

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة منتوري قسنطينة

UNIVERSITE MENTOURI – CONSTANTINE

N° d'ordre...

THESE

Série ...

Présenté à la faculté des Sciences exactes

Département de Chimie

Pour l'Obtention du Diplôme de

DOCTORAT en SCIENCES

En Chimie Organique

Option : Phytochimie

Présentée par:

Melle. MEZACHE Nadjet

THEME

**DETERMINATION STRUCTURALE ET EVALUATION
BIOLOGIQUE DE SUBSTANCES NATURELLES DE
QUELQUES ESPECES DE LA FAMILLE ASTERACEAE:
Senecio giganteus Desf. et *Chrysanthemum myconis* L.**

JURY

| | | |
|---------------------|----------------------------------|--------------|
| Abdelhamid BELATTAR | Prof. U. Mentouri de Constantine | Président |
| Salah AKKAL | Prof. U. Mentouri de Constantine | Rapporteur |
| Séverine DERBRÉ | M. C. U. d'Anger | Co-Encadreur |
| Farouk ZAIDI | M. C. U. de Sétif | Examineur |
| Nouredine AOUF | Prof. U. d'Annaba | Examineur |

Soutenue le 28/09/2010

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Salah AKKAL**, pour m'avoir accueilli dans son groupe de recherche et permis de réaliser cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur **Pascal RICHOMME**, Professeur de chimie organique à l'UFR Science pharmaceutique et ingénierie de la santé d'Angers de m'avoir accueilli dans son laboratoire SONAS.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Denis SÉRAPHIN**, Professeur de chimie organique à l'UFR Science pharmaceutique et ingénierie de la santé d'Angers pour avoir accepté Co-encadrer ma thèse en France. Je le remercie également pour m'avoir fait confiance et m'avoir conseillé tout en me laissant une grande liberté.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à Madame le Docteur **Séverine DERBRÉ**, Maître de conférences à l'UFR Science pharmaceutique et ingénierie de la santé d'Angers, pour avoir accepté également Co-encadrer ma thèse en France. Je la remercie encore d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Au laboratoire SONAS d'Angers, j'ai beaucoup appris avec elle les nouveaux outils chromatographiques, ce qui a donné plus de valeur à mon travail. Je la remercie pour m'avoir constamment guidé et aidé. Ses critiques constructives ont beaucoup contribué à l'amélioration du manuscrit.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Abdelhamid BELATTAR** de l'Université Mentouri de Constantine, pour le grand honneur qu'il me fait en présidant le jury de thèse.

J'aimerais également remercier Monsieur **Farouk ZAIDI** Maître de conférences de l'Université de Sétif pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le professeur **Noureddine AOUF** de l'Université d'Annaba pour avoir accepté de juger ce travail.

J'aimerais également citer ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour plusieurs aspects de ce travail. Je remercie en particulier Monsieur le Professeur **Hocine LAOUER** de l'université de Sétif pour la récolte et l'identification de l'espèce *Senecio giganteus* Desf., pour la réalisation de l'activité antibactérienne et pour son aide, Monsieur **Amar ZELAGUI** pour la récolte de l'espèce *Chrysanthemum myconis* L., Madame **M. C. AUMOND** et Madame **J. GATTO** pour la réalisation des testes antioxydants à l'UFR Science pharmaceutique et ingénierie de la santé d'Angers, laboratoire SONAS.

Je ne remerciais jamais assez **N. ZABAAT, S. MEZHOUD, S. LOUAAER, S. MOREL, A. DU LAC** et **K. ALOMAR** pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le témoignage de mes remerciements les plus amicaux.

Toute ma gratitude va enfin à mes parents pour leur soutien tout au long de mes études et durant cette thèse.

En manière de reconnaissance, je dédie ce travail

À mes chers parents, à mes frères et sœurs

Ainsi qu'à tous mes amis.

Abréviations et symboles

| | |
|---------------------------------|---|
| 1, 2, ... | Symboles utilisés pour les composés mentionnés dans la littérature |
| S1, S2, et C1, C2... | Symboles utilisés pour les composés identifiés dans cette étude |
| $[\alpha]_D$ | Pouvoir rotatoire |
| MeOH | Méthanol |
| BuOH | Butanol |
| Acote | Acétate d'éthyle |
| MeCN | Acétonitrile |
| EtOH | Ethanol |
| CH ₂ Cl ₂ | Dichlorométhane |
| MeOH-d ₄ | Méthanol deutérié |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| CDCl ₃ | Chloroforme deutérié |
| D ₂ O | Eau deutériée |
| CPC | Chromatographie de partage centrifuge |
| CLHP | High Pressure Liquid Chromatography |
| CC | Chromatographie sur Colonne ouverte |
| CCM | Chromatographie sur couche mince |
| SPE | Extraction en phase solide |
| VLC | Chromatographie liquide sous vide |
| RP | Phase inverse |
| ESI | ionisation par électrospray (electrospray ionization) |
| MS | Spectrométrie de masse |
| MS ⁿ | Spectrométrie de masse en n étapes |
| LC/MS | Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (Liquid chromatography/Mass Spectrometry) |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |
| RMN ¹ H | Spectre Résonance Magnétique Nucléaire du proton |
| RMN ¹³ C | Spectre Résonance Magnétique Nucléaire de carbone 13 |
| DEPT 135 | Spectre de carbone 13 réalisé en Distortionless Enhancement by Polarisation transfer |

| | |
|------------------|--|
| HMQC | Heteronuclear multiple Quantum Corrélation |
| HMBC | Heteronuclear multiple Bond Connectivity |
| COSY | Spectroscopie de corrélation |
| UV | Ultraviolet |
| VIS | Visible |
| t_R | Temps de rétention |
| R_f | Rapport frontal |
| ppm | Partie par million |
| δ_C | Déplacement chimique du carbone |
| δ_H | Déplacement chimique du proton |
| nm | Nanomètre |
| uma | Unité de masse atomique |
| mAU | Milli unité d'absorbance |
| Hz | Hertz |
| J | Constante de couplage |
| s | Singulet |
| d | Doublet |
| dd | Doublet des doublets |
| m | Multiplet |
| m | Massif |
| t | Triplet |
| m/z | Rapport masse/charge électrique |
| min | Minute |
| S.I | Toluène-Méthanol-Méthyle éthyle cétone (4:3:3) |
| S.II | Eau-Méthanol-Méthyle éthyle cétone-Acétyl acétone (13:3:3:1) |
| DPPH | 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle |
| EOR | Espèces oxygénées réactives |
| RL | radicaux libres |
| O_2^\bullet | Anion superoxyde |
| OH^\bullet | Radical hydroxyle |
| TE | Equivalent Trolox |
| IC ₅₀ | Concentration inhibitrice à 50% |
| AGEs | Advanced glycation and products |
| BSA | Albumine sérique bovine |

Table des matières

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| Bibliographie..... | 3 |
| CHAPITRE I | 4 |
| I. Etude botanique | 4 |
| I. 1. La famille des Astéracées..... | 4 |
| I. 1. 1. Généralités..... | 4 |
| I. 1. 2. Distribution..... | 5 |
| I. 1. 3. Systématique..... | 5 |
| I. 1. 4. Caractéristiques morphologiques des Astéracées..... | 6 |
| I. 2. Le genre <i>Senecio</i> | 6 |
| I. 2. 1. Systématique..... | 6 |
| I. 2. 2. Caractéristiques botaniques..... | 7 |
| I. 2. 3. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Senecio</i> | 7 |
| I. 2. 4. Utilisation en médecine traditionnelle..... | 10 |
| I. 3. Le genre <i>Chrysanthémum</i> | 10 |
| I. 3. 1. Systématique..... | 10 |
| I. 3. 2. Caractéristiques botaniques..... | 11 |
| I. 3. 3. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Chrysanthémum</i> | 11 |
| I. 3. 4. Utilisation en médecine traditionnelle..... | 16 |
| II. Les flavonoïdes | 16 |
| II. 1. Généralités..... | 16 |
| II. 1. 1. Définition, classification, distribution et biosynthèse des flavonoïdes..... | 16 |
| II. 2. Propriétés biologiques..... | 20 |
| II. 3. Analyse structurale des flavonoïdes..... | 24 |
| II. 3. 1. Fluorescence sous la lumière UV..... | 24 |
| II. 3. 2. Le rapport frontal R_f | 25 |
| II. 3. 3. Spectroscopie UV-Visible..... | 25 |
| II. 3. 3. 1. Absorption dans le Méthanol..... | 26 |
| II. 3. 3. 2. Absorption en présence des réactifs..... | 27 |
| II. 3. 4. Spectrométrie de masse..... | 30 |
| II. 3. 5. Résonance Magnétique Nucléaire (R. M. N)..... | 32 |
| II. 3. 5. 1. R. M. N. du proton..... | 32 |

| | |
|--|-----------|
| II. 3. 5. 2. R. M. N. du Carbone 13..... | 34 |
| III. Bibliographie..... | 36 |
| CHPITRE II Partie expérimentale..... | 47 |
| II. 1. Etude phytochimique de <i>Senecio giganteus</i>..... | 47 |
| II. 1. 1. Place dans la systématique..... | 47 |
| II. 1. 2. Description botanique..... | 47 |
| II. 1. 3. Répartition géographique..... | 48 |
| II. 1. 4. Travaux personnels..... | 49 |
| II. 1. 4. 1. Récolte du matériel végétal..... | 49 |
| II. 1. 4. 2. Extraction..... | 49 |
| II. 1. 4. 3. Isolement des composants de l'extrait n-butanol..... | 51 |
| II. 1. 4. 3. a. Purification sur colonne de polyamide..... | 51 |
| II. 1. 4. 3. b. Purification par Chromatographie de Partage Centrifuge..... | 54 |
| II. 1. 5. Conclusion..... | 84 |
| II. 2. Etude phytochimique de <i>Chrysanthemum myconis</i>..... | 85 |
| II. 2. 1. Place dans la systématique..... | 85 |
| II. 2. 2. Description botanique..... | 85 |
| II. 2. 3. Répartition géographique..... | 86 |
| II. 2. 4. Travaux personnels..... | 87 |
| II. 2. 4. 1. Récolte du matériel végétal..... | 87 |
| II. 2. 4. 2. Extraction..... | 87 |
| II. 2. 4. 3. Purification des composants de l'extrait n-butanol de <i>C. myconis</i> | 90 |
| II. 2. 4. 5. Purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de <i>C. myconis</i> | 92 |
| II. 2. 4. 5. Purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle des fleurs de <i>C. myconis</i> | 93 |
| II. 3. Bibliographie..... | 96 |
| CHAPITRE III Détermination structurale des composés isolés de <i>Senecio giganteus</i> et <i>Chrysanthemum myconis</i>..... | 98 |
| III. 1. Détermination structurale des composés isolés de <i>Senecio giganteus</i> Desf..... | 98 |
| • Appareillage..... | 98 |
| III. 1. 1. Détermination structurale du composé S1..... | 99 |
| III. 1. 2. Détermination structurale du composé S2..... | 104 |
| III. 1. 3. Détermination structurale du composé S3..... | 110 |

| | |
|---|------------|
| III. 1. 4. Détermination structurale du composé S4..... | 116 |
| III. 1. 5. Détermination structurale du composé S5..... | 122 |
| III. 1. 6. Détermination structurale du composé S6..... | 129 |
| III. 1. 7. Détermination structurale du composé S7..... | 134 |
| III. 1. 8. Détermination structurale du composé S8..... | 139 |
| III. 1. 10. Détermination structurale du composé S10..... | 146 |
| III. 1. 11. Détermination structurale du composé S11..... | 152 |
| III. 1. 12. Détermination structurale du composé S12..... | 157 |
| III. 2. Détermination structurale des composés isolés de <i>Chrysanthemum myconis</i>..... | 161 |
| III. 2. 1. Détermination structurale du composé C1..... | 161 |
| III. 2. 2. Détermination structurale du composé C2..... | 165 |
| III. 2. 3. Détermination structurale du composé C3..... | 167 |
| III. 2. 4. Détermination structurale du composé C4..... | 171 |
| III. 3. Bibliographie..... | 175 |
| CHAPITRE IV Evaluation biologiques des composés isolés..... | 178 |
| I. Tests réalisés sur <i>Senecio giganteus</i> | 178 |
| I. 1. Test antioxydant..... | 178 |
| I. 2. Test anti-AGEs..... | 180 |
| II. Test réalisé sur <i>Chrysanthemum myconis</i> | 183 |
| II. 1. Test antibactérien..... | 183 |
| III. Bibliographie..... | 185 |
| CONCLUSION..... | 186 |

INTRODUCTION

Depuis toujours, l'homme a pu exploiter les plantes qui constituent une grande partie du monde vivant pour couvrir ses besoins de nourriture, d'abri et pour traiter toutes les maladies.

L'efficacité des plantes utilisées dans la médecine populaire est due à la présence des produits chimiques. Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent.

De plus, les plantes synthétisent une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires. Ces derniers sont des "antibiotiques" au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes. Donc, les plantes ont été une riche source de médicament parce qu'elles produisent une foule de molécules bioactives, dont la plupart jouent le rôle de défense chimique contre les prédateurs ou des agents infectieux [1]. Elles restent la source prédominante de médicaments pour la majorité de la population mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement. Environ 40 % des médicaments sont ainsi dérivés de la nature [2].

L'intensité des ressources naturelles qui caractérise l'Algérie [3] ayant l'intérêt biomédicale a poussé les chercheurs Algériens à explorer ces ressources sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique [4, 5].

L'objectif de mon travail de thèse consiste à isoler des substances naturelles qui peuvent trouver une utilisation en thérapeutique. Ainsi, deux plantes de la famille Asteraceae ont fait l'objet d'une étude phytochimique: *Chrysanthemum myconis* L. et *Senecio giganteus* Desf.

Ce travail sera présenté comme suit :

- ✓ Dans un premier chapitre, nous présenterons une étude bibliographique sur les connaissances botaniques et phytochimiques de la famille Asteraceae et sur les deux genres étudiés. Nous aborderons également un aperçu général sur les flavonoïdes, principaux constituants de ces deux plantes.

- ✓ Le second chapitre sera consacré au travail personnel consistant en la séparation et la purification des composés obtenus. Nous présenterons également dans ce chapitre un aperçu botanique sur chaque plante.
- ✓ L'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés isolés seront détaillées dans le troisième chapitre.
- ✓ L'évaluation biologique de la majorité des composés isolés des deux espèces sera présentée dans le quatrième chapitre.
- ✓ À la fin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Bibliographie

- [1] Cox P. A., Balick M. J., (1994), The ethnobotanical approach to drug discovery. *Journal of Science American* 270(6): 82-87.
- [2] Newman D. J., Cragg G. M., (2007), Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* 70: 461-477.
- [3] Quezel P., Santa S., (1962), *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I et Tome II, C. N. R. S. Paris.
- [4] Akkal S., Benayache F., Benayache S., Jay M., (1997), Flavonoids from *Centaurea incana* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 25(4): 361-362.
- [5] Medjroubi K., Benayache F., Bermejo J., (2005), Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 76(7-8): 744-746.

I. Etude botanique et métabolites secondaires isolés de *Chrysanthémum myconis* et *Senecio giganteus* Desf.

I. 1. La famille des Astéracées

I. 1. 1. Généralités

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur.

La famille Asteraceae est la plus vaste du groupe des dicotylédones. Plusieurs plantes de cette famille sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, *etc.*) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, *etc.*).

En effet, il a été rapporté que les fleurs et les feuilles de ces plantes possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires [1]. De ce fait, de nombreuses espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle [2].

Les principes amers (sesquiterpènes lactones), les corps insaturés, les flavonoïdes, les coumarines, les polyphénols, les terpènes..., principaux constituants chimiques des Astéracées expliquent la diversité de leurs activités pharmacologiques [2]. Le **Tableau I. 1** montre la variation en constituants chimiques d'une espèce de la famille des Astéracées de valeur alimentaire et médicinale qui est la camomille (*Matricaria recutita* L.) [3].

| Constituants chimiques | Nom trivial | structure |
|------------------------|-------------------------|-----------|
| Flavonoïde | Apigénine-7-O-glucoside | 1 |
| Sesquiterpène lactone | Matricine | 2 |
| Huile essentielle | Chamazulène | 3 |
| Coumarine | Ombelliférone | 4 |
| Acide phénolique | Syringique | 5 |

Tableau I. 1 : Quelques constituants chimiques de la camomille.

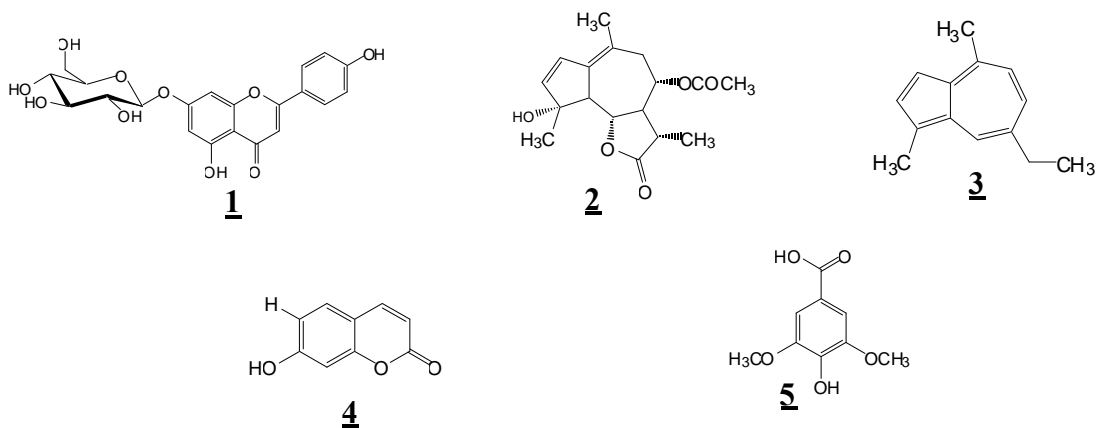


Figure I. 1: Structures chimiques des quelques produits isolés de la camomille.

I. 1. 2. Distribution

La famille des Astéracées est la plus étendue du monde végétal, avec environ 25000 espèces réparties en 1300 genres, dispersées sur toute la Terre [4].

Cette famille est la plus vaste du groupe des dicotylédones. On y retrouve un grand nombre d'espèces très communes dans les champs et les villes. Ce sont des plantes herbacées pour la plupart. Mais, il existe de rares espèces arborescentes qui peuplent principalement les régions tropicales de la planète (Genres: *Olearia*, *Cassinia*, *Baccharis*, *Senecio*, par exemple).

I. 1. 3. Systématique

| | |
|--------------------|-------------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Sous-règne | Tracheobionta (Plantes vasculaires) |
| Embranchement | Phanerogamae (Phanérogames) |
| Sous-embranchement | Magnoliophytina (Angiospermes) |
| Classe | Magnoliopsida (Dicotyledones) |
| Sous-classe | Asteridae |
| Ordre | Asterales |
| Famille | Asteraceae (Compositae) |

I. 1. 4. Caractéristiques morphologiques des Astéracées

Les Astéracées sont caractérisées par la disposition des fleurs en capitule. Les capitules sont constitués du regroupement de fleurs sessiles sur un même réceptacle. Les fleurs sont de deux types : fleurs tubulées (tubuliflores) et fleurs ligulées (liguliflores). Le tout donnant à l'ensemble l'apparence d'une seule fleur. Le capitule est entouré à la base généralement par 1 à 6 séries de bractées dont l'ensemble forme l'involucre [4].



Figure I. 2: Types de fleurs des Astéracées.

Les feuilles sont le plus souvent alternes. Elles peuvent aussi être opposées ou réunies en rosette principale (Pâquerette).

Les fruits sont des akènes généralement surmontées d'une aigrette de poils (Pappus) apparaissant sous la forme d'écailles, de soies, d'arêtes ou d'une couronne qui favorise leur dispersion par le vent.

I. 2. Le genre *Senecio*

I. 2. 1. Systématique

Le genre *Senecio* appartient à la famille des Astéraceae, tribu des Senecioneae [4].

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Embranchement | Phanerogamae (Phanérogames) |
| Classe | Magnoliopsida (Dicotyledones) |
| Ordre | Asterales |
| Famille | Asteraceae (Compositae) |
| Tribu | Senecioneae |
| Genre | <i>Senecio</i> Linné. |

I. 2. 2. Caractéristiques botaniques

Le genre *Senecio* est très vaste, d'environ 1500 espèces dont certaines ont développé une succulence des tiges, feuilles, tronc ou racines [5]. Il est répandu dans tous le monde et la majorité des espèces sont concentré en Afrique.

Ces espèces sont des plantes herbacées annuelles et vivaces, arbustes (voire très rarement arbres), à canaux résineux.

* **Feuilles** : elles sont alternes et spirales, généralement simples, lobées où dentées.

* **Fleurs** : le principal type d'inflorescence est simple ou ramifiée à capitules en coupe assez large vertes libres disposées sur 1-2 ranges. Les fleurs sont tubulées, de couleurs blanches, jaunes, rouges ou pourpres.

* **Fruit** : Il s'agit à la base d'un fruit à une graine sec et indéhiscents, ou akène presque cylindrique, surmonté d'une aigrette (pappus) à soies très fines disposées sur plusieurs rangs [6].

I. 2. 3. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Senecio*

Une large variété de produits naturels caractérise les espèces du genre *Senecio*, ainsi les plus rencontrés sont les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpènes et d'autres métabolites secondaires tels que, les quinones, les acides phénoliques *etc...* Voici quelques exemples de molécules des principales classes de métabolites secondaires dans le genre *Senecio*:

- **Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes les plus rencontrés dans le genre *Senecio* sont les dérivés de la pyrrolizidine (**Figure I. 3**).

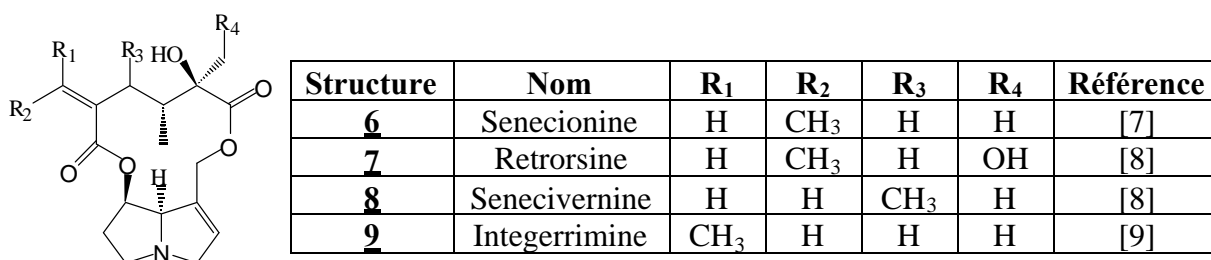


Figure I. 3 : Structures chimiques des alcaloïdes isolés de quelques espèces du genre *Senecio*.

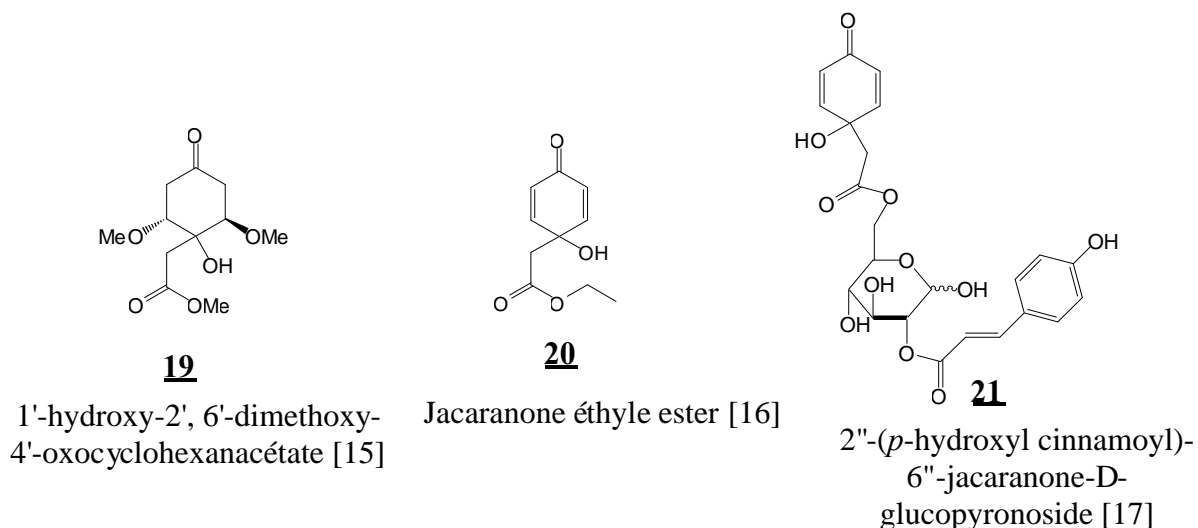
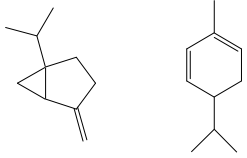
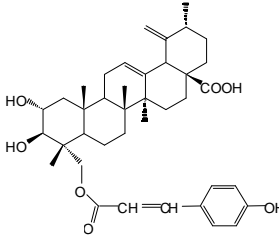
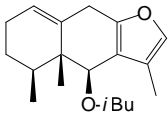
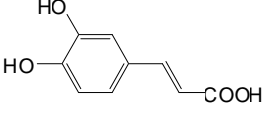


Figure I. 5: Structures chimiques de quinones isolées de quelques espèces du genre *Senecio*.

- **Autres composés**

| Constituant | Structure | Composé | Référence |
|---------------------|---------------|---|-----------|
| Huiles essentielles | 22, 23 |  Sabinène α-pinène | [18] |
| Triterpène | 24 |  HO, HO, COOH, CH=CH, OH | [19] |
| Sesquiterpène | 25 |  O- <i>i</i> Bu | [15] |
| Acide phénolique | 26 |  HO, HO, COOH | [11] |

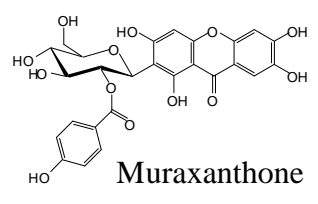
| | | | |
|----------|----|--|------|
| Xanthone | 27 |  Muraxanthone | [20] |
|----------|----|--|------|

Tableau I. 2 : Divers composés isolés de quelques espèces du genre *Senecio*.

I. 2. 4. Utilisation en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces du genre *Senecio* sont utilisées en médecine traditionnelle et folklorique à travers le monde pour certaines propriétés thérapeutiques, anti-inflammatoires, emménagogues, vaso-dilatateurs, *etc.* [21, 22], illustré par le **Tableau I. 3**.

| Espèce | Propriété | Référence |
|------------------------|--|-----------|
| <i>S. pseudotites</i> | Diurétique, antiasthmatique, | [23] |
| <i>S. brasiliensis</i> | Anti-inflammatoire, régulateur de sang, douleur d'estomac, Anti-ulcérrogénique | [24, 25] |
| <i>S. latifolius</i> | Anti-brûlure, Anti-blessure, émétique, lavement | [26] |

Tableau I. 3 : Exemples d'utilisation en médecine traditionnelle de quelques espèces du genre *Senecio*.

L'empoisonnement par des plantes du genre *Senecio* est l'une des causes principales pour des pertes parmi les bétails, aux moutons et aux chevaux à travers le monde, principalement au sud américain [27]. La toxicité de certaines espèces telle que, *S. brasiliensis*, *S. cisplatinus*, *S. heterotrichus*, *S. leptolobus*, *S. selloi* et *S. oxiphyllus* [28], a suscité des recherches phytochimiques intensives qui ont montré que cela est dû à l'activité cytotoxique notamment l'hépatotoxicité des alcaloïdes pyrrolizidiniques, principaux métabolites secondaires du genre *Senecio* [8] [29, 30].

I. 3. Le genre *Chrysanthemum*

I. 3. 1. Systématique

Le genre *Chrysanthemum* appartient à la famille Asteraceae, tribu Anthemideae [31].

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Embranchement | Phanerogamae (Phanérogames) |
| Classe | Magnoliopsida (Dicotyledones) |
| Ordre | Asterales |
| Famille | Asteraceae (Compositae) |
| Tribu | Anthemideae |
| Genre | <i>Chrysanthemum</i> Linné. |

I. 3. 2. Caractéristiques botaniques

De la famille des Astéracées, les chrysanthèmes font partie d'une vaste tribu (Anthemideae). Le genre *chrysanthemum* est très grand, d'environ 140 espèces de couleurs et de formes extrêmement variées. A la floraison, les chrysanthèmes produisent une multitude de fleurs solitaires. Ils ont une longue tradition horticole.

Il y a plus de 2000 ans, les chinois savaient le cultiver. Dans la Chine et le Japon anciens, le chrysanthème avait une valeur symbolique importante (*Chrysanthemum horturum*, par exemple) (chrysanthème des fleuristes). Ses fleurs ont pour signification, l'amitié, la paix, la joie, la santé et l'optimisme. Vers la fin du XIXème siècle, les chinois et les japonais en connaissaient environ 3000 variétés. Le genre a également des représentants qui poussent dans nos régions [32].

Les chrysanthèmes sont des plantes annuelles ou vivaces de 20 à 120 cm de haut, à tiges dressées. Les feuilles sont alternes, incisées ou très divisées. Les capitules sont grands, longuement pédonculés, comprenant des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées (rayons manquant quelquefois).

Les fleurs sont ligulées pastillées et fertiles. Les fruits sont des akènes de 2-3 mm munis de 5-10 côtes [33].

I. 3. 3. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre

Chrysanthemum

Le genre *Chrysanthemum* est connu pour être une riche source de flavonoïdes [34], de sesquiterpènes lactones [35], de coumarines [36] et d'acides phénoliques [37] avec de

grande variété d'activités biologiques. Voici quelques exemples de molécules des principales classes de métabolites secondaires dans le genre *chrysanthemum*.

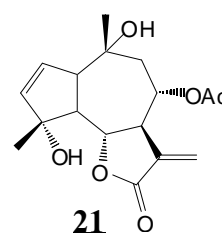
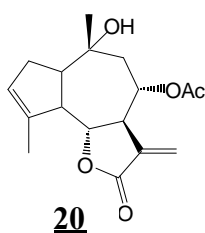
- **Les sesquiterpènes lactones**

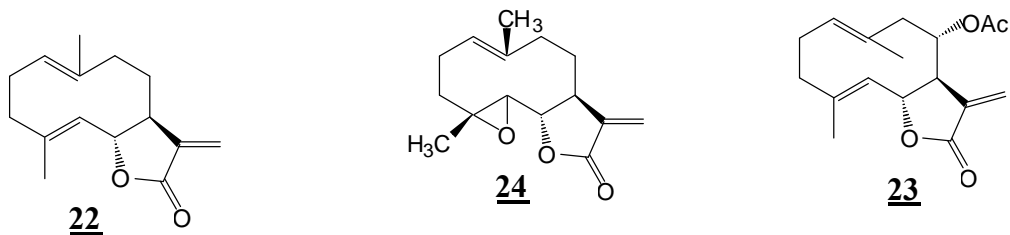
Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe de produits naturels très importants dans la famille des Astéracées ayant une large variété d'activités biologiques. Ils possèdent des propriétés ; neurotoxique [38], anti-inflammatoire [39], anti-leucémique [40], antifongique [41], anti-tumoral [42].

Les sesquiterpènes lactones présents dans le genre *Chrysanthemum* sont essentiellement des guaianolides et des germacranolides. Le tableau ci-dessous représente les dérivés des lactones sesquiterpéniques isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.

| Espèce | Nom | structure | Activité biologique | Référence |
|---|---|------------------|---|------------------|
| <i>C. coronarium</i> <i>C. boreale</i> | Cumambrin A | 20 | Antimicrobienne | [43, 44] |
| <i>C. boreale</i> | 8-acetoxy-4,10-dihydroxy-2,11(13)-guaïadiène-12,6-olide | 21 | Cytotoxique | [45] |
| | Costunolide | 22 | Antimicrobienne | [46] |
| | Tulipinolide | 23 | Antimicrobienne | [46] |
| <i>C. parthenium</i> | Parthenolide | 24 | Spasmolytique Anti-inflammatoire Anti-sécrétoire Antimicrobienne | [47] |

Tableau I. 4: Sesquiterpènes lactones isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.

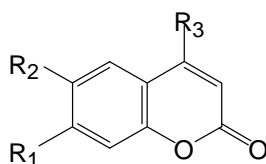




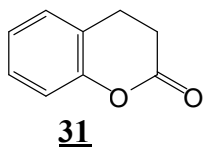
- **Les coumarines**

Les coumarines sont des produits naturels très actifs. Ils ont des propriétés phototoxique, antibiotique, spasmolytique, antifongique et anticancéreuse [48].

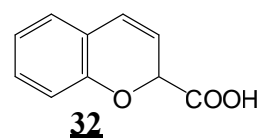
Les structures coumariniques les plus courantes dans le genre *Chrysanthemum* sont les dérivées de la coumarine. La figure ci-dessous représente les dérivés coumariniques isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.



| Structure | Nom | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Référence |
|-----------|--------------------|------------------|------------------|-----------------|------------|
| <u>25</u> | Coumarine | H | H | H | [49] |
| <u>26</u> | Herniarine | OCH ₃ | H | H | [45], [49] |
| <u>27</u> | Umbelliferone | OH | H | CH ₃ | [45], [49] |
| <u>28</u> | Aesculetine | OH | OH | H | [49] |
| <u>29</u> | 4-Hydroxycoumarine | H | H | OH | [49] |
| <u>30</u> | Scopoletine | OH | OCH ₃ | H | [45] |



31
Dihydrocoumarine [49]



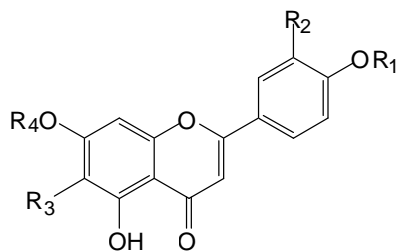
32
Acide coumarinique [49]

Figure I. 6: Structures chimiques de coumarines isolées de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.

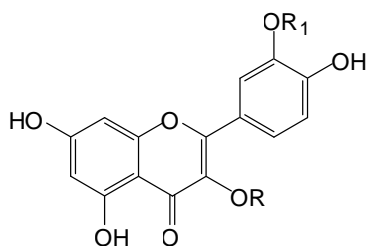
- **Les flavonoïdes**

Les espèces du genre *Chrysanthemum* ont été aussi démontrées pour produire une large variété de flavonoïdes [50, 51] possédant des propriétés anti-inflammatoire, anti-cancer [52] et Anti-virus de type 1 (VIH-1) [51, 53].

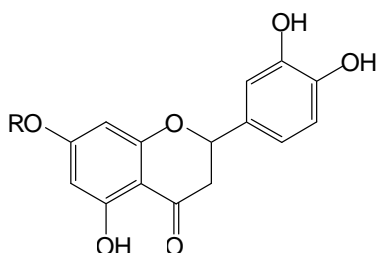
Les flavonoïdes identifiés dans le genre *Chrysanthemum* sont les flavonols, les flavones et les flavanones, illustrés par la **Figure I. 7**.



| Structure | Nom | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|-----------|------------------------------------|-----------------|------------------|----------------|-----------------|
| 33 | Apigénine | H | H | H | H |
| 34 | Acacétine | CH ₃ | H | H | H |
| 35 | Lutéoline | H | OH | H | H |
| 36 | Diosmétine | CH ₃ | OH | H | H |
| 37 | Eupatorine | CH ₃ | H | OH | H |
| 38 | Scopolétine | CH ₃ | OCH ₃ | OH | CH ₃ |
| 39 | Apigénine-7- <i>O</i> -glucoside | H | H | H | Glu |
| 40 | Acacétine-7- <i>O</i> -glucoside | CH ₃ | H | H | Glu |
| 41 | Lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside | H | OH | H | Glu |
| 42 | Diosmétine-7- <i>O</i> -glucoside | CH ₃ | OH | H | Glu |
| 43 | Eupatorine-7- <i>O</i> -glucoside | CH ₃ | H | OH | Glu |
| 44 | Scopolétine-7- <i>O</i> -glucoside | CH ₃ | OCH ₃ | OH | Glu |

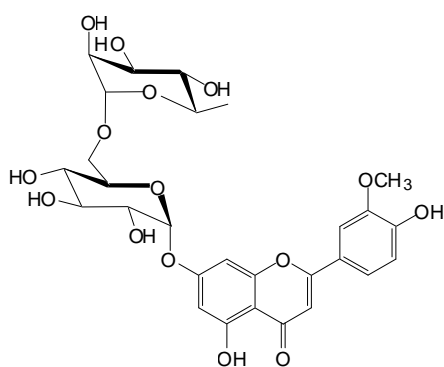


| Structure | Nom | R ₁ | R |
|-----------|--------------------------------------|-----------------|-----|
| 45 | Quercétine | H | H |
| 46 | Isorhamnétine | CH ₃ | H |
| 47 | Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside | H | glu |
| 48 | Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside | CH ₃ | glu |



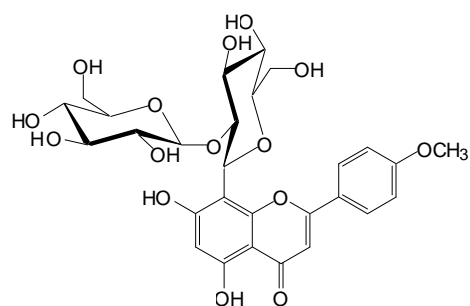
| Structure | Nom | R |
|-----------|-------------------------------------|-----|
| 49 | Eriodictyole | H |
| 50 | Eriodictyole-7- <i>O</i> -glucoside | glu |

Figure. I. 7: Structures chimiques de flavonoïdes identifiés dans l'espèce *C. morifolium* Ramat [54].



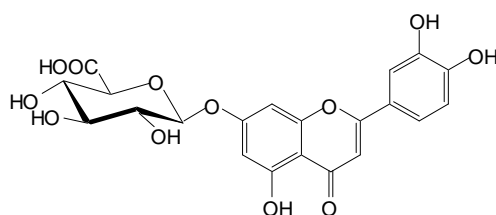
51

Diosmétique-7-O-rutinoside [55]



52

2''-glucosyl-8-C-glucosyl-4'-O-méthylapigénine [56]

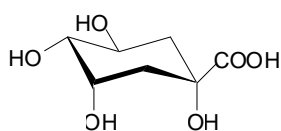


53

Lutéoline 7-O- β -glucuronide [57]

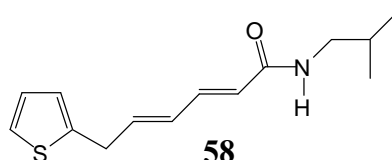
Figure. I. 8 : Structures chimiques des flavonoïdes isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.

• **Divers composés**



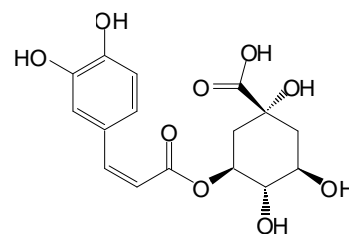
54

Acide quinique [54]



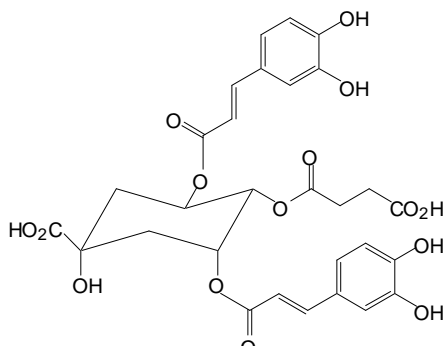
58

N-isobutyl-6-(2-thiényl)-2E,4E-héxadienamamide [58]



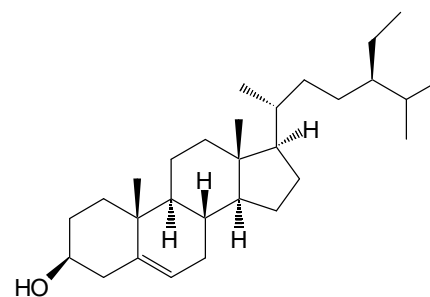
55

Acide chlorogénique [59]



56

Acide 4-succinyl-3,5-dicafféoylquinique [60]



57

β -Sitostérol [61]

Figure. I. 9 : Structures chimiques des composés isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.

I. 3. 4. Utilisation en médecine traditionnelle

Les espèces du genre *chrysanthemum* sont connues pour avoir une activité médicinale et certaines d'elles sont utilisées en médecine traditionnelle.

En médecine folklorique Chinoise, plusieurs espèces sont utilisées. A titre d'exemple, l'espèce *C. morifolium* Ramat est largement utilisée comme complément alimentaire ou tisane. Elle est considérée comme un aliment de santé par de nombreux consommateurs [62, 63].

L'espèce *C. indicum* est utilisée pour traiter plusieurs maladies infectieuses et les troubles d'hypertension en médecine Coréen et Chinoise [64]. Le **Tableau I. 5** représente des propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.

| Espèce | Propriété thérapeutique | Référence |
|--|--|--------------|
| <i>C. macrocarpum</i> | Antiparasitaire | [56] |
| <i>C. coronarium</i> L. | Antibactérienne Antiparasitaire | [65] [66] |
| <i>C. trifurcatum</i> et <i>C. segetum</i> | Maladies hépatiques et biliaires | [67] |
| <i>C. indicum</i> | Anti-inflammatoire Antibactérienne Antivirale Antioxydante Immunomodulatrice | [68-70] |
| <i>C. morifolium</i> | Antibactérienne Antifongique Antivirale Anti-inflammatoire Parkinson Troubles nerveux | [71, 72] |

Tableau I. 5 : Utilisation en médecine traditionnelle de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.

II. Les flavonoïdes

II. 1. Généralités

II. 1. 1. Définition, classification, distribution et biosynthèse des flavonoïdes

II. 1. 1. a. Définition

Les flavonoïdes font partie de la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments universels des végétaux. Ils se sont révélés être de bon marqueurs taxonomiques pour la famille des Astéracées. Tous les flavonoïdes (presque 6500) [73]

possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (**Figure I. 10**) [74].

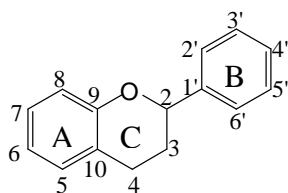


Figure. I. 10: 2-phénylchromane (**59**).

II. 1. 1. b. Classification

Les flavonoïdes sont des composés structurellement proches possédant le même squelette type à 15 carbones ; deux noyaux phényles (A et B) et un hétérocycle (C) contenant un atome d'oxygène (**Figure. I. 10**). La **Figure I. 11** illustre les principales classes de flavonoïdes.

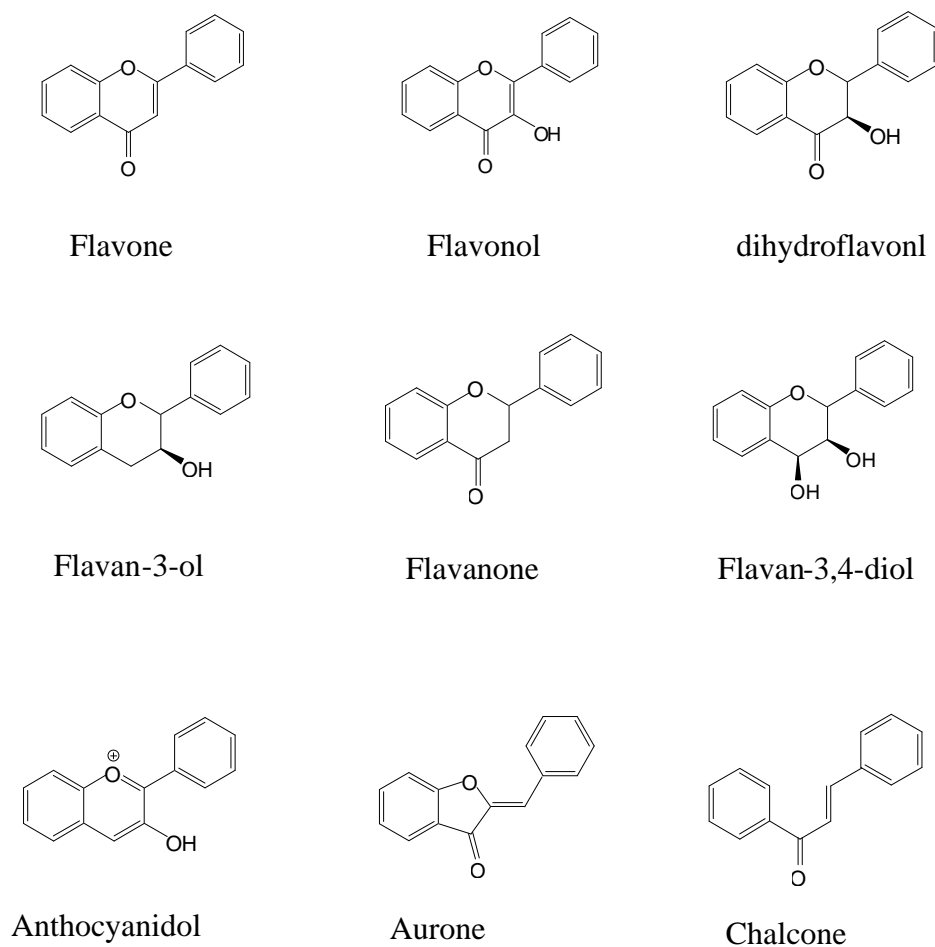


Figure I. 11: Les principales classes de flavonoïdes [74].

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4' et / ou 6. Généralement, un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous forme de C- ou O-glycosylés. Les O-hétérosides (en 3 ou 7) sont plus fréquents que les C-hétérosides (en 6 ou 8).

Les oses les plus communs sont le rhamnose, le glucose, le galactose et l'arabinose. Les acides glucuronique et galacturoniques sont rares [75].

II. 1. 1. c. Distribution dans la famille des Astéracées

Les flavonoïdes se sont révélées être de bons marqueurs taxonomiques pour la famille Asteraceae. Plus de 4700 flavonoïdes ont été inclus dans un système de calcul spécialement conçu à des fins chimiotaxonomiques. Ce système a été appliqué par Emerenciano *et al.* [76] sur les tribus et les sous-tribus de la famille Asteraceae (**Tableau I. 6**). Ce calcul peut être appliqué pour les autres familles.

| Tribus | Flavonols | Flavones | Flavanones | Chalcones | Aurones | Dihydroflavonols | Dihydrochalcones |
|--------------|-----------|----------|------------|-----------|---------|------------------|------------------|
| Anthemideae | 438 | 387 | 19 | 1 | 0 | 4 | 0 |
| Astereae | 316 | 97 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Barnadesieae | 122 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Calenduleae | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cardueae | 50 | 161 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Eupatorieae | 149 | 121 | 26 | 6 | 0 | 4 | 0 |
| Gnaphalieae | 226 | 64 | 30 | 18 | 1 | 2 | 10 |
| Helenieae | 552 | 209 | 61 | 14 | 16 | 7 | 0 |
| Heliantheae | 392 | 181 | 52 | 138 | 87 | 1 | 0 |
| Inulea | 79 | 10 | 11 | 0 | 0 | 7 | 0 |
| Lactuceae | 49 | 343 | 11 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Liabeae | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| Mutisieae | 31 | 29 | 19 | 3 | 0 | 3 | 3 |
| Plucheeae | 8 | 1 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Senecioneae | 12 | 1 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| Vernonieae | 5 | 22 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 |

Tableau I. 6: Distribution des différents types de flavonoïdes dans les différentes tribus de la famille Asteraceae.

II. 1. 1. d. Biosynthèse

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en règle générale le 4-coumaroyl-CoA, pour obtenir la 4, 2', 4', 6'-tetrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthase). Dans les conditions physiologiques normales, cette chalcone tend à s'isomériser en flavanone sous l'action de la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à la seule (2S)-flavanone. Cette chalcone peut également se cycliser en aurone. Il est le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes comme le montre la **Figure I. 12** [74].

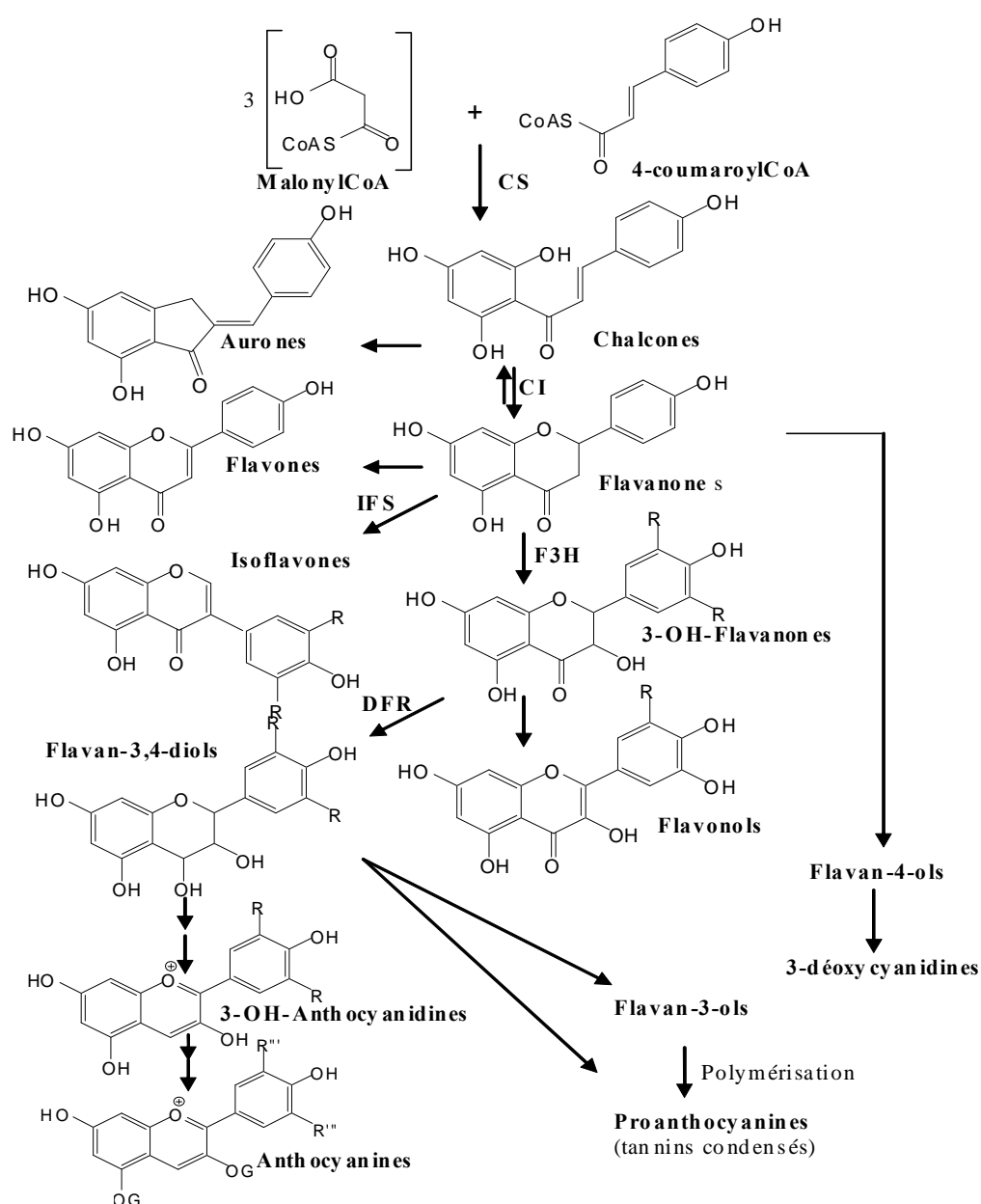


Figure I. 12 : Biosynthèse des flavonoïdes.

* **Enzymes** : CS : chalcone synthase ; CI : chalcone isomérase ; F3H : Flavanone 3-hydroxylase ; IFS : isoflavone synthase ; DRF : dihydroflavonol reductase ; FS : flavonol synthase ; AS : anthocyanin synthase.

* **Substituants** : R=H, OH ou OCH₃ et OG= O-sucre [77].

Remarque : cas particulier des flavonoïdes C-méthylés

D'après Vederas *et al.* [78], la biosynthèse des chalcones C-méthylées s'expliquerait par la présence d'une méthylchalcone synthase qui catalyserait la réaction de condensation entre un méthylmalonyl-CoA et le 4-coumaroyl-CoA pour donner la chalcone méthylée correspondante qui par suite des réactions présentées dans la **Figure I. 12** conduirait aux autres flavonoïdes C-méthylés. L'existence d'une telle enzyme constitue un des thèmes de recherche de Schröder *et al.* [79]. Néanmoins en septembre 2007, ce groupe de chercheurs n'a pas encore isolé cette enzyme.

II. 2. Propriétés biologiques

II. 2. 1. Intérêt vis-à-vis des plantes

Les flavonoïdes sont l'un des plus grands groupes de métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans les plantes. Ils interviennent comme des composés de défense ainsi que dans la signalisation de la reproduction, de la pathogenèse et de la symbiose [80, 81]. Les flavonoïdes végétaux sont impliqués dans le mécanisme d'intervention contre l'infection par des micro-organismes [82] ou l'attaque par les herbivores [83]. Les flavonoïdes sont également impliqués dans la production de nodosités des racines comme un système de fixation de l'azote après l'infection par la bactérie *Rhizobium* dans une variété de plantes légumineuses [84]. Ils sont des sources de pigments pour la coloration des composés de fleurs [85] et jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes [86].

II. 2. 2. Intérêt pharmacologique

Les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmaco-biologiques. De nombreux travaux semblent indiquer qu'ils possèdent des propriétés anti-oxydantes [87-93], anti-inflammatoires [94, 95], anti-VIH [96, 97], antitumorales spécialement lorsqu'ils sont utilisés conjointement avec d'autres agents chimiothérapeutiques [98, 99], antiviraux [100], antibactériens [101], antiallergiques [102].

Parmi les flavonoïdes d'une importance majeure alimentaire, les flavonols. Plusieurs études ont indiqué qu'une consommation élevée est associée au flavonols réduit par conséquent les maladies graves telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires [103, 104]. Ceci a conduit à la conviction qu'un régime alimentaire riche en fruits et légumes dont largement les flavonols se produisent, contribue à une bonne santé [105].

Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels.

II. 2. 3. Activité anti-oxydante des flavonoïdes

Ces dernière années, une importance particulière a été accordée aux propriétés anti-oxydantes des flavonoïdes [106-108] qui sont attribuées à :

- leur capacité de piéger directement les RL (radicaux libres).
- de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des EOR (Espèces oxygénées réactives).
- d'inhiber quelques enzymes en particulier oxydases.
- d'activer les enzymes anti-oxydantes et de réduire les radicaux α -tocophéryl.

II. 2. 3. 1. Piégeage direct de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox [109], les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^\bullet) comme le superoxyde, le radical alkoyle et le OH^\bullet par transfert d'hydrogène

(Figure I. 13).

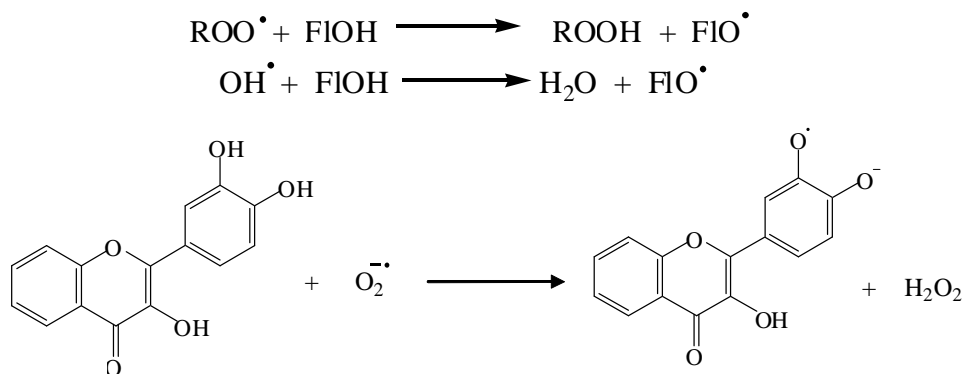
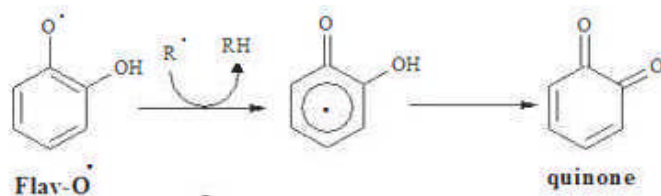


Figure I. 13: Réaction des flavonoïdes avec les EOR.

(D'après Densiov *et al.* [110])

Le radical aroxyde résultant (Flav-O[•]) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.



De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur (scavenger) des radicaux libres [109] [111]. Ces travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- i) La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons [112, 113].
- ii) La double liaison C2=C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité radical scavenger des flavonoïdes [113].
- iii) La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2=C3 augmente également la capacité radical scavenger des flavonoïdes (la substitution du groupement 3-OH conduit à la réduction de l'activité anti-oxydante) [113].

II. 2. 3. 2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu²⁺) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense anti-oxydant (par exemple, Fe pour la catalase, Cu pour la ceruloplasmine, Cu et Zn pour la superoxyde dismutase).

Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène [106]. Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques ([114, 115]. Les études menées par Van Acker *et al.* [116] sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont pu ressortir les sites potentiels pour la chélation des ions métalliques (**Figure I. 14**); (i) un noyau catéchol sur le cycle B, (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C [117, 118].

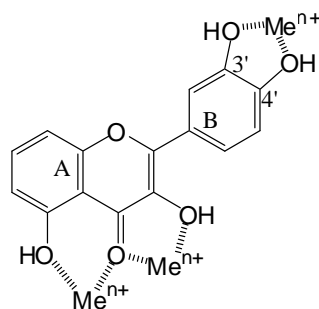


Figure I. 14: Flavonoïdes et leurs sites de chélation des ions métalliques.

II. 2. 3. 2. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $O_2^{\cdot-}$ et d'autres EOR, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, la lipooxygénase, la monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transférase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase [110] [117].

- **Inhibition de la xanthine oxydase**

Depuis 1968, quand McCord et Fridovich ont démontré la participation de la xanthine oxydase (XO) dans la génération des radicaux libres, l'intérêt aux nouvelles propriétés de cette enzyme s'est considérablement accru. Son rôle dans la génération des EOR dans plusieurs pathologies a été largement étudié. L'allopurinol est le seul inhibiteur de la XO utilisé en clinique pour contrôler la production de l'acide urique dans la goutte et l'hyperuricémie [118, 119]. Cependant, la toxicité sévère de l'allopurinol a été rapportée [120]. Pour cela, la recherche de nouveaux inhibiteurs dépourvus d'effets indésirables est toujours d'actualité. Les composés phénoliques d'origine naturelle, comme les flavonoïdes, semblent être des inhibiteurs prometteurs de la xanthine oxydase. Plusieurs études sur des polyphénols naturels (surtout les flavonoïdes), sous forme de plantes entières ou extraits purifiés, ont montré qu'ils peuvent être une source importante d'inhibiteurs de la XO. Cos *et al.* [111] ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production de l'acide urique par la XO. Ils ont ainsi déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la XO. Ces chercheurs ont montré que seuls les flavonols et les flavones ont la capacité d'inactiver l'enzyme, ceci montre l'importance de la double liaison C2=C3 dans l'inhibition de la XO. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Des études

ultérieures menées par Danny *et al.* [121] montrent clairement l'importance de cette structure plane dans l'inhibition de la xanthine oxydase. En comparant les activités des flavones et de leurs analogues flavonols, Cos *et al.* [111] ont constaté que l'absence du groupe hydroxyle en C-3 augmente légèrement l'activité. Ils ont montré également que le cycle B n'a que peu d'influence sur cette inhibition et que les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés.

II. 3. Analyse structurale des flavonoïdes

Les méthodes d'analyse structurale comprennent des méthodes chimiques et physico-chimiques. Les techniques les plus couramment utilisées sont :

II. 3. 1. Fluorescence sous la lumière UV

La fluorescence d'un flavonoïde en UV (365 nm) est l'étape primaire et fondamentale de son analyse structurale. Chaque classe des flavonoïdes est caractérisée par une couleur qui oriente vers sa structure. Le **Tableau I. 7** résume cette relation structure-fluorescence [75] [122].

| Fluorescence sous lampe UV | Type de flavonoïdes |
|----------------------------|---|
| Violet - noir | Flavone 5, 6, 7-trihydroxyflavone 5, 7, 8-trihydroxyflavone Flavonol substituée en position 3 (3-OR) |
| Violet - bleu | Flavone sans 5-OH libre Flavonol 3-OH substituée ou sans 5-OH libre |
| Jaune ou jaune pale | Flavonol avec 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre. |
| Orange fluorescent | Isoflavone |
| Jaune - verre | Aurone |

Tableau I. 7: Fluorescences des flavonoïdes sous la lumière UV (365 nm).

II. 3. 2. Le rapport frontal R_f

La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = d/D$$

d : distance entre l'origine et la tache du produit après élution.

D : distance entre l'origine et le front du solvant.

Cette valeur permet d'avoir une idée du flavonoïde ainsi que la nature des substituants. En effet, on peut différencier les aglycones des hétérosides. Il faut cependant signaler que les valeurs de R_f dépendent des conditions expérimentales telles que : la température, la nature du solvant, la concentration de l'échantillon et la nature de la matière adsorbante. Le **Tableau I. 8** explique la relation structure - R_f [123].

| Structure des flavonoïdes | R_f |
|---|---|
| Augmentation de nombre des groupements -OH | Diminution de R_f dans les systèmes organiques |
| Substitution des -OH par des groupements -CH ₃ | Croissement de R_f dans les systèmes organiques |
| Substitution des -OH par des groupements osidiques | La valeur de R_f diminue dans les systèmes organiques et croit dans les systèmes aqueux |

Tableau I. 8: Relation entre le R_f et la structure des flavonoïdes.

II. 3. 3. Spectroscopie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-Visible est basée sur le principe suivant : en milieu alcoolique, chaque famille de flavonoïdes a un spectre d'absorption caractéristique, susceptible d'être modifié par l'addition des réactifs. D'après Jurd *et al.* [124] et Voirin *et al.* [125], la nature du réactif et l'effet qu'il produit sur le spectre d'absorption apportent des indications sur la structure des flavonoïdes. Les étapes d'enregistrement des spectres en présence de réactifs sont effectuées selon les étapes suivantes :

Première étape : On enregistre le spectre d'absorption dans le méthanol neutre puis immédiatement après l'ajout d'une goutte de NaOH (0,5 N), ensuite on enregistre après 5 minutes.

Deuxième étape : On enregistre une première fois le spectre d'absorption dans le méthanol, puis à cette solution on additionne d' AlCl_3 (1%) et on enregistre le spectre d'absorption. Après cette opération on rajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (6N) puis on enregistre le spectre de cette nouvelle solution.

Troisième étape : On enregistre dans la solution méthanolique puis on ajoute NaOAc (sec) et on enregistre le spectre, après cette opération on additionne à cette solution quelques gouttes de solution saturée d'acide borique puis on enregistre le spectre d'absorption.

