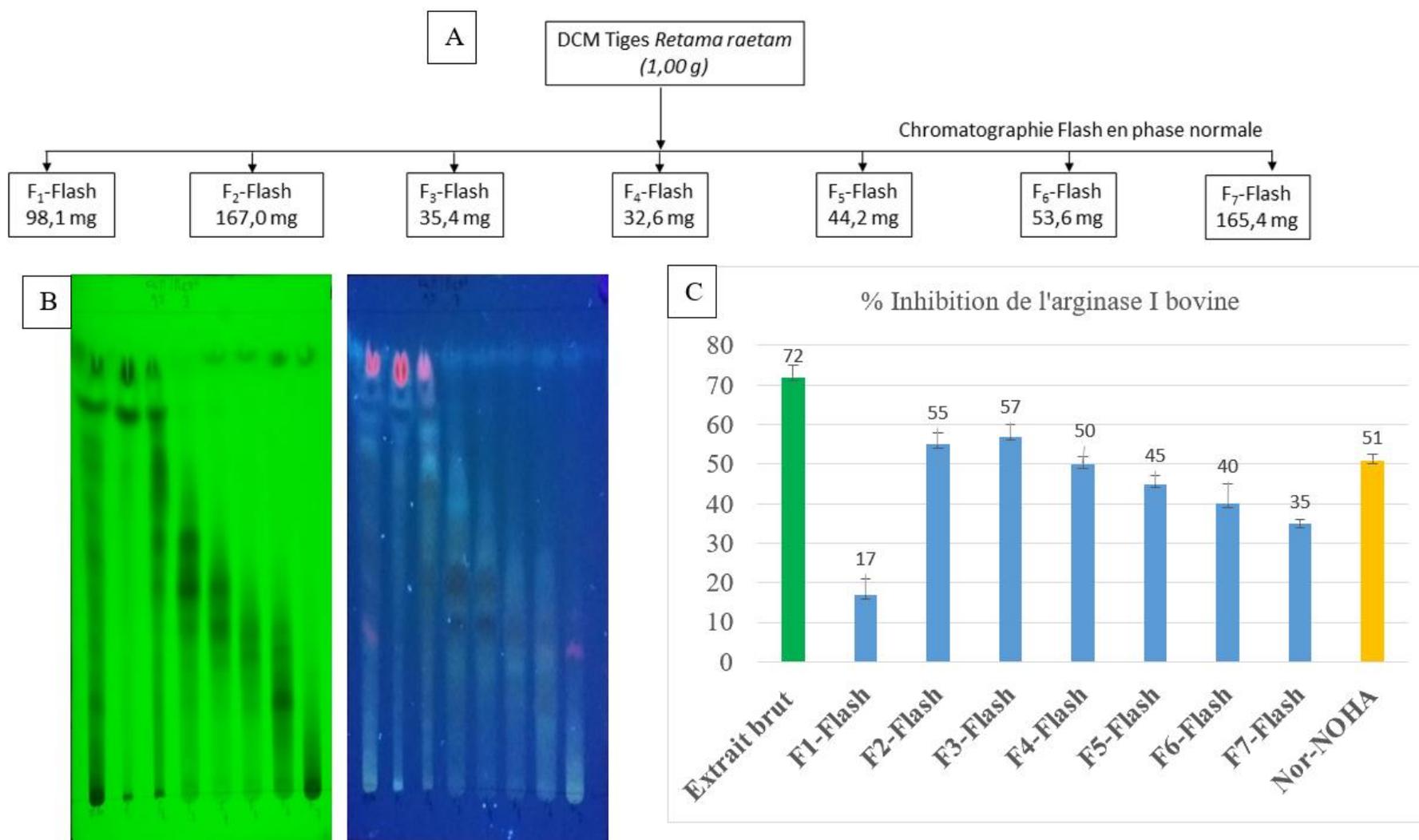


Figure 83 : Fractionnement de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam* par chromatographie Flash. A, Schéma de fractionnement par chromatographie Flash ; B, profil CCM des fractions-Flash obtenues ; C, activité inhibitrice de l'arginase à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; la nor-NOHA a été testée à 4 μM .

Plusieurs purifications ont été conduites, dans un deuxième temps, sur les fractions F2_Flash à F5_Flash, ayant montré une activité inhibitrice supérieure ou égale à 45% d'inhibition de l'arginase et un profil chromatographique intéressant (Figure 84).

Le processus complet de séparation des produits issus des fractions F2_Flash à F5_Flash est résumé sur la Figure 85-1 à 4. Chacune des fractions citées ci-dessus a subi des étapes de purification par CLHP préparative afin de collecter, de manière exhaustive les pics de chaque fraction, détectés à 280 nm.

La fraction F2_Flash (167 mg) a fourni 14 sous-fractions. Parmi elles, figure le composé UV-majoritaire de l'extrait qui a été isolé de nouveau (Rr-9, Figure 85-1). Les sous-fractions issues de la F2_Flash ont été, dans la majorité, obtenues sous forme de mélange de produits avec des masses assez faibles comprise entre 0,4 mg et 7,4 mg.

La fraction F3_Flash (35,4 mg) a donné 12 sous-fractions parmi lesquelles quelques-unes ont présenté des produits de pureté assez satisfaisante mais leurs masses n'ont pas dépassé les 1,1 mg (Figure 85 -2).

La fraction F4_Flash (32,6 mg) a produit 20 sous-fractions. Certaines d'entre elles présentent des produits de pureté acceptable mais les masses de ces produits n'ont pas dépassé les 1,9 mg et plusieurs sous-fractions étaient à l'état de traces (Figure 85-3).

La fraction F5_Flash (44,2 mg) nous a procuré 11 sous-fractions constituées, dans la plupart des cas, de plusieurs produits avec des masses ne dépassant pas les 1,4 mg (Figure 85-4).

Ces résultats témoignent de la complexité et des contraintes qui peuvent être rencontrés lors de la réalisation d'un fractionnement bioguidé classique sur un extrait de plante riche en composés. En effet, cette première démarche de fractionnement bioguidé que nous avons adoptée était un processus long et fastidieux nécessitant plusieurs étapes consécutives de séparation par des techniques chromatographiques qui ont conduit finalement à des composés de masses faibles. Les masses très faibles des composés obtenus présentent une contrainte pour la poursuite de l'identification structurale de ces composés et leur évaluation sur notre cible biologique.

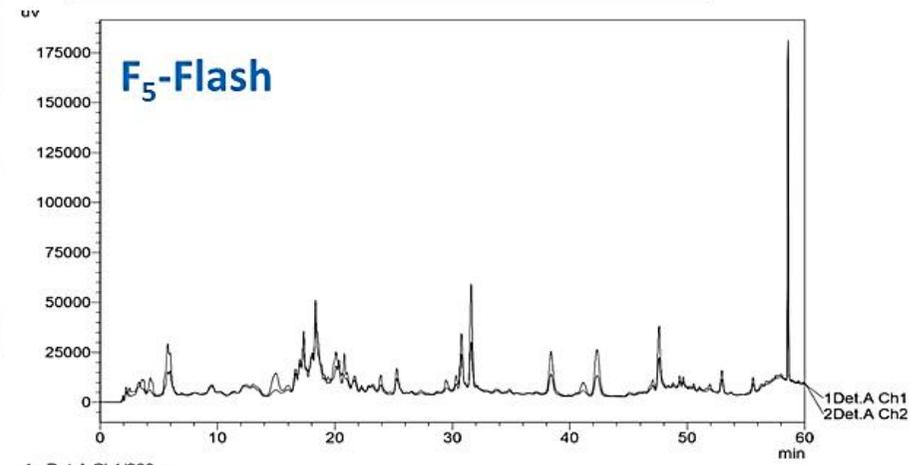
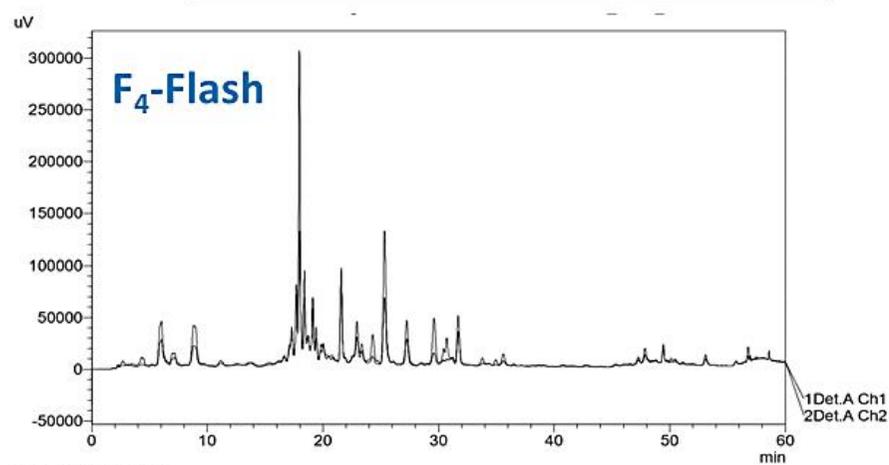
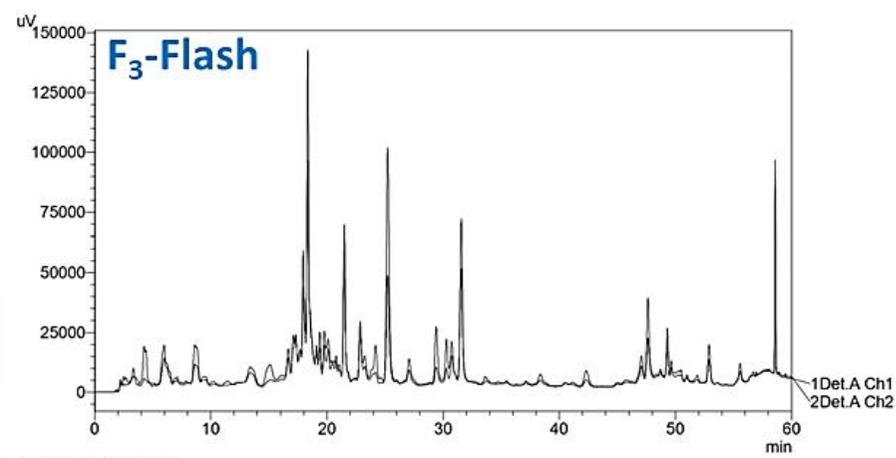
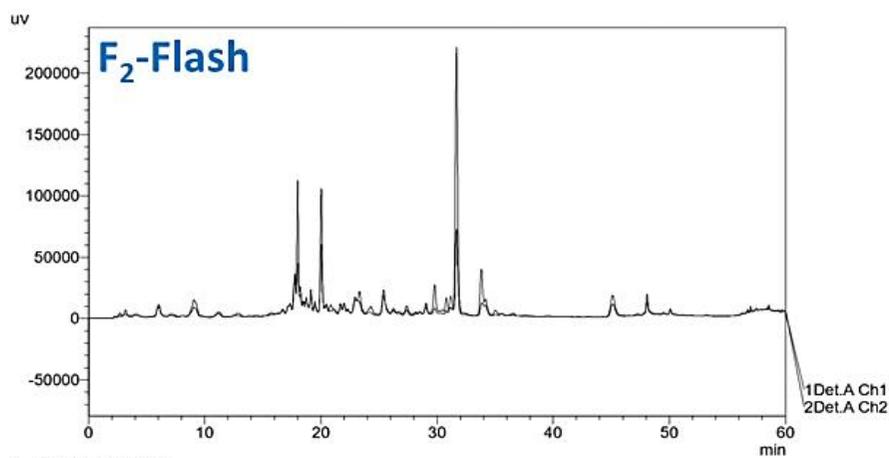


Figure 84 : Chromatogrammes des fractions issues de l'extrait chlorométhylénique de *Retama raetam* fractionné par chromatographie Flash.

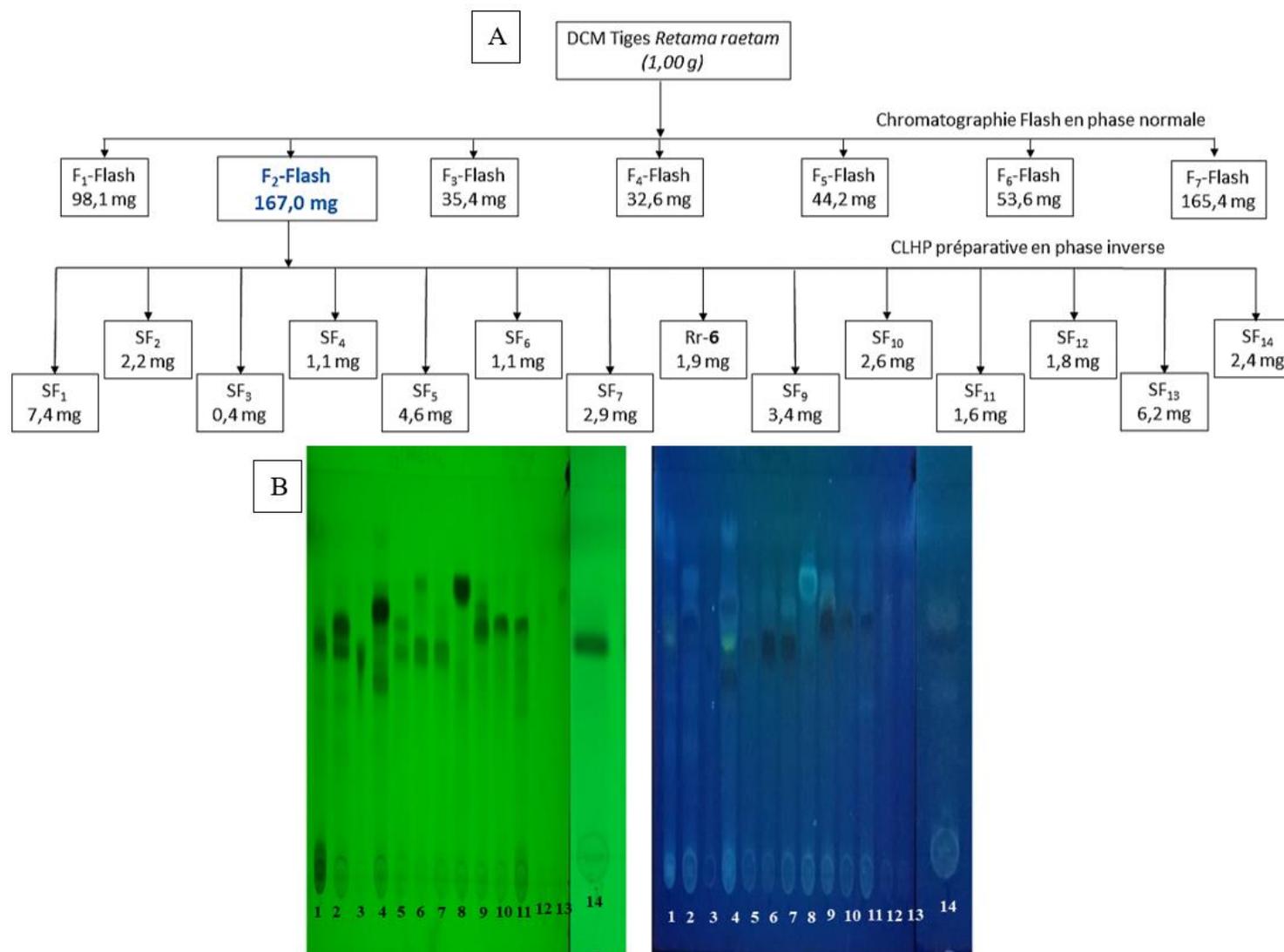


Figure 85-1 : Fractionnement des fractions les plus actives issues des tiges de *Retama raetam* par chromatographie Flash. A, Schéma de fractionnement par CLHP préparative ; B, profil CCM des fractions-Flash obtenues.

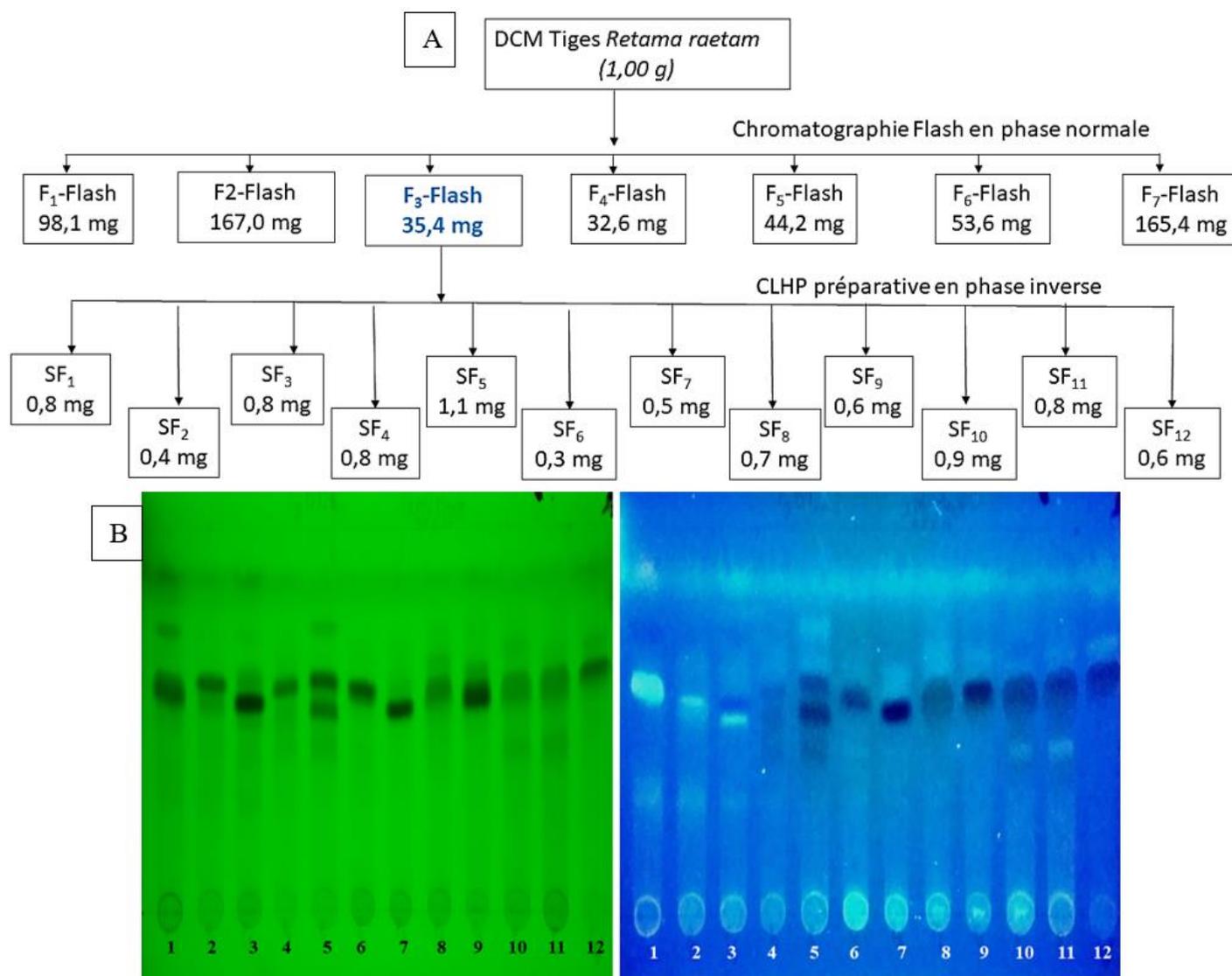


Figure 85-2 : Fractionnement des fractions les plus actives issues des tiges de *Retama raetam* par chromatographie Flash. A, Schéma de fractionnement par CLHP préparative ; B, profil CCM des fractions-Flash obtenues.

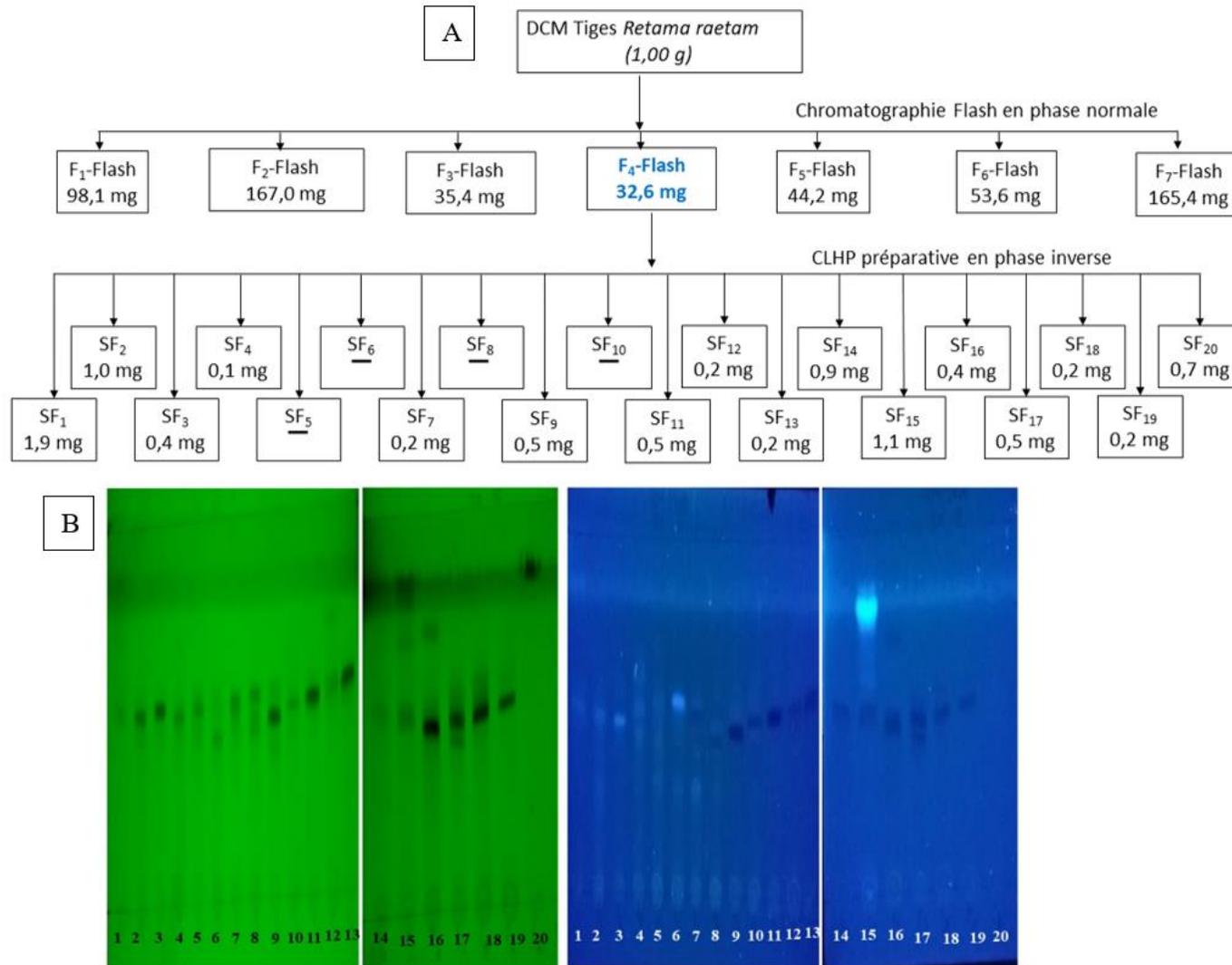


Figure 85-3 : Fractionnement des fractions les plus actives issues des tiges de *Retama raetam* par chromatographie Flash. A, Schéma de fractionnement par CLHP préparative ; B, profil CCM des fractions-Flash obtenues.

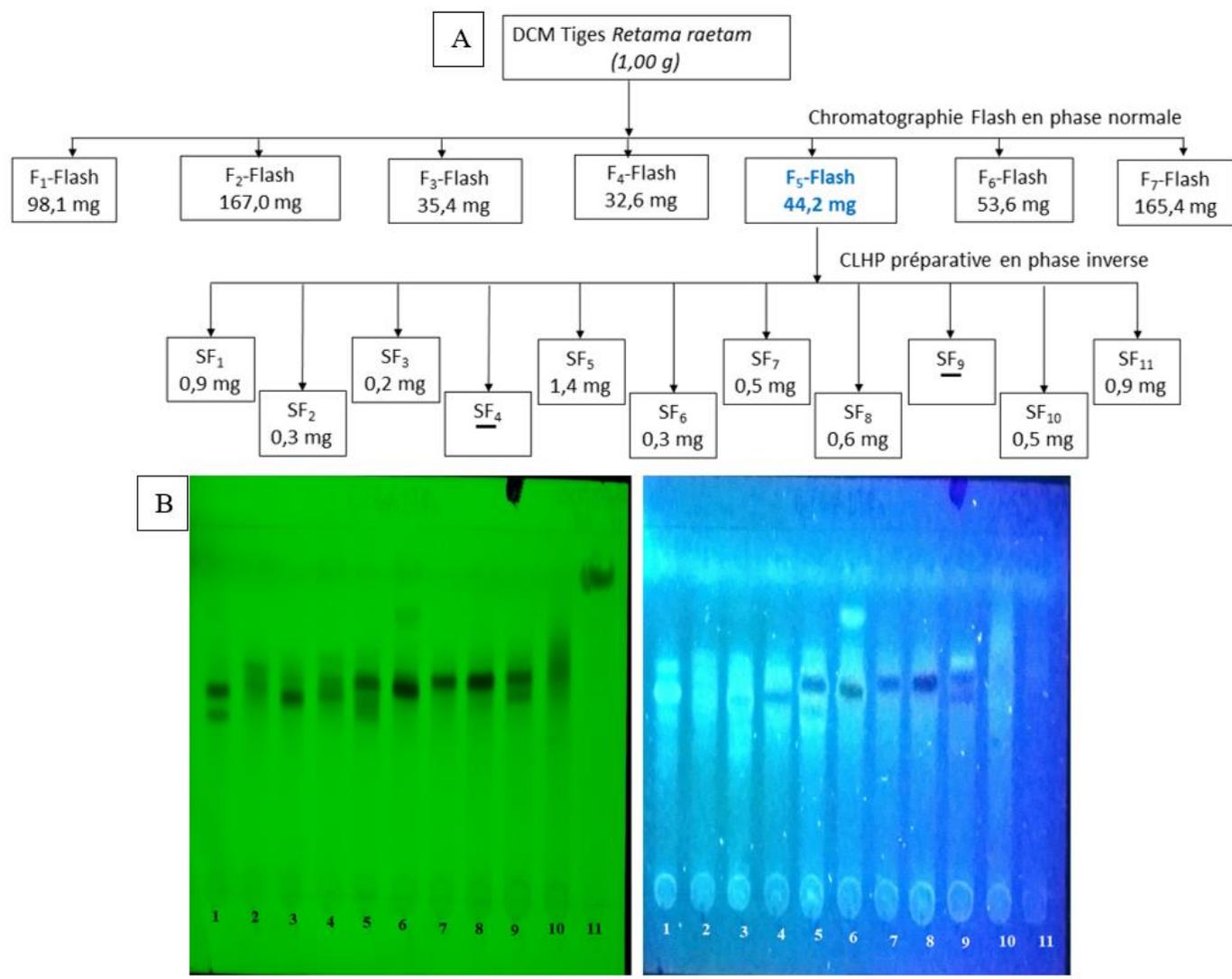


Figure 85-4 : Fractionnement des fractions les plus actives issues des tiges de *Retama raetam* par chromatographie Flash. A, Schéma de fractionnement par CLHP préparative ; B, profil CCM des fractions-Flash obtenues.

En plus d'être long et coûteux, le fractionnement bioguidé, a conduit à la perte de la bioactivité dans le cas des fractions obtenues par la chromatographie Flash comme le montre la [Figure 83 C](#) page 294. Ces contraintes rencontrées lors des étapes itératives de fractionnement bioguidé nous ont orientés vers le développement d'une nouvelle technique plus rapide et plus efficace qui consomme moins de produits et qui regroupe les étapes de séparation des produits naturels des mélanges complexes avec celles de l'évaluation de l'activité biologique sur la cible dans une même interface chimique / biologique. C'est la technique de bioautographie couplée à la CCM dont le développement sera détaillé dans la [Partie II :Chapitre 4 :page 309](#).

3.4. Détermination des structures des composés isolés

3.4.1. Composé Rr-9: Alpinumisoflavone ou 5-hydroxy-7-(p-hydroxyphényl)-2,2-diméthyl-2H-6H-benzo-[1,2-b:5,4-b]dipyran-6-one

Le composé Rr-9 ([Figure 86](#)) a été isolé sous la forme d'un solide jaune pâle. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode positif, présente un pic pseudomoléculaire à $m/z [M+H]^+ = 337,1076$ ce qui correspond à une formule brute s'établissant en $C_{20}H_{16}O_5$ pour une masse calculée de 336,09977. Le spectre HR-MS en électrospray de ce composé, montre aussi un ion à $m/z [2M+Na]^+ = 695,18839$. Ce composé présente trois bandes d'absorption UV entre 200 et 300 nm ([Figure 105](#) page 360).

Le spectre RMN 1H de Rr-9 ([Annexe 10](#)) a montré le singulet d'un proton déblindé à δ_H 8,37 caractéristique du H-2 de la structure des isoflavones. Le spectre RMN 1H a présenté également une paire de doublets ($J = 8,4$ Hz), intégrant chacun pour deux protons, à δ 6,82 et 7,38 attribuables aux signaux d'un groupe *para*-hydroxyphényle sur le noyau B. Nous avons également noté la présence d'un groupe -OH chélaté à δ_H 13,42 et d'un proton sous forme d'un singulet dans la plage aromatique à δ_H 6,50 ppm caractéristique pour 5-OH et H-6 ou H-8 du noyau A d'un isoflavonoïde. De plus, les spectres RMN 1H et ^{13}C du composé Rr-9 ont montré la présence d'un cycle 2,2-diméthylpyrano en raison de la présence d'une résonance gem-diméthyl [δ_H 1,43 (6H, s, H-5'' et H-6''), δ_C 27,89 (C-5'' et C-6'')], un groupe oléfinique [δ_H 5,81 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, H-3'') et 6,62 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-4''), δ_C 129,13 (C-3'') et 114,53 (C-4'')] et un carbone quaternaire oxygéné (δ_C 78,12). Sur la base des spectres RMN 1H et ^{13}C , l'emplacement du cycle 2,2-diméthylpyrano peut être fusionné en C-6 et C-7 ou C-7 et C-8. Ainsi, l'emplacement de l'unité 2,2-diméthylpyrano en C-6 et C-7 a été déterminé par la suite

sur la base des corrélations HMBC observées (Tableau 22 page 360 et Annexe 10). La présence de corrélations à longue distance sur le spectre HMBC du composé Rr-9 entre le signal de proton d'un groupe 5-OH chélaté à δ_H 13,37 et trois signaux de carbone quaternaire à δ_C 104,76 (C-4a), 156,72 (C-5), 105,43 (C-6) a permis de placer sans ambiguïté le 2,2-diméthylpyrano fusionné en C-6 et C-7.

Ce composé Rr-9 correspond, ainsi, à l'alpinumisoflavone, qui a été isolée de l'écorce de tige d'*Erythrina lysistemon* (Leguminosae) [447] et pour la première fois du genre *Retama*.

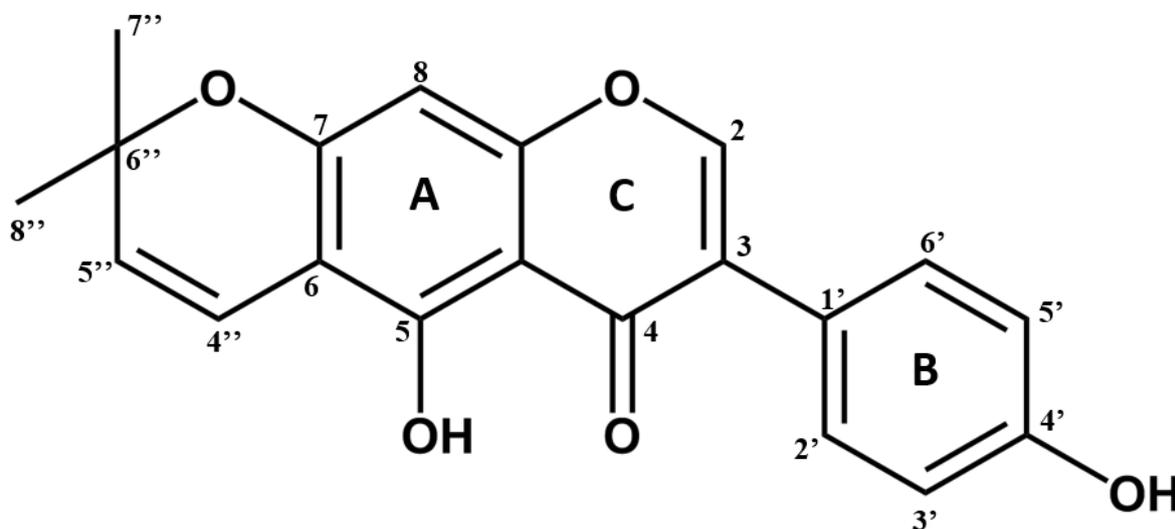


Figure 86 : Structure du composé Rr-9 isolé de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam*.

Cette isoflavone prénylée a été explorée pour de nombreux effets biologiques et pharmacologiques. Les données rapportées ont démontré qu'elle a un potentiel multithérapeutique avec des propriétés antiostéoporotique, antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, anticancéreuse, œstrogénique et anti-œstrogénique, antidiabétique et neuroprotectrice. Cette molécule présente un vrai potentiel en tant que candidat-médicament [448].

Au cours de notre étude sur l'inhibition de l'arginase ce composé a présenté une CI_{50} de 315 μ M. Cette activité reste loin de l'activité des inhibiteurs synthétiques de référence [5] mais dans la gamme des activités des produits naturels testés sur l'arginase [147].

3.4.2. Composé Rr-13 : Monotésone B ou (5,7,3',5'-Tetrahydroxy-6,8-diprénylflavanone)

Le composé Rr-13 (Figure 87) a été isolé sous forme d'une poudre cristalline de couleur jaune vert, très hygroscopique. Son spectre UV présente plusieurs maxima d'absorption : 210 ; 250 et 300 nm. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode positif, présente un pic pseudomoléculaire à $m/z [M+H]^+ = 425,19647$ ce qui correspond à une formule brute s'établissant en $C_{25}H_{28}O_6$ pour une masse calculée de 424,18859 et un pic à $m/z [2M+Na]^+ = 871,36570$, correspondant à la formule brute (Figure 106 page 362).

Sur le spectre de RMN- 1H réalisé dans le DMSO deutéré (Annexe 11), un signal à δ_H 12,42 ppm indique la présence d'un OH chélaté. De plus, les signaux à δ_H 3,09 et 2,70 ppm, sous forme de doublets de doublets intégrant chacun pour 1H et couplant avec un signal à 5,29 ppm, sont caractéristiques d'une flavanone. Dans la région des protons aromatiques, deux singulets ont été détectés à δ_H 6,73 et 6,86 intégrant pour 2H et 1H respectivement. Ces singulets correspondent aux protons aromatiques du cycle B. Nous observons également deux singulets à δ_H 9,10 et 8,01 intégrant chacun pour 1H, témoignant de la présence de deux groupements OH sur le même cycle. Les autres signaux correspondent à ceux de deux prénylations linéaires de type 3,3-DMA : quatre méthyles apparaissant sous forme de quatre singulets à δ_H 1,55, 1,59, 1,61 et 1,70 ppm, deux CH_2 sous forme d'un doublet intégrant chacun pour 2H (3,19 et 3,16 ppm) ; deux CH éthylénique sous forme d'un triplet intégrant pour 1H chacun (5,08 et 5,06 ppm). L'interprétation des spectres bidimensionnels permet de situer les prénylations sur le cycle A (Annexe 11). En effet, le proton à δ_H 3,19 ppm corrèle avec le carbone à δ_C 158,47 ppm (C5), lui-même porteur du OH chélaté avec la fonction cétonique en C4 ; de plus, il corrèle également avec un carbone à 161,60 ppm qui correspond à un carbone porteur d'un groupement OH (C7). L'attribution des différents signaux des spectres 1H et ^{13}C est résumée dans le Tableau 23 page 362.

La monotésone B a été isolée auparavant de l'espèce *Monotes engleri* appartenant à la famille des *Dipterocarpaceae*. Seul son spectre RMN 1H est décrit dans la littérature. Au cours de cette étude, nous décrivons pour la première fois son isolement à partir de la famille des *Fabaceae*. Une seule étude a considéré l'activité biologique de cette molécule [449]. Cette dernière a montré que la monotésone B est capable d'inhiber le transporteur membranaire de médicaments, l'ABCG2, dont la surexpression peut rendre les cellules tumorales résistantes aux traitements par des agents chimiothérapeutiques conventionnels. Nous avons testé ce

produit sur l'arginase hépatique bovine et il a montré une CI_{50} assez intéressante de l'ordre de $118 \mu\text{M}$. D'autres études biologiques seront nécessaires afin d'explorer d'autres activités biologiques de cette flavanone.

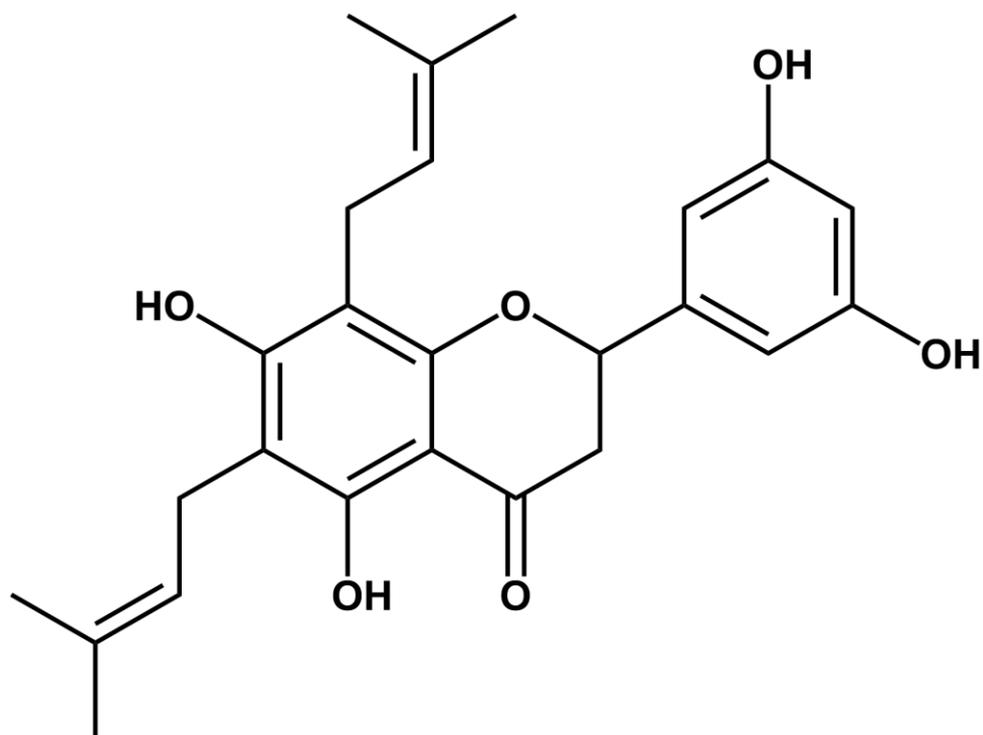


Figure 87: Structure du composé Rr-13 isolé de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam*.

3.5. Conclusion

Les flavonoïdes de Fabaceae jouent un rôle fondamental dans leur adaptation à l'environnement en tant que composés ayant un rôle défensif [450]. Ces composés sont recherchés pour leurs éventuels effets bénéfiques sur la santé humaine. Les différentes études sur les espèces appartenant à la famille des Fabaceae ont mené, à l'isolement et la purification de composés doués de plusieurs activités biologiques [451].

Dans ce contexte, notre étude de l'espèce *Retama raetam*, a permis d'identifier un nouveau composé dans le genre *Retama* qui est l'alpinumisoflavone, présent dans les tiges de l'espèce *R. raetam*. Ce composé est une pyranoisoflavone à diverses activités biologiques (antiostéoporotique, antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne, anticancéreuse,

œstrogénique et anti-œstrogénique, antidiabétique et neuroprotectrice). Les pyranoflavonoïdes sont principalement distribués dans les Fabaceae et ont attiré l'attention ces dernières années en raison de leurs importantes activités pharmacologiques qui en font des candidats médicaments potentiels [83].

En outre, l'étude phytochimique sur *Retama raetam* a conduit à l'isolement d'une tétrahydroxyflavanone substituée par des groupes prényles sur les positions 6 et 8. Il s'agit de la monotésone B décrite pour la première fois dans la famille des Fabaceae. Les flavonoïdes prénylés constituent un ensemble particulier au sein du groupe des flavonoïdes. Ces composés se caractérisent par une distribution botanique relativement restreinte [452].

La 5,7,3',5'-Tetrahydroxy-6,8-diprénylflavanone (Monotésone B) a montré une CI_{50} pertinente sur l'arginase I bovine (118 μM) suggérant que sa structure est intéressante dans le cadre de l'inhibition de l'arginase de mammifères.

4. Discussion et conclusion

Les travaux effectués sur les extraits MeOH des boutons floraux de *C. azarolus* et DCM des tiges de *R. raetam*, ont permis de purifier quatre flavonoïdes qui ont été évalués sur l'arginase hépatique bovine. Ce sont l'hypéroside, le 8-méthoxykaempférol-3-O- β -glucopyranoside, l'alpinumisoflavone et la monotésone B, qui ont présenté des CI_{50} comprises entre 100 μM (l'hypéroside) et 315 μM (l'alpinumisoflavone).

La comparaison des structures de ces flavonoïdes avec celle d'autres flavonoïdes décrits dans la littérature comme actifs sur l'arginase, a permis de fournir des données de relation structure-activité. En effet, plusieurs études ont considéré l'activité inhibitrice d'arginase de divers flavonoïdes et ont défini les principaux groupements impliqués dans l'activité inhibitrice.

L'hypéroside ayant la CI_{50} la plus faible (reflétant l'activité inhibitrice la plus élevée) présente bien des critères favorables à l'activité inhibitrice de l'arginase, à savoir la présence d'un motif catéchol sur le cycle B du flavonoïde, un groupement hydroxyle en C5 ainsi que la liaison α entre C2-C1'. Il est en effet établi que ces éléments permettent une augmentation de

l'activité. En revanche, il semble que le galactoside en position 3 sur le cycle C ait provoqué une baisse de l'activité [105] [111] [20] [112].

Le 8-méthoxykaempférol 3-glucoside, avec une CI_{50} de 300 μM , se différencie, par rapport au produit précédent, par l'absence de groupement catéchol sur le noyau B et présente en plus un groupement méthoxyle sur le noyau A. Il semble ainsi, qu'outre la perte du catéchol, la méthylation d'un hydroxyle sur son noyau A réduit l'activité inhibitrice de l'arginase.

L'alpinumisoflavone présente une activité proche de celle du produit précédent (CI_{50} de 315 μM). La faible activité inhibitrice de ce produit peut être attribué à l'absence du groupement catéchol mais aussi à la substitution de l'hydroxyle en 7 pour former un cycle pyrane.

Finalement, la monotésone B qui ne présente pas de groupement catéchol mais des hydroxyles en position ortho sur le noyau A et sur le noyau B a démontré une activité non négligeable (CI_{50} égale de l'ordre de 118 μM). Ces résultats corroborent les travaux antérieurs qui ont montré que le flavonoïde le plus actif sur l'arginase mammifère, jusqu'à aujourd'hui, est une flavanone, la (2S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-diméthoxyflavanone (Figure 88) ($CI_{50} = 11,6 \mu M$ sur l'ARG II de souris) dépourvue de groupement catéchol [135]. Cette constatation vient renforcer l'intérêt des flavanones dans l'inhibition de l'arginase mammifère mais il serait nécessaire d'évaluer ces deux molécules, *in vitro*, sur le même modèle afin de pouvoir directement les comparer. La monotésone B présente en plus deux substituants prényles sur son noyau A, connus pour offrir aux flavonoïdes une affinité importante pour les membranes biologiques et permettre ainsi l'amélioration de leurs activités [83]. Cette molécule présente donc un réel intérêt pour des tests *in vivo*.

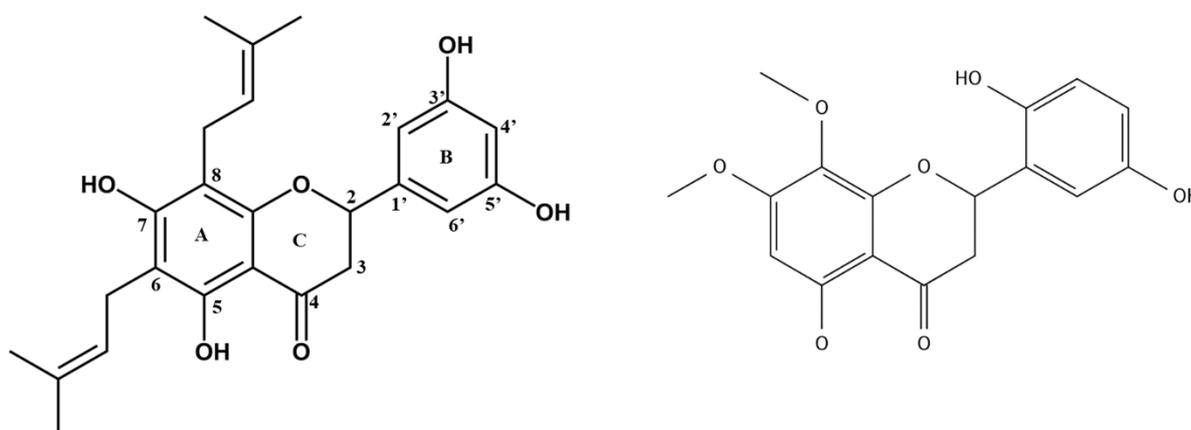


Figure 88 : Comparaison de la monotésone B (à gauche) à la (2S)-5,2',5'-trihydroxy-7,8-diméthoxyflavanone (à droite)

D'autre part, l'étude de l'extrait DCM des tiges de *C. azarolus*, a montré que les acides terpéniques représentent les composés majoritaires de cette matrice végétale. Cette constatation témoigne d'une dissemblance de la répartition des métabolites secondaires dans les différents organes de cette même plante puisque l'extrait méthanolique des boutons floraux est dépourvu de terpènes. Cette disparité peut cependant être expliquée par la nature différente des solvants qui ont été employés pour l'extraction. En outre, il serait intéressant de poursuivre l'identification des produits isolés de cet extrait. Ces composés suscitent notre curiosité car ils présentent une partie caféoylole facilitant la pénétration dans la poche du site actif de l'arginase à l'égard de son motif catéchol qui interagit avec le cofacteur Mn^{2+} et plusieurs résidus d'acides aminés cruciaux (Asp234, Thr246, His141 et His126) impliqués dans le mécanisme d'hydrolyse de l'arginase humaine [58]. Ces éléments seraient en faveur d'une inhibition compétitive qui permettrait de valoriser les terpènes, classe de métabolites secondaires ignorée, jusqu'à présent, dans les recherches d'inhibiteurs d'arginase.

Chapitre 4 : Développement d'un test de CCM-bioautographique

1. Introduction

Au sein de notre laboratoire, dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules naturelles inhibitrices de l'arginase, un test *in vitro* sur microplaque 96 puits est utilisé pour le criblage préliminaire ([Partie II :Chapitre 1 :2.1 page 180](#)). Brièvement, ce test est basé sur la détection colorimétrique de l'urée produite par l'arginase à partir de l'arginine. Ce test permet dans un premier temps le criblage d'un grand nombre d'extraits de plantes. Cependant, la deuxième étape, consistant à isoler, à partir de ces derniers, les composés responsables de l'activité, devient plus difficile, du fait de la complexité de ces matrices naturelles. Par conséquent, les processus d'isolement sont souvent laborieux et il est probable que la plupart des composés isolés soient inactifs en raison de la perte des composés actifs en très faible quantité au cours des étapes de purification. Afin de pallier ce problème, différentes études suggèrent le recours à des techniques de CCM-bioautographique afin d'accélérer la détection des inhibiteurs enzymatiques dans les extraits végétaux dont les constituants sont initialement séparés. Il existe actuellement de nombreuses applications de cette technique sur différentes enzymes telles que l'acétylcholinestérase, la dipeptidyl peptidase IV, l' α -chymotrypsine, l' α -glucosidase, la xanthine oxydase, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase, la phosphoglucose isomérase, la lipase, la peroxydase ou la tyrosinase (voir [Partie I :Chapitre 3 :4.2.4 page 117](#)). C'est dans ce contexte que nous rapportons ici, le développement d'un test CCM-bioautographique pour la détection directe d'inhibiteur(s) de l'arginase dans des extraits bruts de plantes. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal « *Journal of Separation Science* » en 2020 [160].

