

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

**UNIVERSITE FRERES MENTOURI-CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :83/D3C/2018
Série :13/Ch/2018

**THÈSE : Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)**

Spécialité : Chimie pharmaceutique

INTITULÉ :

Étude phytochimique et biologique de trois espèces
Algériennes : *Calendula stellata* Cav. (Asteraceae), *Scabiosa
stellata* L. (Caprifoliaceae) et *Salvia barrelieri* Etl. (Lamiaceae)

Par :

Meryem LEHBILI

Devant le jury :

Pr. Zahia KABOUCHE	(U. des frères Mentouri-Constantine)	Présidente
Pr. Ahmed KABOUCHE	(U. des frères Mentouri-Constantine)	Directeur de thèse
Dr. Abdulmagid ALABDUL MAGID	(U. de Reims Champagne-Ardenne)	Co-directeur de thèse
Pr. Noureddine AOUF	(U. Badji Mokhtar-Annaba)	Examineur
Dr. Naima BOUTAGHANE	(U. des frères Mentouri-Constantine)	Examineur

Soutenue publiquement le 3/7/2018.

Dédicaces

Je dédie cette thèse ...

*A mes adorables parents, mon père et ma mère qui ont été
une source inépuisable d'encouragement et qui m'ont aidé à
être ce que je suis.*

A mes chers frères et à mes chères sœurs

A mes nièces

A toute ma famille

A tous mes amis et collègues

Meryem

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration entre le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) de l'Université Frères Mentouri Constantine 1 et le groupe Isolement et Structure de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR, UMR CNRS 7312), de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, en bénéficiant d'une bourse accordée par le ministère de l'enseignement supérieur de l'Algérie.

Tout d'abord, j'adresse un grand merci au Professeure **Zahia KABOUCHE**, Directrice du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de m'avoir guidée dans mes travaux, pour son soutien, sa grande générosité, sa disponibilité et pour sa contribution à la réussite de ce travail. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude. Ainsi, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur **Ahmed KABOUCHE**, de l'Université Frères Mentouri Constantine 1 pour sa confiance, sa patience, sa rigueur, sa disponibilité, ses conseils et surtout pour toute l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation de ce travail et la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur **Abdulmagid ALABDUL MAGID**, de l'Université de Reims Champagne-Ardenne pour avoir bien voulu encadrer cette thèse quotidiennement, pour son soutien de tous les instants, sa confiance, ses conseils et son amitié. Je le remercie vivement de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie et pour toute l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation de mes publications scientifiques et la rédaction de ce manuscrit. Les remerciements exprimés ici donc ne seront jamais à la hauteur de votre implication dans la réalisation de ce travail de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier très chaleureusement Madame la Professeure **Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO**, de l'Université de Reims Champagne-Ardenne de m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour tout le temps qu'elle m'a accordé et pour sa contribution à la réussite de ce travail. Ses conseils, son soutien et sa gentillesse m'ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ce travail, qu'elle soit assurée de ma profonde reconnaissance.

Je remercie respectueusement le Professeur *Noureddine AOUF* de l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba et le docteur *Naima BOUTAGHANE* de l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir aimablement accepté de se consacrer à la lecture de mon manuscrit et d'en être les examinateurs, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

Je remercie également le Docteur *Jane HUBERT* (Institut de Chimie Moléculaire de Reims) qui, malgré ses nombreuses responsabilités et ses occupations, a réalisé les analyses de RMN liées à la Caractérisation « CAMEL », qui a grandement contribué à la richesse de cette thèse.

Je tiens également à remercier le Docteur *Amin ABEDINI* (Institut de Chimie Moléculaire de Reims) pour la réalisation des tests antimicrobiens, pour sa gentillesse, son amitié et ses encouragements.

Monsieur le Professeur *Hamid MORJANI* (Laboratoire MEDyC de l'UFR de pharmacie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne), je lui adresse mes plus vifs remerciements de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir initiée et guidée à réaliser mes tests en cytotoxicologie, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues du laboratoire LOST avec lesquels les échanges des conseils et suggestions m'ont aidée à réaliser mes travaux, plus particulièrement le Dr *Abbes BENMERACHE*, le Dr *Naima BOUTAGHANE* et M^{me} *Ilhem SEMRA* qui m'ont accompagnée tout au long ma période de séjour en France, et le Dr *Ramzi MAADADI* pour l'aide qu'il m'a apportée.

Je voudrais également remercier tous les membres du groupe Isolement et Structure de Reims : le professeur *Jean-Marc NUZILLARD*, *Nicolas BORIE*, *Agathe MARTINEZ*, *Ali BAKIRI*, *Benjamin BERTAUX* et *Charlotte SAYAGH*, sans oublier *Dominique HAKAT* pour la réalisation des spectres de masse.

Enfin, je remercie toutes mes amies avec qui j'ai passé de bons moments et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel je cite en particulier : *Wafa TADRENT*, *Sihem TERFASSI*, *Meriem Khaizourane ABDERREZAK*, *Aicha LOUHICHI* et *Meriem MEDJANI*.

Liste des figures

Partie I. Revue bibliographique

- Figure I-01.** Le capitule chez les Astéracées. p5
- Figure I-02.** Carte géographique du genre *Calendula*. p6
- Figure I-03.** Illustrations de *C. officinalis* (Souci des jardins) et *C. arvensis* (Souci des champs). p7
- Figure I-04.** Images et dessin illustrant l'espèce *C. stellata* (Souci étoilée). p23
- Figure I-05.** Distribution mondiale de la famille des Caprifoliaceae. p26
- Figure I-06a.** Dessin explicatif des caractéristiques des fleurs et fruits de la famille des Caprifoliaceae. p27
- Figure I-06b.** Fleurs et fruits des espèces appartenant à la famille des Caprifoliaceae. p27
- Figure I-07.** Carte géographique du genre *Scabiosa*.. p29
- Figure I-08.** Caractéristiques générales des scabieuses. P30
- Figure I-09.** Photographie et illustration de l'espèce *Scabiosa stellata* L. p43
- Figure I-10.** Distribution mondiale de la famille des Lamiaceae. p46
- Figure I-11.** Tige et inflorescence d'une Lamiacée. p47
- Figure I-12.** Variation de la corolle bilabée chez les Lamiacées. p47
- Figure I-13.** Carte géographique du genre *Salvia*. p48
- Figure I-14.** Saug des prés, portion d'inflorescence et étamine. p49
- Figure I-15.** Fleurs, racines, produits commercialisés de *S. miltiorrhiza* (Danshen). p49
- Figure I-16.** Images (A, B) et dessin illustrant (C) l'espèce *S. barrelieri*. p57

Partie II. Matériel et méthodes

- Figure II-01.** Système Grace Reveleris® disponible dans le laboratoire. p65
- Figure II-02.** Appareil de l'extracteur de partage centrifuge disponible dans le laboratoire. P66
- Figure II-03.** Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait EtOH et des fractions A-E de la plante *C. stellata*. P70

Figure II-04. Profil CCM en phase normale de la fraction E .	P71
Figure II-05. Chromatogramme HPLC semi-préparative et profil CCM de la fraction E9 .	P72
Figure II-06. Chromatogramme HPLC semi-prép et profil CCM de la fraction E16 .	P72
Figure II-07. Chromatogramme HPLC semi-prép et profil CCM de la fraction E23 .	P73
Figure II-08. Chromatogramme HPLC semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction [32-33].	P73
Figure II-09. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait EtOH et des fractions A-E de la plante <i>S. stellata</i> .	P74
Figure II-10. Chromatogramme HPLC analytique de la fraction D (1) et profil CCM des sus-fractions de la fraction D (2) .	P75
Figure II-11. Chromatogramme HPLC et CCM de la sous-fraction [36-38] de F34 .	P76
Figure II-12. Plaque CCM de l'extraction de partage centrifuge (EPC) de la fraction C .	P77
Figure II-13. Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de <i>Salvia barrelieri</i> .	P80
Figure II-14. Profil CCM en phase normale (1) et inverse (2) des fractions de l'exsudat.	P81
Figure II-15. Illustration d'une plaque 96 puits d'un test de la CMI en milieu liquide.	P86
Figure II-16. Organisation générale d'un test de cytotoxicité.	P88
Figure II-17. Les différentes étapes de l'entretien et de l'ensemencement des cellules cancéreuses.	P90

Partie III. Résultats et discussion

Figure III-01. Schéma d'extraction et de purification des composés de <i>Calendula stellata</i> .	P93
Figure III-02. Structures des génines des saponosides isolées à partir de <i>Calendula stellata</i> .	P94
Figure III-03. Structures des sucres retrouvés dans les saponosides isolées.	P95
Figure III-04. Structures des saponosides isolées de <i>Calendula stellata</i> .	P96
Figure III-05. Spectre de masse HR-ESI-MS du composé Cs1 .	P97

Figure III-06. Spectre de RMN ^1H du composé Cs1 .	P98
Figure III-07. Spectre de RMN ^{13}C du composé Cs1 .	P99
Figure III-08. Spectre COSY dans la partie génine du composé Cs1 .	P100
Figure III-09. Spectre HSQC de la partie génine du composé Cs1 .	P101
Figure III-10. Corrélations COSY et HMBC des noyaux A et B du composé Cs1 .	P102
Figure III-11. Corrélations HMBC du composé Cs1 .	P103
Figure III-12. Spectre HMBC du composé Cs1 .	P104
Figure III-13. Spectre COSY du composé Cs1 au niveau de méthyne oxygéné.	P105
Figure III-14. Structure de la partie génine du composé Cs1 (Acide échinocystique).	P105
Figure III-15. Spectre HSQC dans la zone des anomères du composé Cs1 .	P106
Figure III-16. Spectre COSY de la partie osidique du composé Cs1 .	p108
Figure III-17. Spectre HSQC de la partie osidique du composé Cs1 .	p109
Figure III-18. Spectre HMBC de la partie osidique (protons anomériques) du composé Cs1 .	p110
Figure III-19. Spectre de masse du composé Cs2 .	p112
Figure III-20. Spectre de RMN ^1H du composé Cs2 en comparaison avec Cs1 .	p112
Figure III-21. Spectre de RMN ^{13}C du composé Cs2 .	p113
Figure III-22. Corrélations COSY de la génine (acide oléanolique) du composé Cs2 .	p114
Figure III-23. Spectre COSY du composé Cs2 .	p114
Figure III-24. Spectre HSQC du composé Cs2 .	p115
Figure III-25. Spectre HMBC du composé Cs2 .	p116
Figure III-26. Spectres de RMN ^1H des composés Cs3 et Cs4 .	p118
Figure III-27. Spectre de RMN ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Cs4 .	p118
Figure III-28. Etalement du spectre de RMN ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Cs3 .	p119
Figure III-29. Spectre TOCSY dans la zone des sucres du composé Cs4 .	p120
Figure III-30. Spectre HSQC dans la zone des sucres du composé Cs4 .	p120
Figure III-31. Spectre ROESY dans la zone des sucres du composé Cs3 .	p121
Figure III-32. Spectre HSQC dans la zone des sucres du composé Cs3 .	p121
Figure III-33. Spectre de masse du composé Cs5 .	p125
Figure III-34. Spectre de RMN ^1H du composé Cs5 .	p125
Figure III-35. Spectre de RMN ^{13}C du composé Cs5 .	p126

Figure III-36. Spectre HSQC du composé Cs5 dans la zone des sucres.	p127
Figure III-37. Spectre HMBC du composé Cs5 entre 2.6 et 5.4 ppm.	p128
Figure III-38. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé Cs6 .	p130
Figure III-39. Spectre de RMN ^1H du composé Cs7 .	p132
Figure III-40. Spectre de masse du composé Cs9 .	p135
Figure III-41. Spectre de RMN ^1H du composé Cs9 .	p135
Figure III-42. Spectre de RMN ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Cs9 .	p136
Figure III-43. Spectre HMBC du composé Cs9 .	p136
Figure III-44. Spectre ROESY du composé Cs9 .	p137
Figure III-45. Spectre de RMN ^1H du composé Cs12 .	p139
Figure III-46. Spectre HMBC du composé Cs11 .	p141
Figure III-47. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé Cs13 .	p143
Figure III-48. Spectre HMBC dans la zone des méthyles du composé Cs13 .	p144
Figure III-49. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C <i>J</i> modulé du composé Cs15 .	p147
Figure III-50. Spectre de RMN ^1H de composés Cs16+Cs17 .	p149
Figure III-51. Spectre COSY de Cs16+Cs17 (zone des sucres).	p150
Figure III-52. Spectre HSQC de Cs16+Cs17 (zone des sucres).	p150
Figure III-53. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé Cs18 .	p152
Figure III-54. Spectre HSQC de composés Cs18 .	p153
Figure III-55a,b. Spectre HSQC de composés Cs18 .	p154
Figure III-56. Spectre HSQC de composés Cs18 .	p155
Figure III-57. Spectre de RMN ^1H du composé Cs19 .	p158
Figure III-58. Spectre de RMN ^1H du composé Cs20 .	p160
Figure III-59. Spectres COSY du composé Cs20 .	p160
Figure III-60a. Schéma d'extraction et de purification des composés de <i>Scabiosa stellata</i> .	p163
Figure III-60b. Schéma d'extraction et de purification des composés de <i>Scabiosa stellata</i> .	p164
Figure III-61. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Ss21 .	p166
Figure III-62. Corrélations ROESY du saponoside Ss21 .	p167
Figure III-63. Spectres HMBC du saponoside Ss21 .	p167
Figure III-64. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé Ss22 .	p169
Figure III-65. Spectres TOCSY du composé Ss22 (zone des sucres).	p169

Figure III-66. Corrélation ROESY de l'acide asiatique (cycle E d'un noyau ursane).	p170
Figure III-67. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C de Ss23 .	p171
Figure III-68. Corrélation ROESY de l'acide asiatique.	p172
Figure III-69. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C <i>J</i> -modulé de Ss24 .	p176
Figure III-70. Spectres HSQC de Ss24 (zone des anomères).	p177
Figure III-71. Spectre COSY de la partie osidique du saponoside Ss24 .	p178
Figure III-72. Spectre ROESY de la partie osidique du saponoside Ss24 .	p179
Figure III-73. Spectre TOCSY étalé de la partie osidique du saponoside Ss24 .	p180
Figure III-74. Spectre TOCSY étalé de la partie osidique du saponoside Ss24 .	p181
Figure III-75. Spectre HMBC de la partie osidique du saponoside Ss24 .	p182
Figure III-76. Spectre HSQC <i>J</i> -modulé de la partie osidique du saponoside Ss24 .	p183
Figure III-77. Spectre HMBC du saponoside Ss24 (zone des protons anomériques).	p184
Figure III-78. Spectre ROESY de la partie osidique du saponoside Ss24 .	p185
Figure III-79. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C <i>J</i> -modulé du saponoside Ss25 .	p186
Figure III-80. Spectre HSQC du saponoside Ss25 (zone des anomères).	p187
Figure III-81. Spectre COSY du saponoside Ss25 (zone des sucres).	p188
Figure III-82. Spectre ROESY du saponoside Ss25 (zone des sucres).	p189
Figure III-83. Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du saponoside Ss25 (zone des sucres).	P190
Figure III-84. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C <i>J</i> -modulé du saponoside Ss26 .	p193
Figure III-85. Spectres HSQC <i>J</i> -modulé du saponoside Ss26 .	p194
Figure III-86. Spectres TOCSY du saponoside Ss26 .	p194
Figure III-87. Spectres HSQC <i>J</i> -modulé de la partie osidique du saponoside Ss26 .	p195
Figure III-88. Spectres HMBC du saponoside Ss26 (zone des anomères).	p196
Figure III-89. Spectres ROESY du saponoside Ss26 (zone des anomères).	p197
Figure III-90. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du saponoside Ss27 .	p198
Figure III-91. Spectres HSQC <i>J</i> -modulé du saponoside Ss27 (zone des anomères).	p199
Figure III-92. Spectres TOCSY et HSQC-TOCSY du saponoside Ss27 .	P200
Figure III-93. Spectres HSQC <i>J</i> -modulé de la partie osidique du saponoside Ss27 .	P201
Figure III-94. Spectre HMBC du saponoside Ss27 (zone des protons anomériques).	P202

Figure III-95. Spectre ROESY de la région des protons anomériques de la partie osidique du saponoside Ss27 .	P203
Figure III-96. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du saponoside Ss28 .	P205
Figure III-97. Spectres HSQC J -modulé du saponoside Ss28 (zone des anomères).	P206
Figure III-98. Spectres TOCSY et ROESY du composés Ss28 .	P207
Figure III-99. Spectre HSQC J -modulé de la partie osidique du composé Ss28 .	P208
Figure III-100. Spectre HMBC du composé Ss28 (zone des protons anomériques).	p209
Figure III-101. Spectre de RMN ^1H du composé Ss29 .	p210
Figure III-102. Spectre HSQC J -modulé du composé Ss29 (zone des anomères).	p211
Figure III-103. Spectre TOCSY du composé Ss29 .	p212
Figure III-104. Spectre ROESY du composé Ss29 .	p212
Figure III-105. Spectre TOCSY du composé Ss29 .	p213
Figure III-106. Spectre HSQC-TOCSY du composé Ss29 .	p214
Figure III-107. Spectre HSQC J -modulé du composé Ss29 .	p215
Figure III-108. Spectre HMBC du composé Ss29 (au niveau des protons anomériques).	p216
Figure III-109. Principe du traitement des données dans la déréplication CAMEL (bakiri et al., 2017).	P219
Figure III-110. Dendrogramme des clusters obtenus par application HCA « CAMEL » sur les sous-fractions de la CPC des fractions B et C de <i>S. stellata</i> .	P221
Figure III-111. Spectre de RMN ^1H du composé Ss34 .	p223
Figure III-112. Spectre de RMN ^{13}C J -modulé du composé Ss34 .	p223
Figure III-113. Spectre COSY du composé Ss34 .	p224
Figure III-114. Spectre HSQC J -modulé du composé Ss34 .	p225
Figure III-115. Spectre HMBC du composé Ss34 .	p226
Figure III-116. Spectre de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé du composé Ss35 .	p227
Figure III-117. Spectre COSY du composé Ss35 .	p228
Figure III-118. Spectre HMBC du composé Ss35 .	p228
Figure III-119. Spectres de RMN ^{13}C J -modulé des composés Ss35/Ss36 .	p229
Figure III-120. Spectre de RMN ^1H du composé Ss36 .	p230

Figure III-121. Squelettes de base retrouvés dans les bis-iridoïdes isolés de <i>S.stellata</i> .	p231
Figure III-122. Spectre de RMN ¹ H du composé Ss33 .	p232
Figure III-123. Spectre de RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Ss33 .	p232
Figure III-124. Spectre COSY du composé Ss33 .	p233
Figure III-125. Spectre COSY du composé Ss33 .	p234
Figure III-126. Spectre COSY étalé du composé Ss33 .	p235
Figure III-127. Spectre HMBC du composé Ss33 .	p236
Figure III-128. Spectres de RMN ¹ H et ¹³ C du composé Ss32 .	p238
Figure III-129. Spectre COSY du composé Ss32 .	p239
Figure III-130. Spectre HMBC du composé Ss32 .	p241
Figure III-131. Spectre de masse du composé Ss30 .	p243
Figure III-132. Spectres de RMN ¹ H des composés Ss30 et Ss31 .	p244
Figure III-133. Spectres de RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé des composés Ss30 et Ss31 .	p245
Figure III-134. Spectre COSY étalé (partie 1) du composé Ss30 .	p246
Figure III-135. Spectre COSY étalé (partie 2) du composé Ss30 .	p247
Figure III-136. Spectre COSY étalé du composé Ss31 .	p248
Figure III-137. Spectre HMBC étalé du composé Ss30 .	p250
Figure III-138. Spectre HMBC étalé du composé Ss31 .	p251
Figure III-139. Spectre ROESY du composé Ss30 .	p252
Figure III-140. Spectre de RMN ¹ H du composé Ss37 .	p254
Figure III-141. Spectre de RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Ss37 .	p255
Figure III-142. Spectres de RMN ¹ H et ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Ss38 .	p256
Figure III-143. Spectres de RMN ¹ H des composés Ss40 et Ss41 .	p258
Figure III-144. Spectres de RMN ¹ H du composé Ss42 .	p260
Figure III-145. Spectre COSY du composé Ss42 .	p262
Figure III-146. Schéma d'extraction et de purification des composés de <i>Salvia barrelieri</i> .	p265
Figure III-147. Schéma d'extraction et de purification des composés de <i>Scabiosa stellata</i> .	p266
Figure III-148. Triterpenoïdes (Sb44-Sb49) isolés de l'exsudat de <i>Salvia barrelieri</i> .	p267
Figure III-149. Spectres de RMN ¹ H des composés Sb44-Sb47 .	p268

Figure III-150. Spectres de RMN ^{13}C <i>J</i> -modulé des composés Sb44-Sb47 .	p269
Figure III-151. Spectre COSY du composé Sb44 .	p270
Figure III-152. Spectre COSY du composé Sb46 .	p271
Figure III-153. Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Sb44 .	p272
Figure III-154. Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Sb46 .	p273
Figure III-155. Spectre HMBC étalé du composé Sb44 .	p274
Figure III-156. Spectre HMBC du composé Sb44 .	p275
Figure III-157. Spectre de RMN ^1H du composé Sb49 .	p277
Figure III-158. Spectre de RMN ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Sb49 .	p277
Figure III-159. Spectre COSY du composé Sb49 .	p278
Figure III-160. Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Sb49 .	p279
Figure III-161. Importantes corrélations HMBC de l'acide micromérique (Sb49).	p280
Figure III-162. Spectre HMBC du composé Sb49 .	p281
Figure III-163. Spectres de RMN ^1H des composés Sb50-Sb53 .	p283
Figure III-164. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Sb54 .	p284
Figure III-165. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Sb55 .	p285
Figure III-166. Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Sb55 .	p286
Figure III-167. Spectre HMBC du composé Sb55 .	p286
Figure III-168. Bioautographie des fractions A-E de <i>S. stellata</i> contre <i>S. aureus</i> CIP 53.154.	p291
Figure III-169. Bioautographie des composés isolés de <i>S. barrelieri</i> , <i>S. stellata</i> et <i>C. stellata</i> .	p293
Figure III-170. Courbes de pourcentage d'inhibition de DPPH par l'isoorientine (Ss37).	P298

Liste des tableaux

Partie I. Revue bibliographique

Tableau I-01. Les saponines isolées du genre <i>Calendula</i> .	p14
Tableau I-02. Les flavonoïdes isolés du genre <i>Calendula</i> .	P20
Tableau I-03. Les flavonoïdes isolés du genre <i>Scabiosa</i> .	p39

Partie II. Matériel et méthodes

Tableau II-01. Les différentes cartouches utilisées pour les colonnes flash avec les débits des solvants adaptés.	P65
Tableau II-02. Les programmes utilisés pour les analyses CLHP analytique.	P67
Tableau II-03. Flash chromatographie de la fraction E sur colonne de gel de silice normale/masse en milligramme.	P71
Tableau II-04. Flash chromatographie de la fraction D sur colonne de gel de silice normale.	P75
Tableau II-05. Liste de bactéries et levures mis au test de l'activité antimicrobienne.	P83
Tableau II-06. Les concentrations préparées pour déterminer la CMI en milieu solide.	P84
Tableau II-07. Les concentrations préparées au test de la CMI en milieu liquide.	P86

Partie III. Résultats et discussion

Tableau III-01. Nature des sapogénines des composés Cs (1-18).	P94
Tableau III-02. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) du saponoside Cs1 dans CD_3OD .	p111
Tableau III-03. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la génine des composé Cs2, Cs3 et Cs4 (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz) dans CD_3OD .	p123
Tableau III-04. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des composé Cs2, Cs3 et Cs4 (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz) dans CD_3OD .	p124
Tableau III-05. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé Cs5 dans CD_3OD .	p129

Tableau III-06. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de la partie osidique des composés Cs6 , Cs7 et Cs8 dans CD_3OD .	p133
Tableau III-07. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de la partie génine des composés Cs6 , Cs7 et Cs8 dans CD_3OD .	p134
Tableau III-08. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé Cs9 dans CD_3OD .	p138
Tableau III-09. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des composés Cs10 , Cs11 et Cs12 dans CD_3OD .	p142
Tableau III-10. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de la partie osidique des composés Cs13 et Cs14 dans CD_3OD .	p146
Tableau III-11. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique du Cs15 dans CD_3OD .	p148
Tableau III-12. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides Cs16 et Cs17 dans CD_3OD .	p151
Tableau III-13. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) du saponoside Cs18 dans CD_3OD .	p156
Tableau III-14. Déplacement chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C de la partie génine des saponosides Cs10-Cs17 dans CD_3OD .	p157
Tableau III-15. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des flavonoïdes Cs19 et Cs20 dans CD_3OD .	p161
Tableau III-16. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie génine des composés Ss21 , Ss22 et Ss23 dans CD_3OD .	p174
Tableau III-17. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des composés Ss21 , Ss22 et Ss23 dans CD_3OD .	p175
Tableau III-18. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des composés Ss24 et Ss25 dans CD_3OD .	p192
Tableau III-19. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des composés Ss26 et Ss27 dans CD_3OD .	p204
Tableau III-20. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique des composés Ss28 et Ss29 dans CD_3OD .	p217
Tableau III-21. Déplacement chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C de la partie génine des saponosides Ss24-Ss29 dans CD_3OD .	p218

Tableau III-22. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) des composés Ss30- Ss32 dans CD ₃ OD.	p230
Tableau III-23. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) du composé Ss33 et Ss34 (600 MHz, 150 MHz) dans CD ₃ OD.	p242
Tableau III-24. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) des composés Ss35 et Ss36 dans CD ₃ OD.	p253
Tableau III-25. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) des composés Ss37 et Ss38 dans CD ₃ OD.	p257
Tableau III-26. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) des composés Ss40 et Ss41 dans CD ₃ OD.	p259
Tableau III-27. Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et ¹³ C (125 MHz) du composé Ss42 dans CD ₃ OD.	p263
Tableau III-28. Déplacement chimiques en RMN ¹ H et RMN ¹³ C des triterpénoïdes de <i>Salvia barrelieri</i> (Sb44-Sb45) et (Sb47-Sb49) dans CDCl ₃ et Sb46 dans CD ₃ OD.	p282
Tableau III-29. Déplacement chimiques en RMN ¹ H et RMN ¹³ C des flavonoïdes de <i>Salvia barrelieri</i> (Sb50-Sb55) dans CD ₃ OD.	p287
Tableau III-30. Résultats de la CMI de l'activité antimicrobienne en milieu solide des extraits hydroéthanoliques de <i>C. stellata</i> (E_{ca}) et <i>S. stellata</i> (E_{sa}), de l'exsudat (E_{sa}) et la phase butanoliques (Bu_{sa}) de <i>S. barrelieri</i> .	p290
Tableau III-31. Résultats de la CMI de l'activité antimicrobienne en milieu solide des fractions A-E de <i>S. stellata</i> .	p292
Tableau III-32. Résultats de Bioautographie des composés isolés de <i>C. stellata</i> , <i>S. stellata</i> et <i>S. barrelieri</i> contre <i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154.	p293
Tableau III-33. Activité antibactérienne (CMI) des produits isolés de <i>C. stellata</i> .	p294
Tableau III-34. Les valeurs des CMI des produits isolés de <i>S. stellata</i> .	p295
Tableau III-35. Activité antibactérienne (CMI) des produits isolés de <i>S. barrelieri</i> .	p296
Tableau III-36. Valeurs des IC ₅₀ de l'activité antioxydante des extraits et produits par la méthode de DPPH.	p297
Tableau III-37. Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de <i>S. barrelieri</i> .	p299
Tableau III-38. Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de <i>C. stellata</i> et <i>S. stellata</i> .	p299

Liste des abréviations

Extraits et produits isolés

Cs	Produit isolé de <i>Calendula stellata</i>
Ss	Produit isolé de <i>Scabiosa stellata</i>
Sb	Produit isolé de <i>Salvia barrelieri</i>

Solvants et réactifs

ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
BuOH	Butanol
CD ₃ OD	Méthanol deutéré
CHCl ₃	Chloroforme
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO-d ₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
DPPH	1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl
HCl	Acide chlorhydrique
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
MEM	Minimum Essential Media
MeOH	Méthanol
MtBE	Méthyl tert-butyl éther
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
Rp-18	Silice greffée C-18
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
TFA	Acide trifluoroacétique

Technique chromatographique

CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLV	Chromatographie liquide sous vide
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
EPC	Extracteur de Partage Centrifuge

Détermination structurale

Ara	α -L-arabinose
Gal	β -D-galactose
Glc	β -D-glucose
GlcA	acide β -D-glucuronique
Rha	α -L-rhamnose
Xyl	β -D-xylose
ax	axial

COSY	COrrrelated SpectroscopY
d	doublet
dd	doublet de doublets
ddd	doublet de doublets de doublets
d/	doublet large
dm	doublet de multiplets
dq	doublet de quadruplets
dt	doublet de triplets
eq	équatorial
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HR-ESI-MS	High Resolution Electro Spray Ionization Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Connectivity
<i>J</i>	constante de couplage (en Hz)
IR	Infrarouge
m	multiplet
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
rOe	rotation Overhauser effect
ROESY	ROtating Overhauser Effect SpectroscopY
s	singulet
<i>sl</i>	singulet large
t	triplet
td	triplet de doublets
TOCSY	TOal Correlation SpectroscopY
<i>tr</i>	temps de rétention
UV	Ultra-Violet
δ_C	Déplacement chimique du carbone en ppm
δ_H	Déplacement chimique du proton en ppm
<i>m/z</i>	masse/charge d'un ion
SM	Spectrométrie de Masse
λ_{max}	longueur d'onde d'absorption maximale
$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire

Activités biologiques

ATCC	American type culture collection
ç/ml	Cellules par millilitre
CFU/mK	Colony Forming Unit/MegaKaryocytic
CIP	Collection of the Institut Pasteur
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice

Unités des grandeurs physiques et chimiques

Hz	Hertz
min	Minute
ppm	Parties par million
uma	Unité de masse atomique
μ M	Micromolaire

Table des matières

Liste des figures	i
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	xii

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Partie I. Revue bibliographique

Chapitre 1. Aperçu bibliographique sur le genre *Calendula*

I.1.1. Introduction sur la famille des Asteraceae	5
I.1.2. Le genre <i>Calendula</i> L	6
I.1.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Calendula</i>	8
I.1.4. Quelques activités biologiques du genre <i>Calendula</i>	9
I.1.4.1. Activité antimicrobienne	9
I.1.4.2. Activité antiinflammatoire	10
I.1.4.3. Activité antioxydante	10
I.1.4.4. Activité cytotoxique	11
I.1.4.5. Activité anti HIV	12
I.1.4.6. Effets sur la santé bucco-dentaire	12
I.1.5. Métabolites isolés du genre <i>Calendula</i>	13
I.1.5.1. Saponines	13
I.1.5.2. Triterpènes	15
I.1.5.3. Sesquiterpènes	17
I.1.5.4. Caroténoïdes	18
I.1.5.5. Flavonoïdes	19
I.1.5.6. Acides phénoliques	21
I.1.5.7. Acides gras	21
I.1.5.8. Huiles essentielles	22
I.1.6. <i>Calendula stellata</i> Cav	22
I.1.6.1. Place dans la systématique	22
I.1.6.2. Description botanique	23
I.1.6.3. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>C. stellata</i> Cav.....	24

Chapitre 2. Aperçu bibliographique sur le genre *Scabiosa*

I.2.1. Introduction sur la famille des caprifoliaceae.....	26
I.2.2. le genre <i>Scabiosa</i>	28
I.2.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Scabiosa</i>	31
I.2.4. Quelques activités biologiques du genre <i>Scabiosa</i>	32
I.2.5. Métabolites isolés du genre <i>Scabiosa</i>	32
I.2.5.1. Saponines	32
I.2.5.2. Triterpènes et stérols	35

I.2.5.3. Iridoïdes	36
I.2.5.3.1. Mono-iridoïdes	36
I.2.5.3.2. Bis-iridoïdes	36
I.2.5.4. Flavonoïdes	37
I.2.5.5. Coumarines	37
I.2.5.6. Acides phénoliques et acides gras	40
I.2.5.7. Huiles essentielles	40
I.2.6. <i>Scabiosa stellata</i> L	42
I.2.6.1. Place dans la systématique	42
I.2.6.2. Description botanique	42
I.2.6.3. Usage traditionnel	44
I.2.6.4. Travaux antérieurs	44

Chapitre 3. Aperçu bibliographique sur le genre *Salvia*

I.3.1. Introduction sur la famille des Lamiaceae	46
I.3.2. le genre <i>Salvia</i>	48
I.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Salvia</i>	49
I.3.4. Activités biologiques du genre <i>Salvia</i>	50
I.3.5. Métabolites isolés du genre <i>Salvia</i>	51
I.3.6. <i>Salvia barrelieri</i> Etl	51
I.3.6.1. Place dans la systématique	56
I.3.6.2. Description botanique	56
I.3.6.3. Travaux antérieurs	58

Partie II. Matériel et méthodes

Chapitre 1. Extraction, séparation et purification des plantes

II.1.1. Matériel végétal	62
II.1.1.1. <i>Calendula stellata</i> Cav	62
II.1.1.2. <i>Scabiosa stellata</i> L	62
II.1.1.3. <i>Salvia barrelieri</i> Etl	62
II.1.2. Techniques chromatographiques.....	62
II.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	62
II.1.2.2. Chromatographie sur résine polymère aromatique diaion (HP-20)	63
II.1.2.3. Chromatographie liquide sous vide	64
II.1.2.4. Chromatographie sur colonne flash (CCF)	64
II.1.2.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)	65
II.1.2.6. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	67
II.1.2.6.1. CLHP analytique	67
II.1.2.6.2. CLHP semi-préparative	67
II.1.2.6.3. CLHP préparative	68
II.1.3. Méthodes physico-chimiques	68
II.1.3.1. Pouvoir réfractaire	68
II.1.3.2. Spectrométrie Ultra-violet-visible (UV)	69
II.1.3.3. Spectrométrie infrarouge (IR)	69

II.1.3.4. Spectrométrie de masse (SM)	69
II.1.3.5. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	69
II.1.4. Extraction et purification	70
II.1.4.1. <i>Calendula stellata</i> Cav	70
II.1.4.1.1. Macération	70
II.1.4.1.2. Extraction par résine HP-20	70
II.1.4.1.3. Fractionnement et purification de la fraction E (100% MeOH)	71
II.1.4.1.4. Etude de la fraction [C+D]	73
II.1.4.2. <i>Scabiosa stellata</i> L	73
II.1.4.2.1. Macération	73
II.1.4.2.2. Extraction par résine HP-20	74
II.1.4.2.3. Séparation et purification des produits	75
II.1.4.2.3.1. Partie saponines (Etude de la fraction D)	75
II.1.4.2.3.2. Etude de la fraction E (100% MeOH)	76
II.1.4.2.3.3. Partie CPC-CARAMEL (Etude des fractions B et C)	77
II.1.4.2.3.3.1. <i>Extraction de partage centrifuge (EPC)</i>	77
II.1.4.2.3.3.2. <i>Analyses RMN et déréplication des composés majoritaires</i>	77
II.1.4.2.3.3.3. <i>Purification des produits</i>	79
II.1.4.3. <i>Salvia barrelieri</i> Etl	79
II.1.4.3.1. Extraction	79
II.1.4.3.2. Purification des produits	80

Chapitre 2. Méthodes expérimentales des activités biologiques

II.2.1. Activité antimicrobienne	83
II.2.1.1. Microorganismes testés	83
II.2.1.2. Méthode en milieu solide (CMI)	83
II.2.1.3. Méthode de bioautographie	84
II.2.1.4. Méthode de dilution en milieu liquide (microplaques)	85
II.2.2. Activité antioxydante	86
II.2.3. Activité antiproliférative	88
II.2.3.1. Les lignées cellulaires cancéreuses utilisées	88
II.2.3.2. Entretien des cellules	88
II.2.3.3. Ensemencement des plaques	89
II.2.3.4. Préparation des dilutions et traitement	90
II.2.3.5. Lecture	91

Partie III. Résultats et discussion

Chapitre 1. Identification des produits isolés de *Calendula stellata* Cav.

III.1.1. Détermination structurale des saponosides de <i>Calendula stellata</i>	94
III.1.1.1. Elucidation structurale du composé Cs1	97
III.1.1.2. Elucidation structurale du composé Cs2	112
III.1.1.3. Elucidation structurale des composés Cs3 et Cs4	117
III.1.1.4. Elucidation structurale du composé Cs5	125
III.1.1.5. Elucidation structurale du composé Cs6	130

III.1.1.6. Elucidation structurale des composés Cs7 et Cs8	131
III.1.1.7. Elucidation structurale du composé Cs9	135
III.1.1.8. Elucidation structurale des composés Cs10, Cs11 et Cs12	139
III.1.1.9. Elucidation structurale des composés Cs13 et Cs14	142
III.1.1.10. Elucidation structurale du composé Cs15	147
III.1.1.11. Elucidation structurale du composé Cs16 et Cs17.....	149
III.1.1.12. Elucidation structurale du composé Cs18	152
III.1.2. Détermination structurale des flavonoïdes Cs19 et Cs20.....	158

Chapitre 2. Identification des produits isolés de *Scabiosa stellata* L.

III.2.1. Détermination structurale des saponosides de <i>Scabiosa stellata</i>	165
III.2.1.1. Elucidation structurale des composés Ss21 et Ss22	165
III.2.1.2. Elucidation structurale du composé Ss23	170
III.2.1.3. Elucidation structurale des composés Ss24 et Ss25	175
III.2.1.4. Elucidation structurale des composés Ss26 et Ss27	193
III.2.1.5. Elucidation structurale du composé Ss28	205
III.2.1.6. Elucidation structurale du composé Ss29	210
III.2.2. Déréplication des composés majoritaires de <i>Scabiosa stellata</i>	219
III.2.3. Détermination structurale des iridoïdes de <i>Scabiosa stellata</i>	222
III.2.3.1. Elucidation structurale des mono-iridoïdes	222
III.2.3.2. Elucidation structurale des bis-iridoïdes	231
III.2.3.2.1. Détermination structurale de Ss33	231
III.2.3.2.2. Détermination structurale de Ss34	238
III.2.3.2.2. Détermination structurale de Ss35 et Ss35	243
III.2.4. Détermination structurale des flavonoïdes de <i>Scabiosa stellata</i>	254
III.2.4.1. Etude des spectres de Ss37 et Ss38	254
III.2.4.2. Etude des spectres de Ss40 et Ss41	258
III.2.5. Détermination structurale des composés isolés de la fraction E	259
III.2.5.1. Détermination structurale du composé Ss42	260

Chapitre 3. Identification des produits isolés de *Salvia barrelieri* Etl.

III.3.1. Détermination structurale des triterpénoïdes de <i>Salvia barrelieri</i>	266
III.3.1.1. Elucidation structurale des triterpènes à noyau oléanane	267
III.3.1.2. Elucidation structurale des triterpènes à noyau ursane	276
III.3.1.2.1. Identification de l'acide micromérique (Sb49)	276
III.3.2. Détermination structurale des flavonoïdes de <i>Salvia barrelieri</i>	283
III.3.2.1. Apigénine et glycosides	283
III.3.2.2. Glycosides de lutéoline	284
III.3.2.3. Salvigénine	284

Chapitre 4. Evaluation des activités biologiques

III.4.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne	289
III.4.1.1. Activité antimicrobienne des extraits	289
III.4.1.2. Activité antimicrobienne des produits isolés	292

III.4.1.2.1. Bioautographie contre <i>S. aureus</i>	292
III.4.1.2.2. Détermination de la CMI en milieu liquide	293
III.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante	296
III.4.3. Evaluation de l'activité antiproliférative	299
Conclusion générale	303
Références bibliographiques	307
Annexes	
Caractéristiques des composés isolés	320
Publications scientifiques	335

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes ont constitué le premier et principal outil thérapeutique à la disposition de l'homme, et ce, pendant de nombreux siècles. Dans de nombreuses civilisations et sur tous les continents, les pharmacopées végétales se sont développées et enrichies grâce aux pratiques empiriques. Avec un don d'observation inégalé, les anciens ont pu mettre en évidence des propriétés des plantes médicinales qui n'ont jamais été démenties par l'usage (Carillon., 2009). Celles-ci demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (Tabuti et al., 2003). L'utilisation de la médecine traditionnelle ne se limite pas aux seuls pays en développement, même dans les pays industrialisés l'application de thérapies alternatives a considérablement augmenté durant ces dernières décennies (Richard et al., 2009 ; Iris et al., 2011).

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de la médecine traditionnelle. En 2004, près de 75% de la population africaine a eu recours aux plantes pour se soigner et n'a pas accès aux médicaments dits modernes, par ailleurs l'industrie pharmaceutique elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites (Hostettman et al., 1998).

Par la richesse et la diversité originelle de sa flore, l'Algérie constitue un véritable réservoir phytogénétique avec environ 3150 espèces de plantes vasculaires avec un taux d'endémisme à 10% environ du nombre total des espèces (Greuter et al., 1991). Cependant, ce potentiel floristique reste très peu exploré d'un point de vue phytochimique et biologique. D'autre part, les plantes médicinales constituent un potentiel prometteur dans les domaines scientifique et économique du pays. Il importe donc de leur accorder tout l'intérêt qu'elles méritent à l'égard de la richesse qu'elles recèlent pour le développement socio-économique du pays en général et de certaines régions en particulier.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration de recherche entre le Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) de l'Université Frères Mentouri-Constantine 1 et l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR, CNRS UMR

7312) de l'Université de Reims Champagne-Ardenne visant à valoriser les plantes endémiques et/ou médicinales de l'Algérie.

Dans cette optique, une étude phytochimique et biologique réalisée sur trois espèces Algériennes appartenant à trois familles végétales différentes. Il s'agit de *Calendula stellata* (**Asteraceae**), *Scabiosa stellata* (**Caprifoliaceae**) et *Salvia barrelieri* (**Lamiaceae**). La sélection des plantes étudiées est basée principalement sur leur endémisme et aussi sur leur usage traditionnel. L'objectif principal de notre travail est la recherche de nouveaux composés d'origine végétale à intérêts thérapeutiques.

Notre présent travail s'articule sur l'utilisation de différentes méthodes chromatographiques pour la purification et l'isolement des métabolites secondaires, suivie de l'identification des structures de ces derniers et enfin la détermination de leur potentiel biologique. De plus, une nouvelle approche de déréplication nommée « CARAMEL » qui signifie **C**aractérisation des **M**élanges a été adoptée, elle permet d'identifier directement les composés majoritaires dans un mélange complexe de produits. Notre travail décrit dans ce manuscrit est divisé en trois parties :

- La première partie est consacrée à la description des trois plantes étudiées, leurs répartition géographique, usages traditionnels et à une étude bibliographique sur les genres auxquels elles appartiennent, du point de vue composition en métabolites secondaires et activités biologiques.
- La deuxième partie décrit le matériel utilisé et résume les différentes étapes d'extraction et de purification des molécules des trois espèces *C. stellata*, *S. stellata* et *S. barrelieri*, ainsi que les protocoles suivis de détermination des activités biologiques expérimentées, à savoir, les activités antimicrobienne, antioxydante et antiproliférative.
- La troisième partie concerne l'élucidation structurale des produits isolés de chacune des espèces étudiées par le biais de méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D, UV, IR) conjuguées à la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) ainsi que la discussion des résultats obtenus de CARAMEL et des tests biologiques réalisés sur les extraits de plantes et les composés purs.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

PARTIE I

Revue bibliographique

Chapitre 1

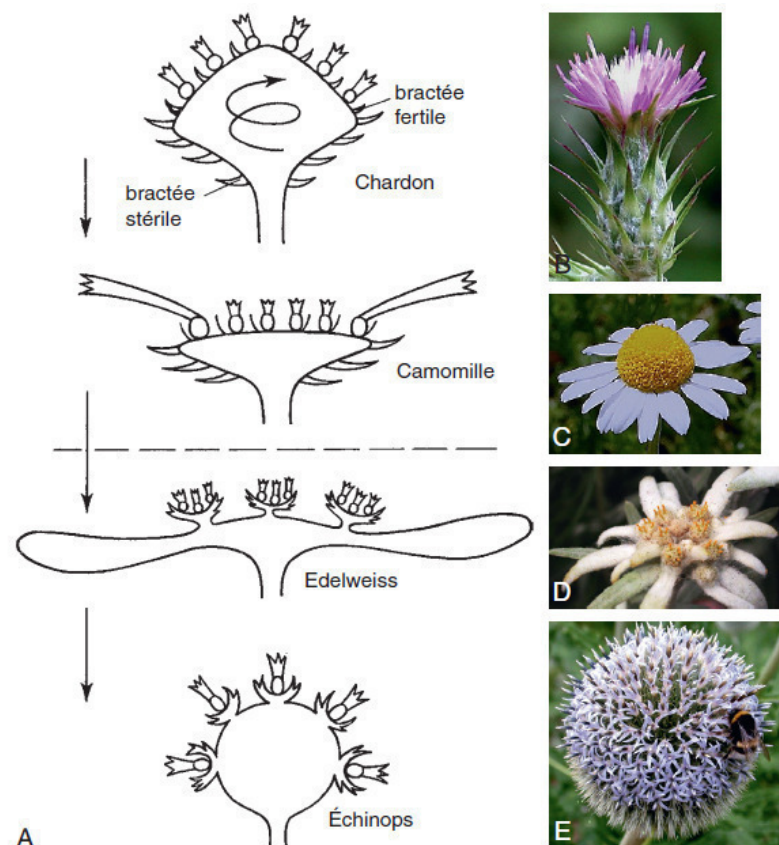
Aperçu bibliographique sur le
genre *Calendula*

I.1.1. Introduction sur la famille des Asteraceae

C'est la famille la plus importante des Angiospermes, avec 25 000 espèces réparties en 1600 genres (Heywood et al., 2007). Le sol algérien compte environ 109 genres et plus de 408 espèces de cette famille (Quezel et santa., 1963). C'est une famille répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées. On y trouve surtout des plantes herbacées vivaces et à feuilles alternes.

Les Astéracées sont caractérisées par :

- L'inflorescence en capitule qui comprend un réceptacle sur lequel sont insérées des fleurs formant ainsi une « fleur composée », d'où l'ancien nom de la famille (Compositae) (Figure I-01).
- Les fleurs, très particulières dont les anthères sont soudées entre elles (Synanthérées) ;
- Le fruit, un akène généralement surmonté d'un pappus (Dupont et Guignard., 2012).



A : schémas traduisant l'évolution. B : Chardon. C : Camomille. D : Edelweiss. E : Echinops.

Figure I-01. Le capitule chez les Astéracées (Dupont et Guignard., 2012).

I.1.2. Le genre *Calendula* L.

Le nom latin *Calendula* aurait son origine aux « Calendes », parce que plusieurs espèces de ce genre fleurissent à toutes les calendes, qui étoient le premier jour de chaque mois chez les Romains. Le genre *Calendula* L. est connu aussi sous plusieurs dénominations : « Souci » en français, « Marigold » en anglais et par son nom vernaculaire « Djamir, Razehima » en arabe (Quezel et santa., 1963).

Les plantes aiment particulièrement le soleil. D'ailleurs, le nom « souci » est tiré du latin « solsequia » qui signifie littéralement « qui suit le soleil ». Ainsi, les fleurs de *Calendula* s'ouvrent au petit matin et se referment en même temps que le coucher du soleil.

Les soucis sont des plantes herbacées, annuelles ou vivaces, ordinairement couvertes d'un fin duvet plus au moins glanduleux et odorantes. Leurs feuilles sont alternes, sinuées ou dentées. Leurs fleurs sont réunies au sommet des rameaux en capitules stipités. Les fleurs sont de couleurs jaunes ou orangées, à odeurs souvent forte, peu agréables. Elles habitent l'Europe moyenne et méridionale, les îles occidentales de l'Afrique du nord, la région méditerranéenne et l'Orient (Baillon, H., 1886) (Figure I-02).

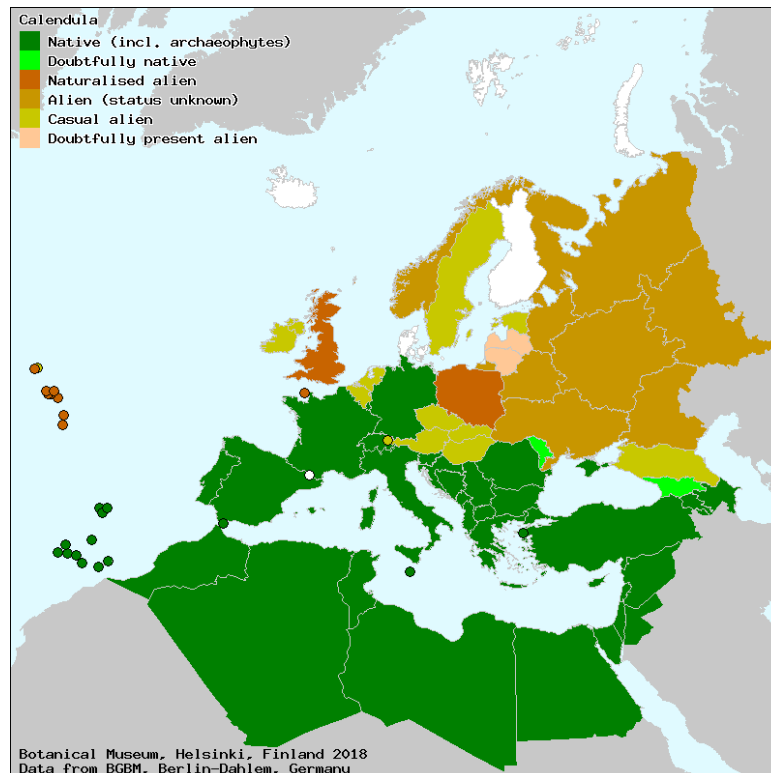


Figure I-02. Carte géographique du genre *Calendula* [1].

En Algérie, le genre *Calendula* est représenté par huit espèces et près de vingt-six variétés et sous-espèces (Quezel et santa., 1963).

D'un point de vue botanique, les soucis sont caractérisés par :

- Des capitules hétérogame, multiflores et radiés, bractées de l'involucre disposé en deux séries alternes, étroitement scarieuses sur les bords. Réceptacle plan jusqu'à l'anthèse puis légèrement convexe.
- Les fleurs marginales femelles et fertiles sur deux rangs, à ligule entière ou tridentée. Fleurs du disque hermaphrodites, stériles, tubuleuse à cinq dents.
- Anthères sagittées auriculées, Stigmate simple.
- Akène de morphologie très spéciale, constitués par un prisme triangulaire présentant une face dorsale ou externe et convexe et deux faces latérales planes (Quezel et santa., 1963).



Figure I-03. Illustrations de *C. officinalis* (Souci des jardins) et *C. arvensis* (Souci des champs) (Masclef., 1891).

I.1.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre *Calendula*

Certaines espèces du genre *Calendula* ont été utilisées en médecine traditionnelle pour leurs vertus thérapeutiques, notamment souci des jardins (*C. officinalis*) et souci des champs (*C. arvensis*) qui sont actuellement largement utilisées en phytothérapie et aromathérapie dans le domaine de cosmétologie, dont seules les fleurs sont utilisées. Il existe plusieurs produits de différentes manufactures et marques, comme exemple Yves Rocher, et si on tape sur Amazon, on trouve des dizaines d'articles à base de *Calendula* (huile essentielle, pommade, crèmes, savon, ...).



Calendula crème de Yves Rocher



Calendula oil (100 ml, 11.⁶⁹ €). Amazon

Nous présentons les différentes espèces du genre *Calendula* à usage traditionnel multiple :

- ***C. officinalis* L.** : Souci des jardins, les feuilles complètent les salades, les fleurs colorent le riz et poissons. Selon des études, les fleurons externes réduiraient la pilosité d'où un intérêt pour les crèmes pour visage. Antiseptique, antifongique, le souci contient des précurseurs d'hormones et de vitamine A. Par voie interne, il apaise les douleurs d'estomac et inflammations de ganglions lymphatiques. Stimulant le foie. La phytothérapie le prescrit pour stimuler légèrement la production d'oestrogènes. L'huile macérée est bonne pour la peau (Baudoux et al., 2005).
- ***C. arvensis* L.** : Souci des champs « Jemra », les fleurs sont utilisées en décoction contre les désordres gastriques, maladies des intestins et refroidissement, cholérétique et contre la migraine (El Hassani et al., 2013).
- ***C. aegyptiaca* Dsef.** : « Hmer Erras/Jemra », la tisane obtenue de ses fleurs est utilisé contre les vers intestinaux et les infections microbiennes (Fleurentin et al., 2002).

- *C. alata* Rech.f. : Les parties aériennes sont utilisées pour le traitement de calculs rénaux et la lithiase vésiculaire.
- *C. persica* C.A. : La décoction ou l'infusion obtenue des parties aériennes sont employées pour calculs biliaires (Ghorbani, A., 2005).

C. algériensis, *C. officinalis* et *C. arvensis* sont utilisées en Algérie, depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour calmer les douleurs de tête et de dents, et comme antiseptique et vulnéraire. En usage interne, une infusion obtenue des fleurs est utilisées dans les cas d'engorgement du foie, de céphalées et comme dépuratif. En usage externe, la décoction serait utile pour soigner les affections des yeux (en application sous forme de compresses), les brûlures, ulcères, les crevasses, les abcès, les furoncles, l'acné, les engelures, les irritations cutanées, l'eczéma et les plaies de toute nature. Le principe colorant contenu dans les fleurs pourrait être utilisé comme colorant pour teindre les cheveux (Baba Aïssa., 1991).

I.1.4. Quelques Activités biologiques du genre *Calendula*

I.1.4.1. Activité antimicrobienne

L'effet antimicrobien des extraits hydroéthanoliques des fleurs et pétales de *C. officinalis* à différentes concentrations a été évalué contre huit types de bactéries (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* et *Enterococcus pneumoniae*). Les extraits de pétales étaient plus actifs contre toutes les bactéries en particulier *Pseudomonas aeruginosa* (zone d'inhibition de 25mm à la concentration de 100 µg/mL), et *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 14 mm à la concentration 50 µg/mL) ; tandis que les extraits des fleurs étaient moins efficaces que la partie des pétales (Hamad et al., 2011).

Lorsque l'huile essentielle des fleurs a été testée (en utilisant la méthode de diffusion de disque) contre diverses souches fongiques de référence, à savoir, *Candida albicans* (ATCC64548), *Candida dubliniensis* (ATCC777), *Candida parapsilosis* (ATCC22019), *Candida glabrata* (ATCC90030), *Candida krusei* (ATCC6258), et les levures hospitalières, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* et *Rhodotorella* spp., elle a montré une très bonne activité antifongique (à 15 µL/disque) (Gazim et al., 2008).

I.1.4.2. Activité antiinflammatoire

La fraction acétate d'éthyle de l'extrait méthanolique de fleurs de *C. officinalis* présentait une forte inhibition (84%) de l'inflammation induite par le 12-*O*-tétradécanoyl phorbol-13-acétate (TPA) (1 µg/oreille) chez des souris ayant une valeur ID₅₀ de 0.05 – 0.20 mg /oreille, par rapport à l'indométhacine comme médicament de référence. De plus, le bioguidage a montré que son activité était principalement due au triterpène glycosylé de type oléanane (Silwowski et al, 1973). Une dose de 1200 µg/oreille d'un extrait hydroéthanolique a montré une inhibition de 20% de l'œdème de la souris induit par l'huile de croton. L'activité a été attribuée à la présence de triterpénoïdes dont les trois composés les plus actifs étaient les esters de l'acide 3-myristique faradiol, de l'acide 3-palmitique du faradiol et du 4-taraxastérol (Della., 1990 ; Della et al., 1994).

L'extrait de fleurs de *C. officinalis* possédait une activité anti-inflammatoire significative contre l'œdème de la patte aigu induit par le carraghénane et le dextran. L'administration orale de 250 et 500 mg/kg de poids corporel d'extrait de *Calendula* produit une inhibition significative (50.6 et 65.9% respectivement) dans l'œdème des pattes des animaux induit par la carragénine et 41.9 et 42.4% respectivement avec l'inflammation produite par le dextran. L'administration de 250 et 500 mg/kg de poids corporel d'extrait de *Calendula* produit une inhibition de 32,9 et 62,3% par rapport aux contrôles, respectivement dans le modèle anti-inflammatoire chronique en utilisant du formol. La production de TNF-alpha par une culture de macrophages traitée avec du lipopolysaccharide (LPS) s'est révélée significativement inhibée par l'extrait de *Calendula*. De plus, des niveaux accrus de cytokines pro-inflammatoires IL-1beta, IL-6, TNF-alpha et IFN-gamma et de protéine de phase aiguë, protéine C-réactive (CRP) chez des souris produites par injection de LPS ont été inhibés de façon significative par l'extrait. Les niveaux de cyclooxygénase-2 (Cox-2) induits par le LPS chez la souris ont également été inhibés par le traitement par l'extrait (Preethi et al., 2009).

I.1.4.3. Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de *Calendula officinalis*, en utilisant différentes méthodologies a montré un effet antiradicalaire de *Calendula officinalis* contre différents radicaux (Fonseca et al., 2010).

Un extrait de *Calendula officinalis* a été évalué pour son potentiel antioxydant *in vitro* et *in vivo*. L'extrait de *C. officinalis* a montré une capacité de piégeage des radicaux superoxydes

générés par la photoréduction de la riboflavine et des radicaux hydroxyles générés par la réaction de Fenton et a inhibé la peroxydation lipidique *in vitro*. Les radicaux ABTS et DPPH, sont inhibés par cet extrait avec des IC₅₀ étaient de 6.5 et 100 mg/mL, respectivement. L'extrait a également piégé l'oxyde nitrique et la IC₅₀ s'est révélée être de 575 mg/mL. L'extrait a également produit un piégeage dose-dépendante de l'oxyde nitrique en culture. L'administration orale d'extrait de *Calendula* a inhibé la production de superoxyde dans les macrophages *in vivo* de 12.6% et de 38.7% à des doses de 100 et 250 mg/kg. L'administration orale de *Calendula officinalis* à des souris pendant 1 mois a augmenté significativement l'activité de la catalase. L'extrait a produit une augmentation significative des niveaux de glutathion dans le sang et le foie. La glutathion réductase a été augmentée, alors que la glutathion peroxydase s'est avérée être diminuée après l'administration de l'extrait de *Calendula* (Preethi et al., 2006).

Plusieurs études ont mis en évidence un potentiel antioxydant des différents extraits de *C. officinalis* (Popovic et al., 1999 ; Cordova et al., 2002).

I.1.4.4. Activité cytotoxique

L'activité anti-tumorale et immunomodulatrice de l'extrait de *C. officinalis* activé au laser (LACE) ont été étudiées *in vitro*. Des lignées cellulaires tumorales dérivées de leucémies, de mélanomes, de fibrosarcomes et de cancers du sein, de la prostate, du col de l'utérus, du poumon, du pancréas et colorectal ont été utilisées. L'effet de (LACE) sur la prolifération des lymphocytes du sang périphérique humain (PBL) *in vitro* a également été analysé. Des études du cycle cellulaire et de l'apoptose ont été réalisées dans des cellules traitées par LACE.

L'activité anti-tumorale *in vivo* a été évaluée contre les cellules de mélanome Ando-2 humaines sous-cutanées chez des souris. L'extrait de LACE a montré une puissante inhibition *in vitro* de la prolifération des cellules tumorales lors de tests sur une grande variété de lignées cellulaires tumorales humaines et murines. L'inhibition variait de 70 à 100%. Le même extrait a montré un effet opposé lorsqu'il a été testé sur des LSP et une lignée cellulaire NKL, dans lesquels une induction *in vitro* de la prolifération et de l'activation de ces cellules a été observée. L'injection intrapéritonéale ou l'administration orale d'extrait de LACE chez des souris a inhibé la croissance tumorale *in vivo* des cellules de mélanome Ando-2 et prolongé la survie des souris (Jiménez et al., 2006).

Quinze composés isolés de *C. officinalis* ont été évalués contre l'activation de l'antigène précoce du virus Epstein-Barr (EBV-EA) induite par le TPA, dix composés ont présenté des effets inhibiteurs modérés. En outre, après évaluation de l'activité cytotoxique contre les lignées

cellulaires cancéreuses humaines *in vitro*, deux glycosides triterpéniques ont montré des effets cytotoxiques contre le cancer du colons, la leucémie et les cellules de mélanome (Ukiya et al., 2006).

I.1.4.5. Activité anti HIV

Les fleurs de *C. officinalis* ont provoqué une réduction significative de l'activité de transcriptase inverse (RT) du VIH-1. Une inhibition de RT à 85% a été obtenue après un traitement de 30 min d'enzyme partiellement purifiée. Ces résultats suggèrent que l'extrait organique de fleurs de *C. officinalis* possède des propriétés anti-VIH d'intérêt thérapeutique. (Kalvatchev et al., 1997).

I.1.4.6. Effets sur la santé bucco-dentaire

L'effet de l'extrait des fleurs de *C. officinalis* sous forme de gel oral (par macération dans l'éthanol à 70% pendant 72 heures) a été évalué dans la mucite oropharyngée radio-induite chez des patients atteints d'un cancer de la tête et du cou. Quarante patients atteints de cancers du cou et de la tête traités par radiothérapie ou chimioradiothérapie concomitante ont reçu soit un rince-bouche à l'extrait de *Calendula* à 2%, soit un placebo. Les patients ont été traités avec la radiothérapie par télécobalt au fractionnement classique (200 cGy/fraction, cinq fractions par semaine, 30-35 fractions dans les 4-7 semaines). La mucite oropharyngée a été évaluée par l'échelle d'évaluation de la mucite buccale (OMAS). Le rince-bouche au *Calendula* a significativement diminué l'intensité de l'OM comparativement au placebo à la 2^{ème} semaine (score : 5.5 vs 6.8, $p = 0.019$), semaine 3 (score : 8.25 vs 10.95, $p < 0.0001$) et semaine 6 (score : 11.4 vs. 13.35, $p = 0.031$) (Babae et al., 2013)

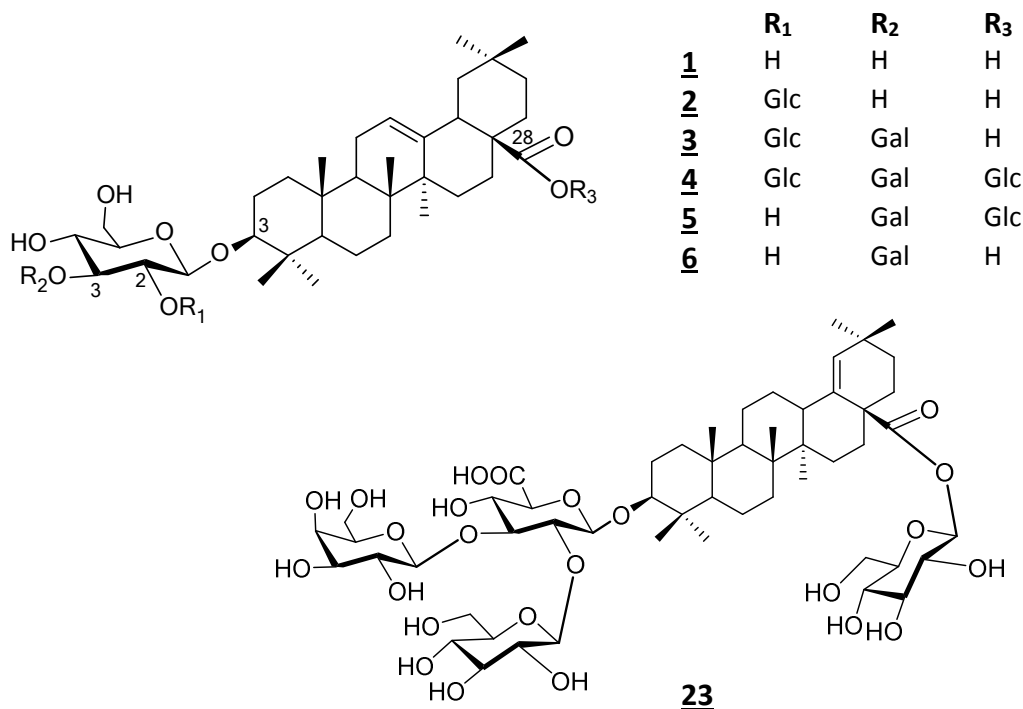
L'effet thérapeutique du gel de *C. officinalis* a été évalué dans la mucite orale induite par la chimiothérapie (5-FU) chez le hamster. Dans les groupes recevant à la fois une chimiothérapie et un traitement au *C. officinalis*, la guérison de la mucite buccale était significativement améliorée à la fois cliniquement et histopathologiquement ($P < 0.05$) par rapport au groupe non traité. Le groupe traité par un gel à 5% de *Calendula officinalis* démontré de meilleurs résultats en comparaison avec le groupe traité avec un gel de *C. officinalis* à 10% (Tavakoli., 2011).

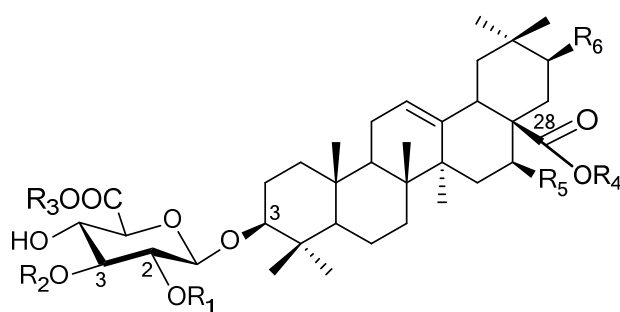
I.1.5. Métabolites isolés du genre *Calendula*

Les investigations phytochimiques du genre *Calendula* menées depuis 1971, sont rapportées seulement sur les deux espèces *C. officinalis* et *C. arvensis*. Les travaux ont conduit à la détermination des principaux métabolites secondaires de ce genre et qui sont majoritairement des terpenoïdes avec un grand pourcentage de saponines et triterpènes suivi des sesquiterpènes et caroténoïdes, en parallèle un bon nombre de flavonoïdes et d'acides phénoliques a été isolé.

I.1.5.1. Saponines

Une vingtaine de saponines (**1-23**) a été isolée de *C. officinalis* et *C. arvensis*, toutes ces saponines sont des glycosides de l'acide oléanolique avec comme partie osidique : le glucose, le galactose et l'acide glucuronique. Seulement, quatre saponines ont une génine différente, il s'agit des calendasaponines A-D, dont la calendasaponine A (**23**) est un glycoside de l'acide morolique et les calendasaponines B-C (**20-21**) sont des glycosides de l'acide cochalique et le dernier calendasaponine D (**22**) est un dérivé de l'acide machaérinique. Deux enchaînements sont retrouvés dans ces saponosides, selon le premier sucre lié directement à la génine en C-3 soit un glucose ou un acide glucuronique.





	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆		R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆
<u>7</u>	Glc	Gal	H	Glc	H	H	<u>15</u>	Glc	Gal	n-Bu	H	H	H
<u>8</u>	Glc	Gal	H	H	H	H	<u>16</u>	H	Gal	CH ₃	Glc	H	H
<u>9</u>	H	Gal	H	Glc	H	H	<u>17</u>	H	Gal	n-Bu	Glc	H	H
<u>10</u>	H	Gal	H	H	H	H	<u>18</u>	H	H	n-Bu	H	H	H
<u>11</u>	H	H	H	Glc	H	H	<u>19</u>	H	Gal	CH ₃	H	H	H
<u>12</u>	H	H	H	H	H	H	<u>20</u>	H	Gal	H	Glc	OH	H
<u>13</u>	Glc	Gal	CH ₃	Glc	H	H	<u>21</u>	Glc	Gal	H	Glc	OH	H
<u>14</u>	Glc	Gal	n-Bu	Glc	H	H	<u>22</u>	Glc	Gal	H	Glc	H	OH

Glc : β -D-glucose ; Gal : β -D-galactose ; GlcA : acide β -D-glucuronique ; n-Bu : n-butyl

Tableau I-01. Les saponines isolées du genre *Calendula*.

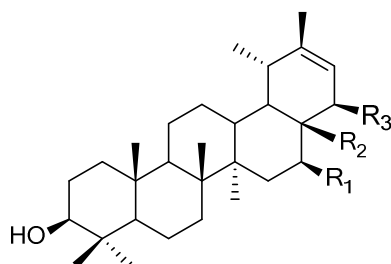
	Composés	Source	Références
<u>1</u>	Calenduloside A	<i>C. officinalis</i>	Vecherko et al., 1975
<u>2</u>	Calenduloside B		
<u>3</u>	Calenduloside C = Arvensoside C	<i>C. officinalis</i> <i>C. arvensis</i>	Vecherko et al., 1975 Elias et al., 1990
<u>4</u>	Calenduloside D = Arvensoside D	<i>C. officinalis</i>	Yoshikawa et al., 2001 Vecherko et al., 1975
<u>5</u>	Arvensoside A	<i>C. arvensis</i> <i>C. officinalis</i>	Pizza et al., 1987 ; Elias et al., 1990 Vecherko et al., 1975
<u>6</u>	Arvensoside B	<i>C. arvensis</i>	Chemli et al., 1987 ; Pizza et al., 1987 ; Elias et al., 1990
<u>7</u>	Calendulaglycoside A	<i>C. officinalis</i>	Yoshikawa et al., 2001
<u>8</u>	Calendulaglycoside B		Ukiya et al., 2006
<u>9</u>	Calendulaglycoside C		Vidal-Olivier et al., 1989
<u>10</u>	Calendulaglycoside D		
<u>11</u>	Calendulaglycoside D ₂		
<u>12</u>	Calendulaglycoside F		

13	Calendulaglycoside A-6'-O-méthylester	<i>C. officinalis</i>	Ukiya et al., 2006
14	Calendulaglycoside A-6'-O-butylester		
15	Calendulaglycoside B-6'-O-butylester		
16	Calendulaglycoside C-6'-O-méthylester		
17	Calendulaglycoside C-6'-O-butylester		
18	Calendulaglycoside F-6'-O-méthylester		
19	Calendulaglycoside F-6'-O-butylester		
20	Calendasaponine B	<i>C. officinalis</i>	Yoshikawa et al., 2001
21	Calendasaponine C		
22	Calendasaponine D		
23	Calendasaponine A		

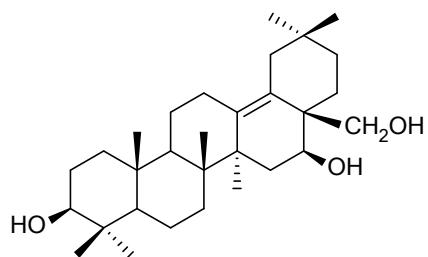
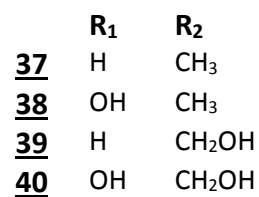
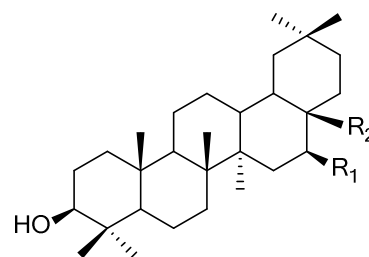
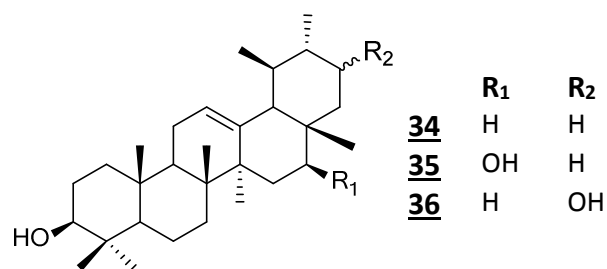
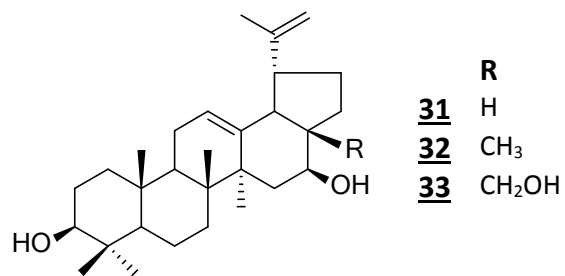
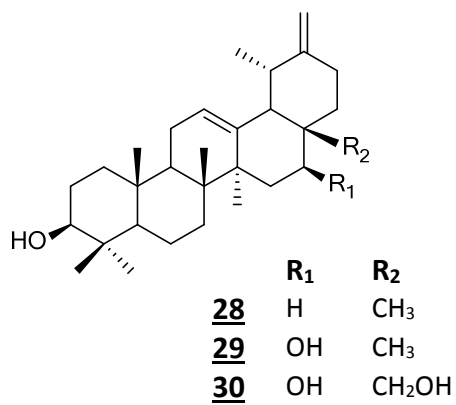
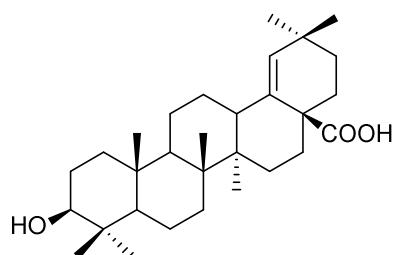
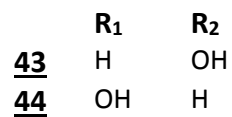
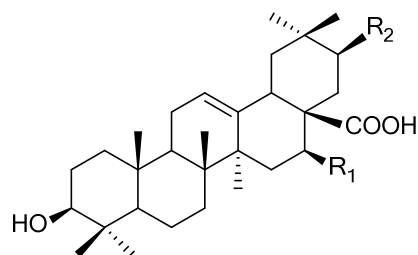
I.1.5.2. Triterpènes

Les études phytochimiques des fleurs de *C. officinalis* (Siwowski et al., 1973 ; Wilkomirski et al., 1979 ; Yoshikawa et al., 2001) ont mis en évidence la présence de triterpènes pentacycliques.

- Des dérivés de ψ -taraxastane : le ψ -taraxasterol (**24**), faradiol (**25**), héliantriol B₀ (**26**) et héliantriol C (**27**).
- Type Taraxastane : taraxasterol (**28**), arnidol (**29**), héliantriol B₁ (**30**).
- Type lupane : lupeol (**31**), calenduladiol (**32**), héliantriol B₂ (**33**).
- Type ursane : α -amyrine (**34**), breine (**35**), ursadiol (**36**) (Siwowski et al., 1973).
- Type oléanane : β -amyrine (**37**), maniladiol (**38**), erythrodiol (**39**), longispinogénine (**40**), héliantriol A₁ (**41**) (Wilkomirski et al., 1979), acide morolique (**42**), acide machaérinique (**43**) et l'acide cochalique (**44**) (Yoshikawa et al., 2001).

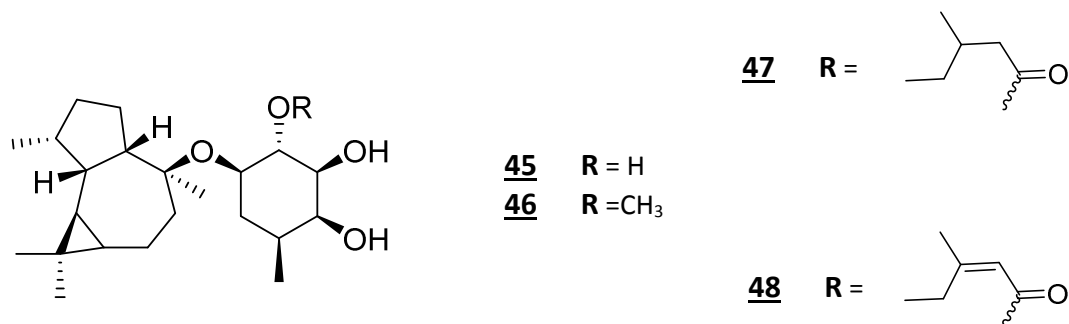


	R ₁	R ₂	R ₃
24	H	CH ₃	H
25	OH	CH ₃	H
26	OH	CH ₂ OH	H
27	OH	CH ₂ OH	OH

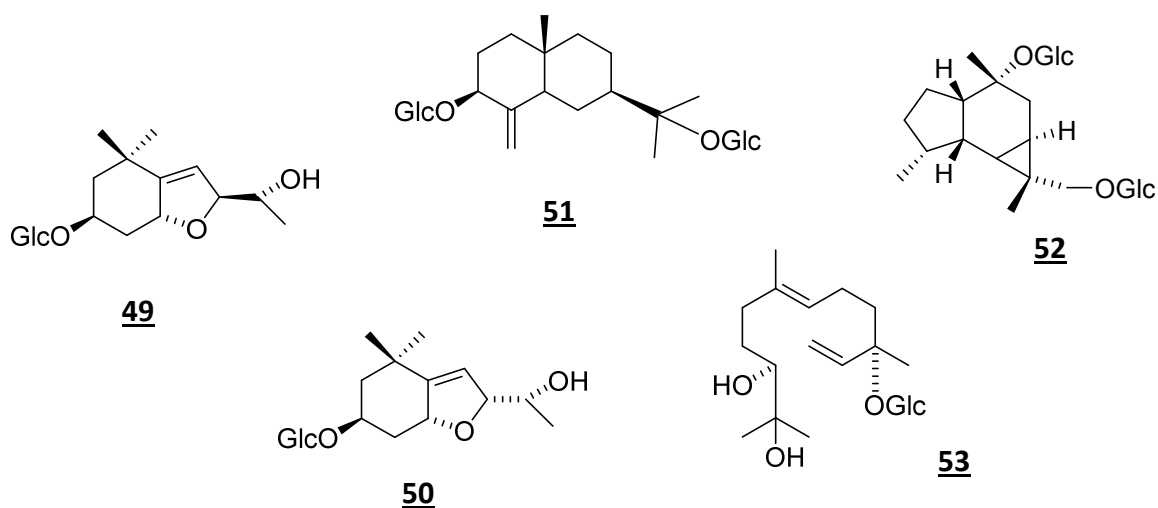
**41****42**

I.1.5.3. Sesquiterpènes

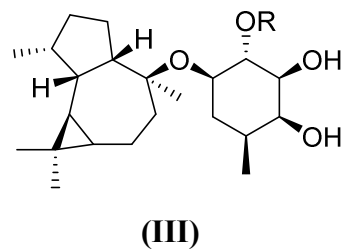
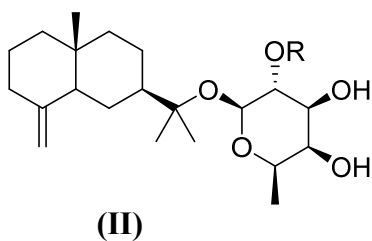
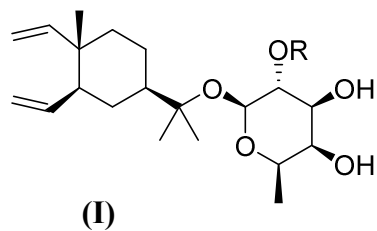
Quatre glycosides sesquiterpènes ont été isolés à partir des parties aériennes de *C. arvensis* (Pizza et al, 1988), qui sont l'arvoside B (**45**) et ses dérivés, dont la partie génine est un rare-alloaromadendrole avec le β -fucopyranosyle comme partie osidique.



Deux glucosides d'ionones [Officinosides A (**49**) et B (**50**)] avec trois sesquiterpène glycosides [Officinosides C (**51**) et D (**52**)] (Marukami et al, 2001) et icariside C₃ (**53**) (Yoshikawa et al, 2001) ont été purifiés à partir des fleurs de *C. officinalis*.



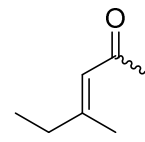
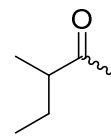
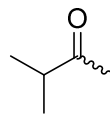
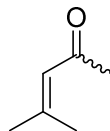
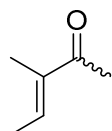
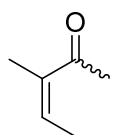
Une étude récente a permis de mettre en évidence la présence de quinze sesquiterpènes glycosylés (D'ambrosio et al., 2015). Parmi ces composés, deux ont été déjà caractérisés dans *C. arvensis* (Pizza et al., 1988). Il s'agit d'arvoside B (**45**) et son dérivé (2-méthylbutylique) (**48**).



I
54 R= H
55 R= a

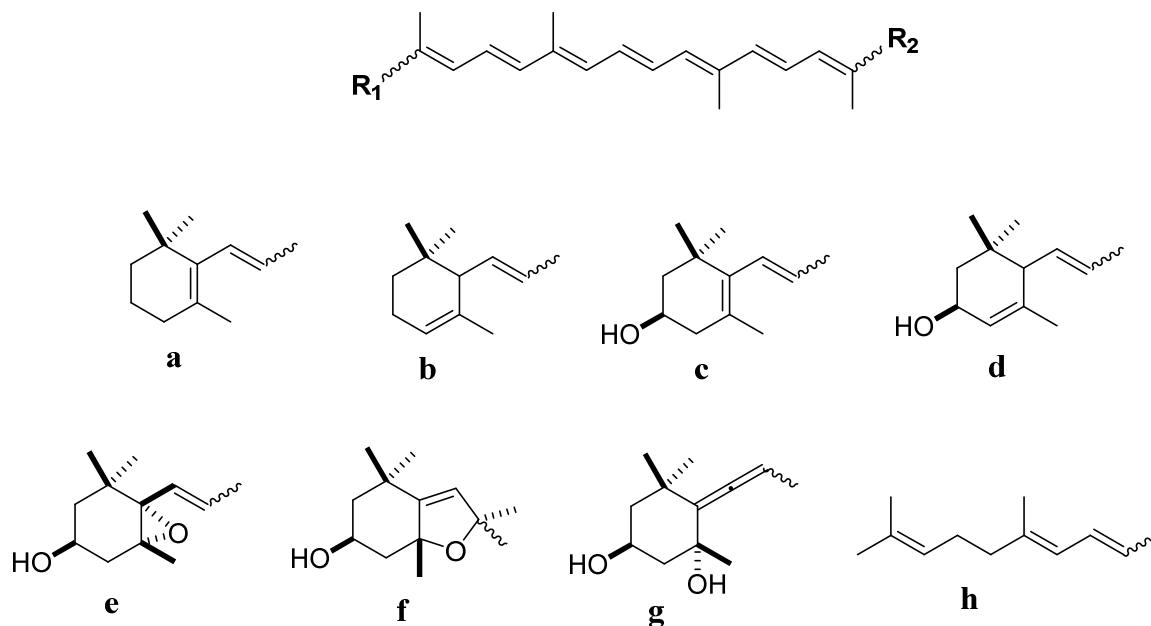
II
56 R= H
57 R= a
58 R= b
59 R= c
60 R= d
61 R= e
62 R= f

III
45 R= H
63 R= a
64 R= b
65 R= c
66 R= d
48 R= f



I.1.5.4. Caroténoïdes

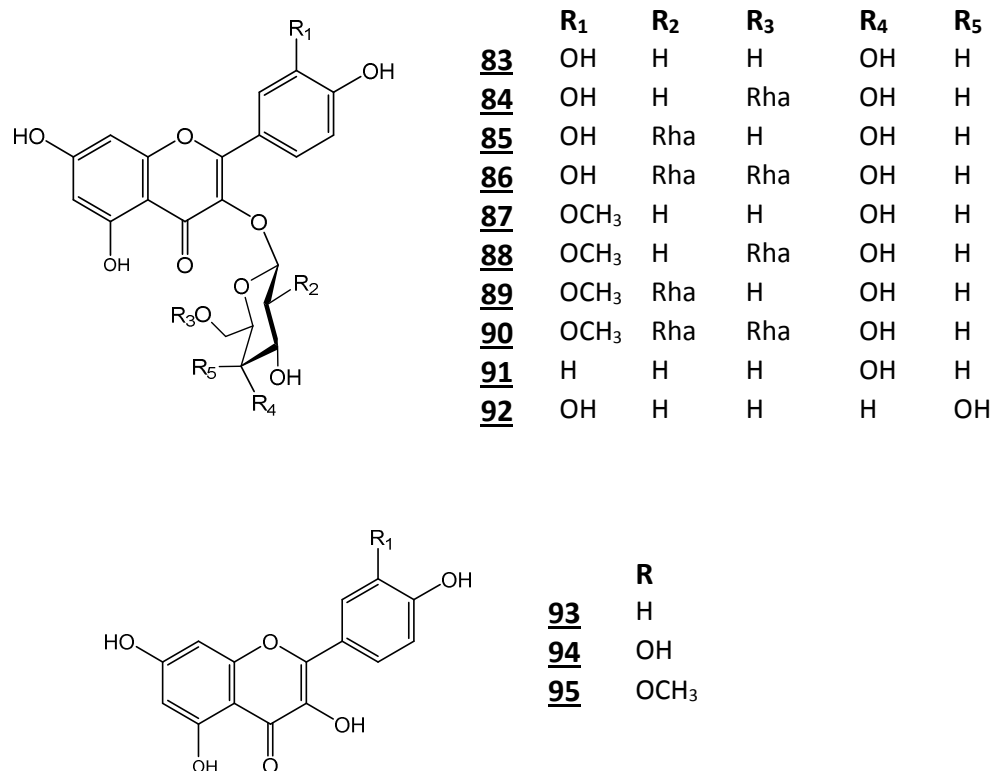
Une étude par HPLC a permis d'identifier seize caroténoïdes (67-82) dans les feuilles, pétales et pollens de *Calendula officinalis* L. Dans les pétales et les pollens, les principaux caroténoïdes étaient flavoxanthin et auroxanthin tandis que la tige et les feuilles contenaient principalement de la lutéine et β -carotène (Bako et al., 2002).



		R ₁	R ₂
67	Antheraxanthine	e	c
68	Auroxanthine	f	f
69	α -carotène	a	b
70	β -carotène	a	a
71	α -cryptoxanthine	c	b
72	β -cryptoxanthine	c	a
73	Flavoxanthin/chrysanthemaxanthine	f	d
74	Luteine	c	d
75	Lutein 5,6-epoxide	e	d
76	Luteoxanthine	e	f
77	Lycopene	h	h
78	Mutatoxanthine	f	c
79	Neoxanthine	g	e
80	Neochrome	g	f
81	Violaxanthine	e	e
82	Zeaxanthine	c	c

I.1.5.5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (**83-95**) caractérisés dans ce genre sont tous des flavonols et leurs dérivés glycosylés, ont été isolés majoritairement de *C. officinalis* (Ukiya et al., 2006 ; Yoshikawa et al., 2001) (Tableau I-02). Seuls les composés (**83**), (**84**) et (**88**) ont été obtenus aussi de *C. arvensis* (Asolkar et al., 1992).

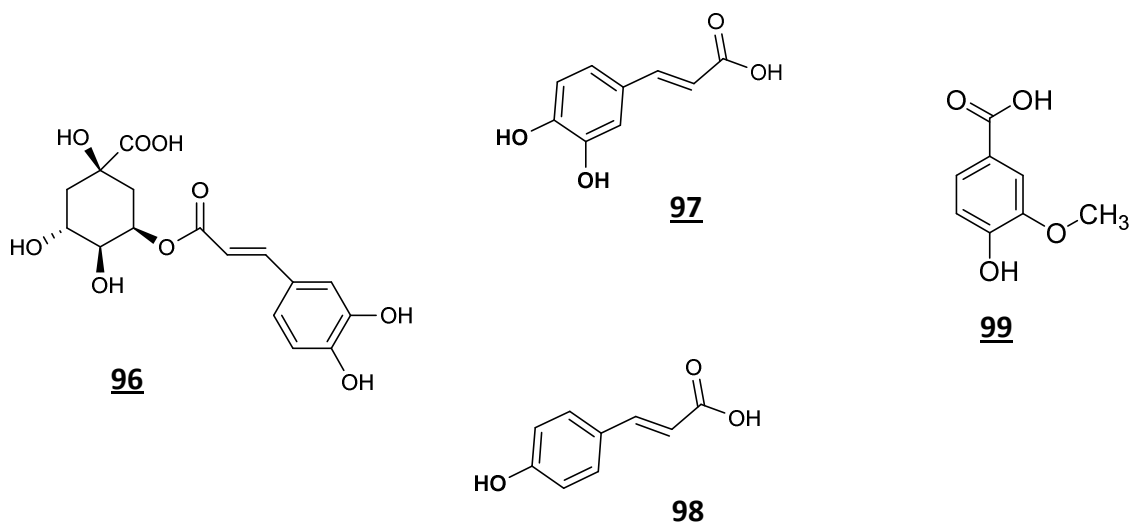
**Tableau I-02.** Les flavonoïdes isolés du genre *Calendula*.

	Composé	Source	Références
83	Quercetine-3- <i>O</i> -glucoside	<i>C. officinalis</i>	Yoshikawa et al., 2001 ;
84	Quercetine-3- <i>O</i> -rutinoside	<i>C. arvensis</i>	Ukiya et al., 2006 Asolkar et al., 1992
85	Quercetine-3- <i>O</i> -neohesperidoside	<i>C. officinalis</i>	Yoshikawa et al., 2001
86	Quercetine-3- <i>O</i> -2 ^{G*} -rhamnosylrutinoside		
87	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -glucoside		
88	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -rutinoside	<i>C. officinalis</i> <i>C. arvensis</i>	Yoshikawa et al., 2001 ; Ukiya et al., 2006 Asolkar et al., 1992
89	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -neohesperidoside	<i>C. officinalis</i>	Yoshikawa et al., 2001
90	Isorhamnetine-3- <i>O</i> -2 ^{G*} -rhamnosylrutinoside		Ukiya et al., 2006
91	Astragalin	<i>C. officinalis</i>	Arora et al., 2013
92	hyperoside		
93	Kaempferol		
94	Quercetine		
95	Isorhamnetine		

* G : rhamnose en position 2 de glucose de rutinoside.

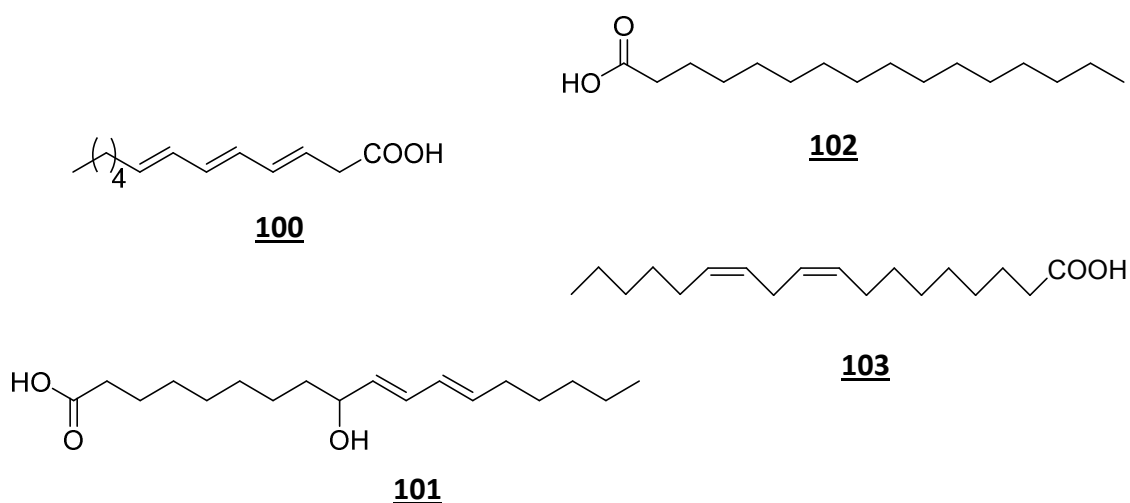
I.1.5.6. Acides phénoliques

Une caractérisation sur des plaques CCM à partir des différents extraits obtenus des fleurs de *C.officinalis* a permis d'identifier quatre acides phénoliques : acide chlorogénique (**96**), acide caféique (**97**), acide coumarique (**98**) et acide vanillique (**99**) (Ćetković et al., 2003).



I.1.5.7. acides gras

A partir de *C. officinalis* et *C. arvensis* sont caractérisés : l'acide calendique (**100**) et l'acide dimorphécolique (**101**) (Ulchenko et al., 1998 ; Chisholm et al., 1967). L'acide palmitique (**102**) et linoléique (**103**) ont été identifiés de *Calendula persica* (Mamedova et al., 1995).



I.1.5.8. Huiles essentielles

Les composés prédominants dans les huiles essentielles de *C. officinalis* cultivée diffèrent d'un pays à un autre :

Le δ -cadinène (22.5%), l' α -cadinol (20.4%), l'épi- α -muurol (12.9%), le δ -cadinène (8.9%) et l' α -muurolène (5.6%) étaient les composés majoritaires des H.E obtenus des fleurs de *C. officinalis* cultivées au Brésil (Gazim et al, 2008). Tandis que l' α -cadinol (26,5%), le τ -cadinol+ τ -muurol (9,8%) et γ -cadinène (3.0%) et α -thujène (26.9%), τ -muurol (24.9%), δ -cadinène (13.1%) et le germacrène D (2.8%) étaient les principaux composés identifiés des H.E de *C. officinalis* collectés en Serbie (Petrovic et al, 2007) et en Afrique du Sud (Okoh et al, 2008).

Les huiles essentielles de *C. officinalis* cultivées en Lituanie sont caractérisées par de fortes teneurs en α -thujène (14.8-26.8%), α -pinène (10,9-16,3%), germacrène D (7.6-11.6%), en γ -cadinène (8.5% -15.3%) et le δ -cadinène (8.2-16.1%) (Kaškonienė et al, 2011).

I.1.6. *Calendula stellata* Cav. (1791)

I.1.6.1. Place dans la systématique

Royaume : Plantes

Sous royaume : Tracheobiontes

Embranchement : Spermatophytes

Division : Magnoliophytes

Classe : Magnoliopsides

Sous classe : Asteridae

Ordre : Astéales

Famille : Asteraceae

Genre : *Calendula*

Espèce : *Calendula stellata*

Adolphe Raeschel, botaniste nomenclateur Allemand, désigne cette espèce sous le nom de *Calendula stellata*, parce que son fruit ressemble à une étoile (Figure I-04). Cette plante peut être employé comme les autres soucis ; étant céphalique, antispasmodique, emménagogue, apéritif, résolutif (Delamethrie., 1799).

I.1.6.2. Description botanique

Plante annuelle à tige florale peu développée à la floraison. Souci à grands capitules de 20 à 40 cm de diamètre. Cette espèce a de très-grands rapports avec le souci des champs (*C. arvensis*) ; elle s'en distingue par la forme de ses semences, surtout par celles de la circonférence, bien plus grandes et de deux sortes ; par ses fleurs plus petites, et par ses feuilles ordinairement plus étroites ou plus allongées.

Ses tiges sont droites, un peu couchées à leur base, hautes, rudes, velues, striés, rameutes, dures, cylindriques, garnies de feuilles alternes, sessiles, un peu rudes, pubescentes surtout dans leur jeunesse, légèrement ciliées, oblongues, lancéolées, rétrécies à leur base en spatule, surtout les inférieures, sinuées ou légèrement dentées à leur contour, obtuses à leur sommet, les feuilles supérieures étroites, lancéolées, souvent un peu aiguës.



A : fleurs [2], B : fruit [3], C : dessin illustrant l'espèce par son inventaire Cavanille (Cavanille et José., 1791), D : comparaison entre le fruit des *C. officinalis*, *stellata* et *arvensis* [4].

Figure I-04. Images et dessin illustrant l'espèce *C. stellata* (Souci étoilée).

Les fleurs sont terminales, solitaires, assez nombreuses, supportées sur de longs pédoncules, simples, feuilles, grêles, striées, très-rudes. Le calice est pubescent chargé d'aspérités, composé de plusieurs folioles presque toutes égales, disposées sur deux rangs, étroites, lancéolées, tubulées, une fois plus courtes que la corolle. Celle-ci est d'un jaune-pâle, un peu plus petite que celle du souci des jardins. Les demi-fleurons sont étroits, linéaires, à trois ou quatre dents. Les semences sont roussâtres, de deux sortes ; celles du centre étroites, fortement arquées, presque en coquille de limaçon, hérissées de pointes sur leur carène. Celles de la circonférence au nombre de dix, cinq extérieures et alternes ovales, lancéolées, assez larges, membraneuses, échancrées, presque lobées ou denticulées sur les bords de leur membrane, un peu courbées en nacelle, hérissées sur le dos, ouvertes en étoile ; les cinq autres fortement recourbées en dedans, tant à leurs bords qu'à leur sommet, de forme naviculaire (Baillon, 1886).

I.1.6.3. Travaux antérieurs sur l'espèce *C. stellata* Cav.

La synthèse bibliographique a montré que seules les compositions de l'huile essentielle et acides gras ont été évalués (Arora et al., 2013). Aucune étude phytochimique ou biologique n'a été apportée sur cette espèce.

Chapitre 2

Aperçu bibliographique sur le
genre *Scabiosa*

I.2.1. Introduction sur la famille des Caprifoliaceae

Cette famille largement distribuée se compose des herbes, annuelles, bisannuelles, vivaces ou des arbustes, parfois lianescents (Dupont et Guignard., 2012). Son nom provenant du latin *caprifolium*, qui signifie « feuille de chèvre/de bouc », car les tiges volubiles de certains chèvrefeuilles rappellent la forme des cornes de bouc [6].

Dans la classification APGIV (2016), les Caprifoliaceae comprennent toutes les espèces des Dipsacaceae, Valerianaceae et Caprifoliaceae de la classification traditionnelle, à l'exception des genres *Sambucus* et *Viburnum* (qui sont dorénavant des Adoxaceae).

Environ 900 espèces dans le monde, réparties dans 36 genres, dont les principaux sont : *Valeriana* (200 esp.), *Lonicera* (150 esp.) et *Scabiosa* (80 esp.). Elle fait partie de l'ordre des Dipsacales qui comprend des espèces dont les fleurs ont un périanthe différencié en calice et en corolle, celle-ci à pétales soudés entre eux (Dupont et Guignard, 2012) [6].



Figure I-05. Distribution mondiale de la famille des Caprifoliaceae [5].

Caractéristiques générales permettant de reconnaître une plante appartenant à cette famille :

- Les plantes de la famille des Caprifoliaceae concernent des arbustes et des petits arbres, quelques lianes et herbacées surtout présente dans l'hémisphère boréal, son feuillage est démunie de stipules ou de tailles si réduites qu'ils sont à peine visibles.
- Des feuilles opposées et pennées arborant des bords lobés ou dentés et souvent parsemées de poils glanduleux, son inflorescence est regroupée en cyme.

- Des fleurs de teinte allant du blanc, jaune à rouge, elles sont hermaphrodites actinomorphe ou zygomorphe avec un calice à cinq dents, son fruit est une baie charnue renfermant des graines (Baillon., 1880).
- Calice souvent petit et composé de 5 sépales, dont la base est soudée en tube, lui-même soudé à l'ovaire.
- 5 étamines soudées au tube de la corolle ;
- ovaire infère, à 2-5 loges, surmonté d'un style terminé par 2-5 stigmates ;
- Fruit : baie ou drupe [6].

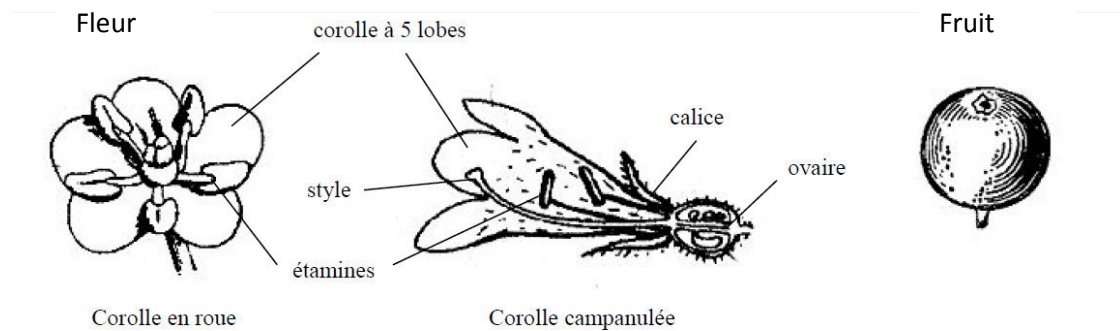


Figure I-06a. Dessin explicatif des caractéristiques des fleurs et fruits de la famille des Caprifoliaceae (Dupont et Guignard, 2012).



Fleurs de 2 sortes de *Viburnum opulus* (viome obier) ; fleurs régulières de *V. lantana* (viome lantane), *Sambucus racemosa* (sureau à grappes) et *Lonicera pyrenaica* (chèvrefeuille des Pyrénées) ; fleurs irrégulières de *L. periclymenum* (c. des bois)



Fruits de *Viburnum opulus* (viome obier), *Viburnum tinus* (viome-tin), *Sambucus racemosa* (sureau à grappes), *Lonicera periclymenum* (chèvrefeuille des bois) et *Lonicera nigra* (chèvrefeuille noir)

Figure I-06b. Fleurs et fruits des espèces appartenant à la famille des Caprifoliaceae [6].

Toutes les plantes de la sous-famille des Dipsacaceae ont comme caractères constants la direction descendante de l'ovule, qui les séparent des Astéraceae, et la présence d'un albumen dans la graine, qui les distinguent des Astéraceae (Baillon., 1880).

I.2.2. Le genre *Scabiosa* L.

Scabieuse (*Scabiosa*) est un genre de plantes dicotylédones, à fleurs complètes, agrégées, monopétales, de la famille des Caprifoliaceae. Il comprend des herbes tant exotiques qu'indigènes de l'Europe, dont les feuilles sont opposées, simples ou pinnatisides ; les fleurs très-ordinairement terminales et les tiges presque ligneuses dans quelques espèces.

- Le caractère essentiel de ce genre est d'avoir :

Fleurs composées de fleurons. Les fleurons sont rassemblés dans un calice commun divisé en plusieurs folioles qui entoure un réceptacle convexe. Chaque fleuron renfermé en particulier dans un double calice qui repose sur le germe.

- Caractères génériques

Les fleurs sont agrégées, réunies sur un réceptacle commun, convexe, chargé de paillettes ou de filaments raides, ou nu ; muni d'un calice commun ouvert, composé de folioles disposées sur un ou plusieurs rangs.

Chaque fleur séparée offre :

1°. Un calice propre double ; l'extérieur souvent plus court, membraneux, plissée, persistant ; l'intérieur terminé par cinq découpures tubulées, presque capillaires.

2°. Une corolle gamopétale, tubulée, à quatre ou cinq divisions régulières ou irrégulières, insérée sur le calice interne.

3°. Quatre étamines, quelquefois cinq, dont les filaments sont tubulés, capillaires, attachés au bas du tube de la corolle, terminés par des anthères oblongues, horizontales.

4°. Un ovaire environné par une gaine propre en forme de petit calice, terminé par un stigmate échancré.

Les semences sont enveloppées par les deux calices propres, solitaires, ovales -oblongues, diversement couronnées par les calices (Lamarck et poiret., 1804).

Les scabieuses sont toutes originaires de l'ancien monde et n'existent en Amérique et l'Océanie que pour y avoir été introduite. On les trouve dispersées dans toute l'Asie, l'Afrique et l'Europe ; mais elles abondent surtout en Orient et dans la région méditerranéenne (Figure I-07) (Baillon., 1880).

Ce genre est représenté par (80-100) espèces dans le monde, natives dans les pays du bassin méditerranéen (Figure I-07). En Algérie, on compte entre 18 (Battendier., 1988) et 12 espèces (Quezel et santa., 1963).

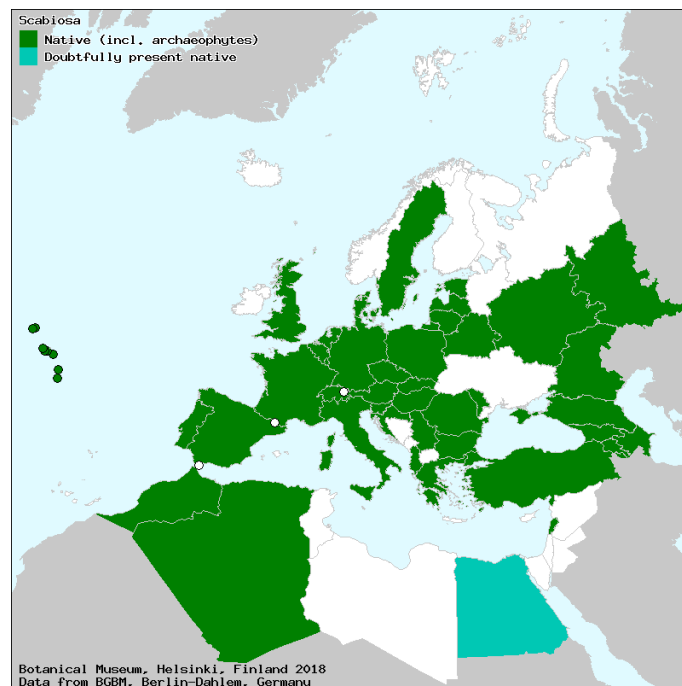
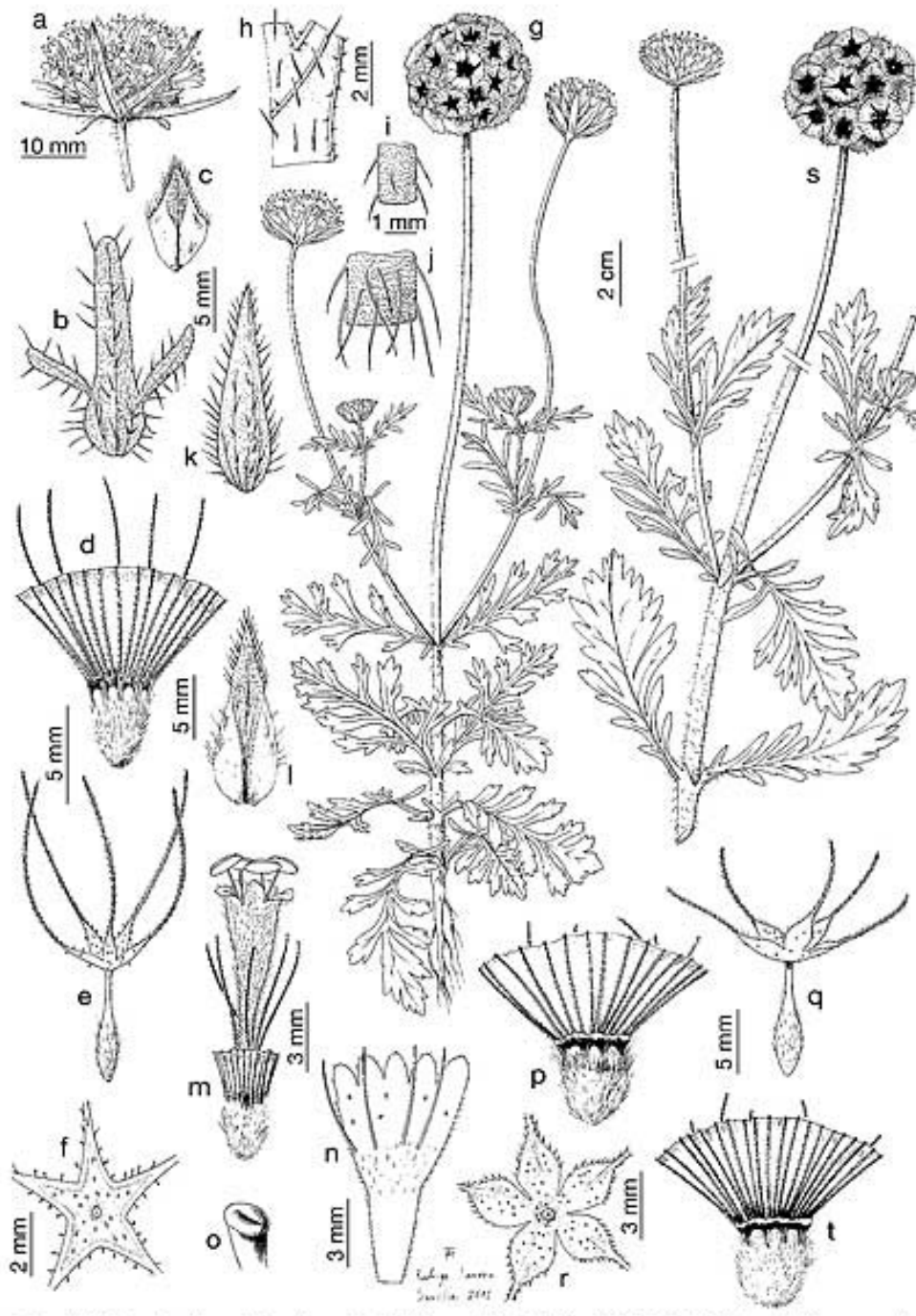


Figure I-07. Carte géographique du genre *Scabiosa* [1].

Les plantes de ce genre sont caractérisées par la préfloraison imbriquée de la corolle, l'indépendance des anthères, l'existence des involucelles floraux et imposition des feuilles (Baillon, 1880).

Les Scabieuses ont à peu près les fleurs des Cardères, avec une corolle à tube plus court et un limbe plus évasé, à quatre ou cinq lobes d'autant plus inégaux et plus développés, que les fleurs se rapprochent davantage de la base de l'inflorescence. Dans les corolles très-irrégulières de la circonférence, c'est le lobe antérieur qui est le plus grand et qui recouvre les latéraux, ordinairement plus développés que le postérieur ou les deux postérieurs qu'ils enveloppent dans le bouton.



a, b, c, d, e, f : les éléments caractéristiques de l'espèce *Scabiosa stellata*.

Figure I-08. Caractéristiques générales des scabieuses.

Les étamines sont au nombre de quatre, alternes avec les divisions de la corolle, et c'est l'étamine postérieurs qui fait défaut.

Leurs fleurs, entourées chacune d'un involucre sacciforme, qui persiste autour de leur fruit, sont groupées en capitules terminaux, ovoïdes et globuleux, ou déprimés. Elles sont protégées par un involucre, dont les bractées sont foliacées ou rigides.

Les bractées qui plus haut sur le réceptacle, se situent au-dessous de chaque fleur. Elles sont ordinairement étroites, courtes, ou même elles disparaissent tout à fait.

L'involucre est très-variables dans les diverses sections du genre, quant à sa forme, les côtes ou les sillons qu'il porte, le nombre et la configuration des lobes ou des dents dont son orifice est découpé. Il y a également des grandes variations dans la forme et la taille des divisions du calice qui surmonte l'ovaire et persiste au-dessus du fruit, ainsi que dans la longueur du corps même du calice et du goulot réceptaculaire, quelquefois fort étroit et allongé, qui supporte ce dernier et sort par l'ouverture de l'involucre persistant (Baillon H, 1880).

I.2.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre *Scabiosa*

Plusieurs Scabieuses sont réputées pour être des remèdes contre la rage. Le *Scabiosa succisa* est dit-on, vénéneux ; on l'a aussi signalé comme fébrifuge. C'est une plante tinctoriale, qui donne une couleur verdâtre ; et assez astringente pour pouvoir servir à préparer les peaux. Le *S. arvensis* a été recommandé contre les maladies des poumons et la gale. De même que les *S. sylvatica* et *S. columbaria*. Le *S. cochinchinensis* a été employé dans la médecine, et le *S. centauroides* passait en Europe pour antisypilitique et antidartreux. (Baillon H., 1880).

◆ *Scabiosa succisa (succisa pratensis)*

La scabieuse est une plante médicinale qui possède des propriétés sudorifiques et dépuratives, expectorantes et vulnéraires. La scabieuse est utilisée dans le traitement des maladies de la peau, comme les démangeaisons et la gale, ainsi que la teigne et le charbon. Elle favorise efficacement la respiration des personnes asthmatiques.

- Noms communs : scabieuse, mors du diable, herbe de Saint Joseph, scabieuse des bois, tête de loup, scabieuse des près.

- Utilisations traditionnelles et vertus :

Autrefois la scabieuse servait à guérir la gale, d'où son nom latin scabies qui veut dire « gale ».

- Propriétés thérapeutiques et médicinales :
- Sudorifique et dépurative, la scabieuse est aussi expectorante et vulnérable.
- Elle est principalement utilisée dans les maladies cutanées, maladies de peau, démangeaison et la gale.
- On l'employait aussi contre le charbon, la teigne et les manifestations de la peau du à la syphilis.
- Favorisant l'expectoration, elle était aussi préconisée au début des affections respiratoires, dans les rhumes et les gripes, les bronchites.
- Elle permet de faciliter la respiration des personnes atteinte d'asthme (Movsumov et Yusifova., 2015).

I.2.4. Quelques activités biologiques du genre *Scabiosa*

Des études limitées ont été reportées sur les extraits obtenus à partir des espèces du genre *Scabiosa*. Ces études ont démontré un effet antibactérien dans les cas de *S. atropurpurea* (Bussman et al., 2001), *S. hymettia* (Christopoulou et al., 2008), *S. columbaria* (Van-Vuren et al., 2010), ou *S. arenaria* (Hilla et al., 2016). Les extraits de *S. arenaria* et *S. tschiliensis* ont été évalués pour leur activité antioxydante (Hilla et al., 2015 ; Wang et al., 2017).

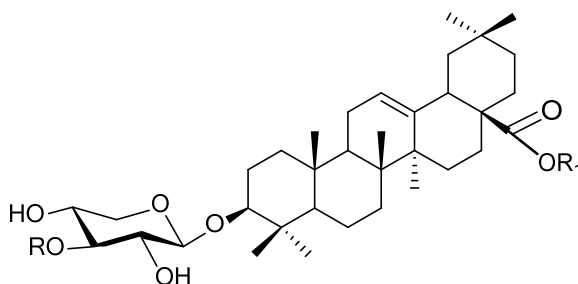
I.2.5. Métabolites isolés du genre *Scabiosa*

Plusieurs plantes de ce genre ont fait l'objet d'études phytochimiques depuis 1968. Les travaux ont conduit à la détermination des principaux métabolites secondaires du genre et qui sont majoritairement des saponines et des flavonoïdes avec des iridoïdes.

I.2.5.1. Saponines

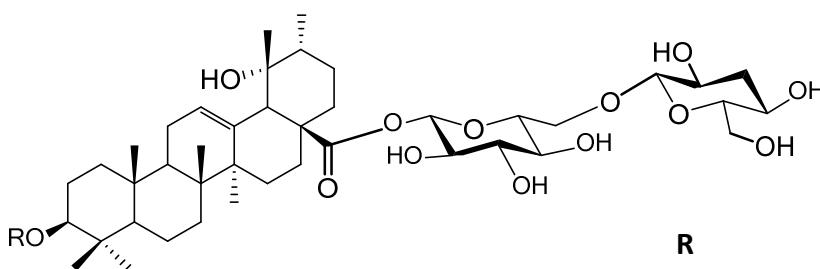
Les travaux menés sur quatre scabieuses ont permis d'isoler 25 saponines, dont 22 sont caractérisées pour la première fois :

A partir des racines de *S. soongoria*, sept glycosides de l'acide oléanolique nommés songoroside A, C, E, G, I, M et O (**106-112**) ont été caractérisés pour la première fois (Akimaliev et al., 1976 a et b). La partie osidique comporte de un à sept sucres constituée du : β -D-xylose (Xyl), le α -L-rhamnose (Rha) et le β -D-glucose (Glc).



	R	R₁
106 Songoroside A	H	H
107 Songoroside C	Rha	H
108 Songoroside E	Xyl(1→3)Rha	H
109 Songoroside G	Xyl(1→3) Xyl(1→3)Rha	H
110 Songoroside I	Xyl(1→3)Xyl(1→3)Xyl(1→3)Rha	H
111 Songoroside M	Xyl(1→3) Xyl(1→3)Rha	Glc(1→6)Glc
112 Songoroside O	Xyl(1→3)Xyl(1→3)Xyl(1→3)Rha	Glc(1→6)Glc

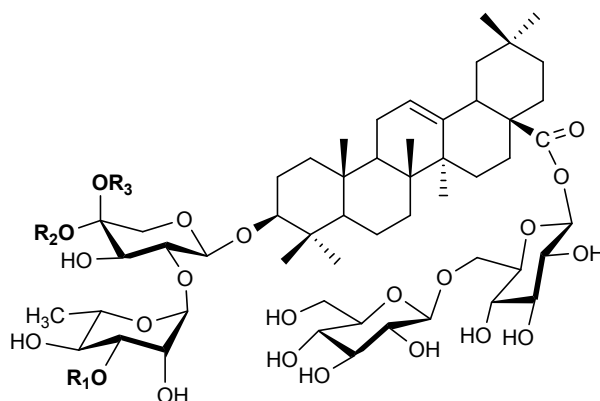
Quatre glycosides de l'acide pomolique ; nommés « Scabrioside A-D » (**113-116**), ont été isolés à partir des racines de *S. rotata* (Baykal et al., 1998). Ce sont des bidesmosides avec les mêmes unités osidiques rencontrées dans *S. soongoria*. En plus de α -L-arabinose (Ara) et de β -D-allopyranose, ce dernier constitue avec le glucose la chaîne disaccharide liée en position 28 de la génine.



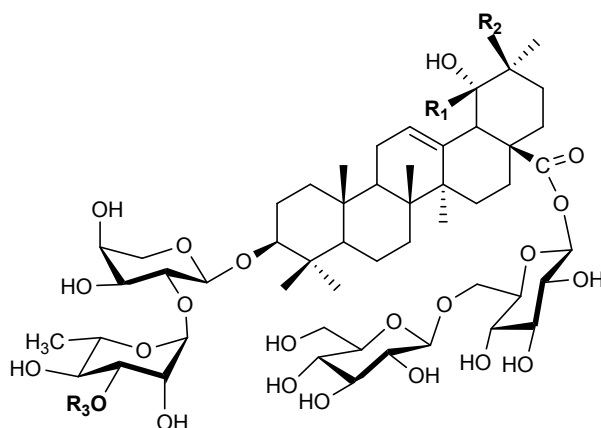
	R
113 Scabrioside A	Xyl
114 Scabrioside B	Rha(1→2)Xyl
115 Scabrioside C	Rha(1→2)Ara
116 Scabrioside D	Glc(1→3)Rha(1→3)Xyl

L'étude phytochimique de la plante entière *S. tchilliensis* a permis de mettre en évidence la présence de treize saponines dont onze ont été de structures nouvelles, nommées « scabiosaponine A-K » (**117-127**) (Zheng et al., 2004). Ce sont des bidesmosides de l'acide oléanolique, l'acide pomolique et l'acide siaresinolique. La partie osidique est constituée des

mêmes sucres retrouvés dans les saponines de *S. rotata* excepté de l'allopyranose, cette partie porte de quatre à sept unités.

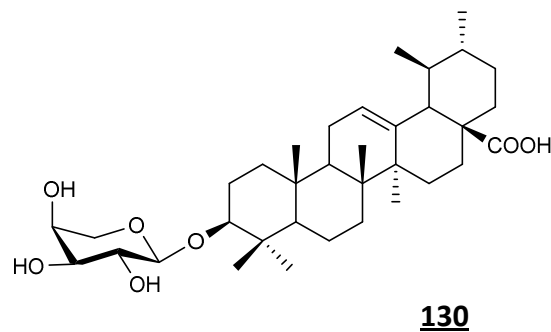


		R₁	R₂	R₃
117	Scabiosaponine A	Glc(1→4)Xyl	H	OH
118	Scabiosaponine B	Xyl(1→4)Glc(1→4)Xyl	H	OH
119	Scabiosaponine C	Glc(1→4)Xyl	H	O-Glc
120	Scabiosaponine D	H	H	O-Glc
121	Scabiosaponine E	Glc	OH	H
122	Scabiosaponine F	Xyl	OH	H
123	Scabiosaponine G	Glc(1→4)Glc	OH	H
128	Hookeroside A	Glc(1→4)Xyl	OH	H
129	Hookeroside B	Xyl(1→4)Glc(1→4)Xyl	OH	H



		R₁	R₂	R₃
124	Scabiosaponine H	CH ₃	H	Glc(1→4)Glc
125	Scabiosaponine I	CH ₃	H	Glc
126	Scabiosaponine J	H	CH ₃	Glc
127	Scabiosaponine K	H	CH ₃	Glc(1→4)Xyl

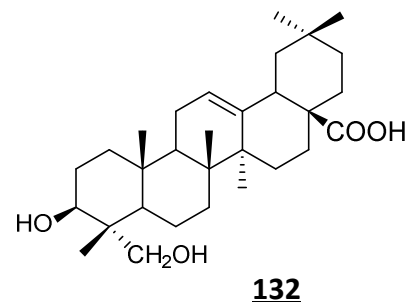
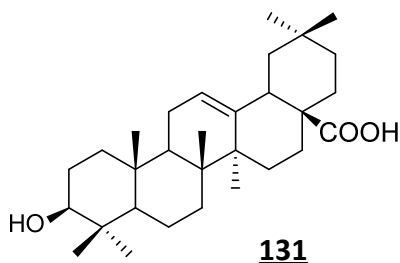
Récemment, une autre *Scabieuse*, *S. prolifera*, a révélé la présence de l'acide ursolique-3-O- α -L-arabinopyranoside (Al-Qudah et al., 2017).

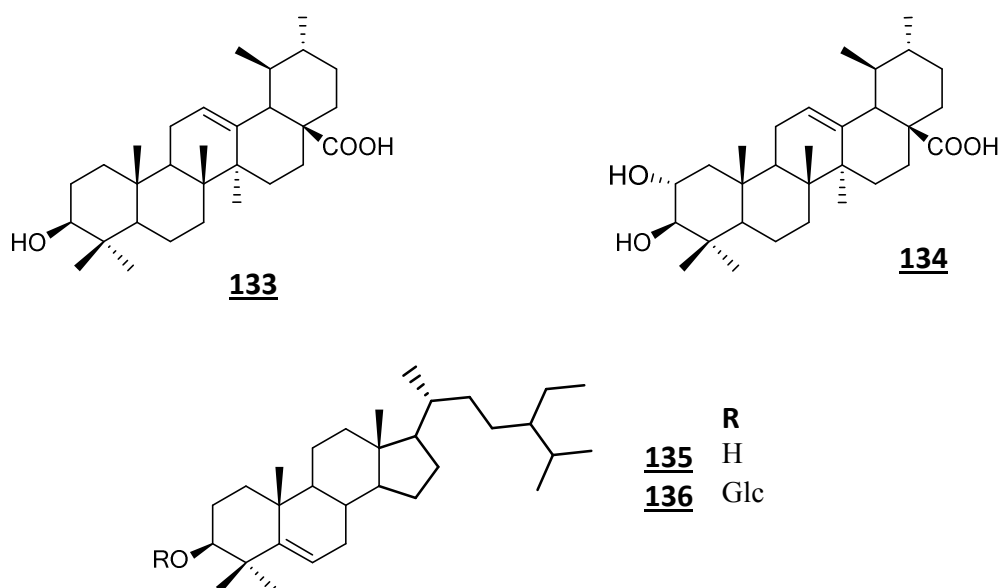


I.2.5.2. Triterpènes et stérols

L'acide oléanolique (**131**) a été obtenu majoritairement dans les études reportées sur huit scabieuses (Movsumov et Yusifova., 2015). Tandis que l'hédéragénine (**132**) et l'acide ursolique (**133**) ont été obtenus de *S. columbaria* et *S. urcanica* seulement (Movsumov et Yusifova., 2015). Une étude récente a mis en évidence la présence de l'acide corosolique (**134**) avec l'acide ursolique dans *S. prolifera* (Al-Qudeh et al., 2017).

Le β -sitosterol (**135**) a été caractérisé dans plusieurs scabieuses : la *S. columbaria* et *S. urcanica* (Movsumov et Yusifova., 2015), *S. Soongoria* (Akimaliev et al., 1988), *S. tchilliensis* (Wang et al., 2015) et *S. prolifera* (Al-Qudeh et al., 2017). A partir de ces deux dernières, le daucosterol (**136**) a été également isolé.





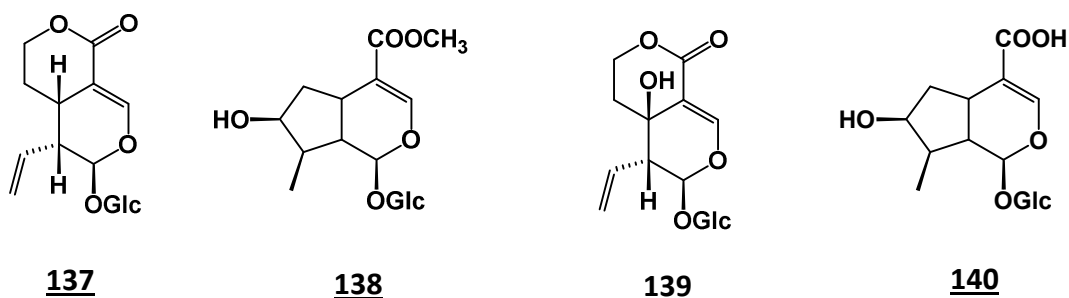
I.2.5.3. Iridoïdes

Les études phytochimiques portées sur cinq scabieuses ont mis en évidence la présence de quatre mono-iridoïdes et trois bis-iridoïdes :

I.2.5.3.1. Mono-iridoïdes

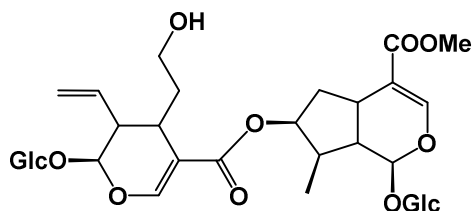
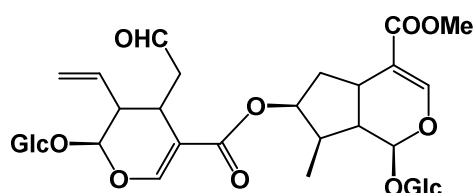
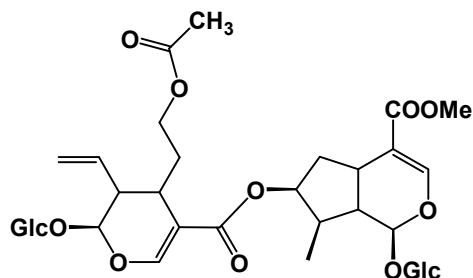
- Sweroside (**137**) et loganine (**138**) sont retrouvés dans *S. columbaria* (Horn et al, 2001), *S. varifolia* (Papalenzandrou et al., 2003), *S. hymettia* (Christopoulou et al., 2008), *S. atropurpuria* ssp *maritima* (Polat et al., 2010) et *S. tchilliensis* (Wang et al., 2015).

- A partir des deux espèces *S. varifolia* (Papalenzandrou et al., 2003) et *S. hymettia* (Christopoulou et al., 2008), ont été isolées le Swertiamarine (**139**) et l'acide loganique (**140**), ce dernier a été obtenu aussi de *S. atropurpuria* ssp *maritima* (Polat et al., 2010).

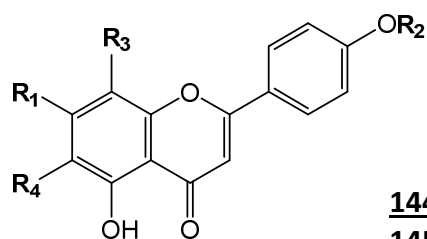


I.2.5.3.2. Bis-iridoïdes

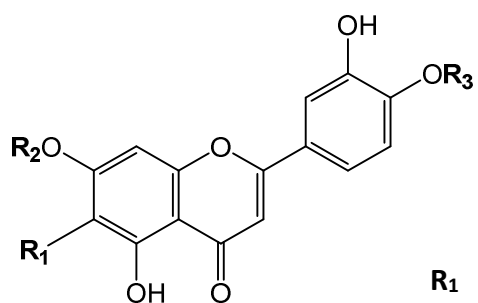
- Canthléoside (**141**) a été identifié à partir de *S. varifolia* (Papalenzandrou et al., 2003) et *S. atropupuria* ssp *maritima* (Polat et al., 2010).
- Sylvestroside I (**142**) et II (**143**) ont été caractérisés de *S. tchilliensis* (Wang et al., 2015).

**141****142****143****I.2.5.4. Flavonoïdes**

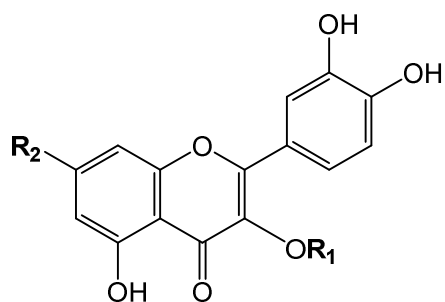
Plusieurs flavonoïdes (**144-167**) ont été isolés à partir des études menées sur neuf scabieuses (Tableau I-3). Les flavonoïdes caractérisés dans ce genre sont des flavonol ou flavone qui sont principalement des dérivés glycosylés de l'apigénine, lutéoline, quercétine et kaempferol.



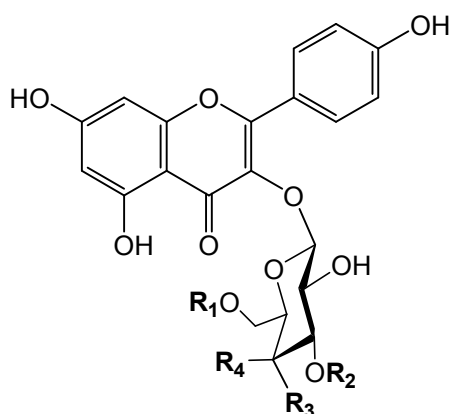
	R₁	R₂	R₃	R₄
144	OH	H	H	H
145	O-Glc	H	H	H
146	O-Rut	H	H	H
147	OH	Glc	H	H
148	C-Glc	H	H	H
149	OH	H	C-Glc	H
150	OCH ₃	H	H	C-Glc



	R ₁	R ₂	R ₃
<u>151</u>	H	H	H
<u>152</u>	H	Glc	H
<u>153</u>	H	GlcA	H
<u>154</u>	H	H	Glc
<u>155</u>	C-Glc	H	H
<u>156</u>	H	Ara(1→6)Glc	CH ₃
<u>157</u>	H	2''-O-éthyl-Glc	H
<u>158</u>	H	Glc	CH ₃



	R ₁	R ₂
<u>159</u>	H	OH
<u>160</u>	Gal	OH
<u>161</u>	Ara	OH
<u>162</u>	H	O-Glc



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>163</u>	OH	H	OH	H
<u>164</u>	Coum	Acétyl	OH	H
<u>165</u>	Coum	H	OH	H
<u>166</u>	Coum	Coum	OH	H
<u>167</u>	Coum	H	H	O-Coum

Coum= *p*-(*E*)-coumaryol

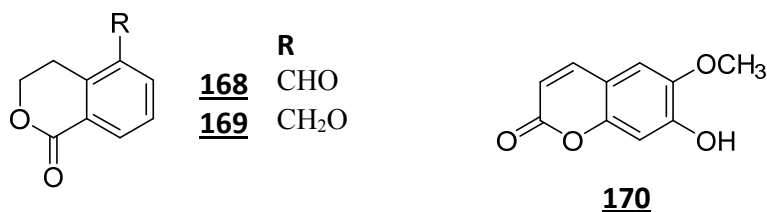
Tableau I-03. Les flavonoïdes isolés du genre *Scabiosa*.

	Composé	Source	Référence
144	Apigénine	<i>S. tenuis</i> , <i>S. argentea</i> <i>S. ochroleuca</i> , <i>S. comosa</i> <i>S. tchilliensis</i>	Perdetzoglou et al., 1994 Movsumov et Yusifova., 2015 Wang et al., 2015
145	Cosmosine	<i>S. tchilliensis</i> <i>S. micrantha</i> <i>S. arenarea</i>	Wang et al., 2015 Movsumov et Yusifova., 2015 Hilla et al., 2016
146 147	Apigénine-7- <i>O</i> - β -D-rutinoside Apigénine-4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>S. tchilliensis</i>	Wang et al., 2015
148 149	Isovetexine Vitexine	<i>S. tenuis</i>	Perdetzoglou et al., 1994
150	Swerticine	<i>S. atrpurpuria</i> , <i>S. algea</i>	Zemtsova et al., 1977
151	Lutéoline	<i>S. arenarea</i> <i>S. tchilliensis</i> <i>S. tenuis</i> <i>S. georgica</i> <i>S. argentea</i>	Hilla et al., 2016 Wang et al., 2015 Perdetzoglou et al., 1994 Movsumov et Yusifova., 2015
152	Cynaroside	<i>S. prolifera</i> <i>S. arenarea</i> <i>S. tchilliensis</i> <i>S. tenuis</i> , <i>S. argentea</i> <i>S. caucasia</i> <i>S. argentia</i> <i>S. bipinnata</i> , <i>S. micrantha</i> , <i>S. hyrcanica</i> , <i>S. columbaria</i> , <i>S. georgica</i>	Al-Qudeh et al., 2017 Hilla et al., 2016 Wang et al., 2015 Perdetzoglou et al., 1994 Garaev et al., 2008 Movsumov et Yusifova., 2015
153	Lutéoline-7- <i>O</i> - β -D-glucuronopyranoside	<i>S. tenuis</i> , <i>S. argentea</i>	Perdetzoglou et al., 1994
154	Lutéoline -4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>S. tchilliensis</i>	Wang et al., 2015
155	Isoorientin	<i>S. prolifera</i> <i>S. tchilliensis</i> <i>S. argentea</i>	Al-Quedeh et al., 2017 Wang et al., 2015 Perdetzoglou et al., 1994
156	Palustroside	<i>S. caucasia</i>	Garaev et al., 2008
157	Lutéoline-7- <i>O</i> -(2'' <i>O</i> -éthyl- β -D-glucopyranoside	<i>S. prolifera</i>	Al-Quedeh et al., 2017
158	Diosmetin-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>S. argentea</i>	Perdetzoglou et al., 1994

159	Quercetine	<i>S. argentea</i> <i>S. bipinnata</i> , <i>S. ochroleuca</i>	Perdetzoglou et al., 1994 Garaev et al., 2008 Movsumov et Yusifova., 2015
160	Hyperoside	<i>S. argentea</i> <i>S. hyrcanica</i> , <i>S. columbaria</i> , <i>S. ochroleuca</i> , <i>S. comosa</i>	Perdetzoglou et al., 1994 Garaev et al., 2008 Movsumov et Yusifova, 2015
161	Quercetine-3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranoside	<i>S. argentea</i>	Perdetzoglou et al., 1994
162	Quercemetrine	<i>S. georgica</i> , <i>S. argentea</i> <i>S. caucasia</i>	Movsumov et Yusifova., 2015 Garaev et al., 2008
163 164	Astragalline Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-[3- <i>O</i> -Acétyl-6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaryol]-glucopyranoside	<i>S. hymettia</i>	Christopolou et al., 2008
165 166	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-[-6- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaryol]-glucoside Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-[3,6-di- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaryol]- glucopyranoside	<i>S. tchilliensis</i>	Wang et al., 2015
167	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-[4,6-di- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaryol]- glucopyranoside	<i>S. prolifera</i>	Al-Quedeh et al., 2017

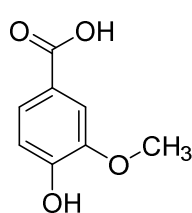
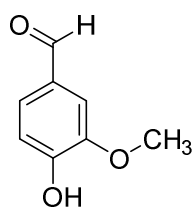
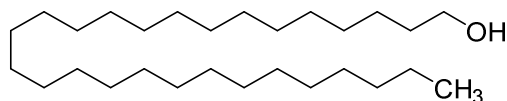
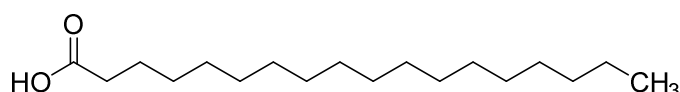
I.2.5.5. Coumarines

L'étude phytochimique de l'espèce *S. hymettia* a abouti à l'identification de trois coumarines : l'erythrocentaurine (**168**), le 5(hydroxyméthyl)-isochroman-1-one (**169**) et le scopoletine (**170**) (Christopoulou et al., 2008).



I.2.5.6. Acides phénoliques et acides gras

L'étude précédente a permis d'isoler l'acide vanillique (**171**) et la vanilline (**172**) alors que l'octacosanole (**173**) et l'acide stéarique (**174**) ont été obtenus de *S. tchilliensis* (Wang et al., 2015).

**171****172****173****174**

I.2.5.7. huiles essentielles

Les huiles essentielles isolées à partir des fruits, tiges, feuilles et les fleurs de *Scabiosa arenaria* Forssk cultivée en Tunisie ont été examinées pour leur composition chimique. Selon la GC-FID et la GC/MS, 61 (99.26% de la composition totale de l'huile), 79 (98.43%) et 51 composés (99.9%) ont été identifiés dans les trois huiles essentielles, respectivement. l' α -thujone (34.39%), le camphre (17.48%) et le β -thujone (15.29%) constituaient les principaux composés de l'huile de fruit, chrysanthénone (23.43%), avec le camphre (12.98%) et l' α -thujone (10.7%) étaient les constituants majoritaires de l'huile de tiges+feuilles. Dans le cas de l'huile de fleurs, sont aussi retrouvés le chrysanthénone (38.52%), le camphre (11.75%) et de l' α -thujone (9.5%) identifiés comme les principaux composés (Besbes et al., 2012).

La composition chimique des extraits par CO₂ supercritique de *S. isetensis* et *S. ochroleuca* cultivées en Kazakhstan a été récemment investiguée. Les principaux constituants volatils de cet extrait sont le 1,8-cinéole (29.1%), α -santonin (10.6%), α -thujone (9.8%), β -thujone (5.0%) et un constituant non identifié qui était probablement un stéroïde (16.4%). Les constituants principaux de l'extrait de CO₂ supercritique de *S. ochroleuca* étaient la santonine (21.8%), le 1,8-cinéole (14.9%), l'acide *n*-hexadécanoïque (5.6%), campestérol (5.0%), α -thujone (4.8%), et un constituant qui était probablement un stéroïde (7.3%) (Zhunusova et al., 2017).

I.2.6. *Scabiosa stellata* L.

I.2.6.1. Place dans la systématique

Royaume : Plantes

Sous royaume : Tracheobiontes

Embranchement : Spermatophytes

Division : Magnoliophytes

Classe : Magnoliopsides

Sous classe : Asteridae

Ordre : Dipsacales

Famille : Caprifoliaceae

Sous-famille : Dipsacaceae

Genre : *Scabiosa*

Espèce : *Scabiosa stellata*

I.2.6.2. Description botanique

Plante robuste, peu rameuse à la base, feuilles peu divisées, très grande, gros capitule, folioles de l'involucre entières et laineuses. Paillettes concaves, brusquement acuminées, ciliés. Corolle multinerviée, à nervures scabres et non velues. Calice stipité à dents ovoïdes-lancéolée, terminée par une arête dépassant peu la corolle (Battendier., 1988).

Cette espèce est remarquable par la grandeur et l'élégance du calice propre extérieur de ses corolles, et par ses feuilles pinnatisides a leur base ; la pinnule terminale grande, très-large et dentée. Les tiges s'élèvent à la hauteur d'environ deux pieds ; elles sont droites, pleines, dures, cylindriques, blanchâtres, rudes et anguleuses, plus ou moins velues, divisées.

Les feuilles sont pétiolées, opposées, molles, d'un vert- blanchâtre, pileuses ou velues ; les feuilles radicales entières, en forme de spatule , longuement pétiolées, dentées en soie à leur contour, obtuses à leur sommet, rétrécies et en partie décurrentes sur leur pétiole ; les caulinaires pinnatisides, ovales, oblongues ; les pinnules étroites, lancéolées; les unes entières ; d'autres plus ou moins incisées, obtuses ou un peu aiguës; la terminale très-grande, élargie, incisée ou dentée à sa partie supérieure. Les feuilles terminales sont quelquefois simplement découpées en lyre.



A : fleurs, B : fruit, C : dessin illustrant la plante *S. stellata* (Addisonia., 1959)

Figure I-09. Photographies illustrant de l'espèce *Scabiosa stellata* L. (Scabieuse étoilée).

Les fleurs forment de grosses têtes globuleuses, terminales, soutenues par des pédoncules très-longs, nus, raides, anguleux, striés, rudes au toucher, un peu velus. Le calice commun est composé de plusieurs folioles linéaires, verdâtres, velues, ciliées, au moins de la longueur des corolles ; très-aiguës, rabattues sur les pédoncules après la floraison. Les corolles sont blanches ou d'un bleu-tendre, assez grandes ; celles de la circonférence un peu plus grandes que celles du disque, tubulées, velues sur leur tube, divisées à leur limbe en cinq découpures inégales ; les trois extérieures plus grandes : ces découpures sont plus régulières dans les fleurs du centre.

Le calice propre extérieur est très-grand, scarieux, campanulé, muni d'un grand nombre de nervures divergentes. Sa partie inférieure ou l'enveloppe propre des semences est très-velue, cannelée, terminée par huit cavités à jour ; la semence qu'elle renferme est ovale, aiguë, très-velue. Le calice intérieur est pédiculé, ouvert en une étoile noirâtre, à cinq rayons ovales, lancéolés à leur base, terminés par cinq filets plus longs que le calice extérieur. Le réceptacle est globuleux, garni de paillettes très-larges, concaves, minces, diaphanes, blanches, subulées à leur sommet, plus longues que les semences.

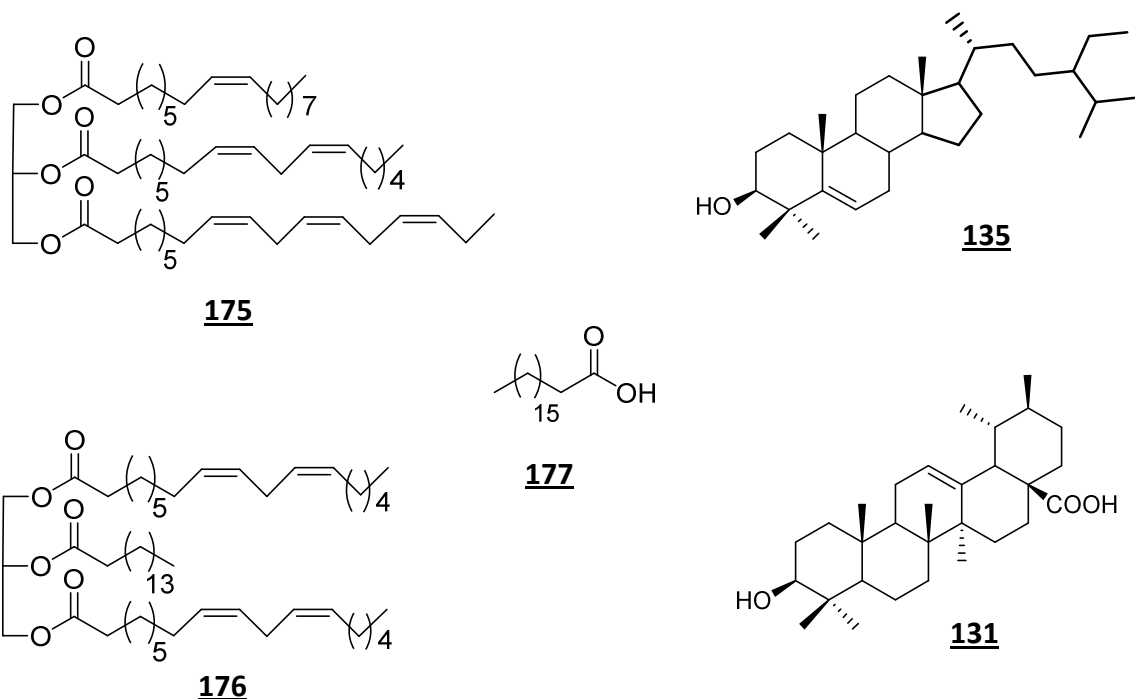
Cette plante croît dans l'Espagne et sur les côtés de la Barbarie (Afrique du nord) ; elle est cultivée au Jardin des Plantes de Paris (Lamarck et Poiret., 1804).

I.2.6.3. Usage traditionnel

Au Maroc, *Scabiosa stellata* est appelée Nouarat Laklab. Les feuilles et les fleurs, pulvérisées, associées à la graisse de poulet et à l'huile d'olive, en cataplasme, agissent contre les fissures au talon (Bammi et al., 2002).

I.2.6.4. Travaux antérieurs

Le profil GC-MS de l'extrait hexane de *S. stellata* a été récemment publié. La composition chimique est constituée majoritairement des acides carboxyliques et esters (87,1% de tous les composés identifiés), suivis par les alcanes (7,9%), terpènes (3,4%), sucres (1,3%) et alcools (0,3%). La purification de cet extrait lipophile a abouti à l'isolement de cinq composés, l'acide ursolique (**131**), sitostérol (**135**) avec deux dérivés triacylglycérol-type, le 1,3-*O*-dilinoléoyl-2-*O*-palmitoyl glycérol (**175**) et le 2-*O*-linoléoyl-3-*O*-oléoyl glycérol (**176**) (Rahmouni et al., 2017).



Chapitre 3

Aperçu bibliographique sur le
genre *Salvia*

I.3.1. Introduction sur la famille des Lamiaceae

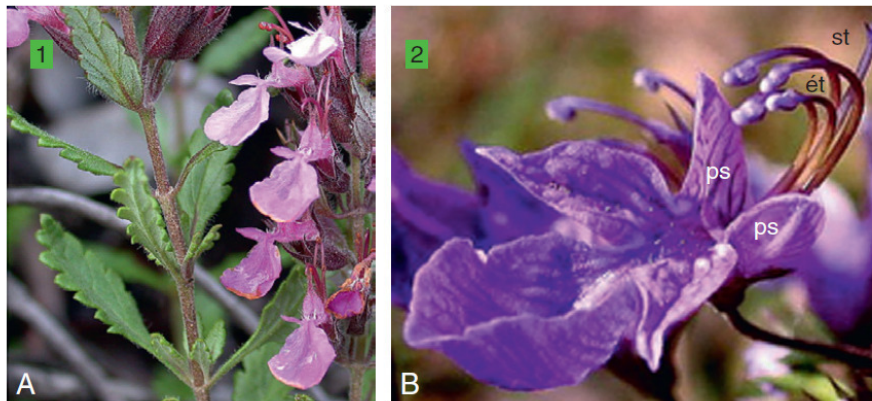
Du genre *Lamium*, du grec *laïmos*, gueule ouverte ; forme de la corolle, Lamier. Les Lamiacées comprennent 6 500 espèces réparties en 220 genres, dont l'aire de dispersion est extrêmement étendue, mais avec une prépondérance pour les régions méditerranéennes : Thym, Lavande, Romarin caractérisent la flore des garrigues. Les Lamiacées sont rares, par contre, dans les régions arctiques et en haute montagne. C'est une famille très homogène : une Lamiacée est facile à reconnaître (Dupont et Guignard., 2012).



Figure I-10. Distribution mondiale de la famille des Lamiaceae [5].

Les Lamiaceae sont caractérisées par :

- Ce sont des herbes (Figure I-11) à tiges quadrangulaires (souvent renflées aux nœuds) ou arbustes « romarin ».
- Les feuilles sont simples et toujours opposées. Elles sont, chez les espèces vivant dans les endroits secs, coriaces et présentent des adaptations leur permettant de réduire leur transpiration (feuilles velues à limbe enroulé par-dessous ; stomates enfoncés)
- Ce sont des plantes à essence dont l'odeur se dégage par simple attouchement : en effet, la localisation des huiles essentielles est très externe ; elles se forment dans des poils à essence et se localisent sous la cuticule qui se soulève.
- Les inflorescences, situées à l'aisselle des feuilles supérieures, sont des cymes : D'abord bipares, puis unipares par manque de place. Elles sont fréquemment condensées en glomérules et, souvent, simulent autour de la tige un verticille de fleurs (et, si les entrenœuds sont très courts et les feuilles réduites à des bractées, un capitule : Menthes).



A : Germandrée petit-chêne. B : fleur isolée de Germandrée d'Orient ; *ét*, 4 étamines ; *st*, style. On notera ici que les deux pétales supérieurs (*ps*) sont réduits et ne forment pas de lèvre supérieure mais descendent sous les organes reproducteurs pour former une lèvre unique.

Fig. I-11. Tige et inflorescence d'une Lamiacée (Dupont et Guignard., 2012).

- Le fruit est un tétrakène logé au fond d'un calice persistant, chaque demi-carpelle donnant naissance à un akène élémentaire.
- Le plan de symétrie vertical a pour résultat une corolle zygomorphe et la perte de l'étamine supérieure.
 - **La corolle** est typiquement bilabée, d'où le nom de Labiées donné par les premiers botanistes : une lèvre est formée des deux pétales supérieurs, l'autre des trois pétales inférieurs.
 - **L'androcée** est à quatre étamines didyames (2 longues et 2 courtes) mais on trouve chez quelques rares Lamiacées tropicales une cinquième étamine (la supérieure) et, quelques genres dont les Sauges, le Romarin, n'ont plus que deux étamines.
 - **Le gynécée** comporte, disposés sur un disque nectarifère toujours présent, deux carpelles soudés qui se subdivisent chacun par une fausse cloison en deux demi-loges, chacune contenant un ovule. Le style unique qui semble partir de la base est dit gynobasique. Chez quelques espèces tropicales primitives, le style est encore terminal, il est intermédiaire chez la Bugle.



Figure I-12. Variation de la corolle bilabée chez les Lamiacées (Dupont et Guignard., 2012).

I.3.2. Le genre *Salvia*

Le mot *Salvia* provient de l'italien "salvare" qui veut dire sauver. La sauge a toujours été considérée comme une plante magique qui sauve des vies humaines. C'est un genre de plantes dicotylédones, qui forment un très-beau genre dans l'ordre des familles naturelles (Kadioglu et Efferth., 2015).

Le genre *Salvia* comprend près de 900 espèces natives de l'Europe et du Nord d'Afrique (Figure I-13). L'Algérie compte 23 espèces du genre *Salvia* (Quezel et Santa., 1963), dont *Salvia barrelieri*, objets de notre étude.

Le genre *Salvia* est largement distribué dans divers régions du monde, y compris les zones tempérées et plus chaudes du monde tels que la Méditerranée, l'Asie centrale, des Îles du Pacifique, Afrique tropicale et Amérique (Heywood et al., 2007).

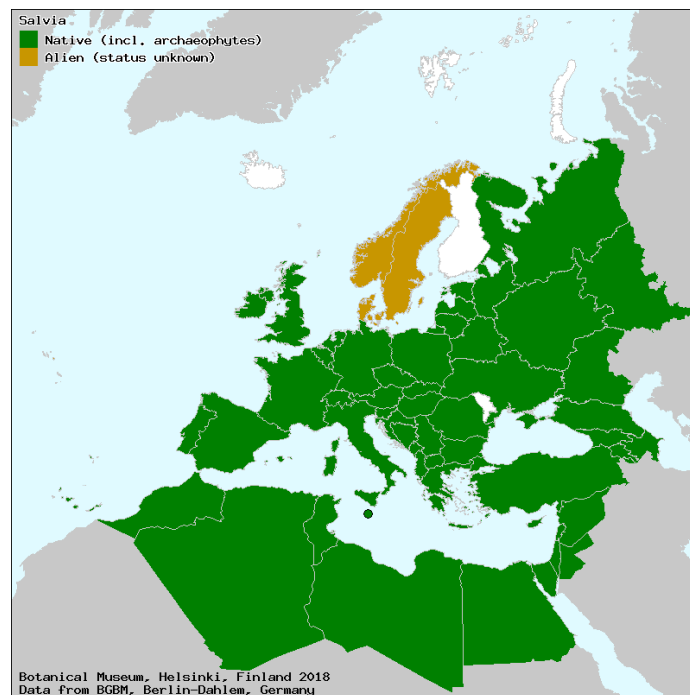


Figure I-13. Carte géographique du genre *Salvia* [1].

D'un point de vue botanique, les sauges sont remarquables surtout par la disposition et la forme des étamines, dont le filament est porté transversalement sur un pivot ou un autre filament fort court, inséré sur la corolle. Dans les sauges proprement dite ; telles que *Salvia officinalis*, le filament est placé exactement dans son milieu sur le pivot, et forme une sorte de balancier, dont une des extrémités est terminée par une anthère fertile, l'autre extrémité par une glande ou une anthère stérile Ce caractère, joint à celui de la lèvre inférieure de la corolle à trois lobes, mais point concave, constitue les *Salvia*.

Les sauges sont des plantes à fleurs complètes, gamopétales, irrégulières, qui ont des rapports avec les romarins, et qui comprennent des herbes ou sous-arbrisseaux, les uns exotiques, d'autres indigènes de l'Europe, à feuilles opposées, entières ou quelquefois pinnatisides ; les fleurs verticillées, en épis, munies de bractées (Lamarck et Poiret., 1804).



lgf : loge fertile. *lgs* : loge stérile. *cn* : connectif. *f* : filet.

Figure I-14. Sauge des prés, portion d'inflorescence et étamine (Dupont et Guignard., 2012).

I.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle du genre *salvia*

Les sauges sont utilisées en médecine traditionnelle depuis très longtemps, il y a environ 40 espèces de *Salvia* qui ont été utilisées pour le traitement de la maladie coronarienne, et plus de 700 entreprises pharmaceutiques produisent des préparations de Danshen en Chine. Aux États-Unis et en Europe, les produits de « Danshen » (*S. miltiorrhiza*) ont été largement utilisés pour le traitement des maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires ; en Chine, Danshen classé comme un médicament "Supergrade" dans Pen-Ts'ao de Shen-Nung (Watzke et al., 2006).



A : Fleurs et racines de *S. miltiorrhiza*. **B** : Tablettes commerciales de Danshen. **C** : complément alimentaire de *S. miltiorrhiza* (Amazon).

Figure I-15. Fleurs, racines, produits commercialisés de *S. miltiorrhiza* (Danshen).

- ***S. miltiorhiza*** : les racines de cette espèce sont utilisées en médecine chinoise pour traiter des maladies cardio-vasculaires, hépatiques et rénales. Une décoction des racines combat les saignements de l'utérus et maux de ventre résultants de la stagnation du sang. Elle revigore le sang dans les cas d'hépatite ou d'ulcère du foie et aide à réduire les contusions, à traiter les inflammations des seins, des os, ou des reins. Elle est indiquée contre l'épuisement nerveux et l'insomnie.
- ***S. sclarea*** : Saugé sclarée, le distillat de fleurs et de feuilles soulage les yeux fatigués. L'huile essentielle de feuilles est utilisée en parfumerie et cosmétique. Important relaxant en aromathérapie, préconisé contre le stress, la fatigue, les difficultés digestives et asthme (Baudoux et al., 2005).
- ***S. verbenaca*** : trempé dans l'eau ou fondu par la chaleur et l'humidité du globe oculaire, devient comme de la gelée et adhère à tout corps étranger, lui permettant d'être extrait avec le minimum de douleur. «Clary» est prétendument une corruption de «clair-oeil» (Allen et Hatfield., 2004).
- ***S. aegyptica*** : Graines utilisées contre la diarrhée, également dans les hémorroïdes. Les graines donnent du mucilage et une gomme qui contiennent de l'acide aldobiuronique et l'acide aldotriuronique.
- ***S. moorcroftiana*** : Racine-brique. Feuilles-antitussif ; appliqué comme cataplasme contre les furoncles et les affections cutanées chroniques. Graines-antispasmodique, émétique. Utilisé pour calmer la colique, la dysenterie, et aussi des hémorroïdes. Elles sont également appliquées aux furoncles (Khare., 2007).
- ***S. officinalis*** : « Siwak ennabi », c'est une plante aux nombreuses propriétés médicinales. Elle est signalée comme antisudorale, antispasmodique, sédative, carminative, stomachique, cholérétique, hypoglycémiant et tonique. L'infusion des feuilles est le mode d'utilisation courant, en usage externe, elle exerce une action désinfectante sur les plaies et les ulcérations, ainsi qu'en gargarisme contre les maux de gorge et stomatite (Baba Aïssa., 1990).

I.3.4. Activités biologiques du genre *Salvia*

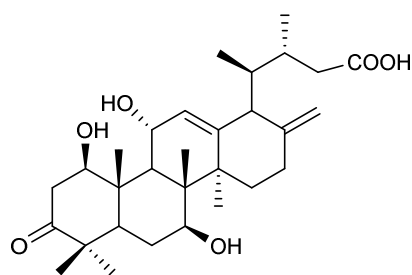
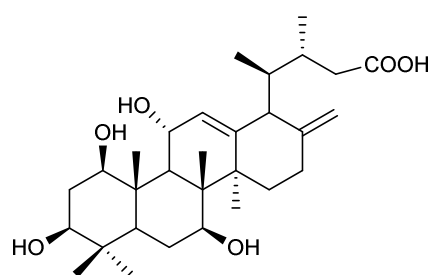
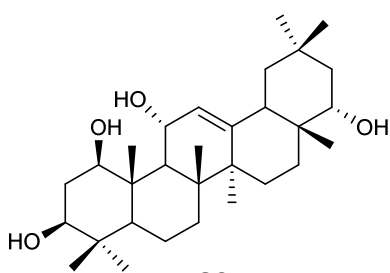
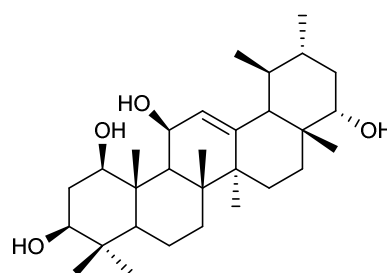
Les activités anticholinestérase, neuroprotectrice, anticancéreuse, antivirale, anti-inflammatoire, antioxydante, antibactérienne et cytotoxique des extraits obtenus à partir du genre *Salvia* ont été résumées dans de nombreuses revues scientifiques. Ainsi que les activités biologiques des composés isolés des différentes espèces de *Salvia* ont été évaluées. (Dziurzynski et al., 2013, Jassbi et al., 2015, Wu et al., 2012).

