

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

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre.....

Série.....

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences
en Chimie organique

OPTION :

Phytochimie

Etude phytochimique et biologique des espèces
Chrysanthemum segetum* L. (Asteraceae) et *Limonium
***pruinatum* (L.) Chaz. (Plumbaginaceae).**

Par

M^{lle}. KENNOUCHE Samira

Devant le jury :

Mr. BENAYACHE Samir	Pr. Université Frères Mentouri Constantine	Président
Mr. BENTAMENE Ali	Pr. Université Frères Mentouri Constantine	Rapporteur
Mr. ZAITER Lahcene	Pr. Université Frères Mentouri Constantine	Examineur
Mr. BOUDJERDA Azzedine	Pr. Université Mohamed Seddik Benyahia Jijel	Examineur
M ^{me} . BENAÏSSA Ouahiba	MCA. Université Batna 2	Examinatrice
Mr. ZAIDI Farouk	MCA. Université Ferhat Abbas Sétif	Examineur

15 février 2017

Je dédie ce travail

A' mes chers Parents

A' mes sœurs et frères

A' toute ma famille

A mes amis et mes collègues

Samira

REMERCIEMENTS

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Monsieur **Ali BENTAMENE** Professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'a accordé dans la réalisation de ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le professeur **Samir BENAYACHE**, directeur de l'unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL) pour son accueil, son aide et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Lahcene ZAITER** de l'université des frères Mentouri, Constantine, qui a très amicalement accepté de juger ce travail. Je suis très flatté de le compter parmi les juges.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Azzedine BOUDJERDA** de l'université de Jijel, pour avoir accepté sans hésiter d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.*

*Je tiens à remercier Monsieur **Farouk ZAIDI** Maître de Conférences à l'université de Sétif d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je suis sensible à l'honneur que me fait Madame **Ouahiba BENAÏSSA**, Maître de conférence à l'université de Batna, en acceptant de juger ce travail.*

*Ma spéciale gratitude et mes grands remerciements sont adressés à Monsieur **Guella GRAZIANO** Professeur à l'université de trento (Italia), Monsieur **Gian Carlo TENORE** Professeur à l'université Frédéric II de Naples (Italia) pour leur accueil et leur aide durant mes courts stages dans leurs laboratoires.*

*Je remercie aussi Monsieur le professeur **Hocine Laouer** et Monsieur le professeur **Mohamed KAABECHE** de l'université de Sétif pour l'identification botanique de deux plantes.*

*Je remercie très chaleureusement Madame **Djamila ZAAMA**, Maitre de Conférences à l'université des frères Mentouri, Constantine pour avoir réalisé les tests biologiques.*

*J'adresse un grand merci à Madame **Fadila BENAYACHE**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine, pour sa disponibilité, ses conseils éclairés et pour toute l'aide qu'elle m'a accordée.*

*Je remercie en particulier Madame **Sabrina BICHA**, Maitre de conférences à l'université des frères Mentouri, Constantine pour son encouragement, son soutien moral, son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit et son amitié.*

*Ma reconnaissance va également à Monsieur **Ramdane SEGHIRI**, professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine pour son aide précieuse.*

Un très grand merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études et la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée. Merci à toute ma famille et mes amies pour leur présence à mes côtés.

Enfin, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

ABREVIATIONS

H₂O : Eau

BuOH : Butanol

MeOH: Methanol

MeCN: Acétonitrile

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

NaOH : Hydroxyde de Sodium

NaOAc: Acétate de Sodium

H₃BO₃ : Acide borique

HCl : Acide chlorhydrique

AcOEt : Acétate d'éthyle

CHCl₃ : Chloroforme

CDCl₃ : Chloroforme deutéré

CD₃OD : Méthanol deutéré

DMSO-d₆: diméthylsulfoxyde deutéré

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

UV : Ultra-Violet

ESI : Ionisation par électrospray

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

¹H : Proton

¹³C : Carbone 13

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfert

COSY: Correlated Spectroscopy

HMBC: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Correlation

δ (ppm) : Déplacement chimique en partie par million

J (Hz) : Constante de couplage exprimé en hertz

s : Singulet

d : Doublet

dd : Doublet de doublet

t : Triplet

q : Quadruplet

m : Multiplet

m/z : Masse / charge électrique

IC 50 : Concentration Inhibitrice à 50%

DPPH[•] : 1,1-Diphényl-2-Pyryl-Hydrazyl

CUPRAC : capacité antioxydante par réduction du cuivre

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

HPLC-DAD : Chromatographie Liquide Haute Performance Coupleé à un détecteur à barrette de diodes

UHPLC-MS : Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance Coupleé à la Spectrométrie de Masse

C18 : Silice greffée

tr : Temps de retention

δC : Déplacement chimique du carbone en ppm

δH : Déplacement chimique du carbone en ppm

ESI : ionisation par électrospray

UV : Ultra-Violet

λmax : longueur d'onde maximale

Les unités couramment utilisées sont citées ci-dessous :

°C : Température en degrés Celsius

eV : Electron Volt

g : Gramme

Hz : Hertz

MHz : Mega hertz

mg : Milligramme

mn: Minute

ml : Millilitre

µg : Microgramme

% : Pourcentage

nm : Nanomètre

h : Heure

Da : Dalton (unité de masse moléculaire)

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Références bibliographiques.....	3

CHAPITRE I SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La famille des astéracées	4
I.1.1. Généralités.....	4
I.1.2. Systématique.....	4
I.1.3. Description botanique.....	4
I.1.4. Utilisation, Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique.....	5
I.1.5. le genre <i>Chrysanthemum</i>	6
I.1.5.1. Introduction.....	6
I.1.5.2. Systématique.....	6
I.1.5.3. Description botanique.....	6
I.1.5.4. Description géographique.....	7
I.1.5.5. Utilisation, Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique.....	7
I.1.5.6. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Chrysanthemum</i>	10
I.1.5.6. A. Les sesquiterpènes... ..	10
I.1.5.6. B. Les flavonoïdes	15
I.1.5.6.C. Les pyrétroïdes... ..	24

I.1.5.6.D. Les stéroïdes.....	25
I.1.5.6.E. Les polyacétylènes.....	29
I.2.La famille des Plumbaginacees.....	35
I.2.1.Généralités.....	35
I.2.2.Systematique.....	36
I.2.3. Description botanique.....	36
I.2.4.Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique.....	36
I.2.5. Le genre <i>Limonium tourn .ex Mill</i>	38
I.2.5.1.Introduction.....	38
I.2.5.2. Caractères généraux du genre <i>Limonium</i>	38
I.2.5.3. Etude pharmacologique du <i>Limonium</i>	40
I.2. 5.4.Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Limonium</i>	41
I.2. 5.4.A. Les flavonoïdes.....	41
I.2. 5.4.B. Divers.....	49
I.3.Conclusion.....	51
Références bibliographiques.....	52

CHAPITRE II PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. Etude phytochimique de l'espece <i>Chrysanthemum segetum</i> L.....	62
II.1.1. Place dans la systematique.....	62
II.1.2.Dénomination et synonyme.....	63

II.1.3. Description.....	63
II .1.4. Distribution géographique.....	64
II .1.5. Travaux antérieurs sur <i>Chrysanthemum segetum</i> .L	65
II .1.5.A. Les coumarine.....	65
II .1.5.B. Les flavonoides.....	67
II .1.5.C. Les composés acétyléniques.....	68
II .1.5.D. Autres composés.....	71
II.1.6.Utilisation.....	71
II.1.7. Matériel végétal.....	71
II.1.8. Traitement des extraits de l'espèce <i>C.segetum</i>	72
II.1.8.1.Traitement de l'extrait chloroforme.....	72
II.1.8.1.A. Chromatographie des fractions de l'extrait chloroforme.....	73
II.1.8.2. Analyse qualitative des extraits acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanol de l'espèce <i>Chrysanthemum segetum</i> par HPLC-DAD et UHPLC- ESI-MS.....	75
II.1.8.2.A. Analyses par HPLC-DAD.....	75
II.1.8.2.B . Analyses UHPLC-ESI-MS.....	77
II.2.Etude phytochimique de l'espèce <i>Limonium pruinorum</i>	80
II.2.1. Place dans la systematique.....	80
II.2.2. Dénomination et synonyme.....	81
II.2.3.Distribution géographique.....	81
II.2.4.Description botanique	82
II.2.5.Utilisation.....	82

II.2.6.Travaux antérieurs sur <i>Limonium pruinosum</i>	82
II.2.7.Matériel végétal.....	85
II.2.8.Traitement des extraits de <i>L.pruinosum</i>	87
II.2.8.1.Traitement de l'extrait acétate d'éthyle.....	87
II.2.8.1.A. Chromatographie des fractions de l'extrait acétate d'éthyle.....	88
II .2.8.2.Traitement de l'extrait <i>n</i> - butanol.....	88
II .2.8.2.A.Chromatographie des fractions de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	89
II .2.Conclusion.....	90
Références bibliographiques.	91

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. 1 : Identification des produits de <i>C.segetum</i>	94
III. 1. 1 : Identification des produits de l'extrait chloroforme.....	94
III.1. 1.1. Identification du composé CSF4-2.....	94
III.1. 1.2. Identification du composé CSF7-2.....	102
III.1. 1.3. Identification du composé CSF7-3.....	105
III.1. 1.4. Identification du composé CSF7-4	112
III.1. 1.5. Identification du composé CSF11-3.....	118
III.1. 1.6. Identification du composé CSF12.....	122
III. 1. 2 : Analyse qualitative des extraits acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanol de <i>C.segetum</i>	129
III. 1. 2.1. Analyse qualitative des extraits acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanol par HPL-DAD.	129

III. 1. 2.1 . A. Analyse d'extrait acétate d'éthyle	129
III. 1. 2.1 .B. Analyse de l'extraits <i>n</i> -butanol.....	129
III. 1. 2.2. Analyse qualitative des extraits acétate d'éthyle et <i>n</i> -butanol par Chromatographie Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (UHPLC-MS)	131
III. 1. 2.3. Discussion.....	132
III. 2. Identification des produits de <i>L.prunosuim</i>	137
III. 2. 1. Identification des produits de l'extrait EtOAc.....	137
III. 2. 1.1. Identification du composé LPF06.....	137
III. 2. 1.2. Identification du composé LPF09.....	145
III. 2. 2. Identification des produits de l'extrait butanolique.....	150
III. 2. 2.1. Identification du composé LPF02.....	150
III. 2. 2.2. Identification du composé LPF07.....	157
III. 2. 2.3. Identification du composé LPF25.....	163
III. 3. Conclusion.....	169
Références bibliographiques	170

CHAPITRE IV ACTIVITE BIOLOGIQUE

IV.1. Introduction.....	174
IV.2. Stress oxydatif et Radicaux libres.....	174
IV.2.1. Définition du stress oxydatif.....	174

IV.2.2. Définition des radicaux libres.....	174
IV.2.3. Définition des espèces réactives oxygénées (ROS).....	174
IV.3. Les Antioxydants.....	175
IV.4. Définition d'un antioxydant.....	175
IV.5. Les antioxydants naturels.....	175
IV .5.1. La vitamine C (acide ascorbique).....	176
IV.5.2. La vitamine E (tocophérol).....	176
IV.5.3. Les caroténoïdes.....	176
IV.5.4. Les polyphénols.....	177
IV.6. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes.....	178
IV.7. Activités antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle et des flavonoïdes isolés de l'espèce <i>Limonium pruinosum</i>	179
IV.7. 1. Matériel Végétale.....	179
IV.7. 2. Dosage des polyphénols.....	180
IV.7.3. Activité antiradicalaire au DPPH.....	180
IV.7.4. Résultats et discussion.....	182
IV.7.5.Conclusion.....	185
IV.8. Activités antioxydante des différents extrait de <i>C. segetum</i>	185
IV.8. 1. Matériel Végétale.....	185
IV.8. 2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	185
IV.8. 2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	185
IV.8. 2.2. Dosage des flavonoïdes	185

IV.8. 3. Etude de l'activité anti-radicalaire.....	186
IV.8. 3.1. Test d'inhibition du radical DPPH.....	186
IV.8. 3.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre(CUPRAC).....	186
IV.8. 4. Résultats et discussion.....	187
IV.8. 4.1. Résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes	187
IV.8. 4.2. Résultats des tests antioxydants.....	188
IV.8.5. Conclusion.....	191
Références bibliographiques.....	192
Conclusion générale.....	195

INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des milliers d'années, l'humanité a toujours utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies [1], ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels, attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire [2]. Les médicaments à base de plantes sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs datant du XIX^e siècle, en améliorant la connaissance des structures a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type [3].

La recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur la répartition des plantes médicinales et sur les études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes d'une zone ou d'un pays, puis par des études phytochimiques et pharmacologiques, de ce fait la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays.

Il existe environ 300 000 espèces de plantes à fleurs sur terre, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques [4], ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

La flore algérienne compte près de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques [5], reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique.

La connaissance des constituants chimiques des plantes facilite l'étude de leur activité biologique et un meilleur contrôle de qualité en vue d'une préparation pharmaceutique.

C'est dans ce cadre que notre travail a porté sur une étude phytochimique et biologique de :

1. L'espèce *chrysanthemum segetum* L, plante originaire de la région Méditerranéenne [6] appartenant à la famille des composées. En effet, les études chimiques réalisées sur le genre *Chrysanthemum* ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, des lactones sesquiterpéniques et des polyacétylènes [7-9].

2. L'espèce *Limonium pruinosum* L, est une plante appartenant à la famille des plombaginacees, les diverses investigations phytochimiques menées sur le genre *Limonium*, ont montré une richesse remarquable en composés phénoliques notamment les flavonoïdes [10-11].

Notre travail sera divisé en quatre chapitres :

Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique des plantes étudiées et en particulier des genres *Chrysanthemum* et *Limonium* portant sur l'aspect botanique, l'utilisation en médecine traditionnelle et les différentes classes de métabolites antérieurement isolés.

Le second chapitre sera consacré à l'étude phytochimique des espèces *Chrysanthemum segetum* et *Limonium pruinosum*. Pour chaque espèce, nous présenterons les étapes d'extraction, du fractionnement et d'isolement, ainsi que les méthodes d'analyse des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *C. segetum*.

L'interprétation des résultats et la détermination structurale des composés isolés ainsi que les composés identifiés par UHPLC /MS des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *C.segetum* seront détaillées dans le troisième chapitre, en plus la discussion des résultats obtenus.

Le dernier chapitre sera consacré à l'activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *L.pruinosum* et des flavonoïdes qui ont été isolés à partir de cet extrait ainsi que les trois extraits organiques de l'espèce *C. segetum*.

À la fin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- [1] Lee K H., 2004, Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead. *Journal of Natural Products* 67: 273-283.
- [2] World Health Organization. 2002, WHO traditional medicine strategy 2002-2005.
- [3] Bahorun T., 1997, Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research*, 83-94.
- [4] Verpoorte R., Contin A., Memelink J., 2002, Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1):13-25.
- [5] Quezel P., Santa S., 1963, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques. Tome I, CNRS, Paris.
- [6] Zajac M., Zajac A., Tokarska-Guzik B., 2009, Extinct and endangered archaeophytes and the dynamics of their diversity in Poland. *Biodiversity, Research and Conservation*, 13(-1):17-24.
- [7] Lin L Z., Harnly J M., 2010, Identification of the phenolic components of *Chrysanthemum* flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*, 120(1): 319-326.
- [8] Mladenova K., Tsankova E., Ivanova B S., 1985, Sesquiterpene lactones from *Chrysanthemum indicum*. *Planta Medica*, 51(3):284-285.
- [9] Wrang P A., Lam J., 1975, Polyacetylenes from *Chrysanthemum leucanthemum*. *Phytochemistry*, 14(4):1027-1035.
- [10] Korul Kina L M., Shul'ts E E., Zhusupova G E., Abilov Zh A., Erzhanov K B., Chaudri M I., 2004, Biologically active compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(5):465-471.
- [11] Ye G., Huang Ch., 2006, Flavonoids of *Limonium aureum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(2): 232-234.

CHAPITRE I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. LA FAMILLE DES ASTERACEES (COMPOSEES)

I.1.1. Généralités

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. La famille des composées est celle qui compte le plus grand nombre d'espèces soit environ 25000 espèces réparties en 1300 genres [1], ce qui représente environ 8 à 10% de toutes les plantes à fleurs. Les composées ont une distribution mondiale (sauf l'Antarctique) avec une large diversification écologique. Toutefois, elles sont abondantes principalement dans les régions tropicales et subtropicales bordant les zones semi-arides et désertiques, elles sont moins fréquentes dans les forêts tropicales.

Les genres les plus importants du point de vue nombre d'espèces sont : *Senecio* (1500 espèces), *Vernonia* (1000 espèces), *Cousinia* (600 espèces) et *Centaurea* (600 espèces). D'après Quezel et Santa, en Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces [2].

I.1.2. 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.1.3. Description botanique

Les Asteraceae ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules c'est –à dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige ou entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelée un involucre [3]. La fleur des Asteraceae est très particulière: les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situées des "brosses à pollen". Ceci est adapté à un mode de pollinisation «à piston». La croissance rapide du style permet un brossage du pollen et sa récupération. Une fois que le stigmate a traversé le tube formé par les anthères, les stigmates se déplient et exposent leur face gluante au pollen. Il faut considérer qu'à ce moment-là, du nectar est sécrété.

L'inflorescence est ordinairement un compact de fleurs sessiles tubulées et/ou ligulées soustendu par un involucre de bractées disposées sur un ou plusieurs rangs (Figure I.1) Les bractées peuvent être herbacées, scarieuses ou épineuses. Sur le réceptacle, les bractéoles, si elles sont présentes, peuvent prendre la forme d'écailles, de soies ou de paillettes. Le capitule est entouré à la base généralement par 1 à 6 séries de bractées dont l'ensemble forme l'involucre.

Les fruits sont des achaines et contenant chacun une seule graine. L'ornementation joue un rôle important dans la reconnaissance des genres et espèces. Les caractères du fruit sont généralement identiques pour les diverses espèces du même genre [4].



Figure I.1: Types des fleurs des Astéracée

I.1.4. Utilisation Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique

La famille des Composées contient plus de dix mille espèces, la grande majorité des espèces étant comestibles, elle fournit des plantes alimentaires: La laitue est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon et du tournesol.

L'arnica montana est une plante vivace originaire des régions montagneuses de l'Europe et du sud de la Russie. Elle est décrite dans des pharmacopées européennes pour son usage dans le traitement de petits traumatismes comme les hématomes. Cette plante est utilisée traditionnellement en phytothérapie pour aider à soulager la douleur et/ou l'inflammation des muscles et des articulations (entorses, ecchymoses, douleur articulaire) [5, 6].

Les Astéracées fournissent également des insecticides : *Chrysanthemum cinerariaefolium* (L.) est une plante herbacée originaire des balkans, cette espèce donne des fleurs qui contiennent des pyréthrine non toxique pour les animaux à sang chaud, mais très toxique pour ceux à sang froid [7].

Le guayule (*Parthenium argentatum*), seconde source de caoutchouc naturel, exploité au début du siècle et en période de crise (1940-1945), pourrait reprendre une place économique importante. Grâce à la sélection variétale et à la stimulation de la production du caoutchouc dans la plante, les rendements à l'hectare vont approcher ceux de l'hévéa. Les procédés d'extraction du caoutchouc ont été améliorés récemment et donnent un caoutchouc identique à celui de l'hévéa [8].

Plusieurs espèces du genre *Artemisia* ont largement été utilisées en médecine, Traditionnelle et dans la préparation de liqueurs comme l'absinthe et le génépi [9].

I.1.5. LE GENRE *CHRYSANTHEMUM*

I.1.5.1. Introduction

Le genre *Chrysanthemum* appartient à la famille des composées (Astéracées), sous famille tubiflore et tribu anthémideae [2]. Le nom chrysanthème combine les mots grecs *chrysos*, or, et *antheon*, fleur [10]. Ce genre est apparu la première fois en 1694 dans l'ouvrage du botaniste français Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708) : « Éléments de Botanique ». En 1753, le botaniste suédois Carl von Linné (1707-1778), l'a repris dans sa classification binominale qui reste valide aujourd'hui.

I.1.5.2. Systématique

Le genre *Chrysanthemum* appartient à la famille Asteraceae, tribu Anthemideae [2].

- *Embranchement Phanerogamae (Phanérogames)
- *Classe Magnoliopsida (Dicotyledones)
- *Ordre Asterales
- *Famille Asteraceae (Compositae)
- *Tribu Anthemideae
- *Genre *Chrysanthemum* Linné

I.1.5.3. Description botanique

Le genre *Chrysanthemum* compte plus de 300 espèces dans le monde [11]. En Algérie, il compte environ 20 espèces dont 8 sont endémiques [2]. Les *Chrysanthèmes* sont des plantes annuelles ou vivaces de 20 à 120 cm de haut, à tiges dressées. Les feuilles sont alternes, à marge dentée en scie ou parfois entière. Les capitules sont à fleurs centrales jaunes et agrandis et à fleurs ligulées jaunes, blanches, orangés ou pourprés. L'involucre de bractée possède des

écailles à marge membraneuses très larges, à chaînes de deux sortes, les extrêmes différentes de celles du centre du capitule. Les fruits sont des akènes de 2-3 mm munis de 5-10 côtés [9].

I.1.5.4. Description géographique

Le *Chrysanthemum* est largement répandu dans le monde entier [12] à cause de ses propriétés ornementales et cosmopolites, il est souvent cultivé dans les jardins pour ses qualités décoratives en variétés de couleurs. L'origine géographique du genre *Chrysanthemum* est imputée à l'Asie de l'Est [13], Quezel et Santa (1963) considèrent que 20 espèces appartenant à ce genre sont distribuées en Algérie [2] : *C. Fontanesii* (B. et R.), *C. grandiflorum* (L.) Batt., *C. Maresii* Batt., *C. trifurcatum* (Desf.) B. et T., *C. Gayanum* Ball., *C. Reboudianum* (Pomel), *C. Parthenium* (L.) Pers., *C. corymbosum* L., *C. paludosum* Poiret., *C. macrocarpum* Coss et Kral. p.p., *C. fuscatum* Desf., *C. viscido-hirtum* (Schott.) Theil., *C. coronarium* L., *C. segetum* L., *C. macrocarpum* p.p., *C. deserticolum* Batt. et Trab., *C. macrotum* (Dur.) Ball., *C. multicaule* Desf., *C. Clausonis* (Pomel) Batt., *C. Myconis* L.

I.1.5.5. Utilisation Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique

Le *Chrysanthème* fut d'abord apprécié en Chine comme plante médicinale. Il est classé dans la plus ancienne matière médicale chinoise [14], ce genre est souvent consommé en Chine sous forme de tisane rafraîchissante, il possède des vertus calmantes et antiseptiques, combat les symptômes liés à l'hypertension artérielle [15].

Certaines espèces du genre *Chrysanthemum* sont utilisées en médecine traditionnelle populaire pour guérir bon nombre de maladies.

Le Tableau I.1. Représente les propriétés thérapeutiques des espèces du genre *Chrysanthemum*.

Espèce	Propriété thérapeutique	Médecine traditionnelle	Réf
<i>C.morifiliuom</i> Ramat.	Anticancéreuse Antimicrobienne Anti-inflammatoire Neuroprotectrice Cardioprotecteur Antidiabétique	Les maux de tête, le vertige, l'inflammation des yeux, les problèmes oculaires (vision floue), les démangeaisons, la perte de la vision, les yeux fatigués, la rougeur de l'œil, Carminatif, antipyrétique, sédatif	[16]
<i>C.balsamita</i> L.	Antimicrobienne Antifongique Hépatoprotectrice Anti-inflammatoire Analgésique Décongestive	Les blessures, les bulbes, les furoncles, les maux de dents, la chute des cheveux, les maladies du foie, les poumons, un remède, contre les parasites intestinaux.	[17]
<i>C.coronarum</i> L.	Antibactérienne. Antihypercholesterolemique Antihyperglycemique	gastrique, aromatique, expectorant, amer.	[18] [19] [20]
<i>C. leucanthemum</i> L.	Allergénique Anti-inflammatoire Antipyrétique Antisécrétoire Antispasmodique Diurétique, Emétique, Tonique	La fièvre, le diurétique, les sueurs nocturnes, la tuberculose, la coqueluche, la plaie, le fébrifuge, l'asthme, le cancer, le catarrhe, les crampes, les maux féminins.	[21] [22]

<i>C. zawadskii</i> var.	Antipyrétique Anti-inflammatoire Anti-allergique Anticancéreuse	La pneumonie, la bronchite, le rhume, la pharyngite, les troubles liés à la vessie, les maladies des femmes, l'hypertension, la toux ,les troubles gastro-entériques	[23] [24] [25]
<i>C.parthenium</i> L.	Antiagrégant , Antisecretory Anti allergénique Anti Alzheimeran Antiarthritique Antibactérienne, Anticancer, Antihistaminique Antiinflammatoire Antileucotriène Antipyrétique Antirhumatismal Antiseptique, Antisérotonine Antispasmodique, Antitumorale	Ulcérations de la bouche, la Stomatite , l'inflammation de la muqueuse buccale et de la langue, le gonflement des lèvres, la perte de goût, Les troubles urinaires , les maux de la tête, la diarrhée, la sécheresse de la bouche, la glossite, l'hypersensibilité, les nausées, la stomatosis , le vomissements	[21]
<i>C.inducim</i> L.	Activité antioxydante Anticancéreuse Antimicrobienne Anti-inflammatoire Neuroprotecteur Cardioprotecteur Antidiabétique	Amer, gastrique, aperiitif	[16] [20]

Tableau I.1: Les propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*

I.1.5.6. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Chrysanthemum*

Le genre *Chrysanthemum* est caractérisé par une diversité structurale en métabolites secondaires riche en composés de types : terpéniques, flavonoïdes, stéroïdes et pyréthrinés [26].

I.1.5.6.A. LES SESQUITERPENES

Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe important de substances dans la famille des Astéracées [27], chez ces dernières, les lactones sont fréquemment localisées dans les poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence.

Le genre *Chrysanthemum* est connu pour produire des lactones sesquiterpènes de types guaianolides et germacranolides.

Le tableau I.2. Ci-dessous représente les dérivés des sesquiterpènes et sesquiterpènes lactones isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*.

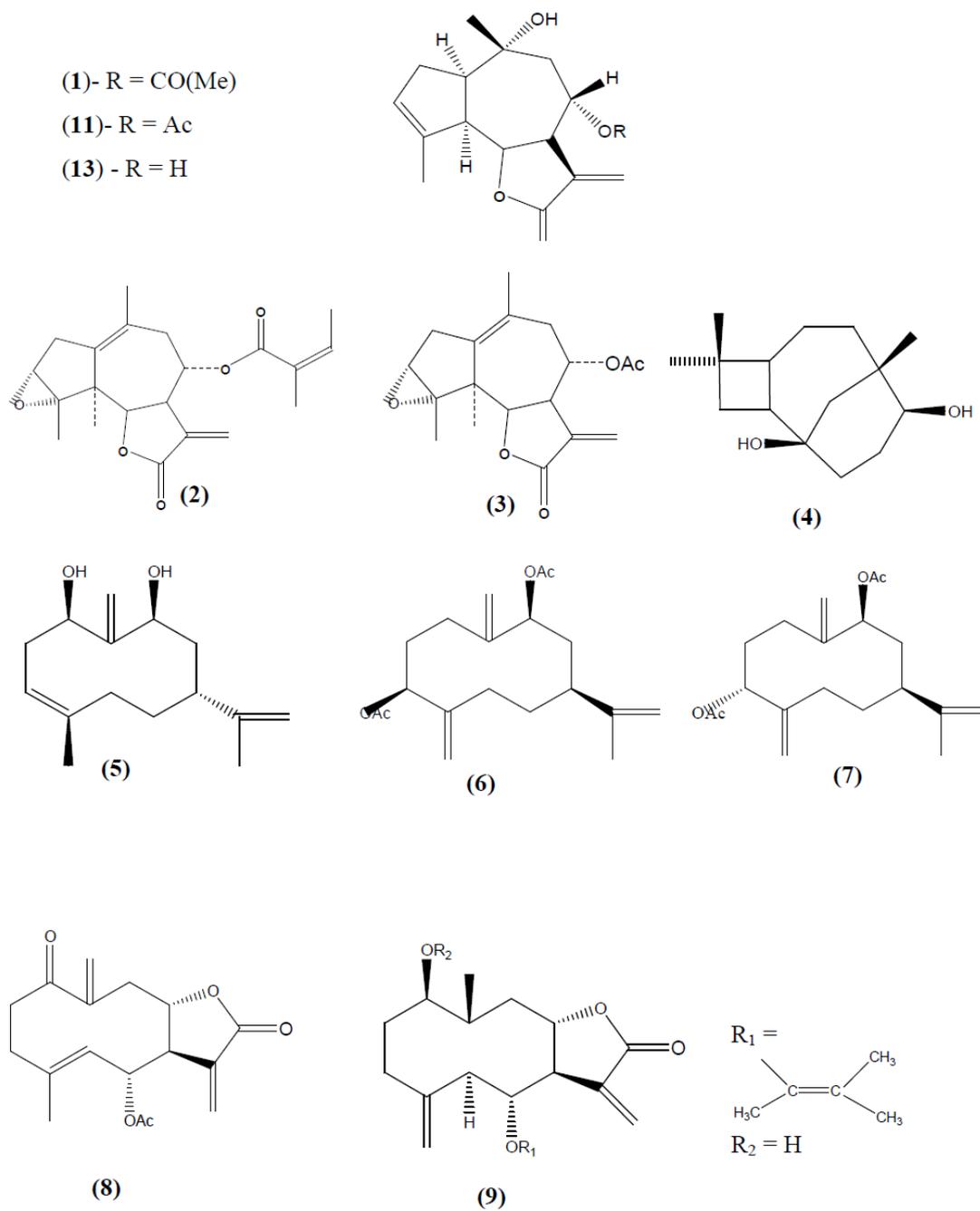
Composé	Partie étudiée	Espèces	Réf
AngeloylcumambrineB(1)	PE	<i>C. oranatum</i>	[28]
	AP	<i>C. indicum</i>	[29]
Angeloylajadine(2)	AP	<i>C. indicum</i>	
Arteglasine-A(3)	AP	/	[30]
Caryolane-1,9- β -diol(4)	FL	/	
Chrysanthediol-A (5)	FL	<i>C. morifolium</i>	[31]
Chrysanthediacetate-B (6)	FL	/	
Chrysanthediacetate-C (7)	FL	/	
Chrysanolide (8)	FL	<i>C. cinerariaefolium</i>	[32]
Chrysanine(9)		/	
Clovanediol(10)		<i>C. indicum</i>	[30]
Cumambrine-A(11)	PE	<i>C. oranatum</i>	[28]
	Cap	<i>C. coronarium</i>	[33]
Dihydrocumambrine-A (12)	Cap	<i>C. coronarium</i>	
Cumambrine-B (13)	PE	<i>C. oranatum</i>	[28]
Delobanone (14)	PF	<i>C. indicum</i>	[34]
β -Dictyopterole (15)	FL	<i>C. morifolium</i>	[31]
Handeline (16)	EP	<i>C. oranatum</i>	[28]
Indicumenone (17)	PF	<i>C. indicum</i>	[34]
Kikkanol-A (18)	FI	/	[30]
Kikkanol-B (19)	FI	/	
Kikkanol-C (20)	FL	/	
Kikkanol-D (21)	FL	/	
Kikkanol-D-monoacetate (22)	FL	/	
Kikkanol-E (23)	FL	/	
Kikkanol-F (24)	FL	/	

Kikkanol-F-monoacetate (25)	FL	/	
Oplopanone (26)	FL	/	
Pyrethrosine (27)	Cap	<i>C. cinerariaefolium</i>	[35]
β -Cyclopyrethrosine (28)	FL	/	[32]
Dihydro- β -cyclopyrethrosine (29)	FL	/	[32]
<i>cis</i> -spiroketalenoether polyynes (30)	FL	<i>C. indicum</i>	[30]
<i>trans</i> -spiroketalenoether polyynes (31)	FL	<i>C. indicum</i>	
Tatridine-A (32)	Cap	<i>C. cinerariaefolium</i>	
Tatridine-B (33)	/	/	
11 <i>R</i> -11,13-Dihydrotatridine-A (34)	/	/	
(11 <i>R</i>)-11,13-Dihydrotatridine-B (35)	/	/	
(11 <i>R</i>)-6- <i>O</i> - β -D-Glucosyl-11,13-dihydrotatridin-B (36)	/	/	[36]

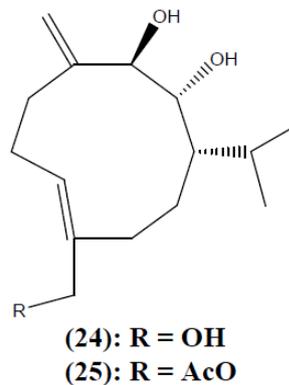
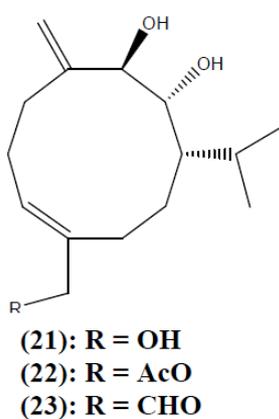
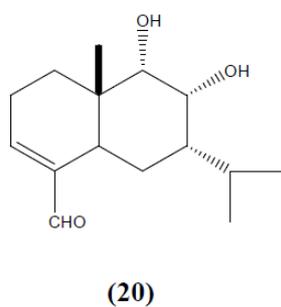
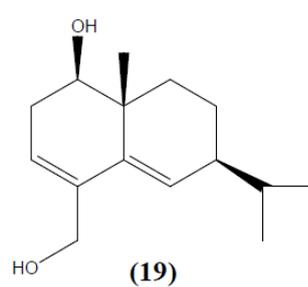
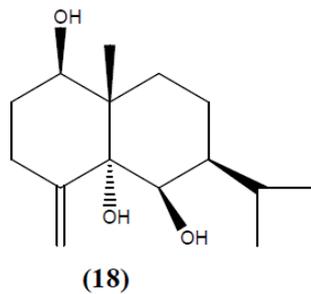
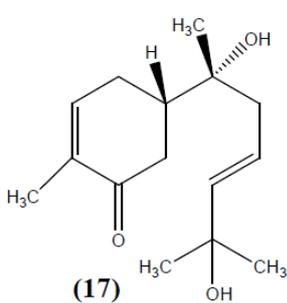
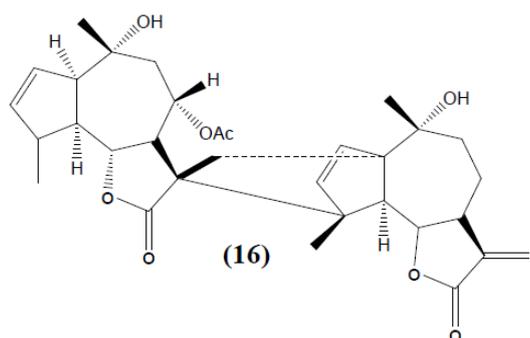
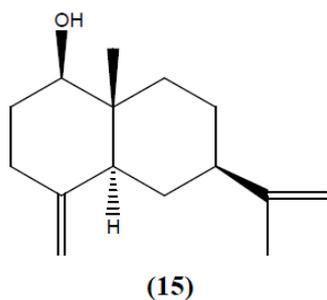
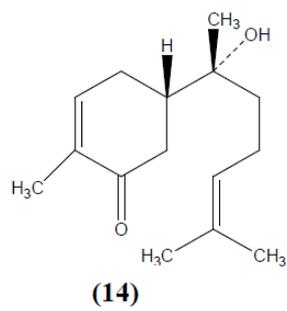
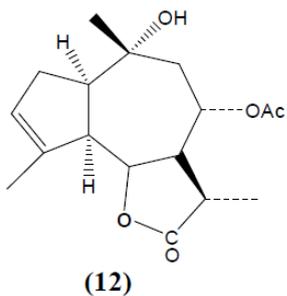
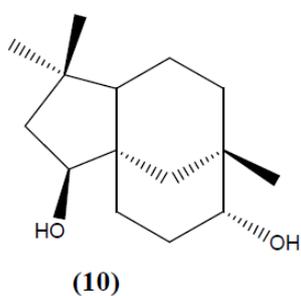
PE: Plante entière ; AP, Partie aérienne ; FL : Fleur ; Cap : Capitule ; PF : Petite fleur.

Tableau I.2: Les sesquiterpènes et sesquiterpènes lactones isolés du genre *Chrysanthemum*

Les structures des différents composés isolés des espèces du genre *Chrysanthemum* cités dans le tableau I.2 sont présentées dans la figure suivante (figure I.2).



Suite



Suite

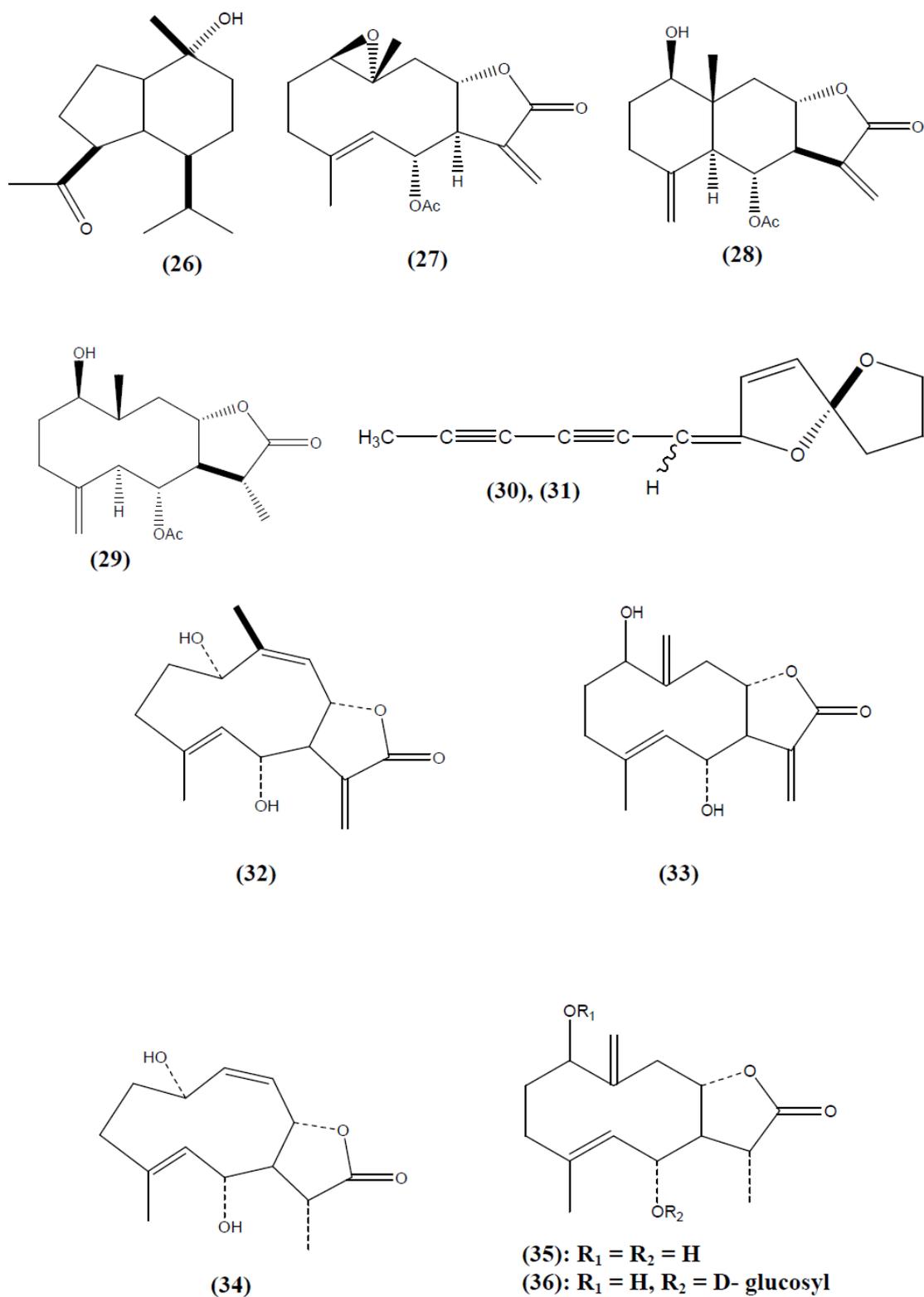


Figure I.2: les sesquiterpènes et sesquiterpènes lactones isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*

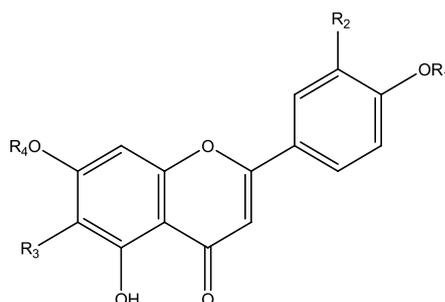
I.1.5.6.B. LES FLAVONOÏDES

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques très répandus dans le genre *Chrysanthemum* [37]. Ils sont présents dans presque tous les organes de la plante et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants [38], ils sont présents dans ce genre à l'état libre ou sous forme des hétérosides de flavones, flavonols et rarement des flavanones.

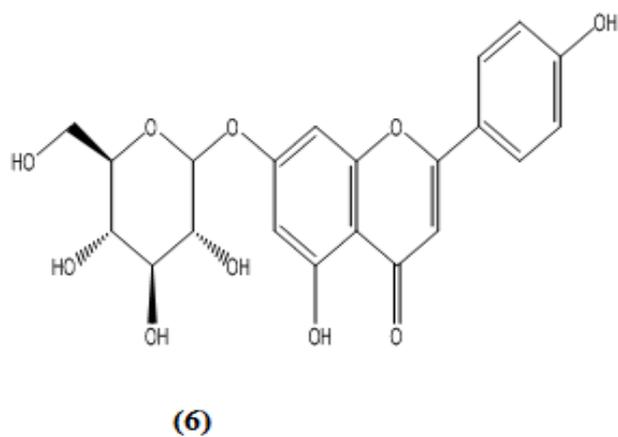
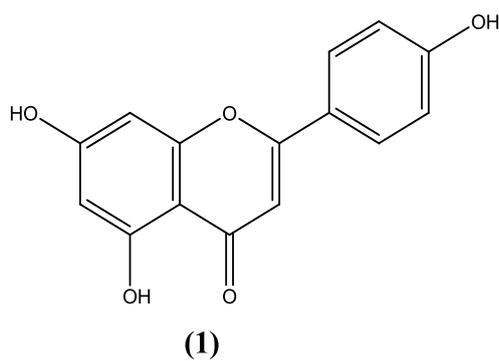
L'espèce la plus étudiée de ce genre est sans doute *C.morifolium* Ramat pour ses diverses propriétés thérapeutiques telles que antiradicalaire, antioxydante, anti-inflammatoire, anti-virus, anti-VIH, anti-mutagène, anticancéreux, anti-hépatotoxiques, et anti-âge activités qui sont considérées comme bénéfiques pour la santé humaine [39], ces effets seraient dus à la présence d'une grande quantité de flavonoïdes dans les fleurs.

Les flavonoïdes identifiés dans l'espèce *C. morifolium* Ramat . Illustrés par la Figure I.3

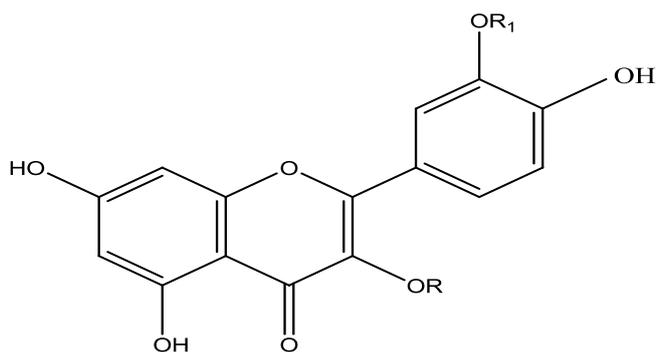
- **Flavone**



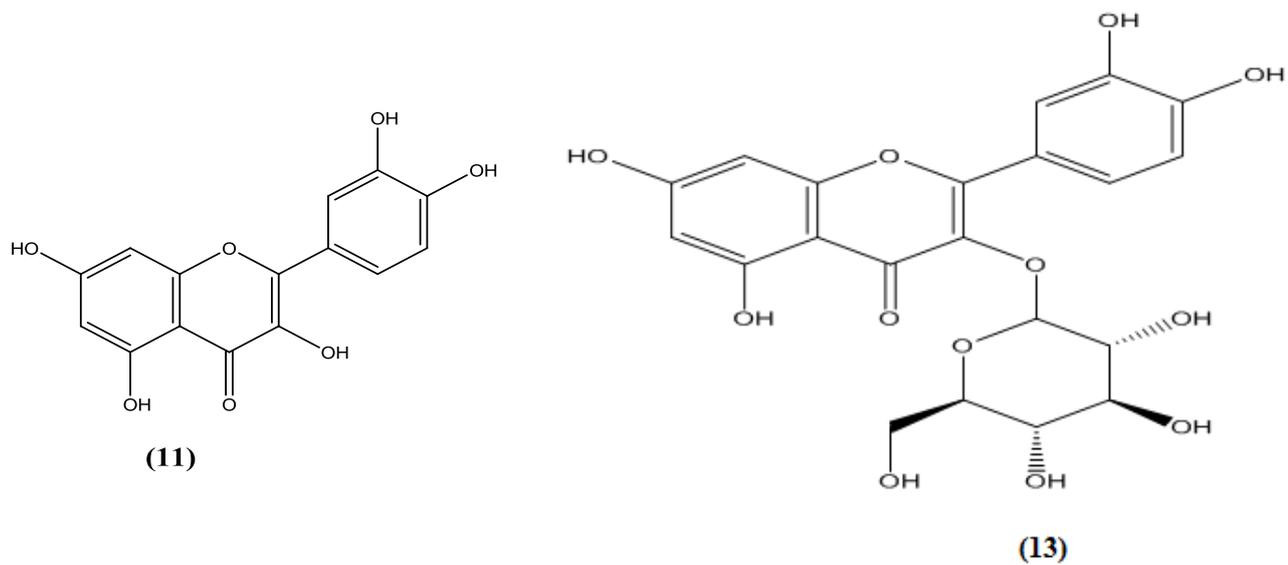
structure	Nom	R1	R2	R3	R4
1	Apigénine	H	H	H	H
2	Acacétine	CH3	H	H	H
3	Lutéoline	H	OH	H	H
4	Diosmétine	CH3	OH	H	H
5	Eupatorine	CH3	H	OH	H
6	Apigénine-7-O-glucoside	H	H	H	Glu
7	Acacétine-7-O-glucoside	CH3	H	H	Glu
8	Lutéoline-7-O-glucoside	H	OH	H	Glu
9	Diosmétine-7-O-glucoside	CH3	OH	H	Glu
10	Eupatorine-7-O-glucoside	CH3	H	OH	Glu



- **Flavonol**



structure	Non	R ₁	R
11	Quercétine	H	H
12	Isorhamnétine	CH ₃	H
13	Quercétine-3- <i>O</i> -glucoside	H	Glu
14	Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside	CH ₃	Glu



- Flavonone

Structure	Nom
15	Eriodictyole
16	Eriodictyole-7-O-glucoside

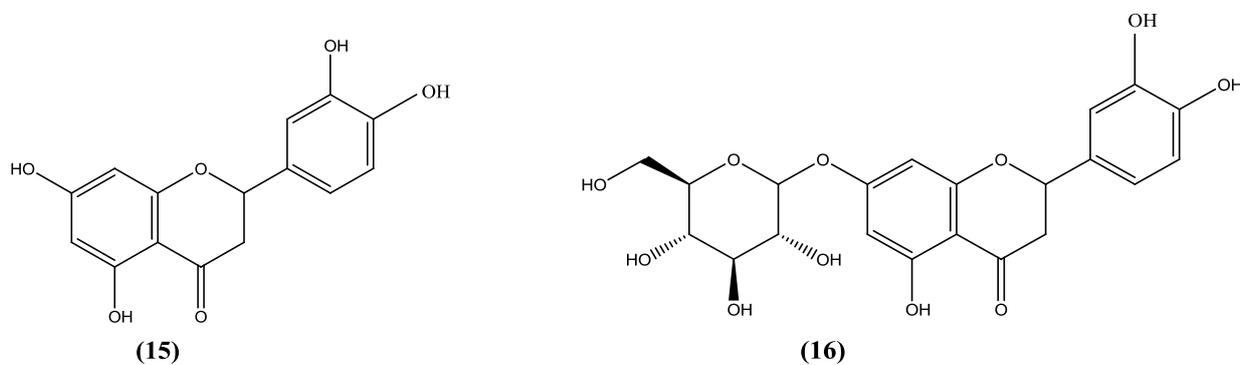
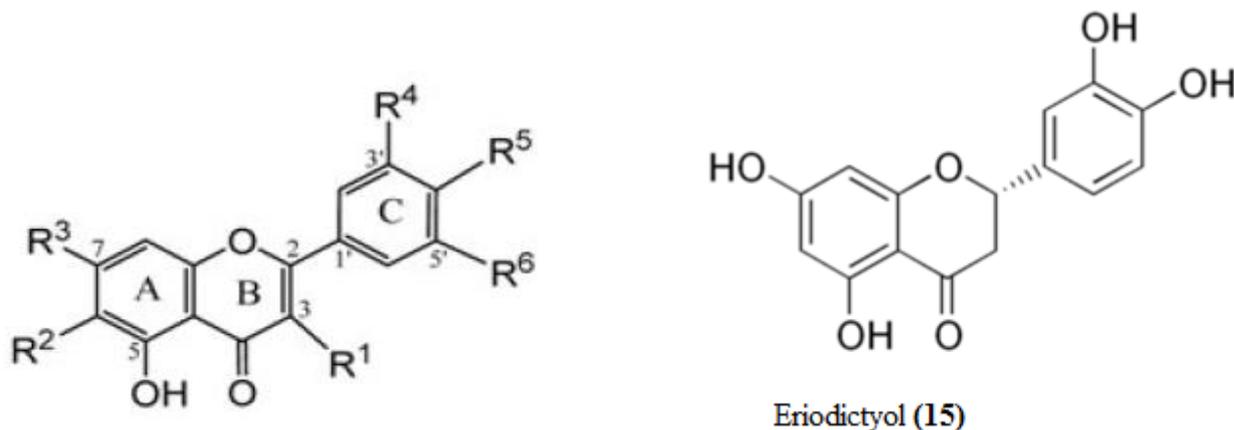


Figure I.3: Structures des flavonoïdes identifiés dans l'espèce *C. morifolium*

Ramat [39].

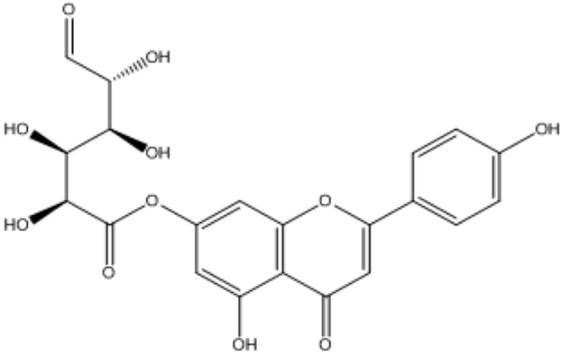
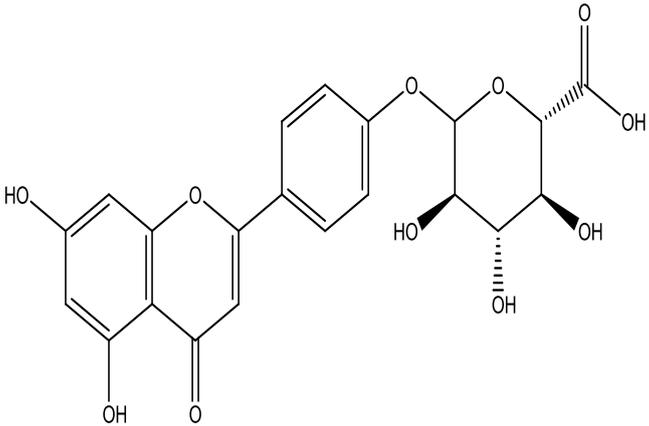
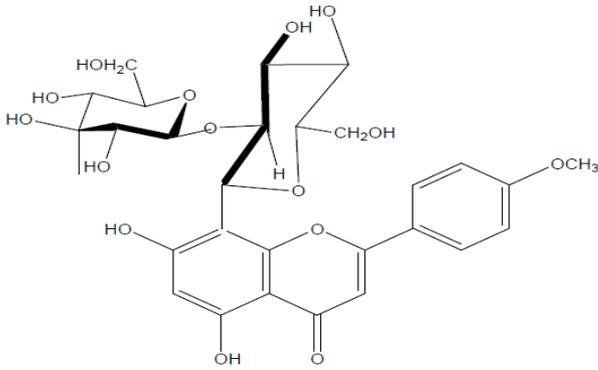
L'espèce *Chrysanthemum sinense* est également riche en flavonoïdes, une étude menée sur l'extrait de méthanol des feuilles de cette plante a permis d'obtenir 15 composés flavonoïdes[40].

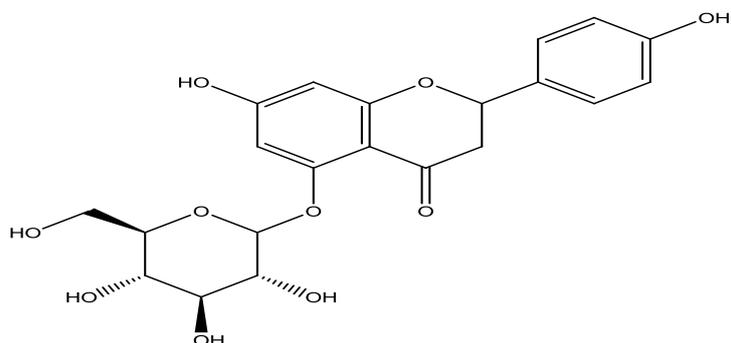


structure	Nom	R1	R2	R3	R4	R5	R6
17	7-O-(3-O-acetyl-β-D-glucopyranoside)	H	H	O-3-O-Ac-Glc	H	O-Me	H
18	Selgine	H	H	OH	OH	OH	O-Me
19	Lutéoline	H	H	OH	OH	OH	H
20	Diosmétine	H	H	OH	OH	O-Me	H
20	Apigénine	H	H	OH	H	OH	H
22	Eupafoline	H	OMe	OH	OH	OH	H
23	Chrysoériol	H	H	OH	O-Me	OH	H
24	Acacétine	H	H	OH	O-Me	O-Me	H
25	Jaceidin	OMe	OMe	OH	OH	OH	O-Me
26	Tricetin-3',4',5'-triméthyl ether	H	H	OH	O-Me	O-Me	O-Me
27	5,7,3'trihydroxy-6,4',5'-triméthoxyflavone	H	OMe	OH	OH	O-Me	O-Me
28	Apigénine-6,3',5'-triméthyl ether	H	OMe	OH	O-Me	OH	H
29	Acacétine- 7-O-β-D-Glucopyranoside	H	H	O-Glc	H	O-Me	H
30	Lutéoline-7-O-glucoside	H	H	O-Glc	OH	OH	H

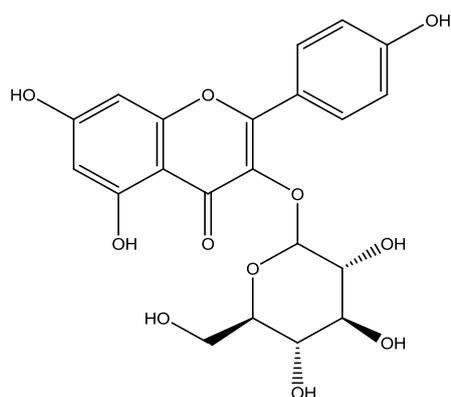
Tableau I.3: Les flavonoïdes identifiés dans l'espèce *Chrysanthemum sinense*.

Les différents flavonoïdes qui sont isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum* sont présentés dans le Tableau I.4.

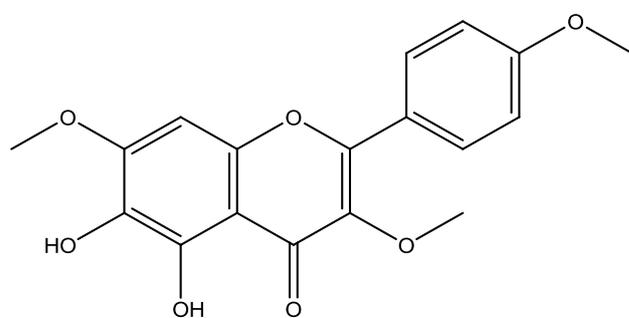
Structure	Source et référence
 <p data-bbox="351 862 837 900">Acide apigénine-7-glucuronique (31)</p>	
 <p data-bbox="391 1438 794 1476">Apigénine-4'-glucuronide (32)</p>	<p data-bbox="1061 1070 1369 1108"><i>C. cinerariaefolium</i>[41]</p>
 <p data-bbox="247 1937 933 1975">2''-glucosyl-8-C-glucosyl-4'-O-méthylapigénine (33)</p>	<p data-bbox="1077 1691 1353 1729"><i>C. viscidhirtum</i> [42]</p>



Naringinine-5-O- glucoside (34)

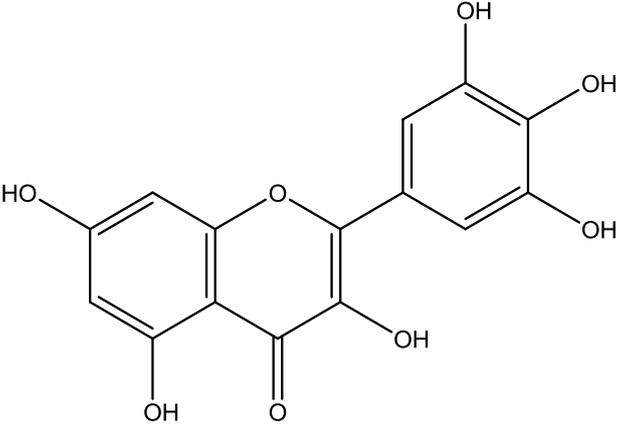
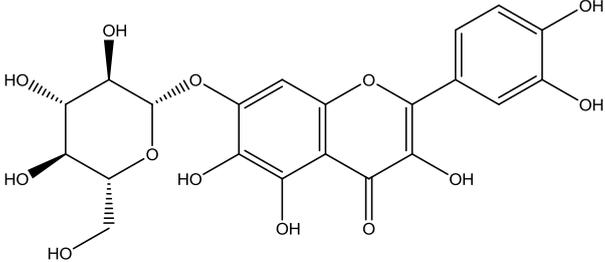
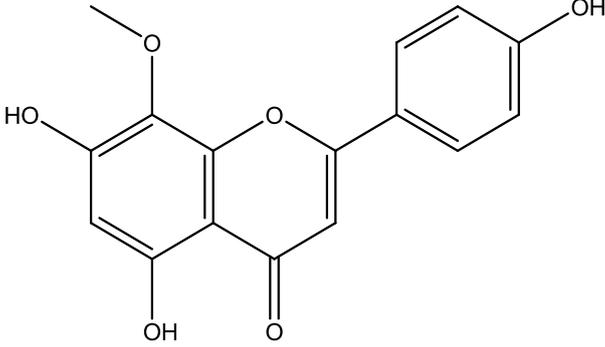


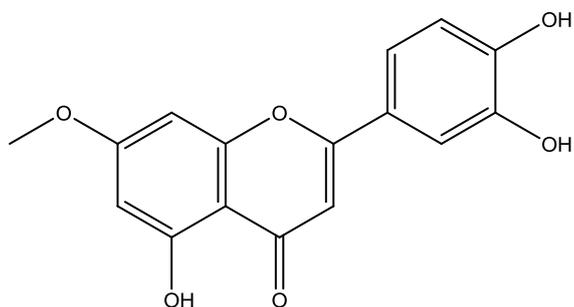
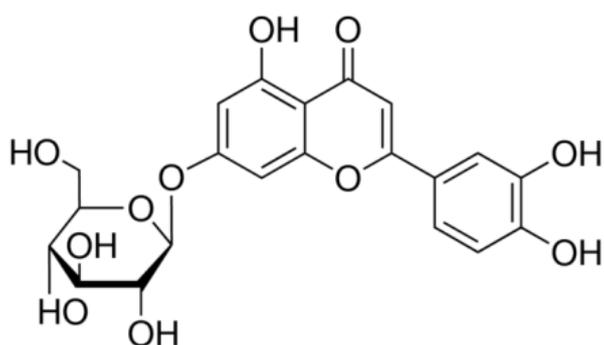
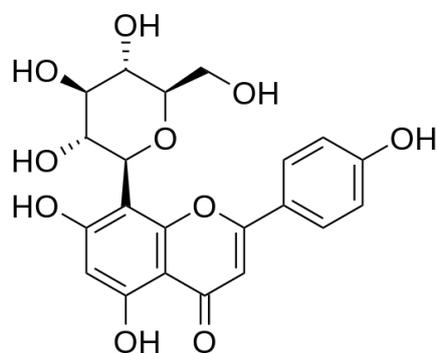
Kaempférol-3-O-glucoside (35)

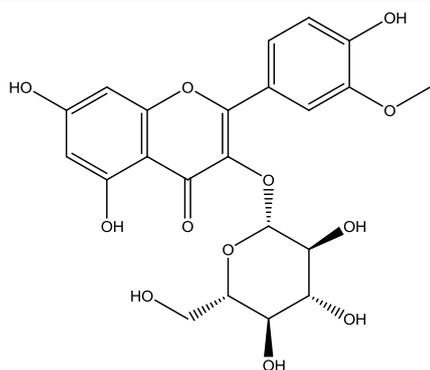


6-Hydroxykaempférol-3, 7, 4'-triméthylether (36)

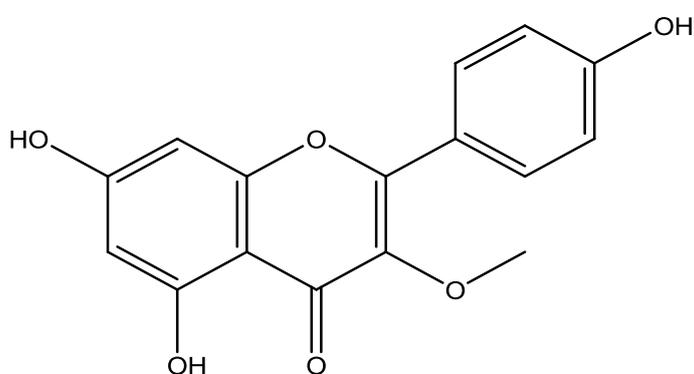
C. coronarium [43]*C. parthenium* [44]

 <p>Myricétine (37)</p>	<p><i>C.indicum</i> [45]</p>
 <p>Quercétagétine-7-O-glycoside (38)</p>	<p><i>C. myconis</i> [46]</p>
 <p>5,7,4'-trihydroxy-8-méthoxyflavone (39)</p>	<p><i>C.fuscatum</i> [47]</p>

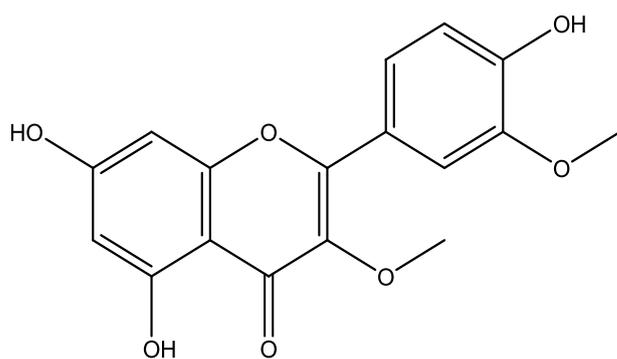
5,3',4'-trihydroxy-7-méthoxyflavone (**40**)5,3',4'-trihydroxy-7-O-glucosylflavone (**41**)Apigénine- 8-C-glucoside (**42**)



4',5,7-trihydroxy-3'-méthoxy-3-O-glucosylflavone (**43**)



4',5,7-trihydroxy-3-méthoxyflavone (**44**)



4',5,7-trihydroxy-3,3'-diméthoxyflavone (**45**)

C. fontanesii [48]

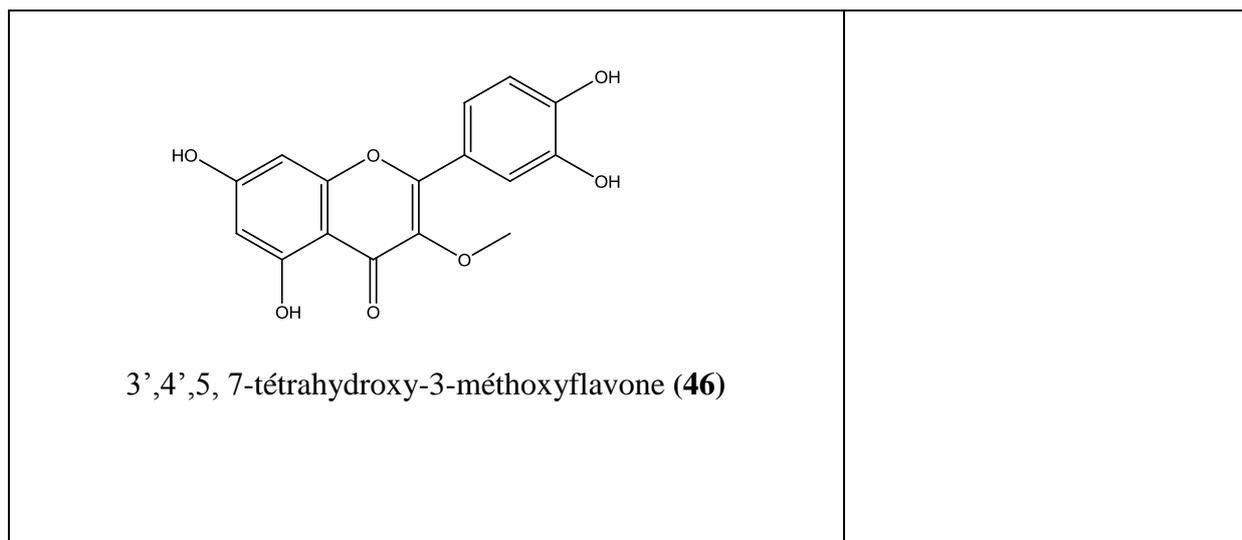
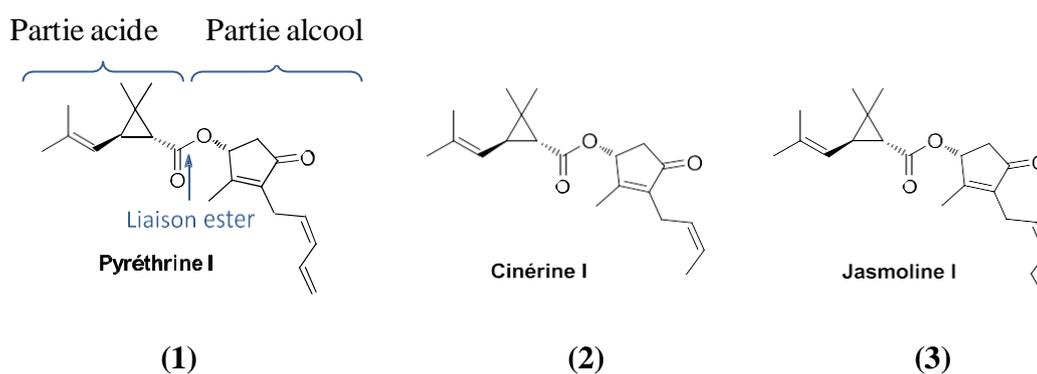


Tableau I .4: Flavonoïdes isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*

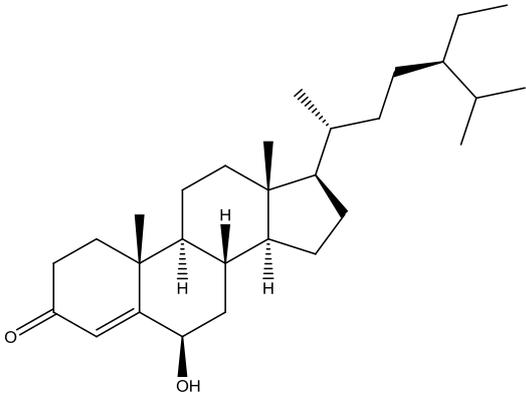
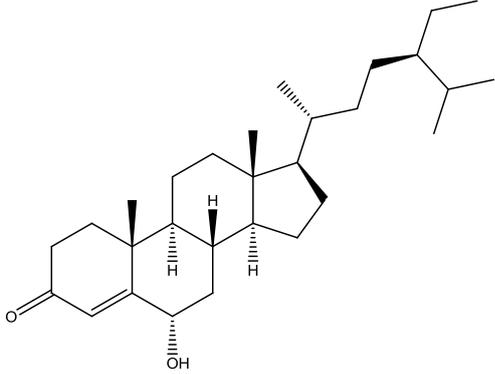
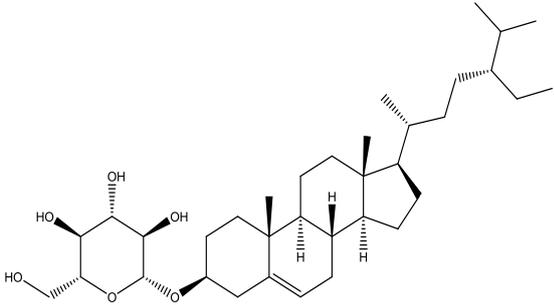
I.1.5.6.C. LES PYRETHRINOIDES

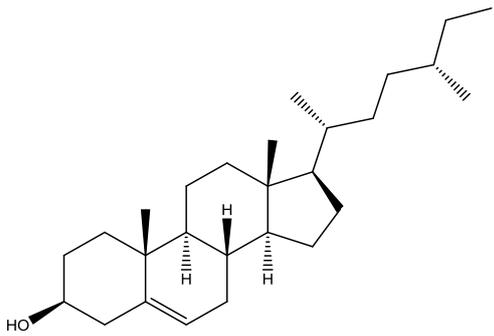
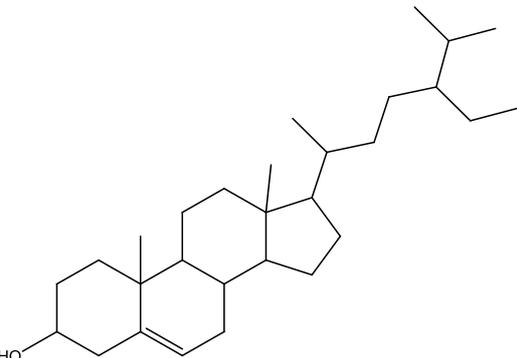
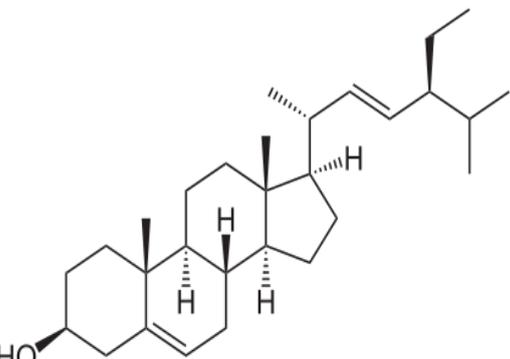
Les pyréthrine naturelles (pyréthroïdes) regroupent un ensemble de principes actifs d'origine végétale, dont les propriétés insecticides [49] sont connues depuis au moins le milieu des années 1800 [50] extraits de la fleur de Chrysanthème insecticide ou Pyrèthre de Dalmatie, plus particulièrement de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. L'étude phytochimique de cette espèce a permis d'isoler six composés [51].