II. 3. 3. 1. Absorption dans le Méthanol

Dans le méthanol les flavonoïdes présentent un spectre constitué de deux bandes :

- ✓ La bande I correspond à l'absorption du système cinnamoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle C-4 avec le noyau B. Elle nous permet de faire la distinction entre les différentes classes de flavonoïdes et elle donne des informations sur les changements structuraux des noyaux B et C [126].
- ✓ La bande II correspond à l'absorption du système benzoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A [127].

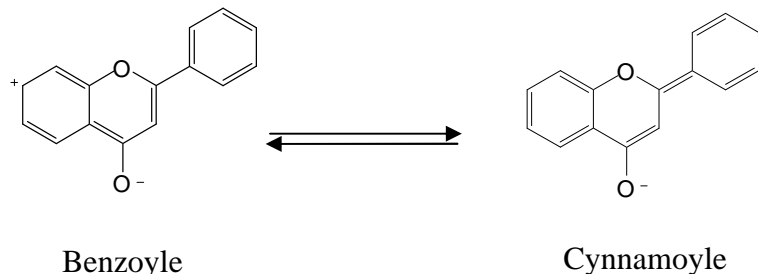


Figure I. 9: Forme limites de type cinnamoyle ou benzoyle

Le déplacement exact et l'intensité des deux bandes I et II du spectre effectué dans le méthanol illustrent la nature de la structure du flavonoïde ainsi que sa substitution, conformément au Tableau I. 9.

| Bande II (nm) | Bande I (nm) | Type de flavonoïdes |
|---------------|--------------|---------------------|
| 250-280 | 310-350 | Flavone |
| 250-280 | 330-360 | Flavonol "3-OR" |
| 250-280 | 350-385 | Flavonol "3-OH" |
| 245-275 | 310-330 | Isoflavone |

| | | |
|----------------------------|---------|--------------------------------|
| 275-295 | 330-300 | Flavanone ou dihydroflavonol |
| 230-270 Intensité basse | 340-390 | Chalcone |
| 230-270 Intensité basse | 380-430 | Aurone |
| 270-280 | 465-560 | Anthocyanidine ou anthocianyne |

Tableau I. 9: Déplacements des maximums des bandes I et II remarqués dans le méthanol des principales classes de flavonoïdes.

II. 3. 3. 2. Absorption en présence des réactifs

L'emploi de réactifs spécifiques permet de localiser les groupements hydroxyles libres ou substitués sur la molécule.

- **Spectre en présence de la soude**

La soude est une base forte, elle ionise tous les hydroxyles phénoliques de la molécule, ce qui provoque un déplacement bathochrome des bandes I et II, essentiellement pour la bande I.

Les flavonoïdes qui présentent un déplacement bathochrome de la bande I de 45 à 65 nm avec une densité optique stable, possèdent un hydroxyle libre en position 4'. Si cette intensité optique diminue, ceci montre que l'hydroxyle en 4' est substitué. La présence d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm indique à la présence d'un hydroxyle en position 7, celui-ci sera confirmé par le spectre mesuré en présence d'acétate de sodium.

- **Spectre en présence de NaOAc et NaOAc + H₃B0₃**

L'acétate de sodium est faiblement basique, elle ionise les hydroxyles les plus acides en position: 7, 3' et 4'. L'ionisation de l'hydroxyle en 7 entraîne un effet bathochrome sur la bande II de l'ordre de 5 à 20 nm.

L'ajout de l'acide borique en présence de l'acétate de sodium chélate les groupements orthodihydroxyles. Cette chélation entraîne sur le spectre UV un déplacement bathochrome sur la bande I de 12 à 36 nm [128].

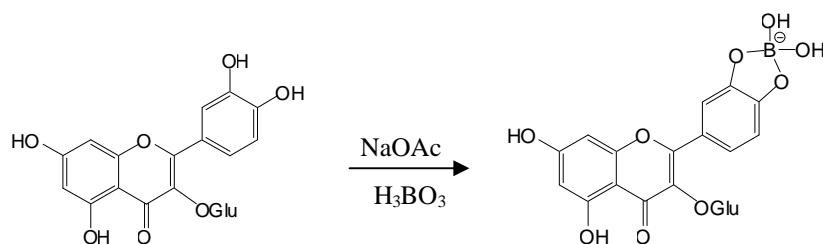


Figure I. 10: Formation de complexes en présence de H_3BO_3 et NaOAc.

- **Spectre en présence de $AlCl_3$ et $AlCl_3+HCl$**

Le chlorure d'aluminium possède des propriétés chélatantes vis-à-vis des flavonoïdes avec formation d'un complexe labile avec deux hydroxyles libres en position ortho sur le phényle latéral et/ou 7, 8 ou 6, 7, et d'un complexe stable avec le carbonyle en position 4 et l'hydroxyle en position 5 ou en position 3.

L'addition de l'acide chlorhydrique permet de vérifier la labilité ou la stabilité du complexe formé selon la **Figure I. 11**.

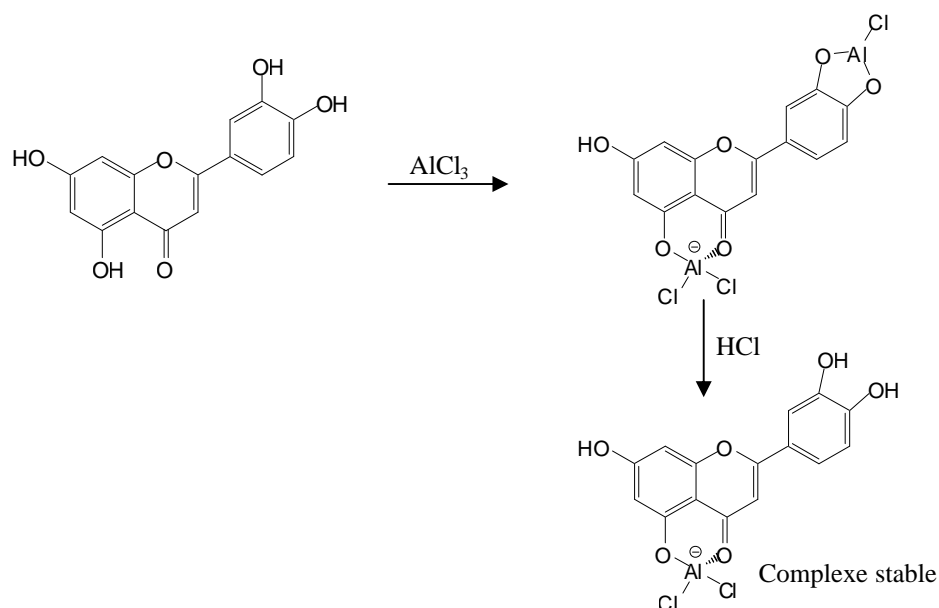


Figure I. 11: Complexes stables et labiles entre les flavonoïdes et $AlCl_3$ avant et après l'addition de HCl

Le tableau suivant représente les déplacements avant et après addition des réactifs [75] [129].

| Réactifs | Déplacement (nm) | | Interprétation |
|--|--|----------|--|
| | Bande I | Bande II | |
| MeOH | 310-350 | 250-280 | Flavone |
| | 330-360 | 250-280 | Flavonol (3-OR) |
| | 350-385 | 250-280 | Flavonol (3-OH) |
| NaOH | +45 à +65 de la bande I sans diminution d'intensité optique | | 4'-OH |
| | +45 à +60 de la bande I avec diminution d'intensité optique | | 3-OH, 4'-OR |
| | Apparition d'une nouvelle bande entre 320-335 nm | | 7-OH |
| | Décomposition lente | | 3, 4' di-OH ou orthodi-OH sur le noyau A (6, 7 ou 7, 8) |
| NaOAc | +5 à +20 de la bande II | | 7-OH |
| | Déplacement faible de la bande II | | 7-OH avec substitution en 6 ou 8 |
| NaOAc + H ₃ BO ₃ | +12 à +36 de la bande I Faible déplacement bathochromique de la bande I | | 3', 4' di-OH Orthodi-OH sur le noyau A |
| AlCl ₃ | +20 à +40 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ +HCl | | Orthodi-OH sur le noyau B |
| | +20 à +25 de la bande I par rapport au spectre AlCl ₃ + HCl | | Orthodi-OH sur le noyau A + Orthodi-OH sur le noyau B |
| AlCl ₃ + HCl/MeOH | +35 à +55 de la bande I | | 5-OH |
| | +17 à +20 de la bande I | | 5-OH (avec 6-oxygénation) |
| | +50 à +60 de la bande I | | 3-OH avec ou sans 5-OH |

Tableau I. 10 : Interprétation des déplacements des maximums des bandes I et II avant et après addition des réactifs.

II. 3. 4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique très puissante qui permet la détermination structurale des composés organiques par leurs rapports masse/charge.

Plusieurs techniques ont été appliquées aux flavonoïdes, telles que l'impact électronique (EI), l'ionisation chimique (CI), l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB) et l'ionisation chimique directe (DCI) [130, 131].

Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse des flavonoïdes s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permis l'analyse de très faibles quantités.

Donc, les flavonoïdes ont été largement étudiés en spectrométrie de masse en particulier les dérivés glycosylés [73] 132]. Ces études ont permis d'établir des schémas de fragmentation de ces composés dans le but de pouvoir les identifier dans un extrait brut sans avoir à les isoler [133, 134].

Ainsi, l'introduction de la LC/MSⁿ dans l'analyse des extraits de plante représente une étape importante dans l'identification des produits naturels [135, 136]. C'est la technique de choix pour caractériser rapidement sans séparation chimique les éléments d'un mélange de composés naturels pour savoir s'ils sont connus ou non.

Nous présenterons dans cette partie le schéma de fragmentation de la quercétine-3-O-glucuronide (**Figure I. 12**), analysée par la méthode électrospray (ESI) couplée à l'CLHP et proposé par Dueñas *et al.* [137].

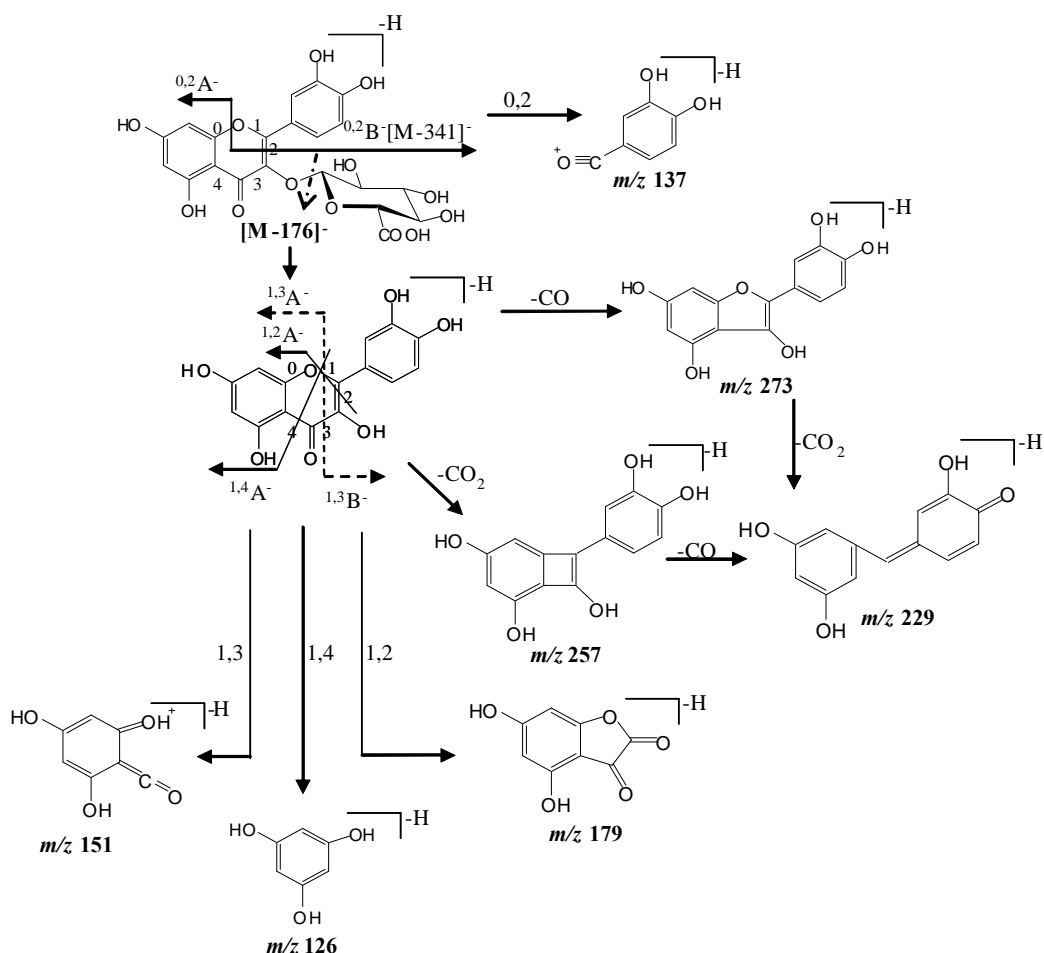


Figure I. 12: Schéma de fragmentation du quercétine-3-*O*-glucuronide par ESI/MS-MS proposé par Dueñas *et al.* [137].

Les notations $^{ij}A^-$ et $^{ij}B^-$ sont utilisées pour désigner les ions produits contenant les cycles, respectivement A et B et les notations i,j concernent les liaisons qui ont été scindées.

Selon Dueñas *et al.*, le fragment principal obtenu pour la quercétine-3-*O*-glucuronide à toutes les énergies de collision a été à m/z 301 correspondant à l'aglycone. Le reste des fragments formés dérivés à partir de la quercétine. Le Signal à m/z 273 correspondrait à la perte du groupe CO, à m/z 257, la perte de CO₂ et à m/z 229, la perte des deux groupes. Ce dernier fragment n'a été observé que dans les énergies de collision les plus élevées. Ces pertes inhabituelles de CO et de CO₂ apparaissent comme caractéristique du mode d'ions négatifs [138], et le fragment à m/z 229 était considéré comme caractéristique de la quercétine [139, 140]. D'autres fragments caractéristiques de la quercétine sont ceux à m/z 151 et 179 correspondant au fragment du noyau A⁻, issus respectivement après la RDA (retro-diels Alder) et la retrocyclisation qui se forme après le clivage des deux liaisons 1 et 2 (**Figure I. 12**). Les fragments à m/z 255, 229 et 151 ont été

utilisés par certains auteurs pour identifier la quercétine glucuronide dans les urines et les échantillons de plasma, lorsque sa concentration est négligeable [139] [141, 142].

II. 3. 5. Résonance Magnétique Nucléaire (R. M. N)

II. 3. 5. 1. R. M. N . du proton

Concernant l'analyse des flavonoïdes, la spectroscopie en résonance magnétique nucléaire de proton (RMN ^1H) permet de visualiser les relations existant entre les protons des différents noyaux et déduire leur degré de substitution.

Elle permet également de repérer les groupements méthoxyles, de dénombrer les sucres et d'envisager leur mode de liaison à la génine.

a. Analyse des signaux provenant des protons de la génine.

Les positions relatives des protons sur les noyaux A et B sont facilement déductibles grâce aux valeurs des constantes de couplage.

➤ Protons du noyau A

Lorsque le noyau A est disubstitué par des OH en 5 et 7, les protons H-6 et H-8 présentent deux doublet, respectivement, entre 6 et 6,25 ppm avec une constante de couplage $J = 2,5$ Hz et entre 6,39 et 6,56 ppm avec la même constante de couplage. La substitution des OH en positions 5 et/ou 7 conduit au déblindage des deux protons voisins [143]. Le **Tableau I. 11** suivant représente quelques déplacements chimiques des protons du noyau A.

| Flavonoïde | H-5 | H-6 | H-8 |
|-----------------------------|------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| 5, 7-OH | / | 6-6,2 ppm d ($J=2,5$ Hz) | 6,3- 6,5 ppm d ($J=2,5$ Hz) |
| 5-OH, 7-OR R=sucre | / | 6,4-6,5 ppm d ($J=2,5$ Hz) | 6,7-6,9 ppm d ($J=2,5$ Hz) |
| 5, 6, 7-OR R= H ou sucre | / | / | 6,3 ppm (s) |
| 5, 6, 8-OR R= H ou sucre | / | 6,3 ppm (s) | / |
| 7-OR R=H ou sucre | 8 ppm D ($J=9$ Hz) | 6,7-7,1 ppm dd ($J=9; 2,5$ Hz) | 6,7-7,0 ppm d ($J=2,5$ Hz) |

Tableau I. 11: Déplacements chimiques des protons du noyau A.

➤ **Protons du noyau B**

Le déplacement chimique des protons du noyau B se trouve entre 6,5-8,1 ppm. Ce déplacement chimique est basé sur les substituants dans le noyau B et le degré d'oxydation du noyau C.

Quand le noyau B est monosubstitué en 4', les quatre protons H-2', H-3', H-5' et H-6' présentent deux doublets dont les constantes de couplages sont identiques (8,5 Hz). Les protons H-2' et H-6' résonnent toujours à des champs inférieurs à ceux des protons H-3' et H-5'. Le tableau suivant représente quelques déplacements chimiques des protons du noyau B [143].

| Flavonoïdes | H-2' | H-6' | H-3' | H-5' |
|------------------------------------|----------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Flavones (4'-OH) [143] | 7,7-7,9 ppm d ($J = 8,5$ Hz) | 7,7-7,9 ppm d ($J = 8,5$ Hz) | 6,5-7,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz) | 6,5-7,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz) |
| Flavonols (4'-OH) [143] | 7,9-8,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz) | 7,9-8,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz) | 6,5-7,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz) | 6,5-7,1 ppm d ($J = 8,5$ Hz) |
| Flavones (3'-OMe, 4'-OH) [144] | 7,4-7,5 ppm d ($J = 1,2$ Hz) | 7,3-7,5 ppm dd ($J = 7,2; 1,2$ Hz) | / | 6,8-6,9 ppm d ($J = 7,2$ Hz) |
| Flavonols (3'-OMe, 4'-OH) [145] | 7,7-7,8 ppm d ($J = 2,1$) | 7,6-7,7 ppm dd ($J = 8,5; 2,1$ Hz) | / | 6,9-7 ppm d ($J = 8,5$ Hz) |

Tableau I. 11: Quelques déplacements chimiques des protons du noyau B.

➤ **Protons du cycle C**

Le proton H-3 d'une structure flavone résonne entre 6 et 7 ppm sous forme d'un singulet [143], pouvant être confondu avec les protons H-6 et H-8.

b. Analyse des signaux provenant des protons de la partie osidique.

➤ **Proton anomérique**

Le proton anomérique apparaît sur le spectre sous forme d'un doublet déblindé par rapport aux autres protons osidiques. La valeur de la constante de couplage permet de distinguer les anomères β ($J = 7-8$ Hz) des anomères α ($J = 3-4$ Hz) [146].

Le proton anomérique lié à un autre ose, devient relativement loin de l'influence du noyau flavonique, et résonne à champ plus fort que le proton anomérique lié à la génine. A

titre d'exemple dans le cas de Kampférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside le proton H-1'' du rhamnose résonne à 4,54 ppm dans le méthanol deutérié [147] alors que dans le cas du Kampférol-3-*O*-rhamnoside le proton anomérique H-1'' résonne à 5,43 ppm avec une constante de couplage $J = 2,1$ Hz [148].

➤ **Autres protons osidiques**

Les autres protons osidiques résonnent entre 3 et 4 ppm. Ils apparaissent souvent sous forme de multiplets difficiles à interpréter.

II. 3. 5. 2. R. M. N. du Carbone

Les spectres sont enregistrés entre 0 et 200 ppm. Le **Tableau I. 12** présente les déplacements chimiques (en ppm) des carbones des génines de quelques composés flavoniques.

| Composé | 1 [149] | 2 [149] | 3 [150] | 4 [151] | 5 [152] | 6 [152] |
|---------|---------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Solvant | DMSO | DMSO | CD ₃ OD | CD ₃ OD | CD ₃ OD | CD ₃ OD |
| C-2 | 165,5 | 164,0 | 158,9 | 148 | 159,3 | 159,0 |
| C-3 | 104,3 | 102,7 | 135,5 | 137,2 | 135,6 | 135,3 |
| C-4 | 183,2 | 181,5 | 179,7 | 177,3 | 179,2 | 179,4 |
| C-5 | 162,0 | 160,8 | 150,4 | 162,5 | 162,9 | 162,9 |
| C-6 | 100,3 | 99,5 | 100,1 | 99,3 | 98,6 | 99,5 |
| C-7 | 164,9 | 162,9 | 158,5 | 165,3 | 166,2 | 166,4 |
| C-8 | 95,6 | 104,6 | 129,1 | 94,4 | 94,2 | 94,9 |
| C-9 | 158,7 | 156,0 | 158,1 | 158,2 | 158,5 | 158,5 |
| C-10 | 105,1 | 103,9 | 105,7 | 104,5 | 105,5 | 105,9 |
| C-1' | 122,7 | 121,6 | 122,9 | 124,3 | 123,1 | 123,1 |
| C-2' | 129,8 | 128,6 | 132,3 | 116,0 | 116,4 | 116,1 |
| C-3' | 117,3 | 116,1 | 116,2 | 148,7 | 145,8 | 145,7 |
| C-4' | 161,8 | 161,4 | 161,7 | 146,2 | 149,8 | 149,9 |
| C-5' | 117,3 | 116,1 | 116,2 | 116,2 | 117,3 | 117,9 |
| C-6' | 129,8 | 128,6 | 132,3 | 121,7 | 122,3 | 122,8 |
| C-1'' | - | 74,4 | 104,1 | - | 103,7 | 101,9 |
| C-2'' | - | 71,1 | 75,7 | - | 75,1 | 73,9 |
| C-3'' | - | 78,7 | 78,1 | - | 79,3 | 75,2 |

| | | | | | | |
|--------|---|------|------|---|-------|-------|
| C-4" | - | 70,6 | 71,4 | - | 72,5 | 70,2 |
| C-5" | - | 81,9 | 78,5 | - | 78,3 | 75,4 |
| C-6" | - | 61,4 | 62,7 | - | 68,5 | 67,6 |
| C-1''' | - | - | - | - | 101,2 | 100,1 |
| C-2''' | - | - | - | - | 71,0 | 72,1 |
| C-3''' | - | - | - | - | 71,0 | 72,4 |
| C-4''' | - | - | - | - | 73,2 | 73,2 |
| C-5''' | - | - | - | - | 70,2 | 69,7 |
| C-6''' | - | - | - | - | 17,0 | 17,9 |

Tableau I. 12 : Déplacements chimiques des carbones des génines de quelques composés flavoniques.

1 : Apigénine, **2 :** Apigénine-8-*C*- β -glucopyranoside, **3 :** 8-methoxykaempferol-3-*O*- β -glucopyranoside, **4 :** Quercétine, **5 :** Quercétine-3-*O*- β -rutinoside, **6 :** Quercétine-3-*O*- β -robinobioside.

I. 4. Bibliographie

- [1] Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Yoshikawa M., (2002), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 972.
- [2] Sarembaud A., Poitevin B., (1996), *Médicament à usage homéopathique*, Ed. Masson, 256 p., Paris.
- [3] Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R., (2009), *Matricaria recutita* L. Rauschert (Asteraceae) Camomille allemande, matricaire. *Phytothérapie* 7: 316-322.
- [4] Bremer K., (1994), *Asteraceae, Cladistics and Classification*. (Timber Press), 752 p., Portland, Oregon.
- [5] Encyclopédie des plantes grasses, <http://www.cactuspro.com/encyclo/Senecio>, [en line], consulté le 28 janvier 2010.
- [6] Ghedira K., Goetz P., Lejeune R., Wuyts D., (2008), *Echinacea* spp. (Asteraceae). *Phytothérapie* 6: 306–311.
- [7] Pelser P. B., de Vos H., Theuring C., Beuerle T., Vrieling K., Hartmann T., (2005), Frequent gain and loss of pyrrolizidine alkaloids in the evolution of *Senecio* section *Jacobaea* (Asteraceae). *Phytochemistry* 66: 1285–1295.
- [8] Gardner D. R., Thorne M. S., Molyneux R. J., Pfister J. A., Seawright A. A., (2006), Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 736-744.
- [9] Suau R., Cabezudo B., Rico R., Na´jera F., López-Romero J. M., Garcíá A. I., (2002), Pyrrolizidine alkaloids from three Spanish *Senecio* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 981–984.
- [10] Zhang C.-F., Jin J., Zhang M., (2008), Studies on chemical constituents of *Senecio laetus* Edgew. *Chinese Pharmaceutical Journal* 43(16): 1214-1217.
- [11] Tan D.-P., Chou G.-X., Wang Z.-T. (2010). Phenolic compounds from *Senecio scandens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, doi:10.1016/j.bse.2009.12.032.
- [12] Urzua A., Andrade L., Mendoza L., Bustos F., (2000), *Biochemical Systematics and Ecology* 28(4): 399.
- [13] Suleimenov E. M., Jose R. A., Rakhmadieva S. B., De Borggraeve W., and Dehaen W., (2009), Flavonoids from *Senecio viscosus*. *Chemistry of Natural Compounds* 45(5): 732.

- [14] Mansour R., Saleh N., (1981), Flavonoids of three local *Senecio* species. *Phytochemistry* 20(5):1180-1181.
- [15] Torres P., Grande C., Anaya J., Grande M., (2000), Secondary metabolites from *Senecio minutus* and *Senecio boissieri*: a new jacaranone derivative. *Fitoterapia* 71: 91-93.
- [16] Tian X.-Y., Wang Y.-H., Yang Q.-Y., Yu S.-S., Fang W.-S., (2009), Jacaranone analogs from *Senecio scandens*. *Journal of Asian Natural Products Research* 11(1): 63-68.
- [17] Tian X.-Y., Wang Y.-H., Yang, Liu X., Yu W.-S., Yu S.-S., (2006), Jacaranone glycosides from *Senecio scandens*. *Journal of Asian Natural Products Research* 8(1-2): 125-132.
- [18] Pérez C., Agnese A. M., Cabrera J. L., (1999), The essential oil of *Senecio graebeolens* (*Compositae*): chemical composition and antimicrobial activity tests. *Journal of Ethnopharmacology* 66: 91-96.
- [19] De Tommasi N., Rastrelli L., Lauro M. R., Aquino R., (1998), Polyhydroxylated triterpenes from *Senecio pseudotites*. *Phytochemistry* 49(4): 1123-1125.
- [20] Catalano S., Luschi S., Flamini G., Cioni P. L., Nieri E. M., Morelli I., (1996), A xanthone from *Senecio mikanioides*. *Phytochemistry* 42(6): 1605-1607.
- [21] Chen Y.-L., (1999), *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Science Press, Beijing. 77: 225-271.
- [22] Bautista P. J., Stübing G., Figuerola R., (1991), *Gúia de las Plantas Medicinales de la Comunidad Valenciana*, Las Provincias, Valencia.
- [23] Valdizan H., and Maldonado A., (1922), *La Medicina Popular Peruana*, Tome II, 287 p., Lima-Perú: Iditerial Torres Aguirre.
- [24] i Serra B., (1994), *Gran Enciclopedia de las Plantas Medicinales*. Ed. Tikal, pp. 880-881, 1068 p., Madrid.
- [25] Toma W., Trigo J. R., Bensuaski de Paula A. C., Monteiro Souza Brito A. R., (2004), Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 95: 345-351.
- [26] Watt J. M., Breyer-Brandwijk M. G., (1962), *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern Africa*. 2nd Ed. Livingstone, Edinbuergh.
- [27] Tokarnia C. H., Döbereiner J., (1984), *Pesquisa Veterinária Brasileria* 4: 39.
- [28] Driemeier D., Barros C. S. L., (1992), *Pesquisa Veterinária Brasileria* 12: 33.
- [29] Habermehl G. G., Martz W., Tokarnia C. H., Döbereiner J. and Mendez M. C., (1988), *Toxicon* 26: 275.

- [30] Tundis R., Loizzo M. R., Bonesi M., Menichini F., Dodaro D., Passalacqua N. G., Statti G., Menichini F., (2009), *In vitro* cytotoxic effects of *Senecio stibianus* Lacaixa (Asteraceae) on human cancer cell lines. *Natural Product Research* 23(18): 1707-1718.
- [31] Anderson N. O., (1987), Reclassifications of the genus *Chrysanthemum* L., *Horticultural Science* 22: 313.
- [32] Quezel P., Santa S., (1963), *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales*, Tome II, 988 p., CNRS Paris.
- [33] Frère Marie-Victorin., (1935), *Flore laurentienne*, Ed. Les Frères des Ecoles Chrésiennes, 917 p., Québec.
- [34] Harborne J. B., Heywood V. H., Saleh N. A. M., (1970), *Phytochemistry* 9: 2011.
- [35] Drozd B., Bloszyk E., (1978), *Planta Medica* 33: 379.
- [36] Oksfiz S., Wagner H., (1982), *Journal of Natural Products* 45: 374.
- [37] Harborne J. B., Baxter H., (1999), *The handbook of natural flavonoids*, Lavoisier librairie, 1770 p.
- [38] Robles M., Aregullin M., West J., Rodriguez E., (1995), Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology, and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Medica* 61: 199-203.
- [39] Cho J. Y., Baik U. K., Jung J. H., Park M., (2000), *European Journal of Pharmacology* 398: 399-407.
- [40] Kasai R., Shingu T., Wu R. Y., Hal I. H., Lee K. H., (1982), *Journal of Natural Products* 45(3): 317-320.
- [41] Scaltse H., Lazari D., Panagouleas C., Geogiadou E., Garcia B., Sokovic M., (2000), *Phytochemistry* 55(8): 903-908.
- [42] Picman A. K., (1986), Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* 14: 255-281.
- [43] El-Masry S., Abou-Donia A. H. A., Darwish F. A., Abou-Karam M. A., Grenz M. and Bohlmann F., (1984), Sesquiterpene lactones from *Chrysanthemum coronarium*. *Phytochemistry* 23(12): 2953-2954.
- [44] Jang D. S., Yang M. S., Ha T. J. and Park K. H., (1998), Structural analogues of cumambrin B from the flower of *Chrysanthemum boreale*. *Archive of Pharmacal Research Pharmaceutical Society of Korea* 0253-6269 (Print) 1976-3786 (Online), 21(5).
- [45] Park K. H., Yang M. S., Park M. K., Kim S. Ch., Yang Ch. H., Park S. J., Lee J. R., (2009), A new cytotoxic guaianolide from *Chrysanthemum boreale*. *Fitoterapia* 80: 54-56.

- [46] Jang D. S., Park K. H., Yang M. S., (1998), Germacranolides from flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino. *Korean Journal of Pharmacognosy* 29(2): 67-70.
- [47] Blakeman J. P. and Atkinson P., (1979), Antimicrobial properties and possible rôle in host-pathogen interactions of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from glands of *Chrysanthemum parthenium*. *Physiological Plant Pathology* 15(2): 183-190.
- [48] Hagmar B., (1969), *European Journal of Pathology* 4: 283.
- [49] Ochocka R. J., Rajzer D., Kowalski P., Lamparczyk H., (1995), Coumarins from *Chrysanthemum segetum*, Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 709: 197-202.
- [50] Hu C. Q., Chen K., Shi Q., Kilkuskie R. E., Cheng Y. C., Lee K. H., (1994), *Journal of Natural Products* 57: 42.
- [51] Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Yoshikawa M., (2002), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 972.
- [52] Singh R. P., Agrawal P., Yim D., Agarwal C., Agarwal R., (2005), *Carcinogenesis* 26: 845.
- [53] Lee J. S., Kim H. J., Lee Y. S., (2003), *Planta Medica* 69: 859.
- [54] Lin L.-Z., Harnly J. M., (2010), Identification of the phenolic components of *chrysanthemum* flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry* 120: 319-326.
- [55] Schwinn K. E., Markham K. R. and Giveno N. K., (1993), Floral flavonoids and the potential for pelargonidin biosynthesis in commercial *chrysanthemum* cultivars. *Phytochemistry* 35(1): 145-150.
- [56] Khallouki F., Hmamouchi M., Younos C., Soulimani R., Essassi E. M., (2000), A new flavonoid from the aerial parts of *Chrysanthemum viscidifolium*. *Fitoterapia* 71: 413-416.
- [57] Beninger C. W., Hall J. C., (2005), Allelopathic activity of luteolin 7-O- β -glucuronide isolated from *Chrysanthemum morifolium* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 103-111.
- [58] Shahat A. A., Apers S., Pieters L., Vlietinck A. J., (2001), Isolation and complete NMR assignment of the numbing principle from *Chrysanthemum morifolium*. *Fitoterapia* 72: 89-91.
- [59] Lai J.-P., Lim Y. H., Su J., Shen H.-M., Ong C. N., (2007), Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS. *Journal of Chromatography B* 848: 215-225.
- [60] Chuda Y., Ono H., Ohnishi-Kameyama M., Nagata T., Tsushida T., (1996), Structural

Identification of Two Antioxidant Quinic Acid Derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2037-2039.

[61] Wilkomirski B., Dubielecka B., (1996), Sterol content as a similarity marker of different organs of two varieties of *Chrysanthemum parthenium*. *Phytochemistry* 42:1603-1604.

[62] Chu Q., Fu F., Guan Y., Ye J., (2004), Determination and differentiation of Flos *Chrysanthemum* based on characteristic electrochemical profiles by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7828-7833.

[63] Lai J. P., Lim Y. H., Su J., Shen H. M., Ong C. N., (2007), Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD–APCI/MS. *Journal of Chromatography B* 848: 215-225.

[64] Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., Yue Y., Guolin Z., (2005), Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 151-158.

[65] Urzua A., Mendoza L., (2003), Antibacterial activity of fresh flowerheads of *Chrysanthemum coronarium*. *Fitoterapia* 74: 606-8.

[66] Agelopoulos N., Birkett M. A., Hik A. J., Koper A. M., Pickett J. A., Pow E. M., (1999), Exploiting semichemicals in insect control. *Journal of Pesticide Science* 55: 225-35.

[67] Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J., Younos C., (1991), *Journal of Ethnopharmacology* 35:123.

[68] Do Y. L., Goya C., Taesook Y., Myeong S. C., Byung K. C., Ho K. K., (2009), Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 149-154.

[69] Ren A. N., Wang Z. G., Lu Z. C., Wang L. W., Wu Y. L., (1999), Study on bacteriostasis and antiviral activity of flowers *Chrysanthemum indicum*. *Pharmaceutical Biotechnology* 6: 241-244.

[70] Wang Z. G., Ren A. N., Xu L., Sun X. J., Hua X. B., (2000), The experimental study on the immunological and anti-inflammatory activities of *Chrysanthemum indicum*. *Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology* 2: 92-93.

[71] Hu C.-Q., Chen H., Chi Q., (1994), *Journal of Natural Products* 57: 42.

[72] Macdonald Hocking G., (1997), *A Dictionary of Natural Products*. Medford_NJ.: Plexus Publishing Inc., 992 p.

- [73] de Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. Th., (2006), Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31-63.
- [74] Bruneton J., (1999), *Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales*, 3^{ème} édition, Ed. Tec et Doc Lavoisier, 1120 p., Paris.
- [75] Markham K. R., (1982), *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, 144 p., London.
- [76] Emerenciano V. P., Militão J. S. L. T., Camposa C. C., Romoff P., Kaplan M. A. C., Zambon M., Brant A. J. C., (2001), Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 947-957.
- [77] Shirley B. W., (1996), Flavonoid biosynthesis: a new function for an old pathway. *Trends In Plant Science* 1: 377-382.
- [78] Vederas J. C., Leeper F. J., (2000), *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*. Springer.
- [79] Schröder J., Raiber S., Berger T., Schmidt A., Schmidt J., Soares-Sello A. M., Bardshiri E., Strack, D., Simpson T. J., Veit M., (1998), Plant polyketide synthases: a chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. *Biochemistry* 37: 8417-8425.
- [80] Maxwell C. A., Philips D. A., (1990), *Plant Physiology* 93:1552.
- [81] Barz W., Welle R., (1990), Ed. Stafford H. A., *Flavonoid Metabolism*, CRC Press, Boca Raton, 139 p., FL, USA.
- [82] Middleton E. M., Teramura A. H., (1993), *Plant Physiology* 103: 741.
- [83] Wang C.-Y., Huang H.-Y., Kuo K.-L., Hsieh Y.-Z., (1998), *Journal of Chromatography A* 802: 225.
- [84] Etherington J. R., (1983), Ed. *Wetland Ecology*, Edward Arnold Publishers, London, UK.
- [85] Goto T., Kondo T., (1991), *Angewandte Chemie* 30: 17.
- [86] Biggs D. R., Lane G. A., (1978), *Phytochemistry* 17: 1683.
- [87] Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1997), *Trends Plant Science* 2: 152.
- [88] Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933-956.
- [89] Jovanovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M. G., (1994), Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 116: 4846.

- [90] Kandaswami C., Middleton E., (1994), Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 366: 351-376.
- [91] van Acker S. A. B. E., van den Berg D.-J., Tromp M. N. J. L., Griffioen D. H., van Bennekom W. P., van der Vijgh W. J. F., Bast A., (1996), Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 331.
- [92] Arora A., Nair M. G., (1998), Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine* 24: 1355.
- [93] van den Berg R., Haenen G. R. M. M., van den Berg H., van der Vijgh W., Bast A., (2000), The predictive value of antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry* 70: 391.
- [94] Read M. A., (1995), Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. *American Journal of Pathology* 147(2): 235-237.
- [95] Middleton E., Kandaswami C., (1992), Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. *Biochemical Pharmacology* 43:1167-1179.
- [96] Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Yoshikawa M., (2002), *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50: 972.
- [97] Hu C. Q., Chen K., Shi Q., Kilkuskie R. E., Cheng Y. C., Lee K. H., (1994), *Journal of Natural Products* 57: 42.
- [98] Shi R. X., Ong C. N., Shen H. M., (2005), *Cancer Research* 65: 7815.
- [99] Shi R. X., Ong C. N., Shen H. M., (2004), *Oncogene* 23: 7712.
- [100] Amaral A. C. F., Kuster R. M., Gonçalves J. L. S., Wigg M. D., (1999), *Fitoterapia* 70: 293-295.
- [101] Mori A., Nishiro C., Tawata S., (1987), *Phytochemistry* 18(26): 2231-2234.
- [102] Nijveldt R. J., van Nood E., van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., van Norren K., van Leeuwen P. A. M., (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of actions and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418.
- [103] Block G., (1992), *Nutrition reviews* 50:207-213
- [104] Yochum L., Kushi L. H., Meyer K., Folsom A. R., (1999), *American Journal of Epidemiology* 149: 943-949.
- [105] Williamson A., Day A. J., Plumb G. W., Couteau D., (2000), Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions* 28: 16-22.

- [106] Cotelle N., (2001), Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry* 1: 569-590.
- [107] Lin J. K., Weng M. S., (2006), Flavonoids as Nutraceuticals. In : *The science of flavonoids*. Ed. Grotewold E., *Springer* p. 217.
- [108] Heim E. K., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., (2002), Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13: 572-584.
- [109] Javanovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marjanovic B., Simic M. J., (1994), Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 116: 4846-4851.
- [110] Densiov E. T., Afanas'ev I. B., (2005), IN: *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*., Ed. Taylor & Francis Group p: 703-861., U.S.A.
- [111] Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A. V., Berghe D. K., (1998), Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products* 61: 71-76.
- [112] Hendrich A. B., (2006), Flavonoid-membrane interactions : possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica*. 27: 27-40.
- [113] Balasundram N., Sundram K., Samman S., (2006), Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry* 9: 191-203.
- [114] Morris C. J., Earl J. R., Trenam C. W., Blake D. R., (1995), Reactive oxygen species iron-a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 27: 109-122.
- [115] Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C., (1998), Structural dependence of flavonoïdes interactions with Cu²⁺ ions : implication for their antioxidant properties. *The Biochemical journal* 330: 1173-1178.
- [116] Van Acker S. A. B. E., Van Den Berg D. J., Tromp M. N. L., Griffioen D. H., Bennenkom W. P. V., Van Der Vijgh W. J. F., Bast A., (1996), Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology & medicine* 20: 331-342.
- [117] Pietta P. G., (2000), Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.
- [118] Rundles R. W., Metz E. N., Sliberman H. R., (1966), Allopurinol in the treatment of gout. *Annals of Internal Medicine* 64: 229-258.

- [119] Klinenberg J. R., Goldfinger S. E., Seegmiller J. E., (1965), The effectiveness of xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout. *Annals of Internal Medicine* 62: 639-647.
- [120] Young J. L., Boswell R. B., Nies A. S., (1974), Severe allopurinol hypersensitivity. association with Thiazides and Prior Renal Compromise. *Archives of Internal Medicine* 134: 553-559.
- [121] Danny E. C., Van Hoorn R. J., Nijveldt Paul A. M., Van L., Zandrie Hofman A., Laura M'Rabet A., Dries B. A., De Bont A, Norren K. V., (2002), Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology* 451: 111-118.
- [122] Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H., (1975), *The flavonoids*. Tome I, academic press.
- [123] Randerath K., (1971), *Chromatographie sur couche mince*, Gauthier, Villers.
- [124] Jurd L., (1969), *Phytochemistry*, 8: 445-462.
- [125] Voirin B., (1983), *Phytochemistry* 22: 2107-2145.
- [126] Mabry T. J., (1969), In "*Perspective in Phytochemistry*". Ed. Harborne J. B., Academic Press. London
- [127] Jurd L. (1962). In "*The Chemistry of Flavonoid compounds*". Ed. Geissman, T. A., Pergamon Press, 107 p., New York.
- [128] Benkiniouar R., (2007), *Thèse de Doctorat d'Etat en Chimie Organique* p.17., Université Mentouri Constantine, Algérie.
- [129] Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B., (1970), *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-verlag, New-York.
- [130] Ma Y. L., Li Q. M., Van den Heuvel H., Claeys M., (1997), *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 11(12): 1357-1364.
- [131] Stobiecki M., (2000), *Phytochemistry* 54(3): 237-256.
- [132] Hvattum E., Ekeberg D., (2003). ,Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoidglycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole massspectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 38: 43-49.
- [133] Stobiecki M., (2000)., Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 54: 237-256.
- [134] Fabre N., Rustan I., de Hoffmann E., Quetin-Leclercq J., (2001), Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography

Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12: 707-715.

[135] Ablajan K., Abliz Z., Shang X.-Y., He J.-M., Zhang R.-P. and Shi J.-G., (2006), Structural characterization of flavonol 3,7-di-*O*-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 41: 352-360.

[136] Wolfender J. L., Waridel P., Ndjoko K., Hobby K. R., Major H. J., Hostettmann K., (2000), IT-MS n for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis* 28.

[137] Dueñas M., Mingo-Chornet H., Pérez-Alonso J. J., Di Paola-Naranjo R., González Paramás A. M., Santos-Buelga C., (2008), Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC–DAD–ESI/MS. *European Food Research and Technology* 227: 1069-1076.

[138] Fabre N., Rustan I., de HoVmman E., Quetin-Leclercq J., (2001), *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12: 707-715.

[139] Witting J., Herderich M., Graefe E. U., Veit M., (2001), *Journal of Chromatography B* 753: 237-243.

[140] Ma Y. L., Li Q. M., Van den Heuvel H., Claeys M., (1997), *Rapid Communocation in Mass Spectrometry* 11: 1357-1364.

[141] Hong Y., Mitchell A. E., (2004), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6794-6801.

[142] Mullen W., Boitier A., Stewart A. J., Crozier A., (2004), *Journal of Chromatography A* 1058:163-168.

[143] Markham K. R., Geiger H., (1994), *The Flavonoids*. Ed. Harborne J. B., Capman and Hall, London.

[144] Eunjung L., Byoung-Ho M., Younghee P., Sungwon H., Sunhee L., Younggiu L., Yoongho L., (2008), Effects of hydroxyl and methoxy substituents on NMR data in flavonols. *Bulletin of Korean Chemistry Society* 29(2): 507-510

[145] Yayli N., Seymen H., Baltaci C., (2001), Flavone C-glycosides from *Scleranthus uncinatus*. *Phytochemistry* 58: 607.

[146] Markham K. R., Mabry T. J., (1975), *In The Flavonoids*. Ed. Harborne J. B., Mabry T., and Mabry H., Cahpman and Hall, London, p. 45.

[147] Sang S., Laspley K., Jeong W. S., Lachance P. A., Ho C. T., Rosen R. T., (2002), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:2459-2463.

- [148] Bilia A. R., Ciampi L., Mendez J., Morelli I., (1996), *Pharmaceutics Acta Helvetiae* 71:199-204.
- [149] Markham K. R., Ternail B., Stanley R., Geiger H., Mabry T. J., (1978), *Tetrahedron* 34: 1389-1397.
- [150] Rayyan S., Fossen T., Nateland H. S., Andersen Ø. M., (2005), Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug "*Crataegi folium cum flore*" (Hawthorn). *Phytochemical Analysis* 16: 334-341.
- [151] Fossen T., Pedersen A. T., Andersen Ø. M., (1998), Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 47: 281.
- [152] Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O., Dini A., (1995), Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2020-2024.

II. 1. Etude phytochimique de *Senecio giganteus* Desf.

II. 1. 1. Place dans la systématique [1]

| | |
|---------------|--------------------------|
| Embranchement | Angiospermae |
| Classe | Dicotyledones |
| Sous-classe | Asteridae |
| Ordre | Asterales |
| Famille | Asteraceae |
| Tribu | Senecioneae |
| Genre | <i>Senecio</i> |
| Espèce | <i>Senecio giganteus</i> |

Son nom commun est séneçon géant. Elle a été découverte par Monsieur Desfontaine dans le royaume d'Algérie, sur le bord des ruisseaux aux environs de Béliida.

II. 1. 2. Description botanique

Cette espèce admet les synonymes suivants [2] :

- *Jacobaea gigantuea* ;
- *Senecio giganteus* ;
- *Jacobaea gigantuea* (Desf.) Pelsler ;
- *senecio giganteus* Desf.

Son nom sert à rappeler que c'est une plante géante. Elle possède de nombreuses fleurs, réunies en un corymbe très ample et étalé. Ses tiges sont de l'épaisseur du doigt, elles sont hautes de 1,50 à 1,80 m. Quant à ses feuilles, elles possèdent un pétiole, elles sont alternes, glabres ou légèrement cotonneuses. Les feuilles inférieures diffèrent des feuilles supérieures. Les feuilles inférieures sont longues d'environ quarante-cinq centimètres, larges d'une vingtaine de centimètres, lobées, oblongs, ovales et inégalement dentées. Tandis que les supérieures sont lancéolées et oblongs. Les folioles du calice sont linéaires et la corolle est jaune [3]. Cette espèce n'a jamais fait l'objet d'études phytochimiques.



Figure II. 1: Photo de *Senecio giganteus* Desf.

II. 1. 3. Répartition géographique

Cette espèce est endémique Nord Africaine [4]. Elle pousse aux bords des eaux, lieux humides des plaines et surtout des montagnes du Nord Africain (Algérie, Tunisie), jusqu'à 2000 m d'altitude durant les saisons de Mai-juillet.

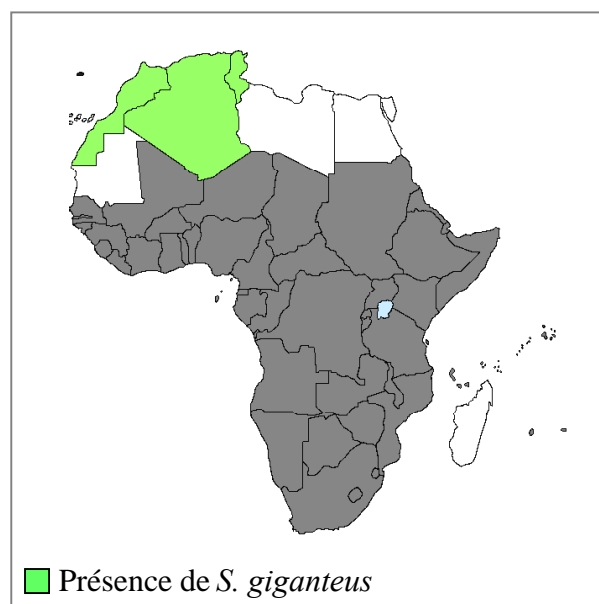


Figure II. 2: Répartition géographique de *Senecio giganteus* Desf. [5].

II. 1. 4. Travaux personnels

II. 1. 4. 1. Récolte du matériel végétal

En pleine floraison, les parties aériennes de *Senecio giganteus* ont été récoltées en Juin 2006 d'une prairie à environ 1250 à 1300 m d'altitude dans les environs de Sétif (Ain Roua), en Algérie. Par la suite, elles sont débarrassées des impuretés puis séchées à l'ombre à une température ambiante. La plante a été récoltée et identifiée par le professeur Hocine LOUER, département de biologie (Université de Sétif, Algérie). Un échantillon de cette plante est déposé au Muséum de la ville de Nice (Voucher number B-8997).

II. 1. 4. 2. Extraction

800 g des fleurs sèches de *Senecio giganteus* sont coupés en petits morceaux, et extraits par macération trois fois dans le n-hexane (5 L), trois fois dans le dichlorométhane (5 L) et trois fois dans le mélange méthanol-eau 7:3 (10 L) à chaud. Les fractions de chaque macération sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite pour obtenir respectivement, 12 g d'extrait n-hexanique, 9 g d'extrait dichlorométhanique et l'extrait hydrométhanolique.

L'extrait hydrométhanolique est repris par la suite avec de l'eau bouillante. Une décantation pendant trois nuits permet l'élimination de la chlorophylle.

Le mélange filtré est extrait par l'acétate d'éthyle (3x500 mL). Après concentration à sec sous vide on a obtenu un extrait de 20 g. On extrait par la suite la phase aqueuse avec du n-butanol plusieurs fois pour obtenir après concentration à sec, un extrait d'environ 40 g.

Les différentes étapes de l'extraction sont représentées sur la **Figure II. 3**.

Les deux extraits acétate d'éthyle et n-butanol sont testés par chromatographie sur couche minces bidimensionnelle de polyamide DC₆ (**Figure II. 4**) et (**Figure II. 5**) dans les systèmes S.I et S.II.

- La 1^{ère} dimension S.I : Toluène-Méthanol-Méthyle éthyle cétone (4:3:3) (système organique)
- La 2^{ème} dimension S.II : Eau-Méthanol-Méthyle éthyle cétone-Acétyle acétone (13:3:3:1) (système aqueux)

Schéma d'extraction

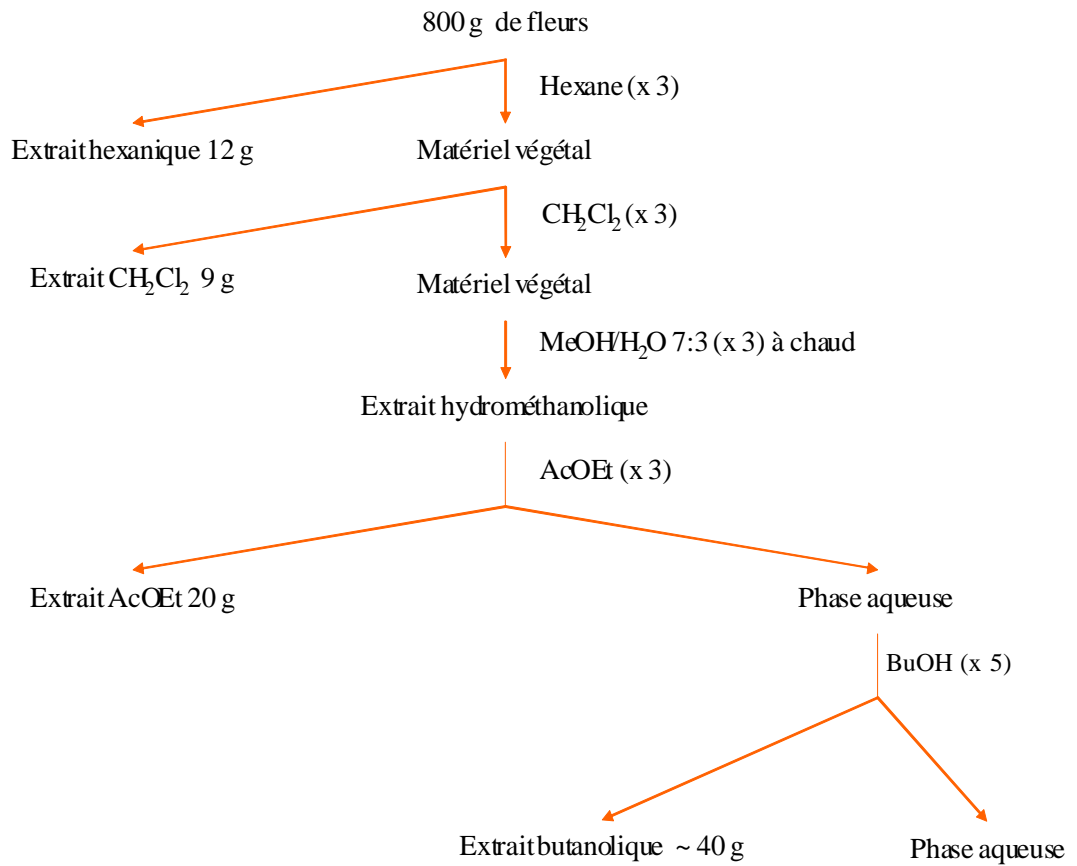


Figure II. 3: Schéma général de l'extraction de *Senecio giganteus* Desf.

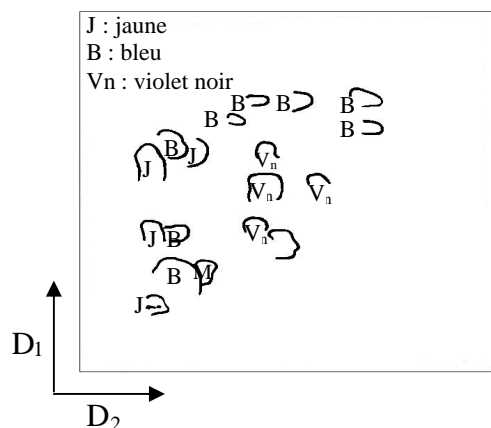


Figure II. 4: CCM bidimensionnelle de polyamide DC₆ de l'extrait acétate d'éthyle de *S. giganteus*, visualisée sous lampe UV à 365 nm (D₁ = S.I, D₂ = S.II).

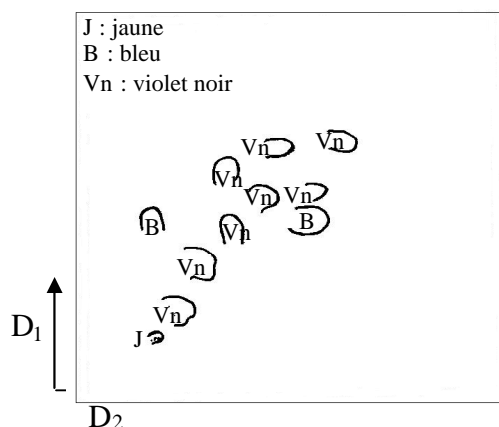


Figure II. 5: CCM bidimensionnelle de polyamide DC₆ de l'extrait butanolique de *S. giganteus*, visualisée sous lampe UV à 365 nm (D₁ = S.I, D₂ = S.II).

Les **Figures II. 4** et **II. 5** montrent que les composés présents dans les deux extraits sont globalement différents. Ceci nous a mené à étudier chaque extrait séparément.

II. 1. 4. 3. Isolement des composants de l'extrait n-butanol

II. 1. 4. 3. a. Purification par colonne

Cette étape permet une séparation grossière des molécules selon leur polarité. De ce fait, une masse d'environ 16 g de l'extrait n-butanol est déposée sur une colonne de polyamide SC₆ (0,05-0,16 mm) (réf.: 815620.1) préparée dans le toluène. L'élution est réalisée par gradient de polarité croissante du système Toluène - MeOH.

Le suivi des fractions obtenues, est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice (SiO₂ 60 F254, Merck, Darmstadt, Allemagne) sur support Aluminium, visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm).

La progression de cette colonne est rassemblée dans le **Tableau II. 1**.

| Fractions | Gradient de solvant | Masse (mg) |
|------------------|----------------------------|-------------------|
| F1 | Toluene 100 % | 15 |
| F2 | Toluene-MeOH 5 % | 71 |
| F3 | Toluene-MeOH 5 % | 225 |
| F4 | Toluene-MeOH 5 % | 82 |
| F5 | Toluene-MeOH 5 % | 506 |
| F6 | Toluene-MeOH 10 % | 300 |
| F7 | Toluene-MeOH 15 % | 440 |
| F8 | Toluene-MeOH 20 % | 591 |
| F9 | Toluene-MeOH 25 % | 962 |
| F10 | Toluene-MeOH 30 % | 1042 |
| F11 | Toluene-MeOH 30 % | 1204 |
| F12 | Toluene-MeOH 35 % | 1506 |
| F13 | Toluene-MeOH 40 % | 2072 |
| F14 | Toluene-MeOH 50 % | 814 |
| F15 | Toluene-MeOH 60 % | 1932 |
| F16 | Toluene-MeOH 80 % | 318 |
| F17 | MeOH 100 % | 1050 |
| F18 | MeOH-H ₂ O 50 % | 1064 |
| F19 | AcOH 15 % | 112 |

Tableau II. 1: Fractions issues de la purification par chromatographie sur colonne de polyamide SC₆ de l'extrait n-butanol de *S.giganteus* Desf.

Il faut noter que la partie précédente a été réalisée dans le laboratoire de phytochimie et d'analyses physico-chimiques, Université Mentouri, Constantine, Algérie.

Lorsque nous avons commencé cette partie de purification (laboratoire SONAS Angers, France), nous avons constaté après avoir analysé les 19 fractions sur CCM de gel de silice, qu'il y'a deux types de fractions: des fractions semi-polaires dont F3 est la plus importante et des fractions polaires dont les plus importantes sont les fractions F6, F13, F14 et F15.

La purification de la fraction semi-polaire F3 est effectuée par chromatographie sur gel de silice. Quand aux fractions polaires F6, F13, F14 et F15, elles trainent sur gel de

silice, ce qui rend leur séparation difficile. Nous avons donc choisi d'employer la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) pour les purifier.

- **Purification de la fraction F3**

Une masse de 225 mg de la fraction F3 est purifiée au départ, sur colonne de gel de silice 60 (40-63 μm , Merck) préparée dans le dichlorométhane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité croissante du système CH_2Cl_2 -AcOEt.

Le suivi des fractions obtenues est réalisé par chromatographie de gel de silice, visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm).

La progression de cette colonne est rassemblée dans le **Tableau II. 2**.

| Fractions | Gradient de solvant | Masses (mg) |
|-----------|--------------------------------------|-------------|
| f1 | CH_2Cl_2 100 % | 2 |
| f2 | CH_2Cl_2 100 % | 4 |
| f3 | CH_2Cl_2 -AcOEt 1 % | 2 |
| f4 | CH_2Cl_2 -AcOEt 5 % | 5 |
| f5 | CH_2Cl_2 -AcOEt 10 % | 6 |
| f6 | CH_2Cl_2 -AcOEt 10 % | 4 |
| f7 | CH_2Cl_2 -AcOEt 10 % | 14 |
| f8 | CH_2Cl_2 -AcOEt 10 % | 6 |
| f9 | CH_2Cl_2 -AcOEt 15 % | 7 |
| f10 | CH_2Cl_2 -AcOEt 20 % | 20 |
| f11 | CH_2Cl_2 -AcOEt 30 % | 10 |
| f12 | CH_2Cl_2 -AcOEt 40 % | 15 |
| f13 | CH_2Cl_2 -AcOEt 50 % | 20 |
| f14 | CH_2Cl_2 -AcOEt 75 % | 18 |
| F15 | AcOEt 100 % | 22 |

Tableau II. 2: Résultats de la purification par chromatographie sur colonne de gel de silice de la fraction F3.

La sous-fraction f7 a été purifiée par la suite sur plaque préparative de gel de silice, en utilisant comme système éluant : CH₂Cl₂-AcOEt 8:2, pour donner 8 mg d'un produit pur. C'est le composé **S1**.

Avant de présenter les travaux réalisés sur les purifications des fractions F6, F13, F14 et F15 par CPC, il est important d'avoir une idée sur la méthodologie d'une séparation par Chromatographie de Partage Centrifuge.

II. 1. 4. 3. b. Purification par Chromatographie de Partage Centrifuge

- **Chromatographie de Partage Centrifuge**

- a- Définition**

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une méthode de chromatographie liquide-liquide. Cette méthode de séparation est basée sur le partage de solutés entre deux phases liquides non miscibles d'un système de solvants. Ces phases sont maintenues en contact dans la colonne chromatographique. L'une des phases, dite stationnaire, reste dans la colonne grâce au champ de forces centrifuges généré par l'appareil. L'autre phase liquide, dite mobile, est pompée. Son élution permet la séparation progressive des solutés en fonction de leur coefficient de partage respectif.

Ces systèmes sont à compléter par une pompe d'élution, un système d'injection avec différents volumes de boucle, tous types de détecteurs et un collecteur de fractions ainsi qu'un logiciel d'acquisition et de traitement des chromatogrammes (**Figure II. 6**).

Les bases de la chromatographie liquide-liquide sont établies dès 1941 avec les travaux de Martin et Synge pour qui la phase stationnaire est alors un liquide fixé sur un support inerte. Le soluté se partage dans les deux phases liquides selon la loi de Nernst (ou loi de distribution). Ainsi, tout soluté A dissous dans les deux phases non miscibles, présente une répartition à l'équilibre (en tenant compte de toutes ses espèces) reproductible dans des conditions physico-chimiques constantes et définie par un coefficient de partage K.

$$K = \frac{[A_{\text{tot}}]_{\text{org}}}{[A_{\text{tot}}]_{\text{aq}}}$$

[A_{tot}]_{org} : concentration analytique totale du soluté A dans la phase organique.

[A_{tot}]_{aq} : concentration de l'espèce A dans la phase aqueuse.