I.3.5. Métabolites isolés du genre *Salvia*

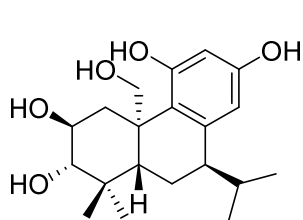
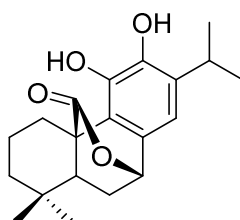
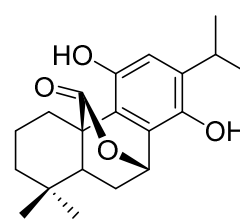
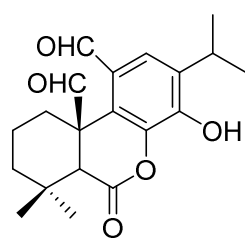
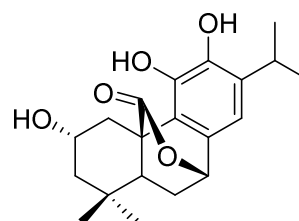
Vu l'intérêt en médecine traditionnelle du genre *Salvia*, de nombreuses investigations ont été menées pour déterminer les principes actifs. Les diterpènes constituent les métabolites secondaires les plus importants avec un nombre de plus de 550 inventoriés. Les produits de cette classe peuvent être considérés comme des marqueurs taxonomiques (Kabouche et al., 2008). D'autres travaux ont suivi cette approche de classification des métabolites secondaires et ont conduit à recenser 773 composés (diterpènes, triterpènes, sesquiterpènes, sesterpènes, polyphénols, ... etc) isolés de 134 espèces de *Salvia* (Wu et al., 2012 ; Jassbi et al., 2015 ; Gorai et al., 2016 ; Jash et al., 2016).

Dans notre laboratoire, des recherches ont été réalisées sur la famille des Lamiaceae et notamment le genre *Salvia*, qui ont fait l'objet de deux projets de thèse doctorat, dont l'une s'est intéressée à l'espèce *Salvia argentea* var *aurasiaca* (Lakhal., 2014). Les espèces *S. barrelieri* et *S. jaminiana* ont été étudiées par mon directeur de thèse, le Pr. Ahmed kabouche (Kabouche., 2005). Ainsi, la synthèse bibliographique et les travaux concernant ce genre ont été précédemment décrits.

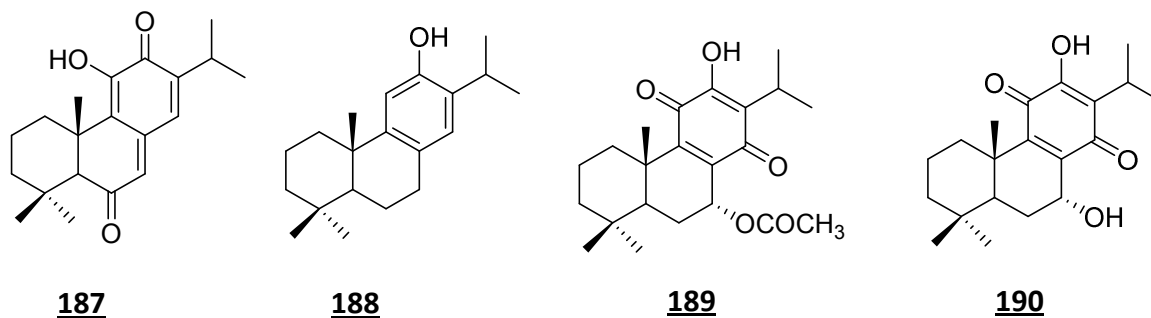
Les études phytochimiques menées sur les parties aériennes de *Salvia urmiensis* ont permis de mettre en évidence la présence de deux triterpènes de type *E*-seco-ursane, le nouveau acide $1\beta,7\beta,11\alpha$ -trihydroxy-3-oxo-17,22-seco-urs-12,17(28)-diène-22-oïque (**178**) et l'acide $1\beta,3\beta,7\beta,11\alpha$ -tetrahydroxy-17,22-seco-urs-12,17(28)-diène-22-oïque (**179**), qui a été déjà caractérisé dans ce genre (*S. syriaca*). En plus de quatre autres composés connus : l'acide oléanolique (**131**), β -sitostérol (**135**), daucostérol (**136**) et l'apigénine (**144**) (Farimani et al., 2015). Par la même équipe, deux nouveaux triterpénoïdes polyhydroxylés ont été isolés : olean-12-ène- $1\beta,3\beta,11\alpha,22\alpha$ -tétraol (**180**) et urs-12-ène- $1\beta,3\beta,11\beta,22\alpha$ -tétraol (**181**). Ces derniers (**180-181**) ont montrés une faible cytotoxicité contre les lignées cellulaires MCF-7, avec des valeurs d'IC₅₀ de 110 et 88 μ M, respectivement (Farimani et al., 2016).

**178****179****180****181**

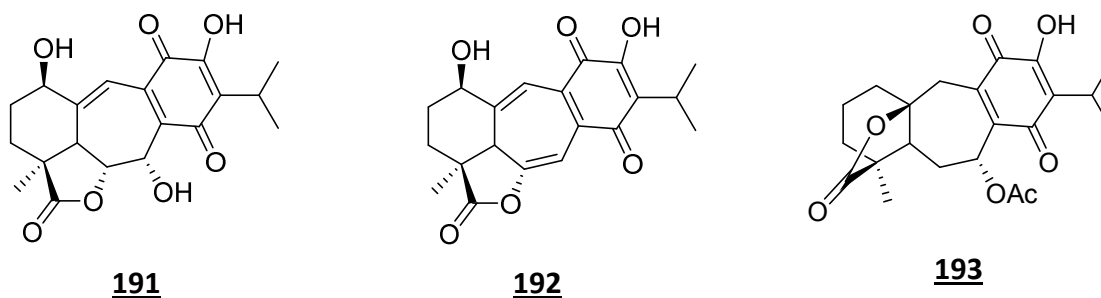
A partir de *Salvia plebeia*, ont été isolés, un nouveau squelette diterpénique nommé plebeianiol A (**182**) avec quatre diterpénoïdes connus (**183-186**). Qui sont : carnosol (**183**), isocarnosol (**184**), salicinolide (**185**) et 2,11,12-trihydroxy-7,20-époxy-8,11,13-abietatriène (**186**). Ces composés ont été évalués pour leurs activités antioxydante et anti-inflammatoire *in vitro*, les résultats ont montré que le plebeianiol A (**182**) et le carnosol (**183**) ont des activités antioxydantes et anti-inflammatoires significatives (Zhang et al., 2015).

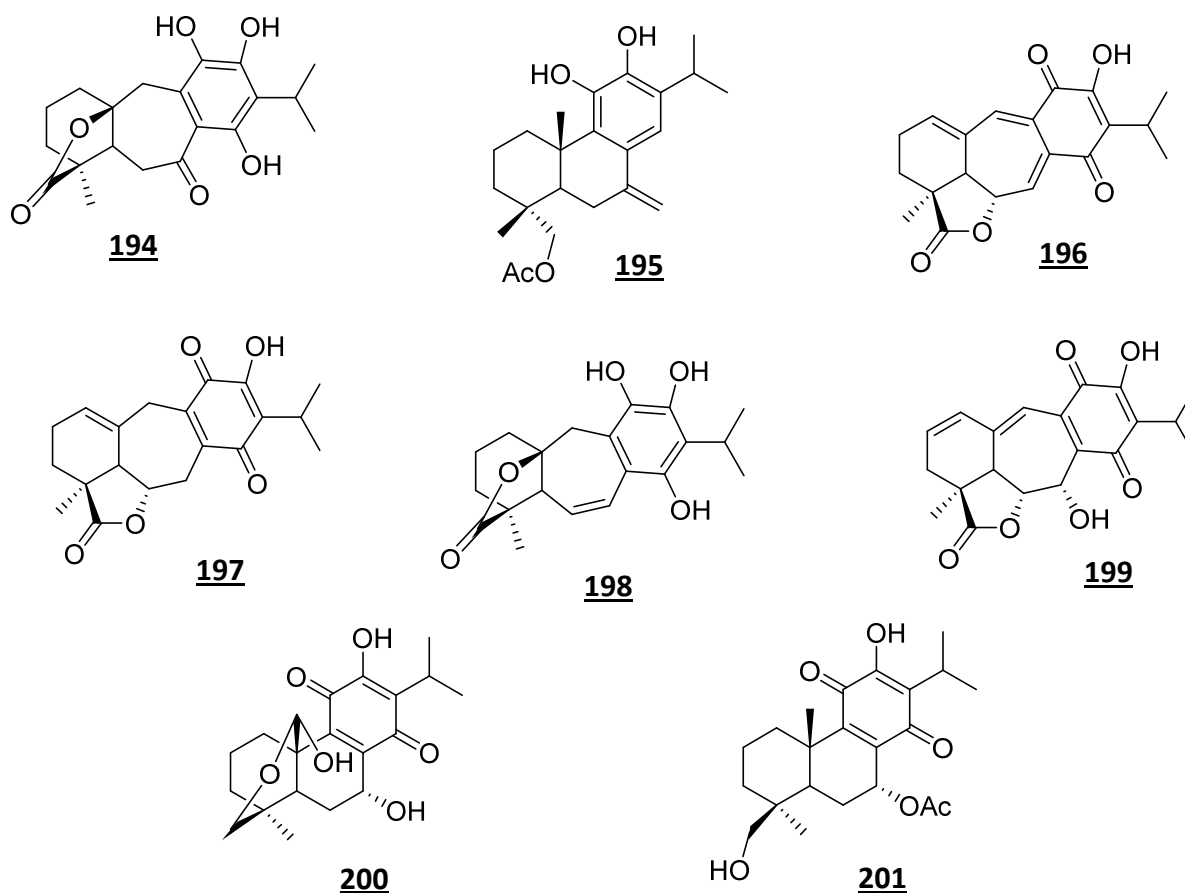
**182****183****184****185****186**

Quatre diterpènes ont été isolés à partir des racines de *S. deserta*, le taxodione (**187**), le ferruginol (**188**), le 7-*O*-acetylhorninone (**189**) et l'horninone (**190**). Le taxodione (**187**) était considéré comme leishmanicide avec une valeur d'IC₅₀ de 1.46 μM contre *Leishmania donovani* et il a également montré un bon effet antimicrobien. Le ferruginol (**188**) a présenté la meilleure activité (CMI=10.0 μM) contre *Streptococcus iniae* (Búfalo et al., 2016).

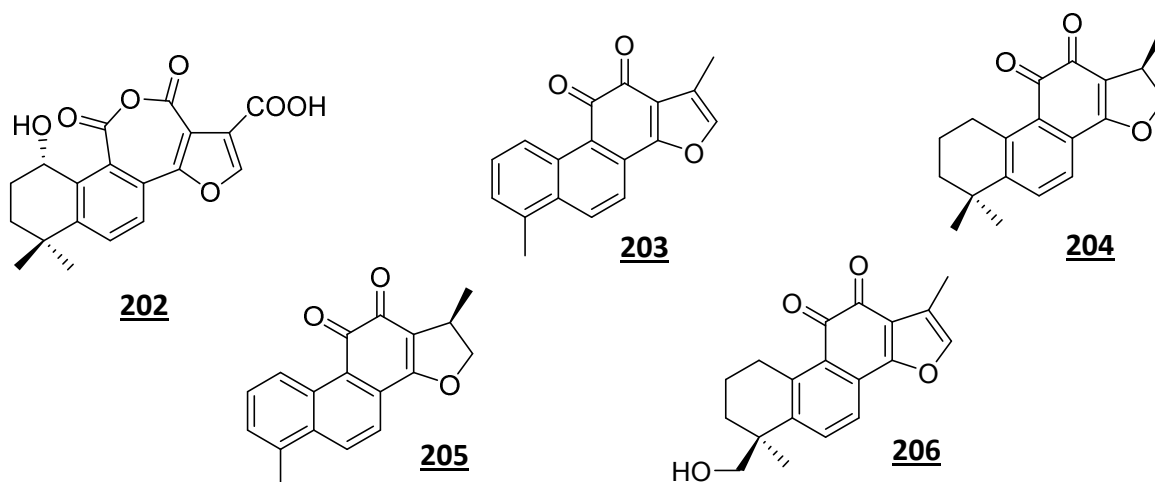


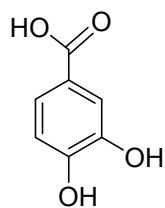
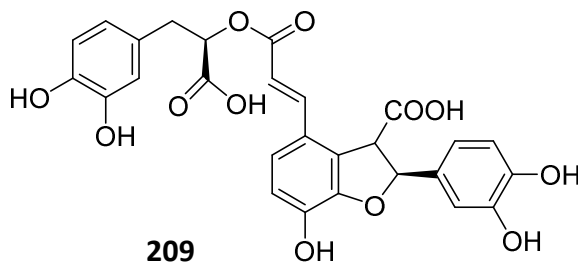
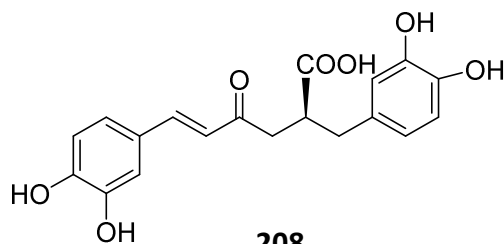
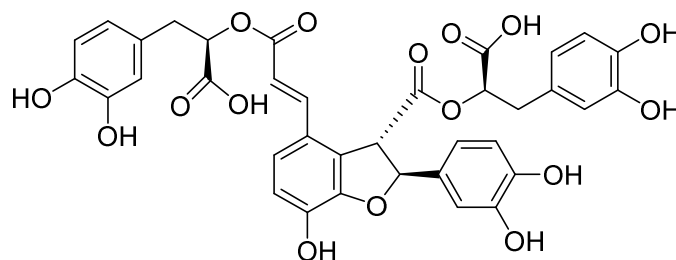
L'étude phytochimique des parties aériennes de *S. ballotiflora* a conduit à la séparation et à l'identification d'onze diterpènes, quatre icetexanes, le ballotiquinone (**191**), le 6,7-anhydroballotiquinone (**192**), le 7-acétoxy-6,7-dihydroicetexone (**193**), le 6,7,11,14-tetrahydro-7-oxo-icetexone (**194**) et un abietane, 18-acétoxy-11-hydroxysugiol (**195**), qui sont de nouvelles structures. Les composés connus sont : l'anastomosine (**196**), le 7,20-dihydroanastomosine (**197**), icetexone (**198**), 1,2-anhydroballotiquinone (**199**), conacytone (**200**), et le 7-acétoxy-19-hydroxyroyleanone (**201**). Les diterpènes (**193-194**), (**196-198**) et (**200**) ont été testés pour l'activité antiproliférative, en plus des activités anti-inflammatoire et antioxydante. Les composés (**193-194**) et (**196-198**) ont montré une activité antiproliférative intéressante, tandis que les composés (**193**) et (**200**) ont montré une réduction significative dans le test d'œdème de l'oreille chez les souris, et (**194**) était le seul diterpénoïde qui a présenté une activité antioxydante (Esquivel et al., 2017).



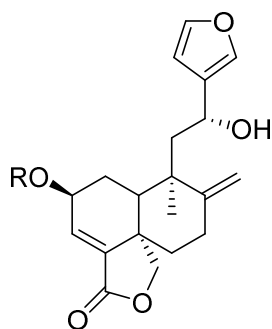
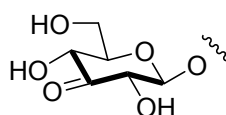


L'étude phytochimique menée sur les racines de *S. przewalskii* a abouti à la séparation et à l'identification d'un nouveau diterpène nommé acide ganxincastanique A (**202**) avec neuf composés connus, quatre diterpènes : tanshinone I (**203**), cryptotanshinone (**204**), dihydrotanshinone I (**205**) et tanshinone IIB (**206**) avec cinq acides phénoliques : acide protocatechuique (**207**), acide caffeique (**97**), acide rosmarinique (**208**), acide lithospermique (**209**) et acide salvianolique B (**210**) (Yang et al., 2017).



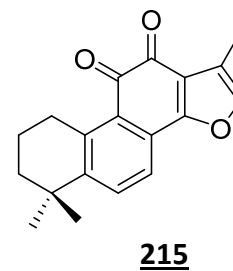
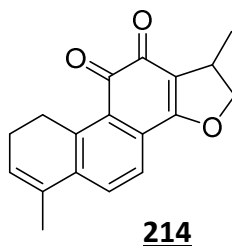
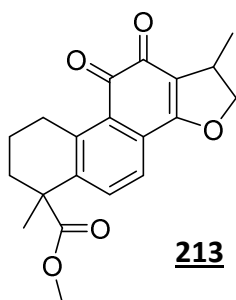
**207****209****208****210**

Une étude récente a permis d'identifier un néo-clérodane diterpénoïde, la salvihispine A (**211**), ainsi que son glycoside, la salvihispine A-2-O- β -D-3-kéto-glucopyranoside (**212**) à partir des parties aériennes de *S. hispanica* (Fan et al., 2018).

**211** : R=H**212** : R=

L'étude phytochimique de la fraction hexane des racines de *S. miltiorrhiza* (Danshen) a permis d'isoler les diterpènes de la tanshinone: dihydrotanshinone I (**205**), trijuganone C (**213**), trijuganone B (**214**), cryptotanshinone (**204**), tanshinone IIA (**215**) et tanshinone I (**203**). Le composé (**213**) a montré des activités antiprolifératives significatives contre les cellules leucémiques humaines HL-60, avec des valeurs d'IC₅₀ inférieures à 10 μ M contre les cellules HL-60 et Jurkat ainsi que sur les cellules cancéreuses du côlon DLD-1, COLO 205 et CACO. 2. Les résultats suggèrent que le trijuganone C (**213**) exerce un effet antiprolifératif via l'induction de l'apoptose médiée par un dysfonctionnement mitochondrial et l'activation de la

caspase. Ce composé peut servir de candidat d'agent chimiothérapeutique potentiel contre la leucémie humaine (Takuhiro et al., 2018).



I.3.6. *Salvia barrelieri* Etl.

I.3.6.1. Place dans la systématique

Royaume : Plantes

Sous royaume : Tracheobiontes

Embranchement : Spermatophytes

Division : Magnoliophytes

Classe : Magnoliopsides

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia barrelieri*

I.3.6.2. Description botanique

Sauge barrelière. *Salvia barrelieri*. Etling. Communément appelée « Salema ».

C'est une assez belle plante qui a des rapports par la forme de ses feuilles avec *Salvia canariensis*, qui en diffère par ses corolles et surtout par ses petites bractées. Ses tiges s'élèvent à la hauteur de trois à quatre pieds ; elles sont droites, quadrangulaires, velues, divisées en rameaux opposés, droits, étalés, peu nombreux, garnis de feuilles opposées. Pétiolées, oblongues, lancéolées, hastées, presque auriculées à leur base ; quelques-unes échancrées en cœur, sinuées, anguleuses, dentées à leur contour, acuminées à leur sommet, ridées, crispées,

amples, vertes à leurs deux faces, légèrement velues, particulièrement à leur face inférieure ; les dernières sessiles, très-étroites.

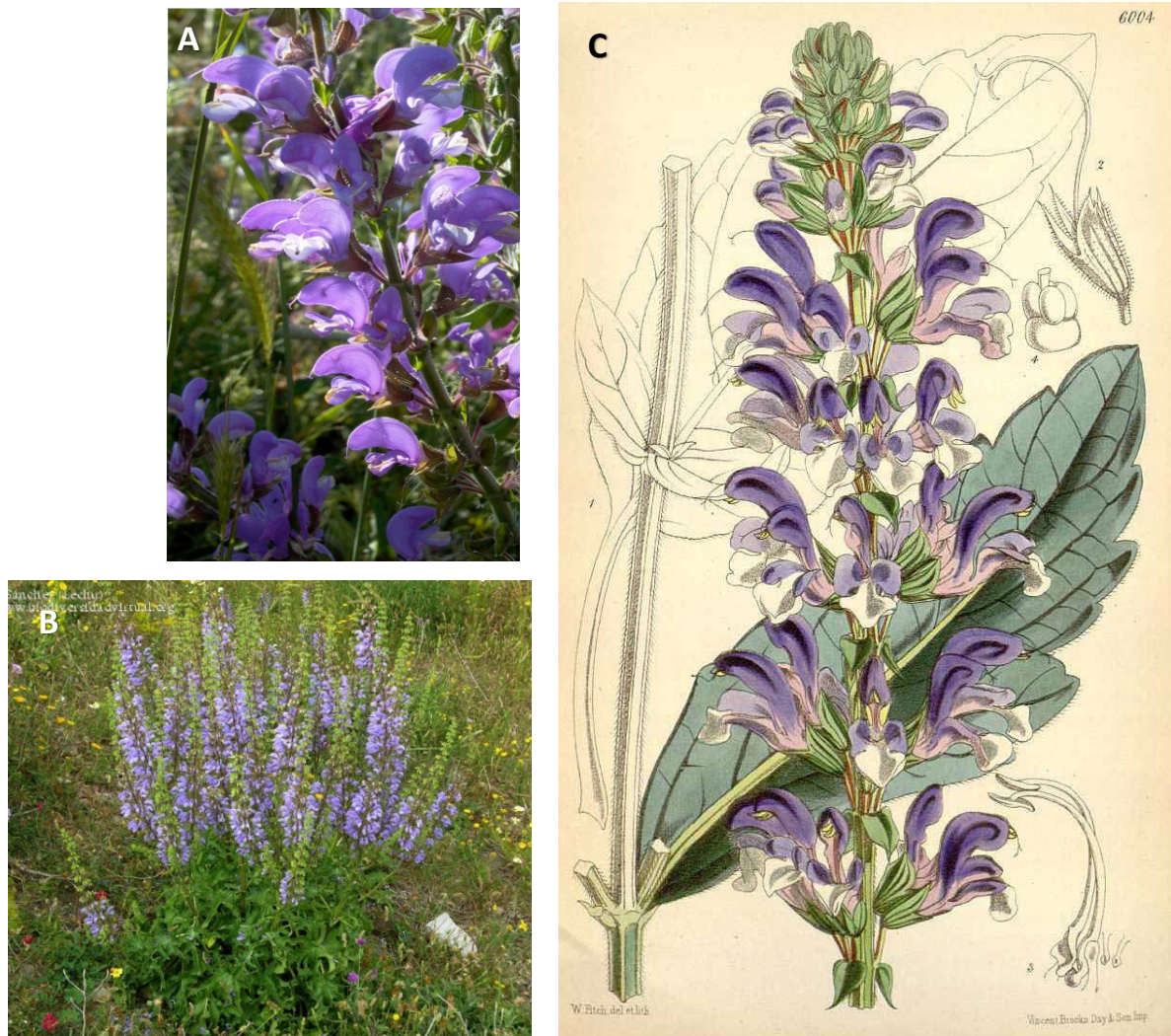
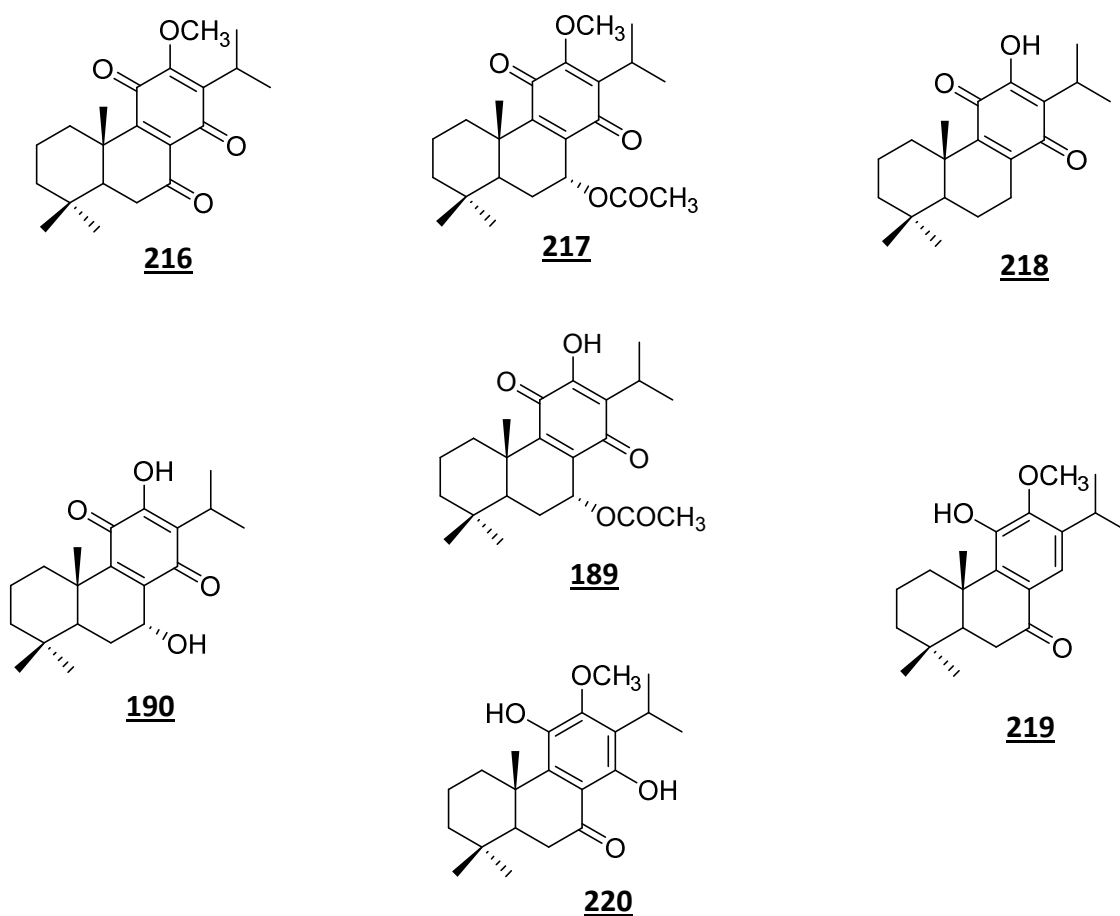


Figure I-16. Images (A, B) [7] et dessin illustrant (C) [8] l'espèce *S. barrelieri*.

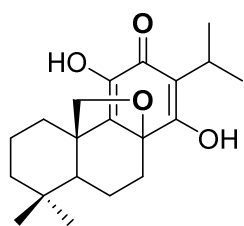
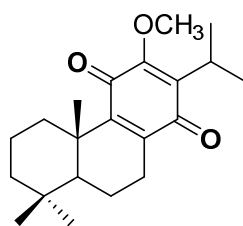
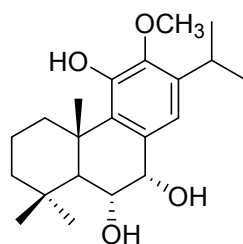
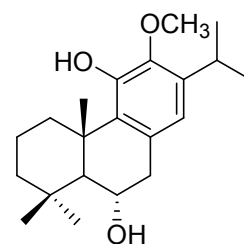
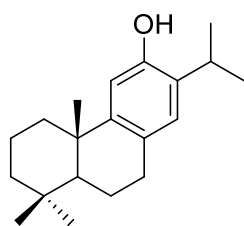
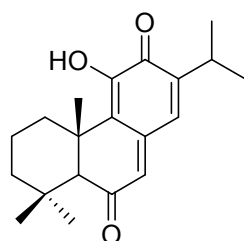
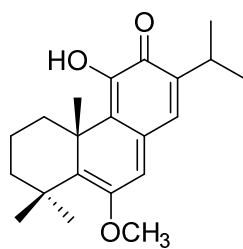
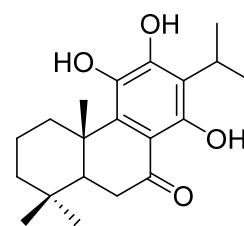
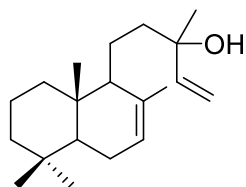
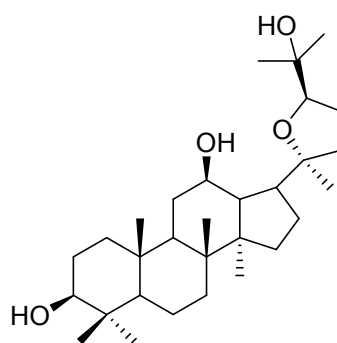
Les fleurs sont en épis terminaux, comportes de verticilles peu distants, de quatre à six fleurs pédonculées, munies de bractées courtes, ovales caduques, plus courtes que les calices, pubescentes. Le calice est campanulé, strié velu, ouvert à son orifice en deux lèvres écartées ; la supérieure à trois découpures presque égales, ciliées, très-aiguës ; l'inférieure bifide, à deux dents aiguës. La corolle est grande, de couleur bleue ; divisé à son orifice en deux lèvres, la supérieure très- longue, un peu courbée en faux, obtuse à son sommet, velue sur le dos ; l'inférieure écartée, beaucoup plus courte, à trois lobes inégaux celui du milieu concave ; les semences brunes arrondies, renfermées dans le fond du calice (Lamarck et Poiret., 1804).

I.3.6.3. Travaux antérieurs

L'étude phytochimique des racines de *S. barrelieri* a conduit à la séparation et à l'identification de dix-sept composés (16 diterpènes et 1 triterpène) : sept diterpènes de type abiétane, le 7-oxoroyleanone-12-methyl ether (**216**), le 7 α -acétoxyroyléanone-12-methyl ether (**217**), le royleanone (**218**), horminone (**190**), le 7-acéthylhorminone (**189**), le cryptojaponol (**219**) et l'inuroyleanol (**220**), et qui ont été évalués pour leur activité antioxydante. Les résultats ont montrés que le composé (**220**) est le plus actif (Kabouche et al., 2007).



La même équipe a poursuivi l'étude sur les racines de cette espèce, ce qui a conduit à l'isolement de dix autres composés. Huit diterpènes de type abiétane, le barreliol (**221**), royleanone 12-methyl ether (**222**), 7-*epi*-salviviridinol (**223**), iguestol (**224**), ferruginol (**188**), taxodione (**187**), viridone (**225**) et déméthylinuroyléanol (**226**), un labdane l'isomanoöl (**227**) avec un triterpène de type dammarane, le pyxinol (**228**). De même que l'étude précédente, ces composés ont été évalués pour leur activité antioxydante, les résultats ont montrés que le taxodione (**187**) est le plus actif (Kolak et al., 2009).

**221****222****223****224****188****187****225****226****227****228**

PARTIE II

Matériel et méthodes

Chapitre 1

Extraction, séparation et purification des
plantes

II.1.1. Matériel Végétal

Le matériel végétal étudié a été récolté et identifié par Mr. Kamel Kabouche. Un échantillon a été déposé au laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (LOST) (LOSTCs 05/15) pour l'espèce *Calendula stellata*, (LOSTSs 06/15) *Scabiosa stellata* et (LOSTSb 04/14) pour la plante *Salvia barrelieri*.

II.1.1.1. *Calendula stellata* Cav.

La plante entière *Calendula stellata* a été collectée au mois de mai 2015 dans la région de Geulma (Nord-est Algérien). Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, 261 g du matériel pulvérisé ont été obtenus.

II.1.1.2. *Scabiosa stellata* L.

Le matériel végétal de *Scabiosa stellata* a été récolté en juin 2015 à Constantine. Ce matériel est aussi constitué de la plante entière (fruits, tige, racines, feuilles et fleurs), Après séchage et broyage, la poudre obtenue est pesée pour obtenir 653 g du broyât.

II.1.1.3. *Salvia barrelieri* Etl.

Les parties aériennes de la plante *Salvia barrelieri* ont été collectées à Djebel Elwahch- Constantine, en avril 2014. Pour cette plante, 7 kg du matériel frais ont été coupés en petits fragments.

II.1.2. Techniques chromatographiques

II.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince, CCM (TLC, pour thin-layer chromatography), est une méthode analytique qui permet de contrôler la présence et la pureté des composés isolés à chaque étape de fractionnement et de purification.

Conditions chromatographiques :

Phase stationnaire

Nous avons utilisé des plaques de gel de silice prêtes à l'emploi, du commerce :

- Plaques de silice (phase normale) sur support aluminium (silice 60 F254, Merck).

- Plaques de silice greffée C₁₈ (phase inverse) sur support aluminium (Silicagel 60 RP-18 F254S, Merck).

Phase mobile

Pour la migration des composés, nous avons utilisé divers systèmes qui sont constitués d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Les systèmes utilisés pour les CCM en phase normale sont :

- CHCl₃-MeOH-AcOEt-H₂O, 60-32-1-7
- CHCl₃-MeOH -H₂O, 70-30-5 ; 70-25-3
- AcOEt- MeOH-H₂O, 85-15-10
- CHCl₃-MeOH, 85-15
- Toluène-Acétone, 9-1

Pour les CCM en phase inverse (RP-18), le système utilisé est constitué du MeOH et H₂O à des différents pourcentages, avec ceux les plus utilisés :

- MeOH- H₂O, 85-15 ; 60-40

Révélation

Après le développement, les plaques sont séchées à l'aide d'un sèche-cheveux puis observées sous lampes UV (lampe Vilber Lourmat VL-6.MC) à 254 et à 366 nm avant révélation. Le révélateur utilisé est :

- l'acide sulfurique 50% (H₂SO₄-96%/H₂O 50/50 v/v), chambre de dérivatisation Camag® TLC spray) suivi d'un chauffage au décapeur thermique.

II.1.2.2. Chromatographie sur résine polymère aromatique diaion (HP-20)

La résine diaion HP-20 est un copolymère de divinylbenzène, utilisée pour la séparation de petites molécules. La résine est utilisée dans une colonne en verre (4.3 × 40 cm) sur laquelle on fait passer un solvant approprié, après avoir déposé l'extrait en tête de la colonne. Le passage du solvant fait déplacer continuellement les composés, mais de façons différentes.

II.1.2.3. Chromatographie liquide sous vide

Cette technique (VLC, pour vacuum Liquid Chromatography) est utilisée pour réaliser un fractionnement grossier et rapide des extraits. En utilisant moins de solvants que les techniques classiques. Elle nécessite l'utilisation d'un filtre en verre fritté, qui est un entonnoir en verre contenant un disque fritté, de porosité fixe (n°4). Ce dernier est fixé sur une fiole à vide dans laquelle les fractions sont rassemblées par application du vide à l'aide d'une pompe ou d'une trompe à eau.

Conditions chromatographiques :

Phase stationnaire.

- gel de silice 60 en phase normale (Merk, Silicagel 60 40-43 μ m)
- phase inverse RP-18 (Merk, Lichroprep RP-18 43-60 μ m)

Phase mobile.

- Silice en phase normale :

Hexane –AcOEt, 100 :0 \rightarrow 0 : 100 v/v (pas de 10%)

- Silice en phase inverse, RP-18.

H₂O -MeOH, 100 :0 \rightarrow 0 : 100 v/v (pas de 25%)

II.1.2.4. Chromatographie sur colonne flash (CCF)

La Flash chromatographie est une forme rapide de chromatographie préparative à moyenne pression sur colonne optimisée pour des séparations au cours desquelles le solvant est pompé à un débit élevé accélérant la séparation. L'appareil utilisé est de marque Grace® Reveleris® (Figure II-01) qui est un système automatisé, muni d'un détecteur DEDL (Détecteur évaporatif à diffusion de Lumière), d'un détecteur UV/vis, d'une vanne de purge pour la ligne DEDL (isopropanol) et d'une vanne de purge pour les 4 lignes de solvant. Le tout est piloté par le logiciel Reveleris® Flash System, sur lequel nous pouvons programmer un gradient et collecter directement les fractions grâce à un collecteur automatique intégré.



FigureII-01. Système Grace Reveleris® disponible dans le laboratoire de Reims.

Des cartouches en plastiques de gel de silice préemballées de différents diamètres contenant de la silice normale ou greffée C₁₈, sont utilisées pour les séparations en phase normale ou inversée, comme indiqué sur le tableau suivant :

Tableau II-01. Les différentes cartouches utilisées pour les colonnes flash avec les débits des solvants adaptés.

support	Poids de silice (g)	Masse de l'échantillon à déposer (mg)	Débit prescrit (mL/min)
Gel de silice 40 μ m	4	4-800	18
	12	12-2400	36
	40	40-8000	40
	80	80-16000	60
	120	120-24000	80
	330	330-66000	120
RP-C ₁₈	4	5-200	18
	12	19-600	30
	40	45-1350	40
	80	93-2800	60
	120	150-6000	80

II.1.2.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La CPC est une technique de chromatographie liquide-liquide préparative moderne qui utilise un système de solvant biphasique et pas de phase stationnaire solide. La séparation des molécules est principalement basée sur leur différence de partage entre les deux phases liquides non miscibles.

Une colonne CPC est constituée d'un empilement de disques en acier inoxydable dans lesquels sont gravées des cellules de partage reliées entre-elles par des capillaires.

Le laboratoire est équipé de chaînes chromatographiques : CPC et EPC (extracteur de partage centrifuge) avec des capacités différentes, dont nous avons utilisé la chaîne EPC.

- **Chaîne EPC**

Il s'agit d'une chaîne FPCE300 de chez Kromaton Technologies[®] avec une colonne d'un volume de 300 ml comportant 7 disques de 250 mm de diamètre contenant chacun 33 cellules de partage connectées par des conduits de 0.8 mm. Ce rotor est intégré dans un système complet muni de différents éléments :

- Pompe gradient 1800-V7115
- Système d'injection Isco 500D (Teledyne IsoInc)
- Détecteur UVD170S (Dionex)
- Collecteur de fraction Pharmacia Superfrac

Ces différentes composantes sont manipulées grâce au logiciel Chromeleon[®].



Figure II-02. Appareil de l'extracteur de partage centrifuge disponible dans le laboratoire.

En fonction du type de la phase stationnaire, nous allons avoir deux modes d'élution : un mode dit ascendant lorsque la phase stationnaire est constituée de la phase la plus dense et un mode descendant dans le cas contraire. Nous avons travaillé dans les mêmes conditions pour réaliser les expériences sur les fractions B et C de la plante *Scabiosa stellata*.

En effet, Le rotor est rempli par la phase stationnaire adéquate en pompant le double du volume de la colonne (300 mL) à un débit de 20 mL/min et une vitesse de rotation de 500 rpm puis de 1200 rpm.

L'échantillon est préparé dans le mélange de upper phase/lower phase (15 mL/15 mL) du système choisi, soit 30 mL le volume de la boucle d'injection.

La phase mobile est pompée au travers de la phase stationnaire en mode ascendant pendant 103 minutes pour B et 80 minutes dans le cas de la fraction C, ensuite le passage en mode dual (inversement du rôle des deux phases) est maintenu pendant 20 minutes de plus.

En fin de l'expérience, nous pompons un mélange MeOH/H₂O (50/50) en utilisant un mode d'élution contraire à celui utilisé lors de l'élution afin de chasser la phase stationnaire de la colonne et tout récupérer.

II.1.2.6. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

II.1.2.6.1. CLHP analytique

Les analyses par CLHP ont été réalisées sur une chaîne CLUP (chromatographie liquide ultra-performante) Dionex U3000 dotée d'une pompe LPG-3000 SD, d'un détecteur à barrettes de diodes DAD-3000, d'un échantillonneur automatique WPS-3000 et d'un four TTC-3000. Cette chaîne est pilotée par le logiciel Chromeleon®.

Les conditions sont les même dans toutes les analyses réalisées :

- colonne CLHP à polarité de phase inversée : Colonne Phenomenex C₁₈-2.5 μm, 100 A°, 250×4.5 mm.
- Température : 28°C
- Débit : 1mL/min
- Volume injecté : 10μL

Le système d'élution est constitué de deux solvants : ACN (qualité CLHP-Carlo Erba) et d'eau acidifiée (0.025 % TFA). Nous avons utilisé ces deux gradients différents détaillés dans le tableau suivant :

Tableau II-02. Les programmes utilisés pour les analyses CLHP analytique.

	Temps (min)	0	30	31	36	37	42
Gradient de l'ACN dans H ₂ O (% ; v/v)	<i>Calendula stellata</i>	10	80	100	100	10	10
	<i>Scabiosa stellata</i>	10	50	100	100	10	10

II.1.2.6.2. CLHP semi-préparative

La purification des produits par CLHP semi-préparative a été effectuée par le système HPLC Dionex®, qui consiste en une pompe LPG 3400AB avec un dégazeur intégré, un

injecteur ASI-100, un détecteur UVD 340S, un collecteur AFC 3000 et un four STH 585 séparé des autres unités. Cette chaîne est également commandée par le logiciel Chromeleon® avec une pression maximale de 250 bars, et un débit de 1 à 6 mL/min selon la colonne utilisée.

Selon la quantité des fractions choisies pour les purifications, deux types de colonne ont été utilisés :

- Colonne Phenomenex Luna 5 µm C18 100 A° 250×10.0 mm.
- Colonne Interchim Luna 5 µm C18 100 A° 250×15.0 mm.

Le système de solvants employé est le même que celui de la CLHP analytique (ACN et l'eau distillée additionnée de 0,025 % TFA). Pour chaque analyse, les conditions chromatographiques (gradient, débit et détection) sont précisées selon la composition et la séparation souhaitée.

L'eau distillée utilisée est une eau permutée et osmosée, filtrée sur une membrane de cellulose régénérée RC55 de 0,45 µm (Whatman) ; pour la chaîne de CLHP semi-préparative. Puis sur une membrane de polyvinylidène fluoride hydrophile GVWP de 0,22 µm (Durapore®, Millipore) pour les analyses en CLHP analytique. L'utilisation de l'eau filtrée est nécessaire afin d'éviter toute contamination de la chaîne CLHP. L'ajout de TFA (1%) permet d'obtenir une meilleure résolution des pics chromatographiques.

II.1.2.6.3. CLHP préparative

La chaîne consiste en une colonne Merck® de 200x50 mm, d'une pompe Armen® AP 250/500 avec un injecteur ACC 250/500, et un détecteur UV Merck® K-2501 Knauer. La colonne est remplie avec de la silice greffée Lichroprep RP-18 (12 µm) Merck®. Un enregistreur papier Kipp & Zonen®BP111 (UV) permet de suivre les étapes de purification et les fractions sont collectées grâce à un collecteur Büchi C-660®.

II.1.3. Méthodes physico-chimiques

II.1.3.1. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques des nouveaux composés sont mesurés à l'aide d'un polarimètre électronique Perkin-Elmer®, Model 341 à 20°C, équipé d'une lampe à sodium

($\lambda=589$ nm). En utilisant une cuve de 10 cm de long et de 1 ml de volume. Après calibrage du zéro optique avec le solvant, le pouvoir rotatoire spécifique de chaque produit $[\alpha]_D$, exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D = (100 \times \alpha) / (l \times c)$$

α : angle de rotation en degré lu sur le polarimètre

l : longueur en dm de la cuve de mesure

c : concentration de la molécule en solution en g/100 mL

II.1.3.2. Spectrométrie Ultra-violette-visible (UV)

Les spectres UV ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimadzu UV/Vis U-2450, double faisceau, avec des cuves en quartz à trajet optique de 1 cm.

II.1.3.3. Spectrométrie Infrarouge (IR)

Le spectre IR est réalisé à l'aide d'un appareil Nicolet® Impact 410 FTIR. Une poudre de 2 mg de composé mélangé à du KBr pulvérulent anhydre est pressée pour formuler une pastille. Le spectre est enregistré par un logiciel E₂ Ommic ESP 5.2a.

II.1.3.4. Spectrométrie de Masse (SM)

Les spectres de masse en basse et haute résolution ont été enregistrés en électro-spray sur un appareil micromasse ESI-Q-TOF®. (Manchester, UK). L'injection se fait grâce à une seringue de 500 μ L, avec un débit de 5 μ L/min.

II.1.3.5. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN sont enregistrés sous forme d'expériences monodimensionnelles et bidimensionnelles. Chaque expérience fournit des informations spécifiques à la détermination structurale des composés isolés.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN ¹H et ¹³C) ont été respectivement enregistrés à 600 et 150 MHz (Bruker Avance DRX-600), ou bien à 500 et 125 MHz (Bruker Avance DRX-500). Le logiciel Topspin 3.2 est utilisé pour le traitement et l'exploitation des données spectrales. Les expériences de RMN bidimensionnelles (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, HSQC-TOCSY et ROESY) sont

effectuées grâce aux programmes de séquences impulsionnelles standard fournis par Brüker.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés : CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ et CD_3OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et les constantes de couplage en Hz.

II.1.4. Extraction et purification

II.1.4.1. *Calendula stellata* Cav.

II.1.4.1.1. Macération

Le matériel végétal, séché et broyé (261.4 g) a été macéré dans un mélange hydro-alcoolique : Éthanol/Eau ; (70 : 30, (v/v), 3L), pendant 24 heures à température ambiante puis filtrée et concentrée sous pression réduite (cette opération a été répétée trois fois). On obtient l'extrait brut hydroéthanolique qui est pesé et conservé (57 g).

II.1.4.1.2. Extraction par résine HP-20

Une partie de l'extrait brut obtenu (40 g) a été soumis à une chromatographie sur colonne (CC) de Résine HP-20, en utilisant un gradient H_2O -MeOH (2L pour chaque composition) conduisant à cinq fractions : A (100% H_2O , 22 g), B (25% MeOH, 2.4 g), C (50 %MeOH, 2.84 g), D (75% MeOH, 1.45 g) et E (100% MeOH, 4.1 g).

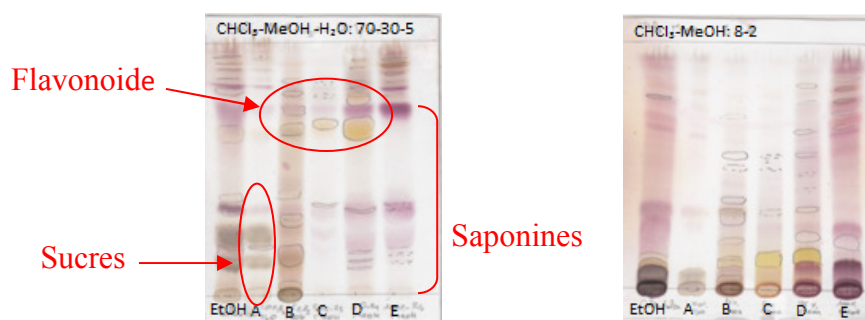


Figure II-03. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait EtOH et des fractions A-E de la plante *C. stellata*.

- Une grande similitude est observée entre le profil CCM de fraction C et celui de la Fraction D nous a permis de réunir ces deux fractions C et D.
- Nous avons choisi à étudier la fraction E car la quantité (4.1 g) est plus importante que les autres fractions et son profil CCM a montré une richesse en métabolites.

Avant d'entamer la séparation chromatographique, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice normale ou greffée (CCM) en parallèle avec des analyses sur HPLC analytique, afin de choisir la technique convenable pour une meilleure séparation.

II.1.4.1.3. Fractionnement et purification de la fraction E (100% MeOH)

Une cartouche de 40 g de gel de silice en phase normale a été utilisée pour le fractionnement de 3.5 g de la fraction E par flash chromatographie, en utilisant comme système de séparation CHCl_3 :MeOH (10:0-4:6). Des fractions de 25 mL ont été récoltées et regroupées selon leur profil en CCM (phase normale) fournissant 26 sous fractions (E1-E26). Les sous fractions E12 et E21 contiennent successivement les composés **2** (19 mg) et **4** (26 mg) à l'état pur (tableau II-03) (figure II-4).

Tableau II-03. Flash chromatographie de la fraction E sur colonne de gel de silice normale/masse en milligramme.

Lots	Fraction	Masse	Lot	Fraction	Masse	Lot	Fraction	Masse
1-3	E1	2.6	57-67	E10	109.8	107-113	E19	199.4
4-7	E2	114.1	68-69	E11	45	114-115	E20	91.5
8-11	E3	82	70	E12	19	116	E21	26
12-16	E4	21.5	71-74	E13	188.8	117-124	E22	136
17-32	E5	116.5	75-78	E14	308	125-131	E23	45
33-40	E6	65	79-83	E15	165.7	132-142	E24	74
41-45	E7	56.5	84-93	E16	136.5	144-167	E25	140
46-50	E8	78	94-99	E17	48.6	168-176	E26	1.4
51-56	E9	73.8	100-106	E18	62.5			

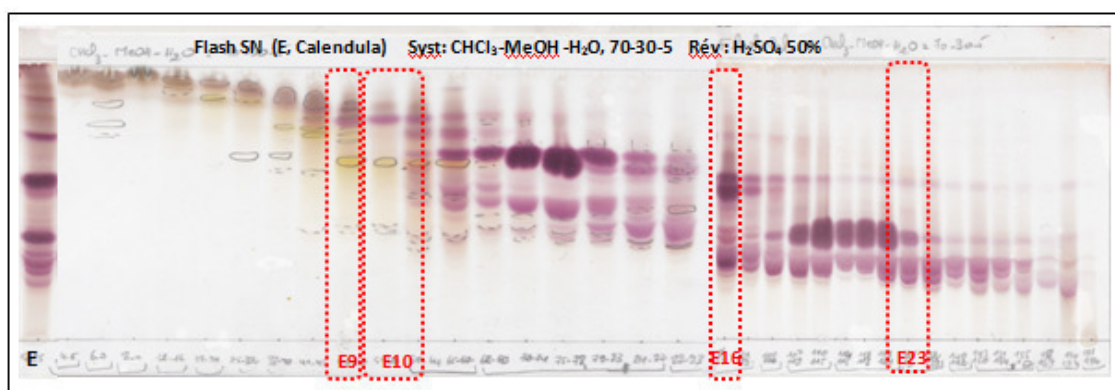


Figure II-04. Profil CCM en phase normale de la fraction E.

Nous nous sommes intéressés aux fractions **E9**, **10**, **16** et **23**. Toutes ces fractions ont été purifiées par HPLC semi-préparative.

Fraction E9: Une masse (73 mg) est éluée par un gradient 25-70% de CH₃CN pendant 20 min pour donner le flavonoïde **Cs19** (*Rt* 4.9 min, 3 mg), les saponosides **Cs6** (*Rt* 12.0 min, 7 mg) et **Cs7** (*Rt* 18.3 min, 8 mg).

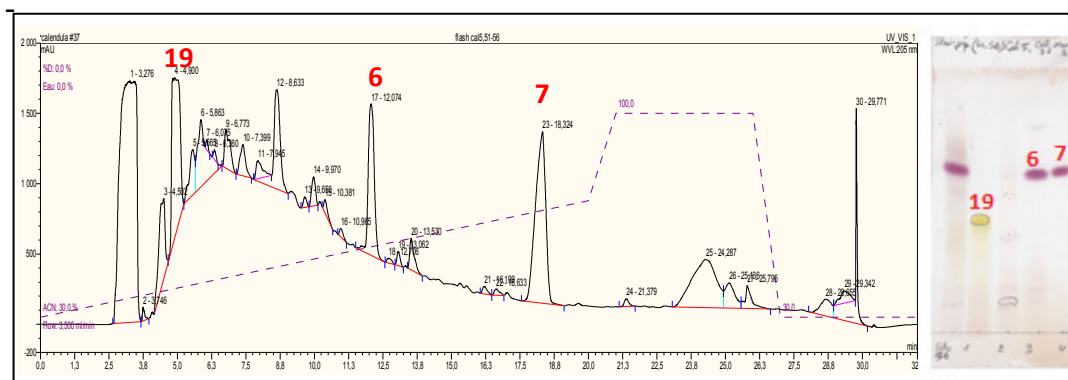


Figure II-05. Chromatogramme HPLC semi-préparative et profil CCM de la fraction E9.

- **Fraction E10:** Une masse (110 mg) est purifiée en HPLC avec le gradient 25-50% de CH₃CN pendant 20 min et a permis d'obtenir le flavonoïde **Cs20** (*Rt* 7.8 min, 3 mg).
- **Fraction E16:** Une masse (136 mg) est purifiée en HPLC avec le gradient (30-70% CH₃CN), dans 30 min, permettant ainsi d'obtenir les saponosides **Cs1** (*Rt* 14.5 min, 3 mg), **Cs10** (*Rt* 16.0 min, 3 mg), **Cs5** (*Rt* 19.5 min, 6 mg), **Cs11** (*Rt* 20.3 min, 2 mg), **Cs9** (*Rt* 23.6 min, 2 mg), **Cs8** (*Rt* 25.7 min, 6 mg), **Cs16** (*Rt* 27.7 min, 3 mg), **Cs17** (*Rt* 27.9 min, 3 mg) et **Cs12** (*Rt* 29.6 min, 3 mg), avec le composé **Cs2** (*Rt* 18.0 min, 2.7 mg) déjà obtenu dans la sous fraction E12.

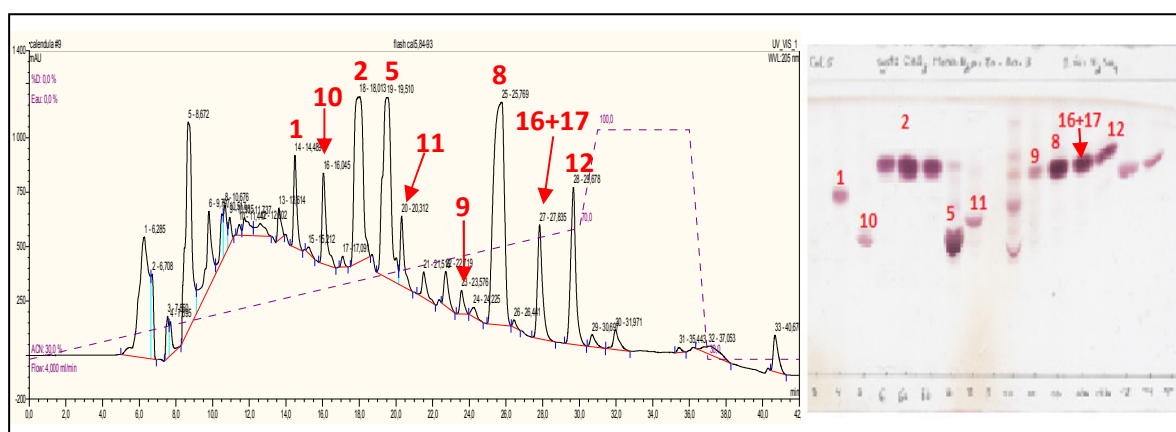


Figure II-06. Chromatogramme HPLC semi-préparative et profil CCM de la fraction E16.

- **Fraction E23:** En utilisant le système 35-45% CH₃CN, dans 20 min. nous avons obtenu les composés : **Cs3** (*Rt* 9.6 min, 3 mg), **Cs15** (*Rt* 15.9 min, 6 mg) et **Cs14** (*Rt* 16.7 min,

4 mg), avec le composé **Cs4** (R_t 14.2 min, 8.3 mg) déjà obtenu dans la sous fraction **E21**.

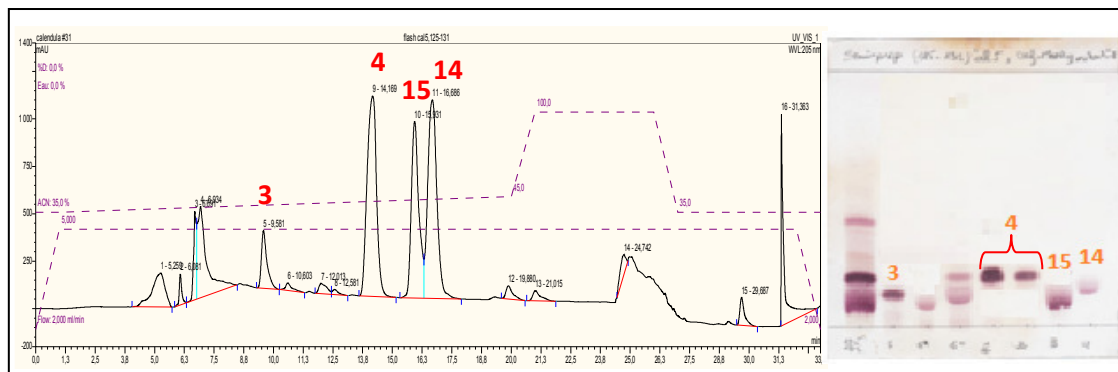


Figure II-07. Chromatogramme HPLC semi-prép et profil CCM de la fraction **E23**.

II.1.4.1.4. Etude de la fraction [C+D]

L'ensemble des deux fractions C et D a été soumis à une flash chromatographie sur silice normale, éluée par un gradient du MeOH dans le CHCl_3 (de 0 à 60% MeOH dans 32 minutes), pour donner 39 sous-fractions. La purification de la sous-fraction [32-33] (44 mg) par CLHP semi-préparative, en utilisant comme système d'éluion (gradient 22-40% CH_3CN , 20 min) a permis d'obtenir deux saponines: **Cs13** (R_t 12.0 min, 2 mg) et **Cs18** (R_t 11.0 min, 2 mg).

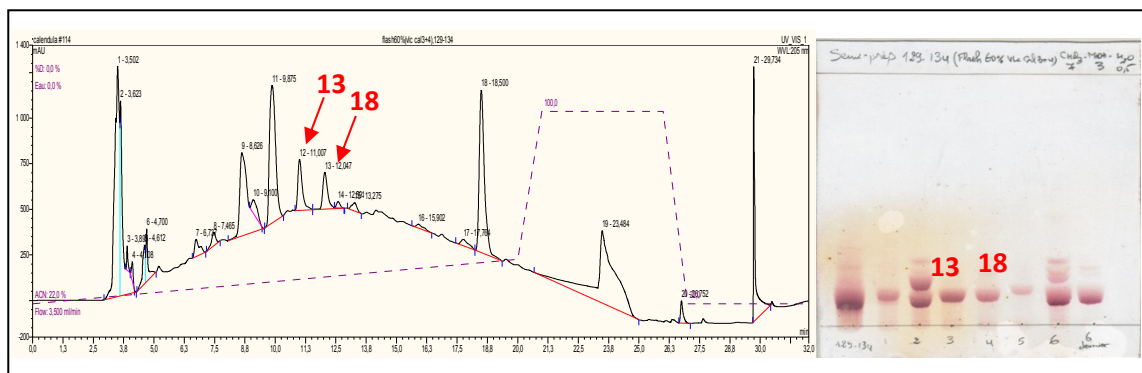


Figure II-08. Chromatogramme HPLC semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction [32-33].

II.1.4.2. *Scabiosa stellata* L.

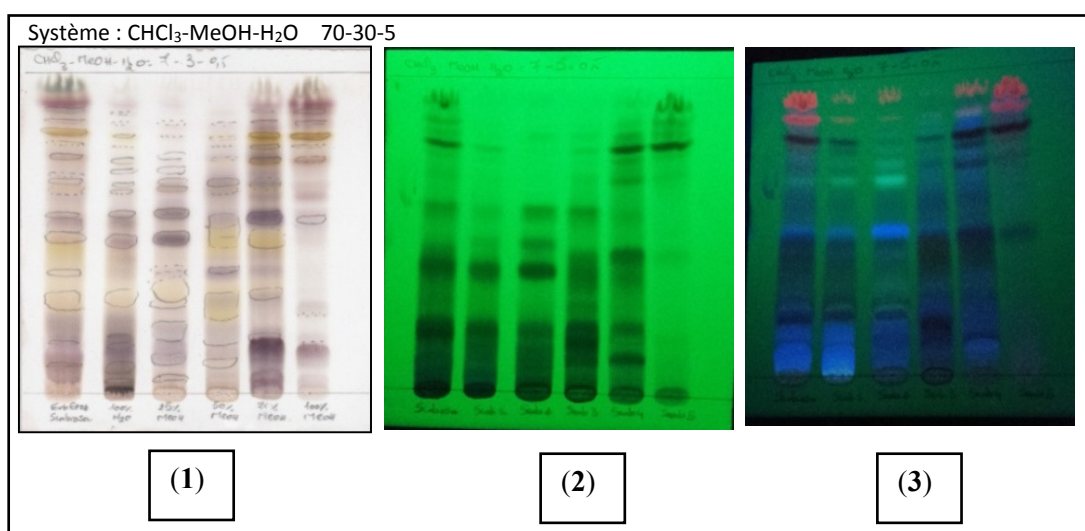
II.1.4.2.1. Macération

La matière végétale, séchée et broyée (653 g) a été macérée dans un mélange hydro-alcoolique : Éthanol/Eau ; (70 : 30 ;(v/v)) pendant 24 heures à température ambiante (cette

opération a été répétée trois fois). La solution extractive obtenue est concentrée par évaporation pour donner 118 g d'extrait brut.

II.1.4.2.2. Extraction par résine HP-20

Un traitement analogue à celui de la plante *Calendula stellata* a été adopté. En effet, l'extrait hydroéthanolique brut obtenu (118g) a été aussi soumis à une chromatographie sur colonne (CC) de Résine HP-20, en utilisant le même gradient H₂O-MeOH (2L chaque) pour donner les cinq fractions : A (100%H₂O, 48.5g), B (25%MeOH, 9.3g), C (50%MeOH, 11.9g), D (75%MeOH, 8.3g) et E (100%MeOH, 5.3g).



1 : plaque CCM après révélation. 2 : plaque CCM sous la lampe UV 254. 3 : plaque CCM sous la lampe UV 365.

Figure II-09. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait EtOH et des fractions A-E de la plante *S. stellata*.

II.1.4.2.3. Séparation et purification des produits

II.1.4.2.3.1. Partie saponines (Etude de la fraction D (75%MeOH))

Une flash chromatographie sur silice normale a été utilisée pour le fractionnement de 4.8 g de la fraction D, éluée avec un gradient de $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (100: 0:0; 60:40:0; 60:40:5), 36 sous-fractions sont obtenues.

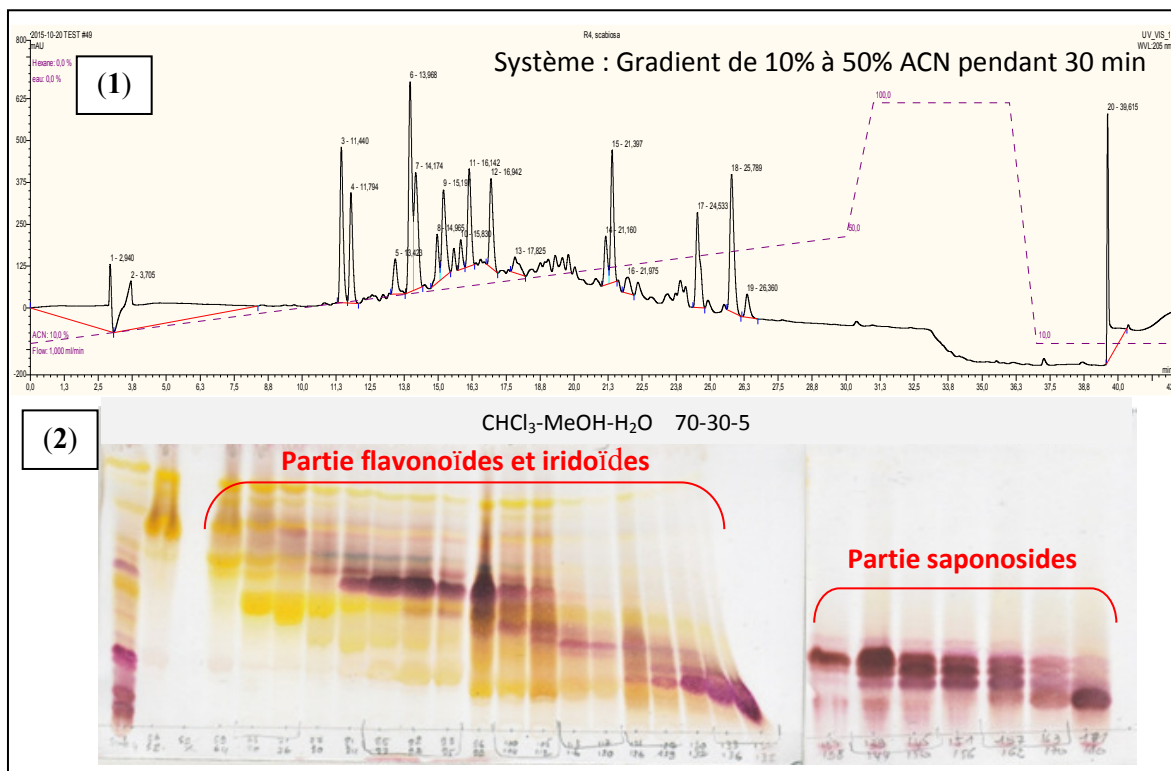


Figure II-10. Chromatogramme HPLC analytique de la fraction **D** (1) et profil CCM des sous-fractions de la fraction **D** (2).

- Le profil CCM a permis de distinguer deux parties des métabolites, une première riche en flavonoïdes et iridoïdes et une deuxième partie riche en saponosides (**F31** à **F36**). Les sous-fractions obtenues sont regroupées selon leurs profils CCM et HPLC.

Tableau II-04. Flash chromatographie de la fraction **D** sur colonne de gel de silice normale.

Fraction	Masse (mg)	Fraction	Masse(mg)	Fraction	Masse(mg)	Fraction	Masse(mg)
F1	32	F10	15.8	F19	14.6	F28	63.4
F2	10.6	F11	52	F20	142.3	F29	205.6
F3	58.4	F12	20.4	F21	103.9	F30	118.5
F4	67.3	F13	10.1	F22	311	F31	304.4
F5	89.5	F14	6.6	F23	293.1	F32	623.4
F6	48.5	F15	17.8	F24	278	F33	105.2
F7	18.7	F16	64	F25	190	F34	154.4
F8	25.2	F17	85.2	F26	68.8	F35	153.6
F9	7.9	F18	73.8	F27	67.1	F36	571.9

Nous nous sommes intéressés aux fractions enrichies en saponosides, de **F31** à **F36**. Les composés de ces fractions ont été séparés par Flash chromatographie en phase inverse ou par HPLC semi-préparative.

La fraction **F31** (300 mg) a été soumise à une flash chromatographie sur RP-18, éluée par un système à gradient de 18 à 60% de CH₃CN, en 32 minutes pour donner le composé **Ss25** (4,5 mg). La fraction **F33** (105 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative, en utilisant un gradient de 25% à 35% de CH₃CN pendant 10 minutes, puis un système isocratique à 35% de CH₃CN pendant 20 minutes pour donner 7 mg du composé **Ss24** (*t_R* 21,9 min). La fraction **F34** (154 mg) a été purifiée par Chromatographie flash sur RP-18, éluée par un gradient du MeOH:H₂O (30% à 100%, en 30 minutes) pour donner 4 mg de composé **Ss22**. La purification par HPLC semi-préparative des sous-fractions [36-38] obtenues à partir de **F34** avec une solution isocratique de 35% de CH₃CN a conduit aux composés **Ss27** (*t_R* 11,5, 7 mg) et **Ss26** (*t_R* 12,6, 8 mg). La fraction **F35** (150 mg) a été soumise à une Chromatographie flash sur RP-18, éluée avec un gradient de MeOH:H₂O (10% à 60% de MeOH, en 30 minutes) pour donner les composés **Ss28** (5 mg), **Ss29** (3 mg) et **Ss23** (3 mg). Finalement, La fraction **F36** (500 mg) a été purifiée par Chromatographie flash sur RP-18, éluée avec le même système de la fraction précédente (**F35**) pour donner le composé **Ss21** (4 mg).

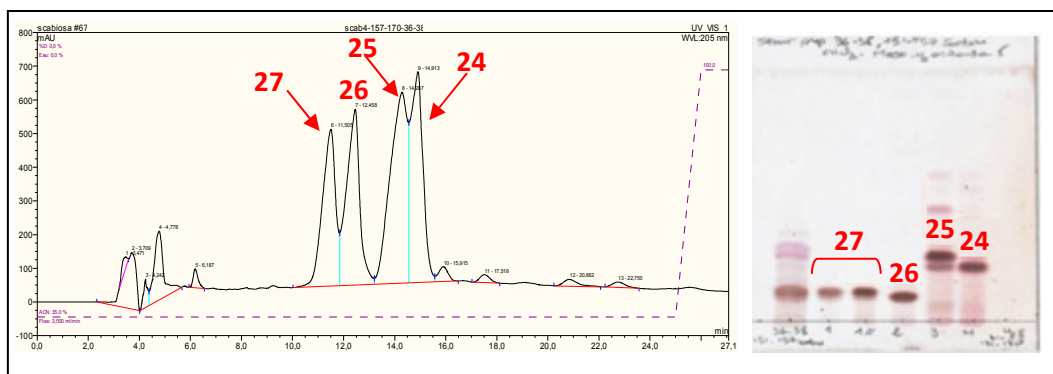


Figure II-11. Chromatogramme HPLC et CCM de la sous-fraction [36-38] de **F34**.

II.1.4.2.3.2. Etude de la fraction E (100%MeOH)

Une cartouche de 40 g de gel de silice en phase normale a été utilisée pour le fractionnement de 4 g de la fraction E par flash chromatographie en utilisant comme système de séparation CHCl₃-MeOH (10:0 à 4:6). Des fractions de 25 mL ont été récoltées et regroupées selon leur profil en CCM (phase normale) fournissant les composés et **Ss36** (2.8 mg), **Ss42** (15 mg) et **Ss43** (18 mg).

II.1.4.2.3.3 Partie CPC-CARAMEL (Etude des fractions B et C)

II.1.4.2.3.3.1. Extraction de partage centrifuge (EPC)

Les fractions **B** (2 g) et **C** (3 g) ont été soumises séparément à la CPC ; chacune a été dissoute dans 30 ml de mélange des phases inférieure et supérieure du système de solvant biphasique utilisé pour la séparation, ce dernier est constitué du MtBE/CH₃CN/ H₂O avec les proportions 3/3/4 (v / v / v). Dans la première expérience concernant la fraction **B**, la colonne a été remplie avec la phase inférieure à 500 tr/min. La vitesse de rotation a été ensuite augmentée jusqu'à 1200 tr/min, puis la phase supérieure a été pompée pendant 100 minutes en mode ascendant à 20 ml/min. Après cette étape, on procède à un inversement du rôle des deux phases, c-à-d la phase inférieure devient la phase mobile et la phase supérieure sera la phase stationnaire. Ce passage en mode dual est maintenu pendant 20 minutes de plus. Des fractions de 20 ml ont été recueillies sur toute l'expérience. Dans la deuxième expérience (fraction **C**), la méthode CPC était identique, à l'exception de l'étape d'extrusion qui a été effectuée entre 80 et 100 min. Toutes les fractions ont été analysées par CCM et HPLC puis rassemblées en donnant des sous-fractions respectives B₁-B₂₄ et C₁-C₂₁.

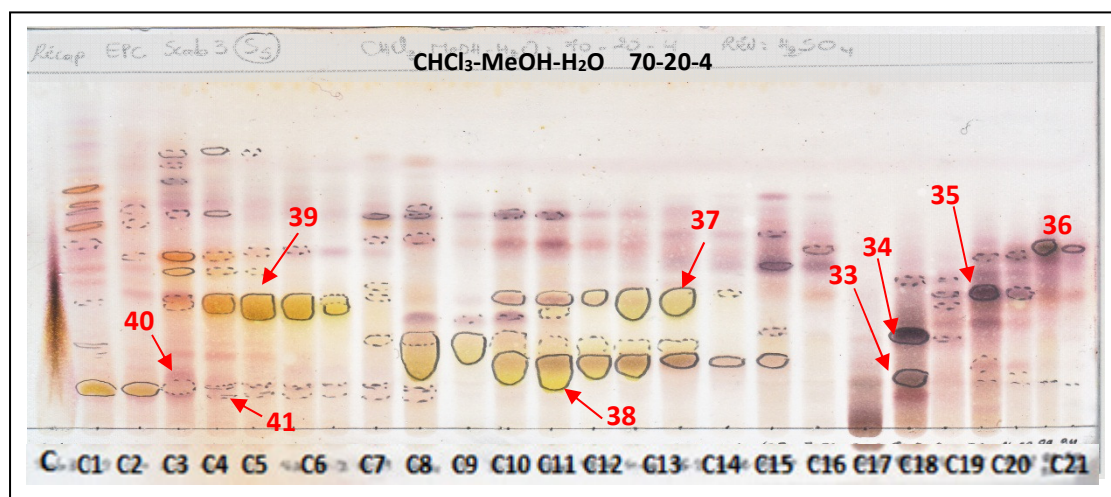


Figure II-12. Plaque CCM de l'extraction de partage centrifuge (EPC) de la fraction C.

II.1.4.2.3.3.2. Analyses RMN et déréplication des composés majoritaires

Nous avons opté pour la stratégie de déréplication qui est une approche qui consiste à caractériser les produits sans les isolés. Elle peut être réalisée par couplage de CPC et analyse en RMN ¹³C (Abedini et al., 2016 ; Ottl et al, 2014). Additionnée aux informations

chimio taxonomiques, cette technique permet une recherche efficace des bases de données en réduisant le nombre de candidats possible pour une molécule.

Dans une première étape, un aperçu bibliographique a été effectué pour obtenir les noms et les structures du maximum de métabolites déjà décrits dans le genre *Scabiosa* et la famille des Caprifoliaceae. Les déplacements chimiques prédits (^{13}C) des produits trouvés sont ajoutés à la base de données qui comprend au préalable les valeurs des déplacements chimiques (δ_{C}) de 2500 structures de produits naturels. Le fichier de données de chaque métabolite est stocké dans la base de données (NMR Workbook Suite 2012, ACD/Labs, Ontario, Canada).

Dans une deuxième étape, toutes les sous-fractions des deux expériences CPC (Fractions B et C) ont été évaporées et séchées sous vide et un échantillon d'environ ≈ 20 mg de chacune a été dissout dans 600 μL de méthanol- d_4 et analysée par RMN ^{13}C .

La troisième étape : Après analyse en RMN ^{13}C des fractions résultantes, les structures des molécules majoritaires ont été directement identifiées à partir des fractions successives en utilisant une méthode développée récemment pour la reconnaissance des motifs ou ensemble de signaux. Elle consiste à combiner l'alignement et la classification ascendante hiérarchique (HCA) pour assigner les déplacements chimiques des carbones (δ_{C}) des classes (Clusters) à leurs molécules.

A partir des spectres RMN ^{13}C , les signaux positifs sont automatiquement collectés tout en évitant ceux qui sont dus au bruit de fond, chaque liste de pics a été convertie en un fichier texte. Les intensités absolues des pics recueillis pour toutes les fractions successives analysées sont alignées grâce à un algorithme local écrit en langue python. Son principe est de diviser la largeur de la gamme du spectre ^{13}C qui est de 0 à 240 ppm en segments réguliers d'intervalle $\Delta\delta_{\text{C}} = 0.2$ ppm et d'associer l'intensité absolue de chaque pic du ^{13}C au segment correspondant. La classification a été basée uniquement sur les déplacements chimiques des segments.

Il en résulte un tableau qui importé dans un logiciel « PermutMatrix version 1.9.3 » (LIRMM, Montpellier, France) pour une analyse des classes (clustering analysis). La méthode de Ward a été performée pour agglomérer les données et obtenir des clusters.

Les classes résultantes des déplacements chimiques de carbones ^{13}C regroupés sont visualisées en diagramme appelé dendrogramme sur une carte à deux dimensions.

La dernière étape est consacrée à l'identification des métabolites. Chaque classe de déplacements chimiques obtenue par l'analyse ascendante hiérarchique (HCA) est soumise au moteur de recherche de structure dans la base de données (database management software).

Afin de confirmer les structures des composés identifiés par cette méthode, des expériences supplémentaires en RMN 1D et 2D (RMN ^1H , HSQC, HMBC et ^1H - ^1H -COSY) ont également été réalisées en utilisant des séquences d'impulsions Bruker standard (Bakiri et al., 2017).

Pour obtenir les composés identifiés, les sous-fractions ont subi des purifications poussées sur HPLC semi-préparative ou traités par des chromatographies flash. Et les produits purs issus de ces opérations ont été analysés par RMN 1D et 2D (HSQC, HMBC COSY, etc).

II.1.4.2.3.3.3. Purification des produits

Les sous-fractions C₂₋₄ ont été purifiées par HPLC semi-préparée RP-18 avec le système (18-45% de CH₃CN, 25 min) pour donner les composés **Ss39** (t_R 7.9, 6 mg), **Ss40** (t_R 13.4, 6 mg) et **Ss41** (t_R 14.2, 16 mg). Les composés **Ss35** (7 mg) et **Ss36** (23 mg) ont été purifiés par chromatographie flash en phase inverse de la sous-fraction C₂₀₋₂₁ (293 mg), en utilisant un gradient 10-50% de CH₃CN dans l'eau en tant que phase mobile. Les composés **Ss38** (36 mg) et **Ss37** (7 mg) ont été obtenus sous forme d'un précipité jaune dans les sous-fractions C₁₀ et C₁₃ respectivement. La sous-fraction C₁₈ (398 mg) a été soumise à une Chromatographie flash sur du gel de silice, élué par un système à gradient de CHCl₃-MeOH (10:0-7:3) pour donner les composés **Ss33** (3 mg) et **Ss34** (15 mg). Les composés **Ss30** (4 mg), **Ss31** (6 mg) et **Ss32** (5 mg) ont été obtenus à partir des sous-fractions B₂₁₋₂₂ par chromatographie flash sur du gel de silice, élué par le système CHCl₃-MeOH (10:0-7:3).

II.1.4.3. Salvia barrelieri Etl.

II.1.4.3.1. Extraction

Les parties aériennes fraîches de *S. barrelieri* (7 kg) ont été d'abord immergées dans du CHCl₃ pendant 20 s. Après filtration et évaporation du solvant sous pression réduite, on obtient 48 g d'exsudat. Ensuite, les parties aériennes broyées et séchées ont été macérées

dans EtOH-H₂O (8:2, 7 L), trois fois à température ambiante. Les extraits combinés ont été concentrés sous pression réduite et le résidu a été mis en suspension dans H₂O (1 L), puis partagé successivement avec CHCl₃, EtOAc et *n*-BuOH (3x300 mL chacun), ces phases ont été évaporées à sec et ont permis d'obtenir respectivement 1.8, 2.7 et 11 g pour chaque fraction.

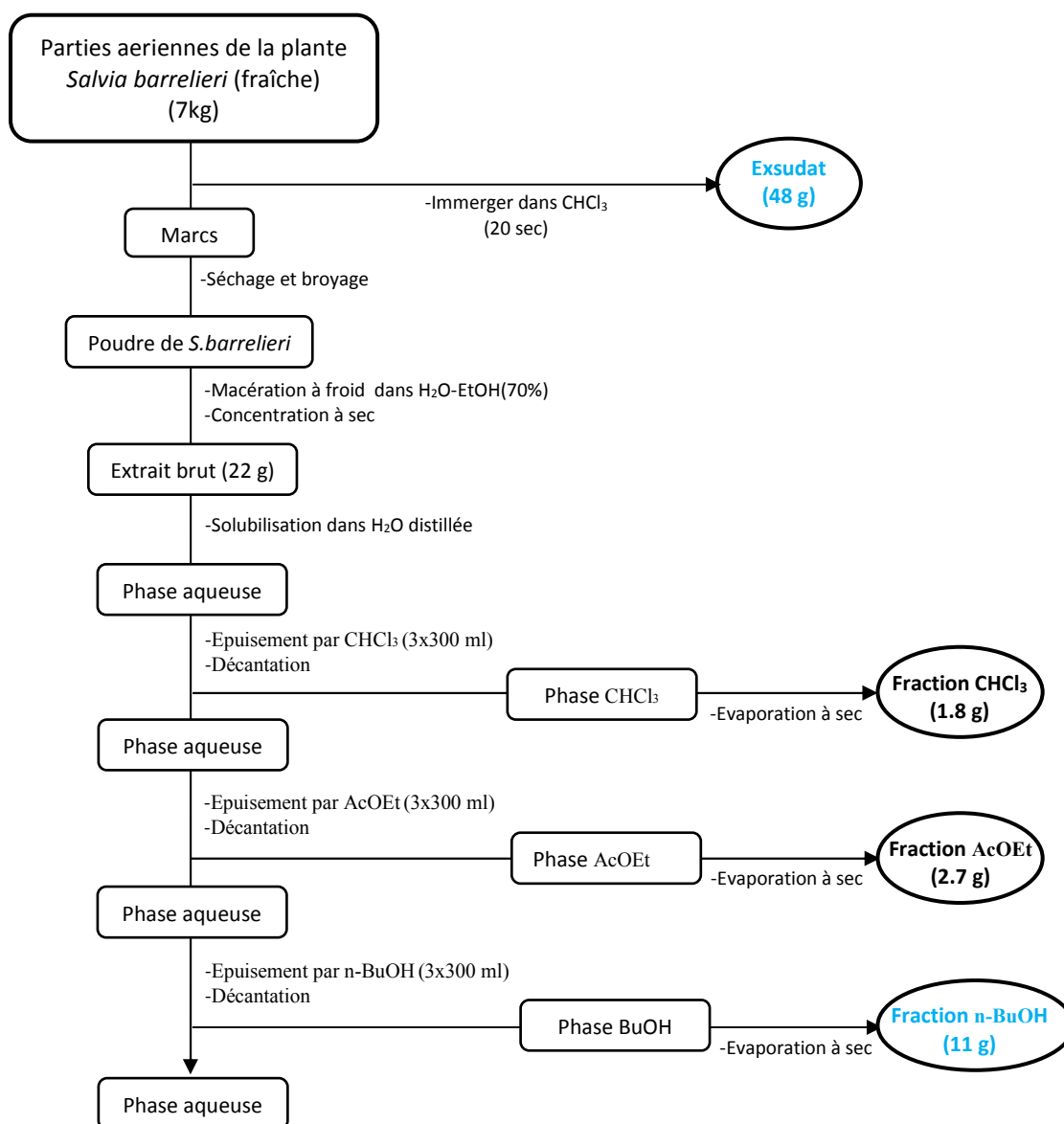


Figure II-13. Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *Salvia barrelieri*.

II.1.4.3.2. Purification des produits

- *A partir de l'exsudat :*

Une partie de l'exsudat (10 g) a été fractionnée par chromatographie liquide sous vide de gel de silice (VLC) en utilisant un gradient d'un système (*n*-hexane-AcOEt) allant de

100% de *n*-hexane à 100% AcOEt avec un incrément de 10% pour obtenir 21 fractions [E₁- E₂₁]. La fraction E₅ (129 mg) a été soumise à une chromatographie flash sur RP-18, en utilisant un gradient de 90 à 100% de MeOH dans l'eau, pendant 30 minutes conduisant ainsi au composé **Sb47** (32 mg). La fraction E₁₁ (380 mg) a aussi été purifiée par chromatographie flash sur RP-18, éluée avec du MeOH de 80 à 100% dans l'eau, pour donner le composé **Sb44** (67 mg). La fraction E₁₄ (1.28 g) a également été soumise à une chromatographie flash sur RP-18, éluée avec le même système de la fraction précédente (E₁₁), pour donner les composés **Sb45** (23.3 mg), **Sb48** (10.5 mg) et **Sb49** (8 mg). Le composé **Sb46** (1.5 mg) a été obtenu à partir de la chromatographie flash sur gel de silice de la fraction E₁₆ (1.47 g), éluée par le système toluène-acétone (100:0-80:20).

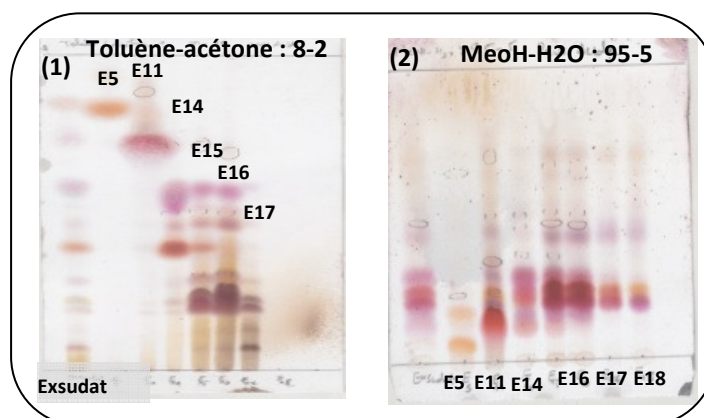


Figure II-14. Profil CCM en phase normale (1) et inverse (2) des fractions de l'exsudat.

- *A partir de la phase butanolique :*

Une partie de la fraction *n*-BuOH (2 g) a été soumise à une VLC sur RP-18, éluée avec un système de solvant MeOH:H₂O (de 0% à 100% MeOH) pour donner 6 fractions. La fraction de 60% de MeOH (310 mg) a été soumise à une Chromatographie flash sur gel de silice, éluée par le gradient du système CHCl₃-MeOH (100:0-90:10), en 25 min, pour donner les composés **Sb50** (4,6 mg), **Sb51** (6,8 mg), **Sb52** (18,5 mg) et **Sb54** (6.4 mg). La fraction 20% de MeOH (200 mg) a été aussi soumise à une HPLC préparative, éluée par CH₃CN:H₂O (de 0% à 100% de CH₃CN), pour donner le composé **Sb53** (13.8 mg). La première sous-fraction (98.7 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative, éluée avec un système isocratique (22% CH₃CN) pour donner le composé **Sb55** (*t_R* 19.0 min, 2 mg).

Chapitre 2

Méthodes expérimentales des activités
biologiques

II.2. Méthodes biologiques

II.2.1. Activité antimicrobienne

L'inhibition de la croissance microbienne *in vitro* est évaluée par mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI), les tests ont été réalisés par le Dr Amin ABEDINI.

II.2.1.1. Microorganismes testés

Les souches de microorganisme utilisées dans cette étude sont des souches de référence du laboratoire de microbiologie EA 4691 Bios (Biomatériaux et Inflammation en site osseux), UFR de pharmacie de l'université de Reims Champagne-Ardenne. Parmi les 22 souches testées, on distingue 8 bactéries à Gram positif, 9 bactéries à Gram négatif et 5 levures :

Tableau II-05. Liste de bactéries et levures mis au test de l'activité antimicrobienne.

Micro-organismes		
Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif	Levures
1 <i>Bacillus subtilis</i>	9 <i>Escherichia coli</i> CIP 54.127	18 <i>Candida albicans</i>
2 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1034	10 <i>Enterobacter cloacae</i>	19 <i>Candida glabrata</i>
3 <i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	11 <i>Salmonella enterica</i>	20 <i>Candida tropicalis</i>
4 <i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154	12 <i>Serratia marcescens</i>	21 <i>Candida kefyr</i>
5 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	13 <i>Proteus vulgaris</i>	22 <i>Cryptococcus neoformans</i>
6 <i>Micrococcus luteus</i>	14 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
7 <i>Listeria innocua</i>	15 <i>Providencia stuartii</i>	
8 <i>Streptococcus pyogenes</i>	16 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	
	17 <i>Shigella sonnei</i>	

II.2.1.2. Méthode en milieu solide (CMI)

L'activité est évaluée visuellement par la présence ou l'absence de colonie, en utilisant la gélose de Mueller Hinton (MHA) coulée en boîtes de Pétri puisensemencée grâce à un inoculateur à tête multiples (appareil de STEERS). La lecture sera ensuite estimée après incubation à l'étuve à 37 °C pendant 18 - 24 heures (Abedini et al., 2016).

Préparation des dilutions

Pour chaque extrait, une solution mère à 200 mg/mL a été préparée (soit 500 mg dans 2.5mL de MeOH/H₂O (50/50)). Ensuite, une série de dilutions de 10 mg/mL à 0.3 mg/mL a été réalisée. Ainsi, pour obtenir la concentration à 10 mg/mL, 1 mL de solution mère (SM) sont introduits dans une boîte de pétri, puis on ajoute 19 mL de gélose à chaud (45°C), on procède de la même façon pour obtenir les autres dilutions (Tableau II-06).

Tableau II-06. Les concentrations préparées pour déterminer la CMI en milieu solide.

Solution	Concentration solution (mg/ml)	Concentration finale dans les boîtes (mg/ml)
SM	200	10
S1	100	5
S2	50	2.5
S3	25	1.2
S4	12.5	0.6
S5	6.25	0.3

- Pour l'exsudat de *S. barrelieri* (extrait apolaire), le solvant utilisé est un mélange Acétone/EtOH (75/25) au lieu de MeOH/H₂O (50/50).

Préparation des souches microbiennes et culture *in vitro*

A partir d'une culture de 24 heures, une goutte de chaque suspension est récupérée puis ajoutée à 10 mL de solution MH contenue dans un tube. 1 mL de suspension de chaque tube est ensuite prélevé pour remplir les 22 puits de la plaque de l'ensemencement automatique (Appareil de STEERS) pour finaliser la culture dans les boîtes de Pétri.

Incubation et lecture

Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Après 24 heures, les colonies seront dénombrées visuellement.

II.2.1.3. Méthode de bioautographie**Préparation de la plaque CCM**

Les composés purs (50 µg dans 50 µL de MeOH ou CHCl₃) sont déposés en point sur une plaque de silice normale en vérifiant sous lumière UV à 254 nm ; la plaque est mise dans un dessiccateur pour la sécher (Abedini et al., 2016).

Préparation de la suspension bactérienne

Les microorganismes sont cultivés dans des tubes contenant un milieu MHA à 37°C. Après 24h, 10 mL de liquide RC (Ringer Cystéine) sont ajoutés aux tubes pour obtenir la concentration de 10⁷ CFU/mL. Ensuite, deux dilutions successives au 1/10 dans du milieu MHA sont réalisées pour obtenir la concentration bactérienne de 10⁵ CFU/mL. Puis 250 µL de cette solution sont prélevés et mis dans un tube de 30 mL de gélose MHA. Cette suspension bactérienne est utilisée pour faire les tests antibactériens.

Les CCM sur lesquelles sont déposées les composés purs et qui sont stérilisées sont placées au fond de boîtes de culture de forme carrée. Ensuite, 30ml de suspension bactérienne sont ajoutés à chaque boîte. L'incubation se fait pendant 24 heures à 37°C. Une solution de para-iodonitrotétrazolium (INT) à 2 mg/mL dans H₂O est vaporisée sur la surface de la gélose, et l'incubation est renouvelée pendant 4 heures. L'INT est alors transformé par une déhydrogénase bactérienne en un composé d'une couleur rouge foncé ; ainsi l'inhibition de la croissance bactérienne est révélée par la présence de zone claire.

II.2.1.4. Méthode de dilution en milieu liquide (microplaques)

Préparation de la suspension bactérienne

Les microorganismes sont cultivés et préparés selon le protocole précédent pour obtenir de la suspension bactérienne à la concentration de 10⁵ CFU/mL.

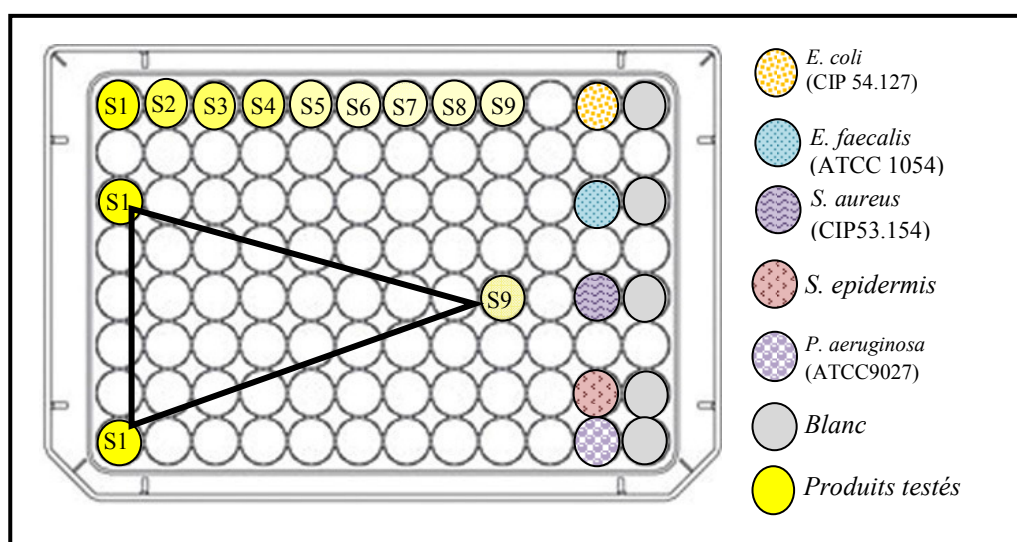
Préparation des produits et des microplaques

Une série de dilution de chaque composé à tester est préparée à 9 concentrations en allant de 500 µg/mL à 1.9 µg/mL, à partir d'une solution mère à 2 mg/mL dans MeOH/H₂O (50/50) et à raison de 100 µL de chaque dilution par puits. Enfin, 100 µL de suspension bactérienne sont ajoutés dans les 9 puits pour obtenir un volume final de 200 µL (tableau II-07) (Abedini et al., 2016).

Tableau II-07. Les concentrations préparées au test de la CMI en milieu liquide.

Solution	Concentration solution (µg/mL)	Concentration finale dans les puits (µg/mL)
SM	2000	-
S1	1000	500
S2	500	250
S3	250	125
S4	125	62.5
S5	62.5	31.2
S6	31.25	15.6
S7	15.5	7.8
S8	7.75	3.9
S9	3.87	1.9

Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C. La lecture est réalisée par pulvérisation du réactif INT à 2 mg/mL et incubation de nouveau pendant trente minutes à 37 °C. La CMI correspond à la concentration du premier puits présentant une décoloration.

**Figure II-15.** Illustration d'une plaque 96 puits d'un test de la CMI en milieu liquide.

II.2.2. Activité antiradicalaire

Des plaques 96 puits de 100 µL (Greiner® F bottom) et le lecteur de microplaques (FLUOstar® Omega) sont utilisés pour faire les tests au DPPH.

Solution de DPPH

- Préparation d'une solution mère de DPPH à 316 µM : 6.23 g de DPPH dans 50 mL d'éthanol 99%.

- Préparation d'une solution test de DPPH à 158 μM dans EtOH 50% : faire une dilution de la solution mère au $\frac{1}{2}$ dans l'eau.

Solution d'échantillon

- Préparation des échantillons : 4 mg dans 1 mL de DMSO pour les extraits (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le puits), et 2 mg dans 1 mL de DMSO pour les produits (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le puits).

Pour chaque produit et extrait actif, une série des dilutions est réalisée pour déterminer l' IC_{50} , comme indiqué dans le tableau suivant :

	Extraits		Produits purs	
	Dilution	Concentration finale dans le puits	Dilution	Concentration finale dans le puits
Solution S ₁	-	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Solution S ₂	0.5 mL S ₁ + 0.5 mL DMSO	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.5 mL S ₁ + 0.5 mL DMSO	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Solution S ₃	0.5 mL S ₂ + 0.5 mL DMSO	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.5 mL S ₂ + 0.5 mL DMSO	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Solution S ₄	0.2 mL S ₃ + 0.8 mL DMSO	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.2 mL S ₃ + 0.8 mL DMSO	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Solution S ₅	0.5 mL S ₄ + 0.5 mL DMSO	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.5 mL S ₄ + 0.5 mL DMSO	2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Solution des témoins positif et négatif

1. Une solution d'acide ascorbique (vitamine C) à 4 mg/mL est préparée dans le DMSO, puis la solution est diluée au 1/40 (soit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par puits).
2. Une solution de quercétine à 4 mg/mL est préparée dans le DMSO, puis la solution est diluée au 1/8 pour donner une solution de 0,5mg/mL (**Q1**) (soit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par puits).

Dans une plaque de 96 puits :

- Introduire pour chaque échantillon : 5 μL du produit ou de l'extrait + 95 μL de la solution test DPPH (réaliser cette opération dans 3 puits voisins).
- Introduire pour chaque blanc : 5 μL d'extrait ou produit + 95 μL d'éthanol à 50% (réaliser cette opération après chaque 3 puits d'un échantillon).
- Témoin négatif : 5 μL de DMSO + 95 μL de solution test DPPH.
- Témoin positif : 5 μL de la solution témoin (acide ascorbique et quercétine) + 95 μL de DPPH.

Chaque mesure doit être réalisée en triplicate et la mesure se fait à 37°C et à $\lambda = 515 \text{ nm}$.

II.2.3. Activité antiproliférative

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés en collaboration avec le Pr. Hamid MORGANI, au sein du laboratoire MEDyC, Faculté de Pharmacie de l'université de Reims.

Le protocole général consiste en trois étapes réalisées comme illustré dans le schéma suivant :

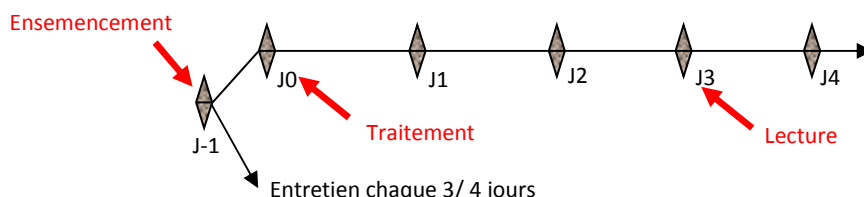


Figure II-16. Organisation générale d'un test de cytotoxicité.

• Test au MTT

L'essai colorimétrique au MTT est une opération relativement simple. Le MTT ou bromure de 3[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium est un colorant jaune de type tétrazolium qui est réduit par les enzymes mitochondriales (la succinate déshydrogénase notamment) en cristaux de formazan coloré en bleu. Seules les cellules dont les mitochondries sont viables vont donner cette réaction ; en conséquence, l'intensité de la couleur est directement proportionnelle au degré d'intégrité des mitochondries. Il s'agit d'un test utile pour détecter des composés cytotoxiques.

II.2.3.1. Les lignées cellulaires cancéreuses utilisées

Nous avons utilisé plusieurs lignées cellulaires :

- Deux types du cancer du sang : la lignée leucémique promyélocytaire (HL-60) et la lignée leucémique érythromyéloblastoïde humaines K562),
- cancer du poumon humain (A549),
- Un type rare du cancer des os, fibrosarcome qui affecte les tissus fibreux dans la jambe, le bras ou la mâchoire (HT1080).

Le milieu de culture est constitué du milieu commercial approprié ajouté de 10 % de SVF (sérum de veau fœtal) et 1% d'antibiotique (pénicilline).

Les milieux utilisés sont :

- RPMI 1640 pour HL60 et K562.

- DMEM pour A549.
- MEM pour HT1080.

II.2.3.2. Entretien des cellules

Pour chaque culture cellulaire, des flasques T75 contenant les cellules sont conservés dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂. Le milieu de culture est changé tous les 3 ou 4 jours (confluence des cellules à 80% environ). Une concentration de 30000 ϕ /ml est préparée à chaque entretien selon la procédure du comptage et vérification de l'état des cellules par observation sous microscope. Pour chaque entretien, on procède les étapes suivantes :

- Aspiration du milieu de culture.
- Rinçage au D-PBS (5mL) sur la surface qui ne contient pas les cellules puis mélanger une seule fois avant aspiration.
- Trypsination avec 400 μ L de la trypsine sur la surface qui contient les cellules (adhérées) afin de décoller les cellules.
- Incubation pendant 5 minutes.
- Ajout de 5 mL du milieu de culture neuf (soit bien chauffer à 37 °C), sinon on aura un risque d'un choc thermique.
- Homogénéisation de la suspension pour prendre 1 mL dans un cryotube.
- Mettre 13 μ L dans KOVA Slide[®].
- Comptage sous microscope.
- Préparation d'une nouvelle flasque (5mL) à la concentration 30000 ϕ /mL.
- Incubation.

II.2.3.3. Ensemencement des plaques

Lorsque les cellules sont à confluence (le jour de l'entretien), nous avons réalisé cette étape. Après comptage selon la méthode indiquée précédemment, une suspension de 10000 ϕ /mL est préparée pour les plaques 96 puits (100 μ L par puits) et de 20000 ϕ /mL pour les plaques 24 puits (1 mL par puits).

La figure suivante montre les différentes étapes de l'entretien et de l'ensemencement :

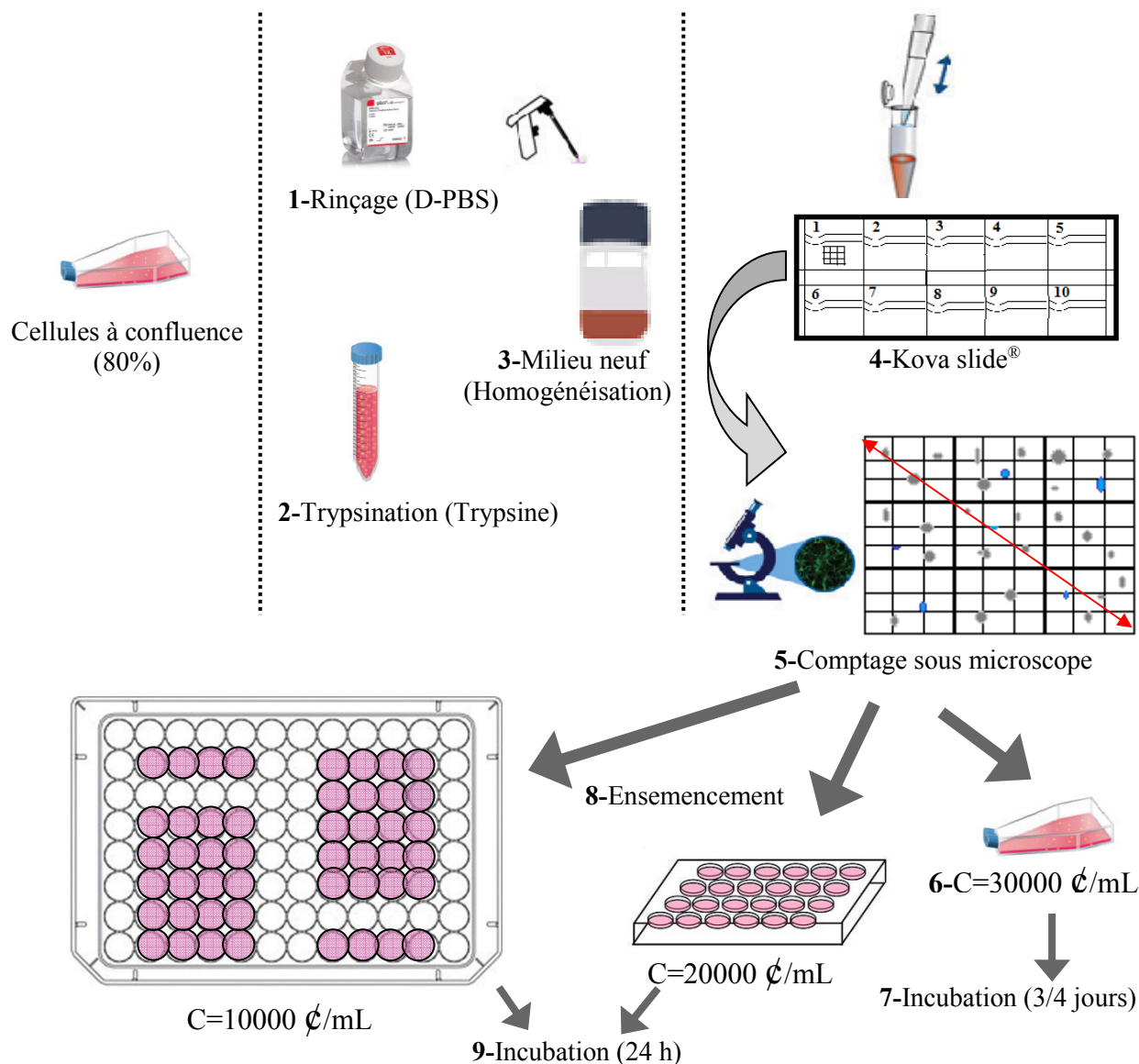


Figure II-17. Les différentes étapes de l'entretien et de l'ensemencement des cellules cancéreuses.

II.2.3.4. Préparation des dilutions et traitement

Pour chaque produit, une solution mère à $50 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ou $25 \cdot 10^{-3} \text{M}$ a été préparée dans le DMSO. Ensuite, une série de dilutions dans le milieu de culture approprié a été réalisée de $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ à $2.5 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

Les produits à tester sont distribués dans les puits selon des dilutions croissantes et laissés au contact des cellules. Chaque dilution a été testée sur 4 puits distincts (en quadruplicat pour plaques 96 puits) et sur 3 puits distincts (triplicat pour plaques 24 puits).

II.2.3.5. Lecture

Après 72 heures de culture dans un incubateur à 37 °C et 5% CO₂, nous avons suivi les étapes suivantes indiquées par Promega Manufacur's :

Plaques 96 puits

- 15 µL de solution Dye (MTT) sont ajoutés dans chaque puits et sont mélangés en tapotant doucement sur le côté du plateau en agitant brièvement avec un agitateur orbital.
- L'ensemble est incubé à 37°C pendant 4 heures. Pour de fortes densités cellulaires, le temps d'incubation peut être réduit à 2 heures.
- 100 µL de solubilisation/solution stop sont ajoutés dans chaque puits pour dissoudre le formazan (précipité) par aspiration et refoulement à plusieurs reprises.
- A l'abri de la lumière, mettre la boîte dans un réfrigérateur à 4 °C pendant au moins une heure.
- Les densités optiques (DO) sont ensuite mesurées à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA à une longueur d'onde d'essai de 570 nm.

Plaques 24 puits

- Aspiration du milieu de culture.
- Rinçage au D-PBS (1 mL).
- Trypsination avec 200 µL de la trypsine sur la surface qui contient les cellules (adhérées) afin de décoller les cellules.
- Incubation pendant 5 minutes.
- Ajout de 0.8 mL du milieu de culture neuf (bien chauffer à 37 °C).
- Comptage : tout en travaillant dans un bain de glace, pour chaque puits le comptage est répété trois fois selon la même méthode indiqué pour l'entretien et l'ensemencement des cellules (figure II-17).

PARTIE III

Résultats et discussion

Chapitre 1

Identification des produits isolés
de *Calendula stellata* Cav.

Étude chimique de *Calendula stellata*

Toutes les parties de *C. stellata* réduites en poudre sèche (261.4 g) ont été extraites par une solution hydroalcoolique à 70% et seulement une partie de l'extrait brut obtenu (40 g) a été soumise à une chromatographie sur colonne (CC) de résine diaion HP-20. Cette opération a été menée en utilisant un gradient du système H₂O-MeOH et elle permet d'obtenir cinq fractions (A-E). Seules, les fractions C+D et E ont été exploitées. La purification de ces dernières a été effectuée entièrement par CLHP semi-préparative répétitive, ce qui a conduit à l'isolement de vingt composés Cs (1-20) (Figure III-01).

La plante *C. stellata* (261.4 g)

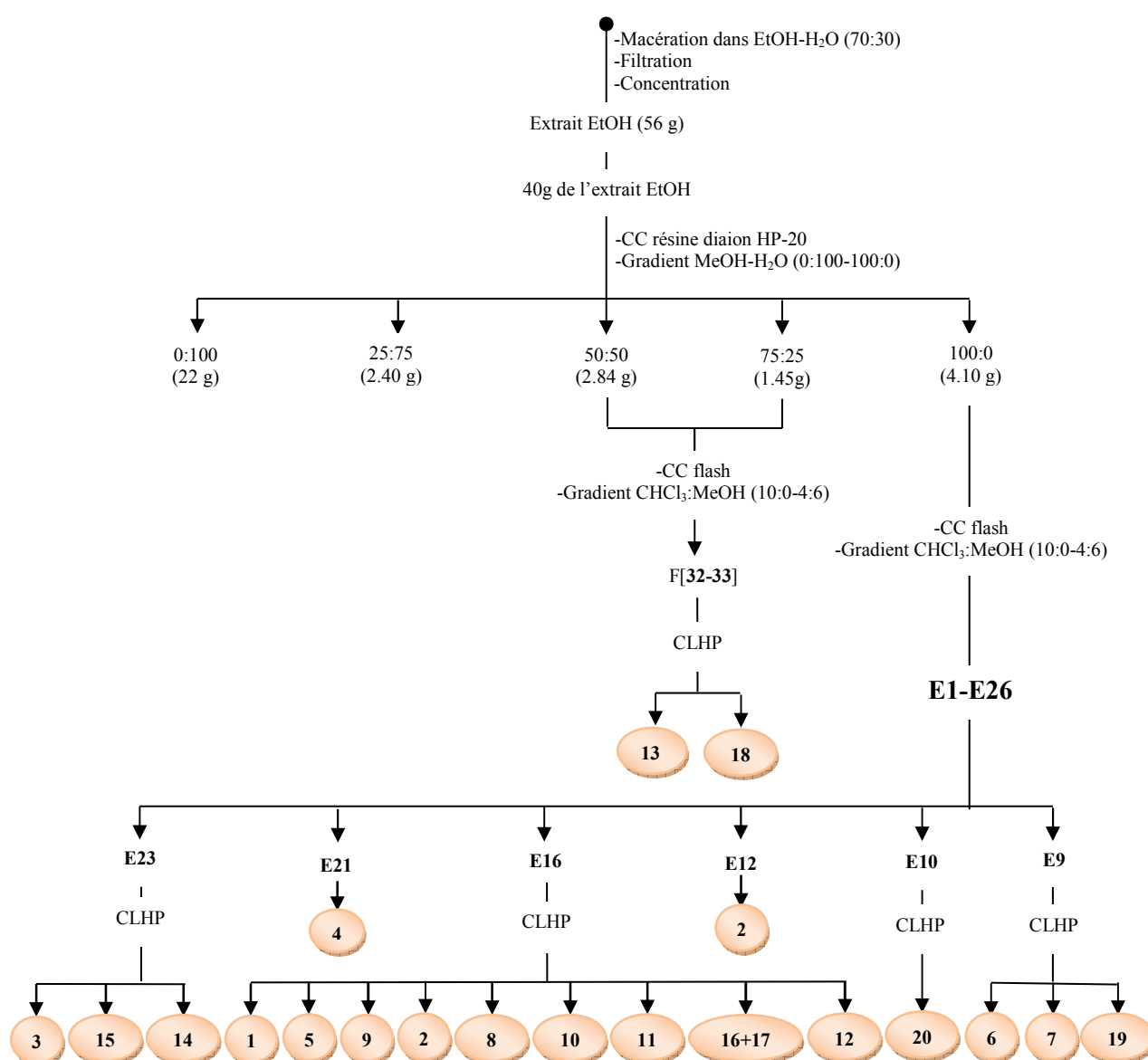


Figure III-01. Schéma d'extraction et de purification des composés de *Calendula stellata*.

III.1.1. Détermination structurale des saponosides de *Calendula stellata*

Dix-huit saponines Cs (**1-18**) ont été isolées à partir de l'extrait hydroéthanolique de *Calendula stellata*, dont cinq sont de nouvelles structures. Parmi ces dix-huit saponines, six sont des monodesmosides (glycosilation en position 3) et les douze autres sont des bisdesmosides (glycosilation en positions 3 et 28).

• Nature des génines des composés Cs1- Cs18

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D, en particulier l'étude des corrélations observées sur les spectres HSQC, HMBC et COSY comparées avec les données de la littérature a permis d'identifier les génines des composés (Tableau III-01). Ces génines sont des triterpènes pentacycliques du type oléanane. Les génines ont été identifiées à l'acide oléanolique (**I**), l'acide échinocystique (**II**), l'acide morolique (**III**), l'acide 29-hydroxyoléanolique (**IV**) et l'acide machaérinique (**V**) (Figure III-02).

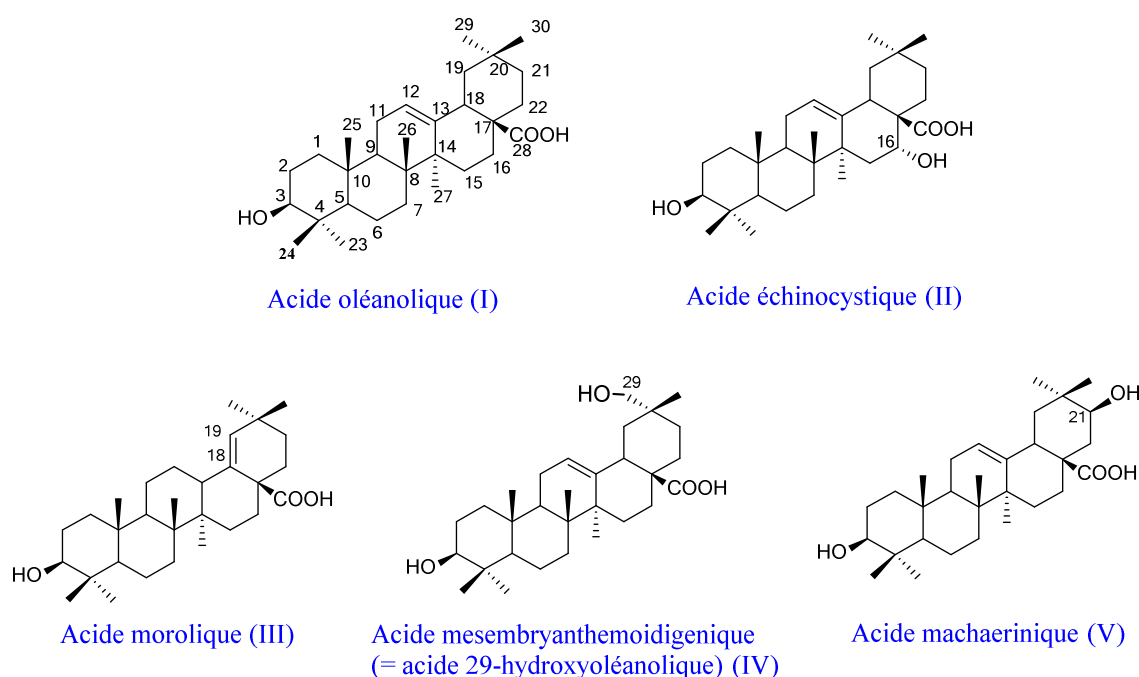


Figure III-02. Structures des génines des saponosides isolées à partir de *Calendula stellata*.

Tableau III-01. Nature des sapogénines des composés Cs (**1-18**).

Génines	Composés	Références
Acide oléanolique (I)	2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16, 17	Mahato et al., 1994
Acide échinocystique (II)	1, 3, 10	Li et al., 2007
Acide morolique (III)	9	Hamburger et al., 2002
Acide mesembryanthemoidigénique (IV)	13	Plasman et al., 2000
Acide machaérinique (V)	18	Günter et al., 2000

- **Nature des sucres**

L'analyse des spectres ^1H - ^1H COSY et TOCSY, complétée par celle du HMBC et ROESY permet à partir de chaque anomère d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des constantes de couplage spin-spin et des déplacements chimiques a permis de caractériser chacun d'eux. Ainsi, trois types d'unité osidique ont été caractérisé et identifié : glucose, galactose et l'acide glucuronique (Figure III-03). Les configurations absolues des sucres ont été déterminées à D grâce à l'hydrolyse acide de la fraction **D** (100:0). Dans les spectres RMN ^1H des composés, les relatives grandes valeurs des constantes de couplage $^3J_{\text{H-1, H-2}}$ des protons anomériques (entre 7.0 et 8.3 Hz) ont indiqué une orientation β .

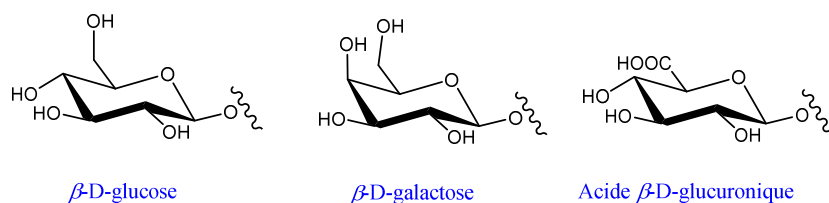
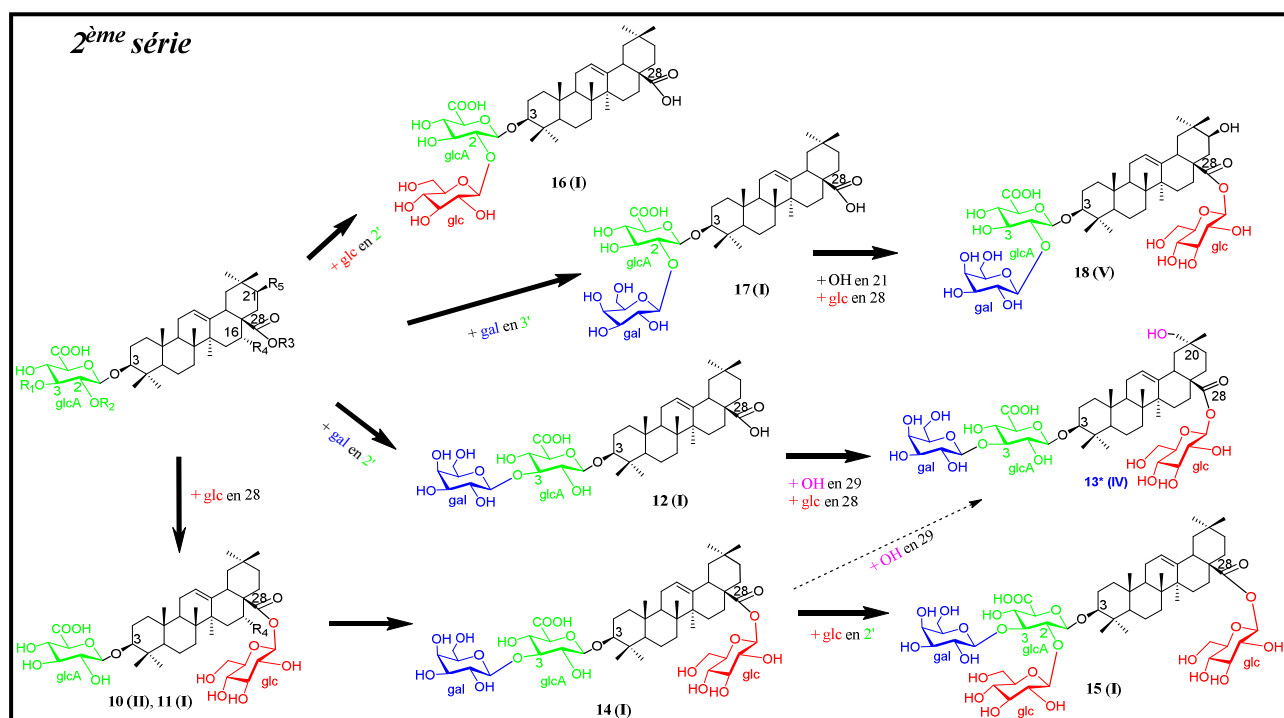
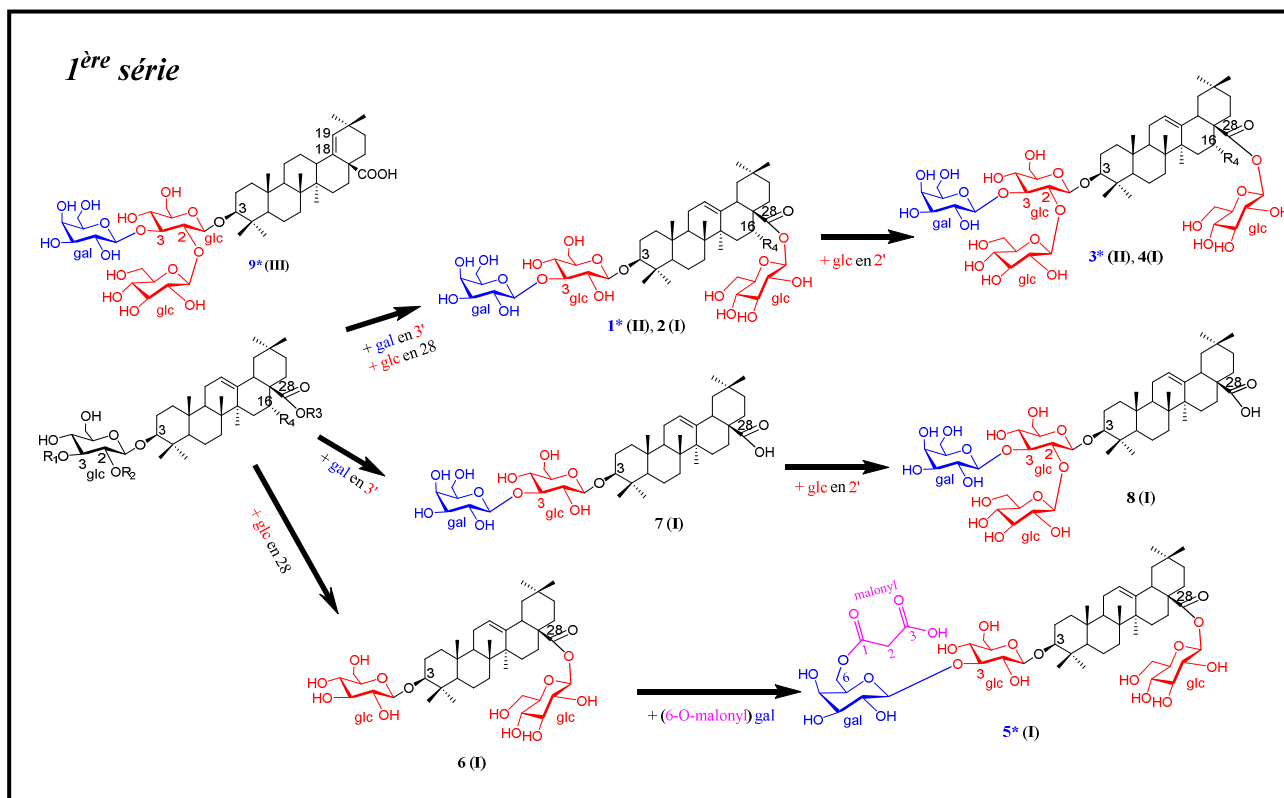


Figure III-03. Structures des sucres retrouvés dans les saponosides isolées.

Selon le premier sucre lié à la génine en position 3, nous avons regroupé les composés en deux séries (Figure III-04). Une première avec le glucose et une deuxième partie avec l'acide glucuronique.

Nous allons d'abord commencer par l'élucidation structurale des saponosides de la première série (le glucose est le premier sucre lié à la génine en position 3). Trois génines sont retrouvées dans cette série, génine **I**, **II** et **III**. En vue de déterminer la structure de chaque composé, les parties génine et osidique seront interprétées séparément pour le premier composé, ensuite les composés qui ont une partie osidique identique seront étudiés ensemble. Dans ce cas les caractéristiques principales de la partie génine seront indiquées quand elle est différente de celle des produits déjà identifiés.

Les tableaux des déplacements chimiques ^1H et ^{13}C de la génine et de la partie osidique sont retrouvés à la fin de chaque interprétation. Ce qui n'est pas le cas pour les saponines de la deuxième série, où on trouve uniquement le tableau des déplacements chimiques ^1H et ^{13}C de la partie osidique après chaque composé élucidé et celui de la partie génine est mis à la fin de la partie traitant l'élucidation des structures des saponines (Tableau III-14).



* : structure nouvelle. (I) : acide oléanolique. (II) : acide échinocystique. (III) : acide morolique. (IV) : Acide mesembryanthemoidigénique. (V) : acide machaérinique.

Figure III-04. Structures des saponosides isolés de *Calendula stellata*.

III.1.1.1. Elucidation structurale du composé Cs1

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS mode positif (Figure III-05) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 981.5029 $[M+Na]^+$, correspondant à la formule brute $C_{48}H_{78}O_{19}$.

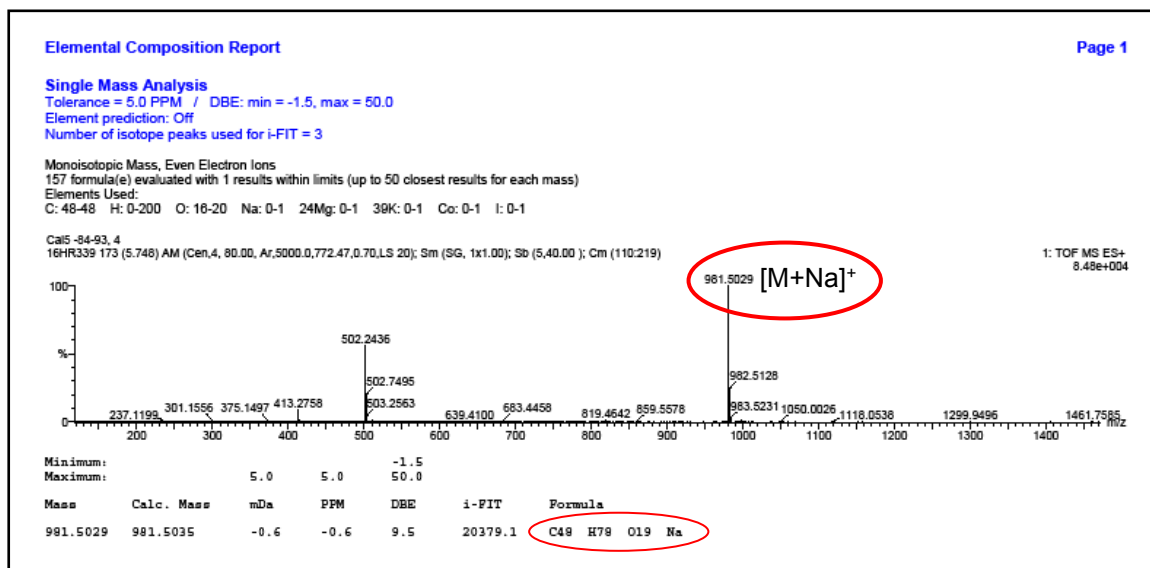


Figure III-05. Spectre de masse HR-ESI-MS du composé Cs1.

– Analyse du spectre de RMN 1H du composé Cs1

L'analyse du spectre de RMN 1H de Cs1 (Figure III-06), nous suggère la présence d'un squelette triterpénique avec trois unités osidiques, à cause des signaux caractéristiques suivants :

- Sept singulets d'intégration 3H chacun entre δ_H 0.80 et 1.40 ppm (0.81, 0.86, 0.91, 0.98, 0.99, 1.08, 1.39) correspondant à 7 méthyles tertiaires angulaires.
- Des groupements aliphatiques CH et CH₂ de la génine apparaissent dans la zone entre δ_H 0.8 et 2.0 ppm.
- Le proton H-3 résonne à δ_H 3.23 ppm sous la forme d'un doublet de doublets ($J=11.0, 4.4$ Hz) indiquant l'absence de substitution en position 2.
- Un proton oléfinique résonnant à δ_H 5.34 ppm ($J=3.3$ Hz), correspond au proton H-12 caractéristique de l'insaturation $\Delta^{12,13}$.
- Un proton résonnant sous la forme d'un doublet de doublets ($J=13.8, 3.9$ Hz) à δ_H 3.02 ppm attribuable à H-18, qui pourrait indiquer une génine de type oléanane.

- La présence d'un signal sous forme d'un triplet à δ_H 4.55 ppm ($J=3.2$ Hz) correspondant à un méthine hydroxylé (CHOH) est également observée.

En plus des signaux observés de la génine, la présence de trois unités osidique est justifiée par les signaux caractéristiques suivants :

- Trois protons anomériques résonant sous forme d'un doublet à δ_H 4.39 ppm ($J=7.5$ Hz), δ_H 4.53 ppm ($J=7.8$ Hz) et δ_H 5.37 ppm ($J=8.1$ Hz).
- Un ensemble de signaux dans la zone compris entre δ_H 3.3 et 3.9 ppm qui sont des groupements méthines hydroxylés des sucres.

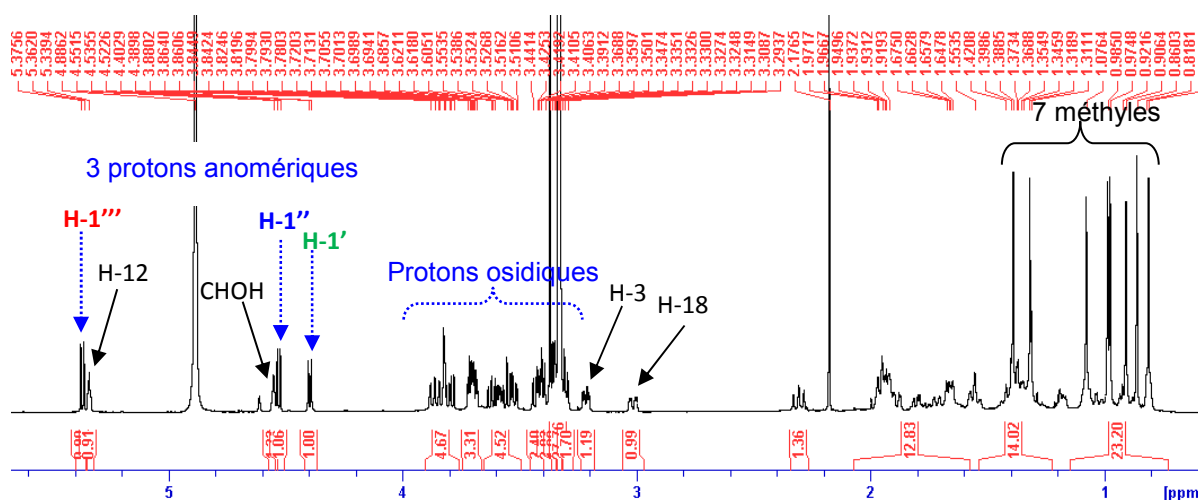


Figure III-06. Spectre de RMN 1H du composé Cs1.

– Analyse du spectre de RMN ^{13}C du composé Cs1

Le spectre de RMN ^{13}C enregistré à 150 MHz (Figure III-07), nous a permis de distinguer les carbones suivants :

- Un carbonyle à δ_C 175.8 ppm attribué au carbonyle en position 28 (C-28).
- Deux signaux à δ_C 122.3 et 143.2 correspondent aux carbones de la double liaison $\Delta^{12,13}$.
- Des groupements aliphatiques CH, CH₂, CH₃ et carbones quaternaires de la génine résonant entre δ_C 17.9 et 55.8 ppm.
- Un ensemble de carbones dont les déplacements chimiques se situent entre δ_C 60 et 86 ppm attribuables aux carbones osidiques en plus des deux méthines oxydés de la génine, et dont celui du carbone C-3 est localisé à δ_C 89.4 ppm.
- Des carbones anomériques à δ_C 94.3, 104.3 et 104.9 ppm.

Ce premier constat permet de déduire que le composé Cs1 est constitué d'une génine triterpénique hydroxylée et substituée par trois hexoses. Le carbone C-28 observé à δ_C 175.8

ppm est blindé par rapport à l'acide libre (≈ 180 ppm), il est donc engagé dans une liaison ester. Le carbone C-3 déblindé à δ_C 89.4 ppm par rapport au signal de la génine libre (≈ 75 ppm) est engagé dans une liaison glycosidique. Il s'agit donc d'une saponine bidesmosidique.

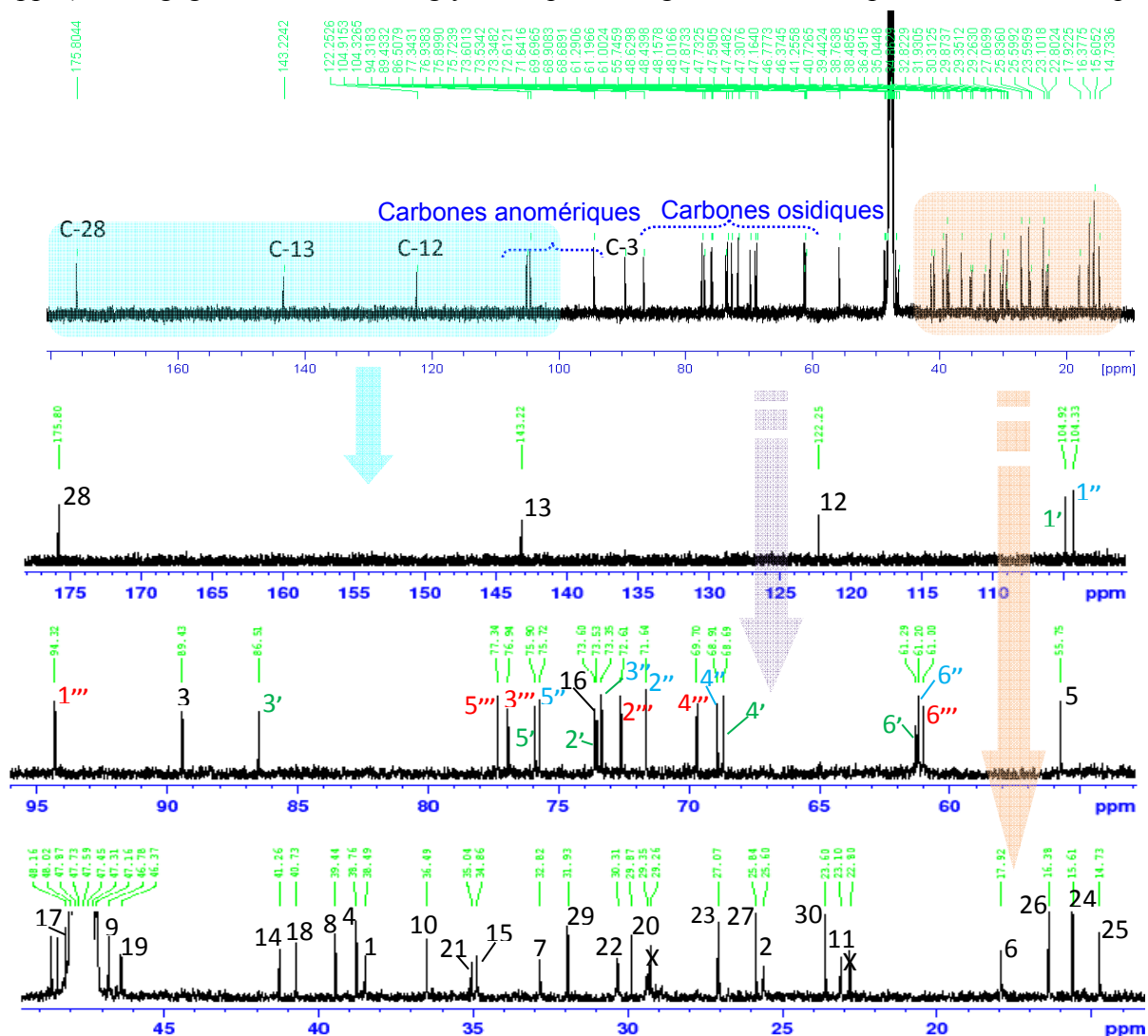


Figure III-07. Spectre de RMN ^{13}C du composé Cs1.

- **Identification de la partie aglycone (génine II)**

L'analyse approfondie des spectres de RMN 2D (HSQC, COSY et HMBC) a permis d'attribuer les signaux de la génine en comparaison avec ceux décrits dans la littérature et d'identifier celle-ci à l'acide échinocystique (Génine II) (Li et al., 2007).

- Analyse du spectre COSY de la partie génine

Le spectre COSY met en évidence les couplages directs (géminal et vicinal) des protons d'un même système de spin. Ce sont des couplages scalaires du type 2J , 3J et même $^4J_{1H-1H}$.

En examinant le spectre COSY du composé **Cs1** (Figure III-08) nous pouvons identifier les protons non analysables sur le spectre de RMN ^1H :

- le proton H-18 présente des corrélations avec les deux protons géminés $\text{H}_{\text{a,b-19}}$ à δ_{H} 1.08 et 2.31 ppm, ce dernier donne une faible corrélation avec le méthyle situé à δ_{H} 0.98 ppm attribuable à celui en position 30 qui est à son tour corrélé avec le méthyle résonnant à δ_{H} 0.91 ppm suggéré pour le CH_3 -29.
- A partir du proton H-3 situé à δ_{H} 3.23 ppm, les deux protons géminés $\text{H}_{\text{a,b-2}}$ sont localisés à δ_{H} 1.72 et 1.95 ppm. Eux-mêmes corrélient avec les deux protons géminés $\text{H}_{\text{a,b-1}}$ résonnant à δ_{H} 1.15 et 1.66 ppm, ainsi les protons du cycle A sont attribués.
- Au niveau du proton oléfinique H-12, nous observons une corrélation avec H-11 (δ_{H} 1.92) qui montre lui-même une corrélation avec le proton H-9 situé à δ_{H} 1.66 ppm.
- Une corrélation entre le proton d'un méthyne oxygéné très déblindé à δ_{H} 4.55 ppm avec deux protons géminés à δ_{H} 1.38 et 1.89 ppm qui restent indéterminés à ce stade.

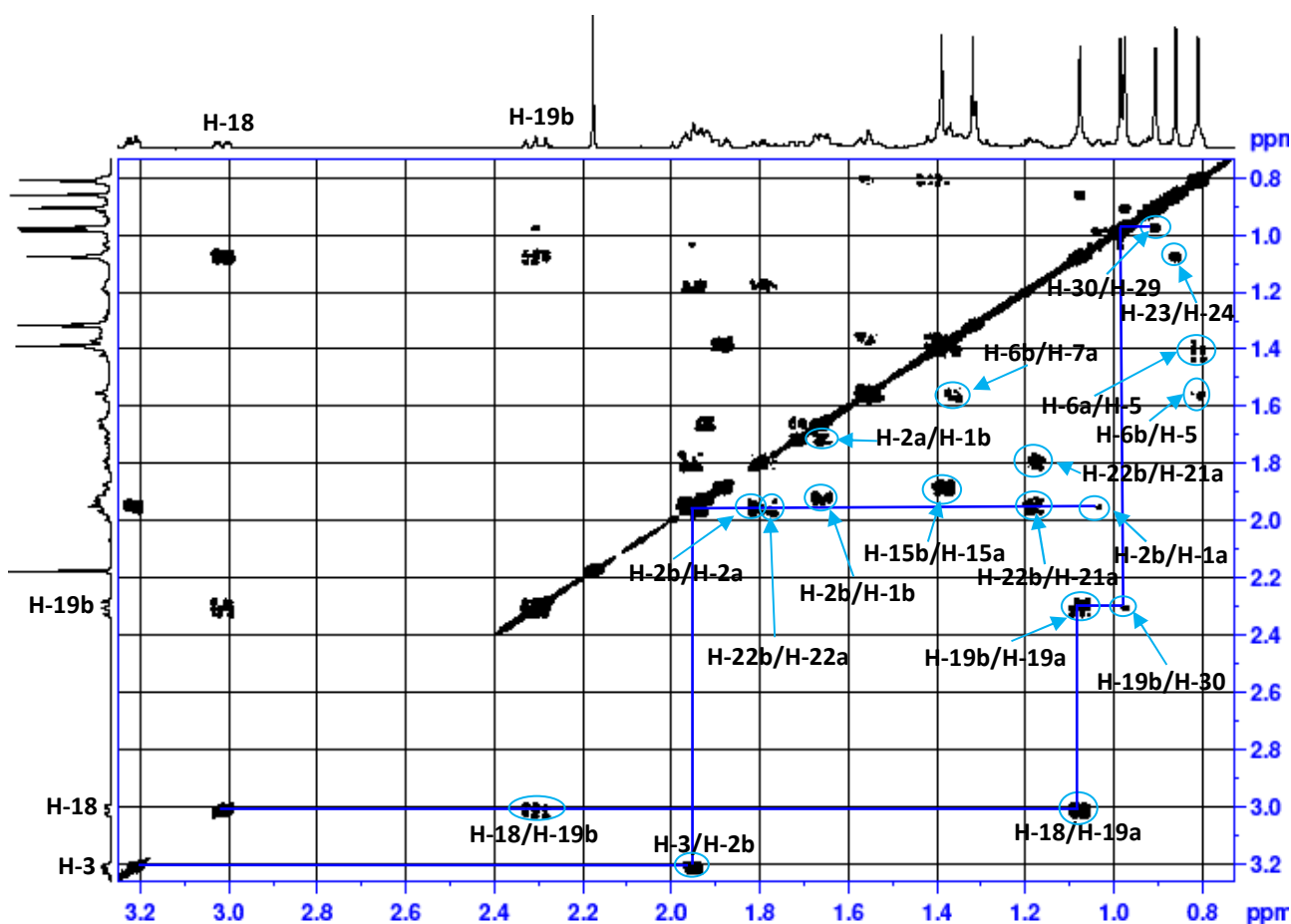


Figure III-08. Spectre COSY dans la partie génine du composé Cs1.

– Analyse du spectre HSQC de la partie génine de Cs1

L'interprétation du spectre HSQC met en évidence les couplages hétéronucléaires directs $^1J_{H-C}$. A l'aide du spectre HSQC de Cs1 (Figure III-09), la majorité des carbones protonés sont alors déterminés selon les données obtenues depuis les spectres RMN 1D et COSY.

• A partir des protons identifiés sur le spectre COSY, sont attribués les carbones correspondants : C-1 (δ_C 38.5), C-2 (δ_C 25.6) et C-3 (δ_C 89.4) du cycle A, C-9 (δ_C 46.8), C-11 (δ_C 23.1), C-12 (δ_C 122.3) du cycle C, C-18 (δ_C 40.9). Ainsi pour le cycle E, le carbone C-19 situé à δ_C 46.4 ppm. Les méthyles CH₃-29 et CH₃-30 sont également localisés à δ_C 31.9 et 23.6 ppm, respectivement.

Les valeurs des δ_C de la partie génine sont répertoriées dans le tableau III-02.

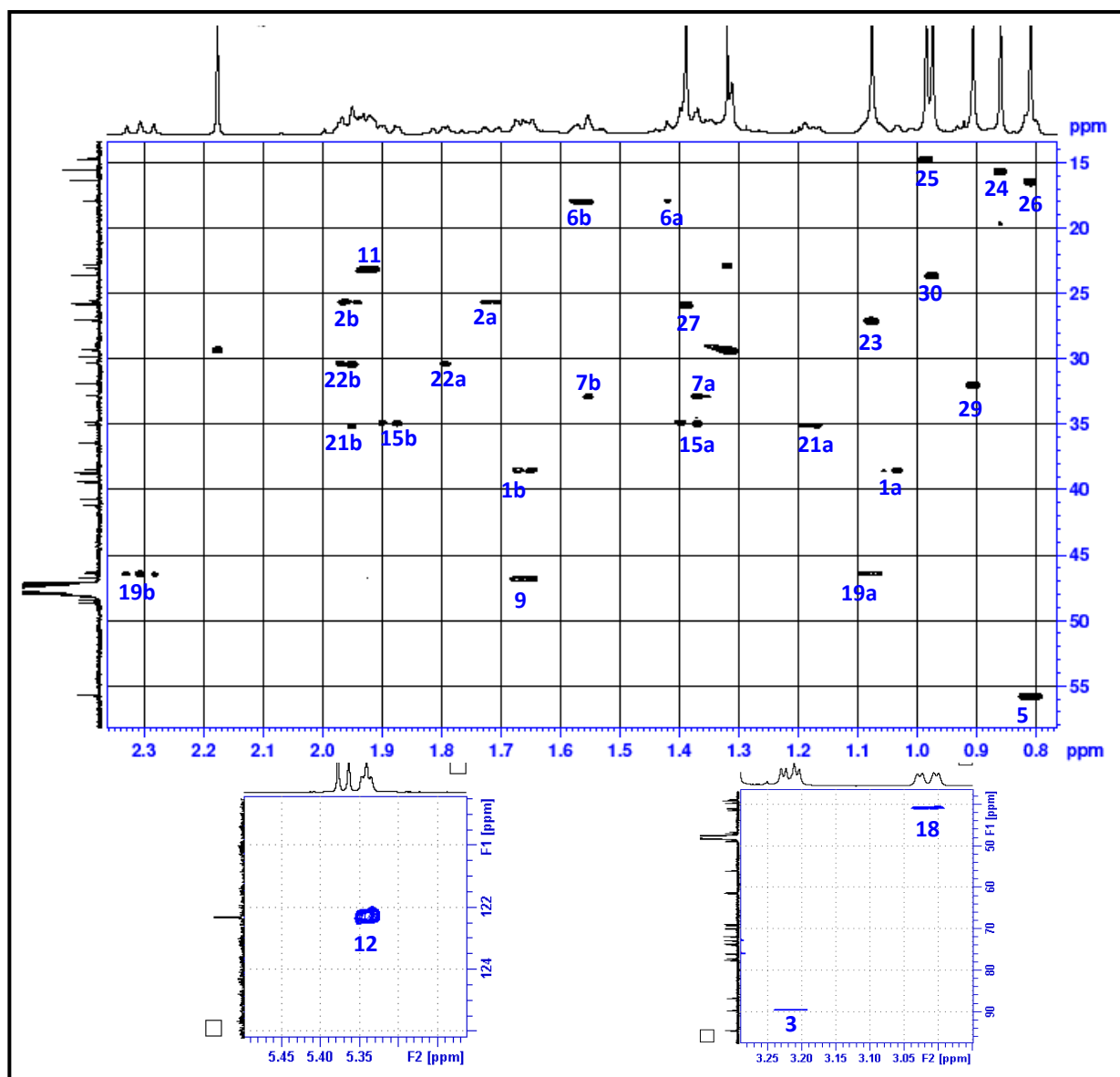


Figure III-09. Spectre HSQC de la partie génine du composé Cs1.

– Analyse du spectre HMBC de la partie génine de Cs1

L'expérience HMBC permet d'établir les couplages hétéronucléaires à longue distance $^{n>1}J_{H-C}$, donnant une confirmation sur les données précédentes ce qui permet également de compléter la structure et de corréler les carbones quaternaires avec les protons voisins.

Parmi les corrélations observées sur le spectre HMBC du composé **Cs1** (Figure III-12), nous avons choisi les plus importantes pour élucider la structure finale de la génine :

- A partir du carbone C-3 (δ_C 89.4), les méthyles CH₃-23 et CH₃-24 sont localisés à δ_H 1.08 et 0.86 ppm, la distinction entre ces derniers s'effectue grâce à la différence des valeurs de leurs déplacements chimiques. En effet, sur le spectre HSQC le carbone α -équatoriale CH₃-23 (δ_C 27.1) est plus déblindé que le carbone β -axial CH₃-24 (δ_C 16.3).
- Au niveau des protons méthyles CH₃-23 et CH₃-24 nous observons trois corrélations identiques avec le C-3 cité précédemment, C-4 (δ_C 38.8) et C-5 (δ_C 55.8) en plus de leurs corrélations mutuelles.
- Le carbone C-5 corrèle avec un autre méthyle situé à δ_H 0.99 ppm attribuable au CH₃-25. Ce dernier corrèle avec les carbones CH₂-1, C-9 et un carbone quaternaire situé à δ_C 36.5 ppm attribuable au carbone C-10.

Après attribution du proton H-5 à δ_H 0.81 ppm sur le spectre HSQC, les deux protons géminés H_{a,b}-6 sont localisés à δ_H 1.45 et 1.56 ppm, grâce aux corrélations observées avec le H-5 sur le spectre COSY, permettant également la localisation des protons géminés H_{a,b}-7 à δ_H 1.36 et 1.54 ppm (voir figure III-08). Ainsi, les deux carbones CH₂-6 (δ_C 17.9) et CH₂-7 (δ_C 32.8) sont attribués à l'aide du spectre HSQC.

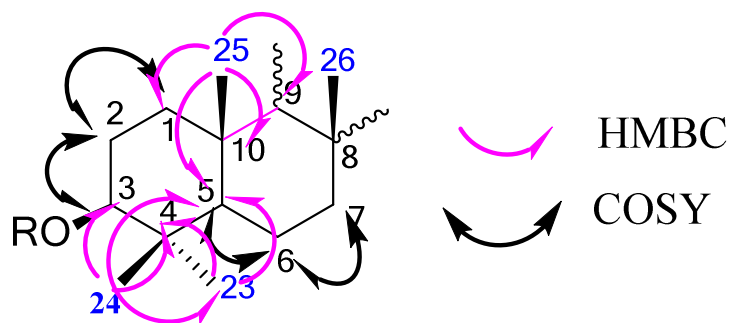


Figure III-10. Corrélations COSY et HMBC des noyaux A et B du composé **Cs1**.

- En partant du carbone C-9, le méthyle CH₃-26 est localisé à δ_H 0.81 ppm, au niveau duquel d'autres corrélations sont observées avec trois carbones dont un attribué au carbone CH₂-7 (δ_C 32.8) et deux quaternaires situés à δ_C 39.4 et 41.3 ppm attribués au C_q-8 et C_q-14, respectivement. Ces deux derniers corrélerent avec les protons du méthyle situé à δ_H 1.39 ppm attribuable au CH₃-27.
- Deux autres corrélations sont également observées à partir des protons du méthyle CH₃-27 avec le carbone quaternaire oléfinique C-13 (δ_C 143.2) et le carbone situé à δ_C 34.9 ppm attribuable au carbone C-15.
- Le carbone C-19 présente des corrélations avec les protons des deux derniers méthyles CH₃-29 et CH₃-30 situés à δ_C 31.9 et 23.6 ppm, respectivement. Ces derniers corrélerent entre eux en plus des corrélations avec un carbone quaternaire attribué au C-20 (δ_C 29.9) et le carbone situé à δ_C 35.0 ppm. Sur le spectre HSQC, ce derniers (δ_C 35.0) corréle avec deux protons géminés situés à δ_H 1.18 et 1.95 ppm attribuable au CH₂-21.

L'analyse du spectre COSY à partir des protons CH₂-21 permet de localiser les deux derniers protons géminés CH₂-22 à δ_H 1.79 et 1.95 ppm. De même, les corrélations observées entre les protons en position 15 à δ_H 1.40 (H-15_a) et 1.92 (H-15_b) et le signal de proton oxygéné à δ_H 4.56 (t, $J = 3,3$ Hz), attribué à H-16, permet de placer le groupement hydroxyle en position 16 de la génine.

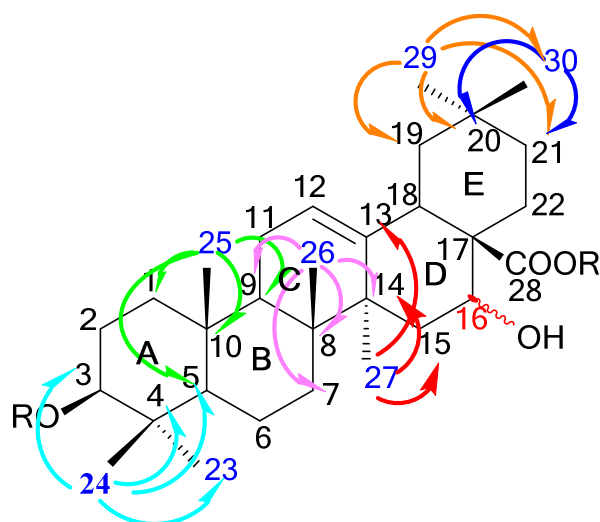


Figure III-11. Corrélations HMBC du composé Cs1.

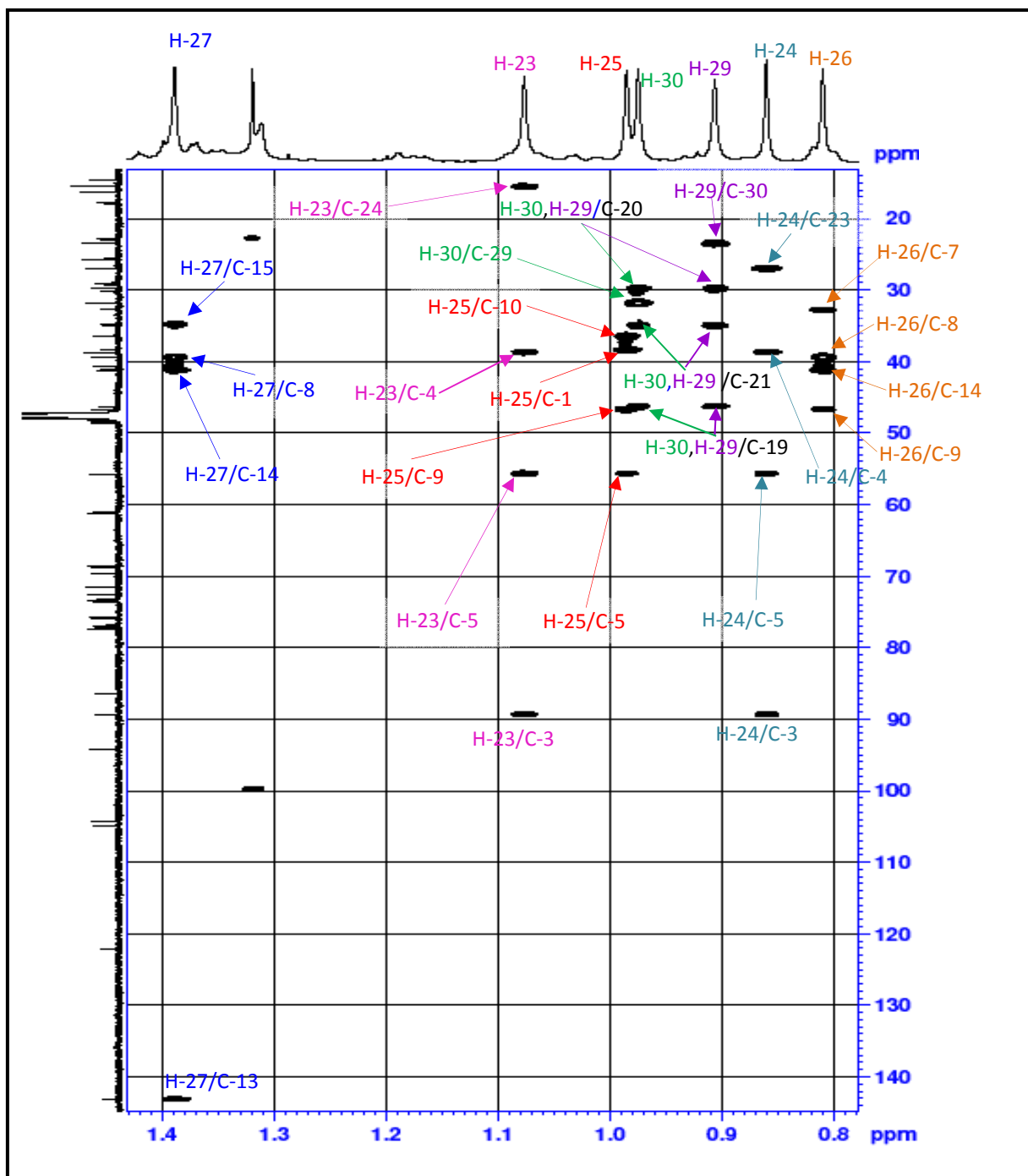


Figure III-12. Spectre HMBC du composé Cs1.

A ce stade, nous pouvons proposer l'acide échinocystique comme partie génine du composé Cs2. L'orientation α -axiale de OH-16 était justifiée par la valeur relativement faible de la constante de couplage vicinal de H-16_{eq} / H-15_{ax} et H-16_{eq} / H-15_{eq} ($J = 3.3$ Hz), comme dans l'acide échinocystique (Li et al., 2007). Alors que dans les triterpènes possédant une orientation β -équatoriale de OH-16 comme l'acide cochalique (acide 16 β -hydroxyoléanolique), le proton H-16 α -axiale résonne à δ_H 4.04 ppm en doublet de doublets

avec deux constantes de couplage vicinale différentes ($J_{16\alpha-15ax} = 11.6$ et $J_{16\alpha-15eq} = 4.3$ Hz) (Nielsen et al., 2010) ce qui n'est pas le cas dans **Cs1**.

