

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

LES COMPOSÉS POLYPHENOLIQUES DANS
GENTIANA ASCLEPIADEA L.
GENTIANA CRUCIATA L.
ET GENTIANA CILIATA L.

CONTRIBUTION A LA PHYTOCHIMIE DE LA SOUS-TRIBU DES
GENTIANINAE

THÈSE PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DES SCIENCES PAR

MICHEL GOETZ
INGÉNIEUR CHIMISTE DIPLOMÉ
DE L'UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
POUR L'OBTENTION DU GRADE
DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

INSTITUT DE CHIMIE
DE L'UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL

DÉCEMBRE 1977

F. Stettler - DISS-PRINT - Fribourg

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Les composés polyphénoliques dans *Gentiana
asclepiadea* L., *Gentiana cruciata* L. et
Gentiana ciliata L. - Contribution à la
phytochimie de la sous-tribu des *Gentianinae*
de M^{onsieur} Michel Goetz

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

MM. les professeurs A. Jacot-Guillarmod,

C. Favarger, R. Tabacchi et R. Hegnauer

(Leiden)

autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer
d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 10 février 1978

Le doyen : *J. P. Schaer*

J.-P. Schaer

à ma femme

à mes parents

Le présent travail a été effectué de décembre 1973 à décembre 1977 dans les laboratoires de Chimie Organique de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel sous la direction de Monsieur le Professeur André Jacot-Guillarmod, auquel nous exprimons toute notre reconnaissance pour le soutien précieux et les conseils qu'il nous a donnés tout au long de ce travail.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur Claude Favarger pour sa collaboration dans le choix et l'identification du matériel végétal et ses nombreux conseils dans le domaine botanique. Nous remercions Monsieur le Professeur Raphaël Tabacchi de l'intérêt qu'il a porté à ce travail et de son aide dans l'interprétation des spectres RMN.

Nous exprimons toute notre gratitude à Monsieur Kurt Hostettmann qui nous a fait bénéficier de son expérience dans les domaines de la chromatographie et des substances naturelles.

Tous nos remerciements vont à ceux qui nous ont apporté leur collaboration et leur amitié, en particulier Madame Maryse Hostettmann, Messieurs Luong Minh Duc, Gilles Nicollier, Jean-Bernard Weber et Faustin Maniliho.

Enfin, nous remercions la maison Hoffmann La Roche et Co. à Bâle, du relevé des spectres RMN.

TABLE DES MATIERES

I. <u>INTRODUCTION</u>	1
1. HISTORIQUE.	1
2. CONSIDERATIONS BOTANIQUES.	8
3. CONSIDERATIONS SUR LA CHIMIOTAXONOMIE.	14
II. <u>RECHERCHE ENTREPRISE</u>	18
4. BUT DU TRAVAIL.	18
5. ETUDE DES COMPOSES DANS LES FEUILLES DE <u>GENTIANA ASCLEPIADEA L.</u>	20
5.1 Extraction du matériel végétal et fractionnement des extraits.	21
5.2 Examen de la fraction F 1.	25
5.2.1 Détermination de la structure de la substance <u>A</u> .	27
5.2.2 Détermination de la structure de la substance <u>B</u> .	36
5.3 Examen de la fraction F 2.	45
5.3.1 Détermination de la structure de la substance <u>C</u> .	45
5.4 Examen de la fraction F 3.	48
5.5 Détermination des structures des substances <u>D</u> et <u>E</u> .	48
5.6 Examen de la fraction F 4.	62
5.6.1 Détermination de la structure de la substance <u>F</u> .	62
5.6.2 Détermination de la structure de la substance <u>G</u> .	66
5.7 Examen de la fraction F 5.	72
5.7.1 Détermination des structures des substances <u>H</u> et <u>I</u> .	73

5.8	Examen de la fraction F 6.	80
5.8.1	Détermination des structures des substances <u>J</u> et <u>K</u> .	81
5.9	Examen de la fraction F 7.	83
5.9.1	Détermination de la structure de la substance <u>L</u> .	83
5.10	Résumé.	86
6.	ETUDE DES COMPOSES DANS LES FEUILLES DE <u>GENTIANA CRUCIATA</u> L.	87
6.1	Extractions et fractionnement des extraits.	87
6.2	Examen de la fraction 1.	90
6.3	Examen de la fraction 2.	91
6.4	Examen de la fraction 3.	93
6.5	Examen de la fraction 4.	97
6.6	Examen de la fraction 5.	98
6.6.1	Identification de la substance <u>P</u> .	98
6.6.2	Identification de la substance <u>Q</u> .	99
6.7	Examen de la fraction 6.	101
6.7.1	Identification de la substance <u>R</u> .	102
6.8	Résumé.	107
7.	ETUDE DES COMPOSES DANS LES FEUILLES ET TIGES DE <u>GENTIANA CILIATA</u> L.	108
7.1	Extraction du matériel végétal et fractionnement des extraits.	109
7.2	Examen de la fraction 1.	111
7.3	Examen de la fraction 2.	115
7.4	Examen de la fraction 3.	118
7.5	Examen de la fraction 4.	121
7.6	Examen de la fraction 5.	124
7.6.1	Détermination de la structure de la substance <u>S</u> .	124
7.6.2	Détermination de la structure de la substance <u>T</u> .	126

7.7 Examen de la fraction 6.	129
7.8 Examen de la fraction 7.	133
7.9 Examen de la fraction 8.	136
7.10 Résumé.	138
8. CONCLUSION.	139
III. <u>LES POLYPHENOLS DANS LA SOUS TRIBU DES GENTIANINAE.</u>	142
9. TABLEAU RECAPITULATIF DE LA DISTRIBUTION DES POLYPHENOLS DANS LA SOUS TRIBU DES <u>GENTIANINAE.</u>	143
DISCUSSION.	176
IV. <u>PARTIE EXPERIMENTALE.</u>	182
10. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.	182
10.1 Chromatographie sur couches minces.	182
10.2 Chromatographie sur colonne.	183
11. TECHNIQUES D'ANALYSE.	185
11.1 Spectroscopie UV.	185
11.2 Spectroscopie IR.	185
11.3 Résonnance magnétique nucléaire.	185
11.4 Hydrolyse acide.	185
11.5 Hydrolyse enzymatique.	185
11.6 Recherche des sucres.	186
11.7 Méthylation.	186
11.8 Acétylation.	187
11.9 Analyse élémentaire.	187
BIBLIOGRAPHIE.	189

I. INTRODUCTION

1. HISTORIQUE

Lorsque LINNE [1] en 1753 établit le statut taxonomique du genre Gentiana, il reconnut 23 espèces réparties en trois groupes; il fixa également le genre Swertia dans lequel il distingue cinq espèces (voir tableau 1). Toutefois, il faut relever que c'est TOURNEFORT [2] qui usa le premier du terme Gentiana pour désigner un genre.

Tableau 1. Les genres Gentiana s.l. et Swertia de LINNE

- Gentiana : 1. " corollis quinquefidis subcampaniformibus " (lutea, purpurea, punctata, asclepiadea, pneumonanthe, etc)
2. " corollis quinquefidis infundibuliformibus " (bavarica, verna, utriculosa, nivalis, amarella, etc)
3. " corollis non quinquefidis " (campestris, ciliata, cruciata, etc)
- Swertia : " corollis quinquefidis " (perennis, difformis, rotata, corniculata et dichotoma)
-

Gentianella apparaît pour la première fois comme genre en 1794 dans l'ouvrage de MOENCH [3] ; il est basé sur la seule espèce Gentianella tetrandra (= Gentiana campestris).

SCHMIDT, BORCKHAUSEN et FROBLICH, tous trois en 1796, tentèrent de subdiviser les genres Gentiana et Swertia de Linné en genres plus petits. FROBLICH distingue à cette époque 47 espèces dans le genre Gentiana. Trente-trois ans plus tard, BUNGE décrit 80 espèces pour ce genre.

Les travaux de GRISEBACH [4] marquent des dates importantes pour la systématique des Gentianacées. Cet auteur établit le traitement taxonomique de la famille; pour le genre Gentiana, il compte 15 sections (voir tableau 2).

HUXLEY, en 1888, propose un réarrangement du genre Gentiana s.l. sur la base des mécanismes de pollination et des positions des glandes corollaires. Ses deux sous-groupes du genre, les Mesomelitae et les Perimelitae préfigurent les deux sous-genres de KUSNEZOV. Celui-ci, en 1894, divise le genre Gentiana de Linné en deux : Eugentiana (qui compte 10 sections) et Gentianella [5] (voir tableau 3). C'est avec KUSNEZOV et, dans le même ouvrage avec GILG [6] (voir tableau 4) que le système entier est fixé, et il est resté ainsi, dans ses grandes lignes, jusqu'à nos jours.

Les travaux de ce siècle n'aboutiront, à quelques exceptions près, qu'à des réarrangements mineurs : WETTSTEIN [7] décrit une nouvelle section (Comastoma) à partir de deux espèces du sous-genre Gentianella; ce sous-genre est élevé au rang de genre par SCHUSTLER [8].

Certains botanistes contemporains démembrent encore davantage le genre Gentiana de Linné. MA [10], en 1951, crée le genre Gentianopsis à partir d'espèces de la section Crossopetalum de Gentianella. GILLETT [12] et TOYOKUNI [13], [17] sont en accord avec MA pour maintenir le genre Gentianopsis (= Eublephis chez GILLETT). En plus, ils séparent la section Comastoma du reste des Gentianella pour en faire un genre. LOVE et LOVE [14] et TOYOKUNI [15] vont même plus loin : ils suggèrent de subdiviser aussi le sous-genre Eugentiana de Kusnezov et de restaurer Hippion (section Cyclostigma) et Ericcoila (section Thylacites additionnée de Gentiana prostrata et de Gentiana pyrenaica). Cependant, ce dernier genre paraît par trop hétérogène à beaucoup de botanistes systématiciens.

Enfin, une dernière classification a été proposée récemment par SMITH [16] . Elle diffère de celle de Kusnezov par la suppression de quelques petites sections qui sont soit réunies, soit réparties en d'autres sections plus larges (voir tableau 5).

Tableau 2. La sous-tribu des Swertiae de GRISEBACH.

Genre Gentiana Tournef.

sections : Asterias Ren.

Andicola Griseb.

Imaicola Griseb.

Amarella Griseb.

Antarctophila Griseb.

Arctophila Griseb.

Crossopetalum Froel.

Cyclostigma Griseb.

Chondrophylla Bung.

Eurythalia Griseb.

Pneumonanthe Neck.

Thylacites Ren.

Coelanthé Ren.

Dasystephana Griseb.

Tretorrhiza Ren.

Genres : Eudoxia G. Don.

Stellera Turcz.

Crawfordia Wall.

Ophelia Don.

Tripterospermum Blume

Exadenus Griseb.

Centaurella Mich.

Halenia Borkh.

Pleurogyne Escholz

Swertia Linn.

Anagallidium Griseb.

Frasera Walt.

Tableau 3. Le genre Gentiana selon KUSNEZOV

(avec en parenthèses le nombre d'espèces)

Sous-genres :

I. Eugentiana Kusn.

II. Gentianella Kusn.

Sections :

I. Coelanthé Ren. (5)

XI. Dasystephana Griseb. (1)

II. Pneumonanthé Neck. (41)

XII. Andicola Griseb. (>50)

III. Othophora Kusn. (1)

XIII. Imaicola Griseb. (1)

IV. Stenogyne Franch. (6)

XIV. Stylophora Clarke (1)

V. Frigida Kusn. (25)

XV. Megacodon Hemsl. (1)

VI. Aptera Kusn. (17)

XVI. Amarella Griseb. (>40)

VII. Isomeria Kusn. (5)

XVII. Antarctophila Griseb.

(4-6)

VIII. Chondrophylla Bg. (54)

XVIII. Arctophila Griseb.

(>10)

IX. Thylacites Ren. (1)

XIX. Crossopetalum Froel. (10)

X. Cyclostigmá Griseb. (6)

Tableau 5. La sous-tribu des Gentianinae selon SMITH.

Genres : Ixanthus Griseb.

Jaeschkea Kurz.

Crawfurdia Wall.

Tripterospermum Blume

Gentiana L.

Sections : Coelanthé Ren. emend. Kusn.

Pneumonanthé Neck.

Othophora Kusn.

Stenogyne Franch. emend. Kusn.

Frigida Kusn.

Aptera Kusn.

Chondrophylla Bg.

Thylacites Ren.

Cyclostigma Griseb.

Gentianella L.

Sections : Crossopetalum Froel.

Arctophila Griseb.

Amarella Griseb.

Comastoma Wett.

Antarctophila Griseb.

Andicola Griseb.

Lomatogonium A. Br.

Swertia L.

Sections : Ophelia Don. Benth. et Hooke

Euswertia C.B. Clarke

Latouchea Franch.

Megacodon Hemsl. (H. Smith)

Halenia Borkh.

Veratrilla Baill.

2. CONSIDERATIONS BOTANIQUES

Les contours nets que l'on peut en général donner aux diverses sections de la famille des Gentianacées pourraient indiquer un âge élevé pour la famille. Notons cependant que les espèces du genre Gentianella sont parfois difficiles à distinguer les unes des autres.

En taxonomie, les caractères morphologiques, qui pendant longtemps furent les seuls à être utilisés, conservent aujourd'hui toute leur valeur. Ils restent à la base d'une classification valable et qui se doit d'être aussi pratique (détermination des espèces d'une flore par exemple). Nous tenterons de relever quelques cas frappants de leur emploi dans la classification des Gentianaceae.

La séparation des Gentianaceae et des Menyanthaceae a été faite sur la base des différences morphologiques et anatomiques, en particulier des grains de pollen. Selon GILLET [12], les différences sont telles qu'il pourrait même s'agir là de deux familles sans parenté aucune, bien qu'on n'ait pas encore pu mettre en évidence de relations phylogénétiques avec d'autres groupes de végétaux.

Le genre Gentiana se distingue aisément du genre Gentianella. SCHUSTLER [8] a clairement reconnu qu'une seule caractéristique morphologique est commune aux deux groupes et SMITH [29] donne, en 1945, un nombre important de caractères morphologiques distinctifs.

En 1940, LINDSEY [28] montre des différences basées sur l'anatomie florale entre la section Crossopetalum (genre Gentianopsis moderne) et les autres sections du genre Gentiana s.l. MA et ILLIS [10], [27] se servent de ces

données et de considérations sur l'aspect général des espèces, de leurs graines et de la distribution des ovules pour justifier l'érection du genre Gentianopsis.

GILLETT, lui, au moyen de données sur la position des nectaires et sur la forme des lobes corollaires, reconnaît qu'au sein des Gentianella, les gentianes ciliées (Eublephis) sont distinctes des espèces de la section Amarella et que les sections Arctophila et Amarella sont beaucoup plus proches l'une de l'autre que de la section Eublephis. Il remarque en outre une parenté entre les genres Gentianella, Swertia, Halenia et Lomatogonium, qui éloigne le premier du genre Gentiana. Remarquons que selon LINDSEY [26] , l'anatomie florale du genre Lomatogonium indiquerait qu'il s'agit là du plus primitif de la famille.

L'anatomie florale est aussi employée par ST-JOHN [9] qui sépare le genre Swertia en deux sous-genres.

A l'échelle infragénérique, notons que Gentiana lutea L. diffère des autres Coelanthé par la morphologie de ses grains de pollen. Ce résultat sera du reste confirmé par les études chimio-taxonomiques.

Relevons enfin, en ce qui concerne les études morphologiques, que SCHARFETTER [25] a tenté d'estimer les âges respectifs des sections de Eugentiana et Gentianella (Kusn.) Il se base sur les quelques points suivants :

1. la morphologie des fleurs : les fleurs les plus simples indiquent les espèces les plus anciennes.

2. l'amplitude de variation des espèces : les sections les plus anciennes renferment des taxons à contours bien définis et leurs membres ne présentent que peu de variétés.

3. les couleurs : les sections plus récentes présentent une homogénéité du point de vue de la coloration de leurs fleurs.

4. la distribution géographique : des aires disjointes indiquent des espèces plus anciennes.

Ces considérations lui permettent d'ébaucher un tableau de relations phylogénétiques que nous reproduisons ici (voir tableau 6).

Si intéressante que soit la tentative de SCHARFETTER, son essai phylogénétique ne s'appuie que sur la morphologie et la distribution géographique. En taxonomie moderne, le but ultime est bien d'établir une classification phylogénétique, c'est-à-dire de réunir dans un même groupe les taxons les plus étroitement apparentés, issus les uns des autres ou ayant un ancêtre commun. Mais la taxonomie moderne est essentiellement synthétique, et s'appuie sur tous les caractères disponibles (cytologiques, palynologiques, biochimiques etc.). Parmi ceux-ci, les caractères cytologiques (nombre et morphologie des chromosomes) ont une grande importance parce qu'ils ne dépendent pas du milieu.

La cytologie n'est employée que dans de rares cas pour différencier des familles de végétaux. Il en est autrement pour la division en genres et en leurs sous-groupes, car ceux-ci sont le fruit d'une évolution plus tardive que celle des familles. Les données relatives au genre Gentiana sont encore fragmentaires. Les nombres de base de chromosomes sont multiples. Les résultats doivent être examinés avec prudence en raison des phénomènes de convergence possibles ou d'évolution parallèle du caryotype (FAVARGER [18]).

Les nombres de base, établis indépendamment par RORK et FAVARGER [20] , [21] , [22] sont $x = 5, 7, 9, 11$ et 13 . LOVE [24] y ajoute $x = 6$ sur la base des travaux de SKALINSKA [23] , confirmés plus tard par d'autres auteurs. Relevons que les données

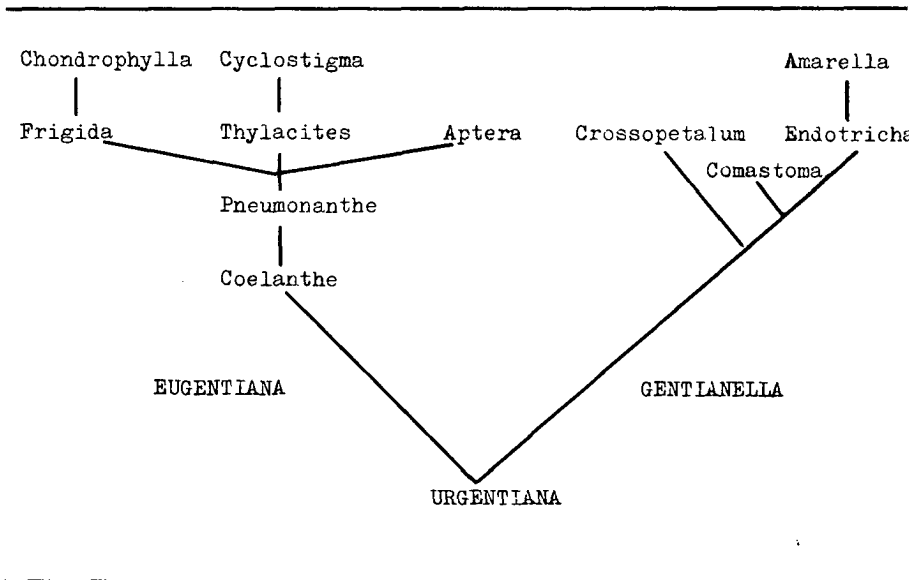
cytologiques correspondent assez bien avec la classification de Kusnezov. Certaines sections, telles Thylacites et Coelanthé, qui représentent des groupes naturels, possèdent un nombre de base unique. Il en va de même pour les sections Amarella, Arctophila, Andicola, Antarctophila et Comastoma, bien que ces dernières n'aient pas été étudiées suffisamment.

Quelques cas rares se signalent par des nombres de base aberrants, mais le système ne perd pas de sa valeur pour autant. Par exemple, Gentiana asclepiadea L. ($2n = 44$) se différencie des autres espèces de la section Pneumonanthé qui ont $2n = 26$; NILSSON [30] d'autre part a pu montrer que la morphologie des grains de pollen de cette espèce s'éloignait de celles des autres espèces.

Trois sections présentent des difficultés plus importantes. Dans la section Chondrophylla, les données de NILSSON ne correspondent pas aux résultats cytologiques. Chez les Cyclostigma, on trouve trois nombres de bases différents bien que les douze espèces soient morphologiquement voisines. Enfin une espèce collective (d'après GILLETT) de la section Crossopetalum (Gentianopsis) présente deux nombres de bases distincts.

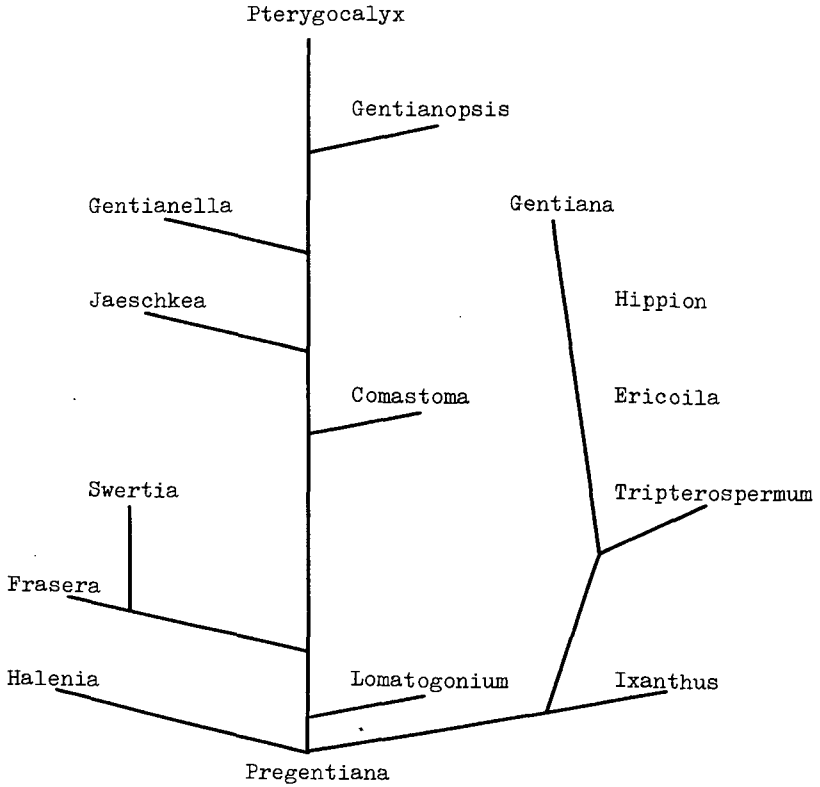
Nous constatons donc que la valeur taxonomique des nombres chromosomiques varie d'une section à l'autre. Cela pourrait résulter des différences d'âge des sections. Remarquons que la plupart des déviations importantes citées ci-dessus se rencontrent dans des sections plus récentes, selon SCHARFETTER. De plus, les phénomènes d'hybridation (FAVARGER [19] et LOVE [24]) ont certainement joué un rôle non-négligeable si l'on se réfère à des analogies palynologiques entre des sections aussi éloignées que les Cyclostigma, Chondrophylla et Amarella. Les résultats cytologiques doivent donc nécessairement être employés avec ceux de toutes les autres disciplines.

Tableau 6. Relations phylogénétiques d'après SCHARFETTER.



Nous présentons ci-après (voir tableau 7) le schéma de la phylogénie de la sous-tribu des Gentianinae tel qu'il a été établi par TOYOKUNI [15]. Cet auteur considère que tous les genres proviennent du même ancêtre, le genre Pregentiana, suivant deux lignes principales d'évolution. Nous y avons inclus les nombres de base connus.

Tableau 7. Phylogénie de la sous-tribu des Gentianinae
selon TOYOKUNI.



3. CONSIDERATIONS SUR LA CHIMIOTAXONOMIE.

Les caractéristiques morphologiques seront toujours prépondérantes pour l'identification d'espèces végétales et pour le regroupement de celles-ci en unités naturelles. Cependant, à cause des phénomènes de parallélisme ou de convergence et de la diversification, des ressemblances morphologiques n'indiquent pas toujours une parenté proche, et il n'est pas rare d'observer des différences marquées entre taxons parents.

C'est alors qu'interviennent la chimie et la biochimie : les corrélations entre les constituants chimiques d'un végétal et son organisation ne doivent pas être négligées. La chimie appliquée à des fins taxonomiques, la chimiotaxonomie, ne remplacera jamais d'autres disciplines systématiques, mais elle apportera sa contribution à l'ensemble des données. Celles-ci seront glanées dans un éventail de disciplines très vaste. La chimie pourra intervenir de façon prépondérante lors d'incertitudes. Mais pour cela, il est nécessaire que les corrélations entre les données chimiques et botaniques aient bien été établies et puissent être interprétées.

La chimiotaxonomie peut intervenir pour confirmer l'inclusion d'une famille dans un ordre. Elle joue parfois un rôle pour caractériser une famille et pour la division en tribus ou en sous-familles.

Elle peut vérifier l'homogénéité d'un genre ou expliquer la formation de sous-genres.

C'est cependant au niveau des sections, à des fins de comparaison, et au niveau des espèces pour leur caractérisation,

qu'elle revêt sa plus grande importance. C'est elle seule qui pourra reconnaître des races et des variétés chimiques au sein d'une même espèce.

Enfin, elle joue un rôle capital chez les végétaux inférieurs où les caractéristiques morphologiques sont plus vagues.

La chimiotaxonomie n'a pas toujours été appliquée avec toute la rigueur nécessaire. Les comparaisons ne doivent pas être fondées, comme c'est souvent le cas, uniquement sur des réactions colorées à l'aide de chromatogrammes. Prenons comme exemple le primvéroside xanthonique, le gentioside, qui est très facile à confondre avec la C-glucosylflavone, l'isoscoparine, sur la base de la chromatographie. Que dire des auteurs qui fondent tous leurs résultats sur des considérations chromatographiques élémentaires? Comment justifier les " résultats " obtenus après un traitement trop brutal, en particulier lors de l'extraction, sans vérifier la présence d'artefacts ?

Nous nous élevons donc contre certaines manières de procéder. A notre avis, ne peuvent être considérés comme valables seuls les résultats obtenus après combinaison d'au moins trois techniques : chromatographie sur couches minces, comportement à l'hydrolyse acide et spectrophotométrie UV ou spectrographie de masse, et cela dans les cas simples (aglycones ou substances bien connues telles la mangiférine ou l'iso-orientine). Dans les cas plus complexes (glycosides), il faudra y ajouter le point de fusion et la spectrophotométrie IR pour les substances connues; la formation de dérivés (méthylés ou acétylés) et la spectrométrie RMN sont encore nécessaires pour les composés nouveaux.

A partir de quelle concentration une substance revêt-elle une importance en chimiotaxonomie ? Nous nous sommes aperçu

que les composés majeurs ne suffisent pas pour dresser une image valable d'une espèce. Citons la mangiférine (identifiée dans une quinzaine de familles) et les C-glucosylflavones iso-orientine et isovitexine et leurs isomères orientine et vitexine (trouvés dans plus d'une douzaine de familles d'angiospermes, dans les monocotylédones et les dicotylédones) dont la distribution est trop vaste pour en faire des critères taxonomiques intéressants. Il faut aller plus loin et rechercher tous les glycosides des aglycones mis en évidence. Un exemple frappant est celui de la section Cyclostigma dont les membres sont tous caractérisés par des xanthonnes oxygénées en 1, 3, 7 et 8, mais où presque chaque espèce peut être reconnue par la présence d'un glycoside particulier [88] .

Certains auteurs préconisent l'examen chimique de tous les organes d'une espèce et à tous les stades de la végétation. Dans les travaux que les chercheurs de l'Institut de Chimie de Neuchâtel ont consacrés aux espèces de la sous-tribu des Gentianinae, il est apparu plus intéressant d'aborder un grand nombre de plantes dans le but de contribuer à leur chimiotaxonomie, plutôt que d'approfondir l'examen d'un nombre restreint d'espèces. Il ne s'agissait pas de donner un catalogue chimique complet d'un végétal (on ne pourrait du reste pas se contenter d'une seule classe de substances) mais de comparer les espèces. Or, en étudiant systématiquement les feuilles des plantes choisies, prélevées en période de floraison, nous avons peut-être une vue d'ensemble partielle; cependant cette approche nous permet de comparer entre eux nos nombreux résultats et de contribuer de manière précieuse à la connaissance de la sous-tribu.

L'étude de la corrélation entre les substances chimiques trouvées d'une part et les systèmes enzymatiques ainsi que la biogénèse d'autre part, constitue un perfectionnement de la chimiotaxonomie. Cet aspect n'a été abordé que par peu d'auteurs.

Signalons par exemple les remarques de SWAIN sur les variations biosynthétiques et leurs effets sur la chimiotaxonomie [110] .

En conclusion de cette introduction, relevons que c'est BORODIN [11] qui, en 1892, fut l'un des premiers chimiotaxonomistes des Gentianacées. Il put mettre en évidence des cristaux d'oxalate de calcium dans le mésophylle des feuilles de toutes les espèces d'EUGENTIANA (Kusnezov) et démontrer leur absence chez les espèces de GENTIANELLA (Kusnezov). Depuis lors, un éventail plus grand de substances a été utilisé, notamment les polyphénols. Le lecteur trouvera dans l'ouvrage de HEGNAUER [68] un recueil de tous les travaux consacrés, jusqu'en 1965, aux Gentianacées. Nous nous sommes bornés à relever dans un tableau (chapitre 9) la distribution des polyphénols dans la sous-tribu des Gentianinae.

II. RECHERCHE ENTREPRISE.

=====

4. BUT DU TRAVAIL

Depuis 1965, de nombreux travaux de phytochimie ont été effectués à l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel, en collaboration avec l'Institut de Botanique. Ces études ont toutes été consacrées à la sous-tribu des Gentianinae : de nombreuses espèces des genres Gentiana et Gentianella ont été examinées pour leur contenu en polyphénols. Notre travail se situe dans le cadre de ces investigations systématiques.

Parmi les études faites par nos prédécesseurs, nous citerons les travaux de HOSTETTMANN et JACOT-GUILLARMOD sur les sections Coelanthé et Cyclostigma, ceux de KALDAS et JACOT-GUILLARMOD sur le genre Gentianella et enfin ceux de LUONG et JACOT-GUILLARMOD ayant pour objet de nouveaux composés dans la section Coelanthé.

Dans chacun de ces cas, les espèces prises en considération faisaient partie d'un ensemble botanique bien déterminé : toutes les espèces d'une seule section par exemple. Ces investigations très approfondies ont permis de définir les caractéristiques chimiques de chaque groupe.

On peut toutefois se demander s'il est impératif d'examiner plusieurs espèces avant de pouvoir définir les caractéristiques principales d'une section. En effet, les Cyclostigma, qui pourtant ne forment nullement un ensemble homogène du point de vue cytologique, présentent une excellente homogénéité chimique : toutes ces espèces contiennent de nombreuses xanthones 1, 3, 7, 8.

L'étude d'une seule espèce pourrait suffire pour déterminer cette caractéristique. Il va de soi que les études approfondies de plusieurs représentants d'une section gardent toute leur valeur et restent extrêmement utiles pour la différenciation des espèces. Notre approche se veut exploratoire.

Nous nous sommes donc intéressé à des représentants de sections ou de genre dont la chimie n'était pas connue ; afin d'avoir des points de comparaison pour nos résultats, nous devons, de plus, considérer les sections ou genres qui présentaient soit de forts liens phylogénétiques avec des groupes bien étudiés, soit suffisamment de différences pour avoir été séparés en genres distincts par les botanistes systématiciens.

Notre choix s'est porté d'abord sur Gentiana asclepiadea L., qui fait partie d'une section dont la chimie est très mal connue, mais qui se rapproche selon SCHARFETTER de la section Coelanthé dont le contenu en polyphénols est en revanche bien connu.

Gentiana cruciata L. nous a ensuite paru intéressante; tout en faisant partie d'une autre section, elle est apparentée, d'après le même auteur, à Gentiana asclepiadea L., laquelle pouvait nous servir de point de comparaison.

La troisième espèce que nous avons choisie, Gentiana ciliata L., fait partie d'un genre distinct : Gentianopsis. Nous avons voulu déterminer si l'examen des composés polyphénoliques dans cette espèce permet de justifier d'une part sa séparation du genre Gentiana et d'autre part son éloignement du genre Gentianella, comme l'a suggéré MA (1951).

5. ETUDE DES COMPOSES DANS LES FEUILLES DE GENTIANA ASCLEPIADEA L.

La très vaste section Pneumonanthe, représentée principalement sur le continent Américain, ne comprend que deux espèces européennes : Gentiana asclepiadea L. et Gentiana pneumonanthe L. Cette section, nous l'avons dit, serait très proche de la section Coelanthé qui nous est familière puisqu'elle a été bien étudié à l'Université de Neuchâtel (voir tableau récapitulatif, chapitre 9).

Alors que les polyphénols de Gentiana pneumonanthe L. avaient déjà fait l'objet d'un travail très partiel de LEBRETON et coll. [49] , seules quelques études sur les alcaloïdes (MAREKOV et coll. [98]) et les principes amers des racines (WAGNER et coll. [99]) avaient été consacrées à Gentiana asclepiadea L. avant notre investigation. Comme cette espèce est plus répandue dans nos régions que Gentiana pneumonanthe L. elle constituait un choix idéal pour nos premiers essais.

Gentiana asclepiadea L. est une plante très touffue, d'une hauteur moyenne de 70 cm. Elle se caractérise par des feuilles larges. Nous l'avons récoltée en période de floraison (août-septembre) en particulier dans la région du Ganttrisch (canton de Berne), sur des pentes humides et bien exposées, à une altitude d'environ 1000 m. Nous n'en avons prélevé que les feuilles, organe généralement étudié dans nos laboratoires; afin de ne causer aucune dégradation à la nature, nous avons pris soin de ne prendre que quelques échantillons sur chaque plante.

5.1 Extraction du matériel végétal et fractionnement des extraits.

En vue de l'extraction du matériel végétal, nous avons mis en oeuvre la méthode de HOSTETTMANN et coll. [74], lequel utilise des solvants de polarité croissante. Cette technique s'est toujours révélée être la meilleure dans les nombreux travaux effectués à l'Institut de Chimie. Elle consiste dans l'emploi successif de ligroïne, d'éther, de chloroforme et de méthanol à chaud, sur le matériel végétal séché et moulu. En principe, chaque stade de l'extraction dure 12 heures et est répété. Nous avons cependant usé d'une troisième extraction au chloroforme, en raison des grandes quantités de caroténoïdes et de chlorophylles contenues dans Gentiana asclepiadea L. De plus il nous a paru utile de compléter les deux extractions au méthanol par un traitement au méthanol aqueux en vue d'extraire les polyphénols hautement glycosylés mis en évidence dans la fraction méthanolique. Nous présentons le schéma d'extraction ci-après.

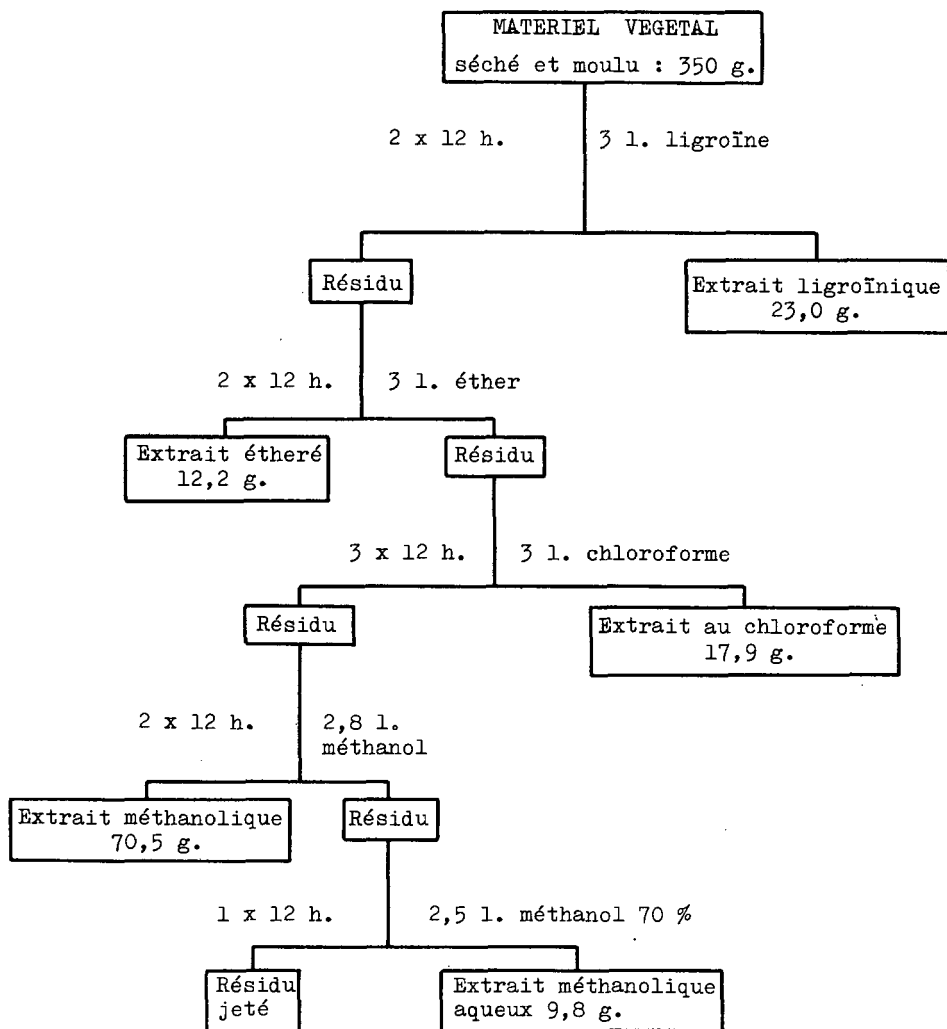


Figure 1. Schéma d'extraction appliquée   *Gentiana asclepiadea* L.