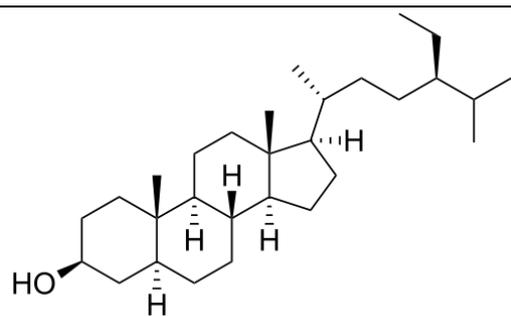
Pyréthrine I (**1**), Cinérine I (**2**), Jasmoline I (**3**), Pyréthrine II (**4**), Cinérine II (**5**), JasmolineII (**6**)



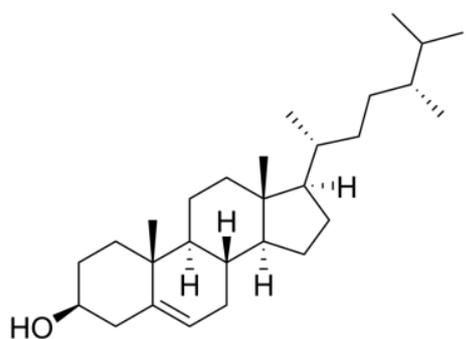
Quelques espèces ont permis d'isoler plusieurs composées stérols présentées dans le Tableau I.5

Structure	Source et référence
 <p>Stigmast-4-ene-6β-ol-3-one (1)</p>	
 <p>Stigmast-4-en-6α-ol-3-one (2)</p>	<p><i>C.coronarium</i> [54], [55]</p>
 <p>Daucostérol (3)</p>	

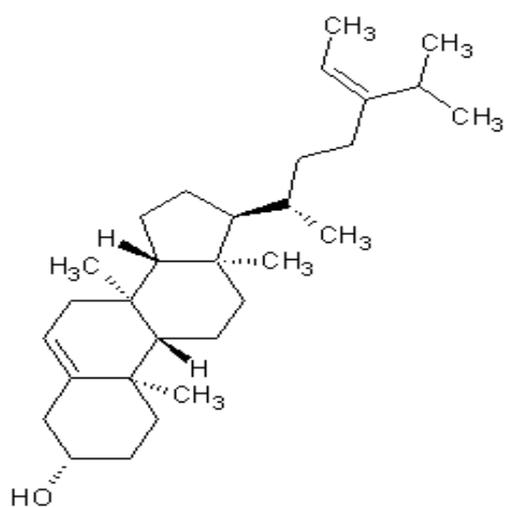
 <p>Campesterol (4)</p>	
 <p>β-sitostérol (5)</p>	<p><i>C. fontanesii</i> [48] <i>C. coronarium</i> [54] <i>C. parthenium</i> var. <i>Aureum</i> , [56] <i>C. parthenium</i> var. <i>Schneeball</i></p>
 <p>Stigmastérol (6)</p>	<p><i>C. parthenium</i> var. <i>Aureum</i> <i>C. parthenium</i> var. <i>Schneeball</i> [56]</p>



Stigmastanol (7)



Campesterol (8)



Fucostérol (9)

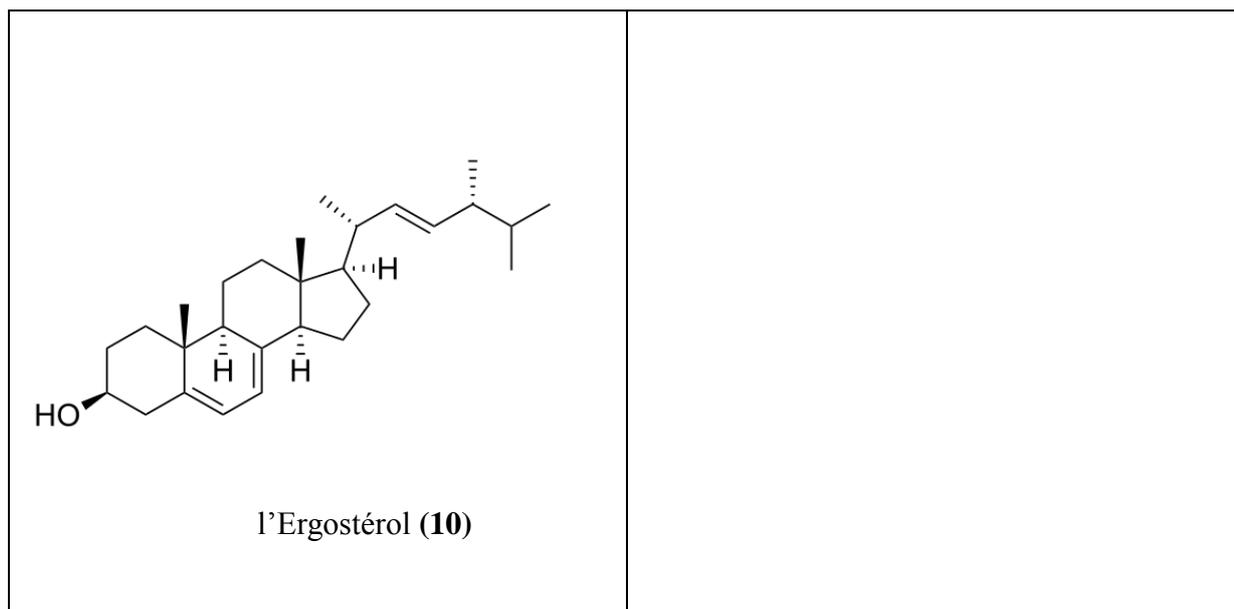


Tableau I.5 Structures chimiques des stérols isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*

I.1.5.6.E. LES POLYACÉTYLÈNES

Les polyacétylènes sont des exemples de métabolites secondaires bioactifs qui ont été jugés indésirables dans les aliments d'origine végétale en raison de leur toxicité [57].

Certains acétylènes sont connus pour être des sensibilisants cutanés puissants et irritants, et neurotoxiques à des concentrations élevées, mais ils ont également montré une activité cytotoxique sélective contre différentes cellules cancéreuses. En raison de leur rôle dans la défense de la plante, nombreux polyacétylènes sont considérés comme des pesticides naturels. Bien que de nombreux polyacétylènes soient toxiques lorsqu'ils sont ingérés en quantités relativement élevées, ils peuvent avoir des effets bénéfiques à de faibles concentrations, ce qui pourrait expliquer en partie les effets bénéfiques des plantes alimentaires où ils apparaissent

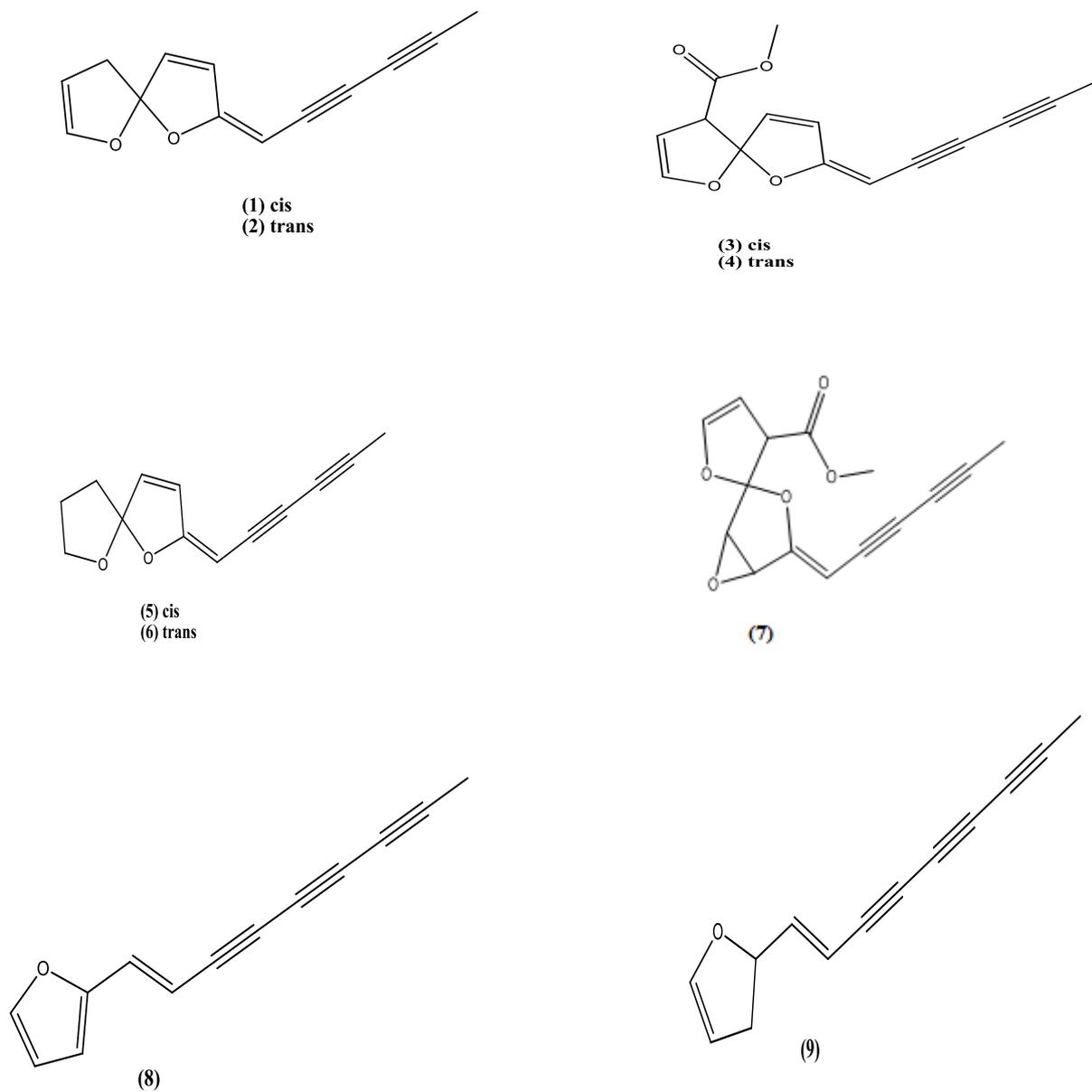
Les polyacétylènes forment, une importante classe du métabolisme secondaire présent dans plusieurs espèces de la famille des Astéracées dans cette dernière plus de 1100 acétylènes ont été identifiés [58].

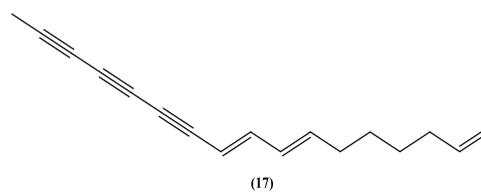
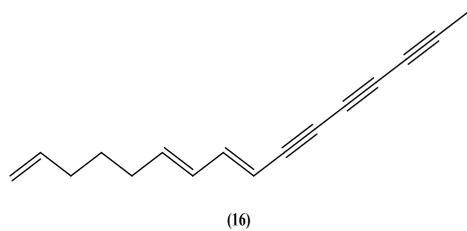
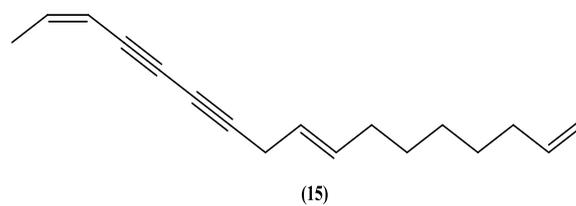
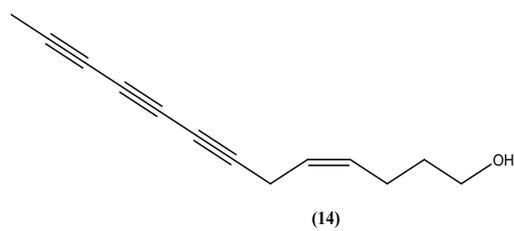
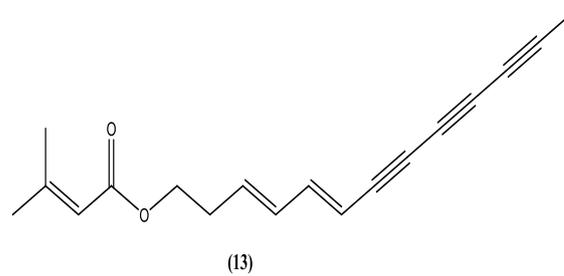
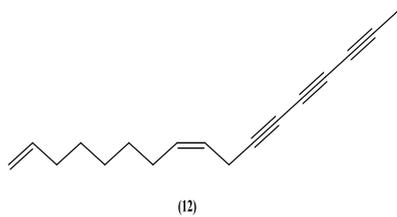
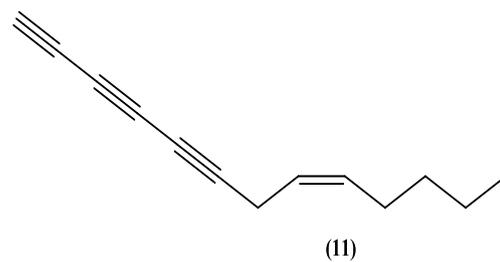
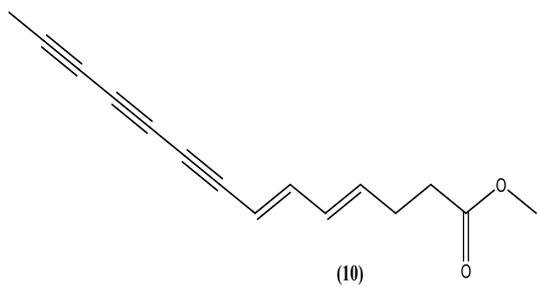
Les différents polyacétylènes qui sont isolés de plusieurs espèces du genre *Chrysanthemum* sont rassemblés dans le tableau I.6.

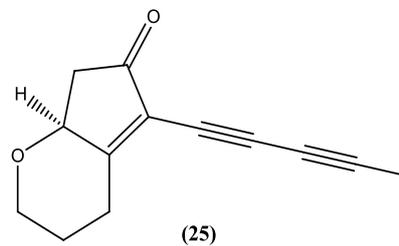
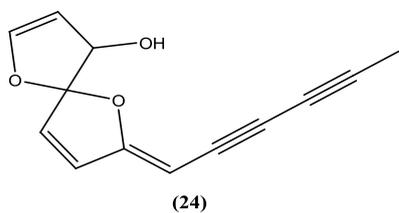
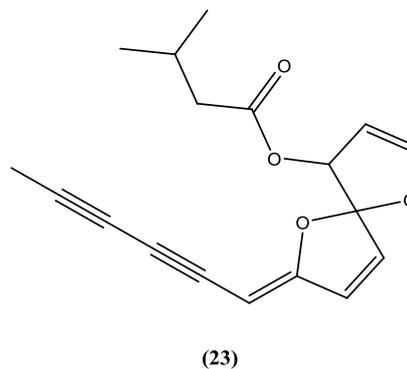
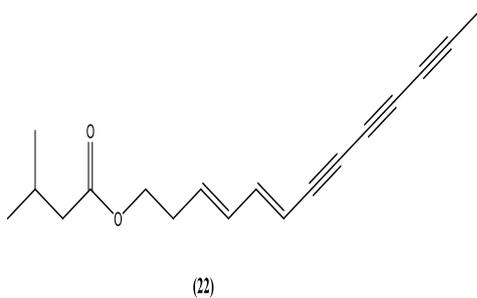
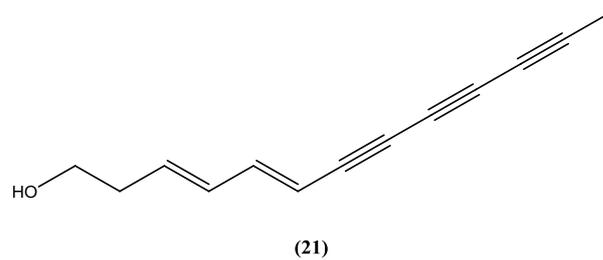
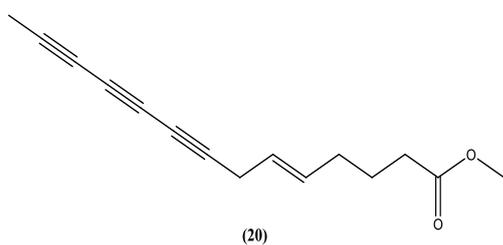
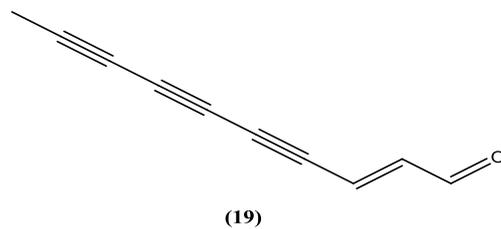
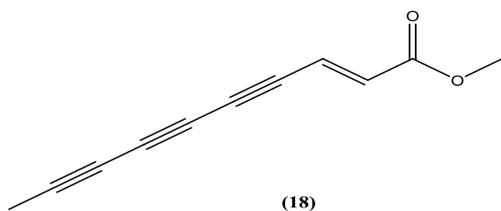
Structures	Composés	Espèces	Réf		
(1) cis (2) trans	7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-diène	<i>C. Leucanthemum</i>	[59]		
(3) cis (4) trans	méthyl 7-(hexa-2,4-diynylidène)-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-diène-4-carboxylate				
(5) cis (6) trans	2-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ène				
7	méthyl 4-(hexa-2,4-diynylidène)-3'H-3,6-dioxaspiro[bicycle[3.1.0]hexane-2,2'-furane]-3'-carboxylate				
8	E-2-(nona-1-èn-3,5,7-triynyl)furane				
9	(E)-2-(nona-1-èn-3,5,7-triynyl)-2,3-dihydrofurane				
10	(4E,6E)-méthyl tétradéca-4,6-dièn-8,10,12-triynoate				
11	(Z)-hexadéca-1,7-dièn-10,12,14-triène				
12	(Z)-heptadéca-1,8-dièn-11,13,15-triène				
13	(3E,5E)tridéca-3,5-dièn-7,9,11-triynyl 3-méthylbut-2-énoate				
14	(z)-tridéca-4-èn-7,9,11-triyn-1-ol				
15	(15Z)-heptadéca-1,8,15-trièn-11,13-diène				
16	(6E,8E) hexadéca-1,6,8-trièn-10,12,14-triène				
17	(7E,9E)-heptadéca-1,7,9-trièn-11,13,15-triène				
18	(E)-méthyl déca-2-én-4,6,8-triynoate				
19	(E)-déca-2-èn-4,6,8-triynal				
20	(E)-méthyl tétradéca-5-én-8,10,12-triynoate				
21	(3E,5E)-tridéca-3,5-dièn-7,9,11-triyn-1-ol				
22	(3E,5E)-tridéca-3,5-dièn-7,9,11-triynyl 3-méthylbutanoate				
23	Z-7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4-yl e3-méthylbutanoate				
24	(Z)-7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4-ol				
25	chrysindinA			<i>C.indicum</i>	[60]
26	chrysindinB				
27	chrysindinC				
28	chrysindiniD				
29	(+)-(3S*,4S*,5R*)-(E)-4-hydroxy-3-isovaleroyloxy-2-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4,5]décane.				
30	(-)-(3S*,4S*,5R*)-(E)-3,4-diacétoxy-2-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4,5]décane.				
31	(+)-(3S*,4S*,5R*,8S*)-(E)-8-acétoxy-4-hydroxy-3-isovaleroyloxy-2-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4,5]décane.				
32	Z-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ène.				
33	E-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ène.				
34	Cis-spiroketalenoether polyène.				
35	Acétate de 8-(2-thiényl)-3-trans, 5-trans-octadièn-7-yn-1-yle	<i>C.macrotum</i>	[61]		
36	8-(2-thiényl)-3-trans,-5-trans-octadièn-7-yn-1-ol, 2-trans				
37	4-trans-undécadiène-8,10-diynoic acid 1-hepta-4,6-diynyle ester				
38	1-(2,3-dihydro-2-furyl)-4-(2-thiényl)-1-trans-buten-3-yne				

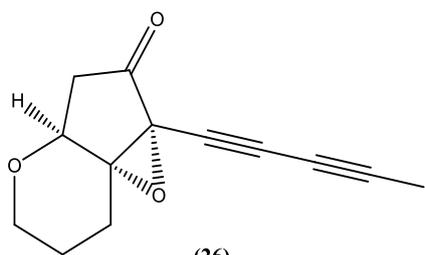
Tableau I.6: Structures chimiques des polyacétylènes isolés de quelques espèces du genre *Chrysanthemum*

Les structures des polyacétylènes qui sont isolés des espèces du genre *Chrysanthemum* cités dans le tableau I.6, sont présentées dans la figure I.6.

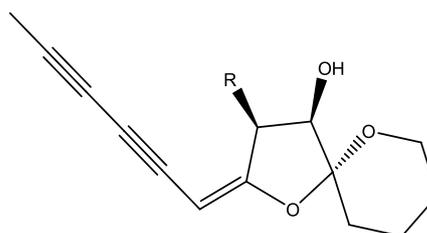




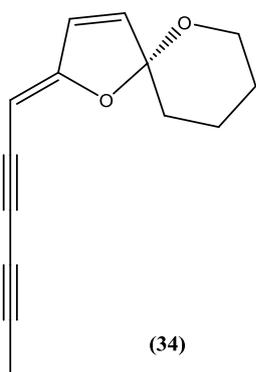




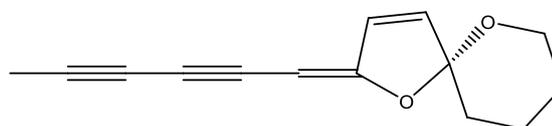
(26)



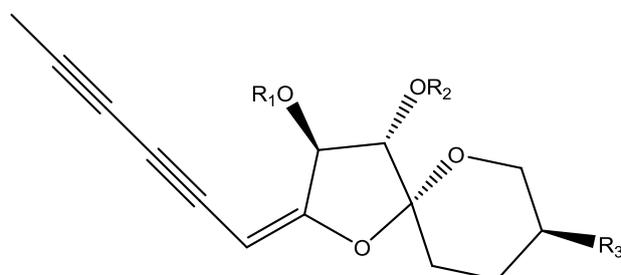
(27) R=AcO
(28) R=OH



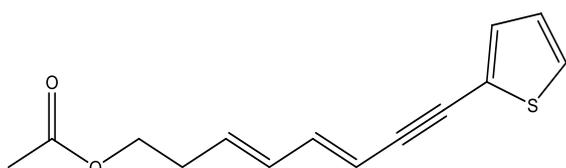
(34)



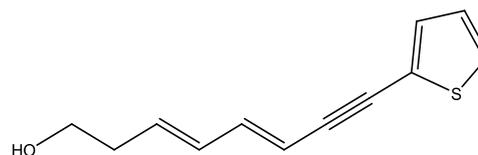
(32) 6Z
(33) 6E



	R1	R2	R3
(29)	<i>i</i> -BuCO	H	H
(30)	Ac	Ac	H
(31)	<i>i</i> -BuCO	H	AcO



(35)



(36)

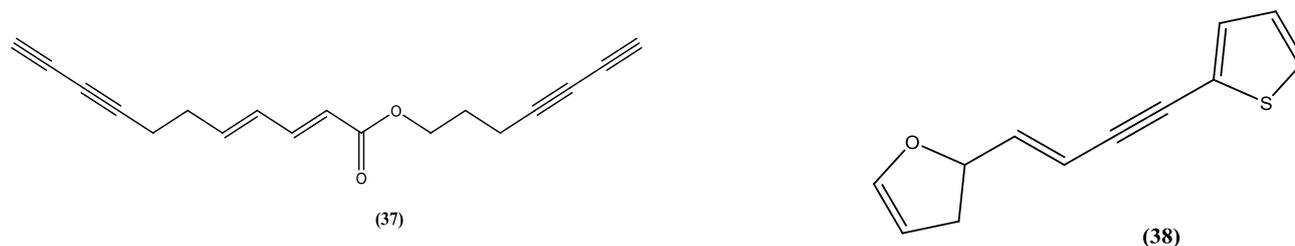


Figure I.6 : Structures des polyacétylènes isolés à partir des espèces du genre *Chrysanthemum*

I.2. LA FAMILLE DES PLUMBAGINACEES

I.2.1. Généralités

La famille des Plumbaginaceae (ou Plombaginaceae) comprend environ 700 espèces regroupées en 27 genres, c'est une famille cosmopolite, mais surtout centré sur la méditerranée. Cette famille est retrouvée dans tous les milieux salins des régions tropicales et chaudes d'Afrique, d'Amérique et d'Asie [62]. Les Plumbaginaceae sont représentées en Algérie par 4 genres sont respectivement, répertoriés dans le tableau ci-dessous [2].

Le genre	Nombre d'espèces
<i>Arméria</i> Willd	6
<i>Plumbago</i> Tourn	1
<i>Limoniastrum</i> Moench	3
<i>Limonium</i> Tourn	23

Tableau I.7: Les genres et les espèces de la famille Plumbaginacées en Algérie.

I.2.2. Systématique

Tableau I-8: Classification des Plumbaginaceae selon Classification APG III (2009)

Clade	<i>Angiospermes</i>
Clade	<i>Dicotylédones vraies</i>
Clade	<i>Noyau des Dicotylédones vraies</i>
Ordre	<i>Caryophyllales</i>
Famille	Plumbaginaceae

I.2.3. Description botanique

- **Appareil végétatif**

Ce sont des plantes surtout herbacées à feuilles, simple entières, parfois en rosette sans ochréa. L'épiderme des feuilles possède groupes de 8 cellules assemblées à la manière des stomates et qui fonctionnent comme des stomates aquifères [63].

- **Appareil reproducteur**

Inflorescence : les fleurs sont regroupées en épis, grappes, thyrses ou têtes cymeuses

Fleur : la fleur est régulière, hermaphrodite, pentamère et tétracyclique, le périanthe est constitué de 5 sépales soudés, souvent persistants et de 5 pétales soudés, l'androcée est isostémone, avec 5 étamines opposées aux pétales ,il ya souvent le phénomène d'hétérostylie , la pollinisation est entomophile, le gynécée possède 5 carpelles soudés, formant un ovaire uniloculaire et uniovulé les carpelles sont surmontés par stigmates libres (*Plumbago*) ou même 5 styles libres (*Armeria*), l'ovule bitégumenté est anatrophe

Fruit : c'est un akéne ou une capsule, par fois une pyxide, la graine est albuminée et renferme un embryon droit [63].

I.2.4. Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique

Certaines plumbaginaceae élaborent des naphtoquinones comme la plumbagone a été isolée pour la première fois de *plumbago resea* L [62]. La plumbagone présente des propriétés antibactériennes à de faibles concentrations, elle est active, in vitro, aussi bien sur le cocci à

Gram + (staphylocoques, streptocoques, pneumocoques) que sur quelque Gram – (salmonelles) elle est également active sur certains champignons pathogènes et sur quelques protozoaires parasites, à plus forte dose la plumbagone est cytotoxique [63].

Le genre *plumbago* est originaire d’Afrique du Sud, comporte plusieurs espèces utilisées en médecine traditionnelle.

- ✓ *plumbago europaea* (dentelaire) : Répandue sur tout le pourtour de la méditerranée. On l’employait pour soigner le cancer, la rache (teigne), les ulcères, Hémorroïdes et aussi le mal de dents . D’où les noms de herbe au cancer,herbe de la rache, herbe des plaies,dentelaire qu’elle portait en différents pays, on employait aussi la décoction de feuilles comme antisporique.[64]
- ✓ *Plumbago zeylanica* est très apprécié dans toute l’Afrique et l’Asie en tant que remède contre les maladies de peau, les infections et les vers intestinaux, notamment la lèpre, la gale, la teigne, la dermatite, les plaies, les ulcères de la jambe et les hémorroïdes et Toutes les parties de la plante sont utilisées, mais c’est la racine qui passe pour avoir le plus d’activité, en Afrique cette plante est assez communément utilisée en médecine traditionnelle, c’est un remède très connu contre diverses maladies cutanées parasitaires[65].
- ✓ *plumbago auriculata* est une espèce très couramment proposée dans les jardinerie, elle est originaire d’Afrique du sud, la racine pressée de cette espèce peut colorer la peau en gris-bleu, en Afrique du sud ,elle est utilisée pour le tatouage [62].

Les espèces du genre *Arméria* sont cultivées sous le nom de gazon d’Olympe ou gazon d’Espagne en raison de leur souche rameuse donnant naissance à des feuilles persistantes [62]

Dans le sud de la Tunisie, la tisane des feuilles, des branches et des galles de *Limoniastrum guyonianum* a été utilisée dans la médecine populaire comme un remède de la dysenterie [66]. L’importance de la décoction des racines est considérable à ses applications en tant que dépuratif, les extraits des galles sont utilisés pour le tannage des cuirs [67].

Limonium brasiliense est une espèce répartie en Argentine, Uruguay et dans le sud du Brésil, a été utilisée par la médecine populaire pour le traitement de l’hémorragie et de rhumatisme, ainsi que pour ses propriétés cardio-protective [68].

I.2.5. LE GENRE *LIMONIUM* TOURN. Ex Mill.

I.2.5.1. Introduction

Le genre *Limonium* Tourn appartient à la famille Plumbaginaceae a été souvent connu sous le synonyme statice [69].

Le nom *Limonium* est dérivé du mot grec Leimon, signifiant pré. La plante pousse essentiellement près de la mer, dans les prés-salés. Pas étonnant que cette fleur est également connue sous le nom de lavande de mer [70].

Le genre *Limonium* comprend 400 espèces réparties dans le monde entier avec une forte diversification sur le pourtour méditerranéen [71], les *Limonium* sont très caractéristiques des zones vaseuses salées ou des régions subdésertiques de l'hémisphère Nord.

I.2.5.2. Caractères généraux du genre *Limonium*

Les fleurs ont un périanthe imbriqué, dont les écailles sont placées les une sur les autres, la corolle est en forme d'entonnoir à leur base, mais larges et étendus au sommet, la fleur a cinq étamines en forme d'alène, plus courtes que la corolle et dont les sommets sont tombants, avec un germe très menu, qui soutient cinq styles minces, éloignés et couronnés par des stigmates aigus, le calice de la fleur se resserre ensuite au cou par l'expansion du limbe, et renferme les semences[70].

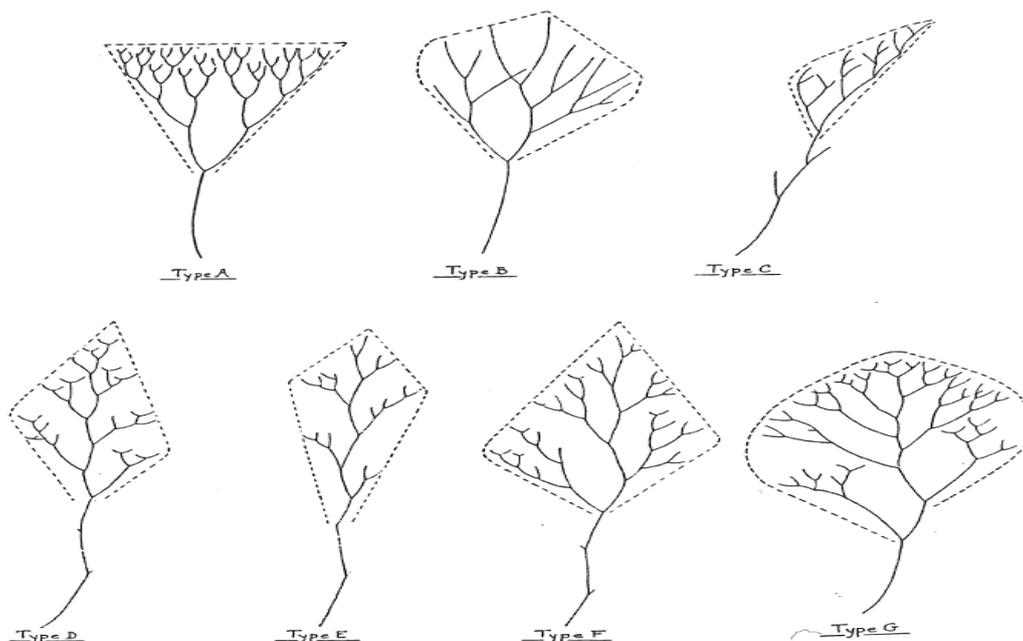


Figure I.6: Types de ramifications et d'inflorescences de *Limonium* [72].

La détermination des espèces du genre *Limonium* est rendue difficile par la forte variabilité qui s'observe chez de nombreuses espèces [73].

Dans la flore Algérienne on recense environ 23 espèces [2], dont 8 sont endémiques.

Le tableau I.9. Ci-dessous représente les différentes espèces du genre *Limonium* en Algérie.

<i>Limonium pruinosum</i> (L.)Kuntze	<i>Limonium minutiflorum</i> (Gruss.) Kuntze	<i>Limonium Sinuatum</i> (L.) mill
<i>Limonium asparagoides</i> (coss.et Dur.)Maire	<i>Limonium delicatulum</i> (de Girard) Kuntze	<i>Limonium ramorissimum</i> (Poiret)Maire
<i>Limonium thouinii</i> (Viv) O. Kuntze	<i>Limonium spathulatum</i> (Desf.) Kuntze	<i>Limonium duriusculum</i> (de Girard) Kuntze
<i>Limonium gummiferum</i> (Dur.) Kuntze	<i>Limonium cymuliferum</i> (Boiss.)Sauv.et Vindt	<i>Limonium gougetianum</i> (de Girard) Kuntze
<i>Limonium vulgar</i> Miller	<i>Limonium duriaei</i> (de Girard) Kuntze	<i>Limonium tunetanum</i> (baratte et bounet
<i>Limonium lingua</i> (Pernel) pons et Quézel	<i>Limonium virgatum</i> (willd.) Kuntze	<i>Limonium minutum</i> (L.) Kuntze
<i>Limonium densiflorum</i> (Guss.) Kuntze	<i>Limonium echioides</i> L	<i>Limonium letourueuxii</i> (coss) Pous et Quézel
<i>Limonium psiloclodon</i> (Boiss.) Kuntze	<i>Limonium Ferulaceum</i> (l...) O. Kuntze	-----

Tableau I.9: Les différentes espèces du genre *Limonium* Tourn en Algérie

I.2.5.3. Etude pharmacologique du genre *Limonium*

Plusieurs espèces du genre *Limonium* sont largement utilisées en médecine traditionnelle (Tableaux I.10).

Espèce	Médecine traditionnelle	Propriété thérapeutique	Réf
<i>Limonium brasiliense</i> (Boiss) kuntze	Les hémorragies, les troubles menstruels, les rhumatismes	Cardioprotective Anti-inflammatoire Antioxydante Bactériostatique	[74]
<i>Limonium sinense</i> (Girad) kuntze	La fièvre, les hémorragies, les troubles menstruels, l'hémostase sanguine	Antivirale Antioxydante Hepatoprotective	[75] [76]
<i>Limonium wrightii</i> (Hance) kuntze	La fièvre, l'arthrite	Antioxydante Hepatoprotective Cardioprotecteur	[75] [77]
<i>Limonium gmelinii</i> (willd) kuntze	Les maladies intestinales, les maladies des voies respiratoires	Antibactérienne Antifongique Anti leishmania Antiproliférative Anti-exsudative	[75] [78]
<i>Limonium axillare</i> (Forssk) Kuntze	Le diabète, les blessures, les inflammation, Tamer	Anti inflammatoire Antitumorale	[76] [79]
<i>Limonium densiflorum</i> (Guss) Kuntze		Antioxydante anti-intiflamatoire anticancéreuse	[80]
<i>Limonium vulgare</i> P. Mill	La tuberculose, remède, hémorragie, la diarrhée, la dysenterie saignements, action astringente, la dysenterie	Cytotoxique Antitumorale	[81] [82] [83]

<i>Limonium californicum</i> (Boiss.)	La maladie vénérienne, les problèmes urinaires	Antioxydante Antivirale, Antibactérienne.	[84] [85]
--	---	---	--------------

Tableau I.10: Les propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Limonium*.

I.2. 5.4.Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Limonium*

La plupart des produits naturels signalés et répertoriés dans le genre *Limonium* appartiennent au grand groupe des composés polyphénoliques et plus précisément aux flavonoïdes [86,89]. On retrouve également les naphthoquinones [90], les tanins, les alcaloïdes et les acides aminés [91,92].

I.2. 5.4.A. LES FLAVONOÏDES

Les espèces du genre *Limonium* sont riches en flavonoïdes, elles ont permis l'isolement d'un bon nombre d'entre eux.

Les structures des différents flavonoïdes isolés des espèces du genre *Limonium* sont regroupées dans le Tableau I-11.

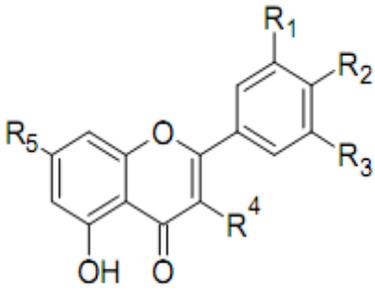
L'espèce	Le composé	Réf
<i>Limonium tetragonum</i>	Myricétine-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside (1) Myricétine-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside(2) Quercétine-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside(3) Quercétine-3- <i>O</i> - β -Dgalactopyranoside(4)	[93]
<i>Limonium aureum</i>	Myricétine-3- <i>O</i> - β -galactopyranoside(1) Myricétine-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside(2) Quercétine-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside(4) Quercétine-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside(5) Myricétine-3- <i>O</i> - β -glucopyranoside (6) Myricétine-3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranoside (7) Myricétine-3- <i>O</i> -(6''-Galloyl)- β -galactopyranoside(8) Myricétine-3- <i>O</i> -(6''-Galloyl)- β -glucopyranoside(9) Myricétine (10), Quercétine (11), Kaempférol (12)	[89]

	Naringenine(13), Homoeriodityol(14), Eriodictyol(15) Homoeriodictyol-7-O- β -D-glucopyranosid(16) Myricétine-7-O- α -L-rhamnopyranoside (17)	
<i>Limonium popovii</i>	Myricétine-3-O- β -galactopyranoside(1) Myricétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside(2) Myricétine-3-O- β -glucopyranoside(6) Myricétine-3-O- α -L-arabinopyranoside(7) Myricétine-3-O-(6''-Galloyl)- β -galactopyranoside (8) Myricétine-3-O-(6''-Galloyl)- β -glucopyranoside (9) Myricétine (10), Quercitine (11), Kaempferole(12) Myricétine-7-O- α -L-rhamnopyranoside(17) Myricétine-3-O- β -L-xylopyranoside(18, Rutine(19) Myricétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glu (20) Myricétine-3-O- β -D-(2''-galloyl) arabinopyranoside(21) (-)-Epigallocatechine-3-O-gallate(22)	[94]
<i>Limonium gmelinii</i>	Myricétine-3-O- β -galactopyranoside (1) Myricétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside(2) Myricétine-3-O- β -glucopyranoside(6) Myricétine-3-O- α -L-arabinopyranoside(7) Myricétine-3-O-(6''-Galloyl)- β -galactopyranoside (8) Myricétine-3-O-(6''-Galloyl)- β -glucopyranoside(9) Myricétine (10), Quercitine(11)Kaempferole (12), Myricétine-7-O- α -L-rhamnopyranoside (17) Myricétine-3-O- β -L-xylopyranoside(18), Rutine(19) Myricétine-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glu (20) Myricétine-3-O- β -D-(2''-Galloyl) arabinopyranoside(21) (-)-Epigallocatechine-3-O-gallate(22), (-)-Epigallocatechine(23), (+)-Gallocatechine(24) 5, 7,4'-trihydroxy-3'-méthylflavan-4-ol(25) 3, 5, 7, 3', 4', 6'-hexahydroxyflavane(26) Gmelinoside I (27)	[95] [96] [97]

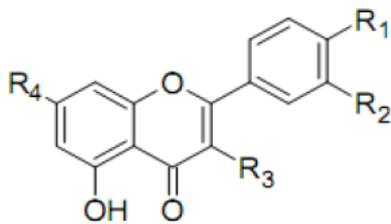
<i>Limonium axillare</i>	Myricétine(10), Quercétine(1), Kaempférol (12)	[94]
	Lutéoline-7-O-glucoside (28)	[98]
	Lutéoline (29), Apiine(30), Apigénine (31)	[99]
	3,5,7,3',4',6' Hexahydroxyflavone(32)	[104]
	Myricétine-3-O-β-D-sorposide(33)	
<i>Limonium bicolor</i>	5, 7,4'-trihydroxy-3'-méthylflavan-4-ol(25)	[9]
<i>Limonium cv (gold coast)</i>	Quercétine(11), Eriodictyol (15)	
	4, 6,4'-tri-hydroxyaurone (34),	
	Cernuoside (35), Aureusin (36), Aureusidine (37)	
	3, 4,2',4',6'-penta-hydroxy-chalcone (38)	[100]
	Lutéoline(9),Apigénine(31), Quercitrine(39), isoorientine(40)	
<i>Limonium Sinuatum</i>	Myricétin-3'-methylether-7-O-β-D-glucopyranoside (41)	[101]
	Isorhamnetin-7-O-β-D-glucopyranoside(42)	
	Eriodictyol (15), Lutéoline (29), Apigénine (31)	[108]
<i>Limonium sinense</i>	Myricétin 3-O-(2"-O-p-hydroxybenzoyl)-α-	[87]
	Rhamnopyranoside (43)	[102]
	Samargenine B (44)	[103]
	Myricétine-3-O-α-L-hamnopyranoside(2)	
	Myricétine(10)	
<i>Limonium brasiliense</i>	Myricétine-3-O-α-L-rhamnopyranoside (2)	[104]
	(-)-Epigallocatechine-3-O-gallate (22)	
	(-)-Epigallocatechine (23), (+)-Gallocatechine (24)	
	Delphinidine-3- rhamnoside (45)	
	Delphinidine-3- glucoside(46)	
	Delphinidine-3,5- di-glucoside (47)	

Tableau I-11 : Les structures des différents flavonoïdes isolés des espèces du genre
Limonium

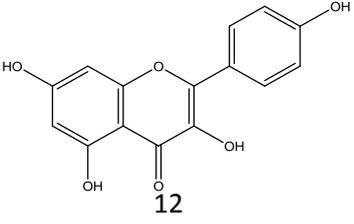
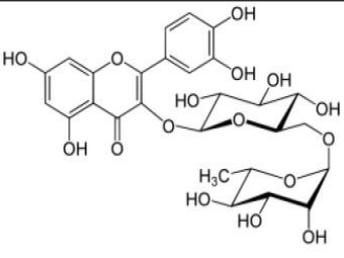
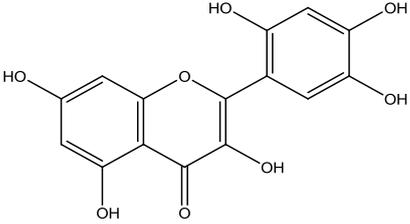
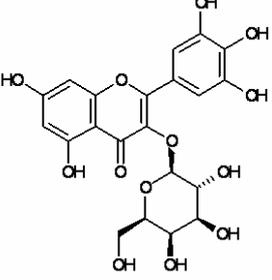
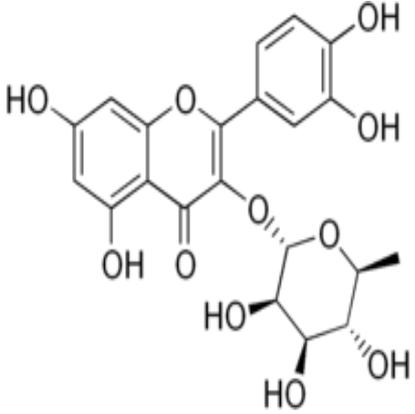
Les structures des flavonols isolés du genre *Limonium* sous présenté dans Tableau I.12

Squelette					
	structures	Substituant			
	R1	R2	R3	R4	R5
1	-OH	-OH	-OH	-O-β-Gal	-OH
2	-OH	-OH	-OH	-O-α-L-rha	-OH
6	-OH	-OH	-OH	O-β-Glu	-OH
7	-OH	-OH	-OH	-O-α-LAra	-OH
8	-OH	-OH	-OH	-O-(6''-Galloyl)-β-Gal	-OH
9	-OH	-OH	-OH	-O-(6''-Galloyl)-β-Glu	-OH
10	-OH	-OH	-OH	-OH	-O-α-L-Rha
17	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH
18	-OH	-OH	-OH	-O-α-L-rha-(1-6)-β-D-Glu	-OH
20	-OH	-OH	-OH	-O-B-L-Xyl	-OH
21	-OH	-OH	-OH	-O-β-D-(2''-Galloyl)-Ara	-OH
33	-OH	-OH	-OH	-O-β-D-sorboside	-OH
41	-OCH3	-OH	-OH	-OH	-O-β-D-Glu
43	-OH	-OH	-OH	-O-5244-O-p-hydroxybenzoyl)-α-rha	OH

Suite:

Squelette				
	structures	Substituant		
	R1	R2	R3	R4
3	-OH	-OH	-O-β-D-Glu	-OH
4	-OH	-OH	-O-β-D-Gla	-OH
5	-OH	-OH	-O-α-L-Rha	-OH
11	-OH	-OH	-OH	-OH
42	-OCH3	-OH	-OH	-O-β-D-Glu

Suite

 <p>(12)</p>	 <p>(19)</p>
 <p>(32)</p>	 <p>(27)</p>
 <p>(39)</p>	

Suite

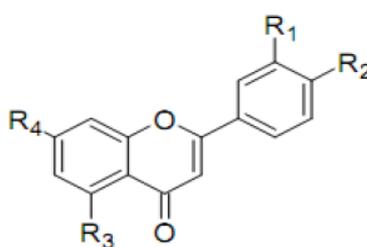
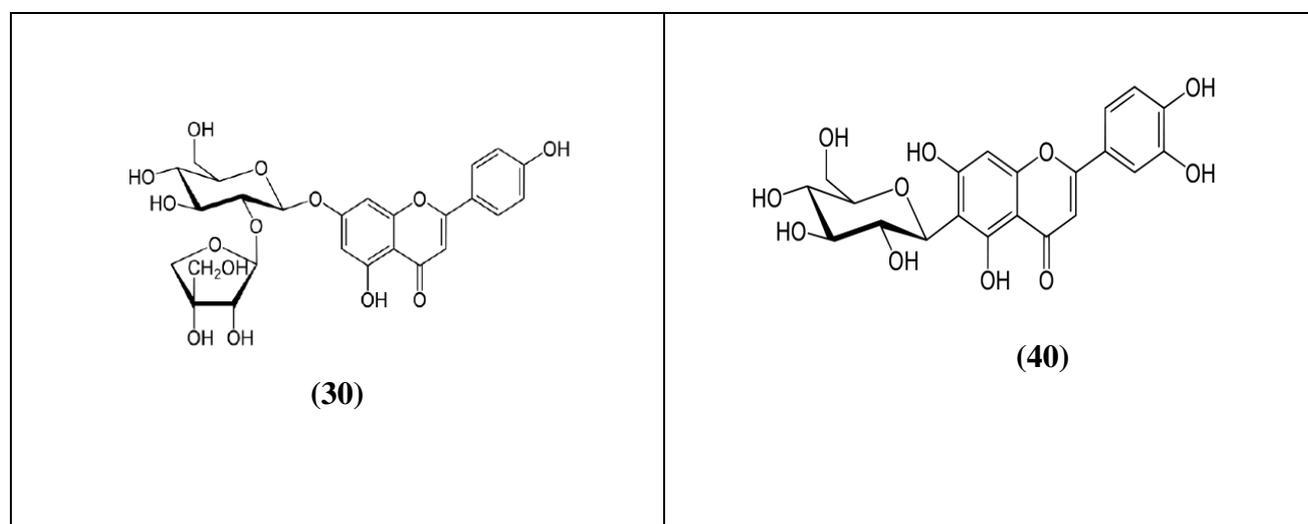
Squelette				
	Substituant			
structures	R1	R2	R3	R4
28	-OH	-OH	-OH	-O-Glu
29	-OH	-OH	-OH	-OH
31	-H	-OH	-OH	-OH

Tableau I.12: Structures des flavonols isolés du genre *Limonium*Tableau I.13: Structures des flavones isolés du genre *Limonium*

Squelette				
structures	Substituant			
	R1	R2	R3	R4
13	-H	-OH	-H	-OH
14	-OCH3	-OH	-H	-OH
15	-OH	-OH	-H	-OH
16	-OCH3	-OH	-H	-O-Glu

Tableau I.14: Structures des flavanones isolés du *Limonium*

<p>(22)</p>	<p>(23)</p>	<p>(24)</p>
<p>(25)</p>	<p>(26)</p>	<p>(44)</p>

Tableau I.15: Structures des flavanes isolés du genre *Limonium*

Squelette			
structures	Substituant		
	R1	R2	R3
34	-H	-OH	-OH
35	-OH	-O-Glu	-OH
36	-OH	-OH	-O-Glu
37	-OH	-OH	-OH

Tableau I.16. Structures des aurones isolés du genre *Limonium*

Structure	Squelette
38	

Tableau I.16 : Structure de chalcone isolé du genre *Limonium*

Squelette		
structures	Substituant	
	R1	R2
45	-Rha	-OH
46	-Glu	-OH
47	-Glu	-Glu

Tableau I.17. Structures des anthocyanidines isolés du genre *Limonium*

I.2. 5.4.B. DIVERS

Espèce	Composé	Réf
<i>Limonium brasiliense</i> <i>Limonium gmelinii</i> <i>Limonium popovii</i> <i>Limonium myrianthum</i> <i>Limonium sinense</i>	acide gallique (1)	[105] [94] [106] [87]
<i>Limonium axillare</i>	acide férulique (2) acide ellagique (3) acide gallique (1) acide isoférulique (4)	[98] [99]
<i>Limonium gmelinii</i>	acide ellagique (3) acide syringique (5)	[94]
<i>Limonium avei</i>	Acide m-coumarique (6)	[107]
<i>Limonium Bonduelli</i>	Acide vanillique (7)	[108]
<i>Limonium densiflorum</i>	4-hydroxybenzoïque (8)	[80]

Tableau I.18 : Acides phénoliques isolés du genre *Limonium*

Les structures des acides phénoliques qui sont isolés des espèces du genre *Limonium* cités dans le tableau I.18 sont présentées dans la figure suivante :

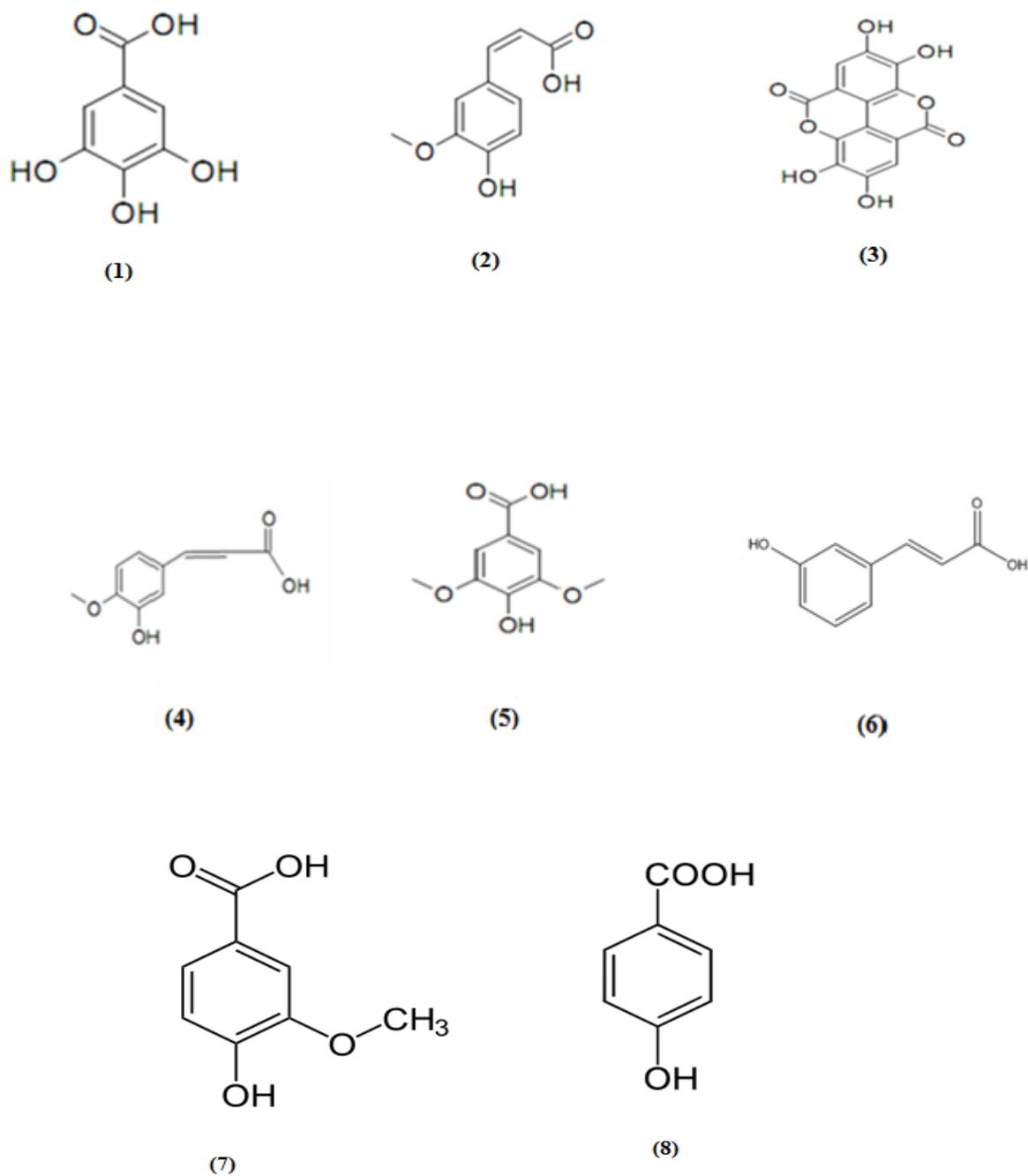


Figure I.6 : Structures des acides phénoliques isolés à partir des espèces du genre *Limonium*

I.3.Conclusion

Les différentes études phytochimiques réalisées sur diverses espèces des genres *Chrysanthemum* et *Limonium* montrent que ces deux genres sont riches en métabolites secondaires, les composés phénoliques représentent la majorité de ces métabolites, dont la plupart sont des flavonoïdes présents sous diverses formes.

Une recherche bibliographique approfondie sur les espèces *Chrysanthemum segetum* et *Limonium pruinosum* a montré que ces deux plantes n'ont fait l'objet que de très peu d'études phytochimiques et biologiques. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'étudier les extraits des parties aériennes de ces espèces.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- [1] Bremer K., 1994, Asteraceae, Cladistics and Classification. Timber Press, Portland, Oregon, 752.
- [2] Quezel P., Santa S., 1963, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. Tome 1, CNRS, Paris.
- [3] Barkely T M., Brouillet L., Strother J L., 2006, Flora of North America- Asteraceae.19, 3-69.
- [4] Ozenda P., 1991, Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition, CNRS, Paris, 626.
- [5] ESCOP., 2003, ESCOP Monographs: the scientific foundation for herbal medicinal products. 2^{ème} édition, Thieme, Exeter and London UK.
- [6] Grieve M., 1979, A Modern Herbal. Dover Publications, Inc, a New York.
- [7] Polosky Z., 2015, 21st Century Homestead: Biological Pest Control. 1st Edition, Lulu, 176.
- [8] Serier J B., 1979, Le guayule *Parthenium argentatum* : son intérêt économique, sa culture, l'extraction et les propriétés de son caoutchouc. Revue Générale du Caoutchouc et des Plastiques, 56 (591):75-85.
- [9] Gaussen H., Leroy F., 1982, Précis de botanique (Végétaux supérieurs). 2^{ème} édition, 424-426.
- [10] Quattrocchi U., 1999, CRC World Dictionary of Plant Names: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms and Etymology. Volume 1, CRC, Press, 728.
- [11] Kumar A., Singh S P., Bhakuni R S., 2005, Secondary metabolites of *Chrysanthemum* genus and their biological activities. Current Science, 89, 1489.
- [12] Yue-Ping M ., Jiang-xue W ., Zhi-yang Y ., Si-lan D ., 2015, Characterization of ploidy levels in *Chrysanthemum* L. by flow cytometry. Journal of Forestry Research, 26(3): 771–775.

- [13] Liu P L., Wan Q., Guo Y P., Yang J., Rao G Y., 2012, Phylogeny of the Genus *Chrysanthemum* L: Evidence from Single-Copy Nuclear Gene and Chloroplast DNA Sequences. PLOS ONE, 7(11).
- [14] Chevalier A., Notes Historiques sur l'origine du Chrysanthème d'automne. Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale, bulletin n°195, 804-813.
- [15] Jinglun H., Xiu'e G., 1997, Traditional Chinese Treatment for Senile Diseases. Academy Press, Beijing.
- [16] Lim T K., 2013, Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants. Volume 7, Flowers, Springer Science & Business Media, 1102.
- [17] Marculescu A., Tamas M., 2002, Contribution à l'étude morphologique, chimique et thérapeutique pour l'espèce *Chrysanthemum balsamita* L. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 412-415.
- [18] Urzua A., Mendoza L., 2003, Antibacterial activity of fresh flowerheads of *Chrysanthemum coronarium*. Fitoterapia,74: 606-8.
- [19] Abd-Alla H I., Albalawy M A., Aly H F., Shalaby N M., Shaker K H., 2014, Flavone composition and antihypercholesterolemic and antihyperglycemic activities of *Chrysanthemum coronarium* L. Zeitschrift fur Naturforsch C, 69(5-6):199-208.
- [20] Vardhana R., 2008, Direct uses of medicinal plants and their identification. Sarup, New Delhi, 423.
- [21] Duke J A., 2002, Handbook of Medicinal Herbs. 2nd Edition, CRC Press, 896 .
- [22] Duke J A., 2000, Handbook of Edible Weeds: Herbal Reference Library, CRC Press, 256.
- [23] Han S., Sung K H., Yim D., Kim K J., 2002, The effect of linarin on LPS-induced cytokine production and nitric oxide inhibition in murine macrophages cell line RAW264.7. Archives of Pharmacal Research, 25(2):170-7.

- [24] Singh R P, Agrawal P., Yim D., Agarwal R., 2005, Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: Structure-activity relationship with linarin and linarin acetate. *Carcinogenesis*, 26(4):845-54 .
- [25] Kim Y. Y., Lee S. Y., Yim D. S., 2001, Biological Activities of Linarin from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. *Journal of the Pharmaceutical Society of Korea*, 45:604-610.
- [26] Kumar A., Singh S P., Bhakuni R S., 2005, Secondary metabolites of *Chrysanthemum* genus and their biological activities. *current science*, 89,1489.
- [27] Urbanska M., Nawrot J., Dawid-Pac R., Kaczerowska-Pietrzak K., Morag M., Ratajczak L., Nowak G., 2014, Detection of pharmacological active compounds of the Asteraceae family and their chemotaxonomical implications. *Journal of Plant Sciences*, 2(5):187-191.
- [28] Haruna M., Kato M., Ito K., Toshiaki N., Sugihara H., Murata H., 1989, Angeloylcumambrin-B, An antimicrobial and sesquiterpene lactone from *Chrysanthemum oranatum* var. *spontaneous*. *Phytochemistry*, 20, 2583-2584.
- [29] Mladenova K., Tsankova E., Ivanova B S., 1985, Sesquiterpene lactones from *Chrysanthemum indicum*. *Planta Medica*, 51(3):284-285.
- [30] Yoshikawa M., Morikawa T., Toguchida I., Harima S., Matsuda H., 2000, Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type sesquiterpenes, Kikkanols D, D Monoacetate, E, F and F Monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chemical pharmaceutical Bulletin*, 48:651-656.
- [31] Hu L., Chen Z., 1997, Sesquiterpenoid alcohols from *Chrysanthemum morifolium*. *Phytochemistry*, 44(7):1287-1290.
- [32] Doskotch R W., El-feraly F S., Hufford C D., 1971, Sesquiterpene lactones from *Pyrethrum* flowers. *Canadian Journal of Chemistry*, 49(12):2103-2110.
- [33] El-Masry E., Abou-Donia A H A., Darwish F A., Abou-karam M A., Grenz M., Bohlmann F., 1984, Sesquiterpene lactones from *Chrysanthemum coronarium*. *Phytochemistry*, 23(12):2953-2954.