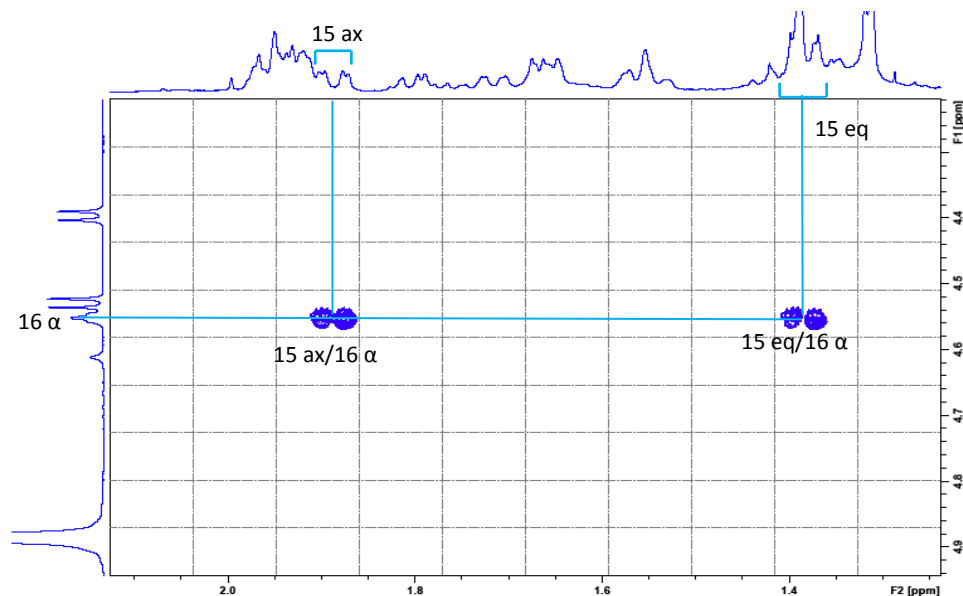


Figure III-13. Spectre COSY du composé **Cs1** au niveau de méthine oxygéné CHOH-16.

En comparaison avec celles rapportées dans la littérature, toutes ces données étaient caractéristiques pour l'acide 16α -hydroxyoléanique appelé également l'acide échinocystique, qui a été déjà isolé sous forme glycosylé (Li et al., 2007).

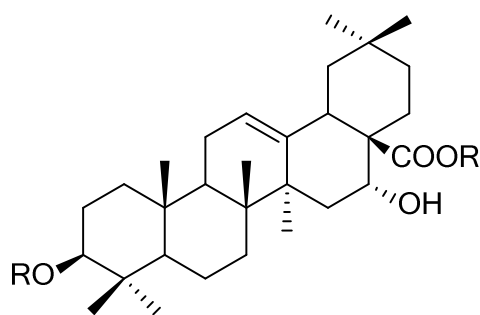


Figure III-14. Structure de la partie génine du composé **Cs1** (Acide échinocystique).

- **Identification de la partie osidique**

Le spectre de RMN ^1H montre les signaux de trois protons anomériques à δ_{H} 4.39 ppm (d, $J=7.5$ Hz), 4.53 ppm (d, $J=7.8$ Hz), 5.37 ppm (d, $J=8.1$ Hz), qui corrèlent sur le spectre

HSQC avec trois carbones à δ_C 104.9, 104.3 et 94.3 ppm, respectivement (Figure III-15). Après l'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC, les trois sucres ont été identifiés comme suit :

- Deux β -D-glucopyranosyles à partir des protons résonnant à δ_H 4.39 ppm (d, $J = 7.5$ Hz, **Glc I**) et δ_H 5.37 ppm (d, $J = 8.1$ Hz, **Glc II**).
- Un β -D-galactopyranosyle à partir du proton résonnant à δ_H 4.53 ppm (d, $J = 7.8$ Hz, **Gal**).

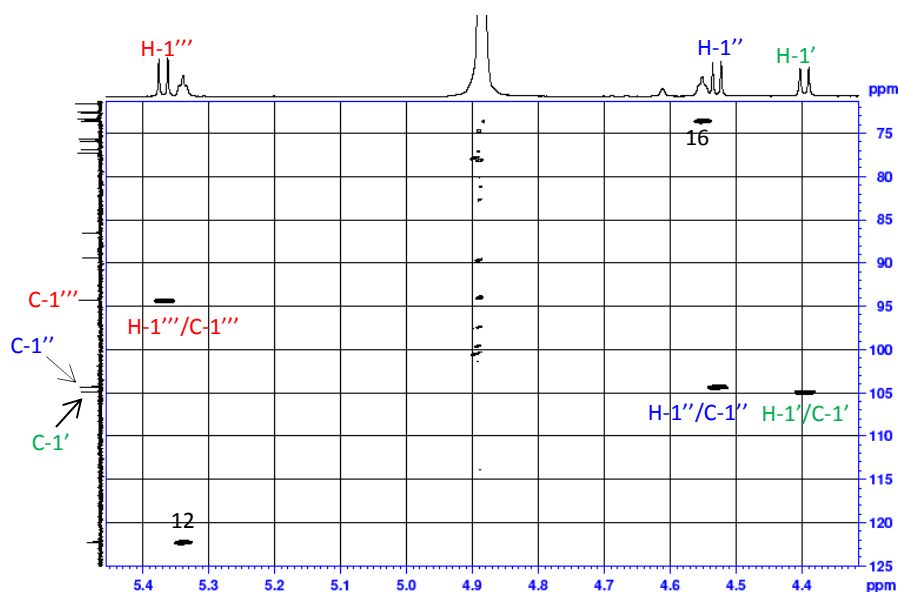


Figure III-15. Spectre HSQC dans la zone des anomères du composé **Cs1**.

– Analyse du spectre COSY de la partie osidique

L'analyse des corrélations observées sur le spectre COSY (Figure III-16) à partir du doublet anomérique H-1'' (δ_H 4.53, d, $J = 7.8$ Hz) nous indique la présence d'un hexose dont le proton H-2'' résonne sous forme d'un doublet de doublets à δ_H 3.62 ppm ($J=9.7, 7.8$ Hz) qui corrèle avec le proton H-3'' à δ_H 3.52 ppm sous forme d'un doublet de doublets ($J=9.8, 3.3$ Hz). Ce dernier présente une corrélation avec le proton H-4'' résonnant à δ_H 3.83 ppm sous forme d'un doublet ($J=3.3$ Hz). A l'aide du spectre HMBC, le proton H-5'' est localisé à δ_H 3.58 ppm depuis sa corrélation avec le carbone C-1''. Revenant au spectre COSY, le proton H-5'' couple avec les protons géminés H_a-6'' (δ_H 3.71) et H_b-6'' (δ_H 3.80). Les valeurs élevées des constantes de couplage entre H-1'', H-2'' et H-3'' indiquent que ces protons sont en position transdiaxiale, tandis que la faible valeur de la constante de couplage entre H-3'' et H-4'' ($^3J_{H3''-H4''}=3.3$ Hz) met en évidence une position équatoriale du proton H-4'' suggérant la présence d'un β -D-galactose. La comparaison des déplacements chimiques δ_C des carbones

correspondants à ces protons (à l'aide du spectre HSQC) avec ceux rapportés dans la littérature confirme la présence d'un β -D-galactopyranose terminal (Alabdul Magid., 2005).

En partant du proton anomérique H-1' à δ_H 4.39 ppm, les sept protons du second hexose sont attribués. Le proton H-2' résonne sous la forme d'un doublet de doublets à δ_H 3.41 ppm ($J=9.0,7.5$ Hz) et corrèle avec le proton H-3' situé à δ_H 3.55 (t, $J=9.0$ Hz). Le proton H-4' est localisé à δ_H 3.42 ppm (t, $J=9.0$ Hz) et le proton H-5' résonne à δ_H 3.30 ppm. Ce dernier corrèle avec les deux protons géminés H_a-6' (δ_H 3.70, dd, $J=11.5,4.3$ Hz) et H_b-6' (δ_H 3.87, dd, $J=11.5,2.0$ Hz). Les constantes de couplage entre tous les protons de cette unité osidique sont caractéristiques d'un β -D-glucopyranose. Les valeurs des déplacements chimiques de ses carbones, attribués après analyse du spectre HSQC montrent un déblindage de C-3' suggérant une substitution en position 3' de ce glucose.

Le doublet anomérique (H-1''') détecté à δ_H 5.37 ppm (d, $J=8.1$ Hz) est fortement déblindé et son carbone blindé situé à δ_C 94.3 ppm sont caractéristiques d'une unité osidique impliquée dans une liaison ester avec le carbonyle C-28 de la génine (Alabdul Magid., 2005). Le proton H-2''' est localisé à δ_H 3.31 ppm sous forme d'un triplet avec une constante de couplage $J=8.1$ Hz. Avec la même multiplicité et constante de couplage, les deux protons H-3''' et H-4''' résonnent à δ_H 3.41 et δ_H 3.36 ppm, respectivement. Le proton H-5''' est localisé à δ_H 3.36 ppm et les deux protons géminés H_a-6''' situé à δ_H 3.65 et H_b-6''' localisé à δ_H 3.83 ppm (dd, $J=11.4,3.7$ Hz). Les valeurs des constantes de couplage obtenues sur le spectre de RMN 1H indiquent une position transdiaxiale de tous les protons de cette unité osidique, suggérant la présence d'un second β -D-glucopyranose (Tableau III-02).

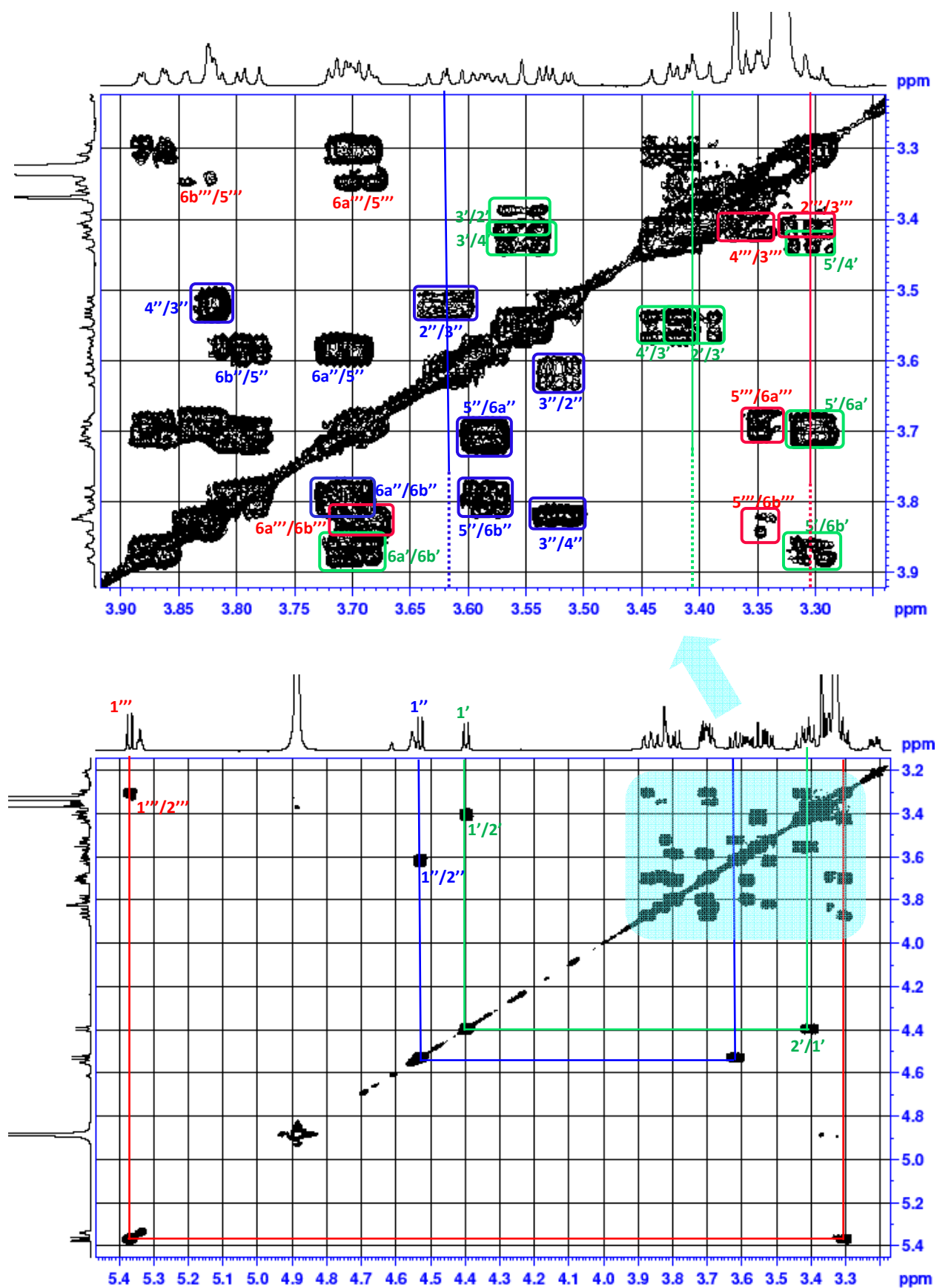


Figure III-16. Spectre COSY de la partie osidique du composé Cs1.

– Analyse du spectre HSQC de la partie osidique de Cs1

Après la localisation des protons de la partie osidique, l'analyse des corrélations hétéronucléaires $^1J_{H-C}$ observées sur le spectre HSQC permet l'identification et l'attribution des déplacements chimiques des carbones correspondants (Figures III-17).

Les valeurs des δ_C sont répertoriées dans le tableau III-02.

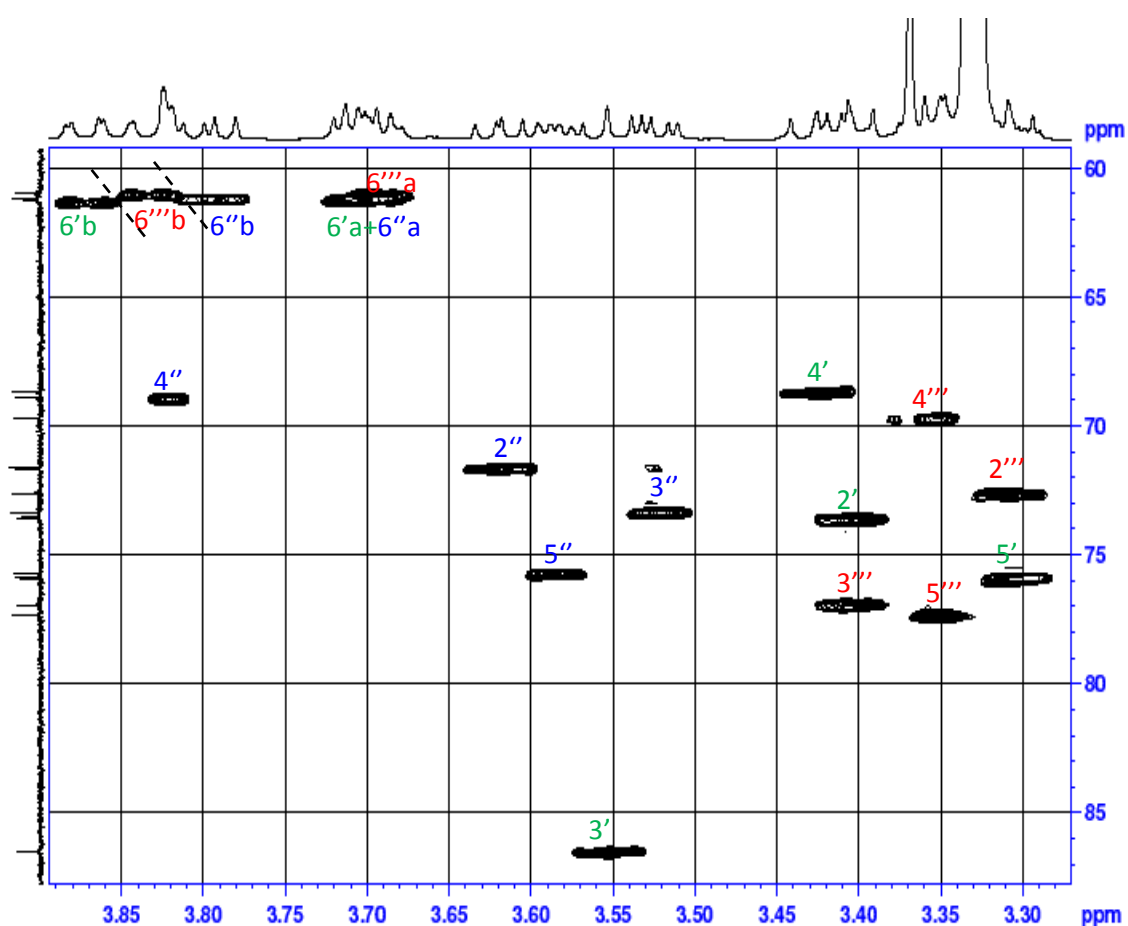


Figure III-17. Spectre HSQC de la partie osidique du composé Cs1.

– Analyse du spectre HMBC de la partie osidique de Cs1

Les corrélations $^3J_{H-C}$ observées sur le spectre HMBC à partir de chaque proton anomérique permet d'élucider l'enchaînement des unités osidiques ainsi que le point d'ancrage des sucres sur la génine (Figure III-18).

- La corrélation entre le proton H-1' du glucose (**Glc I**) et le carbone C-3 de l'acide échinocystique montre que ce sucre est attaché à l'hydroxyle en position 3 de la génine.
- Le proton H-1'' du galactose (**Gal**) corrèle avec le carbone C-3' du glucose (**Glc I**) lié à la génine.

• La corrélation observée entre le proton H-1''' et le carbonyle C-28 à δ_c 175.8 ppm confirme que le second glucose (**Glc II**) est impliquée dans une liaison ester avec le carbonyle C-28 de la génine.

L'ensemble de ces données permet de confirmer que la génine est substituée en position 3 par le disaccharide [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glc-] et en position 28 par un β -D-Glc.

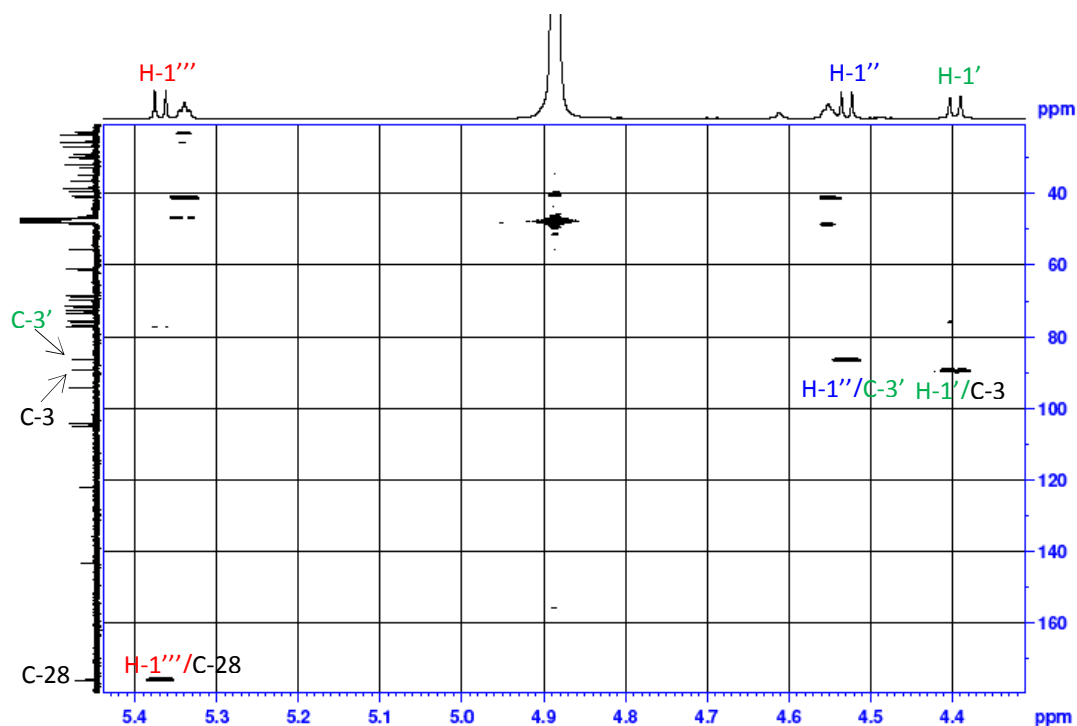


Figure III-18. Spectre HMBC de la partie osidique (protons anomériques) du composé **Cs1**.

La structure finale du composé **Cs1** est établie comme étant le 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-échinocystique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, un nouveau composé naturel nommé **calendustellatoside B**.

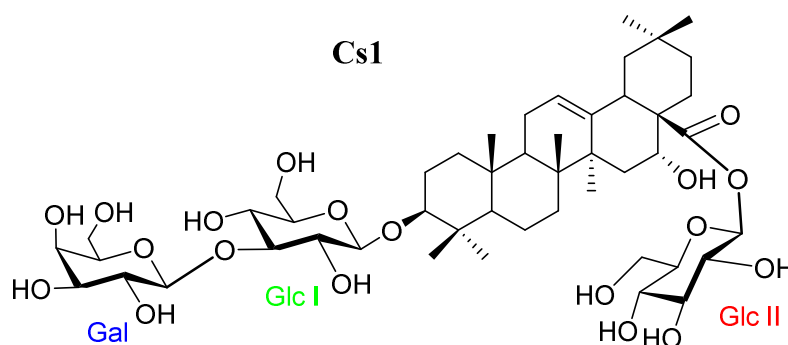


Tableau III-02. Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et ¹³C (150 MHz) du saponoside **Cs1** dans CD₃OD.

Cs1 (calendustellatoside B)			
δ_H m (J en Hz)	δ_C	δ_H m (J en Hz)	δ_C
Partie génine			
1 1.05 m	38.5	24 0.86 s	16.3
1.66m		25 0.99 s	14.7
2 1.72 m	25.6	26 0.81 s	16.5
1.95 m		27 1.39s	25.8
3 3.23 dd (11.0, 4.4)	89.4	28 -	175.8
4 -	38.8	29 0.91 s	31.9
5 0.81 m	55.8	30 0.98 s	23.6
6 1.42 m	17.9		
1.56 m			
7 1.36 m	32.8	Partie osidique	
1.54 m		Glc I: glc-at-C-3	
8 -	39.4	1' 4.39 d (7.5)	104.9
9 1.66 m	46.8	2' 3.41 dd (9.0, 7.5)	73.6
10 -	36.5	3' 3.55 t (9.0)	86.5
11 1.92 m	23.1	4' 3.42 t (9.0)	68.7
		5' 3.30 m	75.9
12 5.34 t (3.3)	122.3	6' 3.71 dd (11.5, 4.3)	61.3
13 -	143.2	3.87 dd (11.5, 2.0)	
14 -	41.3	Gal: gal→glc-C-3	
15 1.38 m	34.9	1'' 4.53 d (7.8)	104.3
1.89 m		2'' 3.62 dd (9.7, 7.8)	71.6
16 4.55 t (3.2)	73.5	3'' 3.52 dd (9.8, 3.3)	73.4
		4'' 3.83 d (3.3)	68.9
17 -	48.1	5'' 3.35 m	75.2
18 3.02 dd (13.8, 3.9)	40.7	6'' 3.69 dd (11.9, 4.3)	61.0
19 1.08 m	46.4	3.83 dd (11.5, 4.5)	
2.31 t (13.5)		Glc II: glc→C-28	
20 -	29.9	1''' 5.37 d (8.1)	94.3
21 1.18 m	35.0	2''' 3.31 t (8.1)	72.6
1.95 m		3''' 3.41 t (8.1)	76.9
22 1.79 m	30.3	4''' 3.36 t (8.1)	69.7
1.95 m		5''' 3.59 m	77.3
23 1.08 s	27.1	6''' 3.71 m	61.3
		3.80 dd (11.4, 3.7)	

III.1.1.2. Elucidation structurale du composé Cs2

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS mode positif (Figure III-19), montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 965.5093 $[M+Na]^+$, correspondant à la formule brute $C_{48}H_{79}O_{18}Na$. ce qui indique une perte d'un groupement hydroxyle, en comparaison avec celle du composé Cs1.

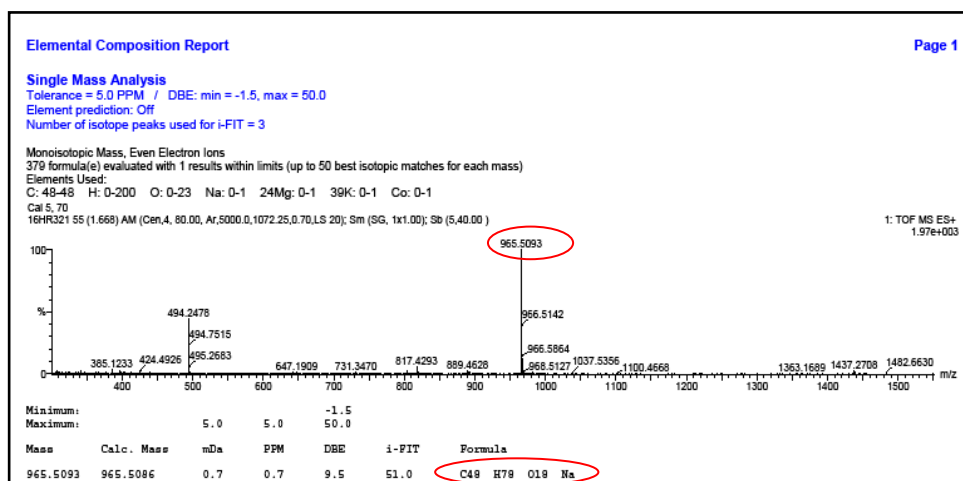


Figure III-19. Spectre de masse du composé Cs2.

- **Identification de la partie aglycone (génine I)**
 - Analyse des spectres de RMN 1H et ^{13}C du composé Cs2

L'analyse du spectre de RMN 1H de Cs2 (Figure III-20), nous suggère la présence d'un squelette triterpénique avec les mêmes unités osidiques que ceux de Cs1, cela est confirmé par la présence des mêmes signaux, excepté certains relatifs à la partie génine ou on note la disparition du signal du groupement OH en position 16 de l'acide échinocystique nous suggérant l'acide oléanolique comme étant la partie aglycone de ce composé.

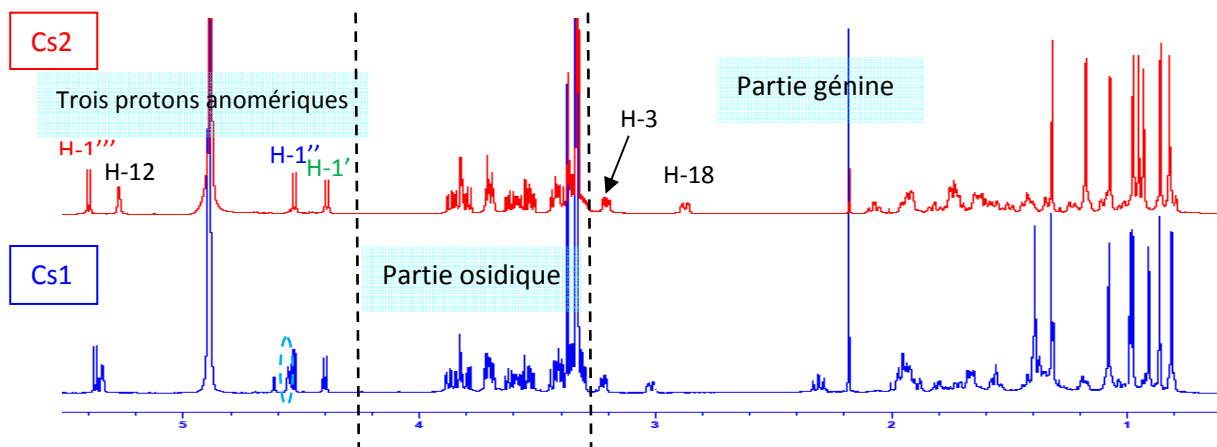


Figure III-20. Spectre de RMN 1H du composé Cs2 en comparaison avec Cs1.

Le spectre de RMN ^{13}C de **Cs2** présente des carbones avec des déplacements chimiques proches de ceux identifiés sur celui du **Cs1**. Cependant quelques différences ont été constatées dans la zone entre 22 et 42 ppm dues à la perte du groupement hydroxyle (Tableau III-03) par la disparition du signal attribué au C-16 de **Cs1** (Figure III-21).

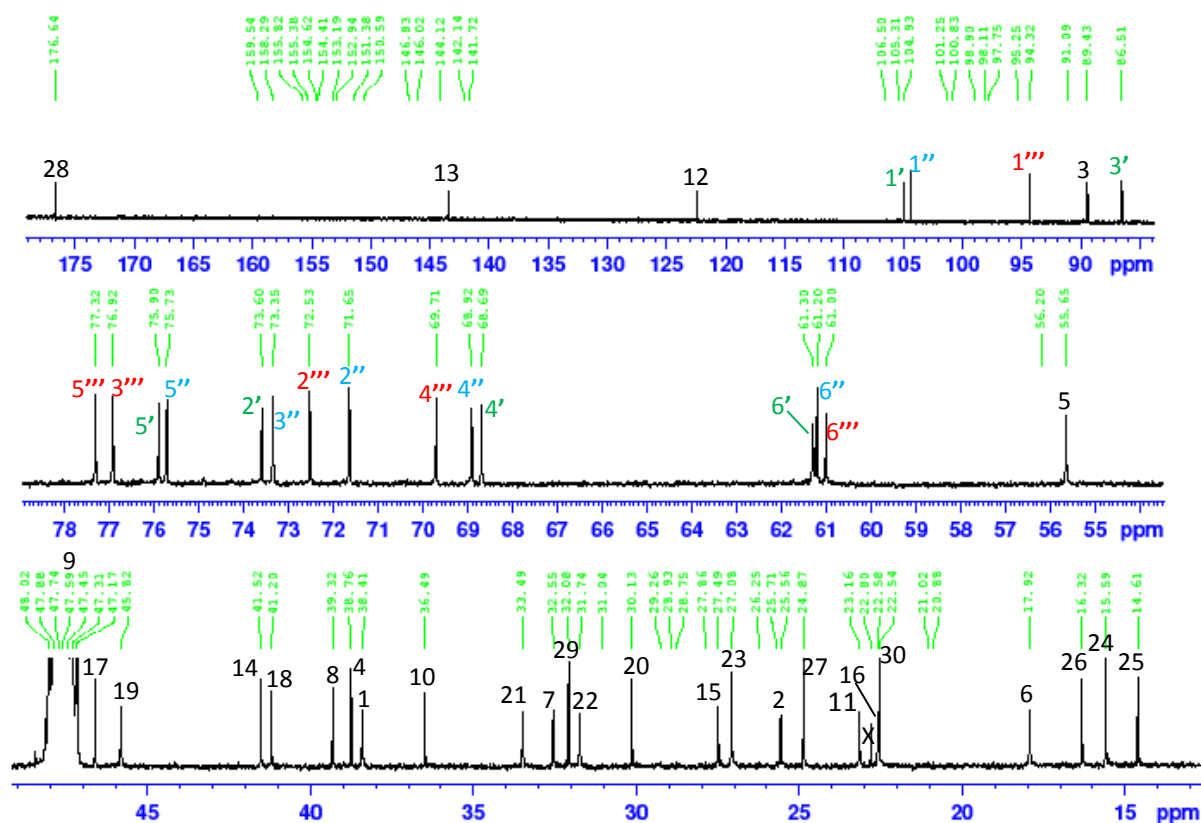


Figure III-21. Spectre de RMN ^{13}C du composé **Cs2**.

– Analyse des spectres COSY et HSQC du composé **Cs2**

L'analyse combinée des spectres COSY (Figure III-23) et HSQC (Figure III-24) de cette molécule, nous a conduit à un noyau oléanane caractérisé par les éléments suivants (Figure III-22) :

- Le proton éthylénique H-12 (δ_{H} 5.15, t, $J=3.5\text{Hz}$) dont le carbone est à δ_{C} 122.4 ppm, corrèle avec les deux protons H-11 (δ_{H} 1.91, m, δ_{C} 23.2) en COSY, eux-mêmes sont corrélés avec le proton H-9 (δ_{H} 1.61, m, δ_{C} 47.7).
- Le carbone C-3 (δ_{C} 89.5) voit son proton H-3 (δ_{H} 3.07, dd, $J=12.1-4.1\text{Hz}$) corrèle en COSY avec les deux protons géminés H-2_b (δ_{H} 1.93, m) et H-2_a (δ_{H} 1.10, td, $J=13.5-3.5\text{ Hz}$) dont le carbone est localisé à δ_{C} 25.6 ppm. Les protons H-2 corrèlent avec les protons H-1_b

(δ_H 1.63, m) et H-1_a (δ_H 1.01, m), qui donnent sur le spectre HSQC une corrélation avec le carbone C-1 à δ_C 38.5 ppm.

- Les deux protons géminés H-19 [H-19_b (δ_H 1.73, dd, $J=13.0, 3.4$) et H-19_a (δ_H 1.18, m)] sont localisés grâce aux corrélations observées sur le spectre COSY avec le proton H-18 (δ_H 2.75, dd, $J=13.0, 3.4$ Hz). Sur le spectre HSQC les carbones C-18 et C-19 sont localisés à δ_C 41.2 et 45.8 ppm, respectivement.

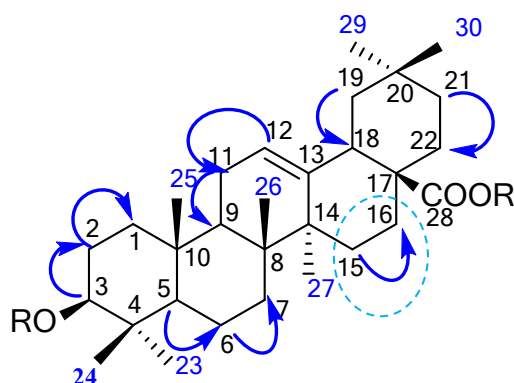


Figure III-22. Corrélations COSY de la génine (acide oléanolique) du composé Cs2.

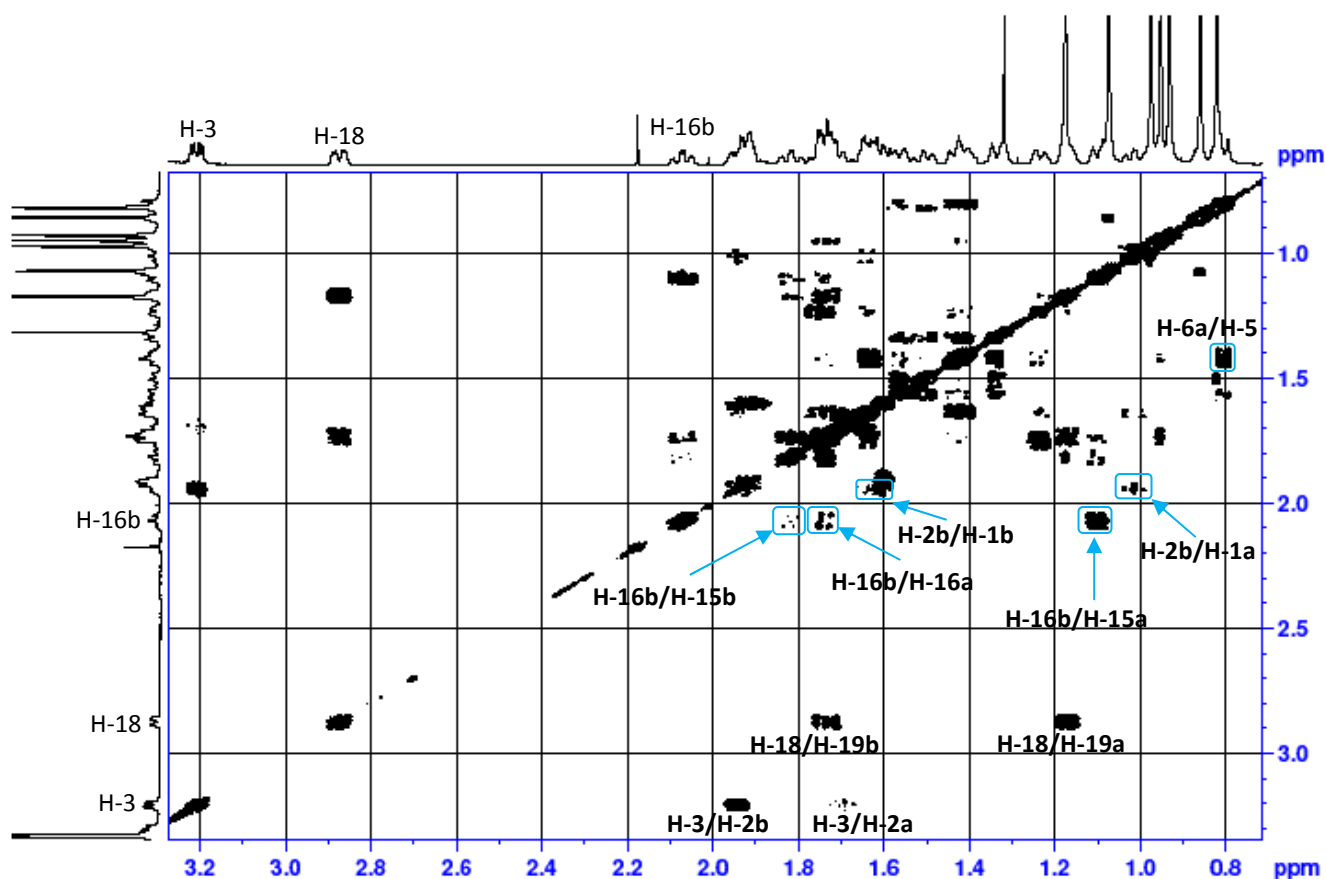


Figure III-23. Spectre COSY du composé Cs2.

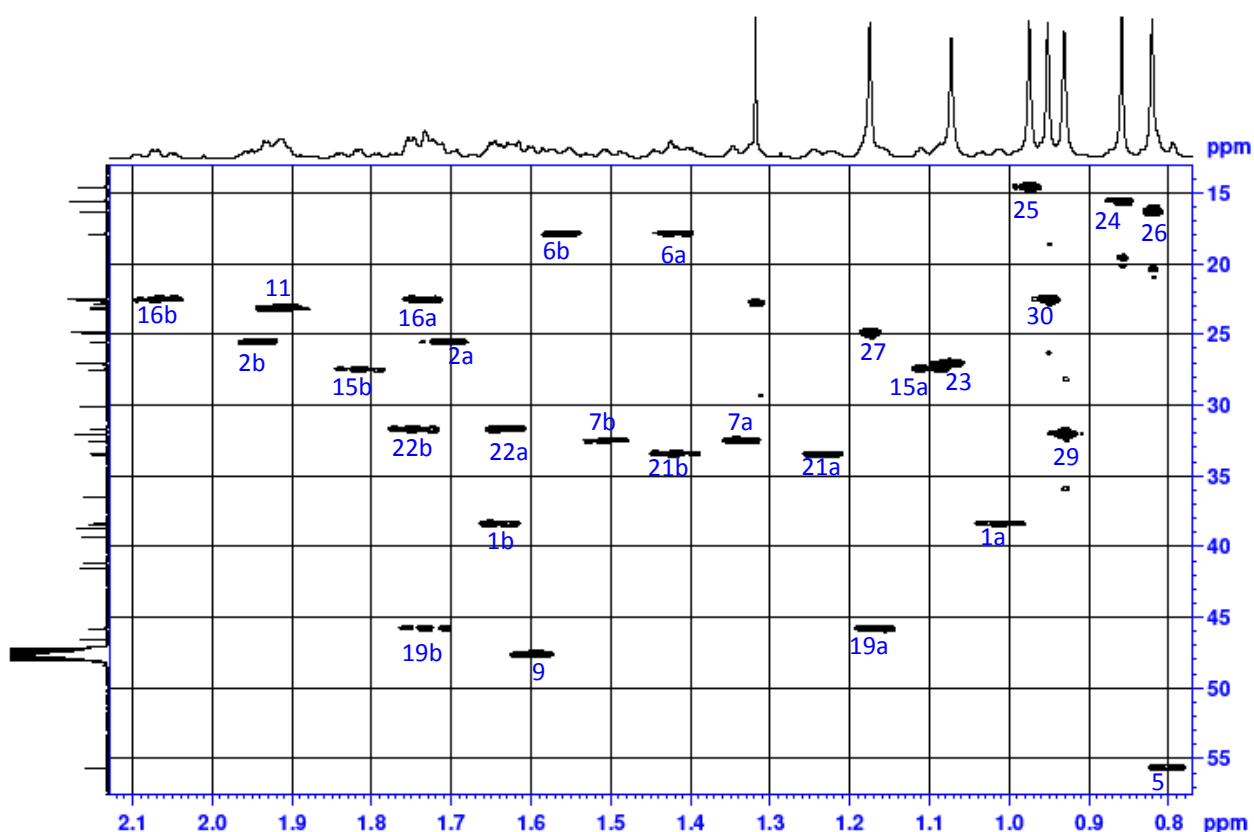


Figure III-24. Spectre HSQC du composé **Cs2**.

– Analyse du spectre HMBC du composé Cs2

Parmi les corrélations observées sur le spectre HMBC de ce **Cs2** (Figure III-25), nous allons évoquer les plus importantes afin d'attribuer le reste des protons et carbones de la génine :

- Le carbone C-3 corrèle avec les protons des méthyles (CH₃-23, δ_H 1.08) et (CH₃-24, (δ_H 0.86) qui donnent des corrélations avec C-4 (δ_C 38.8) et C-5 (δ_C 55.7), en plus de leurs corrélations mutuelles.

- A l'aide du spectre HSQC, le proton H-5 est localisé à δ_H 0.80 ppm qui corrèle sur le spectre COSY avec les deux protons géminés H-6_a (δ_H 1.43, td, $J=13.3,3.6$ Hz) et H-6_b (δ_H 1.57, m). Ces derniers corrèlent avec les deux protons H-7_b (δ_H 1.50, dd, $J=12.5,3.5$ Hz) et H-7_a (δ_H 1.33, m). Permettant de localiser les carbones C-6 (δ_C 18.0) et C-7 (δ_C 32.6) sur le spectre HSQC (Voir figure III-24).

- Le carbone C-5 corrèle avec un méthyle à δ_H 0.98, attribué au CH₃-25 (δ_C 14.7). Les protons CH₃-25 correspondant corrèlent avec les carbones C-1 et C-9 et avec un carbone quaternaire à δ_C 17.5 ppm attribuable au carbone C-10. Le carbone C-9 permet de détecter le méthyle CH₃-26 dont les protons sont localisés à δ_H 0.82 ppm (δ_C 16.3) qui corrèlent avec les carbones C-7, C-8 et C-14. Les deux carbones C-8 et C-14 corrèlent avec les protons d'un

second méthyle CH₃-27 à δ_H 1.18 ppm (δ_C 24.9) et ces derniers corrént avec le carbone éthylénique quaternaire C-13 et le carbone C-15 (δ_C 27.5).

– A partir du carbone C-15 les deux protons H-15_a (δ_H 1.10, m) et H-15_b (δ_H 1.82, td, $J=14.1,3.9$ Hz) sont localisés sur le spectre HSQC. Ces derniers nous ont permis d'attribuer les protons H-16_a (δ_H 1.73, m) et H-16_b (δ_H 2.07, td, $J=13.6,3.9$ Hz) à l'aide du spectre COSY, dont le carbone correspondant résonne à δ_C 22.6 ppm (C-16). Cela confirme la disparition du groupement OH en position 16 de la génine.

• Le carbone C-19 présente des corrélations avec les protons des deux méthyles CH₃-29 (δ_H 0.93, δ_C 32.1) et CH₃-30 (δ_H 0.96, δ_C 22.6). Ces derniers présentent des corrélations avec le carbone quaternaire C-20 (δ_C 30.1) et le carbone situé à δ_C 33.5 ppm. qui corréle sur le spectre HSQC avec deux protons géminés situé à δ_H 1.23 et 1.42 ppm attribuables au CH₂-21 ceux-ci montrent sur le spectre COSY avec les deux protons géminés CH₂-22 à δ_H 1.63 et 1.75 ppm (δ_C 31.8). Le carbone C-17 est localisé à δ_C 46.6 depuis sa corrélation avec les deux protons CH₂-22 et H-18 sur le spectre HMBC (Figure III-25).

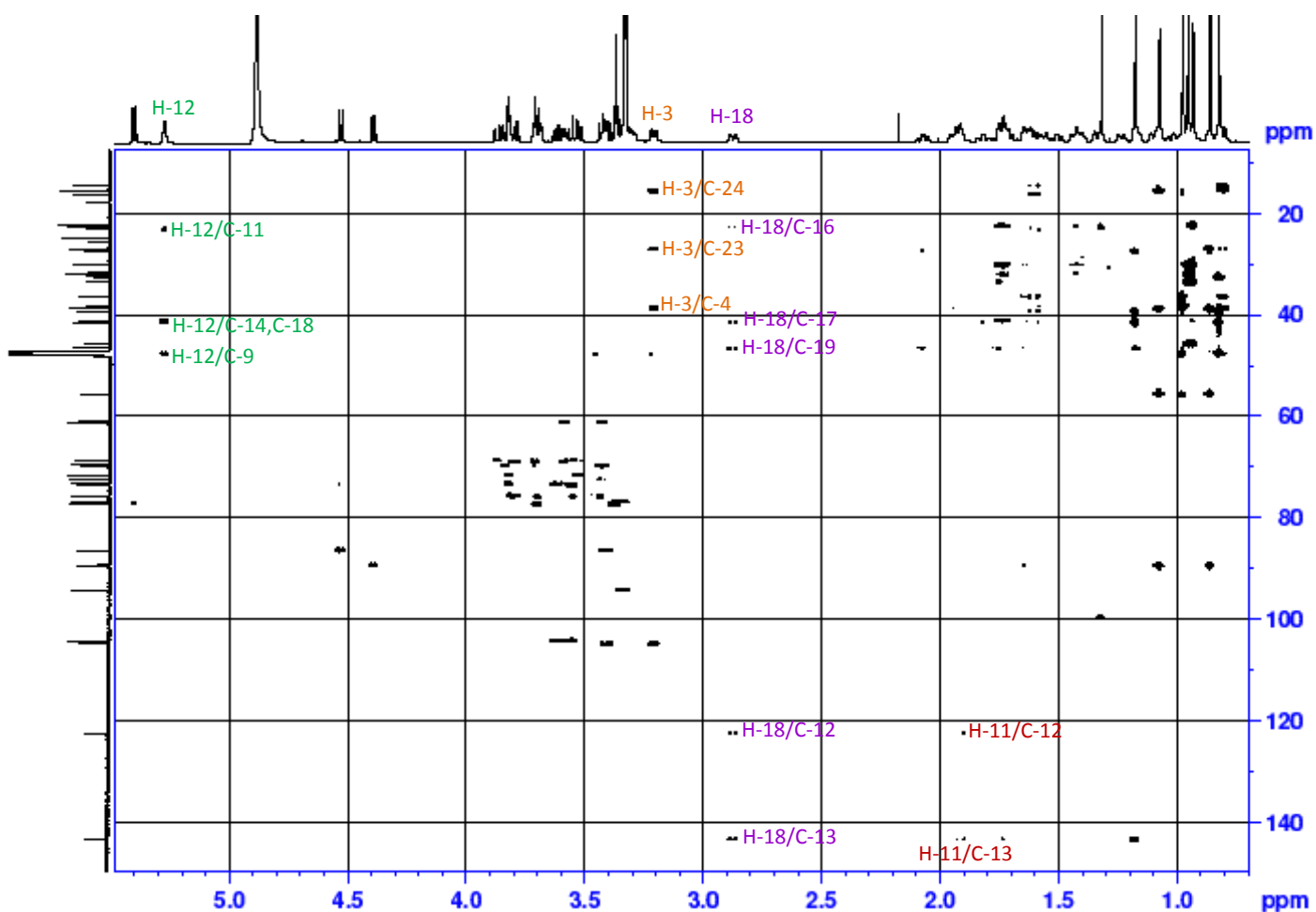


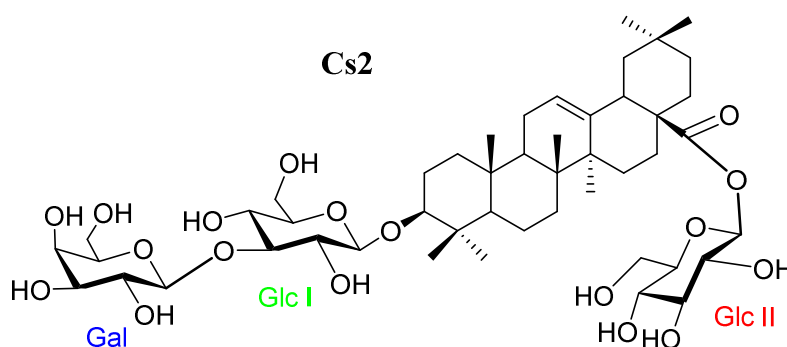
Figure III-25. Spectre HMBC du composé Cs2.

L'ensemble de toutes ces données (Tableau III-03) nous a conduit à élucider la structure de la génine du composé **Cs2** comme étant l'acide oléanolique, ceci a été confirmé par comparaison aux données bibliographiques (Mahato et al., 1994).

La partie osidique de ce composé s'avère identique à celle de **Cs1** comme l'indique les valeurs des déplacements chimiques δ_H et δ_C (Tableau III-03). Ainsi, la génine est substituée en position 3 par la chaîne disaccharide [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3) - β -D-Glc-] et en position 28 par un β -D-Glc, ceci est confirmé par l'analyse du spectre HMBC sur lequel les corrélations suivantes sont observées :

- H-1' (**Glc I**) /C-3 de la génine et H-1'' (**Gal**)/C-3' (**Glc I**).
- H-1''' (**Glc II**) /C-28 de la génine.

L'ensemble des données spectroscopiques nous ont conduit à proposer pour ce composé la structure suivante : 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-oléanolique-28-O- β -D-glucopyranosyl ester. Cette molécule est également identifiée sous le nom de arvensoside A isolée de *Calendula arvensis* L. (Pizza et al., 1987).



III.1.1.3. Elucidation structurale des composé **Cs3** et **Cs4**

Les spectres de masse HR-ESI-MS en mode positif de **Cs3** et **Cs4** montrent les ions pseudo-moléculaires $[M+Na]^+$ à m/z 1143.5554 et 1127.5608, correspondant aux formules respectives $C_{54}H_{88}O_{24}Na$ et $C_{54}H_{88}O_{23}Na$. En comparaison avec les saponosides précédents (**Cs1** et **Cs2**), ces masses indiquent la présence d'un hexose supplémentaire dans **Cs3** et **Cs4**. Ainsi, La partie osidique de ces composés est constituée de quatre hexoses.

L'analyse des spectres RMN 1D (1H et ^{13}C) de **Cs3** et **Cs4** comparativement à ceux de **Cs1** et **Cs2**, nous révèle la présence presque des mêmes signaux, auxquels s'ajoutent dans la

zone des sucres un quatrième proton anomérique H-1'''' à δ_H 5.00 ppm et d'autres signaux appartenant à l'hexose supplémentaire. Le carbone C-1'''' correspondant résonne à δ_C 101.8 ppm.

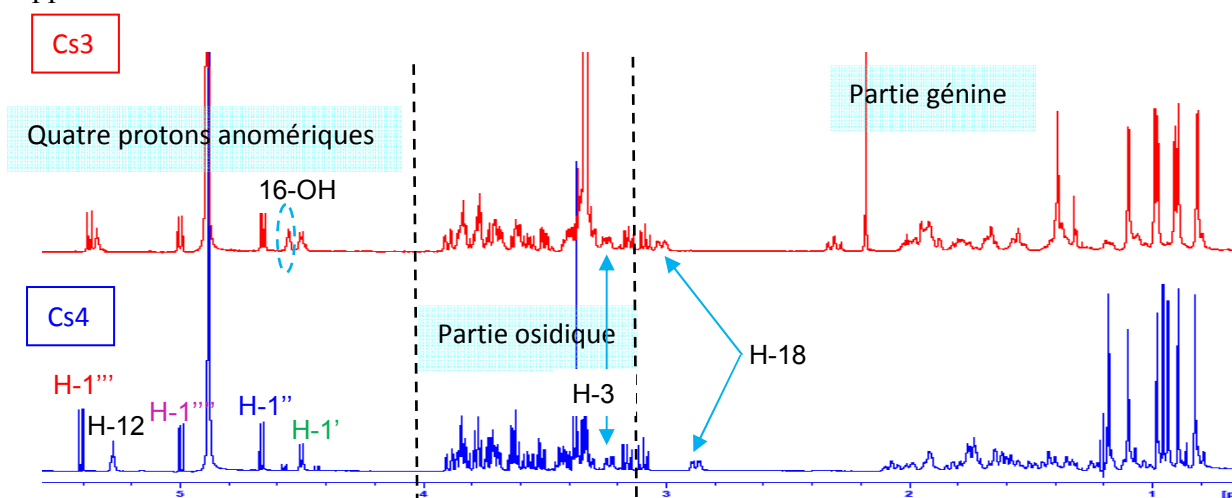


Figure III-26. Spectres de RMN 1H des composés **Cs3** et **Cs4**.

Sur le spectre de RMN ^{13}C de **Cs3** (Figure III-28), les déplacements chimiques de la partie génine sont identiques de ceux du composé **Cs1** (car c'est la même génine). De même, le composé **Cs4** montre les mêmes signaux de la partie génine que ceux de **Cs2** (Figure III-27). Cette première constatation nous suggère l'acide échinocystique et oléanolique comme étant la partie génine des composés **Cs3** et **Cs4**, respectivement. Ceci est confirmé par l'analyse approfondie des spectres de RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC et ROESY).

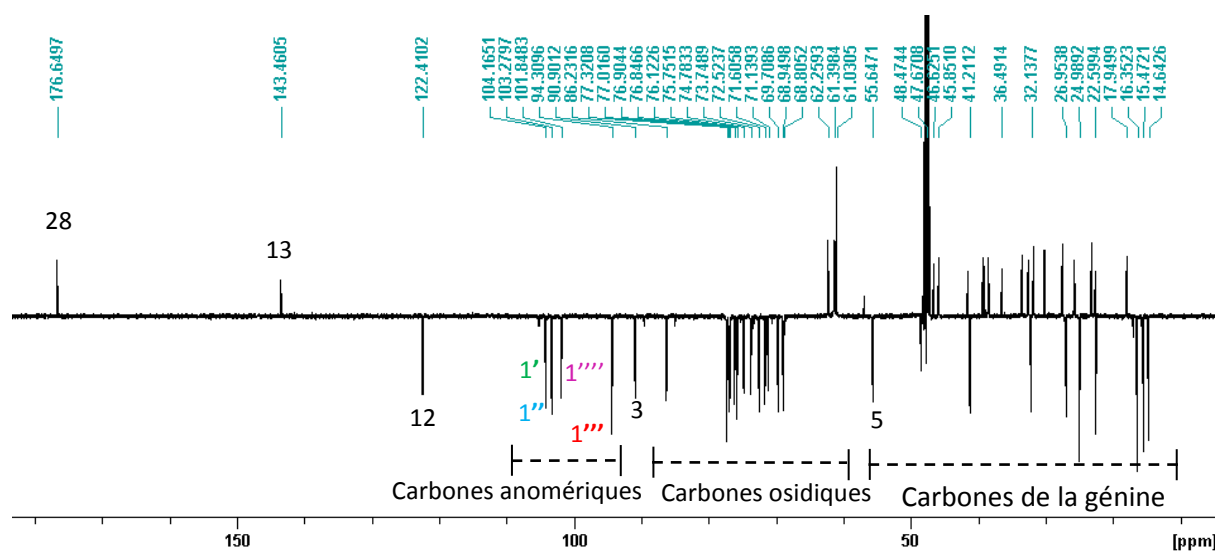


Figure III-27. Spectre de RMN ^{13}C J -modulé du composé **Cs4**.

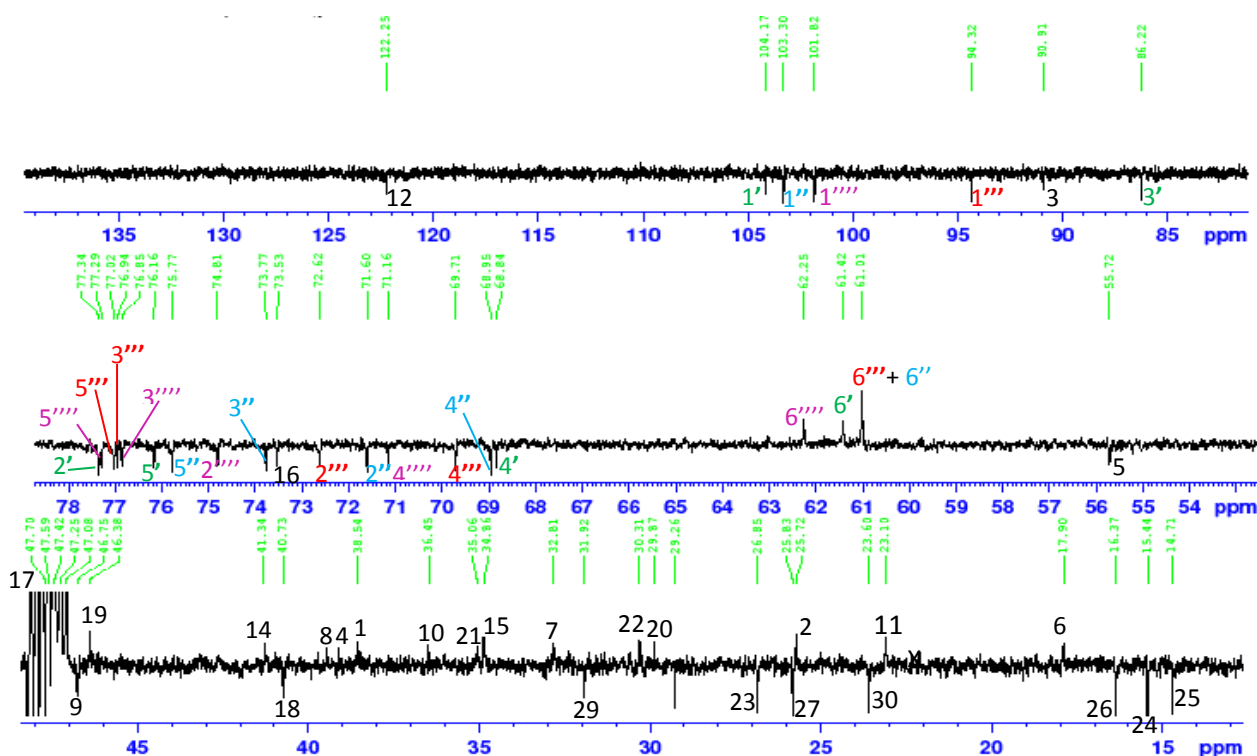


Figure III-28. Etallement du spectre de RMN ^{13}C J -modulé du composé **Cs3**.

L'analyse des spectres COSY et TOCSY permet d'attribuer les sept protons de l'hexose supplémentaire et de l'identifier à un β -D-glucopyranose (**Glc III**).

En partant du proton anomérique H-1^{''''} à δ_{H} 5.00 ppm sur le spectre TOCSY de **Cs4** (Figure III-29), les sept protons de l'hexose sont localisés. L'attribution de ces derniers est réalisée à l'aide du spectre COSY. En effet, le proton H-2^{''''} résonne à δ_{H} 3.16 ppm qui corrèle avec le proton H-3^{''''} situé à δ_{H} 3.37 ppm. Le proton H-4^{''''} est localisé à δ_{H} 3.10 ppm et le proton H-5^{''''} résonne à δ_{H} 3.32 ppm. Ce dernier corrèle avec les deux protons géminés H_a-6^{''''} (δ_{H} 3.57) et H_b-6^{''''} (δ_{H} 3.85). Les valeurs des constantes de couplage calculées sur le spectre de RMN ^1H ($J > 8$ Hz) entre tous les protons H-1^{''''}, H-2^{''''}, H-3^{''''}, H-4^{''''} et H-5^{''''} (Tableau III-04) de cette unité osidique sont supérieures à 8 Hz indiquant un β -D-glucopyranose. Ceci est confirmé par l'effet rOe observé sur le spectre ROESY entre les protons H-1^{''''}/ H-3^{''''} et H-1^{''''}/ H-5^{''''} de ce glucose.

Les trois autres unités osidiques sont identifiées grâce à l'analyse complète de RMN 2D. Et elles sont identiques à celles des composés **Cs1** et **Cs2**. Les carbones de ces sucres sont attribués au moyen du spectre HSQC J -modulé (Figures III-30 et III-32) (Tableau III-04).

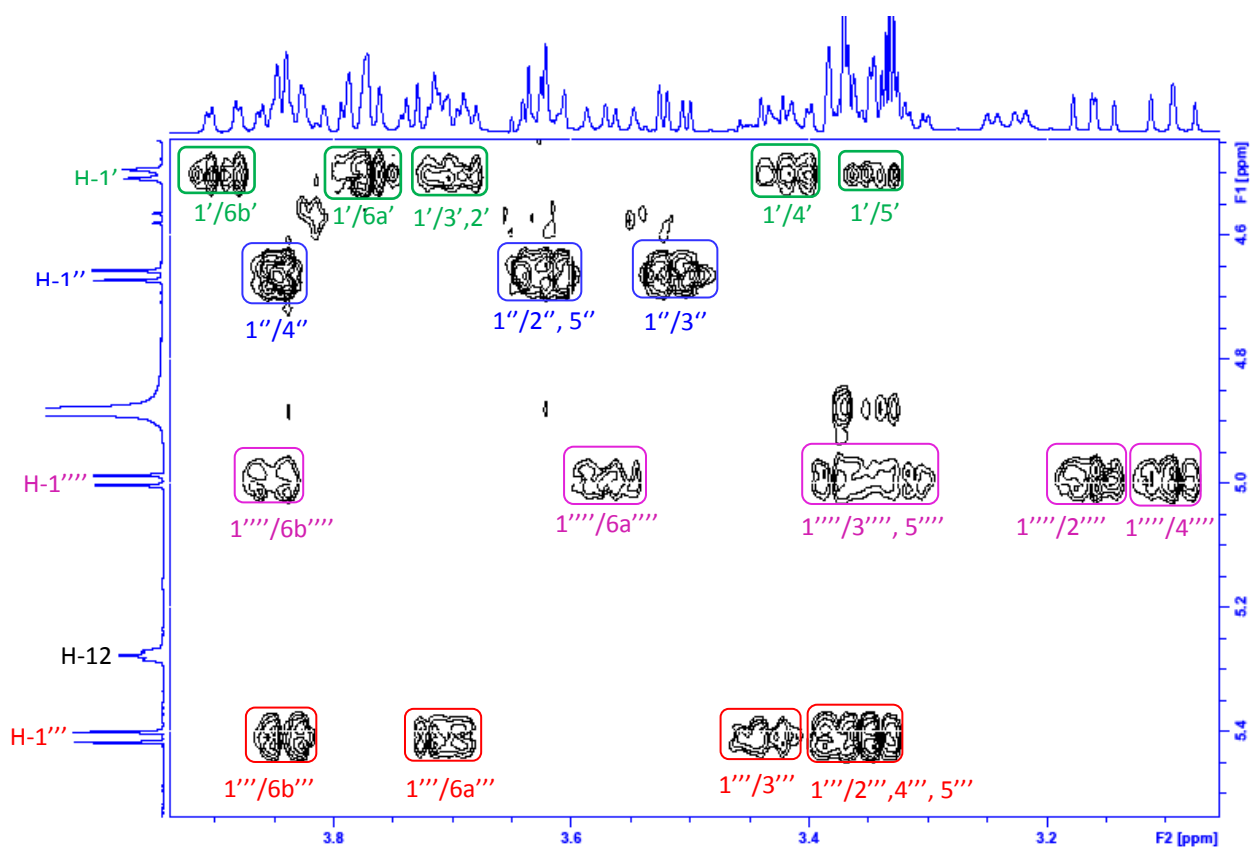


Figure III-29. Spectre TOCSY dans la zone des sucres du composé Cs4.

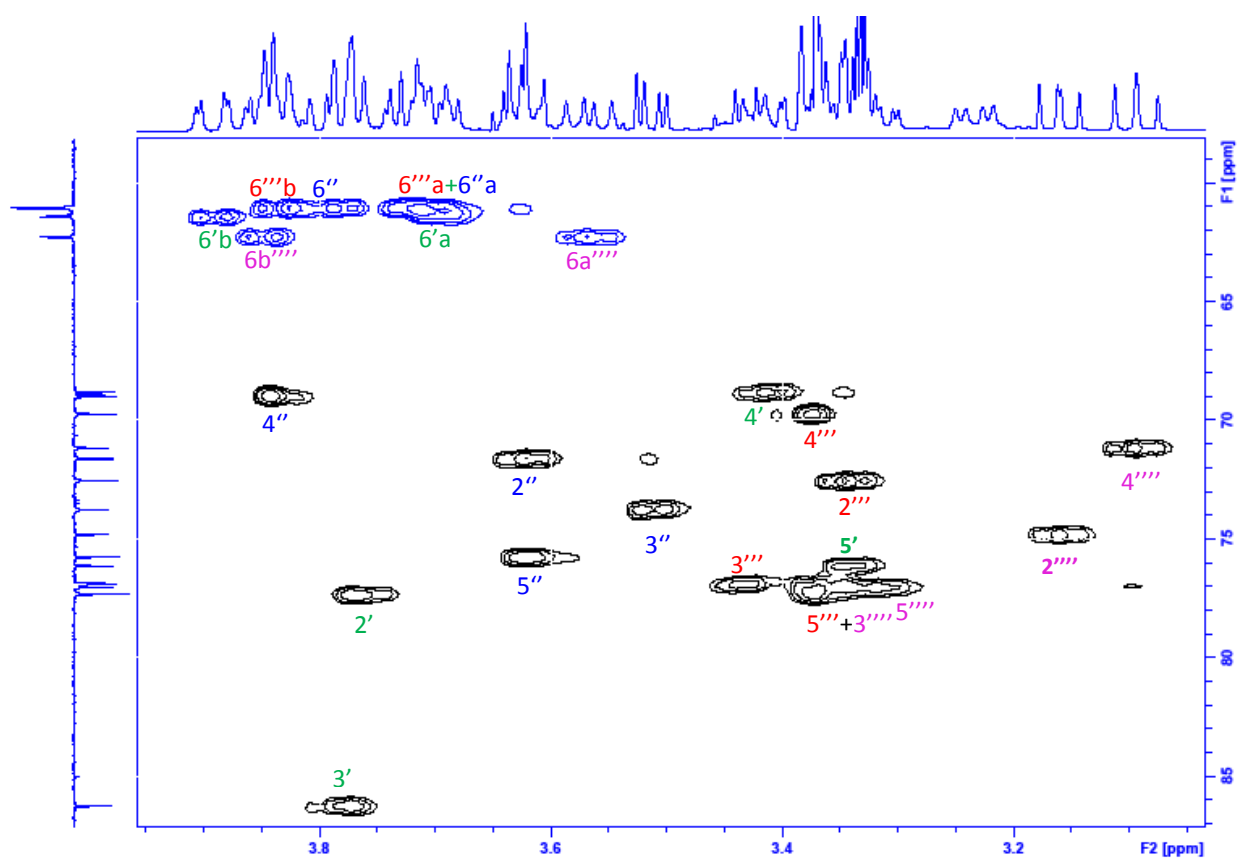


Figure III-30. Spectre HSQC *J*-modulé dans la zone des sucres du composé Cs4.

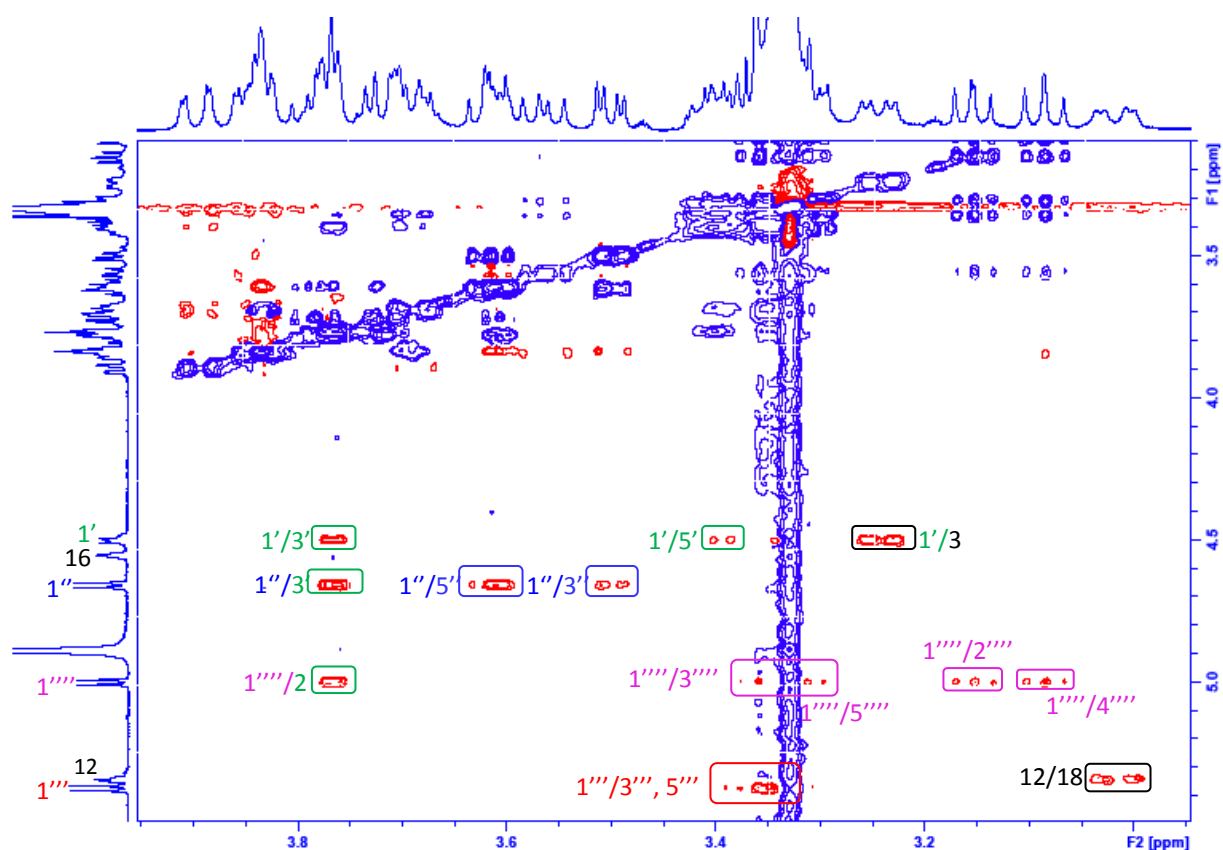


Figure III-31. Spectre ROESY dans la zone des sucres du composé Cs3.

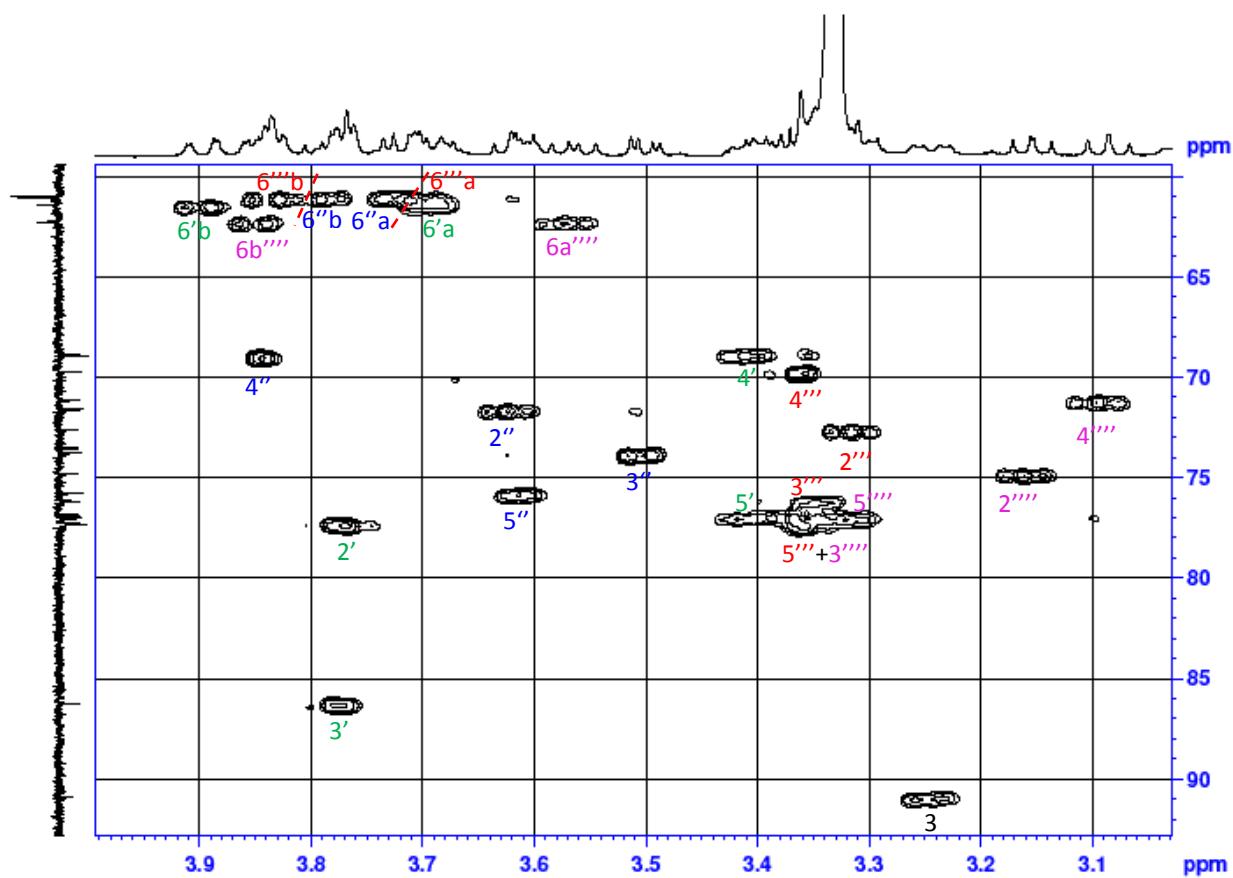


Figure III-32. Spectre HSQC J -modulé dans la zone des sucres du composé Cs3.

Le déblindage du carbone C-2' (δ_C 77.3) dans **Cs3** et **Cs4** comparativement à ceux de **Cs1** et **Cs2** (δ_C 73.6) permet de suggérer que le glucose supplémentaire (**Glc III**) est attaché au glucose (**Glc I**) en C-2'. Les séquençages de ces deux bisdesmosides sont confirmés par l'analyse des spectres HMBC sur lesquels les corrélations suivantes sont observées :

- H-1'''' (**Glc III**) / C-2'(**Glc I**) et H-1'' (**Gal**) / C-3'(**Glc I**) ;
- H-1' (**Glc I**) / C-3 de la génine ;
- H-1''' (**Glc II**) / C-28 de la génine.

A ce stade de notre étude structurale, l'ensemble des données précédentes indiquent que la structure de ces saponosides est identifiée comme étant pour :

- Le saponoside **Cs3**, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-] échinocystique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.
- Le saponoside **Cs4**, 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-] oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Le saponoside **Cs3** (nommé **calendustellatoside A**) est isolé pour la première fois dans le règne végétal, tandis que le **Cs4** est connu par calenduloside D qui est déjà isolé de l'espèce *C. officinalis* (Vidal et al., 1989).

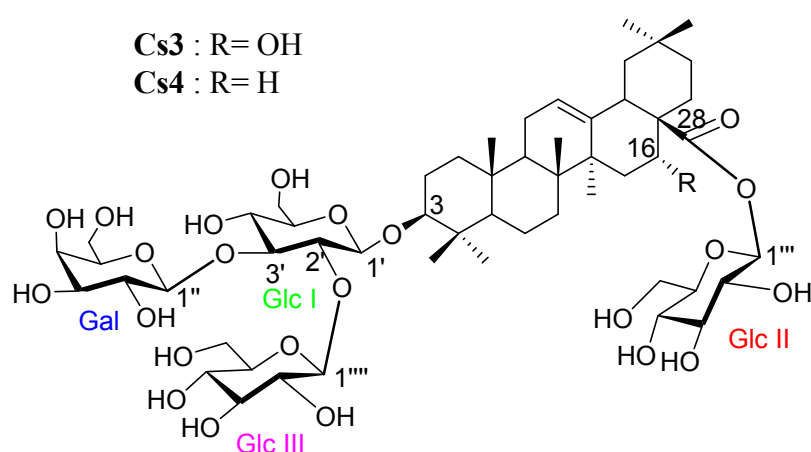


Tableau III-03. Déplacements chimiques de la partie génine des composés **Cs3-Cs4** en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) et **Cs2** (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz) dans CD_3OD .

	Cs2		Cs3 (calendustellatoside A)		Cs4	
	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}
1	0.01 m 1.63 m	38.5	1.06 m 1.68 m	38.5	1.03 m 1.65 m	38.5
2	1.10 td (13.5,3.5) 1.93 m	25.6	1.76 m 2.01m	25.7	1.74 m 1.98	25.7
3	3.07 dd (12.1,4.1)	89.5	3.24 dd (11.7, 4.3)	90.9	3.24 dd (13.2,3.5)	90.9
4	-	38.8	-	39.1	-	38.9
5	0.80 m	55.7	0.81 m	55.7	0.80 dm (11.8)	55.7
6	1.43 td (13.3,3.6) 1.57 m	18.0	1.41 m 1.56 brd (11.8)	17.9	1.57 m 1.66 m	18.0
7	1.33 m 1.50 dd (12.5,3.5)	32.6	1.37 m 1.53 brt (11.8)	30.3	1.34 dt (12.0,2.2) 1.51 td (12.0,4.1)	32.6
8	-	39.3	-	41.3	-	39.3
9	1.60 m	47.7	1.66 m	46.8	1.59 m	47.5
10	-	36.5	-	36.5	-	36.7
11	1.91 m	23.2	1.93 m	23.1	1.92 m	23.2
12	5.15 t (3.5)	122.4	5.34 t (3.4)	122.3	5.28 t (3.6)	122.4
13	-	143.5	-	143.2	-	144.3
14	-	41.5	-	39.5	-	41.4
15	1.10 m 1.02 td (14.2,3.8)	27.5	1.40 m 1.92 m	34.9	1.10 m 1.82 td (13.5,3.8)	27.5
16	1.73 m 2.07 td (13.1,3.5)	22.6	4.56 t (3.3)	73.5	1.73 m 2.07 td (13.5,4.1)	22.6
17	-	46.6	-	46.7	-	46.6
18	2.75 dd (13.0,3.4)	41.2	3.02 dd (13.5, 4.3)	40.7	2.88 dd (13.4,3.9)	41.2
19	1.18 m 1.73 dd (13.0,3.4)	45.8	1.08 m 2.31 t (13.5)	46.4	1.18 m 1.73 t (13.5)	45.9
20	-	30.1	-	29.9	-	30.2
21	1.23 m 1.42 m	33.5	1.18 dd (14.3, 5.1) 1.96 m	35.1	1.24m 1.42 m	33.5
22	1.63 m 1.75 m	31.8	1.81 m 1.96 m	32.8	1.63 dm (15.5) 1.75 m	31.8
23	1.08 s	27.1	1.09 s	26.9	1.10 s	27.0
24	0.86 s	15.7	0.89 s	15.4	0.89 s	15.5
25	0.98 s	14.7	0.98 s	14.7	0.98 s	14.6
26	0.82 s	16.3	0.81 s	16.4	0.82 s	16.3
27	1.18 s	24.9	1.38 s	25.8	1.18 s	25.0
28	-	176.7	-	175.7	-	176.7
29	0.93 s	32.1	0.90 s	31.9	0.93 s	32.1
30	0.95 s	22.6	0.97 s	23.6	0.96 s	22.6

Tableau III-04. Déplacements chimiques de la partie osidique des composés **Cs3-Cs4** en RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) et **Cs2** (¹H 600 MHz, ¹³C 150 MHz) dans CD₃OD.

	Cs2		Cs3 (calendustellatoside A)		Cs4	
	δ_H m (J en Hz)	δ_C	δ_H m (J in Hz)	δ_C	δ_H m (J en Hz)	δ_C
Glc I:						
glc-à-C-3						
1'	4.40 d (7.8)	104.9	4.50 d (7.4)	104.7	4.50 d (7.5)	104.2
2'	3.41 dd (9.0,7.8)	73.6	3.76 dd (8.9, 7.4)	77.3	3.77 dd (7.8,7.5)	77.3
3'	3.56 t (9.0)	86.5	3.77 t (8.9)	86.2	3.78 t (7.8)	86.2
4'	3.44 dd (9.6,8.5)	68.7	3.41 t (8.9)	68.8	3.42 t (7.8)	68.8
5'	3.31 m	75.9	3.33 m	76.2	3.36 m	76.1
6'	3.70 dd (12.1,3.2)	61.3	3.69 dd (12.0, 5.3)	62.4	3.70 dd (12.0,8.0)	61.4
	3.87 dd (12.1,2.1)		3.89 dd (12.0, 2.1)		3.89 dd (12.0,2.0)	
Gal:						
gal→glc-C-						
3						
1"	4.54 d (7.7)	104.3	4.66 d (7.8)	103.3	4.67 d (7.8)	103.3
2"	3.62 dd (9.4, 7.7)	71.7	3.62 t(9.7),	71.6	3.62 dd (9.8,7.8)	71.6
3"	3.53 dd (9.4, 3.3)	73.3	3.50 dd (9.7, 3.3)	73.8	3.51 dd (9.8, 3.3)	73.8
4"	3.83 d (3.3)	68.9	3.84 d (3.3)	69.0	3.84 d (3.3)	69.0
5"	3.59 dd (7.7,4.3)	75.7	3.61 m	75.8	3.62 m	75.8
6"	3.71 dd (11.4,4.3)	61.2	3.72 dd (11.7, 3.4)	61.0	3.73 dd (11.0,3.2)	61.0
	3.80 dd (11.4, 7.7)		3.78 dd (11.7, 5.6)		3.79 dd (11.0,7.5)	
Glc III:						
glc→glc-C-2						
1'''			5.00 d (7.9)	101.8	5.00 d (7.9)	101.9
2'''			3.15 dd (9.3, 7.9)	74.8	3.16 dd (9.3,7.9)	74.8
3'''			3.36 t (9.3)	76.9	3.37 t (9.3)	77.3
4'''			3.08 t (9.3)	71.2	3.10 t (9.3)	71.1
5'''			3.35 m	77.3	3.32 m	76.9
6'''			3.56 dd (11.8, 6.7)	62.3	3.57 dd (12.0,7.8)	62.3
			3.85 dd (11.8, 2.3)		3.85 dd (12.0,2.0)	
Glc II:						
glc-à-C-28						
1'''	5.40 d (8.1)	94.3	5.37 d (8.2)	94.3		
2'''	3.34 t (8.5)	72.5	3.32 m	72.6		
3'''	3.43 m	76.9	3.40 t (8.4)	77.0		
4'''	3.37 t (8.2)	69.7	3.36 t (8.4)	69.7		
5'''	3.37 m	77.3	3.32 m	76.9		
6'''	3.70 dd (11.5,3.2)	61.0	3.70 dd (12.0, 4.1)	61.0		
	3.84 dd (11.5,2.7)		3.84 m			

III.1.1.4. Elucidation structurale du composé Cs5

L'analyse du spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS mode positif (Figure III-33) montre un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 1051.5094 correspondant à une formule $C_{51}H_{80}O_{21}Na$. Un ion fragment est également observé à m/z 965.5074 $[M+Na-86]^+$ qui correspond à la masse du composé **Cs2**. Cette première constatation permet de déduire d'une part que le **Cs5** contient un substituant supplémentaire dans **Cs2** et que ce dernier est un substituant organique.

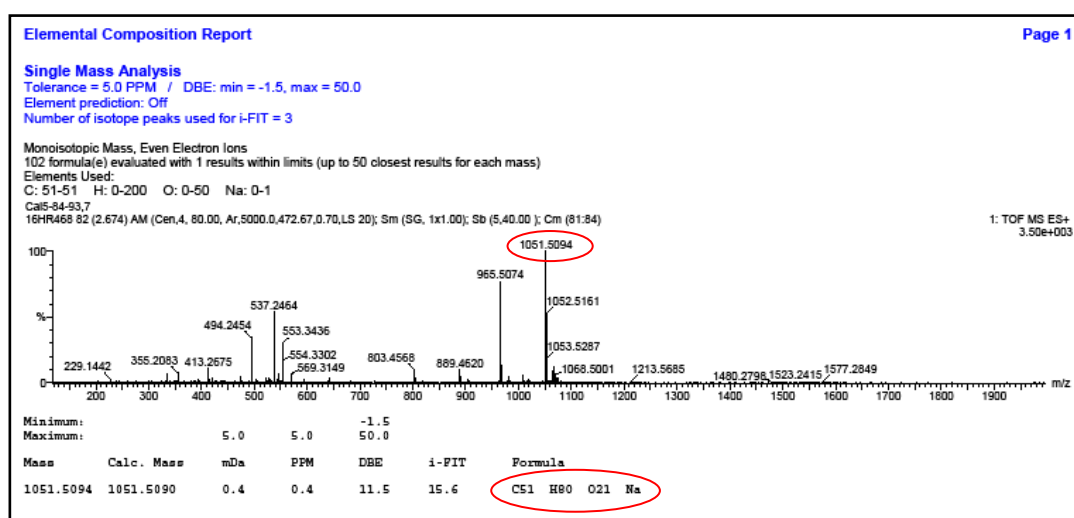


Figure III-33. Spectre de masse du composé **Cs5**.

Les spectres de RMN 1D et 2D du composé **Cs5** montrent une similitude avec ceux de **Cs2** indiquant la présence de l'acide oléanolique comme partie aglycone du composé **Cs5**. Ce qui confirme la supposition signalé plus haut et qui suggère que la substitution est dans la partie osidique.

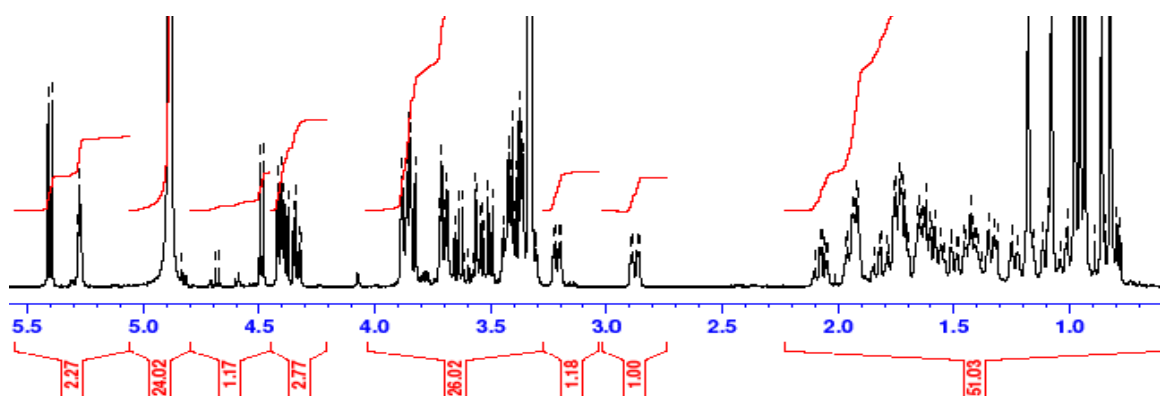


Figure III-34. Spectre de RMN 1H du composé **Cs5**.

L'examen du spectre de RMN ^{13}C (Figure III-35) de ce composé montre une grande similarité dans les valeurs des déplacements chimiques à ceux de **Cs2** avec la présence de deux carbonyles (δ_{C} 167.0 et 168.7 ppm) et un groupement CH_2 à δ_{C} 40.2 ppm, cette observation est aussi confirmée dans le spectre de HSQC où on observe la corrélation de ce dernier CH_2 avec leurs proton à δ_{H} 3.42 ppm.

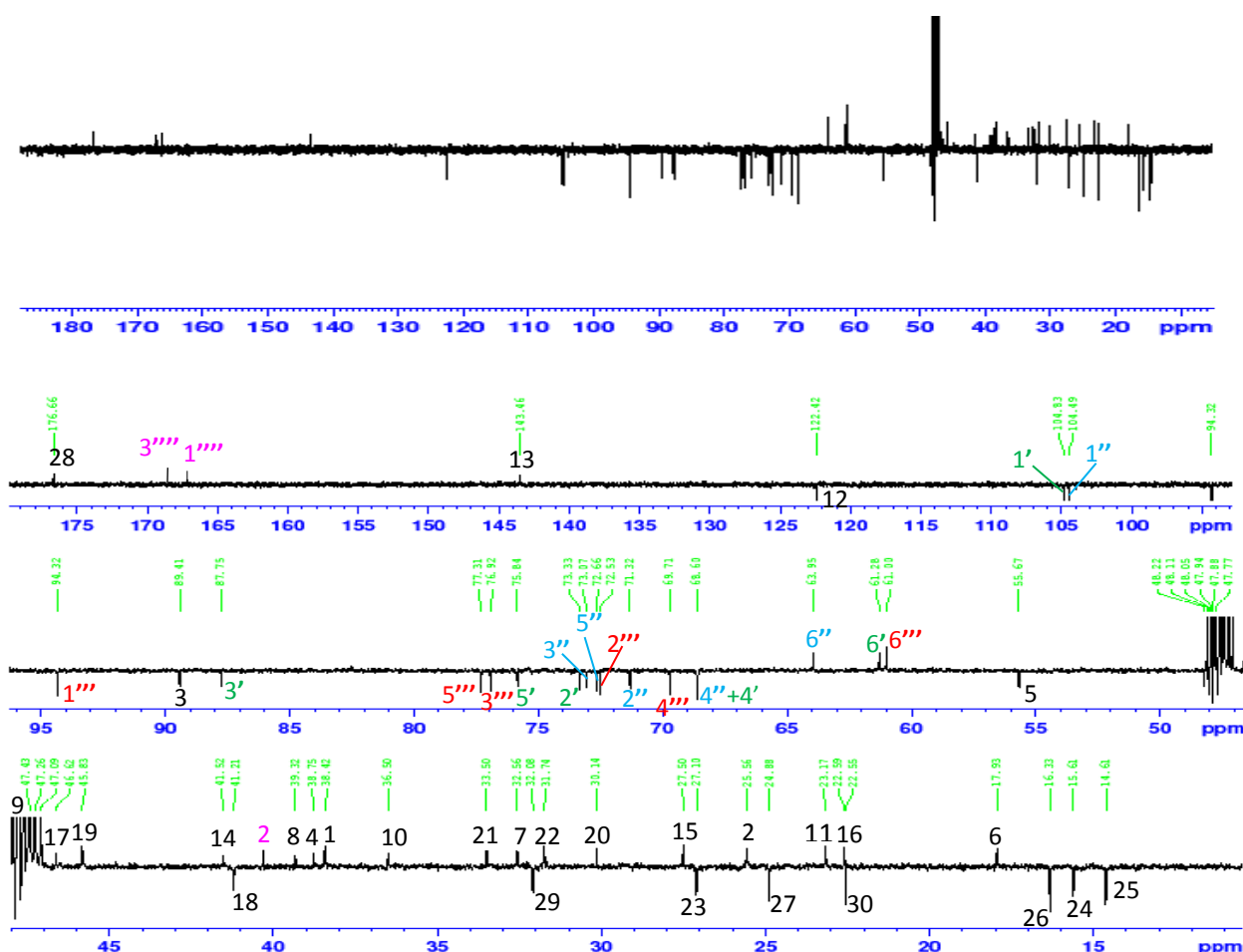


Figure III-35. Spectre de RMN ^{13}C J -modulé du composé **Cs5**.

La comparaison des valeurs RMN ^1H et ^{13}C de la partie oligosaccharide avec celles de **Cs2** et **Cs1** conduit à déduire que **Cs5** a le même séquençage. Ainsi, la chaîne [β -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 3) β -D-glucopyranosyl] est liée à C-3 et un β -D-glucopyranosyl attaché à C-28 de la génine.

L'examen simultané des spectres ^1H , ^{13}C et HSQC (figure III-36) montre que la différence se situe dans la partie terminale du galactose, plus précisément les positions des signaux H-5'' H-6'' et C-6'' dont les protons et le carbone subissent un déblindage par rapport à ceux des composés **Cs2** et **Cs1**. Cependant, le carbone C-5'' subit un blindage par rapport à

ceux des composés **Cs2** et **Cs1**. Ainsi, le proton H-5'' est localisé à δ_H 3.88 ppm (+ 0.29 ppm) et son carbone à δ_C 72.7 ppm (- 3 ppm), les deux protons géminés H_a-6'' (δ_H 4.34, dd, $J = 11.5, 4.3$ Hz) et H_b-6'' (δ_H 4.40, dd, $J = 11.5, 5.7$ Hz) (≈ 0.6 ppm) et le carbone correspondant à δ_C 64.0 ppm (+ 3 ppm). Ces observations indiquent une substitution de la position 6''-Gal comme le confirme la corrélation des protons H_a-6'' et H_b-6'' au carbonyle à δ_C 167.0 ppm dans le spectre HMBC (Figure III-37). Ce carbonyle avec un autre carbonyle à δ_C 168.7 ppm donnent des corrélations avec le groupement CH₂ à δ_H 3.42 ppm, qui à son tour ne présente aucune corrélation sur le spectre COSY.

Cette information combinée avec la formule moléculaire proposée par HR-ESI-MS suggèrent la présence de l'acide malonique (Toki et al., 1996) qui est lié au galactose en position 6''.

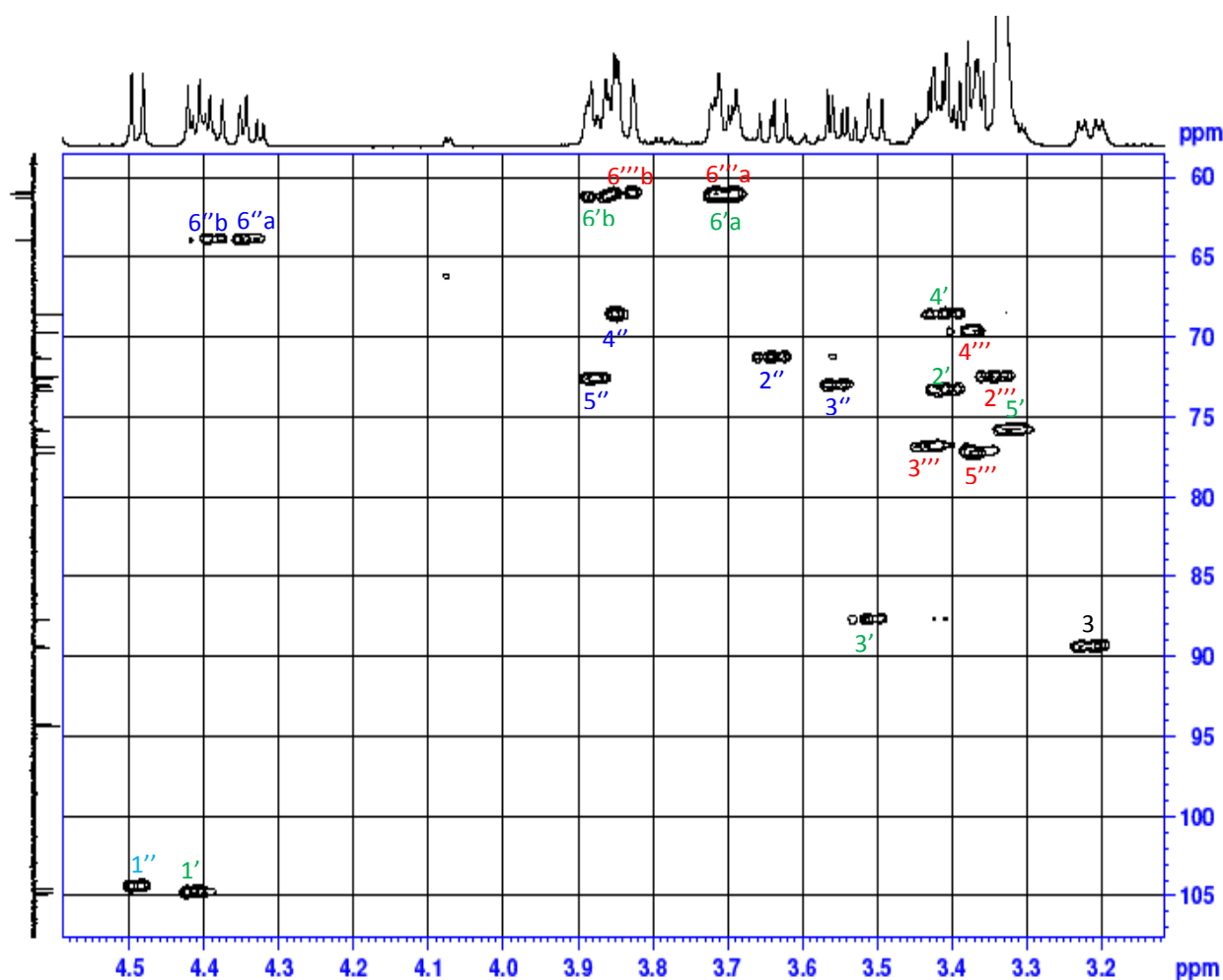


Figure III-36. Spectre HSQC du composé **Cs5** dans la zone des sucres.

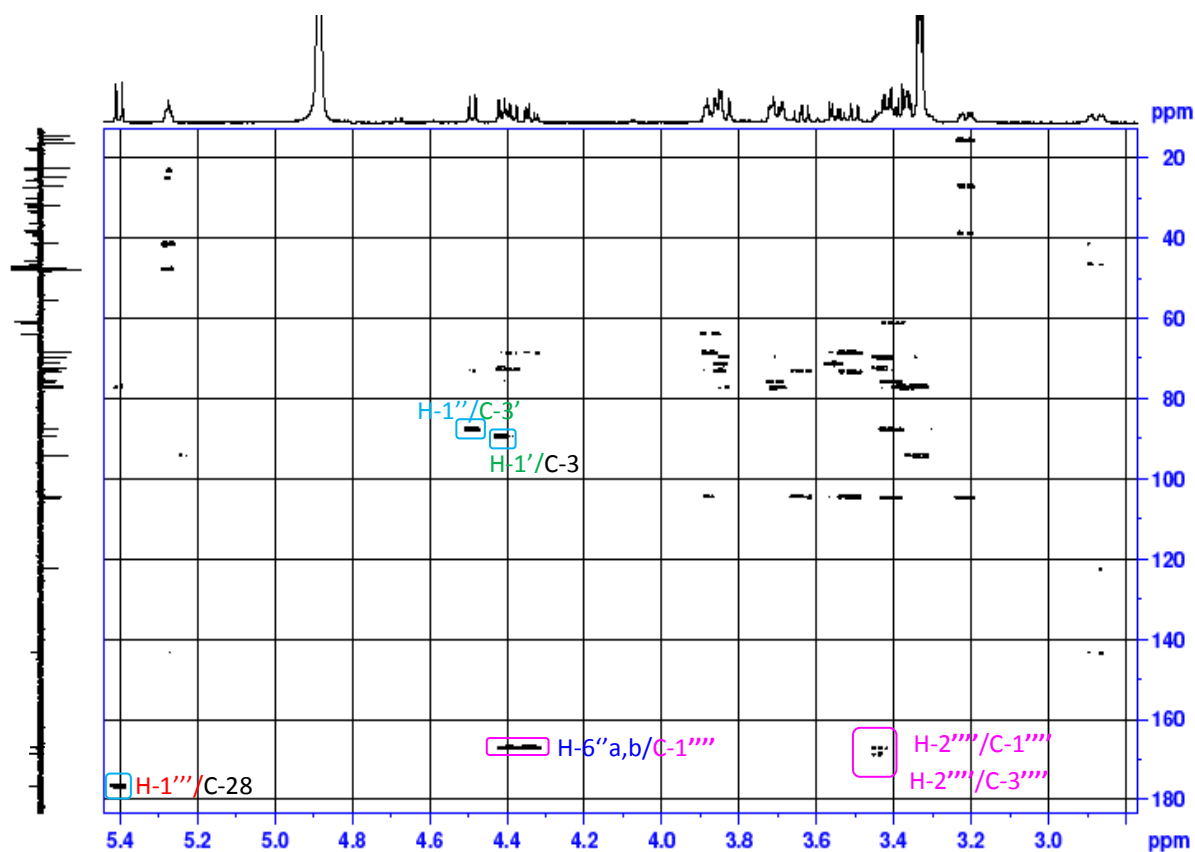


Figure III-37. Spectre HMBC du composé **Cs5** entre 2.6 et 5.4 ppm.

L'ensemble de ces données spectrales du saponoside **Cs5** mène à la nouvelle structure : 3-*O*-(6-*O*-malonyl)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**calendustellatocide C**).

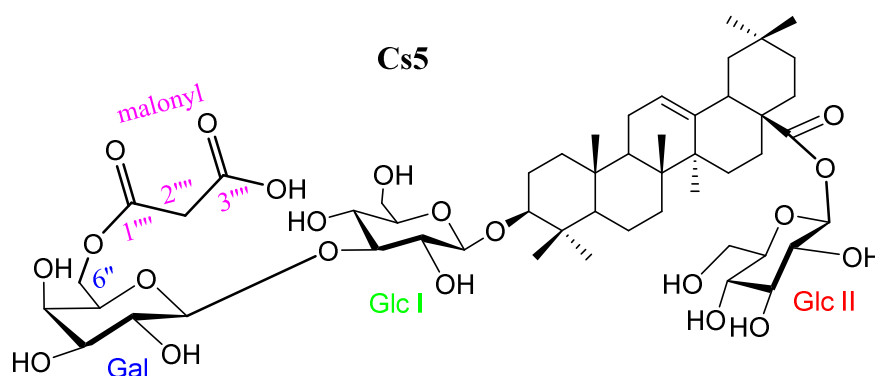


Tableau III-05. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé **Cs5** dans CD_3OD .

Cs5 (calendustellatoside C)				
	Partie génine		Partie osidique	
	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}
1	1.02 m	38.4		
	1.65 m		Glc I: glc-at-C-3	
2	1.71 m	25.6	1'	4.41 d (7.8) 104.8
	1.95 m		2'	3.41 dd (8.7, 7.8) 73.3
3	3.21 dd (11.7, 4.3)	89.4	3'	3.51 t (8.7) 87.8
4	-	38.8	4'	3.42 t (8.7) 68.6
5	0.81 m	55.7	5'	3.35 m 75.8
6	1.42 m	17.9	6'	3.70 dd (12.0,4.2) 61.3
	1.57 m			3.87 dd (12.0,2.2)
7	1.34 m	32.6		
	1.50 m		Gal: gal→glc-c-3	
8	-	39.3	1''	4.49 d (7.8) 104.5
9	1.61 m	47.9	2''	3.64 dd (9.8,7.9) 71.3
10	-	36.5	3''	3.55 dd (9.8, 3.4) 73.1
11	1.92 m	23.2	4''	3.85 d (3.4) 68.6
			5''	3.88 m 72.7
12	5.27 t (3.5)	122.4	6''	4.34 dd (11.5,4.3) 64.0
13	-	143.5		4.40 dd (11.5,5.7)
14	-	41.5		
15	1.11 m	27.5	Glc II: glc à C-28	
	1.83 m		1'''	5.40 d (8.2) 94.3
16	1.74 m	22.6	2'''	3.32 t (8.2) 72.5
	2.07 td (13.6, 3.5)		3'''	3.38 t (8.2) 76.9
17	-	46.6	4'''	3.36 t (8.2) 69.7
18	2.88 dd (13.7, 4.2)	41.2	5'''	3.34 m 77.3
19	1.18 m	45.8	6'''	3.71 dd (11.9, 2.3) 61.0
	1.74 m			3.84 dd (11.9, 2.2)
20	-	30.1		
21	1.24 m	33.5	malonyl→gal-c-6	
	1.43 m		1''''	- 167.0
22	1.63 m	31.7	2''''	3.42 m 40.2
	1.75 m		3''''	- 168.7
23	1.08 s	27.1		
24	0.88 s	15.6		
25	0.98 s	14.6		
26	0.83 s	16.3		
27	1.18 s	24.9		
28	-	176.7		
29	0.94 s	32.1		
30	0.96 s	22.5		

III.1.1.5. Elucidation structurale du composé Cs6

Le spectre de masse obtenu en ESI-MS montre un ion quasi-moléculaire à $[M+Na]^+$ à m/z 803.4. Une simple comparaison des spectres 1D et 2D avec les composés identifiés précédemment montre que les signaux du composé Cs6 sont identiques à ceux de Cs2, sauf pour la partie osidique où on observe la disparition des signaux liés au galactose. Ceci est confirmé par le blindage du carbone C-3' δ_C 77.3 ppm (- 9.2) du glucose attaché en position 3 de la génine.

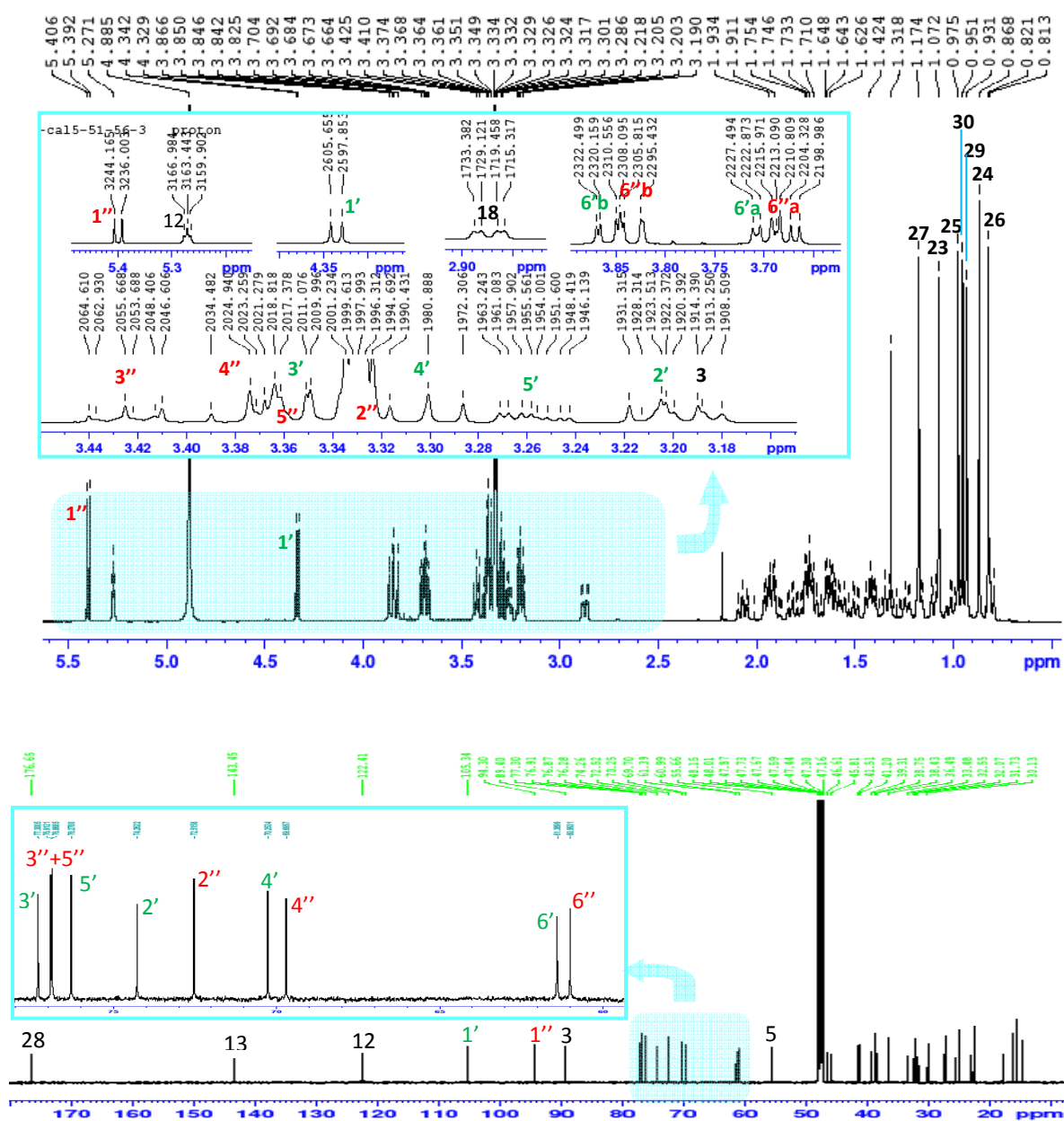
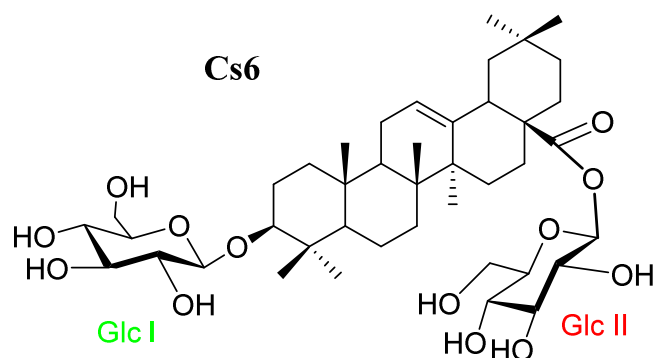


Figure III-38. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé Cs6.

La comparaison avec les données de la littérature nous a permis d'élucider la structure du composé **Cs6** comme étant le silphioside B ou acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, isolé à partir de *Fadogia ancylantha* (Mencherini et al., 2010) et *Aralia elata* (Zhang et al., 2013).



III.1.1.6. Elucidation structurale des composés **Cs7** et **Cs8**

Le spectre de masse ESI-MS du composé **Cs7** montre un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ identique à celui de **Cs6** à m/z 103.4 correspondant à la perte d'un hexose dans **Cs2**. Cependant l'hexose disparu est celui attaché en position 28. Cela est traduit par le déplacement chimique du C-28 à δ_C 180.4 ppm signifiant qu'il n'y a pas de substitution sur cette position.

Sur le spectre de RMN 1H (Figure III-39) de **Cs7** et comparativement au saponoside **Cs2**, nous observons la présence de deux unités osidiques repérées par deux protons anomériques résonnants à δ_H 4.40 ppm (d, $J=7.9$ Hz) et δ_H 4.50 (d, $J=7.9$ Hz) correspond aux protons anomériques H-1' du glucose (**Glc I**) et H-1'' du galactose, respectivement comme pour **Cs2**.

Les données spectrales du composé **Cs8** sont comparables avec ceux de **Cs7**, mais dans ce cas on observe un hexose supplémentaire correspondant au glucose (**Glc III**) lié en C-2' du glucose (**Glc I**) comme dans le saponoside **Cs4**. Ainsi, la partie osidique du composé **Cs8** s'avère identique à la chaîne trisaccharide lié en C-3 de la génine retrouvée dans **Cs4**.

Les déplacements chimiques 1H et ^{13}C de la partie osidique des saponosides **Cs6-Cs8** sont répertoriés dans le tableau III-06 et la partie génine dans le tableau III-07.

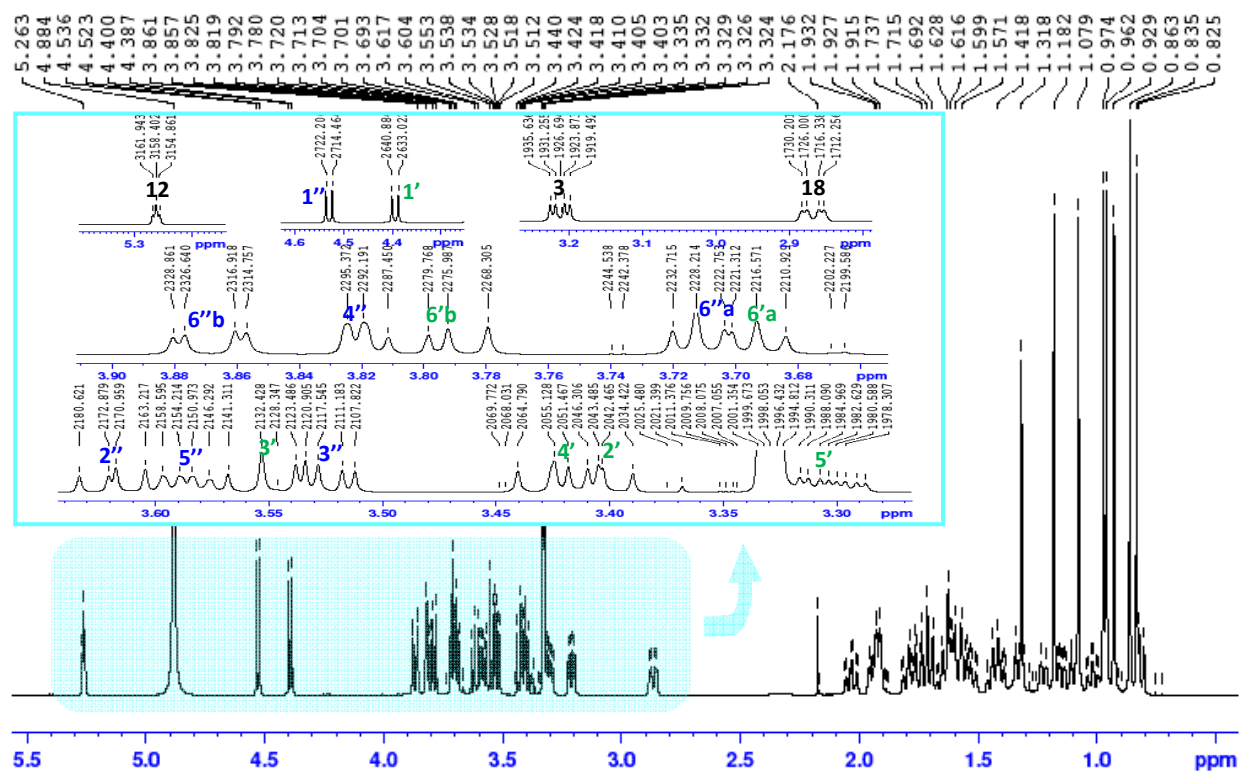
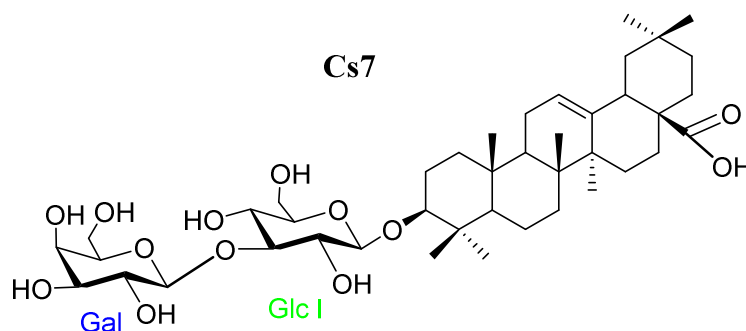


Figure III-39. Spectre de RMN ^1H du composé Cs7.

L'ensemble des données expérimentales 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY) nous ont permis d'établir la structure des monodesmosides **Cs7** et **Cs8** :

- L'acide 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-oléanolique pour le **Cs7**, connu par averososide B isolé à partir de *calendula arvensis* (Pizza et al., 1987).



- pour le **Cs8**, l'acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl]-oléanolique. Désigné par osteosaponin A, isolé à partir d'*Osteospermum vaillantii* (Ahmed et al., 2010).

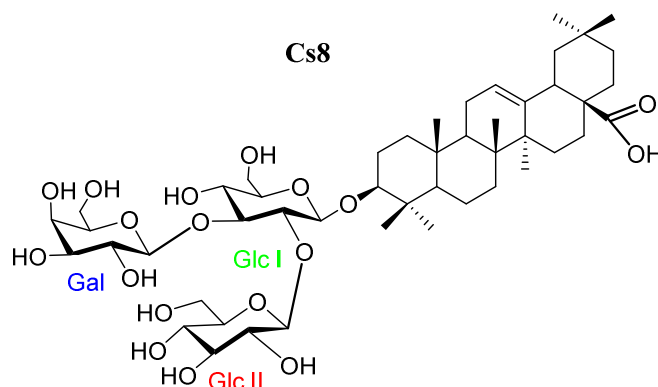


Tableau III-06. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de la partie osidique des composés **Cs6**, **Cs7** et **Cs8** dans CD_3OD .

	Cs6		Cs7		Cs8	
	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}
Glc I: glc-at-C-3						
1'	4.34 d (7.8)	105.3	4.40 d (7.9)	104.9	4.33 d (7.3)	104.1
2'	3.21 dd (9.0,7.8)	74.3	3.40 dd (9.0,7.9)	73.6	3.57 t (7.3)	77.6
3'	3.36 dd (9.0, 8.6)	77.3	3.55 t (9.0)	86.5	3.54 t (7.3)	87.5
4'	3.30 t (8.6)	70.3	3.42 dd (9.8,9.0)	68.7	3.18 t (7.3)	68.9
5'	3.26 ddd (9.4,5.5,2.3)	76.3	3.30 ddd (9.8,5.3,2.2)	75.9	3.17 m	76.6
6'	3.68 dd (11.9,5.0)	61.4	3.71 dm (11.5)	61.3	3.44 m	61.4
	3.86 dd (11.9,2.3)		3.79 dd (11.5,7.7)		3.65 dd (12.1,5.1)	
Gal: gal\rightarrowglc-C-3						
1''			4.50 d (7.9)	104.3	4.40 d (7.8)	104.2
2''			3.62 dd (9.7,7.9)	71.6	3.37 m	71.5
3''			3.52 dd (9.7, 3.4)	73.3	3.29 dd (9.1, 3.4)	73.8
4''			3.82 d (3.4)	68.9	3.63 d (3.4)	68.7
5''			3.58 dd (7.6,4.3)	75.7	3.45 m	76.2
6''			3.69 dd (11.9,4.3)	61.2	3.48 m	60.8
			3.87 dd (11.9,5.2)		3.52 dd (10.2, 6.7)	
Glc II: glc\rightarrowC-28					Glc II: glc\rightarrowglc-C-2	
1'''	5.40 d (8.2)	94.3			4.78 d (7.8)	102.1
2'''	3.34 m	72.5			2.91 dd (8.5,7.8)	75.0
3'''	3.43 t (9.1)	76.9			3.13 t (8.5)	77.0
4'''	3.37 t (9.1)	69.7			2.94 t (8.5)	71.3
5'''	3.36 m	76.9			3.10 m	77.0
6'''	3.70 dd (12.1,2.9)	61.0			3.38 m	62.1
	3.84 dd (12.1,1.8)				3.66 dd (12.1,1.8)	

Tableau III-07. Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et ¹³C (150 MHz) de la partie génine des composés **Cs6**, **Cs7** et **Cs8** dans CD₃OD.

	Cs6		Cs7		Cs8	
	δ_H m (J en Hz)	δ_C	δ_H m (J in Hz)	δ_C	δ_H m (J en Hz)	δ_C
1	1.02 td (13.4,3.5) 1.65 m	38.4	1.02 td (13.4,3.4) 1.63 m	38.4	0.90 td (13.2,3.5) 1.51 m	38.6
2	1.71 m 1.96 m	25.6	1.69 m 1.94 m	25.6	1.54 td (13.2,3.5) 1.88 dt(13.2,1.8)	26.0
3	3.20 dd (11.9,4.5)	89.4	3.21 dd (11.7,4.4)	89.4	3.04 dd (13.2,3.5)	89.4
4	-	38.8	-	38.8	-	39.2
5	0.81 dm (11.9)	55.7	0.81 dm (11.8)	55.6	0.71 m	55.5
6	1.42 m 1.58 m	17.9	1.42 m 1.58 m	17.9	1.29 m 1.48 m	18.2
7	1.34 m 1.51 td (13.3,3.6)	32.6	1.33 dt (12.8,2.3) 1.51 m	32.6	1.24 m 1.42 td (12.8,3.7)	32.9
8	-	39.3	-	39.2	-	39.3
9	1.60 m	47.8	1.61 m	47.7	1.50 m	47.5
10	-	36.5	-	36.5	-	36.7
11	1.92 m	23.2	1.91 m	23.1	1.81 m	23.4
12	5.28 t (3.5)	122.4	5.26 t (3.5)	122.3	5.27 t (3.5)	122.0
13	-	143.5	-	143.8	-	144.3
14	-	41.5	-	41.5	-	41.8
15	1.10 m 1.82 td (14.1,3.9)	27.5	1.10 dt (13.9,3.2) 1.79 td (13.9,4.0)	27.4	1.01 m 1.65 td (13.8,4.1)	27.6
16	1.73 m 2.07 td (13.6,3.9)	22.5	1.61 m 2.03 td (13.6,4.0)	22.6	1.48 m 1.92 td (13.9,4.1)	23.1
17	-	46.6	-	46.2	-	45.9
18	2.88 dd (13.6,4.2)	41.2	2.90 dd (13.9,4.2)	41.3	2.75 dd (13.2,3.7)	41.3
19	1.17 m 1.73 m	45.8	1.15 ddd (13.7,4.5,2.2) 1.71 t (13.7)	45.8	1.05 m 1.61 t (13.8)	46.1
20	-	30.1	-	30.2	-	30.9
21	1.24 m 1.42 m	33.5	1.22 dm (13.8) 1.41 m	33.5	1.13 m 1.32 m	33.8
22	1.62 m 1.74 m	31.7	1.56 m 1.76 m	32.4	1.44 m 1.16 tm (14.2)	32.6
23	1.07 s	27.1	1.07 s	27.1	1.00 s	27.8
24	0.88 s	15.6	0.86 s	15.6	0.77 s	16.5
25	0.99 s	14.6	0.97 s	14.5	0.87 s	15.6
26	0.82 s	16.3	0.83 s	16.3	0.72 s	17.3
27	1.19 s	24.9	1.18 s	25.0	1.10 s	26.0
28	-	176.7	-	180.4	-	179.0
29	0.93 s	32.1	0.93 s	32.2	0.88 s	33.3
30	0.95 s	22.6	0.96 s	22.6	0.88 s	23.8

III.1.1.7. Elucidation structurale du composé Cs9

L'examen du spectre de masse à haute résolution (HR- ESI-MS) (Figure III-40) montre la présence d'un ion à $m/z = 965.5095$ correspond à la formule $C_{48}H_{78}O_{18}Na$, indiquant une formule brute $C_{48}H_{78}O_{18}$.

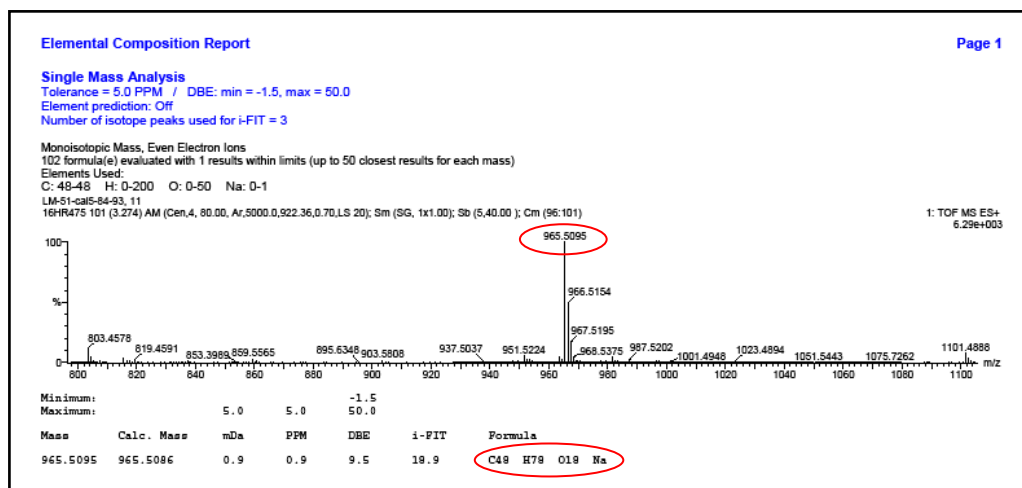


Figure III-40. Spectre de masse du composé Cs9.

L'élucidation structurale du composé Cs9 (Tableau III-08) a été réalisée par comparaison des données spectrales de ce composé avec celles du composé Cs8 (III.1.1.6).

- **Détermination structurale de la génine III**

Une grande similitude des données de RMN 1D et 2D de Cs9 et Cs8 est constatée dans les cycles A-B. Toutefois quelques différences sont observées au niveau des cycles C D et E. En effet, sur le spectre de RMN ^{13}C , l'apparition d'une paire de signaux de carbones oléfiniques à δ_C 133.1 (C-19) et δ_C 137.0 (C-18) caractéristiques de l'acide oléan-18ène (Hamburger et al., 2002) et la disparition de ceux lié à Δ^{12-13} . Cette hypothèse est supportée d'une part par la présence du proton H-13 sous forme d'un doublet large à δ_H 2.33 ppm ($J=11.7$ Hz) et d'autre part par la disparition du signal très déblindé correspondant au proton H-18 (δ_H 2.75).

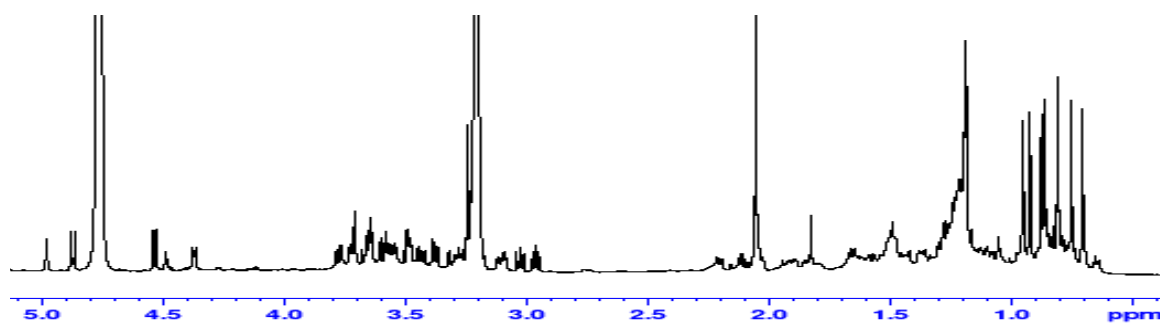


Figure III-41. Spectre de RMN 1H du composé Cs9.

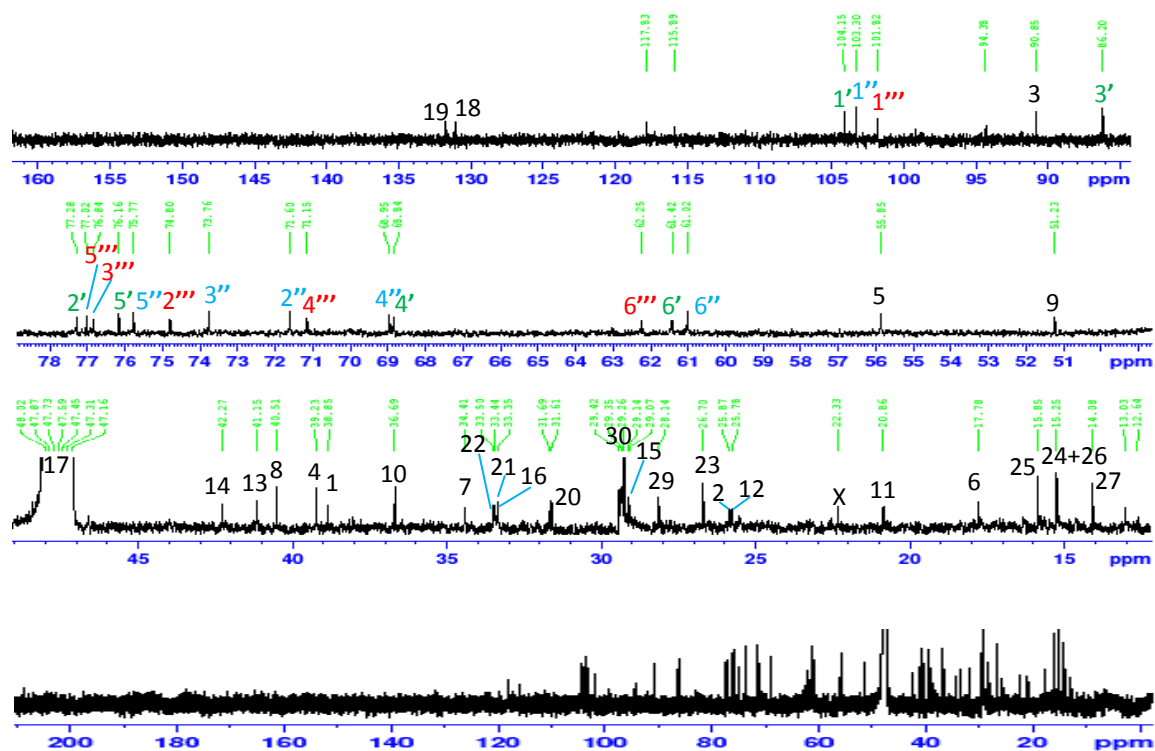


Figure III-42. Spectre de RMN ^{13}C du composé Cs9.

L'examen simultané des spectres HMBC et HSQC confirme la présence d'un acide oléan-18-ène et cela par les corrélations observées entre le carbone C-19 (δ_{C} 133.1) et les méthyles CH_3 -29 (δ_{H} 0.98) et CH_3 -30 (δ_{H} 1.01). À l'inverse, le proton H-19 à δ_{H} 5.11 montre des taches de corrélations avec les carbones C-17 (δ_{C} 48.2), C-13 (δ_{C} 41.2), C-21 (δ_{C} 33.9), C-20 (δ_{C} 31.6) et C-30 (δ_{C} 29.4) (figure III-43).

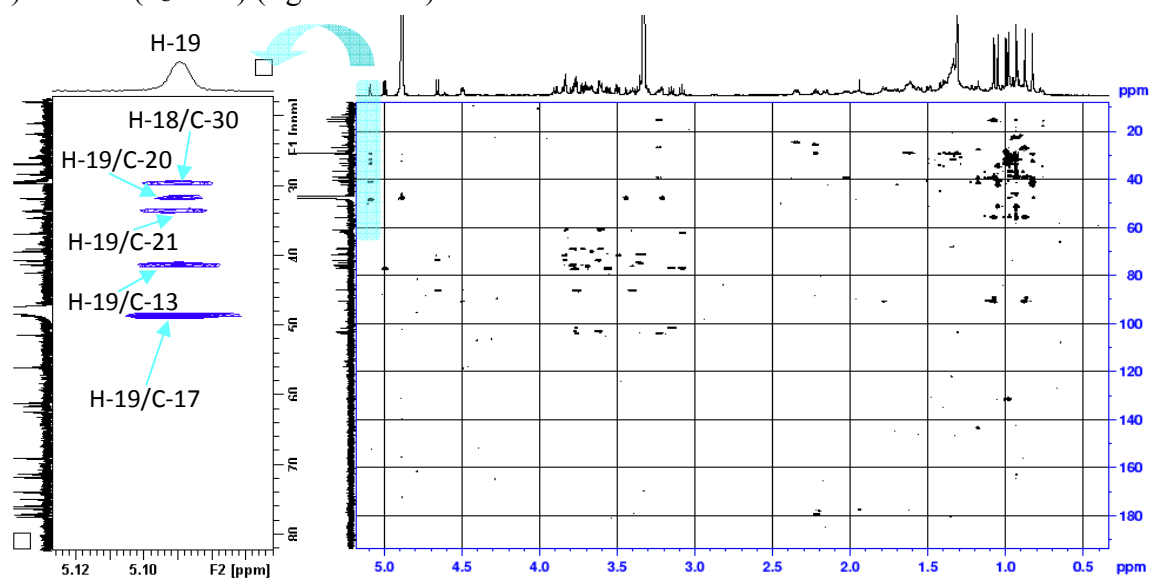


Figure III-43. Spectre HMBC du composé Cs9.

L'orientation β -axiale de H-13 découle de la valeur de sa constante de couplage avec H-12 ($J = 11.7$ Hz). De plus, en ROESY (Figure III-44), nous observons une tache de corrélation entre le H-13 et le méthyle CH₃-26 ($\delta_{\text{H}} 1.05$) (orientation β -axiale).

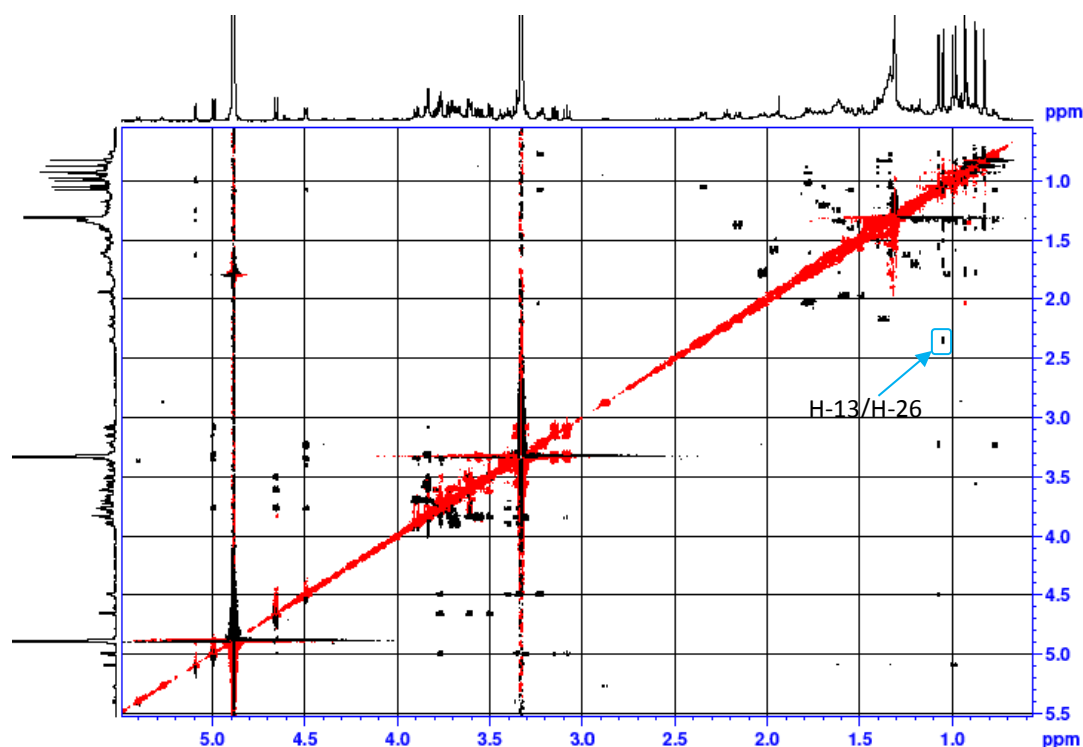


Figure III-44. Spectre ROESY du composé **Cs9**.

Tous les signaux des carbones et des protons (tableau III-08) sont déterminés et attribués d'après l'analyse des spectres COSY, ROESY, HSQC et HMBC. Ainsi, la structure de l'aglycone du composé est identifiée à l'acide oléan-18-ène précédemment caractérisé comme l'acide morolique (**génine III**) (Hamburger et al., 2002 ; Lopez-Martinez et al., 2013) isolé sous forme glycosylé à partir de *Calendula officinalis* (Yochikawa et al., 2001).

Comme signalé plus haut, la partie osidique est identique à celle du composé **Cs8**. Ceci est constaté à partir des déplacements chimiques des protons et carbones des trois unités osidiques. Selon les corrélations observées sur le spectre HMBC, ces derniers constituent la même chaîne trisaccharide (β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl]) lié en position 3 de la génine, comme pour le **Cs8**. Ainsi le composé **Cs9** est un monodesmoside de l'acide morolique.

L'ensemble des données précédentes nous permet ainsi d'établir la structure de **Cs9** comme étant l'acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl]-morolique ou alors **calendustellatose D**, nouveau composé naturel.

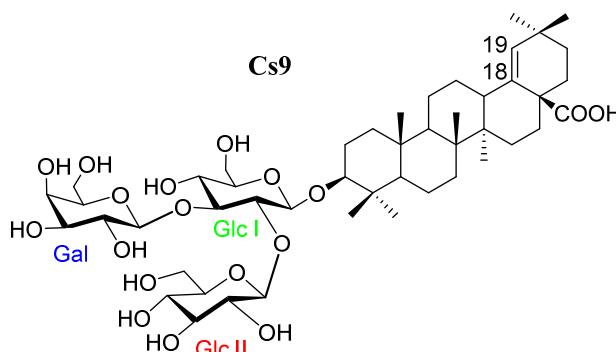


Tableau III-08. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) du composé **Cs9** dans CD_3OD .

Cs9 (calendustellatose D)					
	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}	
Partie génine					
1	1.02 m	38.9	24	0.87 s	15.3
	1.78 m		25	0.93 s	15.9
2	1.77 m	25.9	26	1.05 s	15.3
	2.02 m		27	0.82 s	14.1
3	3.23 dd (14.0, 4.8)	90.9	28	-	180.6
4	-	39.2	29	0.98 s	28.1
5	0.77 dl (11.9)	55.9	30	1.01 s	29.4
6	1.40 m	17.8	Partie osidique		
	1.56 <i>brd</i> (11.8)		Glc I: glc-à-C-3		
7	1.40 m	34.4	1'	4.50 d (7.5)	104.2
	1.49 m		2'	3.76 dd (8.6, 7.4)	77.3
8	-	40.5	3'	3.77 t (8.6)	86.2
9	1.33 m	51.2	4'	3.40 t (8.6)	68.8
10	-	36.7	5'	3.34 m	76.2
11	1.34 m	20.9	6'	3.69 dd (11.9, 5.4)	62.4
	1.60 m			3.90 dd (11.9, 2.0)	
12	1.62 m	25.8	Gal: gal→glc-C-3		
13	2.33 dl (11.7)	41.2	1''	4.66 d (7.8)	103.3
14	-	42.3	2''	3.62 dd (9.6, 7.8)	71.6
15	1.22 m	29.4	3''	3.50 dd (9.6, 3.3)	73.8
	1.69 m		4''	3.84 d (3.3)	69.0
16	1.94 m	33.4	5''	3.61 m	75.8
	2.15 m		6''	3.72 dd (11.5, 4.0)	61.0
17	-	48.2		3.78 dd (11.5, 7.5)	
18	-	137.0	Glc II: glc→glc-C-2		
19	5.11 s	133.1	1'''	4.99 d (7.9)	101.8
20	-	31.6	2'''	3.15 dd (9.2, 7.9)	74.8
21	1.35 m	33.9	3'''	3.36 t (9.2)	76.8
	1.48 m		4'''	3.08 t (9.2)	71.2
22	1.36 m	33.4	5'''	3.32 m	77.0
	1.58 m		6'''	3.56 dd (12.0, 7.8)	62.3
23	1.08 s	26.7		3.85 dd (12.0, 2.1)	

III.1.1.8. Elucidation structurale des composé Cs10, Cs11 et Cs12

Les composés **Cs10** et **Cs11** ont la même partie osidique et la différence réside dans la nature de la génine. Pour le **Cs12**, la partie osidique est différente de celle des **Cs10** et **Cs11**. Ainsi, l'interprétation sera effectuée pour le **Cs12** puis nous mentionnons les changements qui apparaissent sur les spectres de **Cs10** et **Cs11**.

L'examen des spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé indique la présence des signaux caractéristiques de l'acide échinocystique pour le **Cs10** et l'acide oléanolique pour **Cs11** et **Cs12** (tableau III-09). Comme nous l'avions observé pour les saponosides précédemment identifiées dans la 1^{ère} série, l'analyse des spectres est aisée puisque les spectres de RMN ^1H ne montrent que deux protons anomériques indiquant la présence de deux unités osidiques.

Le spectre de RMN ^1H de **Cs12** (Figure III-45) montre les signaux de deux protons anomériques à δ_{H} 4.46 ppm (d, $J=7.9$ Hz) et δ_{H} 4.55 ppm (d, $J=7.7$ Hz), qui corrèlent sur le spectre HSQC avec deux carbones à δ_{C} 105.2 et 104.3 ppm, respectivement.

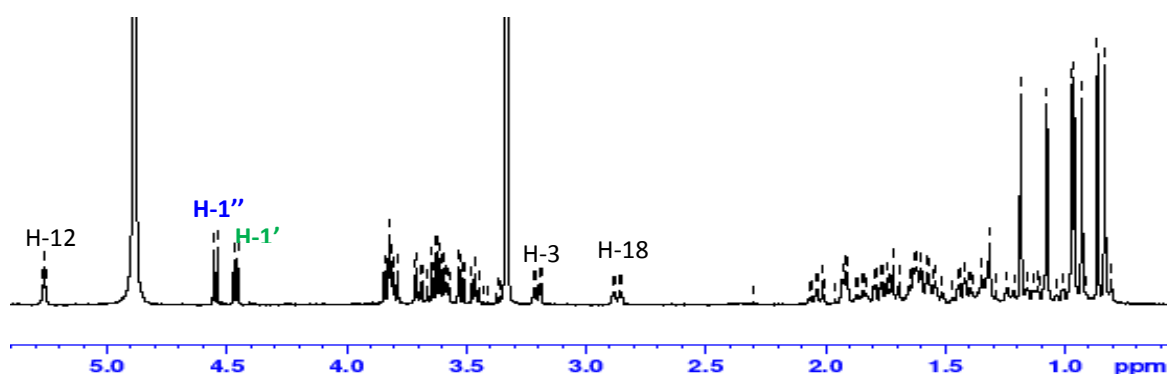


Figure III-45. Spectre de RMN ^1H du composé **Cs12**.

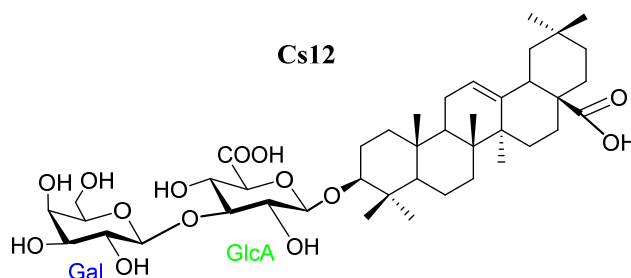
A partir du proton anomérique H-1' (δ_{H} 4.46), un système de spin à cinq protons est identifié à l'aide du spectre COSY, sur lequel nous observons les corrélations entre H-1' et H-2' (δ_{H} 3.46) qui corrèle avec H-3' (δ_{H} 3.61). Le H-4' résonne à δ_{H} 3.63 ppm et il corrèle avec H-5' (δ_{H} 3.83). Les constantes de couplages entre les protons H-2', H-3', H-4' et H-5' sont toutes supérieures à 8 Hz (tableau III-09) indiquent une position transdiaxiale de ces protons. Le proton H-5' résonne sous forme d'un doublet avec une constante de couplage ($J=9.5$ Hz) est caractéristique d'un acide glucuronique. Ceci est justifié par la présence d'un signal d'un carbonyle d'acide à δ_{C} 172.0 ppm correspondant au carbone C-6' de l'acide glucuronique. Les

valeurs des déplacements chimiques δ_C attribuées à partir du spectre HSQC sont en accord avec un acide β -D-glucuronopyranique (**GlcA**) (Alabdul Magid., 2005).

De la même manière, un β -D-galactopyranose (**Gal**) a été identifié à partir du proton anomérique H-1'' à δ_H 4.55 ppm, caractérisé par la position équatoriale du proton H-4'' donnant une constante de couplage faible ($J_{H-4''-H-3''} = 3.3$ Hz).

Le déblindage du carbone C-3' (δ_C 85.2) de l'acide glucuronique permet de supposer la chaîne disaccharide [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA] attaché à la génine. En outre, la non estérification de l'acide en C-28 (δ_C 179.7) et le déblindage de C-3 (δ_C 89.7) de la génine indiquent que cette chaîne est attaché sur l'hydroxyle en position 3. Ceci est confirmé par les corrélations observées sur le spectre HMBC entre (H-1''/ C-3') et (H-1'/ C-3).

Toutes ces données permettent d'identifier le saponoside **Cs12** à l'acide 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl oléanolique. Ce composé est également connu par calendulaglycoside D isolé précédemment du genre *Calendula* à partir de *C. officinalis* (Vercherko et al., 1975 ; Vidal-Olivier et al., 1989 ; Yoshikawa et al., 2001) et *C. arvensis* (Pizza et al., 1987).



L'examen du spectre de RMN 1H de **Cs10** montre les signaux de deux protons anomériques H-1' à δ_H 4.39 ppm (d, $J = 7.9$ Hz) et H-1'' à δ_H 5.37 ppm (d, $J = 7.7$ Hz), qui corrélerent sur le spectre HSQC avec deux carbones à δ_C 105.5 et 94.3 ppm respectivement.

L'analyse des spectres COSY et HSQC permet d'identifier un β -D-glucose (**Glc**) à partir du proton anomérique H-1'' (δ_H 5.37). Le déblindage de H-1'' et le blindage de C-1'' indiquent que ce dernier est lié en position 28 de la génine comme le montre la tache de corrélation entre H-1'' et C-28 sur le spectre HMBC et l'effet rOe observé entre H-1''/H₃-26 sur le spectre ROESY.

Un acide β -D-glucuronique (**GlcA**) est également identifié à partir du proton anomérique H-1' (δ_{H} 4.39) caractérisé par son carbonyle à δ_{C} 172.0 et par la constante de couplage ($J_{\text{H-5}'-\text{H-4}'} = 9.5$ Hz). Comparativement à celui de **Cs12**, le blindage de C-3' (-8.2 ppm) indique que cet acide n'est pas substitué. La corrélation H-1'/C-3 observée sur le spectre HMBC permet de déduire le site d'encrage en position C-3 de la génine ce qui est confirmé sur le spectre ROESY par l'effet rOe observé entre H-1'/H-3.

De la même manière, la partie osidique de **Cs11** est identifiée à un acide β -D-glucuronique lié en position 3 de la génine et un β -D-glucose en position 28. (Figure III-56).

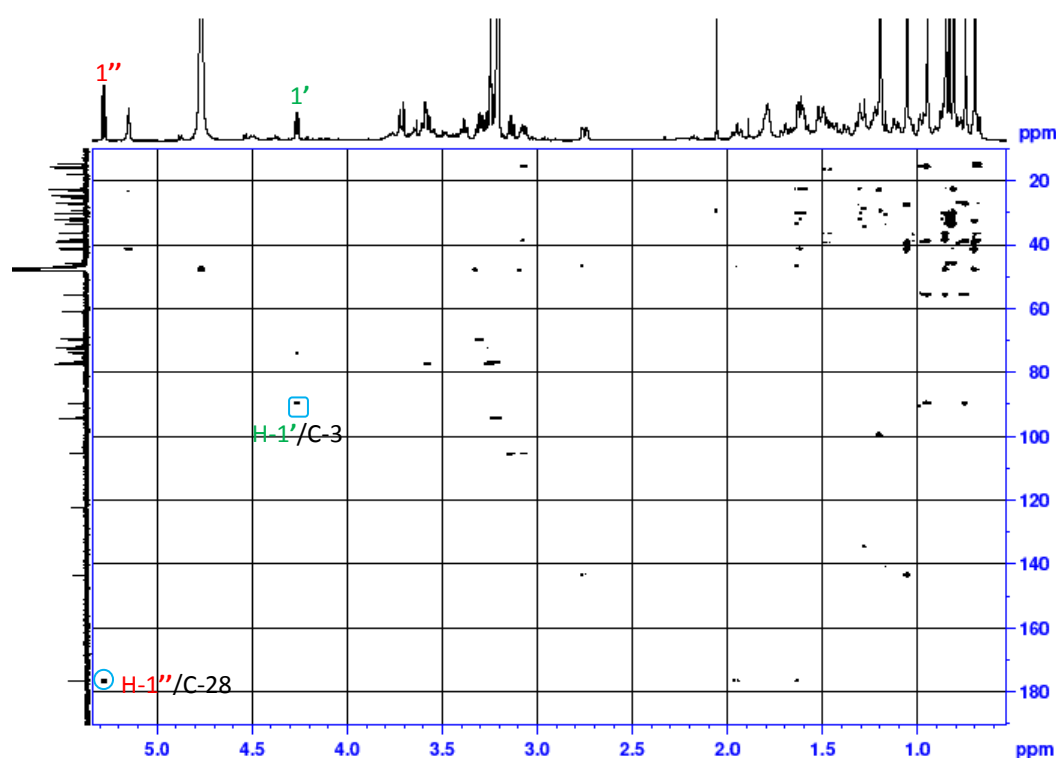


Figure III-46. Spectre HMBC du composé **Cs11**.

Les déplacements chimiques comparés avec les valeurs de la littérature permet d'identifier les composés **Cs10** et **Cs11** (tableau III-09):

– Le **Cs10** est l'acide 3-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-échinocystique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (acanthopanaxoside E), qui a précédemment été isolé à partir de *Acanthopanax senticosus* (Araliaceae) (Li et al., 2007). Ici nous l'avons isolé pour la deuxième fois dans le règne végétal et pour la première fois dans la famille des Asteraceae.

– Le **Cs11** est l'acide 3-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (silphioside G), également isolé de la famille des Araliaceae à partir d'*Acanthopanax senticosus* (Li et al., 2007). Aussi nommé calendulaglycoside D₂ à partir de *Calendula officinalis* (Vidal et al., 1989).

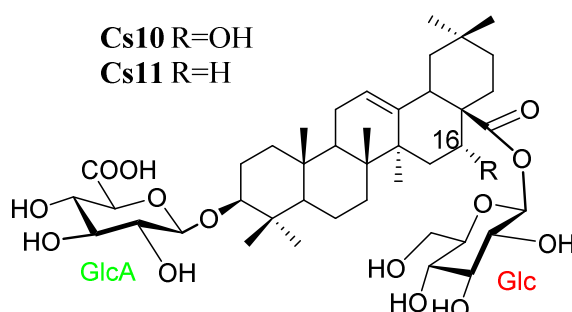


Tableau III-09. Déplacements chimiques de la partie osidique des composés **Cs10**, **Cs12** en RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) et **Cs11** (500 MHz, 125 MHz) dans CD₃OD.

	Cs10		Cs11		Cs12	
	δ_H m (J en Hz)	δ_C	δ_H m (J en Hz)	δ_C	δ_H m (J en Hz)	δ_C
GlcA-à-C-3						
1'	4.39 d (7.8)	105.5	4.39 d (7.9)	105.5	4.46 d (7.9)	105.2
2'	3.26 dd (9.1,7.8)	74.0	3.14 dd (8.9,7.9)	74.0	3.46 dd (8.6,7.9)	73.3
3'	3.39 t (9.1)	76.4	3.26 t (8.9)	76.4	3.61 t (8.6)	85.2
4'	3.51 t (9.1)	72.0	3.39 t (8.9)	72.1	3.63 dd (9.5, 8.6)	70.4
5'	3.74 d (9.1)	75.2	3.60 d (8.9)	75.2	3.83 d (9.5)	74.9
6'	-	172.2	-	172.0	-	172.0
Glc : glc→C-28					Gal: gal→glcA-C-3	
1''	5.37 d (8.2)	94.3	5.29 d (8.1)	94.3	4.55 d (7.7)	104.3
2''	3.32 m	72.6	3.21 m	72.5	3.62 dd (9.8,7.7)	71.6
3''	3.41 t (8.5)	76.9	3.31 t (9.0)	76.9	3.52 dd (9.8,3.3)	73.3
4''	3.36 t (8.5)	69.7	3.25 m	69.7	3.83 d (3.3)	69.0
5''	3.36 m	77.3	3.24 m	77.3	3.58 dd (7.8,4.4)	75.8
6''	3.70 dd (11.5,2.5)	61.0	3.58 dd (12.0,4.5)	61.0	3.70 dd (11.6,4.4)	61.3
	3.83 dd (11.5,1.8)		3.72 dd (12.0,1.5)		3.81 dd (11.6,7.8)	

III.1.1.9. Elucidation structurale des composé **Cs13** et **Cs14**

Ces deux composés sont des 3-28 bidesmosides qui ont la même partie osidique, ce sont des glycosides de l'acide oléanolique (génine I) pour **Cs14** et de l'acide 29-hydroxyoléanolique (génine IV) pour le **Cs13**. Ainsi, l'interprétation sera effectuée au premier temps sur la partie génine de **Cs13**. Ensuite nous passerons à la détermination de la partie osidique.

- **Détermination structurale de la génine IV**

Sur le spectre de RMN ^1H du composé **Cs13** (Figure III-47), la majorité des signaux caractéristiques de l'acide oléanolique sont présents. L'analyse des spectres 2D montre que les cycles A, B, C et D restent identiques, cependant, les changements observés se situent au niveau du cycle E. En effet, la présence d'un groupement hydroxyle est déduit depuis le signal observé à δ_{H} 4.50 de plus la disparition d'un signal du groupement méthyle permet de suggérer le site d'hydroxylation en position 29 ou 30.

Le spectre de RMN ^{13}C de **Cs13** montre les signaux dus à trois sucres et un triterpène de type oléanène. Une simple comparaison des signaux avec ceux de **Cs14**, montre que ces derniers ont la même partie oligoglycosyle et aglycone à l'exception des signaux du cycle E, dans lequel un carbone qui porte un hydroxyle (δ_{C} 74.3) apparaît dans **Cs13**.

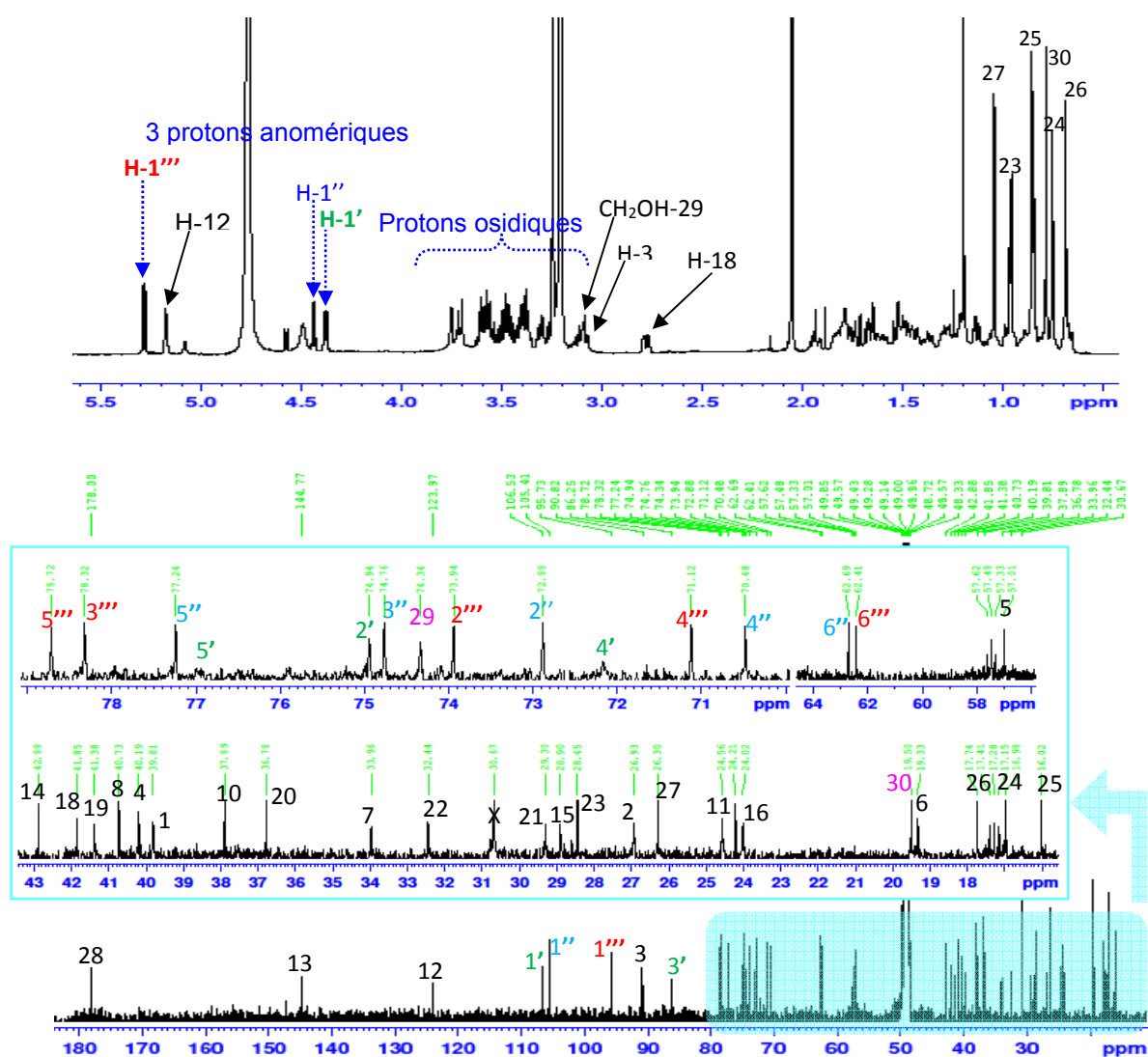


Figure III-47. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **Cs13**.

Les corrélations HMBC observées à partir des protons des différents méthyles angulaires nous permettent d'attribuer pratiquement l'ensemble des carbones de la génine comme nous l'avons décrit dans le cas des saponosides précédents. Ainsi sont confirmés la double liaison Δ^{12-13} , l'hydroxyle en position 3 et l'acide carboxylique en position C-28. On peut trouver également dans le spectre HMBC toutes les taches de corrélations à partir du méthyle situé à δ_H 0.93 (attribuable au CH₃-30) avec les carbones C-19 (δ_C 40.1), C-20 (δ_C 35.5), C-21 (δ_C 28.1) et avec l'hydroxyméthylène (C-29) à δ_C 74.3 ppm (Figure III-48).