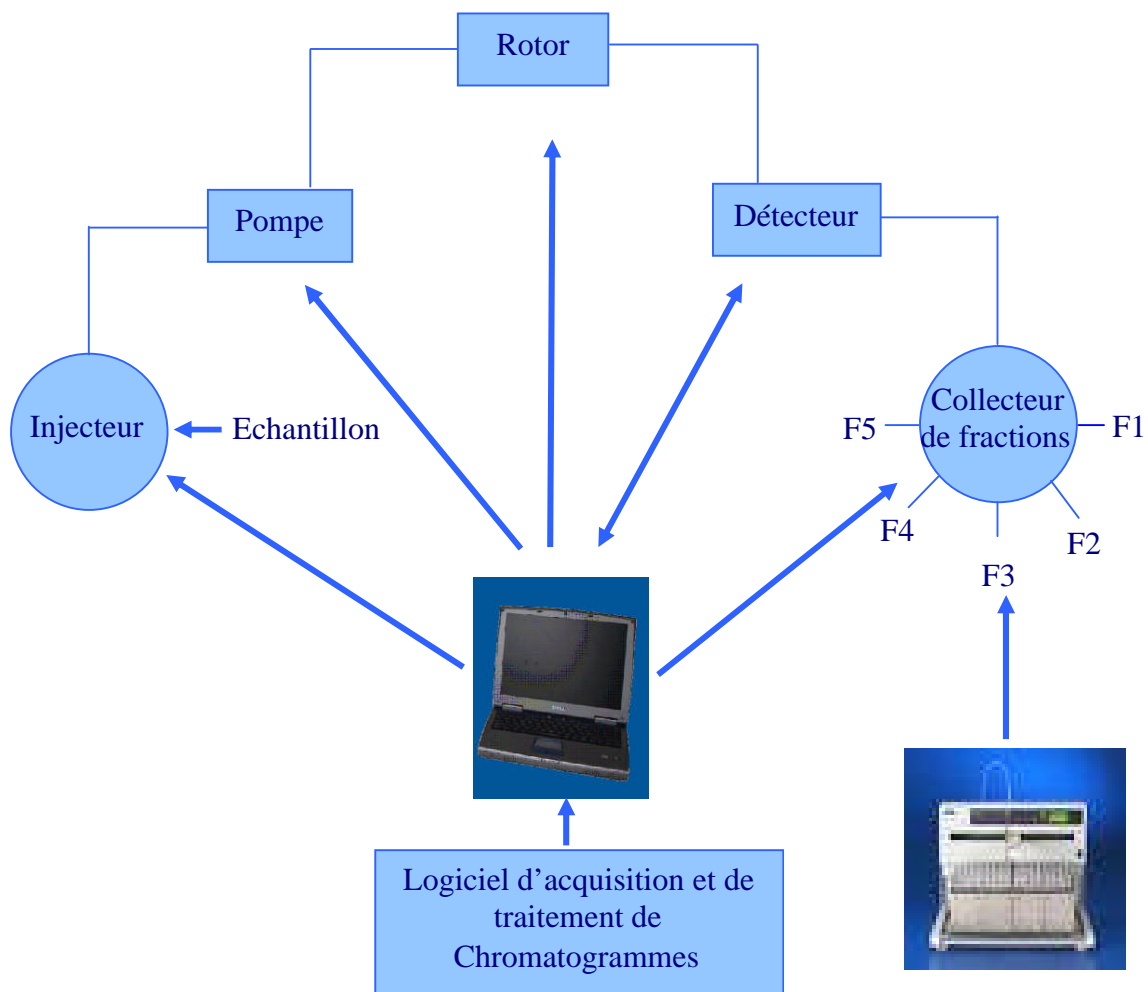


Figure II. 6 : Schéma et photo du banc chromatographique de la CPC.

Globalement, la séparation par CPC s'apparente à une ampoule à décantier. Plutôt que chercher à ce que tout le produit désiré soit dans la même phase, on cherche à ce qu'il se répartisse équitablement dans chacune d'entre elles. Aussi, l'une des grandeurs les plus importantes est le coefficient de partage K qui se définit de la manière suivante [6]:

$$K = \frac{\text{Concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{Concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

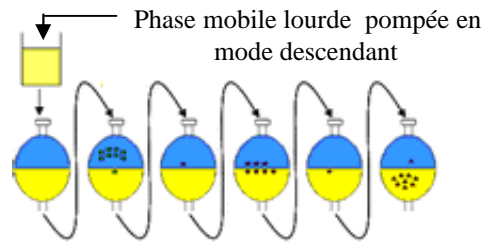


Figure II. 7 : Ampoules à décantier montées en séries.

Pour espérer une bonne séparation, K doit être le plus proche de l'unité. Il se détermine préalablement lors de la recherche du système biphasique. L'évaluation du K peut se faire, approximativement, par CCM ou de manière plus précise par CLHP.

Pour cela, un mélange équivolumique de chaque phase du système biphasique est introduit dans un tube à essai.

Une petite quantité de l'échantillon y est dissoute. Après agitation et décantation, les deux phases sont séparées et à l'aide d'un capillaire, la même quantité de chaque phase est déposée sur une plaque CCM. La même opération est réalisée pour différents systèmes biphasiques. Après migration, la répartition des principaux constituants du soluté dans les phases supérieures et inférieures des différents systèmes est visualisée sous lampe UV (254 et 365 nm) (**Figure II. 8**).

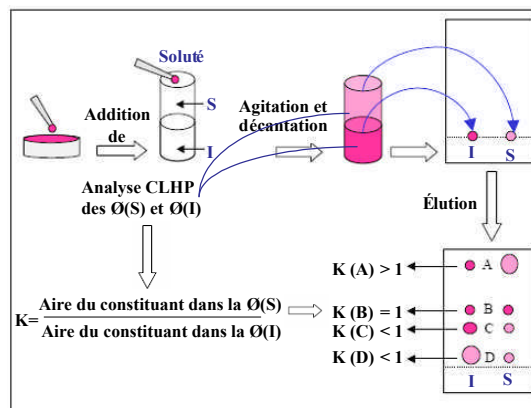


Figure II. 8 : Méthodologie suivie pour le choix du système de solvants biphasique.

Cette méthode, très visuelle, semble approximative, mais, en pratique, permet assez facilement une sélection préliminaire des mélanges biphasiques qui sont analysés par la suite par CLHP pour l'évaluation du coefficient de partage K.

$$K = \frac{\text{Aire du constituant dans la phase supérieure}}{\text{Aire du constituant dans la phase inférieure}}$$

Le mélange retenu est celui pour lequel le constituant à purifier a un $K \sim 1$, et qui permet d'avoir des temps de rétention distincts pour les principaux constituants.

b- Choix du système de solvants biphasique

Le choix du système de solvant biphasique est à la base de toute séparation par CPC. Afin de réaliser une bonne séparation, il est important de tenir compte de la solubilité du mélange et de sa polarité. On utilise généralement des mélanges de trois solvants ou plus à partir des gammes préétablies.

L'utilisation des gammes que nous allons présenter ci-après se dévoile très utile. Une combinaison entre certains solvants en variant graduellement leurs proportions, pour former des séries quasiment continues. Lorsque les mêmes solvants sont utilisés pour une gamme, il s'agit d'une échelle homogène. Pour les hétérogènes la polarité évolue avec des solvants différents [7].

- **Les gammes ou l'approche multisolvants**

Nous présenterons ici les gammes qui ont pu être utilisées lors de nos travaux lors de l'application.

i. Les gammes multi solvants homogène

- La gamme HBAE

Sept systèmes biphasiques composés de n-heptane (H), de butanol (B), d'acétonitrile (A) et d'eau (E) ont été décrits et testés par A. P. Foucault *et al.* [6] (**Tableau II. 3**). Dans ce cas la polarité décroît du système 3 au système -3. L'étude débute en testant les systèmes 0 de polarité intermédiaire. Si l'échantillon reste préférentiellement dans la phase la plus polaire alors les systèmes 1 à 3 seront testés. Inversement, s'il va préférentiellement dans la phase la moins polaire, on essayera les systèmes de -1 à -3.

| Système | n-Heptane | BuOH | MeCN | Eau |
|---------|-----------|------|------|-----|
| -3 | 5 | 0 | 5 | 0 |
| -2 | 5 | 2 | 3 | 0 |
| -1 | 4 | 2,6 | 2,4 | 1 |
| 0 | 4 | 3,2 | 1,8 | 2 |
| 1 | 2 | 3,8 | 1,2 | 4 |
| 2 | 1 | 4,4 | 0,6 | 4 |
| 3 | 0 | 5 | 0 | 5 |

Tableau II. 3 : Composition des systèmes biphasiques de la gamme HBAE.

- La gamme Oka

Oka *et al.* [8] Utilisent 16 mélanges de n-hexane, acétate d'éthyle, n-butanol, méthanol et eau. Les proportions se répartissant du système le moins polaire Hexane/MeOH/H₂O (2:1:1) au plus polaire : n-BuOH/H₂O (1:1) (**Tableau II. 4**). Cette gamme s'applique à des composés moyennement polaires à très polaires en raison de la présence d'eau dans chacun des systèmes. Notons la présence de n-BuOH dans plusieurs systèmes, ce qui peut engendrer des difficultés lors de l'évaporation.

| Numéro du système | n-Hexane | Acétate d'éthyle | n-Butanol | Méthanol | Eau |
|-------------------|----------|------------------|-----------|----------|-----|
| 1 | 10 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| 2 | 9 | 1 | 0 | 5 | 5 |
| 3 | 8 | 2 | 0 | 5 | 5 |
| 4 | 7 | 3 | 0 | 5 | 5 |
| 5 | 6 | 4 | 0 | 5 | 5 |
| 6 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 |
| 7 | 4 | 5 | 0 | 4 | 5 |
| 8 | 3 | 5 | 0 | 3 | 5 |
| 9 | 2 | 5 | 0 | 2 | 5 |
| 10 | 1 | 5 | 0 | 1 | 5 |
| 11 | 0 | 5 | 0 | 0 | 5 |
| 12 | 0 | 4 | 1 | 0 | 5 |
| 13 | 0 | 3 | 2 | 0 | 5 |
| 14 | 0 | 2 | 3 | 0 | 5 |
| 15 | 0 | 1 | 4 | 0 | 5 |
| 16 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 |

Tableau II. 4 : Composition des systèmes biphasiques de la gamme Oka.

- La gamme " Arizona "

En 1991, Margraff *et al.* [9] ont établi une gamme de 23 systèmes sur la base d'un mélange n-heptane, acétate d'éthyle, méthanol et eau (**Tableau II. 5**). Le système le moins polaire dans ce cas est un mélange équimolaire heptane/MeOH (Z) et le plus polaire AcOEt/H₂O (A).

| Système | n-Heptane | AcOEt | MeOH | Eau |
|---------|-----------|-------|------|-----|
| A | 0 | 1 | 0 | 1 |
| B | 1 | 19 | 1 | 19 |
| C | 1 | 9 | 1 | 9 |
| D | 1 | 6 | 1 | 6 |
| F | 1 | 5 | 1 | 5 |
| G | 1 | 4 | 1 | 4 |
| H | 1 | 3 | 1 | 3 |
| J | 2 | 5 | 2 | 5 |
| K | 1 | 2 | 1 | 2 |
| L | 2 | 3 | 2 | 3 |
| M | 5 | 6 | 5 | 6 |
| N | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P | 6 | 5 | 6 | 5 |
| Q | 3 | 2 | 3 | 2 |
| R | 2 | 1 | 2 | 1 |
| S | 5 | 2 | 5 | 2 |
| T | 3 | 1 | 3 | 1 |
| U | 4 | 1 | 4 | 1 |
| V | 5 | 1 | 5 | 1 |
| W | 6 | 1 | 6 | 1 |
| X | 9 | 1 | 9 | 1 |
| Y | 19 | 1 | 19 | 1 |
| Z | 1 | 0 | 1 | 0 |

Tableau II. 5: Composition des systèmes biphasiques de la gamme "Arizona".

ii. La gamme multi solvant hétérogène : la gamme Abbott *et al.* [10]

TP. Abbott et P. Kleimen ont établi une série de 13 systèmes biphasiques dont la composition est donnée dans le **Tableau II. 6**. Les auteurs définissent trois groupes de systèmes : le lipophile (systèmes 1 à 3), l'intermédiaire (système 4 à 8) et le polaire (systèmes 9 à 13).

Cette gamme « discontinue » présente une importante étendue de polarité et permet donc des applications pour une grande variété de composés.

| Systèmes | Solvants | Volumes |
|----------|---|-----------|
| 1 | n-hexane/acétonitrile | (1:1) |
| 2 | n-hexane/acétonitrile/chloroforme | (5:5:1) |
| 3 | n-hexane/méthanol/eau | (6:5:1) |
| 4 | n-hexane/acétate d'éthyle/acétonitrile/méthanol | (5:2:5:4) |
| 5 | n-hexane/acétate d'éthyle/méthanol/eau | (1:1:1:1) |
| 6 | Chloroforme/méthanol/eau | (13:7:2) |
| 7 | Chloroforme/méthanol/eau | (1:1:1) |
| 8 | Chloroforme/méthanol/eau | (7:13:8) |
| 9 | Toluène/acétonitrile/éthanol/eau | (3:4:2:3) |
| 10 | Chloroforme/méthanol/acide acétique 0.2 M | (1:1:1) |
| 11 | Acétate d'éthyle/éthanol/eau | (2:1:2) |
| 12 | Butan-1-ol/acide acétique/eau | (4:1:5) |
| 13 | Butan-1-ol/acétate d'éthyle/eau | (4:1:4) |

Tableau II. 6: Composition des systèmes biphasiques de la gamme Abbott *et al.*

c- Répartition des deux phases

- Appareillages

La colonne d'un Chromatogramme de Partage Centrifuge (CPC) est constituée d'une suite de petites cellules reliées entre elles par de fins capillaires et soumise à un champ de gravité constant en tout point. Toutes ces petites cellules remplissent la circonférence de disques empilés les uns sur les autres et communiquant entre eux (**Figure II. 9**).



Figure II. 9 : Colonne de CPC.

- Mise en œuvre du remplissage

L'utilisation et le remplissage se font de la même manière quelque soit le mode mis en œuvre. Dans un premier temps, la phase stationnaire est injectée. Celle-ci est

préalablement choisie en tant que phase stationnaire pour des raisons pratiques (température d'ébullition pour la récupération du soluté....). Lorsque la colonne est remplie de phase stationnaire, la phase mobile peut être alors injectée. S'il s'agit de la phase la moins dense, elle sera injectée dans le mode ascendant. Inversement la phase inférieure serait injectée à la suite de la phase la moins dense, dans le mode descendant. Dans tous les cas, la phase mobile doit être injectée de sorte qu'elle traverse la phase stationnaire.

- **Purification des fractions F6, F13, F14 et F15 par chromatographie de partage centrifuge**

- ✓ **Analyse CCM**

Des plaques CCM de gel de silice (SiO₂ 60 F254, Merck, Darmstadt, Allemagne) ont été employées.

Les systèmes de solvants utilisés pour une détermination rapide de coefficient de partage et pour le suivi des fractions issues par CPC de chaque fraction sont :

- La fraction F6 : Dichlorométhane-Acétate d'éthyle (7:3).
- Les fractions F13, F14 et F15 : AcOEt-H₂O-HCOOH (8:1:1).
- L'extrait butanolique : AcOEt-H₂O-HCOOH (8:1:1).

Après élution, les plaques ont été révélées sous lampe UV à 254 et 365 nm.

- ✓ **Analyse CLHP**

1- Appareillage

Au début de ce travail, l'analyse est effectuée sur un module de séparation waters 2996 muni d'un détecteur UV à barrette de diode 2996 est relié au logiciel Empower. Un échantillon de 10 µL est injecté sur une colonne BDS HYPERSIL C18, 250 x 4.6 mm (5 µm), en utilisant un gradient eau/acétonitrile comme éluant. Le gradient de la phase mobile est le suivant : ACN/H₂O 10:90 v/v à 30:70 v/v pendant 35 min, le débit est fixé à 1 mL/min.

La détection UV est réalisée à 210, 254 et 365 nm.

Après, on a changé l'appareil, la colonne et la phase mobile. Le nouvel appareil utilisé est l'Agilant 1100 Online muni d'une pompe G1311A et d'un détecteur UV à barrette de diode G1315A, reliés au logiciel Agilant Chem Station (Agilant Technologies).

Un échantillon de 10 μL est injecté sur une colonne Lichrospher® 100, RP-18e (5 μm). Le gradient de la phase mobile est le suivant : H_2O - HCOOH 0.1 % / MeOH 75:35 v/v à 20:80 v/v pendant 35 min. Le débit est fixé à 1 mL/min. La détection UV est réalisée à 210, 254 et 365 nm.

2- Détermination du coefficient de partage

Le coefficient de partage K a été déterminé par analyse CLHP. Environ 1 mg d'échantillon a été solubilisé dans 1 mL de chaque système biphasique pré-équilibré. Après agitation vigoureuse, 200 μL de chaque phase a été repris, évaporé et analysé par CLHP. K correspond au rapport des AUC (Area Under Curve) de chaque produit dans la phase supérieure et dans la phase inférieure comme il a été décrit précédemment.

✓ CPC

1- Appareillage

Toutes les expériences de CPC ont été réalisées sur un appareil FCPC® 200 (Kromaton, Angers, France) sauf pour la purification de la fraction F6. Le volume total de la cellule est de 275 mL. Une valve incorporée à l'appareil permet de choisir le mode ascendant ou descendant. Ce système est équipé d'une pompe à gradient, d'un détecteur UV-visible, d'une vanne Rhéodyne et boucle d'injection avec système « auto-start » et d'un collecteur de fractions (Kromaton). Le système est piloté par le logiciel Ecomac.

La fraction F6 a été purifiée sur un appareil FCPC (Kromaton) dont le volume total de la cellule est de 55 mL.

2- Réalisation des CPC

Les volumes adéquats de chaque solvant ont été mis dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation, les deux phases séparées ont été placées dans des flacons fermés.

Initialement la colonne est remplie d'un mélange eau/acétone. La colonne est mise en rotation et remplie avec de la phase stationnaire en mode ascendant ou descendant (40 mL/min), puis équilibrée avec la phase mobile avec un débit de 10 mL/min.

Une éprouvette vide placée en sortie de la colonne a permis de mesurer la rétention de la phase stationnaire dans la colonne.

L'échantillon a été solubilisé dans 10 mL d'un mélange 1:1 de chaque phase et injecté manuellement via la vanne Rhéodyne.

Les fractions (10 mL) ont été récupérées par un collecteur automatique, puis rassemblées de façon approprié par CCM visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm), et/ou CLHP.

La colonne de CPC a été rincée après chaque expérience avec différents solvants de polarité croissante : AcOEt, MeOH, MeOH/H₂O, Acétone/H₂O.

A. Purification de la Fraction F6 par CPC

- **Détermination du système de solvants biphasique**

La détermination du système de solvants biphasique pour la réalisation de la CPC de la fraction F6 a été faite en se basant sur la répartition de ses produits majoritaires sur CCM de gel de silice, visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm), en utilisant comme système éluant : CH₂Cl₂-AcOEt (7:3) (**Figure II. 10**). Le système biphasique retenu est l'AcOEt/EtOH/H₂O (2:1:2) (le système 11 de la gamme Abbott *et al.*, **Tableau II. 6**), dont le composé à purifier (**S2**) se répartit équitablement dans les deux phases.

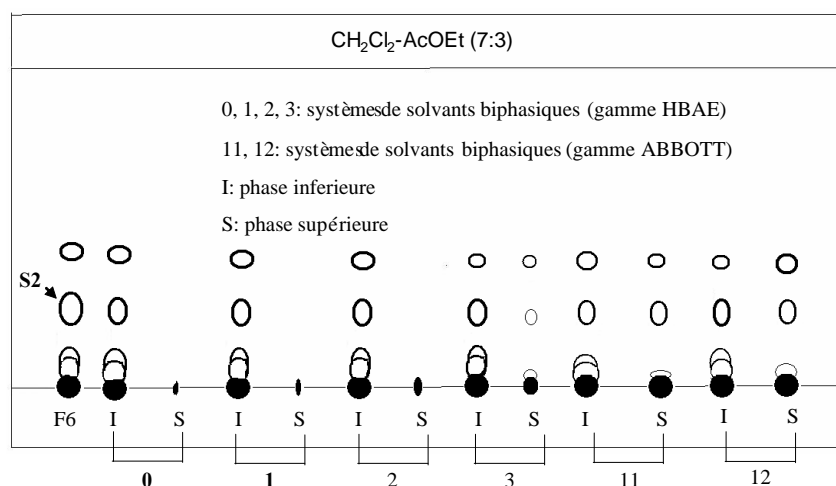


Figure II. 10: CCM analytique de la fraction F6 dans différents systèmes de solvants biphasiques.

- **Procédure de la purification de la fraction F6**

La purification de la fraction F6 par CPC a été réalisée avec le système de solvants biphasique AcOEt/EtOH/H₂O (2:1:2) en isocratique, en mode ascendant.

Les conditions relatives à cette séparation sont regroupées dans le **Tableau II. 7**.

| | |
|----------------------------------|--|
| - Système de solvants biphasique | - AcOEt/EtOH/H ₂ O 2:1:2 |
| - Phase stationnaire | - Phase aqueuse |
| - Phase mobile | - Phase organique |
| - Equilibre rotor | - Mode ascendant - Débit 2 mL/min - Rotation 1800 tr/min - Pression pendant l'équilibre 13 bars |
| - Analyse et fractionnement | - Quantité d'échantillon et volume d'injection : 300 mg de F6 solubilisé dans 2,5 mL d'un mélange de 1:1 de chaque phase. - Durée 120 min - Volume de sous-fraction 3 mL - Nombre de sous-fractions 80 |

Tableau II. 7: Conditions expérimentales de la purification de la fraction F6 par CPC.

Le suivi du rassemblement des sous-fractions collectées a été effectué par analyse CCM de gel de silice, visualisées sous loupe UV (254 et 365 nm).

Le **Tableau II. 8** regroupe la progression de regroupement des sous-fractions de cette expérience.

| Temps-collecte (min) | Sous-fractions | Masse (mg) | Observations |
|----------------------|----------------|------------|-------------------|
| 11-23 | f1 | 35 | Mélange |
| 24 | f2 | 17 | Mélange |
| 25 | f3 | 46 | Mélange |
| 26-27 | f4 | 13 | Mélange |
| 28-30 | f5 | 43 | Mélange |
| 31-39 | f6 | 54 | Composé pur S2 |
| 40-46 | f7 | 11 | Trace de produits |
| 47-91 | f8 | 24 | Mélange |
| 92-103 | f9 | 21 | Mélange |
| 105-114 | f10 | 12 | Mélange |
| 115-120 | f11 | 10 | Mélange |

Tableau II. 8: Résultats de la purification par chromatographie de partage centrifuge de la fraction F6.

B. Purification de la fraction F13 par CPC

- **Détermination du système de solvants biphasique**

Les recherches du système biphasique menées selon la méthodologie précédemment décrite, nous ont permis de sélectionner un mélange de trois solvants : Acétate d'éthyle/acétonitrile/eau (3:2:5) [11], optimisé pour une meilleure purification des composés majoritaires de la fraction F13 (**Figure II. 11**) en fonction des valeurs du coefficient de partage K (**Tableau II. 9**).

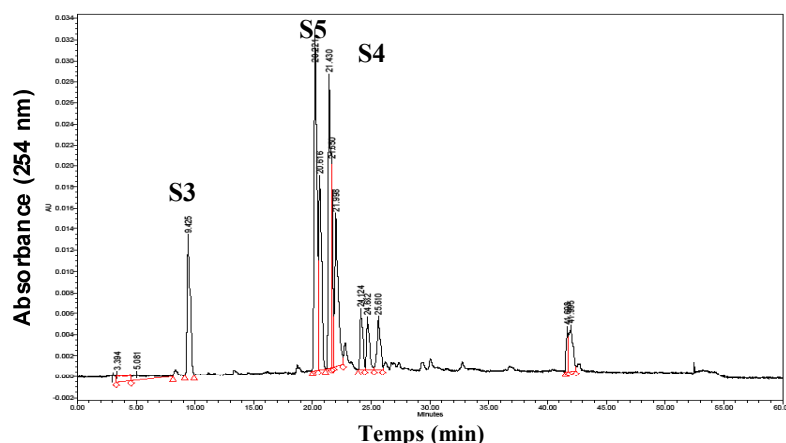


Figure II. 11 : Chromatogramme CLHP de la fraction F13*.
 (* Analyse CLHP à partir de l'appareil waters 2996 (voir p. 61))

| Systèmes de solvants biphasiques | Coefficient de partage $K = \frac{\text{Air}(Q_s)}{\text{Air}(Q_t)}$ | | |
|---|--|-----|------|
| | S3 | S5 | S4 |
| Butanol/eau/acétate d'éthyle 4:1:4 | 0.2 | 6.1 | 34.0 |
| Dichlorométhane/méthanol/eau 1:1:1 | * | * | * |
| Acétate d'éthyle/acétonitrile/eau 3:2:5 | 1.4 | 1.1 | 6.9 |

* L'ensemble des produits se trouve dans la phase supérieure.

Tableau II. 9 : Valeurs de K dans différents systèmes biphasiques.

On remarque que le système de solvants biphasique AcOEt/MeCN/H₂O (3:2:5) permet d'obtenir des coefficients de partages (K) différents pour les trois produits dont le K du produit majoritaire est au tour de 1.

- **Procédure de la purification de la fraction F13 par CPC**

La séparation de la fraction F13 a été réalisée en mode isocratique avec le système de solvants biphasique AcOEt/MeCN/H₂O (3:2:5).

Les conditions relatives à cette séparation sont regroupées dans le **Tableau II. 10** et représentées par la **Figure II. 12**.

| | |
|----------------------------------|--|
| - Système de solvants biphasique | - AcOEt/MeCN/H ₂ O 3:2:5 |
| - Phase stationnaire | - Phase aqueuse |
| - Phase mobile | - Phase organique |
| - Equilibre rotor | - Mode ascendant - Débit 10 mL/min - Rotation 1000 tr/min - Rétention de la phase stationnaire 64 % - Pression pendant l'équilibre 20 bars |
| - Analyse et fractionnement | - Quantité d'échantillon et volume d'injection : 630 mg de F13 solubilisé dans 10 mL d'un mélange de 1:1 de chaque phase. - Durée et déroulement de l'expérience: Durée 85 min {0-54,9 min, phase mobile 100 %, 10 mL/min 55-85 min, phase stationnaire 100 %, 12 mL/min} Délai d'injection-collecte 7 min Volume de sous-fraction 10 mL Nombre de sous-fractions 78 Détection UV (210, 254 et 350 nm) |

Tableau II. 10: Conditions expérimentales de la purification de la fraction F13 Par CPC.

Le rassemblement des sous-fractions obtenues est effectué par analyse CCM de gel de silice et/ou par analyse CLHP.

La progression de regroupement de ces sous-fractions est rassemblée dans le **Tableau II. 11**.

| Temps de collecte (min) | Sous-fractions | Masse (mg) | Observation |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| 8-14 | f1 | 15 | Mélange |
| 15-16 | f2 | 8 | Mélange |
| 17-19 | f3 | 9 | Mélange |
| 20 | f4 | 3 | Mélange |
| 21-22 | f5 | 6 | Trois taches |
| 23 | f6 | 3 | Trois taches |
| 24-28 | f7 | 24 | Deux taches + précipité jaune S4 |
| 29-30 | f8 | 8 | Deux taches |
| 31 | f9 | 3 | Trois taches |
| 32-33 | F10 | 3 | Trois taches |
| 34-39 | F11 | 12 | Un produit + impuretés |
| 40-48 | F12 | 9 | Produit pur S3 |
| 49-59 | F13 | 8 | Trois taches |
| 60-65 | F14 | 7 | Deux taches |
| 66-68 | F15 | 11 | Trois taches |
| 69-73 | F16 | 34 | Produit pur S5 |
| 74-76 | F18 | 12 | Deux taches |
| 77 | F19 | 15 | Mélange |
| 78-85 | F20 | 180 | Mélange |

Tableau II. 11: Résultats de la purification par chromatographie de partage centrifuge de la fraction F13.

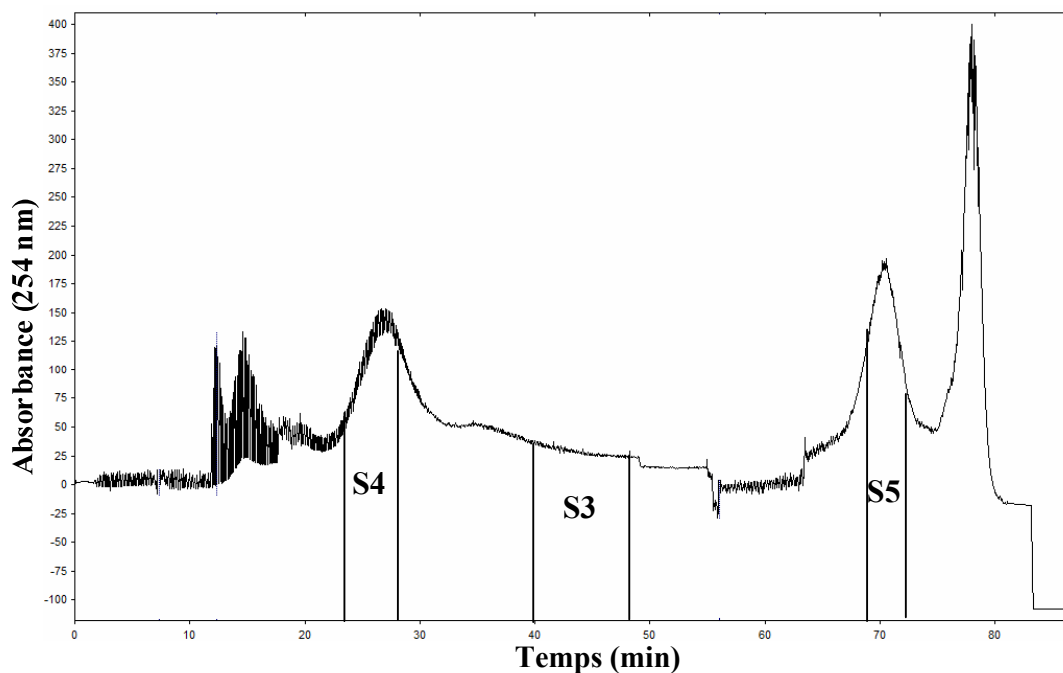


Figure II. 12: Chromatogramme CPC de la fraction F13.

C. Purification de la fraction F14 par CPC

- **Détermination du système de solvants biphasiques**

Pour choisir un système de solvants biphasiques pour la fraction F14, on a pensé au système qui a été choisi pour la fraction F13 (AcOEt/MeCN/H₂O 3:2:5), vu l'approche des constituants des deux fractions (**Figure II. 13**), mais ce système ne convenant parfaitement après avoir calculer les valeurs de Coefficient de partage K des produits majoritaires de F14 (**Tableau II. 12**), ce qui nous a amené à modifier les proportions des solvants pour avoir le système AcOEt/MeCN/H₂O (5:1:4), optimisé pour une meilleur séparation pour les composés majoritaires de la fraction F14.

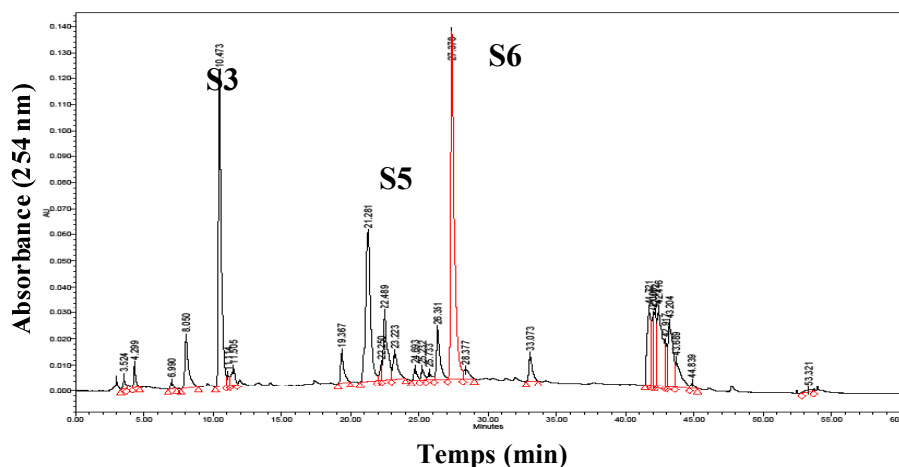


Figure II. 13: Chromatogramme CLHP de la fraction F14*.

(* Analyse CLHP à partir de l'appareil waters 2996 (voir p. 61)).

| Systèmes de solvants biphasiques | Coefficient de partage <i>K</i> | | |
|--|---------------------------------|-------------|-------------|
| | S3 | S5 | S6 |
| Acétate d'éthyle/acétonitrile/eau 3:2:5 | 0,33 | 0,34 | 1,09 |
| Acétate d'éthyle/acétonitrile/eau 6:1:3 | 0,34 | 0,34 | 1,20 |
| Acétate d'éthyle/acétonitrile/eau 5:1:4 | 0,32 | 0,13 | 1,29 |

Tableau II. 12: Valeurs de *K* dans différents systèmes biphasiques de la fraction F14.

On remarque que le système de solvants biphasique AcOEt/MeCN/H₂O (5:1:4) choisi pour cette séparation (**Tableau II. 12**), permet d'obtenir des coefficients de partages (*K*) différents pour les trois produits dont le *K* du produit majoritaire est au tour de 1.

- **Procédure de la purification de la fraction F14 par CPC**

La séparation en mode isocratique de la fraction F14 a été réalisée avec le système de solvants biphasique AcOEt/MeCN/H₂O (5:1:4).

Les conditions expérimentales de la CPC sont rassemblées dans le **Tableau II. 13**.

| | |
|---------------------------------|--|
| - Système de solvant biphasique | - AcOEt/MeCN/H ₂ O 5:1:4 |
| - Phase stationnaire | - Phase aqueuse |
| - Phase mobile | - Phase organique |
| - Equilibre rotor | - Mode ascendant - Débit 10 mL/min - Rotation 900 tr/min - Rétention de la phase stationnaire 60 % - Pression pendant l'équilibre 10 bars |
| - Analyse et fractionnement | - Quantité d'échantillon et volume d'injection : 814 mg de F14 solubilisé dans 10 mL d'un mélange de 1:1 de chaque phase. - Durée et déroulement de l'expérience: Durée 85 min {0-54,9 min, phase mobile 100 %, 10 mL/min |

| | |
|--|--|
| | <p style="text-align: center;">55-85 min, phase stationnaire 100 %, 12 mL/min }</p> <p>Délai d'injection-collecte 7 min</p> <p>Volume de sous-fraction 10 mL</p> <p>Nombre de sous-fractions 78</p> <p>Détection UV (210, 254 et 350 nm)</p> |
|--|--|

Tableau II. 13. Conditions expérimentales de la purification de la fraction F14
Par CPC.

L'analyse des sous-fractions obtenues a été effectuée par CCM de gel de silice, visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), et/ou par analyse CLHP.

La progression de regroupement de ces sous-fractions est rassemblée dans le **Tableau II. 14.**

| Temps de collecte (min) | Sous-fractions | Masse (mg) | Observation |
|-------------------------|----------------|------------|-------------------------|
| 12 | F1 | 10 | Mélange |
| 13 | F2 | 14 | Mélange |
| 14-15 | F3 | 4 | Mélange |
| 16 | F4 | 18 | Trois taches |
| 17 | F5 | 7 | Trois taches |
| 18-21 | F6 | 34 | Mélange |
| 22-23 | F7 | 20 | Produit ~ pur S6 |
| 24-28 | F8 | 10 | Trois taches |
| 29 | F9 | 4 | Trois taches |
| 30-31 | F10 | 11 | Trois taches |
| 32 | F11 | 9 | Un produit + impuretés |
| 33-37 | F12 | 21 | Produit pur S3 |
| 38-42 | F13 | 17 | Un produit + impuretés |
| 43-47 | F14 | 9 | Un produit + impuretés |

| | | | |
|-------|-----|-----|-----------------------|
| 48-61 | F15 | 30 | Trois taches |
| 62-65 | F16 | 4 | Trois taches |
| 66 | F17 | 3 | Mélange |
| 67-68 | F18 | 5 | Mélange |
| 69-70 | F19 | 6 | Mélange |
| 71-72 | F20 | 8 | Mélange |
| 73 | F21 | 6 | Deux taches |
| 74-76 | F22 | 17 | Produit pur S5 |
| 77-85 | F23 | 275 | Mélange |

Tableau II. 14: Résultats de la purification par chromatographie de partage centrifuge de la fraction F14.

D. Purification de la fraction F15 par CPC

- **Détermination du système de solvants biphasique**

La purification de la fraction F15 a été réalisée avec le système biphasique AcOEt/MeCN/H₂O (5:1:4), après avoir déterminé les valeurs de K des composés majoritaires (**Figure II. 14**) (**Tableau II. 15**).

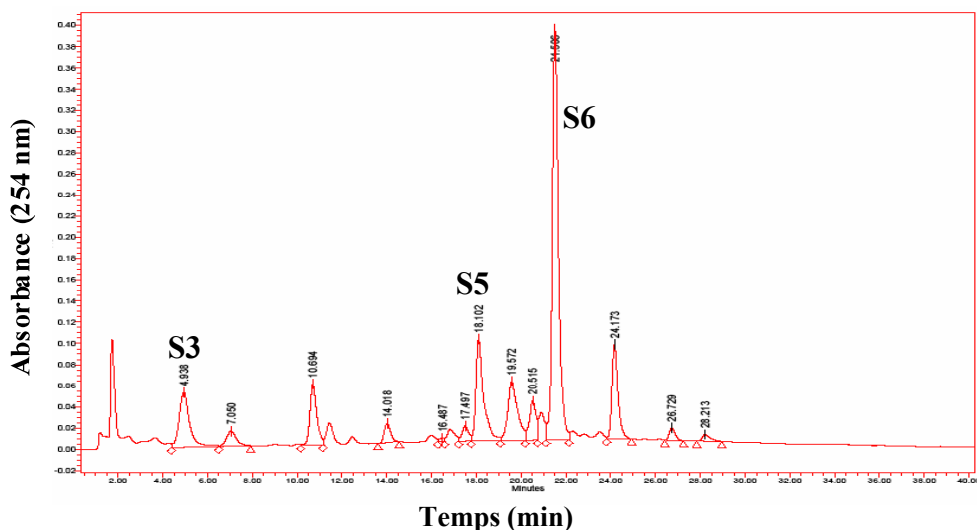


Figure II. 14: Chromatogramme CLHP de la fraction F15*.

(* Analyse CLHP à partir de l'appareil Agilent 1100 Online (voir p. 61))

| Systèmes de solvants biphasiques | Coefficient de partage <i>K</i> | | |
|--|---------------------------------|-------------|-------------|
| | S3 | S5 | S6 |
| Acétate d'éthyle-acétonitrile-eau 1:1:2 | 0,44 | 0,49 | 1,29 |
| Acétate d'éthyle-acétonitrile-eau 4:1:5 | 0,25 | 0,32 | 1,21 |
| Acétate d'éthyle-acétonitrile-eau 6:1:3 | 0,40 | 0,42 | 1,89 |
| Acétate d'éthyle-acétonitrile-eau 7:1:2 | 0,46 | 0,51 | 1,25 |
| Acétate d'éthyle-acétonitrile-eau 3:2:5 | 0.50 | 0,57 | 1,79 |
| Acétate d'éthyle-acétonitrile-eau 5:1:4 | 0.29 | 0,56 | 1,34 |

Tableau II. 15: Valeurs de *K* dans différents systèmes biphasiques de la fraction.

Le tableau en dessus montre que le système de solvants biphasique AcOEt/MeCN/H₂O (3:2:5) permet d'obtenir des coefficients de partages (*K*) différents pour les trois produits dont le *K* du produit majoritaire est au tour de 1.

- **Procédure de la purification de la fraction F15 par CPC**

Comme la fraction F14, la séparation en isocratique en mode ascendant de la fraction F15 a été réalisée avec le système de solvants biphasique AcOEt/MeCN/H₂O (5:1:4) en deux injections de 1932 mg.

Les conditions expérimentales de la CPC des deux injections de la fraction F15 sont rassemblées dans le **Tableau II. 16** et présentées par les chromatogrammes CPC (**Figure II. 15 et II. 16**).

| | |
|----------------------------------|--|
| - Système de solvants biphasique | - AcOEt/MeCN/H ₂ O 5:1:4 |
| - Phase stationnaire | - Phase aqueuse |
| - Phase mobile | - Phase organique |
| - Equilibre rotor | - Mode ascendant - Débit 10 mL/min - Rotation 900 tr/min - Rétention de la phase stationnaire: - Première injection 68 % - Deuxième injection 69 % |

| | |
|-----------------------------|--|
| | - Pression pendant l'équilibre : - Première injection 10 bars - Deuxième injection 20 bars |
| - Analyse et fractionnement | - Quantité d'échantillon et volume d'injection : * Première injection : 1 g de F15 solubilisé dans 10 mL d'un mélange de 1:1 de chaque phase. * Deuxième injection : 932 mg de F15 solubilisé dans 10 mL d'un mélange de 1:1 de chaque phase. - Durée et déroulement de l'expérience de chaque injection: Durée 85 min {0-54,9 min, phase mobile 100 %, 10 mL/min 55-85 min, phase stationnaire 100 %, 12mL/min} Délai d'injection-collecte 7 min Volume de sous-fraction 10 mL Nombre de sous-fractions 78 Détection UV (210, 254 et 350 nm) |

Tableau II. 16: Conditions expérimentales de la purification de la fraction F15 Par CPC.

L'analyse des sous-fractions obtenues a été suivie par CCM de gel de silice, visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), et/ou CLHP.

La progression de regroupement de ces sous-fractions est rassemblée dans les **Tableau II. 17 et II. 18.**

| Temps de collecte (min) | Sous-fractions | Masse (mg) | Observation |
|-------------------------|----------------|------------|-----------------------------------|
| 12 | f1 | 2 | Mélange |
| 13 | f2 | 142 | Mélange |
| 14-15 | f3 | 36 | Mélange |
| 16-18 | f4 | 25 | Trois taches |
| 19 | f5 | 10 | Deux taches + produit majoritaire |

| | | | |
|-------|-----|-----|--|
| 20-24 | f6 | 61 | Produit pur ~ S6 (précipité jaune) |
| 25-28 | f7 | 18 | Produit pur S6 |
| 29-33 | f8 | 2 | Deux taches |
| 34 | f9 | 4 | Mélanges |
| 35 | f10 | 3 | Mélange |
| 36 | f11 | 4 | Mélange |
| 37-39 | f12 | 18 | Produit pur S3 |
| 40-47 | f13 | 20 | Trois taches |
| 48-54 | f15 | 9 | Trois taches |
| 55-63 | f16 | 10 | Mélange |
| 64-69 | f17 | 17 | Deux taches |
| 70 | f18 | 3 | Produit pur S5 |
| 71-74 | f19 | 16 | Trois taches |
| 75-77 | f20 | 86 | Mélanges |
| 78-85 | f21 | 120 | Mélanges |

Tableau II. 17: Résultats de la purification par chromatographie de partage centrifuge de la première injection de la fraction F15.

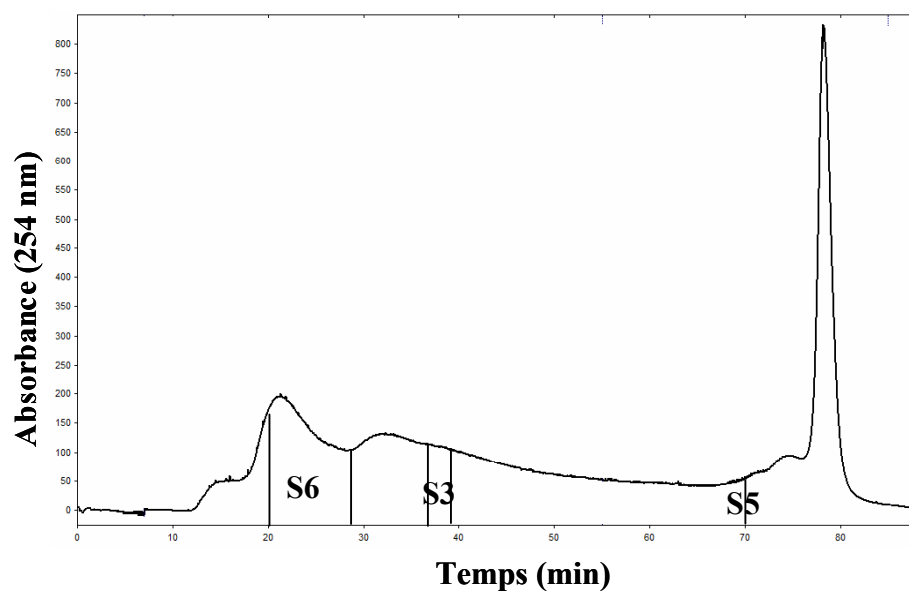


Figure II. 15: Chromatogramme CPC de F15 (première injection).

| Temps de collecte (min) | Sous-fractions | Masse (mg) | Observation |
|-------------------------|----------------|------------|---|
| 12-13 | f1 | 21 | Deux spots |
| 14-15 | f2 | 32 | Mélange |
| 16-17 | f3 | 17 | Mélange |
| 18 | f4 | 56 | Mélange |
| 19-23 | f5 | 74 | Produit pur (précipité jaune) S6 |
| 24 | f6 | 8 | Produit pur S6 |
| 25-28 | f7 | 19 | Deux taches |
| 29 | f8 | 5 | Deux taches |
| 30-33 | f9 | 13 | Produit ~ pur S7 |
| 34-39 | f10 | 20 | Deux taches |
| 40-43 | f11 | 12 | Deux taches |
| 44-51 | f12 | 9 | Produit pur S3 |
| 52-60 | f13 | 8 | Trois taches |
| 61-66 | f14 | 7 | Mélange |
| 67-68 | f15 | 4 | Deux taches |
| 69 | f16 | 2 | Deux taches |
| 70-73 | f17 | 14 | Deux taches |
| 74 | f18 | 5 | Produit ~ pur S5 |
| 75-77 | f19 | 31 | Deux taches |
| 78-85 | f20 | 112 | Mélanges |

Tableau II. 18 : Résultats de la purification par chromatographie de partage centrifuge de la deuxième injection de la fraction F15.

Le composé **S7** a été purifié sur une micro-colonne de Séphadex LH20 pour obtenir 5 mg de produit d'une pureté de 82,9 % à 254 nm.

Les sous fractions f3 et f2 issues respectivement de la première et de la deuxième injection, ont été mélangées et purifiées sur plaque de gel de silice en utilisant le système éluant dichlorométhane-méthanol (9:1), et filtrées sur colonne de Séphadex LH20 pour obtenir 6 mg du composé **S8**.

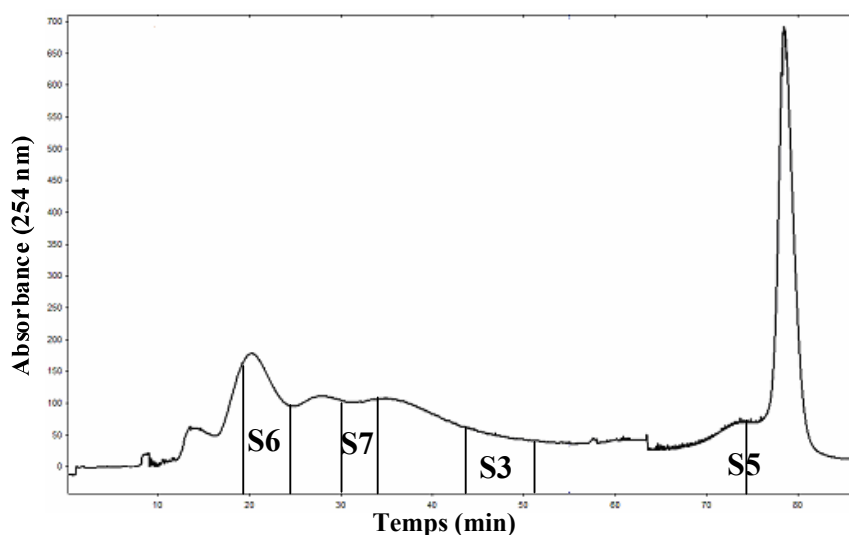


Figure II. 16: Chromatogramme CPC de la deuxième injection de la fraction F15.

Comme nous avons décrit précédemment, la purification de l'extrait butanolique a mené à l'isolement de huit produits purs, S1 (8 mg), S2 (53 mg), S3 (57 mg), S4 (11 mg), S5 (59 mg), S6 (181 mg), S7 (5 mg) et S8 (6 mg) (Figure II. 16) en utilisant la chromatographie classique avant de passer par la suite à la chromatographie de partage centrifuge.

Afin d'améliorer les qualités de produits obtenues, il nous a semblé intéressant de réaliser une CPC directement sur l'extrait n-butanolique brut. Nous avons donc mené une étude comparative.

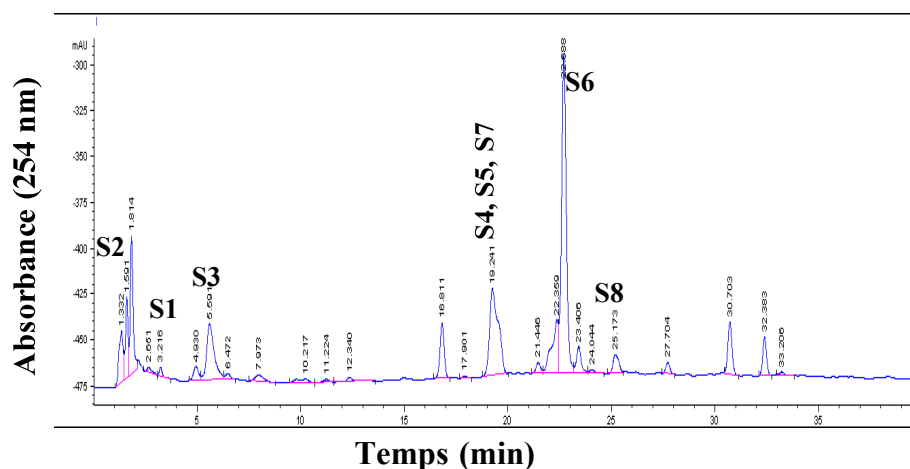


Figure II. 17 : Chromatogramme CLHP de l'extrait butanolique *S. giganteus* Desf.*
 (* Analyse CLHP à partir de l'appareil Agilent 1100 Online (voir p. 61))

E. Purification des produits majoritaires de l'extrait butanolique de *S. giganteus* directement par CPC

- **Détermination du système biphasique**

Plusieurs systèmes de solvants biphasiques ont été testés sur l'extrait butanolique. Six systèmes ont été sélectionnés par CCM de gel de silice conformément au protocole précédemment décrit. Les coefficients de partage K des différents composés ont été calculés après analyse CLHP des phases supérieures et inférieures des systèmes sélectionnés (**Tableau II. 19**), comme il a été décrit précédemment.

| Systèmes de solvants biphasiques | Valeurs de coefficient K | | | | | | | |
|--|--------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 |
| n-Heptane-acétate d'éthyle-méthanol-eau (0:1:0:1) | ^a | 0,79 | 3,72 | 3,14 | 3,40 | 0,87 | 3,14 | 0,02 |
| n-Heptane-acétate d'éthyle-méthanol-eau (1:19:1:19) | 0,29 | ^b | 0,18 | 0,33 | 0,33 | 0,46 | 0,33 | 3,65 |
| Acétate d'éthyle-éthanol-eau (2:1:2) | 0,33 | 0,43 | 0,22 | 0,44 | 0,44 | 0,82 | 0,44 | 8,62 |
| Butan-1-ol-acide acétique-eau (4:1:5) | 0,55 | 0,93 | 3,72 | 4,30 | 4,30 | 4,59 | 4,30 | 3,86 |
| Butan-1-ol-acétate d'éthyle-eau (4:1:4) | 0,51 | ^b | 2,81 | 5,07 | 5,07 | 6,05 | 5,07 | 14,86 |
| Acétate d'éthyle-acétonitrile-eau (3:2:5) | 0,78 | 0,91 | 0,49 | 0,79 | 0,79 | 1,19 | 0,79 | 13,37 |
| Acétate d'éthyle-acétonitrile-eau (5:1:4) | 0,59 | 0,48 | 0,53 | 0,58 | 0,58 | 1,02 | 0,58 | ^a |

^aProduit est dans la phase supérieure, ^bProduit est dans la phase inférieure.

Tableau II. 19 : Valeurs de K dans différents systèmes biphasiques des produits majoritaires de l'extrait butanolique.

Les valeurs de coefficient de partage K dans le **Tableau II. 19**, montrent que le bon système de solvant biphasique est le système Acétate d'éthyl-acétonitrile-eau (5:1:4), dont le K ~ 1 du produit majoritaire **S6** (**Figure II. 17**), produit ciblé dans cette partie. Le **Tableau II. 19** montre également que ce système de solvants biphasique permet de séparer les deux composés **S2** et **S3** dont leurs coefficients de partages sont différents.

- **Procédure de la purification de l'extrait butanolique de *S. giganteus***

La purification de (2 x 1 g) de l'extrait butanolique de *S. giganteus* par CPC a été réalisée en mode ascendant, en utilisant le système de solvant biphasique AcOEt/MeCN/H₂O (5:1:4). Quatre fractions contenant des produits purs ont été obtenues. Elles correspondent aux composés **S2**, **S3**, **S5** et **S6** (**Figure II. 18**).

Les conditions expérimentales ainsi que les fractions issues de la CPC de l'extrait butanolique de la première et la deuxième injection, sont rassemblées dans les **Tableaux II. 20**.

| | |
|----------------------------------|---|
| - Système de solvants biphasique | - AcOEt/MeCN/H ₂ O 5:1:4 |
| - Phase stationnaire | - Phase aqueuse |
| - Phase mobile | - Phase organique |
| - Equilibre rotor | - Mode ascendant - Débit 10 mL/min - Rotation 900 tr/min - Rétention de la phase stationnaire : - Première injection 64 % - Deuxième injection 71 % - Pression pendant l'équilibre : - Première injection 17 bars - Deuxième injection 18 bars |
| - Analyse et fractionnement | - Quantité d'échantillon et volume d'injection : 2 x 1 g de l'extrait butanolique solubilisé dans 10 mL d'un mélange de 1:1 de chaque phase. - Durée et déroulement de l'expérience: Durée 85 min {0-54,9 min, Ø mobile 100 %, 10 mL/min 55-85 min, Ø stationnaire 100 %, 12 mL/min} Délai d'injection-collecte 7 min Volume de sous-fraction 10 mL Nombre de sous-fractions 78 Détection UV (210, 254 et 350 nm) |

Tableau II. 20 : Conditions expérimentales de la purification de l'extrait butanolique par CPC.

Les progressions des regroupements des sous-fractions issues de la purification de 2 x 1 g de l'extrait butanolique sont rassemblées dans les **Tableau II. 21** et **II. 22**.

| Temps de collecte (min) | Sous-fractions | Masse (mg) | Observation |
|-------------------------|----------------|------------|-------------------------------|
| 13-16 | F1 | 178 | Mélange |
| 17-19 | F2 | 58 | Produit pur S6 |
| 20-21 | F3 | 26 | Produit S6 + impuretés |
| 22-26 | F4 | 63 | Mélange |
| 27-33 | F5 | 58 | Produit pur S2 |
| 34-53 | F6 | 48 | Produit pur S3 |
| 54-63 | F7 | 18 | Mélange |
| 64-70 | F8 | 35 | Mélange |
| 71-74 | F9 | 44 | Deux taches |
| 75-76 | F10 | 33 | Produit pur S5 |
| 77 | F11 | 26 | Mélange |
| 78-85 | F12 | 385 | Mélange |

Tableau II. 21: Résultats de la purification par chromatographie de partage centrifuge de la première injection de l'extrait butanolique *S. giganteus*.

| Temps de collecte (min) | Sous-fractions | Masse (mg) | Observation |
|-------------------------|----------------|------------|-----------------------|
| 12-15 | F1 | 112 | Mélange |
| 16-20 | F2 | 81 | Produit pur S6 |
| 21 | F3 | 10 | Trois taches |
| 22-24 | F4 | 32 | Trois taches |
| 25-28 | F5 | 43 | Produit pur S2 |
| 29 | F6 | 6 | Trois taches |
| 30-32 | F7 | 15 | Deux taches |
| 33-43 | F8 | 38 | Produit pur S3 |
| 44-61 | F9 | 26 | Deux taches |
| 62 | F10 | 02 | Mélange |
| 63-70 | F11 | 43 | Mélange |
| 71-73 | F12 | 27 | Deux taches |
| 74-75 | F13 | 27 | Produit pur S5 |
| 76-85 | F16 | 266 | Mélange |

Tableau II. 22: Résultats de la purification par chromatographie de partage centrifuge de la deuxième injection de l'extrait butanolique *S. giganteus*.

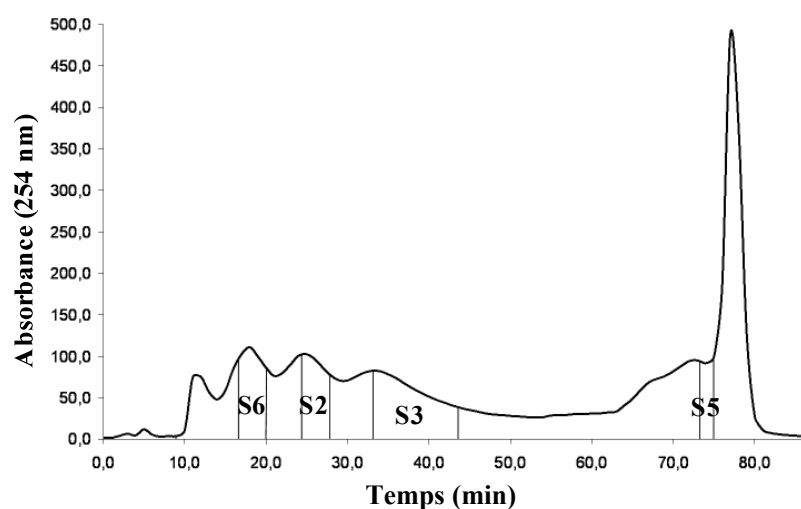


Figure II. 18: Chromatogramme CPC de l'extrait butanolique.

Donc, à partir de 2 g de l'extrait butanolique de *Senecio giganteus*, nous avons pu isoler, **139 mg** du composé majoritaire **S6**, **101 mg** de **S2**, **86 mg** de **S3** et **60 mg** de **S5** en une seule étape et sans purification supplémentaire.

La fraction F1 (290 mg) (**Tableau II. 21** et **II. 22**) issue de la purification de 2 x 1 g de l'extrait butanolique contient plusieurs produits que nous souhaitons les séparer uniquement par la CPC (**Figure II. 19**).

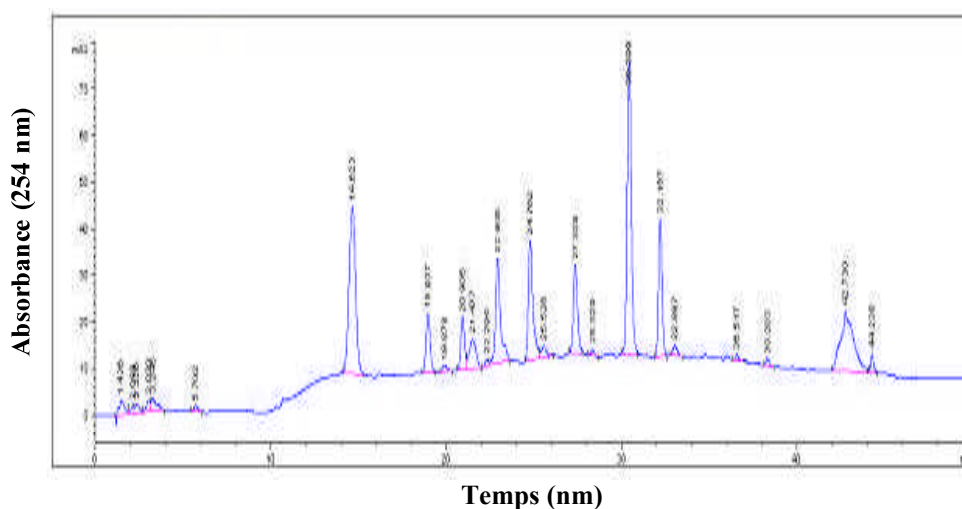


Figure II. 19: Chromatogramme CLHP de la fraction F1 de l'extrait butanolique* .
 (* Analyse CLHP à partir de l'appareil Agilent 1100 Online (voir p. 61))

F. Purification de la fraction F1 de l'extrait butanolique par CPC

- **Détermination du système biphasique**

La purification de la fraction F1 issue de la purification de l'extrait butanolique par CPC, a été réalisée avec le système biphasique $\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:2:3:2) [12], après avoir déterminé les valeurs de K des composés majoritaires (**Figure II. 19**) (**Tableau II. 23**).

| Systèmes de solvants biphasiques | valeurs du coefficient K | | |
|---|--------------------------|-------------|-------------|
| | S9 | S10 | S11 |
| Chloroforme-méthanol-eau (8:7:4) | * | 0,42 | 0,34 |
| Chloroforme-dichlorométhane-méthanol-eau (2:2:3:2) | * | 0,48 | 0,43 |

*Produit est dans la phase supérieure

Tableau II. 23: Calculs des K des produits majoritaires de la fraction F1 dans différents systèmes de solvants biphasiques.

- **Procédure de la purification de la fraction F1 par CPC**

La séparation en isocratique de la fraction F1, issue de la purification de l'extrait butanolique par CPC, a été réalisée avec le système de solvants biphasique Chloroforme-dichlorométhane-méthanol-eau (2:2:3:2) en mode descendant (**Figure II. 20**).

Les conditions expérimentales de la CPC sont rassemblées dans le **Tableau II. 24**.

| | |
|----------------------------------|---|
| - Système de solvants biphasique | - Chloroforme-dichlorométhane-méthanol-eau (2:2:3:2) |
| - Phase stationnaire | - Phase aqueuse |
| - Phase mobile | - Phase organique |
| - Equilibre rotor | - Mode descendant - Débit 10 mL/min - Rotation 900 tr/min - Rétention de la phase stationnaire 40 % - Pression pendant l'équilibre 15 bars |
| - Analyse et fractionnement | - Quantité d'échantillon et volume d'injection : 280 mg de F1 solubilisé dans 10 mL d'un mélange de 1:1 de chaque phase. - Durée et déroulement de l'expérience: Durée 85 min {0-54,9 min, Ø mobile 100 %, 10 mL/min |

| | |
|----------------------------|--|
| | 55-85 min, Ø stationnaire 100 %, 12 mL/min} |
| Délai d'injection-collecte | 7min |
| Volume de sous-fraction | 10 mL |
| Nombre de sous-fractions | 78 |
| Détection | UV (254, 280 et 350 nm) |

Tableau II. 24 : Conditions expérimentales de la purification de la fraction F1 par CPC de la première injection.

L'analyse des sous-fractions obtenues a été suivie par CCM de gel de silice, visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), et/ou CLHP.

La progression de regroupement de ces sous-fractions est rassemblée dans le **Tableau II. 25.**

| Temps de collecte (min) | Sous-fractions | Masse (mg) | Observation |
|-------------------------|----------------|------------|------------------------|
| 16-19 | F1 | 126 | Mélange |
| 20-22 | F2 | 28 | Mélange |
| 23 | F3 | 05 | Une tache + impuretés |
| 24-25 | F4 | 10 | Composé pur S9 |
| 26 | F5 | 3 | Une tache + impuretés |
| 27-28 | F6 | 5 | Deux taches |
| 29-30 | F7 | 6 | Composé pur S10 |
| 31-34 | F8 | 13 | Deux taches |
| 35-37 | F9 | 5 | Composé pur S11 |
| 38-50 | f10 | 7 | Trace de produits |
| 51-85 | f11 | 125 | Mélanges |

Tableau II. 25 : résultats de la purification de la fraction F1 par CPC.