Les cinq extraits ainsi obtenus sont ensuite examinés par CCM (chromatographie sur couches minces) sur trois supports différents (polyamide, cellulose et silicagel). Nous avons pu constater la présence de plusieurs polyphénols de polarité moyenne ou forte, et l'absence totale de polyphénols peu polaires : il s'est en effet avéré que seuls les extraits au méthanol et au méthanol aqueux à 70 % contenaient des quantités appréciables de polyphénols, alors que aucune trace de ces produits n'était visible dans les autres extraits. Ces derniers ont donc été écartés. Les deux extraits polaires ont pu être réunis en raison de leur composition semblable. Le lecteur pourrait s'interroger alors sur l'utilité de notre technique d'extraction, en particulier du stade au méthanol; en fait, nous nous sommes aperçu dans un essai préliminaire que des traitements au méthanol aqueux seul ne permettaient pas l'extraction complète des produits moyennement polaires.

Les extraits méthanoliques réunis sont ensuite soumis à un fractionnement grossier sur colonne de polyamide. Ce support paraît être le plus indiqué pour cette opération. Les produits hautement glycosylés (c'est-à-dire très polaires) sont facilement séparés des polyphénols moyennement polaires; de plus la capacité de la polyamide est suffisamment grande pour permettre l'application d'une quantité importante d'extrait brut; enfin les pertes par adsorption irréversible sur ce support sont beaucoup plus petites que sur le silicagel. L'élution est effectuée par du méthanol à 50 %, suivie d'une augmentation progressive de la teneur en méthanol jusqu'à 90 %. Les conditions expérimentales exactes sont décrites au chapitre 10. Nous présentons le détail de ce fractionnement dans la figure 2, et l'aspect chromatographique des diverses fractions dans le dessin de la figure 3. Dans la suite de ce chapitre, chacune de ces fractions sera traitée séparément.

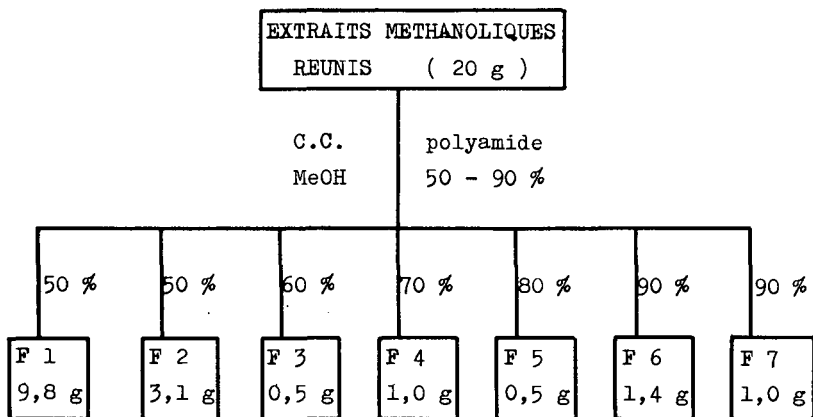


Figure 2. Fractionnement des extraits méthanoliques.

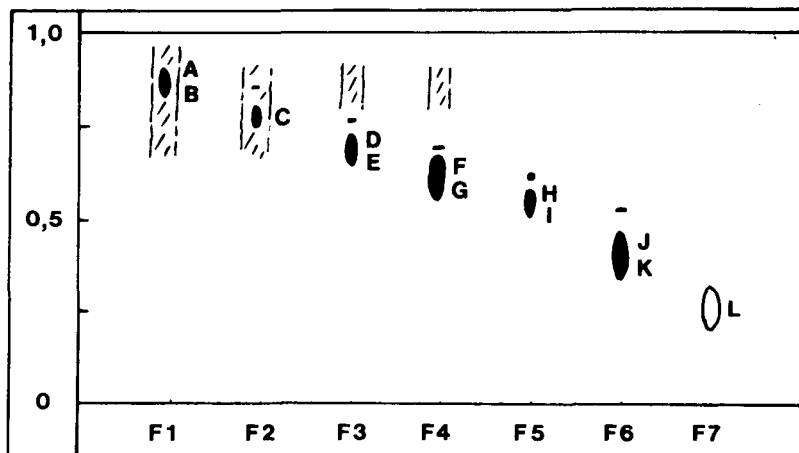


Figure 3. Chromatogramme des fractions F 1 - F 7.

Polyamide DC 11; MeOH 90 %; Rév : UV 366 nm.

⊗ : spot bleu-clair ● : spot brun ○ : spot jaune

5.2 Examen de la fraction F 1

La fraction F 1 est obtenue à partir de la colonne de polyamide initiale par élution avec du MeOH à 50 %. Les premières fractions d'une colonne de ce type contiennent invariablement des produits très polaires, en particulier des polysaccharides, des sucres libres et parfois des polyphénols hautement glycosylés. Cette fraction de tête, à l'encontre des suivantes, est souvent d'une couleur très foncée et son examen est rendu difficile par la présence des sucres. Dans Gentiana asclepiadea L., la fraction F 1 est plus importante que dans les autres espèces que nous avons étudiées; à elle seule, elle représente en poids presque la moitié de l'extrait brut.

Avant de tenter une séparation des constituants de F 1, nous nous sommes attachés à détecter la présence d'un éventuel polyphénol. La technique est très simple : hydrolyse acide d'un aliquot de F 1 (HCl 2N; 100°; 2h.), suivie de l'analyse par CCM de l'extrait butanolique de l'hydrolysate (voir partie expérimentale). Dans une fraction aussi riche en impuretés que l'était F 1, cette analyse est un peu plus ardue que d'habitude mais nous avons pu néanmoins prouver la présence d'au moins un glycoside polyphénolique par l'apparition à bas R_f d'une substance brune.

Ce premier point acquis, nous nous sommes penché sur la séparation des constituants de notre fraction. Après de nombreux essais de CCM, nous avons choisi de soumettre cette solution à une chromatographie sur colonne de cellulose microcristalline avec le solvant de Partridge: n-BuOH-AcOH-H₂O; 4 : 1 : 5 (phase supérieure). Ce système de chromatographie de partage

présente l'avantage de faire migrer la plupart des sucres à un $R_f > 0,50$, alors que les glycosides polyphénoliques restent au dessous de $R_f = 0,40$. Nous avons effectué deux fois ce passage sur colonne.

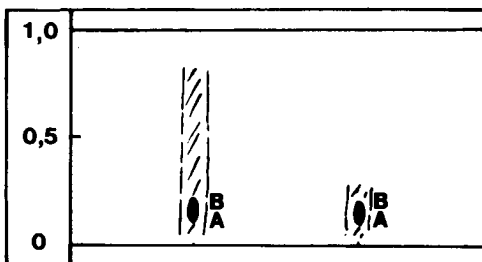


Figure 4. Chromatogramme de F 1 avant et après la première purification.

Cellulose Merck; n-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5) Rév.: UV 366nm

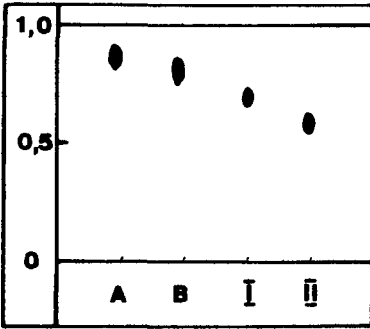
La séparation proprement dite a été réalisée par passages successifs sur deux colonnes de cellulose (éluants : AcOH 4 % et CHCl₃-AcOH-H₂O 20 : 15 : 3). On obtient de ce fait deux constituants A et B qui sont finalement purifiés par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH).

Produit A : F : 206 - 8^o (déc.)

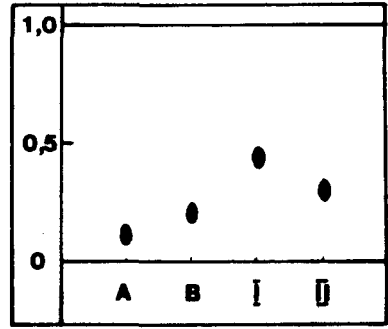
Produit B : F : 211 - 13^o (déc.)

350 g. de feuilles ont fourni 10 mg. de A et 12 mg de B.

La comparaison des comportements chromatographiques avec ceux de certains témoins obtenus d'autres sources nous montre qu'il s'agit, en effet, de polyphénols hautement glycosylés.



polyamide DC 11
MeOH-H₂O (9 : 1)



cellulose Merck
CHCl₃-AcOH-H₂O (20 : 15 : 3)

Figure 5. Comportements chromatographiques de A et de B.
substances témoins I : isovitexine-4'-O-glucoside
II: iso-orientine-4'-O-glucoside
Rév. UV 366nm

5.2.1 Détermination de la structure de la substance A.

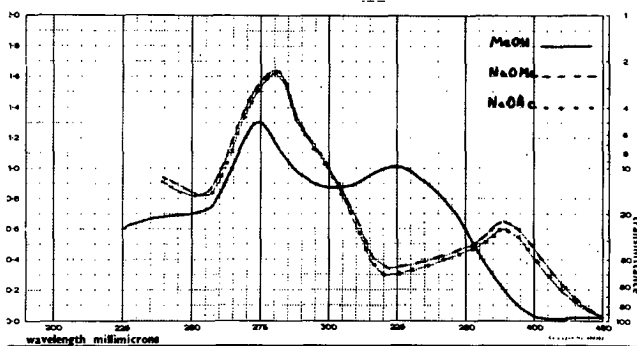
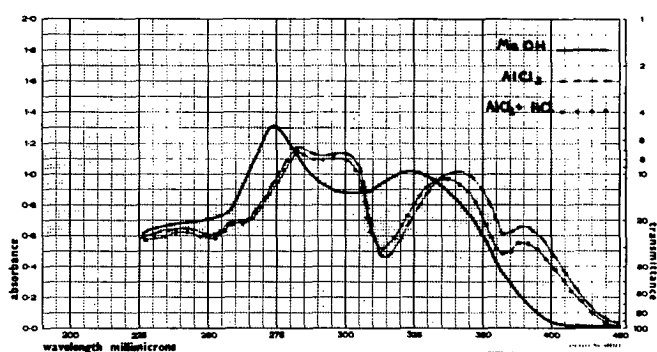
Le spectre UV de A est caractéristique d'un squelette flavonique [100]. L'addition de quelques réactifs (voir partie expérimentale) indique que ce produit possède

- des groupes hydroxyles en position 5 et 7
- pas de groupement o-dihydroxyle
- la position 4' probablement substituée.

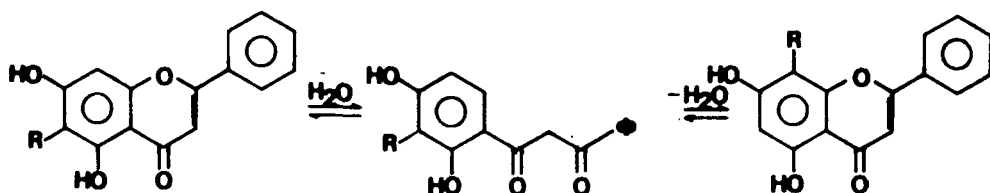
Tableau 8. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance A.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH		324		274
+ AlCl ₃	376	340	300	283
+ AlCl ₃ /HCl	376	336	296 (e)	283
+ NaOMe	372			281
+ NaOAc	372			281

(e) : épaulement

Figure 6. Spectres UV de A.

L'hydrolyse acide de A est effectuée comme précédemment par chauffage à reflux avec de l'acide chlorhydrique 2N. Nous voyons apparaître un produit à valeur R_f plus petite; après un certain temps cet aglycone semble s'isomériser. Cela montre que A est un O-glycoside de C-glucoside flavonique. En effet, les C-glucosides possédant un groupe hydroxyle libre en position 5 s'isomérisent, en milieu acide, par ouverture de l'hétérocycle flavonique en β -dicéto-
 one selon le schéma de WESSELY-MOSER [101]



La comparaison du résultat de l'hydrolyse de A avec certaines substances témoins est présentée dans la figure 7.

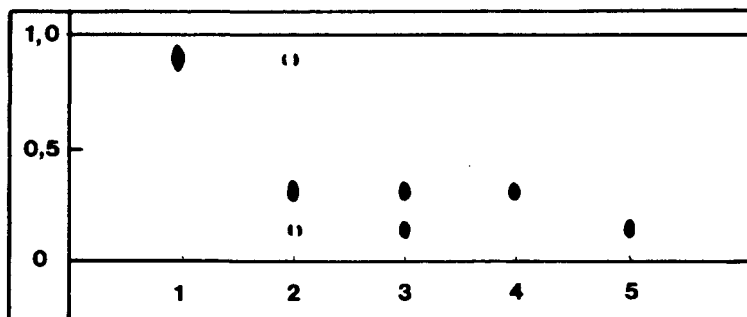


Figure 7. Chromatogramme de A hydrolysé
 Cellulose Merck; AcOH 10 %; Rév : UV 366 nm.
 1. substance A
 2. A hydrolysé, pendant 1 ½ heure
 3. A hydrolysé, pendant 3 heures
 4. Témoin isovitexine
 5. Témoin vitexine

A est donc probablement un O-glycoside de l'isovitexine.

Cette hypothèse est vérifiée par l'enregistrement des spectres UV de l'aglycone A₁. Ces spectres correspondent à ceux du témoin.

Tableau 9. Maximums d'absorption des spectres UV de l'aglycone A₁.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH	335			272	
+ AlCl ₃	382	349	305	279	265 (e)
+ AlCl ₃ /HCl	380	344	303	280	265 (e)
+ NaOMe	396	330		280	
+ NaOAc	384		298 (e)	280	

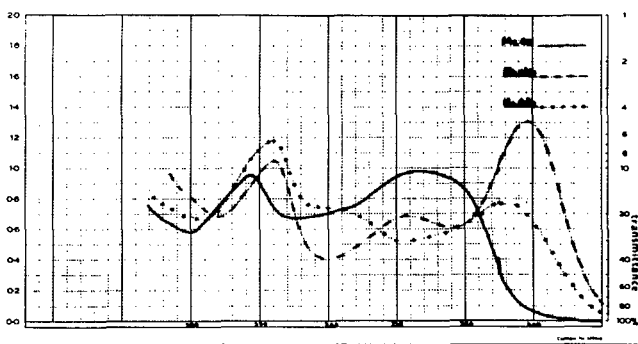
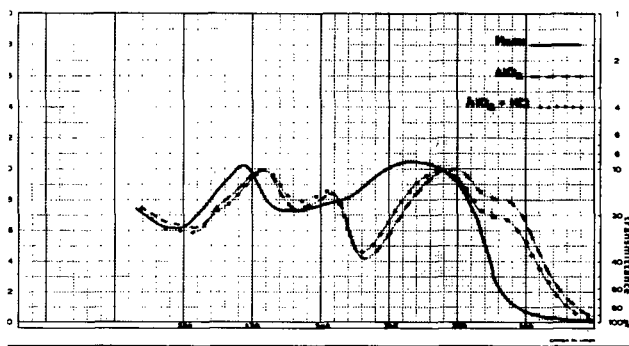


Figure 8. Spectres UV de A₁.

De plus, la valeur R_f de \underline{A} dans différents systèmes de CCM correspond à celle de l'isovitexine.

La recherche des sucres libérés par l'hydrolyse est effectuée dans la phase aqueuse de l'hydrolysats (voir chapitre 10). Elle nous indique la présence de glucose uniquement.

Il s'agissait alors de montrer que \underline{A} est un glucoside simple de l'isovitexine, c'est à dire sans autres substituants, en procédant à son hydrolyse enzymatique avec la β -glucosidase. Celle-ci nous indique les deux points essentiels suivants :

- a) que \underline{A} contient sans doute deux unités de β -glucose, puisqu'il subit deux modifications successives.
- b) que \underline{A} est bien un glucoside simple, puisqu'il ne fournit que l'isovitexine lorsque l'hydrolyse est complète.

L'évolution de cette hydrolyse est résumée dans la figure 9.

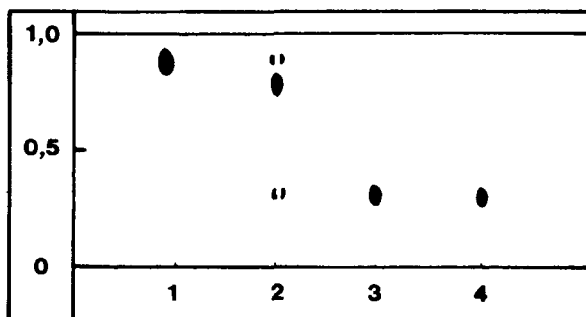


Figure 9. Chromatogramme de l'évolution de l'hydrolyse enzymatique de \underline{A} .

Cellulose Merck; AcOH 10 %; Rév.: UV 366 nm

1. Substance \underline{A}
2. Après 8 heures d'hydrolyse
3. Après 24 heures d'hydrolyse
4. Témoin isovitexine

Il est aisé de déterminer la position d'attache d'au moins un glucose (probablement en 4') par la méthylation complète de A au moyen du diazométhane (voir partie expérimentale) suivie de l'hydrolyse acide. L'aglucone méthyly hydrolysé est purifié par chromatographie sur colonne de Sephadex LH20 (MeOH), et ses spectres UV sont enregistrés.

Tableau 10. Maximums d'absorption des spectres UV de A méthyly hydrolysé.

Solvant	Maximums [nm]		
MeOH	323		263
+ AlCl ₃	323		263
+ NaOMe	380	300 (e)	262 (e) 240

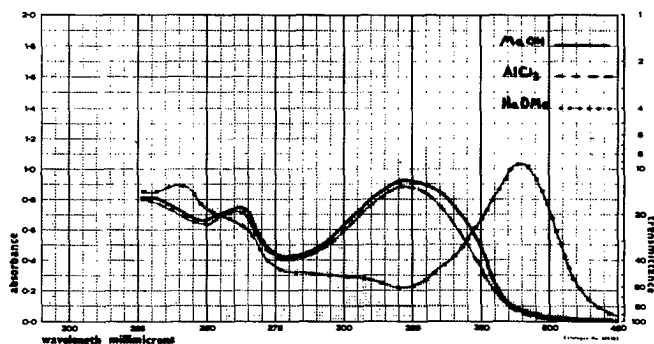


Figure 10. Spectres UV de A méthyly hydrolysé.

Le déplacement bathochrome important de la bande I, avec augmentation de l'intensité, lors de l'addition du méthylate de sodium est dû à la présence d'un groupe hydroxyle libre en position 4'. Il n'y a, de toute évidence, aucun autre hydroxyle libre dans la molécule. Au moins un O-glucose est fixé en position 4'.

Il nous reste dès lors deux possibilités de structure :

- a) le deuxième O-glucose est fixé sur le glucose que nous savons maintenant être en 4' (donc O- β -D-diglucoyl-4'-isovitexine)
- b) le O-glucose manquant est attaché sur la partie C-glucosidique de l'isovitexine (donc di-O- β -D-glucosyl-x",4'-isovitexine).

Comme les spectres RMN des dérivés acétylés des flavonoïdes permettent de tirer de nombreux renseignements, nous avons effectué l'acétylation de A par l'anhydride acétique en présence de pyridine (voir partie expérimentale). Le dérivé acétylé obtenu est recristallisé dans l'éthanol (F. 156-8°) et son spectre RMN est enregistré.

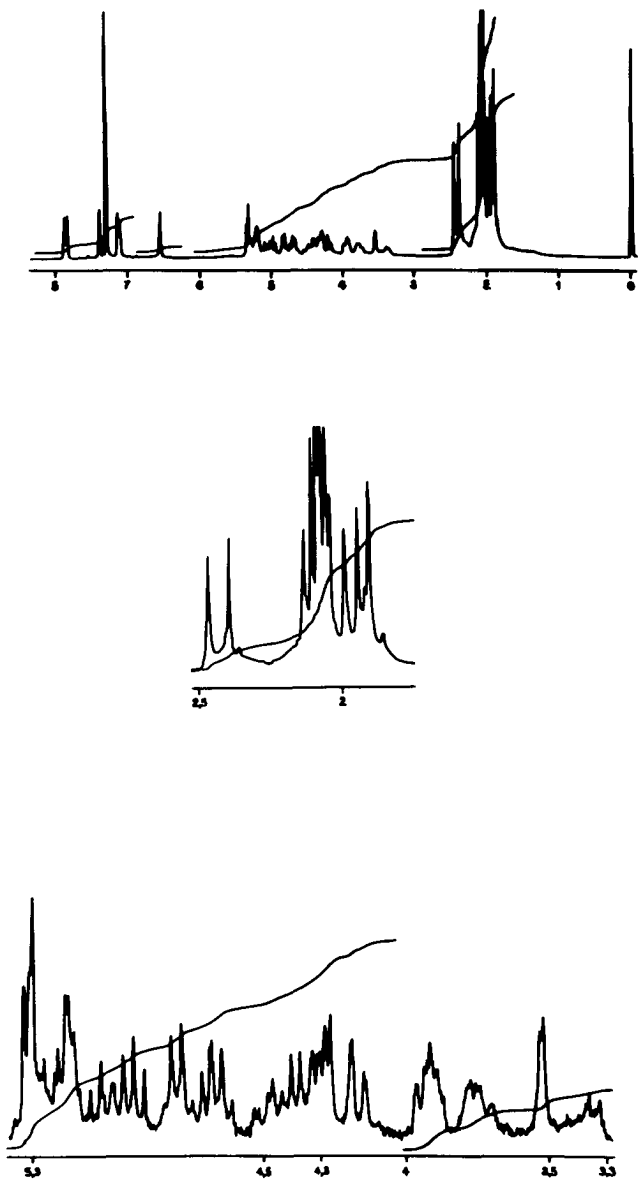


Figure 11. Spectre RMN de A acétylé (CDCl₃) (270 MHz)

Dans ce spectre (270 MHz, δ en ppm, avec le TMS comme référence interne) nous relevons

- a) les deux groupes acétoxy aromatiques attendus à 2,40 (position 7) et 2,46 (position 5).
- b) les six protons aromatiques, dont un à 6,52 (position 3) deux à 7,11 (position 3' et 5', $J = 8,5$ Hz), un à 7,37 (position 8) et deux à 7,82 (position 2' et 6', $J = 8,5$ Hz).
- c) 21 protons aliphatiques correspondant à trois unités de glucose et formant un multiplet complexe entre 3,35 et 5,36, dont les trois protons anomériques à 3,92, 4,20 et 4,80 (tous $J = 10$ Hz, précisant la configuration β).
- d) onze groupes acétoxy aliphatiques (singulets entre 1,90 et 2,13). Il faut remarquer ici l'absence du groupe acétoxy en 2" caractéristique des 6-C-glucosides flavoniques acétylés (région 1,70-1,83) [102], ce qui nous indique la position d'attache du deuxième O-glucose.

La figure 12 représente le spectre IR de A.

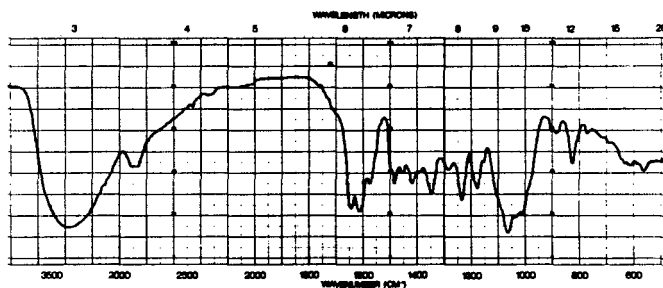
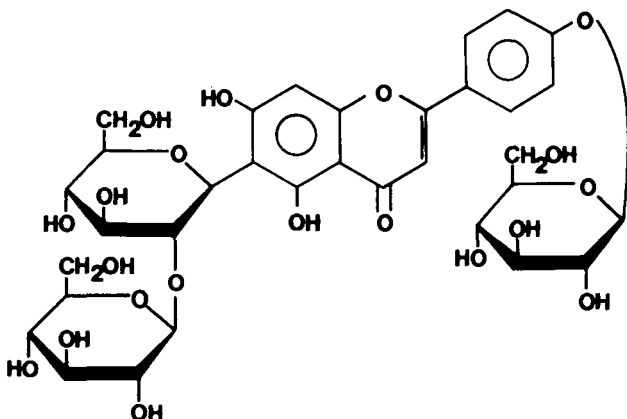


Figure 12. Spectre IR de la substance A.

En résumé, la structure de A est établie comme étant le di-O- β -D-glucosyl-2'',4'-isovitexine. Il s'agit là du premier di-O-glucoside de C-glucosylflavone rencontré dans la nature.



A : di-O- β -D-glucosyl-2'',4'-isovitexine

5.2.3 Détermination de la structure de la substance B.

Le comportement chromatographique de B sur de nombreux systèmes de CCM étant très semblable à celui du produit A, nous pouvions nous attendre à une structure assez proche de celle de notre première substance. C'est en effet le cas.

L'examen des spectres UV de B, en présence des réactifs usuels, nous montre qu'il s'agit d'une flavone possédant des groupes hydroxyle libres en 5 et en 7 et probablement une fonction oxygénée substituée en position 4'. La présence d'un groupement o-dihydroxyle est exclue. La position plus élevée de la bande I (333 nm) chez B que celle dans A (324 nm) pourrait indiquer une oxygénation supplémentaire sur le cycle B.

Tableau 11. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance B.

Solvant	Maximums [nm]		
MeOH	333		274
+ AlCl ₃	345		281
+ AlCl ₃ /HCl	344		283
+ NaOMe	380	278 (e)	270
+ NaOAc	350	315 (e)	279

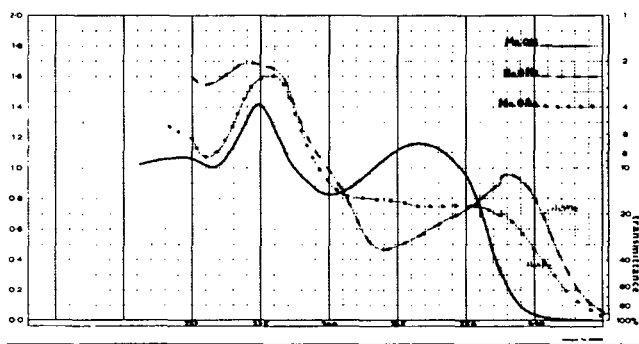
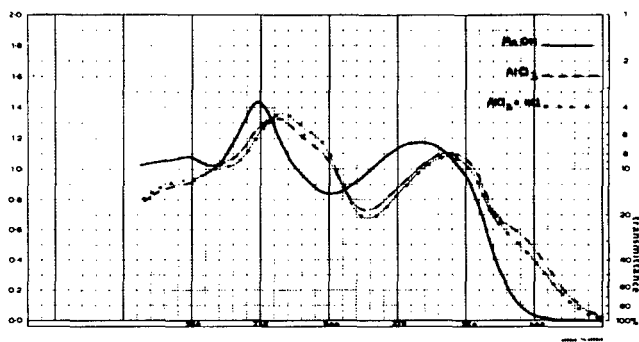


Figure 13. Spectres UV de B.

L'hydrolyse acide de B fournit un premier aglycone qui s'isomérisse peu à peu. Il pourrait s'agir là respectivement de l'iso-orientine et de son isomère en 8, l'orientine, comme le montre le chromatogramme de la figure suivante.

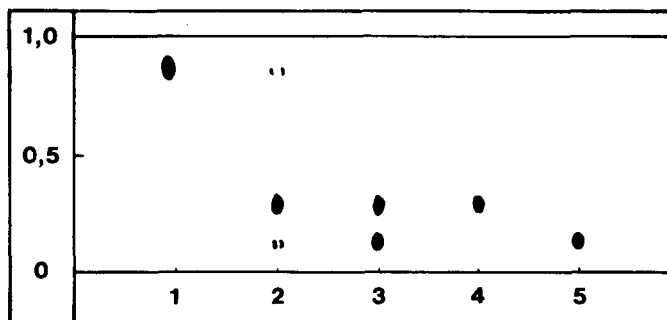


Figure 14. Chromatogramme de B hydrolysé.
Cellulose Merck; AcOH 10 %; Rév.: UV 366 nm

1. Substance B
2. B hydrolysé pendant 1,5 h.
3. B hydrolysé pendant 3 h.
4. Témoin iso-orientine
5. Témoin orientine

L'identité de l'aglycone B₁ et de son isomère avec ces deux C-glucosides bien connus a été prouvée par co-chromatographie sur plusieurs systèmes de CCM, ainsi que par l'étude des spectres UV dans lesquels nous relevons notamment la présence d'un groupement o-dihydroxyle, sans doute produit par la perte du substituant en 4'.

Tableau 12. Maximums d'absorption des spectres UV de l'aglycone B₁.

Solvant	Maximums $\bar{\lambda}$ [nm]			
MeOH		347		271 265 (e)
+ AlCl ₃	420	344 (e)	300 (e)	276
+ AlCl ₃ /HCl	381	355	295 (e)	278 265 (e)
+ NaOMe	406	337 (e)		275
+ NaOAc	396	324 (e)		278

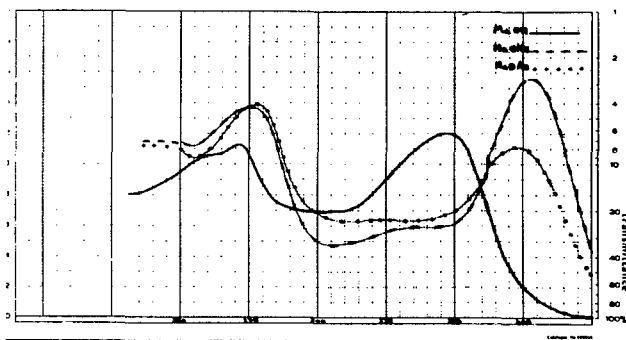
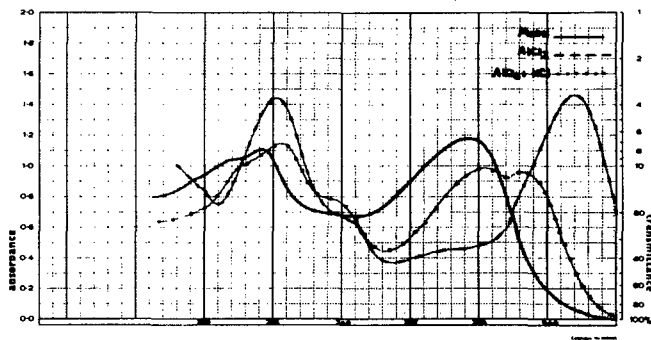


Figure 15. Spectres UV de B₁ dans le méthanol.

Comme précédemment, lors de l'examen de A, seul le glucose est mis en évidence dans la fraction des sucres après l'hydrolyse acide.

L'hydrolyse enzymatique de B avec la β -glucosidase est effectuée comme pour A, et elle conduit à un résultat analogue : B fournit en deux étapes, l'aglucone iso-orientine. Ici, la première phase de l'hydrolyse semble conduire à un produit connu : l'iso-orientine-2"- β -D-glucoside, isolé pour la première fois par HOSTETTMMANN et coll. à partir des feuilles de Gentiana verna L. [81] .

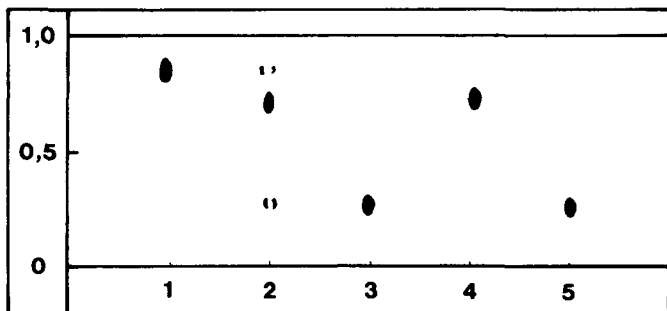


Figure 16. Chromatogramme de l'évolution de l'hydrolyse enzymatique de B.
Cellulose Merck; AcOH 10 %; Rév.:UV 366 nm.

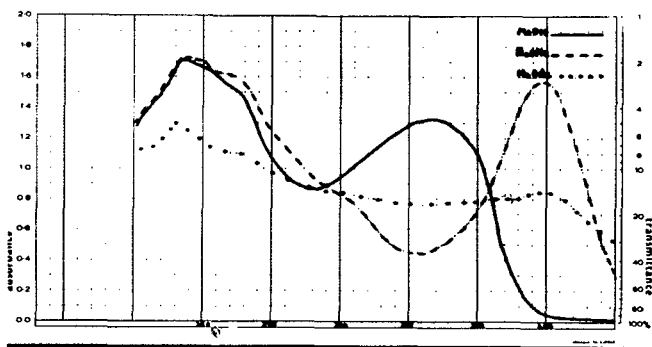
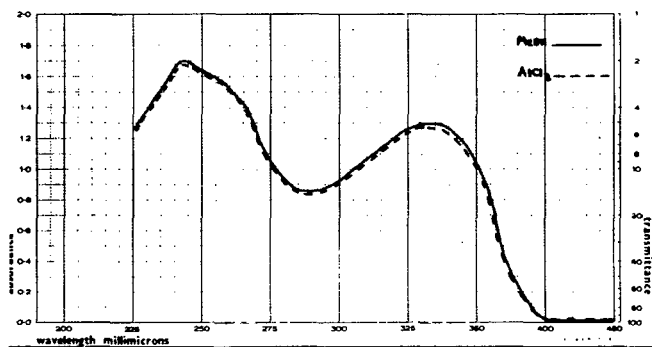
1. Substance B
2. B hydrolysé pendant 10 h.
3. B hydrolysé pendant 24 h.
4. Témoin iso-orientine-2"-O- β -D-glucoside
5. Témoin iso-orientine

B pourrait donc être le diglucoside de l'iso-orientine.

B méthylié puis hydrolysé est purifié sur colonne de Sephadex LH 20 (élution au méthanol); les spectres UV confirment, selon notre attente, la présence d'un groupe hydroxyle libre en 4'.

Tableau 13. Maximums d'absorption des spectres UV de B méthylé hydrolysé.

Solvant	Maximums [nm]		
MeOH	334	260 (e)	243
+ AlCl ₃	334	260 (e)	243
+ NaOMe	398	260 (e)	241
+ NaOAc	398	261 (e)	241

Figure 17. Spectres UV de B méthylé hydrolysé.

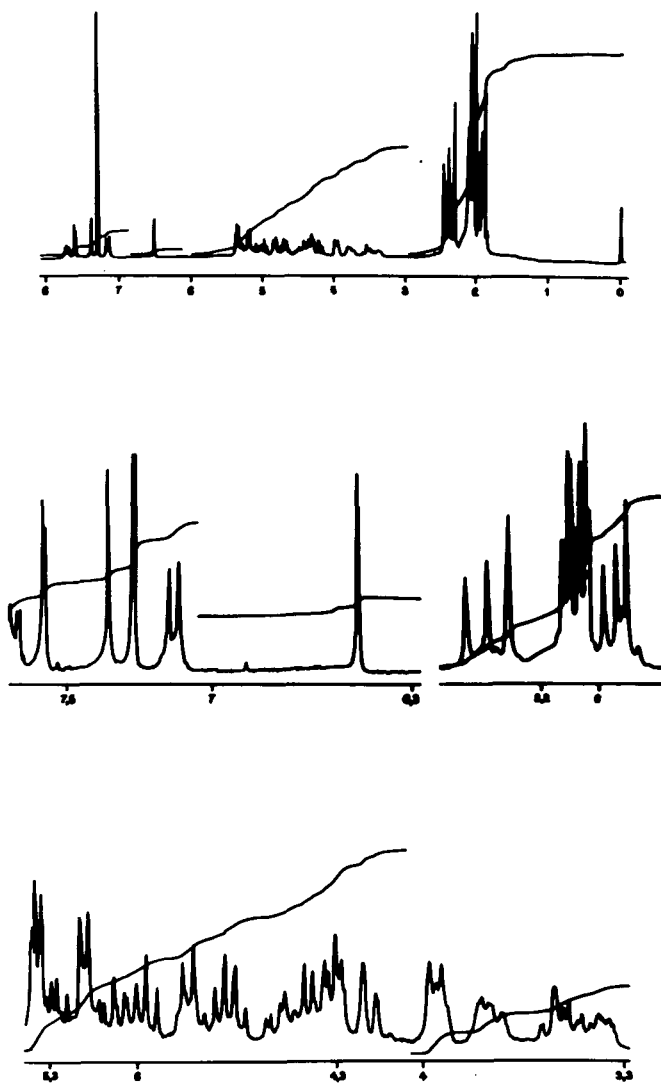


Figure 18. Spectre RMN de N acétylé (CDCl₃).