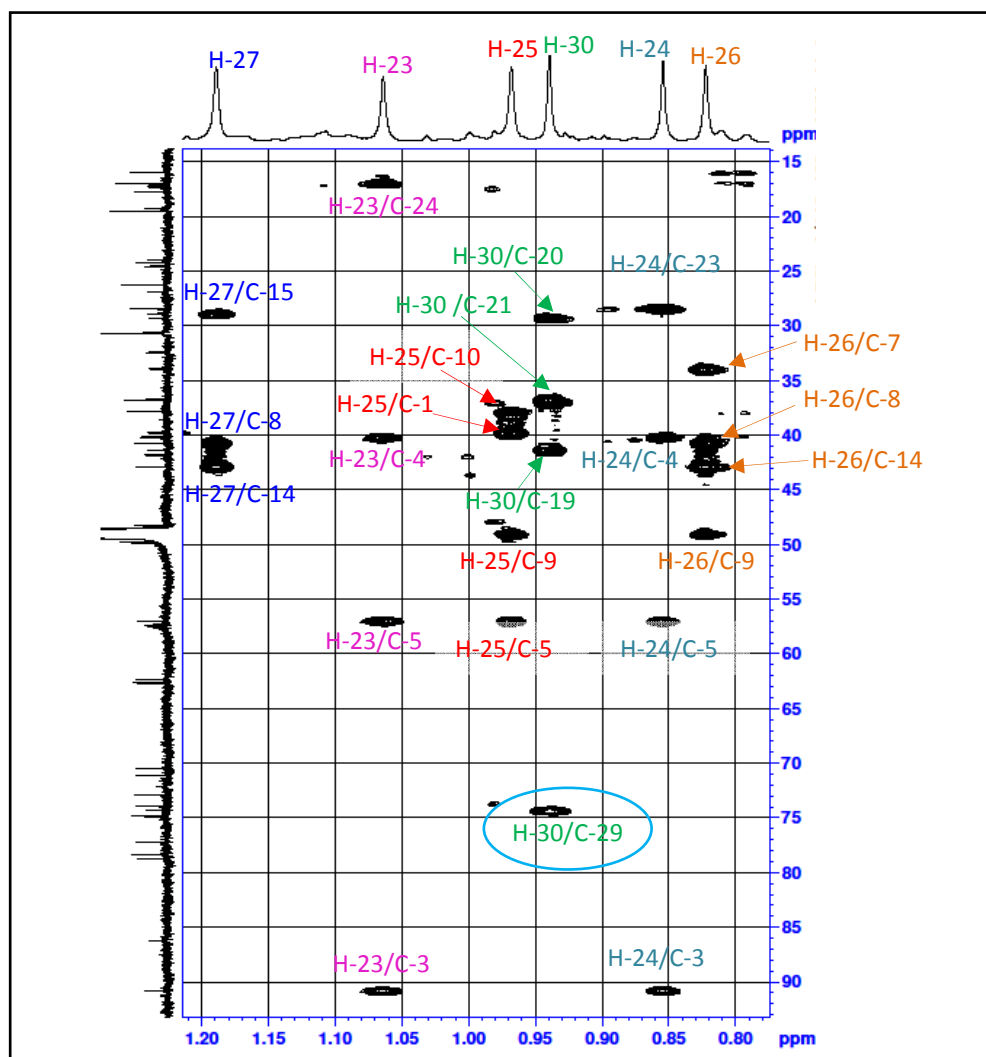


Figure III-48. Spectre HMBC dans la zone des méthyles du composé Cs13.

L'emplacement du groupement hydroxyle en position 29 est établi à l'aide des données disponibles dans la littérature. Ainsi dans le cas de 29-hydroxyoléanolique les déplacements chimiques des carbones C-29 (δ_C 73.8) et C-30 (δ_C 19.7) (Plasman et al., 2000) sont en accord avec ceux du composé Cs13. Tandis que pour le cas du 30-hydroxyoléanolique, le carbone C-30 résonne à δ_C 68.6 et le C-29 à δ_C 18.5 (Martinez et al., 2013).

Ces données sont donc en accord avec l'acide 3-*epi*-mesembryanthemoidiginique ou acide 3 α ,29-dihydroxy-oléane-12-ène-28-oïque isolé précédemment sous forme glycosylé à partir d'*Acanthopanax spinosus* (Miyakoshi et al., 1993) et *Acanthopanax senticosus* (Shao et al., 1989).

Les déplacements chimiques de la partie aglycone sont répertoriés dans le tableau III-14.

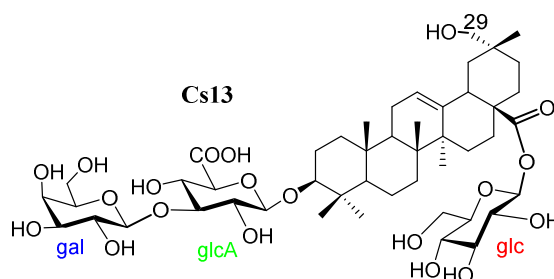
Pour la partie osidique de **Cs13**, les données spectrales sont comparables avec ceux de **Cs7** mais on observe dans **Cs13** un hexose supplémentaire, Cet hexose dont les signaux anomériques à δ_H 4.57 ppm et δ_C 104.2 ppm et quatre carbones osidiques à δ_C 71.7 (C-2'', δ_H 3.62), 73.5 (C-3'', δ_H 3.56), 69.2 (C-4'', δ_H 3.80), 76.0 (C-5'', δ_H 3.58) et 61.5 (C-6'', δ_H 3.69 et 3.80) a été identifié comme étant un β -D-galactose, (Tableau III-10).

A partir des deux protons anomériques résonnant à δ_H 4.42 et 5.40 ppm sont identifiées deux oses comme pour le saponoside **Cs11** :

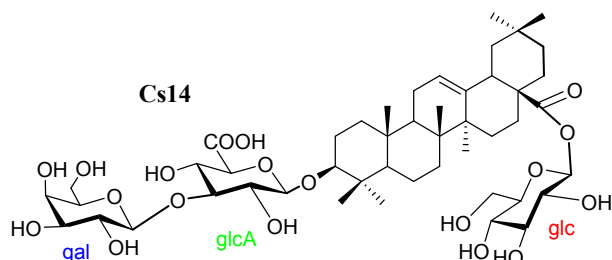
- Un β -D-glucose estérifie l'acide carboxylique en C-28 de la génine comme la montre la tache de corrélation sur le spectre HMBC entre H-1''' (δ_H 5.40) et le carbone C-28 (δ_C 176.8).
- l'acide β -D-glucuronique lié en position 3 de la génine,

Un déblindage remarquable de C-3' (δ_C 85.0) de l'acide glucuronique suggère que l'hexose supplémentaire est lié en cette position de l'acide glucuronique. Ceci est confirmé par les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le proton H-1'' du galactose et le carbone C-3' de l'acide glucuronique, ainsi la chaîne disaccharide [β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcA] est attachée en position 3 de la génine.

Le saponoside **Cs13** est identifié à l'acide 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl-29-hydroxyoléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, un nouveau composé naturel nommé **calendustellatoside E**.



L'analyse combinée des spectres de RMN du composé **Cs14** permet de retrouver les mêmes signaux de la partie osidique décrits pour le saponoside **Cs3** (Tableau III-10) avec l'acide oléanolique comme partie aglycone. Ainsi, le saponoside **Cs14** est identifié à : 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.



Les valeurs des déplacements chimiques (δ_H , δ_C) de la partie génine des saponines **Cs13** et **Cs14** sont répertoriées dans le tableau III-14.

Tableau III-10. Déplacements chimiques en RMN 1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de la partie osidique des composés **Cs13** et **Cs14** dans CD_3OD .

	Cs13 (calendustellatoside E)		Cs14	
	δ_H m (J en Hz)	δ_C	δ_H m (J en Hz)	δ_C
GlcA-à-C-3				
1'	4.42 d (7.1)	105.3	4.45 d (7.9)	105.6
2'	3.45 dd (8.4, 7.1)	73.7	3.44 dd (8.4, 7.9)	73.3
3'	3.63 t (8.4)	85.0	3.59 t (8.4)	85.1
4'	3.64 t (8.4)	70.9	3.62 t (8.4)	70.4
5'	3.69 m	75.8	3.81 d (9.3)	74.9
6'	-	171.9	-	170.8
Gal: gal\rightarrowglcA-				
C-3				
1''	4.57 d (7.7)	104.2	4.52 d (7.8)	104.2
2''	3.62 dd (9.6, 7.7)	71.7	3.60 dd (9.7, 7.8)	71.7
3''	3.56 dd (9.8, 3.4)	73.5	3.50 dd (9.7, 2.9)	73.3
4''	3.80 d (3.4)	69.2	3.80 d (2.9)	69.0
5''	3.58 m	76.0	3.57 dd (7.7,4.2)	75.8
6''	3.69 dd (11.6, 3.8)	61.5	3.68 dd (11.5,4.2)	61.3
	3.80 dd (11.6, 6.8)		3.78 dd (11.5, 7.7)	
Glc : glc\rightarrowC-28				
1'''	5.40 d (8.1)	94.5	5.39 d (8.2)	94.3
2'''	3.33 m	72.7	3.32 m	72.5
3'''	3.44 t (9.1)	77.1	3.41 t (9.2)	76.9
4'''	3.38 t (9.1)	69.9	3.36 t (9.2)	69.7
5'''	3.37 m	77.5	3.35 m	77.3
6'''	3.70 m	61.2	3.68 dd (11.5,4.2)	61.0
			3.82 dm (11.5)	

III.1.1.10. Elucidation structurale du composé Cs15

L'analyse des spectres RMN 1D (^1H et ^{13}C) de **Cs15**, comparativement à ceux de **Cs14**, nous révèle la présence presque des mêmes signaux, auxquels s'ajoutent dans la zone des sucres un quatrième proton anomérique H-1'''' à δ_{H} 4.69 ppm et d'autres signaux appartenant à l'hexose supplémentaire. Le carbone C-1'''' correspondant résonne à δ_{C} 103.1 ppm.

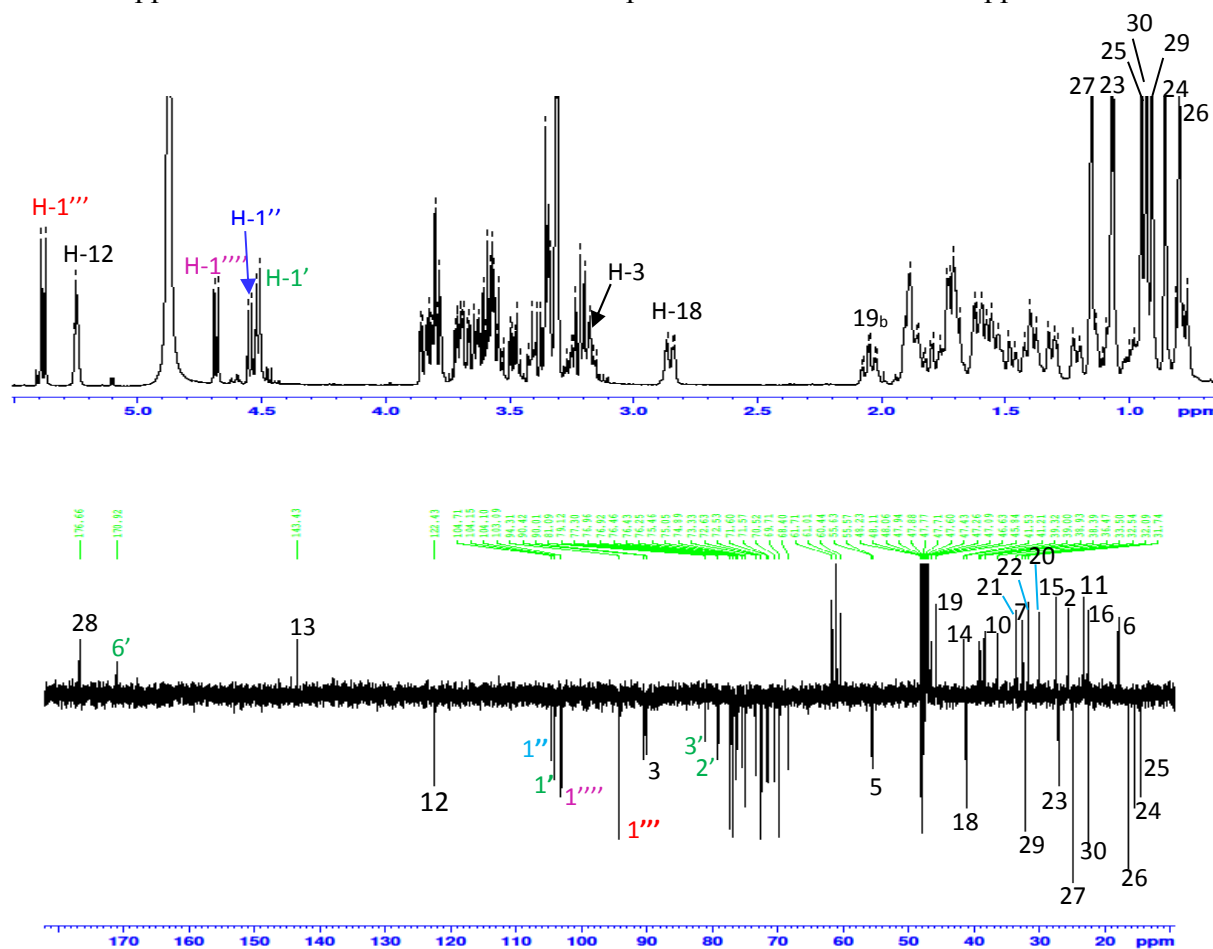


Figure III-49. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C J modulé du composé **Cs15**.

L'analyse des spectres COSY et HSQC permet d'attribuer les sept protons de l'hexose supplémentaire et de l'identifier à un β -D-glucose (**Glc I**).

A partir de l'anomère résonnant à δ_{H} 4.69 et δ_{C} 103.1 ppm, sont attribués les sept protons de l'hexose. Les valeurs des constantes de couplage calculées sur le spectre de RMN ^1H ($J > 8$ Hz) entre tous les protons couplés (Tableau III-11) de cette unité osidique sont caractéristiques d'un β -D-glucopyronose. Ceci est confirmé par l'effet rOe observé sur le spectre ROESY entre les protons H-1''''/ H-3'''' et H-1''''/ H-5'''' de ce glucose.

Le déblindage du carbone C-2' de l'acide glucuronique (δ_C 79.1 ppm) par rapport à celui du **Cs17** (δ_C 73.3 ppm) permet de suggérer que le glucose supplémentaire (**Glc I**) est attaché sur l'acide glucuronique en C-2'. Cette proposition avec le séquençage de ce bisdesmoside sont confirmés par l'analyse du spectre HMBC sur lequel les corrélations suivantes sont observées :

- H-1''' (**Glc I**)/ C-2'(**GlcA**) et H-1'' (**Gal**)/ C-3'(**GlcA**) ;
- H-1' (**GlcA**)/ C-3 de la génine ;
- H-1''' (**Glc**)/ C-28 de la génine.

Le saponoside **Cs15** est l'acide 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-(β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl)-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

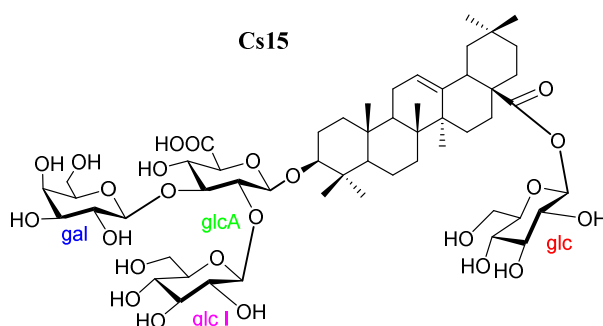


Tableau III-11. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie osidique du **Cs15** dans CD_3OD .

Cs 15					
	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}		δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}
GlcA-à-C-3			Glc I : glc→glcA-C-2		
1'	4.51 d (7.5)	104.1	1'''	4.69 d (7.7)	103.1
2'	3.64 dd (8.6,7.5)	79.1	2'''	3.22 dd (9.2,7.7)	74.9
3'	3.59 dd (9.5,8.6)	81.1	3'''	3.35 t (9.0)	76.3
4'	3.54 t (9.5)	71.6	4'''	3.20 t (9.0)	70.5
5'	3.79 d (9.5)	75.1	5'''	3.25 m	76.9
6'	-	170.9	6'''	3.61 dd (12.1,4.8)	61.7
Gal: gal→glcA-C-3			Glc : glc-à-C-28		
1''	4.55 d (7.6)	104.7	1''	5.38 d (8.1)	94.3
2''	3.59 dd (9.2, 7.6)	72.6	2''	3.33 m	72.5
3''	3.48 dd (9.2, 3.3)	73.3	3''	3.43 t (9.1)	77.0
4''	3.86 d (3.3)	68.4	4''	3.36 t (9.1)	69.7
5''	3.46 m	75.5	5''	3.35 m	77.3
6''	3.68 m	60.4	6''	3.68 dd (12.3,4.6)	61.0
	3.73 dd (11.5, 6.7)			3.81 dd (12.3, 2.7)	

III.1.1.11. Elucidation structurale des composés Cs16 et Cs17

Les deux composés sont obtenus sous forme d'un mélange 55:45, ce sont des monodesmosides de l'acide oléanolique.

L'analyse du spectre de RMN ^1H (Figure III-50) montre la présence de trois protons anomériques résonnant à δ_{H} 4.52, 4.56 et 4.70 ppm, ce qui suggère la présence de trois unités osidiques. Cependant l'examen approfondi des spectres RMN ^1H et ^{13}C permet d'observer un dédoublement des méthyles CH_3 -23 et CH_3 -24 et des carbones C-24 et C-3. Ce qui indique la présence d'un mélange de deux produits. Ceci est confirmé par l'analyse complète de la RMN 2D indiquant que chaque composé comporte deux unités osidiques. Nous détaillerons les principales corrélations qui justifient cette constatation.

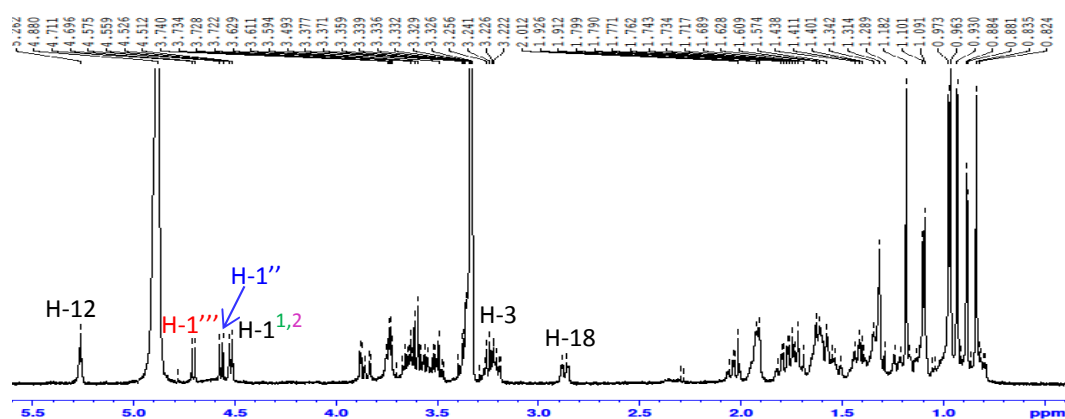


Figure III-50. Spectre de RMN ^1H de composés Cs16+Cs17.

L'examen simultané des spectres COSY (Figure III-51) et HSQC (Figure III-52) a mis en évidence la présence d'un β -D-glucose et un β -D-galactose à partir des protons anomériques résonnant à δ_{H} 4.56 et 4.70 ppm, respectivement.

Sur le spectre COSY, deux taches de corrélation sont observées à partir du proton anomérique à δ_{H} 4.52 ppm, ces deux taches désignées pour les positions 2¹ (δ_{H} 3.58) et 2² (δ_{H} 3.65) de deux hexoses à partir desquelles nous observons les corrélations avec les protons en position 3 (δ_{H} 3.61). Ces derniers corrélent avec H-4 (δ_{H} 3.54) qui sont à leur voient le proton H-5 (δ_{H} 3.74). Les grandes valeurs des constantes de couplage ($J > 9$ Hz) et les valeurs des déplacements chimiques de ses carbones (à l'aide du spectre HSQC) sont caractéristiques de l'acide β -D-glucuronique. Ainsi, deux acides glucuroniques sont identifiés à partir des protons anomériques $\text{H}^{1,2}$ à δ_{H} 4.56 ppm.

glucose et le carbone C-2² (δ_C 79.4) du second acide glucuronique (GlcA²) et entre le proton H-1^{1,2} des acides glucuroniques et les carbones C-3 des acides oléanoliques.

La structure du saponoside **Cs16** est l'acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-oléanolique.

La structure du saponoside **Cs17** est l'acide 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-oléanolique.

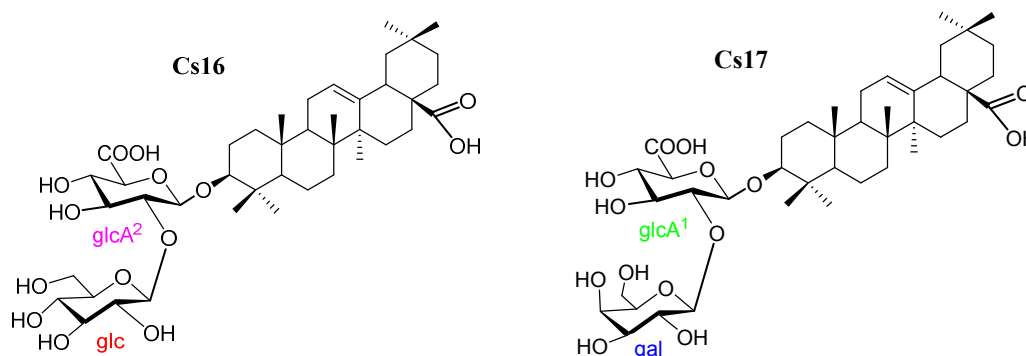


Tableau III-12. Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des saponosides **Cs16** et **Cs17** dans CD₃OD.

	Cs16			Cs17	
	δ_H m (J en Hz)	δ_C		δ_H m (J en Hz)	δ_C
GlcA²-à-C-3			GlcA¹-à-C-3		
1'	4.52 d (7.2)	104.0	1'	4.52 d (7.2)	104.0
2'	3.65 dd (9.4, 7.2)	79.4	2'	3.58 dd (9.4, 7.2)	81.3
3'	3.61 dd (9.4)	76.4	3'	3.61 dd (9.4)	76.4
4'	3.54 t (9.4)	71.8	4'	3.54 t (9.4)	71.8
5'	3.74 m	74.9	5'	3.74 m	74.9
6'	-	170.9	6'	-	170.9
Glc: glc→glcA²-C-2			Gal: gal→glcA¹-C-2		
1'''	4.70 d (7.7)	103.1	1''	4.56 d (7.6)	104.8
2'''	3.24 dd (9.2, 7.7)	74.9	2''	3.61 dd (9.2, 7.6)	72.6
3'''	3.38 t (9.2)	76.4	3''	3.51 dd (9.2, 3.2)	73.4
4'''	3.22 t (9.2)	70.5	4''	3.87 t (3.2)	68.4
5'''	3.27 m	77.0	5''	3.49 m	75.5
6'''	3.64 m	61.7	6''	3.72 m	60.4
	3.84 dd (12.4, 2.4)				

III.1.1.12. Elucidation structurale du composé Cs18

Le spectre de masse HR-ESI-MS de **Cs18** montre un ion moléculaire à $m/z = 995.4838$ indiquant une formule brute $C_{48}H_{76}O_{20}$, qui est identique à celle du saponoside **Cs13**. L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D de **Cs18**, en comparaison avec ceux de **Cs15** montre la présence des mêmes unités osidiques avec un dérivé de l'acide oléanolique comme partie génine.

- **Détermination structurale de la génine V**

Sur le spectre de RMN 1H nous retrouvons les signaux caractéristiques d'un acide oléanolique avec la présence d'un méthine hydroxylé à $\delta_H 4.61$ ppm. De même, sur le spectre de RMN ^{13}C une similitude des signaux est constatée avec ceux de l'acide oléanolique exception faite dans le cycle E dont les déplacements de certaines positions sont plus déblindés.

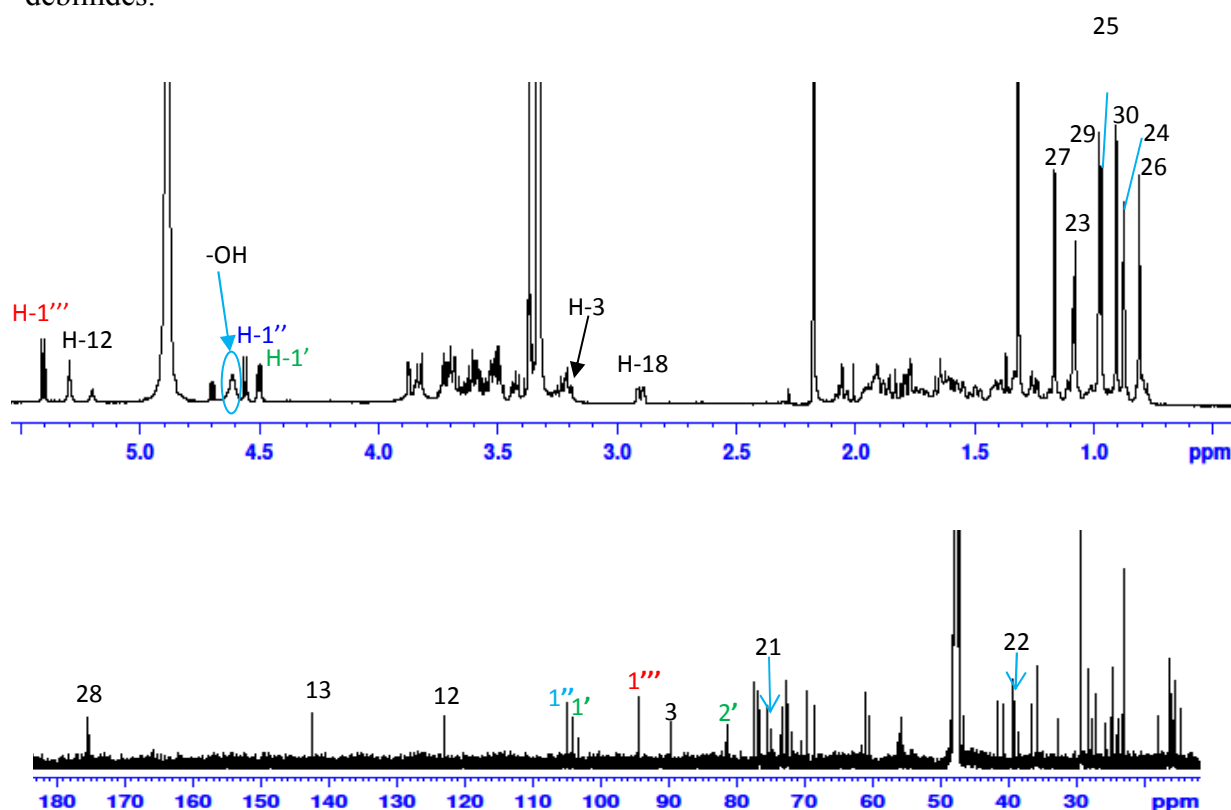


Figure III-53. Spectres de RMN 1H et ^{13}C du composé **Cs18**.

L'examen des spectres COSY et HSQC (figure III-54) permet d'attribuer la plupart des signaux que nous avons déjà détaillé dans les cas des génines précédentes. Le signal du carbone à $\delta_C 72.4$ ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le proton à $\delta_H 3.51$ ppm (d, $J=12.6$,

4.9 Hz) qui corrèle sur le spectre COSY avec les deux protons géminés à δ_H 1.65 et δ_H 1.77 (δ_C 38.9). La disparition des signaux liés à la position 21 de l'acide oléanolique suggère que ce méthine oxygéné est placé sur la génine en cette position et que les deux protons géminés sont attribués au CH₂-22.

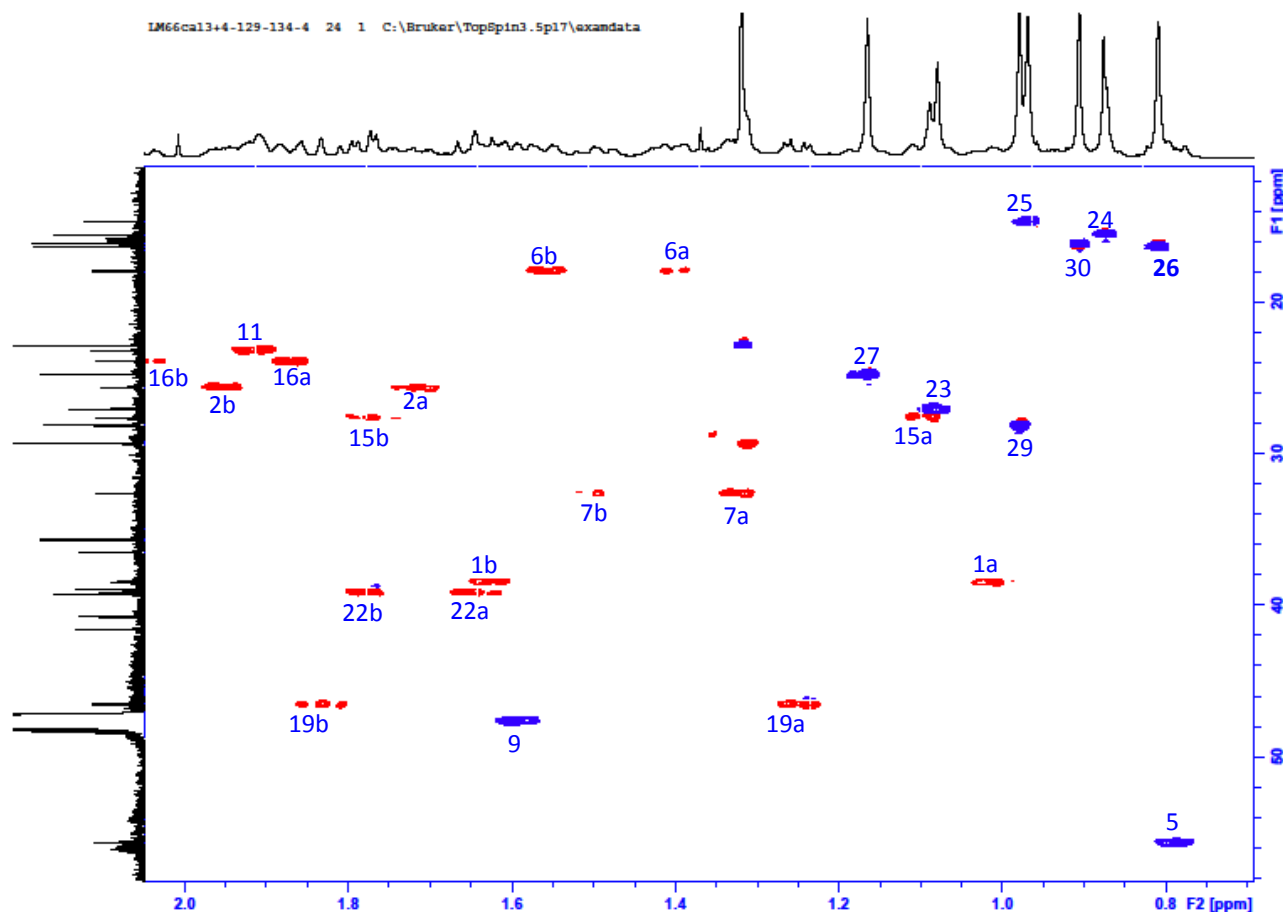


Figure III-54. Spectre HSQC de composés Cs18.

L'emplacement du groupement hydroxyle en position 21 est confirmé grâce à l'analyse de spectre HMBC (Figure III-55-a,b). Sur ce spectre nous visualisons les corrélations à partir des protons des méthyles CH₃-29 (δ_H 28.1) et CH₃-30 (δ_H 16.1) avec les carbones C-19 (δ_C 46.5), C-20 (δ_C 35.7) et C-21 (δ_C 72.4), qui a son tour montre des taches de corrélations avec les deux protons géminés H-19b (δ_H 1.83) et H-19a (δ_H 1.25) et les deux protons H-22eq (δ_H 1.77) et H-22ax (δ_H 1.65) (Figure III-55-b).

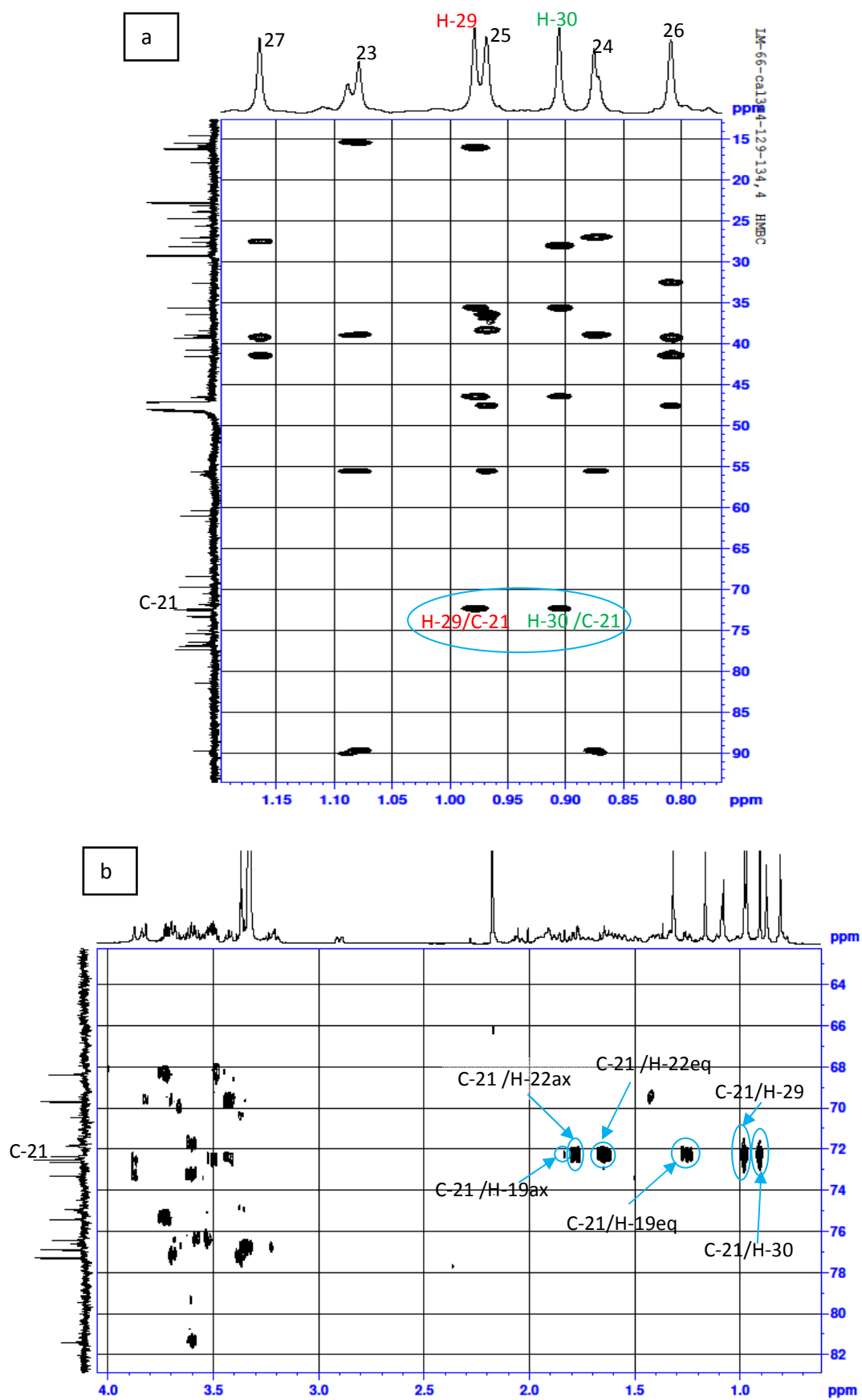


Figure III-55a,b. Spectres HMBC étalés du composés Cs18.

L'orientation β -équatoriale de OH-21 était justifié par la valeur de deux constantes de couplage vicinal différentes de H-21 ($J_{H-21ax,H-22ax} = 12.6$ et $J_{H-21ax,H-22eq} = 4.9$ Hz). Ceci est confirmé par l'effet rOe qu'il présente avec les protons du méthyle α -équatoriale CH₃-29 sur le spectre ROESY (Figure III-56). Les valeurs des déplacements chimiques de la partie aglycone du **Cs18** sont en accord avec l'acide machaerinique (acide $3\beta,21\beta$ -dihydroxyoléan-12-ène-28oïque) qui a été déjà trouvé sous forme glycosylé (Günter et al., 2000 ; Yochikawa et al., 1998).

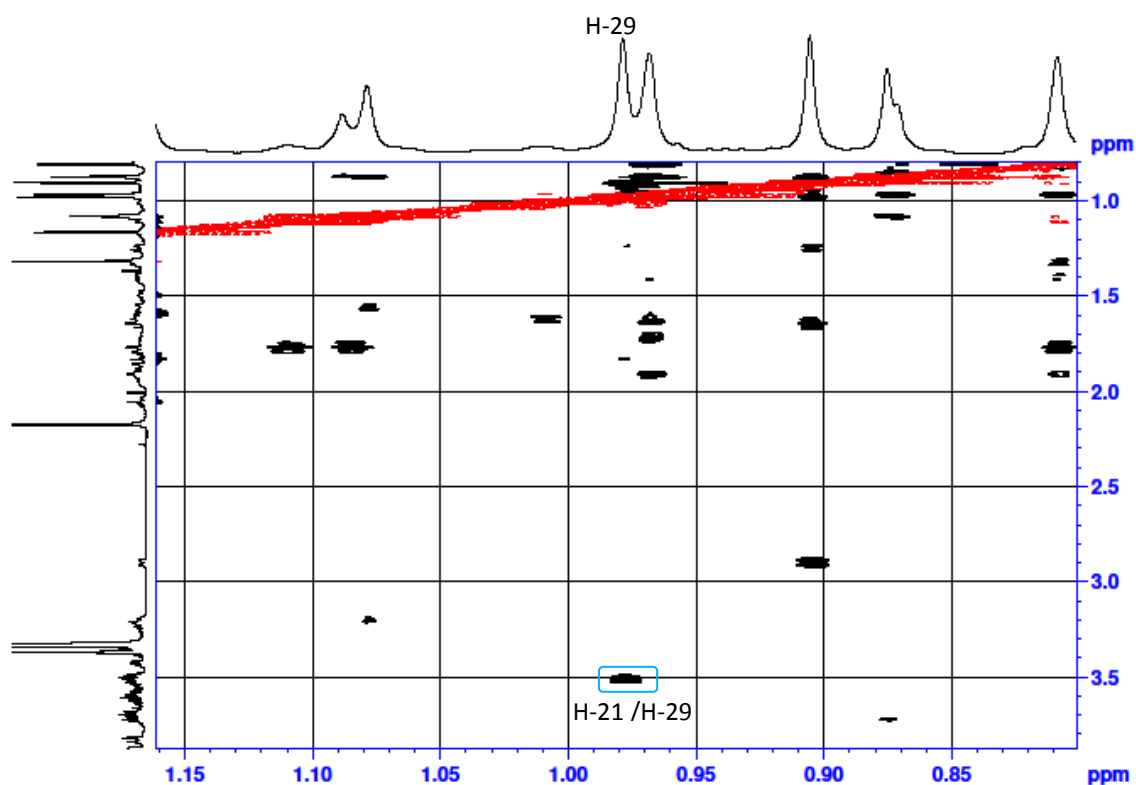


Figure III-56. Spectre ROESY de composés **Cs18**.

Dans la partie osidique nous retrouvons les trois sucres (GlcA, Gal et Glc) (Tableau III-13) comme dans le cas des saponosides **Cs13** et **Cs15**. Le glucose ($\delta_{H-1''} 5.41$, $\delta_{C-1''} 94.4$) estérifie l'acide carboxylique en C-28 de la génine et le galactose ($\delta_{H-1''} 4.56$, $\delta_{C-1''} 104.8$) est attaché en position 2 de l'acide glucuronique ($\delta_{H-1'} 4.50$, $\delta_{C-1'} 104.0$). Cette chaîne disaccharide [β -D-Gal-(1 \rightarrow 2)- β -D-GlcA] est engagé dans une liaison éther avec l'hydroxyle en C-3 de la génine.

La structure complète du saponoside **Cs18** est l'acide 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-machaerinique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester, isolé précédemment à partir d'*Achyranthes aspera* Linn (Amaranthaceae) (Günter et al., 2000).

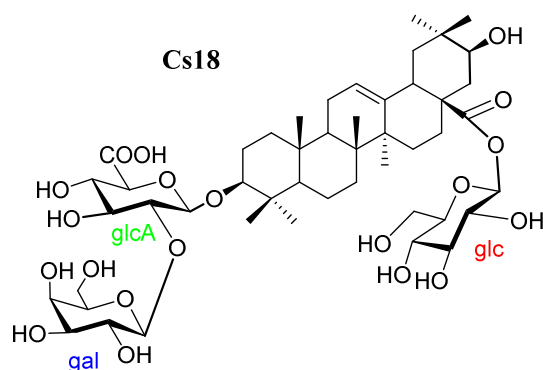


Tableau III-13. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) du saponoside **Cs18** dans CD_3OD .

Cs18					
	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	
Partie génine					
1	0.98 m	38.4	24	0.88 s	15.5
	1.62 m		25	0.97 s	14.6
2	1.72 td (14.0,4.4)	25.6	26	0.81 s	16.3
	1.95 m		27	1.16 s	24.7
3	3.20 dd (11.5,4.5)	89.7	28	-	176.0
4	-	38.9	29	0.98 s	28.1
5	0.79 dm(12.0)	55.6	30	0.91 s	16.1
6	1.41 td (13.4,3.5)	17.9	Partie osidique		
	1.56 m		GlcA: glA-à-C-3		
7	1.33 m	32.6	1'	4.50 d (7.2)	104.0
	1.51 td (14.1,4.1)		2'	3.57 dd (8.4, 7.2)	81.4
8	-	39.3	3'	3.60 t (8.4)	76.4
9	1.59 m	47.3	4'	3.53 t (8.4)	71.9
10	-	36.5	5'	3.69 m	75.0
11	1.92 m	23.2	6'	-	172.9
	5.30 t (3.4)	122.9	Gal: gal→glc-c-2		
12	-	142.4	1''	4.56 d (7.7)	104.8
13	-	41.5	2''	3.61 dd (9.3,7.7)	72.7
14	1.10 m	27.6	3''	3.50 dd (9.3,3.2)	73.3
15	1.77 td (13.3,4.4)		4''	3.88 d (3.2)	68.4
	1.86 m	23.9	5''	3.49 m	75.4
16	2.05 td (13.3,3.6)		6''	3.73 m	60.4
	-	47.7		3.74 dd (11.3,4.9)	
17	2.88 dd (14.1, 3.8)	40.7	Glc: glc→C-28		
18	0.98 m	38.4	1'''	5.41 d (8.1)	94.4
19	1.25 dd (14.1, 4.5)	46.5	2'''	3.34 m	72.5
	1.83 t (14.1)		3'''	3.43 t (8.8)	76.9
20	-	35.7	4'''	3.37 t (8.8)	69.7
21	3.51 dd (12.6, 4.9)	72.4	5'''	3.36 m	77.3
22	1.65 t (12.6)	39.1	6'''	3.69 dd (11.2,3.6)	61.0
	1.77 m				
23	1.08 s	27.1			

Tableau III-14. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C de la partie génine des saponosides **Cs10-Cs17** dans CD₃OD.

	Cs10	Cs11	Cs12	Cs13	Cs14	Cs15	Cs16+Cs17	
	δ_{H} m (ν en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (ν en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (ν en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (ν en Hz)	δ_{C}
1	1.03 m 1.65 m	38.5 25.6	1.01 td (13.5,3.4) 1.63 m	38.3 25.6	0.98 td (13.5,3.3) 1.62 m	38.4 25.6	1.01 m 1.63 dd m	38.4 25.6
2	1.72 m 1.91 m	25.6 89.7	1.84 m 3.21 dd (11.7,4.6)	25.6 89.7	1.69 m 1.82 m	25.6 89.8	1.72 m 1.93 m	25.6 89.8
3	3.20 dd (11.6,3.5)	89.7	3.07 dd (12.1,4.1)	89.6	3.20 dd (11.7,4.6)	89.8	3.20 dd (12.1,4.1)	89.8
4	-	39.8	-	38.8	-	38.7	-	39.0
5	0.81 m	55.7	0.68 m	55.6	0.83 d (13.1)	55.6	0.81 dm (11.9)	55.6
6	1.41 m	17.9	1.30 td (13.3,3.6)	17.9	1.45 td (13.1,3.5)	17.9	1.42 m	17.9
7	1.58 m 1.37 m	32.9	1.45 m	32.5	1.59 m	32.6	1.58 m	32.6
8	1.55 m	40.1	1.21 m	39.3	1.33 m	39.3	1.51 m	39.2
9	1.67 m	47.8	1.38 dd (12.5,3.5)	47.7	1.53 m	47.3	-	47.7
10	-	36.5	1.47 m	36.5	1.62 m	36.5	1.61 m	36.5
11	1.92 m	23.1	1.79 m	23.2	-	23.2	1.92 m	23.1
12	5.33 t (3.5)	122.3	5.15 t (3.5)	122.3	1.92 m	122.7	5.26 t (3.5)	122.3
13	-	144.4	-	143.4	5.26 t (3.3)	143.4	-	144.0
14	-	41.2	-	41.3	-	41.5	-	41.5
15	1.39 m 1.90 m	34.9	0.97 m	27.4	1.10 m	27.5	1.11 m	27.4
16	4.55 br s	73.5	1.70 td (14.2,3.8)	22.7	1.82 m	22.6	1.80 td (14.5,4.4)	22.7
17	-	47.7	1.62 dd (12.1,4.4)	46.6	1.74 m	47.7	1.62 m	48.2
18	3.02 dd (13.0,3.4)	40.7	1.95 td (13.1,3.5)	41.2	2.06 td (13.2,3.7)	41.2	2.87 dd (13.8,3.2)	41.3
19	1.07 m	46.9	2.87 dd (13.2,3.7)	45.8	2.90 dd (13.8,3.6)	45.8	1.15 m	45.8
20	2.31 t (13.0)	29.9	1.15 m	30.2	1.12 m	30.1	1.72 t (13.8)	30.2
21	1.18 m 1.95 m	35.0	1.72 t (13.2)	33.5	1.83 t (13.8)	33.5	-	33.5
22	1.78 m	30.4	1.23 dm (13.4)	32.2	1.71 td (13.8,4.2)	31.7	1.42 td (13.9,4.0)	32.4
23	1.96 m	27.1	1.40 m	39.1	1.62 m	31.7	1.56 m	32.4
24	0.88 s	15.6	1.57 m	27.0	1.72 m	27.0	1.76 td (13.7,4.5)	27.1
25	0.99 s	14.7	1.77 td (14.1,4.1)	27.1	1.05 s	27.0	1.09 s	27.1
26	0.82 s	16.4	1.08 s	15.5	0.85 s	15.5	0.88 s	15.5
27	1.39 s	25.9	0.86 s	14.5	0.97 s	14.6	0.97 s	14.5
28	-	177.1	0.97 s	16.3	0.82 s	16.3	0.84 s	16.3
29	0.91 s	31.9	1.18 s	24.7	1.19 s	24.9	1.18 s	25.0
30	0.97 s	23.6	1.92 s	176.7	3.21 br s	176.6	-	173.8
			0.96 s	22.7	0.93 s	22.5	0.91 s	32.2
			0.83 s	22.5	0.93 s	22.5	0.96 s	22.6

III.1.2. Elucidation structurale des flavonoïdes Cs19 et Cs20

Le spectre de RMN ^1H (Figure III-57) de **Cs19** montre les signaux caractéristiques d'un flavonol (3-OR) disubstitué sur le cycle B, qui apparaissent comme suit :

- Un doublet à δ_{H} 7.74 d'intégration 1H ($J= 2.0$ Hz) (couplage *meta*) attribuable à H-2'.
- Un doublet de doublets à δ_{H} 7.49 d'intégration 1H ($J= 8.4, 2.0$ Hz) (couplage *ortho* et *mé*ta) attribuable à H-6'.
- Un doublet à δ_{H} 6.77 d'intégration 1H ($J=8.4$ Hz) (couplage *ortho*) attribuable à H-5'.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun ($J= 2.0$ Hz) indicateur d'un couplage *mé*ta, le premier à δ_{H} 6.30, le second à δ_{H} 6.10 attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.

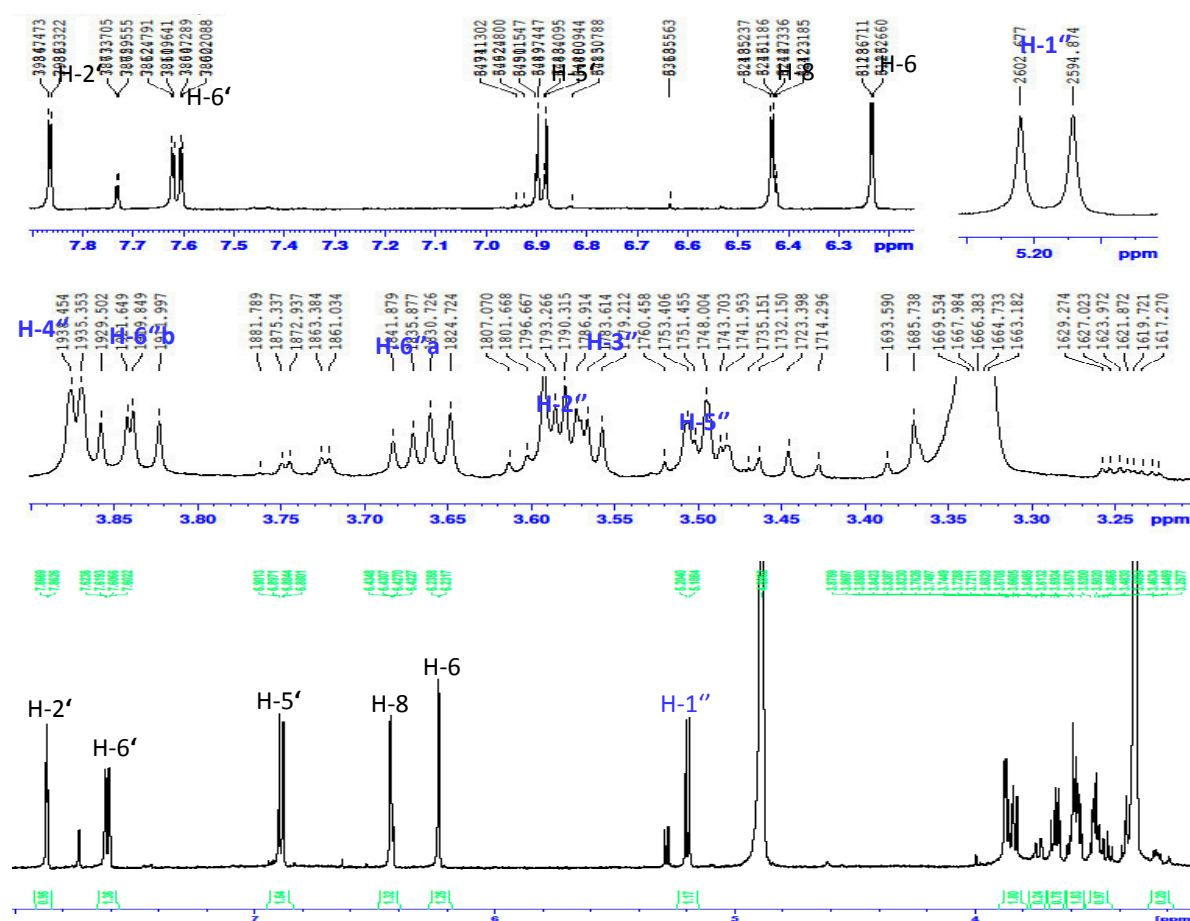
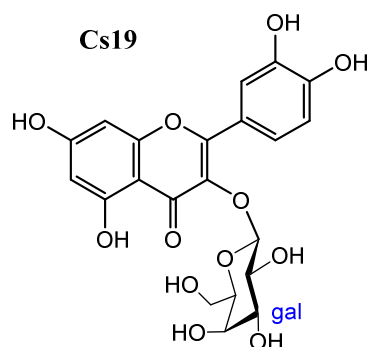


Figure III-57. Spectres de RMN ^1H du composé **Cs19**.

L'analyse combinée des spectres de RMN 2D (HSQC, HMBC) de **Cs19** permet d'attribuer tous les carbones correspondant à la quercétine substituée en position 3, les valeurs de déplacements chimiques sont en accord avec les données de la littérature (Mabry et al., 1970).

En plus des signaux de la quercétine, le spectre de RMN ^1H de **Cs19** présente un doublet à δ_{H} 5.38 ($J= 7.8$ Hz) caractéristique du proton anomérique d'un hexose ainsi que de ses autres protons qui résonnent entre 3 et 4 ppm. La constante de couplage ($J= 7.8$ Hz) observée pour le proton anomérique montre une liaison de configuration β entre le sucre et la génine. Cet hexose est identifié à un β -D-galactose à l'aide des spectres 2D (HSQC, HMBC et COSY) comme dans le cas des saponines **Cs1** et **Cs2**. La tâche de corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique de ce galactose et le carbone C-3 (δ_{C} 133.9) indique qu'il est attaché en cette position.

Le composé **Cs19** est la quercétine-3-*O*- β -D-galactopyranoside (hyperine) (Pereira al., 2012).



Le spectre de RMN ^1H du produit **Cs20** (Figure III-58) permet d'observer la même séquence des signaux caractéristiques de la quercétine substituée en position 3 avec des signaux supplémentaires.

- La présence d'un groupement méthoxy est déduite depuis le signal intégrant pour trois protons à δ_{H} 3.98 ppm (d, $J= 9.3$ Hz) dont le carbone correspondant résonne à δ_{C} 55.5 ppm, d'après le spectre HSQC.

- Un doublet apparaissant à δ_{H} 5.06 ppm (d, $J= 7.6$ Hz) et un autre à δ_{H} 4.54 ppm (d, $J= 1.5$ Hz) ont été attribués aux protons anomériques d'un β -D-galactose et d'un α -L-rhamnose, respectivement (Tableau III-15).

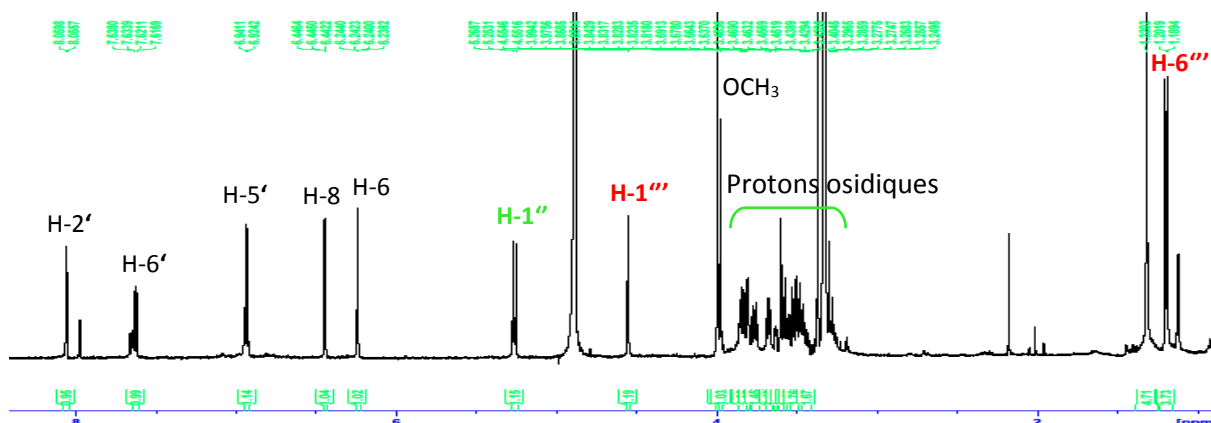


Figure III-58. Spectre de RMN ^1H du composé Cs20.

A partir du proton supplémentaire H-1''' (δ_{H} 4.5), un système à huit protons a été identifié. L'analyse des spectres COSY (Figure III-59) et HSQC permet de les attribuer, le proton H-2''' est localisé à δ_{H} 3.60 (δ_{C} 70.7) qui corrèle avec H-3''' à δ_{H} 3.50 (δ_{C} 70.9), lui-même couple avec H-4''' à δ_{H} 3.30 (δ_{C} 72.5). Ce dernier et les protons CH₃-6''' (résonnant sous forme d'un doublet intégrant pour trois protons à δ_{H} 1.31 (δ_{C} 29.3) corrélient avec H-5''' à δ_{H} 3.55 (δ_{C} 68.3). Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de ce 6-désoxyhexose indiquent qu'il s'agit d'un α -L-rhamnose.

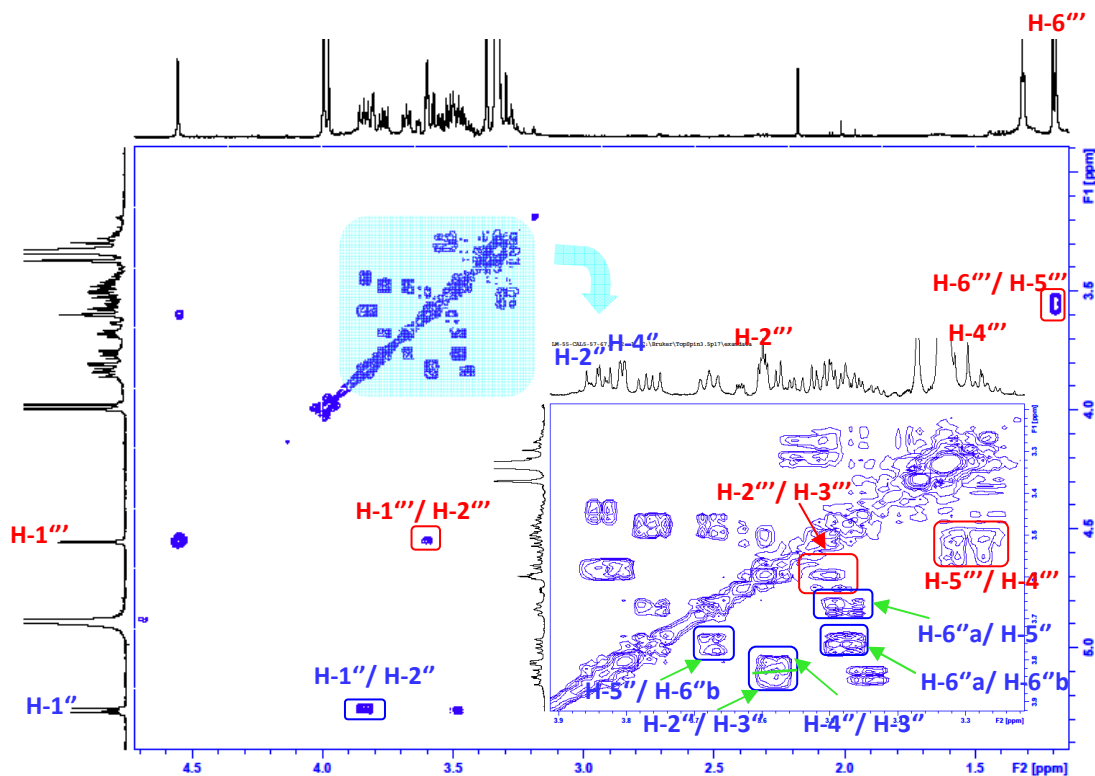


Figure III-59. Spectre COSY du composé Cs20.

Le déblindage de C-6'' (δ_C 66.0) du galactose par rapport à celui de **Cs19** permet de supposer que le rhamnose est lié en position 6'' de ce galactose. Ceci est confirmé par la corrélation observée sur le spectre HMBC entre H-1''' du rhamnose et C-6'' du galactose. Le proton anomérique de ce dernier montre également une tache de corrélation avec le carbone C-3 de la quercétine. Sur le même spectre, l'emplacement du groupement méthoxy en position C-3' du cycle B est déduit depuis la corrélation observée entre les protons du méthoxy et le carbone C-3'.

Le flavonoïde **Cs20** est le 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl-isorhamnetine (Figure III-76) (Buracheva et al., 1975 ; Labeled et al., 2016).

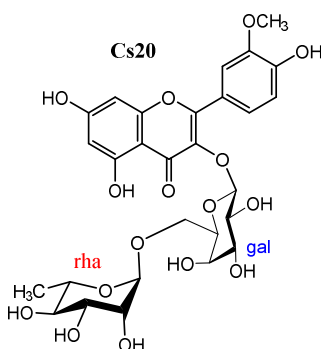


Tableau III-15. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des flavonoïdes **Cs19** et **Cs20** dans CD_3OD .

	Partie génine				Partie osidique				
	Cs19		Cs20		Cs19		Cs20		
	δ_H m (<i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H m (<i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H m (<i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H m (<i>J</i> en Hz)	δ_C	
					Gal : gal-à-C3				
2	-	156.7	-	157.5	1''	5.38 d (7.8)	102.2	5.25 d (7.8)	103.5
3	-	133.9	-	134.5	2''	3.57 t (8.9)	71.6	3.83 dd (9.7, 7.8)	71.7
4	-	177.6	-	177.4	3''	3.36	73.6	3.58 dd (9.7, 3.4)	73.6
5	12.63 s/ (OH)	161.3		164.5	4''	3.65 d/ (2.5)	68.3	3.80 d/ (3.4)	68.6
6	6.20 d (2.0)	99.1	6.23 d (2.0)	98.5	5''	3.31	76.3	3.67 m	74.1
7	-	164.6	-	164.4	6''	3.28	60.5	3.48 dd (10.2, 5.6)	66.0
8	6.41 d (2.0)	94.0	6.44 d (2.0)	93.4		3.44		3.76 m	
9	-	156.7	-	156.8					
10	-	104.2	-	104.1	Rha : rha-→gal-C-6				
1'	-	121.5	-	122.3	1'''			4.54 d (1.5)	100.5
2'	7.53 d (2.2)	116.3	8.05 d (2.0)	113.2	2'''			3.60 m	70.7
3'	-	145.1	-	147	3'''			3.50 m	70.9
4'	-	149.0	-	149.5	4'''			3.30 t (9.5)	72.4
5'	6.82 d (8.5)	115.6	6.93 d (8.5)	114.6	5'''			3.55 m	68.3
6'	7.67 dd (8.5, 2.2)	122.4	7.62 dd (8.5 2.0)	122.4	6'''			1.31 d (6.3)	29.3
OMe	-	-	3.98 d (9.3)	55.54					

Chapitre 2

Identification des produits isolés
de *Scabiosa stellata* L.

Étude phytochimique de *Scabiosa stellata*

Toutes les parties de la plante de *S. stellata* réduites en poudre sèche (653 g) ont été soumises au même protocole d'extraction que la plante *C. stellata*. La poudre est extraite par une solution hydroalcoolique à 70%, l'extrait brut obtenu (118 g) a été soumis à une chromatographie sur colonne (CC) de résine diaion HP-20, en utilisant le même gradient H₂O-MeOH, conduisant à cinq fractions (A-E). Les fractions B, C, D et E ont été exploitées, et la purification de ces dernières a été effectuée par flash chromatographie ou par CLHP semi-préparative (voir section matériel et méthodes), ce qui a conduit à l'isolement de vingt-trois composés Ss (21-43) (Figure III-60 a, b).

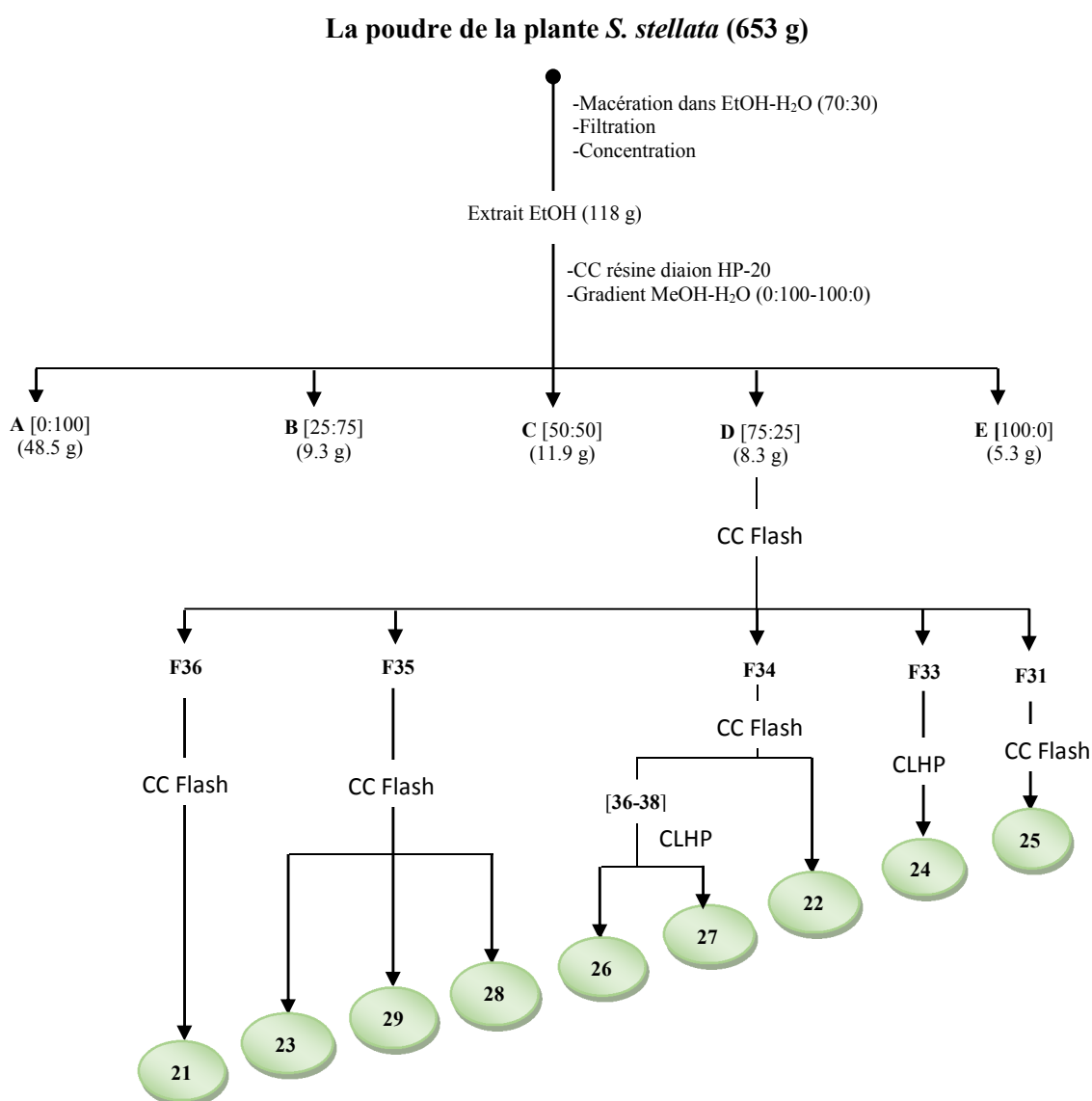


Figure III-60a. Schéma d'extraction et de purification des saponines de *Scabiosa stellata*.

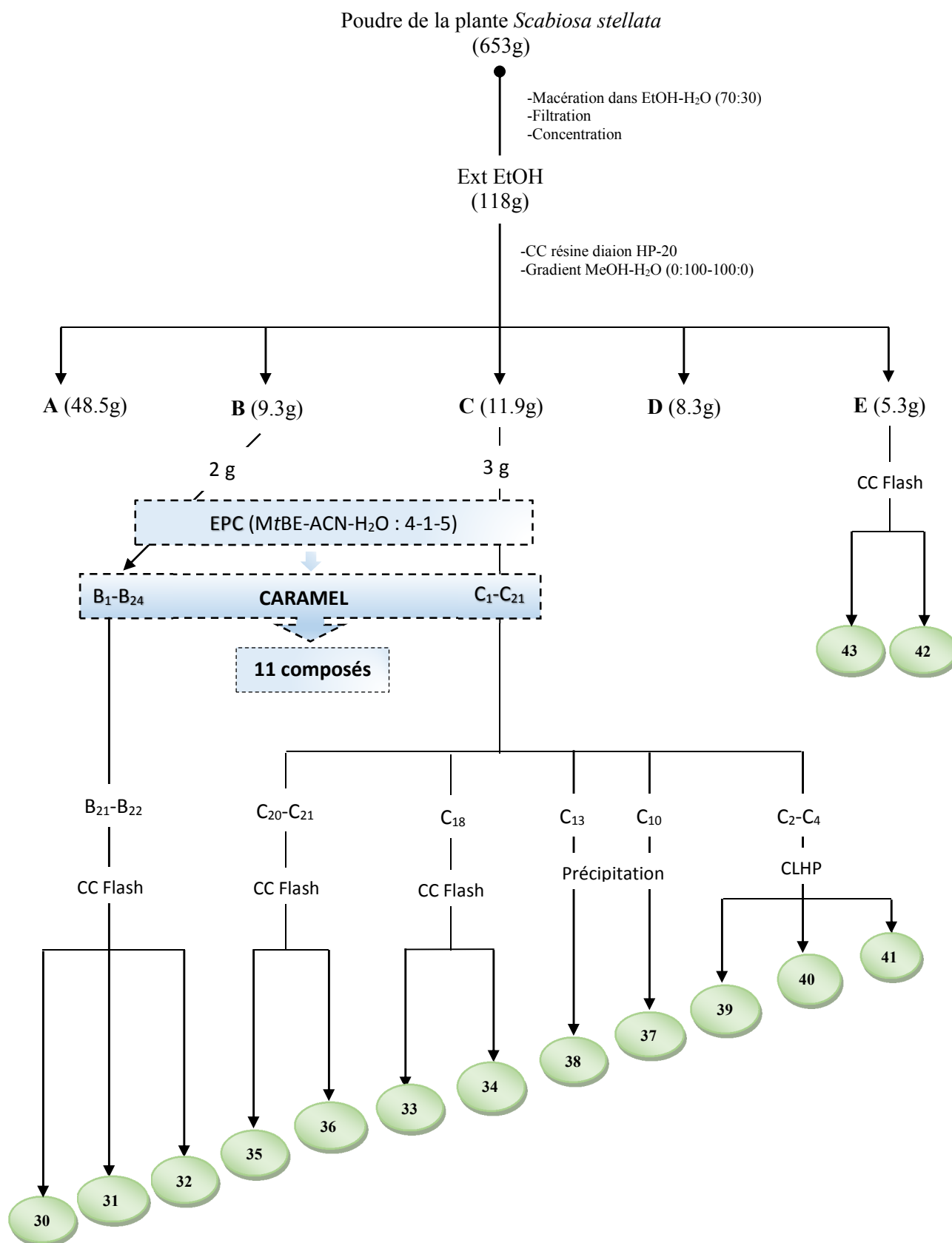
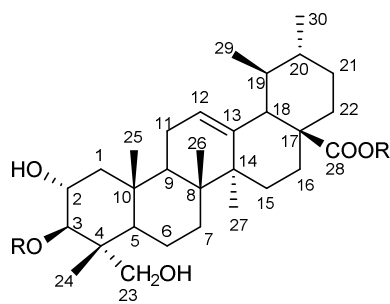


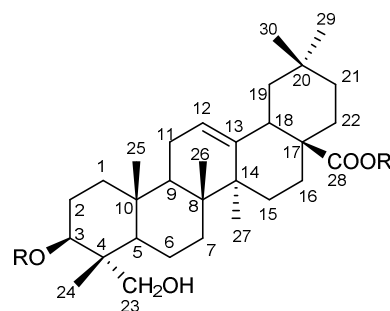
Figure III-60b. Schéma d'extraction et de purification des composés de *Scabiosa stellata*.

III.2.1. Détermination structurale des saponosides de *Scabiosa stellata*

Neuf saponines **Ss(21-29)** dont huit sont de structures nouvelles ont été isolées à partir de la fraction **D** de l'extrait hydroéthanolique de *Scabiosa stellata*. Ces saponines sont des bidesmosides (glycosilation en positions 3 et 28) et un seul monodesmoside (**Ss26**). Trois génines sont retrouvées dans les saponines obtenues : l'acide oléanolique, l'hédéragénine et l'acide asiatique.

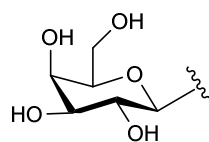
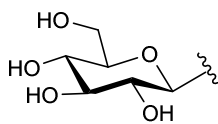
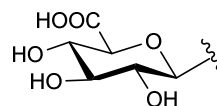
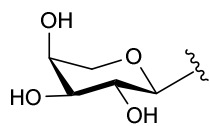
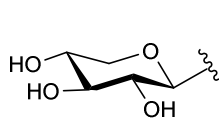
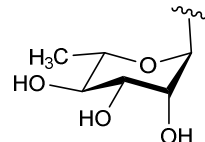


Acide asiatique



Hédéragénine

Plusieurs types d'unités osidiques sont identifiés dont le glucose, le galactose et l'acide glucuronique déjà caractérisés dans les saponosides de *Calendula stellata*, en plus de l'arabinose, xylose et le rhamnose. L'hydrolyse acide de la fraction **D** (25:75%) a conduit à l'obtention du rhamnose et de l'arabinose de configuration absolue L et au xylose de configuration absolue D.

 β -D-galactose β -D-glucoseAcide β -D-glucuronique α -L-arabinose β -D-xylose α -L-rhamnose

III.2.1.1. Elucidation structurale des composés **Ss21** et **Ss22**

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS du composé **Ss21** présente un pic d'ion pseudo- moléculaire à m/z 995.4822 $[M+Na]^+$, soit une formule $C_{48}H_{76}O_{20}Na$ (calculé 995.4828), identique à celle du saponoside **Cs18** obtenu dans l'espèce *Calendula stellata*.

L'examen des spectres de RMN ^1H et ^{13}C (Figure III-61) de ce composé en comparaison avec ceux de **Cs18** indique que le **Ss21** est également un bidesmoside avec trois unités osidiques. Ce qui est déduit à partir des valeurs des déplacements chimiques des signaux caractéristiques C-3 (δ_{C} 82.6), C-28 (δ_{C} 176.7) et des carbones anomériques C-1', C-1'' (δ_{C} 103.1) et C-1''' (δ_{C} 94.3). Cependant, la disparition du signal d'un méthyle sur le spectre RMN ^1H et l'apparition d'un signal correspond à un CH_2OH (δ_{C} 63.3) sur le spectre RMN ^{13}C suggère l'hydroxylation d'un méthyle cette fois-ci.

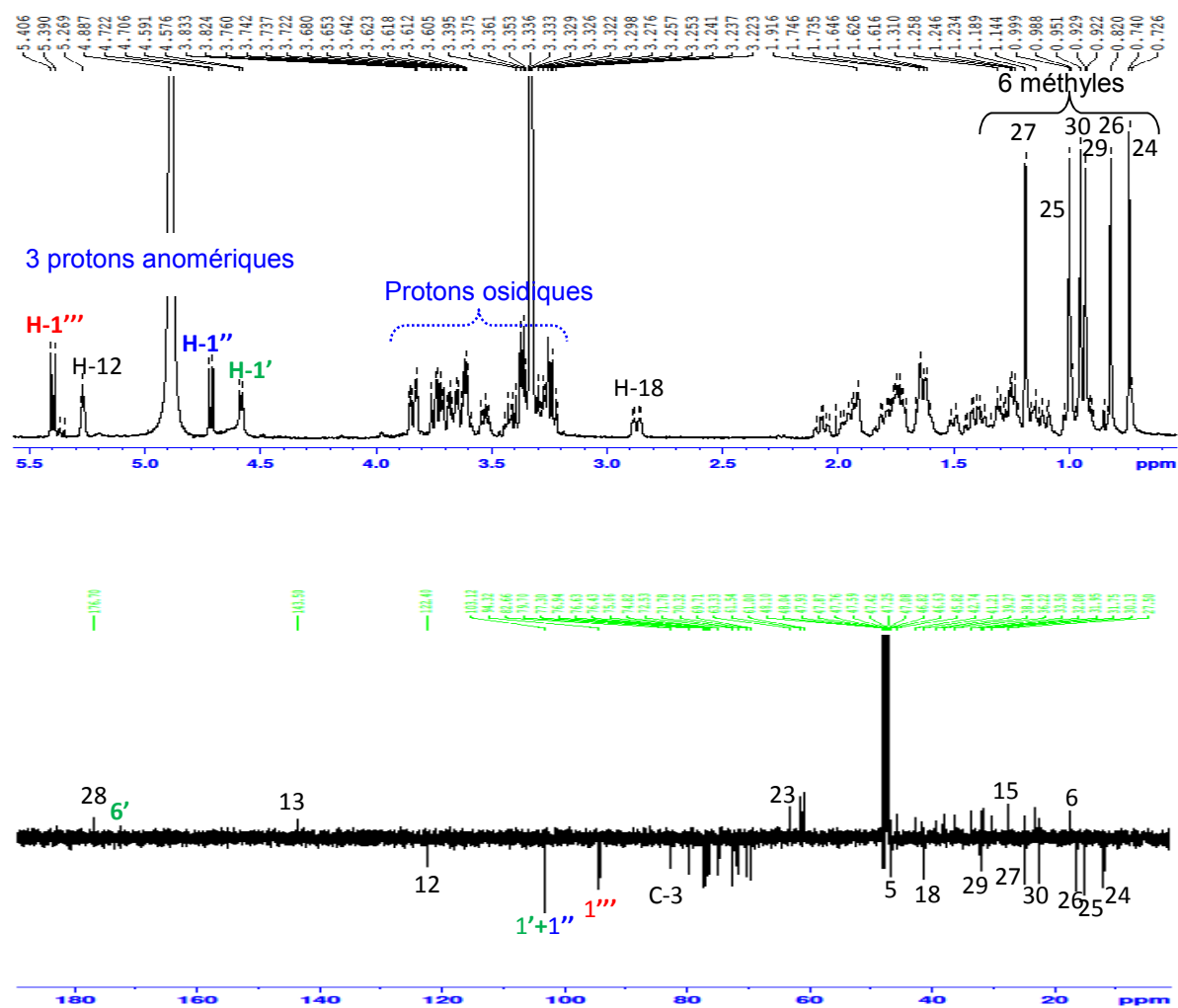


Figure III-61. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé du composé **Ss21**.

L'analyse des spectres de RMN 2D indique que le méthyle CH_3 -23 est oxydé en alcool primaire. Sur le spectre HMBC (Figure III-63), les carbones C-3, C-4 (δ_{C} 42.7) et C-5 (δ_{C} 46.8) corrélient avec le méthyle situé à δ_{H} 0.75 attribuable au CH_3 -24 (δ_{C} 11.9), qui à son tour donne une tache de corrélation avec le carbone CH_2OH -23 à δ_{C} 63.3. Cette attribution est confirmée par l'observation d'effet rOe entre les protons des méthyles 24, 25 et 26 et entre H-23b, H-3 et H-5 (Figure III-62).

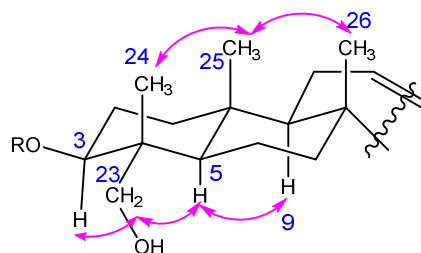


Figure III-62. Corrélations ROESY du saponoside Ss21.

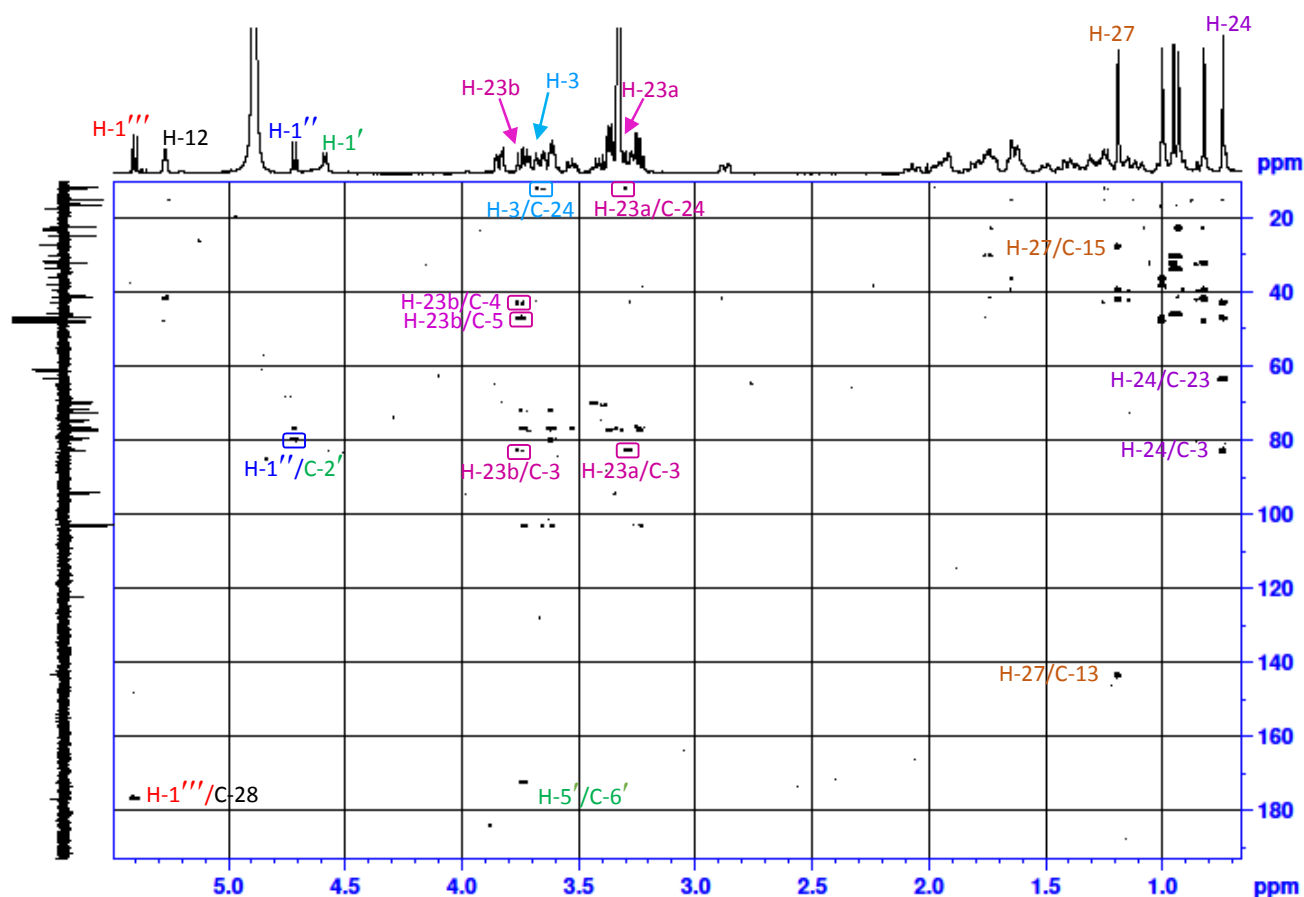


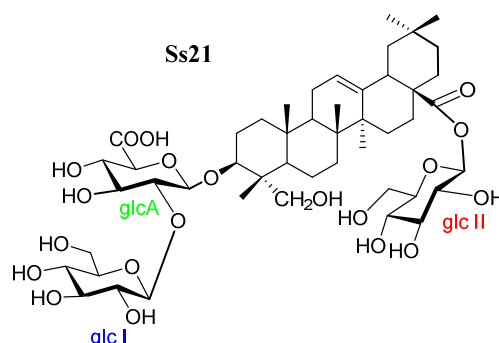
Figure III-63. Spectre HMBC du saponoside Ss21.

L'emplacement du groupement hydroxyle en position 23 est aussi établi à l'aide des données disponibles dans la littérature qui permettent de distinguer entre les deux cas (CH₂OH en 23 ou 24) facilement. Ainsi, dans le cas de 24-hydroxyoléanolique (acide brédemolique), le carbone C-24 résonne à δ_C 63.3 et le C-23 à δ_C 22.6 (Udayama et al., 1998). Alors que pour le 23-hydroxyoléanolique (l'hédéragénine), les déplacements chimiques des carbones C-23 (δ_C 63.5) et C-24 (δ_C 13.1) (Rezgui et al., 2016) sont en accord avec ceux du composé Ss21.

Comme mentionné plus haut, dans la partie osidique nous retrouvons trois sucres (GlcA, Glc I et Glc II) (Tableau III-17). L'analyse des expériences COSY, ROESY, HSQC *J*-modulé et HMBC a conduit à l'identification d'une unité d'acide β -D-glucuronique à partir du proton anomérique H-1' à δ_{H} 4.58 (d, $J=7.5\text{Hz}$). Les données de RMN ^{13}C montrent le déblindage de C-2' de l'acide β -D-glucuronique (δ_{C} 79.7) indiquant qu'il est substitué en cette position. Les unités de sucre identifiées à partir des protons anomériques H-1'' et H-1''' à δ_{H} 4.71 (d, $J=7.7\text{Hz}$) et δ_{H} 5.40 (d, $J=8.1\text{Hz}$) correspondant à deux unités β -D-glucopyranose (Glc I et Glc II, respectivement).

Le glucose (**Glc II**) estérifie l'acide carboxylique en C-28 de la génine et le glucose (**Glc I**) est attaché en position 2' de l'acide glucuronique. Cette chaîne disaccharide [β -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-GlcA] est liée en C-3 de la génine comme montre les taches de corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-63).

Ainsi, le saponoside **Ss21** est identifié au 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (Ming et Dian.,2002)



Le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif de **Ss22** montre un ion pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à m/z 1157.5363 correspondant à une formule brute $\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{O}_{25}$ (calculée pour $\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{O}_{25}\text{Na}$, 1157.5356). Cette masse indique la présence d'un hexose supplémentaire dans **Ss22**, comparativement au saponoside précédent (**Ss21**).

L'analyse des spectres RMN 1D (^1H et ^{13}C) de **Ss22** (Figure III-64), par comparaison à ceux de **Ss21**, nous révèlent la présence des mêmes signaux, auxquels s'ajoutent dans la zone des sucres un signal correspondant au quatrième proton anomérique H-1'''' à δ_{H} 4.36 (d, $J=7.8\text{Hz}$) (δ_{C} 102.8) et d'autres résonances appartenant à l'hexose supplémentaire.

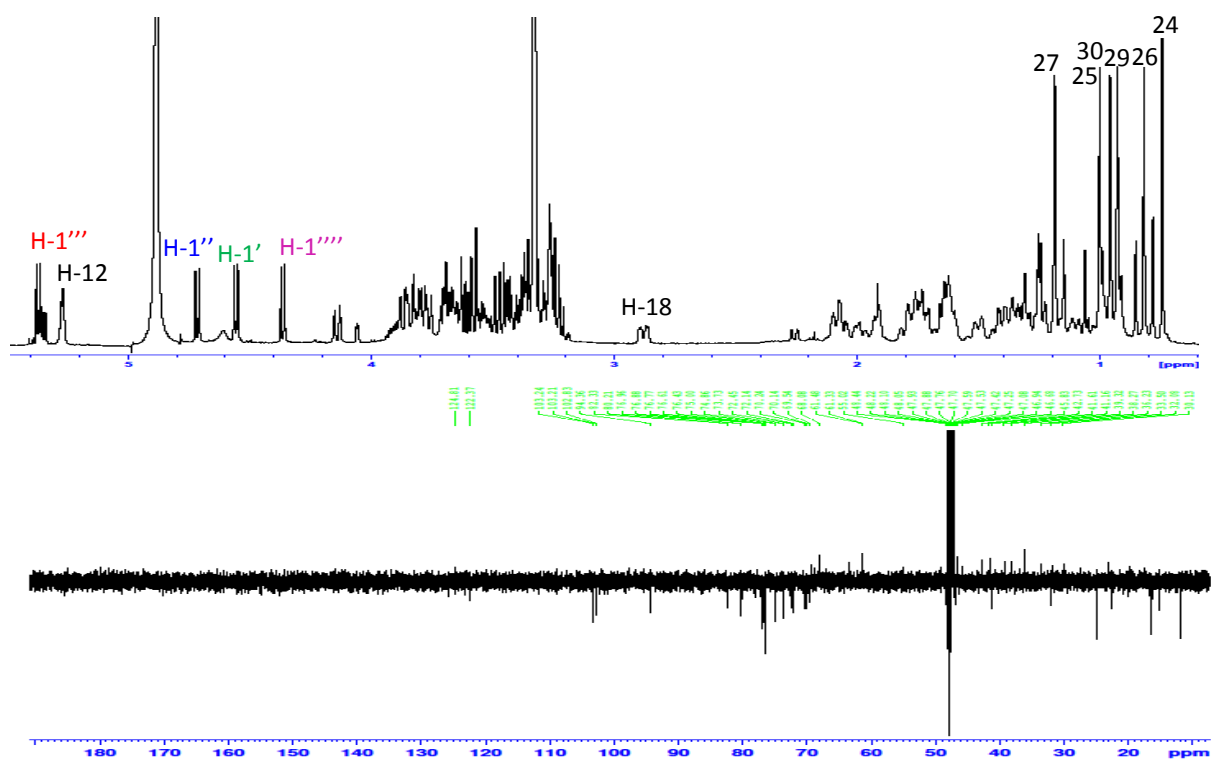


Figure III-64. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé Ss22.

Les signaux caractéristiques de 3-28 bidesmoside de l'hédéragénine avec quatre unités osidiques sont caractérisés à l'aide de l'examen complet des spectres de RMN 2D. L'analyse des spectres COSY, TOCSY et ROESY (Figure III-65) permet d'attribuer les sept protons de l'hexose supplémentaire et de l'identifier à un β -D-glucose (**Glc III**).

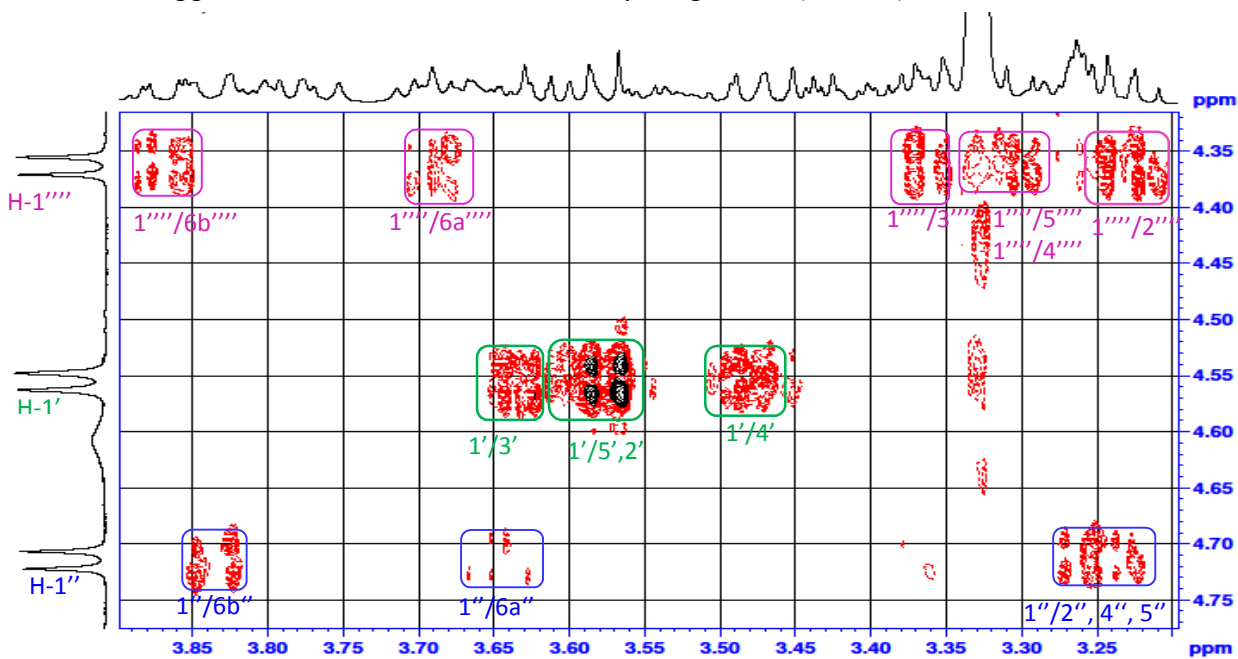
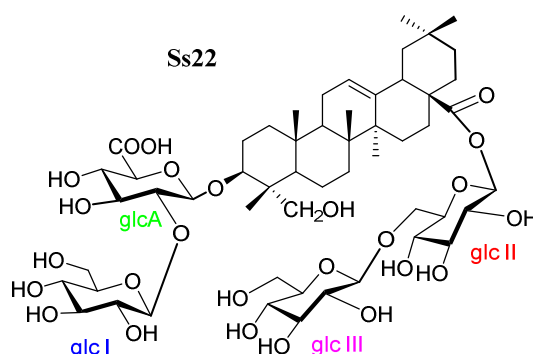


Figure III-65. Spectre TOCSY du composé Ss22 (zone des sucres).

Le déblindage du carbone C-6''' du glucose (**Glc II**) (δ_C 68.1) par rapport à celui du **Ss21** (δ_C 61.0) permet de suggérer que le glucose supplémentaire (**Glc III**) est attaché sur cette position (C-6'''). Cette proposition avec le séquençage de ce bidesmoside sont confirmés par l'analyse du spectre HMBC sur lequel les corrélations de la partie osidique de **Ss21** sont retrouvées, en plus de la corrélation entre H-1''''/C-6'''.

Le saponoside **Ss22** est la 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-hédéragénine-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester. C'est un nouveau composé naturel nommé **scabiostellatoside G**.



III.2.1.2. Elucidation structurale du composé Ss23

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS mode positif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 995.4836 $[M+Na]^+$ correspondant à une formule brute $C_{48}H_{76}O_{20}$ (calculée 995.4828).

L'analyse combinée des spectres de RMN 1D et 2D de cette molécule, nous a conduit à un dérivé de noyau ursane caractérisé par les éléments suivants :

- La présence de deux méthyles secondaires CH_3 -29 (δ_H 0.92, d, $J=6.3$ Hz) et CH_3 -30 (δ_H 0.99, d, $J=6.3$ Hz), en plus de quatre méthyles tertiaires CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -26 et CH_3 -27 à δ_H 0.78, 1.07, 0.87 et 1.15 ppm (s), respectivement.
- Le signal du proton H-18 sous forme d'un doublet à δ_H 2.26 (d, $J=11.4$ Hz) est un indicateur d'un noyau ursane.

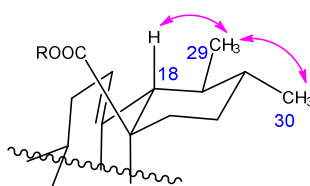


Figure III-66. Corrélation ROESY de l'acide asiatique (cycle E d'un noyau ursane).

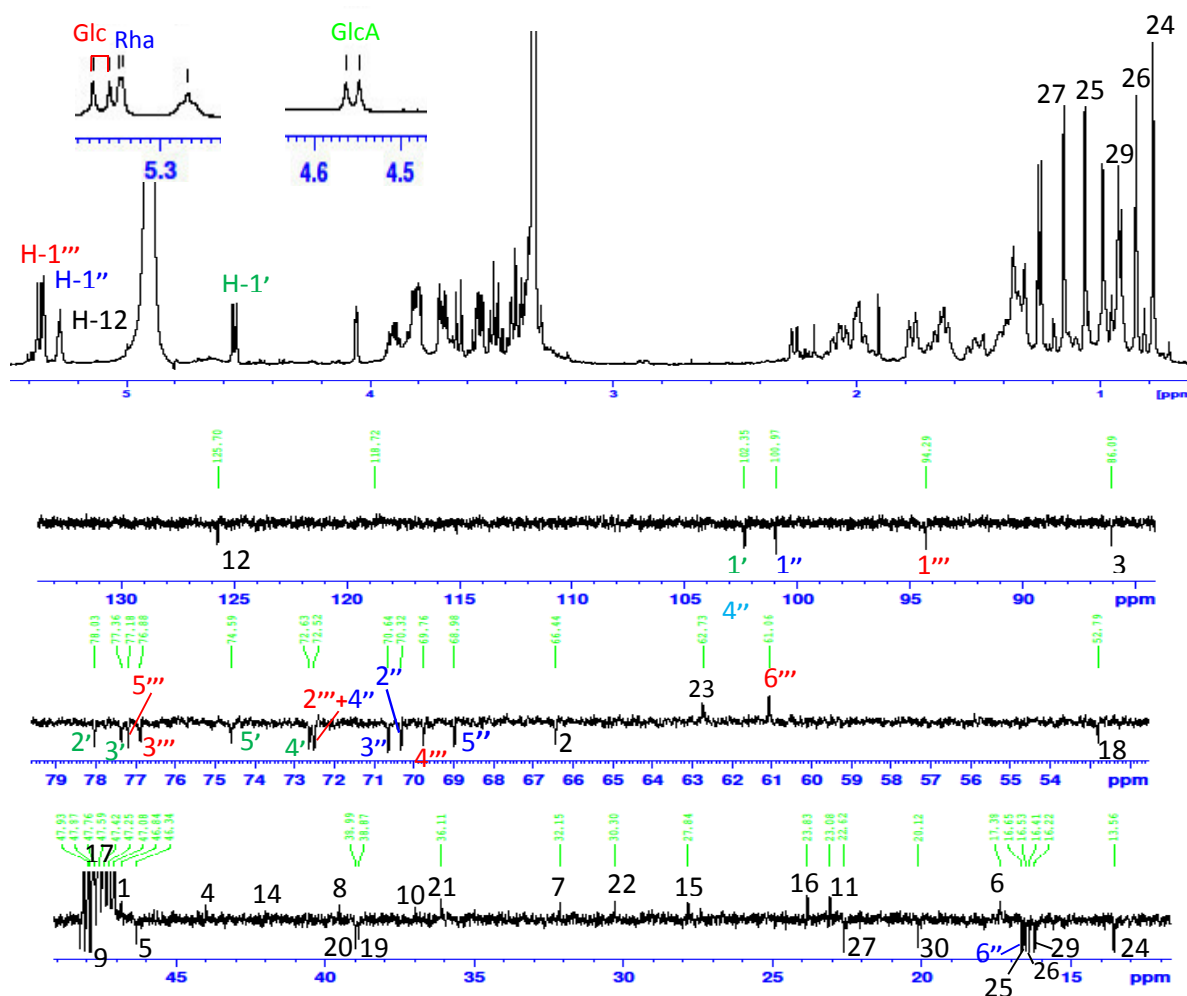


Figure III-67. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé de Ss23.

- Une paire de protons méthylène oxygéné sont également observés à δ_{H} 3.30 et 3.70 (d, $J = 11.8$ Hz, CH_2 -23). Cette paire de protons corrèle dans le spectre HSQC avec un carbone à δ_{C} 62.7 (C-23). L'emplacement de l'hydroxyle en 23 est déduit par l'observation dans le spectre ROESY des corrélations entre H-3, H-5 et $\text{H}_{\text{a,b}}$ -23 et entre les méthyles CH_3 -24 et CH_3 -25 (Figure III-68).

- Le proton H-3 résonnant sous la forme d'un doublet à δ_{H} 3.54 ppm (d, $J=9.5$ Hz) indique une substitution en position C-2. La présence d'une fonction alcool secondaire en C-2 est déduite des déplacements chimiques de C-2 à δ_{C} 66.4 ppm et de H-2 (δ_{H} 3.82). La valeur de la constante de couplage entre H-2 et H-3 ($J=9.5$ Hz) est révélatrice d'une position trans-diaxiale entre ces derniers.

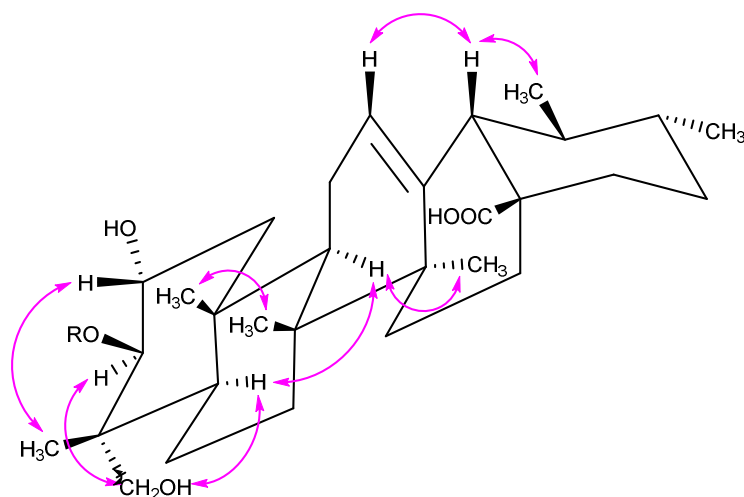
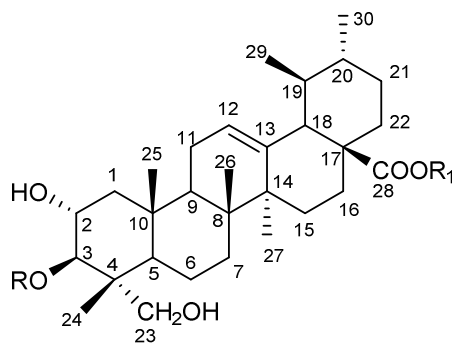


Figure III-68. Corrélation ROESY de l'acide asiatique.

Toutes ces informations comparées avec les données bibliographiques sont caractéristiques de l'acide asiatique (Acebey-Castellon et al., 2011).



Acide asiatique

D'autre part, trois unités osidiques sont caractérisées par les signaux des anomères H-1' à δ_H 4.55 (d, $J=7.5$ Hz), H-1'' à 5.34 (d, $J=1.6$ Hz) et H-1''' à 5.37 (d, $J=8.1$ Hz). Les carbones correspondants corrént à δ_C 102.4, 101.0 et 94.3, respectivement.

L'analyse des corrélations sur le spectre COSY de **Ss23** nous permet d'identifier un système de spin à huit protons à partir du proton anomérique H-1'' résonnant à δ_H 5.34 qui corréle avec le proton H-2'' (δ_H 4.06, dd, $J= 3.1-1.6$ Hz). Ce dernier donne une corrélation avec le proton H-3'' (δ_H 3.81, dd, $J= 9.2-3.1$ Hz) qui à son tour couple avec le proton H-4'' (δ_H 3.40, t, $J= 9.2$ Hz). Ce dernier présente une corrélation avec le proton H-5'' (δ_H 3.91, dq, $J= 9.5-6.3$ Hz) qui corréle lui-même avec un doublet intégrant pour trois protons (δ_H 1.25, d, $J= 6,3$ Hz) indiquant la présence d'un 6-désoxyhexose. Les valeurs des constantes de couplage indiquent une configuration transdiaxiale des protons H-3'', H-4'' et H-5'' ($J_{H3''-H4''}=J_{H4''-H5''}= 9.2$ Hz) et une position équatoriale des protons H-1'' et H-2'' ($J_{H1''-H2''}= 1.6$ Hz, $J_{H2''-H3''}=3.3$ Hz) caractéristiques

d'un α -L-rhamnose. A l'aide du spectre ROESY, la configuration α est confirmée par un effet rOe observé entre les protons H-1"/H-2" et l'absence d'effets rOe entre les protons H-1"/H-5". Les déplacements chimiques des carbones de ce sucre (Tableau III-17) attribués sont en accord avec un α -L-rhamnose en position terminale (Zheng et al., 2004).

L'analyse des corrélations observées sur le spectre COSY à partir des deux autres doublets anomériques H-1' et H-1''' nous indique la présence d'un β -D-glucuronopyranose et un β -D-glucopyranose respectivement.

L'enchaînement des unités osidiques ainsi que le point d'ancrage des sucres sur la génine sont élucidés grâce à l'analyse du spectre ROESY. Des effets rOe sont observés entre les protons H-1'/H-3 et H-2'/H-1" suggérant que l'acide glucuronique est relié à la génine et qu'il est substitué en position 2' par le rhamnose. Ceci est confirmé par l'analyse du spectre HMBC sur lequel nous distinguons les corrélations suivantes :

- H-1' de l'acide glucuronique (**GlcA**)/ C-3 de la génine (δ_c 86.1).
- H-1" du rhamnose (**Rha**)/ C-2' de l'acide glucuronique (**GlcA**) (δ_c 78.1).
- H-1''' du glucose (**Glc**)/ C-28 de la génine (δ_c 176.7).

L'ensemble de nos données nous permettent d'identifier le saponoside **Ss23** à l'acide 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-asiatique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**scabiostellatoside H**), identifié pour la première fois.

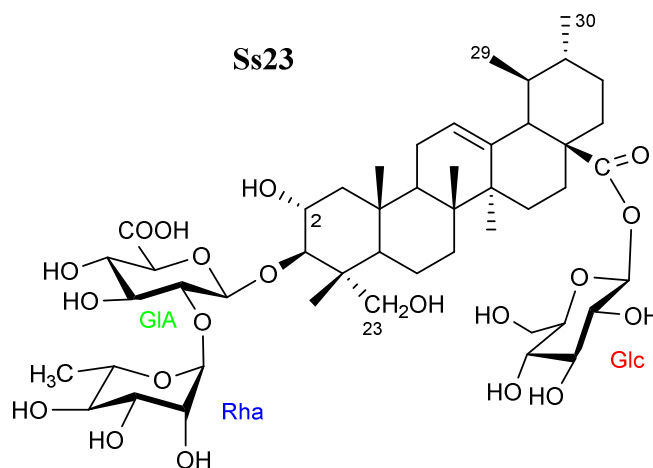


Tableau III-16. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) de la partie génine des composés **Ss21**, **Ss22** et **Ss23** dans CD_3OD .

	Ss21		Ss22		δ_{C}	Ss23	
	δ_{H} m (J en Hz)		δ_{H} m (J en Hz)			δ_{H} m (J en Hz)	
1	0.98 m	38.1	0.98 m	38.1		0.92 m	46.8
	1.63 m		1.62 m			2.05 td (11.1,4.2)	
2	1.78 m	25.0	1.78 m	25.1		3.82 m	66.4
	1.97 m		1.97 m				
3	3.66	82.6	3.66 dd (11.5, 3.7)	82.3		3.54 d (9.5)	86.1
4	-	42.7	-	42.7		-	44.1
5	1.25 m	46.8	1.25 m	47.1		1.35 m	46.3
6	1.39 m	17.5	1.39 m	17.5		1.36 m	17.4
	1.50 m		1.49 m			1.49 m	
7	1.29 m	31.9	1.29 m	32.0		1.31 m	32.2
	1.60 m		1.60 m			1.70 td (13.5,3.5)	
8	-	39.2	-	39.3		-	39.4
9	1.65 m	47.9	1.64 m	47.9		1.63 m	47.7
10	-	36.2	-	36.2		-	37.2
11	1.92 m	23.1	1.92 m	23.2		1.99 m	23.8
12	5.27 t (3.6)	122.4	5.27 t (3.4)	122.4		5.27 t (3.4)	125.7
13	-	143.5	-	143.5		-	137.1
14	-	41.2	-	41.2		-	42.1
15	1.10 m	27.5	1.11 m	27.5		1.11 m	27.8
	1.80 m		1.80 m			1.98 td (13.3,4.2)	
16	1.73 m	22.6	1.73 m	22.6		1.78 dt (13.0,4.2)	23.1
	2.07 td (13.5,3.9)		2.07 m			2.10 td (13.0,4.2)	
17	-	46.6	-	46.6		-	47.5
18	2.87 dd (14.3,4.3)	41.2	2.87 dd (14.1, 4.3)	41.2		2.26 d (11.4)	52.8
19	1.17 m	45.8	1.28 m	45.8		0.98 m	38.9
	1.73 m		1.73 m				
20	-	30.1	-	30.1		1.41 m	39.0
21	1.23 m	33.5	1.23 m	33.5		1.37 m	30.3
	1.41 td (13.8,4.1)		1.40 m			1.52 td (13.1,4.1)	
22	1.62 m	31.7	1.62 m	31.8		1.66 m	36.1
	1.74 m		1.73 m			1.78 dt (13.0,4.2)	
23	3.29 d (11.2)	63.3	3.27 d (11.2)	63.4		3.30 d (11.8)	62.7
	3.75 d (11.2)		3.75 d (11.2)			3.70 d (11.8)	
24	0.75 s	11.9	0.72 s	12.0		0.78 s	13.6
25	1.00 s	15.0	1.00 s	15.2		1.07 s	16.7
26	0.82 s	16.4	0.82 s	16.5		0.87 s	16.5
27	1.19 s	24.9	1.19 s	25.0		1.15 s	22.6
28	-	176.7	-	175.7		-	176.7
29	0.93 s	32.0	0.92 s	32.1		0.92 d (6.3)	16.2
30	0.95 s	22.5	0.95 s	22.6		0.99 d (6.3)	20.1

Tableau III-17. Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des composés **Ss21**, **Ss22** et **Ss23** dans CD₃OD.

	Ss21 δ_H m (J en Hz)		Ss22 δ_H m (J en Hz) δ_C		Ss23 δ_H m (J en Hz)	
glcA à C-3						
1'	4.58 d (7.5)	103.1	4.56 d (7.5)	103.3	4.55 d (7.5)	102.4
2'	3.60 dd (9.1,7.5)	79.7	3.57 dd (9.0,7.5)	80.2	3.49 dd (9.4,7.5)	78.0
3'	3.62 t (9.1)	76.6	3.63t (9.0)	76.9	3.56 t (9.4)	77.4
4'	3.53 t (9.1)	71.8	3.47 t (9.0)	72.1	3.47 t (9.4)	72.6
5'	3.73 d (9.1)	75.0	3.58 d (9.0)	74.9	3.64 d (9.4)	75.0
6'	-	172.5		176.2		176.5
glc/rha	glc à glcA-C-2		glc à glcA-C-2		rha à glcA-C-2	
1''	4.71 d (7.7)	103.1	4.71 d (7.7)	103.2	5.34 d (1.6)	101.0
2''	3.24 t (8.3)	74.8	3.22dd (7.7, 8.3)	74.8	4.06 dd (3.1,1.6)	70.3
3''	3.37 t (8.3)	76.4	3.36 m	76.4	3.81 dd (9.2,3.1)	70.6
4''	3.24 t (8.3)	70.3	3.23 t (8.5)	70.3	3.40 t (9.2)	69.8
5''	3.68 m	76.9	3.25 t (8.3)	76.9	3.91 dq (9.5,6.3)	69.0
6''	3.63 m	61.5	3.65 m	61.5	1.25 d (6.3)	16.7
	1.84 dd (12.0,2.1)		3.82 dd (12.0,2.1)			
GlcI à C-28						
1'''	5.40 d (8.1)	94.3	5.37 d (8.1)	94.3	5.37 d (8.1)	94.3
2'''	3.34 m	72.5	3.32 m	72.5	3.34 m	72.5
3'''	3.42 t (8.7)	76.9	3.43 t (8.4)	76.4	3.42 t (8.7)	76.9
4'''	3.37 t (8.7)	69.7	3.43 t (8.4)	70.3	3.38 t (8.7)	69.8
5'''	3.36 m	77.3	3.52 m	76.9	3.34 m	77.2
6'''	3.70 dd (12.0,1.2)	61.0	3.77 m	68.1	3.71 dd (12.0,1.2)	61.1
	3.83 dd (12.0,3.8)		4.14 dd (12.2,1.6)		3.82 dd (12.0,3.8)	
glcII à glc-C-6						
1''''			4.36 d (7.8)	102.8		
2''''			3.39 m	72.5		
3''''			3.34 t (8.4)	76.4		
4''''			3.35 m	70.3		
5''''			3.52 m	76.9		
6''''			3.69 m	61.5		
			3.88 dd (12.2,1.2)			

III.2.1.3. Elucidation structurale des composés **Ss24** et **Ss25**

Ces composés sont des glycosides de l'acide oléanolique dont la partie aglycone a été traité précédemment. Par conséquent, l'analyse structurale sera effectuée uniquement sur la partie osidique qui est formée de six sucres.

*a- Étude des spectres du composé **Ss24***

Le composé **Ss24** montre dans le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 1359.6548 $[M + Na]^+$ ($C_{64}H_{104}O_{29}Na$, calc. 1359.6561), suggérant une formule moléculaire $C_{64}H_{104}O_{29}$. L'analyse du spectre de masse présente des ions fragments à m/z :

- 1213 $[M + Na-146]^+$ dû à la perte d'un 6-désoxyhexose.

- 1081 [M + Na-146-132]⁺ dû à la perte d'un 6-désoxyhexose et un pentose.
- 1035 [M + Na-162-162]⁺ dû à la perte de deux hexoses.
- 935 [M + Na-2×146-132]⁺ dû à la perte de deux 6-désoxyhexoses et un pentose.
- 804 [M + Na-2×146-2×132]⁺ dû à la perte de deux 6-désoxyhexoses et deux pentoses.

Ce premier constat indique la présence de six unités osidiques ce qui est confirmé par l'analyse du spectre de RMN ¹H (Figure III-69), dont six protons anomériques résonnent à δ_H 4.36 (d, J=7.8), 4.39 (d, J=7.1), 4.48 (d, J=7.7), 5.20 (d, J= 1.7), 5.37 (d, J= 8.0) et 5.39 (d, J= 1.7). A l'aide de l'expérience HSQC, les carbones respectifs sont localisés à δ_C 103.2, 105.0, 105.1, 101.1, 94.4 et 99.9 ppm (Figure III-70).

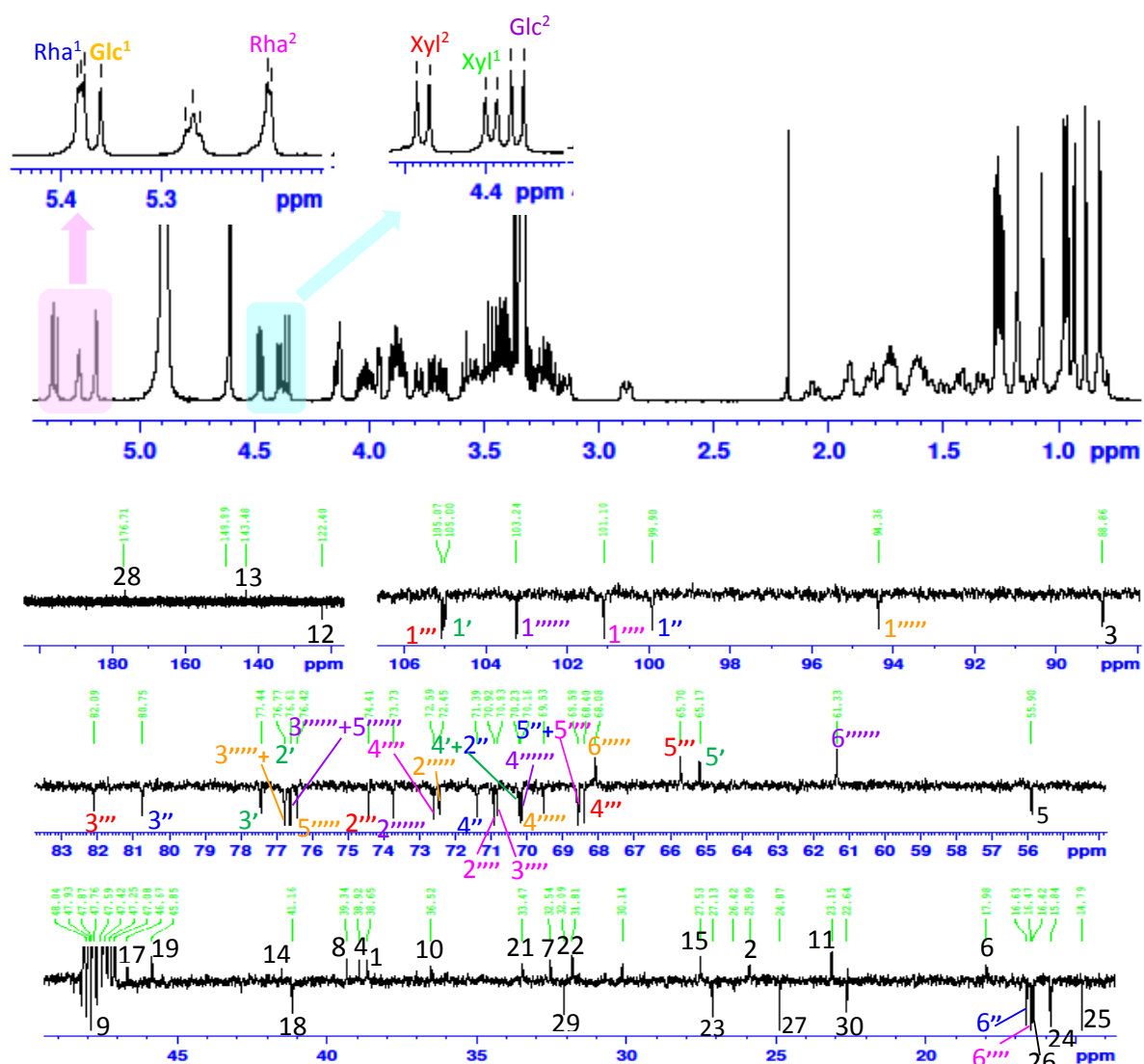


Figure III-69. Spectres de RMN ¹H et ¹³C J-modulé de Ss24.

L'analyse des spectres COSY, TOCSY, ROESY, HMBC et HSQC J-modulé permet de caractériser les systèmes de spin à partir de chaque anomère :

- Deux β -D-glucoses (Glc¹ et Glc²).
- Deux α -L-rhamnoses (Rha¹ et Rha²).
- Deux β -D-xyloses (Xyl¹ et Xyl²).

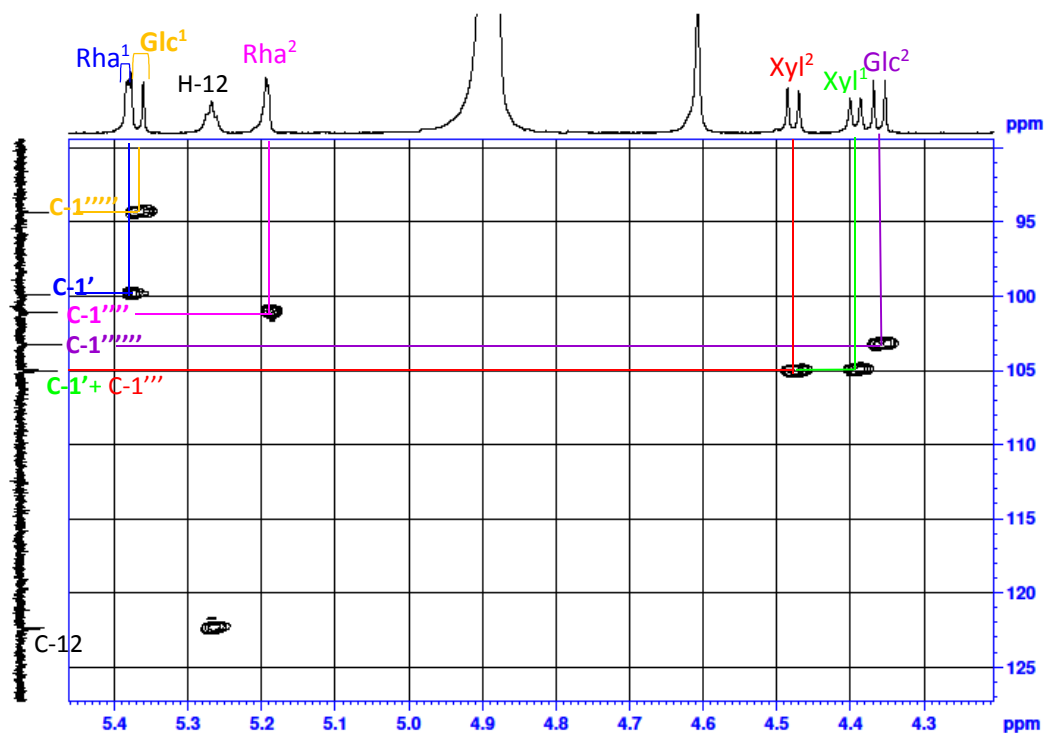


Figure III-70. Spectre HSQC *J*-modulé de Ss24 (zone des anomères).

Identification des glucoses

- *Identification de Glc¹*

Le sucre dont le proton anomérique déblindé H-1'''' à δ_H 5.37 ppm (d, $J=8.0$ Hz) et le carbone correspondant C-1'''' résonne à δ_C 94.4 indiquent que cette unité est impliqué dans une liaison ester. Ce glucose est donc lié au carbonyle C-28 de l'acide oléanolique comme dans les cas précédents. A l'aide des spectres COSY (Figure III-71) et TOCSY (Figure III-74), un système de spin à sept protons est identifié. Le proton H-2'''' est localisé à δ_H 3.34 (m) et le proton H-3'''' à δ_H 3.43 sous la forme d'un triplet (t, $J=8.5$ Hz). Ce dernier couple avec H-4'''' à δ_H 3.44 (t, $J=8.5$ Hz). Sur le spectre COSY, le proton H-5'''' (δ_H 3.52, m) présente des corrélations avec H-6a'''' et H-6b'''' dont les doublets de doublets sont situés à δ_H 3.78 (dd, $J=11.7, 5.0$ Hz) et δ_H 4.14 ppm (dd, $J=11.7, 2.0$ Hz), respectivement. Les valeurs des constantes de couplage calculées sur le spectre de RMN ¹H sont toutes supérieures à 8 Hz ce qui indique une position axiale des protons H-1'''' , H-2'''' , H-3'''' , H-4'''' et H-5''''.

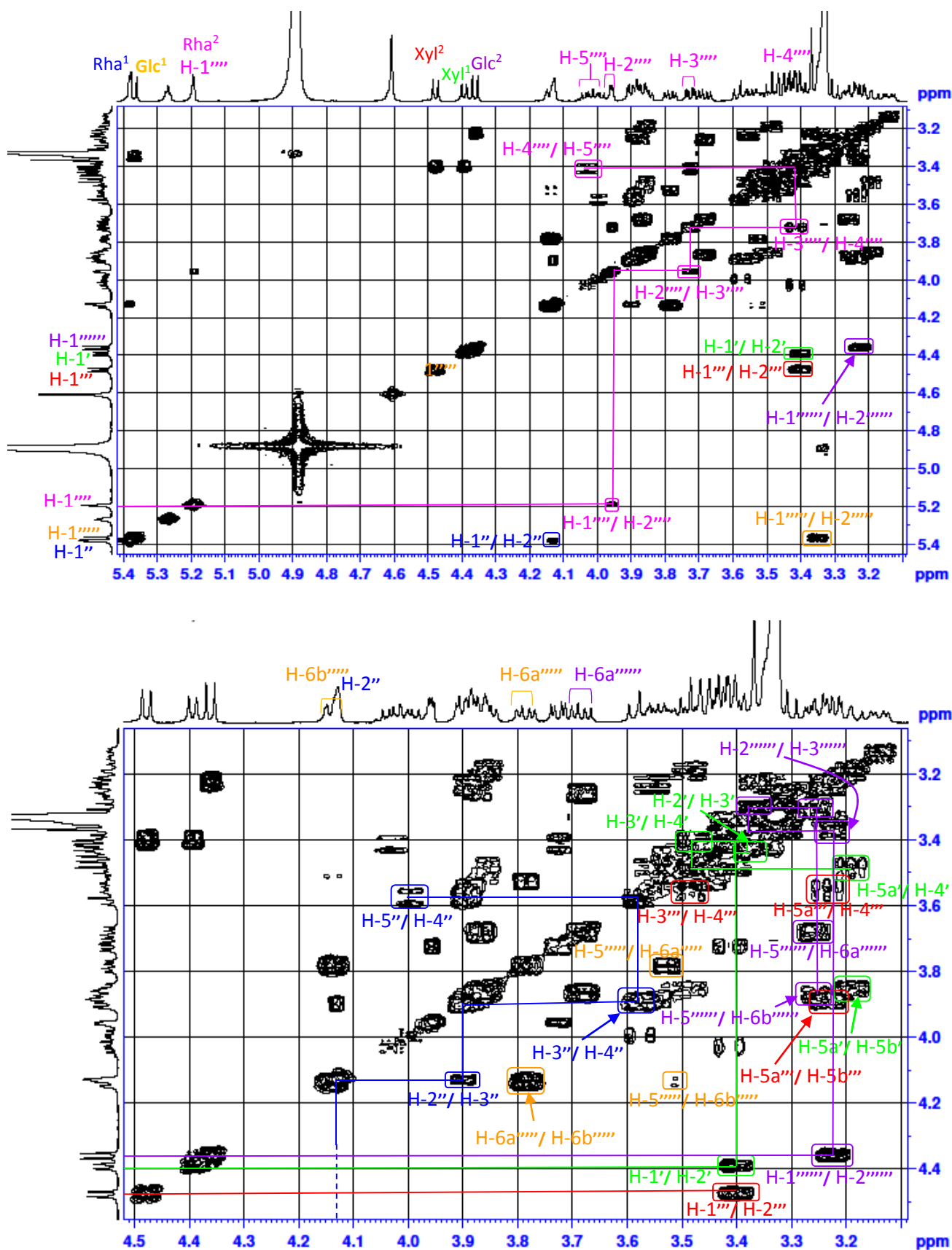


Figure III-71. Spectres COSY étalés de la partie osidique du saponoside Ss24.

Les déplacements chimiques des carbones de ce sucre (Tableau III-18) attribués par analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III-76) sont en accord avec un β -D-glucose. Le déblindage du carbone C-6^{''''} suggère une substitution en cette position.

Les effets rOe observés sur le spectre ROESY (Figure III-72) entre les protons H-1^{''''}/ H-3^{''''} et H-1^{''''}/ H-5^{''''} de ce glucose et les corrélations observées sur le spectre HMBC entre H-1^{''''}/ C-3^{''''} et C-5^{''''} confirment la structure d'un β -D-glucopyranose.

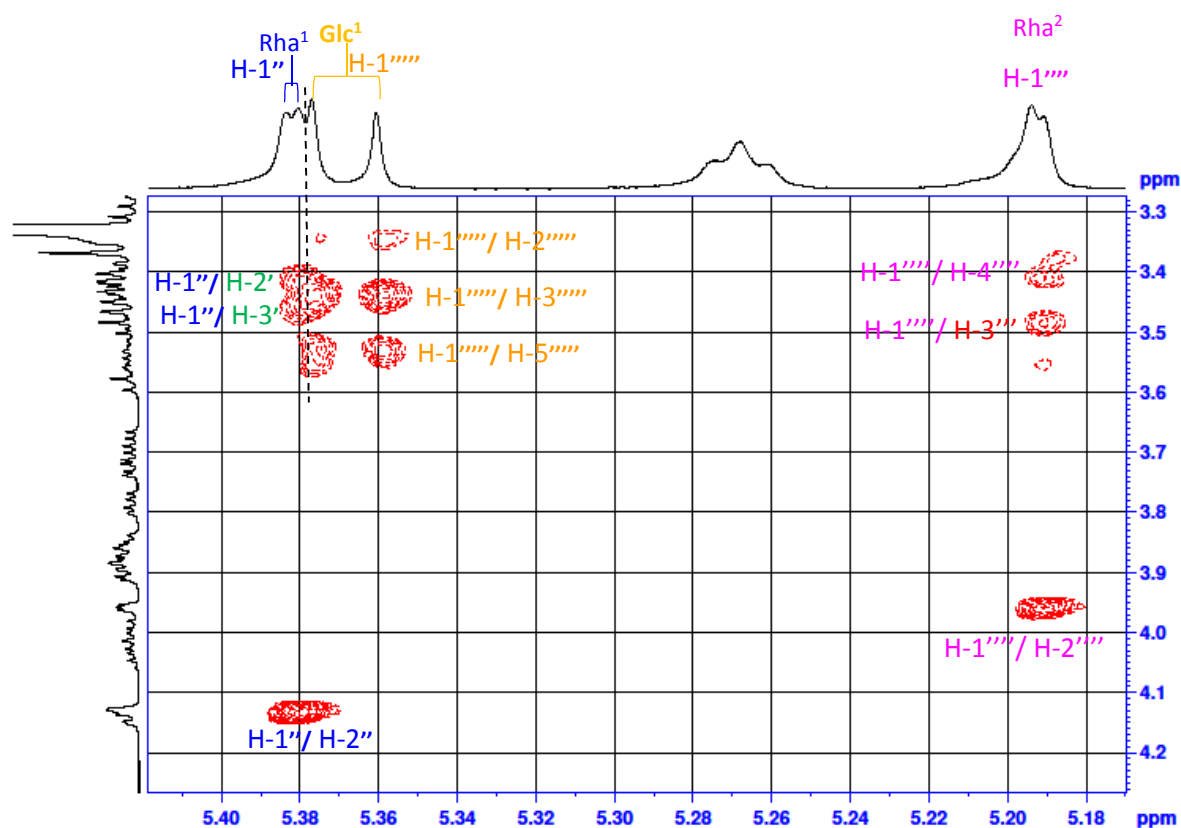


Figure III-72. Spectre ROESY de la partie osidique du saponoside Ss24.

- *Identification de Glc²*

Le deuxième β -D-glucose est identifié à partir du proton anomérique 1^{''''} résonnant à δ_H 4.36 (d, $J=7.8$ Hz, δ_C 103.2). Sur le spectre TOCSY (Figure III-73), sont localisés les signaux des protons appartenant à cet hexose. L'analyse des taches de corrélations observées sur le spectre COSY nous a permis de les attribuer à chaque proton de ce sucre. Ainsi, le proton H-2^{''''} résonne sous forme d'un doublet de doublets à δ_H 3.21 (dd, $J=8.6, 7.8$ Hz), le triplet attribuable au proton H-3^{''''} à δ_H 3.37 ($J=8.6$ Hz) et le proton H-4^{''''} est localisé à δ_H 3.31 (t, $J=8.6$ Hz). Ce dernier corrèle avec H-5^{''''} à δ_H 3.27 (m) qui à son tour présente des corrélations avec les protons H-6a^{''''} et H-6b^{''''}. Les déplacements de leurs carbones (Tableau III-18) sont

assignés par analyse du spectre HSQC J -modulé et ils sont caractéristiques d'un β -D-glucose terminal.

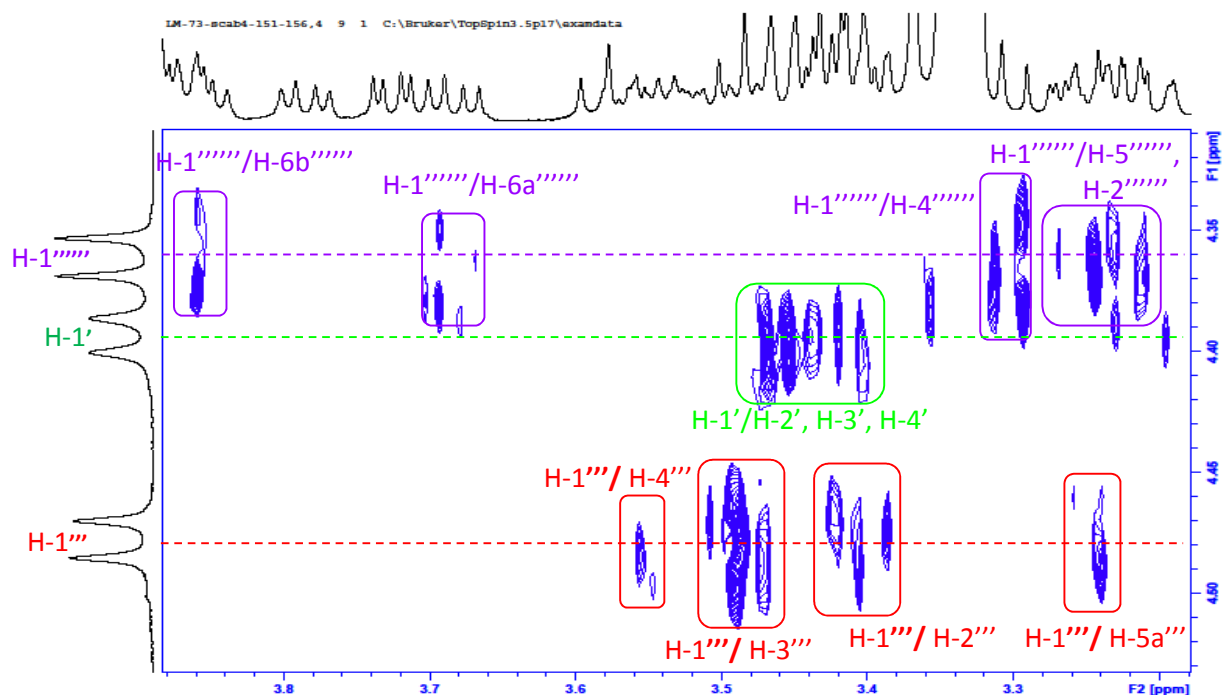


Figure III-73. Spectre TOCSY étalé de la partie osidique du saponoside Ss24 [F₁ : 4.30-4.50].

Identification des rhamnoses

- *Identification de Rha¹*

L'analyse des corrélations observées sur le spectre COSY (Figure III-71) à partir du doublet anomérique H-1'' (δ_H 5.39, d, $J=1.7$ Hz) nous oriente vers la présence d'un 6-désoxyhexose dont le proton H-2'' résonne à δ_H 4.13 ppm sous forme d'un doublet de doublets ($J=2.9, 1.7$ Hz) et corrélant avec H-3'' (δ_H 3.90, dd, $J=9.5, 2.9$ Hz). Le proton H-4'' est localisé à l'aide du spectre TOCSY (Figure III-74) à δ_H 3.58 ppm (t, $J=9.5$ Hz) et il présente une corrélation avec H-5'' (δ_H 4.01, dq, $J=8.4-6.9$ Hz) sur le spectre COSY, qui couple avec les protons H₃₋₆'' résonnant sous forme d'un doublet à δ_H 1.25 ppm ($J=6.9$ Hz). La faible constante de couplage entre H-1''/ H-2'' et H-2''/ H-3'' indique une configuration équatoriale des protons H-1'' et H-2'', contrairement aux protons H-3'', H-4'' et H-5'' qui présentent des constantes de couplage élevées révélant des positions axiales, il s'agit donc d'un α -L-rhamnose. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones correspondant sont attribuées après analyse du spectre HSQC J -modulé attestent la nature de ce sucre (Tableau III-18). Le déblindage du carbone C-3'' à 80.8 ppm suggère une substitution de ce rhamnose (Rha¹) en cette position.

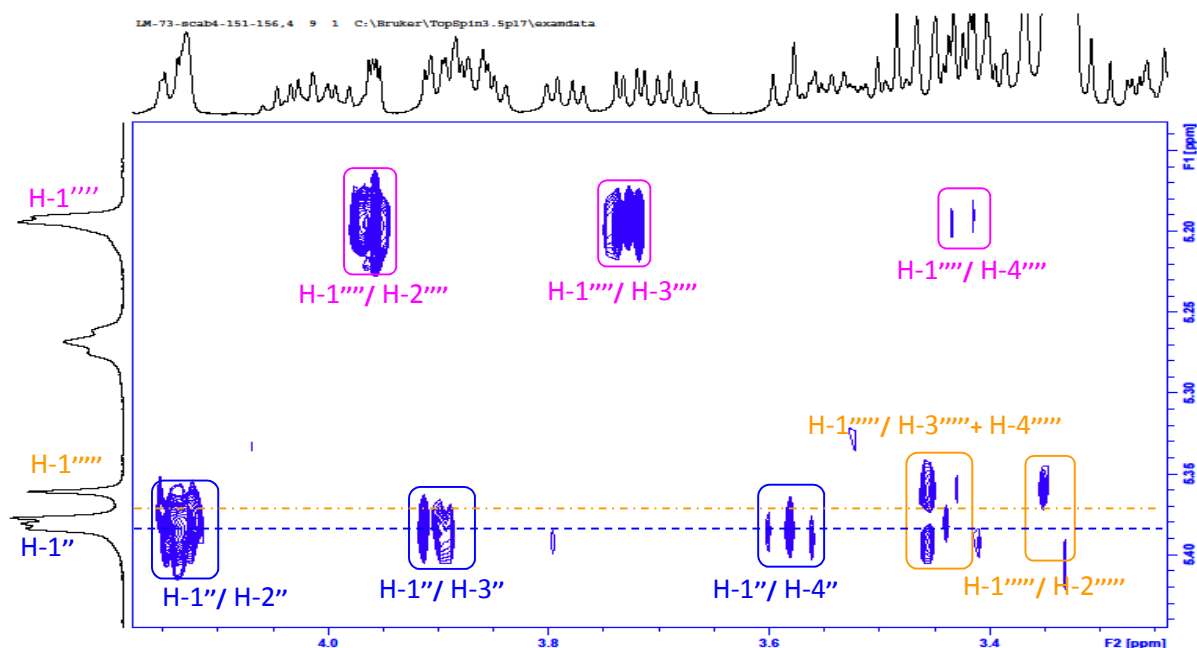


Figure III-74. Spectre TOCSY étalé de la partie osidique du saponoside Ss24 [F₁ : 5.15-5.45].

- *Identification de Rha*²

En partant du proton anomérique H-1''' à δ_H 5.20 (d, $J=1.7$ Hz, δ_C 101.1) un système de spin à huit protons est identifié grâce aux corrélations observées sur les spectres COSY et TOCSY (Figure III-74). L'attribution des signaux de ce système est facile à réaliser sur le spectre COSY seul car ils ne présentent qu'une superposition partielle (Figure III-71). En effet, à partir du proton H-1''', le proton H-2''' est localisé à δ_H 3.96 (dd, $J=3.3, 1.7$ Hz) qui couple avec H-3''' (δ_H 3.72, dd, $J=9.5, 3.3$ Hz). Le proton H-3''' quant à lui montre une corrélation avec le proton H-4''' (δ_H 3.40, t, $J=9.5$ Hz). Ce dernier couple avec H-5''' à δ_H 4.04 (dq, $J=9.5-6.5$ Hz) qui corrèle lui-même avec le doublet intégrant pour trois protons attribuable au méthyle CH₃-6''' à δ_H 1.28 (d, $J=6.5$ Hz). Ceci indique la présence d'un 6-désoxyhexose. Les valeurs des constantes de couplage indiquent une position transdiaxiale des protons H-3''', H-4''' et H-5''' ($J=9.5$ Hz) et une configuration équatoriale des protons H-1''' et H-2''' ($J_{H-1'''-H-2'''}=1.7$ Hz et $J_{H-2'''-H-3'''}=3.3$ Hz) permettant de suggérer la présence d'un deuxième α -L-rhamnopyranose. Ceci est confirmé par la présence d'effet rOe entre H-1'''/H-2''' sur le spectre ROESY et l'absence d'effet rOe entre H-1'''/H-5''' (Figure III-72).

Les déplacements chimiques des carbones sont attribués par l'analyse du spectre HSQC J -modulé (Tableau III-18) sont en accord avec un α -L-rhamnose terminal (Zheng et al., 2004).

Identification des xyloses

- *Identification de Xyl^I*

L'analyse des spectres de RMN 2D nous permet d'identifier un système de spin à six protons appartenant à un pentose dont l'anomère H-1' résonne à δ_{H} 4.39 ppm (d, $J=7.1$ Hz). L'attribution était difficile sur le spectre COSY car on observe une superposition de ses signaux avec ceux d'un autre sucre. Après soustraction des corrélations liées aux quatre sucres déjà identifiés et à l'aide du spectre HMBC (Figure III-75), la distinction entre les protons de chaque sucre est établie. En effet, le carbone C-1' résonne à δ_{C} 105.0 ppm et présente des corrélations sur le spectre HMBC avec H-5'a (δ_{H} 3.19, dd, $J=11.4, 9.0$ Hz), H-5'b (δ_{H} 3.86, dd, $J=11.4, 5.1$ Hz) et le proton H-3' à δ_{H} 3.44 ppm (t, $J=8.2$ Hz) dont le carbone correspondant C-3' est localisé à δ_{C} 77.4 ppm. Ce dernier corrèle sur le spectre HMBC avec les protons H-5'a,b, le proton H-2' (δ_{H} 3.40, m) et avec H-4' localisé à δ_{H} 3.47 ppm sous forme d'un triplet large ($J=8.2$ Hz).

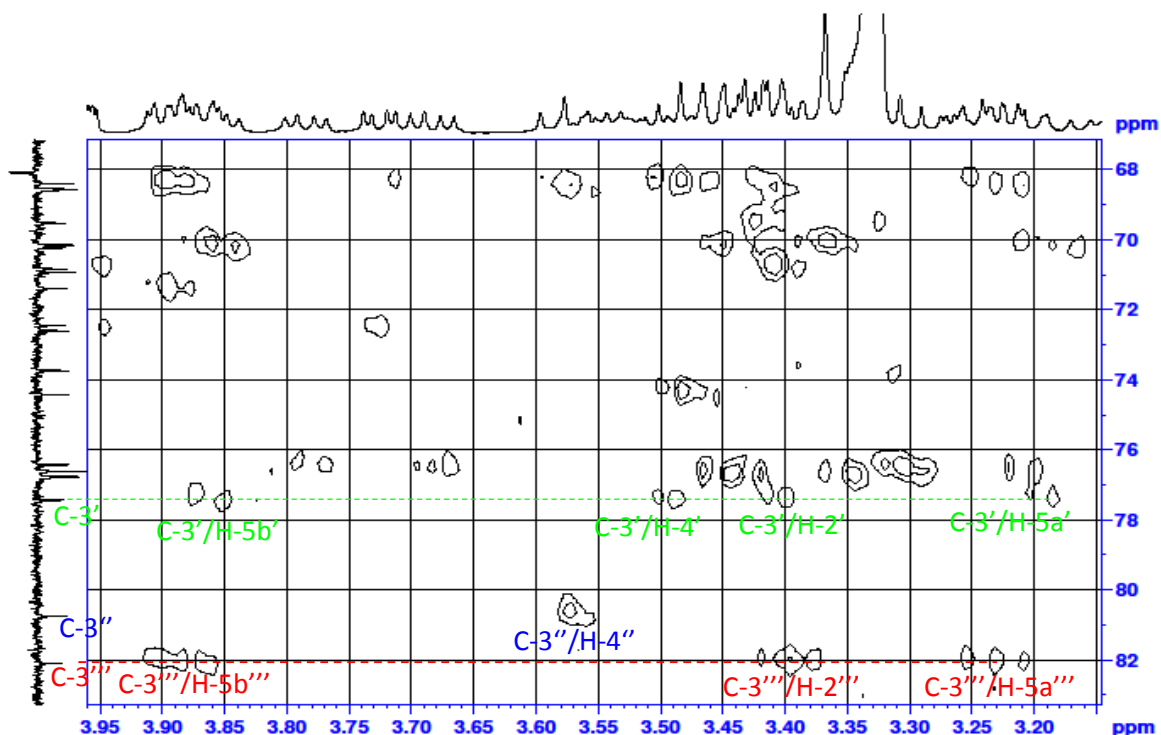


Figure III-75. Spectre HMBC de la partie osidique du saponoside Ss24.

Les valeurs des constantes de couplage sont toutes supérieures à 7 Hz indiquant une position transdiaxiale de ces protons et permettent par conséquent d'identifier ce pentose à un β -D-xylose. La configuration anomérique β est confirmée par l'observation des effets rOe entre H-1'/H-3' et H-1'/H-5'a sur le spectre ROESY (Figure III-79). La comparaison des déplacements chimiques des carbones de ce sucre avec ceux rapportés dans la littérature (Zheng

et al., 2004 ; Rezgui et al., 2016) indique une structure d'un β -D-xylopyranose substitué en position 2' (δ_C 76.8).

- *Identification de Xyl*²

Un deuxième β -D-xylose est identifié à partir du doublet anomérique de H-1''' (δ_H 4.48, d, $J=7.7$ Hz) dont le proton H-2''' résonne à δ_H 3.40 ppm (dd, $J=8.9, 7.7$ Hz) et corrélant avec le proton H-3''' à δ_H 3.48 sous forme d'un triplet ($J=8.9$ Hz) sur le spectre COSY. Le proton H-4''' résonnant sous forme d'un triplet large à δ_H 3.5 ($J=8.9$ Hz) couple avec les protons H-5a''' et H-5b'''. Les constantes de couplage $J_{H-1'''}-H-2'''$, $J_{H-2'''}-H-3'''$, $J_{H-3'''}-H-4'''$ et $J_{H-4'''}-H-5'''$ étant toutes supérieures à 7 Hz, attestent que ces protons sont tous axiaux. Ce qui permet d'identifier ce pentose à un β -D-xylopyranose. La stéréochimie est confirmée par l'observation d'effets rOe entre H-1'''/H-3''' et H-1'''/H-5a''' sur le spectre ROESY (Figure III-79). Les valeurs des déplacements chimiques de ces carbones sont en accord avec celles d'un β -D-xylose substitué en position 3 (δ_C 82.1) (Top et al., 2017).

L'expérience HSQC J -modulé permet d'assigner tous les déplacements chimiques (Tableau III-18, figure III-76) des protons et carbones de la partie osidique du composé **Ss24**.

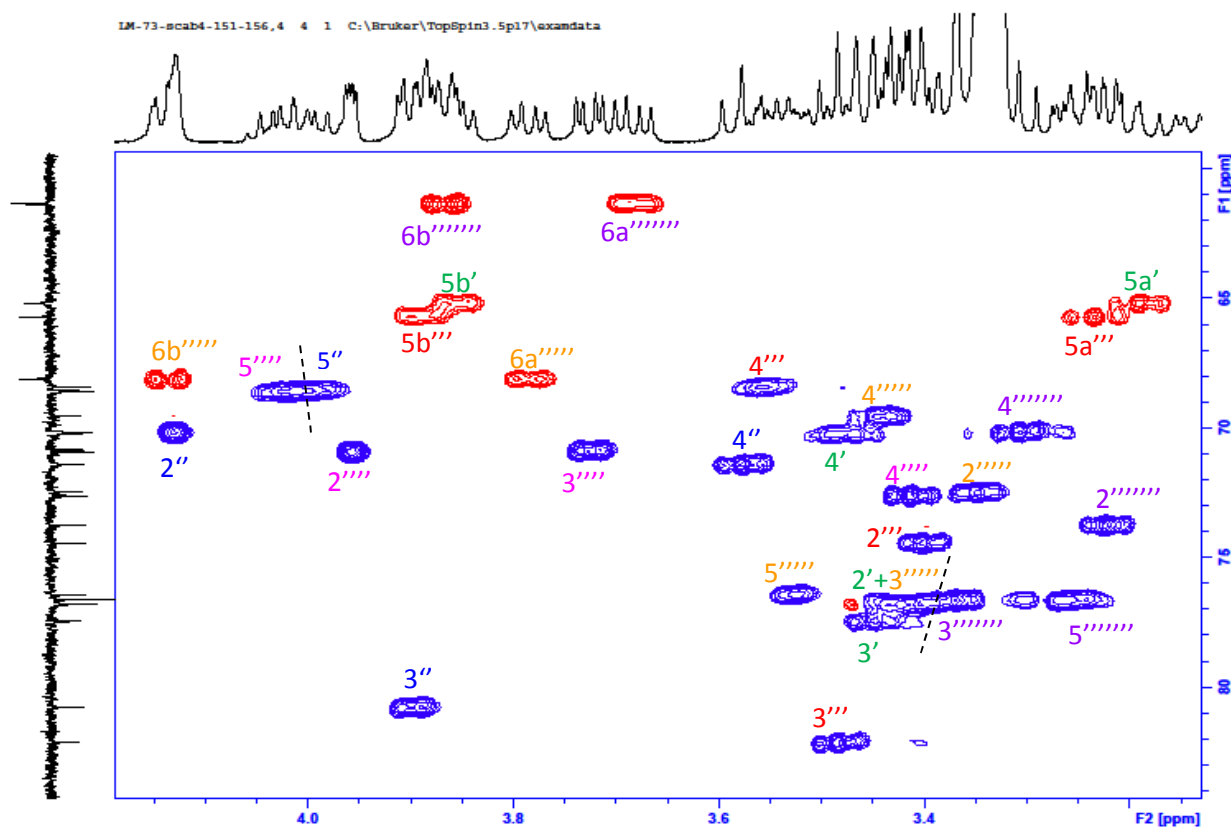


Figure III-76. Spectre HSQC J -modulé de la partie osidique du saponoside **Ss24**.

Séquençage des chaînes osidiques

L'examen du spectre HMBC de **Ss24** (Figure III-77) permet d'établir l'enchaînement des unités osidiques à l'aide des corrélations observées entre :

- H-1'''' Rha² terminal/C-3''' Xyl²
- H-1''' Xyl²/C-3'' Rha¹
- H-1'' Rha¹ /C-2' Xyl¹
- H-1' Xyl¹/C-3 de la génine
- H-1'''''' Glc² terminal/C-6'''''' Glc¹
- H-1'''''' Glc¹/C-28 de la génine (Figure III-78).

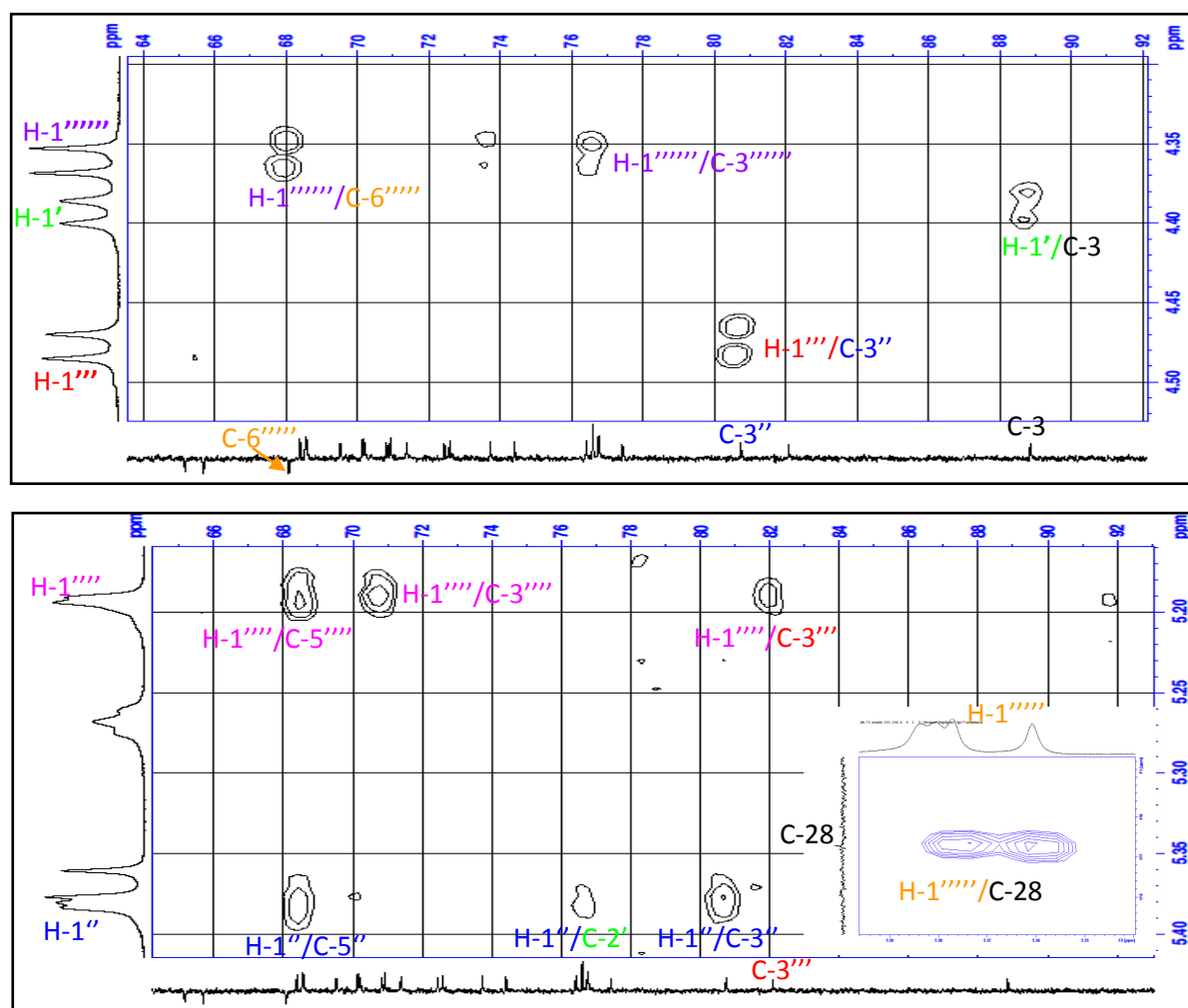


Figure III-77. Spectre HMBC du saponoside **Ss24** (zone des protons anomériques).

Les effets rOe observés sur le spectre ROESY (Figure III-72,78) confirment le séquençage des chaînes osidiques déduit des corrélations HMBC précédentes. Ces corrélations montrent que la séquence [α -L-Rha²-(1→3)- β -D-Xyl²-(1→3)- α -L-Rha¹-(1→2)- β -D-Xyl¹] constitue la

chaîne «éther» liée en C-3 de la génine et que la chaîne disaccharide [β -D-Glc²-(1→6)- β -D-Glc¹] est impliquée dans une liaison ester en C-28.

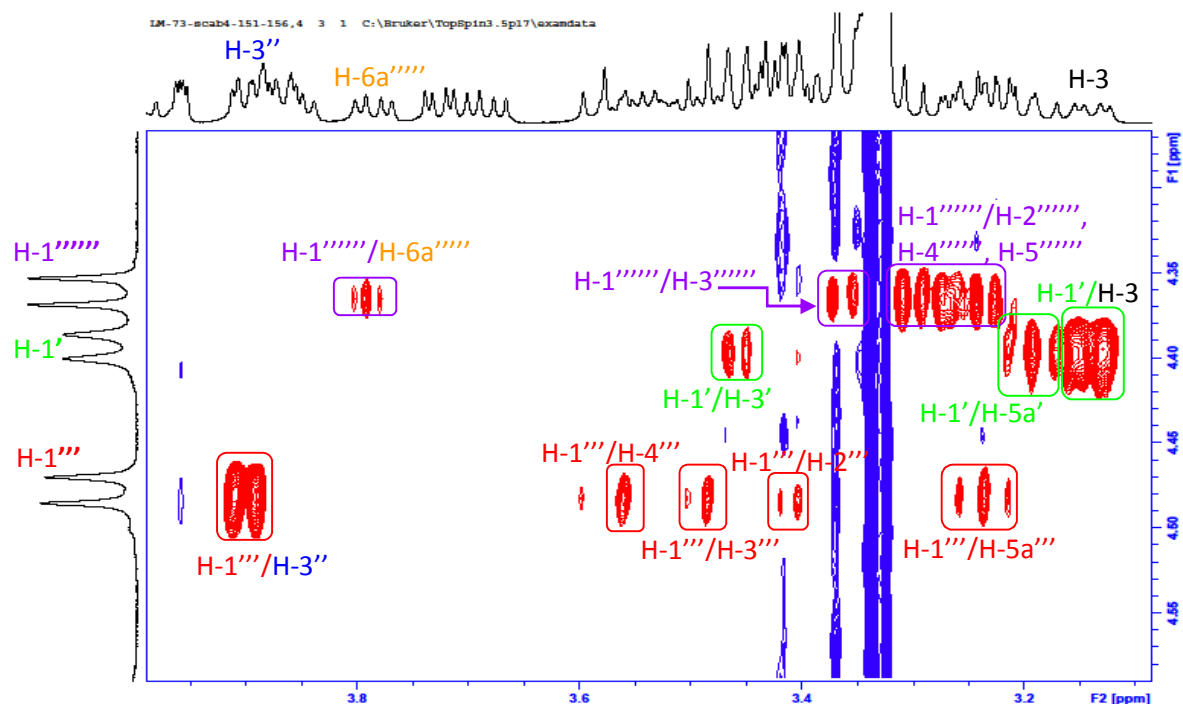
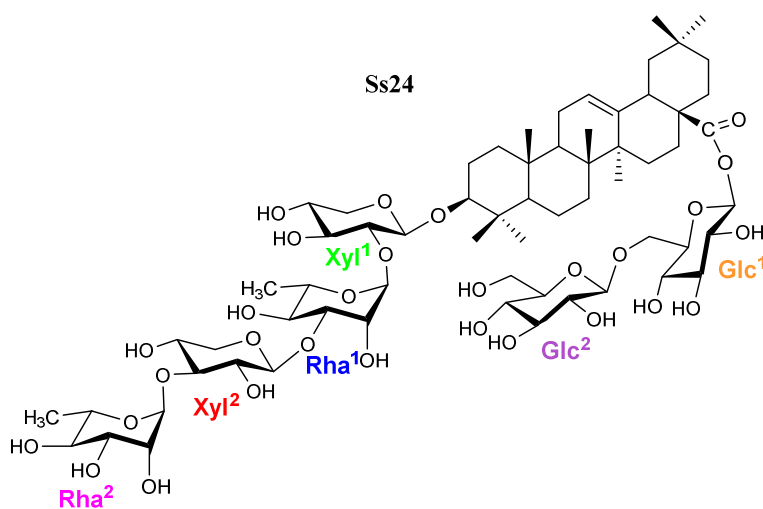


Figure III-78. Spectre ROESY de la partie osidique du saponoside **Ss24**.