La purification de la fraction F1 par CPC a donné trois fractions contenant des produits purs. Elles correspondent aux composés **S9**, **S10**, et **S11** (**Figure II. 19**).

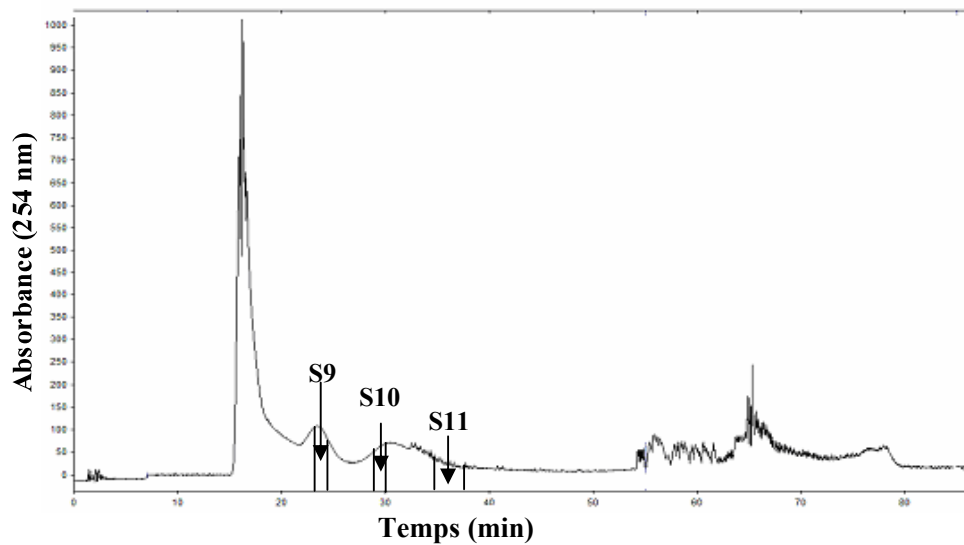


Figure II. 20: Chromatogramme CPC de la fraction F1.

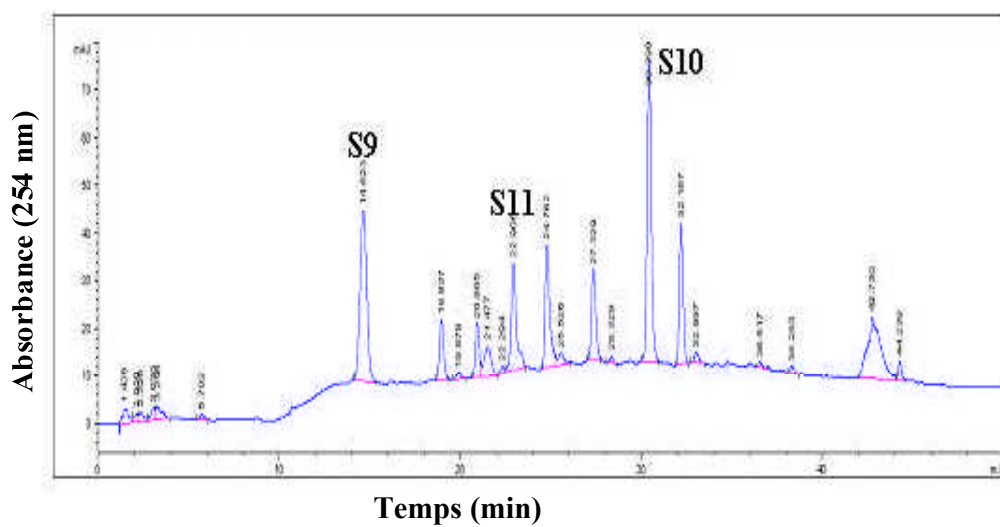


Figure II. 21: Chromatogramme CLHP des produits majoritaires isolés de la fraction F1 de l'extrait butanolique.

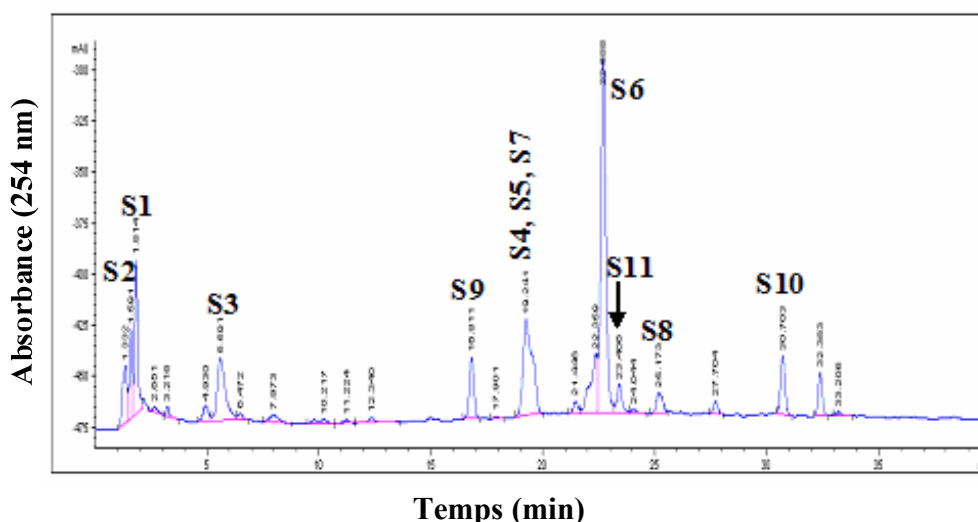


Figure II. 22: Chromatogramme CLHP des composés majoritaires isolés de l'extrait butanolique de *S. giganteus*.

- Le composé **S12** est un précipité blanc de la fraction F12 issue du fractionnement de l'extrait butanolique sur colonne de polyamide SC₆ (**Tableau II. 1**). Il a été filtré et rincé avec du méthanol pour avoir 2 mg de produit pur.

II. 1. 5. Conclusion

L'étude phytochimiques de l'extrait butanolique des fleurs de *S. giganteus* Desf. a mené à la séparation et la purification de 12 composés purs.

Au début, neuf produits purs ont été isolés à partir de 16 g de l'extrait butanolique en combinant des techniques de purifications classiques et la chromatographie de partage centrifuge (CPC), particulièrement adaptée pour ces produits polaires: **S1 (8 mg)**, **S2 (53 mg)**, **S3 (57 mg)**, **S4 (11 mg)**, **S5 (59 mg)**, **S6 (produit majoritaire) (169 mg)**, **S7 (5 mg)**, **S8 (6 mg)**, **S12 (2 mg)**.

Vu les avantages de la chromatographie de partage centrifuge qui seront illustrés par la suite, et à titre comparatif, nous avons utilisé uniquement cet outil pour la purification directe des composants majoritaires de 2 g de l'extrait butanolique. Cette étape nous a permis d'isoler rapidement, en une seule étape et sans purification supplémentaire, quatre produits purs qui ont été séparés au début: **S6 (139 mg)**, **S2 (101 mg)**, **S3 (86 mg)** et **S5 (60 mg)**. La deuxième purification par CPC a été réalisée sur la fraction **F1**, issue de la purification de l'extrait butanolique par CPC. Cette étape nous a permis d'isoler également

trois autres produits, en une seule étape: **S9 (10 mg)**, **S10 (6 mg)** et **S11 (5 mg)**. En totale, douze produits ont été séparés.

d. Les principaux avantages de la CPC

- Absence de contamination pouvant provenir d'un support solide
- Récupération quantitative de tout l'échantillon
- Utilisation possible des deux phases en tant que phase stationnaire ou mobile
- Moindre consommation de solvant (5 à 10 fois moins)
- Applicable à tous les types d'extrait ou de mélanges complexes (synthèse, naturels, fermentation)

II. 2. Etude phytochimique de *Chrysanthemum myconis* L.

II. 2. 1. place dans la systématique [13]

| | |
|--------------------|--------------------------------|
| Embranchement | Phanerogamae (Phanérogames) |
| Sous-embranchement | Magnoliophytina (Angiospermes) |
| Classe | Magnoliopsida (Dicotyledones) |
| Sous-classe | Asteridae |
| Ordre | Asterales |
| Famille | Asteraceae (Compositae) |
| Tribu | Anthemideae |
| Genre | <i>Chrysanthemum</i> Linné. |
| Espèce | <i>Chrysanthemum myconis</i> |

II. 1. 2. Description botanique

Cette espèce admet les synonymes suivants [14] :

- *Coleostephus myconis* (L.) Cass.
- *Pyrethrum myconis* (L.) Moench

L'espèce *C. myconis* ressemble au chrysanthème des blés, sa tige est droite, rameuse, haute de 5-6 dicim. Ses feuilles sont oblongues, dentées en scie, découpées. Les inférieures en spatule et les supérieures oblongues. La tige se divise au sommet en rameaux grêles, presque nus, terminés chacun par une fleur d'un jaune d'oré. Les demi-fleurons sont courts, elliptiques, à trois dents, les grains sont nus au sommet [15].



Figure II. 23: Photo de *Chrysanthemum myconis* L. [16].

II. 2. 3. Répartition géographique

C'est une espèce méditerranéenne qu'on rencontre à basse altitude dans les cultures et les terrains vagues, de préférence sur les terrains siliceux, durant les saisons d'avril à juin.

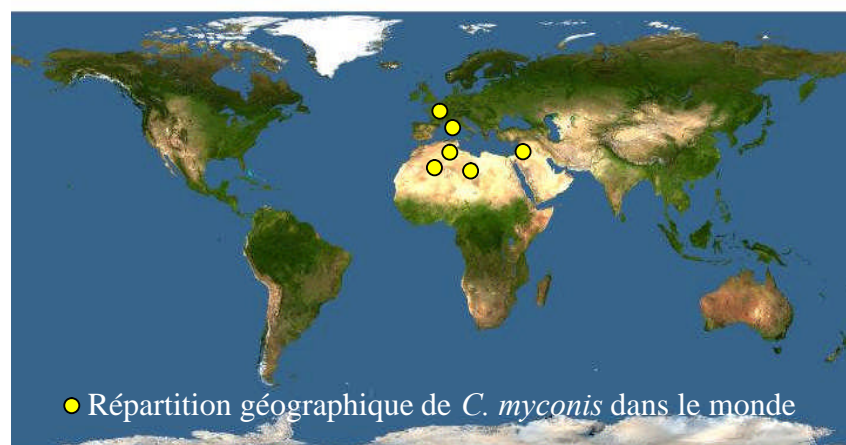


Figure II. 24: Répartition géographique de *Chrysanthemum myconis* L. [17].

II. 2. 4. Travaux personnels

II. 2. 4. 1. Récolte du matériel végétal

Les parties aériennes de *Chrysanthemum myconis* sont recueillies dans les alentours de Constantine (djebel El Ouahche), en Mai 2005. Ensuite, elles sont débarrassées des impuretés puis séchées à l'ombre à une température ambiante. L'espèce est recueillie en pleine floraison.

II. 2. 4. 2. Extraction

465 g de feuilles et 650 g de fleurs sèches sont extraites séparément jusqu'à l'épuisement, par le mélange hydro-alcoolique Méthanol/Eau (7:3). Les extraits hydrométhanoliques sont concentrés à sec sous pression réduite et repris par la suite par de l'eau chaude. Une décantation de trois nuits a permis l'élimination globale de la chlorophylle avec une simple filtration.

Les extraits aqueux sont fractionnés avec l'acétate d'éthyle (3 fois) et le n-butanol (3 fois). Les différentes fractions sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite (**Figure II. 25** et **II. 26**).

L'analyse chromatographique bidimensionnelle sur couche mince de polyamide DC₆ des extraits acétate d'éthyle et butanoliques dans les systèmes S.I et S.II, nous a permis de mélanger les extraits butanoliques et non pas les extraits acétates d'éthyle des fleurs et des feuilles, à cause de la chlorophylle (**Figure II. 27** et **II. 28**).

- La 1^{ère} dimension S.I : Toluène-méthanol-méthyle éthyle cétone (4:3:3)

- La 2^{ème} dimension S.II : Eau-méthanol-méthyle éthyle cétone-acétyl acétone (13:3:3:1)

Schéma d'extraction
des fleurs de *C. myconis*

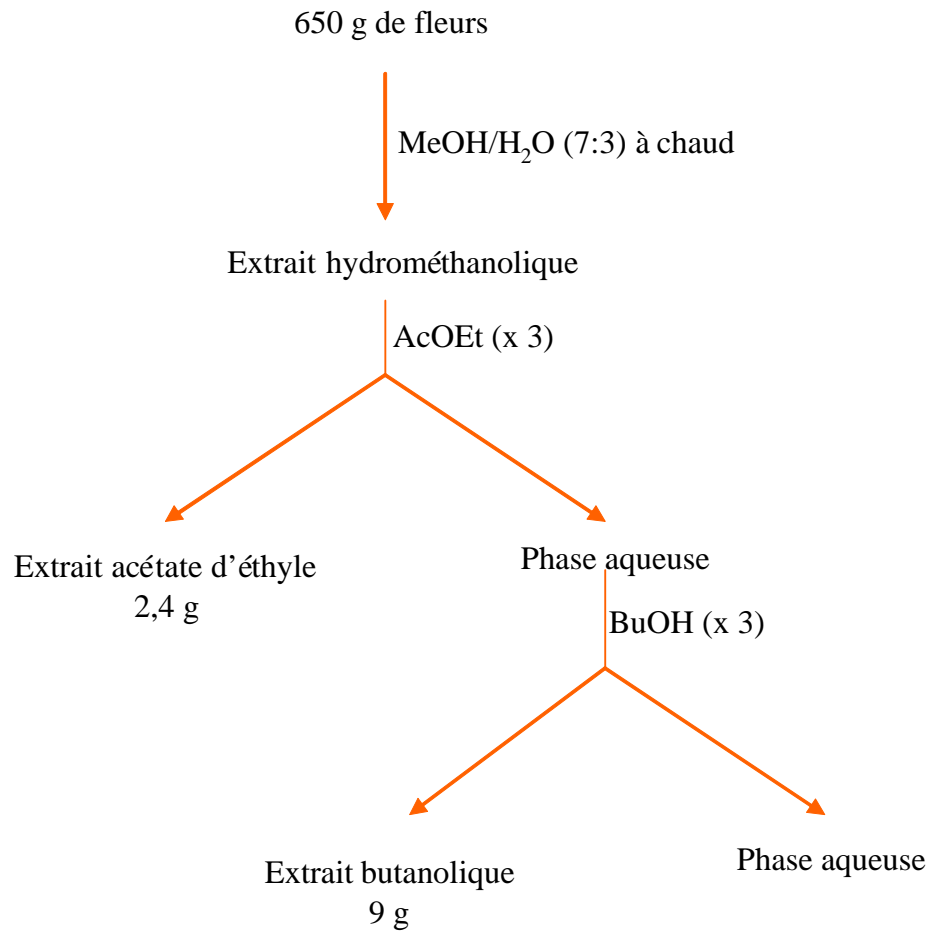


Schéma II. 25: Schéma générale d'extraction des fleurs de *C. myconis*.

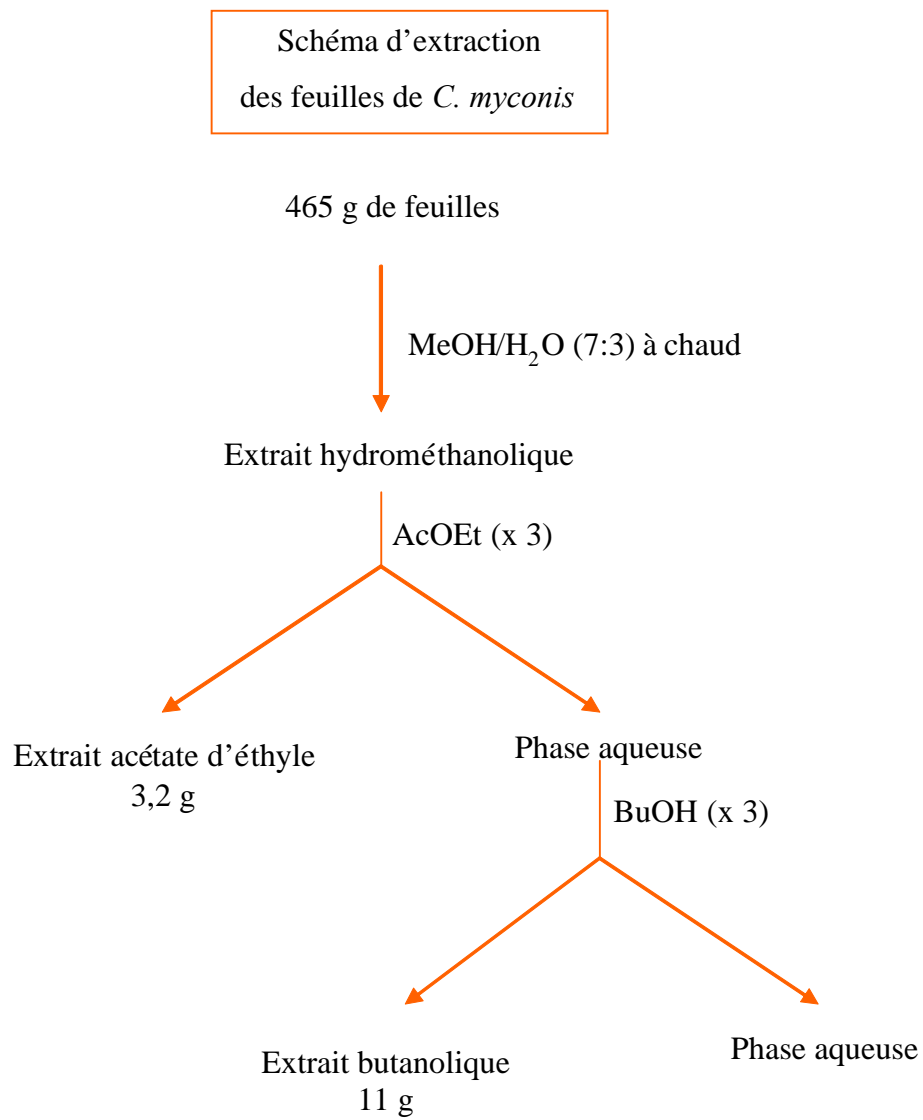


Schéma II. 26: Schéma générale d'extraction des feuilles de *C. myconis*.

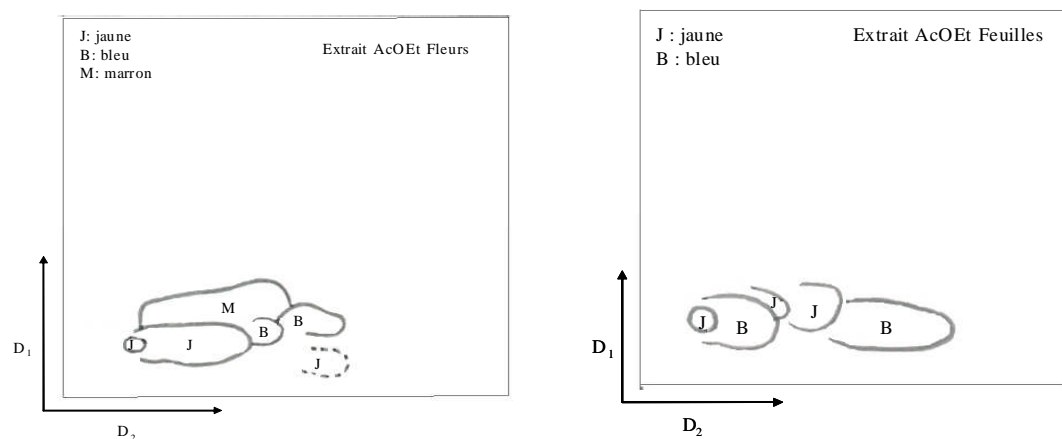


Figure II. 27: CCM bidimensionnelles de polyamide DC₆ des extraits acétate d'éthyle des fleurs et des feuilles de *C. myconis*, visualisée sous UV 365 nm.

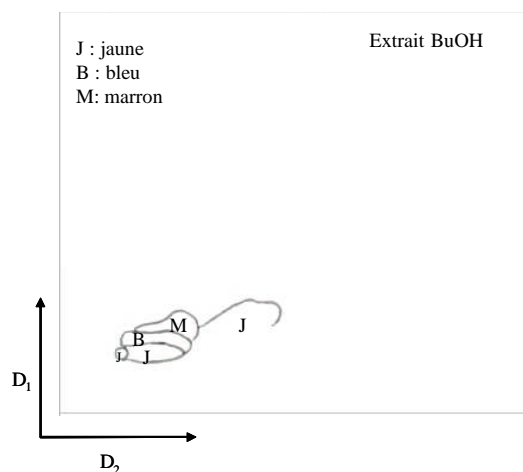


Figure II. 28: CCM bidimensionnelles de polyamide DC₆ de l'extrait butanolique des fleurs et des feuilles de *C. myconis*, visualisée sous UV 365 nm.

II. 2. 4. 3. Purification des composants de l'extrait n-butanol de *C. myconis*

Une masse de 17 g de l'extrait butanolique est déposée sur une colonne de polyamide SC₆ (0,05-0,16 mm) (réf. : 815620.1) préparé dans le toluène. L'élution est réalisée par gradient de polarité croissante du système Toluène - MeOH.

Le suivi des fractions obtenues, est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice (SiO₂ 60 F254, Merck, Darmstadt, Allemagne) sur support Aluminium, dans le système (AcOEt-MeOH-Eau 9,8:0,2:0,05) visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). Le rassemblement des pots effectué sur la base des données analytique des plaques a permis l'obtention de 18 fractions. La progression de cette colonne est rassemblée dans le **Tableau II. 26.**

| Fractions | Graduant de solvant | Masse (mg) | Observation |
|-----------|---------------------|------------|---------------------------------------|
| F1 | Toluène 100 % | 13 | Mélange (trainé) |
| F2 | Toluène-MeOH 1 % | 55 | Mélange (trainé) |
| F3 | Toluène-MeOH 5 % | 200 | Mélange complexe (trainé) |
| F4 | Toluène-MeOH 10 % | 104 | Mélange complexe (trainé) |
| F5 | Toluène-MeOH 15 % | 412 | Mélange complexe (trainé) |
| F6 | Toluène-MeOH 20 % | 323 | Mélange complexe (trainé) |
| F7 | Toluène-MeOH 25 % | 527 | Mélange complexe (trainé) |
| F8 | Toluène-MeOH 25 % | 478 | Mélange complexe (trainé) |
| F9 | Toluène-MeOH 25 % | 1061 | Mélange complexe + précipité jaune C1 |
| F10 | Toluène-MeOH 30 % | 1742 | Mélange complexe + précipité jaune C1 |
| F11 | Toluène-MeOH 40 % | 987 | Mélange complexe + précipité jaune C1 |
| F12 | Toluène-MeOH 40 % | 2103 | Mélange complexe + précipité jaune C1 |
| F13 | Toluène-MeOH 40 % | 2047 | Mélange complexe + précipité jaune C1 |
| F14 | Toluène-MeOH 50 % | 602 | Mélange complexe + précipité jaune C1 |
| F15 | Toluène-MeOH 60 % | 215 | Mélange complexe + précipité jaune C1 |
| F16 | Toluène-MeOH 80 % | 553 | Mélange complexe + précipité jaune C1 |
| F17 | Toluène/MeOH 100 % | 761 | Mélange complexe+ précipité jaune C1 |
| F18 | AcOH 15 % | 212 | Mélange complexe (trainé) |

Tableau II. 26: Résultats de la purification par chromatographie sur colonne de polyamide SC₆ de l'extrait n-butanol de *C. myconis*.

Au cours de la purification de l'extrait butanolique sur colonne de polyamide SC₆ (**Tableau II. 26**), nous avons constaté la formation d'un précipité jaune dans la plus part des fractions recueillies. Le précipité est immédiatement récupéré, filtré et rincé avec du méthanol pour obtenir un produit pur sous forme d'une poudre jaune (le composé C1).

Les fractions issues de cette purification (**Tableau II. 29**) trainent sur gel de silice et sur polyamide DC₆, ce qui a rendu leur séparation difficile. Pour cela, nous n'avons pu séparer dans cette partie qu'un seul produit et nous avons passé directement à la purification des composants des extraits acétate d'éthyle.

II. 2. 4. 4. Purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *C. myconis*

Environ 3 g de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles (chargé en chlorophylle) sont déposés sur une colonne de gel de silice 60 (40-63 μm , Merck) préparé dans le Dichlorométhane. L'élution est réalisée par gradient de polarité croissante du système dichlorométhane-acétate d'éthyle.

Le suivi des fractions obtenues, est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice (SiO_2 60 F254, Merck, Darmstadt, Allemagne) sur support Aluminium dans les systèmes de solvants : CH_2Cl_2 -AcOEt (6:4) et AcOEt-MeOH-Eau (80:3:3), visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). La progression de cette colonne est rassemblée dans le **Tableau II. 27**.

| Fractions | Gradient de solvant | Observation |
|-----------|---------------------------------------|--|
| F1 | CH_2Cl_2 100 % | Trainé + Chlorophylle |
| F2 | CH_2Cl_2 100 % | Trainé + Chlorophylle + précipité blanc C2 |
| F3 | CH_2Cl_2 -AcOEt 1 % | Trainé + Chlorophylle |
| F4 | CH_2Cl_2 -AcOEt 1 % | Trainé + Chlorophylle |
| F5 | CH_2Cl_2 -AcOEt 7 % | Trainé + Chlorophylle |
| F6 | CH_2Cl_2 -AcOEt 10 % | Trainé + Chlorophylle |
| F7 | CH_2Cl_2 -AcOEt 15 % | Mélange complexe + Chlorophylle |
| F8 | CH_2Cl_2 -AcOEt 20 % | Mélange + Chlorophylle + précipité jaune C1 |
| F9 | CH_2Cl_2 -AcOEt 30 % | Mélange + Chlorophylle +précipité jaune C1 |
| F10 | CH_2Cl_2 -AcOEt 40 % | Mélange + Chlorophylle +précipité jaune C1 |
| F11 | CH_2Cl_2 -AcOEt 60 % | Mélange + Chlorophylle +précipité jaune C1 |
| F12 | CH_2Cl_2 -AcOEt 80 % | Mélange + Chlorophylle +précipité jaune C1 |
| F13 | CH_2Cl_2 -AcOEt 100 % | Mélange + Chlorophylle +précipité jaune C1 |
| F14 | AcOEt-MeOH 30 % | Mélange complexe + Chlorophylle |

Tableau II. 27: Résultats de la purification par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait AcOEt des feuilles de *C. myconis*.

Le précipité dans la fraction F2 (**Tableau II. 27**) est filtré et rincé avec du méthanol pour obtenir 2 mg de produit pur sous forme d'une poudre blanche (le composé **C2**).

Dans la majorité des fractions obtenues, la présence de la chlorophylle était prédominante par rapport aux produits existants, c'est la raison pour laquelle la séparation était très délicate et on n'a pas pu aboutir à un nombre important de produits purs.

Donc, dans cette partie nous avons pu séparer deux composés: **C2** et **C1**, ce dernier déjà séparé de l'extrait butanolique.

II. 2. 4. 5. Purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle des fleurs de *C. myconis*

Une masse de 2,4 g de l'extrait acétate d'éthyle des fleurs est déposée sur une colonne de gel de silice 60 (40-63 μm , Merck) préparé dans le dichlorométhane. L'élution est réalisée par gradient de polarité croissante du système de solvants Dichlorométhane-acétate d'éthyle.

Le rassemblement des pots est effectué sur la base des données de la chromatographie sur couche mince de gel de silice (SiO_2 60 F254, Merck, Darmstadt, Allemagne) sur support Aluminium dans les systèmes de solvants : CH_2Cl_2 -AcOEt (6:4) et AcOEt-MeOH-Eau (80:3:3). Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). Le **Tableau II. 28** englobe les résultats obtenus.

| Fractions | Gradient de solvant | Masse (mg) |
|-----------|--------------------------------------|------------|
| F1 | CH_2Cl_2 100 % | 5 |
| F2 | CH_2Cl_2 -AcOEt 5 % | 13 |
| F3 | CH_2Cl_2 -AcOEt 10 % | 8 |
| F4 | CH_2Cl_2 -AcOEt 15 % | 20 |
| F5 | CH_2Cl_2 -AcOEt 20 % | 17 |
| F6 | CH_2Cl_2 -AcOEt 30 % | 9 |
| F7 | CH_2Cl_2 -AcOEt 40 % | 15 |
| F8 | CH_2Cl_2 -AcOEt 50 % | 44 |
| F9 | CH_2Cl_2 -AcOEt 60 % | 260 |
| F10 | CH_2Cl_2 -AcOEt 80 % | 35 |
| F11 | CH_2Cl_2 -AcOEt 80 % | 124 |
| F12 | AcOEt 100 % | 109 |
| F13 | AcOEt 100 % | 885 |
| F14 | AcOEt-MeOH 30 % | 180 |

Tableau II. 28: Résultats de la purification par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait AcOEt des fleurs de *C. myconis*.

Parmi les 14 fractions obtenues (**Tableau II. 28**), on a procédé à la séparation des fractions F9 et F13 à cause soit de leur simplicité soit de leur poids relativement important.

A. Purification de la fraction F9

La fraction F9 a été purifiée en utilisant une SPE (Extraction en phase solide) en phase inverse. 260 mg ont été déposés sur une cartouche de RP-18 préparé dans l'eau. Le système d'élution utilisé en gradient de polarité est l'Eau-MeOH.

Le suivi des fractions obtenues est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice dans les systèmes de solvants : AcOEt-MeOH-HCOOH (9,8:0,2:0,05), visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). La progression de cette séparation est rassemblée dans le **Tableau II. 29**.

| Fractions | Gradient de solvant | Masse (mg) |
|-----------|---------------------|------------|
| f1 | Eau-MeOH 10 % | 22 |
| f2 | Eau-MeOH 20 % | 13 |
| f3 | Eau-MeOH 25 % | 5 |
| f4 | Eau-MeOH 25 % | 14 |
| f5 | Eau-MeOH 30 % | 38 |
| f6 | Eau-MeOH 40 % | 22 |
| f7 | Eau-MeOH 60 % | 89 |
| f8 | MeOH 100 % | 78 |

Tableau II. 29: Résultats de la purification par SPE en phase inverse de la fraction F5.

Une deuxième purification a été réalisée sur plaque préparatives de polyamide DC₆ de la sous-fraction f5 en deux étapes:

- A. La première étape : migration dans le système organique S.I., puis séparation et concentration.
- B. La deuxième étape : migration dans le système aqueux Eau-MeOH-Méthyle éthyle cétone-acétyle acétone (30:15:10:4), séparation et filtration sur colonne de Séphadex LH20 pour obtenir 4 mg du composé C3.

B. Purification de la fraction F13

La purification de la fraction F13 a d'abord été réalisée par une VLC (Chromatographie liquide sous vide). Une masse de 885 mg est déposée sur verre frité de gel de silice 60 (40-63 μm , Merck) préparé dans l'acétate d'éthyle. L'élution sous vide est réalisée par gradient de polarité croissante du système Acétate d'éthyle-méthanol-acide formique.

Le suivi des fractions obtenues est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice dans les systèmes de solvants : AcOEt-MeOH-HCOOH (9,8:0,2:0,05), visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm). La progression de cette séparation est rassemblée dans le **Tableau II. 30**.

| Fractions | Gradient de solvant | Masse (mg) |
|-----------|-------------------------------|------------|
| f1 | AcOEt 100 % | 32 |
| f2 | AcOEt-MeOH 2 % | 5 |
| f3 | AcOEt-MeOH-HCOOH: 98:2:0,5 % | 11 |
| f4 | AcOEt-MeOH-HCOOH: 90:10:0,5 % | 61 |
| f5 | AcOEt-MeOH-HCOOH: 80:20:0,5 % | 145 |
| f6 | AcOEt-MeOH-HCOOH: 70:30:0,5 % | 175 |
| f7 | AcOEt-MeOH-HCOOH: 50:50:0,5 % | 270 |

Tableau II. 30: Résultats de la purification par VLC en gel de silice de la fraction F13.

Le Composé **C4** a été obtenu de la sous-fraction f6 (**Tableau II. 30**) après une SPE en phase inverse, suivie d'une séparation sur plaques préparatives de gel de silice avec le système éluant AcOEt-MeOH-HCOOH (9,8:0,2:0,05) pour avoir une masse de 6 mg de produit pur.

En conclusion, l'étude chimique des extraits polaires de l'espèce *C. myconis* L. a permis l'obtention de 4 produits purs, deux flavonoïdes glycosylés, une coumarine et un acide phénolique.

II. 3. Bibliographie

- [1] Tela Botanica, <http://www.tela-botanica.org/eflore/BDNFF/4.02/nn/101426/synthese>, [en ligne], consulté le 22 janvier 2010.
- [2] Medical dictionary, <http://en.dict.md/translation/Senecio%20giganteus>, [en ligne], consulté le 29 novembre 2009.
- [3] Tela Botanica, <http://www.tela-botanica.org/eflore/BDAFN/nn/139213>, [en ligne], consulté le 26 août 2009.
- [4] Quezel P., Santa S., (1962), *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Tome II, 963 p., C. N. R. S. Paris.
- [5] Tela Botanica, <http://www.tela-botanica.org/eflore/BDAFN/1.00/nn/139213>, [en ligne], consulté le 30 janvier 2010.
- [6] Foucault A. P., (1994), *Centrifugal partition chromatography*. Ed. Marcel Dekker, 400 p., New York.
- [7] Berthod A., Brown L., Leitao G. G. and Leitao S. G., (2002), Counter current chromatography: the support-free liquid stationary phase In *Journal of Comprehensive Analytical Chemistry* 38: 49-81, Elsevier, Amsterdam.
- [8] Oka F., Oka H. and Ito Y., (1991), Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* 538: 99-108.
- [9] Le Crouérou G., (2000), Fractionnement et isolement de substance naturelles d'origines végétale par Chromatographie de Partage Centrifuge : Application aux composés peu polaires et aux composés ionisables. Université de Reims, *Thèse de doctorat* 220 p.
- [10] Abbott T. P., Kleima R., (1991), Solvent selection guide for counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* 538: 109-118.
- [11] Kim C. Y., Lee H. J., Lee M. K., Mi-Jeong Ahn, Kim J., (2007), One step purification of flavanone glycosides from *Poncirus trifoliata* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Separation Science* 30: 2693-2697.
- [12] Tian G., Zhang U., Zhang T., Yang F., Ito Y., (2004), *Journal of Chromatography A* 1049: 219.
- [13] <http://www.conservationnature.fr/statut.php?Nom=Chrysanthemum%20myconis%20var.%20gracile>, [en ligne], consulté le 30 janvier 2010.

- [14] Lorenzi H., (2000), *Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitase tóxicas*, 3, Nova Odessa, , 141 p., Livro. São Paulo.
- [15] Jean Baptiste P. A. de Monet de Lamarck., (1805), *Flore Franc aise, ou, Descriptions succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France*. (3^{ème} édition) 4, 406 p., Paris.
- [16] http://crdp2.ac-besancon.fr/flore/flore/Asteraceae/especies/coleostephus_myconis.htm, [en ligne], consulté le 19 février 2010.
- [17] Discover Life, <http://www.discoverlife.org/mp/20o?kind=Chrysanthemum+myconis>, [en ligne], consulté le 01 mars 2010.

III. 1. Détermination structurale des composés isolés de *Senecio giganteus* Desf.

- **Appareillage**

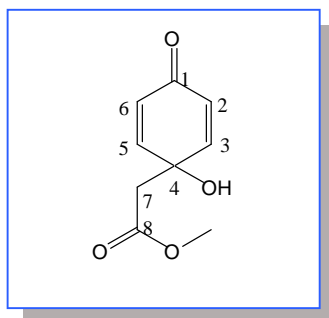
Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisés sur des spectromètres Jeol GSX WB (270 MHz, ^1H RMN et 67.5 MHz, ^{13}C RMN) et Bruker Avance DRX (500 MHz, ^1H RMN et 125 MHz, ^{13}C RMN) dans le méthanol deutérié avec le pic de MeOH résiduel comme référence, dans l'acétone deutérié avec le pic d'acétone résiduel comme référence et dans le diméthyle sulfoxyde deutérié avec le pic de DMSO résiduel comme référence. Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en partie par million (ppm) et les constantes de couplages (J) en Hertz (Hz). Les abréviations utilisées pour désigner la multiplicité des signaux sont s, d, dd, t, m, *m* et désignent respectivement un singulet, un doublet, un doublet de doublet, un multiplet et un massif. Toutes les attributions ont été confirmées par des expériences COSY, HMQC et HMBC.

Les spectres des masses ont été enregistrés sur un spectromètre de masse à analyseur à piège d'ions Esquire 3000 Plus (Bruker) (MS-ESI). Les valeurs des pics ioniques sont indiquées par m/z en g/mol. suivie de l'importance relative des ions en pourcentage.

L'analyse CLHP des produits ainsi que l'évaluation de leur pureté sont réalisées sur un module de séparation Agilent 1100 Online muni d'une pompe G1311A, d'un détecteur UV à barrette de diode G1315A, reliés à Agilent Chem Station (Agilent Technologies). Un échantillon de 10 μL est injecté manuellement à partir d'une boucle G1313 A, sur une colonne Lichrospher® 100, RP-18 (5 μm) en utilisant un gradient Eau/Méthanol comme éluant. Le gradient de la phase mobile est le H₂O-HCOOH 0.1 %/MeOH 75 : 35 v/v à 20 : 80 v/v pendant 35 min. Le débit est fixé à 1 mL/min.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à la longueur d'onde de la raie D du sodium sur polarimètre Schmidt Haensch Polartronic.

III. 1. 1. Détermination structurale du composé S1



Ce composé se présente sous forme d'une huile marron et de fluorescence violette sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique :

| | |
|-------|---|
| R_f | 0,58 (CH_2Cl_2 -AcOEt 7:3) |
| t_R | 3,16 min |

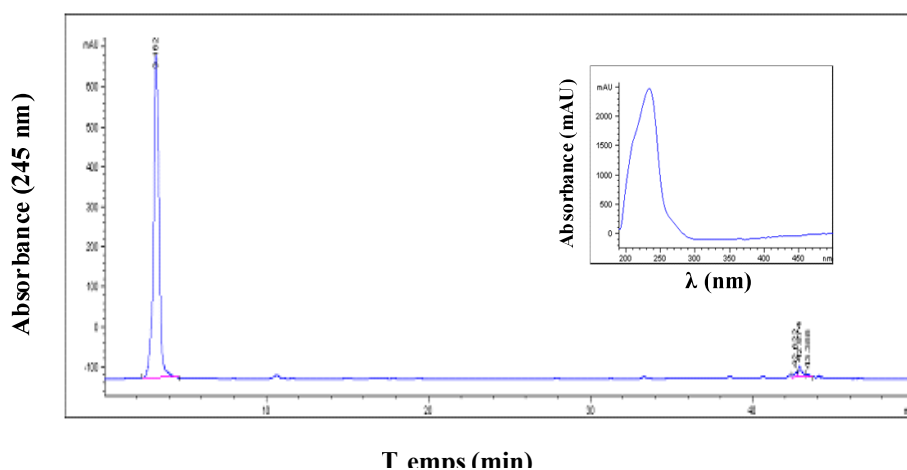


Figure III. 1 : Chromatogramme CLHP et Spectre UV-Visible du **composé S1**.

L'analyse CLHP (**Figure III. 1**) a montré que la pureté du composé S1 est de 96 % à 254 nm et de 85 % à 210 nm.

Spectroscopie UV

Le spectre d'absorption UV (**Figure III. 1**) du composé S1 montre un maxima à 235 nm.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Sur le spectre de masse réalisé en ESI/MS en mode positif (**Figure III. 2**) du composé S1, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 205 $[M+Na]^+$ et un ion pseudo-moléculaire à m/z 183 $[M+H]^+$ suggérant une masse moléculaire de 182 uma.

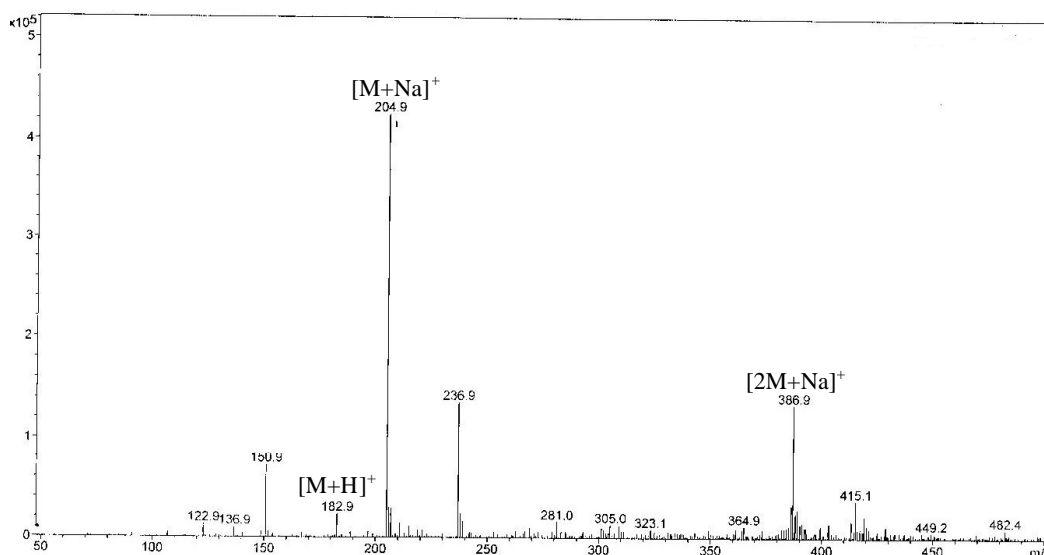


Figure III. 2 : Spectre de masse ESI/MS du composé S1.

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 3**) indique la présence de sept signaux dont deux correspondent aux deux groupements carbonyles résonnant à δ_C 171,3 ppm et δ_C 184,8 ppm

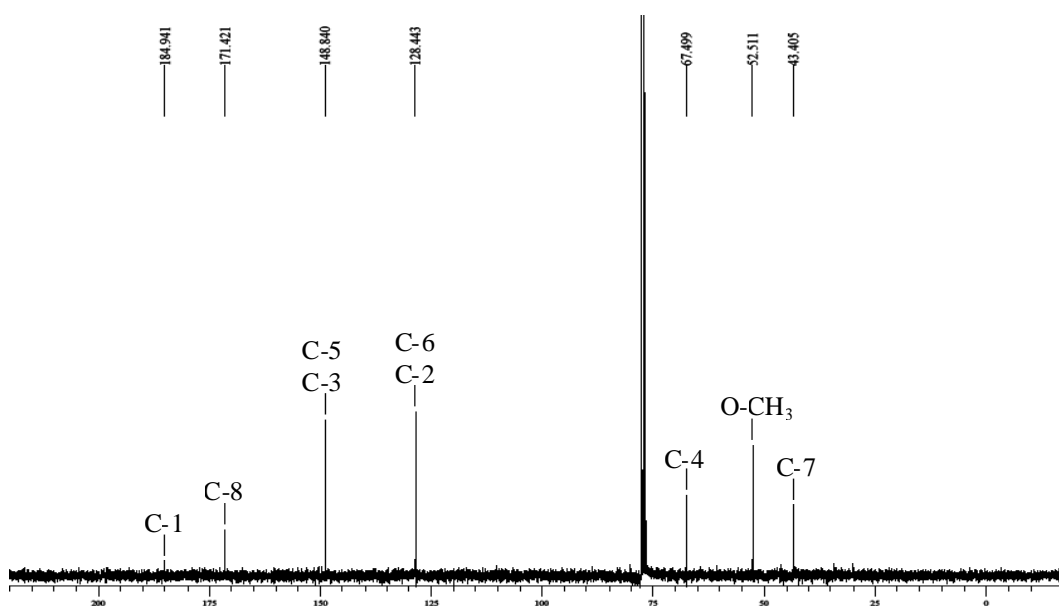


Figure III. 3: Spectre ^{13}C -RMN (67.5 MHz, $CDCl_3$) du composé S1.

Le spectre RMN ^1H (**Figure III. 4**) présente :

- Deux doublets chacun d'intensité de 2H à δ_H 6,18 ppm et à δ_H 6,94 ppm caractéristiques respectivement des protons vinyliques H-2, H-6 et H-3, H-5.
- Un singulet d'intensité de 3H à δ_H 3,69 ppm, correspondant à un groupement méthoxyle aromatique.
- Un groupement méthylène sous forme d'un singulet à δ_H 2,69 ppm, attribuable au proton H-7.
- Un groupement méthoxyle sous forme d'un singulet à δ_H 3,69 ppm.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC (**Figure III. 5**) démontre les corrélations géminales ^1H - ^{13}C -RMN. Ainsi, le spectre montre les corrélations des protons H-2, H-6 et H-3, H-5 résonnant respectivement à δ_H 6,18 ppm et à δ_H 6,94 ppm avec les carbones résonnant respectivement à δ_C 128,4 ppm et δ_C 148,7 ppm, ce qui permet d'attribuer ces derniers respectivement aux carbones C-2, C-6 et C-3, C-5.

Le spectre montre également que les protons du groupement méthylène (H-7) résonnant à δ_H 2,69 ppm corrélient avec le carbone situé à 43,3 ppm, le carbone C-7. Cette séquence nous a permis de localiser le carbone du groupement méthoxyle à δ_C 52,3 en montrant clairement sa corrélation avec les protons à δ_H 3,69 ppm qui correspondent aux protons du même groupement.

La molécule, de masse 182 uma et qui présente 10 atomes de protons et 9 atomes de carbones peut donc avoir une formule brute de $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ avec un degré d'insaturation de 5.

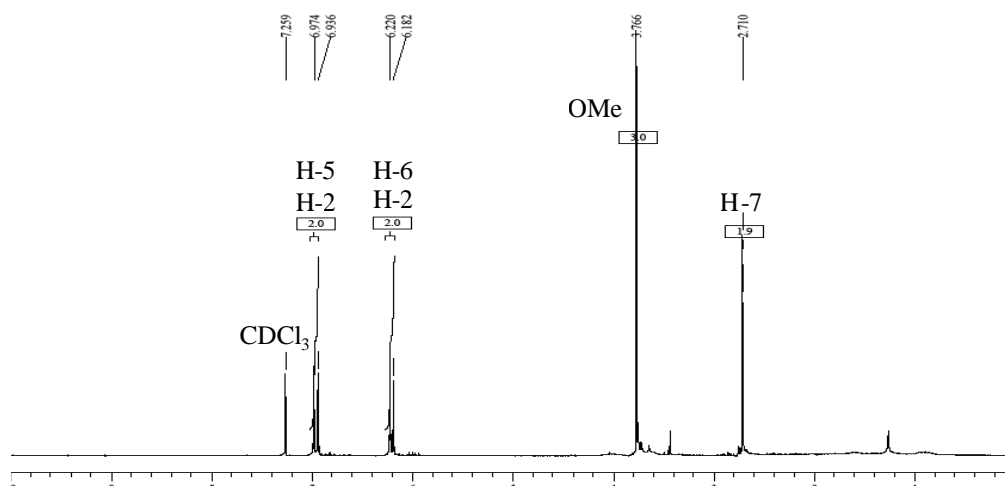
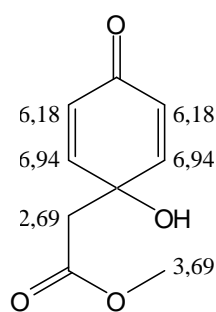


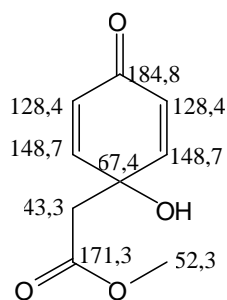
Figure III. 4: Spectre ^1H -RMN (270 MHz, CDCl_3) du composé S1.

L'expérience de corrélations hétéronucléaires observée à longue distance RMN HMBC (**Figure III. 6**) affirme l'attribution des déplacements chimiques RMN ^{13}C et ^1H , ainsi, elle montre les corrélations entre :

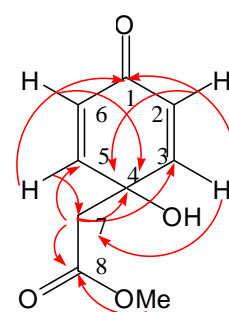
- Les deux protons vinyliques H-3 et H-5 à δ_H 6,94 ppm et le carbone du carbonyle situé à δ_C 184,8 ppm, montrant que ce dernier est un des substituants du noyau cyclohexadiénique ce qui permet d'attribuer ce déplacement chimique au carbone C-1.
- Les deux protons vinyliques H-2 et H-6 à δ_H 6,18 ppm et le carbone quaternaire situé à δ_C 67,4 ppm, ce qui affirme la présence d'un cycle cyclohexadiénique, ainsi on peut attribuer ce déplacement chimique au carbone C-4.
- Les protons du méthoxy résonnant à δ_H 3,69 ppm et le carbone du carbonyle situé à δ_C 171,3 ppm, mettant en évidence la présence d'un méthyle ester.
- Les protons du méthylène H-7 résonnant à δ_H 2,69 ppm et les deux carbones C-8 et C-4 résonnant respectivement à δ_C 171,3 ppm et δ_C 67,4 ppm, ce qui a pu déterminer la position de carbone du groupement méthyle ester à δ_C 171,3 ppm.



δ_H ppm



δ_C ppm



Corrélations HMBC

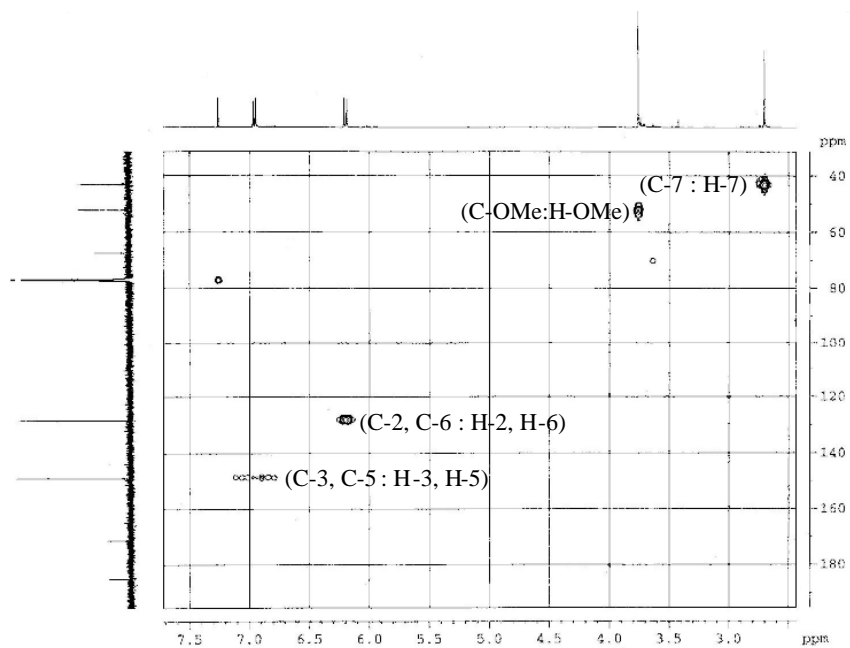


Figure III. 5 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé S1.

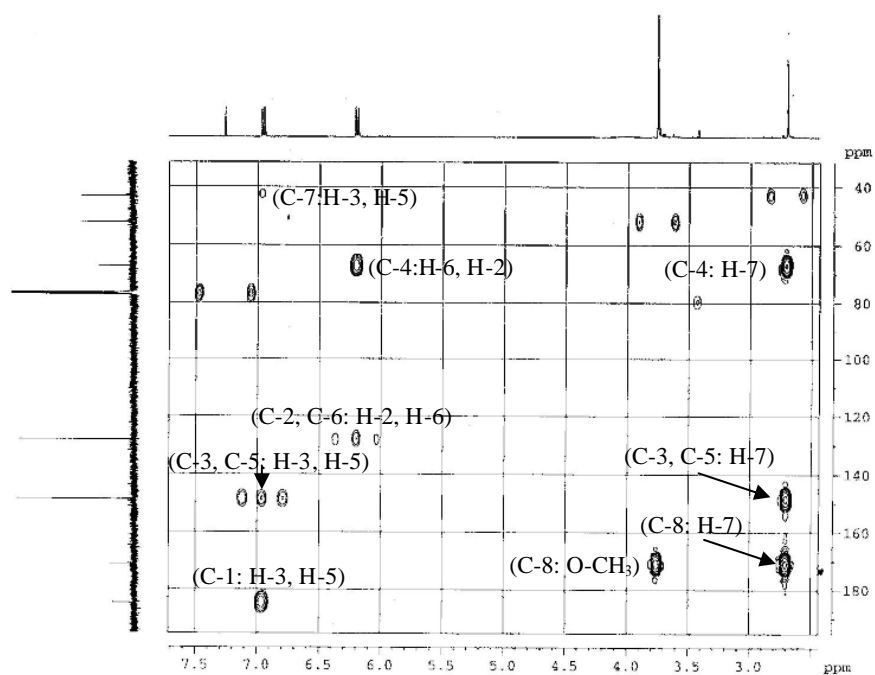


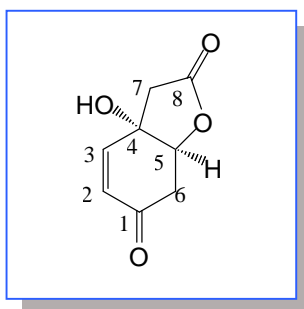
Figure III. 6: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S1.

| Position | RMN ^{13}C δ_c ppm | RMN 1H (δ_H ppm) [intégration, m., J en Hz] | Corrélations HMBC |
|-------------------|---------------------------------------|--|----------------------|
| 1 | 184,8 | | |
| 2 | 128,4 | 6,18 (2H, d, $J = 10,3$) | C-2, C-4 |
| 3 | 148,7 | 6,94 (2H, d, $J = 10,3$) | C-3, C-7, C-1 |
| 4 | 67,4 | | |
| 5 | 148,7 | 6,94 (2H, d, $J = 10,3$) | C-5, C-7, C-1 |
| 6 | 128,4 | 6,18 (2H, d, $J = 10,3$) | C-6, C-4 |
| 7 | 43,3 | 2,69 (2H, s) | C-4, C-3, C-5, C-8 |
| 8 | 171,3 | | |
| O-CH ₃ | 52,3 | 3,69 (3H, s) | C-8 |

Tableau III. 1 : Données spectrales RMN du **composé S1**.

Sur la base de ces résultats, la structure du **composé S1** a pu être établie comme: la **Jacaranone** déjà isolée dans d'autres espèces [1, 2].

III. 1. 2. Détermination structurale du Composé S2



Ce composé se présente sous forme d'une huile marron et de fluorescence violette sous lampe UV à 350 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|-------|---|
| R_f | 0,27 (CH ₂ Cl ₂ -AcOEt 7:3) |
| t_R | 1,59 min |

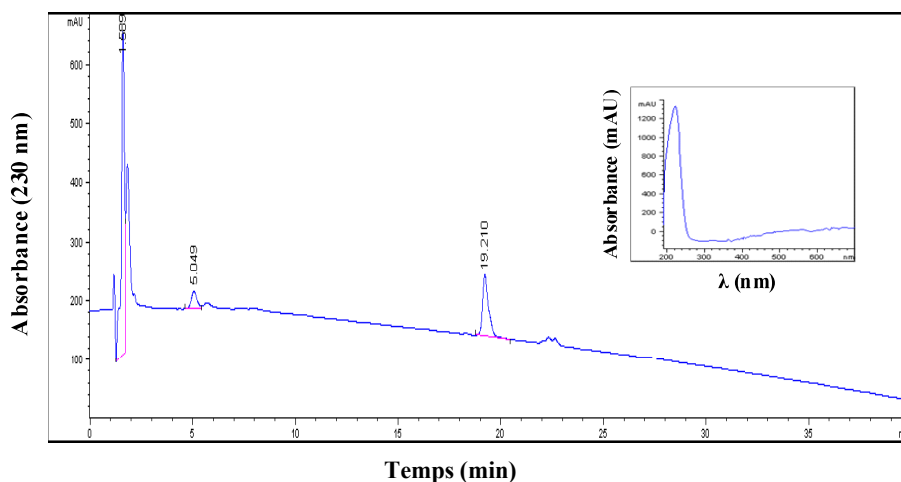


Figure III. 7: Chromatogramme CLHP et Spectre UV-Visible du **composé S2**.

L'analyse CLHP du composé S2 (**Figure III. 7**) a montré que sa pureté est de 85 % à 230 nm et de 70 % à 254 nm.

Spectroscopie UV

Le spectre d'absorption UV (**Figure III. 7**) du composé S2 montre un maxima à 216 nm.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse ESI/MS en mode négatif du composé S2 donne un ion quasi-moléculaire à m/z 167 $[M-H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 168 uma. Le spectre MS/MS de cet ion présente un ion majoritaire à m/z 123 [perte de 44 uma] (**Figure III. 8**).

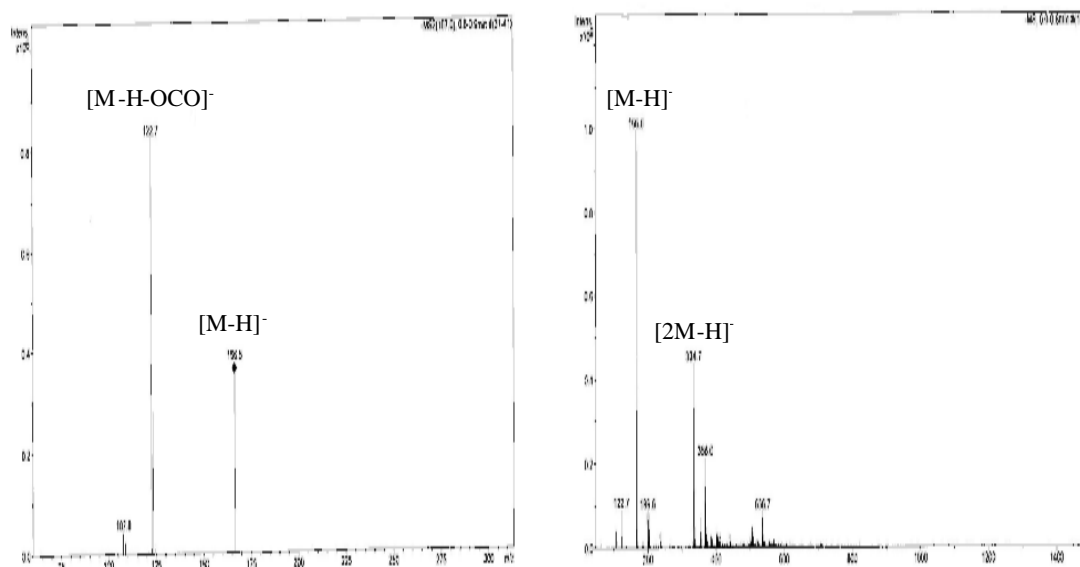


Figure III. 8 : Spectre de masse ESI/MS en mode négatif du **composé S2**.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 9**) du composé S2 montre la présence de huit signaux révélant la présence de huit atomes de carbones.

L'analyse du spectre DEPT 135 (**Figure III. 10**) donne plus d'indications, parmi ces atomes de carbones on en dénombre deux méthylènes (δ_{C} 33,3 ppm, 36,4 ppm), trois groupement CH (δ_{C} 77,8 ppm, 123,4ppm, 142,2 ppm) et par déduction, trois carbones quaternaires (δ_{C} 66,6 ppm, 171,0 ppm, 192,9 ppm).

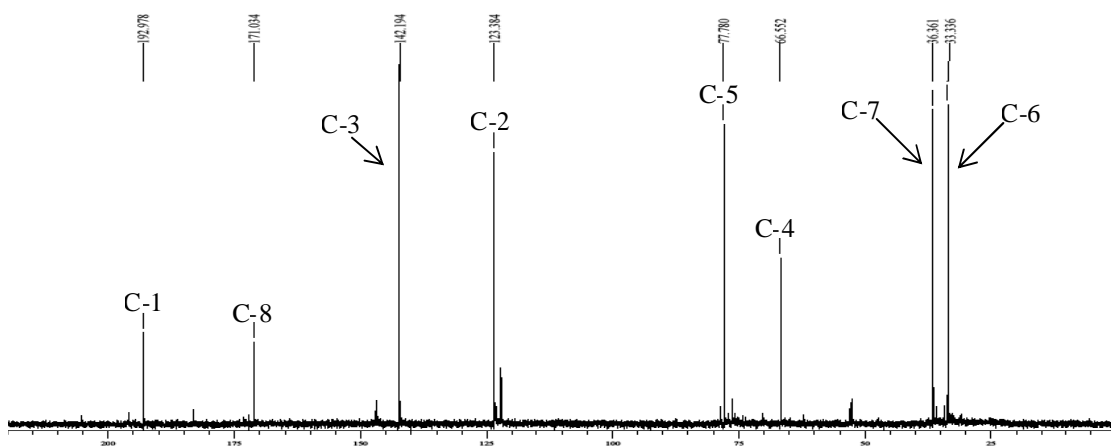


Figure III. 9 : Spectre ^{13}C -RMN (67,5 MHz, D_2O) du composé S2.

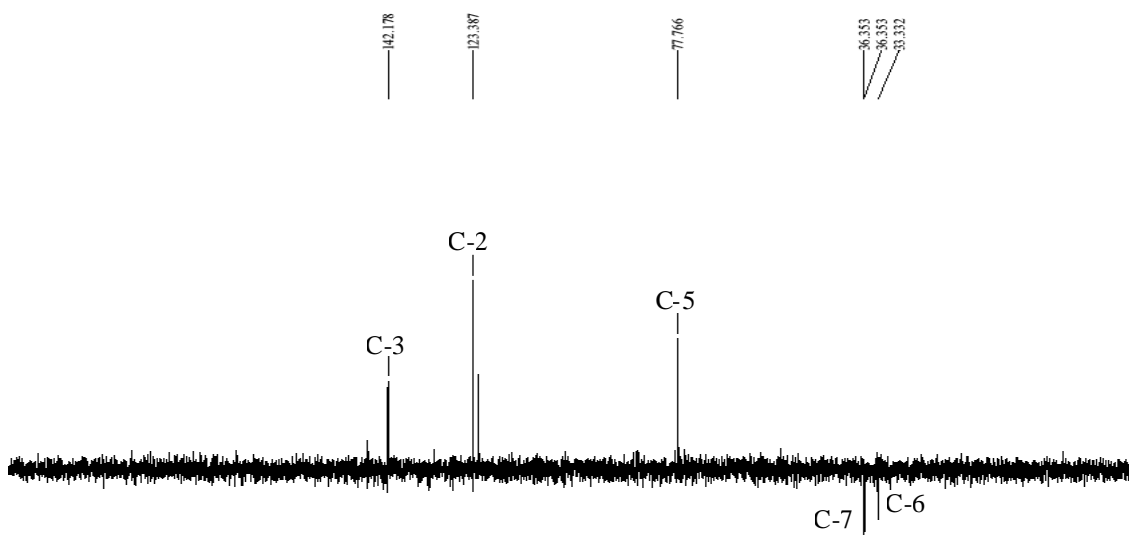


Figure III. 10 : Spectre DEPT 135 (67,5 MHz, D_2O) du composé S2.