(270 MHz)

L'enregistrement du spectre RMN (270 MHz, δ en ppm) du dérivé acétylé de B (recristallisé dans l'éthanol, F. 163-5⁰) nous fournit la preuve finale que B est bien analogue à A.

Nous notons les points suivants :

- a) trois groupes acétoxyde aromatiques à 2,31 (position 3') 2,39 (position 7) et 2,46 (position 5).
- b) cinq protons aromatiques, dont un à 6,57 (position 3), un à 7,14 (position 5', J = 8,5 Hz), un à 7,36 (position 8), un à 7,58 (position 2', J = 2,5 Hz) et un à 7,69 (position 6', J = 8,5 et 2,5 Hz).
- c) vingt et un protons aliphatiques, correspondant à trois unités de glucose et formant un multiplet complexe entre 3,35 et 5,38, dont les trois protons anomériques à 3,98, 4,21 et 4,84 (tous J = 10 Hz, précisant la configuration β dans chaque cas).
- d) onze groupes acétoxyde aliphatiques (singulets entre 1,90 et 2,12). L'absence du signal acétoxyde dans la région 1,70 - 1,85 est une nouvelle preuve de l'attache d'un glucose en 2".

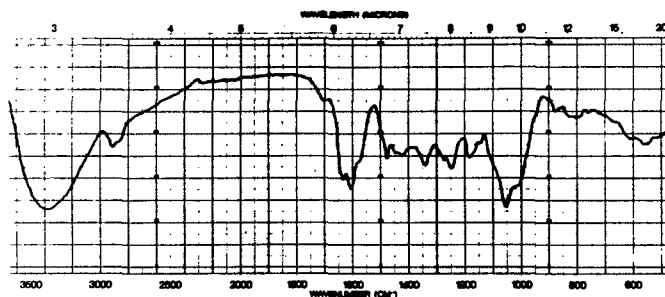
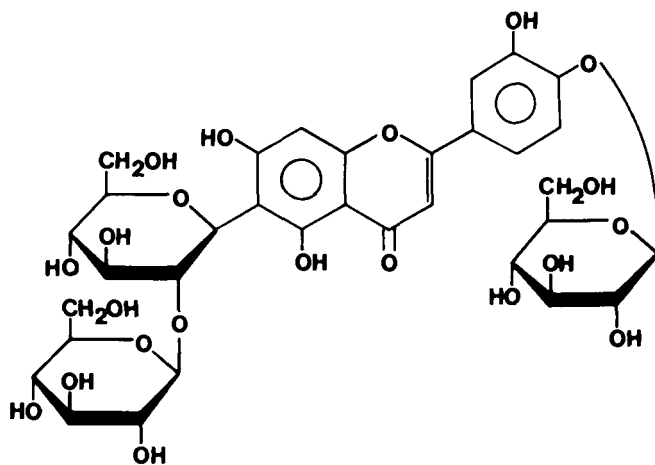


Figure 19. Spectre IR de la substance B.

B est donc le di-O- β -D-glucosyl-2",4'-iso-orientine, et constitue le deuxième exemple d'un di-O-glucoside de C-glucosyl-flavone naturel.



B : di-O- β -D-glucosyl-2'',4''-iso-orientine

5.3. Examen de la fraction F 2.

Par rapport à F 1, la composition de la fraction F 2 est assez simple; elle ne contient en effet qu'un seul polyphénol en quantité importante, C. Les sucres présents ont pu être facilement éliminés par une première chromatographie sur colonne de cellulose microcristalline (solvant : n-BuOH-AcOH-H₂O; 4 : 1 : 5). La purification est achevée par passage sur le même support (AcOH 5 %) suivi d'une filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH).

C se présente sous forme d'un solide jaune pâle se décomposant à 204°. Quantité isolée : 20 mg soit environ 0,006 % du matériel végétal de départ.

5.3.1. Détermination de la structure de la substance C.

Le comportement chromatographique de C est identique à celui de l'isovitexine-4'-O-glucoside, isolé par HOSTETTMANN et coll. dans les feuilles des espèces de la section Coelanthé [79] . La co-chromatographie a été effectuée sur trois supports différents : silicagel, cellulose et polyamide (voir partie expérimentale).

Les spectres UV de C, avec l'addition des réactifs usuels sont identiques à ceux de cet échantillon témoin.

Tableau 14. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance C.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH		322		274	255 (e)
+ AlCl ₃	380	342	300	282	262 (e)
+ AlCl ₃ /HCl	379	337	300 (e)	283	261 (e)
+ NaOMe	372			280	
+ NaOAc	372			281	

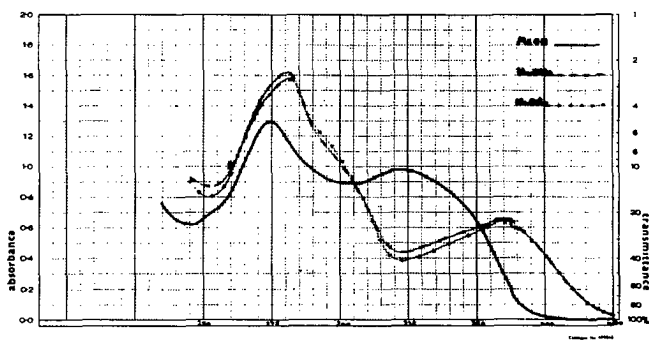
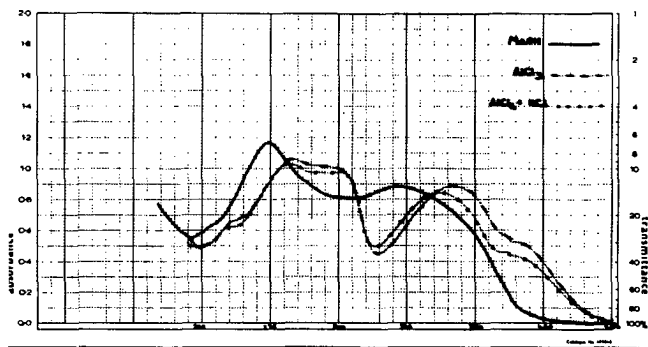


Figure 20. Spectres UV de C.

L'hydrolyse acide fournit, comme prévu, l'isovitexine qui s'isomérisse peu à peu en vitexine, ainsi que du glucose. L'identité de l'aglucone de C avec l'isovitexine est établie sur la base de la co-chromatographie avec un échantillon authentique et de la similitude des spectres UV. Les spectres IR de C et de l'isovitexine-4'-O-glucoside sont du reste eux aussi superposables.

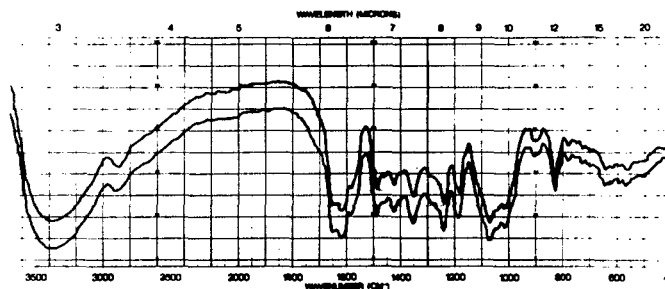
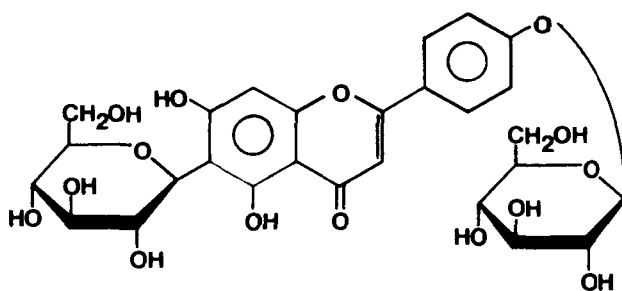


Figure 21. Spectres IR de C et de l'isovitexine 4'-O-glucoside.

Enfin la valeur du point de décomposition mixte ne subit aucune dépression.



C : isovitexine-4'-O- β -D-glucoside.

5.4. Examen de la fraction F 3.

Un examen préliminaire de cette fraction par CCM (voir figure 3) ne met en évidence qu'un seul spot pouvant correspondre à un produit polyphénolique. Après l'élimination des impuretés par trois passages successifs sur colonne de cellulose microcristalline (deux fois de suite avec le solvant de Partridge, puis une fois avec CHCl_3 -AcOH- H_2O 20 : 15 : 3), il s'avère que la fraction contient en fait deux constituants. Ces substances, D et E, sont enfin séparées par chromatographie sur le même support (n-BuOH-AcOH- H_2O 10 : 4 : 7) et obtenues à l'état pur par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH). Les substances D et E se présentent sous forme de poudres jaunes très pâles (recristallisation dans le méthanol).

Quantités isolées à partir de 350 g. de feuilles séchées :

D : 8 mg; F. 209-10° (déc)

E : 13 mg; F. 220-1° (déc)

5.5. Détermination des structures des substances D et E.

Comme dans le cas de l'étude des structures de A, B et C (voir ci-dessus), la première opération consiste en l'enregistrement des spectres UV (avec plusieurs réactifs spécifiques), lesquels fournissent des informations précieuses et essentielles. Nous devons cependant préciser que le relevé des spectres UV de substances encore impures est pratiquement inutile, en raison de conclusions erronées que l'on peut faire.

Les spectres UV des composés D et E (voir tableaux 15 et 16 et figures 22 et 23) présentent quelques analogies : ils sont caractéristiques de xanthones et ressemblent à ceux de la mangiférine; nous y relevons notamment la présence de groupes hydroxyles libres en position 1 et 3 ou 6; en revanche le groupement o-dihydroxyle présent dans ce C-glucoside xanthonique bien connu est absent.

Tableau 15. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance D.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	365	312	260	243
+ AlCl ₃	411	340	271	235
† AlCl ₃ /HCl	407	328	274	235
† NaOMe	400	339	275	252
† NaOAc	390	341	274	

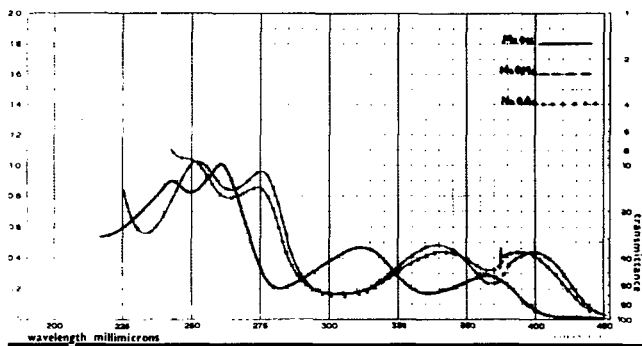
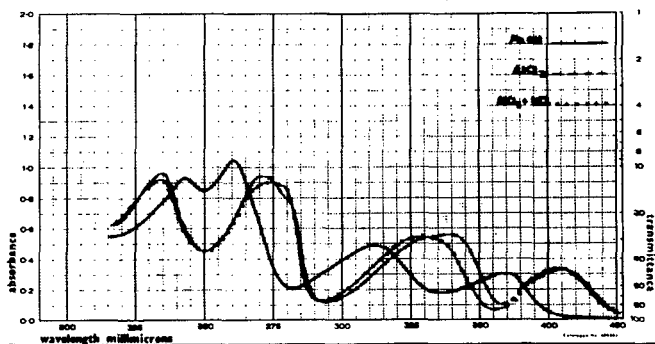


Figure 22. Spectres UV de D.

Tableau 16. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance E.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	353	315	257	242
+ AlCl ₃	390	340	266	233
+ AlCl ₃ /HCl	392	335	266	233
+ NaOMe	381	303	272	238
+ NaOAc	379	303	271	230

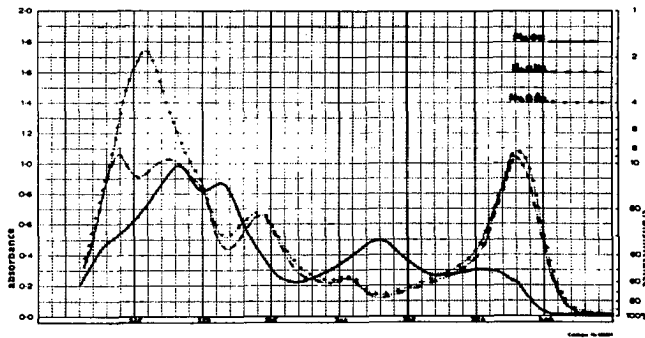
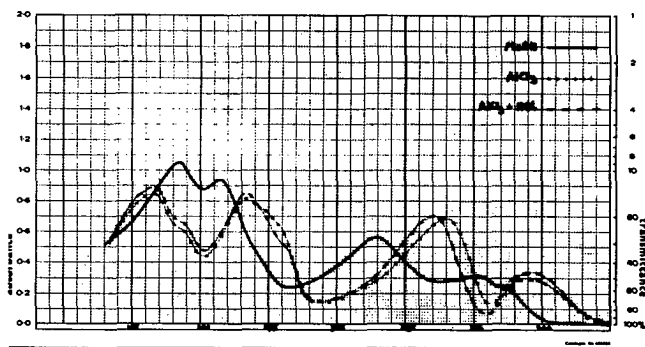


Figure 23. Spectres UV de E.

L'hydrolyse acide fournit, dans les deux cas, la mangiférine et du glucose. Alors que le glucose n'est déterminé que par CCM, l'identité de D et E hydrolysés avec un échantillon authentique de mangiférine est prouvée par la co-chromatographie dans plusieurs systèmes de solvants, et par comparaisons des spectres UV et IR. A titre d'exemple, nous présentons ici ces spectres dans le cas de E hydrolysé.

Tableau 17. Maximums d'absorption des spectres UV de E hydrolys

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	362	314	258	241
+ AlCl ₃	405	352	269	236
+ AlCl ₃ /HCl	400	336	266	235
+ NaOMe	389	302 (e)	274	238
+ NaOAc	382	302 (e)	270	230

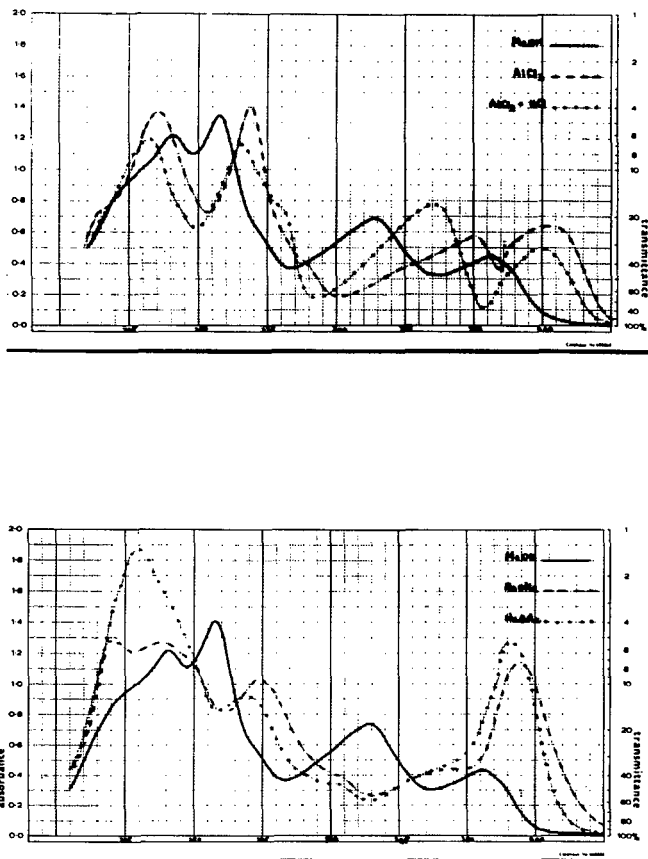


Figure 24. Spectres UV de E hydrolysé.

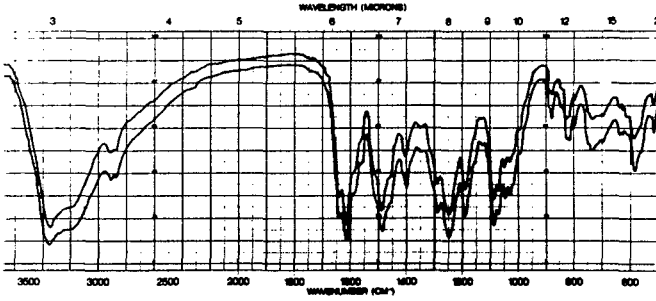


Figure 25. Spectres IR de E hydrolysé et de la mangiférine.

L'hydrolyse enzymatique avec la β -glucosidase donne aussi la mangiférine; il n'apparaît qu'une seule étape dans les deux cas.

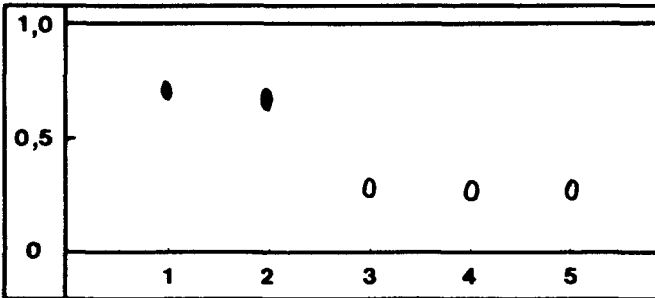


Figure 26. Chromatogramme de l'hydrolyse enzymatique de D et de E.

Cellulose Merck; AcOH 10 %; Rév. UV 366 nm.

1. Substance D
2. Substance E
3. D hydrolysé pendant 10 heures
4. E hydrolysé pendant 10 heures
5. Témoin mangiférine.

Certaines conclusions peuvent déjà être envisagées.

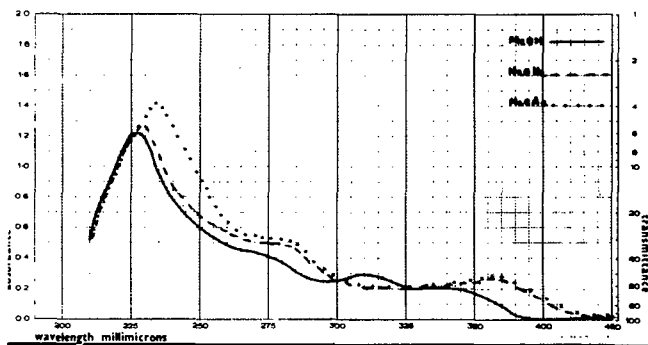
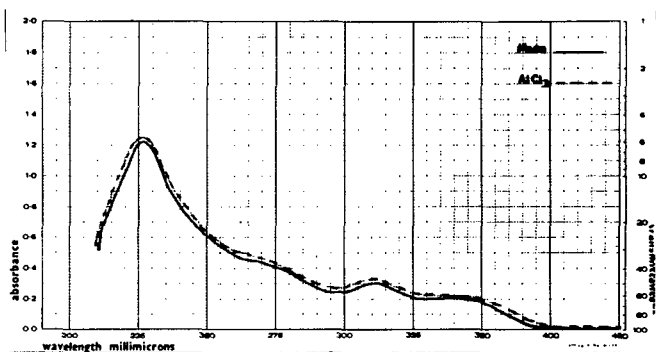
Les valeurs R_f élevées de D et de E (0,77 et 0,73 sur polyamide DC 11, MeOH 90 %) indiquent qu'il s'agit de glycosides. Les deux composés sont des glucosides de la mangiférine; l'un et l'autre portent le sucre soit en 6 soit en 7, en raison de l'apparition du groupement o-dihydroxyle de la mangiférine après hydrolyse. L'acidité de E est certainement plus grande que celle de D en raison du R_f plus faible du premier. A priori, D et E pourraient être le 6- et le 7-O-glucoside de la mangiférine. Relevons que ces informations et cette conclusion probable ont été obtenues avec 3 mg. seulement de produit.

La position d'attache du glucose est trouvée par la méthylation totale suivie de l'hydrolyse acide et l'étude des spectres UV des dérivés obtenus.

Le déplacement bathochrome important que subissent toutes les bandes lors de l'addition de la base faible dans le cas de D méthylé hydrolysé indique un hydroxyle libre fortement acide (c'est à dire en position 6).

Tableau 18. Maximums d'absorption des spectres UV de D méthylé hydrolysé.

Solvant	Maximums [nm]		
MeOH	330 (e)	310	226
+ AlCl ₃	330 (e)	310	226
+ NaOMe	366	275 (e)	228
+ NaOAc	366	275 (e)	233

Figure 27. Spectres UV de D méthylé hydrolysé.

Ce déplacement bathochrome n'est pas observé avec E méthylé hydrolysé lors de l'addition de l'acétate de sodium. L'hydroxyle libre, c'est-à-dire la position d'attache du glucose, est donc situé en 7.

Tableau 19. Maximums d'absorption des spectres UV de E méthylé hydrolysé.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH	334 (e)	309	273 (e)	252	
+ AlCl ₃	334 (e)	309	273 (e)	252	
+ NaOMe	380	309	270	232	
NaOAc	333 (e)	309	252	229	

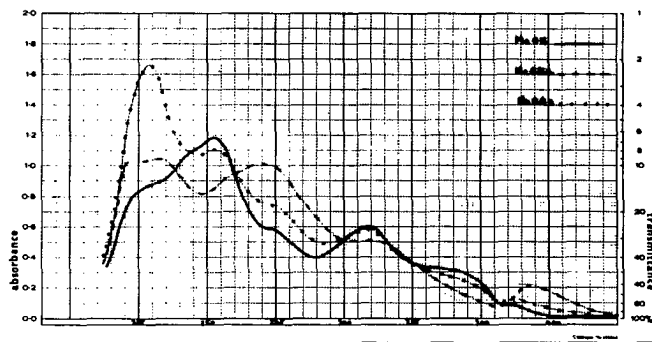
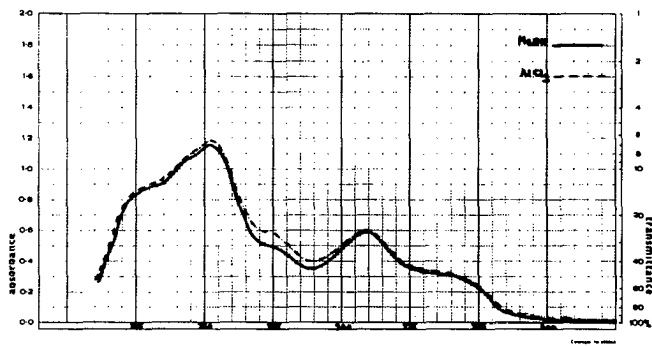


Figure 28. Spectres UV de E méthylé hydrolysé.

Les spectres RMN (270 MHz, δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne) des dérivés acétylés de D et de E ont permis de vérifier les structures proposées (voir tableau 20). Nous y remarquons le grand déplacement des protons en 5 et en 8 par rapport à ceux de la mangiférine acétylée (valeurs indiquées par BELLMANN et coll. [72] , ainsi que les protons anomériques des parties C- et O-glucosidiques dont les grandes constantes de couplage précisent la configuration β . Nous notons enfin la présence, attendue, du signal acétoxyyle en 2" aux environs de 1,80 ppm, relevé par GENTILI et coll. [102] .

Tableau 20. Spectres RMN des dérivés acétylés de D, E et de la mangiférine (entre parenthèses constante de couplage J en Hz).

	H-4	H-5	H-8	H glucosidiques
<u>D</u>	7,19	7,01 (1)	7,86 (1)	14 H entre 3,78 et 5,80 dont H-1 ^a à 4,85 (10) et H-1 ^b à 4,20 (10)
<u>E</u>	7,20	7,24 (1)	7,79 (1)	14 H entre 3,79 et 5,81 dont H-1 ^a à 4,84 (10) et H-1 ^b à 4,23 (10)
mangi- férine	7,28	7,45 (1)	8,08 (1)	7 H entre 3,80 et 5,80 dont H-1 ^a à 4,87 (10)
	Ac-1	Ac-3	Ac-6	Ac-7
<u>D</u>	2,52	2,49	-	2,29
<u>E</u>	2,50	2,47	2,32	-
mangi- férine	2,53	2,47	2,33	2,32

a : partie C-glucosidique b: partie O-glucosidique

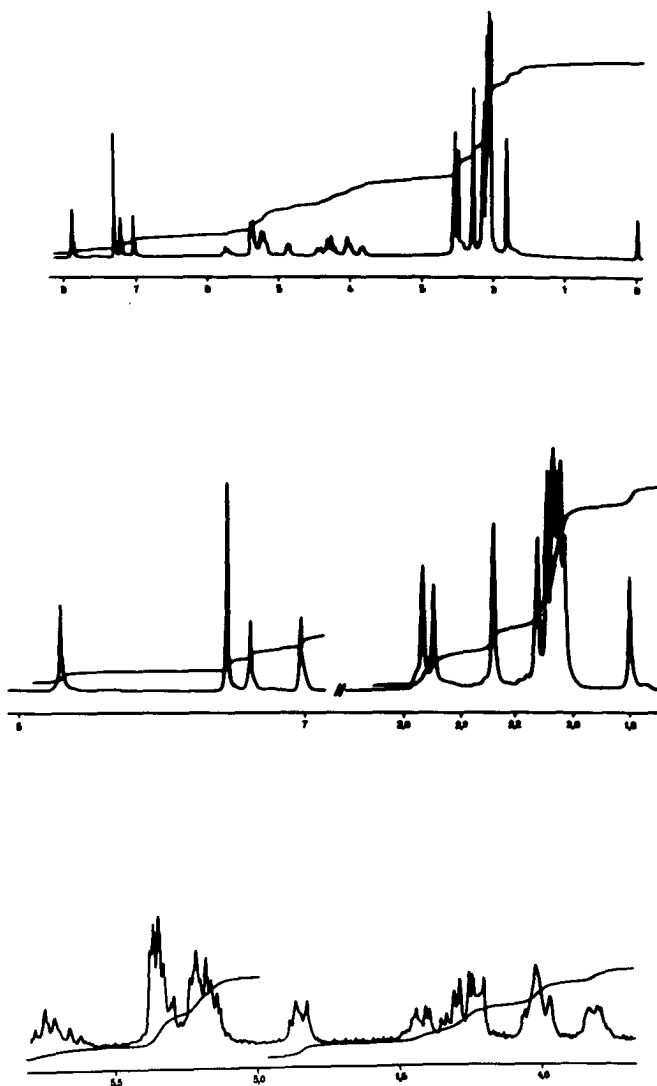


Figure 29. Spectre RMN du dérivé acétylé de D (CDCl₃).
(270 MHz)

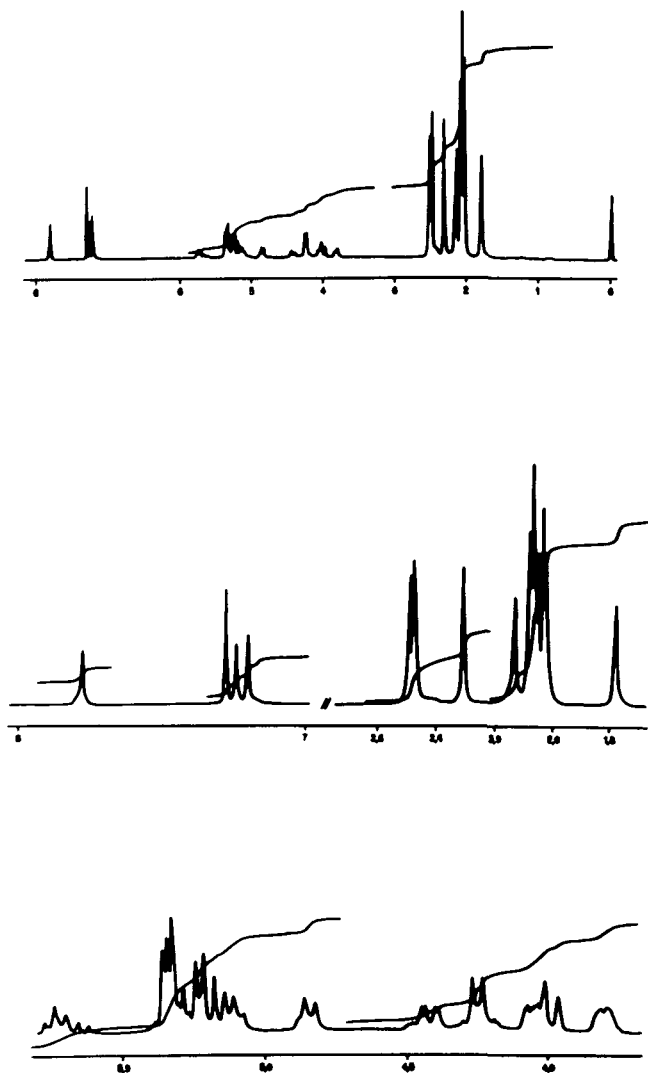


Figure 30. Spectre RMN du dérivé acétylé de E (CDCl_3).
(270 MHz)

Les structures établies sont donc bien celles que nous proposons:

D : O- β -D-glucosyl-6-mangiférine

E : O- β -D-glucosyl-7-mangiférine

Bien que la présence de la mangiférine ait été observée dans de nombreuses espèces végétales, aucun O-glucoside de celle-ci n'a été identifié jusqu'à présent. L'existence de telles substances a cependant été prouvée dans Asplenium montanum [114] et dans Hedysarum flavescens [115], sans que les auteurs puissent toutefois en déterminer les structures. D et E sont donc les premiers O-glucosides de la mangiférine décrits. La figure 31 présente les spectres IR de ces composés.

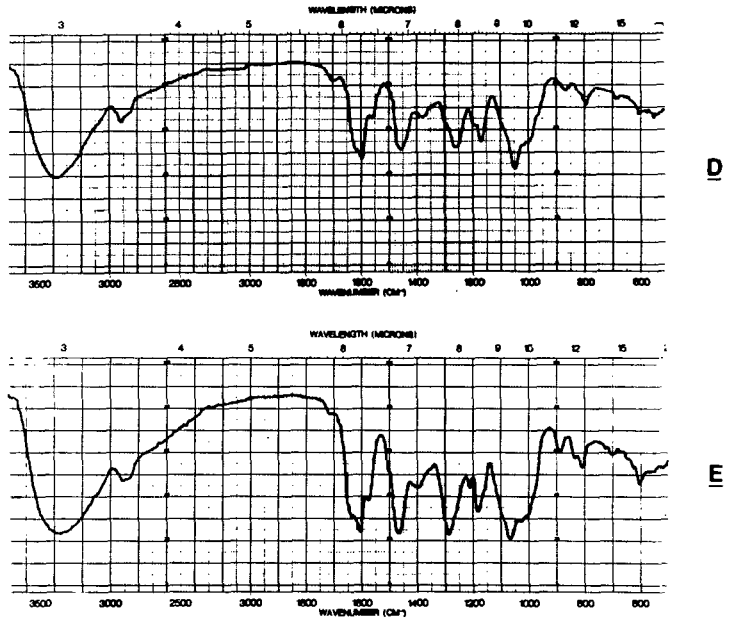
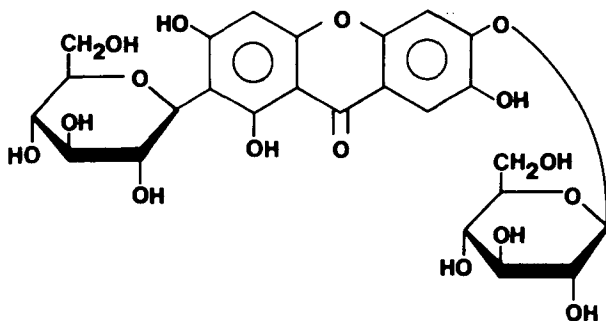
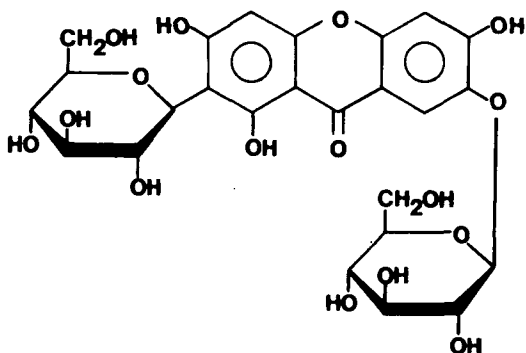


Figure 31. Spectres IR des substances D et E.



D : O- β -D-glucosyl-6-mangiférine



E : O- β -D-glucosyl-7-mangiférine

5.6. Examen de la fraction F 4.

Les impuretés non-polyphénoliques que contenaient la fraction F 4 ont pu être éliminées par deux passages successifs sur colonne de Sephadex LH 20 (élution au méthanol à 80 %). Les deux polyphénols qui se trouvent dans cette fraction sont ensuite séparés sur colonne de cellulose microcristalline avec le solvant CHCl_3 -AcOH- H_2O (20 : 15 : 3).

Le premier, F, présent en plus grande concentration, est purifié par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH). Nous en obtenons environ 115 mg. à partir de 350 g. de feuilles séchées. F est un solide jaune fondant à 214° .

Le deuxième G, nécessite plusieurs recristallisations dans le méthanol avant d'être chromatographiquement pur. Quantité isolée 20 mg. F 234-6^o.

5.6.1. Détermination de la structure de la substance F.

Le comportement chromatographique de F dans divers systèmes de CCM est le suivant :

$R_f = 0,72$	polyamide DC 11; MeOH- H_2O (9 : 1)
$R_f = 0,56$	cellulose Merck; AcOH 15 %
$R_f = 0,10$	silicagel 60; AcOEt-MeOH- H_2O (21 : 4 : 3)

Ces valeurs sont identiques à celles obtenues pour un échantillon du 4'-O-glucoside de l'iso-orientine, identifié par HOSTETTMANN et coll. [79] dans les feuilles des espèces de la section Coelanthé.

Les spectres UV, qui indiquent un noyau flavonique possédant deux groupes hydroxyle libres en 5 et 7 et probablement un troisième occupé, en 4', sont eux aussi semblables à ceux de la substance témoin.

Tableau 21. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance F.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH		335	273	243
+ AlCl ₃	375 (e)	354	284	265 (e)
+ AlCl ₃ /HCl	380 (e)	348	282	258
+ NaOMe	382	300 (e)	269	245
+ NaOAc	380		277	

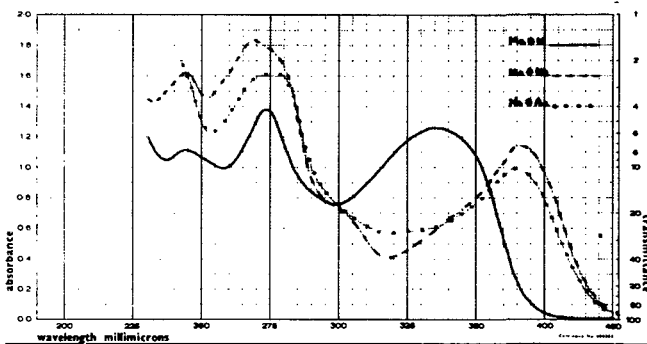
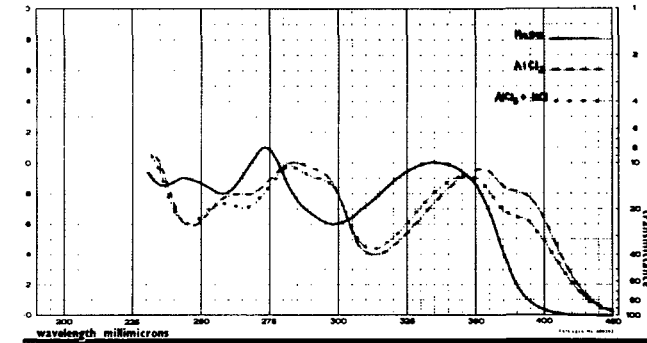


Figure 32. Spectres UV de la substance F.

L'hydrolyse acide conduit, comme c'est le cas pour le témoin, à l'iso-orientine (identifiée par co-chromatographie et ses spectres UV) et à son isomère l'orientine. Le glucose est mis en évidence dans la phase aqueuse de l'hydrolysât.