- [34] Mladenova K., Tsankova E., Kostova I., Ivanova B S., 1987, Indicumene, a new bisabolane ketodiol from *Chrysanthemum indicum*. *Planta Medica*, 53(1):118–119.
- [35] Galal A M., 2001, Microbial transformation of pyrethrosin. *Journal of Natural Products*, 64(8):1098-1099.
- [36] Sashida Y., Nakata H., Shimomura H., Kagaya M., 1983, Sesquiterpene lactones from *Pyrethrum* flowers. *Phytochemistry*, 22: 1219-1222.
- [37] Harborne J B., Heywood V H., Saleh N A M., 1970, Chemosystematics of the composite: Flavonoid patterns in the chrysanthemum complex of the tribe Anthemideae. *Phytochemistry*, 9 (9): 2011-2017.
- [38] Ghedira K., 2005, Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*, 3(4): 162-169.
- [39] Lin L Z., Harnly J M., 2010, Identification of the phenolic components of *Chrysanthemum* flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*, 120(1): 319-326.
- [40] Nguyen M T., Awale S., Tezuka Y., Ueda J Y., Tran Q I., Kadota S., 2006, Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense*. *Planta Medica*, 72(1):46-51.
- [41] Rao P R., Seshadri T R., Sharma P., 1973, Polyphenolic constituents of *Pyrethrum* flowers (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Current Science*, 42,811-812.
- [42] Khallouki F., Hmamouchi M., Younos C., Soulimani R., Essassi E M., 2000, A new flavonoid from the aerial parts of *Chrysanthemum viscidhirtum*. *Fitoterapia*, 71(4): 413-416.
- [43] Ibrahim L F., El-Senousy W M., Hawas U W., 2007, NMR spectral analysis of flavonoids from *Chrysanthemum coronarium*. *Chemistry of natural compounds*, 43(6):659-662.
- [44] Wilkomirski B., Dubielecka B., 1996, Sterol content as a similarity marker of different organs of two varieties of *Chrysanthemum parthenium*. *Phytochemistry*, 42(6),1603-1604.

- [45] Wu L Y., Gao H Z., Wang X L., Ye J H., Lu J L., Liang Y R., 2010, Analysis of chemical composition of *Chrysanthemum indicum* flowers by GC/MS and HPLC. Medicinal Plants Research, 4(5):421-426.
- [46] 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.
- [47] Ameddah S., Dendougui H., Menad A., Mekkiou R., Meraihi Z., Benayache S., Benayache F., 2007, Flavonoids from *Chrysanthemum fuscatum*. Chemistry of Natural Compounds, 43(2):210-210.
- [48] Benaissa O., Bentamene A., Bicha S., 2011, Flavonoids aglycones and stero from *Chrysanthemum fontanesii*. Chemistry of Natural Compounds, 47(1):107-108.
- [49] Wolansky M J., Harrill J A., 2007, Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals:A critical review. Neurotoxicology and Teratology, 30(2):55-78.
- [50] HANSEN S R., 2006, Pyrethrins and pyrethroids. In: PETERSON M E., TALCOTT P A., Small Animal Toxicology 2nd Edition, Elsevier Saunders, St Louis, 1002-1008.
- [51] Staba E J., Zito SW., 1985, The production of pyrethrins by *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Trev) Boccone. In: Neuman B., Barz W., Reinhard E., Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Proceedings in Life Sciences 209-214.
- [52] Reginald H G., Charles M G., 2000, Biochimie, De Boeck Supérieur, 1292.
- [53] Neeraj V.,2016, Phytoconstituents and Their Mode of Extractions: An Overview. Research Journal of Chemical and Environmental Sciences,4 (2) : 08-15.
- [54] Song M Ch., Kim D H., Hong Y H., Yang H J., Chung I S., Kim S H., Kwon B M., Kim D K., Park M H., Baek N I., 2005, Polyacetylenes and Sterols from the Aerial Parts of *Chrysanthemum coronarium* L. (Garland). Frontiers in Natural Product Chemistry, 1(1):163-168.
- [55] Choi J M., Lee EO., Lee H J., Kim K H., Ahn K S., Shim B S., Kim N I., Song M C., Baek N I., Kim SH., 2007, Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L.and antiangiogenic activities. Phytotherapy Research, 21(10):954-959.

- [56] Wilkomirski B., Dubielecka B., 1996, Sterol content as a similarity marker of different organs of two varieties of *Chrysanthemu parthenium*. *Phytochemistry*, 42(6):1603-1604.
- [57] Lars P C ., Kirsten B., 2006, Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(3) : 683–693
- [58] Konovalov D A., 2014, Polyacetylene Compounds of Plants of the *Asteraceae* Family (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48(9):613-631.
- [59] Wrang P A., Lam J., 1975, Polyacetylenes from *Chrysanthemum leucanthemum*. *Phytochemistry*, 14,1027-1035.
- [60] Lui LL., 2011, Chrysindins A-B, polyacetylenes from the flowers of *Chrysanthemum indicum*. *planta medica*, 77(16):1806-1810.
- [51] Bohlmann F., Zdero C., 1975, Polyacetylenic compounds. 233 Constituents of *Chrysanthemum macrotum*. *Chemische Berichte*, 108,739-42.
- [62] Botineau M., 2010, Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs appliquée des plantes à fleurs. volumes 1, Tec&Doc, Lavoisier, paris ,1336.
- [63] Bruton J., 2009, pharmacologie, phytochimie plante médicinales. 4^{ème} édition, Lavoisier, 499.
- [64] Chevalier A., 1938, Utilisation du *Plumbago zeylanica* pour le traitement de la lèpre. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 18 (200) :269-272.
- [65] Boullard B., 2001, Plantes médicinales du monde : croyances et réalités. ESTEM, 636.
- [66] Hammami S., Ngair A., Dhouha S., Cheriaa J., Mighri Z., 2011, Chemical analysis and antimicrobial effects of essential oil from *Limoniastrum guyonianum* growing in Tunisia. *Medicinal Plants Research*, 5(12):2540-2545.
- [67] Fintelmann V., Weiss R F., 2004, Manuel pratique de phytothérapie. Vigot, Paris, 184.
- [68] Gupta M P., 1995, 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYTED-SECAB, Santafé de Bogotá, Colombia, 441-442.

- [69] Petr B., Vojtech A., Ladislav H., Rene K., 2009, Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones their Occurrence, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 5(1):47-68.
- [70] Miller P H., 1785, *Dictionnaire des jardiniers*. Volume 4, Guillot, Paris, 439.
- [71] Aparicio A., 2005, *Limonium silvestrei* (Plumbaginaceae), a new agamospecies from southern Spain . *Annales Botanici Fennici*, 42(5):371-377 .
- [72] BIORET F., Lahondère C., 1996, Le genre *Limonium* Miller sur les côtes armoricaines. Conservatoire botanique national de Brest, 8,1-22.
- [73] Strahm S., 2005, Le Top 50 des plantes menacées des îles méditerranéennes Bertrand de Montmollin. IUCN, 110.
- [74] Murray A P., Rodriguez S., 2004, Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift Naturforsch C*, 59(7-8): 477-480.
- [75] Quattrocchi U., 2012, *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology*. Volume 5, CRC Press, 3960.
- [76] Xinhui T., Jing G., Jin C., Lizhi X., Yahong T., Huan D., Wen Y., Xiaoning Z., 2007 , Expression of VDAC Regulated by Extracts of *Limonium sinense* Ktze root Against CCl₄-induced Liver Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(3):204-213.
- [77] Aniya Y., Miyagi C., Nakandakari A., Kamiya S., Imaizumi N., Ichiba T., 2002, Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine*, 9(3): 239-244.
- [78] Korul'kina L M., Zhusupova G E., Shul'ts E E.,ErzhanovK B., 2004, Fatty-acid composition of two *Limonium* plant species. *Chemistry of Natural Compounds*, 40(5):417-419.
- [79] Mahmoud T., Sanjay G., 2013, Eastern Desert of Egypt: a case study from Wadi El-Gemal National Park. *Medicinal Plants and Studies*, 1(6):10-17.

- [80] Medini F., Bourgou S., Lalancette K G., Snoussi M., Mkadmini K., Coté I., Abdelly C., Legault J., Ksouri R., 2015, Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. South African Journal of Botany, 99,158-164.
- [81] Chandler R F., Freeman L., Hooper S N., 1979, Herbal Remedies of the Maritime Indians. Journal of Ethnopharmacology, 1(1):49-68 .
- [82] Burgess J G., Osinga R., Wijffels R H., Tramper J., 1999, Marine Bioprocess Engineering. Volume 5, Elsevier science B V, 413.
- [83] Lellau T F., Liebezeit G., 2003, Cytotoxic and Antitumor Activities of Ethanolic Extracts of Salt Marsh Plants from the Lower Saxonian Wadden Sea, Southern North. Sea ,Pharmaceuticla Biology, 41(4):293-300.
- [84] Harrington J P., 1984, Ethnobotany of Costanoan Indians, California, Based on Collections. Economic Botany, 38(2):240-255.
- [85] Yoshikazu S., Hiroko M., Tsutomu N., Yuka I., Kazuhito W., Munekazu I., Toshiyuki T., Jin M., Frank A L., 2001, Inhibitory Effect of Plant Extracts on Production of Verotoxin by,Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 : H7. Journal of Health Science, 47(5):473-477.
- [86] Harborn J B., 1967, Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Phytochemistry, 6,1415.
- [87] Lin L C., Chou Ch J., 2000, Flavonoids and Phenolics from *Limonium sinense*. Planta Medica, 66(4):382-383.
- [88] Zhen-fa X., Liang Z., 1991, *Limonium sinense* in mice with hemorrhagic anemia - *Limonium sinense* main component analysis. Shantou University, 6, 78-83.
- [89] Ye G., Huang Ch., 2006, Flavonoids of *Limonium aureum*. Chemistry of Natural Compounds, 42(2):232-234.
- [90] Takhtajan A., 2009, Flowering Plants. Springer Science & Business Media, 871.
- [91] Zhu G., Jiu-Rong Y., 1994, *Limomium sinense* Chemical constituents. Journal of Chinese Herbal Medicines, 25(8):398.

- [92] Xinmin Z C., 1991, *Limonium bicolor* on chemical constituents. Chinese Herbal Medicines, 22(9): 390.
- [93] Lee J I., Kong C S., Jung M E., Kong C K., Hong J W., Lim S Y., Seo Y., 2011, Antioxidant Activity of the Hlaphyte *Limonium tetragonum* and its Major Active Components. Biothecnology and Bioprocess Engineering, 16(5): 992-999.
- [94] Korul Kina L M., Shul'ts E E., Zhusupova G E., Abilov ZhA., Erzhanov K .B., Chaudri M I., 2004, Biologically Actives Compounds From *Limonium gmelinii* and *L.popovii*. Chemistry of Natural Compounds, 40(5):465-471.
- [95] Zhuspova G E., Abil'kaeva S A., 2006, Flavanes FROM *Limonium gmelinii*. Chemistry of Natural Compounds, 42(1):112-113.
- [96] Lian-ru Z ., Guo-lin Z., 2004, Flavonol of *Limonium bicolor*. Chemistry of Natural Compounds, 40(6):602.
- [97] Kozhamkulova Z A., Radwan M M., Zhusupova G E., Abilov Z Zh., Rahadilova S N., Ross S A., 2010, Gmelinoside I, a new flavonol glycoside from *Limonium gmelinii*. Natural product communications , 5(7):1061-1062.
- [98] Ahmed K M.,Kandil F E., Mabry T J., 1999, Anticancer tannin and other phenolics from *Limonium axillare* (Plumbaginaceae). Asian Journal of Chemistry, 11(1):261-263.
- [99] Bachir A K., Abdalla A A.,Wasfi I A., Hassen E S., Amir M H., Crabb T A., 1994, Flavonoids from *Limonium axillare*. International Journal of Pharmacognosy, 32(4): 366-372.
- [100] Asen S., Plimmer J R S., 1972, 4,6,4'-Trihydroxy aurone and other flavonoids from *Limonium*. Phytochemistry, 11,2601-2603.
- [101] Ross S A., 1984, Myricetin-3'-Methyl Ether-7-Glucoside from *Limonium sinuatum*. Journal of Natural Products, 47(5):862-364.
- [102] Kuo Y C., Lin L C., Tsai W J., Chou C J., Kung S H., Ho Y H., 2002, Samarangenin B from *Limonium sinense* Suppresses Herpes SimplexVirus Type 1 Replication in Vero Cells by Regulation of Viral Macromolecular Synthesis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(9):2854-2864.

- [103] Movsumov I S., 1996, Flavonoids of the roots of *Limonium caspium*. Chemistry of Natural Compounds, 32(6).
- [104] Kandil F E., Ahmed K M., Hussieny H A., Souliman AM., 2000, A new flavonoid from *Limonium axillare*. Archiv der Pharmazie: Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, 333(8): 275-277.
- [105] Murray A P., Rodriguez S., Frontera M A., Tomas M A., Mulet M C., 2004, Antioxidant Metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. Zeitschrift Naturforsch. 59(7-8): 477-480.
- [106] Gadetskaya A V., Zhusupova G E., Tarawneh A H., Ma G., Cutler S J., Ross S A., 2015, Therapeutic efficacy of phenolic compounds from *Limonium* in acute lymphoblastic leukemia. Planta Medica, 81(5).
- [107] Nostro A., Filocamo A., Giovannini A., Catania S., Costa C., Marino A., Bisignano G., 2012, Antimicrobial activity and phenolic content of natural site and micropropagated *Limonium awei* (DeNot) Brullo & Erben plant extracts. Natural product research, 26(22):2132-6.
- [108] Benaissa W., Amrani A., Bicha S., Zama D., Benayache F., Marchioni E., Benayache ., 2013, Free radical scavenging action of phenolic compounds from *Limonium bonduelli* (Plumbaginaceae). Der Pharmacia Lettre, 5(5):234-240.

CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE

II.1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE *CHRYSANTHEMUM SEGETUM*

II.1.1. Place dans la systématique

- * **Embranchement:** Angiospermes
- * **Classe:** Dicotylédones
- * **Ordre:** Astérales
- * **Famille:** Compositae
- * **Sous-famille:** Tubiflores
- * **Genre :** *Chrysanthemum*
- * **Espèce:** *segetum*



Figure II.1: *Chrysanthemum Segetum* L.

II.1.2. Dénomination et synonyme

Le tableau II.1 ci-dessous montre plusieurs synonymes de l'espèce *Chrysanthemum segetum* Linnaeus [1].

Synonyme de l'espèce <i>Chrysanthemum Segetum</i> L. 1753
<i>Leucanthemum segetum</i> (L.)stankov., 1949
<i>Chrysanthemum laciniatum</i> Gilib., 1782
<i>Matricaria segetum</i> (L.) Schrank., 1789
<i>Pyrethrum segetum</i> (L.) Moench., 1794
<i>Glebionis segetum</i> (L.) Fourr., 1869

Tableau II.1: Les synonymes de l'espèce *Chrysanthemum segetum* L.

II.1.3. Description :

C'est une Plante annuelle de 20 à 60 cm de hauteur, un peu charnue et glaucescente ; tige ascendante ou dressée, simple ou ramifiée.

Feuilles simple de 3 à 6 cm de longueur ; limbes à lobes (lorsqu'ils existent) aigus au sommet.

Inflorescence en capitules solitaires à l'extrémité de pédoncules, de 3 à 5 cm de diamètre; pédoncule renflé en massue au sommet ; involucre à bractées externes ovales obtuses, à bordure scarieuse étroite ; bractées internes plus longues, à large bordure scarieuse brun pâle.

Fleurs tubuleuses jaunes à ligules jaune d'or, allongées rayonnantes.

Fruits =akènes ; les internes cylindriques à 10 côtes saillantes ; les externes aussi larges que longs, munis de deux ailes latérales.

La plantule porte deux cotylédons elliptiques à ovales, à sommet arrondi, plus ou moins pétiolés [2,3,4].

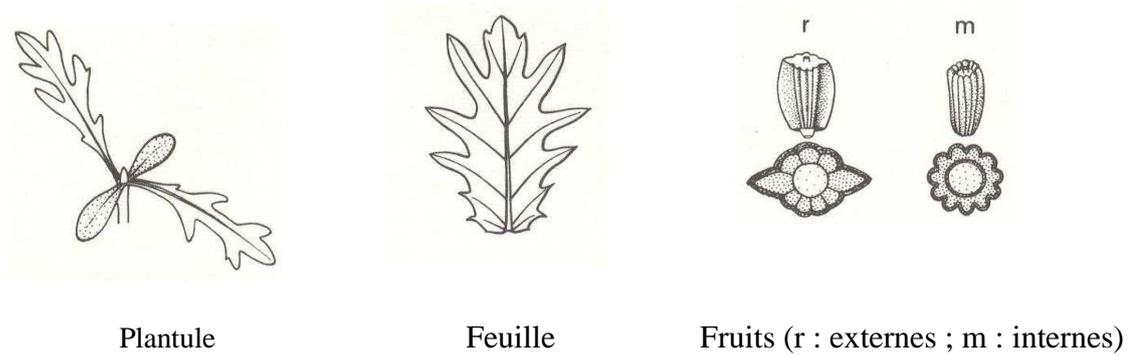


Figure II.2: Plantule et fruits de *Chrysanthème segetum*

II .1.4. Distribution géographique

Chrysanthemum segetum est une plante originaire de la région Méditerranéenne [3] elle est largement distribuée en Europe [2], introduit en Amérique du nord, en Australie, en Afrique du nord et du sud, en Nouvelle-Zélande, en Asie mineure et en Asie de l'ouest [2].



● *Chrysanthemum segetum*

Figure I.3 : Répartition géographique de *Chrysanthemum segetum*
(www.discoverlife.org/Chrysanthemum+segetum page consultée le 8/12/16)

II .1.5. Travaux antérieurs sur *Chrysanthemum segetum* L.

Une recherche bibliographique sur l'espèce *C.segetum* a montré qu'il n'existe en fait que très peu de travaux phytochimiques antérieurs concernant cette plante. Les produits isolés sont essentiellement, des coumarines [5], des polyacétylènes [6], des flavonoïdes [7] et quelques acides phénoliques.

II.1.5.A. LES COUMARINES

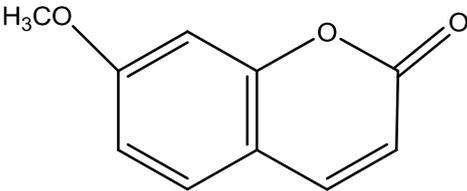
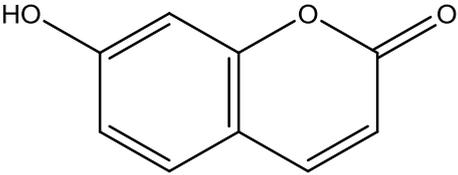
Historiquement, la coumarine tire son nom de « kumaru » d'une langue amérindienne, qui représente le nom d'un arbre poussant en Amérique du sud donnant la fève tonka, cette molécule fut isolée pour la première fois en 1820 par Vogel [8].

Les coumarines, composés phénoliques non volatils, sont très répandues chez les végétaux, notamment dans les racines et les écorces, d'odeurs agréables, certaines servent en parfumerie ou pour aromatiser le tabac, d'autres sont très toxiques telles que les aflatoxines des champignons inférieurs. Ce sont des dérivés du phénylpropane dont les précurseurs sont des acides hydroxycinnamiques [9].

Des études phytochimiques menées sur les parties aériennes de l'espèce *C.segetum* ont permis d'obtenir sept composés Coumarine à savoir :

Herniarine (1), Umbelliférone (2), Scopolétine (3) [10] , Coumarine (4), Aésculétine (5), 4-Hydroxycoumarine (6), et dihydrocoumarine (7) [5].

Le tableau II.2, ci-dessous représente les dérivées coumariniques isolées à partir de l'espèce *Chrysanthemum segetum* L.

Structures	structures
 <p style="text-align: center;">(1)</p>	 <p style="text-align: center;">(2)</p>

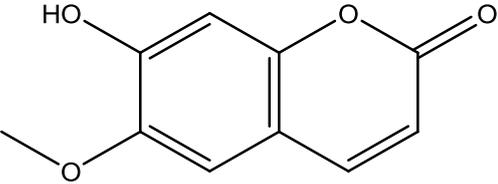
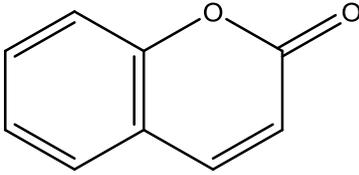
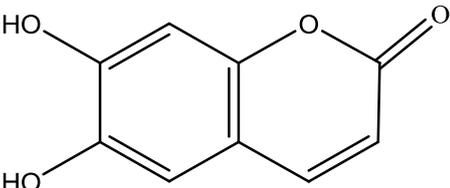
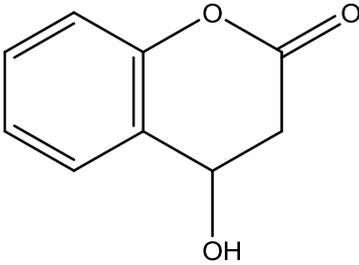
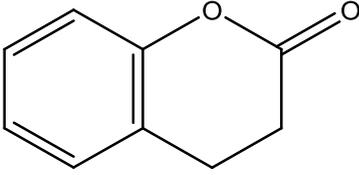
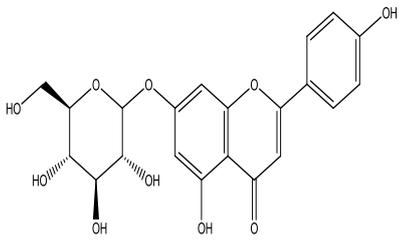
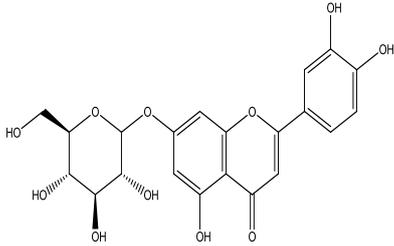
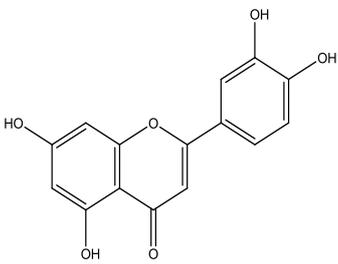
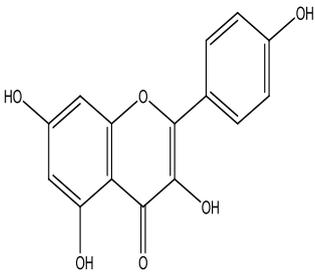
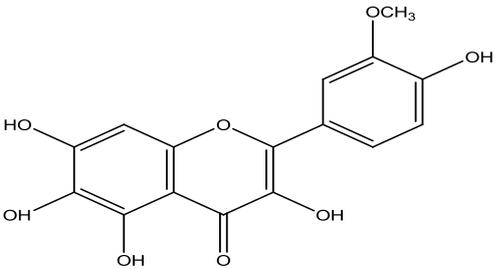
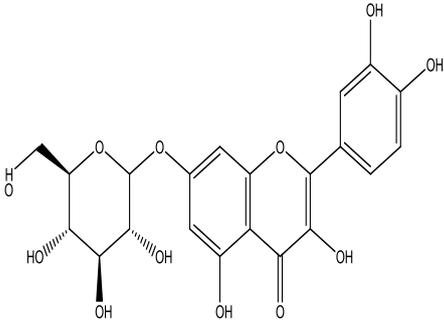
 <p>(3)</p>	 <p>(4)</p>
 <p>(5)</p>	 <p>(6)</p>
 <p>(7)</p>	

Tableau II.2: Structures des coumarines isolées à partir de l'espèce *C.segetum* L

II.1.5.B. LES FLAVONOÏDES

D'autres études effectuées sur les feuilles et les fleurs de cette espèce ont permis d'isoler les flavonoïdes, Apigénine-7-glucoside (8), Lutéoline-7-glucoside (9) [7], Lutéoline (10), kaempférol (11), Quercétagine-3'-méthylether (12) [11], Quercétine-7-O-glucoside (13), Gossypetine- 7-glucoside(14) ,8-hydroxy quercétine (15) [12].

Les composés répertoriés sont regroupés dans le tableau II.2.

Structures	structures
 <p style="text-align: center;">(8)</p>	 <p style="text-align: center;">(9)</p>
 <p style="text-align: center;">(10)</p>	 <p style="text-align: center;">(11)</p>
 <p style="text-align: center;">(12)</p>	 <p style="text-align: center;">(13)</p>

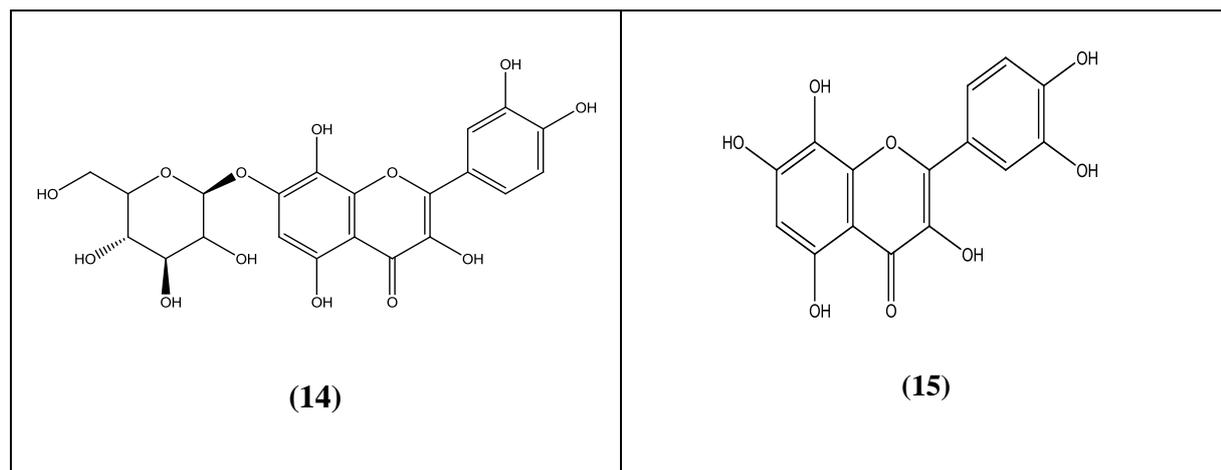


Tableau II.3: Structures des flavonoïdes isolés à partir de l'espèce *C.segetum* L.

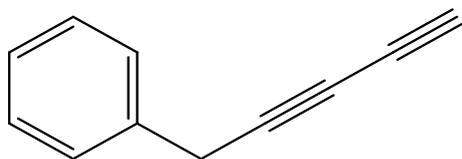
II.1.5.C. LES COMPOSE ACETYLENIQUES

Des études réalisées sur les parties aériennes de l'espèce *C.segetum* ont permis d'isoler et d'identifier de nombreux composés polyacétyléniques. Les composés isolés sont rapportés dans le tableau I.4.

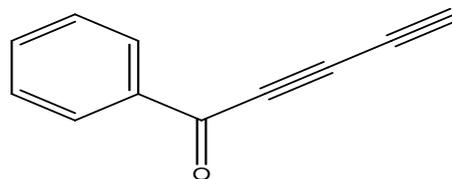
Structure	Nom	Réf
16	Benzene,2,4-pentadiynyle	
17	1-phénylpenta-2,4-diyn-1-one	
18	(Z)-méthyl(5-phénylpent-1-èn-3-ynyl)sulfane	[6]
19	(E)-5-(méthylthio)-1-phénylpent-4-èn-2-yn-1-one	[13]
20	(Z)-5-(méthylthio)-1-phénylpent-4-èn-2-yn-1-one	
21	1-phénylhexa-2,4-diyn-1-one	[14]
22	Acétate de 2-(hexa-2,4-diynyl)-6-méthoxyphényle	[15]
23	(S,E)-2-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ène	
24	(S,Z)-2-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]non-3-ène	
25	E-(S)-7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-diène	
26	Z-(S)-7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-diène	
27	Acétate de (5R,E)-7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle	
28	Acétate de (5R,Z)-7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle	
29	Acétate de 2-méthoxy-6-(penta-2,4-diynyl)phényle	

Tableau II.4 : Les polyacétylènes isolés à partir de l'espèce *Chrysanthemum segetum*

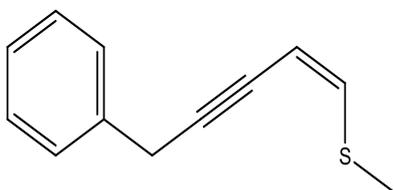
Les structures des polyacétylènes qui sont isolés de l'espèce *chrysanthemum segetum* cités dans le tableau II.4 sont présentées dans la figure suivante (Figure II.4).



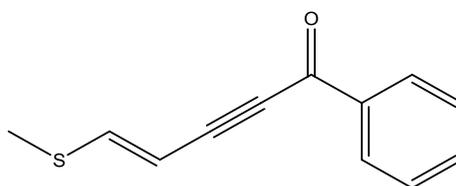
(16)



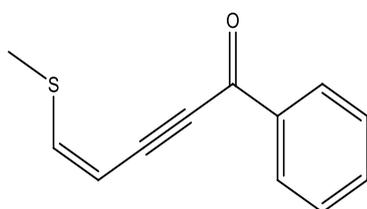
(17)



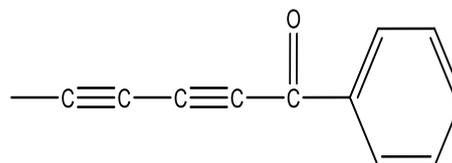
(18)



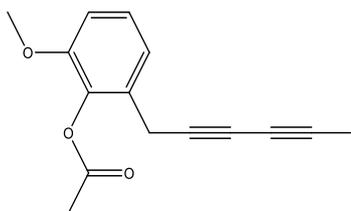
(19)



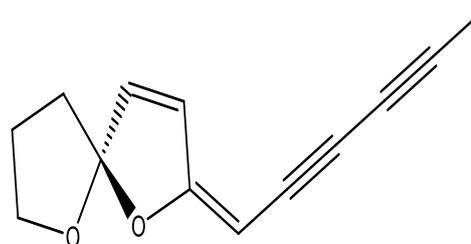
(20)



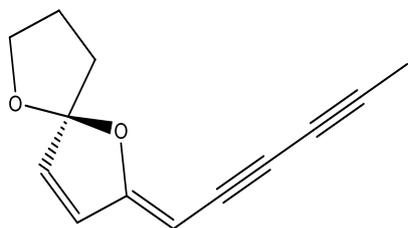
(21)



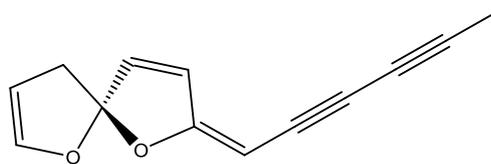
(22)



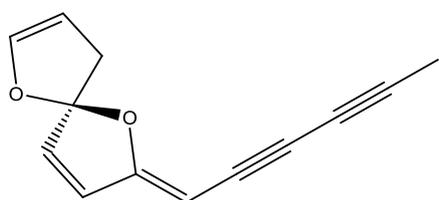
(23)



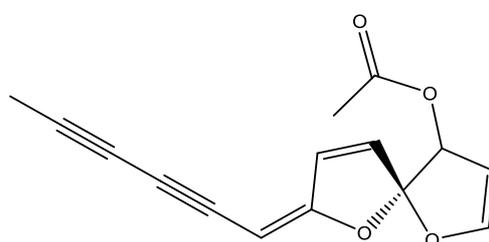
(24)



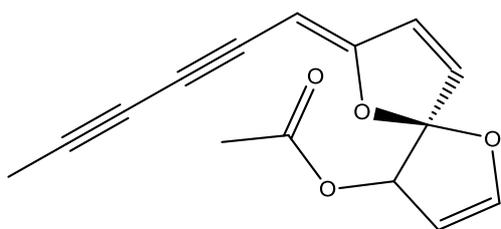
(25)



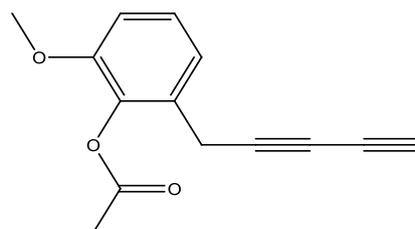
(26)



(27)



(28)



(29)

Figure II.4. Structures des polyacétylènes isolés à partir de l'espèce *Chrysanthemum segetum*.

II.1.5.D. AUTRES COMPOSES

Trois acides ont été isolés à partir de l'espèce *Chrysanthemum segetum*, l'acide chlorogénique(29), acide isochlorogénique (30) [12] et l'acide coumarique (31)[5] .

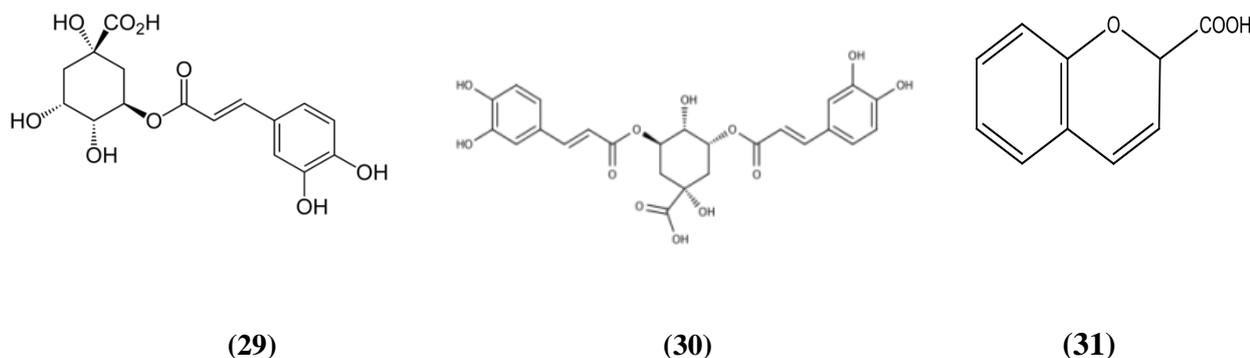


Figure II.5 : Structures des acides isolés à partir de l'espèce *C.segetum*

II.1.6.Utilisation

La recherche de nouvelles molécules d'origine naturelle à activité insecticide constitue un double moyen de protection de l'environnement et des cultures.

Chrysanthemum segetum est une espèce riche en pyrèthre présentant une activité insecticide [16].

En Tunisie, une enquête menée dans le milieu urbain a montré que, cette espèce est essentiellement utilisée pour les maladies hépatiques et biliaires [17]. elle est également utilisée contre l'ictère, l'asthme ,l'essoufflement, les brûlures des vomissements chroniques, stomachique vermifuge, la diarrhée, les contusions, les blessures, les plaies simples, la fièvre, et traitement pour des sueurs nocturnes et toutes les violations de la surface de la peau [18,19].

II.1.7. Matériel végétal

- **Récolte et séchage**

Les parties aériennes de la plante *Chrysanthemum segetum* ont été récoltées en jaune 2014 durant la période de florisation à ELkala (dans l'EST de l'Algérie), La détermination botanique a été réalisée par le professeur Kâabache (Département des sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbas, Sétif).

Le matériel végétal récolté est séché, coupé en petits morceaux et conservé à la température ordinaire du laboratoire à l'abri du soleil.

- **Extraction**

Une quantité de 1,5 kg de la parties aériennes est mise à macérer 3 fois dans le système de solvants MeOH / H₂O (80 /20) pendant 24 heures suivi d'une filtration puis concentration du filtrat. Ce dernier subit des extractions successives de type liquide –liquide en utilisant des solvants de polarité croissante (Chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol). Les extraits secs obtenus sont ensuite stockés à température ambiante, à l'abri de la Lumière jusqu'à utilisation. Le rendement d'extraction est donné dans le tableau II.5 suivant :

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement %
1,5Kg	Chloroforme	3,273	0,22
	Acétate d'éthyle	12	0,80
	<i>n</i> -butanol	30	2

Tableau II.5 : Rendements des extraits de l'espèce *Chrysanthemum segetum*

II.1.8. TRAITEMENT DES EXTRAITS DE L'ESPÈCE *C.SEGETUM*

II.1.8.1. Traitement de l'extrait chloroforme

L'extrait obtenu est soumis à une séparation par flash chromatographie sur colonne de gel silice. Une quantité de 1,5 g de l'extrait brut est solubilisée dans un minimum de l'hexane puis introduite dans une colonne de gel de silice (flash superclean LC-Si.SPE) de masse de 2 g. En phase et pression normale.

L'élution est réalisée au moyen de l'hexane dont augmente la polarité par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle puis par mélange chloroforme –méthanol, l'élution complète de la colonne est réalisée avec du méthanol pur.

Des fractions de 100 millilitres ont été collectées et analysées par chromatographie sur couche mince. Les plaques ont été visualisées à la lumière du jour et sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec le Cérium sulfate.

Les fractions sont réunies suivant leurs taches en CCM (tableau II.6).

Solvant d'éluion	Fractions recueillies		Masse (mg)
Hexane 100%	1-3	F0	-
Hexane-AcOEt -9/1	4 à 5	F1	60,19
Hexane-AcOEt -8/2	6	F2	30,4
Hexane-AcOEt -7/3	7 à 8	F3	60,6
Hexane-AcOEt -7/3	9 à 10	F4	100
Hexane-AcOEt -7/3	11 à 12	F5	57,9
Hexane-AcOEt -6/4	13 à 15	F6	200
Hexane-AcOEt -5/5	16 à 17	F7	200
Hexane-AcOEt -5/5	18	F8	50
Hexane-AcOEt -3/7	19 à 23	F9	100
Hexane-AcOEt -7/3	24 à 26	F10	120
CHCl₃-MeOH -9/1	27 à 29	F11	100
CHCl₃-MeOH-8/2	30 à 31	F12	200
CHCl₃-MeOH-5/5	32 à 33	F13	100
MeOH100%	34 à 35	F14	100

Tableau II.6: Fractionnement de l'extrait chloroformique du *Chrysanthemum segetum* L.

II.1.8.1.A. Chromatographie des fractions de l'extrait chloroforme

- **Etude de la fraction F4**

La fraction F4 (100 mg) a été soumise à une Flash chromatographie (FC) sur silice greffée C18 à l'aide du système H₂O/MeOH, la réunion de ces sous fractions selon leur profil CCM permet d'obtenir les sous fractions SF4-1 à SF4-6, les résultats sont présentés dans le suivant (Tableau II.7)

Erlin		1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
Sous fractions		SF4-1	SF4-2	SF4-3	SF4-4	SF4-5	SF4-6
Eluants %	MeOH	50	40	30	20	10	0
	H ₂ O	50	60	70	80	90	100
Vol (ml)		100	100	100	100	100	100

Tableau II.7: Séparation chromatographique de la fraction F4

- La sous fraction SF4-2 a directement offert un produit pur **CSF4-2**, d'un poids de 2 mg

- **Etude de la fraction F7**

Cette fraction a subi une flash chromatographie, sur silice greffée C18. L'élution est réalisée par un mélange MeOH/H₂O, Le contrôle des sous-fractions éluées est effectué sur les plaques CCM de gel de silice dans le solvant (hexane/AcOEt ; 7/3), avec le Cérium sulfate comme réactif de révélation, les résultats de cette séparation sont regroupés dans le tableau II.8, on obtient six sous fractions notées SF7-1 à SF7-6.

Erlin		1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16
Sous fractions		SF7-1	SF7-2	SF7-3	SF7-4	SF7-5	SF7-6
Eluants %	MeOH	50	40	30	20	10	0
	H ₂ O	50	60	70	80	90	100
Vol (ml)		100	100	100	100	100	100

Tableau II.8. Séparation chromatographique de la fraction F7

- Dans la sous fraction SF7-2, on a observé la formation d'un précipité blanc, après filtration, lavage au chloroforme, nous avons obtenu le produit **CSF7-2** d'unc poids de 3mg.

- La sous fraction SF7-3 (2mg) a directement offert un produit pur **CSF7-3**.

- Dans la sous fraction SF7-4, on a observé la formation des cristaux incolores, après filtration, lavage au chloroforme, nous avons pu obtenir 3 mg du produit pur **CSF7-4**.

- **Etude de la fraction F11**

La fraction F11 (100 mg) a été soumise à une flash chromatographie sur silice greffée C18 avec le système éluant H₂O/MeOH de polarité croissante de 50 à 0 % de MeOH, nous avons obtenu la sous fraction CSF11-3 à 30 % de MeOH.

Dans cette sous fraction, on a observé la formation d'un précipité jaune. Ce dernier récupéré est purifié par lavages successifs à l'aide de CHCl₃ pour donner le produit **CSF11-3** de poids de 4 mg.

- **Etude de la fraction F12**

Dans la fraction F12 (200 mg), on a observé la formation d'un précipité blanc, la partie insoluble est récupérée et lavée plusieurs fois avec le MeOH, pour donner le produit **CSF12** de poids de 3 mg.

II.1.8.2. ANALYSE QUALITATIVE DES EXTRAITS ACETATE D'ETHYLE ET N-BUTANOL DE L'ESPECE *CHRYSANTHEMUM SEGETUM* PAR HPLC-DAD ET UHPLC-ESI-MS

II.1.8.2.A. Analyses par HPLC-DAD

Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *C. segetum* ont été soumis à l'analyse par chromatographie liquide à haute performance avec détection à réseau de diodes (HPLC/UV-DAD). L'objectif de la présente étude est d'identifier les composés phénoliques que renferme l'espèce *C.segetum*.

Sur une base des études antérieures, les principales composantes de cette plante appartiennent aux classes de Flavonoïdes, des coumarines et des acides phénoliques.

Les conditions expérimentales utilisées lors des analyses chromatographiques permettent d'envisager un ordre d'élution possible des composés polyphénoliques. Les composés les plus polaires sont moins retenus par la colonne C18 alors que ceux possédant un caractère apolaire se verraient plus retenus par celle-ci. L'ordre d'élution des molécules étant aussi déterminé par la nature et le gradient des solvants utilisés.

On peut donc envisager que pour un solvant d'élution tel que l'acétonitrile les premiers constituants à être élués soient : les acides hydroxybenzoïques, suivis des flavan-3-ols, des acides hydroxycinnamiques, des coumarines, des flavanones, des dihydrochalcones, des flavonols et des flavones. Si les polyphénols devaient contenir des groupements apolaires (groupement méthoxy par exemple), ils seraient alors plus retenus par la phase stationnaire. S'ils devaient posséder des sucres, ils seraient alors élués avant leur forme aglycone [20].

Le profil d'élution des composés issus de l'extrait a été suivi à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques. En effet, tous les phénols sont détectés dans la région des ultra-violets avec un pic d'absorption maximum à 280 nm du à la présence du cycle phénolique [21]. Le cycle B présent dans les différentes classes de flavonoïdes est caractérisé généralement par un pic d'absorption qui se situe dans un intervalle de mesure compris entre 300 et 400 nm [22].

Le tableau II.9 donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Types de flavonoïdes	Bande II (nm)	Bande I (nm)
Flavones	240-285	304-350
Flavonols	240-285	352-385
Flavanones	270-295	300-330
Dihydroflavonols	270-295	300-320
Chalcones	220-270	340-390
Aurones	-	370-430
Anthocyanidines	270-280	465-550

Tableau II.9: Relation entre le maximum d'absorption en UV et le type de flavonoïdes [22]

Les coumarines sont des composés organiques aromatiques issus de substances naturelles et peuvent être considérées en première approximation, comme une lactone de l'acide ortho-hydroxycinnamique, le tableau II.10 donne la longueur d'onde d'absorbance maximale en milieu éthanolique de quelques types de coumarines [23].

Types de coumarines	λ max (nm)
Coumarine	310 ; 285 ; 274 ; 220
Umbelliférone	370 ; 330 ; 290 ; 255 ; 240 ; 220
Aésculétine	400 ; 350 ; 300 ; 260 ; 230
Scopolétine	400 ; 345 ; 300 ; 253 ; 230

Tableau II.10 : la longueur d'onde d'absorbance maximale de quelques types de coumarines.

Les extraits bruts de *C.segetum* ont été injectés sur une colonne (Kinetex 5u C18 100A new column 250x4.6mm) et un détecteur à barrette de diode. Les longueurs d'onde suivies sont 280, 360 nm. Les analyses ont été réalisées en phase reverse avec une colonne C18. Le débit est réglé à 1.2mL/min. Le volume d'injection choisi était 50 μ l. La phase mobile constituée de deux solvants eau-acide formique 0.2 % (A) et acétonitrile-acide formique 0.5% (B) dans les conditions suivantes 0 mn: 5% B ; 10 mn : 55% B ; 60 mn : 95 %B; 65 mn : 95% B; 70 mn : 10% B.

II.1.8.2. B. Analyses UHPLC-ESI-MS

Pour bénéficier à la fois d'une bonne sensibilité, sélectivité et des possibilités d'identifications, nous avons fait appel à la spectrométrie de masse couplée à l'UHPLC par une interface de type électrospray (ESI).

- **Principe de l'UHPLC Analyses**

Cette technique se base sur les mêmes principes que l'HPLC, mais améliore les performances de cette dernière au niveau de la résolution chromatographique, la vitesse d'analyse et la sensibilité. En effet, l'UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) utilise une phase stationnaire composée de particules de diamètre inférieur à 2 μm (alors que les colonnes HPLC sont habituellement remplies de particules de 3 à 5 μm).

- **spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse des molécules ou atomes présents dans un échantillon étudié. Le principe de la mesure repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions. Ce principe impose aux molécules et atomes d'un échantillon d'être préalablement transformés en ions, en phase gazeuse, avant d'être analysés par la spectrométrie de masse. La fragmentation au niveau de l'ion moléculaire, conduit à la formation d'ions fragments caractéristiques indiqués par le rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires (m/z), positives ou négatives. Ce rapport est exprimé en daltons (1 Da = masse de l'atome d'hydrogène) [24], également en uma (unité de masse atomique).

Le couplage de l'UHPLC avec la spectrométrie de masse, ou LC/MS, suppose de vaporiser complètement la phase liquide en provenance de l'HPLC tout en maintenant le vide dans le spectromètre et d'ioniser les analytes.

- **Ionisation par électrospray (ESI)**

La source ESI (*ElectroSpray Ionization*), ou ionisation par électronébulisation, a été développée par J.B. Fenn (prix Nobel 2002). L'ionisation est ici produite par application, à pression atmosphérique, d'une différence de potentiel élevé de 4 à 6 kV sur un liquide traversant un capillaire en silice enchâssé dans un tube au travers duquel circule un gaz inerte (azote), appelé gaz de nébulisation.

Il se forme à la sortie du capillaire *via* le cône de Taylor (Fig II.6), un aérosol (*spray*) composé de fines gouttelettes chargées en suspension dans l'air. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes conduit à une augmentation importante de leur densité de charge des forces coulombiennes répulsives atteignent le niveau des tensions superficielles.

Les gouttelettes explosent en libérant des ions en phase gazeuse (microgouttelettes).

Les ions ainsi générés par protonation ou déprotonation des molécules de l'échantillon sont ensuite transférés vers l'analyseur [25].

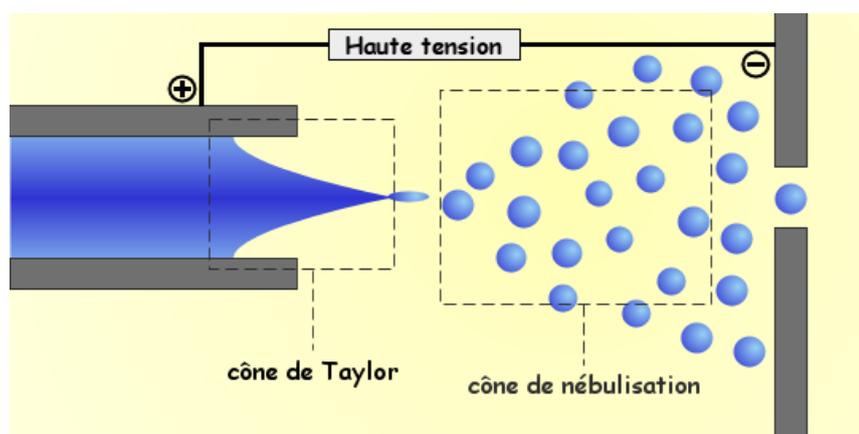


Figure II.6. Représentation schématique d'une source d'ionisation par électrospray(Wikipedia 2016)

L'ESI est une méthode d'ionisation très douce qui permet essentiellement d'observer des ions pseudo-moléculaires (par exemple $[M+H]^+$ en mode positif ou $[M-H]^-$ en mode négatif) mais induit peu de fragmentation.

- **UHPLC- MS instrumentations et conditions**

L'appareil de chromatographie liquide ultra performante (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) permet d'améliorer sensiblement la séparation et la résolution des pics chromatographiques, par rapport à un système HPLC classique. Le couplage de cette technique séparative avec un analyseur de masse haute résolution est idéal pour établir la structure des composés originaux. Les analyses (UHPLC/ESI-MS) ont été effectuées à l'aide d'un système Dionex Ultime 3000 et une pompe HPLC Quaternaire 1250 bar. Un passeur automatique d'échantillons thermostaté à 25°C, et d'une colonne Kinetex 2.6 μ m Biphenyl (100x2.1 mm). Le système de solvants utilisé était le suivant: A : H₂O + 0.1% HCOOH / B : MeOH + 1% HCOOH à un débit de 0.2 mL/min. Le gradient utilisé était le suivant: 0 min - 5

% phase B, 1.3 min - 30% phase B, 9.3 min- 100% phase B, 11.3 min- 100% phase B, 13.3 min- 5% phase B, 20 min- 5% phase B. Le volume d'extrait injecté était 10 µL. La détection, a été réalisée en mode négatif dans le domaine m/z 100.00-1000.00.

Une source de type electrospray (ESI) était installée avec les conditions d'ionisation suivantes :

- Voltage capillaire : 2.8 kV
- Température de la source : 175 °C
- Temperature de désolvatation : 305 °C
- Gaz de gainage (N₂> 95%) 45
- Gaz auxiliaire (N₂> 95%) 10

Source d'ionisation : Spectromètre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Logiciel d'acquisition : Xcalibur software, v. 3.0.63 (Xcalibur, Thermo Fisher Scientific).

II.2.ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE *LIMONIUM PRUINOSUM*

II.2.1.Place dans la systématique

Règne	Plante
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Caryophyllidae
Ordre	Plumbagina
Famille	Plumbaginaceae
Genre	<i>Limonium</i>
Espèce	<i>pruinatum</i>

Tableau II.10 : La classification de *Limonium pruinatum* [26].



Figure II.7: *Limonium pruinatum*

II.2.2. Dénomination et synonyme

Le tableau II.11 ci-dessus montre le plusieurs synonymes de l'espèce *Limonium pruinosum*

Synonyme de l'espèce <i>Limonium pruinosum</i> (L.) Chaz. (1790)	
<i>Statice pruinosus</i> L. (1767)	<i>Limonium alleizettei</i> (Pau) Brullo & Erben (1989)
<i>Statice pruinosus</i> var. <i>hirtiflora</i> Cavara	<i>Statice alleizettei</i> Pau (1929)
<i>Limonium pruinosum</i> var. <i>hirtiflorum</i> (Cavara) Maire & Weiller (1939)	<i>Limonium pruinosum</i> var. <i>glabrum</i> Maire & Weiller (1939)
<i>Limonium pruinosum</i> (L.) Chaz. subsp. <i>pruinosum</i>	<i>Limonium pruinosum</i> subsp. <i>alleizettei</i> (Pau) Maire (1931)
	<i>Statice alleizettei</i> Pau (1929)

Tableau II.11: Les synonymes de l'espèce *Limonium pruinosum*

II.2.3. Distribution géographique

Cette espèce est largement distribuée en Algérie, en Maroc, en Tunisie en Libye, en Égypte, en Palestine et en Jordanie [26].

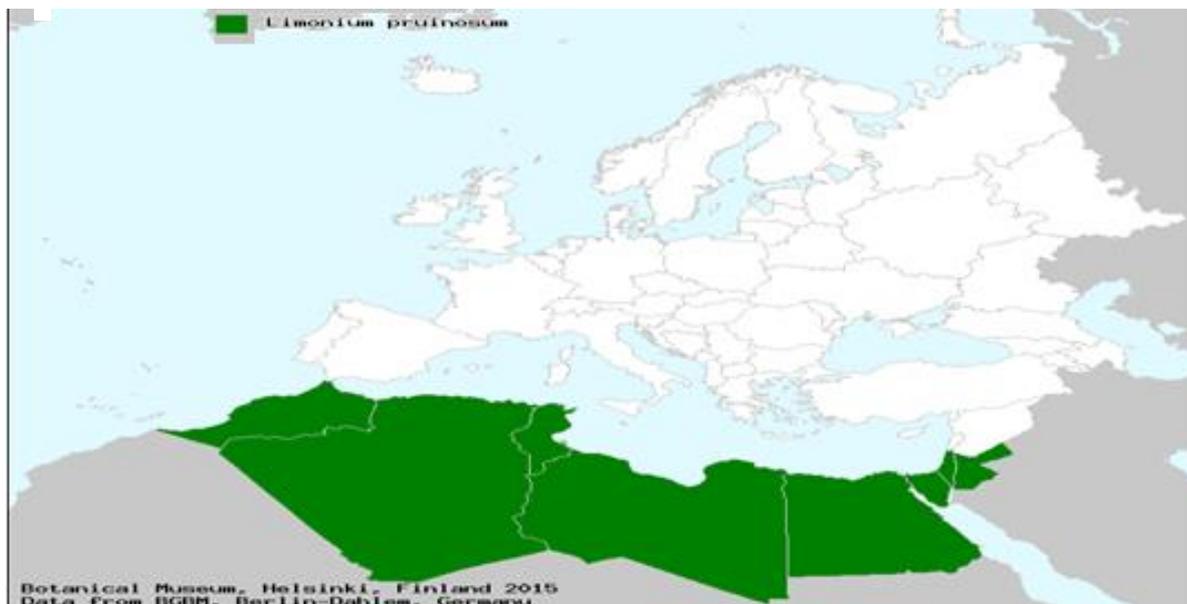


Figure II.8 Répartition géographique de *Limonium pruinosum*

II.2.4. Description botanique

Cette plante pousse sur les sols argileux des oueds à eau et sol salés. Les tiges vert foncé, ramifiées ne portent pas de feuilles, leur extrémité porte de très nombreux glomérules de petites fleurs roses. Les feuilles forment une éphémère rosette à la base des tiges.

II.2.5. Utilisation

Dans le sud de la Tunisie, cette plante est utilisée pour nourrir les chameaux pendant la saison sèche [27].

II.2.6. Travaux antérieurs sur *Limonium pruinatum*

Limonium pruinatum est une espèce végétale très peu étudiée. En effet, jusqu'à ce jour, elle n'a fait l'objet que d'une seule étude phytochimique qui a permis d'isoler et d'identifier seize Produits naturels [28].

Méricétine-3-*O*- β -galactopyranoside (1) ; Méricétine 3-*O*-(6''*O*-galloyle-gluco-paranoside)(2)

Méricétine-3-*O*- β -glucopyranoside (3) ; Kampférol-3-*O*-rhamnopyranoside(4)

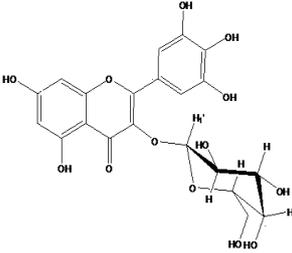
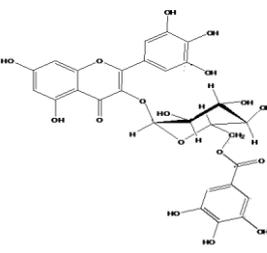
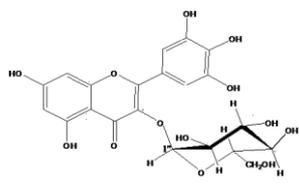
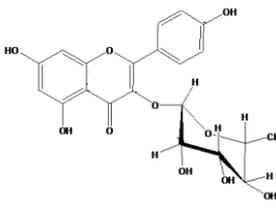
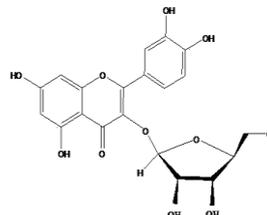
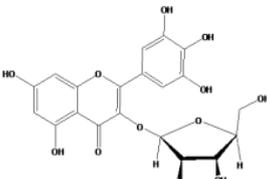
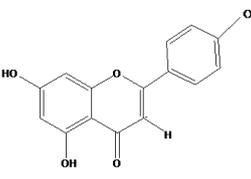
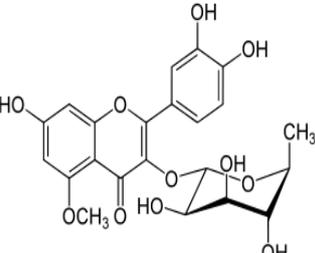
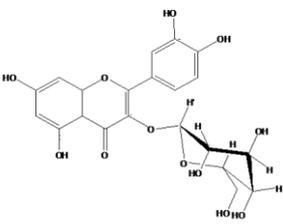
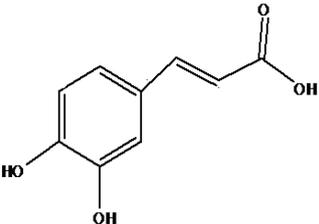
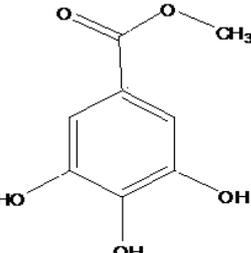
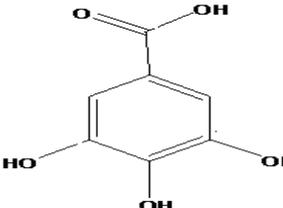
Quéricétine-3-*O*-arabinofuranoside (5) ; Méricétine-3-*O*-arabinofuranoside (6)

Quéricétine-3-*O*-rhamnopyranoside (7), Apigénine (8) ; Quéricétine-3-*O*- β -galactopyranoside (9) ; L'acide caféique (10) ; gallate de méthyle (11) ; L'acide gallique (12) ;

6'-*O*-sulfonyl-salidoside (13) ; 1,6-*O*-Digalloyle- β -D-gluco-pyranose (14),

N-E-cafféoyl tyramine (15) ; Limoniastramide (16).

Les composés répertoriés sont regroupés dans le tableau II.12.

 <p style="text-align: center;">(1)</p>	 <p style="text-align: center;">(2)</p>	 <p style="text-align: center;">(3)</p>
 <p style="text-align: center;">(4)</p>	 <p style="text-align: center;">(5)</p>	 <p style="text-align: center;">(6)</p>
 <p style="text-align: center;">(8)</p>	 <p style="text-align: center;">(7)</p>	 <p style="text-align: center;">(9)</p>
 <p style="text-align: center;">(10)</p>	 <p style="text-align: center;">(11)</p>	 <p style="text-align: center;">(12)</p>

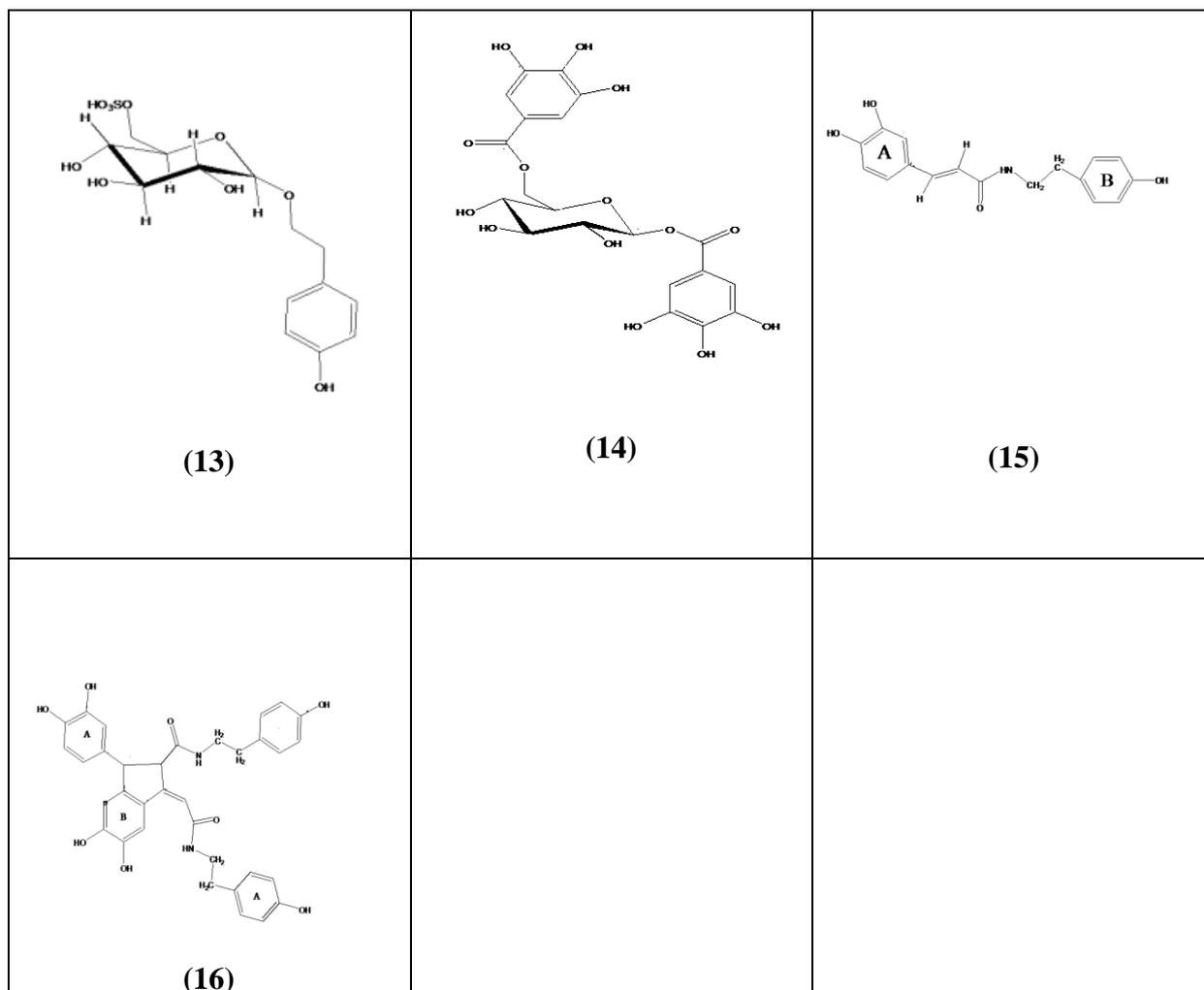


Tableau II.12: Structures des composés isolés à partir de l'espèce *Limonium pruinosum*

II.2.7. Matériel végétal

- **Récolte et séchage**

La plante *Limonium pruinosum* a été récoltée en 2010 dans la région de Batna. La détermination botanique d'espèce a été réalisée par le professeur Laouer Hocine laboratoire de valorisation des ressources naturelles biologiques, département de biologie Université Ferhat Abbas de Sétif).

Le matériel végétal récolté est séché, coupé en petits morceaux et conservé à la température ordinaire du laboratoire à l'abri du soleil.

- **Extraction**

Nous avons procédé à l'extraction de 2.6 kg de plante entière par macération dans un mélange MeOH/Eau (70/30) pendant 3x24 heures.

Après filtration et concentration de la solution, on ajoute de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche et on procède à des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, l'acétate d'éthyle et enfin par le *n*-butanol, chaque extraction est répétée trois fois.

Les trois phases organique obtenues (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre, puis filtrées, concentrées à sec sous pression réduite, pesées et les rendements sont donnés dans le tableau II.13.

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement %
2600g	Chloroforme	0,8	0,030
	Acétate d'éthyle	5,67	0,218
	<i>n</i> -butanol	30	1,154

Tableau II.13: Rendements des extraits de l'espèce *Limonium pruinosum*

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure II.10.

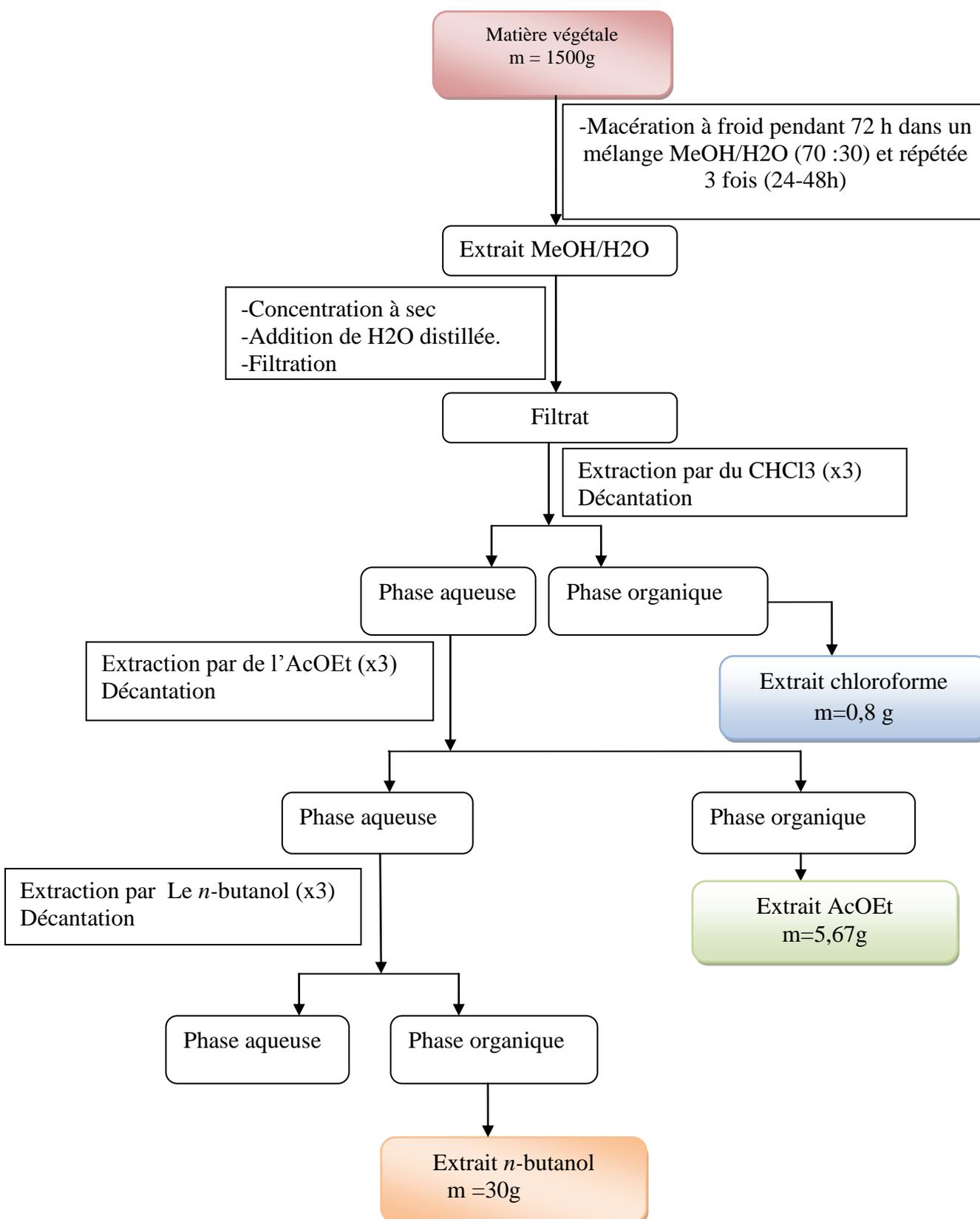


Figure II.10 : Protocole d'extraction de l'espèce *Limonium pruinosum*

II.2.8.TRAITEMENT DES EXTRAITS DE *LIMONIUM PRUINOSUM*

II.2.8.1.Traitement de l'extrait acétate d'éthyle

L'extrait EtOAc est soumis à des fractionnements successifs par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement des molécules pures, les différentes étapes sont présentées ci-dessous:

Après les tests effectués pour choisir le meilleur système d'éluion, un premier Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Limonium pruinum* (4g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice.