Le spectre RMN ^1H (**Figure III. 11**) présente :

- Deux doublets intégrant chacun pour 1H à δ_H 6,09 ppm ($J = 10,3$ Hz) et δ_H 6,83 ppm ($J = 10,3$ Hz) caractéristiques de deux hydrogènes oléfiniques.
- Un triplet intégrant pour 1H localisé à δ_H 4,92 ppm ($J = 6,7$ Hz), cette valeur exige la présence d'un groupement CH attaché à un atome d'oxygène.
- Deux doublets de doublets intégrant chacun pour 2H à δ_H 2,77 ppm ($J = 17,3; 6,7$ Hz) et δ_H 3,02 ppm ($J = 17,3; 5,4$ Hz).

Ainsi, les informations précédentes nous permettent d'envisager une formule brute de $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ avec un degré d'insaturation de 5.

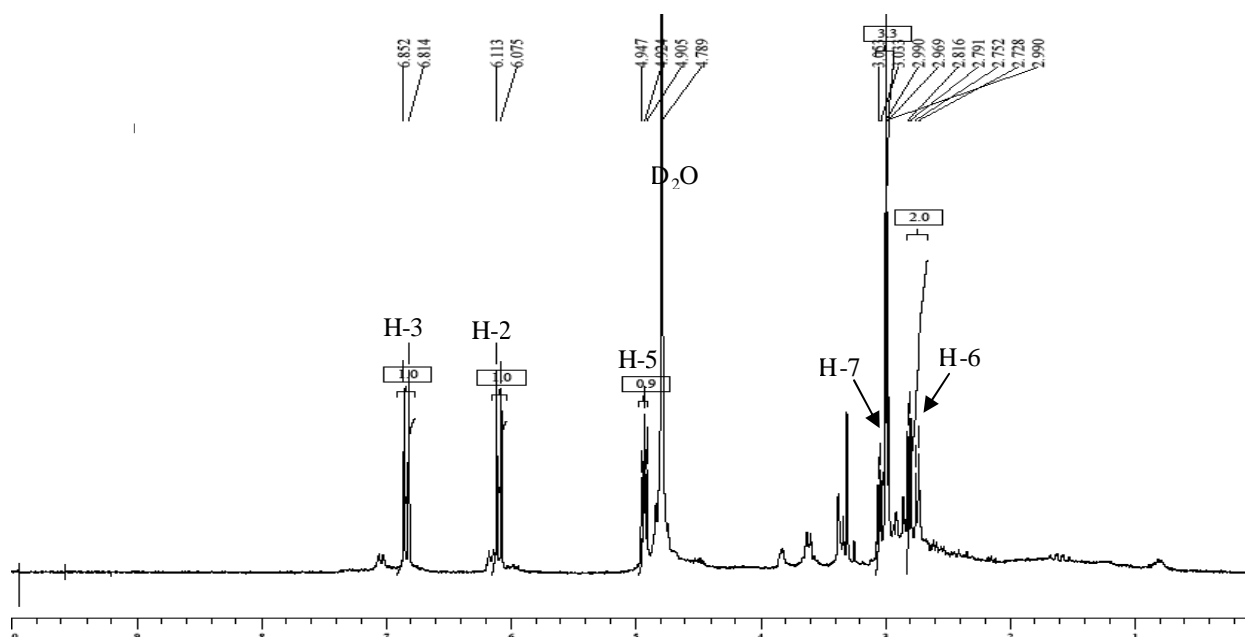
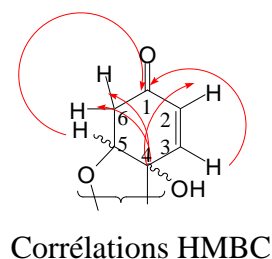
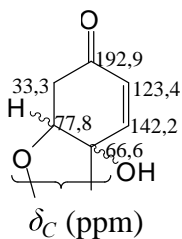
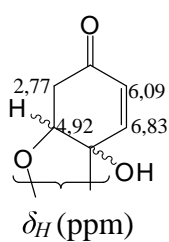


Figure III. 11 : Spectre ^1H -RMN (270 MHz, D_2O) du composé **S2**.

Le spectre RMN 2D HMBC (**Figure III. 12**) montre que le proton oléfinique localisé à δ_H 6,83 ppm et le proton situé à δ_H 4,92 ppm corrélient avec le carbone du carbonyle situé à δ_C 192,9 ppm suggérant la présence d'un noyau cyclohexénique, dont ce carbonyle est un de ses substituent. Ceci est confirmé par la corrélation du carbone quaternaire à δ_C 66,6 ppm avec le deuxième proton oléfinique situé à δ_H 6,09 ppm et avec les protons du méthylène à δ_H 2,77 ppm.



Ainsi on peut attribuer le carbone à δ_C 192,9 ppm au carbone C-1, les deux carbones éthyléniques à δ_C 123,4 ppm et δ_C 142,2 ppm respectivement aux carbones C-2 et C-3, le carbone quaternaire à δ_C 66,6 ppm au carbone C-4, le groupement CH-O à δ_C 77,8 ppm au C-5 et le méthylène à δ_C 33,3 ppm au carbone C-6. Il nous reste à positionner le deuxième groupement carbonyle à δ_C 171,0 ppm et le carbone du méthylène à δ_C 36,4 ppm.

L'expérience HMBC nous montre également que le proton H-5 (δ_H 4,92 ppm) corrèle avec le carbone du carbonyle à δ_C 171,0 ppm, ce dernier corrèle à son tour avec les protons méthyléniques situés à δ_H 3,02 ppm qui eux même corrélerent avec les carbones C-4 et C-5, ce qui suggère la présence d'un système bicyclique dont le deuxième est une γ -lactone.

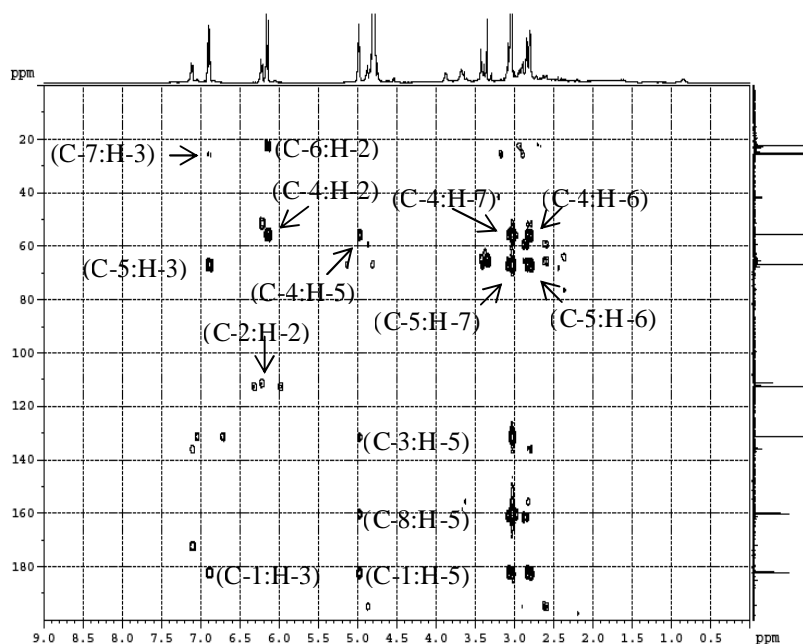
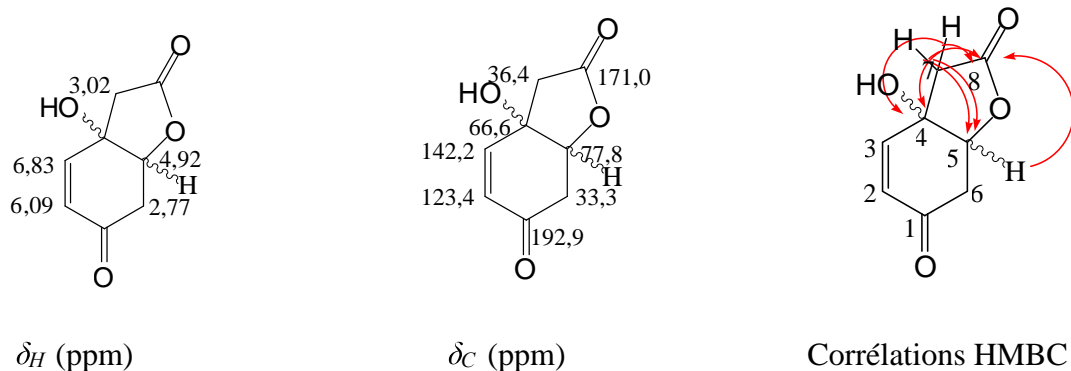


Figure III. 11: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S2.

L'expérience de corrélations hétéronucléaires HMQC (Figure III. 12) confirme l'attribution des données spectrales ^1H - ^{13}C -RMN.

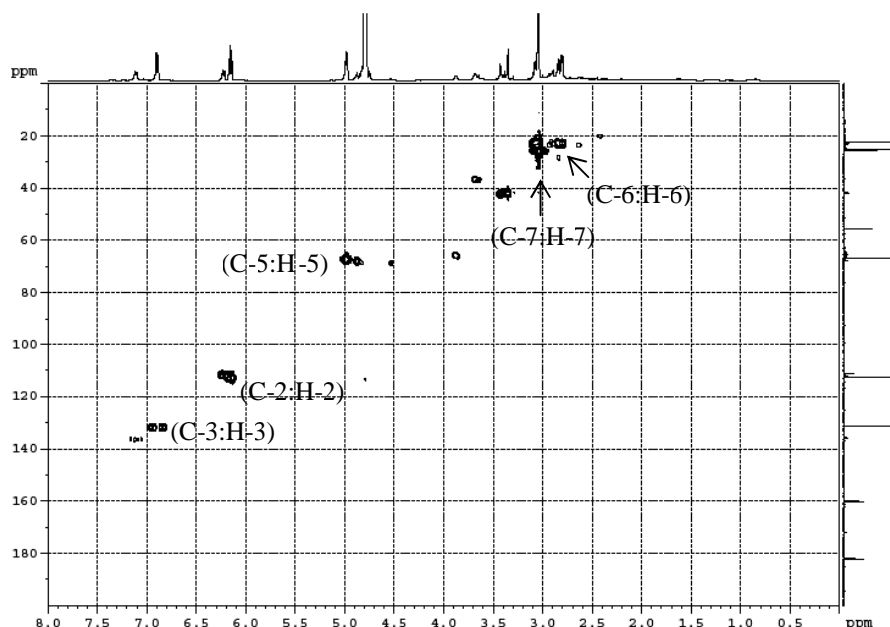


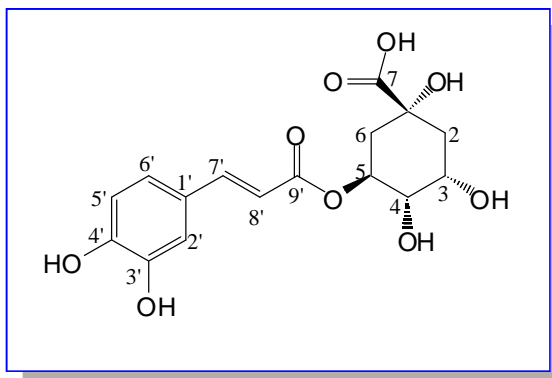
Figure III. 12 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du **composé S2**.

| Position | δ_c (ppm) | δ_H (ppm) (intégration, m., J en Hz) | Corrélations COSY | Corrélations HMBC |
|----------|---------------------|--|----------------------|----------------------|
| 1 | 192,9 | | | |
| 2 | 123,4 | 6,09 (1H, d, $J = 10,3$) | H-3 | C-4, C-6 |
| 3 | 142,2 | 6,83 (1H, d, $J = 10,3$) | H-2 | C-5, C-1, C-7 |
| 4 | 66,6 | | | |
| 5 | 77,8 | 4,92 (1H, t, $J = 6,7$) | H-6 | C-4, C-3, C-8, C-1 |
| 6 | 33,3 | 2,77 (2H, dd, $J = 17,3; 6,7$) | | C-4, C-5, C-1 |
| 7 | 36,4 | 3,02 (2H, dd, $J = 17,3; 5,4$) | | C-4, C-5, C-3, C-8 |
| 8 | 171,0 | | | |

Tableau III. 2: Données spectrales RMN du **composé S2**.

La mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = -18$, MeOH, $c = 0.27$) et les données précédentes du **composé S2** sont en accord avec les données connues dans la littérature [3, 4]. Donc, il s'agit bien du **3a-hydroxy-3,3a,7,7a-tétrahydrobenzofuran-2,6-dione**.

III. 1. 3. Détermination structurale du Composé S3



Ce produit se présente sous forme d'une huile de couleur marron et de fluorescence jaune verte sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|-------|---|
| R_f | 0,46 (AcOEt-H ₂ O-HCOOH 8:1:1) |
| t_R | 5,67 min |

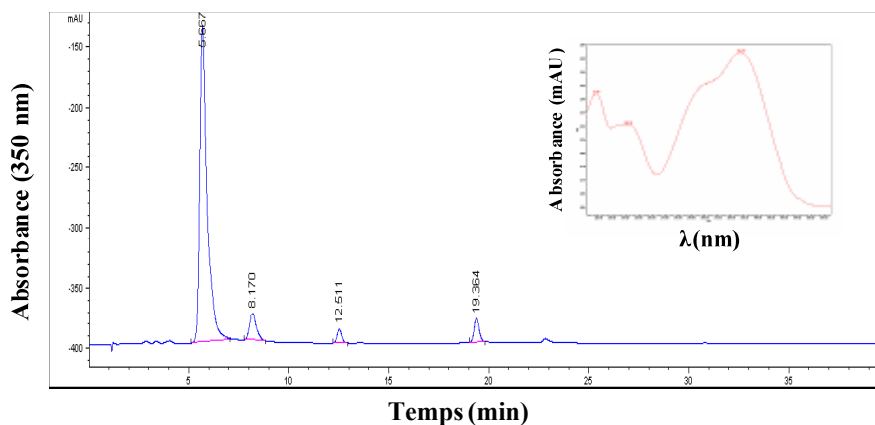


Figure III. 13: Chromatogramme CLHP et spectre UV-Visible du composé S3.

L'analyse CLHP du composé S3 (**Figure III. 13**) a montré que sa pureté est de 77,7 % à 254 nm et de 78 % à 350 nm.

Spectroscopie UV

Le spectre d'absorption UV (**Figure III. 13**) montre trois maxima à 217 nm, 242 nm et 327 nm.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

La mesure du spectre de masse réalisée en ESI/MS en mode positif (**Figure III. 14**) présente un pic quasi-moléculaire à m/z 355 $[M+H]^+$ ce qui suggère une masse moléculaire de 354 uma.

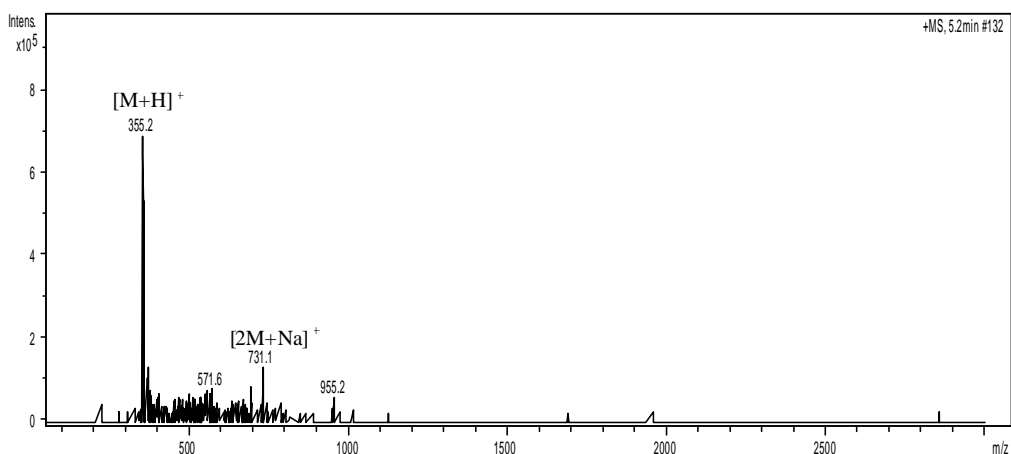


Figure III. 14: Spectre de masse ESI/MS mode positif du composé S3.

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 15**) met en évidence la présence de 16 atomes de carbones, dont deux carbones de groupements carbonyles à δ_C 168,6 ppm et δ_C 177 ppm.

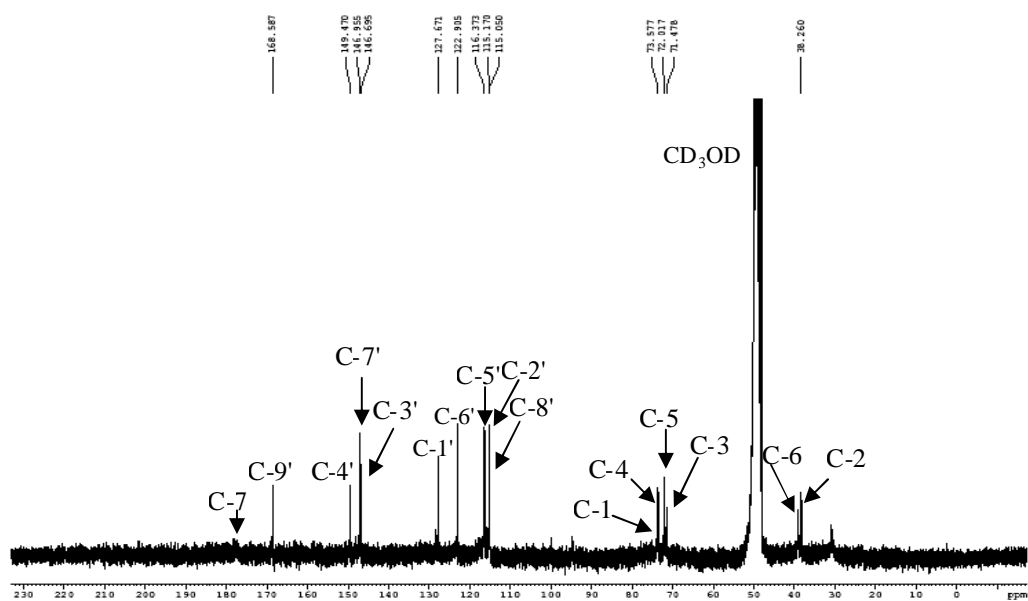


Figure III. 15: Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, MeOH-d4) du composé S3.

Le spectre RMN ^1H (**Figure III. 16**) présente des signaux caractéristiques des protons de l'acide caféique [5] :

- Deux doublets intégrant chacun pour 1H à δ_H 6,66 ppm ($J = 15,6$ Hz) et δ_H 7,94 ppm ($J = 15,6$ Hz) attribués respectivement aux protons éthyléniques H-8' et H-7'.
- Des signaux à δ_H 7,26 ppm (1H, d, $J = 8,4$ Hz), δ_H 7,44 ppm (1H, dd, $J = 8,4, 1,9$ Hz) et δ_H 7,56 ppm (1H, d, $J = 1,9$ Hz) attribués aux protons du cycle aromatiques du groupement caffeoyle respectivement H-5', H-6' et H-2' [6].

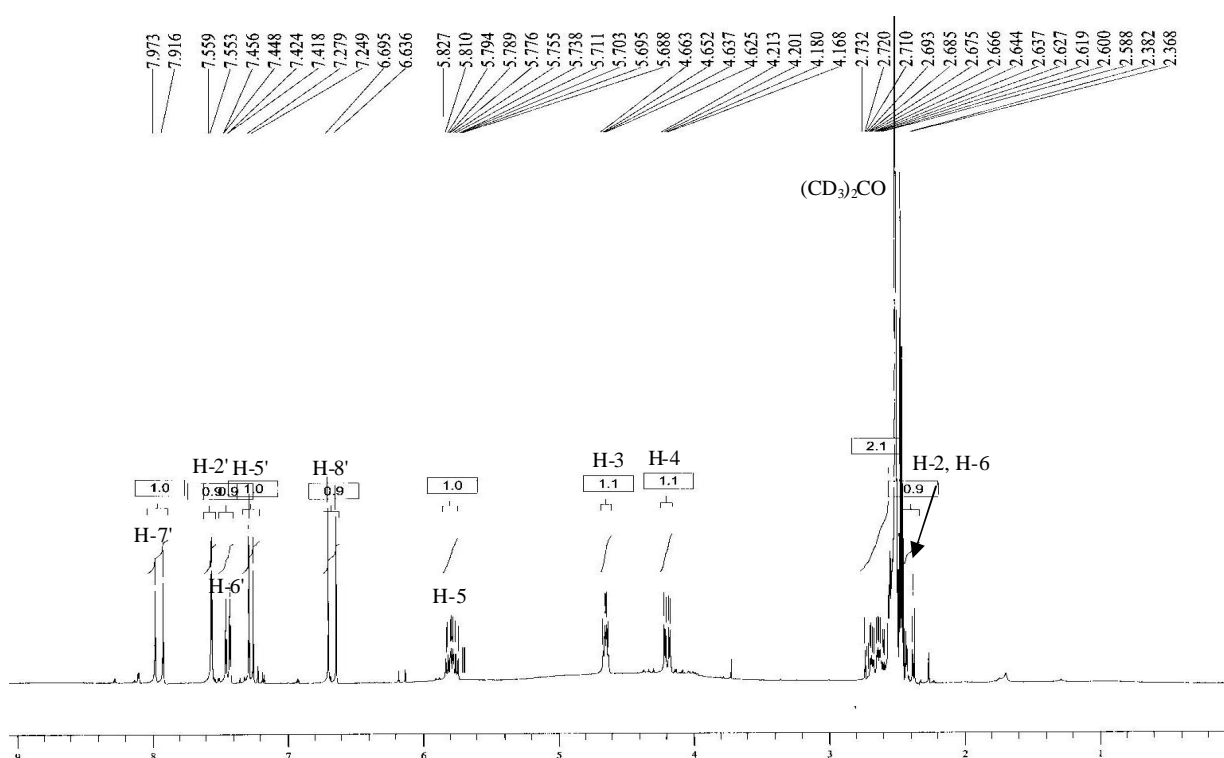


Figure III. 16: Spectre ^1H -RMN (270 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) du composé S3.

Ce spectre (**Figure III. 16**) montre également des signaux caractéristiques des protons de l'acide quinique [5] :

- Un doublet de doublet intégrant pour 1H à δ_H 4,19 ppm ($J = 8,9 ; 3,2$ Hz).
- Un multiplet intégrant pour 1H à δ_H 4,64 ppm.
- Un doublet de triplet intégrant pour 1H à δ_H 5,79 ppm ($J = 10,3; 8,9; 4,6$ Hz).
- Un massif d'intensité 4H entre δ_H 2,37-2,73 ppm.

Jusqu'à maintenant, l'analyse des spectres RMN ^1H , ^{13}C et la masse du composé S3 indique à la présence de l'acide cafféique et l'acide quinique. Il nous reste à positionner le groupement cafféoylé sur l'acide quinique.

Par ailleurs, toutes ces données spectrales nous permettent d'attribuer au composé S3 la formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ avec un degré d'insaturation de 8.

La connexion entre les deux unités est expliquée par les déplacements chimiques et les constantes de couplages des protons H-3, H-4 et H-5 de l'unité acide quinique [5-8] mesurés dans le MeOH-d_4 :

- Selon Ida *et al.* [7] et Li *et al.* [8], la substitution du groupement cafféoylé sur l'acide quinique est en C-4 lorsque les déplacements chimiques des protons H-3, H-4 et H-5 sont respectivement 4,3, 4,8 et 4,2 ppm et en C-3 ou C-5 lorsque les valeurs de δ_H sont 5,3, 3,7 et 4,1 ppm.

En outre, les valeurs de δ_H des protons H-3, H-4 et H-5 de l'acide quinique dans le spectre RMN ^1H réalisé dans le MeOH-d_4 (**Figure III. 17**) du composé S3 sont respectivement 5,27, 3,68 et 4,12 ppm, ce qui oriente vers une substitution soit sur C-3 ou C-5. On voit bien que ces valeurs de δ_H sont identiques à celles prises dans le $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (**Figure III. 16**) (**Tableau III. 3**).

- Selon Pauli *et al.* [5], la substitution est en C-3 lorsque les constantes de couplages à δ_H 5,3 ppm sont de 5,3, 3,3 et 3,3 Hz ($J_{2\text{eq}/3}$, $J_{2\text{ax}/3}$ et $J_{3/4}$) et en C-5 lorsque les valeurs de δ_H sont de 8,3, 9,3 et 4,3 Hz ($J_{4/5}$, $J_{5/6\text{ax}}$ et $J_{5/6\text{eq}}$).

Pour cela, le spectre RMN ^1H (**Figure III. 16**) a montré qu'à δ_H 5,79 ppm les valeurs de J sont 8,9, 10,3 et 4,6 Hz ($J_{4/5}$, $J_{5/6\text{ax}}$ et $J_{5/6\text{eq}}$) (**Tableau III. 3**) ce qui suggère la substitution du groupement cafféoylé sur l'acide quinique en C-5.

En outre, le spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC (**Figure III. 18**), présente l'attribution complète des déplacements RMN ^{13}C et ^1H .

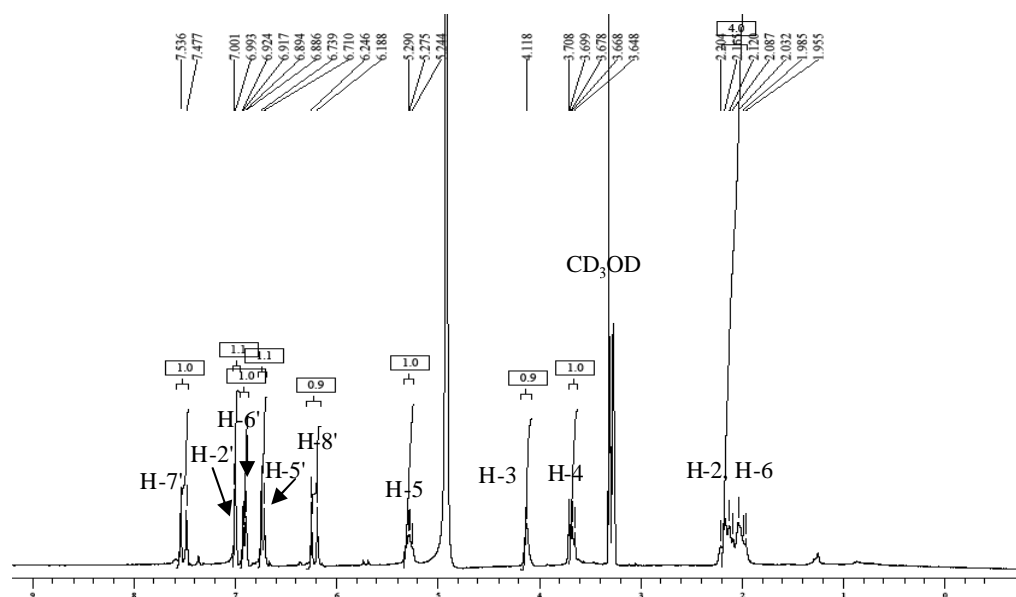


Figure III. 17: Spectre ^1H -RMN (270 MHz, MeOH-d4) du composé S3.

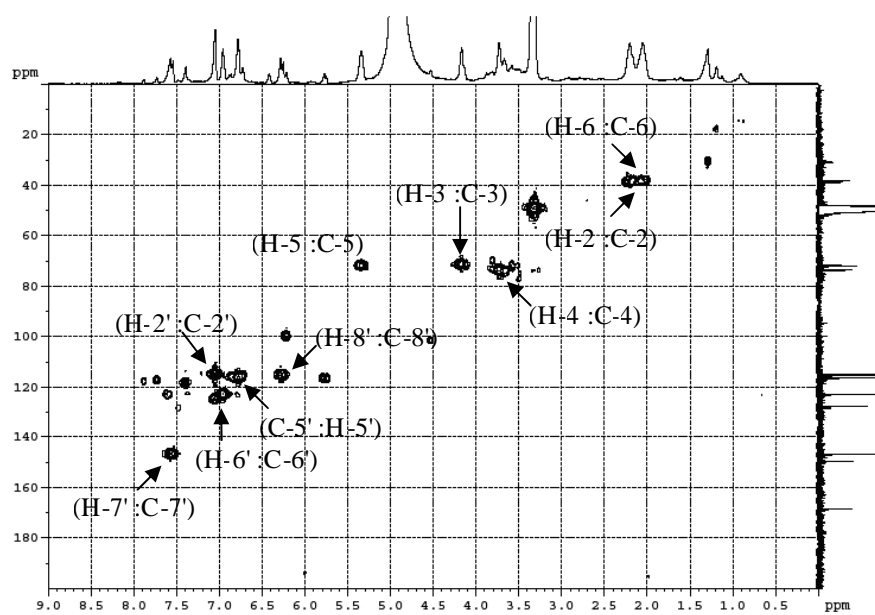


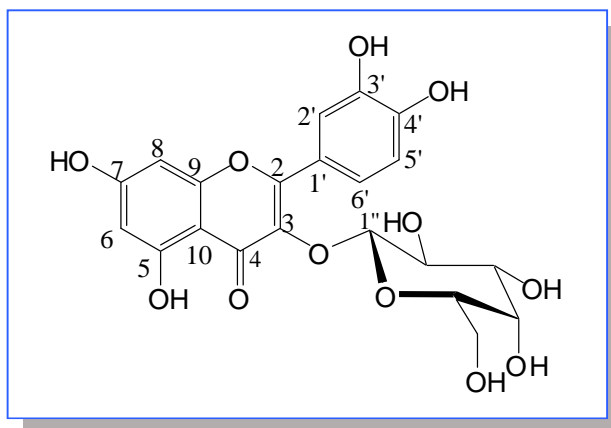
Figure III. 18: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé S3.

| Position | δ_c ppm | δ_H ppm (integration, m., J en Hz) |
|----------|----------------|---|
| 1 | 73,8 | |
| 2 | 38,3 | 2,37-2,73 (2H, <i>m</i>) |
| 3 | 71,5 | 4,64 (1H, <i>m</i>) |
| 4 | 73,6 | 4,19 (1H, dd, $J = 8,9; 3,2$) |
| 5 | 72,0 | 5,79 (1H, dt, $J = 10,3; 8,9; 4,6$) |
| 6 | 39,0 | 2,37-2,73(2H, <i>m</i>) |
| 7 | 177,0 | |
| 1' | 127,7 | |
| 2' | 115,1 | 7,56 (1H, d, $J = 1,9$) |
| 3' | 146,7 | |
| 4' | 149,5 | |
| 5' | 116,4 | 7,26 (1H, d, $J = 8,4$) |
| 6' | 122,9 | 7,44 (1H, dd, $J = 8,1; 1,9$) |
| 7' | 146,9 | 7,94 (1H, d, $J = 15,6$) |
| 8' | 115,2 | 6,66 (1H, d, $J = 15,6$) |
| 9' | 168,6 | |

Tableau III. 3: Données spectrales du **composé S3**.

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déduire la structure du **composé S3**. Il s'agit de : l'**Acide 5-O-caffeoyl quinique** [9]. Noton que le pouvoir rotatoire du **composé S3** est : $[\alpha]_D = - 5,26^\circ$, MeOH, $c = 0,38$.

III. 1. 4. Détermination structurale du Composé S4



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune et de fluorescence violette noire sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|-------|---|
| R_f | 0,49 (AcOEt-H ₂ O-HCOOH 8:1:1) |
| t_R | 18,76 min |

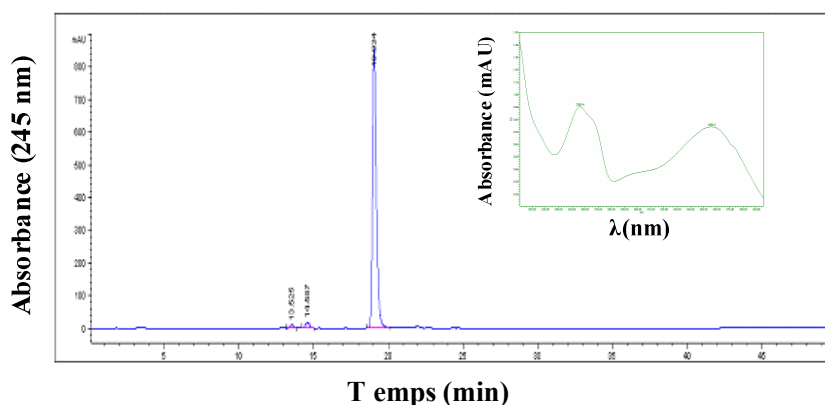


Figure III. 19: Chromatogramme CLHP et Spectre UV-Visible du **composé S4**.

L'analyse CLHP du composé S4 (**Figure III. 19**) a montré que sa pureté est de 93,9 % à 254 nm et de 96,51 % à 350 nm.

Spectroscopie UV

Son spectre d'absorption UV (**Figure III. 20**) présente deux maxima d'absorption à 256 nm et 356 nm correspondant à l'absorption des cycles A (bande II) et B (bande I) d'un flavonol-3OR [10]. Ceci est expliqué par sa fluorescence violette noire sous lampe UV [10].

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse obtenue ESI/MS en mode positif (**Figure III. 21**) du composé S4 montre un ion pseudo-moléculaire à m/z 487 $[M+Na]^+$, relatif à un poids moléculaire de 464 uma.

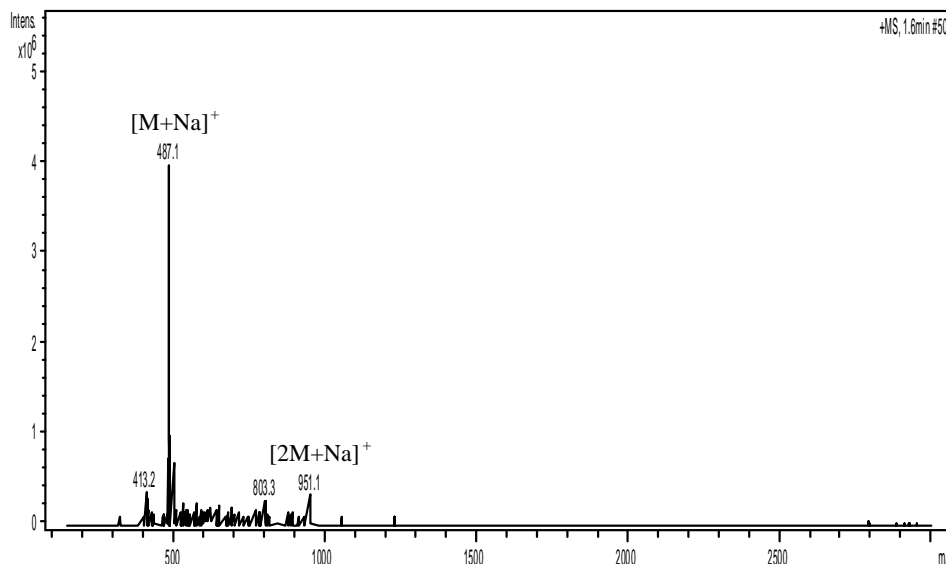


Figure III. 21: Spectre de masse ESI/MS en mode positif du **composé S4**.

L'analyse du spectre RMN 1H (**Figure III. 22**), indique que le composé S4 est une flavonol glycosylée, cela est expliqué par la présence de:

- Un doublet d'intensité 1H à δ_H 5,17 ppm ($J = 8\text{Hz}$) typique d'un proton anomérique H-1'' en configuration β d'un sucre [11].
- Des signaux entre δ_H 3,48 et 3,86 ppm intégrant pour 6H relatif aux protons osidiques d'un hexose [11].
- Deux doublets chacun d'intensité 1H à δ_H 6,21 ppm ($J = 2\text{ Hz}$) et à δ_H 6,41 ppm ($J = 2\text{ Hz}$), caractéristiques respectivement des protons H-6 et H-8 du cycle A des flavonols.

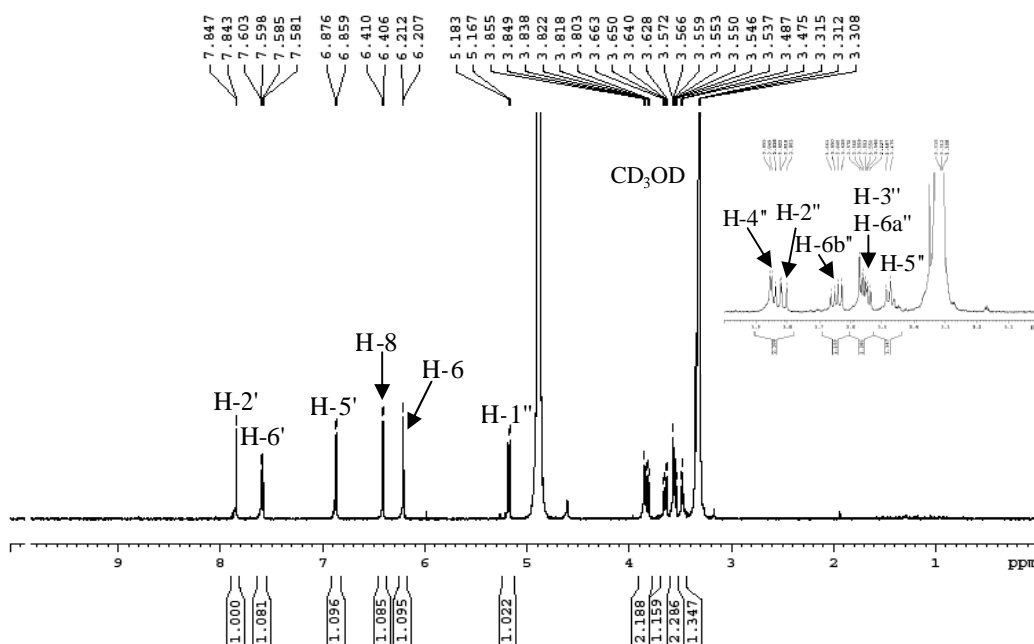


Figure III. 22: Spectre ^1H -RMN (500 MHz, MeOH- d_4) du composé S4.

Au niveau du cycle B, le spectre RMN ^1H présente trois signaux à δ_H 7,85 ppm (1H, d, $J = 2,5$ Hz), δ_H 7,59 ppm (1H, dd, $J = 8,5; 2,5$ Hz) et δ_H 6,87 ppm (1H, d, $J = 8,5$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5', ce qui montre que le noyau B est ortho-disubstitué.

Le spectre RMN ^{13}C (67,5 MHz dans MeOH- d_4) (**Figure III. 23**) donne 21 atomes de carbones dont sept signaux résonants à 105,3 ppm, 73,2 ppm, 75,1 ppm, 70,0 ppm, 77,2 ppm et 61,9 ppm. Selon la littérature, ces déplacements chimiques sont caractéristiques des carbones osidiques C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' d'un galactose [12].

Par ailleurs, le composé S4 a la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ avec un degré d'insaturations de 12.

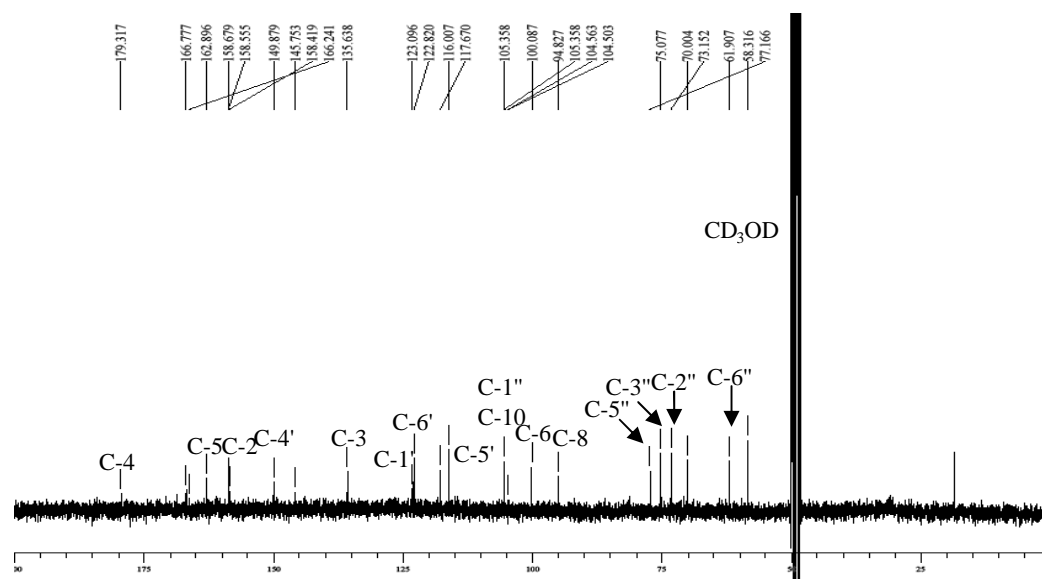


Figure III. 23 : Spectre ^{13}C -RMN (67.5 MHz, MeOH-d₄) du composé S4.

L'interprétation des taches de corrélations observées sur le spectre COSY ^1H , ^1H (Figure III. 24) entre l'anomère H-1'' en configuration β à δ_H 5,17 ppm (d, $J = 8$ Hz) et le proton situé à δ_H 3,82 ppm (dd, $J = 10, 8$ ppm), permet de repérer le proton H-2'', ce qui confirme la présence du galactose [12], et par la suite repérer le reste des protons osidiques.

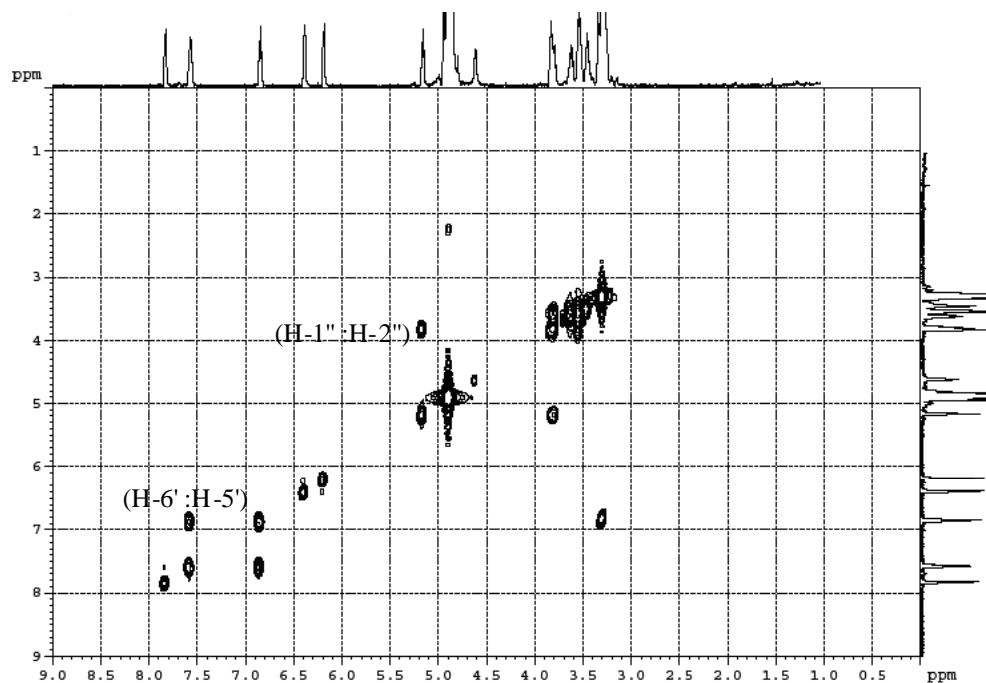


Figure III. 24 : Spectre de corrélations homonucléaires COSY ^1H , ^1H du composé S4.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC (**Figure III. 25**), montre les connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé S4.

Le spectre indique que l'anomère H-1'' à δ_C 5,17 ppm corrèle au carbone situé à δ_C 105,3 ppm permettant de localiser la position du carbone anomérique C-1'' sur le spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 23**).

Cette expérience montre également les corrélations (H-6 : C-6), (H-8 : C-8), (H-6' : C-6'), (H-5' : C-5') et (H-2' : C-2') pour l'aglycone.

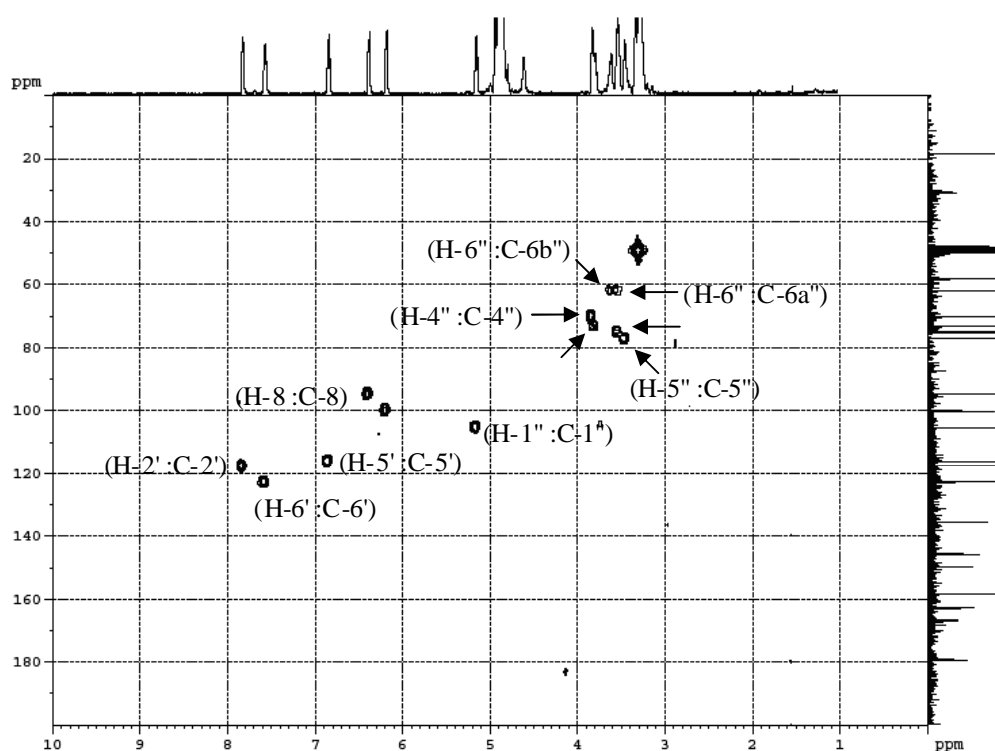


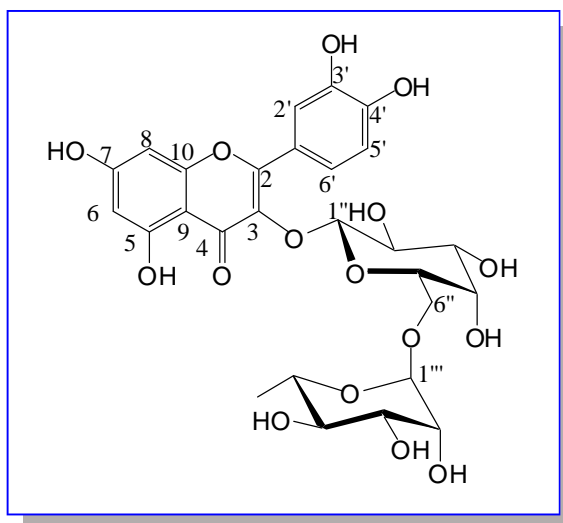
Figure III. 25: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé S4.

| Position | RMN ¹³ C [δ_C (ppm)] | RMN ¹ H [δ_H (ppm)] [intégration, m., J (Hz)] | Corrélations COSY |
|----------|--|---|----------------------|
| 2 | 158,5 | | |
| 3 | 135,6 | | |
| 4 | 179,0 | | |
| 5 | 162,9 | | |
| 6 | 100,1 | 6,21 (1H, d, $J = 2$) | H-8 |
| 7 | 166,0 | | |
| 8 | 94,8 | 6,41 (1H, d, $J = 2$) | H-6 |
| 9 | 162,9 | | |
| 10 | 105,3 | | |
| 1' | 123,0 | | |
| 2' | 117,7 | 7,85 (1H, d, $J = 2,5$) | |
| 3' | 145,0 | | |
| 4' | 149,8 | | |
| 5' | 116,0 | 6,86 (1H, d, $J = 8,5$) | H-6' |
| 6' | 122,8 | 7,59 (1H, dd, $J = 8,5; 2$) | H-5' |
| 1'' | 105,3 | 5,17 (1H, d, $J = 8$) | H-2'' |
| 2'' | 73,2 | 3,82 (1H, dd, $J = 10, 8$) | H-1'', H-3'' |
| 3'' | 75,1 | 3,57(1H, m) | H-2'' |
| 4'' | 70,0 | 3,85 (1H, m) | |
| 5'' | 77,2 | 3,48-3,49 (1H, m) | |
| 6a'' | 61,9 | 3,55-3,57 (1H, m) | |
| 6b'' | 61,9 | 3,64 (1H, dd, $J = 11,5, 6,5$) | |

Tableau III. 4: Données spectrales RMN du composé S4.

Par comparaison avec les données de la littérature [12], le **composé S4** est identifié comme étant la **Quercétine-3-O- β -galactopyranoside** ou l'**hyperoside**.

III. 1. 5. Détermination structurale du Composé S5



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune. Sa fluorescence est violette noire sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|-------|---|
| R_f | 0,25 (AcOEt-H ₂ O-HCOOH 8:1:1) |
| t_R | 19,6 min |

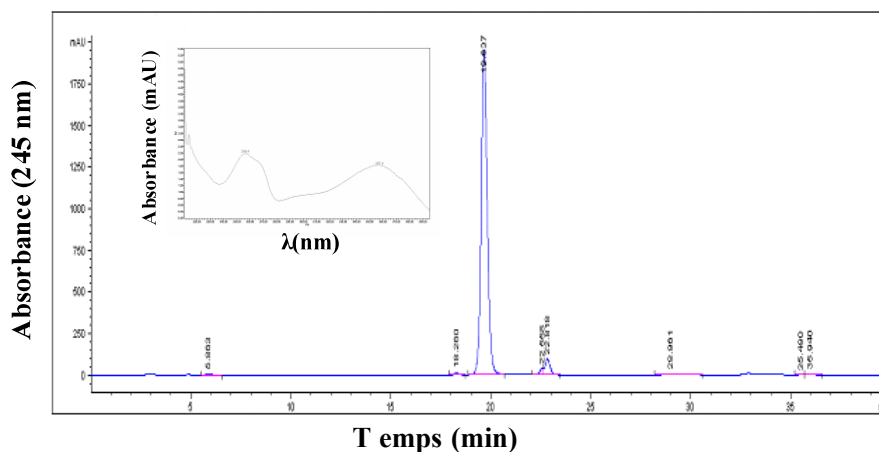


Figure III. 26: Chromatogramme CLHP et Spectre UV-Visible du composé S5.

L'analyse CLHP du composé S5 a montré que sa pureté est de 94,14 % à 254 nm et de 92,6 % à 350 nm.

Spectroscopie UV

Les données spectrales UV (**Figure III. 26**) sont identiques à celles du composé S4 (**Figure III. 21**).

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse ESI/MS en mode positif (**Figure III. 27**) donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 633 $[M+Na]^+$ suggérant une masse moléculaire de 610 uma. Le spectre MS/MS de cet ion donne des ions à m/z 487 (perte de 146 uma) et à m/z 331 (perte de 302 uma).

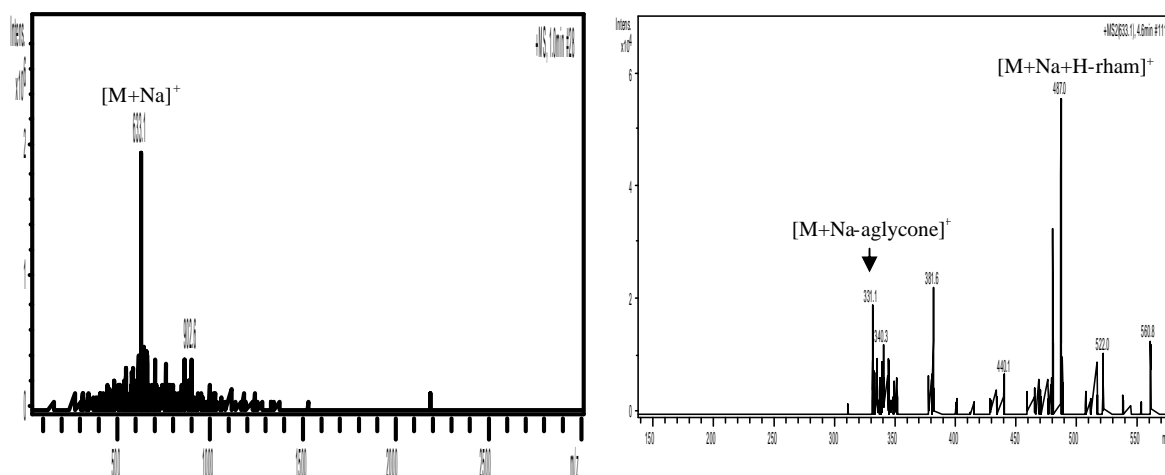


Figure III. 27: Spectre de masse ESI/MS en mode positif du **composé S5**.

L'analyse du spectre RMN 1H (**Figure III. 28**) (**Tableau III. 5**), indique que le composé S5 est une flavonol diglycosylée. Ceci est expliqué par sa fluorescence violette-noire sous lampe UV [10]. Ainsi le spectre montre les signaux comme:

- Un doublet d'intensité 1H à δ_H 5,07 ppm ($J = 7,5$ Hz) et un singulet d'intensité 1H à δ_H 4,53 ppm indiquant à la présence de deux sucres.
- Un méthyle sous forme d'un doublet à δ_H 1,19 ppm ($J = 6,0$ Hz) caractéristique du méthyle d'un rhamnose ce qui montre que ce dernier est un des deux sucre.
- Des signaux entre δ_H 3,27 et 3,96 ppm caractéristiques des protons osidiques des deux Sucres.

Comme le composé S4, le spectre RMN 1H du composé S5 montre des signaux à 6,21 ppm et 6,40 ppm caractéristiques respectivement des protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonol. On outre, le cycle B est présenté par des signaux à δ_H 6,87 ppm, 7,60 ppm et 7,88 ppm, caractéristiques respectivement des protons H-5' (d, $J = 8,5$ Hz), H-6' (d, $J = 8,5$ Hz) et H-2' (s), révélant une orto- disubstitution.

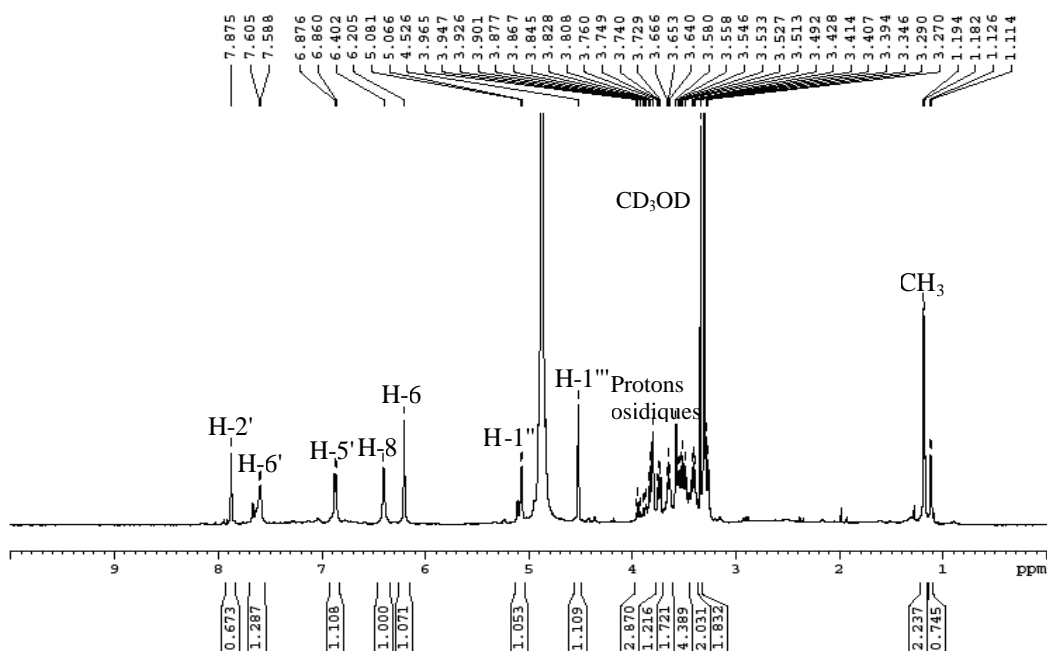


Figure III. 28: Spectre ^1H -RMN (500 MHz, MeOH-d4) du composé S5.

Le spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 29**), montre bien la présence d'un dioside dont la majorité de ses carbones résonne entre δ_C 67,3 et δ_C 75,7 ppm. Les pics des carbones anomériques C-1'' et C-1''' sortent respectivement à δ_C 105,5 ppm et δ_C 101,8 ppm [13].

La mesure de corrélations hétéronucléaires HMQC (**Figure III. 30**), montre les connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé S5.

Le spectre indique que les anomères H-1'' et H-1''' à δ_H 5,07 ppm et 4,53 ppm corrélerent respectivement aux carbones situés à δ_C 105,5 ppm et 101,8 ppm permettant de localiser la position des carbones anomériques C-1'' et C-1''' sur le spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 29**).

Selon la littérature, les déplacements chimiques des carbones osidiques (**Figure III. 29 et II. 31**) à δ_C 105,5 ppm, 73,0 ppm, 75,1 ppm, 70,0 ppm, 75,2 ppm et 67,3 ppm attribuables respectivement aux carbones C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' qui sont caractéristiques des carbones d'un galactose [12, 13]. Ainsi les carbones osidiques du rhamoses résonnant à δ_C 101,8 ppm, 72,0 ppm, 72,2 ppm, 73,8 ppm, 69,7 ppm et 18,0 ppm sont attribuables aux carbones C-1''', C-2''', C-3''', C-4''', C-5''', et C-6''' [13].

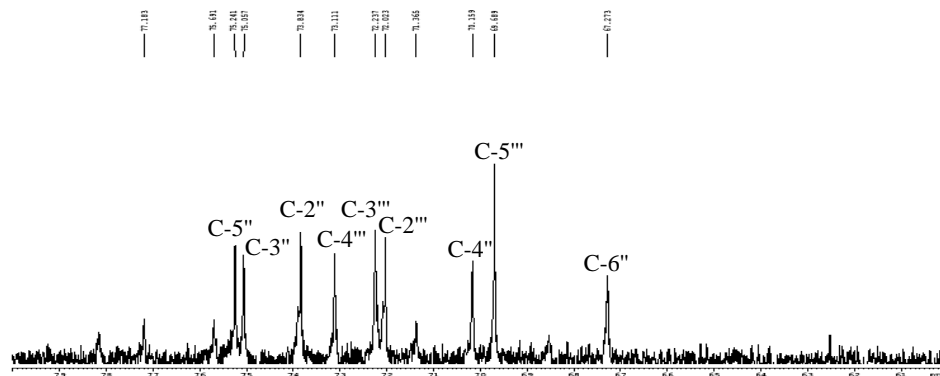


Figure III. 31: Etalement de la partie des carbones osidiques du spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, MeOH-d4) du **composé S5**.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des corrélations homonucléaires COSY ^1H , ^1H et hétéronucléaires HMBC.

L'expérience COSY ^1H , ^1H (**Figure III. 32**) a montré que le proton anomérique H-1'' à δ_{H} 5,07 ppm couple avec un proton de multiplet situé entre δ_{H} 3,27 et 3,96 ppm, ce qui permet de repérer le proton H-2'' du galactose. La corrélation observée entre le méthyle résonnant à δ_{H} 1,19 ppm et un proton du multiplet situé entre δ_{H} 3,27 et 3,96 ppm, affirme la présence du rhamnose.

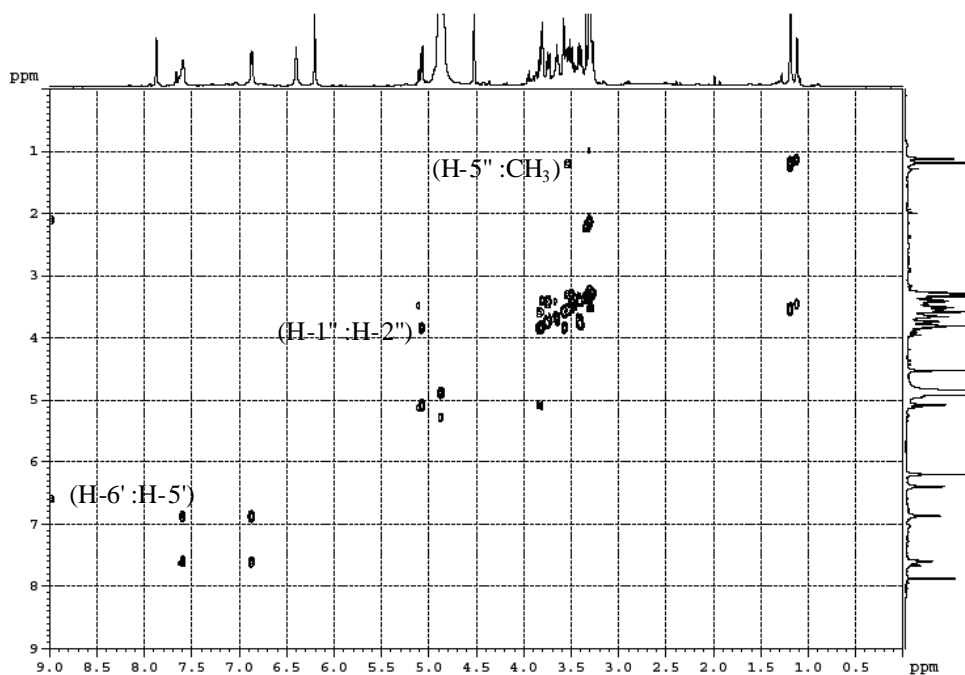


Figure III. 32: Spectre de corrélations homonucléaires COY ^1H , ^1H du **composé S5**.

L'interprétation du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à long distance HMBC (**Figure III. 33**) indique à la substitution en C-3 du flavonol par le sucre, en montrant clairement la corrélation entre le proton anomérique du galactose H-1'' et le C-3 à δ_C 135,8 ppm de l'aglycone.

Le déplacement chimique vers les champs faibles du carbone C-6'' du galactose à δ_C 67,3 ppm, montre que les deux sucres sont liés (galactose-rhamnose) [14].

Par ailleurs, la corrélation observée sur le spectre HMBC (**Figure III. 33**) entre le proton H-1''' à δ_H 4,53 ppm et le carbone C-6'' situé à δ_C 67,3 ppm montre que la liaison galactose-rhamnose est 1 \rightarrow 6, donc il s'agit du robinobioside [rhamnosyl- α -(1 \rightarrow 6)- β -galactose].

Ainsi, le composé S5 a la formule brute $C_{27}H_{30}O_{16}$ avec un degré d'insaturation de 13.

