

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1  
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :

N° de série :

## **THESE**

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle (LMD)**

**Spécialité : Chimie pharmaceutique**

**Option : Analyses physicochimiques, contrôle de la qualité et synthèse de  
substances bioactives**

**Par**

**M<sup>me</sup> SFAKSI Nesrine Ep SEMAILI**

**Evaluation de l'effet antioxydant et détermination  
structurale de métabolites secondaires de  
*Volutaria lippii* syn. *Centaurea lippii* (Asteraceae)**

**Devant le jury :**

Pr. MECHHOUD Youcef	Université Frères Mentouri-Constantine 1,	Président
Pr. BENAYACHE Fadila	Université Frères Mentouri-Constantine 1,	Directrice de thèse
		Rapporteuse
MCA. ZAIDI Farouk	Université Ferhat Abbas-Sétif,	Examineur
Pr. KHIRI Naima	Université Frères Mentouri-Constantine 1,	Examinatrice
Pr. TOUIL Ahmed	Université Frères Mentouri-Constantine 1,	Examineur

**Décembre 2022**

## Dédicaces

Je dédie ce travail aux personnes les plus chères à mon cœur

À mes chers parents, Mounira et Abderrahmene

En témoignage de ma gratitude, si grande qu'elle puisse être, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon bien être, leur affection inépuisable leurs précieux conseils et tout le soutien qu'ils m'ont prodigué. Que Dieu, le tout puissant, les préserve et les procure santé et longue vie

À mon cher mari, Abdelmalek SEMAILI,

Qui par sa compréhension m'a donné une grande motivation pour progresser et arriver à l'achèvement de ce travail, sans ses sacrifices je n'en serais pas là.

À mon frère Mahmoud et ma sœur Kaouther,

Pour leur grand amour et leur soutien qu'ils trouvent ici l'expression de ma grande reconnaissance.

À ma joie de vivre, ma chère fille Rousseline

À ma belle-famille, en exception mes beaux-parents Fouzia et Abdelhadi

Aux familles SFAKSI et YAHIA CHERIF

À toutes mes amies et collègues

# Remerciements

Mes remerciements sont d'abord à Dieu de m'avoir donné la force et le courage nécessaire pour mener ce travail à bout.

J'adresse un remerciement tout particulier pour exprimer ma profonde reconnaissance au Pr. **Fadila BENAYACHE** de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, je la remercie pour toute la patience et la disponibilité dont elle a fait preuve à mon égard et particulièrement pour sa gentillesse, son expertise, sa disponibilité, sa constante attention et ses judicieux conseils et remarques constructives qui m'ont permis d'améliorer grandement la qualité de cette thèse.

Mes remerciements les plus chaleureux et les plus sincères vont également au professeur **Sabrina BICHA** qui a pris le temps de suivre mon travail régulièrement et de m'aiguiller à chaque fois que j'en avais besoin, pour ses encouragements, sa gentillesse, ses conseils, son aide précieuse et sa disponibilité. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Je suis très honorée que messieurs **MECHHOUD Youcef**, **TOUIL Ahmed** et madame **KHIRI Naima**, professeurs à l'université Frères Mentouri de Constantine aient accepté de juger ce travail de thèse et de siéger dans le jury de sa soutenance.

Je remercie également monsieur **ZAIDI Farouk**, Maître de conférences à l'université Ferhat Abbas de Sétif, pour son acceptation de juger mon travail et d'être parmi le jury.

Je tiens à remercier vivement le professeur **BENAYACHE Samir**, pour m'avoir accordé un stage dans le cadre de son projet de coopération (Algérie-Italie).

Je remercie très sincèrement la Professeure **Sonia PIACENTE**, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de phytochimie du département de pharmacie de l'université de Salerno, Italie.

Un merci tout spécial à **Alfredo BOTTONE**, je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de mon stage de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de son efficacité certaine. Les remerciements exprimés ici ne seront jamais à la hauteur de son implication dans la réalisation de ce travail.

J'associe à ces remerciements **Milena MASSULO** et **Gilda D'URSO** pour leur disponibilité, leur aide précieuse, leur gentillesse et leur amitié.

Je désire grandement remercier le professeur **Ali BENTAMENE** pour avoir mis à ma disposition la plante étudiée ainsi que monsieur **Khellaf REBBAS** pour avoir réalisé son identification.

Je voudrais également remercier les ingénieurs de notre unité de recherche : monsieur **HAZMOUNE Hichem** et madame **TEBBOUB Naouel** pour leur aide et leur gentillesse.

J'adresse mes plus sincères remerciements, à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
------------------------------------	----------

## **Chapitre I : Aperçu bibliographique**

<b>I. La famille des Astéracées (Asteraceae)</b> .....	<b>4</b>
I.1. Généralités .....	4
I.2. Distribution .....	4
I.3. Taxonomie .....	4
I.4. Utilisations économiques et thérapeutiques .....	6
<b>II. Le genre <i>Centaurea</i></b> .....	<b>6</b>
<b>II.1. Répartition géographique</b> .....	<b>6</b>
<b>II.2. Description et classification botanique</b> .....	<b>7</b>
<b>II.3. Principaux métabolites secondaires</b> .....	<b>9</b>
II.3.1. Les lactones sesquiterpéniques .....	9
II.3.1.1. Les guaianolides .....	9
II.3.1.2. Les germacranolides .....	12
II.3.1.3. Les élémanolides .....	16
II.3.1.4. Les eudesmanolides .....	19
II.3.1.5. Les héliangolides .....	21
II.3.2. Les flavonoïdes .....	24
II.3.2.1. Flavonoïdes aglycones .....	25
II.3.2.2. Flavonoïdes glycosylés.....	28
II.3.3. Les acides phénoliques .....	30
<b>II.4. Etudes antérieures sur <i>Volutaria lippii</i></b> .....	<b>32</b>
<b>II.4. Intérêts thérapeutiques du genre <i>Centaurea</i> et de ses principaux métabolites secondaires</b> .....	<b>33</b>
<b>III. Conclusion</b> .....	<b>34</b>

## **Chapitre II : Travaux personnels**

<b>I. Etude botanique de l'espèce <i>Volutaria lippii</i></b> .....	<b>35</b>
<b>I.1. Place dans la systématique</b> .....	<b>35</b>
<b>I.2. Répartition géographique</b> .....	<b>35</b>
<b>I.3. Description botanique</b> .....	<b>35</b>
<b>I.4. Récolte de la matière végétale</b> .....	<b>36</b>
<b>I.5. Matériels utilisés</b> .....	<b>37</b>

I.5.1. Matériel chromatographique .....	37
I.5.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	37
I.5.1.2. Chromatographie sur colonne (CC).....	37
I.5.1.3. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	37
I.5.1.3.1. CLHP analytique .....	37
I.5.1.3.2. CLHP semi-préparative .....	37
I.5.2. Matériel physico-chimique .....	38
I.5.2.1. Spectrométrie de masse .....	38
I.5.2.2. Spectroscopie RMN.....	38
I.5.2.3. Spectrophotométrie UV-visible.....	38
<b>II. Extraction de la matière végétale .....</b>	<b>38</b>
<b>III. Analyses quantitatives des extraits de <i>Volutaria lippii</i> .....</b>	<b>41</b>
<b>III.1. Dosage des polyphénols totaux .....</b>	<b>41</b>
III.1.1. Principe .....	41
III.1.2. Procédure expérimentale .....	41
III.1.3. Expression des résultats .....	41
<b>III.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....</b>	<b>42</b>
III.2.1. Principe .....	42
III.2.2. Procédure expérimentale .....	42
III.2.3. Expression des résultats .....	42
<b>III.3. Évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce <i>Volutaria lippii</i> .....</b>	<b>42</b>
III.3.1. Matériel végétal .....	43
III.3.2. Matériels et méthodes .....	43
III.3.2.1. Test de l'activité antiradicalaire par la méthode du DPPH' .....	43
III.3.2.1.1. Principe .....	43
III.3.2.1.2. Procédure expérimentale .....	44
III.3.2.2. Test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS <sup>•+</sup> .....	44
III.3.2.2.1. Principe .....	44
III.3.2.2.2. Procédure expérimentale .....	45
III.3.2.3. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène .....	46
III.3.2.3.1. Principe .....	46
III.3.2.3.2. Procédure expérimentale .....	46
III.3.2.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....	46
III.3.2.4.1. Principe .....	46

III.3.2.4.2. Procédure expérimentale .....	47
<b>IV. Expression des résultats des analyses quantitatives des extraits de <i>Volutaria lippii</i> ..</b>	<b>47</b>
IV.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux .....	48
IV.2. Résultats du dosage des flavonoïdes totaux .....	48
IV.3. Résultats du test de l'activité antiradicalaire par la méthode au radical DPPH .....	49
IV.4. Résultats du test de l'activité antiradicalaire antiradicalaire à l'ABTS <sup>•+</sup> .....	50
IV.5. Résultats du test de blanchiment du $\beta$ -carotène .....	51
IV.6. Résultats du test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC).....	52
<b>V. Etude phytochimique des extraits .....</b>	<b>54</b>
<b>V.1. L'extrait acétate d'éthyle .....</b>	<b>54</b>
V.1.1 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Volutaria lippii</i> .....	54
V.1.2 Séparation et purification des fractions issues de l'extrait acétate d'éthyle.....	56
V.1.2.1. Par CLHP semi-préparative à détecteur UV.....	56
V.1.2.1.1. Etude de la fraction FA5.....	56
V.1.2.1.2. Etude de la fraction FA12.....	57
V.1.2.2. Par chromatographie sur couche mince .....	59
V.1.2.2.1. Etude de la fraction FA11 .....	59
<b>V.2. L'extrait <i>n</i>-butanol.....</b>	<b>60</b>
V.2.1. Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Volutaria lippii</i> .....	60
V.2.2. Séparation et purification des fractions issues de l'extrait <i>n</i> -butanol .....	62
V.2.2.1. Par CLHP semi-préparative à détecteur UV .....	62
V.2.2.1.1. Etude de la fraction FB2.....	62
V.2.2.1.2. Etude de la fraction FB5.....	64
V.2.2.1.3. Etude de la fraction FB8.....	65
V.2.2.2. Par CLHP semi-préparative à détecteur d'indice de réfraction (RI).....	67
V.2.2.2.1. Etude de la fraction FB4.....	67
V.2.2.2.2. Etude de la fraction FB13.....	68
V.2.2.2.3. Etude de la fraction FB17 .....	70
<b>V.3. L'extrait chloroforme .....</b>	<b>72</b>
V.3.1 Fractionnement de l'extrait chloroforme de <i>Volutaria lippii</i> .....	72
<b>VI. Conclusion .....</b>	<b>74</b>

## Chapitre III : Résultats et discussions

<b>I. Résultats de l'étude phytochimique</b> .....	<b>75</b>
<b>II. Détermination structurale des composés isolés</b> .....	<b>75</b>
II.1. Détermination structurale du composé <b>B-1</b> .....	<b>75</b>
II.2. Détermination structurale du composé <b>B-2</b> .....	<b>91</b>
II.3. Détermination structurale du composé <b>A-3</b> .....	<b>95</b>
II.4. Détermination structurale du composé <b>A-4</b> .....	<b>107</b>
II.5. Détermination structurale du composé <b>B-5</b> .....	<b>114</b>
II.6. Détermination structurale du composé <b>B-6</b> .....	<b>121</b>
II.7. Détermination structurale du composé <b>B-7</b> .....	<b>127</b>
II.8. Détermination structurale du composé <b>B-8</b> .....	<b>139</b>
II.10. Détermination structurale du composé <b>B-9</b> .....	<b>148</b>
II.10. Détermination structurale du composé <b>A-10</b> .....	<b>155</b>
II.11. Détermination structurale du composé <b>B-11</b> .....	<b>158</b>
II.12. Détermination structurale du composé <b>A-12</b> .....	<b>164</b>
II.13. Détermination structurale du composé <b>A-13</b> .....	<b>167</b>
II.14. Détermination structurale du composé <b>B-14</b> .....	<b>170</b>
II.15. Conclusion .....	<b>176</b>
Conclusion générale .....	<b>177</b>
Références bibliographiques .....	<b>179</b>
<b>Résumés</b>	

# Liste des figures

## Chapitre I : Aperçu bibliographique

<b>Figure I.1.</b> Quelques espèces du genre <i>Centaurea</i> .....	8
<b>Figure I.2.</b> Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type guaianolide .....	10
<b>Figure I.3.</b> Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type guaianolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	12
<b>Figure I.4.</b> Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type germacranolide .....	12
<b>Figure I.5.</b> Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type germacranolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	15
<b>Figure I.6.</b> Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type élémanolide .....	16
<b>Figure I.7.</b> Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type élémanolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	18
<b>Figure I.8.</b> Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type eudesmanolide .....	19
<b>Figure I.9.</b> Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type eudesmanolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	21
<b>Figure I.10.</b> Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type héliangolide .....	22
<b>Figure I.11.</b> Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type héliangolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	24
<b>Figure I.12.</b> Squelette de base des flavonoïdes .....	24
<b>Figure I.13.</b> Quelques structures d'acides phénoliques isolés du genre <i>Centaurea</i> .....	32

## Chapitre II : Travaux personnels

<b>Figure II.1.</b> L'espèce <i>Volutaria lippii</i> .....	36
<b>Figure II.2.</b> Organigramme d'extraction des parties aériennes de <i>Volutaria lippii</i> .....	40
<b>Figure II.3.</b> Réaction du radical DPPH avec un phénol .....	43
<b>Figure II.4.</b> Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de l'ABTS <sup>•+</sup> .....	45
<b>Figure II.5.</b> La réduction du complexe Cu <sup>+2</sup> -Nc .....	47
<b>Figure II.6.</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique .....	48
<b>Figure II.7.</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	49
<b>Figure II.8.</b> Courbes représentatives des pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanol et les standards en fonction de la concentration .....	50
<b>Figure II.9.</b> Courbes de pourcentage d'inhibition de l'ABTS <sup>•+</sup> par les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanol de <i>Volutaria lippii</i> .....	51



<b>Figure II.10.</b> Courbes de pourcentage d'inhibition du $\beta$ -carotène par les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanol de <i>Volutaria lippii</i> .....	<b>52</b>
<b>Figure II.11.</b> Courbes d'absorbance des différents extraits de <i>Volutaria lippii</i> et des standards en fonction de leurs concentrations dans le test CUPRAC .....	<b>53</b>
<b>Figure II.12.</b> Plaques CCM des fractions de l'extrait acétate d'éthyle .....	<b>56</b>
<b>Figure II.13.</b> Chromatogramme d'analyse et de séparation de la fraction <b>FA5</b> .....	<b>57</b>
<b>Figure II.14.</b> Chromatogramme d'analyse et de séparation de la fraction <b>FA12</b> .....	<b>58</b>
<b>Figure II.15.</b> Plaque CCM du produit <b>A-4</b> .....	<b>59</b>
<b>Figure II.16.</b> Organigramme récapitulatif des étapes de séparation et purification de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Volutaria lippii</i> .....	<b>60</b>
<b>Figure II.17.</b> Plaques CCM des fractions de l'extrait <i>n</i> -butanol .....	<b>62</b>
<b>Figure II.18.</b> Chromatogramme d'analyse et de séparation de la fraction <b>FB2</b> .....	<b>63</b>
<b>Figure II.19.</b> Chromatogramme d'analyse et de séparation de la fraction <b>FB5</b> .....	<b>65</b>
<b>Figure II.20.</b> Chromatogramme d'analyse et de séparation de la fraction <b>FB8</b> .....	<b>66</b>
<b>Figure II.21.</b> Chromatogramme de séparation de la fraction <b>FB4</b> .....	<b>67</b>
<b>Figure II.22.</b> Plaques CCM des sous-fractions de <b>FB13</b> révélée à l'acide sulfurique .....	<b>69</b>
<b>Figure II.23.</b> Chromatogramme de la sous-fraction <b>FB13-7</b> .....	<b>69</b>
<b>Figure II.24.</b> Chromatogramme de la fraction <b>FB17</b> .....	<b>70</b>
<b>Figure II.25.</b> Organigramme récapitulatif des étapes de séparation et purification de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Volutaria lippii</i> .....	<b>71</b>

### **Chapitre III : Résultats et discussions**

<b>Figure III.1.</b> Spectre de masse ESI-MS (-) du composé <b>B-1</b> .....	<b>75</b>
<b>Figure III.2.</b> Etalement du spectre de masse ESI-MS (-) du composé <b>B-1</b> .....	<b>76</b>
<b>Figure III.3.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>76</b>
<b>Figure III.4.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>77</b>
<b>Figure III.5.</b> Etalement du Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>78</b>
<b>Figure III.6.</b> Etalement du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>79</b>
<b>Figure III.7.</b> Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>79</b>
<b>Figure III.8.</b> Groupement <i>O</i> -(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside) présent dans le composé <b>B-1</b> .....	<b>80</b>
<b>Figure III.9.</b> Etalements du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>80</b>
<b>Figure III.10.</b> Etalements du Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>81</b>
<b>Figure III.11.</b> Etalements du Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>82</b>

<b>Figure III.12.</b> Corrélations HMBC et HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> (Lactone fermée en C-6).....	<b>83</b>
<b>Figure III.13.</b> Corrélations HMBC et HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> (Lactone fermée en C-8).....	<b>83</b>
<b>Figure III.14.</b> Etalement du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>84</b>
<b>Figure III.15.</b> Etalement du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>85</b>
<b>Figure III.16.</b> Principaux types de squelettes de lactones sesquiterpéniques ici 12,6-lactonisées ..	<b>86</b>
<b>Figure III.17.</b> Etalement du Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>87</b>
<b>Figure III.18.</b> Etalements du Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-1</b> .....	<b>88</b>
<b>Figure III.19.</b> Structure partielle du composé <b>B-1</b> .....	<b>88</b>
<b>Figure III.20.</b> Structure du composé <b>B-1</b> : <b>3β-hydroxy-11β,13-dihydrodehydrocostuslactone 8α-O-(6'-acetyl-β-D-glucopyranoside</b> .....	<b>89</b>
<b>Figure III.21.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-2</b> .....	<b>91</b>
<b>Figure III.22.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-2</b> .....	<b>92</b>
<b>Figure III.23.</b> Etalement du Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-2</b> .....	<b>93</b>
<b>Figure III.24.</b> Etalement du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-2</b> .....	<b>93</b>
<b>Figure III.25.</b> Structure du composé <b>B-2</b> : <b>3β-hydroxy-11β,13-dihydrodehydrocostuslactone 8α-O-β-D-glucopyranoside</b> .....	<b>94</b>
<b>Figure III.26.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>96</b>
<b>Figure III.27.</b> Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>97</b>
<b>Figure III.28.</b> Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>97</b>
<b>Figure III.29.</b> Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>98</b>
<b>Figure III.30.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>99</b>
<b>Figure III.31.</b> Etalement du spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>99</b>
<b>Figure III.32.</b> Etalement du spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>100</b>
<b>Figure III.33.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>101</b>
<b>Figure III.34.</b> Etalements du spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>102</b>
<b>Figure III.35.</b> Etalement du spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>102</b>
<b>Figure III.36.</b> Etalement du spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>103</b>
<b>Figure III.37.</b> Etalement du spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-3</b> .....	<b>104</b>
<b>Figure III.38.</b> Structure partielle du composé <b>A-3</b> .....	<b>104</b>
<b>Figure III.39.</b> Structure du composé <b>A-3</b> : <b>11β,13-dihydrodeacylcynaropicrine</b> .....	<b>105</b>
<b>Figure III.40.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> .....	<b>107</b>
<b>Figure III.41.</b> Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> .....	<b>108</b>

<b>Figure III.42.</b> Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> .....	<b>108</b>
<b>Figure III.43.</b> Spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> .....	<b>109</b>
<b>Figure III.44.</b> Etalements du spectre RMN <sup>1</sup> H, HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> ...	<b>109</b>
<b>Figure III.45.</b> Etalement du spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> .....	<b>110</b>
<b>Figure III.46.</b> Etalement des spectres RMN <sup>1</sup> H, HSQC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> .	<b>111</b>
<b>Figure III.47.</b> Etalement du spectre HMBC (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> .....	<b>112</b>
<b>Figure III.48.</b> Etalement du spectre COSY (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-4</b> .....	<b>112</b>
<b>Figure III.49.</b> Structure du composé <b>A-4</b> : <b>Desacylcynaropicrine</b> .....	<b>113</b>
<b>Figure III.50.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-5</b> .....	<b>115</b>
<b>Figure III.51.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-5</b> .....	<b>115</b>
<b>Figure III.52.</b> Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-5</b> .....	<b>116</b>
<b>Figure III.53.</b> Groupement hydroxyméthylacrylate présent dans le composé <b>B-5</b> .....	<b>117</b>
<b>Figure III.54.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-5</b> .....	<b>118</b>
<b>Figure III.55.</b> Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-5</b> .....	<b>118</b>
<b>Figure III.56.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-5</b> .....	<b>119</b>
<b>Figure III.57.</b> Structure du composé <b>B-5</b> : <b>cynaripicrine</b> .....	<b>119</b>
<b>Figure III.58.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-6</b> .....	<b>121</b>
<b>Figure III.59.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-6</b> .....	<b>122</b>
<b>Figure III.60.</b> Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-6</b> .....	<b>122</b>
<b>Figure III.61.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-6</b> .....	<b>124</b>
<b>Figure III.62.</b> Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-6</b> .....	<b>124</b>
<b>Figure III.63.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-6</b> .....	<b>125</b>
<b>Figure III.64.</b> Structure du composé <b>B-6</b> : <b>Deacylcynaropicrine 8-O-[(S)-3-hydroxy-2-méthylpropionate</b> .....	<b>125</b>
<b>Figure III.65.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>127</b>
<b>Figure III.66.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>128</b>
<b>Figure III.67.</b> Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>128</b>
<b>Figure III.68.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>129</b>
<b>Figure III.69.</b> Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>130</b>
<b>Figure III.70.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>131</b>
<b>Figure III.71.</b> Entité 1 présente dans le composé <b>B-7</b> .....	<b>131</b>
<b>Figure III.72.</b> Etalements du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>132</b>
<b>Figure III.73.</b> Etalements du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>133</b>
<b>Figure III.74.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	<b>133</b>

<b>Figure III.75.</b> Structure partielle du composé <b>B-7</b> .....	134
<b>Figure III.76.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	135
<b>Figure III.77.</b> Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	135
<b>Figure III.78.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-7</b> .....	136
<b>Figure III.79.</b> Structure plane du composé <b>B-7</b> .....	137
<b>Figure III.80.</b> Structure du composé <b>B-7</b> : <b>(6R, 9R)-3-oxo-<math>\alpha</math>-ionol-<math>\beta</math>-D-glucopyranoside</b> ....	137
<b>Figure III.81.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	140
<b>Figure III.82.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	140
<b>Figure III.83.</b> Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	141
<b>Figure III.84.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	142
<b>Figure III.85.</b> Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	143
<b>Figure III.86.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	144
<b>Figure III.87.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	145
<b>Figure III.88.</b> Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	146
<b>Figure III.89.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-8</b> .....	146
<b>Figure III.90.</b> Structure finale du composé <b>B-8</b> : <b>lippianoside E</b> .....	147
<b>Figure III.91.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-9</b> .....	149
<b>Figure III.92.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-9</b> .....	150
<b>Figure III.93.</b> Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-9</b> .....	150
<b>Figure III.94.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-9</b> .....	151
<b>Figure III.95.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-9</b> .....	152
<b>Figure III.96.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-9</b> .....	153
<b>Figure III.97.</b> Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-9</b> .....	153
<b>Figure III.98.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-9</b> .....	154
<b>Figure III.99.</b> Structure finale du composé <b>B-9</b> : <b>(Z)-3-hexenyl-O-<math>\beta</math>-D-glucopyranoside</b> .....	154
<b>Figure III.100.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-10</b> .....	156
<b>Figure III.101.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-10</b> .....	157
<b>Figure III.102.</b> Structure du composé <b>A-10</b> : <b>lutéoline</b> .....	158
<b>Figure III.103.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-11</b> .....	160
<b>Figure III.104.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-11</b> .....	160
<b>Figure III.105.</b> Série spectrale UV du composé <b>B-11</b> .....	162
<b>Figure III.106.</b> Structure du composé <b>B-11</b> : <b>apigénine -7-O-<math>\beta</math>- glucopyranoside</b> .....	163
<b>Figure III.107.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-12</b> .....	165
<b>Figure III.108.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-12</b> .....	166

<b>Figure III.109.</b> Structure du composé <b>A-12 : acide férulique</b> .....	<b>166</b>
<b>Figure III.110.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-13</b> .....	<b>168</b>
<b>Figure III.111.</b> Etalement du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>A-13</b> .....	<b>169</b>
<b>Figure III.112.</b> Structure du composé <b>A-13 : acide caféique</b> .....	<b>169</b>
<b>Figure III.113.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-14</b> .....	<b>171</b>
<b>Figure III.114.</b> Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-14</b> .....	<b>172</b>
<b>Figure III.115.</b> Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-14</b> .....	<b>172</b>
<b>Figure III.116.</b> Etalements du spectre RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-14</b> .....	<b>173</b>
<b>Figure III.117.</b> Etalements du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-14</b> .....	<b>174</b>
<b>Figure III.118.</b> Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-14</b> .....	<b>174</b>
<b>Figure III.119.</b> Corrélations HMBC H vers C (MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ) du composé <b>B-14</b> .....	<b>175</b>
<b>Figure III.120.</b> Structure finale du composé <b>B-14 : phenyl-methyl-O- β-D-Glucopyranoside</b> ...	<b>176</b>

# Liste des tableaux

## Chapitre I : Aperçu bibliographique

<b>Tableau I.1.</b> Localisation de quelques espèces du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>6</b>
<b>Tableau I.2.</b> Quelques lactones sesquiterpéniques de type guaianolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>10</b>
<b>Tableau I.3.</b> Quelques lactones sesquiterpéniques de type germacranolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>13</b>
<b>Tableau I.4.</b> Quelques lactones sesquiterpéniques de type élémanolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>17</b>
<b>Tableau I.5.</b> Quelques lactones sesquiterpéniques de type eudesmanolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>20</b>
<b>Tableau I.6.</b> Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type héliangolide isolées du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>22</b>
<b>Tableau I.7.</b> Quelques flavonoïdes du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>25</b>
<b>Tableau I.8.</b> Les structures des flavonoïdes de <b>67</b> à <b>87</b> .....	<b>27</b>
<b>Tableau I.9.</b> Quelques flavonoïdes glycosylés du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>28</b>
<b>Tableau I.10.</b> Les structures des flavonoïdes de <b>88</b> à <b>111</b> .....	<b>29</b>
<b>Tableau I.11.</b> Quelques structures d'acides phénoliques isolés du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>31</b>
<b>Tableau I.12.</b> Quelques molécules bioactives du genre <i>Centaurea</i> .....	<b>34</b>

## Chapitre II : Travaux personnels

<b>Tableau II.1.</b> Masses et rendements des extraits de <i>Volutaria lippii</i> .....	<b>39</b>
<b>Tableau II.2.</b> Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits de <i>Volutaria lippii</i> ..	<b>49</b>
<b>Tableau II.3.</b> Valeurs $CI_{50}$ et $A_{0,50}$ des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanol de <i>Volutaria lippii</i> dans les tests DPPH, ABTS <sup>+</sup> , $\beta$ -carotène et CUPRAC .....	<b>53</b>
<b>Tableau II.4.</b> Résultats du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Volutaria lippii</i> ..	<b>55</b>
<b>Tableau II.5.</b> Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction <b>FA5</b> .....	<b>56</b>
<b>Tableau II.6.</b> Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction <b>FA12</b> .....	<b>58</b>
<b>Tableau II.7.</b> Résultats du fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Volutaria lippii</i> .....	<b>61</b>
<b>Tableau II.8.</b> Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction <b>FB2</b> .....	<b>63</b>
<b>Tableau II.9.</b> Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction <b>FB5</b> .....	<b>64</b>
<b>Tableau II.10.</b> Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction <b>FB8</b> .....	<b>66</b>
<b>Tableau II.11.</b> Résultats de la séparation par CC de la fraction <b>FB13</b> .....	<b>68</b>
<b>Tableau II.12.</b> Résultats du fractionnement de l'extrait chloroforme de <i>Volutaria lippii</i> .....	<b>72</b>

### Chapitre III : Résultats et discussions

<b>Tableau III.1.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>B-1</b> .....	<b>90</b>
<b>Tableau III.2.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>B-2</b> .....	<b>94</b>
<b>Tableau III.3.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>A-3</b> ...	<b>106</b>
<b>Tableau III.4.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>A-4</b> ...	<b>113</b>
<b>Tableau III.5.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>B-5</b> ....	<b>120</b>
<b>Tableau III.6.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>B-6</b> ....	<b>126</b>
<b>Tableau III.7.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>B-7</b> ....	<b>138</b>
<b>Tableau III.8.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>B-8</b> ....	<b>147</b>
<b>Tableau III.9.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>B-9</b> ....	<b>155</b>
<b>Tableau III.10.</b> Données relatives au spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>A-10</b> .....	<b>158</b>
<b>Tableau III.11.</b> Données de la série UV-Vis du composé <b>B-11</b> .....	<b>163</b>
<b>Tableau III.12.</b> Données relatives au spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>B-11</b> .....	<b>164</b>
<b>Tableau III.13.</b> Données relatives au spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>A-12</b> .....	<b>167</b>
<b>Tableau III.14.</b> Données relatives au spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>A-13</b> .....	<b>170</b>
<b>Tableau III.15.</b> Données relatives aux spectres RMN $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé <b>B-14</b>	<b>175</b>

# Liste des abréviations

## Solvants et réactifs

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium

**BuOH** : Butanol

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**MeOH** : Méthanol

**MeOH-*d*<sub>4</sub>** : Méthanol deutéré

## Techniques de chromatographie

**CC** : Chromatographie sur Colonne

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**CLHP** : Chromatographie Liquide Haute Performance

## Détermination structurale

**COSY** : Correlated spectroscopy

**d** : doublet

**dd** : doublet de doublets

**dt** : doublet de triplets

**dl** : doublet large

**Glc** : Glucose

**Hz** : Hertz

**HMBC** : Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Connectivity

**J** : constante de couplage

**m** : multiplet

**m/z** : masse/charge d'un ion

**ppm** : partie par million

**q** : quadruplet

**IR** : Indice de réfraction

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RMN <sup>1</sup>H** : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

**RMN <sup>13</sup>C** : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13



**s** : Singulet

**sl** : Singulet large

**t** : Triplet

**t<sub>R</sub>** : Temps de rétention

**UV-Vis** : Ultraviolet-Visible

**δ<sub>C</sub>** : déplacement chimique du carbone

**δ<sub>H</sub>** : déplacement chimique du proton

**λ** : Longueur d'onde

### **Activités biologiques**

**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%

**DPPH<sup>•</sup>** : Radical 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl

**BHA** : Butyl Hydroxy Anisole

**BHT** : Butyl Hydroxy Toluene

**CUPRAC** : Cupric reducing antioxidant capacity

**ABTS<sup>•+</sup>** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3 ethylbenzothiazoline-6- sulfonique

**μg EQ/mg d'extrait** : Microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait sec

**μg EAG/mg d'extrait** : Microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait sec

# **Introduction**

## **générale**

## Introduction générale

Depuis des millénaires, les hommes ont toujours exploité les plantes comme une des sources les plus importantes d'agents thérapeutiques. Les documents les plus anciens ont été reportés il y a 2600 années avant J-C indiquant l'utilisation en Mésopotamie de 1000 préparations médicales à base de plantes.

En 1862, Edwin Smith découvrit le papyrus d'Ebers à Louxor (Egypte) datant de 1550 ans avant J-C. Ce papyrus contient plus de 700 formules et remèdes à base de plantes, montrant l'importance de la médecine traditionnelle en Egypte antique (Anton 1999). Pedanius Discoride, un médecin grec a écrit l'ouvrage référence « *Materia Medica* » répertoriant en 800 chapitres, plus de 600 végétaux, 35 animaux ainsi que 90 minéraux utilisés par les Grecs, les Romains et d'autres populations d'Asie, d'Egypte ou encore de Syrie. Ce n'est que 1500 ans plus tard que Pierandrea Mattioli, médecin et botaniste italien compléta et enrichit le manuscrit.

Depuis, les plantes médicinales ont été un des moyens de se soigner. Ces dernières forment la base de systèmes de médecines traditionnelles très sophistiqués aussi bien en Asie (Médecine traditionnelle Chinoise, médecine Ayurvédique en Inde) qu'en Afrique. Les plantes sont la source de nombreux traitements pharmaceutiques, et elles n'ont pas fini de fournir de nouvelles molécules thérapeutiques.

Actuellement, seulement 10% des 400 000 espèces végétales recensées ont été étudiées sur le plan phytochimique et pharmacologique (Gurib-Fakim 2008). Or les plantes peuvent contenir jusqu'à plusieurs milliers de molécules et recèlent donc un potentiel thérapeutique énorme. En Afrique Noire, 80% de la population utilisent encore de nos jours la médecine traditionnelle pour des soins d'ordre primaire (Farombi 2003). Au Mali des tradithérapeutes, formés de génération en génération, sont présents dans tous les villages et soignent les patients des plantes de la brousse. Cependant comme le dit le dicton d'Amadou Hampâté Bâ écrivain et ethnologue Malien : « En Afrique, quand un vieillard meurt, c'est une bibliothèque qui brûle ». Il est donc important de préserver ce savoir et d'établir l'efficacité potentielle des traitements traditionnels. Ceci passe par la vérification des pratiques ancestrales basées sur des observations empiriques par des tests biologiques. La nature

demeure encore à ce jour probablement notre plus grande source d'inspiration et la découverte de nouvelles molécules d'intérêts extraites de plantes est toujours possible.

Ces dernières années, les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans de nombreux domaines. En effet, avec un public de plus en plus réticent à consommer des produits contenant des molécules issus de la synthèse chimique, un certain nombre de secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules d'origine naturelle, aux caractéristiques chimiques et biologiques originales, dans leurs formulations. La valorisation de ces principes actifs d'origine naturelle représente donc un potentiel économique énorme.

En Algérie, le traitement par les plantes médicinales fait partie intégrante de la culture locale (Nouara et al. 2016), il constitue la plus importante et parfois la seule source thérapeutique pour près de 50% des humains et plus de 70% des peuples ruraux (Hammadi et al. 2015). De par sa situation géographique et sa diversité climatique, l'Algérie est l'un des plus riches pays arabes avec 3164 espèces végétales (Nouara et al.2016), (Vasisht and Kumar. 2004). Cette grande biodiversité floristique a contribué au développement de la recherche scientifique en Algérie, dans plusieurs domaines tels que : l'ethnomédecine, la pharmacopée traditionnelle et la valorisation des substances naturelles.

C'est dans cet esprit que notre unité de recherche VARENBIOMOL a établi un programme sur les plantes médicinales algériennes. Ce travail de thèse a pour objectif de réaliser l'investigation chimique et l'évaluation biologique d'une espèce de la flore algérienne de la famille Asteraceae.

Les travaux reportés dans ce manuscrit sont présentés dans trois chapitres essentiels :

- Le premier chapitre renferme une synthèse bibliographique consacrée à la famille Asteraceae et les principaux métabolites secondaires isolés du genre *Centaurea*.
- Le deuxième chapitre est consacré à la présentation de nos travaux personnels en commençant par les travaux expérimentaux pour l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de notre espèce; ensuite le matériel et les méthodes utilisées pour l'extraction, l'isolement et la purification des métabolites secondaires de l'espèce *Volutaria lippi* syn. *Centaurea lippii*.

- Le troisième chapitre représente les résultats obtenus ainsi que les discussions liées à la détermination structurale des différents métabolites secondaires isolés, basée sur diverses expériences de résonance magnétique nucléaire ( $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC, COSY) et de spectrométrie de masse en mode d'ionisation electrospray négatif [ESI-MS (-)].

Nous finissons par une conclusion générale reportant les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives que ce travail a permis d'entrevoir.

# **CHAPITRE I**

## **Aperçu bibliographique**

## I. La famille des Astéracées (Asteraceae)

### I.1. Généralités

L'ordre Astérale regroupe des plantes dicotylédones et inclut environ 11 familles, dont la plus grande est la famille Asteraceae avec près de 23000 espèces, arrive ensuite la famille Campanulaceae avec environ 2000 espèces, les familles restantes comptent ensemble pour moins de 500 espèces.

Les Astéracées, également appelées Composées, tirent leur nom du terme grec « aster » qui signifie « étoile » en référence à la forme de leurs fleurs. Les marguerites, les pâquerettes, les tournesols en font partie. Avec la famille des Orchidées, elle représente une des plus grandes familles de plantes, avec près de 1500 genres et plus de 23000 espèces décrites (Gaussen and Leroy 1982 ; Guignard 1994). Ses plus grands genres sont *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (600 espèces). D'après Quezel et Santa, en Algérie il en existe 109 genres et 408 espèces (Quezel and Santa 1963).

### I.2. Distribution

Les Astéracées ont une distribution mondiale, on les trouve partout sauf en Antarctique. Elles sont surtout nombreuses dans les régions tropicales et subtropicales (l'Amérique centrale notamment, le Brésil de l'est, les Andes, l'Afrique méditerranéenne, l'Asie centrale et le sud-ouest de la Chine) (Dorni et al. 2017).

### I.3. Taxonomie

Selon Engler, les Astéracées appartiennent à l'ordre des Campanulales. Pour Cronquist, cette même famille est rattachée au superordre des Asteridées et l'ordre des Astrales. Dahlgren classe la famille Asteraceae dans le super ordre des Asteriflorées et l'ordre des Astrales. Thome a élaboré une classification selon laquelle les Astéracées se trouvent dans le superordre des Asteranées et l'ordre des Astrales (Spichiger et al. 2004). L'arbre phylogénétique présenté ci-dessous a été proposé par Panero et Funk (2002) (Panero and Funk 2002).

- Les Astéroïdées, avec 1130 genres et 16200 espèces distribués dans le monde entier ; forment l'essentiel des Astéracées. Ce groupe diversifié caractérisé par ses capitules «radiés», comportant au centre, des fleurs tubulées généralement jaunes et à la périphérie des fleurs ligulées terminées par 3 dents, blanches comme chez la marguerite. Dans ce groupe on inclut aussi des espèces ayant perdu secondairement leurs fleurs ligulées comme les Armoises

- Les Cichorioïdées, avec 224 genres et 3200 espèces distribués dans le monde entier; correspondent à des Astéracées à latex, dont le nom est évoqué dans les espèces comme Lactuca, Laitue, Laiteron. Les capitules ne portent que des fleurs ligulées terminées par 5 dents, formant une languette typiquement jaune, parfois bleue.
- Les Carduoïdeae (Carduoïdés) avec 83 genres et 2500 espèces, distribués dans le monde entier ; possèdent des fleurs typiquement roses, bleues ou pourpres, toutes en tube, comme celles du capitule du Bleuet. Les chardons, les cirses et beaucoup d'Astéracées épineuses méditerranéennes se trouvent dans cette sous-famille.
- Les Branadesioïdeae avec 9 genres, 93 espèces poussent en Amérique du sud, principalement les Andes et les Mutisioïdeae 58 genres, 750 espèces sont des arbustes ou des plantes herbacées poussant principalement en Amérique du Sud. Il s'agit de formes archaïques d'astéracées, dont les fleurs sont à corolle zygomorphe bilabée (Dupont and Guignard 2012).
- Wunderlichioïdeae : 8 genres, 24 espèces poussent surtout au Venezuela et en Guyane
- Pertyoïdeae : 5 ou 6 genres et 70 espèces.
- Gochnatioïdeae : 4 ou 5 genres et 90 espèces.
- Hecastocleïdoïdeae : un seul genre avec une seule espèce, *Hecastocleis shockleyi*, elle pousse au Sud-Ouest des États-Unis
- Gymnarrhenoïdeae : un seul genre avec une seule espèce, *Gymnarrhena micrantha*, elle pousse en Afrique du nord.
- Corymbioïdeae : seulement le genre *Corymbium* avec 7 espèces.
- Stifftioïdeae : Elles poussent en Amérique du sud et en Asie.
- Asteroïdeae (Astéroïdes) : 1130 genres et 16200 espèces. Elles sont divisées en plusieurs tribus dont les plus importantes sont : les Anthemioïdeae (Anthémioïdés), les Astereae (Astérées), les Senecioneae (Sénécionées) et les Heliantheae (Hélianthées) (Dupont and Guignard 2012). Il est à remarquer que les quatre sous-familles Asteroïdeae, Cichorioïdeae, Carduoïdeae et Mutisioïdeae renferment environ 98 % de la diversité spécifique de la famille Asteraceae entière (environ 70 %, 14 %, 11 % et 3 %, respectivement).

#### I.4. Utilisations économiques et thérapeutiques

Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires : La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis,



de la chicorée, de l'estragon et du tournesol. De nombreuses autres espèces ont une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster. Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie : l'Arnica (*Arnica montana* L.), la camomille (*Matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.), le pied de chat (*Antennaria dioica* L. Gaertn), le tussilage (*Tussilago farfara* L.). Certaines espèces comme le genre *Pyrethrum* fournissent un insecticide, d'autres (genre *Artemisia*) sont utilisées comme plantes médicinales et dans la fabrication de liqueurs comme l'absinthe ou le génépi (Gaussen and Leroy 1982).

## II. Le genre *Centaurea*

### II.1. Répartition géographique

Le genre *Centaurea* (tribu Cynareae) est l'un des genres les plus répandus dans le monde, il compte environ 700 espèces, distribuées aussi bien sur le territoire algérien qu'en Europe méridionale, dans le bassin méditerranéen, à l'ouest de l'Asie, en Australie et sur le continent Américain (Mabberley 1987). En Algérie, ce genre est représenté par 45 espèces dont 7 se localisent au sud (Quezel and Santa 1963). Le tableau I.1 résume la localisation de quelques espèces du genre *Centaurea*.

**Tableau I.1.** Localisation de quelques espèces du genre *Centaurea*

Localisation	Espèces
Région méditerranéenne	<i>C. calcitrapa</i> , <i>C. hololeuca</i>
Afrique du nord	<i>C. chamaerhaponticum</i> , <i>C. pullata</i>
Toute l'Europe	<i>C. maroccana</i> , <i>C. ptosimopappa</i>
Saharienne	<i>C. ruthenica</i> , <i>C. tougourensis</i>
Europe de l'Est	<i>C. solstitialis</i> , <i>C. diffusa</i>
Algérie	<i>C. pubescens</i> , <i>C. musimonum</i>

Assez proche du genre *Centaurea*, le genre *Volutaria* Cass., tribu des Cardueae, sous-tribu des Centaureinae de la famille des Astéracées, comprend dix-huit espèces poussant dans les zones semi-arides à arides de la région méditerranéenne et irano-turaniennne de l'Arabie et l'Iran au Maroc (Kadereit et Jeffrey, 2007). En Algérie, il existe cinq espèces de *Volutaria* réparties dans la région sud, dont deux sont endémiques au Sahara, on note : *Volutaria muricata*, *Volutaria crupinoides*, *Volutaria leucantha*, *Volutaria saharae* et *Volutaria lippii* (Quezel et Santa 1963)

## II.2. Description et classification botanique

Les centaurées sont, comme pour l'ensemble des composées, des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternes, leurs fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule, entourées d'un involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubulées, celles de la périphérie (fréquemment stériles) s'ouvrent beaucoup en cinq lobes. Leur couleur fluctue le plus fréquemment entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes. L'involucre se compose de bractées inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus habituel) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Le réceptacle plan ou sub-plan est garni de soies abondantes. Les fruits sont des akènes longs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non, portant une aigrette assez courte, simple ou double, persistante ou caduque (Quezel and Santa 1963). La figure suivante représente quelques espèces de ce genre.



**Figure I.1.** Quelques espèces du genre *Centaurea*  
(<https://www.gardenersworld.com/plants/centaurea-cyanus/>)

Le genre *Centaurea* appartient à la classification suivante :

- **Règne** : Plantes
- **Sous règne** : Plantes vasculaires
- **Embranchement** : Phanérogames
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Sous classe** : Astéride
- **Ordre** : Astérales
- **Famille** : Astéracées
- **Genre** : *Centaurea*

### II.3. Principaux métabolites secondaires

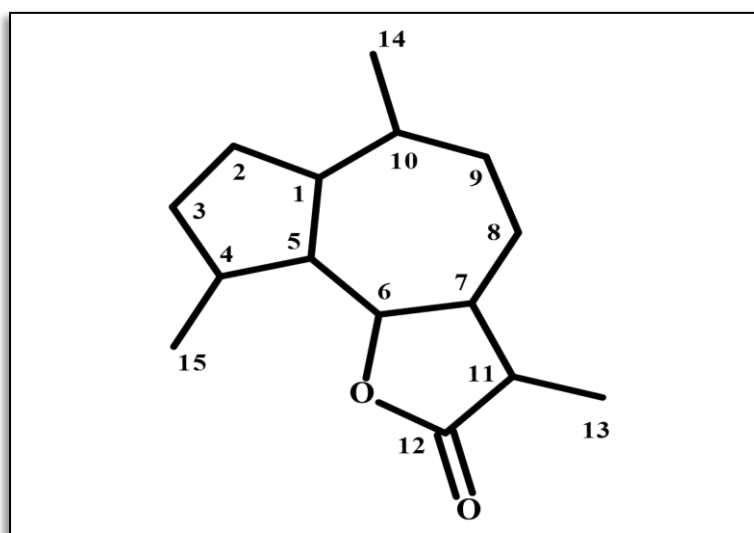
De nombreuses études phytochimiques sur des espèces du genre *Centaurea* ont révélé la richesse de ces dernières en métabolites secondaires tels que les stéroïdes (stérols) (Flamini et al. 2001, 2002, 2004), les composés phénoliques, quelques alcaloïdes (Shoeb et al. 2006<sup>b</sup> ; Seghiri et al. 2006 ; Akkal et al. 2007 ; Bentamène et al. 2007) et les lactones sesquiterpéniques ainsi que les flavonoïdes qui sont les principaux métabolites secondaires de ces espèces (Medjroubi et al. 2005 ; Seghiri et al. 2006 ; Ayad et al. 2012 ; Aliouche et al. 2020).

#### II.3.1. Les lactones sesquiterpéniques

Les lactones sesquiterpéniques du genre *Centaurea* sont dans la majorité du type guaiane (Bentamene et al. 2005) et germacrane (Marco et al. 2005 ; Medjroubi et al. 2005 ; Çelik et al. 2006), cependant, des élémanolides et eudesmanolides (Karamenderes et al. 2007 ; Djeddi et al. 2008) ainsi que des héliangolides y ont été isolés (Nacer et al. 2012), on note également la séparation de sesquiterpènes à squelette élémmane (Marco et al. 2005).

##### II.3.1.1. Les guaianolides

Les lactones sesquiterpéniques de type guaianolide ont comme squelette de base un cycle pentagonal et un autre heptagonal (Figure I.2), celles isolées du genre *Centaurea*, sont caractérisées par la stéréochimie  $\alpha$  des protons H-1, H-5 et H-7 et la stéréochimie  $\beta$  des protons H-6 et H-8 dans le cas d'une substitution en C-8 et une fermeture du cycle lactonique en C-6. Le tableau I.2 regroupe quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type guaianolide isolées du genre *Centaurea*.



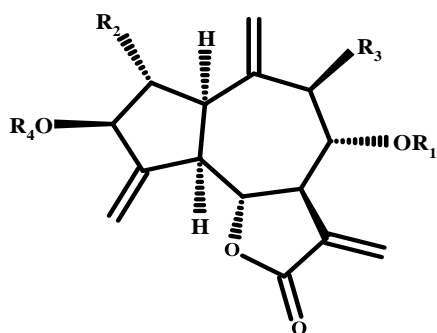
**Figure I.2.** Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type guaianolide

**Tableau I.2.** Quelques lactones sesquiterpéniques de type guaianolide isolées du genre *Centaurea*.

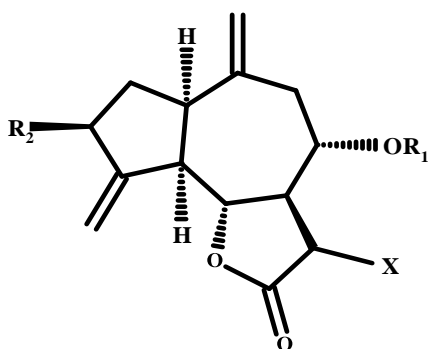
Guaianolide	N°	Espèce	Réf
Répidiolide	1	<i>C. kandavanensis</i> .	(Rustaiyan et al. 1984)
Kandavanolide	2	<i>C. salonitana</i>	(Daniewski et al. 1993)
Cébelline B	3	<i>C. scoparia</i> Syn.: <i>Phaeopappus scoparia</i> Sieb.	(Helal et al. 1997)
Aguérine A	4	<i>C. ornata</i> Will.	(Navarro et al. 1990)
Déacylcynaropicrine	5	<i>C. omphalotricha</i>	(Kolli et al. 2012)
8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\alpha$ , 13-dihydrozaluzanin C	6	<i>C. scoparia</i> Syn.: <i>Phaeopappus scoparia</i> Sieb.	(Helal et al. 1997)
8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13H-dehydrocostuslactone	7	<i>C. canariensis</i> Brouss.Var. <i>subexpinnata</i> Bruch.	(Bohlmann and Gupta 1981)
11,13-dihydrodéacylcynaropicrine	8	<i>C. canariensis</i> Brouss.Var. <i>subexpinnata</i> Bruch.	(Collado et al. 1985)
Cébelline G	9	<i>C. hermannii</i> F. Hermann	(Öksüz et al. 1994)
Répidiolide triol (pterocauline)	10		
Chlorohyssopifoline D	11	<i>C. musimomum</i>	(Medjroubi et al. 1997)
<i>epi</i> -Centaurépensine	12	<i>C. glastifolia</i> L. Syn.:	(Öksüz and Topçu 1994)
15-déschloro-15-hydroxyépisolstiolide	13	<i>Chartolepis glastifolia</i> (L.) Cass.	

**Tableau I.2.** Quelques lactones sesquiterpéniques de type guaianolide isolées du genre *Centaurea*. (Suite)

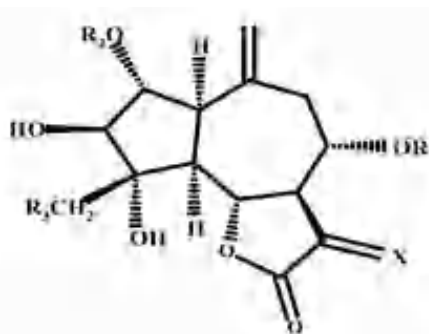
Guaianolide	N°	Espèce	Réf
Grossheimine	14	<i>C. lippii</i> L.	(Gonzalez et al. 1976)
$\alpha,\beta$ -dihydroxyisobutyrategrossheimine	15		
Amberbeine	16	<i>C. muricata</i> DC.	(Fvsiratova et al. 1973)
Cynaropicrine	17	<i>Rhaponticoides africana</i> (sub <i>C. africana</i> )	(Nowak et al. 1986)
4'-Acétyl cynaropicrine	18	<i>C. omphalotricha</i>	(Kolli et al. 2012)
3-Acétyl cynaropicrine	19		



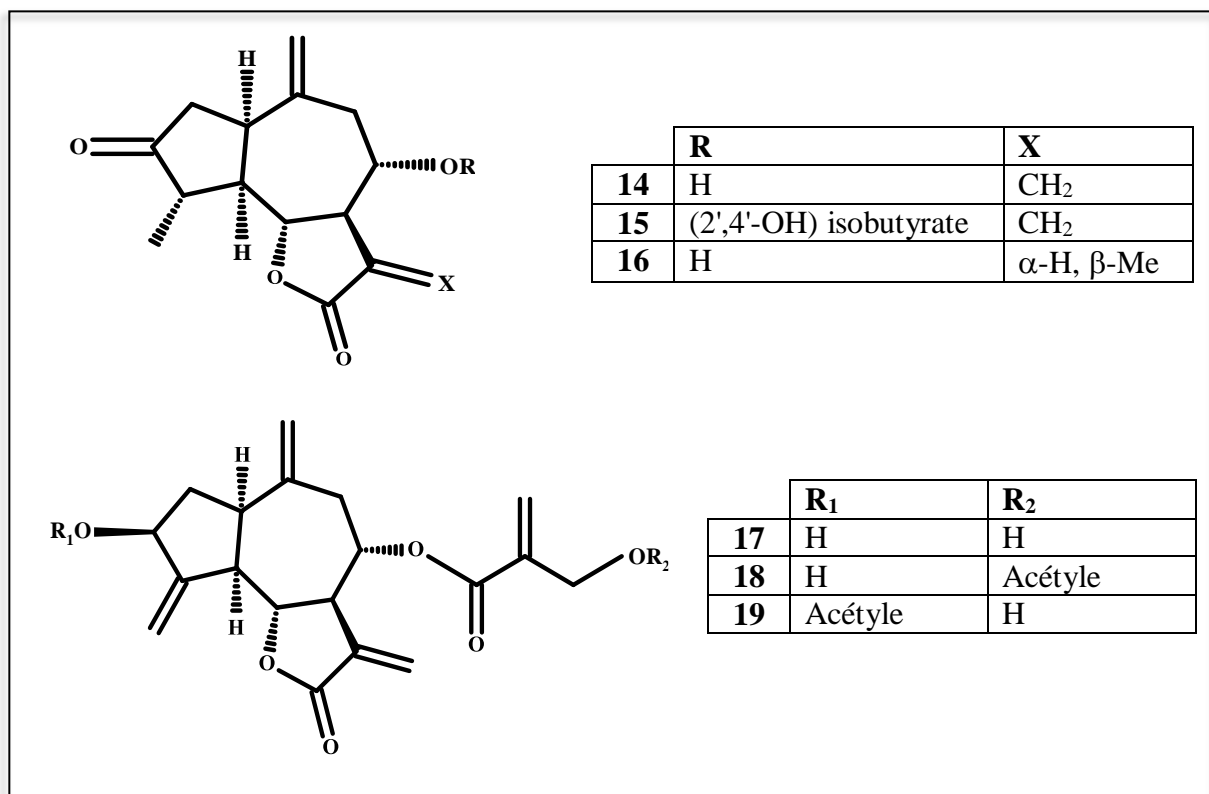
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	methacrylate	OH	H	H
2	H	H	H	acrylate
3	H	<i>O</i> -isobutyrate	H	H
4	isobutyrate	H	H	H
5	H	H	H	H



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X
6	H	OH	$\beta$ -H, $\alpha$ -Me
7	H	H	$\beta$ -H, $\alpha$ -Me
8	H	OH	$\alpha$ -H, $\beta$ -Me



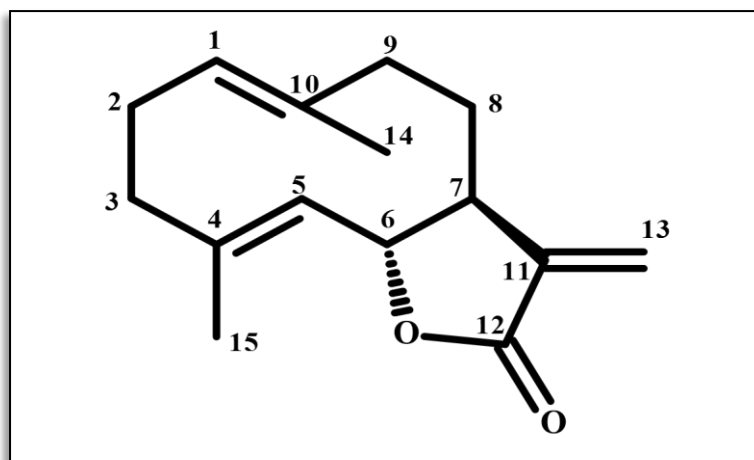
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
9	4'-OH-Macrylate	H	OAc
10	Méthacrylate	H	OH
11	(2'-OEt-4'-OH) isobutyrate,	H	Cl
12	(2'- $\alpha$ -OH-4'-Cl) isobutyrate	H	Cl
13	époxy-méthacrylate	H	OH



**Figure I.3.** Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type guaianolide isolées du genre *Centaurea*.

### II.3.1.2. Les germacranolides

Les lactones sesquiterpéniques du type germacranolide renferme dans leur squelette de base un cycle à dix atomes de carbone (Figure I.4).



**Figure I.4.** Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type germacranolide

La plupart de ces structures contiennent deux doubles liaisons, une entre C-1 et C-10 et l'autre entre C-4 et C-5 de configuration (E, E). Ces doubles liaisons peuvent être remplacées par des fonctions époxydes avec les stéréochimies  $\beta$  C-1,  $\beta$  C-5. La double liaison exocyclique en C-11 peut être réduite en 11 $\alpha$ -H, 13 $\beta$ -Me ou 11  $\beta$ -H, 13 $\alpha$  -Me. Dans la plupart des composés de ce type, isolés du genre *Centaurea* le carbone C-4 porte le groupement CH<sub>2</sub>OH. D'après notre étude concernant ce type de structures issues du genre *Centaurea*, la lactonisation se fait en C-6 ou en C-8. Selon le point de lactonisation, les carbones C-8 ou C-6 sont souvent substitués par des groupes esters ou hydroxyles de stéréochimie  $\alpha$ . Les hydrogènes H-6 et H-7 ont toujours des stéréochimies  $\beta$  et  $\alpha$  respectivement. En général, les carbones C-9 et C-3 ne sont pas substitués à l'exception de quelques composés (Benayache et al. 1992).

Le tableau I.3 regroupe quelques lactones sesquiterpéniques de type germacranolide isolées du genre *Centaurea*.

**Tableau I.3.** Quelques lactones sesquiterpéniques de type germacranolide isolées du genre *Centaurea*.

Germacranolide	N°	Espèce	Réf
8-O-(4'-acetoxy-5'-hydroxyangeloyl) salonitenolide	20	<i>C. moesiaca</i>	(Trendafilova et al. 2007)
11 $\beta$ , 13-dihydro19-désoxycnicine	21	<i>C. adjarica</i> Alb.	(Aslan and Oksuz 1999)
11 $\beta$ , 13-dihydrosalonitenolide	22	<i>C. alba</i> L.	(Fernandez et al. 1995)
11,13-dihydroarbutifoline	23	<i>C. arbutifolia</i>	(Gonzalez et al. 1981)
Arbutifoline	24	Svent	
11,13-dihydronopordopicrine	25	<i>C. americana</i> Nutt.	(Ohino et al. 1973)
Amarine	26	<i>C. amara</i> L.	(Gonzalez et al. 1976)
Dihydromarine	27		
Sténophylloïde	28	<i>C. aspera</i> L. Subsp.	(Marco et al. 2005)
Dihydrosténophylloïde	29	<i>stenophylla</i>	
1-(10)-epoxy-15-hydroxy-germacr-4-ene-6,12-olide	30	<i>C. sphaerocephala</i>	(Maurizio et al. 1994)
Artémisifoline	31	<i>C. nicaensis</i> All.	(Bruno et al. 1996)
Salonitolide	32	Scop.	
Acétylartémisifoline	33	<i>C. serdis</i> L.	(Gonzalez et al. 1973)



**Tableau I.3.** Quelques lactones sesquiterpéniques de type germacranolide isolées du genre *Centaurea*. (Suite)

Germacranolide	N°	Espèce	Réf
Scabiolide	34	<i>C. salonitana</i> Vis.	(Daniewski et al. 1992)
Stizolicine	35	<i>C. balsamita</i> Lam.	(Rybajko et al. 1976)
Balzamine	36		
8 $\alpha$ ,4'-hydroxysenecioloxy-9 $\alpha$ -hydroxyparthenolide	37	<i>C. coronopifolia</i> Lam.	(Öksüz and Ayyildiz 1986)
8 $\alpha$ ,senecioloxy-9 $\alpha$ -hydroxyparthenolide	38		
Stizoline	39	<i>C. balsamifera</i>	(Murkhmetzhanov et al. 1969)

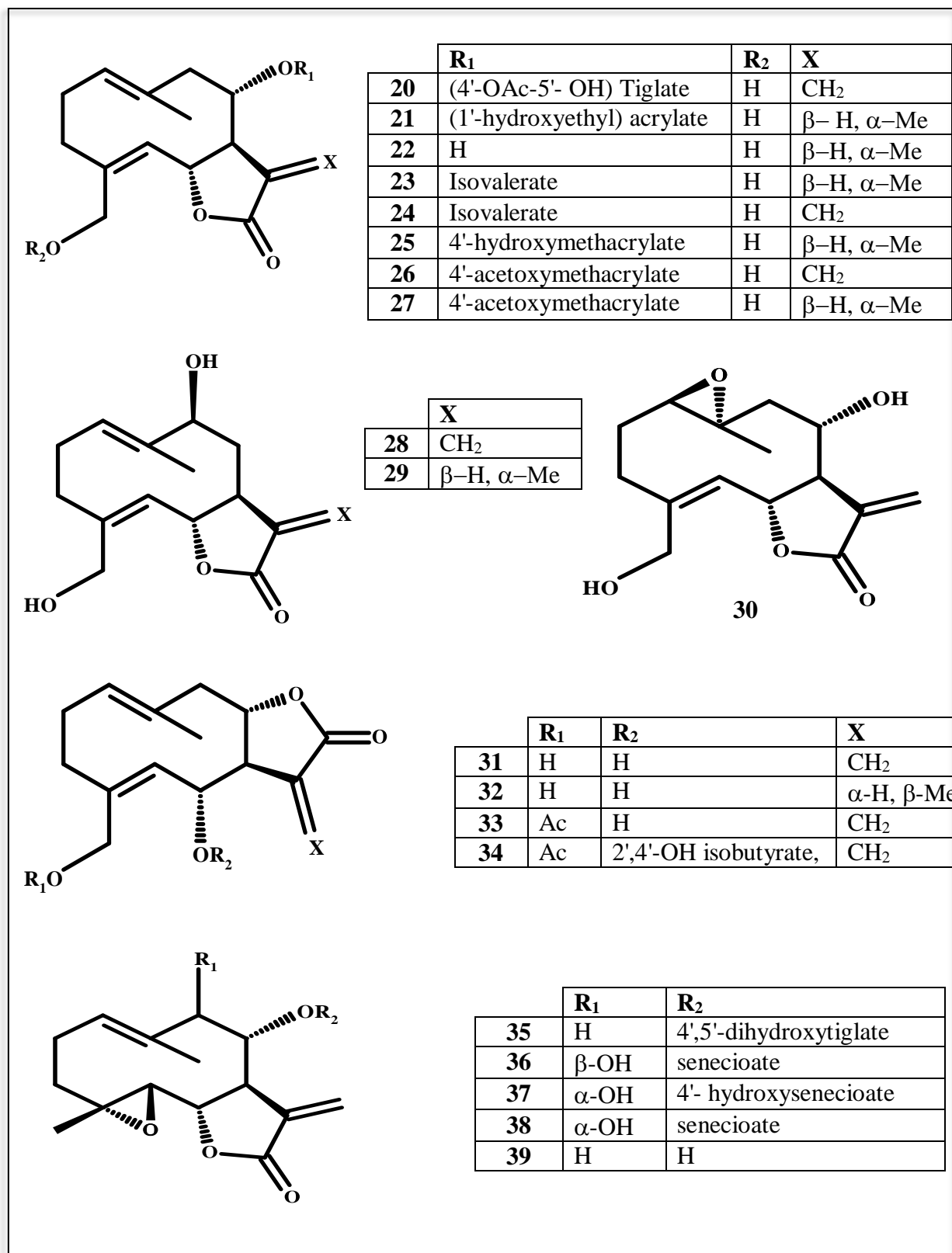
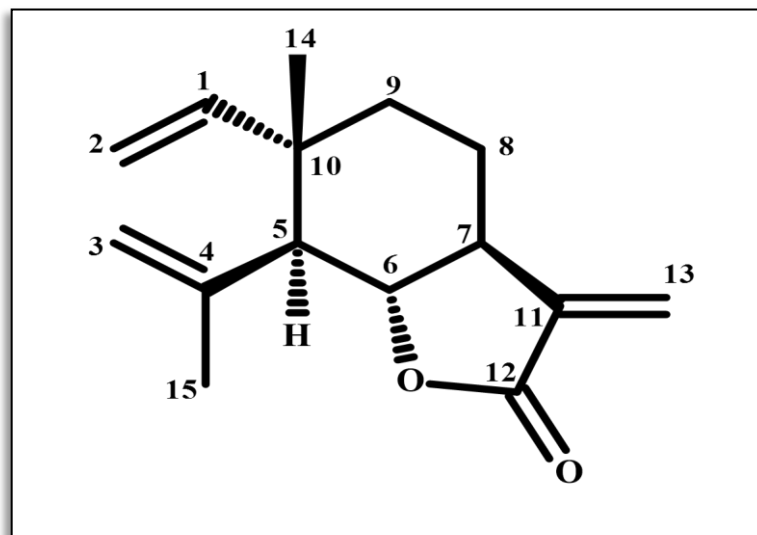


Figure I.5. Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type germacranolide isolées du genre *Centaurea*.

### II.3.1.3. Les élémanolides

Les lactones sesquiterpéniques du type élémanolide ont comme squelette de base un monocycle à six atomes de carbone (Figure I.6).



**Figure I.6.** Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type élémanolide

L'ossature principale est caractérisée par la stéréochimie  $\alpha$  de la liaison C-1 – C-10 et  $\beta$  de la liaison C-4 – C-5,  $\alpha$  de l'hydrogène porté par le carbone C-5 et  $\beta$  du méthyle porté par le carbone C-10. Tous les élémanolides du genre *Centaurea* contiennent une double liaison entre C-1 et C-2 et une autre entre C-3 et C-4 et en général une double liaison exocyclique en C-11 qui peut être réduite en 11  $\beta$ -H, 13  $\alpha$ -Me ou 11  $\beta$ -OH, 13  $\alpha$ -Me.

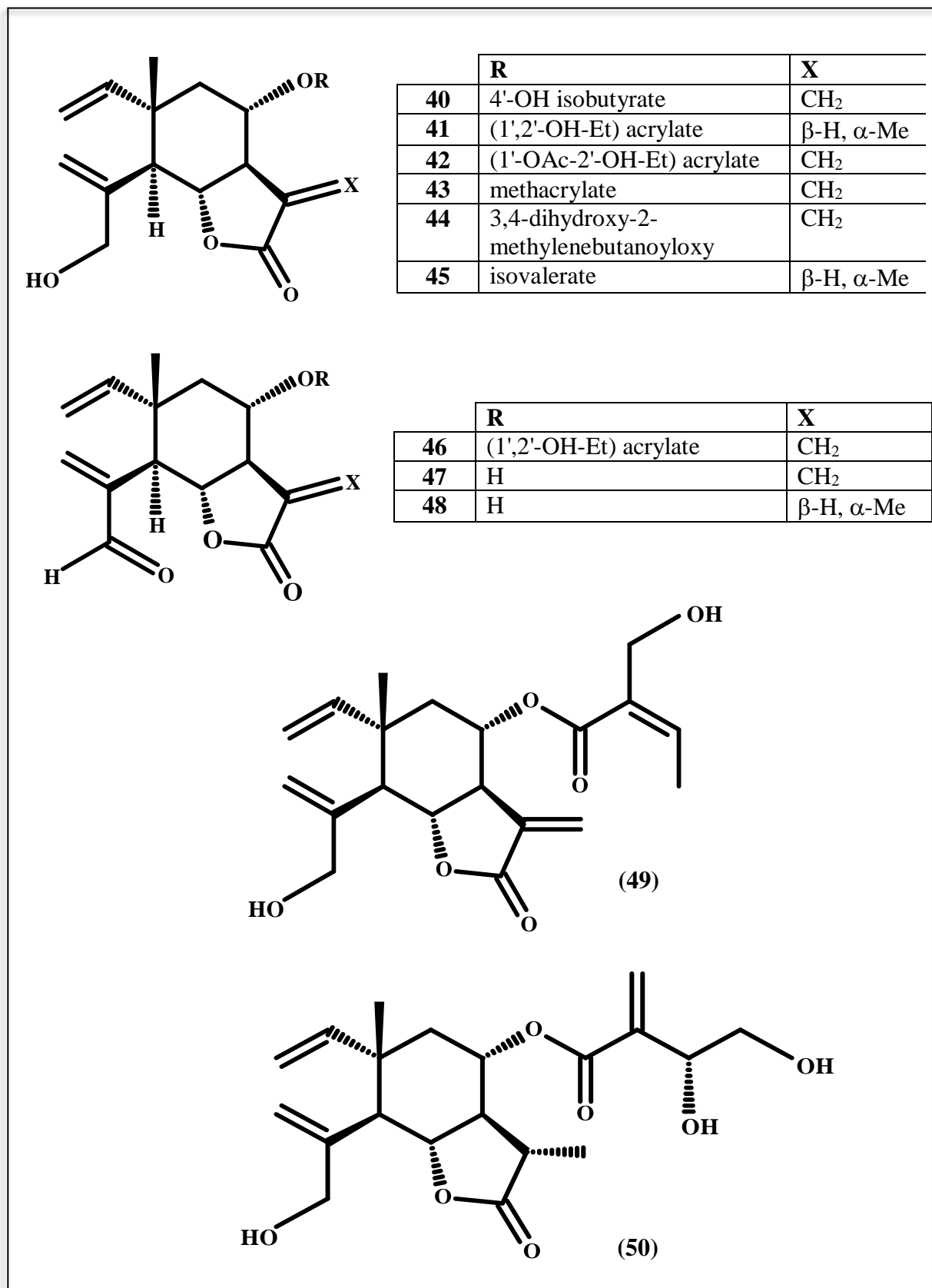
Le carbone C-4 porte souvent le groupement  $\text{CH}_2\text{OH}$ , mais ce groupement peut être oxydé et donner un CHO.

La lactonisation se fait normalement en C-6, cependant elle se fait également en C-8. Quel que soit le carbone de lactonisation, les carbones C-6 ou C-8 portent souvent des groupes esters ou hydroxyles avec une stéréochimie  $\alpha$  (Karamenderes et al. 2007).

Le tableau I.4 regroupe quelques lactones sesquiterpéniques de type élémanolide isolées du genre *Centaurea*.

**Tableau I.4.** Quelques lactones sesquiterpéniques de type élémanolide isolées du genre *Centaurea*.

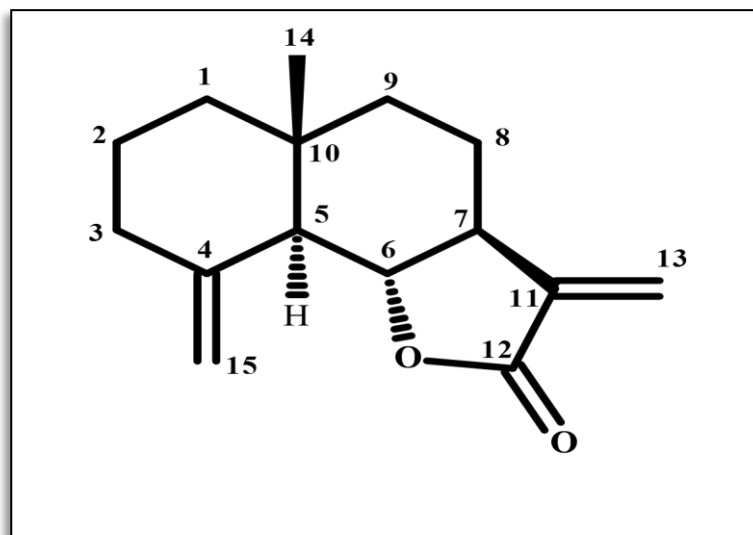
Elémanolide	N°	Espèce	Réf.
$\beta$ -hydroxyisomaslane 11,13-dehydromélitensine	40	<i>C. ornata</i>	(Navarro et al. 1990)
5R,6R,7R,8S,11S-15-hydroxy-8-(1',2'-dihydroxy-ethyl)-acryloxy-elema-1,3-dien-6,12-olide	41	<i>C. nicaensis</i> All. Scop.	(Bruno et al. 1996)
(5R*,6R*,7R*,8S*,10S*)-15-hydroxy-8-(2'-[ $\alpha$ -hydroxy, $\beta$ -acetoxyethyl]-acryloxy)- elema-1,3 dien-6,12-olide	42	<i>C. napifolia</i> L.	(Bruno et al. 1995)
2'-méthyl-2'-propenoate 11,13-dehydromélitensine	43	<i>C. chilensis</i>	(Negrete et al. 1993)
8 $\alpha$ -(3,4-dihydroxy-2-méthylènebutanoxyloxy)-dehydromélitensine	44	<i>C. moesiaca</i> Urum.& J. Wagner	(Trendafilova et al. 2007)
11,13-dihydroisoarbutifoline	45	<i>C. arbutifolia</i> Svent	(Gonzalez et al. 1981)
8 $\alpha$ -(1',2'-dihydroxy-ethyl)-acryloxy-15-oxo-5-elema-1,3,11(13)-trien-6,12-olide	46	<i>C. paui</i> Loscos ex Willk.	(Cardona et al. 1997)
8 $\alpha$ -hydroxy-15-oxo-5,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-elema-1,3,11(13)-trien-6,12-olide	47		
8 $\alpha$ -hydroxy-15-oxo-5,7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H,11 $\beta$ H-elema-1,3-dien-6,12-olide	48		
8 $\alpha$ -[20-Hydroxyméthyl-2'-butenoxyloxy]-dehydromélitensin	49	<i>C. maroccana</i>	(Bicha et al. 2013 <sup>b</sup> )
5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,8 $\beta$ ,11 $\beta$ (H)-15-Hydroxy-8-(1',2' dihydroxyethyl)-acryloxy-elema-1,3-dien-6,12-olide	50	<i>C. nicaensis</i>	(Medjroubi et al. 2003)



**Figure I.7.** Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type élémanolide isolées du genre *Centaurea*.

### II.3.1.4. Les eudesmanolides

Les eudesmanolides sont communément dérivés d'un squelette de base de deux cycles hexagonaux (Figure I.8), ils se distinguent par la stéréochimie  $\alpha$  de l'hydrogène H-5 et par la stéréochimie  $\beta$  du méthyle porté par le carbone C-10. Ce méthyle est caractérisé en RMN  $^1\text{H}$  par un déplacement chimique inférieur à 1 ppm (Medjroubi et al. 1998).



**Figure I.8.** Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type eudesmanolide

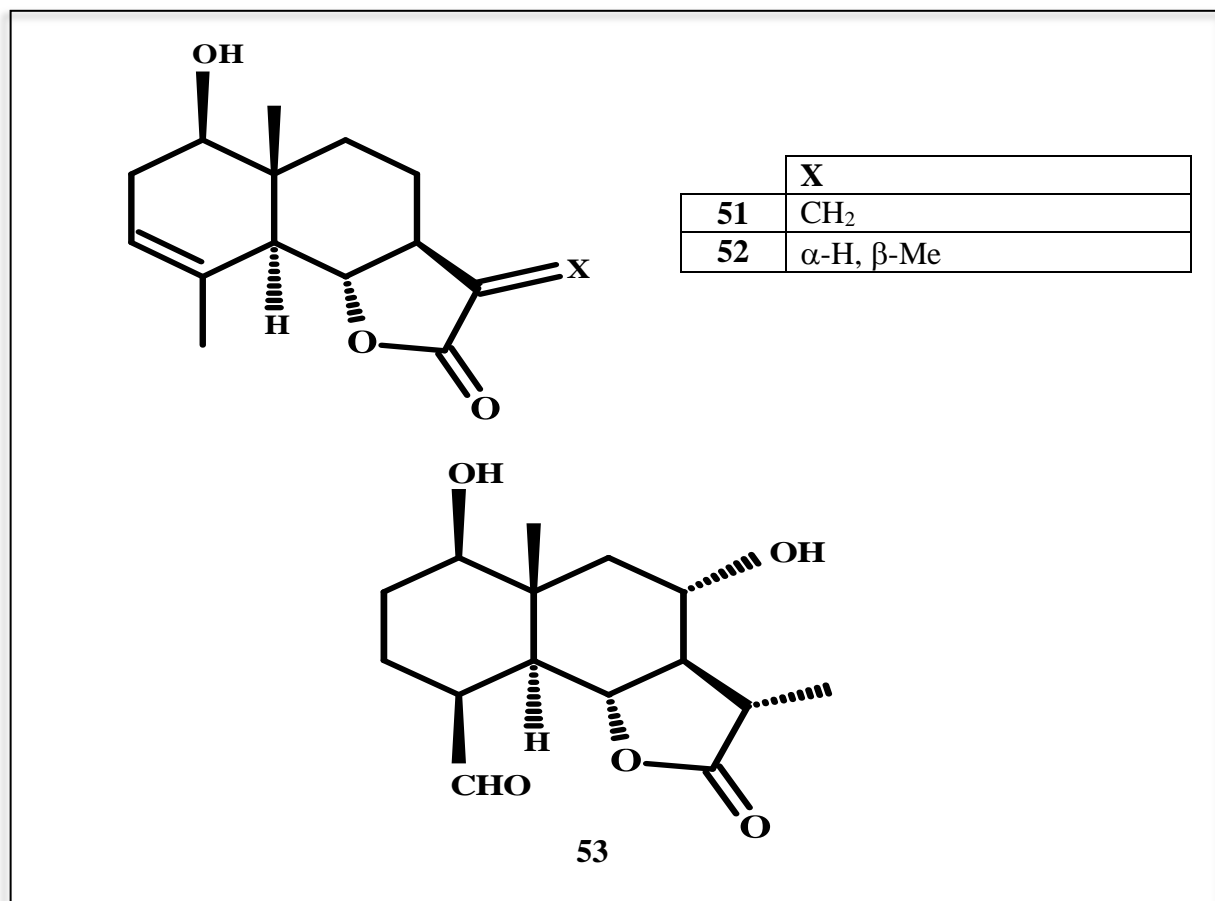
La majorité des eudesmanolides du genre *Centaurea* décrits jusqu'à présent ont leur groupe lactonique fermé en C-6. Si le carbone C-8 porte des groupes esters ou des hydroxyles, leur stéréochimie est  $\alpha$ . La double liaison exocyclique en C-11 peut être réduite en  $11\beta\text{-H}$ ,  $13\alpha\text{-Me}$ , le carbone C-4 peut porter différents groupements fonctionnels ( $\alpha$  (OH),  $\alpha$ (CHO),  $\beta$ (CHO)... ) comme dans la majorité des composés étudiés, ou une double liaison ( $\Delta^{3,4}$  ou  $\Delta^{4,15}$ ). La substitution par un  $\beta$  hydroxyle en C-1, est presque signalée dans tous les eudesmanolides. Concernant la stéréochimie des hydrogènes H-6 et H-7, elle est toujours  $\beta$  et  $\alpha$  respectivement.

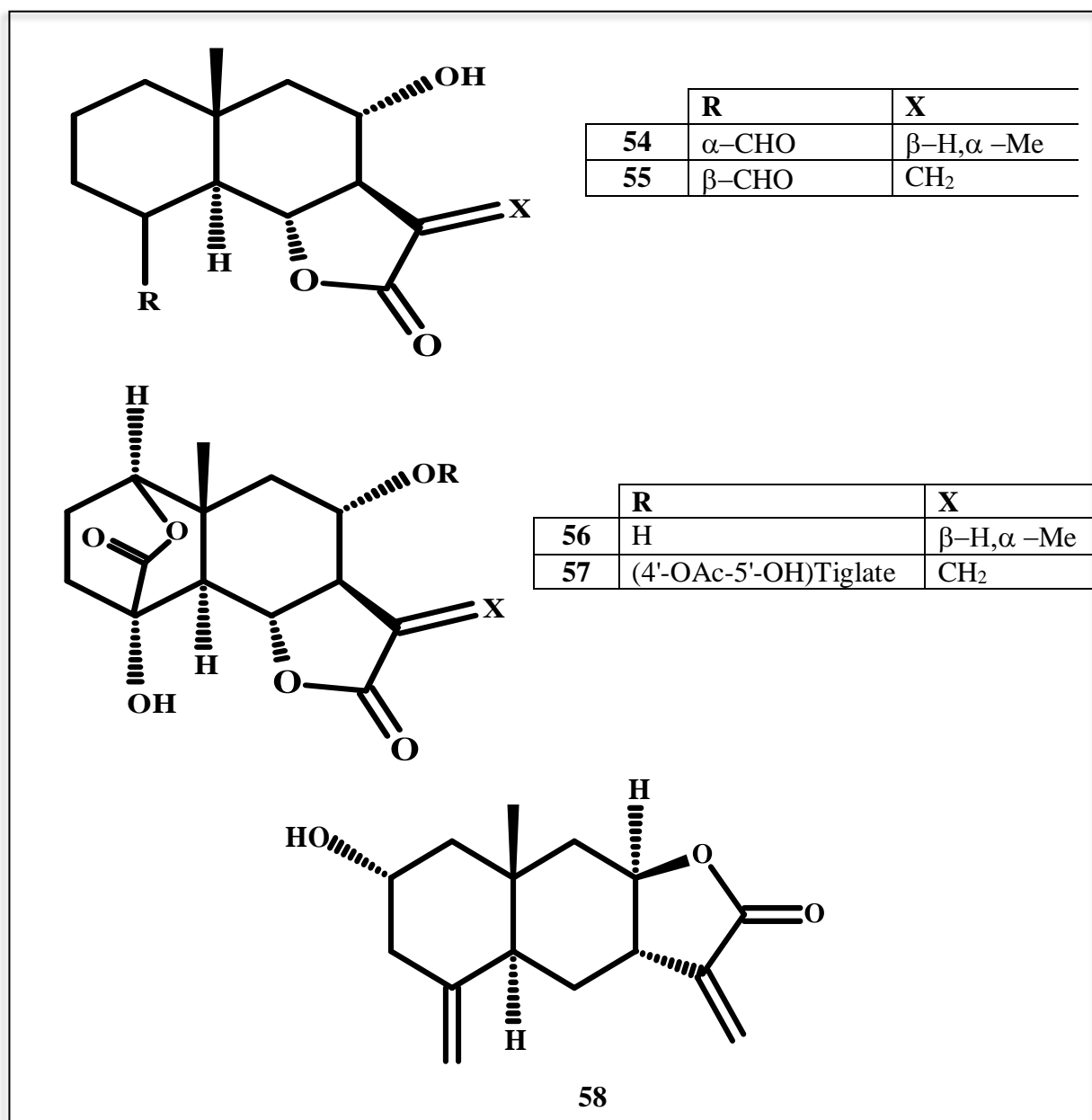
En RMN- $^1\text{H}$ , l'hydrogène H-6 donne un signal souvent sous forme d'un triplet. Cela est considéré comme une particularité des eudesmanolides (Skaltsa et al. 2000).

Quelques lactones sesquiterpéniques de type eudesmanolide, isolées du genre *Centaurea* sont reportées dans le tableau I.5.

**Tableau I.5.** Quelques lactones sesquiterpéniques de type eudesmanolide isolées du genre *Centaurea*.

Eudesmanolide	N°	Espèce	Réf
Santamarine	51	<i>C. ornata</i>	(Navarro et al. 1990)
11- <i>epi</i> -dihydroreynosine : $\Delta^{4,15}$	52	<i>C. ornata</i>	(Navarro et al. 1990)
8 $\alpha$ -Hydroxy-11 $\beta$ ,13-4- <i>epi</i> -sonchucarpolide	53	<i>C. pullata</i>	(Djeddi et al. 2008)
8 $\alpha$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydroonopordaldéhyde	54	<i>C. granata</i> L.	(Medjroubi et al. 1998)
Stoebenolide	55	<i>C. cadmea</i>	(Karamenderes et al. 2007 <sup>a</sup> )
15-carboxy-4 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-eudesma-6 $\beta$ H,7 $\alpha$ H,11 $\beta$ H-6,12-olide	56	<i>C. linifolia</i> Vahl.	(Gonzalez et al. 1978)
15-carboxy-4 $\alpha$ -hydroxy-8 $\alpha$ -(4'-acétoxy-5'-hydroxy)-angeloxy-eudesma-6 $\beta$ ,7 $\alpha$ H,11(13)-ene-6,12-olide	57	<i>C. aspera</i> L. <i>subinermis</i> DC	(Cardona et al. 1991)
Ivaline	58	<i>C. aspera</i> L. <i>subinermis</i> DC	(Cardona et al. 1991)



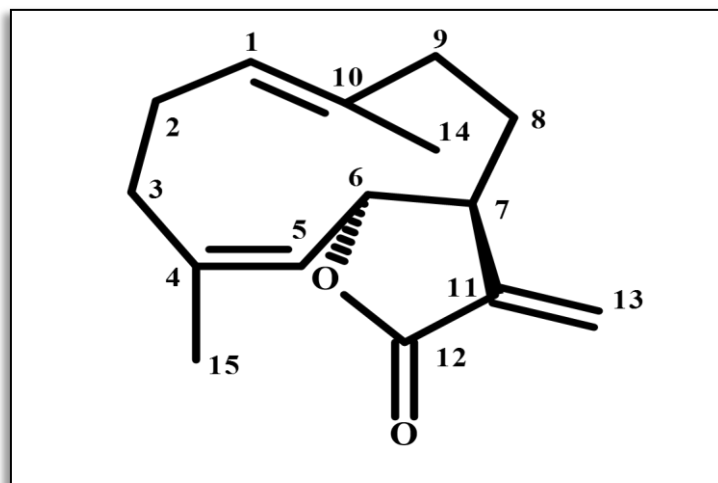


**Figure I.9.** Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type eudesmanolide isolées du genre *Centaurea*

### II.3.1.5. Les héliangolides

Les héliangolides montrent une grande similarité structurale avec celle des germacranolides ; avec une double liaison de configuration (E) entre C-1 et C-10 et l'autre (Z) entre C-4 et C-5. Le squelette de base de ce type de composés est représenté dans la figure I.10.