L'extrait acétate d'éthyle dissout dans le méthanol est mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière, est déposée sur une colonne de gel de silice, (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le chloroforme. L'éluion a été réalisée par un gradient de solvants organiques composé du chloroforme et de l'acétone.

Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique en couche mince sur des plaques analytiques. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'acide sulfurique et chauffées pendant 3 mn à 100°C.

La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau II.14.

Lot de fractions	N° de la fraction	SYSTEME D'ELUTION		
		% CHCl ₃	% Acétone	Poids de la fraction (mg)
1-8	F0	100	0	-
9-19	F1	100	0	-
20-27	F2	99	1	20
28-35	F3	99	1	30
36-40	F4	99	1	54
41-52	F5	98	2	70,5
53-55	F6	98	2	30
56-70	F7	98	2	45
71-80	F8	95	5	65,5
81-84	F9	95	5	35
85-102	F10	90	10	50
103-119	F11	85	15	100
120-135	F12	80	20	120
136-145	F13	70	30	240
146-156	F14	75	40	305
157-163	F15	70	30	210
164-171	F16	60	40	200,5
172-180	F17	50	50	400

181-190	F18	45	55	456,5
191-200	F19	45	55	560,5
201-220	F20	40	60	512,5

Tableau II.13 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait acétate d'éthyle de *Limonium pruinosum*.

II.2.8.1.A. Chromatographie des fractions de l'extrait acétate d'éthyle

- **Etude de la fraction F06**

La fraction F06 (30mg) renferme un produit majoritaire (**FLP06**) soluble partiellement dans le MeOH et soluble totalement dans le DMSO. Ce produit est purifié par lavages successifs à l'aide d'un mélange de CHCl₃ et de MeOH, la masse du produit pur obtenu est de 15 mg.

- **Etude de la fraction F09**

La fraction F09 (35mg) est purifiée sur plaque analytique de gel de silice, dans le système chloroforme/acétone (5/1) a mené à l'obtention du produit pur **FLP09** (16mg), soluble dans le DMSO, sa coloration sur plaque CCM sous des vapeurs d'ammoniac est jaune, orientant vers un flavonoïde.

II .2.8.2.Traitement de l'extrait *n*-butanol

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de cet extrait, nous avons débuté le traitement par une chromatographie sur couche mince pour mettre au point l'éluant ou le système d'éluion qui donnerait le meilleur résultat.

12g de l'extrait butanolique ont été fractionnés par chromatographie sur colonne de gel de silice (type 60, 70-230 mesh). L'éluion est effectuée avec un gradient de polarité croissante chloroforme / méthanol (90/ 10 à 0/ 100) puis suivi d'un lavage de la colonne avec le MeOH. Les résultats de cette colonne sont regroupés dans le tableau II.14.

Lot de fractions	N° de la fraction	SYSTEME D'ELUTION		
		% CHCl ₃	% MeOH	Poids de la fraction (mg)
1-4	F0	100	0	-
5-9	F1	100	0	-
10-17	F2	98	2	150
18-28	F3	98	2	125
29-36	F4	96	4	390

37-45	F5	96	4	295
46-49	F6	94	6	269
50-55	F7	94	6	225
56-60	F8	92	8	310
61-65	F9	92	8	360
66-69	F10	90	10	250
70-75	F11	90	10	354
76-79	F12	88	12	292
80-83	F13	88	12	452
84-86	F14	84	16	541
87-90	F15	84	16	423
91-94	F16	80	20	485
95-100	F17	78	22	653
101-112	F18	75	25	454
113-116	F19	70	30	552
117-120	F20	65	35	652
121-125	F21	60	40	585
126-130	F22	55	45	675
131-135	F23	50	50	695
136-140	F24	60	40	565
141-145	F25	70	30	675
146-149	F26	80	20	650
150-180	F27	90	10	900

Tableau II.14 : Regroupement final des fractions issues de la colonne chromatographique de l'extrait *n*-butanol de *Limonium pruinosum*.

II .2.8.2.A.Chromatographie des fractions de l'extrait *n*-butanol

- **Etude de la fraction F02**

La fraction F02 (150 mg) contient un précipité jaune soluble dans le DMSO, qui après Plusieurs lavages successifs par un mélange de CHCl₃ et de MeOH , nous avons pu obtenir 40 mg du produit **LPF02**, sa coloration sur plaque CCM sous des vapeurs d'ammoniac est jaune, orientant vers un flavonoïde.

- **Etude de la fraction F07**

Dans la sous fraction F7 (225 mg), on a observé la formation des cristaux incolores insolubles dans le méthanol, après filtration, Lavage au méthanol, nous avons pu obtenir 30 mg du produit **LPF07**.

- **Etude de la fraction F25**

La fraction F25 (695 mg) insoluble dans le méthanol contient un précipité blanc, qui après

Plusieurs lavages successifs par ce solvant, on obtient une poudre blanchâtre de masse 50mg, soluble dans le DMSO, c'est le composé **LPF25**.

II.3.Conclusion

L'étude par chromatographie liquide de l'extrait chloroforme de l'espèce *C.segetum* a permis d'isoler 6 composés : **CSF4-2**, **CSF7-2** , **CSF7-3**, **CSF7-4**, **CSF11-3** et **CSF12**.

Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *C. segetum* ont été soumis à l'analyse par HPLC-DAD et UHPLC- ESI-MS, c'est une méthode utilisée en phytochimie pour identifier des molécules connues sans avoir à les isoler.

Le fractionnement et la purification de l'extrait acétate d'éthyle de l'espece *L.pruinosum* ont permis d'obtenir les composés **FLP06** et **FLP09** et seules trois molécules ont été isolées à partir de l'extrait *n*- butanol **LPF02**, **LPF07** et **LPF25**. L'isolement des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques (CCM, LC, Flash Chromatographie).

REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Hanelt P., 2001, Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops. Springer Science & Business, Media, 3641.
- [2] Heywood V H., 1976, *Chrysanthemum*. In: Tutin T G., Flora Europaea. Volume 4. Cambridge University Press, Cambridge, 168-169.
- [3] Bojnanský V., Fargašová A., 2007, Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora. Springer Science & Business Media, 1046.
- [4] Roxana S F., LeRoy A., 1960, Illustrated Flora of the Pacific States. Stanford University Press, 740.
- [5] 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, 709(1):197-202.
- [6] Bohlmann F., Burkhardt T., Zdero C., 1973, Naturally Occurring Acetylenes. Academic Press, London.
- [7] Harborne J B., Heywood V H., Saleh N A M., 1970, Chemosystematics of the compositae: flavonoid patterns in the *Chrysanthemum* complex of the tribe anthemideae. Phytochemistry, (9):2011-2017.
- [8] Clark G S., 1995, Coumarin, Perfumer & Flavorist, 20(6):23-34.
- [9] Garabeth F., Bouaoun D., Elyafi-Elzahri G., 2007, Etude quantitative des coumarines d'une plante sauvage Prangos asperula Boissier. Phytothérapie, 5(1):259-263.
- [10] Öksüz S., Wagner H., 1982, Coumarins From *Chrysanthemum segetum*. Journal of Natural Products, 45(3):374-374.
- [11] Valant-Vetschera K M., Wollenweber E., Faure R., Gaydou E., 2003, New exudate flavonoids of species from the *Chrysanthemum* complex (Asteraceae-Anthemideae). Biochemical Systematics and Ecology, 31(5):545-548.
- [12] Geissman A., Steelink C., 1957, Flavonoid Petal Constituents of *Chrysanthemum segetum* L. Journal of Organic Chemistry, 22 (8):946-948.

- [13] Greger H., 1977, The Biology and Chemistry of the Compositae. Volume 2, Chapitre 32, Academic Press, London, 899.
- [14] Bohlmann F., Arndt C., Bornowski H., Kleine K M., Herbst P., 1964, Polyacetylenverbindungen, LVI. Neue Acetylenverbindungen aus *Chrysanthemum*-Arten. Chemische Berichte, 97,1179-1192.
- [15] Bohlmann F., Herbst P., Dohrmann I., 1963, Polyacetylenverbindungen, XLIV. Über neue Acetylenverbindungen aus der Gattung *Chrysanthemum* L. Chemische Berichte, 96, 226-236.
- [16] Haouas D., Skhiri-Harzallah F., Chaieb I., Ben Hamouda M H., 2003, Etude des potentialités insecticides de trois espèces de *Chrysanthemum* (Astéracée) chez *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera, Noctuidae). Actes des 10^{èmes} Journées Nationales sur les Résultats de la Recherche Agronomique –Nabeul.
- [17] Bellakhdar J., Chaisse R., Fleurentin J., Younos C., 1991, Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. Journal of Ethnopharmacology, 35(2):123-143.
- [18] Gray S F., 1836, A Supplement to the Pharmacopœia and Treatise on Pharmacology in General. 6th Edition, London, 446.
- [19] Qasem J R., 2015, Prospects of wild medicinal and industrial plants of saline habitats in the Jordan valley. Pakistan Journal of Botany, 47(2):551-570.
- [20] Abad-García B., Garmón-Lobato S., Berrueta L A., Gallo B., Vicente F., 2009, Practical guidelines for characterization of *O*-diglycosyl flavonoid isomers by triple quadrupole MS and their applications for identification of some fruit juices flavonoids. Journal of Mass spectrometry, 44(7):1017-1025.
- [21] Chantal B., Raymond S., 2005, Pratiquer les contrôles analytiques en œnologie. Educagri Editions, 203.
- [22] Sujata V B., Nagasampagi B A., Meenakshi S., 2005, Chemistry of Natural Products, Springer Science & Business Media, 840.

- [23] Abu-Eittah R H., El-Tawil B A H.,1985, The electronic absorption spectra of some coumarins. A molecular orbital treatment. Canadian Journal of Chemistry, 63,1173.
- [24] Vollhardt K P C., Schore N E., 1994, Traité de Chimie Organique. 2^{ème} édition. De Boeck-Wesmael S.A, Bruxelles.
- [25] MArch R E., 1997, An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 32(4):351-369.
- [26] Domina G., 2011, Plumbaginaceae:in : Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity.
- [27] Laudadio V., Dario M., Hammadi M., Tufarelli V., 2009, Nutritional composition of three fodder species browsed by camels (*Camelus dromedarius*) on arid area of Tunisia. Tropical Animal Health and Production, 41(7): 1219-122.
- [28] Boudermine S., Malafronteb N., Mencherini T., Vassallo A., 2015, Phenolic compounds from *Limonium pruinosum*. Natural Product Communications, 10(2):319-321.

Chapitre III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1: IDENTIFICATION DES PRODUITS DE *Chrysanthemum segetum*

III.1.1: IDENTIFICATION DES PRODUITS DE L'EXTRAIT CHLOROFORME

III.1.1.1. IDENTIFICATION DU COMPOSE CSF4-2

L'analyse du spectre RMN ^1H (spectre III.1) et son étalement (spectre III.2) montrent

Un signal sous forme d'un singlet à $\delta = 1,99$ ppm d'intégration 3H indiquant la présence d'un groupement méthyle, sur le spectre HMBC (spectre III.3) les protons de ce méthyle sont corrélés avec quatre carbones quaternaires à 64,7 (C-4'), 70,15 (C-2'), 77,5 (C-3') et 80,4 ppm (C-5'), d'après les valeurs de déplacements chimiques des 4 atomes de carbone quaternaires, il est parfaitement envisageable de conclure la présence de deux triples liaisons, cela explique également la valeur très faible du déplacement chimique du groupement méthyle qui doit subir probablement l'influence du cône d'anisotropie d'un groupement acétylénique.

Un signal sous forme d'un singlet à $\delta = 5,14$ ppm d'intégration 1H, son carbone résonne à 83 ppm attribuable à CH éthylénique, ce proton (H-1') est corrélé avec les carbones quaternaires acétyléniques C-4', C-2' et C-3'.

A partir de ces données on a pu établir l'enchaînement suivant: $\text{CH}_3 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{CH} =$.

Deux signaux sous forme doublet de doublet d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,35$ ppm avec une constante de couplage $J = 5,7 ; 1,7$ Hz, le second à $\delta = 6,77$ ppm ($J = 5,7 ; 0,5$ Hz) attribuables à H-9 et H-8 respectivement, ces protons sont portés par les carbones à $\delta = 126$ ppm (C-9) et à $\delta = 133,60$ ppm (C-8). Ce qui indique la présence de deux CH éthylénique.

Le spectre COSY (spectre III.4) montre la présence d'une tache de corrélation entre les deux protons H-8 et H-9, on suppose que les deux H soient voisins.

Un retour vers le spectre HMBC, on observe deux taches de corrélations entre les protons H-1', H-8 et le carbone quaternaire (C-7) à $\delta = 168,7$ ppm (Le déplacement chimique de carbone C-7 indique qu'il est lié à un atome d'oxygène). De plus le proton H-1' corréle avec le carbone à $\delta = 133,6$ ppm (C-8).

Ces données permettent de construire la sous-structure **a**. (figure III.1)

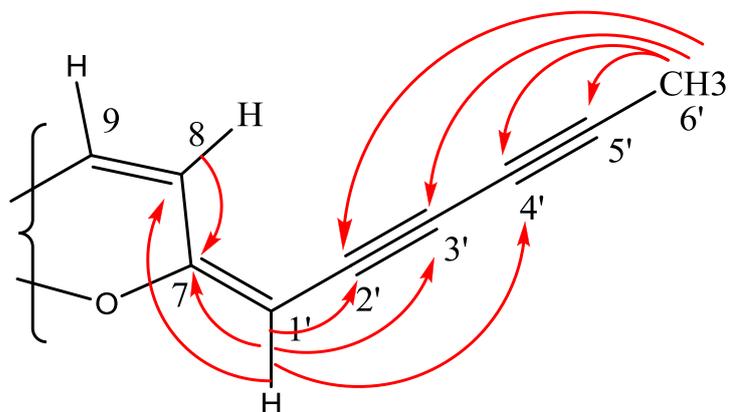


Figure III.1: Corrélations HMBC de la sous structure **a**

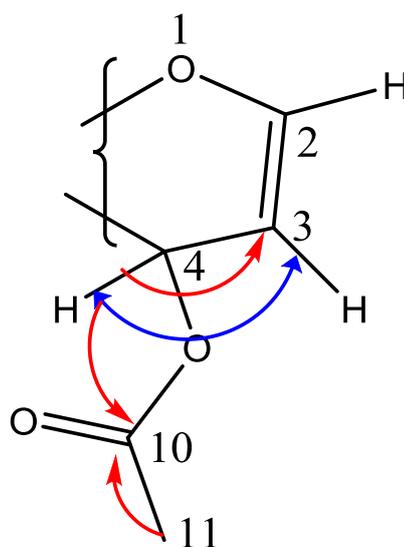
Sur le spectre RMN ^1H on observe également la présence de deux signaux sous forme doublet de doublet d'intégration 1H chacun, à $\delta = 5,20$ ($J = 3,1 ; 2,3$ Hz) et à $\delta = 6,60$ ($J = 3,1 ; 1,7$ Hz), correspond aux déplacements chimiques des protons éthyléniques H-3 et H-2, ces protons sont portés par les carbones à $\delta = 100,7$ ppm (C-3) et à $\delta = 148$ ppm (C-2), la valeur du déplacement chimique déblindé de carbone C-2 indique que ce carbone est lié à un atome d'oxygène.

Un singulet à $\delta = 2,04$ ppm d'intégration 3H, leur déplacement chimique laisse fort à penser qu'il s'agit d'un groupement acétoxy, ceci est confirmé par l'observation d'une tache de corrélation en HMBC entre le groupement méthyle et un atome de carbone quaternaire à 170,3 ppm (C-10).

L'expérience COSY (spectre III.4) permet de mettre en évidence la présence d'un signal à $\delta = 5,71$ ppm (H-4) d'intégration de 1H corrèle avec le proton H-3 suppose que les deux protons soient voisins.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (spectre III.3) entre le proton H-4 et les carbones C-3 et C-10 indiquent que le groupe acétoxy est porté par le carbone C-4.

Ces données permettent de construire la sous-structure **b**. (Figure III.2)

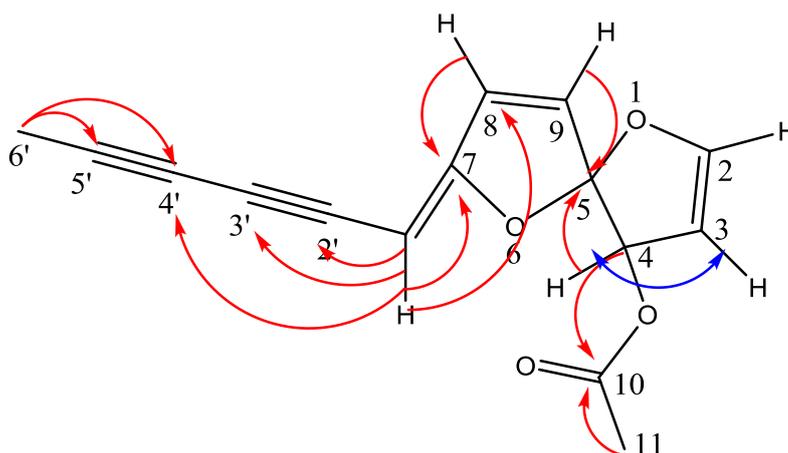


COSY(H-H) \longleftrightarrow

HMBC(C-H) \longrightarrow

Figure III.2 : Corrélations HMBC et COSY choisies de la sous structure (b).

Sur le même spectre HMBC, on observe des taches de corrélations entre le carbone quaternaire à 117,20ppm (C-5) et les protons H-9 et H-4, ce qui permet d'assembler les sous-structures a et b. (Figure III.3)



COSY(H-H) \longleftrightarrow

HMBC(C-H) \longrightarrow

Figure III.3: Corrélations HMBC et COSY choisies du composé CSF4-2

L'ensemble des données conduit à la structure plane du composé CSF4-2 est

l'acétate de 7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle. (Fig III.4)

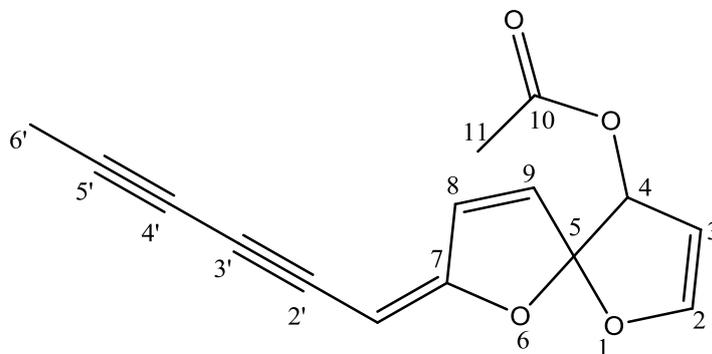


Figure III.4: Structure plane du composé CSF4-2 : Acétate de 7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC et COSY sont présentés dans le tableau III.1.

Position	δ_{H} (m) <i>J</i>	δ_{C}	HMBC	COSY
6'	1,99 .s	4,70	C-4', C-2', C-3', C-5', C-7, C-1'	
5'		80,40		
4'		64,70		
3'		77,50		
2'		70,15		
1'	5,14.s	83	C-4', C-2', C-8, C-7, C-3'	
7		168,70		
8	6,77.dd (5,7 ; 0,5)	126	C-9, C-7, C-5	H9
9	6,35.dd (5,7 ; 1,7)	133,60	C-5, C-8, C-7	H8
5		117,20		
4	5,71.m	75,10	C-3, C-9, C-2, C-10	H3
3	5,20.dd (3,1 ; 2,3)	100,70	C-2, C-5, C-4	H4, H2
2	6,60. dd (3,1 ; 1,7)	148,50	C-5	H3
10		170,30		
11	2,04.s	20,40	C-10	

Tableau III.1: Données de la spectroscopie RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC et COSY du composé CSF4-2

La formule développée plane du composé CSF4-2 est donc établie, nous constatons dans la littérature que celle –ci est valable pour deux isomères **acétate de (5R,E)- 7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle**. Figure(III.5) et **acétate de (5R, Z)- 7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle**. Figure(III.6) qui étaient déjà isolés à partir de l'espèce *C.segetum* [1], Ces composés ont été également isolés à partir de *C.coronarium* [2] et *Plagus flosculosus* [4]. Nous n'avons pas déterminé la configuration de notre structure cela peut être fait au future.

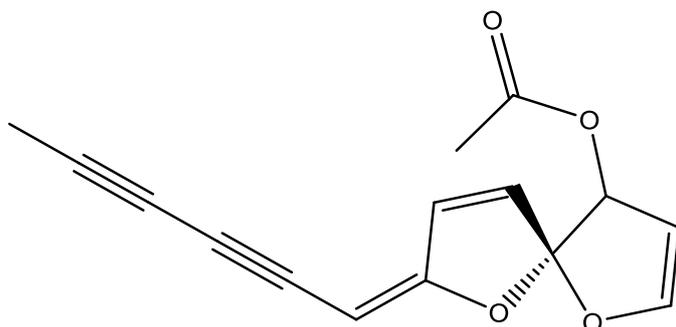


Figure III.5: Acétate de (5R, E)-7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle.

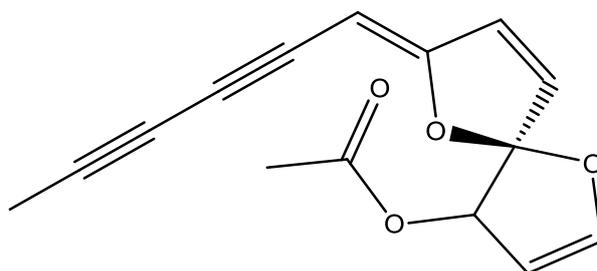
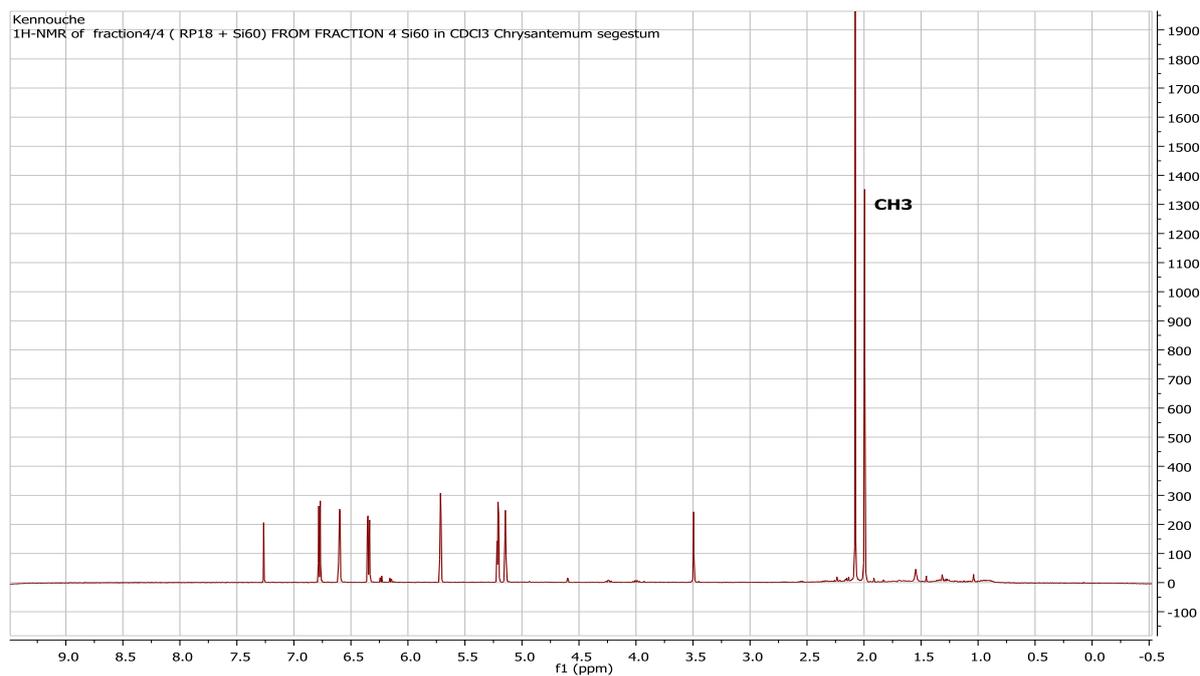
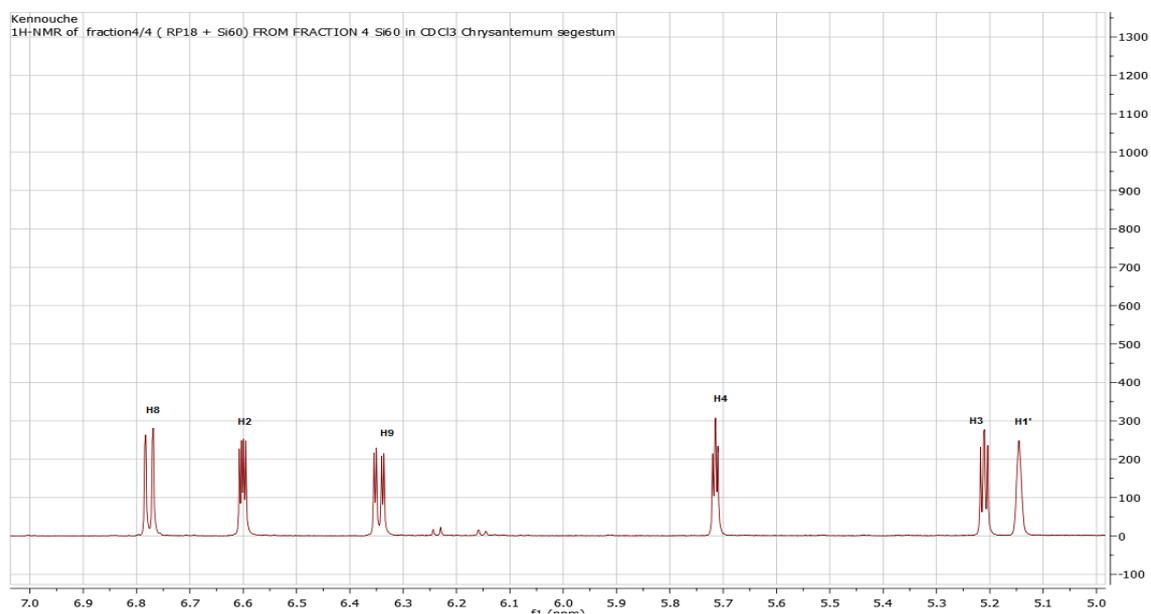


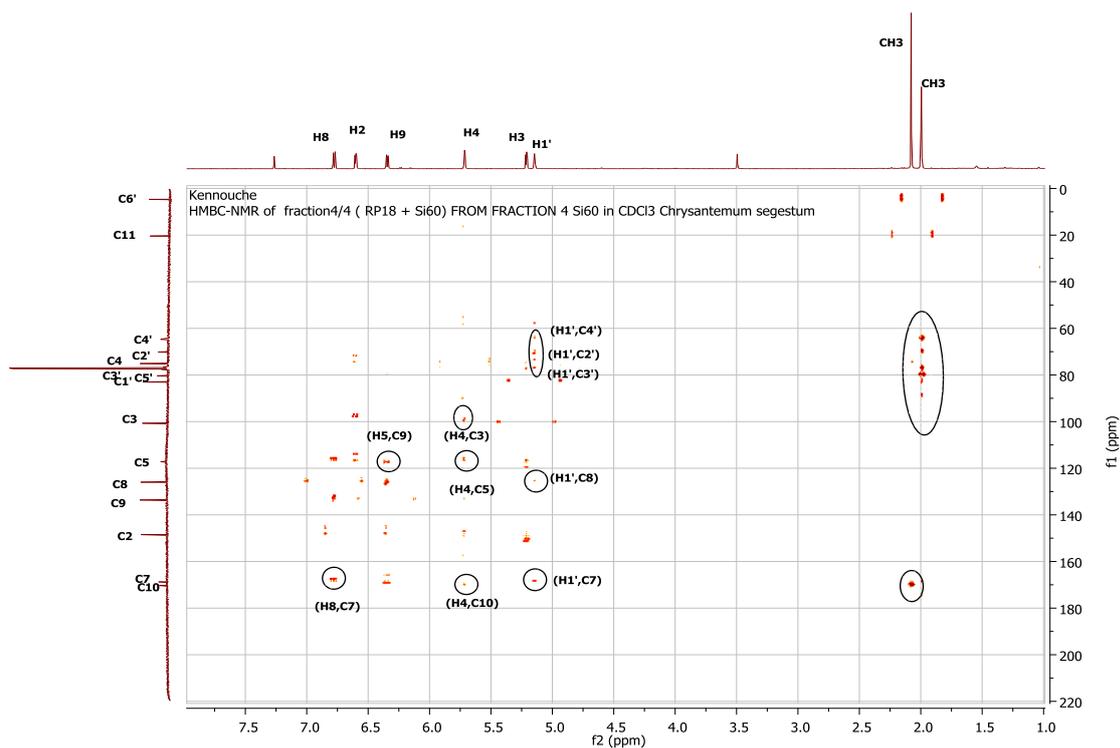
Figure III.6: Acétate de (5R, Z)-7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle.



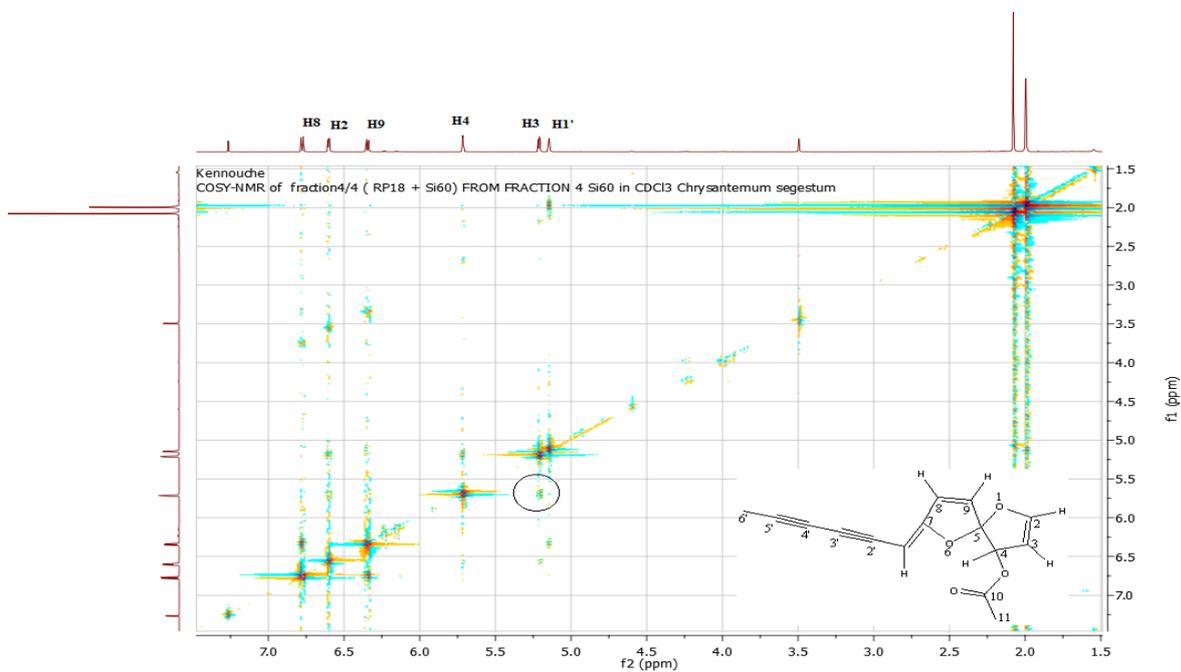
Spectre III.1: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé CSF4-2



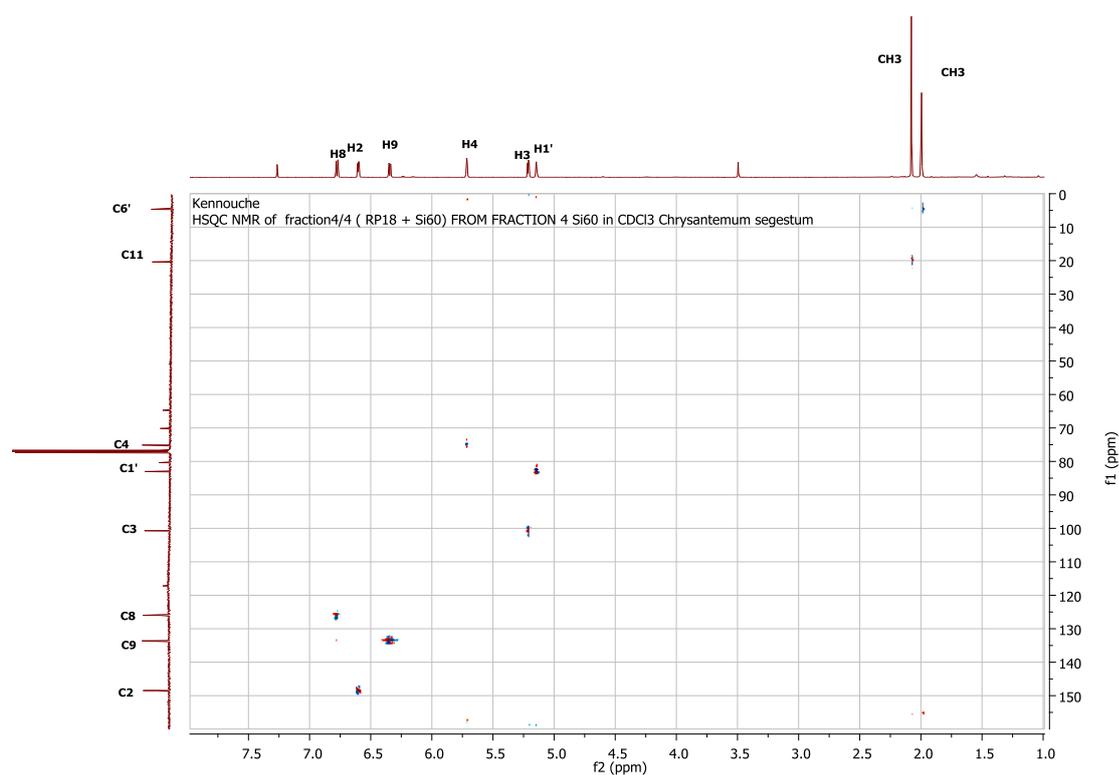
Spectre III.2: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé CSF4-2 étalé



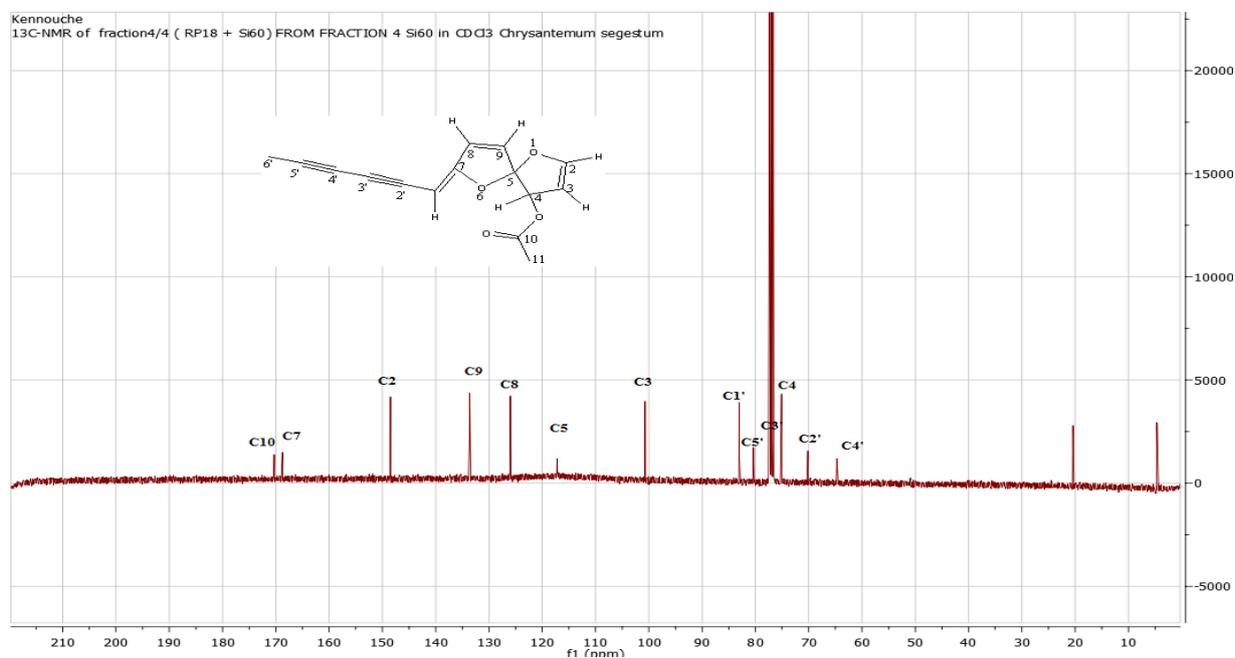
Spectre III.3: Spectre HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) du composé CSF4-2



Spectre III.4: Spectre COSY (500 MHz, $CDCl_3$) du composé CSF4-2



Spectre III.5: Spectre HSQC (500 MHz, CDCl_3) du composé CSF4-2



Spectre III.6: Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) du composé CSF4-2

III.1.1.2. IDENTIFICATION DU COMPOSE CSF7-2

Le spectre RMN¹H (spectre III.7) et son étalement (spectre III.8) du composé CSF7-2 montrent la présence de Trois protons aromatiques à $\delta = 6,94$ ppm (d, $J = 8,3 ; 2$ Hz). 6,77 ppm ($J = 8, 2$ Hz) et 7,03 ppm ($J = 2,1$ Hz) dont, les constantes de couplage indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle aromatique et que celui-ci est 1, 3, 4-trisubstitué, ces protons sont respectivement attribués à H-6, H-5 et H-2.

Les spectres montrent également la présence d'un système AX à $\delta = 7,53$ et $\delta = 6,25$ ppm ($J = 15,9$ Hz), un couplage vicinal éthylénique trans (CH=CH) caractéristique d'un acide phénolique.

Un triplet d'intégration 3H à $\delta = 1,31$ ppm caractéristique d'un groupement méthyle, ces protons couplent avec les protons d'un groupement CH₂ oxygéné, situé à $\delta = 4,21$ ppm.

Ces données suggèrent que cette molécule est un ester caféique.

Les déplacements chimiques des signaux observés, en RMN du ¹H (spectre III.7, 8) et du ¹³C (spectre III.9) sont présentés dans le tableau III.2, avec leurs attributions, ils sont comparés avec ceux rapportés dans la littérature [3].

Position	Intégration	δ_H (ppm), m, J (Hz)	δ_C (ppm)
1			127,24
2	H	7,03 .d (2,1)	115,10
3			146,73
4			149,56
5	H	6,77. d (8,3)	116,50
6	H	6,94. dd (8,3 ; 2)	122,88
7	H	7,53 .d (15,9)	146,83
8	H	6,25 .d (15,9)	115,28
9			169,33
1'	2H	4,21.q (7,1)	61,40
2'	3H	1,31 .t (7,1)	14,63

Tableau III.2: Données de la spectroscopie RMN ¹H et RMN¹³C du composé CSF7-2

Toutes ces données permettent de proposer la structure de:

(2E)-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate d'éthyle ou bien **le cafféate d'éthyle**. (Fig III.7)

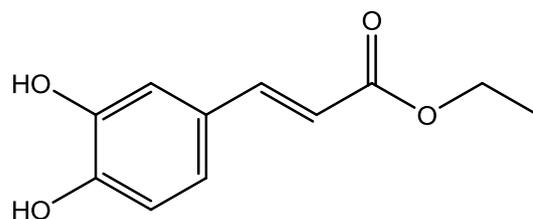
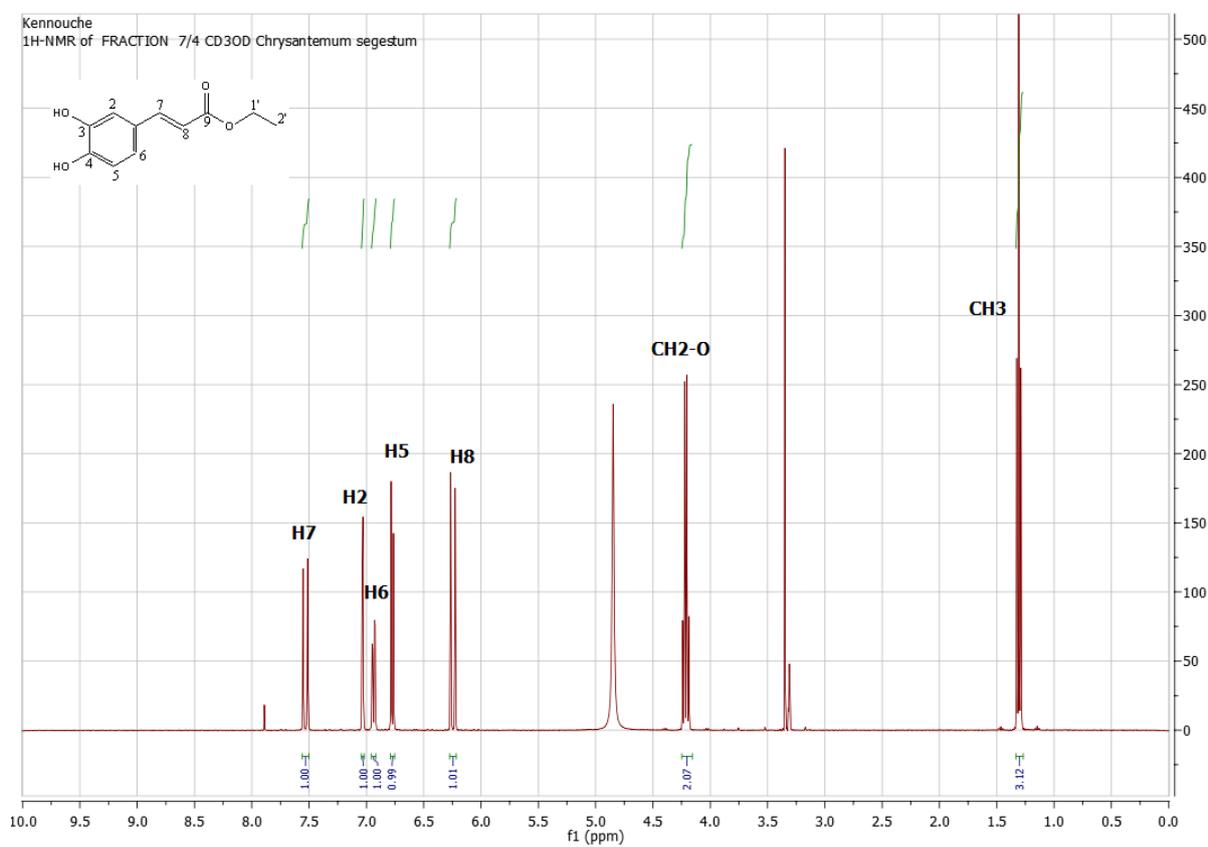
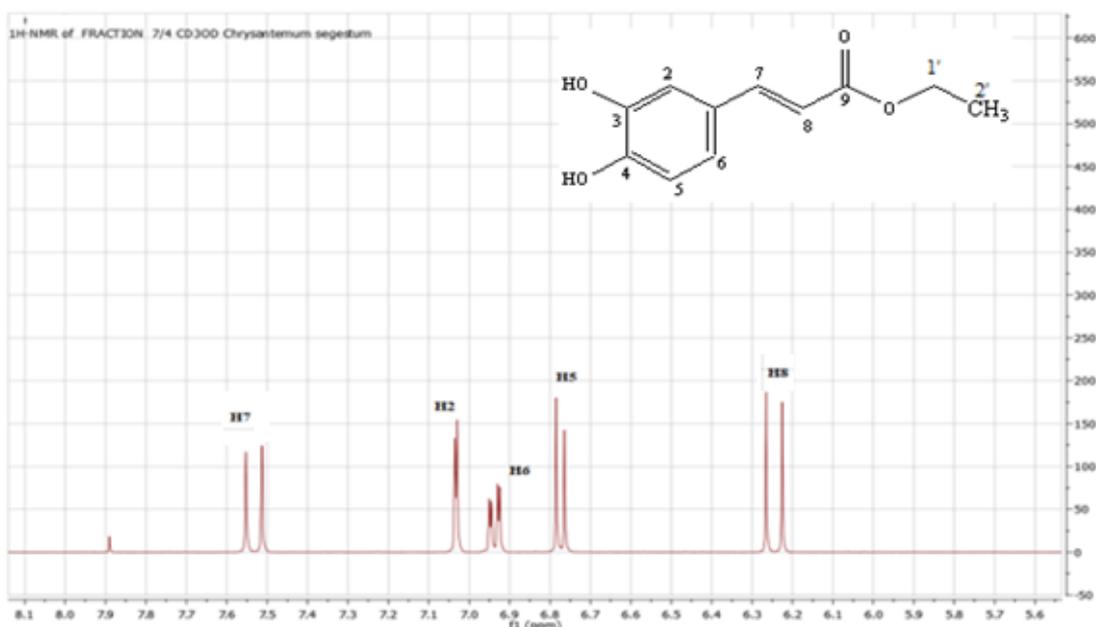


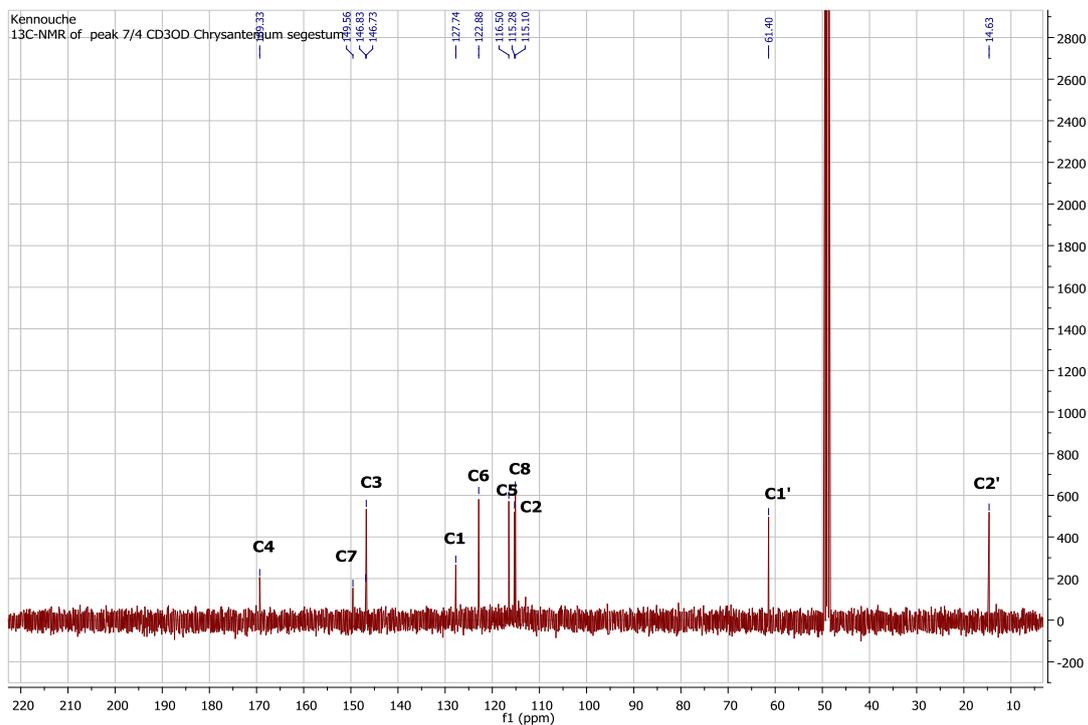
Figure III.7: la structure du cafféate d'éthyle.



Spectre III.7: Spectre RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) du composé CSF7-2



Spectre III.8: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du composé CSF7-2(étalement)



Spectre III.9: Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) du composé CSF7-2

III.1.1.3. IDENTIFICATION DU COMPOSE CSF7-3

L'observation conjointe des spectres de RMN ^1H (spectre III.10, 11) et ^{13}C (spectre III.12) du composé CSF7-3 présente de fortes similitudes avec celui de composé CSF4-2.

On retrouve un singlet à $\delta = 1,98$ ppm d'intégration 3H, indiquant la présence d'un groupement méthyle, sur le spectre HMBC (spectre III.13) les protons de ce méthyle sont corrélés avec quatre carbones quaternaires acétyléniques à 64,55 (C-4'), 67,55 (C-2'), 81,22 (C-3') et 81,46 ppm (C-5').

On observe également un singlet à 5,33 ppm correspondant à un proton (H-1') porté par un carbone éthylène à 87,56 ppm, ce proton corrèle avec les carbones quaternaires acétyléniques C-4', C-2' et C-3', ces données sont identiques à celles obtenus avec le composé CSF4-2.

La principale différence c'est l'absence de double liaison entre C-8 et C-9. On retrouve un singlet large d'intégration 1H à $\delta = 4,71$ ppm attribuable à H-9, ce proton porté par un carbone à $\delta = 80,90$ ppm (C-9), dont les déplacements chimiques évoquent ceux d'un alcool secondaire, le carbone C-9 est donc substitué par un groupement hydroxyle.

Un signal sous forme d'un doublet de doublet à $\delta = 4,79$ ppm ($J = 5,8 ; 1,8$ Hz) d'intégration 1H attribuable à H-8, ce proton porté par un carbone à 57,18 ppm, caractéristique d'un CH substitué par un atome de chlore.

Le spectre COSY (spectre III.14) montre la présence d'une tache de corrélation entre les deux protons H-8 et H-9, on suppose que les deux H soient voisins.

Le spectre HMBC nous indique que, le carbone quaternaire oxygéné à 164,09 ppm (C-7) corrèle avec les protons à $\delta = 5,33$ (H-1') et 4,79 ppm (H-8), on observe également sur le même spectre la présence d'une tache de corrélation entre le proton H-1' et le carbone à $\delta = 57,18$ ppm (C-8), ces données définissent la sous-structure **a**.

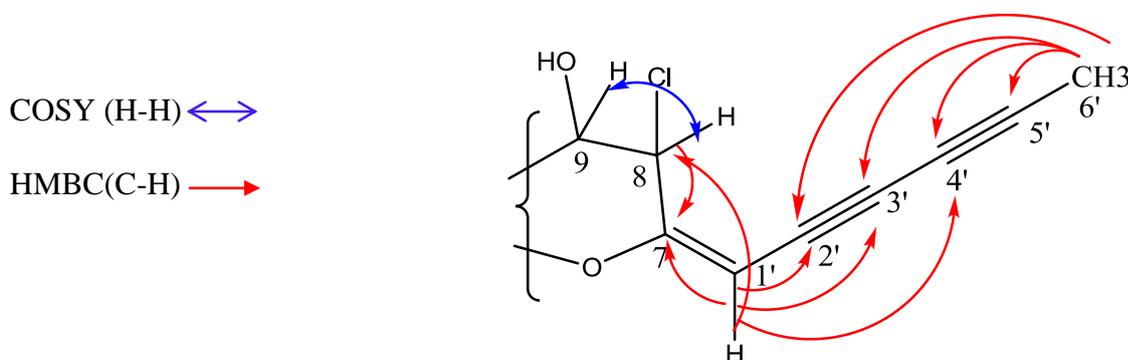


Figure III.7: Corrélations HMBC et COSY choisies du sous structure (a)

Un retour vers les spectres RMN¹ H et HMBC on retrouve :

Deux groupe CH éthylènes observables à $\delta = 5,25$ ($J = 3 ; 2,3$ Hz) et $6,59$ ppm ($J = 3 ; 1,8$ Hz) attribuables à H-3 et H-2 ,ces protons portés par les carbones à $\delta = 102,02$ (C-3) et $147,78$ ppm (C-2) .Le déplacement chimique de carbone C-2 indique qu'il est lié à un atome d'oxygène.

Un singulet à $\delta = 2,12$ ppm d'intégration 3H leur déplacement chimique laisse fort à penser qu'il s'agit d'un groupement acétoxy, ceci est confirmé par une tache de corrélation entre les protons du groupe méthyle à $\delta = 2,12$ ppm et un atome de carbone quaternaire à $\delta = 170,57$ ppm (C-10).

L'examen du spectre COSY (spectre III.14) montre la présence d'une tache de corrélation entre le proton à $\delta = 5,85$ ppm (H-4) et le proton H-3 suppose que les deux H soient voisins.

Sur le spectre HMBC (spectre III.13), le proton H-4 est corrélé aux carbones à $\delta = 102,02$ (C-3) et $170,57$ ppm (C-10) ce qui indique que le groupe acétoxy est porté par le carbone C-4. Ces données définissent la sous-structure **b**

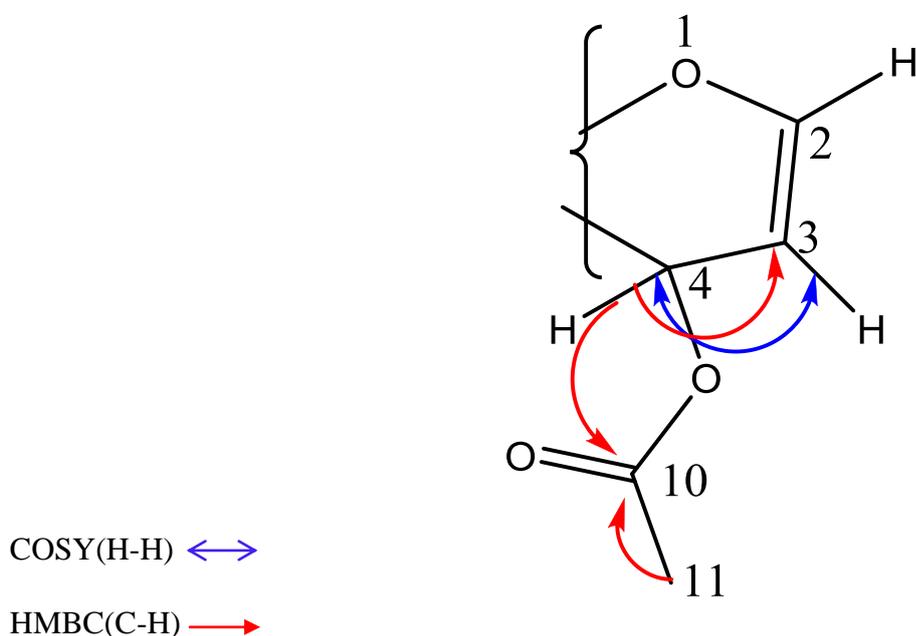


Figure III.8: Corrélations HMBC et COSY choisies du sous structure (**b**)

Les corrélations observées sur le spectre HMBC, du carbone quaternaire à 110,65 ppm (C-5) avec les protons H-4 et H -8, ont permis de situer la jonction des deux sous-structures **a** et **b**

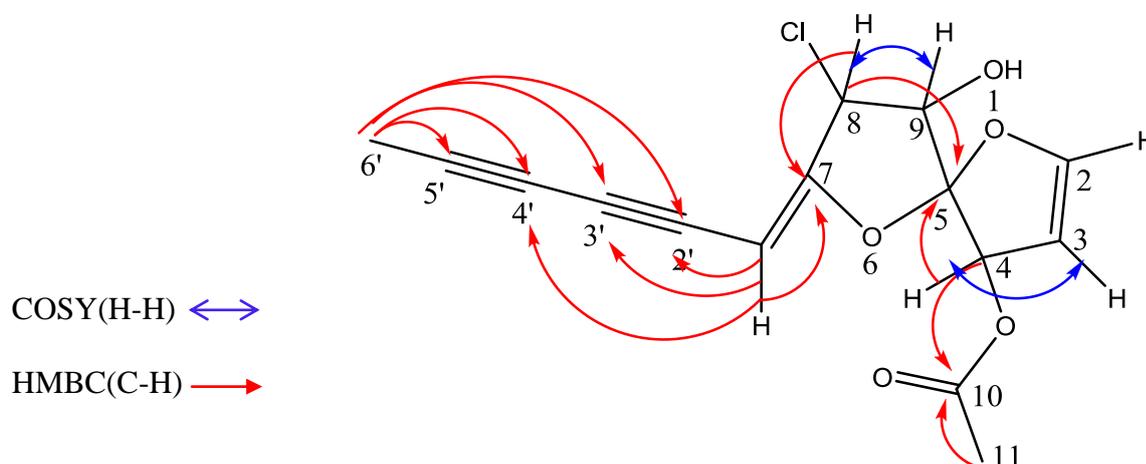


Figure III.9: Corrélations HMBC et COSY choisies du composé CSF7-3

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC et COSY sont présentés dans le tableau III.3.

Position	δ_{H} (m) J(Hz)	δ_{C}	HMBC	COSY
6'	1,98	4,71	C-4', C-2', C-3', C-5', C-1'	
5'		81,46		
4'		64,55		
3'		81,22		
2'		67,55		
1'	5,33.d (1,1)	87,56	C-5', C-8, C-7	H8
7		164,09		
8	4,79. dd (5,8 ; 1,8)	57,18	C-9, C-7, C-5	H1', H9
9	4,71. sl	80,90		
5		110,65		
4	5,85. t	75,05	C-3, C-9, C-5, C-2	H3, H2
3	5,25. dd (3 ; 2,3)	102,02	C-5', C-2'	H4, H2
2	6,59. dd (3 ; 1,8)	147,78	C-4, C-3, C-14	H4, H3
10		170,57		
11	2,12. s	20,5	C-10	

Tableau III.3: Données de la spectroscopie RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC et COSY du composé CSF7-3

L'ensemble des données conduit à la structure plane du composé CSF7-3 est

l'acétate de 8-chloro-7-(2,4-hexadiyn-1-ylidène)-9-hydroxy-1,6-dioxaspiro[4.4]non-2-én-4-yle. (Fig III.10)

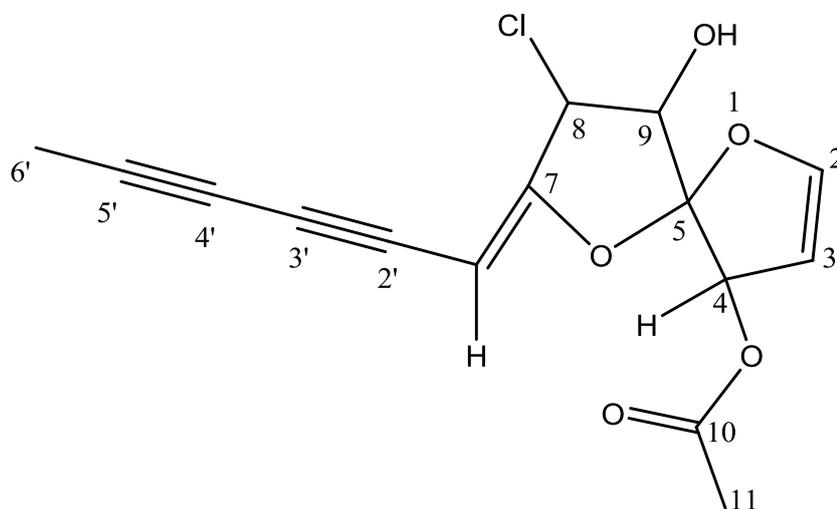


Figure III.10: La structure de l'acétate de 8-chloro-7-(2,4-hexadiyn-1-ylidène)-9-hydroxy-1,6-dioxaspiro[4.4]non-2-én-4-yle.

Au vu des différentes données spectrales discutées qui sont en accord avec celle indiquées dans la littérature, La formule développée plane du composé CSF7-3 est valable pour un isomère rapportée qu'une seule fois en 2006, **acétate de (4R,5S,7E,8S,9R)-8-chloro-7-(2,4-hexadiyn-1-ylidène)-9-hydroxy-1,6-dioxaspiro[4.4]non-2-én-4-yle**, connu sous le nom Flosculins qui a été isolé pour la première fois de *Plagus flosculosus* [4].

Malheureusement, il est impossible avec les seules données spectrales disponibles de déterminer la configuration absolue des centres asymétriques du composé CSF7-3.

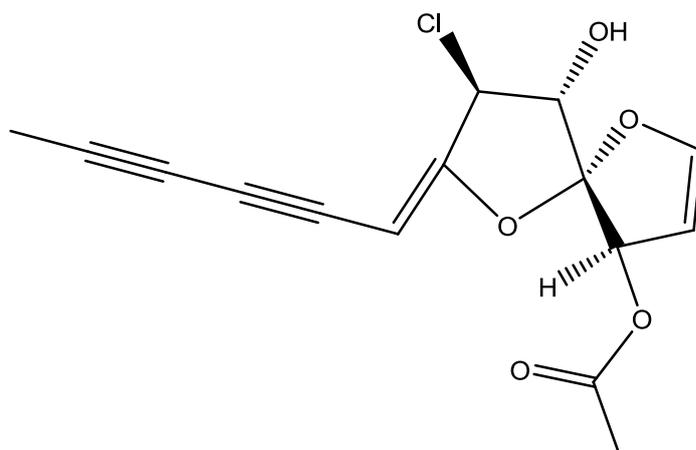
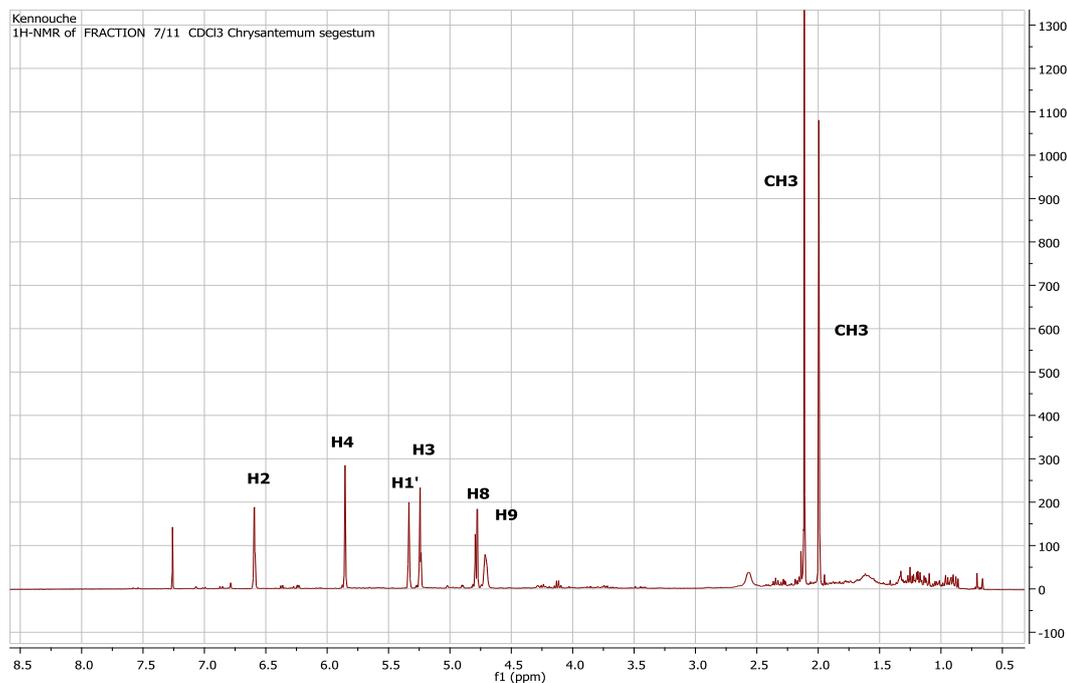
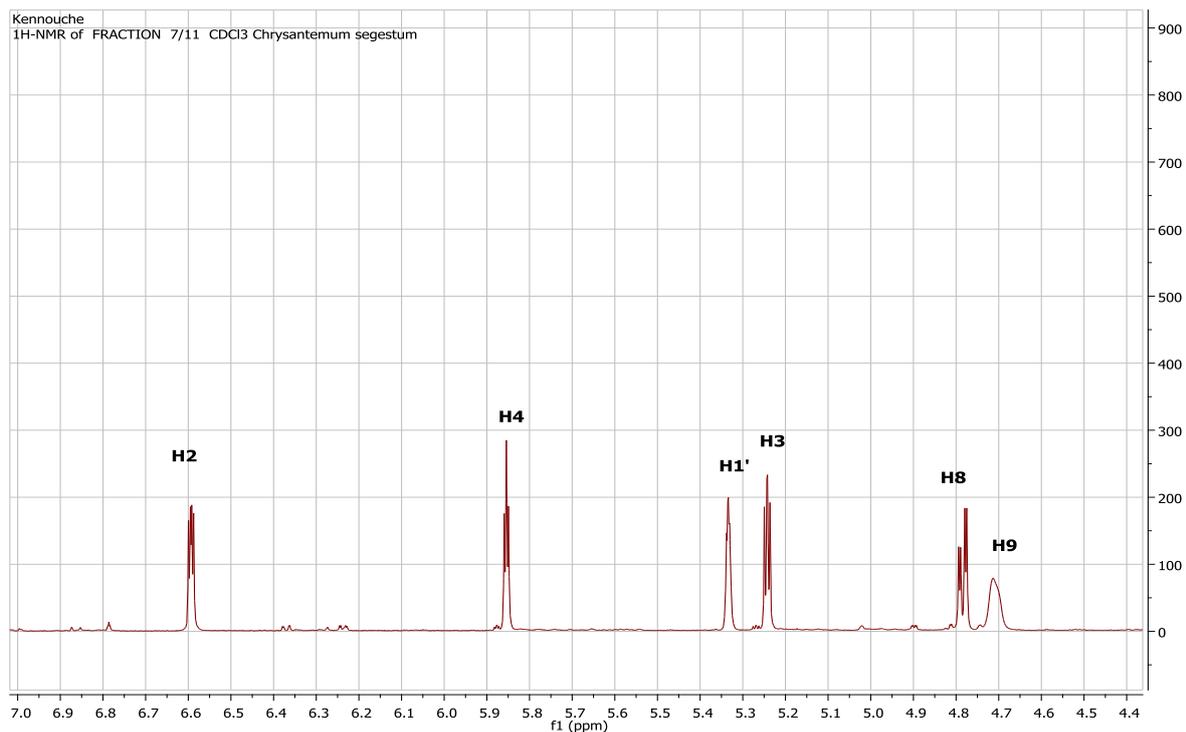


Figure III.11: la structure de l'acétate de (4R,5S,7E,8S,9R)-8-chloro-7-(2,4-hexadiyn-1-ylidène)-9-hydroxy-1,6-dioxaspiro[4.4]non-2-én-4-yle

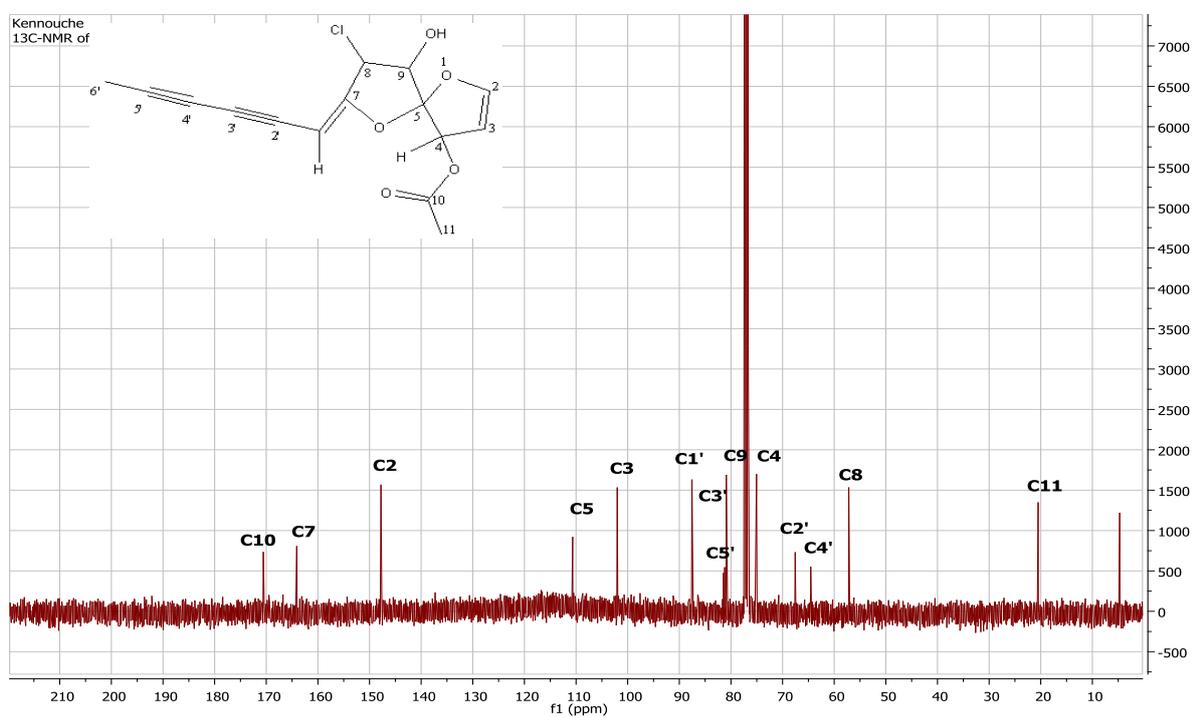
On veut souligner que la présence de cette molécule dans l'extrait chloroforme de l'espèce *C.segetum* est intéressante, un nombre relativement faible de plantes terrestres qui contiennent des métabolites secondaires halogénés [5.6] et d'autre part une grande majorité des composés chlorés obtenus à partir de plantes supérieures ont été isolés de la famille des Astéracées [7].