2. Principe de la technique

L'urée produite par l'arginase va réagir avec un révélateur pour donner un fond de plaque CCM coloré. Les inhibiteurs de l'arginase vont être identifiés sous forme de taches extinctrices de la couleur du fond de la plaque de silice.

3. Essais préliminaires

Lors de la procédure préliminaire du test bioautographique couplée à la CCM, nous avons d'abord testé le réactif de *Jung* modifié comme indicateur colorimétrique pour l'étape de révélation [163]. Cette réaction rapide et facile est largement utilisée pour révéler la présence d'urée au cours des dosages sur microplaques, car elle se produit à température ambiante et ne dure que 15 min. Cette méthode révèle des taches jaunes, correspondant aux zones d'inhibition, sur un fond orange donné par l'urée produite par l'arginase. Cependant, ce test n'a pas fourni de contraste assez net entre les zones d'inhibition et la couleur du fond de la plaque. De plus, les standards et les extraits de couleur initialement jaunâtre ont tendance à interférer avec le fond de la plaque de Silice. Enfin, la couleur orange de la plaque CCM était instable, rendant difficile la détection des inhibiteurs de l'arginase. À la suite de ces constatations, il a été décidé d'utiliser le réactif α -isonitrosopropiophénone qui offre un meilleur contraste en donnant un fond rose assez stable après l'étape de révélation de l'urée produite sur la plaque qui se réalise à 100°C pendant 1h. La plaque de CCM de couleur rose, protégée de la lumière, reste exploitable durant des semaines.

4. Limite de détection de l'urée

La détection de différentes quantités d'urée sur des plaques de CCM a ensuite été évaluée. Ce test préliminaire nous a permis de définir la gamme de concentrations d'arginase nécessaires pour produire une quantité d'urée suffisante pouvant être détectable sur les plaques CCM. Nos résultats ont montré que les concentrations d'urée s'échelonnant de 5 mM à 100 mM ont fourni un revêtement rose approprié sur les plaques (Figure 89).

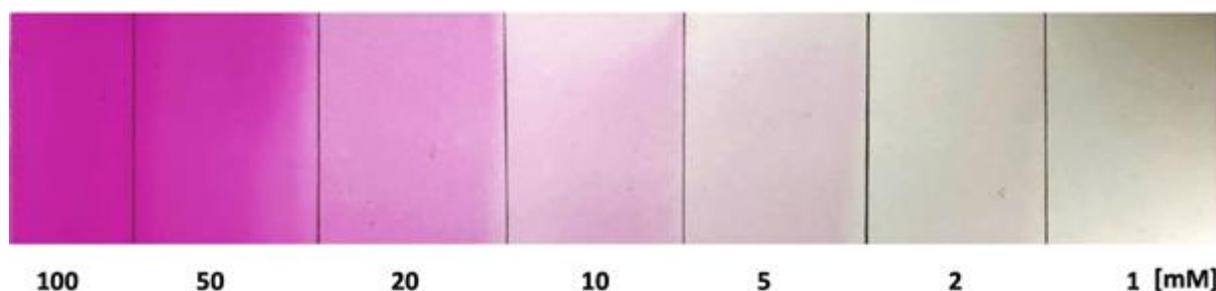


Figure 89 : Détection de l'urée sur une plaque de gel de silice CCM 60 F254 de 10 × 20 cm, pulvérisée en quantités décroissantes [1-100 mM]. La plaque a été photographiée sous lumière visible.

5. Optimisation des tests

Le test bioautographique a été conçu pour être réalisé sur une plaque de CCM sur laquelle les composés d'un mélange complexe sont initialement séparés par migration avec une phase mobile adéquate sur une couche de silice. Les conditions du test ont été optimisées pour produire un fond de couleur rose suffisamment intense sur les plaques de CCM qui permettrait de voir facilement le contraste lorsqu'un composé inhibiteur génère une zone plus claire. Il était également crucial de maintenir une résolution appropriée des composés séparés combinée à un revêtement de coloration uniforme sur toute la surface de la plaque de silice, sinon il est difficile de détecter clairement les zones d'inhibition.

La pulvérisation des réactifs du test sur les plaques CCM pouvant engendrer la dispersion des bandes des échantillons, les volumes pulvérisés ont été choisis après plusieurs tentatives afin de réduire ce risque tout en conservant une détection appropriée des inhibiteurs déposés. De plus, il convient de souligner que l'application, sur des plaques, par pulvérisation des solutions de l'essai biologique dépend fortement des propriétés physico-chimiques des réactifs, en particulier de leur viscosité, ce paramètre a donc dû être pris en compte pour obtenir une répartition homogène des réactifs du test.

Afin d'optimiser la réaction enzymatique sur les plaques de CCM, différents paramètres, tels que la durée, l'hygrométrie et la température d'incubation ainsi que les concentrations en substrat et arginase, ont été testés. Une faible production d'urée a été observée avec une concentration enzymatique inférieure à 50 U dans 3 mL du tampon. Avec une concentration plus élevée, la couleur rose était plus intense (Figure 90), mais compte tenu du coût de l'expérience et étant donné qu'avec une concentration de 50 U/3 mL, le contraste entre les zones d'inhibition et le fond rose était suffisant, cette concentration a été conservée. En outre, l'augmentation de la quantité de L -arginine de 12,5 à 200 mM a permis d'augmenter le contraste qui était plus net entre le fond et la zone d'inhibition. Par conséquent, ces concentrations pour le couple Arginase/Arginine ont été sélectionnées pour le test. Par ailleurs, différentes durées d'incubation et différentes températures ont été également testés. Il a été constaté que ces paramètres ont une faible influence sur les résultats de l'essai, au-delà de 60 min d'incubation à 37°C. Ces conditions, ayant conduit à des images bien définies, ont par conséquent été sélectionnées pour notre méthode bioautographique.

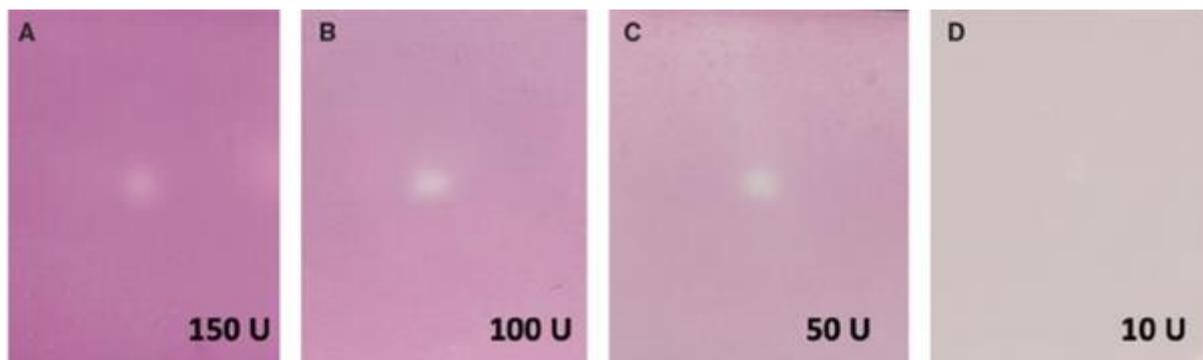


Figure 90 : Optimisation des concentrations d'arginase ; de A à D, respectivement de 150 à 10 U, en présence de 200 mM de L-arginine. Le contrôle positif, nor-NOHA à 0,5 µg, a été appliqué au milieu de la plaque afin de comparer le contraste entre le fond rose et la zone d'inhibition plus claire.

De plus, les résultats ont montré que la réaction enzymatique ne se produit que dans une atmosphère humide. L'incubation de la plaque de CCM à 37°C dans une étuve en milieu sec ne permet pas de réaliser la réaction enzymatique (aucune coloration rose n'est détectée sur la plaque après incubation pendant 60 min dans une atmosphère sèche). L'incubation en atmosphère saturée en vapeur d'eau représente donc un des paramètres clé de l'activité enzymatique. Il est important de maintenir la plaque de silice humide pendant la manipulation pour éviter l'inactivation de l'enzyme ; ainsi, la plaque a été déposée à plat sur une grille, elle-même placée dans un bain-marie à 37°C. Bien que la plaque de CCM ne soit pas en contact direct avec l'eau, ce système garantit une atmosphère humide à 80 %.

Un autre paramètre clé dans ce test de bioautographie couplée à la CCM est le choix du matériau de revêtement des plaques CCM. En effet, des plaques de silice en phase inverse ont été testées au cours des essais d'optimisation de la technique. Les résultats ont montré qu'il était difficile d'obtenir une coloration rose uniforme sur toute la surface de la plaque en phase inverse et d'éviter le décollement du matériau de revêtement avec ce type de phase stationnaire. Cela peut s'expliquer par le fait que l'hydrophobicité des surfaces des plaques en phase inverse empêche le dépôt d'une couche aqueuse homogène contenant les réactifs nécessaires pour l'essai. De plus, la répulsion entre les couches hydrophile et hydrophobe à l'interface peut bloquer la diffusion efficace des composés. Ce problème pourrait être surmonté en immobilisant l'enzyme sur le support non polaire en utilisant un copolymère amphiphile [205]. Le test a également été réalisé avec une plaque de CCM haute performance (ALUGRAM® Xtra Nano-SIL G) mais aucun changement significatif n'a été observé en ce qui concerne la résolution. Considérant la différence de coût entre les deux types de phases stationnaires

(normale et haute performance) et que le déposeur automatique de chez CAMAG a permis d'obtenir une résolution satisfaisante avec des spots bien définis, des couches de silice standard ont été choisies pour les expériences.

Le problème majeur posé par la combinaison de la CCM avec des tests enzymatiques biologiques pourrait être la sensibilité de l'enzyme aux phases mobiles utilisées pour la séparation des composés des échantillons. Les solvants organiques utilisés pendant la procédure de séparation sur CCM doivent être complètement séchés afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme par les phases mobiles (voir [Partie I :Chapitre 3 :4.2.4 page 117](#)). Concernant notre méthode CCM-bioautographique, nous avons testé une large gamme de solvants. Pour la majorité des éluants utilisés, la seule différence observée entre les plaques avec ou sans étapes de séparation préalable, était l'intensité de la couleur rose sur le fond de la plaque mais le contraste entre les zones d'inhibition et le fond restait facilement détectable. Néanmoins, l'utilisation de certains solvants/liquides difficilement éliminables par évaporation, comme le butanol ou l'acide formique ($\geq 2\%$) dans les phases mobiles, peut être critique non seulement pour la progression de la réaction enzymatique mais également pour l'étape de révélation du produit de la réaction enzymatique (réaction se produisant entre l'urée et l' α -isonitrosopropiophénone). Toutefois, les acides pourraient être neutralisés par des vapeurs d'ammoniaque [211].

6. Test de détection des faux positifs

L'apparition de faux positifs lors des tests de bioautographie n'est pas rare. Plusieurs publications décrivent l'apparition d'artefacts dûs, par exemple, à des problèmes de mouillabilité sur la plaque de CCM. D'autres articles considèrent que l'apparition de zones d'artefacts est due à l'interaction non spécifique de certains composés avec les réactifs du test. Par conséquent, il est indispensable de prévoir un test préliminaire facile et rapide offrant un contrôle systématique de ce type d'interaction. Fondamentalement, notre test de contrôle a consisté à remplacer l'arginase par une solution d'urée à 10 mM. Des produits de référence précédemment décrits dans la littérature comme de puissants inhibiteurs de l'arginase, y compris la nor-NOHA, le picéatannol, l'acide chlorogénique et le catéchol, ont été soumis à ce test de contrôle ([Figure 91 A](#)). Bien que ces produits naturels (picéatannol, acide chlorogénique et catéchol) aient donné des zones d'inhibition à la fin du test bioautographique ([Figure 91 B](#)), nous avons néanmoins remarqué l'apparition de halos blancs autour des produits de couleur jaunâtre sur la plaque CCM de contrôle. Cependant, la nor-NOHA a montré une activité inhibitrice spécifique de l'arginase

très distincte (Figure 91 B) avec l'absence totale de halos blancs sur la plaque de contrôle de faux positifs (Figure 91 A). Ainsi, la nor-NOHA a été sélectionnée comme contrôle positif pour notre méthode CCM-bioautographique.

Dans le cadre des analyses de matrices complexes, une seconde plaque de CCM sera donc réalisée en parallèle afin de vérifier l'absence de composés réagissant avec l'urée ou les réactifs du test.

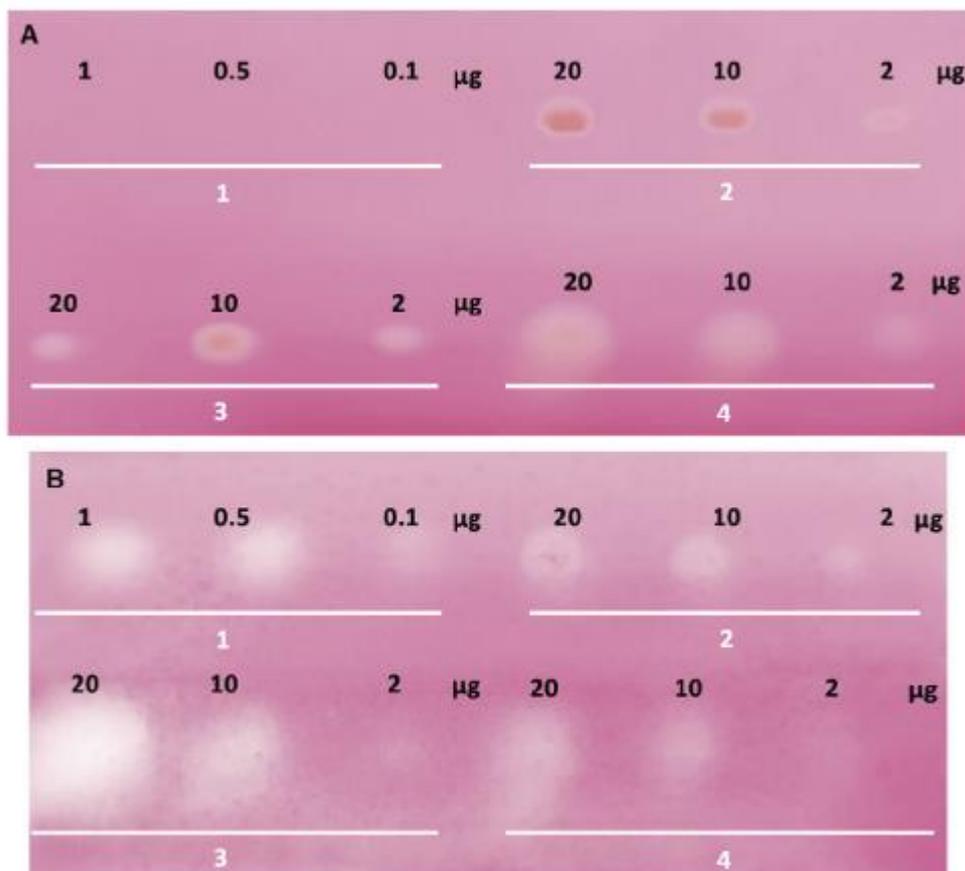


Figure 91 : Criblage des faux positifs (A) et test bioautographique (B) utilisant (1) nor-NOHA, (2) picéatannol, (3) catéchol, (4) acide chlorogénique pour la détection de l'activité inhibitrice spécifique de l'arginase sur CCM.

7. Linéarité et sensibilité

La sensibilité du test CCM-bioautographique, estimée par la limite de détection (LOD) de la nor-NOHA, a montré que les tâches d'inhibition étaient détectables à l'œil nu jusqu'à 0,1 µg/zone (Figure 92 B) avec une bonne linéarité pour les quantités allant de 0,1 à 1,5 µg pour ce

contrôle positif (Figure 92 A). L'équation qui lie l'aire de la zone d'inhibition à la concentration d'inhibiteur était celle d'une droite du type : $y = 38209 x + 2076,7$ avec un coefficient de corrélation de linéarité (R^2) de 0,969.

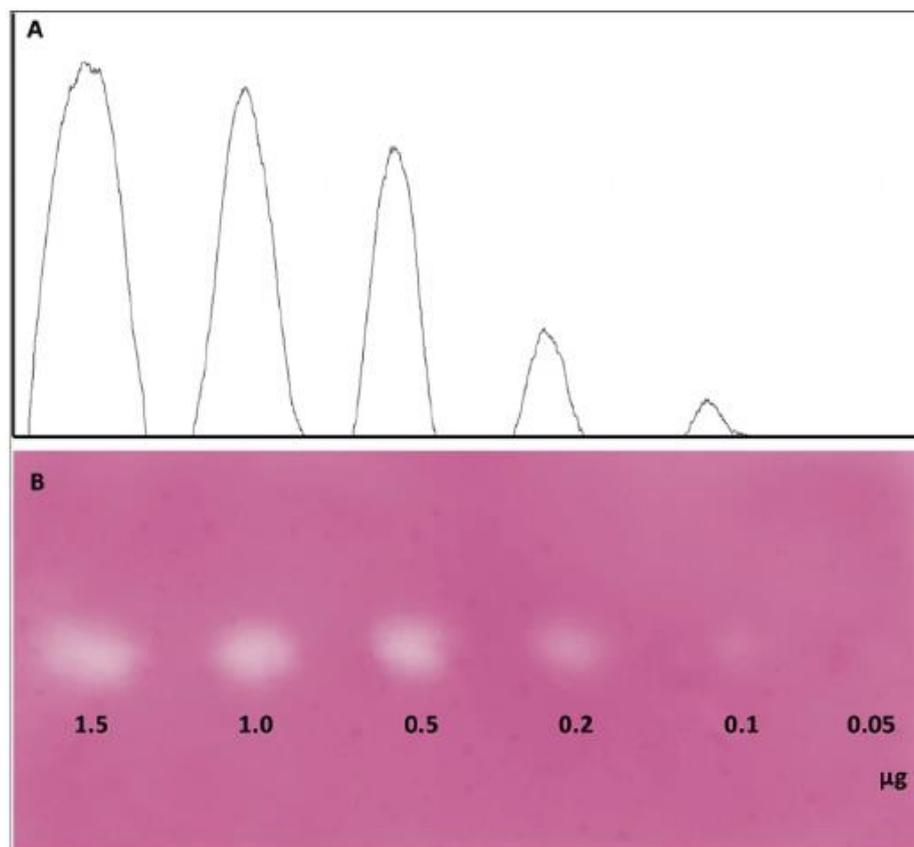


Figure 92 : Inhibition de l'activité de l'arginase détectée sur une couche de CCM en fonction des quantités décroissantes de nor-NOHA (1,5-0,05 µg). (A) Aire des spots mesurée par le logiciel imageJ ; (B) CCM-bioautographique observée sous lumière visible.

8. Sélectivité en présence d'une matrice complexe

Afin d'évaluer la sélectivité de notre technique pour un composé actif au sein d'une matrice complexe, la nor-NOHA a été mélangée à l'extrait méthanolique de fruit de *Myrtus communis* (Mc) qui est inactif. Cet extrait végétal a été choisi pour sa richesse en composés avec une large gamme de polarités. Les composés de cet extrait ont subi une séparation sur la plaque CCM grâce à une phase mobile adéquate avant d'effectuer le test bioautographique (Figure 93).

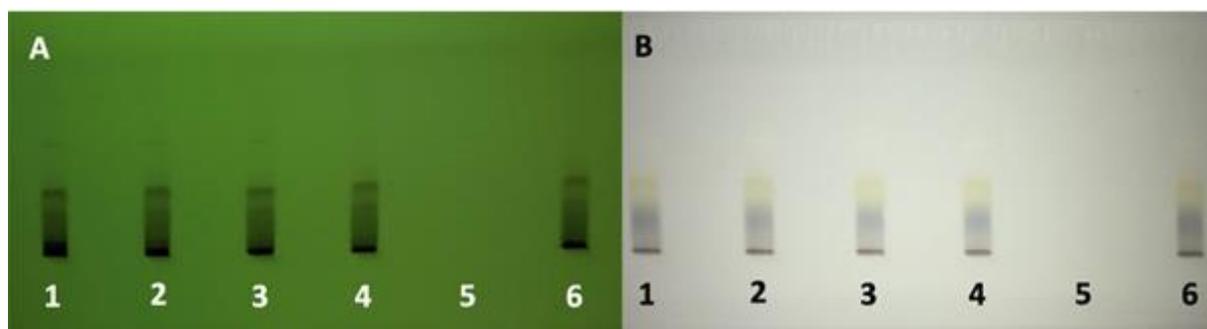


Figure 93 : Analyse CCM de l'inhibiteur de l'arginase nor-NOHA en présence d'extrait méthanolique de fruit de *Myrtus communis* (Mc). (A) détection à lumière UV 254 nm, (B) détection à lumière visible avant la réaction enzymatique. De gauche à droite (1- 4) : extrait (Mc) déposé à 200 µg avec des quantités décroissantes de nor - NOHA : 1 µg, 0,5 µg, 0,2 µg et 0,1 µg respectivement. (5) nor-NOHA déposé seul à 0,5 µg et (6) extrait (Mc) repéré seul à 200 µg. Une plaque de silice G60 F254 a été utilisée. L'éluion a été réalisée avec un mélange AcOEt/ MeOH / W / CH₂O₂ (80: 10: 10: 0,1).

Cette expérience a montré que les taches blanches de nor-NOHA peuvent être facilement distinguées des tâches des autres constituants de l'extrait (Mc) (Figure 94 C). De plus, la limite de détection (LOD) est stable. En effet, la LOD est identique (= 0,1 µg/zone) quand l'inhibiteur de référence est mélangé avec une matrice complexe ou simplement déposé seul sur la plaque de CCM. De même, une bonne linéarité a été observée, comme le montre l'équation liant l'aire de la zone d'inhibition à la concentration d'inhibiteur ($y = 45114 x + 19302$) avec une corrélation linéaire de 0,960. Ces tests de sélectivité ont montré que notre méthode CCM-bioautographique permet de localiser un constituant actif mineur dans des matrices complexes comme les extraits de plantes riches en composés. Par ailleurs, avant le test de bioautographie, l'extrait végétal (Mc) et le témoin positif (nor-NOHA) ont été également soumis au test de détection des faux positifs afin d'éviter des résultats erronés concernant l'inhibition de l'arginase. Aucun des échantillons analysés n'a montré de réaction positive pendant le test de contrôle négatif (le fond rose homogène a été observé sans zones d'inhibition blanches) (Figure 94 B), il peut être donc supposé que le risque d'observer une interférence est relativement réduit.

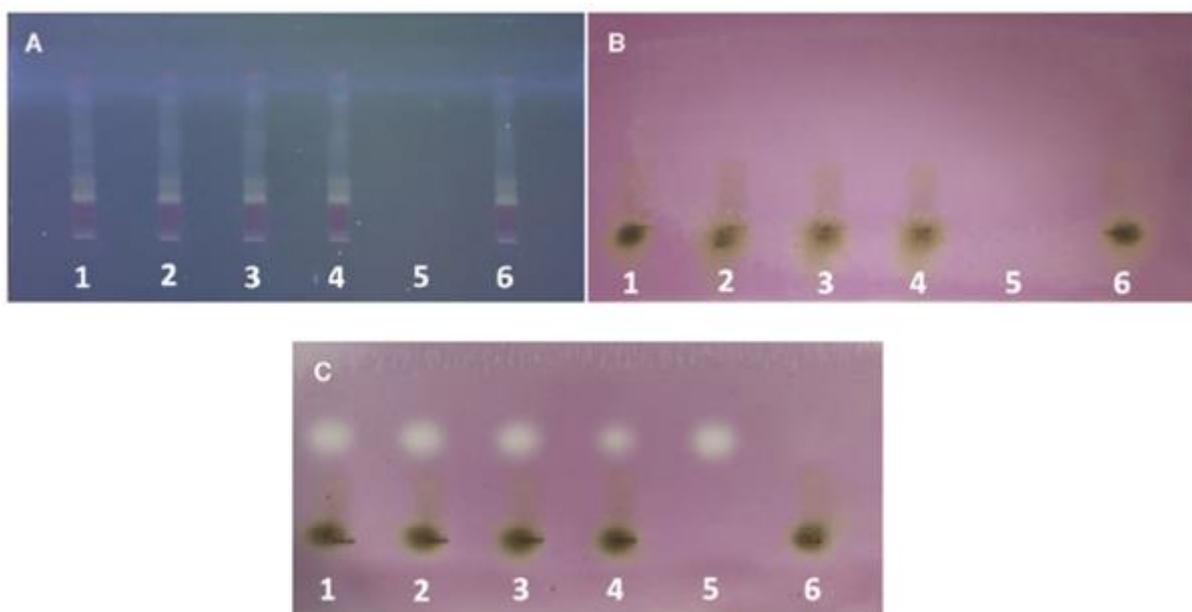


Figure 94 : Analyse par CCM-bioautographique de l'inhibiteur nor-NOHA en présence de l'extrait méthanolique de fruit de *Myrtus communis* (Mc). (A) détection à la lumière UV 365 nm ; (B) test de détection des faux positif et (C) test bioautographique sous lumière visible. De gauche à droite (1-4): extrait (Mc) à 200 μg déposé avec des quantités décroissantes de nor-NOHA: 1, 0,5, 0,2 et 0,1 μg respectivement. (5) nor-NOHA déposé seul à 0,5 μg et (6) (Mc) extrait déposé seul à 200 μg . Le test a été réalisé en utilisant une plaque de silice G60 F254. L'élution a été réalisée avec AcOEt / MeOH / W / CH₂O₂

9. Applicabilité au criblage d'inhibiteurs naturels dans l'extrait de *Cannabis sativa*

L'applicabilité du test CCM-bioautographique à un mélange complexe, afin de détecter des inhibiteurs naturels, a ensuite été testée à l'aide d'un extrait méthanolique de *C. sativa*. Cet extrait particulier a été choisi car il a présenté une activité inhibitrice de l'arginase lors d'une précédente étude au sein de notre laboratoire [453].

Après la séparation des composés avec un éluant composé de DCM MeOH/CH₂O₂ (90:10:0,2), la plaque a été soumise à la procédure bioautographique. Une tâche d'inhibition bien distincte est apparue avec un $R_f = 0,27$ qui n'a pas d'équivalent sur la plaque contrôle (Figure 95 C vs Figure 95 D). Cette zone d'inhibition correspond à la *N-trans*-caféoyltyramine, connue pour son activité inhibitrice de l'arginase [453]. De plus, il est important de noter que d'autres zones d'inhibition sont apparues sur la plaque bioautographique à des $R_f < 0,27$. Ce

résultat démontre que d'autres composés actifs existent dans cet extrait et il serait nécessaire de les identifier.

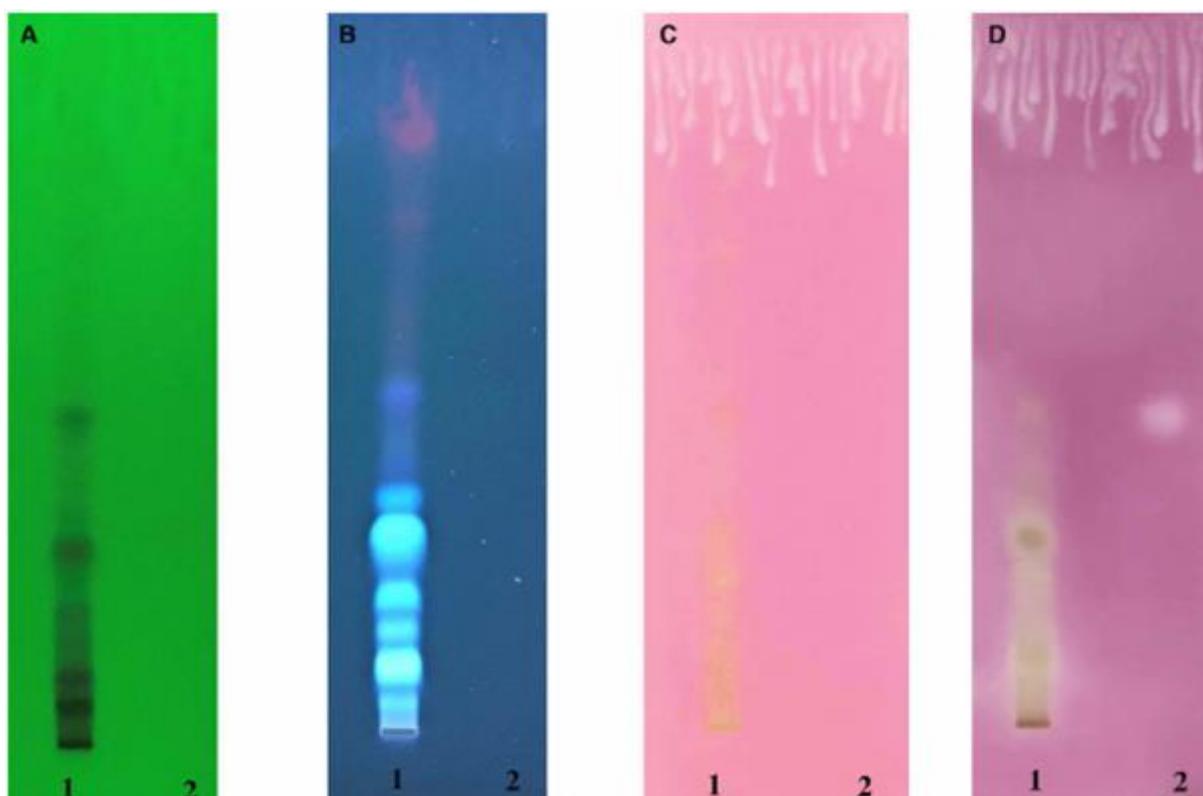


Figure 95 : Criblage des inhibiteurs de l'arginase des tourteaux de chanvre (*Cannabis sativa* L.). (A) détection à la lumière UV254 nm ; (B) détection à la lumière UV365nm ; (C) test de criblage des faux positifs et (D) test bioautographique sous lumière visible. (1) 200 μ g d'extrait méthanolique de *C. sativa* déposés sur une plaque de gel de silice G60 F254 développée dans une phase mobile composée d'un mélange DCM/MeOH/HCO₂H (90:10:0,2) et (2) 0,5 μ g de nor-NOHA repéré comme contrôle positif.

Afin de confirmer l'activité inhibitrice de l'arginase de la *N-trans*-caféoyltyramine, préalablement purifiée dans notre laboratoire à partir de l'extrait méthanolique de *C. sativa*, cette molécule a été déposée sur des plaques de CCM avec des quantités allant de 20 à 80 μ g (Figure 96). Les résultats ont montré que les halos d'inhibition étaient visibles à l'œil nu avec un $R_f = 0,5$ dans un éluant composé de DCM/MeOH (85:15), confirmant le potentiel d'inhibition de l'arginase de ce produit naturel (Figure 97 C). De plus, comme observé avec le contrôle positif, nor-NOHA (Figure 97 C), les zones d'inhibition de la *N-trans*-caféoyltyramine étaient proportionnelles aux quantités déposées sur les plaques (Figure 97 C). Il est important

de noter que le produit pur, la *N-trans*-caféoyltyramine, n'a pas montré de faux positifs au cours du test de contrôle (Figure 97 B) tout comme l'extrait brut *C. sativa*.

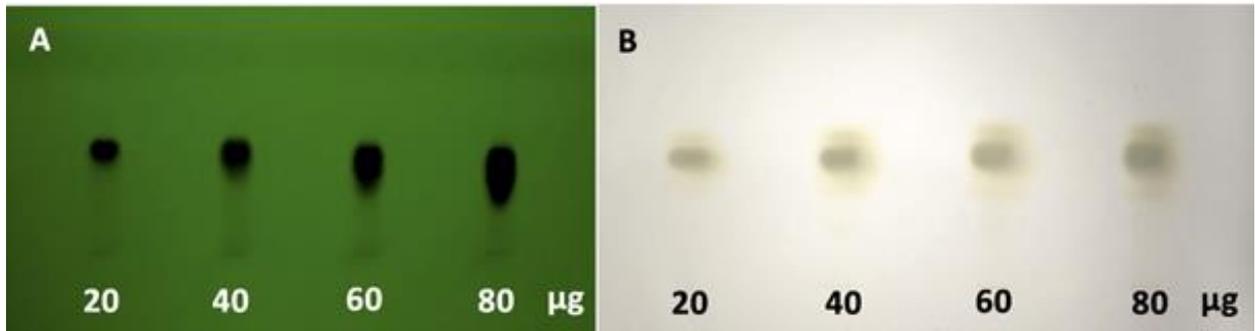


Figure 96: Analyse CCM de la *N-trans*-caféoyltyramine après élution préalable sur la plaque de silice G60 F254 en utilisant une phase mobile constituée de DCM / MeOH (85:15). (A) détection à lumière UV254 nm (B) détection à lumière visible avant la réaction enzymatique

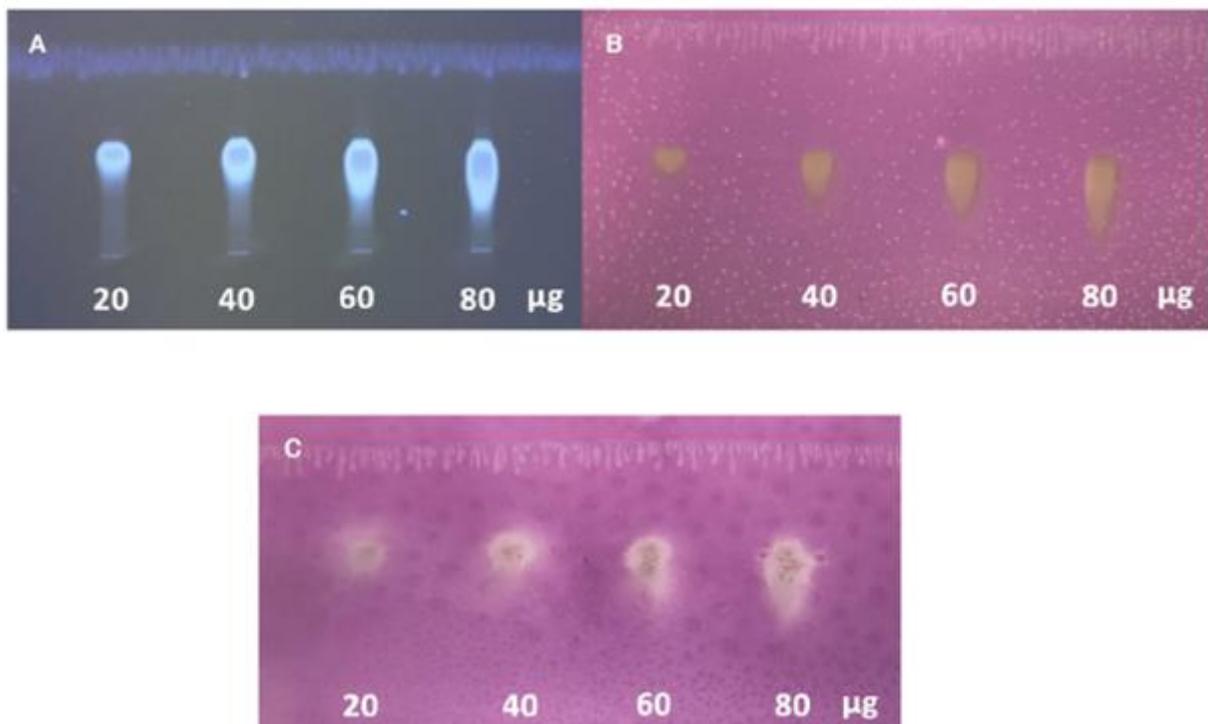


Figure 97: Évaluation de l'activité inhibitrice de l'arginase de la *N-trans*-caféoyltyramine après sa migration préalable sur une plaque de gel de silice G60 F254 en utilisant une phase mobile constituée de DCM / MeOH (85:15). (A) détection à la lumière UV365 nm, (B) test de détection de faux positifs et (C) chromatogramme bioautographique sous lumière visible

10. Conclusion

Ce chapitre décrit une mise en œuvre réussie d'un test CCM-bioautographique pour le criblage rapide des inhibiteurs de l'arginase dans des matrices complexes tels que des extraits de plantes. Contrairement aux dosages sur microplaques conventionnels qui permettent de déterminer si un extrait brut de plante est doué d'une activité biologique, le test CCM-bioautographique permet de localiser spécifiquement le ou les constituants actifs dans des matrices complexes.

Plusieurs paramètres, tels que les matériaux de revêtement des plaques CCM, les concentrations en enzyme, en substrat et en réactifs de pulvérisation ainsi que les conditions d'incubation (durée, température, humidité) ont été optimisés afin d'identifier facilement, à l'œil nu, les composés actifs qui apparaissent sous forme de spots blancs sur un fond de plaque CCM rose. Le produit actif peut ensuite être identifié par des méthodes analytiques plus fines telles que la CCM-MS ou la CCM-RMN. Par ailleurs, il est important de souligner que le dosage sur microplaques reste une technique complémentaire à notre technique nouvellement développée pour estimer la concentration inhibitrice médiane (CI₅₀) des composés isolés. Néanmoins, cette technique CCM-bioautographique pourrait considérablement contribuer à accélérer la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'arginase.

Conclusion générale et perspectives

Ce projet de thèse avait comme objectif la valorisation de certaines plantes médicinales Tunisiennes et la recherche d'inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase. Cette enzyme représente en effet une cible thérapeutique d'actualité suite à la découverte de son implication dans diverses pathologies liées aux maladies cardiovasculaires, rénales, neurovasculaires, inflammatoires, cancéreuses ou encore dans certaines parasitoses comme la leishmaniose.

Dans ce contexte, un travail de recherche bibliographique a été entrepris en examinant plusieurs critères, principalement ethnopharmacologique et chimiotaxonomique, dans le but de sélectionner des plantes présentant un intérêt potentiel. Cette étude a conduit à la sélection de douze espèces médicinales largement utilisées en médecine traditionnelle Tunisienne. Les extractions à partir de différents organes de ces dernières, ont permis d'obtenir 81 extraits. Pour évaluer leur activité sur l'arginase, ils ont été testés à l'aide d'un essai *in vitro* utilisant l'arginase I hépatique bovine purifiée. Ce premier criblage a permis de fournir des données relatives à l'effet inhibiteur de chaque extrait. Cinq extraits se sont avérés actifs avec des CI_{50} s'échelonnant de 41,99 à 96,69 $\mu\text{g/mL}$. Les cinq extraits actifs, qui sont les extraits méthanoliques de tiges et de boutons floraux de *Crataegus azarolus*, de tiges de *Rhus tripartita* et les extraits chlorométhyléniques de tiges de *Crataegus azarolus* et de *Retama raetam*, ont subi une analyse phytochimique préliminaire qui a permis de restreindre à trois le nombre d'extraits retenus pour une étude phytochimique approfondie. Les échantillons concernés sont les extraits méthanolique des boutons floraux et chlorométhylénique des tiges de *C. azarolus* et l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam*, qui se sont démarqués par leur teneur importante en polyphénols et flavonoïdes s'échelonnant de 25,96 à 79,35 μg équivalent acide gallique/mg d'extrait sec et de 23,41 à 38,79 μg équivalent rutine/mg d'extrait sec respectivement.

L'étude de ces trois extraits a débuté par des analyses déréplicatives par CLHP-DAD/UV, LC-MS/MS et RMN ^{13}C . Ces analyses ont permis, dans un premier temps, de mettre en

évidence les principales classes chimiques qui les composent et d'identifier les composés déjà connus dans ces matrices végétales. La déréplication sur l'extrait des boutons floraux de *C. azarolus* a permis de caractériser 51 composés appartenant principalement aux acides hydroxycinnamoylquiniques, aux chalcones et aux flavonoïdes. Par ailleurs, la déréplication sur l'extrait chlorométhylénique des tiges de *C. azarolus* a permis de repérer 36 produits appartenant essentiellement aux acides triterpéniques. Finalement, la déréplication sur l'extrait chlorométhylénique des tiges *Retama raetam* a permis de repérer 19 métabolites secondaires appartenant principalement aux flavonoïdes.

Avec l'objectif d'isoler les produits naturels de ces espèces, leurs extraits ont subi plusieurs étapes de fractionnement bioguidé ayant conduit à la récupération, au total, de 134 fractions. Parmi ces fractions, seulement six produits ont présenté un degré de pureté assez satisfaisant pour permettre une identification. Trois d'entre eux ont été décrits pour la première fois de l'espèce dont ils ont été extraits. Il s'agit du 8-méthoxykaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside, décrit pour la première fois dans *C. azarolus* (isolés des boutons floraux), de l'alpinumisoflavone décrite pour la première fois dans *R. raetam* et la monotésone B isolée des tiges de *R. raetam* et décrite pour la première fois chez la famille des Fabaceae. Un produit naturel original a été aussi décrit : le 8-méthoxykaempférol-3-*O*-(6''-acétyl- β -glucopyranoside) isolé de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *C. azarolus*. Malheureusement, uniquement quatre composés ont fourni des masses suffisantes pour être testés sur l'arginase. Il s'agit de l'hypéroside, du 8-méthoxykaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside, de l'alpinumisoflavone et de la monotésone B. Ces derniers ont présenté des CI_{50} comprises entre 100 (l'hypéroside) et 315 μ M (l'alpinumisoflavone). Bien que ces valeurs avoisinent celles des produits naturels décrits comme actifs sur l'arginase, tels que le picéatannol-3'-*O*- β -D-glucopyranoside (testé sur les ARG I et II murines) et l'acide chlorogénique (testé sur l'ARG I bovine) ayant présenté des CI_{50} de l'ordre de 11 μ M, elles restent encore éloignées de celles des inhibiteurs synthétiques de référence (comme, par exemple, la nor-NOHA, $CI_{50} = 1,7 \pm 0,7 \mu$ M sur l'arginase I bovine).

La majeure contrainte rencontrée au cours de ce projet de thèse fut les quantités très faibles de fractions récupérées après les longues étapes de fractionnement bioguidé. Ceci nous a orientés vers le développement d'une nouvelle stratégie, permettant l'accélération de notre démarche de découverte de molécules bioactives. Dans ce cadre, une technique CCM-bioautographique a été développée, méthode à l'interface chimie/biologie. Elle permet, à la fois de séparer les composés des matrices végétales et de les tester simultanément sur l'arginase en

consommant une quantité minimale de produits et en évitant la perte de composés actifs minoritaires lors des étapes de purification.

En perspective, ce projet pourrait se prolonger par la finalisation de l'identification des composés isolés de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *C.azarolus*, par l'évaluation des produits isolés sur d'autres cibles thérapeutiques et par l'exploitation de la technique bioautographique, nouvellement développée, pour l'identification accélérée de nouveaux inhibiteurs de l'arginase.

Partie III : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

1.1. Récolte du matériel végétal

Les espèces étudiées ont été récoltées dans diverses régions de la Tunisie. Ces espèces ont été identifiées par le Pr. Chokri Messaoud et un échantillon de chacune d'elle, auquel une référence a été attribuée, est conservé au laboratoire de Pharmacognosie de l'EA 4267 PÉPITE (Pathologies et épithéliums : prévention, innovation, traitements, évaluation). L'ensemble des données de collecte sont répertoriées dans le [Tableau 13](#).

Tableau 13: Données de collecte des plantes sélectionnées pour l'étude.

Famille	Espèce	Site de collecte	Date de collecte	Organe Utilisé	Référence	Masse poudre sèche (g)
Anacardiaceae	<i>Rhus tripartita</i> (Ucria) Grande	Sousse	Janvier 2017	Feuilles	Rt-fe/01-2017	15,45
				Tiges	Rt-ti/01-2017	19,8
				Fruits	Rt-fr/01-2017	29,3
				Noyaux	Rt-no/01-2017	23
	<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Morneg	Février 2019	Feuilles	Pl-fe/02-2019	208,3
				Fruits	Pl-fr/02-2019	12
Rosaceae	<i>Crataegus azarolus</i> L.	Morneg	Février 2017	Feuilles	Ca-fe/02-2017	16,1
				Tiges	Ca-ti/02-2017	26,1
				Boutons	Ca-bo/02-2017	20,3
	<i>Rubus ulmifolius</i> shott.	Morneg	Février 2017	Feuilles	Ru-fe/02-2017	15,3
				Tiges	Ru-ti/02-2017	13
	Fabaceae	<i>Retama raetam</i> (Forssk.) Webb	Sousse	Janvier 2017	Fleurs	Rr-f/01-2017
Tiges					Rr-t/01-2017	16,8
Asteraceae		Sousse	Février 2019	Feuilles	Hc-fr/02-2019	98
				Fruits	Hc-fr/02-2019	81,8

				Fleurs	Hc-fl/02-2019	7,1
	<i>Hertia cheirifolia</i> (L.) Kuntze			Tiges	Hc-ti/02-2019	41
				Calices	Hc-ca/02-2019	35,5
		<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.	Jilma	Janvier 2016	Plante entière	Aha/01-2016
	<i>Artemisia campestris</i> L.	Gafsa	Janvier 2016	Plante entière	Ac-G/01-2016	5
		Ain Errahma	Janvier 2016	Plante entière	Ac-A/01-2016	5
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Sousse	Février 2019	Feuilles	Ro-fe/02-2019	5
	<i>Thymus algeriensis</i> Boiss. et Reut.	Sousse	Février 2019	Plante entière	Ta /02-2019	5
Lauraceae	<i>Laurus Nobilis</i> L.	Sbeitla	Janvier 2019	Feuilles	Ln-fe/01-2019	5
Myrtaceae	<i>Myrtus communis</i> L.	Korbous	Janvier 2016	Feuilles	Mc-fe/01-2016	5
				Fruits	Mc-fr/01-2016	5
				Tiges	Mc-ti/01-2016	5

1.2. Dessiccation et stabilisation

Le séchage a été réalisé à l'air libre sur une durée moyenne de dix à vingt jours au sein du laboratoire de biotechnologie végétale à l'INSAT. Cette opération a permis de stabiliser la composition des plantes et a facilité le transport de la matière première.

1.3. Broyage

Les parties des plantes séchées ont été ensuite broyées afin d'assurer une homogénéisation des différents éléments du mélange et une augmentation de la surface de contact avec le solvant en vue de l'extraction à venir. Ce traitement mécanique, a été réalisé à l'aide d'un broyeur (AEG type AM80 NX2).

2. Techniques extractives

L'extraction de la matière végétale s'est déroulée en trois étapes successives :

- La macération : Chaque partie de plante est mise en contact, à température ambiante et dans un endroit frais, successivement avec des solvants organiques de polarités croissantes : éther de pétrole (EP) ou l'hexane (H), puis dichlorométhane (DCM) et enfin méthanol (MeOH). Pour chaque solvant, une extraction de 24 heures est répétée jusqu'à ce que la solution extractive devienne limpide, signifiant que le marc est épuisé. Pour chaque extraction, la quantité de solvant utilisée est d'environ 50 mL pour 1g de matière végétale sèche.
- La filtration : cette opération est destinée à séparer la solution extractive du marc. Elle est réalisée sur papier filtre, sous vide. Le solvant organique contenant les molécules d'intérêt est transvasé dans un ballon et le marc humide est séché pour être réutilisé pour l'extraction avec le solvant suivant.
- L'évaporation du solvant d'extraction : la solution extractive est ensuite concentrée sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi®) jusqu'à l'élimination complète du solvant permettant ainsi l'obtention d'extraits.

3. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés

3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant la méthode Folin – Ciocalteu telle que décrite par Messaoud et col. [454] avec quelques modifications. En bref, 0,1 mL d'une solution méthanolique à 1 mg/mL de l'extrait a été mélangé avec 0,5 mL de réactif de Folin–Ciocalteu (dilué 10 fois avec de l'eau distillée) et 0,4 mL de carbonate de sodium à 7,5 %. Après incubation à température ambiante pendant 90 min, l'absorbance de la solution résultante a été mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux a été exprimée en microgrammes d'équivalent en acide gallique par milligramme d'extrait brut (μg EAG/mg EB).

3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée en utilisant le test colorimétrique décrit par Messaoud et col. [454] avec quelques modifications. Un volume de 0,5 mL d'une solution d'extrait méthanolique à 1 mg/mL a été mélangé avec 0,5 mL de solution méthanolique d' AlCl_3 (2%). Le mélange est incubé pendant 30 minutes. L'absorbance de la solution résultante est mesurée à 430 nm. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en microgrammes d'équivalent rutine par milligramme d'extrait brut (μg ER/mg EB).

3.3. Dosage des tanins

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide [455] avec quelques modifications. 20 μL d'extrait sont ajoutés à 600 μL de vanilline et 300 μl d'acide chlorhydrique (HCl). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide, pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme équivalent de la catéchine par gramme d'extrait brut sec (μg EC/mg EB).

4. Techniques analytiques

4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les supports utilisés pour les chromatographies sur couche mince (CCM) sont des supports en aluminium recouvert d'une couche de silice (Silica gel 60 F254, épaisseur 0,2 mm, Merck®). Les différents mélanges d'éluants utilisés pour séparer les composés des différents échantillons sur les plaques CCM sont résumés dans le [Tableau 14](#). 10µL des solutions à analyser sont déposés et après migration, les plaques CCM sont observées sous lumière visible et sous lumière ultra-violette (UV) à 254 et 365 nm.

4.2. Chromatographie liquide haute performance couplée à la détection UV (CLHP-UV)

L'appareil de chromatographie liquide haute performance (CLHP) utilisé est une chaîne (Shimadzu®). Cet appareil est équipé d'une boucle d'injection de 20 µL et d'un détecteur UV-Visible. La phase stationnaire est constituée par une colonne apolaire type C18, (Kinetex® EVO C18, 100 Å, H15-075635), de dimensions 250 x 4.6 mm. La méthode de l'élution est optimisée pour chaque extrait analysé ([Tableau 15](#)). Le débit est fixé à 1mL/min et la pression maximale est fixée à 300 bars. L'échantillon à analyser est solubilisé dans le MeOH de façon à obtenir une solution entre 1mg/mL et 5 mg/mL puis filtré sur un filtre Millipore® nylon 0,2 µm. La détection UV a été faite à 280 et 254 nm. Les phases mobiles utilisées pour les différentes analyses sur CLHP-UV sont données dans le [Tableau 15](#).

4.3. CLHP-UV-DAD

Les analyses par CLHP-UV-DAD ont été réalisées au sein de L'EA 921 "Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux" (SONAS) à Angers. Ces analyses ont été effectuées sur un équipement Agilent® HP 1100 series équipé d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'une vanne d'injection manuelle et d'un détecteur UV à barrette de diodes, et assisté du logiciel Agilent Chemstation for LC 3D. Avant injection, les échantillons ont été solubilisés dans le MeOH et centrifugés afin d'éliminer les éventuelles particules en suspension. 20 µL

d'échantillon concentré à 5 mg/mL ont été injectés sur une colonne Phenomenex Luna C18 de 250 x 4,6 mm (5 µm). Les différentes phases mobiles utilisées sont résumées dans le [Tableau 15](#). Le débit a été fixé à 1 mL/min et la détection UV a été faite entre 200 et 400 nm.

Tableau 14 : Éluants utilisés pour les CCM analytiques

Éluant	Proportions	Échantillon
DCM / MeOH	97/3	Extrait DCM des tiges de <i>Retama raetam</i> et ses fractions obtenues par CLHP préparative (F ₁ -PLC à F ₆ -PLC)
		Extrait DCM des tiges de <i>Retama raetam</i> et ses fractions obtenues par chromatographie Flash (F ₁ -Flash à F ₆ -Flash)
	95/5	F ₃ -Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> et ses sous-fractions
		F ₄ -Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> et ses sous-fractions
	90 /10	Extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> et ses fractions (F ₁ -Flash à F ₁₀ -Flash)
		F ₅ -Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> et ses sous-fractions

	F ₆ -Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> et ses sous-fractions
	F ₇ -Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> et ses sous-fractions obtenues par CLHP préparative
	Sous-fractions de la fraction F ₃ -PLC de <i>Retama raetam</i>
	Sous-fractions de la fraction F ₃ -Flash de <i>Retama raetam</i>
	Sous-fractions de la fraction F ₄ -Flash de <i>Retama raetam</i>
	Sous-fractions de la fraction F ₅ -Flash de <i>Retama raetam</i>
95 /15	F ₃ -Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> et ses sous-fractions obtenues par CLHP préparative
	F ₄ -Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> et ses sous-fractions obtenues par CLHP préparative
85/15	Extrait de tourteaux de <i>Cannabis sativa</i>

		N- <i>trans</i> -caféoyltyramine
EtOAc/MeOH/EUP/CH₂O₂	80/ 10/ 10/ 0,1	Extrait méthanolique de fruit de <i>Myrtus communis</i>

Tableau 15 : Méthodes séparatives en CLHP

Échantillon	Solvant A	Solvant B	Méthode
<ul style="list-style-type: none"> Extrait MeOH des tiges de <i>Crataegus azarolus</i> 	EUP +0.1% AF	ACN	De 100% (A) à 0% (A) sur 50 min
<ul style="list-style-type: none"> Extrait MeOH des tiges de <i>Rhus tripartita</i> 			
<ul style="list-style-type: none"> Extrait MeOH des boutons floraux de <i>Crataegus azarolus</i> et ses fractions obtenues par chromatographie Flash 	EUP + AF 0,1%	ACN	0 à 60 min : De 0% (B) à 30% (B) 60 à 61 min : De 30% (B) à 100% (B) 61 à 71 min 100% (B)
<ul style="list-style-type: none"> Fraction F7-Flash de l'Extrait MeOH des 	EUP + AF 0,1%	ACN	

boutons floraux de <i>Crataegus azarolus</i>			0 à 30 min : De 15% (B) à 50% (B)
• Fraction F8-Flash de l'Extrait MeOH des boutons floraux de <i>Crataegus azarolus</i>			30 à 35 min : De 50% (B) à 100% (B) 50 à 60 min : 100% (B)
• Sous-fractions sF ₁ - CLHP de l'Extrait MeOH des boutons floraux de <i>Crataegus azarolus</i>	EUP + AF 0,1%	ACN	0 à 40 min : De 15% (B) à 40% (B) 40 à 50 min : 100% (B) 50 à 60 min 100% (B)
• Sous-fractions sF ₂ - CLHP de l'Extrait MeOH des boutons floraux de <i>Crataegus azarolus</i>			
• Sous-fractions sF ₃ - CLHP de l'Extrait MeOH des boutons floraux de <i>Crataegus azarolus</i>			
• Extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i>	EUP + AF 0,1%	MeOH	0 à 40 min : De 60% (B) à 100% (B) 40 à 41 min : 100% (B) 41 à 51 min 100% (B)
• Fraction F3-Flash de l'extrait DCM des	EUP	MeOH	0 à 10 min : 50% (B)

tiges de <i>Crataegus azarolus</i>			10 à 12 min : 60% (B)
• Fraction F4-Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i>			12 à 22 min : 60 % (B)
			22 à 27 min : 65% (B)
			27 à 35 min : 65 % (B)
			35 à 40 min : 70% (B)
			40 à 55 min : 70% (B)
			55 à 58 min : 80% (B)
			58 à 68 min : 80% (B)
			68 à 70 min : 100% (B)
			70 à 80 min : 100% (B)
• Fraction F5-Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i>	EUP	MeOH	0 à 10 min : 50% (B)
			10 à 15 min : 70% (B)
			15 à 18 min : 75 % (B)
• Fraction F6-Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i>			18 à 23 min : 75% (B)
			23 à 25 min : 80 % (B)
• Fraction F7-Flash de l'extrait DCM des tiges de <i>Crataegus azarolus</i>			25 à 35 min : 80% (B)
			35 à 38 min : 85% (B)
			38 à 48 min : 85% (B)
			48 à 50 min : 100% (B)

			50 à 60 min : 100% (B)
<ul style="list-style-type: none"> Extrait DCM des tiges de <i>Retama raetam</i> pour analyse LC-DAD-MSⁿ 	EUP + AF 0,1%	MeOH	0 à 50 min : De 50% (B) à 100% (B) 50 à 60 min 100% (B)
<ul style="list-style-type: none"> Extrait DCM des tiges de <i>Retama raetam</i> pour isolement de l'alpinumisoflavone et la Monotésone B 			
<ul style="list-style-type: none"> Produit Rr-6 isolé de l'extrait DCM des tiges de <i>Retama raetam</i> 	EUP	MeOH	0 à 10 min : 50% (B) 10 à 12 min : 65% (B) 12 à 22 min : 65 % (B) 22 à 25 min : 70% (B) 25 à 40 min : 70 % (B)
<ul style="list-style-type: none"> Produit Rr-14 isolé de l'extrait DCM des tiges de <i>Retama raetam</i> 			40 à 43 min : 80% (B) 43 à 50 min : 80% (B) 50 à 53 min : 100% (B) 53 à 60 min : 100% (B)
<ul style="list-style-type: none"> Fraction F₃-CLHP issue de l'extrait DCM des tiges de <i>Retama raetam</i> 			
<ul style="list-style-type: none"> Fraction F₂-Flash issue de l'extrait DCM des tiges de <i>Retama raetam</i> 			
<ul style="list-style-type: none"> Fraction F₃-Flash issue de l'extrait 			

DCM des tiges de
Retama raetam

- Fraction F₄-Flash
issue de l'extrait
DCM des tiges de
Retama raetam
-

- Fraction F₅-Flash
issue isolé de
l'extrait DCM des
tiges de *Retama*
raetam
-

4.4. CLHP-UV-ESI-MSⁿ

Les analyses CLHP-UV-MSⁿ ont été réalisées par Dr. Ingrid Freuze à la faculté des sciences à Angers. Ces analyses ont été conduites sur un système Waters[®] 2795 connecté à un détecteur UV Waters 2487 (Waters) et à un spectromètre de masse Esquire 3000 PLUS composé d'un système d'ionisation électrospray et d'un analyseur de type trappe ionique, et relié au logiciel HyStar (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Les spectres de masse ont été traités par le logiciel *DataAnalysis* (Bruker). Les conditions d'analyse ont été celles optimisées sur la colonne Phenomenex Luna C18 de 250 x 4,6 mm (5 µm). La détection UV a été faite aux longueurs d'onde de 254 et 280 nm Pour tous les échantillons sauf pour l'extrait de tiges de *Retama raetam* qui est détecté à 280 et 210 nm. Le spectromètre de masse a été réglé pour une plage de mesures : m/z 50-1500 Da, avec une cible moyenne de 500 uma. Les analyses ont été enregistrées en modes d'ionisation positif et/ou négatif.

5. Techniques préparatives

5.1. Élimination des tanins sur des cartouches SPE

Les extraits méthanoliques riches en tanins ont été purifiés par extraction en phase solide (SPE) sur cartouche de polyamide Upti-CleanTM P6 1 g/6 mL (Interchim, Montluçon, France). Environ 50 mg d'extrait solubilisé dans du MeOH ont été chargés sur la cartouche, préalablement activée par le MeOH. Les tanins sont retenus par le polyamide. Les produits d'intérêt sont élués par le MeOH à travers les cartouches préremplies et sont récupérés pour être valorisés.

5.2. Chromatographie flash

Les purifications par chromatographie Flash ont été effectuées à l'aide d'un appareil Spot II Armen[®], équipé d'un détecteur UV et d'un collecteur de fractions.

Le fractionnement de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus* a été effectué sur une cartouche Macherey-Nagel[®] Chromabond Flash RS 25 C₁₈ec (26g,

volume de colonne 45 mL, pression maximale 21 bar). 300 mg de l'extrait solubilisé dans un mélange EUP/MeOH (50:50) ont été déposés sur la cartouche. Le débit a été défini à environ 20 mL/min. La méthode d'élution pour cet extrait est résumée dans le [Tableau 16](#).

Tableau 16: Gradient d'élution de l'extrait MeOH des boutons floraux de Crataegus azarolus au cours de la chromatographie flash

Volume de colonne (VC)	Solvant A (%) EUP	Solvant B (%) ACN
0	98	2
2	98	2
10	90	10
15	80	20
25	60	40
29,92	0	100

Le fractionnement de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Crataegus azarolus* a été effectué sur une cartouche Merck® EVF D24 Si60 15-40 µm - 20 g, volume de colonne = 36 mL, pression maximale < 10 bars. 500 mg ont subi un dépôt solide sur la cartouche (500 mg adsorbés sur 2g Silice). Le débit a été de l'ordre de 60 mL/min. La phase mobile est décrite dans le [Tableau 17](#).

Tableau 17: Gradient d'élution de l'extrait DCM des tiges de Crataegus azarolus au cours de la chromatographie flash

Volume de colonne (VC)	Solvant A (%) Cyclohexane	Solvant B (%) DCM	Solvant C (%) MeOH
0	100	0	0
5	100	0	0
5	60	40	0

9,97	60	40	0
9,97	20	80	0
14,91	20	80	0
14,91	0	100	0
19,86	0	100	0
19,88	0	99	1
24,83	0	99	1
24,83	0	98	2
29,79	0	98	2
29,79	0	97	3
34,74	0	97	3
34,76	0	96	4
39,71	0	96	4
39,72	0	95	5
44,69	0	95	5
45,69	100	0	0

Le fractionnement de l'extrait chlorométhylénique des tiges de *Retama raetam* a été effectué avec une cartouche Macherey-Nagel® Chromabond Flash RS 40 SiOH, 40–63 µm, 40 g (pression maximale =21 bars). 1 g d'extrait ont subi un dépôt solide sur la cartouche (1g adsorbé sur 3g de Silice). Le débit a été de l'ordre de 60 mL/min. Le gradient de la phase mobile est résumé dans le [Tableau 18](#).

Tableau 18: Gradient d'élution de l'extrait DCM des tiges de *Retama raetam* au cours de la chromatographie flash

Volume de colonne (VC)	Solvant A (%) DCM	Solvant B (%) MeOH	Solvant C (%) Cyclohexane
0	0	0	100
1	0	0	100
1,02	80	0	20
5,98	80	0	20
5,98	100	0	0
10,95	100	0	0
10,95	99	1	0
15,88	99	1	0
15,88	98	2	0
20,84	98	2	0
20,84	96	4	0
25,74	96	4	0
25,74	90	10	0
30,66	90	10	0

5.3. Chromatographie liquide haute performance préparative

L'appareil utilisé est une chaîne PLC 2020 (Gilson®) équipée d'une boucle d'injection de 500 µL, de deux pompes de 50mL/min et d'un détecteur UV – Visible. La phase stationnaire utilisée est une colonne apolaire type C18, (Kinetex® EVO C18, 100 Å, H15081422), de dimensions 250 x 21.2 mm. L'échantillon à analyser est solubilisé dans le MeOH de façon à obtenir une solution à 50 mg/mL puis filtrée sur filtre Millipore® nylon de 0,2 µm. Le débit est

fixé à 20 mL/min et la pression maximale à 200 bars. Les phases mobiles utilisées pour la purification des produits sont celles optimisées sur la CLHP analytique [Tableau 15](#).

6. Évaluation de l'activité inhibitrice de l'arginase

6.1. Sur microplaque 96 puits

L'évaluation biologique des extraits a été réalisée grâce à un test enzymatique *in vitro*, développé dans l'EA 4267 et utilisant l'arginase hépatique bovine purifiée. Ce test est issu de l'optimisation, de la miniaturisation (plaques 96 puits) et de l'automatisation partielle (robot de pipetage microlab NIMBUS Hamilton®) du test publié par Corraliza et ses collaborateurs [157]. Le principe de la technique a été détaillé dans la Partie II-chapitre 1-section 2).

Les solutions à préparer pour le test de dosage de l'activité de l'arginase sont les suivantes :

- ✓ Tris-HCl (50mM), pH 7,5 : Trizma base (Sigma T-1503) dans l'eau ultra pure (EUP).
- ✓ Tris-HCl-BSA (0,1% m/v), pH 7,5 : Tris-HCl (50 mM) pH 7.5 + BSA.
- ✓ Acide d'arrêt de la réaction : H₂SO₄ : H₃PO₄ : EUP (1:3:7).
- ✓ L-arginine 0,05 M, pH 9,7 : - Chlorhydrate de L-arginine (Sigma A-5131)
-EUP
-NaOH 10 N qsp pH 9,7.
- ✓ Solution arginase (0,025U/μL) : solution mère d'arginase bovine MP Biomédicals dans le Tris-HCl-BSA(0,1%).
- ✓ Tris-HCl-MnCl₂ (1,26 mg/mL) : MnCl₂ (Aldrich 203734) dans TrisHCl (50mM).
- ✓ Solution α-isonitrosopropiophénone (5%) : α-isonitrosopropiophénone (Sigma I-3502) dans EtOH absolu.

- ✓ Échantillon à tester : pour les tests de criblage et de détermination des CI_{50} , des solutions sont préparées à 0,7 mg/mL et 7 mg/mL respectivement (dans EUP et/ou DMSO). Le robot de pipetage microlab NIMBUS Hamilton® prépare des dilutions au $1/10^{\text{ème}}$, à partir des solutions mères, pour réaliser le criblage à deux concentration différentes (concentration finale dans les puits = 100 $\mu\text{g/mL}$ et 10 $\mu\text{g/mL}$ pour un criblage) et effectuera les dilutions pour les tests des CI_{50} comme décrit ci-dessous (Figure 98).

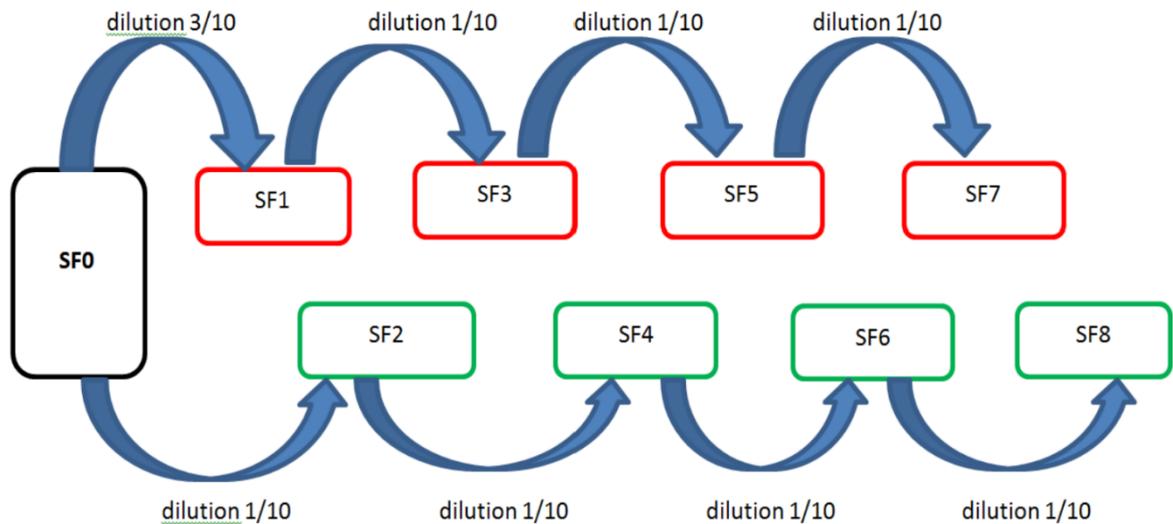


Figure 98: Dilutions en séries de la substance à tester pour la détermination de la CI_{50}

Durant la manipulation, le robot de pipetage microlab NIMBUS Hamilton® est programmé afin d'effectuer les étapes suivantes :

1. Mettre 70 μL EUP dans les puits au bord de la microplaque.
2. Mettre 10 μL de la solution de Tris-HCl-BSA dans les puits correspondants tel qu'indiqué dans le plan de plaque pour le criblage ou la détermination de l' CI_{50} (Figure 99 ; Figure 100).
3. Mettre 10 μL de la solution d'arginase dans les puits correspondants.
4. Ajouter, dans tous les puits, sauf ceux des bords, 30 μL de la solution de Tris-HClMnCl₂ (activateur de l'enzyme).
5. Ajouter 10 μL , soit de l'EUP (puits arginase 100%), soit du solvant (dans lequel a été solubilisé l'échantillon), soit de l'échantillon à tester, soit de l'inhibiteur de référence.
6. Ajouter 20 μL de la solution de L-arginine, dans tous les puits, sauf ceux des bords.
7. Appliquer un film en plastique sur la microplaque et l'incuber pendant une heure au bain marie à 37°C (étape réalisée par le manipulateur).

8. Sortir la microplaque du bain marie, la mettre sur le bac à glace dans le robot (étape réalisée par le manipulateur).
9. Ajouter dans tous les puits 120 μ L de solution d'acide d'arrêt de la réaction.
10. Ajouter, 10 μ L de solution d' α -isonitrosopropiophénone (indicateur coloré) dans tous les puits.

Le manipulateur réalise ensuite les étapes suivantes :

11. Appliquer un film en aluminium et incuber la microplaque pendant 45 min dans l'étuve à 100°C.
12. Sortir la microplaque de l'étuve, la centrifuger pendant 5 min à 25°C et la laisser reposer à l'obscurité pendant 10 min.
13. Lire la microplaque à l'aide du spectrophotomètre UV-visible à 550 nm toujours à l'obscurité.
14. Exploitation des résultats pour évaluer l'effet de l'échantillon à tester sur l'arginase. Le calcul du pourcentage d'inhibition d'arginase de chaque extrait ou composé est réalisé à l'aide du logiciel de calcul Microsoft® Excel (pour le criblage) ou le logiciel GraphPad® (version 5.0.3) pour le calcul de la CI₅₀.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	A
B	70 SFU	10 AR	70 SFU	B									
		10 SC	10 I1	10 I2	10 I3	10 I4	10 I5	10 I6	10 I7	10 I8	10 I9		
C	70 SFU	10 AR	70 SFU	C									
		10 SC	10 I1	10 I2	10 I3	10 I4	10 I5	10 I6	10 I7	10 I8	10 I9		
D	70 SFU	10 TBSA	70 SFU	D									
		10 SC	10 I1	10 I2	10 I3	10 I4	10 I5	10 I6	10 I7	10 I8	10 I9		
E	70 SFU	10 AR	70 SFU	E									
		10 T+	10 I1'	10 I2'	10 I3'	10 I4'	10 I5'	10 I6'	10 I7'	10 I8'	10 I9'		
F	70 SFU	10 AR	70 SFU	F									
		10 T+	10 I1'	10 I2'	10 I3'	10 I4'	10 I5'	10 I6'	10 I7'	10 I8'	10 I9'		
G	70 SFU	10 TBSA	70 SFU	G									
		10 T+	10 I1'	10 I2'	10 I3'	10 I4'	10 I5'	10 I6'	10 I7'	10 I8'	10 I9'		
H	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figure 99: Plan de plaque utilisé pour le test de criblage

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	A
B	70 SFU	10 AR 10 EUP	10 AR 10 EUP	10 AR 10 EUP	10 TBSA 10 EUP	10 TBSA 10 EUP	10 AR 10 T+	10 AR 10 T+	10 AR 10 T+	10 TBSA 10 T+	10 TBSA 10 T+	70 SFU	B
C	70 SFU	10 AR 10 SC	10 AR 10 SF8	10 AR 10 SF7	10 AR 10 SF6	10 AR 10 SF5	10 AR 10 SF4	10 AR 10 SF3	10 AR 10 SF2	10 AR 10 SF1	10 AR 10 SF0	70 SFU	C
D	70 SFU	10 AR 10 SC	10 AR 10 SF8	10 AR 10 SF7	10 AR 10 SF6	10 AR 10 SF5	10 AR 10 SF4	10 AR 10 SF3	10 AR 10 SF2	10 AR 10 SF1	10 AR 10 SF0	70 SFU	D
E	70 SFU	10 AR 10 SC	10 AR 10 SF8	10 AR 10 SF7	10 AR 10 SF6	10 AR 10 SF5	10 AR 10 SF4	10 AR 10 SF3	10 AR 10 SF2	10 AR 10 SF1	10 AR 10 SF0	70 SFU	E
F	70 SFU	10 TBSA 10 SC	10 TBSA 10 SF8	10 TBSA 10 SF7	10 TBSA 10 SF6	10 TBSA 10 SF5	10 TBSA 10 SF4	10 TBSA 10 SF3	10 TBSA 10 SF2	10 TBSA 10 SF1	10 TBSA 10 SF0	70 SFU	F
G	70 SFU	10 TBSA 10 SC	10 TBSA 10 SF8	10 TBSA 10 SF7	10 TBSA 10 SF6	10 TBSA 10 SF5	10 TBSA 10 SF4	10 TBSA 10 SF3	10 TBSA 10 SF2	10 TBSA 10 SF1	10 TBSA 10 SF0	70 SFU	G
H	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	70 SFU	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figure 100: Plan de plaque utilisé pour la détermination de la CI_{50}

6.2. Sur plaque CCM

6.2.1. Description de la technique

Cette technique a été réalisée à l'aide d'un équipement fourni par Camag® (MuttENZ, Suisse). 10 µL de chaque échantillon sont déposés sous forme de bande de 6 mm grâce à un flux de diazote sur une plaque CCM (gel de silice 60 F254 de 10 x 20 cm) avec le déposeur ATS 4 automatique pour CCM. La plaque est séchée après la migration des composés avec la phase mobile adéquate en utilisant la chambre de migration ADC 2. Les éléments ATS 4 et ADC 2 sont contrôlés par le logiciel VisionCATS® version 2.4. Une photographie des plaques a été réalisée sous lumière UV à 254 et 365 nm et sous lumière blanche.

Après évaporation complète des solvants, une solution d'arginase à 50 U dans 3 mL de tampon contenant du Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) et 0,1% de BSA est pulvérisée sur la plaque à l'aide du CAMAG derivatizer (buse jaune/vitesse 6). 3mL d'une solution de L-arginine (200 mM, pH 9,7) sont ensuite pulvérisés à l'aide du même dispositif (buse bleu/vitesse 4). La plaque est ensuite déposée horizontalement sur une grille dans un bain marie (Memmert WNB 22L,

Büchenbach, Allemagne) à 37°C pendant 1h. Après la fin de cette incubation, la plaque est séchée pendant 5 min à l'air libre et ensuite pulvérisée successivement par 3mL d'une solution aqueuse de H₂SO₄/H₃PO₄/EUP (2:7:91) et 2 mL d'une solution α -isonitrosopropiophénone à 5% dans l'alcool absolue (en utilisant la buse rouge/vitesse 6 et la buse bleu/vitesse 4, respectivement). La révélation de l'urée produite pendant la réaction enzymatique s'effectue par exposition de la plaque dans une étuve à 100 °C pendant 1h.

6.2.2. Limite de détection de l'urée

La limite de détection (LOD) de l'urée a été déterminée par pulvérisation de 3 mL de chaque solution sur une surface de 28 cm² d'une plaque de CCM (gel de silice 60 F254 de 10 x 20 cm) à l'aide du Camag[®] Derivatizer (buse bleu/vitesse 4). Les solutions déposées sont obtenues par dilution de la poudre d'urée dans l'eau ultrapure pour obtenir des concentrations entre 1 et 100 mM.

6.2.3. Limite de détection de la N^o-hydroxy-nor-arginine (nor-NOHA)

Pour évaluer la LOD de l'inhibiteur de référence de l'arginase, la nor-NOHA, des quantités décroissantes de cette molécule (1,5 ; 1 ; 0,5 ; 0,2 ; 0,1 et 0,05 μ g) ont été déposées sur une plaque CCM. La technique de bioautographie a été ensuite appliquée.

6.2.4. Analyse bioautographique de substances naturelles

Trois quantités décroissantes (20, 10 et 2 μ g) de chaque composé pur (picéatannol, acide chlorogénique et catéchol) ont été déposées sur la plaque CCM à partir de solutions méthanoliques à 20, 10 et 2 mg/mL respectivement.

L'analyse de l'extrait méthanolique du fruit de *Myrtus communis* (*Mc*) a été réalisée après dépôt de 10 μ L d'une solution d'extrait à 20 mg/mL (200 μ g) sur une plaque de 10 x 20 cm. Pour les expériences de sélectivité, 10 μ L d'une solution de nor-NOHA, inhibiteur de référence, (déposé à 55 mm du bas de la plaque) ont été co-déposés avec d'extrait (*Mc*) (déposé à 25 mm du bas de la plaque). Une gamme de quantité en nor-NOHA (1 ; 0,5 ; 0,2 ; 0,1 μ g) a été testée.

L'analyse des tourteaux de chanvre a aussi été effectuée sur une plaque CCM 20 x 10 cm après dépôt de 10 µL d'extrait méthanolique à 20 mg/mL.

L'analyse du composé pur *N-trans*-cafféoyltyramine, isolé des tourteaux de chanvre, a été réalisée en préparant quatre dilutions en série à partir d'une solution méthanolique à 8 mg/mL de *N-trans*-cafféoyltyramine. 10 µL de chaque solution diluée a été déposés, donnant des quantités décroissantes (80, 60, 40 et 20 µg) sur les plaques CCM.

Les phases mobiles utilisées pour la séparation des composés des différents échantillons naturels sont données dans le [Tableau 14](#). Chaque analyse a été réalisée en triplicat.

6.2.5. Détermination de faux-positifs

Les éventuelles interférences des échantillons avec les réactifs utilisés ou avec le produit de la réaction enzymatique (l'urée) ont été explorées afin d'éviter l'obtention de faux positifs et de confirmer l'inhibition sélective de l'arginase. La réalisation de ce contrôle s'effectue sur une plaque CCM sur laquelle 3mL d'une solution d'urée à 10 mM dans l'EUP ont été pulvérisés à la place de l'arginase (en utilisant la buse bleu/vitesse 4). Les plaques avec ou sans arginase sont traitées de façon identique. La révélation de la plaque fera apparaître un fond rose et la présence d'une tache blanche indiquera par conséquent un faux positif.

6.2.6. Analyse d'image

Les images des plaques bioautographiques ont été converties du format couleur CMYK en niveau de gris puis transformées en mode négatif. La densité en niveau de gris de chaque spot a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ[®] (National Institute of Health). Les bandes ont été définies manuellement puis elles ont été intégrés automatiquement. La représentation graphique des zones d'inhibition en fonction des différentes concentrations en nor-NOHA a été réalisée grâce au tableur Microsoft[®] Excel afin de déterminer le coefficient de corrélation linéaire entre ces deux variables.

7. Analyse statistique des données

Toutes les mesures ont été effectuées en triplicat et les résultats pour chaque paramètre mesuré ont été exprimés en la moyenne \pm erreur standard. Les variations des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et activité inhibitrice de l'arginase entre les cinq extraits les plus actifs ont été déterminés par la procédure d'analyse de la variance (ANOVA) ($p < 0,05$),

suivie par le test de plage multiple de Duncan utilisant le programme SAS[®] version 9. Les corrélations entre la teneur en phénols totaux ou en flavonoïdes et l'activité inhibitrice de l'arginase ont été déterminées avec la Procédure PROC CORR utilisant le logiciel analytique SAS[®] version 9.

8. Techniques spectroscopiques

8.1. Spectrométrie de masse haute résolution

Les analyses de spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées à l'Université de Strasbourg (Plateforme PACSI) à l'aide d'un appareil LC-MS (LC : Agilent 1200 / source : ESI / Analyseur : Q-ToF en tandem, Agilent Accurate Mass QToF 6520).

8.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) mono- et bi-dimensionnelle des composés purs sont réalisés à l'UFR ST de l'Université de Franche-Comté sur un spectromètre Brüker 400 MHz équipé d'une sonde TXI. Les composés sont solubilisés dans le solvant deutéré adapté à leur solubilité (les produits purifiés ont été solubilisés dans le DMSO deutéré, les extraits bruts ainsi que leurs fractions ont été solubilisés dans le MeOH deutéré).

Les spectres de RMN-¹³C, DEPT 135 et DEPT 90 des mélanges complexes (extraits bruts et fractions des plantes) ont été réalisés au sein de l'EA 921 (SONAS, université d'Angers). Les extraits ou fractions (12 à 40 mg) ont été dissous dans 600 µL du solvant deutéré adéquat. Les spectres, enregistrés à 100 MHz, ont été obtenus grâce à un spectromètre JEOL 400MHz YH (JEOL Europe, Croissy-sur-Seine, France). Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en partie par million (ppm) et les constantes de couplage (J) en Hertz (Hz).

Les spectres des différents échantillons ont été traités à l'aide du logiciel *NMRnotebook* ou bien *MestReNova*. Pour l'analyse déréplicative par RMN, la liste des pics et les données d'intensité obtenues à partir de chaque spectre ont été exportées sous forme de fichier .csv à l'aide du logiciel Microsoft[®] Excel et utilisées comme fichier d'entrée dans le logiciel *MixONat*.

9. Données spectrales des composés isolés

9.1. Hyperoside (composé bCa-28)

Solide jaunâtre

$C_{21}H_{20}O_{12}$

464 g/mol

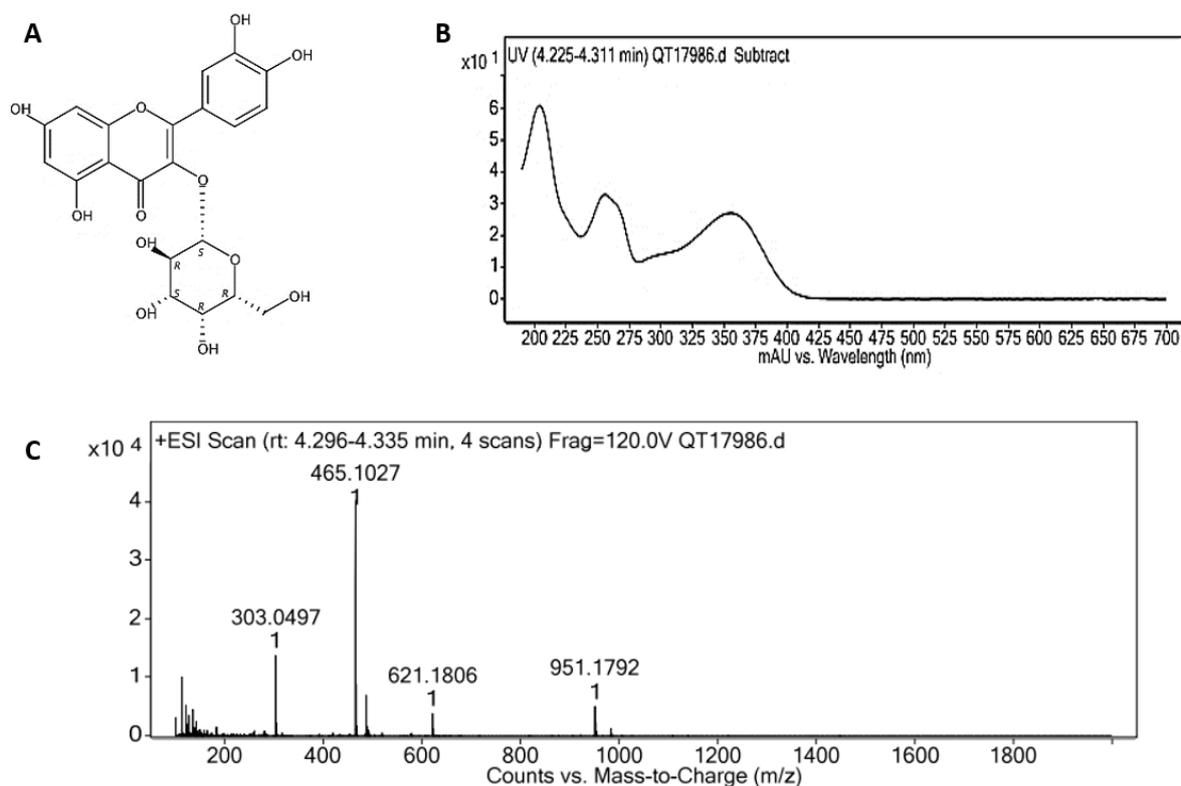


Figure 101: Structure (A), spectre UV (MeOH) (B) et spectre HRMS-ESI (C) du Composé bCa-28

Tableau 19: RMN- 1H (400,13 MHz), RMN- ^{13}C (100,6 MHz) et RMN-2D du Composé bCa-28 (DMSO- D_6 , δ ppm, J(Hz))

Position	^{13}C	1H	HMBC
2	156, 37		
3	133, 72		
4	177, 96		
4a	103, 78		

5-OH	161,56		
6	99,30	6,15 s (1H)	103,78 ; 165,78; 93,81
7-OH	165,78		
8	93,81	6,37 s (1H)	103,78
8a	156,78		
1'	121,14		
2'	116,21	7,55 d (J=2,4)	156,78;145,52;149,2 9;
3'-OH	145,52		
4'-OH	149,29		
5'	115,55	6,80 d (J=8,4)	149,29 ; 145,52 ; 121,14
6'	122,07	7,64 dd (J=8,4; 2,4)	149,29 ; 116,21
1''	102,16	5,37 d (1H ; J=7,6)	133,72
2''	71,68	3,66-3,14 (6H, m, H-2''-6'')	
3''	73,43		
4''	68,17		
5''	76,21		
6''	60,46		

9.2. 8-méthoxykaempférol-3-O-β-glucopyranoside (composé bCa-35)

Solide marron

C₂₂ H₂₂ O₁₂

478 g/mol

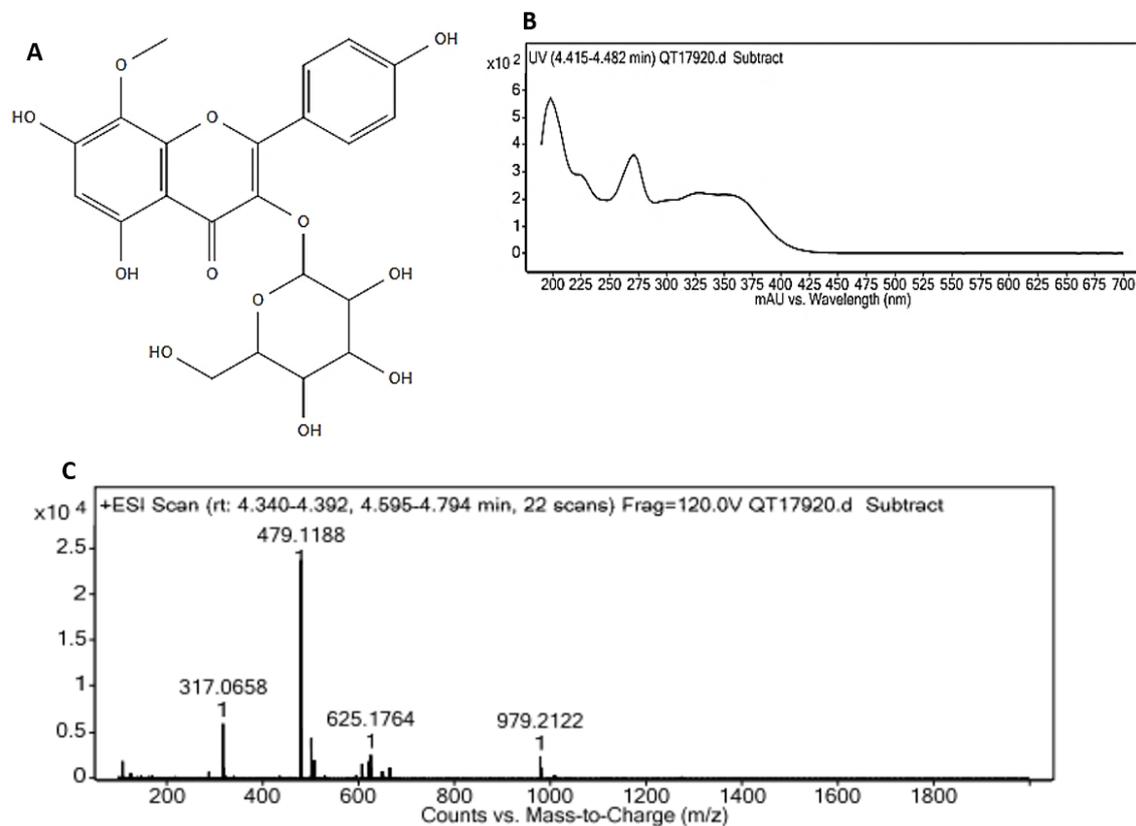


Figure 102: Structure (A), spectre UV (MeOH) (B) et spectre HRMS-ESI (C) du Composé bCa-35

Tableau 20: RMN-¹H (400,13 MHz), RMN-¹³C (100,6 MHz) et RMN-2D du Composé bCa-35 (DMSO-D₆, δ ppm, J(Hz))

Position	¹³ C	¹ H	HMBC	COSY
2	155,93			
3	133,137			
4	177,49			
4a	103,48			
5-OH	155,91	12,29 s (1H)		

6	99,13	6,26 s (1H)	155,91 ; 103,48 ; 157,71 ; 127,60	
7-OH	157,71			
8	127,60			
8a	148,58			
OMe	60,89		127,6	
1'	121,04			
2'	130,73	8,06 d (2H)	155,91 ; 130,73 ; 115,22 ; 160,02	6,91
3'	115,21	6,91d (2H)	121,04 ; 130,73 ; 160,02	
4'-OH	160,02			
5'	115,22	6,91d (2H)	121,04 ; 130,73 ; 160,02	
6'	130,73	8,06 d (2H)	155,91 ; 130,73 ; 115,22 ; 160,02	
1''	100,98	5,46 d (1H ; J=7,2)	133,137 ; 74,22 ; 77,52	
2''	74,22	3,57 dd (1H, J=1,6)		
3''	76,43			
4''	69,88			
5''	77,52			
6''	60,84			

9.3. 8-méthoxykaempférol-3-O-(6''-acétyl-β-glucoyranoside) (Composé bCa-40)

Cristal jaunâtre

C₂₄H₂₄O₁₃

520 g/mol

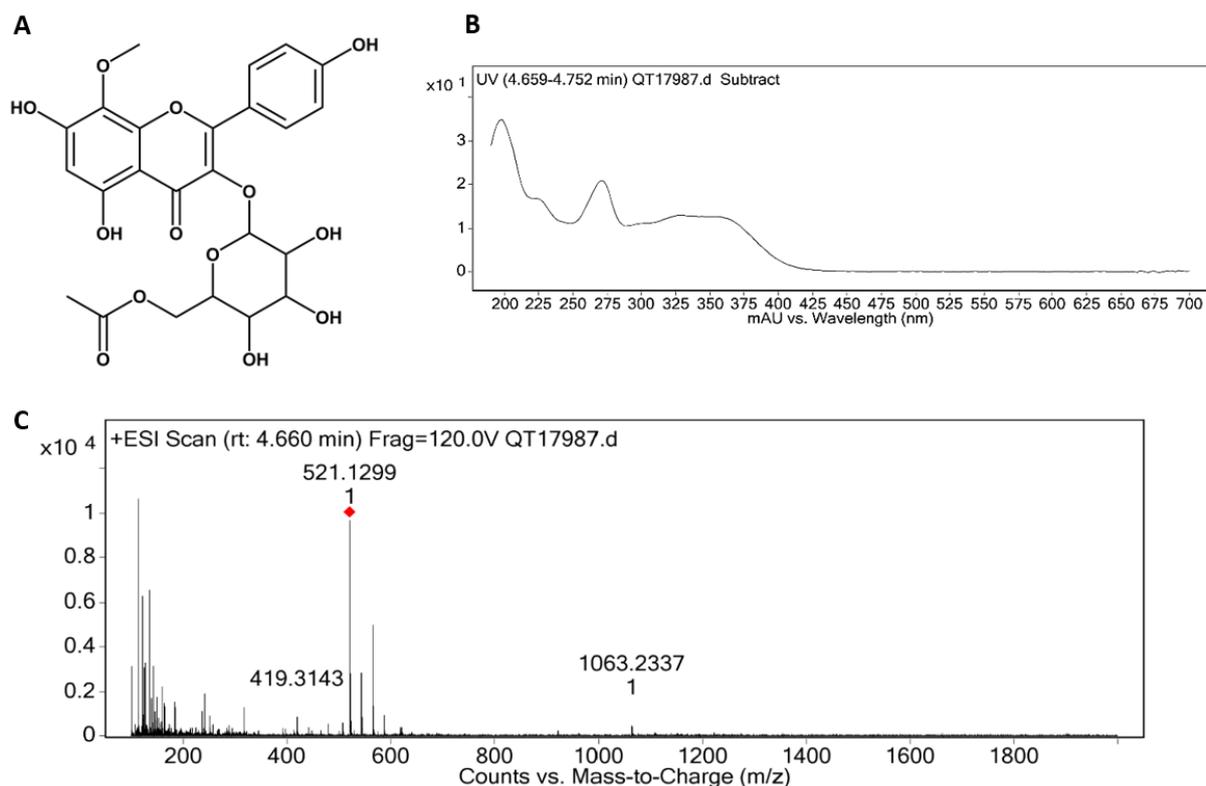


Figure 103: Structure (A), spectre UV (MeOH) (B) et spectre HRMS-ESI (C) du Composé bCa-40

Tableau 21: RMN-¹H (400,13 MHz), RMN-¹³C (100,6 MHz) et RMN-2D du Composé bCa-40 (DMSO-D₆, δ ppm, J(Hz))

Position	¹³ C	¹ H	HMBC	COSY
2	155,9			
3	133,3			
4	177,4			
4a	103,4			

5-OH	156	12,24 s (1H)		
6	99,2	6,29 s (1H)	156 ; 103,4 ; 177,4 ; 157,7 ; 127,6 ; 148,6	
7-OH	157,7	8,66 s (1H)		
8	127,6			
8a	148,6			
OMe	60,9	3,8 s (3H)	127,6	
1'	120,9			
2'	130,7	8,0 d (2H ; J=8,8)	130,7 ; 160,11	6,9
3'	115,3	6,9 d (2H ; J=8,8)	120,9 ; 115,3	
4'-OH	160,1	8,25 s (1H)		
5'	115,3	6,9 d (2H ; J=8,8)	120,9 ; 160,11	
6'	130,7	8,0 d (2H ; J=8,8)	155,91	
1''	101,2	5,25 d (1H ; J=7,2)	133,137; 74,22 ; 77,52	3,21 m
2''	74,1	3,29 m		
3''	76,1	3,21 m		
4''	69,5	3,12 m		
5''	77,6	3,08 m		
6''	63,1	4,0 dd (J= 5,6 ; 12)		3,29 m
		3,99 dd ((J= 2 ; 12)		3,29 m
CH ₃ CO	169,8 ; 20,1	1,74 s (1H)	169,8	

9.4. Tricoumaroylspermidine (Composé bCa-48)

Solide marron odorant

$C_{34}H_{37}N_3O_6$

583 g/mol

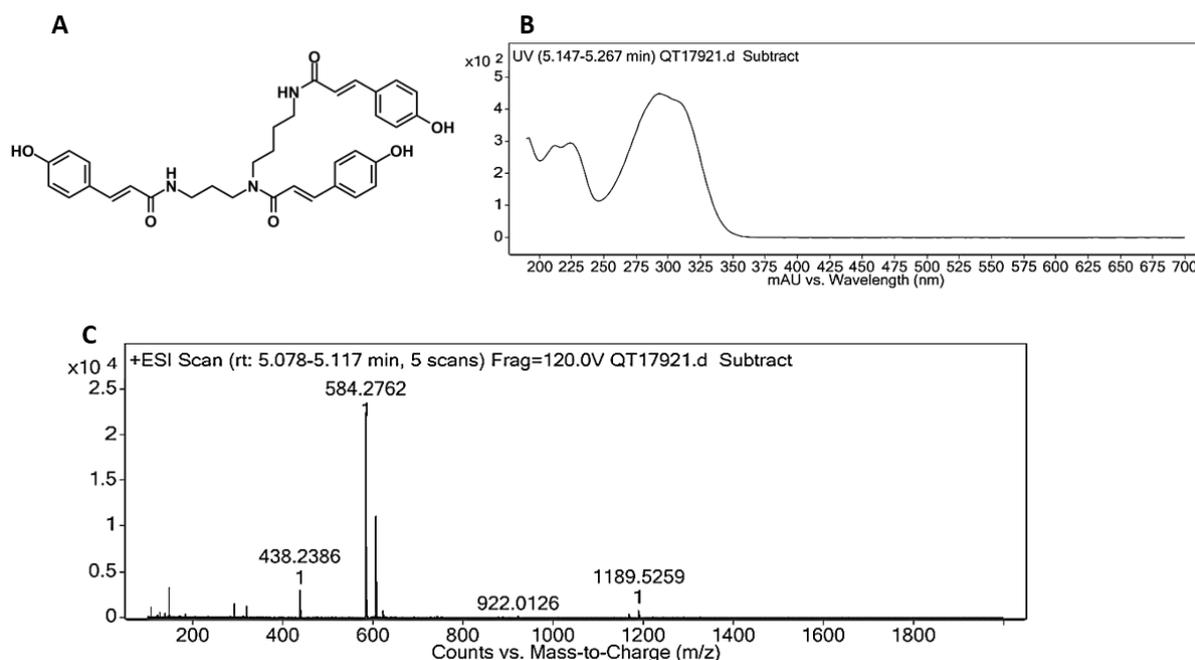


Figure 104: Structure (A), spectre UV (MeOH) (B) et spectre HRMS-ESI (C) du Composé bCa-48

Le Composé bCa-48 a été extrait en mélange avec plusieurs isomères ainsi l'interprétation des spectres 2D (HMBC et HSQC) était complexe ainsi nous fournissons ici uniquement les données RMN 1D (1H et ^{13}C) de ce composé.