**Figure I.10.** Squelette de base des lactones sesquiterpéniques de type héliangolide

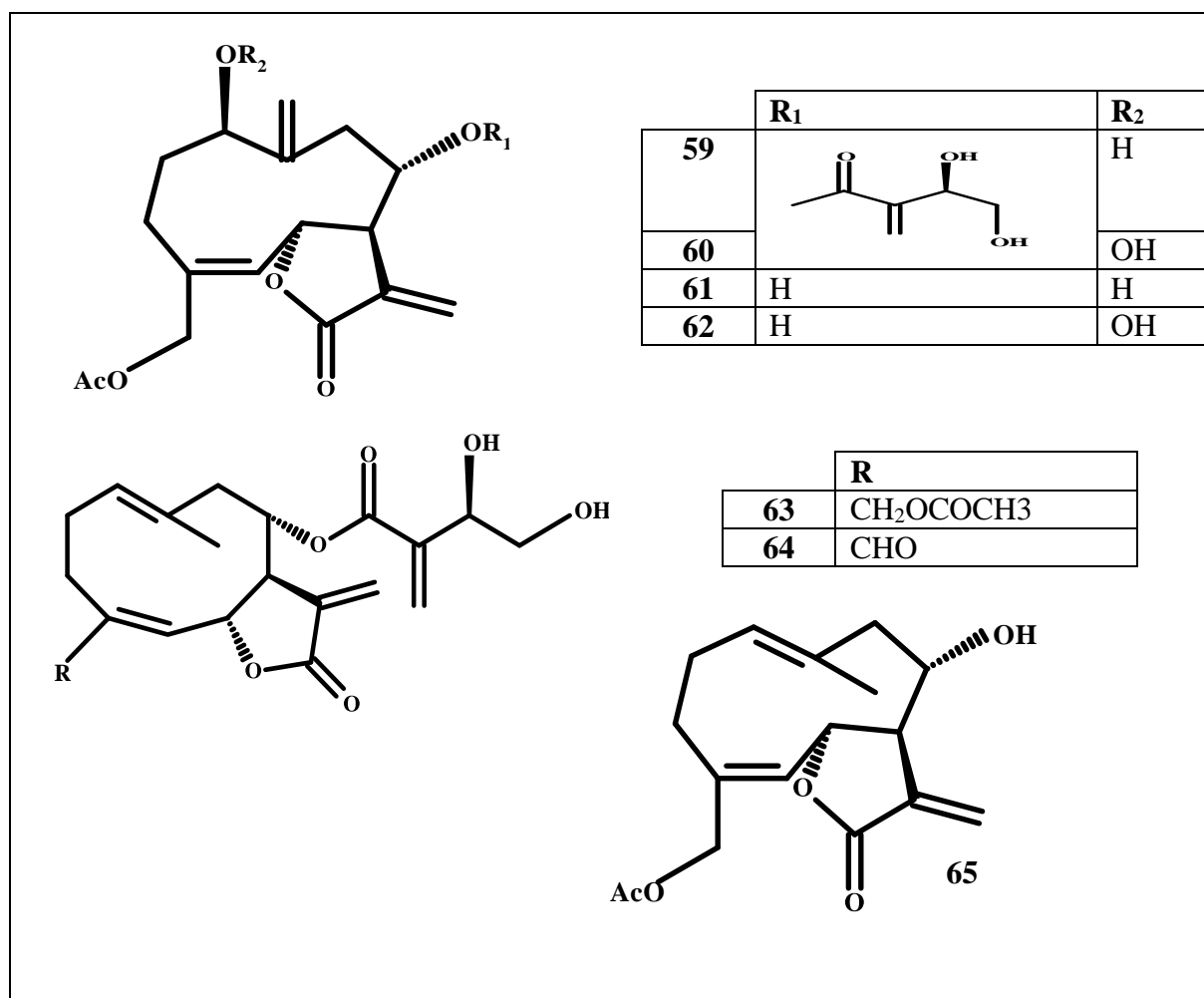
Les structures isolées de ce genre sont toutes fermées en C-6, présentent une stéréochimie  $\beta$  H-6,  $\alpha$  H-7,  $\beta$  H-8, le substituant  $\text{CH}_2\text{OAc}$  en C-4 et une double liaison exocyclique en C-11. La double liaison C-4 et C-5 est permanente dans toutes les structures, par contre celle entre C-1 et C-10 peut être transformée en  $1\beta$ ,  $10\alpha$ -époxyde ou substituées par un  $\beta$ -OH ou un  $\beta$ -OOH en C-1 avec une double liaison exocyclique en C-10. Toutes ces structures sont substituées en C-8. Ce substituant est souvent soit un hydroxyle, soit un (1',2'-dihydroxyethyl) acrylate, soit un (1'-acetoxy-2'-hydroxyethyl) acrylate (Cardona et al. 1997). Quelques molécules ayant le squelette héliangolide isolées du genre *Centaurea* sont reportées dans le tableau I.6.

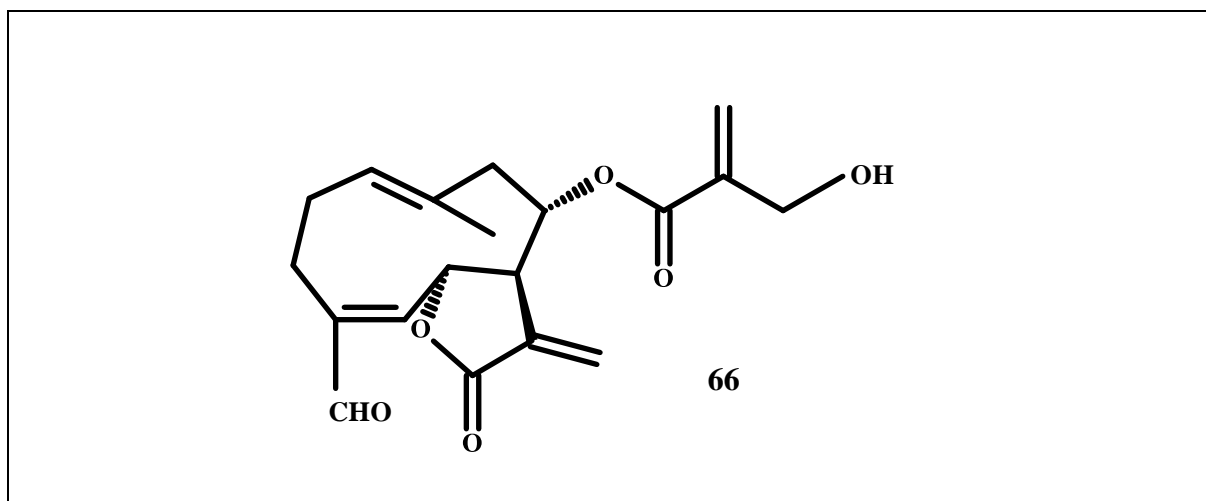
**Tableau I.6.** Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type héliangolide isolées du genre *Centaurea*.

Héliangolide	N°	Espèce	Réf
15-acétoxy-8 $\alpha$ -(3',4'-dihydroxy-2'-méthylènebutanoyloxy)-1 $\beta$ -hydroxy-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-germacra-4E,10(14),11(13)-trien-12,6-olide	<b>59</b>	<i>C. paui</i> Lascos ex Willk	(Fernandez et al. 1995)
15-acétoxy-8 $\alpha$ -(3',4'-dihydroxy-2'-méthylènebutanoyloxy)-1 $\beta$ -hydroperoxy-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-germacra-4E,10(14),11(13)-trien-12,6-olide	<b>60</b>		
15-acétoxy-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-germacra-4E,10(14),11(13)-trien-12,6-olide	<b>61</b>		

**Tableau I.6.** Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type héliangolide isolées du genre *Centaurea*. (Suite)

Héliangolide	N°	Espèce	Réf
15-acétoxy-1 $\beta$ -hydroperoxy-8 $\alpha$ -hydroxy-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ H-germacra-4E,10(14),11(13)-trien-12,6-olide	<b>62</b>	<i>C. paui</i> Lascos ex Willk	(Cardona et al. 1997)
(6R, 7R, 8S, 30 R) 8a-(3, 4-dihydroxy-2-methylene-butanoyloxy)-15-acetoxy-helianga 1(10), 4(5), 11(13) trien-6-olide	<b>63</b>	<i>C. paui</i> Lascos ex Willk	(Cardona et al. 1994)
(6R, 7R, 8S, 30 R) 8a-(3, 4-dihydroxy-2-methylene-butanoyloxy)-15-oxo-helianga 1(10), 4(5), 11(13) trien-6-olide	<b>64</b>		
15-acétoxy- 8 $\alpha$ -hydroxy-7 $\alpha$ H,6 $\beta$ -germacr-4E,11(13)-trien-6,12-olide	<b>65</b>	<i>C. paui</i> Lascos ex Willk	(Cardona et al. 1997)
(6S*,7R*,8S*)-8-(4'-Hydroxy methacryloxy)-15-oxohelianga-1(10),4,11(13)- trien 6,12-olide	<b>66</b>	<i>C. tweediei</i>	(Flamini et al. 2004)

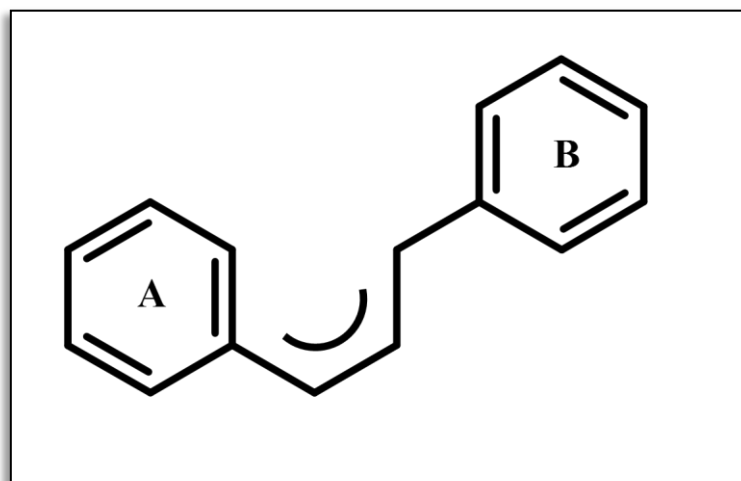




**Figure I.11.** Quelques structures de lactones sesquiterpéniques de type héliangolide isolées du genre *Centaurea*

### II.3.2. Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes. Ils possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux noyaux benzéniques (A et B) reliés par une chaîne en C<sub>3</sub> (Bruneton 1999). (Figure I.12).



**Figure I.12.** Squelette de base des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits (Goto et Kondo 1991) et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (Rice-Evans et al. 1997 ; Van den Berg et al. 2000). De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-tumorale (Stavric et Matul 1992), anti carcinogène (Das et al. 1994), anti-inflammatoire (Bidet

et al. 1987), antivirale (Amaral et al. 1999), antiallergique (Di Carlo et al. 1999), anti hépatotoxique (Wagner et al. 1986).

En Algérie, Les espèces du genre *Centaurea* ont fait l'objet d'études phytochimiques diverses qui ont montré leur richesse en flavonoïdes (Ayad et Akkal 2019 ; Bentamene et al. 2007) dont la majorité est de type flavone. Les recherches bibliographiques précédentes sont en faveur d'une prédominance prononcée de l'apigénine, l'hispiduline et la jacéosidine comme flavones dans ce genre.

Concernant les flavonols, c'est la quercétine qui est la plus accumulée par ce genre suivie du kaempférol et de la centaureidine. Notons par ailleurs que les flavonoïdes *O*-glycosylés sont les plus rencontrés dans les espèces de ce genre contrairement aux flavonoïdes *C*-glycosylés qui sont moins abondants dans ce genre. Les flavonoïdes glucosylés sont très majoritaires par rapport aux autres. Quelques flavonoïdes isolés de ce genre sont regroupés dans le tableau I.7.

### II.3.2.1. Flavonoïdes aglycones

**Tableau I.7.** Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*.

Flavones			
Nom	N°	Espèce	Réf
Acacétine	67	<i>C. cuneifolia</i>	(Oksuz et al.1988)
Apigénine	68	<i>C. furfuracea</i> <i>C. maroccana</i> <i>C. omphalotricha</i> <i>C. tougourensis</i> <i>C. calcitrapa</i>	(Akkal et al. 2003 <sup>b</sup> ) (Bentamene et al. 2007) (Kolli et al. 2012) (Nacer et al. 2006) (Kitouni et al. 2015)
Chrysoériol	69	<i>C. omphalodes</i> <i>C. africana</i>	(Khalfallah et al. 2012) (Seghiri et al. 2009)
Chrysine	70	<i>C. omphalodes</i> <i>C. omphalotricha</i> Coss. & Durieu ex Batt. & Trab.	(Khalfallah et al. 2012) (Mouffok et al. 2012)
Cirsimaritine	71	<i>C. furfuracea</i> <i>C. omphalotricha</i> <i>C. maroccana</i>	(Akkal et al. 2003 <sup>b</sup> ) (Kolli et al. 2012) (Bicha et al. 2011)
Cirsilineol	72	<i>C. foucauldiana</i> <i>C. nicaeensis</i> All. var. <i>walliana</i> M. <i>C. parviflora</i> Desf. <i>C. sulphurea</i>	(Bensouici et al. 2012) (Hammoud et al. 2012) (Belkacem et al. 2014) (Kabouche et al. 2011)

Tableau I.7. Quelques flavonoïdes du genre *Centaurea*. (Suite)

Flavones			
Nom	N°	Espèce	Réf
Eupatiline	73	<i>C. diluta</i> subs. <i>algeriensis</i> <i>C. parviflora</i> Desf. <i>C. tougourens</i>	(Zater et al. 2016) (Belkacem et al. 2014) (Nacer et al. 2006)
Genkwanine	74	<i>C. parviflora</i> Desf.	(Belkacem et al. 2014)
Hispiduline	75	<i>C. moesiaca</i> Urum. & J. Wagner <i>C. furfuracea</i> <i>C. melitensis</i>	(Trendafilova et al. 2007) (Akkal et al. 2003 <sup>b</sup> ) (Ayad et al. 2012)
Jacéosidine	76	<i>C. ruthenica</i> <i>C. sulphurea</i> <i>C. tougourens</i> <i>C. foucauldiana</i>	(Mishio et al. 2006) (Kabouche et al. 2011) (Nacer et al. 2006) (Bensouici et al. 2012)
Lutéoline	77	<i>C. omphalotricha</i> <i>C. urvillei</i> DC. Subsp. <i>urvillei</i> <i>C. sphaerocephala</i> L.	(Kolli et al. 2012) (Gülcemal et al. 2010) (Bentamene et al. 2008)
7,3',5'- Triméthyltricétine	78	<i>C. incana</i>	(Akkal et al. 1997)
5-hydroxy-6,7,3',4'- tétraméthoxyflavone	79	<i>C. foucauldiana</i> <i>C. granata</i> <i>C. napifolia</i> L.	(Bensouici et al. 2012) (Medjroubi et al. 1998) (Akkal et al. 2003 <sup>a</sup> )
Flavonols			
Centaureidine	80	<i>C. jacea</i> L. <i>C. moesiaca</i> Urum. & J. Wagner	(Forgo et al. 2012) (Trendafilova et al. 2007)
Isokaempferide	81	<i>C. moesiaca</i> Urum. & J. Wagner <i>C. maroccana</i> Vahl. <i>C. jacea</i> L.	(Trendafilova et al. 2007) (Bicha et al. 2011) (Forgo et al. 2012)
Jaceidine	82	<i>C. africana</i>	(Seghiri et al. 2009)
Kaempférol	83	<i>C. tougourens</i> <i>C. urvillei</i> DC. Subsp. <i>urvillei</i>	(Nacer et al. 2006) (Gülcemal et al. 2010)
6- Méthoxykaempférol	84	<i>C. ruthenica</i> Lam. <i>C. microcarpa</i> Coss. et Dur. <i>C. seneüalensis</i> DC	(Mishio et al. 2006) (Louaar et al. 2011) (Aqil et al. 1998)
4'-Méthylgossypétine	85	<i>C. africana</i>	(Seghiri et al. 2009)
Patulétine	86	<i>C. ruthenica</i> Lam.	(Mishio et al. 2006)
Quercétine	87	<i>C. napifolia</i> <i>C. omphalotricha</i> Coss. & Durieu ex Batt. & Trab.	(Akkal et al. 2003 <sup>a</sup> ) (Mouffok et al. 2012)

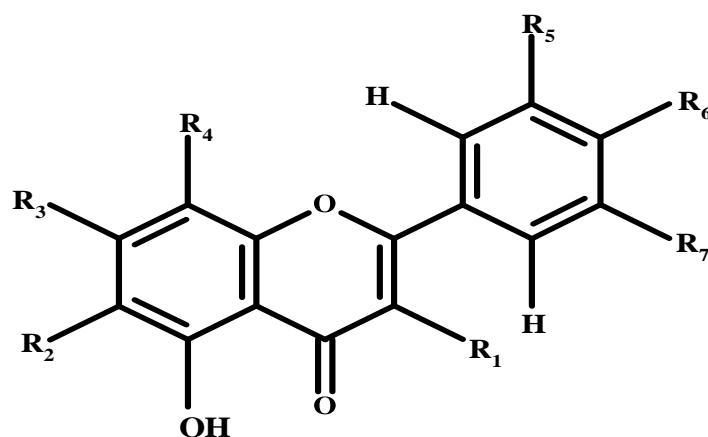


Tableau I.8. Les structures des flavonoïdes de 67 à 87

N°	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
<b>Flavones</b>							
67	H	H	OH	H	H	OCH <sub>3</sub>	H
68	H	H	OH	H	H	OH	H
69	H	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
70	H	H	OH	H	H	H	H
71	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH	H
72	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
73	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
74	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	OH	H
75	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OH	H
76	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
77	H	H	OH	H	OH	OH	H
78	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
79	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>Flavonols</b>							
80	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
81	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	H	OH	H
82	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
83	OH	H	OH	H	H	OH	H
84	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	OH	H
85	OH	H	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	H
86	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH	OH	H
87	OH	H	OH	H	OH	OH	H

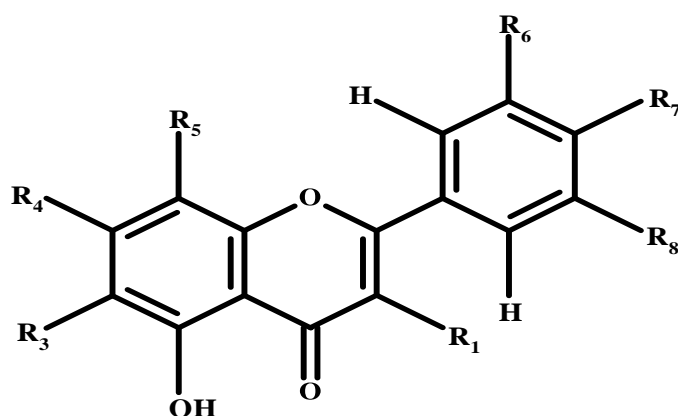
## II.3.2.2. Flavonoïdes glycosylés

Tableau I.9. Quelques flavonoïdes glycosylés du genre *Centaurea*.

Flavones- <i>O</i> -glycosylés			
Nom	N°	Espèce	Réf.
Apigétrine; Cosmoisine; Apigénine 7- <i>O</i> - $\beta$ -glucoside	88	<i>C. furfuracea</i> <i>C. sphaerocephala</i> L. <i>C. fragilis</i> Dur.	(Akkal et al. 2003 <sup>b</sup> ) (Bentamène et al. 2010) (Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Baicaline	89	<i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Chrysoériol 7- <i>O</i> - $\beta$ - glucoside	90	<i>C. sphaerocephala</i> L. <i>C. deflexa</i>	(Bentamène et al. 2010) (Chica et al. 2011)
Diosmine	91	<i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Hispiduline 7- <i>O</i> - méthylglucuronoside	92	<i>C. furfuracea</i>	(Akkal et al. 1999)
Hispiduline 7- <i>O</i> -rutinoside	93	<i>C. bruguierana</i> <i>C. militensis</i>	(Fathallah et al. 1994) (Kamanzi et al. 1983)
Scutellarine	94	<i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Tricine 7- <i>O</i> -glucoside	95	<i>C. incana</i>	(Akkal et al. 1997)
Flavonols- <i>O</i> -glycosylés			
Algérianine; 7-(6''-Sinapyl- <i>O</i> - $\beta$ glucopyranosyl) Centaureidine	96	<i>C. africana</i>	(Seghiri et al. 2009)
Bracteoside	97	<i>C. bracteata</i>	(Flamini et al. 2001)
Centaureine	98	<i>C. africana</i> <i>C. alexandrina</i> <i>C. jacea</i> <i>C. isaurica</i>	(Seghiri et al. 2009) (Ahmed et al. 1970) (Roesler et al. 1971) (Flamini et al. 2004)
3,5'-Diméthylmyricétine 7- <i>O</i> -glucoside	99	<i>C. incana</i>	(Akkal et al. 1997)
7- <i>O</i> -Glucosylspinacétine	100	<i>C. sicula</i> (sub <i>C.</i> <i>nicaensis</i> )	(Athmani et al. 1998)
Isoquercitrine; Quercétine 3- <i>O</i> - $\beta$ glucoside	101	<i>Volutaria lippii</i> (sub <i>C. lippii</i> )	(Mezache et al. 2010)
Kaempférol 7- <i>O</i> - $\beta$ -D- glucoside	102	<i>C. microcarpa</i> Coss. et Dur.	(Louaar et al. 2011)
Nicotiflorine; Kaempférol 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-rutinoside	103	<i>Volutaria lippii</i> (sub <i>C. lippii</i> ) <i>C. parviflora</i>	(Mezache et al. 2010) (Belkacem et al. 2014)
5,7,4'-Trihydroxy-3,6- diméthoxyflavone 7- <i>O</i> - $\beta$ - glucoside	104	<i>C. microcarpa</i> Coss. et Dur.	(Louaar et al. 2014)
Rutine	105	<i>C. scabiosa</i> L. <i>C. fragilis</i> Dur.	(Lar'kina al. 2009) (Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )

**Tableau I.9.** Quelques flavonoïdes glycosylés du genre *Centaurea*. (Suite)

Flavonoïdes-C-glucosides			
Chrysine-8-C-glucoside	<b>106</b>	<i>C. omphalodes</i>	(Khalfallah et al. 2012)
Isoorientine 6''-O-glucoside	<b>107</b>	<i>C. sicula</i> (sub <i>C. nicaeensis</i> )	(Athmani et al. 1998)
Isoorientine 7-O-glucoside	<b>108</b>	<i>C. sicula</i> (sub <i>C. nicaeensis</i> )	(Athmani et al. 1998)
Isovitexine	<b>109</b>	<i>Volutaria lippii</i> (Syn: <i>C. lippii</i> )	(Mezache et al. 2010)
Isovitexine 2''-O-glucoside	<b>110</b>	<i>C. triumphetti</i>	(Gonnet 1993)
Vicénine-2	<b>111</b>	<i>C. horrida</i> <i>C. triumphetti</i>	(Flamini et al. 2002) (Gonnet 1993)

**Tableau I.10.** Les structures des flavonoïdes de **88** à **111**

N°	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
<b>Flavones-O-glycosylées</b>							
<b>88</b>	H	H	Glu	H	H	OH	H
<b>89</b>	H	OH	Glucur	H	H	H	H
<b>90</b>	H	H	Glu	H	OMe	OH	H
<b>91</b>	H	H	Rut	H	OH	OMe	H
<b>92</b>	H	OMe	MeGlucur	H	H	OH	H
<b>93</b>	H	OMe	Rut	H	H	OH	H
<b>94</b>	H	OH	Glucur	H	H	OH	H
<b>95</b>	H	H	Glu	H	OMe	OH	OMe



**Tableau I.10.** Les structures des flavonoïdes de **88** à **111**. (Suite)

Flavonols- <i>O</i> -glycosylés							
<b>96</b>	OMe	OMe	6''-Sin-Glu	H	OH	OMe	H
<b>97</b>	OMe	H	Glucur	H	H	OH	H
<b>98</b>	OMe	OMe	Glu	H	OH	OMe	H
<b>99</b>	OMe	H	Glu	H	OMe	OH	OH
<b>100</b>	OH	OMe	Glu	H	OMe	OH	H
<b>101</b>	<i>O</i> -Glu	H	OH	H	OH	OH	H
<b>102</b>	OH	H	Glu	H	H	OH	H
<b>103</b>	<i>O</i> -Rut	H	OH	H	H	OH	H
<b>104</b>	OMe	OMe	Glu	H	H	OH	H
<b>105</b>	<i>O</i> -Rut	H	OH	H	OH	OH	H
Flavonoïdes- <i>C</i> -glycosides							
<b>106</b>	H	H	OH	Glu	H	H	H
<b>107</b>	H	Glu-6'' - <i>O</i> -Glu	OH	H	OH	OH	H
<b>108</b>	H	Glu	<i>O</i> -Glu	H	OH	OH	H
<b>109</b>	H	Glu	OH	H	H	OH	H
<b>110</b>	H	Glu-2''- <i>O</i> -Glu	OH	H	H	OH	H
<b>111</b>	H	Glu	OH	Glu	H	OH	H

### II.3.3. Les acides phénoliques

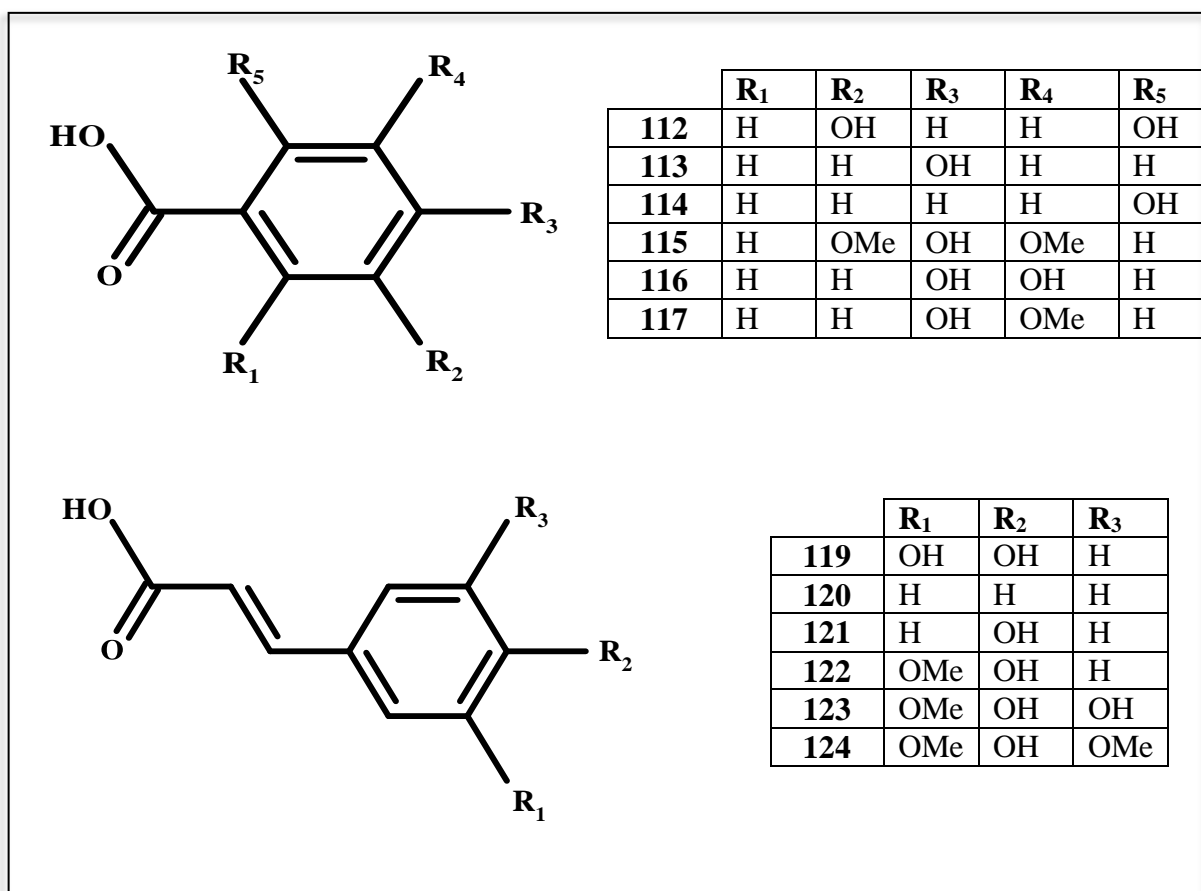
Le terme « acide phénolique » peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique. Quelques structures d'acides phénoliques isolés du genre *Centaurea* sont regroupées dans le tableau I.11.

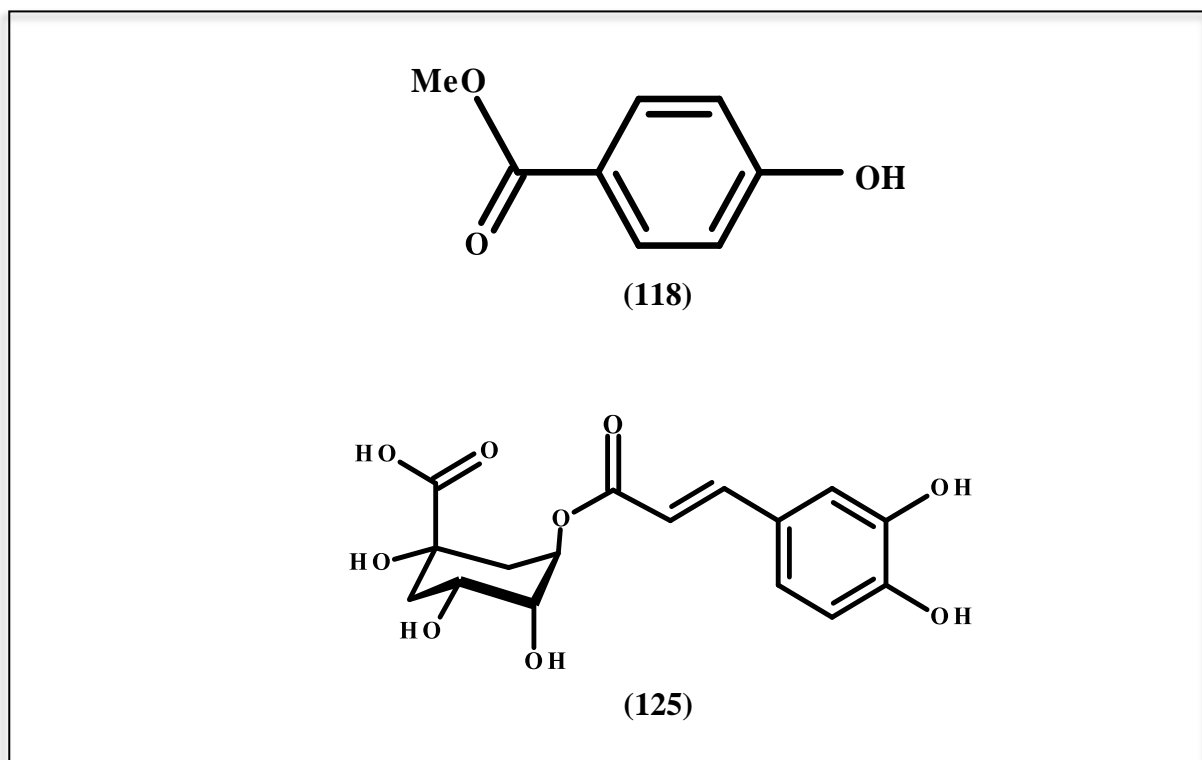
**Tableau I.11.** Quelques structures d'acides phénoliques isolés du genre *Centaurea*

Acide phénolique	N°	Espèce	Réf.
Acide gentisique	<b>112</b>	<i>C. choulettiana</i> <i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> ) (Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Acide 4-hydroxybenzoïque	<b>113</b>	<i>C. choulettiana</i> <i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> ) (Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Acide salicylique	<b>114</b>	<i>C. choulettiana</i>	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> )
Acide syringique	<b>115</b>	<i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )

**Tableau I.11.** Quelques structures d'acides phénoliques isolés du genre *Centaurea*. (Suite)

Acide phénolique	N°	Espèce	Réf.
Acide protocatéchique	116	<i>C. choulettiana</i> <i>C. fragilis</i> Dur. <i>C. melitensis</i>	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> ) (Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> ) (Ayad et al. 2012)
Acide vanillique	117	<i>C. choulettiana</i> <i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> ) (Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Paridol	118	<i>C. diluta</i> subsp. <i>algeriensis</i>	(Zater et al. 2016)
Acide caféïque	119	<i>C. choulettiana</i>	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> )
Acide cinnamique	120	<i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Acide <i>p</i> -coumarique	121	<i>C. choulettiana</i>	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> )
Acide férulique	122	<i>C. choulettiana</i>	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> )
Acide 5-hydroxyférulique	123	<i>C. africana</i>	(Seghiri et al. 2006)
Acide sinapique	124	<i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )
Acide chlorogénique	125	<i>C. choulettiana</i> <i>C. fragilis</i> Dur.	(Azzouzi et al. 2016 <sup>a</sup> ) (Azzouzi et al. 2016 <sup>b</sup> )





**Figure I.13.** Quelques structures d'acides phénoliques isolés du genre *Centaurea*

#### II.4. Etudes antérieures sur *Volutaria lippii*

Des investigations phytochimiques antérieures sur *Volutaria lippii* ont été menées et ont conduit à l'isolement et la détermination de trois lactones sesquiterpéniques : amberboïne, groshemine et cnicine ; et trois flavonoïdes : apigénine 6-*C*-glucoside (isovitexine), quercétine 3-*O*-glucoside (isoquercitrine) et kaempférol 3-*O*-rutinoside (nicotiflorine), (Mezache et al. 2010 ; Bermejo et al. 1969 ; Breton et al. 1968).

En utilisant la technique LC-ESI-MS/MS, dix-huit composés appartenant aux familles des acides phénoliques et des flavonoïdes ont été identifiés : acide quinique, acide gallique, acide protocatéchique, acide chlorogénique, acide caféique, acide syringique, acide 1,3-di-*O*-cafeoylquinique, acide *trans*-fêrulique, rutine, lutéoline-7-*O*-glucoside, acide 3,4-di-*O*-cafeoylquinique, quercetrine, apigénine-7-*O*-glucoside, acide 4,5-di-*O*-cafeoylquinique, kaempférol, apigénine, cirsilinéol, acacétine (Ben Salah et al. 2019).

Une étude plus récente menée l'investigation phytochimique de l'extrait méthanol 90% a reporté l'isolement et la détermination structurale de 5 lactones sesquiterpéniques de type

guaianolide : lippiine, aguérine B, 11 $\beta$ ,13-dihydrodéacylcynaropicrine, 3 $\beta$ -O-acetylcynaropicrine et cynaropicrine ; trois flavonoïdes de type flavone : hispiduline, lutéoline et apigénine-7-O- $\beta$ -glucuronidemethylester (Rafrafi et al. 2021).

## II.5. Intérêts thérapeutiques du genre *Centaurea* et de ses principaux métabolites secondaires

Dans la littérature, plusieurs espèces du genre *Centaurea* sont référenciées pour une large utilisation en médecine traditionnelle (Yesilada 2002 ; Kamanzi et al. 1983), notons par exemple :

- *Centaurea iberica* Trev. ex Sprengel utilisée pour les traitements des abcès et de l'asthme (Yesilada 2002).
- *Centaurea calcitrapa* L., *Centaurea jacea* L. et *Centaurea sinaica* sont utilisées dans le traitement de la fièvre (Yesilada 2002).
- *Centaurea melitensis* et *Centaurea pallascens*, sont très connues pour leurs activités diurétiques, digestives et antidiabétiques (Kamanzi et al. 1983).

De plus, plusieurs études récentes ont montré : l'activité anti inflammatoire de plusieurs centaurees dont *Centaurea ainetensis*, *Centaurea tchihatcheffii* Fischer (Talhok et al. 2008 ; Koca et al. 2009), l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Centaurea diffusa* (Skliar et al. 2005) et l'activité antipyrétique de *Centaurea calcitrapa* et *Centaurea jacea* (Kumarasamy et al. 2003).

Dans le cadre de l'étude de la biodiversité de la flore algérienne, le genre *Centaurea* présente un grand intérêt, notamment comme source de lactones sesquiterpéniques et flavonoïdes. En effet, des études réalisées dans notre laboratoire ont montré que les extraits chloroforme de *Centaurea furfuracea* et *Centaurea musimomum* (*musimonum*) ont des activités anti-plasmodiale et cytotoxique importantes (Medjroubi et al. 2005 ; Akkal et al. 2007).

Aux cours de ces dernières décennies, l'investigation biologique des extraits et des constituants chimiques du genre *Centaurea*, a montré qu'ils possèdent diverses activités biologiques. Une synthèse de quelques études concernant les molécules bioactives isolées du genre *Centaurea* est présentée dans le tableau I.12.

Tableau I.12. Quelques molécules bioactives du genre *Centaurea*.

Activité développée	Espèce	Molécule	Réf.
<b>Antioxydante et cytotoxique</b> <b>Antimicrobienne et antifongique</b>	<i>C. montana</i>	Montanoside	(Shoeb et al. 2006)
	<i>C. pullata</i>	8 $\alpha$ -O-(4-hydroxy-2-méthylènebutanoyloxy) mélitensine	(Djeddi et al. 2008)
<b>Antiproliférative et cytotoxique</b> <b>Antiproliférative</b>	<i>C. jacea</i> L.	Centaureidine	(Forgo et al. 2012)
<b>Cytotoxique</b> <b>Antinociceptive et antipyrétique</b> <b>Antiulcérogène</b>	<i>C. deflexa</i>	Aguérine B 15-nor-guaianolide	(Chica et al. 2011)
	<i>C. africana</i>	Algérianine	(Seghiri et al. 2009)
<b>Antiprotosomale</b>	<i>C. depressa</i>	Solstitialine A	(Akkol et al. 2009)
	<i>C. solstitialis</i>	Acetylsolstitialine	
	<i>C. solstitialis</i>	Solstitialine A Acetylsolstitialine Chlorojanérine	(Gürbüz and Yesilada 2007)
	<i>C. urvillei</i>	Kaempférol Apigénine eriodictyol-7-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside - 3,5-dihydroxyphenethyl alcohol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	(Gülcemal et al. 2010)

### III. Conclusion

A l'issue de cette recherche bibliographique, il est à relever que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les lactones sesquiterpéniques constituent des classes de substances naturelles fortement accumulées par les genres *Centaurea* et *Volutaria* et que leurs diverses activités biologiques sont bien reconnues. Ces raisons nous ont poussés à entreprendre dans le cadre de notre travail, l'étude de l'espèce algérienne : *Volutaria lippii* synonyme *Centaurea lippii*.

# **CHAPITRE II**

## **Travaux personnels**

## I. Etude botanique de l'espèce *Volutaria lippii*

### I.1. Place dans la systématique

L'espèce *Volutaria lippii* L. appartient à :

- **Règne** : Plante
- **Sous règne** : Plantes vasculaires
- **Embranchement** : Phanérogames
- **Sous embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Sous classe** : Astéride
- **Ordre** : Astérales
- **Famille** : Astéracées
- **Genre** : *Volutaria*
- **Espèce** : *Volutaria lippii* (L.) Cass. Ex Maire. Syn. : *Centaurea lippii* (L.)

### I.2. Répartition géographique

*Volutaria Lippii* est une plante herbacée vivace indigène qui pousse largement dans le bassin méditerranéen surtout en Tunisie et en Algérie (Quezel and Santa 1963 ; Kadereit and Jeffrey 2007).

### I.3. Description botanique

Cette espèce admet les synonymes suivants :

- *Centaurea lippii* (L.)
- *Amberboa lippii* (L.) DC
- *Volutarella lippii* (L.) Cass.
- *Volutaria lippii* (L.) Cass.

L'espèce *Volutaria lippii* (L.) Cass. a des fleurons rouges, bleus ou purpurins. Une plante généralement rameuse dès la base. Tiges un peu scabres, diffuses ou dressées. Feuilles lyrées ou pinnatifides. Capitules petits (1 – 1,2 cm de long). Bractées scarieuses sur les bords, jaunes, à sommet noir en général, velues-soyeuses. Akènes très pubescents à côtes en général peu marquées de même que les fossettes (Quezel and Santa 1963).



**Figure II.1.** L'espèce *Volutaria lippii*

([https://www.jungledragon.com/specie/18439/volutaria\\_lippii.html](https://www.jungledragon.com/specie/18439/volutaria_lippii.html))

#### **I.4. Récolte de la matière végétale**

La plante a été collectée dans la région de M'Sila (Coordonnées GPS : 35° 40' 37.5924" N et 4° 32' 30.5304" E), au mois de Mai 2015, la détermination botanique de cette plante a été réalisée par Monsieur Rebbas Khellaf, professeur au département des sciences de la nature et de la vie, faculté des sciences, université Mohamed Boudiaf M'Sila. Un spécimen (KR0065) a été déposé au niveau de l'herbier du laboratoire botanique, Université Mohamed Boudiaf, M'Sila.

Les parties aériennes de cette espèce (fleurs, feuilles) ont été séchées dans un endroit sec, frais, aéré et à l'abri des rayons solaires ; puis broyées et pesées (3300 g).



## **I.5. Matériels utilisés**

### **I.5.1. Matériel chromatographique**

#### **I.5.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les travaux analytiques en vue de trouver les meilleurs systèmes de solvants pour effectuer des séparations par CCM, ont été réalisés sur plaques de gel de silice 60 F254 déposé sur des feuilles d'aluminium (Merck).

Après dépôt de l'échantillon et élution par divers systèmes de solvants, les plaques CCM sont révélées par des lampes UV ( $\lambda = 254$  et  $365$  nm). Les spots qui apparaissent sur les plaques indiquant la présence de composés qui absorbent à ces deux longueurs d'onde, sont délimités. Ensuite, ces plaques sont pulvérisées avec une solution d'anisaldéhyde-  $H_2SO_4$  à 1 %, puis chauffées jusqu'à apparition des taches préalablement délimitées et d'éventuelles autres taches indiquant la présence de composés qui n'absorbent pas aux longueurs d'onde 254 et 365 nm. Les systèmes de solvants donnant les meilleurs profils chromatographiques sont retenus pour les séparations par CCM préparative.

#### **I.5.1.2. Chromatographie sur colonne (CC)**

Les séparations chromatographiques des extraits de la plante ont été effectuées avec des colonnes de gel de silice (Merck 230-400 mesh) de différents diamètres (15 et 40 mm). La phase mobile est choisie en fonction des résultats des travaux analytiques par CCM.

#### **I.5.1.3. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)**

##### **I.5.1.3.1. CLHP analytique**

Avant injection, les fractions ont subi un test effectué par CLHP analytique afin d'avoir une idée sur leur profil chromatographique (richesse en composants), de choisir le meilleur gradient de polarité pour l'appliquer lors de la séparation par CLHP semi-préparative et afin de définir les longueurs d'onde auxquelles nos produits absorbent le plus.

##### **I.5.1.3.2. CLHP semi-préparative**

La séparation des fractions a été effectuée avec deux techniques CLHP semi-préparatives :

- RP-HPLC-UV-Vis Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), système VL 1260 Bin Pump, équipé d'un détecteur 1260 MWD VL UV-Vis,  $\mu$ -Dégazeur 1260, une colonne Phenomenex (Torrance, CA, USA) Supelcosil LC-18 (250 x 10 mm, 5  $\mu$ m) et un injecteur Rheodyne.

- RP-HPLC-RI système Waters 590 équipé d'un détecteur à indice de réfraction Waters R-401, une colonne Knauer Eurospher 100-10 C-18 (300 x 8 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) ou  $\mu\text{Bondapak C-18}$  (300 x 7,8 mm, 10  $\mu\text{m}$ ) et un injecteur Rheodyne.

## **I.5.2. Matériel physico-chimique**

### **I.5.2.1. Spectrométrie de masse**

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un système ESI-MS Finnigan LCQ Deca, équipé du logiciel Xcalibur 3,1 software.

### **I.5.2.2. Spectroscopie RMN**

Les expériences RMN ont été réalisées sur un spectromètre Bruker AVANCE 400 et un spectromètre Bruker DRX-600 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Allemagne) équipé d'une cryosonde Bruker 5 mm TCI à 300 K. Tous les spectres RMN 2D ont été enregistrés dans le MeOH- $d_4$  (Sigma Aldrich), des séquences d'impulsion standard et un cycle de phase ont été utilisés pour les spectres relatifs aux expériences COSY, HMBC et HSQC. Les données RMN ont été traitées à l'aide du logiciel Topspin 3.2.

### **I.5.2.3. Spectrophotométrie UV-visible**

Les spectres UV-Visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre (THERMO ELECTRON 300, 190–800 nm). Les différentes mesures sont effectuées dans des cuves en quartz contenant 2 ml de la solution.

## **II. Extraction de la matière végétale**

Les parties aériennes (feuilles et fleurs) récoltées ont été séchées pendant plusieurs jours à l'abri des rayons solaires et de l'humidité puis pesées et broyées grossièrement. La quantité obtenue (3300 g) est mise à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol/Eau ; 70/30 ; v/v) pendant 48 heures. Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant, le macérât est filtré et le filtrat est récupéré.

L'extrait hydroalcoolique obtenu est concentré sous vide à une température n'excédant pas 35 °C. La solution obtenue est diluée avec de l'eau distillée à raison de 400 mL par kg de matière sèche puis mise au frais (4 °C) pendant une nuit pour décantation et précipitation de composés hautement lipophiles (chlorophylles, cires, résines, boues terpéniques etc...). Après filtration, la solution obtenue subit des affrontements successifs par des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-

butanol. Les trois phases organiques obtenues sont séchées au sulfate de sodium anhydre, filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite. Le tableau II.1, résume la masse des extraits obtenus et leur rendement par rapport au poids initial du matériel végétal.

**Tableau II.1.** Masses et rendements des extraits de *Volutaria lippii*

Extrait	Masse	Rendement
Chloroforme	9,2 g	0,27 %
Acétate d'éthyle	6,5 g	0,18 %
<i>n</i> -butanol	41 g	1,24 %

La figure II.2 résume les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des trois extraits dérivés de l'extrait hydroalcoolique.

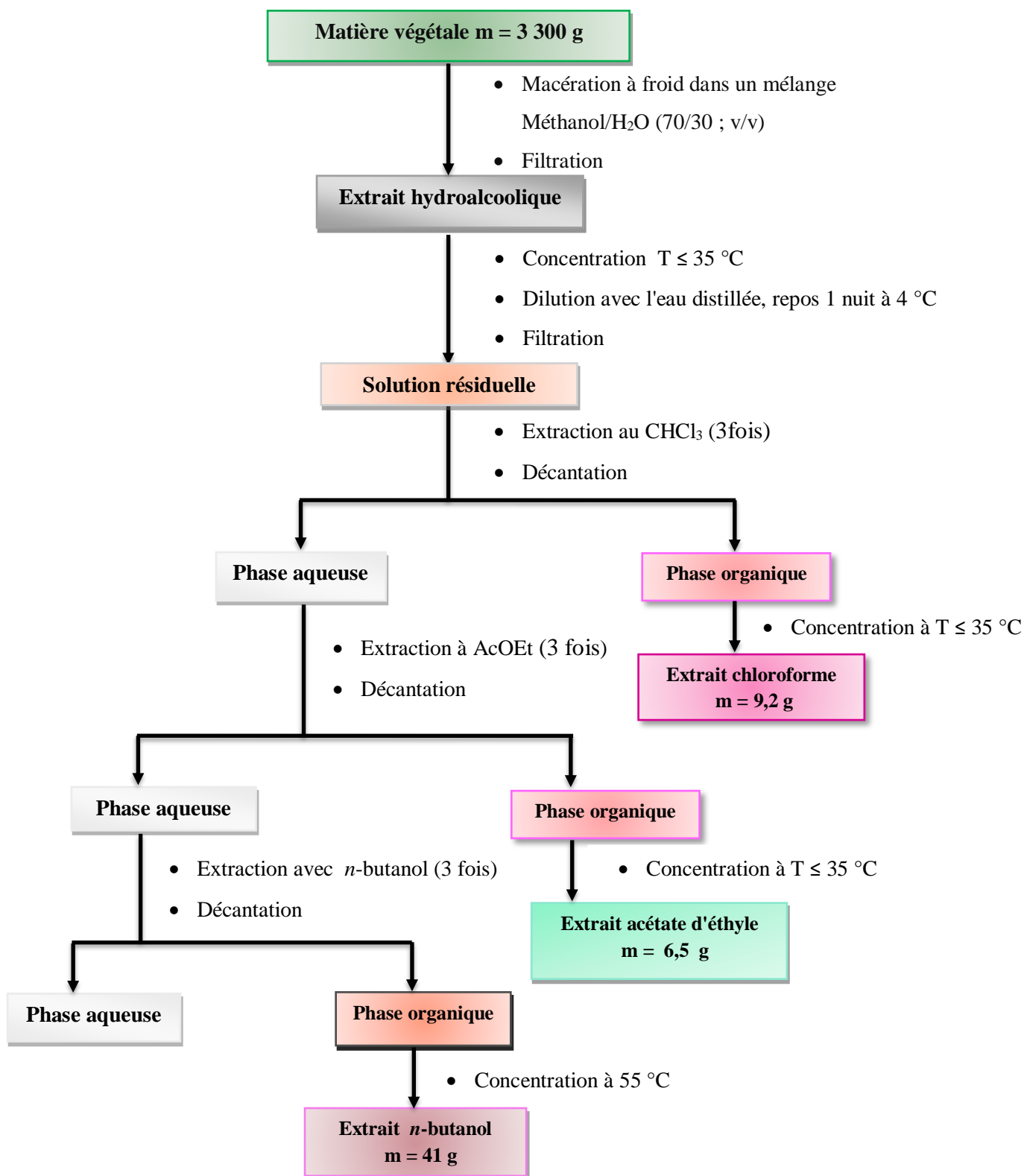


Figure II.2. Organigramme d'extraction des parties aériennes de *Volutaria lippii*

### III. Analyses quantitatives des extraits de *Volutaria lippii*

Des déterminations quantitatives des principaux composés phénoliques ont été effectuées sur les trois extraits de l'espèce *Volutaria lippii*.

#### III.1. Dosage des polyphénols totaux

##### III.1.1. Principe

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de l'espèce *Volutaria lippii* a été effectué par une méthode adaptée par Singleton avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximale aux environs de 750-765 nm. L'acide gallique est utilisé comme étalon (Singleton et al. 1965).

##### III.1.2. Procédure expérimentale

Un volume de 125  $\mu$ L de chaque extrait préparé dans le méthanol (1 mg d'extrait dissout dans 1 mL de méthanol), ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essais, suivis de l'addition de 500  $\mu$ L d'eau distillée et 125  $\mu$ L de réactif de Folin-Ciocalteu (FCR). Après incubation pendant 3 minutes, 1250  $\mu$ L de carbonate de sodium (2 %) et 1 mL d'eau distillée ont été ajoutés respectivement au milieu réactionnel.

Ensuite, le mélange a été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 90 minutes. L'absorbance de toutes les solutions a été mesurée par un spectrophotomètre à 760 nm contre le blanc sans extrait. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

##### III.1.3. Expression des résultats

La teneur en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon de l'acide gallique (50-500  $\mu$ g/mL) et les résultats sont exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g extrait).

## III.2. Dosage des flavonoïdes totaux

### III.2.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé en utilisant le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), ce réactif forme avec les groupements hydroxyles des positions C-5 ou C-3 et l'oxygène du carbonyle de la position C-4 des flavones et flavonols, un complexe très stable de couleur jaune qui absorbe à une longueur d'onde de 430 nm (Amen et al. 2013).

### III.2.2. Procédure expérimentale

Un volume de 1 mL de chaque extrait préparé dans le méthanol (1 mg d'extrait dissout dans 1 mL de méthanol) est mélangé à 1 mL de trichlorure d'aluminium à 2%. Après une incubation pendant 15 min à température ambiante, l'absorbance du mélange obtenu est directement mesurée au spectrophotomètre UV- visible à 430 nm contre le blanc sans extrait. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

### III.2.3. Expression des résultats

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, réalisée par un standard étalon (la quercétine) à différentes concentrations (10-80  $\mu\text{g/mL}$ ) et les résultats sont exprimés en mg d'équivalents de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g extrait) ou en mg d'équivalents de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

## III.3. Évaluation de l'activité antioxydante de l'espèce *Volutaria lippii*

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire (Naveed et al. 2015).

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante font intervenir généralement la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un agent antioxydant. Ces méthodes peuvent être classées en deux groupes selon leurs mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (Chang et al. 1994).

### III.3.1. Matériel végétal

Dans ce contexte, nous avons étudié l'activité anti-radicalaire des trois extraits ( $\text{CHCl}_3$ , AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *Volutaria lippii*.

### III.3.2. Matériels et méthodes

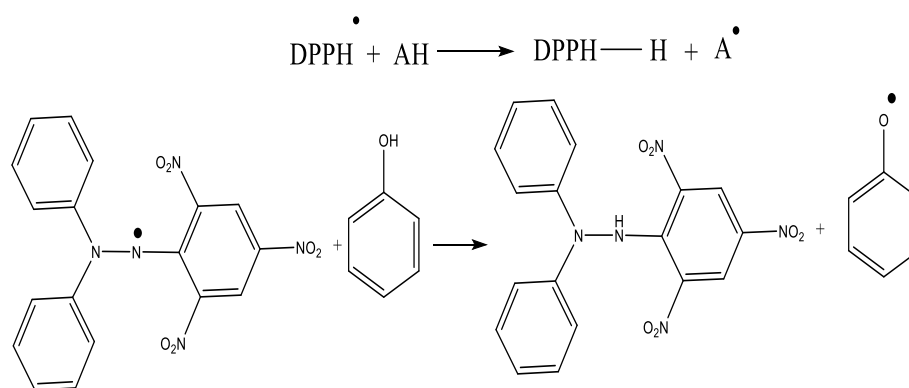
Au cours de cette étude, notre choix s'est porté sur l'utilisation de plusieurs tests chimiques, à savoir : l'effet scavenger de nos extraits sur le radical (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) (DPPH $\cdot$ ) et le radical cation 2,2-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS $^{+\cdot}$ ), le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et enfin le test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) qui mesure les pouvoir de réduction des ions du cuivre.

#### III.3.2.1. Test de l'activité antiradicalaire par la méthode du DPPH $\cdot$

##### III.3.2.1.1. Principe

Le radical DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou de mélange complexe. La méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant visualisé également par un changement de coloration de la solution qui vire du violet au jaune (Stürtz et al. 2006).

La première étape est la capture d'un atome d'hydrogène du composé phénolique par le radical DPPH pour donner du diphénylhydrazine et un radical phénoxy (figure II.3). Cette étape est la première d'une série de réactions telles que des fragmentations, additions, ou autres qui peuvent éventuellement influencer les résultats, notamment les cinétiques de la capture du DPPH par le composé testé (Magalhães et al. 2006).



**Figure II.3.** Réaction du radical DPPH avec un phénol (Koleva et al. 2002)

### III.3.2.1.2. Procédure expérimentale

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Blois (Blois M.S. 1958). Dans un lecteur de microplaque à 96 puits on introduit 40  $\mu\text{L}$  des différents extraits aux concentrations allant de 12,5-800  $\mu\text{g/mL}$ , on ajoute 160  $\mu\text{L}$  de la solution méthanolique de DPPH préparée à une concentration de (0,1 mM). Après agitation, le mélange est incubé à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible contre un contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH et le méthanol. Le BHT et le BHA ont été utilisés comme contrôles positifs.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre DPPH est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH selon l'équation suivante :

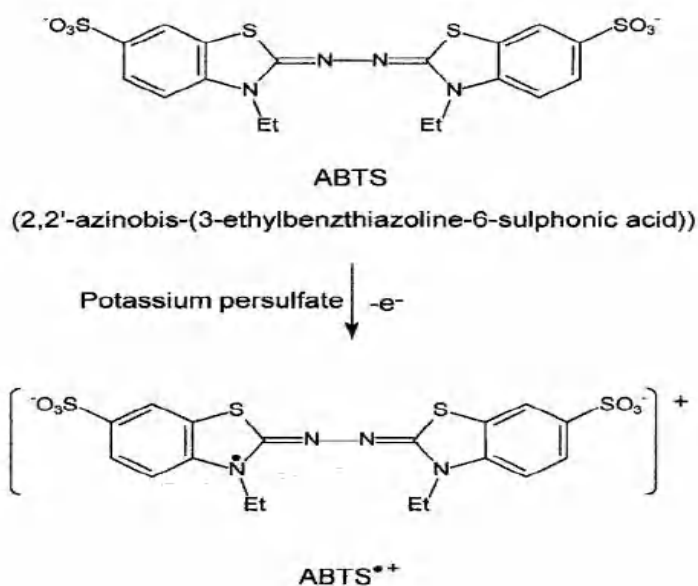
$$\% \text{ d'activité anti - radicalaire} = \left[ \frac{(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{contrôle}}} \times 100 \right]$$

### III.3.2.2. Test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS<sup>•+</sup>

#### III.3.2.2.1. Principe

L'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) (incolore) réagit facilement en présence du persulfate de potassium ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) pour donner le radical cation stable : 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) de couleur bleu verdâtre. L'ajout d'un antioxydant de type phénol, thiol, ou tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron va réduire ce radical cation pour redonner l'ABTS et donc provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical-cation mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants (Rice-Evans and Miller. 1994), (Pannala et al. 2001).





**Figure II.4.** Oxydation de l'ABTS par le persulfate de potassium et génération de l'ABTS<sup>•+</sup> (Pannala et al. 2001).

### III.3.2.2.2. Procédure expérimentale

L'analyse spectrophotométrique de l'activité de piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup> a été déterminée selon la méthode de Re (Re et al. 1999), avec une légère modification. Une solution d'ABTS à 7 mM dans l'eau a été ajoutée à une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM. Le mélange est agité puis placé à l'abri de la lumière pendant 12 h pour former le radical cation ABTS<sup>•+</sup>. Avant utilisation, la solution est diluée dans l'éthanol pour obtenir une absorbance de  $0,708 \pm 0,025$  à 734 nm. La solution obtenue est stable lorsqu'elle est conservée à l'abri de la lumière et à température ambiante. Ensuite, un volume de 160  $\mu\text{L}$  de la solution diluée du radical ABTS<sup>•+</sup> est ajoutée à 40  $\mu\text{L}$  des différents extraits aux concentrations allant de 12,5 à 800  $\mu\text{g/mL}$ . Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible contre un contrôle négatif contenant uniquement la solution d'ABTS<sup>•+</sup> et le méthanol. Le BHT et le BHA ont été utilisés comme contrôles positifs.

Le pourcentage de réduction du radical-cation ABTS<sup>•+</sup> est calculé selon la formule ci-dessous

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire ABTS}^{\bullet+} = \left[ \frac{(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{contrôle}}} \times 100 \right]$$

### III.3.2.3. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène

#### III.3.2.3.1. Principe

L'activité de blanchiment du  $\beta$ -carotène a été évaluée en utilisant la méthode décrite par Marco (Marco 1968). L'acide linoléique en émulsion aqueuse est oxydé. Les radicaux libres formés sont piégés par la  $\beta$ -carotène. La mesure de l'activité antioxydante suit la diminution de la densité optique en fonction du temps. En effet la décoloration du  $\beta$ -carotène résulte du piégeage des radicaux formés au cours de l'autooxydation de l'acide linoléique, ce qui a pour effet de diminuer la conjugaison.

#### III.3.2.3.2. Procédure expérimentale

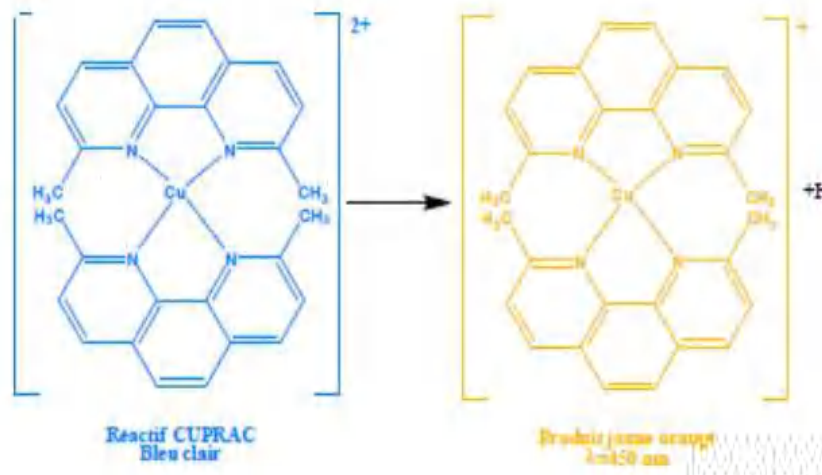
Une masse de 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dissoute dans 1 mL de chloroforme puis ajouté à un volume de 25  $\mu$ L d'acide linoléique et de 200 mg de Tween 40, en donnant un mélange émulsifiant. Après l'évaporation du chloroforme, 50 mL d'eau distillée saturée en oxygène, ont été ajoutés (barboter à l'oxygène pendant 30 min avec un débit de 100 mL/min) tout cela pour donner la solution A. L'absorbance du  $\beta$ -carotène doit être entre 0,8-0,9 nm et mesurée à 470 nm. Les activités antioxydantes (pourcentage d'inhibition) des échantillons ont été calculées selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{\text{Absorbance du } \beta - \text{ carotène à 24 h}}{\text{Absorbance initiale du } \beta - \text{ carotène}} \times 100 \right]$$

### III.3.2.4. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

#### III.3.2.4.1. Principe

La méthode CUPRAC est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (NC), cuivre ( $\text{Cu}^{+2}$ ),  $\text{Nc}2\text{-Cu}^{+2}$ . En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproïne est réduit et cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak et al. 2004). Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe  $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}$ , produisant ainsi un complexe chromogène de  $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}$  qui absorbe à 450 nm (Figure II.5). La méthode du CUPRAC mesure le pouvoir antioxydant à un pH à peu près physiologique (environ  $\text{pH}=7$ ), et à 450 nm de sorte qu'il simule mieux l'action physiologique de ces antioxydants. Le CUPRAC chromophore monovalent chargé [ $\text{Cu}(\text{Nc})^{2+}$ ] est soluble dans les deux solvants aqueux et organiques, ce qui permet la détermination simultanée des antioxydants hydrophiles et lipophiles (Apak et al., 2004).



**Figure II.5.** La réduction du complexe chromogène  $\text{Cu}^{+2}\text{-Nc}$

#### III.3.2.4.2. Procédure expérimentale

La réduction du cuivre (CUPRAC) a été déterminée par la méthode décrite par Apak (Apak et al. 2004) avec quelques modifications. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles du BHA et du BHT utilisés comme contrôles positifs.

Dans une microplaque à 96 puits, on introduit un volume de 60  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon d'acétate d'ammonium  $\text{AcONH}_4$  à pH 7,0, un volume de 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure de cuivre (II) et 50  $\mu\text{L}$  d'une solution alcoolique de néocuprine. 40  $\mu\text{L}$  des extraits testés à différentes concentrations (12,5 - 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ont été ajoutés pour atteindre un volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Les microplaques de 96 puits ont été ensuite incubées pendant 1 h à l'abri de la lumière. Enfin l'absorbance est mesurée à 450 nm contre un blanc sans extrait.

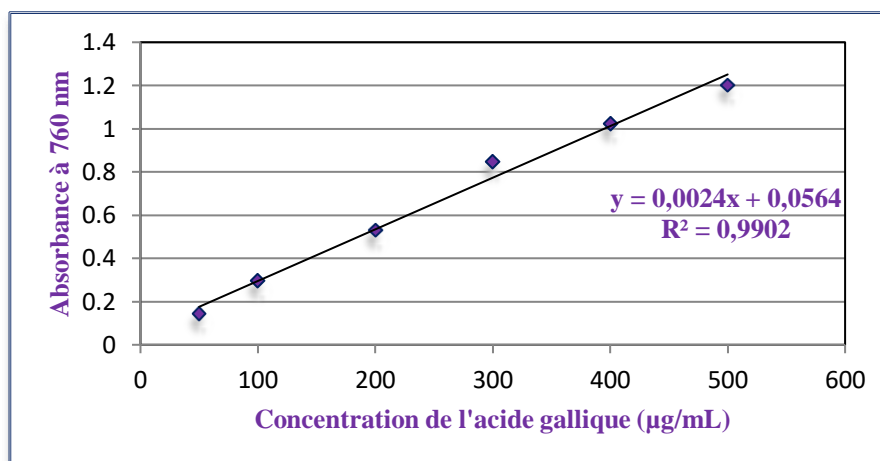
### IV. Expression des résultats des analyses quantitatives des extraits de *Volutaria lippii*

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (écart type) d'analyses en trois essais.

Les valeurs de  $\text{CI}_{50}$  (la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical) et de  $\text{A}_{0,50}$  (la concentration indiquant 0,50 d'absorbance) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir des deux courbes : [% inhibition = f (concentrations)] pour la  $\text{CI}_{50}$  et [Absorbance = f (concentrations)] pour la valeur  $\text{A}_{0,50}$ .

#### IV.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Volutaria lippii* a été réalisé par la méthode spectrophotométrique de Folin-ciocalteu (FCR). La teneur en polyphénols totaux est exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique par g d'extrait, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique ( $y = 0,0024x + 0,0564$ ) avec  $R^2 = 0,9902$  (Figure II.6).



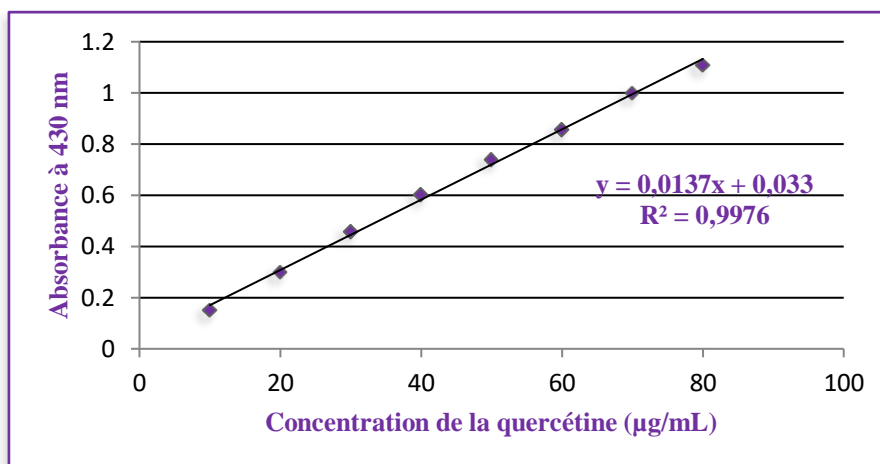
**Figure II.6.** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats du dosage des polyphénols totaux ont été obtenus par extrapolation de l'absorbance des extraits sur la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats représentés dans le tableau II.2 montrent que l'extrait acétate d'éthyle est l'extrait le plus riches en polyphénols avec une teneur de  $165,80 \pm 1,97$  mg EAG/g d'extrait sec de la plante, suivi par les extraits *n*-butanol et chloroforme ( $121,50 \pm 1,25$  et  $81,92 \pm 1,25$  mg EAG/g d'extrait sec de la plante, respectivement).

#### IV.2. Résultats du dosage des flavonoïdes totaux

La détermination quantitative des flavonoïdes est réalisée par la méthode de trichlorure d'aluminium, elle est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 430 nm.

La quercétine a été utilisée comme étalon. La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en mg d'équivalents de quercétine par g d'extrait. Les résultats sont obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage ayant l'équation : ( $y = 0,0137x + 0,033$ ) avec  $R^2 = 0,9976$  (Figure II.7).



**Figure II.7.** Courbe d'étalonnage de la quercétine

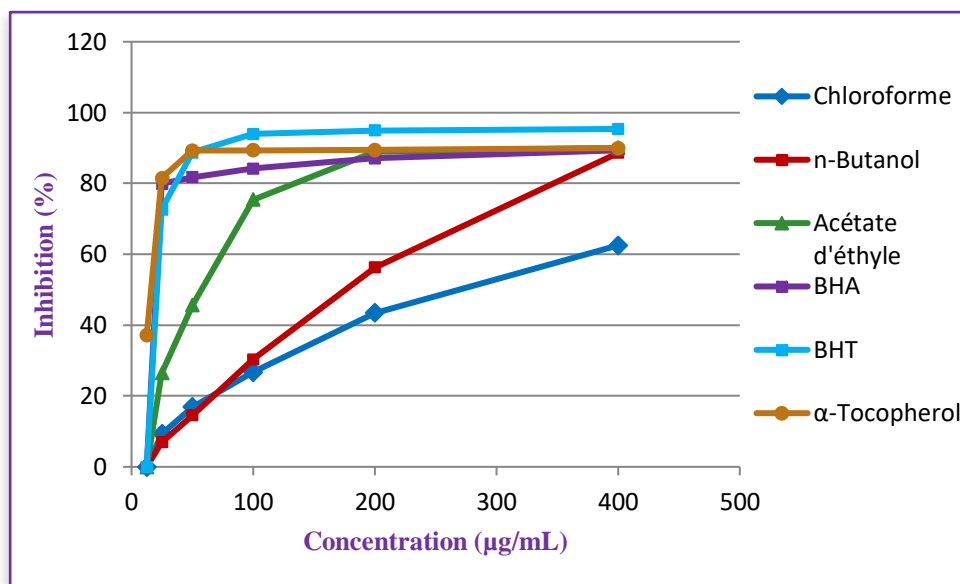
Le tableau II.2, montre que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de  $86,13 \pm 0,55$  mg EQ/g d'extrait sec de la plante, suivi par les extraits *n*-butanol et chloroforme ( $50,51 \pm 1,67$  et  $23,26 \pm 1,11$  mg EQ/g d'extrait sec de la plante respectivement).

**Tableau II.2.** Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits de *Volutaria lippii*

Extraits	Teneur des polyphénols (mg EGA/g)	Teneur des flavonoïdes (mg EQ/g)
Chloroforme	$81,92 \pm 1,25$	$23,26 \pm 1,11$
Acétate d'éthyle	$165,80 \pm 1,97$	$86,13 \pm 0,55$
<i>n</i> -butanol	$121,50 \pm 1,25$	$50,51 \pm 1,67$

#### IV.3. Résultats du test de l'activité antiradicalaire par la méthode au radical DPPH

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés pour une évaluation directe, rapide et fiable de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité et de la simplicité de l'analyse. Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe présentant le pourcentage d'inhibition des différents extraits ainsi que celle des standards en fonction des concentrations testées (figure II.8). Les résultats ont été enregistrés en moyenne  $\pm$  écart type dans le tableau II.3



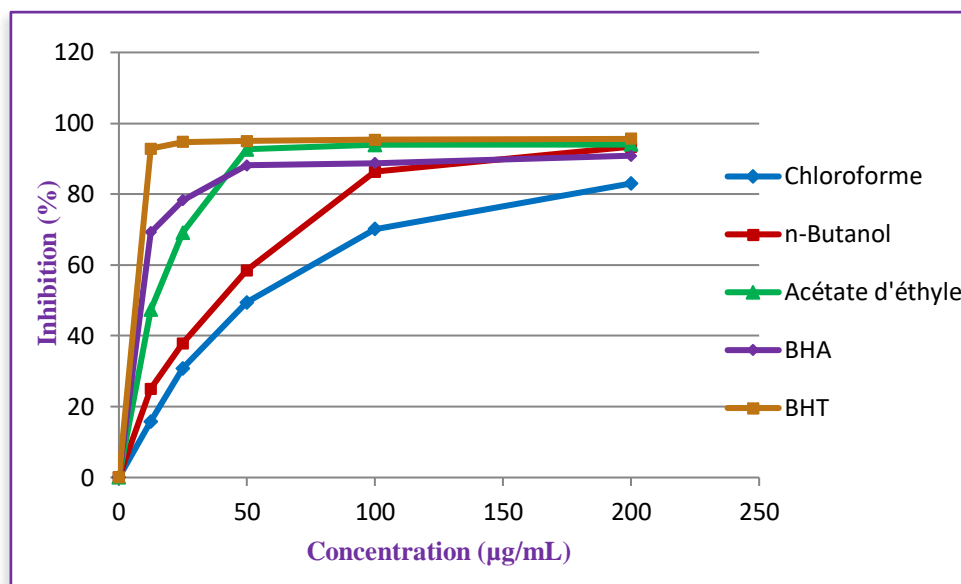
**Figure II.8.** Courbes représentatives des pourcentages d'inhibition du radical DPPH par les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol et les standards en fonction de la concentration.

Les résultats montrent que les trois extraits présentent un effet inhibiteur modéré. L'extrait acétate d'éthyle présente la meilleure activité par rapport aux autres extraits ( $CI_{50} = 59,67 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$ ). Ceci peut être expliqué par sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes signalé précédemment. En comparant l'activité de cet extrait par rapport aux standards, la  $CI_{50}$  de l'extrait acétate d'éthyle est quatre fois plus faible que celle du BHT ( $CI_{50} = 12,99 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$ ) et neuf fois plus faible que la  $CI_{50}$  du BHA ( $CI_{50} = 6,14 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$ ).

#### IV.4. Résultats du test de l'activité antiradicalaire à l'ABTS<sup>+</sup>

L'ABTS est un composé organique stable utilisé dans l'évaluation de l'activité antiradicalaire. Les résultats des  $CI_{50}$  sont présentés dans le tableau II.3.

La figure II.9 représente le graphe de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Volutaria lippii* et des standards.

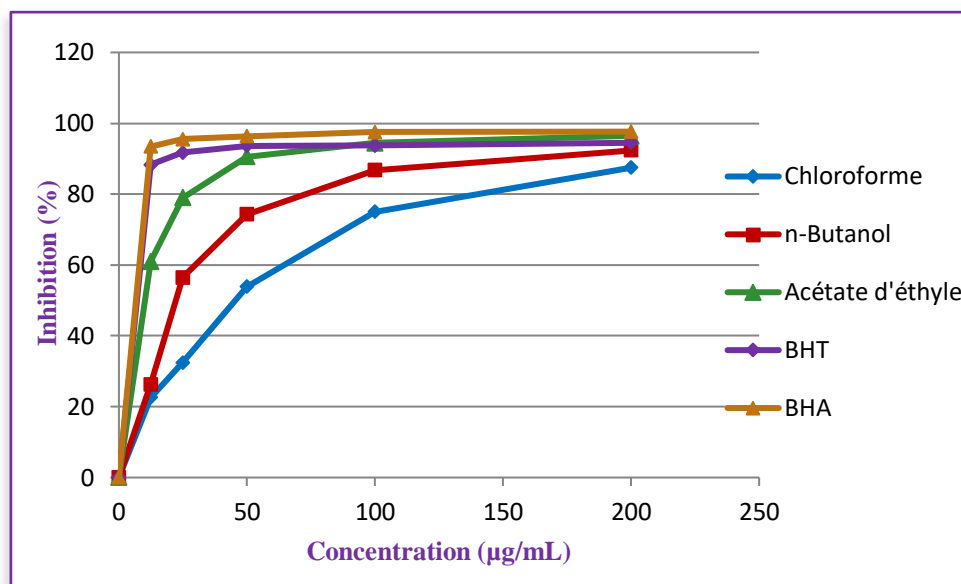


**Figure II.9.** Courbe des pourcentages d'inhibition de l'ABTS<sup>+</sup> par les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Volutaria lippii*

Les pourcentages d'inhibition et les valeurs des  $CI_{50}$  révèlent que les trois extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol ont une activité antioxydante modérée ( $CI_{50} = 116,30 \pm 8,84 \mu\text{g/mL}$ ;  $12,30 \pm 1,04$  et  $36,82 \pm 3,53$  respectivement), elle est inférieure à celle des deux standards BHA et BHT ( $CI_{50} < 1,81 \mu\text{g/mL}$ ).

#### IV.5. Résultats du test de blanchiment du $\beta$ -carotène

Les résultats des  $CI_{50}$  sont présentés dans le tableau II.3. La figure II.10 représente le graphique de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Volutaria lippii* et des standards.



**Figure II.10.** Courbe des pourcentages d'inhibition du  $\beta$ -carotène par les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Volutaria lippii*

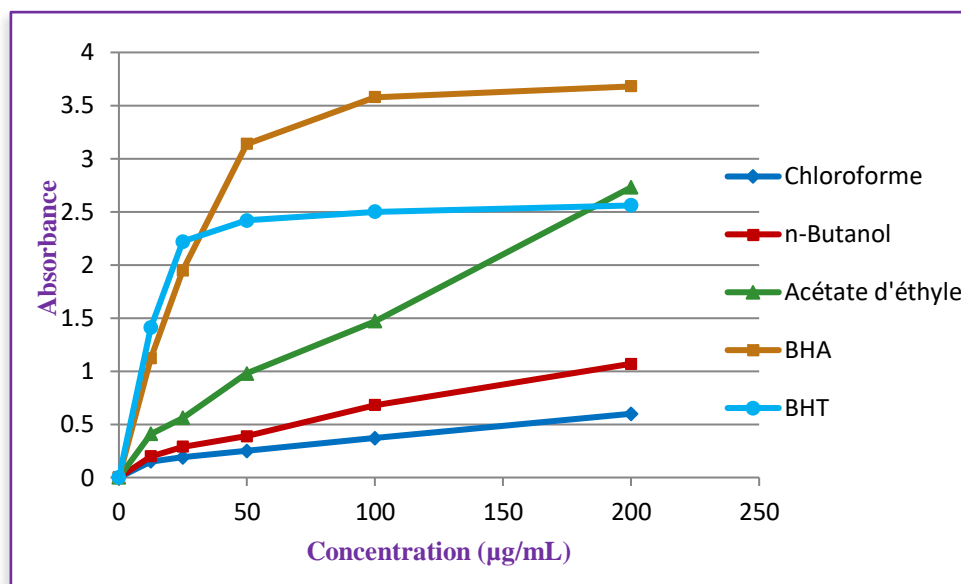
Les pourcentages d'inhibition et les valeurs des  $CI_{50}$  révèlent que les trois extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol ont une activité antioxydante modérée (Chloroforme :  $CI_{50} = 47,70 \pm 4,94 \mu\text{g/mL}$  ; *n*-butanol :  $CI_{50} = 27,30 \pm 1,94$  et acétate d'éthyle  $CI_{50} < 12.5$ ).

#### IV.6. Résultats du test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

L'activité antioxydante déterminée par la méthode (CUPRAC) est basée sur la mesure de l'absorbance à 450 nm de la réduction du complexe stable Neocuproïne-cuivre (II) de couleur bleu en présence d'un antioxydant en complexe stable Neocuproïne-cuivre (I) de couleur orange. Les résultats de l'absorbance  $A_{0,50}$  sont résumés dans le tableau II.3

Les résultats du test CUPRAC de chaque extrait ainsi que des standards sont représentés par les absorbances pour chaque concentration (Figure II.11)





**Figure II.11.** Courbes d'absorbance des différents extraits de *Volutaria lippii* et des standards en fonction de leurs concentrations dans le test CUPRAC

D'après les résultats obtenus, les absorbances  $A_{0,50}$  des trois extraits testés chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol varient entre  $151,77 \pm 0,9$ ,  $22,58 \pm 0,93$  et  $63,40 \pm 3,97$  µg/mL, respectivement. On constate que l'extrait qui a une activité significative par rapport aux autres extraits est l'extrait acétate d'éthyle suivi par l'extrait *n*-butanol puis l'extrait chloroforme. Cette activité inhibitrice du CUPRAC de l'extrait acétate d'éthyle est deux fois plus petite que celle du BHT ( $A_{0,50} = 8,97 \pm 3,94$  µg/mL) et quatre fois plus faible que le standard BHA ( $A_{0,50} = 5,35 \pm 0,71$  µg/mL).

Les résultats de ce test confirment les résultats des deux premiers tests.

**Tableau II.3.** Valeurs  $CI_{50}$  et  $A_{0,50}$  des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Volutaria lippii* dans les tests DPPH, ABTS<sup>+</sup>, β-carotène et CUPRAC

	DPPH	ABTS	β-carotène	CUPRAC
	$CI_{50}$ (µg/mL)			$A_{0,50}$ (µg/mL)
<b>Chloroforme</b>	$268,69 \pm 4,92$	$116,30 \pm 8,84$	$47,70 \pm 4,94$	$151,77 \pm 0,9$
<b>Acétate d'éthyle</b>	$59,67 \pm 0,78$	$12,30 \pm 1,04$	< 12,5	$22,58 \pm 0,93$
<b><i>n</i>-butanol</b>	$172,98 \pm 9,21$	$36,82 \pm 3,53$	$27,30 \pm 1,94$	$63,40 \pm 3,97$
<b>BHA</b>	$6,14 \pm 0,41$	$1,29 \pm 0,30$	$1,05 \pm 0,03$	$5,35 \pm 0,71$
<b>BHT</b>	$12,99 \pm 0,41$	$1,81 \pm 0,10$	$0,91 \pm 0,01$	$8,97 \pm 3,94$
<b>α-Tocopherol</b>	$13,02 \pm 5,17$	NT	NT	NT

BHT: butylhydroxytoluène, BHA: Butylhydroxyl anisole.

L'ensemble des résultats obtenus par le test au DPPH, ABTS, blanchiment du  $\beta$ -carotène et la méthode de la capacité antioxydante par réduction de cuivre CUPRAC indique que l'extrait acétate d'éthyle montre un effet antioxydant assez important suivi par les deux autres extraits, il semble que ce résultat corrèle bien avec leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Il a été reporté que l'activité anti-radicalaire des extraits est dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes (Kadri et al. 2011), (Ghedadba et al. 2014).

Les résultats obtenus nous ont guidés à entreprendre par priorité l'investigation phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle puis l'extrait *n*-butanol et enfin l'extrait chloroforme.

## V. Etude phytochimique des extraits

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince pour mettre au point l'éluant ou le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats en matière de séparation. Les résultats de nos travaux analytiques nous ont poussés à étudier les trois extraits vu que leurs profils chromatographiques montrent une richesse de leur composition chimique.

Ces extraits ont subi comme première étape, leur fractionnement sur colonne conduisant à l'obtention d'un certain nombre de fractions. Les fractions obtenues ont été analysées par CCM pour réunir les fractions présentant le même profil chromatographique, et déterminer un nouveau système de solvants susceptible de mieux séparer leurs composants.

### V.1. L'extrait acétate d'éthyle

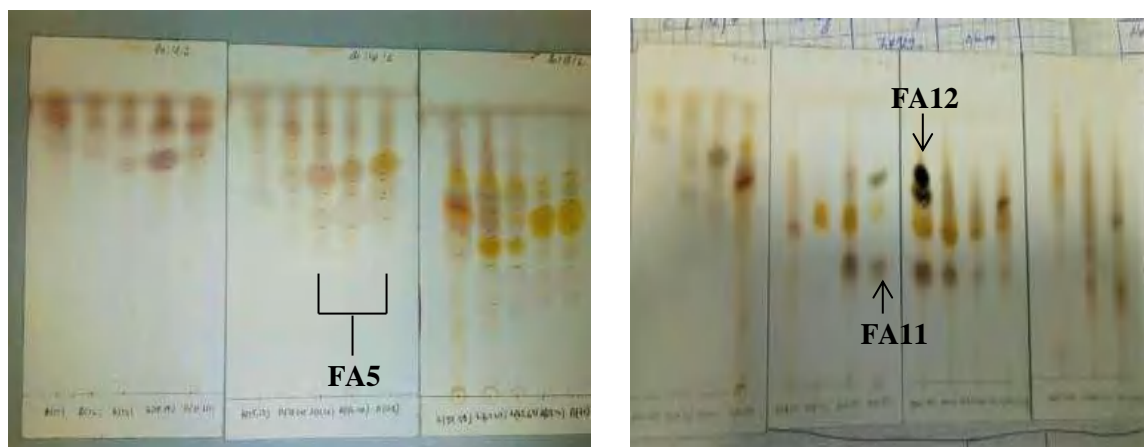
#### V.1.1 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Volutaria lippii*

Une masse d'environ 6 g de l'extrait acétate d'éthyle est dissoute dans un volume minimum de méthanol, additionnée d'une petite quantité de gel de silice puis séchée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène. La poudre obtenue est déposée sur une colonne confectionnée avec 192 g de gel de silice, éluee par un gradient Hexane/Acétate d'éthyle. L'élution débute avec le système Hexane/Acétate d'éthyle (95 : 5) dont la polarité sera augmentée par addition progressive d'acétate d'éthyle. Des pots de 100 mL sont recueillis et analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm) puis révélées avec un révélateur à base d'acide sulfurique et d'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 minutes à 100 °C. Suivant la similitude des profils chromatographiques, les contenus des pots sont regroupés, donnant ainsi 20 fractions. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau II.4.

Tableau II.4. Résultats du fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Volutaria lippii*.