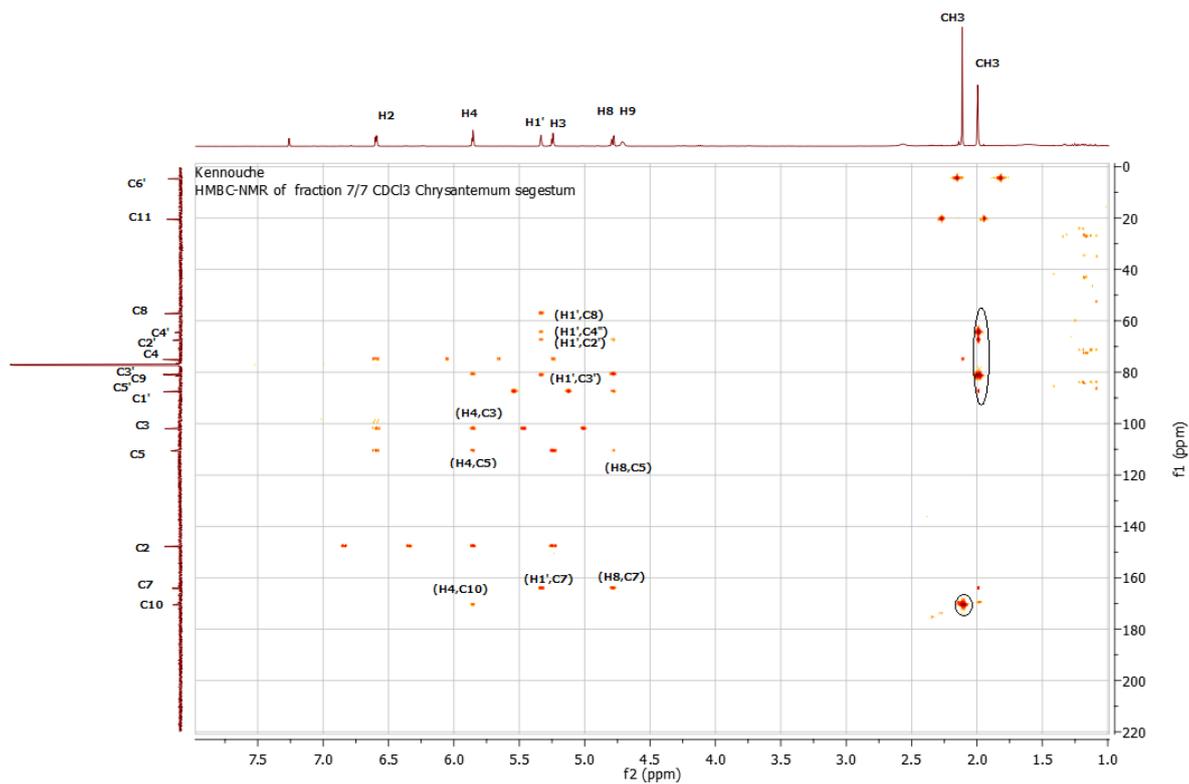
Spectre III.10: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) du composé CSF7-3



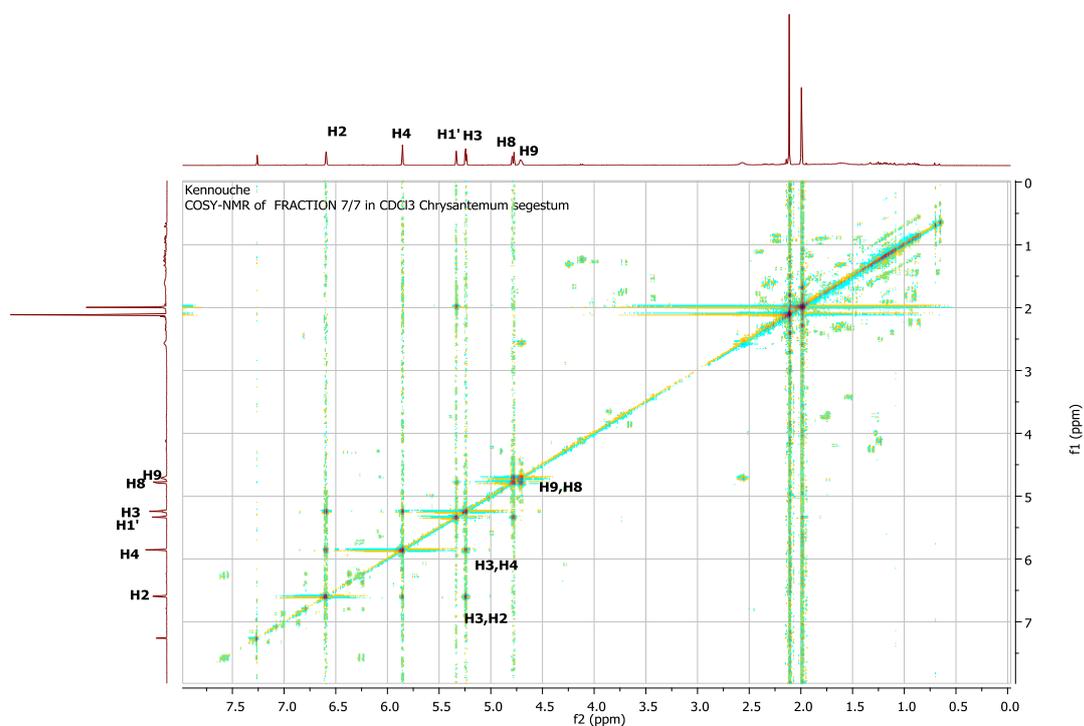
Spectre III.11: Spectre RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) du composé CSF7-3 étalé



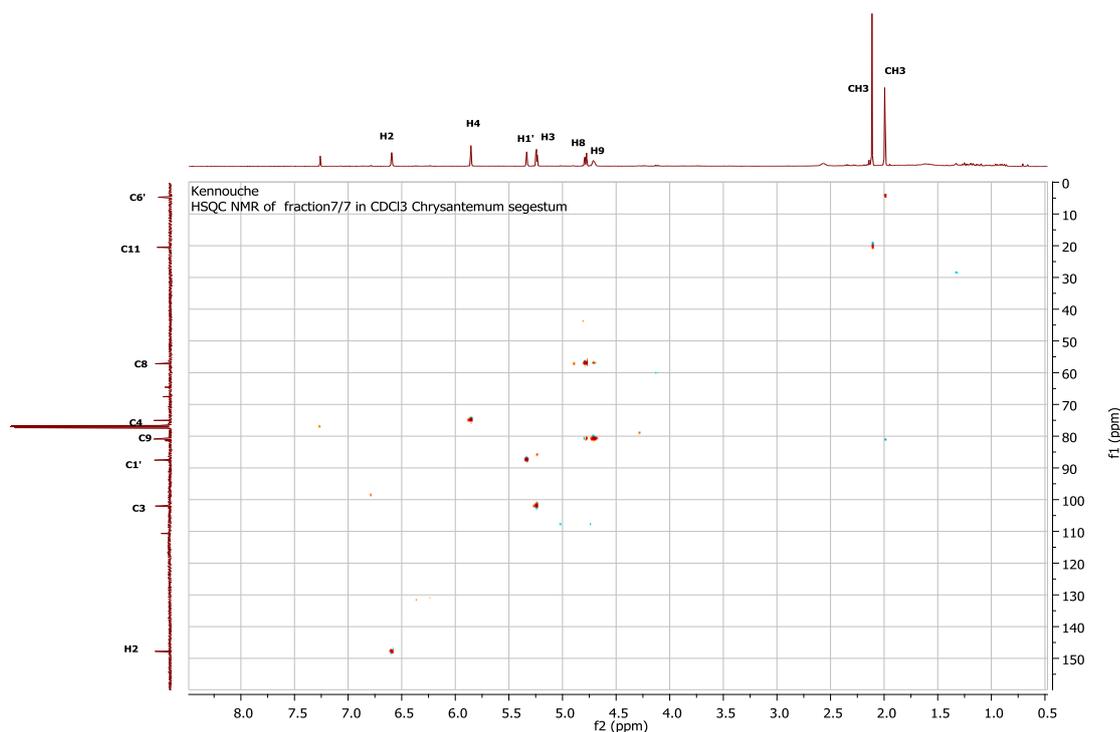
Spectre III.12: Spectre RMN ¹³C (500 MHz, CDCl₃) du composé CSF7-3



Spectre III.13: Spectre HMBC (500 MHz,CDCl₃) du composé CSF7-3



Spectre III.14: Spectre COSY (500 MHz,CDCl₃) du composé CSF7-3



Spectre III.15: Spectre HSQC (500 MHz, CDCl_3) du composé CSF7-3

III.1.1.4. IDENTIFICATION DU COMPOSE CSF7-4

L'examen du spectre RMN ^1H (spectre III.16) montre la présence d'un signal sous forme de singulet à $\delta = 2,01$ ppm, d'intégration 3H indiquant la présence d'un groupement méthyle.

Le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre III.20) montre des corrélations entre les Protons du groupement CH_3 et six carbones quaternaires à 76,56 ; 64,99 ; 68,36 ;

59,47 ; 79,63 et 79,64 ppm, il est parfaitement envisageable de conclure la présence de trois triples liaisons dans cette molécule, cela implique l'enchaînement des trois triples liaisons soit la présence du groupement : $\text{CH}_3 - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} - \text{C} \equiv \text{C} -$.

Les spectres RMN ^1H (spectre III.17,18) montrent :

Deux doubles liaisons conjuguées trans, l'un résonne à 5,99 ppm et 6,26 ppm (dd, $J = 15,2$; 10,7Hz) attribuable à H-3 et H-4 et l'autre à 5,63 ppm (d, $J = 15,6$ Hz) et 6,79 ppm (dd, $J = 15,5$; 10 ; 7Hz) attribuable à H-6 et H-5.

Un signal sous forme d'un quadruplet intégration pour 2H ($\delta = 2,37$ ppm, $J = 6,4$ Hz) attribuable à CH_2 .

Un signal déblindé sous forme d'un triplet intégration pour 2H ($\delta = 3,62$ ppm, $J = 5,3$), selon le spectre HSQC (spectre III.19), ces protons sont portés par le carbone C-1 à 61,95 ppm, suggère que ce dernier porte un atome d'oxygène ou une fonction alcool.

sur le même spectre, on note également la présence des taches de corrélations entre le proton H-6 du groupement éthylénique résonant à 5,63 ppm et les carbones quaternaires acétyléniques à 76,56 (C-12) et 59,47 ppm (C-9), ce qui montre que le groupement éthylénique lié au carbone C-7.

Enfin une tache de corrélation entre les protons de CH₂ résonant à 2,37ppm et le carbone C-3 à 137,92 ppm, qui suppose également leurs jonctions.

Dans le spectre COSY (spectre III.21), les protons des deux groupements CH₂ corrélient entre eux, suppose que les deux CH₂ soient voisins.

Les attributions réalisées sont confirmées par l'expérience COSY (H-H) qui montre la présence des taches de corrélations entre (H-5 et H-6), (H-2 et H-3), (H-5 et H-4) et (H-3 et H-4).

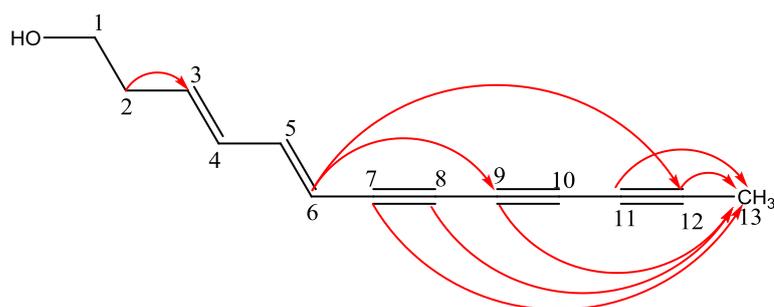


Figure III.12 : Corrélations HMBC choisies du composé CF7-4 (C \longrightarrow H)

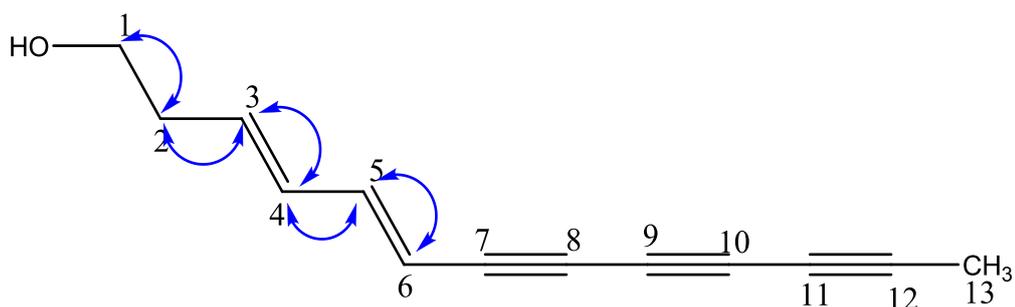


Figure III.13 : Corrélations COSY du composé CF7-4 (H \longleftrightarrow H)

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont présentés dans le tableau III.4.

position	Intégration	δ_{H} (ppm), m, J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	2	3,62. t (5,3)	61,95
2	2	2,37. q (6,4)	36,99
3	1	5,99 .m	137,92
4	1	6,26 .dd (15,2 ; 10,7)	132,31
5	1	6,79 .dd (15,5 ; 10,7)	148
6	1	5,63.d (15,6)	107,91
7			79,64
8			79,63
9			59,47
10			68,36
11			64,99
12			76,56
13	3	2,01s	3,76

Tableau III.4 : Données de la spectroscopie RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé CF7-4

L'ensemble de ces résultats mène à la structure dont le nom est **(3E, 5E)-tridéca-3,5-diène-7,9,11-triyn-1-ol**, précédemment isolé de *Chrysanthemum leucanthemum* [8]

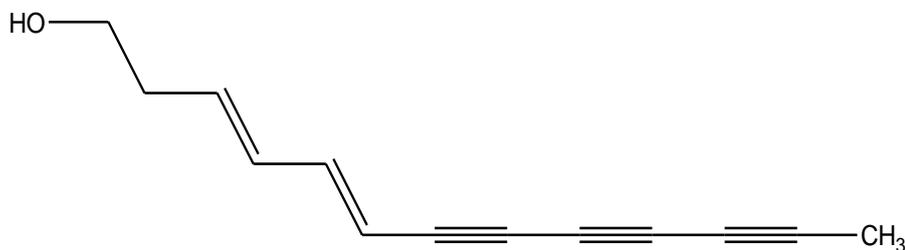
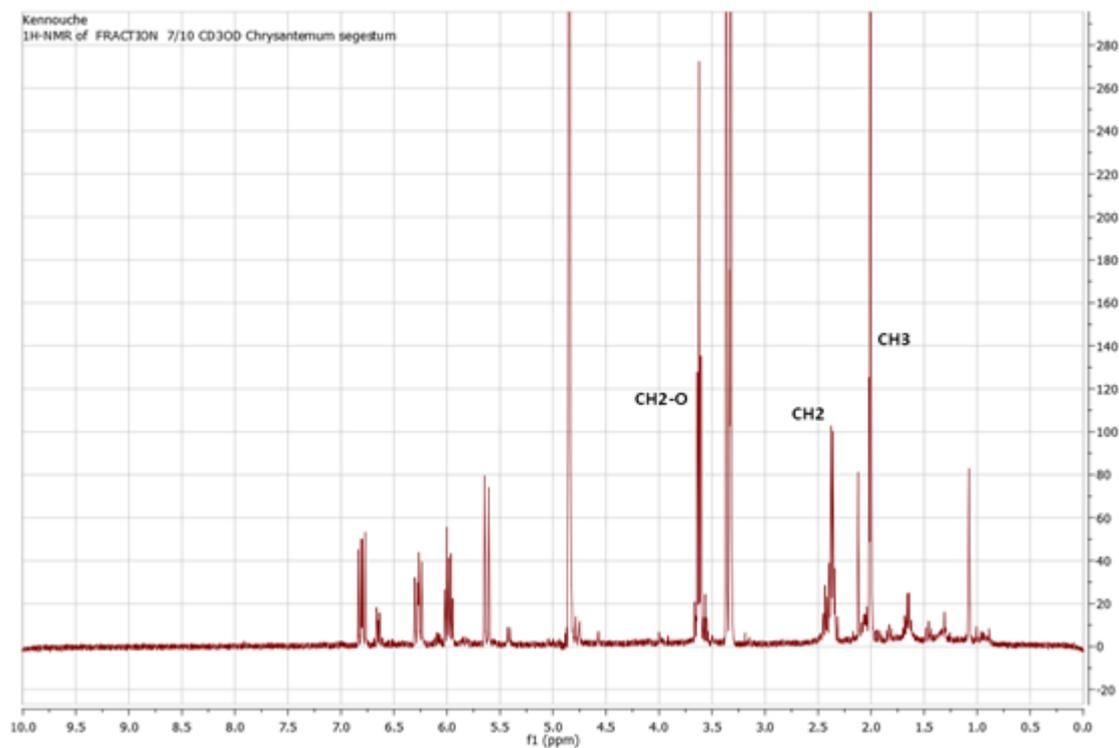
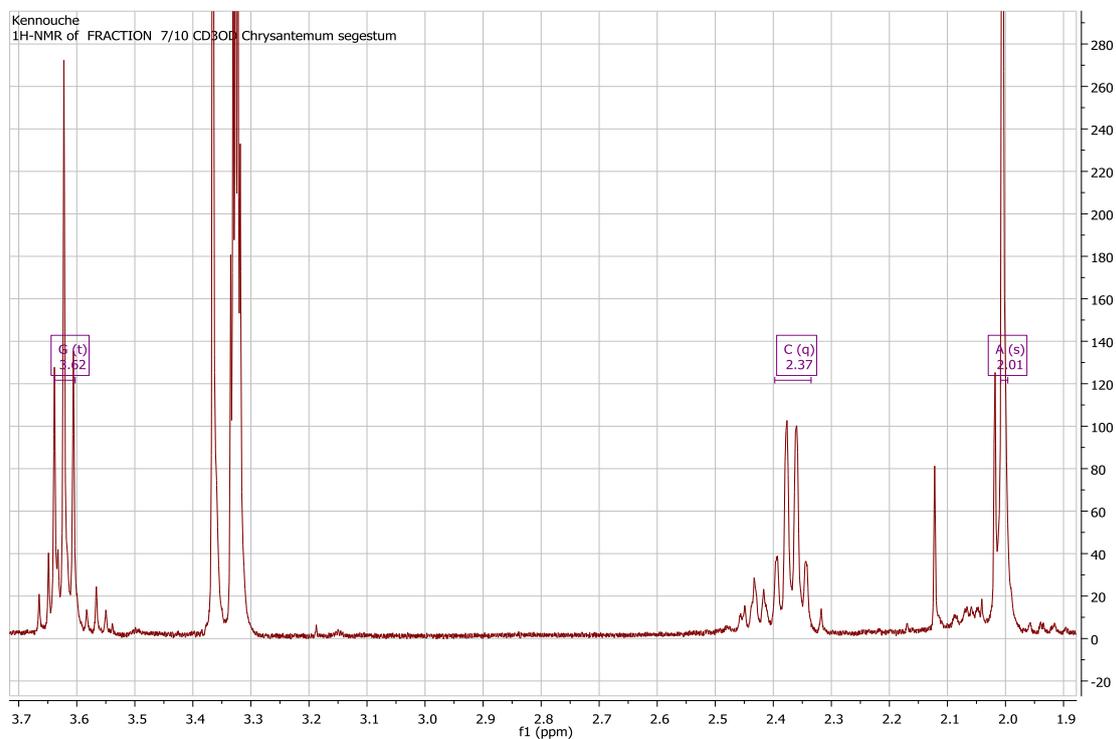


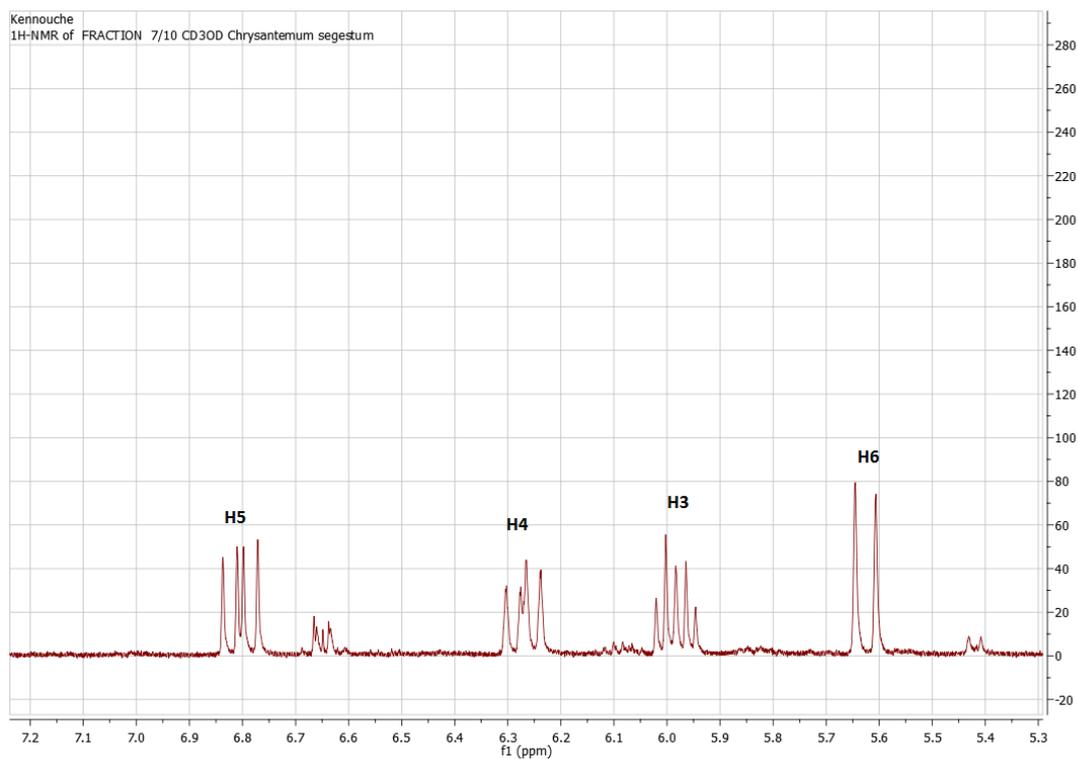
Figure III.14: La structure de **(3E, 5E)-tridéca-3,5-diène-7,9,11-triyn-1-ol**.



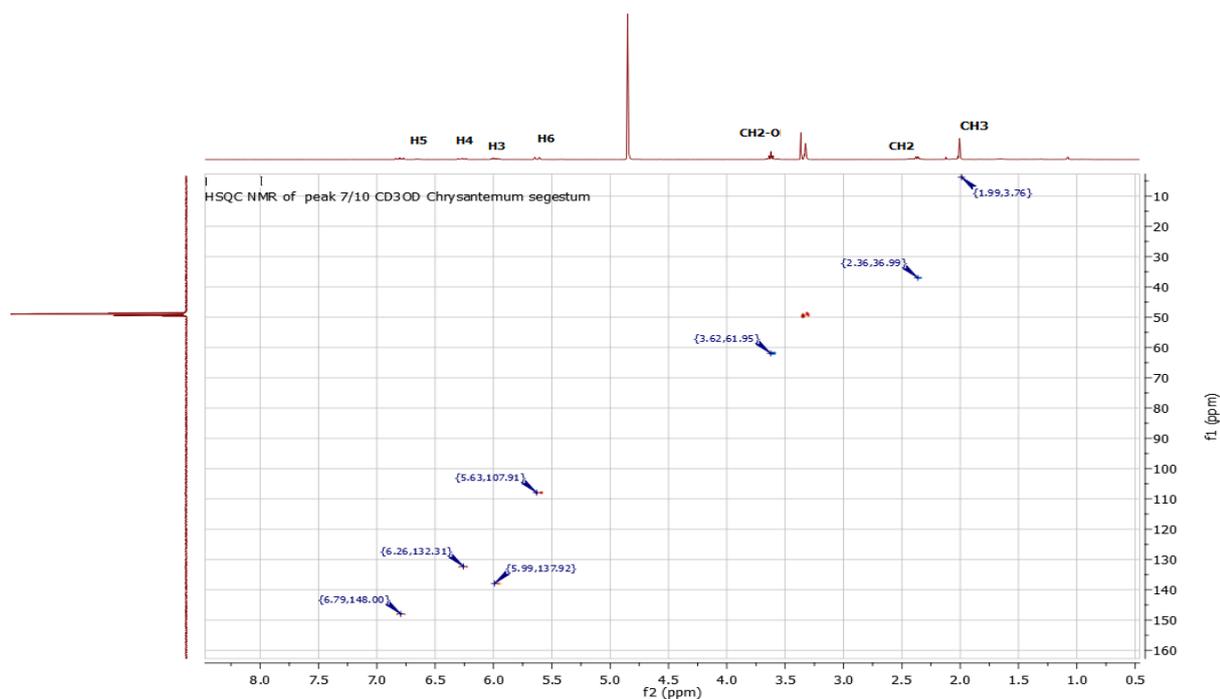
Spectre III.16: Spectre RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) du composé CSF7-4



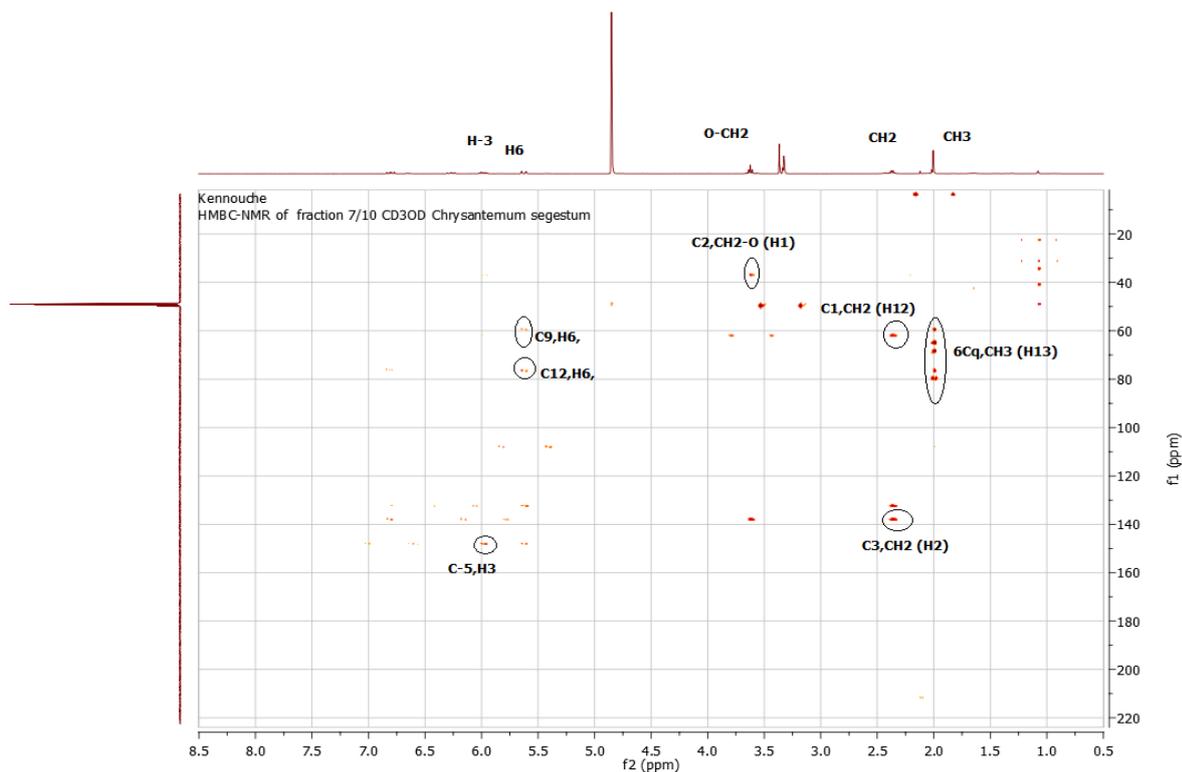
Spectre III.17: Spectre RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) du composé CSF7-4 étalé



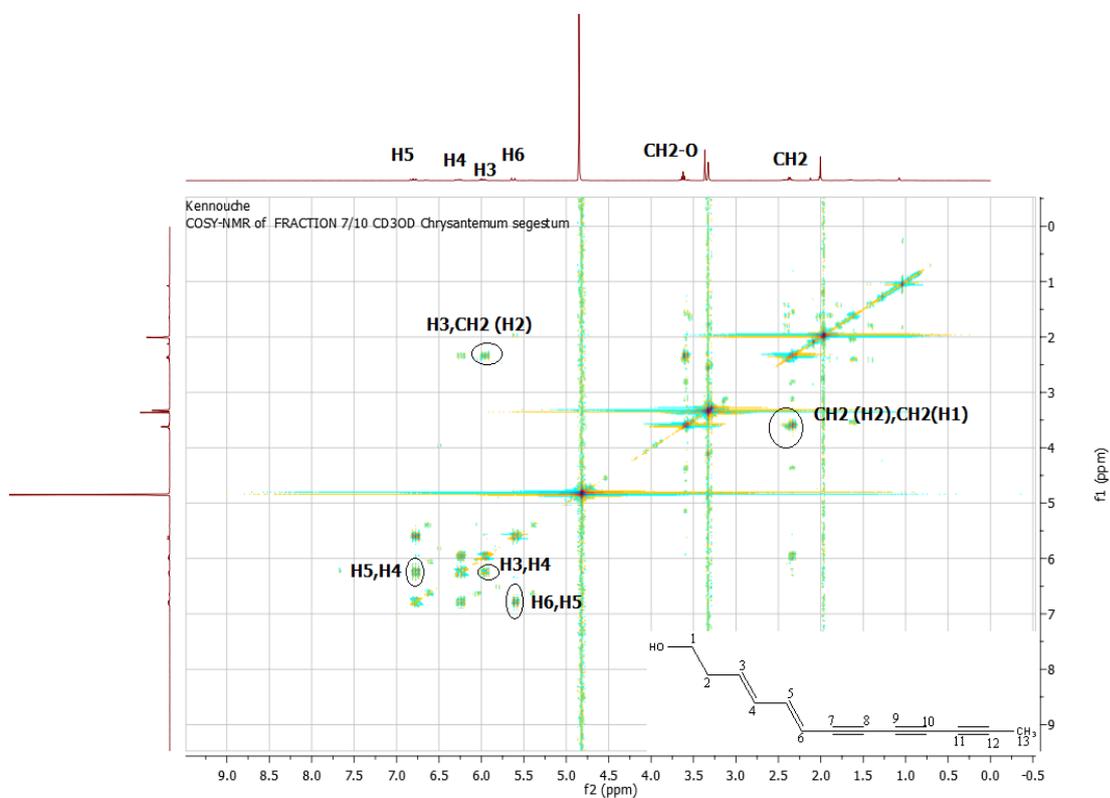
Spectre III.18: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) du composé CSF7-4 étalé



Spectre III.19 : Spectre HSQC (500 MHz, CD_3OD) du composé CSF7-4



Spectre III.20 : Spectre HMBC (500 MHz, CD₃OD) du composé CSF7-4



Spectre III.21: Spectre COSY (500 MHz, CD₃OD) du composé CSF7-4

III.1.1.5. IDENTIFICATION DU COMPOSE CSF11-3

Le composé **CSF11-3** se présente sous forme d'une huile jaune soluble dans le chloroforme. La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

L'étude de la série spectrale UV (spectre III.22) montre :

Le maximum d'absorption de la bande I à 343 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol indique qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +60$ nm) avec une augmentation de l'intensité indiquent la présence d'un OH libre en 4'. L'absence d'une nouvelle bande après addition de NaOH est révélatrice de l'absence d'un OH libre en position 7. L'ajout de NaOAc, ne provoque aucun déplacement de la bande II révélant la présence d'un OR sur C-7.

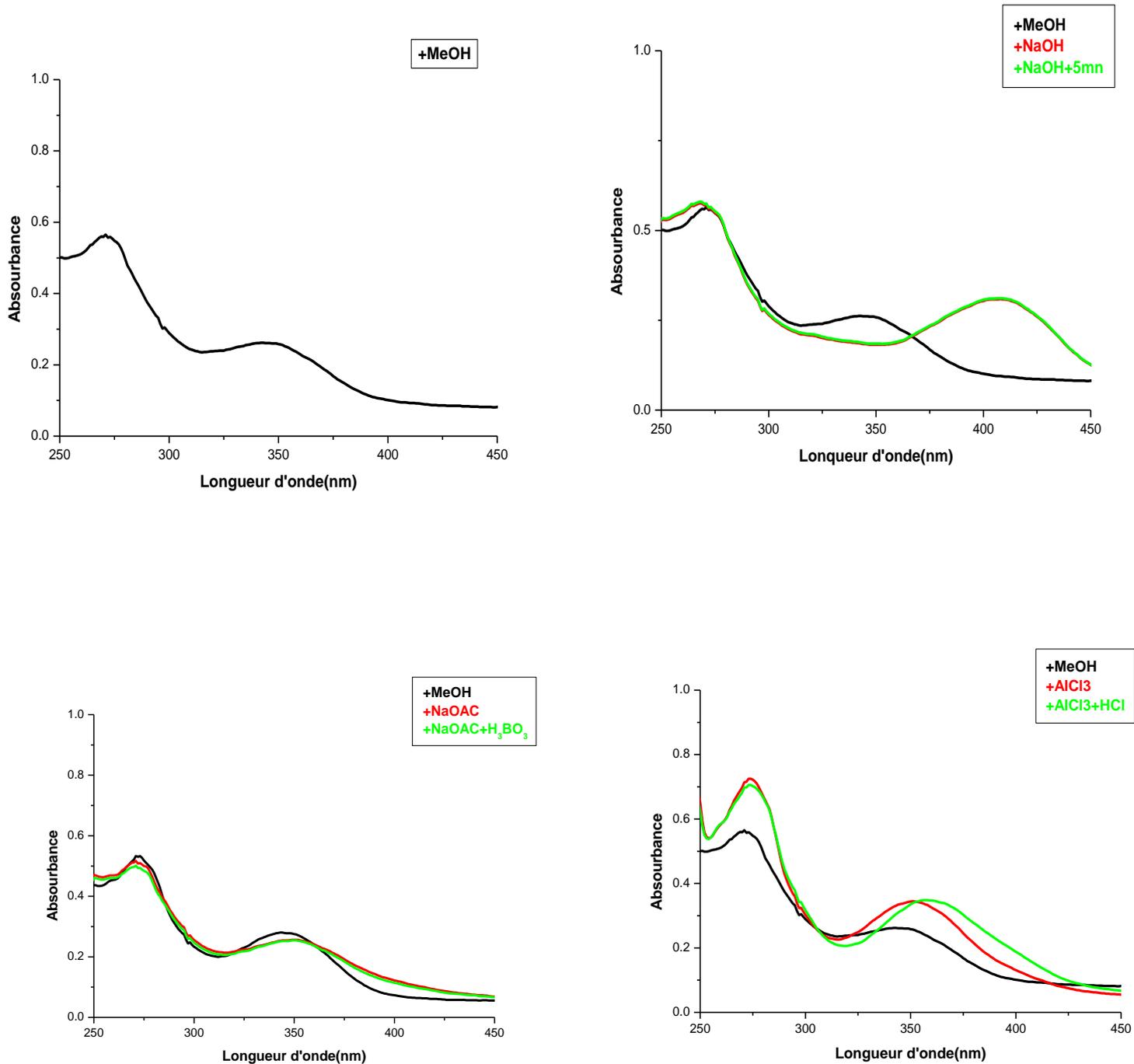
Le déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparativement à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = +15$ nm) indique la présence d'un OH libre en 5.

Un effet bathochrome faible de la bande I ($\Delta\lambda = +9$ nm) dans le spectre NaOAc/ H_3BO_3 par rapport au spectre dans le MeOH, excluent la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le noyau B.

Les données relatives à la série spectrale UV de ce composé sont rassemblées dans le tableau III.5.

Réactifs	Bande II (nm)	Bande I (nm)	Observations
MeOH	271	343	Flavone
NaOH	268	403	OH libre en 4' Pas de OH libre en 7
NaOH après 5 mn	268	403	Spectre stable
NaOAc	271	352	-
NaOAc+ H_3BO_3	271	352	Pas de ortho di-OH sur le cycle B
AlCl_3	274	351	-
AlCl_3+HCl	274	358	OH libre en 5

Tableau III.5 : Données de la série spectrale UV du composé CSF11-3



Spectre III.22: Série spectrale UV du composé CSF11-3

Le spectre RMN ^1H (spectre III.23) et son étalement (spectre III.24) montrent :

Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,22$, et le second à $\delta = 6,48$ ppm ($J = 2,1\text{Hz}$) attribuables à H-6 et H-8 respectivement.

Un signal sous forme d'un singulet à $\delta = 6,67$ ppm intégrant pour 1H attribuable à H-3 du cycle C.

Un signal sous forme d'un singulet à $\delta = 7,27$ ppm intégrant pour 2H attribuables à H-2' et H-6'.

Un signal sous forme d'un singulet à $\delta = 3,96$ ppm intégrant pour 9 protons, correspondant à trois groupements méthoxyles.

La combinaison de ces données avec celles de la série spectrale UV permet de localiser les groupements méthoxyles en position 7,3' et 5'. Les données relatives à la RMN ^1H de ce composé sont reportées dans le tableau III.5.

Interprétation	δ (ppm), m, J (Hz)	Intégration
OCH ₃	3,96. s	9H
H-8	6,48, d (2,1)	1H
H-6	6,22, d (2,1)	1H
H-3	6,67. s	1H
H-6', H-2'	7,27. s	2H

Tableau III.5: Données de la spectrométrie RMN ^1H du composé CSF11-3

L'ensemble des données (UV et RMN ^1H) permettent d'identifier le composé CSF11-3 comme étant le **5,4'-dihydroxy-7,3',5'-triméthoxyflavone** ou bien 7,3',4'-tri-*O*-méthyltricetin.

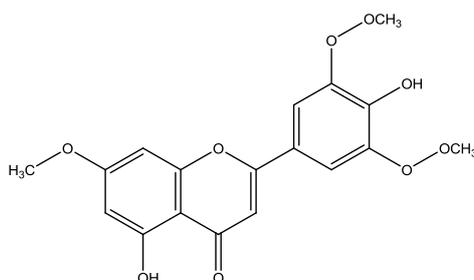
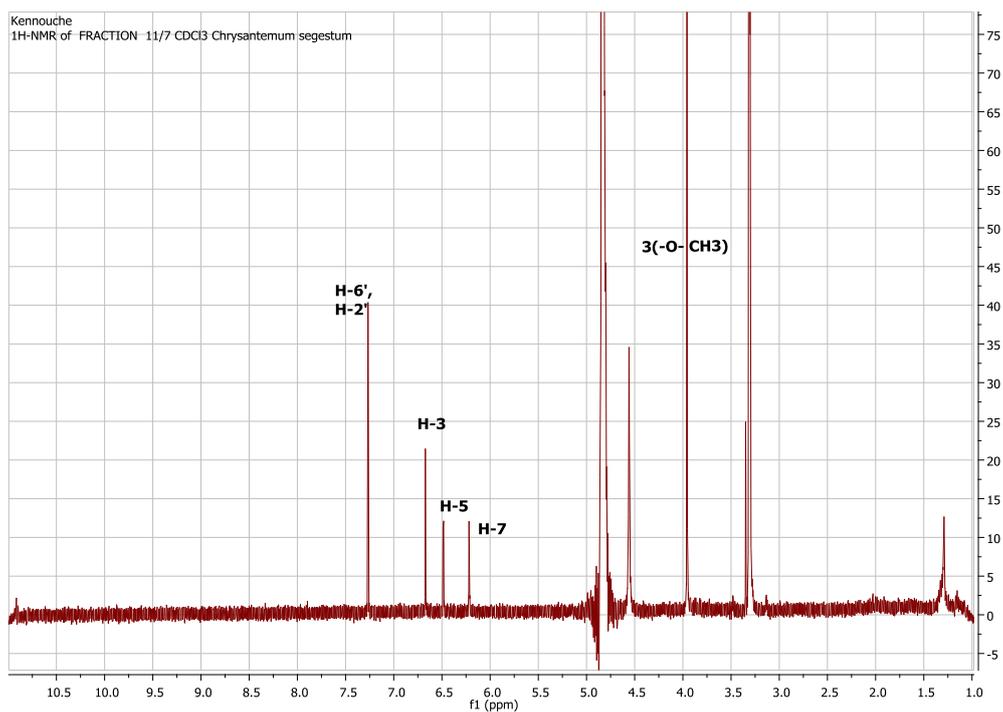
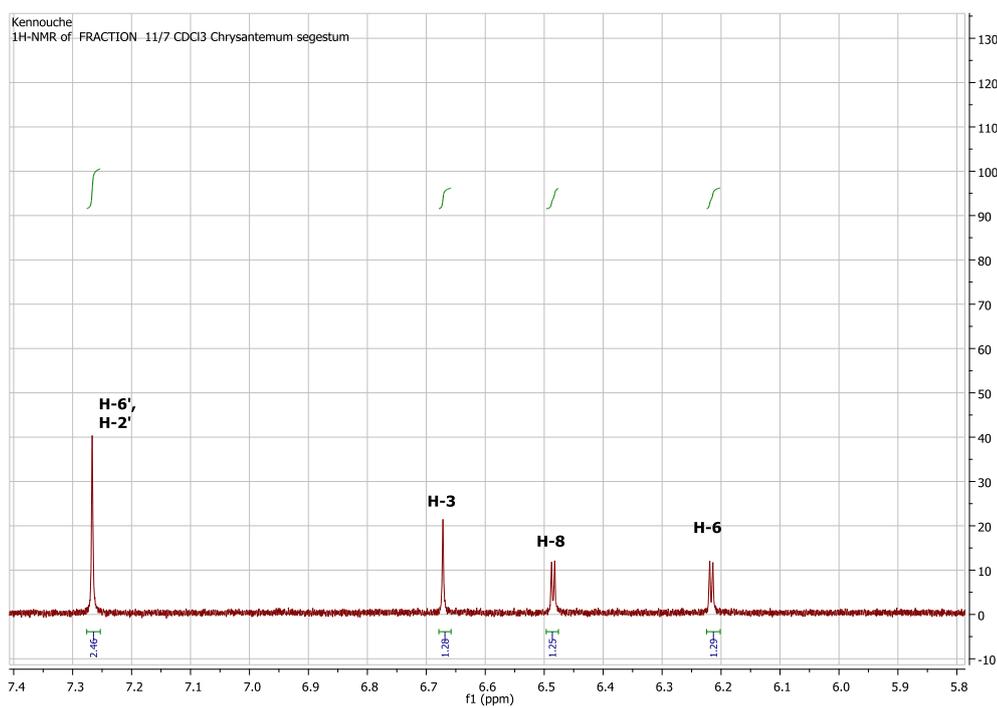


Figure III.15: 5,4', dihydroxy-7,3',5'-triméthoxyflavone



Spectre III.23: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm) du composé CSF11-3



Spectre III.24: Spectre RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) étalé (6.15 à 7,30ppm) du composé CSF 11-3

III.1.1.6. IDENTIFICATION DU COMPOSE CSF12

L'analyse du spectre RMN¹H, réalisé dans le DMSO (spectre III.25) permet d'observer d'une part des signaux entre 0 et 2,4 ppm, indiquant la présence de protons de groupements méthyles, méthylènes et méthynes saturés, d'autre part, les signaux de la région de 2,9 à 5,4 ppm qui peuvent être attribués à des protons portés par des carbones insaturés ou des carbones oxygénés qui orientent vers la présence d'un sucre.

l'ensemble des informations récoltées au niveau du spectre RMN ¹H (spectre III.25) et son étalement (spectre III.26) montre que ce composé fait partie de la classe des phytostérols, notamment en raison de la présence de six signaux à haut champ, d'intégration 3H, chacun correspondant à des groupements méthyliques, repérés à δ H 0,65 H-18 (s), δ H 0,96 H-19 (s), δ H 0,91 H-21 (d), δ H 0,80 H-26 (d), δ H 0,79 H-27 (d) et δ H 0,82 H-29 (t). En outre, l'observation d'un signal multiplet à δ H 3,47 attribuable au proton H-3, ainsi que d'un signal de proton oléfinique à δ H 5,33 H-6 (1H, d, J = 4,1 Hz) atteste de l'appartenance de ce composé à la famille des stérols.

Sur le spectre RMN ¹³C (spectre III.28) et HSQC (spectre III.29, 30,31). On observe la présence des atomes de carbone avec en particulier les signaux suivants :

Le signal apparaissant à δ C = 140,36 ppm attribuable à un carbone quaternaire C-5

Le signal apparaissant à δ C = 120,85 ppm attribuable à un CH vinylique C-6

Le signal apparaissant à δ C = 100,43 ppm correspond à un carbone anomérique du glucose C-1'.

Les signaux apparaissant à δ C = 76,43 ; 69,80 ; 73,12 et 76,36 ppm, correspondant aux groupements osidiques CH.

Le signal apparaissant à δ C = 60,77 ppm, correspondant au groupement oléfinique CH₂ du sucre.

Le signal apparaissant à δ C = 76,58 ppm, correspondant au groupement oxyméthine en position C-3.

La corrélation ³J_{H-C} observée sur le spectre HMBC (spectre III.32) entre le proton anomérique H-1' du glucose résonant à 4,21 ppm et le carbone C-3 de la génine, indique le point de jonction du glucose au stérol.

La grande valeur de constante de couplage du proton anomérique $J_{1',2'} = 7,8$ Hz indique qu'il s'agit d'un glucose de configuration β .

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau Tableau III.6 :

Position	δ (ppm), m, J (Hz)	δ_c (ppm)
1	1,78 m ; 0,99 m	36,5
2	1,46 m ; 1,81 m	28,95
3	3,47 m	76,58
4	2,12 t (12,2) ; 2,35(13,3 ; 2,7)	38
5	-	140,36
6	5,33 d (4,1)	120,85
7	1,90 m, 1,52 m	31,13
8	1,38 m	31,02
9	0,89 m	49,27
10	-	36,21
11	1,44 m	20,32
12	1,97 m ; 1,14 m	38,68
13	-	41,83
14	1,01 m	55,88
15	1,53 m ; 1,02 m	23,47
16	1,80 m ; 1,25 m	27,40
17	1,13 m	55,06
18	0,65 s	11,05
19	0,96 s	18,17
20	1,33 m	35,08
21	0,9 d (6,7)	17,88
22	1,30 m ; 0,97 m	33,04
23	1,14 m	25,04
24	0,91 m	44,76
25	1,62 m	28,32
26	0,80 d (9,6)	18,17
27	0,79 d (7,1)	18,14
28	1,21 m	22,15
29	0,82 t (7,2)	11,25
1'	4,21 d (7 ,8)	100,43
2'	2,89 m	73,12
3'	3,12 m	76,43
4'	3,02 m	69,80
5'	3,05 m	76,36
6'	3,64 m ; 3,42 m	60,77

Tableau III.6: Données de la spectroscopie RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé CSF12.

La comparaison des données spectrales du composé CSF12 avec celles de la littérature [9] confirme l'identité de celui-ci comme étant le β -Sitosterol-3-O- β -D-glucoside.

Sur le spectre RMN ^1H (spectre III.25) on remarque la présence de deux signaux sous forme doublet de doublet ($J = 14$ Hz, $J = 8$ Hz) à $\delta = 5,03$ ppm et $\delta = 5,16$ ppm, correspond aux

déplacements chimiques des protons oléfiniques H-22 et H-23. Ces valeurs sont en faveur d'une insaturation entre les carbones C-22 et C-23 du stérgmastérol, donc ce produit est un mélange de deux stérols, un majoritaire est le β -Sitosterol-3-O- β -D-glucoside et un second minoritaire est le stigmastérol.

Le β -Sitosterol-3-O- β -D-glucoside est connu sous le nom daucostérol, isolé antérieurement des espèces *C. indicum*[10], *C. nankingense*[11], *C. morifolium*[12], *C. coronarium* [13].

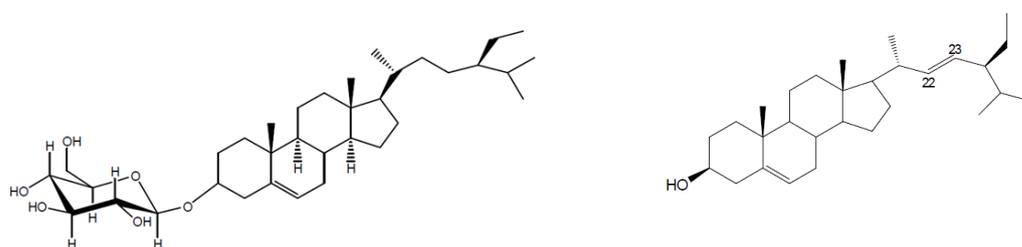
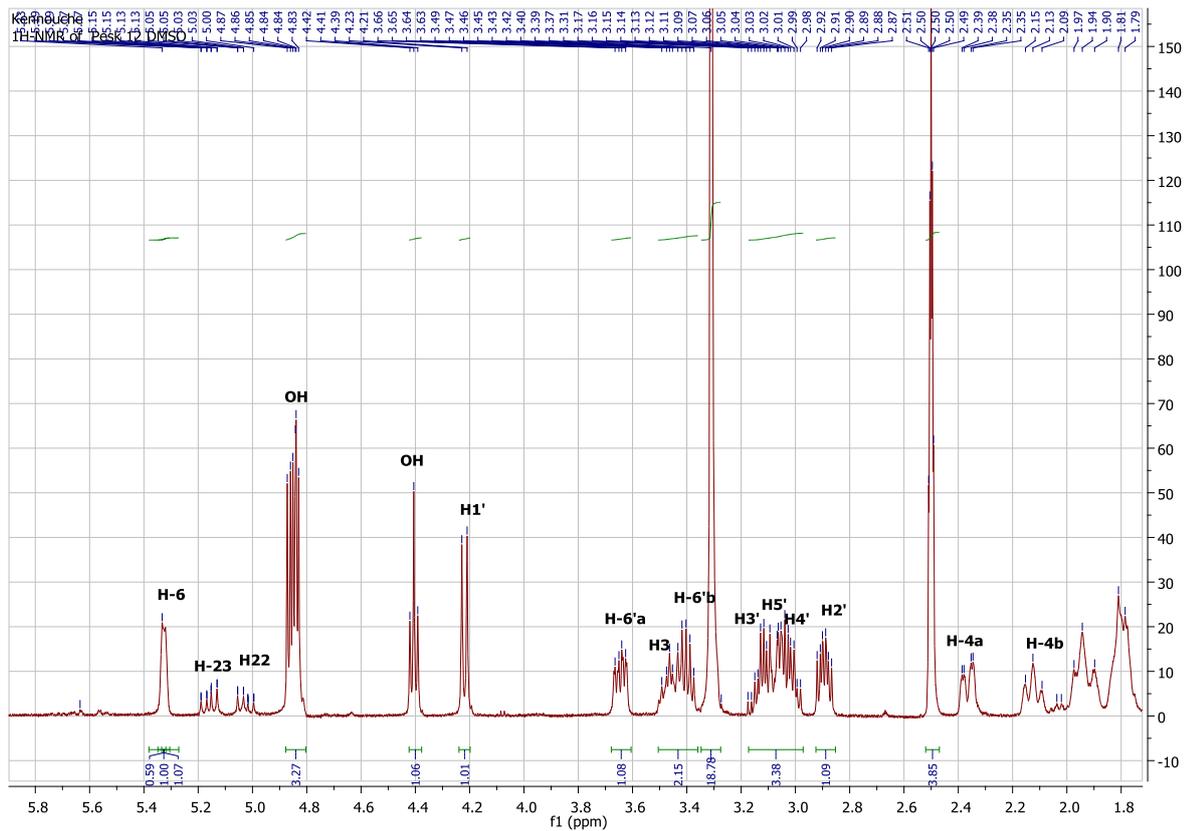
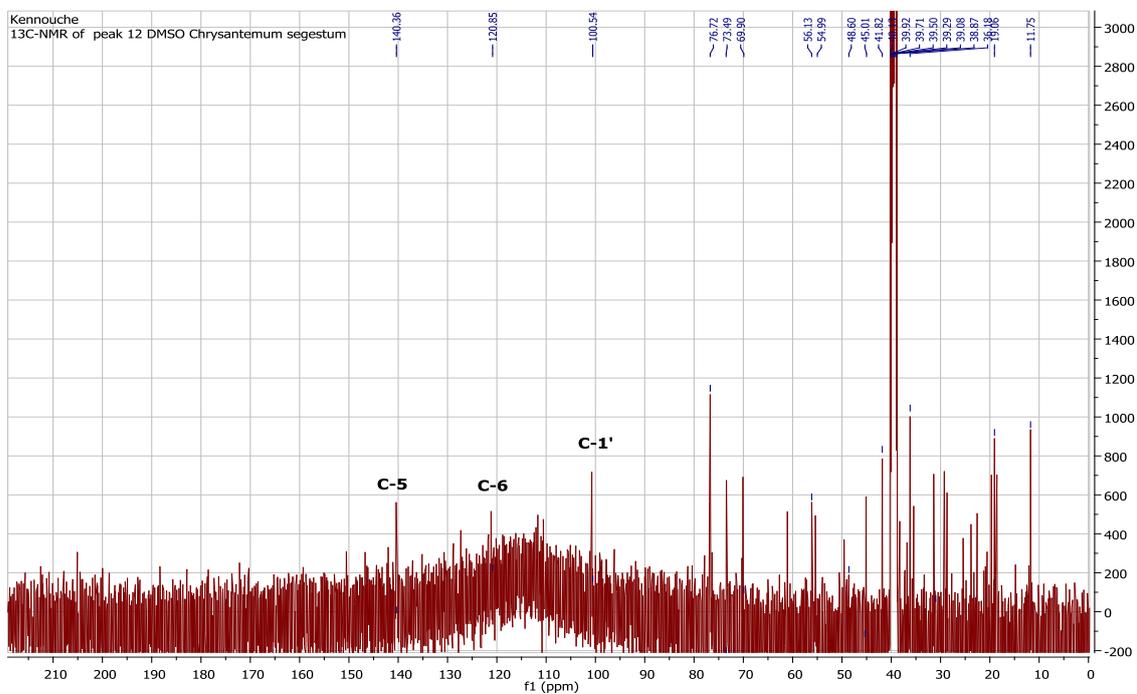


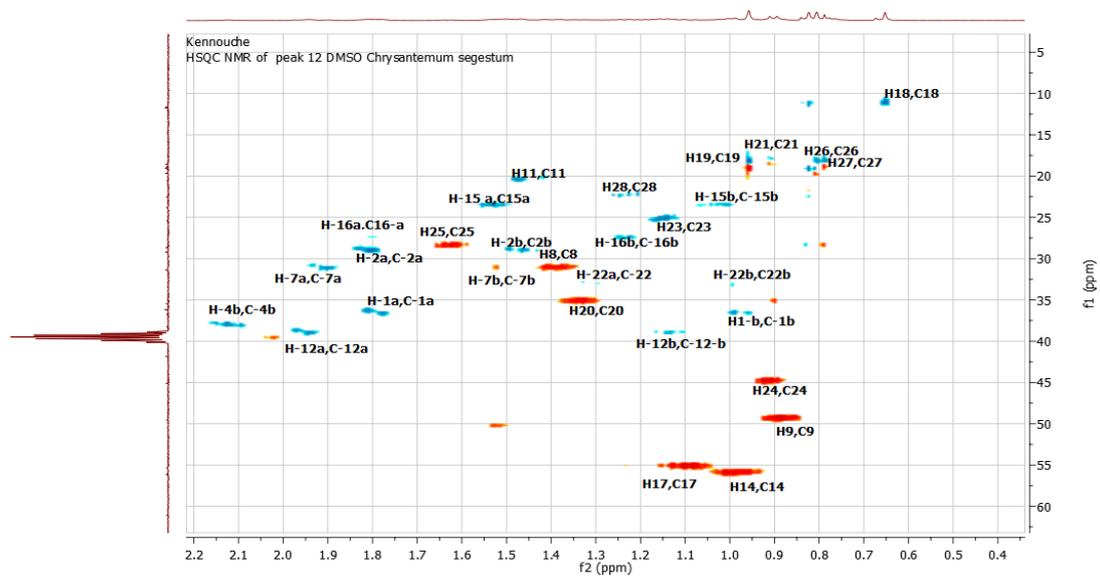
Figure III.16: le β -Sitosterol-3-O- β -D-glucoside et le stigmastérol



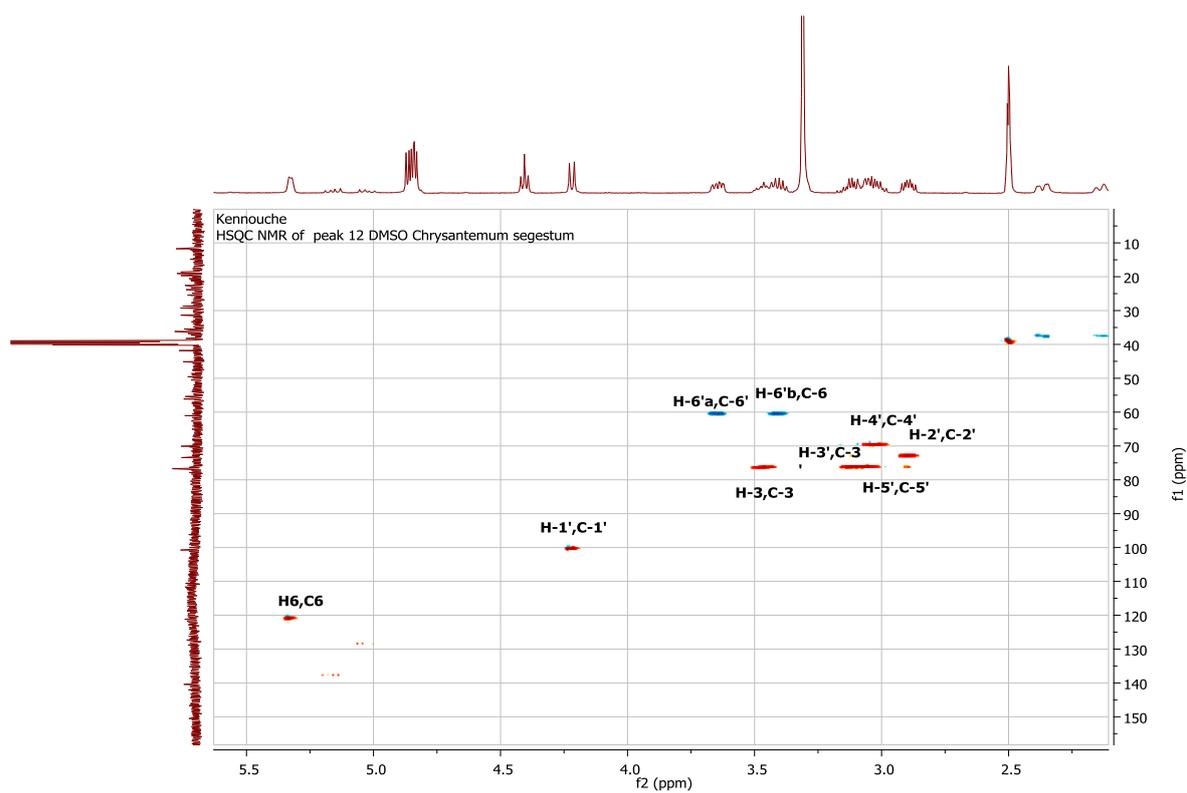
Spectre III.27: Spectre RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) du composé CSF12 étalé



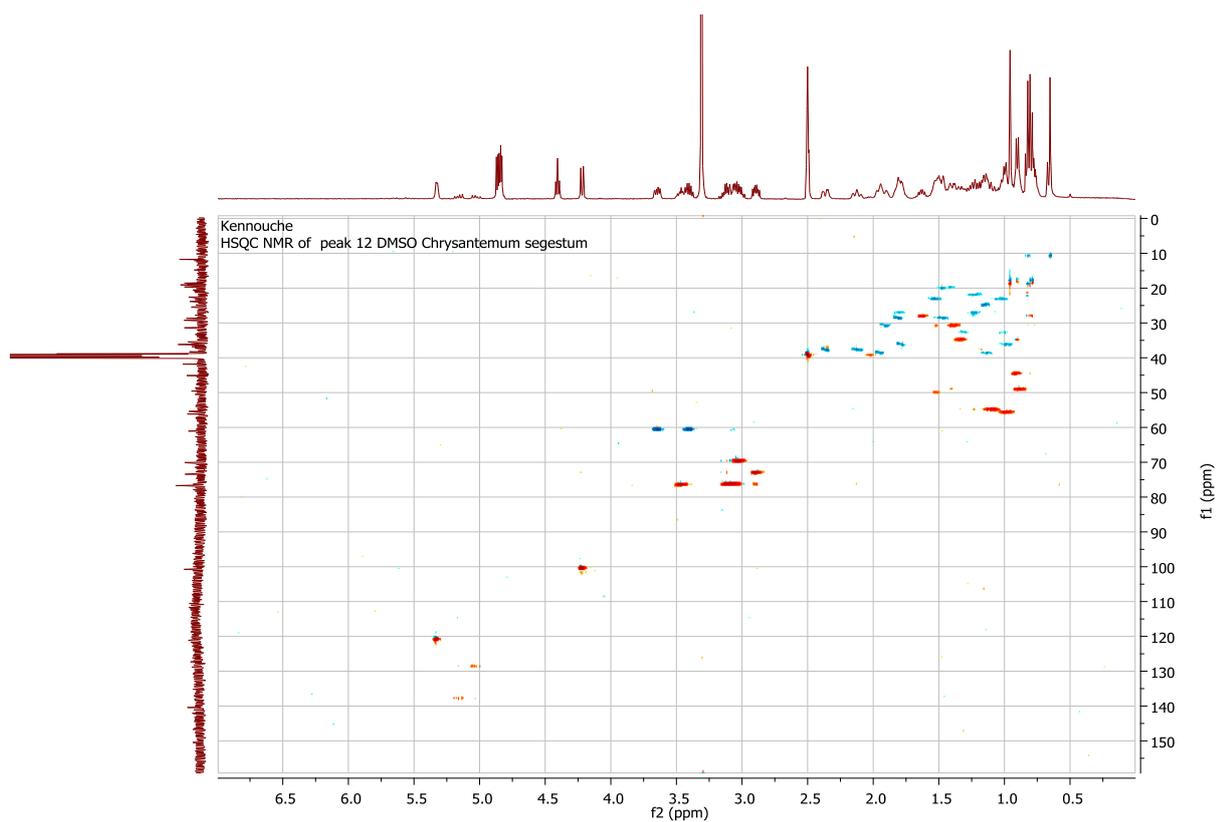
Spectre III.28: Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) du composé CSF12



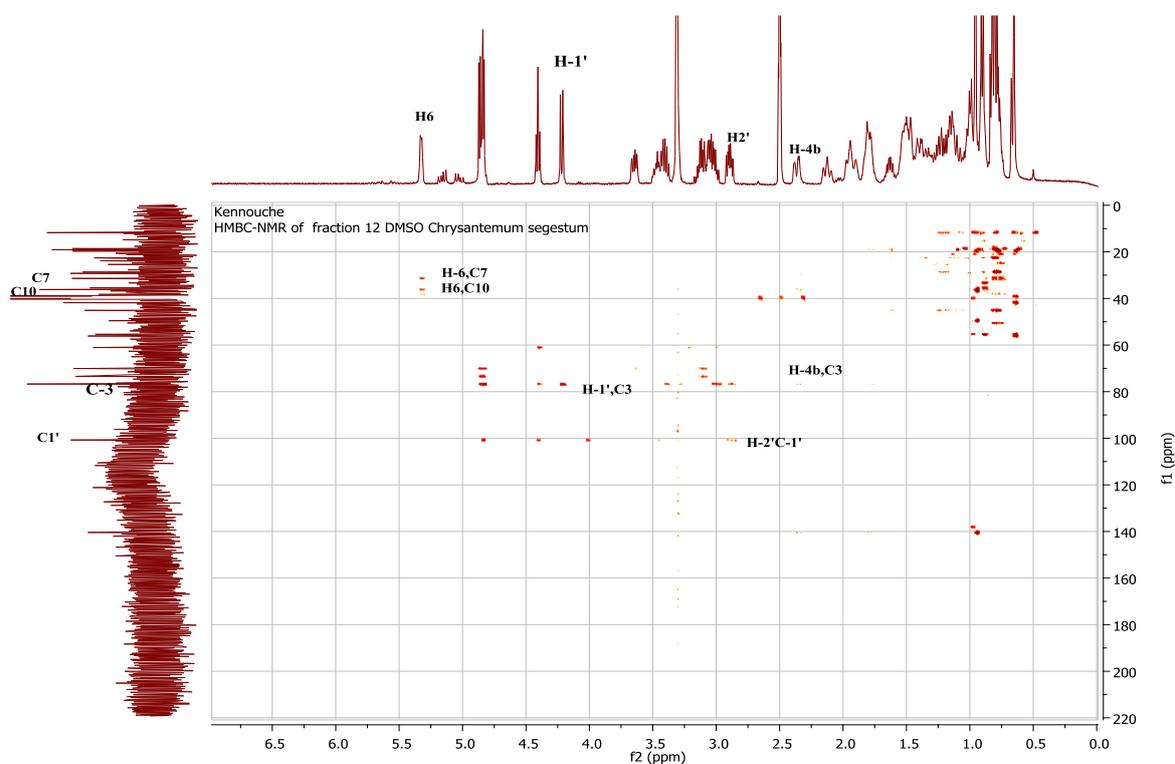
Spectre III.29: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO-d₆) du composé CSF12 étalement



Spectre III.30: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO-d₆) du composé CSF12 étalement



Spectre III.31: Spectre HSQC (400 MHz, DMSO-d₆) du composé CSF12



Spectre III.32: Spectre HMBC (400 MHz, DMSO-d₆) du composé CSF12

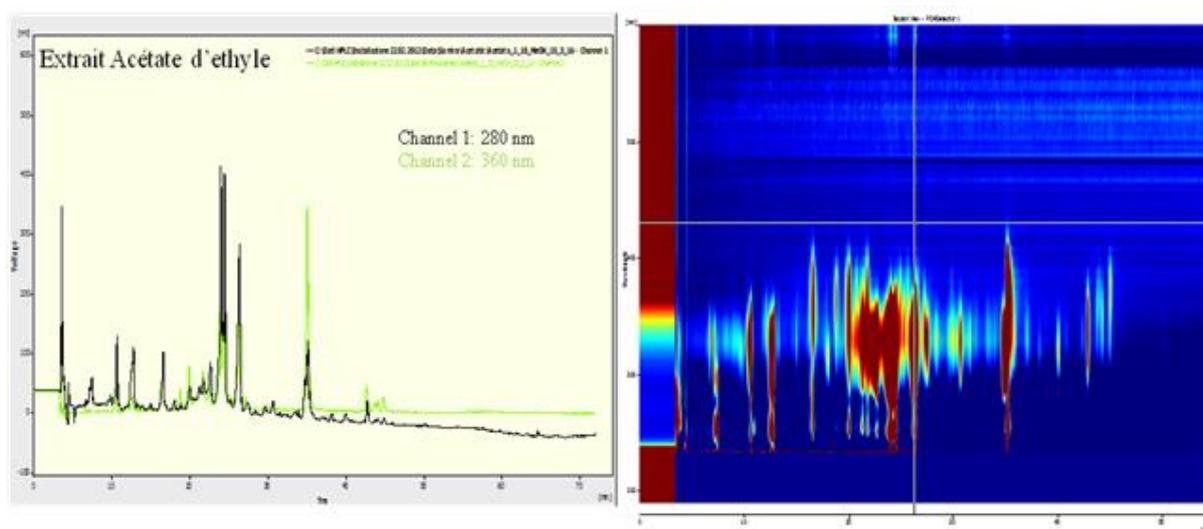
III.1.2: ANALYSE QUALITATIVE DES EXTRAITS ACETATE D'ETHYLE ET *N*-BUTANOL DE *C.SEGETUM*

III.1.2.1. Analyse qualitative des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol par HPLC-DAD

III.1.2.1. A. Analyse d'extrait acétate d'éthyle.