Tableau 22. Maximums d'absorption des spectres UV de F hydrolysé.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	349	272	265 (e)	
+ AlCl ₃	424	334	278	
+ AlCl ₃ /HCl	305	362	295 (e)	279
+ NaOMe	404		275 (e)	269
+ NaOAc	402		280	

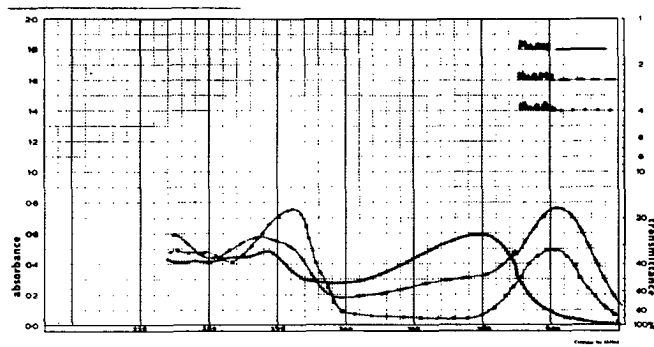
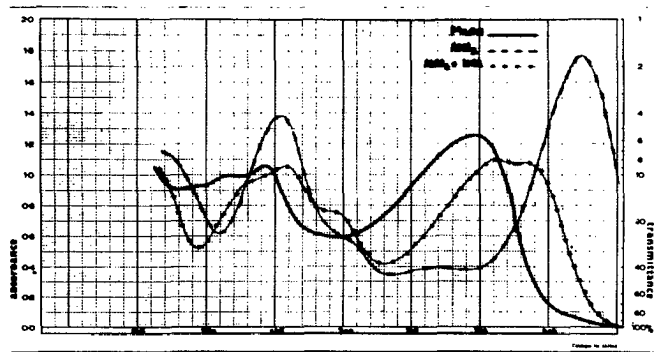


Figure 33. Spectres UV de F hydrolysé dans le méthanol.

Le point de fusion du mélange ne subit aucune dépression ($214-5^{\circ}$). Enfin, le spectre IR correspond en tous points à celui du témoin.

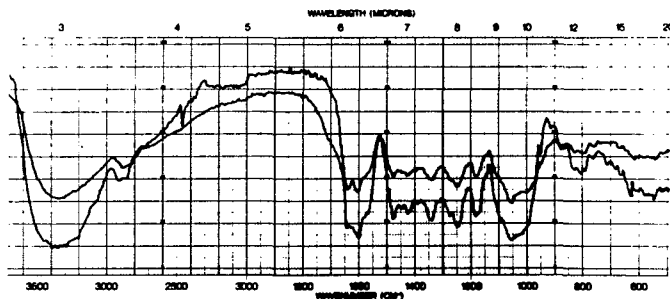
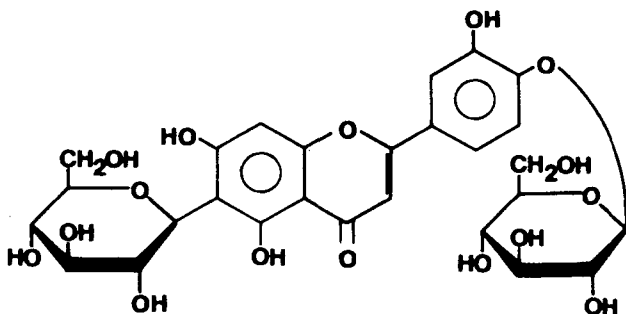


Figure 34. Spectres IR de F et du 4'-O-glucoside de l'iso-orientine.



F : O- β -D-glucosyl-4'-iso-orientine.

5.6.2. Détermination de la structure de la substance G.

L'examen des spectres UV de la substance G montre qu'il s'agit à nouveau d'une flavone; l'addition des réactifs permet de détecter la présence d'hydroxyles libres en 5 et en 4' et d'exclure celle d'un groupement o-dihydroxyle. De plus, la position 7 est occupée.

Tableau 23. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance G.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH		329		272
+ AlCl ₃	378	349	301	279
+ AlCl ₃ /HCl	376	343	300	279
+ NaOMe	385		307 (e)	271
+ NaOAc	388			270

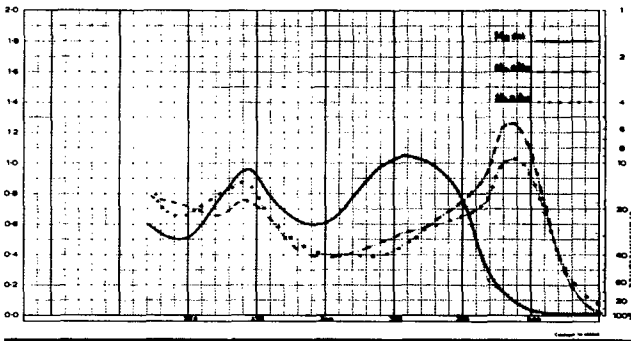
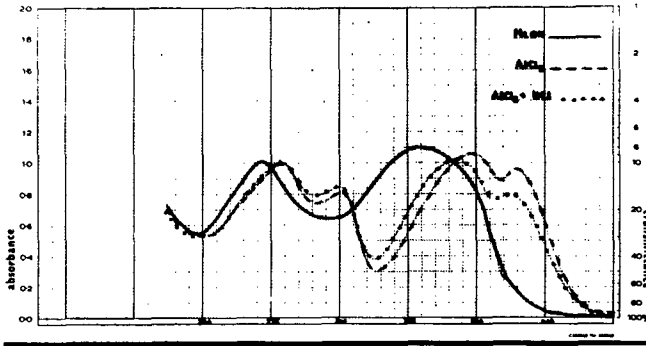


Figure 35. Spectres UV de G.

L'hydrolyse avec l'acide chlorhydrique et celle avec la β -glucosidase sont relativement difficiles : dans le premier cas, un chauffage avec l'acide 4N est nécessaire; par ailleurs il faut attendre quatre jours pour que l'hydrolyse enzymatique soit complète. Ces difficultés ont déjà été remarquées par de

nombreux auteurs dans le cas de glycosyl-7-flavones.

Ces opérations conduisent, lors de l'hydrolyse acide, au glucose, à l'isovitexine puis à la vitexine également, et lors de l'hydrolyse enzymatique, à l'isovitexine uniquement.

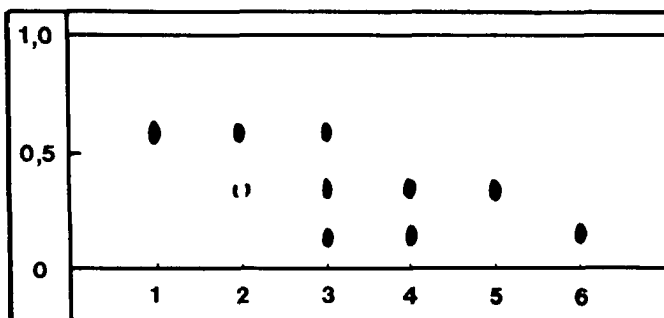


Figure 36. Chromatogramme de l'hydrolyse acide de la substance G

1. Substance G
2. G hydrolysé pendant 1 heure
3. G hydrolysé pendant 3 heures
4. G hydrolysé pendant 8 heures
5. Témoin isovitexine
6. Témoin vitexine

Ces observations sont en accord avec les spectres UV de G hydrolysé.

Tableau 24. Maximums d'absorption des spectres UV de G hydrolysé.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH		336	306 (e)	272
+ AlCl ₃	381	348	303	279
+ AlCl ₃ /HCl	380	344	302	279
+ NaOMe	395		328	280
+ NaOAc	380		300 (e)	280

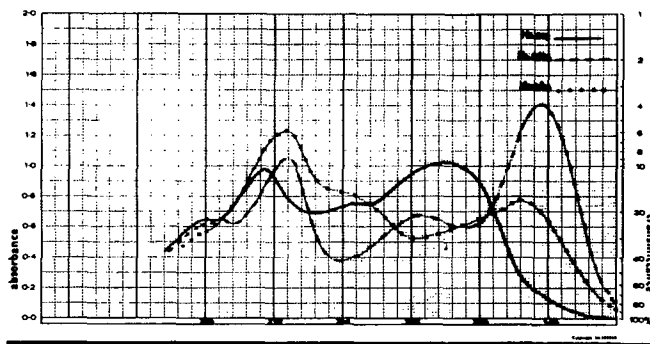
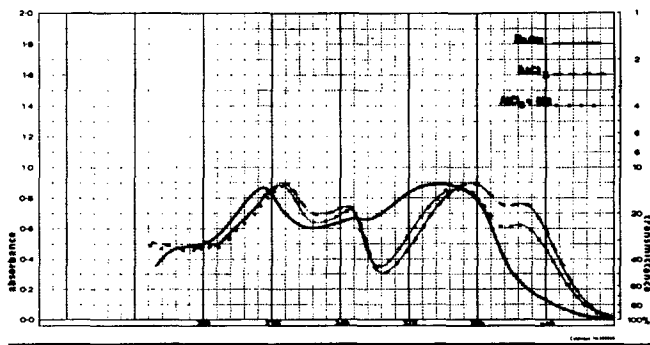


Figure 37. Spectres UV de G hydrolysé.

La confirmation qu'il s'agit d'un 7-O-glucoside est donnée par l'étude (voir spectre UV) du produit obtenu par méthylation de G suivie de l'hydrolyse acide (HCl 4N; 6 h.).

Tableau 25. Maximums d'absorption des spectres UV de G méthylé hydrolysé.

Solvant	Maximums [nm]	
MeOH	325	266
+ AlCl ₃	325	266
+ NaOMe	376	277
+ NaOAc	376	277

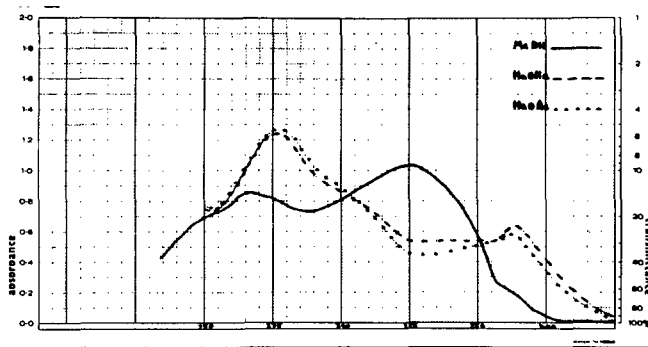
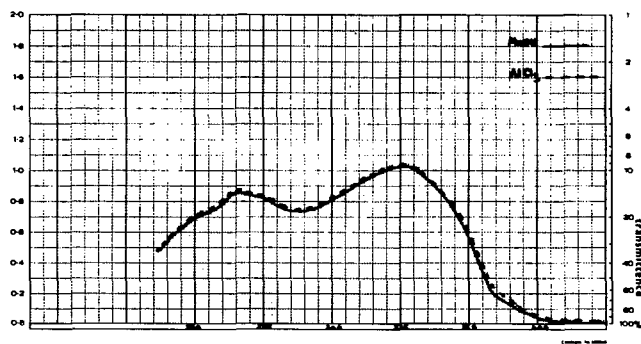


Figure 38. Spectres UV de G méthylé hydrolysé.

Enfin, la superposition du spectre IR de G avec celui d'un échantillon authentique de O-glucosyl-7-isovitexine isolé de Gentiana pyrenaica L. [90] constitue la preuve finale. Ce composé a déjà été signalé dans plusieurs familles mais n'est rencontré que pour la deuxième fois dans les Gentianacées.

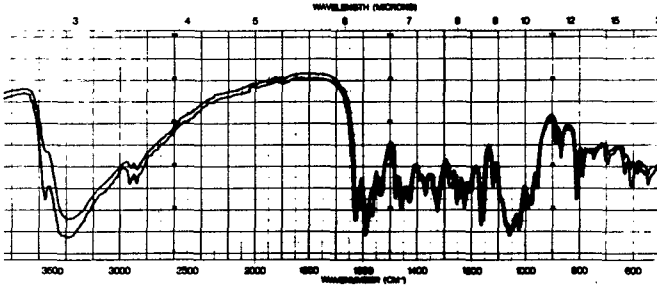
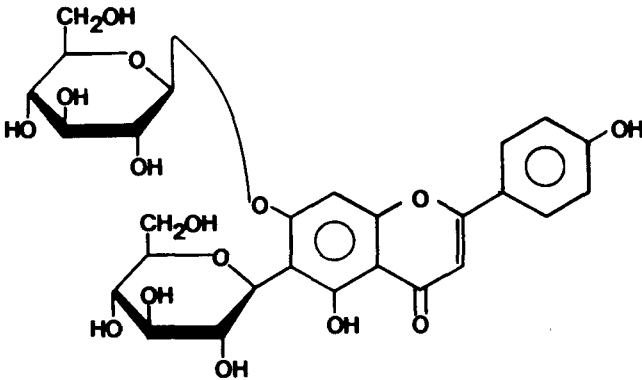


Figure 39. Spectres IR de G et de la saponarine.



G : O-glucosyl-7-isovitexine
(saponarine)

5.7. Examen de la fraction F 5.

La cinquième fraction de la colonne de polyamide, F 5, contient deux nouveaux composés ainsi qu'une trace de la substance F déjà identifiée. Deux passages successifs sur colonne de cellulose avec AcOH 5 % suffisent à séparer ces constituants.

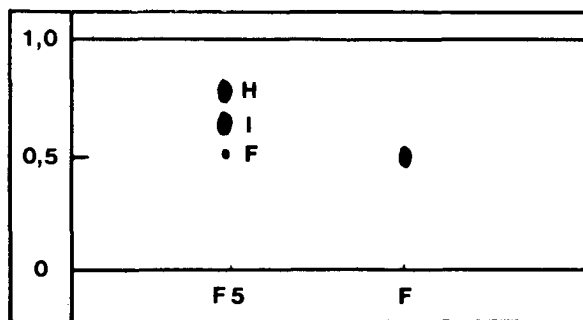


Figure 40. Chromatogramme de la fraction F 5 avant la séparation.
Cellulose Merck; AcOH 5 %; Rév. UV 366 nm.

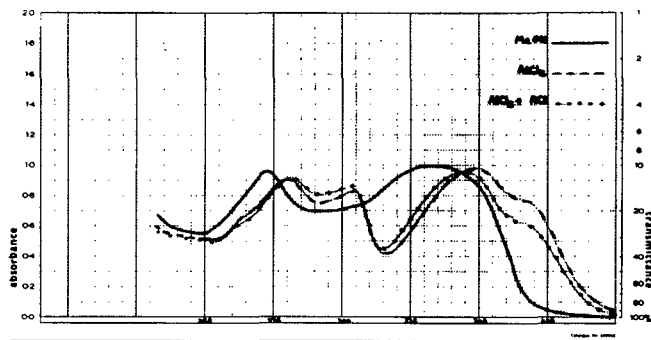
Nous obtenons 13 mg du produit H (F. 208⁰) et 19 mg. de I (F. 211⁰) après purification sur gel de Sephadex LH 20.

5.7.1. Détermination de la structure des substances H et I.

H et I sont tous deux de nature flavonique. Un examen plus approfondi des spectres UV de H permet de préciser trois hydroxyles libres en 5, 7 et 4'; il n'y a pas de groupement o-dihydroxyle.

Tableau 26. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance H.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH		334		273	
+ AlCl ₃	378	349	304	280	264 (e)
+ AlCl ₃ /HCl	378	344	303	281	264 (e)
+ NaOMe	397	332		280	
+ NaOAc	387		299 (e)	280	



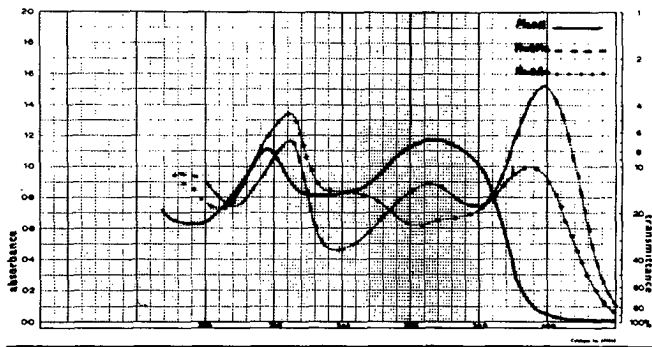


Figure 41. Spectres UV de H.

Quant à I, la présence d'un groupe o-dihydroxyle est probable; ses spectres ressemblent à ceux de l'iso-orientine [100] .

Tableau 27. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance I.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH		347		272 259
+ AlCl ₃	422	337 (e)	300 (e)	278
+ AlCl ₃ /HCl	382 (e)	358	295 (e)	281
+ NaOMe	406	340 (e)		271
+ NaOAc	394	328 (e)		280

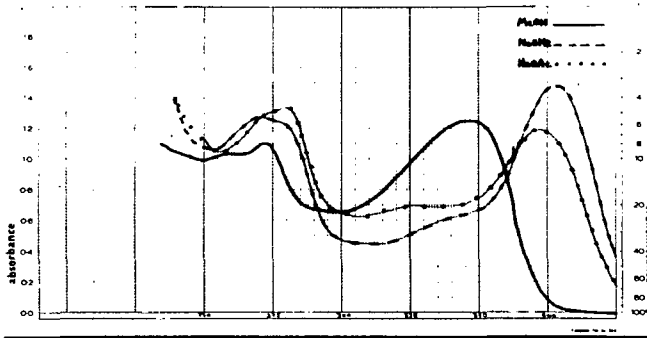
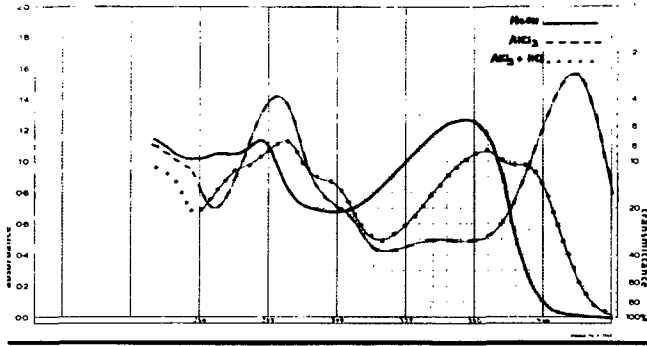


Figure 42. Spectres UV de I.

L'hydrolyse acide fournit l'isovitexine dans le cas de H et l'iso-orientine pour I. On n'observe du reste aucune différence entre les spectres UV des substances initiales et ceux de leurs aglycones. La recherche des sucres par CCM permet d'identifier le glucose dans les deux cas.

L'hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase conduit aux mêmes aglycones. Enfin la méthylation suivie de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique mène à des dérivés ne possédant aucun hydroxyle phénolique libre (aucune modification du spectre par l'addition des réactifs). Voici à titre d'exemple, les spectres UV de H méthylé hydrolysé.

Tableau 28. Maximums d'absorption des spectres UV de H méthylé hydrolysé.

Solvant	Maximums [nm]		
MeOH	330	263	252
+ AlCl ₃	330	263	252
+ NaOMe	330	263	252

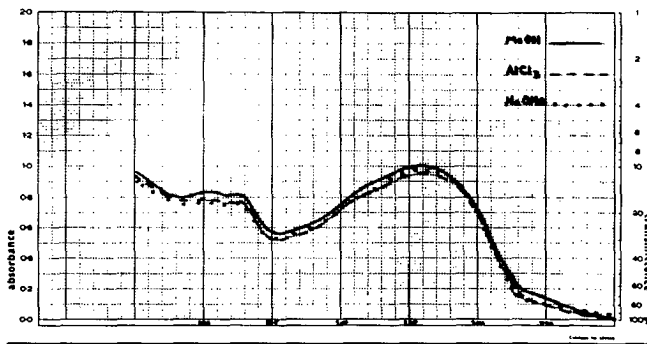


Figure 43. Spectres UV de H méthylé hydrolysé.

Nous pouvons par conséquent conclure qu'il s'agit de O-glucosides dans lesquels le sucre est fixé sur la partie C-glucosidique !

HOSTETTMANN et coll. avaient mis un tel composé en évidence dans les feuilles de *Gentiana verna* L. [81] : le O-glucosyl-2"-iso-orientine. La comparaison des points de fusion de I et de ce

composé témoin, ainsi que celle de leurs spectres IR respectifs ne laissent aucun doute sur la structure de I.

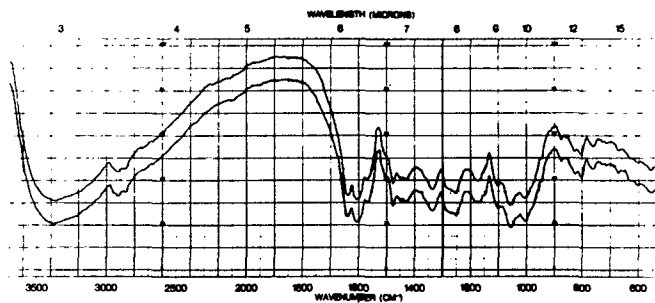
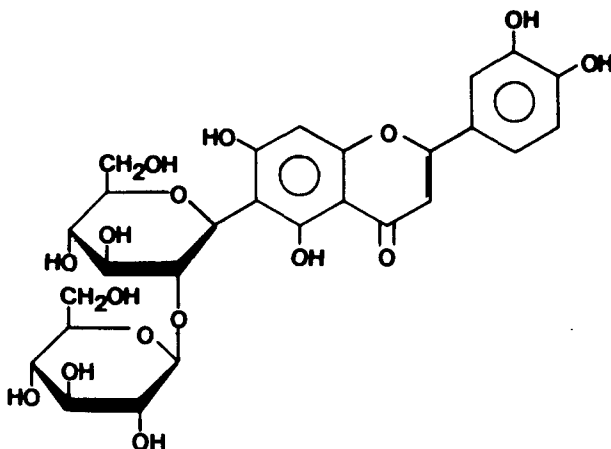


Figure 44. Spectres IR de I et de la O-glucosyl-2''-iso-orientine.



I : O-glucosyl-2''-iso-orientine.

La substance H pourrait donc être le glucoside analogue de l'iso-vitexine. Nous avons effectué l'acétylation de H et enregistré

le spectre RMN du dérivé acétylé (F. 142-4^o, recristallisé dans l'éthanol).

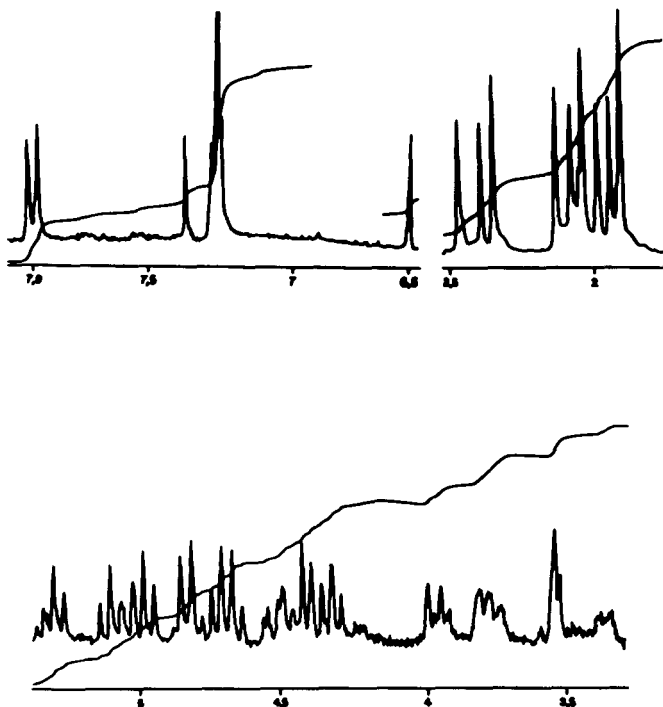
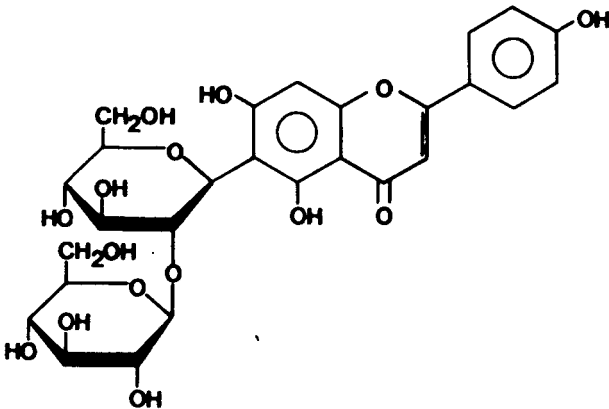


Figure 45. Spectre RMN du dérivé acétylé de \underline{H} (CDCl_3).

Dans ce spectre (270 MHz, δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne) nous relevons :

- a) trois acétoxyles aromatiques à 2,34, 2,39 et 2,48 (positions 4', 7 et 5)
- b) six protons aromatiques dont un à 6,57 (position 3), deux à 7,26 (positions 3' et 5', $J = 8,5$ Hz) un à 7,37 (position 8) et deux à 7,90 (positions 2' et 6', $J = 8,5$ Hz)
- c) quatorze protons aliphatiques entre 3,54 et 5,28 correspondant à deux unités de glucose, dont les protons anomériques à 3,98 et 4,82 ($J = 10$ Hz, indiquant la configuration β).
- d) sept groupes acétoxyle aliphatiques (singulets entre 1,90 et 2,13). L'absence du signal acétoxyle entre 1,70 et 1,83 précise la position d'attache du O-glucose.



H : O- β -D - glucosyl-2"-isovitexine.

La figure 46 représente le spectre IR de H.

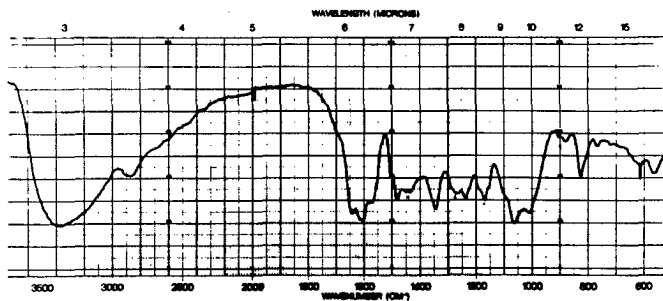


Figure 46. Spectre IR de H.

Le composé H est rencontré ici pour la première fois dans la nature; relevons cependant que peu après la publication de nos travaux TSCHESCHE et coll. l'ont également mis en évidence dans Oxalis acetosella L. [103]. Ses isomères en 7 et 4' sont les seuls connus et ont déjà été mis en évidence dans les fractions précédentes. I, la O-glucosyl-2"-iso-orientine, n'est isolé que pour la troisième fois.

5.8. Examen de la fraction F 6.

Les deux composés polyphénoliques présents dans cette fraction, J et K, ont été très facilement obtenus à l'état pur par une simple séparation sur colonne de polyamide SC 6 avec le solvant toluène-méthanol-acide acétique (45 : 32 : 16). J est encore purifié par passage sur colonne de cellulose avec AcOH 10 % suivi d'une filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH), alors que K ne nécessite que le passage sur Sephadex.

Quantités isolées à partir de 350 g. de feuilles séchées :

J : 10 mg; F. 231-2°

K : 200 mg; F. 235-6°

5.8.1. Détermination des structures des substances J et K.

Comme ces deux composés sont très répandus dans le règne végétal et qu'ils sont bien connus, nous traiterons de leur identification en parallèle et de manière brève.

J et K présentent un comportement chromatographique identique à celui des C-glucosides isovitexine et iso-orientine, dans plusieurs systèmes de CCM. Leurs spectres UV sont eux aussi identiques à ceux d'échantillons authentiques de ces produits. D'autre part, ils ne subissent que l'isomérisation lors de l'hydrolyse acide; leurs points de fusion sont les mêmes que ceux des témoins. Enfin, leurs spectres IR sont superposables à des spectres de référence.

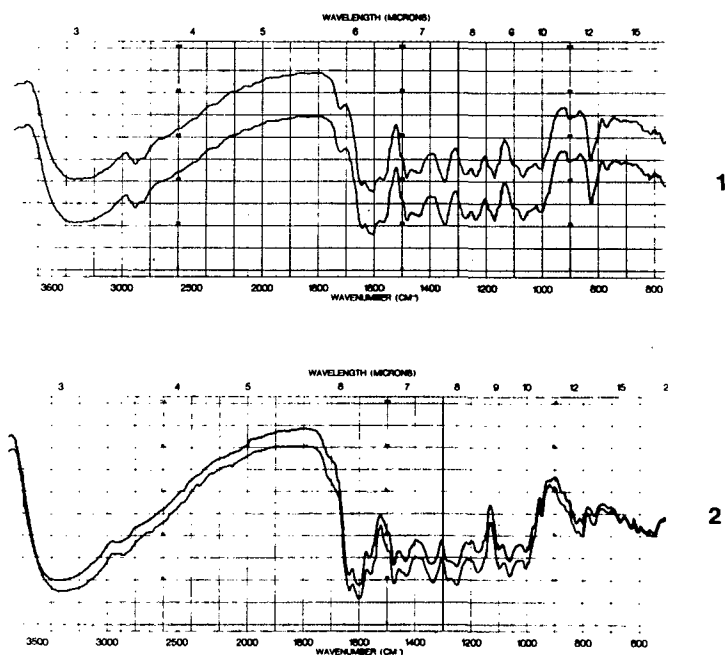
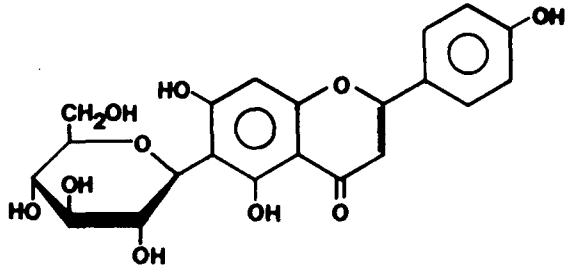
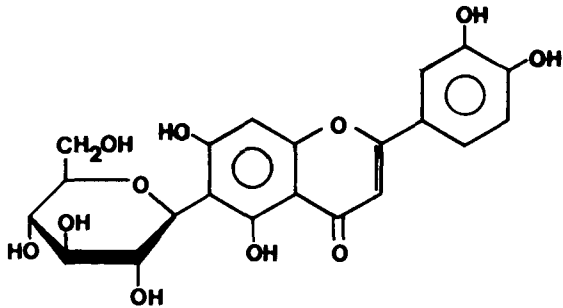


Figure 47. Spectres IR de J et de l'isovitexine (1), et de K et de l'iso-orientine (2).

Nous pouvons donc conclure quant à l'identité des substances J et K. Il n'est du reste pas surprenant de trouver ces composés dans Gentiana asclepiadea L., puisque nous y avons montré la présence de quelques uns de leurs glucosides.



J : isovitexine



K : iso-orientine

5.9. Examen de la fraction F 7.

Cette fraction ne contient qu'un seul polyphénol : la substance L. Celle-ci précipite après une purification sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH). Elle est recristallisée dans du méthanol, F. 260° (déc.). Quantité obtenue : 520 mg. soit environ 0,15 % du matériel végétal de départ.

5.9.1. Détermination de la structure de la substance L.

L présente une fluorescence jaune sous lumière UV 366 nm; la même caractéristique a été remarquée pour la mangiférine par BELLMANN et coll. [72] dans les feuilles de Gentiana lutea L.

Nous avons donc procédé à la co-chromatographie de L avec un échantillon authentique de ce C-glucoside xanthonique : leur comportement est identique dans plusieurs systèmes de CCM.

Les spectres UV de la substance L sont typiques d'une xanthone (quatre maximums) possédant des hydroxyles libres en positions 1 et 3 ou 6, ainsi qu'un groupement o-dihydroxyle. Ils sont identiques à ceux du témoin.

Tableau 29. Maximums d'absorption des spectres UV de L.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH	365	315	271 (e)	259	242
+ AlCl ₃	405	354	288 (e)	270	237
+ AlCl ₃ /HCl	404	338	280 (e)	267	233
+ NaOMe	390	304	273	245 (e)	238
+ NaOAc	384	303	271		230

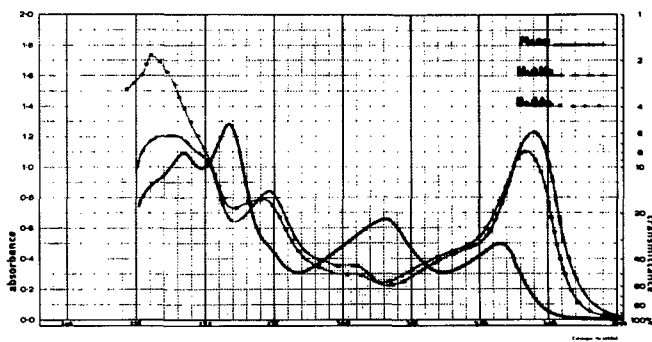
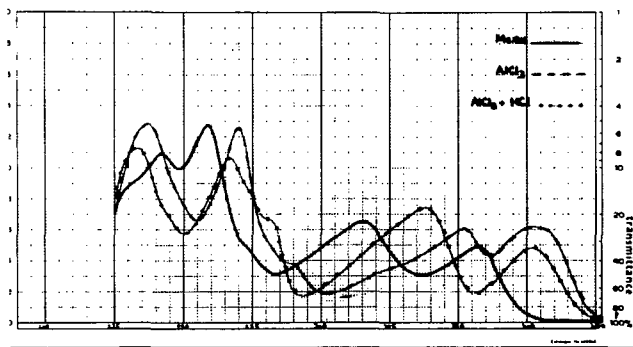


Figure 48. Spectres UV de L.

L ne subit aucune modification par traitement à l'acide chlorhydrique 4N à chaud; de plus, son spectre IR est superposable à celui du témoin.

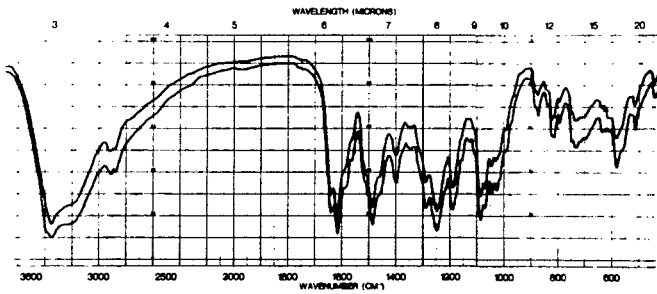
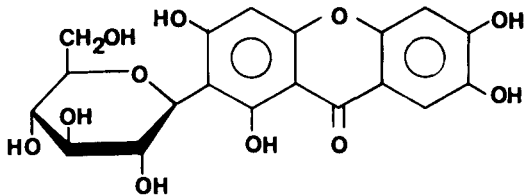


Figure 49. Spectres IR de 1 et de la mangiférine.



1 : mangiférine

La mangiférine est largement répandue dans le règne végétal; elle a également été identifiée dans plusieurs espèces de la sous-tribu des Gentianinae (voir tableau récapitulatif, chapitre 9).

5.10. Résumé

Nous avons été à même d'isoler douze polyphénols dans les feuilles de Gentiana asclepiadea L. Ce sont tous des C-glucosides : l'isovitexine, l'iso-orientine, la mangiférine et neuf de leurs O-glucosides.

- A : di-O- β -D-glucosyl-2",4'-isovitexine
B : di-O- β -D-glucosyl-2",4'-iso-orientine
C : O- β -D-glucosyl-4'-isovitexine
D : O- β -D-glucosyl-6-mangiférine
E : O- β -D-glucosyl-7-mangiférine
F : O- β -D-glucosyl-4'-iso-orientine
G : O- β -D-glucosyl-7-isovitexine
H : O- β -D-glucosyl-2"-isovitexine
I : O- β -D-glucosyl-2"-iso-orientine
J : isovitexine
K : iso-orientine
L : mangiférine

Parmi les composés identifiés, il faut relever en particulier la présence de cinq nouveaux produits naturels :

- A et B : les premiers di-O-glucosides de C-glucosylflavones.
D et E : les seuls glucosides de la mangiférine dont la structure ait pu être établie avec certitude.
H : le troisième glucoside de l'isovitexine à être caractérisé.

En ce qui concerne les sept autres substances, notons que G est trouvé seulement pour la deuxième fois dans les Gentianacées, I pour la troisième fois, alors que C, F, J, K et L ont été mis en évidence dans plusieurs espèces du genre Gentiana.

6. ETUDE DES COMPOSES DANS LES FEUILLES DE GENTIANA CRUCIATA L.

Gentiana cruciata L. fait partie de la section Aptera. Rappelons que celle-ci serait à rapprocher, selon SCHARFETTER, de la section Pneumonanthe, dont nous avons étudié un représentant : Gentiana asclepiadea L.

Quelques travaux ont été consacrés aux constituants de Gentiana cruciata : MAREKOV et coll., en particulier, se sont intéressés à divers alcaloïdes dans les feuilles et les racines [98] et à un dérivé de la lactone mévalonique [104] alors que HEGNAUER relève la présence de gentiopicrine dans les racines [68] . En revanche, les polyphénols n'ont fait l'objet d'aucune investigation.

Nous avons trouvé Gentiana cruciata L. dans des pâturages peu humides et en bordure de chemins de campagne, dans la région de Ceillac (Hautes-Alpes, France). Nous en avons récolté des feuilles, lors de la floraison (mois d'août). Le matériel est séché, comme précédemment, à 40° pendant 48 heures.

6.1. Extractions et fractionnement des extraits.

Nous avons à nouveau appliqué la méthode d'extraction par des solvants de polarité croissante. Le matériel sec (120 g.) est traité à chaud pendant 12 heures avec successivement 900 ml. des solvants suivants : ligroïne, éther, chloroforme et méthanol. Chaque étape est effectuée deux fois. Nous n'avons pas jugé utile de compléter ces extractions par un traitement au méthanol aqueux; en effet, un essai préliminaire sur une petite quantité de matériel nous a montré que les polyphénols étaient obtenus quantitativement lors de l'épuisement au méthanol.