Lots de pots	N° de fraction	Poids (mg)	Système de solvants (%)	
			Hexane	Acétate d'éthyle
1 – 8	FA1	144,0	80	20
9 – 14	FA2	156,3	75	25
15 – 24	FA3	165,7		
25 – 30	FA4	133,0		
31 – 41	<b>FA5</b>	<b>286,5</b>	70	30
42 – 53	FA6	122,3		
54 – 59	FA7	175,9	65	35
60 – 67	FA8	102,4		
68 – 71	FA9	134,6		
72 – 91	FA10	192,1	60	40
92 – 99	<b>FA11</b>	<b>410,3</b>	55	45
100 – 113	<b>FA12</b>	<b>336,2</b>		
114 – 125	FA13	270,6	50	50
126 – 136	FA14	259,6		
137 – 150	FA15	249,0	45	55
151 – 179	FA16	230,0	40	60
180 – 197	FA17	280,0	30	70
198 – 218	FA18	180,8	20	80
219 – 239	FA19	229,2	10	90
240 - 242	FA20	203,7	0	100

La figure II.12 représente le profil chromatographique des fractions obtenue



**Figure II.12.** Plaques CCM des fractions de l'extrait acétate d'éthyle (Système d'élution : butanol/acide acétique/eau (80/18/2) (v/v/v))

## V.1.2 Séparation et purification des fractions issues de l'extrait acétate d'éthyle

### V.1.2.1. Par CLHP semi-préparative à détecteur UV

#### V.1.2.1.1. Etude de la fraction FA5

Cette fraction a été injectée sur CLHP analytique dans les conditions chromatographiques suivantes :

**Colonne :** Supelcosil LC-18 (250 x 10 mm, 5  $\mu$ m)

**Phase mobile :** (H<sub>2</sub>O Milli-Q/Acide formique), (99,9/0,1), (v/v) en voie **A** et (Acétonitrile /MeOH), (50/50) (v/v) en voie **B**

**Concentration de la fraction :** 100 mg/mL

**Débit :** 0,5 mL/min

**Longueur d'onde :** 230 nm

**Volume d'injection :** 5  $\mu$ L

**Profil gradient :** Le gradient utilisé est reporté dans le tableau II.5

**Tableau II.5.** Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction **FA5**.

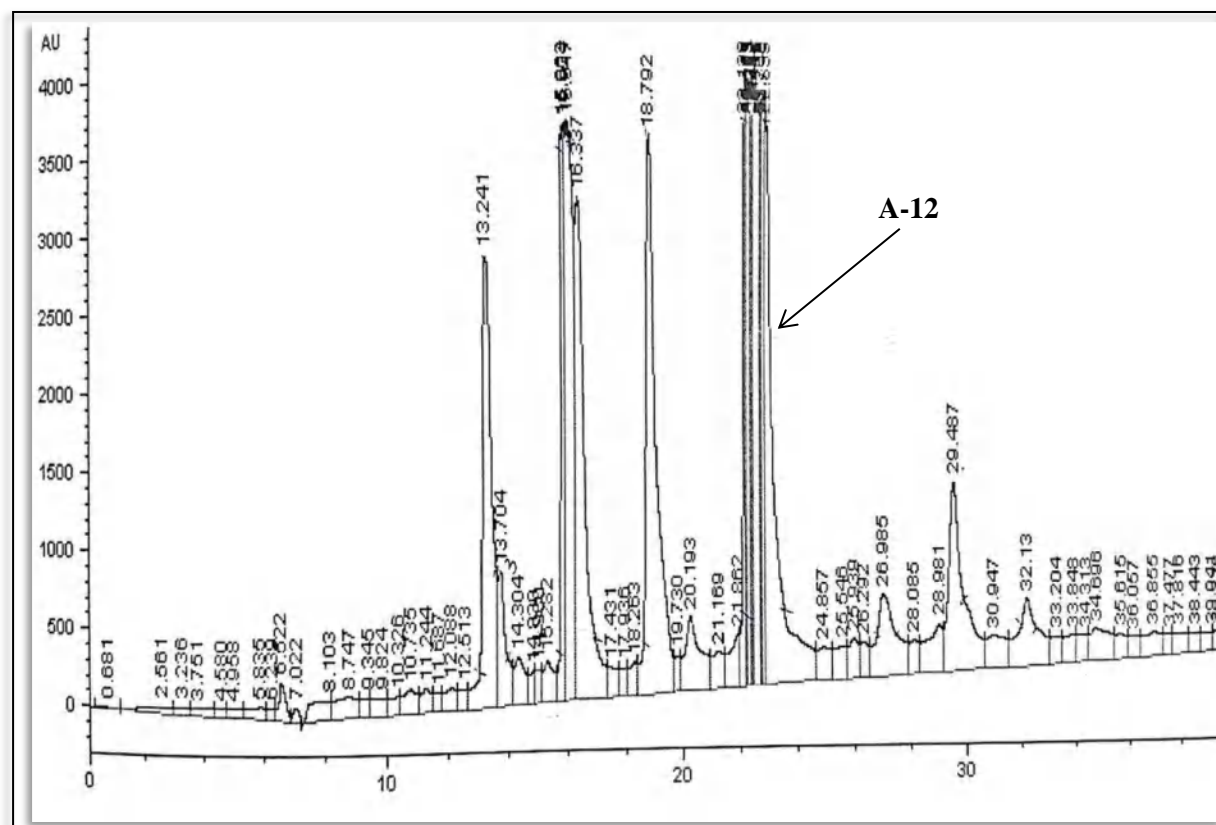
Temps (min)	(%) Voie A	(%) Voie B
0	90	10
10	60	40
15	50	50
45	0	100
55	0	100

Après injection de la fraction en CLHP analytique, on procède à la séparation des produits sur CLHP semi-préparative dans les mêmes conditions chromatographiques sauf :

**Débit :** 2 mL/min

**Volume d'injection :** 30  $\mu$ L

**Profile gradient :** Le même profile (Tableau II.5)



**Figure II.13.** Chromatogramme CLHP de la fraction FA5.

La séparation de la fraction FA5 a donné le composé A-12 ( $m = 3,7$  mg) à  $t_R = 22,0$  min. (Figure II.13)

#### V.1.2.1.2. Etude de la fraction FA12

Cette fraction a été injectée en CLHP analytique dans les mêmes conditions chromatographiques que la fraction FA5:

**Profile gradient :** Le gradient utilisé est reporté dans le tableau II.6

**Tableau II.6.** Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction FA12.

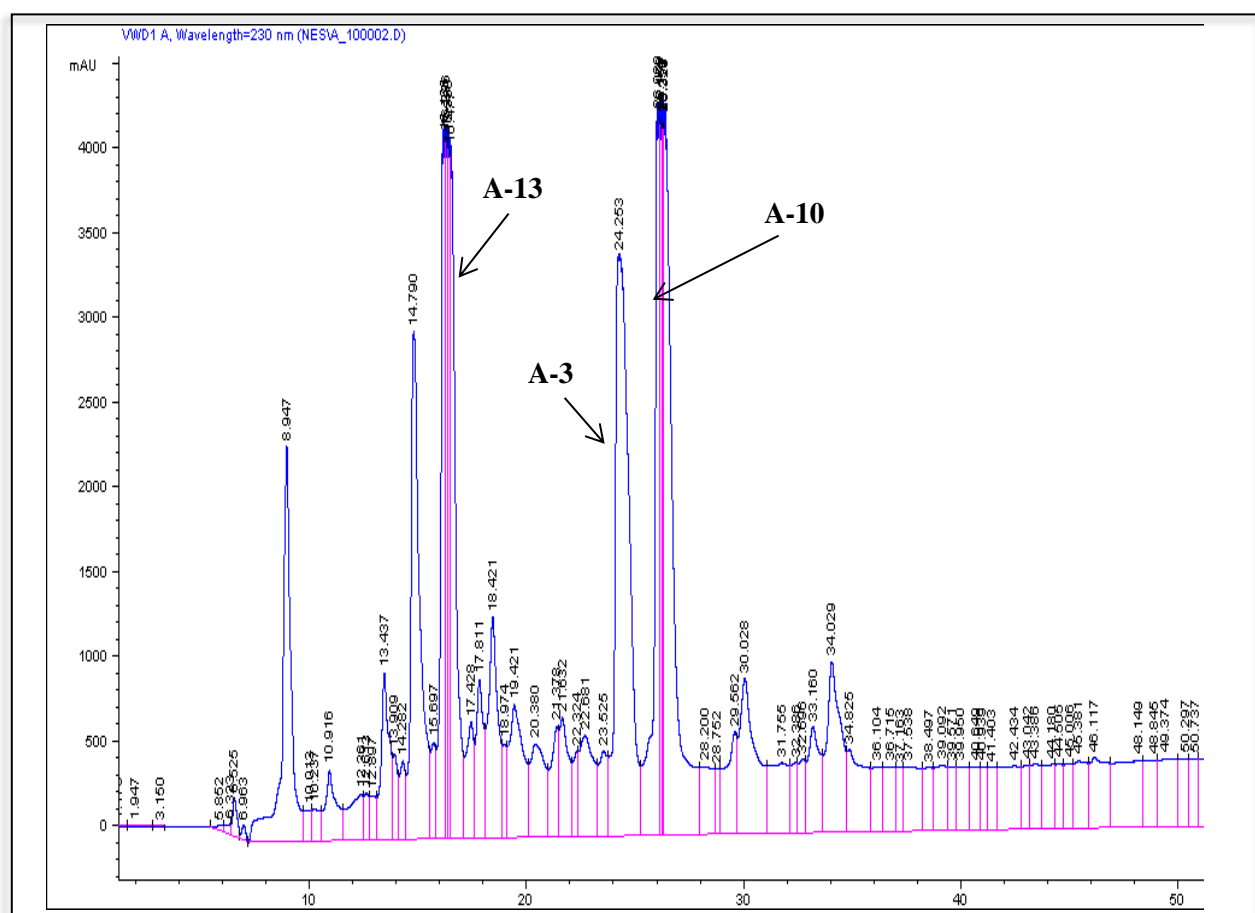
Temps (min)	(%) Voie A	(%) Voie B
0	90	10
10	60	40
15	50	50
45	0	100
55	0	100

Après injection de la fraction en CLHP analytique, on procède à la séparation des produits sur CLHP semi-préparative dans les mêmes conditions chromatographiques sauf :

**Débit :** 2 mL/min

**Volume d'injection :** 30  $\mu$ L

**Profil gradient :** Le même profil (Tableau II.6)

**Figure II.14.** Chromatogramme CLHP de la fraction FA12.

La séparation de la fraction **FA12** a donné les composés **A-13** ( $m = 3,4$  mg) à  $t_R = 16,5$  min, **A-3** ( $m = 4,2$  mg) à  $t_R = 24$  min et **A-10** ( $m = 3,7$  mg) à  $t_R = 26,0$  min. (Figure II.14)

### V.1.2.2. Par chromatographie sur couche mince

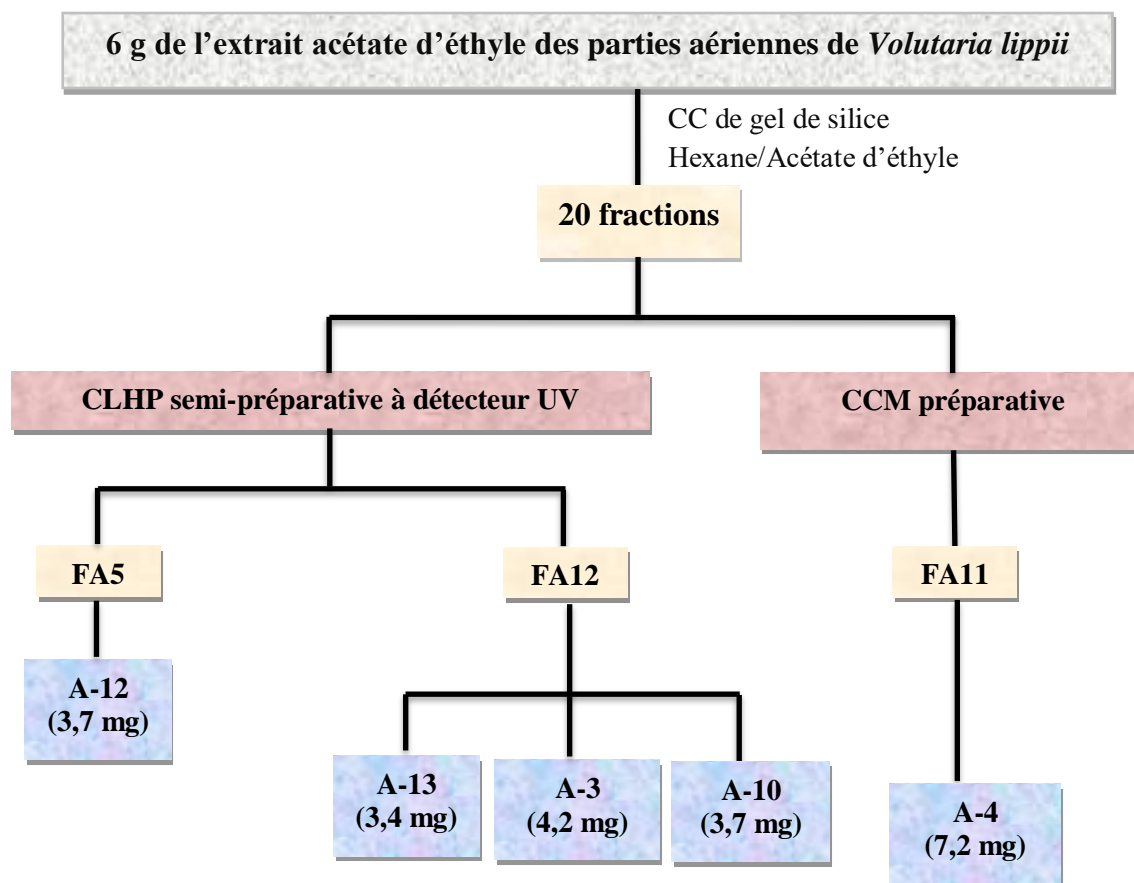
#### V.1.2.2.1. Etude de la fraction FA11

La fraction FA11 (75,9 mg) a été traitée par une chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice. Eluées avec le système (chloroforme/MeOH, 9/0,4), et visionnées par la lumière de Wood, ces plaques montrent trois bandes. Nous nous sommes intéressées à la première bande qui était la plus intense admettant une couleur noire après révélation par l'anisaldéhyde ; cette bande représente le produit **A-4** (7,2 mg).



**Figure II.15.** Plaque CCM du produit **A-4** dans le système d'élution : Chloroforme/Méthanol (9/0,4) (v/v)

L'étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle nous a permis d'isoler 5 produits purs. Le protocole présenté dans la figure II.16 résume les travaux de fractionnement, séparation et purification des produits issus de cet extrait de l'espèce *Volutaria lippii*.



**Figure II.16.** Organigramme récapitulatif des étapes de séparation et purification de l'extrait acétate d'éthyle de *Volutaria lippii*

## V.2. L'extrait *n*-butanol

### V.2.1. Fractionnement de l'extrait *n*-butanol de *Volutaria lippii*

Les tests de chromatographie analytique que nous avons entrepris sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, ont montré que la meilleure séparation était obtenue avec le système de solvant ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) (9 : 1).

Une masse de 12 g de l'extrait *n*-butanol est dissoute dans un volume minimum de méthanol, additionnée d'une petite quantité de gel de silice puis séchée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène. La poudre ainsi obtenue est déposée sur une colonne confectionnée avec 384 g de gel de silice, éluée par un gradient  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ . L'élution débute avec le système ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ) (9 : 1) dont la polarité sera augmentée par addition progressive de MeOH. Des pots de 100 mL sont recueillis, concentrés et analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm) puis révélées avec un révélateur à base d'acide sulfurique et d'anisaldéhyde et



chauffées pendant 3 minutes à 100 °C. Suivant la similitude des profils chromatographiques, les contenus des pots recueillis sont regroupés, donnant ainsi 30 fractions. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau II.7

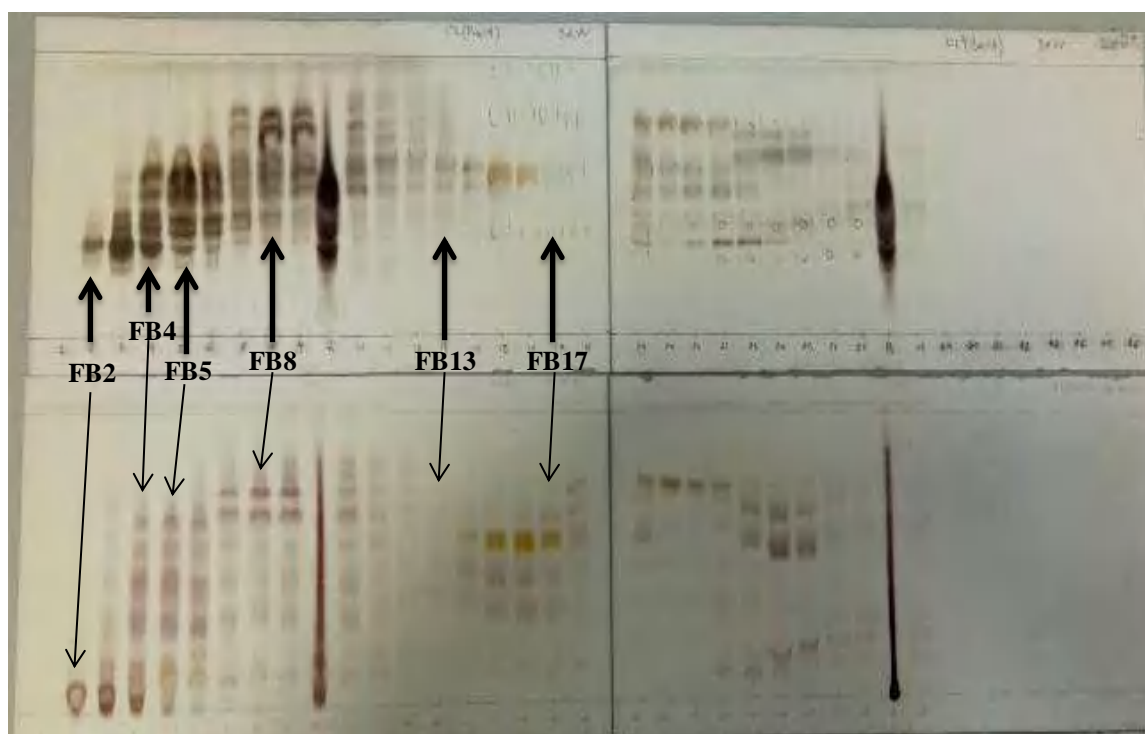
**Tableau II.7.** Résultats du fractionnement de l'extrait *n*-butanol de *Volutaria lippii*

Lots des pots réunis	N° de fraction	Poids (mg)	Système de solvants (%)	
			CHCl <sub>3</sub>	MeOH
1	FB1	341,2	90	10
2	<b>FB2</b>	<b>582,3</b>		
3 – 4	FB3	490,3		
5	<b>FB4</b>	<b>634,4</b>		
6	<b>FB5</b>	<b>455,2</b>		
7 – 8	FB6	726,9	85	15
9 – 10	FB7	826,3		
11 – 12	<b>FB8</b>	<b>670,5</b>		
13 – 15	FB9	998,1	80	20
16	FB10	210,1		
17	FB11	239,4	75	25
18	FB12	387,6		
19 – 21	<b>FB13</b>	<b>1261,9</b>		
22 – 25	FB14	538,5	70	30
26 – 28	FB15	641,9	65	35
29 – 30	FB16	368,9	60	40
31 – 32	<b>FB17</b>	<b>528,8</b>		
33 – 35	FB18	351,7	55	45
36	FB19	146,3		
37	FB20	149,9		
38 – 42	FB21	583,3	50	50
43 – 45	FB22	155,9		
46 – 49	FB23	117,9	40	60
50 – 52	FB24	105,3	30	70
53	FB25	57,4	20	80

**Tableau II.7.** Résultats du fractionnement de l'extrait *n*-butanol de *Volutaria lippii*. (Suite)

Lots des pots réunis	N° de fraction	Poids (mg)	Système de solvants (%)	
			CHCl <sub>3</sub>	MeOH
54	FB26	23,5		
55 – 56	FB27	81,4		
57 – 58	FB28	32,1	10	90
59	FB29	38,7		
60 – 65	FB30	37,1	100	0

La figure II.17 représente le profil chromatographique des fractions sélectionnées pour étude.



**Figure II.17.** Plaques CCM des fractions de l'extrait *n*-butanol, système d'élution :  
Butanol/Acide acétique/Eau (80/18/2) (v/v/v)

## V.2.2. Séparation et purification des fractions issues de l'extrait *n*-butanol

### V.2.2.1. Par CLHP semi-préparative à détecteur UV

#### V.2.2.1.1. Etude de la fraction FB2

Cette fraction a été injectée en CLHP analytique dans les conditions chromatographiques suivantes :

**Colonne :** Supelcosil LC-18 (250 x 10 mm, 5 μm)

**Phase mobile :** (H<sub>2</sub>O Milli-Q/Acide formique), (99,9/0,1), (v/v) en voie **A** et (Acétonitrile /Acide formique), (99,9/0,1) (v/v) en voie **B**.

**Concentration de la fraction :** 100 mg/mL

**Débit :** 0,5 mL/min

**Longueur d'onde :** 230 nm

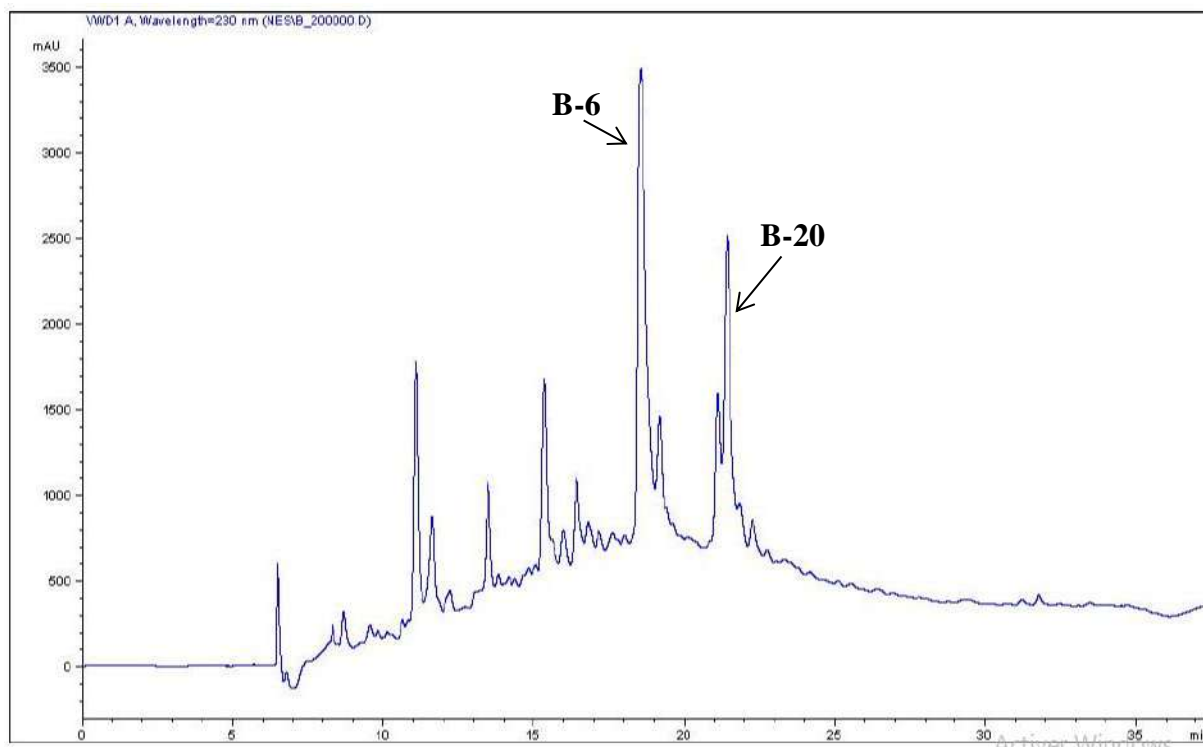
**Volume d'injection :** 5  $\mu$ L

**Profile gradient :** Le gradient utilisé est reporté dans le tableau II.8

**Tableau II.8.** Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction **FB2**.

Temps (min)	(%) Voie A	(%) Voie B
0	90	10
30	0	100
40	0	100

Cette analyse a mené à l'obtention du chromatogramme montré dans la Figure II.18



**Figure II.18.** Chromatogramme CLHP de la fraction **FB2**

Après avoir obtenu une idée sur le chromatogramme de cette fraction, nous avons procédé à la séparation des produits en CLHP semi-préparative dans les mêmes conditions chromatographiques sauf :

**Débit :** 2 mL/min

**Volume d'injection :** 30  $\mu$ L

**Profil gradient :** Le même profil (Tableau II.8)

La séparation de la fraction **FB2** a donné les composés purs **B-6** ( $m = 3,6$  mg) à un temps de rétention  $t_R = 19,0$  min, **B-20** ( $m = 3,0$  mg) à  $t_R = 21,0$  min. (Figure II.18)

#### V.2.2.1.2. Etude de la fraction FB5

Cette fraction a été injectée en CLHP analytique dans les conditions chromatographiques suivantes :

**Colonne :** Supelcosil LC-18 (250 x 10 mm, 5  $\mu$ m)

**Phase mobile :** (H<sub>2</sub>O Milli-Q/Acide formique), (99,9/0,1), (v/v) en voie **A** et (Acétonitrile /MeOH), (50/50) (v/v) en voie **B**

**Concentration de la fraction :** 100 mg/mL

**Débit :** 0,5 mL/min

**Longueur d'onde :** 254 nm

**Volume d'injection :** 5  $\mu$ L

**Profil gradient :** Le gradient utilisé est reporté dans le tableau II.9

**Tableau II.9.** Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction **FB5**.

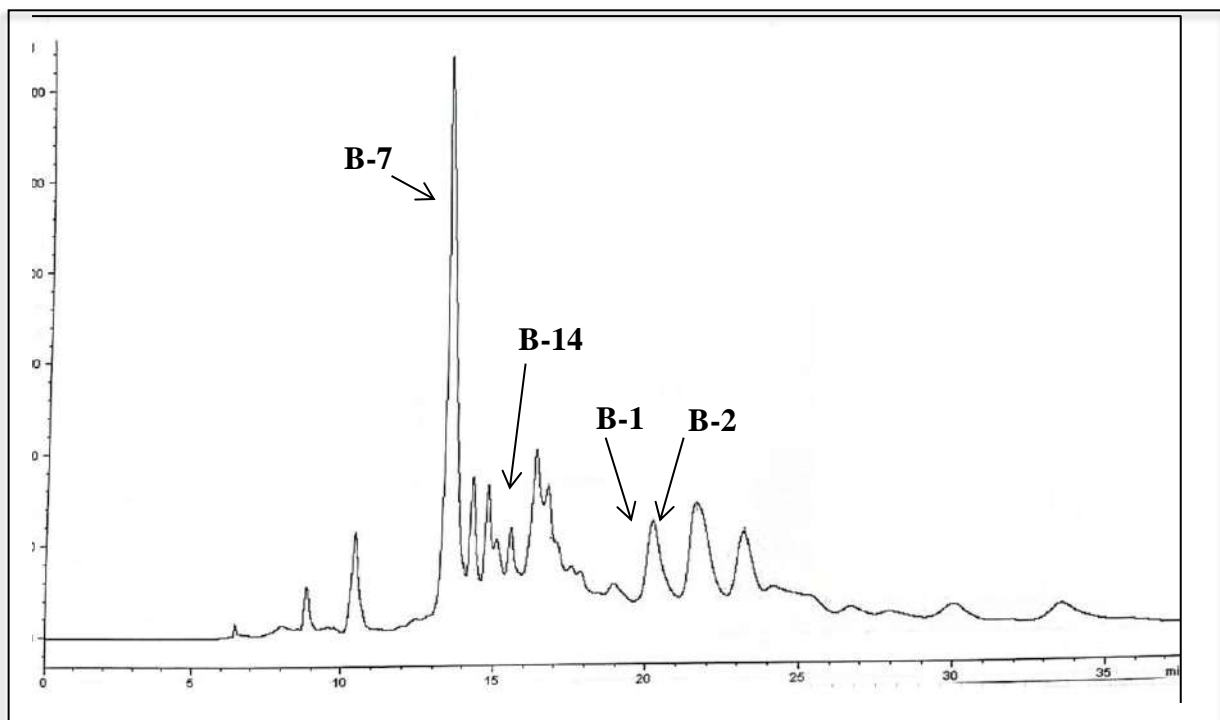
Temps (min)	(%) Voie A	(%) Voie B
0	90	10
10	60	40
15	60	40
45	0	100
55	0	100

Après injection de la fraction en CLHP analytique, nous avons procédé à la séparation des produits en CLHP semi-préparative dans les mêmes conditions chromatographiques sauf :

**Débit :** 2 mL/min

**Volume d'injection :** 30  $\mu$ L

**Profil gradient :** Le même profil (Tableau II.9)



**Figure II.19.** Chromatogramme CLHP de la fraction **FB5**.

La séparation de la fraction **FB5** a donné les composés **B-1** ( $m = 1,8$  mg) à  $t_R = 20,5$  min, **B-2** ( $m = 1,3$  mg) à  $t_R = 20,6$  min, **B-7** ( $m = 3,0$  mg) à  $t_R = 13,5$  min et **B-14** ( $m = 3,2$  mg) à  $t_R = 15,5$  min. (Figure II.19)

#### V.2.2.1.3. Etude de la fraction **FB8**

Cette fraction a été injectée en CLHP analytique dans les mêmes conditions chromatographiques que pour la fraction **FB2** sauf :

**Longueur d'onde :** 254 nm

**Profil gradient :** Le gradient utilisé est reporté dans le tableau II.10

**Tableau II.10.** Gradient de la phase mobile pour analyser la fraction **FB8**.

Temps (min)	(%) Voie A	(%) Voie B
0	90	10
8	66	34
32	30	70
42	0	100
50	0	100

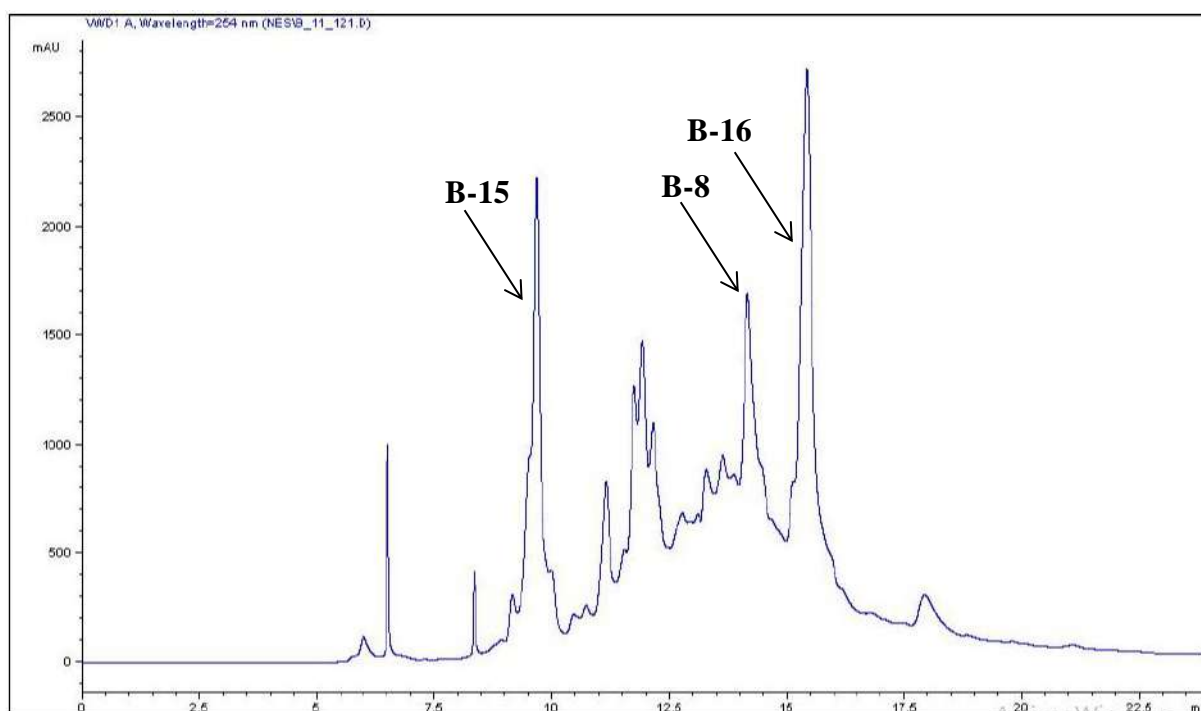
Après injection de la fraction en CLHP analytique, nous avons procédé à la séparation des produits en CLHP semi-préparative dans les mêmes conditions chromatographiques que pour la fraction **FB2** sauf :

**Débit :** 2 mL/min

**Longueur d'onde :** 254 nm

**Volume d'injection :** 30  $\mu$ L

**Profil gradient :** Le même profil (Tableau II.10)

**Figure II.20.** Chromatogramme CLHP de la fraction **FB8**.

La séparation de la fraction **FB8** a donné les composés purs **B-15** ( $m = 3,1$  mg) à  $t_R = 9,5$  min, **B-8** ( $m = 4,5$  mg) à  $t_R = 14,0$  min et **B-16** ( $m = 3,5$  mg) à  $t_R = 15,5$  min. (Figure II.20).

### V.2.2.2. Par CLHP semi-préparative à détecteur RI

#### V.2.2.2.1. Etude de la fraction FB4

La séparation de la fraction **FB4** est réalisée sur une CLHP équipée d'un détecteur à indice de réfraction, dans les conditions chromatographiques suivantes :

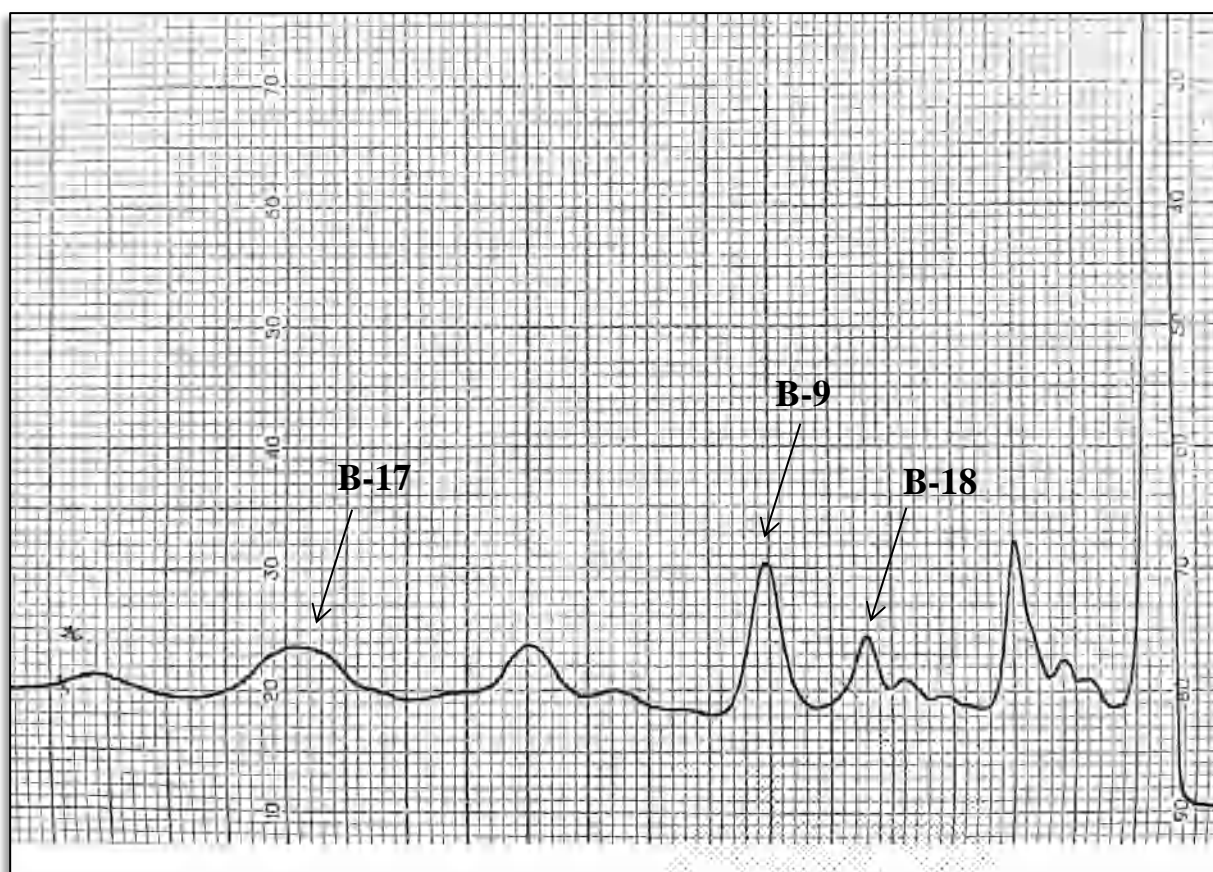
**Colonne** :  $\mu$ Bondapak C-18 (300 x 7,8 mm, 10  $\mu$ m)

**Phase mobile** : H<sub>2</sub>O/MeOH (65/35)%.

**Concentration de la fraction** : 100 mg/mL

**Débit** : 2 mL/min

**Volume d'injection** : 100  $\mu$ L



**Figure II.21.** Chromatogramme CLHP de la fraction **FB4**.

La séparation de la fraction **FB4** a donné les composés purs **B-18** ( $m = 2,9$  mg) à  $t_R = 11,0$  min, **B-9** ( $m = 2,6$  mg) à  $t_R = 14,0$  min et **B-17** ( $m = 3,2$  mg) à  $t_R = 29,0$  min (Figure II.21).

#### V.2.2.2.2. Etude de la fraction **FB13**

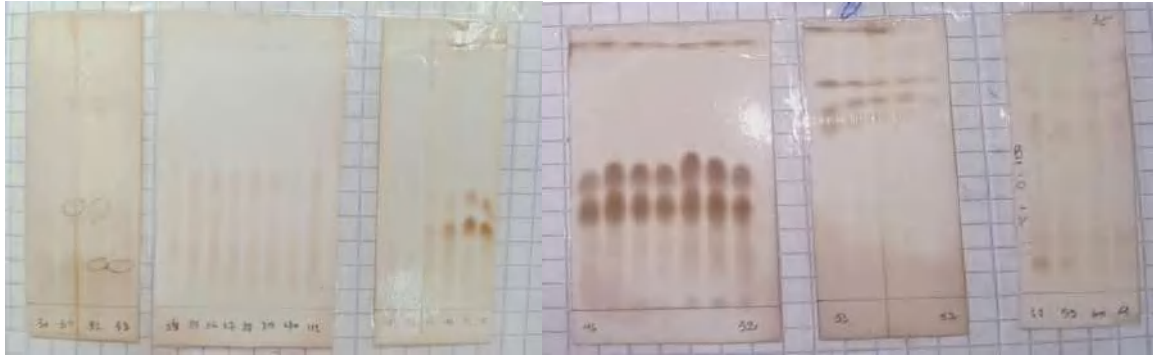
Une masse d'environ 1,2 g de cette fraction est soumise à une séparation par CC. Elle est déposée sur une colonne de gel de silice (diamètre 10 mm) et éluée par le système chloroforme/méthanol (9 : 1) en gradient de polarité. Les contenus des pots obtenus ont été suivies par CCM sur gel de silice en utilisant le même système. Les plaques sont visualisées sous lumière UV 254 nm puis révélées à l'acide sulfurique et chauffées pendant trois minutes à 100 °C. Les contenus des pots similaires sont rassemblés, évaporés et pesés donnant 18 sous-fractions (Tableau II.11), parmi lesquelles la sous-fraction **FB13-7** a été étudiée.

**Tableau II.11.** Résultats de la séparation par CC de la fraction **FB13**.

Lots des pots	N° de fraction	Poids (mg)	Système de solvants (%)	
			CHCl <sub>3</sub>	MeOH
1 – 3	FB13-1	57,7	90	10
4 – 10	FB13-2	39,7		
11 – 25	FB13-3	86,5	85	15
26 – 33	FB13-4	56,0	80	20
34 – 42	FB13-5	90,2		
43 – 45	FB13-6	47,5		
46 – 52	<b>FB13-7</b>	<b>187,0</b>	75	25
53 – 61	FB13-8	108,2		
62 – 74	FB13-9	75,6		
75 – 84	FB13-10	90,9		
85 – 90	FB13-11	92,5	60	40
91 – 96	FB13-12	50,5	50	50
97 – 102	FB13-13	56,7	40	60
103 – 108	FB13-14	65,3	30	70
109 – 114	FB13-15	42,9	20	80
115 – 126	FB13-16	13,5	10	90
121 - 126	FB13-17	12,0	0	100



La figure II.22 représente les plaques CCM des sous-fractions de **FB13** révélée à l'acide sulfurique.



**Figure II.22.** Plaques CCM des sous-fractions de **FB13** révélée à l'acide sulfurique (Système d'élution : Chloroforme/Méthanol (70/30) (v/v))

La sous-fraction **FB13-7** a subi une séparation sur une CLHP équipée d'un détecteur à indice de réfraction, dans les conditions chromatographiques suivantes :

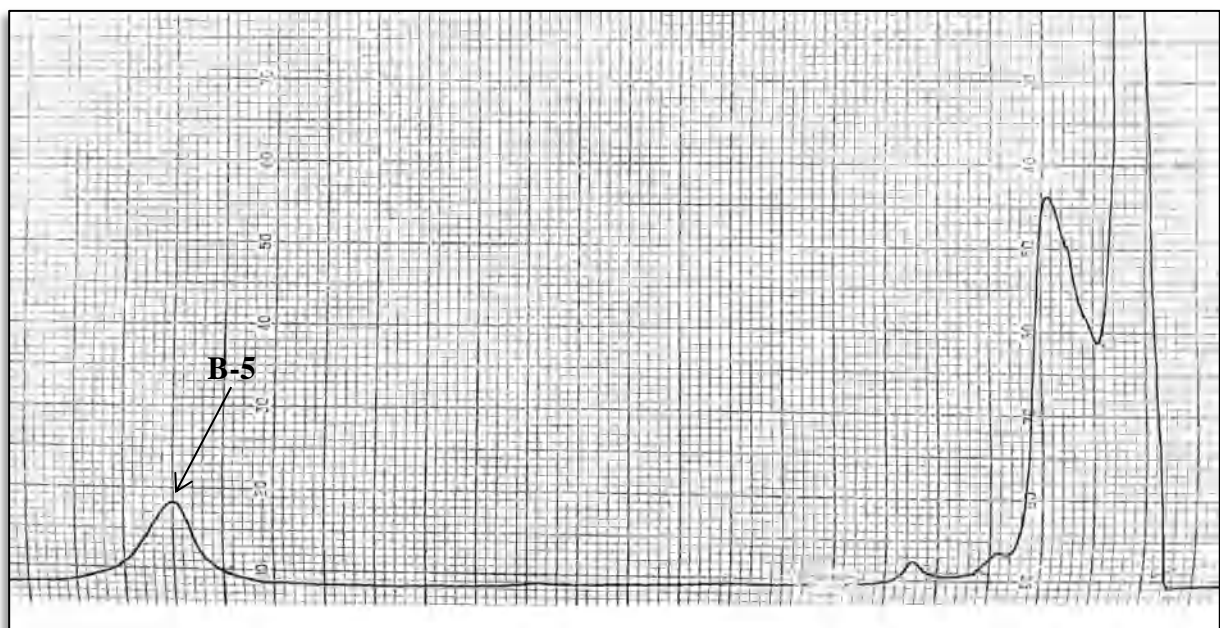
**Colonne :**  $\mu$ Bondapak C-18 (300 x 7,8 mm, 10  $\mu$ m)

**Phase mobile :** H<sub>2</sub>O/MeOH (55/45) %

**Concentration de la fraction :** 100 mg/mL

**Débit :** 2 mL/min

**Volume d'injection :** 100  $\mu$ L



**Figure II.23.** Chromatogramme CLHP de la sous-fraction **FB13-7**

La séparation de la sous-fraction **FB13-7** a donné le composé pur **B-5** ( $m = 4,1$  mg) à  $t_R = 37,0$  min. (Figure II.23)

### V.2.2.2.3. Etude de la fraction **FB17**

La séparation de la fraction **FB17** est réalisée sur une CLHP équipée d'un détecteur d'indice de réfraction, dans les conditions chromatographiques suivantes :

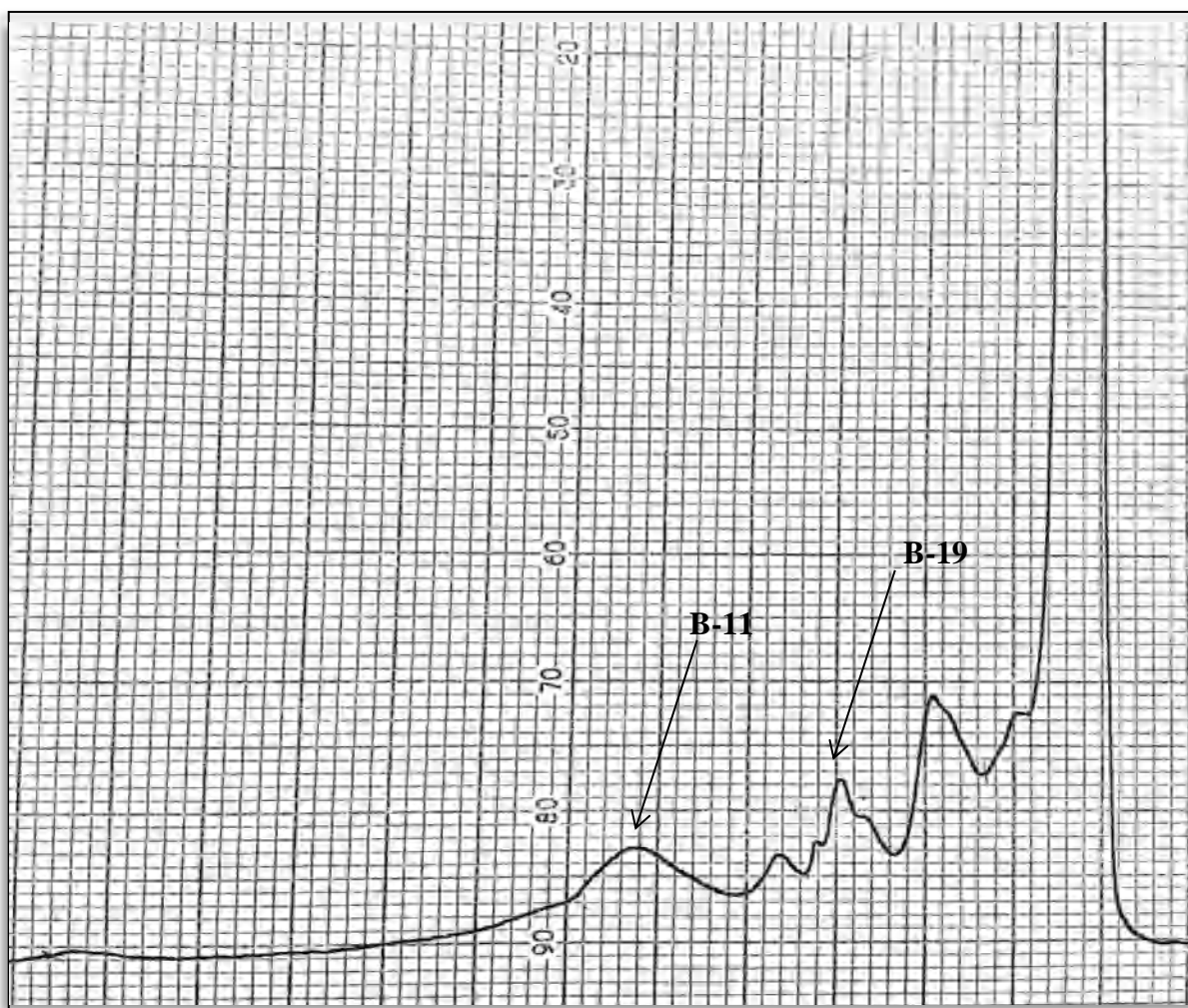
**Colonne :**  $\mu$ Bondapak C-18 (300 x 7,8 mm, 10  $\mu$ m)

**Phase mobile :** H<sub>2</sub>O/MeOH (72/28) %

**Concentration de la fraction :** 100 mg/mL

**Débit :** 2 mL/min

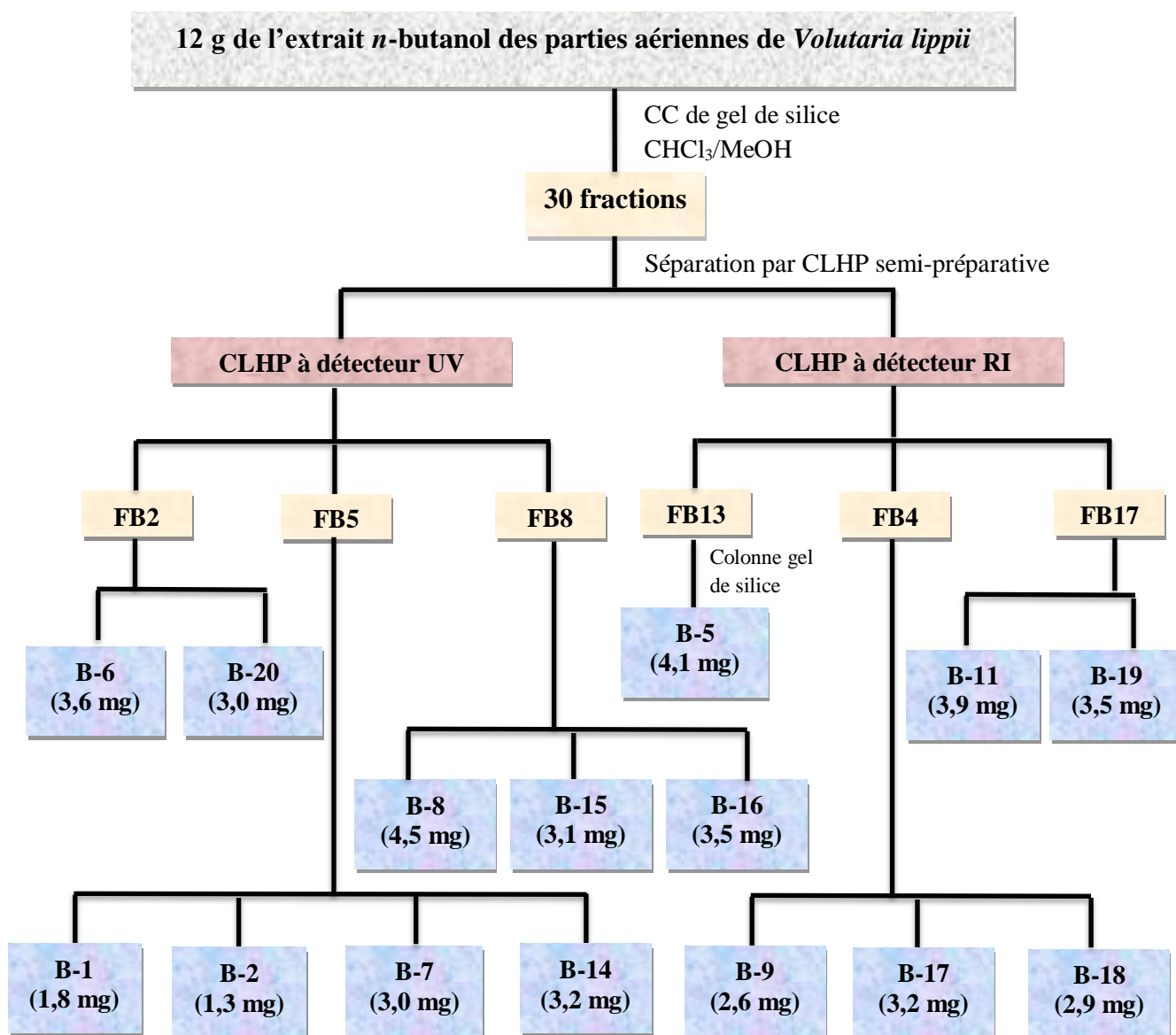
**Volume d'injection :** 100  $\mu$ L



**Figure II.24.** Chromatogramme CLHP de la fraction **FB17**

La séparation de la fraction **FB17** a donné les composés purs **B-19** ( $m = 3,5$  mg) à  $t_R = 6,0$  min et **B-11** ( $m = 3,9$  mg) à  $t_R = 9,0$  min. (Figure II.24).

L'étude phytochimique de l'extrait *n*-butanol nous a permis d'isoler 15 produits purs. Le protocole présenté dans la figure II.25, résume les travaux de fractionnement, séparation et purification des produits issus de cet extrait des parties aériennes de *Volutaria lippii*.



**Figure II.25.** Organigramme récapitulatif des étapes de séparation et purification des produits de l'extrait *n*-butanol de *Volutaria lippii*

### V.3. L'extrait chloroforme

#### V.3.1 Fractionnement de l'extrait chloroforme de *Volutaria lippii*

Une quantité d'environ 9 g de l'extrait chloroforme est dissoute dans un minimum de chloroforme. Cette solution est introduite à l'aide d'une pipette sur une colonne confectionnée avec 315 g de gel de silice préparée dans le chloroforme. L'élution débute avec le même solvant dont la polarité sera augmentée par addition progressive d'acétone et terminée par du méthanol pur. Des pots de 100 mL ont été collectés et analysés par chromatographie sur couche mince, les plaques ont été visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm) puis révélées avec un révélateur à base d'acide sulfurique et d'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 minutes à 100°C. Suivant la similitude des profils chromatographiques, les contenus des pots ont été regroupés, donnant ainsi 53 fractions. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau II.12

**Tableau II.12.** Résultats du fractionnement de l'extrait chloroforme de *Volutaria lippii*

Lots des fractions	N° de fraction	Poids (mg)	Système de solvants (%)					
			CHCl <sub>3</sub>	Acétone	MeOH			
1 – 3	FC1	52,2	100	0	0			
4 – 5	FC2	64,1						
6	FC3	56,0						
7 – 9	FC4	85,1						
10 – 12	FC5	94,4						
13 – 16	FC6	96,5						
17 - 19	FC7	102,2						
20	FC8	114,6						
21	FC9	121,3						
22	FC10	153,8						
23 – 28	FC11	167,9						
29 – 30	FC12	175,7				90	10	0
31 – 39	FC13	185,2						
40 – 41	FC14	198,7						
42 – 43	FC15	258,9						
44	FC16	116,5						
45	FC17	118,9						
46	FC18	198,6						

Tableau II.12. Résultats du fractionnement de l'extrait chloroforme de *Volutaria lippii*  
(Suite)

Lots des fractions	N° de fraction	Poids (mg)	Système de solvants (%)		
			CHCl <sub>3</sub>	Acétone	MeOH
47	FC19	158,7			
48 - 50	FC20	111,9			
51 - 56	FC21	138,0			
57 - 68	FC22	365,1			
69 - 70	FC23	289,3			
71	FC24	116,6			
72 - 85	FC25	269,3	80	20	0
86 - 103	FC26	1491,4			
106	FC27	116,3			
104 - 110	FC28	359,8			
111 - 113	FC29	251,3	70	30	0
114 - 118	FC30	236,1			
119	FC31	193,7			
120 - 124	FC32	179,5			
125 - 133	FC33	198,8			
134 - 137	FC34	190,2			
138 - 140	FC35	97,5			
141 - 145	FC36	105,4			
146 - 158	FC37	117,5	60	40	0
159 - 164	FC38	122,9			
165 - 181	FC39	168,6			
182 - 206	FC40	102,4	50	50	0
207 - 213	FC41	97,2			
214 - 218	FC42	96,8	40	60	0
219 - 234	FC43	88,5			
235 - 236	FC44	85,1			
237 - 259	FC45	84,2	30	70	0
260 - 269	FC46	82,9			
270 - 281	FC47	75,2			
282 - 295	FC48	75,1	20	80	0
296 - 305	FC49	62,8			
306 - 322	FC50	60,3	10	90	0
323 - 362	FC51	59,4			

**Tableau II.12.** Résultats du fractionnement de l'extrait chloroforme de *Volutaria lippii*  
(Suite)

Lots des fractions	N° de fraction	Poids (mg)	Système de solvants (%)		
			CHCl <sub>3</sub>	Acétone	MeOH
<b>363</b>	FC52	49,5	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>365 – 379</b>	FC53	29,3			

## VI. Conclusion

Les analyses chromatographiques effectuées sur les fractions issues des extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle de l'espèce *Volutaria lippii* ont mené à l'isolement et la purification de vingt produits : **B-1, B-2, A-3, A-4, B-5, B-6, B-7, B-8, B-9, A-10, B-11, A-12, A-13, B-14, B-15, B-16, B-17, B-18, B-19** et **B-20**.

Tous ces produits ont été soumis aux analyses physico-chimiques afin d'en établir les structures. Les résultats et la discussion de ces analyses seront développés dans le chapitre III. Les fractions issues de l'extrait chloroforme feront l'objet d'autres études.

# **CHAPITRE III**

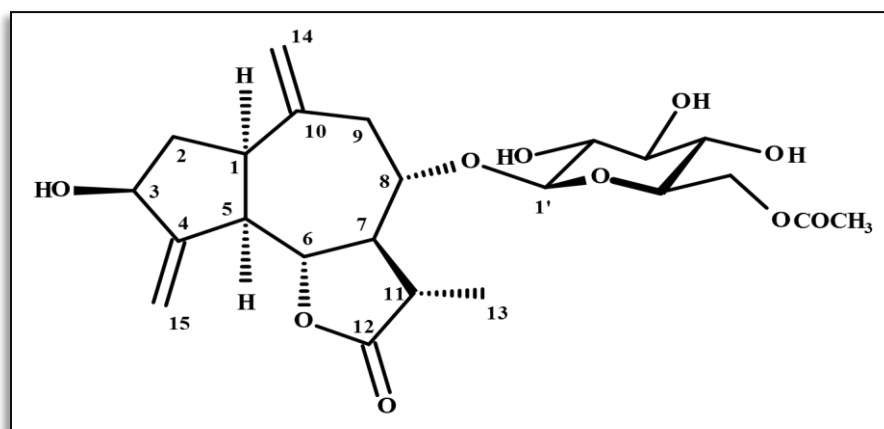
## **Résultats et discussions**

## I. Résultats de l'étude phytochimique

Les produits obtenus de l'espèce étudiée sont soumis à des analyses spectrales RMN 1D (du proton), RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC) et la spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ont été comparés aux données de la littérature pour identifier et déterminer leur structure chimique.

## II. Détermination structurale des composés isolés

### II.1. Détermination structurale du composé B-1



Le spectre ESI-MS négatif (Figure III.1) du composé **B-1**, isolé sous forme d'un solide blanc, montre un ion adduit chloré correspondant à  $[M + Cl]^-$  à  $m/z$  503,17, supportant la formule moléculaire  $C_{23}H_{32}O_{10}$ . La présence du chlore a été déduite du schéma de distribution isotopique naturel du chlore  $^{35}Cl/^{37}Cl \sim 3/1$ . Ce spectre montre également un autre ion adduit à  $m/z$  513,20 correspondant à  $[M + HCOO]^-$  confirmant ainsi, la formule moléculaire du composé **B-1**.

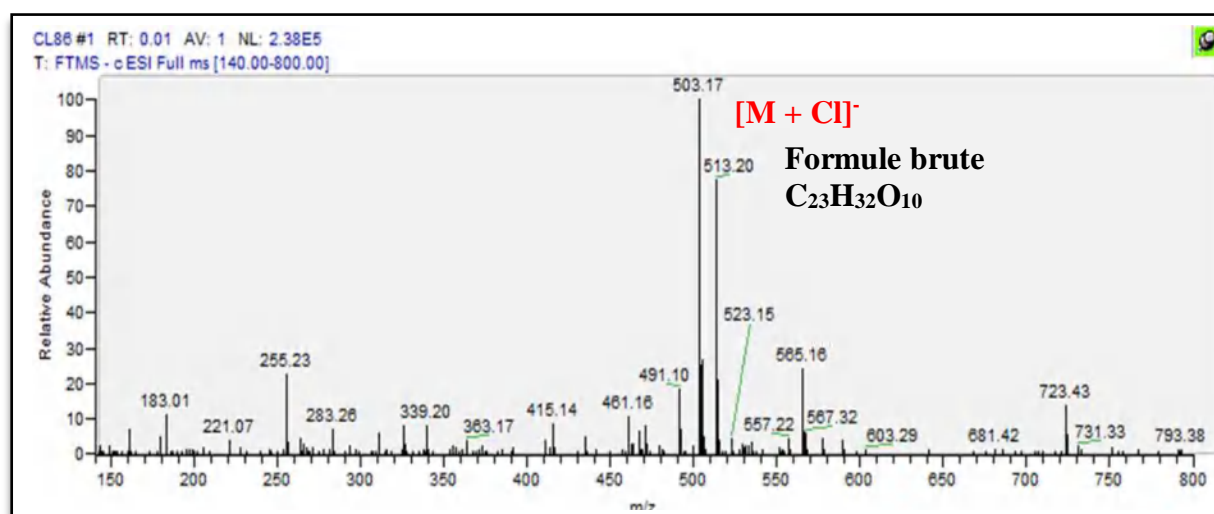
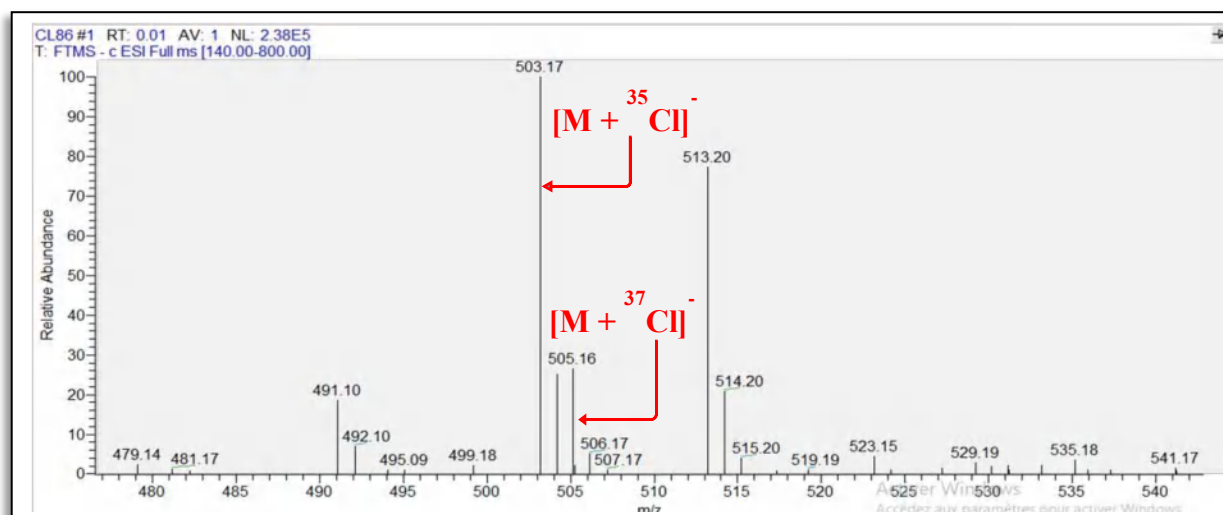


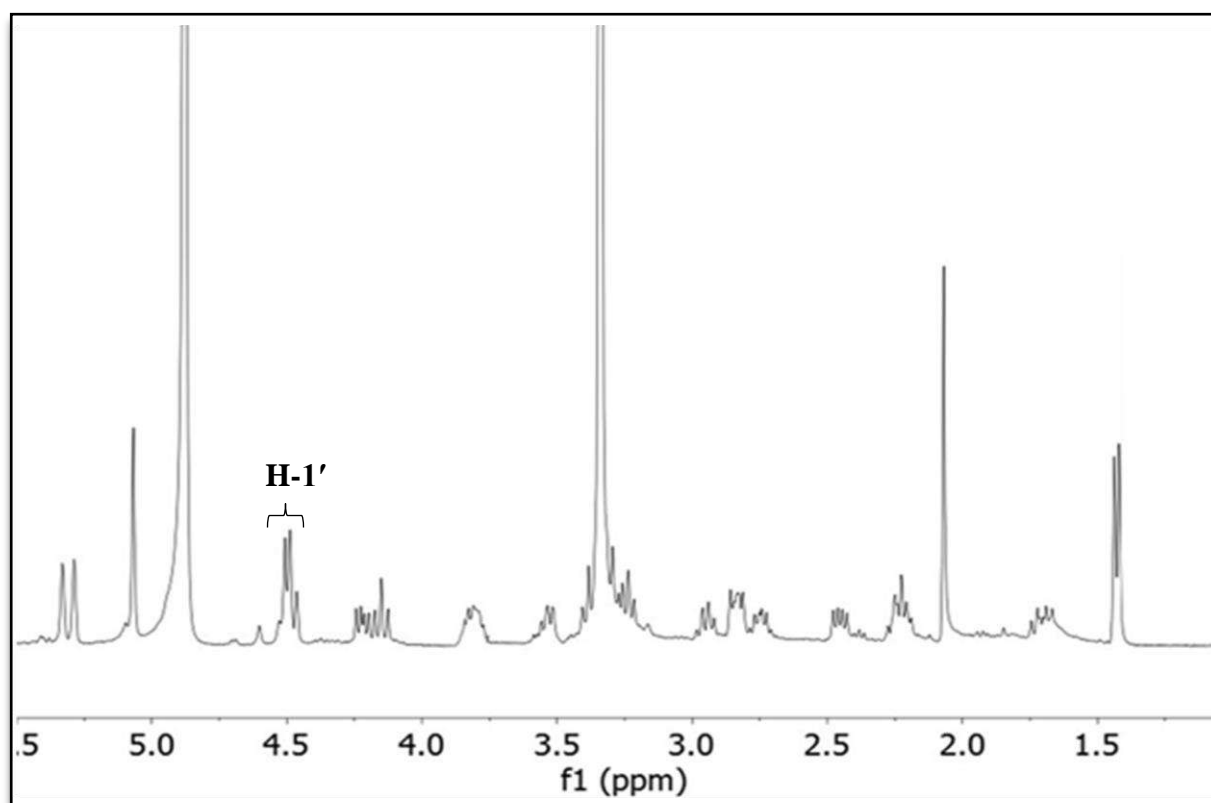
Figure III.1. Spectre de masse ESI-MS négatif du composé **B-1**





**Figure III.2.** Etalement du spectre de masse ESI-MS négatif du composé **B-1**

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.3) enregistré dans le méthanol- $d_4$ , on relève la présence d'un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  4,49 ( $J = 7,4$  Hz).



**Figure III.3.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**

Le carbone attaché à ce proton a pu être attribué sans ambiguïté au noyau résonnant à  $\delta_C$  104,7 grâce à l'analyse du spectre de l'expérience HSQC (Figure III.4). Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone, caractéristiques de la position anomérique d'un sucre, permettent de déduire la présence d'une entité glycosidique dans cette molécule, reliée à l'aglycone par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène. Ce proton ne pouvant être que le proton anomérique de ce sucre, nous le noterons H-1'. Nous noterons alors son carbone porteur C-1'.

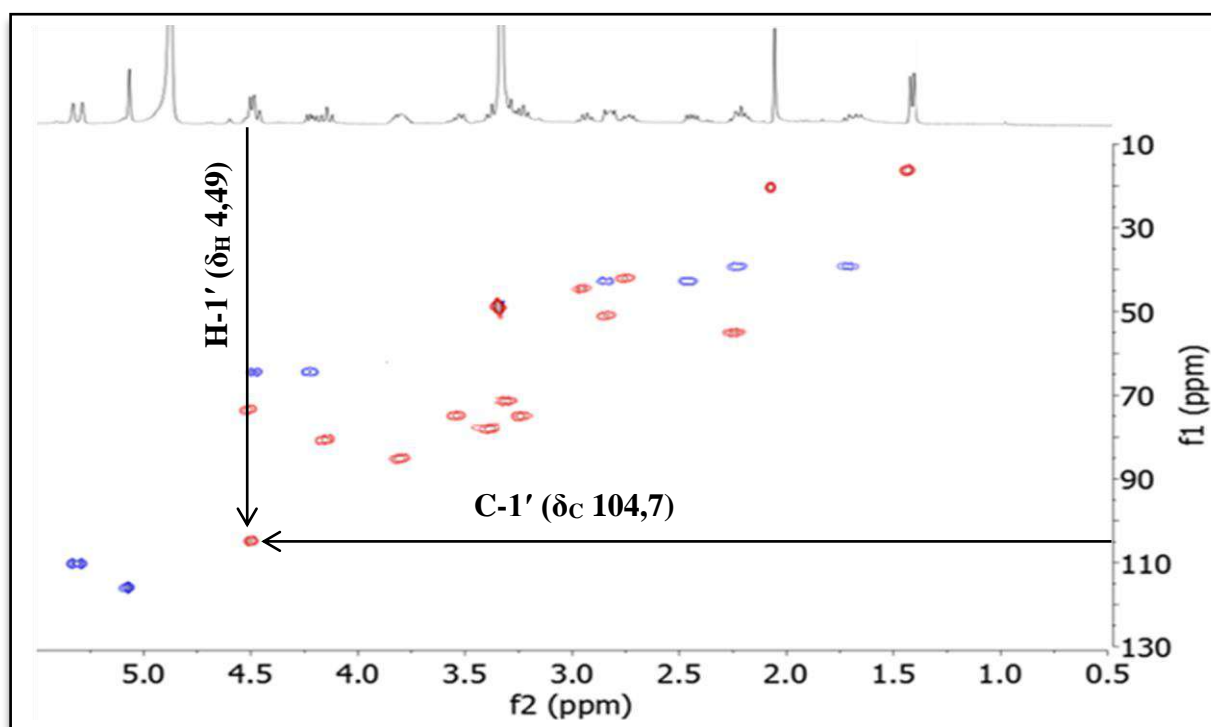


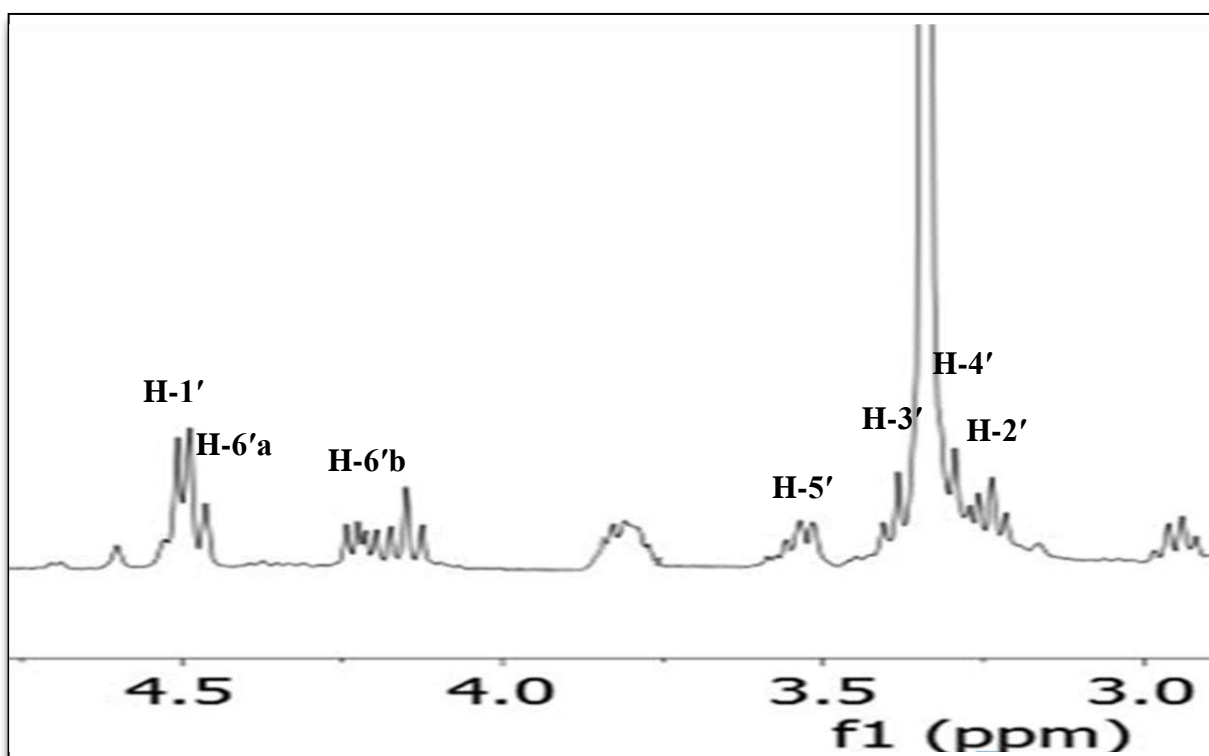
Figure III.4. Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-1

L'analyse approfondie du spectre proton avec notamment les valeurs des constantes de couplage relevées dans les signaux des protons de la partie sucre, permet d'attribuer tous les autres signaux de cette entité à leurs protons respectifs, notamment :

- Le doublet de doublets à  $\delta_H$  3,24 ( $J = 9,0$  et  $7,4$  Hz) au proton H-2'
- Le triplet à 3,38 ( $J = 9,0$  Hz) au proton H-3'
- Le triplet à 3,31 ( $J = 9,0$  Hz) partiellement recouvert par le signal du méthanol résiduel, au proton H-4'
- Le multiplet à 3,53 au proton H-5'
- Le doublet de doublets à 4,22 ( $J = 11,8$  et  $5,0$  Hz) au proton H-6'b

- Le doublet de doublets à 4.47 ( $J = 11,8$  et  $2,5$  Hz), chevauchant le signal de H-1' et d'un autre proton de la molécule, est attribué au proton H-6'a

Ces données mettent en évidence la présence d'un motif *O*- $\beta$ -glucopyranosyle. En effet, la configuration  $\beta$  est déduite de la valeur de l'interaction de couplage (7,4 Hz) entre H-1' et H-2' invoquant des orientations axiales de ces deux protons. Le fait que cette entité soit de type glucopyranosyle est déduit des valeurs des interactions de couplage (9 Hz) entre les protons H-2'/H-3' et H-3'/H-4' mettant en évidence leurs orientations axiales.



**Figure III.5.** Etallement du Spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **B-1**

Les résonances RMN <sup>13</sup>C de leurs carbones attachés ont pu être confirmés sans ambiguïté par l'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Figure III.6). On relève en effet :

- Le C-2' à  $\delta_c$  75,0 ppm
- Le C-3' à  $\delta_c$  78,0 ppm
- Le C-4' à  $\delta_c$  71,4 ppm
- Le C-5' à  $\delta_c$  74,8 ppm
- Le C-6' à  $\delta_c$  64,4 ppm

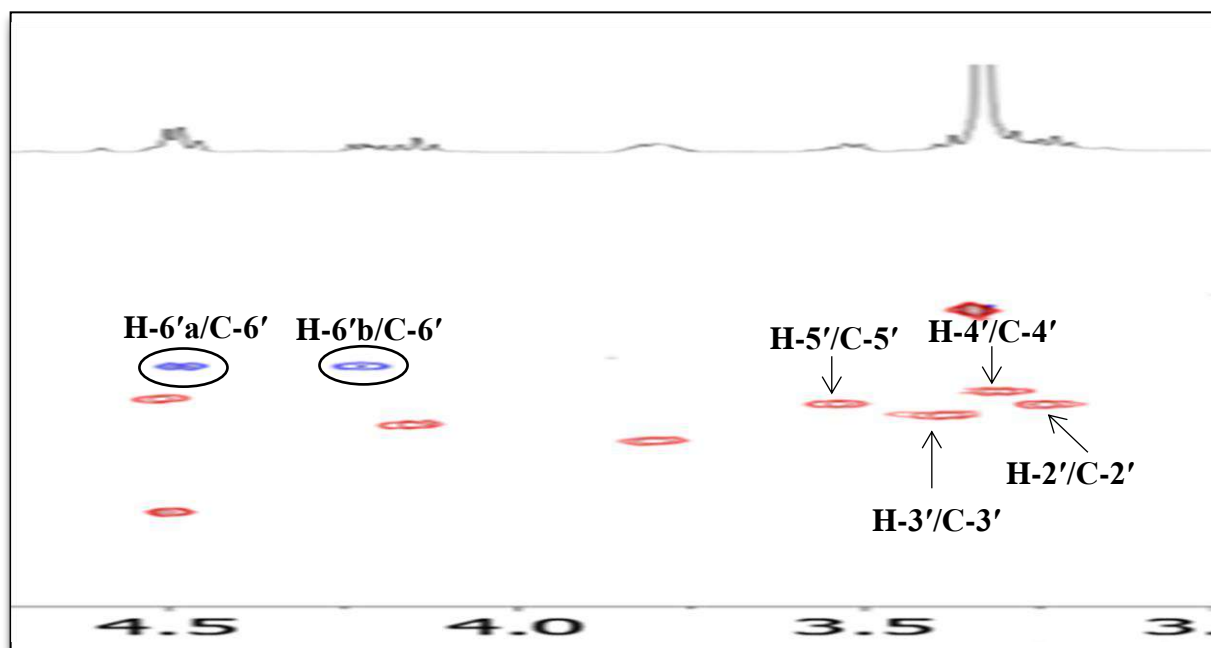


Figure III.6. Etallement du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**

Le déplacement chimique relativement haut de C-6' à  $\delta_C$  64,4 est en faveur d'une acylation de cette position. Un examen approfondi du spectre HMBC (Figure III.7) permet de relever une corrélation entre les protons du méthyle résonnant à  $\delta_H$  2,07 ppm ( $\delta_C$  20,3 ppm) et le carbone du carbonyle résonnant à  $\delta_C$  172,0 ppm. Cette corrélation est en faveur de la présence d'un groupe acétyle dans cette molécule. Vu la valeur du déplacement chimique ( $\delta_C$  172,0 ppm) du carbone de son carbonyle, il est clair qu'il s'agit d'un groupement acétate.

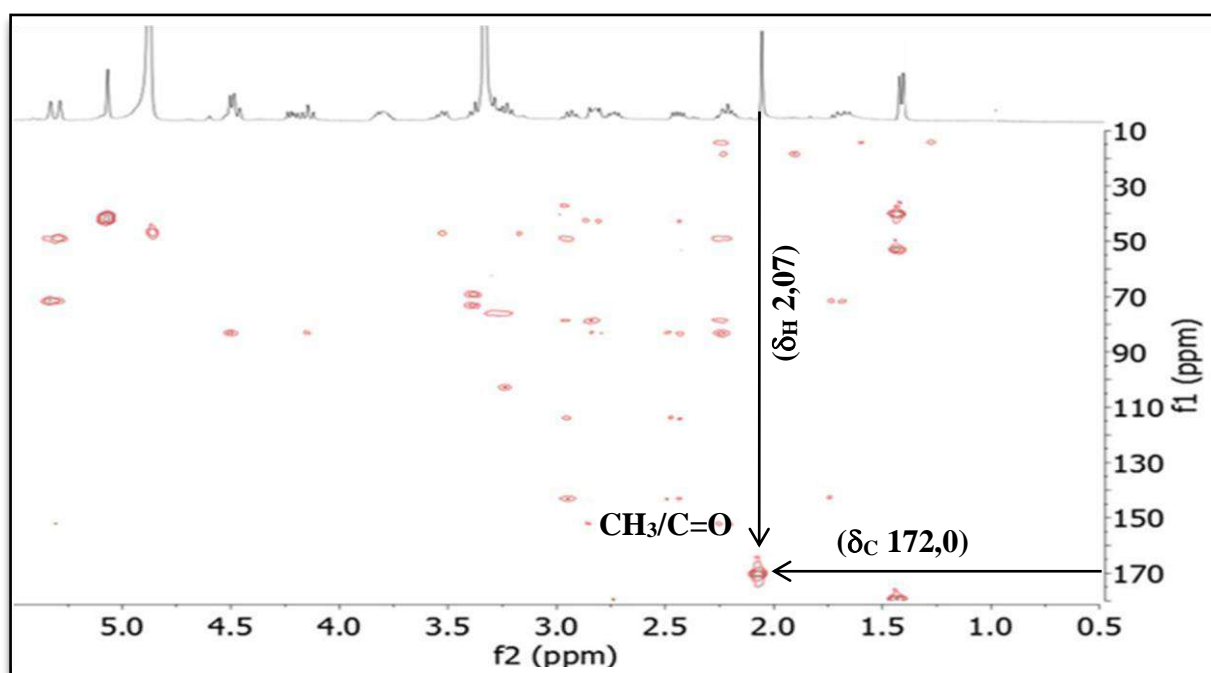
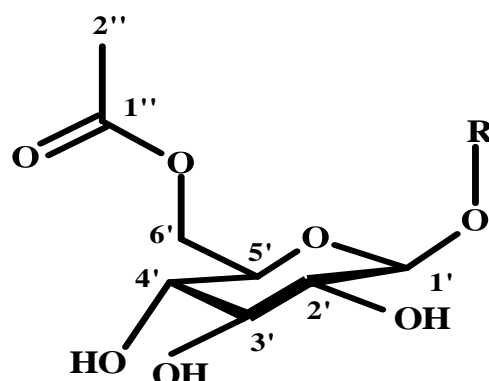


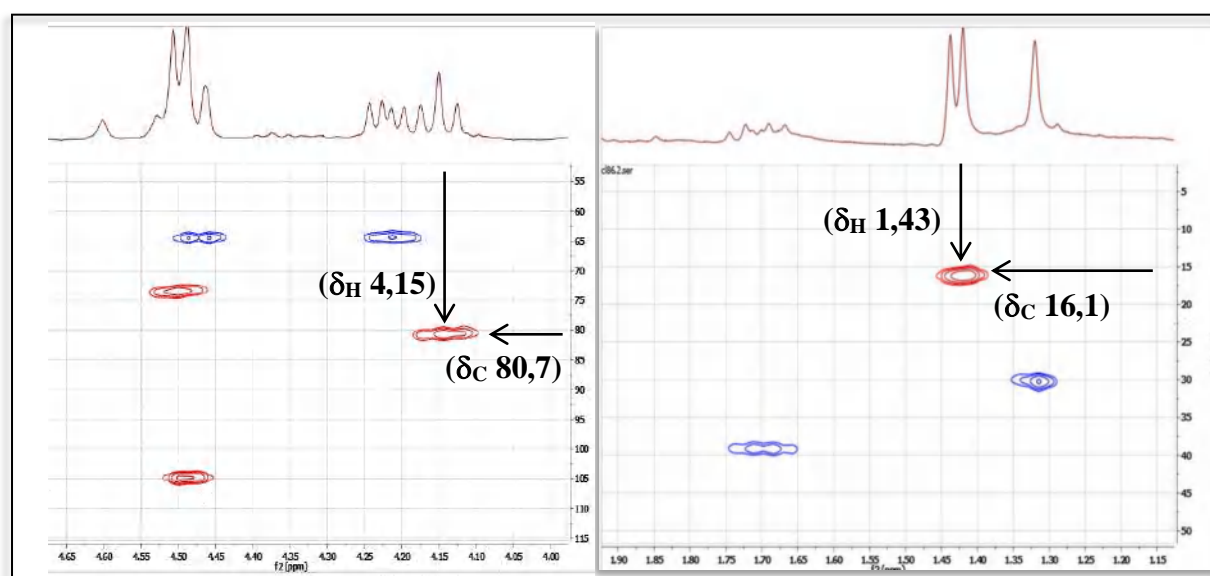
Figure III.7. Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**

Sur la base de ces données, une fonction acétate est localisée en C-6' de l'unité  $\beta$ -glucopyranosyle montrant ainsi la présence du groupement *O*-(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside) comme substituant dans le composé **B-1** (Figure III.8).



**Figure III.8.** Groupement *O*-(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside) présent dans le composé **B-1**

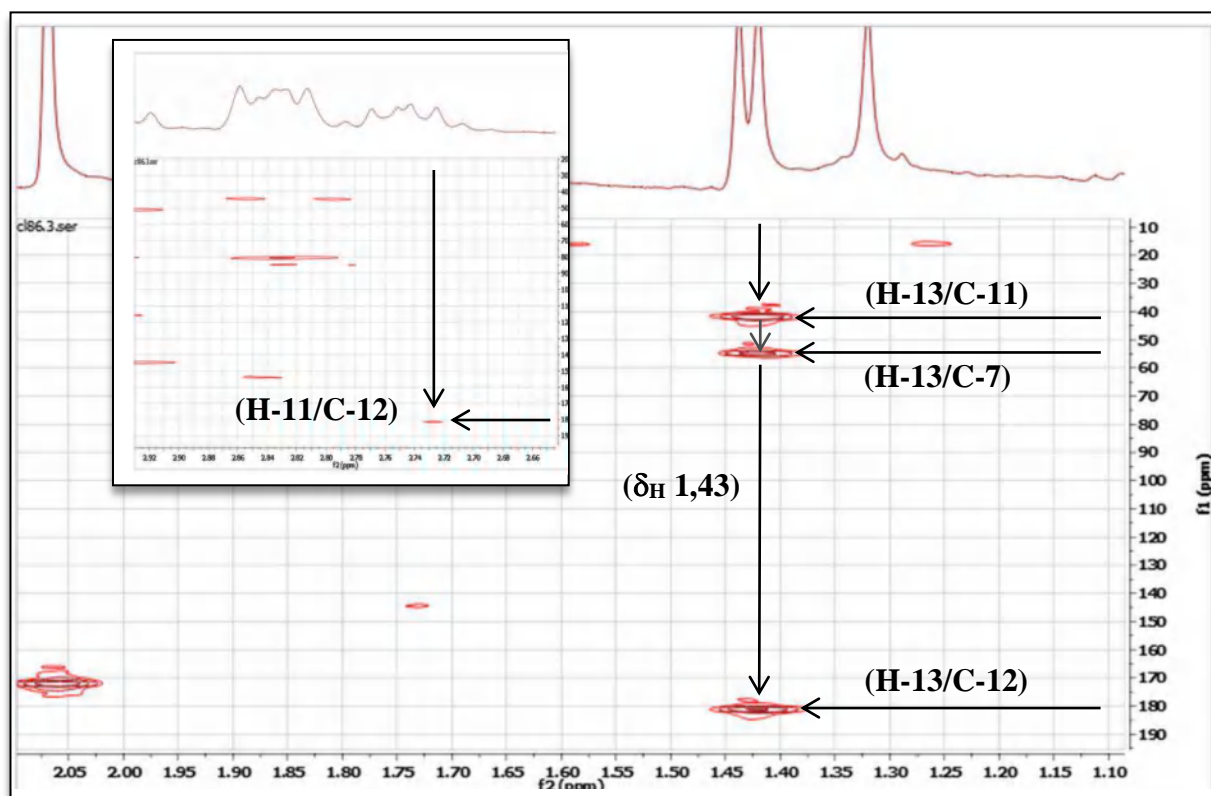
Connaissant la formule moléculaire C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>10</sub> du composé **B-1**, qui doit donc contenir 8 insaturations, on en déduit que le groupement R de formule brute C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub> renferme 6 degrés d'insaturation. Par ailleurs, le spectre proton montre un groupement méthine oxygéné résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  4,15 (t,  $J = 9,8$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC au carbone dont la résonance est localisée à  $\delta_{\text{C}}$  80,7 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces deux noyaux sont caractéristiques d'un CH de fermeture d'une lactone sesquiterpénique. Cette idée est confortée par la présence d'un groupement méthyle résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  1,43 (d,  $J = 7,0$  Hz) et corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  16,1 ppm (Figure III.9).



**Figure III.9.** Etalements du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **B-1**

Sur le spectre HMBC, les protons de ce méthyle montrent une tache de corrélation avec le carbone d'un carbonyle dont le déplacement chimique  $\delta_C$  180,0 ppm confirme bien la présence d'une  $\gamma$ -lactone ici  $\alpha$ ,  $\beta$ -saturée. En nous référant à la numérotation adoptée pour les squelettes des lactones sesquiterpéniques, nous pouvons à ce stade noter le carbone de ce carbonyle C-12 et le carbone de ce méthyle C-13. Vu la multiplicité du signal de ce méthyle (d,  $J = 7$  Hz) en RMN  $^1H$ , on en déduit que la position C-11 est un méthine. Sur le spectre HMBC, on relève en effet, une petite tache de corrélation entre le carbone du carbonyle de la lactone et le proton résonnant à  $\delta_H$  2,74 (dq,  $J = 9 ; 7$  Hz) que nous pouvons noter H-11.

On relève alors, grâce au spectre HSQC, la resonance du C-11 à  $\delta_C$  42,0 ppm. Cette attribution est confirmée par le spectre HMBC qui montre une corrélation entre ce carbone C-11 et les protons H<sub>3</sub>-13. Toujours sur le spectre HMBC, les protons H<sub>3</sub>-13 montrent une tache de corrélation avec le carbone d'un groupement méthine resonant à  $\delta_C$  55,1 ppm et que nous pouvons attribuer sans ambiguïté au C-7 (Figure III.9), le signal de son proton H-7 est relevé à  $\delta_H$  2,24 (m) sur le spectre proton.



**Figure III.10.** Etallements du Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-1

Toujours sur le spectre relatif à l'expérience HMBC, H-7 montre entre autres, deux taches de corrélation, la première avec le carbone du méthine de fermeture de la lactone [ $\delta_C$

80,7 ;  $\delta_H$  4,15 (t,  $J = 9,8$  Hz)] et la seconde avec le carbone d'un autre méthine oxygéné résonnant à  $\delta_C$  85,2 ppm [ $\delta_H$  3,80 (m)] (Figure III.11). Ces données permettent d'avancer les hypothèses suivantes :

a) Ces deux méthines sont attribués respectivement aux C-6 et C-8 ou aux C-8 et C-6 selon le point de fermeture de cette lactone sesquiterpénique (en C-6 ou en C-8).

b) D'après la formule brute de ce composé **B-1** ( $C_{23}H_{32}O_{10}$ ) et sachant, comme reporté plus haut, que son squelette sesquiterpénique porte le substituant *O*-(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside), on peut aisément déduire que ce squelette sesquiterpénique porte un deuxième substituant et qui ne peut être qu'un groupement hydroxyle. La présence de ce groupement hydroxyle est mise en évidence par la présence d'un autre méthine oxygéné ( $\delta_C$  73,4 ppm ;  $\delta_H$  4,51 ppm (tl,  $J = 9,8$  Hz).

c) Suite à cette analyse, il devient évident que le substituant *O*-(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside) est porté par le méthine dont le carbone résonne à  $\delta_C$  85,2 ppm vu la valeur de son déplacement chimique. Bien entendu, à ce stade de notre analyse ce méthine peut être soit la position C-6 (si cette lactone est fermée en C-8) soit la position C-8 (si cette lactone est fermée en C-6). Cette hypothèse est d'ailleurs claire sur le spectre HMBC où l'on relève une corrélation nette entre le proton anomérique du sucre et le carbone du méthine résonnant  $\delta_C$  85,2 ppm (Figure III.11).