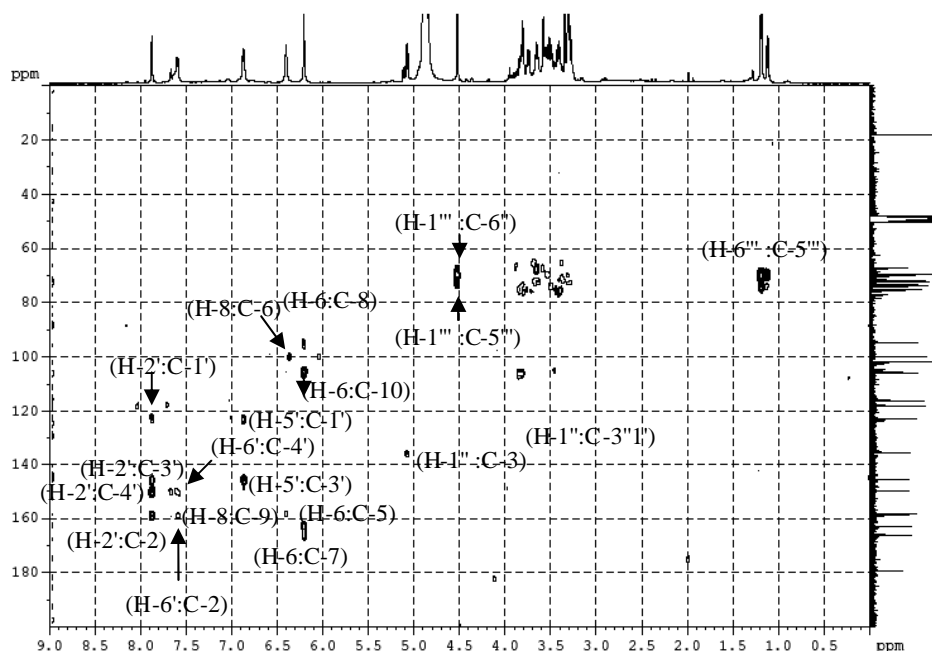
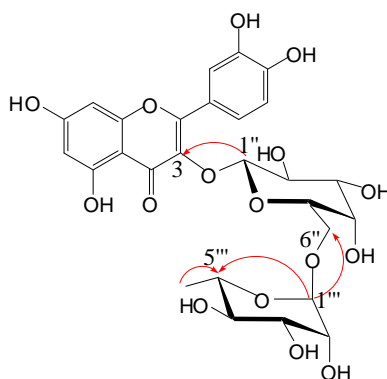


Figure III. 33 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S5.



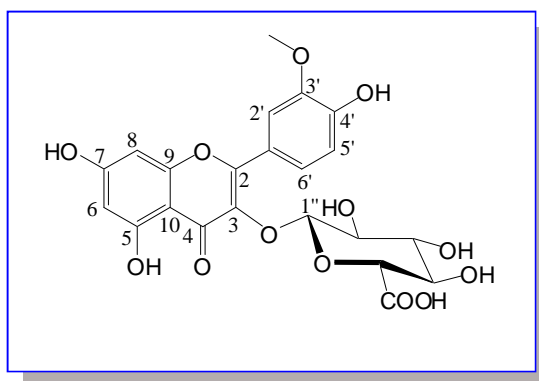
Corrélations HMBC

| Position | RMN ¹³ C [δ_c (ppm)] | RMN ¹ H [δ_H (ppm)] [intégration, m, <i>J</i> (Hz)] | Corrélations HMBC | Corrélations COSY |
|----------|--|---|--------------------------|----------------------|
| 2 | 158,8 | | | |
| 3 | 135,8 | | | |
| 4 | 179,3 | | | |
| 5 | 162,8 | | | |
| 6 | 99,9 | 6,21 (1H, d, <i>J</i> = 2,1) | C-6 | |
| 7 | 166,0 | | | |
| 8 | 94,8 | 6,40 (1H, d, <i>J</i> = 2,1) | C-10, C-5, C-7 | |
| 9 | 158,4 | | | |
| 10 | 105,9 | | | |
| 1' | 122,9 | | | |
| 2' | 117,9 | 7,88 (1H, d, <i>J</i> = 2,2) | C-1', C-3', C-4', C-2 | |
| 3' | 145,6 | | | |
| 4' | 149,9 | | | |
| 5' | 116,1 | 6,87 (1H, d, <i>J</i> = 8,5) | C-1', C-3' | H-6' |
| 6' | 122,7 | 7,60 (1H, dd, <i>J</i> = 8,5; 2,2) | | H-5' |
| 1'' | 105,5 | 5,07 (1H, d, <i>J</i> = 7,5) | C-3 | H-2'' |
| 2'' | 73,1 | | | |
| 3'' | 75,1 | | | |
| 4'' | 70,2 | | | |
| 5'' | 75,2 | | | H-6'' |
| 6'' | 67,3 | | | H-5'' |
| 1''' | 101,8 | 4,53 (1H, d, <i>J</i> = 1,7) | C-6'', C-5''' | |
| 2''' | 72,0 | | | |
| 3''' | 72,2 | | | |
| 4''' | 73,8 | | | |
| 5''' | 69,7 | | | |
| 6''' | 18,0 | 1,19 (1H, d, <i>J</i> = 6) | | |

Tableau III. 5: Données spectrales RMN du composé **S5**.

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déduire la structure du composé **S5**. Il s'agit de la **Quercétine-3-O- β -robinobioside** [13].

III. 1. 6. Détermination structurale du Composé S6



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune et d'une fluorescence violette noire sous lampe UV 365 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|-------|---|
| R_f | 0,58 (AcOEt-H ₂ O-HCOOH 8:1:1) |
| t_R | 22,67 min |

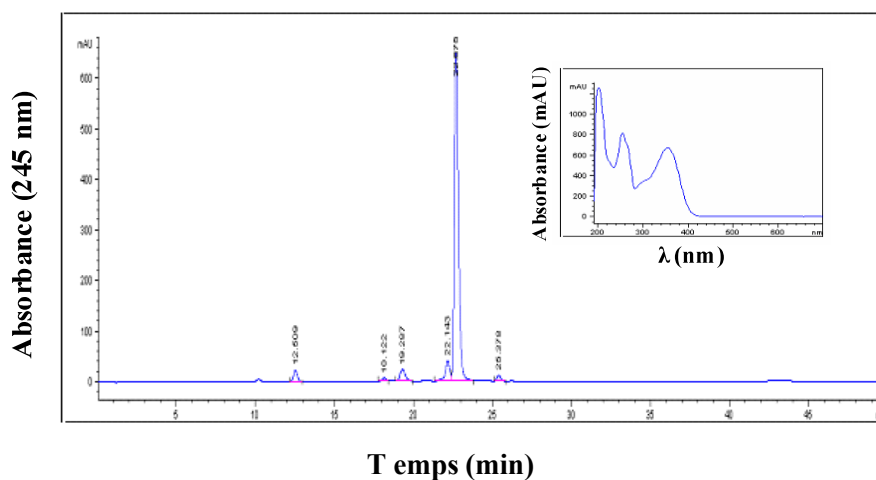


Figure III. 34: Chromatogramme CLHP et Spectre UV-visible du composé S6.

L'analyse CLHP du composé S6 a montré que sa pureté est de 86,1 % à 254 nm et de 85,5 % à 350 nm.

Spectroscopie UV

Le spectre UV (Figure III. 34) du composé S6 montre deux maxima d'absorption à 258 nm et à 355 nm, identiques à celles du composé S4 (Figure III. 20).

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse obtenu en ESI/MS en mode positif (**Figure III. 35**) du composé S6 donne un pic pseudo-moléculaire à m/z 515 $[M+Na]^+$, ce qui suggère une masse moléculaire de 492 uma.

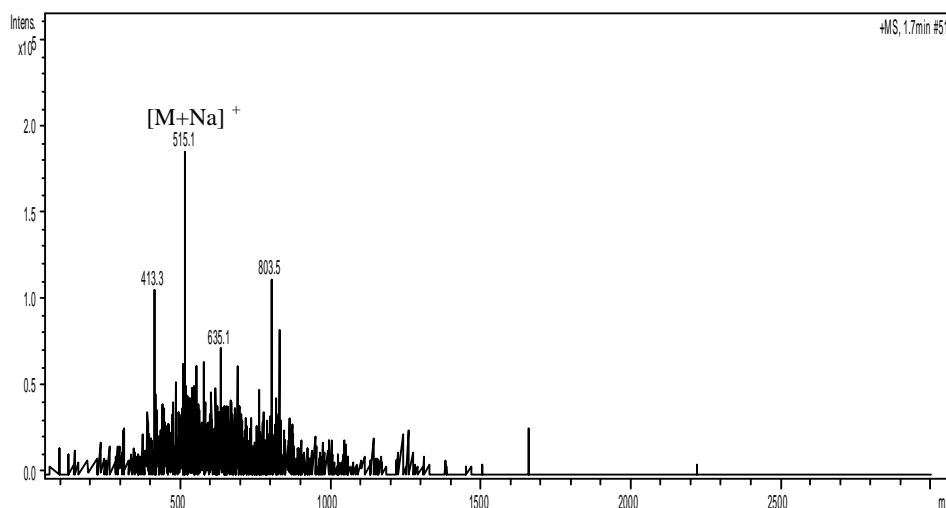


Figure III. 35: Spectre de masse ESI/MS en mode positif du composé S6.

Comme le composé S5, le spectre RMN 1H (**Figure III. 36**), indique que le composé S6 est une flavonol-3-*O*-sucre, mais cette fois-ci la différence est dans le sucre. Donc ce spectre montre :

- Un signal d'intensité 1H à δ_H 5,51 ppm (d, $J = 7,3$ Hz) qui est typique au proton anomérique d'un glucuronide [15]. La présence de ce dernier est expliquée par la localisation de quatre protons osidiques au lieu de six entre δ_H 3,50 et 3,70 ppm protons, dont un proton se présente sous forme d'un doublet à δ_H 3,75 ppm avec une constante de couplage de 7,02 Hz attribuable au proton osidique H-5".
- Des signaux entre δ_H 6,21 et 7,99 ppm identiques à celles du composé S4 (**Figure III. 22**), caractéristiques des protons des deux noyaux A et B (**Tableau III. 6**).
- Un singulet intégrant pour 3H à δ_H 3,96 ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle.

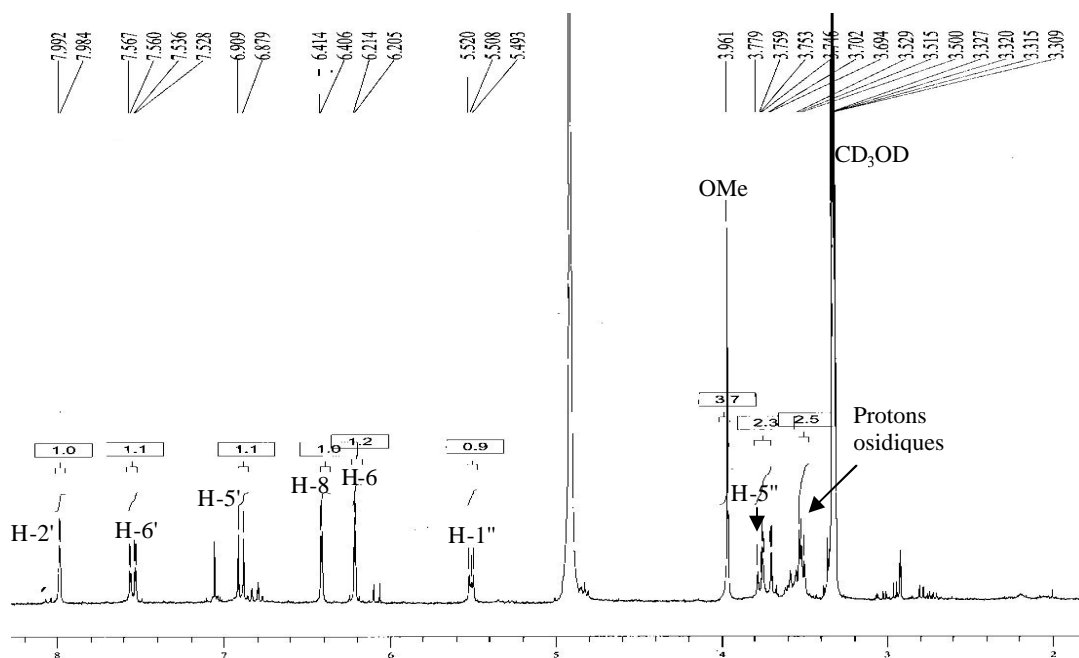


Figure III. 36: Spectre ^1H -RMN (270 MHz, MeOH-d₄) du composé S6.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 37**) du composé S6 indique à la présence de 22 atomes de carbone dont deux groupements carbonyles à δ_{C} 179,2 ppm et δ_{C} 172,0 attribués respectivement au carbone C-4 du flavonol et au carbone C-6'' du glucuronide. Le spectre montre également la présence du groupement méthoxyle à δ_{C} 56,8 ppm.

L'ensemble de ces informations nous permet d'attribuer au composé S6 la formule brute $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$ avec un degré d'insaturation de 13.

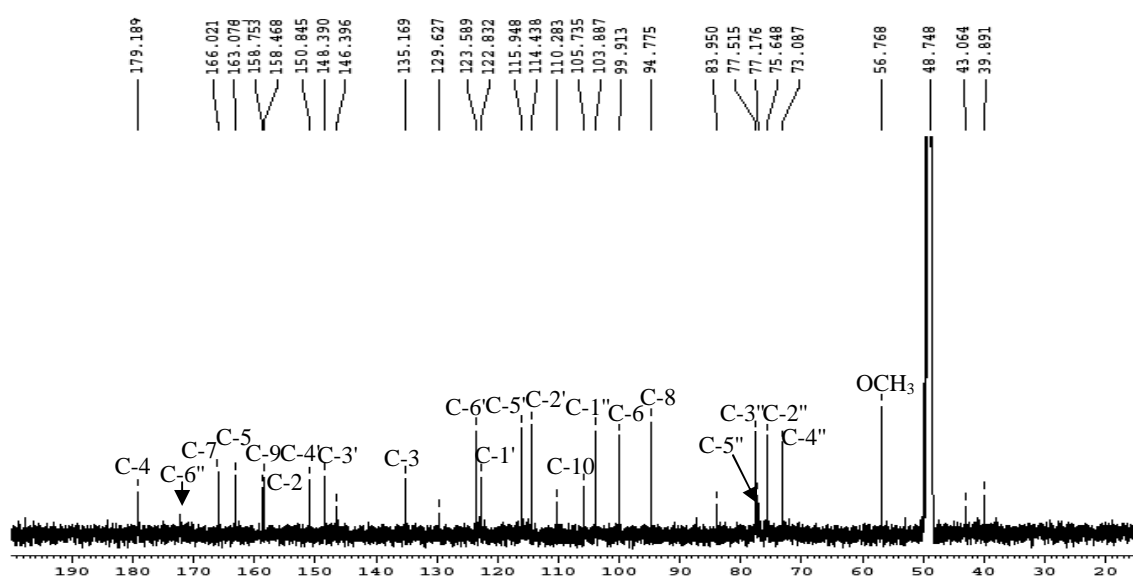
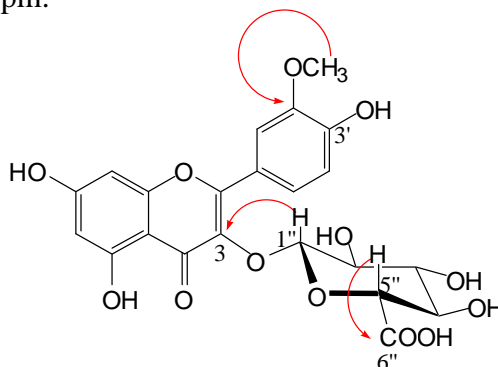


Figure III. 37: Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, MeOH-d₄) du composé S6.

L'interprétation des taches de corrélations observées sur le spectre HMBC (**Figure III. 38**) permet de confirmer la présence du glucuronide en montrant clairement le couplage du proton osidique H-5'' situé à δ_H 3,75 ppm avec le carbone C-6'' localisé à δ_C 172,0 ppm. Cette expérience a permis également la localisation du méthoxyle en C-3' du flavonoïde situé à δ_C 148,4 ppm.



Corrélations HMBC

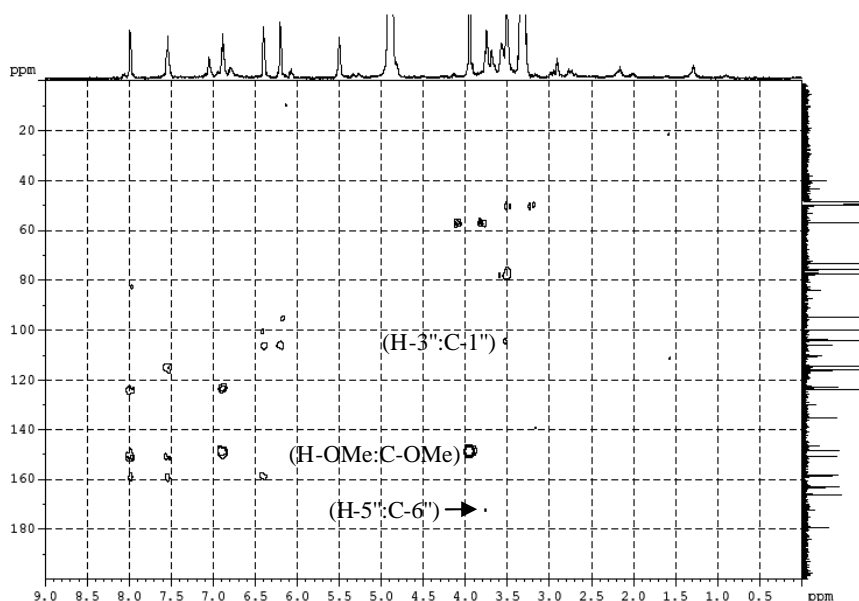


Figure III. 38: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S6.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des corrélations homonucléaires COSY 1H , 1H et hétéronucléaires HMQC et HMBC.

L'expérience des corrélations homonucléaire COSY 1H , 1H (**Figure III. 39**) montre les couplages des protons, (H-2', H-5'), (H-5', H-6'), (H-1'', H-2'').

La mesure de corrélations hétéronucléaires HMQC (**Figure III. 40**) démontre les corrélations géminales 1-H, 13-C-RMN. Le spectre montre que le proton anomérique situé

à δ_H 5,51 ppm corrèle avec le carbone localisé à δ_C 103,9 ppm permettant de localiser la position du carbone anomérique C-1'' sur le spectre RMN ^{13}C .

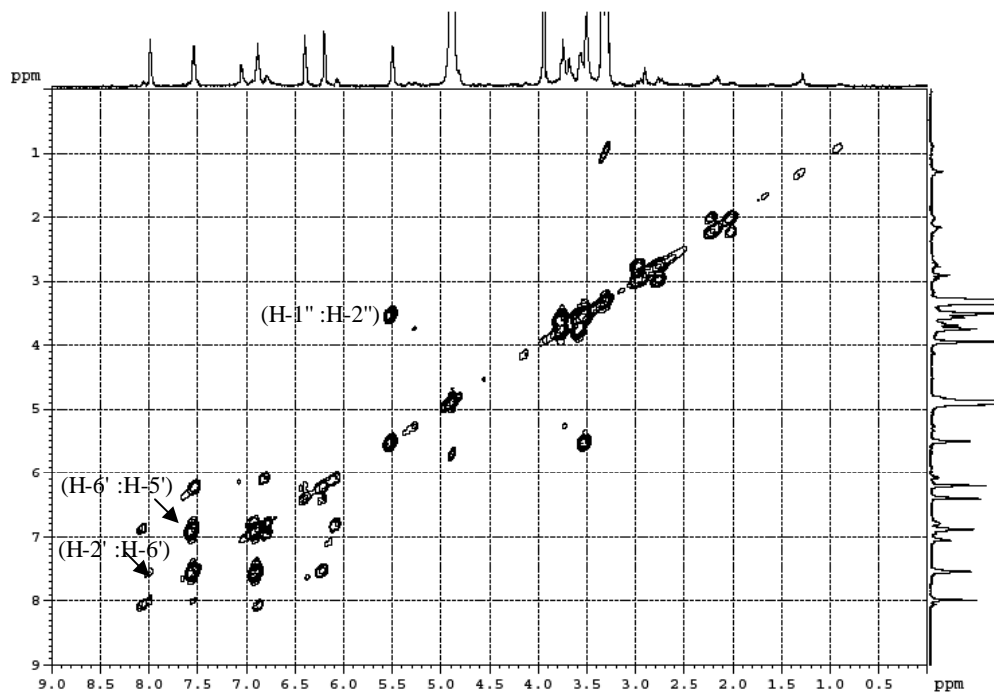


Figure III. 39: Spectre de corrélations homonucléaires COY 1H , 1H du composé S6.

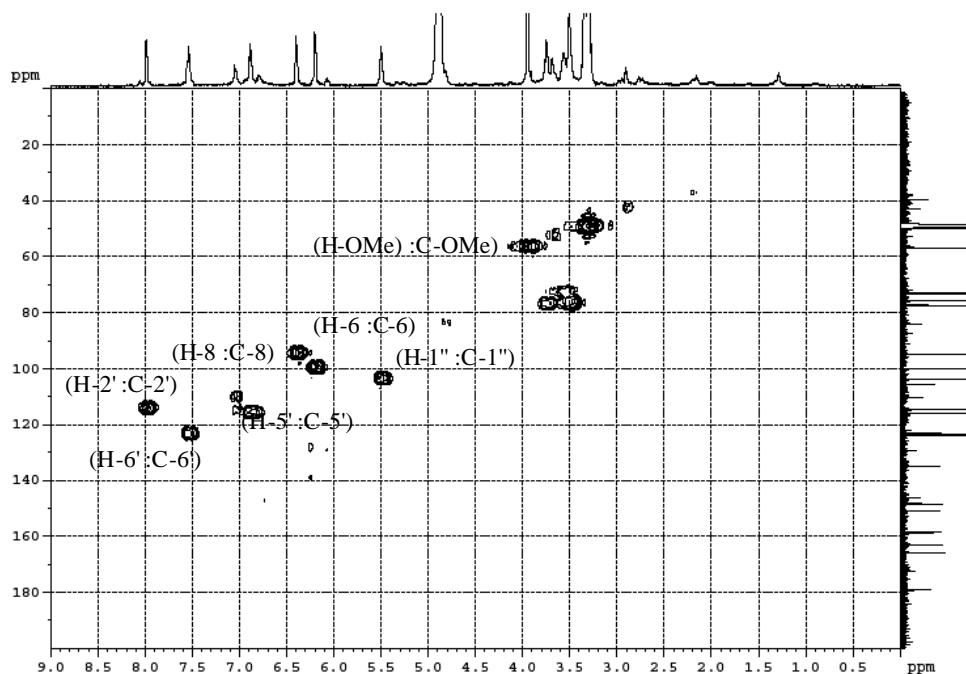


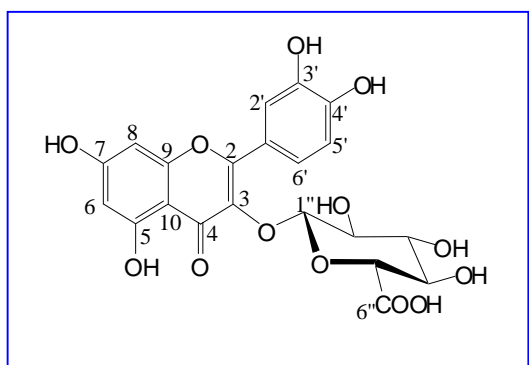
Figure III. 40: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé S6.

| Position | RMN ¹³ C [δ_C (ppm)] | RMN ¹ H [δ_H (ppm)] [intégration, m., J (Hz)] | Corrélations HMBC | Corrélations COSY |
|-------------------|--|---|----------------------|----------------------|
| 2 | 158,7 | | | |
| 3 | 135,2 | | | |
| 4 | 179,2 | | | |
| 5 | 163,1 | | | |
| 6 | 99,9 | 6,21 (1H, d, $J = 2,3$) | C-10, C-8 | |
| 7 | 166,0 | | | |
| 8 | 94,8 | 6,41 (1H, d, $J = 2,3$) | C-6, C-10, C-9 | |
| 9 | 158,5 | | | |
| 10 | 105,7 | | | |
| 1' | 122,8 | | | |
| 2' | 114,4 | 7,98 (1H, d, $J = 2$) | C-6', C-4', C-2 | H-6' |
| 3' | 148,4 | | | |
| 4' | 150,8 | | | |
| 5' | 115,9 | 6,89 (1H, d, $J = 8,4$) | C-1', C-3' | H-6' |
| 6' | 123,6 | 7,55 (1H, dd, $J = 8,4; 2$) | C-2', C-4', C-2 | H-2', H-5' |
| 1'' | 103,9 | 5,51 (1H, d, $J = 7,3$) | | H-2'' |
| 2'', 3'', 4'' | 75,6; 77,5; 73,1 | 3,50-3,70 (3H, m) | | |
| 5'' | 77,2 | 3,75 (1H, d, $J = 7,02$) | C-6'' | |
| 6'' | 172,0 | | | |
| O-CH ₃ | 56,8 | 3,96 (3H, s) | | |

Tableau III. 6: Données spectrales RMN du composé S6.

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déduire la structure du composé S6. Il s'agit du l' **Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide**.

III. 1. 7. Détermination structurale du Composé S7



Ce composé se présente sous la forme d'une poudre jaune et de fluorescence violette noire sous lampe UV 365 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|-------|---|
| R_f | 0,46 (AcOEt-H ₂ O-HCOOH 8:1:1) |
| t_R | 18,95 min |

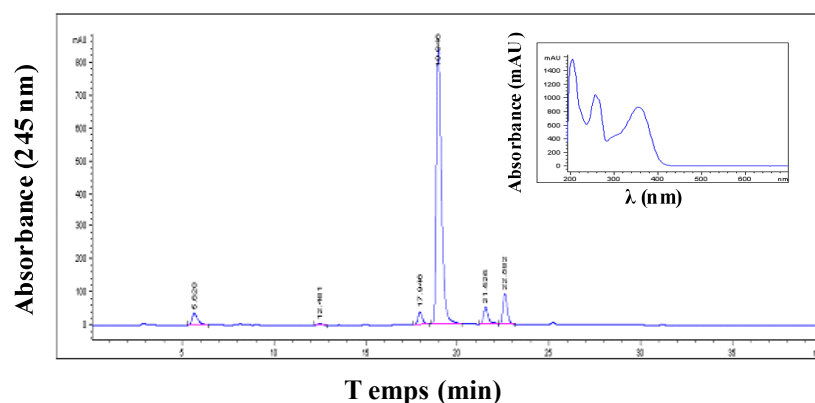


Figure III. 41 : Chromatogramme CLHP et spectre UV-visible du **composé S7**.

L'analyse CLHP du composé S7 a montré que sa pureté est de 83 % à 254 nm et de 81,2 % à 350 nm.

Spectroscopie UV

Son spectre UV (**Figure III. 41**) présente deux maxima d'absorption à 258 nm et 354 nm, caractéristique d'une flavonol-3-OR.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse réalisé en ESI/MS en mode négatif (**Figure III. 42**) du composé S7 donne un ion quasi-moléculaire à m/z 477 $[M-H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 478 uma.

Le spectre MS/MS de cet ion donne un pic à m/z 301 (perte de 176 uma) qui est relatif à l'aglycone ; la quercétine.

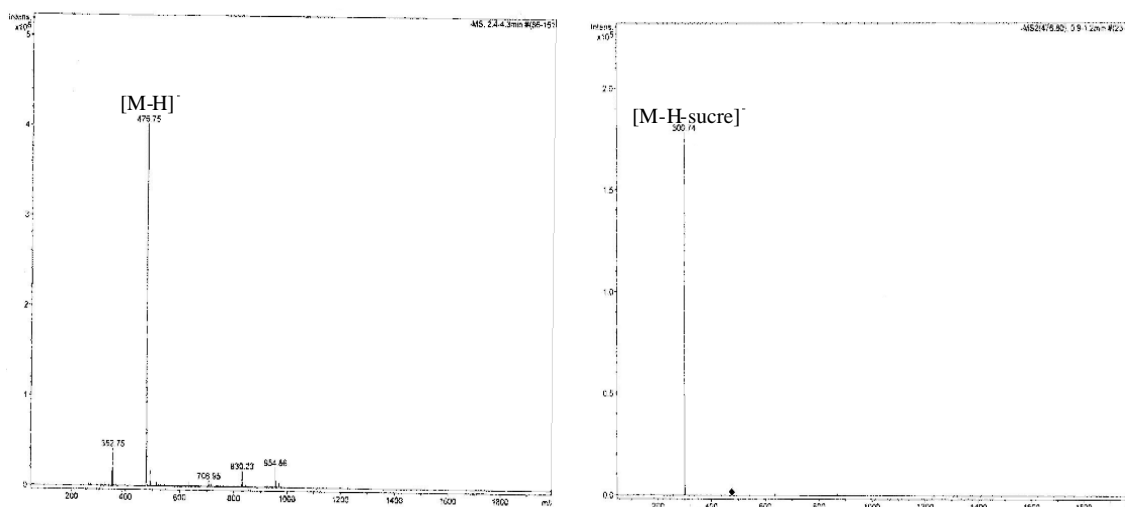


Figure III. 42: Spectre de masse ESI/MS en mode négatif du **composé S7**.

Le spectre RMN du ^1H (**Figure III. 43**) présente les mêmes signaux que ceux du composé S6 avec une seule différence, qui se présente dans l'absence du signal des protons du groupement méthoxyle, ainsi le spectre montre :

- Un doublet d'intensité 1H à δ_H 5,30 ppm ($J = 8$ Hz) attribué au proton anomérique d'un glucuronide [15].
- Un doublet d'intensité 1H à δ_H 3,68 ppm ($J = 10$ Hz) attribué au proton osidique H-5".
- Des signaux intégrant pour 3H entre δ_H 3,42-3,62 ppm caractéristiques aux protons osidiques H-2", H-3" et H-4".
- Des signaux caractéristiques aux protons H-6 et H-8 du cycle A de la quercétol respectivement à δ_H 6,16 ppm et δ_H 6,35 ppm.
- Des signaux caractéristiques aux protons H-2', H-5' et H-6' du cycle B respectivement à δ_H 7,67 ppm, δ_H 6,81 ppm et δ_H 7,56 ppm.

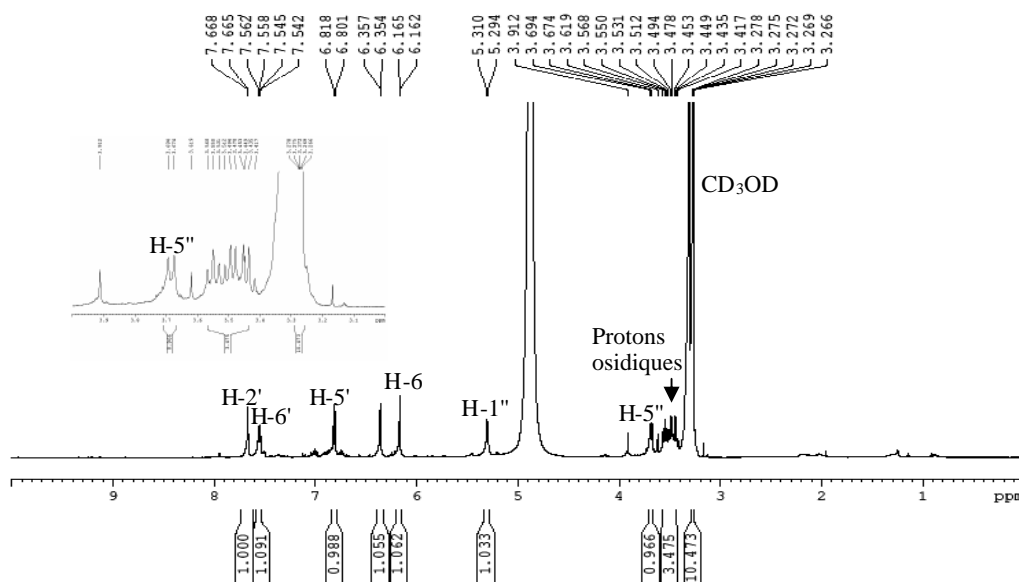


Figure III. 43: Spectre ^1H -RMN (500 MHz, MeOH-d4) du composé S7.

L'ensemble de ces informations avec les données spectrales de l'RMN ^{13}C (**Figure III. 44**) (**Tableau III. 7**), nous permet d'attribuer au composé S7 la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{13}$ avec un degré d'insaturation de 13.

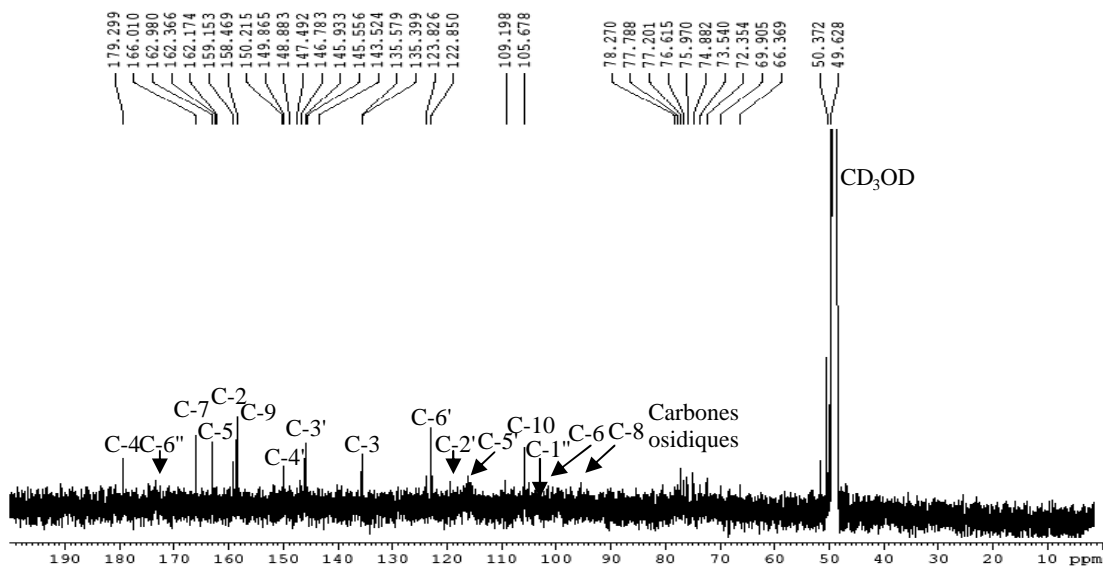


Figure III. 44: Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, MeOH-d₄) du composé S7.

L'attribution complète des signaux a pu être établie par l'analyse des spectres 2D HMQC (Figure III. 45), COSY (Figure III. 46) et HMBC (Figure III. 47).

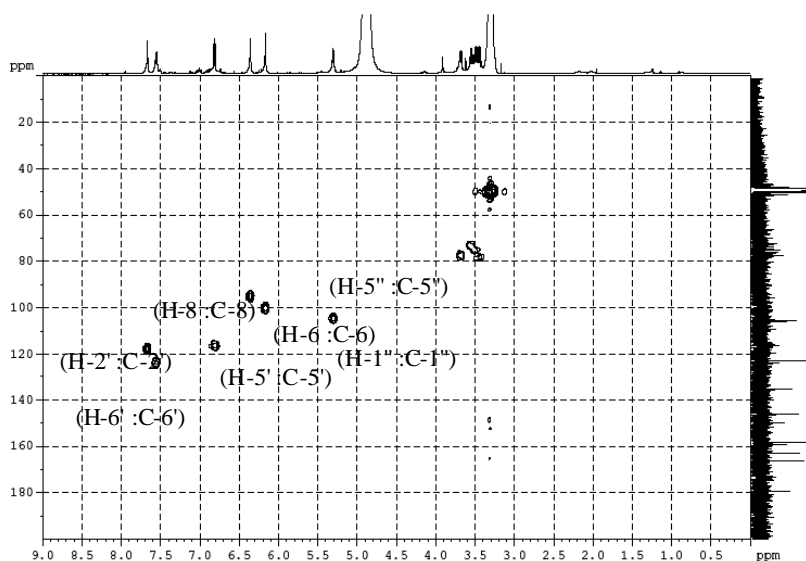


Figure III. 45: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMQC du composé S7.

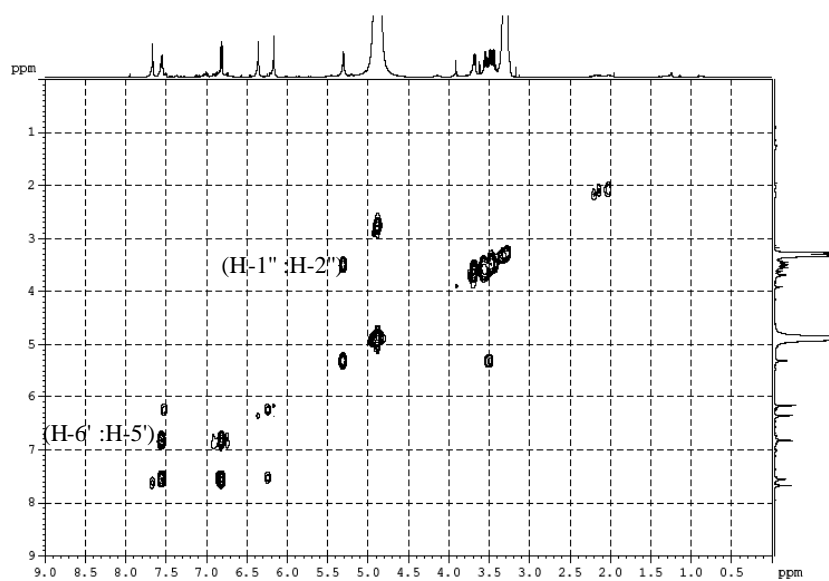


Figure III. 46: Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé S7.

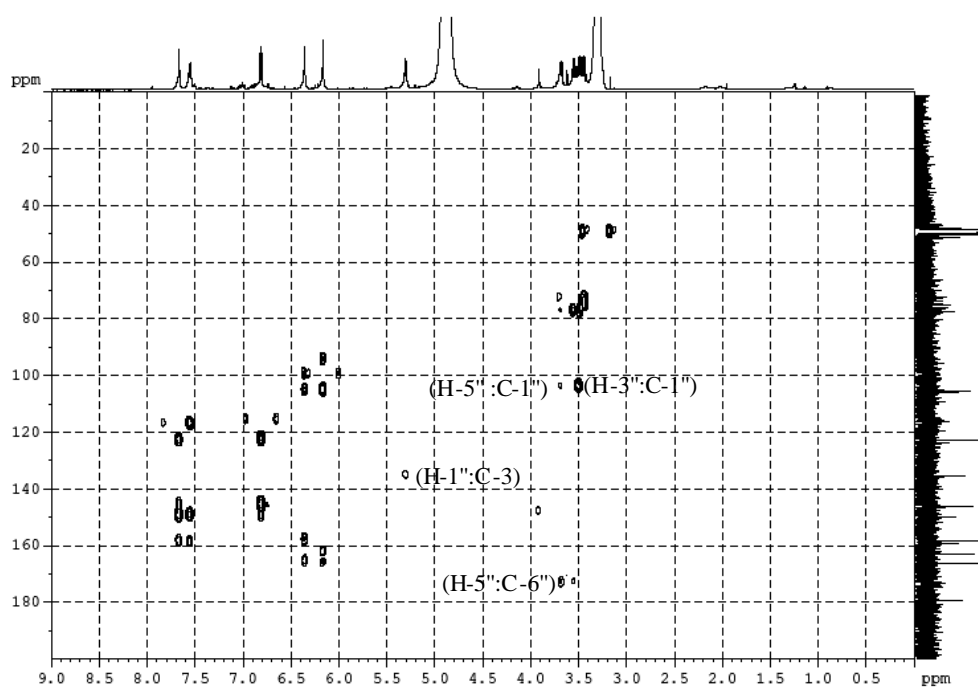


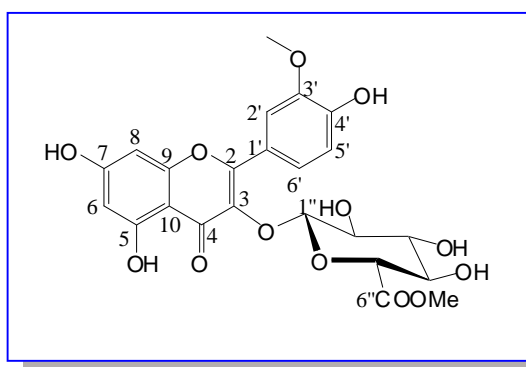
Figure III. 47: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S7.

| Position | δ_C (ppm) | δ_H (ppm) (integration, m, J Hz) | Correlations HMBC | Correlations COSY |
|---------------|---------------------|--|----------------------|----------------------|
| 2 | 159,2 | | | |
| 3 | 135,6 | | | |
| 4 | 179,3 | | | |
| 5 | 162,9 | | | |
| 6 | 99,9 | 6,16 (1H, d, $J = 1,5$) | C-8, C-10, C-5, C-7 | |
| 7 | 166,0 | | | |
| 8 | 94,8 | 6,35 (1H, d, $J = 1,5$) | C-6, C-10, C-9, C-7 | |
| 9 | 158,5 | | | |
| 10 | 105,7 | | | |
| 1' | 123,0 | | | |
| 2' | 117,7 | 7,67 (1H, d, $J = 1,5$) | C-1', C-4', C-2 | |
| 3' | 145,9 | | | |
| 4' | 149,8 | | | |
| 5' | 116,0 | 6,81 (1H, d, $J = 8,5$) | C-1', C-3' | H-6' |
| 6' | 122,8 | 7,56 (1H, dd, $J = 8,5, 1,5$) | C-2', C-4', C-2 | H-5' |
| 1'' | 104,3 | 5,30 (1H, d, $J = 8$) | C-3 | H-2'' |
| 2'', 3'', 4'' | 74,9; 77,2; 72,5 | 3,42-3,62 (3H, m) | | |
| 5'' | 76,6 | 3,68 (1H, d, $J = 10$) | C-6'' | |
| 6'' | 173,5 | | | |

Tableau III. 7: Données spectrales RMN du composé S7.

Sur la base de ces résultats, la structure du **composé S7** a pu être établie comme étant la **Quercétine-3-O- β -glucuronide** [16].

III. 1. 8. Détermination structurale du Composé S8



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune orange et d'une fluorescence violette noire sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|-------|---|
| R_f | 0,75 (AcOEt-H ₂ O-HCOOH 8:1:1) |
| t_R | 24,74 min |

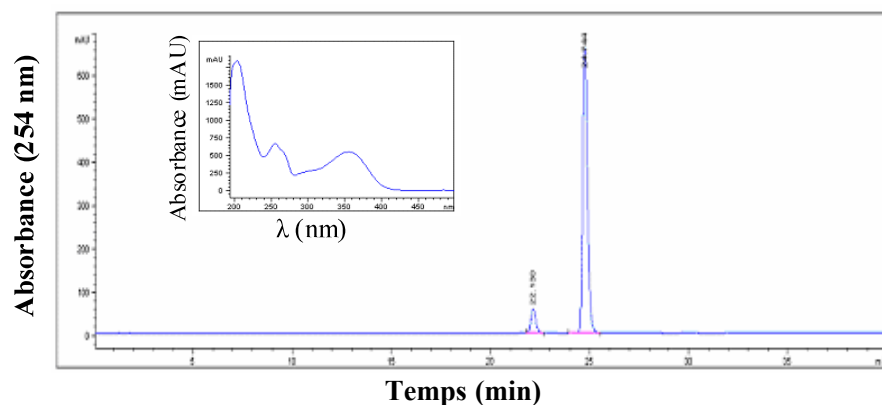


Figure III. 48: Chromatogramme CLHP et spectre UV-visible du **composé S8**.

L'analyse CLHP du composé S8 a montré que sa pureté est de 92 % à 254 nm et de 92,1 % à 350 nm.

Spectroscopie UV

Son spectre UV (**Figure III. 48**) présente deux maxima d'absorption à 255 nm et 356 nm, caractéristique d'une flavonol-3OR.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse obtenu en ESI/MS en mode positif (**Figure III. 49**) du composé S8 donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 529 $[M+Na]^+$ suggérant une masse moléculaire de 506 uma. Le spectre MS/MS de cet ion donne deux pics majoritaires à m/z 501 (perte de 28 uma) et à m/z 339 (perte de 190 uma).

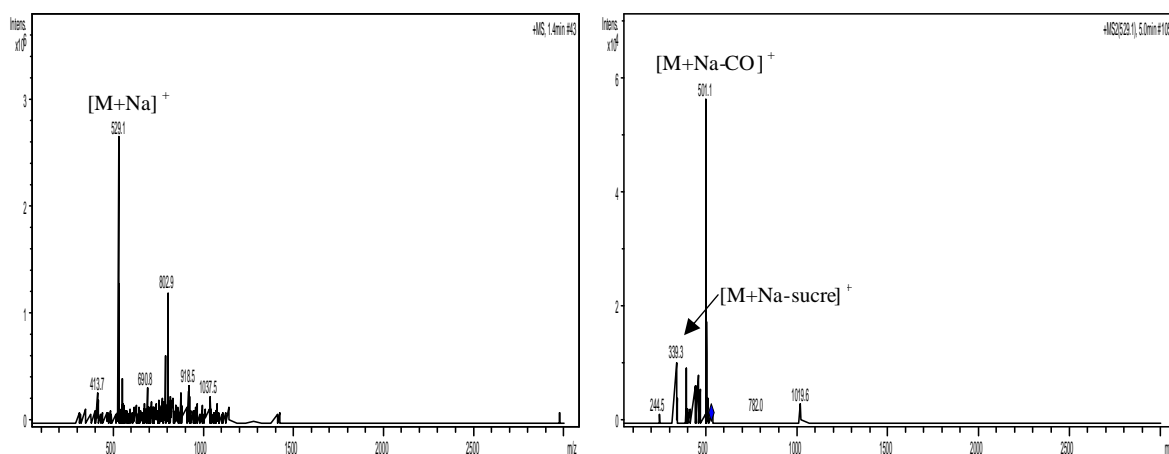


Figure III. 49: Spectre de masse ESIMS en mode positif du **composé S8**.

L'analyse du spectre RMN ^1H (**Figure III. 50**) du composé S8 présente les mêmes signaux que ceux du composé S6 avec un groupement méthoxyle de plus à δ_H 3,35ppm, ainsi le spectre montre :

- Un doublet intégrant pour 1H à δ_H 5,26 ppm ($J = 7,5$ Hz) attribué au proton anomérique d'un glucuronide [15, 16].
- Un doublet d'intensité 1H à δ_H 3,79 ppm ($J = 9,5$ Hz) caractéristique au proton osidique H-5'' du glucuronide.
- Des signaux intégrant pour 3H entre δ_H 3,47-3,57 ppm attribués aux protons osidiques H-2'', H-3'' et H-4'' du glucuronide.
- Deux singulets chacun d'intensité 3H à δ_H 3,35 ppm et δ_H 3,95 ppm caractéristiques aux protons de deux groupements méthoxyles.
- Des signaux entre δ_H 6,05-7,79 ppm relatifs aux protons des deux cycles A et B de l'aglycone, identiques à ceux du composé S6 (**Figure III. 43**).

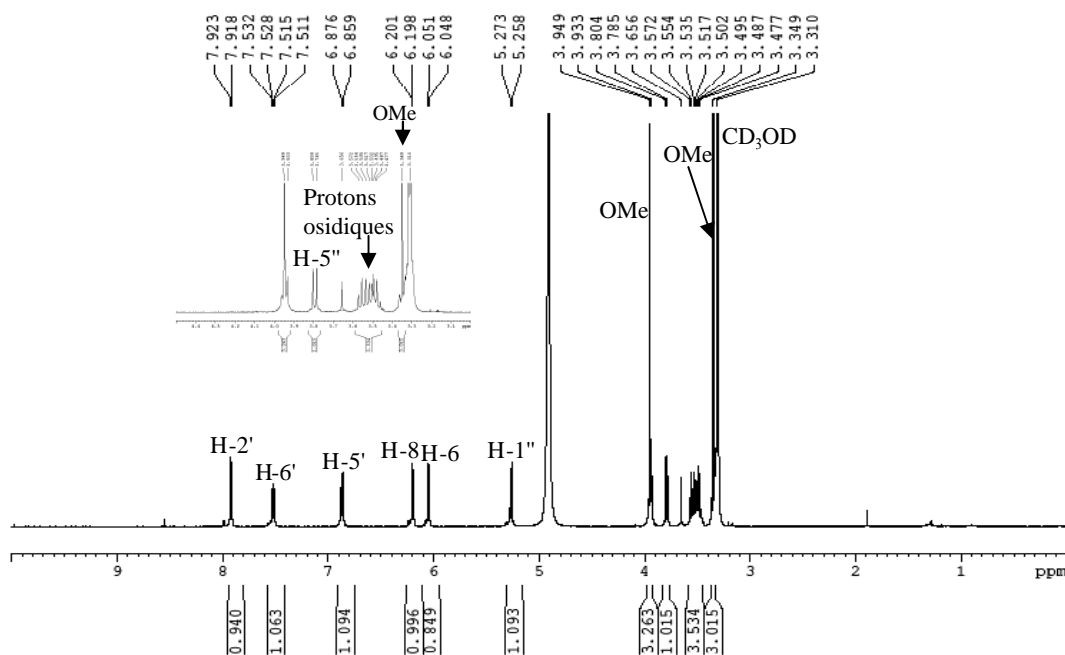


Figure III. 50: Spectre ^1H -RMN (500 MHz, MeOH-d₄) du composé S8.

L'analyse des deux spectres RMN ^{13}C (**Figure III. 51**) et DEPT 135 (**Figure III. 52**) avec les informations précédentes, nous permet de donner au composé S8 la formule brute $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{13}$ avec un degré d'insaturation de 13.

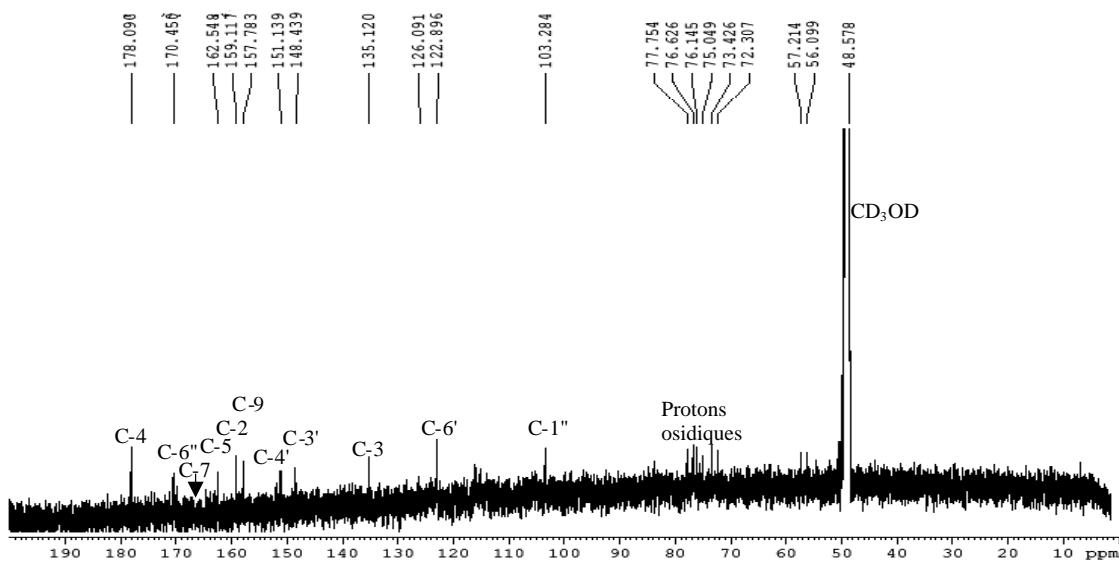


Figure III. 51: Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, MeOH-d4) du composé S8.

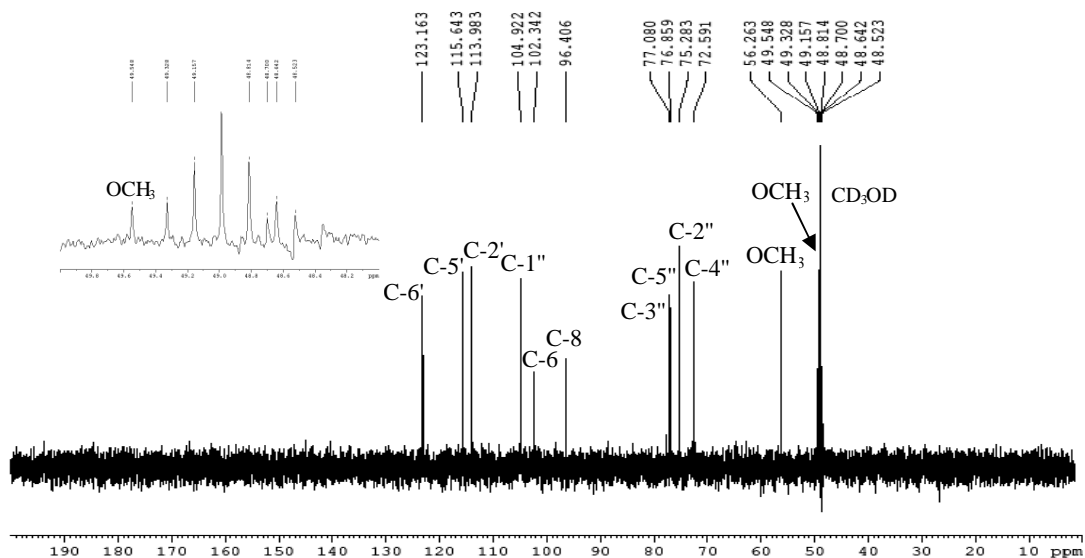


Figure III. 52 : Spectre DEPT 135 (125 MHz, MeOH-d4) du composé S8.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des corrélations homonucléaires COSY (Figure III. 53) et hétéronucléaires HMQC (Figure III. 54) et HMBC (Figure III. 55).

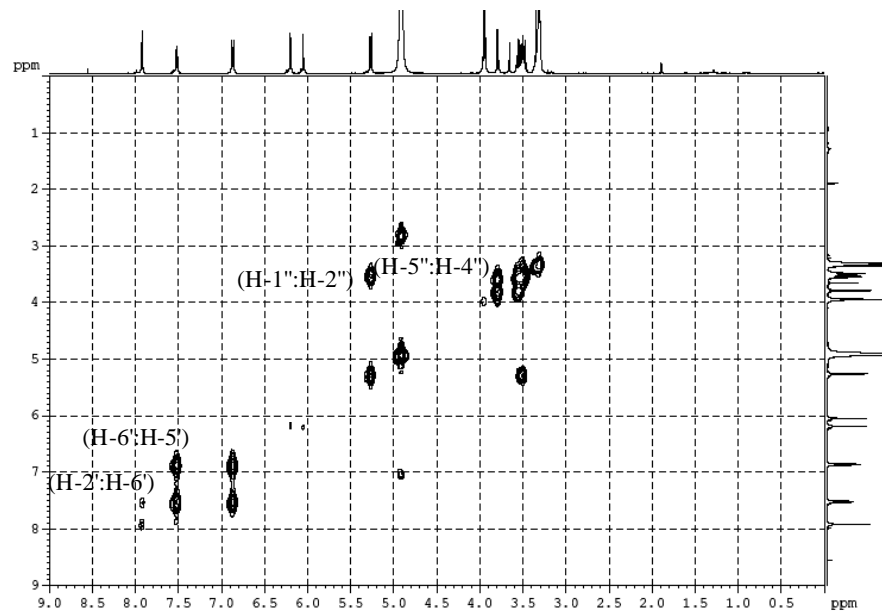


Figure III. 53: Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé S8.

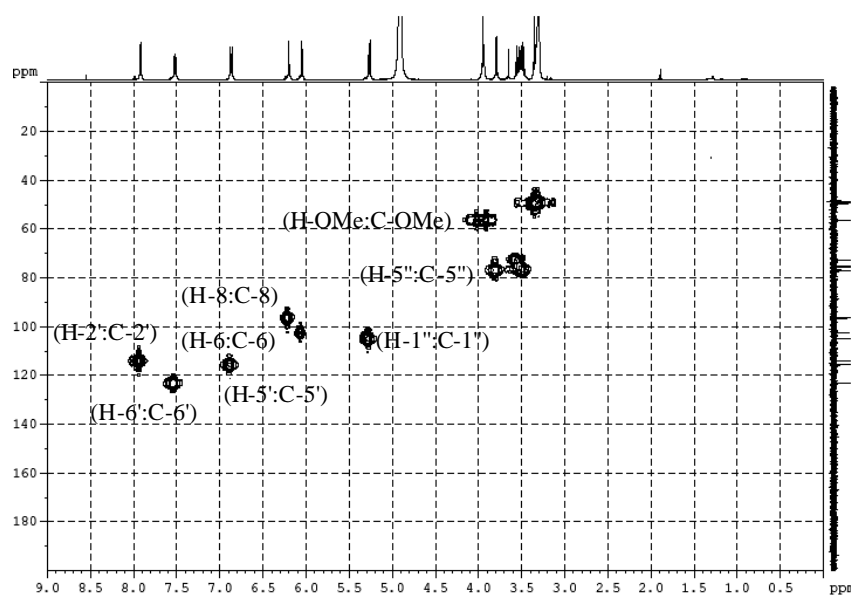


Figure III. 54: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S8.

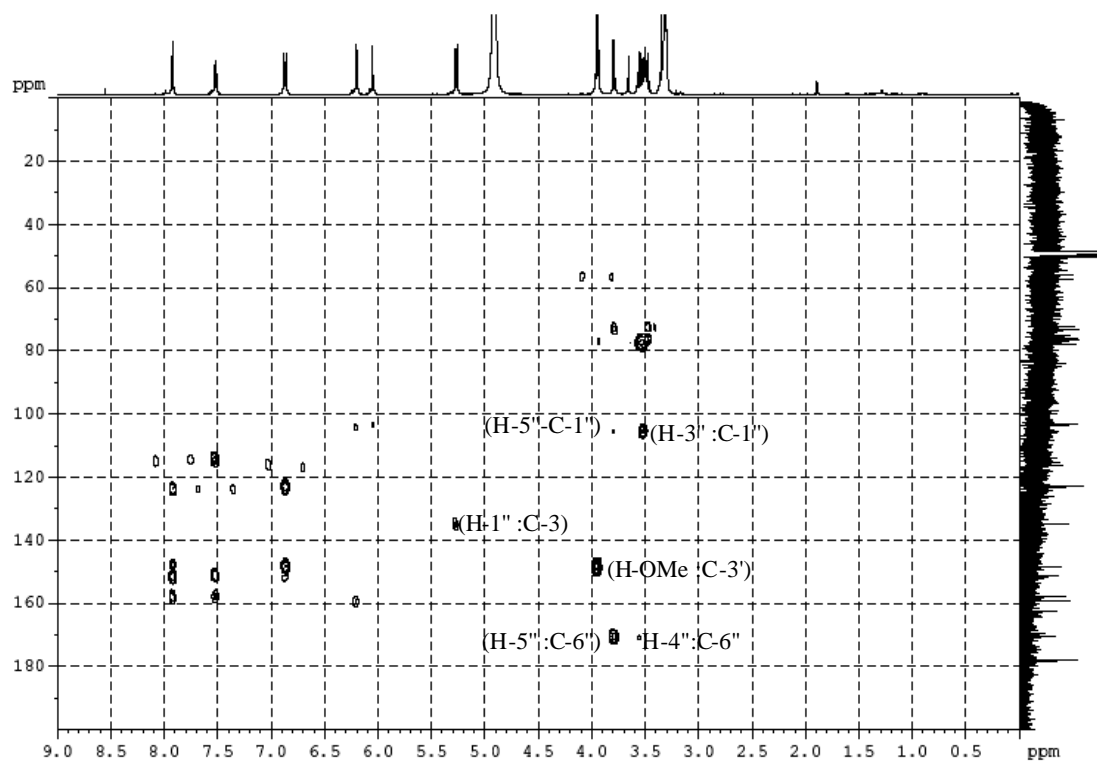


Figure III. 55: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S8.

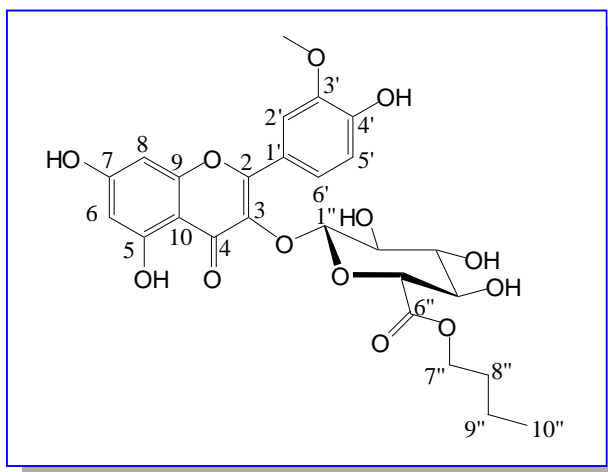
| Position | δ_C (ppm) | δ_H (ppm) (integration, m., J Hz) | Correlation HMBC | Correlation COSY |
|-------------------|------------------|---|--------------------------|---------------------|
| 2 | 159,1 | | | |
| 3 | 135,1 | | | |
| 4 | 178,1 | | | |
| 5 | 162,5 | | | |
| 6 | 102,3 | 6,05 (1H, d, $J = 1,5$) | C-10 | |
| 7 | 166,0 | | | |
| 8 | 96,8 | 6,20 (1H, d, $J = 1,5$) | C-9, C-10 | |
| 9 | 157,8 | | | |
| 10 | 103,5 | | | |
| 1' | 124,5 | | | |
| 2' | 114,0 | 7,92 (1H, d, $J = 2$) | C-1', C-3', C-4', C-2 | H-6' |
| 3' | 148,4 | | | |
| 4' | 151,1 | | | |
| 5' | 115,6 | 6,87 (1H, d, $J = 8,5$) | C-1', C-3', C-4' | H-6' |
| 6' | 123,2 | 7,52 (1H, dd, $J = 8,5; 2$) | C-2', C-4', C-2 | H-2', H-5' |
| 1'' | 104,9 | 5,26 (1H, d, $J = 7,5$) | C-3 | H-2'' |
| 2'', 3'', 4'' | 75,3; 77,1; 72,6 | 3,47-3,57 (3H, m) | | |
| 5'' | 76,9 | 3,79 (1H, d, $J = 9,5$) | C-1'', C-6'' | |
| 6'' | 170,8 | | | |
| O-CH ₃ | 49,5 | 3,35 (3H, s) | | |
| O-CH ₃ | 56,3 | 3,95 (3H, s) | C-3' | |

Tableau III. 8: Données spectrales RMN du **composé S8**.