Les extraits à la ligroïne (9 g.), à l'éther (4,5 g.) et au chloroforme (7,5 g.) ont chacun été passés sur colonne de polyamide MN SC-6 (solvant MeOH-AcOH-H₂O 90 : 5 : 5). Ce système chromatographique présente l'avantage suivant : les chlorophylles et les carotenoïdes sont retenus sur le support, alors que les polyphénols sont élués; il est alors aisé de contrôler la présence de produits intéressants dans l'éluat. Cette technique nous a permis de montrer que seul l'extrait méthanolique contient des polyphénols. Cet extrait est alors fractionné sur colonne de polyamide (MeOH 50 %, avec augmentation progressive du pourcentage de méthanol, jusqu'à atteindre 90 %). La figure ci-après représente le schéma général de l'isolement.

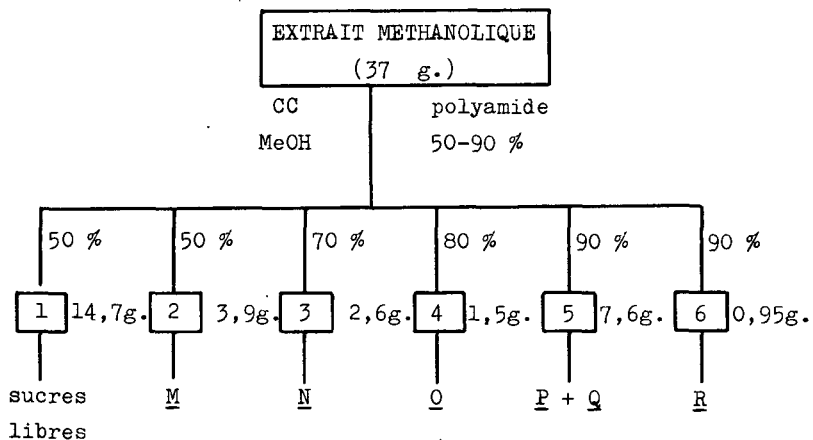


Figure 50. Schéma général d'isolement.

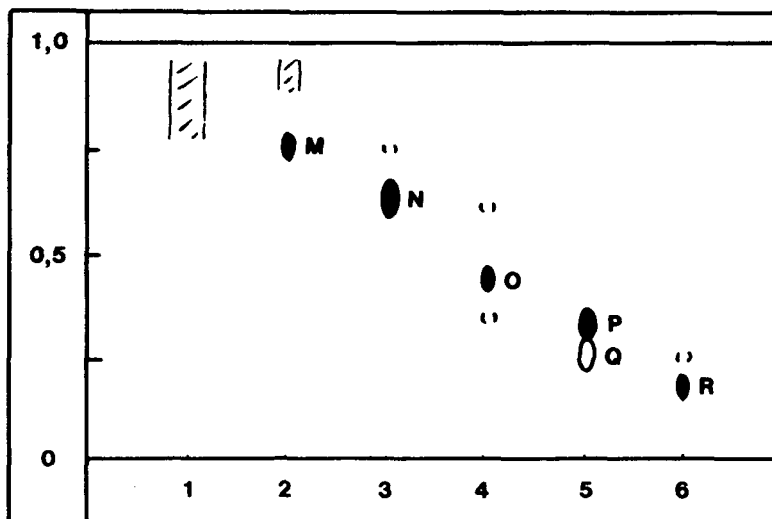


Figure 51. Chromatogramme des six fractions obtenues.

Polyamide DC 11; MeOH 90 %; Rév : UV 366 nm.

● : spot brun

○ : spot jaune

6.2. Examen de la fraction 1.

Une analyse préliminaire de cette fraction par CCM semble indiquer qu'elle ne contient aucun polyphénol. Cela est aisément confirmé : La recherche d'un éventuel aglycone après hydrolyse acide d'un aliquot de cette solution est négative.

Après environ trois semaines au repos, il apparaît quelques cristaux brunâtres qui sont récoltés et recristallisés deux fois dans le méthanol en présence de charbon actif. Nous obtenons environ 40 mg. d'une substance cristalline incolore, ressemblant à un sucre et fondant à 206°.

La comparaison de cette substance avec le (+)-bornésitol isolé à partir des feuilles de Gentiana lutea L. nous indique qu'il s'agit de ce cyclitol assez peu répandu dans la nature. En effet le point de fusion effectué avec le témoin ne subit aucune dépression. Le pouvoir rotatoire spécifique, mesuré à 25° dans l'eau est identiques à celui du témoin : $[\alpha]^{25} = +32,1$. Enfin les spectres IR de ces substances sont rigoureusement superposables.

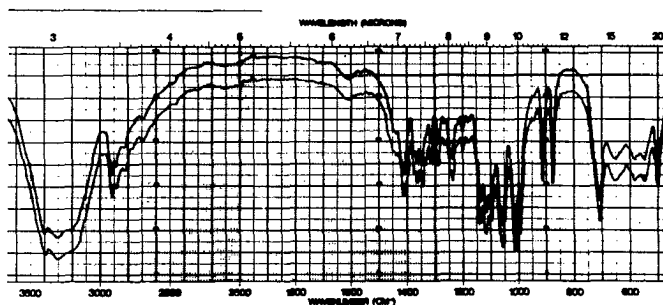
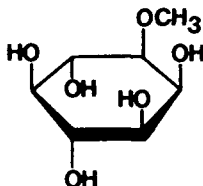


Figure 52. Spectres IR du (+)-bornésitol isolé de la fraction 1 et du témoin.

Mises à part de nombreuses espèces des Gentianacées où il a été mis en évidence par BELLMANN et coll. [73] SCHILLING [105] et HOSTETTMANN et coll. [75] , le L-(+)-bornésitol n'a été signalé que dans les Apocynacées [106] et les Rubiacées [107].



L-(+) - bornésitol

6.3. Examen de la fraction 2.

Nous obtenons la substance M, seul polyphénol contenu dans cette fraction, par un premier passage sur colonne de cellulose microcristalline avec le solvant de Partridge (n-BuOH-AcOH-H₂O (4 : 1 : 5) phase supérieure) suivi de deux filtrations successives sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH). M se présente sous forme d'un solide jaune se décomposant entre 200 et 206°. Quantité isolée : environ 0,03 % du matériel végétal de départ.

Le comportement chromatographique de la substance M est identique, sur plusieurs systèmes de CCM, à celui de C isolé à partir de Gentiana asclepiadea L.

Les spectres UV effectués dans le méthanol et en présence des réactifs habituels sont semblables à ceux de C.

Tableau 30. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance M.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH		322		274	255 (e)
+ AlCl ₃	380	342	300	282	262 (e)
+ AlCl ₃ /HCl	379	337	300 (e)	283	261 (e)
+ NaOMe	372			280	
+ NaOAc	372			281	

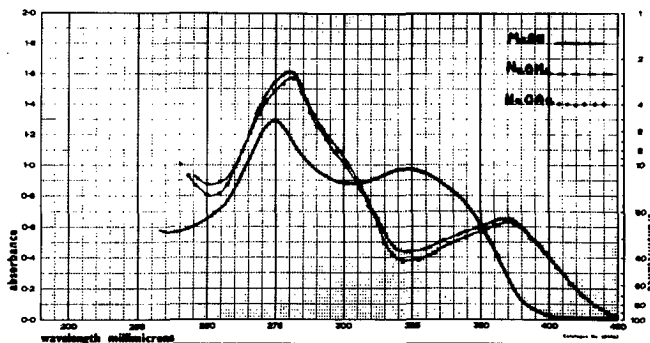
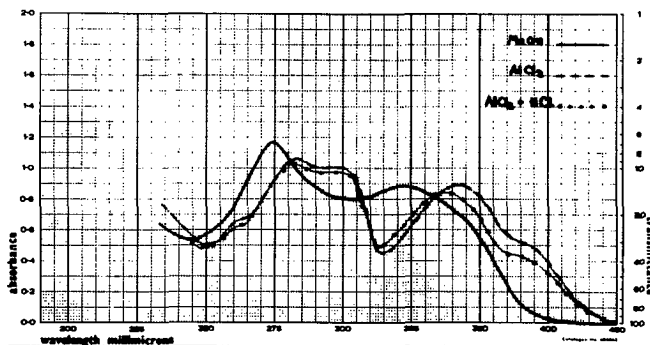


Figure 53. Spectres UV de M.

L'hydrolyse acide conduit à du glucose et à deux spots de R_f inférieur correspondant à l'isovitexine et à la vitexine. Enfin les spectres IR de M et du témoin C sont superposables.

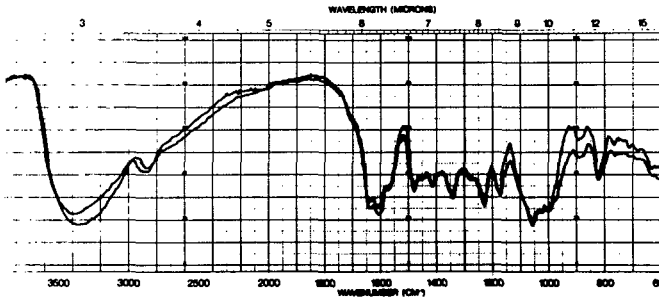
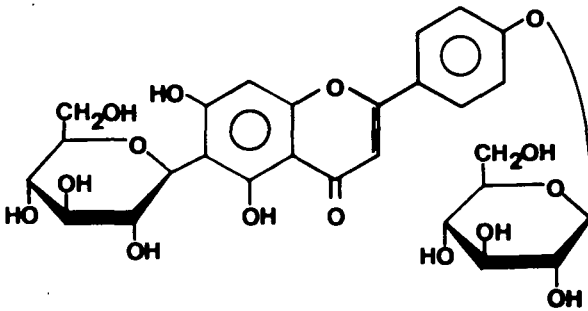


Figure 54. Spectres IR de C et de M.



M : O- β -D-glucosyl-4'-isovitexine

6.4. Examen de la fraction 3.

La troisième fraction provenant de la séparation sur colonne de polyamide contient des traces de M et une quantité relativement importante d'un autre polyphénol, N. Celui-ci semble correspondre à l'iso-orientine-4'-O-glucoside.

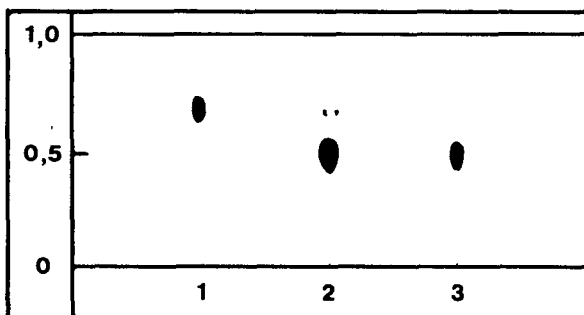


Figure 55. Chromatogramme de la fraction 3 avec des substances témoins.

Cellulose Merck : AcOH 10 %; Rév. : UV 366nm

1. Substance M

2. Fraction 3

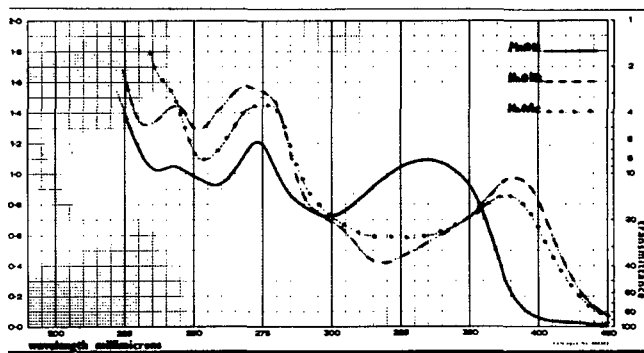
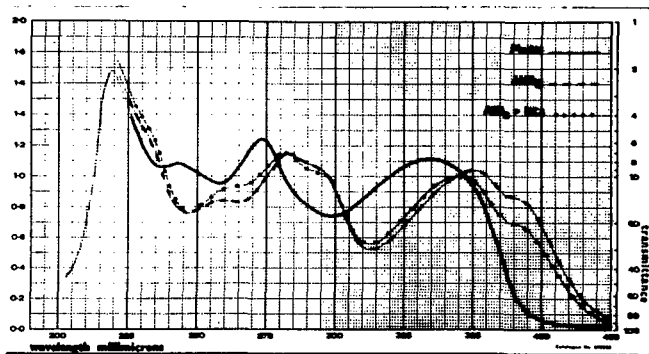
3. Témoin iso-orientine-4'-O-glucoside

Nous effectuons la séparation des constituants de la fraction 3 par chromatographie sur colonne de cellulose avec le solvant AcOH 10 %. La purification de N est achevée par passage sur colonne de Sephadex LH 20 (MeOH). 85 mg. de solide jaune sont obtenus. (F.214⁰).

L'examen des spectres UV indique qu'il s'agit d'une flavone, possédant des groupes hydroxyles libres en 5 et 7; la position 4' semble occupée.

Tableau 31. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance N.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH		334		273	243
+ AlCl ₃	371 (e)	350	290 (e)	283	259
+ AlCl ₃ /HCl	372 (e)	345	290 (e)	281	262 (e)
+ NaOMe	382		300 (e)	269	244
+ NaOAc	378			278	

Figure 56. Spectres UV de N.

Ces spectres sont identiques à ceux du 4'-O-glucoside de l'iso-orientine.

L'hydrolyse acide fournit, selon notre attente, l'iso-orientine (qui s'isomérisise en orientine) ainsi que du glucose. Le même aglucone est obtenu par le traitement de N avec la β -glucosidase.

Les spectres IR de N et d'un échantillon authentique de l'iso-orientine-4'-O-glucoside isolé à partir de Gentiana vilarsii Romn. [79] sont identiques. Ils sont présentés dans la figure suivante.

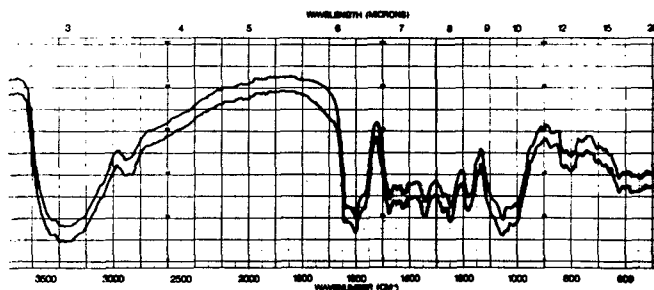
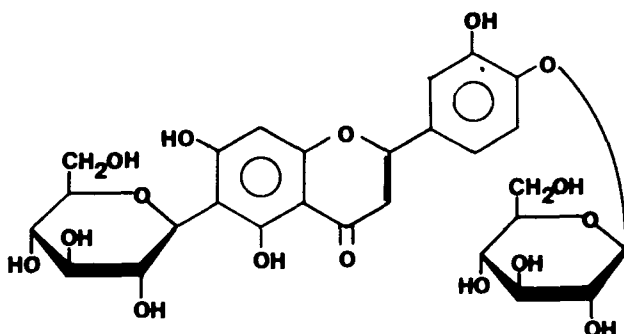


Figure 57. Spectres IR de N et de l'iso-orientine-4'-O-glucoside.



N : O- β -D-glucosyl-4'-iso-orientine.

6.5. Examen de la fraction 4.

Une relativement faible quantité de la substance Q (0,02 % du matériel végétal de départ) est obtenue lors du passage de la fraction 4 sur colonne de cellulose avec AcOH 15 %. Q est purifié par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH).

L'identification de cette substance est immédiate. Elle ne subit que l'isomérisation (en vitexine) lors de l'hydrolyse acide et ses spectres UV sont identiques à ceux de l'isovitexine. Son point de fusion (229-230°), ainsi que la superposition de son spectre IR avec celui d'un échantillon authentique isolé de Gentiana punctata L. [79] confirme qu'il s'agit de ce C-glycoside flavonique largement répandu dans le genre Gentiana.

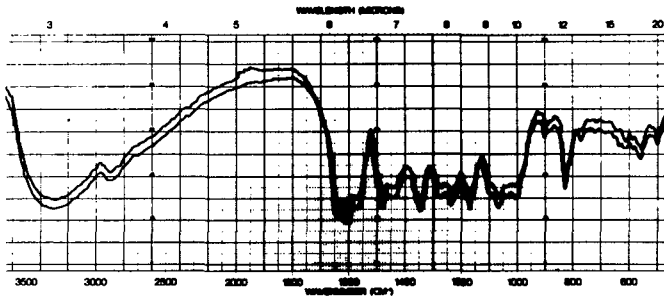
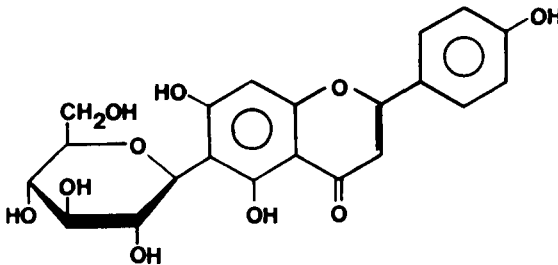


Figure 58. Spectres IR de la substance Q et de l'isovitexine.



Q : isovitexine

6.6. Examen de la fraction 5.

La cinquième partie de l'extrait méthanolique contient deux polyphénols : P et Q. Ils sont séparés par chromatographie sur colonne de polyamide SC-6 (Toluène-méthanol-acide acétique 45 : 32 : 16) puis passés sur colonne de Sephadex LH 20. P est chromatographiquement pur après ces opérations, alors que Q nécessite encore deux recristallisations dans le méthanol. Quantités isolées : respectivement 0,15 et 0,20 % du matériel végétal de départ.

6.6.1. Identification de la substance P.

Comme c'était le cas pour Q, la substance P est bien connue des chercheurs de Neuchâtel en raison de sa large distribution dans le genre Gentiana. Il s'agit de l'iso-orientine. L'identification est effectuée sur la base de la comparaison avec un échantillon témoin.

Les spectres UV, le point de fusion, le comportement chromatographique dans divers systèmes de CCM et le résultat de l'hydrolyse acide concordent tous avec les données pour l'iso-orientine. La superposition des spectres IR est représentée dans la figure suivante.

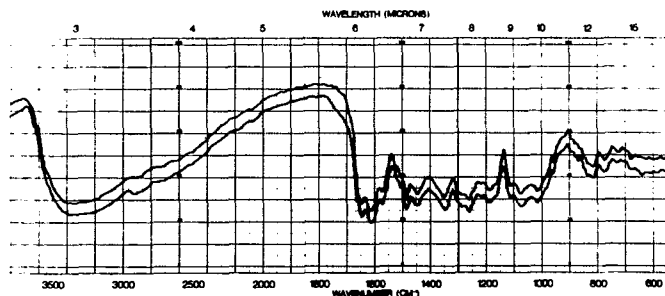
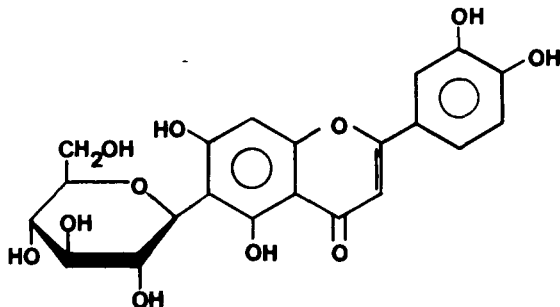


Figure 59. Spectres IR de P et de l'iso-orientine.



P : iso-orientine

6.6.2. Identification de la substance Q.

La substance Q est de nature xanthonique comme le prouve l'examen de ses spectres UV. Ceux-ci sont du reste semblables à ceux de la mangiférine.

Tableau 32. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance Q.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH	362	315	278 (e)	258	242
+ AlCl ₃	414	354	289 (e)	270	237
+ AlCl ₃ /HCl	401	338	280 (e)	267	233
+ NaOMe	388	304	272	246 (e)	237
+ NaOAc	385	303	272		

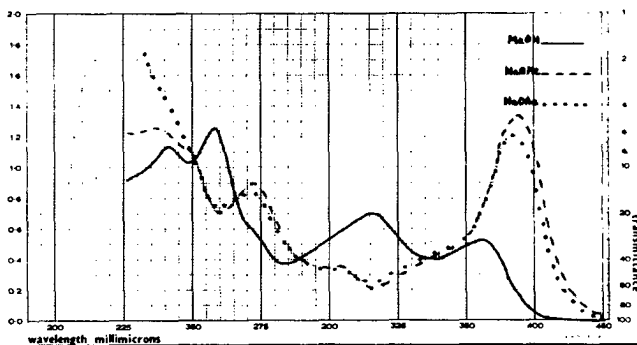
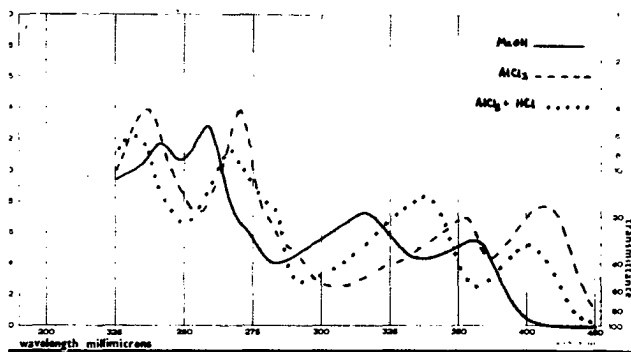


Figure 60. Spectres UV de Q.

Q n'est pas hydrolysé par l'acide chlorhydrique à chaud. Son point de fusion (260°) correspond à celui d'un échantillon de mangiférine. La superposition des spectres IR est présentée dans la figure suivante.

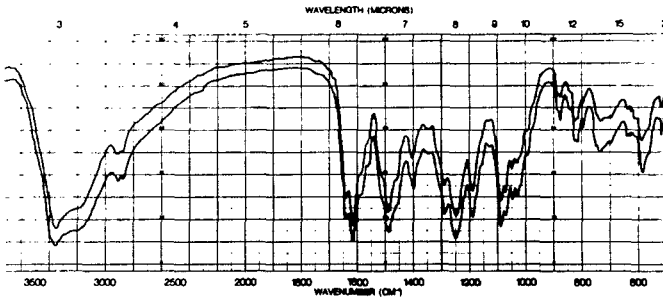
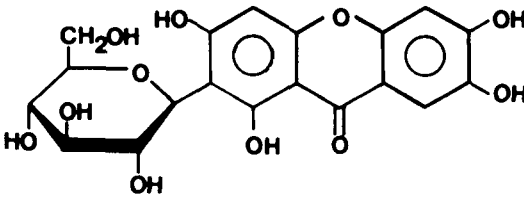


Figure 61. Spectres IR de Q et de la mangiférine.



Q : mangiférine.

6.7. Examen de la fraction 6.

Environ 20 mg. de la substance Q sont encore obtenus lors du fractionnement sur colonne de cellulose (AcOH 15 %) de la sixième et dernière partie de l'extrait méthanolique. Nous obtenons d'autre part environ 3 mg. d'un produit R, à valeur R_f petite (0,15 sur polyamide DC 11, MeOH 80 %). Celui-ci est purifié sur colonne de Sephadex LH 20 (MeOH).

6.7.1. Identification de la substance R.

Les spectres UV de R sont caractéristiques d'une flavone possédant des groupes hydroxyle libres en 5, 7 et 4' ainsi qu'un groupement o-dihydroxyle. Un examen plus attentif de ces spectres permet de mettre en évidence une particularité frappante : la bande I, en présence de chlorure d'aluminium est dédoublée. Cela n'est pas rencontré dans le cas des autres composés que nous avons mis en évidence.

Tableau 33. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance R.

Solvant	Maximums [nm]				
MeOH		335	300 (e)	272	245
+ AlCl ₃	419	384	302	274	
+ AlCl ₃ /HCl	384 (e)	341	298	278	257
+ NaOMe		384	314 (e)	267	235 (e)
+ NaOAc		372		279 (e)	268

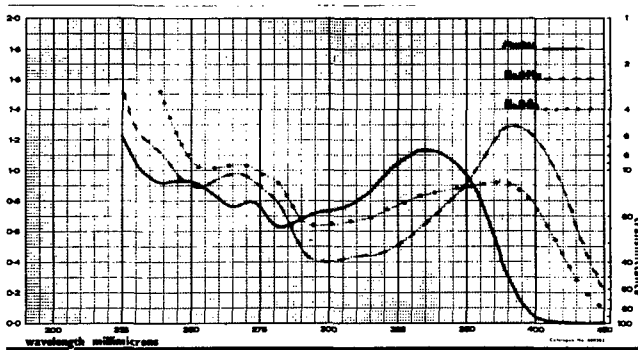
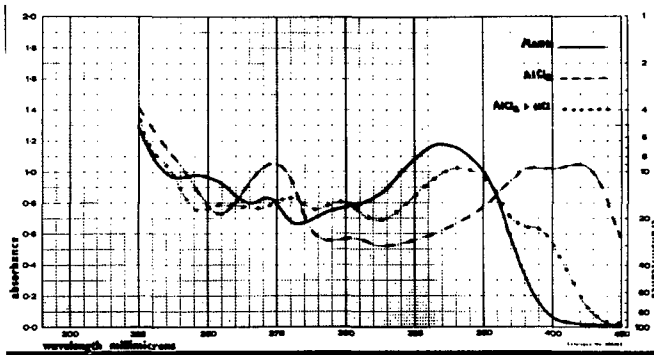


Figure 62. Spectres UV de R.

Le comportement de R à l'hydrolyse acide est également différent de celui des autres polyphénols que nous connaissons. En effet, lors du chauffage avec HCl, toutes les substances rencontrées jusqu'à présent donnent lieu soit à une isomérisation, (sans

disparition du spot initial) soit une hydrolyse (avec disparition du produit initial et apparition de l'aglycone à une valeur R_f inférieure). Or \underline{R} disparaît, mais son aglycone \underline{R}_1 est supérieur !

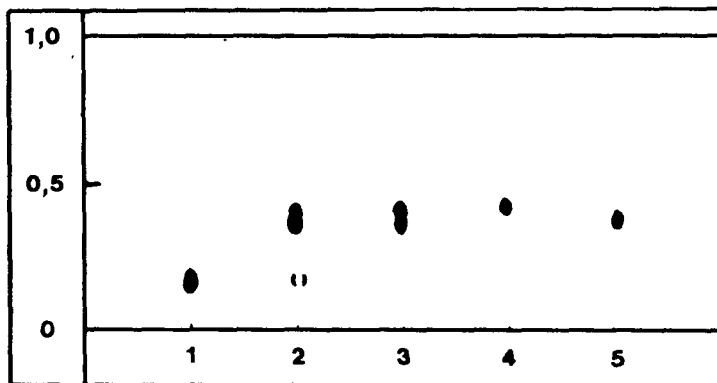


Figure 63. Chromatogramme de \underline{R} et \underline{R}_1 .

Polyamide DC 11; MeOH-H₂O (9 : 1); Rév : UV 366 nm

1. Substance \underline{R}
2. \underline{R} hydrolysé pendant 1 heure
3. \underline{R} hydrolysé pendant 3 heures
4. Témoin iso-orientine
5. Témoin orientine.

L'aglycone \underline{R}_1 correspond du reste à l'iso-orientine (par comparaison de ses spectres UV et de son comportement chromatographique sur plusieurs supports). Il n'y a aucun sucre libéré lors de cette hydrolyse. Nous pouvons donc conclure à la présence, dans \underline{R} , d'un substituant polaire, contenant éventuellement des OH phénoliques, qui est libéré par l'acide chlorhydrique : cela explique le bas R_f de \underline{R} et son comportement à l'hydrolyse.

De telles caractéristiques ont été rencontrées par LUONG et coll.

[85] dans le cas de cinnamoyl-C-glycosylflavones. Nous avons donc, par analogie à ces travaux, procédé à l'examen de la phase étherée de l'hydrolysât. Le substituant cherché a pu être mis en évidence et identifié comme étant l'acide caféique (mélange cis-trans) par co-chromatographie avec un échantillon authentique dans divers systèmes de CCM :

polyamide DC 11; MeOH 90 %
 cellulose Merck; AcOH 5 %
 silicagel 60; toluène-MeOH-AcOH (9 : 2 : 1)

La visualisation des plaques est effectuée sous lumière UV avant et après révélation avec de la p-nitroaniline diazotée

[108] . R serait donc un caféoyl-iso-orientine dans lequel l'acide caféique est sans doute fixé sur la partie C-glucosidique. Le point de fusion de R (211-214° (déc)) est presque identique à celui du t-caféoyl-2"-iso-orientine isolé dans Gentiana burseri Lapeyr. (212-216° (déc)). De plus cette valeur ne subit pas de dépression pour le mélange.

Enfin, comme les spectres IR de R et de cette substance témoin sont superposables, nous pouvons identifier R à cette cinnamoyl-C-glucosylflavone.

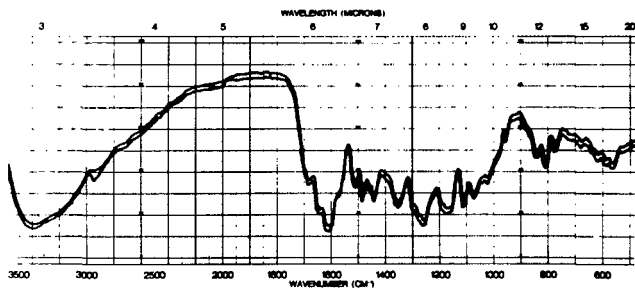
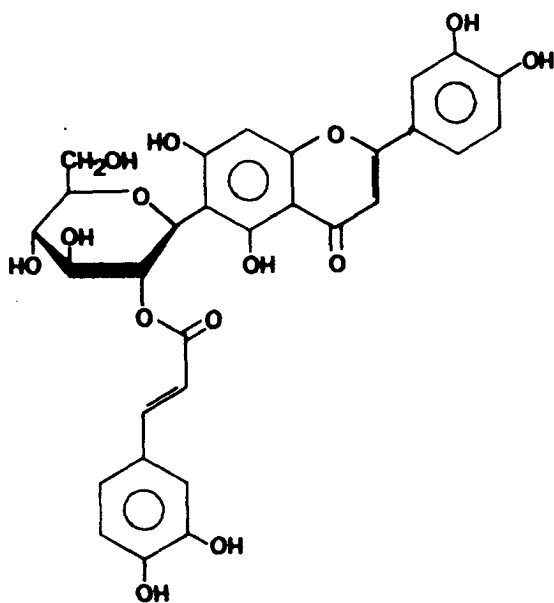


Figure 64. Spectres IR de R et du t-caféoyl-2"-iso-orientine.



R : t-caféoyl-2''-iso-orientine.

6.8. Résumé

Six polyphénols sont isolés à partir des feuilles de Gentiana cruciata L. Ce sont tous des C-glucosides.

- M : O- β -D-glucosyl-4'-isovitexine
- N : O- β -D-glucosyl-4'-iso-orientine
- O : isovitexine
- P : iso-orientine
- Q : mangiférine
- R : caféoyl-2"-iso-orientine

A l'exception de la substance R, qui n'est trouvée ici que pour la deuxième fois dans la nature, ces composés ont tous été signalés dans plusieurs espèces du genre Gentiana.

7. ETUDE DES COMPOSES DANS LES FEUILLES ET TIGES DE GENTIANA

CILIATA L.

Gentiana ciliata L. a longtemps été classée dans le sous-genre Gentianella (Kusn.). Depuis 1951, elle fait partie du genre Gentianopsis. Il nous a paru intéressant d'examiner cette espèce afin de déterminer si son contenu en polyphénols permet de justifier son éloignement du genre Gentiana.

Nous avons récolté Gentiana ciliata L. en période de floraison (Septembre), dans la région des Rasses (canton de Vaud) et sur les pentes du Mont-Soleil (Berne); elle se trouve souvent sur les talus bien exposés et très secs, en bordure des chemins. Cette espèce se caractérise par la présence de plusieurs fleurs ciliées sur une même tige; sa hauteur varie entre 4 et 12 cm.

Quelques travaux phytochimiques consacrés à cette espèce ont permis de mettre en évidence la gentiopicine (KORTE [109]), des triterpènes et des xanthones 1, 3, 7, 8 (CARBONNIER et coll. [51]). Les fleurs ont fait l'objet d'une récente étude de MASSIAS et coll. [42] , qui ont identifié plusieurs xanthones tri- et tetra-oxygénées.

Nous avons déjà abordé l'examen de Gentiana ciliata L. lors de la parution des travaux ayant trait aux polyphénols que nous venons de citer; comme nos premiers résultats ne concordaient pas entièrement avec ceux des auteurs français, nous avons continué nos recherches.

7.1. Extraction du matériel végétal et fractionnement des extraits.

Un examen préliminaire effectué sur une petite quantité de Gentiana ciliata L., nous indique qu'il est possible de réunir les feuilles et les tiges; en effet, leur contenu respectif en polyphénols est identique (extraction par les solvants usuels et analyse par CCM dans plusieurs systèmes de solvants). Cela n'est du reste pas surprenant : HOSTETTMANN et coll. ont remarqué ce même phénomène dans le cas de plusieurs espèces de la section Cyclostigma [88] , et CARBONNIER et coll. ont, eux aussi, réuni ces organes lors de leur étude.

Les feuilles et les tiges sont donc extraites ensemble (200 g.); nous employons les mêmes solvants que dans le cas de Gentiana asclepiadea L. et de Gentiana cruciata L. L'épuisement à la ligroïne (trois stades successifs de 12 heures avec 1600 ml.) fournit un extrait pesant 10,9 g.; les extraits étheré et au chloroforme (chacun deux fois 1600 ml.) pèsent respectivement 6,8 et 5,4 g.; enfin l'extrait au méthanol (deux fois 1800 ml.) a un poids de 53,5 g. Une extraction supplémentaire au méthanol aqueux n'est pas nécessaire.

Le détail du fractionnement des extraits ligroïnique et étheré d'une part et de l'extrait méthanolique d'autre part, est présenté dans la figure suivante.

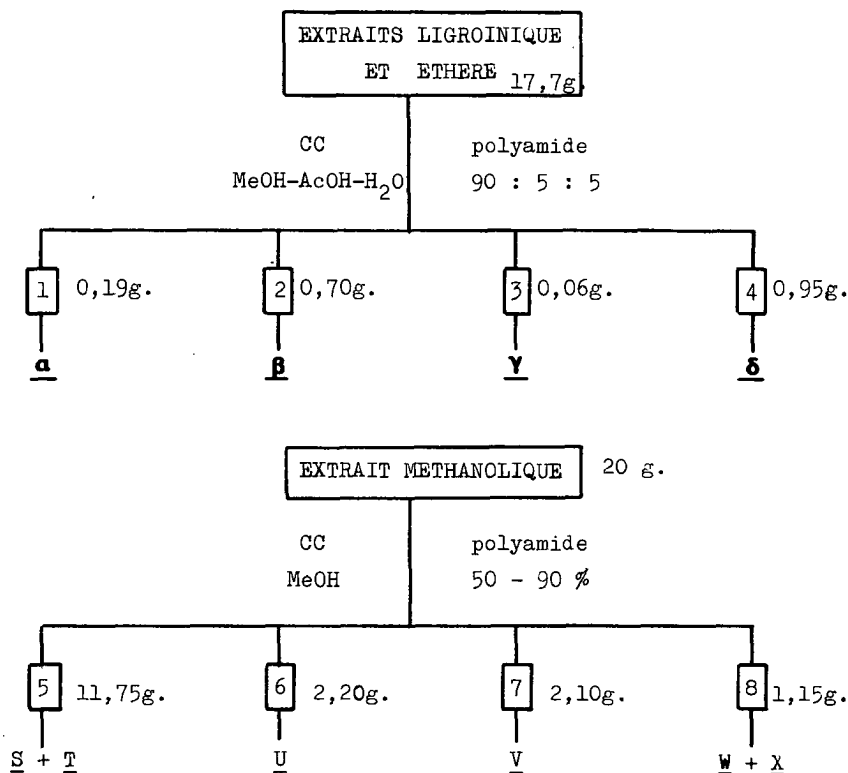


Figure 65. Fractionnement des extraits.

L'extrait au chloroforme a lui aussi été passé sur colonne de polyamide (MeOH-AcOH-H₂O 90 : 5 : 5). L'analyse par CCM de l'éluat ne permet pas de mettre en évidence d'autres composés.

La figure suivante présente le chromatogramme des fractions obtenues après ces différentes chromatographies.

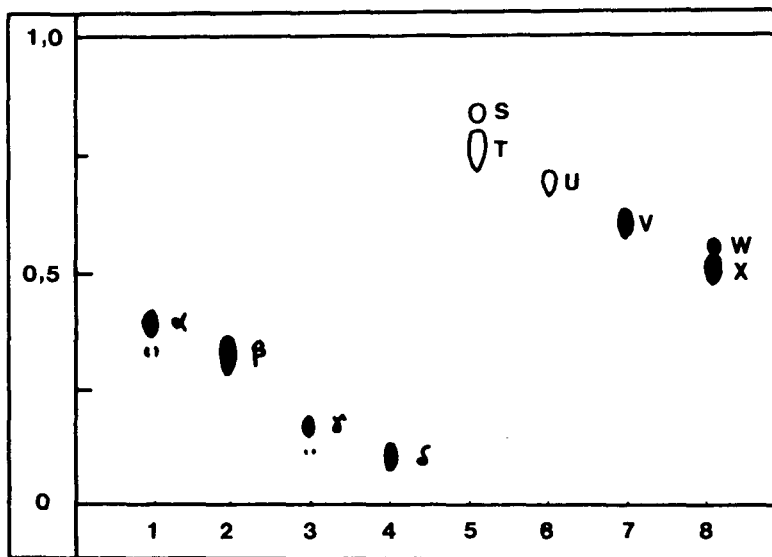


Figure 66. Chromatogramme des fractions 1-8 obtenues à partir des extraits.