Le chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle de *C.segetum* (spectre III.33) peut être divisé en deux parties différentes : la première de 10 et 14 minutes, correspond à des composés polaires tels que les acides benzoïques (acide gallique), les acides hydroxycinnamiques (acide chlorogénique) et les flavanols avec une absorbance maximale entre 280 et 345 nm.

La deuxième partie du chromatogramme, s'étendant de 16 à 45 min, on observe quatre groupes des composés, l'absorbance maximale du premier groupe entre 310-410 nm, le deuxième entre 280-400 nm, le troisième entre 280-365 nm, et le dernier groupe entre 280 - 410 nm peuvent être considérés comme des dérivés coumariniques (scopoltine, esculetine, umbelliférone) [14,15] et des flavonoïdes(flavone et flavonols)[16].



Spectre III.33: Chromatogrammes HPLC-DAD de l'extrait acétate d'éthyle de *C.segetum* à longueurs d'onde 280,360 nm

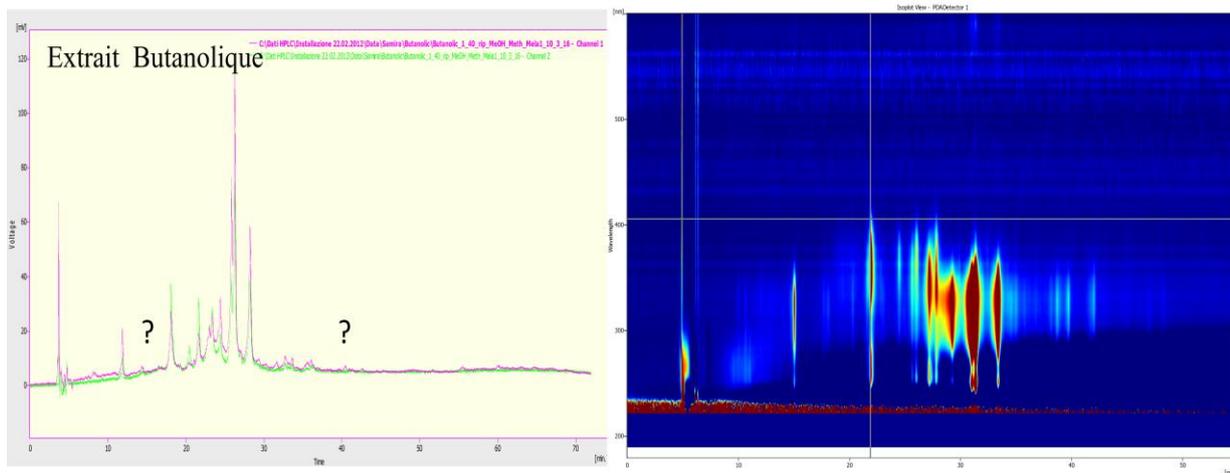
III.1.2.1. B. Analyse de l'extrait *n*-butanol

Les mêmes conditions analytiques ont été utilisées pour étudier la composition de l'extrait *n*-butanol de *C.segetm*.

Les profils des compositions HPLC-DAD à 280 et 360 nm de nos extraits sont similaires mais pas totalement identiques. Dans l'extrait *n*-butanol on remarque l'absence des deux pics

(correspondant aux composés à $t_r = 13$ mn et $t_r = 35$ mn (spectre III.34). Les différences entre les deux extraits reposent sur les concentrations des composés, car les deux extraits présentés n'ayant pas été injectés à la même concentration, il n'est pas donc possible de comparer et discuter de façon plus approfondie.

Notons qu'au cours de nos analyses tous les composés n'ont pas été identifiés par manque des étalons.



Spectre III.34: Chromatogrammes HPLC-DAD de l'extrait *n*-butanol de *C.segtum* à longueurs d'onde 280,360nm

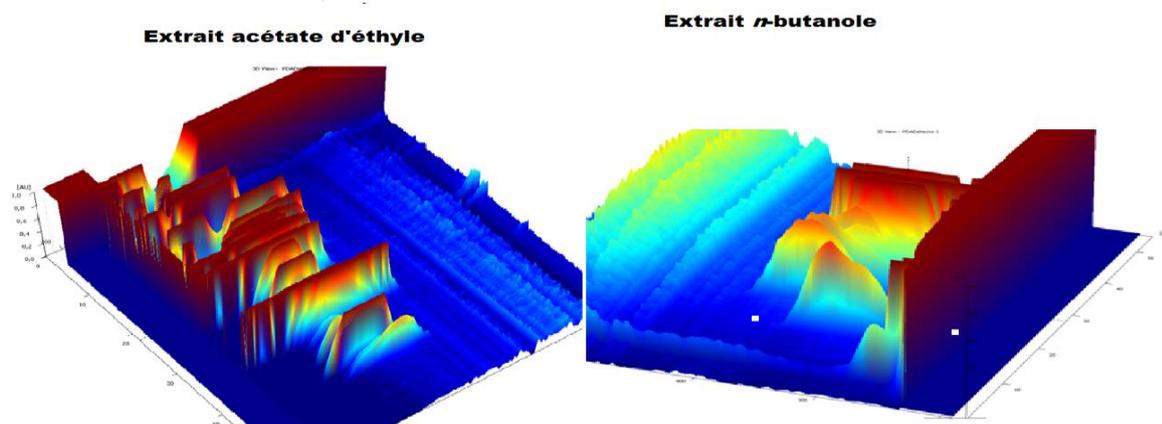


Figure III.17: Chromatogrammes 3D de HPLC-DAD des extraits de *C.segtum* à longueurs d'onde 280,360nm

III.1.2.2. Analyse qualitative des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol par Chromatographie Ultra Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (UHPLC-MS)

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur les contenus des deux extraits obtenus comme indique précédemment une analyse UHPLC/ESI-MS a été effectuée.

L'utilisation de la source d'ionisation par électrospray est bien adaptée à la détection des composés phénoliques, car elle permet une bonne ionisation de ces extraits d'où une intensité de signal suffisante pour avoir une sensibilité de détection satisfaisante.

Les données UHPL/ESI-MS des composés phénoliques présents dans les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol sont indiquées dans le Tableau III.7.

Les ions moléculaire m/z et la comparaison avec les résultats rapportés dans la littérature [21,22,23,24,30], nous a aidé à proposer les structures moléculaires de ces composés.

Le Tableau III.7 présente les principaux composés phénoliques dans les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *C.segetum*.

N° pik	Formule moléculaire proposée	Extrait EtOAc	Extrait BuOH	Formule moléculaire	Mode d'ionisation	m/z théorique	m/z expérimen tal	Réf
		Temps de rétention (min)	Temps de rétention (min)					
A	Acide Neochlorogénique ^b Acide Chlorogénique ^a	8,08	-	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	N	353,08780	353,08603 - 353,08957	[17, 18,19,20] [21]
		8,87	8,88					
B	Isomere -1 Aésculéline ^a	-	8,20	C ₉ H ₆ O ₄	N	177,01933	177,01844 - 177,02022	[22]
		9,10	9,09					
C	gossypetine -7-glucoside ^a	9,84	9,84	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	N	479,0831138	479,08071 - 479,08551	[21]
D	Scopolétine ^a isoscopolétine	8,39	8,39	C ₁₀ H ₈ O ₄	N	191, 0349820	191,03402 - 191,03594	[23]
		9,96	-					
E	Lutéoline-7-o-glucoside ^a Kaempférol-3-o-glucoside ^b , Isomere -1, Isomere-2	9,98	9,98	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	N	447,09328	447,09104 - 447,09552	[24] [25]
		10,59;10,92;11,30	10,59;10,92					
F	Acide cinnamique Dihydrocoumarine ^a	-	8,43	C ₉ H ₈ O ₂	N	147,04515	147,04441 - 147,04589	[26] [21]
		10,17	10,15					
J	Acide 3,5-O-dicafféoylquinique ^a Acide 3,4-O-dicafféoylquinique ^b	10,34	10,34	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	N	515,1194450	515,11687 - 515,12203	[21] [27,28,18]
		10,80	10,80					
H	Umbelliféron ^a 4-hydroxycoumarine ^a Isomère-1	10,34	10,34	C ₉ H ₆ O ₃	N	161,0244174	161,02361 - 161,02523	[23] [22]
		10,78	10,80					
I	Quercétine-7-o-glucoside ^a Quercétine-3-o-glucoside ^b	10,30	10,31	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	N	463,088199	463,08588 - 463,09052	[21] [25,29]
		10,86	10,84					
g	Naringénine-5-o-glucoside ^b Apigénine-7-o-glucoside ^a	10,48	10,47	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	N	431,09837	431,09621 - 431,10053	[25] [24]
		11,05	11,05					
K	Coumarine ^a , isocoumarine isomère-2, isomère-3	8,37 ;9,02 ;9,67 ;11 ,84	8,39 ;9,03 ; 9,67 ;11,83	C ₉ H ₆ O ₂	N	145,0295028	145,02877 - 145,03023	[22]

L	quercétagine-3'-méthylether ^a	10,53	10,52	C16H12O8	N	331,04594	331,04428	[30]
	quercétagine-3-méthylether ^b	12,02	-				-	331,04760
M	8-hydroxy-quercétine ^a	12,04	-	C15H10O8	N	317,03029	317,02870	[21]
	quercétagine ^b	-	9,84				-	317,03188
N	Fistine ^b	-	11,38	C15H10O6	N	285,04046	285,0903-	[33]
	Lutéoline ^a	12,33	12,33				285,04189	[30]
	kaempférol ^a	12,72	12,82					[30]

Tableau III.7 : Principaux composés phénoliques dans les extraits polaires de *C.segetum*

N : mode d'ionisation négatif

^a : Auparavant rapporté dans l'espèce *Chrysanthemum segetum*

^b : Auparavant rapporté dans le genre *Chrysanthemum*.

III.1.2.3. Discussion

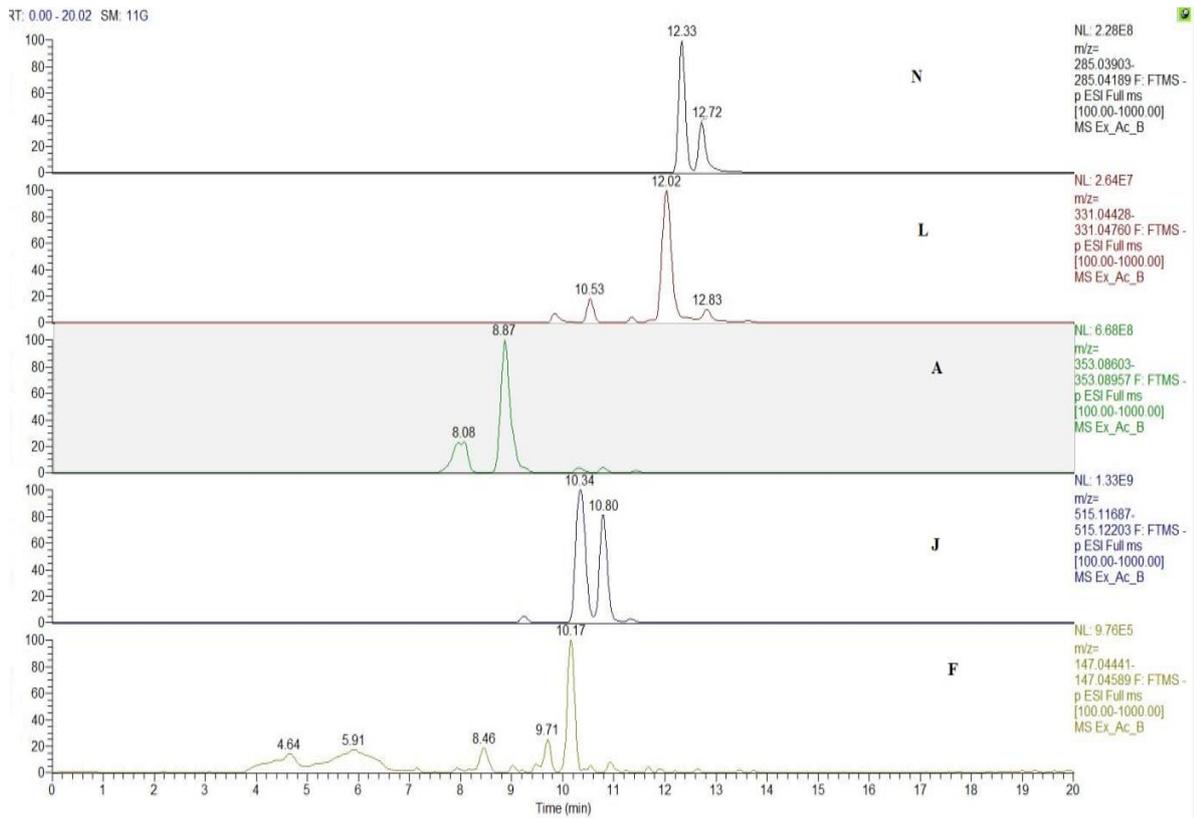
À l'aide de cette méthodologie, nous avons réussi, pour la première fois, à établir le profil chromatographique d'analyse des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *C.segetum* par UHPLC-MS, cette étude nous a permis de proposer les structures de vingt-sept composés phénoliques présents dans ces extraits.

La composition des deux extraits ne diffère pas beaucoup et montre une richesse en substances phénoliques, les coumarines et les flavonoïdes ont été identifiées comme les principaux composés de ces extraits.

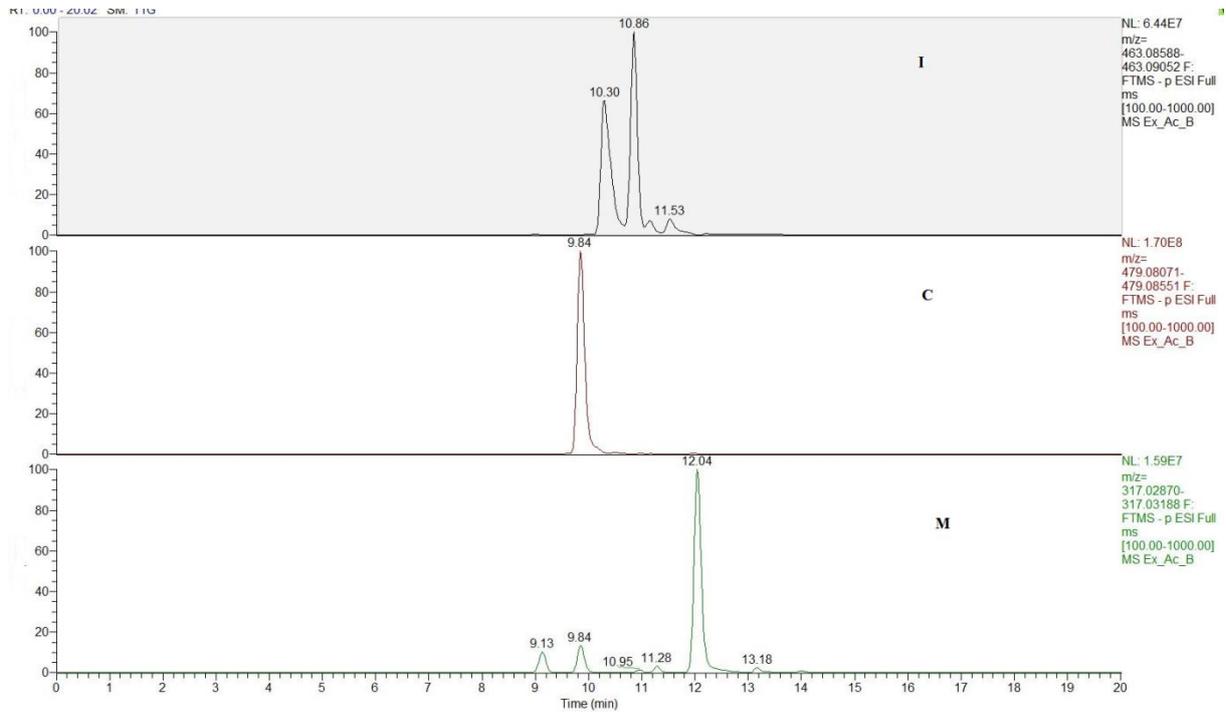
Les résultats indiquent la présence de tous les composés phénoliques qui sont cités dans d'autres travaux, à l'exception du composé herniarine qui n'a pas été détecté dans nos extraits d'après les deux études phytochimiques antérieures sur l'espèce *C.segetum*, la herniarine a été trouvée comme un composant majoritaire de l'extrait de la plante entière, l'absence de ce composé dans les extraits étudiés s'explique par le fait que la plupart des plantes contenant le composé herniarine ne contiennent pas de coumarine [22,23], on peut noter également la présence des isomères pour presque tous les composés rapportés précédemment dans cette espèce.

Malheureusement, il est impossible, avec les seules données de spectrométrie de masse, d'établir la caractérisation confirmée de ces composants.

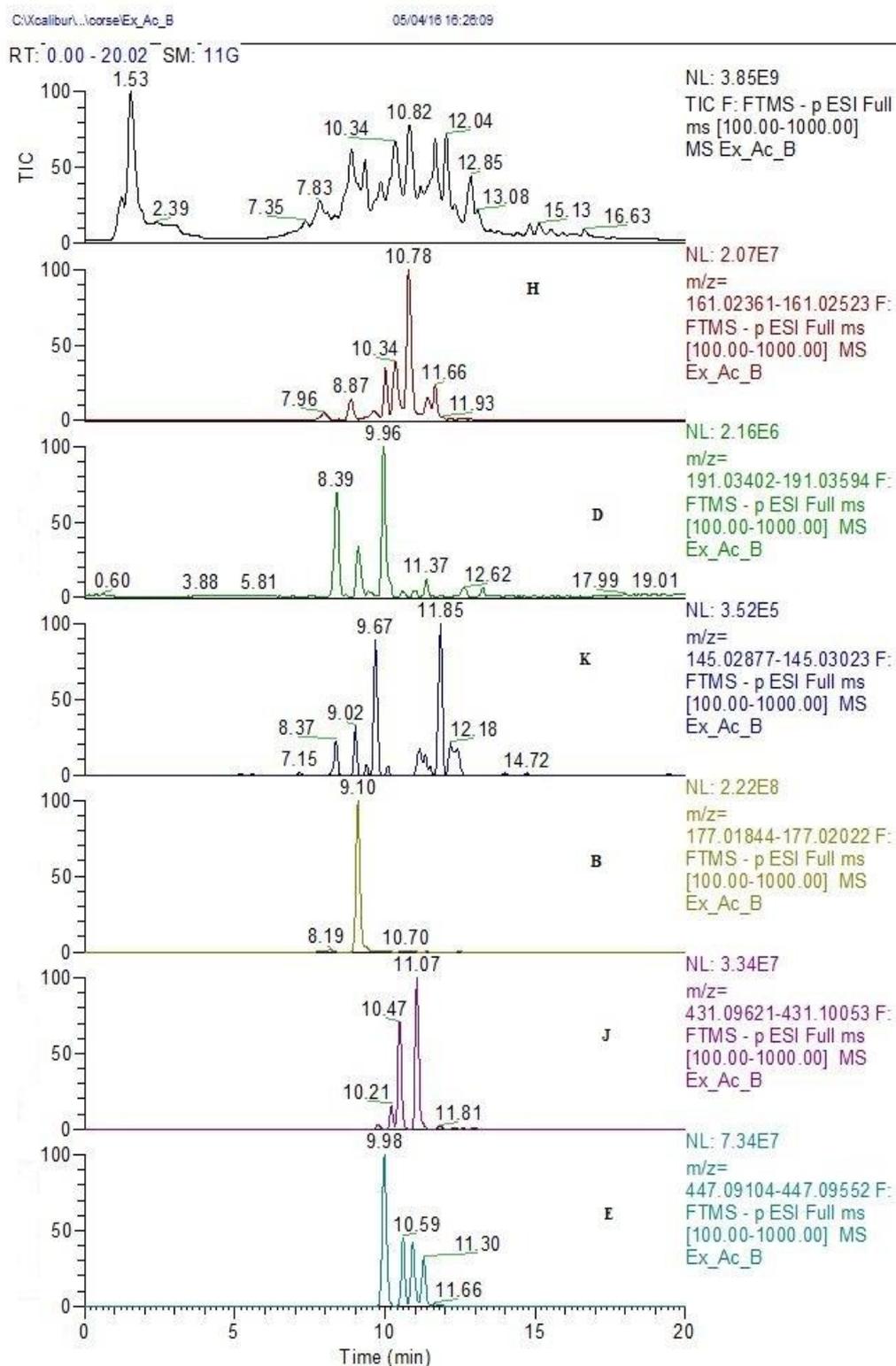
Notre étude confirme les résultats des études publiées sur l'investigation phytochimique de l'espèce *C.segetum* et que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de cette espèce sont riches en différents composés phénoliques, se trouvant surtout sous forme de nombreux isomères.



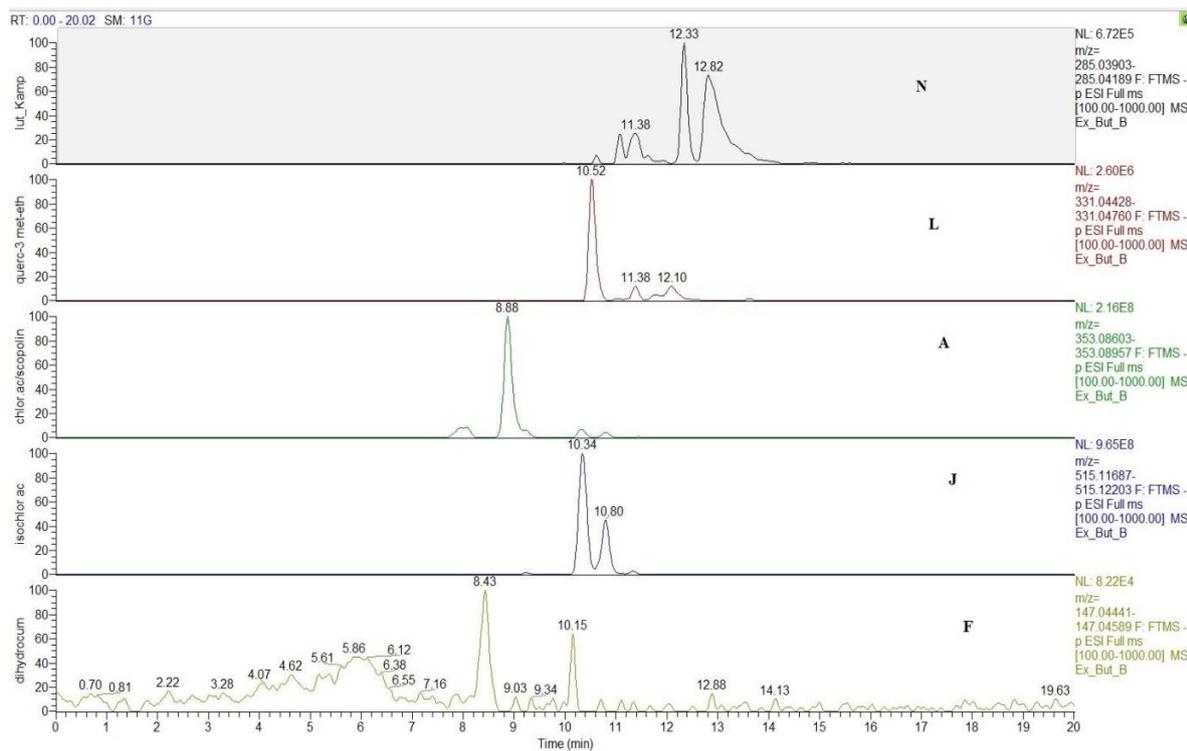
Suite



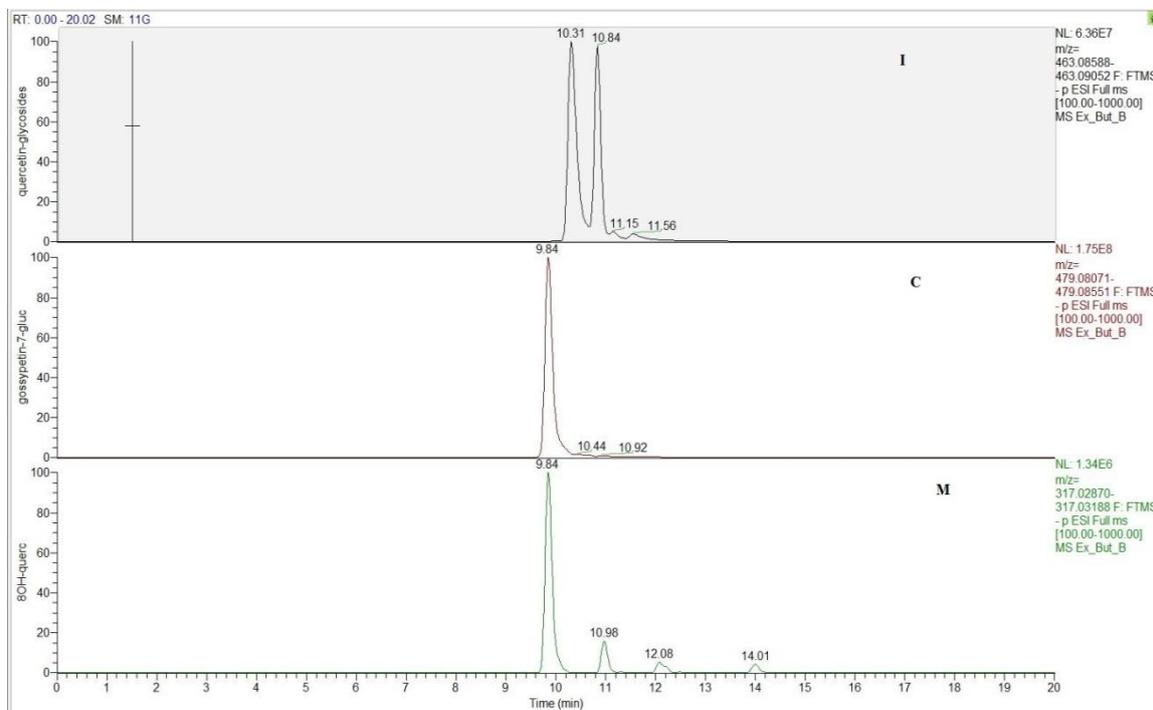
Suite



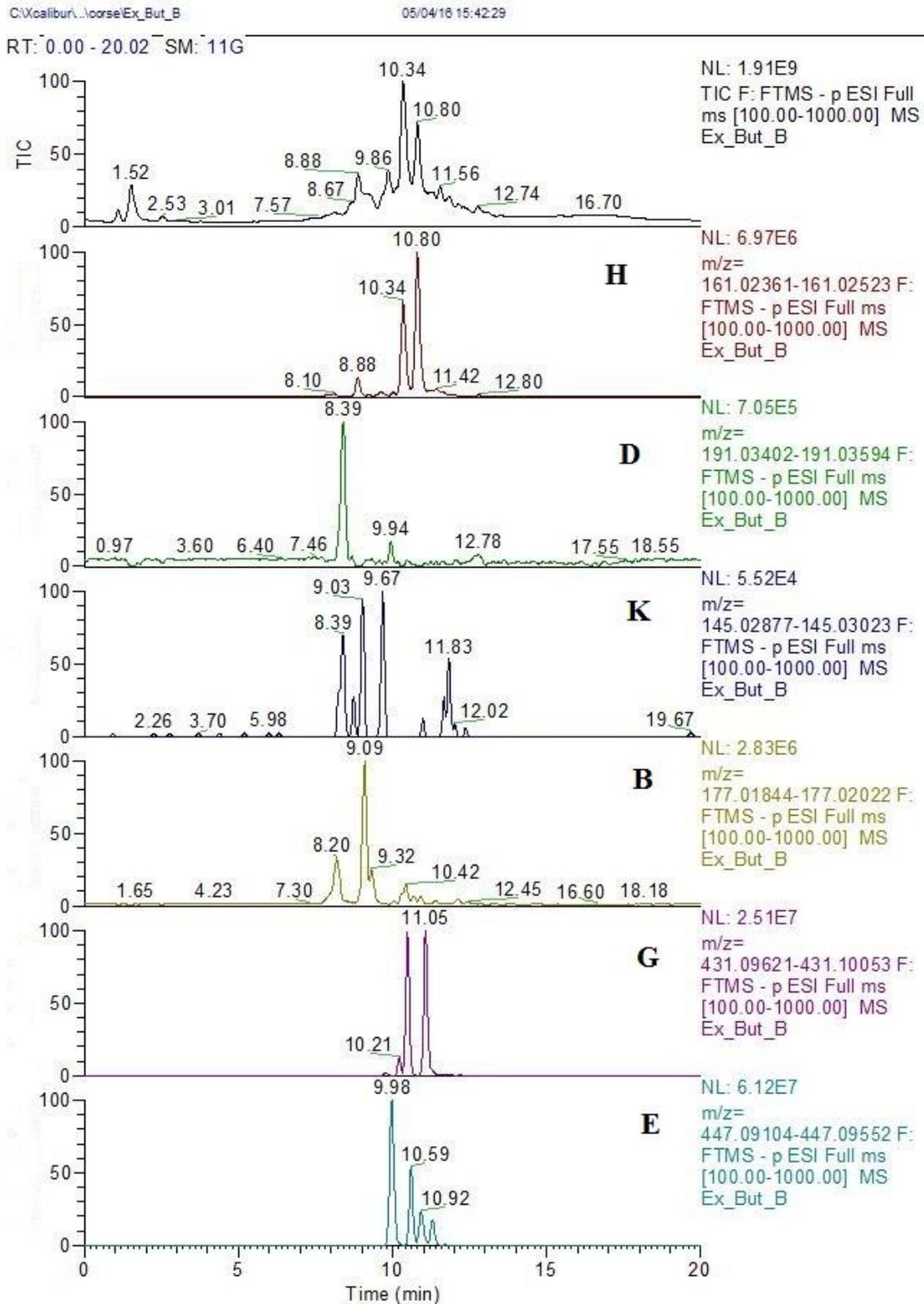
Spectre III.35: Chromatogrammes UHPLC-ESI-MS qualitative de l'extrait acétate d'éthyle du *C.segetum*



Suite



Suite



Spectre III.36: chromatogrammes UHPLC-ESI-MS de l'extrait *n*-butanol

III.2:IDENTIFICATION DES PRODUITS DE *L.PRUINOSUM*

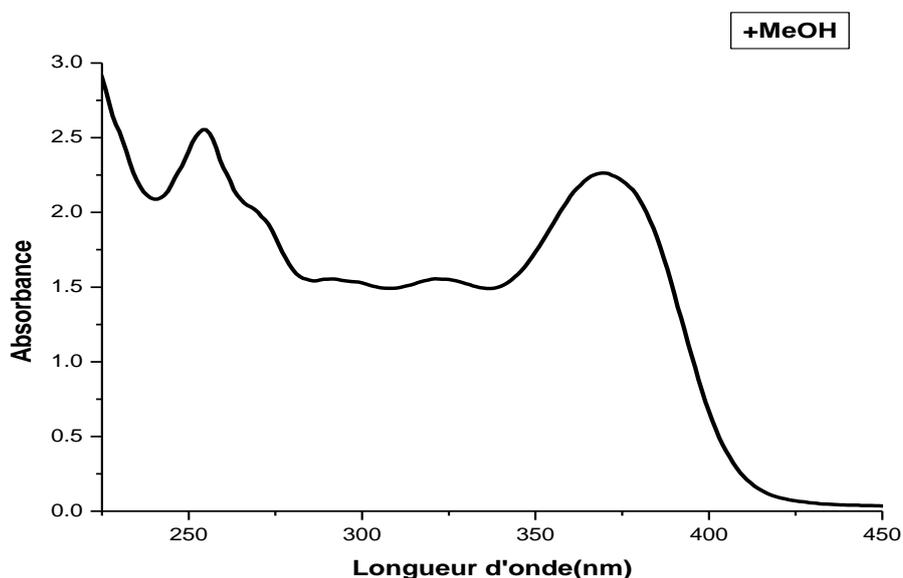
III.2.1: IDENTIFICATION DES PRODUITS DE L'EXTRAIT ACETATE

D'ETHYLE.

III.2.1.1. IDENTIFICATION DU COMPOSE LPF06

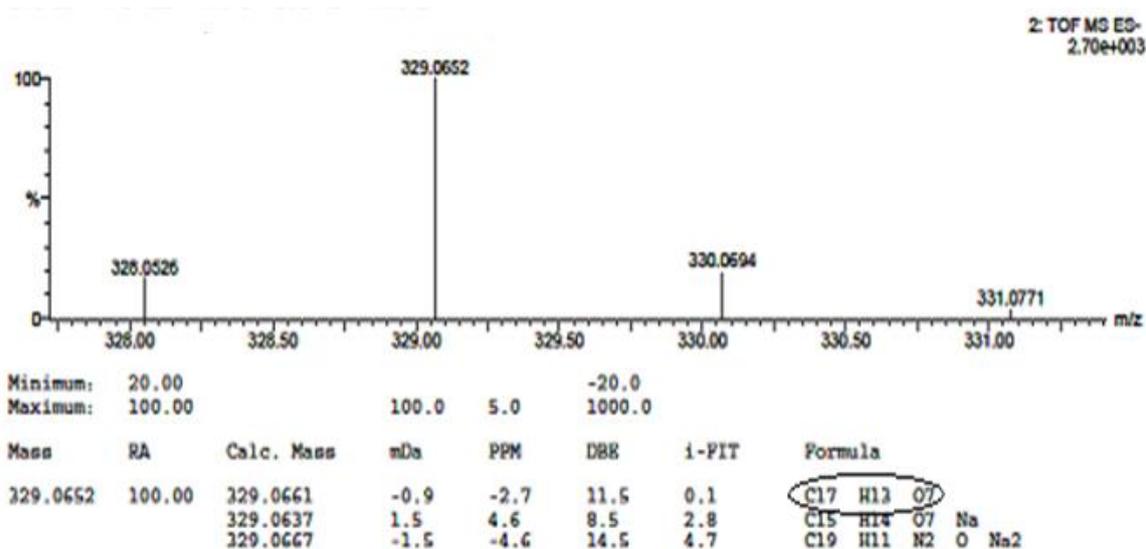
Le composé LPF06 a été isolé sous forme d'une poudre jaune, la fluorescence jaune sous lumière de Wood laisse supposer la structure d'un flavonol.

Les λ max d'absorption de la bande I à 371 nm et la bande II à 255 nm confirment une structure de type flavonol.



Spectre III.36: spectre UV du composé LPF06 dans le méthanol.

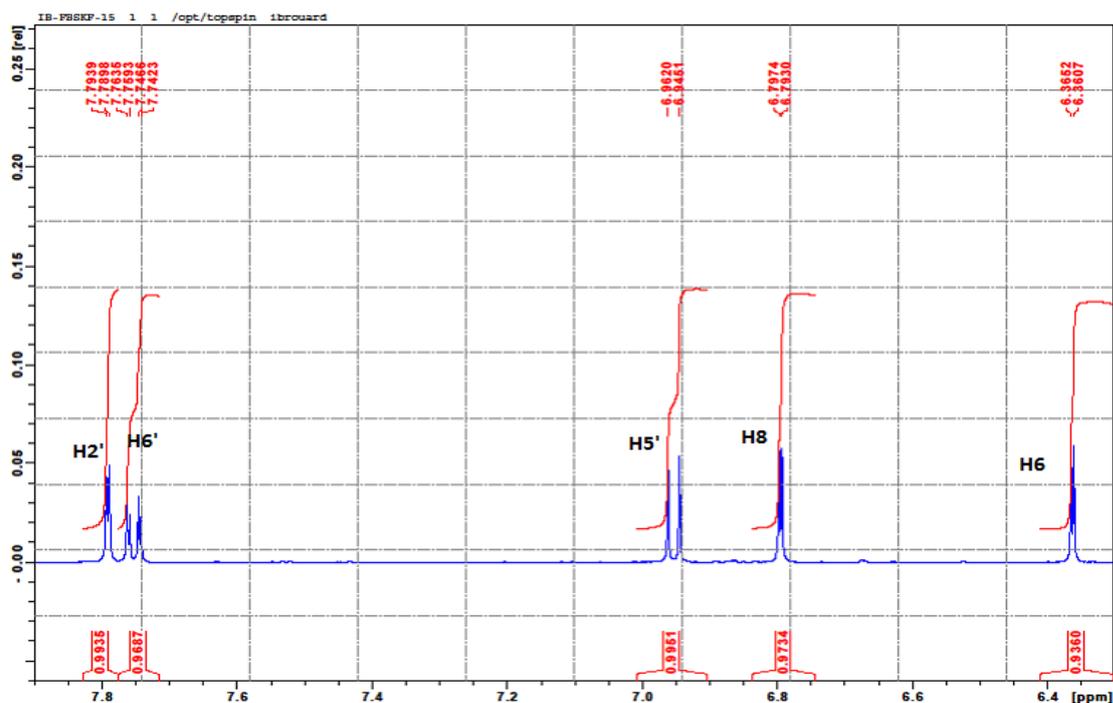
Le spectre de masse (spectre III.36) du composé LPF06 obtenu par ionisation en mode négatif montre un ion quasi-moléculaire à m/z 329,0652 $[M-H]^-$ indiquant une masse moléculaire de 330 Da et laissant envisager la formule brute $C_{17}H_{14}O_7$, avec 11 degrés d'insaturation.



Spectre III.37: Spectres de masse (ESI-MS) du composé LPF06

L'analyse du spectre RMN¹H (spectre IV.38) du composé LPF06 indique la présence de deux protons aromatiques couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à $\delta = 6,36$ et $6,79$ ppm ($J = 2,2$ Hz) typiques d'un couplage en méta sur un cycle aromatique. Ces signaux sont caractéristiques du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7 et peuvent être attribués aux protons H-6 et H-8 respectivement.

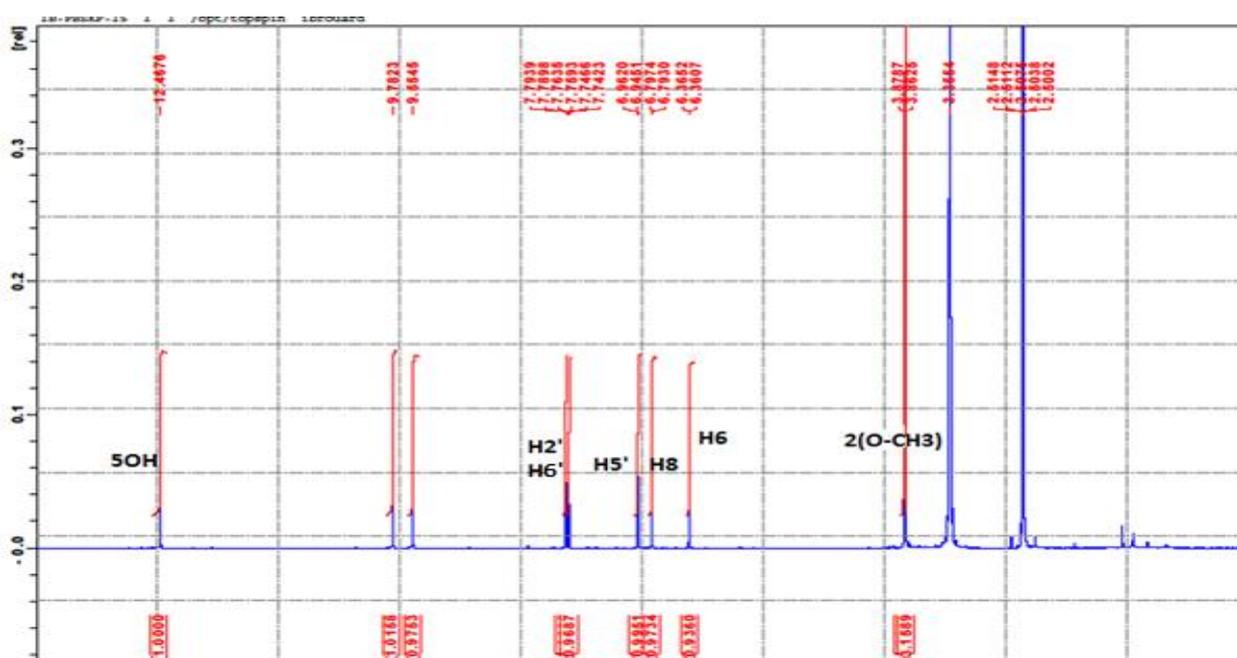
Trois protons aromatiques à $\delta = 7,78$ ppm (d, $J = 2,05$ Hz), $7,74$ ppm (dd, $J = 8,47 ; 2,05$ Hz), $6,94$ ppm (d, $J = 8,45$ Hz) dont, les constantes de couplage indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B et que celui-ci est 1', 3', 4'-trisubstitué, ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-6' et H-5'.



Spectre III.38: Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) étalé (6.30 à 7.85 ppm) du composé LPF06

Sur le spectre RMN ^1H (spectre III.39) on observe, deux singlets d'intégration 3H chacun, le premier à $\delta = 3,87$ ppm et le second à $\delta = 3,86$ ppm attribuables à deux groupements méthoxyles.

Un signal à $\delta = 12,46$ ppm correspondant à la présence d'un hydroxyle libre en position 5.



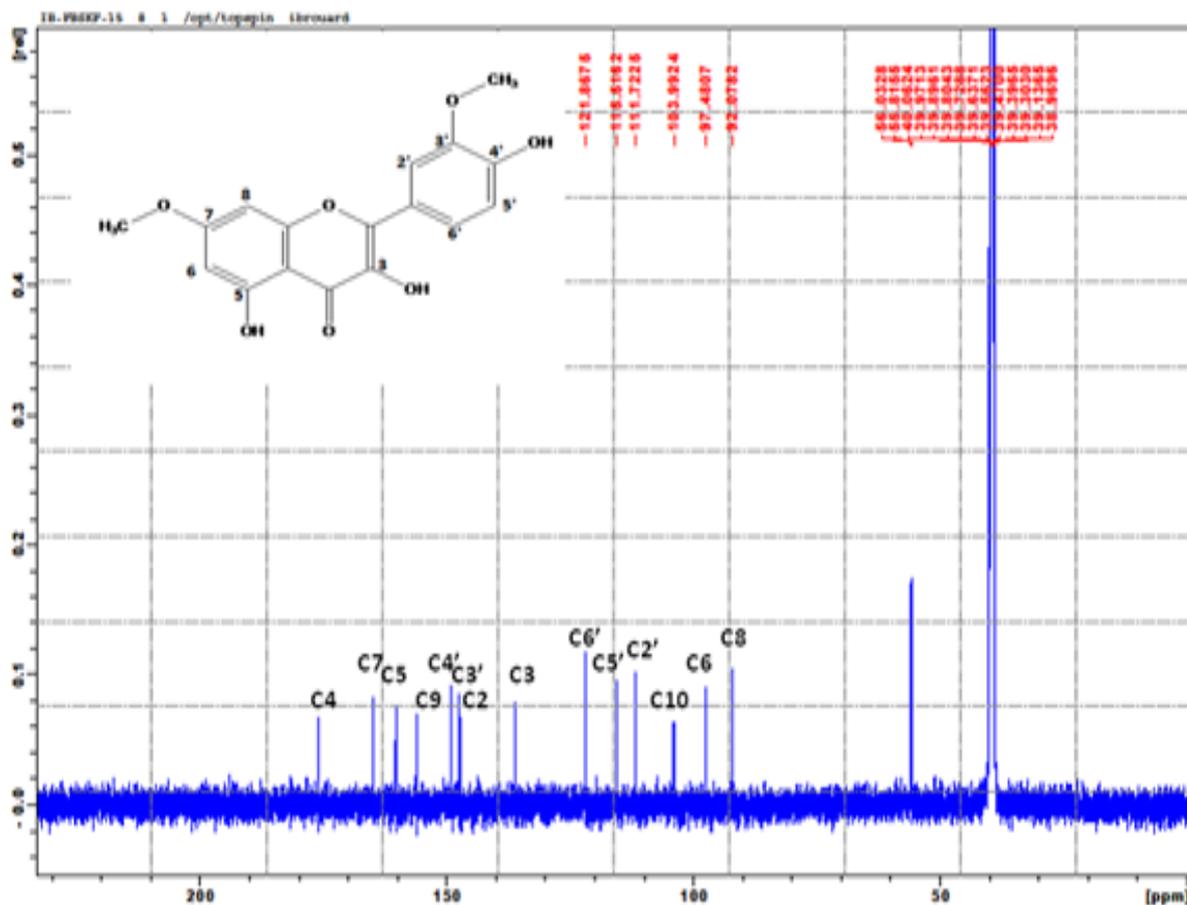
Spectre III.39: Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé LPF06

L'examen simultané des spectres RMN¹³C (spectre III.40), DEPT 135(spectre III.41), et DEPT 90 (spectre III.42) montrent la présence de 16 atomes de carbone :

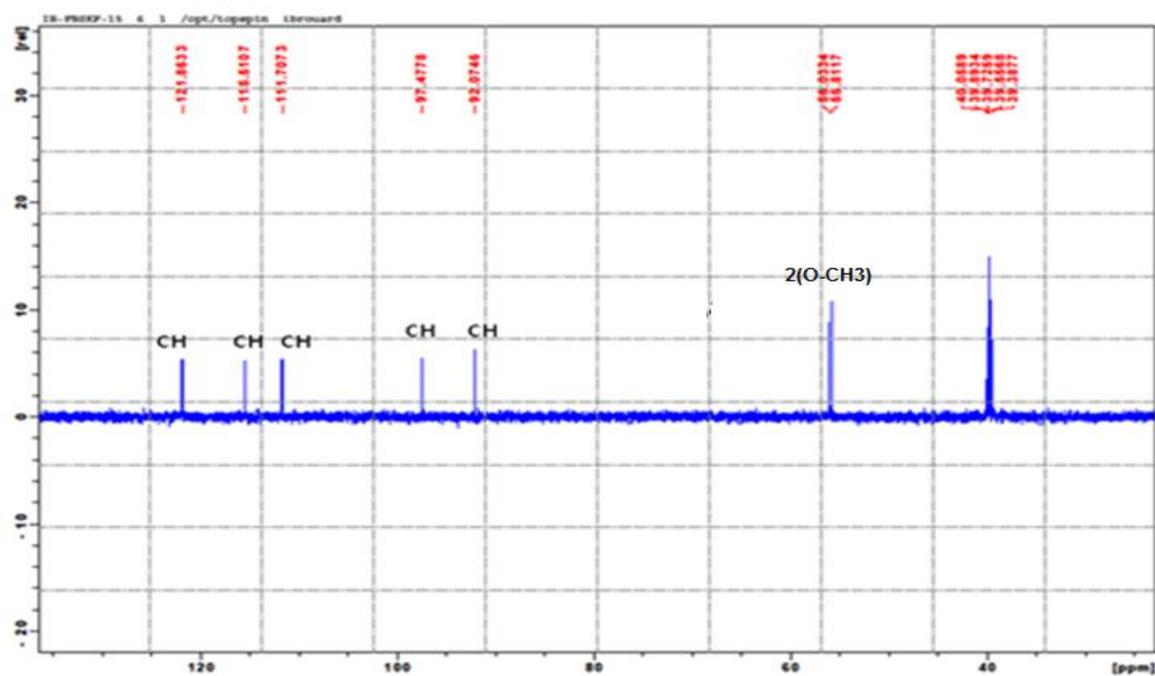
Deux groupements méthoxyles à 55,81 et 55,03 ppm.

Cinq CH aromatiques à 111,56 ; 121,86 ; 147,38 ; 97,48 et 92,07 ppm.

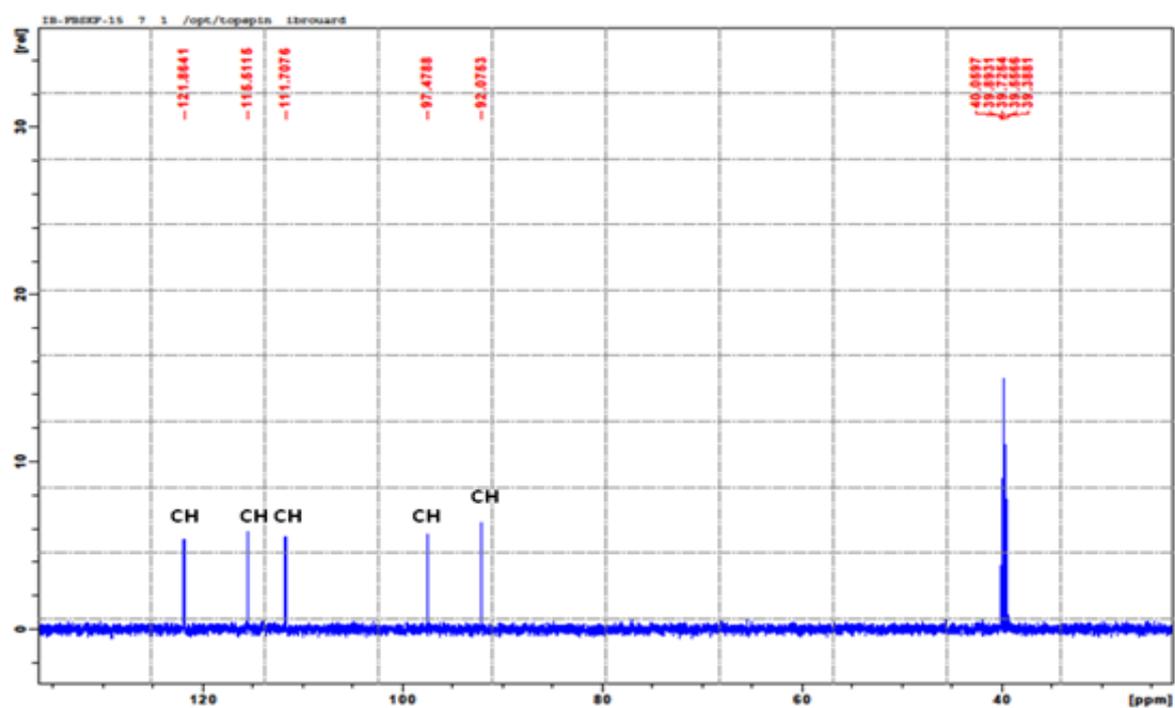
Neuf carbones quaternaires dont sept oxygénés et un groupement carbonyle à $\delta = 175,97$ ppm.



Spectre III.40: Spectre RMN ¹³C (500 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF06

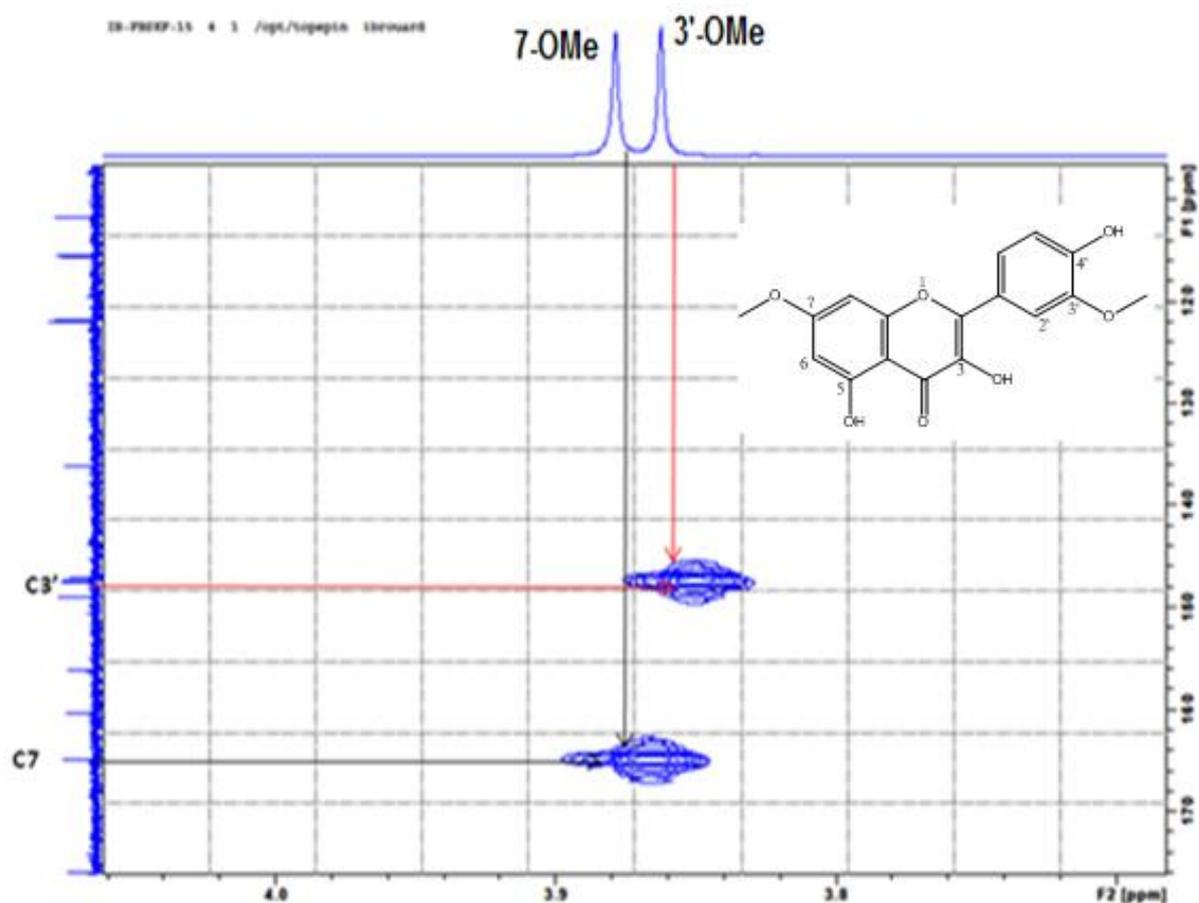


Spectre III.41: Spectre DEPT135 (125 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF06

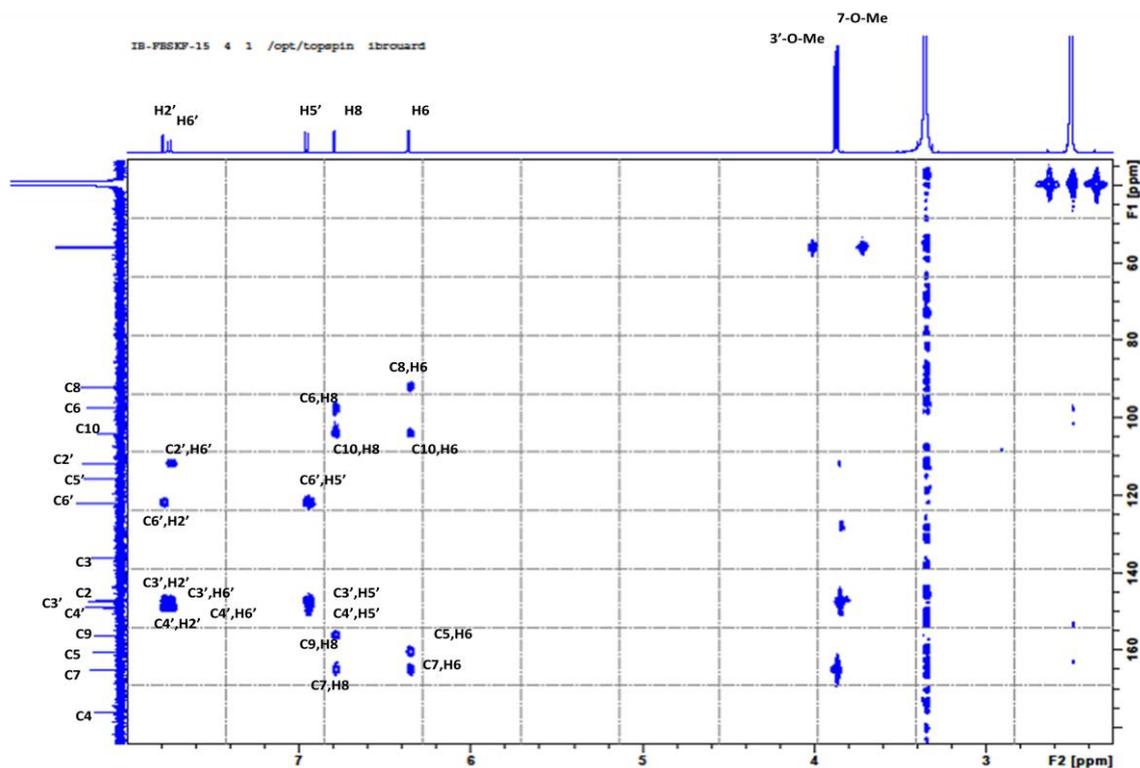


Spectre III.42: Spectre DEPT90 (125 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF06

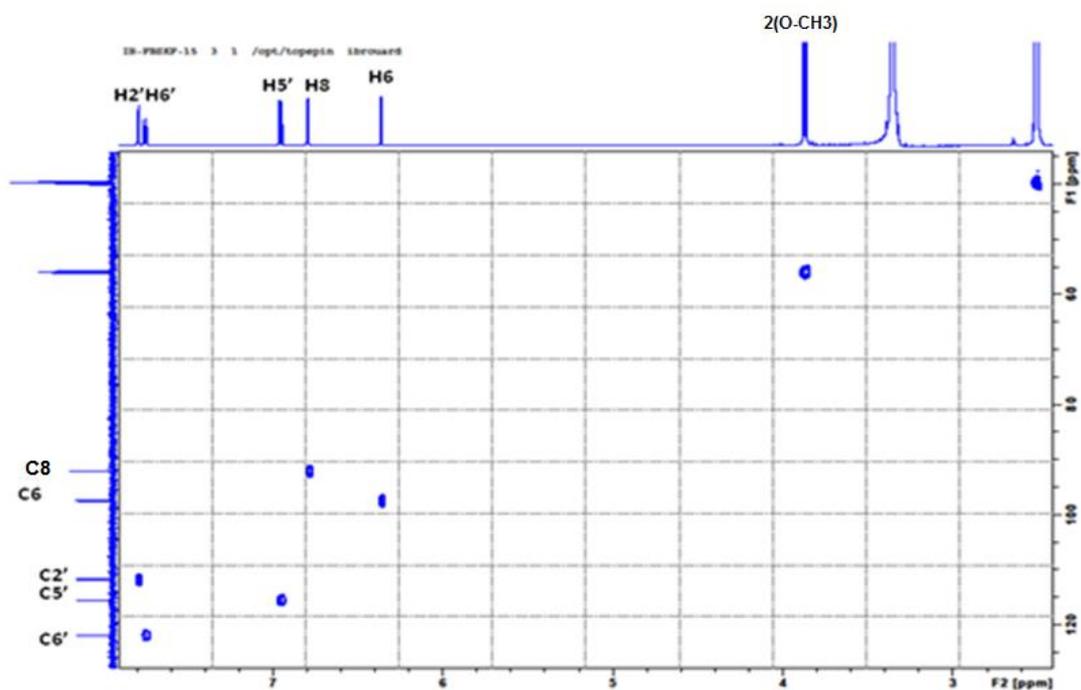
Le spectre HMBC de LPF06, nous indique que les protons des groupements méthoxyles à $\delta = 3,87$ ppm et à $\delta = 3,86$ ppm corrélient respectivement avec les carbones à 164,90ppm (C-7) et à 147,38 ppm (C3'), cette observation permet de placer ces substituants méthoxyles en position 7 et 3'.



Spectre III.43: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) étalé (3.8 à 4ppm) du composé LPF06



Spectre III.44 : Spectre HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF06



Spectre III.45: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF06

Sur le reste du spectre RMN¹H (spectre III.39), on note la présence de deux signaux à $\delta = 9,55$ et $9,78$ ppm attribués à des protons d'hydroxyles libres en position 3 et 4' respectivement.

L'ensemble des données de RMN¹H, RMN¹³C, HSQC et HMBC, est rassemblé dans le tableau IV.8.

Position	δ_H (ppm). m. J (Hz)	δ_C (ppm)	HMBC
2'	7,78.d (2,05)	111,56	C-6', C-4', C-3'
6'	7,74.dd (8,47 ; 2,05)	121,86	C-2', C-4', C-3'
5'	6,94.d (8,45)	115,51	C-6', C-3', C-4'
8	6,79.d (2,2)	92,07	C-6, C-10, C-9, C-7
6	6,36.d (2,2)	97,48	C-8, C-10, C-5, C-7
2		147,03	
3		136,10	
4		175,97	
5		160,30	
7		164,90	
9		156,06	
10		103,99	
1'		-	
4'		148,93	
3'		147,38	
OCH3	3,87.s	55,81	C-7
OCH3	3,86.s	55,03	C-3'
5-OH	12,46.s		

Tableau III.8: Données de la spectroscopie RMN ¹H ,RMN¹³C, et HMBC du composé LPF06

Toutes ces données mènent à la structure finale du composé LPF06 qui est le :

3,5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone ou bien **7,3'-diméthyl quercétine**

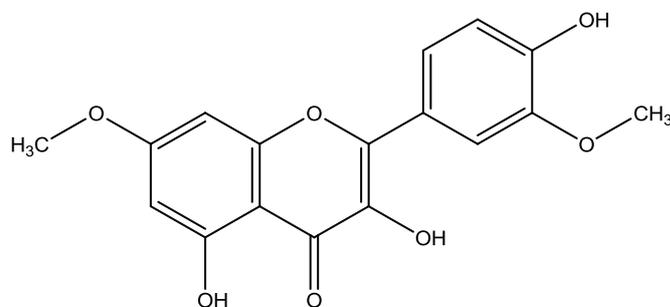


Figure III.18: La structure du 3,5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone

III.2.1.2. IDENTIFICATION DU COMPOSE LPF09

La fluorescence jaune sous lumière de Wood laisse supposer la structure d'un flavonol.