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer au saponoside **Ss24** la structure : acide 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1→3)- β -D-xylopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- β -D-xylopyranosyl-oléanolique-28- β -D-glucopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranosyl ester. Ce composé constitue une nouvelle saponine désignée par **scabiostellatoside B**.



b- Étude des spectres du composé Ss25

Le spectre de masse HR-ESI-MS de **Ss25** montre un ion moléculaire à $m/z= 1359.6552$ indiquant une formule brute $C_{64}H_{104}O_{29}$, qui est identique à celle du saponoside **Ss24**. L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D de **Ss25**, en comparaison avec ceux de **Ss24** montre la présence des mêmes unités osidiques avec la disparition des signaux liés à un des xylooses et l'apparition de ceux d'un autre sucre.

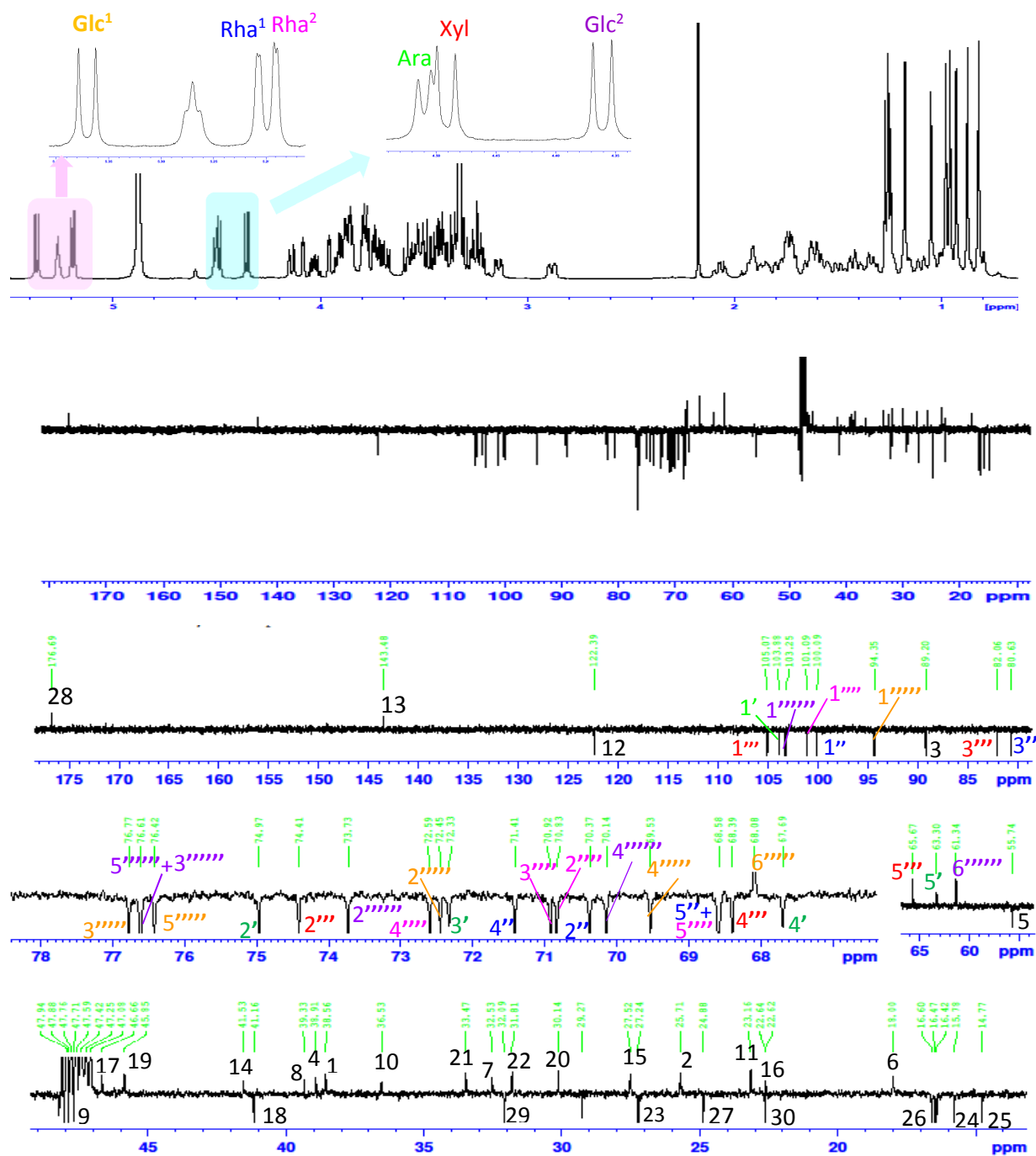


Figure III-79. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé du saponoside **Ss25**.

L'analyse du spectre de RMN ^1H (Figure III-79) indique la présence de six unités osidiques, dont six protons anomériques résonnent à δ_{H} 4.36 (d, $J=7.8$), 4.49 (d, $J=7.6$), 4.51 (d, $J=5.3$), 5.19 (d, $J=1.7$), 5.20 (d, $J=1.7$) et 5.37 (d, $J=8.0$). A l'aide de l'expérience HSQC, les carbones respectifs sont localisés à δ_{C} 103.7, 105.1, 103.9, 101.1, 100.1 et 94.4 (Figure III-80).

L'analyse des spectres COSY, TOCSY, ROESY, HMBC et HSQC J -modulé permet de caractériser les systèmes de spin à partir de chaque anomère :

- Deux β -D-glucoses (Glc¹ et Glc²).
- Deux α -L-rhamnoses (Rha¹ et Rha²).
- un β -D-xylose (Xyl).
- un α -L-arabinose (Ara).

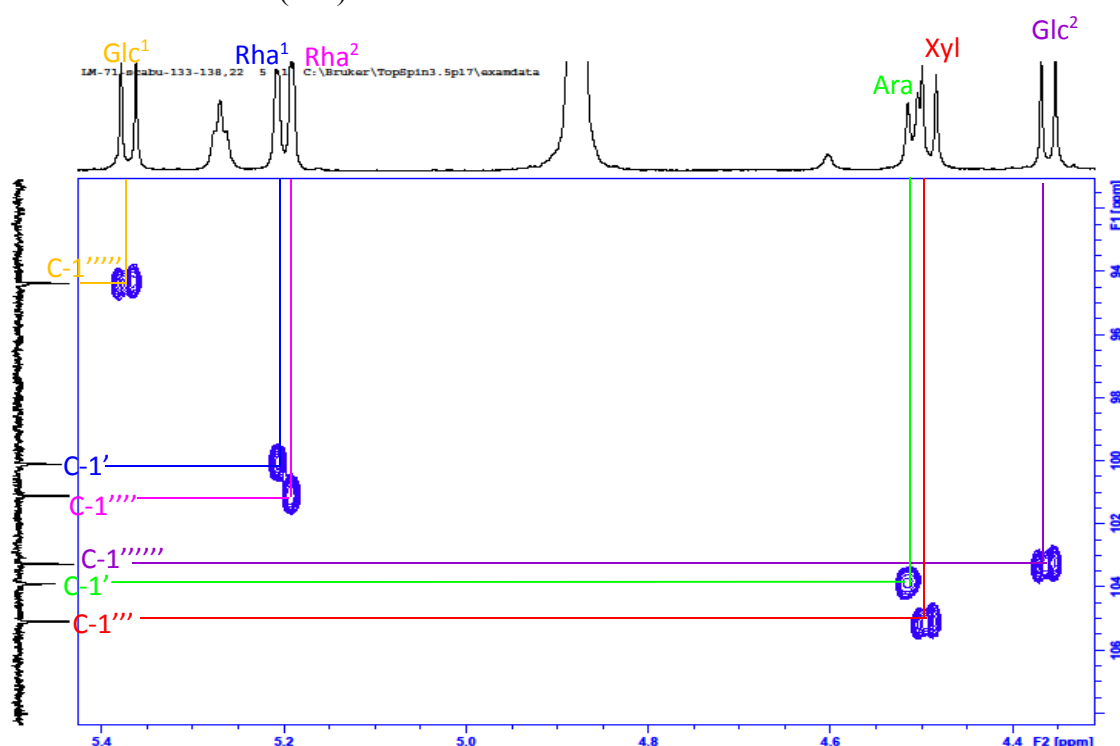


Figure III-80. Spectre HSQC J -modulé du saponoside **Ss25** (zone des anomères).

- *Identification de l'Arabinose*

Un système de spin à 6 protons et cinq carbones d'un pentose est caractérisé à partir du doublet anomérique H-1' (δ_{H} 4.51, d, $J=5.3$ Hz). Sur le spectre COSY (Figure III-81), le proton H-2' est localisé à δ_{H} 3.78 (dd, $J=7.1, 5.3$ Hz), alors que les autres signaux des protons sont attribués à l'aide des spectres TOCSY et ROESY. En effet, sur le spectre TOCSY, des corrélations sont observées entre H-1' et H-3' (δ_{H} 3.73, d, $J=7.1, 3.4$ Hz) et avec H-4' (δ_{H} 3.79, m). Ce dernier couple avec H-5a' (δ_{H} 3.52, d, $J=11.9, 2.3$ Hz) et H-5b' (δ_{H} 3.86, m).

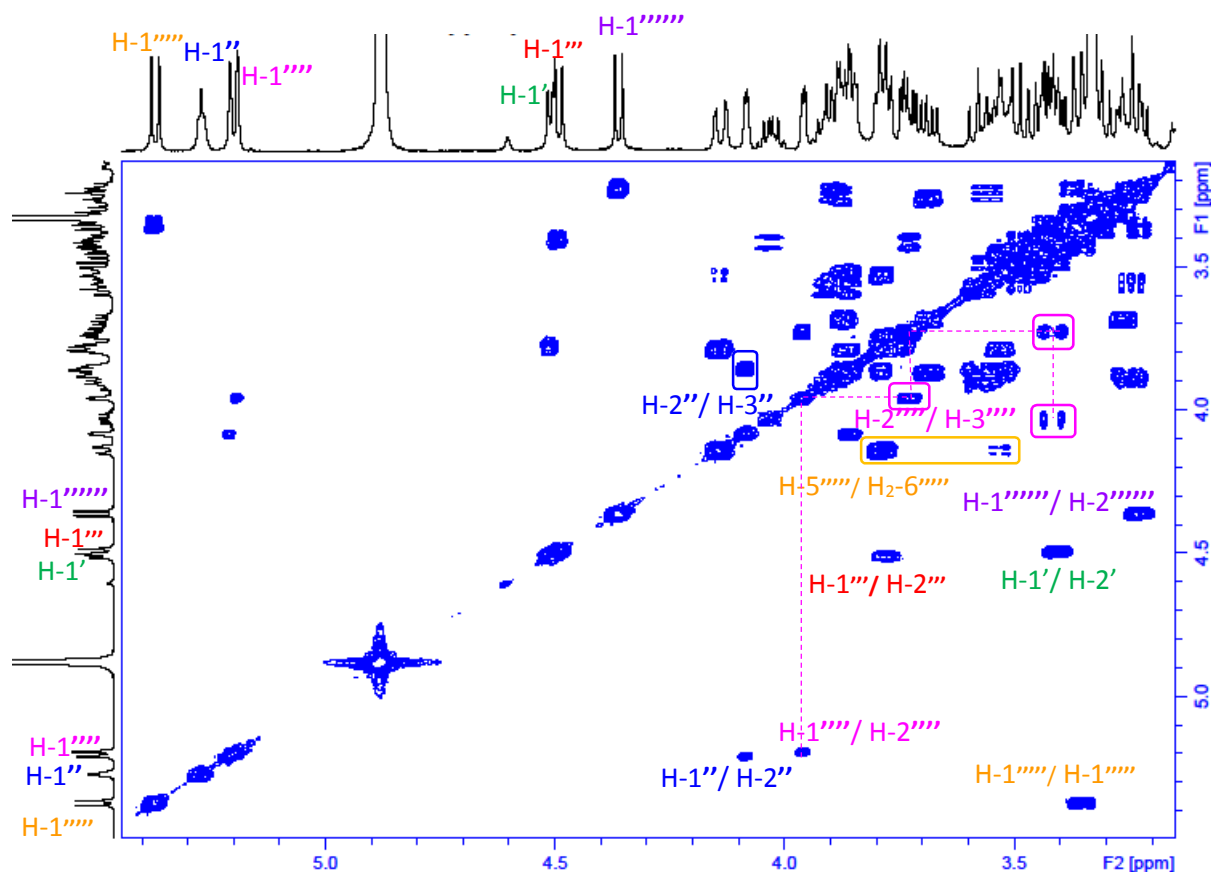


Figure III-81. Spectre COSY de la partie osidique du saponoside Ss25.

L'expérience ROESY (Figure III-82) confirme les positions des différents protons de ce sucre par la visualisation des taches de corrélation entre H-1'/ H-3', H-1'/ H-4' et H-1'/ H-5a'. Ces effets rOe indiquent qu'il s'agit d'un α -L-arabinopyranose (Ara), dont les constantes de couplages relativement faibles $J_{H-3'-H-4'}$ et $J_{H-4'-H-5a'}$ confirment la position équatoriale du proton H-4'. De plus, la comparaison de la constante de couplage $J_{H-1'-H-2'}$ avec celle de la littérature (Jitsuno et al., 2010) est en faveur d'une configuration α de cet arabinose. Les déplacements chimiques des carbones attribués par l'analyse du spectre HSQC J -modulé (Figure III-83) sont en accord avec un α -L-arabinose substitué en position 2 (δ_C 75.0) (Jitsuno et al., 2010 ; Rezgui et al., 2016 ; Top et al., 2017 ; Zheng et al., 2004).

- *Identification du Xylose*

L'analyse des corrélations sur les spectres COSY (Figure III-81) et HMBC indiquent un système de spin à protons appartenant à un pentose. Les déplacements chimiques et les constantes de couplage indiquent un β -D-xylose caractérisé en position 4 par un hydroxyle équatoriale induisant une grande constante de couplage entre les protons transdiaxiaux H-3''', H-4''' et H-5''' (Tableau III-18).

- *Identification des deux rhamnose*

Un système de spin à huit protons est identifié à partir du doublet anomérique H-1'' à δ_H 5.20 ppm (d, $J=1.5$ Hz). L'analyse des spectres COSY, TOCSY et ROESY permet d'attribuer les protons d'un 6-désoxyhexose dont les valeurs des constantes de couplage et des déplacements chimiques des carbones correspondants (tableau III-18) sont caractéristiques d'un α -L-rhamnose (Rha¹). Néanmoins, le proton anomérique de ce rhamnose ne résonne pas de la même façon que dans le composé **Ss24**. Cette variation est due au changement de son environnement car cet α -L-rhamnose est accroché à l' α -L-arabinose par une liaison α (1 \rightarrow 2) et non pas au xylose comme dans **Ss24**.

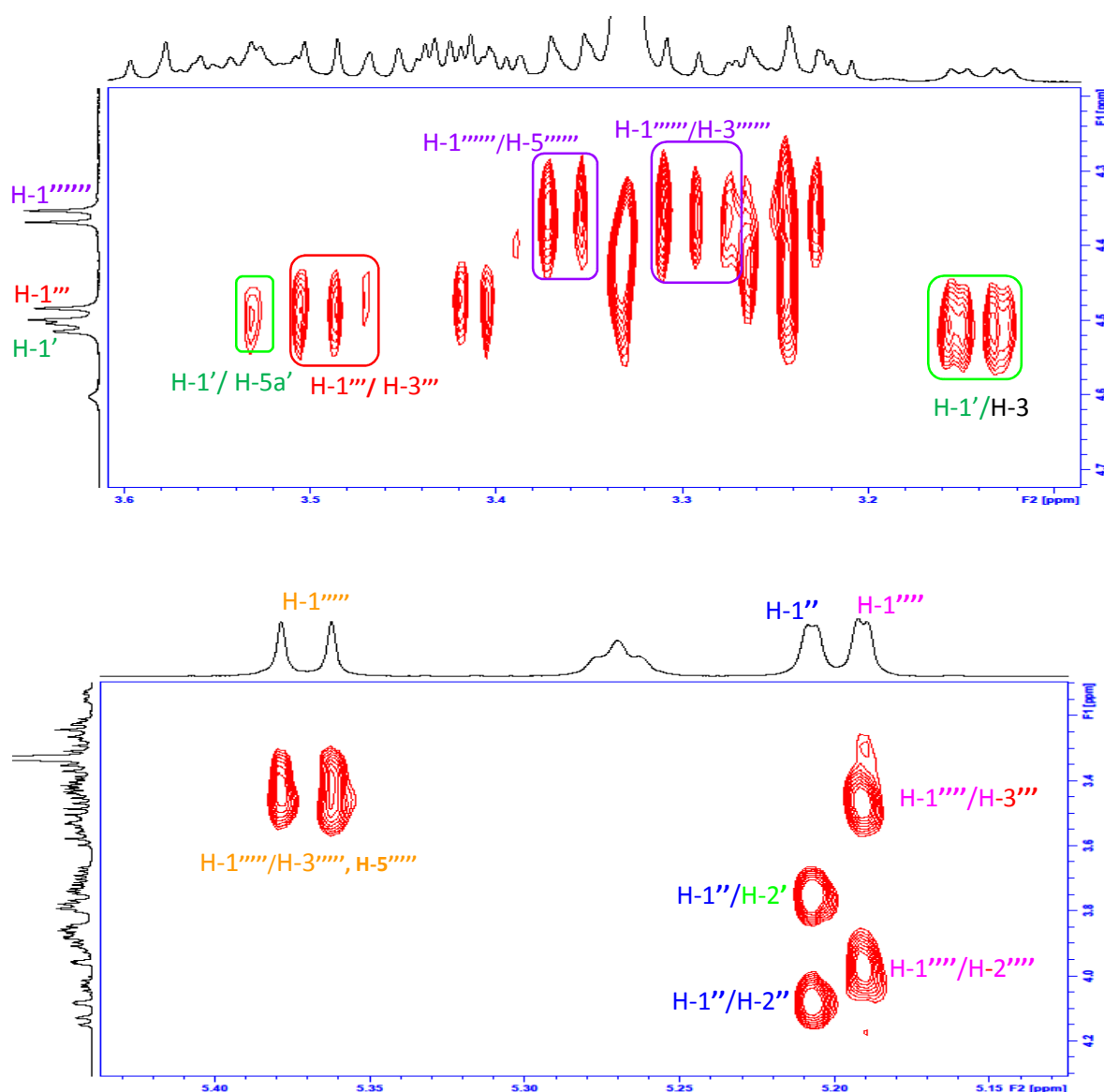


Figure III-82. Spectre ROESY du saponoside **Ss25** (zone des sucres).

Le deuxième rhamnose (Rha²) dont le proton anomérique H-1'''' résonne à δ_H 5.19 ppm (d, $J=1.5$ Hz) reste parfaitement identique à celui observé dans le composé **Ss24**. Ce dernier présente une tache de corrélation en HMBC entre H-1'''' et le carbone C-3''' (δ_C 82.1) du β -D-xylose indiquant ainsi qu'il est attaché au xylose en C-3'''.

- *Identification des deux glucoses*

Comparativement à ceux de **Ss24**, l'analyse des spectres COSY, TOCSY et HSQC J -modulé à partir des protons anomériques H-1'''' (δ_H 5.37, d, $J=8.1$ Hz) et H-1'''''' (δ_H 4.36, d, $J=7.8$ Hz) révèle pour le saponoside **Ss25** la présence de la même chaîne disaccharide [β -D-Glc²-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glc¹] reliée à la génine *via* le carbonyle en position 28.

L'expérience HSQC J -modulé permet d'assigner tous les déplacements chimiques (Figure III-83, tableau III-18) des protons et carbones de la partie osidique du composé **Ss25**.

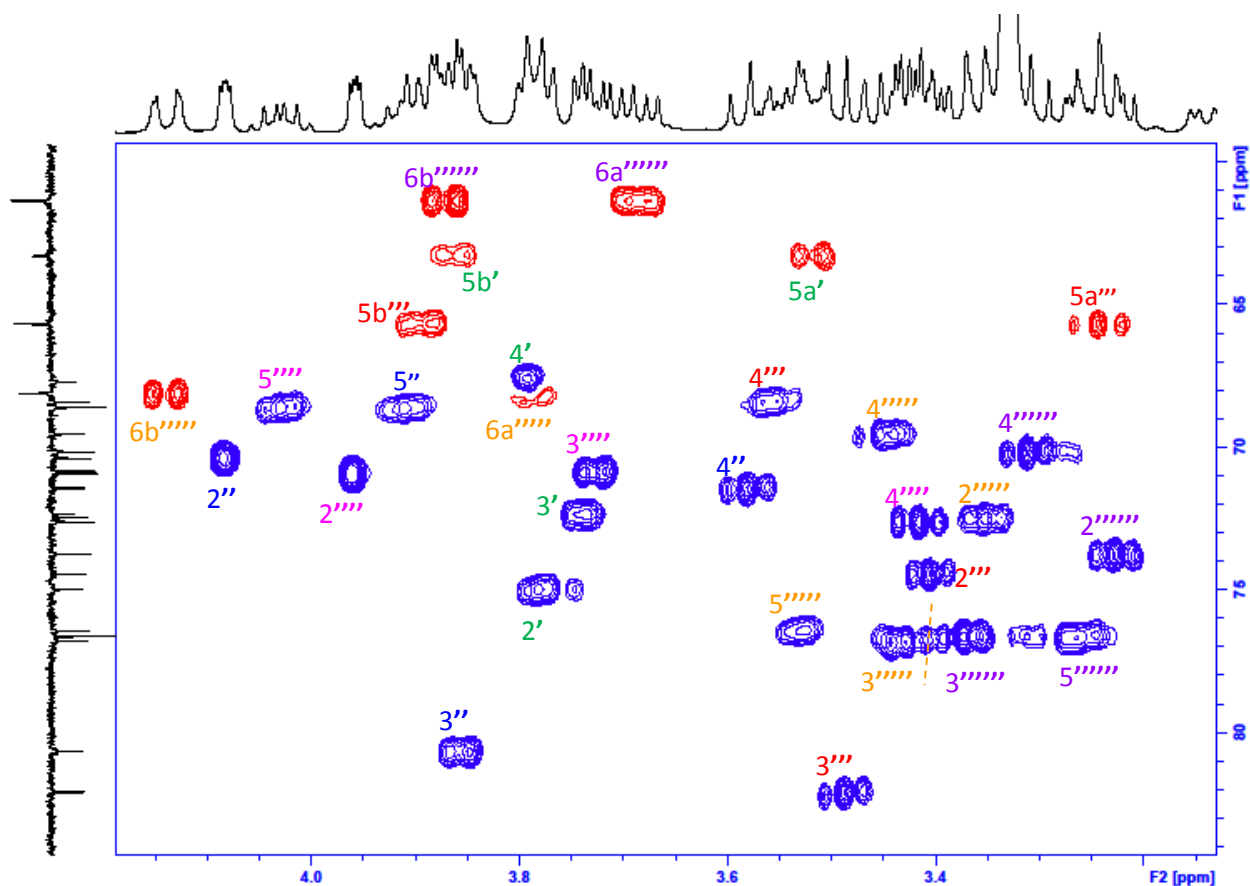


Figure III-83. Spectre HSQC J -modulé du saponoside **Ss25** (zone des sucres).

Séquençage des chaînes osidiques

L'examen du spectre HMBC de **Ss25** révèle la présence des corrélations entre :

- H-1^{''''} Rha² terminal/C-3^{'''} Xyl
- H-1^{'''} Xyl/C-3^{''} Rha¹
- H-1^{''} Rha¹ /C-2' Ara
- H-1' Ara/C-3 de la génine
- H-1^{''''''} Glc² terminal/C-6^{''''} Glc¹
- H-6^{''''} Glc¹/ C-28 de la génine

La saponine **Ss25** est donc l'isomère de **Ss24** au niveau du premier sucre de la chaîne «éther» lié à la génine en C-3, il s'agit de l'acide 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester. Une nouvelle structure nommée **scabiostellatoside A**.

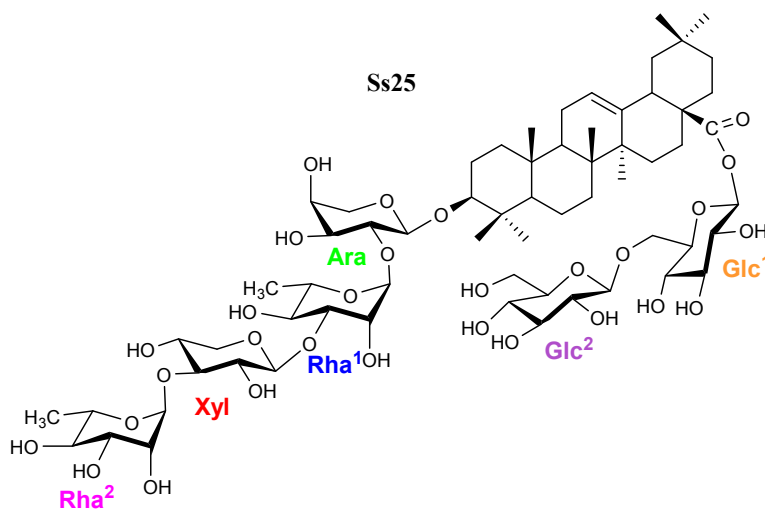


Tableau III-18. Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des composés **Ss24** et **Ss25** dans CD₃OD.

	Ss24	δ_c	Ss25	δ_c
	δ_H m (J en Hz)		δ_H m (J en Hz)	
	Xyl¹ à C-3		Ara (à C-3)	
1'	4.39 d (7.1)	105.0	4.51 d (5.3)	103.9
2'	3.40 m	76.8	3.78 dd (7.1,5.3)	75.0
3'	3.44 t (8.2)	77.4	3.73 dd (7.1,3.4)	72.3
4'	3.47 brt (8.2)	70.2	3.79 m	67.7
5'	3.19 dd (11.4,9.0)	65.2	3.52 dd (11.9, 2.3)	63.3
	3.86 dd (11.4,5.1)		3.86 m	
	Rha¹			
1''	5.39 d (1.7)	99.9	5.20 d (1.5)	100.1
2''	4.13 dd (2.9,1.7)	70.2	4.08 dd (3.5,1.7)	70.4
3''	3.90 dd (9.5,2.9)	80.8	3.85 dd (9.5,3.5)	80.6
4''	3.58 t (9.5)	71.4	3.58 t (9.5)	71.4
5''	4.01 dq (8.4,6.9)	68.4	3.91 m	68.6
6''	1.25 d (6.9)	16.6	1.24 d (6.2)	16.4
	Xyl²		Xyl	
1'''	4.48 d (7.7)	105.1	4.49 d (7.6)	105.1
2'''	3.40 dd (8.9,7.7)	74.4	3.40 dd (8.1,7.6)	74.4
3'''	3.48 t (8.9)	82.1	3.48 t (8.1)	82.1
4'''	3.54 brt (8.9)	68.6	3.55 m	68.4
5'''	3.22 dd (10.9,8.0)	65.7	3.24 t (11.4)	65.7
	3.90 m		3.89 m	
	Rha²			
1''''	5.20 d (1.7)	101.1	5.19 d (1.5)	101.1
2''''	3.96 dd (3.3,1.7)	70.9	3.95 dd (3.5,1.5)	70.9
3''''	3.72 dd (9.5,3.3)	70.8	3.72 dd (9.7,3.5)	70.8
4''''	3.40 t (9.5)	72.6	3.41 t (9.7)	72.6
5''''	4.04 dq (9.5,6.5)	68.4	4.02 m	68.6
6''''	1.28 d (6.5)	16.5	1.27 d (6.2)	16.5
	Glc¹ (à C-28)			
1'''''	5.37 d (8.0)	94.4	5.37 d (8.1)	94.4
2'''''	3.34 m	72.5	3.34 t (8.1)	72.5
3'''''	3.43 t (8.5)	76.8	3.42 dd (9.6,8.1)	76.8
4'''''	3.44 t (8.5)	69.5	3.44 t (9.6)	69.5
5'''''	3.52 m	76.4	3.52 m	76.4
6'''''	3.78 dd (11.7,5.0)	68.1	3.78 dd (11.4,4.3)	68.1
	4.14 dd (11.7,2.0)		4.13 dd (11.4,1.8)	
	Glc²			
1''''''	4.36 d (7.8)	103.2	4.36 d (7.8)	103.7
2''''''	3.21 dd (8.6,7.8)	73.7	3.22 t (7.8)	73.6
3''''''	3.37 t (8.6)	76.6	3.37 dd (8.9,7.8)	76.7
4''''''	3.31 t (8.6)	70.2	3.30 t (8.9)	70.1
5''''''	3.27 m	76.6	3.24 m	76.3
6''''''	3.68 dd (12.0,5.5)	61.3	3.69 dd (11.8,5.4)	61.2
	3.86 dd (12.0,2.0)		3.86 dd (11.8,2.5)	

III.2.1.4. Elucidation structurale des composés Ss26 et Ss27

Les spectres de masse HR-ESI-MS en mode positif de **Ss26** et **Ss27** montrent les ions pseudo-moléculaires $[M+Na]^+$ à m/z 1521.7096 et 1521.7097 respectivement, correspondant à une formule brute $C_{70}H_{114}O_{34}Na$. En comparaison avec les saponosides précédents (**Ss24** et **Ss25**), ces masses indiquent la présence d'un hexose supplémentaire, de plus les ions fragments à m/z 1359 $[M+Na-162]^+$, 1197 $[M+Na-2 \times 162]^+$ et 1035 $[M+Na-3 \times 162]^+$ confirment bien cette proposition. Ainsi, La partie osidique de **Ss26** et **Ss27** est constituée de sept sucres.

a- Étude des spectres de RMN 1D et 2D du composé Ss26

Pour le composé **Ss26**, nous observons sept unités osidiques dont six ont déjà été rencontrés précédemment dans **Ss24** : Xyl¹, Xyl², Rha¹, Rha², Glc¹ et Glc². En outre, un hexose supplémentaire est repéré par le doublet anomérique H-1'''''' résonnant à δ_H 4.61 ppm (d, $J=7.9$ Hz), dont le carbone C-1'''''' est localisé à δ_C 104.6 ppm à l'aide de l'expérience HSQC J -modulé.

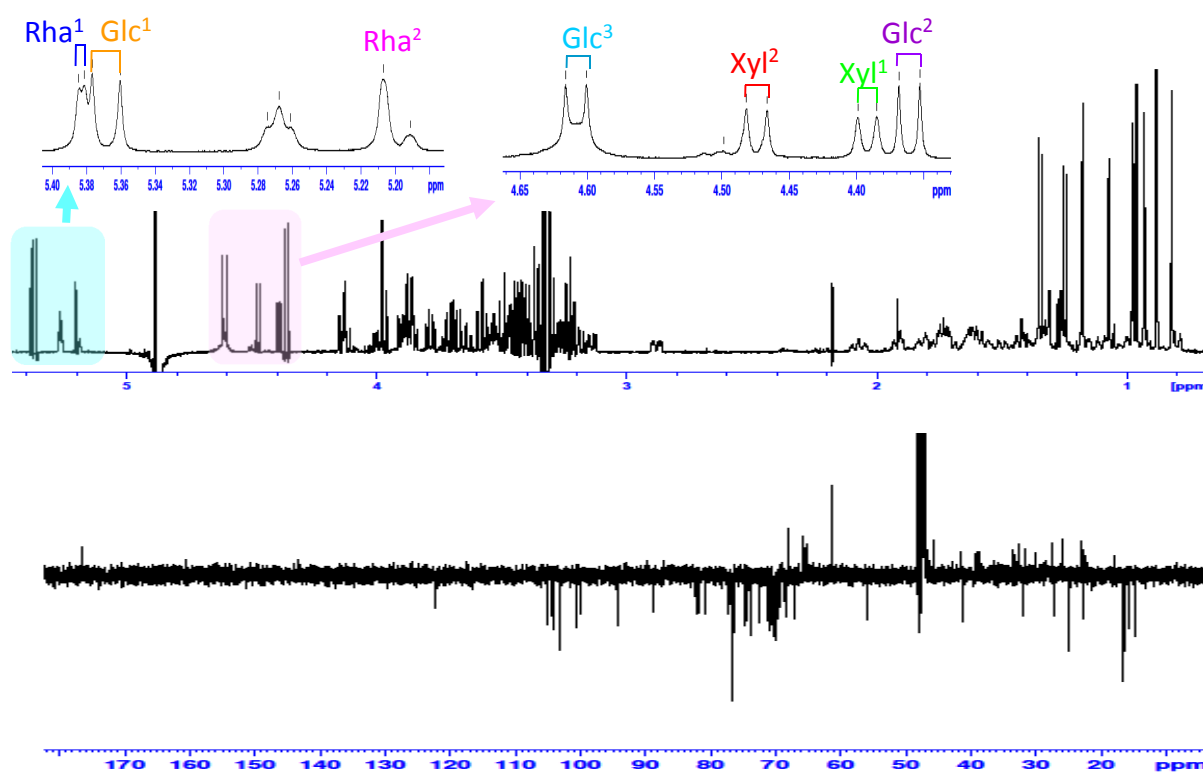


Figure III-84. Spectres de RMN 1H et ^{13}C J -modulé du saponoside **Ss26**.

L'examen simultané des spectres de RMN 2D, particulièrement TOCSY et ROESY nous a permis de confirmer la présence des six unités osidiques caractérisées dans la saponine **Ss24**.

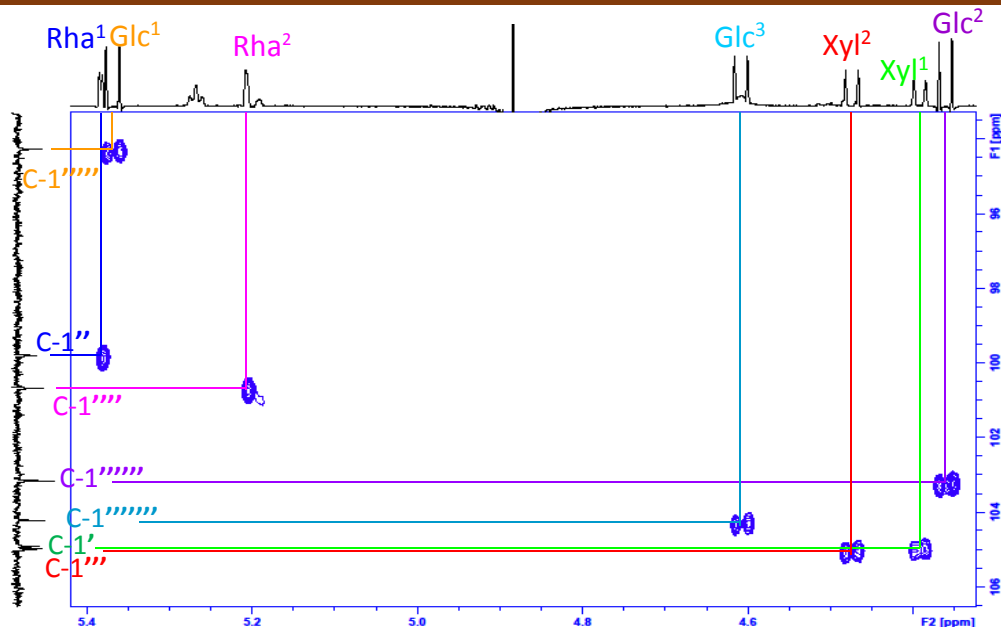


Figure III-85. Spectre HSQC *J*-modulé du saponoside **Ss26** (zone des protons anomériques).

L'hexose supplémentaire est identifié à un β -D-glucopyranose dont le proton anomérique H-1'''''''''' corrèle sur le spectre TOCSY (Figure III-86) avec H-2'''''''''' (δ_H 3.24, dd, $J=8.4, 7.9$ Hz), H-3'''''''''' (δ_H 3.39, t, $J=8.4$ Hz), H-4'''''''''' (δ_H 3.33, m), H-5'''''''''' (δ_H 3.30, m), H-6a'''''''''' (δ_H 3.68, dd, $J=11.9, 5.5$ Hz) et H-6b'''''''''' (δ_H 3.86, dd, $J=11.9, 2.2$ Hz). Les valeurs des constantes de couplage sont toutes supérieures à 7 Hz indiquant une position transdiaxiale de ces protons, ce qui est confirmé par les effets rOe observés entre H-1''''''''''/H-3'''''''''' , H-1''''''''''/H-5'''''''''' (Figure III-89).

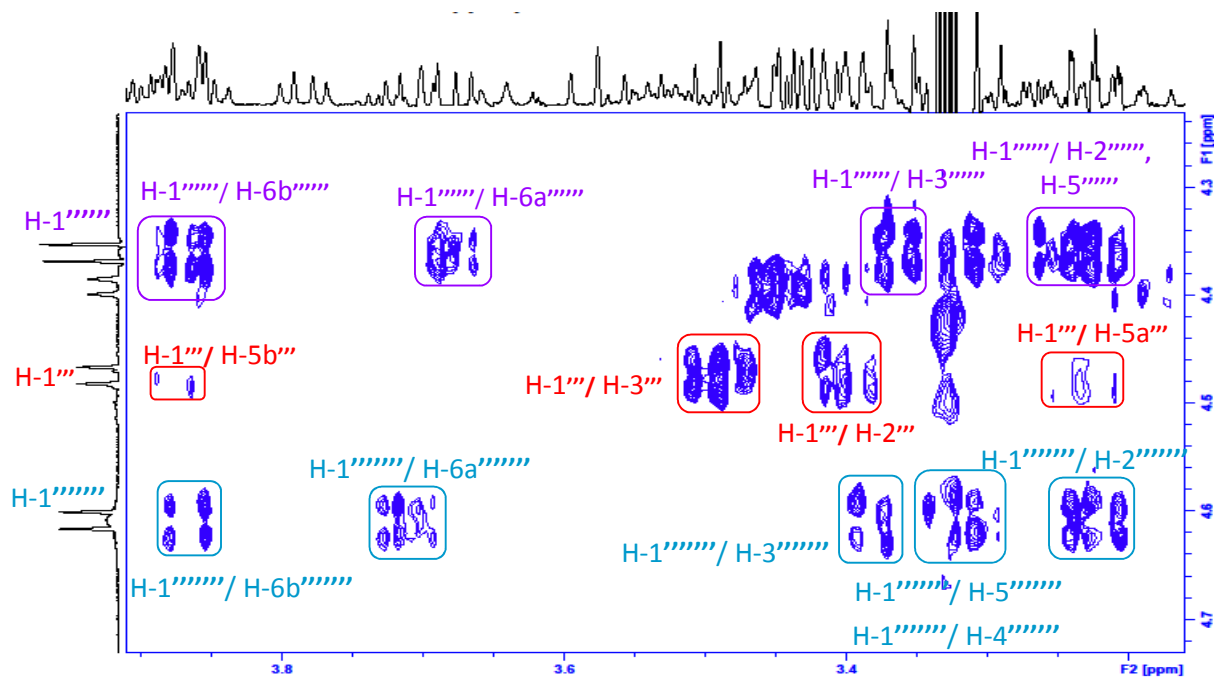


Figure III-86. Spectre TOCSY du saponoside **Ss26** [F1 : 4.2-4.7 ppm].

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones correspondants obtenues d'après l'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III-87) sont caractéristiques d'un β -D-glucose terminal. De plus, les déplacements chimiques des carbones correspondant aux six unités osidiques sont parfaitement identiques à ceux retrouvées dans **Ss24**, excepté le déblindage de C-4''' du rhamnose (Rha²) par rapport à celui de **Ss24** permet de suggérer que le glucose supplémentaire (Glc³) est attaché au rhamnose (Rha²) en cette position (Tableau III-19).

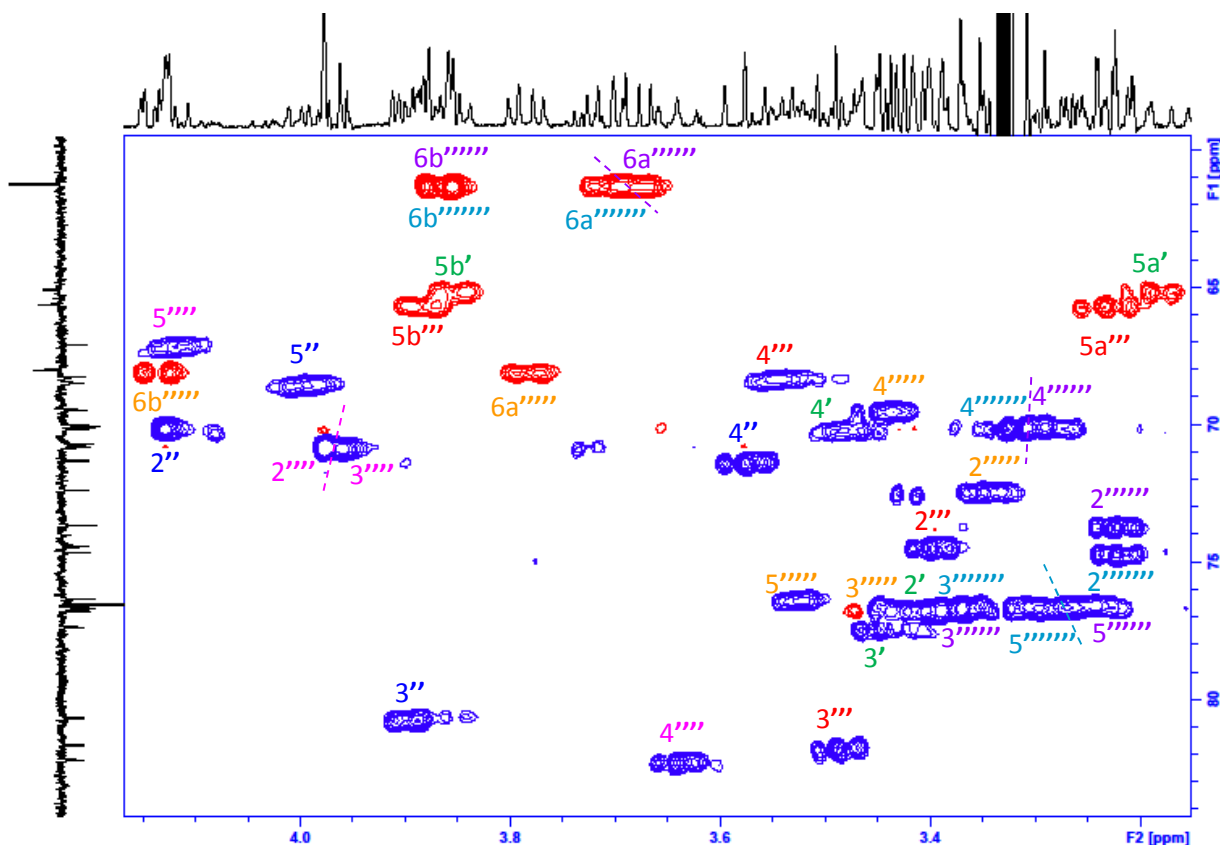


Figure III-87. Spectre HSQC *J*-modulé de la partie osidique du saponoside **Ss26**.

A l'aide de l'expérience HMBC (Figure III-88), cette suggestion sur le séquençage de ce bisdesmoside est confirmée par les corrélations observées entre :

- H-1'''''' Glc³ terminal/C-4'''' Rha²
- H-1'''' Rha²/C-3'''' Xyl²
- H-1'''' Xyl²/C-3'' Rha¹
- H-1'' Rha¹ /C-2' Xyl¹
- H-1' Xyl¹/C-3 de la génine
- H-1'''''' Glc² terminal/C-6'''''' Glc¹
- H-1'''''' Glc¹/C-28 de la génine.

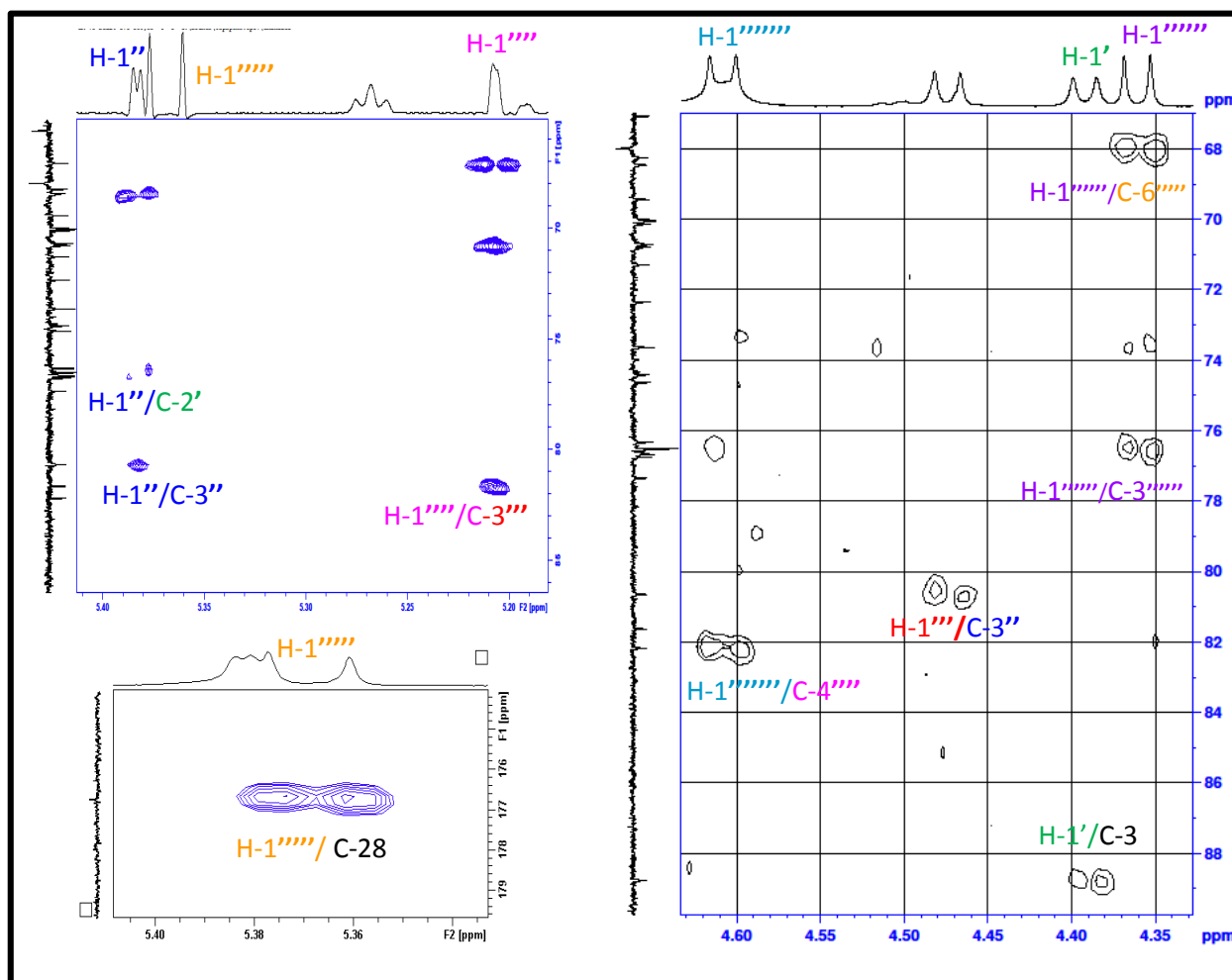


Figure III-88. Spectres HMBC du saponoside **Ss26** (zone des anomères).

Ces corrélations montrent que la séquence de la chaîne «éther» liée en C-3 de la génine est $[\beta\text{-D-Glc}^3\text{-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-L-Rha}^2\text{-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Xyl}^2\text{-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-L-Rha}^1\text{-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Xyl}^1]$ et que la chaîne «ester» en C-28 est $[\beta\text{-D-Glc}^2\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Glc}^1]$. Ces enchainements osidiques sont justifiés également par les effets rOe observés sur le spectre ROESY (Figure III-89) entre:

- H-1'''''' Glc³ terminal/H-4'''' Rha²
- H-1'''' Rha²/H-3'''' Xyl²
- H-1'''' Xyl²/H-3'' Rha¹
- H-1'' Rha¹ /H-2' Xyl¹
- H-1' Xyl¹/H-3 de la génine
- H-1'''''' Glc² terminal/H-6a'''' Glc¹

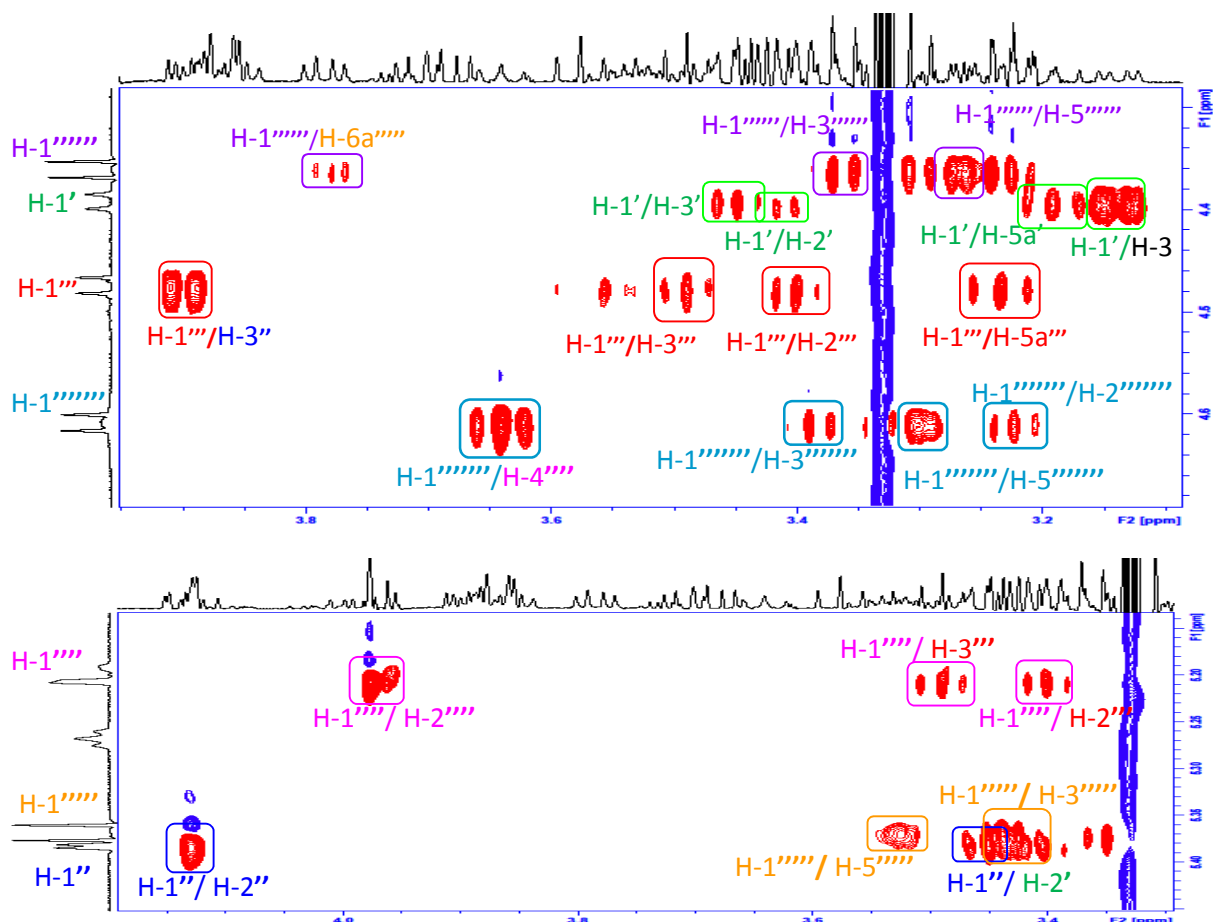
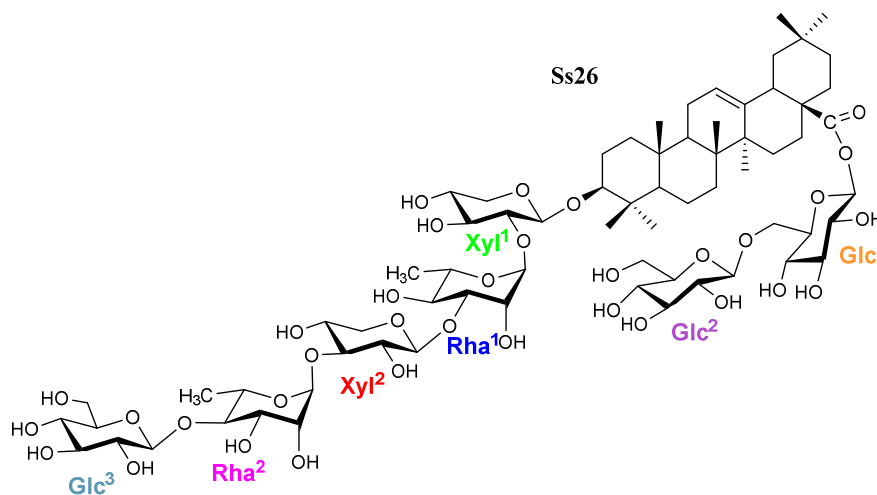


Figure III-89. Spectres ROESY du saponoside Ss26 (zone des anomères).

A ce stade de notre étude structurale, l'ensemble des données précédentes indiquent que la structure de ce saponoside est l'acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-oléanolique-28- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester. Une nouvelle saponine désignée par **scabiostellatoside D**.



Étude des spectres de RMN 1D et 2D du composé Ss27

L'examen des spectres de RMN ^1H et ^{13}C (Figure III-90) de Ss27 révèle la présence de sept protons anomériques corrélant sur le spectre HSQC J -modulé avec leurs carbones anomériques respectifs comme le montre la figure III-91 (Tableau III-19).

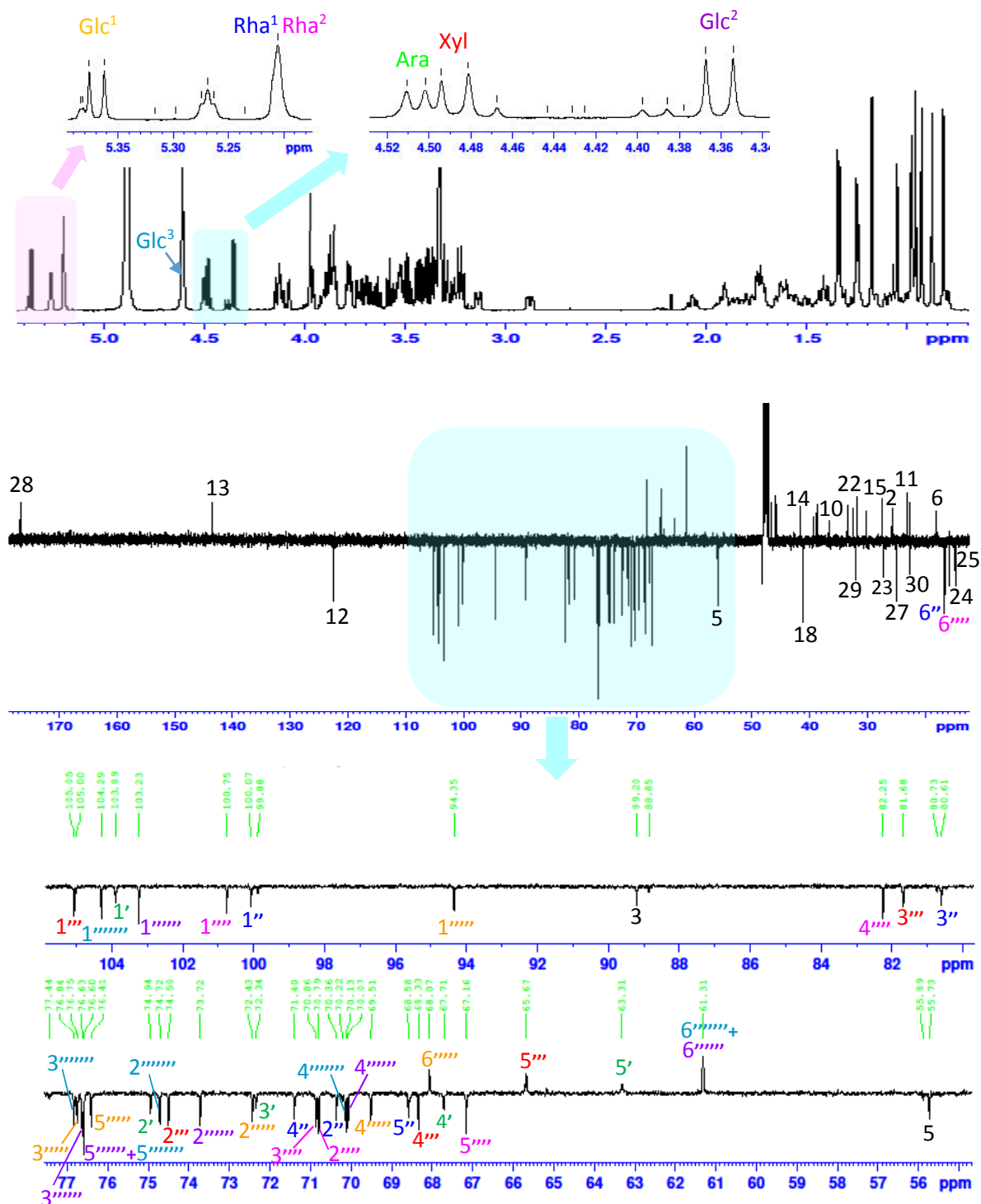


Figure III-90. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé du saponoside Ss27.

L'identification de l'hexose supplémentaire était aisément réalisée par comparaison avec la saponine **Ss25** qui sert de structure de base et **Ss26** qui est l'isomère de ce composé. En plus, l'expérience HSQC-TOCSY qui fait relier à partir de chaque proton anomérique les carbones appartenant à la même unité osidique a été utilisée, ceci nous facilite la distinction entre les protons superposés sur le spectre COSY ou l'HSQC *J*-modulé.

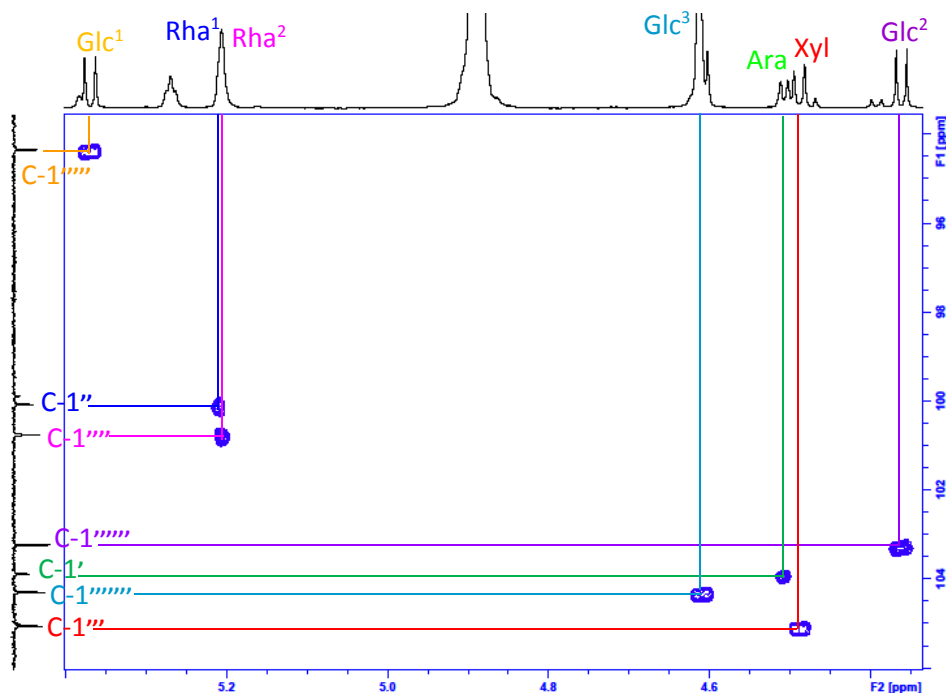


Figure III-91. Spectre HSQC *J*-modulé du saponoside **Ss27** (zone des anomères).

A partir du proton anomérique H-1'''''' à δ_H 4.61 ppm (d, $J=7.6$ Hz), le proton H-2'''''' est localisé à δ_H 3.22 ppm (dd, $J=8.9, 7.6$ Hz) sur le spectre COSY, où on observe une superposition avec le proton H-2'''' du Glc². L'analyse est ensuite effectuée sur le spectre TOCSY (Figure III-92) dont le proton anomérique présente d'autres corrélations avec H-6b'''''' (δ_H 3.86, dd, $J=12.0, 2.3$ Hz), H-6a'''''' (δ_H 3.71, dd, $J=12.0, 5.2$ Hz), H-3'''''' (δ_H 3.38, t, $J=8.9$ Hz), H-4'''''' (δ_H 3.31, t, $J=8.9$ Hz) et H-5'''''' (δ_H 3.27, m). L'attribution des signaux des carbones correspondants est réalisée à l'aide du spectre HSQC-TOCSY (Figure III-92) sur lequel des corrélations sont observées à partir du proton anomérique H-1'''''' avec C-2'''''' (δ_C 74.7), C-3'''''' (δ_C 76.7) et C-4'''''' (δ_C 70.1). Ces dernières corrélations permettent de corréler chaque proton à son carbone sur le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III-93). Les valeurs des constantes de couplage sont toutes supérieures à 7 Hz indiquant qu'il s'agit d'un β -D-glucopyranose. La comparaison des déplacements chimiques des carbones de ce sucre sont caractéristiques d'un β -D-glucose terminal.

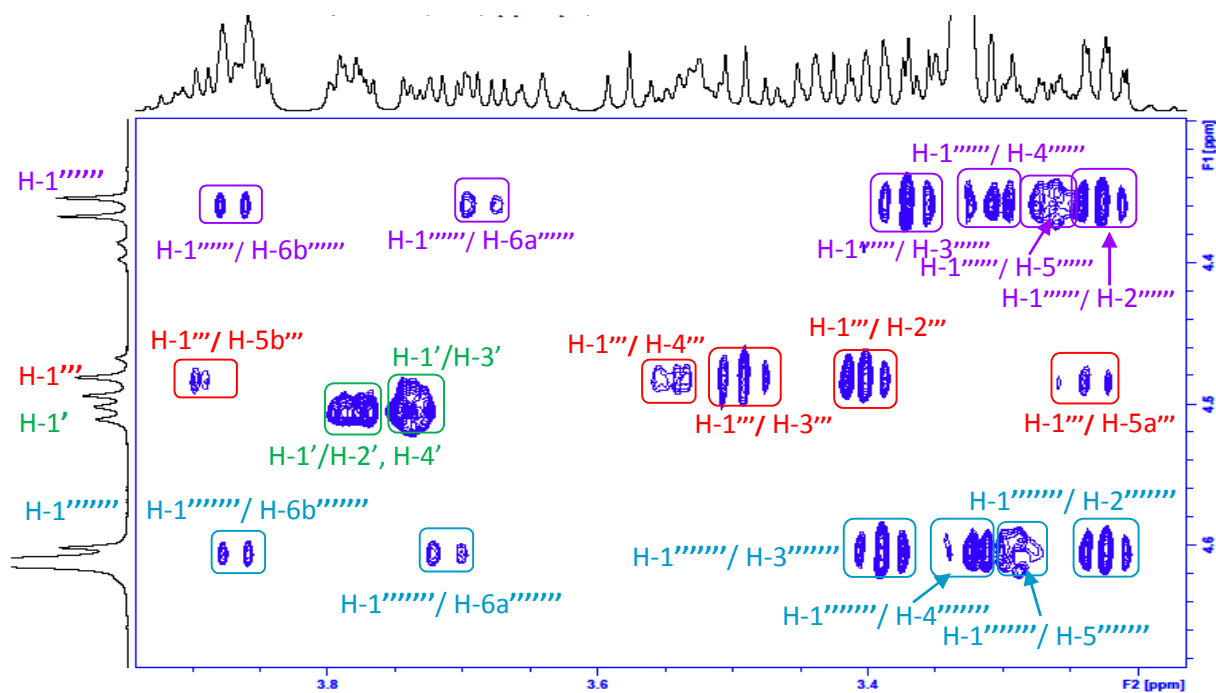
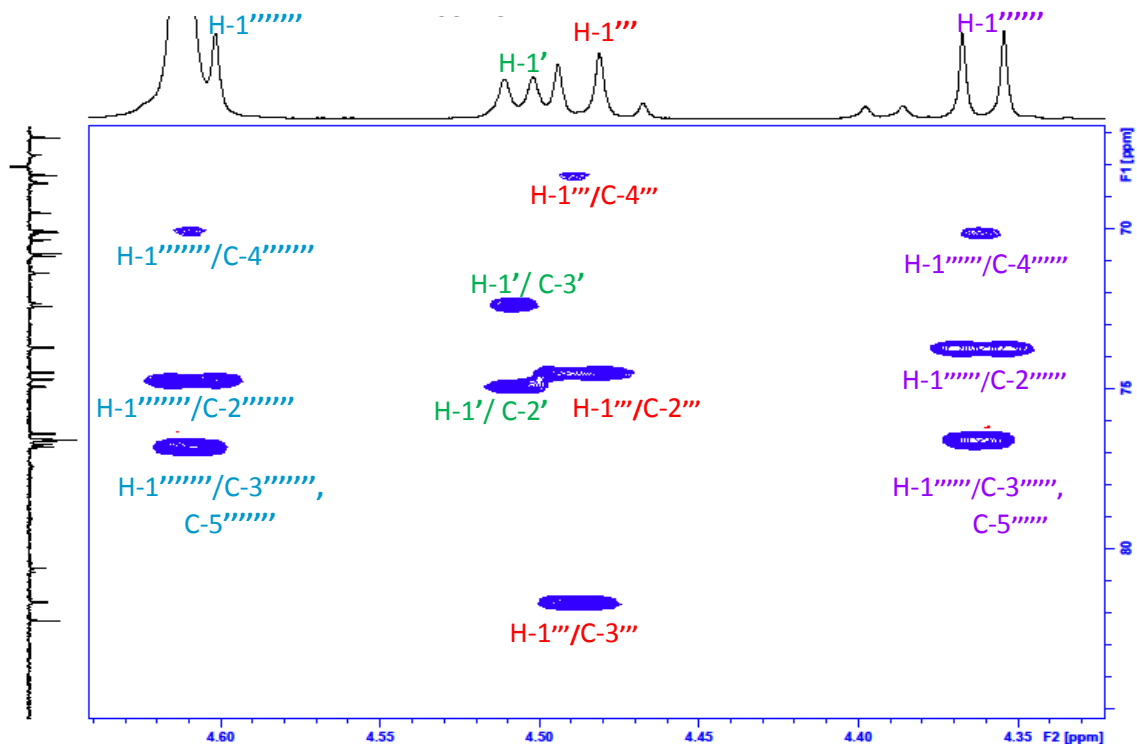
Spectre TOCSYSpectre HSQC-TOCSY

Figure III-92. Spectres TOCSY et HSQC-TOCSY du saponoside Ss23.

Les expériences TOCSY, HSQC-TOCSY, HSQC *J*-modulé, ROESY et HMBC permettent d'assigner sans difficulté tous les déplacements chimiques des protons et carbones de la partie osidique du saponoside Ss27 (Tableau III-19, figure III-93).

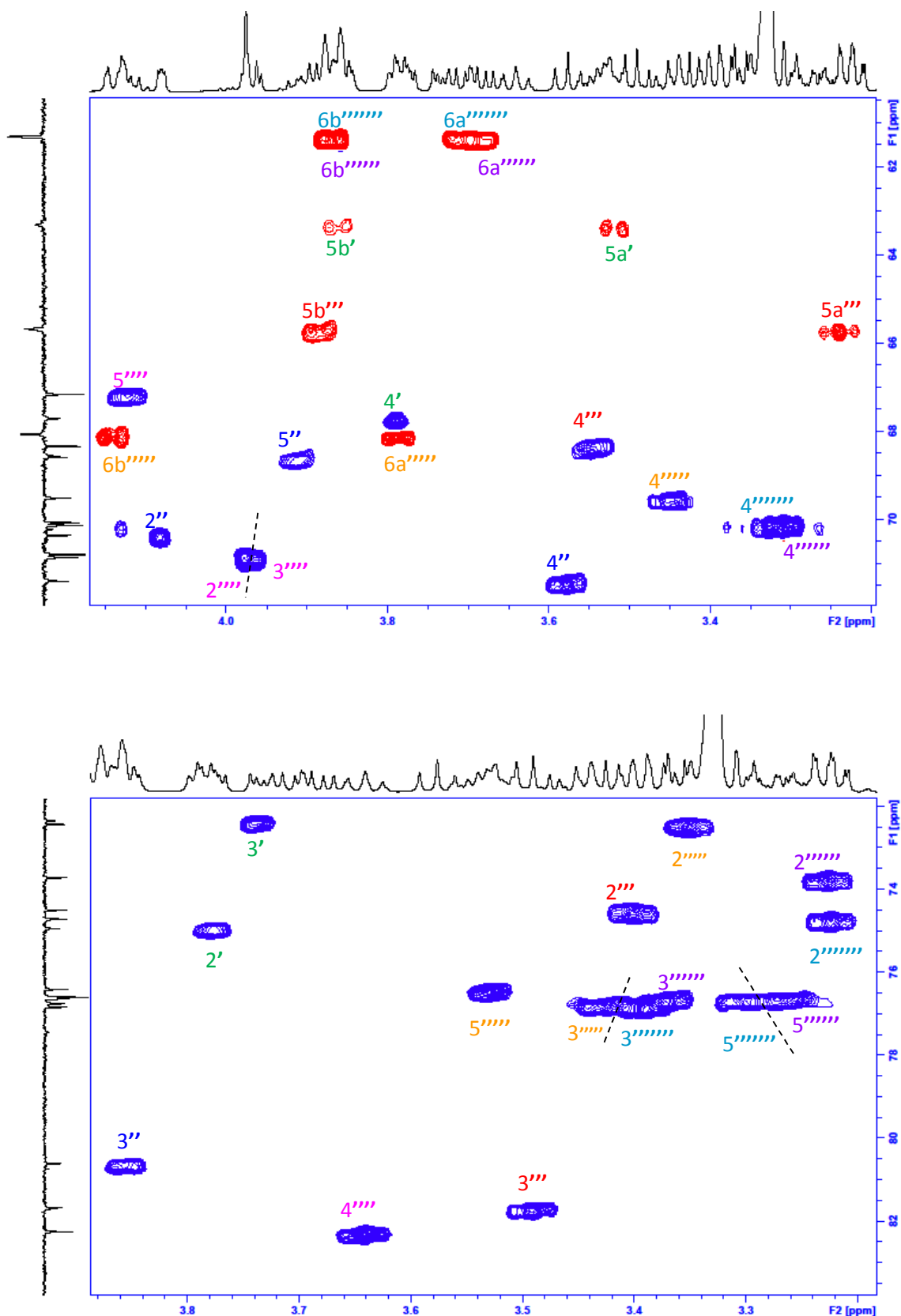


Figure III-93. Spectres HSQC *J*-modulé de la partie osidique du saponoside Ss27.

Ce saponoside (Ss27) présente les mêmes enchainements osidiques que ceux rencontrés dans Ss26 mais avec l' α -L arabinose comme premier sucre de la chaîne [β -D-Glc³-(1→4)- α -L-

Rha²-(1→3)-β-D-Xyl-(1→3)-α-L-Rha¹-(1→2)- α-L-Ara] liée en C-3 de la génine. La chaîne ester en C-28 est [β-D- Glc²-(1→6)-β-D- Glc¹]. Ces enchainements osidiques sont réalisés par analyse du spectre HMBC (Figure III-94) sur lequel les corrélations suivantes sont observées:

- H-1'''''' Glc³ terminal/C-4'''' Rha²
- H-1'''' Rha²/C-3'''' Xyl²
- H-1'''' Xyl/C-3'' Rha¹
- H-1'' Rha¹ /C-2' Ara
- H-1' Ara/C-3 de la génine
- H-1'''''' Glc² terminal/C-6'''''' Glc¹
- H-1'''''' Glc¹/C-28 de la génine.

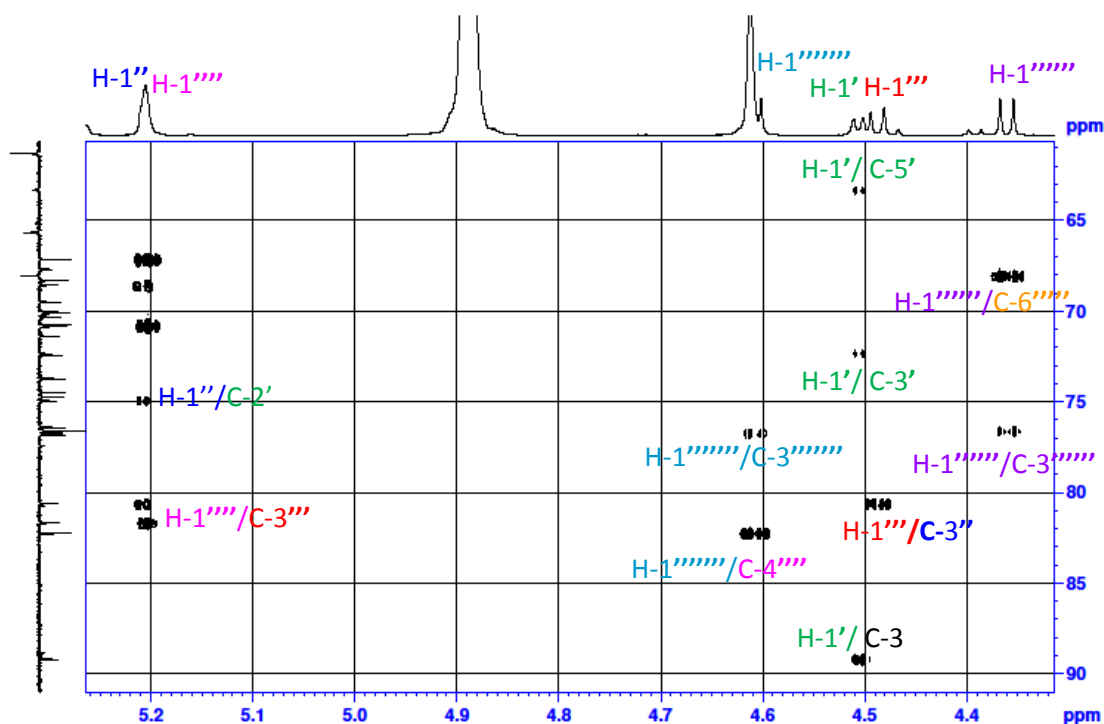


Figure III-94. Spectre HMBC du saponoside Ss27 (zone des protons anomériques).

Le séquençage de la partie osidique est confirmé par les effets rOe observés sur le spectre ROESY (Figure III-95) entre : H-1'''''' Glc³ terminal/H-4'''' Rha², H-1'''' Rha²/H-3'''' Xyl, H-1'''' Xyl/H-3'' Rha¹, H-1'' Rha¹ /H-2' Ara, H-1' Ara/H-3 de la génine et H-1'''''' Glc² terminal/H-6a'''''' Glc¹.

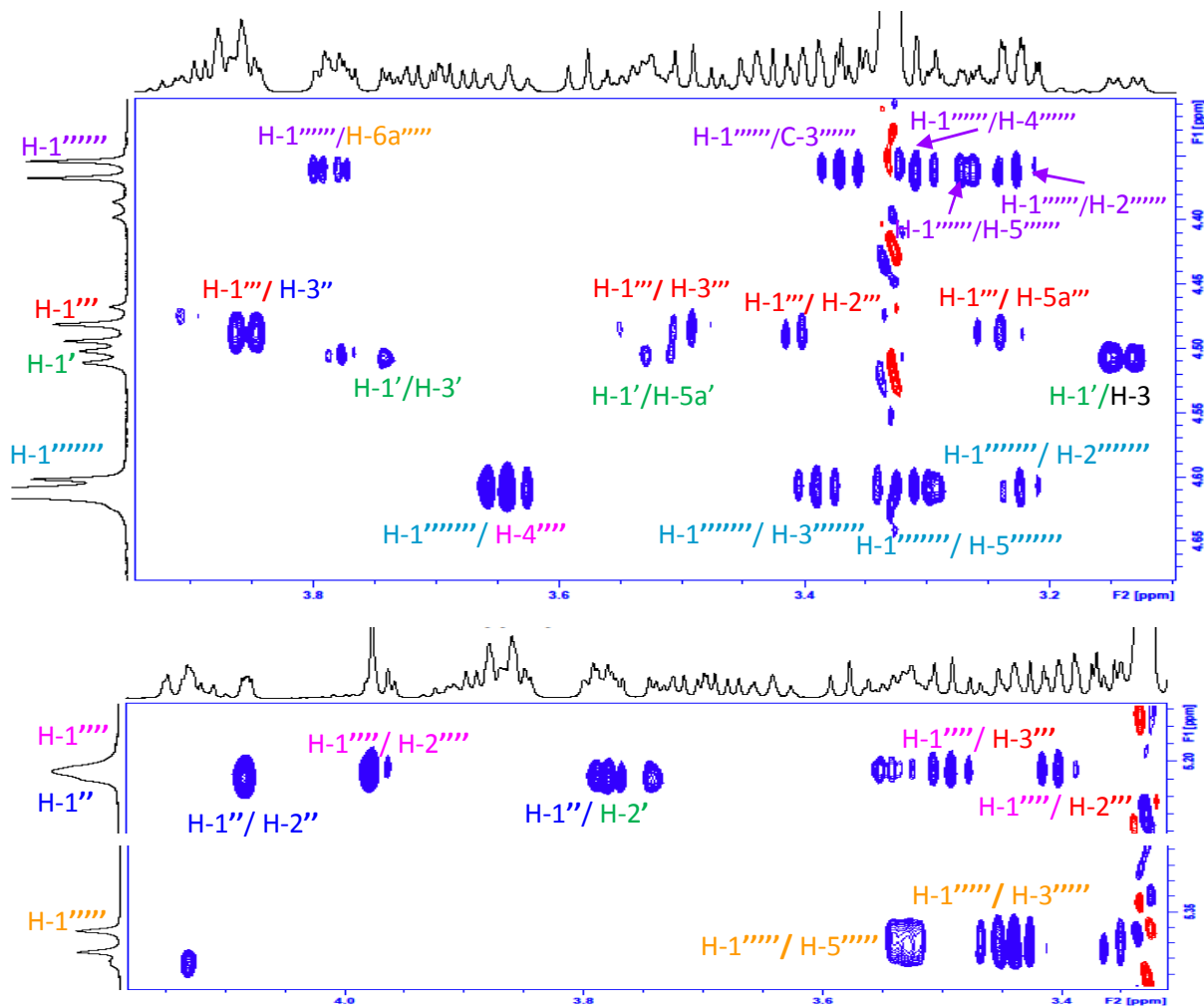


Figure III-95. Spectres ROESY de la région des protons anomériques de la partie osidique du saponoside **Ss27**.

L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau III-19), nous a permis d'attribuer à la nouvelle saponine **Ss27** la structure suivante : 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl- oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

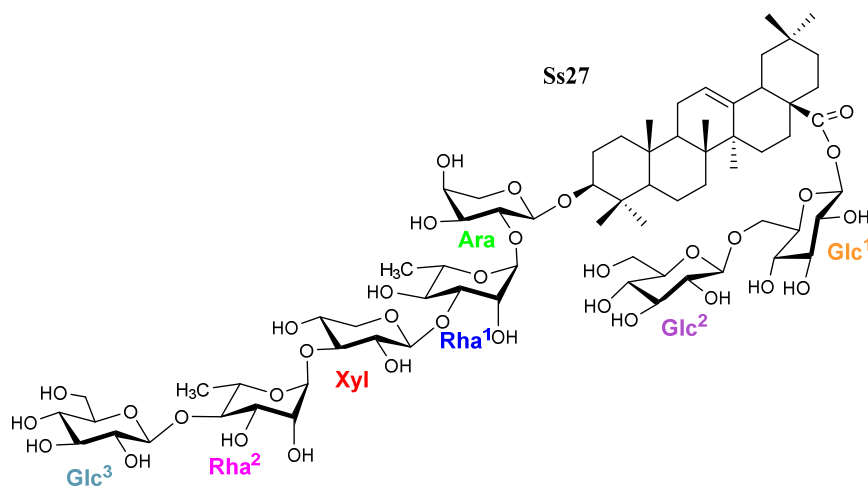
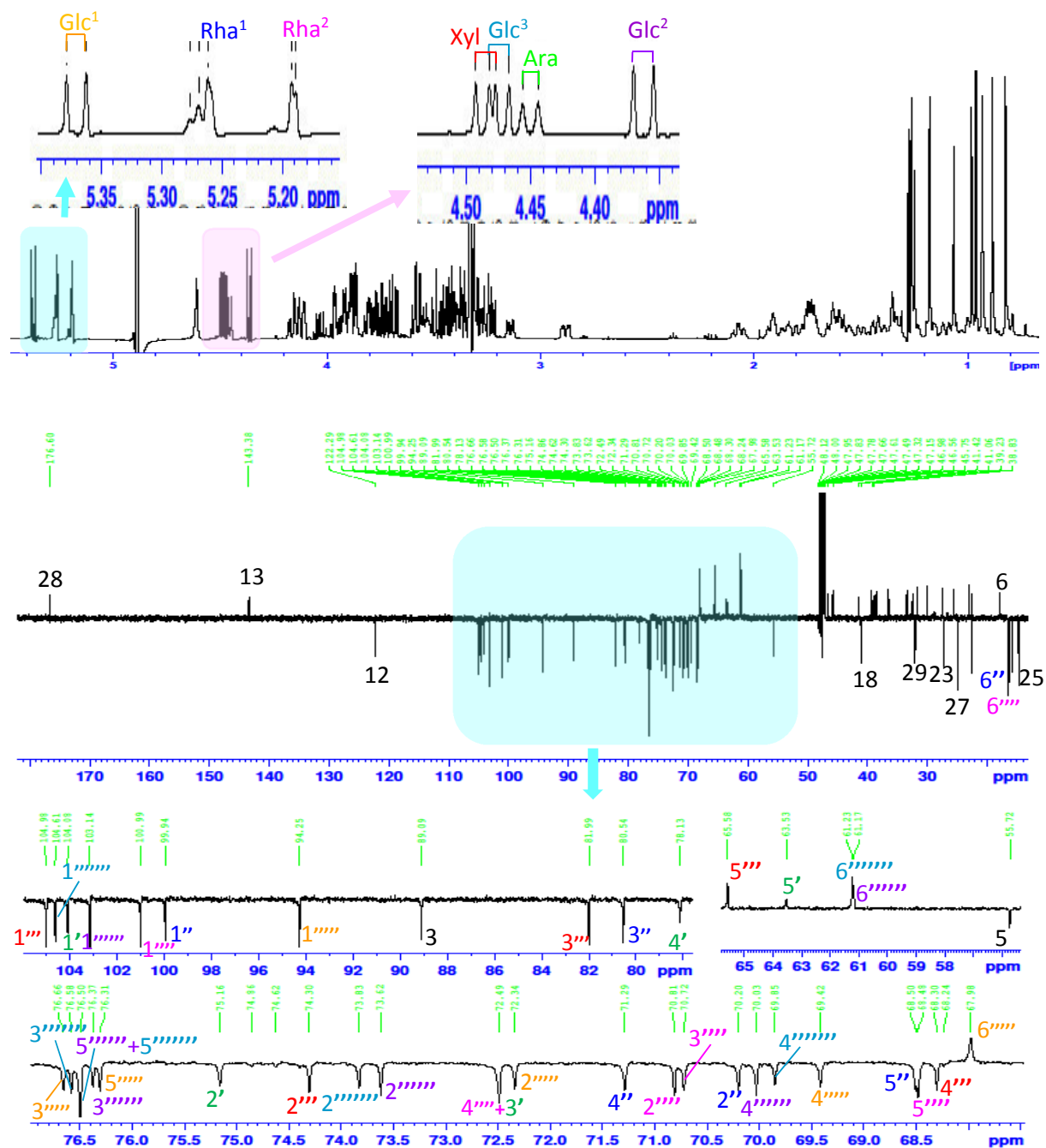


Tableau III-19. Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des composés **Ss26** et **Ss27** dans CD₃OD.

	Ss26		Ss27	
	$\delta_{\text{H m}}$ (J en Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H m}}$ (J en Hz)	δ_{C}
	Xyl¹ (à C-3)		ara (à C-3)	
1'	4.39 d (7.1)	104.9	4.51 d (5.3)	103.9
2'	3.37 dd (8.1, 7.0)	76.7	3.78 dd (7.1,5.3)	74.9
3'	3.45 t (8.0)	77.4	3.73 dd (7.1,3.4)	72.3
4'	3.47 m	70.2	3.79 m	67.7
5'	3.21 dd (10.5,9.1)	65.1	3.52 brd (12.4)	63.3
	3.85 dd (10.5,5.2)		3.86 m	
Rha¹				
1''	5.38 d (1.7)	99.9	5.21 brs	100.1
2''	4.13 dd (3.1,1.7)	70.1	4.08 dd (3.0,1.7)	70.2
3''	3.90 dd (9.5,3.1)	80.7	3.85 dd (9.5,3.0)	80.6
4''	3.58 t (9.5)	71.3	3.58 t (9.5)	71.4
5''	4.01 m	68.5	3.91 m	68.6
6''	1.25 d (6.2)	16.6	1.25 d (6.2)	16.6
	Xyl²		Xyl	
1'''	4.47 d (7.7)	105.0	4.49 d (7.6)	105.1
2'''	3.40 dd (8.8,7.7)	74.4	3.40 dd (8.8,7.6)	74.5
3'''	3.49 t (8.8)	81.6	3.48 t (8.8)	81.7
4'''	3.53 m	68.3	3.55 m	68.3
5'''	3.24 dd (11.4,10.1)	65.6	3.24 dd (11.0,9.2)	65.7
	3.88 dd (11.4,2.3)		3.88 dd (11.0,5.3)	
Rha²				
1''''	5.21 d (1.6)	100.7	5.19 br	100.8
2''''	3.98 dd (3.3,1.6)	70.8	3.98 dd (3.3,1.5)	70.9
3''''	3.97 dd (9.2,3.3)	70.7	3.97 dd (9.2,3.3)	70.8
4''''	3.64 t (9.2)	82.2	3.64 t (9.2)	82.3
5''''	4.12 m	67.1	4.13 m	67.2
6''''	1.34 d (6.2)	16.3	1.35 d (6.2)	16.6
Glc³				
1'''''	4.61 d (7.9)	104.6	4.61 d (7.6)	104.3
2'''''	3.24 dd (8.4,7.9)	74.6	3.22 dd (8.9,7.6)	74.7
3'''''	3.39 t (8.4)	76.6	3.38 t (8.9)	76.7
4'''''	3.33 m	71.3	3.31 t (8.9)	70.1
5'''''	3.30 m	76.5	3.27 m	76.6
6'''''	3.68 dd (11.9,5.5)	61.2	3.71 dd (12.0,5.2)	61.3
	3.86 dd (11.9,2.2)		3.86 dd (12.0,2.3)	
Glc¹ (à C-28)				
1''''''	5.37 d (8.1)	94.3	5.37 d (8.2)	94.4
2''''''	3.35 m	72.4	3.35 t (8.2)	72.4
3''''''	3.42 t (8.8)	76.6	3.44 t (8.2)	76.7
4''''''	3.44 t (8.8)	69.4	3.45 t (8.2)	69.5
5''''''	3.51 m	76.3	3.52 m	76.4
6''''''	3.79 dd (11.7,5.0)	68.0	3.79 dd (11.4,4.7)	68.1
	4.14 dd (11.7,1.6)		4.14 dd (11.4,1.7)	
Glc²				
1'''''''	4.36 d (7.8)	103.2	4.36 d (7.8)	103.2
2'''''''	3.24 dd (8.4,7.8)	73.6	3.22 t (7.8)	73.7
3'''''''	3.44 m	76.8	3.37 dd (8.3,7.8)	76.8
4'''''''	3.31 t (8.5)	70.1	3.31 t (8.3)	70.1
5'''''''	3.27 m	76.5	3.26 m	76.6
6'''''''	3.68 dd (11.9,5.5)	61.2	3.67 dd (11.9,5.5)	61.3
	3.86 dd (11.9,2.2)		3.86 m	

III.2.1.4. Elucidation structurale du composé Ss28

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS du composé Ss28 montre un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 1521.7075, identique à celui de Ss27 et comparativement à Ss25 sa masse correspond à la présence d'un hexose supplémentaire. Cependant, cet hexose devrait être attaché à l'arabinose vu le blindage de son proton anomérique sur le spectre de RMN 1H (Figure III-96) par rapport à celui de Ss25 et Ss27.



La partie osidique du composé **Ss28** s'avère presque identique à celle de **Ss25** comme l'indique l'analyse des spectres de RMN 2D (COSY, TOCSY, ROESY et HSQC *J*-modulé). Cette analyse permet d'identifier chaque unité osidique à partir de chaque anomère correspondant, en effet, six sont commun du point de vu de δ_H et δ_C avec le **Ss25** :

- Deux β -D-glucopyranosyles à partir des protons résonnant à δ_H 5.37 (d, $J = 8.1$ Hz, **Glc¹**) et δ_H 4.36 (d, $J = 7.8$ Hz, **Glc²**).
- Deux α -L-rhamnopyranosyles à partir des protons résonnant à δ_H 5.26 (d, $J = 1.8$ Hz, **Rha¹**) et δ_H 5.19 (d, $J = 1.6$ Hz, **Rha²**).
- Un β -D-xylopyranosyle à partir du proton résonnant à δ_H 4.49 (d, $J = 7.7$ Hz, **Xyl**).
- Un α -L-arabinopyranosyle à partir du proton résonnant à δ_H 4.45 (d, $J = 6.9$ Hz, **Ara**).

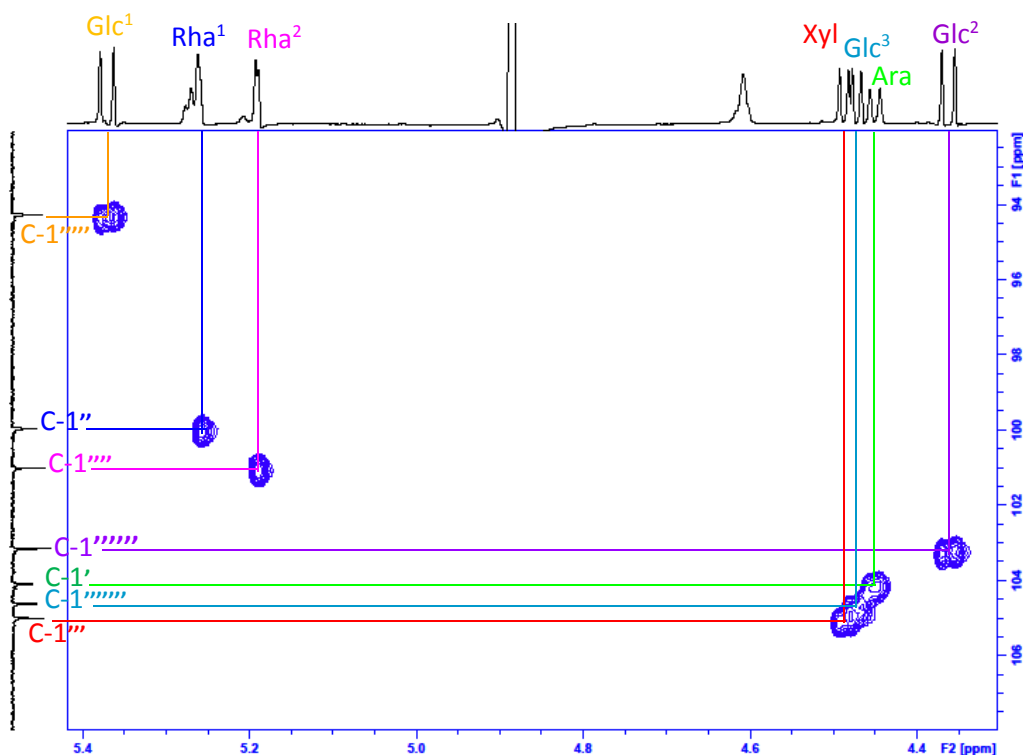


Figure III-97. Spectre HSQC *J*-modulé du saponoside **Ss28** (zone des anomères).

Le septième système de spin est identifié à un β -D-glucose (**Glc³**) dont le proton anomérique H-1'''' résonne à δ_H 4.47 ppm (d, $J = 7.6$ Hz). Ce dernier corrèle sur le spectre TOCSY (Figure III-98) avec les protons H-2'''' (δ_H 3.30, m), H-3'''' (δ_H 3.38, t, $J=8.9$ Hz), H-4'''' (δ_H 3.29, t, $J=8.9$ Hz), H-5'''' (δ_H 3.33, m) et les deux protons géminés H-6a'''' (δ_H 3.71, dd, $J=12.0,5.2$ Hz) et H-6b'''' (δ_H 3.86, dd, $J=12.0,2.3$ Hz). Les valeurs des constantes de

couplage et des déplacements chimiques des carbones correspondants sont en accord avec un β -D-glucopyranose terminal.

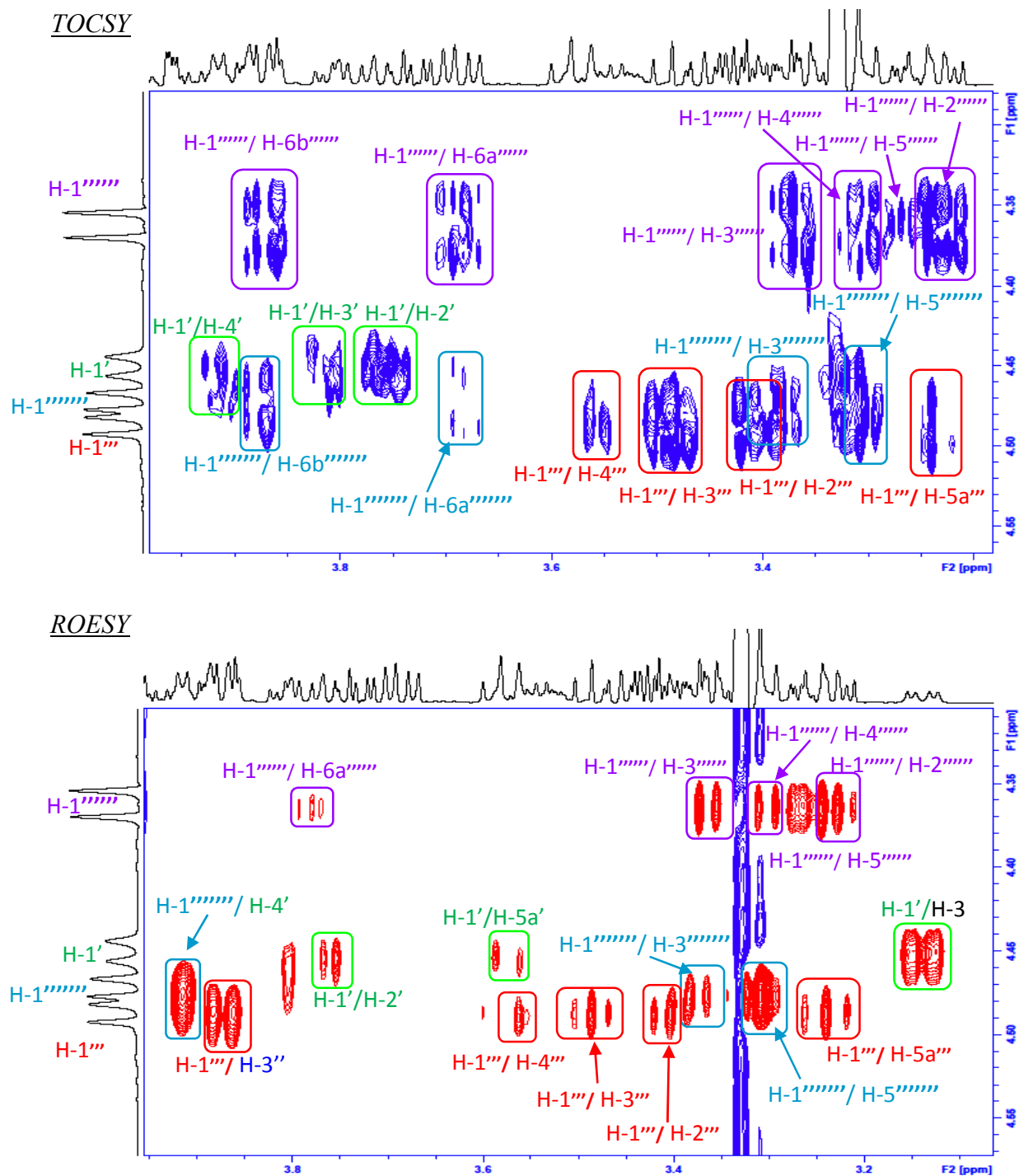


Figure III-98. Spectres TOCSY et ROESY du composés Ss28.

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones de la partie osidique du saponoside Ss28 (Tableau III-20) ont été assignés par analyse du spectre HSQC J -modulé (Figure III-99). Néanmoins, une différence notable dans l' α -L-arabinose lié à la génine en C-3

par rapport à celui dans **Ss2**, décelée par les signaux des protons de ce sucre qui ne résonnent pas aux mêmes champs pour ces deux produits. Ce qui signifie que son environnement a changé. Cette variation est due au sucre supplémentaire (Glc³) qui s'est accroché à α -L-arabinose en position C-4' dont le carbone est déblindé de δ_C 67.7 à 78.1 ppm.

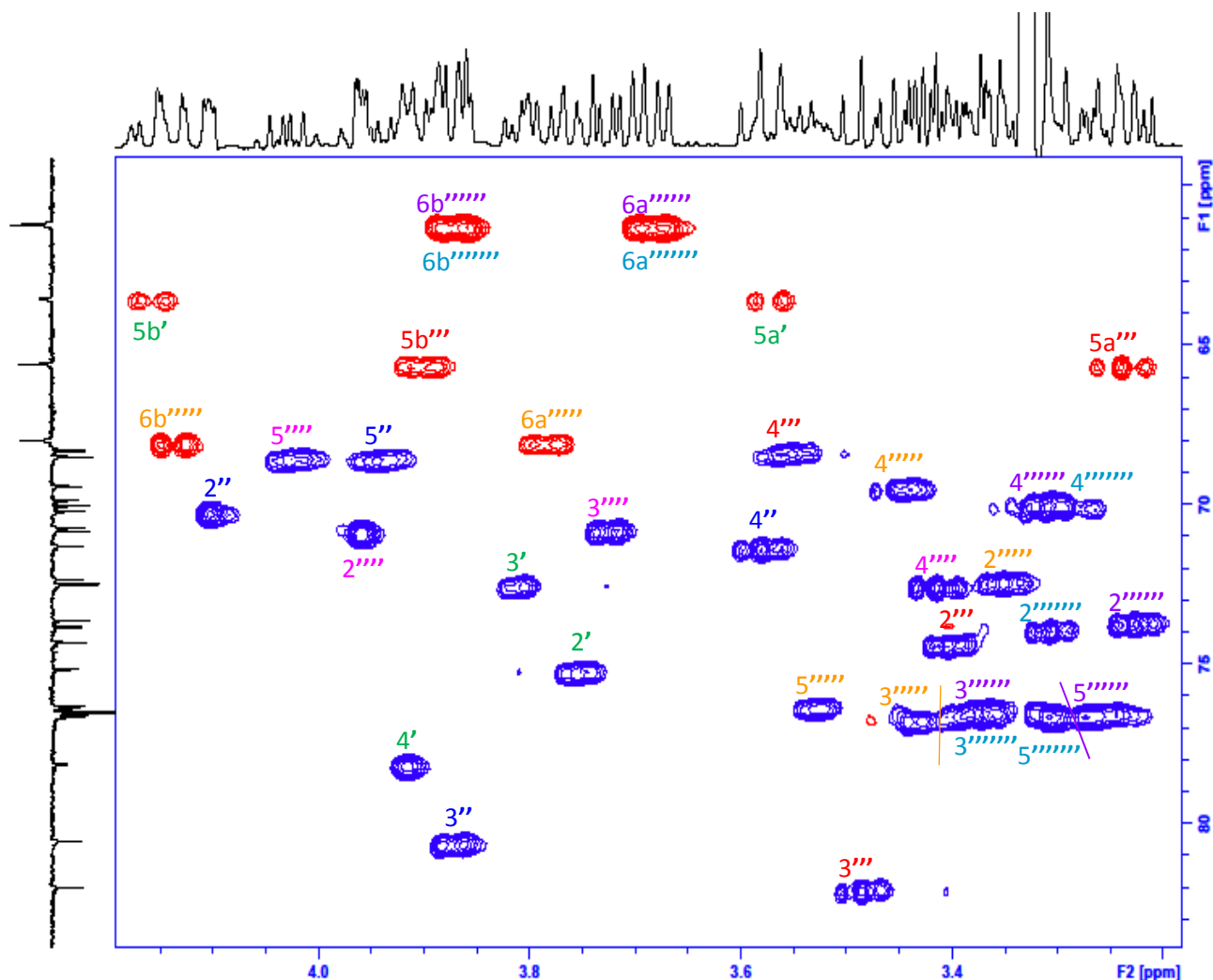


Figure III-99. Spectre HSQC *J*-modulé de la partie osidique du composé **Ss28**.

L'enchaînement des unités osidiques ainsi que les points d'ancrage des sucres sur la génine sont élucidés grâce à l'examen du spectre HMBC (Figure III-100). Sur lequel les mêmes corrélations de **Ss25** sont retrouvées en plus de la corrélation entre H-1'''''' du glucose supplémentaire (Glc³) et C-4' de l'arabinose (Ara). Ceci est confirmé par l'effet rOe observé entre H-1''''''/H-4' sur le spectre ROESY (Figure III-98).

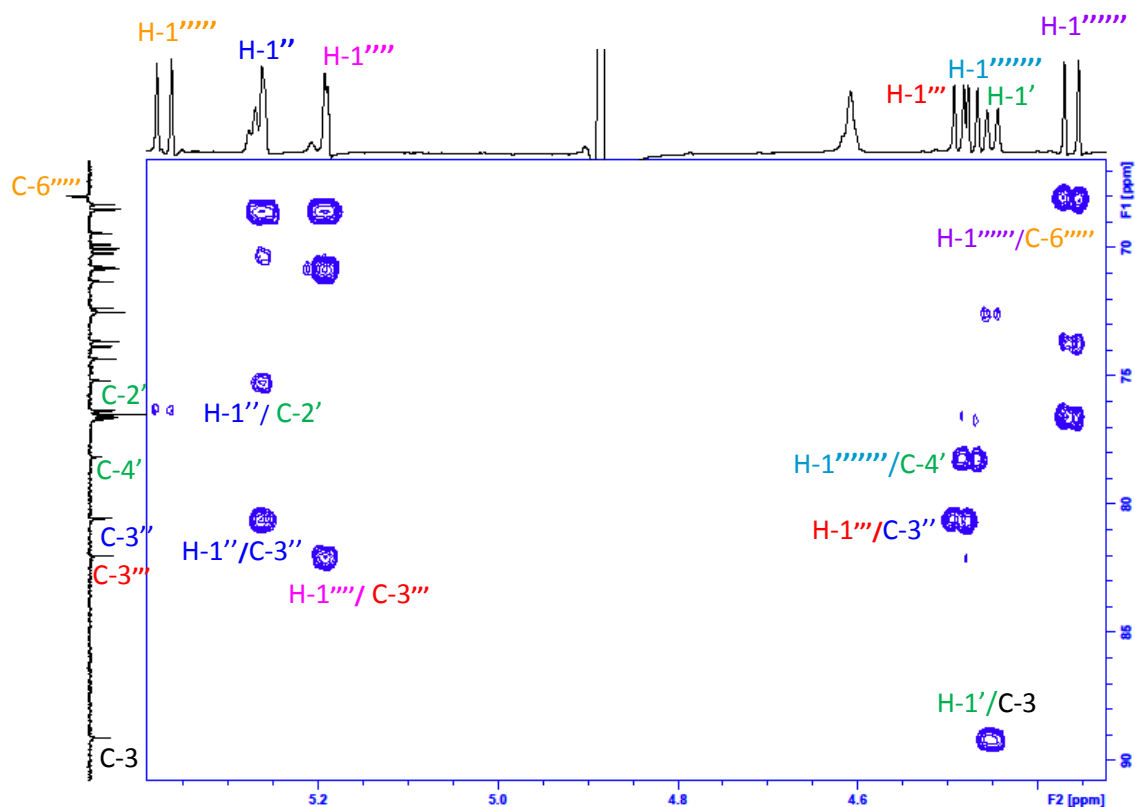
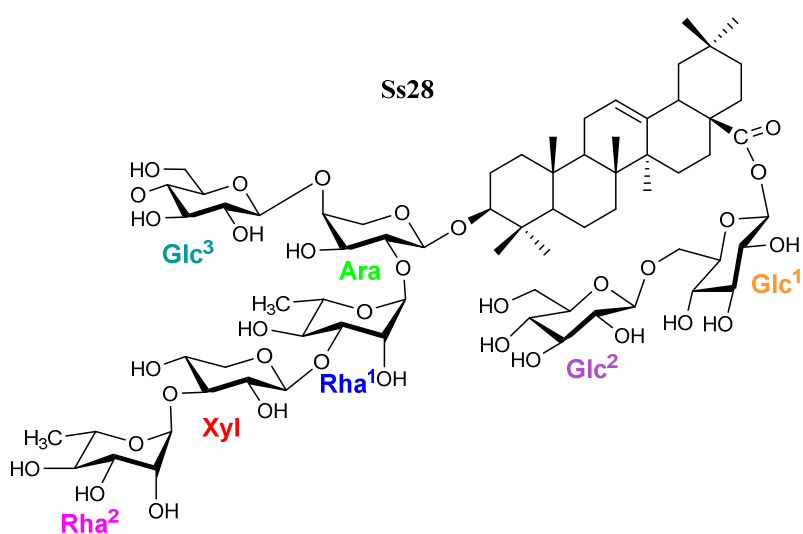


Figure III-100. Spectre HMBC du composé **Ss28** (zone des protons anomériques).

Avec ces données nous avons pu identifier le nouveau saponoside **Ss28** comme étant l'acide 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranonosyl-oleanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester, désigné par **scabiostellatoside E**.



III.2.1.5. Elucidation structurale du composé Ss29

Le composé **Ss29** montre dans le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 1521.7080 $[M + Na]^+$ ($C_{70}H_{114}O_{34}Na$, calc. 1521.7089), suggérant une formule moléculaire $C_{70}H_{114}O_{34}$. L'analyse du spectre de masse présente des ions fragments à m/z :

- 1491 $[M + Na-30]^+$ dû à la perte d'un C-OH.
- 1477 $[M + Na-146-44]^+$ dû à la perte du carbonyle et un désoxyhexose.
- 1359 $[M + Na-162]^+$ dû à la perte d'un hexose.
- 1315 $[M + Na-162-44]^+$ dû à la perte d'un hexose et du carbonyle.

Ces fragments n'ont pas donné des informations sur la nature des unités osidiques de ce composé. Seules, la perte du carbonyle et la présence d'ion fragment à m/z 1315 ($= [M+Na]^+$ de **Ss24** et **Ss25**) nous orientent vers la présence d'un monodesmoside avec sept unités osidiques.

L'examen du spectre de RMN 1H (Figure III-101) de **Ss29** révèle la présence de sept protons anomériques à δ_H 4.40 d (7.2), 5.38 d (1.7), 4.47 d (7.7), 5.21 *sl*, 4.64 d (7.9), 4.48 d (8.0), 4.42 d (7.9). Sur le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III-102), leurs carbones respectifs sont localisés à δ_C 105.0, 99.8, 105.0, 100.7, 104.2, 103.0 et 103.2.

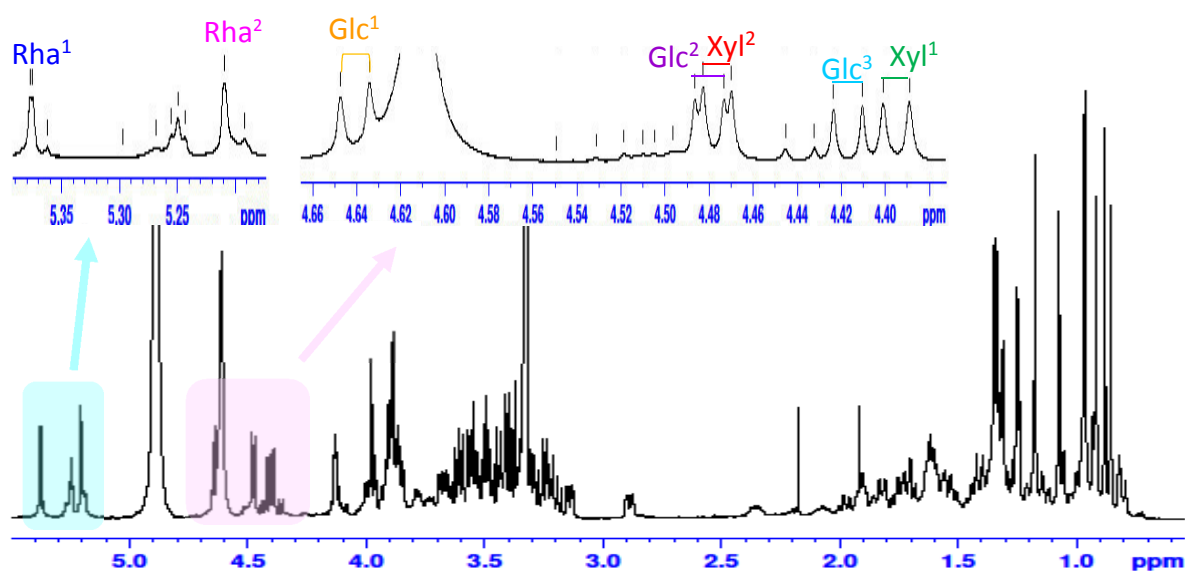


Figure III-101. Spectre de RMN 1H du composé **Ss29**.

La partie osidique du composé **Ss29** est comparable à celle de **Ss26** comme l'indique l'analyse des spectres de RMN 2D (COSY, TOCSY, ROESY et HSQC *J*-modulé). Cette analyse permet d'identifier la même chaîne pentasaccharide [β -D-Glc³-(1→4)- α -L-Rha²-(1→3)- β -D-Xyl²-(1→3)- α -L-Rha¹-(1→2)- β -D-Xyl¹] liée en C-3 de l'acide oléanolique retrouvée dans **Ss26**. Les deux autres unités osidiques n'ont plus la séquence diglucosylique en C-28, mais plutôt un prolongement de la chaîne en C-3 de la génine.

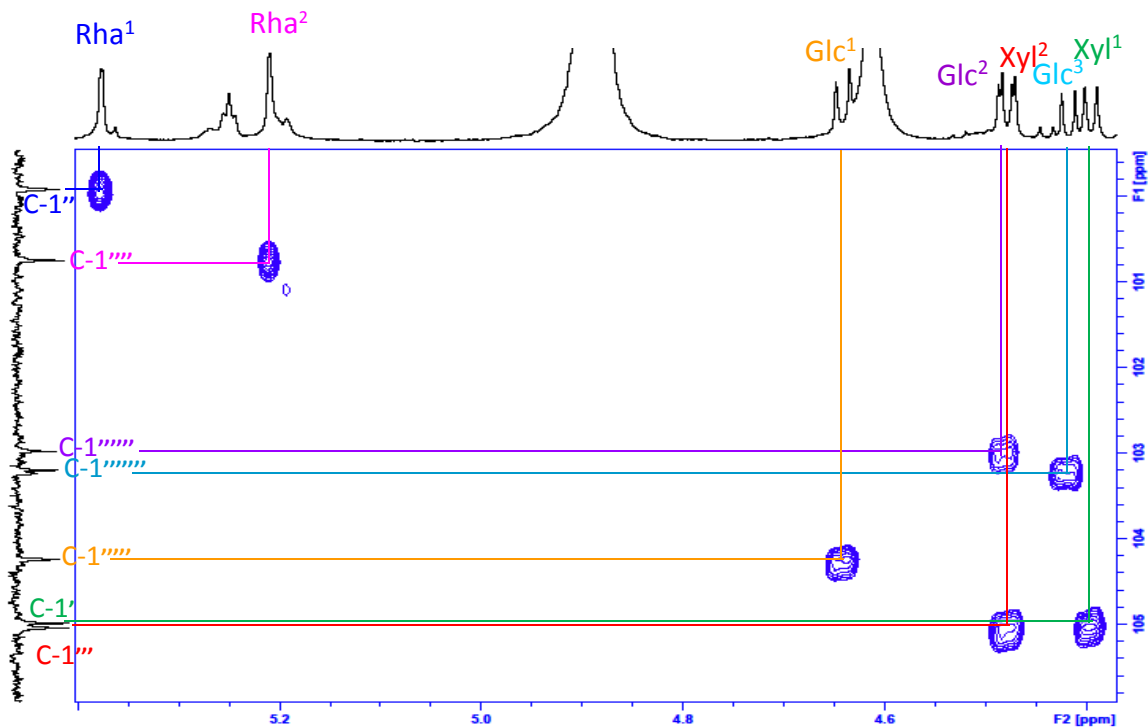


Figure III-102. Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Ss29** (zone des anomères).

Identification des glucoses

- *Identification de Glc¹*

A l'aide des spectres TOCSY (Figure III-103) et HSQC-TOCSY (Figure III-106), un système de spin à sept protons est identifié à partir du proton anomérique H-1'''' à δ_H 4.64 (d, $J=7.9$ Hz). Ce dernier corrèle sur le spectre TOCSY avec les protons H-2'''' (δ_H 3.29, dd, $J=8.4, 7.9$ Hz), H-3'''' (δ_H 3.55, t, $J=8.4$ Hz), H-4'''' (3.61, t, $J=8.4$ Hz), H-5'''' (δ_H 3.42, m) et H-6a,b'''' (δ_H 3.90, m). Les signaux des carbones respectifs sont attribués par analyse des spectres HSQC *J*-modulé (Figure III-107) et HSQC-TOCSY (Figure III-106). En effet, des corrélations sont observées entre H-3''''/ C-2'''' (δ_C 74.4), H-4''''/ C-3'''' et C-5'''' (δ_C 75.2), H-5''''/ C-6'''' (δ_C 60.4) et entre H-3'''' , H-5''''/ C-4'''' (δ_C 79.1). Les valeurs des constantes de couplage (supérieures à 7 Hz) et des déplacements de ces carbones, parmi lesquels le déblindage de C-4'''' indiquent qu'il s'agit d'un β -D-glucose substitué en position 4.

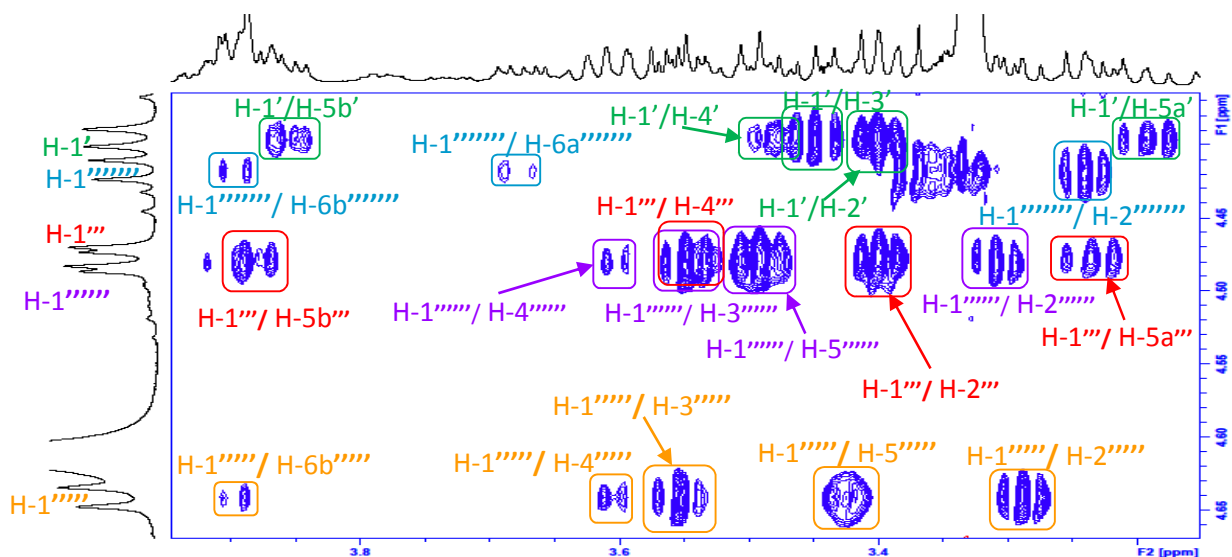


Figure III-103. Spectre TOCSY du composé Ss29 [F1 : 4.40-4.65 ppm].

- *Identification de Glc²*

Un deuxième β -D-glucose est identifié à partir du doublet anomérique H-1'''' à δ_H 4.48 ppm ($J=8.0$ Hz). De la même manière, ce dernier présente des corrélations sur le spectre TOCSY (Figure III-103) avec les protons H-2'''' (δ_H 3.31, dd, $J=8.5, 8.0$ Hz), H-3'''' (δ_H 3.55, t, $J=8.5$ Hz), H-4'''' (3.61, t, $J=8.5$ Hz), H-5'''' (δ_H 3.49, m) et H-6a,b'''' (δ_H 3.90, m). L'attribution des carbones respectifs est réalisée par l'examen combiné des spectres HSQC J -modulé et HSQC-TOCSY. Les valeurs des constantes de couplage et les effets rOe observés sur le spectre ROESY (Figure III-104) entre H-1''''/H-3'''' et H-1''''/H-5'''' confirment que cet hexose est un β -D-glucopyranose dont le déblindage de C-4'''' (δ_C 78.8) indique une substitution en cette position.

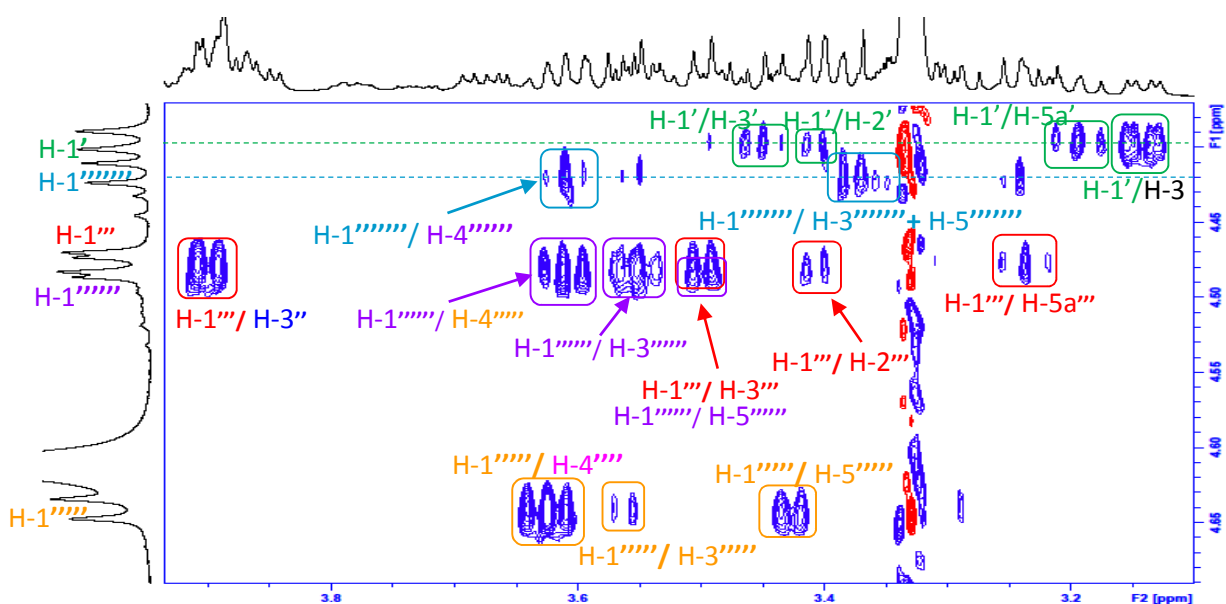


Figure III-104. Spectre ROESY du composé Ss29 [F1 : 4.35-4.70 ppm].

- *Identification de Glc³*

Le dernier glucose (Glc³) dont le proton anomérique H-1'''''' résonne à δ_H 4.42 (d, $J=7.9$ Hz) est identifié après élimination des signaux des autres unités osidiques. Le proton H-2'''''' est localisé à δ_H 3.24 (dd, $J=8.6, 7.9$ Hz) en corrélant avec H-3'''''' (δ_H 3.24, t, $J=8.6$ Hz). Ce dernier couple avec H-4'''''' (δ_H 3.33, m) quant à lui-même corrèle avec H-5'''''' (δ_H 3.36, m) qui couple avec les deux protons H-6a'''''' à δ_H 3.68 (dd, $J=11.8, 5.5$ Hz) et H-6b'''''' à δ_H 3.90 (dd, $J=11.8, 2.2$ Hz). Les déplacements chimiques des carbones respectifs élucidés par analyse du spectre HSQC J -modulé sont caractéristiques d'un β -D-glucose terminal.

Identification des deux rhamnoses

Le premier rhamnose (Rha¹) est identifié à partir du doublet anomérique H-1'' à δ_H 5.38 ppm (d, $J=1.4$ Hz). L'analyse des spectres TOCSY (Figure III-105) et ROESY permet d'attribuer les signaux des protons d'un 6-désoxyhexose dont les valeurs des constantes de couplage et des déplacements chimiques des carbones correspondants (tableau III-20) sont caractéristiques d'un α -L-rhamnose (Rha¹) substitué en position 3.

Le deuxième rhamnose (Rha²) dont le proton anomérique H-1'''' résonne à δ_H 5.21 ppm sous la forme d'un singulet large présente des valeurs des déplacements chimiques (¹H et ¹³C) parfaitement identiques à ceux du rhamnose (Rha²) observé dans le composé **Ss24**.

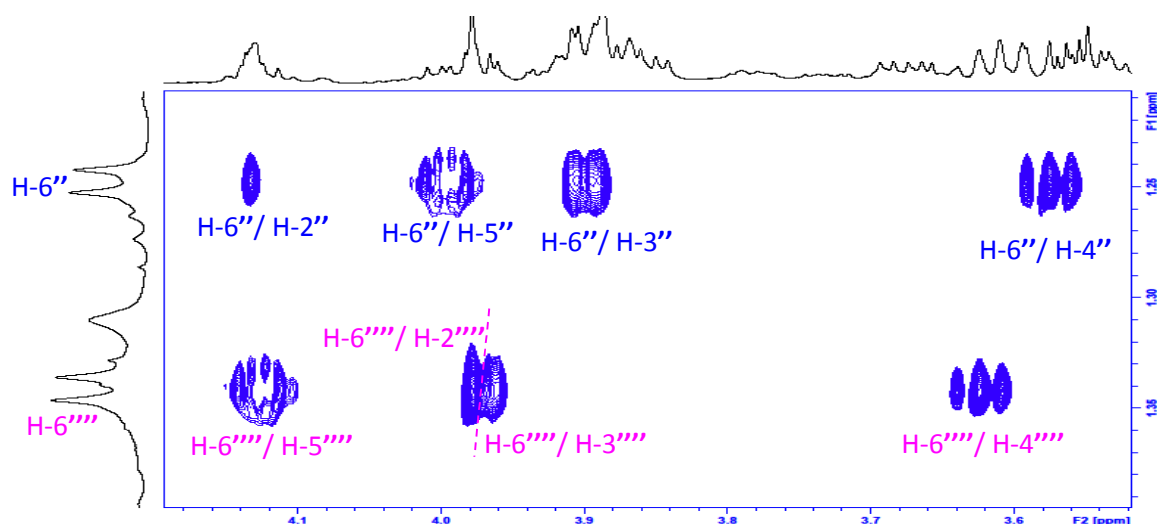


Figure III-105. Spectre TOCSY étalé du composé **Ss29** [F1 : 1.20-1.40 ppm].

Identification des deux xyloses

Deux xyloses ont été caractérisés (Xyl¹ et Xyl²) à partir des doublets anomériques H-1' à δ_H 4.40 (d, $J=7.2$ Hz) et H-1''' à δ_H 4.47 (d, $J=7.7$ Hz), respectivement. L'analyse des corrélations sur les spectres de RMN 2D (COSY, TOCSY, ROESY et HSQC J -modulé) permet d'attribuer les protons et les carbones de ces deux pentoses dont les valeurs des constantes de couplage et des déplacements chimiques (Tableau III-20) sont caractéristiques de deux β -D-xyloses caractérisés par un hydroxyle équatorial en position 4. Comme ceux de **Ss26**, le premier xylose est substitué en C-2' et le deuxième en C-3'''.

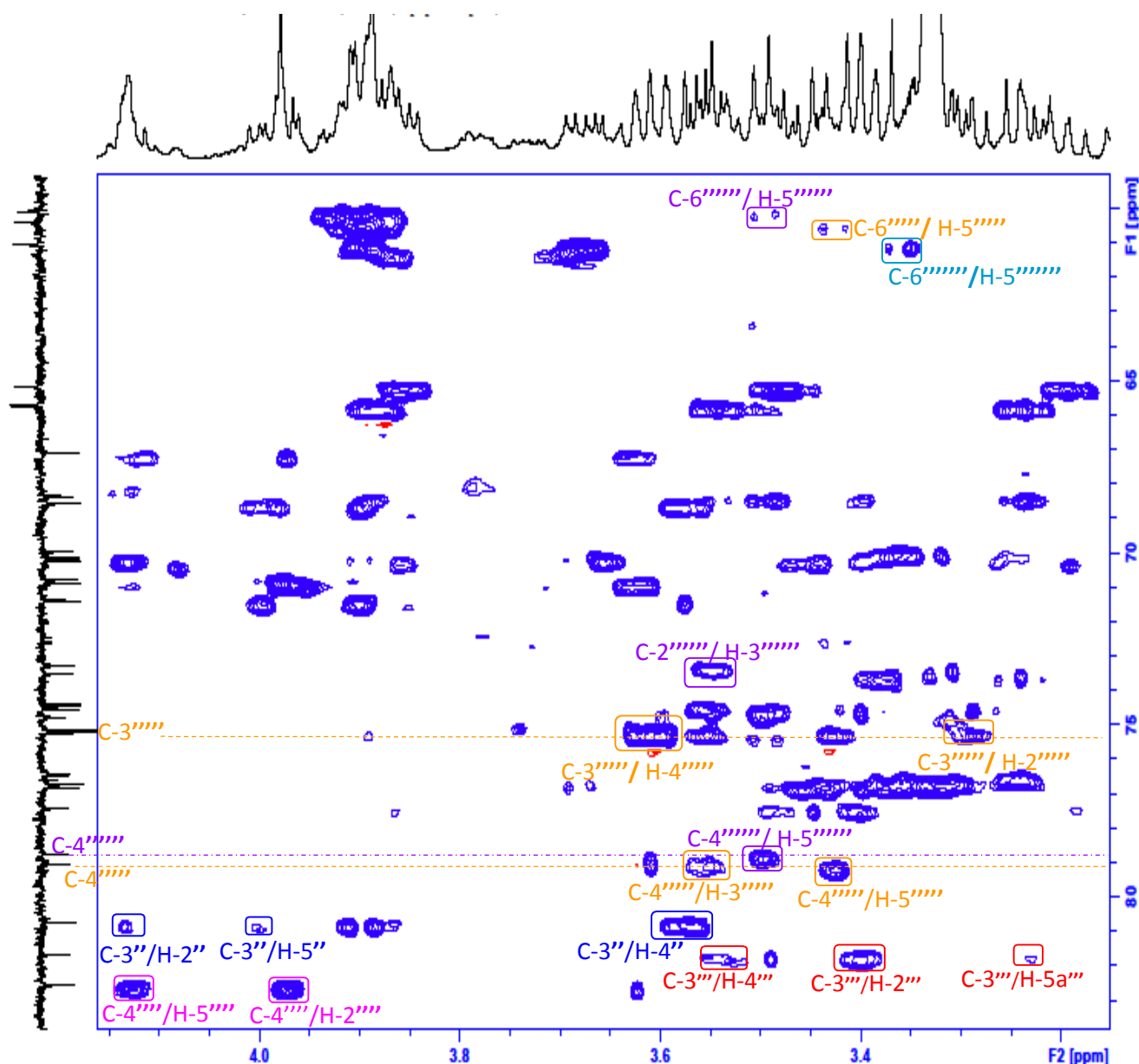


Figure III-106. Spectre HSQC-TOCSY du composé **Ss29** (zone des sucres).

L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'assigner tous les déplacements chimiques (Tableau III- 20, figure III-107) des protons et carbones de la partie osidique du composé **Ss29**.

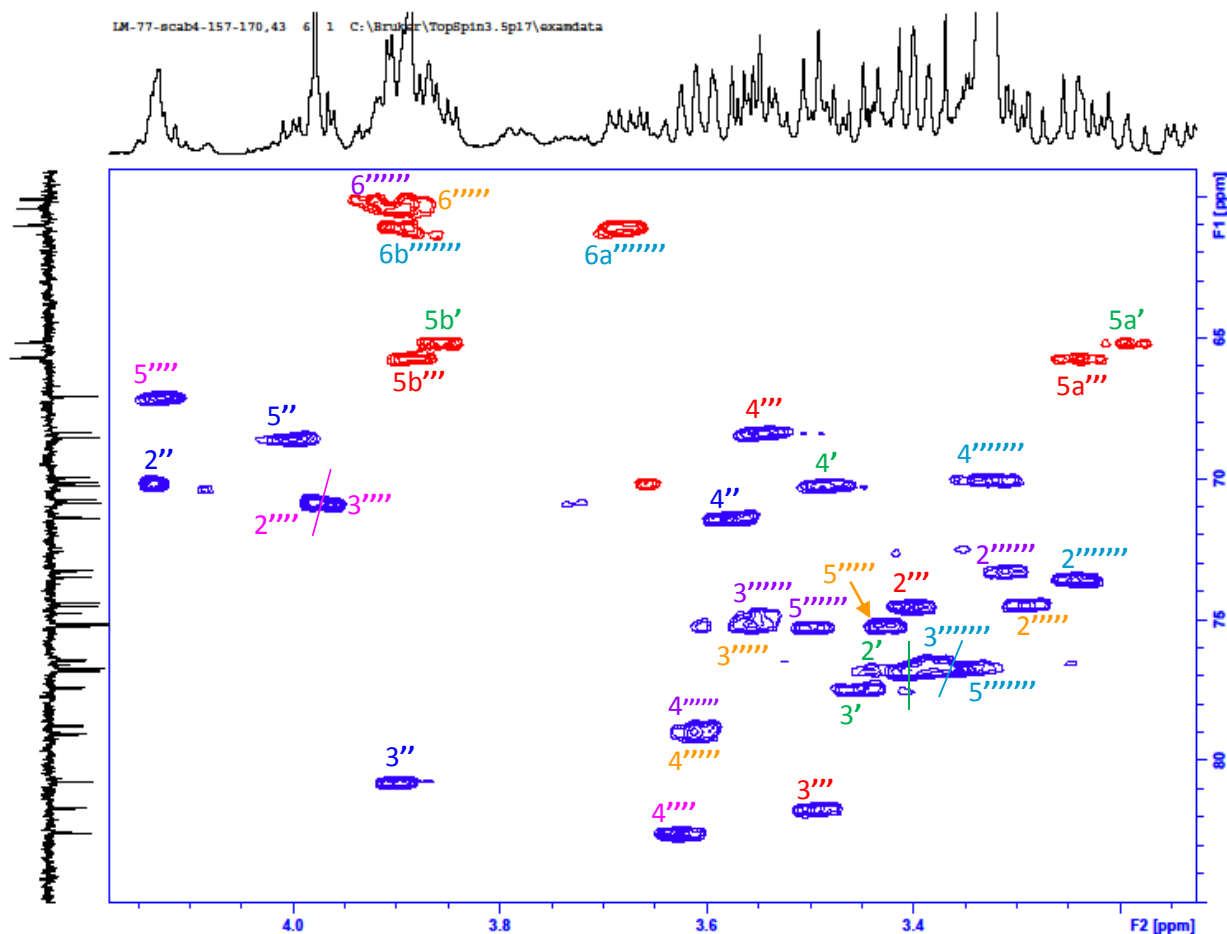


Figure III-107. Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Ss29** (zone des sucres).

Séquençage de la chaîne osidique

L'enchaînement des unités osidiques ainsi que le point d'ancrage du sucre sur la génine sont établis après analyse du spectre HMBC (Figure III-108). Sur lequel sont visualisées les corrélations déjà rencontrées dans **Ss26** en plus des corrélations entre les trois glucoses (Glc¹, Glc² et Glc³) :

- H-1'''''' Glc³ terminal/C-4'''''' Glc²
- H-1'''''' Glc²/C-4'''''' Glc¹
- H-1'''''' Glc¹/C-4'''''' Rha²
- H-1'''''' Rha²/C-3'''' Xyl²
- H-1'''' Xyl²/C-3'''' Rha¹

- H-1'' Rha¹ /C-2' Xyl¹
- H-1' Xyl¹/C-3 de la génine

Sur le spectre ROESY, les effets rOe observés confirment cet enchainement linéaire en C-3 de la génine (Figure III-104).

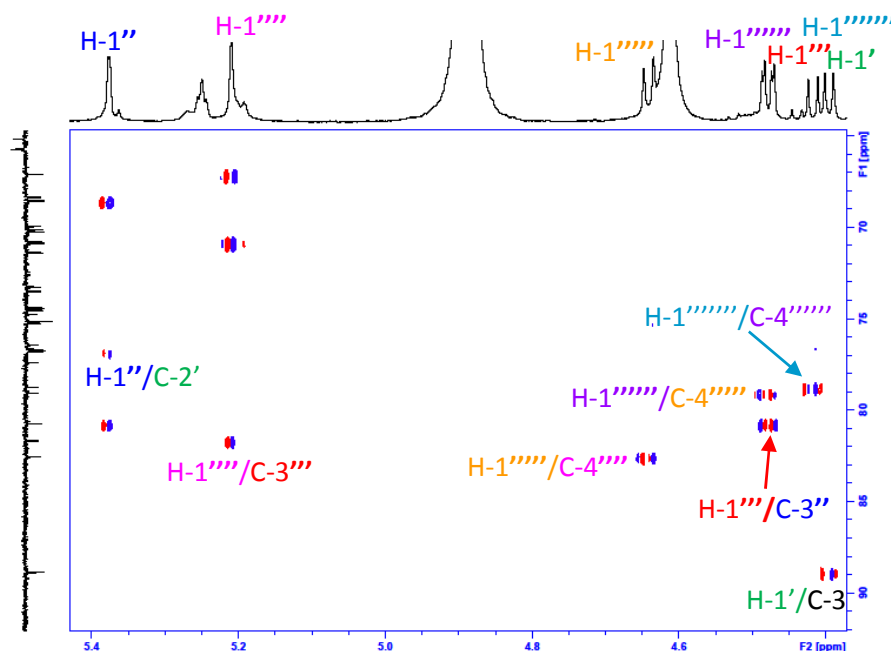


Figure III-108. Spectre HMBC du composé **Ss29** (au niveau des protons anomériques).

L'ensemble des données de RMN et de HR-ESI-MS permettent l'attribution à la nouvelle saponine monodesmodique **Ss29** (**scabiostellatoside F**) la structure suivante : L'acide 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranonosyl-oléanolique.

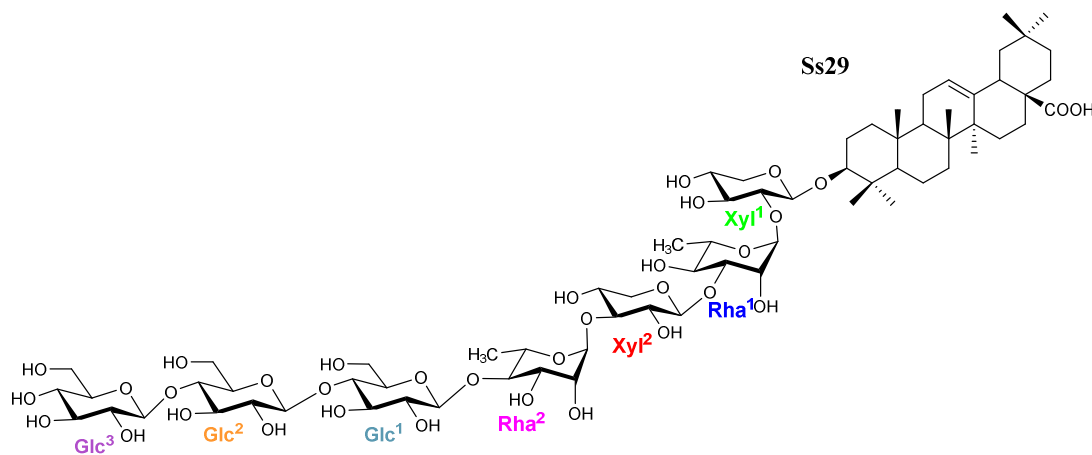


Tableau III-20. Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) de la partie osidique des composés **Ss28** et **Ss29** dans CD₃OD.

	Ss28			Ss29	
	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}		δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}
Ara (à C-3)			Xyl¹ à C-3		
1'	4.45 d (5.9)	104.1	1'	4.40 d (7.2)	105.0
2'	3.75 dd (7.8,6.9)	75.2	2'	3.40 dd (8.2, 7.2)	76.8
3'	3.81 dd (7.8,3.1)	72.5	3'	3.45 t (8.2)	77.4
4'	3.92 m	78.1	4'	3.48 m	70.2
5'	3.57 m	63.5	5'	3.19 dd (10.5,9.1)	65.1
	4.16 dd (12.2,3.1)			3.86 dd (10.5,5.2)	
Rha¹			Rha¹		
1''	5.26 d (1.8)	99.9	1''	5.38 d (1.7)	99.8
2''	4.11 dd (3.5,1.8)	70.2	2''	4.13 dd (3.0,1.7)	70.1
3''	3.88 dd (9.6,3.5)	80.5	3''	3.90 dd (9.5,3.0)	80.7
4''	3.58 t (9.6)	71.3	4''	3.53 t (9.5)	71.4
5''	3.94 m	68.5	5''	3.99 m	68.5
6''	1.24 d (6.2)	16.5	6''	1.25 d (6.2)	16.6
Xyl			Xyl²		
1'''	4.49 d (7.7)	105.0	1'''	4.47 d (7.7)	105.0
2'''	3.41 dd (8.9,7.7)	74.3	2'''	3.40 dd (8.8,7.7)	74.5
3'''	3.48 t (8.9)	82.0	3'''	3.49 t (8.8)	81.7
4'''	3.55 m	68.2	4'''	3.53 m	68.3
5'''	3.24 t (11.4)	65.6	5'''	3.24 dd (11.3,10.0)	65.7
	3.90 dd (12.1,5.1)			3.88 dd (11.3,2.3)	
Rha²			Rha²		
1''''	5.19 d (1.6)	100.1	1''''	5.21 s/	100.7
2''''	3.96 dd (3.3,1.6)	70.8	2''''	3.98 dd (3.3,1.2)	70.9
3''''	3.73 dd (9.3,3.3)	70.7	3''''	3.97 dd (9.2,3.3)	70.8
4''''	3.42 t (9.3)	72.5	4''''	3.63 t (9.2)	82.6
5''''	4.04 m	68.5	5''''	4.13 m	67.1
6''''	1.27 d (6.3)	16.4	6''''	1.34 d (6.2)	16.6
Glc³			Glc¹		
1'''''	4.47 d (7.6)	104.6	1'''''	4.64 d (7.9)	104.2
2'''''	3.30 m	73.8	2'''''	3.29 dd (8.4,7.9)	74.4
3'''''	3.38 t (8.9)	76.6	3'''''	3.55 t (8.4)	75.2
4'''''	3.29 t (8.9)	69.9	4'''''	3.61 t (8.4)	79.1
5'''''	3.33 m	76.5	5'''''	3.42 m	75.2
6'''''	3.68 dd (12.0,5.4)	61.2	6'''''	3.90 m	60.4
	3.86 dd (12.0,2.3)			3.90 m	
Glc¹ (à C-28)			Glc²		
1''''''	5.37 d (8.1)	94.4	1''''''	4.48 d (8.0)	103.0
2''''''	3.36 t (8.1)	72.5	2''''''	3.31 dd (8.5,8.0)	73.3
3''''''	3.44 m	76.8	3''''''	3.55 t (8.5)	74.8
4''''''	3.46 t (9.6)	69.5	4''''''	3.61 t (8.5)	78.8
5''''''	3.53 m	76.4	5''''''	3.49 m	75.2
6''''''	3.79 dd (11.8,4.1)	68.1	6''''''	3.83 m	60.1
	4.13 dd (11.8,2.1)			3.93 m	
Glc²			Glc³		
1'''''''	4.36 d (7.8)	103.1	1'''''''	4.42 d (7.9)	103.2
2'''''''	3.23 dd (8.5,7.8)	73.6	2'''''''	3.24 dd (8.6,7.9)	73.5
3'''''''	3.40 m	76.3	3'''''''	3.38 t (8.6)	76.4
4'''''''	3.32 t (8.5)	70.0	4'''''''	3.33 m	69.9
5'''''''	3.27 m	76.5	5'''''''	3.36 m	76.6
6'''''''	3.68 dd (12.0,5.4)	61.2	6'''''''	3.68 dd (11.8,5.5)	60.0
	3.86 dd (12.0,2.3)			3.90 dd (11.8,2.2)	

Tableau III-21. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C de la partie génine des saponosides **Ss24-Ss29** dans CD₃OD.

	Ss24	Ss25	Ss26	Ss27	Ss28	Ss29
	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{H} m (J in Hz)
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	0.98 m 1.62 m 1.69 m 1.82 dt (13.5,3.2) 3.14 dd (11.5,4.0)	1.01 m 1.63 m 1.72 m 1.86 m 3.15 dd (11.6,4.2)	1.00 m 1.62 m 1.72 m 1.82 dt (13.1,3.5) 3.15 dd (11.8,3.5)	1.01 m 1.65 dt (13.6,3.5) 1.74 m 1.86 m 3.14 dd (11.6,4.3)	1.00 m 1.64 dt (12.7,2.5) 1.73 m 1.82 m 3.15 dd (11.7,4.4)	0.98 m 1.62 m 1.69 m 1.82 dt (13.5,3.2) 3.14 dd (11.5,4.0)
2	-	-	-	-	-	-
3	0.78 brd (12.2) 1.42 td (13.9,3.8)	0.81 m 1.42 td (13.7,3.5)	0.80 brd (12.3) 1.42 td (13.9,3.8)	0.80 m 1.44 m 1.57 m	0.80 m 1.45 td (13.9,3.8) 1.57 m	0.78 brd (12.2) 1.42 td (13.9,3.8)
4	1.56 m 1.33 m 1.51 m	1.57 m 1.33 m 1.51 td (13.1,1.5)	1.55 m 1.61 m 1.73 m	1.34 m 1.52 td (12.7,3.3)	1.62 m 1.73 m	1.56 m 1.33 m 1.51 m
5	-	-	-	-	-	-
6	1.59 m - 1.91 m 5.27 t (3.5)	1.60 m - 1.92 m 5.27 t (3.4)	1.59 m - 1.91 m 5.27 t (3.8)	1.60 m - 1.92 m 5.27 t (3.4)	1.59 m - 1.92 m 5.27 t (3.5)	1.59 m - 1.91 m 5.27 t (3.5)
7	-	-	-	-	-	-
8	47.6 36.5 23.2 122.4 143.5	47.7 36.5 23.2 122.4 143.5	47.6 36.5 23.1 122.3 143.4	48.2 36.5 23.4 122.3 143.5	47.6 36.4 23.1 122.3 143.4	47.6 36.5 23.1 122.4 143.5
9	1.10 m 1.80 m 1.73 m 2.07 td (13.7,3.0)	1.10 dt (14.3,2.5) 1.81 td (14.3,4.4) 1.73 m 2.08 td (13.7,3.8)	1.10 dt (13.1,3.5) 1.81 td (13.1,3.5) 1.73 m 2.07 td (13.8,3.7)	1.10 dt (13.5,2.9) 1.81 td (14.0,3.7) 1.73 m 2.07 td (13.7,3.7)	1.10 dt (13.9,2.7) 1.81 td (13.9,3.9) 1.73 m 2.07 td (13.6,4.0)	1.10 m 1.80 m 1.73 m 2.07 td (13.7,3.0)
10	-	-	-	-	-	-
11	2.88 dd (13.8,3.9) 1.17 m 1.72 m	2.86 dd (13.9,3.8) 1.17 m 1.74 m	2.88 dd (13.7,4.9) 1.17 m 1.74 m	2.88 dd (13.5,4.0) 1.18 m 1.61 m	2.88 dd (13.7,4.4) 1.16 m 1.74 m	2.88 dd (13.8,3.9) 1.17 m 1.72 m
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	1.23 m 1.40 m 1.61 m 1.73 m	1.25 m 1.41 td (14.1,4.1) 1.62 m 1.73 m	1.24 m 1.41 m 1.33 m 1.50 td (12.5,3.5)	1.24 m 1.43 td (13.8,3.7) 1.62 m 1.74 td (13.0,3.7)	1.17 m 1.41 td (13.9,3.8) 1.33 m 1.52 td (13.0,3.7)	1.23 m 1.40 m 1.61 m 1.73 m
16	1.07 s 0.88 s 0.98 s 0.82 s 1.18 s	1.05 s 0.88 s 0.99 s 0.81 s 1.18 s	1.07 s 0.88 s 0.98 s 0.82 s 1.18 s	1.04 s 0.88 s 0.98 s 0.83 s 1.18 s	1.07 s 0.87 s 0.99 s 0.82 s 1.18 s	1.07 s 0.88 s 0.98 s 0.82 s 1.18 s
17	-	-	-	-	-	-
18	30.1 33.5 31.8	30.1 33.5 31.8	30.1 33.4 32.5	30.1 33.5 32.8	30.0 33.4 32.1	30.1 33.7 31.8
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	27.5 15.8 14.8 16.4 24.9	27.2 14.8 16.6 16.3 24.9	27.0 15.8 14.7 16.6 24.8	27.2 15.8 14.8 16.4 24.9	27.1 15.7 14.7 16.3 24.8	27.5 15.8 14.6 16.5 24.9
22	-	-	-	-	-	-
23	0.93 s 0.96 s	0.93 s 0.97 s	0.93 s 0.96 s	0.93 s 0.96 s	0.93 s 0.96 s	0.93 s 0.96 s
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	32.1 22.6	32.1 22.6	32.0 22.6	32.1 22.6	32.0 22.6	32.3 22.8
30	-	-	-	-	-	-

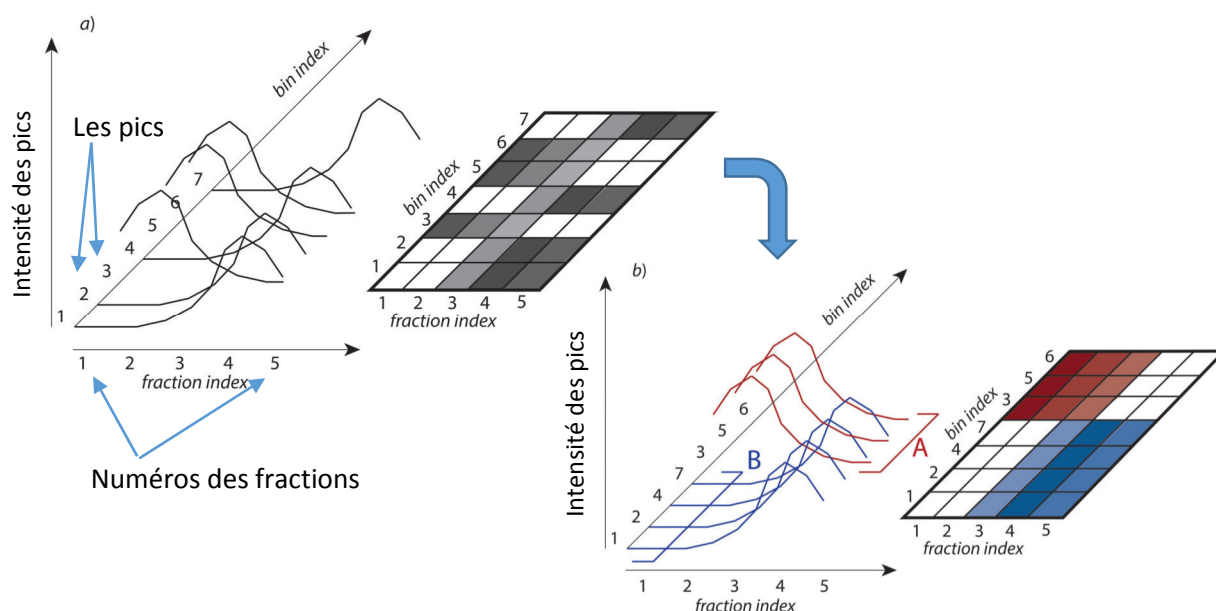
III.2.2. Déréplication des composés majoritaires de *Scabiosa stellata*

Cette étude a été réalisée en France, par le Docteur Jane HUBERT ; Groupe « Isolement-Structure » de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR).

La déréplication consiste à trouver la structure moléculaire d'un composé, pur ou en mélange, parmi ceux déjà disponibles dans la littérature. Avec cette signification, la déréplication est le moyen d'attribuer une structure chimique à un composé en utilisant les connaissances accumulées pendant des décennies de recherche sur les produits naturels.

Nous avons appliqué cette approche sur les fractions **B** (2 g) et **C** (3 g) de *S. stellata* et qui ont été soumises séparément au fractionnement CPC, en utilisant un système de solvant biphasique. Nous avons choisi la CPC pour le fractionnement car elle permet d'isoler des composés ou fractions simplifiées en quantités suivies par l'analyse par RMN ^{13}C de chaque fraction (Partie II, chapitre 1).

Le principe du traitement des données dans la déréplication « CAMEL », sur les spectres de RMN ^{13}C des sous-fractions générées, est basé sur l'évolution de l'intensité pour les différents pics caractérisés par leur index bin (index de ligne dans la table de données) et indice de fraction (index de colonne dans les données table) (Figure III-109).



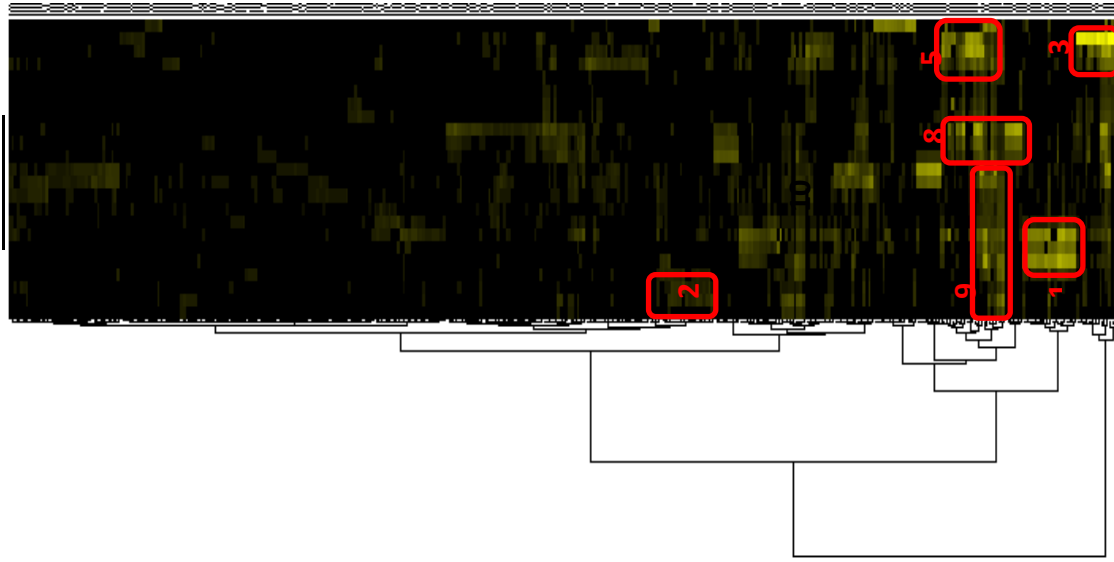
a) des données originales, b) des données réorganisées qui permettent l'apparition du groupement des résonances issues de deux composés (A et B) avec différents comportements chromatographiques.

Figure III-109. Principe du traitement des données dans la déréplication CAMEL (Bakiri et al., 2017).

De cette manière, les corrélations statistiques entre les signaux de RMN ^{13}C appartenant à des structures individuelles au sein de la série de fractions ont été visualisées comme "clusters" sur les cartes de corrélations ascendantes hiérarchique HCA bidimensionnelles résultantes. Comme illustré sur la figure III-110, plusieurs classes sont intensément colorées en jaune. Après avoir entré les valeurs de déplacements chimiques du cluster 1 situées dans les sous-fractions B₄₋₈ et C₇₋₁₄, la structure de l'isoorientine (**Ss37**) est proposé. Au moyen de la même stratégie de recherche dans la base de données, le cluster 2 présent dans les sous-fractions B₂₋₄ et C₃₋₇ est identifié comme étant l'hyperine (**Ss39**). Le cluster 3 présent dans les sous-fractions B₂₀₋₂₃ et C₁₁₋₁₄ est identifié à l'eustomorusside (**Ss31**), le cluster 4 présent dans les sous-fractions C₈₋₉ représente des structures d'acide loganique et d'acide caféique, qui n'ont pas été bien déterminés. Le cluster 5 présent dans les sous-fractions B₁₉₋₂₂ et C₁₅₋₂₁ est identifié au sweroside (**Ss30**), le cluster 6 présent dans les sous-fractions C₆₋₈ est identifié comme le swertiajaponine (**Ss38**). Le cluster 7 présent dans les sous-fractions C₂₋₃ correspond à un mélange d'acide 3,5-dicafféoylquinique (**Ss40**) et d'acide 4,5-dicafféoylquinique (**Ss41**). Le cluster 8 présent dans les sous-fractions B₁₃₋₁₅ correspond à l'eustomoside (**Ss32**). Le cluster 9 présent dans les sous-fractions B₉₋₁₂ est identifié comme étant l'acide caféique. Pour les sous-fractions C₂₀₋₂₃, la base de données propose un mélange complexe de dérivés des bis-iridoïdes, partiellement composés de loganine, déméthylsecologanol et unités de sweroside, qui n'ont pas pu être identifiées sans ambiguïté (Cluster 10).

Des purifications supplémentaires sur les fractions C₂₀₋₂₃ correspondant au cluster 10 ont été réalisées, en utilisant la flash chromatographie sur gel de silice normal ou Rp-18 et la CLHP semi-préparative. Ceci nous a conduit à l'identification de quatre bis-iridoïdes (**Ss33-Ss36**) dont deux sont de nouvelle structure (**Ss35-Ss36**).