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déduire la structure du **composé S8** [17]. Il s'agit de l'**Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide-6''-méthyle ester**. Ce composé n'a jamais été cité jusqu'au ce jour dans la littérature, même s'il est un artefact. Il s'agit donc d'un nouveau produit naturel [18].

III. 1. 9. La détermination structurale du **Composé S9** est en cours d'identification.

III. 1. 10. Détermination structurale du Composé S10



Ce composé est de couleur jaune, et de fluorescence violette noire sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|-------|---|
| R_f | 0.88 (AcOEt-H ₂ O-HCOOH 8 : 1 : 1) |
| t_R | 30.36 min |

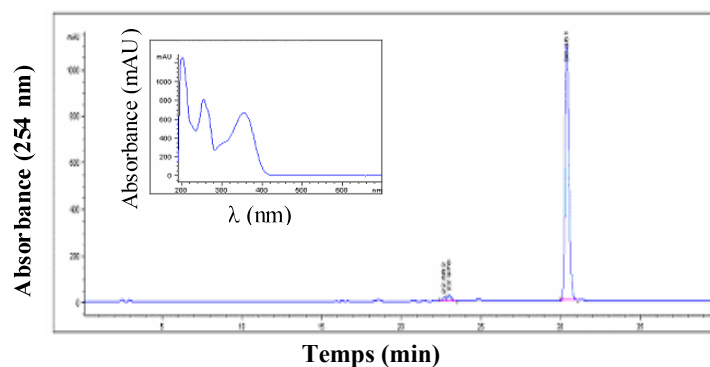


Figure III. 56 : Chromatogramme CLHP et spectre UV-visible du composé S10.

L'analyse CLHP du composé S10 a montré que sa pureté est de 96,7 % à 254 nm et de 94,3 % à 350 nm.

Spectroscopie UV

Les données du spectre UV (Figure III. 56) du composé S10 sont identiques à celles du composé S8 (Figure III. 48).

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse obtenu en ESI/MS en mode positif (**Figure III. 57**) du composé S10 donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 571 $[M+Na]^+$ suggérant une masse moléculaire de 548 uma.

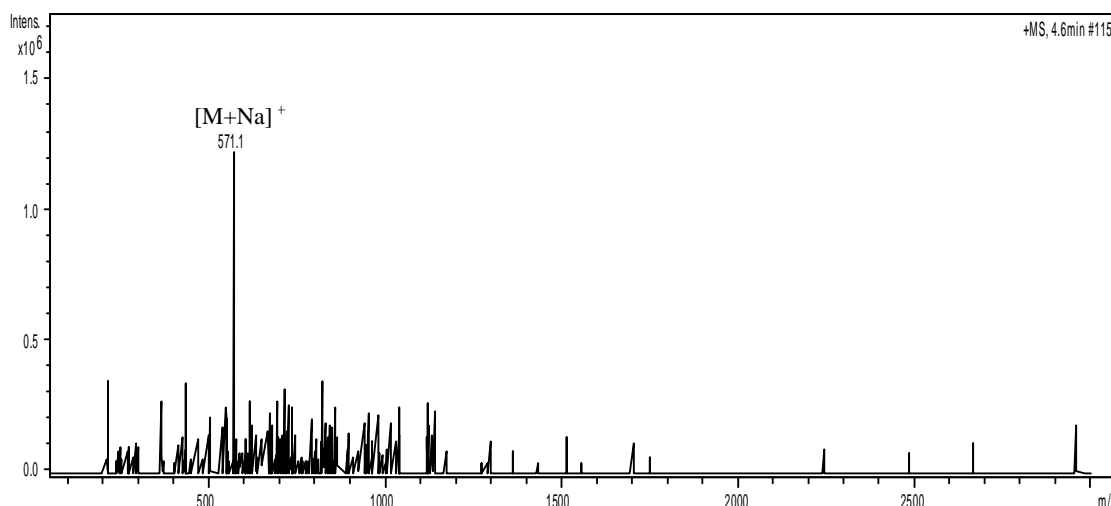


Figure III. 57: Spectre de masse ESI/MS en mode positif du **composé S10**.

L'étude des spectres de RMN ¹H et ¹³C ainsi que leur comparaison avec les spectres des composés précédents en particulier S6 (**Figure III. 43**) et S8 (**Figure III. 50**), confirme qu'il s'agit d'un dérivé d'isorhamnétine-3-*O*-glucuronide [16, 17] avec d'autres signaux résonnant dans les champs les plus élevés, ainsi le spectre RMN ¹H (**Figure III. 58**) les montre comme:

- Un triplet d'intensité 3H à δ_H 0,81 ppm ($J = 7,5$ Hz) attribué à un groupement méthyle.
- Un multiplet d'intensité 2H à δ_H 1,25 ppm attribué à un méthylène.
- Un multiplet d'intensité 2H à δ_H 1,49 ppm attribué à un méthylène.
- Un triplé intégrant pour 2H à δ_H 4,07 ppm suggérant la présence d'un méthylène attaché à un atome d'oxygène.

Ces quatre signaux sont caractéristiques d'un groupement butyle ester.

En ce qui concerne le groupement butyle ester, le spectre RMN ¹³C (**Figure III. 59**) révèle la présence de trois groupements méthylènes à δ_C 19,9 ppm, δ_C 31,5 ppm et δ_C 66,2 ppm, un groupement méthyle à δ_C 13,8 ppm et un groupement carbonyle à δ_C 169,9 ppm.

De plus, les spectres RMN ^{13}C et ^1H révèlent la présence d'un groupement méthoxyle aromatique respectivement à δ_{C} 56,7 ppm et δ_{H} 3,96 ppm.

L'ensemble de ces informations avec les données spectrales précédentes, nous permet d'attribuer au composé S10 la formule brute $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$ avec un degré d'insaturation de 13.

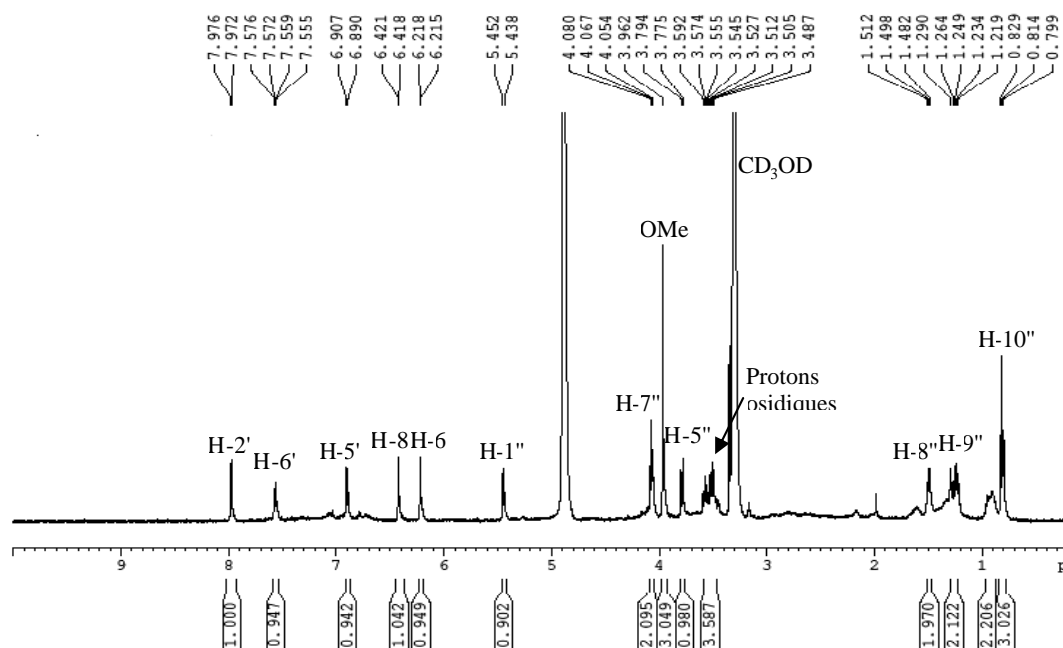


Figure III. 58 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, MeOH-d_4) du composé S10.

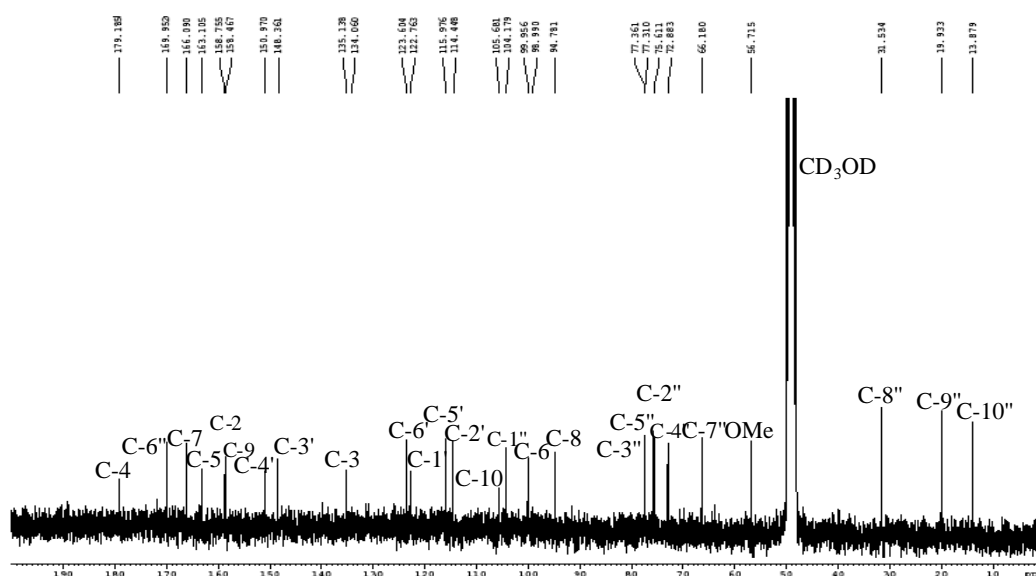
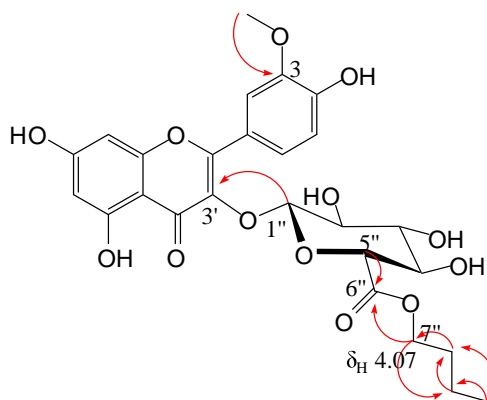


Figure III. 59 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH-d_4) du composé S10.

La mesure de corrélations hétéronucléaires HMBC (**Figure III. 60**) du composé S10 affirme la présence du groupement butyle ester en montrant clairement la corrélation du carbone carbonyle C-6'' à δ_C 169,9 ppm avec le proton H-5'' à δ_H 3,78 ppm et avec les protons méthyléniques (H-7'') à δ_H 4,07 ppm.



Corrélations HMBC

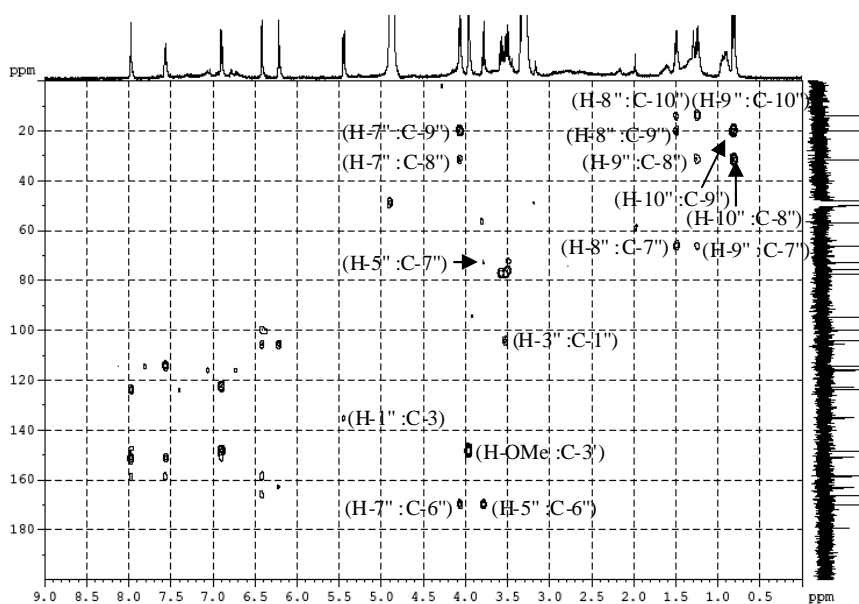


Figure III. 60 : Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S10.

L'attribution complète des signaux a été faite par les spectres RMN 2D HMQC (**Figure III. 61**) et COSY ^1H , ^1H (**Figure III. 62**).

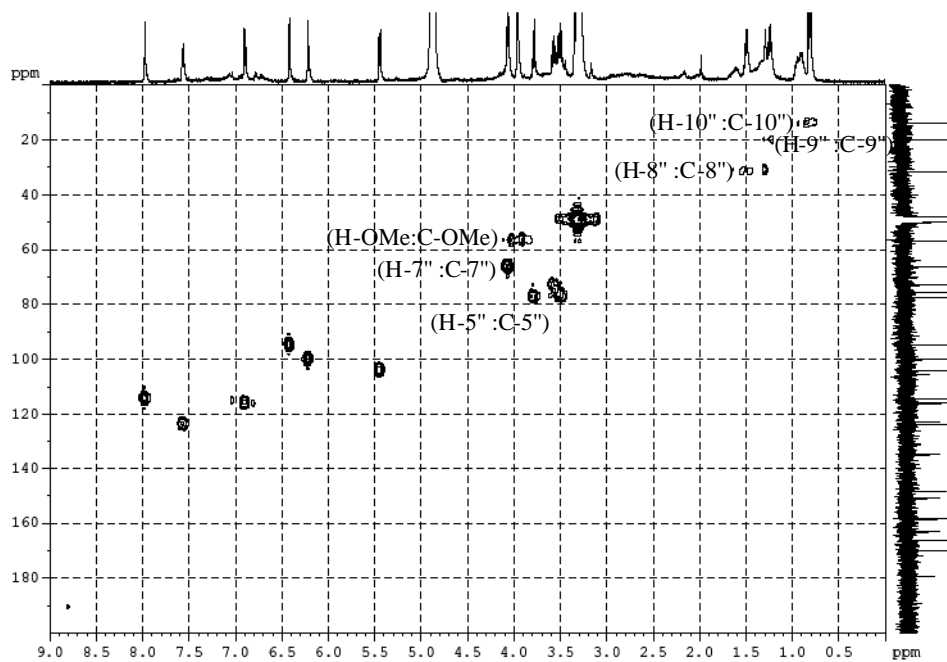


Figure III. 61: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S10.

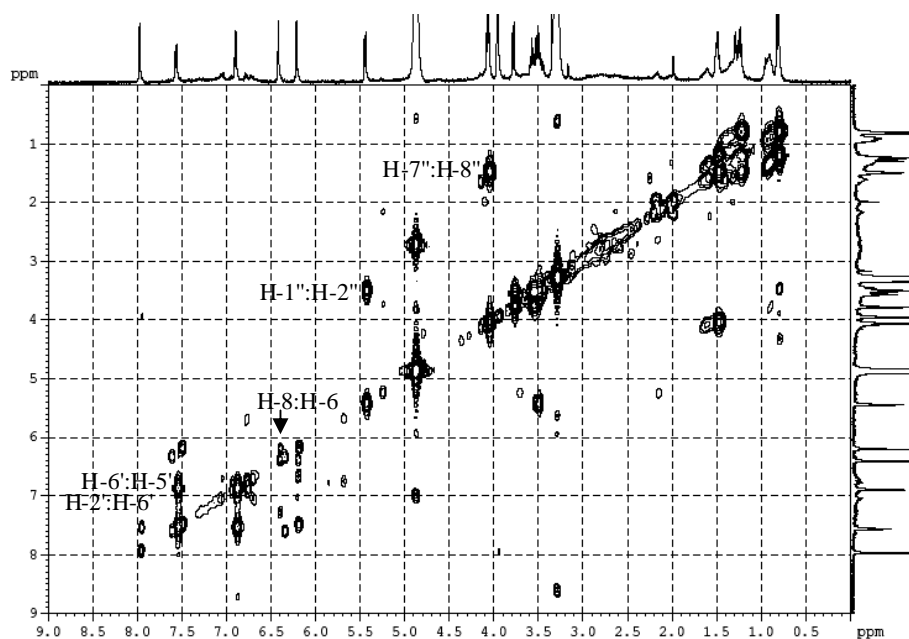


Figure III. 62: Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé S10.

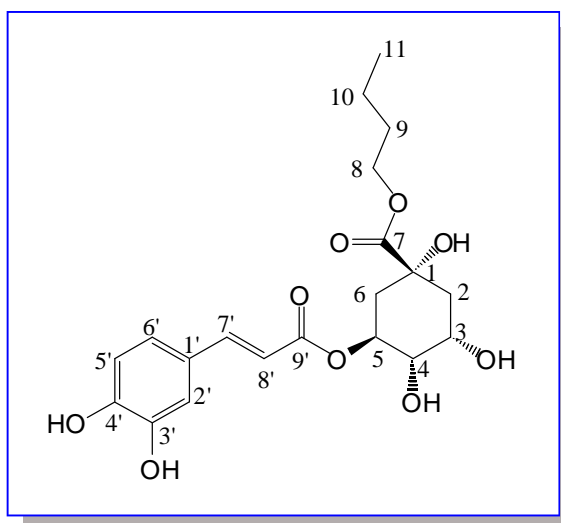
| Position | δ_C (ppm) | δ_H (ppm) (integration, m., J Hz) | Correlations HMBC | Correlations COSY |
|-------------------|------------------|---|--------------------------|----------------------|
| 2 | 158,7 | | | |
| 3 | 135,2 | | | |
| 4 | 179,2 | | | |
| 5 | 163,1 | | | |
| 6 | 99,9 | 6,22 (1H, d, $J = 1,5$) | C-5, C-10 | H-6 |
| 7 | 166,1 | | | |
| 8 | 94,8 | 6,42 (1H, d, $J = 1,5$) | C-6, C-7, C-9 | H-8 |
| 9 | 158,5 | | | |
| 10 | 105,7 | | | |
| 1' | 122,7 | | | |
| 2' | 114,5 | 7,97 (1H, d, $J = 2$) | C-2, C3', C-4', C-6' | H-6' |
| 3' | 148,4 | | | |
| 4' | 150,9 | | | |
| 5' | 115,9 | 6,90 (1H, d, $J = 8,5$) | C-1', C-3' | H-6' |
| 6' | 123,6 | 7,56 (1H, dd, $J = 8,5; 2$) | C-2, C-2', C-4' | H-5' |
| 1'' | 104,2 | 5,44 (1H, d, $J = 7$) | C-3 | H-2'' |
| 2'', 3'', 4'' | 75,6; 77,3; 72,9 | 3,48-3,59 (3H, m) | | |
| 5'' | 77,4 | 3,78 (1H, d, $J = 9,5$) | C-6'', C-7'' | |
| 6'' | 169,9 | | | |
| 7'' | 66,2 | 4,07 (2H, t, $J = 6,5$) | C-6'' | H-7'' |
| 8'' | 31,5 | 1,49 (2H, m) | C-7'', C-9'', C- 10'' | H-8'' |
| 9'' | 19,9 | 1,25 (2H, m) | C-7'', C-8'', C- 10'' | |
| 10'' | 13,8 | 0,1 (3H, t, $J = 7,5$) | C-8'', C-9'' | |
| O-CH ₃ | 56,7 | 3,96 (3H, s) | C-3' | |

Tableau III. 9 : Données spectrales RMN du composé **S10**.

L'ensemble des données précédentes a permis d'établir la structure du composé **S10**, il s'agit de l'**Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide-6''- butyle ester** [17].

Ce composé n'a jamais été cité jusqu'à ce jour dans la littérature, même s'il est un artefact. Il s'agit donc d'un nouveau produit naturel.

III. 1. 11. Détermination structurale du Composé S11



Ce composé se présente sous forme d'une huile de couleur marron et d'une fluorescence jaune verre sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique

| | |
|----------------|---|
| R _f | 0,89 (AcOEt-H ₂ O-HCOOH 8:1:1) |
| t _R | 23,04 min |

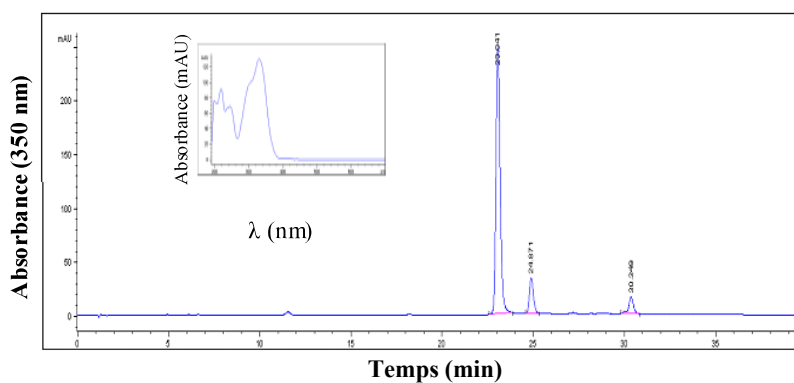


Figure III. 63: chromatogramme CLHP et spectre UV-visible du composé S11.

L'analyse CLHP du composé S11 a montré que sa pureté est de 18,7 % à 254 nm et de 83,4 % à 350 nm.

Spectroscopie UV

Les données du spectre UV (Figure III. 63) du composé S11 sont identiques à celles du composé S3.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse obtenu en ESI/MS réalisé en mode négatif (**Figure III. 65**) présente un ion quasi-moléculaire à m/z 409 $[M-H]^-$ et un autre pic à m/z 819 $[2M-H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 410 uma.

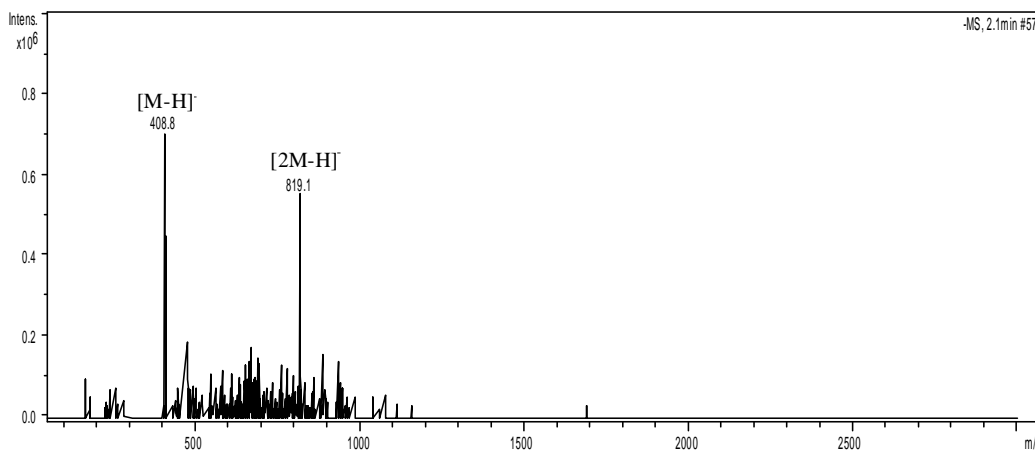


Figure III. 65 : Spectre de masse ESI/MS en mode négatif du composé **S11**.

L'étude comparative des spectres RMN 1H et ^{13}C des composés S11 et S3 indique que le composé S11 est un acide 5-*O*-cafféoyl quinique (**Tableau III. 10**) [9].

Une deuxième étude comparative des spectres RMN 1H et ^{13}C des composés S10 et S11 révèle la présence d'un groupement butyle ester dans ce dernier composé. Ainsi, le spectre RMN 1H (**Figure III. 65**) du composé S11 présente les signaux du groupement butyle ester comme :

- Un triplet intégrant pour 3H à δ_H 0,93 ppm ($J = 7,5$ Hz) attribué à un groupement méthyle.
- Un multiplet d'intensité 2H à δ_H 1,36 ppm (m) attribué au méthylène H-10.
- Un multiplet d'intensité 2H à δ_H 1,63 ppm (m) attribué à un méthylène H-9.
- Un multiplet intégrant pour 2H entre δ_H 4,14-4,16 ppm au méthylène H-8.

Ceci est confirmé par l'analyse des données du spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 66**) (**Tableau III. 10**) du composé S11.

Par ailleurs, toutes ces données spectrales nous permettent d'attribuer au composé S11 la formule brute $C_{20}H_{26}O_9$ avec un degré d'insaturation de 8.

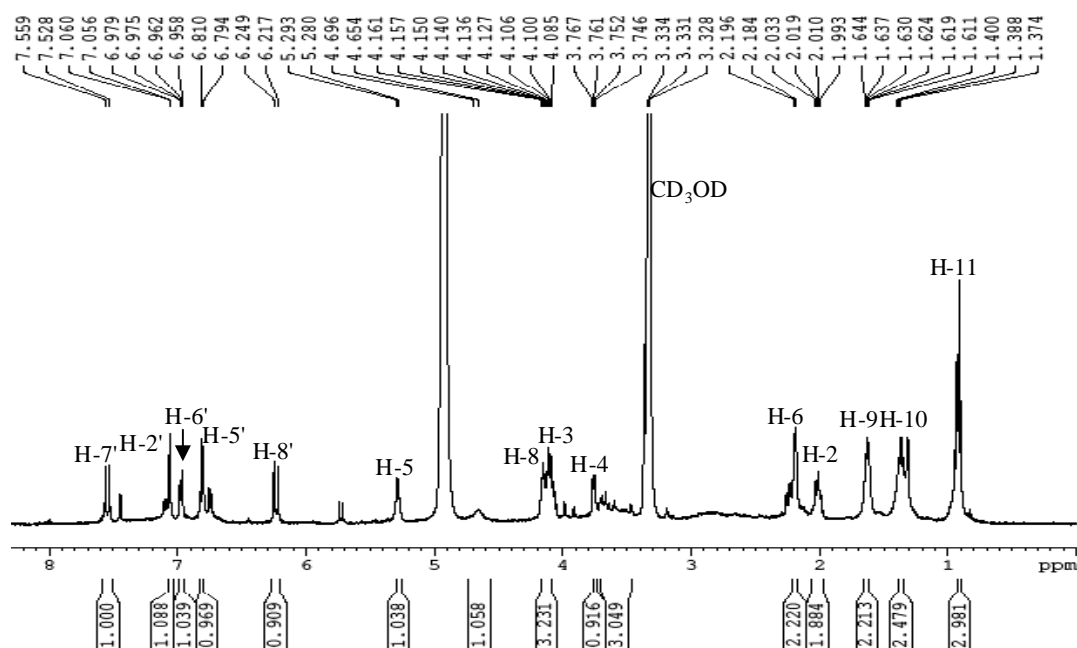


Figure III. 65 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, MeOH- d_4) du composé S11.

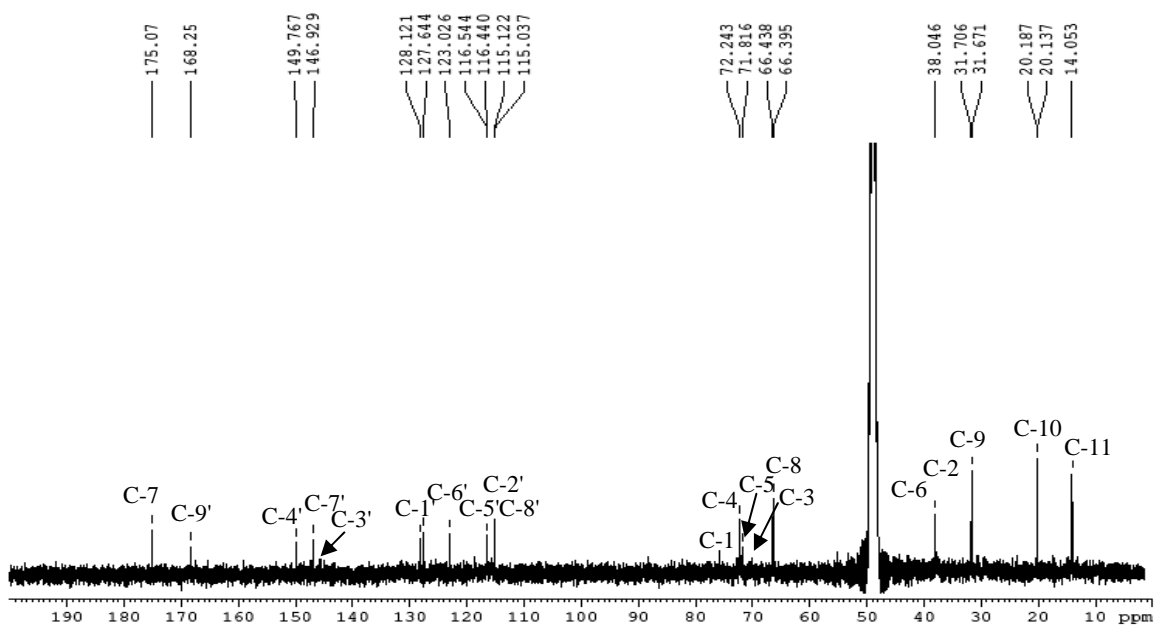
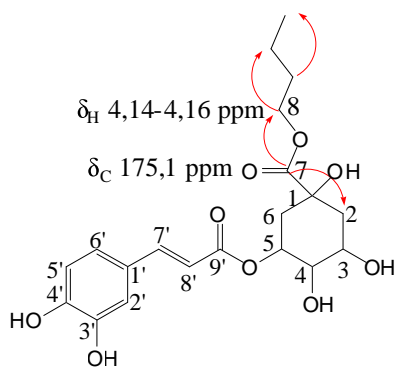


Figure III. 66: Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, MeOH- d_4) du composé S11.

L'analyse du spectre RMN 2D HMBC (Figure III. 67) du composé S11 confirme la présence du groupement butyle ester en montrant clairement la corrélation du carbone C-7 du carbonyle à δ_C 175,1 ppm avec les protons du méthylène (H-8) situé entre δ_C 4,14 et 4,16 ppm.



Corrélations HMBC

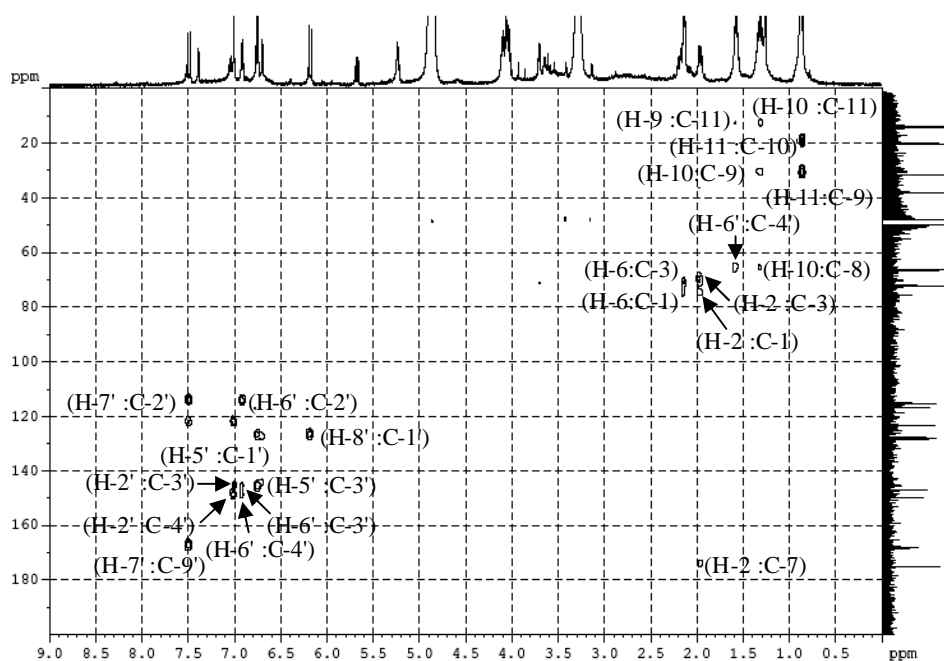


Figure III. 67: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S11.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par les spectres RMN 2D HMQC (Figure III. 68) et COSY 1H , 1H (Figure III. 69).

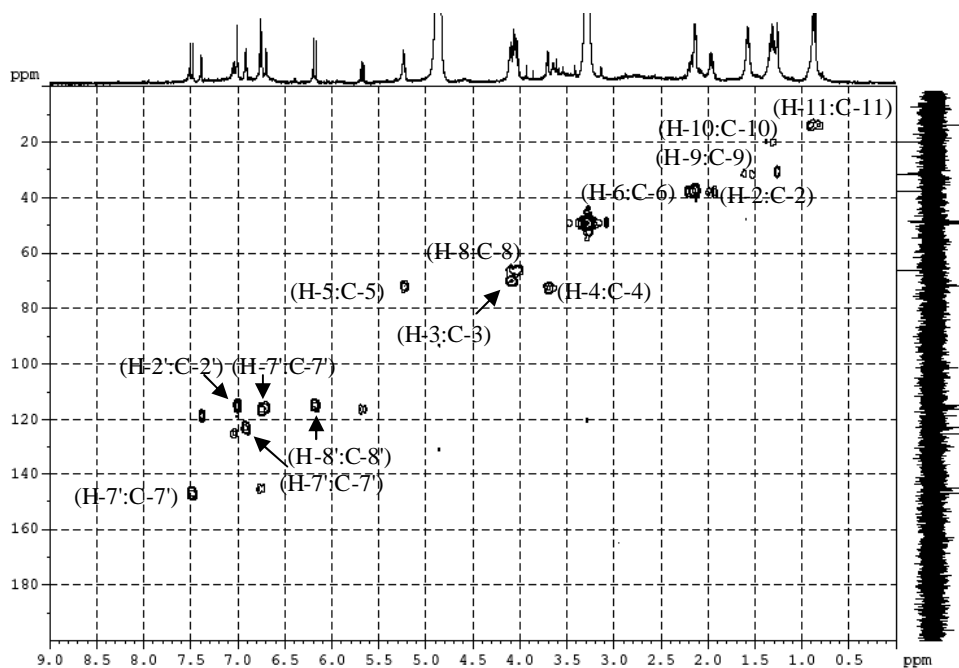


Figure III. 68: Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé S11.

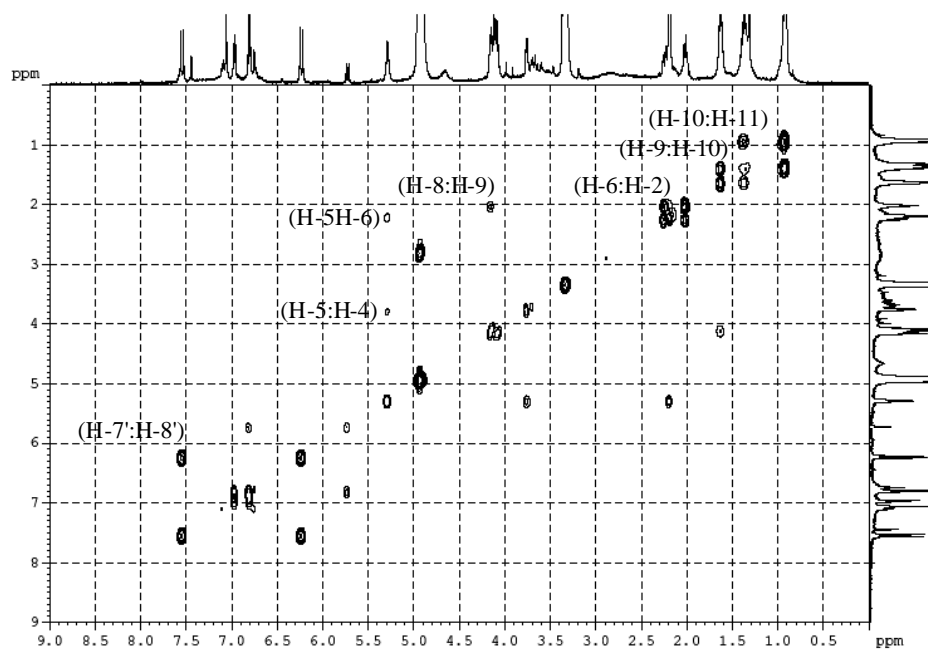


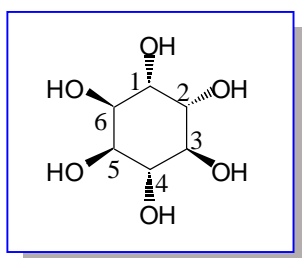
Figure III. 69: Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé S11.

| Position | δ_c (ppm) | δ_H (ppm) (intégration, m., J en Hz) | Corrélations HMBC | Corrélations COSY |
|----------|---------------------|--|----------------------|----------------------|
| 1 | 76,0 | | | |
| 2 | 38,1 | 1,99-2,03 (2H, m) | C-1, C-3 | |
| 3 | 70,5 | 4,10 (1H, m) | | |
| 4 | 72,4 | 3,76 (1H, dd, $J = 7,5; 3$) | | H-5 |
| 5 | 71,8 | 5,32 (1H, m) | | H-4, H-6 |
| 6 | 38,1 | 2,18-2,19 (2H, m) | C-1, C-6 | H-5 |
| 7 | 175,1 | | | |
| 8 | 66,4 | 4,18 (2H, m) | | H-9 |
| 9 | 31,7 | 1,63 (2H, m) | C-8 | H-8, H-10 |
| 10 | 20,2 | 1,36 (2H, m) | C-8 | H-9, H-11 |
| 11 | 14,1 | 0,93 (3H, t, $J = 7,5$) | C-9, C-10 | H-10 |
| 1' | 127,6 | | | |
| 2' | 115,1 | 7,06 (1H, d, $J = 2$) | C-3', C-4' | |
| 3' | 146,0 | | | |
| 4' | 149,7 | | | |
| 5' | 116,4 | 6,80 (1H, m) | C1', C-3' | |
| 6' | 123,0 | 6,96 (1H, dd, $J = 8,3; 2$) | C-2', C-3', C-4' | |
| 7' | 146,9 | 7,54 (1H, d, $J = 15,7$) | C-2', C-9' | H-8' |
| 8' | 115,0 | 6,23 (1H, d, $J = 15,7$) | C-1' | H-7' |
| 9' | 168,3 | | | |

Tableau III. 10: Données spectrales RMN du composé S11.

L'ensemble des données précédentes a permis d'établir la structure du **composé S11**, il s'agit de l'**Acide-5-O-caféoyl quinique butyle ester**. Notons que, le pouvoir rotatoire mesuré du **composé S11** est : $[\alpha]_D = -125^\circ$, MeOH, $c = 0,016$.

III. 1. 12. Détermination structurale du Composé S12



Ce composé se présente sous forme d'une poudre de couleur blanche.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse obtenu en ESI/MS en mode positif (**Figure III. 70**) montre un pic pseudo-moléculaire à m/z 383 $[2M+Na]^+$ et un autre pic à m/z 203 $[M+Na]^+$, suggérant une masse moléculaire de 180 uma.

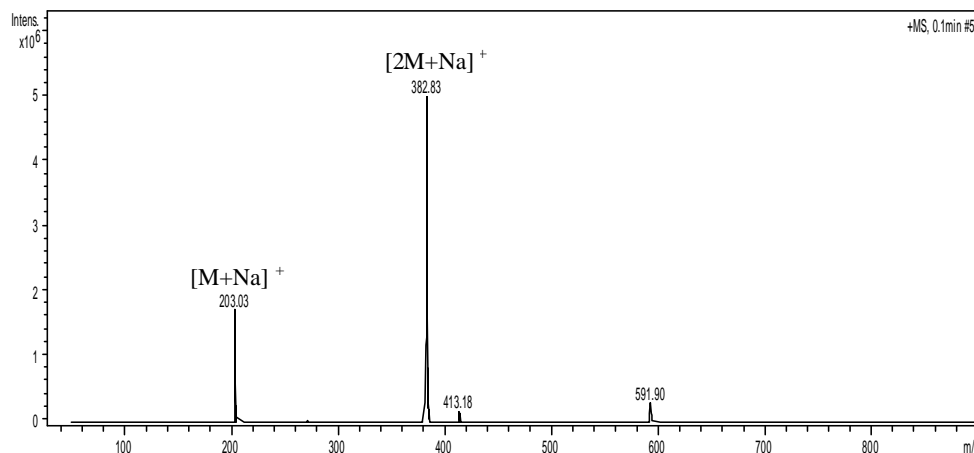


Figure II. 70 : Spectre de masse réalisé en ESI/MS en mode positif du **composé S12**.

Le spectre RMN 1H (**Figure III. 71**) donne:

- Trois signaux à δ_H 4,62 ppm (2H, d, $J = 2$ Hz), 4,44 ppm (2H, s) et 4,32 ppm (2H, d, $J = 5,5$ Hz) relatifs aux groupements hydroxyles respectivement OH (1, 6), OH (3, 4) et OH (2, 5) [19]. Ceci est expliqué par la disparition de ces signaux dans le spectre RMN 1H réalisé dans le D_2O (**Figure III. 72**) [19].
- Trois signaux à δ_H 3,63 ppm (2H, s), 3,40 ppm (2H, m) et 3,25 ppm (2H, m), attribuables respectivement aux protons; (H-1, H-6), (H-2, H-5) et (H-3, H-4) [19]

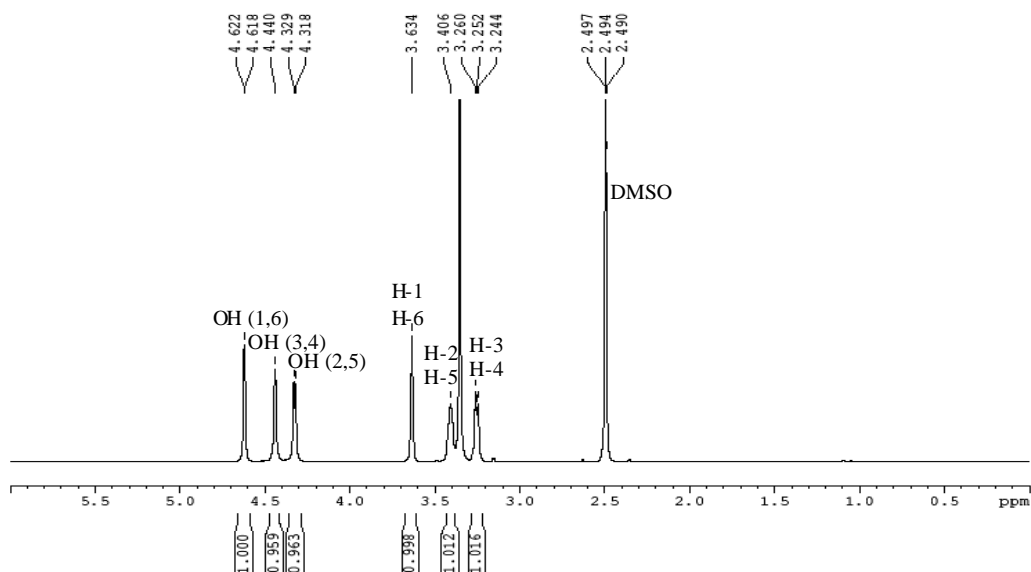


Figure III. 71: Spectre RMN 1H (500 MHz, DMSO) du **composé S12**.

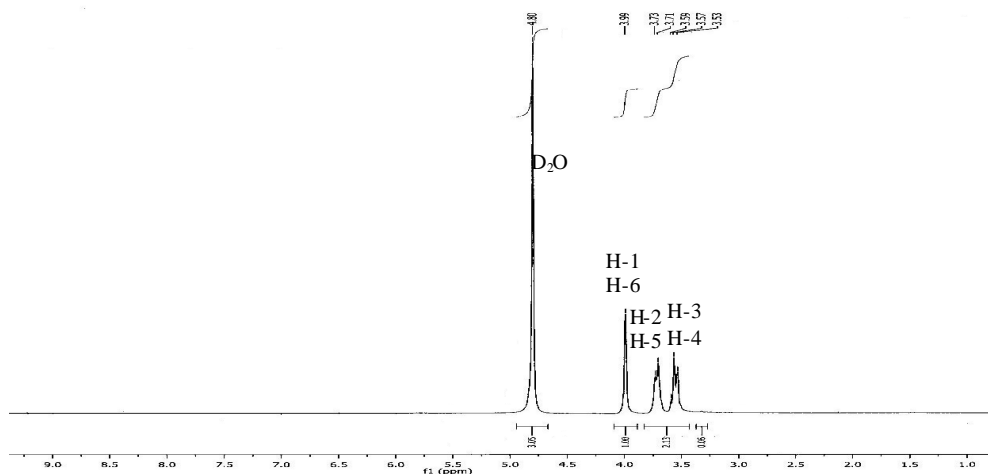


Figure III. 72: Spectre RMN ^1H (500 MHz, D_2O) du composé S12.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (**Figure III. 73**) du composé S12 montre la présence de trois signaux à δ_{C} 73,3 ppm, 72,4 ppm et 70,8 ppm attribuables respectivement aux carbones (C-3, C-4), (C-1, C-6) et (C-2, C-5) [20].

En outre la séquence COSY (**Figure III. 74**), a pu démontrer l'attribution complète des corrélations proton-proton.

Par ailleurs, toutes ces données spectrales nous permettent d'attribuer au composé S12 la formule brute $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ avec un degré d'insaturation de 1.

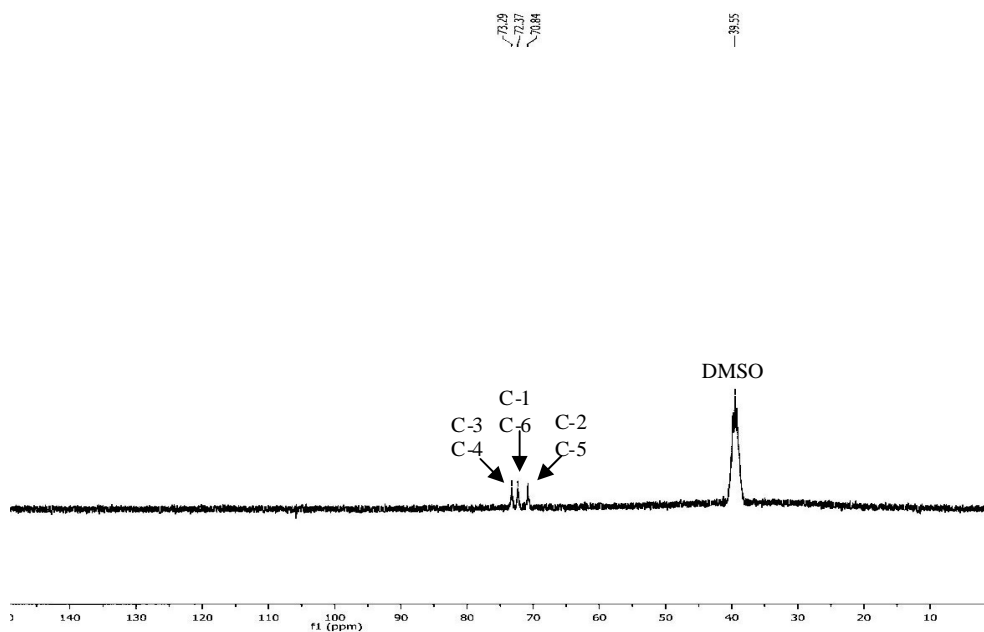


Figure III. 73: Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO) du composé S12.

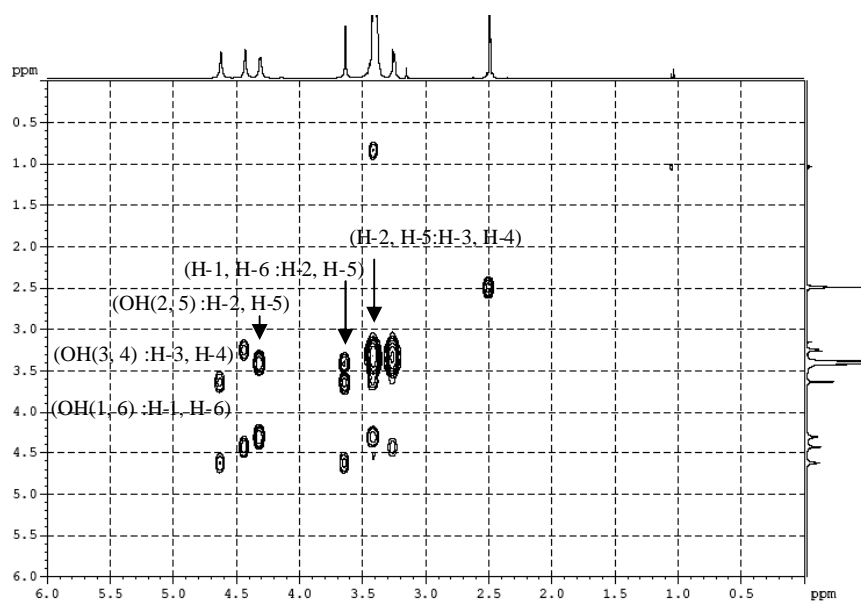
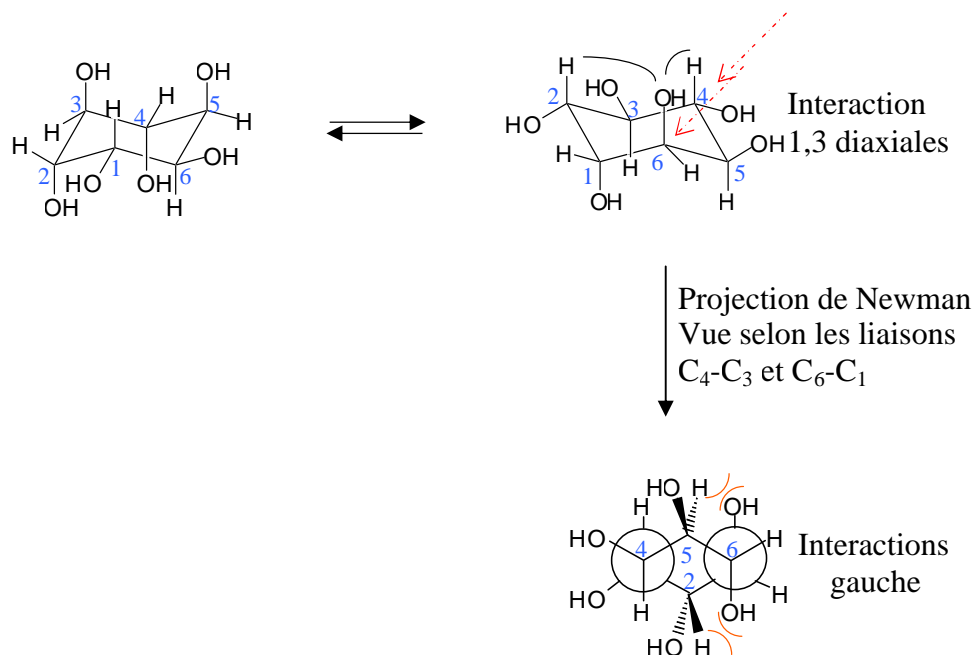


Figure III. 74: Spectre de corrélations homonucléaires COSY du **composé S12**.

| Position | RMN ¹³ C δ_C (ppm) | RMN ¹ H δ_H (ppm) [intégration, m., J (Hz)] | Corrélations COSY |
|----------|---|--|----------------------|
| 1 | 72,4 | 3,63 (1H, s) | H-2 |
| 2 | 70,8 | 3,41 (1H, m) | H-3, H-1 |
| 3 | 73,3 | 3,25 (1H, d, m) | H-2 |
| 4 | 73,3 | 3,25 (1H, d, m) | H-5 |
| 5 | 70,8 | 3,41 (1H, m) | H-4, H-6 |
| 6 | 72,4 | 3,63 (1H, s) | H-5 |
| OH(1, 6) | | 4,62 (2H, d, $J = 2$) | H-1, H-6 |
| OH(2, 5) | | 4,44 (2H, s) | H-2, H-5 |
| OH(3, 4) | | 4,32 (2H, d, $J = 5,5$) | H-3, H-4 |

Tableau III. 11: Données spectrales RMN dans le DMSO du **composé S12**.

La stéréochimie du hexahydroxyle cyclohexane a pu être établie on se basant sur les données de la littérature qu'on peut l'expliquer comme suit :

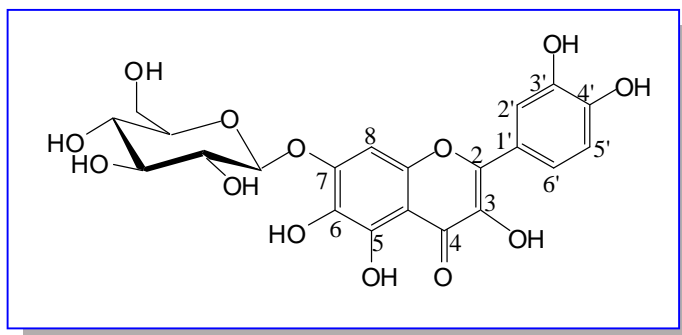


Selon la projection de Newman les -OH équivalents sont : OH-1 et OH-6, OH-2 et OH-5, OH-3 et OH-4. Ainsi, H-1 et H-6, H-2 et H-5, H-3 et H-4 sont équivalents.

La mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = -50^\circ$, H_2O , $c = 0,04$) avec l'ensemble des données précédentes a permis d'établir la structure du **composé S12**, il s'agit de : le (-)-L-*chiro*-Inositol [20].

III. 2. Détermination structurale des composés isolés de *Chrysanthemum myconis* L.

III. 2. 3. Détermination structurale du composé C1



Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune et de fluorescence jaune sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique

| | | | |
|----------------------------|---------|------|------------------------|
| Systèmes de solvants | S.I | S.II | Remarques |
| R_f | 0,24 | 0,36 | Aglycone monoglycosylé |
| Fluorescence sous lampe UV | Jaune | | Flavonol 3-OH libre |
| Ose | Glucose | | Après hydrolyse acide |

Tableau III. 12 : Comportement chromatographique **du composé C1.**

Spectroscopie UV

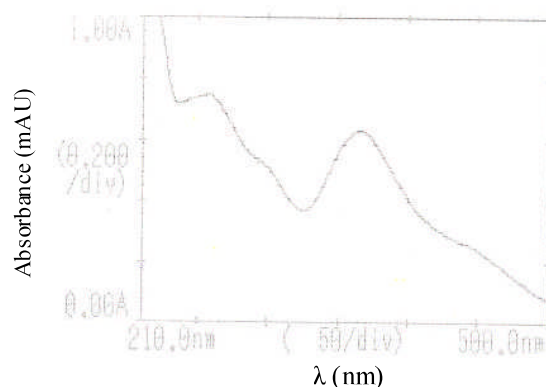


Figure III. 75 : Spectre UV-visible du **composé C1.**

| Réactifs | Bande II | Bande I | Remarques |
|-------------------------|----------|------------------------------------|-----------------------------------|
| MeOH | 259 | 366 | Flavonol-3-OH |
| NaOH | 296 | 454 | 4'-OH, 7-OR |
| NaOH après 5 min | 296 | Spectre se décompose avec le temps | 3, 4' di-OH |
| AlCl ₃ | 281 | 424 | Orthodi-OH sur le noyau B |
| AlCl ₃ + HCl | 274 | 390 | 5-OH Orthodi-OH sur le noyau A |

Tableau III. 13: Analyse spectroscopie UV du **composé C1** en présence de réactifs.

Le spectre d'absorption UV dans le méthanol (**Figure III. 75**) montre deux maxima à 259 nm et 366 nm relatif à la bande I et la bande II d'un flavonol-3-OH libre, ce qui est confirmé par la couleur jaune du composé C1 sous lampe UV à 365 nm [10].

Le spectre méthanol après addition de NaOH présente un déplacement bathochrome de 88 nm de la bande I par rapport au spectre méthanol avec diminution de la densité optique ce qui révèle la présence de 3, 4'-OH libres (spectre se décompose avec le temps). La non apparition d'une nouvelle bande dans le même spectre montre que la position 7 est substituée (7-OR).

Le spectre méthanol en présence d' AlCl_3 présente un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanol neutre ce qui montre la présence de complexes. Le spectre $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ présente un déplacement hypsochrome de la bande I par rapport au spectre AlCl_3 de 35 nm ce qui révèle la présence d'un système orthodihydroxyle sur le noyau B. le même spectre montre un déplacement bathochrome de la bande I de 24 nm par rapport au spectre méthanol ce qui indique à la présence d'un 5-OH avec un groupement oxygéné en 6.

Le comportement chromatographiques du composé C1 dans les deux systèmes de solvants S.I et S.II, indique à la présence d'un aglycone monoglycosylé.

Spectroscopie RMN

Le spectre RMN ^1H (300 MHz dans le MeOH-d4) (**Figure III. 76**) montre :

- Trois signaux d'intensité chacun 1H à δ_H 7,67 ppm ($J = 2,2$ Hz), δ_H 7,57 ppm (dd, $J = 8,5, 2,2$ Hz) et δ_H 6,78 ppm (d, $J = 8,5$ Hz), caractéristiques respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du noyau B.
- Un singlet intégrant pour 1H à δ_H 6,85 ppm attribuable au proton H-8 du cycle A.
- Un doublet intégrant pour 1H à δ_H 4,95 ppm ($J = 7,5$ Hz) caractéristique du proton anomérique du glucose.
- Des signaux entre δ_H 3,39-3,84 ppm relatif aux protons osidiques du glucose [21].

Afin de confirmer la nature du sucre, l'hydrolyse acide du composé C1 a été entreprise. Cette dernière a donné le glucose, identifié par chromatographie sur couche mince en gel de silice (Acétone-eau 9:1).

L'ensemble de ces informations nous permet d'attribuer au **composé C1** la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$ avec un degré d'insaturation de 12.

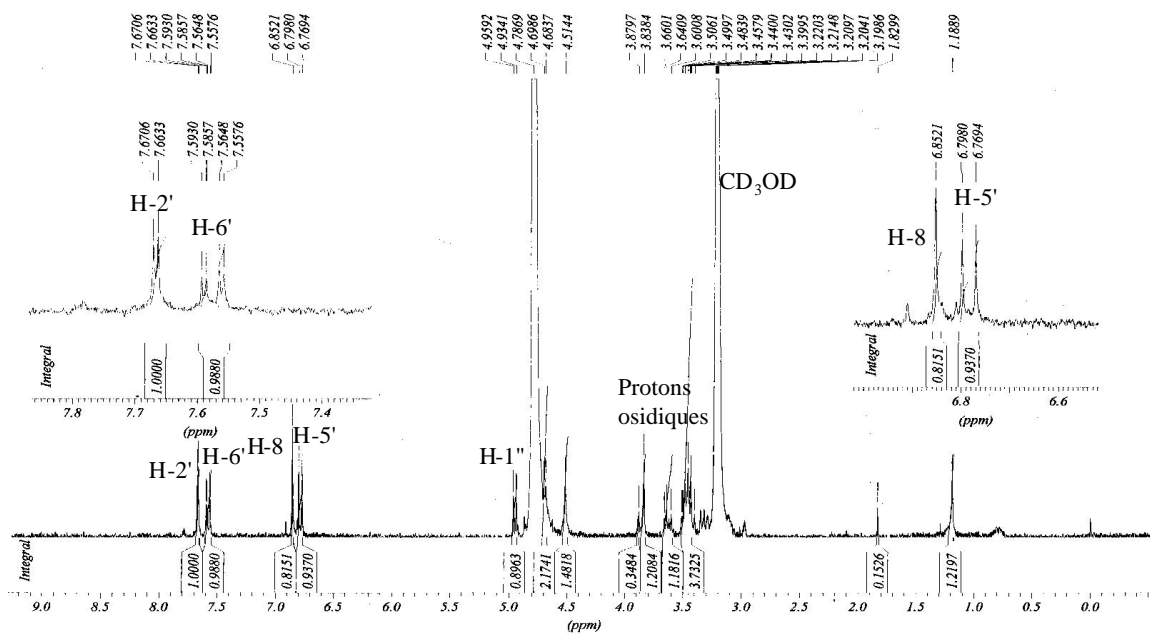


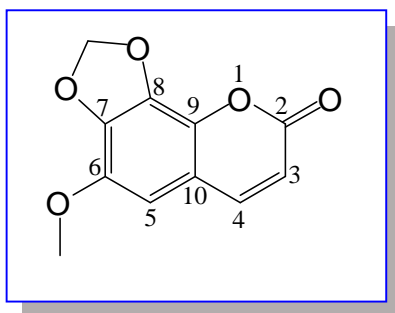
Figure III. 76: Spectre RMN ^1H (300 MHz, MeOH-d₄) du composé C1.

| Position | RMN ^1H δ_H (ppm) [integration, m., J (Hz)] |
|-------------------|--|
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | 6,85 (1H, s) |
| 9 | |
| 10 | |
| 1' | |
| 2' | 7,67 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) |
| 3' | |
| 4' | |
| 5' | 6,78 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) |
| 6' | 7,57(1H, dd, $J = 8,5, 2,2$ Hz) |
| 1'' | 4,95 (1, d, $J = 7,5$ Hz) |
| Protons osidiques | 3,5-4,5 (6H, m) |

Tableau III. 14 : Données spectrales RMN ^1H du composé C1.

L'ensemble des données spectrales a permis d'établir la structure du composé C1. Il s'agit de la **Quercétagine-7-O- β -glucoside** [22-24].

III. 2. 1. Détermination structurale du composé C2



Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche. Sa fluorescence est bleue sous lampe UV 365 nm.

Comportement chromatographique: $R_f = 0.82$ (CH_2Cl_2 9 : 1)

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

La mesure du spectre de masse en impact électronique (**Figure III. 77**) du composé C2 montre un pic de base à m/z 220 $[\text{M}]^+$, un ion à m/z 205 (perte de 15 uma), ainsi que divers ions à m/z 192 (perte de 28 uma), m/z 177 (perte de 43 uma) et d'autres ions résultant de la fragmentation de la molécule.

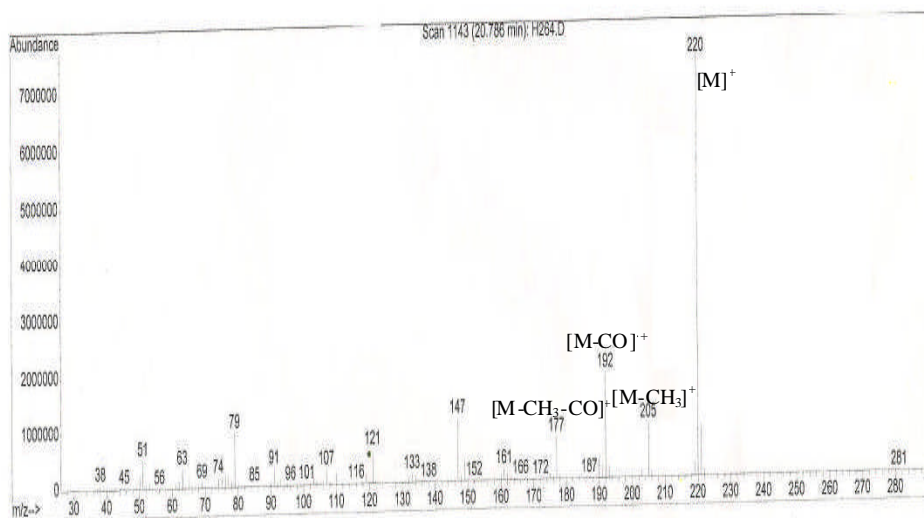


Figure III. 77: Spectre de masse IE-MS du composé C2.