RMN- 1H (400.13 MHz, DMSO-d₆):

Systèmes p-coumaroyle : δ 9,83 (s, 4-OH, 4'-OH, 4''-OH), δ 7,28–7,55 (m, H-2, H-2', H-2'', H-6, H-6', H-6'', H-7, H-7' et H-7''), 6,89 (m, H-8''), 6,76–6,79 (m, H-3, H-3', H-3'', H-5, H-5' et H-5''), 6,37–6,43 (m, H-8 et H-8'). Système de spermidine: δ 7,91–8,12 (m, NH-1 NH-5 et NH-10), 3,13–3,22 (m, H2-2, H2-4, H2-6, H2-9), 1,45–1,80 (m, H2 -3, H2-7, H2-8).

RMN ^{13}C (100.6 MHz, DMSO-d₆):

Systèmes p-coumaroyle : 165,28/165,34/165,38 (C9), 158,76/158,81/158,93 (C4), 141,49 (C7), 129,15 (C2 et C6), 125,84/125,89/125,93 (C1), 115,70 (C8), 114,70/115,16/115,57 (C3 et C5).

Système de spermidine: 47,62 (C4), 48,6 (C6), 27,55 (C7), 42,53 (C9).

9.5. Alpinumisoflavone (composé Rr-9)

Solide jaune pâle

$C_{20}H_{16}O_5$

$336 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

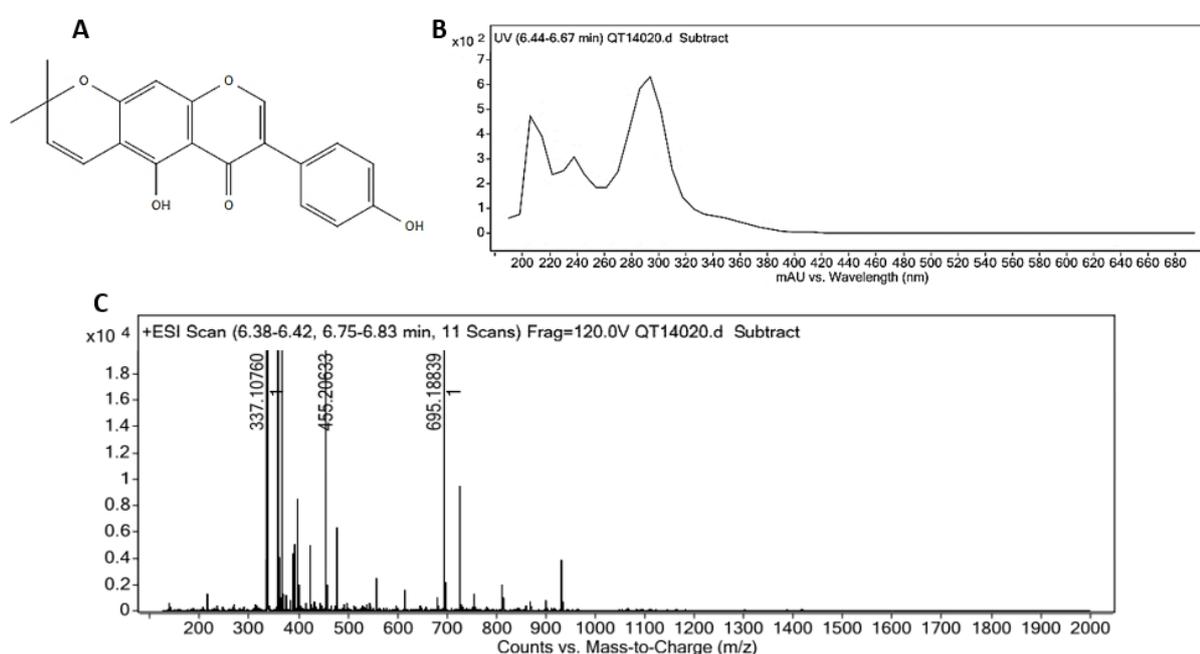


Figure 105: Structure (A), spectre UV (MeOH) (B) et spectre HRMS-ESI (C) du Composé Rr-9

Tableau 22 : RMN- 1H (400,13 MHz), RMN- ^{13}C (100,6 MHz) et RMN-2D du Composé Rr-9 (DMSO- D_6 , δ ppm, J(Hz))

Position	^{13}C	1H	HMBC	COSY
2	154,32	8,37 s (1H)	121,01 ; 122,44 ; 157,51 ; 180,51	
3	122,44			
4	180,51			
4a	104,76			

5-OH	156,72	13,37 s (1H)	105,43 ; 104,76 ; 156,72	
6	105,43			
7	158,80			
8	94,70	6,50 s (1H)	105,43 ; 104,76 ; 157,51; 156,72; 158,80	
8a	157,51			
1'	121,01			
2'	130,20	7,38 s (2H)	122,44 ; 130,20	6,82
3'	115,10	6,82 s (2H)	121,01	7,38
4'-OH	156,01	9,61 s (1H)		
5'	115,10	6,82 s (2H)		
6'	130, 20	7,38 s (2H)		
2''	78,12			
3''	129,13	5,81 d (1H; J = 10,0)	78,12 ; 105,43; 104,76	6,62
4''	114,53	6,62 d (1H, J = 10,0)	78,12 ; 158,80	5,81
5''/6''	27,89	1,43 s (6H)	78,12 ; 129,13	

9.6. Monotésone B (composé Rr-13)

ou (5,7,3',5'-Tetrahydroxy-6,8-diprénylflavanone)

- poudre de couleur jaune vert, hygroscopique

- C₂₅H₂₈O₆

- 424 g.mol⁻¹

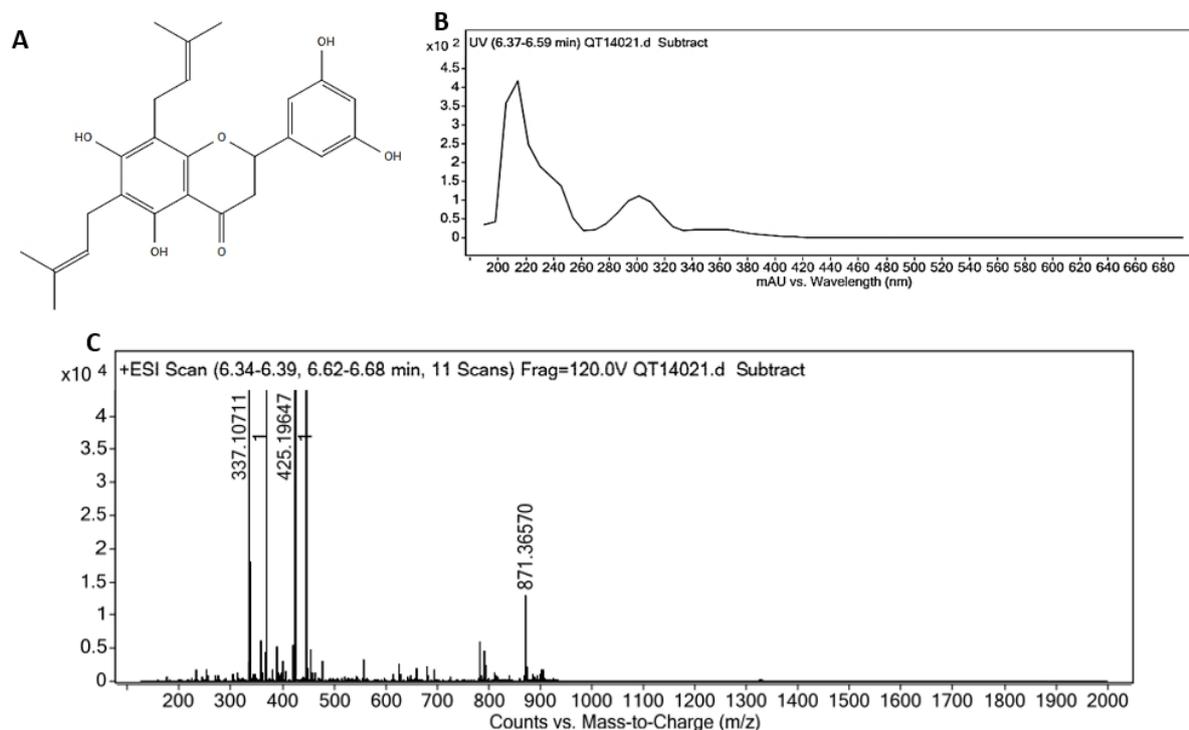


Figure 106: Structure (A), spectre UV (MeOH) (B) et spectre HRMS-ESI (C) du Composé Rr-13

Tableau 23: RMN-¹H (400,6 MHz), RMN-¹³C (100,13 MHz) et RMN-2D du Composé tRr-13 (DMSO-D₆, δ ppm, J(Hz))

Position	¹³ C	¹ H	HMBC	COSY
2	78,15	5,30 dd (1H ; J=12 ;3,2)	129,86	3,09 ; 2,70
3	42,10	3,09 dd (1H, J=12 ;17,2)	78,15 ; 129,86 ; 196,99	
		2,70 br dd (1H, J=3,2)	196,99	
4	196,99			

4a	101,904			
5-OH	158,47	12,42 s (1H)	101,904; 107,84	
6	107,84			
7-OH	161,60			
8	107,19			
8a	157,52			
1'	129,86			
2'	115,25i	6,73 s (2H)	78,15 ; 129,86 ; 145,48 ; 145,15 ; 114,20	
3'-OH	145,48i	8,01 i s (1H)		
4'	114,20	6,86 s (1H)	115,25 ; 117,62 ; 145,48 ; 145,15 ;	
5'-OH	145,15i	9,10 i s (1H)		
6'	117,62i	6,73 s (2H)	78,15 ; 129,86 ; 145,48 ; 145,15 ; 114,20	
1''	20,90	3,19 br d (2H ; J=8,8)	161,60 ; 158,47	5,38 - 1,70-1,61
2''	122,76	5,06 br t (1H, J=1,6)	17,73	1,61- 1,70- 3,19
3''	130,35			
4''	17,73	1,70 s (3H)		3,19 - 5,06
5''	25,50	1,61 s (3H)	122,76 ; 130,35	3,19 - 5,11
1'''	21,57	3,16 br d (2H ; J=4,4)	107,19 ; 161,60 ; 107,84 ; 122,76 ; 130,27	5,11 ; 1,55 ; 1,59
2'''	122,76	5,08 br t (1H, J=1,6)		1,55 ; 1,59 ; 3,16
3'''	130,27			
4'''	17,65	1,56 s (3H)		3,16 ; 5,11
5'''	25,53	1,59 s (3H)	17,65 ; 122,76 ; 130,27	3,16 ; 5,11

Bibliographie

- [1] Cardiovascular diseases (CVDs), World Health Organization, 2017
- [2] Cancer, World Health Organization, 2018
- [3] Caldwell R.W., Rodriguez P.C., Toque H.A., Narayanan S.P., Caldwell R.B., Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease, *Physiol. Rev.*, 2018, 98, 641–665
- [4] Leishmaniasis, World Health Organization, 2020
- [5] Pudlo M., Demougeot C., Girard-Thernier C., Arginase inhibitors: a rational approach over one century, *Med. Res. Rev.*, 2017, 37, 475–513
- [6] Papadopoulos K.P., Tsai F.Y.-C., Bauer T.M., Muigai L., Liang Y., Bennett M.K., *et al.*, CX-1158-101: A first-in-human phase 1 study of CB-1158, a small molecule inhibitor of arginase, as monotherapy and in combination with an anti-PD-1 checkpoint inhibitor in patients with solid tumors., *J. Clin. Oncol.*, 2017, 35, 3005–3005
- [7] Newman D.J., Cragg G.M., Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019, *J. Nat. Prod.*, 2020, 83, 770–803
- [8] Amaral R.G., Dos Santos S.A., Andrade L.N., Severino P., Carvalho A.A., Natural products as treatment against cancer: a historical and current vision, *Clinics Oncol.*, 2019, 4, 1562
- [9] Minozzo B.R., Fernandes D., Beltrame F.L., Phenolic compounds as Arginase inhibitors: new insights regarding endothelial dysfunction treatment, *Planta Med.*, 2018, 84, 277–295
- [10] Pham T.-N., Bordage S., Pudlo M., Demougeot C., Thai K.-M., Girard-Thernier C., Cinnamide derivatives as mammalian Arginase inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular docking, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17, 1656
- [11] Kossel A., Dakin H.D., Über die Arginase., *Biological Chemistry*, 1904, 42, 321–331
- [12] Pandey D., Bhunia A., Oh Y.J., Chang F., Bergman Y., Kim J.H., *et al.*, OxLDL triggers retrograde translocation of arginase2 in aortic endothelial cells via ROCK and mitochondrial processing peptidase, *Circ. Res.*, 2014, 115, 450–459
- [13] Ryoo S., Bhunia A., Chang F., Shoukas A., Berkowitz D.E., Romer L.H., OxLDL-dependent activation of Arginase II is dependent on the LOX-1 receptor and downstream RhoA signaling, *Atherosclerosis*, 2011, 214, 279–287
- [14] Santhanam L., Kyo Lim H., Kyoung Lim H., Miriel V., Brown T., Patel M., *et al.*, Inducible NO synthase-dependent S-nitrosylation and activation of Arginase I contribute to age-related endothelial dysfunction, *Circ. Res.*, 2007, 101, 692–702
- [15] Dowling D.P., Costanzo L.D., Gennadios H.A., Christianson D.W., Evolution of the arginase fold and functional diversity, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, 65, 2039–2055
- [16] Kanyo Z.F., Scolnick L.R., Ash D.E., Christianson D.W., Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase, *Nature*, 1996, 383, 554–557
- [17] Di Costanzo L., Sabio G., Mora A., Rodriguez P.C., Ochoa A.C., Centeno F., *et al.*, Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, 102, 13058–13063
- [18] Uribe E., Reyes M.-B., Martínez I., Mella K., Salas M., Tarifeño-Saldivia E., *et al.*, Functional analysis of the Mn²⁺ requirement in the catalysis of ureohydrolases arginase and agmatinase - a historical perspective, *J. Inorg. Biochem.*, 2020, 202, 110812
- [19] Zhang X., Zhang J., Zhang R., Guo Y., Wu C., Mao X., *et al.*, Structural, enzymatic and biochemical studies on *Helicobacter pylori* arginase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2013, 45, 995–1002

- [20] Da Silva E.R., Maquiaveli C.C., Magalhães P.P., The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase, *Exp. Parasitol.*, 2012, 130, 183–188
- [21] D'Antonio E.L., Ullman B., Roberts S.C., Dixit U.G., Wilson M.E., Hai Y., *et al.*, Crystal structure of arginase from *Leishmania mexicana* and implications for the inhibition of polyamine biosynthesis in parasitic infections, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2013, 535, 163–176
- [22] Hai Y., Edwards J.E., Van Zandt M.C., Hoffmann K.F., Christianson D.W., Crystal structure of *Schistosoma mansoni* Arginase, a potential drug target for the treatment of schistosomiasis, *Biochemistry*, 2014, 53, 4671–4684
- [23] Cama E., Colleluori D.M., Emig F.A., Shin H., Kim S.W., Kim N.N., *et al.*, Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal, *Biochemistry*, 2003, 42, 8445–8451
- [24] Hirsch-Kolb H., Kolb H.J., Greenberg D.M., Nuclear magnetic resonance studies of manganese binding of rat liver arginase, *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 395–401
- [25] Mitić N., Miraula M., Selleck C., Hadler K.S., Uribe E., Pedroso M.M., *et al.*, Catalytic mechanisms of metallohydrolases containing two metal ions, In: Christov, C.Z. (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, Academic Press, 2014, 49–81
- [26] Reczkowski R.S., Ash D.E., Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, 312, 31–37
- [27] Hansmannel F., Sillaire A., Kamboh M.I., Lendon C., Pasquier F., Hannequin D., *et al.*, Is the urea cycle involved in Alzheimer's disease?, *J. Alzheimers Dis.*, 2010, 21, 1013–1021
- [28] Satriano J., Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines, *Amino Acids*, 2004, 26, 321–329
- [29] Boucher J.L., Custot J., Vadon S., Delaforge M., Lepoivre M., Tenu J.P., *et al.*, N ω -hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage Arginase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 203, 1614–1621
- [30] Lee J., Ryu H., Ferrante R.J., Morris S.M., Ratan R.R., Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, 100, 4843–4848
- [31] Toque H.A., Nunes K.P., Yao L., Liao J.K., Webb R.C., Caldwell R.B., *et al.*, Activated Rho kinase mediates diabetes-induced elevation of vascular arginase activation and contributes to impaired corpora cavernosa relaxation: possible involvement of p38 MAPK activation, *J Sex Med*, 2013, 10, 1502–1515
- [32] Chu Y.B., XiangLi X.Y., Niu H., Wang H.C., Jia P.D., Gong W.B., *et al.*, Arginase inhibitor attenuates pulmonary artery hypertension induced by hypoxia, *Mol. Cell. Biochem.*, 2016, 412, 91–99
- [33] Xue J., Nelin L.D., Chen B., Hypoxia induces arginase II expression and increases viable human pulmonary artery smooth muscle cell numbers via AMPK α 1 signaling, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2017, 312, L568–L578
- [34] Cowburn A.S., Crosby A., Macias D., Branco C., Colaço R.D.D.R., Southwood M., *et al.*, HIF2 α -arginase axis is essential for the development of pulmonary hypertension, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2016, 113, 8801–8806
- [35] Eleutério R.M.N., Nascimento F.O., Araújo T.G., Castro M.F., Filho T.P.A., Filho P.A.M., *et al.*, Double-blind clinical trial of arginine supplementation in the treatment of adult patients with sickle cell anaemia, *Adv. Hematol.*, 2019, 2019, e4397150

- [36] Steppan J., Tran H.T., Bead V.R., Oh Y.J., Sikka G., Bivalacqua T.J., *et al.*, Arginase inhibition reverses endothelial dysfunction, pulmonary hypertension and vascular stiffness in transgenic sickle cell mice, *Anesth. Analg.*, 2016, 123, 652–658
- [37] Romero M.J., Platt D.H., Tawfik H.E., Labazi M., El-Remessy A.B., Bartoli M., *et al.*, Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity, *Circ. Res.*, 2008, 102, 95–102
- [38] Beleznai T., Feher A., Spielvogel D., Lansman S.L., Bagi Z., Arginase I contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011, 300, H777-783
- [39] Grönros J., Jung C., Lundberg J.O., Cerrato R., Ostenson C.-G., Pernow J., Arginase inhibition restores in vivo coronary microvascular function in type 2 diabetic rats, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011, 300, H1174-1181
- [40] Shemyakin A., Kövamees O., Rafnsson A., Böhm F., Svenarud P., Settergren M., *et al.*, Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus, *Circulation*, 2012, 126, 2943–2950
- [41] Bhatta A., Yao L., Xu Z., Toque H.A., Chen J., Atawia R.T., *et al.*, Obesity-induced vascular dysfunction and arterial stiffening requires endothelial cell arginase I, *Cardiovasc. Res.*, 2017, 113, 1664–1676
- [42] Bhatta A., Sangani R., Kolhe R., Toque H.A., Cain M., Wong A., *et al.*, Deregulation of arginase induces bone complications in high-fat/high-sucrose diet diabetic mouse model, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2016, 422, 211–220
- [43] Yao L., Bhatta A., Xu Z., Chen J., Toque H.A., Chen Y., *et al.*, Obesity-induced vascular inflammation involves elevated arginase activity, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2017, 313, R560–R571
- [44] Teupser D., Burkhardt R., Wilfert W., Haffner I., Nebendahl K., Thiery J., Identification of macrophage arginase I as a new candidate gene of atherosclerosis resistance, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006, 26, 365–371
- [45] Monin L., Griffiths K.L., Lam W.Y., Gopal R., Kang D.D., Ahmed M., *et al.*, Helminth-induced arginase-1 exacerbates lung inflammation and disease severity in tuberculosis, *J. Clin. Invest.*, 2015, 125, 4699–4713
- [46] Gonon A.T., Jung C., Katz A., Westerblad H., Shemyakin A., Sjöquist P.-O., *et al.*, Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production, *PLoS ONE*, 2012, 7, e42038
- [47] Jung C., Gonon A., Sjöquist P.-O., Lundberg J., Pernow J., Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischemia-reperfusion, *Cardiovasc. Res.*, 2010, 85, 147–54
- [48] Zhu M., Goetsch S.C., Wang Z., Luo R., Hill J.A., Schneider J., *et al.*, FoxO4 promotes early inflammatory response upon myocardial infarction via endothelial ArgI, *Circ. Res.*, 2015, 117, 967–977
- [49] Xiong Y., Yu Y., Montani J.-P., Yang Z., Ming X.-F., Arginase-II induces vascular smooth muscle cell senescence and apoptosis through p66Shc and p53 independently of its L-arginine urea hydrolase activity: implications for atherosclerotic plaque vulnerability, *J. Am. Heart Assoc.*, 2013, 2, e000096
- [50] Xiong Y., Fru M.F., Yu Y., Montani J.-P., Ming X.-F., Yang Z., Long term exposure to L-arginine accelerates endothelial cell senescence through arginase-II and S6K1 signaling, *Aging*, 2014, 6, 369–379
- [51] Dean R.C., Lue T.F., Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction, *Urol. Clin. North Am.*, 2005, 32, 379–v

- [52] Bivalacqua T.J., Hellstrom W.J., Kadowitz P.J., Champion H.C., Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 283, 923–927
- [53] Toque H.A., Tostes R.C., Yao L., Xu Z., Webb R.C., Caldwell R.B., *et al.*, Arginase II deletion increases Corpora cavernosa relaxation in diabetic mice, *J. Sex. Med.*, 2011, 8, 722–733
- [54] Morris S.M., Gao T., Cooper T.K., Kepka-Lenhart D., Awad A.S., Arginase-II mediates diabetic renal injury, *Diabetes*, 2011, 60, 3015–3022
- [55] You H., Gao T., Cooper T.K., Morris S.M., Awad A.S., Diabetic nephropathy is resistant to oral L-arginine or L-citrulline supplementation, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2014, 307, F1292–F1301
- [56] Romero M.J., Yao L., Sridhar S., Bhatta A., Dou H., Ramesh G., *et al.*, L-citrulline protects from kidney damage in type 1 diabetic mice, *Front. Immunol.*, 2013, 4, 480
- [57] Maquiaveli C.C., da Silva E.R., Rosa L.C., Francescato H.D.C., Lucon Júnior J.F., Silva C.G.A., *et al.*, *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity, *J. Ethnopharmacol.*, 2014, 158, 49–57
- [58] Pham T.-N., Liagre B., Girard-Thernier C., Demougeot C., Research of novel anticancer agents targeting arginase inhibition, *Drug Discov. Today*, 2018, 23, 871–878
- [59] Bauer P.M., Buga G.M., Fukuto J.M., Pegg A.E., Ignarro L.J., Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 34458–34464
- [60] Huerta S., Nitric oxide for cancer therapy, *Future Sci. OA*, 2015, 1, FSO44
- [61] Rodriguez P.C., Quiceno D.G., Zabaleta J., Ortiz B., Zea A.H., Piazuelo M.B., *et al.*, Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses, *Cancer Res.*, 2004, 64, 5839–5849
- [62] Mussai F., De Santo C., Abu-Dayyeh I., Booth S., Quek L., McEwen-Smith R.M., *et al.*, Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment, *Blood*, 2013, 122, 749–758
- [63] Munder M., Schneider H., Luckner C., Giese T., Langhans Cl.-D., Fuentes J.M., *et al.*, Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase, *Blood*, 2006, 108, 1627–1634
- [64] Works M., Bennett M., Chen J., Emberley E., Huang T., Janes J., *et al.*, Immunology agent CB-1158 is a potent and selective arginase inhibitor and causes an immune-mediated anti-tumor response, *Cancer Res.*, 2016, 76, 552–552
- [65] Crittenden M.R., Savage T., Cottam B., Baird J., Rodriguez P.C., Newell P., *et al.*, Expression of arginase I in myeloid cells limits control of residual disease after radiation therapy of tumors in mice, *Radiat. Res.*, 2014, 182, 182–190
- [66] Choi S., Park C., Ahn M., Lee J.H., Shin T., Immunohistochemical study of arginase I and II in various tissues of rats, *Acta Histochem.*, 2012, 114, 487–494
- [67] Narayanan S.P., Xu Z., Putluri N., Sreekumar A., Lemtalsi T., Caldwell R.W., *et al.*, Arginase II deficiency reduces hyperoxia-mediated retinal neurodegeneration through the regulation of polyamine metabolism, *Cell Death Dis.*, 2014, 5, e1075
- [68] Narayanan S.P., Suwanpradid J., Saul A., Xu Z., Still A., Caldwell R.W., *et al.*, Arginase II deletion reduces neuro-glial injury and improves retinal function in a model of retinopathy of prematurity, *PLoS One*, 2011, 6, e22460

- [69] Quirié A., Demougeot C., Bertrand N., Mossiat C., Garnier P., Marie C., *et al.*, Effect of stroke on arginase expression and localization in the rat brain, *Eur. J. Neurosci.*, 2013, 37, 1193–1202
- [70] Petrone A.B., O’Connell G.C., Regier M.D., Chantler P.D., Simpkins J.W., Barr T.L., The role of Arginase I in post-stroke immunosuppression and ischemic stroke severity, *Transl. Stroke Res.*, 2016, 7, 103–110
- [71] Ahmad A.S., Shah Z.A., Doré S., Protective role of arginase II in cerebral ischemia and excitotoxicity, *J. Neurol. Neurosci.*, 2016, 7, 88
- [72] Cherian L., Robertson C.S., L-Arginine and free radical scavengers increase cerebral blood flow and brain tissue nitric oxide concentrations after controlled cortical impact injury in rats, *J. Neurotrauma*, 2003, 20, 77–85
- [73] Villalba N., Sackheim A.M., Nunez I.A., Hill-Eubanks D.C., Nelson M.T., Wellman G.C., *et al.*, Traumatic brain injury causes endothelial dysfunction in the systemic microcirculation through Arginase-I-dependent uncoupling of endothelial nitric oxide synthase, *J. Neurotrauma*, 2017, 34, 192–203
- [74] Hsieh C.L., Kim C.C., Ryba B.E., Niemi E.C., Bando J.K., Locksley R.M., *et al.*, Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain, *Eur. J. Immunol.*, 2013, 43, 2010–2022
- [75] Bitner B.R., Brink D.C., Mathew L.C., Pautler R.G., Robertson C.S., Impact of arginase II on CBF in experimental cortical impact injury in mice using MRI, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2010, 30, 1105–1109
- [76] Zahedi K., Huttinger F., Morrison R., Murray-Stewart T., Casero R.A., Strauss K.I., Polyamine catabolism is enhanced after traumatic brain injury, *J. Neurotrauma*, 2010, 27, 515–525
- [77] Rosi S., Ferguson R., Fishman K., Allen A., Raber J., Fike J.R., The polyamine inhibitor alpha-difluoromethylornithine modulates hippocampus-dependent function after single and combined injuries, *PLoS One*, 2012, 7, e31094
- [78] Colton C.A., Mott R.T., Sharpe H., Xu Q., Van Nostrand W.E., Vitek M.P., Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD, *J. Neuroinflammation*, 2006, 3, 27
- [79] Hunt J.B., Nash K.R., Placides D., Moran P., Selenica M.-L.B., Abuqalbeen F., *et al.*, Sustained Arginase I expression modulates pathological Tau deposits in a mouse model of tauopathy, *J. Neurosci.*, 2015, 35, 14842–14860
- [80] Ljubisavljevic S., Stojanovic I., Pavlovic R., Sokolovic D., Pavlovic D., Cvetkovic T., *et al.*, Modulation of nitric oxide synthase by arginase and methylated arginines during the acute phase of experimental multiple sclerosis, *J. Neurol. Sci.*, 2012, 318, 106–111
- [81] Ljubisavljevic S., Stojanovic I., Pavlovic R., Pavlovic D., The importance of nitric oxide and arginase in the pathogenesis of acute neuroinflammation: are those contra players with the same direction?, *Neurotox. Res.*, 2014, 26, 392–399
- [82] Cantoni C., Cignarella F., Ghezzi L., Mikesell B., Bollman B., Berrien-Elliott M.M., *et al.*, Mir-223 regulates the number and function of myeloid-derived suppressor cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis, *Acta Neuropathol.*, 2017, 133, 61–77
- [83] Yang B., Yang J., Zhao Y., Liu H., Jiang Y., The plant resources, structure characteristics, biological activities and synthesis of pyranoflavonoids, *Curr. Med. Chem.*, 2016, 23, 3078–3115
- [84] Greenhalgh A.D., Passos Dos Santos R., Zarruk J.G., Salmon C.K., Kroner A., David S., Arginase-1 is expressed exclusively by infiltrating myeloid cells in CNS injury and disease, *Brain Behav. Immun.*, 2016, 56, 61–67

- [85] Suwanpradid J., Rojas M., Behzadian M.A., Caldwell R.W., Caldwell R.B., Arginase II deficiency prevents oxidative stress and limits hyperoxia-induced retinal vascular degeneration, *PLoS One*, 2014, 9, e110604
- [86] Stevenson L., Matesanz N., Colhoun L., Edgar K., Devine A., Gardiner T.A., *et al.*, Reduced nitro-oxidative stress and neural cell death suggests a protective role for microglial cells in TNF α -/- mice in ischemic retinopathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2010, 51, 3291–3299
- [87] Shosha E., Xu Z., Yokota H., Saul A., Rojas M., Caldwell R.W., *et al.*, Arginase II promotes neurovascular degeneration during ischemia/reperfusion injury, *Cell Death Dis.*, 2016, 7, e2483
- [88] Elms S.C., Toque H.A., Rojas M., Xu Z., Caldwell R.W., Caldwell R.B., The role of arginase I in diabetes-induced retinal vascular dysfunction in mouse and rat models of diabetes, *Diabetologia*, 2013, 56, 654–662
- [89] Patel C., Rojas M., Narayanan S.P., Zhang W., Xu Z., Lemtalsi T., *et al.*, Arginase as a mediator of diabetic retinopathy, *Front. Immunol.*, 2013, 4, 173
- [90] Rojas M., Lemtalsi T., Toque H.A., Xu Z., Fulton D., Caldwell R.W., *et al.*, NOX2-Induced Activation of Arginase and Diabetes-Induced Retinal Endothelial Cell Senescence, *Antioxidants*, 2017, 6, 43
- [91] Zhang W., Baban B., Rojas M., Tofigh S., Virmani S.K., Patel C., *et al.*, Arginase activity mediates retinal inflammation in endotoxin-induced uveitis, *Am. J. Pathol.*, 2009, 175, 891–902
- [92] Lahiri A., Das P., Chakravorty D., New tricks new ways: Exploitation of a multifunctional enzyme arginase by pathogens, *Virulence*, 2010, 1, 563–565
- [93] Iniesta V., Carcelén J., Molano I., Peixoto P.M.V., Redondo E., Parra P., *et al.*, Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease, *Infect. Immun.*, 2005, 73, 6085–6090
- [94] Reguera R.M., Balaña-Fouce R., Showalter M., Hickerson S., Beverley S.M., *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2009, 165, 48–56
- [95] Shishova E.Y., Di Costanzo L., Emig F.A., Ash D.E., Christianson D.W., Probing the specificity determinants of amino acid recognition by arginase, *Biochemistry*, 2009, 48, 121–131
- [96] Colleluori D.M., Ash D.E., Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase, *Biochemistry*, 2001, 40, 9356–9362
- [97] Selamnia M., Mayeur C., Robert V., Blachier F., Alpha-difluoromethylornithine (DFMO) as a potent arginase activity inhibitor in human colon carcinoma cells, *Biochem. Pharmacol.*, 1998, 55, 1241–1245
- [98] Morris Jr S.M., Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases, *Br. J. Pharmacol.*, 2009, 157, 922–930
- [99] Bordage S., Pham T.-N., Zedet A., Gugglielmetti A.-S., Nappey M., Demougeot C., *et al.*, Investigation of mammal arginase inhibitory properties of natural ubiquitous polyphenols by using an optimized colorimetric microplate assay, *Planta Med.*, 2017, 83, 647–653
- [100] Zakharian T.Y., Di Costanzo L., Christianson D.W., (S)-2-Amino-6-nitrohexanoic acid binds to human Arginase I through multiple nitro–metal coordination interactions in the binuclear manganese cluster, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 17254–17255
- [101] Da Silva E.R., Boechat N., Pinheiro L.C.S., Bastos M.M., Costa C.C.P., Bartholomeu J.C., *et al.*, Novel selective inhibitor of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Arginase, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, 86, 969–978

- [102] Rosenfeld J.L., Dutta S.P., Chheda G.B., Tritsch G.L., Purine and pyrimidine inhibitors of arginase, *Biochim. Biophys. Acta - Enzymology*, 1975, 410, 164–166
- [103] Iyamu E.W., Jamal S., Ekekezie C., Woods G., In vitro evidence of the inhibitory capacity of chloroquine on arginase activity in sickle erythrocytes (Erratum), *Br. J. Haematol.*, 2010, 149, 307
- [104] De Sousa L.R.F., Ramalho S.D., Burger M.C.M., Nebo L., Fernandes J.B., da Silva M.F.G.F., *et al.*, Isolation of arginase inhibitors from the bioactivity-guided fractionation of *Byrsonima coccolobifolia* leaves and stems, *J. Nat. Prod.*, 2014, 77, 392–396
- [105] De Sousa L.R.F., Ramalho S.D., Fernandes J.B., Da Silva M.F.G.F., Iemma M.R.C., Corrêa C.J., *et al.*, Leishmanicidal galloylquinic acids are noncompetitive inhibitors of arginase, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2014, 25, 1832–1838
- [106] Jamshidi-Kia F., Lorigooini Z., Asgari S., Saeidi K., Iranian species of *Verbascum*: a review of botany, phytochemistry, and pharmacological effects, *Toxin Rev.*, 2019, 38, 255–262
- [107] Maquiaveli C.C., Lucon-Júnior J.F., Brogi S., Campiani G., Gemma S., Vieira P.C., *et al.*, Verbascoside Inhibits Promastigote Growth and Arginase Activity of *Leishmania amazonensis*, *J. Nat. Prod.*, 2016, 79, 1459–1463
- [108] Da Silva E.R., Brogi S., Grillo A., Campiani G., Gemma S., Vieira P.C., *et al.*, Cinnamic acids derived compounds with antileishmanial activity target *Leishmania amazonensis* arginase, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2019, 93, 139–146
- [109] Muzitano M., Falcão C., Cruz E., Bergonzi M., Bilia A., Vincieri F., *et al.*, Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous leishmaniasis, *Planta Med.*, 2009, 75, 307–311
- [110] Dos Reis M.B.G., Manjolin L.C., Maquiaveli C.C., Santos-Filho O.A., Da Silva E.R., Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and rat arginases by green tea EGCG, (+)-catechin and (–)-epicatechin: A comparative structural analysis of enzyme-inhibitor interactions, *PLoS One*, 2013, 8, e78387
- [111] Manjolin L.C., dos Reis M.B.G., Maquiaveli C.C., Santos-Filho O.A., Da Silva E.R., Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection, *Food Chem.*, 2013, 141, 2253–2262
- [112] Glisic S., Sencanski M., Perovic V., Stevanovic S., García-Sosa A.T., Arginase flavonoid anti-leishmanial in silico inhibitors flagged against anti-targets, *Molecules*, 2016, 21, 589
- [113] André C., Herlem G., Gharbi T., Guillaume Y.C., A new arginase enzymatic reactor: development and application for the research of plant-derived inhibitors, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 55, 48–53
- [114] Akanni O.O., Owumi S.E., Adaramoye O.A., In vitro studies to assess the antioxidative, radical scavenging and arginase inhibitory potentials of extracts from *Artocarpus altilis*, *Ficus exasperate* and *Kigelia africana*, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2014, 4, S492-499
- [115] Prastiwi R., Berna E., Sauriasari R., Hanafi M., Desmiaty Y., Arginase inhibitory, antioxidant activity and pharmacognosy study of *Sterculia macrophylla* Vent. leaves, *Pharmacogn. J.*, 2018, 10, 1109–1113
- [116] Hidayati A.A., Sauriasari R., Elya B., Arginase inhibitory and antioxidant activities in *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves extracts collected from three different locations of java, *Pharm. Sci. Asia*, 2020, 47, 65–73
- [117] Sembiring E.N., Elya B., Sauriasari R., Inhibitory effect on arginase and total phenolic content determination of extracts from different parts of *Melastoma malabathricum* L., *J. Young Pharm.*, 2018, 10, S114–S117

- [118] Shin W., Cuong T.D., Lee J.H., Min B., Jeon B.H., Lim H.K., *et al.*, Arginase inhibition by ethylacetate extract of *Caesalpinia sappan* lignum contributes to activation of endothelial nitric oxide synthase, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 2011, 15, 123–128
- [119] Zalsabela L.T., Elya B., Noviani A., Arginase inhibition activity of stem bark extract of *Caesalpinia pulcherrima*, *J. Young Pharm.*, 2018, 10, S111–S113
- [120] Wulansari A., Elya B., Noviani A., Noviani A., Arginase inhibitory and antioxidant activities of *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd. bark extract, *Pharmacogn. J.*, 2018, 10, 1174–1179
- [121] Atikasari N., Hanafi M., Elya B., Elya B., Arginase inhibitory, antioxidant activity, total phenolic content and total flavonoid content of ethyl acetate extract of *Caesalpinia turtuosa* Roxb stem bark, *Pharmacogn. J.*, 2020, 12, 227–231
- [122] Bujor A., Miron A., Luca S.V., Skalicka-Wozniak K., Silion M., Trifan A., *et al.*, Vasorelaxant effects of *Crataegus pentagyna*: links with arginase inhibition and phenolic profile, *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 252, 112559
- [123] Moon M.K., Kang D.G., Lee J.K., Kim J.S., Lee H.S., Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of rhubarb via a NO-cGMP pathway, *Life Sci.*, 2006, 78, 1550–1557
- [124] Ko S.K., Lee S.M., Whang W.K., Anti-platelet aggregation activity of stilbene derivatives from *Rheum undulatum*, *Arch. Pharm. Res.*, 1999, 22, 401–403
- [125] Frombaum M., Therond P., Djelidi R., Beaudeau J.-L., Bonnefont-Rousselot D., Borderie D., Piceatannol is more effective than resveratrol in restoring endothelial cell dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression and activity after high-glucose oxidative stress, *Free Radic. Res.*, 2011, 45, 293–302
- [126] Choi C.L., Koo B.H., Hong D., Kwon H.J., Hoe K.L., Won M.H., *et al.*, Resveratrol is an arginase inhibitor contributing to vascular smooth muscle cell vasoconstriction via increasing cytosolic calcium, *Mol. Med. Rep.*, 2019, 19, 3767–3774
- [127] Nguyen M.C., Ryoo S., Intravenous administration of piceatannol, an arginase inhibitor, improves endothelial dysfunction in aged mice, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 2017, 21, 83–90
- [128] Woo A., Min B., Ryoo S., Piceatannol-3'-O-beta-D-glucopyranoside as an active component of rhubarb activates endothelial nitric oxide synthase through inhibition of arginase activity, *Exp. Mol. Med.*, 2010, 42, 524–532
- [129] Woo A., Shin W., Cuong T.D., Min B., Lee J.H., Jeon B.H., *et al.*, Arginase inhibition by piceatannol-3'-O-β-D-glucopyranoside improves endothelial dysfunction via activation of endothelial nitric oxide synthase in ApoE-null mice fed a high-cholesterol diet, *Int. J. Mol. Med.*, 2013, 31, 803–810
- [130] Yi B., Nguyen M.C., Won M.-H., Kim Y.M., Ryoo S., Arginase inhibitor 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside activates endothelial nitric oxide synthase and improves vascular function, *Planta Med.*, 2017, 83, 210–216
- [131] Arraki K., Totoson P., Decendit A., Badoc A., Zedet A., Jolibois J., *et al.*, Cyperaceae species are potential sources of natural mammalian arginase inhibitors with positive effects on vascular function, *J. Nat. Prod.*, 2017, 80, 2432–2438
- [132] Schnorr O., Brossette T., Momma T.Y., Kleinbongard P., Keen C.L., Schroeter H., *et al.*, Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, 476, 211–215
- [133] Engler M.B., Engler M.M., Chen C.Y., Malloy M.J., Browne A.E.M., Chiu E.Y., *et al.*, Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults., *J. Am. Coll. Nutr.*, 2004, 23, 197–204

- [134] Nikolić J., Cvetković T., Sokolović D., Role of quercetin on hepatic urea production in acute renal failure, *Ren. Fail.*, 2003, 25, 149–155
- [135] Kim S.W., Cuong T.D., Hung T.M., Ryoo S., Lee J.H., Min B.S., Arginase II inhibitory activity of flavonoid compounds from *Scutellaria indica*, *Arch. Pharm. Res.*, 2013, 36, 922–926
- [136] Oboh G., Adebayo A.A., Ademosun A.O., Abegunde O.A., Aphrodisiac effect of *Hunteria umbellata* seed extract: Modulation of nitric oxide level and arginase activity in vivo, *Pathophysiology*, 2019, 26, 39–47
- [137] Oboh G., Ademiluyi A.O., Ademosun A.O., Olasehinde T.A., Oyeleye S.I., Boligon A.A., *et al.*, Phenolic extract from *Moringa oleifera* leaves inhibits key enzymes linked to erectile dysfunction and oxidative stress in rats' penile tissues, *Biochem. Res. Int.*, 2015, 2015, 175950
- [138] Bujor A., Miron A., Luca S.V., Skalicka-Wozniak K., Sillion M., Ancuceanu R., *et al.*, Metabolite profiling, arginase inhibition and vasorelaxant activity of *Cornus mas*, *Sorbus aucuparia* and *Viburnum opulus* fruit extracts, *Food Chem. Toxicol.*, 2019, 133, 110764
- [139] Joe Y., Zheng M., Kim H.J., Kim S., Uddin M.J., Park C., *et al.*, Salvianolic acid B exerts vasoprotective effects through the modulation of heme oxygenase-1 and arginase activities, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2012, 341, 850–858
- [140] Lim C.J., Cuong T.D., Hung T.M., Ryoo S., Lee J.H., Kim E.-H., *et al.*, Arginase II inhibitory activity of phenolic compounds from *Saururus chinensis*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2012, 33, 3079–3082
- [141] Shin W., Yoon J., Oh G.T., Ryoo S., Korean red ginseng inhibits arginase and contributes to endotheliumdependent vasorelaxation through endothelial nitric oxide synthase coupling, *J. Ginseng Res.*, 2013, 37, 64–73
- [142] Omojokun O.S., Famurewa A.J., Jaiyeoba O.A., Oboh G., Agbebi O.J., Alkaloid extracts from Bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) and Black nightshade (*Solanum nigrum*) inhibit phosphodiesterase-5, arginase activities and oxidative stress in rats penile tissue, *J. Food Biochem.*, 2019, 43, e12889
- [143] Yoon J., Park M., Lee J.H., Min B.S., Ryoo S., Endothelial nitric oxide synthase activation through obacunone-dependent arginase inhibition restored impaired endothelial function in ApoE-null mice, *Vascul. Pharmacol.*, 2014, 60, 102–109
- [144] Nelin L.D., Chicoine L.G., Reber K.M., English B.K., Young T.L., Liu Y., Cytokine-induced endothelial arginase expression is dependent on epidermal growth factor receptor, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2005, 33, 394–401
- [145] Stolarczyk M., Piwowarski J.P., Granica S., Stefańska J., Naruszewicz M., Kiss A.K., Extracts from *Epilobium* sp. herbs, their components and gut microbiota metabolites of *Epilobium* ellagitannins, urolithins, inhibit hormone-dependent prostate cancer cells-(LNCaP) proliferation and PSA secretion, *Phytother. Res.*, 2013, 27, 1842–1848
- [146] Anadozie S.O., Akinyemi J.A., Agunbiade S., Ajiboye B.O., Adewale O.B., *Bryophyllum pinnatum* inhibits arginase II activity and prevents oxidative damage occasioned by carbon tetrachloride (CCl₄) in rats, *Biomed. Pharmacother.*, 2018, 101, 8–13
- [147] Girard-Thernier C., Pham T.-N., Demougeot C., The promise of plant-derived substances as inhibitors of arginase, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2015, 15, 798–808
- [148] Weil L., Russell M.A., A manometric micromethod for arginase determination enzymatic study of blood Arginase in rats, *J. Biol. Chem.*, 1934, 106, 505–513
- [149] Van Slyke D.D., Archibald R.M., Gasometric and photometric measurement of arginase activity., *J. Biol. Chem.*, 1946, 165, 293–309

- [150] Ozer N., A new enzyme-coupled spectrophotometric method for the determination of arginase activity, *Biochem. Med.*, 1985, 33, 367–371
- [151] Garganta C.L., Bond J.S., Assay and kinetics of arginase, *Anal. Biochem.*, 1986, 154, 388–394
- [152] Iyamu E.W., Asakura T., Woods G.M., A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of Arginase activity in vitro, *Anal. Biochem.*, 2008, 383, 332–334
- [153] Chinard F.P., Photometric estimation of proline and ornithine, *J. Biol. Chem.*, 1952, 199, 91–95
- [154] Sandler Y., Amino acids profiling for the diagnosis of metabolic disorders, In: *Biochemical Testing - Clinical Correlation and Diagnosis*, Varaprasad Bobbarala, IntechOpen, 2019
- [155] Gopalakrishna R., Nagarajan B., Use of centrifuge column technique in estimation of arginase in human serum, *Biochem. Med.*, 1979, 22, 70–75
- [156] Gopalakrishna R., Nagarajan B., A simplified procedure for the estimation of arginine in plasma and urine using arginase, *Clin. Chim. Acta*, 1980, 106, 333–337
- [157] Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modolell M., Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod, *J. Immunol. Methods*, 1994, 174, 231–235
- [158] Schimke R.T., Arginase (rat liver), In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, Elsevier, 1970, 313–317
- [159] Timmermans C.J., A rapid colorimetric assay for urea, *Clin. Chim. Acta*, 1962, 7, 887–889
- [160] Attia R., Zedet A., Bourjot M., Skhiri E., Messaoud C., Girard C., Thin-layer chromatography-bioautographic method for the detection of arginase inhibitors, *J. Sep. Sci.*, 2020, 43, 2477–2486
- [161] Hagan J.J., Dallam R.D., Measurement of arginase activity, *Anal. Biochem.*, 1968, 22, 518–524
- [162] Giraldo J.D., Rivas B.L., Determination of urea using p-N,N-dimethylaminobenzaldehyde: solvent effect and interference of chitosan, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2017, 62, 3538–3542
- [163] Jung D., Biggs H., Erikson J., Ledyard P.U., New colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea, *Clin. Chem.*, 1975, 21, 1136–1140
- [164] Zawada R.J.X., Kwan P., Olszewski K.L., Llinas M., Huang S.-G., Quantitative determination of urea concentrations in cell culture medium, *Biochem. Cell Biol.*, 2009, 87, 541–544
- [165] Rüegg U.T., Russell A.S., A rapid and sensitive assay for Arginase, *Anal. Biochem.*, 1980, 102, 206–212
- [166] Cadenas E., Packer L., Nitric oxide, Part F, Elsevier, Academic Press, 2011
- [167] Baggio R., Cox J.D., Harper S.L., Speicher D.W., Christianson D.W., A new chromophoric assay for Arginase activity, *Anal. Biochem.*, 1999, 276, 251–253
- [168] Gilani A., Rahman A., Trends in ethnopharmacology, *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 100, 43–49
- [169] Katiyar C., Gupta A., Kanjilal S., Katiyar S., Drug discovery from plant sources: an integrated approach, *Ayu*, 2012, 33, 10–19
- [170] Chadwick D.J., Marsh J., *Bioactive Compounds from Plants*, John Wiley & Sons, 2008
- [171] *Convention sur la Diversité Biologique*, UICN, 2016
- [172] Lahlou M., Screening of natural products for drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.*, 2007, 2, 697–705
- [173] Gottlieb O.R., *Micromolecular evolution, systematics and ecology: an essay into a novel botanical discipline*, Springer, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1982