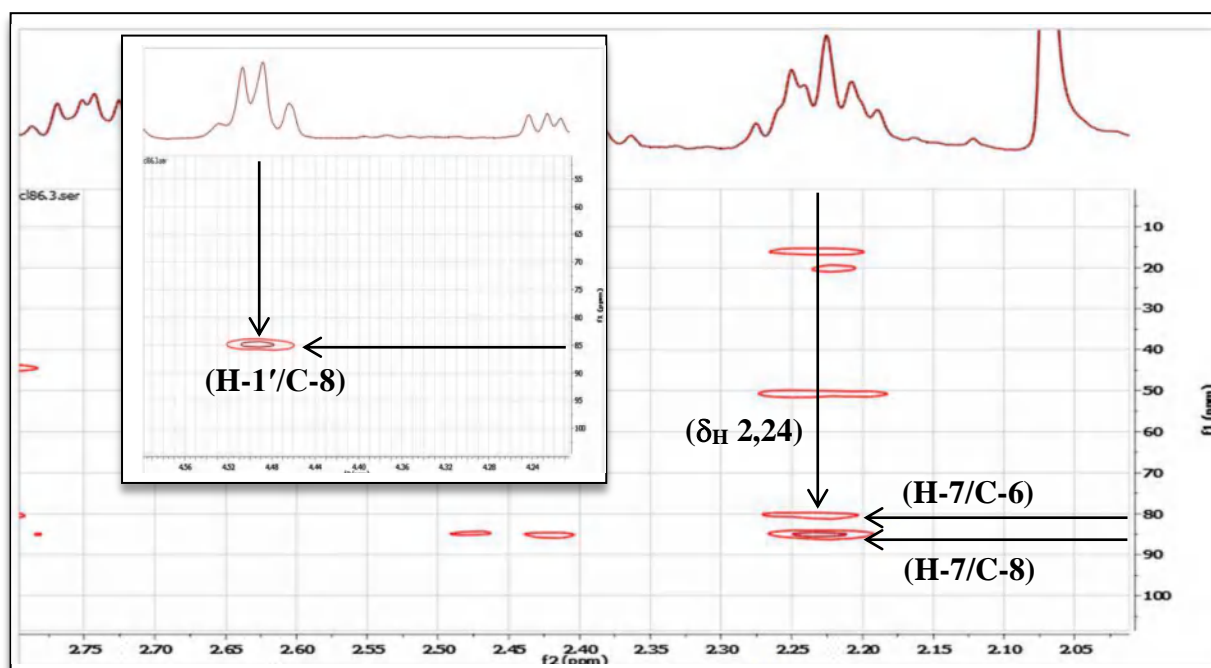
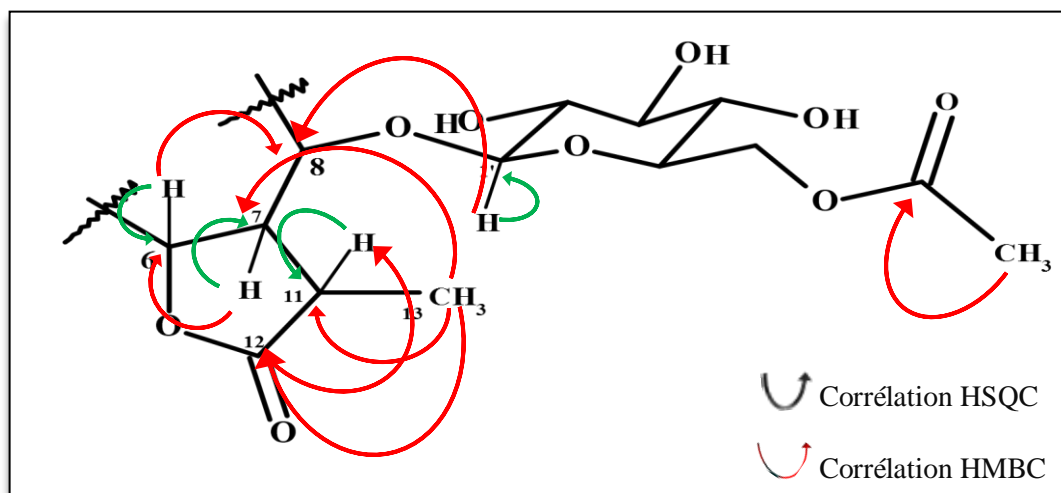
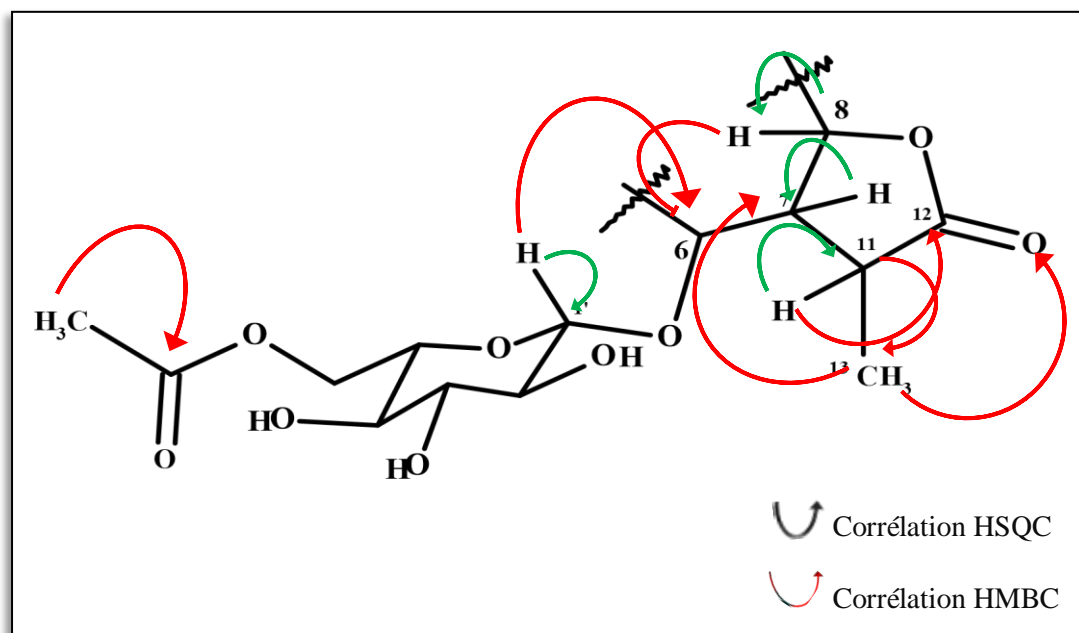


Figure III.11. Etallements du Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**

Les figures suivantes (Figure III.12 ;13) montre les différentes corrélations précédentes pour les deux cas possibles (fermeture de la lactone en C-6 et en C-8).



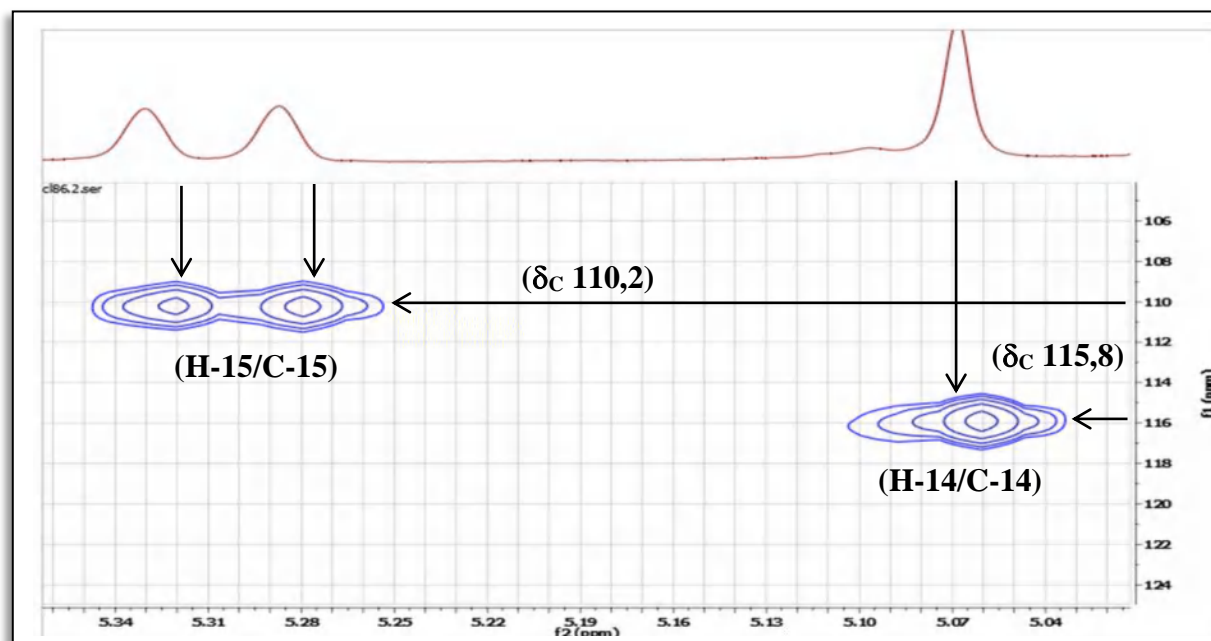
**Figure III.12.** Corrélations HMBC et HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**  
(Lactone fermée en C-6)



**Figure III.13.** Corrélations HMBC et HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**  
(Lactone fermée en C-8)

Par ailleurs, les spectres RMN  $^1\text{H}$  et HSQC, de ce composé montrent des signaux indiquant la présence de deux groupements exométhylènes, le premier à  $\delta_{\text{H}}$  5,33 (1H, sl) et 5,29 (1H, sl) ;  $\delta_{\text{C}}$  110,2 ppm et le second à  $\delta_{\text{H}}$  5,07 (2H, s) ;  $\delta_{\text{C}}$  115,8 ppm. (Figure III.14).





**Figure III.14.** Etallement du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**

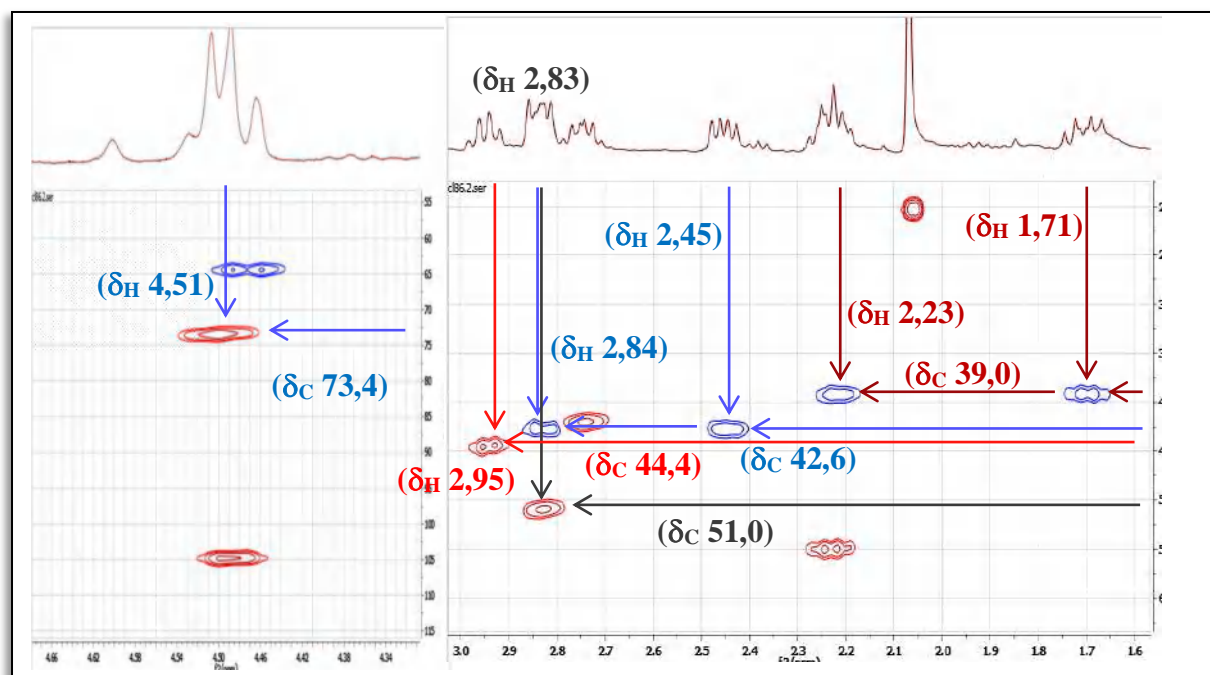
Grâce au spectre HMBC, les résonances des carbones éthyléniques quaternaires délimitant ces deux doubles liaisons exocycliques sont relevées à  $\delta_C$  154,0 et 145,2 ppm, respectivement. Sachant que la position C-13 du squelette sesquiterpénique de cette molécule est un méthyle, il est clair que ces deux exométhylènes ne peuvent être que les positions C-14 et C-15. Rappelons à cet effet que la double liaison correspondant à l'exométhylène C-14 est délimitée par le carbone C-10 (quaternaire éthylénique, bien entendu) et que la double liaison correspondant à l'exométhylène C-15 est délimitée par le carbone C-4 (également quaternaire éthylénique).

A ce stade de notre discussion et en matière de degrés d'insaturation, nous en avons consommées 6 (les deux doubles exocycliques, le cycle et le carbonyle de la  $\gamma$ -lactone et le cycle et le carbonyle du groupement *O*-(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside)) des 8 attendues dans ce composé. Autrement dit, il nous en reste 2 à localiser dans cette structure.

Un réexamen des spectres proton et HSQC, permet de relever la présence de :

a) 2 groupements méthylènes dont les carbones sont hybridés  $sp^3$  et les protons diastéréotopiques. Les protons du premier méthylène résonnent à  $\delta_H$  1,71 (m) et 2,23 (m); la résonance de leur carbone est relevée à  $\delta_C$  39,0 ppm. Les protons du deuxième méthylène résonnent à  $\delta_H$  2,45 (dd,  $J = 13,4 ; 6,9$  Hz) et 2,84 (m) ; la résonance de leur carbone est relevée à  $\delta_C$  42,6 ppm.

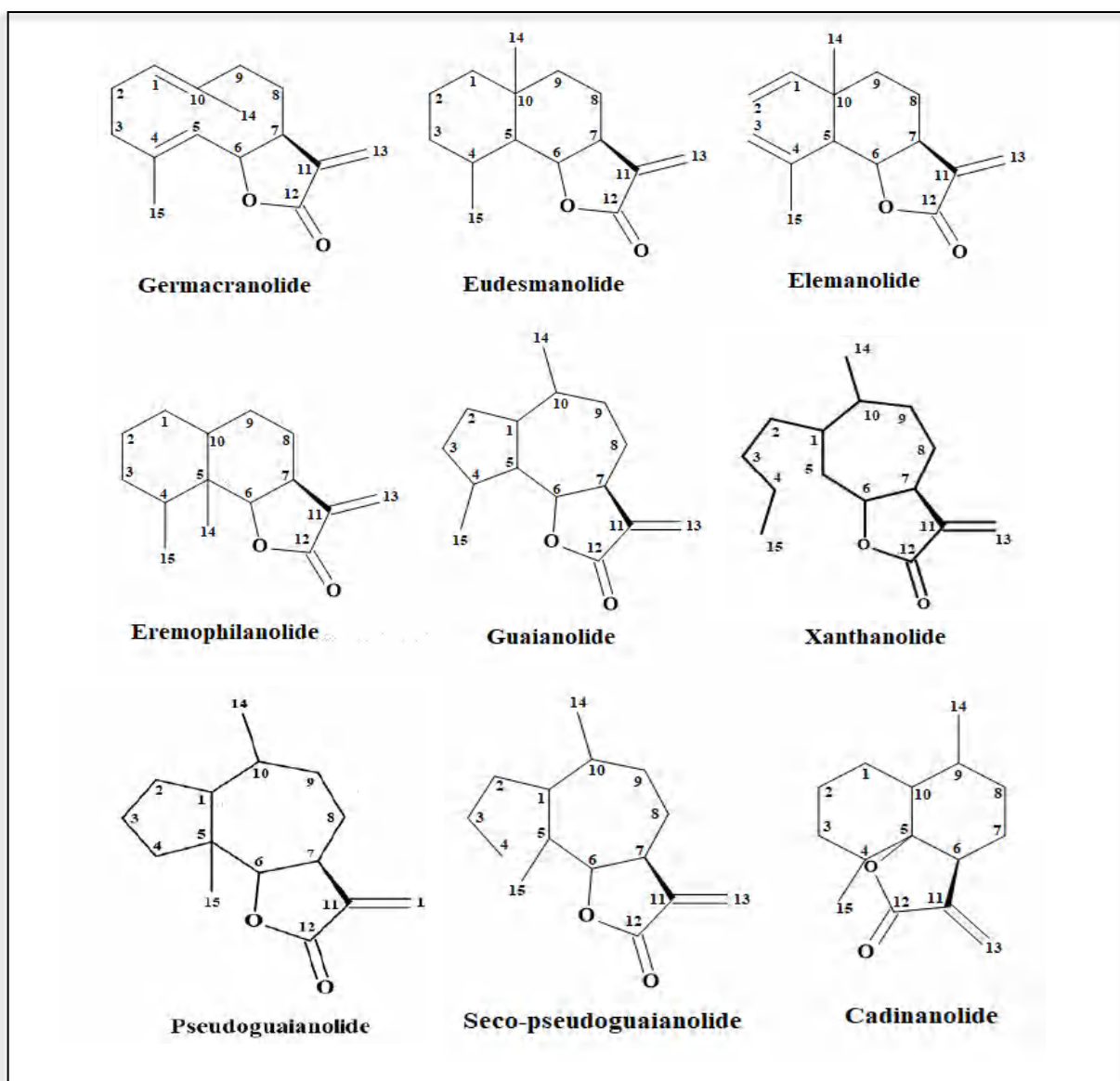
b) 3 groupements méthines dont les carbones sont hybridés  $sp^3$ . Le premier est oxygéné d'après les valeurs des déplacements chimiques de son proton ( $\delta_H$  4,51 (tl,  $J = 9,8$  Hz) et de son carbone ( $\delta_C$  73,4 ppm)), comme reporté plus haut, on peut dire que ce groupement est en fait un hydroxyméthine. Le deuxième et le troisième non oxygénés donne les résonances à  $\delta_H$  2,83 (m) et  $\delta_C$  51,0 ppm pour le deuxième et à  $\delta_H$  2,95 (q,  $J = 8,6$  Hz) et  $\delta_C$  44,4 ppm, pour le troisième (Figure III.15).



**Figure III.15.** Etallements du Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**

Il est évident que tous ces groupements font partie du squelette sesquiterpénique du composé **B-1** vu le nombre d'atomes de carbone qu'il renferme. Les deux insaturations restantes et l'absence de doubles liaisons autres que les deux doubles liaisons exocycliques précédemment signalées indiquent que nous sommes en présence d'un squelette sesquiterpénique bicyclique. Cette donnée élimine les quatre types de germacranolides, le type élémanolide, le type xanthanolide et le type seco-pseudoguaianolide dont les squelettes sesquiterpéniques sont monocycliques. Les types eudesmanolide, pseudoguaianolide et eremophilanolide, seront également éliminés vu la présence des doubles liaisons exocycliques C-10 = C-14 et C-4 = C-15, dans notre composé. On peut également éliminer le type cadinanolide vu la présence d'un proton au point de fermeture de notre lactone.

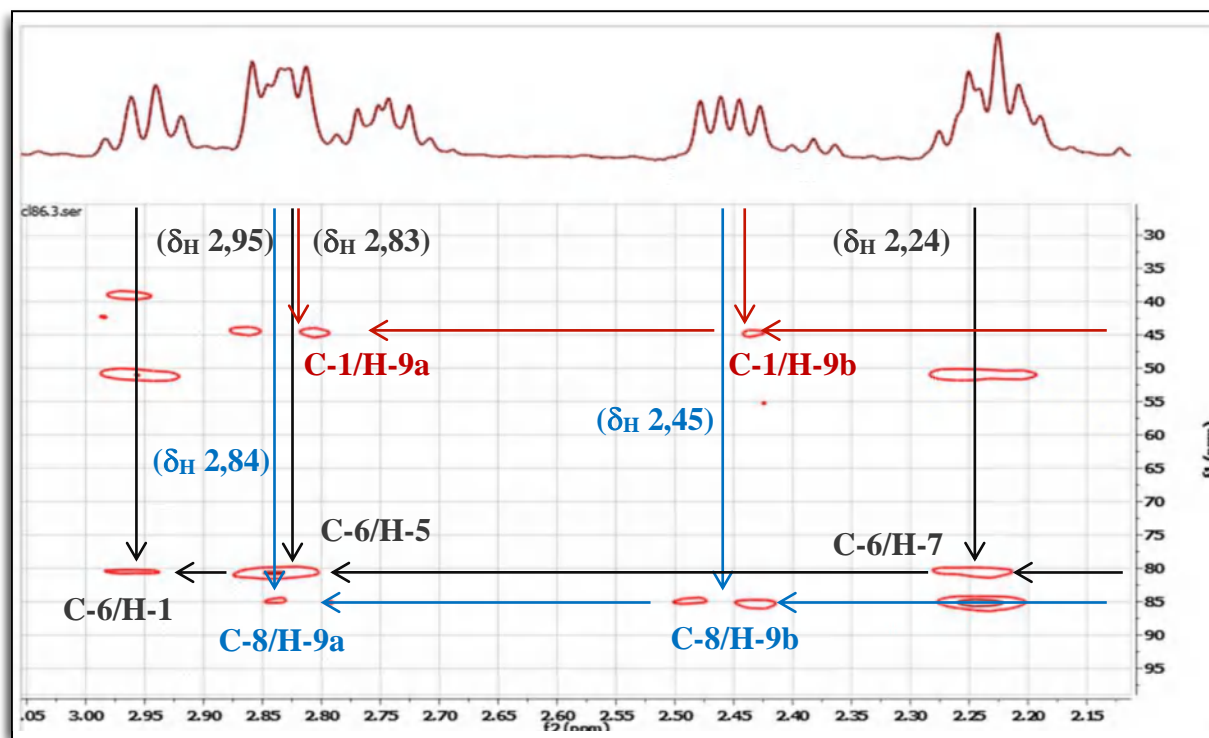
Ainsi notre analyse converge vers une lactone sesquiterpénique de type guaianolide (Fischer, 1990) (Figure III.16).



**Figure III.16.** Principaux types de squelettes de lactones sesquiterpéniques ici 12,6-lactonisés

Le composé **B-1** est donc un guaianolide, bien entendu, il peut être 12,6- ou 12, 8-lactonisé. Pour trancher concernant le point de fermeture du cycle lactonique de ce composé, nous avons réexaminé le spectre HMBC et relevé des corrélations entre le carbone du méthine [ $\delta_C$  85,2 ;  $\delta_H$  3,80 (m)] portant le groupement *O*-6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside et les protons du groupement méthylène résonnant à  $\delta_H$  2,45 (dd,  $J = 13,4 ; 6,9$  Hz) et 2,84 (m), ( $\delta_C$  42,6 ppm). Cette observation suffit pour attribuer ce méthine à la position C-8 et ce méthylène à la position C-9 vu la structure d'un guaianolide et en déduire de ce fait que le méthine de fermeture du cycle lactonique sera le C-6. Cette hypothèse est renforcée par les corrélations observées sur le spectre HMBC, entre ce carbone et les protons des deux groupements méthines résonnant à  $\delta_H$  2,83 (m) ;  $\delta_C$  51,0 ppm et à  $\delta_H$  2,95 (q,  $J = 8,6$  Hz ;  $\delta_C$  44,4 ppm) en

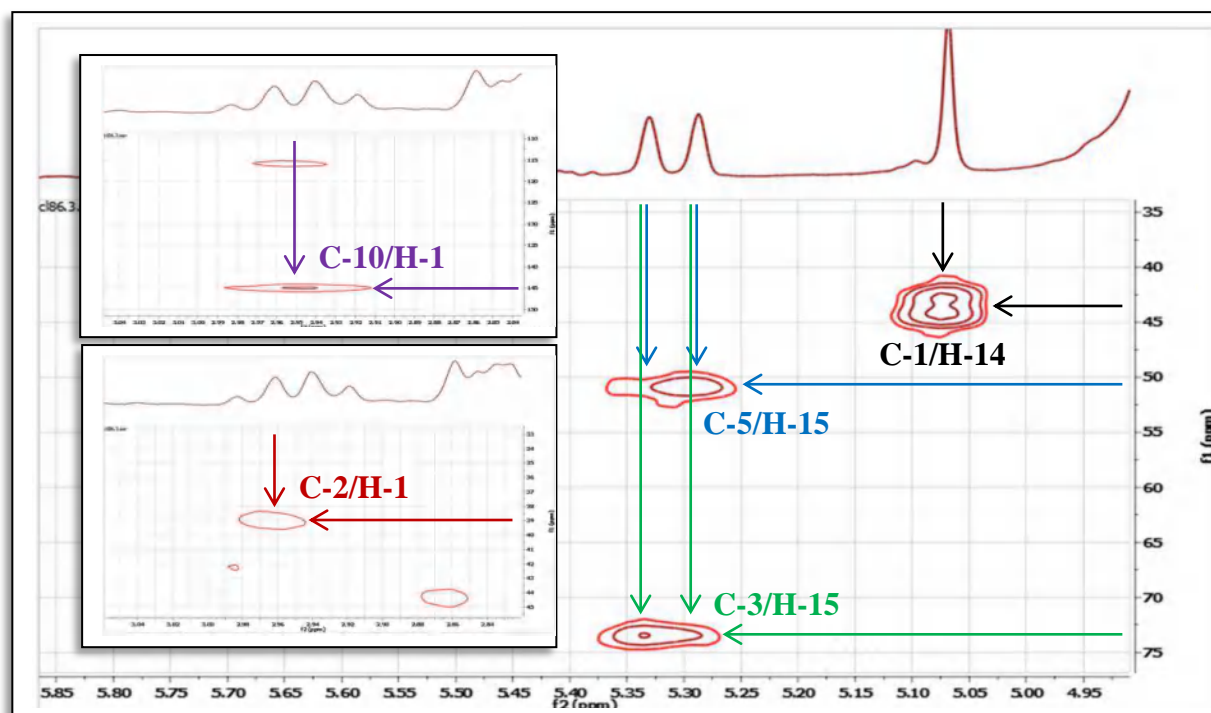
plus de la corrélation avec le H-7, précédemment signalée. Les protons de ces deux méthines sont attribués aux protons H-5 et H-1, respectivement. Ces attributions sont confirmées par les corrélations repérées sur le spectre HMBC entre le C-1 ( $\delta_C$  44,4 ppm) et les protons H-9a ( $\delta_H$  2,84) et H-9b ( $\delta_H$  2,45) (m) (Figure III.17).



**Figure III.17.** Etallement du Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**

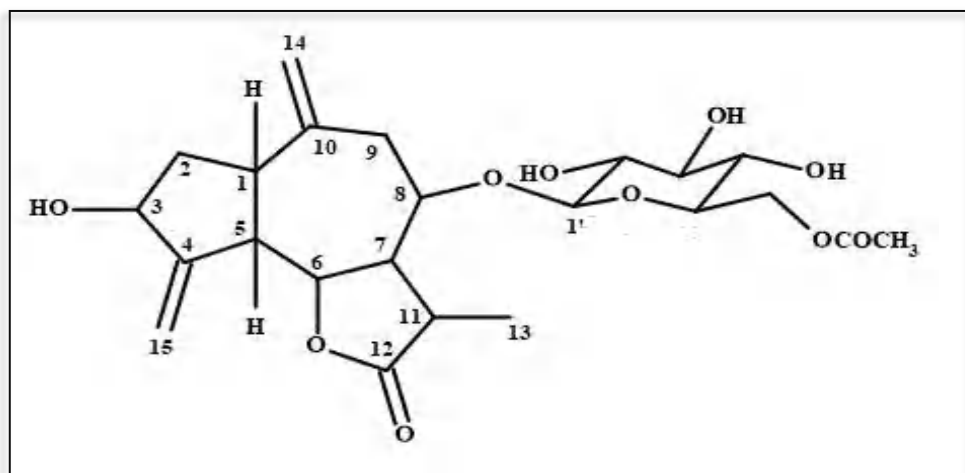
Sur le même spectre HMBC, on relève également une tache de corrélation entre le carbone C-1 et les protons du méthylène de la double liaison exocyclique ( $\delta_H$  5,07 (2H, s) ;  $\delta_C$  115,8 ppm). Cette observation permet d'attribuer cet exométhylène à la position C-14. La résonance du carbone quaternaire éthylénique délimitant cette double liaison soit le C-10 est relevée à  $\delta_C$  145,2 ppm grâce à sa corrélation avec H-1. Ceci confirme les données que nous avons avancées plus haut. Il est évident que le deuxième exométhylène présent dans ce composé est attribuable à la position C-15 ( $\delta_C$  110,2 ppm), le carbone C-4 sera attribué à la résonance à  $\delta_C$  154,0 ppm. Ces attributions sont également justifiées par les corrélations observées entre le C-5 ( $\delta_C$  51,0) et les protons H-15a et H-15b sur le spectre HMBC. Toujours sur le spectre HMBC, une corrélation est observée entre le carbone de l'hydroxyméthine ( $\delta_C$  73,4 ppm) précédemment annoncé et les protons H-15a et H-15b, cette donnée permet d'attribuer le carbone de cet hydroxyméthine à la position C-3. Il ne nous reste plus qu'à attribuer le groupement méthylène restant [ $\delta_H$  1,71 (m) et 2,23 (m) ;  $\delta_C$  39,0 ppm] à la

position C-2. Ceci est en accord avec la corrélation entre C-2 et le proton H-1 relevée sur le spectre HMBC (Figure III.18).



**Figure III.18.** Etalements du Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-1**

Toutes ces données permettent de proposer pour le composé **B-1**, la structure représentée dans la figure III.19.



**Figure III.19.** Structure partielle du composé **B-1**

La stéréochimie des centres asymétriques de la partie aglycone est établie comme suit :

- L'orientation  $\beta$  de H-6 est déduite de la multiplicité de son signal (triplet), et de la valeur de ses interactions de couplage avec ses deux voisins H-5 et H-7 ( $J = 9,8$  Hz), cette donnée impose des orientations  $\alpha$  H-5 et  $\alpha$  H-7.
- L'orientation  $\beta$  de H-8 est déduite de la valeur de la largeur à mi-hauteur (environ 20 Hz) de son signal indiquant des interactions axiale-axiale  $\alpha$  H-7/H-8 et H-8/ $\alpha$  H-9.
- L'orientation  $\alpha$  de H-1 est déduite de la valeur de son interaction de couplage avec H-5 (8,6 Hz), à noter que H-1 et H-5 appartiennent à un cycle à 5 chaînons.
- L'orientation  $\beta$  du groupement hydroxyle en C-3 est déduite de la valeur du déplacement chimique du carbone C-3 ( $\delta_c$  73,4 ppm) (Yang et al. 2008 ; Shimizu et al. 1988). En fait, la valeur du déplacement chimique C-3 est rapportée plus élevée pour la même classe de molécules avec un groupe  $3\alpha$ -hydroxy (Li et Jia 1989).
- L'orientation  $\beta$  de H-11 est déduite de la valeur de sa constante de couplage (9 Hz) avec le proton  $\alpha$  H-7.

La combinaison de l'ensemble des résultats de cette analyse mène à la structure représentée dans la figure III.20. C'est une molécule nouvelle, nous la reportons pour la première fois dans la littérature sous le nom de  $3\beta$ -hydroxy- $11\beta,13$ -dihydrodehydrocostuslactone  $8\alpha$ -O-( $6'$ -acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside).

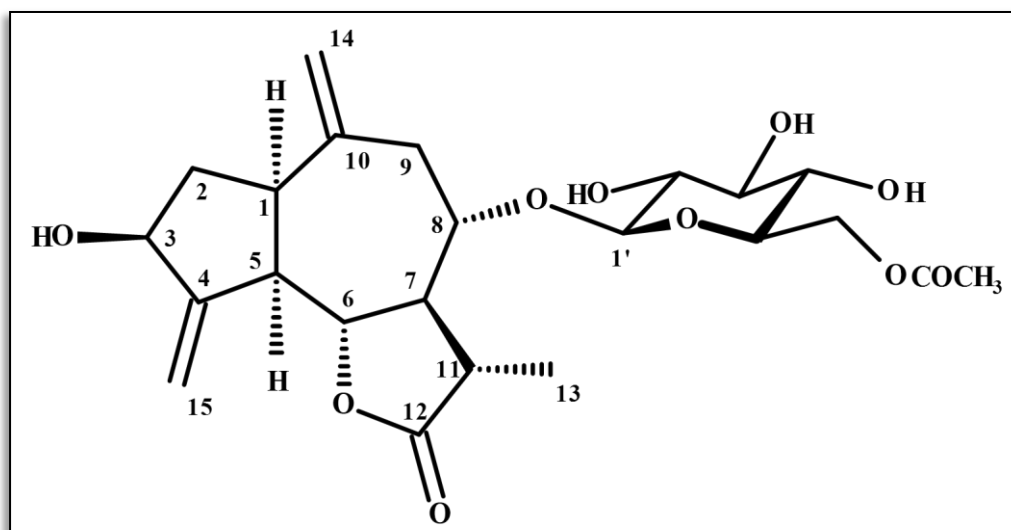


Figure III.20. Structure du composé B-1 :

$3\beta$ -hydroxy- $11\beta,13$ -dihydrodehydrocostuslactone  $8\alpha$ -O-( $6'$ -acetyl- $\beta$ -D-glucopyranoside)

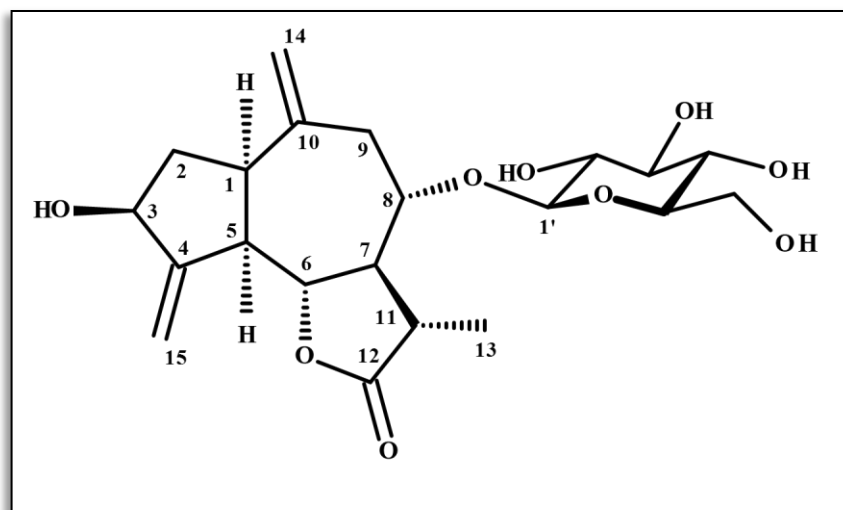
Les résultats de l'analyse des spectres de RMN sont reportés dans le tableau III.1

**Tableau III.1.** Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé **B-1**

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*	HMBC (ppm)
<b>1</b>	2,95	(1H, q, $J = 8,6$ )	44,4	C-2, C-5, C-6, C-14, C-10
<b>2a</b>	2,23	(1H, m)	39,0	C-4, C-5
<b>2b</b>	1,71	(1H, m)	39,0	C-3, C-10
<b>3</b>	4,51	(1H, tl, $J = 9,8$ )	73,4	-
<b>4</b>	-	-	154,0	-
<b>5</b>	2,83	(1H, m)	51,0	C-1, C-6, C-4
<b>6</b>	4,15	(1H, t, $J = 9,8$ )	80,7	C-8
<b>7</b>	2,24	(1H, m)	55,1	C-13, C-5, C-6, C-8
<b>8</b>	3,80	(1H, m)	85,2	-
<b>9a</b>	2,84	(1H, m)	42,6	C-8
<b>9b</b>	2,45	(1H, dd, $J = 13,4-6,9$ )	42,6	C-1, C-7, C-8, C-14, C-10
<b>10</b>	-	-	145,2	-
<b>11</b>	2,74	(1H, m)	42,0	C-12
<b>12</b>	-	-	180,0	-
<b>13</b>	1,43	(3H, d, $J = 7,0$ )	16,1	C-11, C-7, C-12
<b>14</b>	5,07	(2H, s)	115,8	C-9, C-1
<b>15a</b>	5,33	(1H, sl)	110,2	C-5, C-3
<b>15b</b>	5,29	(1H, sl)	110,2	C-5, C-3
<b>1'</b>	4,49	(1H, d, $J = 7,4$ )	104,7	C-8
<b>2'</b>	3,24	(1H, dd, $J = 9,0-7,4$ )	75,0	C-1'
<b>3'</b>	3,38	(1H, t, $J = 9,0$ )	78,0	C-4', C-2'
<b>4'</b>	3,31	1H, t, $J = 9,0$	71,4	C-2', C-5'
<b>5'</b>	3,53	1H, m	74,8	-
<b>6'a</b>	4,47	1H, dd, $J = 11,8 ; 2,5$	64,4	-
<b>6'b</b>	4,22	(1H, dd, $J = 11,8-5,0$ )	64,4	-
<b>CO</b>	-	-	172,0	-
<b>CH<sub>3</sub></b>	2.07	(3H, s)	20,3	C=O

\*  $\delta$   $^{13}\text{C}$  (ppm) obtenus par la combinaison des données des spectres HSQC et HMBC

## II.2. Détermination structurale du composé B-2



L'examen des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.21) et HSQC (Figure III.22) de ce composé **B-2** montre qu'il est en tout point similaire à celui du composé **B-1**.

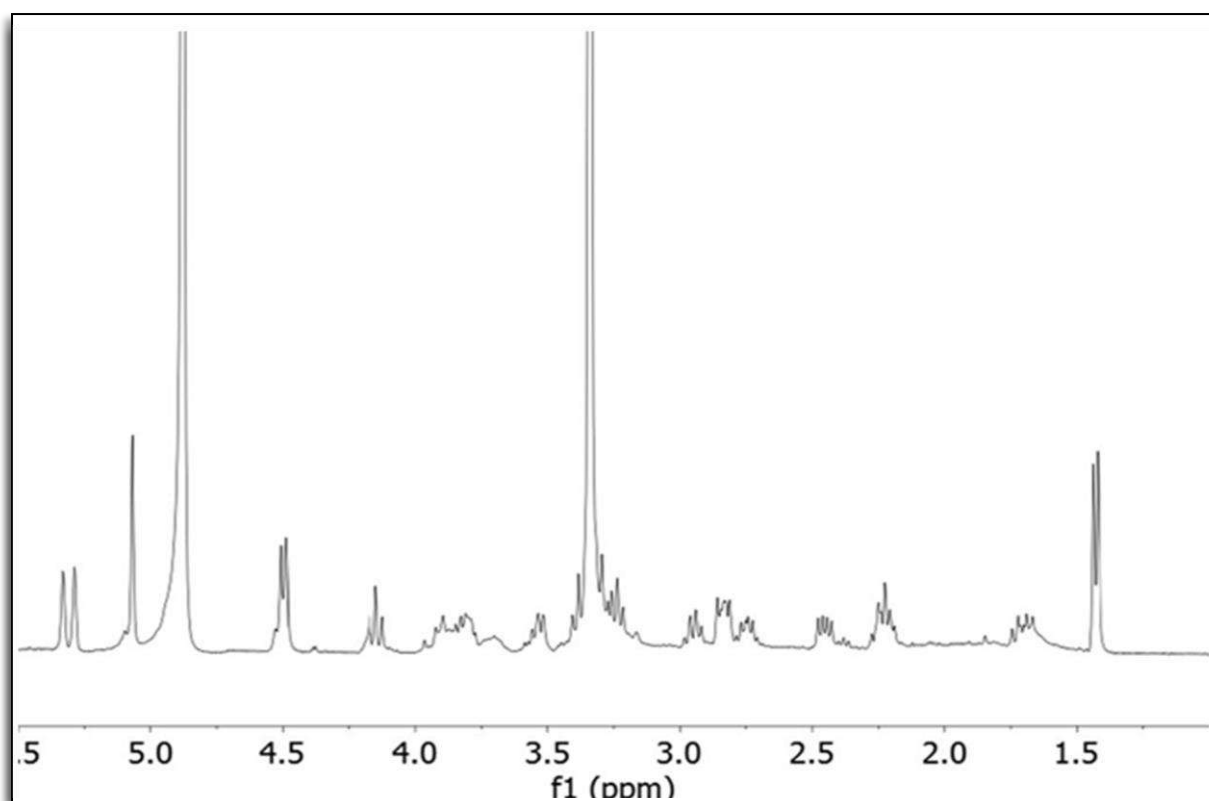
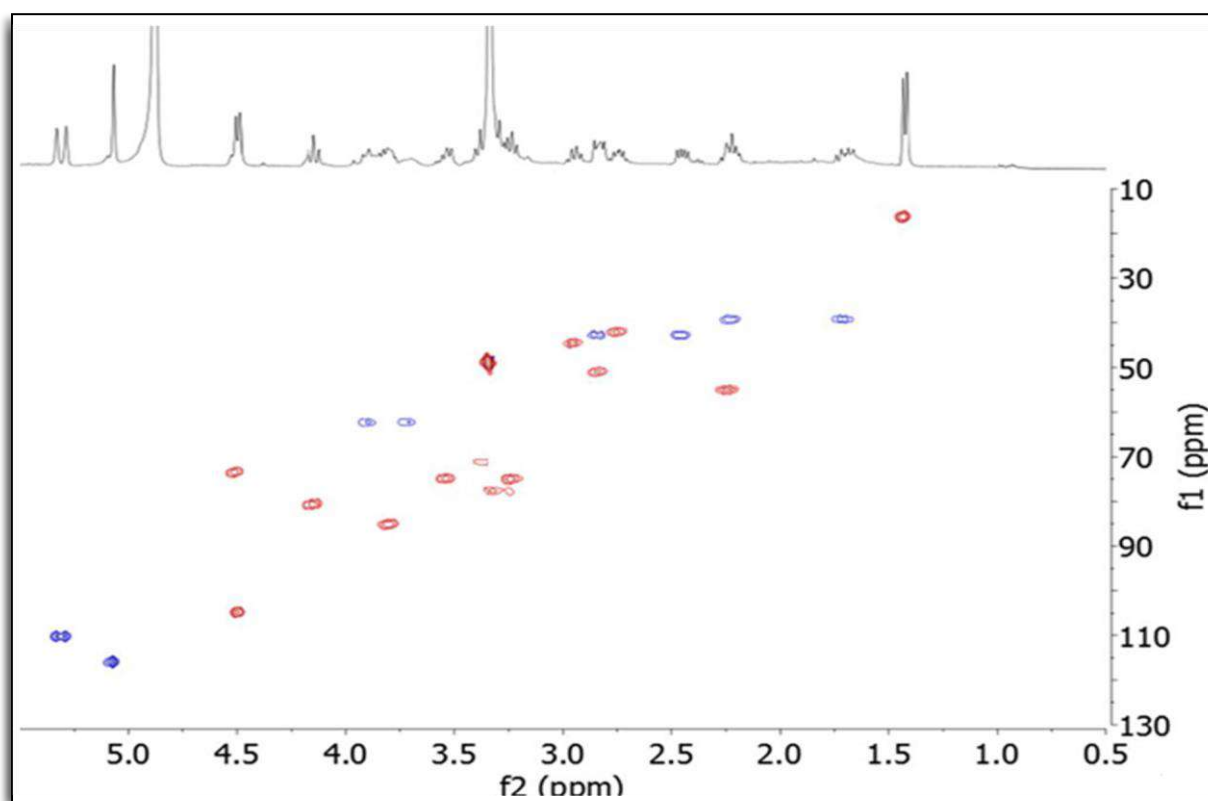


Figure III.21. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-2**





**Figure III.22.** Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-2**

La seule différence remarquable au premier abord est la disparition du signal du méthyle de la fonction acétate indiquant que l'hydroxyle en C-6' du groupement *O*- $\beta$ -glucopyranosyle n'est pas acétylé dans ce composé. En effet, l'examen du spectre HSQC (Figure III.24) montre que les protons H-6'a [ $\delta_{\text{H}}$  3,90 (dd,  $J = 11,8 ; 2,5$  Hz)] et H-6'b [ $\delta_{\text{H}}$  3,72 (dd,  $J = 11,8 ; 5,0$  Hz)] corrélient avec le carbone résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  62,4 (C-6'). Cette valeur est en parfait accord avec un C-6' hydroxylé.

La combinaison des données des spectres proton et HSQC permet sans aucune ambiguïté d'attribuer tous les protons et les carbones de l'entité sucre qui n'est autre qu'un groupement *O*- $\beta$ -glucopyranosyle. En effet, on relève les signaux de la position anomérique à  $\delta_{\text{H}}$  4,49 (d,  $J = 7,4$ , H-1') et  $\delta_{\text{C}}$  104,8 (C-1').

Les signaux des autres protons et leurs carbones correspondants apparaissent à  $\delta_{\text{H}}$  3,24 (dd,  $J = 9,0 ; 7,4$  ; H-2') et  $\delta_{\text{C}}$  75,0 ; C-2') ;  $\delta_{\text{H}}$  3,38 (t,  $J = 9,0$  ; H-3') et  $\delta_{\text{C}}$  78,0 ; C-3') ;  $\delta_{\text{H}}$  3,31 (t,  $J = 9,0$  ; H-4') et  $\delta_{\text{C}}$  71,4 ; C-4') ; 3,32 (m ; H-5') et  $\delta_{\text{C}}$  77,7 ; C-5'). L'idée que la diminution du déplacement chimique de C-6' de ce composé par rapport à celui du composé **B-1** (62,4 contre 64,4 ppm) indique que le OH-6' n'est pas acétylé dans ce composé est confortée par

l'augmentation du déplacement chimique du C-5' dans ce composé (77,5 contre 74,8 ppm) (Li et al. 2007).

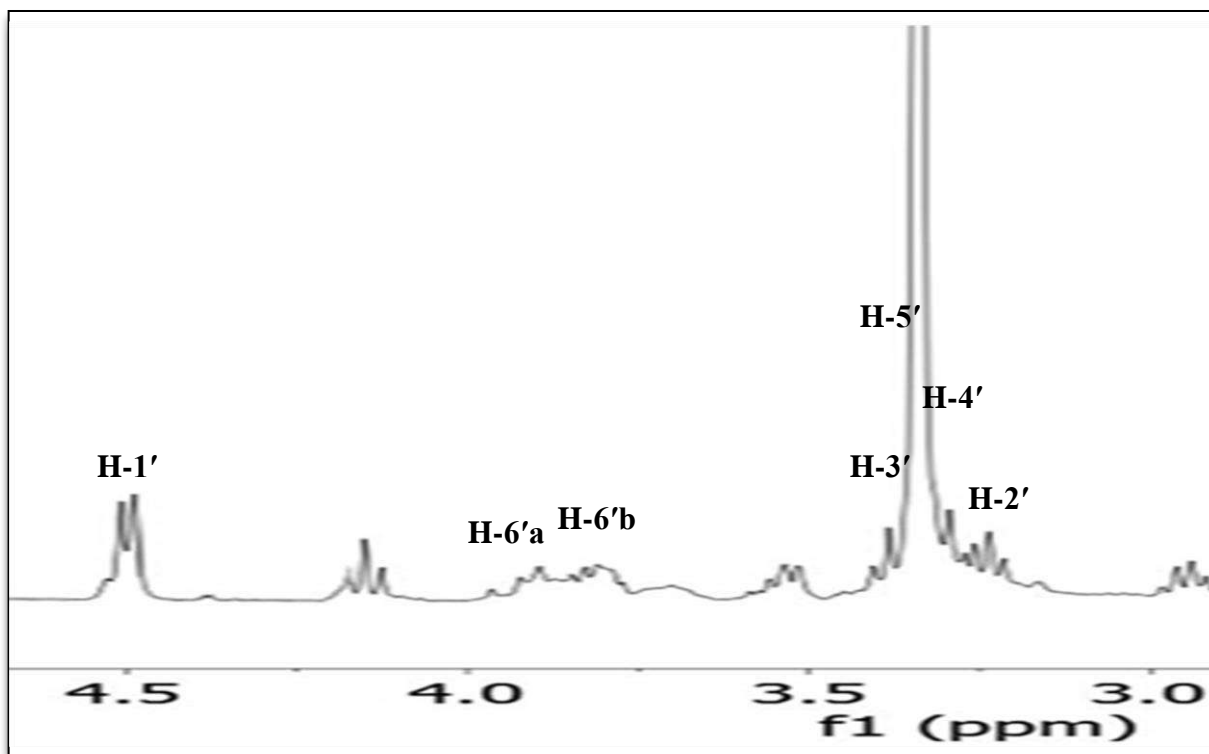


Figure III.23. Etalement du Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-2**

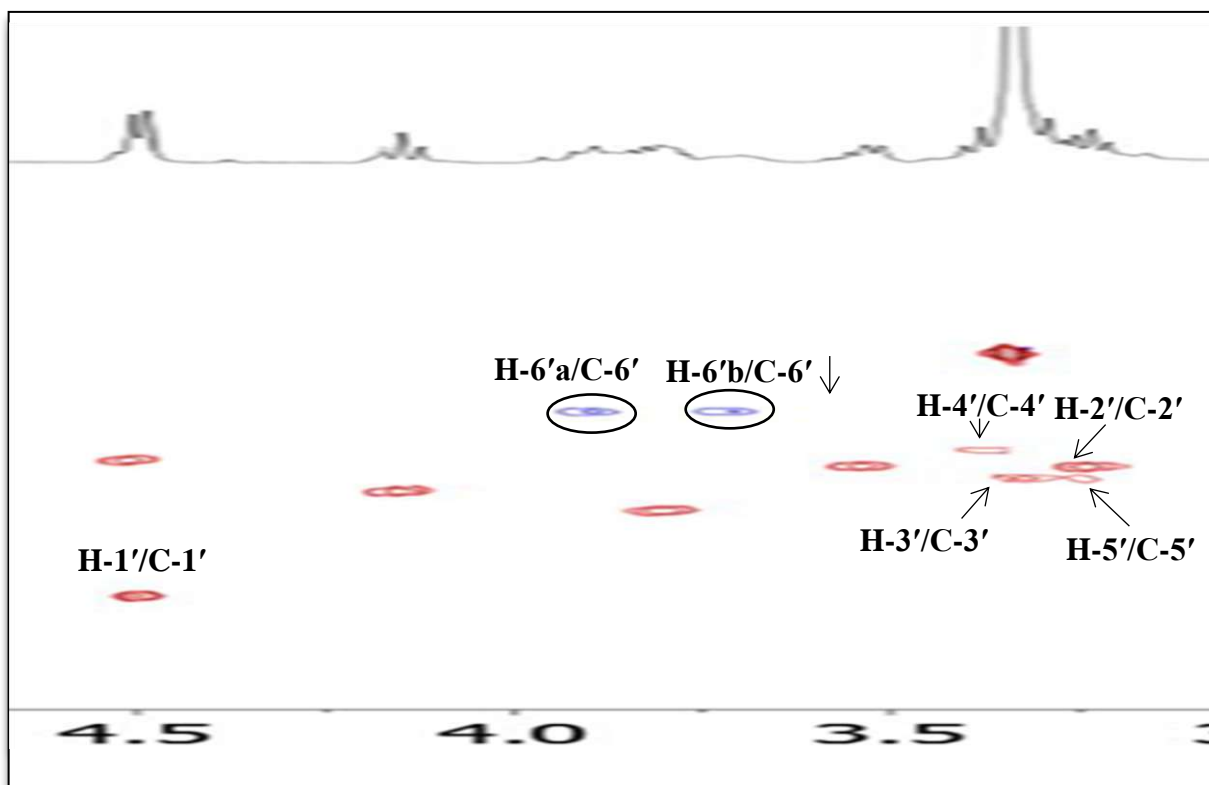


Figure III.24. Etalement du Spectre HSQC ( $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-2**

Cette analyse permet de conclure que le composé **B-2** est le **3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glucopyranoside** (Figure III.25).

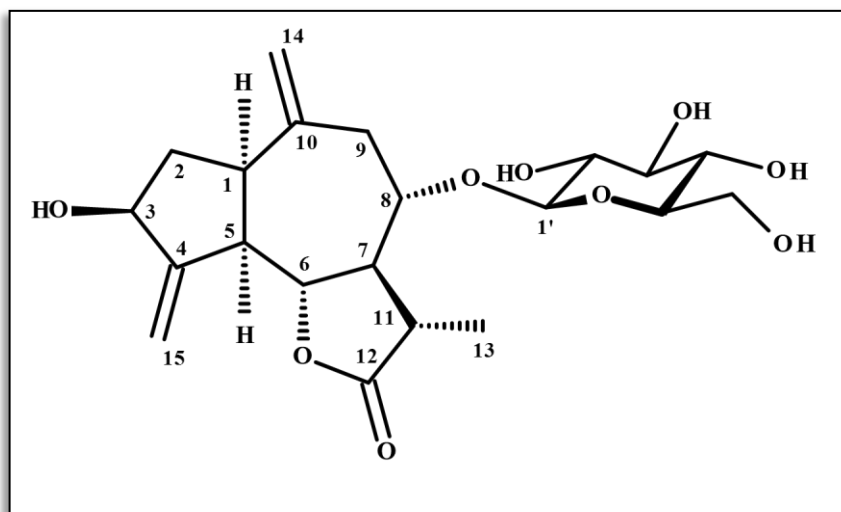


Figure III.25. Structure du composé **B-2** :

**3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -O- $\beta$ -D-glucopyranoside**

Les résultats de l'analyse des spectres de RMN sont reportés dans la tableau III.2

Tableau III.2. Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé **B-2**

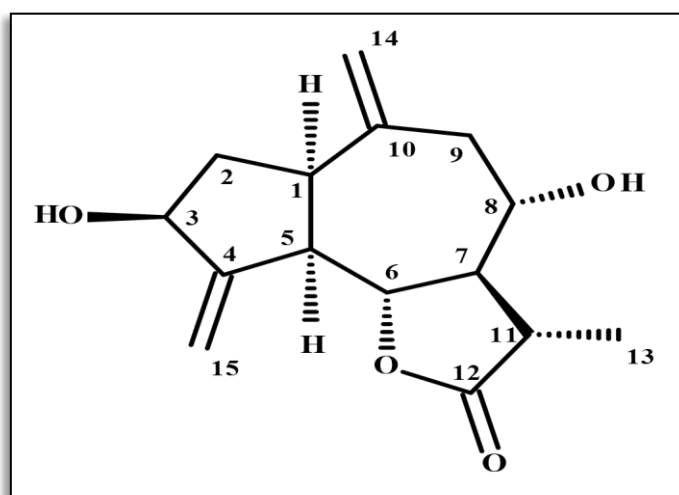
Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*
1	2,95	(1H, q, $J = 8,6$ )	44,3
2a	2,23	(1H, m)	39,0
2b	1,71	(1H, m)	39,0
3	4,51	(1H, tl, $J = 9,8$ )	73,4
4	-	-	154,0
5	2,83	(1H, m)	51,0
6	4,15	(1H, t, $J = 9,8$ )	80,7
7	2,23	(1H, m)	55,1
8	3,82	(1H, m)	85,5
9a	2,84	(1H, m)	42,6
9b	2,45	(1H, dd, $J = 13,4; 6,9$ )	42,6
10	-	-	145,2
11	2,75	(1H, m)	42,1

**Tableau III.2.** Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé **B-2** (Suite)

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*
12	-	-	180,0
13	1,43	(3H, d, $J = 7,0$ )	16,1
14	5,07	(2H, s)	115,7
15a	5,33	(1H, sl)	110,2
15b	5,30	(1H, sl)	110,2
1'	4,49	(1H, d, $J = 7,4$ )	104,8
2'	3,24	(1H, dd, $J = 9,0; 7,4$ )	75,0
3'	3,38	(1H, t, $J = 9,0$ )	78,0
4'	3,31	(1H, t, $J = 9,0$ )	71,4
5'	3,32	(1H, m)	77,7
6'a	3,90	(1H, dd, $J = 11,8; 2,5$ )	62,4
6'b	3,72	(1H, dd, $J = 11,8; 5,0$ )	62,4

\*  $\delta$   $^{13}\text{C}$  (ppm) obtenus par la combinaison des données des spectres HSQC et HMBC

### II.3. Détermination structurale du composé A-3



Ce produit se présente sous forme de cristaux solubles dans le méthanol. Ce composé a une fluorescence noire sous lampe UV à 254 nm et une couleur rose après révélation par l'acide sulfurique.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.26) et HSQC (Figure III.27) enregistrés dans le méthanol- $d_4$ , permettent de remarquer une similitude avec ceux du composé **B-1** et cela en ce qui concerne la partie aglycone de **B-1**. En effet en examinant les spectres RMN  $^1\text{H}$  et HSQC on remarque l'absence du groupement *O*-(6'-acetyl- $\beta$ -*D*-glucopyranoside) et tout autre entité sucre. Ces observations indiquent que ce composé est une aglycone de type sesquiterpène lactone.

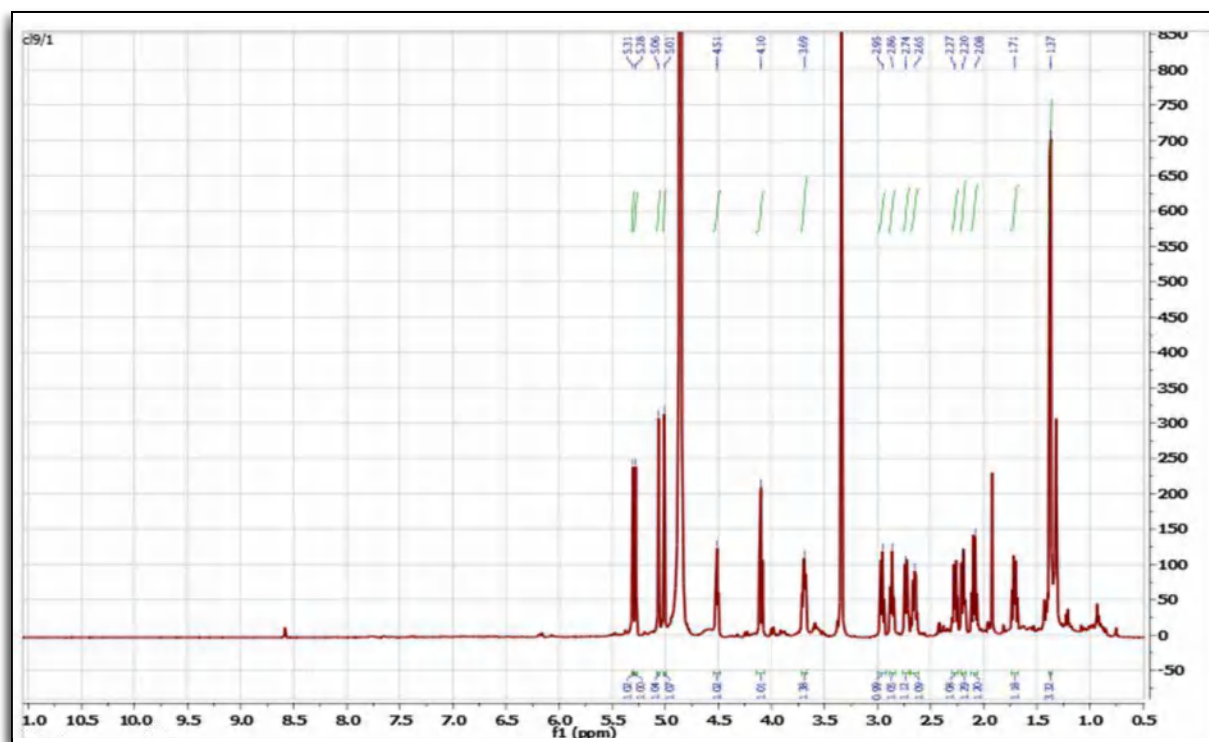


Figure III.26. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-3

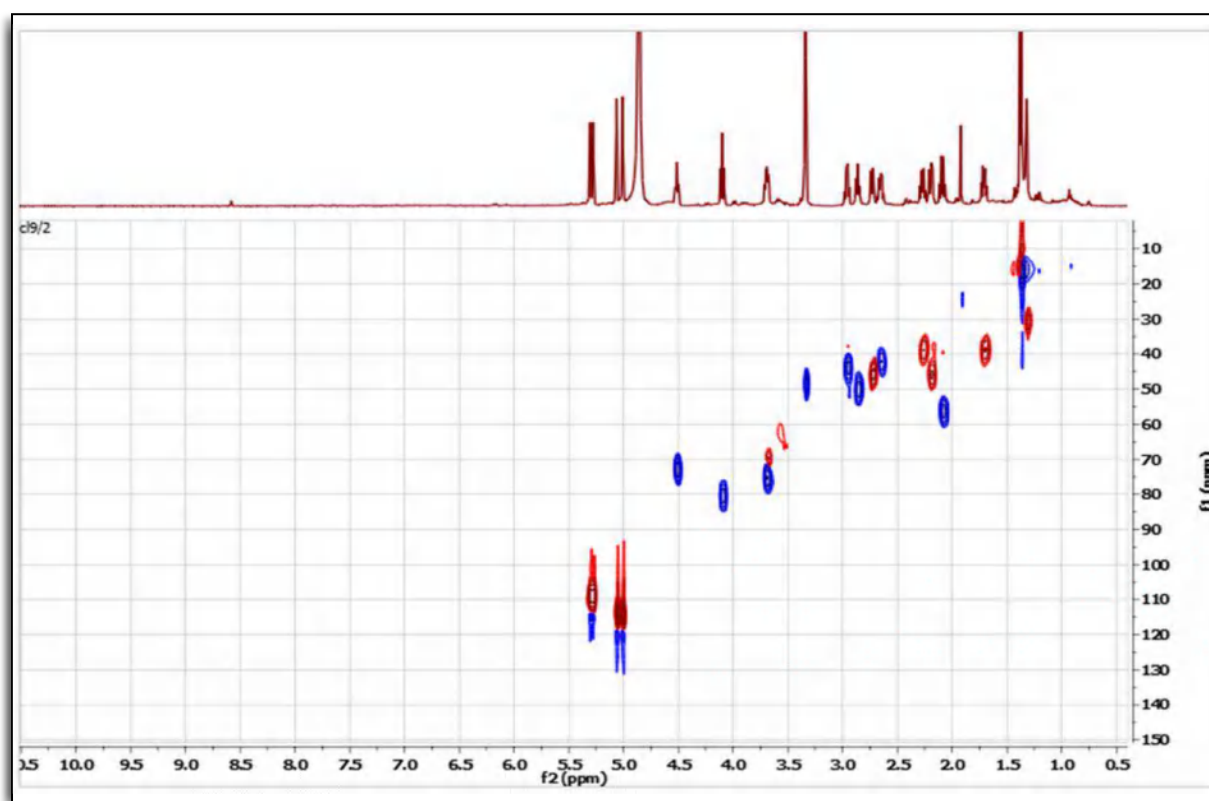


Figure III.27. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé A-3

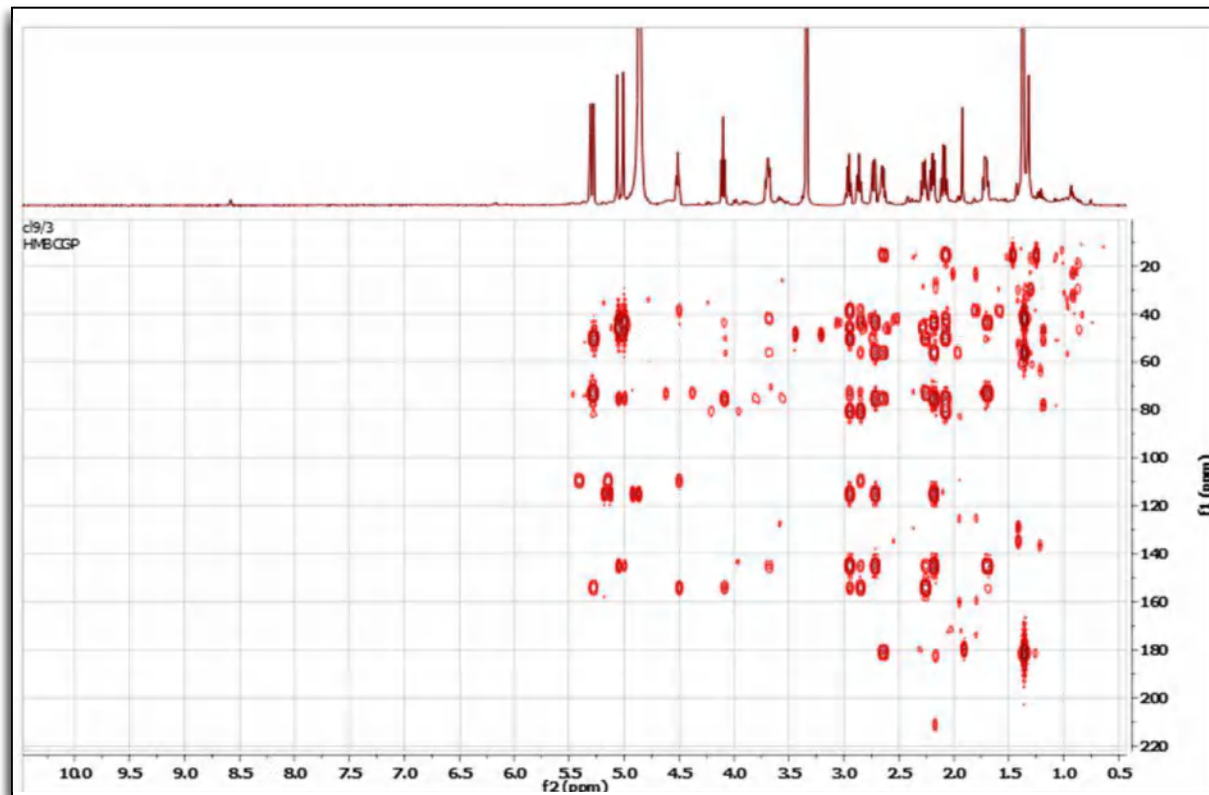
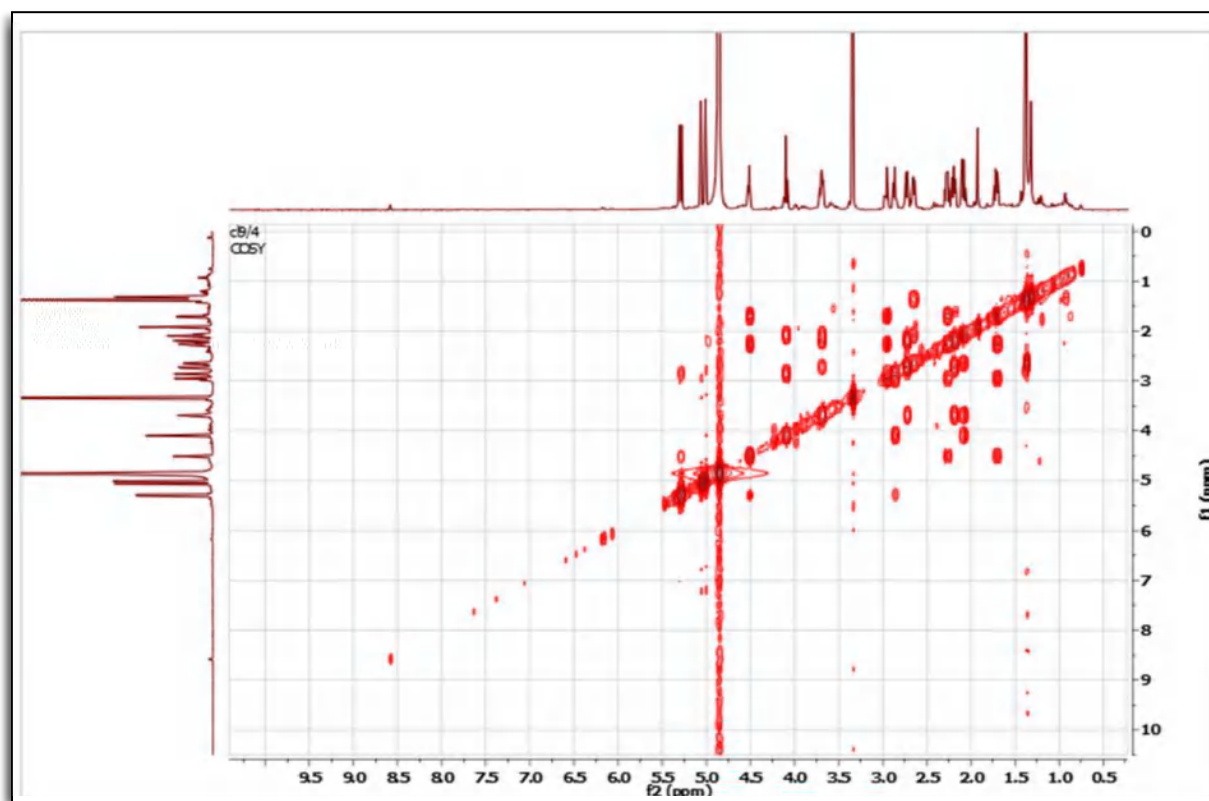


Figure III.28. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé A-3



**Figure III.29.** Spectre COSY (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-3

En effet, l'analyse simultanée des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.29), HSQC (Figure III.30) et HMBC (Figure III.31) permet de relever la présence d'un signal sous forme d'un triplet relatif à un groupement méthine oxygéné résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  4,10 ( $J = 9,9$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC au carbone dont la résonance est localisée à  $\delta_{\text{C}}$  80,7 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces deux noyaux sont caractéristiques du CH de fermeture de cette lactone sesquiterpénique. Cette idée est confortée par la présence d'un groupement méthyle résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  1,37 (d,  $J = 7,0$  Hz) et corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  15,3 ppm (Figure III.30). Sur le spectre HMBC (Figure III.31), les protons de ce méthyle montrent une tache de corrélation avec le carbone d'un carbonyle dont le déplacement chimique  $\delta_{\text{C}}$  180,1 ppm confirme bien la présence d'une  $\gamma$ -lactone ici  $\alpha$ ,  $\beta$ -saturée. En nous référant à la numérotation adoptée pour les squelettes des lactones sesquiterpéniques, nous pouvons à ce stade numéroter le carbone de ce carbonyle C-12 et le carbone de ce méthyle C-13.

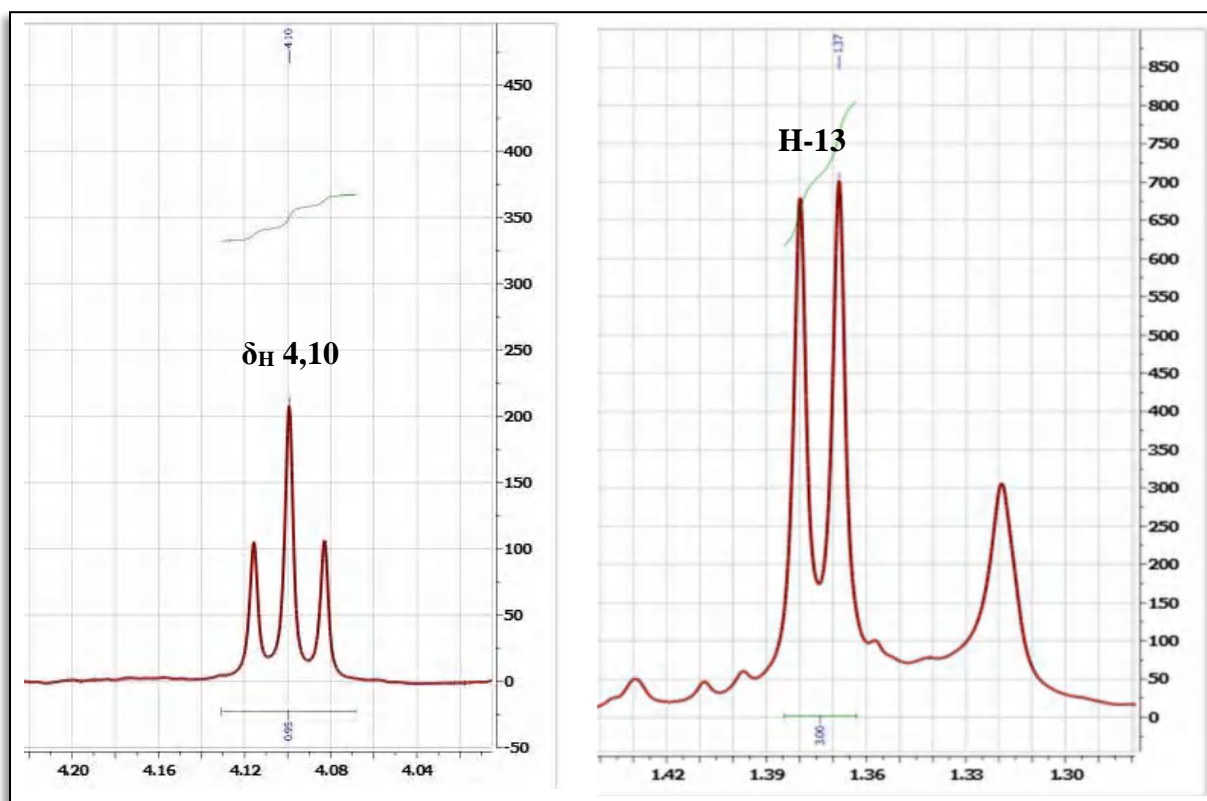


Figure III.30. Etalement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé A-3

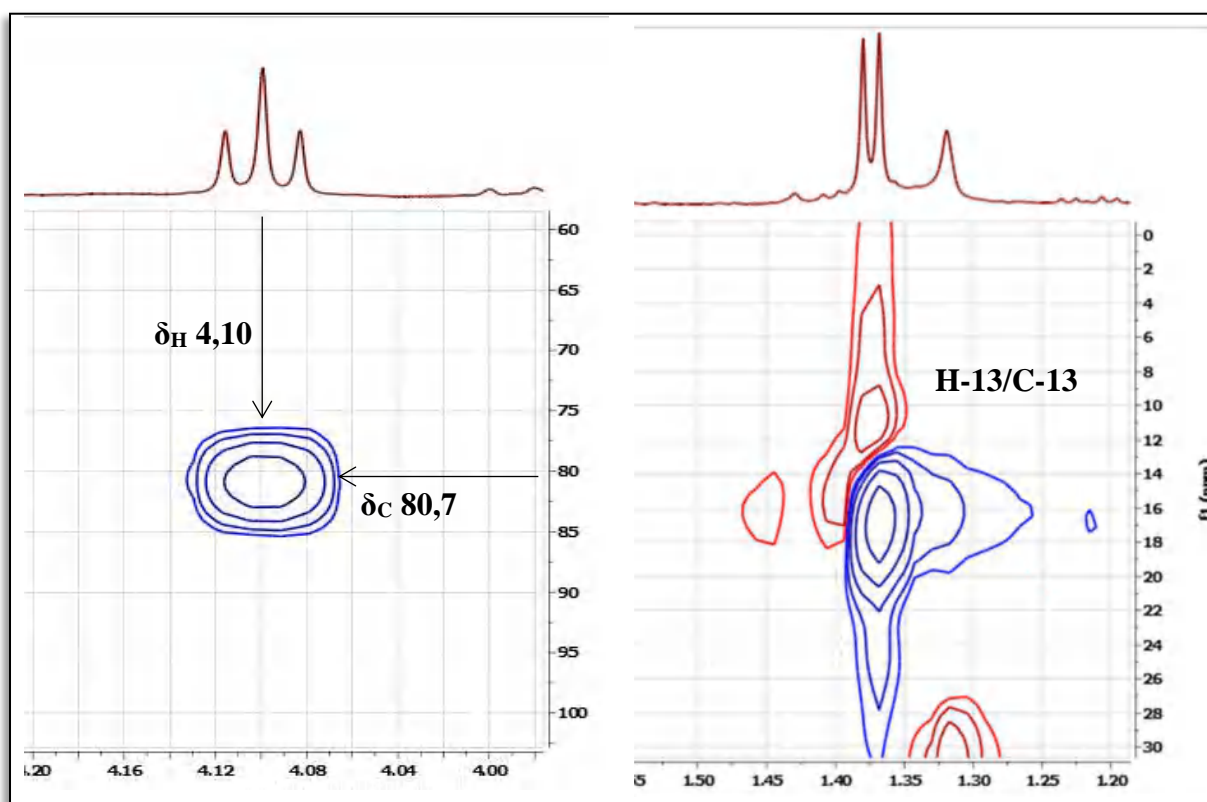
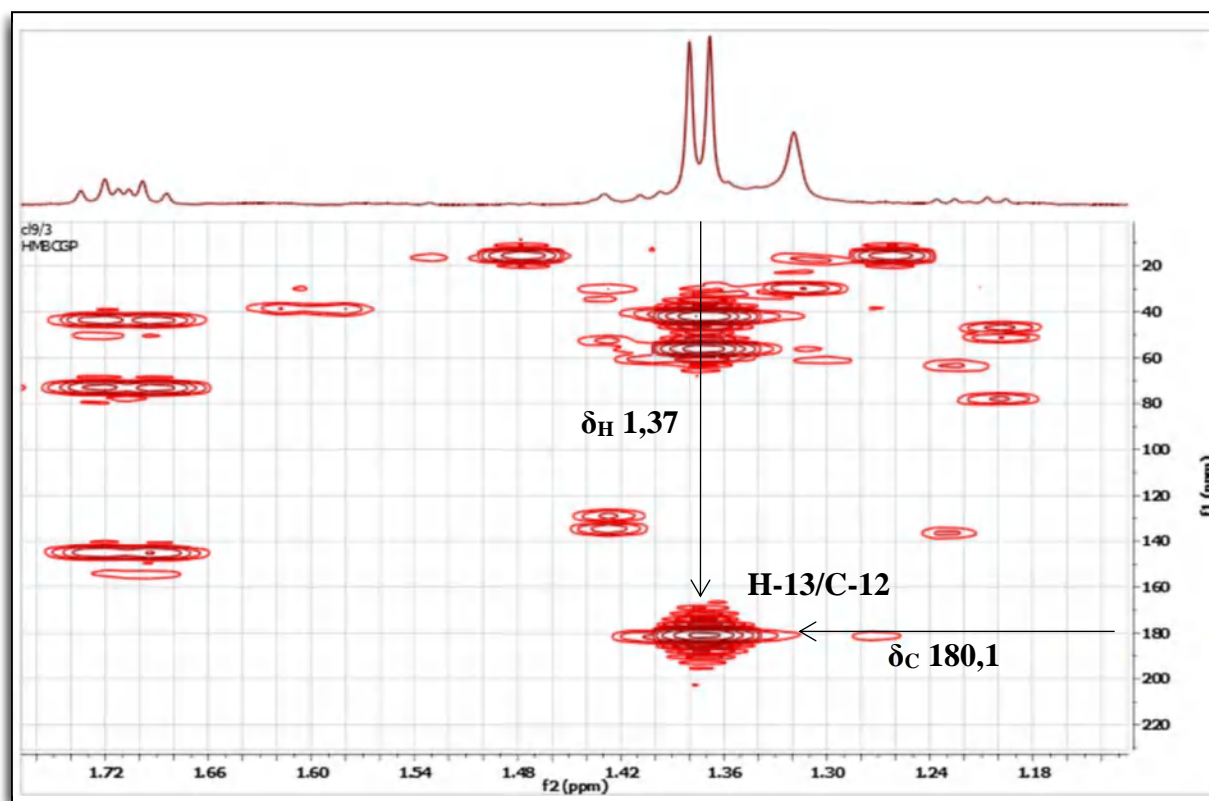


Figure III.31. Etalement du spectre HSQC (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé A-3





**Figure III.32.** Etallement du spectre HMBC (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **A-3**

Le spectre COSY montre une tache de corrélation entre les protons H<sub>3</sub>-13 et le proton d'un méthine résonnant à  $\delta_H$  2,65 sous forme d'un multiplet ; ce proton est de ce fait, attribuable à H-11. La résonance du C-11 est relevée à  $\delta_C$  42,4. Sachant que dans les squelettes sesquiterpéniques, le carbone C-11 est relié au C-7 ; grâce au spectre COSY, le signal du proton H-7 est alors relevé à  $\delta_H$  2,09 (q ;  $J = 9,9$  Hz), la résonance du carbone C-7 est alors localisée à  $\delta_C$  56,8. Sur le spectre COSY, H-7 montre des taches de corrélation avec les protons de deux groupements méthines, celui de la fermeture de la  $\gamma$ -lactone  $\delta_H$  4,10 (t,  $J = 9,9$  Hz ;  $\delta_C$  80,7) et un autre oxygéné d'après la valeur de son déplacement chimique  $\delta_H$  3,69 (multiplet ;  $\delta_C$  75,6) ; il est clair que ces méthines sont attribuables aux positions C-6 et C-8 selon le point de fermeture du cycle lactonique. Le spectre COSY, montre également que le proton de fermeture de cette lactone sesquiterpénique corrèle avec le proton d'un groupement méthine résonnant à  $\delta_H$  2,87 (ddl ;  $J = 9,9$  ; 8,4 Hz ;  $\delta_C$  50,3) lequel corrèle à son tour avec le proton d'un autre méthine résonnant à  $\delta_H$  2,96 (q ;  $J = 8,4$  Hz ;  $\delta_C$  44,2). Sur le spectre HMBC (Figure III.35), le carbone de ce dernier méthine ( $\delta_C$  44,2) montre des taches de corrélation avec les protons d'un groupement exométhylène résonnant sous forme de singlets à  $\delta_H$  5,01 et  $\delta_H$  5,06 ( $\delta_C$  114,2) et le carbone du méthine à  $\delta_C$  50,3 montre des taches

de corrélation avec les protons d'un autre groupement exométhylène résonnant sous forme de singulets à  $\delta_H$  5,28 et  $\delta_H$  5,31 ( $\delta_C$  109,6). Comme nous sommes en présence d'une lactone et sachant comme reporté plus haut, que la position C-13 est un méthyle, il est évident que les deux groupements exométhylènes précédemment cités représentent les positions C-14 et C-15 et délimitent les deux doubles liaisons exocycliques C-10 = C-14 et C-4 = C-15. Ces données permettent de déduire aisément qu'il s'agit d'une lactone sesquiterpénique de type guaianolide et indiquent clairement que le carbone de fermeture de cette lactone est le C-6, que le carbone résonnant à  $\delta_C$  50,3 est le C-5, que le carbone résonnant à  $\delta_C$  44,2 est le C-1, que le carbone résonnant à  $\delta_C$  114,2 est le C-14 et que le carbone résonnant à  $\delta_C$  109,6 est le C-15. On relève alors grâce au spectre HMBC (Figure III.34), les résonances de C-10 et C-4 à  $\delta_C$  145,3 et 153,0, respectivement.