Fraction B



Fraction C

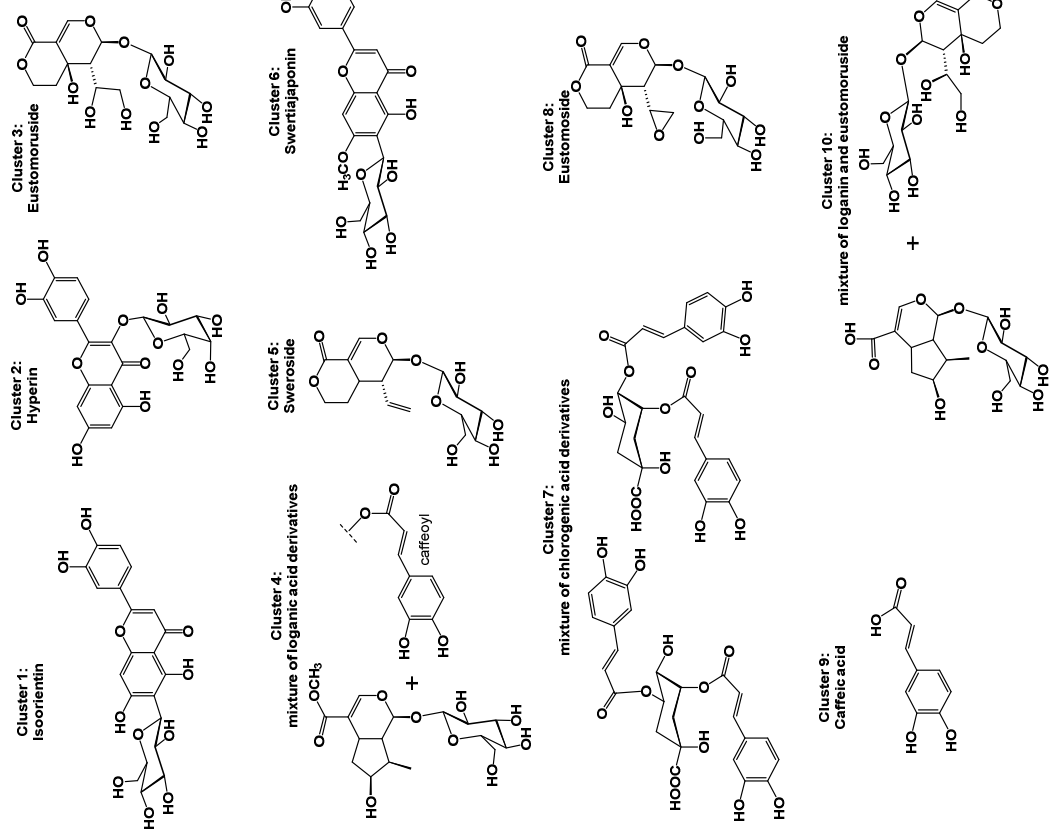


Figure III.110. Dendrogramme des clusters obtenus par application HCA « CARMEL » sur les sous-fractions de la CPC des fractions B et C de *S. stellata*

III.2.3. Détermination structurale des iridoïdes de *Scabiosa stellata*

L'étude des sous-fractions issues de la CPC des fractions **B** et **C** de *S. stellata* a abouti à l'isolement et à la caractérisation de sept iridoïdes (**Ss30-Ss36**). Les sous fractions étudiées correspondent à celles des clusters obtenus par CARAMEL.

Parmi les iridoïdes isolés, quatre sont des bis-iridoïdes hétérodimères de type iridoïde/secoiridoïde (**Ss33-Ss36**) dont deux sont de nouvelles structures (**Ss35-Ss36**). Les trois autres (**Ss30-Ss32**) sont des mono-iridoïdes de type secoiridoïde. L'unité osidique retrouvée dans tous ces iridoïdes est le β -D-glucopyranose.

III.2.3.1. Elucidation structurale des mono-iridoïdes

Trois secoiridoïdes (**Ss30-Ss32**) ont été identifiés à partir de la fraction **B** de *S. stellata*, dont la structure de base est le sweroside (**Ss30**). Les différences structurales de ces composés résident dans la partie génine en positions 8/10 et la présence d'un hydroxyle en position 5 dans **Ss31** et **Ss32**.

a- Étude des spectres de RMN 1D et 2D de Ss30

Le spectre RMN ^1H de **Ss30** (Figure III-111) montre les signaux caractéristiques d'un secoiridoïde glycosylé :

- Un signal déblindé à δ_{H} 7.62 (d, $J=2.5$ Hz) indiquant la présence d'un proton éthylénique dont le carbone est oxygéné, attribuable au proton H-3.
- Trois protons résonnant à δ_{H} 5.56 (1H, ddd, $J=17.3, 10.5, 8.0$ Hz), 5.33 (dd, $J=17.2, 1.4$ Hz) et 5.29 (dd, $J=10.3, 1.9$ Hz). Ces protons indiquent la présence d'un système ABX d'une double liaison terminale ($\text{CH}=\text{CH}_2$).
- Un doublet fin intégrant pour un proton à δ_{H} 5.57 (d, $J= 1.8$ Hz) attribuable au proton H-1.
- Un doublet de doublet dédoublé à δ_{H} 2.72 (ddd, $J= 7.0, 5.5, 1.4$ Hz) intégrant pour un proton (H-9).
- Les deux protons géminés H-6a,b sont localisés à δ_{H} 1.72 (td, $J=13.5, 7.0$ Hz) et δ_{H} 1.78 ppm (m).
- Les protons d'un hexose (entre δ_{H} 3.2 et 4.0) dont le proton anomérique H-1' résonne à δ_{H} 4.71 (d, $J=7.9$ Hz) (Tableau III-22).

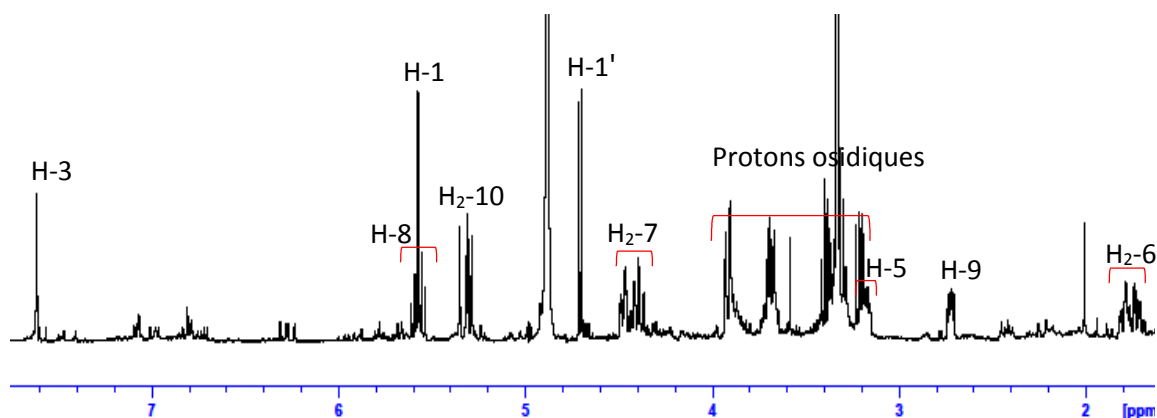


Figure III-111. Spectre de RMN ^1H du composé Ss30.

L'analyse du spectre de RMN ^{13}C J -modulé de Ss30 (Figure III-112) révèle la présence de 16 atomes de carbones dont 10 appartenant à la génine. Parmi lesquels, trois groupements CH_2 , cinq CH et deux carbones quaternaires. De plus nous observons les carbones de l'hexose entre 60 et 78 ppm.

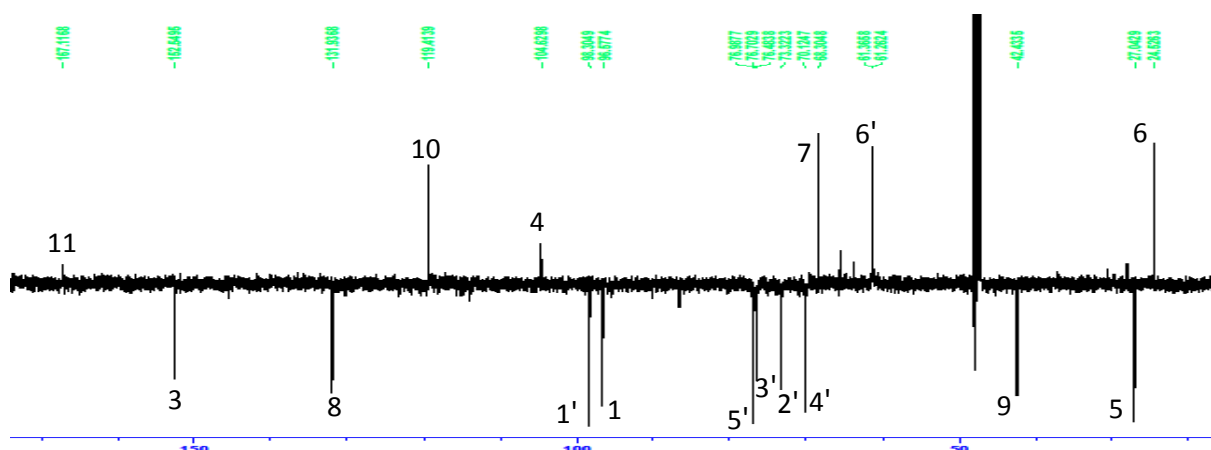


Figure III-112. Spectre de RMN ^{13}C J -modulé du composé Ss30.

L'expérience COSY (Figure III-113) permet de retrouver toutes les corrélations identifiant le sweroside et les protons du glucose bien caractéristiques par leurs déplacements chimiques et constantes de couplage :

- Les deux protons éthyléniques à δ_{H} 5.33 et 5.29 ppm corrént entre eux et avec le proton éthylénique résonnant à δ_{H} 5.56 ppm, qui à son tour couple avec le H-9. Ces déplacements chimiques impliquent des attributions aux protons H_2 -10 et H-8, respectivement.

- une corrélation à partir du proton H-9 avec le proton H-5 localisé à δ_H 3.17. Ce dernier corrèle avec les deux protons H₂-6 à δ_H 1.72 et 1.78 qui corrélient eux même avec les protons en position 7, H₂-7 à δ_H 4.38 et 4.47.

Le spectre COSY permet également d'identifier les protons osidiques : H-2' résonne à δ_H 3.21 (dd, $J=7.9,9.0$ Hz), H-3' résonne à δ_H 3.39 (t, $J=9.0$ Hz), H-4' résonne à δ_H 3.29 (t, $J=9.7$), H-5' résonne à δ_H 3.33, H-6a' résonne à δ_H 3.68 (dd, $J=12.0,5.9$ Hz) et H-6b' résonne à δ_H 3.91 (dd, $J=12.0,2.2$ Hz).

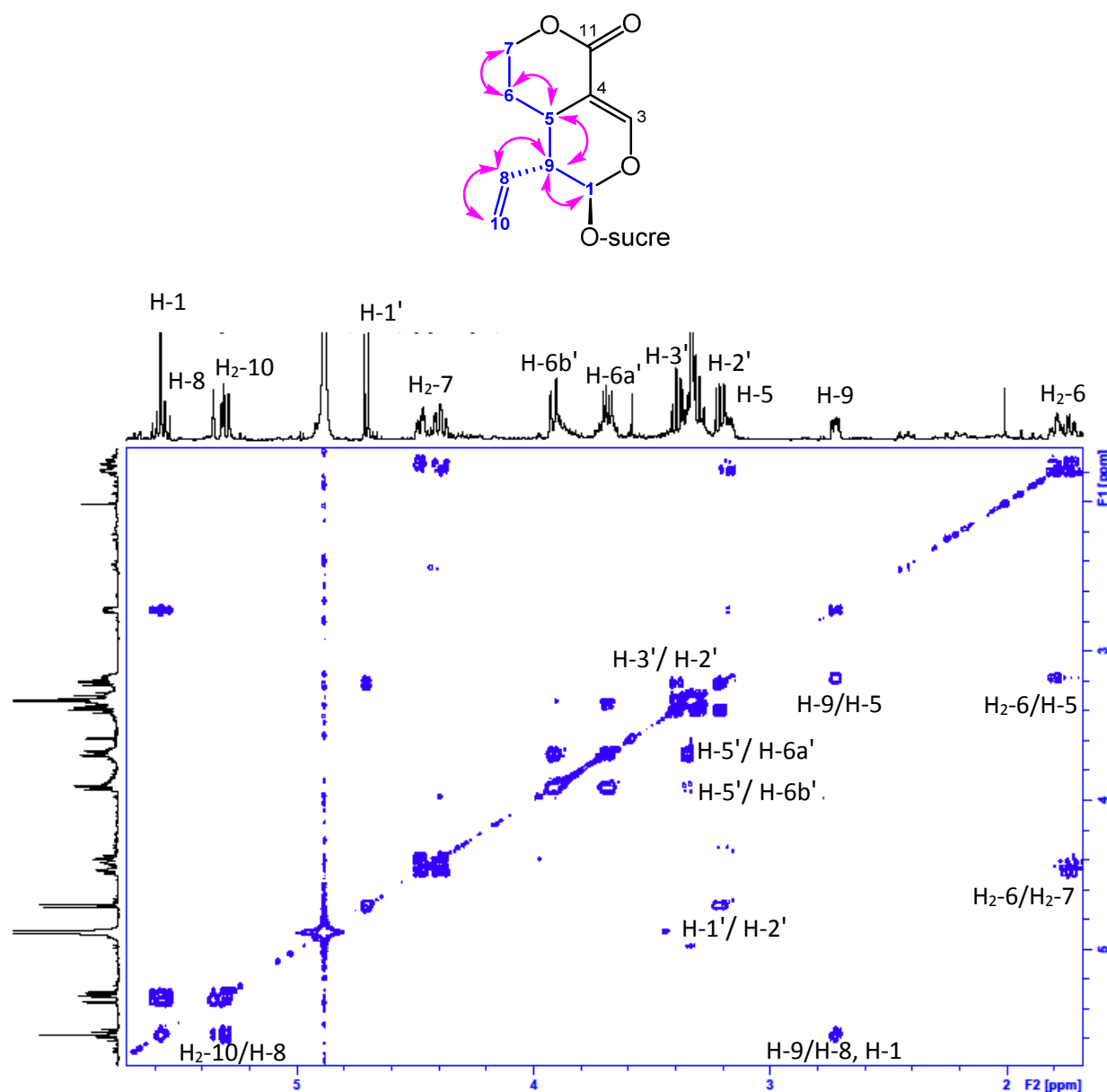


Figure III-113. Spectre COSY du composé Ss30.

Les corrélations C-H observées sur le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III-114) permettent d'attribuer les déplacements chimiques des carbones correspondants. Les carbones osidiques sont en accords avec ceux d'un β -D-glucose.

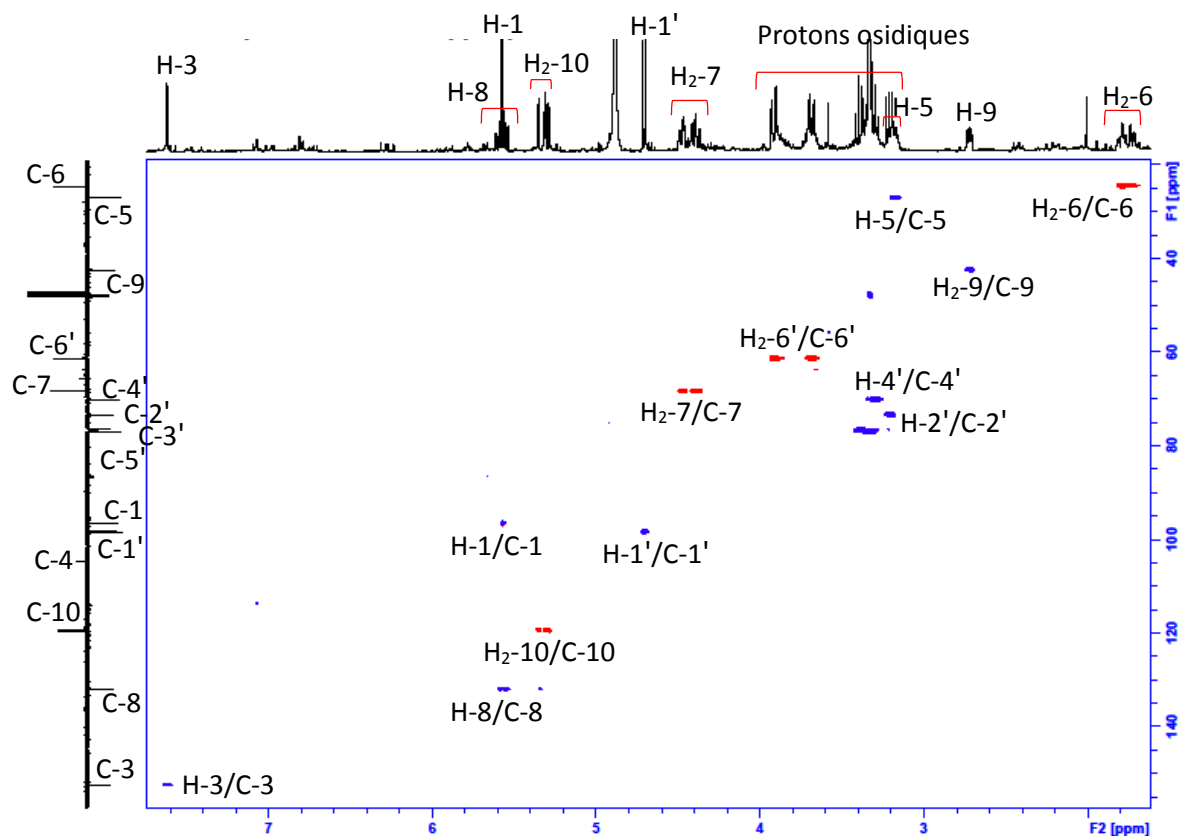


Figure III-114. Spectre HSQC *J*-modulé du composé Ss30.

A l'aide du spectre HMBC (Figure III-115) la structure complète est établie car les corrélations observées permettent d'identifier les carbones quaternaires et de relier toutes les parties de la structure.

- Le proton H-9 présente des corrélations avec les carbones C-5, C-1, C-10, C-8 et avec le carbone quaternaire à δ_c 104.6 ppm attribuable au carbone C-4.
- Des corrélations à partir du proton H-3 sont observées avec les carbones C-5, C-1 et C-4.
- D'autres taches de corrélations sont observées entre H₂-6 et C-5, C-7 et C-4.
- La tâche de corrélation entre H-1' du glucose et C-1 indique que le sucre est attaché en position 1 de la génine.

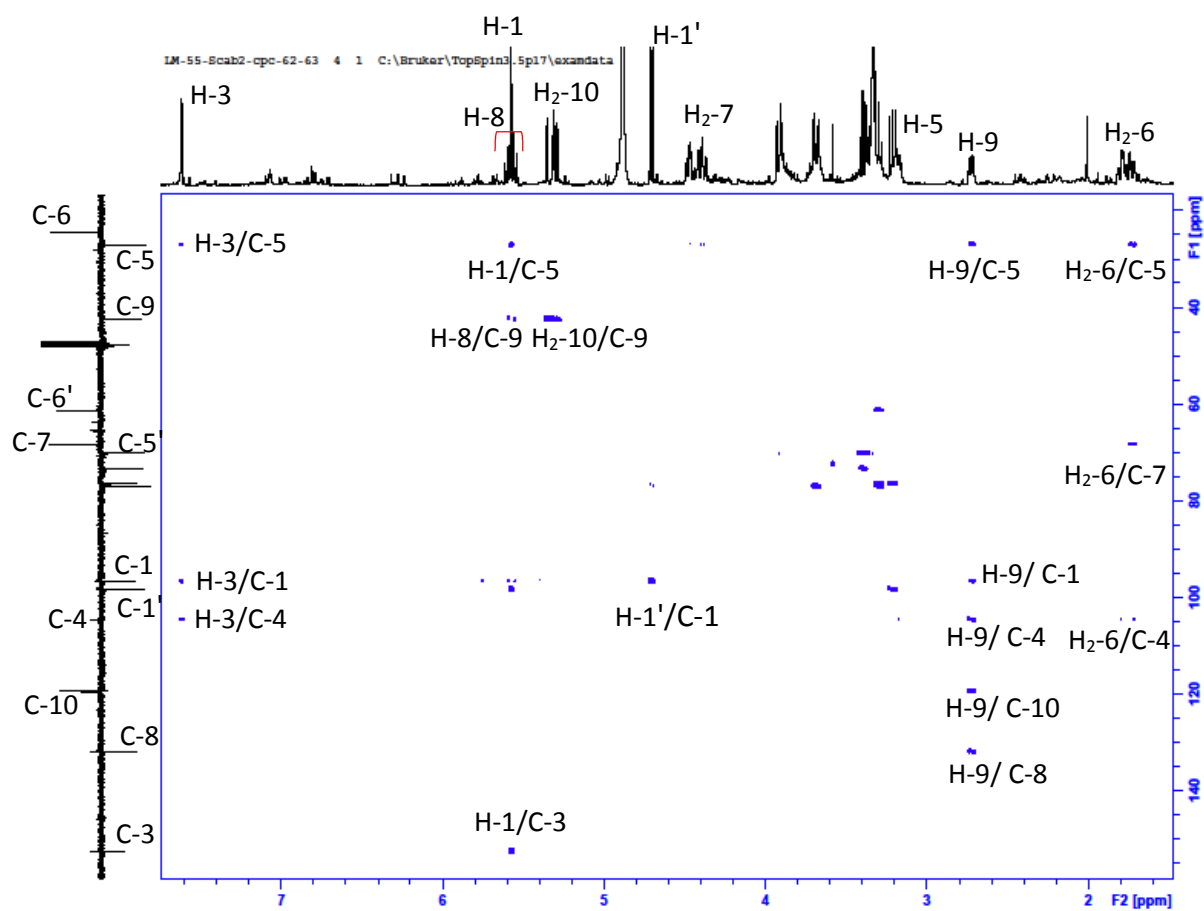
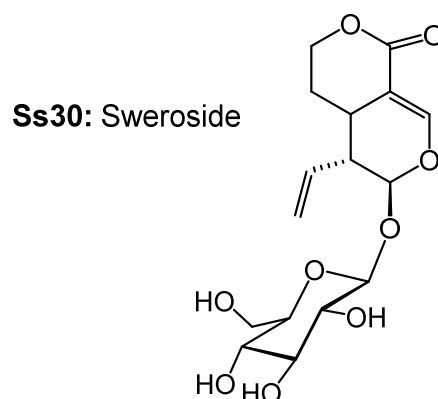


Figure III-115. Spectre HMBC du composé **Ss30**.

L'ensemble de ces éléments sont en accord avec ceux de la littérature (Prasad et al., 2000), ce qui permet d'identifier le composé **Ss30** au sweroside (Tableau III-22).



b- Étude des spectres de RMN 1D et 2D de Ss31

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé (Figure III-116) montrent la présence des signaux du composé **Ss30** avec la disparition des signaux de la double liaison $\text{CH}=\text{CH}_2$ et du signal H-5/C-5, suggérant l'oxydation sur ces positions.

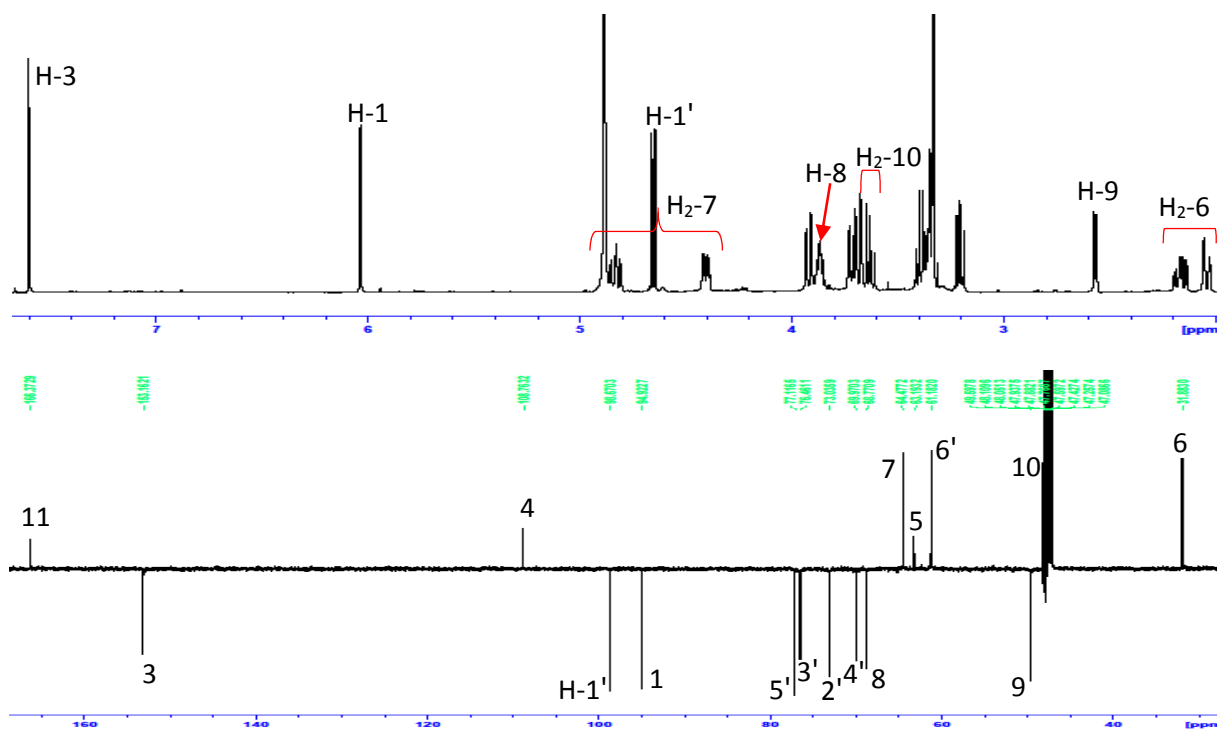


Figure III-116. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé du composé **Ss31**.

L'examen simultané des spectres COSY (Figure III-117), HSQC et HMBC (Figure III-118) permet d'attribuer tous les signaux de **Ss31**, les principales corrélations sont citées ci-dessous :

- Sur le spectre COSY, nous observons les corrélations entre H₂-7 et H₂-6. Ces derniers couplent sur le spectre HMBC avec le carbone quaternaire résonnant à δ_{C} 63.2 ppm, attribuable au carbone C-5.
- Le proton H-1 (δ_{H} 6.04, d, $J=1.2$ Hz) présente une tache de corrélation avec le proton situé à δ_{H} 2.56 ppm attribuable à celui en position 9 qui à son tour corrèle avec le proton résonnant à δ_{H} 3.86 suggéré pour un proton d'un méthyne oxygéné (H-8). Ce dernier couple avec les deux protons géminés résonnant à δ_{H} 3.64 et 3.67 attribuables aux protons méthylène oxygéné (O-CH₂-10).
- Les déplacements chimiques des protons et carbones de l'unité osidique sont attribués à un glucose par comparaison à ceux de **Ss30**.

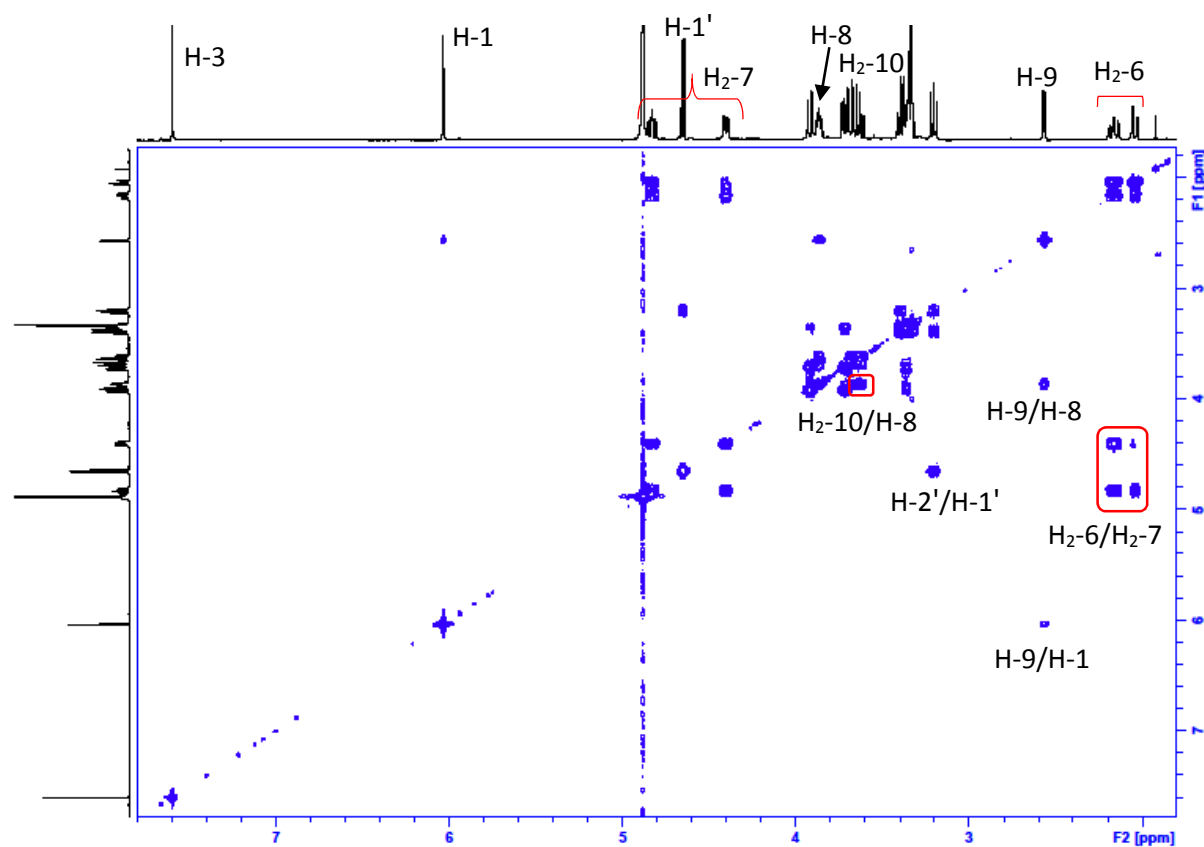


Figure III-117. Spectre COSY du composé Ss31.

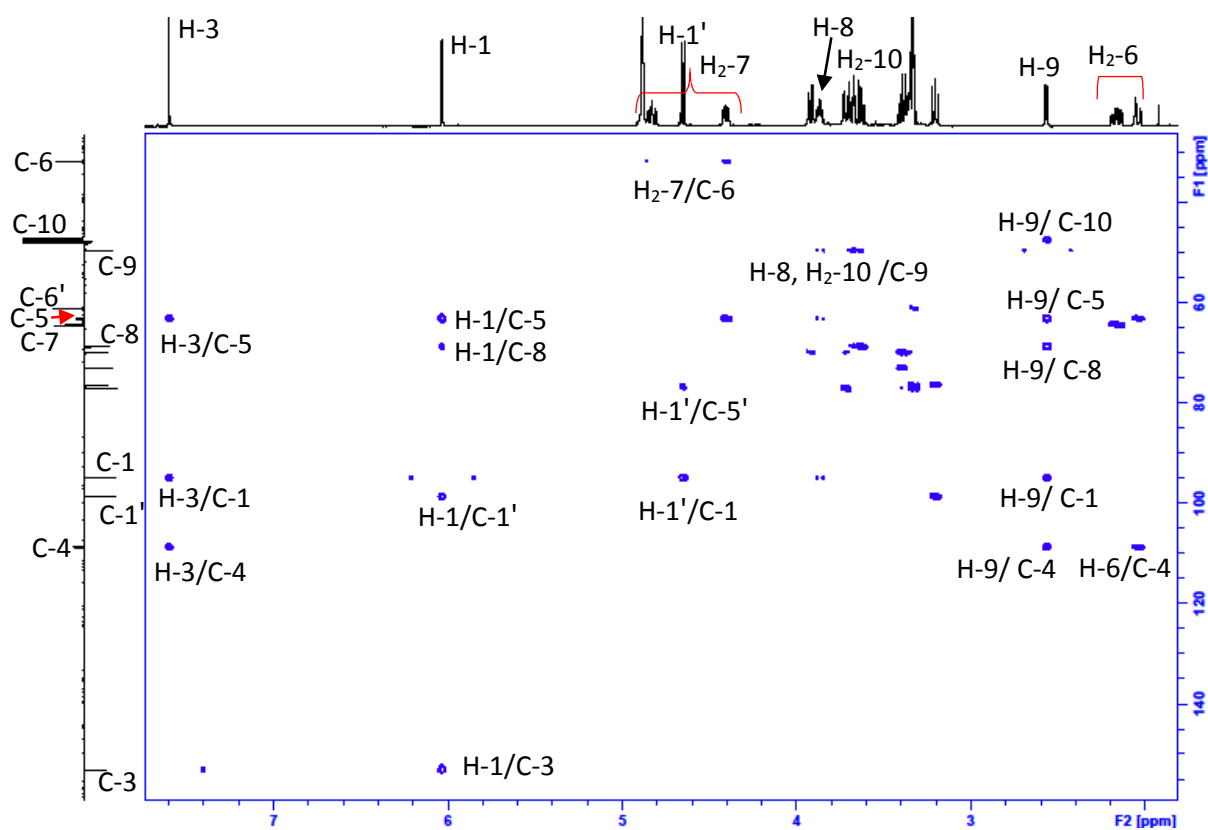
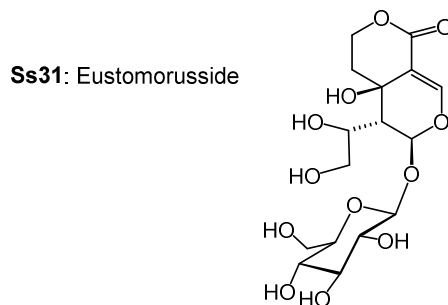


Figure III-118. Spectre HMBC du composé Ss31.

- Au niveau du proton anomérique du glucose H-1' à δ_H 4.65 ppm (d, $J=7.9$ Hz), nous observons une corrélation avec C-1 (δ_C 94.9) sur le spectre HMBC, indiquant que le sucre est lié en position 1, comme pour le **Ss30**.

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de **Ss31** (Tableau III-22) en comparaison avec les données de la littérature indiquent que le composé **Ss31** est l'eustomorusside (Huang et al., 2014).



c- Étude des spectres de RMN 1D et 2D de Ss32

La comparaison des valeurs RMN 1H et ^{13}C (Figure III-119, 120) de **Ss32** avec celles de **Ss31** conduit à déduire qu'ils ont le même squelette. La différence se situe dans la partie terminale en positions 8 et 10 dont le blindage des signaux de C-8 et C-10 sur le spectre de RMN ^{13}C J -modulé suggère cette fois-ci la formation d'un pont oxygéné entre C-8 et C-10.

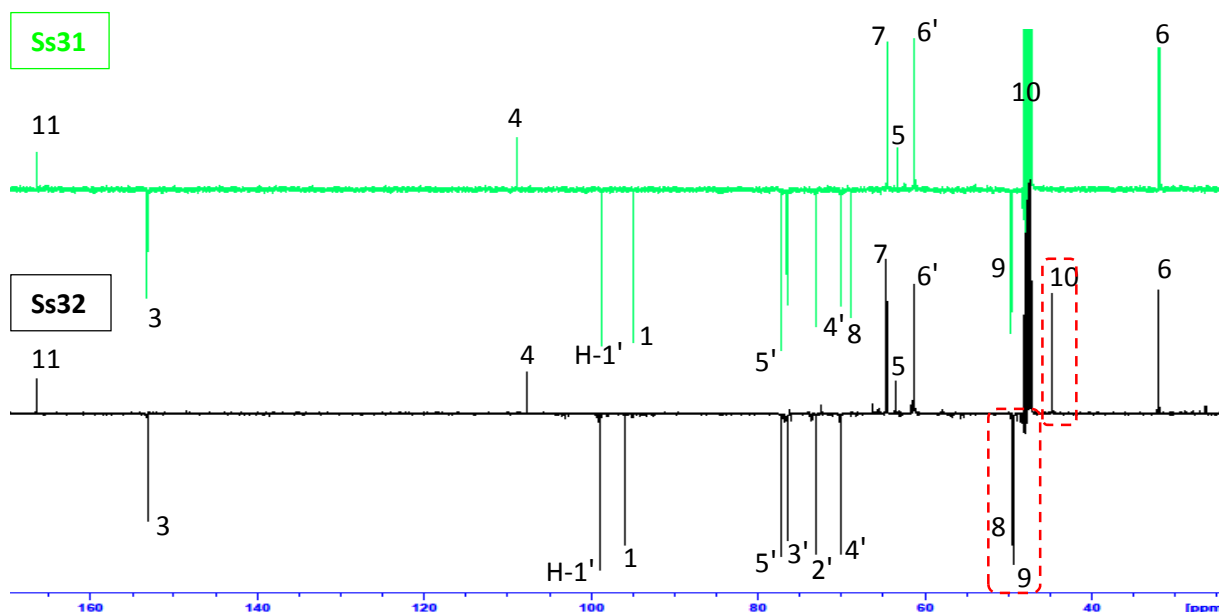


Figure III-119. Spectres de RMN ^{13}C J -modulé des composés **Ss31/Ss32**.

Cette supposition est aussi confirmée par l'analyse des spectres de RMN 2D où on observe toutes les corrélations justifiant les données de RMN 1H et ^{13}C .

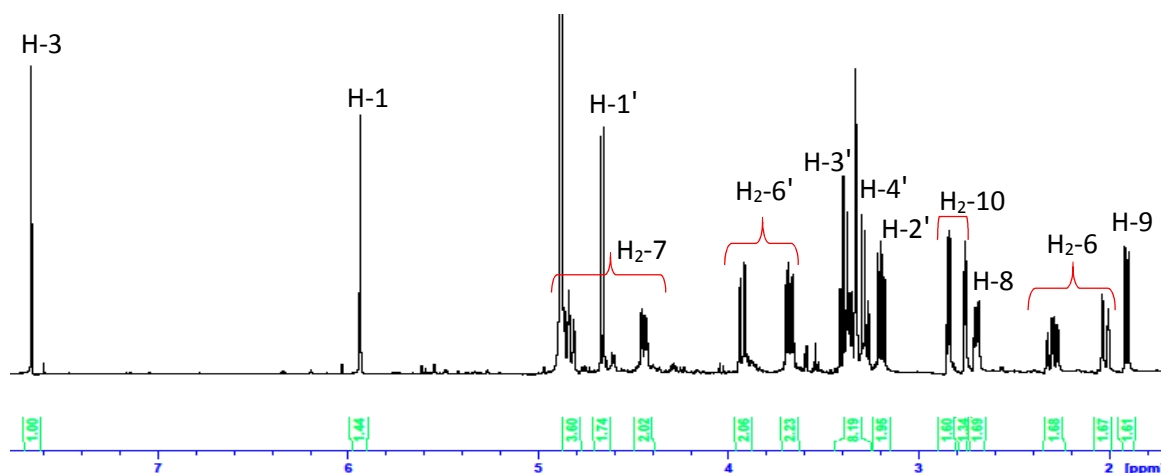


Figure III-120. Spectre de RMN ^1H du composé Ss32.

La comparaison avec les données de la littérature nous a permis d'élucider la structure du composé Ss32 comme étant l'eustomoside (Huang et al., 2014).

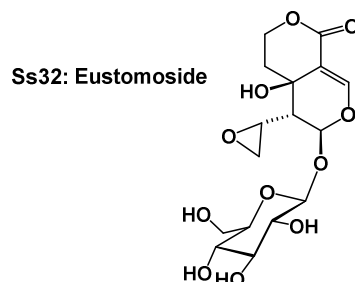


Tableau III-22. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés Ss30- Ss32 dans CD_3OD .

	Ss30 (Sweroside)		Ss31 (Eustomorusside)		Ss32 (Eustomoside)	
	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}
1	5.57 d (1.8)	96.6	6.04 d (1.2)	94.9	5.93 d (1.2)	95.9
3	7.62 d (2.5)	152.5	7.60 s	153.1	7.66 s	153.0
4	-	104.6	-	108.7	-	107.6
5	3.17	27.0	-	63.2	-	63.5
6	1.72 td (13.5, 7.0) 1.78 m	24.5	2.04 d/ (13.4) 2.16 ddd (16.5,12.7, 5)	31.9	2.02 d/ (13.6) 2.29 ddd (14.1,13.0,.5.1)	32.0
7	4.38 m 4.47 m	68.3	4.40 ddd (10.5,4.8,1.2) 4.83 ddd (13.4,10.5,2.7)	64.5	4.44 ddd (10.8,5.1,1.2) 4.83 ddd (13.0,10.8,2.5)	64.5
8	5.56 ddd (17.3, 10.5, 8.0)	131.9	3.86 ddd (7.2, 6.0, 3.0)	68.7	2.69 m	49.4
9	2.72 ddd (7.0, 5.5, 1.4)	42.4	2.56 dd (6.0, 1.2)	49.6	1.90 dd (9.0, 1.2)	49.2
10	5.29 dd (10.3, 1.9) 5.33 d (17.2, 1.4)	119.4	3.64 d (7.2) 3.67 d (3.0)	47.3	2.75 dd (4.9, 2.5) 2.84 dd (4.9, 4.1)	44.6
11	-	167.1	-	166.4	-	166.3
1'	4.71 d (7.9)	98.3	4.65 d (7.9)	98.6	4.66 d (7.9)	98.8
2'	3.21 dd (9.0, 7.9)	73.3	3.20 t (8.0)	73.0	3.20 dd (9.0, 7.9)	72.9
3'	3.39 t (9.0)	76.5	3.40 t (8.7)	76.4	3.39 t (9.0)	70.0
4'	3.29 t (9.7)	70.1	3.32 m	69.9	3.32 t (9.0)	69.9
5'	3.33	77.0	3.35 m	77.1	3.36 m	77.1
6'	3.68 dd (12.0, 5.9) 3.91 dd (12.0, 2.2)	61.3	3.72 dd (11.9, 5.4) 3.92 dd (11.9, 2.0)	61.2	3.67 dd (11.9, 6.3) 3.93 dd (11.9, 2.2)	61.2

III.2.3.2. Elucidation structurale des bis-iridoïdes

Quatre Bis-iridoïdes (**Ss33-Ss36**) ont été identifiés à partir de la fraction **C** de *S. stellata*, dont les structures sont constituées de deux unités iridoïque/sécoiridoïque reliées par une liaison ester. Les deux squelettes iridoïde/sécoiridoïde retrouvés sont des dérivés de l'acide loganique (Figure III-121). Parmi ces dimères d'iridoïdes, deux (**Ss35-Ss36**) sont de nouvelles structures.

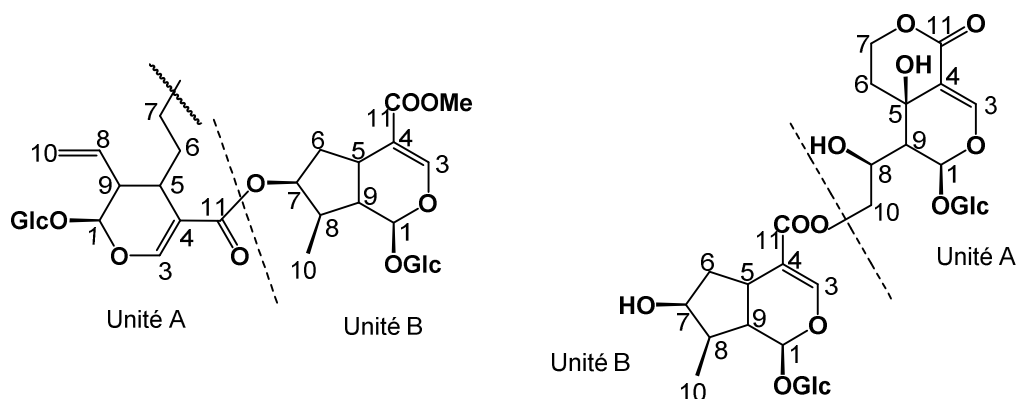


Figure III-121. Squelettes de base retrouvés dans les bis-iridoïdes isolés de *S. stellata*.

III.2.2.2.1. Détermination structurale de Ss33

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé de **Ss33** (Figures III-122, 123) indiquent la présence des signaux caractéristiques d'un iridoïde, un secoiridoïde et deux unités osidiques.

La première unité **A** est assignée à la partie secoiridoïde, celle-ci est aisément identifiée à l'eustomorusside (en comparaison avec les spectres de **Ss31**).

La deuxième unité **B** (partie iridoïde) présente des signaux en RMN ^1H caractéristiques de l'acide loganique :

- Un groupement méthyle à δ_{H} 1.12 (d, $J = 6.9$ Hz) attribuable au CH_3 -10b.
- Un signal d'un proton éthylénique à δ_{H} 7.62 (d, $J = 2.5$ Hz) dont le carbone est oxygéné, attribuable au proton H-3b.
- Un doublet intégrant pour un proton à δ_{H} 5.31 (d, $J = 1.8$ Hz) attribuable au proton H-1b.
- Des protons apparaissent entre δ_{H} 1.67 et 2.10.
- Un ensemble de protons oxygénés entre δ_{H} 3.20 et 4.8 y compris les protons de deux unités glucosidiques.

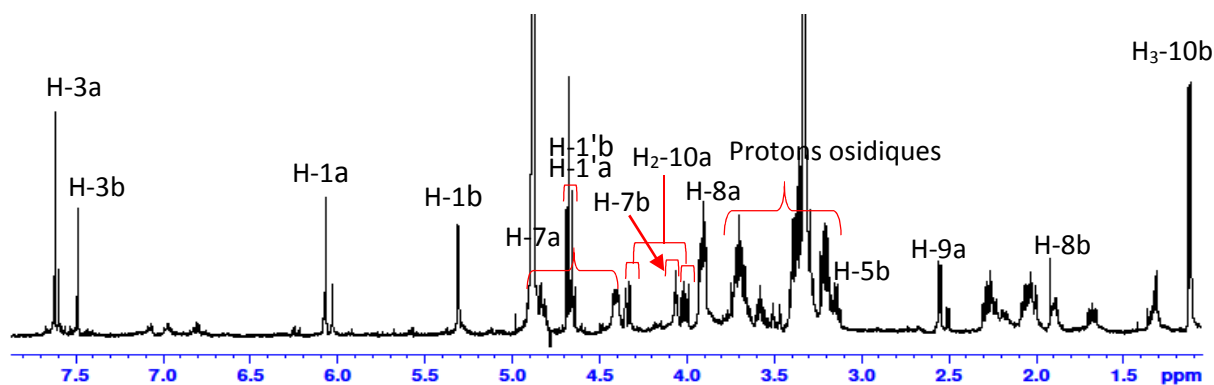


Figure III-122. Spectre de RMN ^1H du composé Ss33.

Sur le spectre de RMN ^{13}C J -modulé, sont retrouvés les signaux liés à l'eustomorusside et à l'acide loganique,

- Deux carbones éthyléniques à δ_{C} 153.3 et 151.3, attribuables aux positions 3a, b.
- Deux carbonyles résonants à δ_{C} 167.6 et 166.4, liés aux positions 11a, b.
- Les deux carbones en position 1a, b sont localisés à δ_{C} 96.3 et 94.7.
- Un signal blindé à δ_{C} 12.0 attribuable au méthyle CH_3 -10b.
- Deux carbones anomériques à δ_{C} 98.6 et 98.8.

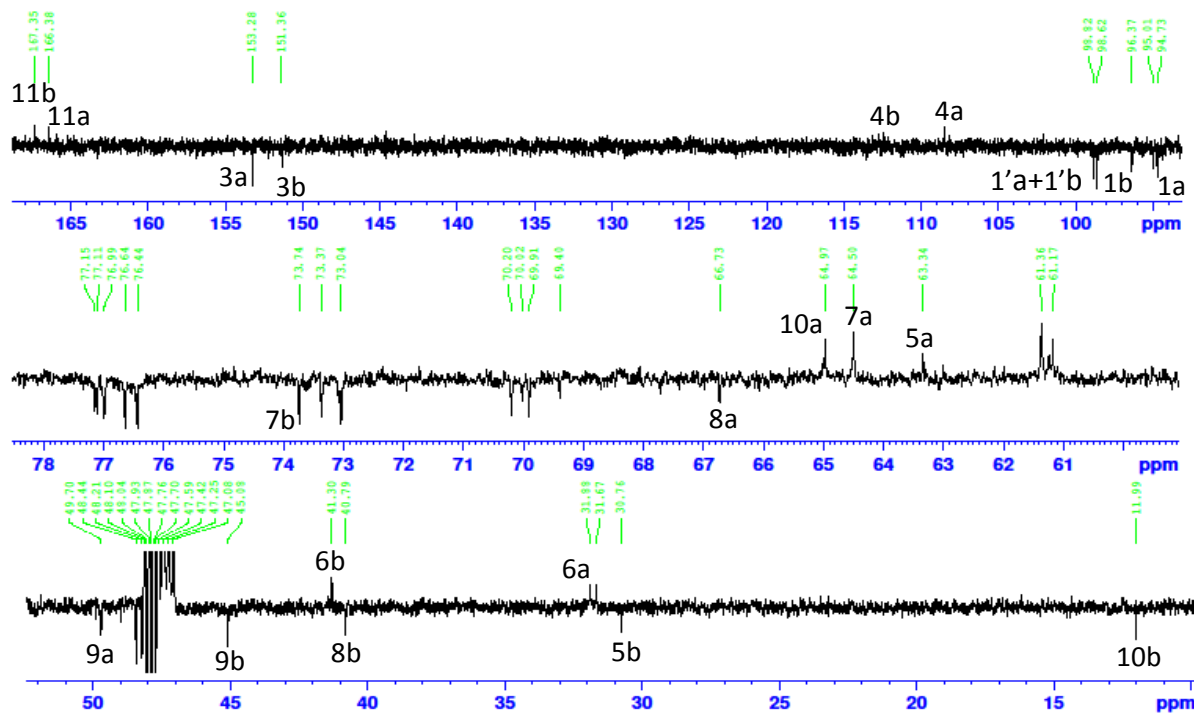


Figure III-123. Spectre de RMN ^{13}C J -modulé du composé Ss33.

En examinant le spectre COSY du composé **Ss33** (Figure III-124), la distinction entre les deux unités **A** et **B** est réalisée grâce aux corrélations observées entre les protons de chaque partie :

- les protons H₃-10b présentent une corrélation avec le proton H-8b à δ_H 1.89, ce dernier donne d'autres corrélations avec le proton situé à δ_H 0.89, attribuable à celui en position 9b et avec H-7b à δ_H 4.06 (t, $J=4.2$ Hz).
- A partir du proton H-7b, les deux protons géminés H₂-6b sont localisés à δ_H 1.67 et 2.26. Eux-mêmes corrélent avec le proton H-5b résonnant à δ_H 3.14.
- Au niveau du proton H-9b, nous observons une corrélation avec H-1b à δ_H 5.31 (d, $J=4.5$ Hz) et une corrélation avec le proton H-5b.

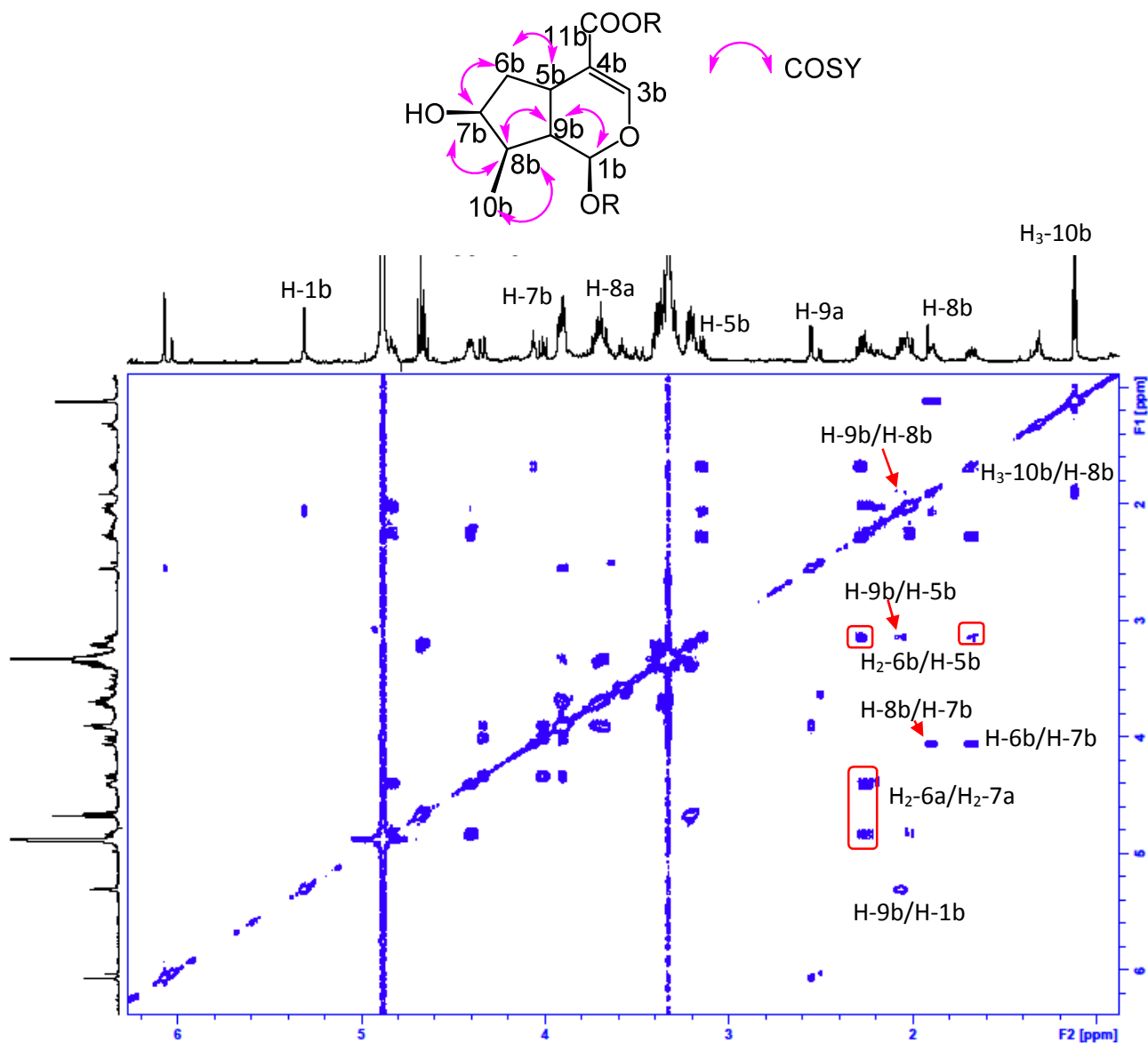


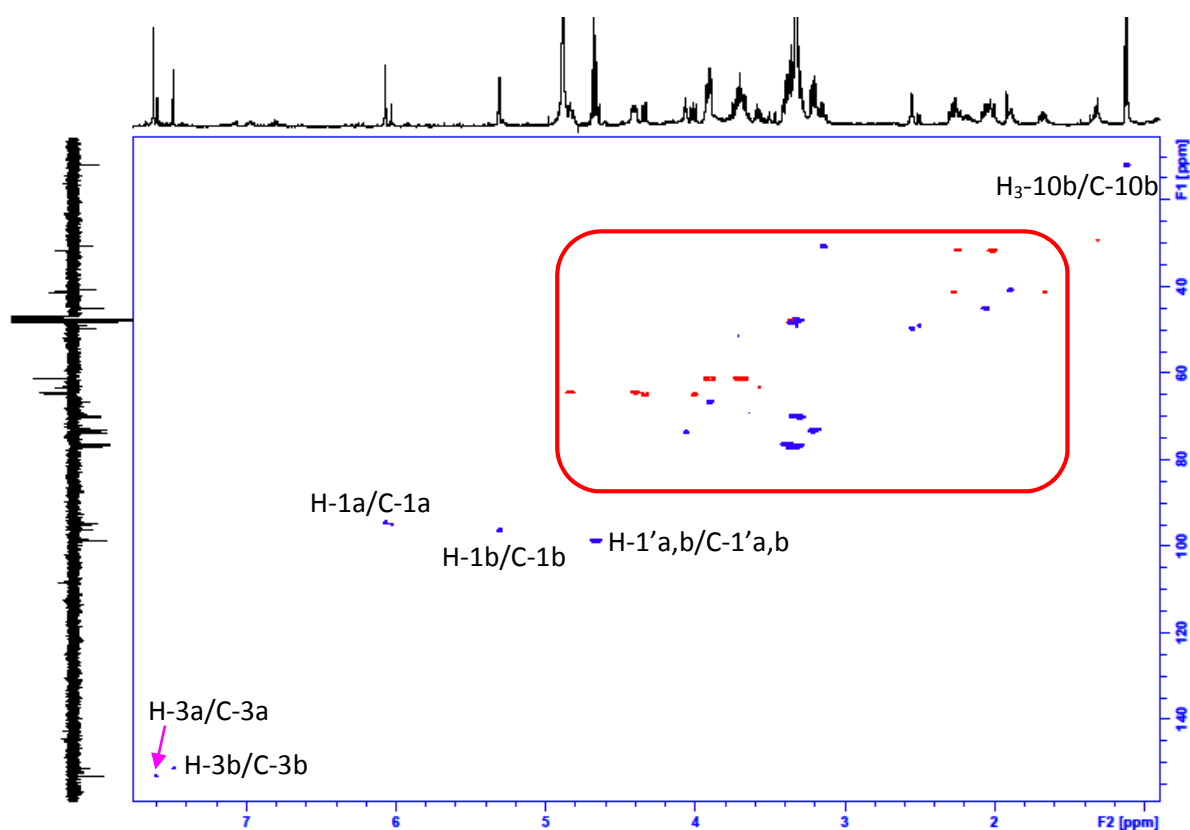
Figure III-124. Spectre COSY du composé **Ss33**.

Au niveau de l'unité **A**, les corrélations observées de secoiridoïde sont identiques à ceux de l'eustomorusside (composé **Ss31**) :

- Le proton H-1a (δ_H 6.06, d, $J=1.0$ Hz) présente une tache de corrélation avec le proton situé à δ_H 2.55 attribuable à celui en position 9a, qui à son tour corréle avec le proton H-8a résonant à δ_H 3.90. Ce dernier couple avec les deux protons géminés CH₂-10a résonants à δ_H 4.00 et 4.33.
- des corrélations entre les deux protons géminés H₂-7a (δ_H 4.40 et 4.83) et H₂-6a (δ_H 2.01 et 2.24) sont également observées.

Au niveau des protons anomériques à δ_H 4.66 (d, $J=7.9$ Hz) et à δ_H 4.68 (d, $J=7.9$ Hz), nous observons les corrélations qui permettent de localiser les autres protons. Ces derniers présentent des valeurs de déplacements chimiques et de constantes de couplage (calculées sur le spectre de RMN ¹H, tableau III-23) caractéristiques de deux unités β -D-glucopyranoses.

L'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III-125 et III-126) de cette molécule, nous a conduit à identifier tous les carbones protonés :



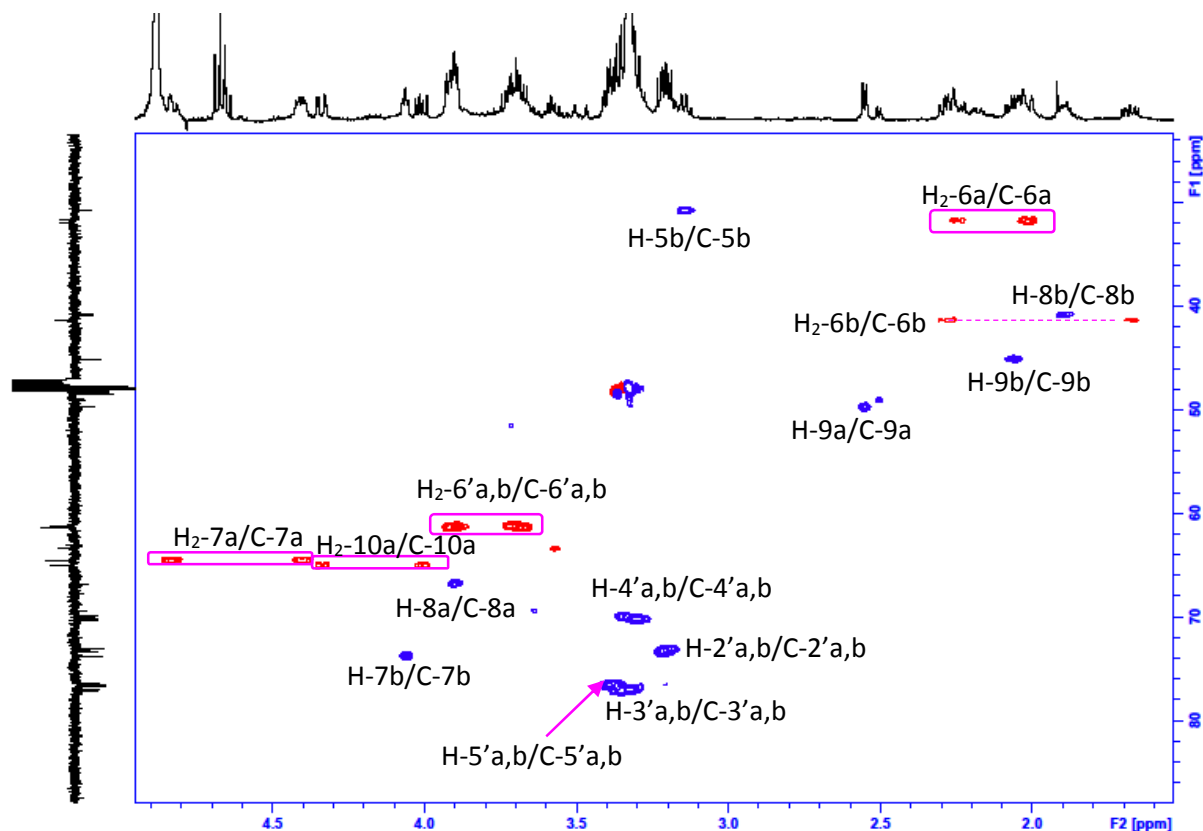
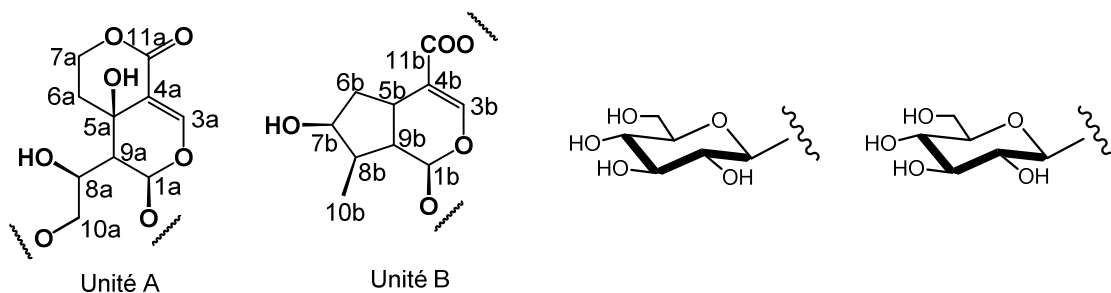


Figure III-126. Spectre HSQC *J*-modulé étalé du composé Ss33.

A ce stade de notre étude structurale nous pouvons constater la présence de l'acide loganique, l'eustomorusside incluant deux β -D-glucopyranoses.



A l'aide du spectre HMBC (Figure III-127), ces structures partielles sont vérifiées et confirmées par la visualisation des corrélations de chaque partie seule et les corrélations qui font relier ces parties entre elles :

- **Unité A**

- Le proton H-9a (δ_H 2.55) corrèle avec les carbones C-5a (δ_C 63.3), C-10a (δ_C 65.0), C-8a (δ_C 66.7), C-1a (δ_C 94.7) et avec le carbone quaternaire C-4a à δ_C 108.5.

- Une corrélation entre le carbone C-4a et le proton éthylénique à δ_H 7.62 attribuable au proton H-3a, quant à lui-même présente des corrélations avec C-1a et le carbonyle à δ_C 166.4 ppm, suggéré pour le C-11a.
- Au niveau du proton H-1a, nous observons des corrélations avec C-5a et avec le carbone éthylénique C-3 à δ_C 153.3.

Unité B

- les protons H₃-10b présentent des corrélations avec les carbones C-7b, C-8b et C-9b à δ_C 73.7, 40.8 et 45.0, respectivement.
- A partir du proton H-1b, des taches de corrélations sont observées avec les carbones C-5b (δ_C 30.7) et C-3b résonnant à δ_C 151.3 dont le proton H3b est localisé à δ_H 7.48 (s) sur le spectre HSQC.
- Des corrélations entre H-3b et les carbones C-5b et C-1b, en plus du carbone quaternaire éthylénique C-4b à δ_C 112.5 et le carbonyle C-11b à δ_C 167.3.

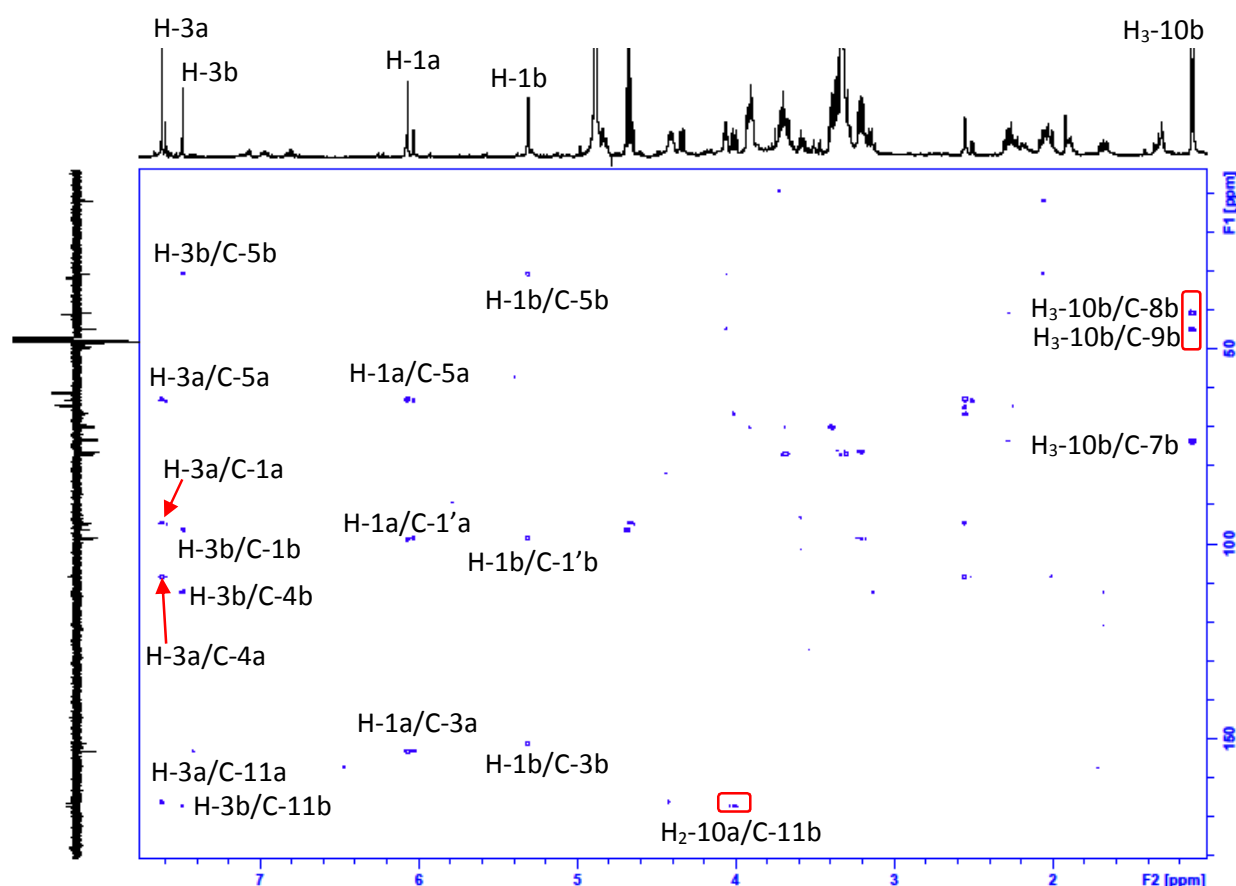


Figure III-127. Spectre HMBC du composé Ss33.

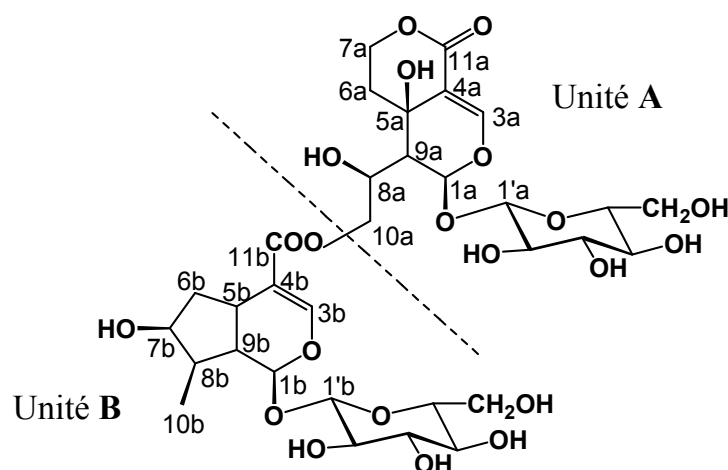
L'expérience HMBC montre également des corrélations entre le carbonyle C-11b (δ_C 167.3) et les protons H₂-10a, ces corrélations indiquent que les deux unités **A** et **B** sont reliées entre elles par la liaison ester en positions 11b/10a.

Au niveau des unités glucidiques, les positions de ces dernières sur le squelette iridoïde sont aussi déterminées par expérience HMBC :

- La localisation du glucose de l'eustomorusside (unité **A**) est déduite de la corrélation que présente le proton H-1a avec le carbone anomérique C-1'a résonant à δ_C 98.8 ppm.
- La corrélation du proton H-1b de l'acide loganique (unité **B**) avec le carbone anomérique C-1'b résonant à δ_C 98.6 ppm atteste que le deuxième glucose est attaché en C-1b.

La stéréochimie relative est établie en tenant compte des valeurs des constantes de couplage calculées sur le spectre de RMN ¹H et de la comparaison avec les données de la littérature.

Toutes ces données permettent d'identifier sans ambiguïté ce dimère d'iridoïde (**Ss33**) au septemfidoside qui a précédemment été isolé à partir de *Gentiana septemfida* (Gentianaceae) (Çalis et al., 1992). Ici nous l'avons isolé pour la première fois dans le genre *Scabiosa*.



Ss33: Septemfidoside

III.2.2.2. Détermination structurale de Ss34

Le composé **Ss34** est un dimère d'iridoïde dont la première unité **A** assigné à la partie secoiridoïde est différente de celle de **Ss33**. La deuxième unité **B** (partie iridoïde) est identifié au loganine qui se diffère de l'acide loganique par la présence d'une fonction ester en C-11 au lieu d'une fonction acide.

Le spectre de RMN ^1H de **Ss34** (Figure III-128) indique la présence des signaux de secologanine caractérisée par les trois protons d'une double liaison terminale ($\text{CH}=\text{CH}_2$) résonnant à δ_{H} 5.80 (ddd, $J=17.3,10.5,8.7$ Hz), 5.31 (dt, $J=17.3,1.1$ Hz) et 5.26 (dd, $J=10.5,1.1$ Hz), assignés à H-8a et H₂-10a. Les carbones éthyléniques correspondants apparaissent à δ_{C} 134.5 et 117.2.

La présence du loganine (unité **B**) est justifiée par les signaux caractéristiques du méthyle H₃-10b à δ_{H} 1.08 (d, $J=6.9$ Hz) et le groupement méthoxy de la fonction ester en C-11b qui apparaît à δ_{H} 3.62 (s), leurs carbones respectifs résonnent à δ_{C} 12.4 et 50.3.

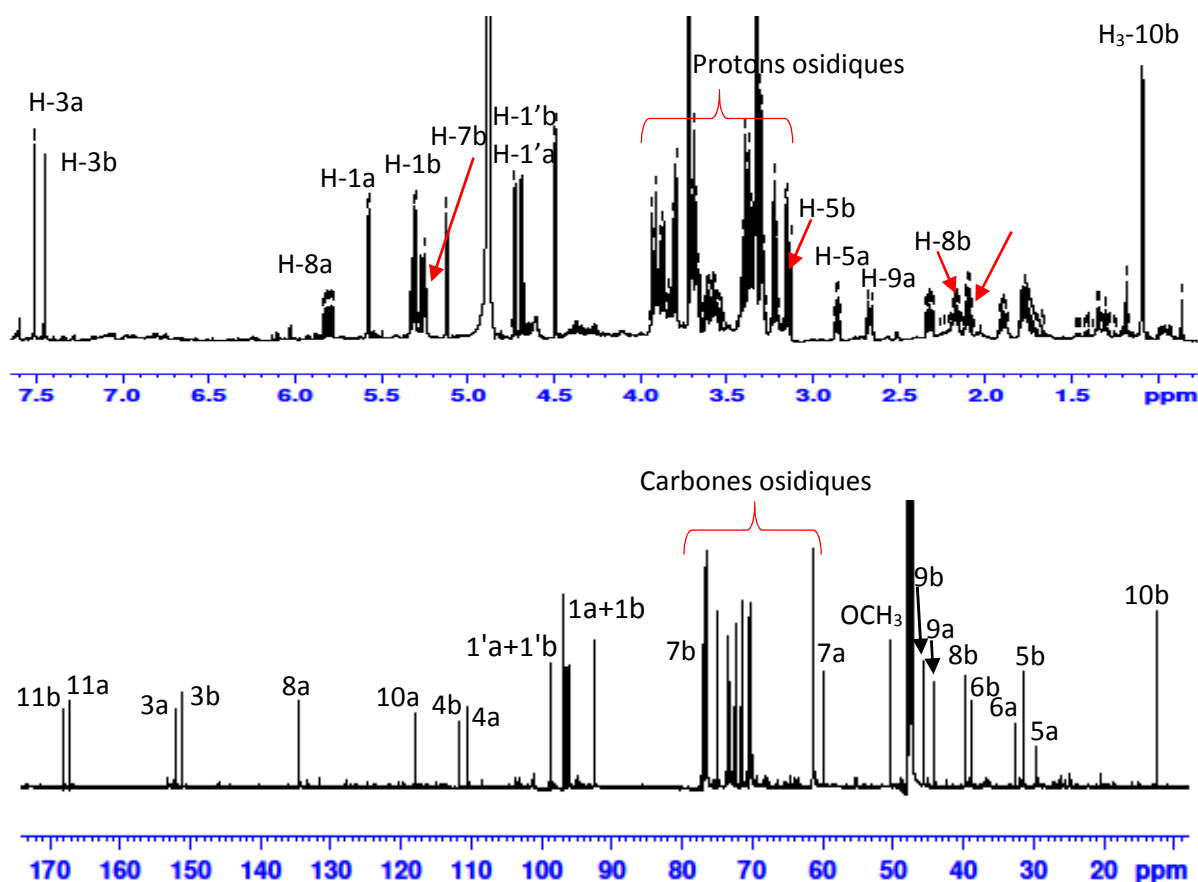


Figure III-128. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé Ss34.

Toutes ces attributions sont par ailleurs confirmées par les expériences de corrélations HSQC, HMBC et COSY. Cette dernière (figure III-129) révèle les couplages attendus entre les protons de chaque unité. En commençant par la partie iridoïde (unité **B**), nous observons les corrélations dues au loganine :

- Entre H₃-10b (δ_H 1.08) et le proton situé à δ_H 2.17 attribuable au proton H-8b.
- Entre H-9b localisé à δ_H 2.10 et H-1b situé à δ_H 5.30.
- Entre H-5b (δ_H 3.14) et les protons H₂-6b situés à δ_H 1.77 et 2.32. Ces derniers corrélient avec H-7b résonant à δ_H 5.24 quant à lui-même couple avec H-8b.

Les corrélations des protons du secologanoside sont également observées entre :

- Entre H-9a (δ_H 2.67) et les protons situés à δ_H 5.80 et 2.86 attribuables aux protons H-8a et H-5a, respectivement.
- Entre H-8a et H₂-10a situés à δ_H 5.26 et 5.31.
- Entre H-5a (δ_H 2.86) et les protons H₂-6a situés à δ_H 1.75 et 2.90. Ces derniers corrélient avec H₂-7a résonant à δ_H 3.55-3.62.

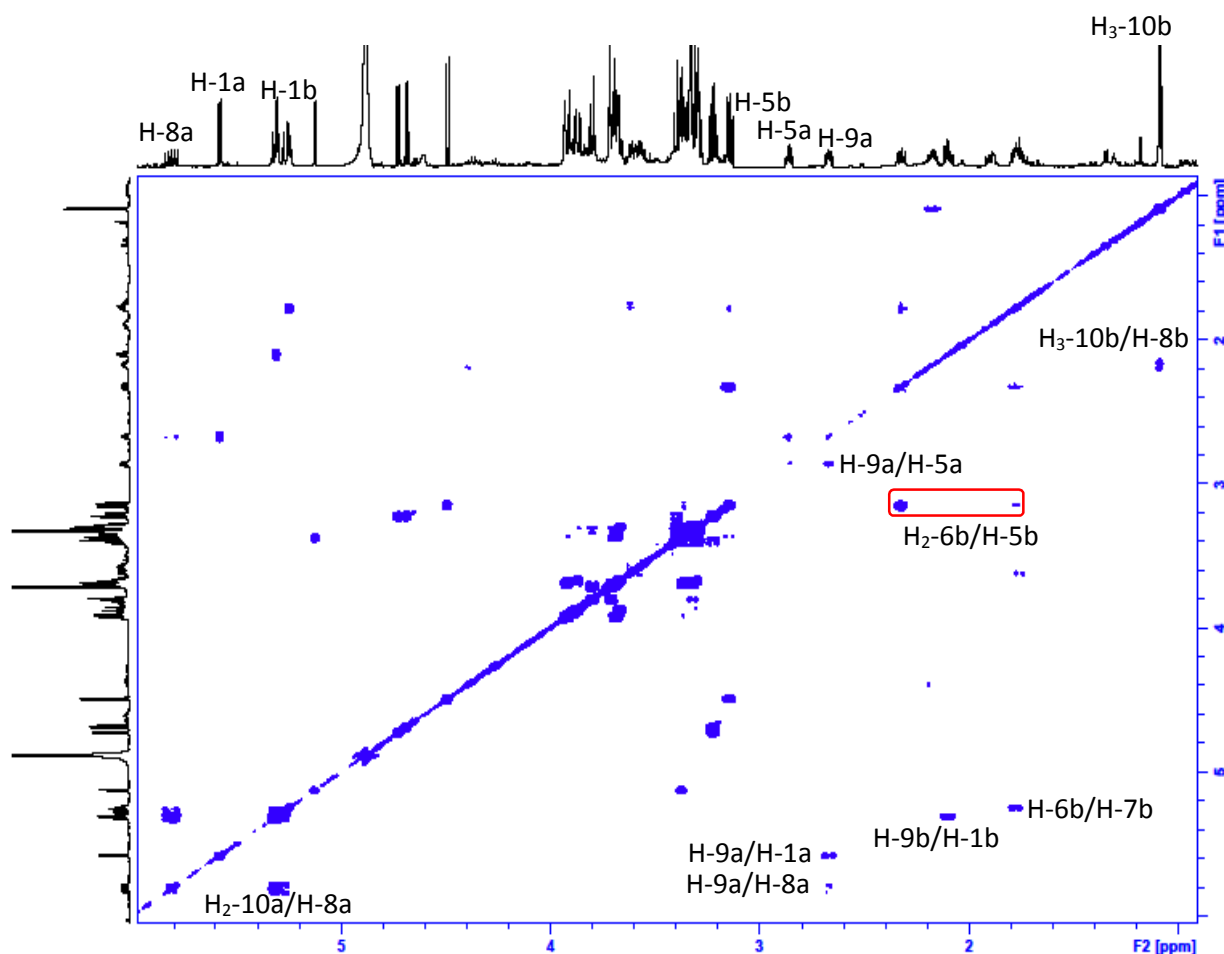


Figure III-129. Spectre COSY du composé Ss34.

Le spectre HMBC (Figure III-130) montre plusieurs taches des couplages de types 2J et 3J , parmi lesquelles nous citerons les plus importantes.

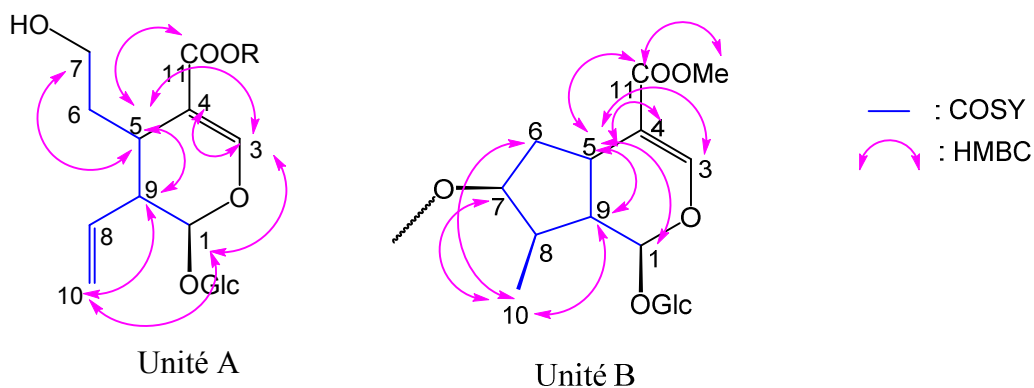
Partie secoiridoïde :

- Le proton H-9a présente des corrélations avec C-4a, C-1a, C-8a et C-10a.
- Le proton H-5a corrèle avec les carbones C-6a, C-7, C-9a, C-1a, C-4a, C-3a, C-8a et C-11a.
- Le proton éthylénique H-3a présente quatre corrélations au niveau des carbones C-5a, C-1a, C-4a et C-11a.
- Le proton H-1a corrèle avec le carbone C-1'a du glucose ce qui nous permet de fixer ce sucre sur l'hydroxyle en position 1a de la secologanane.

Partie iridoïde :

- Les protons du méthyle H₃-10b corrèlent avec C-8b (δ_C 39.6), C-7b (δ_C 76.9) et C-9b (δ_C 45.7).
- Le proton H-5b (δ_H 3.14) présente cinq corrélations dont deux avec le carbone quaternaire C-4b (δ_C 111.7), une avec le carbone éthylénique C-3b (δ_C 151.2), deux avec deux carbones méthine C-9 et C-6 (δ_C 38.9) et la dernière avec C-1b (δ_C 96.1).
- Le proton H-1b corrèle également avec le carbone C-1'b d'un second glucose, permettant ainsi de fixer ce sucre sur l'hydroxyle en position 1b du loganine.
- Le proton H-3b (δ_H 7.51) corrèle avec C-5b, C-1b, C-4b et C-11b. ce dernier présente une corrélation avec les protons du groupement méthoxy (OCH₃) à δ_H 3.62.

Ces éléments indiquent que la fonction ester du loganine n'est pas engagé dans la liaison entre les deux partie de ce bis-iridoïde. De plus, le déblindage du C-7b suggère qu'il est impliqué dans cette liaison ester qui relie les deux parties. Ceci est confirmé par la corrélation observée entre C-11a et H-7b sur le spectre HMBC (Figure III-130).



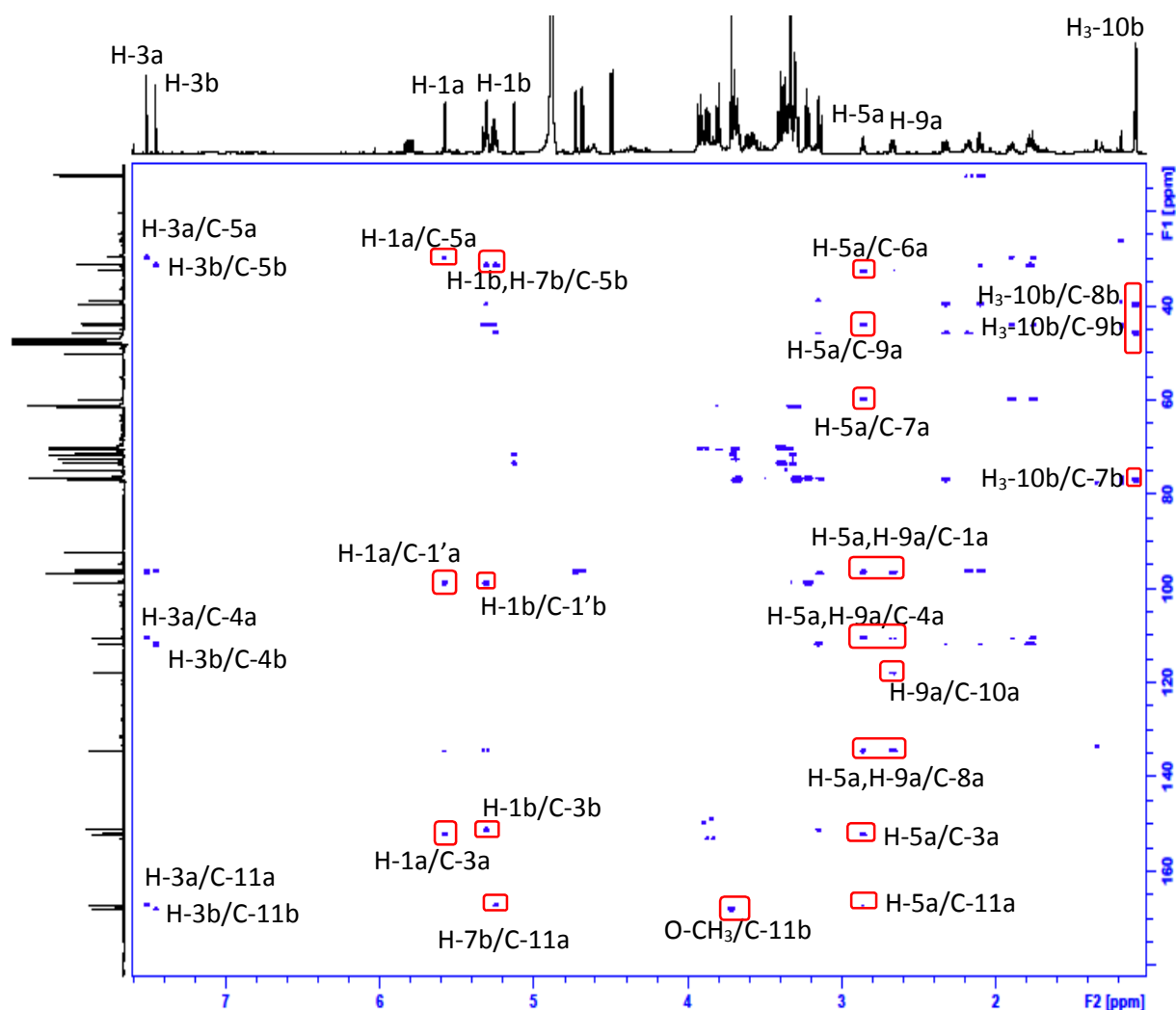
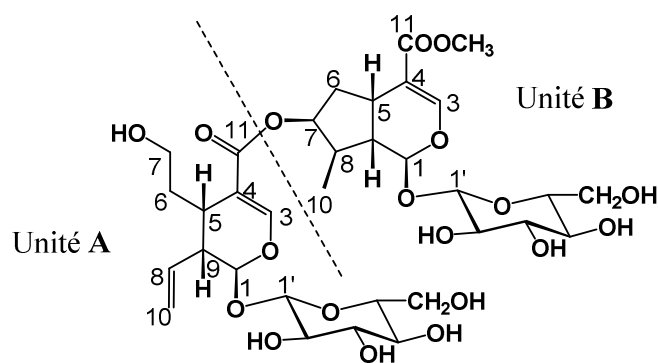


Figure III-130. Spectre HMBC du composé Ss34.

L'ensemble de ces résultats nous a permis d'établir que le composé Ss34 était le sylvestroside I (Tableau III-23) isolé précédemment de *Dipsacus sylvestris* (Jensen et al., 1979) et *Dipsacus laciniatus* (Abdallah., 1991). Il a été isolé récemment du genre *Scabiosa* à partir des fleurs de *S. tschilliensis* (Wang et al., 2015).



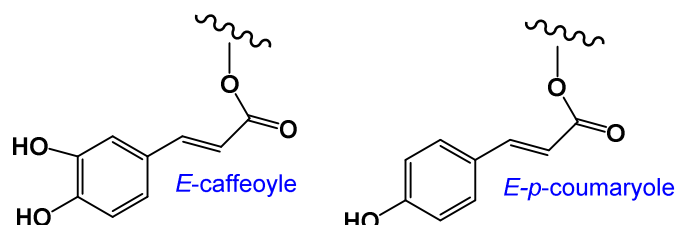
Ss34: Sylvestroside I

Tableau III-23. Déplacements chimiques en RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) du composé **Ss33** et **Ss34** (600 MHz, 150 MHz) dans CD₃OD.

	Ss33 (Septemfidoside)		Ss34 (Sylvestroside I)	
	δ_H m (<i>J</i> en Hz)	δ_C	δ_H m (<i>J</i> en Hz)	δ_C
Unité A				
1a	6.06 d (1.0)	94.7	5.57 d (6.5)	96.4
3a	7.62 s	153.3	7.45 s	152.2
4a	-	108.5	-	110.5
5a	-	63.3	2.86 <i>ql</i> (6.5)	29.7
6a	2.01 <i>dl</i> (13.7)	31.9	1.75 m	32.5
	2.24 <i>dd</i> (14.0, 5.2)		2.90 m	
7a	4.40 <i>dd</i> (10.7, 3.9)	64.5	3.55-3.62 m	59.8
	4.83 m			
8a	3.90 m	66.7	5.80 <i>ddd</i> (17.3, 10.5, 8.7)	134.5
9a	2.55 <i>dd</i> (5.9, 1.0)	49.7	2.67 <i>m</i>	44.0
10a	4.00 <i>dd</i> (11.9, 6.9)	65.0	5.26 <i>dd</i> (10.5, 1.1)	117.2
	4.33 <i>dd</i> (11.9, 2.9)		5.31 <i>dt</i> (17.1, 1.1)	
11a	-	166.4	-	167.2
1'a	4.66 d (7.9)	98.8	4.68 d (7.9)	98.8
2'a	3.20 m	73.0	3.22 <i>t</i> (8.3)	73.3
3'a	3.28-3.41	77.1	3.28-3.42	76.6
4'a	3.28-3.41	70.2	3.28-3.42	70.2
5'a	3.28-3.41	76.4	3.28-3.42	77.0
6'a	3.65-3.73	61.3	3.65-3.72	61.4
	3.88-3.93		3.86-3.93	
Unité B				
1b	5.31 d (4.5)	96.3	5.30 d (4.9)	96.1
3b	7.48 s	151.3	7.51 s	151.2
4b	-	112.5	-	111.7
5b	3.14 m	30.7	3.14 <i>dd</i> (9.2, 7.8)	31.3
6b	1.67 <i>ddd</i> (13.5, 7.5, 5.0)	41.3	1.77 m	38.9
	2.26 m		2.32 <i>ddd</i> (14.5, 7.8, 1.5)	
7b	4.06 <i>t</i> (4.2)	73.7	5.24 <i>td</i> (5.3, 1.5)	76.9
8b	1.89 m	40.8	2.17 m	39.6
9b	2.05 <i>ddd</i> (13.7, 9.1, 4.5)	45.0	2.10 <i>ddd</i> (13.7, 7.1, 4.9)	45.7
10b	1.12 d (6.9)	12.0	1.08 d (6.9)	12.4
11b	-	167.3	-	168.0
OMe	-	-	3.62 s	50.3
1'b	4.68 d (7.9)	98.6	4.72 d (7.9)	98.7
2'b	3.20 m	73.3	3.22 <i>t</i> (8.3)	73.3
3'b	3.28-3.41	77.1	3.28-3.42	76.6
4'b	3.28-3.41	70.0	3.28-3.42	70.2
5'b	3.28-3.41	76.4	3.28-3.42	77.0
6'b	3.65-3.73	61.1	3.65-3.72	61.3
	3.88-3.93		3.86-3.93	

III.2.2.2.3. Détermination structurale de Ss35 et Ss36

Ces deux composés sont des dérivés de **Ss33** par la présence d'un fragment supplémentaire en position 7a du secologanoside, ce qui fait la nouveauté de ces deux bis-iridoïdes. Ce fragment est le *E*-caffeoyle pour le **Ss35** et le *E-p*-coumaryole dans **Ss36**.



Les spectres de masse HR-ESI-MS en mode positif de **Ss35** (Figure III-131) et **Ss36** montrent les ions pseudo-moléculaires $[M+Na]^+$ à m/z 933.2997 et 917.3063, respectivement. Correspondant à une formule brute $C_{42}H_{54}O_{22}Na$ pour le **Ss35** et $C_{42}H_{54}O_{21}Na$ pour le **Ss36**. Ceci indique la présence d'un hydroxyle supplémentaire dans **Ss35** par rapport à **Ss36**.

Le spectre IR indique la présence d'un groupement carbonyle d'ester α,β -insaturée (1697cm^{-1}) et des groupements hydroxyles (3420cm^{-1}).

Le spectre UV révèle une bande d'absorption caractéristique d'un β -alkoxyacrylique acide ou son ester à 228 nm. Une deuxième bande à 326 nm, caractéristique d'un dérivé de l'acide cinnamique.

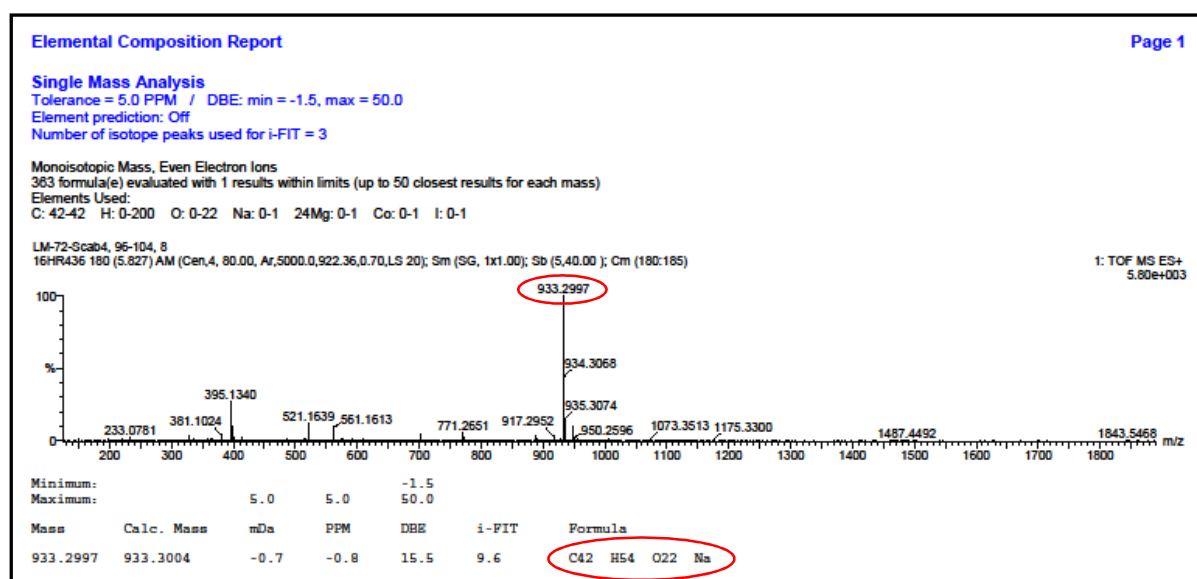


Figure III-131. Spectre de masse du composé Ss35.

L'analyse des spectres de RMN ^1H de **Ss35** et **Ss36** (Figure III-132), nous révèle la présence presque des mêmes signaux. Comparativement à ceux de **Ss33**, nous constatons la présence de sylvestroside I avec des signaux liés à un noyau aromatique dans la zone entre 7 et 8 ppm. Dans cette zone nous observons pour le **Ss35**, deux signaux d'intégration 1H chacun à δ_{H} 6.96 (dd, $J=8.1, 2.0$ Hz) et δ_{H} 7.05 (d, $J=2.0$ Hz) indiquant un couplage *mé*ta entre ces deux protons. Pour le **Ss36**, la présence d'un doublet intégrant pour deux protons à δ_{H} 7.47 ($J=8.6$ Hz) caractéristique d'un couplage *ortho*, nous permet de suggérer la présence d'un noyau aromatique *para* substitué dans **Ss36**. Une double liaison *trans* substituée est également suggérée à partir de deux doublets à δ_{H} 7.55 et δ_{H} 6.24, dont la constante de couplage est de 16.0 Hz, attribués à deux protons oléfiniques en position *trans*.

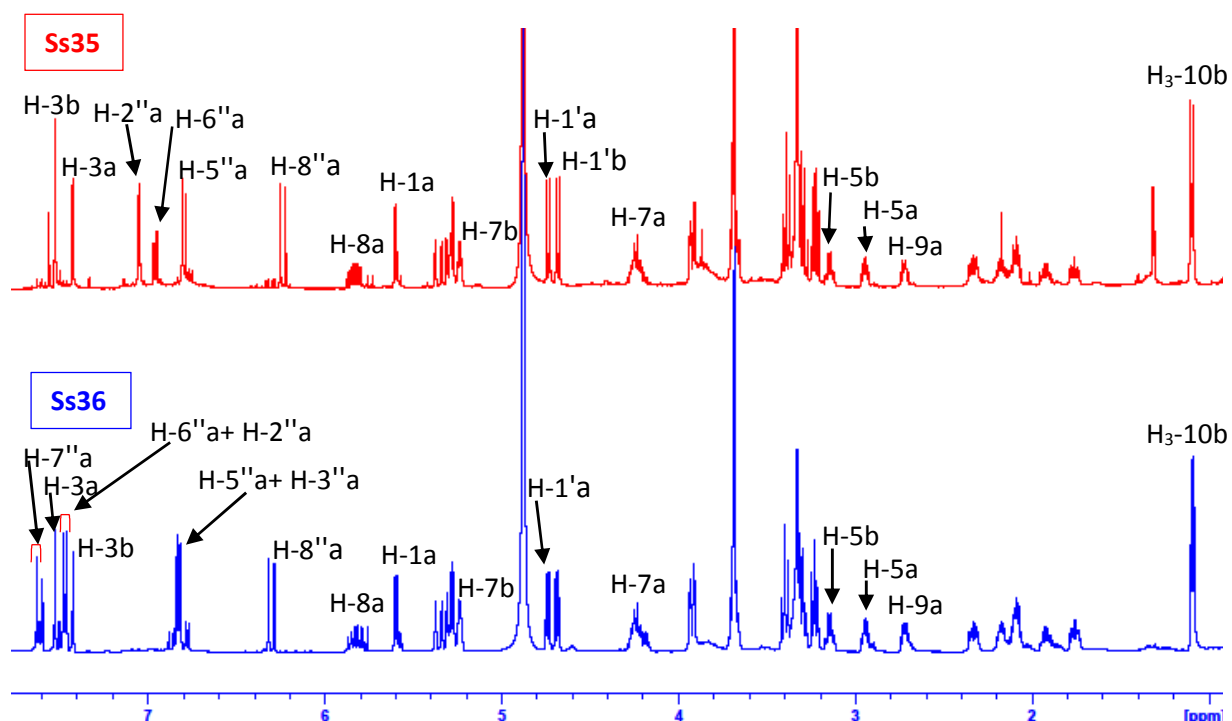


Figure III-132. Spectres de RMN ^1H des composés **Ss35** et **Ss36**.

Sur le spectre de RMN ^{13}C de **Ss35**, les déplacements chimiques sont identiques à ceux du composé **Ss36** (Figure III-133), excepté le signal correspondant au carbone quaternaire oxygéné de **Ss35** à δ_{C} 145.4 ppm. La disparition de ce dernier dans **Ss36** est accompagnée par le signal intense à δ_{C} 115.4 ppm attribuable à deux carbones aromatiques oxygénés identiques C-3'' et C-5''. Cette première constatation nous suggère une substitution supplémentaire sur le noyau aromatique dans **Ss35**. Ceci est confirmé par l'analyse approfondie des spectres de RMN 2D (COSY, HSQC J -modulé, HMBC et ROESY).

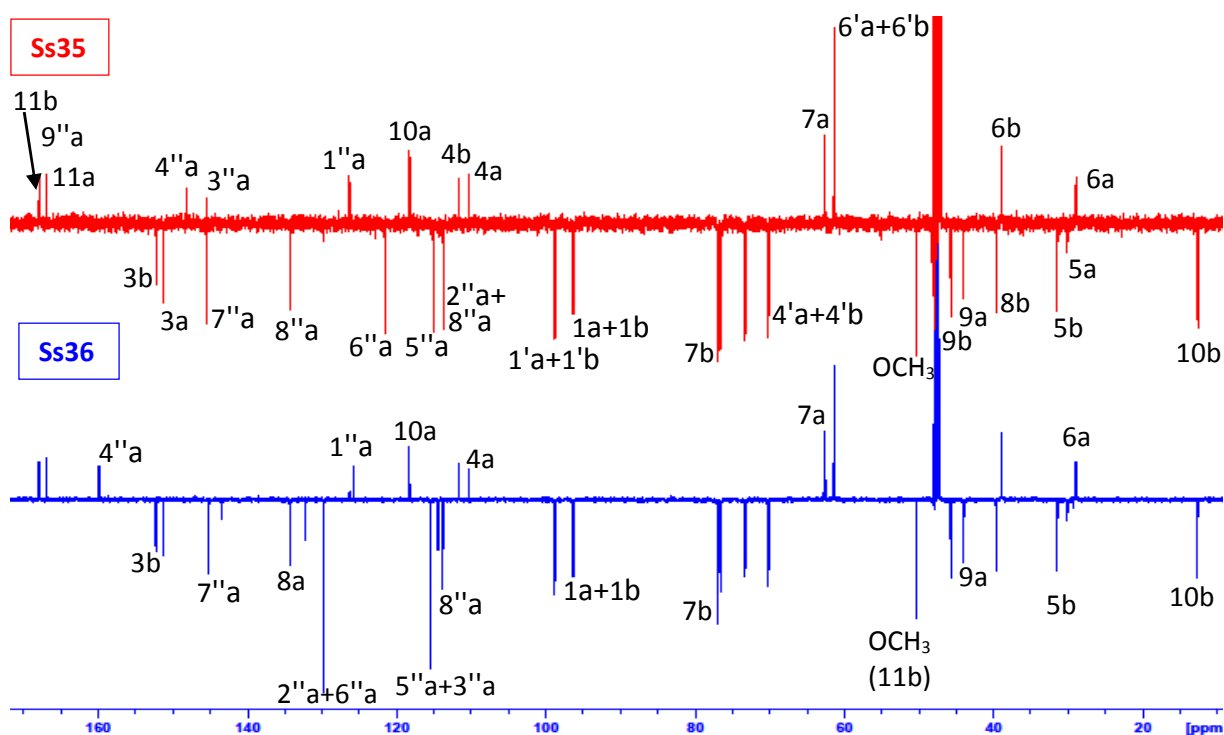


Figure III-133. Spectres de RMN ^{13}C *J*-modulé des composés **Ss35** et **Ss36**.

- **Analyse des spectres COSY et HSQC *J*-modulé**

L'analyse simultanée des spectres COSY (Figure III-134) et HSQC *J*-modulé permet d'attribuer la majorité des signaux de ces dimères d'iridoïdes, dont les corrélations suivantes sont observées dans **Ss35** et **Ss36**. En prenant celles de **Ss35** comme exemple, nous allons discuter brièvement sur les deux unités **A** et **B**, déjà identifiés dans **Ss34**.

• Unité B : partie iridoïde (loganine)

- Sur le spectre COSY (Figure III-132), les protons H₃-10b (δ_{H} 1.10, δ_{C} 12.6) présentent une corrélation avec le proton H-8b à δ_{H} 2.19 (δ_{C} 39.7), ce dernier donne d'autres corrélations avec le proton 9b situé à δ_{H} 2.08 (δ_{C} 45.7) et avec H-7b à δ_{H} 5.24 (δ_{C} 77.0).
- Au niveau du proton H-9b, nous observons une corrélation avec H-1b à δ_{H} 5.28 (δ_{C} 96.3) et une corrélation avec le proton H-5b (δ_{H} 3.14, δ_{C} 31.5), qui à son tour couple avec les deux protons géminés H₂-6 à δ_{H} 1.76 et 2.34 (δ_{C} 38.9). Ces derniers corrélient avec le proton H-7b.

- Unité A : partie secoiridoïde (desoxysecologanine)
 - Sur le même spectre COSY, les deux protons éthyléniques H₂-10a à δ_H 5.30 et 5.36 (δ_C 118.2) corrélient entre eux et avec le proton éthylénique H-8a résonnant à δ_H 5.84 (δ_C 134.3), qui à son tour couple avec le H-9a (δ_H 2.72, δ_C 44.0) quant à lui-même couple avec H-1a (δ_H 5.60, δ_C 96.3) et H-5a (δ_H 2.95, δ_C 30.1).
 - A partir du proton H-5a, les deux protons H₂-6a sont localisés à δ_H 1.92 et 2.10 (δ_C 28.9). Ces derniers corrélient avec les protons H₂-7a situés à δ_H 4.21 et 4.26 dont le carbone C-7a résonne à δ_C 62.7. Il est à noter qu'il y a un déblindage notable en cette position des protons et carbone par rapport à ceux de sylvestroside I (Ss34) permettant de suggérer une substitution en cette position.

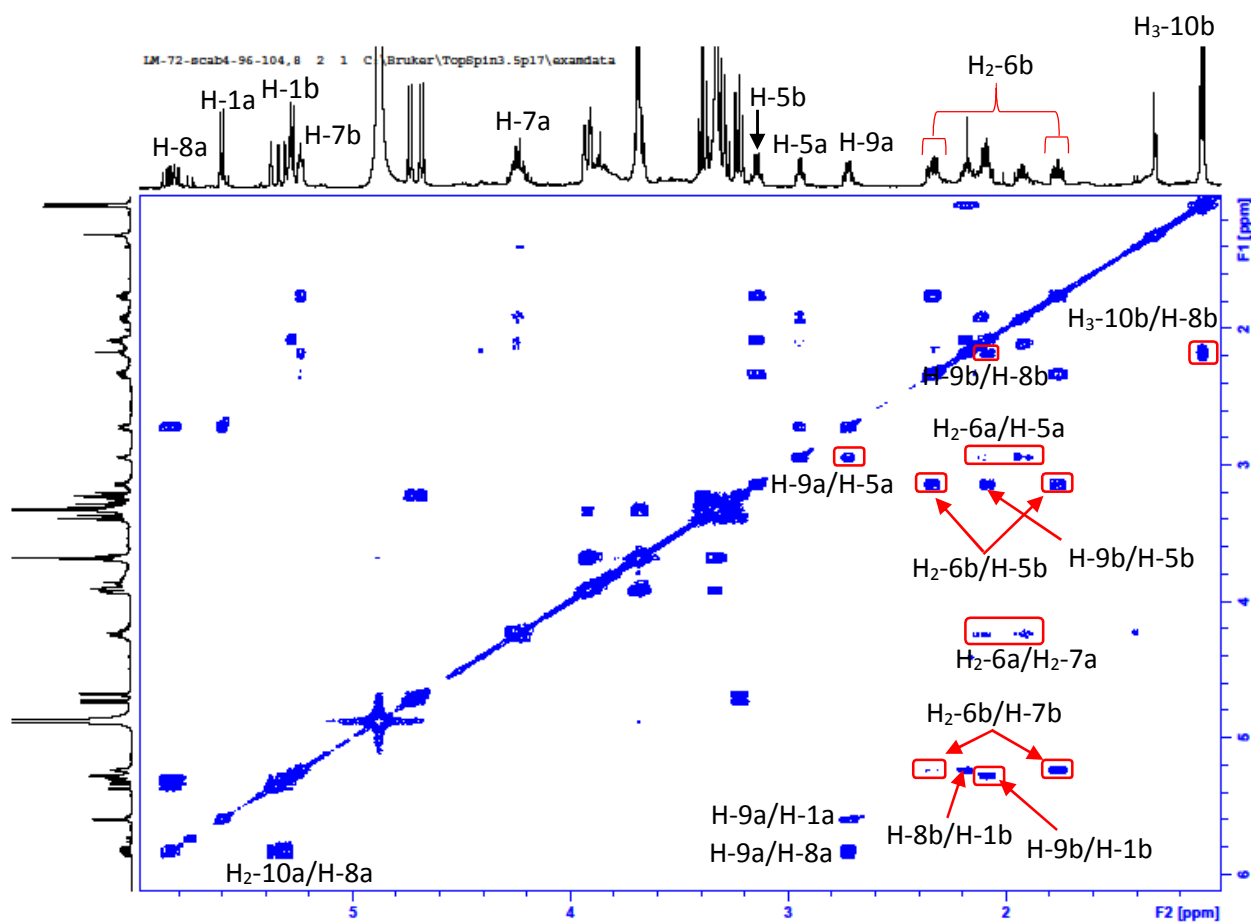


Figure III-134. Spectre COSY étalé (partie 1) du composé Ss35.

- Partie E-caffeoyle (dans Ss35)

Les taches de corrélations observées sur les spectres HSQC, HMBC et COSY étalé (Figure III-135) nous permettent de déduire la présence d'une unité aromatique sur laquelle s'insère un carbonyle d'ester α,β -insaturée, justifiant ainsi les données UV et IR :

- Le proton aromatique résonnant sous la forme d'un doublet à δ_H 6.80 (H-5''a) corrèle avec le proton situé à δ_H 6.96 (H-6''a) et couplent entre eux avec une constante de couplage (*ortho*) de 8.1 Hz.
- Au niveau du proton H-6''a, une autre tâche de corrélation est observée avec le doublet fin à δ_H 7.05 ppm (H-2''a) avec une constante de couplage *meta* ($J=2.0$ Hz).
- Le proton éthylénique à δ_H 6.24 ppm (H-8''a) corrèle avec le deuxième proton éthylénique à δ_H 7.55 ppm (H-7''a), dont la constante de couplage entre eux était de 16.0 Hz (d) indique la présence d'une double liaison *trans* substituée.

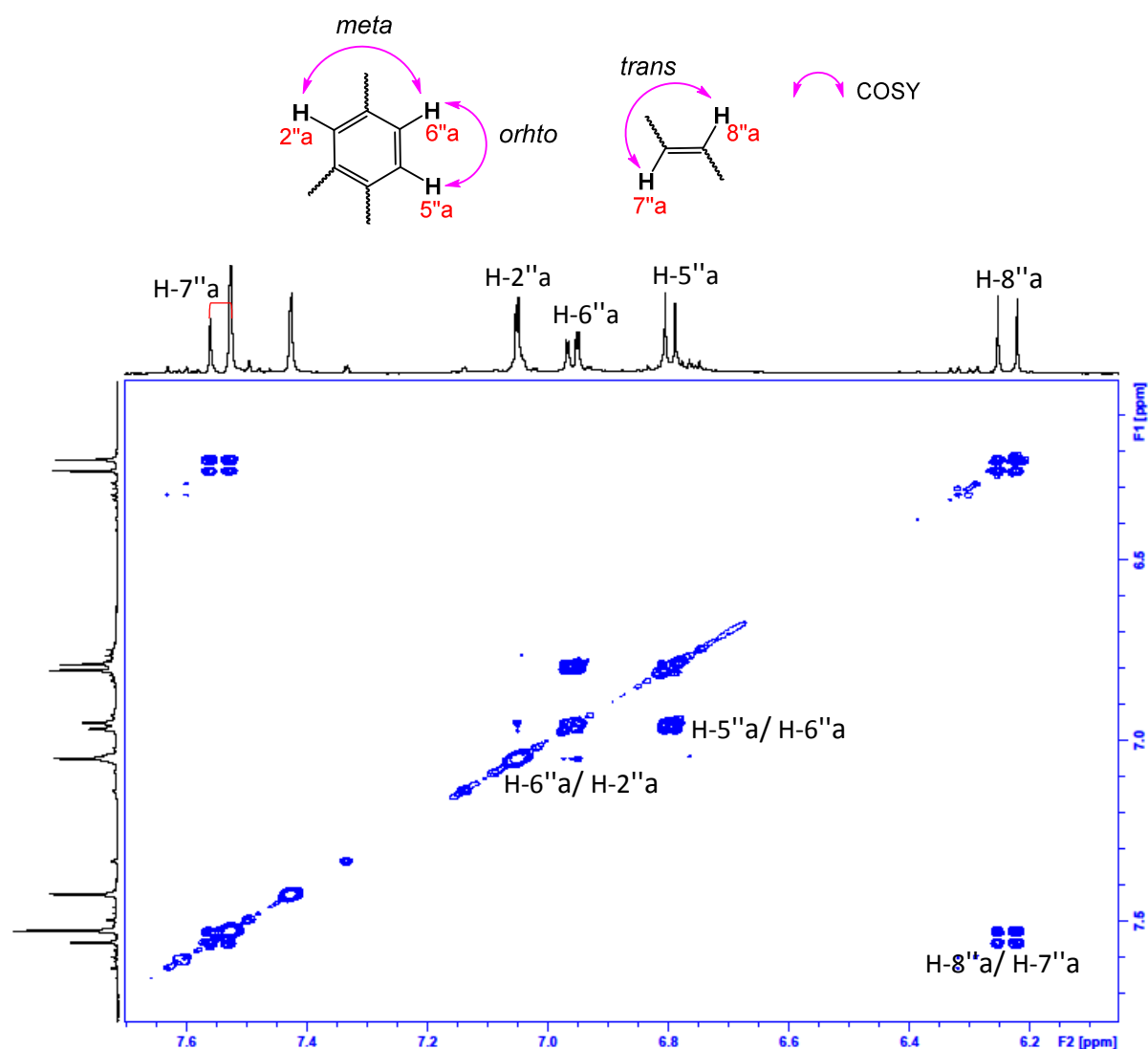


Figure III-135. Spectre COSY étalé (partie 2) du composé Ss35.

- Partie E-p-coumaryole (dans Ss36)

Les taches de corrélations observées sur le spectre COSY étalé de Ss36 (Figure III-136) nous permet de déduire la présence d'une unité aromatique para substituée et une double liaison *trans* substituée :

- Le doublet aromatique résonnant à δ_H 6.83 (H-3''a+ H-5''a) corrèle avec le signal situé à δ_H 7.47 (H-2''a+ H-6''a) avec une constante de couplage (*ortho*) de 8.6 Hz.
- Le proton éthylénique à δ_H 6.30 (H-8''a) corrèle avec le deuxième proton éthylénique à δ_H 7.61 (H-7''a), dont la constante de couplage entre eux était de 16.0 Hz (d) caractéristique d'une double liaison *trans* substituée.

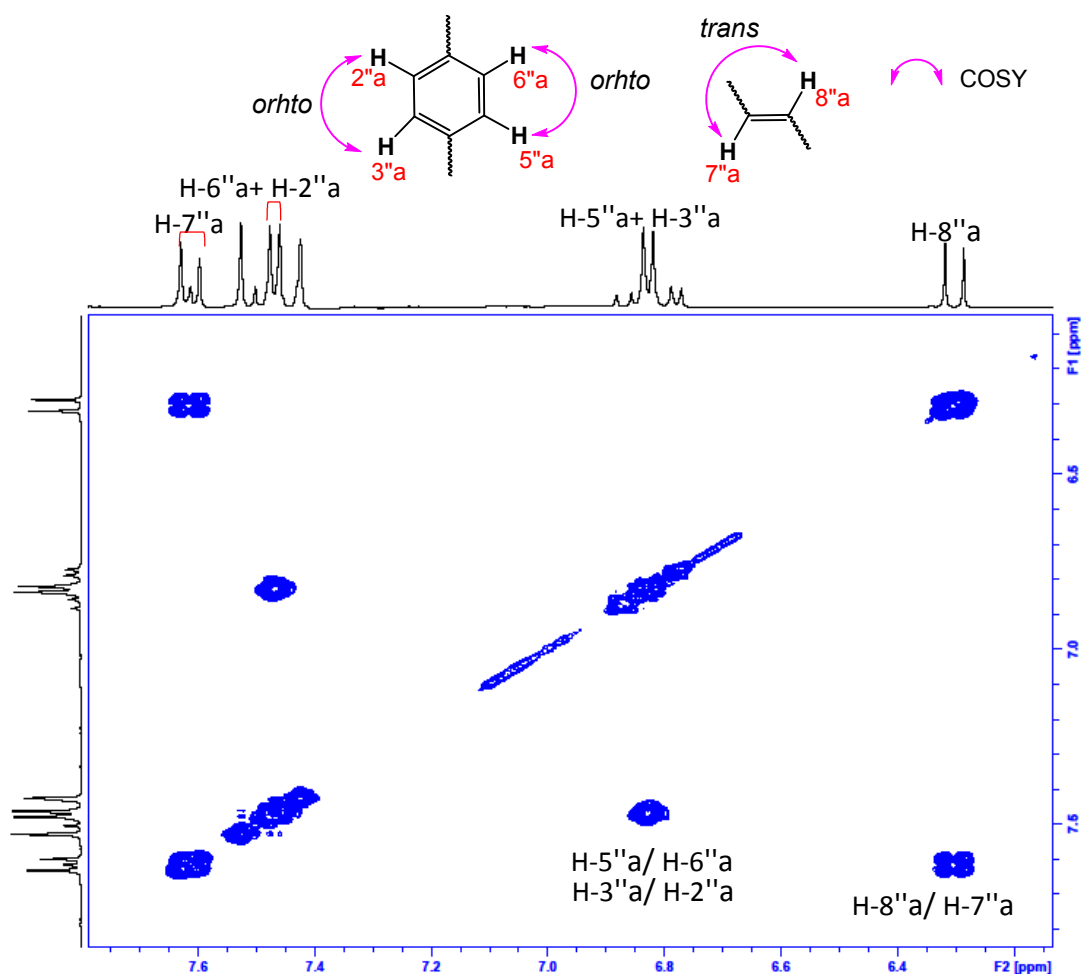


Figure III-136. Spectre COSY étalé du composé Ss36.

- Analyse des spectres HMBC et ROESY

Le spectre HMBC permet d'identifier les autres carbones du noyau aromatique et de compléter la structure :

Partie secoiridoïde

- Le proton éthylénique H-3a présente quatre corrélations au niveau des carbones C-5a, C-1a, C-4a et C-11a.
- Le proton H-1a corrèle avec le carbone C-1'a du glucose ce qui nous permet de fixer ce sucre sur l'hydroxyle en position 1a de secologanine.

Partie iridoïde

- Le proton H-1b corrèle avec le carbone C-1'b d'un second glucose, permettant ainsi de fixer ce sucre sur l'hydroxyle en position 1b du loganine.
- Le proton H-3b (δ_H 7.51) corrèle avec C-5b, C-1b, C-4b et C-11b. ce dernier présente une corrélation avec les protons du groupement méthoxy (OCH₃) à δ_H 3.68.

La corrélation observée entre le carbonyle C-11a et H-7b indique que la jonction iridoïdes/secoiridoïde se fait par la liaison ester en ces positions.

Partie E-caffeoyle (dans **Ss35**)

- Les protons éthyléniques (H-7''a et H-8''a) couplent avec le carbonyle à δ_C 167.9 ppm et le carbone quaternaire à δ_C 126.3 ppm attribuables aux C-9''a et C-1''a, respectivement.
- Le proton aromatique H-5''a corrèle avec C-6''a, C-1''a, C-3''a et C-4''a.
- Au niveau du proton H-6''a, des corrélations sont observées avec C-2''a, C-5''a, C-7''a et C-4''a.
- Le proton H-2''a présente des corrélations avec C-3''a, C-4''a et C-6''a.

La corrélation observée entre le carbonyle C-9''a et H-7a indique que la jonction caffeoyle/secoiridoïde se fait par la liaison ester en ces positions.

Avec ces différentes observations nous concluons à la présence d'un désoxysecoiridoïde estérifié par un E-caffeoyle. Nous avons comparé nos données expérimentales avec des données de littérature et ceci nous a confirmé que l'unité **A** de **Ss35** est le grandifloroside (Itoh et al., 2003).

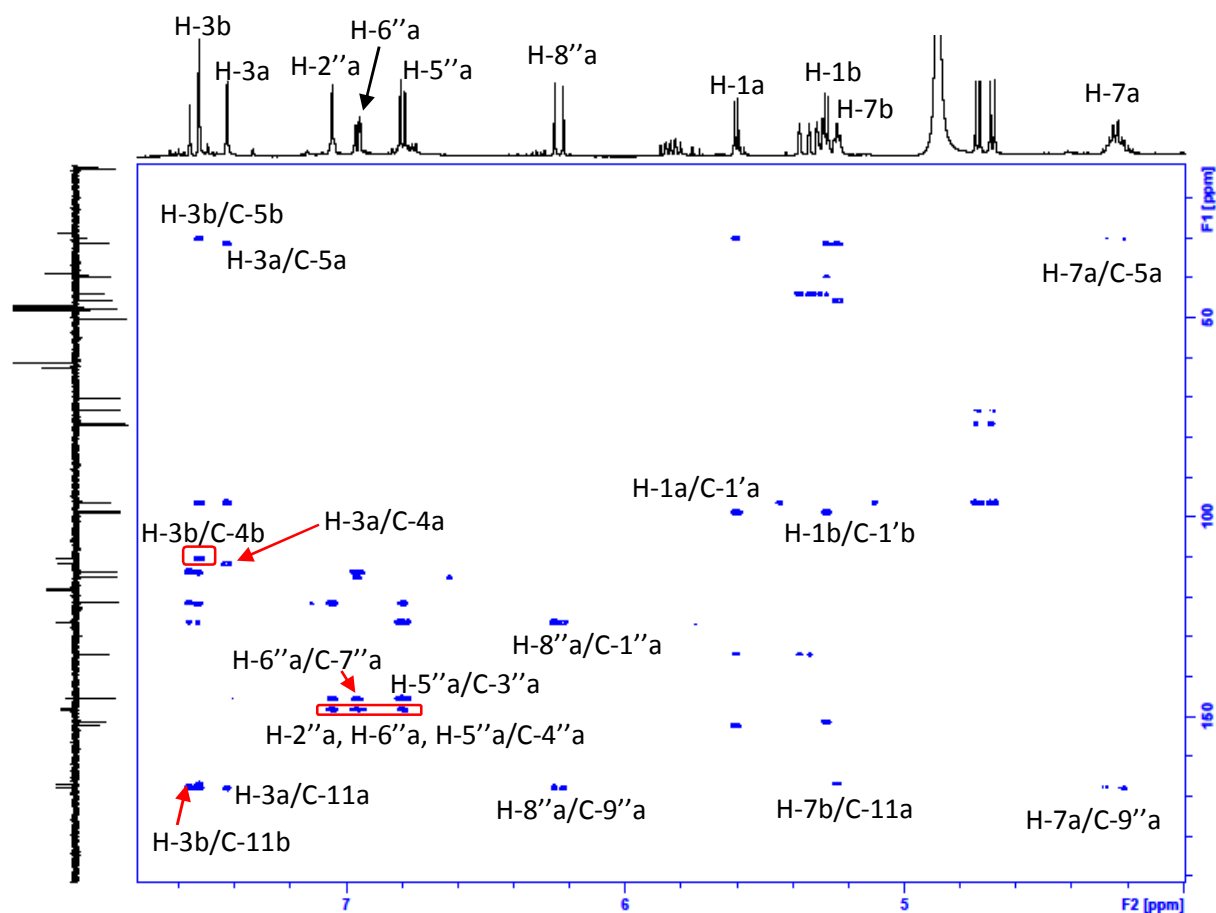
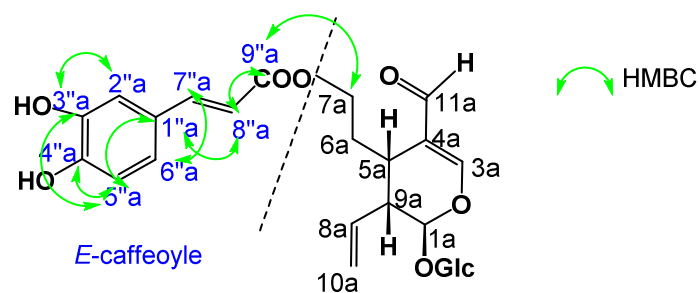


Figure III-137. Spectre HMBC étalé du composé Ss35.

Partie E-p-coumaryole (dans Ss36)

Les mêmes corrélations sont observées dans Ss36 que dans Ss35 :

- Les protons éthyléniques (H-7''a et H-8''a) couplent avec le carbonyle (C-9''a) à δ_c 167.9 ppm et C-1''a (δ_c 125.7).
- Les protons aromatiques (H-5''a+ H-3''a) corrélient avec C-1''a et C-4''a.
- Au niveau des protons (H-2''a+H-6''a), des corrélations sont observées avec C-7''a et C-4''a.

La corrélation observée entre le carbonyle C-9''a et H-7a indique que la jonction coumaryole/secoiridoïde se fait par la liaison ester en ces positions.

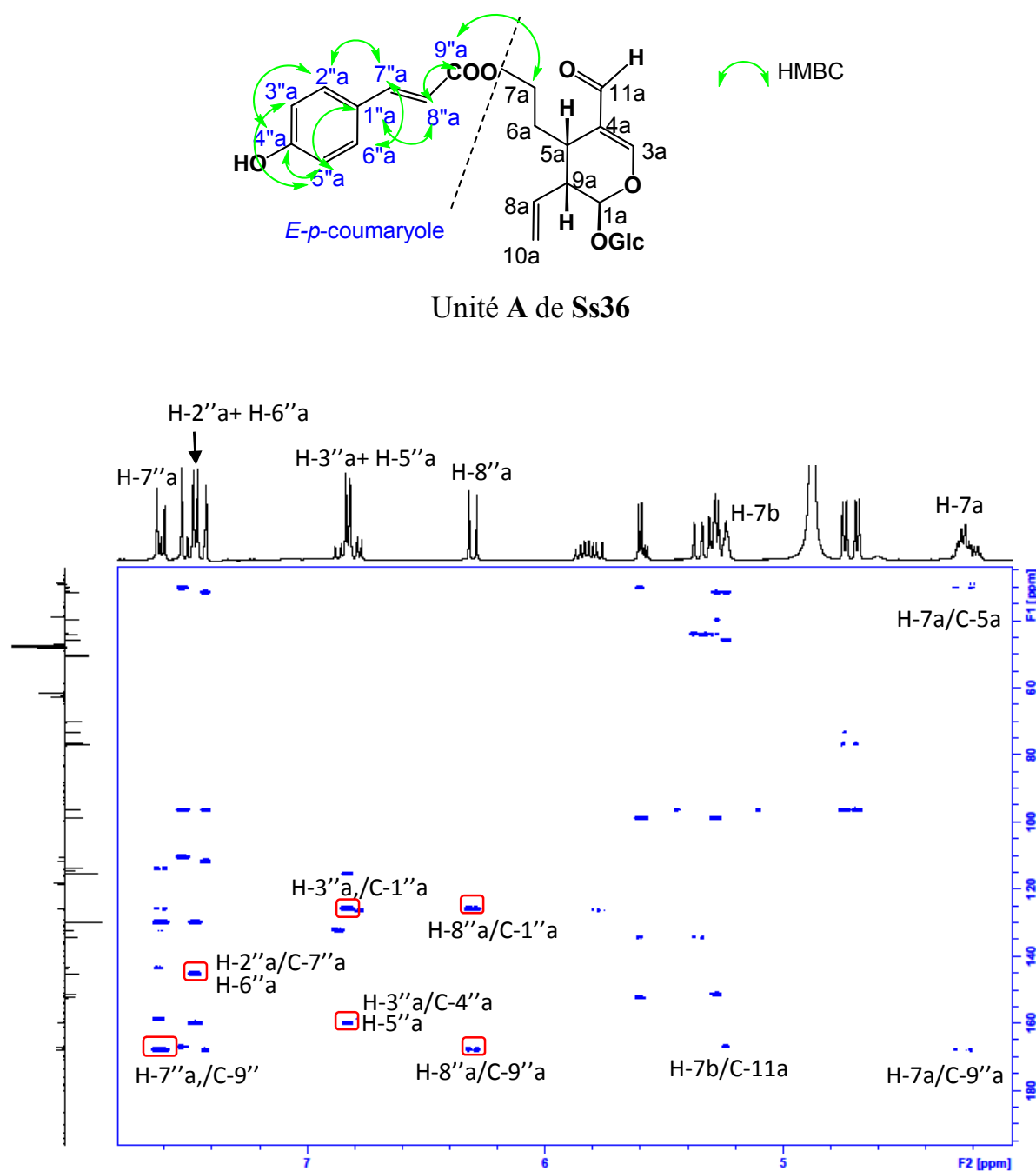


Figure III-138. Spectre HMBC étalé du composé **Ss36**.

La stéréochimie relative est établie en tenant compte des valeurs des constantes de couplage et de l'analyse du spectre ROESY (Figure III-139) sur lequel les corrélations suivantes sont observées entre : H-5a/ H-9a, H-9b/ H-10b, H-5b/ H-9b et H-7b/ H-8b.

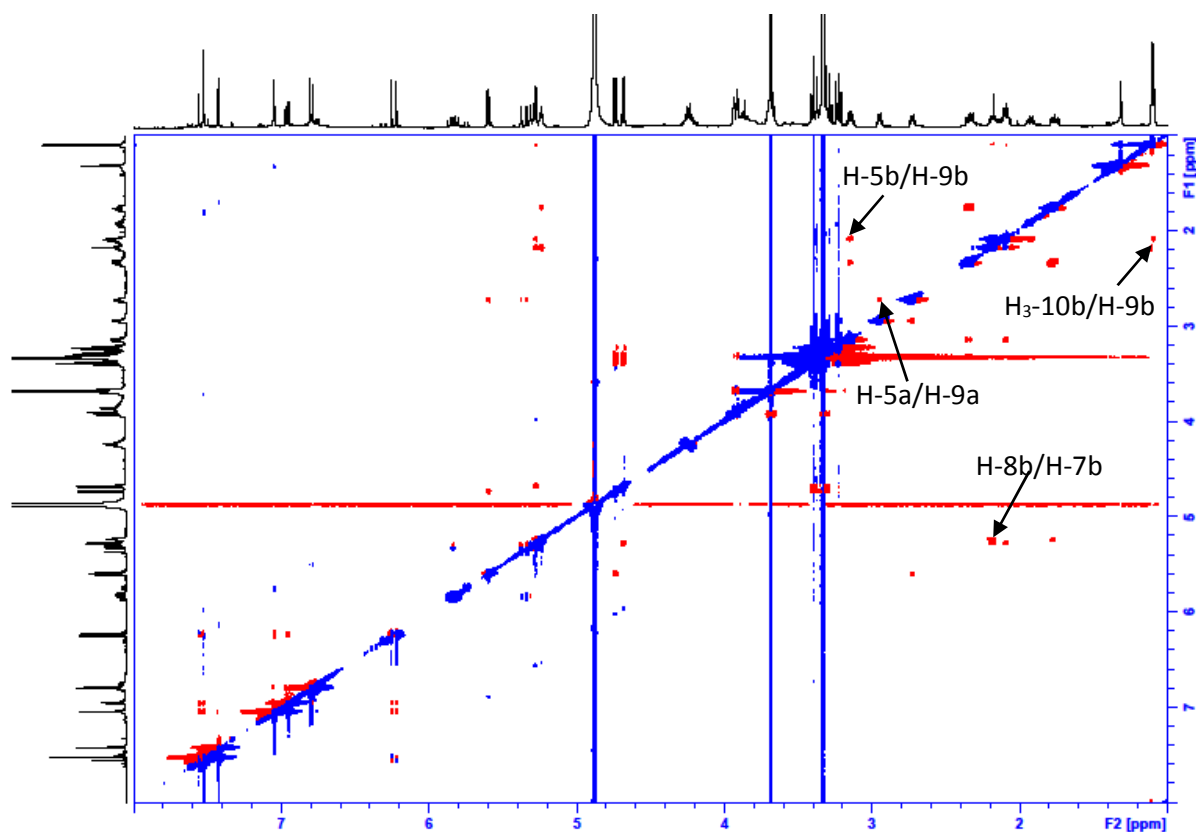


Figure III-139. Spectre ROESY du composé Ss35.

L'ensemble de toutes ses données (Tableau III-24) nous a conduit à élucider la structure de ces deux nouveaux dimères d'iridoïdes comme étant le 7-*O*-(*E*-cafféoyl)-sylvestroside I pour le Ss35 et le 7-*O*-(*E*-*p*-coumaryol)-sylvestroside I pour le Ss36.

Ss35: R=OH

Ss36: R=H

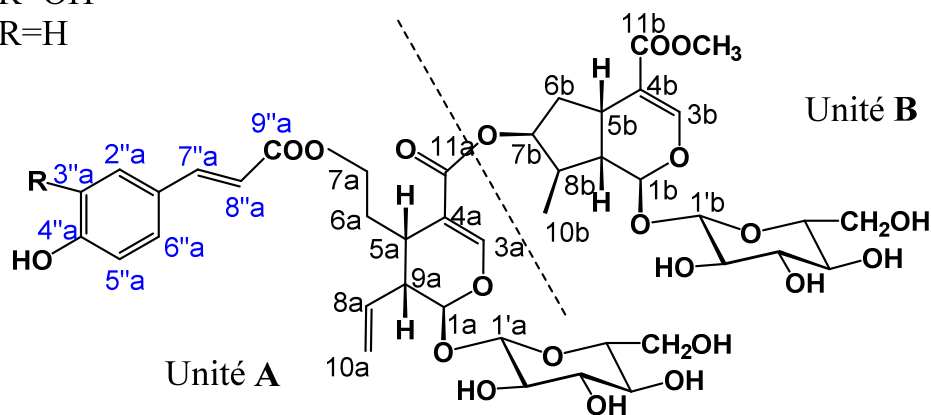


Tableau III-24. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés **Ss35** et **Ss36** dans CD_3OD .

	Ss35		Ss36	
	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}
Unit A				
1a	5.60 d (6.5)	96.3	5.60 d (6.5)	96.3
3a	7.53 s	151.3	7.42 s	151.2
4a	-	110.4	-	110.3
5a	2.95 q (6.2)	30.1	2.95 q (6.2)	30.3
6a	1.92 ddd (13.8, 7.8, 6.6)	28.9	1.92 ddd (13.8, 7.5, 6.8)	28.9
	2.10 m		2.10 m	
7a	4.21 m	62.7	4.21 m	62.7
	4.26 m		4.26 m	
8a	5.84 ddd (17.3, 10.3, 8.7)	134.3	5.82 ddd (17.3, 10.5, 8.0)	134.3
9a	2.72 m	44.0	2.71 dt (8.0, 6.2)	44.0
10a	5.30 d (10.3)	118.2	5.30 d (10.5)	118.2
	5.36 d (17.3)		5.36 d (17.3)	
11a	-	167.8	-	167.8
1a-O-glc				
1'	4.74 d (7.9)	96.8	4.74 d (7.9)	98.8
2'	3.23 t (8.0)	73.3	3.23 t (8.0)	73.3
3'	3.39 t (8.8)	76.6	3.39 t (9.0)	76.6
4'	3.29 t (8.9)	70.2	3.29 t (9.5)	70.2
5'	3.33 m	76.9	3.33 m	76.9
6'	3.68 dd (12.0, 5.6)	61.4	3.68 dd (12.0, 5.6)	61.4
	3.92 dd (12.0, 2.2)		3.92 dd (12.0, 2.2)	
	7a-O-caffeoyle		7a-O-p-Coumaroyle	
1''	-	126.3	-	125.7
2''	7.05 d (2.0)	113.7	7.47 d (8.6)	129.8
3''	-	145.4	6.83 d (8.6)	115.4
4''	-	148.2	-	148.2
5''	6.80 d (8.1)	115.1	6.83 d (8.6)	115.4
6''	6.96 dd (8.1, 2.0)	121.6	7.47 d (8.6)	129.8
7''	7.55 d (16.0)	145.5	7.61 d (16.0)	145.1
8''	6.24 d (16.0)	113.7	6.30 d (16.0)	113.8
9''	-	167.9	-	167.9
Unit B				
1b	5.28 d (5.3)	96.3	5.28 d (5.3)	96.3
3b	7.43 s	152.3	7.53 s	152.3
4b	-	111.6	-	111.7
5b	3.14 q (8.2)	31.5	3.14 q (8.2)	31.5
6b	1.76 ddd (13.8, 8.2, 5.1)	38.9	1.76 ddd (13.5, 8.0, 5.2)	38.9
	2.34 dd (13.8, 8.1)		2.34 dt (13.8, 8.0)	
7b	5.24 t (5.1)	77.0	5.24 t (4.5)	77.0
8b	2.19 m	39.7	2.16 m	39.7
9b	2.08 m	45.7	2.08 m	45.7
10b	1.10 d (6.9)	12.6	1.10 d (6.9)	12.6
11b	-	166.9	-	166.9
OCH₃	3.68 s	50.3	3.68 s	50.3
1b-O-glc				
1'''	4.68 d (7.9)	96.8	4.68 d (7.9)	98.7
2'''	3.23 t (8.0)	73.2	3.23 t (8.0)	73.2
3'''	3.39 t (9.0)	76.6	3.39 t (9.0)	76.6
4'''	3.31 t (8.8)	70.1	3.31 t (8.8)	70.1
5'''	3.33 m	77.0	3.33 m	77.0
6'''	3.68 dd (12.0, 5.6)	61.4	3.68 dd (12.1, 5.6)	61.4
	3.92 dd (12.0, 2.2)		3.92 dd (12.1, 2.0)	

III.2.4. Détermination structurale des flavonoïdes de *Scabiosa stellata*

A partir des sous fractions issues de la CPC des fractions B et C de *S. stellata*, nous avons isolé à côté des iridoïdes, cinq composés phénoliques : trois flavonoïdes (**Ss37-Ss39**), parmi eux le **Ss39** n'est que l'hyperine déjà isolé de l'espèce *C. stellata* et désigné par **Cs20**.

III.2.4.1. Etude des spectres de **Ss37** et **Ss38**

Le spectre de RMN ^1H (Figure III-140) de **Ss37** montre les signaux caractéristiques d'une flavone di-substituée sur le cycle B, qui apparaissent comme suit :

- Un doublet à δ_{H} 7.40 d'intégration 1H ($J= 2.0$ Hz) (couplage *meta*) attribuable à H-2'.
- Un doublet de doublets à δ_{H} 7.43 d'intégration 1H ($J= 8.3, 2.2$ Hz) (couplage *ortho* et *mé*ta) attribuable à H-6'.
- Un doublet à δ_{H} 6.90 d'intégration 1H ($J=8.3$ Hz) (couplage *ortho*) attribuable à H-5'.
- un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à δ_{H} 6.48, attribuable soit à H-6 soit à H-8 indiquant ainsi la substitution des positions 5, 6 et 7 ou bien les positions 5, 7 et 8.
- un singulet à δ_{H} 6.68 attribuable à H-3, ce qui suggère la structure d'une flavone. Les résonances à δ_{H} 6.68 (H-3) et 6.48 (H-8) sont en accord avec la structure d'une flavone dont le cycle A est substitué en positions 5 et 7 par un hydroxyle et en 6 par un sucre (Zhang et al., 2009).

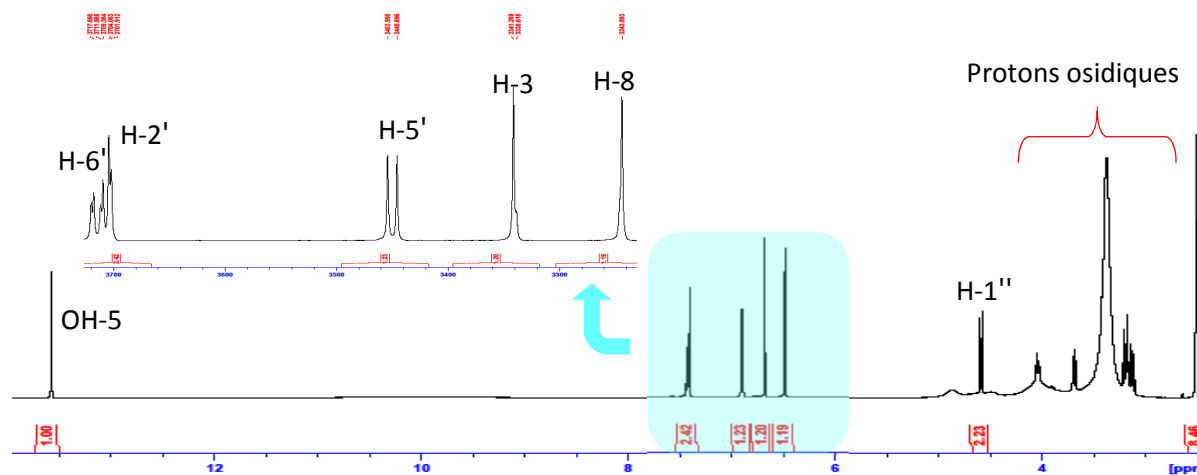


Figure III-140. Spectre de RMN ^1H du composé **Ss37**.

Le spectre de masse en mode ESI-MS du composé **Ss37** révèle un ion pseudo-moléculaire à m/z 471.0948 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. En soustrayant la masse de lutéoline (286 *uma*), il reste 162 *uma* soit l'équivalent d'un hexose.

Le spectre de RMN ^1H du composé **Ss37** montre, en plus des signaux de lutéoline, un signal d'un proton anomérique à δ_{H} 4.58 ppm (d, $J = 9.8$ Hz).

L'analyse de spectre COSY révèle que ce proton anomérique fait partie d'un système de sept protons couplés d'un hexose et la mesure des constantes de couplage permet d'identifier un β -D-glucopyranose. Le déplacement chimique du carbone anomérique, obtenu par analyse de l'expérience HSQC J -modulé, blindé à δ_{C} 73.5 ppm est caractéristique d'une liaison de type C-glycoside avec la génine.

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones obtenues sur le spectre de RMN ^{13}C J -modulé (Figure III-141) correspondent à ceux de la lutéoline 6-C-glucosylé (Cheng-Ning Leong et al., 2010).

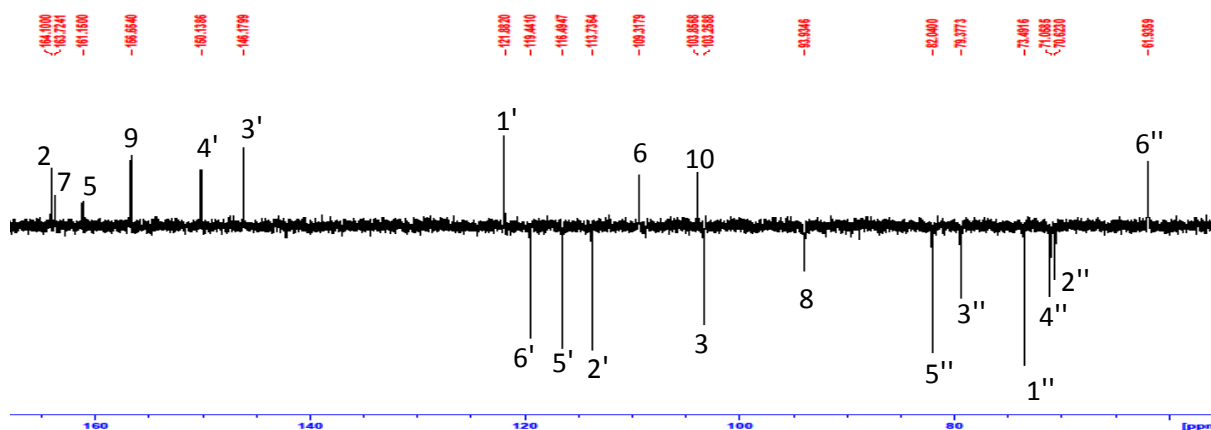
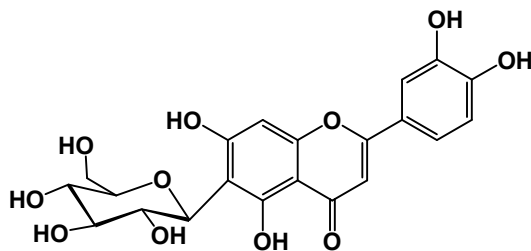


Figure III-141. Spectre de RMN ^{13}C J -modulé du composé **Ss37**.

Toutes ces données permettent d'assigner sans difficulté tous les déplacements chimiques des protons et des carbones (Tableau III-25) et d'attribuer sans ambiguïté à ce composé **Ss37**, la structure de l'isoorientine ou alors homoorientine (6-C- β -D-glucopyranosyl-lutéoline) (Cheng-Ning Leong et al., 2010 ; Zhang et al., 2009).



Ss37: Isoorientine

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C du produit **Ss38** (Figure III-142) permettent d'observer le même ordre des signaux caractéristiques de lutéoline substituée en position 6 avec le signal supplémentaire intégrant pour trois protons à δ_{H} 3.91 ppm (s), indiquant la présence d'un groupement méthoxy, le carbone correspondant résonne à δ_{C} 55.5 ppm.

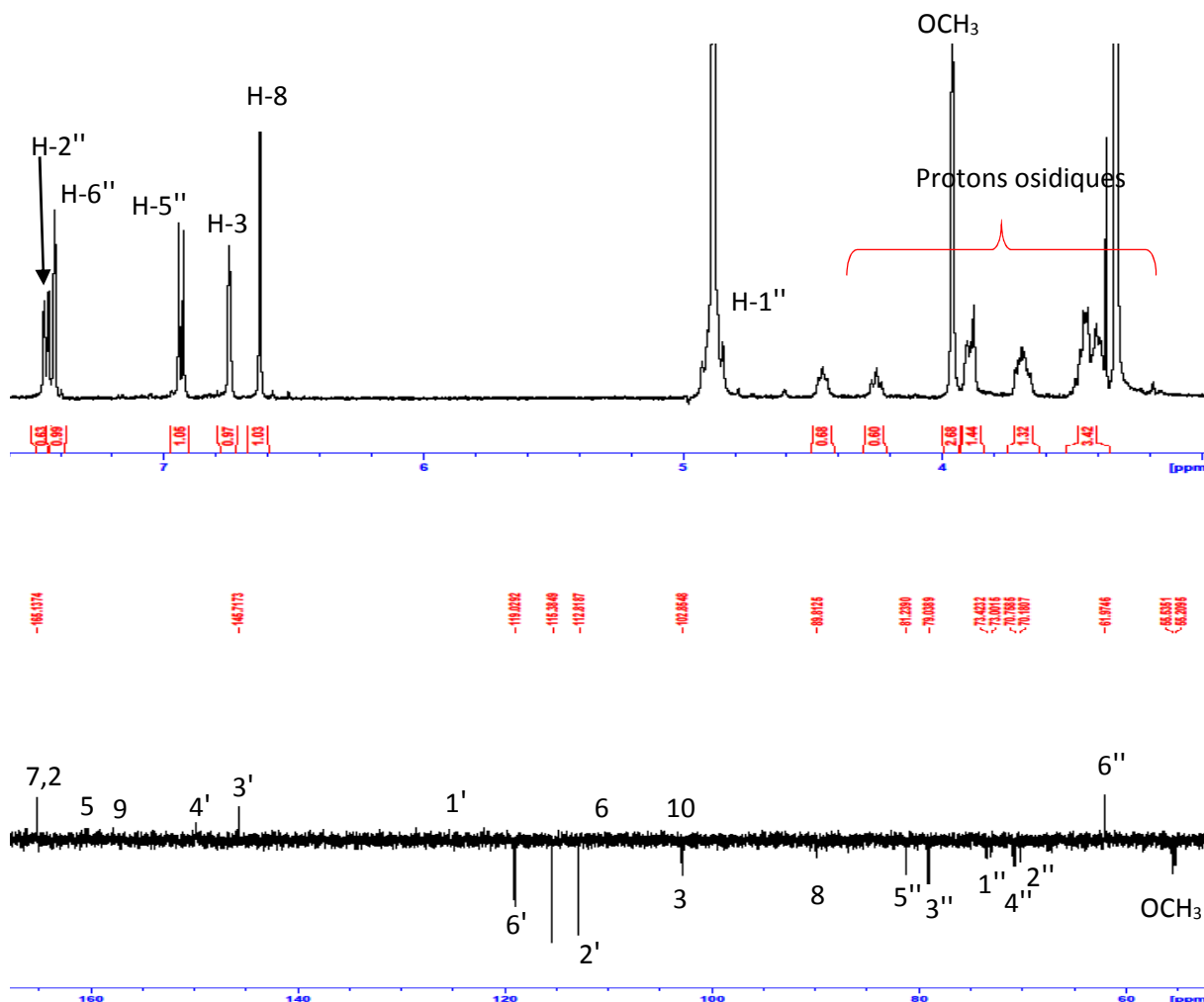
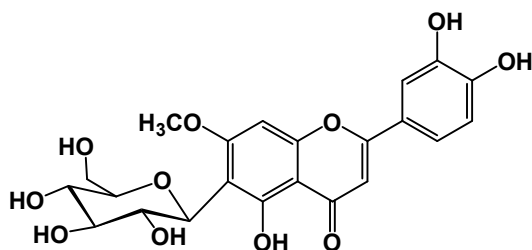


Figure III-142. Spectres de RMN ^1H et ^{13}C J -modulé du composé **Ss38**.

Le spectre de masse en mode ESI-MS du composé **Ss38** le confirme par la présence d'un ion pseudo-moléculaire à m/z 485.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. En soustrayant la masse de **Ss38** [la lutéoline (286 *uma*) et le glucose (162 *uma*)], il reste 15 *uma* soit l'équivalent d'un méthyle (CH_3). Le blindage du proton H-8 à δ_{H} 6.63 ppm indique la substitution du méthyle en C-7.

La comparaison de l'ensemble des données de la RN avec celles de la littérature (Zhang et al., 2009) permet d'identifier Ss38 au swertiajaponine.

Le flavonoïde **Ss38** est le swertiajaponine (Zhang et al., 2009).



Ss38: Swertiajaponine

Tableau III-25. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés **Ss37** et **Ss38** dans CD_3OD .

	Ss37 (Isoorientine)		Ss38 (Swertiajaponine)	
	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}
2	-	164.1	-	164.5
3	6.68 s	103.2	6.75 s	103.5
4	-	182.3	-	182.6
5	13.57 <i>sl</i> (OH)	161.1	13.52 <i>sl</i> (OH)	160.8
6	-	109.3	-	110.1
7	-	163.7	-	164.1
8	6.48 s	93.9	6.63 s	90.5
9	-	156.6	-	157.1
10	-	103.8	-	105.0
1'	-	121.9	-	121.8
2'	7.40 d (2.2)	113.7	7.42 d (2.2)	113.9
3'	-	146.2	-	146.2
4'	-	150.1	-	150.3
5'	6.90 d (8.3)	115.5	6.93 d (8.3)	116.4
6'	7.43 dd (8.3, 2.2)	119.4	7.46 dd (8.3, 2.2)	119.5
6-C-β-D-Glc			6-C-β-D-Glc	
1''	4.58 d (9.8)	73.5	4.60 d (10.0)	73.2
2''	4.04 t (9.2)	70.6	4.17 t (9.1)	70.0
3''	3.10-3.22	79.4	3.16	79.5
4''	3.10-3.22	71.0	3.04-3.21	73.2
5''	3.10-3.22	82.0	3.04-3.21	82.3
6''	3.40	61.9	3.35 m	62.2
	3.70		3.70 <i>dl</i> (11.4)	
7-OMe	-	-	3.91 s	55.5

III.2.4.2. Étude des spectres de Ss40 et Ss41

Les spectres de RMN ^1H de **Ss40** et **Ss41** (Figure III-143) présentent des signaux caractéristiques de l'acide quinique di-substitué par deux unités de caffeoyles.

La comparaison des déplacements chimiques (Tableau III-26) avec les données de la littérature (Wang et al., 2017) permet de les identifier comme suit :

- Le **Ss40** est : l'acide 3,5-di-*O*-Caffeoylquinique.
- Le **Ss41** est : l'acide 3,4-di-*O*-Caffeoylquinique.

Ss40: $\text{R}_1 = \text{caffeoyle}$, $\text{R}_2 = \text{H}$
Ss41: $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{caffeoyle}$

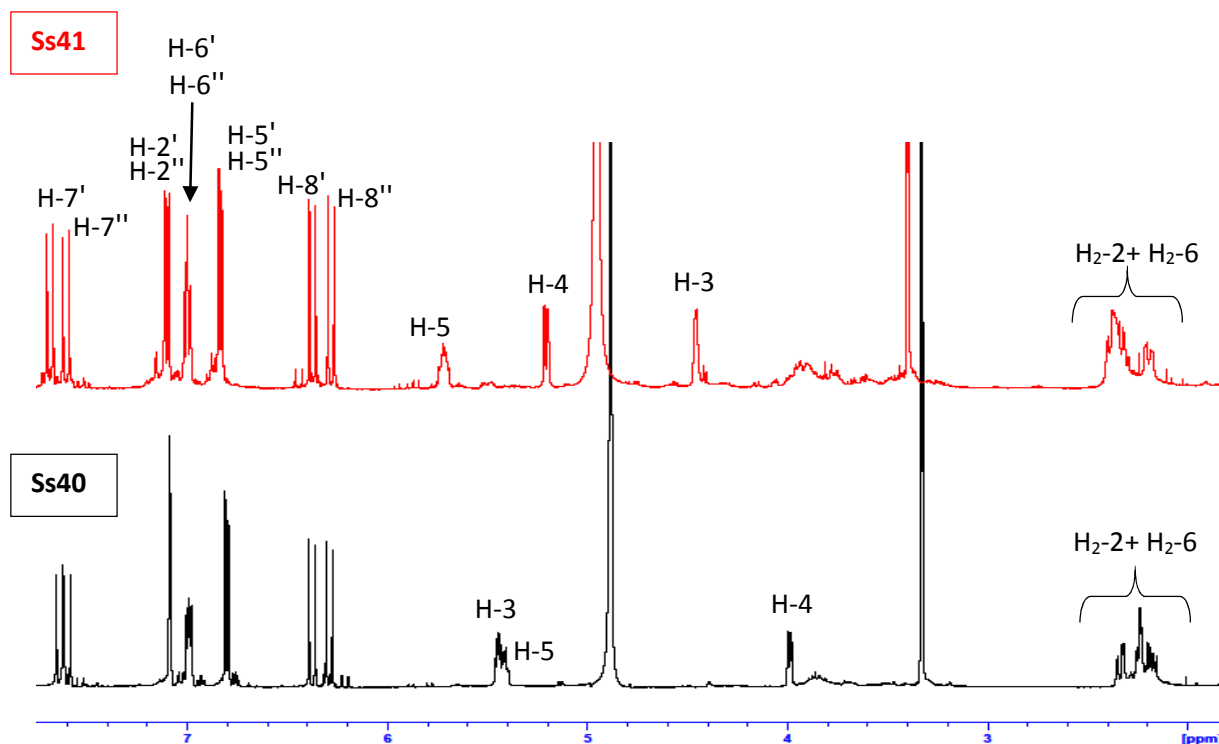
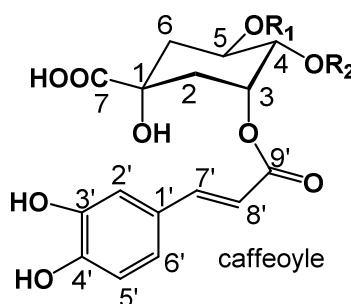


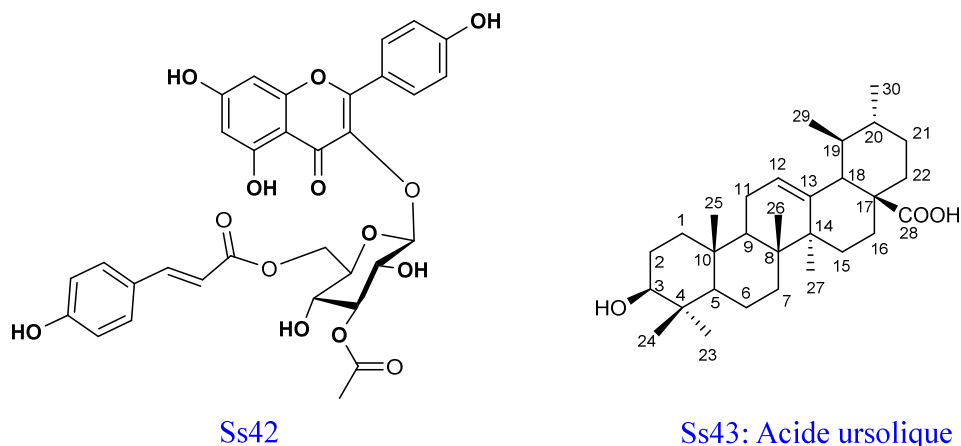
Figure III-143. Spectres de RMN ^1H des composés **Ss40** et **Ss41**.

Tableau III-26. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés **Ss40** et **Ss41** dans CD_3OD .

	Ss40		Ss41	
	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}
1	-	72.5	-	73.6
2	2.19 m 2.23 m	38.1	2.20,2.34 m	38.6
3	5.44 ddd (3.8, 3.2, 3.0)	71.2	4.38 m	67.4
4	3.99 dd (7.6, 3.2)	67.4	5.13 dd (9.1, 3.0)	73.4
5	5.40 ddd (10.5, 9.5, 3.8)	71.0	5.64 m	71.2
6	3.33 dd (13.9, 3.7) 2.17 m	34.8	2.12 m	38.5
7	-	177.5	-	174.8
1'	-	167.0	-	166.0
2'	7.09 d (2.2)	114.1	7.04 d (1.8)	113.8
3'	-	145.1	-	131.6
4'	-	125.6	-	125.4
5'	6.80 d (8.1)	115.8	6.76 d (8.1)	114.8
6'	6.99 dd (8.1, 2.0)	145.6	6.92 dd (8.1, 1.8)	145.6
7'	7.63 d (15.9)	148.4	7.61 d (15.9)	148.5
8'	6.37 d (15.9)	114.7	6.30 d (15.9)	115.8
9'	-	121.4	-	121.5
1''	-	166.1	-	165.6
2''	7.08 d (2.2)	114.1	7.02 d (1.8)	113.6
3''	-	144.8	-	131.6
4''	-	125.5	-	125.4
5''	6.80 d (8.1)	115.8	6.76 d (8.1)	114.8
6''	6.98 dd (8.1, 2.0)	145.6	6.93 dd (8.1, 1.8)	145.6
7''	7.59 d (15.9)	148.3	7.53 d (15.9)	148.5
8''	6.28 d (15.9)	114.7	6.21 d (15.9)	115.7
9''	-	121.2	-	121.4

III.2.4.3. Détermination structurale des composés isolés de la fraction E

La purification effectuée sur la fraction E, en vue d'identifier les composés actifs dans le test de bioautographie contre *Staphylococcus aureus* a abouti à l'isolement du nouveau dimère d'iridoïde (**Ss36**), l'acide ursolique (**Ss43**) et le kaempferol-3-*O*-[3''-*O*-acetyl-6''-*O*-(*E*)-*p*-coumaryol]- β -D-glucopyranoside (**Ss42**). L'acide ursolique est également isolé de *Salvia barrelieri*, leurs déplacements chimiques en RMN (^1H et ^{13}C) sont indiqués dans le tableau III-28 (p282).