L'examen de la série spectrale UV (spectre III.46) enregistré dans le méthanol donne les indications suivantes :

La longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I à $\lambda_{\max}=371$ nm et la bande II à $\lambda_{\max}=255$ nm confirment une structure de type flavonol.

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda=+51$ nm) avec augmentation de l'intensité indiquant la présence d'un OH libre en position 4', l'apparition d'une nouvelle bande à 323 nm dans le même réactif montre la présence d'un OH libre en 7, ceci est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II remarqué après addition de NaOAc ($\Delta\lambda = + 20$ nm) comparativement au spectre pris dans le MeOH.

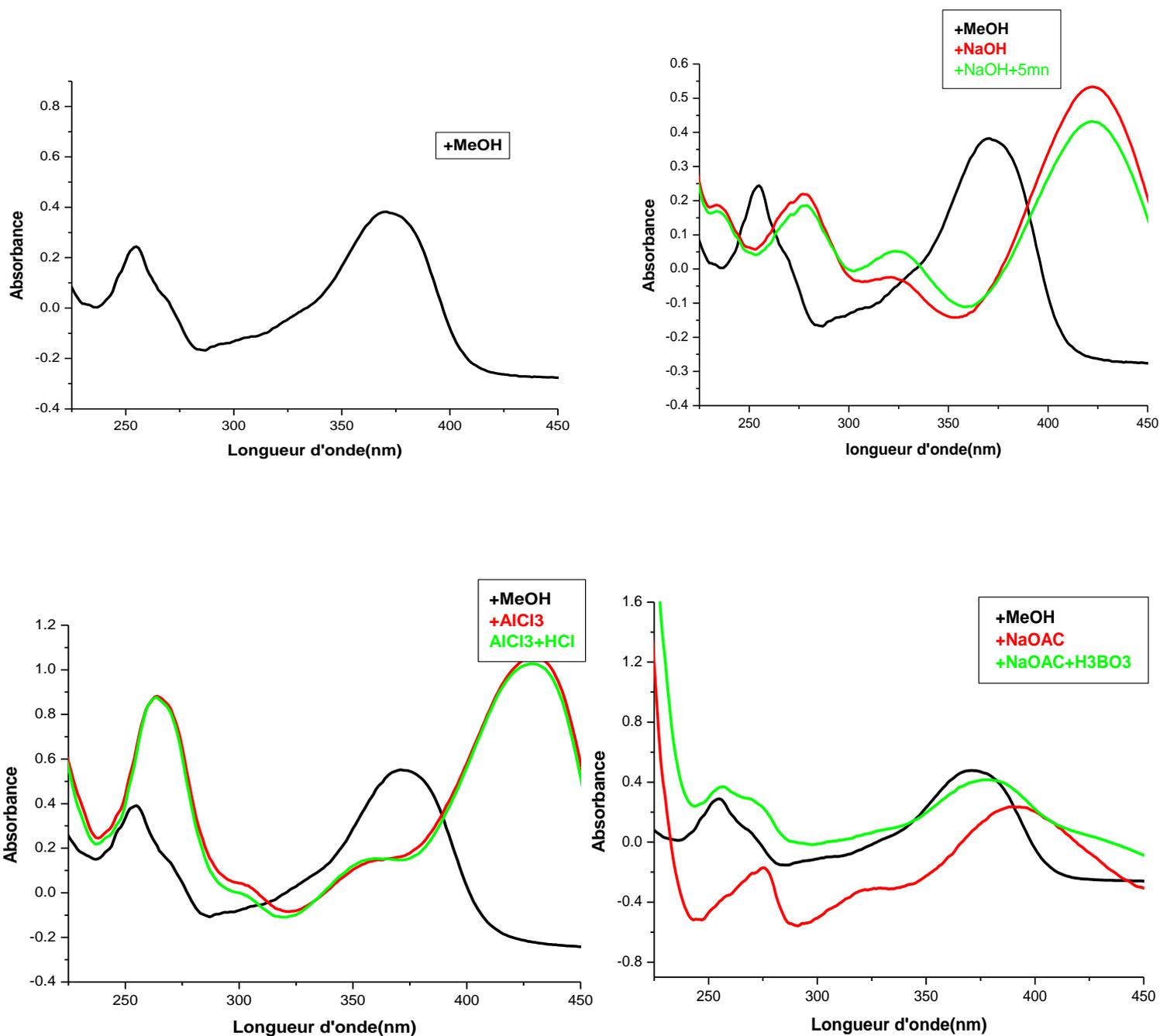
Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 57$ nm) observé dans le spectre UV enregistré dans le ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$), comparativement à celui enregistré dans le MeOH, indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 5.

L'absence de l'effet hypsochrome de la bande I dans le spectre AlCl_3/HCl par rapport au spectre AlCl_3 et l'effet bathochrome faible de la même bande dans $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ par rapport au méthanol excluent le système ortho di-hydroxyle.

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau III.9.

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Autres bandes	Observations
MeOH	371	255	-	Flavonol
NaOH	422	277		OH libre en 4' OH libre en 7
NaOH après 5 mn	423	279	321	-
NaOAc	389	275	-	OH libre en 7
NaOAc+ H_3BO_3	375	255	-	Absence de di-OH sur B
AlCl_3	429	264	-	OH libre en 5
AlCl_3+HCl	428	264	-	OH libre en 5 Absence de di-OH sur B

Tableau III.09 : Données de la série spectrale UV du composé LPF09



Spectre III.46: Série spectrale UV du composé LPF09

L'examen des spectres RMN ^1H (spectre III.47) et son étalement (spectre III.48) montrent :

Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,75$ ppm ($J = 2,5$ Hz) attribuable à H-2'.

Un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,69$ ppm ($J = 10$ Hz, $J = 2,5$ Hz) attribuable à H-6'.

Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6,94$ ppm ($J = 10,5$ Hz) attribuable à H-5'.

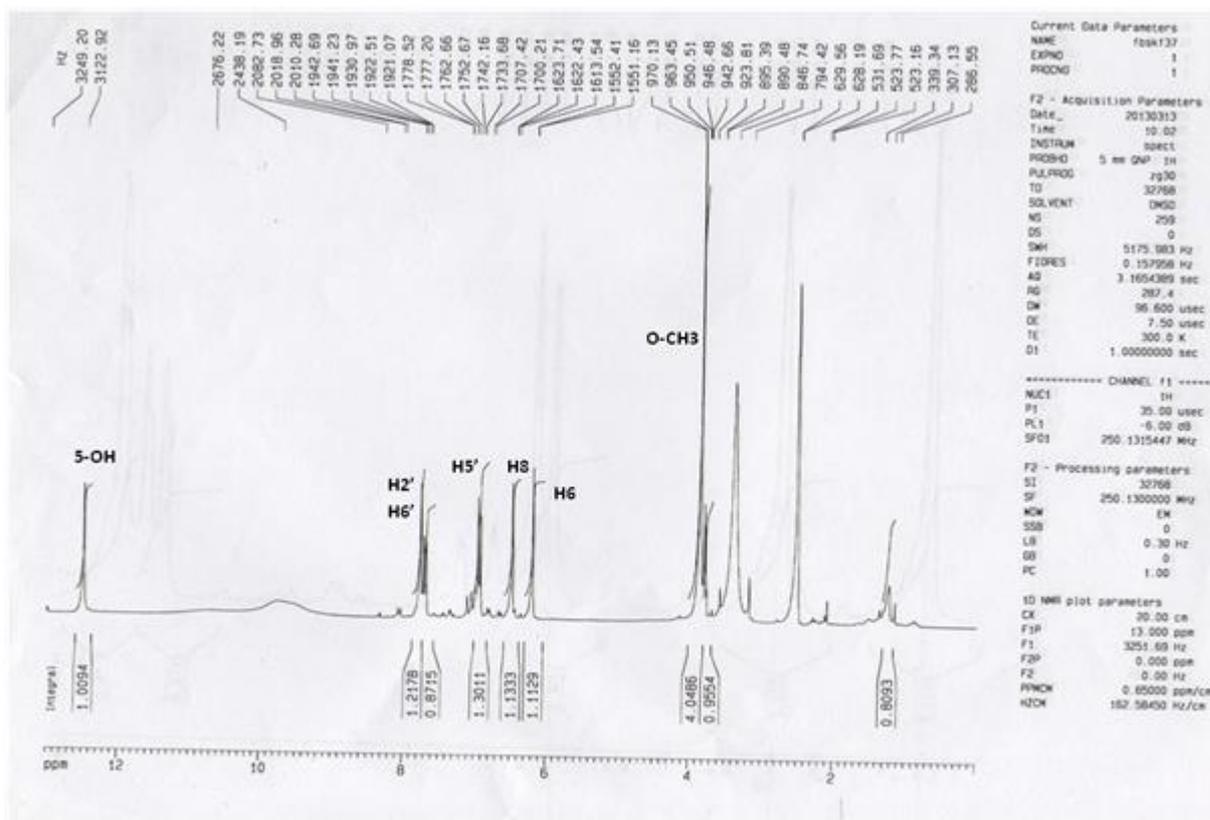
Deux doublets d'intégration 1H chacun, le premier à $\delta = 6,47$, le second à $\delta = 6,19$ ppm ($J = 2,5$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 respectivement.

Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,84$ ppm attribuable à OCH₃.

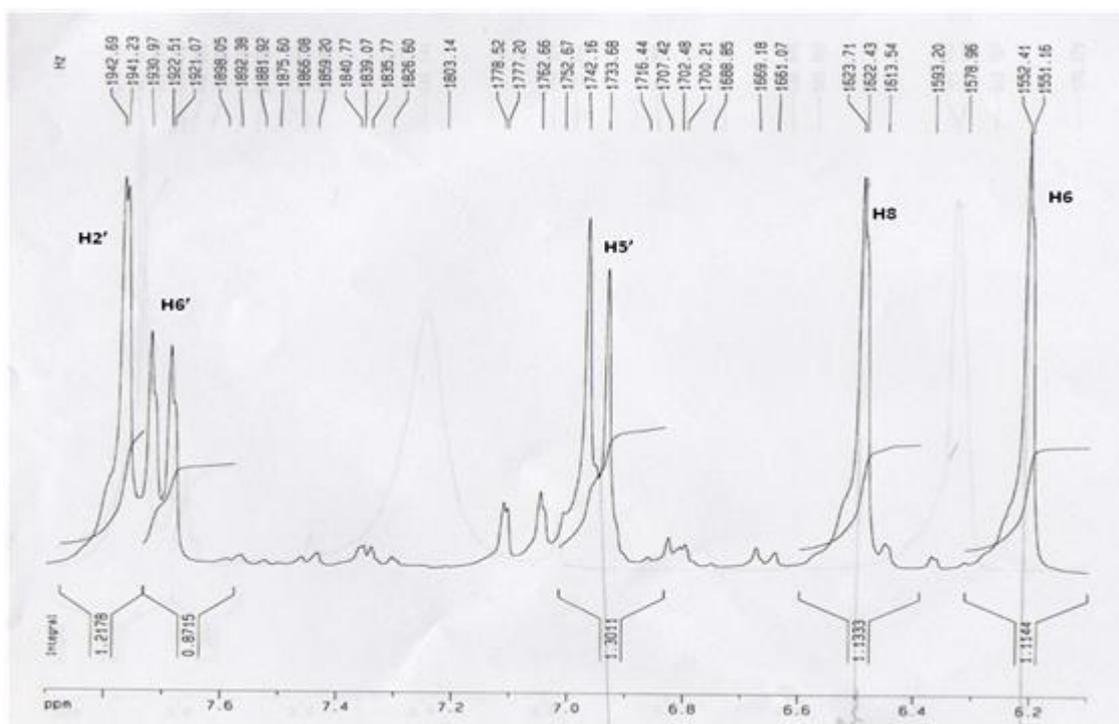
L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau suivant :

Interprétation	δ (ppm), m, J (Hz)	Intégration
OCH ₃	3,84. s	3H
H-6	6,19. d (1,25)	1H
H-8	6,47. d (1,25)	1H
H-5'	6,94. d (8,48)	1H
H-6'	7,69. dd (8,46 ; 1,5)	1H
H-2'	7,75. d (1,5)	1H

Tableau III.10: Données de la spectroscopie RMN ^1H du composé LPF09



Spectre III.47: Spectre RMN ¹H (250 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF09



Spectre III.48: Spectre RMN ¹H (250 MHz, DMSO-d₆) étalé (6,1 à 7,9) du composé LPF09

La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN ^1H et la série spectrale UV mènent à la structure suivante:

3,5,7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone ou bien **3'-méthyl quercétine**. (Figure III.19)

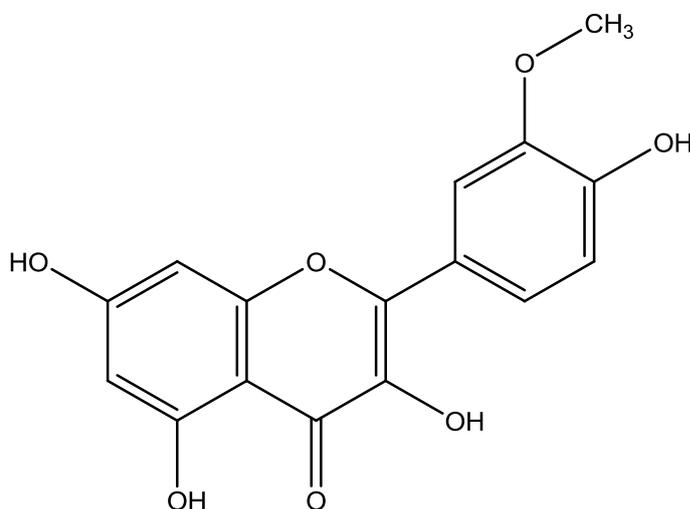
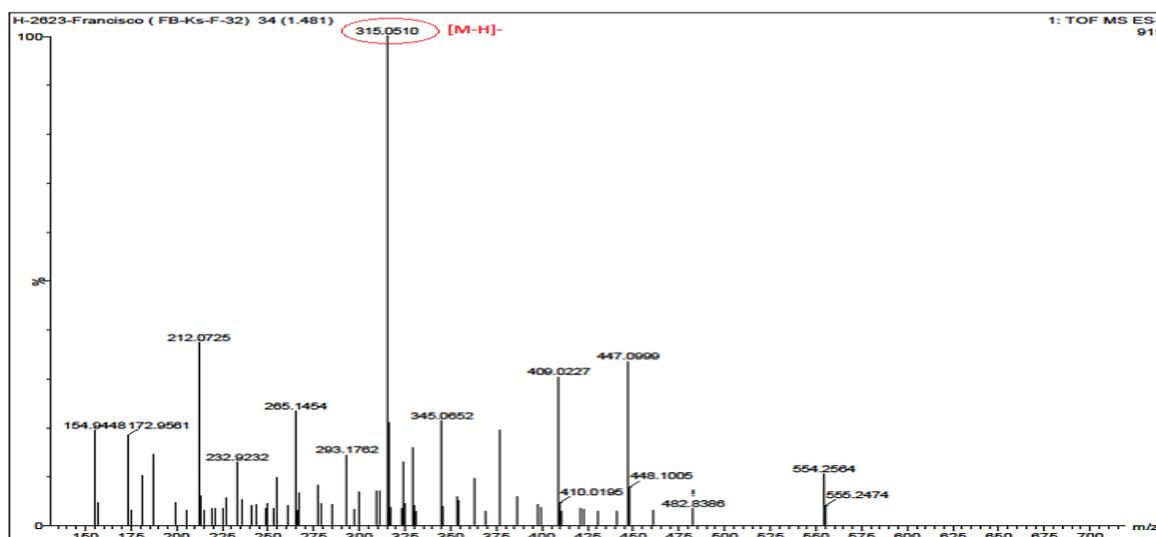
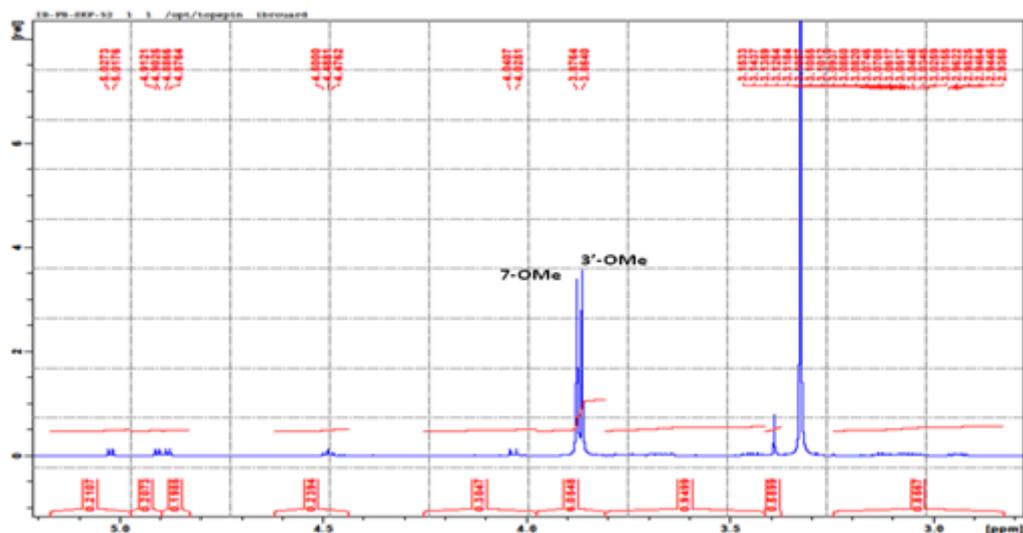


Figure III.19: la structure du **3,5,7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone**

La structure proposée est confirmée par son spectre de masse en mode d'ionisation électrospray négatif spectre (III.49) qui montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z=315$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ ceci correspondant à une masse moléculaire de 316 Da et une formule brute $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$.

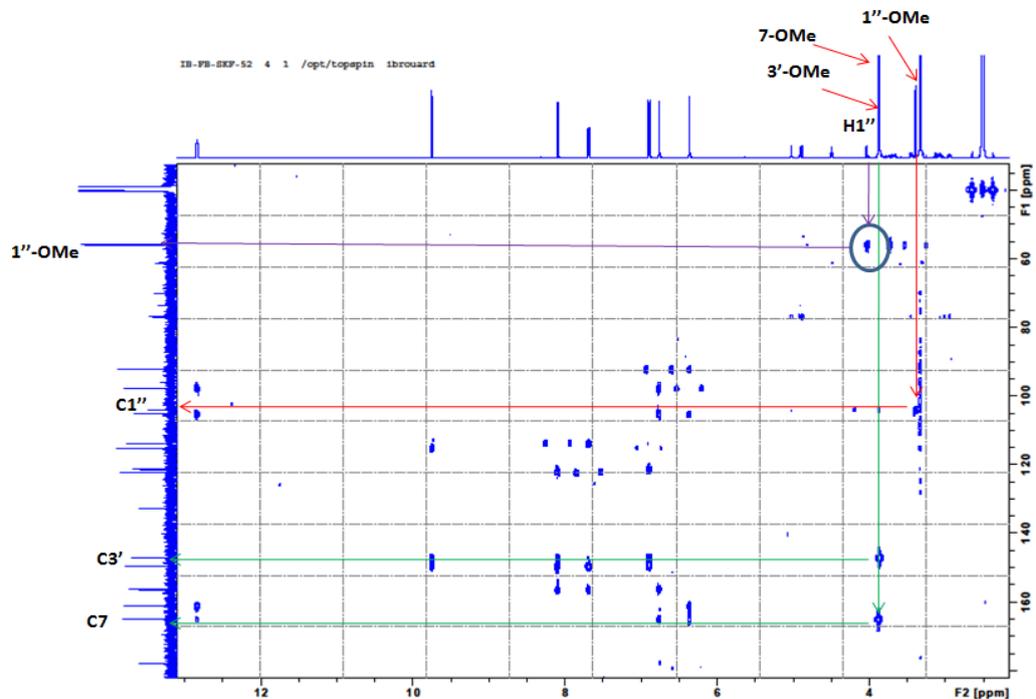


Spectre III.44: Spectre de masse (ESI-MS) du composé **LPF09**



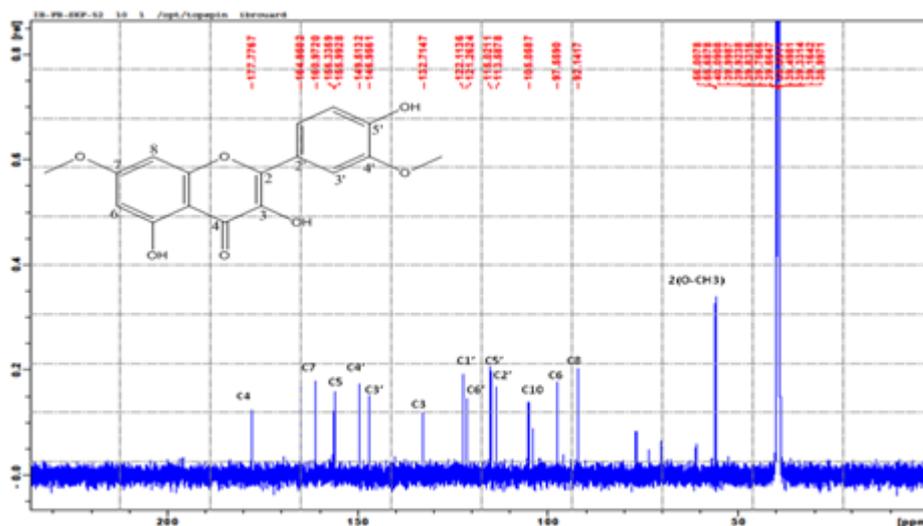
Spectre III.51: Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) du composé LPF02étalement

Selon le spectre HMBC (spectre III.52) les protons des groupements méthoxyles à $\delta = 3,87$ ppm et à $\delta = 3,86$ ppm corèlent respectivement avec les carbones à 164,90ppm (C-7) et à 147,38ppm (C3'), Cette observation permet de placer ces substituants méthoxyles en position 7 et 3'.



Spectre III.52: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO-d_6) du composé LPF02

Nous avons comparé l'ensemble des données RMN du ^1H et du ^{13}C de la génine du composé LPF02 avec celles du composé LPF06 étant en tous points identiques.

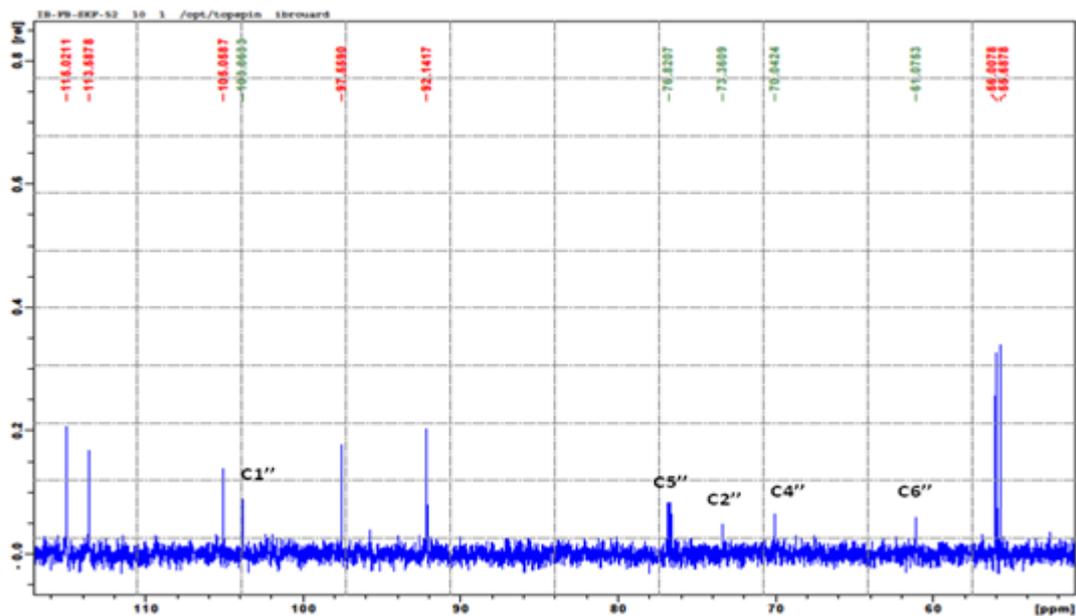


Spectre III.53: Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6) du composé LPF02

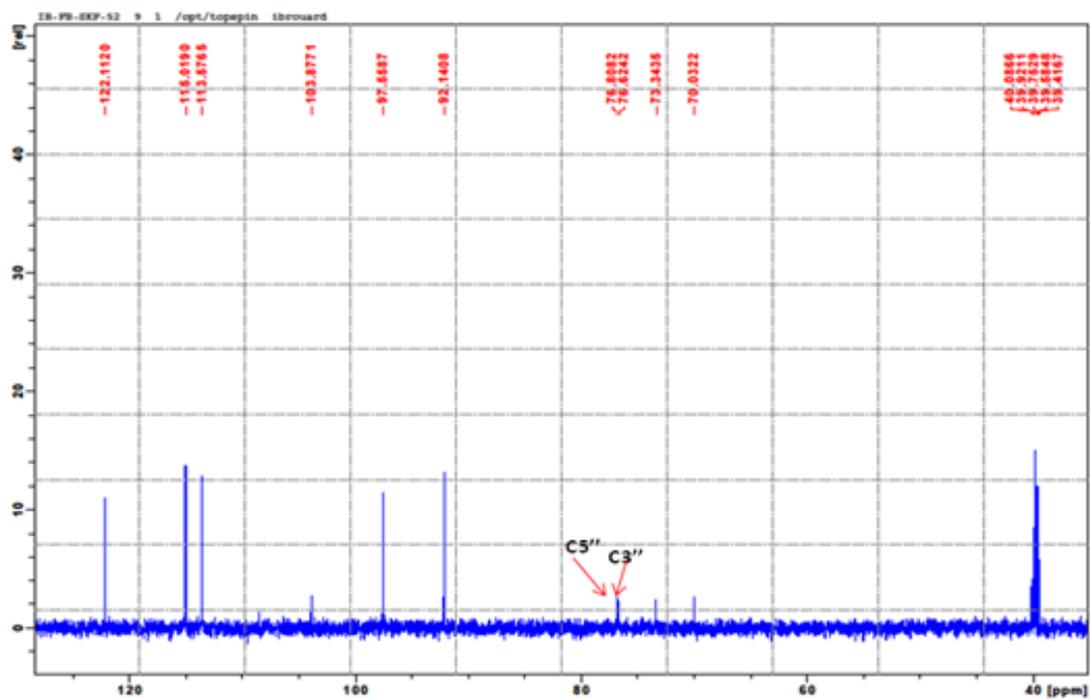
Le signal à $\delta = 4,01$ ppm en spectre RMN ^1H (spectre III.50) peut correspondre au proton anomérique du glucoside, son carbone résonne à $\delta = 103,86$ ppm. Le spectre HMBC (spectre III.52) de LPF02 nous indique que ce proton n'est corrélé à aucun carbone qui correspond à la génine, cela est confirmé que le composé LPF02 est un mélange de deux produits un flavonoïde et un ose.

Les déplacements RMN ^{13}C (spectre III.54), DEPT 90 (spectre III.55) et DEPT135 (spectre III.56) dans la région du sucre sont caractéristiques, d'un glucose (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' respectivement à $\delta = 73,36$; $76,62$; $70,4$; $76,82$ et $61,07$ ppm) dont on note la configuration β grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique ($J = 7,4$ Hz).

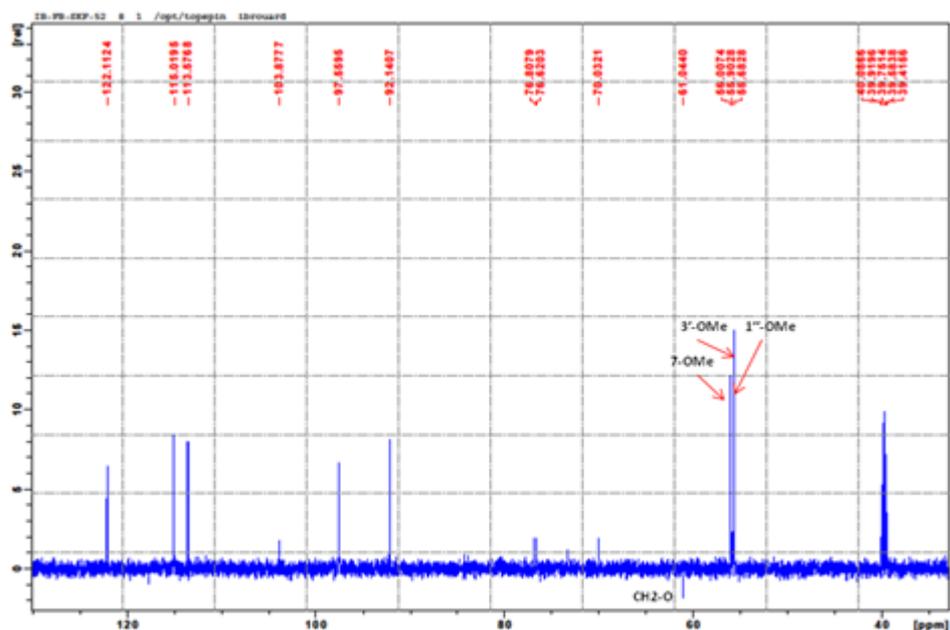
Sur le spectre HMBC, on observe la présence d'une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et un groupement méthoxyle à $\delta = 55,68$ ppm, indique la substitution de ce glucose par un groupement méthoxyle.

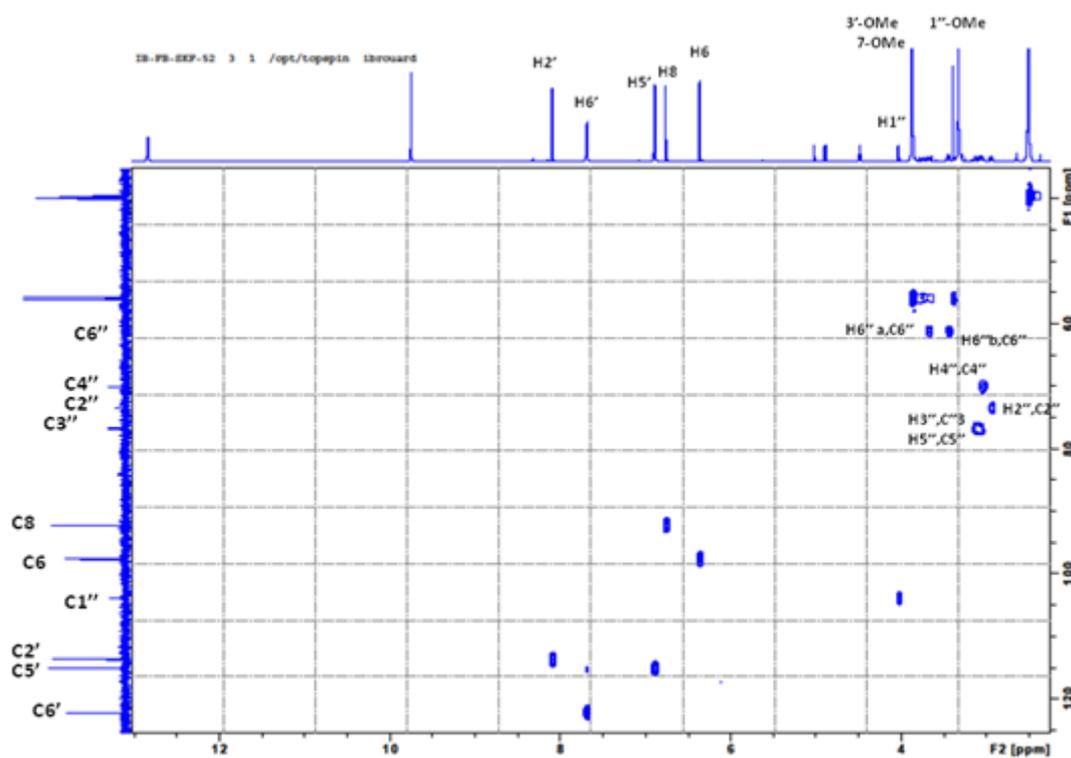


Spectre III.54: Spectre RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6) du composé LPF02étalement

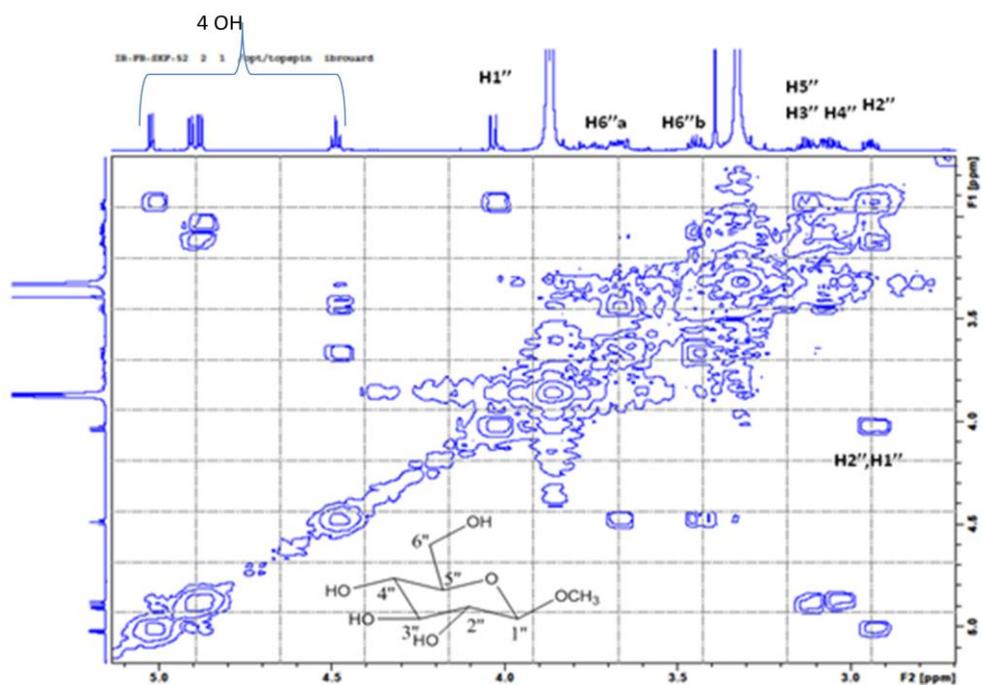


Spectre III.55: Spectre DEPT90 (125 MHz, DMSO- d_6) du composé LPF02





Spectre III.57: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF02



Spectre III.58: Spectre COSY (500 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF02 étalé (2,5-5,5ppm)

Le mélange LPF02 est constitué de deux composés un flavonoïde et un méthylglucoside .
La structure du flavonoïde est établie comme étant le 3,5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxy flavone, ce composé est strictement identique au produit LPF06 déjà décrit (page136) les données de RMN du ^1H et du ^{13}C sont reportés au tableau III.8 (Page143) .
La structure du sucre a été établie comme étant le méthyl- β -D-glucopyranoside .

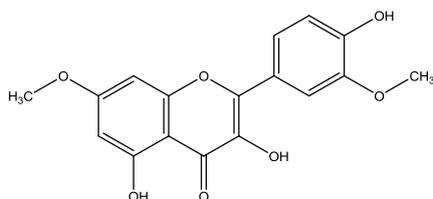


Figure III.20: structure du 3, 5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone

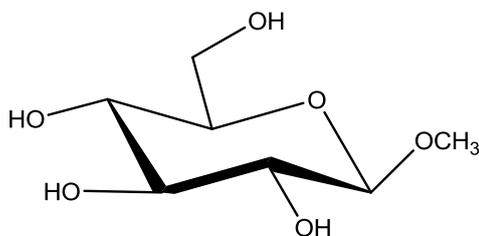


Figure III.21: structure du Méthyl- β -D-glucopyranoside

III.2.2.2. IDENTIFICATION DU COMPOSE LPF07

Sur le spectre de masse (spectre III.59) réalisé en électrospray (ESI-MS) en mode positif, on observe un ion quasi-moléculaire à m/z 217,0695 $[M+Na]^+$, ceci correspond à une masse moléculaire de 194 Da et une formule brute $C_7H_{14}O_6$ avec 1 degré d'insaturation.

Elemental Composition Report

Page 1

Multiple Mass Analysis: 4 mass(es) processed

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -20.0, max = 1000.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

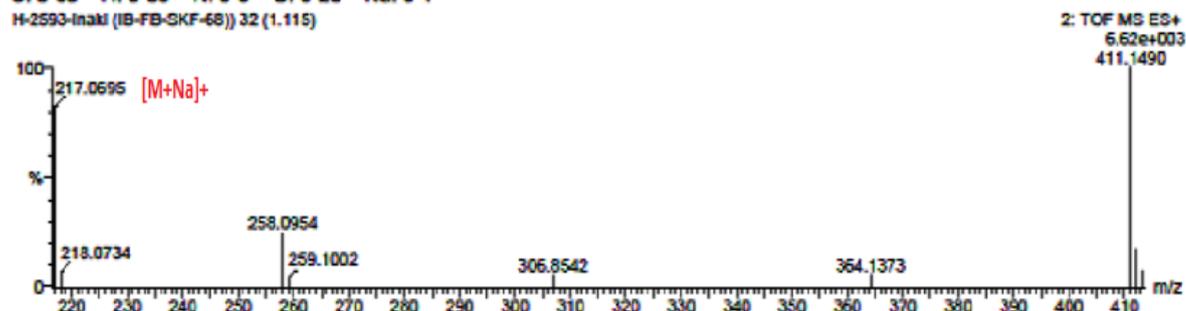
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

6118 formula(e) evaluated with 22 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 0-80 H: 0-80 N: 0-8 O: 0-20 Na: 0-1

H-2593-tnkl (IB-FB-SKF-68) 32 (1.115)



Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
217.0695	82.40	217.0701	-0.6	-2.8	5.5	16.2	C8 H10 N4 O2 Na
		217.0688	0.7	3.2	0.5	0.2	C7 H14 O6 Na
		217.0685	1.0	4.6	4.5	0.7	C5 H9 N6 O4
258.0954	24.11	258.0954	0.0	0.0	1.5	2.0	C9 H17 N O6 Na
		258.0951	0.3	1.2	5.5	2.4	C7 H12 N7 O4
411.1490	100.00	411.1492	-0.2	-0.5	5.5	7.0	C15 H24 N4 O8 Na
		411.1494	-0.4	-1.0	-8.5	319.3	H27 N8 O17

Spectre III.59: Spectre de masse du composé LPF07

Les spectres RMN ^{13}C (spectre III.60) et le DEPT135 (spectre III.61), montrent clairement la présence de 7 signaux dont 6 apparaissent entre 70 et 83 ppm et correspondent à 6 carbones méthynes. Cependant, le signal qui apparaît à 59,58 ppm est relatif à un carbone d'un groupement méthoxyle.

L'examen du spectre de RMN 1H (spectre III.62) montre:

Un singulet d'intégration 3H à $\delta = 3,45$ ppm attribuable à OCH_3 .

Un triplet à $\delta = 3,1$ ppm d'intégration 1H.

Trois multiplets d'intégration 1H chacun, à $\delta = 3,50$; 3,32 et 3,41 ppm .

Un autre multiplet d'intégration 2H, à $\delta = 3,64$ ppm .

Cinq signaux d'intégration ^1H chacun, entre 4,2 et 4,7 ppm attribués aux protons des hydroxyles libres.

A partir du spectre HSQC (spectre III.60), on peut corrélérer les carbones signalés ci-dessus résonant respectivement aux valeurs 71,92 ; 70,03 ; 72,38 ; 70,87 ; 72,55 et 83,8 ppm à travers les taches de corrélation aux protons résonants respectivement à 3,64 ; 3,50 ; 3,32 ; 3,41 ; 3,64 et 3,1 ppm.

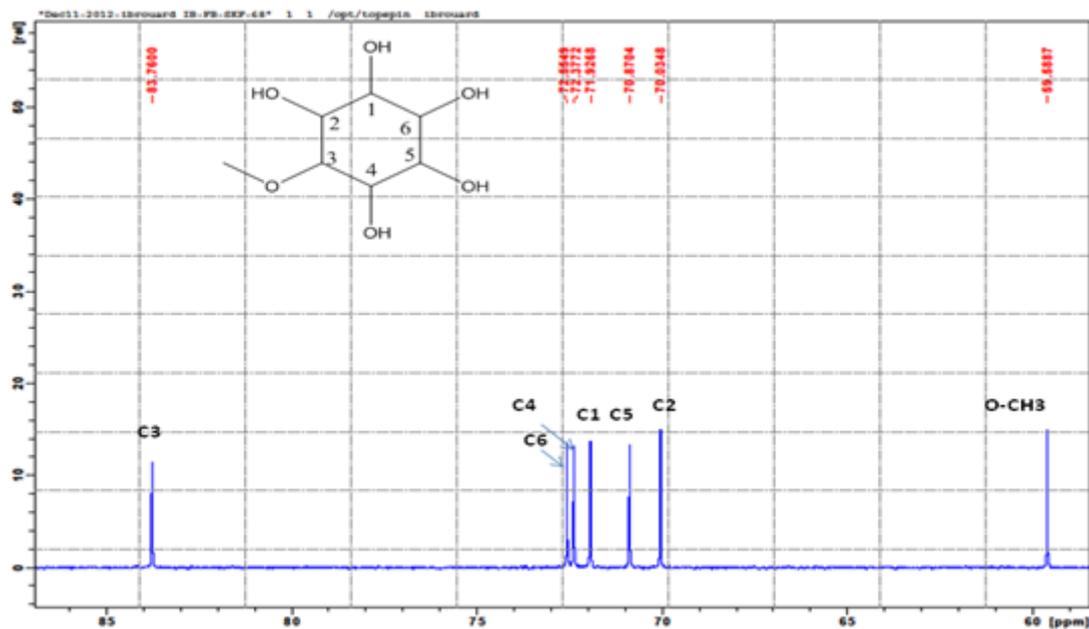
Le proton H-3 blindé à 3,1 ppm est porté par le carbone C-3 le plus déblindé résonant à 83,8 ppm car son hydroxyle est substitué par un méthoxyle. Cette déduction est confirmée par les taches de corrélation du spectre HMBC (spectre III.64) associées au carbone du méthoxyle ($\delta = 59,58$ ppm) et le proton H-3 ($\delta = 3,1$ ppm) et inversement au carbone C-3 ($\delta = 83,8$ ppm) et les protons du méthoxyle ($\delta = 3,45$ ppm).

L'attribution complète des signaux carbones et protons a été réalisée à l'aide des Spectres, HMBC et HSQC, DEPT ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [34]. La structure de ce composé est finalisée par l'analyse du spectre COSY (spectre III.65) on observe des corrélations intenses entre les protons (H-1 et H-2), (H-2 et H-3), (H-3 et H-4), (H-4 et H5), et enfin entre (H-6 et H-5).

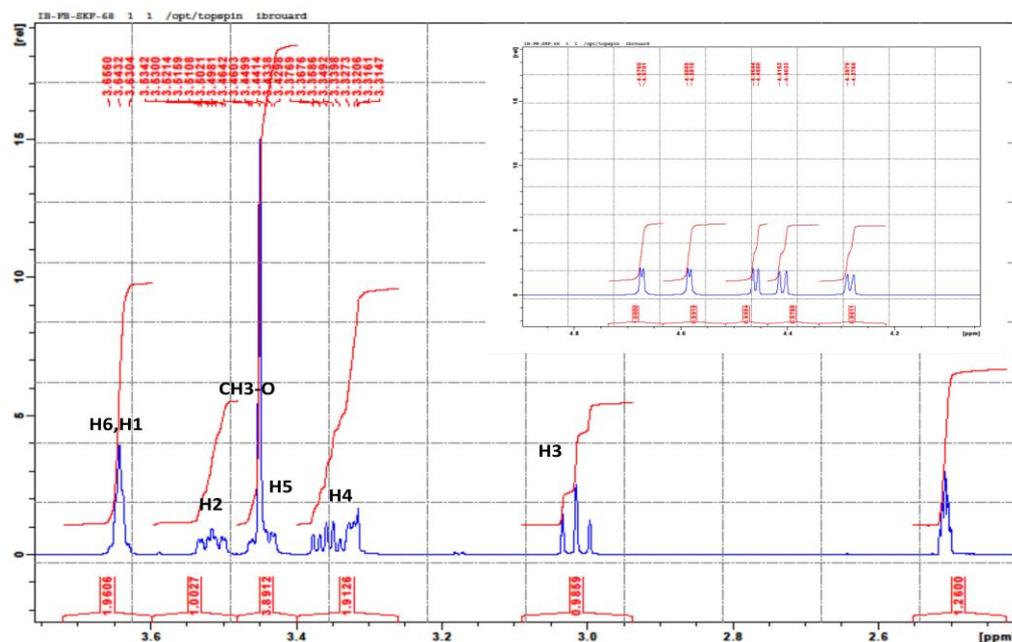
L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau suivant :

Position	δ_{H} (m) <i>J</i>	COSY	δ_{C}	HMBC
1	3,64. 1H, m	H-2, OH-1	71,92	C-3 ,C-5
2	3,50 .1H , m	H-3,H-1,OH-2	70,03	C-3
3	3, 1.1H, t (9,5)	H-4,H-2	83,8	C-1, C-2, C-4 ,O-CH ₃
4	3,32.1H, m	H-5,H-3,OH-4	72,38	C-5,C-3, O-CH ₃
5	3,41. 1H, m	H-4,H-6,OH-5	70,87	C-3
6	3, 64. 1H, m	H-5,OH-6	72,55	C-4,C-2,
OCH3	3, 45. 3H, s		59,58	C-3, C-4
OH-1	4, 58. sl	H-1		C-6, C-2
OH-2	4, 40. d	H-2		C-1, C-2, C-3
OH-4	4, 46. d	H-4		C-3, C-4, C-5
OH-5	4, 27. d	H-5		C-5
OH-6	4, 67. sl	H-6		C-1, C-5

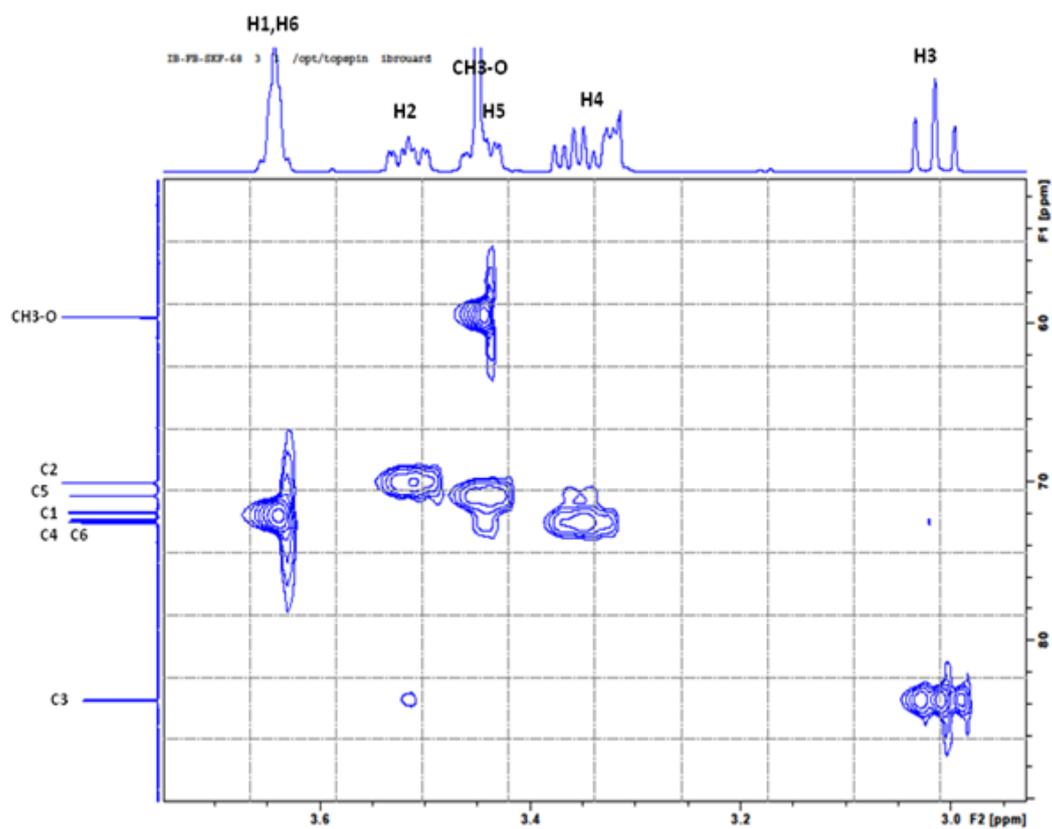
Tableau III.12: Données spectrales RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT et HMBC du composé LPF07



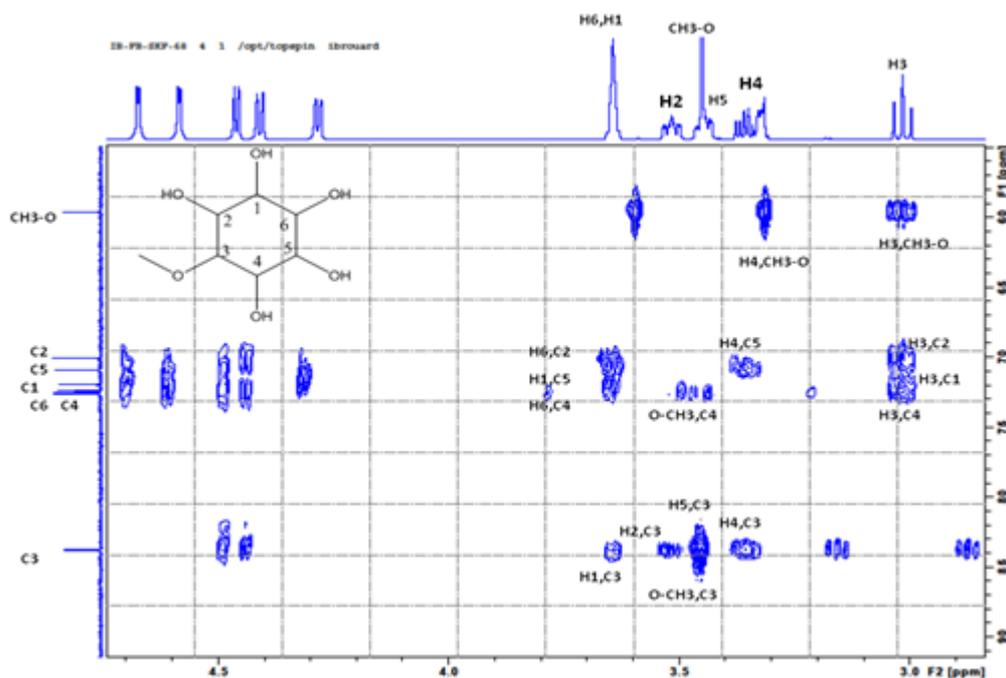
Spectre III.61: Spectre DEP T135 (125 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF07



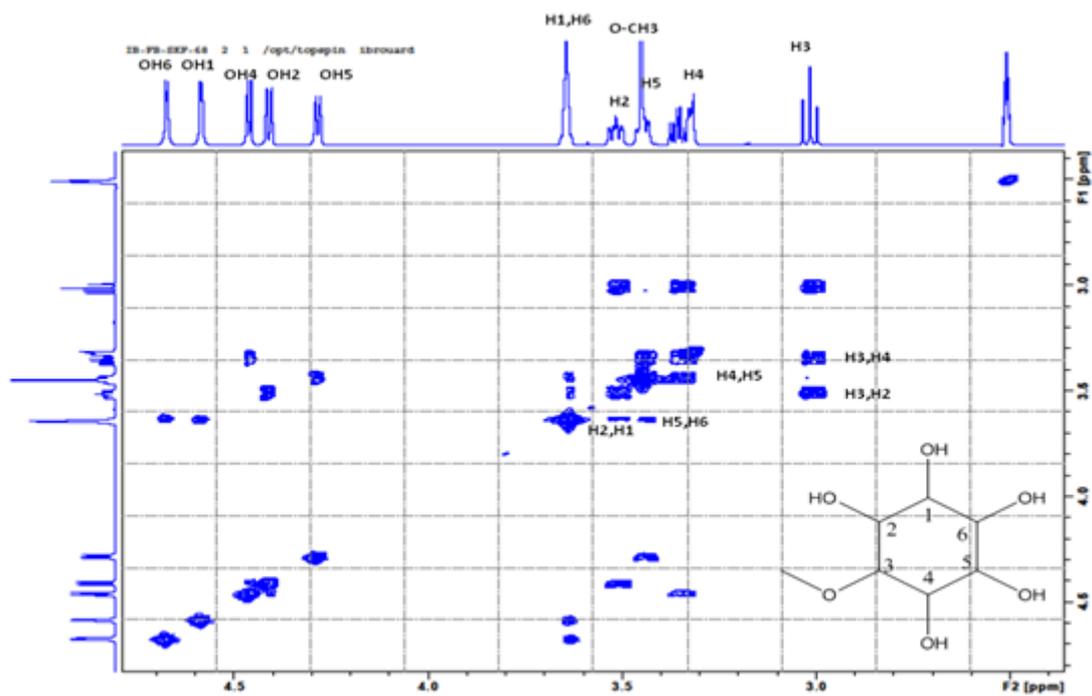
Spectre III.62: Spectre ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF07



Spectre III.63: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF07



Spectre III.64: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) du composé LPF07

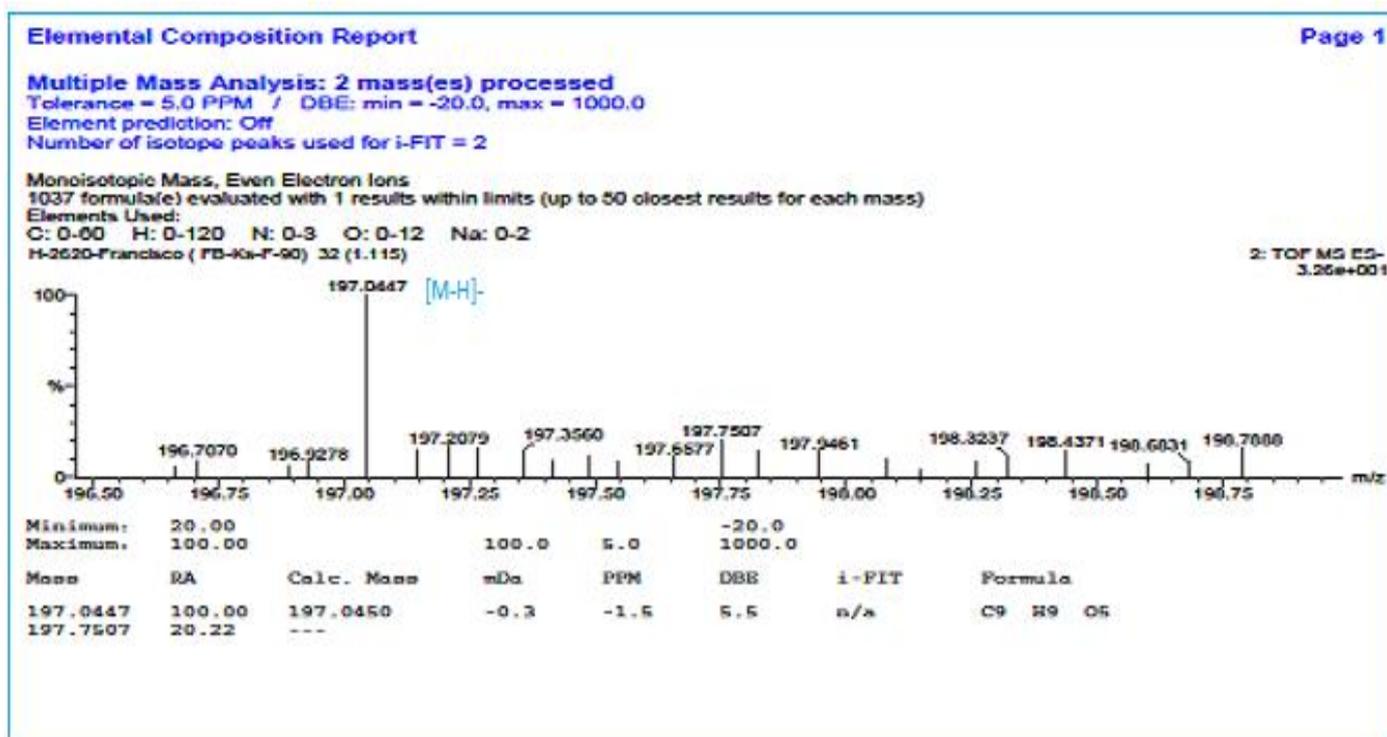


Spectre III.65: Spectre COSY (500 MHz, DMSO-d6) du composé LPF07

III.2.2.3. IDENTIFICATION DU COMPOSE LPF25

La détermination de la structure du composé LPF25 a été effectuée sur la base des spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C avec sa séquence DEPT135, la RMN bidimensionnelle homonucléaire et hétéronucléaire COSY, HMBC, et la spectroscopie de masse ESI.

Le spectre de masse (ESI-MS) du composé LPF25 montre en mode négatif un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 197,044 $[\text{M}-\text{H}]^-$, ceci correspond à une masse moléculaire de 198 Da et une formule brute $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$ avec 5 degrés d'insaturation.



Spectre III.66: Spectre de masse (ESI-MS) du composé LPF25

L'analyse du spectre RMN ^1H (spectre III.67) indique la présence de deux protons aromatiques couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à $\delta = 7,25$ et $7,59$ ppm ($J = 2$ Hz) typiques d'un couplage méta sur un cycle aromatique, ces protons sont respectivement attribués à H-6, H-2.

On y distingue également un singulet à $\delta = 3,81$ ppm d'intégration 6H attribuables à deux groupements méthoxyles.

L'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (spectre III.68) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants.

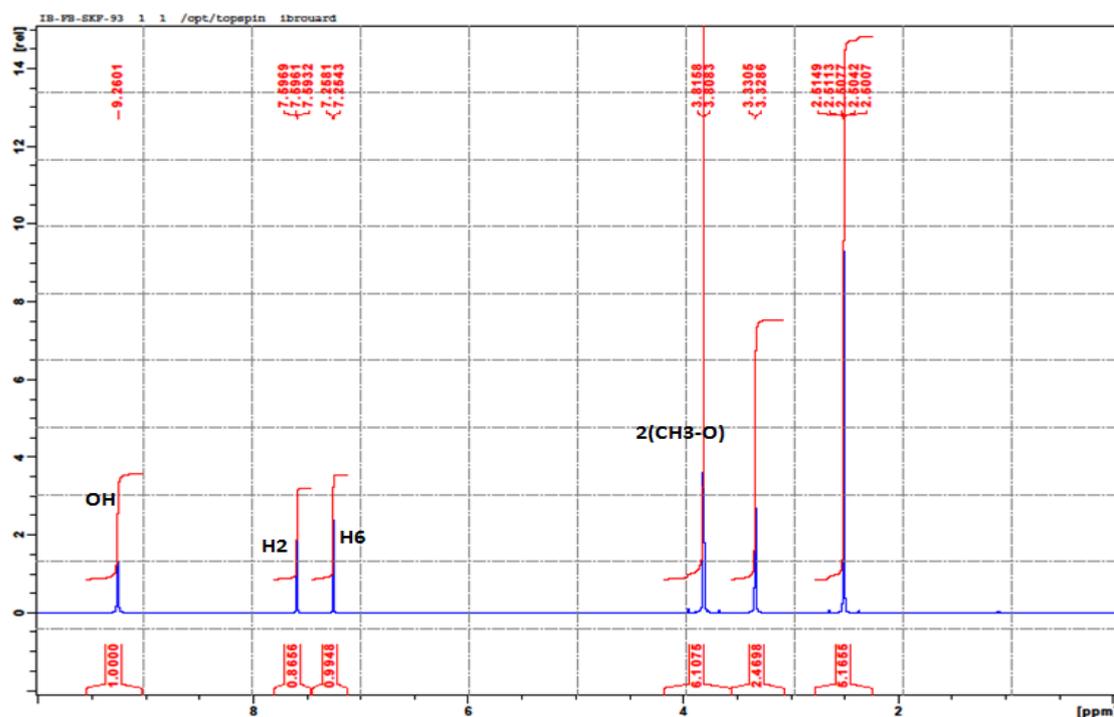
Le spectre RMN ^{13}C (spectre III.69), DEPT 135(spectre III.70) et DEPT90 (spectre III.71) montrent la présence de neuf atomes de carbone :

Deux groupements CH éthylènes aromatiques ($\delta = 108,26$; $116,69$ ppm)

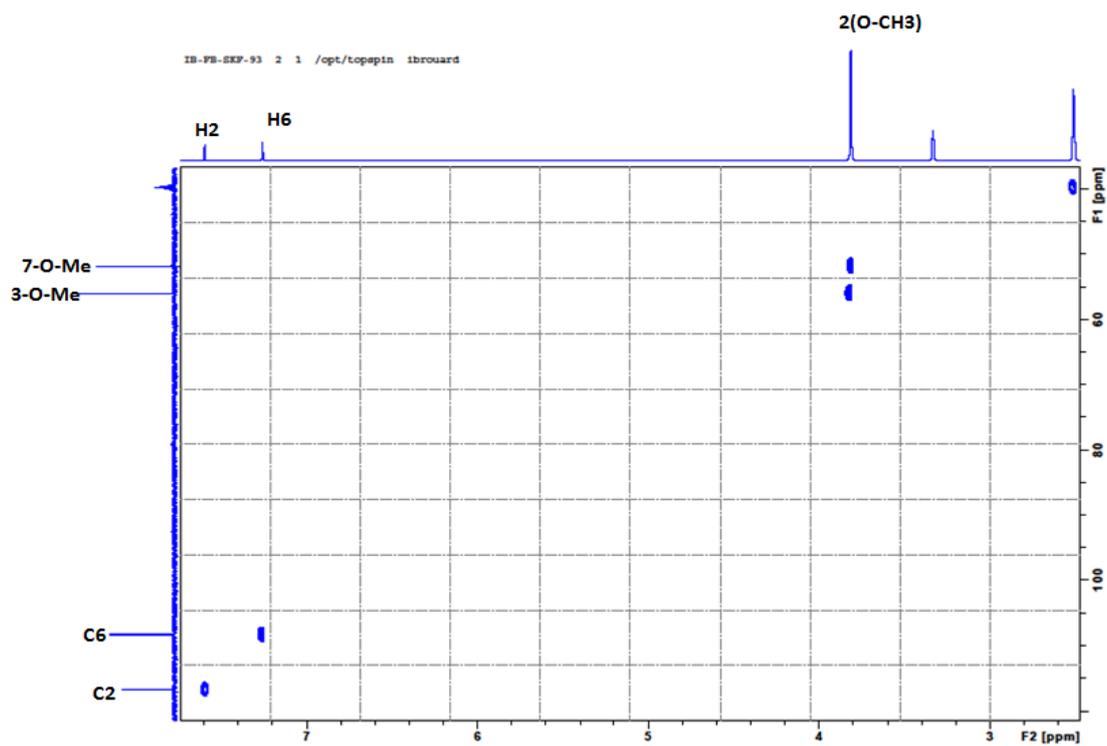
Une fonction carboxylique conjuguée à $\delta = 165,93$ ppm.

Quatre carbones quaternaires sp^2 dont trois oxygénés à $140,96$; $143,42$ et $148,39$ ppm. appartenant au noyau aromatique.

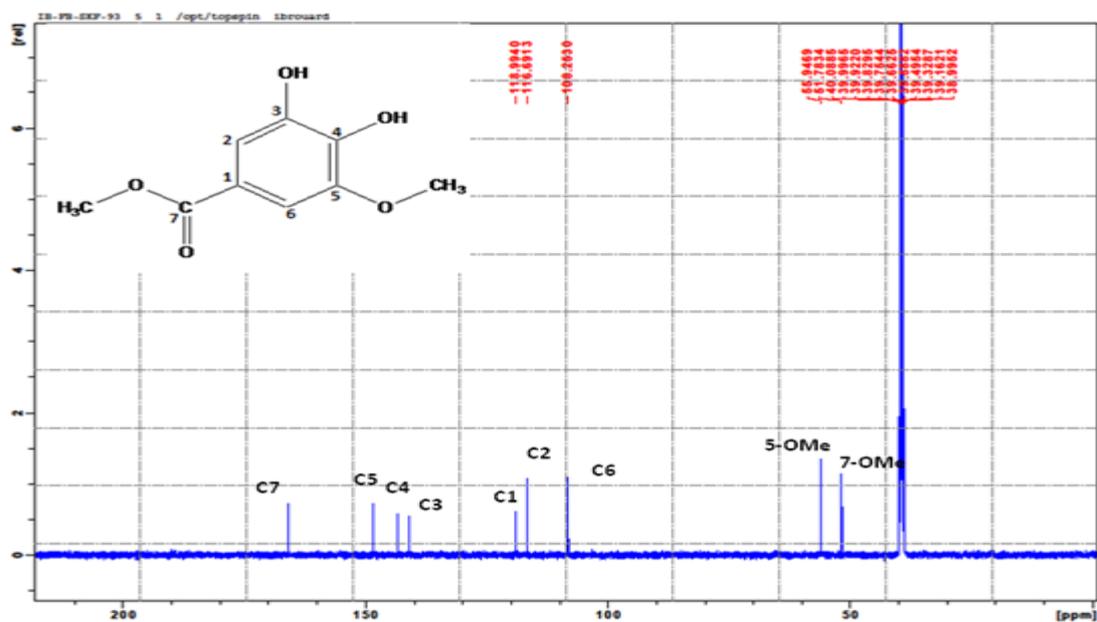
Deux groupements méthoxyles à $\delta = 51,78$ et $55,95$ ppm.