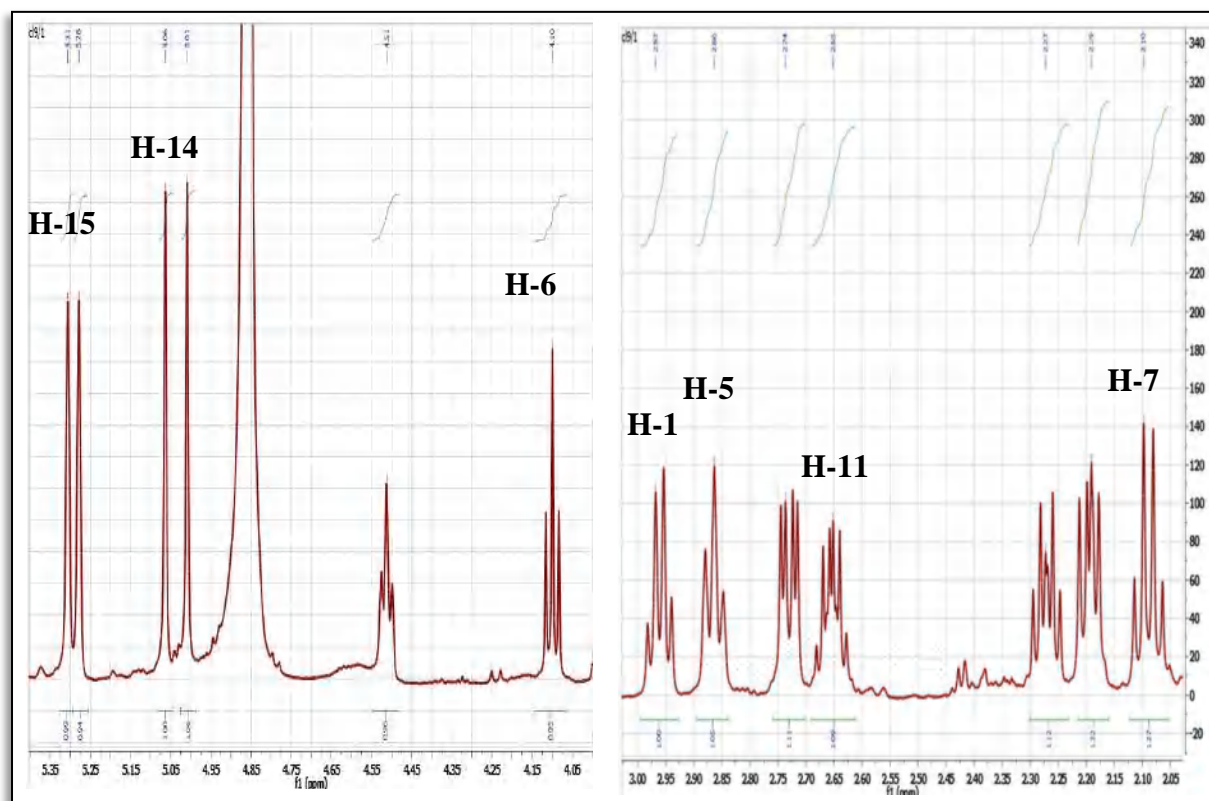


Figure III.33. Etalement du spectre RMN  $^1H$  (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-3

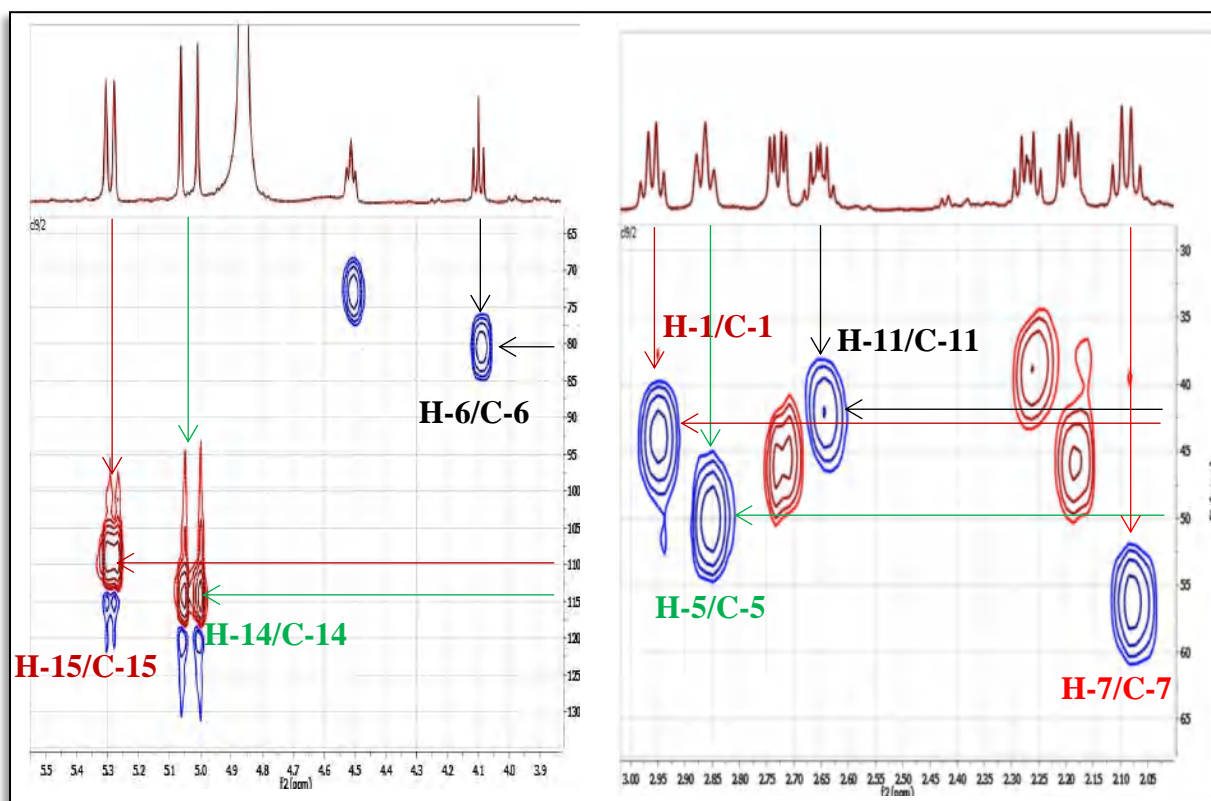


Figure III.34. Etallement du spectre HSQC (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-3

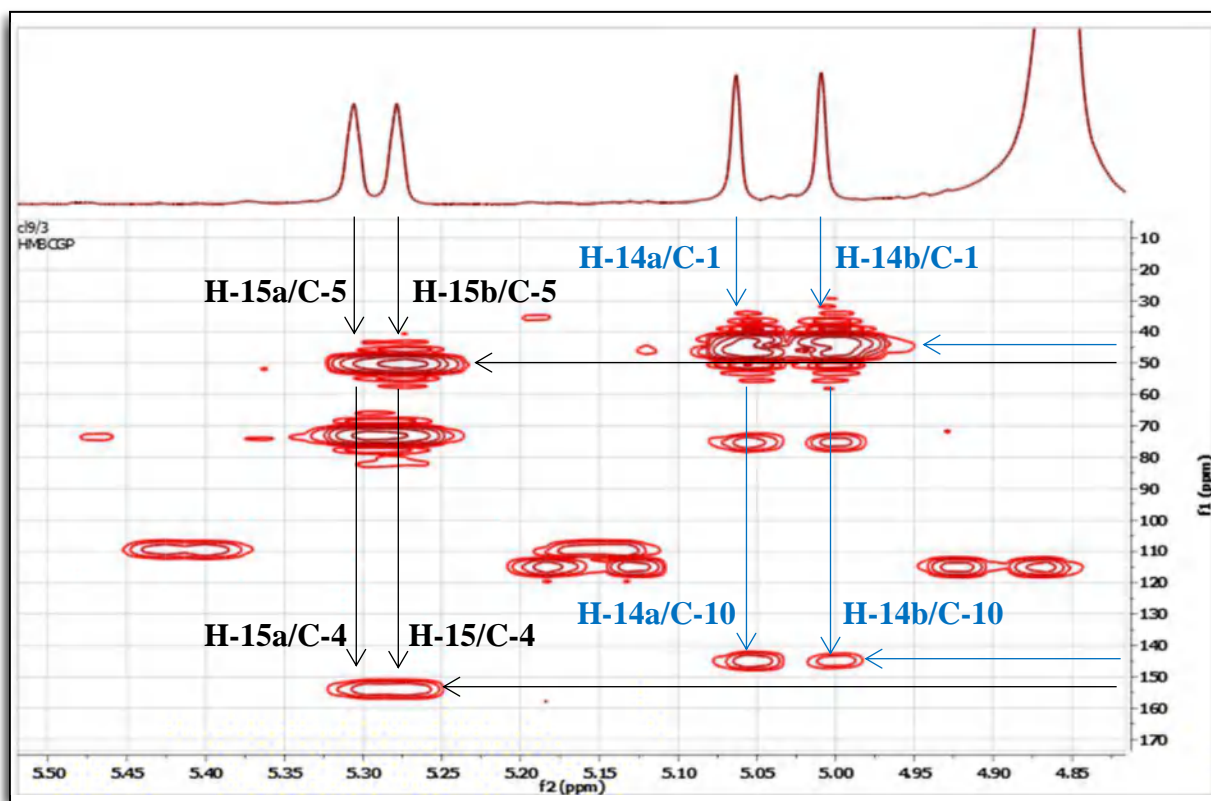
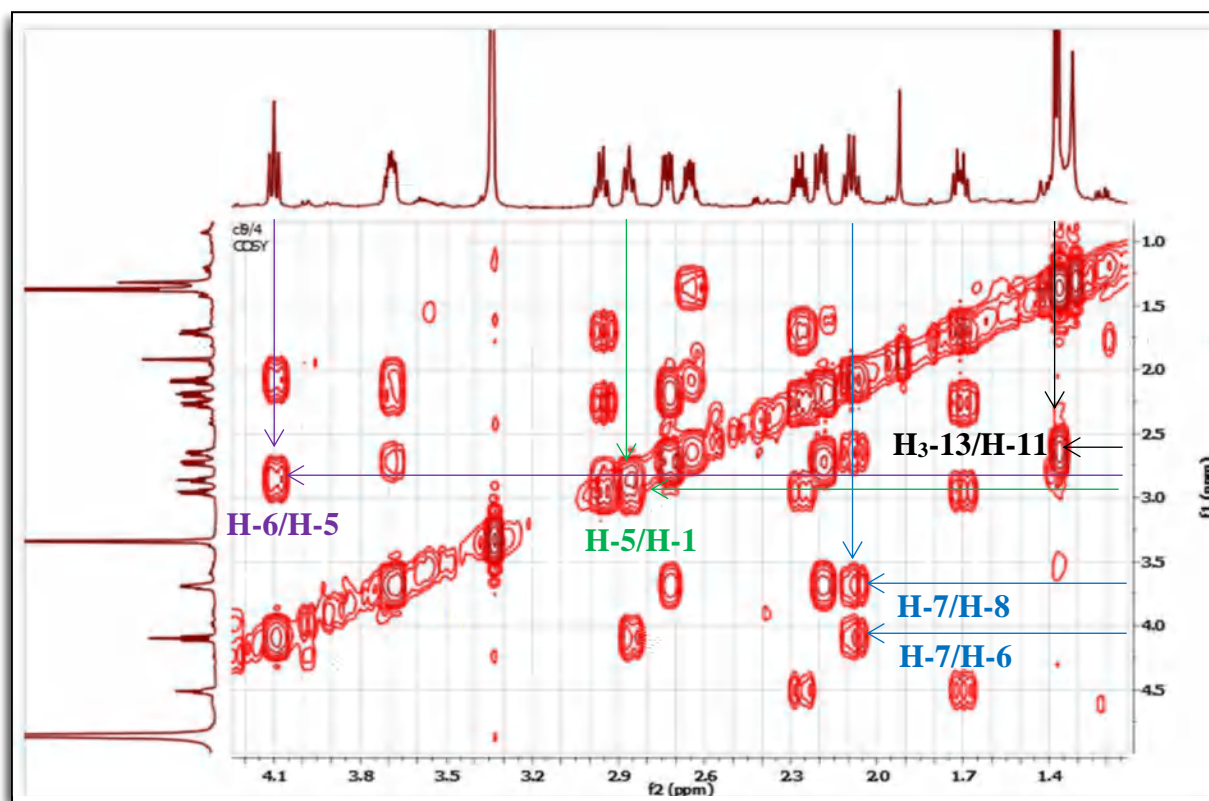


Figure III.35. Etallement du spectre HMBC (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-3



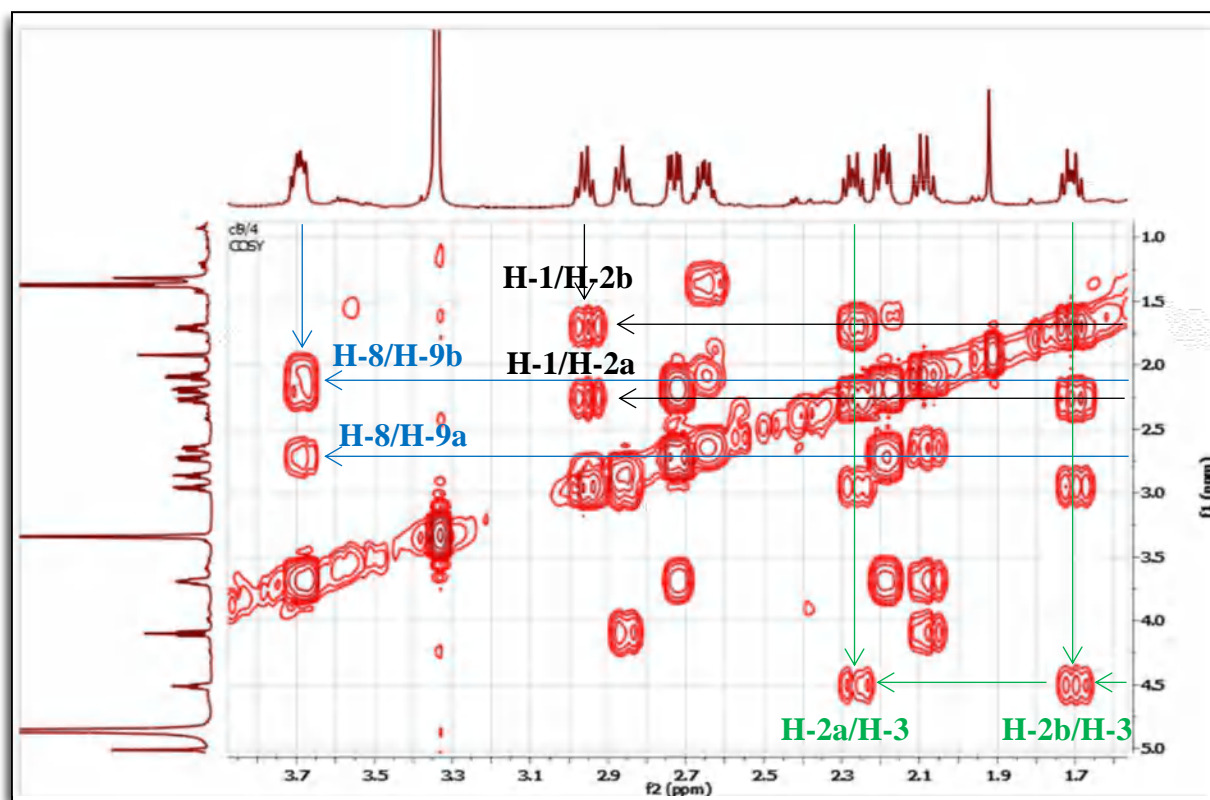
**Figure III.36.** Etallement du spectre COSY (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **A-3**

A ce stade de notre analyse et vu les indications précédemment reportées on peut attribuer sans ambiguïté le proton du méthine résonnant à  $\delta_H$  3,69 ppm ( $\delta_C$  75,6) à la position C-8. Sur le spectre COSY (Figure III.36), on relève une tache de corrélation entre le proton H-8 et les deux protons d'un méthylène résonnant à  $\delta_H$  2,19 (dd,  $J = 12,8 ; 8,0$  Hz) et  $\delta_H$  2,73 (dd,  $J = 12,8 ; 5,0$  Hz) ( $\delta_C$  46,4 ppm) que nous attribuons à H-9b et H-9a respectivement.

Toujours sur le spectre COSY (Figure III.36), le proton H-1 montre des corrélations avec les deux protons d'un méthylène résonnant à  $\delta_H$  1,71 (ddd ;  $J = 13,2 ; 8,4 ; 7,8$  Hz) et  $\delta_H$  2,27 (ddd,  $J = 13,2 ; 8,4 ; 7,8$  Hz) ( $\delta_C$  39,5 ppm) que nous pouvons attribuer à H-2b et H-2a respectivement.

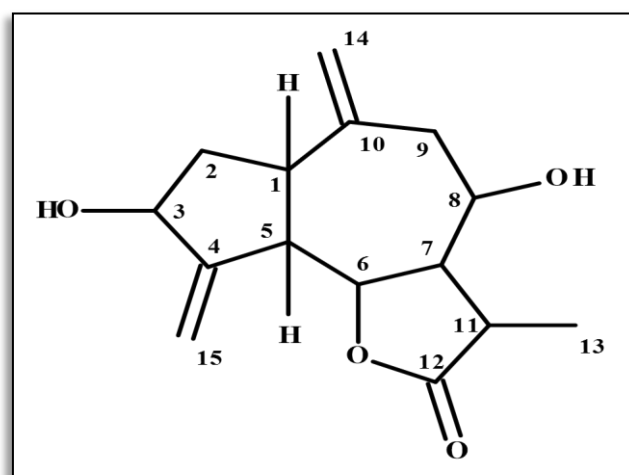
Un dernier recours au spectre COSY (Figure III.37) permet de relever des corrélations de H-2b et H-2a avec le proton d'un groupement méthine résonnant à  $\delta_H$  4,51 (t ;  $J = 7,8$  Hz ;  $\delta_C$  73,8). Il est évident que ce proton est attribuable à H-3 et son carbone au C-3. Cette attribution est supportée par les corrélations relevées entre C-3 et les protons H-15b ( $\delta_H$  5,28) et H-15a ( $\delta_H$  5,31).

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-8 ( $\delta_c$  75,6) et C-3 ( $\delta_c$  73,8) et l'absence d'autres signaux hydrocarbonés sur les spectres de ce composé imposent la présence de groupements hydroxyles en ces deux positions.



**Figure III.37.** Etallement du spectre COSY (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **A-3**

Toutes ces données permettent de proposer pour le composé **A-3**, la structure représentée dans la figure III.38.

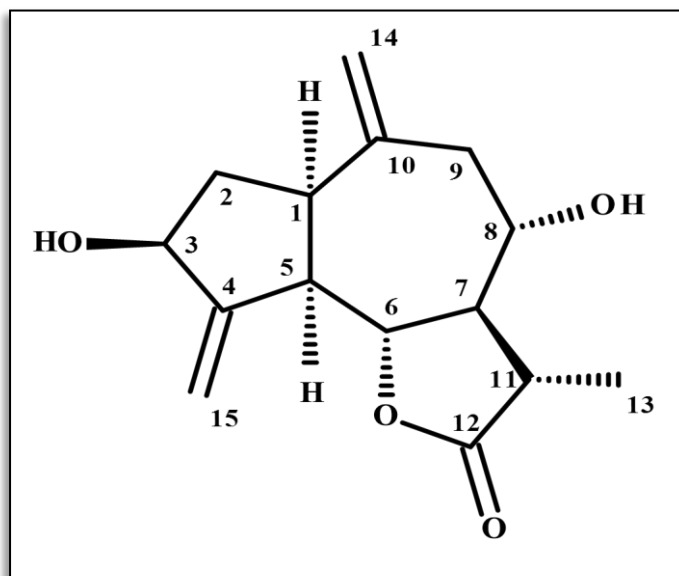


**Figure III.38.** Structure partielle du composé **A-3**

La stéréochimie des centres asymétriques est établie comme suit :

- L'orientation  $\beta$  de H-6 est déduite de la multiplicité de son signal (triplet), et de la valeur de ses interactions de couplage avec ses deux voisins H-5 et H-7 ( $J = 9,8$  Hz), cette donnée impose des orientations  $\alpha$  H-5 et  $\alpha$  H-7.
- L'orientation  $\beta$  de H-8 est déduite de la valeur de la constante de couplage ( $J = 9,9$  Hz) entre H-7 et H-8, vu que H-7 admet une orientation  $\alpha$ .
- L'orientation  $\alpha$  de H-1 est déduite de la valeur de son interaction de couplage avec H-5 (8,6 Hz), à noter que H-1 et H-5 appartiennent à un cycle à 5 chaînons.
- L'orientation  $\beta$  du groupement hydroxyle en C-3 est déduite de la valeur du déplacement chimique du carbone C-3 ( $\delta_C$  73,8 ppm) (Yang et al. 2008 ; Shimizu et al. 1988). En fait, la valeur du déplacement chimique C-3 est reportée plus élevée pour la même classe de molécules avec un groupe  $3\alpha$ -hydroxy (Li et Jia 1989).
- L'orientation  $\beta$  de H-11 est déduite de la valeur de sa constante de couplage (9,9 Hz) avec le proton  $\alpha$  H-7.

La combinaison de l'ensemble des résultats de cette analyse mène à la structure représentée dans la figure III.39.



**Figure III.39.** Structure du composé A-3 :  
**11 $\beta$ ,13-dihydrodeacylcynaropicrin**

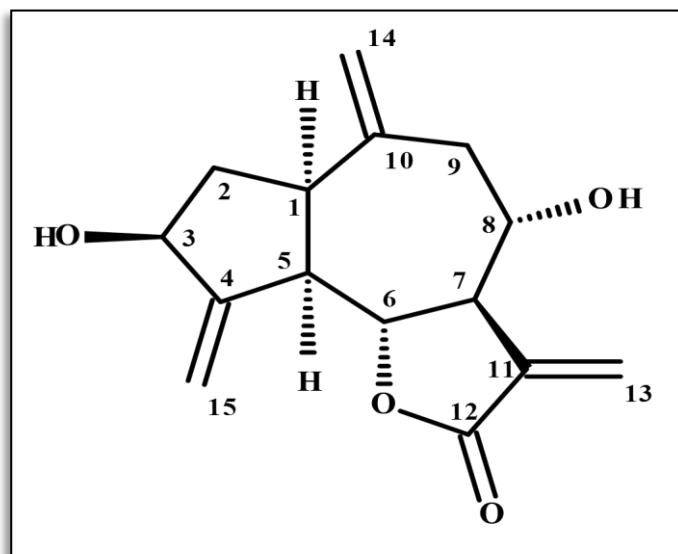


Tableau III.3. Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé A-3

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*	HMBC (ppm)	COSY (ppm)
1	2,96	(1H, q, $J = 8,4$ )	44,2	C-2, C-9, C-5, C-3, C-6, C-14, C-10, C-4	H-2a, H-2b, H-5
2a	2,27	(1H, ddd, $J = 13,2; 8,4; 7,8$ )	39,5	C-1, C-5, C-3, C-14, C-10	H-2b, H-1, H-3
2b	1,71	(1H, ddd, $J = 13,2; 8,4; 7,8$ )	39,5	C-1, C-3, C-10, C-4	H-2a, H-1, H-3
3	4,51	(1H, t, $J = 7,8$ )	73,8	C-2, C-1, C-15, C-4	H-2a, H-2b, H-15a, H-15b
4	-	-	153,0	-	-
5	2,87	(1H, ddl, $J = 9,9; 8,4$ )	50,3	C-2, C-1, C-7, C-3, C-6, C-15, C-10, C-4	H-1, H-6, H-15a, H-15b
6	4,10	(1H, t, $J = 9,9$ )	80,7	C-1, C-5, C-7, C-8, C-4	H-7, H-5
7	2,09	(1H, q, $J = 9,9$ )	56,8	C-13, C-11, C-8, C-6	H-11, H-8, H-6
8	3,69	(1H, m)	75,6	C-11, C-7, C-10	H-7, H-9a, H-9b
9a	2,73	(1H, dd, $J = 12,8; 5,0$ )	46,4	C-1, C-7, C-8, C-14, C-10	H-9b, H-8
9b	2,19	(1H, dd, $J = 12,8; 8,0$ )	46,4	C-1, C-7, C-8, C-14, C-10	H-9a, H-8
10	-	-	145,3		-
11	2,65	(1H, m)	42,4	C-13, C-7, C-8, C-12	H-13, H-7
12	-	-	180,1	-	-
13	1,37	(3H, d, $J = 7,0$ )	15,3	C-11, C-7, C-12	H-11
14a	5,06	(1H, s)	114,2	C-2, C-1, C-9, C-5, C-8, C-10	H-1, H-14b
14b	5,01	(1H, s)	114,2	C-2, C-1, C-9, C-5, C-8, C-10	H-9a, H-14a
15a	5,31	(1H, s)	109,6	C-2, C-1, C-5, C-3, C-6, C-4	H-5, H-3, H-15b
15b	5,28	(1H, s)	109,6	C-2, C-1, C-5, C-3, C-6, C-4	H-5, H-3, H-15a

\*  $\delta$   $^{13}\text{C}$  (ppm) obtenus par la combinaison des données des spectres HSQC et HMBC.

## II.4. Détermination structurale du composé A-4



Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.40), HSQC (Figure III.41), HMBC (Figure III.42) et COSY (Figure III.43) enregistrés dans le méthanol- $d_4$ , montrent des similitudes avec ceux du composé A-3, permettant de déduire une structure de lactone sesquiterpénique de type guaianolide.

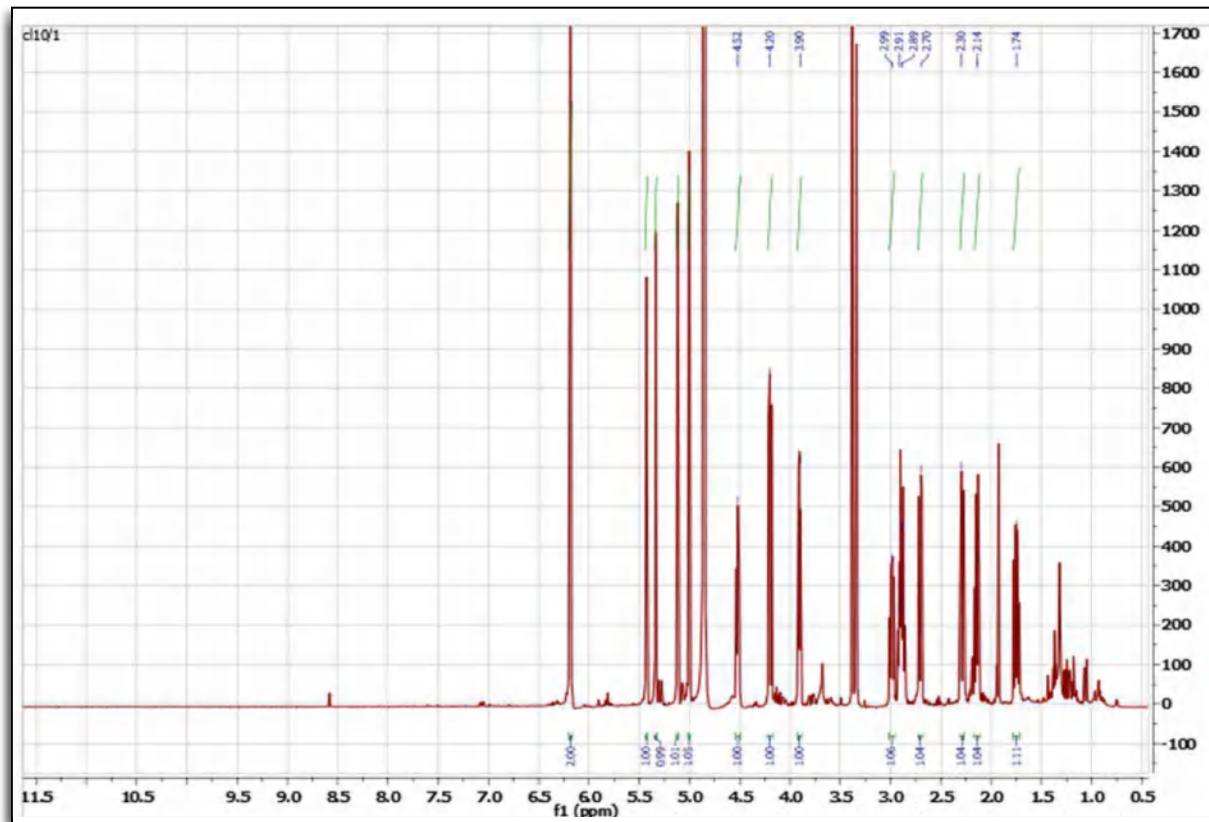


Figure III.40. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-4



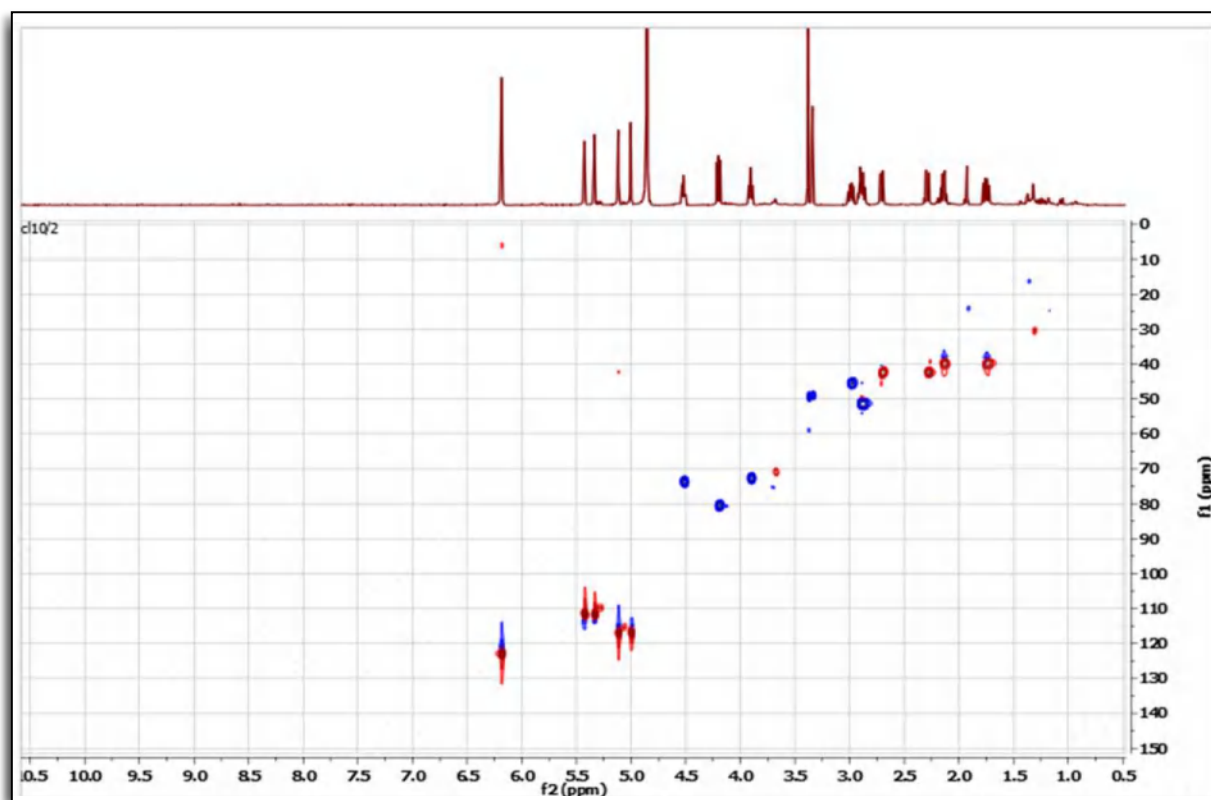


Figure III.41. Spectre HSQC (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-4

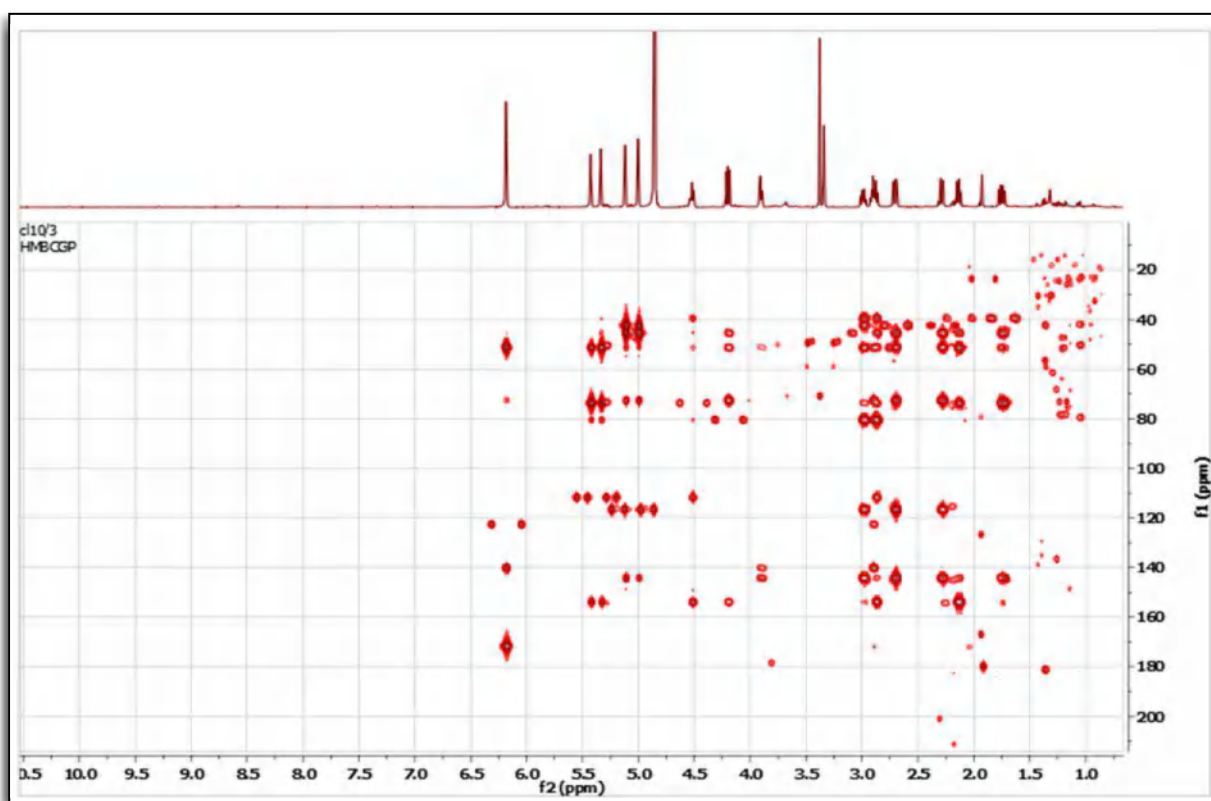
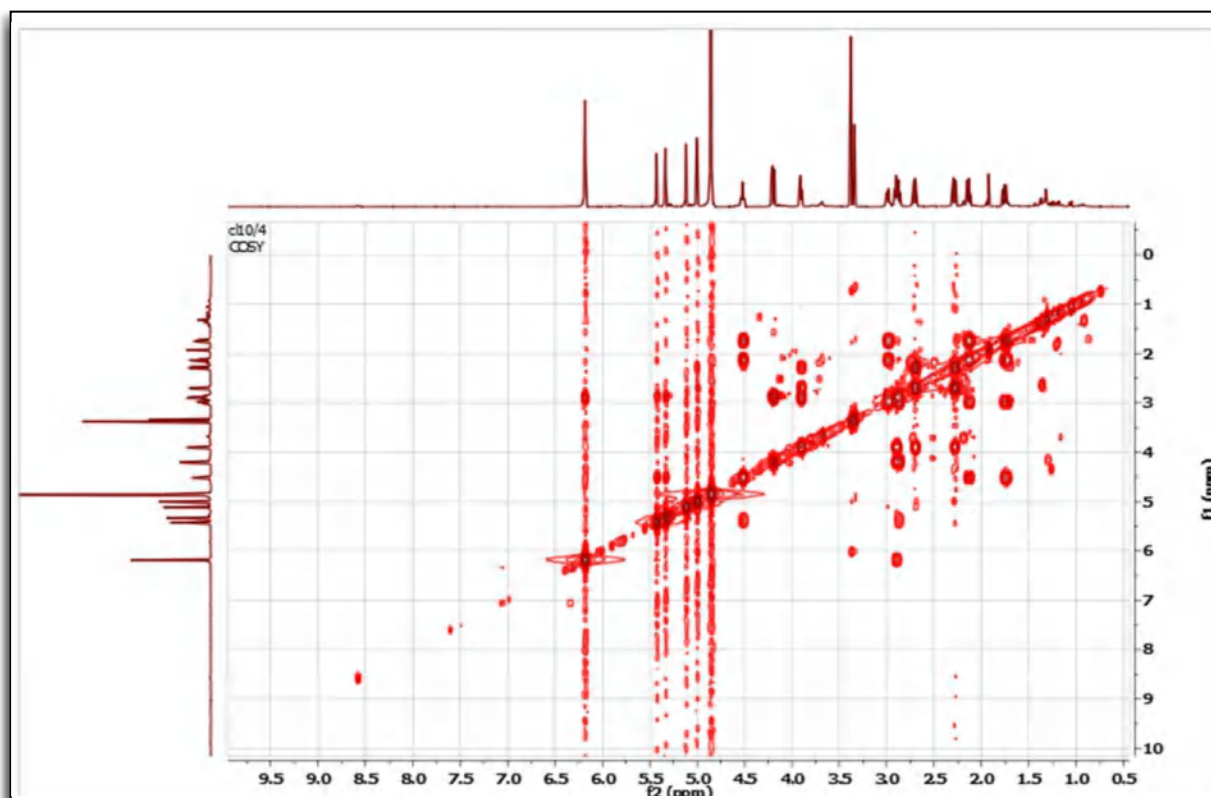
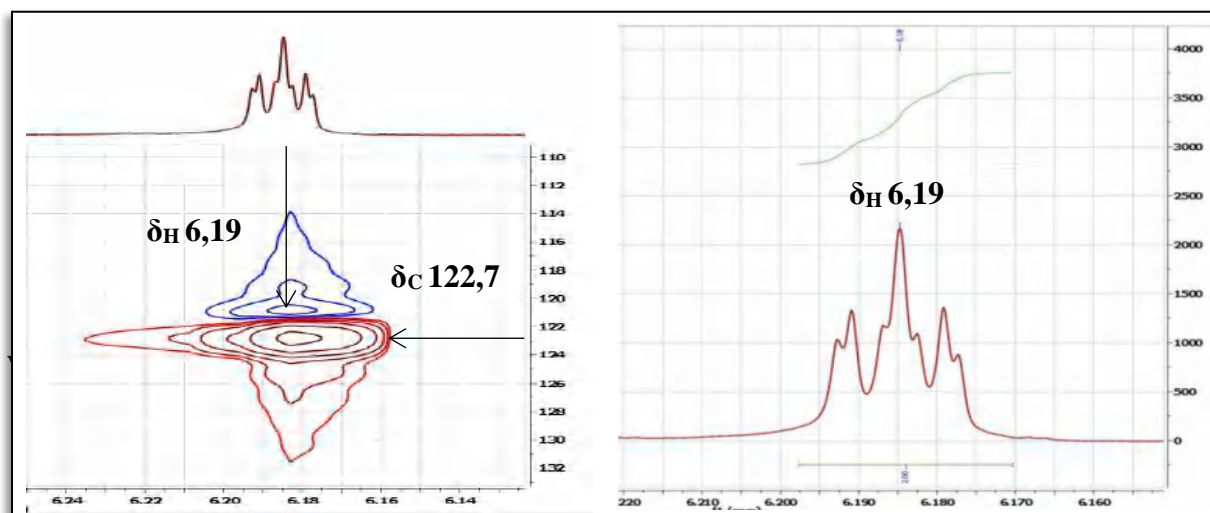


Figure III.42. Spectre HMBC (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-4



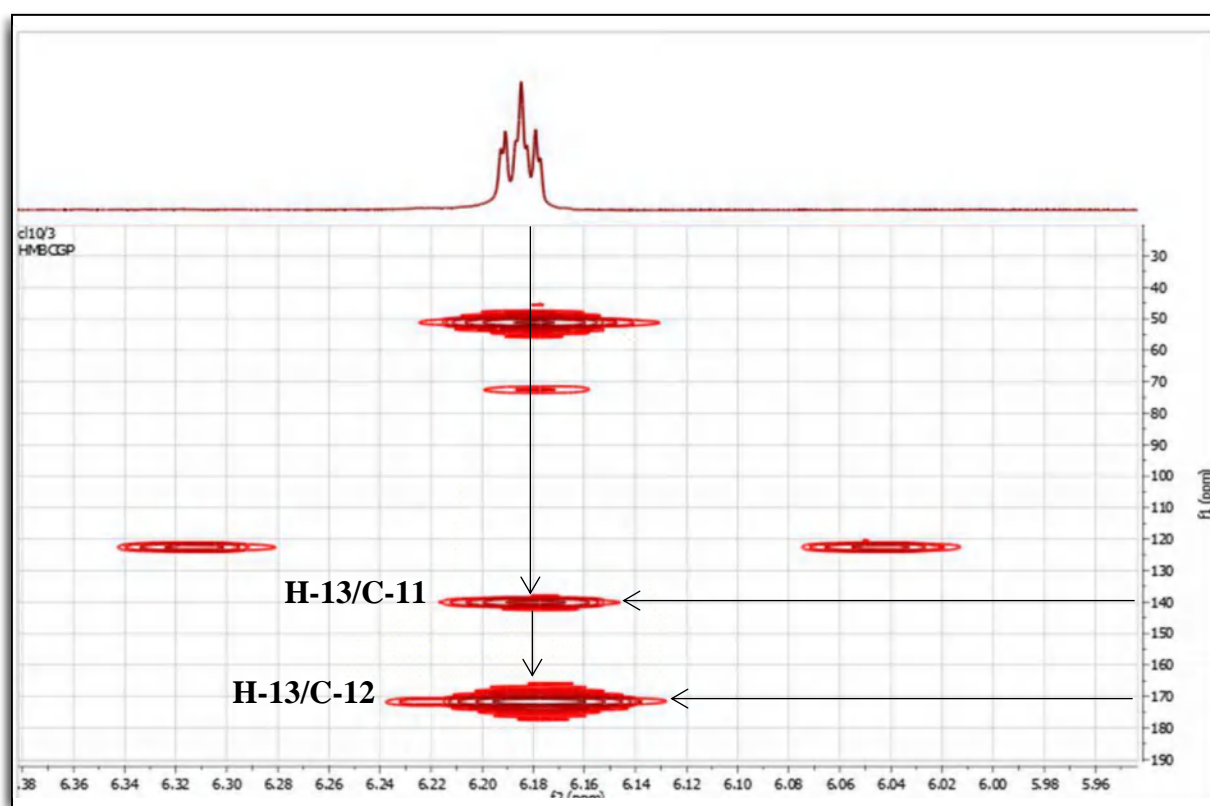
**Figure III.43.** Spectre COSY (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **A-4**

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.44), la seule différence remarquable est la disparition du signal du méthyle représentant la position C-13 ( $\text{H}_3$ -13) résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  1,37 ppm (dans le composé **A-3**) et l'apparition d'un multiplet d'intégration 2H résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  6,19 ppm et corrélant sur le spectre HSQC (Figure III.44) au carbone dont la résonance est localisée à  $\delta_{\text{C}}$  122,7 ppm. Ces données sont en faveur de la présence d'un troisième groupement exométhylène sur le squelette de ce guaianolide.



**Figure III.44.** Etalements du spectre RMN  $^1\text{H}$ , HSQC (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **A-4**

Il est évident que ce groupement exométhylène représente la position C-13 et indique donc une double liaison exocyclique entre C-11 et C-13. Grâce au spectre HMBC (Figure III.45), la résonance du C-11 (carbone quaternaire éthylénique) est relevée à  $\delta_C$  140,2 ppm vu ses corrélations nettes avec les protons H<sub>2</sub>-13. Cette hypothèse est amplement confirmée par les corrélations observées entre ces protons et le carbone du carbonyle résonnant à  $\delta_C$  171,6 qui ne peut être que le C-12 de ce guaianolide. L'abaissement du déplacement chimique du carbone du carbonyle de cette  $\gamma$ -lactone, par rapport à ceux des composés précédents, est en parfait accord avec la présence de la double liaison exocyclique entre C-11 et C-13, indiquant une  $\gamma$ -lactone  $\alpha,\beta$ -insaturée.



**Figure III.45.** Etallement du spectre HMBC (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé A-4.

Les deux autres doubles liaisons exocycliques de ce guaianolide sont toujours présentes et sont facilement attribuées par l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H, HSQC et HMBC (Figures III. 46,47) qui montrent la présence d'un premier groupement exométhylène à  $\delta_H$  5,43 (1H, sl) et  $\delta_H$  5,33 (1H, sl) ;  $\delta_C$  111,5 ppm dont les protons corrélerent sur le spectre HMBC avec le carbone éthylénique quaternaire résonnant à  $\delta_C$  153,7 ppm. Toujours sur le spectre HMBC, les protons de ce groupement exométhylène montre des taches de corrélations avec le carbone C-6 (carbone de fermeture de ce guaianolide  $\delta_C$  80,4) et le carbone C-5 ( $\delta_C$

51,5) dont l'attribution a été facilitée par le spectre COSY (Figure III.48) où l'on relève une tache de corrélation entre son proton H-5 ( $\delta_H$  2,89 ; multiplet) et le proton H-6 ( $\delta_H$  4,19 (dd ;  $J = 10,6 ; 8,9$  Hz). Ces observations permettent de placer cette double liaison exocyclique entre C-4 ( $\delta_C$  153,7) et C-15 [ $\delta_C$  111,5 ;  $\delta_H$  5,43 (sl ; H-15a) et  $\delta_H$  5,33 (sl ; H-15b)]. Il est clair que la double liaison exocyclique restante est celle entre les carbones C-10 ( $\delta_C$  144,4) et C-14 [ $\delta_C$  116,8 ;  $\delta_H$  5,12 (d ;  $J = 1,6$  ; H-14a) ; et  $\delta_H$  5,00 (d ;  $J = 1,8$  ; H-14b)].

Un réexamen du spectre HMBC (Figure III.47) a permis de relever également des taches de corrélation entre les protons H<sub>2</sub>-14 et les carbones résonnant à  $\delta_C$  42,3 (groupement méthylène) ; 45,5 (groupement méthine) et 72,7 ppm (groupement méthine), attribuables aux positions C-9 ; C-1 et C-8 respectivement. Ces données confirment la fermeture de la  $\gamma$ -lactone en C-6 et l'hydroxylation de la position C-8. Ce spectre a permis également de relever en plus des taches de corrélation entre les protons H<sub>2</sub>-15 et les carbones résonnant à  $\delta_C$  51,5 (C-5) et  $\delta_C$  80,4 (C-6) ; des taches de corrélation entre ces protons H<sub>2</sub>-15 et le carbone résonnant à  $\delta_C$  73,7 ppm, attribuable de ce fait, à la position C-3, permettant ainsi de conclure l'hydroxylation de la position C-3.

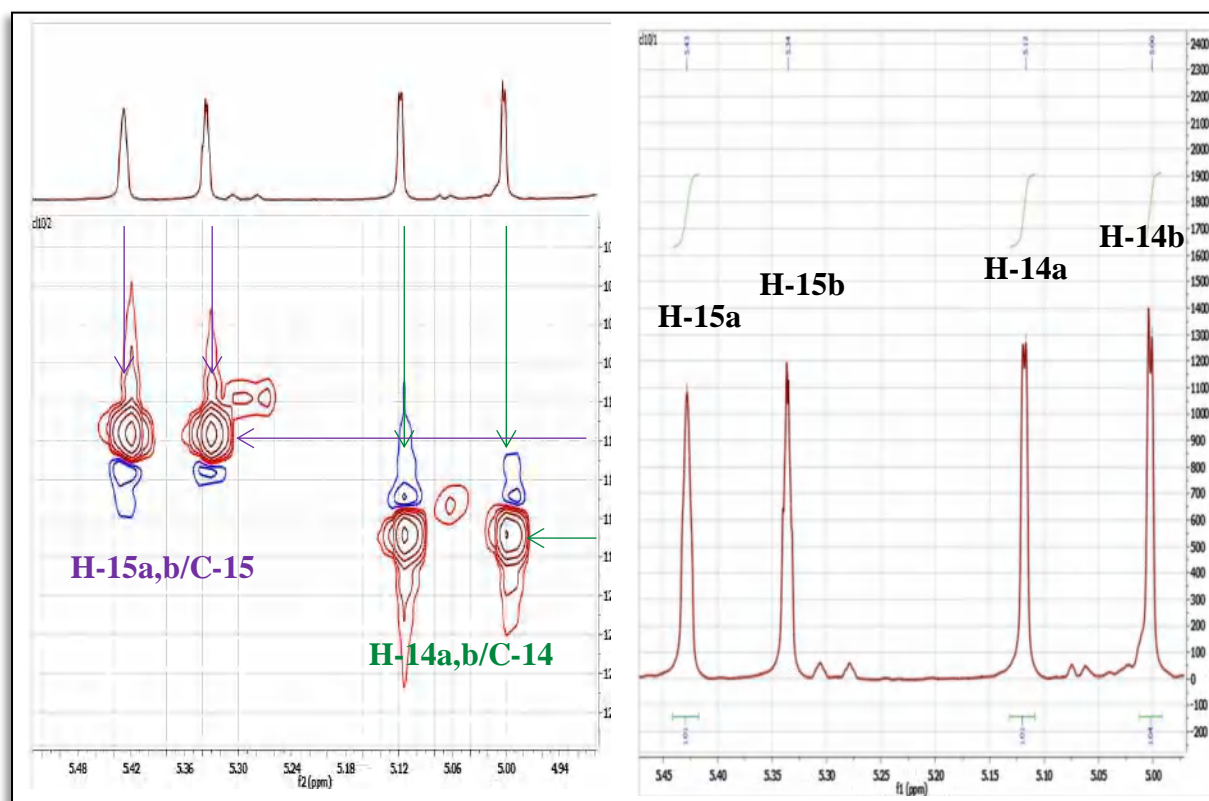


Figure III.46. Etallements des spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé A-4.

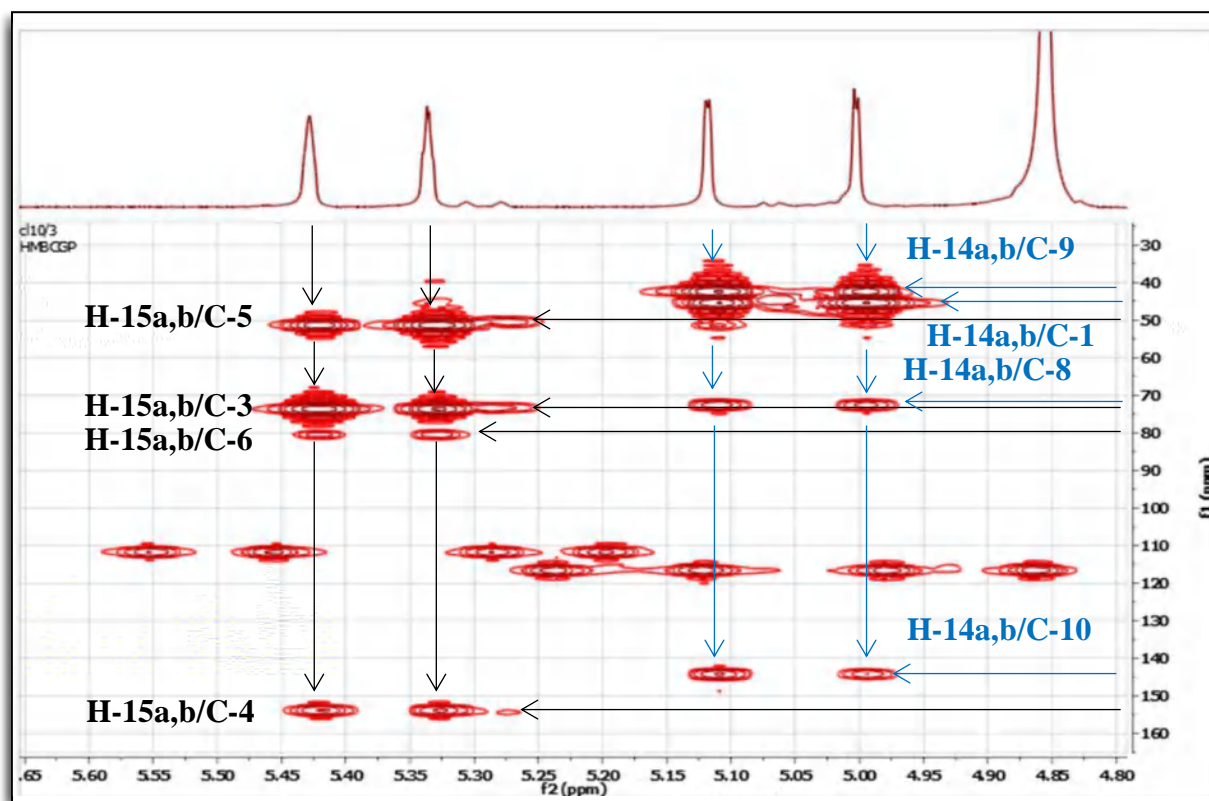


Figure III.47. Etallement du spectre HMBC (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-4.

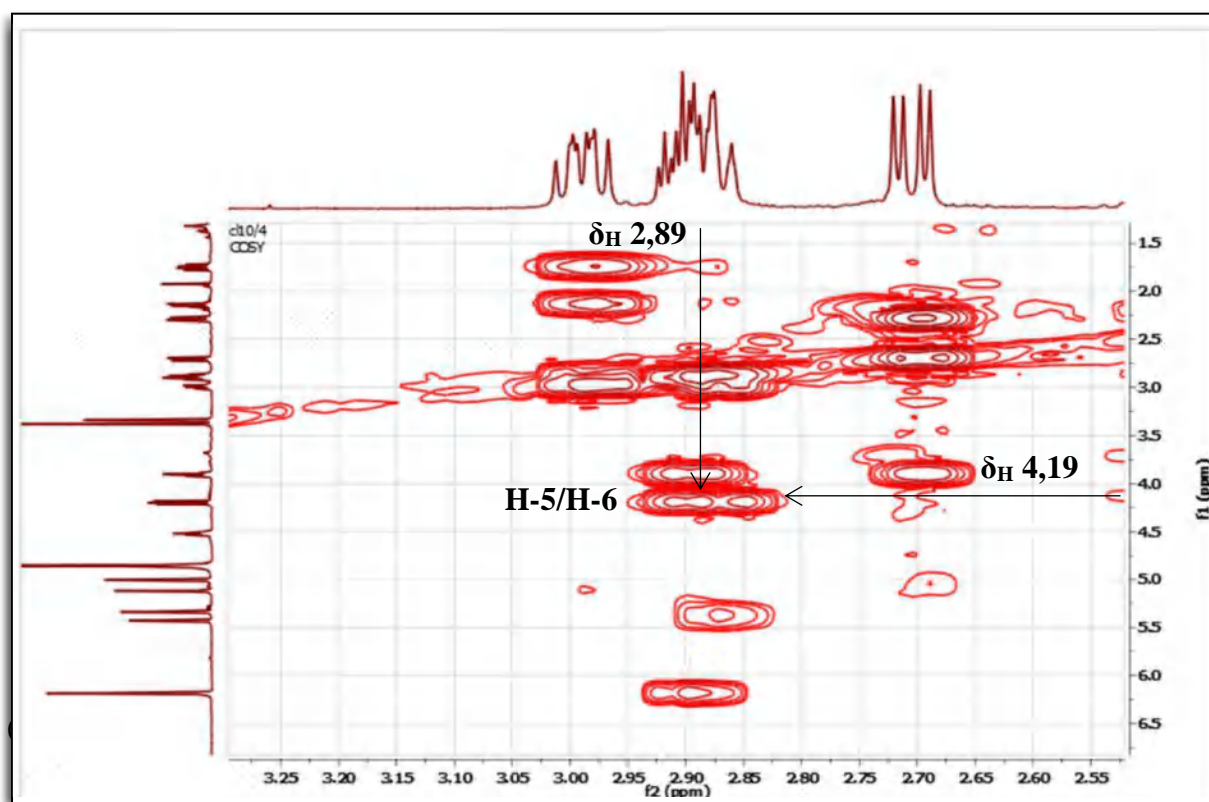
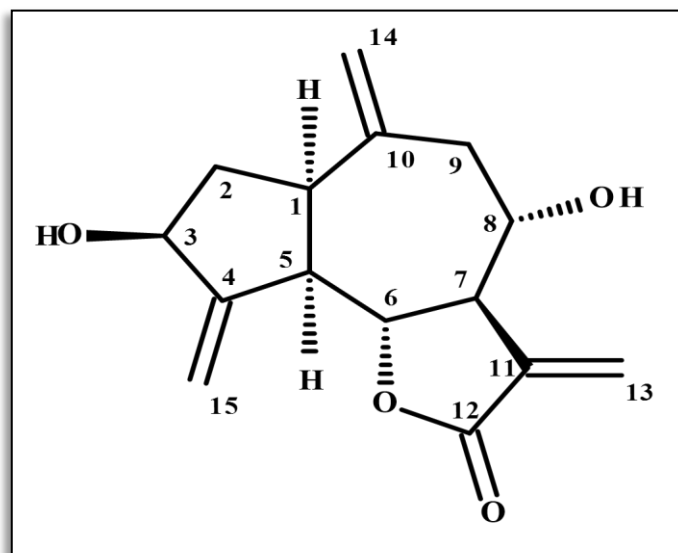


Figure III.48. Etallement du spectre COSY (600 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-4.

L'ensemble des résultats de cette analyse confronté aux résultats des analyses structurales des composés précédents, converge vers la structure représentée dans la figure III.49. Il s'agit de la desacylcynaropicrine (Choi et al. 2005). La stéréochimie des centres chiraux a été définie de la même manière que pour les composés précédents.



**Figure III.49.** Structure du composé A-4 :  
**Desacylcynaropicrine**

Les résultats de l'analyse des spectres de RMN sont reportés dans le tableau III.4.

**Tableau III.4.** Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC et COSY du composé A-4

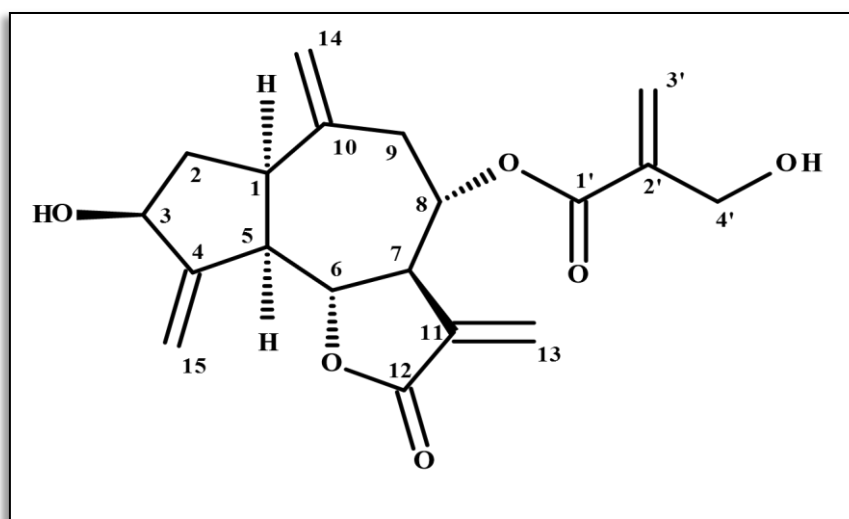
Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*	HMBC (ppm)	COSY (ppm)
<b>1</b>	2,99	(1H, ddd, $J = 11,2 ; 9,0 ; 7,2$ )	45,5	C-2, C-9, C-5, C-3, C-6, C-14, C-10, C-4	H-2b, H-2a, H-5
<b>2a</b>	2,14	(1H, dt, $J = 12,6 ; 7,2$ )	39,7	C-1, C-5, C-3, C-10, C-4	H-2b, H-1, H-3
<b>2b</b>	1,74	(1H, ddd, $J = 12,6 ; 11,4 ; 9,0$ )	39,7	C-1, C-5, C-3, C-10, C-4	H-2a, H-1, H-3
<b>3</b>	4,52	(1H, m)	73,7	C-2, C-1, C-5, C-6, C-15, C-4	H-2b, H-2a, H-15b, H-15a
<b>4</b>	-	-	153,7	-	-
<b>5</b>	2,89	(1H,m)	51,5	C-2, C-1, C-7, C-3, C-6, C-15, C-10, C-4	H-1, H-6, H-15b, H-15a



**Tableau III.4.** Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC et COSY du composé **A-4**. (Suite)

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*	HMBC (ppm)	COSY (ppm)
<b>6</b>	4,19	(1H, dd, $J = 10,6 ; 8,9$ )	80,4	C-1, C-5, C-7, C-8, C-4	H-5, H-7
<b>7</b>	2,91	(1H, m)	51,5	C-9, C-5, C-8, C-6, C-13, C-11	H-8, H-6
<b>8</b>	3,90	(1H, ddd, $J = 9,5 ; 5,1 ; 4,2$ )	72,7	C-7, C-11, C-10	H-7, H-9b, H-9a
<b>9a</b>	2,70	(1H, dd, $J = 13,8 ; 5,1$ )	42,3	C-1, C-7, C-8, C-14, C-10	H-9b, H-8
<b>9b</b>	2,29	(1H, dd, $J = 13,8 ; 4,2$ )	42,3	C-1, C-7, C-8, C-14, C-10	H-9a, H-8
<b>10</b>	-	-	144,4	-	-
<b>11</b>	-	-	140,2	-	H-13, H-7
<b>12</b>	-	-	171,6	-	-
<b>13</b>	6,19	(2H, m)	122,7	C-7, C-8, C-11, C-12	H-7
<b>14a</b>	5,12	(1H, d, $J = 1,6$ )	116,8	C-2, C-9, C-1, C-5, C-8, C-10	H-14b
<b>14b</b>	5,00	(1H, d, $J = 1,8$ )	116,8	C-2, C-9, C-1, C-5, C-8, C-10	H-9b, H-9a, H-14a
<b>15a</b>	5,43	(1H, sl)	111,5	C-5, C-3, C-6, C-4	H-5, H-3, H-15b
<b>15b</b>	5,33	(1H, sl)	111,5	C-5, C-3, C-6, C-4	H-5, H-3, H-15a

## II.5. Détermination structurale du composé **B-5**



Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.50), HSQC (Figure III.51) et HMBC (Figure III.52) enregistrés dans le méthanol- $d_4$ , permettent de remarquer une similitude avec ceux du composé **A-4**, ce qui révèle une lactone sesquiterpénique de type guaianolide, avec trois doubles liaisons exocycliques en positions (C-10 – C-14) ; (C-4 – C-15) et (C-11 – C-13).

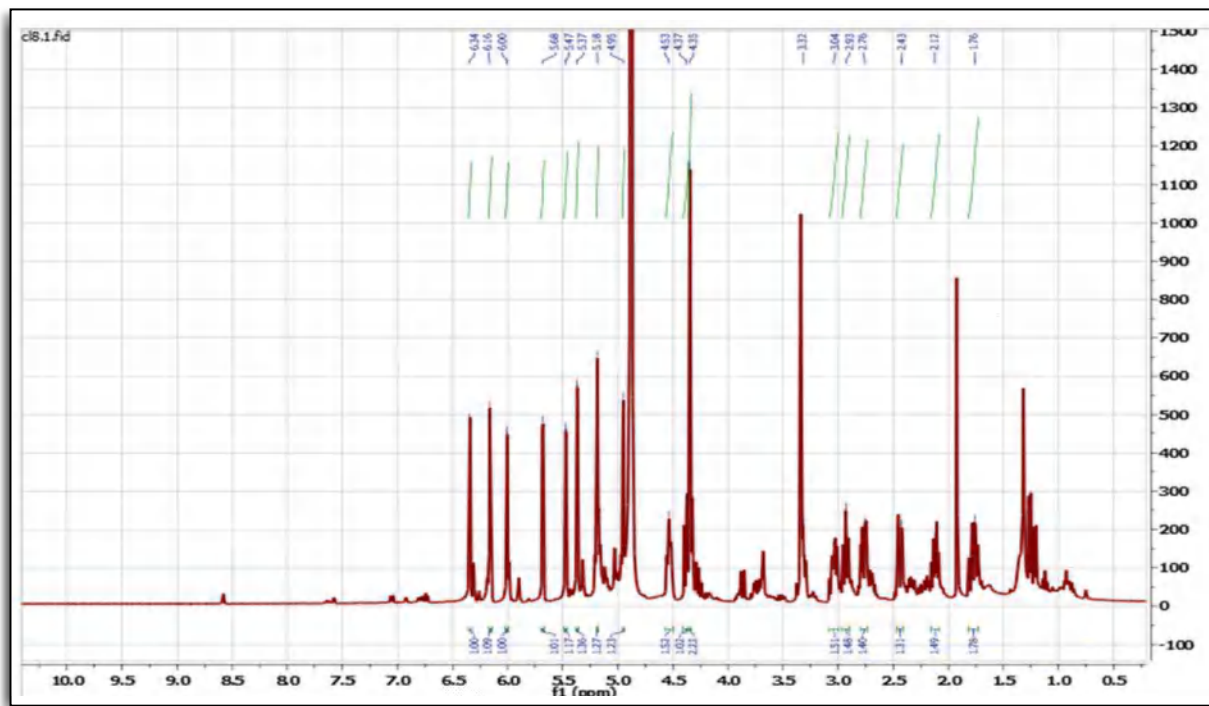


Figure III.50. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-5**

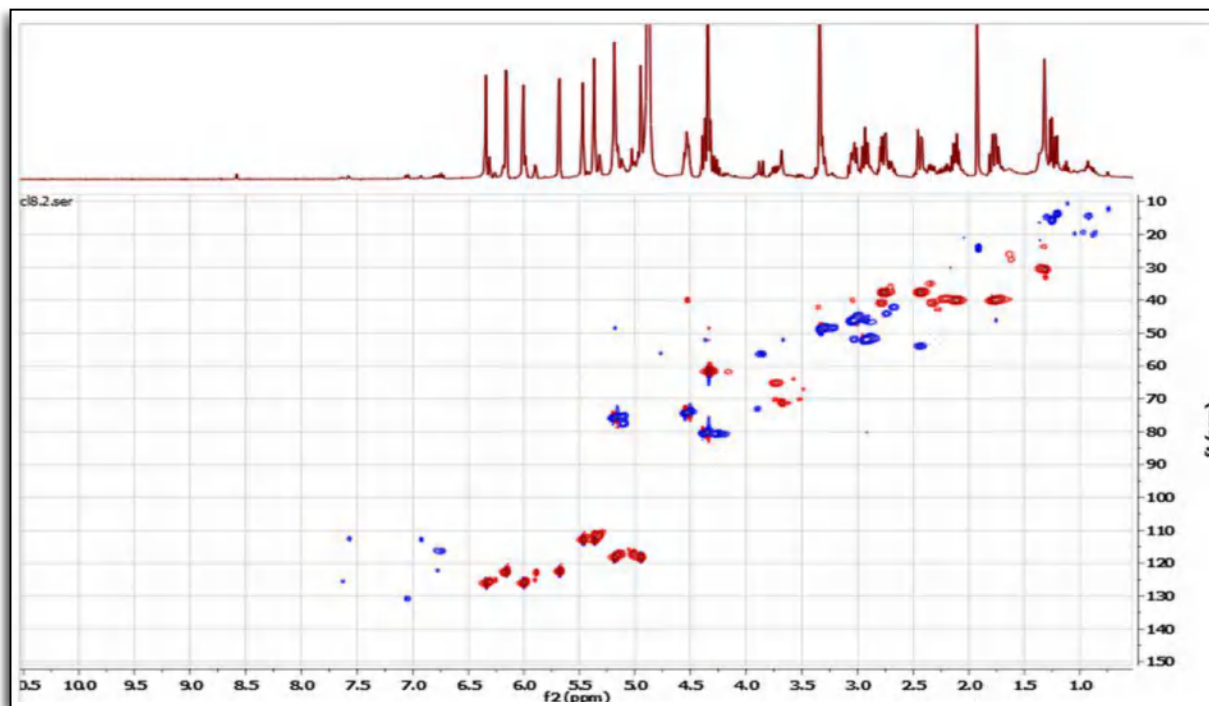


Figure III.51. Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-5**



Comme pour les composés précédents, les corrélations observées sur le spectre HMBC permettent de conclure que le squelette de ce guaianolide est fermé en C-6 et  $\beta$ -hydroxylé en C-3 ( $\delta_C$  74,1 ppm).

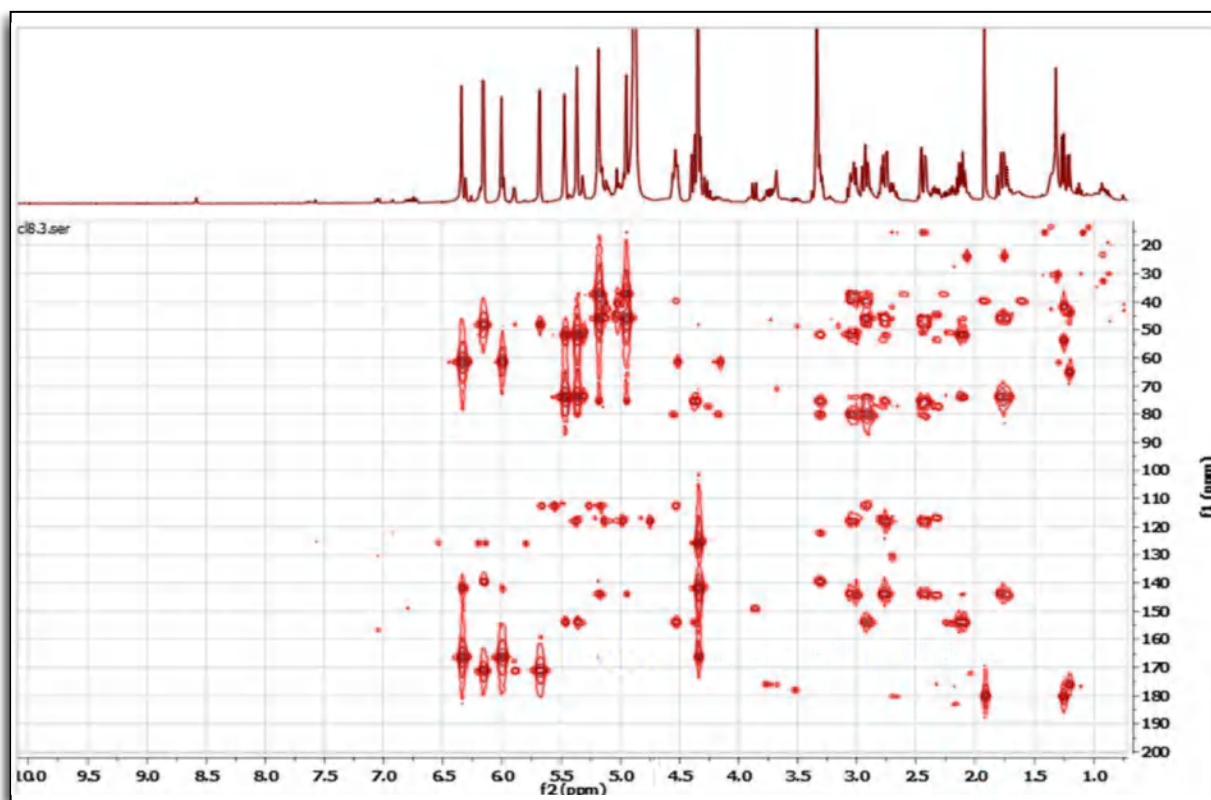
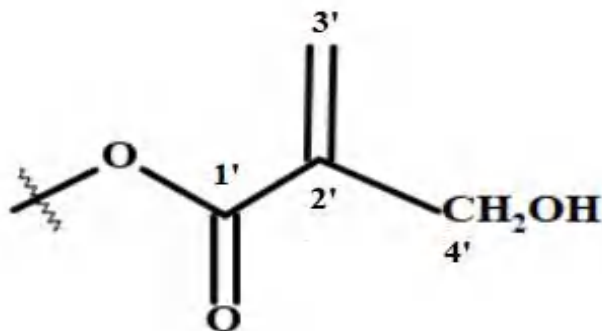


Figure III.52. Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-5**

En plus de l'ensemble des signaux caractéristiques de la structure élucidée pour le composé **A-4** (**desacylcynaropicrine**) ; on remarque l'apparition de deux singulets d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  6,00 ppm et  $\delta_H$  6,34 ppm et qui corrélient, sur le spectre HSQC (Figure III.55), avec le même carbone  $\delta_C$  126,0 ppm attribuables de ce fait aux protons d'un méthylène d'une double liaison, vu leurs déplacements chimiques.

Sur le spectre HMBC (Figure III.56), ces protons montrent des taches de corrélation, avec un carbone résonnant à  $\delta_C$  141,3 ppm qui ne peut être que le carbone éthylénique quaternaire délimitant cette double liaison, et le carbone d'un groupement méthylène résonnant à  $\delta_C$  61,5 ppm ( $\delta_H$  4,34 ; 2H ; m). La valeur du déplacement chimique du carbone de ce groupement et l'absence d'autres groupements hydrocarbonés sur le spectre proton de ce composé, indiquent qu'il s'agit d'un groupement hydroxyméthylène. Par ailleurs et toujours sur le spectre HMBC, les protons du méthylène éthylénique précédemment cité, montrent des taches de corrélations avec le carbone du carbonyle résonnant à  $\delta_C$  166,0 ppm. La valeur du déplacement du carbone de ce carbonyle indique qu'il s'agit d'un carbonyle

d'ester conjugué confirmant ainsi le voisinage de ce carbonyle et de la double liaison précédemment évoquée. On relève également, une tache de corrélation entre le carbone de ce carbonyle et les proton du groupement hydroxyméthylène. Toutes ces données rassemblées, mènent à la présence du groupement hydroxyméthylacrylate (Figure III.53) comme chaîne latérale sur le squelette sesquiterpénique de ce guaianolide.



**Figure III.53.** Groupement hydroxyméthylacrylate présent dans le composé **B-5**

Il est évident que ce groupement est placé sur un carbone oxygéné du squelette guaianolide. Sachant ce guaianolide comporte trois oxyméthines qui sont celui de la fermeture de la  $\gamma$ -lactone, celui de la position C-3 tous deux précédemment évoqués, et celui de la position C-8 ( $\delta_C$  75,5) dont la résonance du proton H-8 est relevée  $\delta_H$  5,18 ppm. Cette augmentation du déplacement chimique du proton H-8 par rapport aux composés précédents, témoigne d'une acylation de cet oxyméthine. En effet, sur le spectre HMBC (Figure III.56), on remarque une petite tache de corrélation entre H-8 et le carbone du carbonyle du groupement hydroxyméthylacrylate.

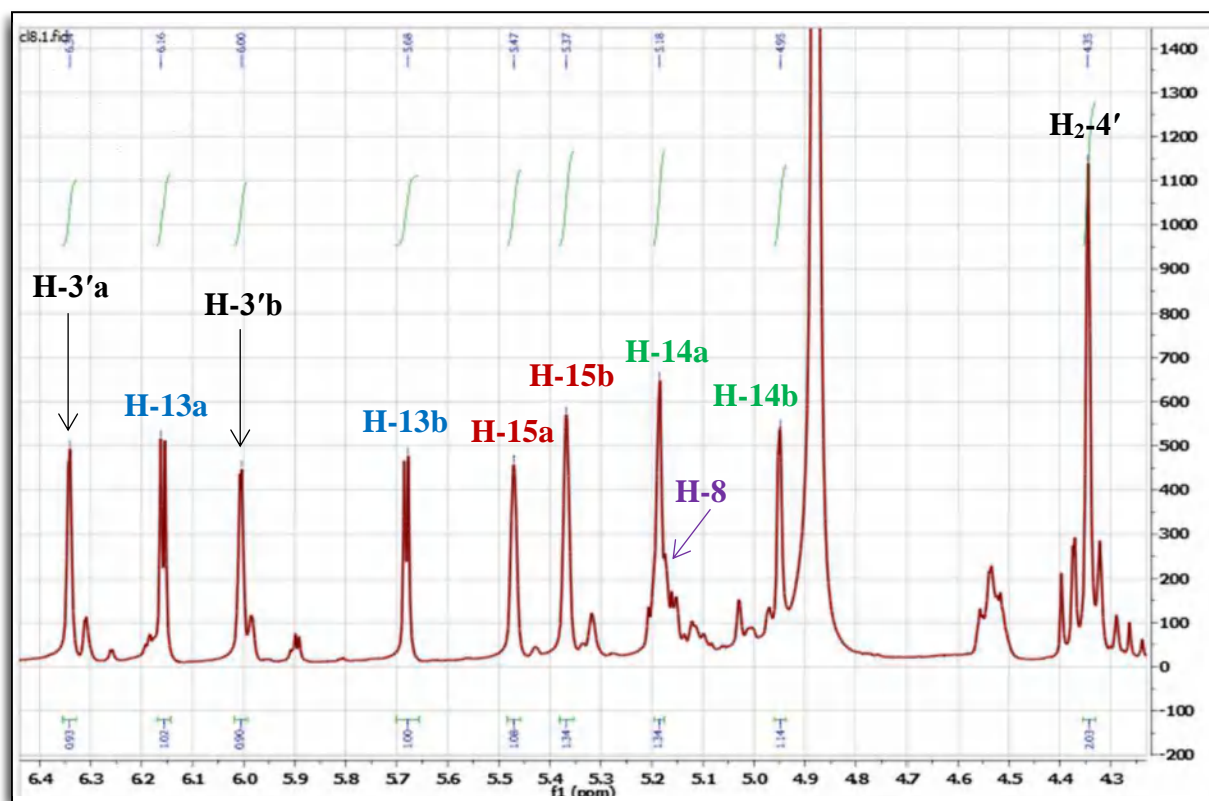


Figure III.54. Etalement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-5**

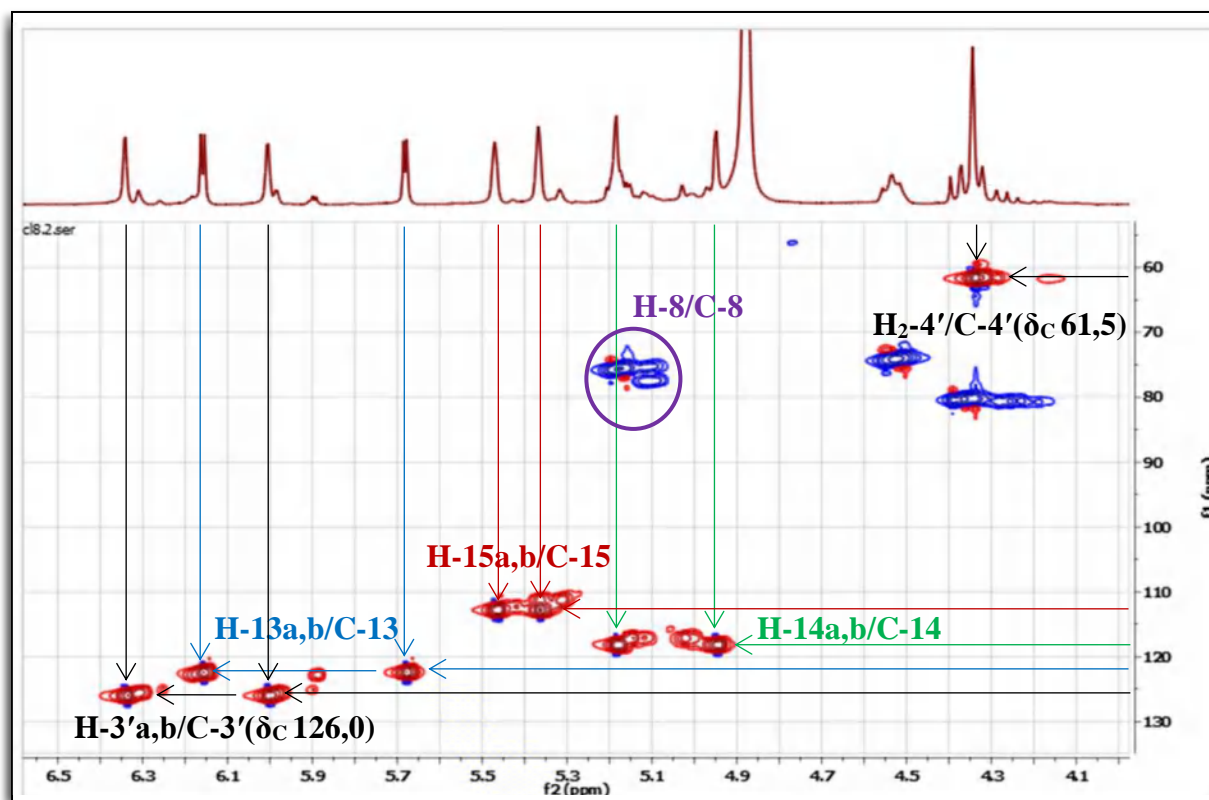


Figure III.55. Etalement du spectre HSQC (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-5**

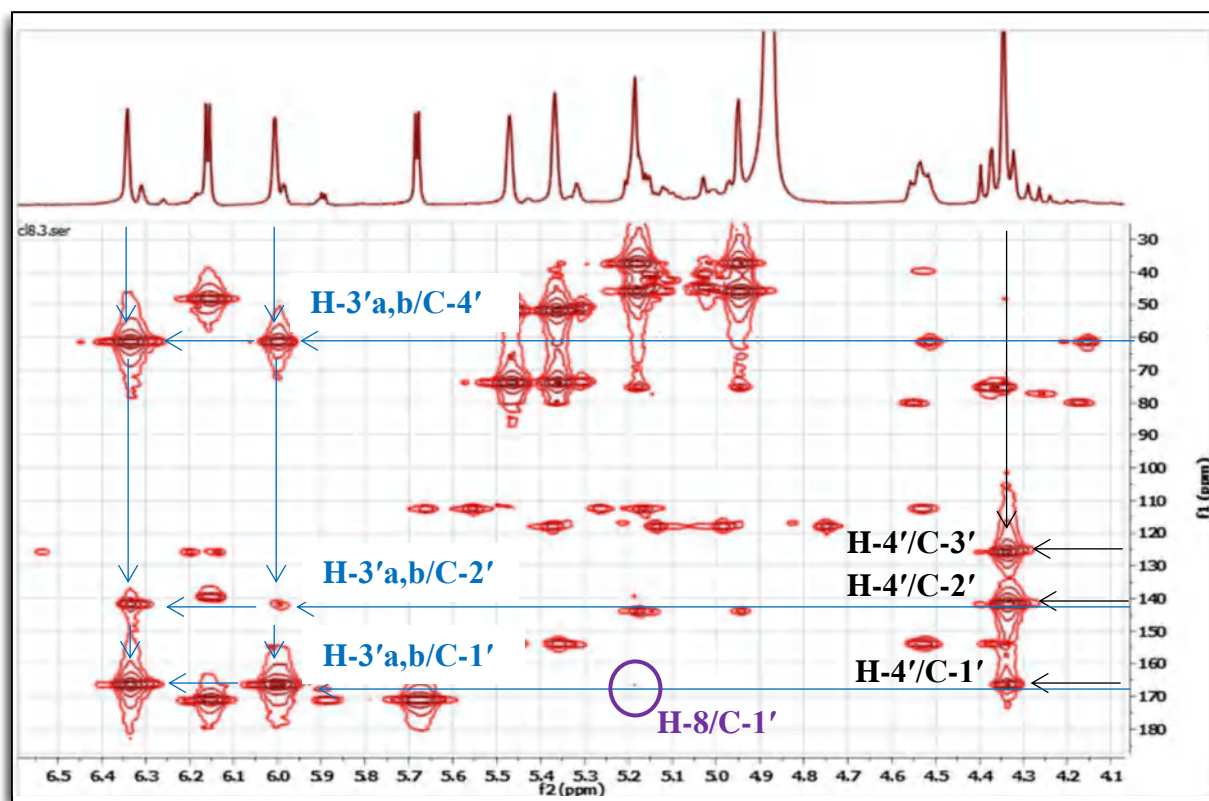


Figure III.56. Etallement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-5**

Toutes ces données permettent de proposer pour le composé **B-5**, la structure représentée dans la figure III.57. Il s'agit de la cynaropicrine (Choi et al. 2005).

Les résultats de l'analyse des spectres de RMN sont reportés dans le tableau III.5.

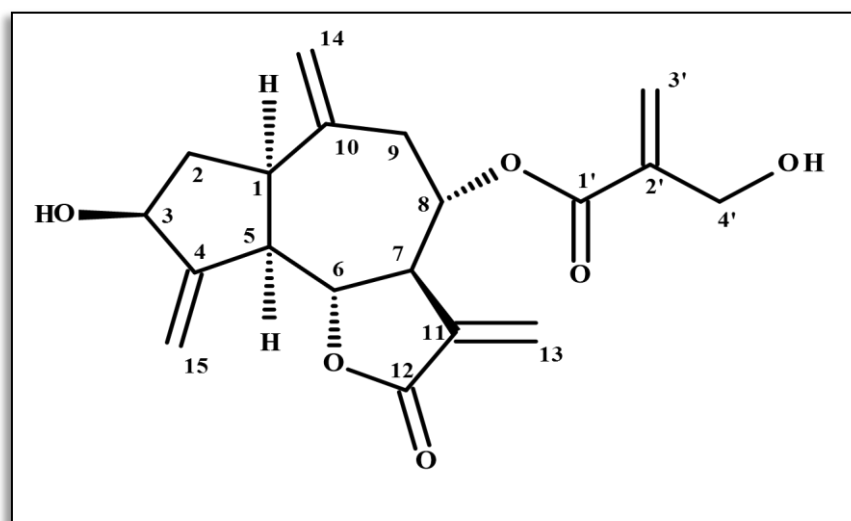
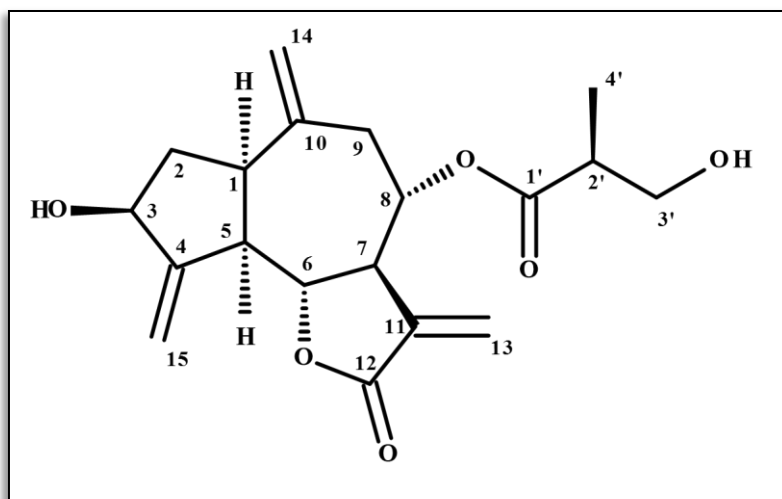


Figure III.57. Structure du composé **B-5** :  
Cynaropicrine

Tableau III.5. Données relatives aux spectres RMN <sup>1</sup>H, HSQC et HMBC du composé B-5

Position	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Intégration, multiplicité, J (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)*	HMBC (ppm)
1	3,04	(1H, m)	46,3	C-9, C-2, C-5, C-3, C-6, C-14, C-10
2a	2,12	(1H, m)	39,9	C-1, C-5, C-3, C-10, C-4
2b	1,77	(1H, m)	39,9	C-1, C-3, C-10
3	4,53	(1H, m)	74,1	C-2, C-6, C-15, C-4
4	-	-	154,0	-
5	2,93	(1H,tl, $J = 10,3$ )	52,0	C-2, C-1, C-7, C-3, C-6, C-15, C-4
6	4,38	(1H, dd, $J = 10,3, 8,9$ )	80,5	C-7, C-8, C-4
7	3,32	(1H, m)	48,8	C-5, C-8, C-6, C-13, C-11
8	5,18	(1H, m)	75,5	C-7, C-9, C-10, C-1'
9a	2,76	(1H, dd, $J = 14,6; 5,1$ )	37,7	C-1, C-7, C-8, C-14, C-10
9b	2,44	(1H, dd, $J = 14,6; 3,2$ )	37,7	C-1, C-7, C-8, C-6, C-14, C-10
10	-	-	144,0	-
11	-	-	139,1	-
12	-	-	170,8	-
13b	6,16	(1H, d, $J = 3,4$ )	122,5	C-7, C-11, C-12
13a	5,68	(1H, d, $J = 3,0$ )	122,5	C-7, C-12
14a	5,19	(1H, sl)	118,2	C-2, C-9, C-1, C-8, C-10
14b	4,95	(1H, sl)	118,2	C-2, C-9, C-1, C-8, C-10
15a	5,47	(1H, sl)	112,8	C-5, C-3, C-4
15b	5,37	(1H, sl)	112,8	C-5, C-3, C-4
1'	-	-	166,0	-
2'	-	-	141,3	-
3'a	6,34	(1H, dl, $J = 1.1$ )	126,0	C-4', C-2', C-1'
3'b	6,00	(1H, dl, $J = 1.4$ )	126,0	C-4', C-2', C-1'
4'	4,34	(2H, m)	61,5	C-3', C-2', C-1'

## II.6. Détermination structurale du composé B-6



Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.58), HSQC (Figure III.59) et HMBC (Figure III.60) enregistrés dans le méthanol- $d_4$ , montrent que ce composé **B-6** n'est pas aussi pur que les précédents, cependant ces spectres montrent une grande similitude avec ceux du composé **B-5**. L'ensemble des signaux du squelette du guaianolide sont présents, avec en particulier les trois doubles liaisons exocycliques en positions (C-10 – C-14) ; (C-4 – C-15) et (C-11 – C-13).