III.2.4.3.1. Détermination structurale du composé Ss42

La fluorescence sous la lumière UV à $\lambda = 366$ nm de ce composé est noir-violette, indiquant une structure de type flavonol substitué en position 3.

L'examen du spectre RMN ^1H (Figure III-144) met en évidence la présence des signaux caractérisant un squelette kaempferol, un hexose et un groupement *p*-coumaroyl :

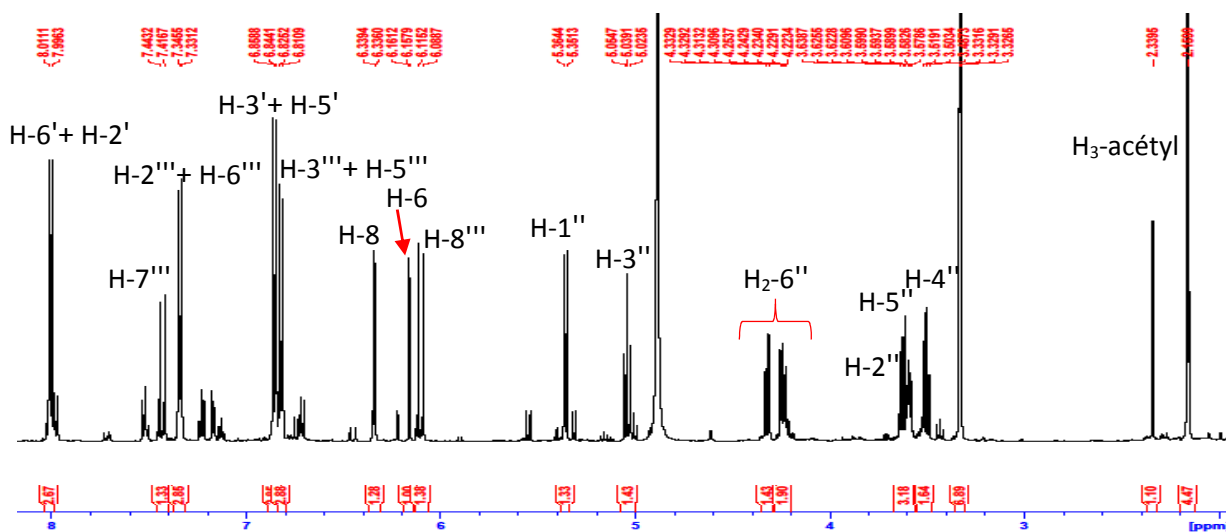
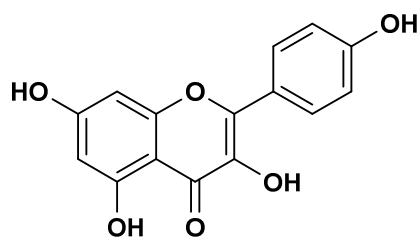


Figure III-144. Spectre de RMN ^1H du composé Ss42.

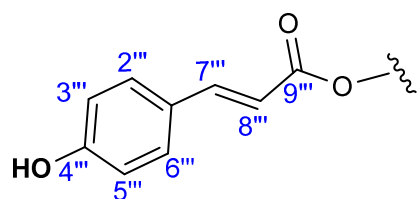
- Deux signaux à $\delta_{\text{H}} 6.15$ (*d*, $J = 2.0$ Hz) et $\delta_{\text{H}} 6.34$ (*d*, $J = 2.0$ Hz) formant un système AX correspondant aux protons H-6 et H-8 du cycle A des flavonoïdes. La faible constante de couplage ($J=1.7$ Hz) indique une position méta des 2 protons.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun d'un système A_2X_2 résonant à $\delta_{\text{H}} 8.02$ ($J = 8.1$ Hz) et $\delta_{\text{H}} 6.85$ ($J = 8.1$ Hz) attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B, respectivement.



Squelette Kaempferol

- Un autre système A_2X_2 à δ_H 7.34 (2H, *d*, $J = 8.1$ Hz) et δ_H 6.82 (2H, *d*, $J = 8.1$ Hz), caractéristiques d'un noyau aromatique para-substitué, correspondant aux protons H-2'''/H-6''' et H-3'''/H-5''', respectivement.
- Des signaux des protons oléfiniques à δ_H 6.10 (H-8''') et δ_H 7.43 (H-7''') sont visualisés aussi sur le spectre RMN 1H . de plus la constante de couplage entre leurs doublets ($J = 16.1$ Hz) indiquent une géométrie *trans* d'une liaison β .

Ces données attestent de la présence d'un groupement *p*-coumaroyl.

Groupement *p*-coumaryol

- Un singulet intégrant pour trois protons est également observé à δ_H 2.38.
- Un doublet à δ_H 5.36, attribuable à un proton anomérique d'un sucre, la constante de couplage ($J = 7.9$ Hz) indique qu'il est de configuration β .

Un β -D-glucopyranoside est caractérisé par analyse du spectre COSY (Figure III-145), sur lequel un système à sept spins couplés est identifié en partant du doublet anomérique. Ainsi, les protons osidiques sont localisés (Tableau III-27). Les déplacements chimiques des carbones correspondants montrent un signal à δ_C 101.0 du carbone anomérique, un autre signal d'un carbone méthylène oxygéné à δ_C 62.0 (C-6'') et quatre signaux de carbones oxyméthines résonant à δ_C 73.5 (C-2''), 70.9 (C-3''), 71.5 (C-4'') et 74.2 (C-5'').

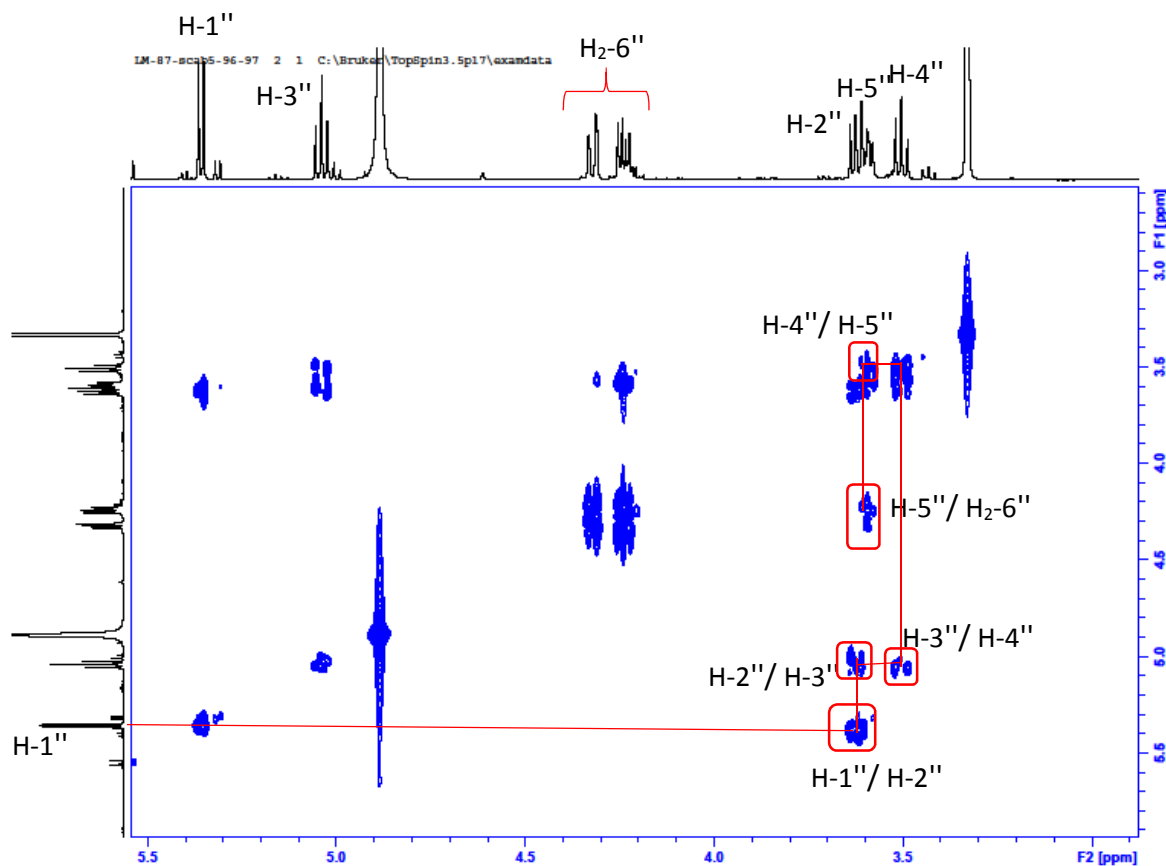


Figure III-145. Spectre COSY du composé Ss42.

Le déblindage des protons H-3'' (δ_{H} 5.04) et H₂-6'' du β -D-glucopyranose [H-6''a (δ_{H} 4.23), H-6''b (δ_{H} 4.32)] suggère le placement des groupements acétyle et coumaroyl en ces positions. Le déplacement chimique du carbone C-3 de l'aglycone (kaempferol) déblindé de plus de 9 ppm comparativement au même carbone dans le cas d'un OH libre en C-3 confirme la glycosylation en position C-3.

La corrélation en HMBC entre H₂-6'' et C-9'' indique que le carbone C-6'' est acylé par le groupement coumaroyle. De même, un carbonyle résonnant à δ_{C} 169.8 ppm corrèle avec les protons du méthyle situé à δ_{H} 2.38 ppm et le proton H-3'' du glucose confirme l'attachement du groupement acétyle en C-3'' du glucose.

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison avec les données trouvées dans la littérature, nous permettent d'élucider la structure du composé Ss42 comme étant le kaempferol-3-O-[3''-O-acetyl-6''-O-(*E*)-*p*-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside (Wu et al., 2003).

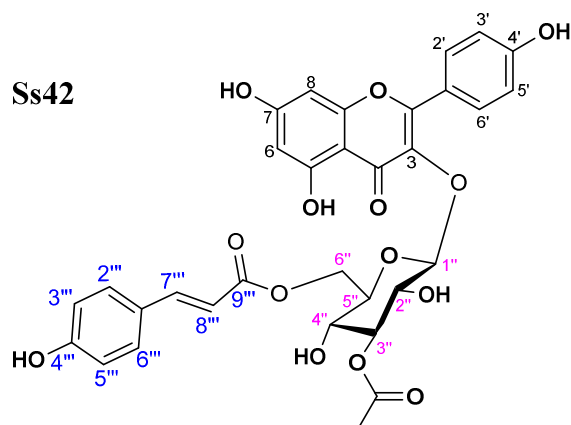


Tableau III-27. Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé **Ss42** dans CD_3OD .

Ss42					
	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (<i>J</i> en Hz)	δ_{C}	
Kaempferol			3''-O-acetyl		
2	-	156.8	CO	-	169.8
3	-	133.4	CH ₃	2.38 s	
4	-	177.4		-	
5	-	161.3	6''-O-(E)-p-coumaryol		
6	6.15 d (2.0)	98.9	1''''	-	125.0
7	-	164.3	2''''	7.34 d (8.1)	130.2
8	6.34 d (2.0)	93.8	3''''	6.82 d (8.1)	115.9
9	-	156.5	4''''	-	159.9
10	-	104.2	5''''	6.82 d (8.1)	133.5
1'	-	120.8	6''''	7.34 d (8.1)	130.2
2'	8.02 d (8.1)	130.9	7''''	7.43 d (16.1)	144.9
3'	6.85 d (8.1)	115.2	8''''	6.10 d (16.1)	115.9
4'	-	160.1	9''''	-	166.0
5'	6.85 d (8.1)	115.2			
6'	8.02 d (8.1)	130.9			
3-O-β-D-Glc					
1''	5.36 d (7.9)	101.0			
2''	3.62dd (9.4, 7.8)	73.5			
3''	5.04 t (9.4)	70.9			
4''	3.50 t (9.4)	71.5			
5''	3.60 m	74.2			
6''	4.23 dd (11.4, 6.6)	62.0			
	4.32 dd (11.4, 2.2)				

Chapitre 3

Identification des produits isolés
de *Salvia barrelieri* Etl.

Étude chimique de *Salvia barrelieri*

Cette étude nous a conduit à l'isolement de douze composés (**Sb44-Sb55**) obtenus de deux extraits. En effet, les parties aériennes de *Salvia barrelieri* à l'état frais (7 kg) ont été extraites par le chloroforme pour obtenir 48 g de l'exsudat. Une partie de l'exsudat obtenu (10 g) a été soumise à une VLC sur gel de silice normale, en utilisant un gradient hexane-AcOEt. Par la suite, la purification des sous-fractions obtenues a été effectuée exclusivement par flash chromatographie en phase normale ou inverse, ce qui a permis d'isoler six triterpènes pentacycliques (**Sb44-Sb49**) parmi lesquels le **Sb44** est de nouvelle structure (Figure III-146).

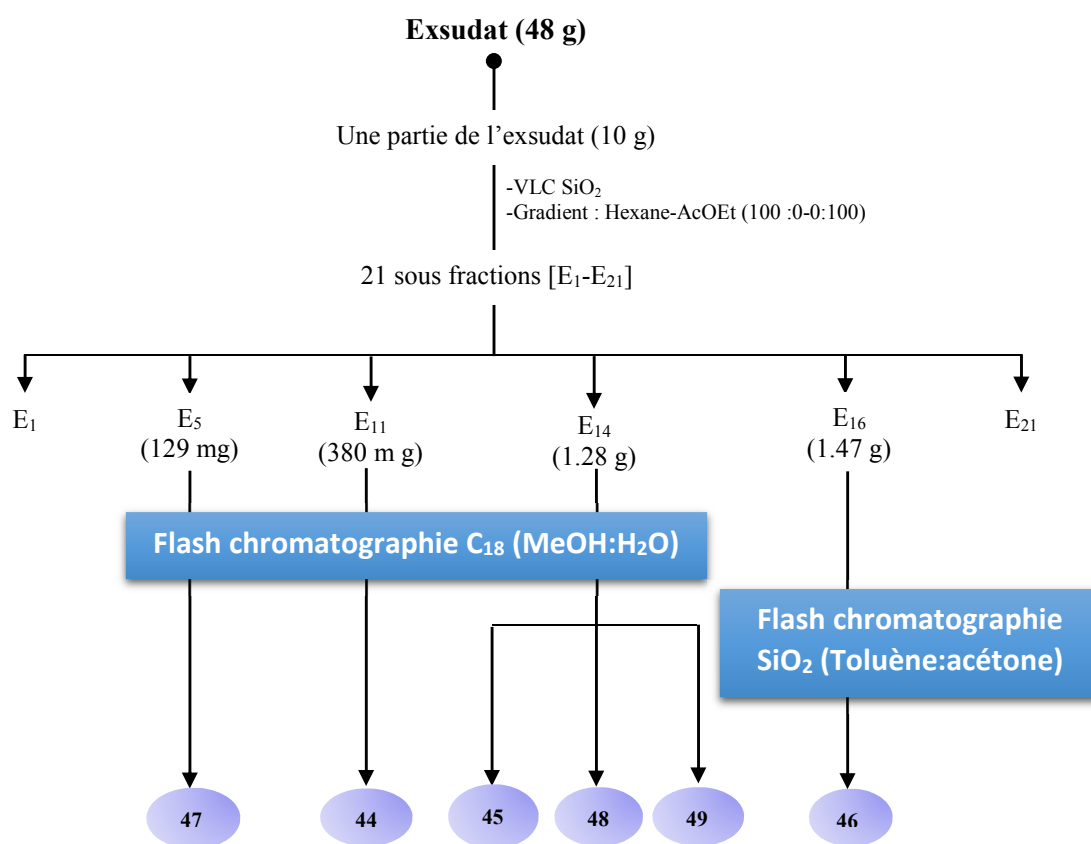


Figure III-146. Schéma de séparation et de purification des triterpènes à partir de l'exsudat de *Salvia barrelieri*.

Après séchage et broyage des parties aériennes de *Salvia barrelieri*, une macération dans une solution hydroalcoolique (70% EtOH) suivie par des extractions de type liquide-liquide avec le chloroforme, AcOEt et enfin le *n*-butanol, sont également réalisées. Les sous-fractions obtenues en VLC en phase inverse de la fraction *n*-butanolique ont été exploitées. En utilisant la flash chromatographie en phase normale, la CLHP préparative et semi-préparative, six flavonoïdes (**Sb50-Sb55**) de structures connues sont obtenus (Figure III-147).

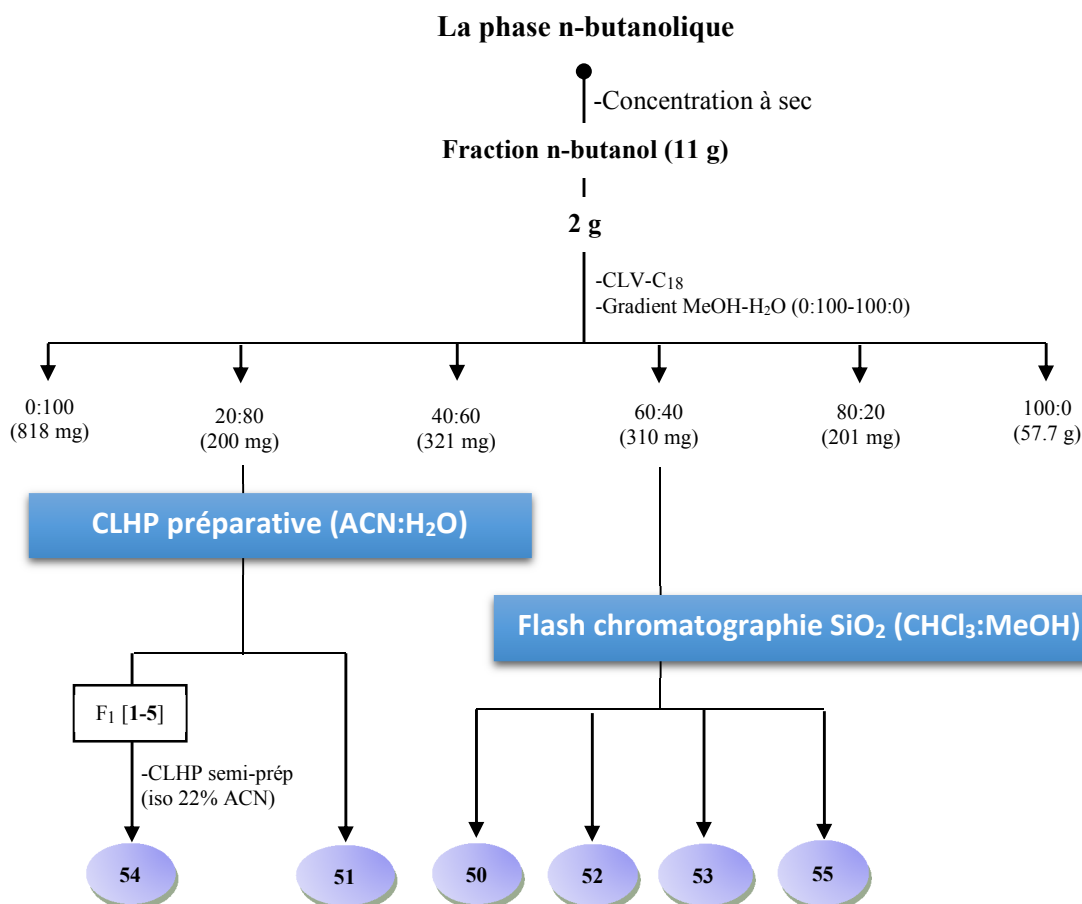


Figure III-147. Schéma de séparation et de purification des flavonoïdes de la fraction butanolique de *Salvia barrelieri*.

L'analyse combinée des spectres de RMN 1D et 2D et de masse ESI-SM et la comparaison aux données de la littérature nous ont permis de déterminer que les composés purs isolés de *Salvia barrelieri* étaient tous de structures connues sauf le **Sb44**. Il s'agit de quatre triterpènes à squelette oléanane- Δ^{18-19} (**Sb44-Sb47**) dont le nouveau composé (**Sb44**) est acétylé en C-3 et de deux triterpènes à squelette ursane- Δ^{12-13} (**Sb48-Sb49**) (Figure III-148). A côté des triterpènes, six flavonoïdes (**Sb50-Sb55**) sont identifiés, dont cinq sont des dérivés de l'apigénine (**Sb50-Sb54**) et un seul glycoside de lutéoline (**Sb55**).

III.3.1. Détermination structurale des triterpénoïdes de *Salvia barrelieri*

Les structures des triterpénoïdes à noyau ursane et oléanane ont été déjà interprétées comme étant des génines dans les saponines de *Calendula stellata* et *Scabiosa stellata* (Chapitre 1 et 2 de la partie III), Ainsi, nous allons expliquer uniquement les principales caractéristiques retrouvées dans chacun de ces composés obtenus de *Salvia barrelieri* (Figure III-148).

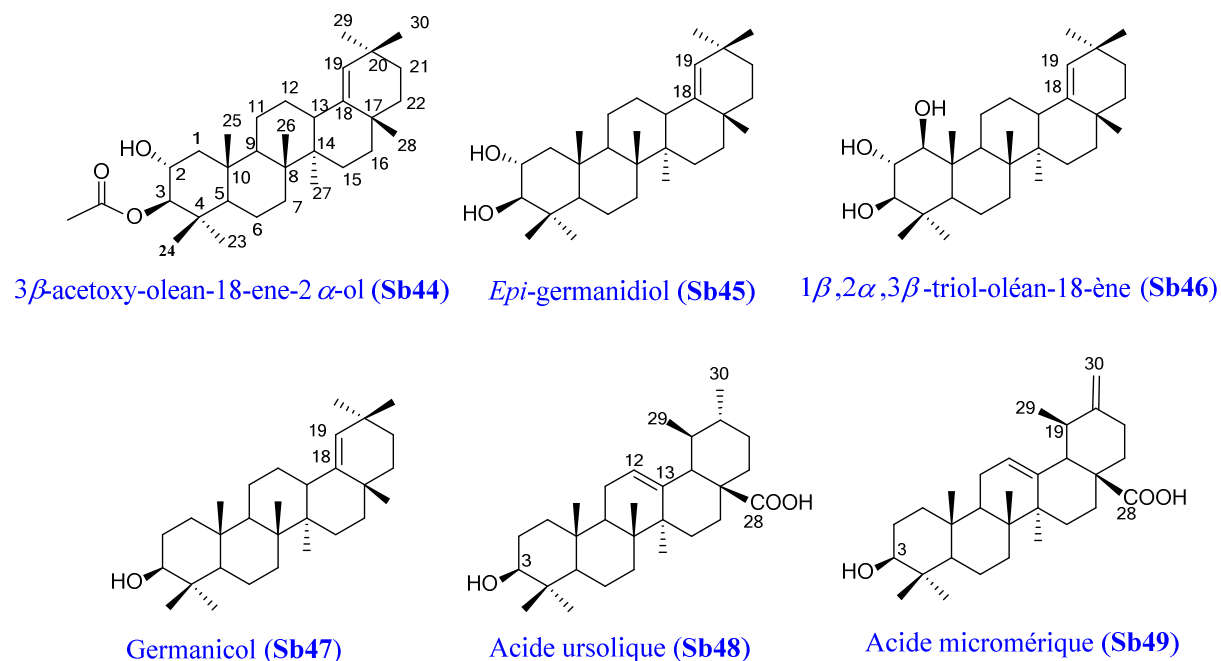


Figure III-148. Triterpénoïdes (Sb44-Sb49) isolés de l'exsudat de *Salvia barrelieri*.

III.3.1.1. Elucidation structurale des triterpènes à noyau oléanane

III.3.1.1.1 Analyse des spectres de RMN ^1H

Le profil des spectres de RMN ^1H des composés **Sb44-Sb47** (Figure III-149) montre la présence des triterpènes pentacycliques, qui sont caractérisés par la présence :

- de plusieurs signaux résonnant sous la forme de singulets intégrant pour 3H entre δ_{H} 0.76 et 1.15 correspondants aux méthyles angulaires (8 CH_3 singulets des positions 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 et 30).
- du bloc des CH_2 et CH aliphatiques des cinq cycles entre δ_{H} 0.72 et 2.32.
- du proton éthylénique H-19 vers δ_{H} 4.89 caractéristique de l'insaturation Δ^{18-19} du noyau oléanane.
- Un à trois protons portés par des carbones hydroxylés entre 3.00 et 4.50 :
 - ♦ le proton H-1 α -axial résonnant à δ_{H} 3.12 sous la forme d'un doublet ($J=9.0$ Hz) dans le composé 1 β ,2 α ,3 β -triol-oléan-18-ène (**Sb46**) du fait de la substitution en position 2 par un OH.
 - ♦ Le proton H-2 β -équatorial résonnant sous la forme de triplet de doublet dans l'*epi*-germanidiol (**Sb45**) [δ_{H} 3.75, $J=9.5, 4.5$ Hz] et son dérivé acétylé en C-3 (**Sb44**) [δ_{H}

3.84, $J=10.6-4.1$ Hz], et sous la forme d'un triplet dans le cas du composé $1\beta,2\alpha,3\beta$ -triol-oléan-18-ène (**Sb46**) [δ_H 3.41, $J=9.3$ Hz].

- ◆ Le proton H-3 α -axial résonnant sous la forme de doublet de doublets dans le germanicol (**Sb47**) à δ_H 3.24, et sous la forme de doublet dans le $1\beta, 2\alpha, 3\beta$ -triol-oléan-18-ène (**Sb46**) [δ_H 2.97, $J=9.4$ Hz], l'*epi*-germanidiol (**Sb45**) [δ_H 3.11, $J=9.5$ Hz] et son dérivé acétylé (**Sb44**) [δ_H 4.52, $J=10.0$ Hz].

- Pour le composé **Sb44**, les protons du méthyle du groupement acétyle apparaissent sous la forme d'un singulet à δ_H 2.16 ppm.

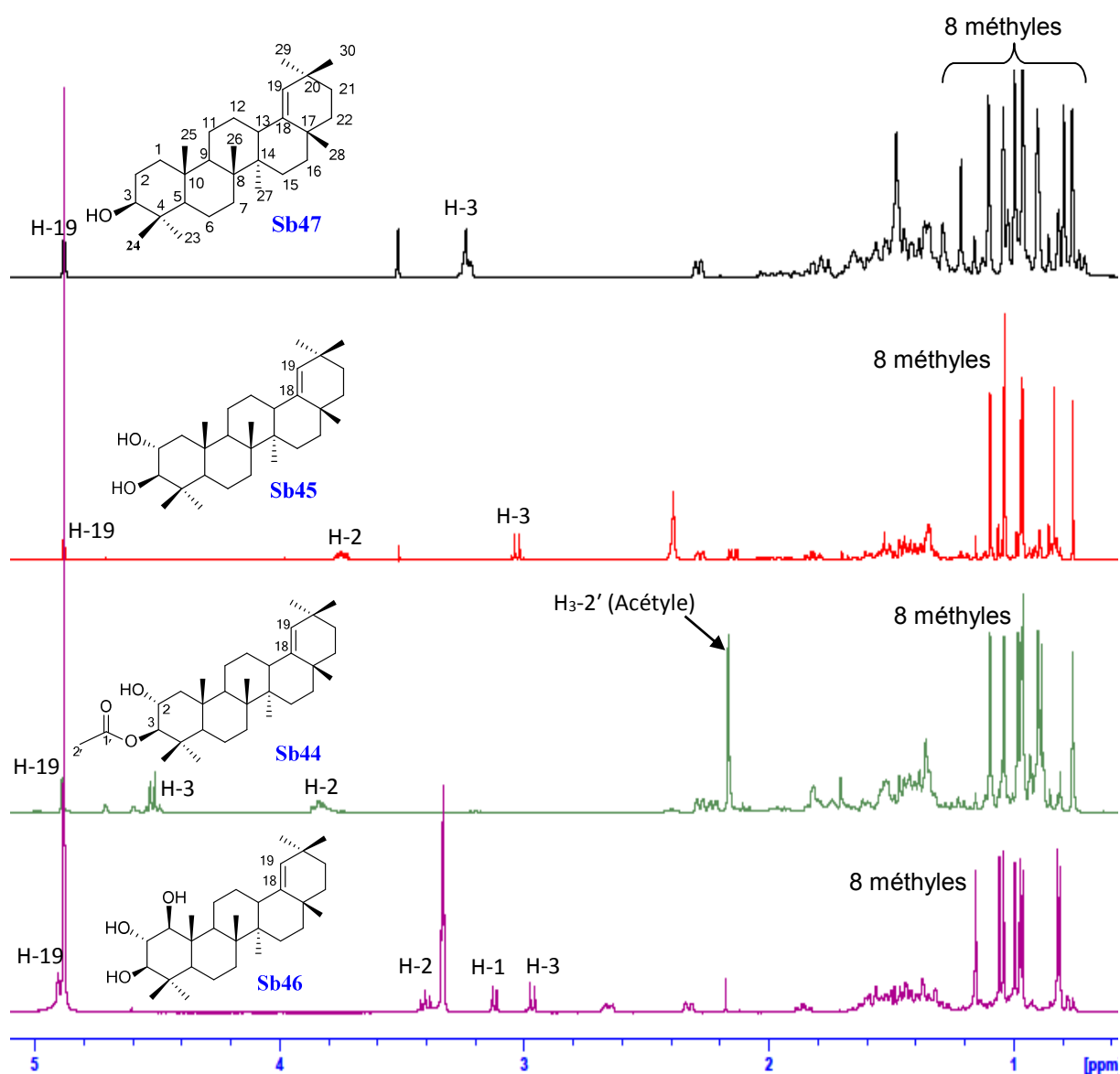


Figure III-149. Spectres de RMN ¹H des composés **Sb44-Sb47**.

III.3.1.2. Analyse des spectres de RMN ¹³C *J*-modulé

Dans le spectre de RMN ¹³C *J*-modulé (Figure III-150), les signaux caractéristiques suivants sont observés :

- Huit méthyles dont les carbones C-23, C-27 et C-29 sont déblindés à cause de leurs positions équatoriales sur les noyaux cyclohexanes.
- Un ensemble de carbones CH₂, CH et C quaternaires résonnants entre 18.5 et 57.0 ppm.
- Un à trois carbones oxydés entre 67.8 et 85.0 ppm :
 - ◆ dans le 1 β ,2 α ,3 β -triol-oléan-18-ène (**Sb46**), le carbone C-1 résonne à δ_c 83.8 ppm.
 - ◆ Le carbone C-2 apparait à δ_c 67.8, 69.3 et 73.6 ppm dans l'*epi*-germanidiol (**Sb45**) et son dérivé acétylé (**Sb44**) et le 1 β ,2 α ,3 β -triol-oléan-18-ène (**Sb46**), respectivement.
 - ◆ Le carbone C-3 résonne vers δ_c 83.9 et 85.0 ppm pour l'*epi*-germanidiol (**Sb45**) et son dérivé acétylé (**Sb44**) et vers δ_c 79.6 et 79.0 ppm pour le 1 β ,2 α ,3 β -triol-oléan-18-ène (**Sb46**) et le germanicol (**Sb47**).
- les carbones éthyléniques C-18 et C-19 de la double liaison Δ^{18-19} résonnant respectivement vers δ_c 129.8 et 142.5, comme dans le cas de l'acide morolique retrouvé dans la saponine **Cs9** isolé de l'espèce *Calendula stellata*.

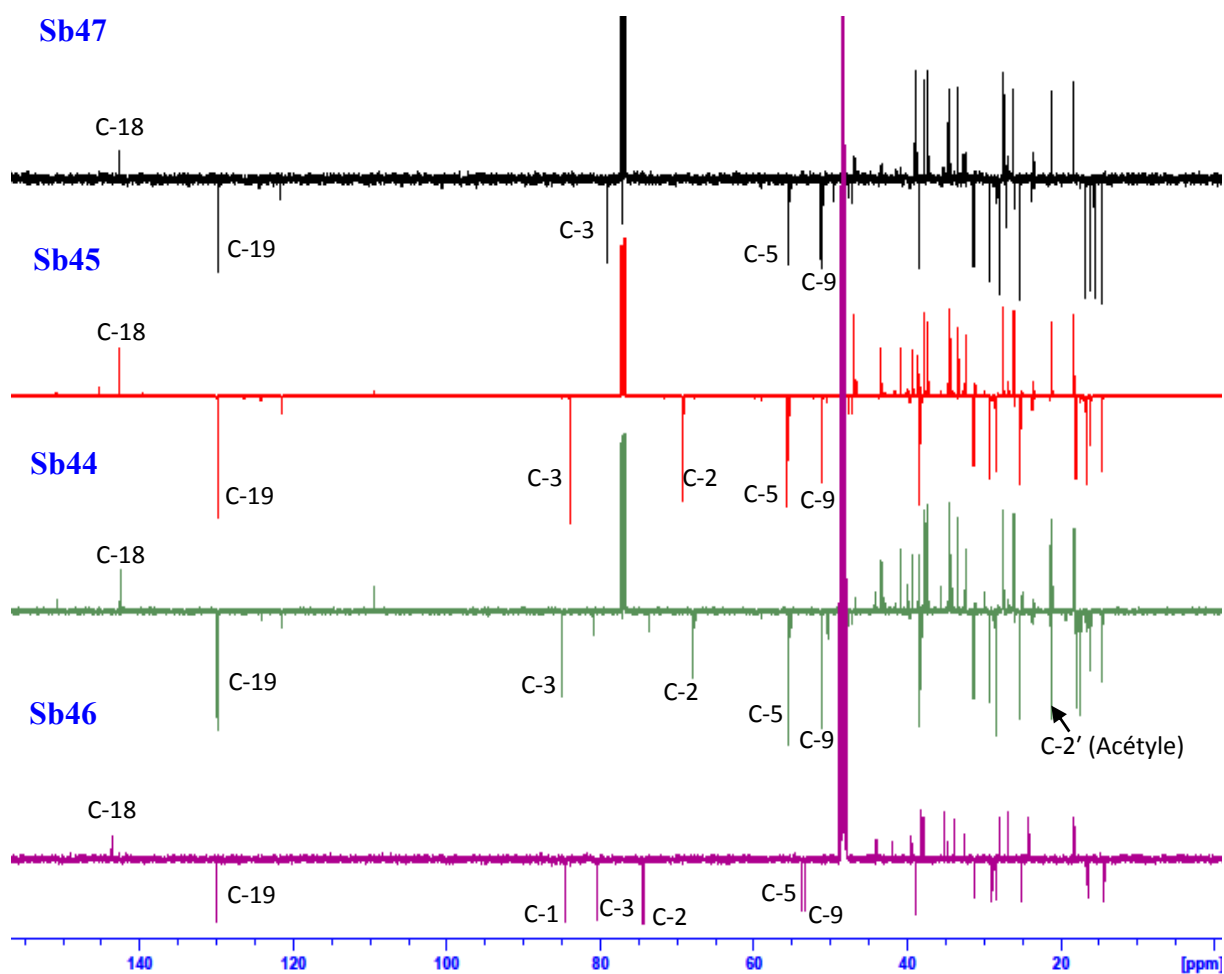


Figure III-150. Spectres de RMN ¹³C J-modulé des composés Sb44-Sb47.

III.3.1.3. Analyse des spectres COSY

L'examen des spectres COSY permet de visualiser les corrélations entre les protons aliphatiques des cinq noyaux. Ainsi, celles des cycles B, C, D et E sont identiques pour tous les quatre triterpènes **Sb44-Sb47**, et la seule différence se situe dans le cycle A du fait de la présence des groupements hydroxyles en C-2 et/ou C-1.

Sur le spectre COSY de **Sb44** (Figure III-151), une corrélation est visible entre les protons H-3 (δ_{H} 4.52, d, $J=10.0$ Hz) et H-2 situé à δ_{H} 3.84 (td, $J=10.6-4.1$ Hz). La valeur de la constante de couplage ($J_{\text{H-2,H-3}}=10.6$ Hz) indique une position transdiaxiale des protons H-2 et H-3 et la non substitution en position 1. Ceci est confirmé par les corrélations observées entre H-2 et les deux protons géminés H₂-1 à δ_{H} 0.98 (m) et 2.23 (dd, $J=12.3,4.2$ Hz).

Les mêmes corrélations sont observées pour l'*epi*-germanidiol (**Sb45**) (Tableau III-28).

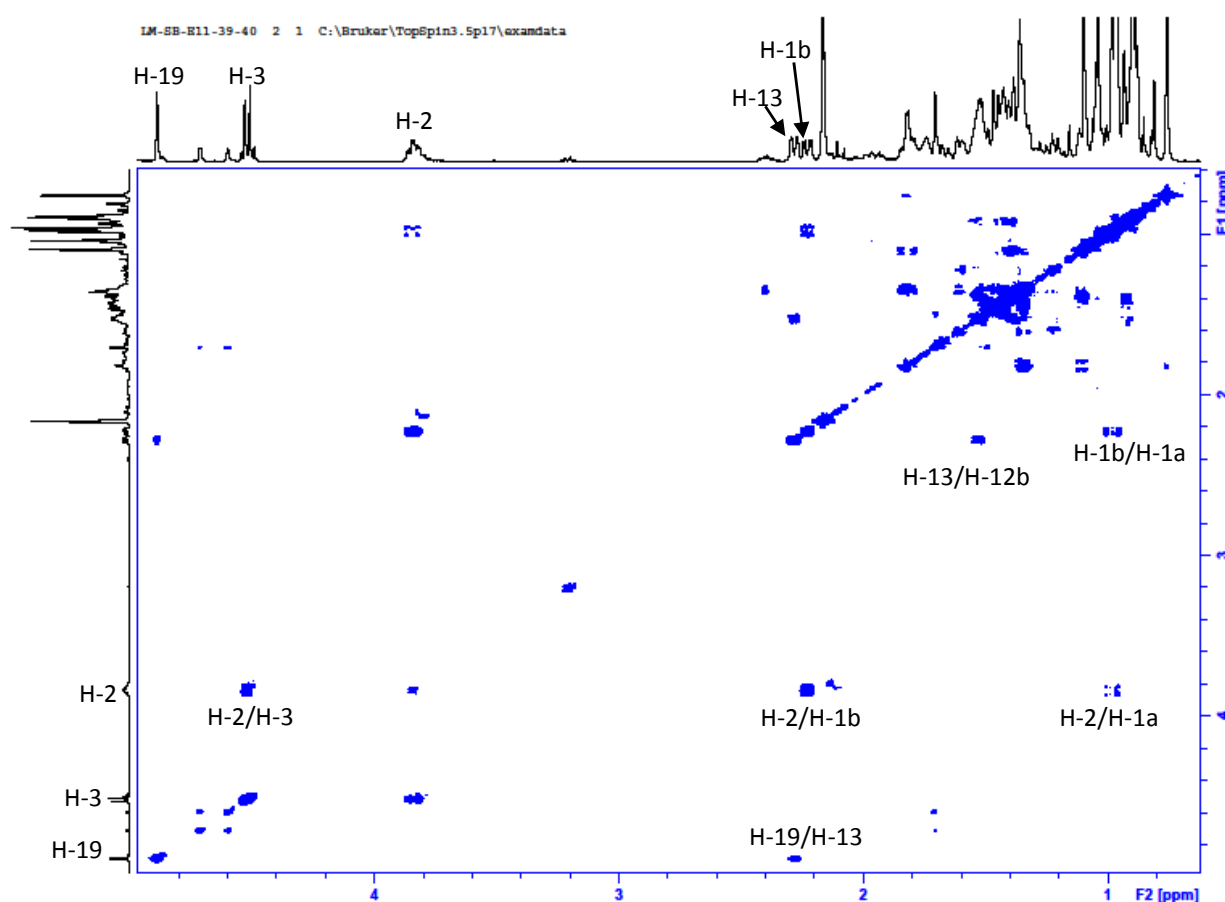


Figure III-151. Spectre COSY du composé **Sb44**.

Une analyse similaire sur le spectre COSY de **Sb46** (Figure III-152) montre des corrélations entre le proton H-3 (δ_{H} 2.97, d, $J=9.4$ Hz) et H-2 situé à δ_{H} 3.41 sous la forme d'un

triplet (t, $J=9.3$ Hz). Le proton H-1 est localisé à δ_{H} 3.12 (d, $J=9.0$ Hz) à partir de sa corrélation avec le proton vicinal H-2. Les valeurs des constantes de couplage ($J_{\text{H-1,H-2}}$ et $J_{\text{H-2,H-3}} \approx 9.3$ Hz) indiquent des positions transdiaxiales des protons H-1/H-2 et H-2/H-3.

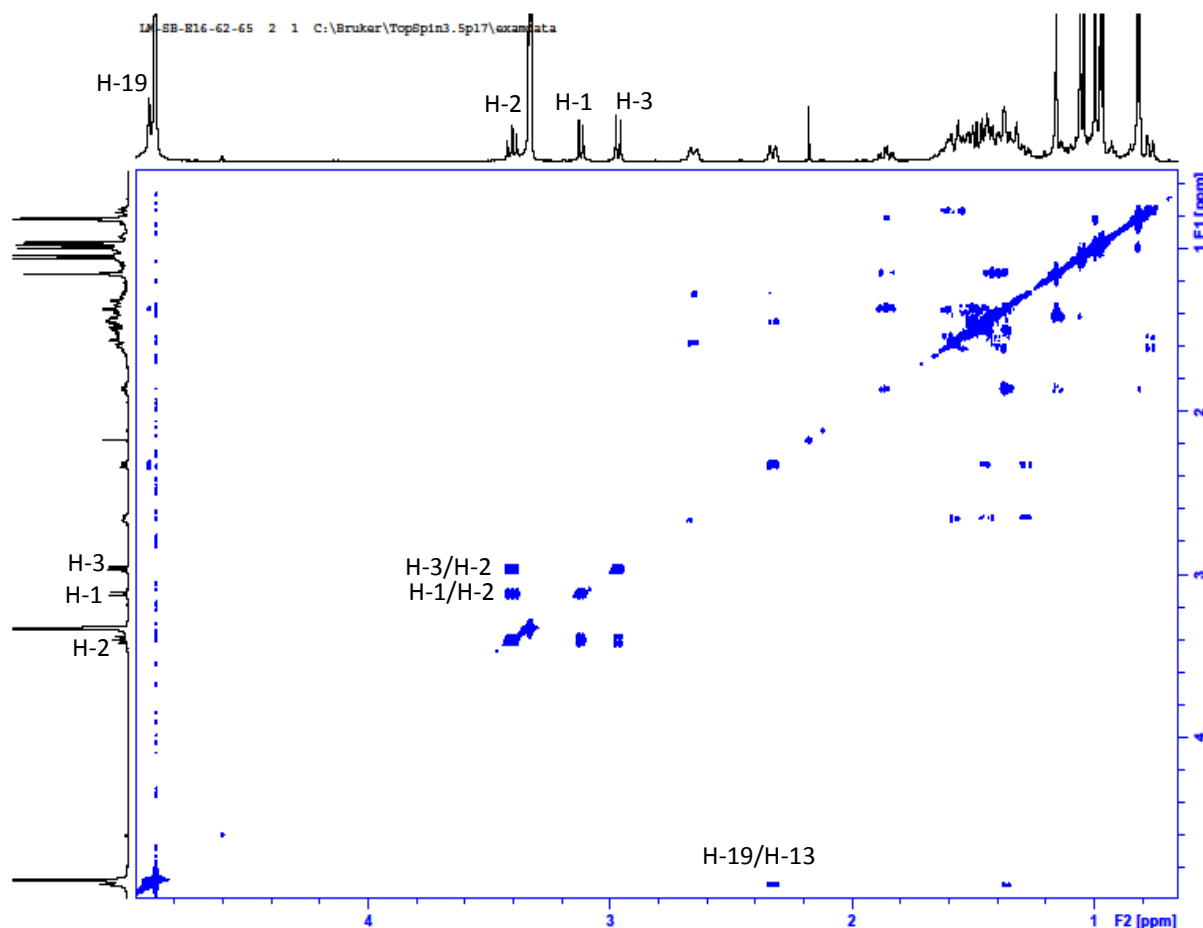


Figure III-152. Spectre COSY du composé Sb46.

- Un seul -OH est positionné sur le C-3 du germanicol (**Sb47**) grâce aux corrélations COSY entre le proton H-3 δ_{H} 3.24 ppm (dd, $J=11.3, 5.0$ Hz) et les protons géminés H₂-2, ces derniers couplent avec les deux protons géminés H₂-1 (Tableau III-28).

III.3.1.4. Analyse des spectres HSQC *J*-modulé

En analysant les corrélations hétéronucléaires $^1J_{\text{H-C}}$ observées sur les spectres HSQC *J*-modulé, les déplacements chimiques des carbones respectifs sont attribués.

Sur le spectre HSQC *J*-modulé du **Sb44** (Figure III-153), nous pouvons visualiser les corrélations H-19/C-19, H-3/C-3, H-2/C-2, H₂-1/C-1 et les protons du méthyle du groupement acétyle avec le carbone les portant à δ_{C} 21.1 ppm.

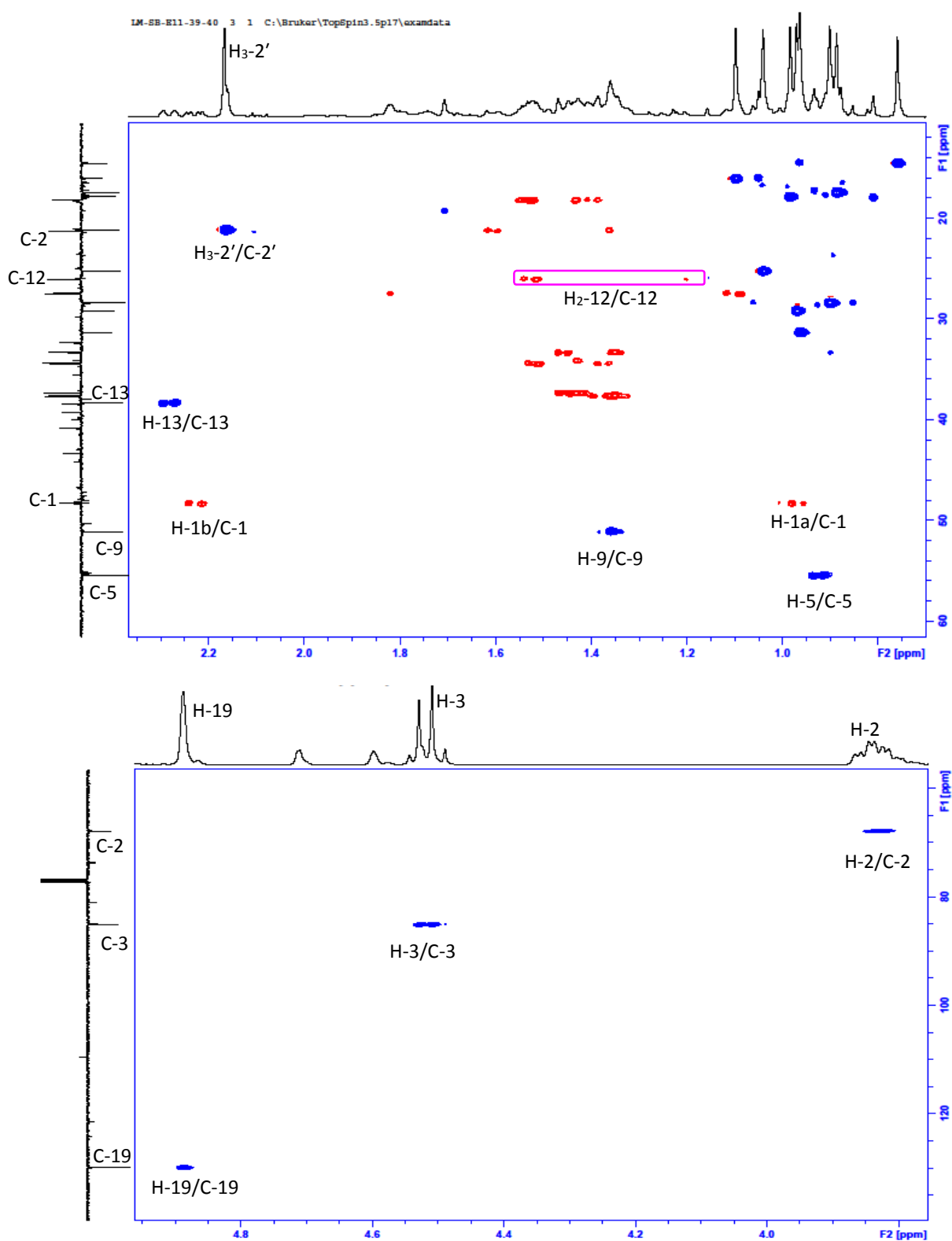


Figure III-153. Spectres HSQC J -modulé étalés du composé **Sb44**.

Le spectre HSQC J -modulé du **Sb46** (Figure III-154), présente les corrélations H-19/C-19, H-3/C-3, H-2/C-2 et H-1/C-1.

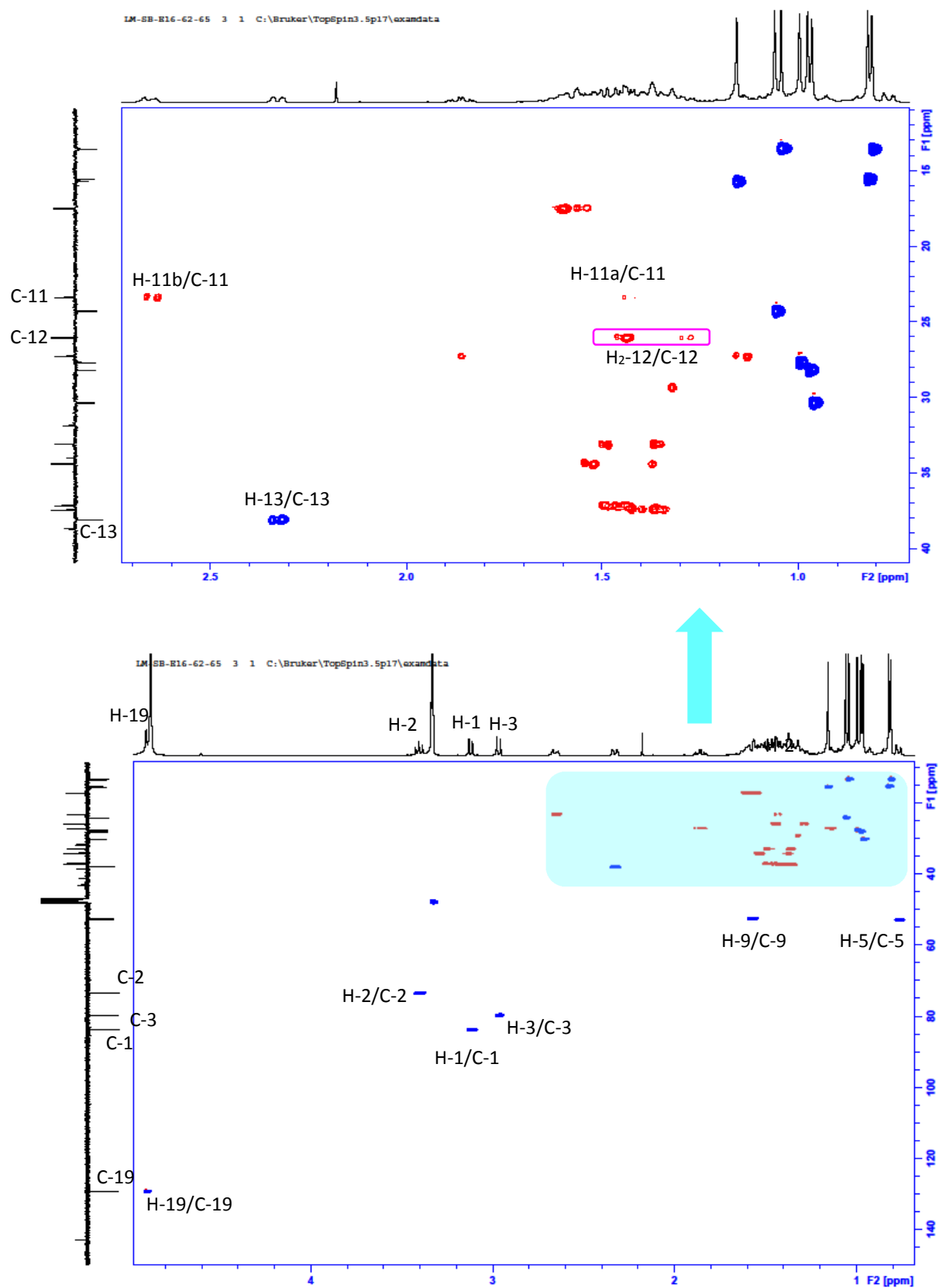


Figure III-154. Spectres HSQC J -modulé étalé [δ_{H} : 0.7-2.7 ppm] (a) et HSQC J -modulé (b) du composé Sb46.

III.3.1.5. Analyse des spectres HMBC

En examinant les spectres HMBC des triterpènes **Sb44-Sb47**, nous pouvons visualiser les couplages entre protons et carbones distant de deux ou trois liaisons, qui permettent l'attribution des méthyles et des autres carbones. Toutes ces corrélations ont été déjà interprétées précédemment dans les sapogénines de **Cs1-Cs4** de *Calendula stellata* (Partie III, chapitre 1).

Le spectre HMBC étalé de **Sb44** (Figure III-155) confirme la présence d'un oléan-18-ène et cela par les corrélations observées entre le carbone C-19 (δ_C 129.8) et les méthyles CH₃-29 (δ_H 0.96) et CH₃-30 (δ_H 0.97), aussi entre le carbone C-18 (δ_C 142.5) et le méthyle CH₃-28 (δ_H 1.04). A l'inverse, le proton H-19 à δ_H 4.89 ppm montre des taches de corrélations avec les carbones C-17 (δ_C 34.4), C-13 (δ_C 38.3), C-21 (δ_C 33.3), C-20 (δ_C 32.3) et C-29 (δ_C 31.3).

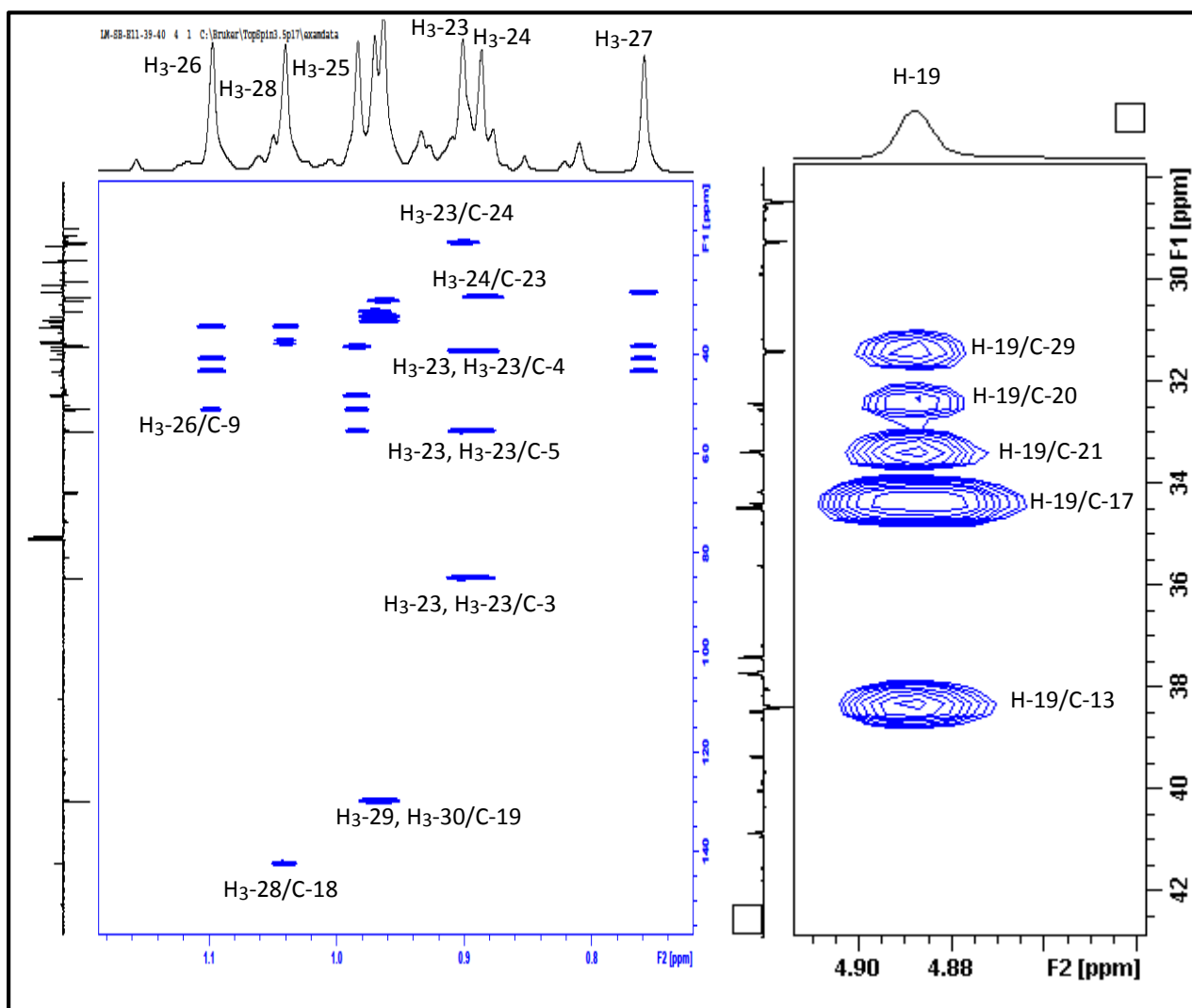


Figure III-155. Spectres HMBC étalés du composé **Sb44**.

L'emplacement du groupement acétyle en C-3 dans le composé **Sb44** est déduite des corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-156) entre H-3 et le carbonyle C-1' résonnant à δ_C 172.4 ppm, qui à son tour corrèle avec les protons du méthyle H₃-2' à δ_H 2.16 ppm (δ_C 21.1).

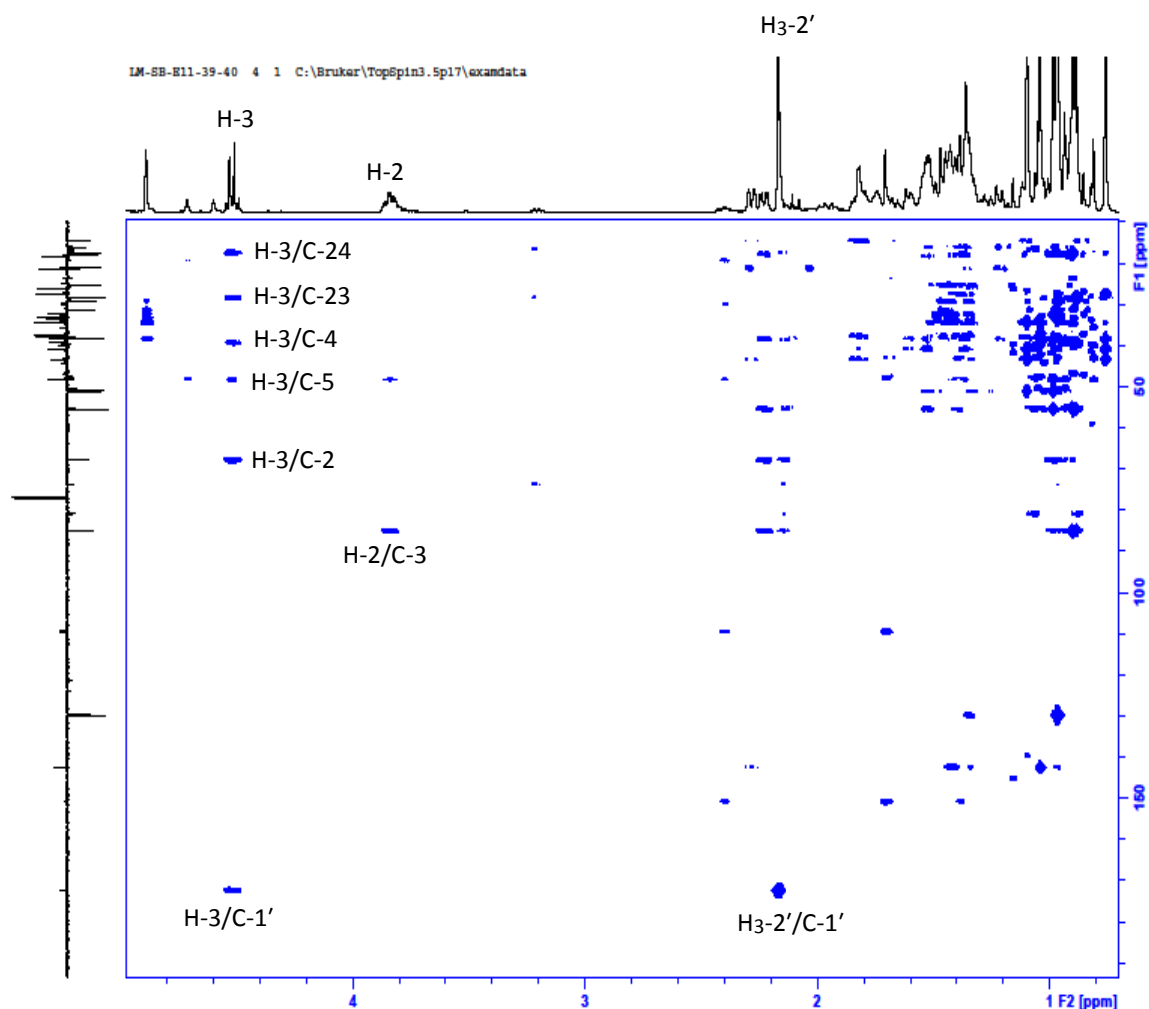


Figure III-156. Spectre HMBC du composé **Sb44**.

Les spectres de masse ESI-MS enregistré en mode positif accompagnés des données spectrales précédentes, nous ont permis d'attribuer aux triterpènes **Sb44-Sb47** les structures suivantes :

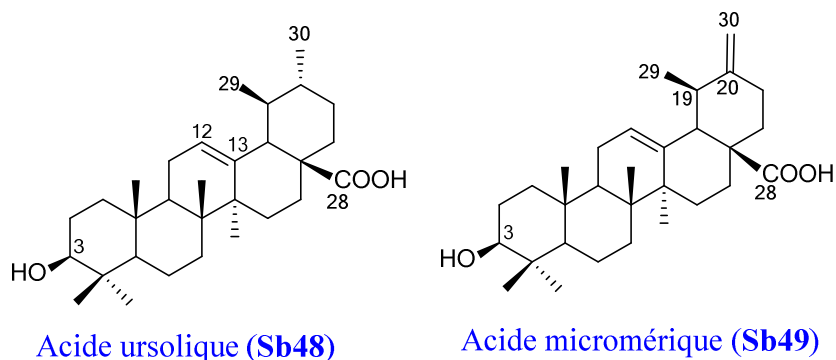
- Le 3 β -acetoxy-oléan-18-ène-2 α -ol (**Sb44**).
- L'*epi*-germanidiol (**Sb45**) (Ageta et al., 1984).
- Le 1 β ,2 α ,3 β -triol-oléan-18-ène (**Sb46**) (Habibi et al., 2011).
- Le germanicol (**Sb47**) (Mahato et al., 1994).

Le **Sb44** est un nouveau composé naturel et les deux composés **Sb46** et **Sb47** ont été déjà identifiés du genre *Salvia*. Tandis que l'*epi*-germanidiol (**Sb45**) est isolé ici pour la première fois dans le genre *Salvia* (Jash et al., 2016).

II.3.1.1.2. Elucidation structurale des triterpènes à noyau ursane

Un triterpène à noyau ursane diffère de celui à noyau oléane par les positions des méthyles CH₃-29 et CH₃-30, dans le cas d'un ursane le méthyle CH₃-29 est porté par le carbone tertiaire C-19. Ce qui permet d'observer en RMN ¹H comme signaux caractéristiques au moins un doublet attribué à ce méthyle.

Deux composés à noyau ursane (**Sb48-Sb49**) ont été obtenus de *S. barrelieri* et comme signalé plus haut, la structure de l'acide ursolique (**Sb48**) (Jang et al., 2014) a été déjà interprétée comme sapogénine dans les saponines de *Scabiosa stellata* (Partie III, chapitre 2). Ainsi, nous allons déterminer uniquement les principales caractéristiques retrouvées dans l'acide micromérique (**Sb49**).



III.3.1.2.1 identification de l'acide micromérique (Sb49)

L'analyse combinée des spectres de RMN ¹H et ¹³C du composé **Sb49**, nous a conduit à un dérivé de noyau ursane caractérisé par les éléments suivants :

- La présence d'un seul méthyle secondaire CH₃-29 (δ_H 0.92, d, $J=6.3$ Hz), en plus de cinq méthyles tertiaires CH₃-23, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26 et CH₃-27 à δ_H 1.00, 0.80, 0.98, 0.87 et 1.19 (s).
- Le signal du proton H-18 sous forme d'un singulet large à δ_H 2.28 est indicatif d'un noyau ursane. Ce proton est déblindé par la présence d'une fonction carbonyle en C-28. En effet, le proton H-18 se retrouve dans le cône d'anisotropie du carbonyle ce qui le déblindé par rapport aux autres protons aliphatiques du triterpène.

- Le proton H-3 résonne sous la forme d'un doublet de doublets à δ_H 3.18 (dd, $J=11.4, 4.8$ Hz) indiquant que la position 2 est non substituée (H₂-2).
- Un signal déblindé à δ_H 5.28 (d, $J=3.6$ Hz) indiquant la présence d'un proton éthylénique, attribuable au proton H-12.
- deux protons d'intégration 1H résonnants à δ_H 4.65 et 4.70 sous la forme d'un singulet. Ces protons indiquent la présence d'une double liaison terminale (C=CH₂).

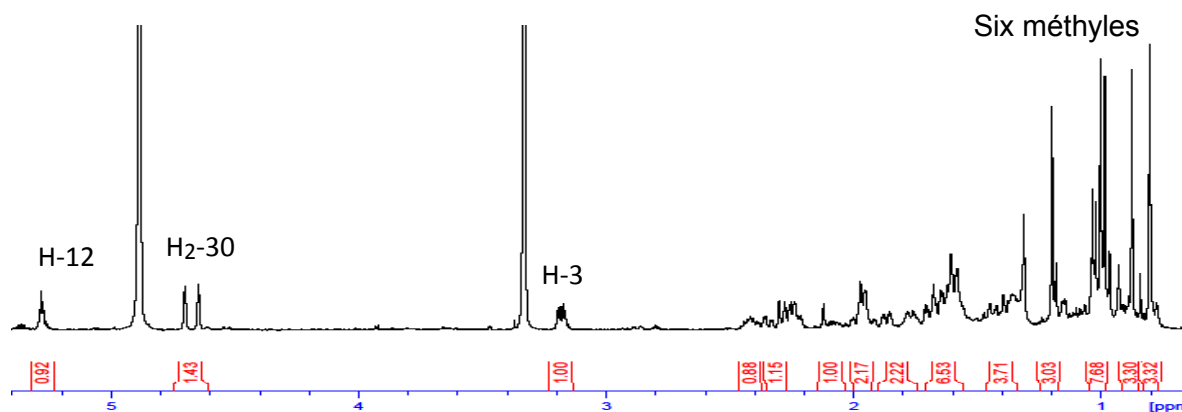


Figure III-157. Spectre de RMN ¹H du composé Sb49.

Sur le spectre de RMN ¹³C *J*-modulé de ce composé, nous pouvons visualiser les signaux caractéristiques suivants :

- Un ensemble de carbones aliphatiques dans la zone entre 14.6 et 55.3 ppm.
- Le carbone C-3 résonne à δ_C 78.3.
- les carbones éthyléniques C-12 et C-13 de la double liaison Δ^{12-13} résonnants respectivement à δ_C 125.7 et 138.4.
- les carbones éthyléniques C-20 et C-30 de la double liaison Δ^{20-30} sont localisés à δ_C 153.2 et 103.8.

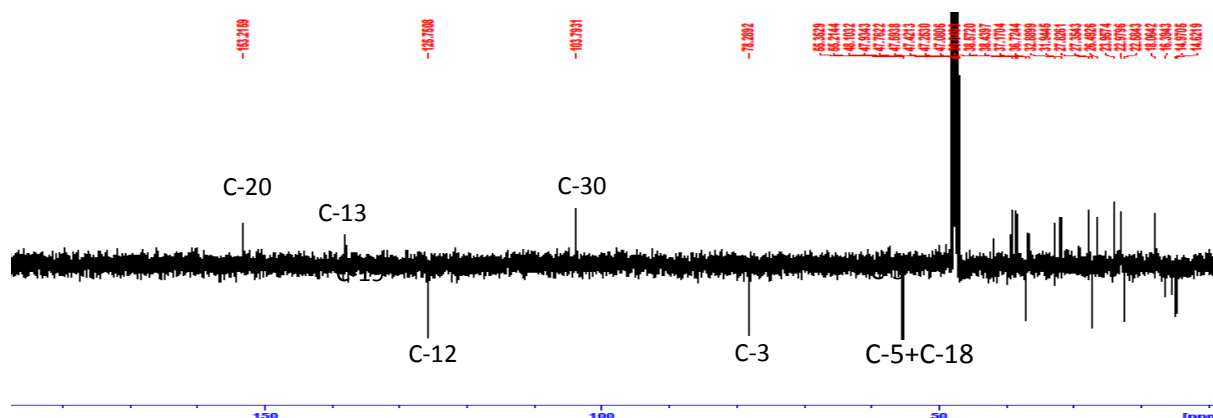


Figure III-158. Spectre de RMN ¹³C *J*-modulé du composé Sb49.

L'expérience COSY (Figure III-159) permet de retrouver toutes les corrélations identifiant le squelette ursane- Δ^{12-13} bien caractéristique par leurs déplacements chimiques et constantes de couplage (Tableau III-28). Toutes les corrélations restent identiques à celle de l'acide ursolique, parmi lesquelles :

- Au niveau du proton oléfinique H-12, nous observons une corrélation avec H₂-11 (δ_H 1.92).
- Une corrélation à longue distance entre les protons éthyléniques de la double liaison terminale à δ_H 4.55 avec le proton à δ_H 2.36 qu'on peut attribuer au proton H_b-21.

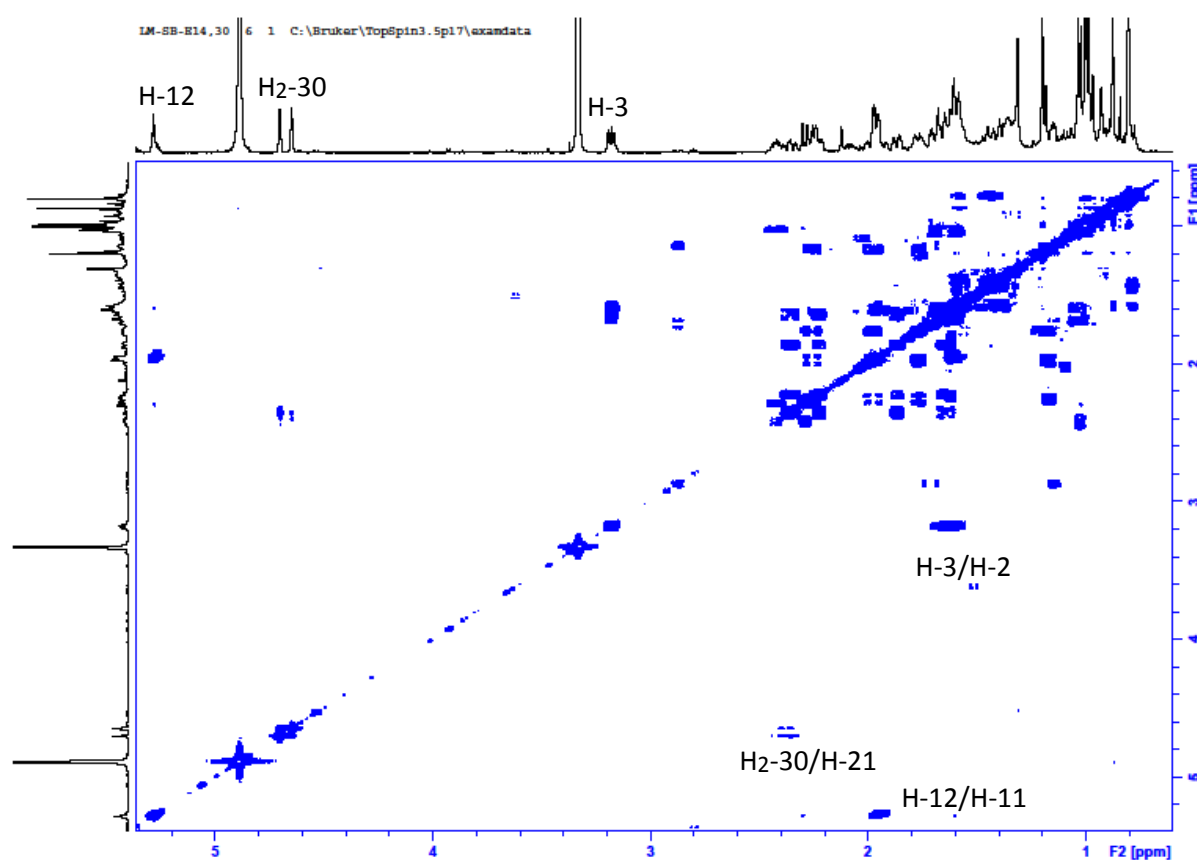


Figure III-159. Spectre COSY du composé **Sb49**.

Sur le spectre HSQC *J*-modulé du **Sb49** (Figure III-160), nous pouvons visualiser les corrélations entre les protons identifiés précédemment avec les carbones correspondant et les protons H₂-30 avec le carbone les portant à δ_C 103.8 ppm.

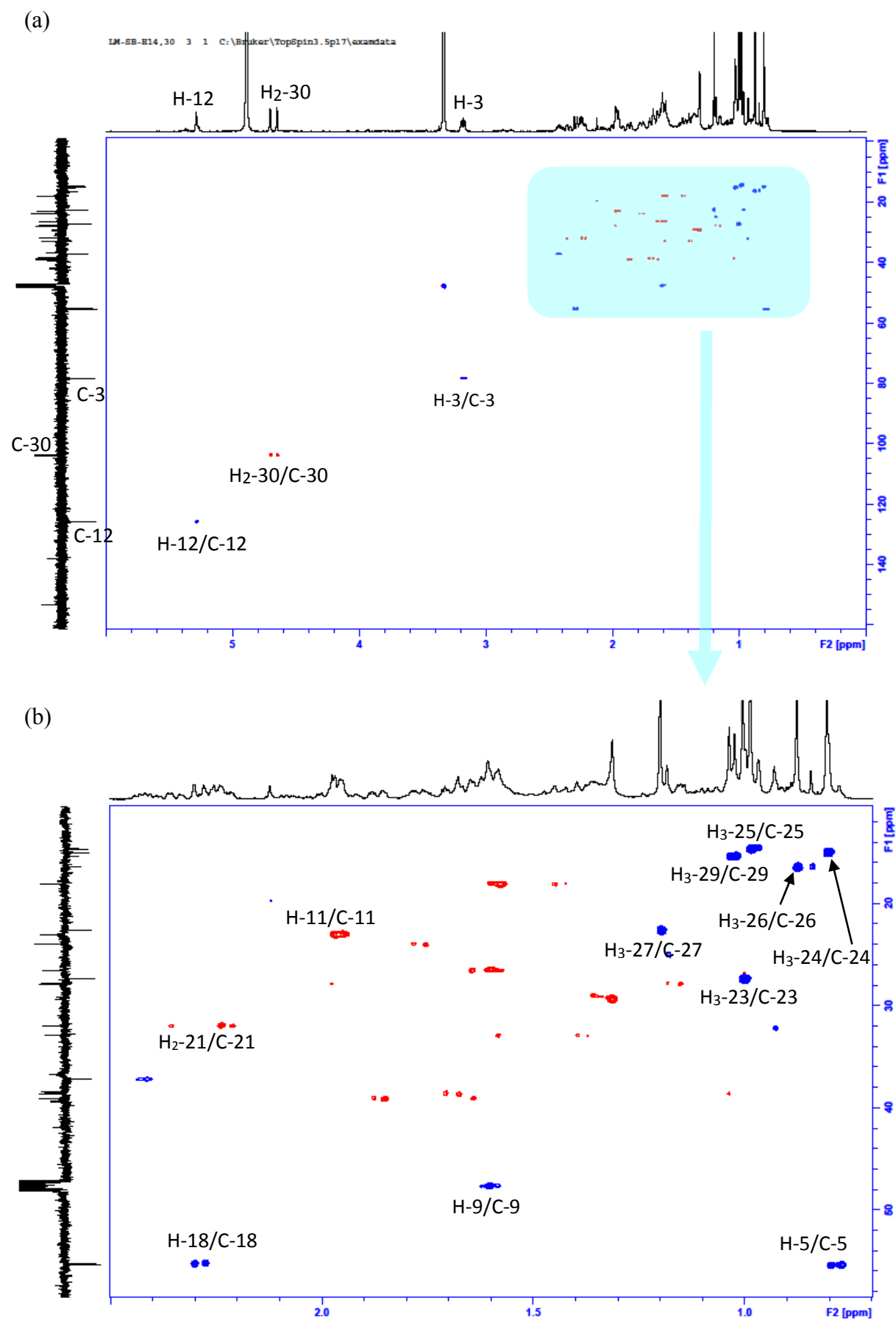


Figure III-160. Spectres HSQC *J*-modulé (a, b) du composé Sb49.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC du composé **Sb49** (Figure III-162) ont été déjà interprétées dans les sapogénines de *Calendula stellata*. Parmi lesquelles, nous avons choisi les plus importantes pour élucider la structure finale de l'acide micromérique :

- En partant du proton éthylénique H-12, des corrélations sont observées avec le carbone quaternaire C-14 (δ_C 41.9) et le carbone situé à δ_C 48.1 attribuable au carbone C-9 et les protons du méthyles CH-27 à δ_C 22.5.
- A partir des protons du méthyle CH₃-27 avec le carbone quaternaire oléfinique C-13 (δ_C 138.4), les carbones C-14 et C-8 (δ_C 39.3) et le carbone situé à δ_C 27.8 attribuable au carbone C-15.
- Le méthyle résonnant sous la forme d'un doublet qui est attribuable au méthyle CH₃-29 présente des corrélations avec les carbones C-18, C-21 et le carbone éthylénique quaternaire C-20 à δ_C 55.2, 39.0 et 153.2, respectivement.
- A partir des protons CH₂-30, deux corrélations sont observées avec les carbones C-19 à δ_C 37.1 et C-21, permettant de confirmer que la double liaison est placée en position 20.

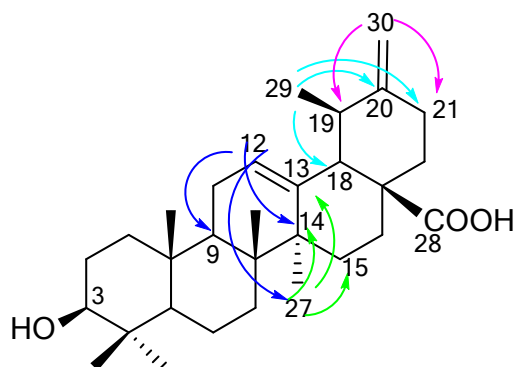


Figure III-161. Importantes corrélations HMBC de l'acide micromérique (**Sb49**).

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif montre la présence d'un ion pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ correspondant à la formule brute $C_{30}H_{46}O_3$. La comparaison des données spectrales avec celles disponibles dans la littérature (Altinier et al., 2007) confirme que le composé **Sb49** est l'acide micromérique (Figure III-161), qui a été caractérisé précédemment dans le genre *Salvia* (Jash et al., 2016).

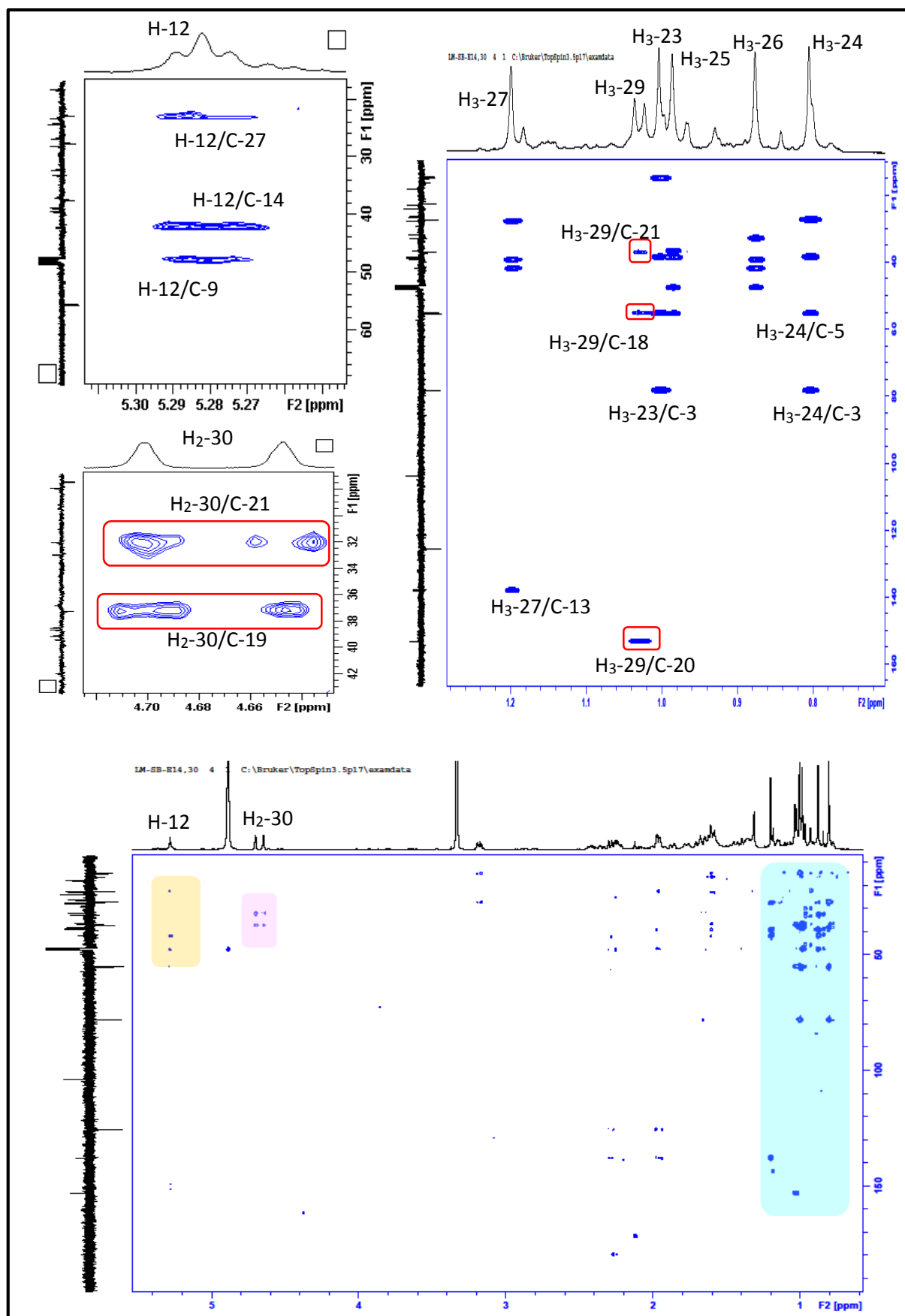


Figure III-162. Spectre HMBC du composé Sb49.

Tableau III-28. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C des triterpénoïdes de *Salvia barrelieri* (Sb44-Sb45) et (Sb47-Sb49) dans CDCl₃ et Sb46 dans CD₃OD.

	Sb44			Sb45			Sb46			Sb47			Sb48			Sb49		
	δ _H m (J en Hz)	δ _C	δ _H m (J en Hz)	δ _C	δ _H m (J en Hz)	δ _C	δ _H m (J en Hz)	δ _C	δ _H m (J en Hz)	δ _C	δ _H m (J en Hz)	δ _C	δ _H m (J en Hz)	δ _C	δ _H m (J en Hz)	δ _C		
1	0.98 m 2.23 dd (12.3,4.2) 3.84 td (10.6,4.1)	48.3	0.91 m 2.14 dd (12.4,4.6) 3.75 td (4.5,9.5)	46.9	3.12 d (9.0)	83.8	0.96 m 1.77 dt (13.1,3.4) 1.62 m	38.9	0.98 m 1.67 m 1.63 m	38.6	0.98 m 1.67 m 1.63 m	38.5	0.98 m 1.67 m 1.63 m	38.6	1.03 m	38.5		
2	4.52 d (10)	85.0	3.11 d (9.5)	69.3	2.97 d (9.4)	79.6	3.24 dd (11.3,5.0)	79.0	3.2 dd (11.0,4.5)	79.0	3.2 dd (11.0,4.5)	79.0	3.18 dd (11.4,4.8)	79.0	3.18 dd (11.4,4.8)	78.3		
3	-	39.3	-	39.2	-	38.8	-	38.5	-	38.5	-	38.5	-	38.7	-	38.4		
4	0.94 m	55.4	0.83 m	55.6	0.77 dd (9.3,2.4)	55.6	0.72 dd (13.8,2.4)	55.5	0.75 d (11.2)	55.2	0.75 d (11.2)	55.2	0.78 m	55.2	0.78 m	55.3		
5	1.43 m	18.2	1.40 m	18.2	1.54 m	17.9	1.39 m	18.2	1.38 m	18.3	1.38 m	18.3	1.43 m	18.3	1.43 m	18.0		
6	1.53 m	34.3	1.53 m	34.4	1.60 m	34.3	1.54 m	34.6	1.57 m	34.6	1.54 m	34.6	1.58 m	34.6	1.58 m	32.9		
7	1.37 m	40.8	1.36 m	40.3	1.37 m	41.2	1.35 m	40.7	1.34 m	40.7	1.34 m	40.7	1.38 m	40.7	1.38 m	39.3		
8	1.52 m	51.1	1.51 m	51.1	1.52 m	52.5	1.50 m	51.2	1.50 m	51.2	1.50 m	51.2	1.57 m	51.2	1.57 m	48.1		
9	1.36 m	38.4	1.34 m	38.5	1.57 m	43.3	1.29 m	37.1	1.53 m	37.0	1.53 m	37.0	1.60 m	37.0	1.60 m	36.7		
10	-	21.2	-	21.2	-	23.3	-	21.1	-	23.3	-	21.1	-	23.3	-	22.9		
11	1.37 m	26.0	1.35 m	26.1	1.43 m	26.0	1.29 m	26.2	1.95 m	26.2	1.29 m	26.2	1.96 m	26.2	1.96 m	125.7		
12	1.60 m	38.3	1.59 m	38.3	2.65 m	38.0	1.57 m	38.4	5.27 t (3.4)	38.4	1.57 m	38.4	5.28 t (3.6)	38.4	5.28 t (3.6)	138.4		
13	1.20 m	43.3	1.20 m	42.3	1.28 dd (16.4,4.2)	43.1	1.19 m	43.3	1.44	43.3	1.19 m	43.3	-	42.0	-	41.9		
14	2.28 d (11.4)	27.5	2.28 dq (12.0, 1.8)	27.4	2.32 d (11.2)	27.2	2.29 dq (12.2,1.5)	27.5	-	27.2	2.29 dq (12.2,1.5)	27.5	-	28.0	-	27.8		
15	1.21 m	37.6	1.10 m	37.6	1.15 m	37.1	1.10 m	37.7	1.82 td (13.2,4.5)	37.1	1.10 m	37.7	1.15 m	37.7	1.15 m	23.9		
16	1.82 td (13.6,4.8)	34.4	1.82 td (13.1,4.9)	34.3	1.86 td (13.2,4.5)	33.9	1.82 m	34.4	1.82 m	34.4	1.82 m	34.4	1.70 m	34.4	1.70 m	47.7		
17	1.42	142.5	1.36 m	142.5	1.36 m	142.8	1.35 m	142.7	1.36 m	142.7	1.35 m	142.7	2.25m	142.7	2.25m	55.2		
18	1.46	129.8	-	129.8	-	129.3	-	129.7	-	129.3	-	129.7	-	38.8	-	37.1		
19	4.89 s/	32.3	4.9 s	32.3	4.90 m	31.8	4.88 s/	32.3	2.35 m	32.3	4.88 s/	32.3	2.35 m	32.3	2.35 m	153.2		
20	-	33.3	-	33.3	-	33.0	-	33.3	-	33.0	-	33.3	-	30.6	-	31.9		
21	1.43 m	37.3	1.34 m	37.3	1.36 m	37.4	1.34 m	37.3	1.36 m	37.3	1.34 m	37.3	1.36 m	37.3	1.36 m	39.0		
22	1.46 m	28.4	1.46 m	28.4	1.49 m	27.6	1.46 m	27.9	1.49 m	27.6	1.46 m	27.9	1.49 m	27.6	1.49 m	27.3		
23	1.34 m	17.4	1.44 m	17.4	1.47 m	13.5	1.44 m	13.5	1.47 m	13.5	1.44 m	13.5	1.47 m	13.5	1.47 m	14.9		
24	1.45 m	17.8	1.45 m	17.9	1.47 m	13.5	1.45 m	13.5	1.47 m	13.5	1.45 m	13.5	1.47 m	13.5	1.47 m	14.6		
25	0.90 s	16.0	1.04 s	16.1	0.99 s	15.7	0.99 s	16.1	0.99 s	15.7	0.99 s	16.1	0.99 s	16.9	0.99 s	16.3		
26	0.88 s	14.5	0.83 s	14.5	0.82 s	14.5	0.80 s	14.6	0.80 s	14.5	0.80 s	14.6	0.80 s	22.5	0.80 s	22.5		
27	0.98 s	17.8	0.97 s	17.9	1.04 s	15.5	0.91 s	17.9	0.95 s	15.4	0.91 s	17.9	0.95 s	181.5	0.95 s	179.3		
28	1.09 s	16.0	1.10 s	16.1	1.15 s	14.6	1.10 s	16.1	1.10 s	14.6	1.10 s	16.1	1.10 s	17.0	1.10 s	15.3		
29	0.76 s	25.2	0.76 s	25.2	0.81 s	24.2	0.76 s	25.2	0.81 s	24.2	0.76 s	25.2	0.81 s	21.1	0.81 s	103.8		
30	1.04	31.3	1.04 s	31.3	1.06 s	30.3	1.05 s	31.3	1.06 s	30.3	1.05 s	31.3	1.06 s	21.1	1.06 s	4.65 s		
	0.96 s	29.1	0.97 s	29.2	0.96 s	28.1	0.96 s	29.2	0.96 s	28.1	0.96 s	29.2	0.96 s	4.70 s	0.96 s	4.70 s		
	0.97 s	172.4	0.96 s	172.4	0.97 s	172.4	0.96 s	172.4	0.97 s	172.4	0.96 s	172.4	0.97 s	-	0.97 s	-		
C=O	-	21.1	-	21.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
O-COCH ₃	2.16 s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

III.3.3. Détermination structurale des flavonoïdes de *Salvia barrelieri*

III.3.3.1. Apigénine et glycosides

- **Sb50** et **Sb51** sont déterminés comme étant l'apigénine et l'apigénine-7-*O*- β -D glucopyranoside (Han et al., 2007 ; Ghohari et al., 2011).
- **Sb52** est l'apigénine-7-*O*- β -D-glucuronopyranoside (Ghohari et al., 2011). La partie osidique est identifiée grâce aux grandes constantes de couplage des protons H-1'', H- 4'' et H-5'' ($J \approx 9.7$ Hz) (Tableau III-29).
- **Sb53** est l'apigénine-7-*O*-glucuronopyranoside méthyle ester (Lee et al., 2002).

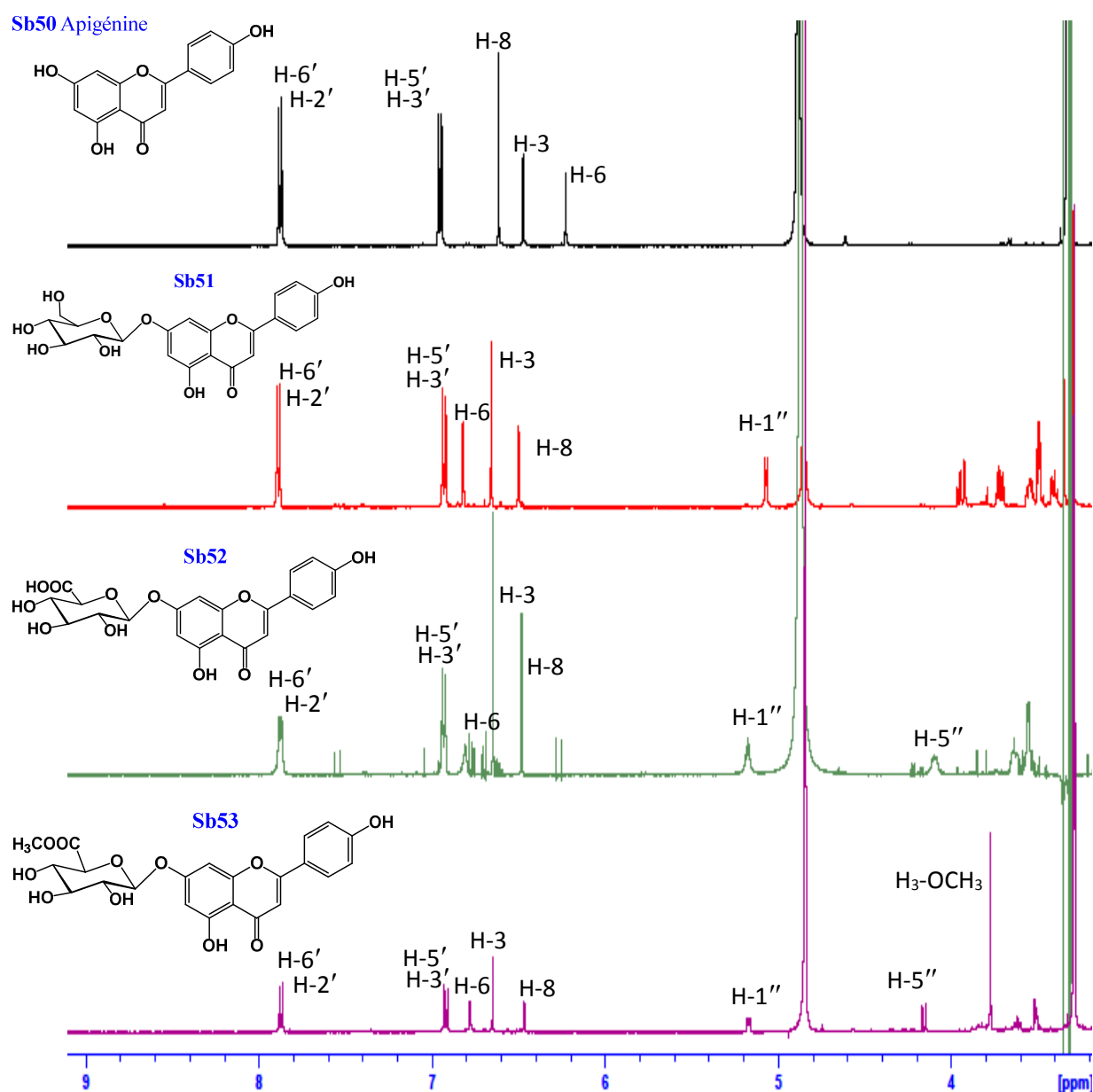
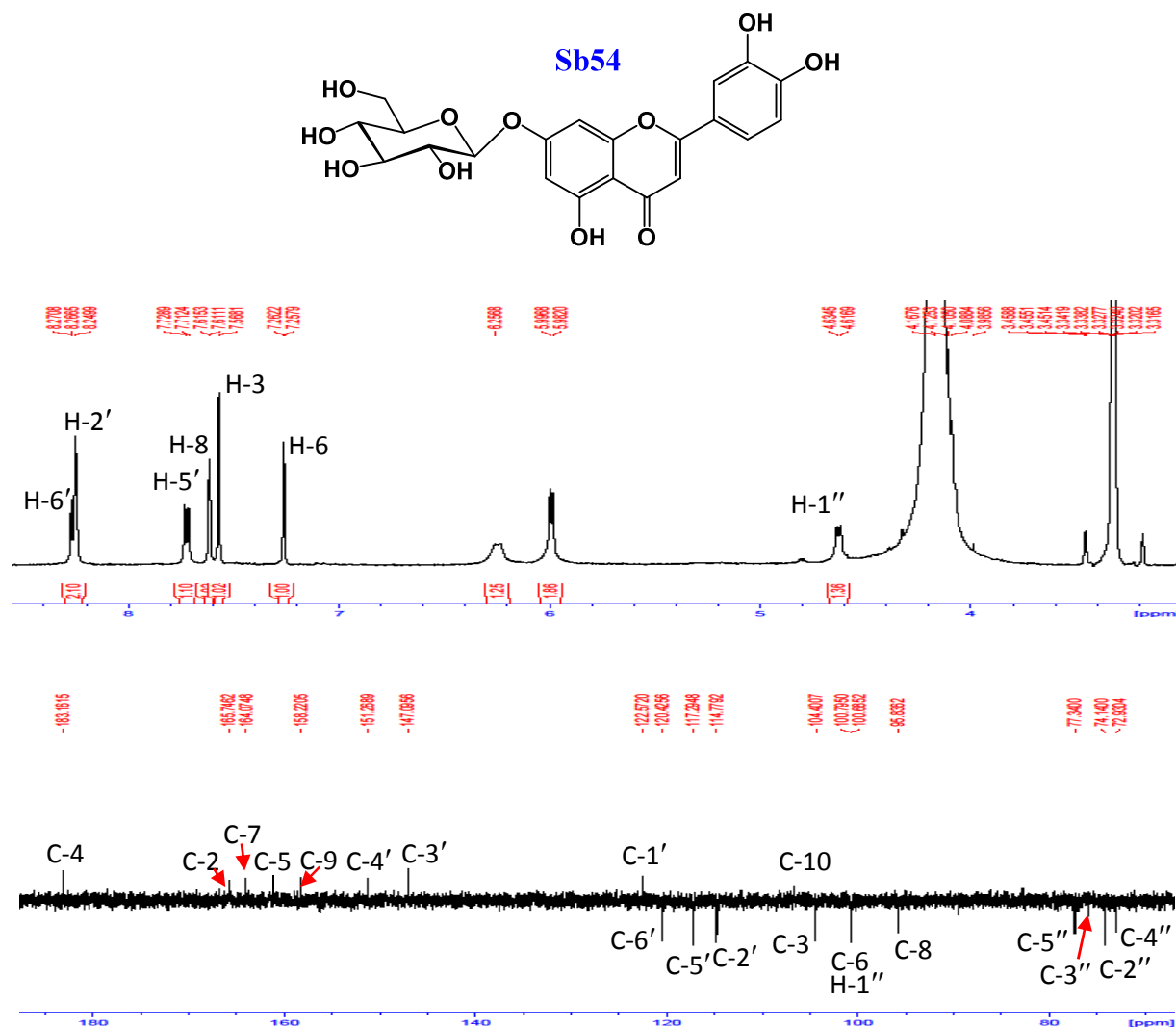


Figure III-163. Spectres de RMN ^1H des composés Sb50-Sb53.

III.3.1.2. Glycoside de lutéoline

- **Sb54** est déterminé comme étant la lutéoline-7-*O*- β -D-glucopyranoside à l'aide des données spectrales (Figure III-164) et par comparaison avec celle de la littérature (Ghorari et al., 2012).



III.3.1.2. Salvigénine

Le **Sb55** est déterminé comme étant le 5-hydroxy-4',6,7-triméthoxy-flavone, connu par salvigénine (Saeidnia et al., 2009).

Le spectre de RMN ^1H du composé **Sb55** (Figure III-165) montre les quatre signaux des six protons aromatiques suivants :

- Deux doublets (couplage *ortho* : $J = 9.0$ Hz), intégrant chacun pour deux protons à δ_H 7.05 (H-3' et H-5') et δ_H 7.88 (H-2' et H-6').
- deux singulets, intégrant chacun pour un proton à δ_H 6.62 (H-3) et δ_H 6.58 (H-8).

Le spectre de RMN 1H présente aussi trois singulets, intégrant chacun pour trois protons à δ_H 3.92, 3.96 et 4.00. Sur le spectre de RMN ^{13}C J -modulé (Figure III-165), la présence de trois signaux δ_C 55.5, 56.3 et 60.9 indiquent qu'ils s'agissent de groupement méthoxyles ($3 \times OCH_3$).

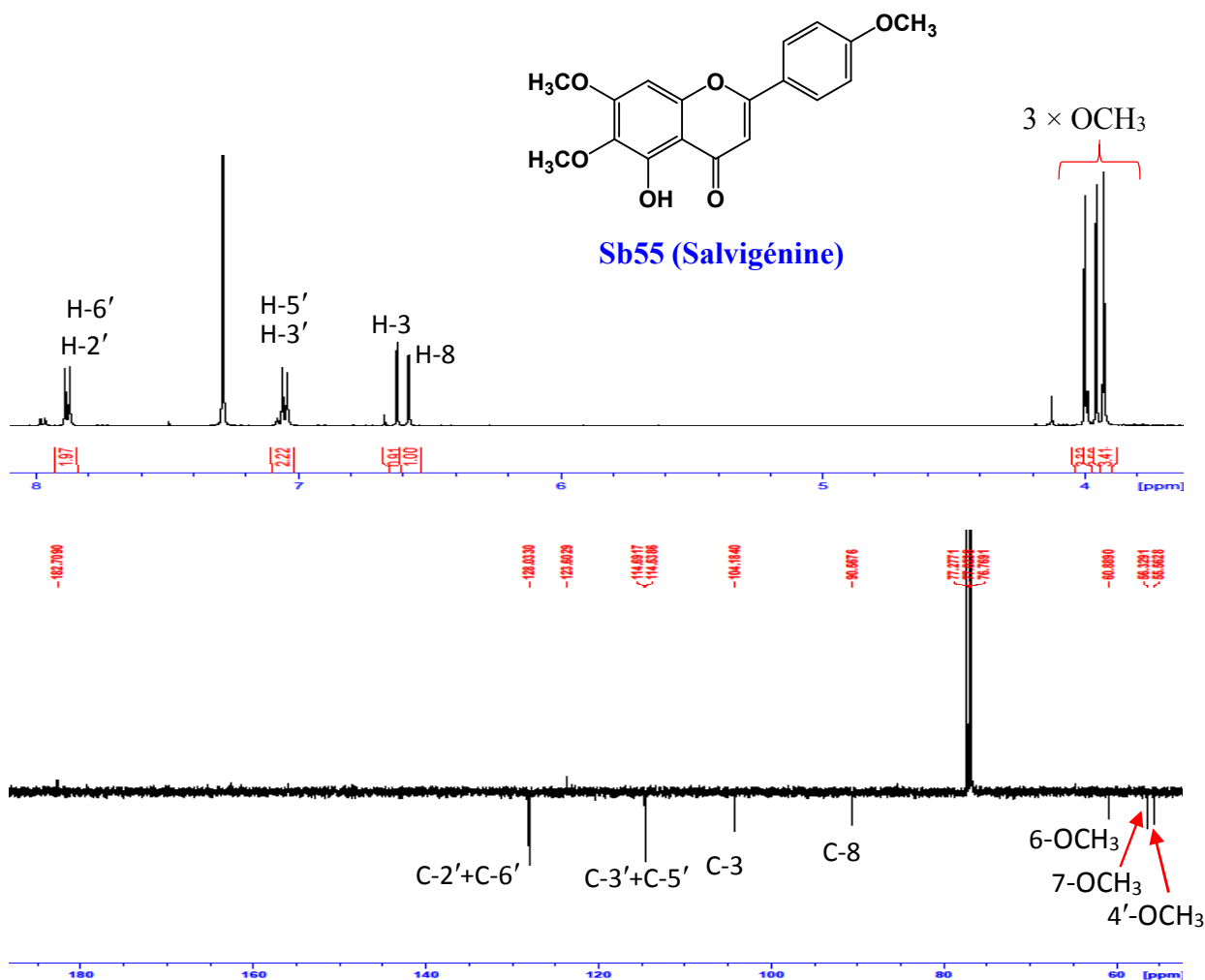


Figure III-165. Spectres de RMN 1H et ^{13}C J -modulé du composé **Sb55**.

L'analyse conjointe des spectres HSQC J -modulé (Figure III-166) et HMBC (Figure III-167) de **Sb55** et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer sur le spectre RMN ^{13}C J -modulé tous les carbones correspondant au salvigénine (Tableau III-29) (Saeidnia et al., 2009).

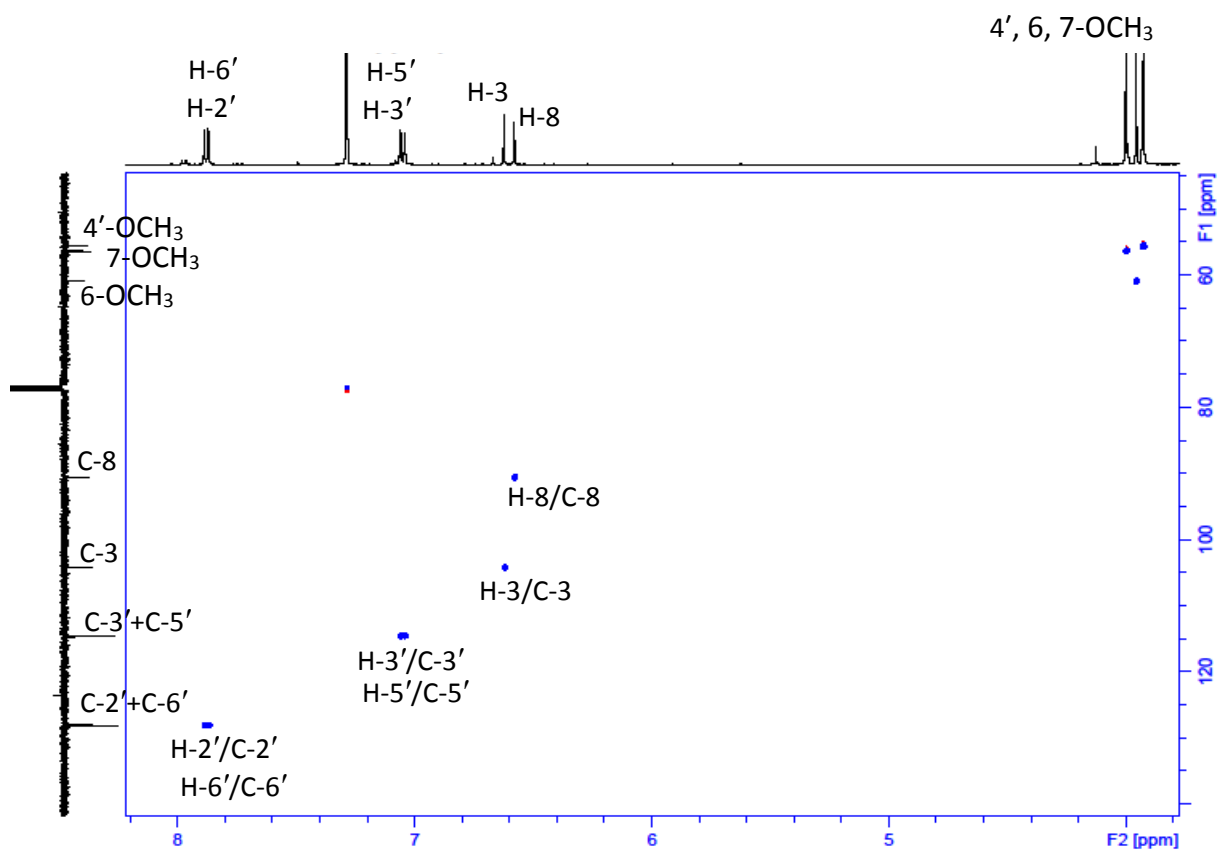
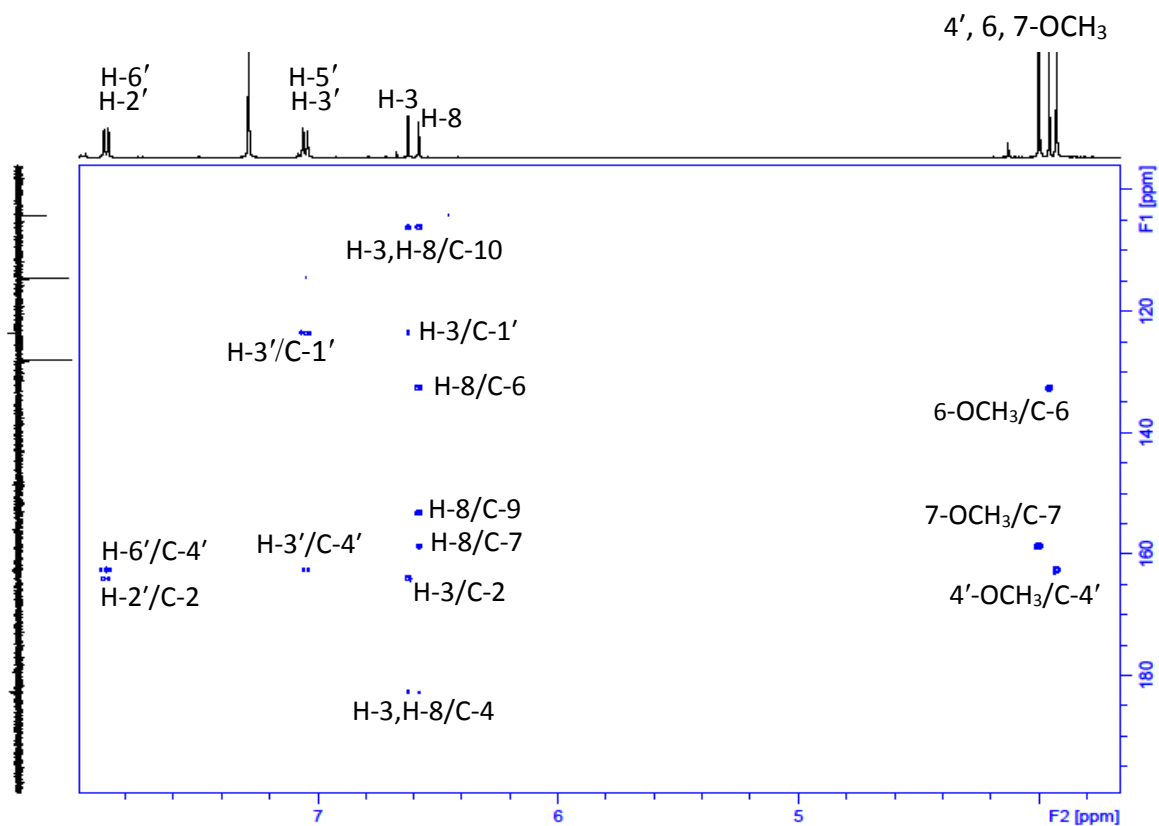
Figure III-166. Spectre HSQC *J*-modulé du composé Sb55.

Figure III-167. Spectre HMBC du composé Sb55.

Tableau III-29. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C des flavonoïdes de *Salvia barrelieri* (Sb50-Sb55) dans CD₃OD.

	Sb50			Sb51			Sb52			Sb53			Sb54			Sb55		
	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J en Hz)	δ_{C}
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	164.1	-	165.3	-	165.4	-	165.4	-	165.4	-	165.4	-	165.4	-	165.7	-	163.9
3	6.62 s	102.3	6.68 s	102.5	6.66 s	102.7	6.66 s	102.7	6.92 s	104.4	6.92 s	104.4	7.57 s	104.4	6.62 s	104.4	6.62 s	104.2
4	-	181.7	-	182.6	-	182.7	-	182.7	-	182.4	-	182.4	-	183.1	-	183.1	-	182.6
5	-	161.4	-	161.4	-	161.5	-	161.5	-	161.6	-	161.6	-	162.2	-	162.2	-	152.9
6	6.28 d (2.1)	98.8	6.52 d (2.1)	99.7	6.82 (OH)	94.6	6.51 d (2.2)	94.6	6.51 d (2.2)	99.53	7.26 d (2.0)	100.7	7.26 d (2.0)	100.7	-	100.7	-	132.4
7	-	163.7	-	163.3	-	163.1	-	163.1	-	162.2	-	162.2	-	164.0	-	164.0	-	158.5
8	6.48 d (2.1)	93.9	6.85 d (2.1)	94.6	6.50 s	99.7	6.82 d (2.2)	94.4	6.82 d (2.2)	94.4	7.61 d (2.1)	95.8	7.61 d (2.1)	95.8	6.58 s	95.8	6.58 s	90.5
9	-	157.3	-	157.5	-	161.5	-	161.5	-	157.2	-	157.2	-	158.2	-	158.2	-	153.1
10	-	103.7	-	105.5	-	105.6	-	105.6	-	105.7	-	105.7	-	106.4	-	106.4	-	106.0
1'	-	121.1	-	121.4	-	121.6	-	121.6	-	121.5	-	121.5	-	122.5	-	122.5	-	123.3
2'	7.88 d (8.8)	128.4	7.91 d (8.8)	128.2	7.89 d (8.1)	128.2	7.92 d (8.9)	128.0	7.92 d (8.9)	128.0	8.25 d (2.1)	114.8	8.25 d (2.1)	114.8	7.88 d (9.0)	114.8	7.88 d (9.0)	128.0
3'	6.95 d (8.8)	115.9	6.96 d (8.8)	115.6	6.95 d (8.6)	115.6	6.96 d (8.9)	115.2	6.96 d (8.9)	115.2	-	147.1	-	147.1	7.05 d (9.0)	147.1	7.05 d (9.0)	114.5
4'	-	161.1	-	161.6	-	161.5	-	161.5	-	161.4	-	161.4	-	151.2	-	151.2	-	162.5
5'	6.95 d (8.8)	115.9	6.96 d (8.8)	115.6	6.95 d (8.6)	115.6	6.96 d (8.9)	115.2	6.96 d (8.9)	115.2	7.72 d (8.2)	117.3	7.72 d (8.2)	117.3	7.05 d (9.0)	117.3	7.05 d (9.0)	114.5
6'	7.88 d (8.8)	128.4	7.91 d (8.8)	128.2	7.89 d (8.1)	128.2	7.92 d (8.9)	128.0	7.92 d (8.9)	128.0	8.26 d (8.2, 2.1)	120.4	8.26 d (8.2, 2.1)	120.4	7.88 d (9.0)	120.4	7.88 d (9.0)	128.0
1''	-	-	5.08 d (7.2)	100.2	m	99.9	5.21 d (7.4)	99.9	5.21 d (7.4)	99.9	5.99 d (7.4)	100.8	5.99 d (7.4)	100.8	-	100.8	-	-
2''	-	-	3.51 m	73.2	m	73.0	m	73.0	m	72.7	m	74.1	m	74.1	-	74.1	-	-
3''	-	-	3.52 m	76.4	m	75.8	3.55 m	75.4	3.55 m	75.4	m	75.8	m	75.8	-	75.8	-	-
4''	-	-	3.43 t (9.2)	69.7	m	71.5	m	71.3	m	71.3	m	72.9	m	72.9	-	72.9	-	-
5''	-	-	3.57 m	76.9	m	75.2	4.20 d (9.7)	75.2	4.20 d (9.7)	75.2	m	77.3	m	77.3	-	77.3	-	-
6''	-	-	3.74 dd (12.1, 5.8)	61.0	-	170.1	-	169.4	-	169.4	m	-	m	-	-	-	-	-
			3.96 dd (12.1, 2.1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6''-OMe	-	-	-	-	-	-	3.82 s	54.4	3.82 s	54.4	-	-	-	-	-	-	-	-
6-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.96 s	-	3.96 s	60.9
7-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.00 s	-	4.00 s	56.3
4'-OMe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.92 s	-	3.92 s	55.5

Chapitre 4

Evaluation des activités biologiques

Evaluation des activités biologiques

Afin de valoriser les résultats phytochimiques des trois espèces étudiées, nous avons cherché à mettre en évidence quels composés isolés possédaient un potentiel biologique.

Les activités anti-oxydante, cytotoxique et antimicrobienne ont été évaluées sur les différents extraits de plantes et sur les composés purs obtenus en quantité suffisante.

III.4.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les tests antimicrobiens ont été réalisés en France, par le Docteur Amin ABEDINI (ATER 2015/2016, ICMR ; Groupe « Isolement-Structure ») dans le laboratoire de Microbiologie de l'UFR de pharmacie de l'URCA en collaboration avec l'unité de recherche EA 4691 "Biomatériaux et Inflammation en site osseux (BIOS)".

Nous avons étudié l'activité antimicrobienne des extraits de chaque plante par méthode de diffusion en milieu solide, suivi par la détermination de la CMI des produits purs isolés. Cette dernière est effectuée en deux étapes, la bioautographie contre la souche *Staphylococcus aureus* et la détermination de la CMI en milieu liquide (voir partie II).

III.4.1.1. Activité antimicrobienne des extraits

Dans notre étude, le potentiel antimicrobien des extraits hydroéthanoliques des plantes *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata* ainsi que l'exsudat et la fraction BuOH de *Savlia barelierri* a été évalué contre 22 microorganismes incluant les bactéries Gram-positif et Gram-négatif ainsi que les levures par l'évaluation de la CMI dans des milieux solides (Tableau III-30). Ceci nous a permis de découvrir le potentiel antimicrobien des extraits à grande échelle.

- **L'extrait hydroéthanolique de *Calendula stellata*:** Une activité antimicrobienne faible à modérée a été observée contre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Streptococcus pyogenes* (CMI=10 mg/mL), néanmoins cet échantillon a montré une activité relativement plus élevée contre *Shigella sonnei* (CMI=1.2 mg/mL). En ce qui concerne l'activité antifongique, cet extrait n'était pas actif contre toutes les levures testées à la concentration de 10 mg/mL.

- **L'extrait hydroéthanolique de *Scabiosa stellata*:** L'activité antibactérienne la plus élevée a été observée contre *Streptococcus pyogenes* (CMI=1.2 mg/mL) et environ deux

fois moins vis-à-vis de *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus epidermidis* (CMI=2.5 mg/mL), tandis qu'une faible activité antimicrobienne a été observée contre *Bacillus subtilis* (CMI=5 mg/mL). En ce qui concerne l'activité antifongique, l'extrait brut s'est montré très actif vis-à-vis de toutes les levures testées (CMI de 2.5 à 5 mg/mL).

- **Exsudat et la fraction butanolique de *Salvia barrelieri*:** Les résultats ont montré une activité très faible pour la fraction *n*-BuOH et l'exsudat. Pour l'exsudat, ceci est dû probablement à la non-solubilité totale de l'exsudat dans le système de solvant (Acétone/EtOH : 75/25).

Tableau III-30. Résultats de la CMI de l'activité antimicrobienne en milieu solide des extraits hydroéthanoliques de *C. stellata* (**E_{Cal}**) et *S. stellata* (**E_{Sca}**), de l'exsudat (**E_{Sal}**) et la fraction butanolique (**B_{uSal}**) de *S. barrelieri*.

Micro-organismes	CMI (mg/mL)				contrôles Positifs CMI (µg/mL)		
	E_{Cal}	E_{Sca}	E_{Sal}	B_{uSal}	G	V	Am
Bactéries Gram positif							
<i>Bacillus subtilis</i>	> 10	5	10	NA	0.12	2	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1034	> 10	> 10	NA	NA	16	> 64	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	10	> 10	NA	NA	0.5	4	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154	10	> 10	NA	NA	4	> 64	NT
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 10	2.5	NA	NA	0.25	4	NT
<i>Micrococcus luteus</i>	10	2.5	NA	10	0.5	4	NT
<i>Listeria innocua</i>	> 10	> 10	NA	NA	0.5	S	NT
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	1.2	10	NA	2	1	NT
Bactéries Gram négatif							
<i>Escherichia coli</i> CIP 54.127	> 10	> 10	NA	NA	S	R	NT
<i>Enterobacter cloacae</i>	> 10	> 10	NA	NA	S	R	NT
<i>Salmonella enterica</i>	> 10	> 10	NA	NA	S	R	NT
<i>Serratia marcescens</i>	> 10	> 10	NA	NA	0.5	> 64	NT
<i>Proteus vulgaris</i>	> 10	> 10	NA	NA	S	R	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 10	> 10	10	NA	> 64	> 64	NT
<i>Providencia stuartii</i>	> 10	> 10	NA	NA	2	> 64	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	> 10	> 10	NA	NA	8	> 64	NT
<i>Shigella sonnei</i>	1.2	> 10	NA	10	0.5	8	NT
Levures							
<i>Candida albicans</i>	> 10	5	NA	NA	> 64	> 64	0.5
<i>Candida glabrata</i>	> 10	2.5	NA	NA	> 64	> 64	0.25
<i>Candida tropicalis</i>	> 10	5	NA	NA	> 64	> 64	0.25
<i>Candida kefyr</i>	> 10	2.5	NA	NA	> 64	> 64	0.25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	> 10	2.5	NA	NA	> 64	> 64	0.5

NA: n'est pas actif, NT: n'est pas testé. Contrôles Positifs : **G**: Gentamicine, **V**: Vancomycine, **Am**: Amphotericine B.

- **Les fractions A-E de *Scabiosa stellata* :**

Nous avons étudié l'activité antimicrobienne des 5 fractions (A, B, C, D et E) issues de la colonne sur résine diaion HP-20 de l'extrait hydroéthanolique de *S. stellata*, en utilisant le test de bioautographie et la méthode de diffusion en milieu solide afin de déterminer la CMI selon le même protocole d'évaluation que celui utilisé pour les extraits hydroéthanoliques.

- Pour la méthode de bioautographie contre la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, nous constatons la présence d'une couleur jaune autour des fractions B et C, et qui contiennent majoritairement les iridoïdes et les composés phénoliques. Ce qui signifie que ces métabolites de cette plante présentent une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*. De plus, les composés apolaires des fractions D et E ont révélé des zones d'inhibition (Figure III-168). Ces observations doivent être vérifiées tout d'abord sur les fractions puis sur les composés purs, par la méthode de diffusion en milieu solide.

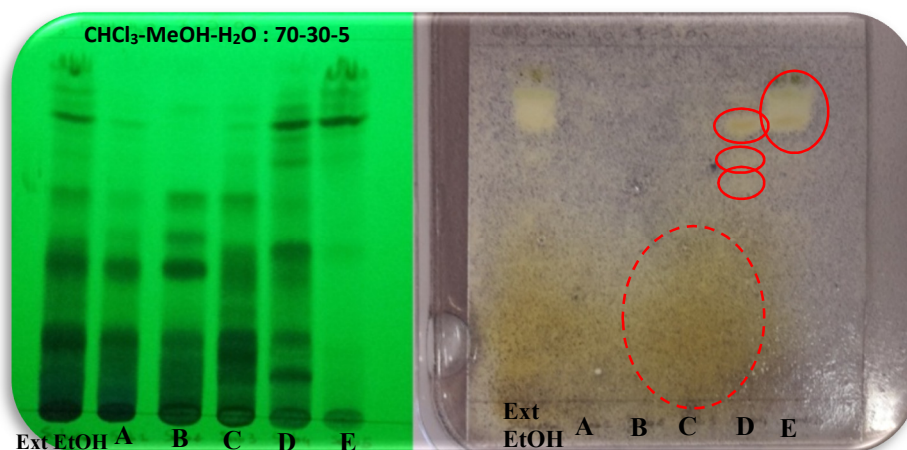


Figure III-168. Bioautographie des fractions A-E de *S. stellata* contre *S. aureus* CIP 53.154.

- Pour la méthode de diffusion en milieu solide, l'activité la plus forte a été mise en évidence pour la fraction C qui était active contre toutes les souches ($CMI \leq 10$ mg/mL) et plus intensément contre les bactéries Gram-positif et les levures, dont les valeurs de la CMI varient entre 1.2 à 2.5 mg/mL. Alors que la fraction B était active contre les levures (CMI de 0.6 à 2.5 mg/mL) et seulement contre les bactéries Gram-positif, sauf contre *Listeria innocua* (CMI > 10 mg/mL) (Tableau III-31). Une activité importante est mise en évidence pour cette fraction contre deux bactéries pathogènes : *S. aureus* 8325-4 et *S. aureus* CIP 53.154 et la levure *Candida albicans* (CMI 0.6 mg/mL vis-à-vis de chaque microorganisme).

Pour les fractions D et E, une activité antibactérienne modérée a été observée vis-à-vis de trois souches Gram positif qui sont *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus* et *Streptococcus pyogenes*

(CMI=5 mg/mL). L'activité antifongique était aussi modérée avec des CMI variant entre 5 et 10 mg/mL.

Tableau III-31. Résultats de la CMI de l'activité antimicrobienne en milieu solide des fractions A-E de *S. stellata*.

Microorganismes	CMI (mg/mL)					CMI (µg/mL)		
	A	B	C	D	E	G	V	Am
Bactéries Gram positif								
<i>Bacillus subtilis</i>	> 10	2.5	2.5	10	> 10	0.12	2	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1034	> 10	1.2	2.5	10	> 10	16	> 64	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	> 10	0.6	1.2	10	> 10	0.5	4	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154	> 10	0.6	1.2	10	> 10	4	> 64	NT
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	1.2	1.2	5	5	0.25	4	NT
<i>Micrococcus luteus</i>	10	1.2	2.5	5	5	0.5	4	NT
<i>Listeria innocua</i>	> 10	> 10	10	> 10	> 10	0.5	S	NT
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	1.2	2.5	5	5	2	1	NT
Bactéries Gram négatif								
<i>Escherichia coli</i> CIP 54.127	> 10	> 10	10	> 10	> 10	≤4	> 64	NT
<i>Enterobacter cloacae</i>	> 10	> 10	10	> 10	> 10	≤4	> 64	NT
<i>Salmonella enterica</i>	> 10	> 10	10	> 10	> 10	≤4	> 64	NT
<i>Serratia marcescens</i>	> 10	> 10	10	> 10	> 10	0.5	> 64	NT
<i>Proteus vulgaris</i>	> 10	> 10	10	> 10	> 10	≤4	> 64	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 10	> 10	10	> 10	> 10	> 64	> 64	NT
<i>Providencia stuartii</i>	> 10	> 10	10	> 10	> 10	2	> 64	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	> 10	> 10	10	> 10	> 10	8	> 64	NT
<i>Shigella sonnei</i>	> 10	> 10	10	> 10	> 10	0.5	8	NT
Levures								
<i>Candida albicans</i>	10	0.6	1.5	5	10	> 64	> 64	0.5
<i>Candida glabrata</i>	10	2.5	2.5	10	10	> 64	> 64	0.25
<i>Candida tropicalis</i>	> 10	1.5	1.5	5	10	> 64	> 64	0.25
<i>Candida kefyr</i>	5	1.2	1.2	5	5	> 64	> 64	0.25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	5	1.2	1.2	5	5	> 64	> 64	0.5

NT: n'est pas testé. Contrôles positifs : G: Gentamicine, V: Vancomycine, Am : Amphotericine B.

III.4.1.2. Activité antibactérienne des produits isolés

III.4.1.2.1. Bioautographie contre *S. aureus*

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des composés purs isolés des trois espèces *C. stellata*, *S. stellata* et *S. barrelieri*, un test de bioautographie a été appliqué sur la souche sensible *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* CIP 53.154). Cette bactérie à cocci Gram positif est fréquemment présente sur la peau et dans les voies respiratoires, et peut être responsable d'infections nosocomiales. Les résultats rassemblés dans le tableau III-32, sont exprimés par rapport au témoin de gentamicine de (-) à (++++), selon les zones d'inhibition observées autour des composés (Figure III-169).

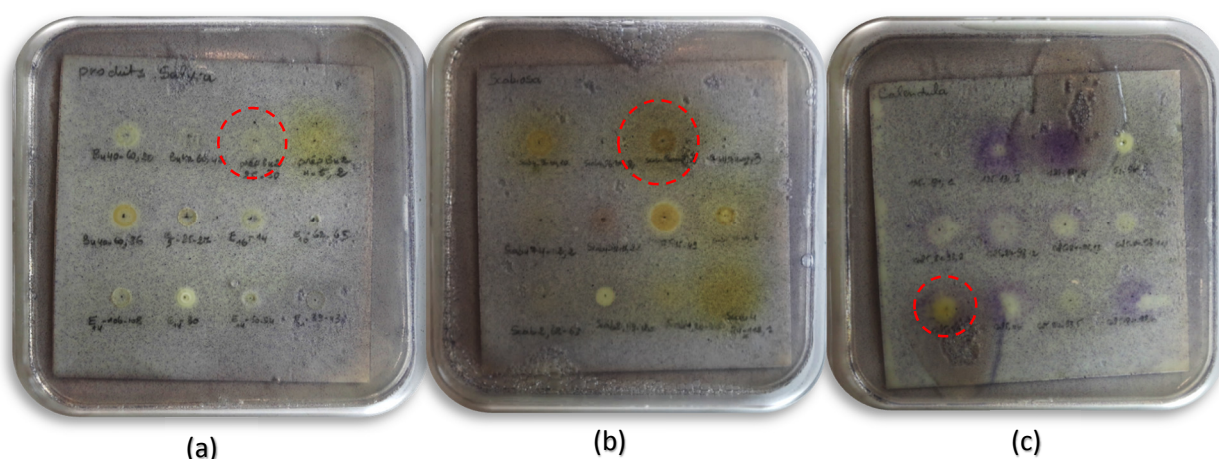


Figure III-169. Bioautographie des composés isolés de *S. barrelieri* (a), *S. stellata* (b) et *C. stellata* (c).

Parmi les composés testés, 23 étaient actifs dont la meilleure activité est observée pour trois saponines de *C. stellata* (Cs2, Cs4 et Cs6), deux iridoïdes de *S. stellata* (Ss31 et Ss36) et deux flavonoïdes de *S. barrelieri* (Sb49 et Sb53). Les autres ont révélé une activité modérée à faible.

Tableau III-32. Résultats de Bioautographie des composés isolés de *C. stellata*, *S. stellata* et

Importance de la zone d'inhibition		Importance de la zone d'inhibition		Importance de la zone d'inhibition	
Composé		Composé		Composé	
Cs2	+++	Ss30	-	Sb45	+
Cs4	+++	Ss31	+++	Sb49	+++
Cs10	+	Ss39	-	Sb48	+
Cs7	+	Ss37	-	Sb44	-
Cs11	+	Ss38	-	Sb46	-
Cs8	++	Ss25	-	Sb47	+
Cs16+ Cs17	++	Ss36	+++	Sb55	+
Cs12	+	Ss41	++	Sb53	+++
Cs3	-	Ss42	+	Sb50	++
Cs15	+	Ss35	++	Sb51	-
Cs14	-	Ss22	-	Sb52	+
Cs6	+++			Sb54	+

S. barrelieri contre *Staphylococcus aureus* CIP 53.154.

« +++ » = très actif ; « ++ » = actif modéré ; « + » = actif ; « - » = non actif.

III.4.1.2.2. Détermination de la CMI en milieu liquide

Pour mesurer la CMI des composés actifs, une méthode de dilution en série a été utilisée contre trois bactéries Gram positif (*Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus*

CIP 53.154 et *Staphylococcus epidermidis*) et deux bactéries Gram négatif (*Escherichia coli* CIP 54.127 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Les CMI obtenues variaient de 15.1 µg/mL à la concentration limite de 500 µg/mL.

- **Les composés isolés de *C. stellata*** : La meilleure activité inhibitrice a été trouvée pour les deux saponines monodesmosides, qui sont le composé **Cs9** contre *E. faecalis* (CMI 31.2 mg/mL) et le **Cs8** contre *S. epidermidis* (CMI 62.5 mg/mL). Les composés **Cs2** et **Cs19** étaient modérément actifs contre les cinq bactéries testées avec des CMI variant entre 125 à 250 mg/mL. Les composés **Cs2**, **Cs7** et **Cs8** possèdent la même partie aglycone (acide oléanolique) et diffèrent par la nature de la partie osidique liée en C-3, une chaîne disaccharide dans **Cs2** et **Cs7** [gal(1→3)glc] et trisaccharide en **Cs8** [glc(1→2) – (gal (1→3)-glc)]. Le bidesmoside **Cs2** est légèrement plus actif que le monodesmoside **Cs7** contre *E. coli* et *S. epidermis* (Tableau III-32). Ainsi, la nature de la partie saccharidique peut influencer sur l'activité antibactérienne. La comparaison de l'activité des composés **Cs2** et **Cs5**, indique que le groupe malonyle dans **Cs3** n'est pas favorable pour l'activité antibactérienne.

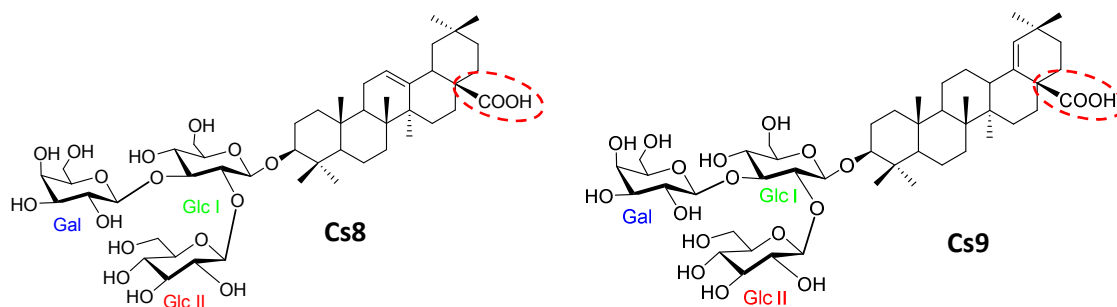


Tableau III-33. Activité antibactérienne (CMI) des produits isolés de *C. stellata*.

Composés	CMI (µg/mL)				
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 1054)	<i>S. aureus</i> (CIP53.154)	<i>E. coli</i> (CIP 54.127)	<i>S. epidermis</i>	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC9027)
Cs2	125	250	250	125	125
Cs4	500	500	NA	500	NA
Cs5	250	500	500	500	500
Cs6	250	250	NA	250	250
Cs7	125	250	500	500	125
Cs8	250	500	NA	62.5	250
Cs9	31.2	250	500	250	125
Cs15	500	500	NA	NA	250
Cs19	125	250	500	125	125

- **Les composés isolés de *S. stellata*** : Les résultats ont montré un effet inhibiteur important des composés **Ss35** et **Ss36** sur la croissance des bactéries *E. faecalis* et *S. epidermidis*, qui ont donné la même CMI= 31.2 µg/mL et un effet moindre sur *S. aureus* (CMI

62.5 µg/mL). Le composé **Ss30** présentait un bon effet inhibiteur contre *E. faecalis* et *S. aureus* (CMI 62.5 µg/mL). Seul le composé **Ss33** a montré une activité antibactérienne contre *E. coli* et *S. aureus* (CMI 62.5 µg/mL). Les composés **Ss32**, **Ss34**, **Ss38** et **Ss41** ont montré une faible activité contre les cinq bactéries testées avec des valeurs de CMI allant de 125 à 500 µg/mL (tableau III-34).

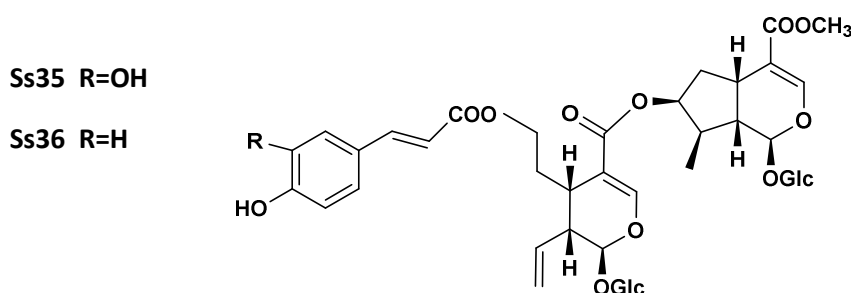
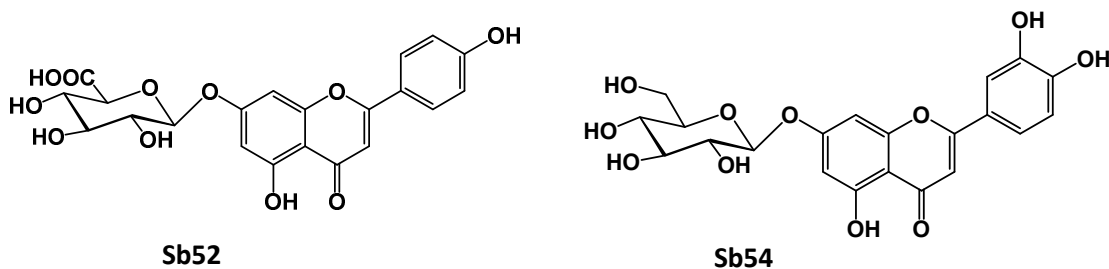


Tableau III-34. Les valeurs des CMI des produits isolés de *S. stellata*.

Composés	CMI (µg/mL)				
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 1054)	<i>S. aureus</i> (CIP53.154)	<i>E. coli</i> (CIP 54.127)	<i>S.</i> <i>epidermis</i>	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC9027)
Ss30	62.5	62.5	125	250	125
Ss32	125	250	125	125	125
Ss33	500	62.5	62.5	125	125
Ss34	125	250	500	250	250
Ss35	31.2	62.5	250	31.2	125
Ss36	31.2	62.5	125	31.2	125
Ss38	250	250	125	125	125
Ss41	250	250	500	250	125
Ss42	125	125	NA	125	62.5

- **Les composés isolés de *S. barrelieri*** : Les résultats ont montré que le composé **Sb10** est le plus actif contre *P. aeruginosa* (CMI 15.1 µg/mL), *E. faecalis*, *S. epidermidis* et *E. coli* (CMI 31.2 µg/mL). Le composé **Sb54** était également actif contre ces quatre bactéries (CMI 31.2 µg/mL). Les triterpènes **Sb44-Sb49** étaient moins actifs que les flavonoïdes **Sb52** et **Sb54**. Seul le composé **Sb48** a montré une activité antibactérienne élevée contre *E. faecalis* (CMI 31.2 µg/mL). Le composé **Sb45** a également montré une bonne activité antibactérienne contre les cinq bactéries testés (CMI 62.5-125 µg/mL) (Tableau III-35). Une activité antibactérienne faible a été obtenue avec les composés **Sb49** et **Sb53** contre toutes ces bactéries testées, dont les valeurs des CMI varient entre 125-250 µg/mL.

**Tableau III-35.** Activité antibactérienne (CMI) des produits isolés de *S. barrelieri*.

Composés	CMI ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 1054)	<i>S. aureus</i> (CIP53.154)	<i>E. coli</i> (CIP 54.127)	<i>S. epidermis</i>	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC9027)
Sb45	125	62.5	125	62.5	62.5
Sb48	31.2	125	500	250	125
Sb49	125	250	250	125	250
Sb51	>500	>500	>500	>500	500
Sb52	31.2	125	31.2	31.2	15.1
Sb53	500	125	500	500	250
Sb54	31.2	250	31.2	31.2	31.2

III.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante

Notre choix s'est porté sur la mesure de la capacité d'un produit à céder un radical hydrogène H^{\bullet} au radical DPPH^{\bullet} . C'est une méthode simple, rapide et souvent utilisée pour rechercher l'activité anti-radicalaire de composés purs ou d'extraits.

Les tests au DPPH ont été réalisés dans des plaques à 96 puits à 37°C avec 5 concentrations différentes (200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ et 5 $\mu\text{g/mL}$). L'acide ascorbique et la quercétine ont été utilisés comme témoins positifs. La lecture de l'absorbance à 515 nm s'est faite après une heure de réaction.

Ci-dessous, un tableau récapitulatif des IC_{50} (concentration qui permet d'avoir 50% d'activité) des produits et extraits testés.

Tableau III-36. Valeurs des IC₅₀ de l'activité antioxydante des extraits et produits par la méthode de DPPH.

	Extraits et produits testés	Activité antioxydante IC ₅₀ (µg/mL)
Contrôles positifs	Acide ascorbique	6.3±0.8
	Quercétine	16.0±0.3
<i>Calendula stellata</i>	Ext EtOH	138.0±1.1
	B (25% MeOH)	30.0±0.7
	C (50% MeOH)	22.0±1.5
	D (75% MeOH)	30.0±1.2
<i>Scabiosa stellata</i>	Ext EtOH	86.0±1.8
	A (100% H ₂ O)	133.0±2.6
	B (25% MeOH)	48.7±1.1
	C (50% MeOH)	25.0±0.8
	D (75% MeOH)	64.3±1.5
	E (100% MeOH)	-
	Ss38	7.1±0.4
	Ss37	7.2±0.4
	Ss 39 (=Cs19)	8.5±0.8
Ss41	16.0±0.6	
<i>Salvia barrelieri</i>	Fraction BuOH	50.1±1.1
	Exsudat	-
	Sb52	79.1±1.3
	Sb54	21.2±0.7

- **Extraits et fractions** : Pour les extraits et les fractions, l'activité antioxydante la plus élevée a été observée avec les deux fractions C (50% MeOH) de *C. stellata* et *S. stellata* (IC₅₀=22 et 25 µg/mL, respectivement) qui sont riches en composés phénoliques et majoritairement des flavonoïdes. tandis qu'une moyenne activité a été observée pour les fractions B et D de *C. stellata* avec une valeur d'IC₅₀=30 µg/mL. Les autres fractions et extraits ont montré une faible activité dont les valeurs d'IC₅₀ varient de 48 à 138 µg/mL.

- **Les produits isolés de *S. stellata*** : Les deux flavonoïdes Isoorientine (**Ss37**) et Swertiajaponine (**Ss38**) sont les plus antioxydants des produits testés de *S. stellata*, avec une valeur d'IC₅₀ de 7 µg/mL. Ces deux derniers présentent une similitude de position et type du sucre. Les deux portent un glucose en position 6 (C-glycosylation). Il est possible d'assimiler cette augmentation d'activité à la présence de deux groupements hydroxyles sur le cycle B.

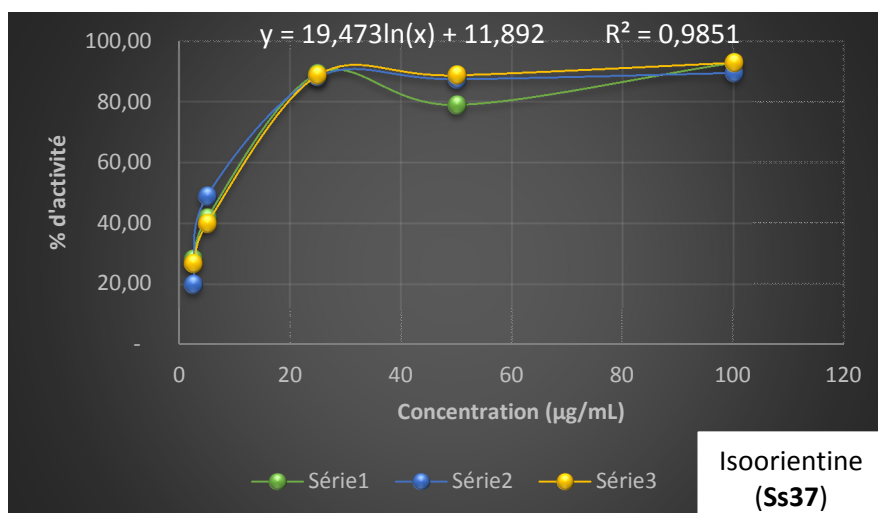
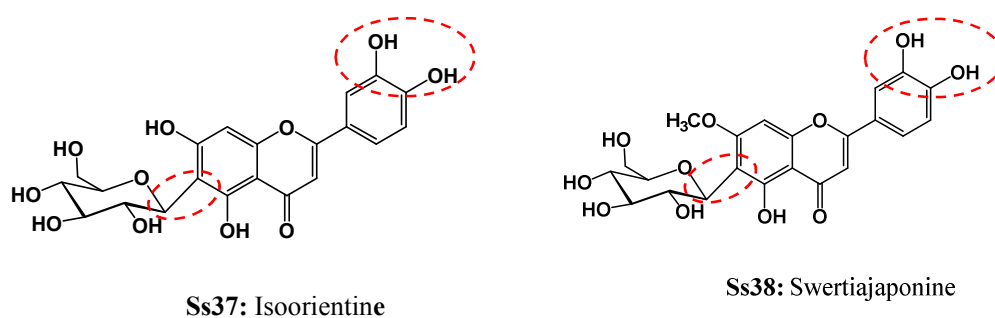
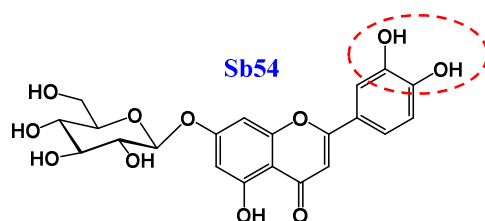


Figure III-170. Courbes de pourcentage d'inhibition de DPPH par l'isoorientine (**Ss37**).

En revanche, l'hyperine (**Cs19** et **Ss39**) retrouvée dans *C. stellata* et *S. stellata* présente une bonne activité antioxydante mais moins intense ($IC_{50} = 8.5 \mu\text{g/mL}$) par rapport aux produits cités précédemment. Néanmoins, elle présente une meilleure activité que les témoins positifs, et contient notamment un *O*-galactose en position 3.

Malgré l'absence de la structure de base d'un flavonoïde dans l'acide dicaféoylquinique (**Ss41**), il possède une valeur IC_{50} égale à celle de la quercétine ($IC_{50} = 16 \mu\text{g/mL}$). Cependant, son activité reste inférieure aux flavonoïdes cités précédemment.

- **Les produits isolés de *S. barrelieri*** : Parmi les flavonoïdes (**Sb50-Sb55**) isolés de *S. barrelieri*, seuls les composés **Sb52** et **Sb54** ont révélé une activité moyenne à bonne (IC_{50} 79.1 et 21.2 $\mu\text{g/mL}$, respectivement) par rapport à l'acide ascorbique. Les cinq autres composés ont montré une activité antiradicalaire faible ou nulle (Tableau III-36).



III.4.3. Evaluation de l'activité antiproliférative

Les composés isolés de structures nouvelles des trois espèces présentes ont été soumis à une évaluation de leur activité cytotoxique.

L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses a été évaluée selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthodes contre quatre lignées cellulaires : deux types du cancer du sang (HL60 et K562), cancer du poumon (A549) et un type rare du cancer des os (HT1080). Le test a été réalisé en triplicate et les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux III-37 et III-38.

Tableau III-37. Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de *S. barrelieri*.

Composés	IC ₅₀ (µM)		
	HT1080	HL60	K562
Sb44	28.75±0.4	>100	>100
Sb45	50±0.9	54±1.8	85±1.6
Sb47	>100	42±0.6	82±1.4
Sb49	37.5±0.6	52±0.9	82±1.0
Doxorubicin*	0.059±02	-	-
Camptothecin*	-	0.25±0.03	0.30±0.05

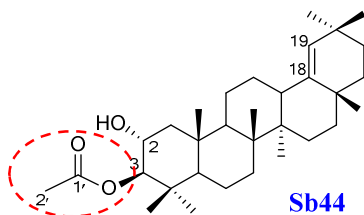
- : non testé. *: contrôles positifs.

Tableau III-38. Résultats de la viabilité cellulaire par le test au MTT des molécules de *C. stellata* et *S. stellata*.

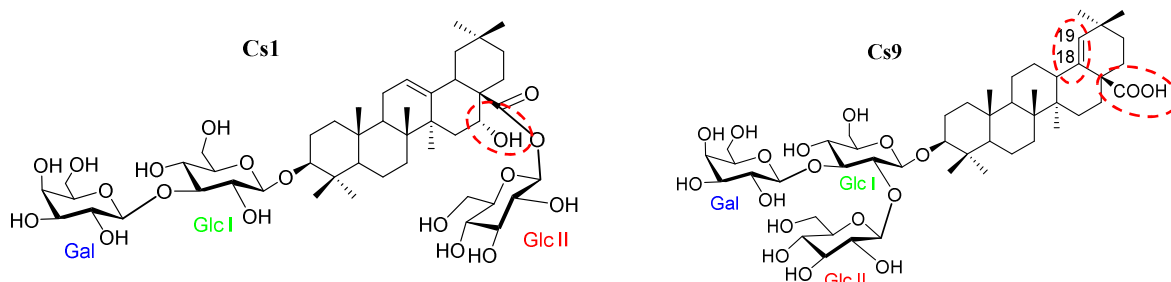
Composés	IC ₅₀ (µM)	
	HT1080	A549
Cs1	47±0.6	>50
Cs3	>50	>50
Cs5	>50	>50
Cs9	39±0.5	>50
Cs13	>50	>50
Ss21	>50	-
Ss22	>50	-
Ss23	40±0.8	-
Ss24	49±1.0	-
Ss25	>50	-
Ss26	40±0.7	-
Ss27	>50	-
Ss28	38±0.8	-
Ss29	12±0.2	-
Ss35	35.9±0.7	-
Ss36	>50	-
Doxorubicin*	0.059	0.026

Cs: *Calendula stellata*, Ss: *Scabiosa stellata*, -: non testé, *: contrôle positif.

- Pour les produits isolés de *S. barrelieri*, les composés **Sb45**, **Sb47** et **Sb49** ont montré une activité cytotoxique modérée contre HL60 (IC_{50} 54.0, 42.0, 52.0 μ M, respectivement) et faible contre les lignées cellulaires K562 (CI_{50} 85.0, 82.0, 82.0 μ M, respectivement). Le composé **Sb44** a montré une bonne activité cytotoxique contre HT1080 (IC_{50} 28.75 μ M), alors que les composés **Sb45** et **Sb49** ont montré une activité cytotoxique modérée à faible contre HT1080 avec les valeurs d' IC_{50} 50 et 37.5 μ M, respectivement.



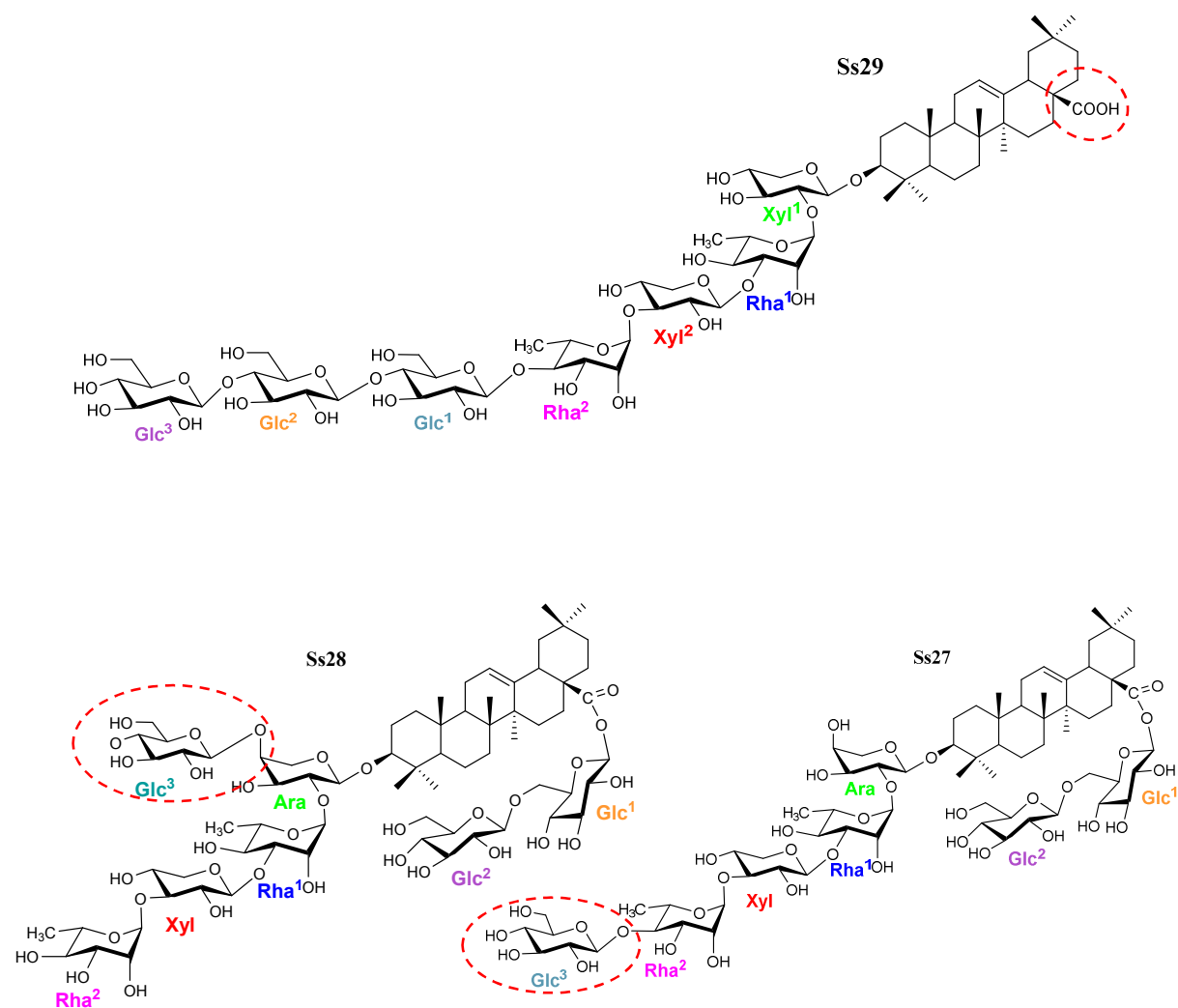
- L'activité cytotoxique des cinq nouveaux composés isolés de *C. stellata* a été évaluée contre les deux lignées cellulaires tumorales, le fibrosarcoma (HT1080) et le cancer du poumon humain (A549). Le **calendustellatoside B (Cs1)** et **D (Cs9)** présentent une faible activité cytotoxique contre la lignée cellulaire fibrosarcoma HT1080 avec valeurs IC_{50} de 39 et 47 μ M, respectivement. **Calendustellatosides A-E** n'ont pas été actifs ($IC_{50} > 50$ μ M) contre la lignée cellulaire de cancer du poumon (A549).



- Parmi les saponines de *S. stellata* testées, le monodesmoside **Ss29** présente la meilleure activité antiproliférative (IC_{50} 12.0 μ M). Les bidesmosides **Ss24**, **Ss26** et **Ss28** sont moins actifs (IC_{50} 49.0, 40.0 et 38.0 μ M, respectivement). Le dérivé d'acide asiatique (**Ss22**) révèle également une faible cytotoxicité (CI_{50} 40 μ M). Les composés **Ss21**, **Ss23** et **Ss25** n'ont montré aucune activité à la concentration de 50 μ M.

La comparaison des valeurs des IC_{50} de composés **Ss24** et **Ss26** avec ceux de **Ss23** et **Ss25** suggèrent que l'activité cytotoxique peut être liée à la nature du sucre attaché en C-3 de l'aglycone ; xylose en **Ss24** et **Ss26** et arabinose en **Ss23** et **Ss27**. Une autre comparaison des

valeurs IC_{50} des composés **Ss27** et **Ss28** qui portent un arabinose attaché en C-3 de la génine suggère que la présence d'une chaîne ramifiée en **Ss28** (IC_{50} 38.0 μ M) est plus favorable à l'activité cytotoxique qu'une chaîne linéaire en **Ss27**.



Conclusion générale

Conclusion générale

A l'issue de l'étude phytochimique menée sur les trois espèces : *Calendula stellata* Cav. (Asteraceae), *Scabiosa stellata* L. (Caprifoliaceae) et *Salvia barrelieri* Etl. (Lamiaceae), **55** composés ont été isolés dont **16** correspondant à des structures nouvellement décrites. Leur purification est réalisée à l'aide de différentes méthodes chromatographiques sur support solide, ou liquide dans le cas de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).

L'identification structurale a été réalisée par l'analyse combinée des données spectrales obtenues par des méthodes spectroscopiques de RMN mono et bidimensionnelle, IR et UV et de spectrométrie de masse (ESIMS et HRESIMS), par la mesure des pouvoirs rotatoires, ainsi que par la comparaison avec les données de la littérature.