(Polyamide DC 11; MeOH-AcOH-H₂O (90:5:5). Rev.UV 366 nm.)

● : spot brun

○ : spot bleu clair.

7.2. Examen de la fraction 1.

La première fraction provenant du passage sur polyamide des extraits apolaires contient un seul polyphénol : α . Celui-ci est purifié par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH) suivie d'une recristallisation dans le méthanol. Nous obtenons 18 mg. de cristaux jaunes fondant entre 158 et 160°.

La présence de ce composé dans les extraits à la ligroïne et à l'éther, ainsi que sa valeur R_f sur polyamide assez faible, indiquent qu'il s'agit d'un aglycone. En effet, **a** ne subit aucune modification lors d'un chauffage avec l'acide chlorhydrique.

Les spectres UV de **a** sont caractéristiques d'une xanthone substituée en 1, 3, 7 et 8 [64], et possédant un hydroxyle libre en 1 ou en 8. L'addition de NaOMe ne provoque qu'une légère modification du spectre, ce qui semble indiquer qu'il n'y a pas d'autres groupes hydroxyles libres.

Tableau 34. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance **a**.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	372	311	260	240
+ AlCl ₃	424	328	275	237
+ AlCl ₃ /HCl	422	327	274	237
+ NaOMe	390	320	262	239
+ NaOAc	372	311	260	

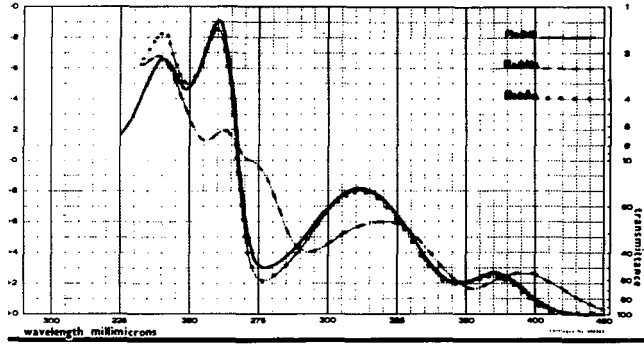
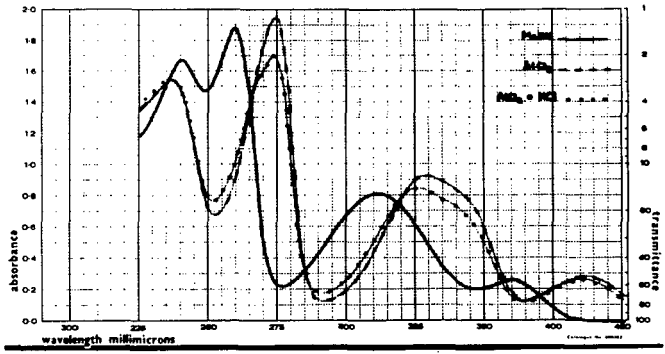


Figure 67. Spectres UV de a .

Le comportement chromatographique de **a** est identique, dans plusieurs systèmes de CCM, à celui de la décussatine isolée à partir des feuilles et tiges de Gentiana bavarica L. [77] .

Le point de fusion d'un mélange de **a** et d'un échantillon de cet aglycone ne subit pas de dépression. Enfin, les spectres IR sont superposables.

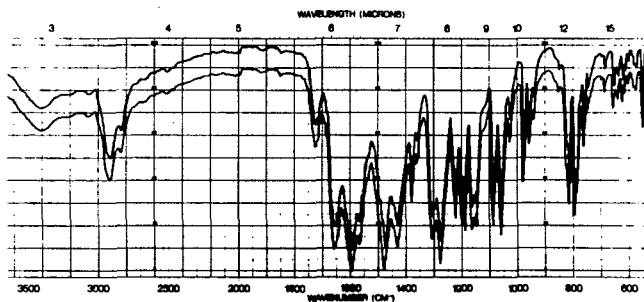
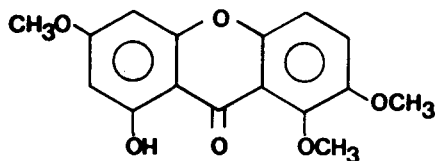


Figure 68. Spectres IR de **a** et de la décussatine.



a : décussatine

7.3. Examen de la fraction 2.

Cette fraction contient, en outre d'une petite quantité de **a**, un deuxième composé **β**. Ces constituants sont séparés par un passage sur colonne de cellulose microcristalline avec le solvant AcOH 20 %. **β** est obtenu à l'état pur par recristallisation dans le méthanol. Quantité isolée à partir de 200 g. de feuilles et de tiges séchées : 80 mg.; F. 194⁰.

Comme c'était le cas pour **a**, le spectre UV de **β** est typique d'un squelette xanthonique tetrasubstitué en 1, 3, 7 et 8. La présence d'un hydroxyle libre en 1 ou 8 est indiquée par l'importante modification du spectre provoquée par l'addition du chlorure d'aluminium. Le déplacement bathochrome que subissent toutes les bandes lors de l'addition de NaOMe suggère la présence d'un deuxième OH libre.

Tableau 35. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance **β**.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	375	310	261	239
+ AlCl ₃	426	328	276	236
+ AlCl ₃ HCl	422	325	275	236
+ NaOMe	411	306	273	
+ NaOAc	376	310	262	

Ces spectres sont identiques à ceux de la gentiacauléine (di-hydroxy-1, 7-diméthoxy-3, 8-xanthane). Comme le point de fusion de **β** coïncide avec celui de cet aglycone et que leurs spectres IR sont rigoureusement superposables, nous pouvons identifier notre composé.

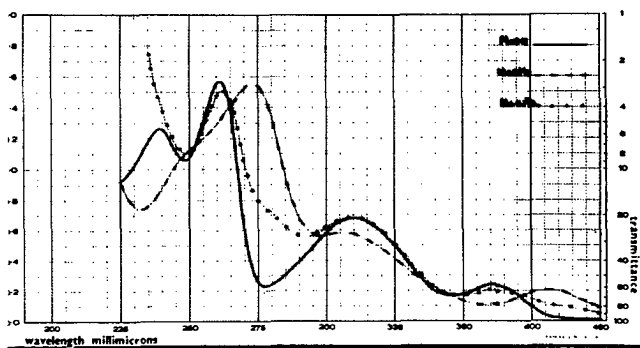
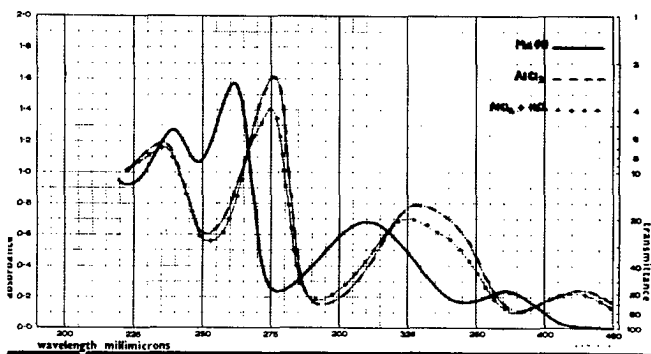


Figure 69. Spectres UV de la substance β

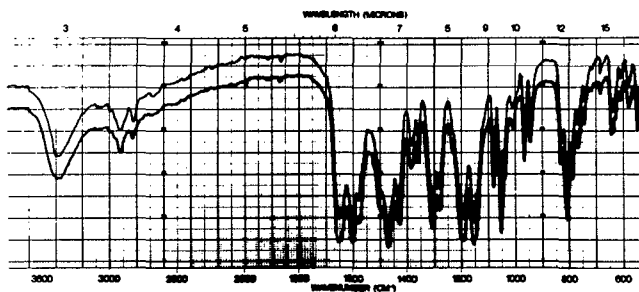
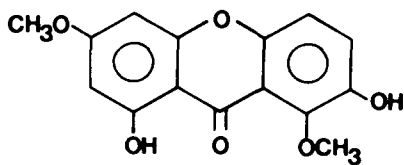


Figure 70. Spectres IR de β et de la gentiacauléine.



β : gentiacauléine.

7.4. Examen de la fraction 3.

L'aglycone **Y** est obtenu en très petite quantité, après passages successifs de la fraction 3 sur colonnes de silicagel (toluène - acétate d'éthyle - éthanol, 7 : 3 : 1), de cellulose (acide acétique 30 %) et de gel de Sephadex LH 20 (MeOH).

Y est encore recristallisé dans le méthanol.

Quantité isolée : 4 mg.; F. 236⁰.

Les spectres UV indiquent que **Y** est de nature xanthonique oxygénée en 1, 3, 7 et 8, et possédant des groupes hydroxyles libres en 3 et en 1 ou 8.

Tableau 36. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance **Y**.

Solvant	Maximums [nm]					
MeOH	384	333 (e)	313	270	243	
+ AlCl ₃	418 (e)	349		279	245	231
+ AlCl ₃ /HCl	418 (e)	349		279	245	231
+ NaOMe	410	335 (e)	322	281		235
+ NaOAc	402	335 (e)	322	280		235

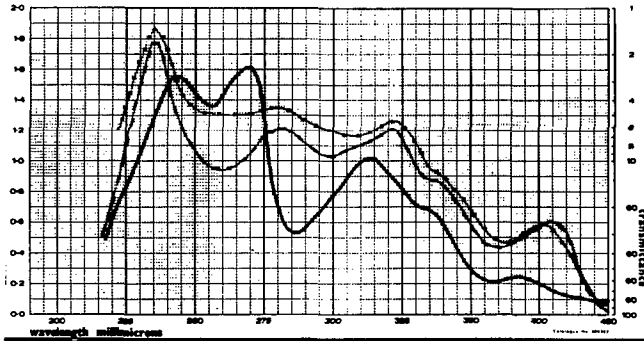
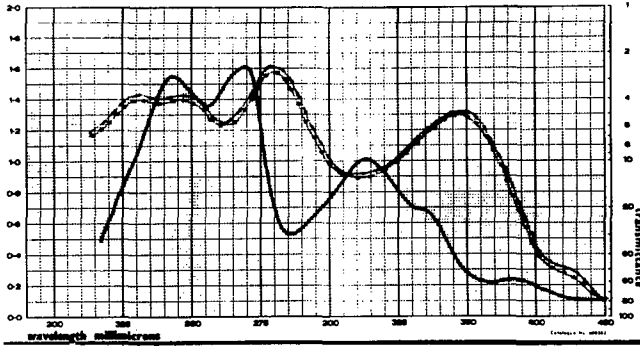


Figure 71. Spectres UV de **Y** .

Le poids moléculaire, déterminé par spectrographie de masse, est de 288, valeur correspondant à une dihydroxy-diméthoxy-xanthone.

Les spectres UV de Y ainsi que le point de fusion concordent avec les données citées dans la littérature [48] pour l'isogentiacauléine, xanthone déjà isolée par CARBONNIER et coll. à partir des feuilles de Gentiana ciliata L. [51]. Le spectre IR (figure 72) est aussi comparable à celui indiqué pour l'isogentiacauléine [48]. Le peu de substance isolée ne nous a pas permis de relever le spectre RMN. Toutefois, au vu des données indiquées ci-dessus, nous pouvons conclure que Y correspond bien à l'isogentiacauléine.

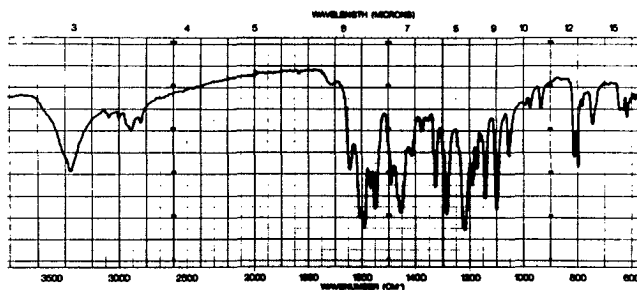
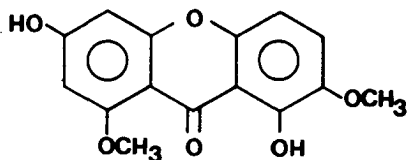


Figure 72. Spectre IR de Y.



Y : isogentiacauléine.

7.5. Examen de la fraction 4.

35 mg. d'un quatrième aglycone, **5**, sont obtenus à l'état pur après passage de la dernière partie des extraits apolaires sur colonne de cellulose (acide acétique 30 %); les cristaux jaunes de **5** sont recristallisés dans le méthanol (F. 223-4°).

Les spectres UV de **5** sont identiques à ceux de la gentiokochianine (ou swertianine).

Tableau 37. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance **5**.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	385	325	268	239
+ AlCl ₃	428	349	277	246
+ AlCl ₃ /HCl	356	330	273	240
+ NaOMe	414	353	274	250
+ NaOAc	400	324	270	

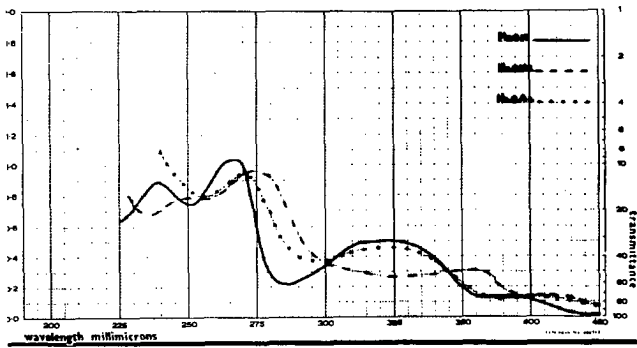
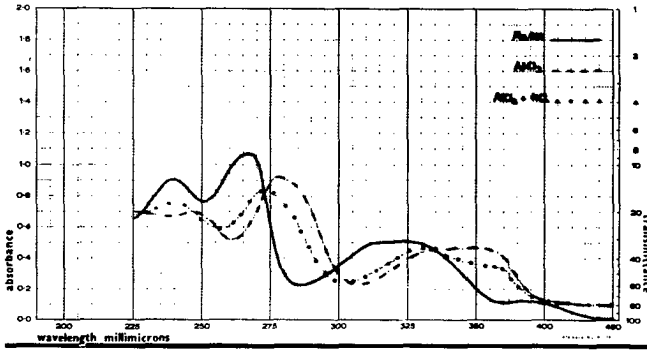


Figure 73. Spectres UV de δ .

La comparaison du point de fusion et du spectre IR de 5 avec les données pour un échantillon authentique de gentiako-chianine isolé à partir de Gentiana bavarica L. [77] permet d'identifier cet aglycone.

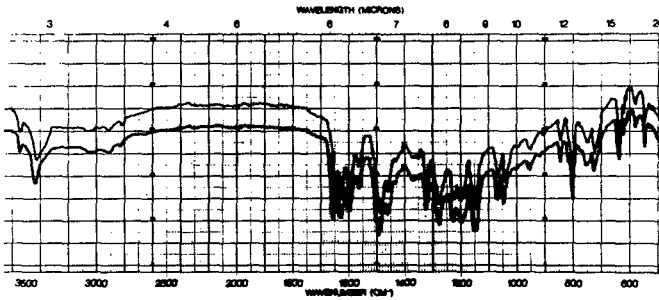
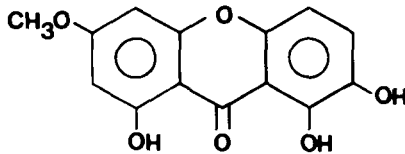


Figure 74. Spectres IR de 5 et de la gentiako-chianine.



5 : gentiako-chianine.

7.6. Examen de la fraction 5.

La première partie de l'extrait méthanolique fractionné sur colonne de polyamide contient, à part une quantité relativement grande de sucres libres, deux polyphénols à valeurs R_f élevées, S et T (respectivement 0,82 et 0,78 sur polyamide DC 11; MeOH 90 %). Le deuxième de ces composés est présent en grande quantité.

Une purification grossière de la fraction est achevée par passage sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH 70 %) suivi d'une chromatographie sur colonne de cellulose (AcOH 5 %). La séparation des polyphénols S et T est effectuée sur cellulose avec le solvant de Partridge, et ils sont obtenus à l'état pur après recristallisation dans le méthanol à 90 %.

Quantités isolées à partir de 200 g. de feuilles et tiges séchées :

S : 35 mg. (F. 191°)

T : 540 mg. (F. 163-4°).

7.6.1. Détermination de la structure de la substance S.

Les spectres UV sont caractéristiques d'une xanthone 1, 3, 7, 8; l'addition des réactifs n'en modifie pas l'allure. S ne possède donc aucun hydroxyle libre.

Tableau 38. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance S.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	354	303	250	243
+ AlCl ₃	354	303	250	243
+ NaOMe	354	303	250	243

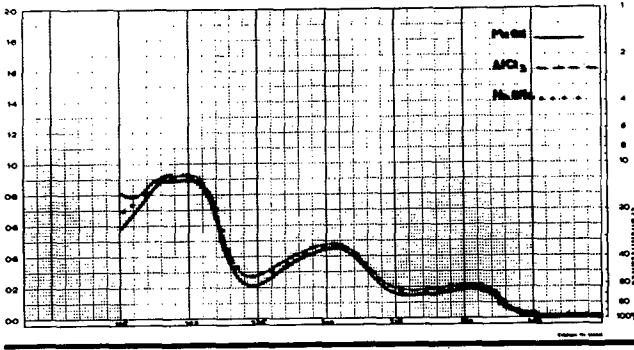


Figure 75. Spectres UV de S.

La valeur R_f élevée de S laisse supposer qu'il s'agit d'un glycoside. Cette hypothèse est vérifiée par l'hydrolyse acide, qui fournit du glucose et du xylose (identifiés par CCM) ainsi que de la décussatine (spectres UV et IR identiques à a).

S est donc un O-glucoside de la décussatine, probablement un primveroside. Le point de fusion de S n'est pas abaissé par un mélange avec un échantillon de primveroside en 1 de la décussatine. De plus, leurs spectres IR sont identiques.

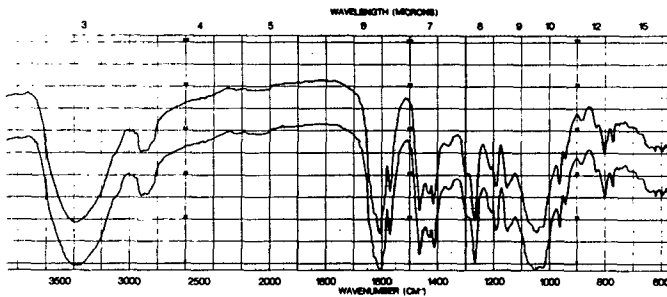
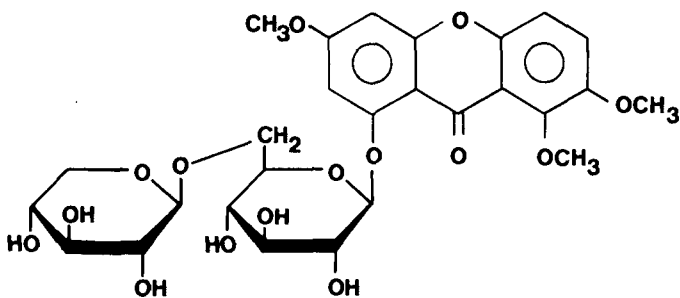


Figure 76. Spectres IR de S et du O-primverosyl-1-décussatine.



S : O-primvérosyl-1-décussatine.

7.6.2. Détermination de la structure de la substance T.

L'étude des spectres UV de T permet de tirer les renseignements suivants : il s'agit d'une xanthone tetrasubstituée en 1, 3, 7 et 8, possédant un hydroxyle libre, sans doute en position 7.

Tableau 39. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance T.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	362	303	252	241
+ AlCl ₃	362	303	252	241
+ NaOMe	409		275	248 (e)
+ NaOAc	362	300	253	242

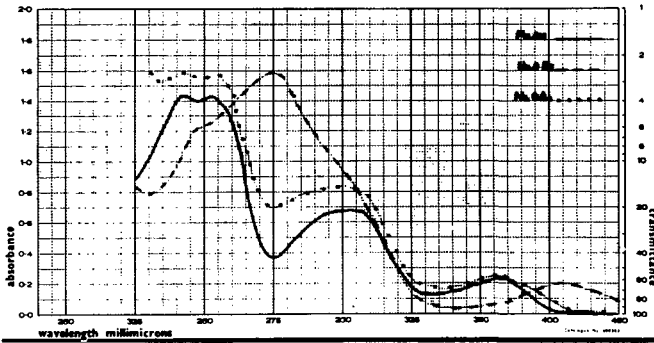
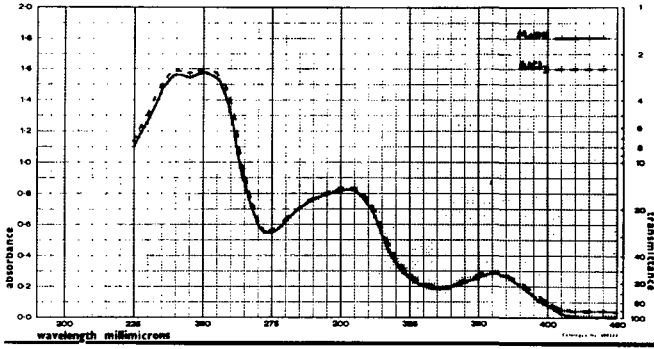


Figure 77. Spectres UV de T.

La gentiacauléine (identifiée par comparaison avec B : spectres UV et IR, co-chromatographie) est obtenue par hydrolyse de T avec l'acide chlorhydrique. Les sucres libérés sont

le glucose et le xylose. Leur position d'attache est déterminée par la méthylation de T suivie de l'hydrolyse acide; ces opérations conduisent à la décussatine (spectres UV et co-chromatographie).

T est donc sans doute le primveroside en 1 de la gentiacauléine (gentiavaroside) isolé pour la première fois par HOSTETTMANN et coll. à partir de Gentiana bavarica L. [77] .

La preuve finale est apportée par la valeur du point de fusion du mélange de T et d'un échantillon authentique de gentiavaroside (163°) et par la superposition des spectres IR.

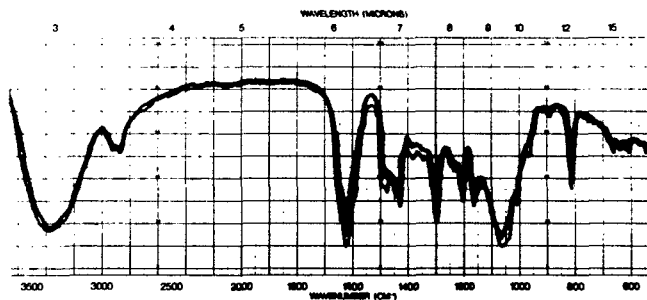
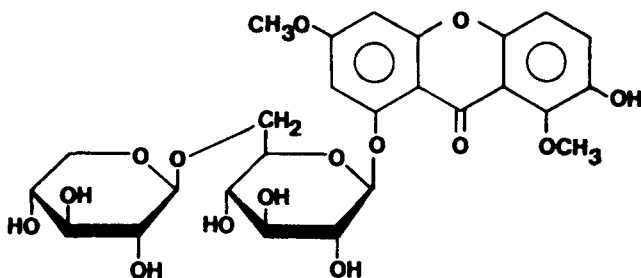


Figure 78. Spectres IR de T et du gentiavaroside.



T : gentiavaroside.

7.7. Examen de la fraction 6.

Nous obtenons 18 mg. d'un troisième glycoside xanthonique, U, à partir de la fraction 6. Celle-ci est passée successivement sur deux colonnes de cellulose avec le solvant de Partridge puis avec du n-BuOH-AcOH-H₂O (10 : 4 : 6); U est enfin purifié par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH) et recristallisé dans le méthanol à 90 %. F 140-141°.

Les spectres UV sont typiques d'une xanthone 1, 3, 7, 8 possédant un seul hydroxyle libre, probablement situé en 7. De plus, ils sont identiques à ceux de T (voir 7.6.2.).

Tableau 40. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance U.

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	360	303	251	241
+ AlCl ₃	360	303	251	241
+ NaOMe	410		275	249 (e)
+ NaOAc	362	300	255	243

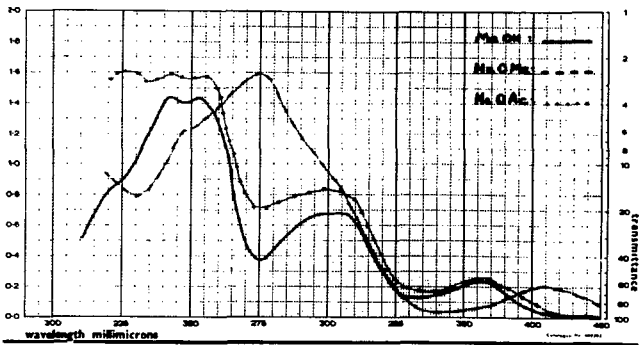
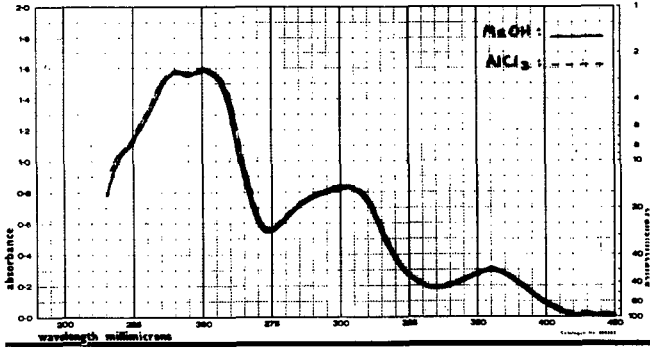


Figure 79. Spectres UV de U.

L'hydrolyse acide conduit à la gentiacauléine et au glucose. Le traitement avec la β -glucosidase donne le même aglucone. U serait par conséquent un glucoside de la gentiacauléine, dans lequel le sucre est fixé en 1. Cette hypothèse est vérifiée par la méthylation de U suivie de l'hydrolyse acide; nous obtenons la décussatine identifiée par comparaison avec un échantillon témoin (identité des spectres UV et IR et co-chromatographie). La figure 80 présente la superposition des spectres IR de U méthylé hydrolysé et de la décussatine.

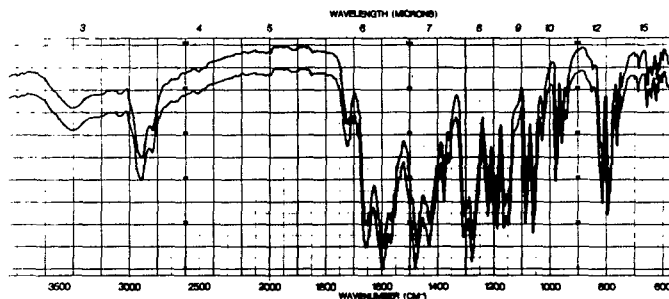


Figure 80. Spectres IR de U méthylé hydrolysé et de la décussatine.

Le spectre RMN (enregistré à 90 MHz, avec le TMS pris comme référence interne) du dérivé acétylé de U est présenté dans la figure 81.

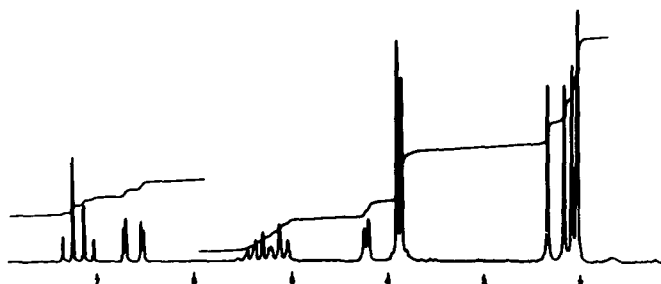


Figure 81. Spectre RMN de U acétylé (CDCl_3)

(90 MHz)

Entre 2,04 et 2,16 ppm se trouvent trois singulets correspondant à quatre groupes acétoxyde aliphatiques. Le groupe acétoxyde aromatique apparaît à 2,34 ppm. Le déplacement chimique assez bas de ce groupe indique qu'il ne se trouve pas au voisinage de la fonction carbonyle (position 1 ou 8) [111]. La courbe d'intégration indique la présence de 13 protons entre 3,87 et 5,47 ppm. Parmi eux, se trouvent, à 3,88 et 3,91 deux singulets correspondant à deux méthoxydes. Les protons H-2 et H-4 forment un spectre AB à 6,56 et 6,74 ($J = 2,5$ Hz). A 7,12 et 7,30 se trouvent les protons H-5 et H-6 (spectre AB, $J = 10$ Hz).

Ce spectre confirme la structure d'un glucoside de la gentia-cauléine, la position d'attache du sucre ne pouvant être qu'en 1. Il s'agit là d'un nouveau produit naturel et constitue le quatrième cas seulement d'un glucoside de xanthone 1, 3, 7, 8.

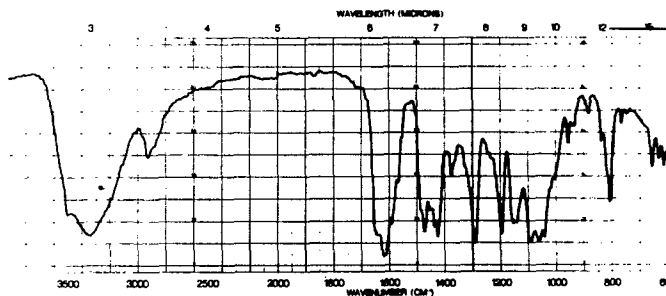
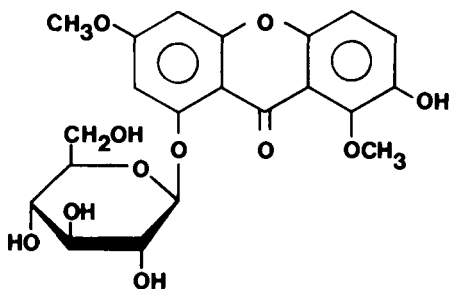


Figure 82. Spectre IR de U.



U : 0- β -D-glucosyl-1-gentiacauléine.

7.8. Examen de la fraction 7.

Un quatrième glycoside, V est obtenu à l'état pur à partir de la fraction 7, après passage sur colonne de cellulose avec comme éluant : n-BuOH-AcOH-H₂O (10 : 4 : 7), et filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH). Quantité isolée : 175 mg.; F. 220-222^o (recristallisation dans le méthanol).

Les spectres UV de V sont caractéristiques d'une xanthone 1, 3, 7, 8 possédant un hydroxyle libre en 1 ou en 8. La position 3 est probablement occupée, puisque l'addition de NaOAc n'a que très peu d'influence sur le spectre.

Tableau 41. Maximums d'absorption des spectres UV de la substance V

Solvant	Maximums [nm]			
MeOH	379	312	269	240
+ AlCl ₃	432	341	280	245
+ AlCl ₃ /HCl	430	338	279	244
+ NaOMe	410	300 (e)	276	244
+ NaOAc	386	310	270	

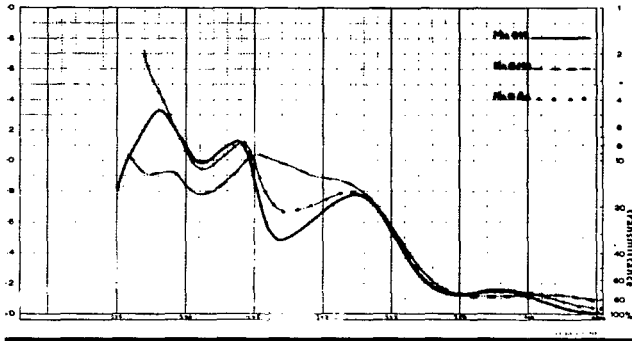
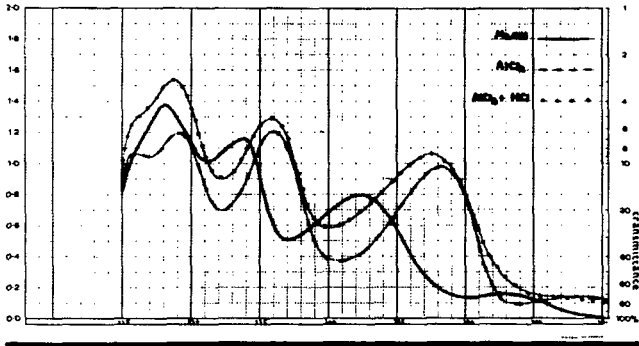


Figure 83. Spectres UV de V.

L'hydrolyse acide conduit au glucose et à du xylose, et à un spot de R_f inférieur correspondant à la gentiakochianine (identité des spectres UV et IR).

La position d'attache du sucre est déterminée par la méthylation de V suivie de l'hydrolyse acide; nous obtenons la décussatine (comparaison avec un échantillon authentique) comme c'était le cas pour T et U.

V est donc sans doute le primvéroside en 1 de la gentiakochianine. Ce composé est connu sous le nom d'isogentiakochianoside [77]. Le point de fusion de V et de l'isogentiakochianoside sont identiques ; il en est de même de leur spectres IR.

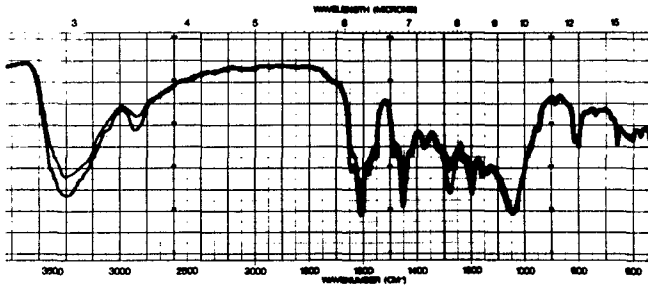
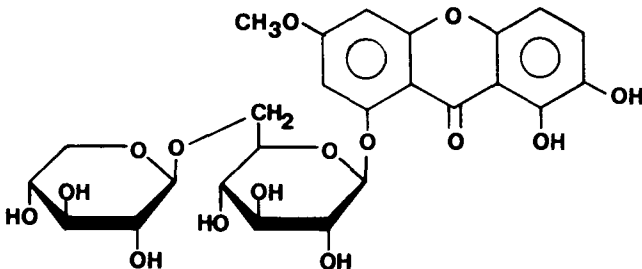


Figure 84. Spectres IR de V et de l'isogentiakochianoside.



V : isogentiakochianoside.

7.9. Examen de la fraction 8.

La dernière partie de l'extrait méthanolique fournit deux nouveaux polyphénols après passage sur colonne de cellulose (AcOH 15 %) : W et X. Ceux-ci sont purifiés par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH). Quantités isolées :

W : 11 mg.; F. 228-230°

X : 38 mg.; F. 234-236°

Ces composés sont les C-glucosyl-flavones isovitexine et iso-orientine, déjà rencontrées dans les autres espèces que nous avons étudiées.

En effet, leur comportement chromatographique dans plusieurs systèmes de solvants, leurs spectres UV et IR et leur point de fusion sont tous identiques aux données pour des échantillons authentiques

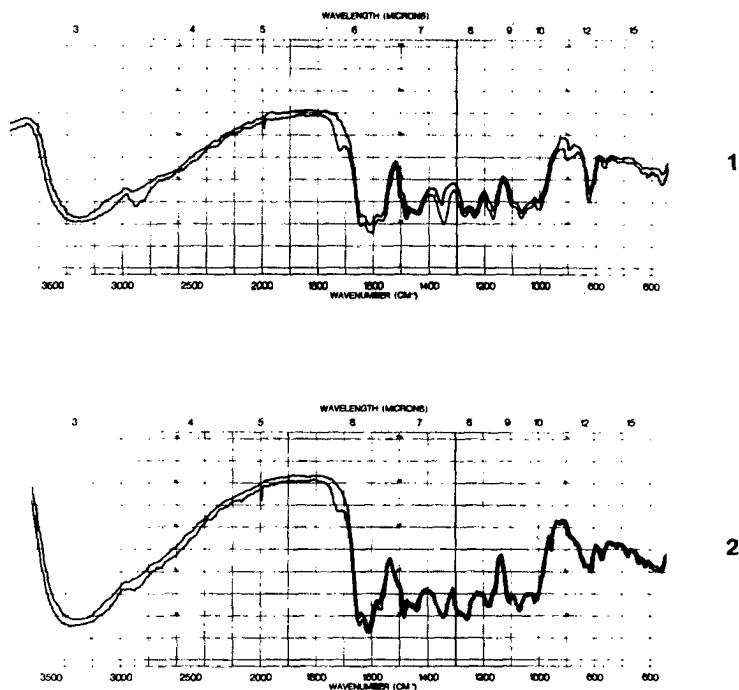
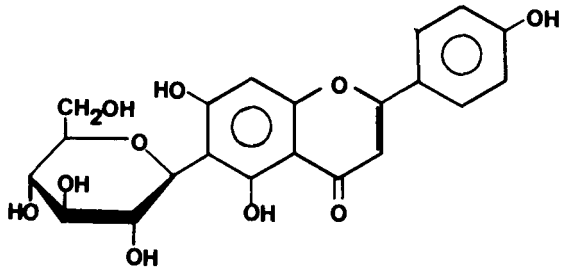
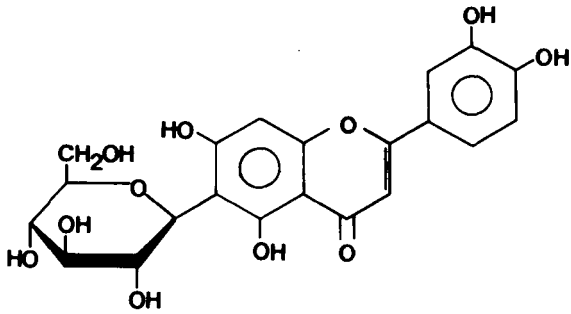


Figure 85. Spectres IR de W et de l'isovitexine (1).
Spectres IR de X et de l'iso-orientine (2).