- [174] Zhu F., Ma X.H., Qin C., Tao L., Liu X., Shi Z., *et al.*, Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs, *PloS One*, 2012, 7, e39782
- [175] Ramesha B.T., Gertsch J., Ravikanth G., Priti V., Ganeshaiyah K.N., Uma Shaanker R., Biodiversity and chemodiversity: future perspectives in bioprospecting, *Curr. Drug Targets*, 2011, 12, 1515–1530
- [176] Feeny P., Wallace J.W., Mansell R.L., Plant apparency and chemical defense, In: *Biochemical Interaction between Plants and Insects*, J.W. Wallace et al., Springer US, Boston, MA, 1976, 1–40
- [177] Schwikkard S., Mulholland D.A., Useful methods for targeted plant selection in the discovery of potential new drug candidates, *Planta Med.*, 2014, 80, 1154–1160
- [178] Blondeau S., Do Q.T., Scior T., Bernard P., Morin-Allory L., Reverse pharmacognosy: another way to harness the generosity of nature, *Curr. Pharm. Des.*, 2010, 16, 1682–1696
- [179] Do Q.-T., Lamy C., Renimel I., Sauvan N., André P., Himbert F., *et al.*, Reverse pharmacognosy: identifying biological properties for plants by means of their molecule constituents: application to meranzin, *Planta Med.*, 2007, 73, 1235–1240
- [180] Kolukisaoglu Ü., Thurow K., Future and frontiers of automated screening in plant sciences, *Plant Sci.*, 2010, 178, 476–484
- [181] Butler M.S., The role of natural product chemistry in drug discovery, *J. Nat. Prod.*, 2004, 67, 2141–2153
- [182] Koehn F.E., Carter G.T., The evolving role of natural products in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, 4, 206–220
- [183] Rahman A., Basha F.Z., *Bioactive natural products*, Elsevier, 1993
- [184] Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I., *Natural products isolation*, Humann Press, 2005
- [185] Pieters L., Vlietinck A.J., Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds?, *J. Ethnopharmacol.*, 2005, 100, 57–60
- [186] Beutler J.A., Alvarado A.B., Schaufelberger D.E., Andrews P., McCloud T.G., Dereplication of phorbol bioactives: *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*, *J. Nat. Prod.*, 1990, 53, 867–874
- [187] Hubert J., Nuzillard J.-M., Renault J.-H., Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept?, *Phytochem. Rev.*, 2017, 16, 55–95
- [188] Bruguère A., Derbré S., Coste C., Le Bot M., Siegler B., Leong S.T., *et al.*, ¹³C-NMR dereplication of *Garcinia* extracts: predicted chemical shifts as reliable databases, *Fitoterapia*, 2018, 131, 59–64
- [189] Hansen M.E., Smedsgaard J., Larsen T.O., X-Hitting: an algorithm for novelty detection and dereplication by UV spectra of complex mixtures of natural products, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 6805–6817
- [190] Ramos A.E.F., Evanno L., Poupon E., Champy P., Beniddir M.A., Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal, *Nat. Prod. Rep.*, 2019, 36, 960–980
- [191] Ruttkies C., Schymanski E.L., Wolf S., Hollender J., Neumann S., MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation, *J. Cheminformatics*, 2016, 8, 3
- [192] Bruguère A., Derbré S., Dietsch J., Leguy J., Rahier V., Pottier Q., *et al.*, MixONat, a software for the dereplication of mixtures based on ¹³C NMR spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2020, 92, 8793–8801
- [193] P. Gaudêncio S., Pereira F., Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process, *Nat. Prod. Rep.*, 2015, 32, 779–810

- [194] Arora N., Banerjee A.K., Dereplication in natural product discovery, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2019, 19, 101–102
- [195] Bräm S., Wolfram E., Recent advances in effect-directed enzyme assays based on thin-layer chromatography, *Phytochem. Anal.*, 2017, 28, 74–86
- [196] Dewanjee S., Gangopadhyay M., Bhattacharya N., Khanra R., Dua T.K., Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry, *J. Pharm. Anal.*, 2015, 5, 75–84
- [197] Potterat O., Hamburger M., Natural products in drug discovery - concepts and approaches for tracking bioactivity, *Curr. Org. Chem.*, 2006, 10, 899–920
- [198] Morel A.F., Araujo C.A., Da Silva U.F., Hoelzel S.C.S.M., Záchia R., Bastos N.R., Antibacterial cyclopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*, *Phytochemistry*, 2002, 61, 561–566
- [199] Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K., A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994, 58, 1780–1783
- [200] Pratt D.E., Miller E.E., A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts (*Arachia hypogoea*), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, 61, 1064–1067
- [201] Whittern C.C., Miller E.E., Pratt D.E., Cottonseed flavonoids as lipid antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1984, 61, 1075–1078
- [202] Müller M.B., Dausend C., Weins C., Frimmel F.H., A new bioautographic screening method for the detection of estrogenic compounds, *Chromatographia*, 2004, 60, 207–211
- [203] Cieśla Ł.M., Waksmundzka-Hajnos M., Wojtunik K.A., Hajnos M., Thin-layer chromatography coupled with biological detection to screen natural mixtures for potential drug leads, *Phytochem. Lett.*, 2015, 11, 445–454
- [204] Wangthong S., Tonsiripakdee I., Monhaphol T., Nonthabenjawan R., Wanichwecharungruang S.P., Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection, *Biomed. Chromatogr.*, 2007, 21, 94–100
- [205] Ramallo I.A., García P., Furlan R.L.E., A reversed-phase compatible thin-layer chromatography autography for the detection of acetylcholinesterase inhibitors, *J. Sep. Sci.*, 2015, 38, 3788–3794
- [206] Ramallo A., Zacchino S., Furlan R., A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers, *Phytochem. Anal.*, 2006, 17, 15–9
- [207] Legerská B., Chmelová D., Ondrejovič M., Miertuš S., The TLC-bioautography as a tool for rapid enzyme inhibitors detection - a review, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2020, 2, 1–19
- [208] Paradowska K., Polak B., Chomicki A., Ginalska G., Establishment of an effective TLC bioautographic method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra phosphoglucose isomerase inhibition by phosphoenolpyruvate, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2016, 31, 1712–1717
- [209] García P., Ramallo A., Salazar M., Furlan R., Chemical diversification of essential oils, evaluation of complex mixtures and identification of a xanthine oxidase inhibitor, *RSC Adv.*, 2016, 6, 57245–57252
- [210] Chen Z., Tao H., Liao L., Zhang Z., Wang Z., Quick identification of xanthine oxidase inhibitor and antioxidant from *Erycibe obtusifolia* by a drug discovery platform composed of multiple mass spectrometric platforms and thin-layer chromatography bioautography, *J. Sep. Sci.*, 2014, 37, 2253–2259
- [211] Taibon J., Ankli A., Schwaiger S., Magnenat C., Boka V.-I., Simões-Pires C., *et al.*, Prevention of false-positive results: development of an HPTLC autographic assay for the detection of natural Tyrosinase inhibitors, *Planta Med.*, 2015, 81, 1198–1204

- [212] Hsu K.-D., Chan Y.-H., Chen H.-J., Lin S.-P., Cheng kuan-C., Tyrosinase-based TLC autography for anti-melanogenic drug screening, *Sci. Rep.*, 2018, 8, 401
- [213] Darwish R.S., Shawky E., Hammoda H.M., Harraz F.M., A new thin-layer chromatography–direct bioautography assay for the qualitative and quantitative determination of peroxidase inhibitors in plant extracts, *J. Planar Chromat.*, 2020, 33, 3–9
- [214] Gu L.H., Liao L.P., Hu H.J., Bligh S.W.A., Wang C.H., Chou G.X., *et al.*, A thin-layer chromatography-bioautographic method for detecting dipeptidyl peptidase IV inhibitors in plants, *J. Chromatogr. A*, 2015, 1411, 116–122
- [215] Tang J., Zhou J., Tang Q., Wu T., Cheng Z., A new TLC bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of lipase inhibitors, *Phytochem. Anal.*, 2016, 27, 5–12
- [216] Kong Y., Li X., Zhang N., Miao Y., Feng H., Wu T., *et al.*, Improved bioautographic assay on TLC layers for qualitative and quantitative estimation of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, 150, 87–94
- [217] Kiely J.S., Moos W.H., Pavia M.R., Schwarz R.D., Woodard G.L., A silica gel plate-based qualitative assay for acetylcholinesterase activity: a mass method to screen for potential inhibitors, *Anal. Biochem.*, 1991, 196, 439–442
- [218] Rhee I.K., Van de Meent M., Ingkaninan K., Verpoorte R., Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining, *J. Chromatogr. A*, 2001, 915, 217–223
- [219] Marston A., Kissling J., Hostettmann K., A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants, *Phytochem. Anal.*, 2002, 13, 51–54
- [220] Gu L., Tian T., Xia L., Chou G., Wang Z., Rapid isolation of a dipeptidyl peptidase IV inhibitor from *Fritillaria cirrhosa* by Thin-Layer Chromatography–bioautography and Mass Spectrometry-directed autopurification system, *J. Planar Chromat.*, 2019, 32, 447–451
- [221] Salazar M.O., Furlan R.L.E., A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors, *Phytochem. Analysis*, 2007, 18, 209–212
- [222] Salazar M.O., Micheloni O., Escalante A.M., Furlan R.L.E., Discovery of a β -glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation, *Mol. Divers.*, 2011, 15, 713–719
- [223] Ramallo I.A., Sierra M.G., Furlan R.L.E., Discovery of β -glucosidase inhibitors from a chemically engineered extract prepared through ethanolysis, *Med. Chem.*, 2012, 8, 112–117
- [224] Simões-Pires C.A., Hmicha B., Marston A., Hostettmann K., A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts, *Phytochem. Anal.*, 2009, 20, 511–515
- [225] Yang Y., Gu L., Xiao Y., Liu Q., Hu H., Wang Z., *et al.*, Rapid identification of α -Glucosidase inhibitors from *Phlomis tuberosa* by Sepbox Chromatography and Thin-Layer Chromatography Bioautography, *PLoS One*, 2015, 10, e0116922
- [226] Theiler B.A., Istvanits S., Zehl M., Marcourt L., Urban E., Caisa L.O.E., *et al.*, HPTLC bioautography guided isolation of α -glucosidase inhibiting compounds from *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae), *Phytochem. Anal.*, 2017, 28, 87–92
- [227] Hassan A.M.S., TLC bioautographic method for detecting lipase inhibitors, *Phytochem. Anal.*, 2012, 23, 405–407

- [228] Bayineni V.K., Suresh S., Singh G., Kadeppagari R.-K., Development of a bioautographic method for the detection of lipase inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014, 453, 784–786
- [229] Tian M., Mohamed A.C., Wang S., Yang L., On-plate enzyme and inhibition assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase using thin-layer chromatography, *J. Sep. Sci.*, 2015, 38, 2907–2914
- [230] Paradowska K., Lutek J., Ginalska G., Rapid detection for the inhibition of phosphoglucose isomerase from *Escherichia coli* by mercury(II) chloride based on TLC-autographic analysis – preliminary studies, *Curr. Issues Pharm. Sci.*, 2014, 27, 127–130
- [231] Momtaz S., Mapunya B.M., Houghton P.J., Edgerly C., Hussein A., Naidoo S., *et al.*, Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening, *J. Ethnopharmacol.*, 2008, 119, 507–512
- [232] Misra B.B., Dey S., TLC-bioautographic evaluation of in vitro anti-tyrosinase and anti-cholinesterase potentials of sandalwood oil, *Nat. Prod. Commun.*, 2013, 8, 253–256
- [233] Kamagaju L., Morandini R., Bizuru E., Nyetera P., Nduwayezu J.B., Stévigny C., *et al.*, Tyrosinase modulation by five Rwandese herbal medicines traditionally used for skin treatment, *J. Ethnopharmacol.*, 2013, 146, 824–834
- [234] García P., Furlan R.L.E., Multiresponse optimisation applied to the development of a TLC autography for the detection of tyrosinase inhibitors, *Phytochem. Anal.*, 2015, 26, 287–292
- [235] García P., Salazar M., Ramallo A., Furlan R., A new fluorinated tyrosinase inhibitor from a chemically engineered essential oil, *ACS Comb. Sci.*, 2016, 18, 283–286
- [236] García P., Ramallo I.A., Furlan R.L.E., Reverse Phase Compatible TLC-Bioautography for Detection of Tyrosinase Inhibitors, *Phytochem. Anal.*, 2017, 28, 101–105
- [237] Legerská B., Chmelová D., Ondrejovič M., TLC-bioautography as a fast and cheap screening method for the detection of α -chymotrypsin inhibitors in crude plant extracts, *J. Biotechnol.*, 2020, 13, 11–17
- [238] Agatonovic-Kustrin S., Morton D.W., High-performance thin-layer chromatography-direct bioautography as a method of choice for alpha-amylase and antioxidant activity evaluation in marine algae, *J. Chromatogr. A*, 2017, 1530, 197–203
- [239] Wedge D.E., Nagle D.G., A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents To control plant pathogens, *J. Nat. Prod.*, 2000, 63, 1050–1054
- [240] Belkhir M., Rebai O., Dhaouadi K., Congiu F., Tuberoso C.I.G., Amri M., *et al.*, Comparative analysis of tunisian wild *Crataegus azarolus* (Yellow Azarole) and *Crataegus monogyna* (Red Azarole) leaf, fruit, and traditionally derived syrup: phenolic profiles and antioxidant and antimicrobial activities of the aqueous-acetone extracts, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61, 9594–9601
- [241] Yahyaoui A., Arfaoui M.O., Rigane G., Hkir A., Amari K., Ben Salem R., *et al.*, Investigation on the chemical composition and antioxidant capacity of extracts from *Crataegus azarolus* L.: effect of growing location of an important tunisian medicinal plant, *Chem. Afr.*, 2019, 2, 361–365
- [242] Bahri-Sahloul R., Ammar S., Grec S., Harzallah-Skhiri F., Chemical characterisation of *Crataegus azarolus* L. fruit from 14 genotypes found in Tunisia, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 2009, 84, 23–28
- [243] Bechkri S., Berrehal D., Semra Z., Bachari K., Kabouche A., Kabouche Z., Composition and biological activities of seeds oils of two *Crataegus* species growing in Algeria, *J. Mater. Environ. Sci.*, 2017, 8, 1526–1531
- [244] Mustapha N., Pinon A., Limami Y., Simon A., Ghedira K., Hennebelle T., *et al.*, *Crataegus azarolus* leaves induce antiproliferative activity, cell cycle arrest, and

- apoptosis in Human HT-29 and HCT-116 colorectal cancer cells, *J. Cell. Biochem.*, 2016, 117, 1262–1272
- [245] Adbesmed H., Hambaba L., Abdeddaim M., Mohamed-Cherif A., Dosage de métabolites secondaires des extraits du fruit *Crataegus azarolus*, *Tunis. J. Med. Plants Nat. Prod.*, 2011, 6, 53–62
- [246] Le Floch E., Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne, Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, Publications scientifiques tunisiennes, 1983
- [247] Esmaeili A., Rahnamoun S., Sharifnia F., Effect of O/W process parameters on *Crataegus azarolus* L nanocapsule properties, *J. Nanobiotechnology*, 2013, 11, 16
- [248] Edwards J.E., Brown P.N., Talent N., Dickinson T.A., Shipley P.R., A review of the chemistry of the genus *Crataegus*, *Phytochemistry*, 2012, 79, 5–26
- [249] Mustapha N., Bouhlel I., Chaabane F., Bzéouich I.M., Ghedira K., Hennebelle T., *et al.*, Aqueous extract of *Crataegus azarolus* protects against DNA damage in human lymphoblast cell K562 and enhances antioxidant activity, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, 172, 2266–2275
- [250] Kallassy H., Fayyad-Kazan M., Makki R., El-Makhour Y., Hamade E., Rammal H., *et al.*, Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of the plant Lebanese *Crataegus Azarolus* L, *Med. Sci. Monit. Basic. Res.*, 2017, 23, 270–284
- [251] Mahmud S.A., Al-Habib O.A.M., Bugonl S., Clericuzio M., Vidari G., A new ursane-type triterpenoid and other constituents from the leaves of *Crataegus azarolus* var. *aronia*, *Nat. Prod. Commun.*, 2016, 11, 1637–1639
- [252] Haydari M.R., Panjeshahin M.R., Mashghoolozekr E., Nekooeian A.A., Antihypertensive effects of hydroalcoholic extract of *Crataegus Azarolus* subspecies *Aronia* fruit in rats with renovascular hypertension: an experimental mechanistic study, *Iran. J. Med. Sci.*, 2017, 42, 266–274
- [253] Bouaziz A., Khennouf S., Abdalla S., Djidel S., Abu Zarga M., Phytochemical analysis, antioxidant activity and hypotensive effect of Algerian azarole (*Crataegus azarolus* L, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2015, 5, 19–28
- [254] Lakache Z., Tigrine-Kordjani N., Tigrine C., Aliboudhar H., Kameli A., Phytochemical screening and antioxidant properties of methanolic extract and different fractions of *Crataegus azarolus* leaves and flowers from Algeria, *Int. Food Res. J.*, 2016, 23, 1576–1583
- [255] Belkhir M., Dhaouadi K., Rosa A., Atzeri A., Nieddu M., Tuberoso C.I.G., *et al.*, Protective effects of azarole polyphenolic extracts against oxidative damage using in vitro biomolecular and cellular models, *Ind. Crops Prod.*, 2016, 86, 239–250
- [256] Shatoor A.S., In vivo hemodynamic and electrocardiographic changes following *Crataegus aronia* syn. *Azarolus* L administration to normotensive Wistar rats, *Saudi Med. J.*, 2013, 34, 123–134
- [257] Dizaya K.F.H., Al-Jeboory A.A., Al-Jaff H.N.F., The pharmacological studies of procyanidine isolated from *Crataegus azarolus* (Iraqi endogenous), *Pak. J. Pharmacol.*, 2005, 22, 57–79
- [258] Shatoor A.S., Soliman H., Al-Hashem F., Gamal B.E., Othman A., El-Menshawly N., Effect of Hawthorn (*Crataegus aronia* syn. *Azarolus* (L)) on platelet function in albino Wistar rats, *Thromb. Res.*, 2012, 130, 75–80
- [259] Kmail A., Lyoussi B., Zaid H., Imtara H., Saad B., In vitro evaluation of anti-inflammatory and antioxidant effects of *Asparagus aphyllus* L., *Crataegus azarolus* L.,

- and Ephedra alata Decne in monocultures and co-cultures of HepG2 and THP-1-derived macrophages, *Pharmacogn. Commn.*, 2017, 7, 24–33
- [260] Mustapha N., Bzéouich I.M., Ghedira K., Hennebelle T., Chekir-Ghedira L., Compounds isolated from the aerial part of *Crataegus azarolus* inhibit growth of B16F10 melanoma cells and exert a potent inhibition of the melanin synthesis, *Biomed. Pharmacother.*, 2015, 69, 139–144
- [261] Henchiri C., Zidi S., Contribution to the study of the antidiabetic effect of local medicinal plant: *Crataegus azarolus*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, 22, S137
- [262] Ben Jemaa H., Aouni Y., Chihi S., Khlifi S., Ben Hmed H., Karmous I., *et al.*, Effets antihypercholestérolémians et antioxydant de l'extrait de *Crataegus azarolus* chez des rats ayant reçu un régime gras, *Nutr. Clin. et Metab.*, 2016, 30, 283
- [263] Abu-Gharbieh E., Shehab N.G., Therapeutic potentials of *Crataegus azarolus* var. *eu-azarolus* Maire leaves and its isolated compounds, *BMC Complement. Altern. Med.*, 2017, 17, 218
- [264] Ghani U., Nur-e-Alam M., Yousaf M., Ul-Haq Z., Noman O.M., Al-Rehaily A.J., Natural flavonoid α -glucosidase inhibitors from *Retama raetam*: Enzyme inhibition and molecular docking reveal important interactions with the enzyme active site, *Bioorg. Chem.*, 2019, 87, 736–742
- [265] Nur-e-Alam M., Yousaf M., Parveen I., Hafizur R.M., Ghani U., Ahmed S., *et al.*, New flavonoids from the Saudi Arabian plant *Retama raetam* which stimulates secretion of insulin and inhibits α -glucosidase, *Org. Biomol. Chem.*, 2019, 17, 1266–1276
- [266] Bellakhdar J., Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc : la situation actuelle, les produits, les sources du savoir (enquête ethnopharmacologique de terrain réalisée de 1969 à 1992), thesis, Université de Lorraine, 1997
- [267] Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J., Younos C., Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea, *J. Ethnopharmacol.*, 1991, 35, 123–143
- [268] Abouri M., Abdelhamid E.M., Msanda F., Boubaker H., Saadi B., Cherifi K., An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Tata Province, Morocco, *Int. J. Med. Plant Res.*, 2012, 1, 99–123
- [269] Mouhajir F., Medicinal plants used by Berber and Arab peoples of Morocco : ethnopharmacology and phytochemistry, University of British Columbia, 2002
- [270] Telli A., Esnault M.-A., Ould El Hadj Khelil A., An ethnopharmacological survey of plants used in traditional diabetes treatment in south-eastern Algeria (Ouargla province), *J. Arid Environ.*, 2016, 127, 82–92
- [271] El-Mokasabi F.M., Floristic composition and traditional uses of plant species at Wadi Alkuf, Al-Jabal Al-Akhder, Libya, *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2014, 14, 685–697
- [272] León-González A.J., Navarro I., Acero N., Muñoz Mingarro D., Martín-Cordero C., Genus *Retama*: a review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities, *Phytochem. Rev.*, 2018, 17, 701–731
- [273] Said O., Khalil K., Fulder S., Azaizeh H., Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region, *J. Ethnopharmacol.*, 2002, 83, 251–265
- [274] El Beyrouthy M., Arnold N., Delelis-Dusollier A., Dupont F., Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon, *J. Ethnopharmacol.*, 2008, 120, 315–334
- [275] Ali-Shtayeh M.S., Yaghmour R.M.-R., Faidi Y.R., Salem K., Al-Nuri M.A., Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area, *J. Ethnopharmacol.*, 1998, 60, 265–271

- [276] Hehmeyer I., Schönig H., Herbal medicine in Yemen: traditional knowledge and practice, and their value for today's world, Brill, Leiden, Nederland, 2012
- [277] Edziri H., Mastouri M., Mahjoub M.A., Mighri Z., Mahjoub A., Verschaeve L., Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers, *Molecules*, 2012, 17, 7284–7293
- [278] Xu W.-H., Al-Rehaily A.J., Yousaf M., Ahmad M.S., Khan S.I., Khan I.A., Two new flavonoids from *Retama raetam*, *Helv. Chim. Acta*, 2015, 98, 561–568
- [279] Edziri H., Mastouri M., Cheraif I., Aouni M., Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia, *Nat. Prod. Res.*, 2010, 24, 789–796
- [280] El Sherbeiny A.E.A., El Sissi H.I., Nawwar M.A.M., El Ansari M.A., The flavonoids of the seeds of *Lygos raetam*, *Planta Med.*, 1978, 34, 335–336
- [281] El-Shazly A., Ateya A.M., Wittle L., Wink M., Quinolizidine alkaloid profiles of *Retama raetam*, *R. sphaerocarpa* and *R. monosperma*, *Z. Naturforsch. C*, 1996, 51, 301–308
- [282] Edziri H., Ammar S., Groh P., Mahjoub M.A., Mastouri M., Gutmann L., *et al.*, Antimicrobial and cytotoxic activity of *Marrubium alysson* and *Retama raetam* grown in Tunisia, *Pak. J. Biol. Sci.*, 2007, 10, 1759–1762
- [283] Edziri H., Mastouri M., Ammar S., Matieu M., Gros P., Hiar R., *et al.*, Antimicrobial, antioxidant, and antiviral activities of *Retama raetam* (Forssk.) Webb flowers growing in Tunisia, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 24, 2933–2940
- [284] Saada M., Falleh H., Jalleli I., Snoussi M., Ksouri R., Phenolic profile, biological activities and fraction analysis of the medicinal halophyte *Retama raetam*, *S. Afr. J. Bot.*, 2014, 94, 114–121
- [285] Awen B.Z.S., Unnithan C.R., Ravi S., Kermagy A., Sasikumar J.M., Khrbash A.S., *et al.*, Essential oils of *Retama raetam* from Libya: chemical composition and antimicrobial activity, *Nat. Prod. Res.*, 2011, 25, 927–933
- [286] Tlili N., Mejri H., Lajnef H.B., Feriani A., Khaldi A., Nasri N., Unexploited *Thapsia garganica*, *Orlaya maritima*, and *Retama raetam* seeds: potential sources of unsaturated fatty acid and natural antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2015, 92, 1175–1181
- [287] Papadopoulos K., Chatter R., Skaltsa H., Djeddi Dr.S., Karioti A., Yannakopoulou E., Analgesic and antioxidant activities of algerian *Retama raetam* Webb & Berthel extracts, *Rec. Nat. Prod.*, 2013, 7, 169–176
- [288] El-Toumy S., Farrag A.R., Elithey M., Koriem K., Effect of plant derived-phenolic extracts on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats, *J. Pharm. Res.*, 2011, 4, 189–192
- [289] Miguel M., Bouchmaa N., Smail A., Gaamoussi F., Lyoussi B., Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of Moroccan plants, *Fresenius Environ. Bull.*, 2014, 23
- [290] Maghrani M., Lemhadri A., Jouad H., Michel J.-B., Eddouks M., Effect of the desert plant *Retama raetam* on glycaemia in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 87, 21–25
- [291] González-Mauraza N.H., León-González A.J., Espartero J.L., Gallego-Fernández J.B., Sánchez-Hidalgo M., Martín-Cordero C., Isolation and quantification of pinitol, a bioactive cyclitol, in *Retama* spp, *Nat. Prod. Commun.*, 2016, 11, 405–406
- [292] Maghrani M., Lemhadri A., Zeggwagh N.-A., El Amraoui A., Haloui M., Jouad H., *et al.*, Effect of *Retama raetam* on lipid metabolism in normal and recent-onset diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.*, 2004, 90, 323–329
- [293] Algandaby M.M., Alghamdi H.A., Ashour O.M., Abdel-Naim A.B., Ghareib S.A., Abdel-Sattar E.A., *et al.*, Mechanisms of the antihyperglycemic activity of *Retama*

- raetam in streptozotocin-induced diabetic rats, *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48, 2448–2453
- [294] Al Tubuly R., Auzi A., Al-Etri-Endi A., Nahar D.L., Sarker S., Effects of *Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel. (Fabaceae) on the central nervous system in experimental animals, *Arch. Biol. Sci.*, 2011, 63, 1015–1021
- [295] Omara E.A., Shaffie N.M., El-Toumy S.A., Aal W.A., Histomorphometric evaluation of bone tissue exposed to experimental osteoporosis and treated with *Retama raetam* extract., *J. Appl. Sci. Res.*, 2009, 5, 706–716
- [296] Omara E.A.A., Nada S.A., El-Toumy S.A.A., Evaluation of hepatoprotective activity of the *Retama raetam* seeds on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats, *Planta Med.*, 2009, 75, PH29
- [297] Koriem K.M., Farrag A.R., El-Toumy S.A., Beneficial effects of two mediterranean medicinal plants on blood, liver, and kidney toxicity induced by formalin in rats, *Biohealth Sci. Bull.*, 2010, 2, 8–14
- [298] Schmid T., Turner D., Oberbaum M., Finkelstein Y., Bass R., Kleid D., Respiratory failure in a neonate after folk treatment with broom bush (*Retama raetam*) extract, *Pediatr. Emerg. Care*, 2006, 22, 124–126
- [299] Algandaby M.M., Assessment of acute and subacute toxic effects of the Saudi folk herb *Retama raetam* in rats, *J. Chin. Med. Assoc.*, 2015, 78, 691–701
- [300] El Bahri L., Djegham M., Bellil H., *Retama raetam* W: a poisonous plant of North Africa, *Vet. Hum. Toxicol.*, 1999, 41, 33–35
- [301] Sisay M., Gashaw T., Ethnobotanical, ethnopharmacological, and phytochemical studies of *Myrtus communis* Linn: a popular herb in Unani system of medicine, *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, 2017, 22, 1035–1043
- [302] Messaoud C., Béjaoui A., Boussaid M., Fruit color, chemical and genetic diversity and structure of *Myrtus communis* L. var. *italica* Mill. morph populations, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2011, 39, 570–580
- [303] Alipour G., Dashti S., Hosseinzadeh H., Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active constituents, *Phytother. Res.*, 2014, 28, 1125–1136
- [304] Shariati M., Sharifi E., Houshmandi M., Nourafshan A., Ghavami F., Effect of hydro alcoholic leaf extract of *Myrtus communis* on pituitary-gonad hormonal axis in adult male rat, *Int. J. Fertil. Steril.*, 2010, 4, 59–60
- [305] Bouaziz A., Khennouf S., Zarga M.A., Abdalla S., Baghiani A., Charef N., Phytochemical analysis, hypotensive effect and antioxidant properties of *Myrtus communis* L. growing in Algeria, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2015, 5, 19–28
- [306] Saadaoui E., Martín Gómez J., Tlili N., Khaldi A., Cervantes E., Effect of climate in seed diversity of wild tunisian *Rhus tripartita* (Ucria) Grande, *J. Adv. Biol. Biotechnol.*, 2017, 13, 1–10
- [307] Ben Mahmoud S., Saad H., Charrier B., Pizzi A., Rode K., Ayed N., *et al.*, Characterization of sumac (*Rhus tripartitum*) root barks tannin for a potential use in wood adhesives formulation, *Wood Sci. Technol.*, 2015, 49, 205–221
- [308] Neffati M., Najjaa H., Máthé Á., Medicinal and aromatic plants of the World - Africa, Springer Netherlands, Springer, 2017
- [309] Ben Miled H., Saada M., Jallali I., Ben Barka Z., Tlili M., Alimi H., *et al.*, Variability of antioxidant and biological activities of *Rhus tripartitum* related to phenolic compounds, *EXCLI J. Alimi*, 2017, 16, 439–447
- [310] Alimi H., Mbarki S., Barka Z.B., Feriani A., Bouoni Z., Hfaeidh N., *et al.*, Phytochemical, antioxidant and protective effect of *Rhus tripartitum* root bark extract against ethanol-induced ulcer in rats, *Gen. Physiol. Biophys.*, 2013, 32, 115–127

- [311] Mahjoub M.A., Ammar S., Mighri Z., A new biflavonoid and an isobiflavonoid from *Rhus tripartitum*, *Nat. Prod. Res.*, 2005, 19, 723–729
- [312] Tlili N., Mejri H., Yahia Y., Saadaoui E., Rejeb S., Khaldi A., *et al.*, Phytochemicals and antioxidant activities of *Rhus tripartitum* (Ucria) fruits depending on locality and different stages of maturity, *Food Chem.*, 2014, 160, 98–103
- [313] Mohammed A.E.-S.I., Phytoconstituents and the study of antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of *Rhus tripartita* growing in Egypt, *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 2015, 4, 6
- [314] Shahat A.A., Alsaïd M.S., Rafatullah S., Al-Sohaibani M.O., Parvez M.K., Al-Dosari M.S., *et al.*, Treatment with *Rhus tripartita* extract curtails isoproterenol-elicited cardiotoxicity and oxidative stress in rats, *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16, 351
- [315] Attia R., Messaoud C., Arraki K., Zedet A., Demougeot C., Boussaïd M., *et al.*, Phytochemical screening and arginase inhibitory activity of extracts from several Tunisian medicinal plants, *S. Afr. J. Bot.*, 2019, 120, 313–318
- [316] Refka Z., Ksontini M., Ferchichi A., Seed germination characteristics of *Rhus tripartitum* (Ucria) Grande and *Ziziphus lotus* (L.): effects of water stress, *Int. J. Ecol.*, 2013, 2013, 7
- [317] Tlili H., Hanen N., Ben Arfa A., Neffati M., Boubakri A., Buonocore D., *et al.*, Biochemical profile and in vitro biological activities of extracts from seven folk medicinal plants growing wild in southern Tunisia., *PLoS One*, 2019, 14, e0213049
- [318] Monasterio-Huelin E., Webert H.E., Taxonomy and nomenclature of *Rubus Ulmifolius* and *Rubus Sanctus* (Rosaceae), *Edinb. J. Bot.*, 1996, 53, 311–322
- [319] Bandeira Reidel R.V., Melai B., Cioni P., Flamini G., Pistelli L., Aroma profile of *Rubus ulmifolius* flowers and fruits during different ontogenetic phases, *Chem. Biodivers.*, 2016, 13, 1776–1784
- [320] Triggiani D., Franconi R., *Rubus ulmifolius*: traditional, current and future pharmaceutical uses, *Curr.Tradit. Mad.*, 2018, 3, 192–203
- [321] Quave C.L., Estévez-Carmona M., Compadre C.M., Hobby G., Hendrickson H., Beenken K.E., *et al.*, Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics, *PLoS One*, 2012, 7, e28737
- [322] Martins A., Barros L., Carvalho A.M., Santos-Buelga C., Fernandes I.P., Barreiro F., *et al.*, Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources, *Food Funct.*, 2014, 5, 1091–1100
- [323] Panizzi L., Caponi C., Catalano S., Cioni P.L., Morelli I., In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*, *J. Ethnopharmacol.*, 2002, 79, 165–168
- [324] Flamini G., Catalano S., Caponi C., Panizzi L., Morelli I., Three anthrones from *Rubus ulmifolius*, *Phytochemistry*, 2002, 59, 873–876
- [325] Tabarki S., Aouadhi C., Mechergui K., Hammi K.M., Ksouri R., Raies A., *et al.*, Comparison of phytochemical composition and biological activities of *Rubus ulmifolius* extracts originating from four regions of Tunisia, *Chem. Biodiversity*, 2017, 14
- [326] Martini S., D'Addario C., Colacevich A., Focardi S., Borghini F., Santucci A., *et al.*, Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009, 34, 50–59

- [327] Hajaji S., Jabri M.-A., Sifaoui I., López-Arencibia A., Reyes-Batlle M., B'chir F., *et al.*, Amoebicidal, antimicrobial and in vitro ROS scavenging activities of Tunisian *Rubus ulmifolius* Schott, methanolic extract, *Exp. Parasitol.*, 2017, 183, 224–230
- [328] Talekar S.J., Chochua S., Nelson K., Klugman K.P., Quave C.L., Vidal J.E., 220D-F2 from *Rubus ulmifolius* kills *Streptococcus pneumoniae* planktonic cells and pneumococcal biofilms, *PLoS ONE*, 2014, 9, e97314
- [329] Boeing J.S., Barizão É.O., E Silva B.C., Montanher P.F., De Cinque Almeida V., Visentainer J.V., Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis, *Chem. Cent. J.*, 2014, 8, 48
- [330] Akkari H., Hajaji S., B'chir F., Rekik M., Gharbi M., Correlation of polyphenolic content with radical-scavenging capacity and anthelmintic effects of *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) against *Haemonchus contortus*, *Vet. Parasitol.*, 2016, 221, 46–53
- [331] Tabarki S., Mechergui K., Khaldi S., Toumi L., Raies A., Analysis of morphological variability in five spontaneous populations of *Rubus ulmifolius* Schott in Tunisia, *Asian J. Biol.*, 2017, 3, 1–9
- [332] Akhtar K., Ali W., Khan A., Shoaib M., Haleem K., Sultana N., Pharmacological effect of *Rubus ulmifolius* Schott as antihyperglycemic and antihyperlipidemic on streptozotocin (STZ)-induced albino mice, *Appl. Biol. Chem.*, 2017, 60, 411–418
- [333] Rahali N., Mehdi S., Younsi F., Boussaid M., Messaoud C., Antioxidant, α -amylase, and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Hertia cheirifolia* essential oils: Influence of plant organs and seasonal variation, *Int. J. Food Prop.*, 2017, 20, 1637–1651
- [334] Majouli K., Besbes Hlila M., Hamd A., Kenani A., Phytochemical and pharmacological properties of *Hertia* L. Genus, *SOJ Pharm. Pharm. Sci.*, 2018, 5, 1–3
- [335] Kada S., Bouriche H., Senator A., Demirtaş I., Özen T., Toptancı B.Ç., *et al.*, Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation, *Pharm. Biol.*, 2017, 55, 330–337
- [336] Majouli K., Hamdi A., Hlila M.B., Phytochemical analysis and biological activities of *Hertia cheirifolia* L. roots extracts, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2017, 10, 1134–1139
- [337] Massiot G., Nuzillard J.-M., Le Men-Olivier L., Aclinou P., Benkouider A., Khelifa A., Eremophilenolides from *Hertia cheirifolia*, *Phytochemistry*, 1990, 29, 2207–2210
- [338] Aclinou P., Benkouider A., Massiot G., Le Men-Olivier L., Eremophilenolides from *Hertia cheirifolia*, *Phytochemistry*, 1991, 30, 2083–2084
- [339] Zellagui A., Gherraf N., Drimenin-rich essential oils from *Hertia cherifolia* growing in Algeria, *J. New Technol. Mater.*, 2012, 02, 38–40
- [340] Ammar S., Edziri H., Mahjoub M.A., Chatter R., Bouraoui A., Mighri Z., Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*, *Phytomedicine*, 2009, 16, 1156–1161
- [341] Attia S., Grissa K.L., Mailleux A.C., Heuskin S., Lognay G., Hance T., Acaricidal activities of *Santolina africana* and *Hertia cheirifolia* essential oils against the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*), *Pest Manag. Sci.*, 2012, 68, 1069–1076
- [342] Majouli K., Kenani A., Hamdi A., Flamini G., Ben Jannet H., Besbes Hlila M., Antioxidant activity and α -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia* (L.), *Ind. Crops Prod.*, 2016, 82, 23–28
- [343] Majouli K., Mahjoub M.A., Rahim F., Hamdi A., Wadood A., Besbes Hlila M., *et al.*, Biological properties of *Hertia cheirifolia* L. flower extracts and effect of the nopol on α -glucosidase, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, 95, 757–761

- [344] Sobeh M., Rezq S., Cheurfa M., Abdelfattah M.A.O., Rashied R.M.H., El-Shazly A.M., *et al.*, Thymus algeriensis and Thymus fontanesii: chemical composition, in vivo antiinflammatory, pain killing and antipyretic activities: a comprehensive comparison, *Biomolecules*, 2020, 10, 599
- [345] Zouari N., Fakhfakh N., Zouari S., Bougatef A., Karray A., Neffati M., *et al.*, Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian Thymus algeriensis Boiss. et Reut. (Lamiaceae), *Food Bioprod. Process.*, 2011, 89, 257–265
- [346] El Hadj Ali I.B., Guetat A., Boussaid M., Chemical and genetic variability of Thymus algeriensis Boiss. et Reut. (Lamiaceae), a North African endemic species, *Ind. Crops Prod.*, 2012, 40, 277–284
- [347] Beloued A., *Plantes médicinales d'Algérie*, Office des publications universitaires, Alger, 1998
- [348] Ziani B.E.C., Heleno S.A., Bachari K., Dias M.I., Alves M.J., Barros L., *et al.*, Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSn and bioactive properties of Thymus algeriensis Boiss. & Reut. and Ephedra alata Decne, *Food Res. Int.*, 2019, 116, 312–319
- [349] Jaouadi R., Silva A.M.S., Boussaid M., Yahia I.B.H., Cardoso S.M., Zaouali Y., Differentiation of Phenolic Composition Among Tunisian Thymus algeriensis Boiss. et Reut. (Lamiaceae) Populations: Correlation to Bioactive Activities, Antioxidants, 2019, 8, 515
- [350] Guesmi F., Ben Farhat M., Landoulsi A., Ahmed L., In-vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of Thymus hirtus sp. algeriensis, *Lipids Health Dis.*, 2014, 13, 114
- [351] Beldjilali M., Mekhissi K., Khane Y., Chaibi W., Belarbi L., Bousalem S., Antibacterial and antifungal efficacy of silver nanoparticles biosynthesized using leaf extract of Thymus algeriensis, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, 2019
- [352] Messaoudi M., Benregueig M., Merah M., Messaoudi Z.A., Antibacterial effects of Thymus algeriensis extracts on some pathogenic bacteria, *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 2019, 41, e48548
- [353] Rezzoug M., Bakchiche B., Gherib A., Roberta A., Guido F., Kiliñarslan Ö., *et al.*, Chemical composition and bioactivity of essential oils and ethanolic extracts of Ocimum basilicum L. and Thymus algeriensis Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas, *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19, 146
- [354] Guesmi F., Saidi I., Bouzenna H., Hfaiedh N., Landoulsi A., Phytochemical variability, antioxidant and antibacterial activities, anatomical features of glandular and aglandular hairs of Thymus hirtus Willd. Ssp. algeriensis Boiss. and Reut. over developmental stages, *S. Afr. J. Bot.*, 2019, 127, 234–243
- [355] Vallès J., Mc Arthur E.D., Durant, Artemisia systematics and phylogeny: cytogenetic and molecular insights, *Provo UT. Proc. RMRS-P-21*, 2001, 67–74
- [356] Bora K.S., Sharma A., The genus Artemisia: a comprehensive review, *Pharm. Biol.*, 2011, 49, 101–109
- [357] Dib I., Tits M., Angenot L., Wauters J.N., Assaidi A., Mekhfi H., *et al.*, Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract of Artemisia campestris L. from Eastern Morocco, *J. Ethnopharmacol.*, 2017, 206, 224–235
- [358] Metoui R., Bouajila J., Znati M., Cazaux S., Neffati M., Akrouf A., Bioactive flavones isolated from Tunisian Artemisia campestris L. Leaves, *Cell. Mol. Biol.*, 2017, 63, 86–91
- [359] Aloui Z., Messaoud C., Haoues M., Neffati N., Bassoumi Jamoussi I., Essafi-Benkhadir K., *et al.*, Asteraceae Artemisia campestris and Artemisia herba-alba Essential Oils

- Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 2016, e9147096
- [360] Moufid A., Eddouks M., *Artemisia herba alba*: a popular plant with potential medicinal properties, Pak. J. Biol. Sci., 2012, 15, 1152–1159
- [361] Mohamed A.E.H.H., El-Sayed M.A., Hegazy M.E., Helaly S.E., Esmail A.M., Mohamed N.S., Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba*, Rec. Nat. Prod., 2010, 4, 1–25
- [362] Touil S., Benrebiha F.Z., Hadj Sadok T., Identification and quantification of phenolic compounds of *Artemisia herba-alba* at three harvest time by HPLC–ESI–Q–TOF–MS, Int. J. Food Prop., 2019, 22, 843–852
- [363] Salah S.M., Jäger A.K., Two flavonoids from *Artemisia herba-alba* Asso with in vitro GABAA-benzodiazepine receptor activity, J. Ethnopharmacol., 2005, 99, 145–146
- [364] Pandey A.K., Singh P., The genus *Artemisia*: a 2012–2017 literature review on chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of essential oils, Medicines, 2017, 4, 68
- [365] Abad M.J.M., Bedoya L.M., Apaza L., Bermejo P., The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils, Molecules, 2012, 17, 2542–2566
- [366] Hatimi S., Boudouma M., Bichichi M., Chaib N., Idrissi N.G., In vitro valuation of antileishmanial activity of *Artemisia herba alba* Asso, Bull. Soc. Pathol. Exot., 2001, 94, 29–31
- [367] Pottier-Alapetite G., Flore de la Tunisie: Angiospermes-dicotyledones, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture, Tunis, 1979
- [368] Pachi V.K., Mikropoulou E.V., Gkiouvetidis P., Siafakas K., Argyropoulou A., Angelis A., *et al.*, Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *Chia*, Anacardiaceae): A review, J. Ethnopharmacol., 2020, 254, 112485
- [369] Nahida, Ansari S.H., Siddiqui A.N., *Pistacia lentiscus*: a review on phytochemistry and pharmacological properties, Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 2012, 4, 16–20
- [370] Ben Douissa F., Étude chimique et biologique de *Pistacia lentiscus* L., Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, 2004
- [371] Andrade J.M., Faustino C., Garcia C., Ladeiras D., Reis C.P., Rijo P., *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity, Future Sci. OA, 2018, 4, FSO283
- [372] Ahmed H.M., Babakir-Mina M., Investigation of rosemary herbal extracts (*Rosmarinus officinalis*) and their potential effects on immunity, Phytoter. Res., 2020, 34, 1829–1837
- [373] Ouchikh O., Chahed T., Ksouri R., Taarit M.B., Faleh H., Abdelly C., *et al.*, The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs, J. Food Compos. Anal., 2011, 24, 103–110
- [374] Chaumon M., Goëlo V., Ribeiro A.M., Rocha F., Estevinho B.N., In vitro evaluation of microparticles with *Laurus nobilis* L. extract prepared by spray-drying for application in food and pharmaceutical products, Food Bioprod. Process., 2020, 122, 124–135
- [375] Duc Dat L., Viet Duc N., Thuy Luyen B.T., Van Oanh H., Jang H.J., Huong T.T., *et al.*, Megastigmane and abscisic acid glycosides from the leaves of *Laurus nobilis* L., Phytochem. Lett., 2019, 33, 1–5
- [376] Gayda A., Etude des principales huiles essentielles utilisées en rhumatologie, Université Paul Sabatier, 2013