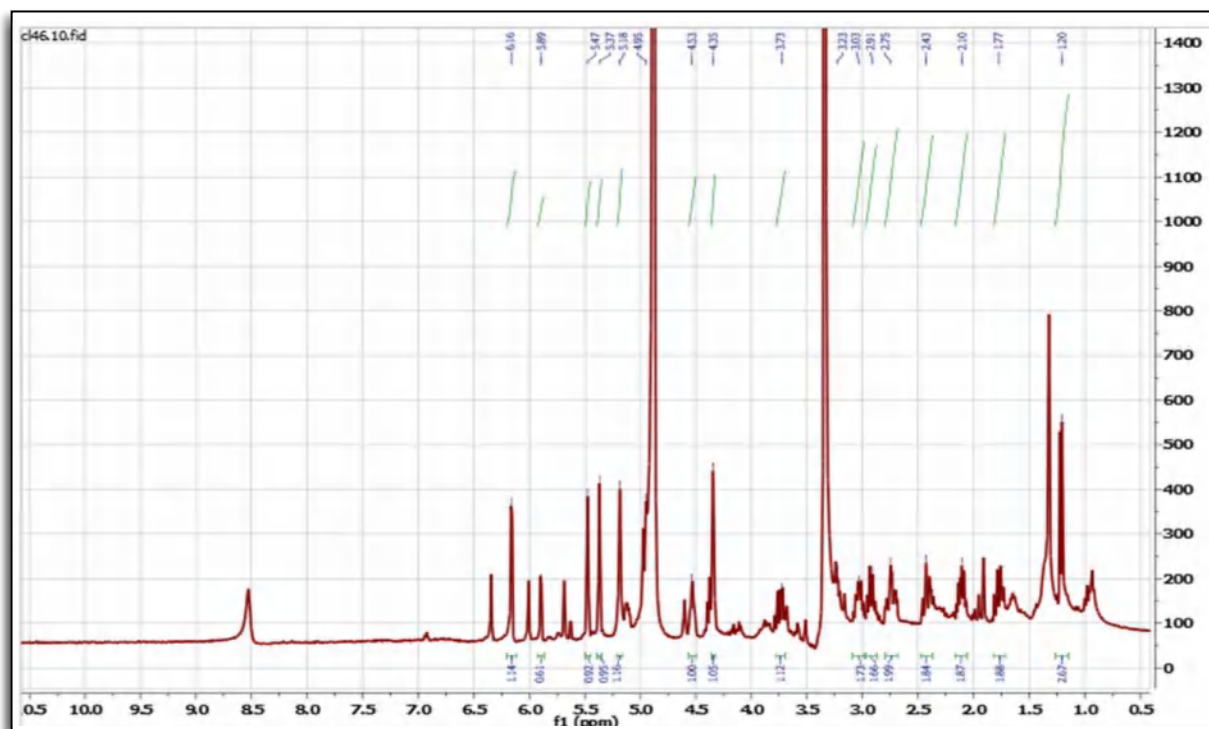


Figure III.58. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-6**

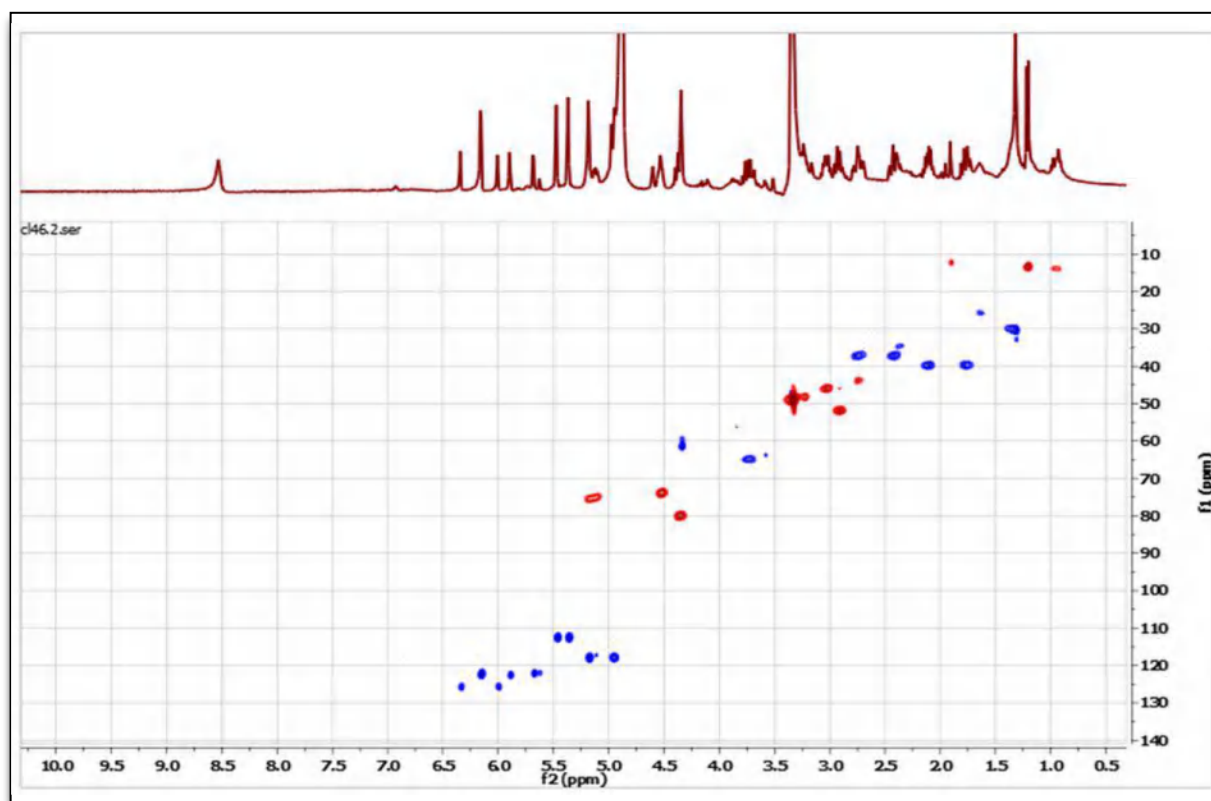


Figure III.59. Spectre HSQC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé B-6

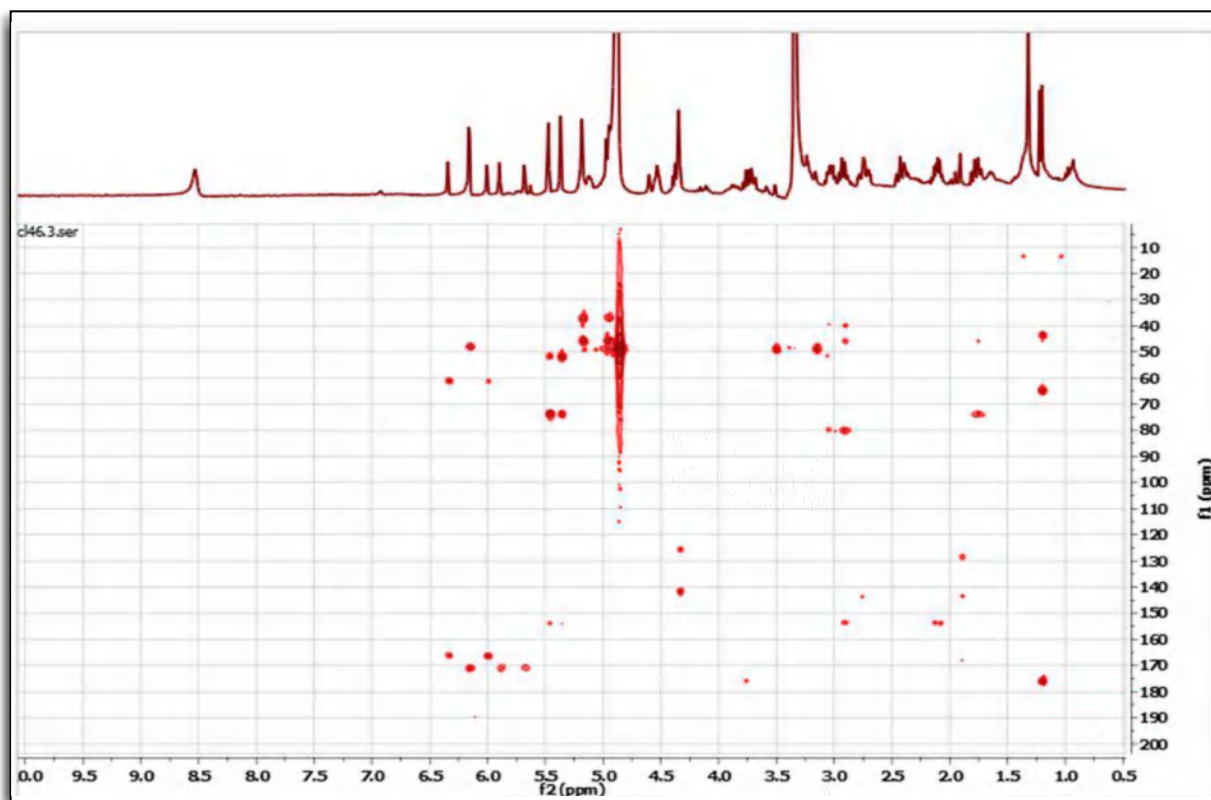


Figure III.60. Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé B-6



La position C-3 est toujours hydroxylée. Comme dans le composé **B-5**, la position C-8 est substituée. L'examen attentif de l'ensemble de ces spectres montre que la seule différence entre ces deux composés réside dans le substituant porté par C-8. En effet, on remarque la disparition de la double liaison et l'apparition d'un groupement méthyle dont les protons résonnent à  $\delta_{\text{H}}$  1,21 ppm (d ;  $J = 7,1$  Hz,  $\delta_{\text{C}}$  13,4 ppm) et d'un méthine dont le proton résonne à  $\delta_{\text{H}}$  2,75 ppm (multiplet ;  $\delta_{\text{C}}$  43,8 ppm).

Sur le spectre HMBC, on relève une tache de corrélation entre les protons du groupement méthyle et le carbone du carbonyle dont la résonance est repérée à  $\delta_{\text{C}}$  176,1 ppm. Le carbone de ce carbonyle montre également une tache de corrélation avec les protons du groupement hydroxyméthylène résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  3,73 ppm (multiplet ;  $\delta_{\text{C}}$  65,0 ppm).

Ces données sont donc en faveur de l'hydrogénation de la double liaison du groupement hydroxyméthylacrylate dans ce composé. Cette observation est amplement confirmée par l'augmentation de déplacement chimique du carbone du carbonyle ( $\delta_{\text{C}}$  176,1 ppm pour ce composé **B-6** contre  $\delta_{\text{C}}$  166,0 ppm pour le composé **B-5**) indiquant la disparition de la conjugaison du carbonyle dans le composé **B-6**.

Ces résultats mènent à la présence du groupement *O*-(-3-hydroxy-2-méthylpropionate) en position C-8 avec une orientation  $\alpha$  comme tous les groupements en C-8 des autres guaianolides vu l'orientation  $\beta$  de H-8.

La présence de ce groupement en C-8 est largement justifiée par l'augmentation des déplacements chimiques de H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  5,14 (multiplet) et C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  75,1)). Concernant le substituant, d'après les résultats de la littérature, le centre chiral numéroté 2 de ce groupement est de configuration (S) (Marco et al. 1992).



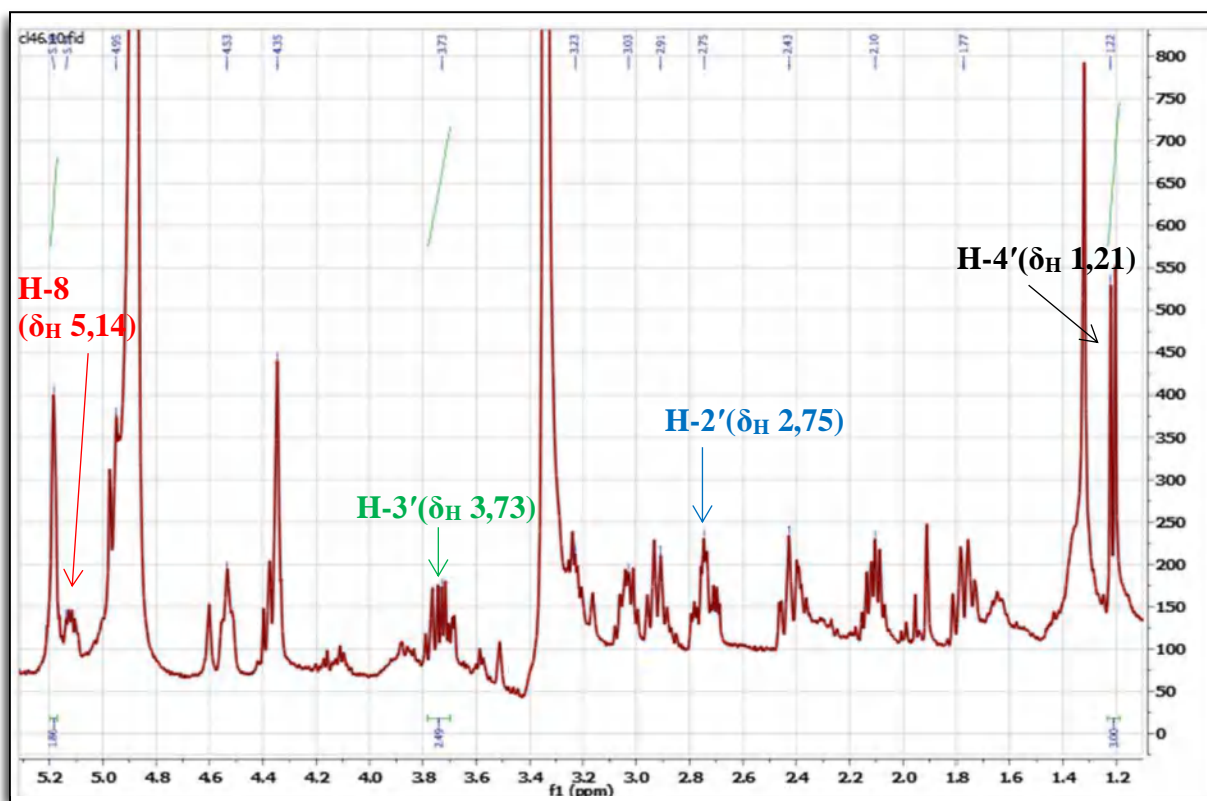


Figure III.61. Etalement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-6**

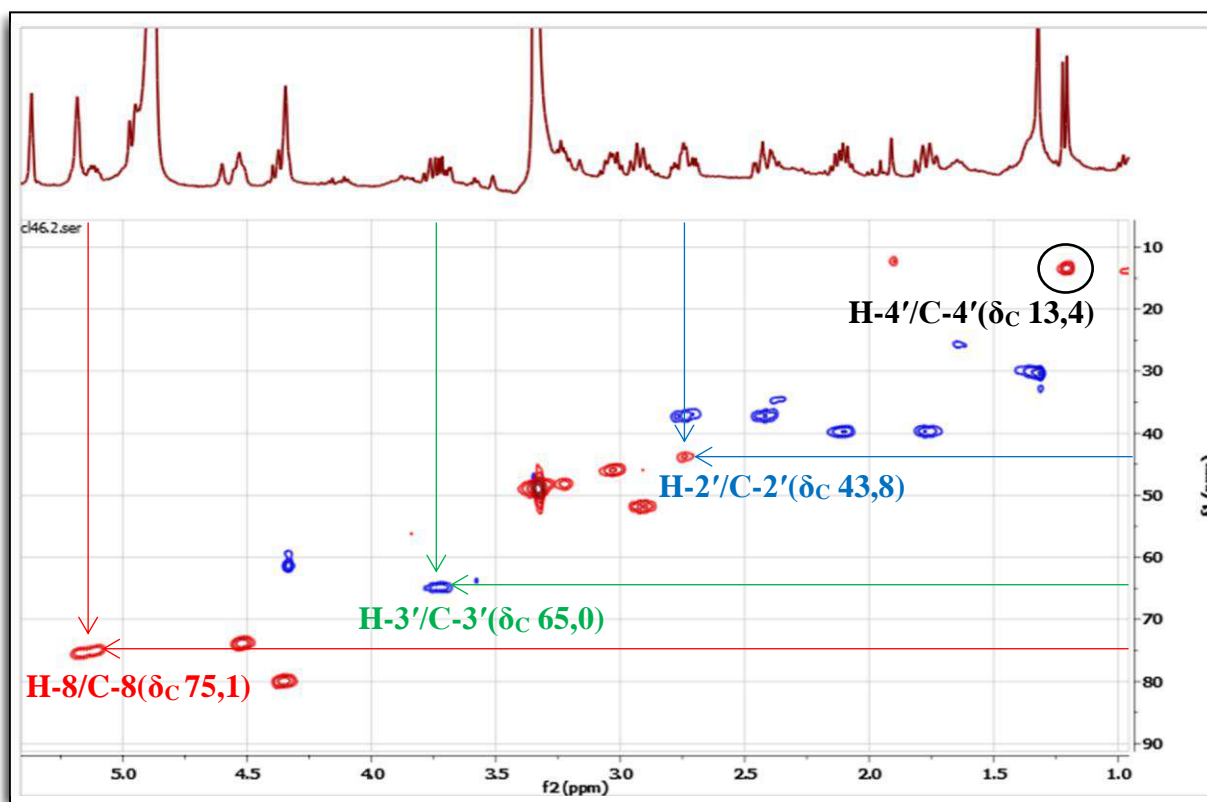
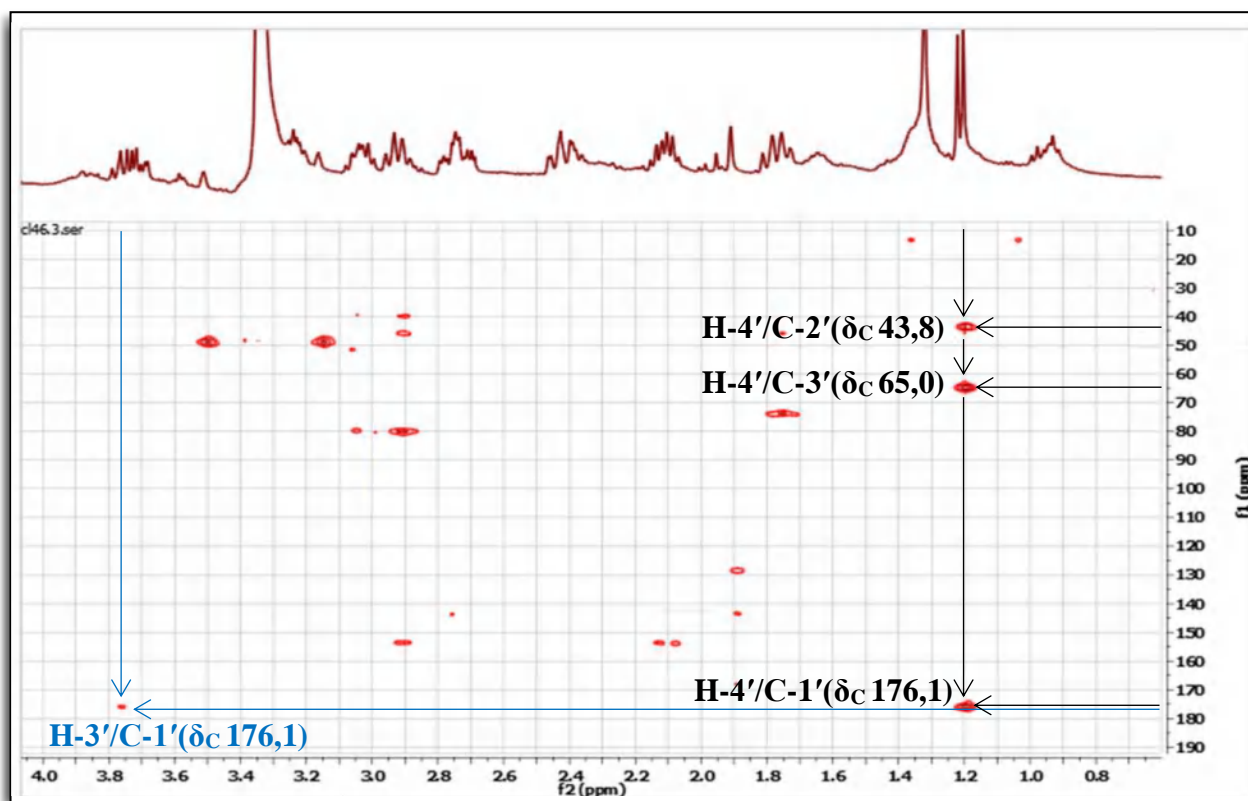
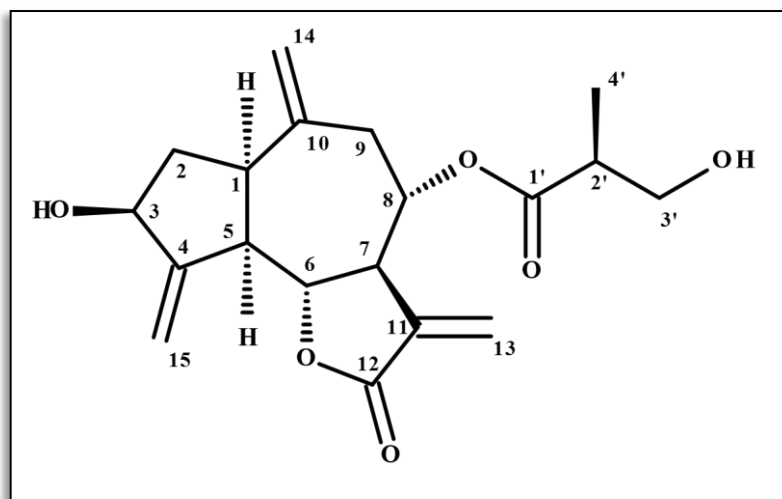


Figure III.62. Etalement du spectre HSQC (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-6**



**Figure III.63.** Etalement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-6**

Toutes ces données permettent de proposer pour le composé **B-6**, la structure représentée dans la figure III.64. Il s'agit de la deacylcynaropicrine 8-*O*-[(*S*)-3-hydroxy-2-methylpropionate] (Marco et al. 1992).



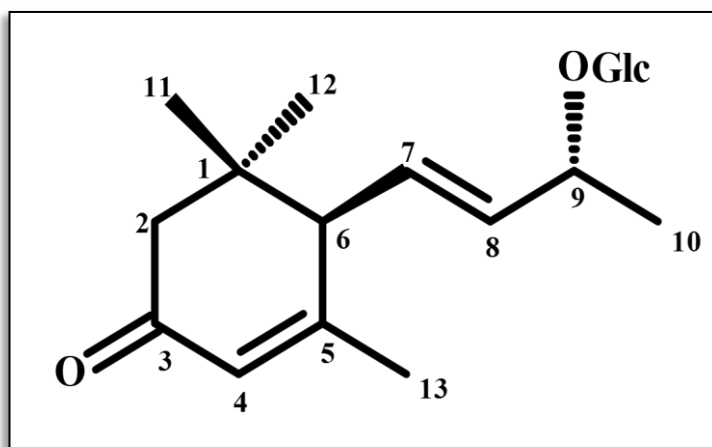
**Figure III.64.** Structure du composé **B-6** :  
Deacylcynaropicrine 8-*O*-[(*S*)-3-hydroxy-2-methylpropionate]

Les résultats de l'analyse des spectres de RMN sont reportés dans le tableau III.6.

**Tableau III.6.** Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé **B-6**

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, J (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*	HMBC (ppm)
<b>1</b>	3,03	(1H, m)	46,0	C-2, C-5, C-6
<b>2a</b>	2,11	(1H, m)	39,8	C-4
<b>2b</b>	1,77	(1H, m)	39,8	C-1, C-3
<b>3</b>	4,53	(1H, m)	73,4	-
<b>4</b>	-	-	154,0	-
<b>5</b>	2,92	(1H,m)	51,8	C-2, C-1, C-6, C-4
<b>6</b>	4,35	(1H, m)	80,1	-
<b>7</b>	3,23	(1H, m)	47,9	-
<b>8</b>	5,14	(1H, m)	75,1	-
<b>9a</b>	2,75	(1H, m)	37,1	C-10
<b>9b</b>	2,42	(1H, m)	37,1	-
<b>10</b>	-	-	144,0	-
<b>11</b>	-	-	139,1	-
<b>12</b>	-	-	171,6	-
<b>13a</b>	6,16	(1H, d, $J = 3,3$ )	122,9	C-7, C-12
<b>13b</b>	5,89	(1H, d, $J = 3,0$ )	122,9	C-12
<b>14a</b>	5,18	(1H, sl)	117,8	C-9, C-1
<b>14b</b>	4,95	(1H, sl)	117,8	C-9, C-1
<b>15a</b>	5,47	(1H, s)	112,7	C-5, C-3, C-4
<b>15b</b>	5,36	(1H, s)	112,7	C-5, C-3, C-4
<b>1'</b>	-	-	176,1	-
<b>2'</b>	2,75	(1H, m)	43,8	-
<b>3'</b>	3,73	(2H, m)	65,0	C-1'
<b>4'</b>	1,21	(3H, d, $J = 7,1$ )	13,4	C-2', C-3', C-1'

## II.7. Détermination structurale du composé B-7



L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.65) et le spectre relatif à l'expérience HSQC (Figure III.66), enregistrés dans le  $\text{MeOH-}d_4$  sur un spectromètre opérant à 400 MHz, montre la présence de signaux caractéristiques d'un mégastigmane notamment la présence de 2 méthyles résonnant sous forme de singulets à  $\delta_{\text{H}}$  1,04 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  27,1 ppm) et  $\delta_{\text{H}}$  1,06 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  27,6 ppm).

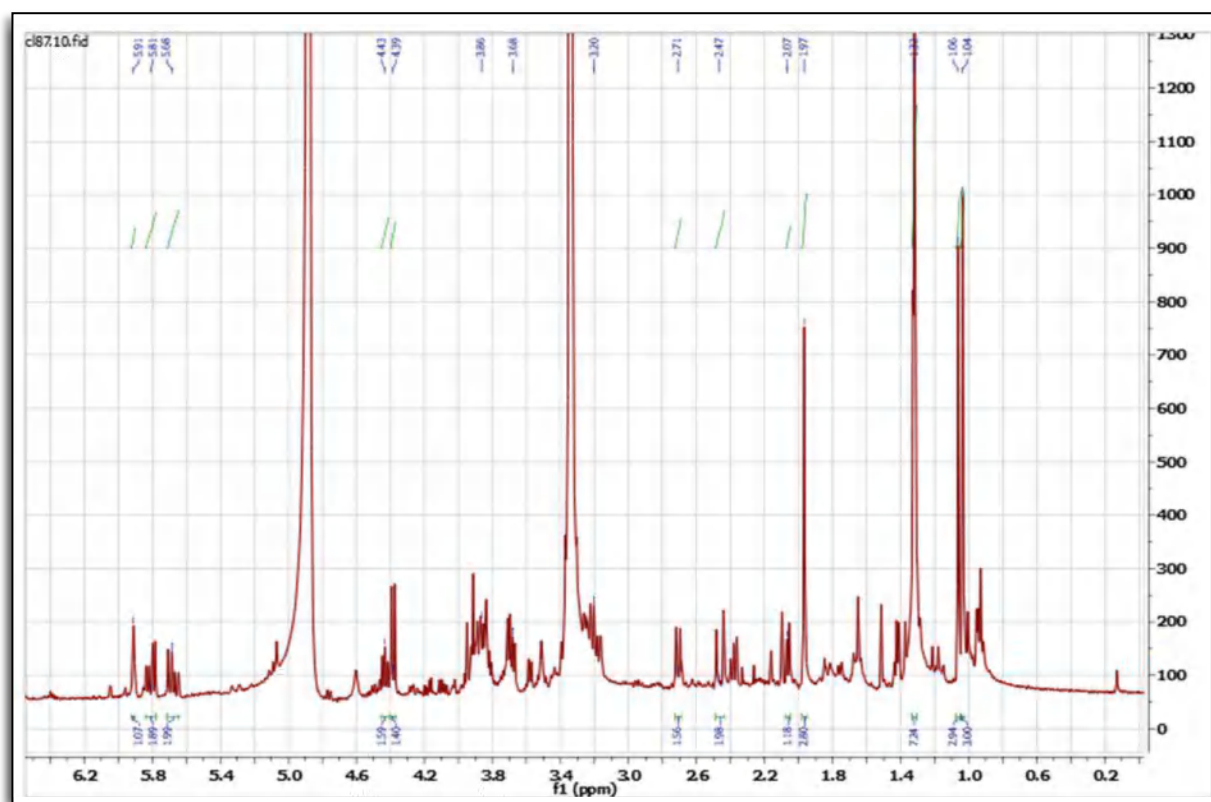


Figure III.65. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé B-7

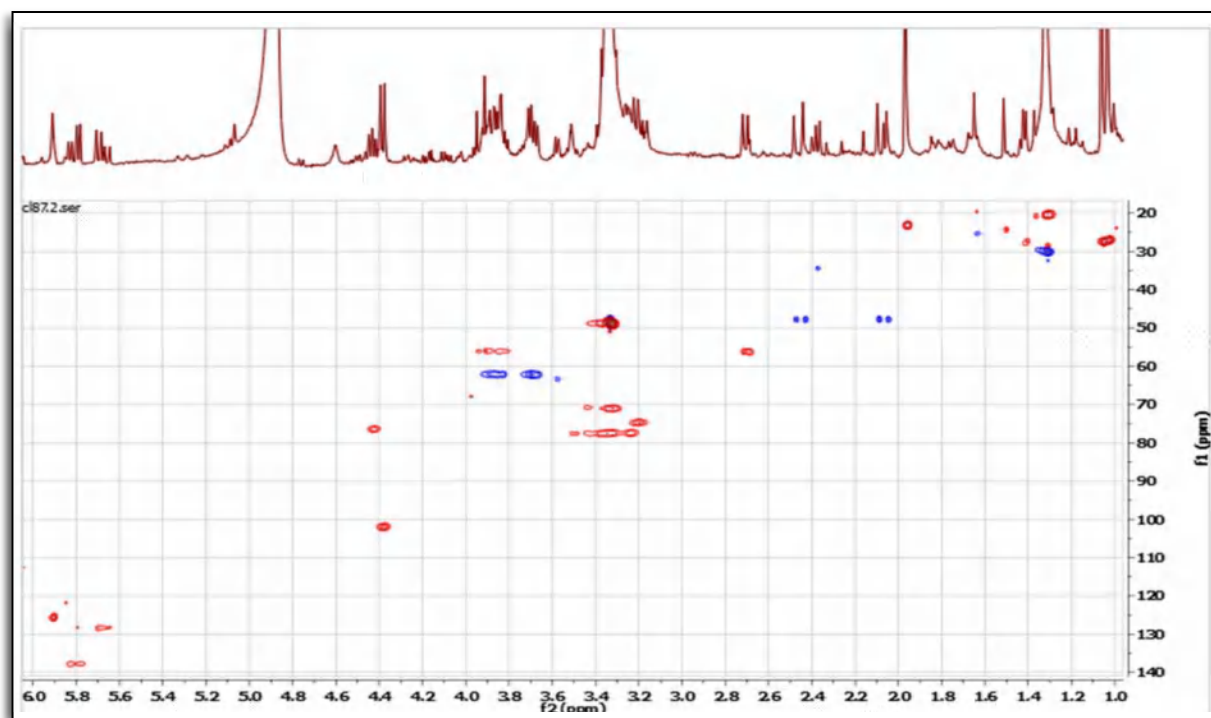


Figure III.66. Spectre HSQC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **B-7**

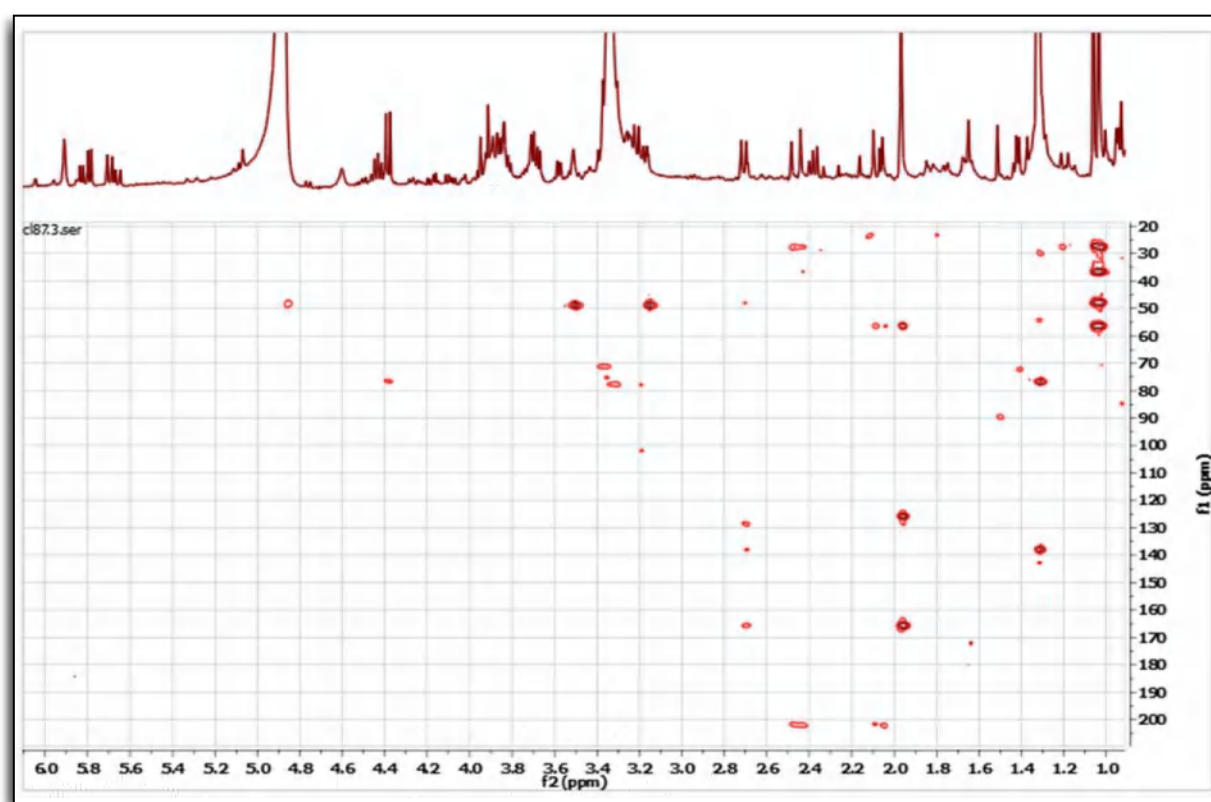


Figure III.67. Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **B-7**

Sur le spectre HMBC (Figure III.70) les protons de l'un corrélient avec le carbone de l'autre et vis-versa. Cette observation indique qu'ils sont géminés ; vu leurs multiplicités, leur carbone porteur est quaternaire.

Nous attribuons la position C-1 à ce carbone quaternaire dont la résonance est relevée à  $\delta_C$  36,5 ppm grâce à ses corrélations HMBC avec les protons de ces deux méthyles que nous attribuons alors aux positions C-12 et C-11, respectivement, conformément à la numérotation adoptée pour les squelettes de type mégastigmane.

Toujours sur le spectre HMBC, les protons de ces 2 méthyles corrélient avec le carbone d'un groupement  $\text{CH}_2$  résonnant à  $\delta_C$  47,7 ppm ; cela indique que ce  $\text{CH}_2$  est relié au carbone C-1, nous pouvons alors attribuer la position C-2 au carbone de ce méthylène.

Grâce au spectre HSQC (Figure III.69), on remarque que les protons portés par C-2 résonnent sous forme d'un système AM indiquant leur nature diastéréotopique et l'absence de protons en position C-3. on relève en effet, le signal de H-2a  $\delta_H$  2.46 (d,  $J = 16,8$ ) et le signal de H-2b à  $\delta_H$  2,07 (1H, d,  $J = 16,8$ ).

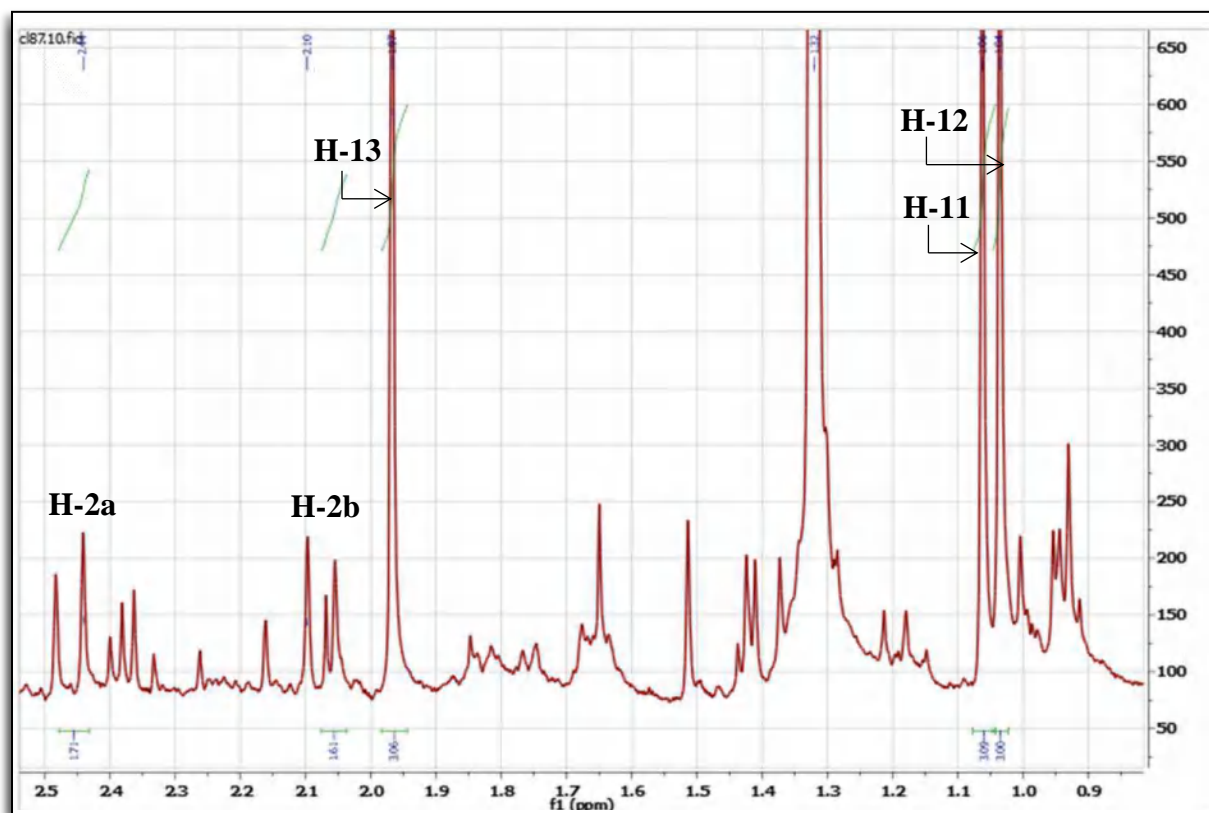
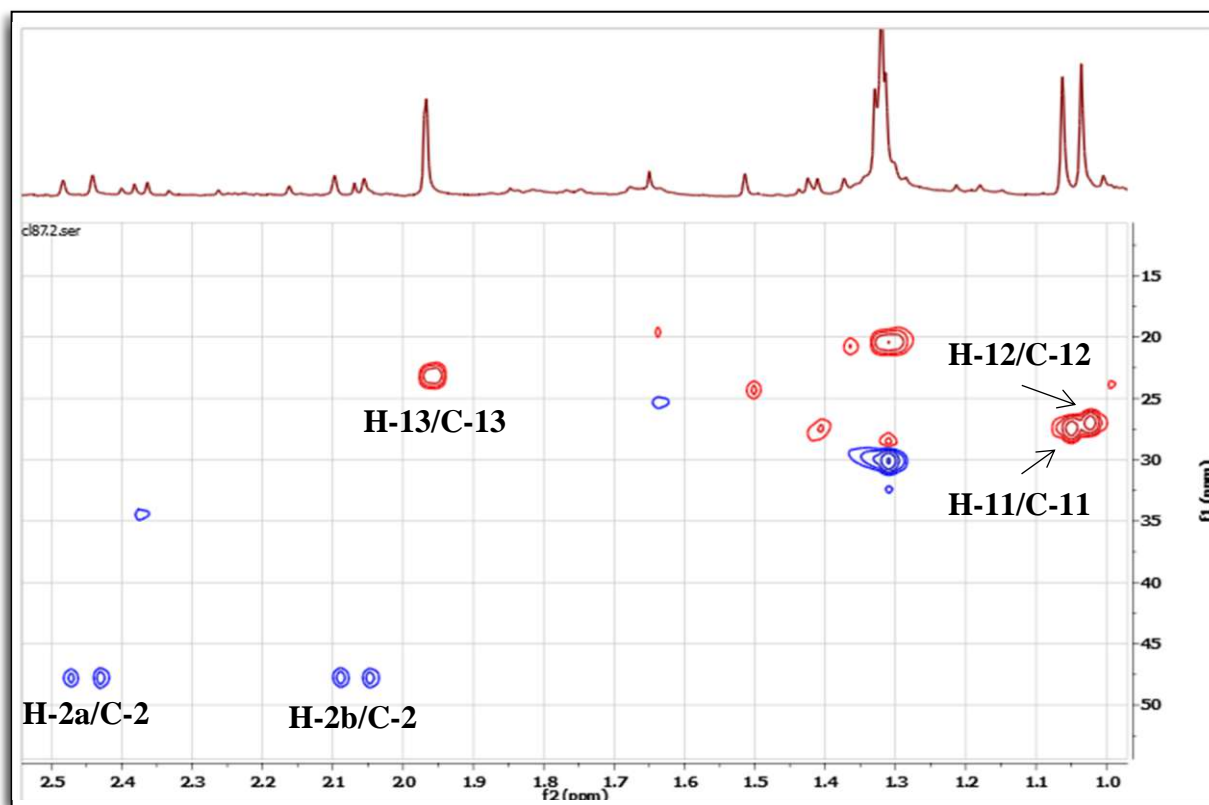


Figure III.68. Etallement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé B-7



**Figure III.69.** Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-7**

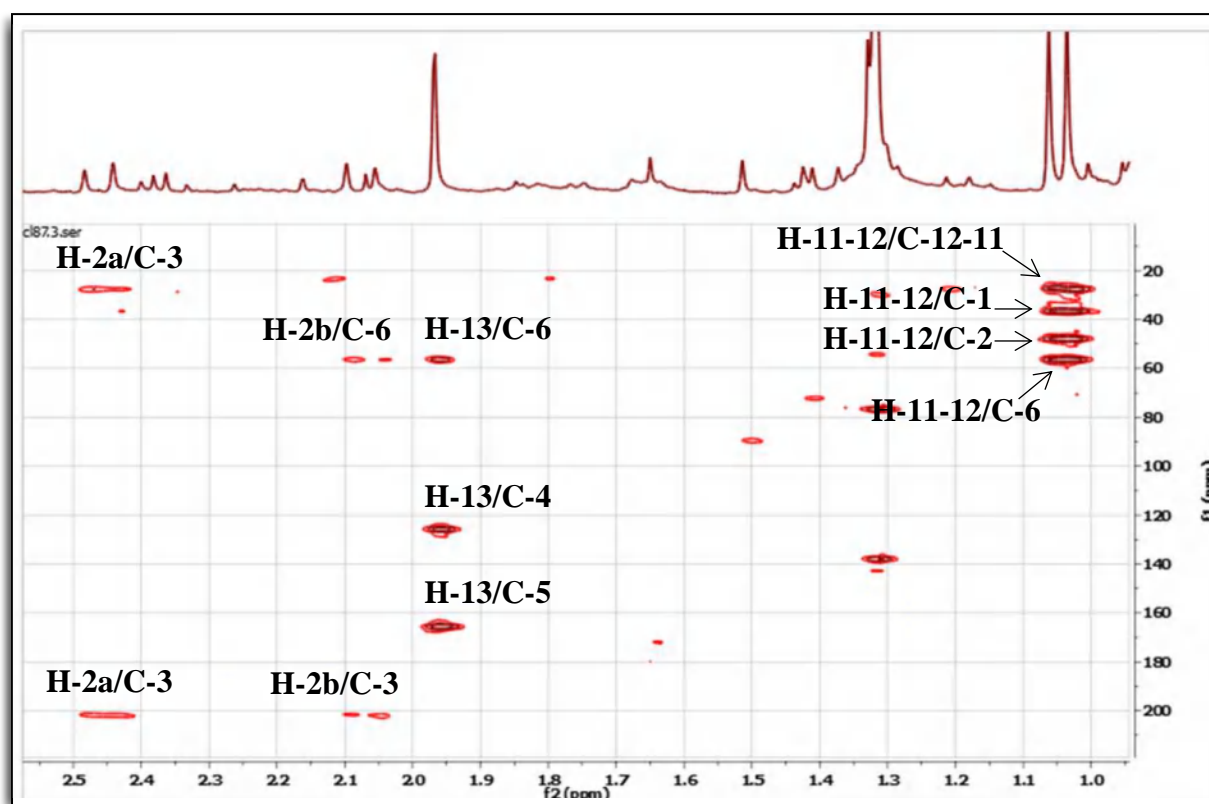
Sur le spectre HMBC (Figure III.70), les proton H-2a et H-2b montrent des corrélations en  $^2J$  avec le carbone résonnant à  $\delta_C$  201.6 ppm. Ce déplacement chimique est en faveur de la présence d'une fonction cétone conjuguée. Cette donnée permet de placer un carbonyle en C-3 et une double liaison entre C-4 et C-5.

La présence de cette double liaison et sachant que dans le squelette mégastigmane le carbone C-5 est relié au C-6 et est substitué par le carbone C-13, il apparaît clairement que le carbone C-5 est quaternaire et éthylénique. On relève en effet, sur le spectre proton, un doublet à  $\delta_H$  1,97 ppm ( $J = 1,2$  Hz) d'intégration 3H ne pouvant correspondre qu'à un méthyle occupant la position C-5 vu les corrélations de ses protons avec le carbone éthylénique quaternaire résonnant à  $\delta_C$  165,8 ne pouvant être que le C-5, et le carbone du méthine oléfinique résonnant à  $\delta_C$  125,7 ppm ( $\delta_H$  5,91 ppm, sl) attribuable au C-4.

Sur le spectre HSQC, la résonance du C-13 est localisée à  $\delta_C$  23,2 ppm. Toujours sur le spectre HMBC, les protons H<sub>3-13</sub> montre une tache de corrélation avec le carbone du groupement méthine résonnant à  $\delta_C$  56,6 ppm que l'on peut attribuer sans ambiguïté au carbone C-6. Le signal de H-6 est relevé à  $\delta_H$  2,71 ppm (d,  $J = 9,1$  Hz). Sur le même spectre,

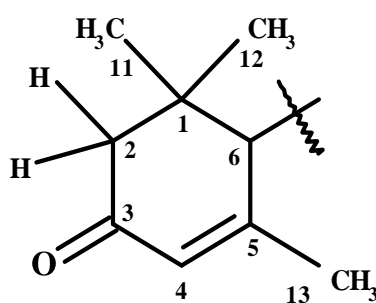


le carbone C-6 montre des taches de corrélation avec les protons H<sub>3</sub>-11 et H<sub>3</sub>-12, confirmant ainsi le jonction C-6 – C-1.



**Figure III.70.** Etallement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **B-7**

A ce stade de notre analyse, nous attendons l'entité représentée dans la figure III.71 dans le composé **B-7**.



**Figure III.71.** Entité 1 présente dans le composé **B-7**

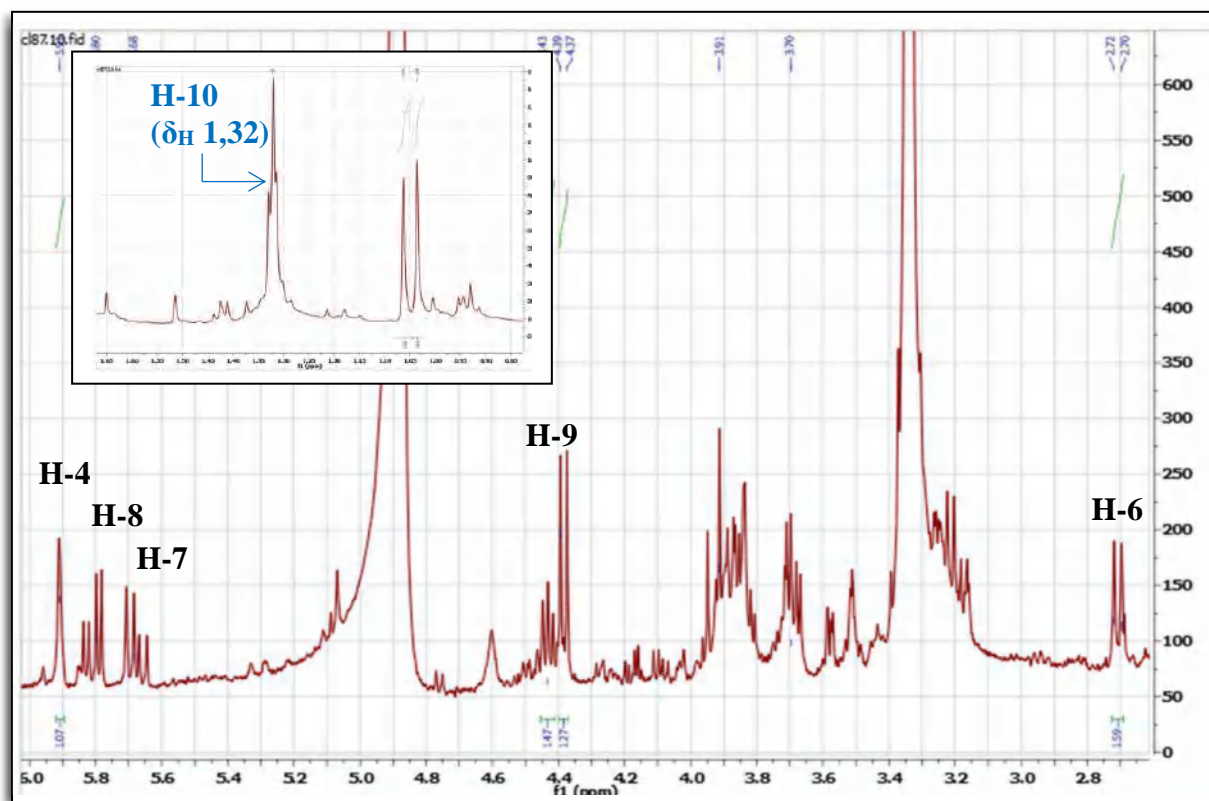
Toujours sur le spectre HMBC (Figure III.74), on relève des taches de corrélation entre H-6 et les carbones de deux groupements CH éthyléniques résonnant à  $\delta_C$  128,4 ppm [ $\delta_H$  5,68 ppm (dd ;  $J = 15,5 ; 9,1$  Hz)] et à  $\delta_C$  137,6 ppm [ $\delta_H$  5,81 ppm (dd ;  $J = 15,5 ; 6,4$  Hz)]. Ces données indiquent que le squelette de ce mégastigmane comporte une double liaison entre



les carbones C-7 et C-8. D'après les valeurs des constantes relevées dans les signaux de H-7 et H-8, la double liaison entre C-7 et H-8 est de configuration trans, ceci d'une part. D'autre part, la valeur (9,1 Hz) de la constante de couplage relevée dans le signal de H-6 suffit amplement pour attribuer le C-7 et le H-7 aux signaux à  $\delta_C$  128,4 ppm et  $\delta_H$  5,68 ppm (dd ;  $J = 15,5 ; 9,1$  Hz) et le C-8 et le H-8 aux signaux à  $\delta_C$  137,6 ppm et  $\delta_H$  5,81 ppm (dd ;  $J = 15,5 ; 6,4$  Hz).

Un retour vers le spectre HMBC permet de relever des taches de corrélation entre le carbone résonnant à  $\delta_C$  76,4 ppm et les protons d'un groupement méthyle résonnant à  $\delta_H$  1,32 (d,  $J = 6,0$  Hz) ;  $\delta_C$  20,3, dont le signal des protons est partiellement recouvert par ceux de la graisse de contamination du solvant.

Connaissant la structure du squelette mégastigmane, il est clair que le groupement oxyméthine représente la position C-9 et le groupement méthyle représente la position C-10.



**Figure III.72.** Etallements du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-7**

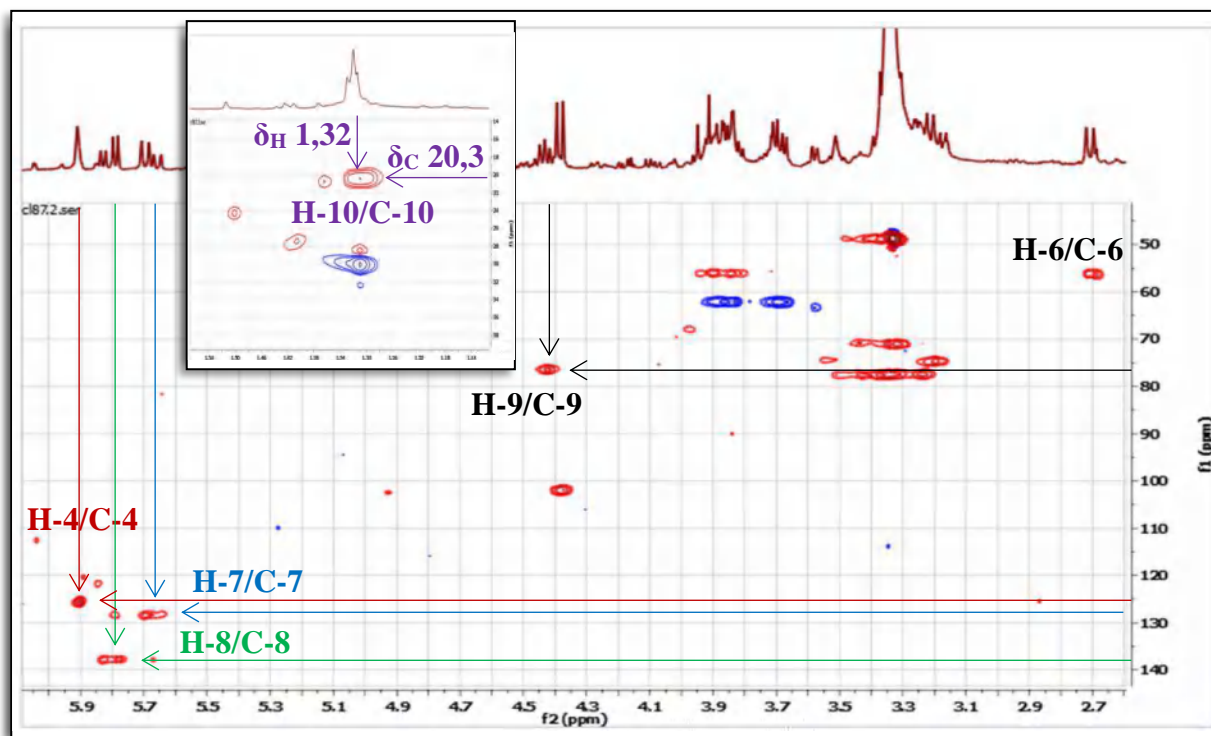


Figure III.73. Etallement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-7

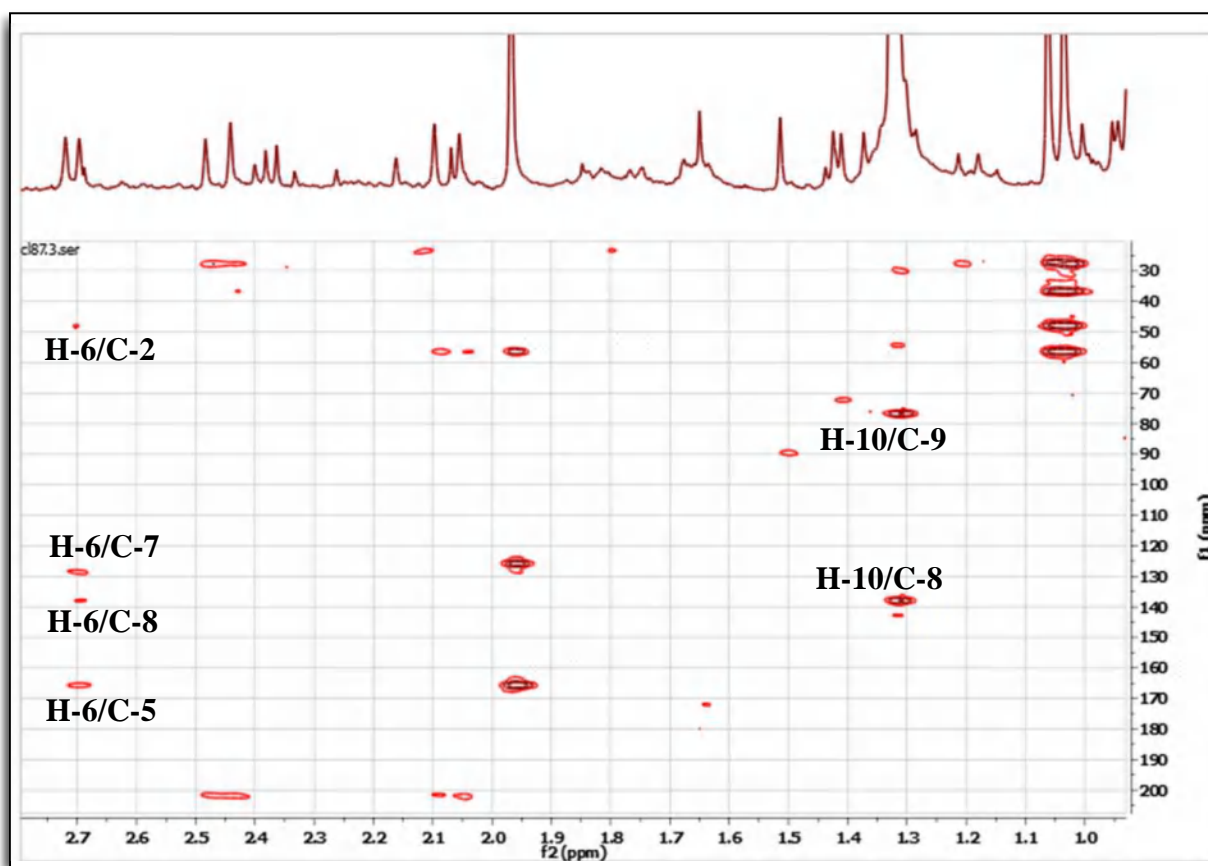
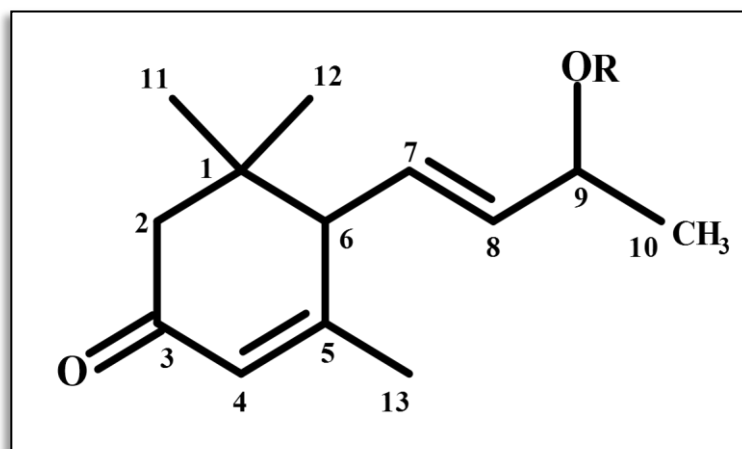


Figure III.74. Etallement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-7

A ce stade de notre analyse, il apparaît clairement que le composé B-7 est substitué en position C-9 par un groupement OR (Figure III.75).



**Figure III.75.** Structure partielle du composé **B-7**

En plus des signaux attribués aux noyaux du squelette mégastigmane, les spectres proton (Figure III.76) et HSQC (Figure III.77) du composé **B-7** montrent un ensemble de signaux caractéristiques d'un hexose notamment :

- Le signal à  $\delta_H$  4,38 ppm sous forme d'un doublet ( $J = 7,8$  Hz), sur le spectre HSQC, ce proton corrèle avec le carbone résonnant à  $\delta_C$  102,0 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces deux noyaux et la valeur de l'interaction de couplage relevée dans le signal de ce proton indiquent qu'il s'agit de la position anomérique d'un groupement  $O$ - $\beta$ -glycoside. Nous noterons ces deux noyaux H-1' et C-1'.
- Deux signaux d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  3,87 ppm (dl;  $J = 11,8$  Hz) et à  $\delta_H$  3,69 ppm (dd ;  $J = 11,8$  ; 5,3 Hz). Les deux protons correspondant à ces deux signaux qui sont portés par le carbone résonnant à  $\delta_C$  62,2 ppm. Ces noyaux sont attribuables respectivement à H-6'a, H-6'b et C-6'.
- Des signaux à :
  - $\delta_H$  3,21 ppm (1H ; dd ;  $J = 8,1$  ; 7,8 Hz) ; ce proton porté par le carbone résonnant à  $\delta_C$  74,8 ppm, est attribuable à H-2'.
  - $\delta_H$  3,35 ppm (signal recouvert par celui du méthanol résiduel) ; ce proton porté par le carbone résonnant à  $\delta_C$  77,6 ppm est attribuable à H-3'

- $\delta_H$  3,33 ppm (signal partiellement recouvert par celui du méthanol résiduel) ; ce proton porté par le carbone résonnant à  $\delta_C$  71,1 ppm est attribuable à H-4'
- $\delta_H$  3,34 ppm (signal recouvert par celui du méthanol résiduel) ; ce proton porté par le carbone résonnant à  $\delta_C$  77,5 ppm est attribuable à H-5'

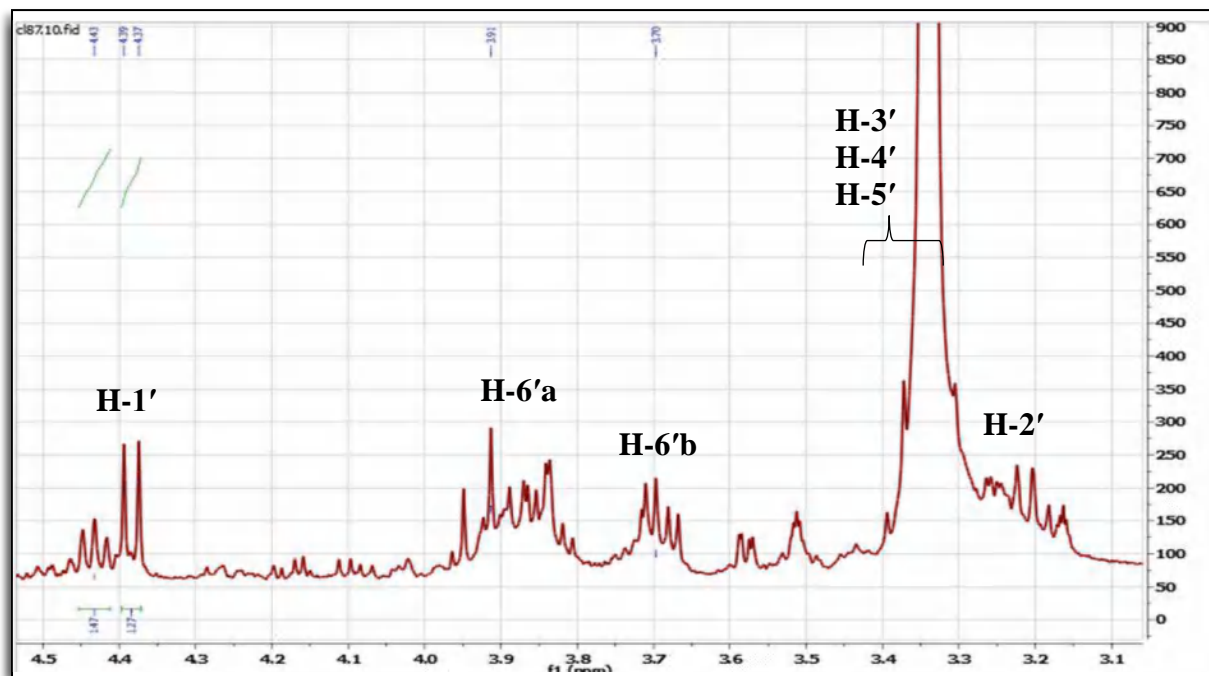


Figure III.76. Etalement du spectre RMN  $^1H$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-7

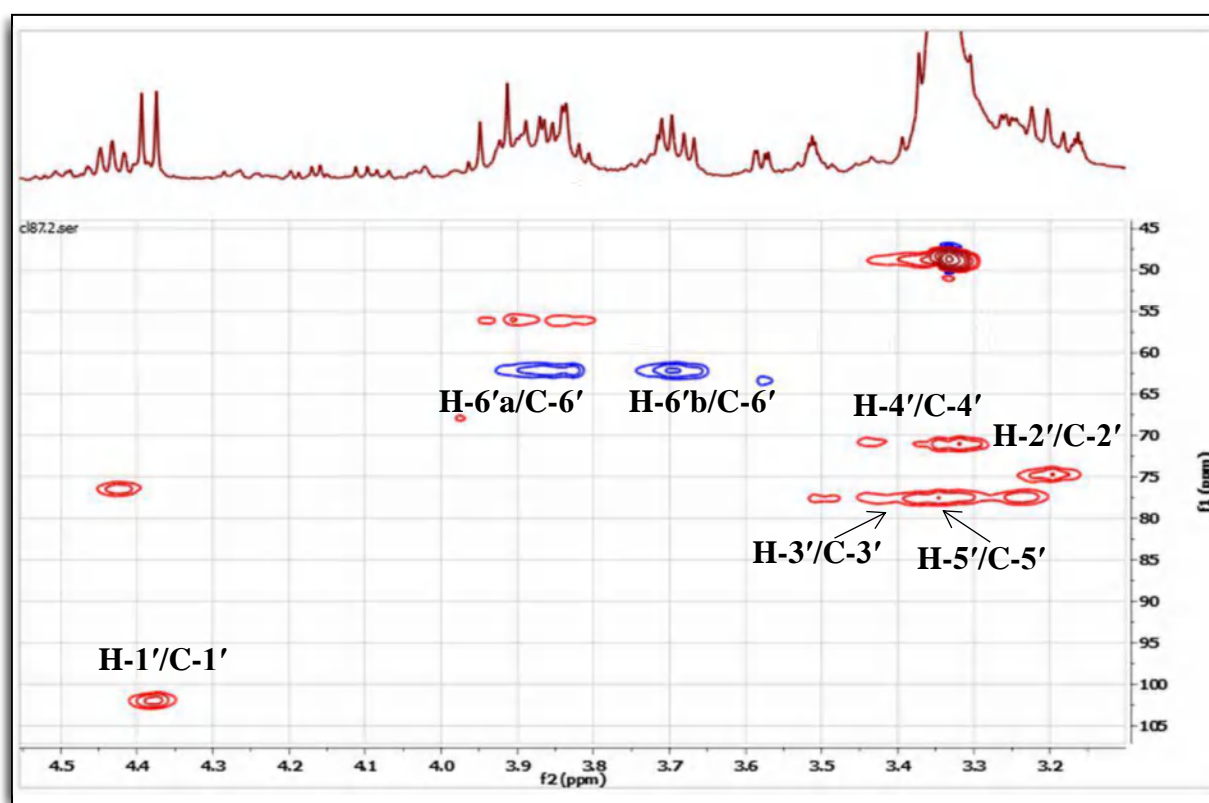
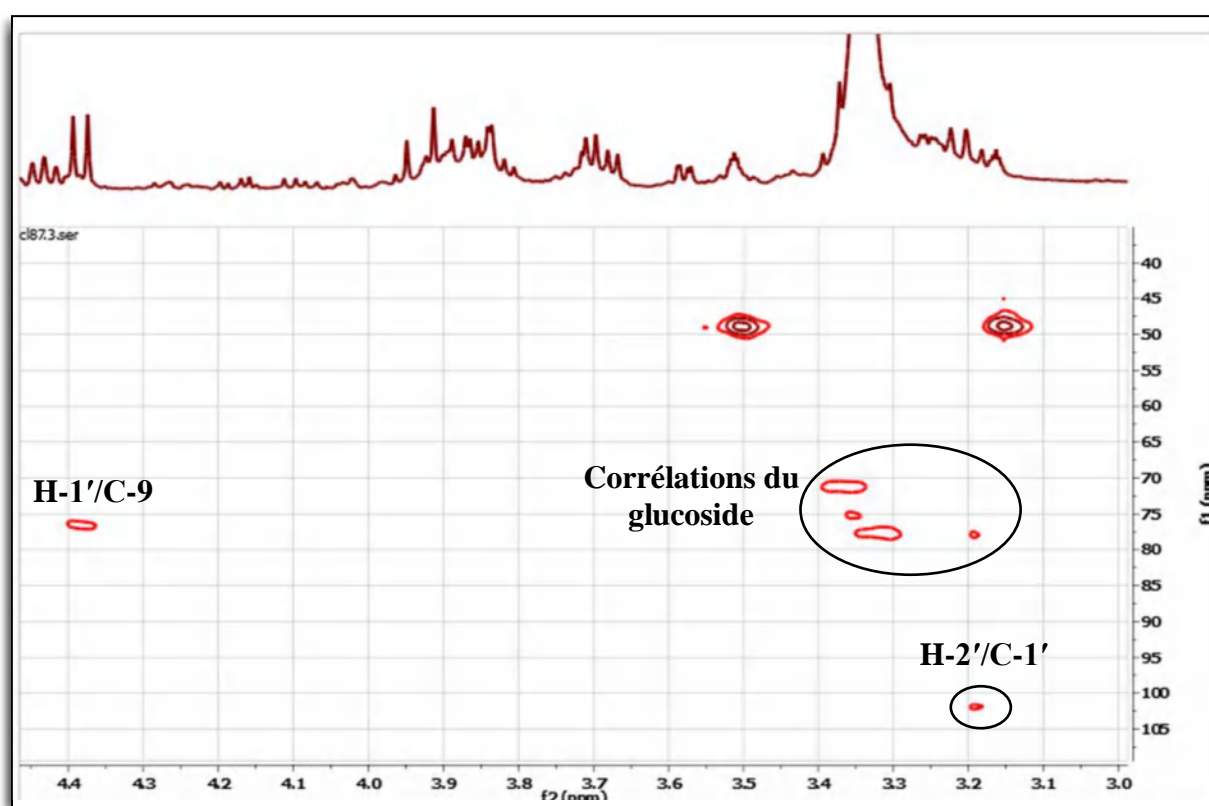


Figure III.77. Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-7

L'ensemble de tous ces signaux converge vers le présence d'un groupement *O*- $\beta$ -glycopyranoside en position C-9 du mégastigmane. Les valeurs des déplacements chimiques des atomes de carbone de cette entité sucre, sont en faveur d'un groupement *O*- $\beta$ -glucopyranoside (Agrawal 1992).

Ainsi ce mégastigmane (3-oxo  $\alpha$ -ionol) porte un groupement  $\beta$ -D-glucopyranosyle. En réexaminant le spectre HMBC (Figure III.78), on relève une tache de corrélation entre le proton anomérique et le carbone du méthine oxygéné ( $\delta_C$  76,4 ppm) correspondant à la position C-9 du squelette mégastigmane.



**Figure III.78.** Etallement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé B-7

Cette dernière observation permet de finir la détermination de la structure du composé B-7, en plaçant un groupement *O*- $\beta$ -D-glucopyranosyle en C-9 (Figure III.79).

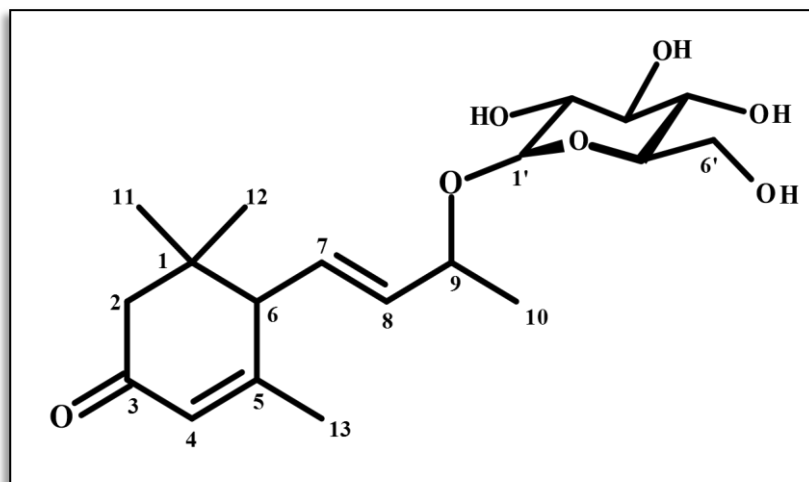


Figure III.79. Structure plane du composé B-7

La stéréochimie des centres chiraux C-6 et C-9 est déduite (6R, 9R) grâce aux valeurs des déplacements chimique des noyaux près du centre asymétrique C-9 notamment ceux des positions 7, 8, 9 et 10 (Pabst et al. 1992). Cette analyse a permis de conclure que le composé B-7 est le **(6R, 9R)-3-oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glucopyranoside** (Pabst et al. 1992) (Figure III.80).

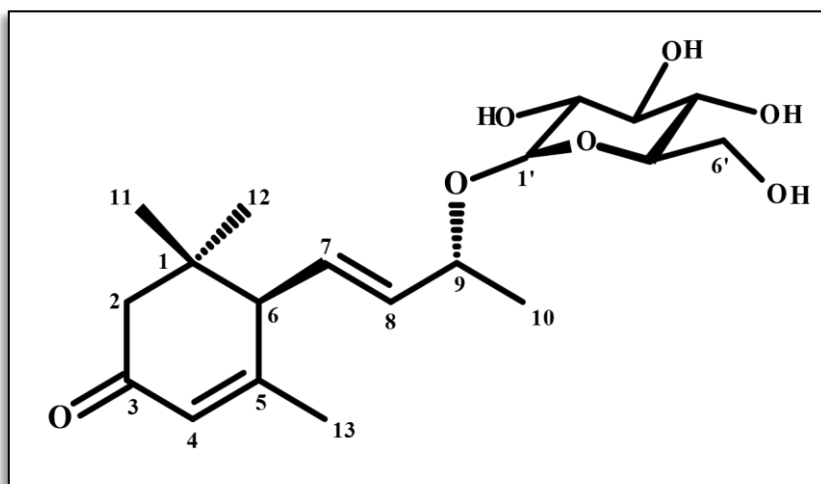


Figure III.80. Structure du composé B-7 :  
**(6R, 9R)-3-oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glucopyranoside**

L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau III.7.

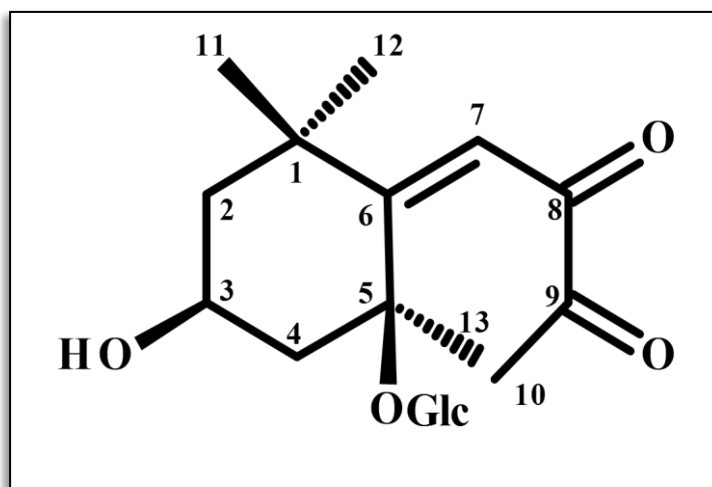
**Tableau III.7.** Données relatives aux spectres RMN <sup>1</sup>H, HSQC et HMBC du composé **B-7**

Position	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Intégration, multiplicité, <i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)*	HMBC (ppm)
<b>1</b>	-	-	36,5	-
<b>2a</b>	2,46	(1H, d, <i>J</i> = 16,8)	47,7	C-11, C-12, C-1, C-3
<b>2b</b>	2,07	(1H, d, <i>J</i> = 16,8)	47,7	C-6, C-3
<b>3</b>	-	-	201,6	-
<b>4</b>	5,91	(1H, sl)	125,7	-
<b>5</b>	-	-	165,8	-
<b>6</b>	2,71	(1H, d, <i>J</i> = 9,1)	56,6	C-2, C-7, C-8, C-5
<b>7</b>	5,68	(1H, dd, <i>J</i> = 15,5; 9,1)	128,4	-
<b>8</b>	5,81	(1H, dd, <i>J</i> = 15,5; 6,4)	137,6	-
<b>9</b>	4,43	(1H, m)	76,4	-
<b>10</b>	1,32	(3H, d, <i>J</i> = 3,0)	20,3	C-9, C-8
<b>11</b>	1,06	(3H, s)	27,6	C-1, C-2, C-6
<b>12</b>	1,04	(3H, s)	27,1	C-1, C-2, C-6
<b>13</b>	1,97	(3H, d, <i>J</i> = 1,2)	23,2	C-6, C-4, C-5
<b>1'</b>	4,38	(1H, d, <i>J</i> = 7,8)	102,0	C-9
<b>2'</b>	3,21	(1H, dd, <i>J</i> = 8,1; 7,8)	74,8	C-1'
<b>3'***</b>	3,35	-	77,6	-
<b>4'***</b>	3,33	-	71,1	-
<b>5'***</b>	3,34	-	77,5	-
<b>6'a</b>	3,87	(1H, m)	62,2	-
<b>6'b</b>	3,69	(1H, dd, <i>J</i> = 11,8; 5,3)	62,2	-

\*  $\delta$  <sup>13</sup>C (ppm) obtenus par la combinaison des données des spectres HSQC et HMBC.

\*\* Recouvert par le signal du méthanol résiduel.

## II.8. Détermination structurale du composé B-8



L'examen des spectres RMN<sup>1</sup>H (Figure III.81), HSQC (Figure III.82) et HMBC (Figure III.83) enregistrés dans le Me-OH-*d*<sub>4</sub> sur un spectromètre opérant à 400 MHz montrent des groupes de signaux assez similaires à ceux du composé précédent (composé **B-7**) laissant envisager un mégastigmane glycoside. En effet, en ce qui concerne le groupe de signaux appartenant au squelette mégastigmane on relève :

- Deux singulets d'intégration 3H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  1,19 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  37,1) et  $\delta_{\text{H}}$  1,40 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  29,6) indiquant la présence de deux méthyles. Comme pour le composé précédent, le spectre HMBC (Figure III.86), montre que les protons de l'un corrélient avec le carbone de l'autre et vis-versa. Cette observation indique qu'ils sont géminés ; vu leurs multiplicités, leur carbone porteur est quaternaire. Nous attribuons alors, la position C-1 à ce carbone quaternaire dont la résonance est relevée à  $\delta_{\text{C}}$  36,4 ppm grâce à ses corrélations HMBC avec les protons de ces deux méthyles que nous attribuons alors aux positions C-12 et C-11, respectivement.



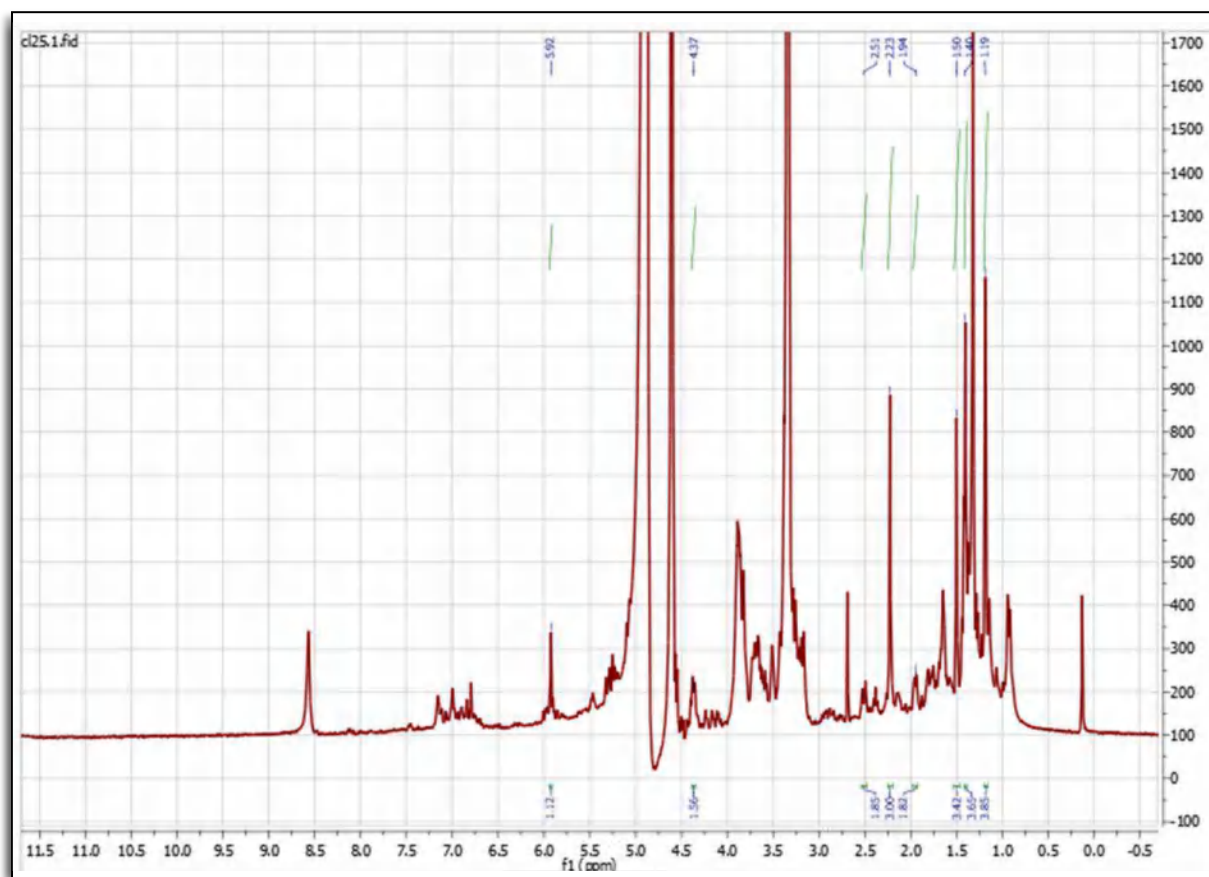


Figure III.81. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-8**

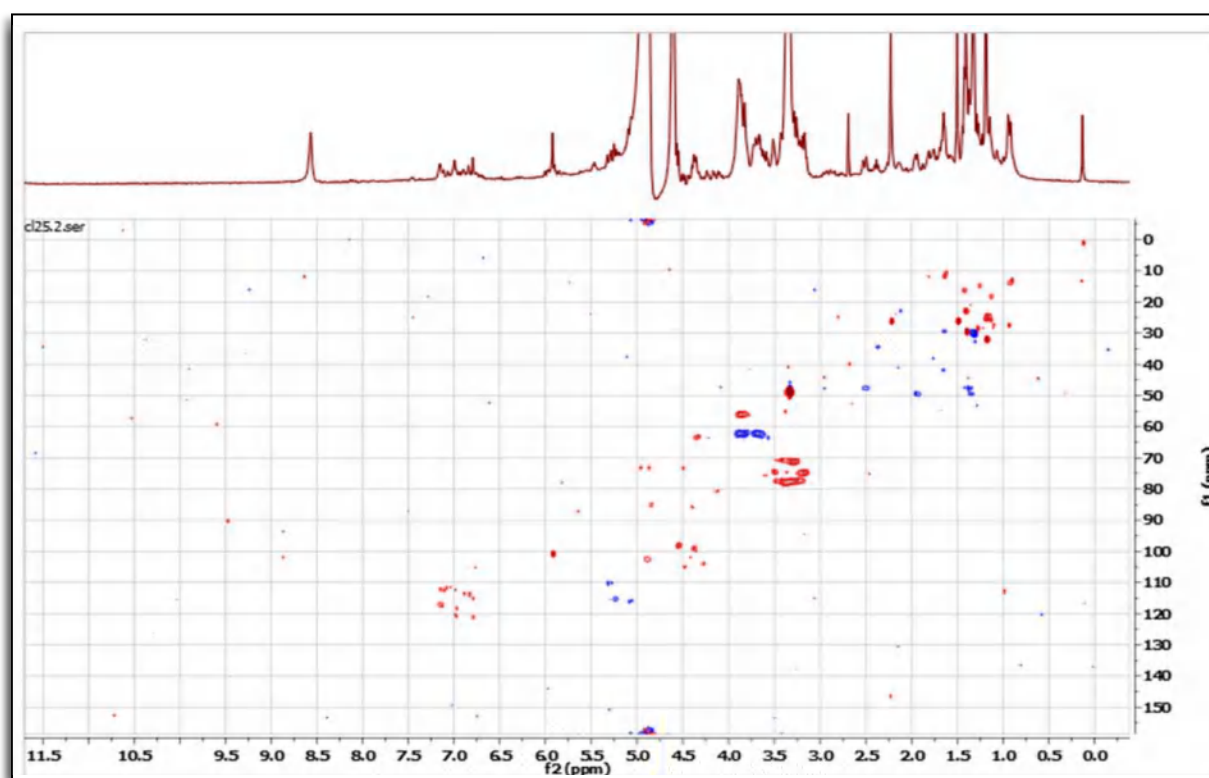
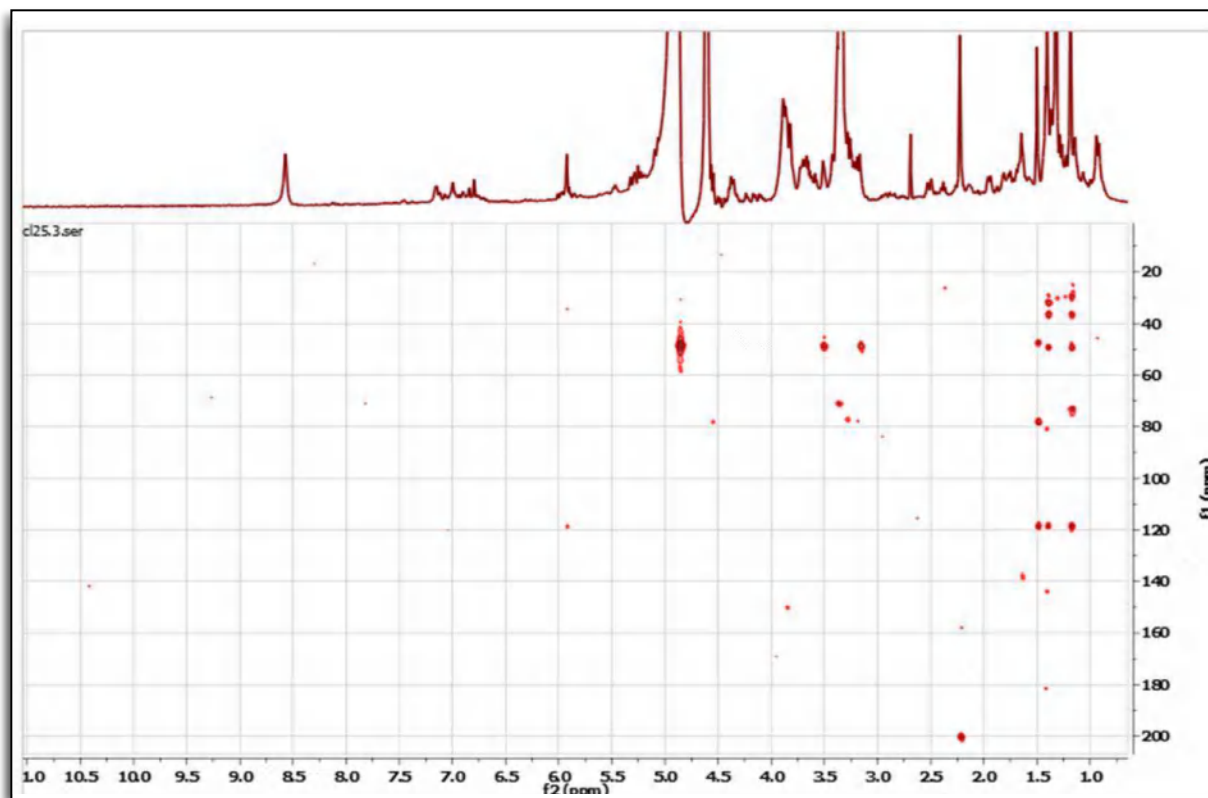


Figure III.82. Spectre HSQC (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-8**



**Figure III.83.** Spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-8**

- Deux multiplets à  $\delta_H$  1,36 et 1,94 ppm d'intégration 1H chacun, portés par le même carbone résonnant à  $\delta_C$  49,5 ppm indiquant la présence d'un premier groupement méthylène. Sur le spectre HMBC le carbone de ce méthylène, corrèle avec les protons des 2 méthyles H<sub>3</sub>-12 et H<sub>3</sub>-11, cette observation indique que ce méthylène est relié au carbone C-1, nous pouvons alors lui attribuer la position C-2 et noter que  $\delta_{C-2} = 49,5$  ppm,  $\delta_{H-2b} = 1,36$  et  $\delta_{H-2a} = 1,94$  ppm.
- Par ailleurs et toujours sur le spectre HMBC, les protons des 2 méthyles H<sub>3</sub>-12 et H<sub>3</sub>-11, corrèlent avec le carbone quaternaire éthylénique résonnant à  $\delta_C$  118,3 ppm ne pouvant être attribué qu'au carbone C-6. On relève également une corrélation entre ce carbone C-6 et le proton d'un méthine résonnant à  $\delta_H$  5,92 ppm (singulet) ( $\delta_C$  100,8 ppm) ne pouvant être attribué qu'à H-7 et son carbone porteur au C-7. D'après les déplacements chimiques de ces deux noyaux, il est clair que la position C-7 est éthylénique, ce qui implique la présence d'une double liaison entre C-6 et C-7. L'attribution du C-7 et non du C-5 à la résonance à  $\delta_C$  100,8 ppm, repose sur la fait que connaissant la structure des mégastigmanes, le C-5 ne peut pas être un méthine

éthylénique vu qu'en plus de ses liaisons avec le C-6 et le C-4, il doit porter le carbone C-13.