W : isovitexine



X : iso-orientine

7.10. Résumé.

Dix polyphénols, dont huit xanthones 1, 3, 7, 8 et deux C-glucosides flavoniques, ont été isolés à partir des feuilles et tiges de Gentiana ciliata L.

- a : décussatine
- β : gentiacauléine
- Y : isogentiacauléine
- δ : gentiakochianine
- S : primvérosyl-1-décussatine
- T : gentiabavaroside
- U : O- β -D-glucosyl-1-gentiacauléine
- V : isogentiakochianoside
- W : isovitexine
- X : iso-orientine

Alors que la plupart de ces composés ont déjà été trouvés à l'état naturel (en particulier dans plusieurs espèces du genre Gentiana), U est un nouveau composé, le premier glucoside de la gentiacauléine connu.

Nos résultats ne concordent pas entièrement avec ceux de CARBONNIER et coll. [51] . En effet, seuls a , β , Y et S sont signalés par ces auteurs; les six autres composés ne sont pas mentionnés. De plus, nous trouvons les isomères de deux glycosides cités par CARBONNIER (gentiacauloside et gentiakochianoside).

8. CONCLUSION.

Notre objectif dans ce travail consistait avant tout dans l'étude des constituants polyphénoliques des trois espèces de la sous-tribu des Gentianinae que nous avons choisies : Gentiana asclepiadea L., Gentiana cruciata L. et Gentiana ciliata L. Ainsi, nous avons pu isoler et identifier vingt-huit polyphénols : douze à partir des feuilles de Gentiana asclepiadea L., dont cinq nouveaux composés naturels, six dans les feuilles de Gentiana cruciata L. et enfin dix à partir des feuilles et tiges de Gentiana ciliata L., dont le premier glucoside de la gentiacauléine à être décrit.

La présence, dans les feuilles de Gentiana asclepiadea L., de nombreuses C-glucosyl-flavones, ainsi que l'absence de xanthones autres que la mangiférine et ses dérivés, permettent de rapprocher la section Pneumonanthe de la section Coelanthe, comme le suggère SCHARFETTER [25]. Il est en outre extrêmement intéressant d'y trouver les cinq nouveaux produits naturels, qui se révèlent être des critères de différenciation entre ces deux sections; les glucosides de la mangiférine et les di-O-glucosides de C-glucosylflavones pourraient même être des caractères précieux pour la différenciation des diverses espèces de la section Pneumonanthe. Enfin, le 7-O-glucoside de l'isovitexine (présent aussi dans la section Chondrophylla) et le 2"-O-glucoside de l'iso-orientine (trouvé dans la section Cyclöstigma) pourraient constituer des caractéristiques permettant un lien entre ces deux dernières sections et la section Pneumonanthe.

Nos résultats sont donc très intéressants au vu des lignes d'évolution suggérées par SCHARFETTER :

Coelanthé - Pneumonanthé - Frigida - Chondrophylla
d'une part et

Coelanthé - Pneumonanthé - Thylacites - Cyclostigma
d'autre part.

De son côté, Gentiana cruciata L. fait partie de la section Aptera, qui, encore selon le même auteur, se situe dans une ligne d'évolution distincte des précédentes :

Coelanthé - Pneumonanthé - Aptera.

Il est par conséquent extrêmement intéressant de constater l'absence de xanthonés dans les feuilles de Gentiana cruciata L. mais d'y relever les C-glucosylflavones, en particulier la caféoyl-2"-iso-orientine, mises en évidence dans la section Coelanthé.

Gentiana ciliata L. se situe dans un genre distinct du genre Gentiana; nous nous attendions donc à y trouver de nombreuses caractéristiques permettant de justifier cette séparation. Nos résultats tendent à prouver que Gentiana ciliata L. (et probablement avec elle la section Crossopetalum = genre Gentianopsis) ne se différencie que très peu, du point de vue chimique, des espèces de la section Cyclostigma (genre Gentiana). En effet, parmi les dix polyphénols que nous avons identifiés, seul le glucoside de la gentiacauléine, nouveau composé naturel, et l'isogentiacauléine, ne sont pas signalés dans les espèces de la section Cyclostigma. Or, si l'on considère que parmi celles-ci, seules Gentiana bavarica L., Gentiana nivalis L. et Gentiana verna L. ont été étudiés avec minutie, la présence de ces deux xanthonés dans Gentiana ciliata L. ne permet pas une différenciation sûre et marquée. La morphologie de Gentiana ciliata L. l'éloigne pourtant nettement des Gentiana; il semblerait donc

que l'on soit en présence d'un phénomène de convergence chimique entre taxons de genres différents.

En résumé, les résultats obtenus pour Gentiana asclepiadea L. et Gentiana cruciata L. vont dans le sens des lignes d'évolution pressenties par SCHARFETTER; ils permettent de plus la différenciation de Gentiana asclepiadea L. avec les autres espèces du genre Gentiana dont le contenu polyphénolique est connu. Enfin, la séparation des genres Gentianopsis et Gentianella paraît justifiée sur la base du contenu en flavones et xanthones.

III. LES POLYPHENOLS DANS LA SOUS-TRIBU DES GENTIANINAE.

=====

Nous présentons ici un tableau récapitulatif complet de la distribution des polyphénols dans les espèces de la sous-tribu des Gentianinae.

Le lecteur y trouvera :

- toutes les espèces qui ont été étudiées
- les polyphénols identifiés
- la mention de l'organe dans lequel se trouvent les polyphénols
- le numéro du polyphénol, qui se rapporte à sa formule développée (voir les pages qui suivent le tableau)
- la référence bibliographique du travail

Les abréviations employées dans ce tableau et dans la liste des formules développées sont :

F : feuilles	gluc : glucosyl
FL : fleurs	glyc : glycosyl
P : plante entière	prim : primvérosyl
R : racines	rutin : rutinosyl
T : tiges	

9. TABLEAU RECAPITULATIF DES POLYPHENOLSDANS LA SOUS-TRIBU DES GENTIANINAE

Organes étudiés	Polyphénols	Formules No	Réf.
--------------------	-------------	----------------	------

I. GENRE GENTIANAA. Section CoelanthéGentiana lutea L.

R	gentiséine	2	46
F, FL	isogentisine	3	46, 47, 74
R	gentisine	4	46, 47
R	méthylgentisine	5	46, 47
R	triméthoxy-1,3,7-xanthone	6	46
F, FL, R	gentioside	7	47, 72
R	dihydroxy-1,3-diméthoxy- 2,7-xanthone	9	97
F	mangiférine	67	72
F	isovitexine	74	72
F	O-glucosyl-4'-isovitexine	75	74
F	iso-orientine	88	72
F	O-glucosyl-4'-iso-orientine	89	74

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana punctata L.

R	gentisine	4	47, 79
R	gentioside	7	47, 79
F, R	isovitexine	74	79
F, R	O-glucosyl-4'-isovitexine	75	79
F	t-feruloyl-2"-isovitexine	78	93
F	t-feruloyl-2"-O-glucosyl-4'-isovitexine	79	93
F, R	iso-orientine	88	79
F, R	O-glucosyl-4'-iso-orientine	89	79
F	O-glucosyl-2"-iso-orientine	91	93
F	t-caféoyl-2"-iso-orientine	93	93
F	t-feruloyl-2"-iso-orientine	94	93
F	t-caféoyl-2"-O-glucosyl-4'-iso-orientine	95	93
F	t-feruloyl-2"-O-glucosyl-4'-iso-orientine	96	93
F	isoscoparine	99	93

Gentiana pannonica Scop.

R	gentisine	4	47
R	gentioside	7	47
F	isovitexine	74	79
F	O-glucosyl-4'-isovitexine	75	79
F	iso-orientine	88	79
F	O-glucosyl-4'-iso-orientine	89	79

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana burseri Lapeyr.

R	isogentisine	3	83
F	isovitexine	74	79
F	O-glucosyl-4'-isovitexine	75	79
F	iso-orientine	88	79
F	O-glucosyl-4'-iso-orientine	89	79
F	t-caféoyl-2"-iso-orientine	93	82
F	t-feruloyl-2"-iso-orientine	94	85
F	t-feruloyl-2"-O-glucosyl- 4'-iso-orientine	96	85
F	p-O-glucosyl-t-caféoyl-2"-O- glucosyl-4'-iso-orientine	97	82

Gentiana purpurea L.

R	gentisine	4	47
R	gentioside	7	47
F	isovitexine	74	79
F	O-glucosyl-4'-isovitexine	75	79
F	iso-orientine	88	79
F	O-glucosyl-4'-iso-orientine	89	79

Gentiana vilarsii Ronn.

F	isovitexine	74	79
F	O-glucosyl-4'-isovitexine	75	79
F	iso-orientine	88	79
F	O-glucosyl-4'-iso-orientine	89	79

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana hegetschweleri

R	gentisine	4	59
---	-----------	---	----

Gentiana hybrida Schleich.

R	gentisine	4	59
---	-----------	---	----

B. Section Cyclostigma Gentiana bavarica L.

F, T	norswertianine	32	77,88
F, T	swertianine	33	77,88
F, T	gentiacauléine	36	77,88
F, T	décussatine	38	77,88
F, T	norswertiaoglucoside	39	77
F, T	norswertiaprimveroside	40	77
F, T	isogentiakochianoside	42	77
F, T	désacétylgentiabavarutinoside	44	89
F, T	gentiabavarutinoside	45	77,89
F, T	gentiabavaroside	48	77
F, T	O-primverosyl-1-décussatine	51	77
F, T	isovitexine	74	88
F, T	isc-orientine	88	88

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana brachyphylla Vill.

F, T	swertianine	33	88
F, T	gentiacauléine	36	88
F, T	décussatine	38	88
F, T	isovitexine	74	88
F, T	iso-orientine	88	88

Gentiana favrati Rittener

F, T	swertianine	33	88
F, T	gentiacauléine	36	88
F, T	décussatine	38	88
F, T	mangiférine	67	88
F, T	isovitexine	74	88
F, T	iso-orientine	88	88

Gentiana nivalis L.

F, T	swertianine	33	88
F, T	gentiacauléine	36	88
F, T	décussatine	38	88
F, T	mangiférine	67	88
F, T	isovitexine	74	88
F, T	iso-orientine	88	88
F, T	O-glucosyl-3'-iso-orientine	90	76

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana rostani Reuter

F, T	swertianine	33	88
F, T	gentiacauléine	36	88
F, T	décussatine	38	88
F, T	isovitexine	74	88
F, T	iso-orientine	88	88

Gentiana schleicheri Kunz.

F, T	gentiacauléine	36	88
F, T	décussatine	38	88
F, T	isovitexine	74	88
F, T	iso-orientine	88	88

Gentiana utriculosa L.

F, T	gentiacauléine	36	88
F, T	décussatine	38	88
F, T	mangiférine	67	88
F, T	isovitexine	74	88
F, T	iso-orientine	88	88

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana verna L.

F, T	norswertianine	32	88
F, T	swertianine	33	78,88
F, T	gentiacauléine	36	88
R, F, T	décussatine	38	59,88
F, T	isogentiakochianoside	42	78
F, T	O-glucosyl-8-swertianine	46	78
F, T	gentiabavaro-side	48	78
F, T	O-primverosyl-1-décussatine	51	59,78
F, T	mangiférine	67	78,88
F, T	isovitexine	74	88
F, T	iso-orientine	88	78,88
F, T	O-glucosyl-4'-iso-orientine	89	81
F, T	O-glucosyl-2"-iso-orientine	91	81
FL	glucosides de la delphinidine	110	70

C. Section Aptera Gentiana cruciata L.

F, T	mangiférine	67	86
F, T	isovitexine	74	86
F, T	O-glucosyl-4'-isovitexine	75	86
F, T	iso-orientine	88	86
F, T	O-glucosyl-4'-iso-orientine	89	86
F, T	t-caféoyl-2"-iso-orientine	93	86

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)

<u>D. Section Pneumonanthe</u>		<u>Gentiana asclepiadea L.</u>	
F	mangiférine	67	87
F	O-glucosyl-6-mangiférine	68	94
F	O-glucosyl-7-mangiférine	69	94
F	isovitexine	74	87
F	O-glucosyl-4'isovitexine	75	87
F	O-glucosyl-2"-isovitexine	76	87
F	saponarine	77	94
F	di-O-glucosyl-2",4'-isovitexine	82	91
F	iso-orientine	88	87
F	O-glucosyl-4'iso-orientine	89	87
F	O-glucosyl-2"-iso-orientine	91	87
F	di-O-glucosyl-2",4'-iso-orientine	98	91
<u>Gentiana makonoi</u> Kusn.			
F	kaemférol	105	68, 69
F	quercétine	106	68, 69
<u>Gentiana pneumonanthe L.</u>			
F, FL	mangiférine	67	49
FL	apigénine	70	49
FL	O-glucosyl-7-apigénine	71	49
FL	di-O-glucosyl-7-apigénine	72	49
FL	O-rhamnoglucosyl-7-apigénine	73	49
F	isovitexine	74	49
F	iso-orientine	88	49

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana septemfida Pall.

F, T	lutéoline	85	71
F	kaempférol	105	68, 69
FL	glucosides de la delphinidine	110	70

E. Section ThylacitesGentiana acaulis L.

F	isovitexine	74	49
F	iso-orientine	88	49
FL	dérivé p-coumaryle de la O-glucosyl-3-delphinidine	111	70

Gentiana alpina Villars

F, R	gentiacauléine	36	51
R	décussatine	38	51
FL	gentiakochianoside	43	51
F, FL, R	gentiacauloside	49	51
F, FL	isogentiacauloside	50	51
F, FL	O-primverosyl-1-décussatine	51	51

Gentiana kochiana Perr.et Song

R, F, FL	swertianine	33	48, 51, 58
R, F, FL	gentiacauléine	36	48, 51
F	isogentiacauléine	37	51, 58
R, F, FL	décussatine	38	48, 51, 58
R, F, FL	gentiakochianoside	43	48, 51, 58
R, F, FL	gentiacauloside	49	48, 51
R, F, FL	isogentiacauloside	50	48, 51, 58
F	isovitexine	74	49
F	iso-orientine	88	49

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana angustifolia Villars

R	swertianine	33	51
R	gentiacauléine	36	51
R	décussatine	38	51
R, F, FL	gentiacauloside	49	51
R, F	isogentiacauloside	50	51

Gentiana clusii Perr. et Song.

R	swertianine	33	51
R, F	gentiacauléine	36	51
R, F	décussatine	38	51
R, F	gentiacauloside	49	51
R, F, FL	isogentiacauloside	50	51
R, F, FL	O-primvérosyl-1-décussatine	51	51

F. Section Chondrophylla Gentiana pyrenaica L.

F, T	saponarine	77	90
F, T	O-glucosyl-7-C-glucosyl-6-acacétine	84	90
F, T	O-glucosyl-7-isoscoparine	101	90
F, T	isopyrénine	103	90
F, T	O-glucosyl-7-isopyrénine	104	90
F, T	isoquercitrine	107	90

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)II. GENRE GENTIANELLA

<u>A. Section Amarella</u>		<u>Gentiana campestris</u> L.	
F, T	desméthylbellidifoline	21	80, 92
F, T	bellidifoline	22	80, 92
F, T	isonorswertianoline	28	80, 92
F, T	isoswertianoline	30	80, 92
F, T	corymbiférine	59	84, 92
F, T	O-glucosyl-1-corymbiférine	62	84, 92
F, T	mangiférine	67	84, 92
F, T	swertisine	83	84, 92
F, T	iso-orientine	88	80, 92
FL	glucosides de la delphinidine	110	70
		<u>Gentiana germanica</u> Willd.	
F, T	desméthylbellidifoline	21	92
F, T	bellidifoline	22	92
F, T	isonorswertianoline	28	92
F, T	isoswertianoline	30	92
F, T	corymbiférine	59	92
F, T	O-glucosyl-1-corymbiférine	62	92
F, T	mangiférine	67	92
F, T	swertisine	83	92
F, T	iso-orientine	88	92

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Gentiana ramosa Hegetschw.

F, T	desméthylbellidifoline	21	92
F, T	bellidifoline	22	92
F, T	isonorswertianoline	28	92
F, T	isoswertianoline	30	92
F, T	corymbiférine	59	92
F, T	O-glucosyl-1-corymbiférine	62	92
F, T	mangiférine	67	92
F, T	swertisine	83	92
F, T	iso-orientine	88	92

B. Section Antarctophylla Gentiana bellidifolia Hook.

R	desméthylbellidifoline	21	52
R	bellidifoline	22	52
R	isobellidifoline	23	53
R	méthylbellidifoline	24	52
R	corymbiférine	59	54
R	diméthyl-4,7-bellidine	64	54

Gentiana corymbifera Kirk

R	corymbiférine	59	54, 63
R	O-glycoside de la corymbiférine	63	63

Gentiana turkestanorum Gand.

F. T	bellidifoline	22	61
------	---------------	----	----

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)III. GENRE GENTIANOPSISGentiana ciliata L.

FL	gentiséine	2	42
FL	isogentisine	3	42
FL, R	gentisine	4	42
FL, R	méthylgentisine	5	42
FL, R, F, T	swertianine	33	42,113
FL, R	swertiaperenine	35	42
FL, R, F, T	gentiacauléine	36	42,51,113
R, F, T	isogentiacauléine	37	51,113
FL, R, F, T	décussatine	38	42,51,113
F, T	isogentiakochianoside	42	113
FL, F, T	gentiakochianoside	43	51
F, T	gentiabavaroside	48	113
F, T	O-glucosyl-1-gentiacauléine	48'	113
FL, R, F, T	gentiacauloside	49	42,51
FL, F, T	isogentiacauloside	50	51
FL, F, T	O-primverosyl-1-décussatine	51	42,51,113
F, T	isovitexine	74	113
F, T	iso-orientine	88	113

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)IV. GENRE SWERTIA

		<u>Swertia bimaculata</u> Hook et Thoms	
P	dihydroxy-1-3-diméthoxy-4,5-xanthone	12	39, 60
P	O-glucosyl-1-hydroxy-3-diméthoxy-4,5-xanthone	15	39
P	O-glycosyl-1-hydroxy-3-diméthoxy-4,5-xanthone	16	60
P	O-glucosyl-1,3-hydroxy-1-diméthoxy-4,5-xanthone	17	39
P	méthylbellidifoline	24	60
P	hydroxy-8-triméthoxy-1,3,5-xanthone	26	60
P	O-glycosyl-1-méthylbellidifoline	31	60
P	décussatine	38	60
P	hydroxy-1-tetraméthoxy-2,3,4,5-xanthone	52	60
P	dihydroxy-1,4-triméthoxy-2,3,7-xanthone	53	60
P	hydroxy-1-tetraméthoxy-2,3,4,7-xanthone	54	60
P	hydroxy-2-tetraméthoxy-1,3,4,7-xanthone	55	60
P	O-glycosyl-1-hydroxy-4-triméthoxy-2,3,7-xanthone	57	60
P	dihydroxy-1,3-triméthoxy-4,5,8-xanthone	60	60
P	isovitexine	74	40
P	iso-orientine	88	40

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Swertia chirata Buch. Ham.

P	gentiséine	2	64
P	isogentisine	3	64
P	desméthylbellidifoline	21	33, 41
P	bellidifoline	22	33, 41
P	isobellidifoline	23	32, 33, 41
P	méthylbellidifoline	24	32, 33, 41
P	hydroxy-1-triméthoxy-3,5,8-xanthone	25	33
P	norswertianine	32	33, 41
P	swertianine	33	32, 41
P	swertinine	34	32
P	swertiapérénine	35	33, 41
P	décussatine	38	32, 33, 41
P	mangiférine	67	33, 41

Swertia decussata Nimmo

F, T	swertianine	33	44, 48
P	swertinine	34	44
FL	décussatine	38	44

Swertia dilata C.B.Clarke

P	norswertianine	32	45
p	norswertiagluco-side	39	38
p	mangiférine	67	38
P	isovitexine	74	38
P	O-glucosyl-7-lutéoline	86	38
P	O-glucosyl-5-lutéoline	87	38
P	iso-orientine	88	38

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Swertia gracilescens A. Sm.

P	norswertianine	32	45
P	norswertia glucoside	39	38
P	mangiférine	67	38
P	O-glucosyl-7-lutéoline	86	38
P	O-glucosyl-5-lutéoline	87	38
P	iso-orientine	88	38

Swertia japonica Makino

P	desméthylbellidifoline	21	35
P	bellidifoline	22	35
P	isobellidifoline	23	41
P	méthylbellidifoline	24	41
P	swertianoline	29	41
P	norswertianine	32	35
P	swertianine	33	35
P	swertiapérénine	35	35
P	isovitexine	74	40
P	swertisine	83	65
P	iso-orientine	88	40
P	swertia japonine	100	65
P	orientine	102	65

Swertia lawii

P	desméthylbellidifoline	21	31
P	hydroxy-1-triméthoxy-3,5,8-xanthone	25	31
P	norswertianine	32	31
P	swertianine	33	31
P	swertiapérénine	35	31
P	décussatine	38	31
P	hydroxy-1-tetraméthoxy-3,4,7,8-xanthone	65	31

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Swertia nervosa Wall.

P	swertianine	33	45
P	swertiapérénine	35	45
P	gentiacauléine	36	45
P	décussatine	38	45
P	isovitexine	74	38
P	O-arabinosyl-x"-isovitexine	80	38
P	iso-orientine	88	38

Swertia perennis L.

F,FL,T	bellidifoline	22	59, 95
F,T	isoswertianoline	30	95
R,F,T	norswertianine	32	59, 95
R,FL	swertiapérénine	35	48, 59, 95
R,F,T	décussatine	38	95
R,F,T	norswertiagluco-side	39	95
F,T	di-O-glucosyl-1,3-norswertianine	41	96
R	O-primverosyl-1-swertiapérénine	47	95
R	O-primverosyl-1-décussatine	51	95
F,T	mangiférine	67	95
F,T	isovitexine	74	95
F,T	O-arabinosyl-6"-isovitexine	81	95
F,T	iso-orientine	88	95
F,T	O-arabinosyl-6"-iso-orientine	92	95

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Swertia pseudochinensis

P	desméthylbellidifoline	21	41
P	bellidifoline	22	41
P	méthylbellidifoline	24	41
P	norswertianine	32	41
P	swertianine	33	41
P	swertiapérénine	35	41
P	décussatine	38	41
P	isovitexine	74	40
P	swertisine	83	40
P	iso-orientine	88	40

Swertia purpurascens Wall.

P	desméthylbellidifoline	21	37
P	bellidifoline	22	34, 37
P	isobellidifoline	23	37
P	norswertianoline	27	36
P	swertianoline	29	36
P	isoswertianoline	30	36
P	norswertianine	32	37
P	décussatine	38	37
P	hydroxy-1-tetraméthoxy-3,4,5,8 xanthone	61	37
P	hydroxy-1-tetraméthoxy-3,5,7,8- xanthone	65	37
F, T	hydroxy-1-tetraméthoxy-3,5,7,8- xanthone	66	34
P	swertisine	83	66

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Swertia racemosa Wall.

P	desméthylbellidifoline	21	45
P	bellidifoline	22	45
P	méthylbellidifoline	24	45
P	norswertianoline	27	38
P	swertianoline	29	38
P	norswertianine	32	45
P	swertianine	33	45
P	swertiapérénine	35	45
P	isovitexine	74	38
P	iso-orientine	88	38

Swertia randaiensis Hayata

P	desméthylbellidifoline	21	41
P	norswertianoline	27	40
P	norswertianine	32	41
P	swertianine	33	41
P	isovitexine	74	40
P	iso-orientine	88	40

Swertia swertopsis Makino

P	méthylbellidifoline	24	40
P	norswertianine	32	40
P	swertianine	33	40
P	swertiapérénine	35	40
P	décussatine	38	40
P	mangiférine	67	40
P	isovitexine	74	40
P	iso-orientine	88	40

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)Swertia tosaensis Makino

P	desméthylbellidifoline	21	41
P	bellidifoline	22	41
P	méthylbellidifoline	24	41
P	norswertianine	32	41
P	swertianine	33	41
P	swertiapérénine	35	41
P	isovitexine	74	40
P	swertisine	83	40
P	iso-orientine	88	40
P	swertiajaponine	100	40

V. GENRE HALENIAHalenia asclepiadea (HBK) G. Don.

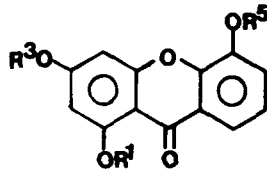
P	hydroxy-1-triméthoxy-2,3,5-xanthone	8	57
P	hydroxy-1-tetraméthoxy-2,3,4,5-xanthone	52	57
P	hydroxy-1-tetraméthoxy-2,3,4,7-xanthone	54	57

TABLEAU RECAPITULATIF (suite)VI. GENRE FRASERAFrasera albicaulis Dougl.ex.Griseb.

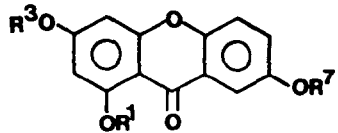
R	triméthoxy-1,3,5-xanthone	1	56
R	méthylgentisine	5	56
R	triméthoxy-1,3,7-xanthone	6	56
R	hydroxy-1-triméthoxy-2,3,5-xanthone	8	56
R	hydroxy-1-triméthoxy-2,3,7-xanthone	10	56
R	hydroxy-2-triméthoxy-1,3,7-xanthone	11	56
R	dihydroxy-1,3-diméthoxy-4,5-xanthone	12	56
R	hydroxy-1-triméthoxy-3,4,5-xanthone	13	56
R	tetraméthoxy-1,3,4,5-xanthone	14	56
R	dihydroxy-1,3-diméthoxy-4,7-xanthone	18	56
R	hydroxy-1-triméthoxy-3,4,7-xanthone	19	56
R	tetraméthoxy-1,3,4,7-xanthone	20	67
R	méthylbellidifoline	24	56
R	hydroxy-1-tetraméthoxy-2,3,4,5-xanthone	52	56
R	hydroxy-1-tetraméthoxy-2,3,4,7-xanthone	54	56
R	hydroxy-2-tetraméthoxy-1,3,4,7-xanthone	55	56
R	pentaméthoxy-1,2,3,4,7-xanthone	56	56

Frasera caroliniensis Wall.

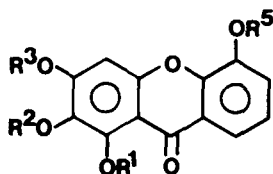
R	hydroxy-1-triméthoxy-2,3,5-xanthone	8	55
R	hydroxy-1-triméthoxy-2,3,7-xanthone	10	55
R	dihydroxy-1,3-diméthoxy-4,5-xanthone	12	55
R	méthylbellidifoline	24	55
R	O-glycosyl-1-méthylbellidifoline	31	55
R	hydroxy-1-tetraméthoxy-2,3,4,5-xanthone	52	55
R	hydroxy-1-tetraméthoxy-2,3,4,7-xanthone	54	55
R	pentaméthoxy-1,2,3,5,8-xanthone	58	55

FORMULES DEVELOPPEESN^oSUBSTITUANTSNOM TRIVIALXANTHONES TRIOXYGENEESEn 1, 3 et 5

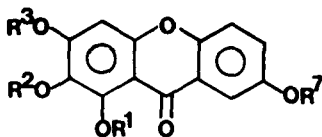
	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁵</u>
1	CH ₃	CH ₃	CH ₃

En 1, 3 et 7

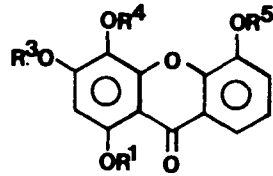
	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁷</u>	
2	H	H	H	gentiséine
3	H	H	CH ₃	isogentisine
4	H	CH ₃	H	gentisine
5	H	CH ₃	CH ₃	méthylgentisine
6	CH ₃	CH ₃	CH ₃	
7	H	prim	CH ₃	gentioside

XANTHONES TETRAOXYGENEESEn 1, 2, 3 et 5

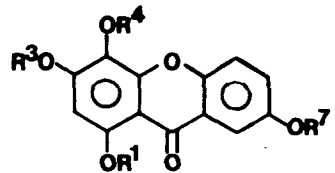
	<u>R¹</u>	<u>R²</u>	<u>R³</u>	<u>R⁵</u>
8	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃

En 1, 2, 3 et 7

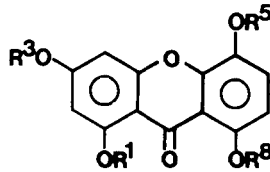
	<u>R¹</u>	<u>R²</u>	<u>R³</u>	<u>R⁷</u>
9	H	CH ₃	H	CH ₃
10	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
11	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃

En 1, 3, 4 et 5

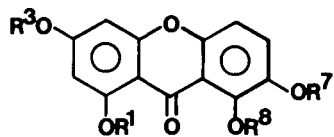
	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁴</u>	<u>R⁵</u>
12	H	H	CH ₃	CH ₃
13	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
14	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
15	gluc	H	CH ₃	CH ₃
16	glyc	H	CH ₃	CH ₃
17	H	gluc	CH ₃	CH ₃

En 1, 3, 4 et 7

	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁴</u>	<u>R⁷</u>
18	H	H	CH ₃	CH ₃
19	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
20	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

En 1, 3, 5 et 8

	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁵</u>	<u>R⁸</u>	
21	H	H	H	H	desméthylbellidifoline
22	H	CH ₃	H	H	bellidifoline
23	H	H	CH ₃	H	isobellidifoline
24	H	CH ₃	CH ₃	H	méthylbellidifoline
25	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	
26	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	
27	gluc	H	H	H	norswertianoline
28	H	H	H	gluc	isonorswertianoline
29	gluc	CH ₃	H	H	swertianoline
30	H	CH ₃	H	gluc	isoswertianoline
31	glyc	CH ₃	CH ₃	H	

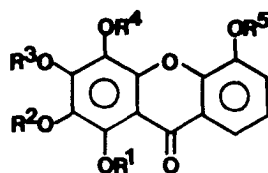
En 1, 3, 7 et 8

	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁷</u>	<u>R⁸</u>	
32	H	H	H	H	norswertianine
33	H	CH ₃	H	H	swertianine
34	H	H	CH ₃	CH ₃	swertinine
35	H	CH ₃	CH ₃	H	swertiapérénine
36	H	CH ₃	H	CH ₃	gentiacauléine

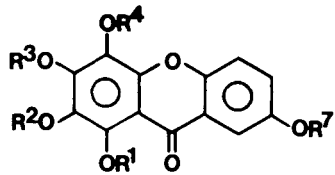
	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁷</u>	<u>R⁸</u>	
37	CH ₃	H	CH ₃	H	isogentiacauléine
38	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	décussatine
39	gluc	H	H	H	norswertiaoglucoside
40	prim	H	H	H	norswertiaprimvéroside
41	gluc	gluc	H	H	
42	prim	CH ₃	H	H	isogentiakochianoside
43	H	CH ₃	H	prim	gentiakochianoside
44	H	CH ₃	rutin	H	desacétylgentiabavarutinoside
45	H	CH ₃	Ac-rutin	H	gentiabavarutinoside
46	H	CH ₃	H	gluc	
47	prim	CH ₃	CH ₃	H	
48	prim	CH ₃	H	CH ₃	gentiabavaroside
48 ¹	gluc	CH ₃	H	CH ₃	
49	H	CH ₃	prim	CH ₃	gentiacauloside
50	CH ₃	prim	CH ₃	H	isogentiacauloside
51	prim	CH ₃	CH ₃	CH ₃	primverosyl-1-décussatine

XANTHONES PENTAOXYGENEES

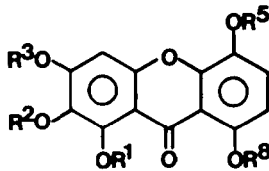
En 1, 2, 3, 4 et 5



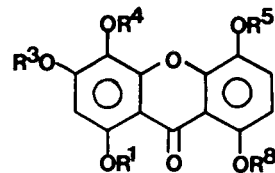
	<u>R¹</u>	<u>R²</u>	<u>R³</u>	<u>R⁴</u>	<u>R⁵</u>
52	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

En 1, 2, 3, 4 et 7

	<u>R¹</u>	<u>R²</u>	<u>R³</u>	<u>R⁴</u>	<u>R⁷</u>
53	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
54	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
55	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
56	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
57	glyc	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃

En 1, 2, 3, 5 et 8

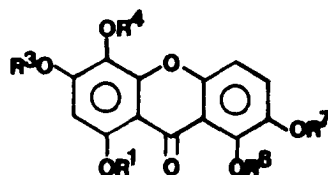
	<u>R¹</u>	<u>R²</u>	<u>R³</u>	<u>R⁵</u>	<u>R⁸</u>
58	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

En 1, 3, 4, 5 et 8

	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁴</u>	<u>R⁵</u>	<u>R⁸</u>
59	H	H	CH ₃	CH ₃	H corymbiférine
60	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃

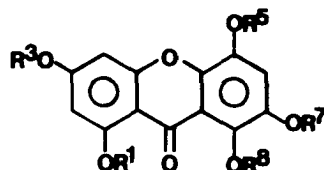
	$\underline{R^1}$	$\underline{R^3}$	$\underline{R^4}$	$\underline{R^5}$	$\underline{R^8}$
61	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
62	gluc	H	CH ₃	CH ₃	H
63	glyc	H	CH ₃	CH ₃	H

En 1, 3, 4, 7 et 8

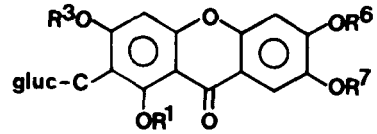


	$\underline{R^1}$	$\underline{R^3}$	$\underline{R^4}$	$\underline{R^7}$	$\underline{R^8}$
64	H	H	CH ₃	CH ₃	H diméthyl-4.7-bellidine
65	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

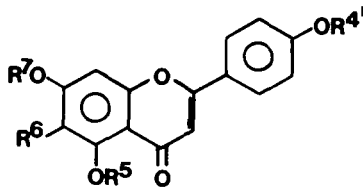
En 1, 3, 5, 7 et 8



	$\underline{R^1}$	$\underline{R^3}$	$\underline{R^5}$	$\underline{R^7}$	$\underline{R^8}$
66	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

C-GLUCOSIDES XANTHONIQUES

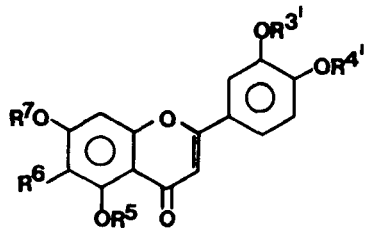
	<u>R¹</u>	<u>R³</u>	<u>R⁶</u>	<u>R⁷</u>	
67	H	H	H	H	mangiférine
68	H	H	gluc	H	
69	H	H	H	gluc	

FLAVONES TRIOXYGENEES

	<u>R⁵</u>	<u>R⁶</u>	<u>R⁷</u>	<u>R^{4'}</u>	
70	H	H	H	H	
71	H	H	gluc	H	
72	H	H	digluc	H	
73	H	H	rhamnogluc	H	
74	H	C-gluc	H	H	isovitexine
75	H	C-gluc	H	gluc	

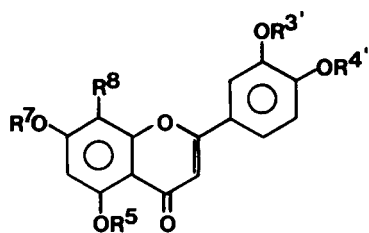
	<u>R⁵</u>	<u>R⁶</u>	<u>R⁷</u>	<u>R^{4'}</u>	
76	H	O-glucosyl- 2"-C-gluc	H	H	
77	H	C-gluc	gluc	H	saponarine
78	H	t-feruloyl- 2"-C-gluc	H	H	
79	H	t-feruloyl- 2"-C-gluc	H	gluc	
80	H	O-arabinosyl- x"-C-gluc	H	H	
81	H	O-arabinosyl- 6"-C-gluc	H	H	
82	H	O-glucosyl- 2"-C-gluc	H	gluc	
83	H	C-gluc	CH ₃	H	swertisine
84	H	C-gluc	gluc	CH ₃	

FLAVONES TETRAOXYGENEES

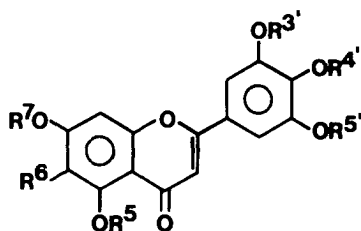


	<u>R⁵</u>	<u>R⁶</u>	<u>R⁷</u>	<u>R^{3'}</u>	<u>R^{4'}</u>	
85	H	H	H	H	H	lutéoline
86	H	H	gluc	H	H	
87	gluc	H	H	H	H	
88	H	C-gluc	H	H	H	iso-orientine

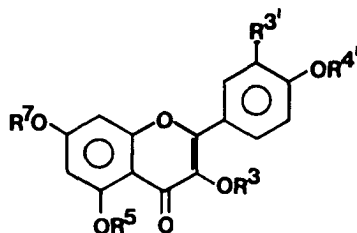
	<u>R⁵</u>	<u>R⁶</u>	<u>R⁷</u>	<u>R^{3'}</u>	<u>R^{4'}</u>	
89	H	C-gluc	H	H	gluc	
90	H	C-gluc	H	gluc	H	
91	H	O-glucosyl- 2"-C-gluc	H	H	H	
92	H	O-arabinosyl- 6"-C-gluc	H	H	H	
93	H	t-caféoyl- 2"-C-gluc	H	H	H	
94	H	t-feruloyl- 2"-C-gluc	H	H	H	
95	H	t-caféoyl- 2"-C-gluc	H	H	gluc	
96	H	t-feruloyl- 2"-C-gluc	H	H	gluc	
97	H	p-O-glucosyl- t-caféoyl- 2"-C-gluc	H	H	gluc	
98	H	O-glucosyl- 2"-C-gluc	H	H	gluc	
99	H	C-gluc	H	CH ₃	H	isoscoparine
100	H	C-gluc	CH ₃	H	H	swertiajaponine
101	H	C-gluc	gluc	CH ₃	H	



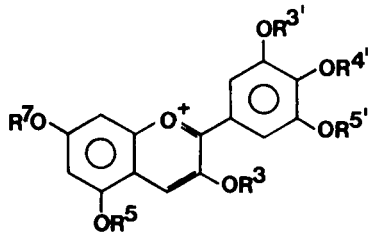
	<u>R⁵</u>	<u>R⁷</u>	<u>R⁸</u>	<u>R^{3'}</u>	<u>R^{4'}</u>	
102	H	H	C-gluc	H	H	orientine

FLAVONES PENTA-OXYGENEESEn 5, 7, 3', 4' et 5'

	<u>R⁵</u>	<u>R⁶</u>	<u>R⁷</u>	<u>R^{3'}</u>	<u>R^{4'}</u>	<u>R^{5'}</u>
103	H	C-gluc	H	CH ₃	H	CH ₃ isopyrénine
104	H	C-gluc	gluc	CH ₃	H	CH ₃

FLAVONOLS

	<u>R⁵</u>	<u>R⁷</u>	<u>R³</u>	<u>R^{3'}</u>	<u>R^{4'}</u>
105	H	H	H	H	H kaempferol
106	H	H	H	OH	H quercétine
107	H	H	gluc	OH	H isoquercitrine
108	H	H	rutin	OH	H rutine
109	H	H	arabin	OH	H peltatoside

ANTHOCYANIDINES

	<u>R³</u>	<u>R⁵</u>	<u>R⁷</u>	<u>R^{3'}</u>	<u>R^{4'}</u>	<u>R^{5'}</u>	
110	H	H	H	H	H	H	delphinidine
111	gluc	H	H	H	H	H	

DISCUSSION

En 1972, JOSSANG et coll. [50] ont établi une méthode de chimiotaxonomie numérique des Gentianacées basée sur les modes de substitution des xanthonnes identifiées dans cette famille. En ce qui concerne la sous-tribu des Gentianinae que nous avons présentée dans le tableau précédent, ces auteurs sont arrivés à la conclusion que le genre Gentiana se rapproche plus du genre Swertia que du genre Frasera, et que ce dernier s'apparente plus à Gentiana qu'à Swertia. Ils ont déterminé les " distances taxonomiques " suivantes :

Swertia - Gentiana : 0,41

Swertia - Frasera : 1,20

Gentiana - Frasera : 1,02

Ces auteurs n'ont cependant considéré que les xanthonnes; de plus, ils ignorent les modes de glycosylation de ces molécules, en précisant qu'à leur avis, trop peu d'espèces avaient été étudiées pour leur contenu en glycosides. Enfin, ils ont inclus les genres Gentianella et Gentianopsis dans Gentiana. Ils reconnaissent cependant deux points importants : tout d'abord, les genres Frasera et Swertia sont bien indépendants et ne doivent pas être réunis comme le proposait WAGENITZ en 1964; par ailleurs, Gentiana corymbifera Kirk et Gentiana bellidifolia Hook (genre Gentianella !) se distinguent des autres espèces du genre Gentiana tel qu'ils le conçoivent.