- [377] Tomar O., Akarca G., Gök V., Ramadan M.F., Composition and antibacterial effects of Laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves essential oil, *J. Essent. Oil-Bear. Plants*, 2020, 23, 414–421
- [378] Turk A., Ahn J.H., Jo Y.H., Song J.Y., Khalife H.K., Gali-Muhtasib H., *et al.*, NF- κ B inhibitory sesquiterpene lactones from Lebanese *Laurus nobilis*, *Phytochem. Lett.*, 2019, 30, 120–123
- [379] Fang F., Sang S., Chen K.Y., Gosslau A., Ho C.-T., Rosen R.T., Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*), *Food Chem.*, 2005, 93, 497–501
- [380] Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Nasr S., El Beyrouthy M., Mnif W., Phytochemical composition and antioxidant activity of Tunisian *Laurus nobilis*, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2018, 31, 2397–2402
- [381] Fiorini C., David B., Fourasté I., Vercauteren J., Acylated kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves, *Phytochemistry*, 1998, 47, 821–824
- [382] Batool S., Khera R.A., Hanif M.A., Ayub M.A., Chapter 5 - Bay Leaf, In: Hanif, M.A., Nawaz, H., Khan, M.M., Byrne, H.J. (Eds.), *Medicinal Plants of South Asia: Novel Sources for Drug Discovery*, Elsevier, 2020, 63–74
- [383] Matsuda H., Shimoda H., Uemura T., Yoshikawa M., Preventive effect of sesquiterpenes from bay leaf on blood ethanol elevation in ethanol-loaded rat: Structure requirement and suppression of gastric emptying, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 2647–2652
- [384] Zimmer N., Cordesse R., Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants, *INRA Prod. Anim.*, 1996, 9, 167–179
- [385] Araya-Cloutier C., Den Besten H.M.W., Aisyah S., Gruppen H., Vincken J.-P., The position of prenylation of isoflavonoids and stilbenoids from legumes (Fabaceae) modulates the antimicrobial activity against Gram positive pathogens, *Food Chem.*, 2017, 226, 193–201
- [386] Asamenew G., Kim H.-W., Lee M.-K., Lee S.-H., Lee S., Cha Y.-S., *et al.*, Comprehensive characterization of hydroxycinnamoyl derivatives in green and roasted coffee beans: a new group of methyl hydroxycinnamoyl quinate, *Food Chem. X*, 2019, 2, 100033
- [387] Carneiro A.A., De Barros Y.Y., De Freitas M.M., Simeoni L.A., Magalhaes P.O., Silveira D., *et al.*, Identification and quantification of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. tablets and capsules, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 2017, 11, 94–102
- [388] Meenu M., Sharma A., Guha P., Mishra S., A rapid High-Performance Liquid Chromatography photodiode array detection method to determine phenolic compounds in mung bean (*Vigna radiata* L.), *Int. J. Food Prop.*, 2016, 19, 2223–2237
- [389] Sun J., Liu W., Zhang M., Geng P., Shan Y., Li G., *et al.*, The analysis of phenolic compounds in daylily using UHPLC-HRMSn and evaluation of drying processing method by fingerprinting and metabolomic approaches, *J. Food Process. Preserv.*, 2018, 42, e13325
- [390] Spínola V., Pinto J., Castilho P.C., Hypoglycemic, anti-glycation and antioxidant in vitro properties of two *Vaccinium* species from Macaronesia: A relation to their phenolic composition, *J. Funct. Foods*, 2018, 40, 595–605
- [391] Karar M.G.E., Kuhnert N., UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) leaves, fruits and their herbal derived drops (*Crataegutt Tropfen*), *J. Chem. Biol. Ther.*, 2015, 1, 102
- [392] Rodrigues S., Calhella R.C., Barreira J.C.M., Dueñas M., Carvalho A.M., Abreu R.M.V., *et al.*, *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory

- activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC–DAD–ESI/MS, *Food Res. Int.*, 2012, 49, 516–523
- [393] Fernández-Poyatos M. del P., Ruiz-Medina A., Zengin G., Llorent-Martínez E.J., Phenolic characterization, antioxidant activity, and enzyme inhibitory properties of *Berberis thunbergii* DC. leaves: a valuable source of phenolic acids, *Molecules*, 2019, 24, 4171
- [394] Gu D., Yang Y., Abdulla R., Aisa H.A., Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2012, 26, 83–100
- [395] Saldanha A.A., de Siqueira J.M., Castro A.H.F., de Azambuja Ribeiro R.I.M., de Oliveira F.M., de Oliveira Lopes D., *et al.*, Anti-inflammatory effects of the butanolic fraction of *Byrsonima verbascifolia* leaves: mechanisms involving inhibition of tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2 production and migration of polymorphonuclear leucocyte in vivo experimentation, *Int. Immunopharmacol.*, 2016, 31, 123–131
- [396] Da Silva M.M., De Oliveira R.R., Differentiation of the phenolic chemical profiles of *Cecropia pachystachya* and *Cecropia hololeuca*, *Phytochem. Anal.*, 2019, 30, 73–82
- [397] Schieber A., Keller P., Streker P., Klaiber I., Carle R., Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (*Malus domestica* cv. “Brettacher”) by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS, *Phytochem. Anal.*, 2002, 13, 87–94
- [398] Ben Said R., Hamed A.I., Mahalel U.A., Al-Ayed A.S., Kowalczyk M., Moldoch J., *et al.*, Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT, *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, 18, 512
- [399] Falcão S.I., Vale N., Gomes P., Domingues M.R.M., Freire C., Cardoso S.M., *et al.*, Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides, *Phytochem. Anal.*, 2013, 24, 309–318
- [400] Sobolev V.S., Sy A.A., Gloer J.B., Spermidine and flavonoid conjugates from peanut (*Arachis hypogaea*) flowers, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 2960–2969
- [401] Sun L., Tao S., Zhang S., Characterization and quantification of polyphenols and triterpenoids in thinned young fruits of ten pear varieties by UPLC-Q TRAP-MS/MS, *Molecules*, 2019, 24, 159
- [402] Li L.-Z., Gao P.-Y., Song S.-J., Yuan Y.-Q., Liu C.-T., Huang X.-X., *et al.*, Monoterpenes and flavones from the leaves of *Crataegus pinnatifida* with anticoagulant activities, *J. Funct. Foods*, 2015, 12, 237–245
- [403] Schüssler M., Hölzl J., Fricke U., Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus* species, *Arzneimittelforschung*, 1995, 45, 842–845
- [404] Strack D., Eilert U., Wray V., Wolff J., Jaggy H., Tricoumaroylspermidine in flowers of rosaceae, *Phytochemistry*, 1990, 29, 2893–2896
- [405] Bahri-Sahloul R., Ammar S., Fredj R.B., Saguem S., Grec S., Trotin F., *et al.*, Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties, *Pak. J. Biol. Sci.*, 2009, 12, 660–668
- [406] Arraki K., Totoson P., Attia R., Zedet A., Pudlo M., Messaoud C., *et al.*, Arginase inhibitory properties of flavonoid compounds from the leaves of Mulberry (*Morus alba*, Moraceae), *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2020, 72, 1269–1277
- [407] Dauguet J.-C., Bert M., Dolley J., Bekaert A., Lewin G., 8-Methoxykaempferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*, *Phytochemistry*, 1993, 33, 1503–1505

- [408] Rayyan S., Fossen T., Nateland H.S., Andersen Ø.M., Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug 'crataegi folium cum flore' (hawthorn), *Phytochemical Analysis*, 2005, 16, 334–341
- [409] Kim J.-S., Kang S.-S., Lee M.-W., Kim O.-K., Isolation of flavonoids from the leaves of *Aralia continentalis*, *Saengyak Hakhoe Chi*, 1995, 26, 239–243
- [410] Islam A.K.M.M., Hong S.-M., Lee H.-S., Moon B.-C., Kim D., Kwon H., Identification and characterization of matrix components in spinach during QuEChERS sample preparation for pesticide residue analysis by LC–ESI–MS/MS, GC–MS and UPLC–DAD, *J. Food Sci. Technol.*, 2018, 55, 3930–3938
- [411] Prinz S., Ringl A., Huefner A., Pemp E., Kopp B., 4'''-Acetylvitexin-2''-O-rhamnoside, Isoorientin, Orientin, and 8-Methoxykaempferol-3-O-glucoside as Markers for the Differentiation of *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* from *Crataegus laevigata* (Rosaceae), *Chemistry & Biodiversity*, 2007, 4, 2920–2931
- [412] Munari C., Investigation phytochimique de plantes alpines, University of Geneva, 2006
- [413] Liao X., Hu F., Chen Z., A HPLC-MS method for profiling triterpenoid acids and triterpenoid esters in *Osmanthus fragrans* fruits, *Analyst*, 2019, 144, 6981–6988
- [414] Yang B., Li H., Ruan Q.-F., Xue Y.-Y., Cao D., Zhou X.-H., *et al.*, A facile and selective approach to the qualitative and quantitative analysis of triterpenoids and phenylpropanoids by UPLC/Q-TOF-MS/MS for the quality control of *Ilex rotunda*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, 157, 44–58
- [415] Su B.-N., Kang Y.-H., Pinos R.E., Santarsiero B.D., Mesecar A.D., Soejarto D.D., *et al.*, Isolation and absolute stereochemistry of coussaric acid, a new bioactive triterpenoid from the stems of *Coussarea brevicaulis*, *Phytochemistry*, 2003, 64, 293–302
- [416] Al-Yousef H.M., Hassan W.H.B., Abdelaziz S., Amina M., Adel R., El-Sayed M.A., UPLC-ESI-MS/MS profile and antioxidant, cytotoxic, antidiabetic, and antiobesity activities of the aqueous extracts of three different *Hibiscus* species, *J. Chem.*, 2020, 2020, e6749176
- [417] Hsu F.-F., Complete structural characterization of ceramides as [M–H][–] ions by multiple-stage linear ion trap mass spectrometry, *Biochimie*, 2016, 130, 63–75
- [418] Becker L., Identification et suivi par spectrométrie de masse de composés impliqués dans la défense des feuilles de vigne caractérisées par leur niveau de résistance au mildiou, Université de Lorraine, 2014
- [419] Zlatanov M., Janakieva I., Phospholipid composition of some fruit-stone oils of Rosaceae species, *Eur. J. Lipid Sci. Technol. (Lipid/Fett)*, 1998, 100, 312–315
- [420] Song S.-J., Li L.-Z., Gao P.-Y., Peng Y., Yang J.-Y., Wu C.-F., Terpenoids and hexenes from the leaves of *Crataegus pinnatifida*, *Food Chem.*, 2011, 129, 933–939
- [421] Bykov V.I., Glyzin V.I., Ban'kovskii A.I., Flavonoids of the genus *Crataegus* the structure of bioquercetin, *Chem. Nat. Compd.*, 1973, 9, 527
- [422] Gao P.-Y., Li L.-Z., Liu K.-C., Sun C., Sun X., Wu Y.-N., *et al.*, Natural terpenoid glycosides with in vitro/vivo antithrombotic profiles from the leaves of *Crataegus pinnatifida*, *RSC Adv.*, 2017, 7, 48466–48474
- [423] Tran P.T., Ngo T.Q.-M., Lee S., Kim O., Tran H.N.K., Hwangbo C., *et al.*, Identification of anti-osteoclastogenic compounds from *Cleistocalyx operculatus* flower buds and their effects on RANKL-induced osteoclastogenesis, *J. Funct. Foods*, 2019, 60, 103388
- [424] Li Y., Xu J., Yuan C., Ma H., Liu T., Liu F., *et al.*, Chemical composition and anti-hyperglycaemic effects of triterpenoid enriched *Eugenia jambolana* Lam. berry extract, *J. Funct. Foods*, 2017, 28, 1–10

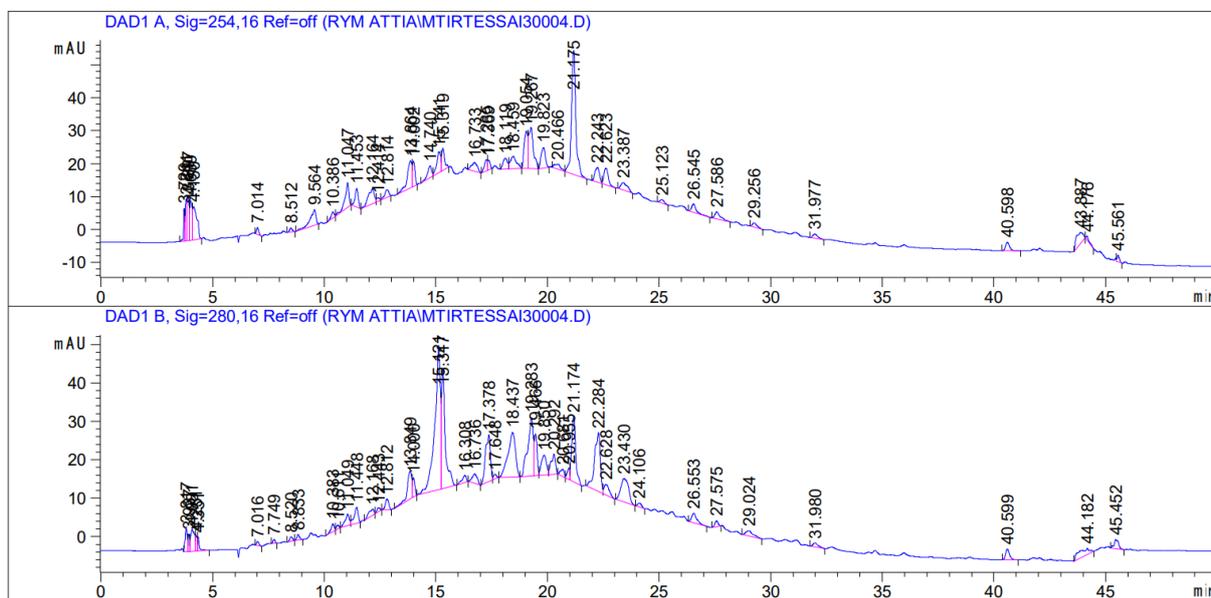
- [425] Gokaraju G., Gokaraju R., Gottumukkala V., Somepalli V., Pharmaceutically active extracts of *Vitex leucoxylo*, a process of extracting the same and a method of treating diabetes and inflammatory diseases therewith, WO/2007/029263, 2007
- [426] Rasamison V.E., Rakotondraibe H.L., Razafintsalama V., Rakotonandrasana S., Rakotondrafara A., Ratsimbason M.A., *et al.*, Chemical constituents from stems and leaves of *Diospyros gracilipes* Hiern and the antimicrobial and cytotoxic principles, *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 2016, 5, 109–113
- [427] Gao H., Wu L., Kuroyanagi M., Harada K., Kawahara N., Nakane T., *et al.*, Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells, *Chem. Pharm. Bull.*, 2003, 51, 1318–1321
- [428] Ameen B.H., Majeed N.S., Abdul D.A., HPLC analysis of fatty acids and triterpenoids in fruit of Hawthorn (*Crataegus azarolus*) in Iraqi Kurdistan region, *Asian Journal of Chemistry*, 2013, 25, 2750–2754
- [429] Gazizov F.Y., Glushenkova A.I., Phospholipids of the pericarp of *Crataegus turkestanica*, *Chem. Nat. Compd.*, 1995, 31, 465–466
- [430] Boudjada A., Touil A., Bendif H., Bensouici C., Rhouati S., Phytochemical constituents, phenolic contents, and antioxidant activity of *Crataegus azarolus* extracts, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 2018, 11, 133–137
- [431] Bahri-Sahloul R., Ben Fredj R., Boughalleb N., Shriaa J., Saguem S., Hilbert J.-L., *et al.*, Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from *Crataegus azarolus* L. var. *aronia* (Willd.) Batt. Ovaries Calli, *J. Bot.*, 2014, 2014, e623651
- [432] Hadjimitsi E., Zabetakis I., The aroma of jam prepared from fruits of mosphilla (*Crataegus azarolus* L.), *Flavour Fragr. J.*, 2005, 20, 507–511
- [433] Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G., Oreopoulou V., Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS, *Molecules*, 2007, 12, 593–606
- [434] Klejdus B., Vacek J., Benesová L., Kopecký J., Lapčík O., Kubán V., Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 389, 2277–2285
- [435] Uchida K., Akashi T., Aoki T., The missing link in leguminous pterocarpan biosynthesis is a dirigent domain-containing protein with isoflavanol Dehydratase activity, *Plant Cell. Physiol.*, 2017, 58, 398–408
- [436] Saada M., Falleh H., Catarino M.D., Cardoso S.M., Ksouri R., Plant growth modulates metabolites and biological activities in *Retama raetam* (Forssk.) Webb, *Molecules*, 2018, 23, 2177
- [437] Menezes J.C.J.M.D.S., Cavaleiro J.A.S., Kamat S.P., Barros C.M.R.F., Domingues M.R.M., Electrospray tandem mass spectrometry analysis of methylenedioxy chalcones, flavanones and flavones: ESI-MS of methylenedioxy chalcones, flavanones and flavones, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2013, 27, 1303–1310
- [438] Belayachi L., Aceves-Luquero C., Merghoub N., Bakri Y., Fernández de Mattos S., Amzazi S., *et al.*, *Retama monosperma* n-hexane extract induces cell cycle arrest and extrinsic pathway-dependent apoptosis in Jurkat cells, *BMC Complement. Altern. Med.*, 2014, 14, 38
- [439] Djeddi Dr.S., Karioti A., Yannakopoulou E., Papadopoulos K., Chatter R., Skaltsa H., Analgesic and antioxidant activities of algerian *Retama raetam* (Forssk.) Webb & Berthel extracts, *Rec. Nat. Prod.*, 2013, 7, 169–176

- [440] Touati R., Santos S.A.O., Rocha S.M., Belhamel K., Silvestre A.J.D., Phenolic composition and biological prospecting of grains and stems of *Retama sphaerocarpa*, *Industrial Crops and Products*, 2017, 95, 244–255
- [441] Oh W.K., Lee C.-H., Seo J.H., Chung M.Y., Cui L., Fomum Z.T., *et al.*, Diacylglycerol acyltransferase-inhibitory compounds from *Erythrina senegalensis*, *Arch. Pharm. Res.*, 2009, 32, 43–47
- [442] Wolfender J.-L., Waridel P., Ndjoko K., Hobby K.R., Major H.J., Hostettmann K., Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts, *Analisis*, 2000, 28, 895–906
- [443] López Lázaro M., Martín-Cordero C., Iglesias-Guerra F., Ayuso González M.J., An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa boissier*, *Phytochemistry*, 1998, 48, 401–402
- [444] Martucci M.E.P., Vos R.C.H.D., Carollo C.A., Gobbo-Neto L., Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus *Vernonia* Schreb, *PLoS One*, 2014, 9, e93149
- [445] Rouger C., *Activité pharmacologique de dérivés polyphénoliques isolés de Clusiaceae et de Calophyllaceae malaisiennes : effets régulateurs sur des marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité*, Université d'Angers, 2015
- [446] Ramabulana A.-T., Steenkamp P., Madala N., Dubery I.A., Profiling of chlorogenic acids from *Bidens pilosa* and differentiation of closely related positional isomers with the aid of UHPLC-QTOF-MS/MS-based in-source collision-induced dissociation, *Metabolites*, 2020, 10, 178
- [447] El-Masry S., Amer M.E., Abdel-Kader M.S., Zaatout H.H., Prenylated flavonoids of *Erythrina lysistemon* grown in Egypt, *Phytochemistry*, 2002, 60, 783–787
- [448] Ateba S.B., Mvondo M.A., Djiogue S., Zingué S., Krenn L., Njamen D., A pharmacological overview of alpinumisoflavone, a natural prenylated isoflavonoid, *Front. Pharmacol.*, 2019, 10, 952
- [449] Versiani M.A., Diyabalanage T., Ratnayake R., Henrich C.J., Bates S.E., McMahon J.B., *et al.*, Flavonoids from eight tropical plant species that inhibit the multidrug resistance transporter ABCG2, *J. Nat. Prod.*, 2011, 74, 262–266
- [450] Chen X., Mukwaya E., Wong M.-S., Zhang Y., A systematic review on biological activities of prenylated flavonoids, *Pharm. Biol.*, 2014, 52, 655–660
- [451] Dixon R.A., Sumner L.W., Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health, *Plant Physiol.*, 2003, 131, 878
- [452] Barron D., Balland C., Possety F., Ravanel P., Desfougères A., Flavonoïdes prénylés et perméabilité membranaire, *Acta Bot. Gall.*, 1996, 143, 509–520
- [453] Bourjot M., Zedet A., Demange B., Pudlo M., Girard-Thernier C., In vitro mammalian arginase inhibitory and antioxidant effects of amide derivatives isolated from the hempseed cakes (*Cannabis sativa*), *Planta Med. Int. Open*, 2016, 3, e64-67
- [454] Messaoud C., Laabidi A., Boussaid M., *Myrtus communis* L. infusions: the effect of infusion time on phytochemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities, *J. Food Sci.*, 2012, 77, C941-947
- [455] Price M.L., Van Scoyoc S., Butler L.G., A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, *J. Agric. Food Chem.*, 1978, 26, 1214–1218

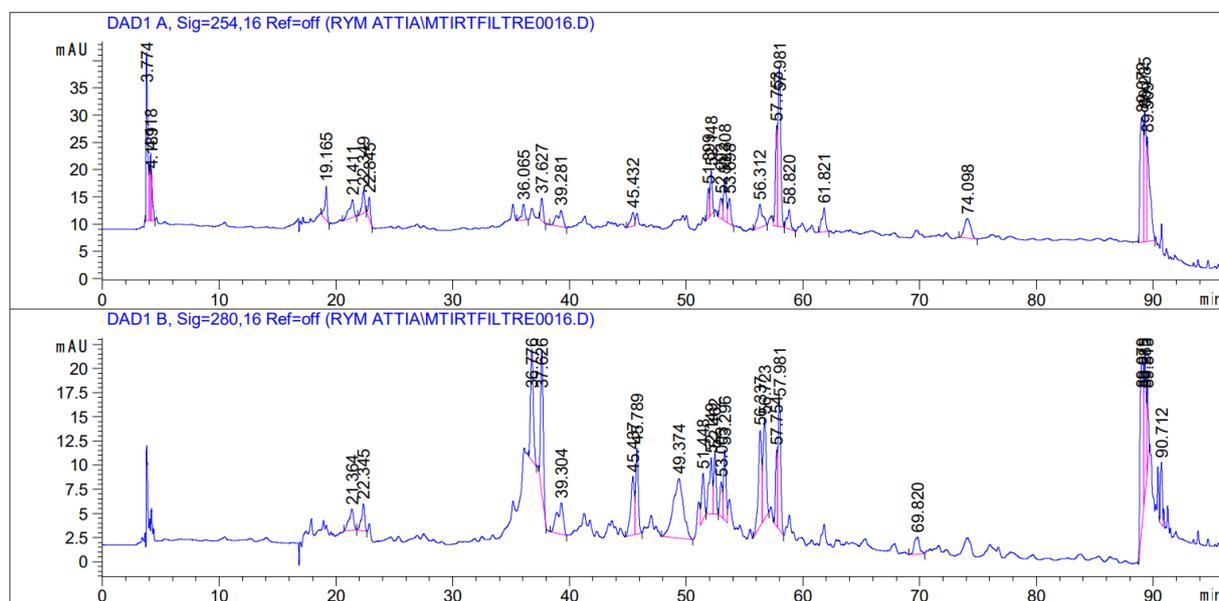
Annexes

Annexe 1: chromatogrammes CLHP de l'extrait méthanolique des tiges de *Rhus tripartita* avant et après filtration sur cartouches SPE en polyamide

Avant filtration

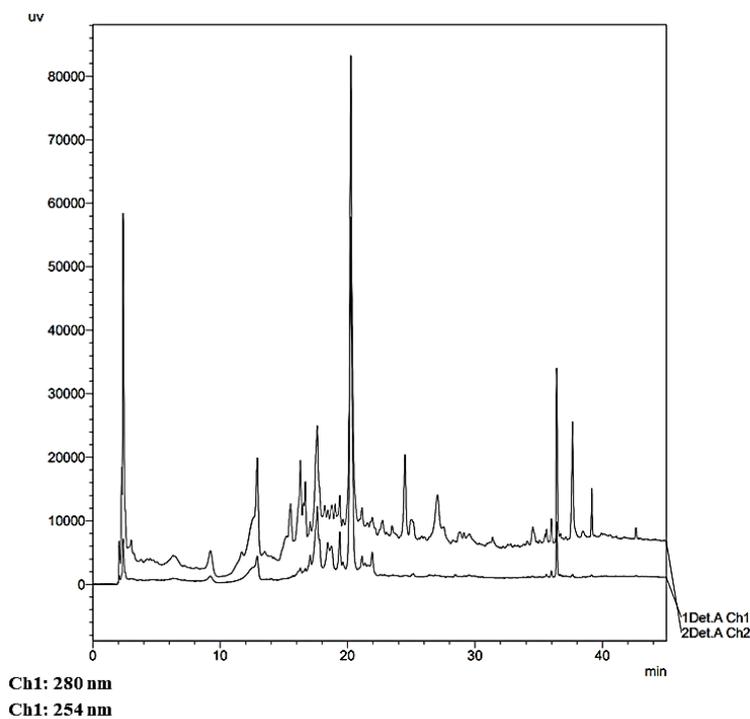


Après filtration

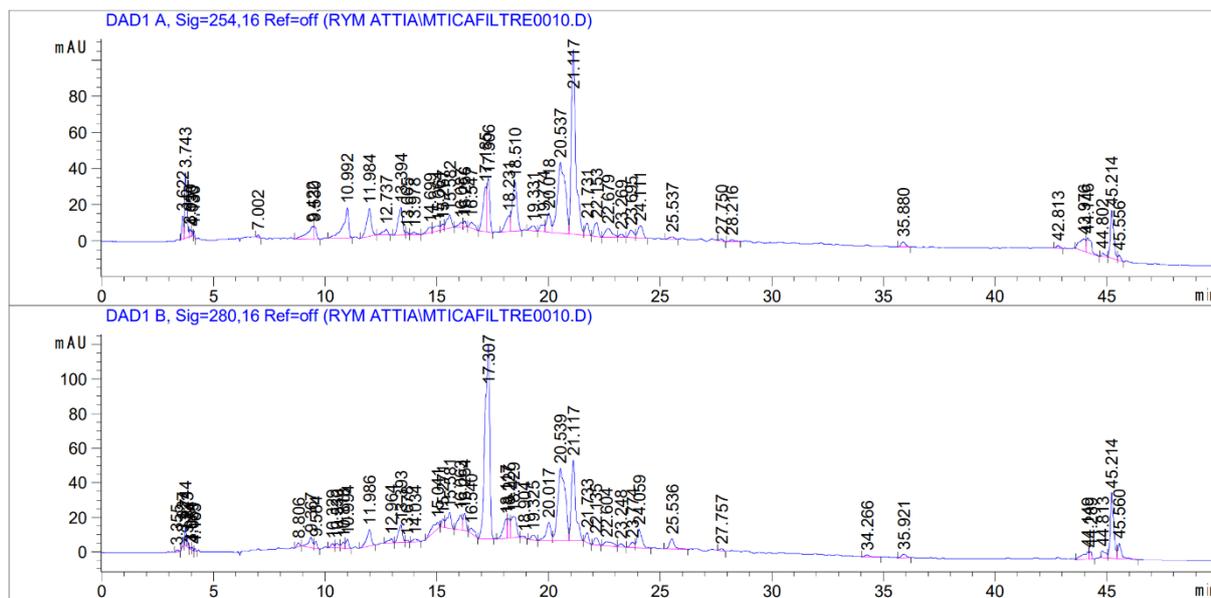


Annexe 2: chromatogrammes CLHP de l'extrait méthanolique des tiges de *Crataegus azarolus* avant et après filtration sur cartouches SPE en polyamide

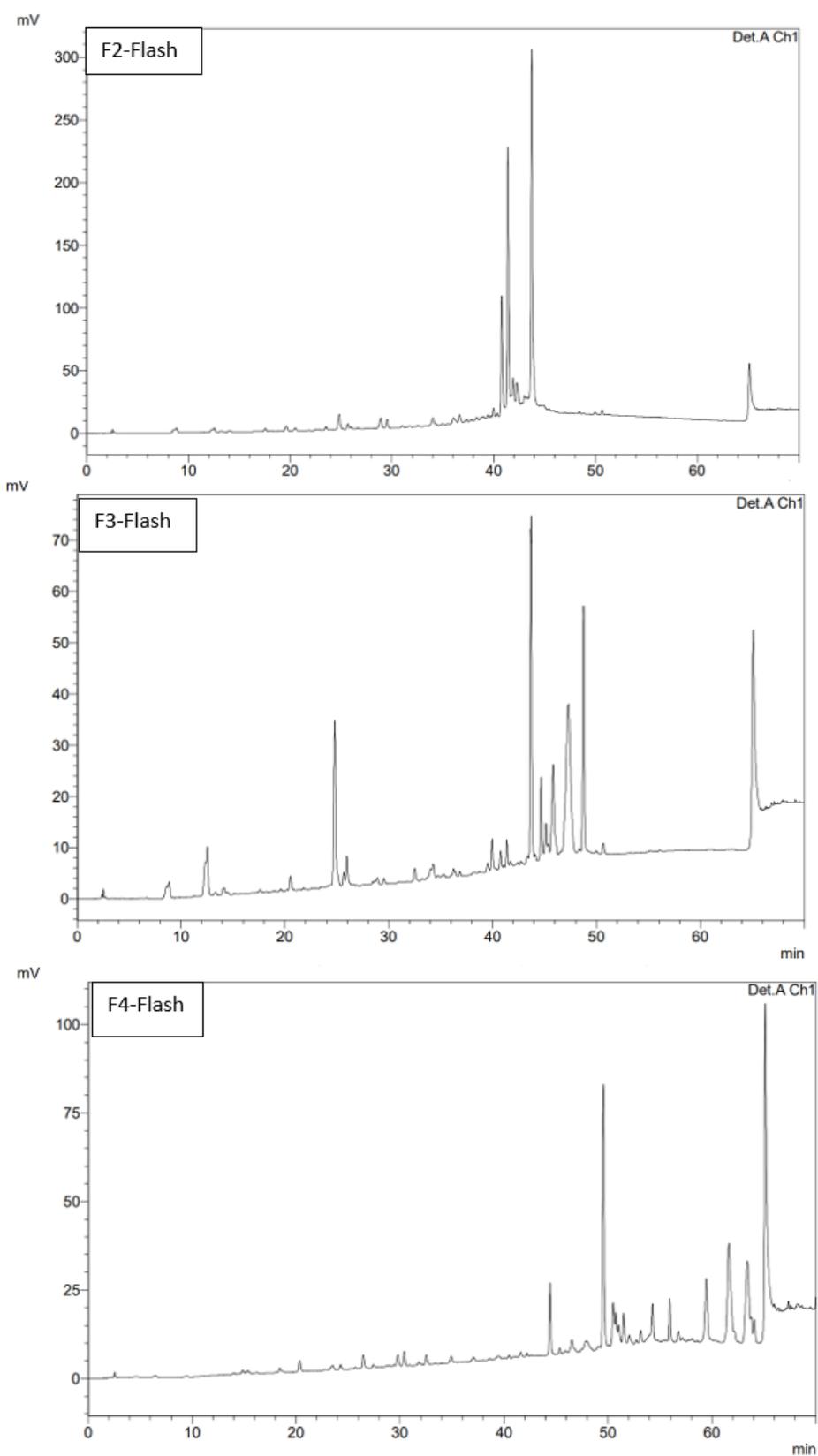
Avant filtration

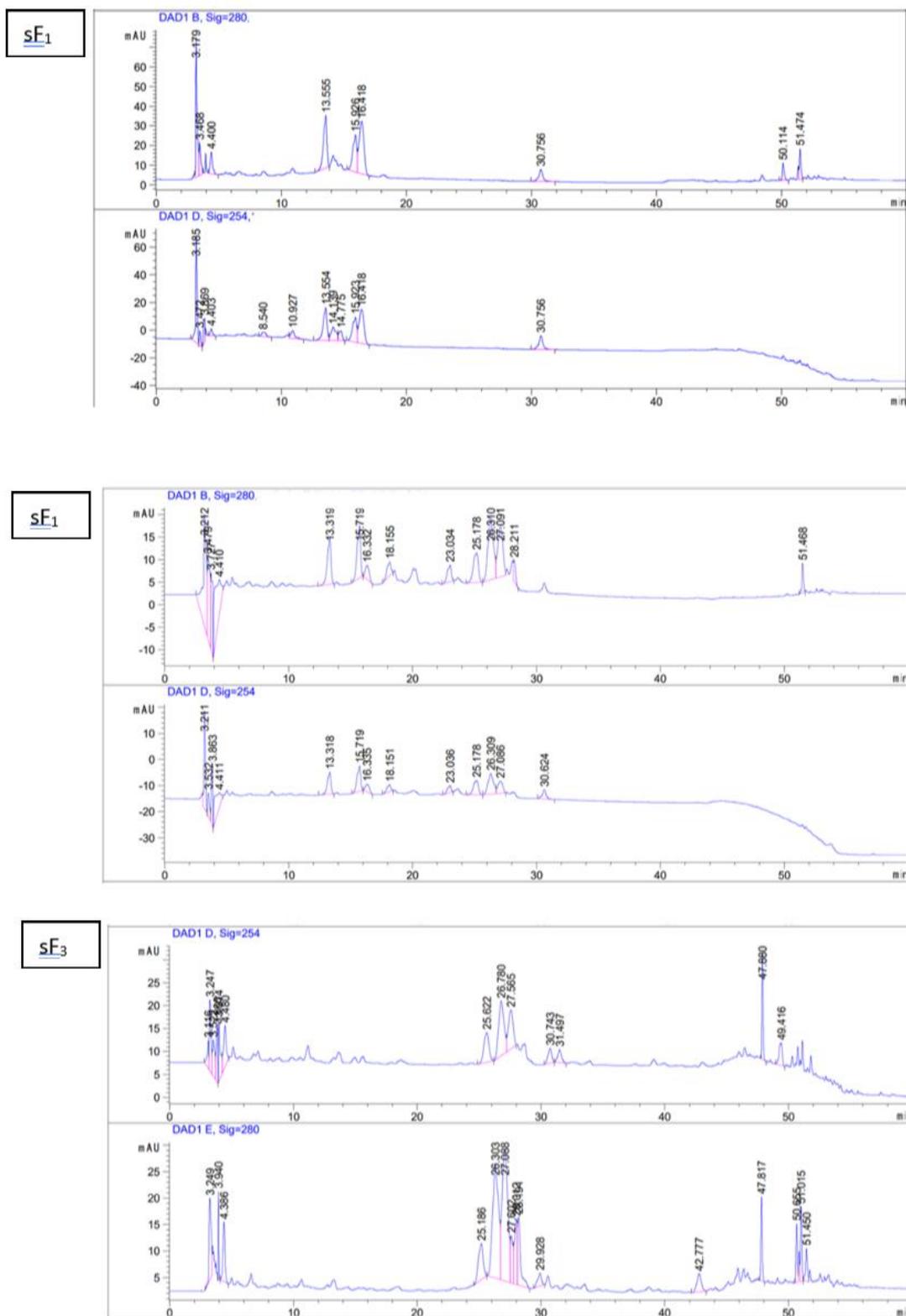


Après filtration

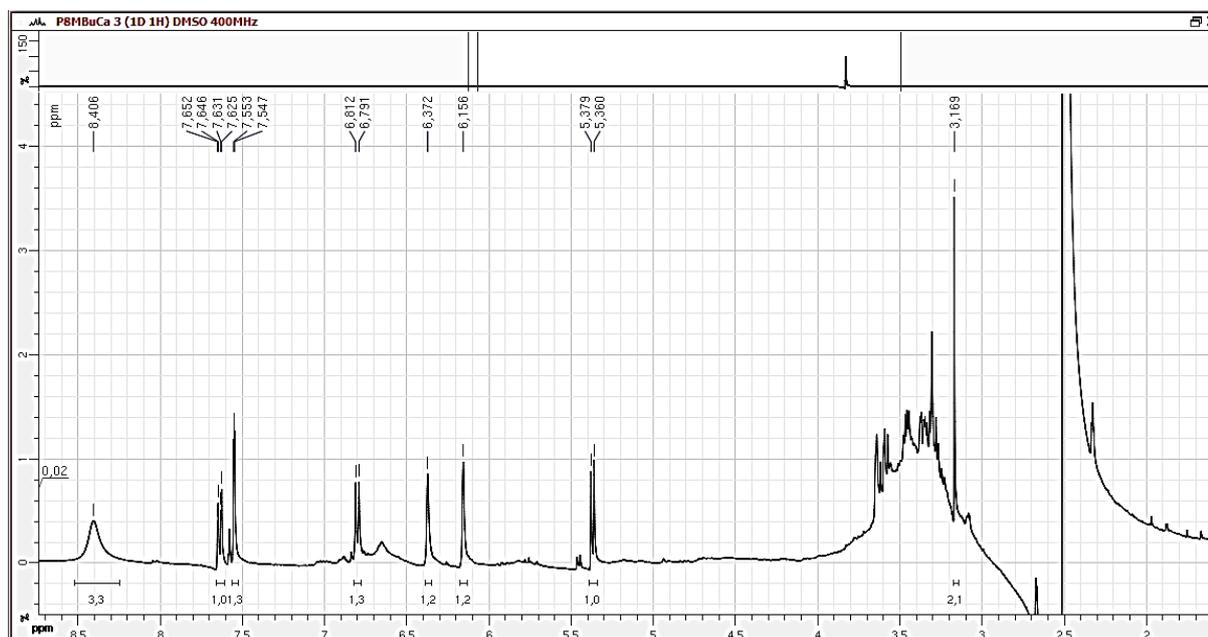


Annexe 3: chromatogrammes CLHP des fractions obtenues par Flash chromatographie à partir de l'extrait méthanolique des boutons floraux de *Crataegus azarolus*

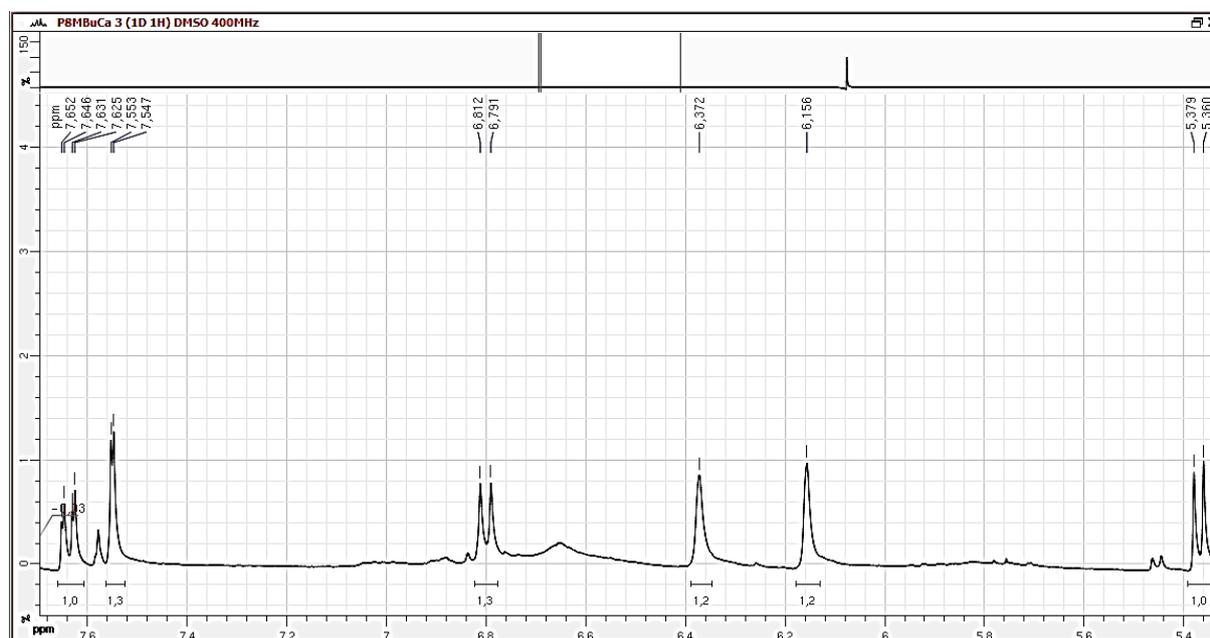




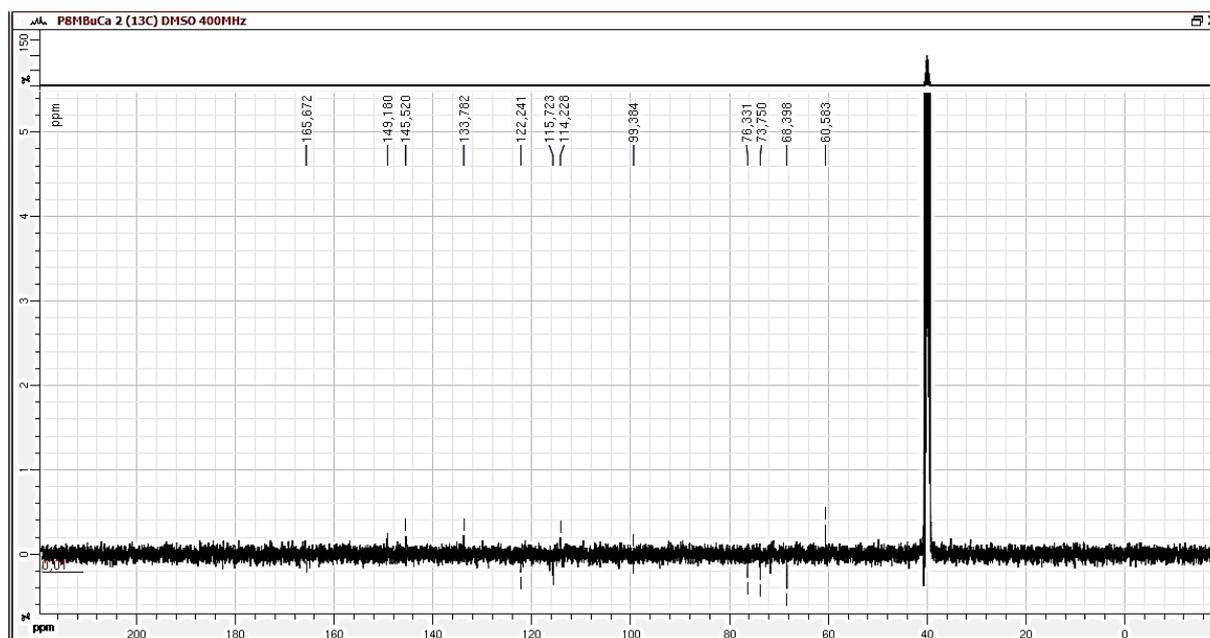
Spectre RMN ^1H (vue d'ensemble) (400,13 MHz, DMSO-d₆)



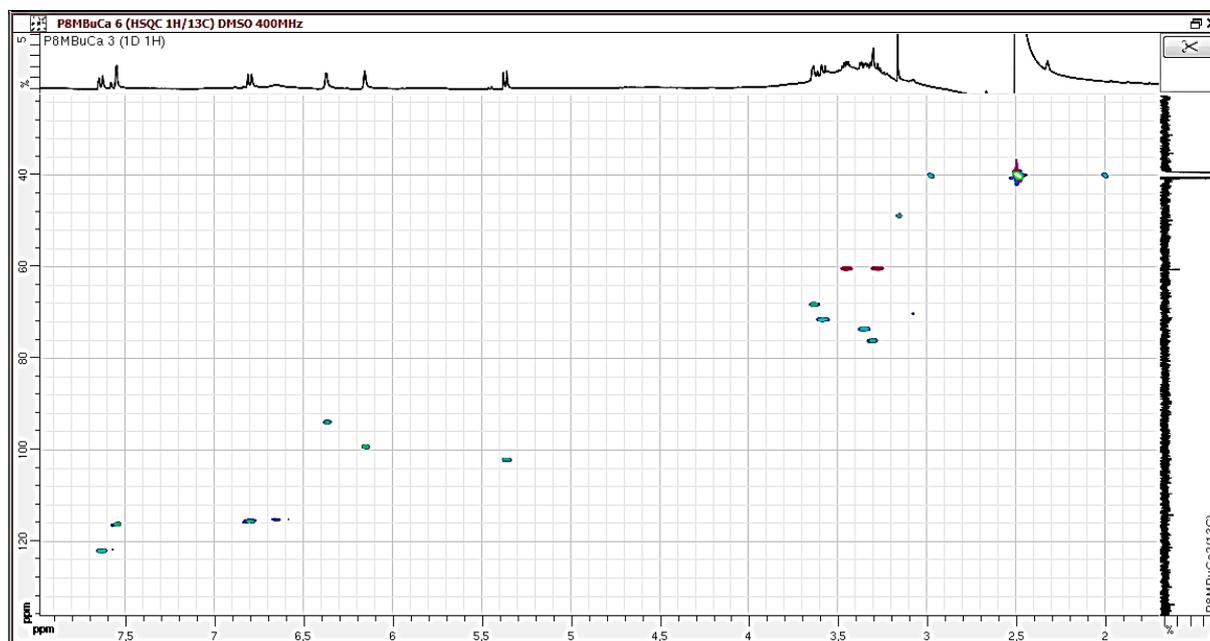
Spectre RMN ^1H (Agrandissement) (400,13 MHz, DMSO-d₆)



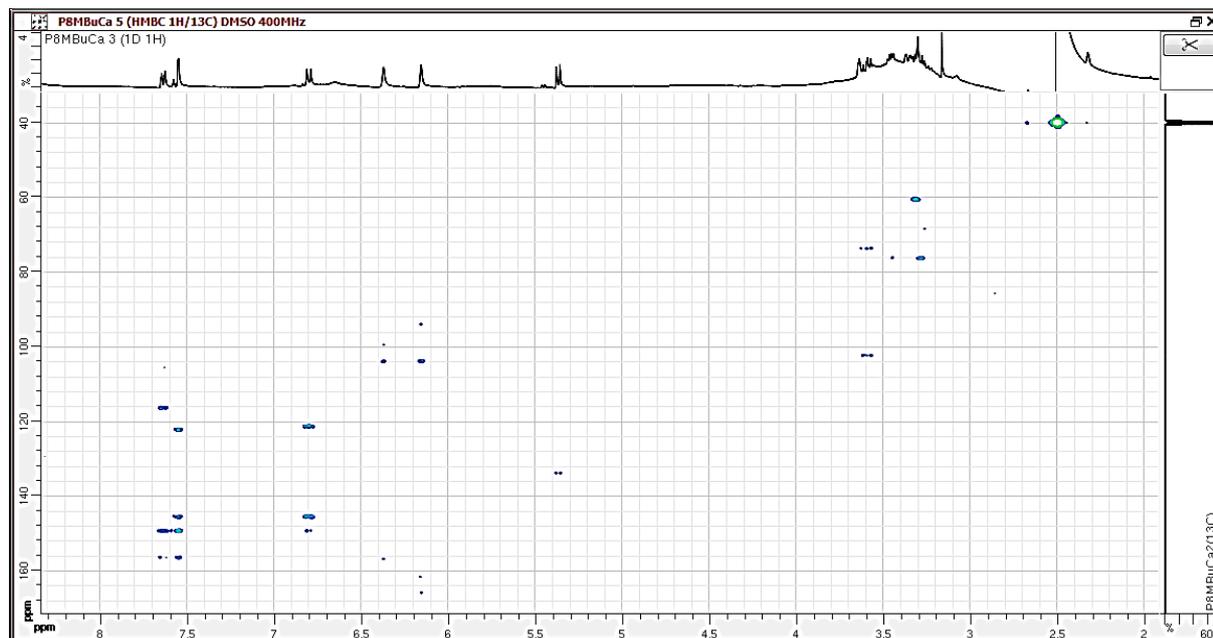
Spectre RMN ^{13}C ((100,6 MHz, DMSO-d₆))



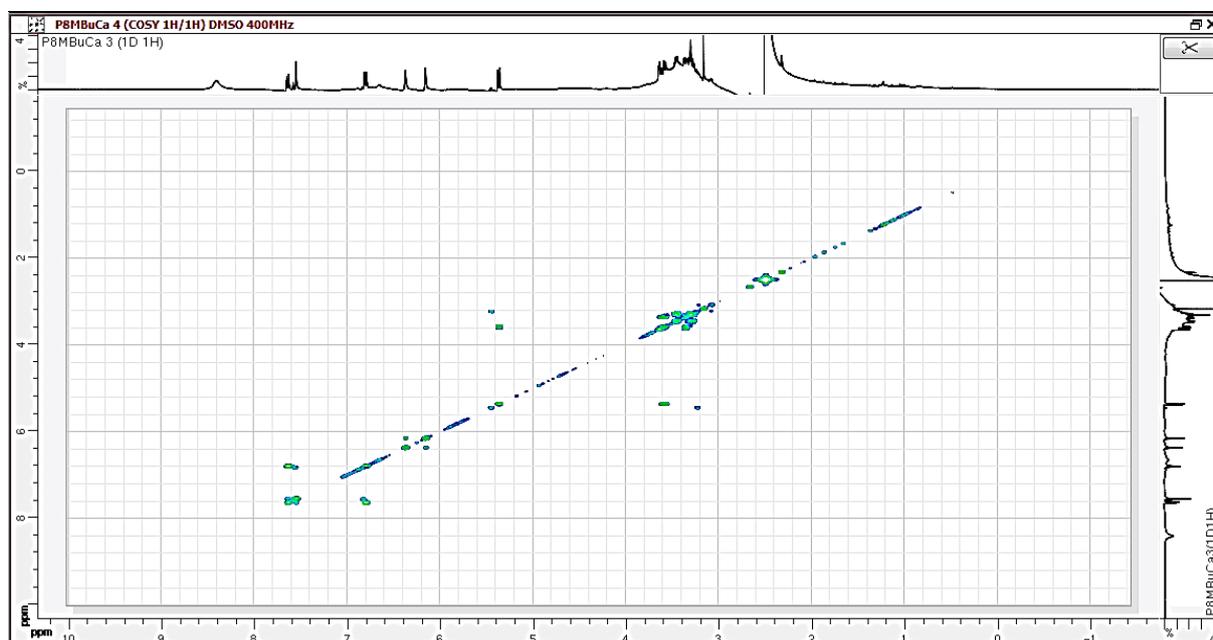
Spectre HSQC (400,13 MHz, DMSO-d₆)