- Un réexamen du spectre HMBC, permet de constater que C-6 corrèle avec les protons du groupement méthyle résonnant à  $\delta_H$  1,50 ppm ( $\delta_C$  26,3 ppm). Ce méthyle ne peut être que le CH<sub>3</sub>-13. Cette attribution permet grâce aux corrélations HMBC de H<sub>3</sub>-13, de relever la résonance de C-5 à  $\delta_C$  78,1 ppm (carbone quaternaire oxygéné, vu la valeur de son déplacement chimique) et la résonance de C-4 à  $\delta_C$  47,5 (groupement méthylène dont les protons resonnent sous forme de deux multiplets à  $\delta_H$  1,38 (H-4b) et  $\delta$  2.51 (H-4a).

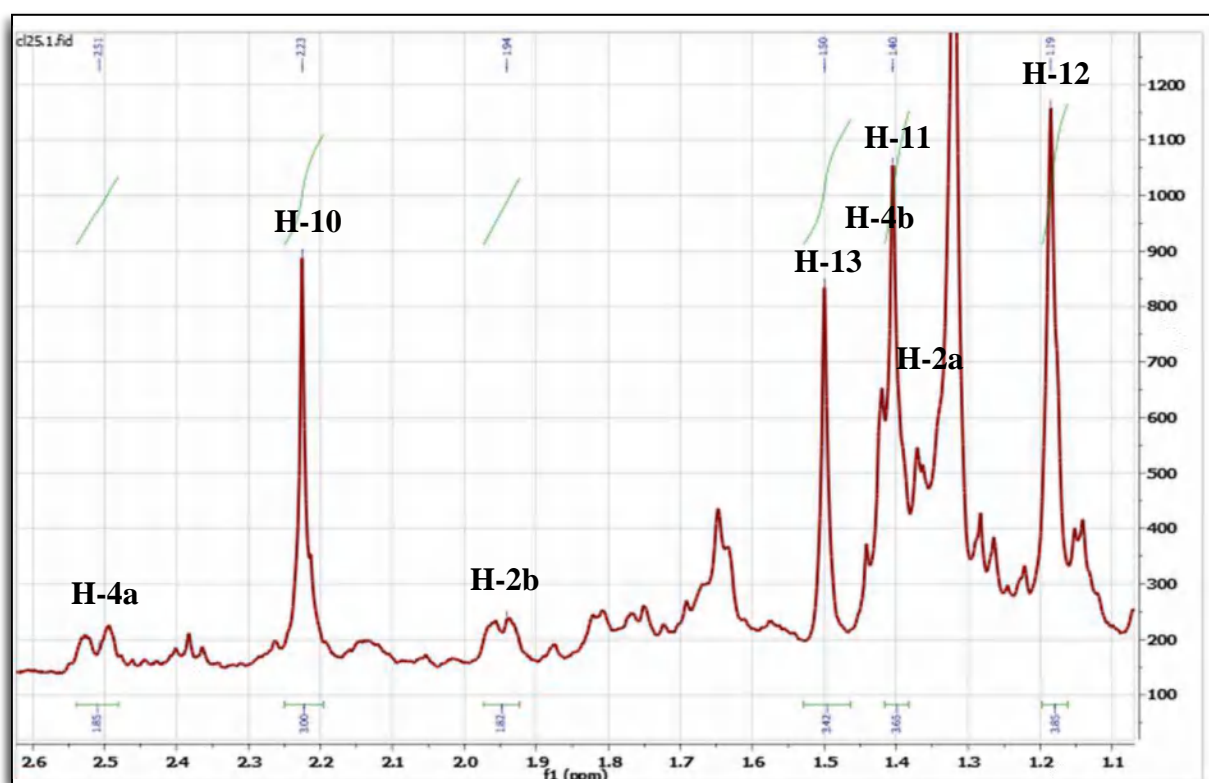
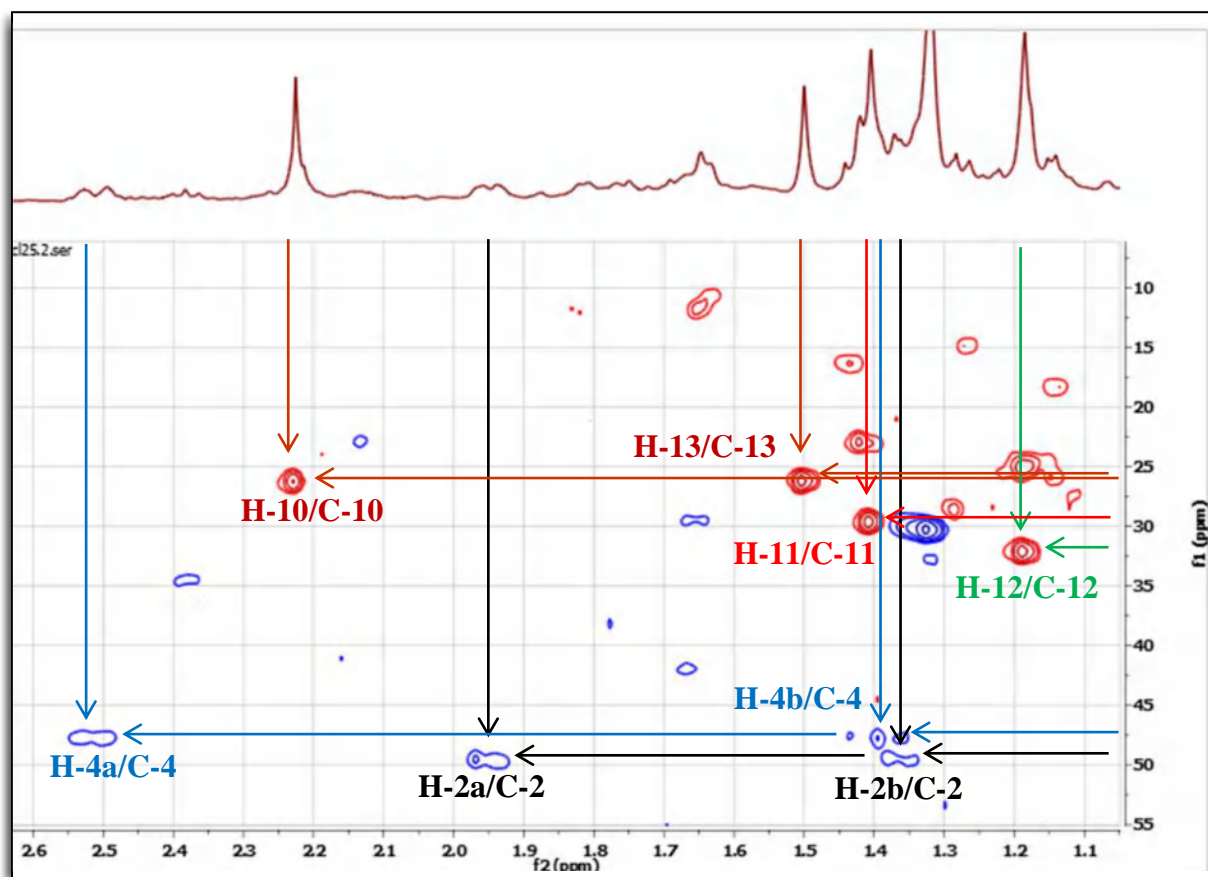
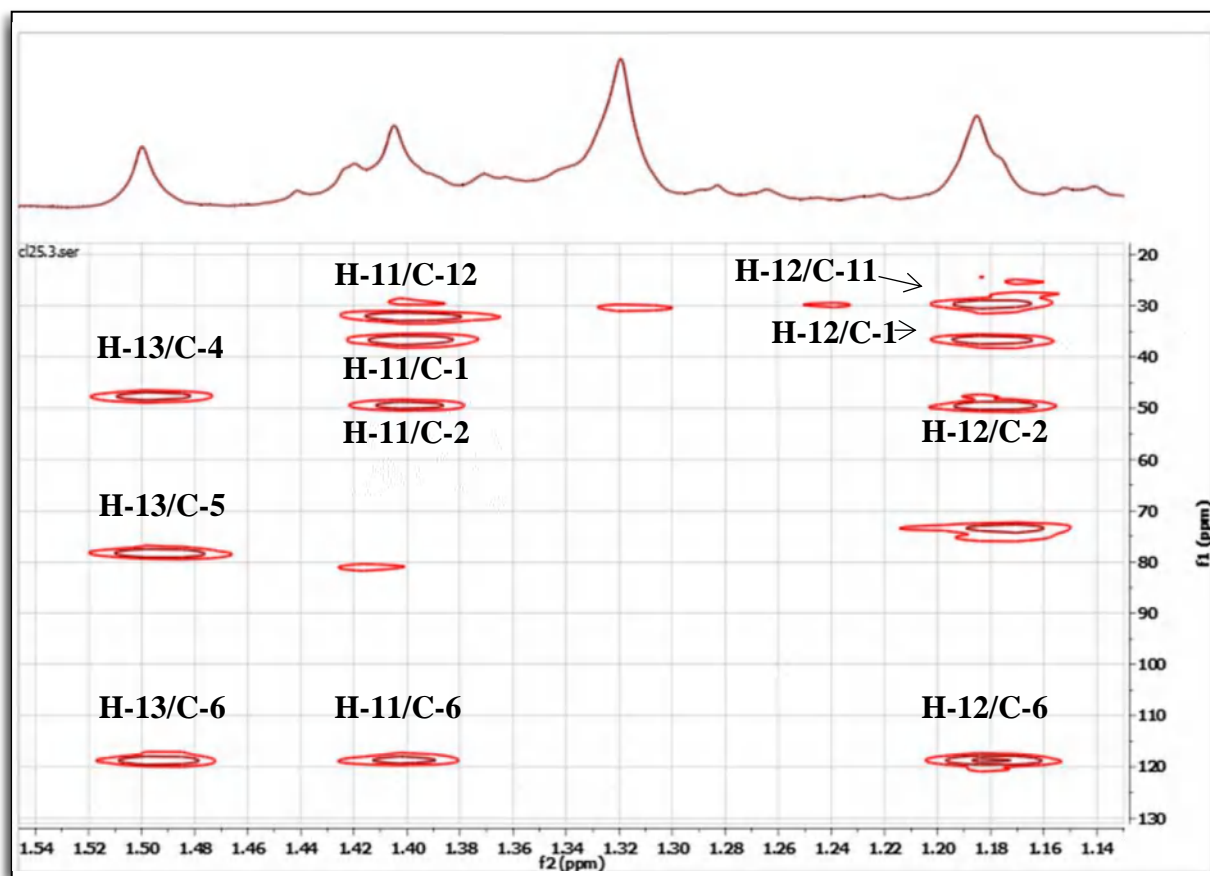


Figure III.84. Etallement du spectre RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé B-8



**Figure III.85.** Etalement du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-8**

- Sur le spectre proton on relève un singulet correspondant à un groupement méthyle dont les protons résonnent à  $\delta_H$  2,23 ppm et corrélient sur le spectre HSQC au carbone résonnant à  $\delta_C$  26,3 ppm. Comme nous sommes en présence d'un composé de type mégastigmane et qu'au stade actuel de notre analyse seul le méthyle CH<sub>3</sub>-10 n'a été ni signalé ni attribué, il est évident que nous sommes en présence de ce méthyle (CH<sub>3</sub>-10). Sur le spectre HMBC, les protons H<sub>3</sub>-10 montrent des corrélations avec les carbones des fonctions cétones résonnants à  $\delta_C$  201,0 (C-9) et 214,0 (C-8). A noter que la tache de corrélation entre H<sub>3</sub>-10 et C-8 est très faible alors que celle entre H<sub>3</sub>-10 et C-9 est très intense.



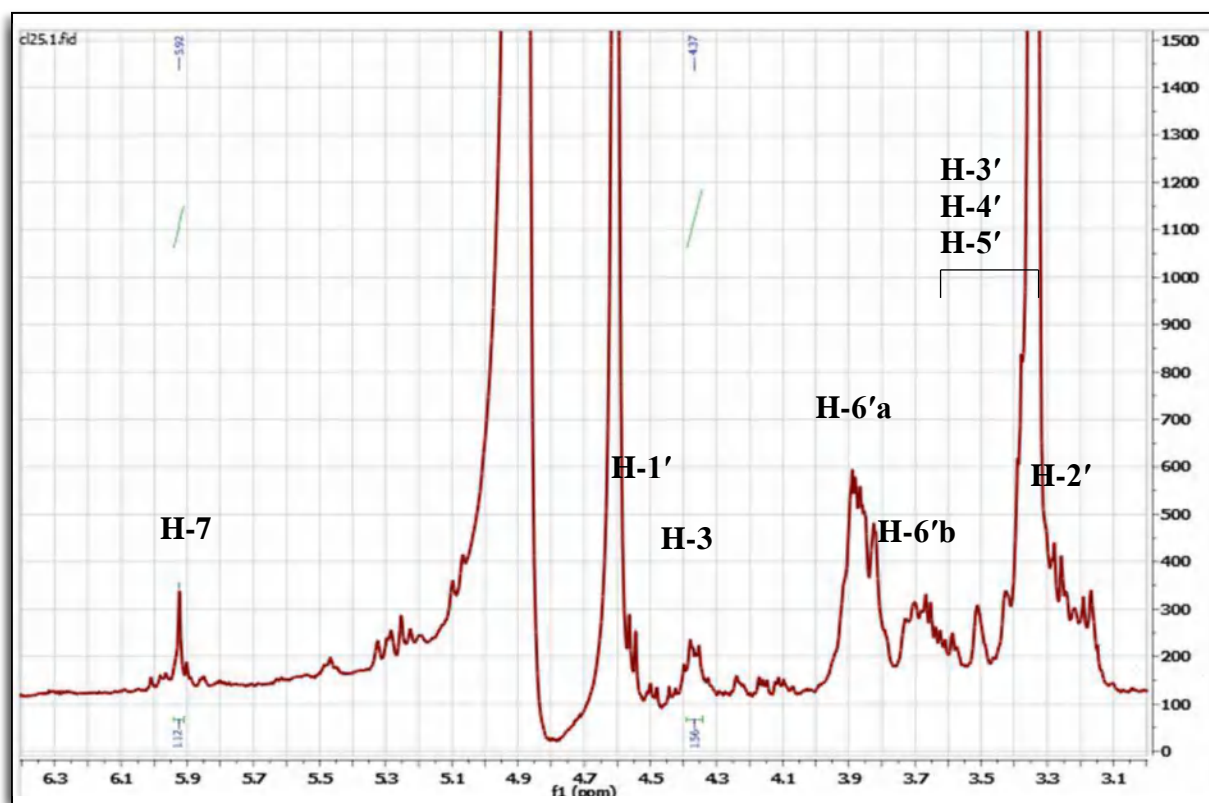
**Figure III.86.** Etallement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-8**

En plus des signaux décrits, les spectres de ce composé **B-8**, montrent un ensemble de signaux caractéristiques d'un hexose, notamment :

- le signal à  $\delta_H$  4,55 ppm sous forme d'un doublet ( $J = 7,7$  Hz) porté par un carbone résonnant à  $\delta_C$  98,2 ppm, attribuable au proton anomérique (H-1') d'un sucre de configuration  $\beta$ .
- Deux signaux d'intégration 1H chacun, attribuables respectivement à H-6'a et H-6'b à  $\delta_H$  3,80 et 3,68 ppm sous forme de multiplets portés par un carbone résonnant à  $\delta_C$  62,4 ppm.
- Un ensemble de signaux attribuables aux protons du sucre, résonnant à :
  - $\delta_H$  3,18 ppm attribuable à H-2' et porté par le carbone  $\delta_C$  74,8 ppm.
  - $\delta_H$  3,38 ppm attribuable à H-3' et porté par le carbone  $\delta_C$  78,0 ppm
  - $\delta_H$  3,28 ppm attribuable à H-4' et porté par le carbone  $\delta_C$  71,4 ppm
  - $\delta_H$  3,28 ppm attribuable à H-5' porté par le carbone  $\delta_C$  77,4 ppm

Ces données sont en faveur de la présence d'un groupement *O*- $\beta$ -D-glucopyranoside sur le squelette mégastigmane de cette molécule. Il est évident que ce groupement est en position C-5 vu la valeur (78.1 ppm) de son déplacement chimique. Ceci est d'ailleurs bien confirmé par la corrélation HMBC entre ce carbone C-5 et le proton anomérique du groupement *O*- $\beta$ -D-glucopyranoside.

En faisant le bilan de notre analyse structurale, il nous reste à définir la position C-3 du cycle à 6 chaînons du squelette mégastigmane. En effet, on relève un signal toujours non attribué consistant en un multiplet d'intégration 1H à  $\delta_H$  4,35 ppm porté par un carbone résonnant à  $\delta_C$  63,3 ppm indiquant un hydroxyméthine comme position C-3.



**Figure III.87.** Etallement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-8**



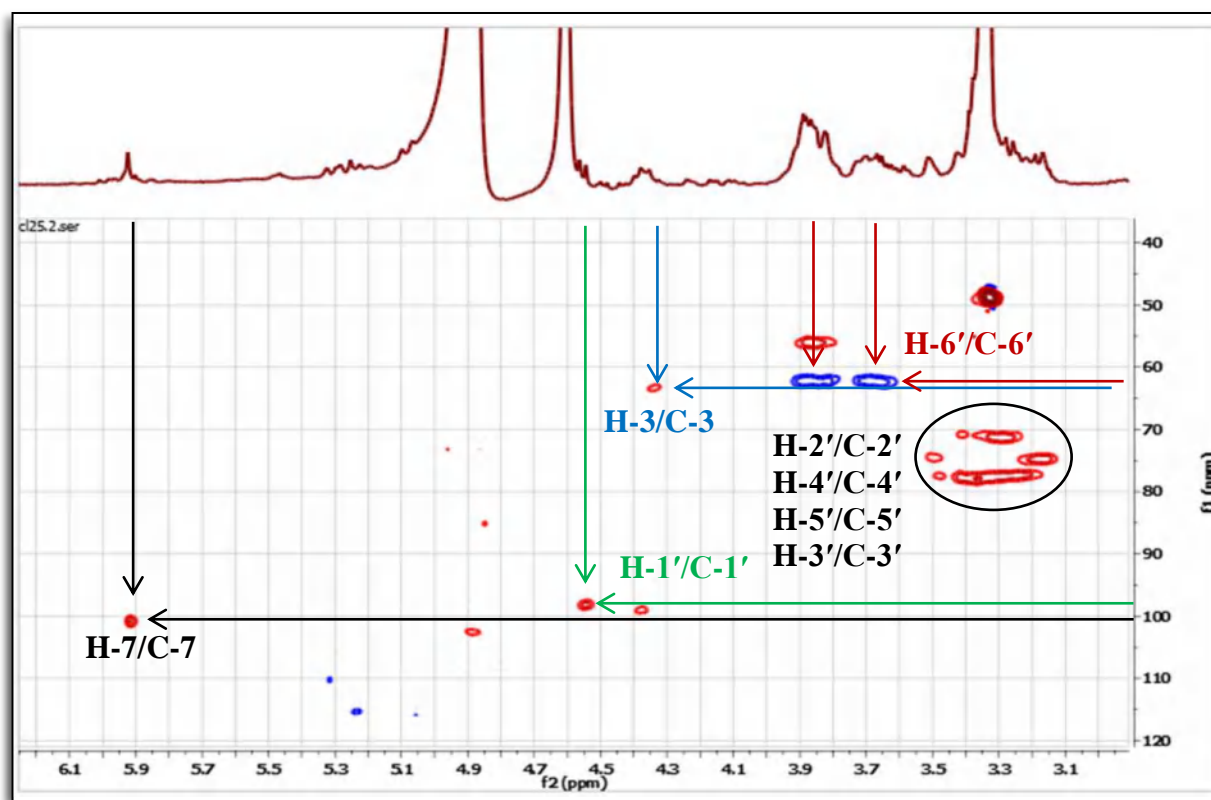


Figure III.88. Etalement du spectre HSQC (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé B-8

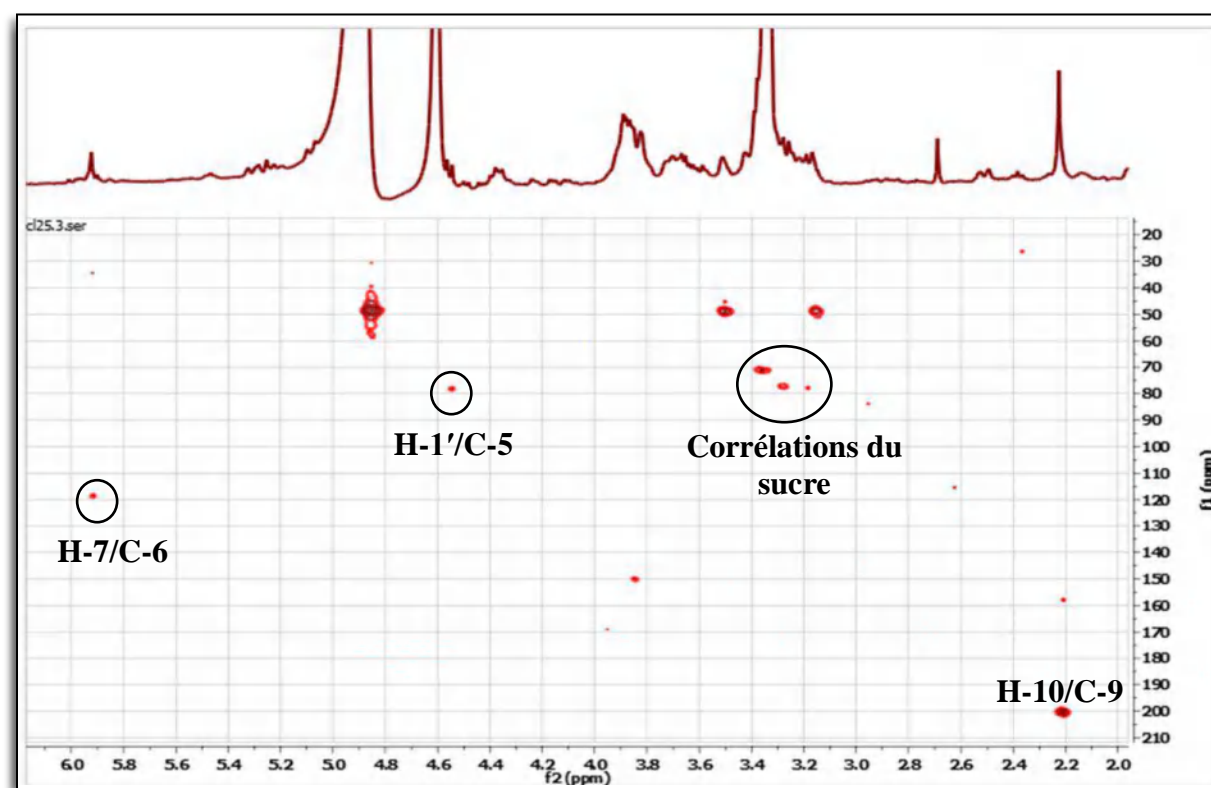
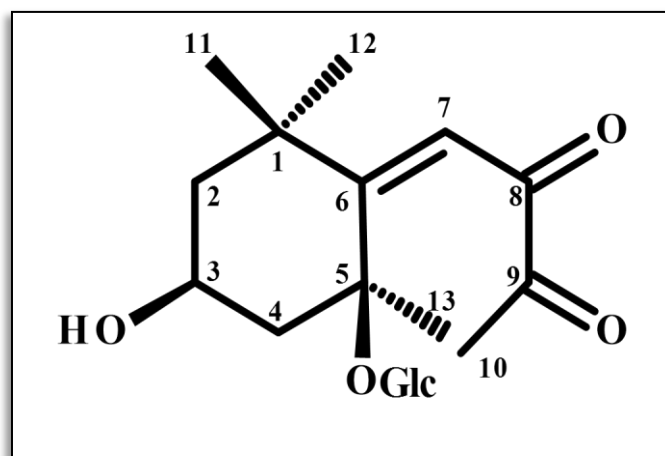


Figure III.89. Etalement du spectre HMBC (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé B-8

L'ensemble des résultats de notre analyse est en parfait accord avec ceux décrivant le **Lippianoside E** (Zhang et al. 2015). La structure de cette molécule est représentée dans la figure III.90.



**Figure III.90.** Structure finale du composé **B-8** : lippianoside **E**

Les données spectrales du produit **B-8** regroupées dans le tableau III.8 sont en accord avec celles publiées pour cette molécule (Zhang et al. 2015) et nous ont permis d'identifier : le **lippianoside E**.

**Tableau III.8.** Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé **B-8**

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégrations, multiplicités $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*	HMBC (ppm)
<b>1</b>	-	-	36,4	-
<b>2a</b>	1,36	(1H, m)	49,5	-
<b>2b</b>	1,94	(1H, m)	49,5	-
<b>3</b>	4,35	(1H, m)	63,3	-
<b>4a</b>	1,38	(1H, m)	47,5	-
<b>4b</b>	2,51	(1H, m)	47,5	-
<b>5</b>	-	-	78,1	-
<b>6</b>	-	-	118,3	-
<b>7</b>	5,92	(1H, s)	100,8	C-6
<b>8</b>	-	-	214,0	-
<b>9</b>	-	-	201,0	-

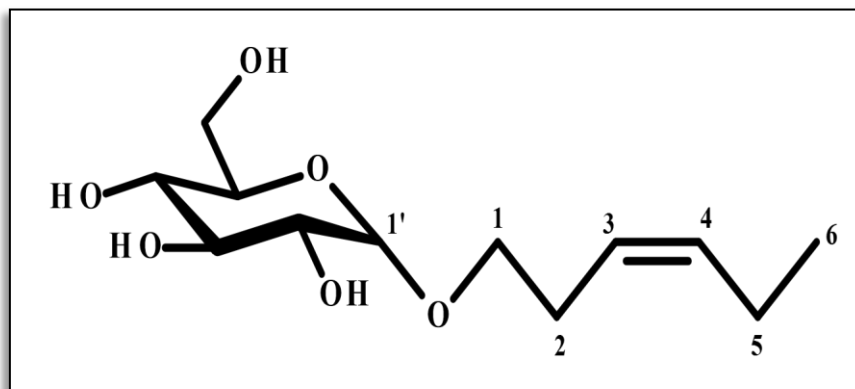


**Tableau III.8.** Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé **B-8**  
(Suite)

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégrations, multiplicités $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*	HMBC (ppm)
10	2,23	(3H, s)	26,3	C-9
11	1,40	(3H, s)	29,6	C-12, C-1, C-2, C-6
12	1,19	(3H, s)	37,1	C-11, C-1, C-2, C-6
13	1,50	(3H, s)	26,3	C-4, C-5, C-6
1'	4,55	(1H, d, $J = 7,7$ )	98,2	C-5
2'	3,18	-	74,8	-
3'	3,38	-	78,0	-
4'	3,28	-	71,4	-
5'	3,28	-	77,4	-
6'a	3,85	(1H, m)	62,4	-
6'b	3,68	(1H, m)	62,4	-

\*  $\delta$   $^{13}\text{C}$  (ppm) obtenus par la combinaison des données des spectres HSQC et HMBC

## II.9. Détermination structurale du composé B-9



L'examen des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figures III.91), HSQC (Figures III.92) ainsi que les spectres étalés montrent la présence d'un ensemble de signaux caractéristiques d'une entité sucre. On relève en effet :

- Un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  4,30 ppm (1H ;  $J = 7,8$  Hz), ( $\delta_{\text{C}}$  104,0 ppm) caractérisant la position anomérique de ce sucre et indiquant sa configuration  $\beta$  et sa jonction à l'aglycone par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène. Ces noyaux seront donc notés H-1' et C-1'.

- Un doublet de doublets (1H ;  $J = 11,9 ; 5,3$  Hz) à  $\delta_H$  3,70 ppm et un multiplet à  $\delta_H$  3,90 ppm d'intégration 1H. Ces deux protons portés par le carbone résonnant à  $\delta_C$  62,4 ppm sont attribuables à H-6'b et H-6'a respectivement. Leur carbone sera noté C-6'.
- Un doublet de doublets ( $J = 8,9 ; 7,8$  Hz) à  $\delta_H$  3,20 ppm d'intégration 1H attribuable à H-2' vu la valeur de la constante de couplage 7,8 Hz qui ne peut résulter que de son interaction avec H-1'. La résonance du carbone C-2' est alors relevée à  $\delta_C$  74,8 ppm.
- Des signaux partiellement recouverts par le signal du méthanol résiduel à  $\delta_H$  3,30 ; 3,38 et 3,38 ppm portés par les carbones  $\delta_C$  77,7 ; 71,2 et 77.8 ppm relatifs aux protons H-3', H-4' et H-5' respectivement.

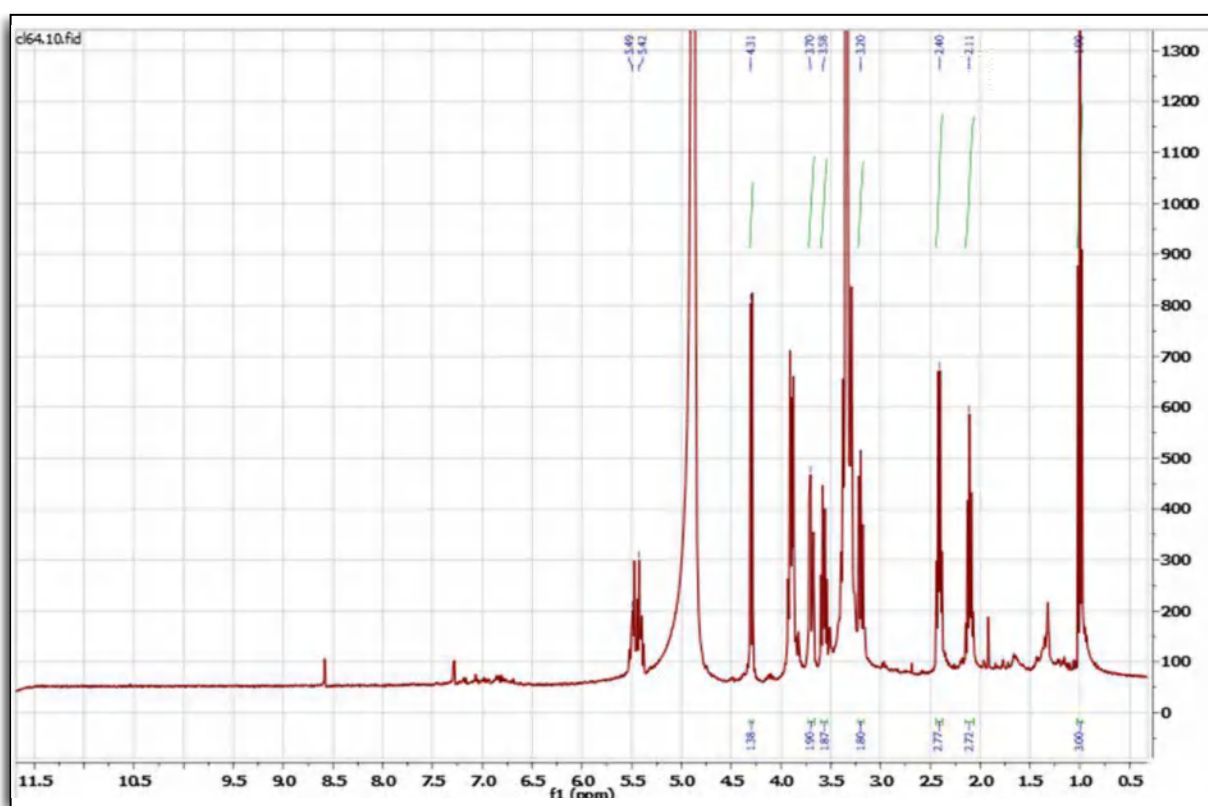


Figure III.91. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-9

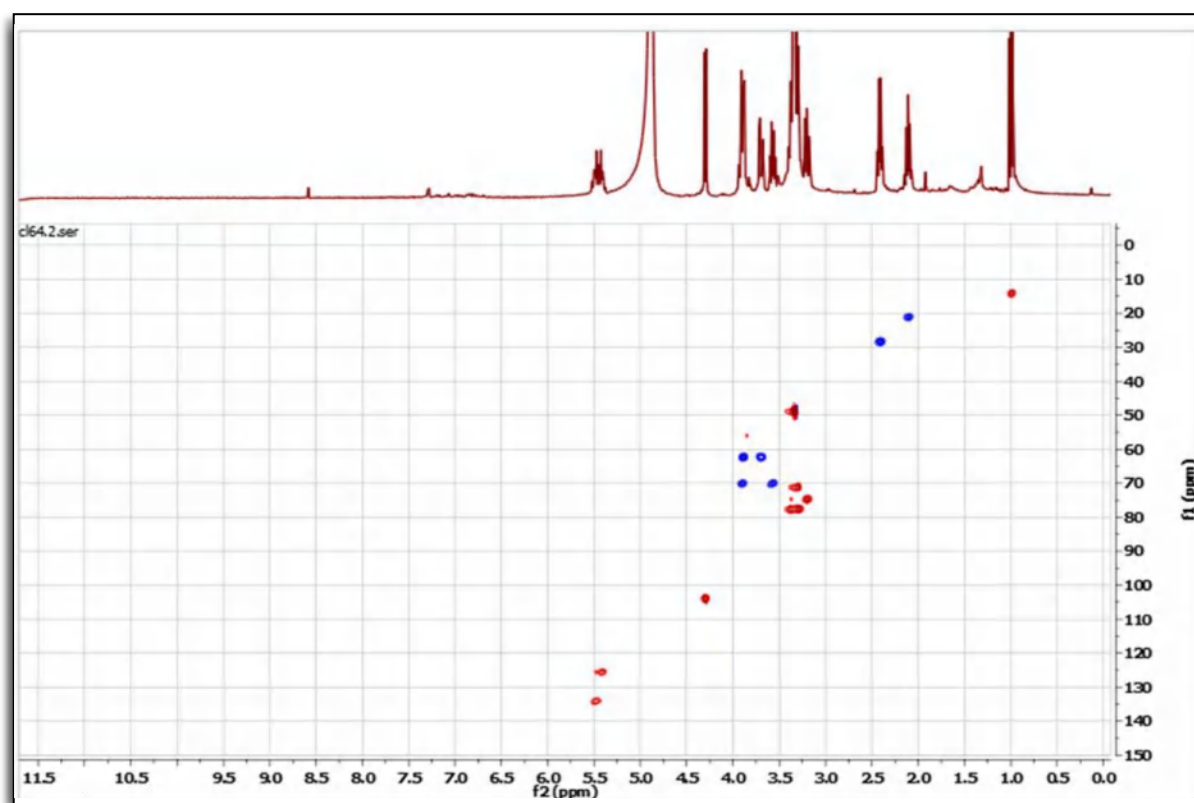


Figure III.92. Spectre HSQC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé B-9

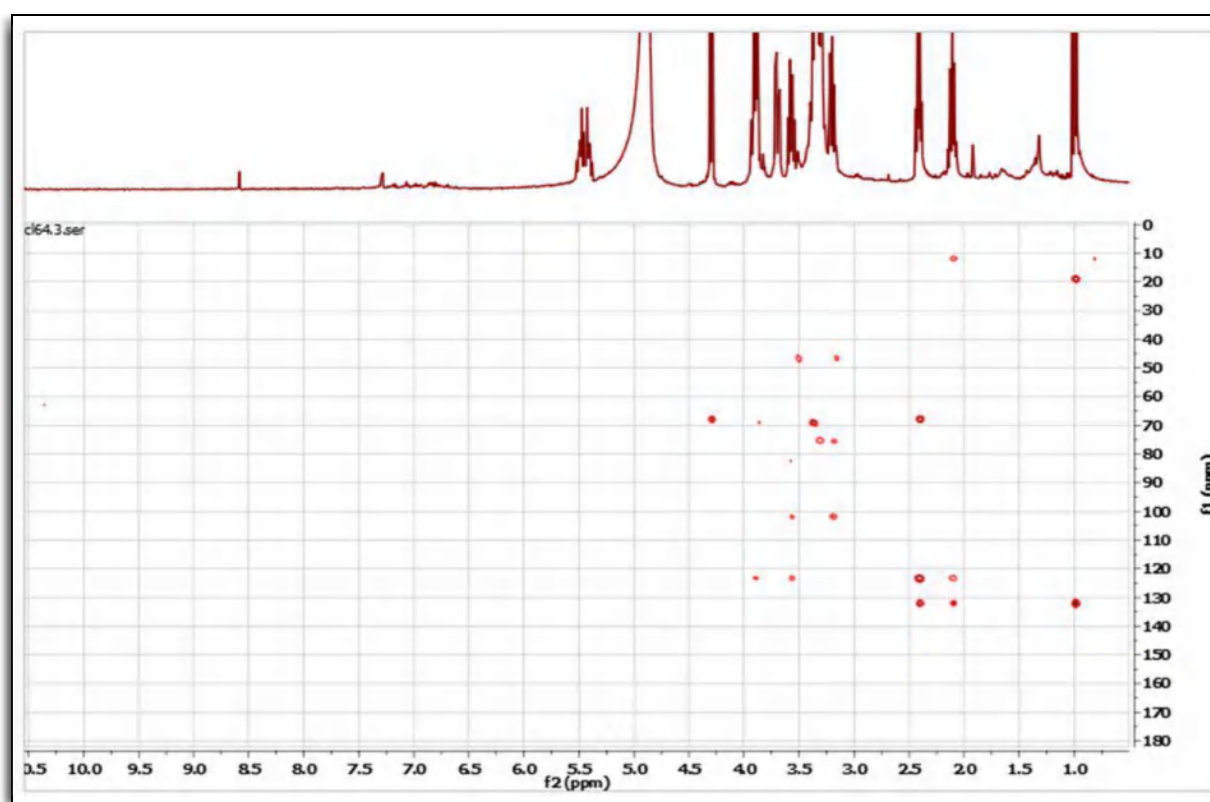


Figure III.93. Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé B-9

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de ce sucre qui est donc un hexose sont en faveur d'un groupement *O*- $\beta$ -D-glucopyranosyle [Agrawal 1992]. On retiendra donc, que cette molécule renferme un groupement *O*- $\beta$ -D-glucopyranosyle.

Sur le spectre HMBC, on relève une corrélation nette entre le proton anomérique H-1' du groupement *O*- $\beta$ -D-glucopyranosyle et le carbone d'un méthylène résonnant à  $\delta_C$  69,9 ppm ; cette observation indique que l'aglycone du composé **B-9** est substituée par l'entité sucre en cette position que nous noterons C-1. Les deux protons portés par C-1 résonnent à  $\delta_H$  3,58 (1H, dt,  $J = 9,3, 7,3$ , H-1b), 3,90 (1H, m, H-1a). Toujours sur le spectre HMBC, le carbone C-1 montre une corrélation avec les protons d'un groupement méthylène résonnant sous forme d'un quadruplet large à  $\delta_H$  2,41 ( $J = 7,0$  Hz). La valeur (7,0 Hz) de la constante de couplage relevée dans ce signal étant très proche d'une des constantes de couplage (7,3 Hz) relevées dans le signal de H-1b indique que les protons de ce méthylène sont en position vicinale par rapport à H-1b, en d'autres termes, il s'agit ici d'une corrélation HMBC en  $^2J$ . Nous attribuerons, ce méthylène à la position C-2. La résonance du carbone C-2 est relevée à  $\delta_C$  28,3 ppm.

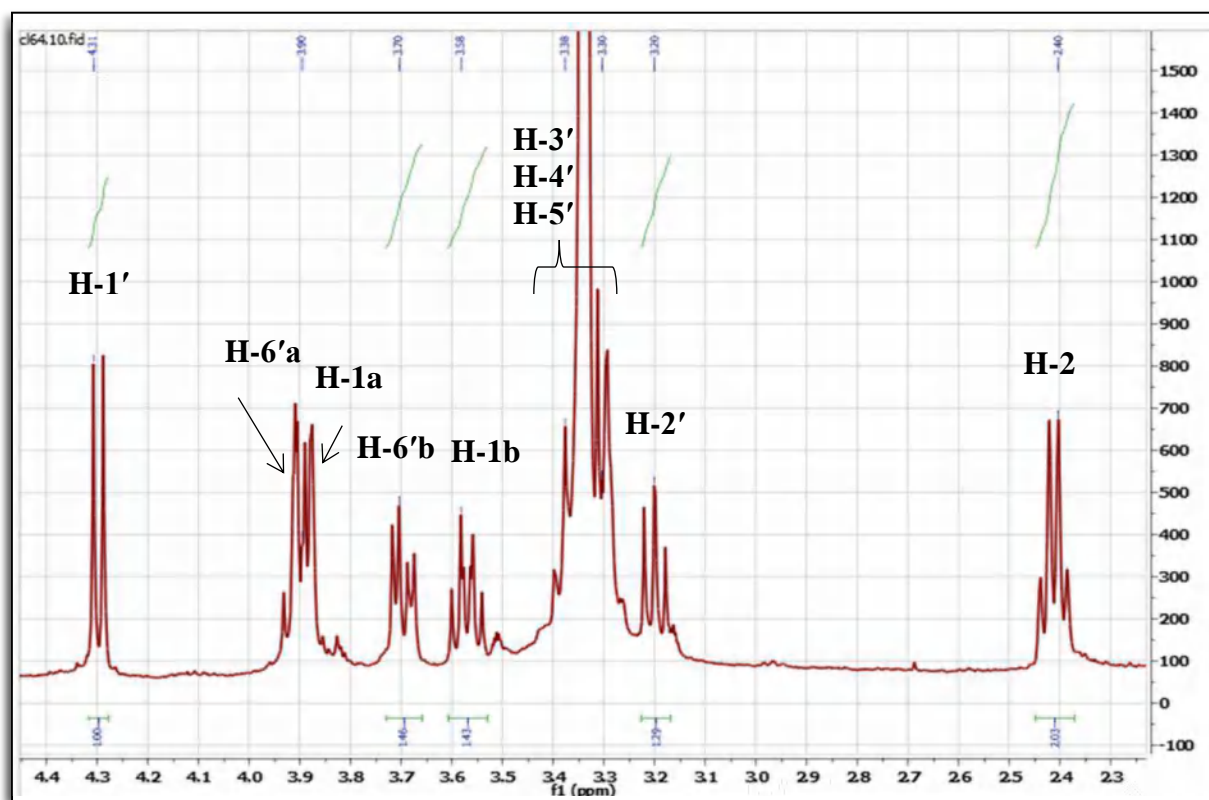


Figure III.94. Etallement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-9**

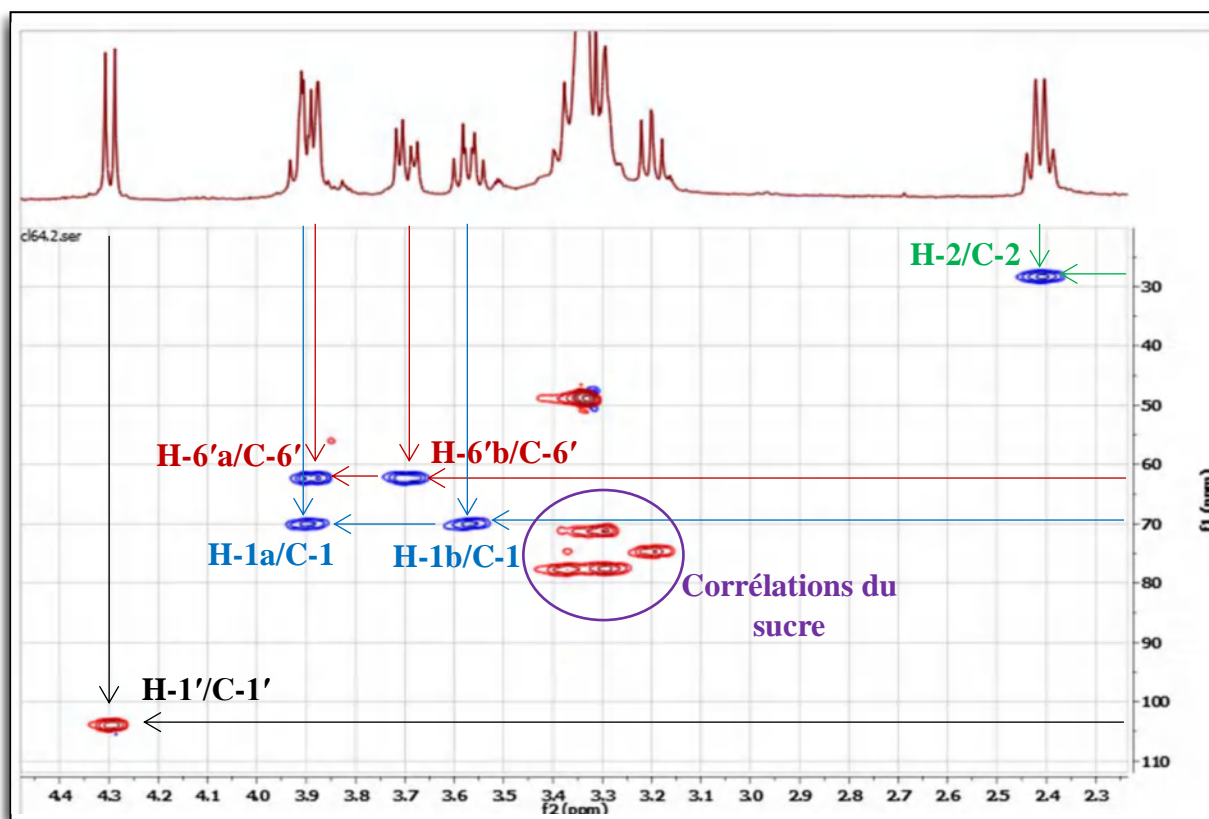


Figure III.95. Spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-9**

Le spectre HMBC montre également que les protons H-1a et H<sub>2</sub>-2 corrélient avec le carbone d'un méthine oléfinique résonnant à  $\delta_C$  125,6 ppm, il est évident que ce carbone ne peut être attribué qu'à la position C-3. Le signal de H-3 est relevé à  $\delta_H$  5,42 ppm sous forme d'un multiplet. Le signal du carbone C-4 délimitant cette double liaison est repéré à  $\delta_C$  134,1 ppm, il s'agit d'un autre méthine oléfinique dont le proton noté H-4 résonne à 5,49 ppm sous forme d'un multiplet. A noter que les déplacements chimiques de H-3 et H-4 étant très proches, leurs signaux montrent un effet de toit. On peut néanmoins relever dans les deux signaux une constante de couplage de 10,8 Hz entre H-3 et H-4 indiquant une configuration (Z) de la double liaison entre C-3 et C-4. Un réexamen du spectre HMBC permet de relever des corrélations entre C-4 et les protons isochrones du méthylène résonnant à  $\delta_H$  2,11 ppm sous forme d'un quadruplet large ( $J = 7,5$  Hz) et les protons d'un groupement méthyle résonnant à  $\delta_H$  1,00 ppm sous forme d'un triplet ( $J = 7,5$ ). Ces observations indiquent clairement que le groupement méthylène représente la position C-5 et le groupement méthyle représente la position C-6. Les résonances des carbones C-5 et C-6 sont relevées à  $\delta_C$  21,1 et 14,1 ppm, respectivement.

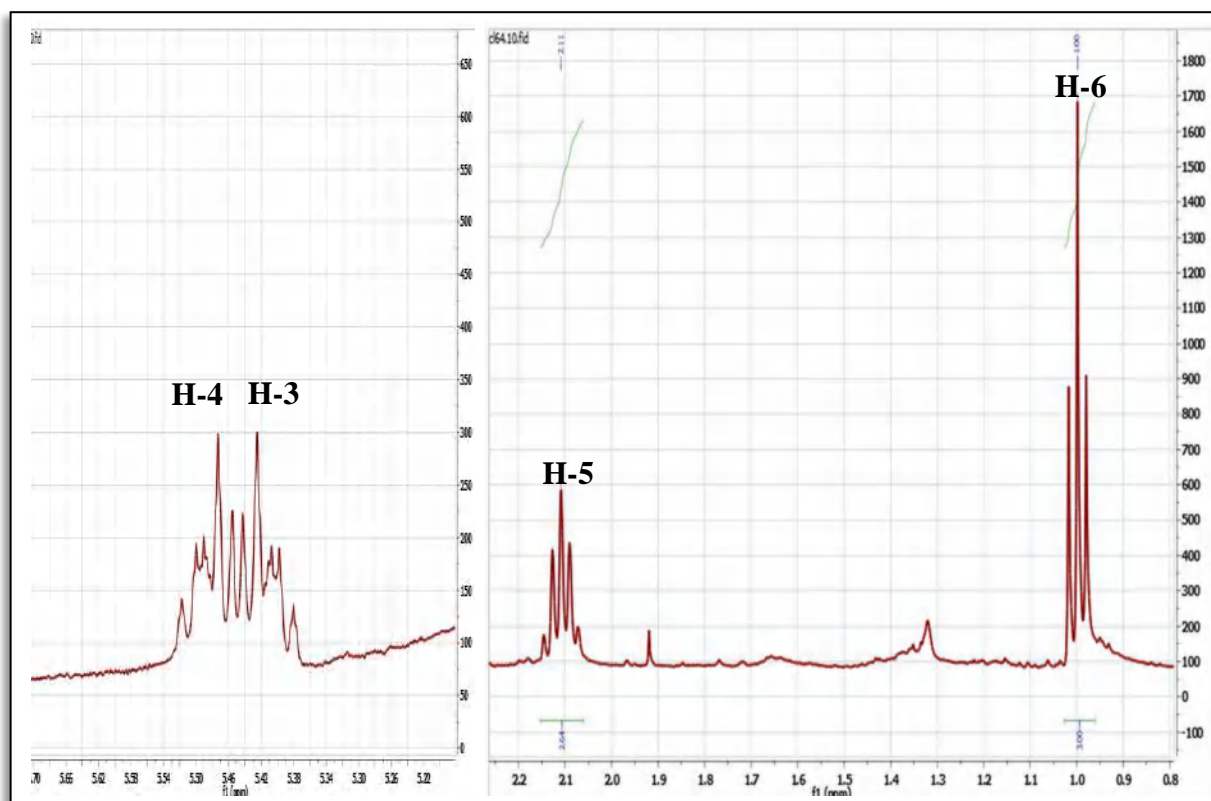


Figure III.96. Etalement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-9**

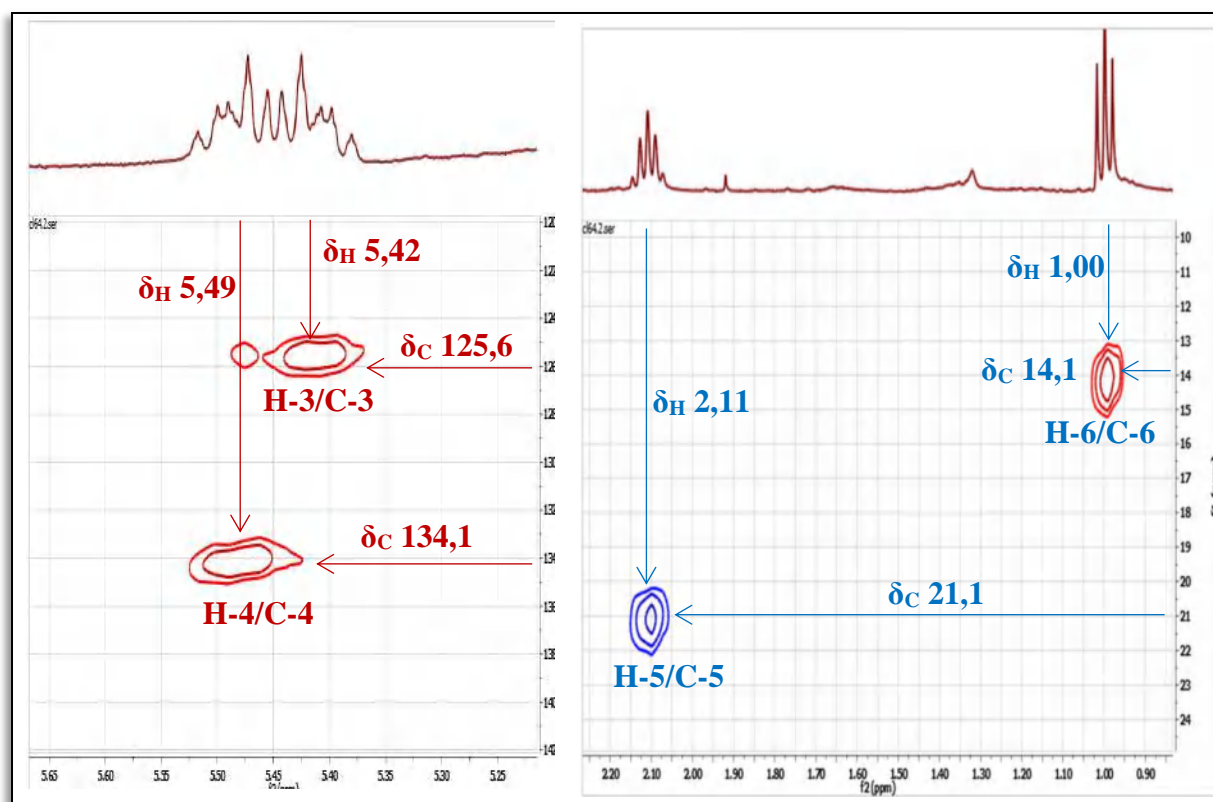
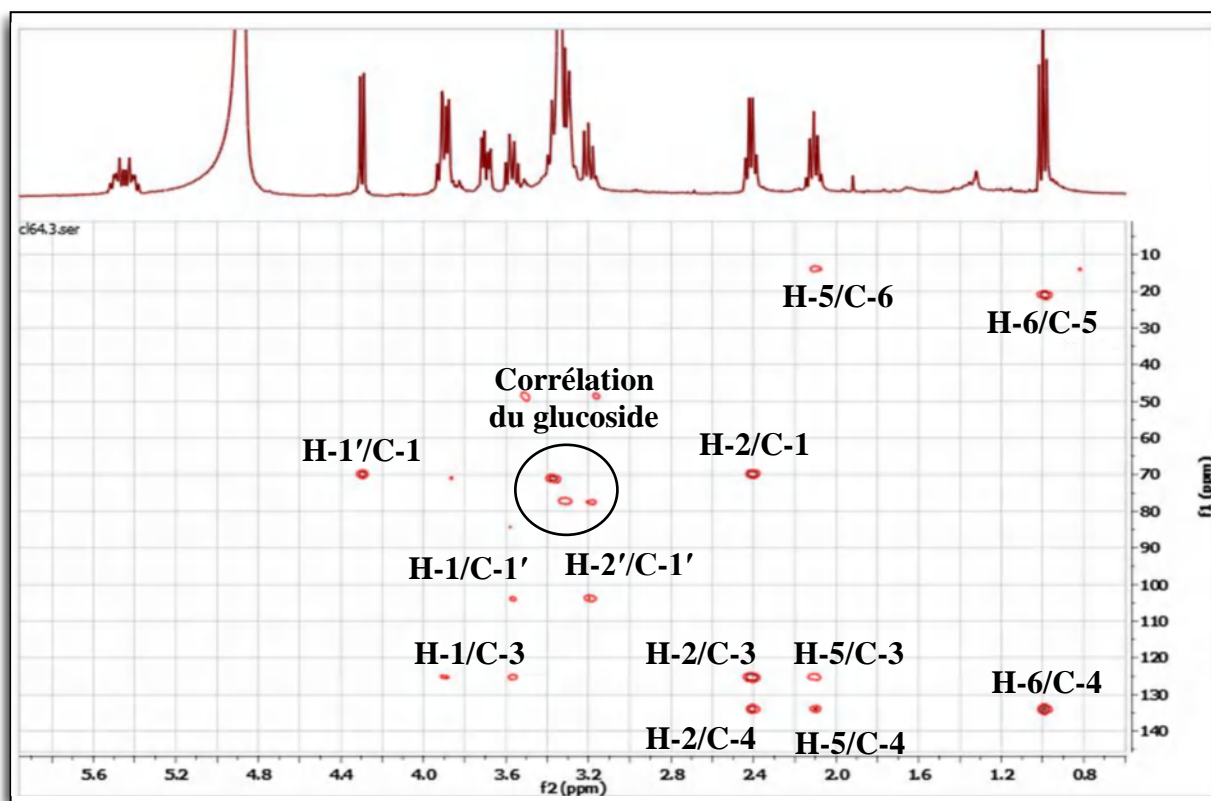
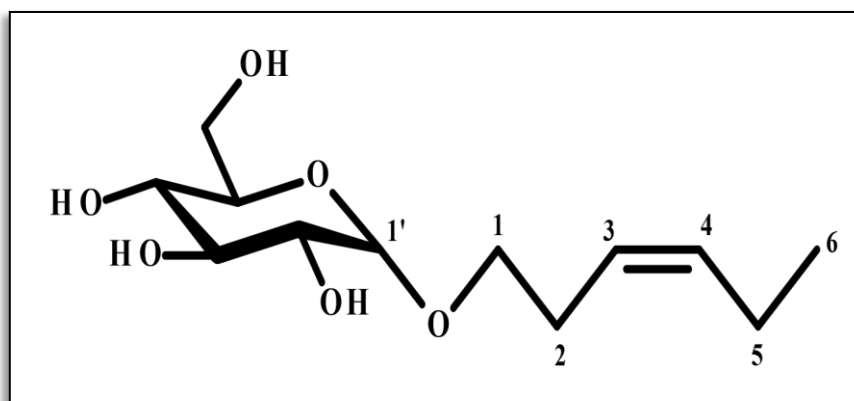


Figure III.97. Etalement du spectre HSQC (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-9**



**Figure III.98.** Etallement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé **B-9**

Les résultats spectroscopiques de cette analyse mènent, à la structure du composé **B-9** : **(Z)-3-hexenyl-O- $\beta$ -D-glucopyranoside** (Moon et al. 1996) (Figure III.99).



**Figure III.99.** Structure finale du composé **B-9** :  
**(Z)-3-hexenyl-O- $\beta$ -D-glucopyranoside**

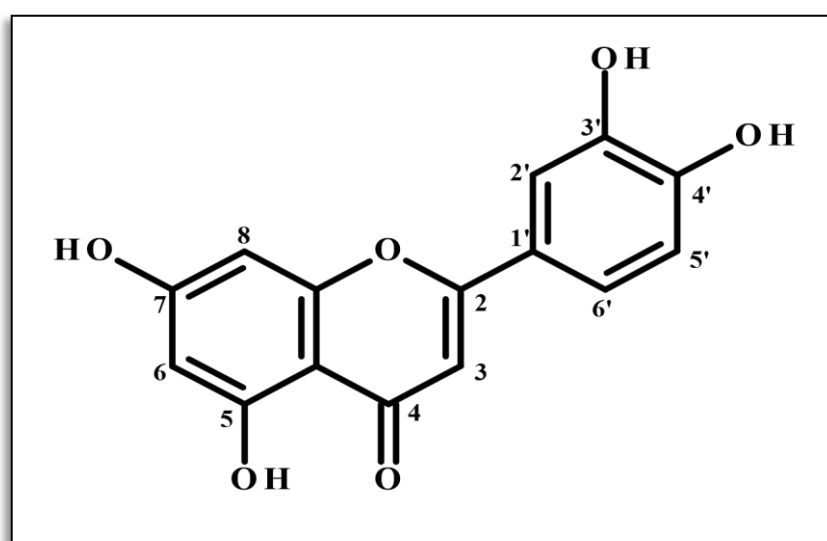
L'ensemble des données spectroscopiques sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau III.9. Données relatives aux spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC et HMBC du composé B-9

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégrations, multiplicités, $J$ (Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)*	HMBC (ppm)
1a	3,90	(1H, m)	69,9	-
1b	3,58	(1H, dt, $J = 9,3 ; 7,3$ )	69,9	C-1', C-3
2	2,41	(2H, ql, $J = 7,0$ )	28,3	C-1, C-3, C-4
3	5,42	(1H, m)	125,6	-
4	5,49	(1H, m)	134,1	-
5	2,11	(2H, ql, $J = 7,5$ )	21,1	C-3, C-4
6	1,00	(3H, t, $J = 7,5$ )	14,1	C-5, C-4
1'	4,30	(1H, d, $J = 7,8$ )	104,1	C-1
2'	3,20	(1H, dd, $J = 8,9 ; 7,8$ )	74,8	C-1, C-3
3'	3,38	-	77,7	-
4'	3,28	-	71,2	-
5'	3,28	-	77,8	-
6'a	3,85	(1H, m)	62,4	-
6'b	3,68	(1H, dd, $J = 11,9 ; 5,3$ )	62,4	-

\* $\delta$   $^{13}\text{C}$  (ppm) obtenus par la combinaison des données des spectres HSQC et HMBC

## II.10. Détermination structurale du composé A-10

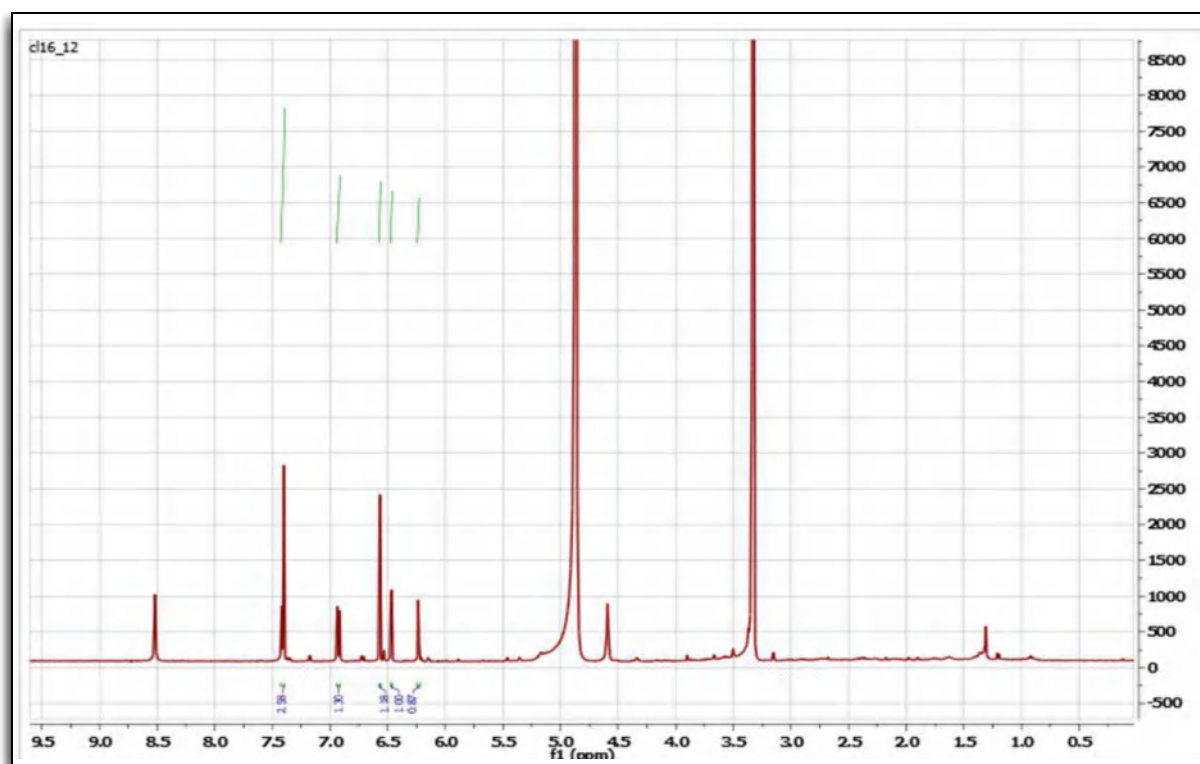




Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol et a une fluorescence noir violet sous lumière de Wood ( $\lambda = 365$  nm) laissant envisager une structure flavonique de types flavone ou flavonol 3-OR.

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.100) ainsi que le spectre étalé (Figure III.101) montrent la présence de signaux caractéristiques d'un flavonoïde de type flavone que l'on peut identifier par :

- un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  6,56 ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure de type flavone.
- deux doublets d'intégration 1H, le premier à  $\delta_{\text{H}}$  6,23 ppm, le second à  $\delta_{\text{H}}$  6,46 ppm avec une constante de couplage  $J = 2,1$  Hz (couplage méta), attribuables à H-6 et H-8 respectivement, indiquant ainsi un noyau A disubstitué en position C-5 et C-7.



**Figure III.100.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **A-10**



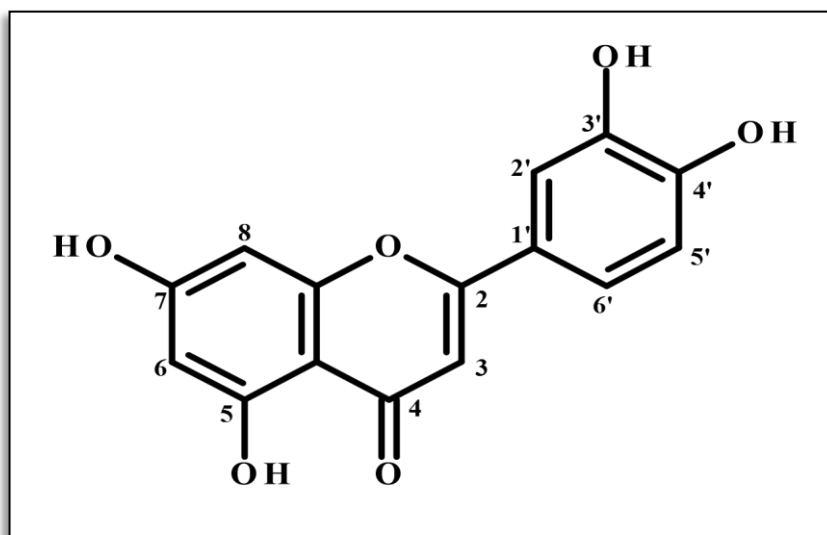


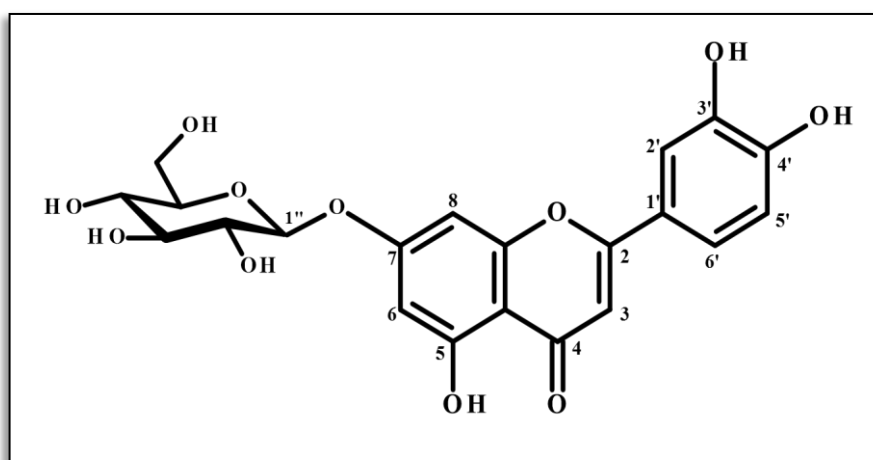
Figure III.102. Structure du composé A-10 : lutéoline

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau III.10.

Tableau III.10. Données relatives au spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé A-10

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)
3	6,56	(1H, s)
6	6,23	(1H, d, $J = 2,1$ )
8	6,46	(1H, d, $J = 2,1$ )
2'	7,40	(1H, d, $J = 2,2$ )
5'	6,92	(1H, d, $J = 8,6$ )
6'	7,42	(1H, dd, $J = 8,6 ; 2,2$ )

### II.11. Détermination structurale du composé B-11



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol et a une fluorescence noir violet sous lumière de Wood ( $\lambda = 365$  nm) laissant envisager une flavone.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.103) ainsi que le spectre étalé (Figure III.104) permettent d'observer des signaux entre 6 et 8 ppm caractéristiques des noyaux aromatiques d'un flavonoïde, ainsi que l'apparition de signaux entre 3,36 ppm et 5,10 ppm caractéristiques d'une entité sucre. On relève en effet,

- deux doublets d'intégration 2H chacun, le premier à  $\delta_{\text{H}}$  7,92 ppm et le second à  $\delta_{\text{H}}$  6,94 ppm avec une constante de couplage  $J = 8,8$  Hz due à un couplage ortho, attribués aux protons H-2' et H-6', H-3' et H-5' respectivement, indiquant un noyau B parasubstitué.
- deux doublets d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  6,52 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  6,89 ppm avec une constante de couplage  $J = 2,0$  Hz due à un couplage méta, attribués aux protons H-6 et H-8 respectivement, indiquant un noyau A substitué dans les positions 5 et 7.
- un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  6,67 ppm attribuable au proton H-3.
- des signaux caractéristiques des protons du sucre à :
  - $\delta_{\text{H}}$  3,36 ppm, 3,57 ppm, 3,66 ppm, et 3,90 ppm attribuables aux protons H-4'', H-2'', H-3'' et H-5'', respectivement
  - $\delta_{\text{H}}$  4,08 ppm, un doublet de doublets d'intégration 1H ( $J = 11,5 ; 6,0$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  4,17 ppm un autre doublet de doublets d'intégration 1H ( $J = 11,5 ; 4,4$  Hz), attribuables à H-6''b et H-6''a respectivement.
  - $\delta_{\text{H}}$  5,10 ppm, un signal sous forme d'un doublet ( $J \sim 7$  Hz) partiellement recouvert par le signal de l'eau de contamination du méthanol- $d_4$ , attribuable au proton anomérique H-1''.

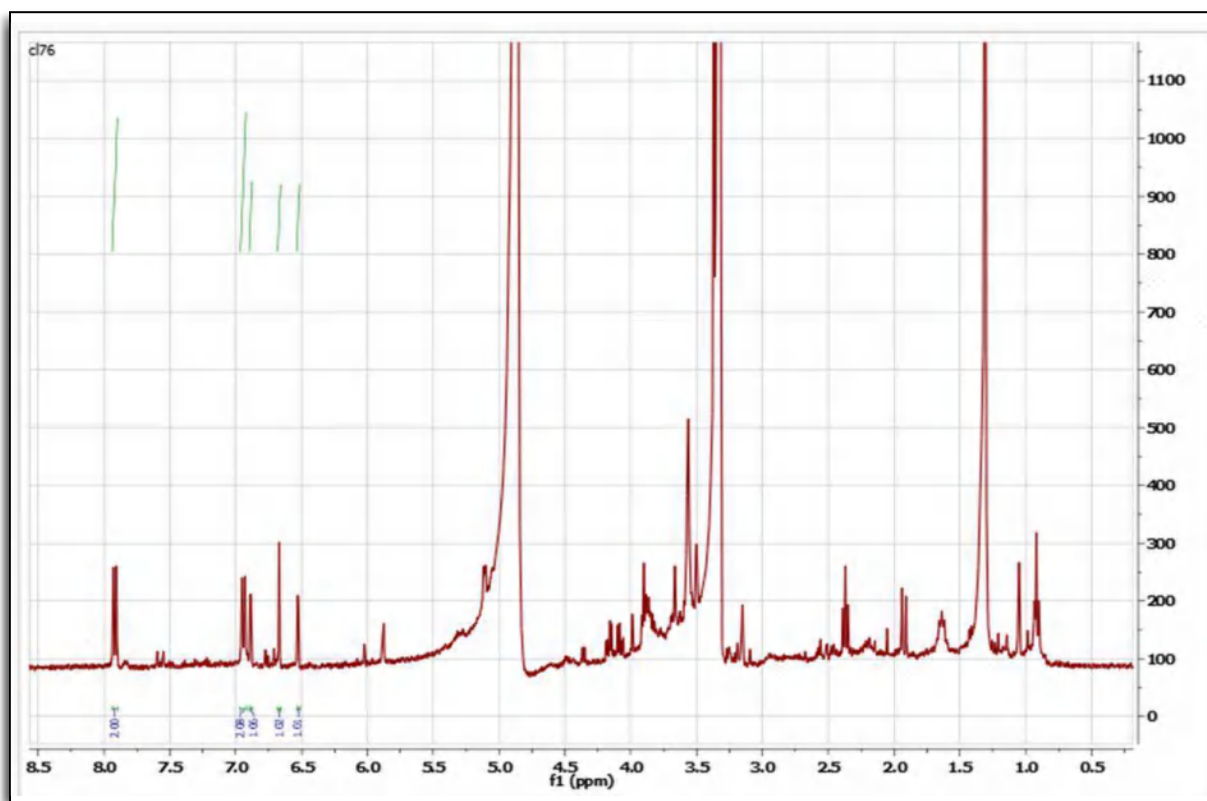


Figure III.103. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-11**

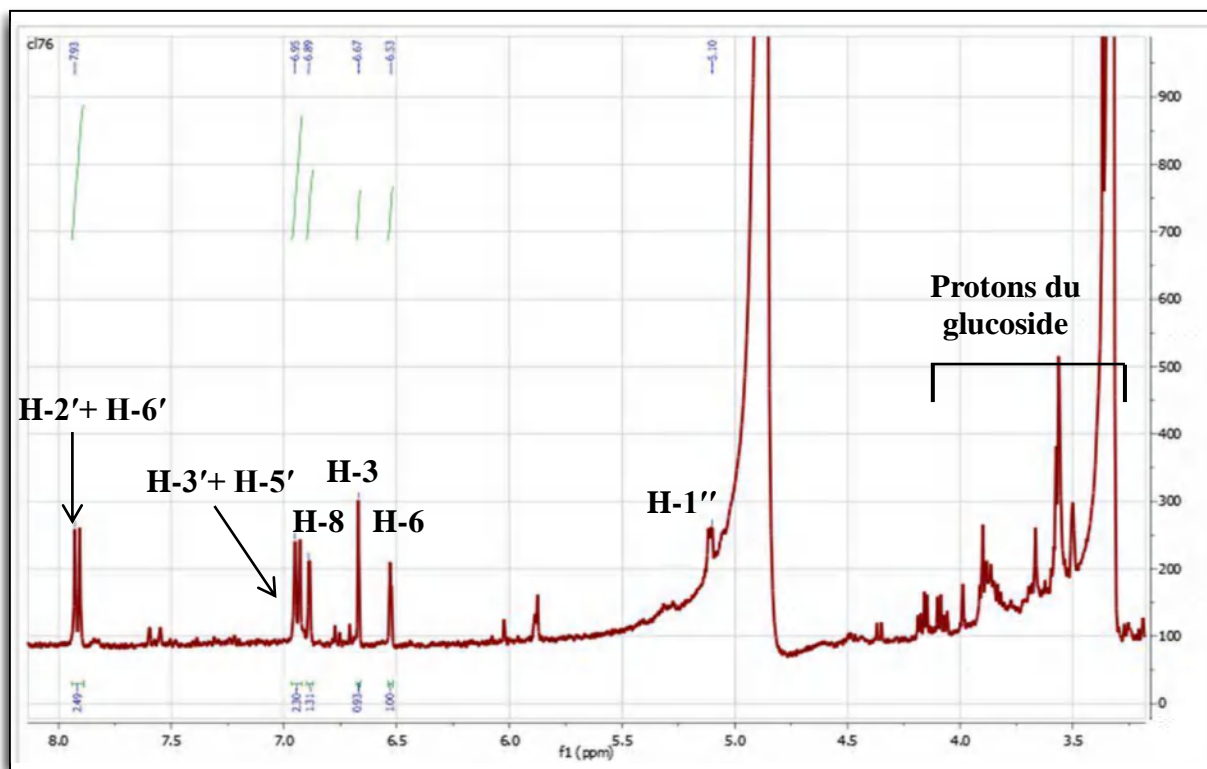


Figure III.104. Etalement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **B-11**

A ce stade de notre analyse, il apparaît clairement que nous sommes en présence de l'**apigénine** substituée par un groupement **O-β-glycopyranoside**. Il ne nous reste plus qu'à déterminer la nature de notre sucre et localiser ce substituant qui sera soit en C-5, soit en C-7 soit en C-4' du squelette de notre aglycone l'apigénine.

La nature du sucre présent dans cette molécule a été déterminée par hydrolyse acide. En effet, dans un tube à essai, un échantillon de 3 à 5 mg de ce produit est additionné d'une solution d'acide chlorhydrique 6% (environ 10 mL) et chauffé dans un bain-marie pendant 45 minutes. Après refroidissement, la solution est extraite à l'éther éthylique. La phase organique contenant l'aglycone est séchée puis évaporée et conservée pour vérifier au besoin sa structure. La phase aqueuse est concentrée et co-chromatographiée avec des sucres authentiques. Dans notre cas, le  $R_f$  relevé pour ce sucre était parfaitement identique à celui du glucose.

La position du groupement **O-β-glucopyranoside** sur le squelette apigénine a été mise en évidence par l'enregistrement et l'analyse de la série spectrale UV-Vis. En effet, l'étude de la série spectrale UV (Figure III.103) montre :

- Le maximum d'absorption de la bande I à 333 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +48$  nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse (effet hyperchrome) indique la présence d'un OH libre en position 4'.
- L'absence d'une nouvelle bande dans ce même spectre entre 320-335 nm révèle l'absence d'un OH libre en position 7.
- L'absence de déplacement bathochrome de la bande II en présence de NaOAc confirme l'absence d'un OH libre en position 7.
- Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu (MeOH+AlCl<sub>3</sub>) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ( $\Delta\lambda = +49$  nm) indique la présence d'un OH libre en 5.
- L'absence du déplacement hypsochrome de la bande I en comparant les spectres AlCl<sub>3</sub> + HCl et AlCl<sub>3</sub>, laisse prévoir l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B. Ceci est confirmé par le spectre en présence de NaOAc et d'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) qui ne montre aucun déplacement bathochrome de la bande I.

A l'issue de cette analyse, il est clair que le groupement *O*- $\beta$ -glucopyranoside est en position C-7.

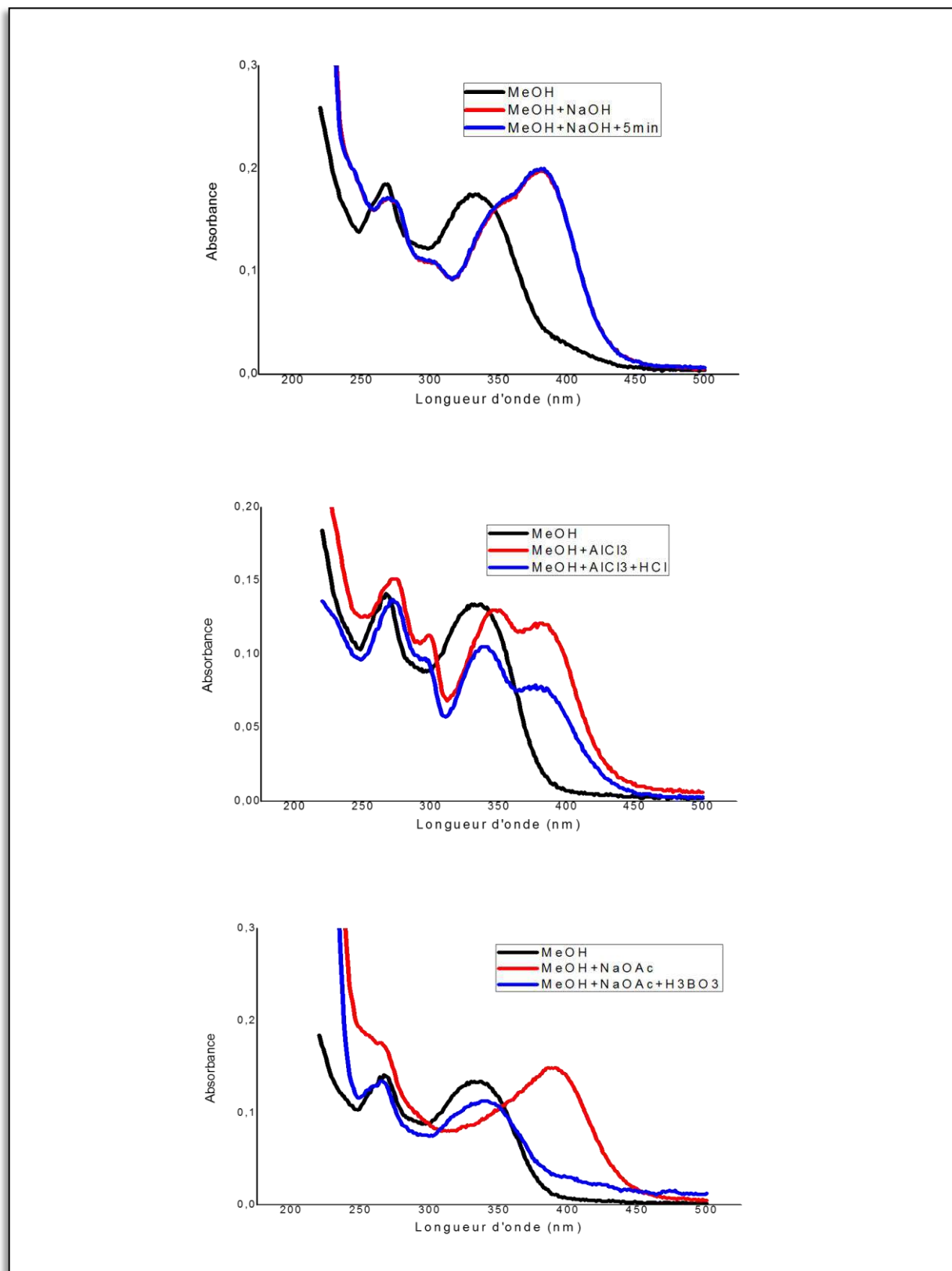


Figure III.105. Série spectrale UV du composé B-11

Tableau III.11. Données de la série UV-Vis du composé B-11

Réactifs	Bande I	Autres bande	Bande II	Commentaires
MeOH	333	/	267	flavone ou flavonol substitué en 3
+NaOH	381	/	270	OH libre en 4'
+NaOH+5min	381	/	270	Stable
+AlCl <sub>3</sub>	382	/	273	Pas de ortho di-OH sur le cycle B OH en 5
+AlCl <sub>3</sub> /HCl	382	/	271	
+NaOAc	389	307	265	Absence OH en 7
+NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	337	/	265	Pas de ortho di-OH sur B et A

Ces données permettent d'établir la structure de l'**apigénine -7-O-β- glucopyranoside** (Figure III.106). Il s'agit d'une flavone, plus précisément un hétéroside, isolée antérieurement de *Centaurea furfuracea* (Akkal et al. 2003). Cette molécule est isolée pour la première fois de l'espèce *Volutaria lippii*.

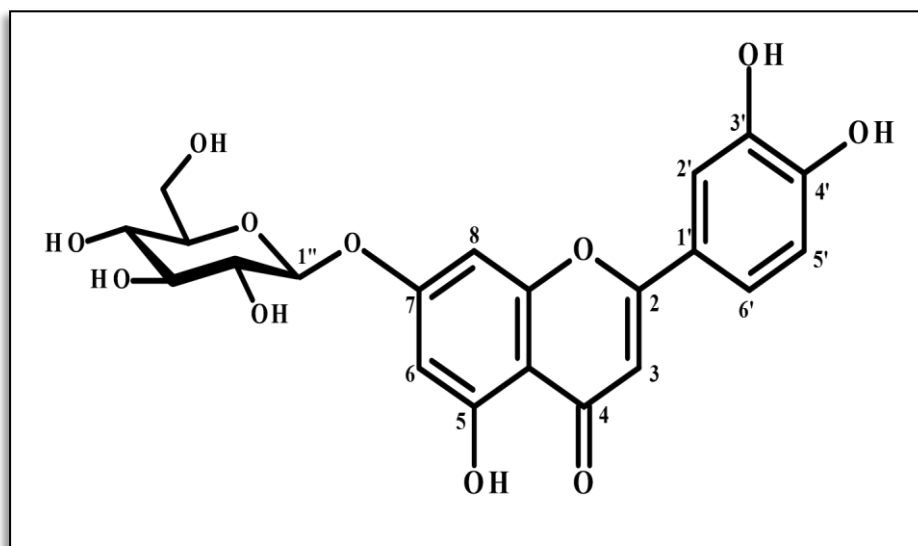


Figure III.106. Structure du composé B-11 :  
apigénine-7-O-β-glucopyranoside

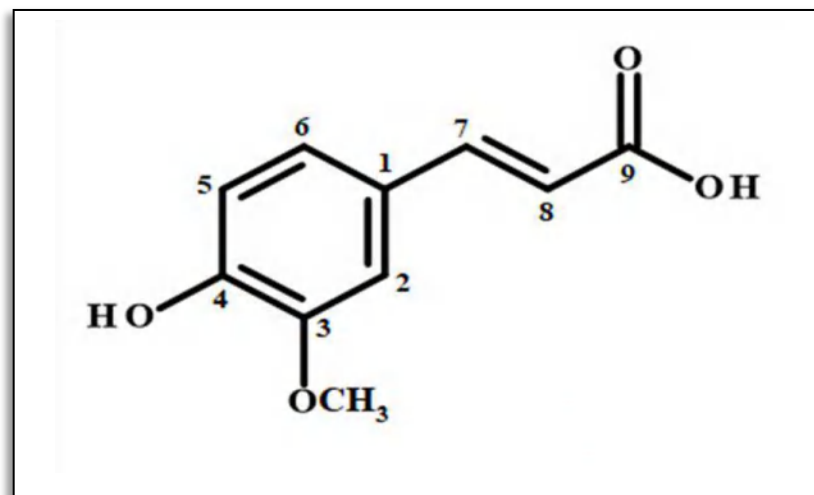


L'ensemble de ces données relatives au spectre RMN  $^1\text{H}$  est reporté dans le tableau III.12.