Sur la base des travaux effectués à l'Institut de Chimie de Neuchâtel et du tableau récapitulatif que nous avons présenté, nous nous proposons d'examiner qualitativement l'apport de l'étude des polyphénols à la chimiotaxonomie de la sous-tribu. Nous tiendrons compte non seulement des xanthonnes qui ont été identifiées mais aussi des flavones; de plus, pour les trois genres les plus étudiés, nous examinerons les modes de glycosylation des xanthonnes.

Malheureusement, les diverses espèces n'ont pas toutes été étudiées de la même manière; certaines identifications sont manifestement incomplètes; dans quelques cas, on ne s'est intéressé qu'à un seul organe, alors que dans d'autres, la plante entière a été examinée. C'est donc avec beaucoup de prudence que nous allons tenter de dégager l'essentiel des données en question. Le lecteur devra tenir compte des restrictions que nous venons de mentionner et du fait que la chimie des polyphénols de la sous-tribu est encore très loin d'être entièrement connue. La mise au point qui va suivre, toute partielle soit-elle, nous paraît cependant intéressante.

De nombreuses espèces de la sous-tribu sont caractérisées par la présence de xanthonés, dont une majorité sont tetraoxygénées. Les schémas de substitution impliquent tous les positions 1 et 3, avec des oxygénations supplémentaires en 5 ou en 7, très souvent en 8 et plus rarement en 4.

Parmi les xanthonés identifiées dans le genre Gentiana, on note une grande majorité substituées en 1, 3, 7 et 8. Il en est de même du genre Gentianopsis. Un lien analogue existe entre Swertia et Gentianella puisqu'ils semblent être les seuls à présenter de nombreuses xanthonés 1, 3, 5 et 8. Remarquons que Swertia semble occuper une place centrale puisqu'il réunit les caractéristiques xanthoniques des autres genres en ayant souvent à la fois les deux schémas de substitution.

La pentaoxygénation est plus rare; elle se trouve chez Gentianella et chez Swertia mais est jusqu'à présent complètement absente des genres Gentiana et Gentianopsis.

Les xanthonés sont fréquemment glycosylées, en particulier par le glucose ou le primvérose. Chez Gentiana, nous trouvons une variété de sucres attachés aux diverses xanthonés : glucose, primvérose et même rutinose. Le genre Gentianella au contraire semble ne présenter que des glucosides. Swertia contient surtout des glucosides, mais quelques primvérosides existent aussi .

Enfin, le genre Gentianopsis est à rapprocher de Gentiana semble-t-il, par la présence de divers primvérosides et d'un glucoside.

Les C-glucosides flavoniques sont assez répandus; c'est le cas notamment de l'iso-orientine et de l'isovitexine. Ce n'est cependant que dans le genre Gentiana que l'on a trouvé un nombre important de dérivés de ces flavones de base.

Les genres Frasera et Halenia n'ont été que très peu étudiés. Néanmoins ils paraissent assez proches : tous deux semblent caractérisés par l'absence totale de flavones. Les xanthones y sont nombreuses, mais on n'en trouve aucune qui soit oxygénée en 1, 3, 7 et 8, et de rares en 1, 3, 5 et 8. Notons enfin que toutes les xanthones sont hautement méthoxylées et que les pentasubstituées sont nombreuses.

En résumé, au niveau des genres, nous constatons que Swertia semble occuper une place centrale dans la sous-tribu; bien qu'elle soit plus proche des genres Gentiana, Gentianella et Gentianopsis, on y trouve certaines caractéristiques des Frasera et Halenia. Le genre Gentianopsis semble se rapprocher de certaines espèces du genre Gentiana. Celui-ci se distingue par l'ample variation des C-glucosides flavoniques. Enfin, le genre Gentianella s'apparente nettement à Swertia et semble s'éloigner des Gentiana et Gentianopsis. Halenia et Frasera paraissent former un groupe à part.

Sur la base de ces considérations, il nous paraît justifié de maintenir la séparation entre les genres Swertia et Frasera de même que celle éloignant Gentianella de Gentiana. La validité de l'élévation de Gentianopsis au niveau de genre distinct de Gentianella nous paraît prouvée. En revanche, les différences entre Gentianopsis et certaines espèces de Gentiana sont beaucoup moins nettes.

En ce qui concerne le niveau infragénérique, nous ne pouvons examiner que les trois genres Gentiana, Gentianella et Swertia, seuls à avoir été suffisamment étudiés. Les résultats obtenus pour les trois autres genres (Gentianopsis, Frasera et Halenia) sont trop limités et ne peuvent être employés qu'au niveau des genres.

Au niveau infragénérique donc, nous notons l'étonnante homogénéité du genre Swertia : les xanthones tétraoxygénées y sont uniformément répandues, et à l'exception des trois espèces, assez peu étudiées, il est vrai, Swertia chirata Buch. Ham., Swertia decussata Nimmo. et Swertia lawii, tous les membres du genre contiennent aussi des flavones. Quelques espèces ont néanmoins un caractère particulier : c'est le cas notamment de Swertia chirata Buch. Ham., seule espèce possédant des xanthones trioxygénées et de Swertia bimaculata Hook et Thoms., ayant des xanthones tétraoxygénées autrement qu'en 1, 3, 5 et 8 et en 1, 3, 7 et 8, ainsi que de nombreuses xanthones penta-oxygénées. Swertia purpurascens Wall. et Swertia lawii se distinguent aussi par quelques xanthones pentasubstituées. Enfin, Swertia perennis L. représente un cas tout à fait particulier par ses glycosides de flavones, par les seuls prim-vérosides dans le genre et par le di-O-glucoside de la norswertianine, unique dans la nature.

Le genre Gentianella ne nécessite que peu de commentaires tant son homogénéité semble bonne. Les cinq espèces étudiées dans ce genre semblent principalement caractérisées par les xanthones 1, 3, 5, 8. Relevons encore la parfaite uniformité de la distribution des polyphénols dans les trois espèces de la section Amarella, qui contiennent, à part les xanthones 1, 3, 5, 8, des C-glucosides flavoniques et la mangiférine.

Nous nous étendrons un peu plus sur le genre Gentiana, qui a particulièrement intéressé les chercheurs à Neuchâtel.

Examinons en premier la section Cyclostigma qui offre une excellente homogénéité par la présence régulière de xanthones 1, 3, 7, 8 et de C-glucosylflavones. Relevons l'intérêt des résultats qu'apporte une étude approfondie des espèces : la différenciation de celles-ci au sein d'une section est possible. Dans les Cyclostigma, trois espèces ont été examinées avec minutie; or il s'avère que chacune d'entre elles se caractérise par des glycosides particuliers : Gentiana verna L. se différencie par son O-glucosyl-2"-iso-orientine et le glucoside en 8 de la swertianine, Gentiana bavarica L. par ses rutinoides de la gentiacauléine et enfin Gentiana nivalis L. par le O-glucosyl-3'-iso-orientine.

Les espèces de la section Coelanthé sont principalement caractérisées par la présence de C-glucosylflavones dans les feuilles et de xanthones trioxygénées dans les racines. Relevons le fait que Gentiana lutea L. se distingue des autres espèces en présentant ces xanthones ainsi que la mangiférine dans ses feuilles.

Ici aussi une différenciation entre les espèces semble possible, non seulement par le cas cité ci-dessus mais aussi sur la base des étonnants cinnamoyl-C-glucosylflavones, dont six ont été mises en évidence chez Gentiana punctata L. et quatre chez Gentiana burseri Lapeyr. Or trois de ces molécules sont particulières à la première espèce et une autre ne se trouve que dans la deuxième. La présence d'isoscoparine dans Gentiana punctata L. pourrait également constituer un caractère particulier. A nouveau, seule une étude extrêmement poussée a pu fournir ces nouvelles informations.

A notre avis, les espèces de la section Thylacites n'ont malheureusement pas été examinées avec toute la rigueur désirée. La différenciation des espèces n'est pas possible sur la base des résultats connus à ce jour. Cependant, tous les membres de la section contiennent des xanthones 1, 3, 7, 8 et quelques primvérosides. Seule Gentiana kochiana Perr. et Song. (= Gentiana acaulis L.) se distingue par la présence des C-glucosides flavoniques iso-orientine et isovitexine.

Le seul représentant de la section Chondrophylla à être étudié, Gentiana pyrenaica L. constitue un cas tout-à-fait spécial : les glucosides en 7 de C-glucosylflavones, les 6-C-glucosides de l'acacétine et de la tricine ainsi que la présence du flavonol isoquercitrine, lui confèrent une place particulière au sein du genre. Parmi les substances identifiées dans cette espèce, seule la saponarine a été mise en évidence ailleurs dans le genre (Gentiana asclepiadea L.).

A l'exception de Gentiana asclepiadea L. précisément, et de Gentiana pneumonanthe L., les espèces de la vaste section Pneumonanthe n'ont pas été étudiées, et seule la première l'a été avec suffisamment de minutie. Néanmoins, on remarquera que l'analogie avec Gentiana pyrenaica L. que nous venons de citer, ainsi que les quelques C-glucosylflavones également identifiées dans la section Coelanthé pourraient avoir une signification particulière, si l'on se réfère au tableau des relations phylogénétiques de SCHARFETTER (voir tableau 6). L'identification, chez Gentiana asclepiadea L. des premiers di-O-glucosides de C-glucosylflavones ainsi que des glucosides de la mangiférine, pourrait être la base de la caractérisation de la section dans le cas d'une étude approfondie des quelques 35 autres espèces.

En résumé, l'homogénéité des genres semble aisément établie et vérifiée sur la base du contenu polyphénolique. Les sections du genre Gentiana ont également chacune leur caractère et leur unité.

Il semble même possible d'aller plus loin, à l'aide des résultats d'études approfondies, en particulier celles sur les glycosides. A l'intérieur d'une section, aussi homogène soit elle, chaque espèce pourrait contenir une ou plusieurs entités capables de lui donner un caractère propre. Il est possible que cela dépasse les objectifs premiers dévolus à la chimiotaxonomie; cependant, en tant que chimiste, nous ne pouvons ignorer ces aspects ambitieux.

IV. PARTIE EXPERIMENTALE.

10. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES.

Nous indiquerons les divers supports et solvants qui se sont révélés efficaces pour la séparation et la purification des polyphénols.

10.1. Chromatographie sur couches minces.

La polyamide offre d'excellents résultats pour tous les polyphénols. Nous avons employé des plaques fabriquées par nous-mêmes, à l'aide de l'étendeur DESAGA. Pour 5 plaques de dimensions 20 X 20 cm., on utilise 8 g. de polyamide en suspension dans 45 ml. d'éthanol.

Types de polyamide utilisés :

Macherey-Nagel DC-11, DC-11 AC et DC-6.

Solvants :

pour les glycosides : MeOH-H₂O 9 : 1, 8 : 2, 6 : 4

pour les aglycones : MeOH-H₂O-AcOH 90 : 5 : 5

Toluène-MeOH-AcOH 45 : 32 : 16

La cellulose est très précieuse pour la séparation des C-glucosides flavoniques et pour les glycosides xanthoniques.

Nous avons utilisé les plaques finies Merck, cellulose F 50, épaisseur de la couche 0,10 mm.

Systèmes de solvants :

AcOH 5, 10, 15 et 30 %

n-BuOH-AcOH-H₂O 4 : 1 : 5 (phase supérieure)

n-BuOH-AcOH-H₂O 10 : 4 : 7

AcOEt-MeOH-H₂O 21 : 4 : 3

CHCl₃-AcOH-H₂O 20 : 15 : 3

Pour les sucres libres (après hydrolyse)

n-BuOH-pyridine-H₂O 6 : 4 : 3

n-BuOH-AcOH-H₂O 4 : 1 : 5 (phase supérieure)

Les plaques de silicagel sont celles du commerce : Merck

60 F₂₅₄ sur feuilles d'aluminium, épaisseur 0,2 mm.

Solvants pour les glycosides :

AcOEt-MeOH-H₂O 21 : 4 : 3

Acétone-CHCl₃-H₂O 16 : 4 : 1

pour les aglycones :

Toluène-AcOEt 4 : 1

Toluène-AcOEt-EtOH 7 : 3 : 1

pour les sucres libres :

AcOEt-AcOH-MeOH-H₂O 65 : 20 : 15 : 15

10.2. Chromatographie sur colonne.

Nous avons utilisé des colonnes en verre de diamètre intérieur variant entre 2 et 6,5 cm. et de hauteur utile 30-130 cm.

Elles sont munies d'un dispositif permettant un écoulement variable à pression constante. Le remplissage d'une colonne se fait avec le support en suspension dans le solvant d'éluat.

Avant l'introduction des substances à séparer, le support est lavé jusqu'à disparition de tout résidu solide dans l'éluat.

La substance est alors introduite en solution dans l'éluant.

Les quantités de substance à introduire sur une colonne dépendent bien évidemment de la nature de la séparation, du support et des dimensions de la colonne. La vitesse d'écoulement varie entre 10 ml/h. pour les petites colonnes et 40 ml/h. pour les grandes.

A titre d'exemple, nous employons une colonne contenant environ 140 cm³ de polyamide pour un gramme d'extrait étheré et 250 cm³ par gramme d'extrait méthanolique.

Les supports utilisés, ainsi que les solvants sont :

Polyamide SC-6 Macherey-Nagel (grosneur des grains 0,16 mm)

MeOH-H₂O 5 : 5 - 9 : 1

MeOH-AcOH-H₂O 90 : 5 : 5

Toluène-MeOH-AcOH 45 : 32 : 16

Gel de silice 60 Merck (0,063 - 0,200 mm)

Toluène-AcOEt-EtOH 7 : 3 : 1

Cellulose microcristalline (Avicel) Merck

AcOH 5 - 30 %

n-BuOH-AcOH-H₂O 4 : 1 : 5 (phase supérieure)

n-BuOH-AcOH-H₂O 10 : 4 : 7

CHCl₃-AcOH-H₂O 20 : 15 : 3

Sephadex LH 20 Pharmacia

MeOH

MeOH-H₂O 9 : 1, 8 : 2

Tous les solvants utilisés en chromatographie sont fraîchement distillés.

11. TECHNIQUES D'ANALYSE.

11.1. Spectroscopie UV.

Les spectres UV ont été enregistrés avec un appareil Unicam SP 800, en solution dans le méthanol. La concentration des solutions est ajustée de façon à obtenir une absorbance maximale aux environs de 1. Pour chaque substance, les spectres sont réalisés en présence des réactifs usuels selon les indications de MABRY et coll. [100] .

11.2. Spectroscopie IR.

Les spectres IR sont enregistrés à partir de pastilles de KBr contenant 0,4 à 0,5 % de substance cristalline, sur un appareil Perkin-Elmer modèle 521.

11.3. Résonance magnétique nucléaire.

Le relevé des spectres RMN a été effectué par la maison Hoffmann-LaRoche et Co. à Bâle, à 90 et à 270 MHz, dans CDCl_3 .

11.4. Hydrolyse acide.

Trois mg. de substance en solution dans 5 ml. de méthanol sont chauffés à reflux pendant 2 à 4 heures dans 20 ml. d'acide chlorhydrique 2N. Après refroidissement, la solution est extraite à l'éther puis au butanol. Ces extraits sont concentrés et analysés par CCM. La phase aqueuse est conservée pour la recherche des sucres.

11.5. Hydrolyse enzymatique.

Nous dissolvons 1 mg. de substance et 1 mg. de β -glucosidase (Sigma Corporation, St.Louis, Mo. U.S.A.) dans 2 ml. de tampon

acétate de sodium-acide acétique 0,5 M. ajusté à pH 5.

La solution est maintenue 12 - 24 h. à 37°, puis extraite à l'éther et au n-butanol. Les extraits sont lavés avec soin avec de l'eau et purifiés sur colonne de Sephadex LH 20 (MeOH). Ils sont ensuite analysés par CCM.

11.6. Recherche des sucres.

La phase aqueuse de l'hydrolysate, après extraction des aglycones à l'éther et au n-butanol, est neutralisée par l'addition de bicarbonate de sodium. Elle est ensuite évaporée à sec et les sucres sont extraits à la pyridine à 60° pendant 30 minutes. Cette solution est analysée par CCM (voir techniques chromatographiques). La révélation des sucres est effectuée par giclage d'une solution de phtalate d'aniline (0,93 g. d'aniline et 1,66 g. d'acide phtalique dans 100 ml. de n-BuOH-H₂O 9 : 1) et chauffage pendant 5 minutes à 100°.

11.7. Méthylation.

La préparation des éthers méthyliques se fait par traitement au diazométhane. Celui-ci est obtenu à partir de la N-nitroso-4-toluène-sulfométhylamide (Fluka) par hydrolyse basique (KOH dans l'éthanol) et distillation, selon les indications de DE BOER et coll. [112] .

5 mg. de substance en solution dans 10 ml. de méthanol absolu sont traités par un excès de solution étherée de diazométhane (10 fois la quantité théorique requise). Le mélange est abandonné pendant 24 heures à 4° C puis 24 heures à température ambiante. On contrôle par CCM si la méthylation est complète : polyamide DC 11, MeOH-H₂O 9 : 1, disparition du spot initial et apparition d'un nouveau spot, bleu-clair, à valeur R_F élevée. Si nécessaire le mélange réactionnel est encore traité par un excès (cinq fois) de diazométhane.

La solution est enfin évaporée à sec et le résidu est purifié par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (MeOH).

11.8. Acétylation.

L'acétylation est effectuée à température ambiante, 10 mg. de substance cristalline, 15 ml. d'anhydride acétique fraîchement distillé et 3 ml. de pyridine anhydre sont réunis et agités jusqu'à dissolution complète. On ajoute alors une pointe de spatule d'acétate de sodium anhydre. Le mélange réactionnel est abandonné pendant 24 heures.

Cette solution est ensuite concentrée à petit volume; le liquide visqueux résultant est traité à l'eau froide et à la glace pour faire précipiter le dérivé acétylé. Celui-ci est recueilli par filtration, lavé à l'eau froide et enfin recristallisé dans l'éthanol.

11.9. Analyse élémentaire.

L'analyse élémentaire a été faite, pour les nouveaux glycosides polyphénoliques, sur les dérivés acétylés. Les résultats sont les suivants :

<u>A</u> acétylé :	$C_{59}H_{68}O_{33}$	(1303,15)	
	Calculé :	C : 54,38	H : 5,10 %
	Trouvé :	C : 53,88	H : 4,97 %
<u>B</u> acétylé :	$C_{61}H_{68}O_{35}$	(1361,17)	
	Calculé :	C : 53,83	H : 5,04 %
	Trouvé :	C : 52,97	H : 4,94 %
<u>D</u> acétylé :	$C_{47}H_{50}O_{27}$	(1046,89)	
	Calculé :	C : 53,92	H : 4,81 %
	Trouvé :	C : 53,79	H : 4,91 %
<u>E</u> acétylé :	$C_{47}H_{50}O_{27}$	(1046,89)	
	Calculé :	C : 53,92	H : 4,81 %
	Trouvé :	C : 53,38	H : 4,97 %

H acétylé : $C_{47}H_{50}O_{25}$ (1014,88)

Calculé : C : 55,62 H : 4,96 %

Trouvé : C : 56,10 H : 5,16 %

U acétylé : $C_{31}H_{32}O_{16}$ (660,59)

Calculé : C : 56,36 H : 4,88 %

Trouvé : C : 56,46 H : 5,02 %

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Linné, C., " Species plantarum ", éd 1 (1753).
- 2 Tournefort, J.P., " Institutiones Rei Herbariae ", 80, t.40, éd. 1 (1700).
- 3 Moench, C., Meth. Pl., 482 (1794).
- 4 Grisebach, R., " Genera et Species Gentianearum " (1839); " Gentianeae ", in De Candolle, " Podremus systematis naturalis regni vegetabilis " 9, 38 (1845).
- 5 Kusnezov, N., in Engler et Prantl, " Die natürlichen Pflanzenfamilien " 4 (2), 80, Leipzig (1895).
- 6 Gilg, E., in Engler et Prantl, " Die natürlichen Pflanzenfamilien " 4 (2), 80, Leipzig (1895).
- 7 Wettstein, R., Osterr. Bot. Zeitschr. (1896).
- 8 Schustler, F., Vestnik ceskoslov. bot. Praze 1, 1 (1922).
- 9 St-John, H., Amer. Midl. Nat. 26, 1 (1941).
- 10 Ma, Yu-chuan, Acta Phytotax. 1, 1 (1951).
- 11 Borodin, Trav. Soc. Imp. Nat. St. Petersb. 22, 131 (1892).
- 12 Gillett, J.M., Ann. Miss. Bot. Gard. 44 (3), 195 (1957).
- 13 Toyokuni, H., J. Fac. Sc. Hokkaido Un. Ser. V, 7 (4), 134 (1963).
- 14 Löve, A., & Löve, D., Op. Bot. Lund. 5, 581 (1961).
- 15 Toyokuni, H., Symbolae Asahikawenses 1, 147 (1965).
- 16 Smith, H., in Nilsson, S., Grana Palynologica 7, 1 (1967).
- 17 Toyokuni, H., Bot. Mag. Tokyo 74, 198 (1961).
- 18 Favarger, C., Revue de Cytologie et de Biologie Végétale 25, 277 (1962).
- 19 Favarger, C., Bull. Soc. Bot. Suisse 59, 62 (1949).
- 20 Rork, C.L., Am. J. Botany 36, 687 (1949).
- 21 Favarger, C., Bull. Soc. Bot. Suisse 62, 244 (1952)
- 22 Favarger, C., Bull. Soc. Bot. Suisse 85, 5 (1965)
- 23 Skalinska, M., Bull. Acad. Sc. et Lettres, Sér. B, Sciences nat. 1, 119 (1952).
- 24 Löve, D., Hereditas, 39, 225 (1953).
- 25 Scharfetter, R., Biographien von Pflanzensippen pp. 312-32, Springer-Verlag, Wien, (1953).

- 26 Lindsey, A.A., Thesis Cornell University (1937).
- 27 Iltis, H.H., *Sida* 2 (2), 129 (1965).
- 28 Lindsey, A.A., *Am. J. Bot.* 27, 640 (1940).
- 29 Smith, H., in Hylander N., *Nomenclatorische und Systematische Studien über nordische Gefässpflanzen*, Uppsala Un. 7, 1, (1945).
- 30 Nilsson, S., *Grana Palynologica* 7, 1 (1967).
- 31 Ghosal, S., Sharma, P. & Chaudhuri, R., *Phytochemistry* 14, 1393 (1975).
- 32 Purushothaman, K., Sarada, A. & Narayanaswami, V., *Leather Science* 20, 132, (1973).
- 33 Ghosal, S., Sharma, P., Chaudhuri, R. & Bhattacharya, S., *J. Pharm. Sc.* 62, 926 (1973).
- 34 Ahmad, S., Ikram, M. & Khan, I., *Phytochemistry* 12, 2542, (1973)
- 35 Komatsu, M., Tomimori, T. & Mikuriya, N., *Chem. Pharm. Bull.* 17, 155 (1969).
- 36 Ghosal, S., Sharma, P., & Chaudhuri, R., *J. Pharm. Sc.* 63, 1286 (1974).
- 37 Ghosal, S., Sharma, P., Chandhuri, R. & Bhattacharya S., *J. Pharm. Sc.* 64, 80 (1975).
- 38 Tomimori, T., Yoshizaki, M. & Namba, T., *Yakugaku Zasshi* 93, 442 (1973).
- 39 Inouye, H., Ueda, S., Inada M., & Tsujii, M., *Yakugaku Zasshi* 91, 1022 (1971).
- 40 Tomimori, T. & Komatsu, M., *Yakugaku Zasshi* 89, 1276 (1969).
- 41 Tomimori, T. & Komatsu, M., *Yakugaku Zasshi* 89, 410 (1969).
- 42 Massias, M., Carbonnier, J. & Molho, D., *Bulletin du Museum d'Histoire Naturelle* 31 ème série n^o 423, 45 (1976)
- 43 Stout, G., Reid, B. & Breck, G., *Phytochemistry* 8, 2417, (1969).
- 44 Dalal, S., Sethna, S. & Shah, R., *J. Ind. Chem. Soc.* 30, 457, 463 (1957).
- 45 Tomimori, T., Yoshizaki, M. & Namba, T., *Yakugaku Zasshi* 94, 647 (1974).
- 46 Atkinson, J., Gupta, P. & Lewis, J., *Tetrahedron* 24, 1507 (1969).
- 47 Verney, A.-M. & Debelmas, A.-M., *Ann. Pharm. Franç.* 31, (6) 415, (1973).

- 48 Rivaille, P., Massicot, J., Guyot, M. & Plouvier, V.,
Phytochemistry 8, 1533 (1969)
- 49 Lebreton, P. & Dangy-Caye, M., Plantes médicinales et phyto-
thérapie VII (2), 87 (1973).
- 50 Jossang, P., Carbonnier, J. & Molho, D., Trav. Lab. Jaysinia
4, 143 (1972).
- 51 Carbonnier, J., Massias, M., Jarreau-Carbonnier, M.-C. &
Molho, D., Trav. Lab. Jaysinia 4, 169 (1972).
- 52 Markham, K., Tetrahedron 20, 991 (1964).
- 53 Markham, K., Tetrahedron 21, 1449 (1965).
- 54 Markham, K., Tetrahedron 21, 3687 (1965).
- 55 Stout, G. & Balkenhol, W., Tetrahedron 25, 1947 (1969).
- 56 Stout, G., Christensen E., Balkenhol, W., Stevens, K.,
Tetrahedron 25, 1961 (1969).
- 57 Stout, G., Fries, J., Phytochemistry 9, 235 (1970).
- 58 Guyot, M., Massicot, J., Rivaille, P., C.R. Acad. Sc. Paris
(c) 267, 423 (1968)
- 59 Rivaille, P. & Raulais, D., C.R. Acad. Sc. Paris (D), 269,
1121 (1969).
- 60 Ghosal, S., Sharma, P. & Chandhuri, R., Phytochemistry 14,
2671 (1975).
- 61 Samatov, A., Akramov, S. & Yunusov, S., Khim. Prir. Soedin
3, 182 (1967).
- 62 Chang, C.H. & Yen, H.-C., Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih 27, 38
(1975).
- 63 Ross, D.J., New Zeal. J. Sci. Tech. 32, 3 (1950).
- 64 Roberts, J.C., Chem. Rev. 61, 591 (1961).
- 65 Komatsu, M., Tomimori, T. & Makiguchi, Y., Chem. Pharm. Bull.
15, 1567 (1967).
- 66 Maina, G., Phytochemistry 12, 728 (1973).
- 67 Christensen, E., Ph. D. Thesis, Univ. Washington (1967)
- 68 Hegnauer, R., Chemotaxonomie der Pflanzen Vol. IV, 176,
éd. Birkhauser Basel & Stuttgart (1966).
- 69 Bate-Smith, E.-C., J. Linn. Soc. London (Botany) 58, 95 (1962).

- 70 Harborne, J.B., " Comparative Biochemistry of the Flavonoids ", Academic Press, London & New York (1967).
- 71 Nikitina, I. & Bukreeva, T., Tr. Leningrad Khim.-Farm. Inst. 21, 159 (1967).
- 72 Bellmann, G. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 56, 284 (1973).
- 73 Bellmann, G. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 56, 773 (1973).
- 74 Hostettmann, K., Bellmann, G., Tabacchi, R. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 56, 3050 (1973).
- 75 Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Phytochemistry 13, 1625 (1974).
- 76 Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 57, 204 (1974).
- 77 Hostettmann, K., Tabacchi, R. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 57, 294 (1974).
- 78 Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 57, 1155 (1974).
- 79 Hostettmann, K., Luong, M.D., Goetz, M. & Jacot-Guillarmod, A., Phytochemistry 14, 499 (1975).
- 80 Kaldas, M., Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 57, 2557 (1974).
- 81 Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 130 (1975).
- 82 Jacot-Guillarmod, A., Luong, M.D. & Hostettmann, K., Helv. 58, 1477 (1975).
- 83 Stefanou, E., Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Phytochemistry 15, 330 (1976).
- 84 Kaldas, M., Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 58, 2188 (1975).
- 85 Luong, M.D., Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. 59, 1294 (1976).
- 86 Goetz, M., Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Phytochemistry 15, 2015 (1976).
- 87 Goetz, M., Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Phytochemistry 15, 2014 (1976).
- 88 Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., Phytochemistry 16, 481 (1977).
- 89 Hostettmann, K., Jacot-Guillarmod, A. & Chari, V.M., Helv. 59, 2592 (1976).

- 90 Marston, A., Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 59, 2596 (1976).
- 91 Goetz, M. & Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 60, 1322 (1977).
- 92 Kaldas, M., Thèse, Université Neuchâtel (1977).
- 93 Luong, M.D. & Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 60, 2099 (1977).
- 94 Goetz, M. & Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 60, 2104 (1977).
- 95 Hostettmann, K. & Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 59, 1584 (1976).
- 96 Hostettmann, K. & Miura, I., *Helv.* 60, 262 (1977).
- 97 Ramos-Morgado, R., *An. Fac. Farm. Porto* 26, 5 (1966).
- 98 Marekov, N., Mollov, N.M., Popov, S. & Kusmanov, B., *C.R. Acad. Bulg. Sci.* 18 (10), 947 (1965).
- Marekov, N., Mollov, N.M. & Popov, S., *C.R. Acad. Bulg. Sci.* 18 (11), 999 (1965).
- Marekov, N., Popov, S. & Georgiev, M., *C.R. Acad. Bulg. Sci.* 19 (9), 827 (1966).
- Marekov, N., Arnandov, M. & Popov, S., *C.R. Acad. Bulg. Sci.* 23 (2), 169 (1970).
- 99 Wagner, H. & Vasirian, K., *Dtsch. Apoth. Ztg.* 114 (33), 1245 (1974).
- 100 Mabry, T.J., Markham, K.R. & Thomas, M.B., "The systematic Identification of Flavonoids" Springer, New York (1970)
- 101 Wessely, F. & Moser, G.M., *Mh. Chem.* 56, 97 (1930).
- 102 Gentili, B. & Horowitz, R.M., *J. Org. Chem.* 33, 1571 (1968).
- 103 Tschesche, R. & Struckmeyer, K., *Chem. Ber.* 109, 2901 (1976).
- 104 Marekov, N. & Popov, S., *Chem. Ind. (London)* 2, 49 (1969).
- 105 Schilling, N., *Phytochemistry* 15, 824 (1976).
- 106 Girard, A., *Compt. Rend.* 73, 426 (1871).
- Plouvier, V., *Compt. Rend.* 253, 3047 (1961).
- Plouvier, V., *Compt. Rend.* 260, 1003 (1965).
- Angyal, S.J., Gilham, P.T. & MacDonald, C.G., *J. Chem. Soc.* 1417 (1957).
- Nishibe, S., Hisada, S. & Inagaki, I., *Phytochemistry* 10, 896 (1971)
- Nishibe, S., Hisada, S. & Inagaki, I., *Phytochemistry* 10, 2543 (1971).

- 107 King, F.E. & Jurd, L., J. Chem. Soc. 1192 (1953).
- 108 Swain, T., Biochem. Journal, 53, 200 (1953).
- 109 Korte, F., Z. Naturf. 9 (b), 354 (1954).
- 110 Swain, T., Bull. Soc. Bot. France 112, 176 (1965).
- 111 Massicot, J., Marthe, J.P. & Heitz, S., Bull. Soc. Chim. France 2712 (1963).
- 112 De Boer, T.J. & Backer, H.L., " Organic syntheses ", IV, 250, John Wiley & Sons, New York (1963).
- 113 Goetz, M. & Jacot-Guillarmod, A., Helv. (à paraître).
- 114 Smith, D.M. & Harborne J.B., Phytochemistry 10, 2117 (1971).
- 115 Glysin, V.I., Ban'Kowski, A.I., Pimenov, M.G. & Borydev, K.I., Khim. Prir. Soedin 9, 434 (1973).