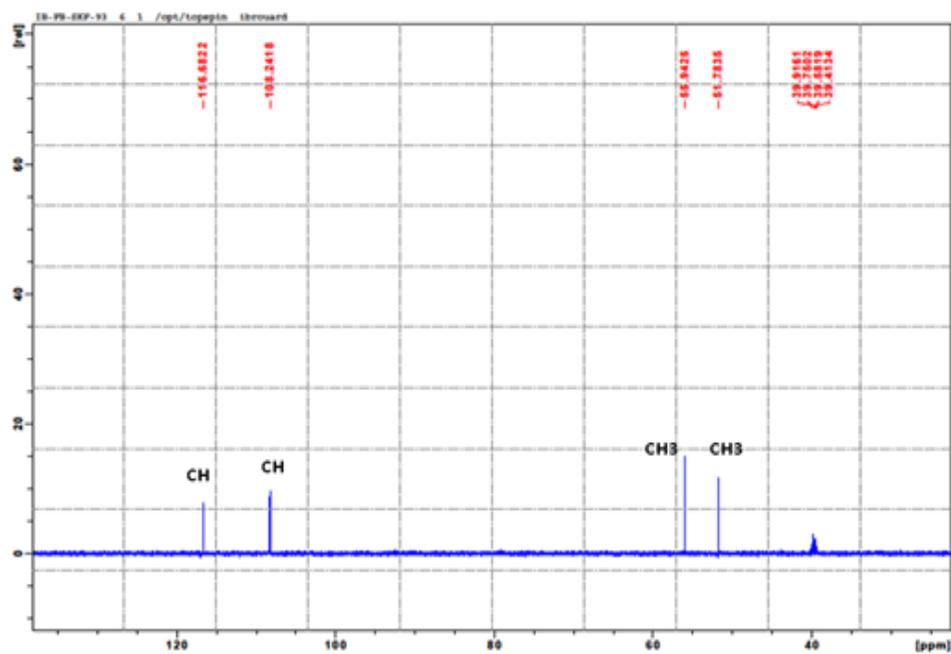
Spectre III.67: Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé LPF25



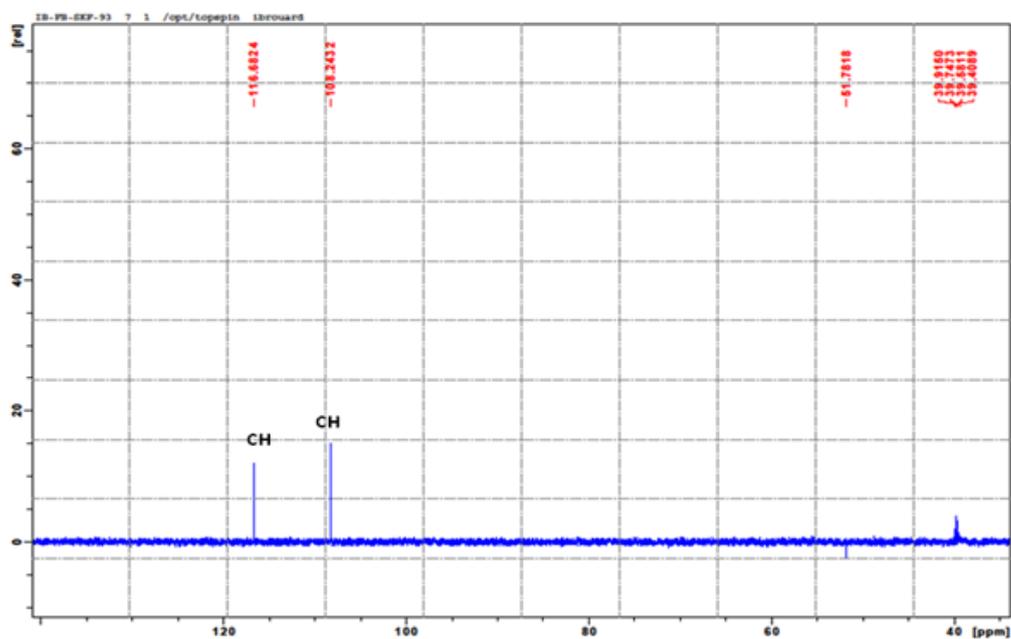
Spectre III.68: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO) du composé LPF25



Spectre III.69: Spectre RMN ^{13}C (500MHz, DMSO- d_6) du composé LPF25

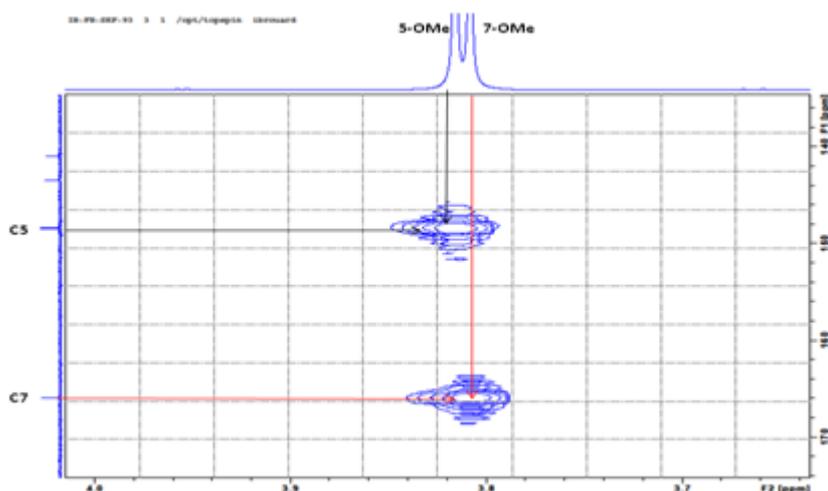


Spectre III.70: Spectre DEPT135 (125MHz, DMSO-d₆) du composé LPF25

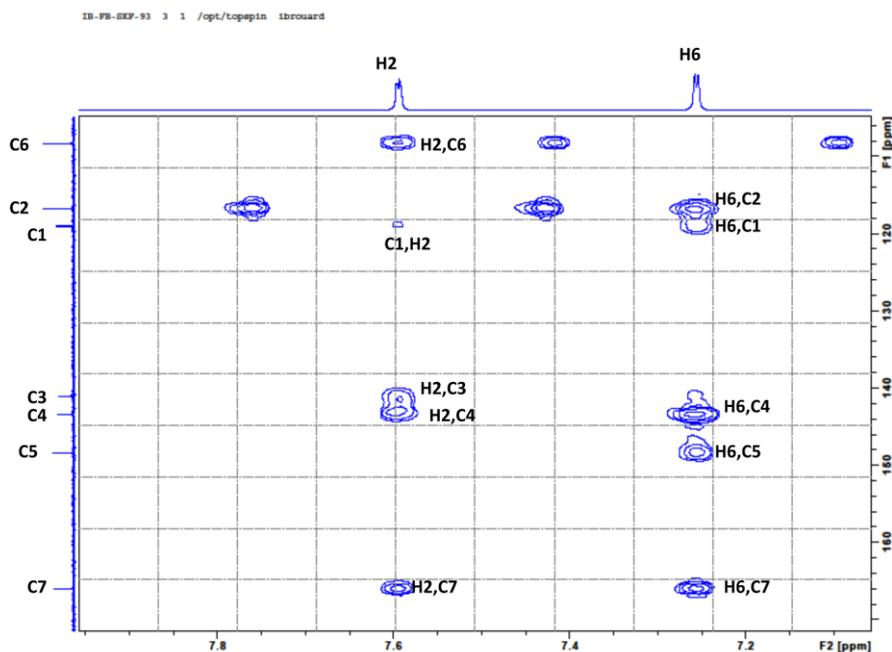


Spectre III.71: Spectre DEPT90 (125MHz, DMSO-d₆) du composé LPF25

Dans le spectre HMBC (spectre III.72) les protons des deux groupes méthoxyles à $\delta=3,81\text{ppm}$ sont fortement corrélés avec les carbones à $165,93\text{ppm}$ (C-7) et $148,39\text{ppm}$ (C-5), cette observation permet de placer les substituants méthoxyles en position 7 et 5.



Spectre III.72: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) étalé (3,4 à 4,02) du composé LPF25



Spectre III.73: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) du composé LPF25

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau suivant :

Position	δ_H (ppm), m, J (Hz)	δ_C (ppm)	HMBC
1		119	
2	7, 59. d (2)	116,69	C-1, C-6, C-3, C-4, C-7
3	-	140,96	-
4	-	143,42	-
5	-	148,39	-
6	7,25. d (2)	108,26	C-2, C-1, C-5, C-4, C-7
7	-	165,93	-
(7)O-CH3	3,81. s	51,78	C-7
(5)O-CH3	3,81. s	55,95	C-3

Tableau III.13: Données spectrales RMN 1H , RMN ^{13}C , et HMBC du composé LPF25

Toutes ces données rassemblées permettent d'écrire la structure finale de cette molécule :

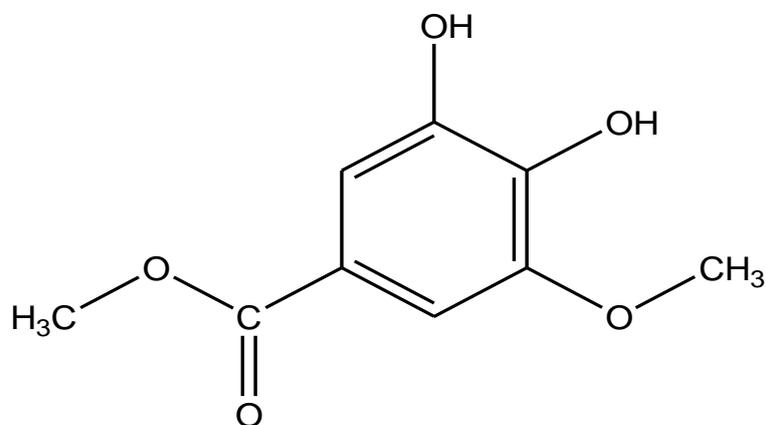


Figure III.23: La structure de 3,4-dihydroxy-5-méthoxybenzoate de méthyle

III. 3. Conclusion

L'étude phytochimique de *C.segetum* à partir d'un extrait chloroforme des parties aériennes, a fourni sept molécules de structure variable: trois polyacétylènes, un flavonoïde, deux Stéroïdes et un ester aromatique, six d'entre eux ont été décrits pour la première fois de cette espèce.

L'analyse des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *C.segetum* par HPLC-DAD et UHPLC- ESI-MS montre que ces extraits sont riches en composés phénoliques et la plupart de ces composés sont des flavonoïdes et des coumarines.

L'investigation phytochimique sur l'espèce *L.pruinosum* a produit cinq composés : deux flavonoïdes, un ester aromatique, un cyclitol et un méthylglucoside. Ces composés sont isolés pour la première fois dans cette espèce.

Cette étude nous a permis de mieux connaître la phytochimie des deux espèces étudiées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- [1] Bohlmann F., Herbst P., Dohrmann I., 1963, Polyacetylenverbindungen, XLIV. Über neue Acetylenverbindungen aus der Gattung *Chrysanthemum* L. Chemische Berichte, 96, 226-236.
- [2] Bohlmann F., Arndt C., Bornowski H., Kleine K M., Herbst P., 1964, Polyacetylenverbindungen, LVI. Neue Acetylenverbindungen aus *Chrysanthemum*-Arten. Chemische Berichte, 97, 1179-1192.
- [3] Layzon A L S., Flávio H R., Larissa G F., Maiquew B., 2015, Phytochemical analysis of *Vernonanthura tweedieana* and a validated UPLC-PDA method for the quantification of eriodictyol. Revista Brasileira de Farmacognosia, 25(4):375-381.
- [4] Casu L., Bonsignore L., Pinna M., Casu M., Floris C., Gertsch J., Cottiglia F., 2006, Cytotoxic diacetylenic spiroketal enol ethers from *Plagius flosculosus*. Journal of Natural Products, 69(2):295-8.
- [5] Youssef D., Frahm A W., 1994, Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; Chlorinated Guaianolides of the Aerial Parts. planta medica, 60(3):267-71.
- [6] Ahmed A A., Gati T., Hussein T., Ali A T., Tzakou O A., Couladis M A., Mabry J T., Toth G., 2003, Ligustolide A and B, two novel sesquiterpenes with rare skeletons and three 1,10-seco-Guaianolide derivatives from *Achilla ligustica*. tetrahedron, 59(21):3729-3735.
- [7] Gribble G W., 1996, In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Hertz W.; Kirby G W.; Moore R E.; Steglich W.; Tamm C., Eds, Springer-Verlag: Vienna, Volume 63, 3-42.
- [8] Wrang P A., Lam J., 1975, Polyacetylenes from *Chrysanthemum leucanthemum*. Phytochemistry, 14(14):1027-1035.
- [9] Mofiz Uddin Khan N M., Sagar Hossain M D., 2015, Scopoletin and β -sitosterol glucoside from roots of *Ipomoea digitata*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 4(2): 05-07.

- [10] Lim T k., 2013, Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants, Volume 7, Springer Science & Business Media, 1102.
- [11] Nianyun Y., Ainong R., Wanchun H., Shihui Q., Jin'ao D., Lijuan T., 2005, Chemical constituents of *Dendranthema nankingense*. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 36(5):402-404.
- [12] Yaohua G., Minjian Q., 2006, Chemical constituents of *Dendranthema morifolium* Ramat. *Zhongcaoyao*, 37(12):1784-1786.
- [13] Song M Ch., Kim D H., Hong Y H., Baek N I., 2005, Polyacetylenes and Sterols from the Aerial Parts of *Chrysanthemum coronarium* L.(Garland). *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 1(1):163-168.
- [14] Abu-Eittah R H., El-Tawil B A H.,1985, The electronic absorption spectra of some coumarins. A molecular orbital treatment. *Canadian Journal of Chemistry*, 63,1173.
- [15] Talapatra S K., Talapatra B., 2015, Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology and Medicine. springer, 1180.
- [16] Andersen, O M., Markham K R., 2005, Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC, Press, 1256.
- [17] Beninger C W., Abou-Zaid M M., Kistner A L., Hallett R H., Iqbal M J., Grodzinski B., Hall J C., 2004, Flavanone and Two Phenolic Acids from *Chrysanthemum morifolium* with Phytotoxic and Insect Growth Regulating Activity. *journal of Chemical Ecology*, 30(3):589-606.
- [18] Chen L., Kotani A., Kusu F., Wang Z., Zhu J., Hakamata H., 2015, Quantitative Comparison of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in *Chrysanthemum morifolium* Flowers and Their Sulfur-Fumigated Products by Three-Channel Liquid Chromatography with Electrochemical Detection Liangmian. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63(1):25–32.
- [19] Nguyen M T., Awale S., Tezuka Y., Ueda J Y., Tran Q l., Kadota S., 2006, Xanthine oxidase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum sinense*. *Planta Medica*, 72(1):46-51.
- [20] Pukalskas A., Venskutonis P R., Dijkgraaf I., Van Beek T A., 2010, Isolation, identification and activity of natural antioxidants from costmary (*Chrysanthemum balsamita*) cultivated in Lithuania. *Food Chemistry*, 122(3):804-811.

- [21] Geissman A., Steelink C., 1957, Flavonoid Petal Constituents of *Chrysanthemum segetum* L. Journal of Organic Chemistry, 22 (8):946-948.
- [22] 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, 709(1):197-202.
- [23] Öksüz S., Wagner H., 1982, Coumarins From *Chrysanthemum segetum*. Journal of Natural Products, 45(3): 374-374.
- [24] Harborne J B., Heywood V H., Saleh N A M., 1970, Chemosystematics of the compositae: flavonoid patterns in the *Chrysanthemum* complex of the tribe anthemideae. Phytochemistry, (9):2011-2017.
- [25] Ibrahim L F., El-Senousy W M., Hawas U W, 2007, NMR spectral analysis of flavonoids from *Chrysanthemum coronarium*. Chemistry of Natural Compounds, 43:(6) 659-662.
- [26] Abraham H H., 1989, Handbook of Flowering, Volume 6, CRC Press, 196.
- [27] Li-guo W., Wei L., Ming-xia W., 2012, Content Determination of Chlorogenic Acid, 3,4-O-Dicaffeoylquinic Acid, 3,5-O-Dicaffeoylquinic Acid in *Chrysanthemi Indici Flos* of Different Areas. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 20.
- [28] Chen L., Kotani A., Kusu F., Wang Z., Zhu J., Hakamata H., 2015, Quantitative Comparison of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in *Chrysanthemum morifolium* Flowers and Their Sulfur-Fumigated Products by Three-Channel Liquid Chromatography with Electrochemical Detection Liangmian. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 63(1):25-32.
- [29] Lin L Z., Harnly J M., 2010, Identification of the phenolic components of *Chrysanthemum* flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). Food Chemistry, 120(1): 319-326.
- [30] Valant V K M., Wollenweber E., Faure R., Gaydou E., 2003, New exudates flavonoids of species from the *Chrysanthemum* complex (Asteraceae-Anthemideae). Biochemical Systematics and Ecology, 31(5):545-548.
- [31] Anyos T., Steelink C., 1960, Fluorescent petal constituents of *Chrysanthemum coronarium* L. Archives of Biochemistry and Biophysics, 90(1):63-67.

[32] Bohm B A., Stuessy T F., 2013, Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). Springer Science & Business Media, 840.

[33] Hu C Q., Chen K., Shi Q., 1994, Anti-aids agents. 10. Acacetin-7-O- β -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and structure activity correlation with some related flavonoids. Journal of Natural Products, 57(1):42-51.

[34] Blanco N., Flores Y., Almanza G R., 2008, Secondary metabolites from *Senna versicolor*. Revista Boliviana de Quimica, 25(1):36-42.

CHAPITRE IV

ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

IV.1. Introduction

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées à diverses activités biologiques. Plusieurs études ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturels à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend d'un certain nombre de paramètres la dose, la structure et les substituants de la molécule. Dans la présente étude, nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Limonium pruinosum* et des flavonoïdes qui ont été préalablement isolés à partir de cet extrait ainsi que les trois extraits organiques de la plante *Chrysanthemum segetum*.

IV.2. Stress oxydatif et Radicaux libres

IV.2.1. Définition du stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables induisant un vieillissement des protéines une peroxydation lipidique et un endommagement de l'ADN [1].

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ROS (espèces réactives de l'oxygène), suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de ROS, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydantes [2].

IV.2.2. Définition des Radicaux libres

Par définition un radical libre est un composé possédant un électron célibataire. Dans une molécule les doublets électroniques sont localisés dans des orbitales liantes, non liantes ou anti-liantes. L'orbitale d'un électron célibataire peut, de même, être liante, non liante ou anti-liante, et ceci a des conséquences sur les propriétés chimiques et structurales du radical libre. Un radical libre est le plus souvent instable, donc réactif et sa durée de vie est très courte (de l'ordre d'une micro à nano-seconde).

IV.2.3. Définition des espèces réactives oxygénées (ROS)

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet, des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons UV, des radiations ionisantes et des métaux de transition. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont:

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyl ($\bullet OH$), mais aussi les radicaux oxyl ($RO\bullet$), peroxy ($ROO\bullet$) et le monoxyde d'azote ($NO\bullet$).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) incluent aussi des espèces non radicalaires, notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxygène singulet (1O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'ozone (O_3) et le peroxydinitrite ($ONOO\bullet$) [3, 4].

IV.3. Les antioxydants

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études, car en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé.

La défense antioxydante est composée d'antioxydants endogènes, qui sont synthétisés par le corps [5], et d'antioxydants exogènes, obtenue à partir de l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamine C, vitamine E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion et acide lipoïque [6]. Les systèmes de défense contre les dommages induits par ROS (Radicaux libres oxygénés) sont classés dans trois catégories : Les antioxydants préventifs qui suppriment la formation de radicaux libre, les antioxydants piègeurs de radicaux, qui inhibent ou empêchent le déclenchement des réactions en chaîne et arrêtent la propagation et les antioxydants impliqués dans des processus de réparation.

IV.4. Définition d'un antioxydant

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques, il est défini par HALLIWELL comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » [7].

C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres.

IV.5. Les antioxydants naturels

La recherche d'extraits végétaux riches en molécules à fort pouvoir antioxydant et la mesure de l'activité antioxydante dans différents milieux restent des domaines de recherche importants.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la

plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxy phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes.

IV .5.1.La vitamine C (acide ascorbique) :

La vitamine C ou acide L-ascorbique est une molécule soluble dans l'eau. Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères tels que l'homme. C'est une molécule antioxydante capable de réagir directement avec tous les ROS réduisant ainsi la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN. La vitamine C a également un pouvoir antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E, d'un autre côté, la vitamine C permet le recyclage de Fe^{3+} en Fe^{2+} favorisant ainsi la réaction de Fenton et a donc de manière indirecte une action pro-oxydante [8].

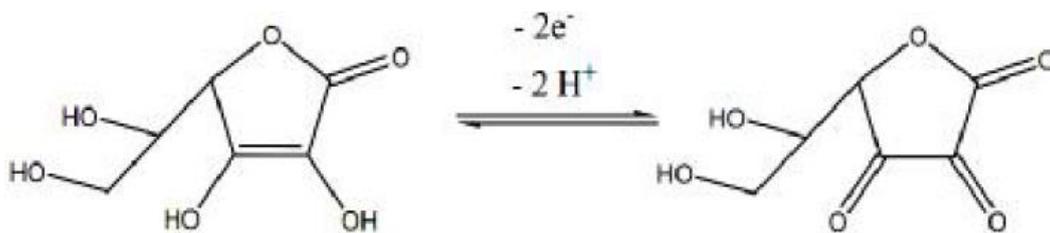


Figure IV.1. Oxydation de l'acide ascorbique

IV.5.2. La vitamine E (tocophérol) :

L' α -tocophérol a été largement étudiée comme complément alimentaire potentiellement préventive dans les maladies cardiovasculaires, il est présent dans les membranes des cellules et les organites cellulaires où, il joue un rôle important dans la suppression de la peroxydation des lipides et il s'accumule sur ces sites au sein des cellules dans lesquelles la production des radicaux d'oxygène est plus grande [9]. Il neutralise les radicaux peroxydes [10], alkyle et alcoxyde [11].

IV.5.3.Les caroténoïdes

Plus de 600 différents caroténoïdes existent à partir des sources naturelles. Toutefois, la pertinence des caroténoïdes a été historiquement limitée à ceux qui possèdent une activité

provitaminique A [12]. L'activité provitaminique A reflète la capacité d'agir en tant que précurseur de la vitamine A comme l'alpha-carotène et le bêta-carotène. La vitamine A est essentielle pour assurer le bon fonctionnement immunitaire et le maintien de la peau, des yeux, des os, des dents et des cheveux. Les caroténoïdes, comme le bêta-carotène, le lycopène, la lutéine, le bêta-cryptoxanthine et la zéaxanthine, forment un groupe d'antioxydants liposolubles qui sont principalement connus comme les pigments colorés des plantes et des microorganismes [13].

Les structures des principaux caroténoïdes sont données dans la figure IV.2.

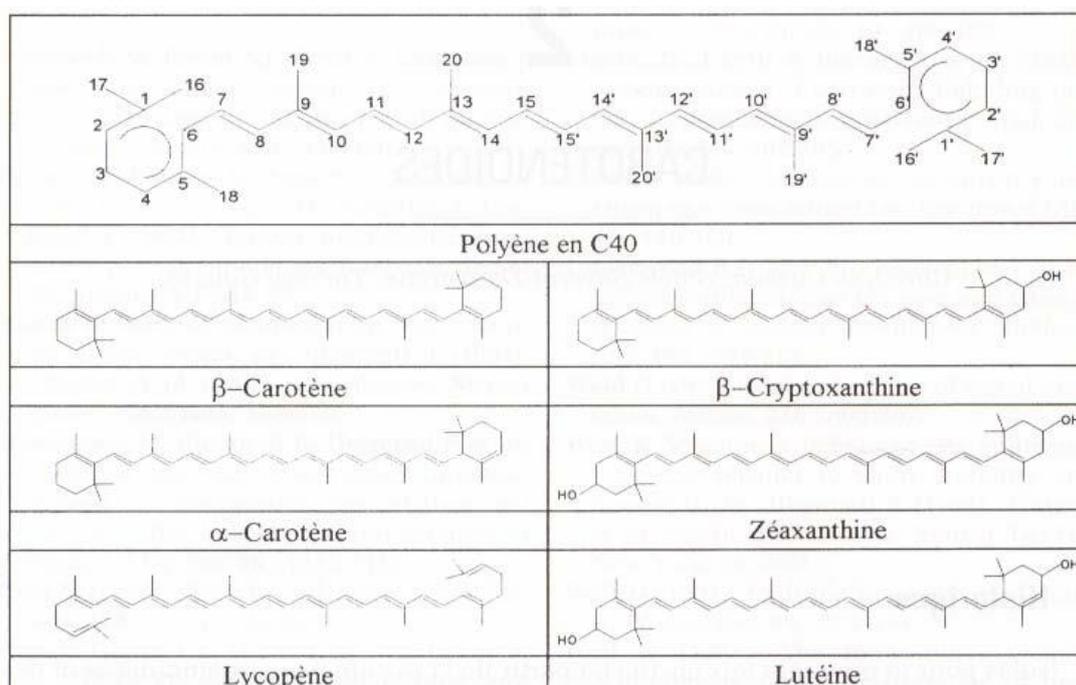


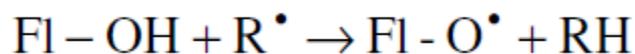
Figure IV.2 : Structures des principaux caroténoïdes d'après LE MOEL [14].

IV.5.4. Les polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par les plantes et constituent un groupe important de substances naturelles présentes dans le règne végétal. Ils prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

IV.6. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le radical aroxyde résultant (Fl-O[•]) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.(figure IV.3)

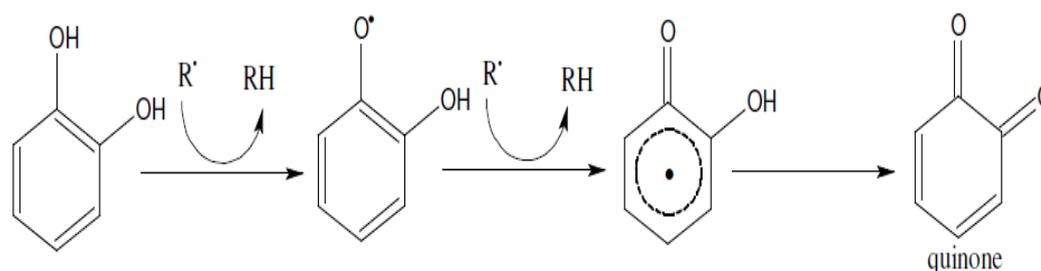


Figure IV.3 : Piégeage des ROS (R[•]) par les flavonoïdes.

De nombreuses études ont montré qu'il existe des relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres. L'obtention d'une activité antioxydante maximale nécessite les éléments structuraux suivants [15]

- 1- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol).
- 2- Le double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- 3- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3

IV.7. 2. Dosage des polyphénols

➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux de l'extrait acétate d'éthyle a été effectué par une méthode adaptée par Singleton avec le réactif de Folin-Ciocalteu [19].

Le réactif de Folin-Ciocalteu voit ces propriétés colorimétriques modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules. Il réagit avec la fonction –OH des phénols, cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée, qui passe une absorption maximale aux environs des 765nm permettant de déterminer la concentration des polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage à partir des concentrations connues.

➤ Procédure expérimentale

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations.

20µl de chaque solution, ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essais, suivis de l'addition de 100µl du réactif de Folin-Ciocalteu puis 1580 µl d'eau distillée. Après incubation pendant 6 minutes, 3000 µl de carbonate de sodium à 20% ont été ajoutés, le mélange mis au bain marie à 37° pendant 30 minutes. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765nm contre un blanc. Sur un spectrophotomètre Toutes les mesures sont répétées 3 fois. Les lectures de la densité optique à 765nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. L'analyse quantitative des phénols totaux d'extrait acétate d'éthyle a été réalisée par la même procédure. La teneur en composés phénoliques de l'extrait acétate d'éthyle a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et exprimée en microgramme par gramme de la matière sèche équivalent en acide gallique.

IV.7.3. Activité anti-radicalaire au DPPH

➤ Principe du test de DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [20,21]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig. IV.5).

Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH[•] reste dans sa forme monomère relativement stable a température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH[•]. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due a une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie a 515-518 nm.

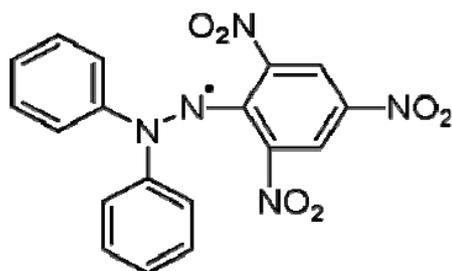
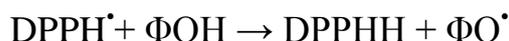
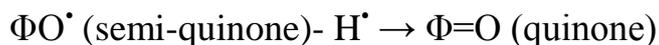
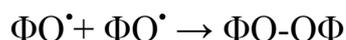


Figure IV.5 : Structure chimique du radical libre DPPH[•](2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle)

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de trois types de mécanismes: (i) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ; (ii) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) [22,23]. Dans le cas des composés phénoliques (Φ-OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH[•] alors transforme en une molécule stable DPPHH [24,25] :



Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles qui forment des structures plus au moins stables :



➤ Procédure expérimentale

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl), selon la méthode décrite par Braca et al [26], 50µl de chacune des solutions méthanoliques des échantillons testées à différentes concentrations (1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 50 et 75 µg/ml) sont mélangées avec 3ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.004%). Après une période d'incubation de 30 minutes à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH par la vitamine C a été également analysée avec la même concentration pour la comparaison. On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour la vitamine C , l'extrait acétate éthyle et pour les deux flavonoïdes (Pourcentage d'inhibition CI_{50}). Tous les essais ont été effectués en triple.

L'activité anti radicalaire est estimée en pourcentage grâce à la formule suivante :

$$I (\%) = [1 - (A_{\text{extrait}} / A_{\text{témoin}})] * 100 \quad \text{Avec :}$$

I (%) : activité inhibitrice en %.

A_{extrait} : absorbance de la solution de DPPH'en présence de l'extrait.

A_{témoin} : absorbance de la solution du DPPH'en absence de l'extrait.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm standard de déviation.

Le pourcentage d'inhibition est finalement exprimé sous forme de CI_{50} (concentration permettant d'obtenir 50 % d'inhibition), celle-ci est calculée à partir d'une droite de régression établie à l'aide des pourcentages d'inhibition (IP) enregistrés en fonction de la concentration de l'extrait.

Le CI_{50} est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de la CI_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

IV.7.4. Résultats et discussion

- Les résultats de l'activité anti-radicalaire et la teneur en polyphénols de l'extrait acétate d'éthyle du *Limonium pruinosum* sont indiqués dans le tableau IV.1.

composé	CI ₅₀ (µg/ml)	µg EAG/g E
Extrait acétate d'éthyle	7,77±0,05	260±0,003
Acide ascorbique	5,55±0,05	-

Tableaux IV.1: valeurs de CI₅₀ et la teneur en polyphénols de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Limonium pruinosum*.

- ✓ Les résultats obtenus (tableux IV.1) montrent que l'extrait acétate d'éthyle de *Limonium pruinosum* contient une quantité importante des polyphénols (260±0,003 µg EAG/g).
- ✓ l'extrait acétate d'éthyle a manifesté une activité inhibitrice du DPPH (CI₅₀ de 7,77µg/ml) très proche de celle de l'acide ascorbique (CI₅₀ =5,14 µg/ml) pris comme antioxydant de référence (fig IV.6). On peut supposer que la bonne activité de piégeage contre le radical libre DPPH de l'extrait acétate d'éthyle due à la présence de polyphénols dans cet extrait, généralement, les polyphénols ayant un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydante très importante [27,28].

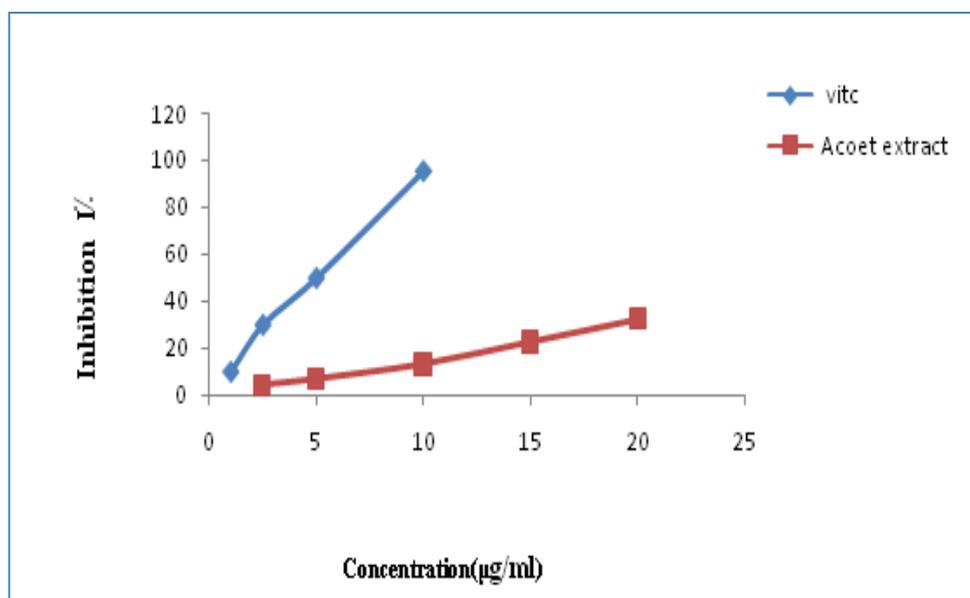


Figure IV.6: Pourcentage d'inhibition pour l'extrait acétate d'éthyle et l'acide ascorbique

➤ **Evaluation du pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes isolés.**

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH des deux flavonoïdes sont enregistrés dans le tableau suivant :

Composé	IC ₅₀ ± SD(µg/ml)
Acide ascorbique	5,14 ± 0,05
3,5,7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone	8.55 ± 0,075
3,5,4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone	16.59 ± 0,300

Tableau IV.2: Valeurs de CI₅₀ de l'extrait acétate d'éthyle, acide ascorbique et les deux flavonols isolés

- ✓ Le composé 3'-méthyl quercétine a montré une activité inhibitrice du DPPH (IC₅₀=8.55 ± 0.075 µg/ml) deux fois plus forte que celle de 3',7-diméthyl quercétine (IC₅₀=16.59 ± 0.300 µg/ml) (tableaux IV.2 ; Fig IV.7), cela peut être due à l'existence d'un OH libre en C-7 qui vise à améliorer l'activité de piégeage du radical libre DPPH car la méthylation des hydroxyles en position C-7 des flavonols réduisent leur activité antioxydante [29].

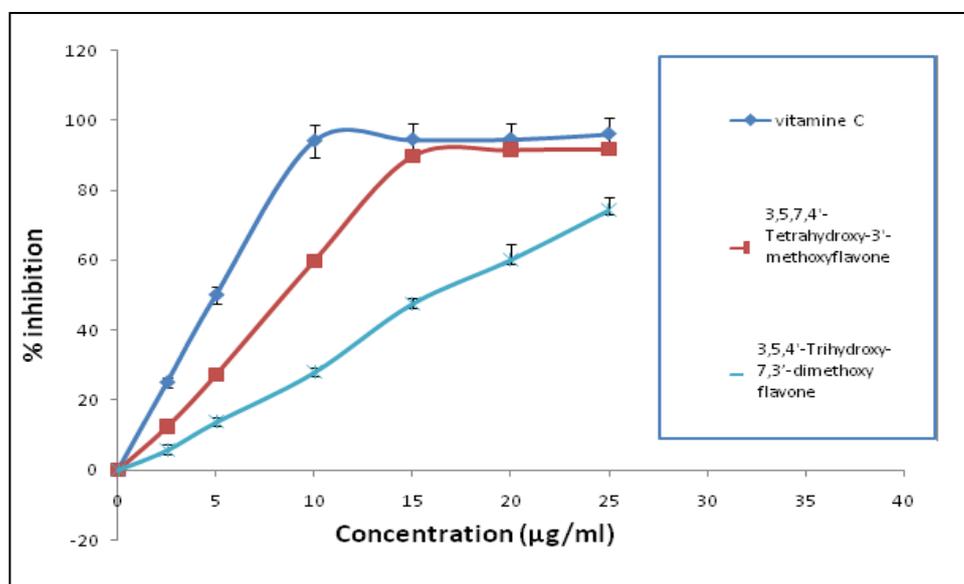


Figure IV.7: Pourcentage d'inhibition pour les deux flavonols et la vitamine C

IV.7.5. Conclusion

Les résultats obtenus montrent que l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Limonium pruinosum* a une activité antioxydante très importante, cette activité semble être liée à la présence des composés phénoliques.

La méthylation de l'hydroxyle en position C-7 de la 3'-méthyl quercétine réduit leur activité antioxydante.

IV.8. Activités antioxydante des extraits de *Chrysanthemum segetum*

IV.8. 1. Matériel Végétal

L'objectif de notre travail est de quantifier les teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes des extraits de *C.segetum* et d'évaluer leurs pouvoirs antioxydants par les méthodes du DPPH et de CUPRAC.

IV.8. 2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

IV.8. 2.1. Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols sont déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu, cette méthode, initialement décrite par Slinkard et Singleton [30]. Brièvement 20µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1,16 ml d'eau distillée suivi de l'addition de 100µl du réactif de Folin-Ciocalteu. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation 300 µl de la solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ (20%) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 30 mn dans l'obscurité à 40°C.

L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 760 nm. La quantification a été faite en utilisant une courbe standard de l'acide gallique.

Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par g de la matière sèche.

IV.8. 2.2. Dosage des flavonoïdes :

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de la plante *C.segetum* est réalisée selon la méthode décrite par Türkoğlu et al [31]. Une quantité aliquote (1ml) de chaque extrait été diluée avec 4,3 ml d'éthanol à 80% contenant 0,1 ml de l'acétate de potassium (1M) et 0,1 ml d'une solution de nitrate d'aluminium à 10% . Après 40 minutes d'incubation à une température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 415 nm,

la quercétine est utilisée comme un standard, la quantité des flavonoïdes est estimée en mg EQ/g d'extrait sec de la plante.

IV.8. 3. Etude de l'activité anti-radicalaire

Pour l'évaluation de l'activité anti-radicalaire de nos extraits, nous avons utilisé deux méthodes à savoir la méthode de DPPH et de CUPRAC. L'utilisation de deux tests différents nous a permis d'avoir une meilleure lecture de l'activité anti-radicalaire de nos extraits.

IV.8. 3.1. Test d'inhibition du radical DPPH

Pour étudier l'activité anti-radicalaire des différents extraits, nous avons utilisé le test de DPPH Selon le protocole décrit par Blois [20]. Le α -tocopherol, le BHA (ButylHydroxyAnisole) ainsi que le BHT (ButylHydroxyToluene) sont utilisés comme témoins positifs, l'activité antioxydante mise en évidence par le test de DPPH sur les extraits concernés exprimée par leur CI_{50} et qui est déterminée graphiquement à partir des droites représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations croissantes représentant la moyenne de trois tests séparés. Les valeurs CI_{50} déterminées en $\mu\text{g}/\text{ml}$ expriment la concentration efficace de l'extrait anti-oxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de molécules de DPPH en dissolution dans le méthanol.

IV.8. 3.2. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La méthode du CUPRAC a été développée par Apak et ces coauteurs [32,33]. Ce dosage est basé sur la réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par l'action combinée de tous les antioxydants ou les réducteurs dans un milieu aqueux-éthanolique (pH=7,0) en présence de Néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline), par les polyphénols, donnant un complexe Cu^+ avec un pic d'absorption maximale à 450 nm (figure IV.9) [34].

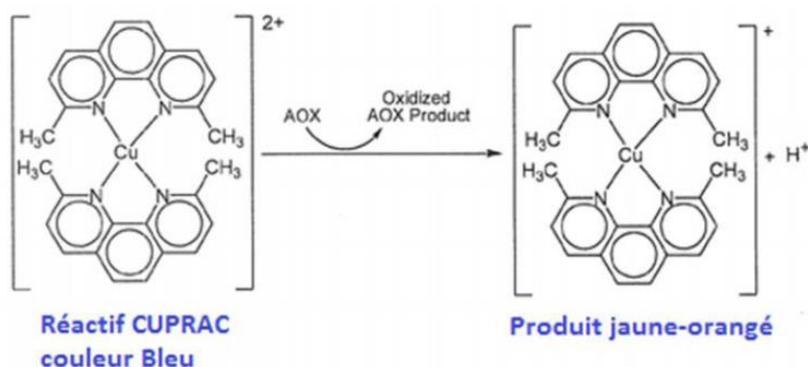


Figure IV.8 : Réaction de CUPRAC par une molécule antioxydante

➤ Procédure expérimentale

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode de CUPRAC décrite par Apak et al. [32]. Une solution est préparée avec le mélange des volumes de : 50 µl Cu (II) (10 mM), 50 µl neocuprine (7,5 mM), et 60 µl de solution tampon NH₄Ac (1 M, pH = 7,0). Différentes concentrations d'extrait ont été ajoutées au mélange initial afin de rendre le volume final de 200 µl. Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles de la BHA et du BHT. Les résultats ont été calculés à titre de A_{0,5} (µg / ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance. Le test de CUPRAC nous a permis de déterminer l'activité antioxydante de nos extraits que nous avons comparé à celle de la BHT^b et du BHA^b (contrôles positifs).

IV.8. 4. Résultats et discussion

IV.8. 4.1. Résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes des extraits analysés du *C.segetum* sont présentés dans le tableau IV.3 et Figure IV.9.

La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS), celle des flavonoïdes totaux en milligramme équivalent à la quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures ± déviation standard.

Extrait	Teneur en polyphénols (mg/g)	Teneur en flavonoïdes (mg/g)
Chloroforme	42,70±2,31	28,42±2,03
Acétate d'éthyle	216,18±12,97	126,64±11,35
<i>n</i> -butanol	154,51±2,92	106,64±11,27

Tableau IV.3 : valeurs des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits du *C.segetum*

- ✓ D'après les résultats dans le tableau précédent, on constaté que la teneur la plus élevée en polyphénol totaux a été trouvée dans l'extrait acétate d'éthyle (216,18±12,97 mg EAG/g) suivie de celle de l'extrait *n*-butanol (154,51±2,92 mg EAG/g). La plus faible quantité en polyphénols a été trouvée dans l'extrait chloroforme (42,70±2,31 mg

EAG/g). On remarque aussi que l'extrait qui possède le fort taux de polyphénols contient aussi de haute teneur en flavonoïdes.

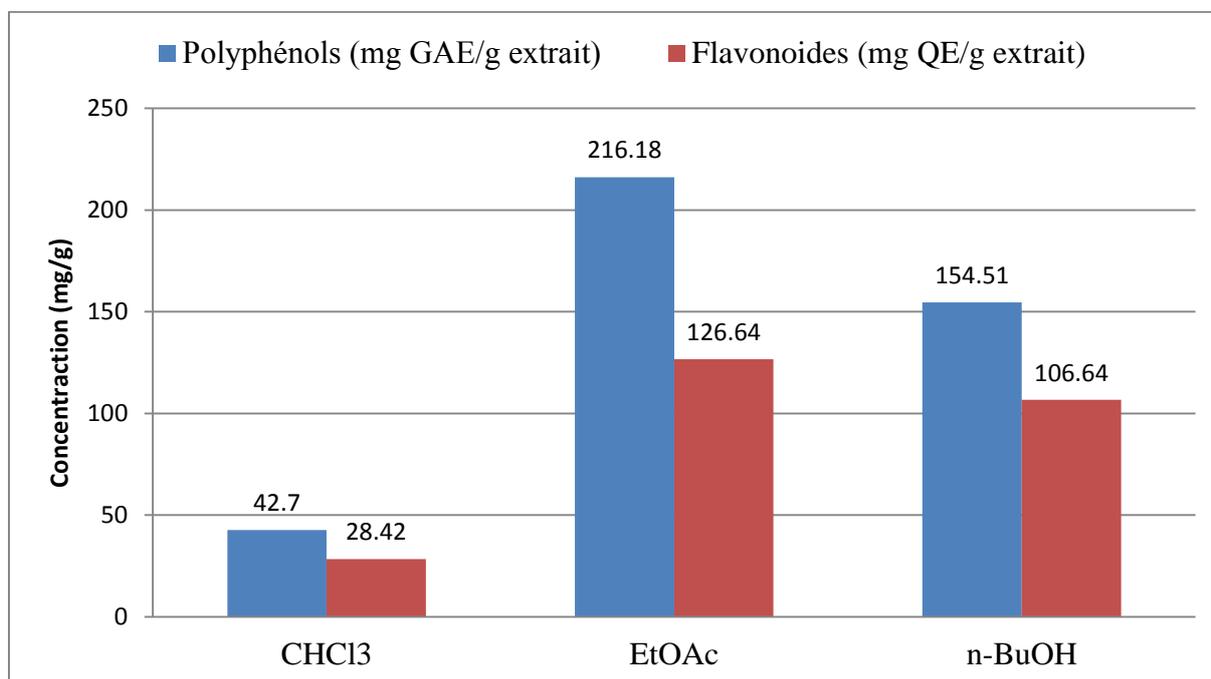


Figure IV.9: Comparaison entre les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits étudiés.

IV.8. 4.2. Résultats des tests antioxydants

➤ Piégeage du radical libre stable DPPH

Les résultats figurant dans le tableau IV.4 ci-après, illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire des extraits de *Chrysanthemum segetum* vis-à-vis du radical libre DPPH. Le CI_{50} de chaque extrait a été déterminée et comparée à celle de trois composés de références (Tableau IV.4).

Extrait	CI ₅₀ µg/mL
Chloroforme	146,95±6,59
Acétate d'éthyle	23,58±1,71
<i>n</i> -butanol	28,68±3,55
BHA ^b	6,14±0,41
BHT ^b	12,99±0,41
α-Tocopherol ^b	13,02±5,17

Tableau IV.4 : Valeurs de CI₅₀ des trios extraits du *C.segetum* et des contrôles positifs.

- ✓ D'après les résultats donnés dans le tableau précédent, on remarque que tous les extraits ont une activité antiradicalaire moins importante que celles des standards α-tocophérol, BHA^b et BHT^b.
- ✓ L'extrait acétate d'éthyle (CI₅₀= 23,58±1,71µg /ml) a montré la plus grande capacité antiradicalaire, suivi de l'extrait *n*-butanol (CI₅₀=28,68±3,55 µg /ml) qui a manifesté une activité proche de celle de l'extrait acétate d'éthyle, et en dernier de l'extrait chloroforme qui a montré une très faible activité antiradicalaire (CI₅₀=146.95±6.59 µg/ml).

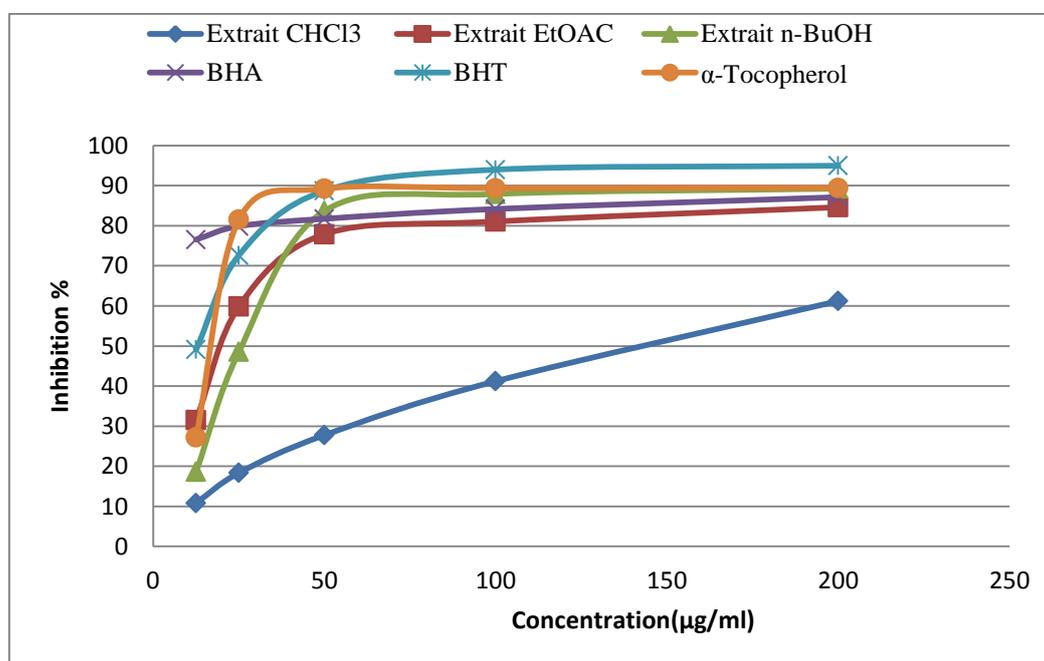


Figure IV.10: Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits de *C.segetum*

➤ réduction du cuivre (CUPRAC)

Les résultats du test CUPRAC sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau IV.5)

Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm déviation standard.

A0.50 : la concentration à l'absorbance 0,5

Concentration $\mu\text{g/mL}$	Absorbance						$A_{0.50}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	12.5	25	50	100	200	400	800	
Extrait CHCl_3	0,21 \pm 0,01	0,26 \pm 0,16	0,60 \pm 0,08	0,96 \pm 0,19	1,68 \pm 0,22	3,21 \pm 0,42	3,24 \pm 0,38	42.97 \pm 5.71
Extrait EtOAc	0,46 \pm 0,07	0,87 \pm 0,15	1,62 \pm 0,40	2,36 \pm 0,48	3,18 \pm 0,40	4,04 \pm 0,28	4,21 \pm 0,08	14.85 \pm 2.45
Extrait <i>n</i> -BuOH	0,31 \pm 0,03	0,49 \pm 0,01	0,96 \pm 0,15	1,64 \pm 0,26	2,92 \pm 0,42	4,09 \pm 0,13	4,14 \pm 0,03	24.57 \pm 2.80
BHA ^b	1,12 \pm 0,05	1,95 \pm 0,31	3,14 \pm 0,46	3,58 \pm 0,42	3,35 \pm 0,20	3,77 \pm 0,19	3,92 \pm 0,13	5,35 \pm 0,71
BHT ^b	1.41 \pm 0.03	2.22 \pm 0.05	2.42 \pm 0.02	2.50 \pm 0.01	2.56 \pm 0.05	2.86 \pm 0.07	3.38 \pm 0.13	8.97 \pm 3.94

Tableau IV.5: Inhibition du CUPRAC par les extraits de *C.segetum*

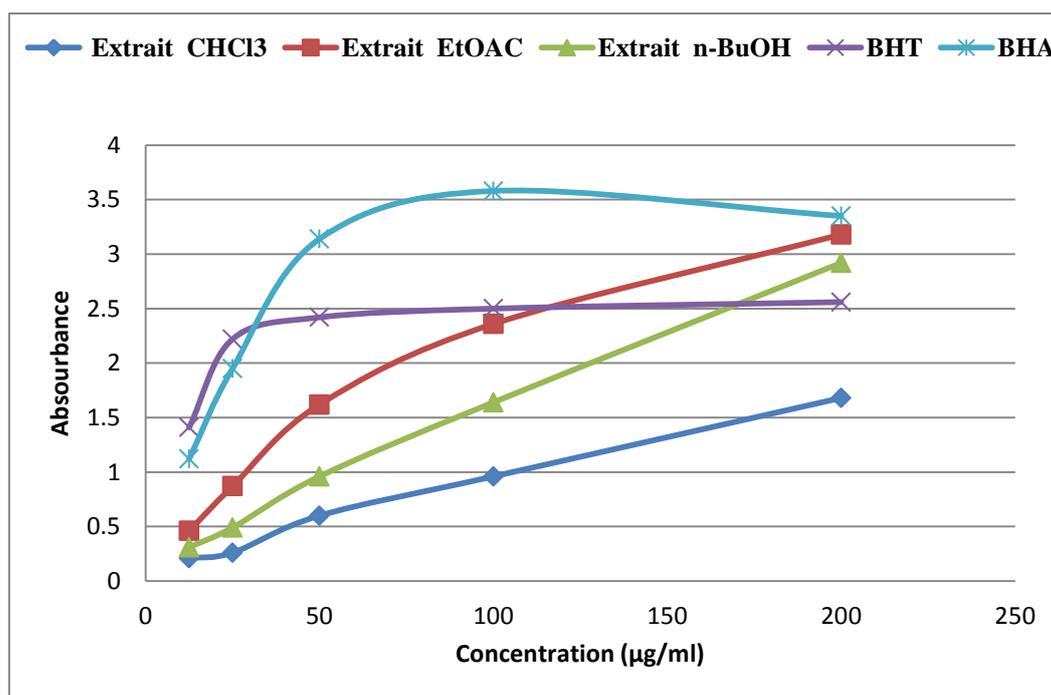


Figure IV.11 : Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) par les extraits de *C.segetum*

- ✓ Les résultats obtenus, montrent que tous les extraits ont une activité antiradicalaire moins importante que celle de BHA et du BHT utilisés comme standards.
- ✓ Il faut noter que l'extrait AcOEt ($A_{0.5} = 14.85 \pm 2.45 \mu\text{g/ml}$) a montré la plus forte inhibitrice du CUPRAC par rapport aux extraits *n*-BuOH ($A_{0.5} = 24.57 \pm 2.80 \mu\text{g/ml}$) et

CHCl_3 ($A_{0,5} = 42.97 \pm 5.71 \mu\text{g/ml}$), elle est deux fois moins faible que celle du standard BHT^b ($8.97 \pm 3.94 \mu\text{g/ml}$).

IV.8.5. Conclusion

Les résultats obtenus ont montré que l'activité antioxydante de même que la teneur en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait acétate d'éthyle sont les plus élevées suivi respectivement de l'extrait *n*-butanol et l'extrait chloroforme, cela indique que les activités antioxydantes prouvées par les deux tests DPPH et CUPRAC sont assurées, peut être par les mêmes molécules actives. Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de *C.segetum* sont riches en polyphénols, ceci suggère un lien entre l'activité anti-oxydante des deux extraits et ces composants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- [1] Favier A., 2003, Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, (11-12): 108-115.
- [2] Sies H., 1991, Oxidative stress from basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3):31-38.
- [3] Baudin B., 2006, Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *M T Cardio*, 2(1): 43-52.
- [4] Aron P M., Kennedy J A., 2008, Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1): 79-104.
- [5] Matés J M., Pérez-Gómez C., Núñez de Castro I., 1999, Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8):595-603.
- [6] McCall M R., Frei B., 1999, Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8):1034-53.
- [7] Halliwell B., Gutteridge J C., 1995, the definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1):125-6.
- [8] Carr A., Frei B., 1999, Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 13(9):1007-24.
- [9] Dutta-roy A K., 1999, Molecular Mechanism of Cellular Uptake and Intracellular Translocation of α -Tocopherol: Role of Tocopherol-binding Proteins. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10): 967-971.
- [10] Lecerf J M., Luc G., Fruchart J C., 1994, Vitamine E, antioxydants et athérosclérose. *Revue de médecine Interne*, 15(10):641-649.
- [11] Herrera E., Barbas C., 2001, Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57(2): 43-56.
- [12] Stargrove M B., Treasure J., McKee D L., 2008, Herb, Nutrient, and Drug Interactions: Clinical Implications and Therapeutic Strategies. Elsevier Health Sciences, 932.

- [13] Rahman K., 2007, Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors, *Clinical Intervention in Aging*. Jun, (2): 219-236.
- [14] Le moel G., 1998, Le statut vitaminique *Physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique*. Em inter, 550.
- [15] Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., 1990, Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 186,343-355.
- [16] Pietta P G., 2000, Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7):1035-1042.
- [17] Heim K E., Tagliaferro A R., Bobilya D J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry Home*, 13(10): 572-584.
- [18] Lester P., 2001, *Handbook of Antioxidants*. 2nd edition. C R C Press, New York.
- [19] Singleton V L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R M .,1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology: oxidant and antioxidants* , Academic Press, 299,152-178.
- [20] Blois M S., 1958, Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* ,181,1199-1200.
- [21] Brand-Williams W., Cuvelier M E., Berset C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, 28,25-30.
- [22] Huang D., Ou B., Prior R L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6):1841-1856.
- [23] Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y., 1996, Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(6):895-902.
- [24] Molyneux P., 2004, The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26 (2): 211-219.

- [25] Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A ., 1998, Saura-Calixto F. A . Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2): 270-276.
- [26] Braca A., De Tommasi N., Di Bari L., Pizza C., Politi M., Morelli. I., 2001, Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products*, 64(7):892-895.
- [27] Heim K E., Tagliaferro A R., Bobilya D J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 13(10): 572-584.
- [28] Torres de pinedo A., Pen alver P., Morales J C., 2007, Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant : structure activity relationship. *Food Chemistry*, 103(1) :55-61.
- [29] Edenharder R., Grunhage D., 2003, Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroxide in *Salmonella typhimurium* . *Mutation Research*, 540 (1): 1-18.
- [30] Slinkard K., Singleton V L., 1977, Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American journal Enology and Viticulture*, 28(1): 49-55.
- [31] Türkoğlu A., Duru M E., Mercan N., Kıvrak Đ., Gezer K., 2007, Antioxidant and antimicrobial activity of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1):267-273.
- [32] Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26):7970-7981.
- [33] Apak R., Guçlu K., Ozyurek M., Celik S E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4): 413-419.
- [34] Gulcin I., 2008, Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition Medicine Chemistry*, 23(6): 871-876.

CONCLUSION
GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La flore Algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle.

L'étude, que nous avons présentée dans cette thèse, portée sur l'investigation chimique et biologique des parties aériennes de deux plantes Algériennes *Chrysanthemum segetum* L. et *Limonium pruinosum* L. Une recherche bibliographique approfondie sur ces espèces a montré que ces deux plantes n'ont fait l'objet que de très peu d'études phytochimiques et biologiques. Au cours de nos travaux, nous avons isolé les métabolites secondaires des deux espèces citées ci-dessus. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solide-liquide sur différents supports (chromatographie sur couche mince, flash chromatographie et chromatographie sur colonnes de gel de silice). La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie de masse (SM) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN).

L'étude phytochimique menée sur l'extrait chloroforme de l'espèce *Chrysanthemum segetum* a permis l'obtention de sept produits purs, dont six sont isolés pour la première fois de cette espèce, ces produits sont :

- ✓ Acétate de 7-(hexa-2,4-diynylidène)-1,6-dioxaspiro[4.4]nona-2,8-dièn-4yle .
- ✓ (2E)-3-(3,4-dihydroxyphényl)acrylate d'éthyle.
- ✓ Acétate de 8-chloro-7-(2,4-hexadiyn-1-ylidène)-9-hydroxy-1,6-dioxaspiro[4.4]non-2-én-4-yle.
- ✓ (3E, 5E)-tridéca-3,5-dièn-7,9,11-triyn-1-ol .
- ✓ 5, 4'-dihydroxy-7, 3',5'-triméthoxyflavone
- ✓ β-Sitosterol-3-O-β-D-glucoside.
- ✓ Stégmastérol.

L'analyse des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Chrysanthemum segetum* par la technique UHPLC-MS, nous a permis de proposer les structures moléculaires de vingt-sept composés phénoliques présents dans ces extraits, une majorité de ces composés sont des flavonoïdes et des coumarines déjà reportés dans cette espèce ou bien dans le genre *Chrysanthemum*.

Dans l'étude phytochimique de l'espèce *Limonium pruinosum*, nous avons pu isoler et identifier cinq produits, tous ces composés sont isolés pour la première fois de cette espèce.

- ✓ **3, 5,4',4'-trihydroxy-7,3'-diméthoxy flavone.**
- ✓ **3, 5, 7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxy favone.**
- ✓ **Méthyl-β-D-glucopyranoside.**
- ✓ **3-O-méthyl-D-chiro-inositol.**
- ✓ **3,4-dihydroxy-5-méthoxybenzoate de méthyle.**

Le potentiel antiradicalaire de l'extrait acétate d'éthyle et des flavonoïdes isolés de *Limonium pruinosum* a été déterminé par la méthode de DPPH dont, les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle et les deux flavonoïdes sont actifs et capables de réduire le radical DPPH, la valeur de CI_{50} de l'extrait acétate d'éthyle (7,77 µg/ml) est proche de celle de l'acide ascorbique (CI_{50} = 5,14 µg/ml) pris comme antioxydant de référence.

Le potentiel antiradicalaire des extraits de l'espèce *Chrysanthemum segetum* a été déterminé par deux méthodes à savoir la méthode du DPPH et de CUPRAC.

Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *C.segetum* ont montré une activité anti-radicalaire plus importante que celle de l'extrait chloroforme, l'inhibition la plus élevée a été fournie par l'extrait AcOEt suivi de l'extrait *n*-BuOH et en dernier de l'extrait chloroforme qui a montré une très faible activité antiradicalaire.

Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH sont riches en polyphénols, ceci suggère un lien entre l'activité antioxydante des deux extraits et ces composants.

En conclusion, cette étude nous a permis de mieux connaître la phytochimie des plantes étudiées. Elle a en outre démontré leur intérêt comme source de produits naturels et de composés aux activités biologiques et pharmacologiques prometteuses.

RESUME

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de deux plantes, une Astéraceae (*Chrysanthemum segetum* L.) et une Plumbaginaceae (*Limonium pruinosum* L.).

L'étude phytochimique de l'extrait chloroforme des parties aériennes de *Chrysanthemum segetum*, nous a permis d'isoler et d'identifier sept composés: trois polyacétylènes, un flavonoïde, deux stérols et un ester aromatique, six d'entre eux ont été isolés pour la première fois de cette espèce.

L'analyse des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *Chrysanthemum segetum* par la technique UHPLC-MS, nous a permis de proposer les structures moléculaires de vingt-sept composés phénoliques présents dans ces extraits, une majorité de ces composés sont des flavonoïdes et des coumarines.

Dans l'étude phytochimique des extraits acétate d'éthyle et du *n*-butanol de l'espèce *Limonium pruinosum*, cinq composés ont été identifiés: deux flavonoïdes, un ester aromatique, un cyclitol et un méthylglucoside. Ces composés ont été décrits pour la première fois dans cette espèce.

Les structures de molécules isolées ont été élucidées principalement par les techniques spectroscopiques de RMN 1-D et 2-D, UV-Vis, de spectrométrie de masse et par la comparaison avec les données de la littérature.

Dans la partie biologique de notre travail, le pouvoir antioxydant de l'extrait acétate d'éthyle et des flavonoïdes isolés de l'espèce *Limonium pruinosum* a été évalué *in vitro* par le test du DPPH, l'extrait acétate d'éthyle a manifesté une activité antioxydante intéressante par rapport au standard.

Les activités antioxydantes des extraits bruts de l'espèce *Chrysanthemum segetum* ont été évaluées par deux méthodes, le piégeage du radical libre DPPH et la méthode de CUPRAC, dont les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle possède l'activité la plus élevée par rapport aux autres extraits testés.

Mots clés :

Astéraceae, Plumbaginaceae, *Chrysanthemum*, *Limonium*, phytochimique, flavonoïdes, coumarines, spectroscopiques, antioxydante.

ABSTRACT

This work was devoted to the phytochemical and biological studies of two plants species belonging to the Asteraceae family (*Chrysanthemum segetum* L.) and Plumbaginaceae family (*Limonium pruinosum* L.).

The phytochemical study of the chloroform extract, of aerial parts of *Chrysanthemum segetum* has allowed us to isolate and identify seven compounds, three polyacetylenes, a flavonoid, two sterols and an aromatic ester. Six of them were isolated for the first time from this species.

Analysis of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Chrysanthemum segetum* by the UHPLC-MS technique enabled us to propose the molecular structures of twenty-seven phenolic compounds present in these extracts, the major part of these compounds are flavonoids and coumarins.

In the phytochemical study of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Limonium pruinosum* species, five compounds were identified: two flavonoids, an aromatic ester, a cyclitol and a methylglucoside. These compounds have been described for the first time in this species.

The structures of the compounds have been elucidated mainly by the use of spectroscopic techniques, NMR 1-D and 2-D, UV-Vis, mass spectrometry and comparison with literature data.

In the biological part of our work, the antioxidant capacity of ethyl acetate extract and the flavonoids isolated of *Limonium pruinosum* species was evaluated in vitro by DPPH test, the ethyl acetate extract showed an interesting antioxidant activity compared to standard.

The antioxidant activities of crude extracts of *Chrysanthemum segetum* species were evaluated by using two methods, DPPH radical scavenging activity and the CUPRAC method, the results showed that the ethyl acetate extract had the highest activity compared to the other extracts tested.

Keywords:

Asteraceae, Plumbaginaceae, *Chrysanthemum*, *Limonium*, phytochemical, flavonoids, coumarins , spectroscopic, antioxidant

المخلص

خصص هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبتتين من العائلة المركبة (*Chrysanthemum segetum* L.) وعائلة الرصاصيات (*Limonium pruinosum* L.) .

الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلص الكلوروفورم للأجزاء الهوائية لنبتة *Chrysanthemum segetum* سمح لنا بعزل و تحديد بنى سبع مركبات : ثلاث مركبات متعددة الأستيلين ، مركب فلافونيدي، مركبين ستيرول و استر عطري، منها ستة مركبات عزلت لأول مرة من هذا النوع .

تحليل مستخلصات خلات الإيثيل و البوتانول بواسطة تقنية UHPLC-MS سمح لنا باقتراح هيكل سبعة وعشرون مركب فينولي موجود في هذه المستخلصات ، غالبية هذه المركبات فلافونيدات وكومارين.

في الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلصات خلات الإيثيل و البوتانول لنوع *Limonium pruinosum* خمس مركبات تم تحديد بنيتها: فلافونويدين، استر عطري ، سيكليطول و جلوكوسيدي الميثيل. هذه المركبات ذكرت لأول مرة في هذا النوع.

تم تحديد البنى الجزئية للمركبات المفصولة باستعمال مطيافية الرنين المغناطيسي أحادية و ثنائية البعد ، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية ، مطيافية الكتلة و المقارنة بالمعطيات البيليوغرافية.

القدرة المضادة للأكسدة لمستخلص خلات الإيثيل لنبتة *Limonium pruinosum* و الفلافونويدين المعزولين من هذا المستخلص تم تقييمها تجريبيا باستعمال اختبار DPPH ، مستخلص خلات الإيثيل أظهر فعالية مضادة للأكسدة مهمة بالمقارنة مع المرجع .

الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الخامة لنوع *C. segetum* تم تقييمها بطريقتين ، طريقة تثبيط الجذور الحرة DPPH و طريقة CUPRAC ، أظهرت النتائج أن مستخلص خلات الإيثيل لديه أعلى فعالية مضادة للأكسدة بالمقارنة مع المستخلصات الأخرى المختبرة.

كلمات مفتاحية :

المركبة، الرصاصيات، الفيتوكيميائية ، *Chrysanthemum* ، *Limonium* ، الفلافونويد، الكومارين، مطيافية، مضاد للأكسدة.