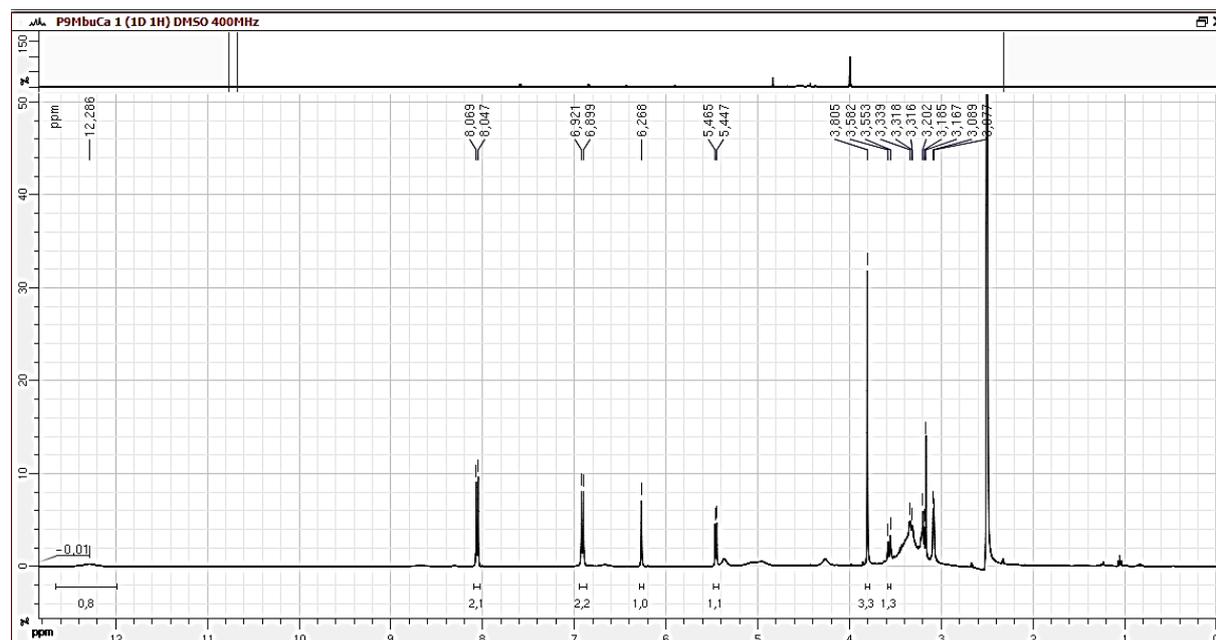
Spectre HMBC (400,13 MHz, DMSO-d6)



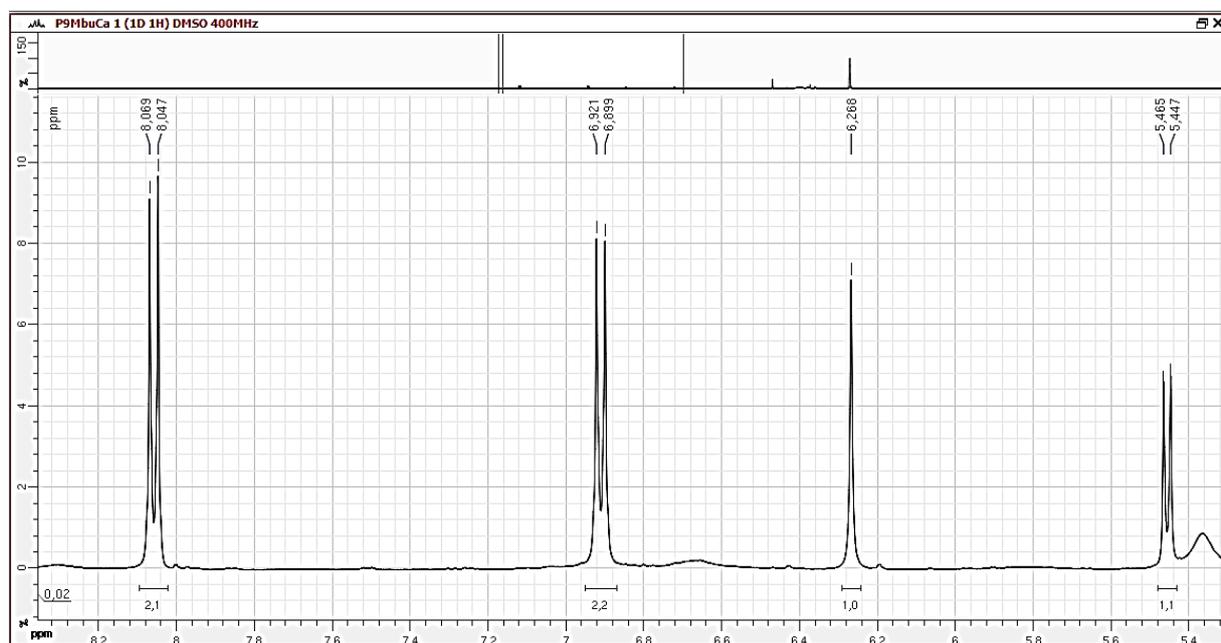
Spectre COSY (400,13 MHz, DMSO-d6)



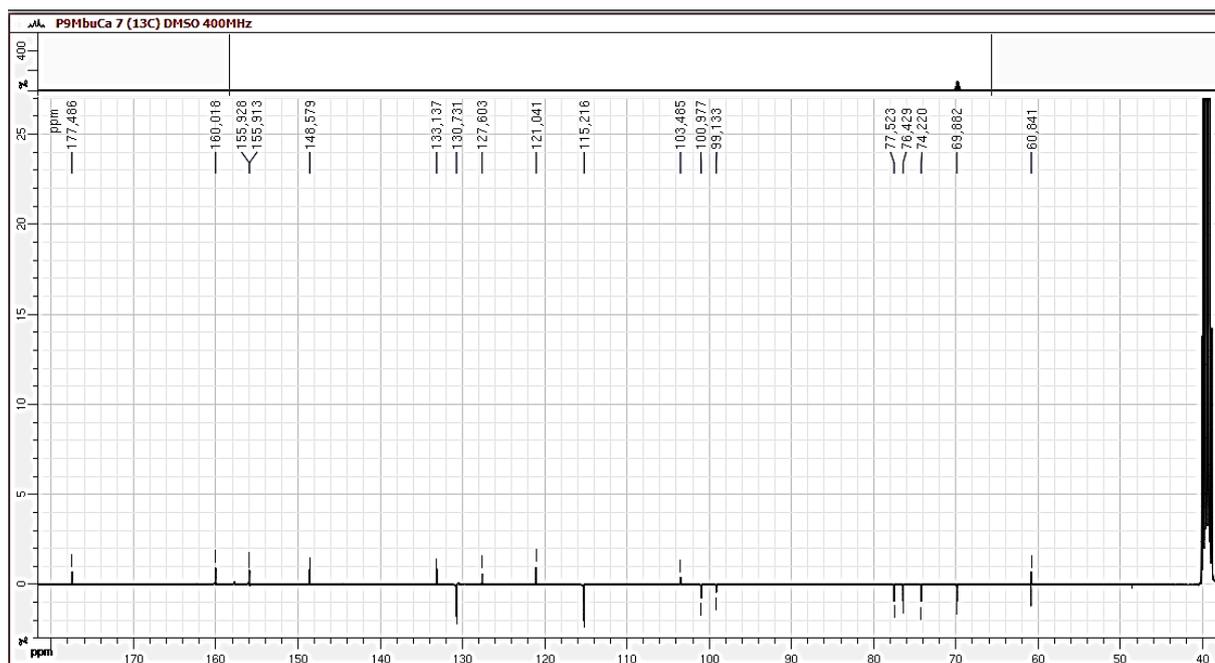
Spectre RMN ^1H (Vue d'ensemble) (400,13 MHz, DMSO-d6)



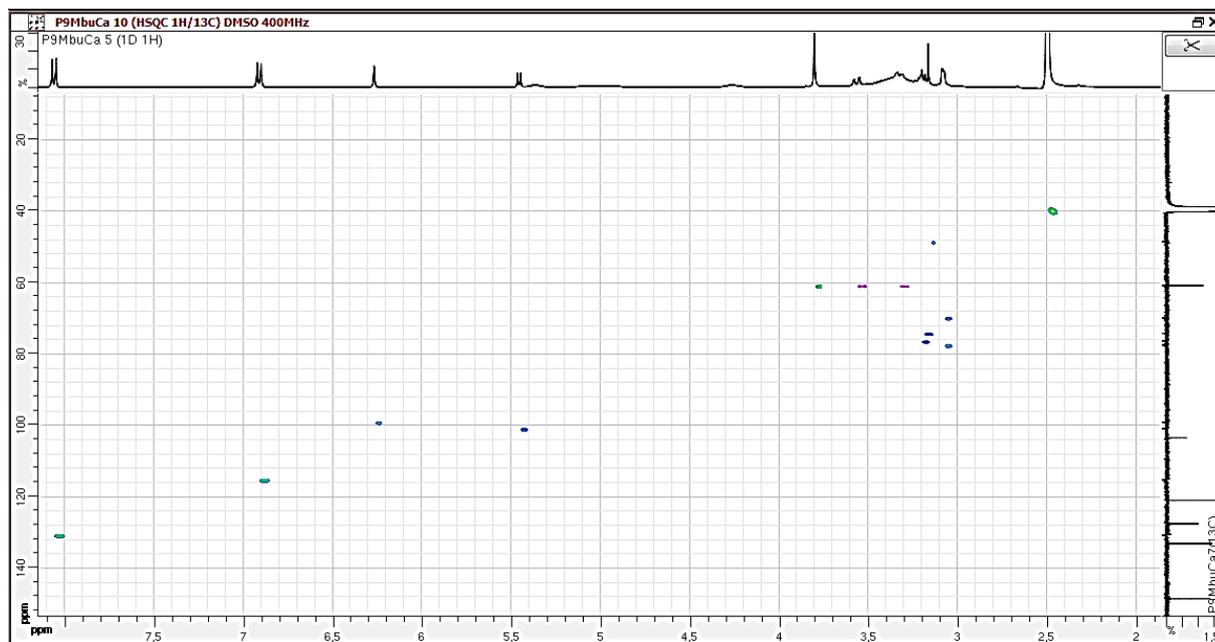
Spectre RMN ^1H (Agrandissement) (400,13 MHz, DMSO-d6)



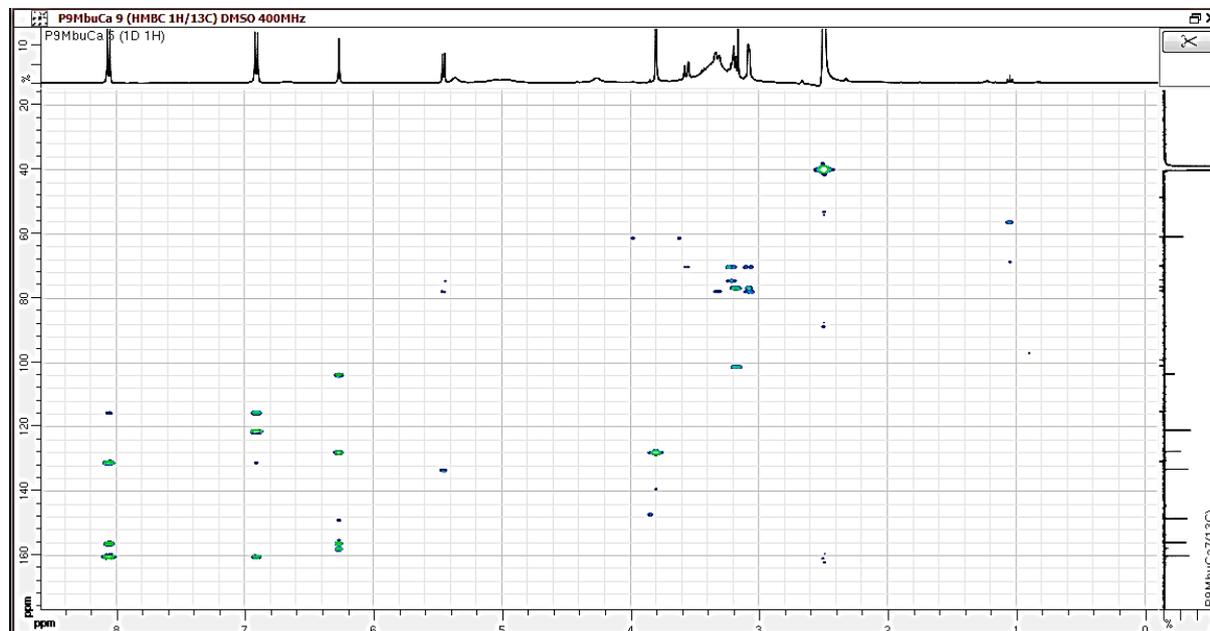
Spectre RMN ^{13}C (100,6 MHz, DMSO-d₆)



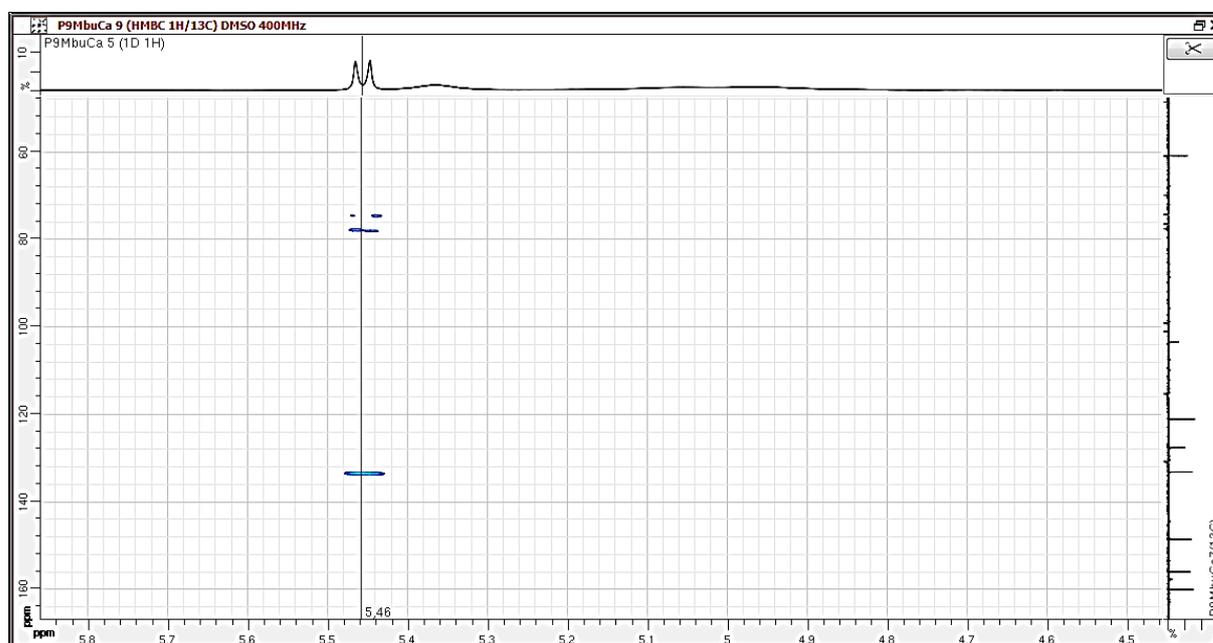
Spectre HSQC (400,13 MHz, DMSO-d₆)



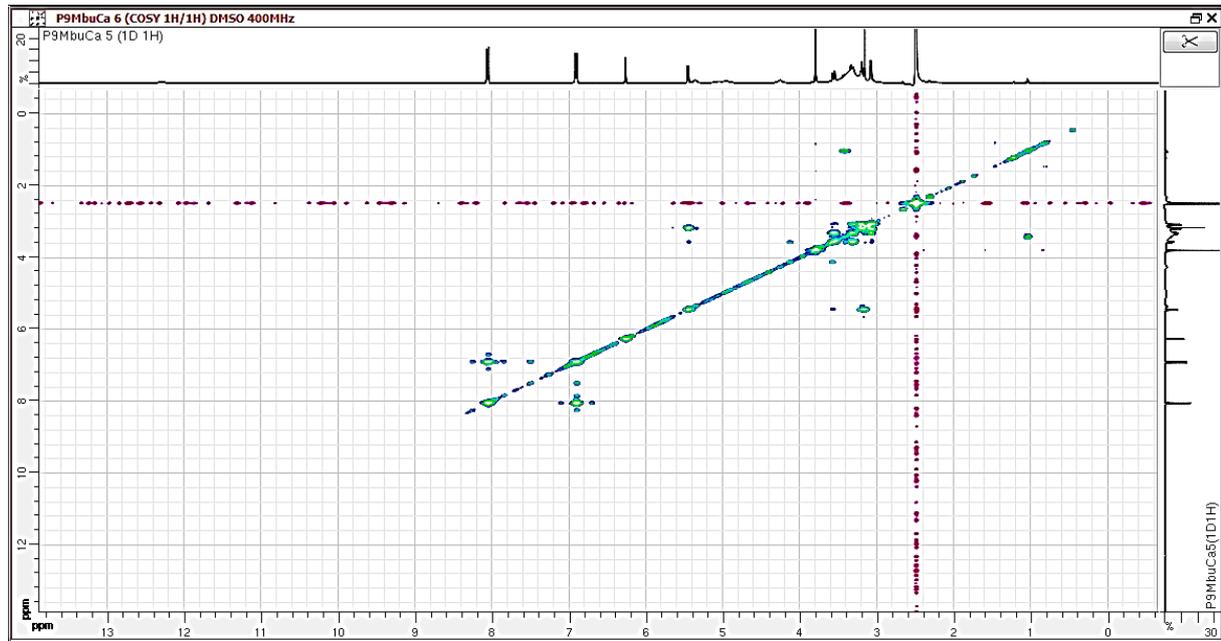
Spectre HMBC (400,13 MHz, DMSO-d6)



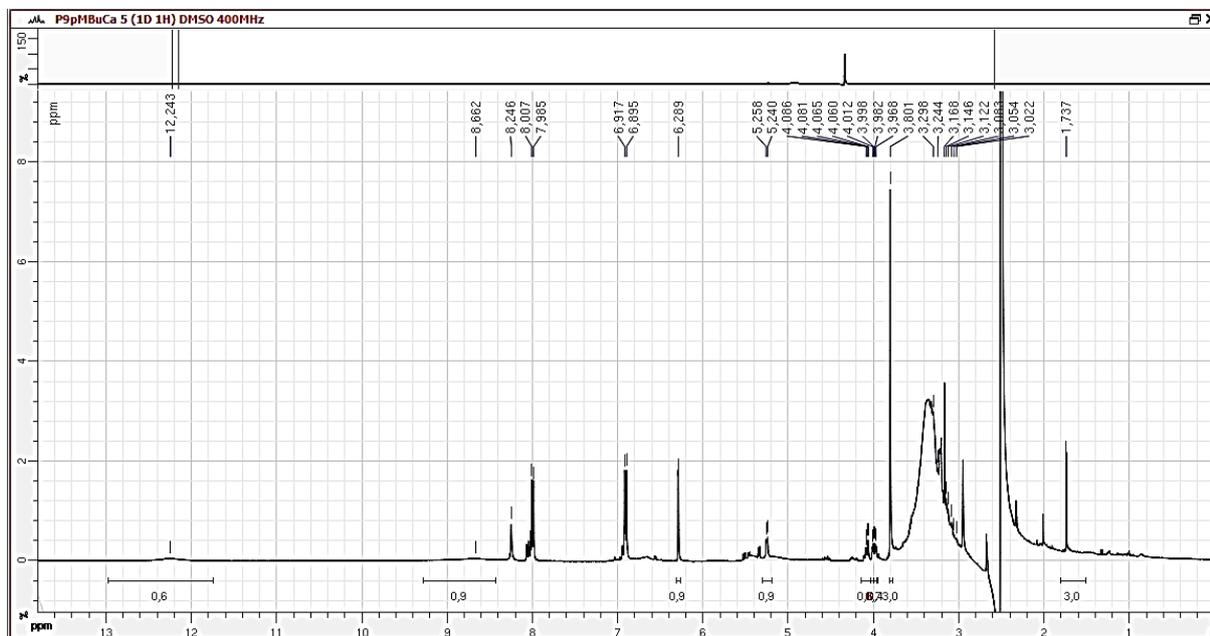
Spectre HMBC (Agrandissement) (400,13 MHz, DMSO-d6)



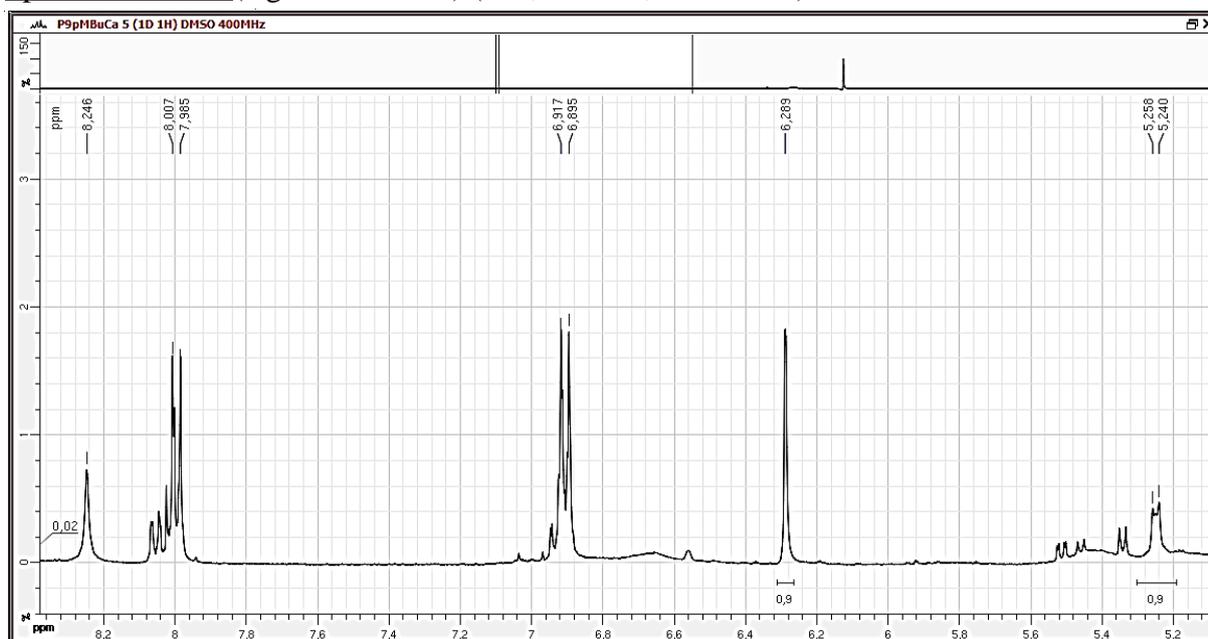
Spectre COSY (400,13 MHz, DMSO-d6)



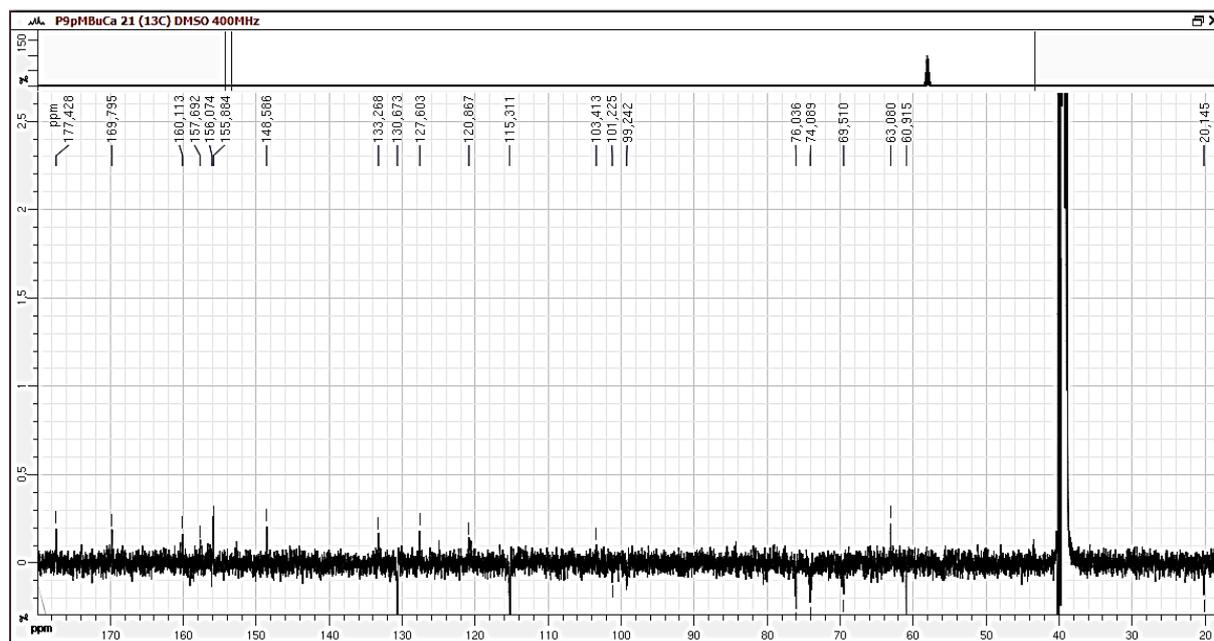
Spectre RMN ¹H (Vue d'ensemble) (400,13 MHz, DMSO-d₆)



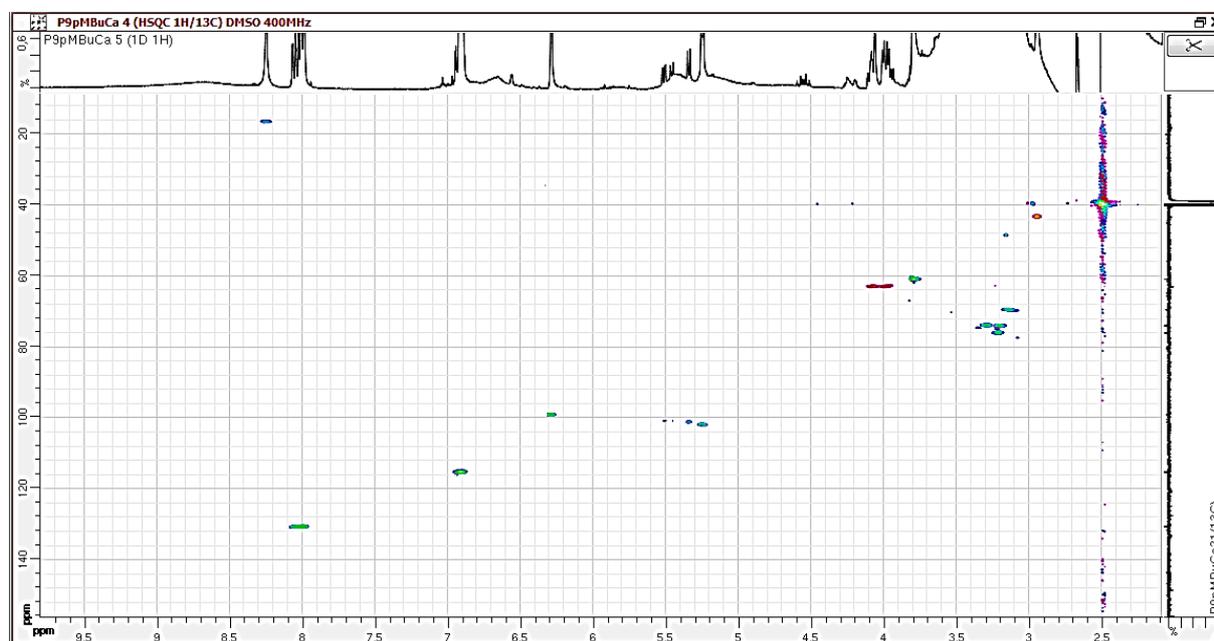
Spectre RMN ¹H (Agrandissement) (400,13 MHz, DMSO-d₆)



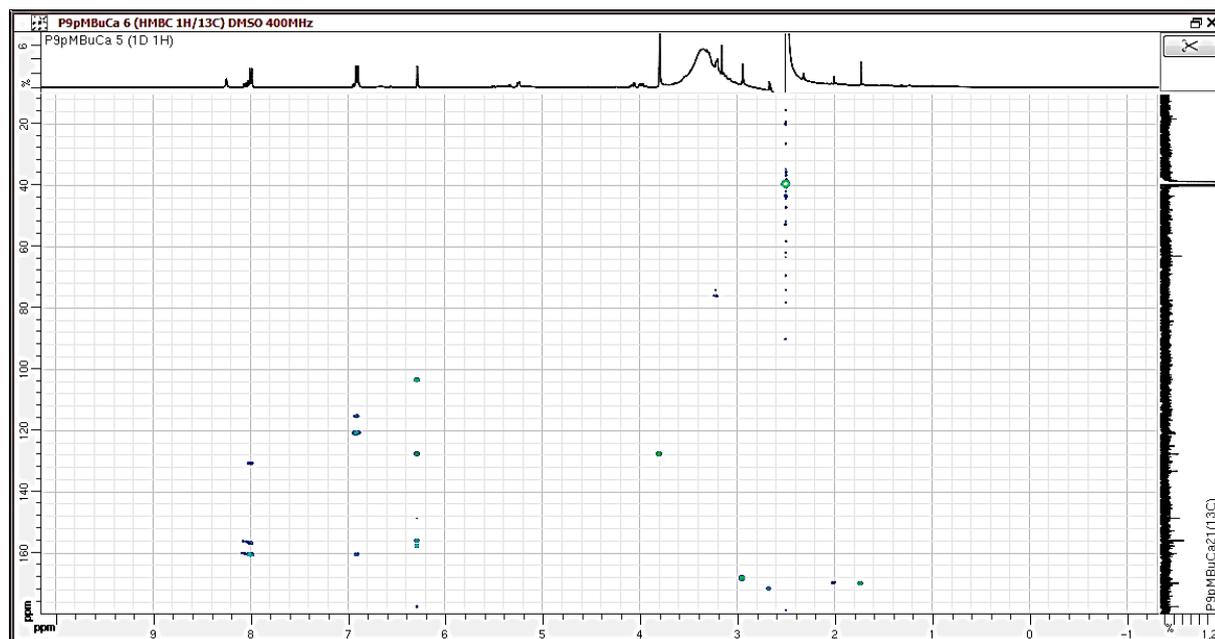
Spectre RMN ^{13}C (100,6 MHz, DMSO-d₆)



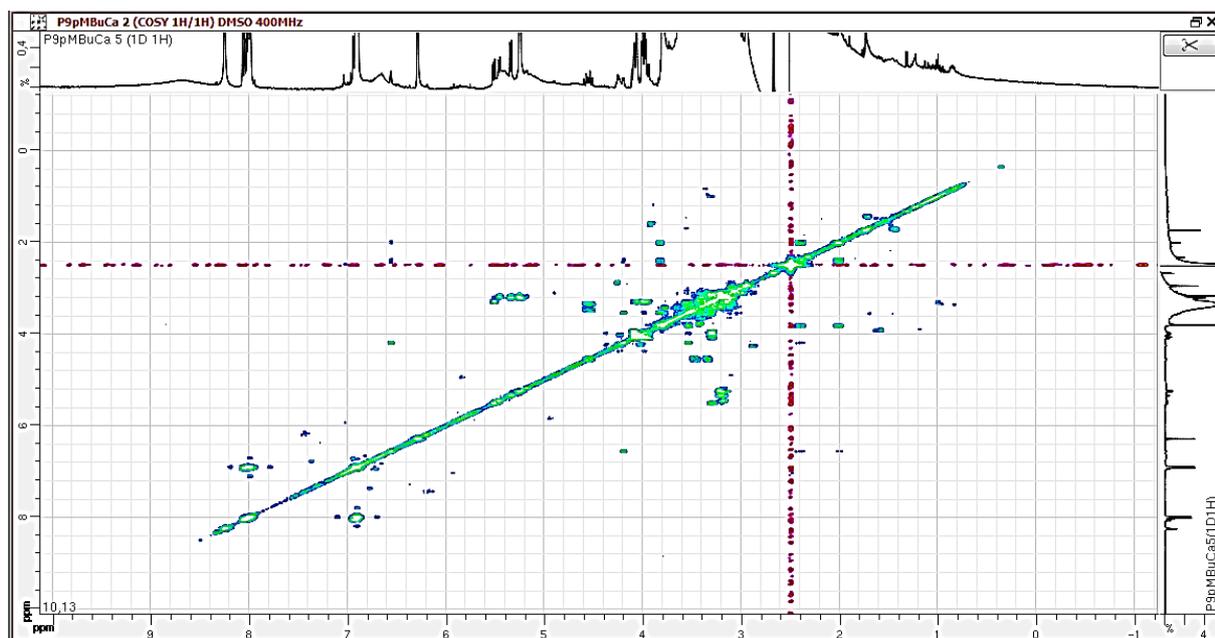
Spectre HSQC (400,13 MHz, DMSO-d₆)



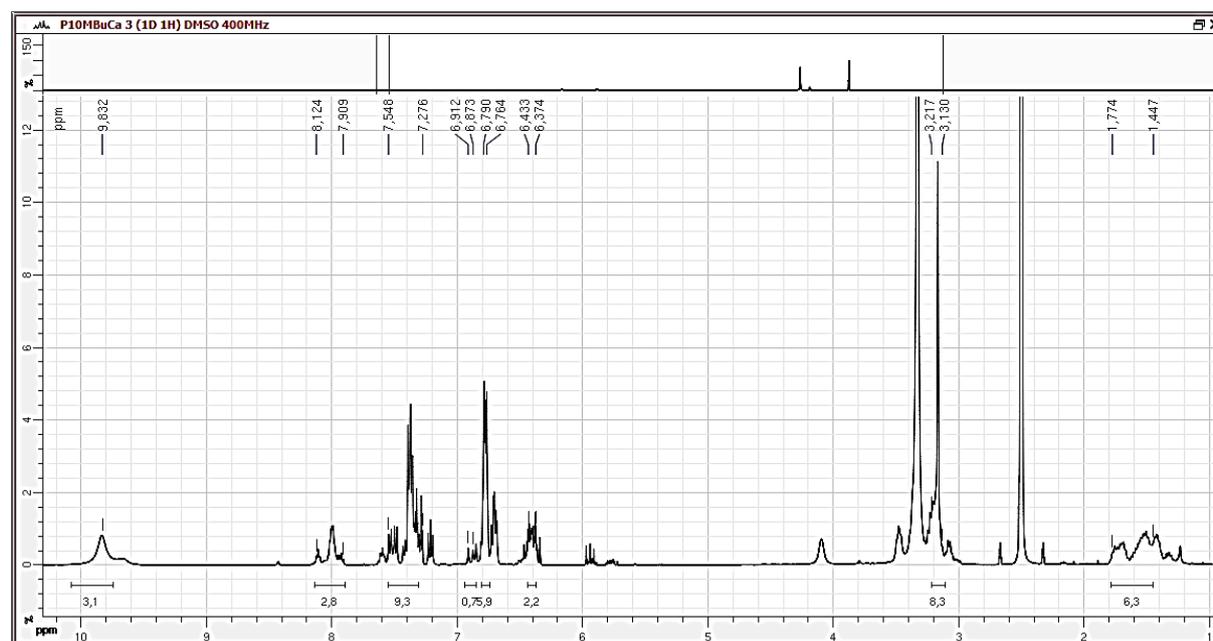
Spectre HMBC (400,13 MHz, DMSO-d6)



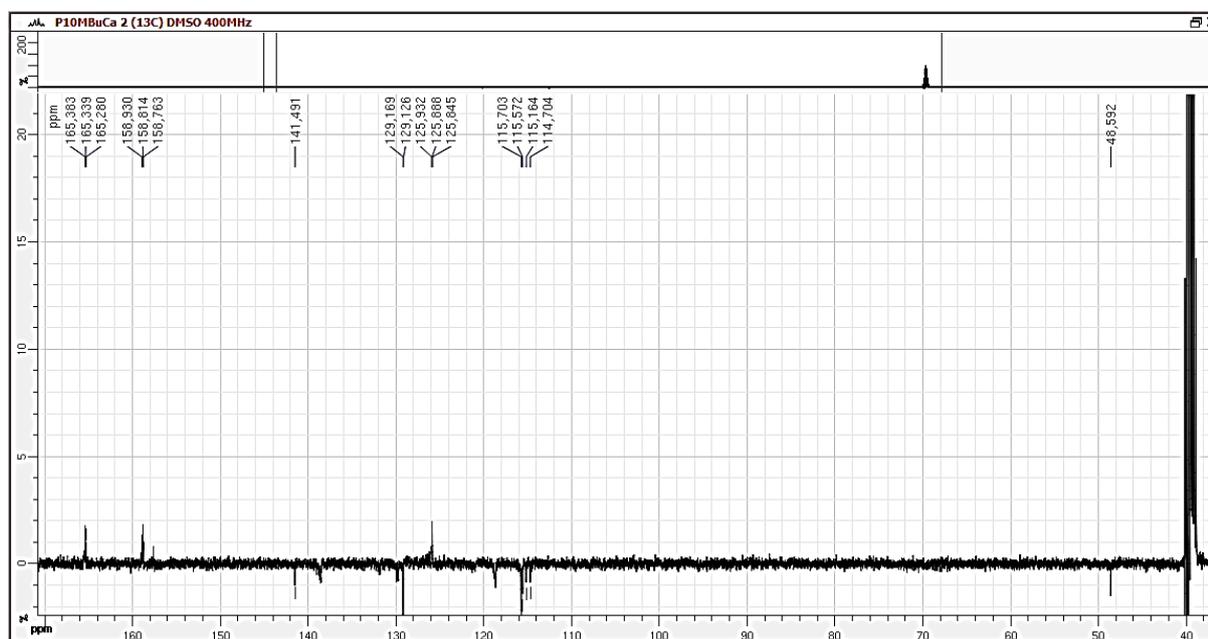
Spectre COSY (400,13 MHz, DMSO-d6)



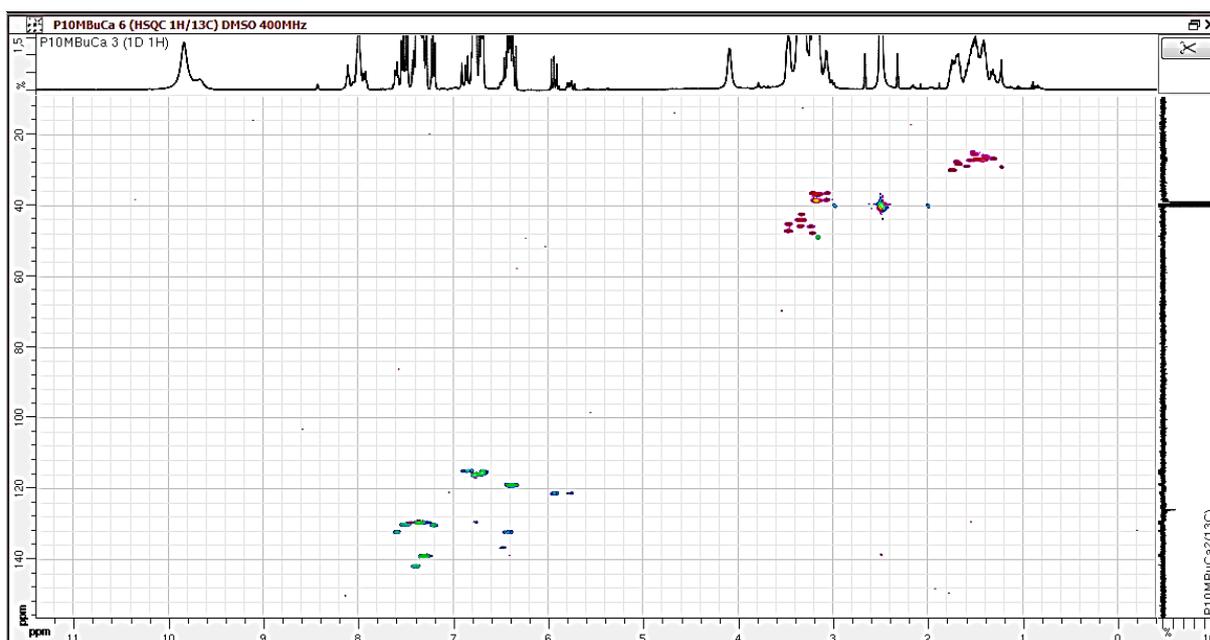
Spectre RMN ^1H (400,13 MHz, DMSO-d₆)



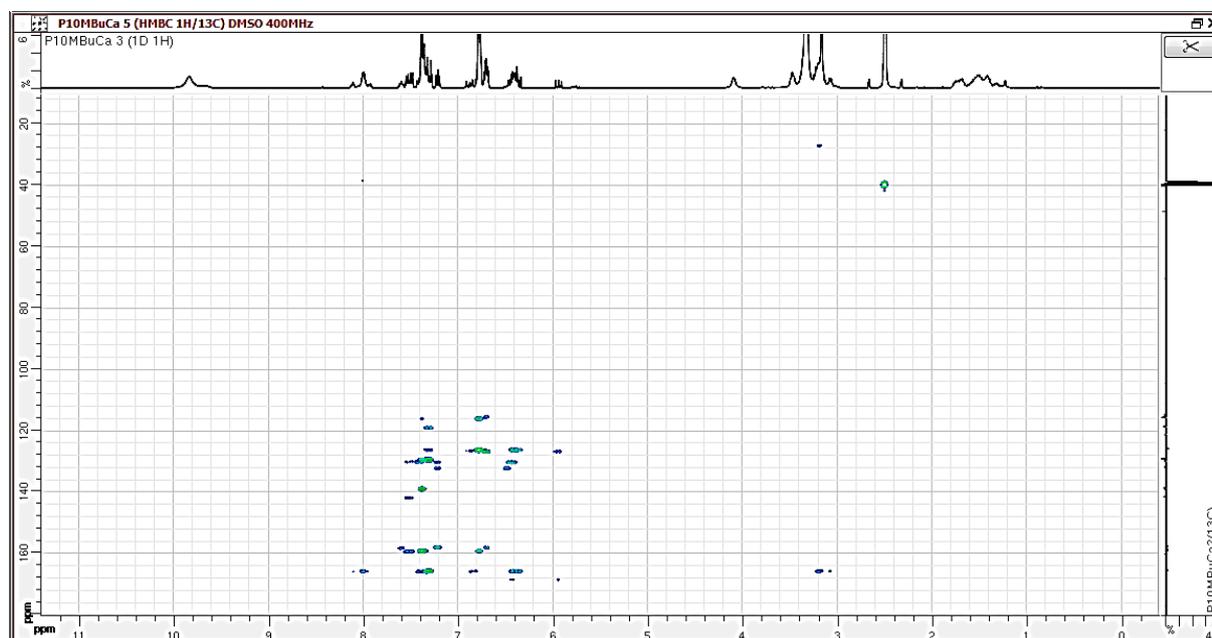
Spectre RMN ^{13}C (100,6 MHz, DMSO-d₆)



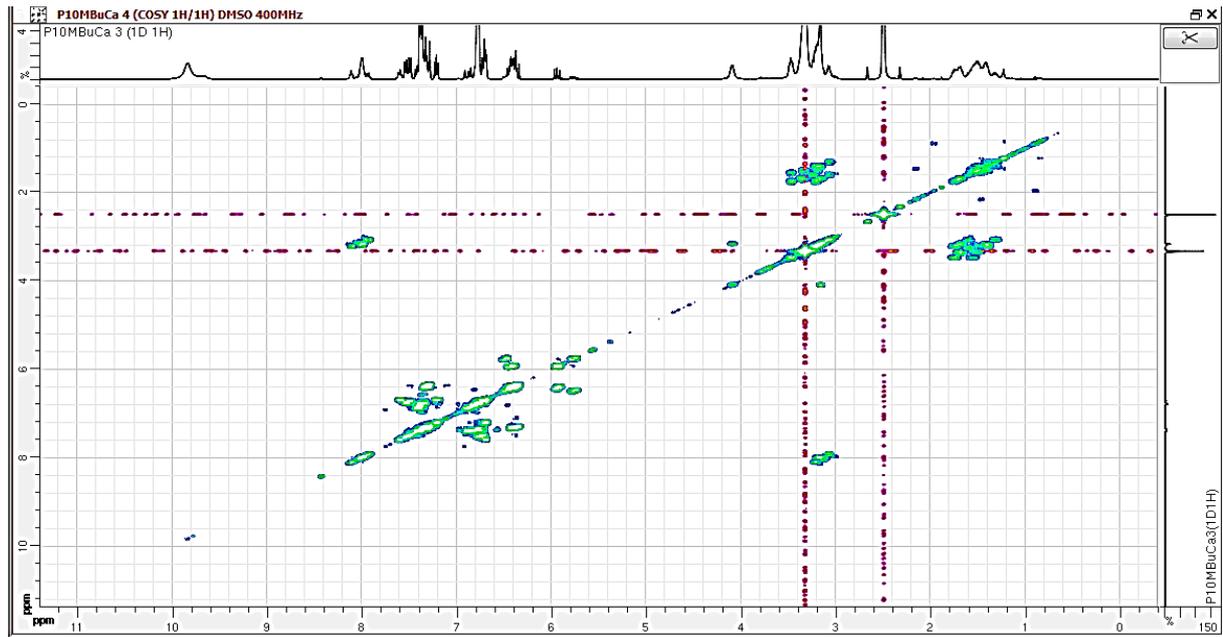
Spectre HSQC (400,13 MHz, DMSO-d6)



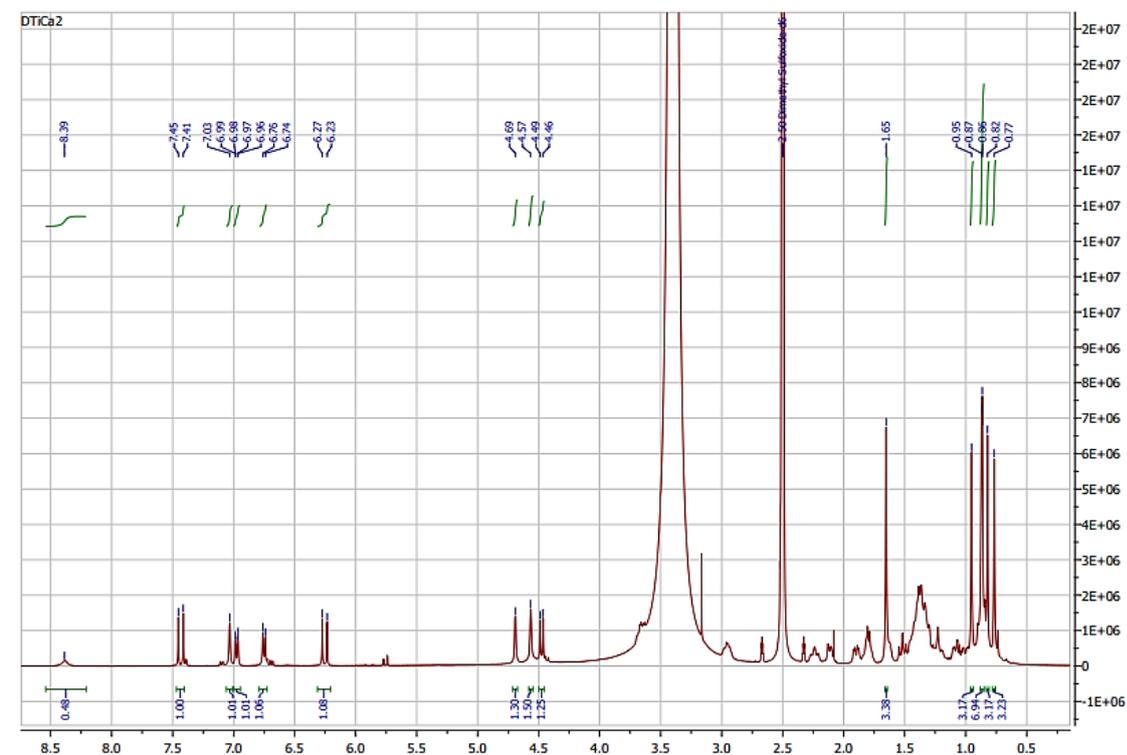
Spectre HMBC (400,13 MHz, DMSO-d6)