Le spectre de RMN ^1H (300 MHz dans le CDCl_3) (**Figure III. 78**) indique que le composé C2 est le dérivé de la coumarine, ainsi il montre [25] :

- Deux doublets intégrant chacun pour 1H à δ_H 7,51 ppm ($J = 9,6$ Hz) et δ_H 6,21 ppm ($J = 9,6$ Hz) attribués respectivement aux protons H-3 et H-4 du cycle pyrane.

- Un singulet d'intensité 1H à δ_H 6,52 ppm attribué au proton H-5.
- Un singulet d'intensité 2H à δ_H 6,12 ppm caractéristique du groupement méthylènedioxy.
- Un singulet intégrant pour 3H à δ_H 3,85 ppm caractéristique du groupement méthoxyle aromatique.

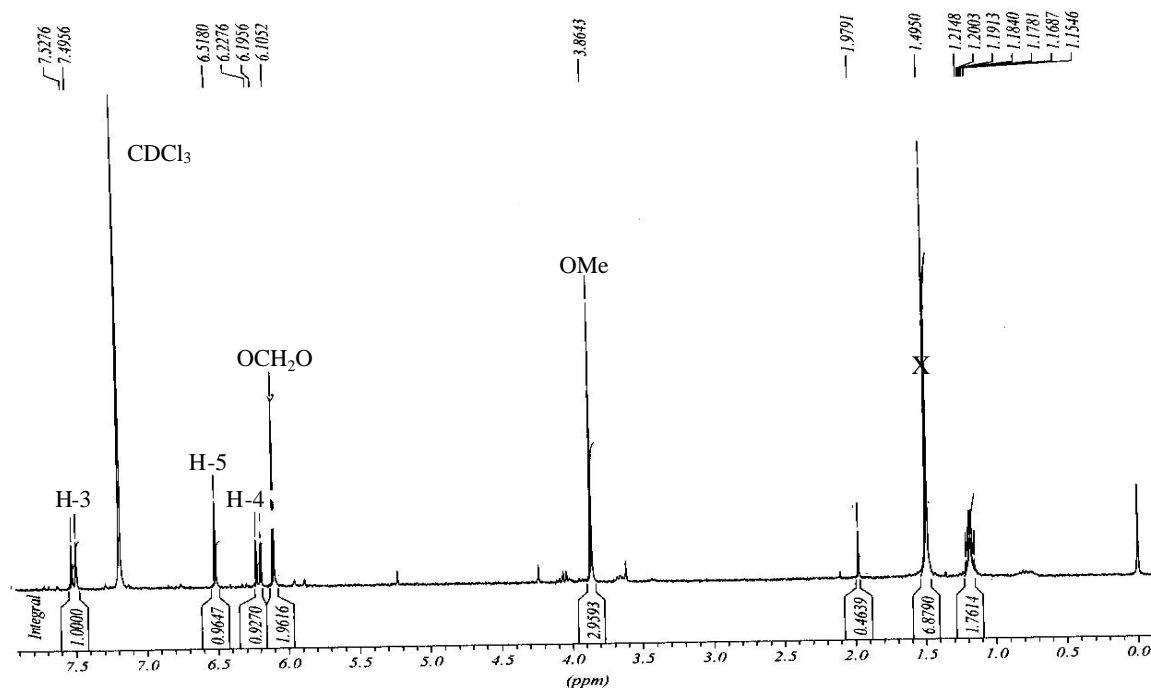


Figure III. 78: Spectre RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) du composé C2.

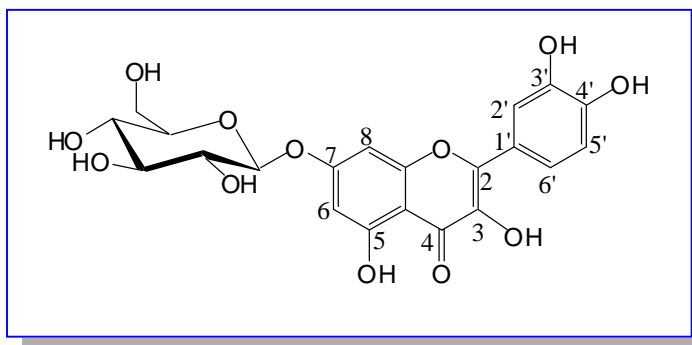
L'ensemble de ces informations nous permet d'attribuer au composé C2 la formule brute $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$ avec un degré d'insaturation de 8.

| Position | RMN ^1H δ_H (ppm) [integration, m., J (Hz)] |
|----------------------|--|
| 2 | |
| 3 | 7,51 (1H, d, $J = 9,6$) |
| 4 | 6,21 (1H, d, $J = 9,6$) |
| 5 | 6,52 (1H, s) |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |
| O-CH ₂ -O | 6,12 (2H, s) |
| O-CH ₃ | 3,85 (3H, s) |

Tableau III. 15 : Données spectrales RMN ^1H du composé C2.

L'ensemble de ces données spectrales a permis d'établir la structure du **composé C2**. C'est la **6-méthoxy-7-méthylènedioxy coumarine** [25].

III. 2. 2. Détermination structurale du composé C3



Ce produit se présente sous forme d'une poudre jaune et de fluorescence jaune sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique

| Systèmes de solvants | S.I | S.II | Remarques |
|----------------------------|---------|------|------------------------|
| R_f | 0,44 | 0,21 | Aglycone monoglycosylé |
| Fluorescence sous lampe UV | Jaune | | Flavonol 3-OH libre |
| Ose | Glucose | | Après hydrolyse acide |

Tableau III. 16: Comportement chromatographique **du composé C3**.

Spectroscopie UV

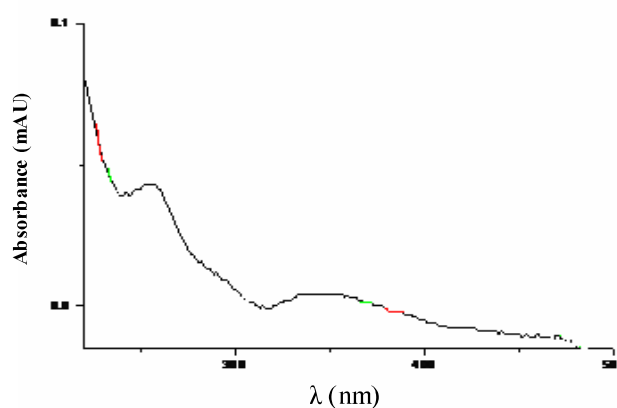


Figure III. 79 : Spectre UV-visible du **composé C3**.

| Réactif | Bande II | Bande I | Remarques |
|--|----------|---------|---------------------------|
| MeOH | 257 | 370 | Flavonol-3-OH |
| NaOH | 296 | 416 | 4'-OH, 7-OR |
| NaOH après 5 min | 296 | 416 | 3, 4' di-OH |
| AlCl ₃ | 267 | 439 | Orthodi-OH sur le noyau B |
| AlCl ₃ + HCl | 267 | 416 | 5-OH |
| NaOAc | 258 | 381 | 7-OR |
| NaOAc + H ₃ BO ₃ | 260 | 389 | Orthodi-OH sur le noyau B |

Tableau III. 17 : Analyse spectroscopie UV du **composé C3** en présence des réactifs.

Le spectre d'absorption UV dans le méthanol (**Figure III. 79**) montre deux maximas à 257 nm et à 370 nm relatifs respectivement à la bande I et la bande II d'une flavonol-3-OH libre, ce qui est confirmé par la fluorescence couleur jaune du composé sous lampe UV à 365 nm [10].

Le spectre méthanol après addition de NaOH présente un déplacement bathochrome (46 nm) de la bande I par rapport au spectre méthanol avec diminution de la densité optique, indique à la présence de 3, 4'-OH libre. La non apparition de nouvelle bande dans le même spectre montre que la position 7 est substituée (7-OR). Ceci est affirmé par l'absence du déplacement bathochrome de la bande II du spectre méthanol en présence de NaOAc par rapport au spectre méthanol neutre.

Le spectre méthanol en présence d'AlCl₃ présente un déplacement bathochrome de la bande I par rapport au spectre méthanol neutre ce qui révèle la présence des complexes. Le spectre AlCl₃ + HCl présente un déplacement bathochrome de la bande I de 46 nm par rapport au spectre méthanol ce qui indique à la présence de 5-OH.

La présence du système orthodi-OH sur le noyau B est expliqué par le déplacement hypsochrome de la bande I (23 nm) en comparant les deux spectres AlCl₃ et AlCl₃ + HCl, et par le déplacement bathochrome (19 nm) de la bande I dans le spectre NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre méthanol neutre.

Le comportement chromatographique du composé C3 dans les deux systèmes de solvants S.I et S.II, indique à la présence d'un aglycone monoglycosylé.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre de masse obtenu en ESI/MS en mode négatif (**Figure III. 80**) du composé C3 montre un pic à m/z 463 [M-H]⁻ relatif à une masse moléculaire de 464 uma.

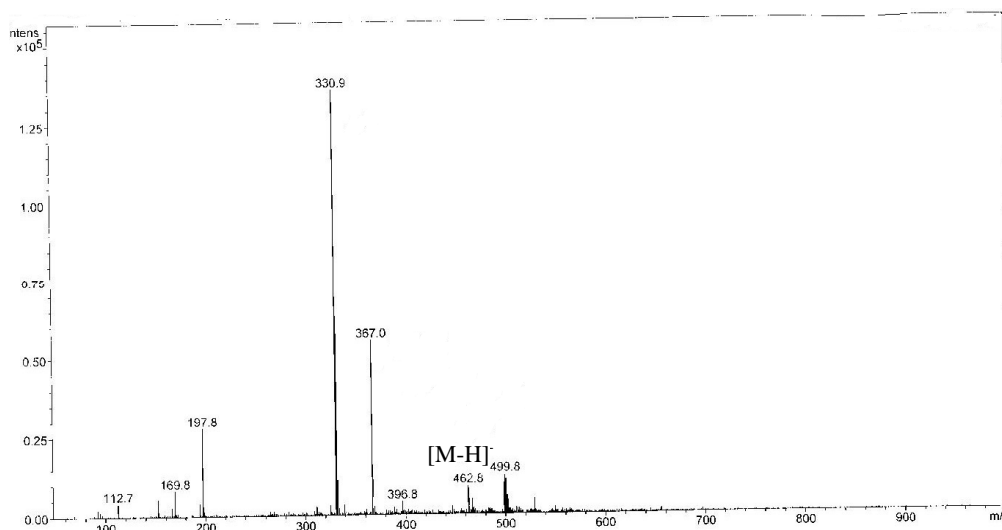


Figure III. 80: Spectres de masse ESI/MS en mode négatif du composé C3.

Le spectre RMN ¹H (250 MHz dans le MeOH-d₄) (**Figure III. 81**) montre :

- Trois signaux chacun d'intensité 1H à δ_H 7,79 ppm ($J = 2,2$ Hz), δ_H 7,71 ppm (dd, $J = 8,5, 2,2$ Hz) et δ_H 6,92 ppm (d, $J = 8,5$ Hz), caractéristiques respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du noyau B.
- Deux doublets intégrant chacun pour 1H à δ_H 6,79 ppm ($J = 2,1$ Hz) et δ_H 6,49 ppm ($J = 2,1$ Hz) attribuables aux protons H-8 et H-6 du cycle A.
- Un doublet intégrant pour 1H à δ_H 5,08 ppm ($J = 7,6$ Hz) caractéristique du proton anomérique du glucose.
- Des signaux entre δ_H 3,46-3,98 ppm relatif aux protons osidiques du glucose [12].

Afin de confirmer la nature du sucre, l'hydrolyse acide du composé C3 a donné le glucose, identifié par chromatographie sur couche mince de gel de silice (Acétone-eau 9 :1).

L'ensemble de ces informations nous permet d'attribuer au composé C3 la formule brute C₂₁H₂₀O₁₂ avec un degré d'insaturation de 12.

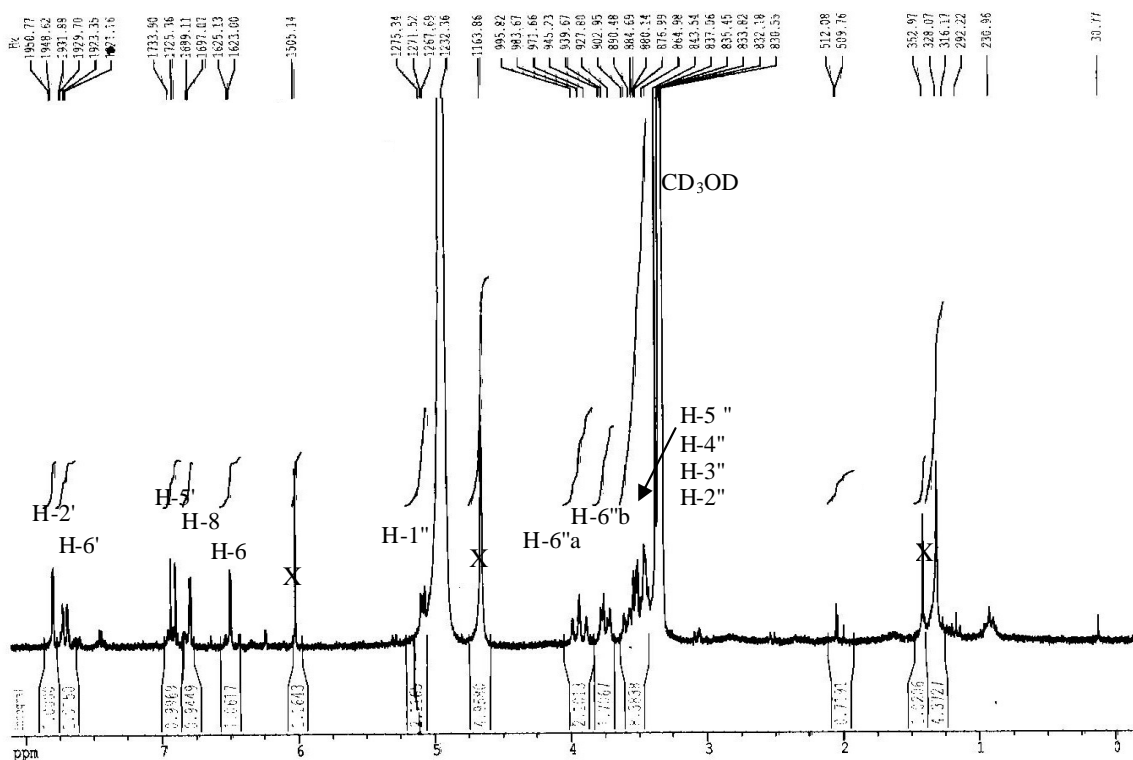


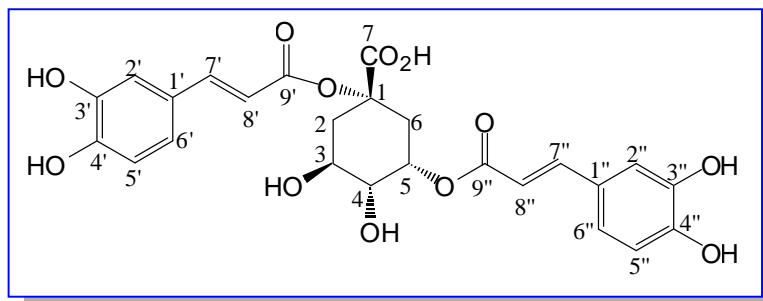
Figure III. 81 : Spectre RMN ^1H (250 MHz, MeOH-d₄) du composé C3.

| Position | RMN ^1H δ_H (ppm) [integration, m. , J (Hz)] |
|----------------------|---|
| 2 | |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | 6,49 (1H, d, $J = 2,1$ Hz) |
| 7 | |
| 8 | 6,79 (1H, d, $J = 2,1$ Hz) |
| 9 | |
| 10 | |
| 1' | |
| 2' | 7,79 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) |
| 3' | |
| 4' | |
| 5' | 6,92 (1H, d, $J = 8,5$ Hz) |
| 6' | 7,71 (1H, dd, $J = 8,5, 2,2$ Hz) |
| 1'' | 5,08 (1H, d, $J = 7,6$ Hz) |
| Protons osidiques | 3,46-3,98 (6H, m) |

Tableau III. 18: Données spectrales RMN ^1H du composé C3.

L'ensemble des données spectrales précédentes a permis d'établir la structure du composé C3. Il s'agit de la **Quercétine-7-O- β -glucoside** [26].

III. 2. 4. Détermination structurale du composé C4



Ce composé se présente sous forme d'une huile marron. Sa fluorescence jaune verte sous lampe UV à 365 nm.

Comportement chromatographique: $R_f = 0,81$ (AcOEt/Eau/HCOOH 8:1:1)

Spectroscopie UV

Son spectre UV (**Figure III. 82**) présente trois maxima d'absorption à 219 nm, 242 nm et 328 nm, caractéristique d'un acide phénolique.

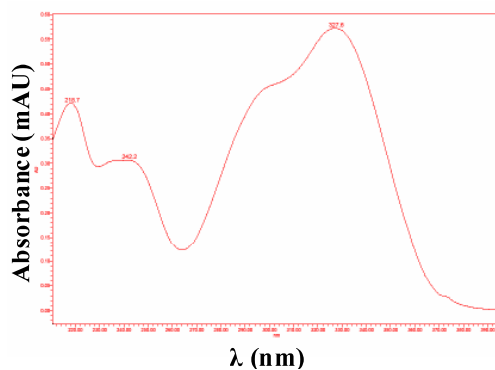


Figure III. 82: spectre UV-visible du composé C4.

Spectroscopie de masse et spectroscopie RMN

Le spectre EIS/MS réalisé en mode négatif (**Figure III. 83**) présente un ion quasi-moléculaire à m/z 515 $[M-H]^-$ suggérant une masse moléculaire de 516 uma.

La MS/MS de cet ion donne un pic majoritaire à m/z 353 (perte de 162 uma) qui représente l'acide chlorogénique déprotoné (perte de l'unité cafféique). La MS/MS de ce

dernier pic, donne un pic majoritaire à m/z 191 (perte de 162 uma), caractéristique de l'acide quinique (perte de la deuxième unité cafféique), et un autre pic à m/z 179 (perte de 174 uma), caractéristique de l'acide cafféique [27].

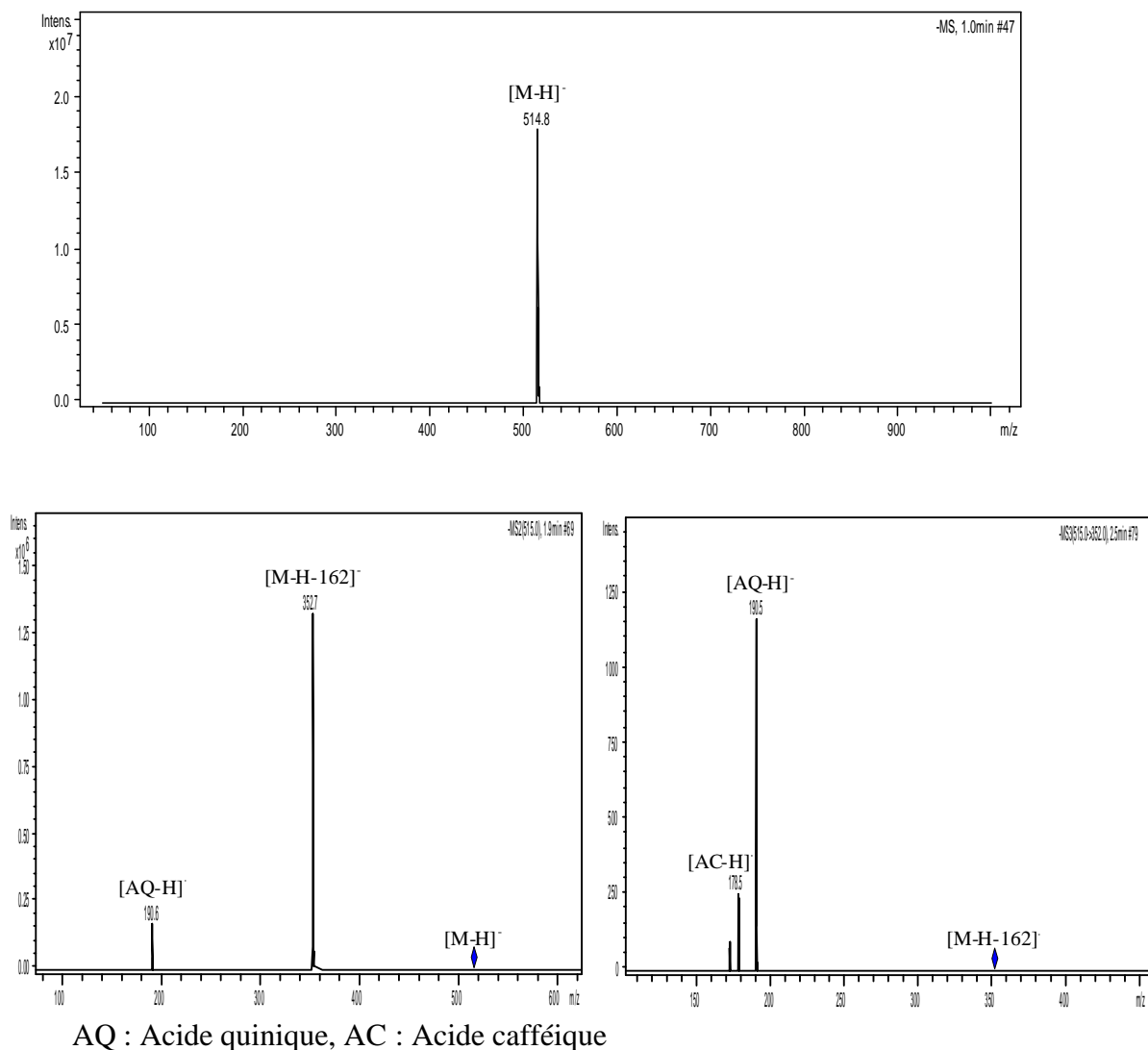


Figure III. 83 : Spectres de masse ESI/MS en mode négatif du **composé C4**.

L'étude comparative des spectres RMN 1H des composés C4 (**Figure III. 84**), S11 (**Figure III. 65**) et S3 (**Figure III. 19**), ainsi que les spectres de masse (**Figure III. 83**), indiquent que le composé C4 est un acide dicafféoyl quinique [5-8].

Or, le spectre RMN 1H (300 MHz dans le MeOH- d_4) (**Figure III. 84**) du composé C4 présente les signaux des protons de l'acide quinique [28]:

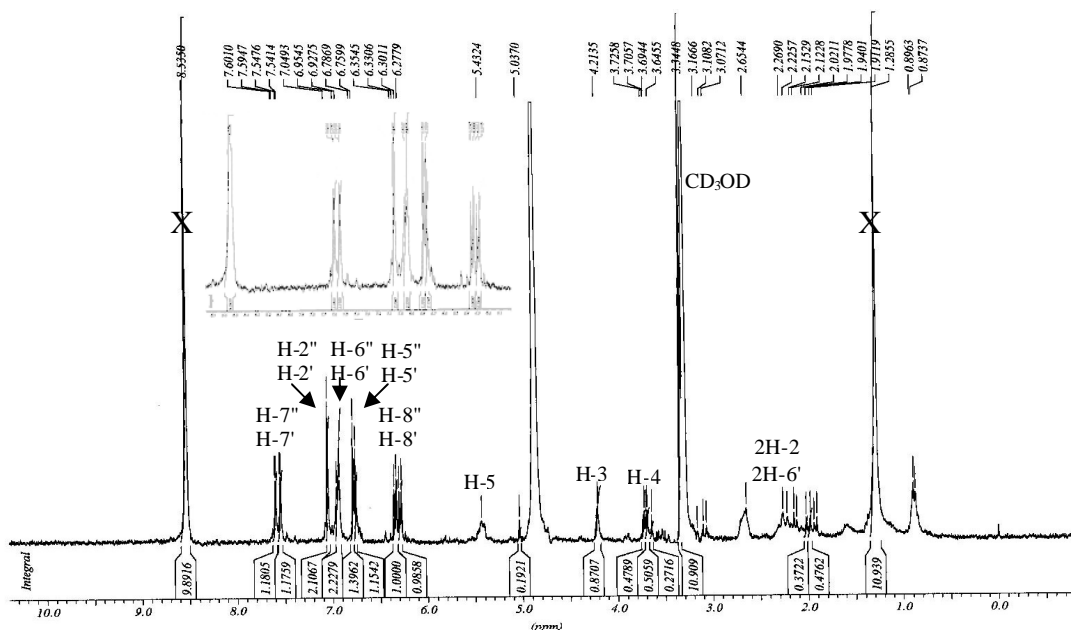
- Un multiplet intégrant pour 1H à δ_H 5,42 ppm, attribué au proton H-5.
- Un multiplet intégrant pour 1H à δ_H 4,21 ppm, attribué au proton H-3.

- Un doublet de doublets d'intensité 1H à δ_H 3,71 ppm ($J = 9,4; 3, 4$ Hz), attribué au proton H-4.
- Un massif d'intensité 4H entre δ_H 1,91-2,65 ppm attribués protons H-2ax, H-2eq, H-6ax et H-6eq.

Le spectre présente également les signaux des protons des deux acides cafféiques [28]:

- Deux doublets intégrants chacun pour 1H à δ_H 7,57 ppm ($J = 16$ Hz) et δ_H 7,56 ppm ($J = 16$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-7'' et H-7'.
- Un singulet d'intensité 2H à δ_H 7,05 ppm (s) attribuable aux protons H-2'' et H-2'.
- Un multiplet intégrants pour 2H à δ_H 6,94 ppm aux protons H-6'' et H-6'.
- Un doublet chacun d'intensité 2H à δ_H 6,77 ppm ($J = 8,1$ Hz), attribuable aux protons H-5'' et H-5'.
- Deux doublets intégrants chacun pour 1H à δ_H 6,33 ppm ($J = 16$ Hz) et δ_H 6,30 ppm ($J = 16$ Hz) caractéristiques respectivement des protons H-8'' et H-8'.

L'ensemble de ces informations nous permet d'attribuer au composé C4 la formule brute $C_{25}H_{24}O_{12}$ avec un degré d'insaturation de 14.



| Position | δ_H (ppm) [intergration, m. , J (Hz)] |
|----------|---|
| 1 | |
| 2 | 1,91-2,65 (2H, m) |
| 3 | 4,21 (1H, m) |
| 4 | 3,71 (dd, $J = 9,4 ; 3, 4$) |
| 5 | 5,42 (1H, m) |
| 6 | 1,91-2,65 (2H, m) |
| 7 | |
| 1' | |
| 1'' | |
| 2' | 7,05 (1H, s) |
| 2'' | 7,05 (1H, s) |
| 3' | |
| 3'' | |
| 4' | |
| 4'' | |
| 5' | 6,77 (1H, d, $J = 8,5$) |
| 5'' | 6,77 (1H, d, $J = 8,5$) |
| 6' | 6,94 (1H, m) |
| 6'' | 6,94 (1H, m) |
| 7' | 7,56 (1H, d, $J = 16$) |
| 7'' | 7,57 (1H, d, $J = 16$) |
| 8' | 6,30 (1H, d, $J = 16$) |
| 8'' | 6,33 (1H, d, $J = 16$) |
| 9' | |
| 9'' | |

Tableau III. 19: Données spectrales RMN ^1H du **composé C4**.

Selon les données spectroscopiques précédentes et par comparaison avec les données de la littérature [27, 28], la connexion des deux groupements cafféoyles sur l'acide quinique est en C-1 et C-5.

Sur la base de ces résultats, la structure du **composé C4** a pu être établie comme :
l'Acide-1,5-di-O-cafféoylquinique.

III. 3. Bibliographie

- [1] Loizzo M. R., Tundis R., Statti G. A., Menichini F., (2007), Jacaranone : A cytotoxic constituent from *Senecio ambiguus* subsp, *ambiguus* (Biv.) DC. Againts renaladenocarcinomaACHN and prostate carcinoma LNCaP cells. *Archives of Pharmaceutical Research* 30: 701-707.
- [2] Yvin J. C., Chevolot L., Chevolot-Magueur A. M., Cochard J. C. Cent., (1985), *Journal of Natural Products* 48(5): 914-16.
- [3] Jakupovic J., Chau-Thi T. V., (1987), Castro V., Inst. Org. Chem., Tech. Univ. Berlin, Fed. Rep. Ger. *Fitoterapia* 58(3): 187-8.
- [4] Massanet G. M., Rogriguez-Luis F., Chozas C. V., Guerra F. M., Dorado J. M., (1993), Guaianolides and ethylcyclohexane lactone from *Andriala integrifolia*. *Phytochemistry* 34: 1565-1567.
- [5] Pauli G. F., Poetsch, Nahrstedt A., (1998), Structure assignement of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochemical Analysis* 9: 177-185.
- [6] Ge F., Ke C., Tang W., Yang X., Tang C., Qin G., Xu R., Li T., Chen X., Zuo J., Ye Y. (2007). Isolation of chlorogenic acids and their gerivatives from stemona japonica by preparative HPLC and evaluation of their Anti-AIV (H5N1) activity in vitro. *Phytochemical Analysis* 18: 213-218.
- [7] Idea Y., Satoh Y., Ohtsuka M., Nagasao M., Shoji J., (1994), Phenolic constituents of *Phellodendron amurense* bark. *Phytochemistry* 35: 209-215.
- [8] Li H. Y., Miyahara T., Tezuka Y., Namba T., Nemoto N., Tonami S., Seto H., Tada T., Kadota S., (1998), The effect of kampo formulae on bone resorption in vitro and invivo. I. Active constituents of Tsu-kan-gan. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 21: 1322-1326.
- [9] Chan E. W. C., Lim Y. Y., Ling S. K., Tan S. P., Lim K. K., Khoo M. G. H., (2009), Caffeoylquinique acids from leaves of *Etlingera species* (Zingiberaceae). *LWT-Food Science and Technology* 42: 1026-1030.
- [10] Markham K.R., (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, 144 p., London.
- [11] Harborne J. B., (1986), *The flavonids: advances in research Since*. Champo and Hall, 656 p., London.

- [12] Rayyan S., Fossen T., Nateland H. S., Andersen Ø. M., (2005), Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug '*Crataegi folium cum florè* (Hawthorn). *Phytochemical Analysis* 16: 334-341.
- [13] Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O., Dini A., (1995), Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Canihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2020-2024.
- [14] Markham K. R., Ternay B., Stanley R., Geiger H., and Marbry T. J., (1978), *Tetrahedron* 34: 1389-1397.
- [15] Needs P. W., Kroom P. A., (2006), Convenient syntheses of metabolically important quercetin glucuronides and sulfates. *Tetrahedron* 62: 6862-6868.
- [16] Merfort I., Wendisch D., (1988), Flavonoid Glucuronides from the Flowers of *Arnica montana*. *Planta Medica* 54(3): 247-250.
- [17] Jerga C., Merfort I., Willuhn G. (1990). Flavonoid Glycosides and Other Hydrophilic Compounds from Flowers of *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* 56(4): 413-415.
- [18] Mezache N., Derbré S., Akkala S., Laouer H., Séraphin D. and Richomme P., (2009), Fast Counter Current Chromatography of a butanolic fraction from *Senecio giganteus* Desf. (Asteraceae). *Natural Product Communications* 4(10): 1357-1362.
- [19] Abraham R. J., Byrne J. J., Griffiths L. and Koniotou R., (2005), ¹H chemical shifts in NMR: Part 22⁺ - Prediction of the ¹H chemical shifts of alcohols, diols and inositols in solution, a conformational and solvation investigation. *Magnetic Resonance in Chemistry* 43: 611-624.
- [20] Podeschwa M., Plettenburg O., Brocke J. vom, Block O., Adelt S. and Altenbach H.-J. (2003). Stereoselective Synthesis of *myo*-, *neo*-, *L-chiro*, *D-chiro*, *allo*-, *scyllo*-, and *epi*-Inositol Synthems via Conduritols Prepared from *p*-Benzoquinone. *European Journal of Organic Chemistry* 1958-1972.
- [21] Lavault M. and Richomme P. (2004). Constituents of *Helichrysum stoechas* variety *olonneuse*. *Chemistry of Natural Compounds* 40(2): 118-121.
- [22] Tereschuk M. L., Riera M. V. Q., Castro G. R., and Abdala L. R, (1997), *J. Ethnopharmacology* 56: 227.
- [23] Goren N., Arda N., and Caliskan Z., (2002), *Chemical Characterization and Activities of the Genus Tanacetum (Compositae)*, in: *Studies in Natural Product Chemistry, Bioactive Natural Products* 27: 547-658.

- 
- [24] Mezache N., Akkal S., Laouar H., Seguin E., (2009), Flavonoids from *Chrysanthemum myconis* and their antibacterial activity. *Chemistry of Natural Compounds* 45(5): 715-716.
- [25] Steck W., Mazurek M., (1972), Identification of natural coumarins by NMR spectroscopy. *Lloydia* 35: 418-439.
- [26] Xie C., Veitch N. C., Houghton P. J., Simmonds M. S. J., (2004), Flavonoid glycosides and isoquinolinone alkaloids from *Corydalis bungeana*. *Phytochemistry* 65: 3041-3047.
- [27] Yang B., Meng Z. Y., Yan L. P., Dong J. X., Zou L. B., Tang Z. M., Dou G. F., (2006), Pharmacokinetics and metabolism of 1,5-dicaffeoylquinic acid in rats following a single intravenous administration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40: 417-422.
- [28] Carnat A., Heitz A., Fraisse D., Carnat A.-P., Lamaison J.-L., (2000), Major dicaffeoylquinic acids from *Artemisia vulgaris*. *Fitoterapia* 71: 587-589.

I. Tests réalisés sur *Senecio giganteus* Desf.

I. 1. Test antioxydant

Le test antioxydant est réalisé sur l'extrait butanolique de *Senecio giganteus* ainsi que les produits purs séparés de cet extrait.

I. 1. 1. Méthode

I. 1. 1. a. Principe

Le dosage des antioxydants par le DPPH est basé sur le protocole mis en place par Abdel-Lateff *et al.* [1]. Elle consiste à suivre la réduction du radical libre DPPH (2,2-diphényl -1- picrylhydrazyl) par un antioxydant à l'aide de spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de l'extrait.

Généralement, les mesures de l'absorbance du DPPH des différentes substances antioxydantes (nos composés et témoin) permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition PI en appliquant la formule suivante :

$$\text{PI (\%)} = [A_0 - (A_i - A_b) / A_0] \times 100$$

Où : A_0 : absorbance du radical seul (contrôle).

A_i : absorbance du radical après 30 minutes de contact à l'obscurité avec l'antioxydant.

A_b : absorbance du flavonoïde seul (blanc).

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés, nous permettent de calculer la valeur du paramètre IC_{50} (concentration d'inhibiteur) qui représente la concentration de la substance nécessaire pour diminuer 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel.

Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (**Figure IV. 1**). Cette décoloration est représentative de la capacité des antioxydants à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique. Ce test nous permet donc d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de nos composés (Flavonoïdes, acides phénoliques).

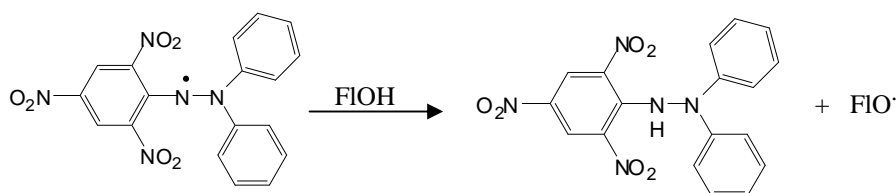


Figure IV. 1: Forme libre et réduite du DPPH.

I. 1. 1. b. Protocol

Comme nous avons mentionné précédemment, le protocole est basé sur celui mis en place par Abdel-lateff *et al.* [1] et adapté sur lecteur de microplaques.

Sur microplaque, les échantillons sont déposés en triplicat à la concentration 0,1 mg/mL et insérée dans le lecteur de microplaques. Une solution de DPPH (5mM) préparé dans le méthanol est injecté dans chaque puits de la microplaque qui est incubée par la suite à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min. La microplaque est réinsérée dans le lecteur pour une lecture d'absorption à 517 nm. À la fin, les résultats d'une gamme étalon réalisée avec du Trolox sont traités sur logiciel Excel.

I. 1. 2. Résultats

| Echantillons | TE/g Moyenne | TE/g écart-type |
|---|-----------------|--------------------|
| acide chlorogénique (<i>Sigma lot : 025K1096</i>) (témoin) | 2890 | 163 |
| Extrait butanolique de <i>S. giganteus</i> | 440 | 63 |
| Jacaranone (S1) | Aucune activité | |
| 3a-hydroxy-3,3a,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2,6-dione (S2) | Aucune activité | |
| Acide-5-O-cafféoyl quinique (S3) | 2562 | 45 |
| Hyperoside (S4) | 5819 | 32 |
| Quercétine-3-O- β -robinobioside (S5) | 2076 | 61 |
| Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide (S6) | 730 | 23 |
| Quercétine-3-O- β -glucuronide (S7) | 2846 | 60 |
| Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide-6"-méthyle ester (S8) | 194 | 48 |
| Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide-6"-butyle ester (S10) | 836 | 138 |
| Acide-5-O-cafféoyl quinique butyle ester (S11) | 1717 | 165 |

Tableau IV. 1: Résultats du test DPPH réalisé pour la majorité des composés isolés de l'extrait butanolique de *S. giganteus*.

Le **Tableau IV. 1** présente les résultats du test DPPH réalisé pour la majorité des composés isolés de l'extrait butanolique de *S. giganteus*. Ainsi, il montre que l'hyperoside (composé **S4**) est l'antioxydant le plus fort dans cette gamme de composés naturels, alors que les composés **S3** et **S7** possèdent un pouvoir antioxydant presque égale à celui de l'acide chlorogénique, l'antioxydant témoin dans cette expérience. Le **Tableau IV. 1** indique également que les composés **S5**, **S6**, **S10** et **S11** possèdent des activités antioxydantes moyennes (inférieures à celle du témoin) et une activité antioxydante modérée du composé **S8**, alors qu'aucune activité n'a été observée pour les composés **S1** et **S2**. Globalement, la majorité des composés isolés de l'extrait butanolique sont des antioxydants.

I. 2. Test anti-âge (AGEIB)

Les produits terminaux de la glycation (AGEs ; Advanced glycation end products) sont issus des réactions non-enzymatiques de Maillard (**Figure IV. 2**). Chez l'homme, ces AGEs sont impliqués dans la pathogenèse de nombreuses affections comme les diabètes ou les maladies neurologiques. Ils sont également à l'origine de certaines altérations tissulaires et organiques liées à l'âge. Ainsi, des produits pouvant les détruire ou empêcher leur formation constituent des médicaments potentiels ou de possibles ingrédients de compléments alimentaires ou produits cosmétiques.

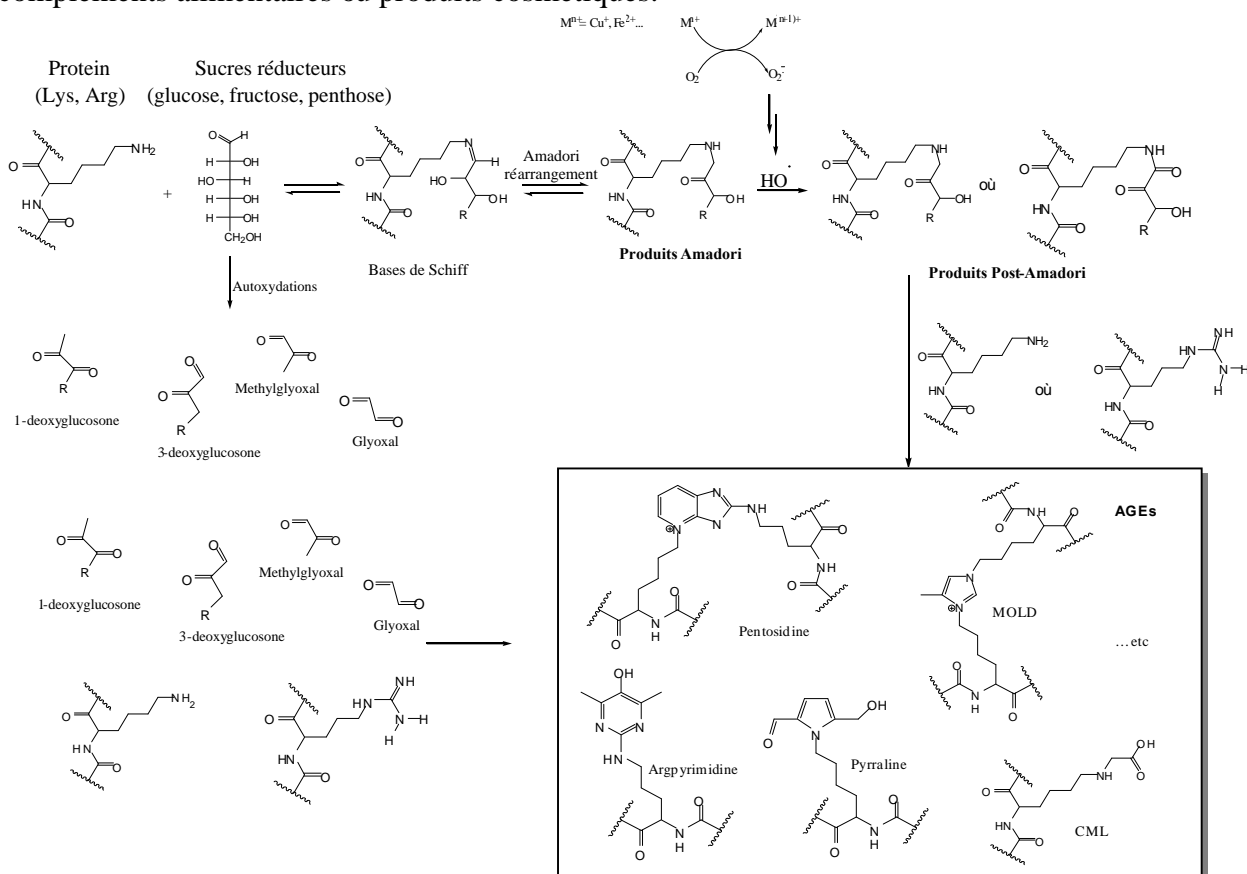


Figure IV. 2 : AGEs issus des réactions non-enzymatiques de Maillard.

I. 2. 1. Méthode

Ce test est réalisé pour les composés **S2, S3, S4, S6, S7, S8** et **S10**. L'évaluation des autres produits isolés de l'extrait butanolique de *S. giganteus* est en cours de réalisation.

I. 2. 1. a. Principe

La méthode retenue pour cribler l'activité des produits inhibiteurs ou destructeurs des AGEs (AGEIB) consiste en la méthode de Vinson *et al.* [2] à la quelle des améliorations sont apportées : certains AGEs sont fluorescents ; leur formation à partir de l'albumine et de sucres réducteurs peut donc être quantifiée par spectrofluorimétrie.

Derbré *et al.* [3] ont développé une méthode de criblage des AGEIB, en solution, en plaque 96 puits. Une série d'expériences a permis de définir les conditions du test de criblage. Elles permettent notamment d'obtenir une quantité maximale d'AGEs en un temps le plus court possible.

- Détection des AGEs : fluorescence λ_{exc} 370 nm ; λ_{em} 440 nm
- Nature et concentration de la protéine : Albumine sérique bovine (BSA) 10 mg/mL
- Sucre réducteur : ribose 0,5 M
- Conditions physiologiques : 37°C / tampon phosphate 50 mM pH 7,4
- Durée de l'incubation : 24 h

I. 2. 1. b. Protocole

Un essai de Mallaird-fluorescence a été développé et optimisé pour le criblage de chimiothèques de composés chimiques qui sont capables d'inhiber la formation de dosage AGEs. L'incubation incluse BSA (10 mg / mL) avec le D-ribose (0,5 M) et le composé testé ($3 \cdot 10^{-6}$ à $3 \cdot 10^{-3}$ M) ou extrait (10⁻⁶ à 1 mg/mL) dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Des solutions ont été incubées en microplaque (96 puits) à 37 ° C pendant 24 heures dans un système fermé. La fluorescence AGEs (excitation: 370 nm; émission: 440 nm) a été mesurée en utilisant un spectrofluorimètre Infinéité M200 (Tecan, Lyon, France). Pour éviter des phénomènes de trempage, la fluorescence résultant de l'incubation dans les mêmes conditions de BSA (10mg/mL) et le composé testé ($3 \cdot 10^{-6}$ à $3 \cdot 10^{-3}$ M) ou extrait (10⁻⁶ à 1 mg / ml) a été soustrait pour chaque mesure. Des tests ont été effectués sur trois exemplaires. Le contrôle est négatif, soit à 100% d'inhibition de la formation des AGEs se composait de puits avec seulement BSA. Le Contrôle est positif, à savoir, aucune

inhibition de la formation AGE se composait de puits à la BSA (10 mg / ml) et D-ribose (0,5 M). Le dosage de volume final était de 100 μ / L. La concentration du composé pour 50 pour cent d'inhibition (IC_{50}) a été calculée et comparée à celle de l'aminoguanidine, composé de référence (2 à 3 mM).

I. 2. 2. Résultats

| Echantillons | Masse moléculaire (mol.g ⁻¹) | Résultats (IC_{50}) En mol.L ⁻¹ |
|---|--|--|
| Aminoguanidine (témoin) | | 63 |
| 3a-hydroxy-3,3a,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2,6-dione (S2) | 168 | Aucune activité |
| Acide chlorogénique (S3) | 354 | Aucune activité |
| Hyperoside (S4) | 464 | $1,0 \cdot 10^{-4}$ |
| Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide (S6) | 492 | $0,7 \cdot 10^{-4}$ |
| Quercétine-3-O- β -glucuronide (S7) | 478 | $1,0 \cdot 10^{-4}$ |
| Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide-6"-méthyle ester (S8) | 506 | $1,4 \cdot 10^{-4}$ |
| Isorhamnétine-3-O- β -glucuronide-6"-butyle ester (S10) | 548 | $1,7 \cdot 10^{-4}$ |

Tableau IV. 2: Résultats du test AGEIB réalisé pour la majorité des composés isolés de l'extrait butanolique de *S. giganteus* Desf.

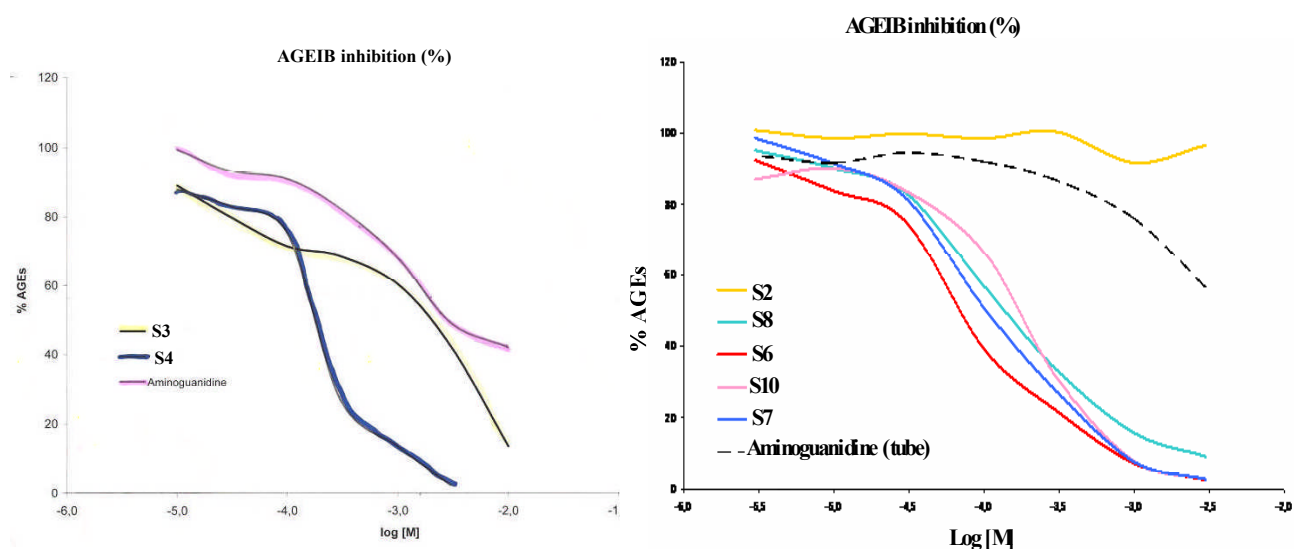


Figure IV. 3 : Chromatogrammes d'inhibition des AGEs des composés isolés de l'extrait butanolique de *S. giganteus*.

Le test anti-AGEs réalisé sur les composés **S4, S6, S7, S8** et **S10** (**Tableau IV. 2**) (**Figure IV. 3**) a été positif ; seulement 1% des AGEs trouvés dans les mêmes concentrations ($3.10^{-3}M$) que le composé témoin, l'aminoguanidine qui présente 50 % d'inhibition de formation des AGEs. L'acide chlorogénique (composé **S3**) a montré 49% d'inhibition de formation des AGEs, inférieure à celle du composé témoin, alors que le composé **S2**, n'a montré aucune activité anti-AGEs.

En conclusion, les flavonoïdes séparés de l'extrait butanolique des fleurs de *S. giganteus* ont présenté un pouvoir antioxydant très important, comme ils ont montré qu'ils peuvent être de très bons anti-AGEs.

II. Test réalisé sur *Chrysanthemum myconis*

II. 1. Test antibactérien

II. 1. 1. Méthode

L'activité antibactérienne est réalisée sur l'extrait butanolique et le composé **C1** (Quercétagine-7-*O*- β -glycoside) séparé de ce dernier de l'espèce *C. myconis*.

L'activité antimicrobienne du flavonoïde a été évaluée sur 3 souches bactériennes qui proviennent de l'American Type Culture Collection: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La culture des bactéries a nécessité l'utilisation du milieu de culture Mueller Hinton agar (MH) qui a pour provenance (Fluka) ainsi que les milieux de culture, la gélose nutritive et le bouillon nutritif qui proviennent de l'institut Pasteur d'Alger.

L'activité antibactérienne de l'extrait est réalisée par la technique du contact direct.

- **Technique par contact direct**

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion, qui initialement est conçue pour les antibiotiques (antibiogramme), mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par d'extrait végétal (ou composé pur) ($10 \mu L$ par disque d'une solution de 10 mg/mL d'échantillon dans le DMSO).

Les géloses sont préparées au préalable dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre, l'épaisseur de la gélose est de 4 mm. L'ensemencement des milieux se fait par écouvillonnage selon les recommandations de l'OMS (Rahal *et al.*, 2005) [4].

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C pendant 18 à 24h. Après ce délai, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés autour de chaque disque.

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (Durauffourd *et al.*, 1990) [5].

Pour savoir si l'effet de l'extrait est bactéricide ou bactériostatique, un prélèvement à partir de la zone d'inhibition est transféré dans un tube contenant du bouillon nutritif. Ce dernier est incubé dans une étuve à 37°C pendant 18 h puis examiné à l'œil nu. Un milieu trouble indique un effet bactériostatique, tandis qu'un milieu clair indique un effet bactéricide de l'extrait testé.

II. 1. 3. Résultats

1- Extrait butanolique de *C. myconis*

Les diamètres mesurés pour les trois bactéries utilisées sont :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: **10 mm.**
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: **8mm.**
- *Escherichia coli* ATCC 25922: **8mm.**

2- Composé C1

Les diamètres mesurés pour les trois bactéries utilisées sont :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: **0 mm.**
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: **21 mm.**
- *Escherichia coli* ATCC 25922: **11 mm.**

Effet: bactéricide

La quercétagine-7-O- β -glycoside (Composé C1) isolée de *C. myconis* a été trouvée en possession d'une forte activité antibactérienne contre la bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et une activité modérée contre la bactérie *Escherichia coli* ATCC 25922, alors qu'aucune activité n'a été observée contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En ce qui concerne l'extrait butanolique, il a été trouvé qu'il possède une activité modérée contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, alors aucune activité n'a été observée contre les deux bactéries *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

III. Bibliographie

- [1] Abdel-Lateff A., König G. M., Fish K. M., Höller U., Jones P. G., Wright A. D., (2002), New antioxidant Hydroquinone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Acremonium* Sp. *Journal of Natural Products* 65: 1605-1611.
- [2] Vinson J. A., Howard T. B., (1996), Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *Journal of Nutritional Biochemistry* 7: 656-663.
- [3] Derbré S., Pelleray A., Coulon L., Séraphin D., Richomme P., Automating a 96-well microtiter plate assay for advanced glycation end-products inhibitors or inducers identification: application to the screening of a small natural compounds library. *Analytical and bioanalytical Chemistry Journal*, Soumise.
- [4] Rahal K., Belouni R., Benslimani A., Tali Maamar H., Missoum M. F. K., Aboun A., Boudouane M., (2005), *Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS*, 3^{ème} Ed., 67 p., Alger.
- [5] Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lapraz J. C., (1990), *Cahiers de Phytothérapie Clinique*. Examen de laboratoire galénique, Eléments Thérapeutiques Synergiques, 2^{ème} Ed. Masson, 87 p., Paris.

CONCLUSION

Comme nous avons mentionné au début de cette recherche, notre objectif principal était la détermination structurale et l'évaluation biologique de substances isolées de certaines plantes de la flore Algérienne: *Chrysanthemum myconis* L. et *Senecio giganteus* Desf. , famille des Astéracées.

L'utilisation de nouvel outil chromatographique telle que la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) pour la purification de l'extrait butanolique des fleurs de *Senecio giganteus* Desf., ainsi que les techniques chromatographiques classiques (CC, CCM, colonne de sephadex LH 20), a mené à la séparation de douze composés dont la plus part sont nouveaux dans le genre.

En faisant appel aux différentes méthodes modernes d'analyse spectroscopiques, particulièrement les techniques de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC et HMBC), et par comparaison avec les données de la littérature, nous avons pu identifier les structures de onze composés comme suit :

- Jacaranone (nouveau dans l'espèce)
- 3a-hydroxy-3,3a,7,7a- tetrahydrobenzofuran-2,6-dione (nouveau dans le genre)
- Acide-5-*O*-cafféoyl quinique(nouveau dans l'espèce)
- Quercétine-3-*O*- β -galactopyranoside (nouveau dans l'espèce)
- Quercétine-3-*O*- β -robinobioside (nouveau dans l'espèce)
- Isorhamnétine-3-*O*- β -glucuronide (nouveau dans le genre)
- Quercétine-3-*O*- β -glucuronide (nouveau dans le genre)
- Isorhamnétine-3-*O*- β -glucuronide-6"-méthyle (nouveau dans le genre)
- Isorhamnétine-3-*O*- β -glucuronide-6"- butyle ester (nouveau dans le genre)
- Acide-5-*O*-cafféoyl quinique butyle ester (nouveau dans l'espèce)
- (-)-*L-chiro*-Inositol (nouveau dans le genre)

Le dernier composé est en court d'identification.

L'étude phytochimique des parties aériennes de l'espèce *Chrysanthemum myconis* c'est avéré très difficile en utilisant les techniques chromatographiques classiques (CC, CCM préparative..), voir même impossible. Cette étude a conduit à l'isolement d'une coumarine, d'un acide phénolique et de deux flavonoïdes glycosylés:

- 6-methoxy-7-methylenedioxy coumarine (nouveau dans le genre)
- Acide-1,5-di-*O*-cafféoylquinique (nouveau dans l'espèce)
- Quercétine-7-*O*- β -glucoside (nouveau dans le genre)
- Quercétagine-7-*O*- β -glucoside (nouveau dans l'espèce)

L'évaluation biologique de la majorité des produits isolés de l'espèce *S. giganteus* a été mise en évidence. Par rapport au molécule témoin l'acide chlorogénique (2890 TE/g), les flavonoïdes glycosylés ont été identifiés comme répondant à l'activité antioxydante (teste DPPH) en commençant par l'hyperoside qui a montré une grande capacité du pouvoir antioxydant (5819 TE/g) ainsi que la quercétine-3-*O*- β -glucuronide (2846 TE/g) et la quercétine-3-*O*- β -robinobioside (2076 TE/g) et en terminant par l'isorhamnétine-3-*O*- β -glucuronide-6"-méthyle (194 TE/g), qui a présenté une activité antioxydante modérée. L'acide chlorogénique et son dérivé ester isolés de la dite espèce ont été démontrés pour être des molécules antioxydantes, alors que la jacaranone et son dérivé lactonique n'étaient pas actifs.

Le test anti-AGEs appliqué sur la majorité des flavonoïdes séparés de l'extrait butanolique de *S. giganteus* a été positif. Seulement 1 % des AGEs trouvés (3.10^{-3} M) par rapport au témoin, l'aminoguanidine (3.10^{-3} M) qui présente 50 % d'inhibition de la formation des AGEs. L'acide chlorogénique (3.10^{-3} M) présente seulement 49 % d'inhibition de la formation des AGEs, alors que, le dérivé lactonique de la jacaranone n'était pas actif.

La quercétagine-7-*O*- β -glycoside isolée de *C. myconis* a été trouvée en possession d'une forte activité antibactérienne contre la bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et une activité modérée contre la bactérie *Escherichia coli* ATCC 25922, alors qu'aucune activité n'a été observée contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Résumé

Ce travail concerne la détermination structurale et l'évaluation biologique de substances naturelles isolées de quelques espèces de la famille **Asteraceae**: ***Senecio giganteus* Desf.** et ***Chrysanthemum myconis* L.** Cette étude a mené à l'isolement de douze composés phénoliques de l'extrait butanolique des fleurs de l'espèce *S. giganteus* (six flavonols glycosylés, acide chlorogénique et son dérivé butyle ester, Jacaranone et son dérivé lactonique, (-)-L-*chiro*-Inositol) en combinant des techniques de purification classique et la chromatographie de partage centrifuge (CPC). Le douzième composé est en cour d'identification. Quatre composés ont été identifiés des extraits polaires des parties aériennes de l'espèce *C. myconis*: 6-méthoxy-7-méthylendioxy coumarine, acide-1,5-di-*O*-cafféoylquinique, quercétine-7-*O*- β -glucoside et quercétagine-7-*O*- β -glucoside. Les structures des composés isolés ont été élucidées par l'utilisation de techniques de RMN 1D et 2D, spectroscopie de masse, spectroscopie UV et hydrolyse acide. La majorité des composés isolés de l'extrait butanolique de l'espèce *S. giganteus* ont montré une grande capacité du pouvoir antioxydant ainsi qu'une forte inhibition de la formation des AGEs. La quercétagine-7-*O*- β -glycoside isolée de l'extrait butanolique de *C. myconis* a été trouvée en possession d'une forte activité antibactérienne contre la bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et une activité modérée contre la bactérie *Escherichia coli* ATCC 25922, alors qu'aucune activité n'a été observée contre la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Mots clés : Asteraceae, *Senecio*, *Chrysanthemum*, Flavonoïdes, Coumarine, Acides phénoliques, quinones, Chromatographie de Partage Centrifuge, activité anti-oxydante, activité anti-AGEs, activité antibactérienne

Summary

The present work deals with the structural determination and biological evaluation of some natural compounds isolated from two species of the Asteraceae family: *Senecio giganteus* Desf. and *Chrysanthemum myconis* L. The study led to the isolation of twelve phenolic compounds from the butanolic extract of flowers of the species *S. giganteus* (six glycosylated flavonols, Chlorogenic acid and its derivative butyl ester, Jacaranone and its derivative lactone, (-)-L-*chiro*-Inositol) by combining classical techniques purification and Centrifugal Partition Chromatography. The last compound is not yet identified. As far as the species *C. myconis* is concerned, four compounds were identified in polar extracts of the aerial parts: 6-methoxy-7-methylenedioxy coumarin, 1,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, quercetin-7-*O*- β -glucoside and quercetagenin-7-*O*- β -glucoside. The structures of compounds were elucidated by NMR techniques using 1D and 2D, mass spectroscopy, UV spectroscopy and acid hydrolysis. The majority of compounds isolated from the butanolic extract of the species *S. giganteus* display a powerful antioxidant effect and they showed a great ability to inhibit the formation of AGEs. The quercetagenin-7-*O*- β -glycoside isolated from the butanolic extract of *C. myconis* was found to involve a strong antibacterial activity against the bacterium *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and moderate activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, while no activity was observed against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Keywords: Asteraceae, *Senecio*, *Chrysanthemum*, Flavonoids, Coumarin, phenolic acids, quinones, Centrifugal Partition Chromatography, anti-oxidant, anti-AGEs, antibacterial activity

ملخص

هذا العمل مخصص لتحديد البنيوي و التقييم البيولوجي لمركبات طبيعية معزولة من جنسين أصيلين من العائلة المركبة. *Senecio giganteus* Desf. و *Chrysanthemum myconis* L. سمح لنا هذا العمل بفصل اثني عشر مركبا فينوليا من المستخلص البيوتانولي لأزهار نبات *S. giganteus* (ست مركبات فلافونيدية جليكوزية، ثلاث أحماض فينولية، مركبين كينونيين) باستعمال تقنيات الكروماتوغرافيا الكلاسيكية و كروماتوغرافيا التوزيع الطرد المركزي. المركب الأخير هو الآن قيد الدراسة. أما دراسة الاجزاء الهوائية لنبات *C. myconis* فقد أدت إلى فصل و تحديد مركبين فلافونيديين جليكوزيين، مركب كومارين و حمض فينولي. إتمدنا في فصل و تنقية هذه المركبات على تقنيات الكروماتوغرافيا الكلاسيكية. و تم تحديد البنى الجزيئية للمركبات المفصولة باستعمال الطرق الفيزيائية: مطيافية إمتصاص الأشعة فوق البنفسجية (U.V)، مطيافية الكتلة و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي (1H RMN، ^{13}C RMN، RMN ثنائية البعد). أظهرت أغلبية المركبات المفصولة من المستخلص البيوتانولي لنبات *S. giganteus* نشاطا مضادا للأكسدة، كما أظهرت قدرة كبيرة على منع تشكيل الـ AGEs. كما أظهر المركب *Quercétagine-7-O-glucoside* المفصول من نبات *C. myconis* فعالية قوية مضادة لبكتيريا المكورات العنقودية ATCC25923 و نشاط معتدل ضد بكتيريا كولات ATCC25922، في حين أنه لم يلاحظ أي نشاط ضد بكتيريا الزائفة الزنجارية ATCC27853.

كلمات مفتاحية: Asteraceae، *Chrysanthemum*، *Senecio*، فلافونويدات جليكوزية، كومارين، أحماض فينولية، كينونات، كروماتوغرافيا التوزيع الطرد المركزي، فعالية مضادة للأكسدة، فعالية مضادة للـ AGEs، فعالية مضادة للبكتيريا