**Tableau III.12.** Données relatives au spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **B-11**

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)
3	6,67	(1H, s)
6	6,52	(1H, d, $J = 2,0$ )
8	6,89	(1H, d, $J = 2,0$ )
2' et 6'	7,92	(2H, d, $J = 8,8$ )
3' et 5'	6,94	(2H, d, $J = 8,8$ )
1''	5,10	(1H, d, $J \sim 7$ )
2''	3,57	(1H)
3''	3,66	(1H)
4''	3,36	(1H)
5''	3,90	(1H)
6''a	4,17	(1H, dd, $J = 11,5 ; 4,4$ )
6''b	4,08	(1H, dd, $J = 11,5 ; 6,0$ )

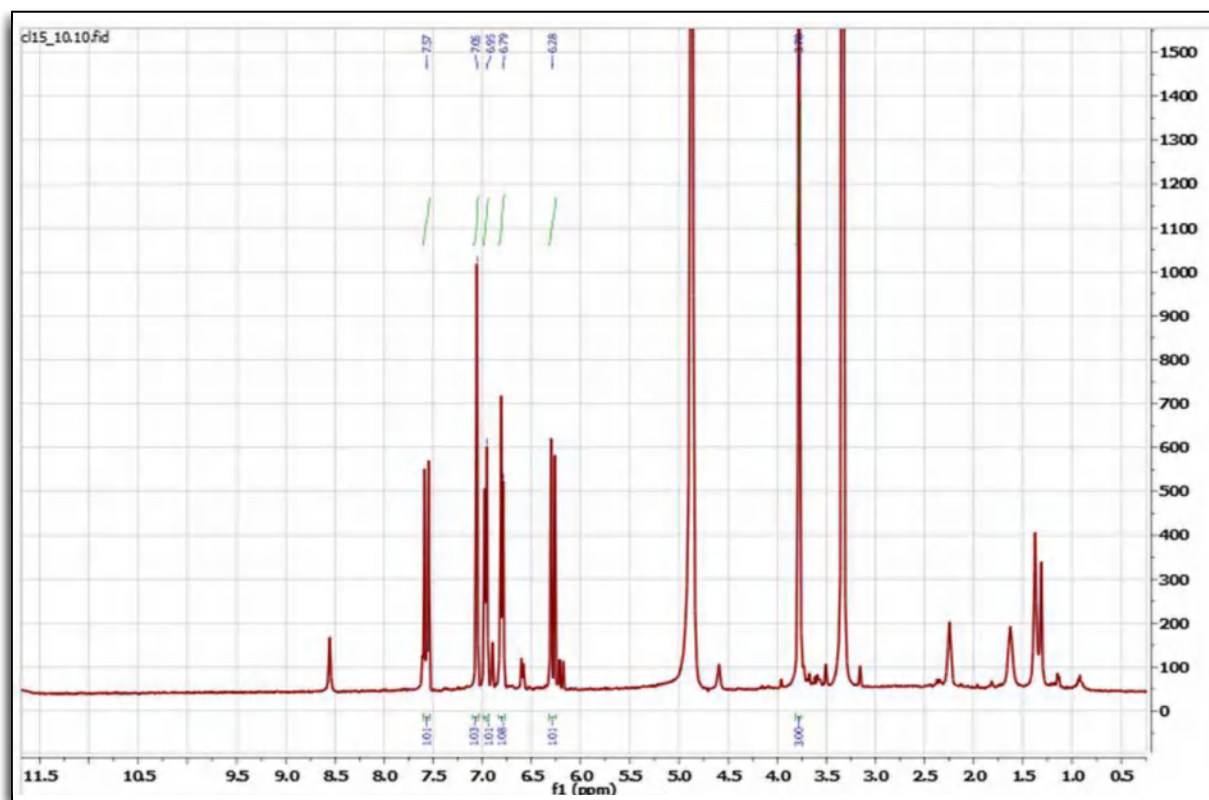
## II.12. Détermination structurale du composé A-12



Le composé **A-12** donne une fluorescence bleue sous lampe de Wood ( $\lambda = 365$  nm), suggérant une structure d'un acide phénolique.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figures III.107,108) montre des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique tri-substitué dans les positions 1, 3 et 4, avec notamment :

- Un singlet d'intégration 3H résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  3,78 ppm indiquant un groupement méthoxyle.
- Un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  6,79 ppm ( $J = 8,0$  Hz ; 1H) et un singlet large à  $\delta_{\text{H}}$  7,05 ppm (1H) attribuables à H-5 et H-2 respectivement.
- Un doublet large à  $\delta_{\text{H}}$  6,96 ppm ( $J = 8,0$  Hz ; 1H) attribuable à H-6.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_{\text{H}}$  6,28 ppm ( $J = 15,9$  Hz) et le second à  $\delta_{\text{H}}$  7,56 ppm ( $J = 15,9$  Hz), les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage de ces noyaux indiquent clairement la présence d'une double liaison éthylénique de configuration *trans* dans la molécule. Ce système de spins est caractéristique des groupements de type cinnamique rencontrés dans les acides phénoliques.



**Figure III.107.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé A-12

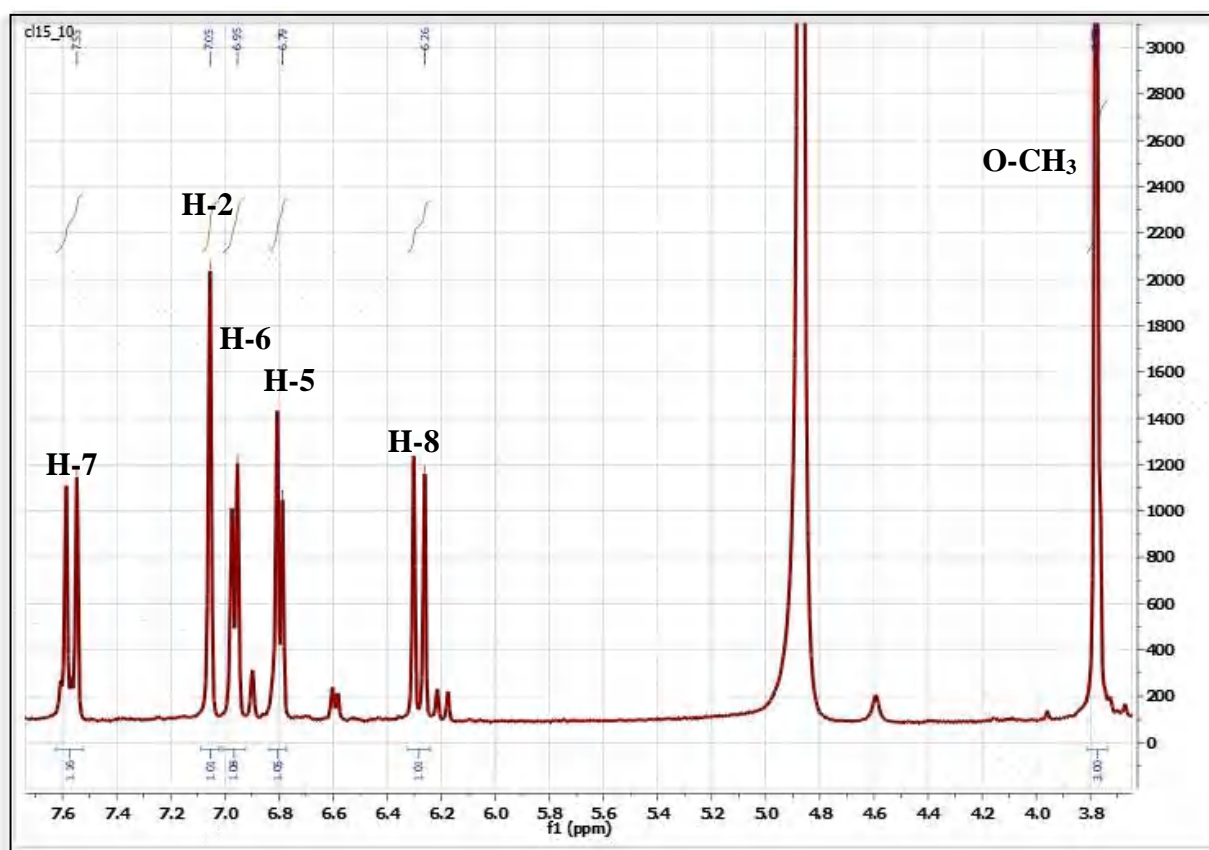


Figure III.108. Etalement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé A-12

L'ensemble de ces données spectrales, et par comparaison avec la littérature, montre qu'il s'agit de l'**acide férulique** (Sajjadi et al. 2012).

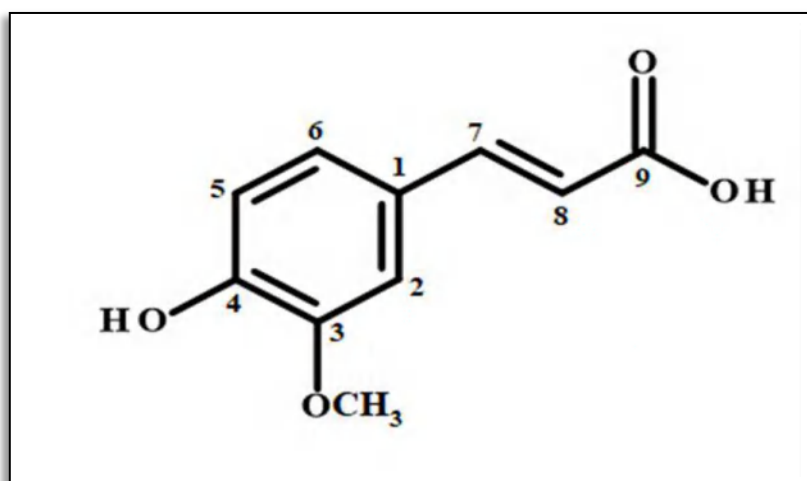


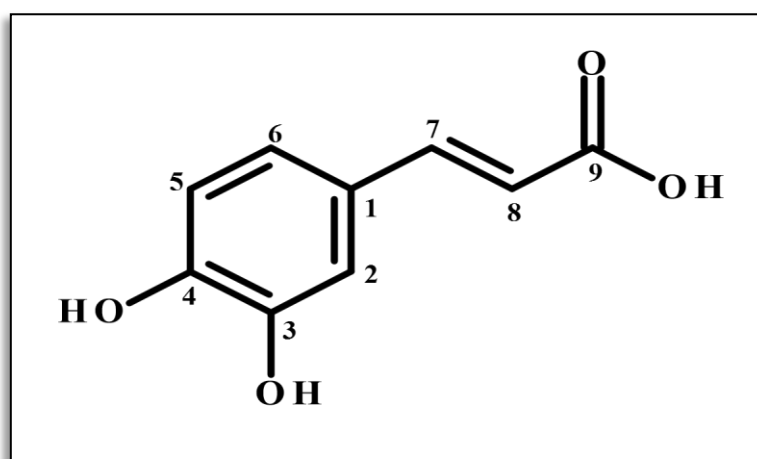
Figure III.109. Structure du composé A-12 :  
**acide férulique**

L'ensemble des données RMN, est reporté dans le tableau III.13.

**Tableau III.13.** Données relatives au spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **A-12**

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégration, multiplicité, $J$ (Hz)
O-CH <sub>3</sub>	3,78	(3H, s)
2	7,05	(1H, sl)
5	6,79	(1H, d, $J = 8,0$ )
6	6,96	(1H, dl, $J = 8,0$ )
7	7,56	(1H, d, $J = 15,9$ )
8	6,28	(1H, d, $J = 15,9$ )

### II.13. Détermination structurale du composé A-13



Le composé **A-13** donne, également, une fluorescence bleue sous lumière de Wood ( $\lambda = 365$  nm), suggérant une structure d'acide phénolique.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figures III.110,111) montre une similitude avec celui du produit **A-12** en remarquant l'absence du pic du groupement méthoxyle, des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique tri-substitué dans les positions 1, 3 et 4, avec notamment :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_{\text{H}} 6,79$  ppm dont la constante de couplage ( $J = 8,2$  Hz) est caractéristique d'un couplage *ortho*, et l'autre à  $\delta_{\text{H}} 7,05$  ppm dont la constante de couplage ( $J = 1,8$  Hz) est caractéristique d'un couplage *méta*, attribuables de ce fait à H-5 et H-2 respectivement.

- Un doublet dédoublé d'intégration 1H, à  $\delta_H$  6,94 ppm où l'on relève des constantes de couplage ( $J = 8,2 ; 1,8$  Hz) caractéristiques de couplages (*ortho* et *mé*ta), attribuable de à H-6.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à  $\delta_H$  6,24 ppm et le second à  $\delta_H$  7,51 ppm, montrant une constante de couplage ( $J = 15,9$  Hz) caractéristique d'un couplage entre deux protons d'une double liaison de configuration *trans*. Ces protons sont attribuables de ce fait, à H-8 et H-7 respectivement.

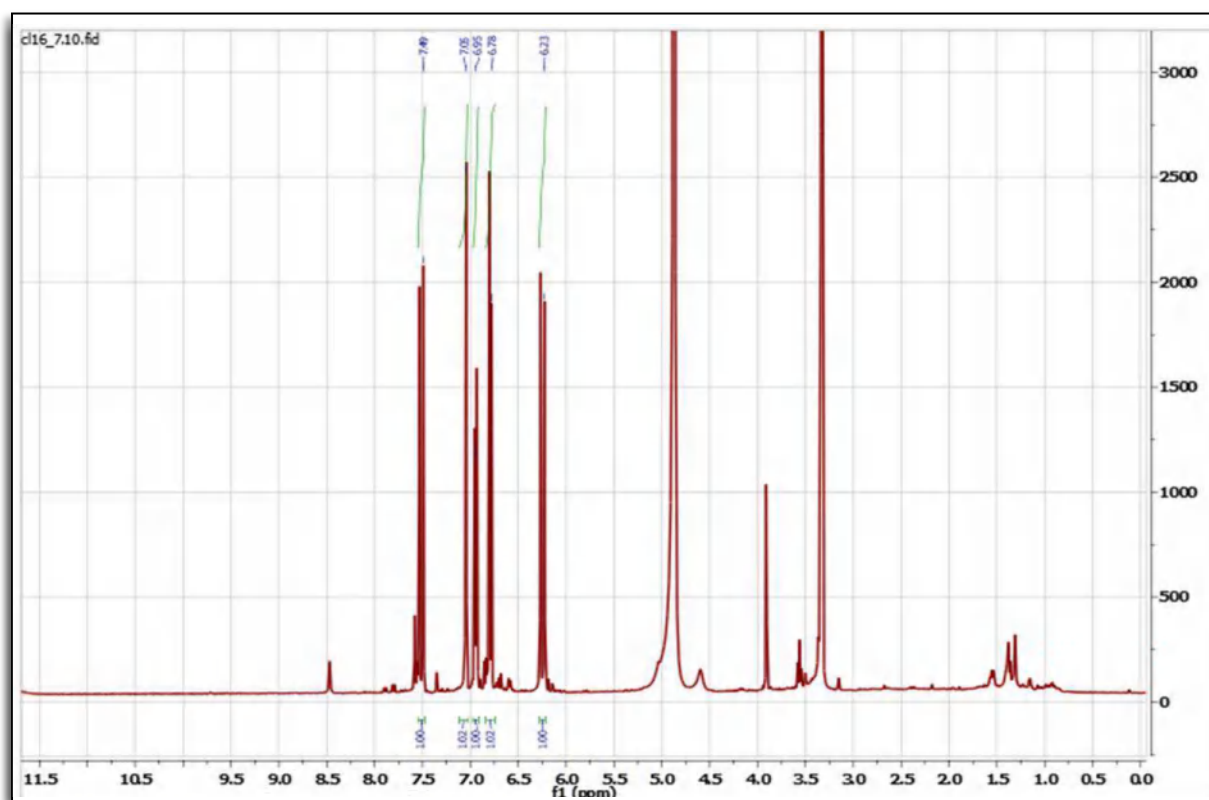
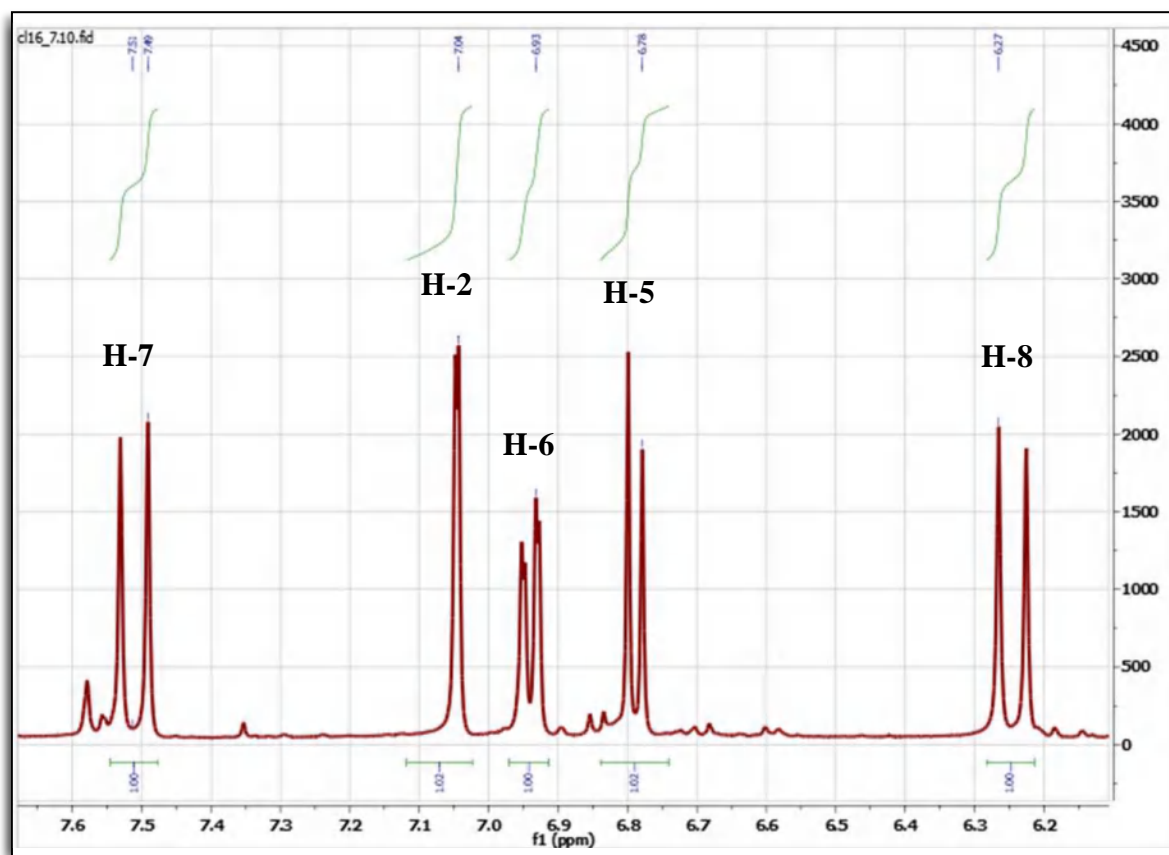
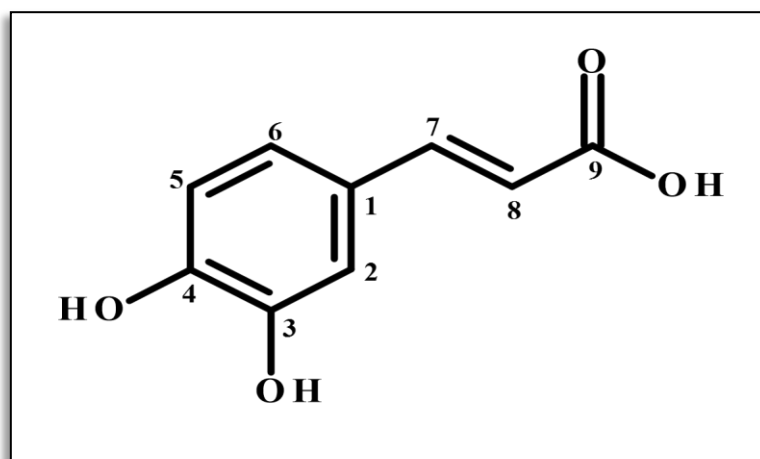


Figure III.110. Spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé A-13



**Figure III.111.** Etalement du spectre RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) du composé **A-13**

L'ensemble de ces données spectrales, et par comparaison avec la littérature, montre qu'il s'agit de l'**acide caféique** (Lemoui et al. 2018) (Figure III.112).



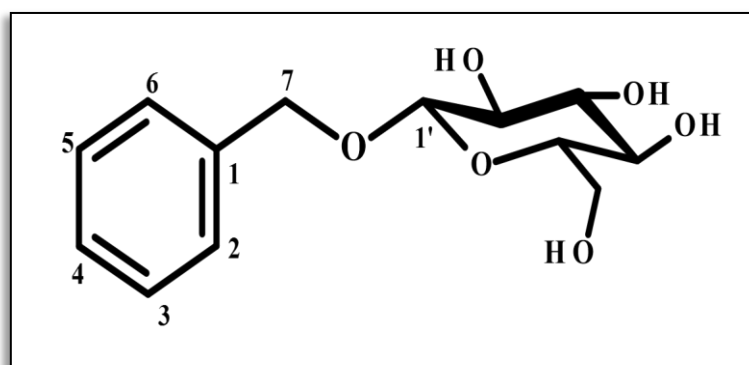
**Figure III.112.** Structure du composé **A-13** :  
**acide caféique**

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau III.14.

**Tableau III.14.** Données relatives au spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé A-13

Position	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	Intégrations, multiplicités, $J$ (Hz)
2	7,05	(1H, d, $J = 1,8$ )
5	6,79	(1H, d, $J = 8,2$ )
6	6,94	(1H, dd, $J = 8,2 ; 1,8$ )
7	7,51	(1H, d, $J = 15,9$ )
8	6,24	(1H, d, $J = 15,9$ )

## II.14. Détermination structurale du composé B-14



L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III.113) et le spectre relatif à l'expérience HSQC (Figure III.114) (400 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) montrent la présence de signaux caractéristiques d'un noyau aromatique mono-substitué dont :

- Un signal d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}}$  7,45 ppm sous forme d'un doublet large ( $J = 7,1$  Hz), attribuables aux protons H-2 et H-6. Sur le spectre HSQC, la résonance commune des carbones C-2 et C-6 est relevée à  $\delta_{\text{C}}$  128,9 ppm,
- Un triplet large d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  7,31 ppm ( $J = 7,1$  Hz) attribuable à H-4, le signal du carbone C-4 est localysé à  $\delta_{\text{C}}$  128,5 ppm,
- Un signal d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}}$  7,36 ppm sous forme d'un triplet ( $J = 7,1$  Hz) attribuable aux protons H-3 et H-5. Sur le spectre HSQC, la résonance commune des carbones C-3 et C-5 est relevée à  $\delta_{\text{C}}$  128,8 ppm,

- Deux doublets d'intégration 1H chacun et formant un système AM à  $\delta_H$  4,70 ppm et  $\delta_H$  4,96 ppm ( $J = 11,8$  Hz). Ces deux protons sont portés par le même carbone résonnant à  $\delta_C$  71,5 ppm, ce qui est attendu vu la valeur de leur interaction de couplage. Vu les valeurs de leurs déplacements chimiques, il s'agit d'un groupement méthylène oxygéné  $CH_2-O$ . Sur le spectre HMBC, les protons de ce méthylène montre des taches de corrélation avec les carbones C-2 et C-6 du noyau aromatique, cette corrélation permet de placer ce groupement oxyméthylène en C-1 de ce noyau aromatique dont la résonance est localisée à  $\delta_C$  138,6 ppm grâce à l'analyse de ce spectre HMBC. Ces deux protons seront alors notés H-7b et H-7a, respectivement et leur carbone porteur C-7.

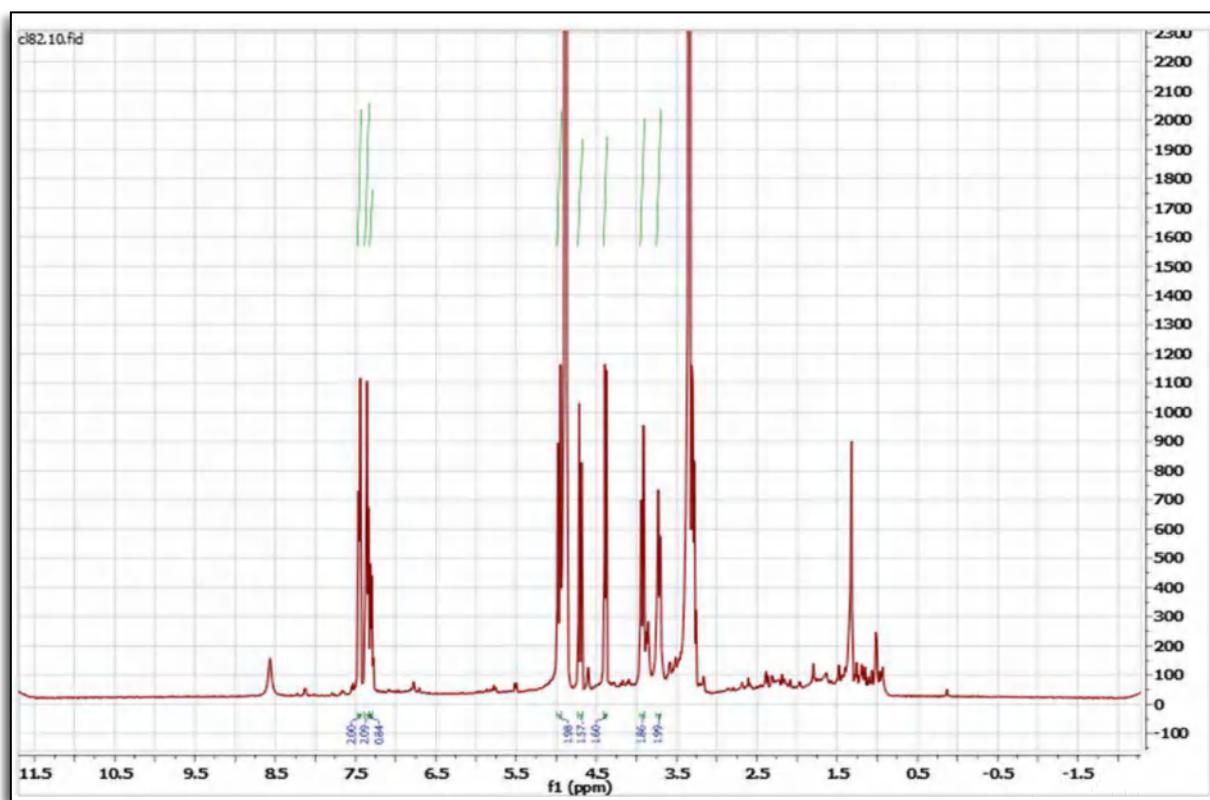


Figure III.113. Spectre RMN  $^1H$  (400 MHz,  $MeOH-d_4$ ) du composé **B-14**



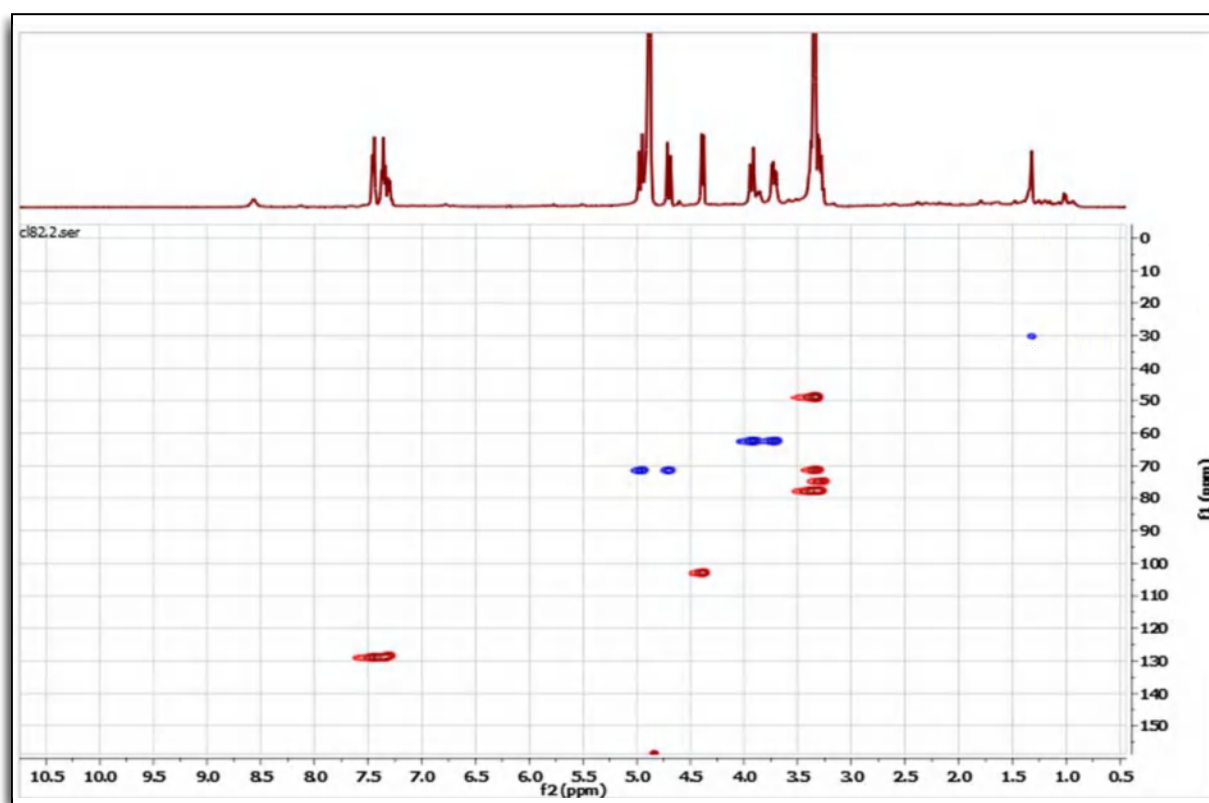


Figure III.114. Spectre HSQC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé B-14

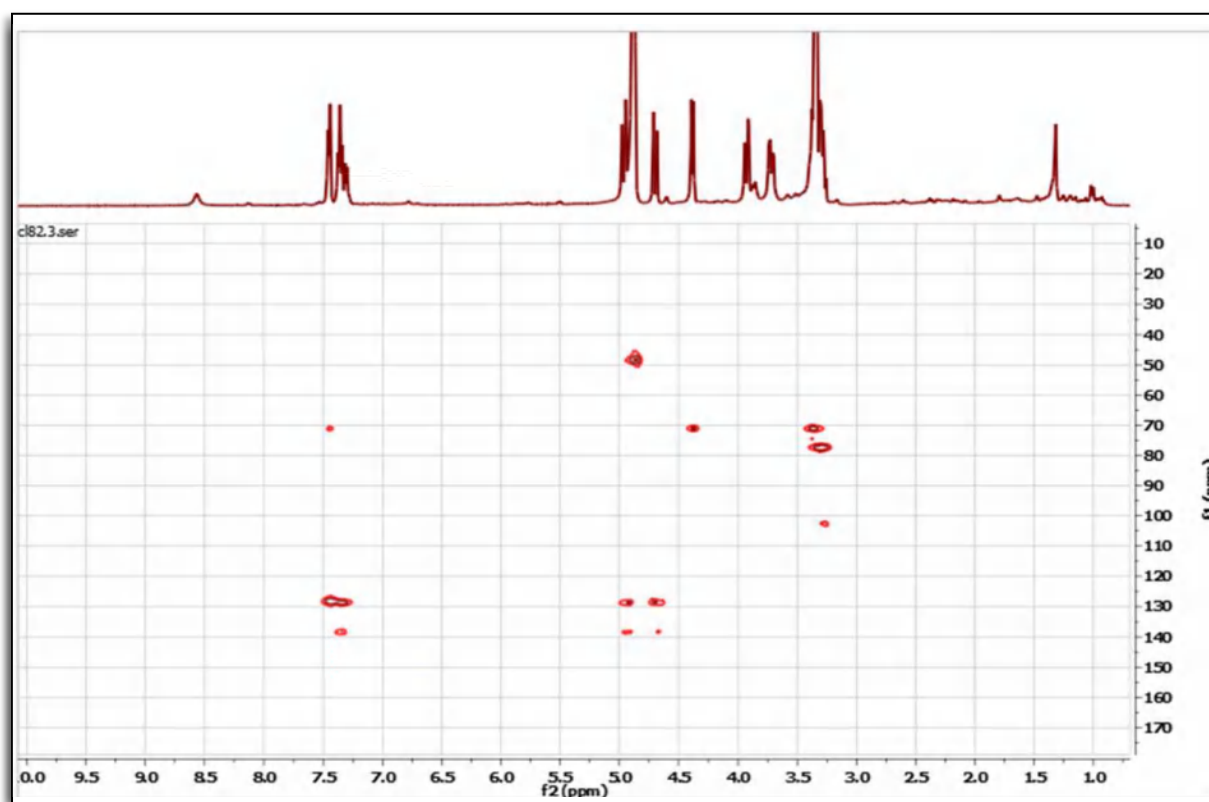


Figure III.115. Spectre HMBC (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé B-14

Par ailleurs les spectres proton et HSQC montrent :

- Un doublet à  $\delta_H$  4,38 ppm d'intégration 1H ( $J = 7,7$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC au carbone résonnant à  $\delta_C$  103,0 ppm, orientant vers la présence d'une entité sucre dans cette molécule, où ce méthine serait la position anomérique ( $\delta_{H-1'}$  4,38 et  $\delta_{C-1'}$  103,0). A ce stade, vu les valeurs des déplacements chimiques des noyaux de la position anomérique et vu la valeur de la constante de couplage relevée dans le signal de H-1', on en déduit la présence d'un groupement  $-O-\beta$ -glycosidique. Ce groupement sera attaché au méthylène précédemment annoncé (C-7), vu la corrélation présente sur le spectre HMBC, entre C-1' et les protons H-7a et H-7b.
- Deux doublets de doublets d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  3,72 ppm ( $J = 11,9 ; 5,4$  Hz) et  $\delta_H$  3,93 ppm ( $J = 11,9 ; 1,8$  Hz) ppm attribuables à H-6'b et H-6'a, respectivement. On relève la résonance du carbone C-6' de ce substituant sucre à  $\delta_C$  62,5 ppm.
- Un ensemble de multiplets dans l'intervalle  $\delta_H$  3,20 – 3,40 ppm attribuable aux protons H-2', H-3', H-4', H-5' portés par des carbones résonnant à  $\delta_C$  74,8 ; 77,8 ; 71,3 et 77,7 ppm respectivement. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de cette entité sucre sont en parfait accord avec un sucre de type glucopyranoside (Agrawal 1992).

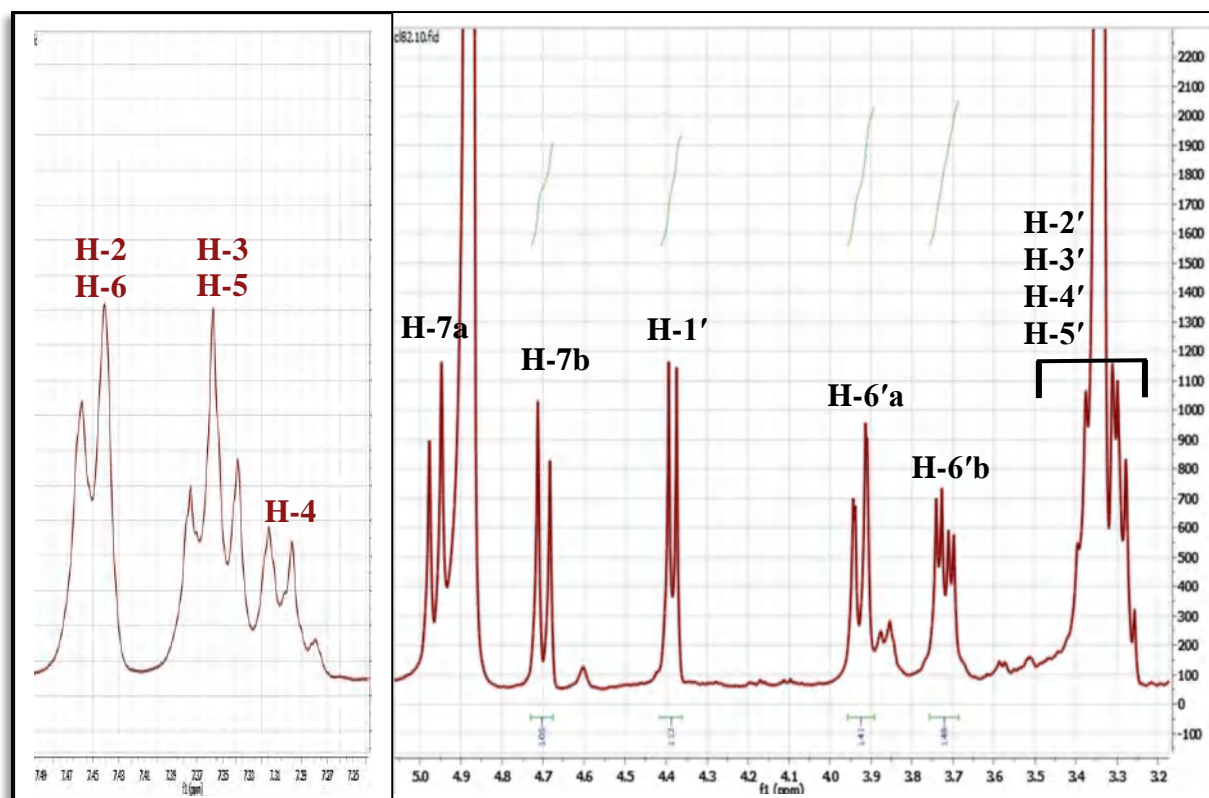


Figure III.116. Etalonnage du spectre RMN  $^1H$  (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-14

L'entité sucre attendue en position C-7 de cette molécule est donc un groupement :  
-O- $\beta$ -glucopyranoside.

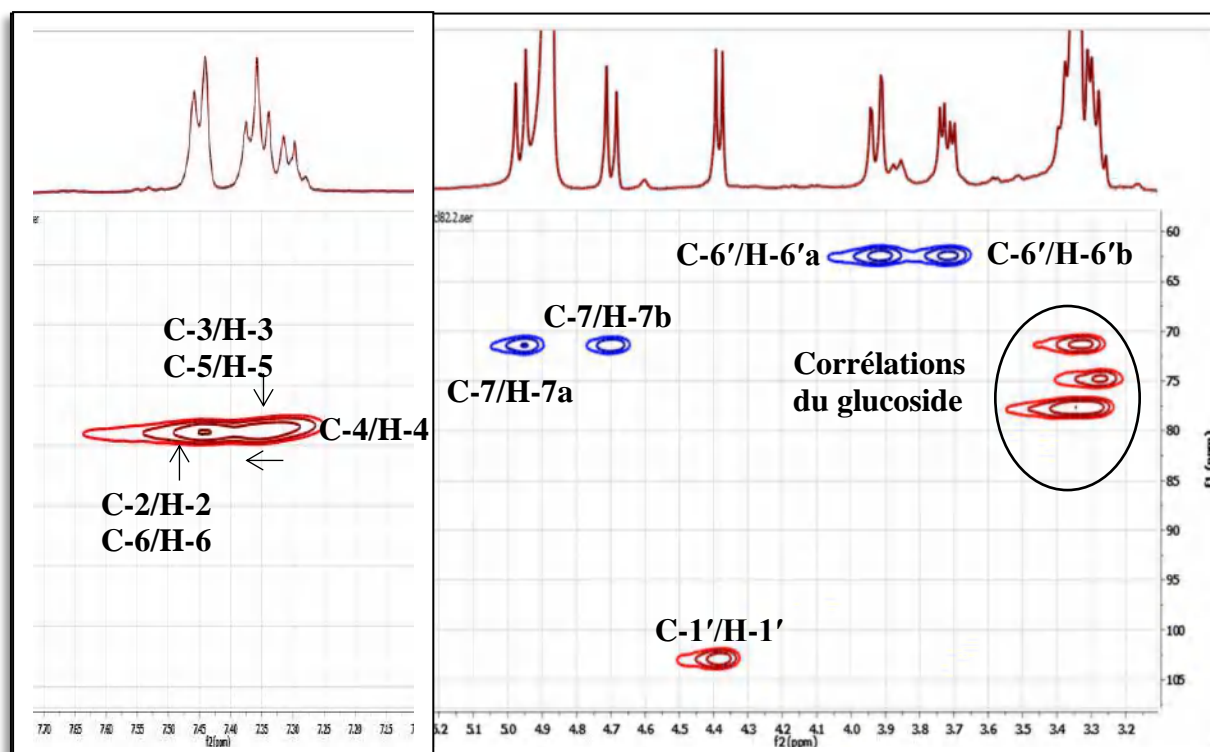


Figure III.117. Etallements du spectre HSQC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-14

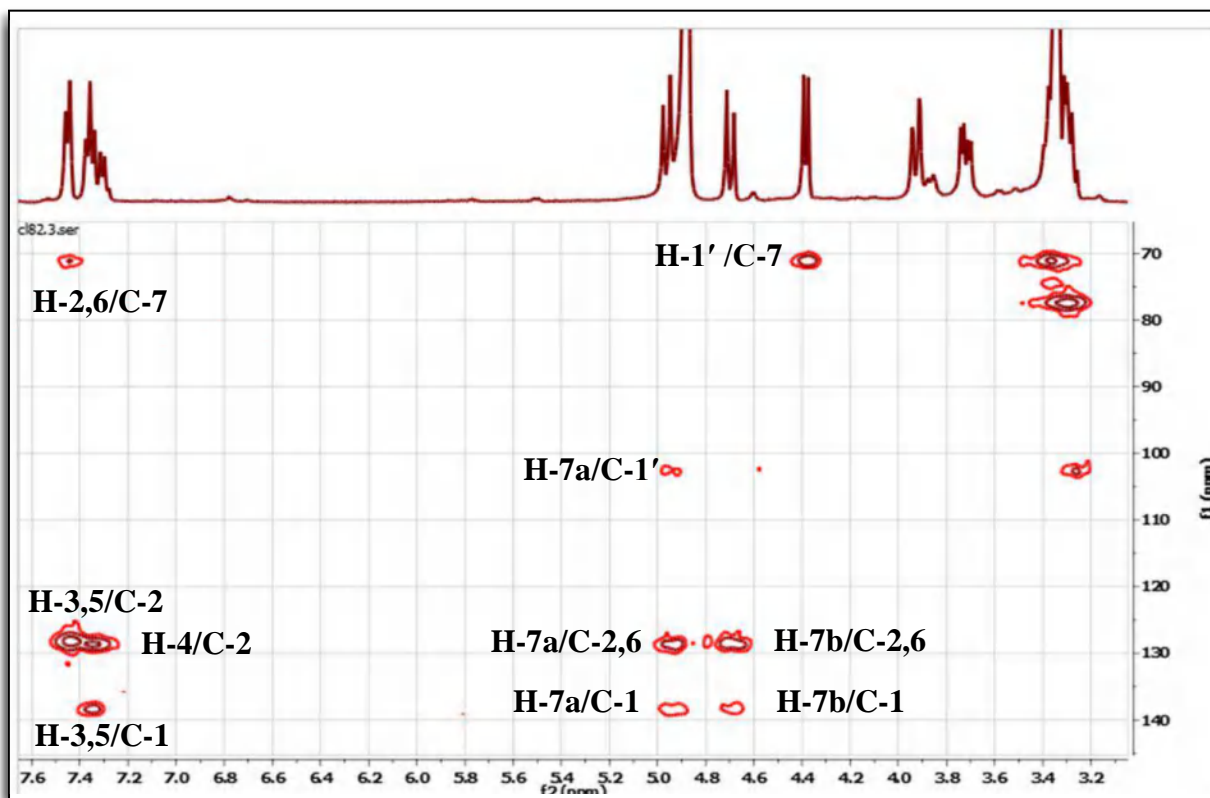
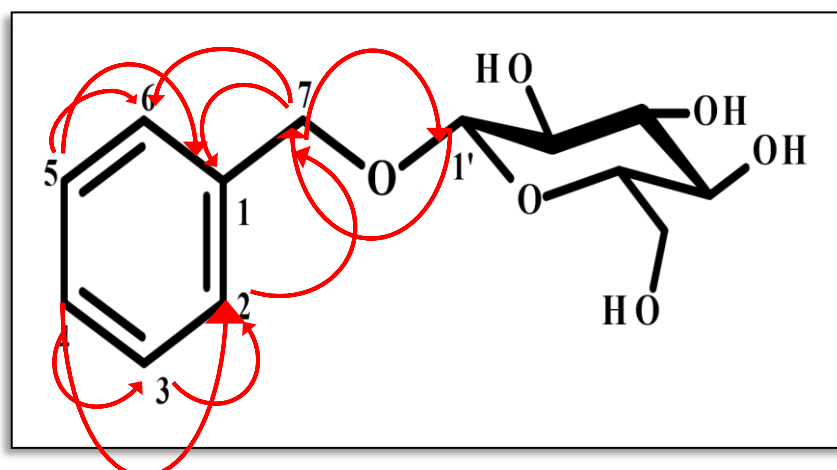


Figure III.118. Etallement du spectre HMBC (400 MHz, MeOH- $d_4$ ) du composé B-14

Les corrélations HMBC H vers C sont présentées dans la figure III.119.



**Figure III.119.** Corrélations HMBC H vers C (MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **B-14**

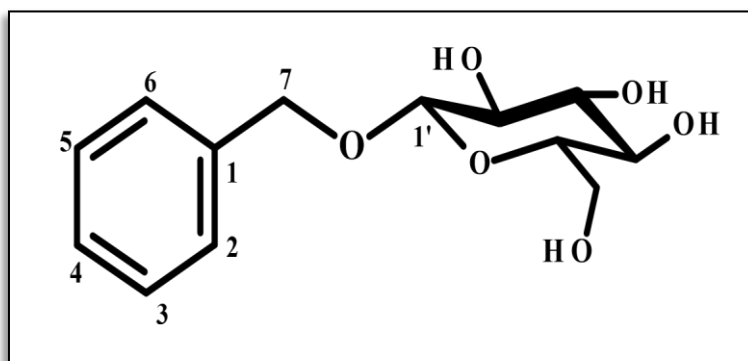
L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau III.15

**Tableau III.15.** Données relatives aux spectres RMN <sup>1</sup>H, HSQC et HMBC du composé **B-14**

Position	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	Intégration, multiplicité, <i>J</i> (Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)*	HMBC (ppm)
<b>1</b>	-	-	138,6	-
<b>2 et 6</b>	7,45	(2H, dl, <i>J</i> = 7,1)	128,9	C-7, C-3 et C-5
<b>3 et 5</b>	7,36	(2H, t, <i>J</i> = 7,1)	128,8	C-4, C-2 et C-6, C-1
<b>4</b>	7,31	(1H, tl, <i>J</i> = 7,1)	128,5	C-3 et C-5, C-2 et C-6
<b>7a</b>	4,96	(1H, d, <i>J</i> = 11,8)	71,5	C-1', C-2 et C-6, C-1
<b>7b</b>	4,70	(1H, d, <i>J</i> = 11,8)	71,5	C-1', C-2 et C-6, C-1
<b>1'</b>	4,38	(1H, d, <i>J</i> = 7,7)	103,0	C-7
<b>2'</b>	3,27	-	74,8	C-1'
<b>3'</b>	3,38	-	77,8	-
<b>4'</b>	3,33	-	71,3	-
<b>5'</b>	3,30	-	77,7	-
<b>6'a</b>	3,93	(1H, dd, <i>J</i> = 11,9 ; 1,8)	62,5	-
<b>6'b</b>	3,72	(1H, dd, <i>J</i> = 11,9 ; 5,4)	62,5	-

\*  $\delta$  <sup>13</sup>C (ppm) obtenus par la combinaison des données des spectres HSQC et HMBC

Les données spectrales que nous avons obtenues mènent à la molécule : **phenyl-methyl-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranoside** (Ghosh et al. 2015) (Figure III.120)



**Figure III.120.** Structure finale du composé **B-14** :  
**phenyl-methyl-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranoside**

## II.15. Conclusion

Les résultats de l'activité antioxydante portée sur les extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle de l'espèce *Volutaria lippii* nous ont encouragé à réaliser leur étude phytochimique qui a conduit à l'isolement de 20 composés dont 14 ont été identifiés. Leur identification a été réalisée par la combinaison des données des expériences de RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ , COSY, HSQC, HMBC), UV-Vis, la spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray (-) [ESI-MS (-)], et par comparaison avec les données de la littérature.

# Conclusion générale

## Conclusion générale

L'évaluation de l'activité antioxydante des trois extraits  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt et *n*-BuOH dérivés de l'extrait hydroalcoolique brut des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Volutaria lippii* (Asteraceae) par différentes méthodes (test du radical DPPH, test du radical cation l'ABTS, test de blanchiment du  $\beta$ -carotène et test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre CUPRAC) a montré que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol possèdent les meilleures activités.

L'investigation phytochimique de ces extraits (acétate d'éthyle et *n*-butanol) a permis d'isoler **20 produits** par des techniques chromatographiques notamment la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Parmi les composés isolés et purifiés, **14** appartenant à différentes classes chimiques ont été caractérisés et décrits. Il s'agit de :

- ✓ **5** composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle :
  - **11 $\beta$ ,13-dihydrodeacylcynaropicrine**
  - **Desacylcynaropicrine** (isolée pour la 1<sup>ère</sup> fois de l'espèce *Volutaria lippii*)
  - **Lutéoline**
  - **Acide férulique** (isolé pour la 1<sup>ère</sup> fois de l'espèce *Volutaria lippii*)
  - **Acide caféique** (isolé pour la 1<sup>ère</sup> fois de l'espèce *Volutaria lippii*)
- ✓ **9** composés isolés de l'extrait *n*-butanol :
  - **3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -O-(6'-acetyl)- $\beta$ -glucopyranoside** (molécule nouvelle, isolée et décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois dans la littérature)
  - **3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -O- $\beta$ -glucopyranoside** (isolée pour la 1<sup>ère</sup> fois de l'espèce *Volutaria lippii*)
  - **Cynaropicrine**
  - **Deacylcynaropicrine 8-O-[(S)-3-hydroxy-2-methylpropionate]** (isolée pour la 1<sup>ère</sup> fois de l'espèce *Volutaria lippii*)
  - **(6R,9R)-3-oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glucopyranoside** (isolé pour la 1<sup>ère</sup> fois de l'espèce *Volutaria lippii*)
  - **Lippianoside E**
  - **(Z)-3-hexenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside** (isolé pour la 1<sup>ère</sup> fois de l'espèce *Volutaria lippii*)

- **Apigenin-7-O-glucoside** (isolée pour la 1ère fois de l'espèce *Volutaria lippii*)
- **Phenyl-methyl-O-β-D-Glucoopyranoside** (isolé pour la 1ère fois de l'espèce *Volutaria lippii*)

Les structures de toutes ces molécules ont été déterminées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (<sup>1</sup>H, COSY, HSQC, HMBC), UV-Vis, la spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray (-) [ESI-MS (-)], et par comparaison avec les données de la littérature.

Nos résultats confirment bien la richesse et la diversité des espèces des genres *Volutaria* et *Centaurea* en métabolites secondaires, et sont bien en accord avec les travaux antérieurement publiés sur ces deux genres.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication internationale dans une revue de catégorie A, deux communications internationales et une nationale dans des congrès de spécialité.



A.

- Agrawal, P. K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 31(10), 3307-3330.
- Ahmed, Z. F., Rimpler, H., Hamouda, F. M., Rizk, A. M and Ismail, S. I. (1970). The flavonoid constituents of certain *Centaurea* species grown in Egypt. *Phytochemistry*. 9(7), 1595-1601.
- Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., & Jay, M. (1997). Flavonoids from *Centaurea incana* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 4(25), 361-362.
- Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Jay, M., Tillequin, F., & Seguin, E. (1999). A new flavone glycoside from *Centaurea furfuracea*. *Fitoterapia*. 70(4), 368-370.
- <sup>a</sup>Akkal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., & Tillequin, F. (2003). Flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*. 39(2), 219-220.
- <sup>b</sup>Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K., Tillequin, F., & Seguin, E. (2003). Flavonoids from *Centaurea furfuracea* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 31(6), 641-643.
- Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K., & Tillequin, F. (2007). Flavonol glycosides from *Centaurea furfuracea*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Chemistry of Natural Compounds*. 43(3), 319-320.
- Akkol, E. K., Arif, R., Ergun, F., Yesilada, E. (2009). Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 210-215.
- Aliouche, L., Mosset, P., León, F., Brouard, I., Benayache, S., Sarri, D., & Benayache, F. (2020). Characterization of chemical compounds and antioxidant activity of *Centaurea solstitialis* sp. schouwii (DC.) Q. et S. (Asteraceae). *Current Bioactive Compounds*. 16(5), 618-626.
- Amaral, A. C. F., Kuster, R. M., Gonçalves, J. L. S., & Wigg, M. D. (1999). Antiviral investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. *Fitoterapia*. 70(3), 293-295.
- Amen, Y. M., Marzouk, A. M., Zaghloul, M. G., Afifi, M. S. (2013). Bioactive compounds from *Tipuana tipu* growing in Egypt. *Journal of American Science*. 9(10), 334-9.
- Anton, R. (1999). Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinales, science et thérapeutique. 3ème édition, Technique Documentation, Paris, p 22, 30.

- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(26), 7970-7981.
- Aslan, Ü., & Öksüz, S. (1999). Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*. *Turkish Journal of Chemistry*. 23(1), 15-20.
- Aqil, M., Khan, I. Z. and Goni, A. D. (1998). Chemical investigation of the methanolic extract of *Centaurea senegalsis* Dc., *Bulletin of Chemical Society of Ethiopia*. 12 (2), 177-180.
- Athmani, G., Benayache, F., Benayache, S. and Dendougui, H. (1998). *Journal de la Société Algérienne de Chimie*. 8(1), 29-36
- Ayad, R., Ababsa, Z. E., Belfadel, F. Z., Akkal, S., León, F., Brouard, I., & Medjroubi, K. (2012). Phytochemical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2(1), 151-154.
- Ayad, R., & Akkal, S. (2019). Phytochemistry and biological activities of Algerian *Centaurea* and related genera. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 63, pp. 357-414). Elsevier.
- <sup>a</sup>Azzouzi, D., Bioud, K., Demirtas, I., Gul, F., Sarri, D., Benayache, S., Benayache, F., Mekkiou, R. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) extracts. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 19(10), 841-846.
- <sup>b</sup>Azzouzi, D., Mekkiou, R., Demirtas, I., Gül, F., Seghiri, R., Boumaza, O., Benayache, S. & Benayache, F. (2016). Qualitative and quantitative analysis of polar extract from *Centaurea fragilis* Dur. Using HPLC-TOF/MS. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 1526 – 1528.
- B.**
- Belkacem, S., Belbache, H., Boubekri, C., Mosset, P., Rached-Mosbah, O., Marchioni, E., Benayache, S. & Benayache, F. (2014). Chemical constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5(3), 1275-1279.
- Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Massiot, G., Aclinou, P., Drodz, B., & Nowaks, G. (1992). Sesquiterpene lactones from *Centaurea pullata*. *Phytochemistry*. 31(12), 4359-4360.

- Ben Salah, H., Smaoui, S., Abdennabi, R., Allouche, N. (2019). LC-ESI-MS/MS phenolic profile of *Volutaria lippii* (L.) Cass. Extracts and evaluation of their *in vitro* antioxidant, antiacetylcholinesterase, antidiabetic, and antibacterial activities. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 9814537.
- Bensouici, C., Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., & Bruneau, C. (2012). Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Centaurea foucauldiana*. *Chemistry of Natural Compounds*. 48(3), 510-511.
- Bentamene, A., Benayache, S., Crèche, J., Petit, G., Bermejo, J., Leon, F., Benayache, F. (2005). A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L. (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 33, 1061-1065.
- Bentamene, A., Benayache, S., Creche, J., Bermejo, J., Benayache, F. (2007), Sesquiterpene lactones and phenolic compounds from *Centaurea maroccana*, *Chemistry of Natural Compounds*. 43(6), 749-750.
- Bentamene, A., Baz, M., Boucheham, R., Benayache, S., Creche, J. and Benayache, F. (2008). Flavonoid aglycones from *Centaurea sphaerocephala*. *Chemistry of Natural compounds*. 44(2), 234-235. 63.
- Bentamene, A., Boucheham, R., Baz, M., Benayache, S., Creche, J. and Benayache, F. (2010). Flavonoid glucosides from *Centaurea sphaerocephala*. *Chemistry of Natural Compounds*. 46(3), 452-453. 64.
- Bermejo, J.B., Betancor, C., Breton, J.L.F., Gonzalez, A.G. (1969). Sesquiterpene lactones of *Amberboa lippii*. *An. Quim.* 65, 285–295.
- Bidet D, Gaignault JC, Girard P, Trotin F. (1987). Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique : du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89 – 97.
- Bicha, S., Bentamène, A., Benaïssa, O., Benayache, S., Garcia, V. P., León, F., Brouard, I., Bermejo, J. and Benayache, F., (2011). flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chemistry of Natural compounds*. 47(1), 105-106.
- Bicha, S., Chalard, P., Hammoud, L., León, F., Brouard, I., Garcia, V. P., Lobstein, A., Bentamene, A., Benayache, S. & Benayache, F. (2013). Maroccanin: a new  $\gamma$ -lactone and other constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae). *Records of Natural Products*. 7(2), 114.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181(4617), 1199-1200.

- Bohlmann, F. and Gupta, R.K. (1981), Guaianolides from *Centaurea canariensis*, *Phytochemistry*. 20, 2773.
- Breton, J.L.F., Garcia, B.M., Gonzalez, A.G. (1968). Sesquiterpene lactones of *Amberboa lippii*. Structure of grosshemin. *An. Quim.* 64, 1015–1016.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Édition : Techniques et Documentation Lavoisier, Paris.
- Bruno, M., Fazio, C., Pipaternalo, M., Diaz, J. G. and Herz, W., (1995), sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea napifolia*. *Planta Medica*. 61, 374-375.
- Bruno, M., Nostro, M.P, Cedris, T.E and Herz, W., (1996), Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea nicaensis*, *Phytochemistry*. 41, 335-336.
- C.**
- Cardona L, M., Fernandez, I., Pedro, J.R and Perez, B., (1991). Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry*. 30, 2331-2333.
- Cardona, L., Garcia, B., Navarro, F. I., & Pedro, J. R. (1994). Sesquiterpene lactones from *Centaurea paui*. *Natural Product Letters*. 5(1), 47-54.
- Cardona, L., Garcia, B., Munoz, M.C., Navarro, F.I. and Pedro, J.R., (1997). New sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea paui*. *Leibigs Annalen Recueil*, 527.
- Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A., M., Raccuglia, R.A., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K., Bruno, M. (2006). Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa* . *Biochemical Systematics and Ecology*. 34, 349-352.
- Chang, Y. C., Nair, M. G., Santell, R. C., Helferich, W. G. (1994). Microwave-mediated synthesis of anticarcinogenic isoflavones from soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42(9), 1869-1871.
- Chica, A., Tebano, M., Adinolfi, B., Ertugrul, K., Flamini, G., Nieri, P. (2011). Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46, 3066-3070.
- Choi, S. Z., Choi, S. U., & Lee, K. R. (2005). Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Saussurea calcicola*. *Archives of Pharmacal Research*, 28(10), 1142-1146.
- Collado, G., Macias, F.A., Massanet, G.M. and Rodriguez luis, F., (1985), Guainolides from *Centaurea canariensis*, *Phytochemistry*. 24, 2107-2109.

**D.**

- Daniewski, W., Nowak, G., Routsis, E., Rychlewska, U., Szezepanska, B. and Piotrski, B., (1992), salograviolide A, a sesquiterpene from *Centaurea salonitana*, *Phytochemistry*. 31 (8), 2891-2893.
- Daniewski, W., Nowak, G., Pankowska, E., Giaadis, T., Routsis, E., Rychlewska, U. and Szezepanska, B., (1993). Sesquiterpene lactones from *Centaurea salonitana*, *Phytochemistry*. 34(2), 445-447.
- Das H C, Wang J H, Lien E J. (1994). Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. *Progress in Drug Research*. 42 :133–136.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A.A., Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review Life Sciences*. 65 : 337-353.
- Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsa, C., Skaltsa, H. (2008). A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 3725-3731.
- Dorni, A.C., Amalraj, A., Gopi, S., Varma, K. & Anjana, S.N. (2017). Novel cosmeceuticals from plants—An industry guided review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 7, 1-26.
- Dupont, F., & Guignard, J. L. (2012). Abrégé de botanique. 15ème édition. *Edition Masson*.
- F.**
- Farombi, E. O. (2003). African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African Journal of biotechnology*. 2(12), 662-671.
- Fathallah, H. M., Kassem, F. F., El-Shaer, N. S. (1994). *Alexendria Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8(3), 219-222.
- Fernandez, I., Pedro, J.R. and Palo, E. (1995). Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba* and *C. conifera*, *Phytochemistry*. 38, 655-675.
- Fischer, N.H. (1990). Sesquiterpene Lactones : Biogenesis and Biomimetic Transformations. In: Towers, G.H.N., Stafford, H.A. (eds) *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids*. Recent Advances in Phytochemistry, vol 24. *Springer, Boston, MA*.
- Flamini, G., Antognoli, E. and Morelli, I. (2001). Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*. 57, 559–564.
- Flamini, G., Pardini, M., Morelli, I. (2001). A flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*. *Phytochemistry*. 58, 1229–1233.

- Flamini, G., Bulleri, C., Morelli, I. (2002). Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30, 1051–1054.
- Flamini, G., Giuseppe Stoppelli, G., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Osman Tugay, O., Demirelma, H. (2004). Secondary metabolites from *Centaurea isaurica* from Turkey and their chemotaxonomical significance. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32, 553–557.
- Forgo, P., Zupkó, I., Molnár, J., Vasas, A., Dombi, G., Hohmann, J. (2012). Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia*. 83, 921-925.
- Fvsiratova, R.I., Scheichenko, V.I. and Rybalko, K.S. (1973). *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. 9,161.
- G.**
- Gausсен, H., Leroy, H. F. (1982). *Précis de Botanique* (végétaux supérieurs). 2ème Ed. 426.
- Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, S., Mouloud, Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*. 12(1), 15-24.
- Ghosh, S., Parihar, V. S., More, P., Dhavale, D. D., & Chopade, B. A. (2015). Phytochemistry and therapeutic potential of medicinal plant: *Dioscorea ulbifera*. *Medicinal Chemistry*. 5(4), 160-172.
- Gonnet, J. F. (1993). Flavonoid glycoside variation in wild specimens of *Centaurea triumfetti* (Compositae) and comments on its relationships with *Centaurea montana* based on flavonoid fingerprints. *Biochemical Systematics and Ecology*. 21(3), 389-396.
- Gonzalez, A.G., Artega, J.M., Breton, J.L. (1973). Germacranolides from *Centaurea 216 seridis*. *Phytochemistry*. 12, 1333.
- Gonzalez, A.G., Marrero, B.G., Breton, J.L. (1976). *Anal.Quim*, 66,799.
- Gonzalez, A.G., Bermejo, J.B., Amaro, J.M., Massanet, G.M., Galindo, A. and Cabrera, I. (1978). Sesquiterpene lactones from *Centaurea linifolia* Vahl. *Canadian Journal of Chemistry*. 56,491.
- Gonzalez, A.G., Bermejo, J.B., Taledo, F. and Rosa Daza, L. (1981). Sesquiterpene lactones from *Centaurea arbutifolia*. *Phytochemistry*. 20, 1895-1897.
- Goto T, Kondo T. (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins Flower color variation. *Angewandte Chemie*. 30: 17-33.
- Guignard, J.L. (1994). *Abrégé Botanique*. 9ème Ed. Édition Masson, Paris. France. 204.

- Gülcemal, D., Alankuş-Çalışkan, Ö., Karaalp, C., Örs, A. U., Ballar, P., Bedir, E. (2010). Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *Urvillei*. *Carbohydrate Research*. 345, 2529-2533.
- Gürbüz, Đ., Yesilada, E. (2007). Evaluation of the anti-ulcerogenic effect of sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* by using various in vivo and biochemical techniques. *Journal of Ethnopharmacology*. 112, 284–291.
- H.**
- Hammadi, D., Ahmed, M., Boudjethia, KW., Boukhalifa, AI., Djebli, N. (2015). Ethnomedicinal survey of medicinal plants used in the western region of Algeria. *Medicinal & Aromatic Plants*. 5, 221.
- Hammoud, L., Seghiri, R., Benayache, S., Mosset, P., Lobstein, A., Chaabi, M., Léon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F. (2012). A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. *Natural Product Research*. 26(3), 203-208.
- Helal, A.M., Nakamura, N., Meselhy, M. R., El-Fishawy, A.M., Hahori, M. and Mahran, G. H. (1997). Guaianolides from *Centaurea scoparia*. *Phytochemistry*. 45, 551-554
- J.**
- Jeffrey, C. (2007). Tribe Gymnarrheneae. Families and Genera of Vascular Plants, vol. VIII, Flowering Plants, Eudicots, Asterales. *Springer-Verlag*, Berlin. 147-148
- K.**
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., & Bruneau, C. (2011). Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chemistry of Natural Compounds*. 46(6), 966-967.
- Kadereit JW, Jeffrey C. (2007). Flowering plants. Eudicots. In: Kubitzki K (ed) The families and genera of vascular plants, vol 8. *Springer-Verlag*, Berlin, pp 60–64
- Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., Gdoura, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*. 10(19), 3908-3914.
- Kamanzi, K., Voirin, B. and Raynaud, J. (1983). The C-glycosyl flavonoids from flowers of *Centaurea malitensis*. *Plantes Medicinal et Phytotherpie*. XVII (1), 47- 51.
- Karamenderes, C., Bedir, E., Pawar, R., Baykan, S., Khan, I., A. (2007). Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry*. 68, 609-615.
- Khalfallah, A., Berrehal, D., Kabouche, A., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2012). Flavonoids from *Centaurea omphalodes*. *Chemistry of Natural Compounds*. 48(3), 482-483.

- Kitouni, R., Benayache, F., & Benayache, S. (2015). Flavonoids of the exudate of *Centaurea calcitrapa*. *Chemistry of Natural Compounds*. 51(4), 762-763.
- Koca, U., Toker, G. and Akkol, E. K. (2009). Assessment of the extracts of *Centaurea tchihatcheffii* Fischer for anti-inflammatory and analgesic activities in animal models. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 8(3), 193-200.
- Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 13(1), 8-17.
- Kolli, E. H., León, F., Benayache, F., Estévez, S., Quintana, J., Estévez, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, S. (2012). Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 23(5), 977-983.
- Kumarasamy, Y., Middleton, M., Reid, R., Nahar, L., Sarker, S. (2003). Biological activity of serotonin conjugates from the seeds of *Centaurea nigra*. *Fitoterapia*. 74, 609-612.
- L.**
- Lar'kina, M. S., Kadyrova, T. V., Ermilova, E. V., & Krasnov, E. A. (2009). Quantitative determination of flavonoids from the aerial part of greater knapweed (*Centaurea scabiosa* L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 43(6), 320-323.
- Lemoui, R., Benyahia, S., Noman, L., Bencherchar, I., Oke-Altuntas, F., Rebbas, K., Benayache, S., Benayache, F., Demirtas, I. (2018). Isolation of phytoconstituents and evaluation of biological potentials of *Berberis hispanica* from Algeria. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 13(2), 179-186.
- Li Y, & Jia Z. J. (1989). Guaianolides from *Saussurea involucreta*. *Phytochemistry*. 28(12), 3395-3397.
- Li Y, Wang C, Guo S, Yang J, Xiao P. (2007). Three guaianolides from *Saussurea involucreta* and their contents determination by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 44(1):288-292.
- Louaar, S., Achouri, A., Lefahal, M., Laouer, H., Medjroubi, K., Duddeck, H., & Akkal, S. (2011). Flavonoids from Algerian endemic *Centaurea microcarpa* and their chemotaxonomical significance. *Natural Product Communications*. 6(11), 1603-1604.
- Louaar, S., Zellagui, A., Gherraf, N., Medjroubi, K., Derbre, S., Seguin, E., Laouer, H., Akkal, S. (2014). Antiradical Activity of Flavonoids from the Algerian Native Plant:



*Centaurea microcarpa* Coss. et Dur. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 4(3), 249-253.

**M.**

Mabberley, D.J. (1987). *The plant book*. Combridge University Press. 110.

Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2006). Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Analytica Chimica Acta*. 558(1-2), 310-318.

Marco, G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 594–598.

Marco, J. A., Sanz, J. F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A., & Saberi, M. (1992). Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species. *Phytochemistry*. 31(10), 3527-3530.

Marco, J., A., Sanz-Cervera, J., F., Yuste, A., Sancenón, F., Carda, M. (2005). Sesquiterpenes from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry*. 66, 1644-1650.

Maurizio, B., Caterina, F., Salvatore, P., Maria, P., Jesus, G. and Werner H. (1994). sesquiterpenes from *Centaurea Sphaerocephala* SSP *Sphaerocephala*. *Phytochemistry*. 35, 1371-1372.

Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Khalfallah, N. and Aclinou, P. (1997). guaianolides from *Centaurea musimomum*. *Phytochemistry*. 45, 1449-1451.

Medjroubi, K., Benayache, F., Benayache, S., Akkal, S., Kaabeche, M., Tillequin, F., & Seguin, E. (1998). Eudesmanolide from *Centaurea granata*. *Phytochemistry*. 49(8), 2425-2427.

Medjroubi, K., Bouderdara, N., Benayache, F., Akkal, S., Seguin, E., & Tillequin, F. (2003). Sesquiterpene lactones of *Centaurea nicaensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 39(5), 506-507.

Medjroubi, K., Benayache, F., & Bermejo, J. (2005). Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia*. 76(7-8), 744-746.

Mezache, N., Bendjeddou, D., Satta, D., Mekkiou, R., Benayache, S., & Benayache, F. (2010). Secondary metabolites from *Centaurea lippii*. *Chemistry of Natural Compounds*. 46(5), 801-802.

Mishio, T., Honma, T., Iwashina, T. (2006). Yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments. *Biochemical Systematics and Ecology*. 34, 180- 184.

- Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., & Benkhaled, M. (2012). Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Natural Product Research*. 6(3), 292-295.
- Moon, J. H., Watanabe, N., Ijima, Y., Yagi, A., & Sakata, K. (1996). cis-and trans-Linalool 3, 7-oxides and methyl salicylate glycosides and (Z)-3-hexenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside as aroma precursors from tea leaves for Oolong tea. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 60(11), 1815-1819
- Murkhmetzhanov, M.N., Scheichenko, V., Bankovskii, L.A., Rybalko, K.S. and Bori, K. (1969). *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*. 5, 567.
- N.**
- Nacer, A., Bernard, A., Boustie, J., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2006). Aglycone flavonoids of *Centaurea tougourensis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*. 42(2), 230-231.
- Nacer, A., Merza, J., Kabouche, Z., Rhouati, S., Boustie, J., Richomme, P. (2012). Sesquiterpene lactones from *Centaurea tougourensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 43, 163-165.
- Naveed, M. A., Riaz, N., Saleem, M., Jabeen, B., Ashraf, M., Alam, U., Jabbar, A. (2015).  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Constituents from *Ficus bengalensis*. *Pakistan Journal of Chemistry*. 5(1), 42-49.
- Navarro, J., Caballero, M.C., Moran, J.R., Medarde, M. and Grande, M., (1990). Guaianolides and eudesmanolides from *Centaurea ornate*. *Journal of Natural Products*. 217 53, 573-578.
- Negrete, R.E., Backhouse, N., Cajigal, I., Delporte, C., Cassels, B.K., Breitmaier, E., Eckhardt, G. (1993). Two new anti inflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 40, 149-153.
- Nouara, B., Mourad, B., Lakhdar, K., Madjda, K.-S. (2016). Enquête ethnobotanique d'une plante médicinale *Peganum harmala* l. dans la région de M'sila. *Revue Agriculture*, 38 – 42.
- Nowak, G., Drozd, B., Kroszezynski, W. and Holub, M. (1986). New guaianolides in *Centaurea bella* Trauty and *Centaurea adjarica* Alb. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 55, 17.
- O.**
- Ohino, N., Hirai, H., Yoshioka, H., Dominguez, X.A., Mabry, T.J. (1973). Cynaropicrin: 214 A sesquiterpene lactone from *Centaurea Americana*. *Phytochemistry*. 12, 221-222

- Öksüz., S. and Ayyildiz,H. (1986). Sesquiterpene lactones from *Centaurea coronopifolia*. *Phytochemistry*. 25, 535-537.
- Oksuz, S., B. Halfon, and B. Terem. (1988). Flavonoids of *Centaurea cuneifolia*. *Planta Medica*. 54(1), 89.
- Öksüz., S. and Topçu,G. (1994). Guaianolides from *Centaurea glastifolia*. *Phytochemistry*. 37, 487-490.
- Öksüz., S., Serin, S. and Topçu, G. (1994). Sesquiterpene lactones from *Centaurea Hermannii*. *Phytochemistry*. 35(2), 435-438.
- P.**
- Pabst, A., Barron, D., Sémon, E., & Schreier, P. (1992). Two diastereomeric 3-oxo- $\alpha$ -ionol  $\beta$ -D-glucosides from raspberry fruit. *Phytochemistry*. 31(5), 1649-1652.
- Panero, J.L., Funk, V.A. (2002). Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 115(4): 909- 922.
- Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J., & Rice-Evans, C. A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282(5), 1161-1168
- Q.**
- Quezel, F., Santa, S. (1962-1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 1-2. Ed. CNRS, Paris France
- R.**
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C., & Miller, N. J. (1994). [241 Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology*. 234, 279-293.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 2:152.
- Roesler, H., Star, A E. and Mabry, T. J. (1971). New 6- methoxyflavonols from *Centaurea jacea*. *Phytochemistry*. 10(2), 450-451.
- Rustaiyan, A., Sharif, Z.,Tajoredi, A., Ziesche, J. and Bohlmann, F. (1984). Neve guajanolide aus *Centaurea imperialis*. *Planta Medica*. 193-194.
- Rybajko, K.S., Muchametzanow, M.N., Szejezenkow,I., Konowalowa,O.A. (1976). *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. 4, 467.

S.

- Sajjadi, S. E., Shokoohinia, Y., & Moayedi, N. S. (2012). Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of *Kelussia odoratissima* Mozaff. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 7(4), 159-162.
- Seghiri, R., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Bermejo, J., Benayache, F. (2006). Phenolic compounds from *Centaurea Africana*. *Chemistry of Natural Compounds*. 42(6), 491-492.
- Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estévez, F., Léon, F., Bermejo, J., Benayache, F. (2009). A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. *Phytochemistry Letters*. 2(3), 114-118.
- Shimizu, S., Ishihara, N., Umehara, K., Miyase, T., & Ueno, A. (1988). Sesquiterpene glycosides and saponins from *Cynara cardunculus* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 36(7), 2466-2474
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., Sarker, S. D. (2006). Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Tetrahedron*. 62, 11172-11177.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P., & Sarker, S. D. (2006). Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. *Tetrahedron*. 62(48), 11172-11177.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16(3), 144-158.
- Skaltsa, H., Lazari, D., Panagouleas, C., Georgiadou, E., Garcia, B., & Sokovic, M. (2000). Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry*. 55(8), 903-908.
- Skliar, M.I., Toribio, M.S., Oriani, D.S. (2005). Antimicrobial activity of *Centaurea diffusa*. *Fitoterapia*. 76, 737-739.
- Spichiger, R. E., Savolainen, V. V., Figeat, M., & Jeanmonod, D. (2004). Botanique Systématique des plantes à fleurs. 3ème édition, 348-349 CaCo2 colon cancer cells. *Tetrahedron*. 62(48), 11172-11177.

Stavric B, Matul TI. (1992). Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health, Lipid soluble and antioxidants. *Biochemistry and Clinical Applications*. 274-294.

Stürtz, M., Lander, V., Schmid, W., Winterhalter, P. (2006). Preparative isolation of isoflavones from soy and red clover. *Molecular Nutrition Food Research*. 50(4-5), 356-361.

**T.**

Talhouk, R. S., El-Jouni, W., Baalbaki, R., Gali-Muhtasib, R., Kogan, J. and Talhouk, S.N. (2008). Anti-inflammatory bio-activities in water extract of *Centaurea ainetensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2(2), pp. 024-033.

Trendafilova, A., Todorova, M. and Bancheva, S. (2007). Secondary metabolites from *Centaurea moesiaca*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 35, 544-548.

**V.**

van den Berg, R., Haenen, G. R., van den Berg, H., van der Vijgh, W., & Bast, A. (2000). The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*. 70(3), 391-395.

Vasisht, K., Kumar, V. (2004). Compendium of medicinal and aromatic plants, Vol. 1. Africa: ICS-UNIDO, Trieste.

**W.**

Wagner H, Wierer M, Bauer R. (1986). In vitro Hemmung der Prostagl and in Biosynthese durch etherische Öle und phenolische Verbindungen. *Planta Medica*. 52(3):184-187.

**Y.**

Yang, M. C., Choi, S. U., Choi, W. S., Kim, S. Y., & Lee, K. R. (2008). Guaiane sesquiterpene lactones and amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Saussurea pulchella*. *Journal of Natural Products*. 71(4), 678-683.

Yesilada, E. (2002). Biodiversity in Turkish Folk Medicine. In: Şener, B. (Ed.), Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, UK, pp. 119–135.

**Z.**

Zater, H., Huet, J., Fontaine, V., Benayache, S., Stévigny, C., Duez, P., & Benayache, F. (2016). Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. algeriensis (Coss. & Dur.) Maire. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9(6), 554-561.

Zhang, Y., Chen, Y., Wang, S., Dong, Y., Wang, T., Qu, L., Li, N., Wang, T. (2015). Bioactive constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. *Molecules*. 20(12), 21946-21959.

## Résumé

Ce travail concerne l'étude de l'espèce *Volutaria lippii* syn. *Centaurea lippii*, appartenant à la famille Asteraceae ; une plante de la flore algérienne qui a fait l'objet de très peu d'études antérieures.

Notre travail a commencé par la macération des parties aériennes (feuilles et fleurs) dans le méthanol à 70%, suivie de filtration, de concentration et de dilution à l'eau distillée. La solution obtenue a été soumise à des affrontements successifs par des solvants de polarité croissante pour donner les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol, dont les polyphénols et les flavonoïdes totaux ont été quantifiés par les méthodes colorimétriques. Ces tests ont montré que l'extrait acétate d'éthyle a la plus forte teneur suivi par l'extrait *n*-butanol. En second lieu nous avons procédé à l'évaluation de leur activité antioxydante par les tests de piégeage du radical DPPH et du radical cation l'ABTS, le test de blanchiment du  $\beta$ -carotène et enfin le test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC). Le meilleur résultat a été obtenu pour l'extrait acétate d'éthyle suivi de l'extrait *n*-butanol.

Les résultats des analyses quantitatives et de l'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits, nous ont encouragés à procéder au fractionnement des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol, cette étape a été réalisée sur colonne de gel de silice 60. Les fractions obtenues ont été purifiées par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice et par HPLC semi-préparative en phase inverse munie de détecteurs UV-Vis et IR. Ces expérimentations nous ont permis **l'isolement et la purification de vingt composés.**

La détermination structurale de **quatorze des composés isolés et purifiés** a été réalisée par la combinaison des techniques d'analyses spectroscopiques : RMN  $^1\text{H}$ , HSQC, HMBC et COSY, de spectrométrie de masse et de spectrophotométrie UV-Vis. Il s'agit de :

- **Six lactones sesquiterpéniques** dont **une nouvelle** et que nous décrivons pour la première fois dans la littérature : 3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -*O*-(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside), trois décrites pour la première fois pour l'espèce *Volutaria lippii* : (3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -*O*- $\beta$ -glucopyranoside, desacylcynaropicrine, deacylcynaropicrine 8-*O*-[(*S*)-3-hydroxy-2-methylpropionate]) et **deux** déjà reportées pour cette espèce, 11 $\beta$ ,13-dihydrodeacylcynaropicrine et cynaropicrine.

- **Deux mégastigmanes** : décrits pour la première fois pour l'espèce *Volutaria lippii*, (6R,9R)-3-oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glucopyranoside et lippianoside E
- **Deux flavonoïdes** : dont **un** est décrit pour la première fois pour l'espèce *Volutaria lippii* (apigénine-7-O-glucoside) et la lutéoline
- **Deux acides phénoliques** : décrits pour la première fois pour l'espèce *Volutaria lippii* Acide caféique et acide férulique
- **Un alcène glucosylé** : décrit pour la première fois pour l'espèce *Volutaria lippii* (Z)-3-hexenyl O- $\beta$ -D-glucopyranoside
- **Un dérivé aromatique glucosylé** : décrit pour la première fois pour l'espèce *Volutaria lippii* (phenyl-methyl-O- $\beta$ -D-glucopyranoside)

**Mots clés** : *Volutaria lippii* (L.) ; Activités antioxydantes ; Analyses spectroscopiques ; Lactones sesquiterpéniques ; Flavonoïdes.

## Summary

This work concerns the study of the species *Volutaria lippii* syn. *Centaurea lippii*, belonging to the Asteraceae family; a plant of the Algerian flora which has been the subject of very few previous studies.

Our work began with the maceration of the aerial parts (leaves and flowers) in 70% methanol, followed by filtration, concentration and dilution with distilled water. The solution obtained was subjected to successive extractions with solvents of increasing polarity to give the chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol extracts, whose polyphenols and total flavonoids were quantified by colorimetric methods. These tests showed that the ethyl acetate extract has the highest content followed by the *n*-butanol extract. Secondly we proceeded to the evaluation of their antioxidant activity by the scavenging tests of the DPPH radical and the cation radical ABTS, the bleaching test of  $\beta$ -carotene and finally the test of cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC). The best result was obtained for the ethyl acetate extract followed by the *n*-butanol extract.

The results of the quantitative analyses and the evaluation of the antioxidant activity of these extracts, encouraged us to proceed with the fractionation of the ethyl acetate and *n*-butanol extracts, this step was carried out on columns of silica gel 60. The fractions obtained were purified by chromatography on preparative silica gel plates and by semi-preparative HPLC in reverse phase equipped with UV-Vis and IR detectors. These experiments allowed us to isolate and purify **twenty compounds**.

The structural determination of **fourteen** of the isolated and purified compounds was carried out by combining spectroscopic analysis techniques: <sup>1</sup>H NMR, HSQC, HMBC and COSY, mass spectrometry and UV-Vis spectrophotometry. These compounds were:

- **Six sesquiterpene lactones** including **a new one** that we describe for the first time in the literature: 3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -O-(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside), **three described** for the first time for the species *Volutaria lippii*: (3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ ,13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -O- $\beta$ -glucopyranoside, desacylcynaropicrin, deacylcynaropicrin 8-O-[(S)-3-hydroxy-2-methylpropionate]) and **two** already reported for this species, 11 $\beta$ ,13-dihydrodeacylcynaropicrin and cynaropicrin.



- **Two megastigmanes:** described for the first time for the species *Volutaria lippii*, (6R,9R)-3-oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glucopyranoside and lippianoside E
- **Two flavonoids:** one of which is described for the first time for the species *Volutaria lippii* (apigenin-7-*O*-glucoside) and luteolin
- **Two phenolic acids:** described for the first time for the species *Volutaria lippii*, caffeic acid and ferulic acid
- **A glucosylated alkene:** described for the first time for the species *Volutaria lippii*, (*Z*)-3-hexenyl *O*- $\beta$ -D-glucopyranoside)
- **A glucosylated aromatic derivative:** described for the first time for the species *Volutaria lippii*, phenyl-methyl-*O*- $\beta$ -D-Glucopyranoside

**Key words:** *Volutaria lippii* (L.); Antioxidant activities; Spectroscopic analyses;

Sesquiterpene lactones; Flavonoids.

## ملخص

يتعلق هذا العمل بدراسة النوع *Centaurea lippii* syn. *Volutaria lippii*, التي تنتمي الى عائلة Asteraceae, نبتة من النباتات الجزائرية, حيث كانت موضوع دراسات سابقة قليلة جدا. بدأ عملنا بنقع الأجزاء الهوائية ( أوراق و أزهار ) في الميثانول 70%, تبع بترشيح و تركيز وتخفيف بالماء المقطر. خضع المستخلص لمصادمات متتالية بواسطة مذيبات ذات قطبية متزايدة للحصول على المستخلصات (  $CHCl_3$ , AcOEt,  $n$ -BuOH ), حيث تم قياس كمية البوليفينول و الفلافونويد الكلي بطرق قياس الألوان . أظهرت هذه الاختبارات أن مستخلص AcOEt هو الأكثر فعالية يليه مستخلص  $n$ -BuOH. ثانيا قمنا بتقييم الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات عن طريق الكسح لجذر DPPH, جذر كابتون ABTS, اختبار تبييض  $\beta$ -carotène و أخيرا اختبار قدرة مضادات الأكسدة عن طريق تقليل النحاس CUPRAC. تم الحصول على أفضل نتيجة لمستخلص AcOEt متبوعا بمستخلص  $n$ -BuOH. شجعنا نتائج التحليلات الكمية و تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لهذه المستخلصات على المضي قدما في تجزئة مستخلصات AcOEt و  $n$ -BuOH, تم تنفيذ هذه الخطوة على عمود من هلام السيليكا 60 تمت تنقية الأجزاء المتحصل عليها بواسطة كروماتوغرافيا على ألواح هلام السيليكا التحضيرية وعن طريق HPLC شبه التحضيرية عكسي المرحلة المجهزة بكاشفات IR و UV-Vis. سمحت لنا هذه التجارب بعزل و تنقية عشرين مركبا. تم اجراء التحديد الهيكلي لأربعة عشر مركبا من المركبات المعزولة و المنقاة عن طريق الجمع بين تقنيات التحليل الطيفي: ( $^1H$  RMN, HSQC, COSY و), مطياف الكتلة و قياس الطيف الضوئي بالأشعة المرئية و فوق بنفسجية حيث تم تعيين :

- ستة لاكتونات سيسكيتيربينية, بما في ذلك واحدة جديدة و التي نصفها لأول مرة في المؤلفات:  
3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ , 13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -O-(6'-acetyl- $\beta$ -glucopyranoside)  
و ثلاثة منها وصفت لأول مرة بالنسبة للنوع *Volutaria lippii* :  
(3 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ , 13-dihydrodehydrocostuslactone 8 $\alpha$ -O- $\beta$ -glucopyranoside,  
desacylcynaropicrine, deacylcynaropicrine 8-O-[(S)-3-hydroxy-2-methylpropionate])  
و اثنان وصفت من قبل بالنسبة لهذا النوع: 11 $\beta$ ,13-dihydrodeacylcynaropicrine و cynaropicrine.
- اثنتين ميغاستيغمان وصفت لأول مرة بالنسبة للنوع *Volutaria lippii* :  
lippianoside E و (6R,9R)-3-oxo- $\alpha$ -ionol- $\beta$ -D-glucopyranoside.
- اثنتين فلافونويدات, واحدة وصفت لأول مرة بالنسبة للنوع *Volutaria lippii* : (apigénine-7-O-glucoside) و lutéoline.
- اثنتين من الأحماض الفينولية وصفت لأول مرة بالنسبة للنوع *Volutaria lippii* : Acide caféique و acide férulique.