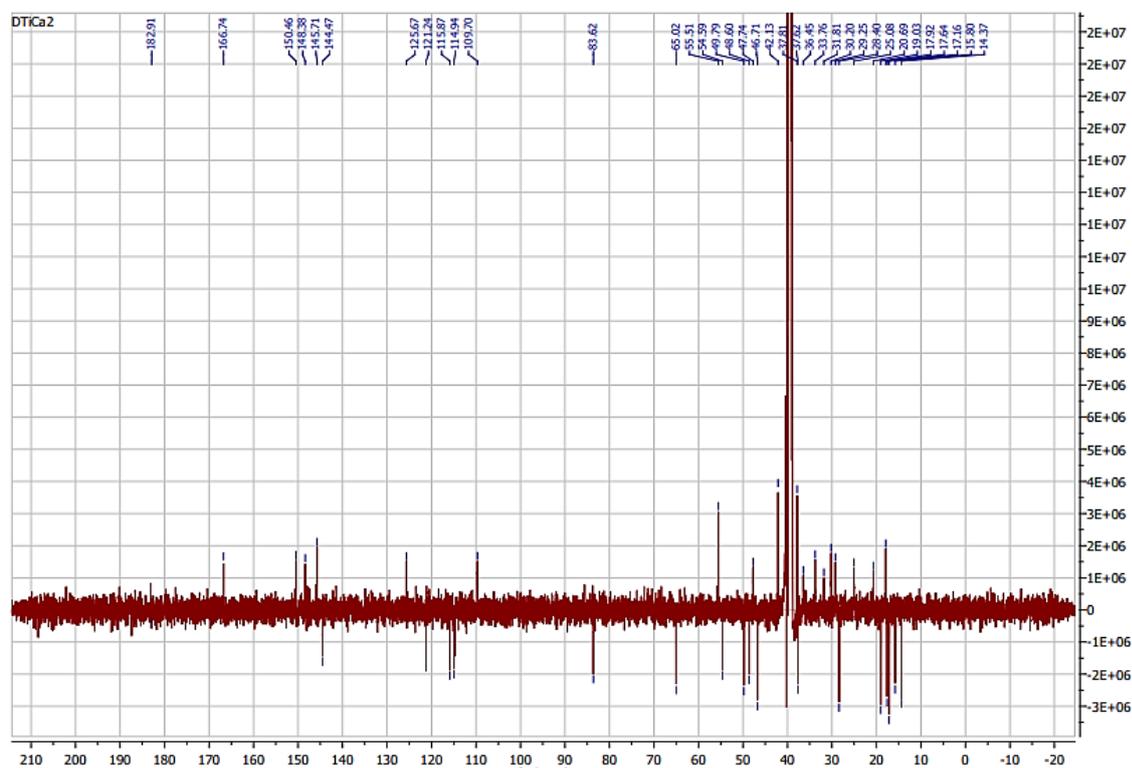
Spectre COSY (400,13 MHz, DMSO-d6)



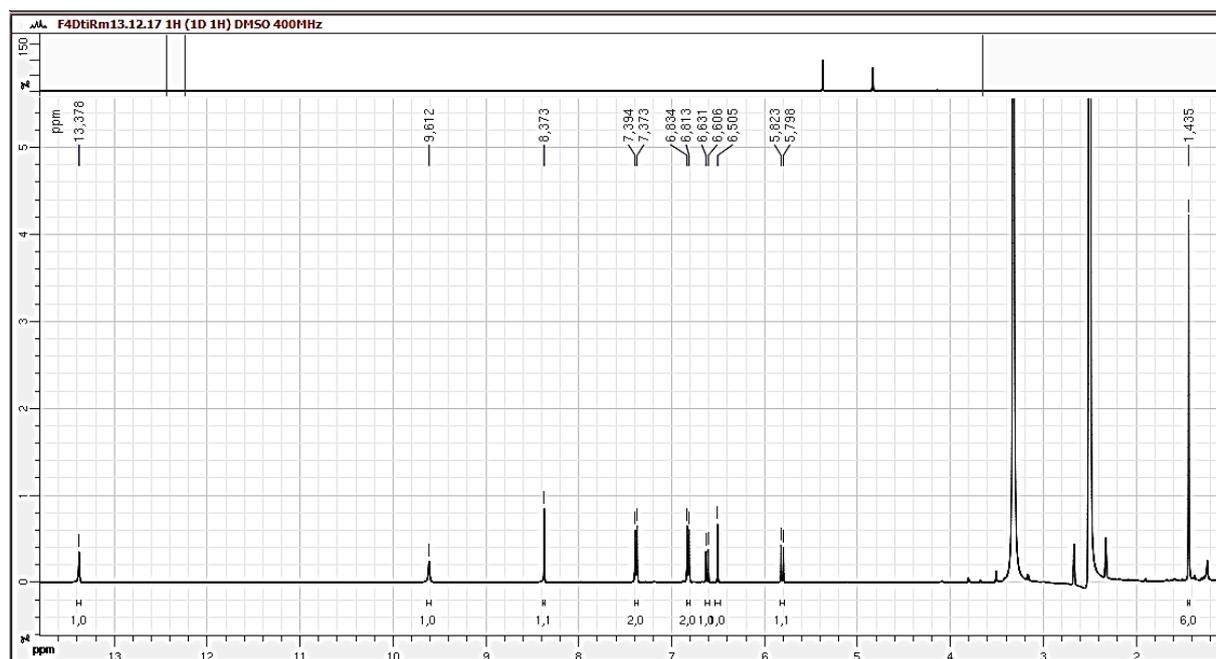
Spectre RMN ^1H (400,13 MHz, DMSO-d $_6$)



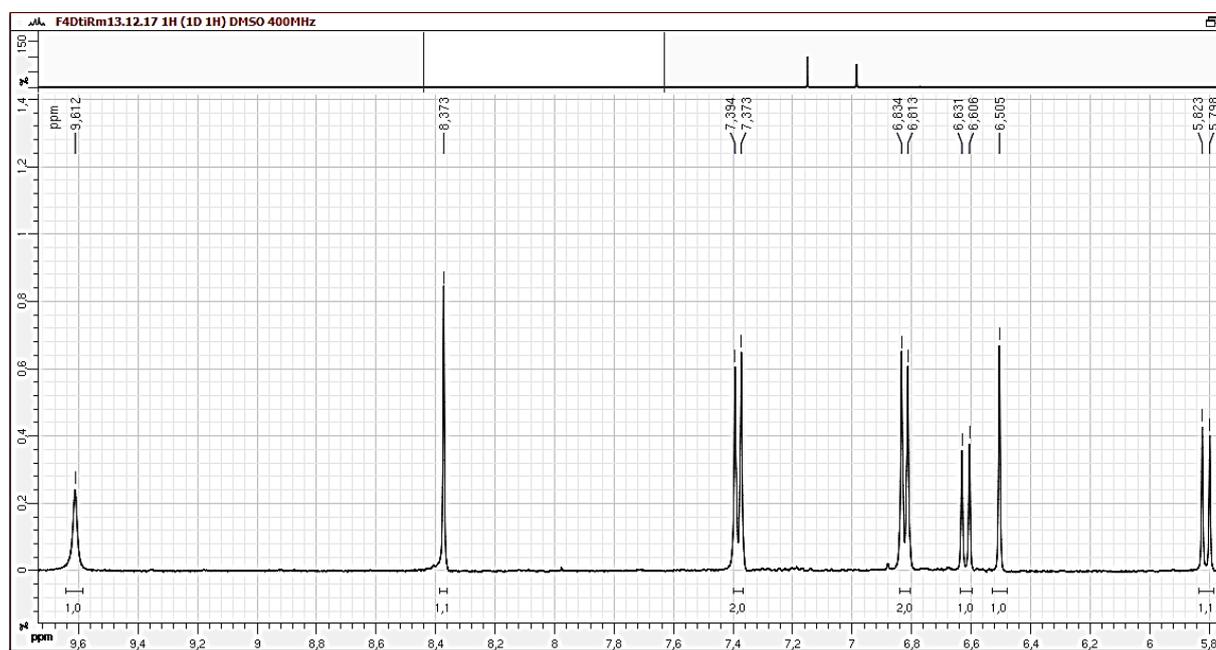
Spectre RMN ^{13}C (100,6 MHz, DMSO-d $_6$)



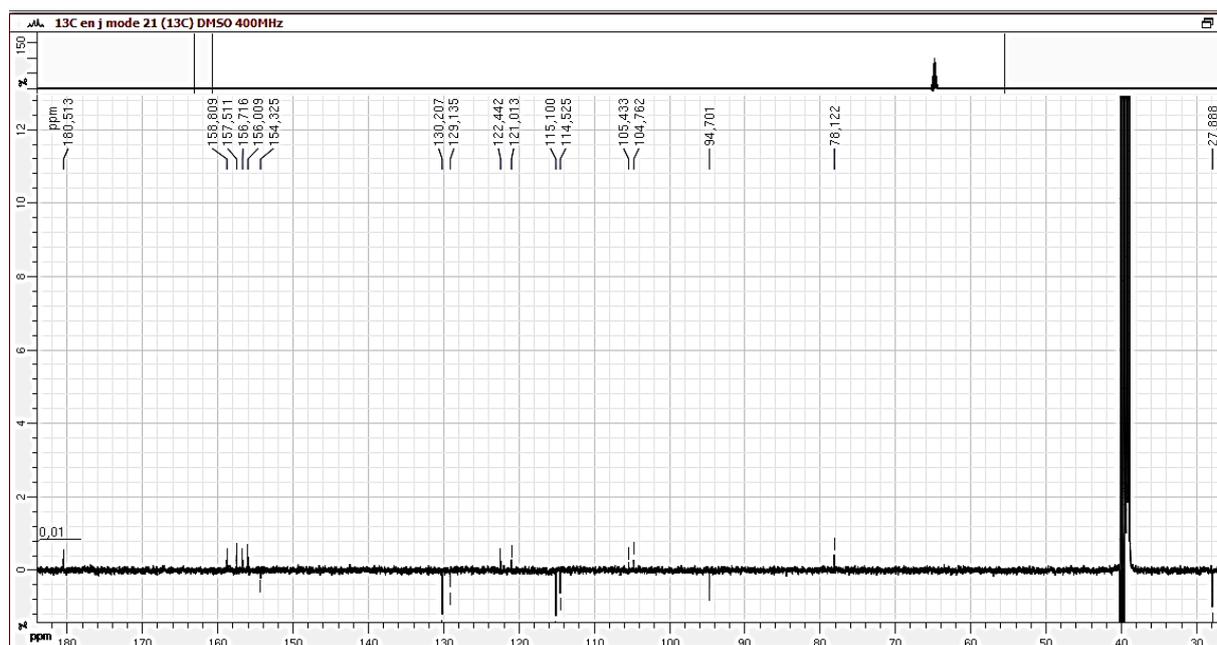
Spectre RMN ^1H (vue d'ensemble) (400,13 MHz, DMSO-d₆)



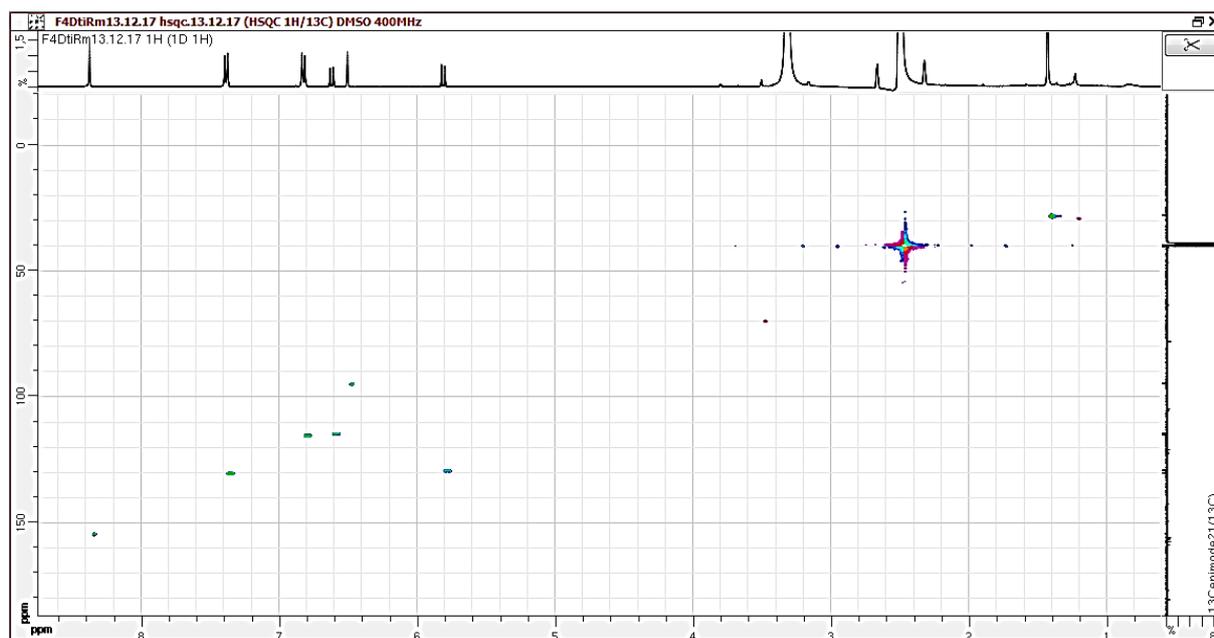
Spectre RMN ^1H (Agrandissement) (400,13 MHz, DMSO-d₆)



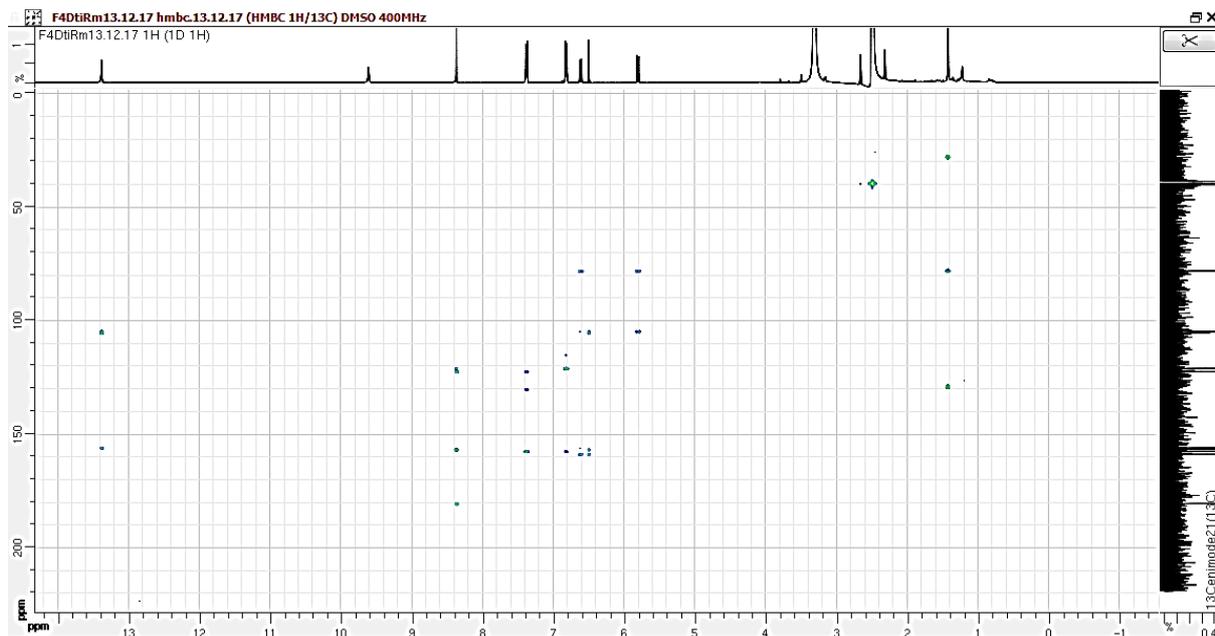
Spectre RMN ^{13}C (100,6 MHz, DMSO-d₆)



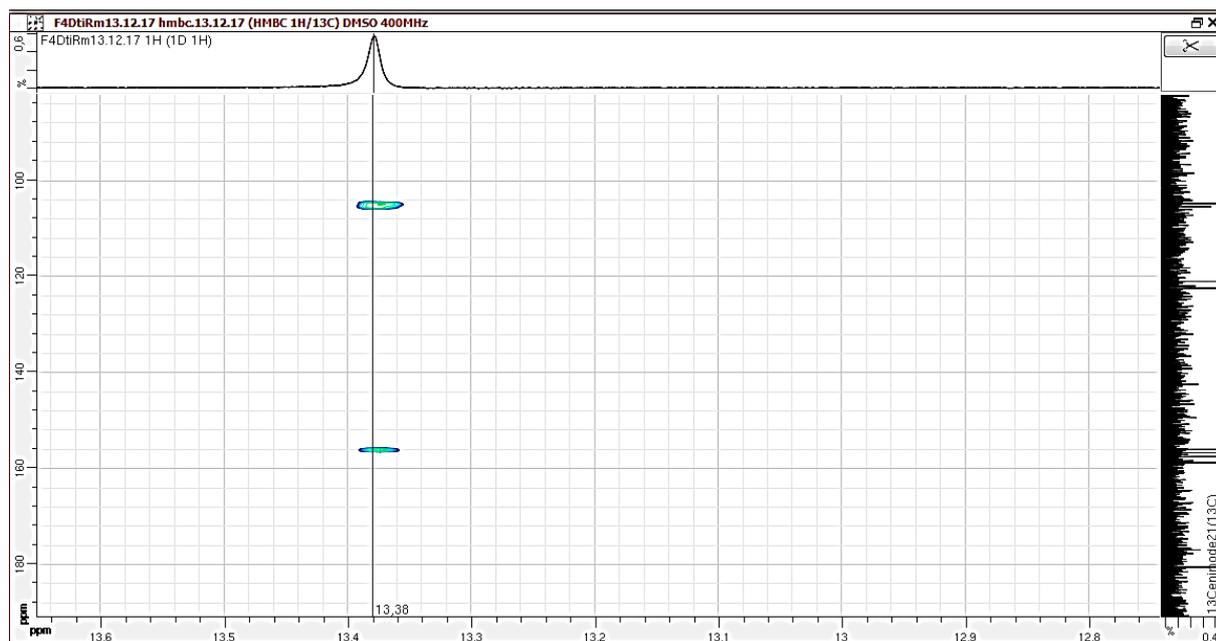
Spectre HSQC (400,13 MHz, DMSO-d₆)



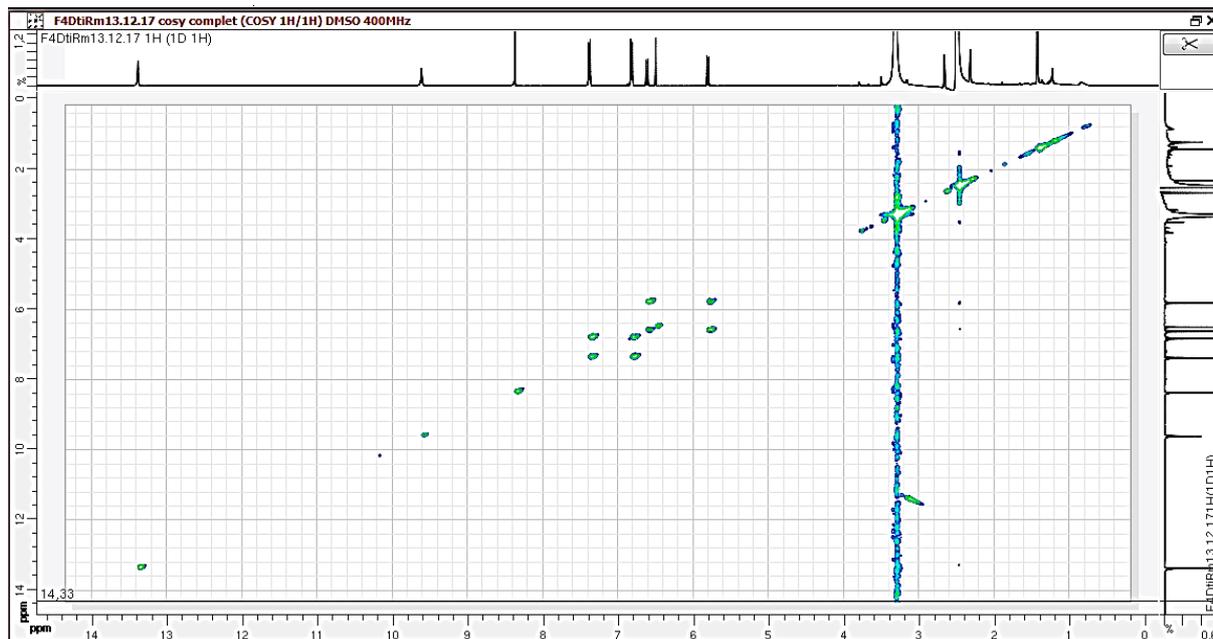
Spectre HMBC (Vue d'ensemble) (400,13 MHz, DMSO-d6)



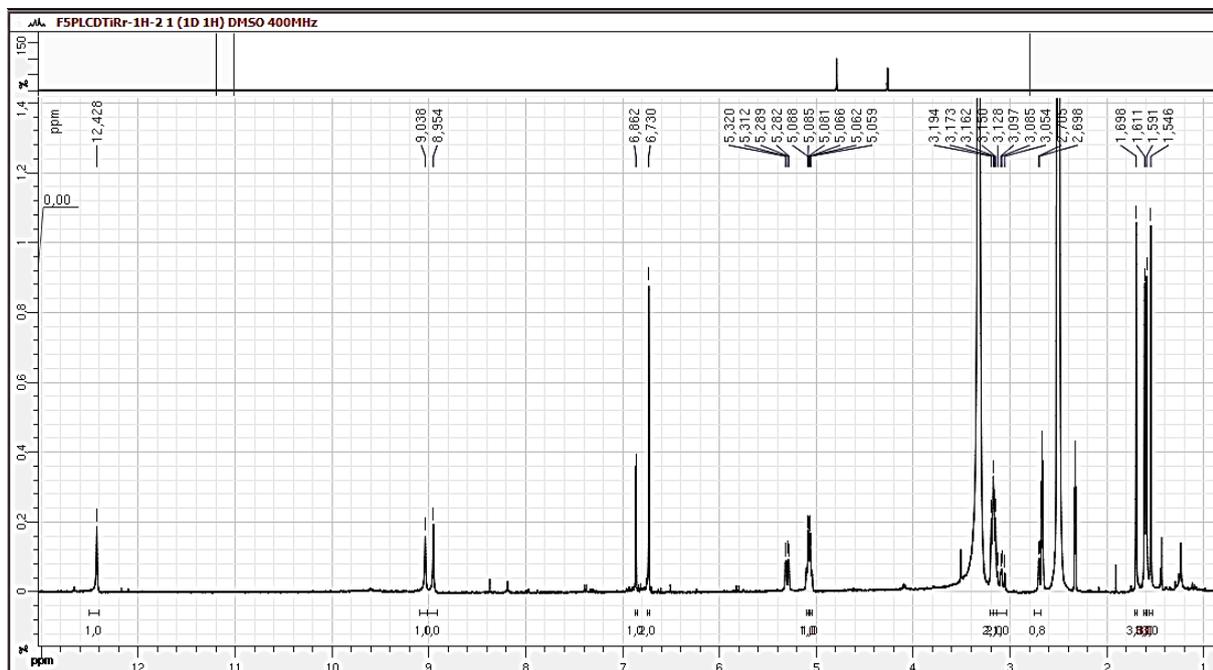
Spectre HMBC (Agrandissement) (400,13 MHz, DMSO-d6)



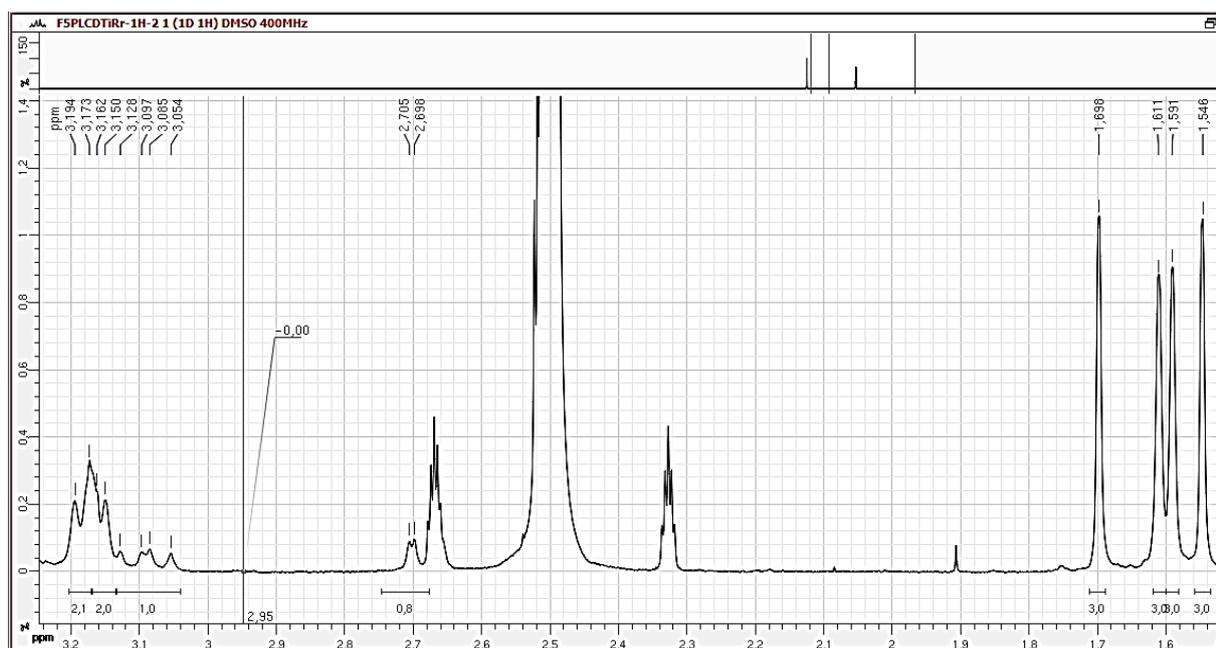
Spectre COSY (400,13 MHz, DMSO-d6)



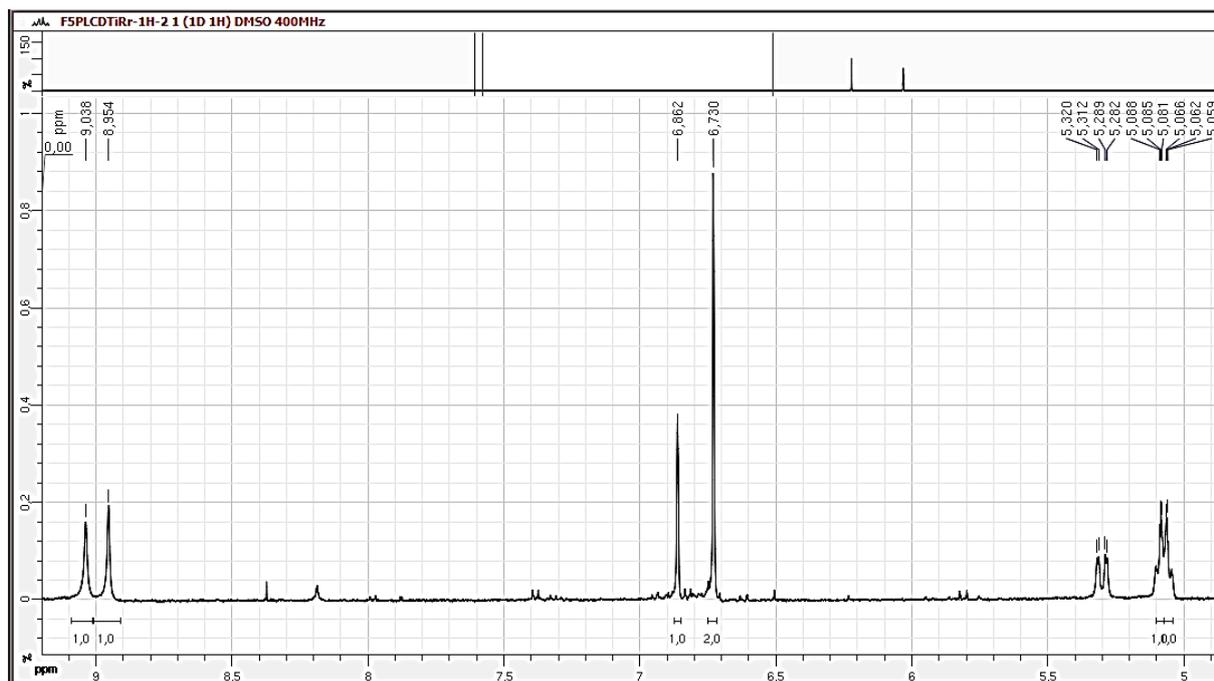
Spectre RMN ^1H (vue d'ensemble) (400,13 MHz, DMSO-d6)



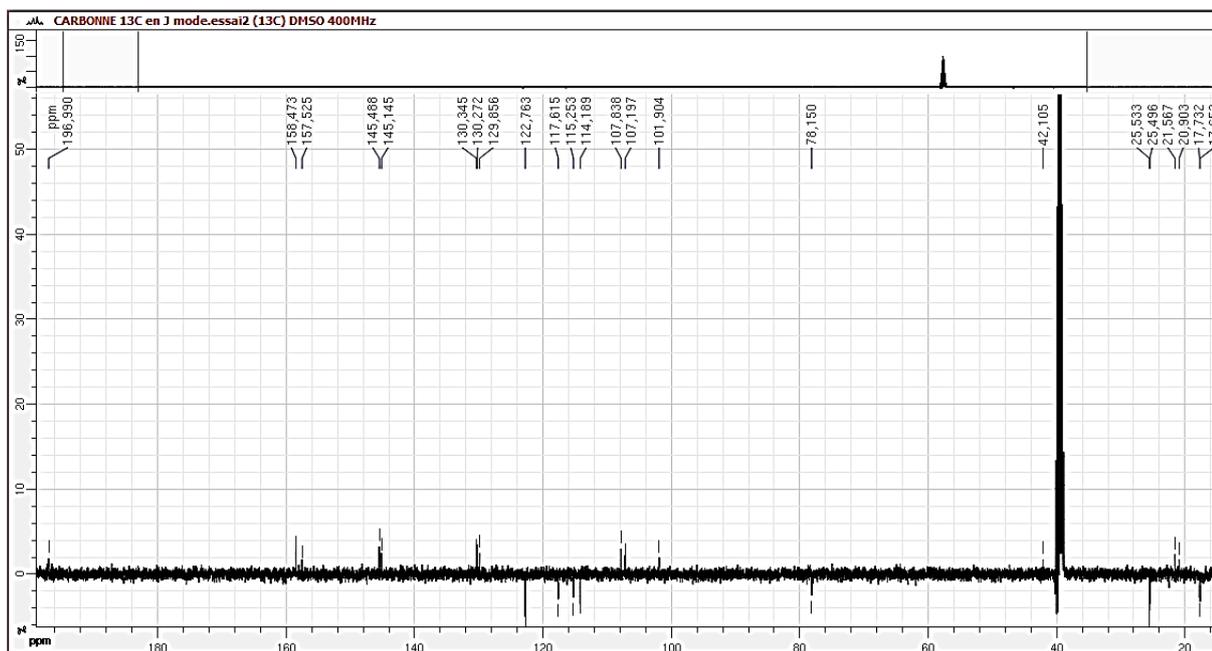
Spectre RMN ^1H (Agrandissement) (400,13 MHz, DMSO-d6)



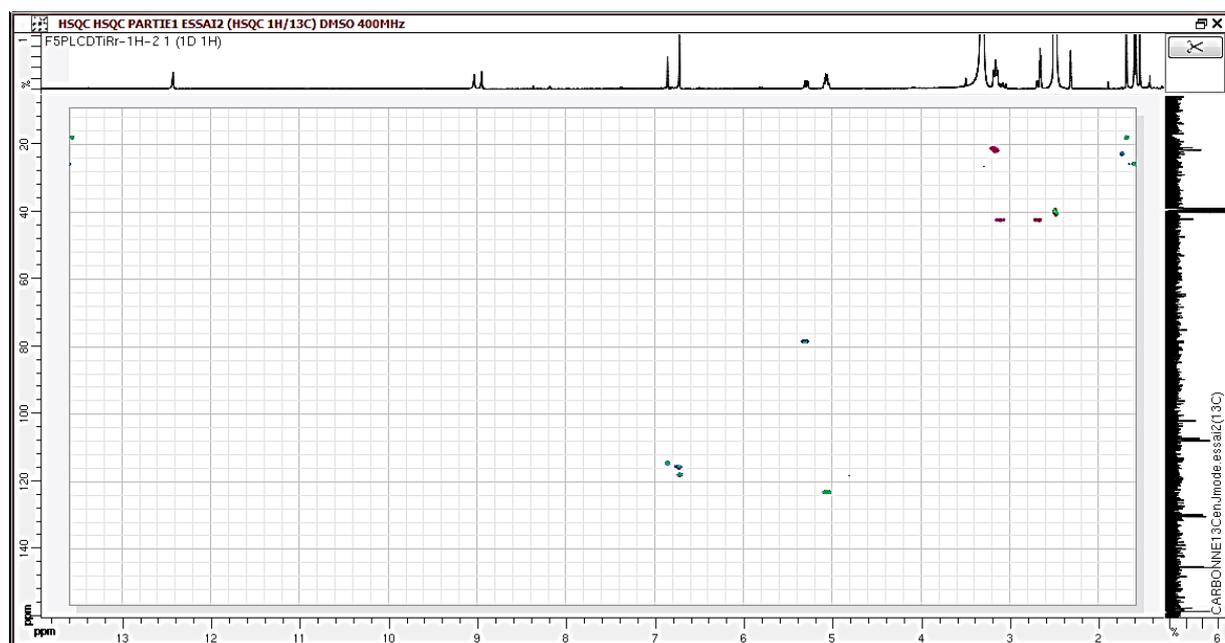
Spectre RMN ^1H (Agrandissement) (400,13 MHz, DMSO-d6)



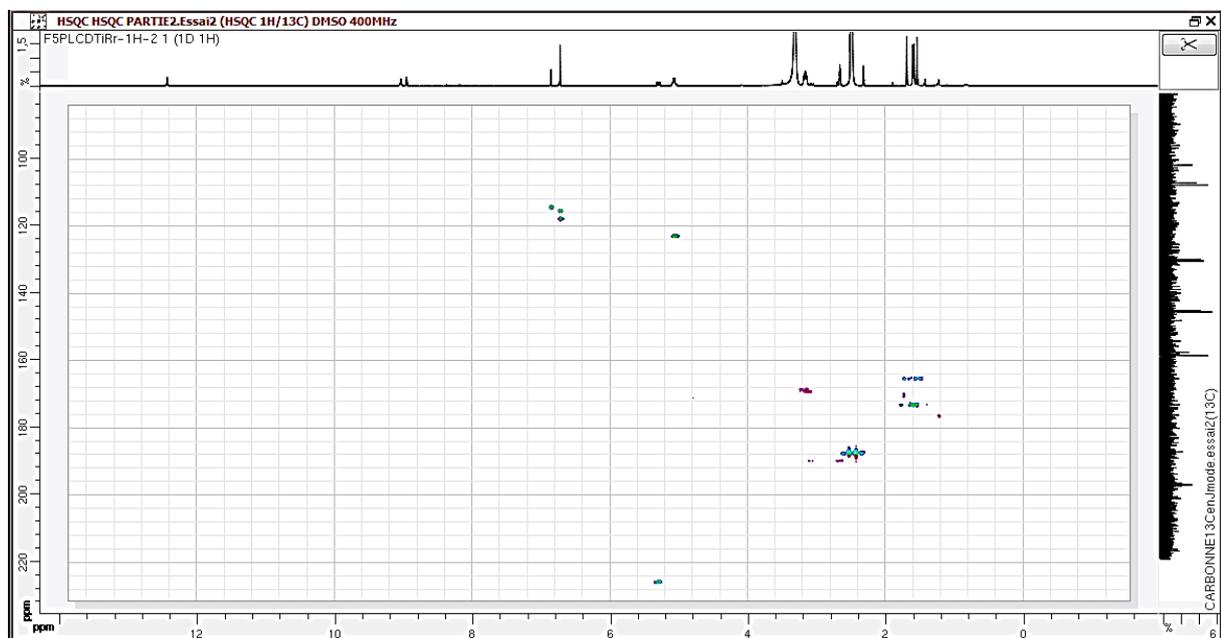
Spectre RMN ^{13}C (100,6 MHz, DMSO-d6)



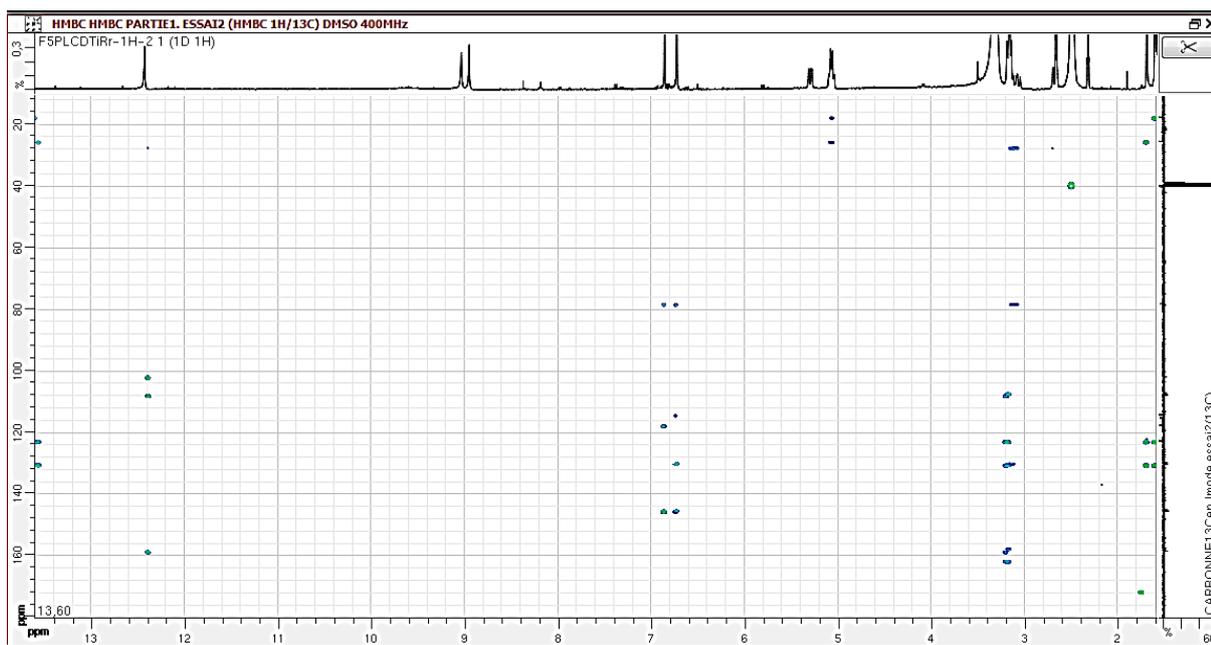
Spectre HSQC (Partie1) (400,13 MHz, DMSO-d6)



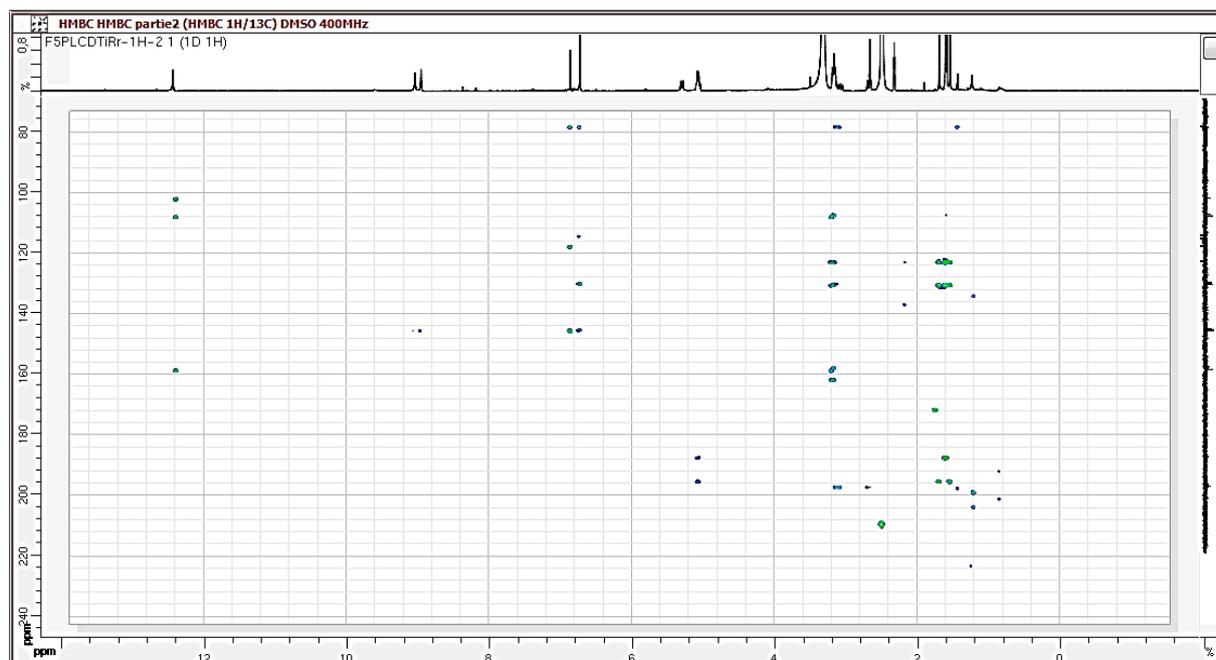
Spectre HSQC (Partie 2) (400,13 MHz, DMSO-d6)



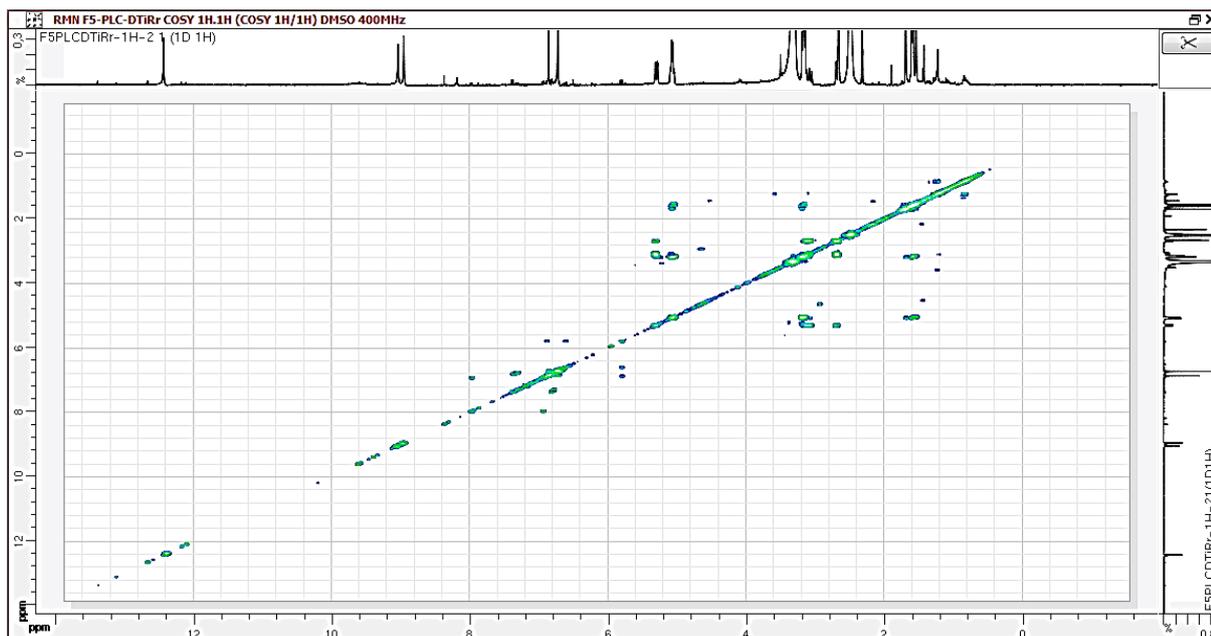
Spectre HMBC (Partie 1) (400,13 MHz, DMSO-d6)



Spectre HMBC (Partie 2) (400,13 MHz, DMSO-d6)



Spectre COSY (400,13 MHz, DMSO-d6)



Titre : Contribution à l'étude de la flore Tunisienne et recherche d'inhibiteurs d'origine naturelle de l'arginase

Mots clés : plantes médicinales, purification, déréplication, arginase, bioautographie

Résumé : Douze plantes médicinales Tunisiennes ont été sélectionnées avec une double ambition : contribuer à la valorisation de des phyto-ressources de la Tunisie et rechercher des inhibiteurs naturels de l'enzyme arginase dont la suractivité est impliquée dans certains cancers et dans diverses maladies cardiovasculaires, inflammatoires, neurovasculaires et infectieuses. Dans cette étude, 81 extraits ont été criblés sur l'arginase. Deux espèces se sont avérées particulièrement intéressantes : *Crataegus azarolus* (Rosaceae) et *Retama raetam* (Fabaceae).

Grâce à différentes études déréplicatives reposant sur des techniques séparatives et spectrales (CLHP-UV/DAD, CLHP-MSⁿ et RMN-¹³C), les composés de *C. azarolus* et de *R. raetam* ont pu être caractérisés.

Le fractionnement bioguidé des extraits a permis de purifier quatre produits naturels qui sont décrits pour la première fois dans ces espèces et dont certains ont fourni des activités non négligeables sur l'arginase.

Afin d'accélérer l'isolement des composés et de réduire les coûts engendrés par la procédure de fractionnement bioguidé, une nouvelle technique CCM-bioautographique a été développée. Cette technique permet de séparer les composés des matrices complexes et de les tester simultanément sur l'arginase en ciblant directement l'isolement des composés actifs. Ce nouveau test pourrait servir à la valorisation d'autres espèces végétales par la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'arginase.

Title : Contribution to the study of the Tunisian flora and research of arginase inhibitors from natural origin

Keywords : medicinal plants, purification, dereplication, arginase, bioautography

Abstract : Twelve Tunisian medicinal plants were selected in order to contribute to their phytochemical study and to search for new natural inhibitors of the arginase enzyme, the overactivity of which is associated to cancers and various cardiovascular, inflammatory, neurovascular and infectious diseases. Successive extraction steps gave 81 extracts from these plants which were screened on arginase. Two species were particularly interesting: *Crataegus azarolus* and *Retama raetam* (Fabaceae).

Based on dereplicative studies, using HPLC-UV/DAD, HPLC-MSⁿ and ¹³C-NMR techniques, compounds of *Crataegus azarolus* (Rosaceae) and *Retama raetam* were characterized.

The bioguided fractionation of these plants allowed the purification of four natural products

which are described for the first time in these species and some of which provided significant activities on arginase.

Since the bioguided fractionation procedure, conventionally used in laboratories is long and expensive, a new TLC-bioautographic technique was developed in order to accelerate the discovery of active compounds on arginase. This technique, at the chemistry/biology interface, makes it possible to separate compounds from complex matrices and to test them simultaneously on arginase by consuming a minimum amount of products and targeting directly the isolation of active compounds. This new test could be used to valorize other plant species through the search for new arginase inhibitors.