Les composés isolés et identifiés appartiennent à cinq familles de métabolites secondaires différentes :

- **27** saponosides dont **13** nouveaux.
- **7** mono et bis-iridoïdes dont **2** dimères originaux.
- **7** triterpènes dont **1** nouveau.
- **12** flavonoides.
- **2** dérivés de l'acide chlorogénique.

L'investigation phytochimique de la plante entière *Calendula stellata* Cav. (Asteraceae), nous a conduit à l'isolement et à la détermination structurale de **20** métabolites naturels : **18** saponines (**Cs1-18**) et **2** flavonoïdes (**Cs19-20**).

Parmi les nouveaux saponosides isolés (**Calendustellatoside A-E**), nous pouvons mentionner deux glycosides de l'acide échinocystique. Les autres saponosides de structure nouvelles sont des dérivés de l'acide oléanolique, l'acide morolique et l'acide 29-hydroxyoléanolique.

Les saponosides connus sont majoritairement des glycosides de l'acide oléanolique, qui sont fréquemment rencontrés chez les soucis, dont **3** seulement sont identifiées pour la première fois dans le genre *Calendula*. Un glycoside de l'acide machaérique est également

nouveau dans ce genre, de plus un glycoside de l'acide échinocystique est isolé dans ce travail pour la deuxième fois dans le règne végétal.

Ces saponines sont des monodesmosides ou bidesmosides dont la partie osidique est constituée de deux à quatre sucres :

La chaîne osidique « ester » des bidesmosides est réduite à une seule unité de β -D-glucose. Alors que deux types d'enchaînement osidique sont rencontrés, selon la nature du sucre directement lié en position 3 de la génine (série glucuronide et série glucoside). Ces chaînes sont constituées de un à trois unités de sucres.

Nos travaux personnels sur l'espèce *Scabiosa stellata* mènent à l'obtention de **23** composés, appartenant à cinq classes de métabolite : **9** saponines (**Ss21-29**) dont **8** (**Ss22-29**) sont décrites pour la première fois dans la littérature, **3** mono-iridoïdes (**Ss30-32**), **4** bis-iridoïdes (**Ss33-36**) dont **2** nouveaux (**Ss35-36**), **4** flavonoïdes (**Ss37-39**, **Ss42**) et **2** dérivés de l'acide chlorogénique (**Ss40-41**) et **1** triterpène (**Ss43**).

Seulement trois genres de génine constituent les saponosides isolées de *Scabiosa stellata*, l'hédéragénine, l'acide asiatique et l'acide oléanolique. Ce sont des saponosides bidesmosidiques et un seul monodesmoside de structure complexe, avec une chaîne osidique liée à la génine en position 3 comportant de quatre à six unités osidiques, disposées de façon linéaire. La chaîne osidique en C-28 comporte ici deux sucres, la chaîne disaccharide [β -D-glucose-(1→6)- β -D-glucose].

La méthode moderne de dériplcation des composés majoritaires « CARAMEL » appliquée sur les fractions générées de la CPC de *Scabiosa stellata* a donné des résultats satisfaisants. En effet cette étude nous a permis d'identifier directement 11 composés connus dans cette plante. De plus, la purification réalisée par la suite était sélective grâce aux informations obtenues dans les clusters présents dans chaque fraction. Ceci nous a conduit à l'isolement de 12 composés parmi lesquels 2 bis-iridoïdes de nouvelles structures. Certains de ces composés ont été déjà caractérisés par la méthode « CARAMEL », on signale également que 3 iridoïdes ont été isolés pour la première fois dans le genre *Scabiosa*.

Suite aux travaux réalisés sur les racines de *Salvia barrelieri* Etl, nos investigations sur les parties aériennes de cette plante ont abouti à l'isolement de **12** composés : **6** triterpenoïdes pentacycliques (**Sb44-49**), dont **1** seul nouveau (**Sb44**), et **6** flavonoïdes (**Sb50-55**).

Les activités biologiques des extraits et de certains composés isolés purs ont été étudiées. Parmi les composés testés, deux mono-iridoïdes et deux flavonoïdes de *S. stellata* possèdent une activité anti-radicalaire importante (CI_{50} entre 7 et 16 μM). Les tests biologiques menés en bactériologie ont montré une activité antibactérienne importante de quatorze composés avec des valeurs de CI_{50} comparables aux antibiotiques (entre 15 et 125 $\mu\text{g/ml}$). Tous les nouveaux composés ont montrés une cytotoxicité modérée (faible à moyenne) contre les cellules cancéreuses testés (HT1080, A549, HL60, K562) dont les valeurs des CI_{50} varient entre 28 et 85 μM , à l'exception du monodesmoside (Scabiostellatoside F) obtenu de *S. stellata*, qui présente un bon effet antiproliférative contre HT1080 ($CI_{50} = 12 \mu\text{M}$).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdallah, M. A., 1991. Phenolic glucoside and other constituents of *Dipsacus laciniatus*. *Phytochemistry* 30, 2805-2806.
- Abedini, A., Chollet, S., Angelis, A., Borie, N., Nuzillard, J.M., Skaltsounis, A.L., Reynaud, R., Gangloff, S.C., Renault, J.H., Hubert, J., 2016. Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1029 (1030), 121-127.
- Acebey-Castellon, L., Voutquenne-Nazabadioko, L., Doan Thi Mai, H., Roseau, N., Boutaghane, N., Muhammad, D., Le MagrexDebar, E., Gangloff, S.C., Litaudon, M., Sevenet, T., Hung, N.V., Lavaud, C., 2011. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *J. Nat. Prod.* 74(2), 163-168.
- Addisonia., (1954-1959). Addisonia colored illustrations and popular descriptions of plants, the New York Botanical Garden. vol 23 (1), P 15.
- Ageta, H., Ageta, T., 1984. Erecaseous constituents : Seventeen triterpenoids isolated from the buds of *Rhododendro macrocephalum*. 32(1), 369-372.
- Ahmed, B., Khan, R.A., Al-Howiriny, T.A., Al-Rehaily, A.J., 2010. Osteosaponins 1 and 2: two new saponin glycosides from *Osteospermum vaillantii*. *Nat. Prod. Res.* 24, 1258-1267.
- Akimaliev, A., Alimaeva, P. K., Mzhel'skaya, L. G., Abubakirov, N.K., 1976a. Triterpene glycosides of *Scabiosa soongorica* II. The structure of songorosides C, G and I. *Khim. Prir. Soedin.* 4, 472-476.
- Akimaliev, A., Alimaeva, P. K., Mzhel'skaya, L. G., Abubakirov, N.K., 1976b. Triterpene glycosides of *Scabiosa soongorica* III. The structure of songorosides M and O. *Khim. Prir. Soedin.*, 476-479.
- Akimaliev, A., Puteiva, Z.M., Alimaeva, P. K., Abubakirov, N.K., 1988. Triterpene glycosides of *Scabiosa soongorica* V. β -sitosterol β -D-glucopyranoside and songoroside A. *Khim. Prir. Soedin.*, 6, 885-886.
- Alabdul Magid, A., 2005. Étude chimique de deux *Caryocar* de Guyane et d'un *Guioa* de Nouvelle Calédonie. Thèse de doctorat en pharmacie. France.
- Alabdul Magid, A., Voutquenne, L., Moretti, C., Long, C., Lavaud, C., 2006. Triterpenoid Saponins from the Fruits of *Caryocar glabrum*. *J. Nat. Prod.* 69, 196-205.
- Allen, D.E., Hatfield, G., 2004. Medicinal plants in folk tradition: an ethnobotany of Britain & Ireland. Timber Press, Portland-Cambridge.

- Al-Qudah, M.A., Ootom, N.K., Al-Jaber H.I., Saleh, A.M., Abu Zarga, M.H., Afifi, F.U., Abu Orabi, S.T., 2017. New flavonol glycoside from *Scabiosa prolifera* L. aerial parts with in vitro antioxidant and cytotoxic activities, *Nat Prod Res*, 31(24), 2865-2874.
- Altinier, G., Sosa, S., Aquino, R., Mencherini, T., Della Loggia, R., Tubaro, A., 2007. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1718-1723.
- Arora, D., Rani, A., Sharma, A., 2013. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacogn. Rev.* 7, 179-187.
- Asolkar, L.V., Kakkar, K.K., Chakre O.J., 1992. Part-1. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research. Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles. p153.
- Baba Aïssa, F., 1991 : Les plantes médicinales en Algérie (identification, description, principes actifs, propriétés et usage traditionnels des plantes communes en Algérie), Edition Bouchéne et Ad. Diwan, Alger.
- Babae, N., Moslemi, D., Khalilpour, M., Vejdani, F., Moghadamnia, Y., Bijani, A., Baradaran, M., Kazemi, M.T., Khalilpour, A., Pouramir, M., Moghadamnia, A.A., 2013. Antioxidant capacity of *Calendula officinalis* flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers : a randomized controlled clinical study. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 21, 18-24.
- Baillon, H., 1880. Histoire des plantes. Vol 7. Paris-france.
- Baillon, H., 1886. Histoire des plantes. Vol 8. Paris-france.
- Bakiri, A., Plainchont, B., Emerenciano, V. de P., Reynaud, R., Hubert, J., Renault, J.H., Nuzillard, J.M., 2017. Computer-aided dereplication and structure elucidation of natural products at the University of Reims. *Mol. Inf.* 36, 1700027-1700036.
- Bakó, E., Deli, J., Tóth, G., 2002. HPLC study on the carotenoid composition of *Calendula* products. *J Biochem Biophys Methods.* 53, 241-50.
- Bammi, J., Douira, A., 2002, Medicinal plants of the achach forest in Morocco. *Acta Botanica Malacitana.* 27, 131-145.
- Battendier, J.A., 1988. Flore de l'Algérie. Ancienne "Flore d'Alger" transformée, contenant la description de toutes les plantes signalées jusqu'à ce jour comme spontanées en Algérie. "Dicotylédones", 1^{er} fascicule. Paris-France.
- Baudoux, M., Garnaud d'Ersu, V., Couplan, F., Desgranges, T., Macé, I., 2005. Larousse Plantes aromatiques et médicinales. Paragramme. Paris.
- Baykal, T., Panayir, T., Tasdemir, D., Sticher, O., Çalis I., 1998. Triterpene saponins from *Scabiosa rotata*. *Phytochemistry* 48, 867- 873.

- Besbes, M., Omri, A., Cheraif, I., Daami, M., Ben Jannet, H., Mastouri, M., Aouni, M., Selmi, B., 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Scabiosa arenaria* Forssk. Growing Wild in Tunisia. *Chem biodiv.* 9, 829-839.
- Búfalo, J., Cantrell, C.L., Jacob, M.R., Schrader, K.K., Tekwani, B.L, Kustova, T.S., Ali, A., Boaro, C-S. F., 2016. Antimicrobial and antileishmanial activities of diterpenoids isolated from the roots of *Salvia deserta*. *Planta Med.* 82, 131-137.
- Burasheva, G.S.H., Mukhamedyarova, M.M., Chumbalov, T.K., 1975. Flavonoids of *Alhagi kirgisorum*. *Chem Nat Comp.* 11:261–261.
- Bussmann, R.W., Malca-García, A., Glenn, D., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirr, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frías-Fernandez, F., Benito, M., 2010. *J. Ethnopharmacol.* 132, 101-108.
- Çalis, I., Irsoz, T., 1992. Septemfidocide: a new bis-iridoid diglucoside from *Gentiana septemfida*. *J. Nat. Prod.* 55, 385-388.
- Carillon, A. 2009. Place de la phytothérapie dans les systèmes de santé au XXI^os.
- Cavanilles, P., José, A., 1791. *Icones et descriptiones plantarum*. Vol 1, table 5, 76.
- Ćetković, G.S, Dilas, S.M., Brunet, J.M., Tumbas, V.T., 2003. Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L) extracts. *Acta Periodica Technologica.* 34, 93-102.
- Chemli, R., Babadjamian, A., Faure, R., Boukef, K., Balansard, G., Vidal E., Arvensoside A and B, triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. *Phytochemistry.* 26, 1785-1788.
- Cheng-Ning Leong, A., KInjo, Y., Tako, M., Iwasaki, H., Oku, H., Tamaki, H., 2010. Flavonoid glycosides in the shoot system of Okinawa Taumu (*Colocasia esculenta* S.). *Food Chem.* 119, 630-635.
- Chisholm, M.J., Hopkins, C.Y., 1967. Calendic acid in seed oils of the genus *Calendula*. *Can J Biochem.* 45, 251-254.
- Christopoulou, C., Graikou, K., Chinou, I., 2008. Chemosystematic value of chemical constituents from *Scabiosa hymettia* (Dipsacaceae). *Chem. Biodiv.* 5, 318-323.
- Cordova, C.A., Siqueira, I.R., Netto, C.A., Yunes, R.A., Volpato, A.M., Cechine, F.V., Curi-Pedrosa, R., Creczynski-Pasa, T.B., 2002. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. *Redox Rep.* 7(2), 95-102.
- D'Ambrosio, M., Ciocarlan, A., Colombo, E., Guerriero, A., Pizza, C., Sangiovanni, E., Dell'Agli, M., 2015. Structure and cytotoxic activity of sesquiterpene glycoside esters from

- Calendula officinalis* L. : Studies on the conformation of viridiflorol. *Phytochemistry*. 117, 1-9.
- Delamethrie, J.C., 1799. *Journal de physique, de chimie, d'histoire naturelle et des arts*. Vol 49. Paris-France.
- Della, L.R., 1990. Topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* extracts. *Planta Med.* 56, 658-658.
- Della, L.R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, S., Isaac, O., 1994. The role of triterpenoids in topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60, 516-520.
- Dupont, F., Guignard, J.L., 2012. *Botanique, les familles de plantes*. 15ed. France.
- El-Hassani, M., Douiri, E. M., Bammi, J., Zidane, L., Badoc, A., Douira, A., 2013. Plantes médicinales de la Moyenne Moulouya (Nord-Est du Maroc), *ethnopharmacologia*, 50, 39-53.
- Elias, R., De Méo, M., Vidal-Ollivier, E., Laget, M., Balansard, G., Dumenil, G., 1990. Antimutagenic activity of some saponins isolated from *Calendula officinalis* L., *C. arvensis* L. and *Hedera helix* L. *Mutagenesis*. 5, 327–331.
- Esquivel, B., Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Nieto-Camacho, A., Ramírez-Apan, T., Joseph-Nathan, P., Quijano, L., 2017. Structure, absolute configuration, and antiproliferative activity of abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia ballotiflora*. *Molecules*. 22 (10), 1690-1690.
- Farimani, M.M., Abbas-Mohammadi, M., Esmaeili, M.A., Salehi, P., Nejad-Ebrahimi, S., Sonboli, A., Hamburger, M., 2015. Seco-ursane-type triterpenoids from *Salvia urmiensis* with apoptosis-inducing activity. *Planta Med.* 81, 1290–1295.
- Farimani, M.M., Abbas-Mohammadi, M., 2016. Two new polyhydroxylated triterpenoids from *Salvia urmiensis* and their cytotoxic activity. *Nat. Prod. Res.* 30 (23), 2648-2654.
- Fleurentin, J., Pelt, J., Mazars, G., 2002. *Des sources du savoir aux médicaments du futur*. IRD Editions.
- Fonseca, Y.M., Catini, C.D., Vicentini, F.T., Nomizo, A., Gerlach, R.F., Fonseca, M.J., 2010. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *J Ethnopharmacol.* 127(3), 596-601.
- Garaev, E. A., Movsumov, I.S., Isaev, M.I., 2008. Flavonoids and oleanolic acid from *Scabiosa caucasica*. *Chem. Nat. Compd.* 44, 520-521.

- Ghorbani, A., 2005. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran (Part 1): General results. *J Ethnopharmacol.* 102 (1), 58-68.
- Gohari, A.R., Ebrahimi, H., Saeidnia, S., Foruzan, M., Ebrahimi, P., Ajani, Y., 2011. Flavones and flavone glycosides from *Salvia macrosiphon* Boiss. *Iran J Pharm Res.* 10, 247-251.
- Gorai, D., Jash, S.K., Roy, R., 2016. Ursane's of the genus *Salvia*. *Indo Am J Pharm Res.* 6, 4242-4253.
- Greuter, W., 1991. Botanical diversity, endemism, rarity, and extinction in the Mediterranean area: An analysis based on the published volumes of Med-Checklist. *Botanical Chronicles* 10: 63–79.
- Günter, M., Dawit, A., Bucar, F., Debella, A., Kunert, O., Schmid, M.G., Mulatu, E., Haslinger, E., 2000. New triterpenoid saponins from *Achyranthes aspera* Linn. *Helvetica Chimica Acta.* 83, 359-363.
- Habibi, Z., Cheraghi, Z., Ghasemi, S., Yousefi, S., 2012. A new highly hydroxylated triterpene from *Salvia atropatana* Bunge. *Nat Prod Res.* 26, 1910-1913.
- Hamad, M.N., Mohammed, H.J., Merdaw, M.A., 2011. Antibacterial activity of *Calendula officinalis* flowers in vitro. *J. Pure & Appl Sci,* 24(3), 1-7.
- Hamburger, M., Adler, S., Baumann, D., Forg, A., Weinreich, B., 2003. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia* 74, 328-338.
- Han, X.H., Hong, S.S., Hwang, J.S., Lee, M.K., Hwang, B.Y., Ro, J.S., 2007. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Arch Pharm Res.* 30, 13-17.
- Heywood, V.H., 2007. Flowering plant families of the world. Entareo. Canada.
- Hlila, B.M., Mosbah, H., Mssada, K., Jannet, H.B., Aouni, M., Selmi, B., 2015. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. *Ind. Crops Prod.* 67, 62-69.
- Hlila, B.M., Mosbah, H., Majouli, K., Ben Nejma, A., Ben Jannet, H., Mastouri, M., Aouni, M., Selmi, B., 2016. Antimicrobial activity of *Scabiosa arenaria* Forssk. extracts and pure compounds using bioguided fractionation. *Chem. Biodiv.* 13, 1262-1272.
- Horn, M.M., Drewes, S.E., Brown, N.J., Munro, O.Q., Marion Meyer, J.J., Mathekga, A-D.M., 2001. Transformation of naturally-occurring 1,9-trans-9,5-cis sweroside to all trans sweroside during acetylation of sweroside aglycone. *Phytochemistry.* 57, 51-56.
- Hostettmann, K., Potterat, O., Wolfender, J. L., 1998. The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimia.* 52, 10-17.

- Huang, F.Y., Wu, J.J., Li, G.P., 2014. A New Secoiridoid Glycoside from *Swertia cincta*. Chinese Herbal Medicines 6, 73-75.
- Benzie, I-F.F., Wachtel-Galor, S., 2011. Herbal medicine – Biomolecular and clinical aspects. 2e Edition. CRC Press, Taylor and Francis Group, 1-10.
- Iris, F-F. B., and Wachtel-Galor, S., 2011. Herbal medicine – Biomolecular and clinical aspects. 2e edition, CRC Press, Taylor and Francis Group, 1-10.
- Itoh, A., Fujii, K., Tomatsu, S., Takao, C., Tanahashi, T., Nagakura, N., Chen, C.C., 2003. Six secoiridoid glucosides from *Adina racemosa*. J. Nat. Prod. 66, 1212-1216.
- Jang, S.E., Jeong, J.J., Hyam, S.R., Han, M.J., Kim, D.H., 2014. Ursolic acid isolated from the seed of *Cornus officinalis* ameliorates colitis in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to Toll-like receptor 4 on macrophages. J Agric Food Chem. 62, 9711-9721.
- Jash, S.K., Gorai, D., Roy, R., 2016. *Salvia* genus and triterpenoids. IJPSR. 7, 4710-4732.
- Jassbi, A.R., Zare, S., Firuzi, O., Xiao, J., 2015. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. Phytochem Rev. 15, 829-867.
- Jensen, S.R., Lyse-Petersen, S.E., Nielsen, B.J., 1979. Novel bis-iridoid glucosides from *Dipsacus sylvestris*. Phytochemistry. 18 (2), 273-277.
- Jiménez, M.E., Garcia, L.A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F., 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. BMC Cancer, 6, 119.
- Jitsuno, M., Mimaki, Y., 2010. Triterpene glycosides from the aerial parts of *Larrea tridentata*. Phytochemistry. 71, 2157-2167.
- Kabouche, A., 2005. Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse de doctorat de l'Université des Frères Mentouri-Constantine 1. Algérie.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R., Bruneau, C., 2008. Diterpenes and sterols from the roots of *Salvia verbenaca* subsp. *clandestina*. Chem Nat Compds 44, 824-825.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., 2008. Bioactive diterpenoids of *Salvia* Species. Stud. Nat. Prod. Chem. 5, 753-833.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Öztürk, M., Kolak, U., Topçu, G., 2007. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. Food Chem. 102, 1281-1287.
- Kadioglu, O., Efferth, T., 2015. Pharmacogenomic Characterization of Cytotoxic Compounds from *Salvia officinalis* in Cancer Cells. J. Nat. Prod. 78, 762-775.

- Khare, C.P., 2007. Indian medicinal plants : An Illustrated Dictionary. Springer Science+Business Media, LLC. USA.
- Kalvatchev, Z., Walder, R., Garzaro, D., 1997. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. Biomed Pharmacother. 51, 176-180.
- Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Jalinskaitė, M., Maruška, A., 2011. Chemical Composition and Chemometric Analysis of Variation in Essential Oils of *Calendula officinalis* L. during Vegetation Stages. Chromatographia. 73 (1), 163–169.
- Kolak, U., Kabouche, A., Ozturk, M., Kabouche, Z., Topcu, G., Ulubelen, A., 2009. Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. Phytochem Anal. 20, 320-327.
- Labeled, A., Ferhat, M., Labeled-Zouad, I., Kaplaner, E., Zerizer, S., Voutquenne-Nazabadioko, L., Alabdul Magid, A., Semra, Z., Kabouche, A., Kabouche, Z., Öztürk, M., 2016. Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities. Pharm. Biol. 54(12), 3026-3032.
- Lamarck, J.L., Poiret, M., 1804. Encyclopédie méthodique, botanique. Vol 6. Paris-France.
- Lakhal, H., Kabouche, A., Alabdul Magid, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Harakat, D., Kabouche, Z., 2014. Triterpenoids from *Salvia argentea* var. *aurasiaca* (Pomel) Batt. & Trab. and their chemotaxonomic significance. Phytochemistry 102, 145-151.
- Lee, M.H., Son, Y.K., Han, Y.N., 2002. Tissue factor inhibitory flavonoids from the fruits of *Chaenomeles sinensis*. Arch Pharm Res. 25, 842-850.
- Li, F., Li, W., Fu, H., Zhang, Q., Koike, K., 2007. Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from fruits of *Acanthopanax senticosus*. Chem. Pharm. Bull. 55, 1087-1089.
- López-Martínez, S., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S., León-Rivera, I., Rios, M.Y., 2013. Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). Nat. Prod. Res. 27, 130-136.
- Mabry, T. J., Thomas, M. B., Markham, K. R., 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. Berlin.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P., 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. Phytochemistry 37, 1517-1575.
- Mamedova, L.A., Abasova, R.L., Aslanov, S.M., Mamedova, M.E., 1995. Fatty acid composition of neutral lipids of *Calendula persica*. Khim. Prir. Soedin. 6, 909-910.
- Martinez, A., Rivas, F., Perojil, A., Parra, A., Garcia-Granados, A., Fernandez-Vivas, A., 2013. Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei*. Phytochemistry 94, 229-237.

- Marukami, T., Kishi, A., Yoshikawa, M., 2001. Medicinal flowers. IV. Marigold. (2): Structures of new ionone and sesquiterpene glycosides from Egyptian *Calendula officinalis*. Chem. Pharm. Bull. 49, 974-978.
- Masclef, A., 1891. Atlas des plantes de la France. Librairie des sciences naturelles-Paul Klincksiek, Paris.
- Ming-An, O., Dian-Peng, L., 2002. Four new triterpenoid saponins from leaves *Ilex godagam*. Journal of Asian Natural Products Research. 4, 25-31.
- Miyakoshi, M., Ida, Y., Isoda, S., Shoji, J., 1993. 3 α -hydroxy-oleanane-type triterpene glycosyl esters from leaves of *Acanthopanax spinosus*. Phytochemistry. 34(6),1599-1602.
- Movsumov, I.S., Yusifova, J. Y., 2015. Component Composition and Biological Properties of The Plants from Dipsacaceae Family. AMEA News (Biologie et sciences médicales), 70 (2), 115-122. Revue en russe.
- Nielsen, N.J., Nielsen, J., Starek, D., 2010. New resistance-correlated saponins from the insect-resistant crucifer *Barbarea vulgaris*. J. Food Chem. 58, 5509-5514.
- Oettl, S. K., Hubert, J., Nuzillard, J.M., Stuppner, H., Renault, J.H., Rollinger, J.M., 2014. Dereplication of depsides from the lichen *Pseudevernia furfuracea* by centrifugal partition chromatography combined to ¹³C nuclear magnetic resonance pattern recognition. Anal. Chim. Acta. 846, 60-67.
- Okoh, O.O., Sadimenko, A.A., Afolayan, A.J., 2007. The effects of age on the yield and composition of the essential oils of *Calendula officinalis*. J Appl Sci. 7, 3806-3810.
- Papalexandrou, A., Magiatis, P., Perdetzoglou, D., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., Harvala, C., 2003. Iridoids from *Scabiosa variifolia* (Dipsacaceae) growing in Greece. Biochem. Syst. Ecol. 31, 91-93.
- Perdetzoglou, D., Skaltsa, H., Tzakou, O., Harvala, C., 1994. Comparative phytochemical and morphological study of two species of the *Scabiosa* L. genus. Feddes Repert., Berlin. 105 3 (4), 157-165
- Pereira, C., Barreto, C.B., Kuster, R.M., Simas, N.K., Sakuragui, C.M., Porzel, A., Wessjohann, L., 2012. Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). Quim Nova 35, 1123-1126.
- Pizza, C., de Tommasi, N., 1988. Sesquiterpene glycosides based on the alloaromadendrane skeleton from *Calendula arvensis*. Phytochemistry. 27:2205-2208.
- Pizza, C., Zhou, Z.L., De Tommasi, N., 1987. Plant metabolites. Triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. J. Nat. Prod. 50, 927-931.

- Plasman, V., Braekman, J.C., Daloze, D., Windsor, D., Pasteels, J.M., 2000. Triterpene saponins, quaternary ammonium compounds, phosphatidyl cholines, and amino acids in the pronotal and elytral secretions of *Platyphora opima* and *Desmogramma subtropica*. *J. Nat. Prod.* 94, 229-237.
- Polat, E., Alankus-Caliskan, Ö., Karayildirim T., Bedir, E., 2010. Iridoids from *Scabiosa atropurpurea* L. subsp. *maritima* Arc. (L.). *Biochem. Syst. Ecol.* 38,253-255.
- Popovic, M., Kaurinovic, B., Mimica, D.N., Vojinovic, M.M., Cupic, V., 1999. Combined effects of plant extracts and xenobiotics on liposomal lipid peroxidation. Part 1. Marigold extract-ciprofloxacin/pyralene. *Oxidation Commun.* 22, 487-494.
- Preethi, K.C., Kuttan, G., Kuttan, R., 2006. Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers *in vitro* and *in vivo*. *Pharmaceutical Biology.* 44(9), 691–697.
- Preethi, K.C., Kuttan, G., Kuttan, R., 2009. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. *Indian. J. Exp. Biol.* 47(2), 113-120.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. *New Flora of Algeria and the Southern Desert Regions*, vol. 1-2. CNRS, Paris.
- Rahmouni, N., Pinto, D.C.G.A., Santos, S.A.O., Beghidja, N., Silva, A.M.S., 2017. Lipophilic composition of *Scabiosa stellata* L.: an underexplored plant from Batna (Algeria). *Chem. Pap.* <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0308-3>.
- Richard, L. N and Stussman, B. J., 2009. *Costs of Complementary and Alternative Medicine (CAM) and Frequency of Visits to CAM Practitioners: United States, 2007*. National Health Statistics Reports. 18, 15.
- Nahin, R.L., Stussman, B.J., 2007. *Costs of Complementary and Alternative Medicine (CAM) and Frequency of Visits to CAM Practitioners: United States, National Health Statistics Reports*. number 18, 15.
- Saeidnia, S., Moradi-Afrapoli, F., Gohari, A.R., Malmir, R., 2009. Cytotoxic flavonoid from *Achillea talagonica* Bioss. *J Med Plants.* 8, 52-56.
- Shao, C.J., Kasai, R., XU, J.D., TANAKA, O., 1989. Saponins from leaves of *Acanthopanax senticosus*, Harms., Ciwujia. II. Structures of ciwujianosides A1, A2, A3, A4 and D3. *Chem Pharm Bull.* 37(1), 42-45.
- Silwowski, J., Dziewanowska, K., Kasprzyk, Z., 1973. Ursadiol: A new triterpene diol from *Calendula officinalis* flowers. *Phytochemistry.* 12, 157–160.
- Tabuti, J.R.S., Lye, K.A., Dhillion, S.S., 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *J. Ethnopharmacol.* 88, 19-44.

- Tavakoli, P., 2011. Evaluation of the therapeutic effect of *Calendula officinalis* gel on oral mucositis induced by chemotherapy in hamster. MSc thesis, Shiraz University of Medical Science, School of Dental Medicine.
- Toki, K., Takeuchi, M., Saito, N., Honda, T., 1996. Two malonylated anthocyanidin glycosides in *Ranunculus asiaticus*. *Phytochemistry* 42, 1055-1057.
- Top, H., Sarikahya, N.B., Nalbantsoy, A., Kirmizigul, S., 2017. Immunomodulatory, hemolytic properties and cytotoxic activity potent of triterpenoid saponins from *Cephalaria balansae*. *Phytochemistry*. 137, 139-147.
- Tziurzynski, T., Ludwiczuk, A., Glowniak, K., 2013. Biological activities of *Salvia* L. species. *Curr Issues Pharm Med Sci*. 26 (3), 326-330.
- Udayama, M., Ohkawa, M., Yoshida, N., Kinjo, J., Nohara, T., 1998. Structures of three new oleanene glucuronides isolated from *Lathyrus palustris* var. *pilosus* and hepatoprotective activity. *Chem. Pharm. Bull.* 46 (9), 1412-1415.
- Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T., Kimura, Y., 2006. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J. Nat. Prod.* 69, 1692-1696.
- Ulchenko, N.T., Glushenkova, A.I., Mukhamedova, K.S., 1998. Lipids of *Calendula officinalis*. *Chem. Nat. Compd.* 34, 272-274.
- Uto, T., Tung, N. H., Ohta, T., Juengsanguanpornasuk, W., Hung, L. Q., Hai, N. T., Long, D. D., Thuong, P. T., Okubo, S., Hirata, S., Shoyama, Y., 2018. Antiproliferative activity and apoptosis induction by trijuganone C isolated from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen). *Phytotherapy Research*. 32 (4), 657-666.
- Van-Vuren, S.F., Naidoo, D., 2010. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. *J. Ethnopharmacol.* 103, 552 – 558.
- Vecherko, L.P. Zinkevich, E. P. Sviridov, A.F., Kogan L. M., 1975. The structure of calendulosides C and D from the roots of *Calendula officinalis*. *Khim. Prirodn. Soedin.* 379-384.
- Vidal-ollivier, E., Babadjamian, A., Faure, R., Chemli, R., Boukef, K., Balansard, G., Vincent, E.J., 1989. Two-dimensional NMR studies of triterpenoid glycosides: ¹H NMR assignment of arvensoside A and B, calenduloside C and D. *Spectrosc. Lett.* 22, 579-584.
- Wang, J., Liu, K., Li, X., Bi, K., Zhang, Y., Huang, J., Zhang, R., 2017. Variation of active constituents and antioxidant activity in *Scabiosa tschiliensis* Grunning from different stages. *J. Food. Sci. Technol.* doi:10.1007/s13197-017-2666-9.

- Wang, J.Y., Zhao, Z.L., Xue, P.F., Ma, F.X., Zhang, D.Y., Wang, N.N., Li, M.H., 2015. Chemical constituents from flowers of *Scabiosa tschiliensis*. China Journal of Chinese Materia Medica. 40 (5), 807-813. Article en chinois.
- Watzke, A., O'Malley, S.J., Bergman, R.G., Ellman, J.A. 2006. Reassignment of the configuration of salvianolic acid B and establishment of its identity with lithospermic acid B. J. Nat. Prod. 69 (8), 1231-1233.
- Wilkomirski, B., Kasprzyk, Z., 1979. Free and ester bound triterpene alcohols and sterols in cellular subfractions of *Calendula officinalis* flowers. Phytochemistry. 18, 253-255.
- Wu, Y.B., Ni, Z.Y., Shi, Q.W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y.C., Cong, B., 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. Chem. Rev. 112, 5967-6026.
- Wu, Y.Q., Li, Y., Lin, X.F., Liu, Z.L., Li, Y., 2003. Phenolic compounds from *Anaphalis aureo-punctata*. Pharmazie. 58, 833-835.
- Yang, Y., Lu, W., Wu, Z., Chen, W., 2017. A new Diterpenoid from *Salvia przewalskii*. Rec. Nat. Prod. 11 (4), 416-420.
- Yoshikawa, K., Satou, Y., Tokunaga, Y., Tanaka, M., Arihara, S., Nigam, S. K., 1998. Four acylated triterpenoid saponins from *Albizia procera*. J. Nat. Prod. 61, 440-445.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Kageura, T., Matsuda, H., 2001. Medicinal flowers. III. Marigold. (1): Hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. Chem. Pharm. Bull. 49, 863-870.
- Zemtsova, G.N., Bandyukova, V.A., 1977. C-glycosides of species of Dipsacaceae III. Khim. Prirodn. Soedin. 5, 705-706.
- Zhang, B.B., He, B.Q., Sun, J.B., Zeng, B., Shi, X.J., Zhou, Y., Niu, Y., Nie, S.Q., Feng, F., Liang, Y., Wu, F.H., 2015. Diterpenoids from *Salvia plebeia* R. Br. and their antioxidant and anti-inflammatory activities. Molecules. 20, 14879-14888.
- Zhang, J., Wang, Y., Zhang, X.Q., Zhang, Q.W., Ye, W.C., 2009. Chemical constituents from the leaves of *Lophatherum gracile*. Chin. J. Nat. Med. 7 (6), 428-431.
- Zhang, Y., Peng, Y., Li, L., Zhao, L., Hu, Y., Hu, C., Song, S., 2013. Studies on cytotoxic triterpene saponins from the leaves of *Aralia elata*. Food Chem. 138, 208-213.
- Zheng, Q., Koike, K., Han, L.K., Okuda, H., Nikaido, T., 2004. New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*. J. Nat. Prod. 67, 604-613.
- Zhunosova, M. A., Suleimen, E. M., Iskakova, Z. B., Ishmuratova, M. Y., Abdullabekova, R. M., 2017. Constituent composition and biological activity of CO₂-extracts of *Scabiosa isetensis* and *S. ochroleuca*. Chem Nat Compd. 53 (4), 775-777.

Références web

- [1] <http://www.emplantbase.org/home.html>
- [2] <https://adventices.afd.be/especies.php?id=77>
- [3] <http://www.tela-botanica.org/>
- [4] http://semina-tischler.de/bilder/buch-3/_51.jpg
- [5] <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>
- [6] <http://montana.plant-life.org/>
- [7] <https://www.biodiversidadvirtual.org/herbarium/Salvia-barrelieri-1-de-6-img207585.html>
- [8] http://botanicalillustrations.org/illustration.php?id_illustration=3450&SID=0&mobile=0&code_category_taxon=1&size=0

Annexes

Caractéristiques des composés isolés

I. Composés isolés de *Calendula stellata*

1. Saponoside Cs1

3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-
échinocystique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

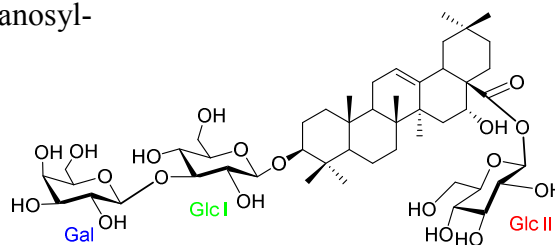
(Calendustellatoside B)

Formule brute : C₄₈H₇₈O₁₉

[α]_D - 3 (c 0.1, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 981.5029 [M+Na]⁺

RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la génine et de la partie osidique (Tableau III-02, page 111).



2. Saponoside Cs2

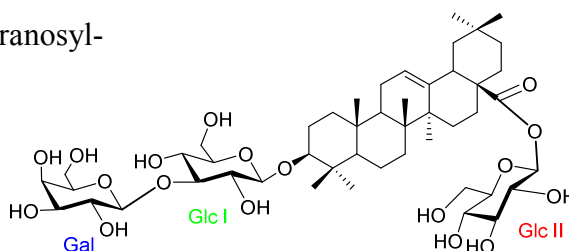
3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-
oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₈O₁₈

HR-ESI-MS : *m/z* 965.5093 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-3, page 123).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-04, page 124).



3. Saponoside Cs3

3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-]
échinocystique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

(Calendustellatoside A)

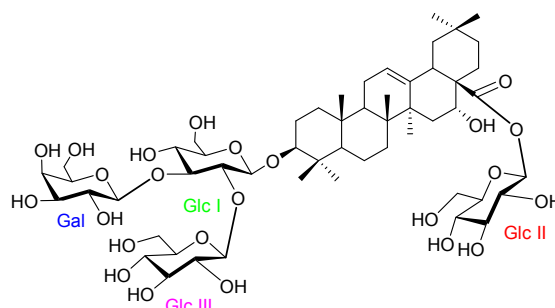
Formule brute : C₅₄H₈₈O₂₄

[α]_D -4.8 (c 0.166, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 1143.5554 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-3, page 123).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-04, page 124).

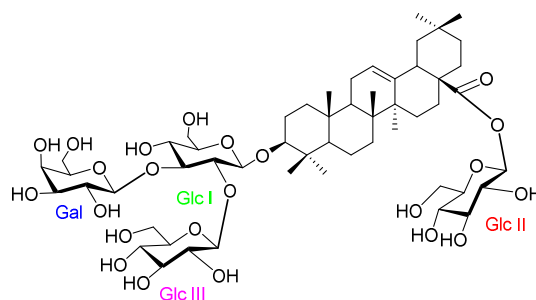


4. Saponoside Cs4

3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl]-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₄H₈₈O₂₃

HR-ESI-MS : *m/z* 1127.5608 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-3, page 123).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-04, page 124).

5. Saponoside Cs5

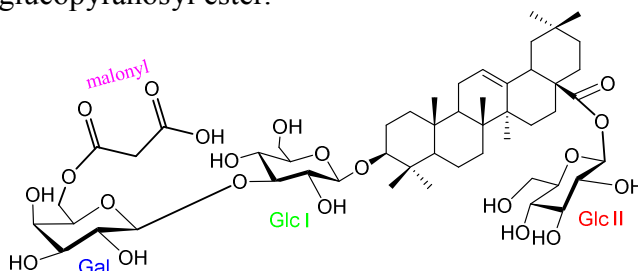
3-*O*-(6-*O*-malonyl)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-échinocystique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

(Calendustellatoside C)

Formule brute : C₅₁H₈₀O₂₁

[α]_D +20.3 (*c* 0.6, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 10515.5094 [M+Na]⁺



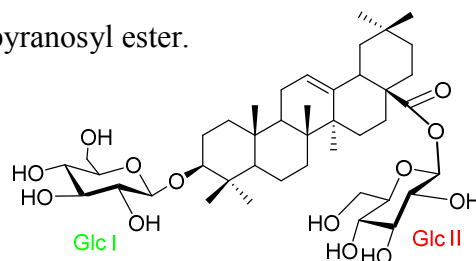
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la génine et de la partie osidique (Tableau III-05, page 129).

6. Saponoside Cs6

3-*O*- β -D-glucopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₂H₆₈O₁₃

ESI-MS : *m/z* 803.4 [M+Na]⁺



RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-06, page 133).

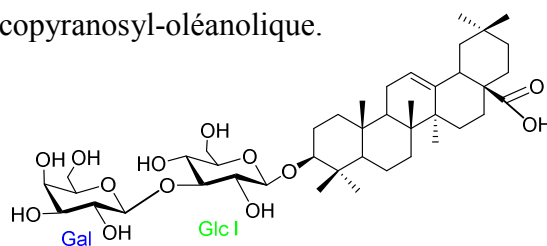
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-7, page 134).

7. Saponoside Cs7

Acide 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-oléanolique.

Formule brute : C₄₂H₆₈O₁₃

ESI-MS : *m/z* 803.4 [M+Na]⁺



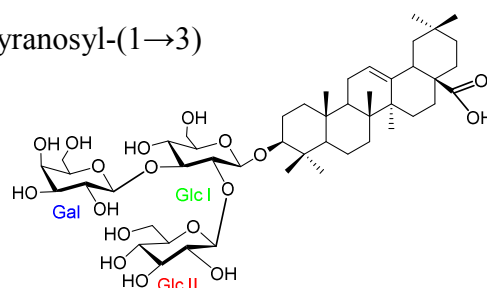
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-06, page 133).
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-7, page 134).

8. Saponoside Cs8

Acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl]-oléanolique.

Formule brute : C₄₈H₇₈O₁₈

ESI-MS : *m/z* 965.3 [M+Na]⁺



RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-06, page 133).
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-7, page 134).

9. Saponoside Cs9

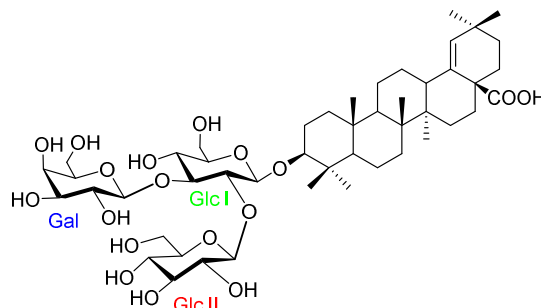
Acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl]-morolique

(Calendustellatocide D)

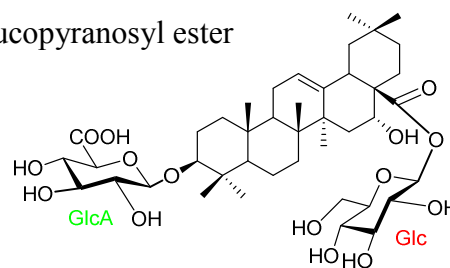
Formule brute : C₄₈H₇₈O₁₈

[α]_D +6.2 (*c* 0.13, MeOH)

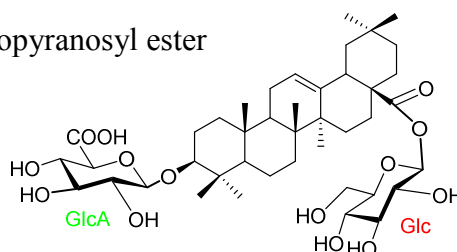
HR-ESI-MS : *m/z* 965.5095 [M+Na]⁺



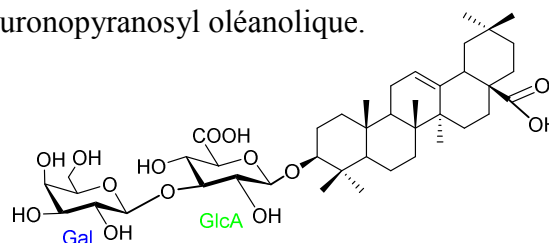
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine et de la partie osidique (Tableau III-08, page 138).

10. Saponoside Cs103-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-échinocystique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester**Formule brute** : C₄₂H₆₆O₁₅**ESI-MS** : *m/z* 833.4 [M+Na]⁺

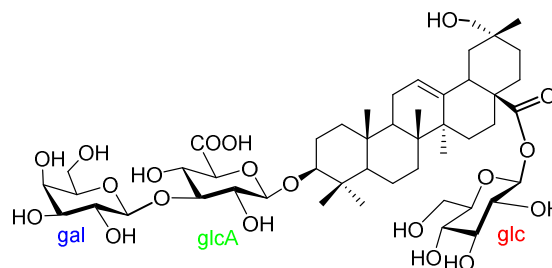
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-09, page 142).
 RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-14, page 157).

11. Saponoside Cs113-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-oléanolique -28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester**Formule brute** : C₄₂H₆₆O₁₄**ESI-MS** : *m/z* 817.3 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-09, page 142).
 RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-14, page 157).

12. Saponoside Cs12Acide 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1→3)- β -D-glucuronopyranosyl oléanolique.**Formule brute** : C₄₂H₆₆O₁₄**ESI-MS** : *m/z* 817.2 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la partie osidique (CD₃OD) (tableau III-09, page 142).
 RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-14, page 157).

13. Saponoside Cs13Acide 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1→3)- β -D-glucuronopyranosyl-29-hydroxyoléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.**(Calendustellatoside E)****Formule brute** : C₄₈H₇₆O₂₀[α]_D -6 (c 0.1, MeOH)**HR-ESI-MS** : *m/z* 995.4820 [M+Na]⁺

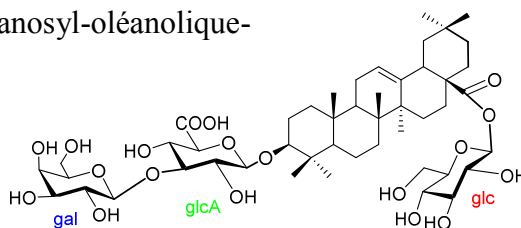
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-10, page 146).
 RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-14, page 157).

14. Saponoside Cs14

3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl-oléanolique-
28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₁₉

HR-ESI-MS : *m/z* 996.5155 [M+Na]⁺



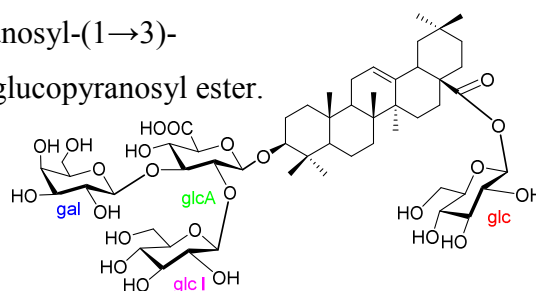
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-10, page 146).
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-14, page 157).

15. Saponoside Cs15

3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-
 β -D-glucuronopyranosyl]-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₅₄H₈₆O₂₄

ESI-MS : *m/z* 1142.3 [M+Na]⁺



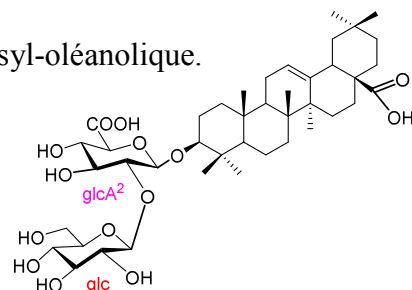
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-11, page 148).
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-14, page 157).

16. Saponoside Cs16

Acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-oléanolique.

Formule brute : C₄₂H₆₆O₁₄

ESI-MS : *m/z* 817.3 [M+Na]⁺



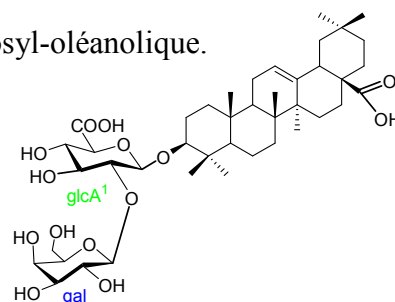
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-12, page 151).
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-14, page 157).

17. Saponoside Cs17

Acide 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-oléanolique.

Formule brute : C₄₂H₆₆O₁₄

ESI-MS : *m/z* 817.3 [M+Na]⁺



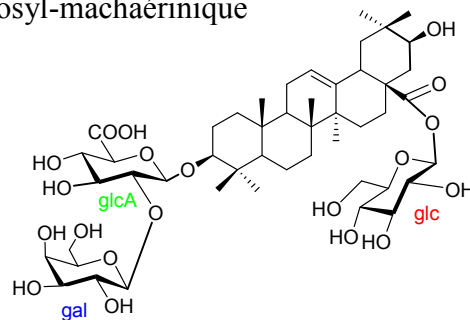
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-12, page 151).
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-14, page 157).

18. Saponoside Cs18

3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-machaérinique
-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₂₀

HR-ESI-MS : *m/z* 995.4838 [M+Na]⁺



RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) de la génine et de de la partie osidique (CD₃OD) (Tableau III-13, page 156).

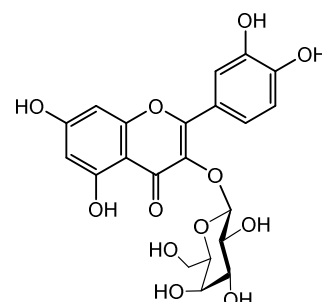
19. Flavonoïde Cs19=Ss39

Quercétine-3-*O*- β -D-galactopyranosyl (hyperine)

Formule brute : C₂₁H₂₀O₁₂

HR-ESI-MS : *m/z* 487.0863 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-15, page 161).

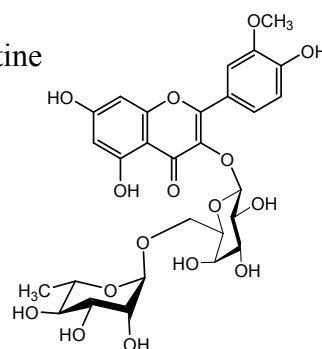
**20. Flavonoïde Cs20**

3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl-isorhamnetine

Formule brute : C₂₈H₃₂O₁₆

ESI-MS : *m/z* 646.9 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-15, page 161).

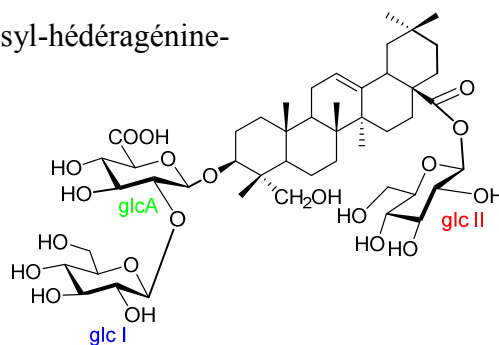
**II. Composés isolés de *Scabiosa stellata*****21. Saponoside Ss21**

3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-hédéragénine-
28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

Formule brute : C₄₈H₇₆O₂₀

HR-ESI-MS : *m/z* 995.4822 [M+Na]⁺

[α]_D +2.2 (*c* 0.18, MeOH)



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-16, page 174).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-17, page 175).

22. Saponoside Ss22

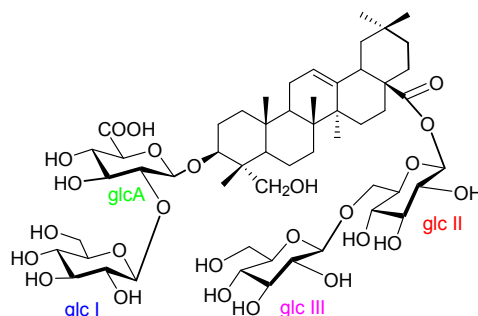
3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-hédéragénine-28-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

(Scabiostellatoside G)

Formule brute : C₅₄H₈₆O₂₅

[α]_D -11.8 (*c* 0.28, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 1157.5363 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-16, page 174).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-17, page 175).

23. Saponoside Ss23

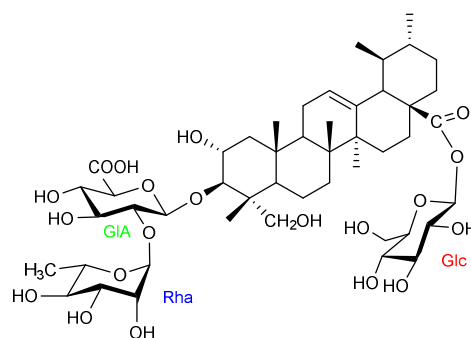
3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-asiatique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester.

(Scabiostellatoside H)

Formule brute : C₄₈H₇₆O₂₀

[α]_D +2.2 (*c* 0.18, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 995.4822 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-16, page 174).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-17, page 175).

24. Saponoside Ss24

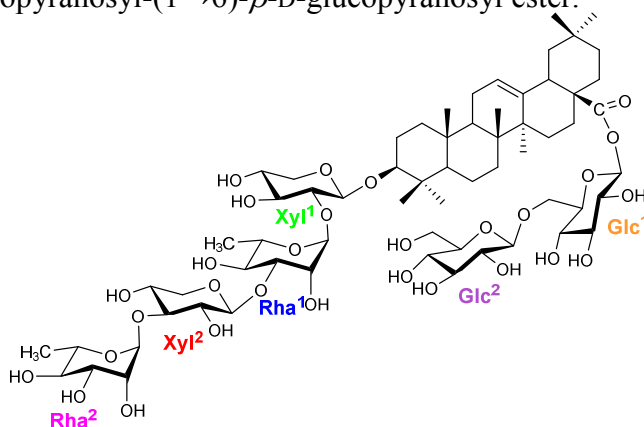
3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

(Scabiostellatoside B)

Formule brute : C₆₄H₁₀₄O₂₉

[α]_D -25 (*c* 0.2, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 1359.6548 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-18, page 192).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-21, page 218).

25. Saponoside Ss25

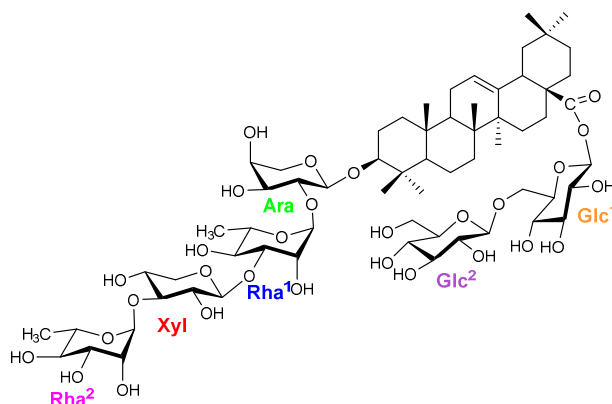
3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

(Scabiostellatoside A)

Formule brute : C₆₄H₁₀₄O₂₉

[α]_D -20.8 (*c* 0.35, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 1359.6552 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-18, page 192).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-21, page 218).

26. Saponoside Ss26

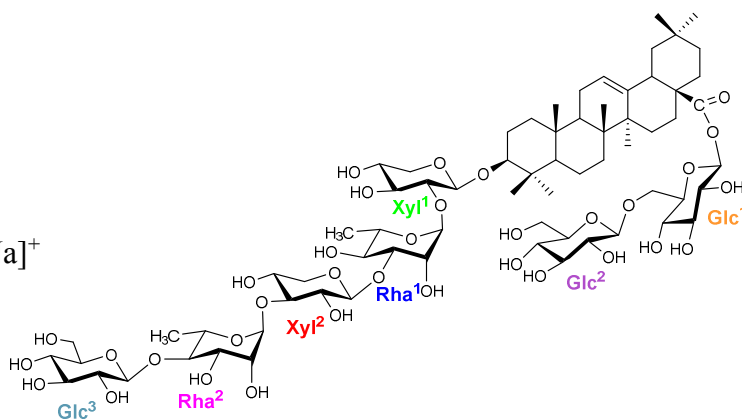
3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

(Scabiostellatoside D)

Formule brute : C₇₀H₁₁₄O₃₄

[α]_D -24.3 (*c* 0.28, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 1521.7096 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-19, page 204).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-21, page 218).

27. Saponoside Ss27

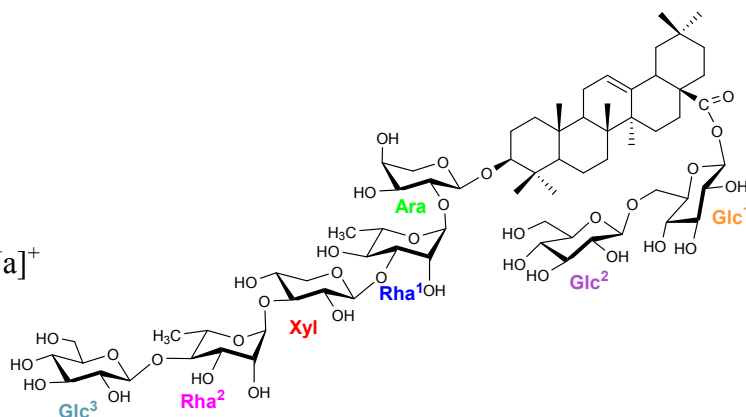
3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-oléanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

(Scabiostellatoside C)

Formule brute : C₇₀H₁₁₄O₃₄

$[\alpha]_D$ -27.8 (*c* 0.18, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 1521.7097 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-19, page 204).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-21, page 218).

28. Saponoside Ss28

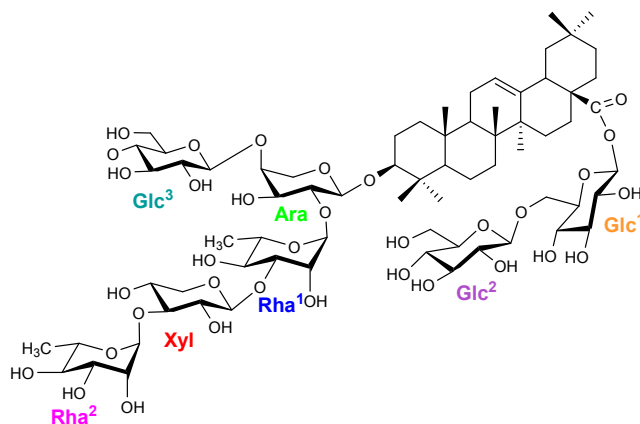
3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranononyl-oleanolique-28-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester.

(Scabiostellatoside E)

Formule brute : C₇₀H₁₁₄O₃₄

$[\alpha]_D$ -26 (*c* 0.26, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 1521.7075 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-20, page 217).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-21, page 218).

29. Saponoside Ss29

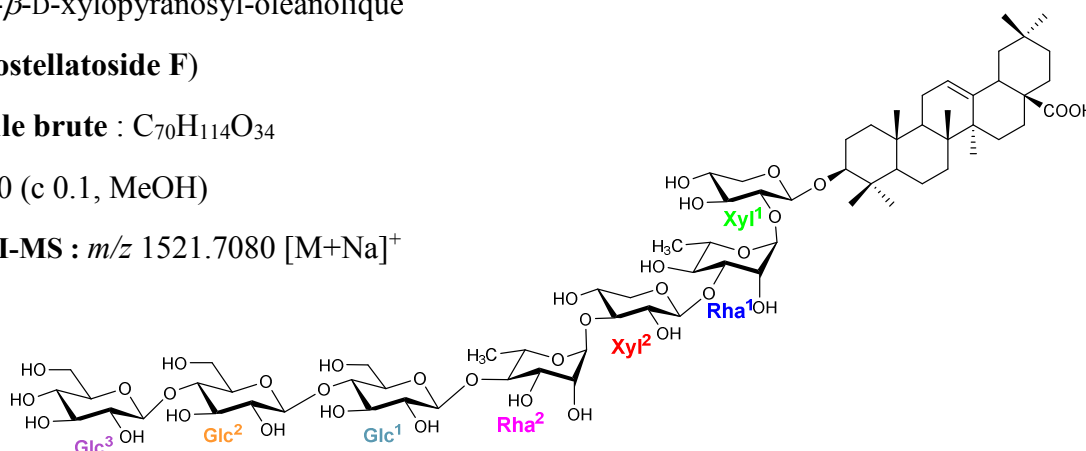
Acide 3-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-oléanolique

(Scabiostellatoside F)

Formule brute : C₇₀H₁₁₄O₃₄

[α]_D -10 (c 0.1, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 1521.7080 [M+Na]⁺



RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de de la partie osidique (Tableau III-20, page 217).

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) de la génine (CD₃OD) (tableau III-21, page 218).

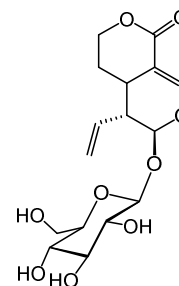
30. Iridoïde Ss30

Sweroside

Formule brute : C₁₆H₂₂O₉

ESI-MS : *m/z* 380.9 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-22, page 230).

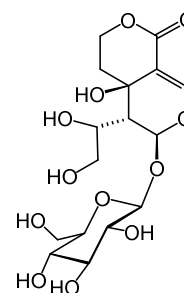
**31. Iridoïde Ss31**

Eustomorusside

Formule brute : C₁₆H₂₄O₁₂

ESI-MS : *m/z* 449 [M+Na+H₂O]⁺

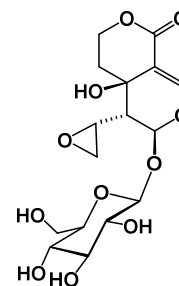
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-22, page 230).

**32. Iridoïde Ss32**

Eustomoside

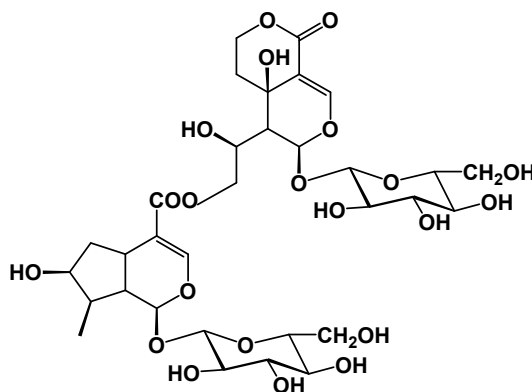
Formule brute : C₁₆H₂₂O₁₁

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-22, page 230).

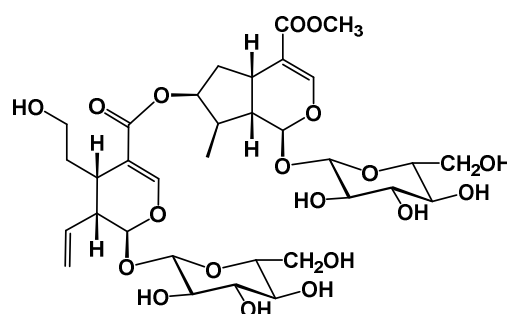
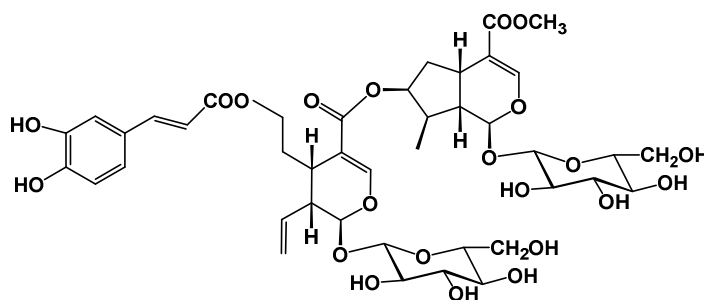
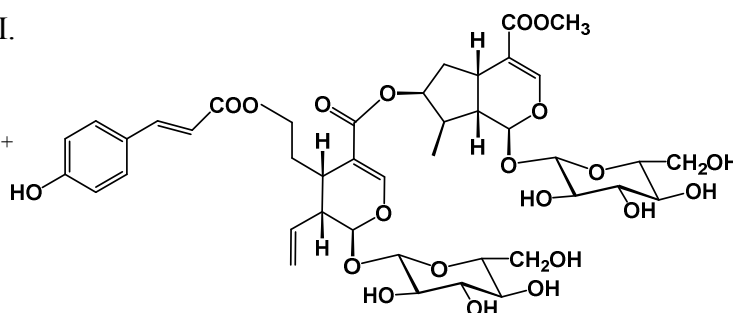


33. Iridoïde Ss33

Septemfidoside

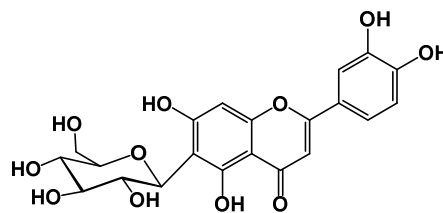
Formule brute : C₃₃H₄₉O₂₁RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
(Tableau III-23, page 242).**34. Iridoïde Ss34**

Sylvestroside I

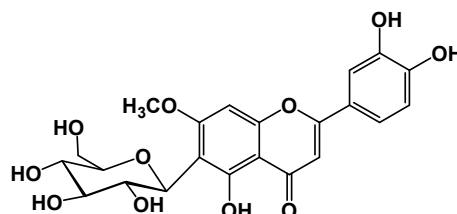
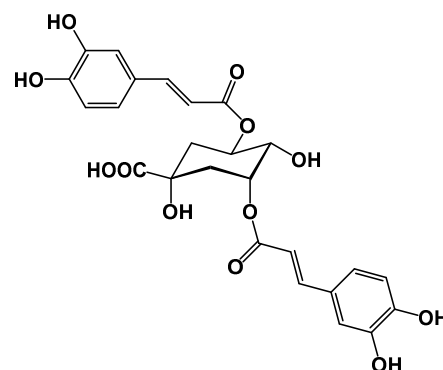
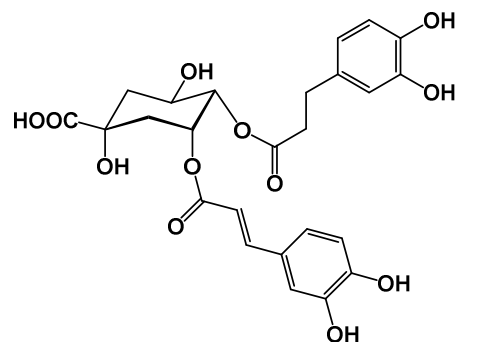
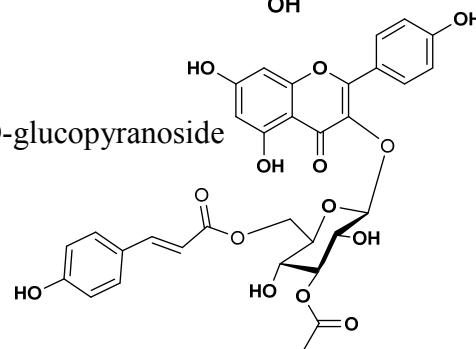
Formule brute : C₃₃H₄₈O₁₉RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)
(Tableau III-23, page 242).**35. Iridoïde Ss35**7-*O*-(*E*-caffeyl)-sylvestroside I.**Formule brute** : C₄₂H₅₄O₂₂**HR-ESI-MS** : *m/z* 933.2997 [M+Na]⁺[α]_D -36.5 (*c* 0.23, MeOH)RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)
(Tableau III-24, page 253).**36. Iridoïde Ss36**7-*O*-(*E*-*p*-coumaryl)-sylvestroside I.**Formule brute** : C₄₂H₅₄O₂₁**HR-ESI-MS** : *m/z* 917.3063 [M+Na]⁺[α]_D -77.2 (*c* 0.25, MeOH)RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)
(Tableau III-24, page 253).

37. Flavonoïde Ss37

Isoorientine

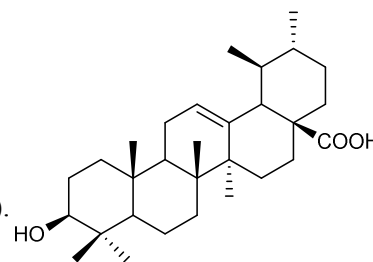
Formule brute : C₂₁H₂₀O₁₁**ESI-MS** : *m/z* 471.0 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
(Tableau III-25, page 257).**38. Flavonoïde Ss38**

Swertiajaponine

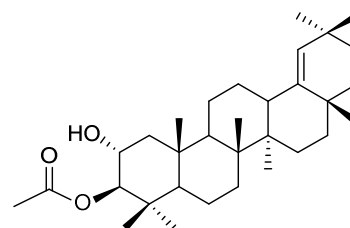
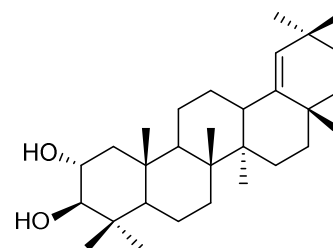
Formule brute : C₂₂H₂₂O₁₁**ESI-MS** : *m/z* 485.0 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
(Tableau III-25, page 257).**39. Flavonoïde Ss39=Cs19****40. Composé Ss40**Acide 3,5-di-*O*-Caffeoylquinique.**Formule brute** : C₂₅H₂₄O₁₂**ESI-MS** : *m/z* 539.0 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
(Tableau III-26, page 259).**41. Composé Ss41**Acide 3,4-di-*O*-Caffeoylquinique.**Formule brute** : C₂₅H₂₄O₁₂**ESI-MS** : *m/z* 539.0 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
(Tableau III-26, page 259).**42. Flavonoïde Ss42**kaempferol-3-*O*-[3''-*O*-acetyl-6''-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl]-β-*D*-glucopyranoside**Formule brute** : C₃₂H₂₈O₁₄RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
(Tableau III-27, page 263).

43. Triterpène Ss43=Sb48

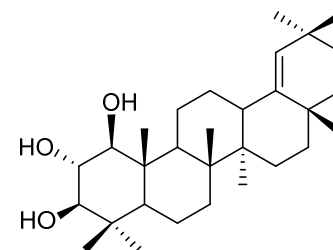
Acide ursolique.

Formule brute : C₃₀H₄₈O₃**ESI-MS** : *m/z* 479.5 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-28, page 282).**III. Composés isolés de *Salvia barrelieri*****44. Triterpène Sb44**

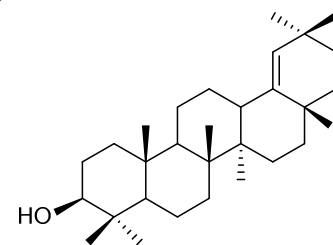
3β-acetoxy-oléan-18-ène-2α-ol.

Formule brute : C₃₂H₅₂O₃**HR-ESI-MS** : *m/z* 507.3820 [M+Na]⁺[α]_D -3 (c 0.1, CHCl₃)RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-28, page 282).**45. Triterpène Sb45***Epi*-germanidiol.**Formule brute** : C₃₀H₅₀O₂**ESI-MS** : *m/z* 465.5 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-28, page 282).**46. Triterpène Sb46**

1β,2α,3β-triol-oléan-18-ène.

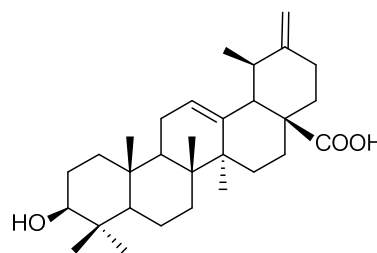
Formule brute : C₃₀H₅₀O₃**ESI-MS** : *m/z* 481.5 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-28, page 282).**47. Triterpène Sb47**

Germanicol.

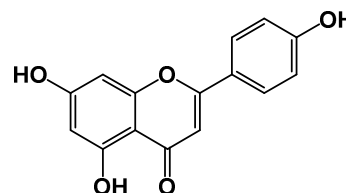
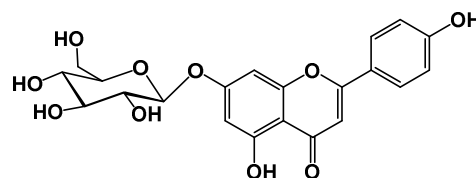
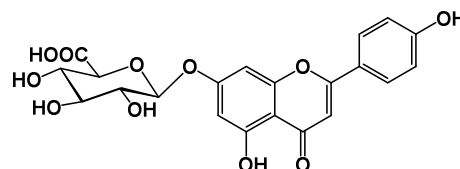
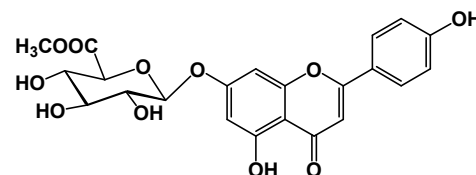
Formule brute : C₃₀H₅₀O**ESI-MS** : *m/z* 917.3063 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-28, page 282).

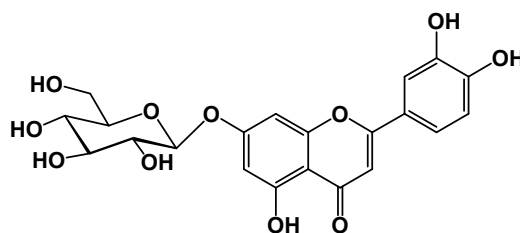
48. Triterpène Sb48=Ss43**49. Triterpène Sb49**

Acide micromérique

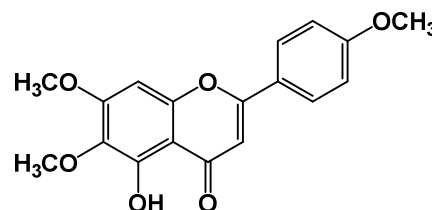
Formule brute : C₃₀H₄₆O₃**ESI-MS** : *m/z* 477.5 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-28, page 282).**50. Flavonoïde Ss50**

Apigénine.

Formule brute : C₁₅H₁₀O₅**ESI-MS** : *m/z* 293.1 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-29, page 287).**51. Flavonoïde Ss51**Apigénine-7-*O*-β-D glucopyranoside**Formule brute** : C₂₁H₂₀O₁₀**ESI-MS** : *m/z* 455.2 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-29, page 287).**52. Flavonoïde Ss52**Apigénine-7-*O*-β-D-glucuronopyranoside**Formule brute** : C₂₁H₁₈O₁₁**ESI-MS** : *m/z* 469.2 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-29, page 282).**53. Flavonoïde Ss53**Apigénine-7-*O*- glucuronopyranoside méthyle ester**Formule brute** : C₂₂H₂₀O₁₁**ESI-MS** : *m/z* 483.2 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-29, page 287).

54. Flavonoïde Ss54Lutéoline-7-*O*- β -D-glucopyranoside**Formule brute** : C₂₁H₂₀O₁₁RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-29, page 287).**55. Flavonoïde Ss55**

Salvigénine

Formule brute : C₁₉H₁₈O₅**ESI-MS** : *m/z* 351.2 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz) (Tableau III-29, page 287).

ملخص

أدت الدراسة الفيتوكيميائية لثلاثة نباتات جزائرية: *Scabiosa*، *Calendula stellata* Cav. و *Salvia barrelieri* Etl إلى فصل وتحديد 55 مركبا منها 16 مركبات تم التعرف عليها لأول مرة في المملكة النباتية. حيث تمت تنقيتها باستعمال تقنيات كروماتوغرافية مختلفة، وكذلك عن طريق كروماتوغرافيا الطرد المركزي (CPC). تنتمي هذه المركبات المعزولة إلى خمس عائلات: 27 saponosides و 7 triterpens و 11 flavonoïds و 7 iridoïds و 2 مشتقات حمض chlorogenic. تم تحديد هياكل هذه المركبات بواسطة التحليل الطيفي 2D-1D NMR وكذلك مطياف الكتلة (ESIMS و HRESIMS)، والبيانات الطيفية في الأشعة تحت الحمراء والأشعة فوق البنفسجية، بالإضافة إلى المقارنة مع المراجع المتوفرة.

تمت دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات والمركبات المعزولة النقية. من بين المركبات التي تم اختبارها، يظهر 2 iridoïds و 2 flavonoïds فعالية جيدة مضادة للأكسدة (IC_{50} بين 7 و 16 μ M). في حين تبين ان أربعة عشر مركبًا أظهر نشاطًا مهمًا مضادًا للبكتيريا، مع قيم IC_{50} بين 15 و 125 μ g/ml. أظهرت المركبات الجديدة نشاط سمية خلوية من منخفضة إلى متوسطة ضد جميع الخلايا التي تم اختبارها، باستثناء Scabiostellatoside F الذي تم الحصول عليه من *Scabiosa stellata* والذي له تأثير جيد ضد HT1080 ($IC_{50} = 12 \mu$ M).

الكلمات المفتاحية: الفعالية البيولوجية، مضادة للأكسدة، مضادة للبكتيريا، سمية خلوية،

Calendula stellata Cav., *Scabiosa stellata* L., *Salvia barrelieri* Etl., saponoside, iridoïdes, triterpenes, flavonoïdes.

Résumé

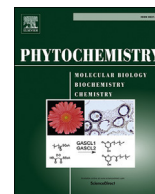
L'étude phytochimique des trois espèces : *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata* et *Salvia barrelieri* a permis d'isoler, à l'aide de différentes méthodes chromatographiques de séparation et de purification, sur support solide ou liquide, **55** composés dont **16** nouveaux répartis en 27 saponosides, 7 triterpénoïdes, 7 iridoïdes, 11 flavonoïdes et 2 dérivés de l'acide chlorogénique. L'activité anti-radicalaire des extraits et de certains composés isolés purs a montré que deux mono-iridoïdes et deux flavonoïdes possèdent une activité importante (CI_{50} : 7-16 μ M). Quatorze composés ont manifesté une bonne activité antibactérienne (CMI : 15-125 μ g/mL). Parmi les produits purs testés, seul le Scabiostellatoside F, isolé de *Scabiosa stellata*, a présenté un bon effet antiprolifératif contre HT1080 (CI_{50} = 12 μ M).

Mots clés : *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata*, *Salvia barrelieri*, saponosides, iridoïdes, triterpénoïdes, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antimicrobienne, cytotoxicité.

Abstract

The phytochemical study of three species: *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata* and *Salvia barrelieri* led to the isolation of **55** compounds, from which **16** were new, by the use of different chromatographic methods of separation and purification on solid or liquid support. The isolated compounds were distributed through 27 saponosids, 7 triterpenes, 11 flavonoids, 7 iridoids and 2 chlorogenic acid derivatives. Two mono-iridoids and two flavonoids showed an important antiradical activity (IC_{50} : 7-16 μ M). Fourteen compounds exhibited a good antibacterial activity (MIC: 15- 125 μ g/mL). The new compounds showed a low to moderate cytotoxic activity against all tested cell lines, except for the monodesmoside, obtained from *Scabiosa stellata* (Scabiostellatoside F) which exhibited a good antiproliferative effect against HT1080 (IC_{50} = 12 μ M).

Keywords : *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata*, *Salvia barrelieri*, saponosids, iridoids, triterpenes, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxicity.



Oleanane-type triterpene saponins from *Calendula stellata*



Meryem Lehbili^{a,b}, Abdulmagid Alabdul Magid^{b,*}, Ahmed Kabouche^a, Laurence Voutquenne-Nazabadioko^b, Amin Abedini^{b,c}, Hamid Morjani^d, Thomas Sarazin^d, Sophie C. Gangloff^c, Zahia Kabouche^a

^a Université des frères Mentouri-Constantine, Département de chimie, Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Campus Chaabet-Ersas, 25000 Constantine, Algeria

^b ICMR-UMR CNRS 7312, Groupe Isolement et Structure, Campus Sciences, Bât. 18, BP 1039, 51687 Reims, France

^c EA 4691 «Biomatériaux et Inflammation en Site Osseux», Laboratoire de microbiologie, UFR de pharmacie, 1, rue du Maréchal-Juin, 51096 Reims, France

^d MEDyC UMR CNRS 7369, URCA, Faculté de Pharmacie, SFR CAP Santé, 1, rue du Maréchal-Juin, 51096 Reims, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2017

Received in revised form

25 August 2017

Accepted 27 August 2017

Keywords:

Calendula stellata

Asteraceae

Triterpenoid saponins

Flavonoids

Antibacterial activity

Cytotoxic activity

ABSTRACT

Five previously undescribed bisdesmosidic triterpenoid saponins named calendustellatosides A–E, along with fifteen known compounds were isolated from the 70% ethanol whole plant extract of *Calendula stellata* Cav. (Asteraceae). Their structures were determined by 1D- and 2D-NMR spectroscopy as well as high resolution mass spectrometry and acid hydrolysis. The saponins comprised oleanolic acid, echinocystic acid, morolic acid or mesembryanthemoidigenic acid as the aglycones and saccharide moieties at C-3 and C-28. Like most *Calendula* saponins, the sugar moiety linked at C-3 was either β -D-glucose or β -D-glucuronic acid which could be substituted at C-3 by a β -D-galactose and/or C-2 by a supplementary β -D-galactose or a β -D-glucose. The sugar moiety linked to C-28 was determined as β -D-glucose. The antibacterial evaluation of compounds **1–20** by bioautography on *Staphylococcus aureus* followed by the determination of MIC values of active compounds by serial dilution technique against 5 bacteria revealed that; calendustellatoside D was the most active against *Enterococcus faecalis* with an antibacterial effect comparable to antibiotics. The cytotoxic activities of isolated compounds were evaluated against fibrosarcoma cell line (HT1080) and human lung cancer cell line (A549). Calendustellatosides B and D exhibited a low cytotoxic activity against HT1080 cell line with IC₅₀ values of 47 ± 0.6 and 39 ± 0.5 μ M, respectively.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Calendula* (Asteraceae), compris 15 species and, is mainly distributed in the Mediterranean Region (Baciu et al., 2010; Naguib et al., 2005). *Calendula* is known as a good source of active specialized metabolites as flavonoids, saponins and sesquiterpenes (Arora et al., 2013; D'Ambrosio et al., 2015; Jakupovic et al., 1988; Mamedova et al., 1995; Marukami et al., 2001; Szakiel et al., 2008; Ukiya et al., 2006; Yoshikawa et al., 2001; Zaki et al., 2016; Pizza et al., 1987). Extracts of *C. officinalis*, as well as pure compounds isolated from it, possess biological activities such as anti-oxidant (Arora et al., 2013; Dall'Acqua et al., 2007), antibacterial, antiparasitic (Szakiel et al., 2008), anti-inflammatory (Hamburger

et al., 2003), anti-tumor (Ukiya et al., 2006), melanin biosynthesis stimulatory (Zaki et al., 2016) and cytotoxic activities (D'Ambrosio et al., 2015).

In Algeria, the genus *Calendula* is represented by 8 species, among them *Calendula stellata* Cav. (Asteraceae), a small annual herb, growing to a height of 30 cm. Leaves are oval or oblong, somewhat pointed, wavy-toothed. Stems are scabrous; achenes outer five with membranous toothed margins, the five inner ones “boat-shaped” and smooth on the back, the rest is angular and muricated on the back (Booth, 1999; Quezel and Santa, 1963). The available literature reveals that only the composition of fatty acids and volatile oils of *C. stellata* was investigated (Baciu et al., 2010; Chisholm and Hopkins, 1966; Naguib et al., 2005).

Here we report the isolation and structural elucidation of five previously undescribed saponins in addition to fifteen known compounds from *Calendula stellata* whole plant. The antimicrobial activity of the crude 70% EtOH extract was evaluated against a panel

* Corresponding author.

E-mail address: abdulmagid.alabdulmagid@univ-reims.fr (A. Alabdul Magid).

of 22 bacteria and yeasts. The antibacterial activity of compounds **1–20** was tested by bioautography on *Staphylococcus aureus* followed by the determination of MIC values of active compounds against 5 bacteria. The cytotoxic activity of previously undescribed compounds was evaluated *in vitro* against fibrosarcoma cell line (HT1080) and human lung cancer cell line (A549).

2. Results and discussion

The whole plant *C. stellata* was extracted with 70% aqueous ethanol. The extract was subjected to a Diaion HP-20 column eluted with different gradients of water and methanol mixture to give five fractions (A–E). Further purification of fractions C–E using combination of silica gel flash chromatography, RP-18 flash chromatography and semi-preparative HPLC yielded five previously undescribed bidesmosidic triterpenoid saponins named calendustellatosides A–E (**1–5**) and fifteen known compounds (**6–20**). Elucidation of their structures was performed by NMR analysis (^1H , ^{13}C , COSY, ROESY, HSQC, and HMBC) and mass spectrometry (HR-ESI-MS). To determine whether sugars belong to the L or D-series, acid hydrolysis was conducted on a part of combined fractions C–E from which compounds **1–20** were purified. After purification of the aqueous layer, three monosaccharides were identified as glucose, galactose and glucuronic acid by comparison with authentic samples on TLC and the measurement of their optical rotation revealed that they belong to the D-series (see experimental).

The known compounds were elucidated as 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (calenduloside B) (**6**) (Pizza et al., 1987), 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (calenduloside D) (**7**) (Vidal-ollivier et al., 1989), 3-O- β -D-glucopyranosyl oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (silphioside B) (**8**) (Zhang et al., 2013), 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl oleanolic acid (arvensoside B) (**9**) (Pizza et al., 1987), 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl oleanolic acid (osteosaponin-I) (**10**) (Ahmed et al., 2010), 3-O- β -D-glucuronopyranosyl-echinocystic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (acanthopanaxoside E) (**11**) (Li et al., 2007), 3-O- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (Chikusetsusaponin) (**12**) (Penders and Delaude, 1994), 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (zingibroside R₁) (**13**) (Huan et al., 1998), 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (udosaponin B) (**14**) (Lavaud et al., 1992), 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid (calenduloside G) (**15**), 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranosyl-oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (calendulaglycoside A) (**16**), 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (calendulaglycoside C) (**17**) (Pizza et al., 1987), 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl machaerinic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (**18**) (Michl et al., 2000), quercetin-3-O- β -D-galactopyranoside (hyperin) (**19**) (Pereira et al., 2012) and isorhamnetin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside (**20**) (Burasheva et al., 1975; Labeled et al., 2016) (Fig. 1). Their spectroscopic data were in perfect agreement with those reported in the literature.

Calendustellatoside A (**1**) was obtained as white amorphous powder. Its molecular formula was determined as C₅₄H₈₈O₂₄ from the [M + Na]⁺ ion peak at *m/z* 1143.5554 in the positive HR-ESI-MS (calcd C₅₄H₈₈O₂₄Na, 1143.5563). The ^{13}C NMR spectrum showed 54 carbon signals, of which 30 were assigned to the aglycone part and 24 to the sugar units comprising four hexoses. The ^1H NMR spectrum of **1** (Table 1) showed signals assignable to seven angular

methyl groups as singlets at δ_{H} 0.81, 0.89, 0.90, 0.97, 0.98, 1.09 and 1.38, one olefinic proton at δ_{H} 5.34 and two oxygenated methines at δ_{H} 3.24 and 4.56. The long range correlations observed in the HMBC spectrum of **1** from the methyl protons signals (23-, 24-, 25-, 26-, 27-, 29- and 30-CH₃), the oxygenated methine at δ_{H} 3.24 (dd, $J = 11.7$, 4.3 Hz, H-3) and the olefinic proton signal allowed the assignment of most aglycone carbons, and were characteristic to an olean-12-ene skeleton with its olefinic carbon signals at δ_{C} 122.3 (C-12) and 143.2 (C-13). A carbonyl signal observed at δ_{C} 175.7 (C-28) in the ^{13}C NMR spectrum (Table 1) together with the correlations in ^1H - ^1H COSY spectrum observed between the protons in position 15 at δ_{H} 1.40 (H-15eq) and 1.92 (H-15ax) and the oxygenated proton signal at δ_{H} 4.56 (t, $J = 3.3$ Hz), assigned to H-16, were characteristic for 16 α -hydroxyoleanolic acid (16 α -hydroxyoleanolic acid = echinocystic acid) (Li et al., 2007). Full assignments of the proton and carbon resonances of the aglycone were achieved by 2D NMR analysis (Table 1). The α -axial orientation of OH-16 in compound **1** was justified by the relatively small value of the vicinal coupling constant of H-16eq/H-15ax and H-16eq/H-15eq ($J = 3.3$ Hz) like in echinocystic acid (Li et al., 2007), whereas in triterpenes possessing β -equatorial orientation of OH-16 as cochalic acid (16 β -hydroxyoleanolic acid) the α -axial H-16 resonated at δ_{H} 4.04 as doublet of doublets with two different vicinal coupling constants ($J_{16\text{ax}-15\text{ax}} = 11.6$ and $J_{16\text{ax}-15\text{eq}} = 4.3$ Hz) (Nielsen et al., 2010). This was confirmed by the correlations observed in the ROESY spectrum of **1** between β -equatorial H-16 and β -axial H-15 (δ_{H} 1.92), and H-15ax and β -axial H₃-26 (Fig. 2). In the ^1H NMR spectrum, four anomeric proton signals at δ_{H} 4.50 (d, $J = 7.4$ Hz), 4.66 (d, $J = 7.8$ Hz), 5.00 (d, $J = 7.9$ Hz) and 5.37 (d, $J = 8.2$ Hz) give correlations in the HSQC spectrum with their anomeric carbon signals at δ_{C} 104.7, 103.3, 101.8 and 94.3, respectively, suggesting the occurrence of four sugar units. The ring protons of the monosaccharide residues were assigned starting from the anomeric protons by means of the COSY, HSQC, HMBC and ROESY NMR plots (Table 2). Based on the assigned protons, the corresponding ^{13}C resonances of each sugar unit were identified by HSQC spectrum and further confirmed by HMBC experiment. All the monosaccharides were determined to be in pyranose form by their ^{13}C NMR data and confirmed by ROESY spectrum. The assignments of the proton and carbon resonances by extensive 2D NMR and the results of acid hydrolysis revealed the presence of three β -D-glucopyranose units (glc', glc'' and glc''') and one β -D-galactopyranose (gal), whose anomeric configurations (β) were determined by the $J_{\text{H-1,H-2}}$ coupling constants and the comparison of ^{13}C NMR data with those in the literature (Agrawal and Bansal, 1989). The steric series (D) were determined after acid hydrolysis of the saponin mixture (see experimental). Starting from the anomeric proton at δ_{H} 4.50 (glc'), the ^1H and ^{13}C NMR signals belonging to the same system were assigned by analysis of 2D NMR spectra to a 2,3-di-substituted β -D-glucopyranose ($\delta_{\text{C-2}}$ 77.3 and $\delta_{\text{C-3}}$ 86.2) (Ahmed et al., 2010) (Table 2). In the same manner, two terminal β -D-glucopyranose units [glc'' (δ_{H} 5.00, d, $J = 7.9$ Hz) and glc''' (δ_{H} 5.37, d, $J = 8.2$ Hz)] were identified according to their carbons chemical shift values and the large coupling constants ($J_{\text{H1,H2}}$, $J_{\text{H2,H3}}$, $J_{\text{H3,H4}}$, $J_{\text{H4,H5}} \geq 7.4$ Hz) (Table 2) (Vidal-ollivier et al., 1989). Starting from the anomeric proton at δ_{H} 4.66, d, $J = 7.8$ Hz) a terminal β -D-galactopyranose unit (gal) was identified by analysis of 2D NMR spectra of **1**, characterized by the large coupling constants $J_{\text{H1,H2}}$ and $J_{\text{H2,H3}}$ (≥ 7.8 Hz) and the small coupling constant between H-3 and H-4 ($J_{\text{H3,H4}} = 3.3$ Hz) as summarized in Table 2 (Agrawal and Bansal, 1989). The sequence and the attachment of the saccharide were determined by an HMBC experiment. The significant glycosylation shift of C-3 (δ_{C} 90.9) and C-28 (δ_{C} 175.7) of the aglycone suggested **1** to be a bidesmosidic glycoside. The cross-peak observed in the HMBC spectrum between H-1 of glc''' and C-28 indicated that glc''' was connected to C-28 of the aglycone. The linkage of the terminal

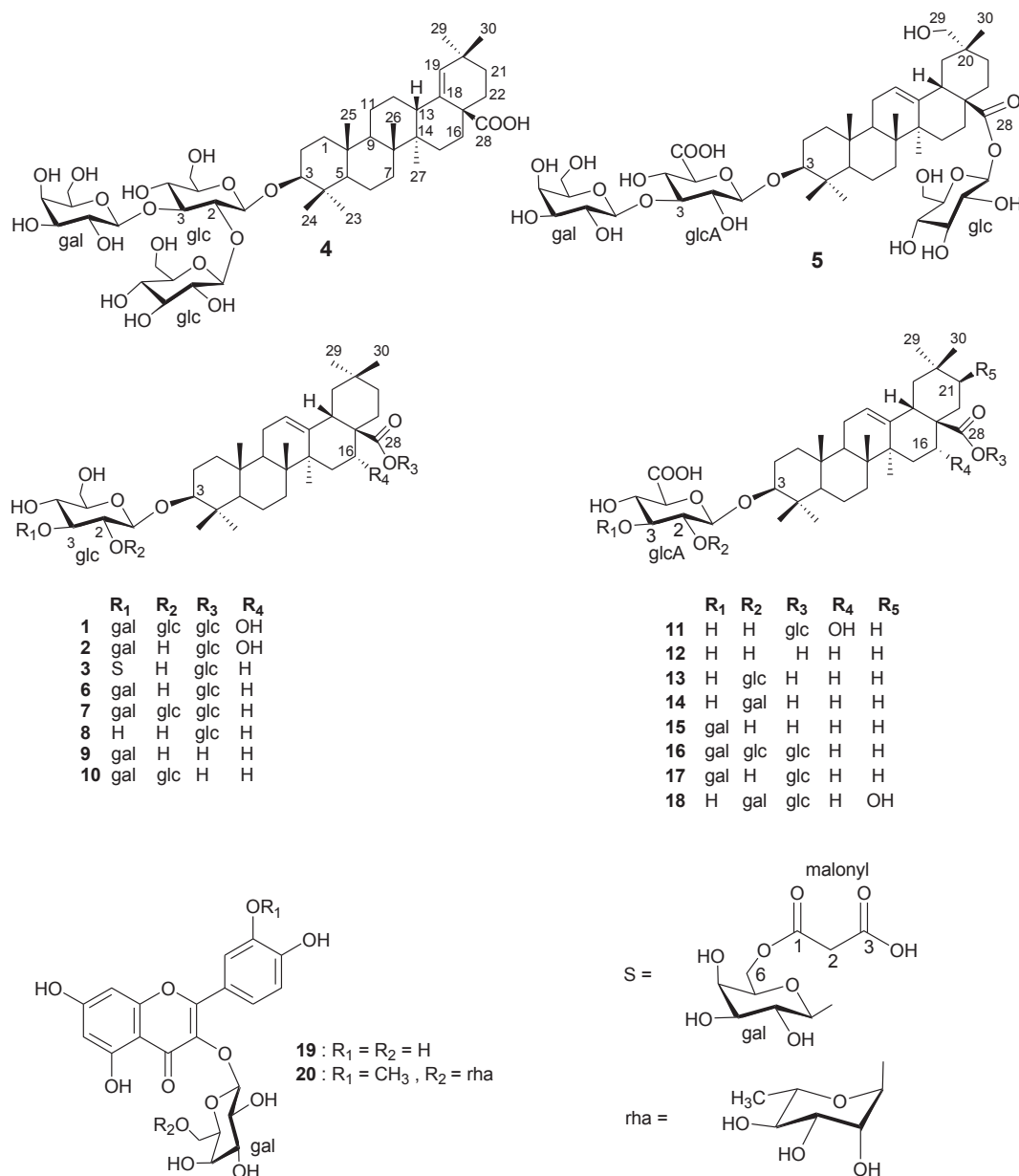


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–20 isolated from *Calendula stellata*.

glc'' at C-2 of the inner glc' was indicated by the correlation between H-1 of the glc'' and C-2 of glc' in the HMBC spectrum. In a similar fashion, the linkage of the terminal gal at C-3 of the inner glc' was indicated by the correlations between H-1 of gal and C-3 of glc'. Furthermore, comparison of ¹H and ¹³C NMR values of oligosaccharide part with those of 7 indicated that 1 and 7 possess the same trisaccharide (β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)-[β-D-galactopyranosyl-(1 → 3)]-β-D-glucopyranosyl) linked to C-3 of the aglycone and a β-D-glucopyranose linked to C-28 of the aglycone (Vidal-ollivier et al., 1989). Consequently, the structure of calendustellatocide A (1) was concluded to be 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 2)-[β-D-galactopyranosyl-(1 → 3)]-β-D-glucopyranosyl echinocystic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester.

The positive HR-ESI-MS of calendustellatocide B (2) displayed an [M+Na]⁺ ion peak at m/z 981.5029, corresponding to the molecular formula C₄₈H₇₈O₁₉ (calcd C₄₈H₇₈O₁₉Na, 981.5035), suggesting the lack of one hexose unit compared to 1. Comparison of ¹H and ¹³C

NMR values and the analysis of the HMBC correlations showed that 1 and 2 contained the same aglycone (echinocystic acid) (Table 1). The positive HR-ESI-MS suggested the presence of three hexose units and this was confirmed by the presence of three anomeric proton and carbon signals in the ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 2). The detailed analysis of the 2D NMR spectra led to the identification, as in 1, of a terminal β-D-galactopyranose (δ_{H-1} 4.53, d, J = 7.8 Hz, gal), a terminal β-D-glucopyranose (δ_{H-1} 5.37, d, J = 8.1 Hz, glc'') linked to an ester group and a C-3 monosubstituted β-D-glucopyranose (δ_{H-1} 4.39, d, J = 7.5 Hz, glc') units. The sequence and the linkage of the saccharide chain were deduced from the HMBC experiment, which showed long-range correlations between H-1 of gal and C-3 of glc' (δ_C 86.5), H-1 of glc' and C-3 of the aglycone (δ_C 89.4), and H-1 of glc'' and C-28 of the aglycone (δ_C 175.8). Comparison of ¹³C NMR data of 2 with those of 6 indicated that 2 and 6 possessed the same disaccharide [β-D-galactopyranosyl-(1 → 3)]-β-D-glucopyranosyl moiety linked to C-3 and a β-D-glucopyranosyl

Table 1
NMR spectroscopic data of the aglycone moieties for compounds **1–5** in CD₃OD (δ in ppm).

	1 ^a		2 ^a		3 ^a		4 ^b		5 ^b	
	δ_H m (J in Hz)	δ_C	δ_H m (J in Hz)	δ_C	δ_H m (J in Hz)	δ_C	δ_H m (J in Hz)	δ_C	δ_H m (J in Hz)	δ_C
1	1.06 m	38.5	1.15 m	38.5	1.02 m	38.4	1.02 m	38.9	0.98 m	38.6
	1.68 m		1.66 m		1.65 m		1.78 m		1.63 m	
2	1.76 m	25.7	1.72 m	25.6	1.71 m	25.6	1.77 m	25.9	1.70 m	25.7
	2.01 m		1.95 m		1.95 m		2.02 m		1.91 m	
3	3.24 dd (11.7, 4.3)	90.9	3.23 dd (11.0, 4.4)	89.4	3.21 dd (11.7, 4.3)	89.4	3.23 dd (14.0, 4.8)	90.9	3.20 dd (11.7, 4.5)	89.6
4	–	39.1	–	38.8	–	38.8	–	39.2	–	39.0
5	0.81 m	55.7	0.81 m	55.8	0.81 m	55.7	0.77 brd (11.9)	55.9	0.81 m	55.8
6	1.41 m	17.9	1.42 m	17.9	1.42 m	17.9	1.40 m	17.8	1.41 m	18.1
	1.56 brd (11.8)		1.56 m		1.57 m		1.56 brd (11.8)		1.56 m	
7	1.37 m	30.3	1.36 m	32.8	1.34 m	32.6	1.40 m	34.4	1.34 m	32.7
	1.53 brt (11.8)		1.54 m		1.50 m		1.49 m		1.50 m	
8	–	41.3	–	39.4	–	39.3	–	40.5	–	39.5
9	1.66 m	46.8	1.66 m	46.8	1.61 m	47.9	1.33 m	51.2	1.61 m	47.1
10	–	36.5	–	36.5	–	36.5	–	36.7	–	36.7
11	1.93 m	23.1	1.92 m	23.1	1.92 m	23.2	1.34 m	20.9	1.91 m	23.3
							1.60 m			
12	5.34 t (3.4)	122.3	5.34 t (3.3)	122.3	5.27 t (3.5)	122.4	1.62 m	25.8	5.28 t (3.5)	122.7
13	–	143.2	–	143.2	–	143.5	2.33 brd (11.7)	41.2	–	143.5
14	–	39.5	–	41.3	–	41.5	–	42.3	–	41.6
15	1.40 m	34.9	1.38 m	34.9	1.11 m	27.5	1.22 m	29.4	1.09 m	27.7
	1.92 m		1.89 m		1.83 m		1.69 m		1.81 m	
16	4.56 t (3.3)	73.5	4.55 t (3.2)	73.5	1.74 m	22.6	1.94 m	33.4	1.72 m	22.8
					2.07 td (13.6, 3.5)		2.15 m		2.06 td (13.2, 3.7)	
17	–	46.7	–	48.1	–	46.6	–	48.2	–	47.3
18	3.02 dd (13.5, 4.3)	40.7	3.02 dd (13.8, 3.9)	40.7	2.88 dd (13.7, 4.2)	41.2	–	137.0	2.90 dd (13.8, 3.6)	40.6
19	1.08 m	46.4	1.08 m	46.4	1.18 m	45.8	5.11 s	133.1	1.10 m	40.1
	2.31 t (13.5)		2.31 t (13.6)		1.74 m				1.83 t (13.8)	
20	–	29.9	–	29.9	–	30.1	–	31.6	–	35.5
21	1.18 dd (14.3, 5.1)	35.1	1.18 m	35.0	1.24 m	33.5	1.35 m	33.9	1.16 m	28.1
	1.96 m		1.95 m		1.43 m		1.48 m		1.50 m	
22	1.81 m	32.8	1.79 m	30.3	1.63 m	31.7	1.36 m	33.4	1.68 m	31.2
	1.96 m		1.95 m		1.75 m		1.58 m		1.76 m	
23	1.09 s	26.9	1.08 s	27.1	1.08 s	27.1	1.08 s	26.7	1.06 s	27.2
24	0.89 s	15.4	0.86 s	16.3	0.88 s	15.6	0.87 s	15.3	0.85 s	15.7
25	0.98 s	14.7	0.99 s	14.7	0.98 s	14.6	0.93 s	15.9	0.96 s	14.8
26	0.81 s	16.4	0.81 s	16.5	0.83 s	16.3	1.05 s	15.3	0.82 s	16.5
27	1.38 s	25.8	1.39s	25.8	1.18 s	24.9	0.82 s	14.1	1.18 s	25.1
28	–	175.7	–	175.8	–	176.7	–	180.6	–	176.8
29	0.90 s	31.9	0.91 s	31.9	0.94 s	32.1	0.98 s	28.1	3.21 m	73.1
30	0.97 s	23.6	0.98 s	23.6	0.96 s	22.5	1.01 s	29.4	0.93 s	18.3

^a NMR spectra recorded at 500 MHz (¹H) and 125 MHz (¹³C).

^b NMR spectra recorded at 600 MHz (¹H) and 150 MHz (¹³C).

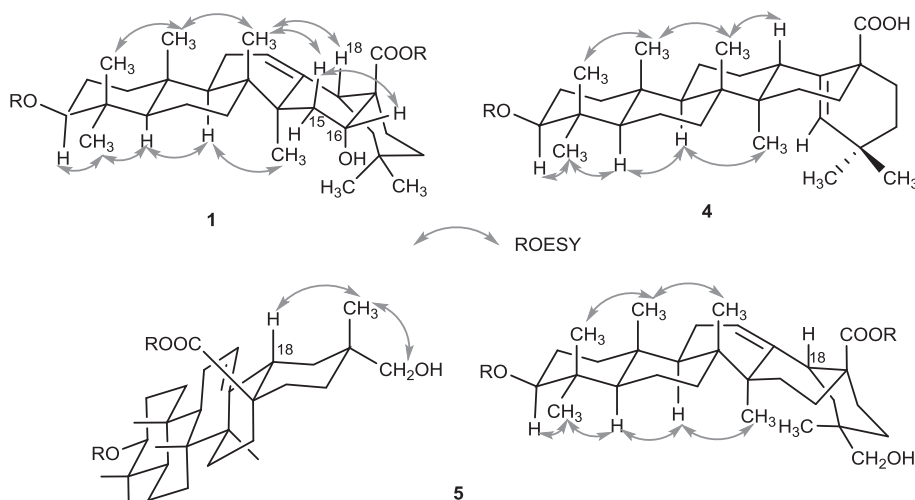


Fig. 2. Key ROESY relationships of compounds **1**, **4** and **5**.

residue linked to C-28 (Pizza et al., 1987). These findings led to the assignment of calendustellatocide B (**2**) as 3-O- β -D-

galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl echinocystic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

and between H-19 and C-17 (δ_C 48.2), C-13 (δ_C 41.2), C-21 (δ_C 33.9), C-20 (δ_C 31.6) and C-30 (δ_C 29.4). The β -axial orientation of H-13 was justified by the value of the vicinal coupling constant H-13/H-12ax ($J = 11.7$ Hz) and by the ROESY correlation observed between H-13 and β -axial H₃-26 (δ_H 1.05), and between the β -axial methyl groups H-26/H-25 and H-25/H-24 (Fig. 2). Unambiguous assignments of the ¹³C and ¹H NMR spectra of the aglycone part of compound **4** were determined with the aid of 2D NMR experiments (Table 1). The ¹³C chemical shifts were in good agreement with literature values of morolic acid (Hamburger et al., 2002; López-Martínez et al., 2013), with the noticeable exception of the C-3 resonance, which was indicative of glycosylation at C-3. The identification of β -D-galactopyranosyl and two β -D-glucopyranosyl units was achieved by considering 2D NMR spectra and spin-spin coupling in ¹H NMR. Comparison of ¹H and ¹³C NMR values of oligosaccharide part with those of **10** indicated that **4** and **10** possess the same trisaccharide (β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl) linked to C-3 of the aglycone (Ahmed et al., 2010). This was confirmed by the correlations observed in HMBC spectrum between the gal-H-1 glc'-C-3, glc''-H-1/glc'-C-2 and glc'-H-1/C-3. According to the above results, the structure of calendustellatolide D (**4**) was elucidated as 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl morolic acid.

The molecular formula C₄₈H₇₆O₂₀ of calendustellatolide E (**5**) was deduced from its positive HR-ESI-MS ([M+Na]⁺ at *m/z* 995.4820). The ¹H NMR spectrum of **5** showed signals for six methyl groups as singlets, one olefinic proton at δ_H 5.28 (H-12), one oxygenated methine at δ_H 3.20 (H-3) and one primary alcoholic function at δ_H 3.21 (H₂-29) suggesting an oleanane-type skeleton (Table 1). In the HMBC spectrum, the cross-peaks observed between H₂-29 and C-19 (δ_C 40.1), C-20 (δ_C 35.5), C-21 (δ_C 28.1) and C-30 (δ_C 18.3) placed a hydroxymethylene at C-20. Full assignments of the proton and carbon resonances of the aglycone were achieved by analysis of the COSY, HSQC and HMBC spectra (Table 1). The triterpene skeleton of **5** was identified as 29-hydroxyoleanolic acid (mesembryanthemoidigenic acid) (Plasman et al., 2000). The location of the primary hydroxyl group at C-29 was deduced from the chemical shift of C-30 at δ_C 18.3, characteristic of an axial position, and by comparison of the ¹³C NMR spectrum of **5** with that of 29-hydroxyoleanolic acid (mesembryanthemoidigenic acid; δ_{C-29} 74.8 and δ_{C-30} 19.5) (Plasman et al., 2000) and 30-hydroxyoleanolic acid (queretaroic acid; δ_{C-30} 66.3 and δ_{C-29} 28.1) (Martínez et al., 2013). The ROESY experiment revealed also several correlations, including H₃-30 (δ_H 0.93)/H-18 (δ_H 2.90), H-18/H-26, H-26/H-25 and H-25/H-24 indicating their β -axial-orientation (Fig. 2). The sugar part of **5** consisted of three residues as evidenced by ¹H and ¹³C NMR spectra which displayed three anomeric protons at δ_H 4.42 (d, $J = 7.1$ Hz), 4.57 (d, $J = 7.7$ Hz) and 5.40 (d, $J = 8.1$ Hz), attached to anomeric carbons at δ_C 105.3, 104.2 and 94.5, respectively in the HSQC spectrum (Table 2). A glucuronic acid (glcA) was identified starting from the anomeric proton at δ_H 4.42, and characterized by a five spin system possessing large coupling constants ($J \geq 7.1$ Hz) and by a carbonyl (C-6) resonating at δ_C 171.9 coupled with H-5 (δ_H 3.69) of the same sugar in the HMBC spectrum. The ¹H and ¹³C NMR signals of the glucuronic acid of **5** were fully determined by analysis of the COSY, HSQC and HMBC experiments and revealed it to be substituted at C-3 position (δ_C 85.0) (Table 2). As in compound **2**, a terminal β -D-galactopyranose (δ_{H-1} 4.57) and a terminal β -D-glucopyranose (δ_{H-1} 5.40) were identified (Table 2). The sequence and the attachment of the two saccharide chains were identical to those of calendulaglycoside C (3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester) **17** (Pizza et al., 1987). This was confirmed by the cross-peak in the HMBC experiment between gal-H-1/glcA-C-3, glcA-H-1/C-3 and

glc-H-1/C-28. Consequently, the structure of calendustellatolide E (**5**) was concluded to be 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl mesembryanthemoidigenic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester.

The antimicrobial activity of the 70% ethanol extract obtained from the whole plant of *Calendula stellata* was evaluated against 22 micro-organisms including 17 Gram-positive and Gram-negative bacteria and 5 yeasts by the MIC determination method in solid media. The results are presented in Table 3. The 70% ethanol extract showed a low antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Streptococcus pyogenes* (MIC 10 mg/mL), whereas the extract showed a relatively higher activity against *Shigella sonnei* (MIC 1.2 mg/mL). Regarding antifungal activity, the 70% ethanol extract was not active against all the examined yeasts at the concentration of 10 mg/mL.

In order to screen the antibacterial potential of the compounds **1–20** isolated from the 70% ethanol extract of *C. stellata*, a bioautography assay was applied against a sensitive strain of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* CIP 53.154), a Gram-positive cocci bacterium frequently found on the skin and in the respiratory tract and that can be responsible for nosocomial infections. Currently its resistance to antibiotics is an acute problem for the treatment of patients. Compounds **3**, **4**, **6–10**, **16** and **19** were the only active compounds as revealed by the white inhibition zones observed on the TLC plate around all compound spots. Except compound **16**, compounds **11–18**, with a glucuronic acid attached to C-3 of the aglycone did not show any antibacterial activity. Similarly, the saponins **1**, **2**, and **11** with echinocystic acid (16 α -hydroxyoleanolic acid) and **5** with 29-hydroxyoleanolic acid were not active. A serial dilution technique with 96-well microtiter plates was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of these nine active compounds against *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, *Escherichia coli* CIP 54.127, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Table 4). The results showed a high inhibitory effect of compounds **4** against *E. faecalis* (MIC 31.2 μ g/mL) and **10** against *S. epidermidis*

Table 3
Antimicrobial activity of 70% ethanol extract of *Calendula stellata* (solid medium).

Micro-organisms	MIC (mg/mL)	Positive controls MIC (μ g/mL)		
		G	V	A
Gram positive bacteria				
<i>Bacillus subtilis</i>	>10	0.12	2	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1034	>10	16	>64	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	10	0.5	4	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154	10	4	>64	NT
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>10	0.25	4	NT
<i>Micrococcus luteus</i>	10	0.5	4	NT
<i>Listeria innocua</i>	>10	0.5	S	NT
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10	2	1	NT
Gram negative bacteria				
<i>Escherichia coli</i> CIP 54.127	>10	S	R	NT
<i>Enterobacter cloacae</i>	>10	S	R	NT
<i>Salmonella enterica</i>	>10	S	R	NT
<i>Serratia marcescens</i>	>10	0.5	>64	NT
<i>Proteus vulgaris</i>	>10	S	R	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>10	>64	>64	NT
<i>Providencia stuartii</i>	>10	2	>64	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	>10	8	>64	NT
<i>Shigella sonnei</i>	1.2	0.5	8	NT
Yeast				
<i>Candida albicans</i>	>10	>64	>64	0.5
<i>Candida glabrata</i>	>10	>64	>64	0.25
<i>Candida tropicalis</i>	>10	>64	>64	0.25
<i>Candida kefyr</i>	>10	>64	>64	0.25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	>10	>64	>64	0.5

MIC: minimum inhibitory concentration, NT: not tested. Positive controls: G: Gentamicin, V: Vancomycin and A: Amphotericin B.

Table 4
Minimum inhibitory concentration (MIC) values of compounds isolated from *C. stellata* in liquid medium.^a

Compounds	MIC (μg/mL)				
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 1034)	<i>S. aureus</i> (CIP53.154)	<i>E. coli</i> (CIP 54.127)	<i>S. epidermis</i>	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC9027)
3	250	500	500	500	500
4	31.2	250	500	250	125
6	125	250	250	125	125
7	500	500	>500	500	>500
8	250	250	>500	250	250
9	125	250	500	500	125
10	250	500	>500	62.5	250
16	500	500	>500	>500	250
19	125	250	500	125	125

^a No bacterial growth inhibition observed in bioautography assay for compounds **1**, **2**, **5**, **11**, **15**, **17**, **18** and **20**.

(MIC 62.5 μg/mL). These MIC values were equal or less than the MIC values of commercially available antibiotics (Table 3). It can be noted that these two compounds (**4** and **10**) are monodesmoside saponins possessing a trisaccharide chain linked to C-3 of the aglycone. Compounds **6** and **19** were moderately active against the five tested bacteria with MICs ranging from 125 to 250 μg/mL. Compounds **6**, **9** and **10** possess the same aglycone (oleanolic acid) but differ in the nature of the saccharide part linked to C-3, disaccharide in **6** and **9** (gal-(1 → 3)-glc-) and trisaccharide in **10** (glc-(1 → 2)-[gal-(1 → 3)-]glc-). The bidesmoside **6** is slightly more active than the monodesmoside **9** against *E. coli* and *S. epidermis* (Table 3). Thus, the nature of the saccharidic part can influence the antibacterial activity. The comparison of the activity of compounds **3** and **6**, indicated that the malonyl group in **3** is not favorable for the antibacterial activity.

The cytotoxic activity of previously undescribed compounds (**1**–**5**) was evaluated *in vitro* using two tumor cell lines, the fibrosarcoma (HT1080) and human lung cancer (A549). The resulting IC₅₀ values are listed in Table 5. Calendustellatoside B (**2**) and D (**4**) exhibited a low cytotoxic activity against the fibrosarcoma HT1080 cell line with IC₅₀ values of 39 ± 0.5 and 47 ± 0.6 μM respectively. A previous study indicated that the presence of sugar(s) at position 28 increases the cytotoxic activity of the saponins of echinocystic acid (Zhang et al., 2013). In the literature and from *C. officinalis*, the modified structure of calendulaglycoside F (3-*O*-β-D-glucuronopyranosyl oleanolic acid 28-*O*-β-D-glucopyranosyl ester) and calendulaglycoside G (3-*O*-β-D-galactopyranosyl-(1 → 3)-β-D-glucuronopyranosyl oleanolic acid) which bear glucuronic acid as the inner sugar linked at C-3 of the aglycone showed potent cytotoxic activity against three cell lines (colon cancer, leukemia and melanoma cells) with growth inhibition values in the range of 0.77–20 μM (Ukiya et al., 2006). Calendustellatosides A–E were inactive (IC₅₀ > 50 μM) against the human lung cancer cell line (A549).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Optical rotations of pure compounds were measured in MeOH

Table 5
Cytotoxic activity of compounds **1**–**5** against HT1080 and A549 cell lines.

Compounds	IC ₅₀ (μM)	
	HT1080	A549
1	>50	>50
2	47 ± 0.60	>50
3	>50	>50
4	39 ± 0.50	>50
5	>50	>50
Doxorubicin ^a	0.59 ± 0.05	0.59 ± 0.04

^a The positive control.

or H₂O using a Perkin-Elmer 341 Polarimeter. ¹H-, ¹³C-NMR and 2D-NMR measurements were recorded in CD₃OD on a Bruker Avance III 500 spectrometer (¹H at 500 MHz and ¹³C at 125 MHz) or on a Bruker Avance AVIII-600 spectrometer (¹H at 600 MHz and ¹³C at 150 MHz) equipped with a 5 mm TCI cryoprobe. 2D-NMR experiments were performed using standard Bruker microprograms (TopSpin 3.2 software). HR-ESI-MS analysis was conducted using a Micromass Q-TOF micro instrument. CC was carried out on HP-20 resin (Sigma Aldrich). Flash chromatography was carried out on a Grace Reveleris system equipped with dual UV and ELSD detection using Grace[®] cartridges (Silica gel or RP-C₁₈). HPLC separations were performed on a Dionex apparatus equipped with an ASI-100 autosampler, an Ultimate 3000 pump, a STH 585 column oven, a diode array detector UVD 340S and a Chromeleon software. A prepacked RP-C₁₈ column (Phenomenex 250 × 15 mm, Luna 5 μ) was used for semi-preparative HPLC. The eluting mobile phase consisted of H₂O with TFA (0.0025%) and CH₃CN with a flow rate of 5 mL/min and the chromatogram was monitored at 205 and 210 nm. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out using silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated aluminium plates (0.2 mm, Merck). After developing with solvent systems, spots were visualized under UV light (254 and 366 nm) and sprayed with 50% H₂SO₄ followed by heating.

3.2. Plant material

The whole plant *Calendula stellata* Cav. (Asteraceae) was collected at altitudes of 616 m (latitude 007°40'43.33"E and longitude 036°21'45.01"N) on Hammam M'Baïla town in Guelma province (North-Eastern Algerian), in May 2015 and it was authenticated by Mr. Kamel Kabouche. A voucher specimen (LOST.Cs.05.15) was deposited at the University of Constantine, Algeria.

3.3. Extraction and isolation

Air-dried and powdered *C. stellata* whole plant (261.4 g) was extracted with 70% EtOH (3.0 L) by soaking three times for 24 h each at room temperature. Evaporation of the combined solvent under reduced pressure provided the 70% EtOH extract (57 g). A part of this extract (40 g) was subjected to chromatography on a Diaion HP-20 column (4.3 × 40 cm). Step gradient elution was conducted with H₂O–MeOH (0, 25, 50, 75 and 100%, each 2 L), to give fractions A (22 g), B (2.4 g), C (2.84 g), D (1.45 g) and E (4.1 g), respectively. Fraction C and D were combined and submitted to flash chromatography over silica gel, eluted by a gradient system of CHCl₃–MeOH (10:0 to 4:6), in 32 min to afford 39 sub-fractions. The combined sub-fractions [32–33] were purified through RP-C₁₈ semi-prep HPLC with a gradient system (22–40% CH₃CN, 20 min) to yield compound **5** (*R*_t 12.0 min, 2 mg) and **18** (*R*_t 11.0 min, 2 mg).

Fraction E was also subjected to flash chromatography over silica gel, eluted by gradient system of CHCl_3 -MeOH (10:0–4:6), in 45 min, to afford 26 fractions (E1–E26) leading to compounds **6** (19 mg) in the fraction E12 and **7** (26 mg) in the fraction E21. Fraction E9 (73 mg) was purified by semi-prep HPLC eluted with gradient system of 25–70% CH_3CN , in 20 min to give **19** (Rt 4.9 min, 3 mg), **8** (Rt 12.0 min, 7 mg) and **9** (Rt 18.3 min, 8 mg). Fraction E10 (110 mg) was purified by semi-prep HPLC using a gradient (25–50% CH_3CN , in 20 min) affording compound **20** (Rt 7.8 min, 3 mg). Fraction E16 (135 mg) was also subjected to semi-prep HPLC with gradient system (30–70% CH_3CN), in 30 min giving compounds **2** (Rt 14.5 min, 3 mg), **11** (Rt 16.0 min, 3 mg), **3** (Rt 19.5 min, 6 mg), **12** (Rt 20.3 min, 2 mg), **4** (Rt 23.6 min, 2 mg), **10** (Rt 25.7 min, 6 mg), **13** (Rt 27.7 min, 3 mg), **14** (Rt 27.9 min, 3 mg), and **15** (Rt 29.6 min, 3 mg). Fraction E23 was purified by semi-prep HPLC eluted with gradient system (35–45% CH_3CN , in 20 min), to give compounds **1** (Rt 9.6 min, 3 mg), **16** (Rt 15.9 min, 6 mg) and **17** (Rt 16.7 min, 4 mg).

3.4. Acid hydrolysis

A part of combined fractions C, D and E of Diaion HP-20 CC (300 mg, 100 mg of each) was refluxed with 30 mL of 2M TFA (90 °C, 3 h). The mixture was left to cool and extracted with ethyl acetate (3 × 15 mL) and the aqueous acid solution was evaporated to furnish the monosaccharides residue (150 mg). Three monosaccharides were identified as glucose, galactose and glucuronic acid by comparison with authentic samples on TLC in MeCOEt:iso-PrOH:acetone:H₂O (20:10:7:6); detection was accomplished with H₂SO₄ 50% and heating. A part of the sugar mixture (50 mg) was dissolved in pyridine (1 mL) and subjected to a preparative TLC using the same solvent. The optical rotation of each purified sugar was measured to reveal D-glucose ($[\alpha]^{20}_D +30.6$ (c 0.5, H₂O), D-galactose ($[\alpha]^{20}_D +44.2$ (c 0.75, H₂O) and D-glucuronic acid ($[\alpha]^{20}_D +29.2$ (c 0.33, H₂O)).

3.5. Antimicrobial activity

3.5.1. Antimicrobial screening of the ethanol extract of *Calendula stellata* against a panel of 22 microbial strains

The antimicrobial screening was performed on a total of 17 bacteria obtained from the Laboratory of Microbiology, faculty of pharmacy from the University of Reims Champagne-Ardenne including the following Gram-positive bacteria: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* 8325-4, *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua*, *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus epidermidis*, and the following Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* CIP 54.127, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Shigella sonnei*, as well as five yeasts obtained from the Laboratory of Parasitology-Mycology (Transmission Vectorielle et Epidémiologie-surveillance des Maladies Parasitaires, EA 4688) of the University of Reims Champagne-Ardenne: *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans*. The 17 bacteria and 5 yeasts were incubated overnight at 37 °C in tubes containing Mueller-Hinton (MH) broth medium. The bacteria were then diluted with MH-broth by means of serial dilution to finally reach a concentration of 10⁵ bacteria/mL. The same process was performed for bacteria and yeasts. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude 70% ethanol extract of *C. stellata* was studied using MH agar in square Petri dishes seeded by multiple inoculators as described in a previous work (Abedini et al., 2016). The crude extract was tested at six final concentrations (10, 5, 2.5, 1.2, 0.6, and 0.3 mg/mL) against the 22 microorganisms. The agar plates were incubated for 24 h at 37 °C. The

activity was then visually estimated by the presence or absence of colonies. MIC values were recorded as the lowest concentrations of compounds enabling growth inhibition. Solvents were checked for absence of antimicrobial activity. Positive antimicrobial controls were used for bacteria (gentamicin and vancomycin) and yeasts (amphotericin B).

3.5.2. Evaluation of the antibacterial activity of the isolated compounds against *Staphylococcus aureus* by bioautography

To identify the most promising compounds in terms of antimicrobial activity, an immersion bioautography method was adopted (Abedini et al., 2016). Compounds **1–20** were solubilized in methanol to obtain a solution of 2 mg/mL and 25 μL of each solution was spotted onto Merck 60 F₂₅₄ pre-coated silica gel plates (10 × 10 cm). Methanol and Gentamicin (50 μg) were also spotted on the plates as negative and positive control, respectively. The TLC plates were directly dried without migration and sterilized. The plates were then covered by Mueller-Hinton (MH) agar medium containing a *Staphylococcus aureus* 53.154 suspension (10⁵ bacteria/mL) in square Petri dishes. After incubation for 24 h at 37 °C, bacterial growth was revealed by a 2 mg/mL solution of thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) and growth inhibition zones were measured. White stains indicated where reduction of MTT to the colored formazan did not take place due to the presence of extracts that inhibited bacterial growth.

3.5.3. MIC determination of the most active compounds against *Staphylococcus aureus* by broth microdilution

A serial dilution technique using 96-well microliter plates was used to determine the MIC values of the most promising compounds as revealed by bioautography. For this purpose, nine concentrations of the most active fractions, from 500 μg/mL to 2 μg/mL, were tested. Two wells were represented as bacteria culture control (positive control) and medium sterility control (negative control). Then the wells were loaded with MH liquid medium and bacterial suspension (10⁵ bacteria/mL) giving a final volume of 200 μL. The plates were incubated overnight at 37 °C, sprayed with a 0.2 mg/mL MTT solution and incubated again at 37 °C for 30 min. Bacterial growth was indicated by a violet color whatever the color intensity, while bacterial growth inhibition was admitted only for wells which remained clear. MIC values were determined as the lowest concentrations of samples having an inhibitory effect on bacteria growth (clear wells).

3.6. Cell proliferation assay

The fibrosarcoma cells (HT1080) and human lung cancer cells (A549) were cultured respectively in Minimum Essential Media (MEM) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin Streptomycin (PS) at 37 °C with 5% CO₂ and harvested every three days for maintenance. Compounds **1–5** were dissolved in DMSO. For treatment, cells were plated at a density of 10⁴ cells/mL in 24-well plates at 37 °C. After 24 h, the culture medium was discarded and cells were treated with the compounds in a fresh culture medium at various concentrations for 72 h, while the same volume of DMSO was added in negative control wells. The concentration of DMSO did not exceed 1% to avoid significant toxicity on the tested cells. Therefore, the cells were washed once with 1 mL of D-PBS and then detached with 0.2% Trypsin/EDTA. Cell counting was carried out on a KOVA[®] slide and with a phase contrast microscope as indicated by the manufacturer. Cell growth was calculated in percentage as the fraction of cell number in treated and control cells. IC₅₀ was determined as the concentration of each compound which induced 50% inhibition of cell growth. The values represent

averages of three independent experiments. Doxorubicin was used as a positive control agent.

3.7. 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl) echinocystic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (Calendustellatocide A) (1)

$[\alpha]_D^{20}$ –4.8 (c 0.166, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR of the aglycone part, see Table 1; ^1H and ^{13}C NMR of the glycosidic part, see Table 2; HR-ESI-MS m/z : 1143.5554 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{O}_{24}\text{Na}$, 1143.5563).

3.8. 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl) echinocystic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (Calendustellatocide B) (2)

$[\alpha]_D^{20}$ –3 (c 0.1, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR of the aglycone part, see Table 1; ^1H and ^{13}C NMR of the glycosidic part, see Table 2; HR-ESI-MS m/z : 981.5029 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{19}\text{Na}$, 981.5035).

3.9. 3-O-[(6-O-malonyl)- β -D-galactopyranosyl]-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl oleanolic acid 28-O- β -D-glucopyranosyl ester (Calendustellatocide C) (3)

$[\alpha]_D^{20}$ + 20.3 (c 0.6, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR of the aglycone part, see Table 1; ^1H and ^{13}C NMR of the glycosidic part, see Table 2; HR-ESI-MS m/z : 1051.5094 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{80}\text{O}_{21}\text{Na}$, 1051.5090).

3.10. 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl morolic acid (Calendustellatocide D) (4)

$[\alpha]_D^{20}$ + 6.2 (c 0.13, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR of the aglycone part, see Table 1; ^1H and ^{13}C NMR of the glycosidic part, see Table 2; HR-ESI-MS m/z : 965.5095 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{18}\text{Na}$, 965.5086).

3.11. 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl mesembryanthemoidigenic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester (Calendustellatocide E) (5)

$[\alpha]_D^{20}$ –6° (c 0.1, MeOH); ^1H and ^{13}C NMR of the aglycone part, see Table 1; ^1H and ^{13}C NMR of the glycosidic part, see Table 2; HR-ESI-MS m/z : 995.4820 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{20}\text{Na}$, 995.4828).

Acknowledgements

The authors are grateful to MESRS Algeria for the PNE grant to Ms Meryem Lehbili, to CNRS, Conseil Régional Champagne Ardennne, Conseil Général de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR) in France, and to the PIANET CPER project for financial support. The authors warmly thank Chantal Grimplet for her technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.08.015>.

References

Abedini, A., Chollet, S., Angelis, A., Borie, N., Nuzillard, J.M., Skaltsounis, A.L., Reynaud, R., Gangloff, S.C., Renault, J.H., Hubert, J., 2016. Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. B* 1029–1030, 121–127.

Agrawal, P.K., Bansal, M.C., 1989. Flavonoid glycosides. In: Agrawal, P.K. (Ed.), *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Elsevier, Amsterdam, pp. 283–364.

Ahmed, B., Khan, R.A., Al-Howiriny, T.A., Al-Rehaily, A.J., 2010. Osteosaponins 1 and 2: two new saponin glycosides from *Osteospermum vaillantii*. *Nat. Prod. Res.* 24, 1258–1267.

Arora, D., Rani, A., Sharma, A., 2013. A review on phytochemistry and ethno-pharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacogn. Rev.* 7, 179–187.

Baciu, A.D., Mihalte, L., Sestras, A.F., Sestras, R.E., 2010. Variability of decorative traits, response to the *Aphis fabae* attack and RAPD diversity in different genotypes of *Calendula*. *Not. Bot. Horti. Agrobr.* 38, 265–270.

Booth, C.O., 1999. *Encyclopaedia of Garden Plants*, vol. 2. Daya Books, Delhi, pp. 202–203.

Burasheva, G.S.H., Mukhamedyarova, M.M., Chumbalov, T.K., 1975. Flavonoids of *Alhagi kirgisorum*. *Chem. Nat. Comp.* 11, 261–261.

Chisholm, M.J., Hopkins, C.Y., 1966. Kamolenic acid and other conjugated fatty acids in certain seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 43, 390–392.

Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Loi, M.C., Innocenti, G., 2007. Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chem.* 106, 745–749.

D'Ambrosio, M., Ciocarlan, A., Colombo, E., Guerriero, A., Pizza, C., Sangiovanni, E., Dell'Agli, M., 2015. Structure and cytotoxic activity of sesquiterpene glycoside esters from *Calendula officinalis* L.: studies on the conformation of viridiflorol. *Phytochemistry* 117, 1–9.

Hamburger, M., Adler, S., Baumann, D., Forg, A., Weinreich, B., 2003. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia* 74, 328–338.

Hamburger, M., Riese, U., Graf, H., Melzig, M.F., Ciesielski, S., Baumann, D., Dittmann, K., Wegner, C., 2002. Constituents in evening primrose oil with radical scavenging, cyclooxygenase, and neutrophil elastase inhibitory activities. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5533–5538.

Huan, V.D., Yamamura, S., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Nham, N.T., Chau, H.M., 1998. Oleanane saponins from *Polyscias fruticosa*. *Phytochemistry* 47, 451–457.

Jakupovic, J., Grenz, M., Bohlmann, F., Rustaiyan, A., Koussari, S., 1988. Sesquiterpene glycosides from *Calendula persica*. *Planta Med.* 54, 254–256.

Labeled, A., Ferhat, M., Labeled-Zouad, I., Kaplaner, E., Zerizer, S., Voutquenne-Nazabadioko, L., Alabdul Magid, A., Semra, Z., Kabouche, A., Kabouche, Z., Öztürk, M., 2016. Compounds from the pods of *Astragalus armatus* with anti-oxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities. *Pharm. Biol.* 54, 3026–3032.

Lavaud, C., Massiot, G., Oliver, M.L.L., Viari, A., Vigny, P., Delaude, C., 1992. Saponins from *Steganotaenia araliacea*. *Phytochemistry* 31, 3177–3181.

Li, F., Li, W., Fu, H., Zhang, Q., Koike, K., 2007. Pancreatic lipase-inhibiting triterpenoid saponins from fruits of *Acanthopanax senticosus*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 1087–1089.

López-Martínez, S., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S., León-Rivera, I., Rios, M.Y., 2013. Chemical constituents of the hemiparasitic plant *Phoradendron brachystachyum* DC Nutt (Viscaceae). *Nat. Prod. Res.* 27, 130–136.

Mamedova, L.A., Abasova, R.L., Aslanov, S.M., Mamedova, M.E., 1995. Fatty acid composition of neutral lipids of *Calendula persica*. *Khim. Priir. Soedin.* 6, 909–910.

Martinez, A., Rivas, F., Perojil, A., Parra, A., Garcia-Granados, A., Fernandez-Vivas, A., 2013. Biotransformation of oleanolic and maslinic acids by *Rhizomucor miehei*. *Phytochemistry* 94, 229–237.

Marukami, T., Kishi, A., Yoshikawa, M., 2001. Medicinal flowers. IV. Marigold. (2): structures of new ionone and sesquiterpene glycosides from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 974–978.

Michl, G., Abebe, D., Bucar, F., Debella, A., Kunert, O., Schmid, M.G., Mulatu, E., Haslinger, E., 2000. New triterpenoid saponins from *Achyranthes aspera* L. *Helv. Chim. Acta* 83, 359–363.

Naguib, N.Y., Khalil, M.Y., El Sherbeny, S.E., 2005. A Comparative study on the productivity and chemical constituents of various sources and species of *Calendula* plants as affected by two foliar fertilizers. *J. Appl. Sci. Res.* 1, 176–189.

Nielsen, N.J., Nielsen, J., Starek, D., 2010. New resistance-correlated saponins from the insect-resistant crucifer *Barbarea vulgaris*. *J. Food Chem.* 58, 5509–5514.

Pereira, C., Barreto, C.B., Kuster, R.M., Simas, N.K., Sakuragui, C.M., Porzel, A., Wessjohann, L., 2012. Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Quim Nova* 35, 1123–1126.

Penders, A., Delaude, C., 1994. Triterpenoid saponins from *Melanthera scandens*. *Phytochemistry* 37, 821–825.

Pizza, C., Zhou, Z.L., De Tommasi, N., 1987. Plant metabolites. Triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. *J. Nat. Prod.* 50, 927–931.

Plasman, V., Braekman, J.C., Daloze, D., Windsor, D., Pasteels, J.M., 2000. Triterpene saponins, quaternary ammonium compounds, phosphatidylcholines, and amino acids in the pronotal and elytral secretions of *Platyphora opima* and *Desmogamma subtropica*. *J. Nat. Prod.* 63, 1261–1264.

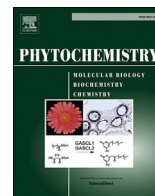
Quezel, P., Santa, S., 1963. *New Flora of Algeria and the Southern Desert Regions*, vols. 1–2. CNRS, Paris.

Szakiel, A., Ruszkowski, D., Grudniak, A., Kurek, A., Wolska, K.I., Doligalska, M., Janiszowska, W., 2008. Antibacterial and antiparasitic activity of oleanolic acid and its glycosides isolated from marigold (*Calendula officinalis*). *Planta Med.* 74, 1709–1715.

Toki, K., Takeuchi, M., Saito, N., Honda, T., 1996. Two malonylated anthocyanidin glycosides in *Ranunculus asiaticus*. *Phytochemistry* 42, 1055–1057.

Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Tokuda, H., Suzuki, T., Kimura, Y., 2006. Anti-

- inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J. Nat. Prod.* 69, 1692–1696.
- Vidal-ollivier, E., Babadjamian, A., Faure, R., Chemli, R., Boukef, K., Balansard, G., Vincent, E.J., 1989. Two-dimensional NMR studies of triterpenoid glycosides: ^1H NMR assignment of arvensoside A and B, calenduloside C and D. *Spectrosc. Lett.* 22, 579–584.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Kageura, T., Matsuda, H., 2001. Medicinal flowers. III. Marigold. (1): hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 49, 863–870.
- Zaki, A., Ashour, A., Mira, A., Kishikawa, A., Nakagawa, T., Zhu, Q., Shimizu, K., 2016. Biological activities of oleanolic acid derivatives from *Calendula officinalis* seeds. *Phytother. Res.* 30, 835–841.
- Zhang, Y., Peng, Y., Li, L., Zhao, L., Hu, Y., Hu, C., Song, S., 2013. Studies on cytotoxic triterpene saponins from the leaves of *Aralia elata*. *Food Chem.* 138, 208–213.



Triterpenoid saponins from *Scabiosa stellata* collected in North-eastern Algeria

Meryem Lehbili ^{a,b}, Abdulmagid Alabdul Magid ^{b,*}, Ahmed Kabouche ^a, Laurence Voutquenne-Nazabadioko ^b, Hamid Morjani ^c, Dominique Harakat ^d, Zahia Kabouche ^a

^a Université des frères Mentouri-Constantine, Département de chimie, Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Campus Chaabet-Ersas, 25000, Constantine, Algeria

^b ICMR-UMR CNRS 7312, Groupe Isolement et Structure, Campus Sciences, Bât. 18, BP 1039, 51687, Reims, France

^c MEDyC UMR CNRS 7369, URCA, Faculté de Pharmacie, SFR CAP Santé, 1, rue du Maréchal-Juin, 51096, Reims, France

^d Service Commun d'Analyses, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), CNRS UMR 7312, Bat. 18 B.P. 1039, 51687, Reims, Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2017

Received in revised form

5 March 2018

Accepted 7 March 2018

Keywords:

Scabiosa stellata L.

Caprifoliaceae

Triterpenoid saponins

Cytotoxic activity

ABSTRACT

Eight undescribed triterpenoid saponins, scabiostellatosides A-H, together with three known compounds were isolated from the whole plant of *Scabiosa stellata* L. Their structures were established by spectroscopic analyses (1D, 2D-NMR and HRESIMS) and chemical methods. Scabiostellatosides A-H were evaluated for their cytotoxicity against human fibrosarcoma cell line (HT1080). Scabiostellatoside F, a heptasaccharide derivative of oleanolic acid, exhibited moderate cytotoxicity against HT1080 cell line with IC₅₀ value of 12.0 μM.

© 2018 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Scabiosa stellata L., known as starflower pincushions, belongs to the Caprifoliaceae family. It is an endemic North African herbaceous, bristly-hairy annual plant (Pottier-Alapetite, 1981). In folk medicine, leaves and flowers of *Scabiosa stellata* were used in Morocco to treat heel cracks (Bammi and Douira, 2002). The majority of *Scabiosa*, comprising about 100 species, occurs in the Mediterranean region (Carlson et al., 2012) and among them, approximately 12 species can be found in Algeria (Quezel and Santa, 1963). Up to date, chemical investigations of *Scabiosa* species have mainly revealed the presence of saponins (Alimbaeva et al., 1977; Baykal et al., 1998; Zheng et al., 2004), flavonoids, coumarins (Garaev et al., 2008), and iridoid glucosides (Papalexandrou et al., 2003; Polat et al., 2010). The aglycones of *Scabiosa* saponins were identified as oleanolic acid, hederagenin, and ursolic acid with glucose, rhamnose, xylose, and arabinose as

sugar (Akimaliev et al., 1976a,b, Yusifova and Movsumov, 2015; Zheng et al., 2004), or pomolic acid with glycoside containing an allose in *Scabiosa rotata* saponins (Baykal et al., 1997, 1998). Previous chemical studies of *S. stellata* demonstrated the presence of fatty acids, β-sitosterol, stigmasterol, oleanolic, ursolic acids, bis-iridoids and flavonoids (Lehbili et al., 2018; Rahmouni et al., 2017). In a continuing of our search for bioactive constituents from Algerian flora, *Scabiosa stellata* L. was phytochemically investigated, and eight undescribed triterpenoid saponins, namely, scabiostellatosides A-H (1–8), together with three known compounds (9–11) were isolated (Fig. 1). Herein, we report the isolation and structural elucidation of the undescribed triterpenoid saponins, along with the evaluation of their cytotoxic activity against human fibrosarcoma HT1080 cell line.

2. Results and discussion

The 70% EtOH extract from the whole plant of *S. stellata* was subjected to Diaion HP-20 resin chromatography to give the saponin-containing fractions, which were subjected to further column chromatography to yield eight undescribed triterpenoid

* Corresponding author.

E-mail address: abdulmagid.alabdulmagid@univ-reims.fr (A. Alabdul Magid).

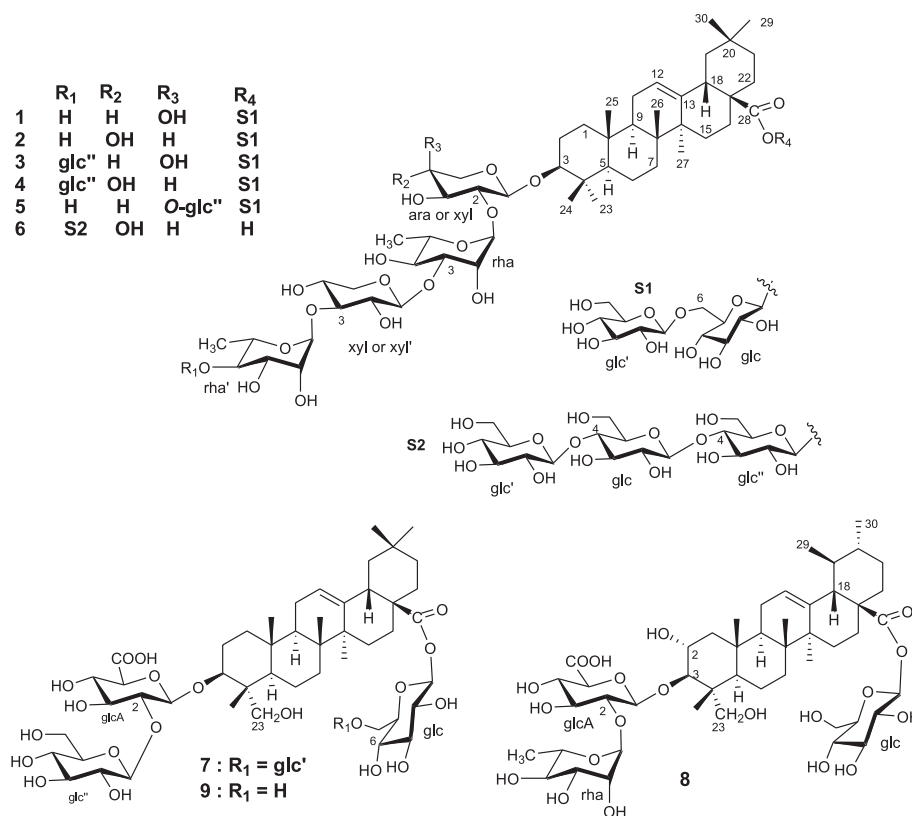


Fig. 1. The structures of compounds 1–9 isolated from *Scabiosa stellata*.

saponins (1–8) and three known compounds (9–11) (Fig. 1). Their structures were established by spectroscopic data analyses (1D, 2D-NMR and HRESIMS) and by comparison with literature data. Acid hydrolysis of an aliquot of the saponin-containing fraction allowed the identification of five monosaccharides as D-glucose, D-xylose, D-glucuronic acid, L-arabinose and L-rhamnose by comparison with authentic samples (see Experimental Section).

Scabiostellatoside A (1) was obtained as amorphous white powder. Its molecular formula, C₆₄H₁₀₄O₂₉, was determined by the positive-ion HRESIMS at *m/z* 1359.6552 [M + Na]⁺ (calcd for 1359.6561). The ¹H NMR spectrum displayed characteristic resonances of an olean-12-ene skeleton, namely, seven tertiary methyls at δ_H 0.83, 0.88, 0.93, 0.97, 0.99, 1.05 and 1.18, an oxymethine at δ_H 3.15 (dd, *J* = 11.6, 4.2 Hz), and an olefinic proton resonance at δ_H 5.27 (t, *J* = 3.4 Hz). The ¹³C NMR spectrum showed resonances for one carboxyl group (δ_C 176.7), two olefinic carbons (δ_C 122.4, 143.5), one downfield glycosylation shifted oxygenated methine (δ_C 89.2), and seven methyls. Taken together, these data were indicative of a typical oleanolic acid (Alabdul Magid et al., 2015). This assumption was confirmed by analysis of the COSY, TOCSY, ROESY, HSQC and HMBC spectra which allowed the full assignment of the proton and carbon resonances of the aglycone (Table 1). In the ROESY spectrum, correlations observed between H-3/H-5 and H-5/H-9 indicated their α-axial orientation and thus the β-orientation of the oxygen at C-3. The sugar part of 1 consists of six residues as evidenced by ¹H NMR spectrum which displayed six anomeric protons at δ_H 4.36, 4.49, 4.51, 5.19, 5.20 and 5.37, showing correlations in the HSQC spectrum to carbons at δ_C 103.3, 105.1, 103.9, 101.1, 100.1 and 94.4, respectively (Table 2). Two α-L-rhamnopyranose units (rha and rha') were identified by equatorial anomeric protons [δ_H 5.20 (d, *J* = 1.5 Hz, rha); 5.19 (d, *J* = 1.4 Hz, rha')], the small coupling constant between H_{eq-2} and H_{ax-3} (*J* = 3.5 Hz), the large coupling constants between

H_{ax-3} and H_{ax-4} (*J* > 9.5 Hz), and the coupling constant values of 6.2 Hz of methyl doublets [δ_H 1.24 (rha); 1.27 (rha')] (Table 2) (Chang et al., 2007). The NMR signals belonging to two β-D-glucopyranose units were assigned starting from the anomeric proton at δ_H 5.37 (d, *J* = 8.1 Hz, glc') and 4.36 (d, *J* = 7.8 Hz, glc). The H-1, H-2, H-3 and H-4 of glc and glc' exhibited large vicinal couplings (≥ 7.8 Hz) indicating that all protons are axial (Table 2). The fifth sugar unit was identified as α-L-arabinopyranose [δ_{H-1} 4.51 (d, *J* = 5.3 Hz, ara)] based on the large *J*_{H-1,H-2} and *J*_{H-2,H-3} (7.1 Hz) and the small couplings *J*_{H-3,H-4} (3.4 Hz) indicating that the H-4 was equatorial (Table 2) (Alabdul Magid et al., 2015; Zheng et al., 2004). The last monosaccharide unit was identified as a β-D-xylopyranose moiety [δ_{H-1} 4.49 (d, *J* = 7.6 Hz, xyl)] by interpretation of 2D-NMR spectra. The H-1, H-2, H-3 and H-4 of xyl exhibited large vicinal couplings (≥ 7.6 Hz) indicating that all are axial (Table 2). The ¹H and ¹³C NMR spectra of 1 displayed many similarities with those of scabiosaponin A (3-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosyl]-28-O-β-D-glucopyranosyl-(1 → 6)-β-D-glucopyranosyl]-oleanolic acid) (Zheng et al., 2004), the difference was the nature and the position of attachment of last sugar residue linked to the xylose, α-L-rhamnopyranose in 1 instead of β-D-glucopyranose in scabiosaponin A. The crosspeak observed in the HMBC spectrum between glc'-H-1/glc-C-6 (δ_C 68.1) and glc-H-1/aglycone-C-28 (δ_C 176.7) established the disaccharide [glc'-(1 → 6)-glc] to be linked to the C-28 of the aglycone. In a similar fashion, the HMBC correlation between rha'-H-1/xyl-C-3 (δ_C 82.1), xyl-H-1/rha-C-3 (δ_C 80.6), rha-H-1/ara-C-2 (δ_C 75.0) and ara-H-1/aglycone-C-3 (δ_C 89.2) indicated that the tetrasaccharide [rha'-(1 → 3)-xyl-(1 → 3)-rha-(1 → 2)-ara] was attached to the C-3 of the aglycone (Fig. 2). In addition, ROESY correlations confirming the interglycosidic linkage and the point of attachment of the tetra-saccharide at the C-3 of the aglycone were

Table 1
NMR spectroscopic data for the aglycone moieties for compounds **1**, **5** (500 MHz, CD₃OD) and **3** (600 MHz, CD₃OD).

position	1		3		5	
	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}
1	1.01, m 1.65, m	38.6	1.01, m 1.65, dt (13.6, 3.5)	38.6	1.00, m 1.64, dt (12.7, 2.5)	38.5
2	1.73, m 1.86, m	25.7	1.74, m 1.86, m	25.7	1.73, m 1.82, m	25.6
3	3.15, dd (11.6, 4.2)	89.2	3.14, dd (11.6, 4.3)	89.2	3.14, dd (11.7, 4.4)	89.1
4	—	38.9	—	38.9	—	38.8
5	0.81, m	55.7	0.80, m	55.7	0.80, m	55.7
6	1.42, td (13.7, 3.5) 1.57, m	18.0	1.44, m 1.57, m	18.0	1.45, td (13.9, 3.8) 1.57, m	17.9
7	1.33, m 1.51, td (13.1, 3.5)	32.5	1.34, m 1.52, td (12.7, 3.3)	32.5	1.33, m 1.49, m	31.7
8	—	39.3	—	39.3	—	39.2
9	1.60, m	47.7	1.60, m	48.2	1.59, m	47.6
10	—	36.5	—	36.5	—	36.4
11	1.92, m	23.2	1.92, m	23.4	1.90, m	23.1
12	5.27, t (3.4)	122.4	5.27, t (3.4)	122.3	5.27, t (3.5)	122.3
13	—	143.5	—	143.5	—	143.4
14	—	41.5	—	41.5	—	41.4
15	1.10, dt (14.3, 2.5) 1.81, td (14.3, 4.4)	27.5	1.10, dt (13.5, 2.9) 1.81, td (14.0, 3.7)	27.5	1.10, dt (13.9, 2.7) 1.81, td (13.9, 3.9)	27.4
16	1.73, m 2.08, td (13.7, 3.8)	22.6	1.73, m 2.07, td (13.7, 3.7)	22.6	1.73, m 2.07, td (13.6, 4.0)	22.5
17	—	46.7	—	46.7	—	46.6
18	2.86, dd (13.9, 3.8)	41.2	2.88, dd (13.5, 4.0)	41.2	2.88, dd (13.7, 4.4)	41.1
19	1.17, m 1.74, m	45.9	1.18, m 1.74, m	45.8	1.16, m 1.73, m	45.8
20	—	30.1	—	30.1	—	30.0
21	1.25, m 1.41, td (14.1, 4.1)	33.5	1.24, m 1.43, td (13.8, 3.7)	33.5	1.24, m 1.41, td (13.9, 3.8)	33.4
22	1.62, m 1.73, m	31.8	1.62, m 1.74, td (13.0, 3.7)	32.8	1.62, m 1.73, td (13.0, 3.7)	32.1
23	1.05, s	27.2	1.04, s	27.2	1.07, s	27.1
24	0.88, s	15.8	0.88, s	15.8	0.87, s	15.7
25	0.99, s	14.8	0.98, s	14.8	0.99, s	14.7
26	0.83, s	16.6	0.83, s	16.4	0.82, s	16.3
27	1.18, s	24.9	1.18, s	24.9	1.18, s	24.8
28	—	176.7	—	176.7	—	176.6
29	0.93, s	32.1	0.93, s	32.1	0.93, s	32.0
30	0.97, s	22.6	0.96, s	22.6	0.96, s	22.6

observed between glc'-H-1/glc-H₂-6, rha'-H-1/xyl-H-3, xyl-H-1/rha-H-3, rha-H-1/ara-H-2 and ara-H-1/aglycone-H-3. Based on all the foregoing evidence, scabiostellatose A (**1**) was elucidated as 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl]-28-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-oleanolic acid.

Scabiostellatose B (**2**) had a molecular formula of C₆₄H₁₀₄O₂₉, on the basis of its HRESIMS (m/z 1359.6548 [M + Na]⁺, calcd for 1359.6561). Comparing the NMR data of **2** with those of **1** (Tables 1 and 3) showed that it had the same aglycone as **1**, but differed in its saccharide units. The ¹H and ¹³C NMR values of **2** were almost superimposable on those of **1** (Tables 2 and 4) excepting those of 2-monosubstituted α -L-arabinopyranose in **1**. Instead, a second β -xylopyranose unit (xyl) was identified starting from its anomeric proton at δ_{H} 4.39 (d, J = 7.1 Hz), characterized by the large coupling constants $J_{\text{H-1,H-2}}$, $J_{\text{H-2,H-3}}$ and $J_{\text{H-3,H-4}}$ (\geq 7.1 Hz) as summarized in Table 4 (Zheng et al., 2004). The long-range correlations observed in the HMBC spectrum between glc'-H-1 (δ_{H} 4.36)/glc-C-6 (δ_{C} 68.1), glc-H-1 (δ_{H} 5.37)/aglycone-C-28 (δ_{C} 176.7), rha'-H-1 (δ_{H} 5.20)/xyl'-C-3 (δ_{C} 82.1), xyl'-H-1 (δ_{H} 4.48)/rha-C-3 (δ_{C} 80.8), rha-H-1 (δ_{H} 5.39)/xyl-C-2 (δ_{C} 76.8) and xyl-H-1 (δ_{H} 4.39)/aglycone-C-3 (δ_{C} 88.9) indicated that the tetrasaccharide [rha'-(1 \rightarrow 3)-xyl'-(1 \rightarrow 3)-rha-(1 \rightarrow 2)-xyl] was linked to the C-3 of the aglycone whereas the disaccharide [glc'-(1 \rightarrow 6)-glc] was linked to C-28 of the aglycone. In addition, as in **1**, complementary pairs of ROESY correlations were found between anomeric and carbinol protons on opposite

sides of the interglycosidic linkage and H-3 of the aglycone. The structure of scabiostellatose B (**2**) was therefore identified as 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-28-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl]-oleanolic acid.

Scabiostellatose C (**3**) gave the molecular formula of C₇₀H₁₁₄O₃₄, on the basis of the positive-ion HRESIMS (m/z 1521.7097 [M+Na]⁺, calcd for 1521.7089). Comparing the NMR data of **3** with those of **1** (Table 1) showed that it had the same aglycone as **1**, but differed in its saccharide units. The NMR spectroscopic data of **3** were almost identical with those of **1** except for one hexose unit (Table 2). Extensive 2D-NMR analysis (COSY, ROESY, HSQC, HMBC, TOCSY and HSQC-TOCSY) enabled the full assignments, as in **1**, of the resonances of two β -D-glucopyranosyl units [$\delta_{\text{H-1}}$ 5.37 (d, J = 8.2 Hz, glc); 4.36 (d, J = 7.8 Hz, glc')], two α -L-rhamnopyranosyl units [$\delta_{\text{H-1}}$ 5.21 (brs, rha); 5.19 (brs, rha')], an α -L-arabinopyranosyl [$\delta_{\text{H-1}}$ 4.51 (d, J = 5.3 Hz, ara)], and a β -D-xylopyranosyl [$\delta_{\text{H-1}}$ 4.49 (d, J = 7.6 Hz, xyl)]. The supplementary hexose unit was identified as β -D-glucopyranose unit [$\delta_{\text{H-1}}$ 4.61 (d, J = 7.6 Hz, glc''); $\delta_{\text{C-1}}$ 104.3] (Table 4). As in **1**, the cross-peaks observed in the HMBC spectrum between glc'-H-1/glc-C-6 (δ_{C} 68.1) and glc-H-1/aglycone-C-28 (δ_{C} 176.7) established the point of attachment of the disaccharide [glc'-(1 \rightarrow 6)-glc] to the C-28 of the aglycone. The HMBC correlation between glc''-H-1/rha'-C-4 (δ_{C} 82.3), rha'-H-1/xyl-C-3 (δ_{C} 81.7), xyl-H-1/rha-C-3 (δ_{C} 80.6), rha-H-1/ara-C-2 (δ_{C} 74.9) and ara-H-1/aglycone-C-3 (δ_{C} 89.2) indicated

Table 2
NMR spectroscopic data for the sugar moieties for compounds **1**, **5** (500 MHz, CD₃OD) and **3** (600 MHz, CD₃OD).

position	1		3		5	
	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}
ara (at C-3)						
1	4.51, d (5.3)	103.9	4.51, d (5.3)	103.9	4.45, d (6.9)	104.1
2	3.78, dd (7.1, 5.3)	75.0	3.78, dd (7.1, 5.3)	74.9	3.75, dd (7.8, 6.9)	75.2
3	3.73, dd (7.1, 3.4)	72.3	3.73, dd (7.1, 3.4)	72.3	3.81, dd (7.8, 3.1)	72.5
4	3.79, ^a	67.7	3.79, ^a	67.7	3.92, ^a	78.1
5	3.52, dd (11.9, 2.3)	63.3	3.52, brd (12.4)	63.3	3.57, ^a	63.5
	3.86, ^a		3.86, ^a		4.16, dd (12.2, 3.1)	
rha						
1	5.20, d (1.5)	100.1	5.21, brs	100.1	5.26, d (1.8)	99.9
2	4.08, dd (3.5, 1.7)	70.4	4.08, dd (3.0, 1.7)	70.2	4.11, dd (3.5, 1.8)	70.2
3	3.85, dd (9.5, 3.5)	80.6	3.85, dd (9.5, 3.0)	80.6	3.88, dd (9.6, 3.5)	80.5
4	3.58, t (9.5)	71.4	3.58, t (9.5)	71.4	3.58, t (9.6)	71.3
5	3.91, ^a	68.6	3.91, ^a	68.6	3.94, ^a	68.5
6	1.24, d (6.2)	16.4	1.25, d (6.2)	16.6	1.25, d (6.2)	16.5
Xyl						
1	4.49, d (7.6)	105.1	4.49, d (7.6)	105.1	4.49, d (7.7)	105.0
2	3.40, dd (8.1, 7.6)	74.4	3.40, dd (8.8, 7.6)	74.5	3.41, dd (8.9, 7.7)	74.3
3	3.48, t (8.1)	82.1	3.48, t (8.8)	81.7	3.48, t (8.9)	82.0
4	3.55, ^a	68.4	3.55, ^a	68.3	3.55, ^a	68.2
5	3.24, t (11.4)	65.7	3.24, dd (11.0, 9.2)	65.7	3.24, t (11.4)	65.6
	3.89, ^a		3.88, dd (11.0, 5.3)		3.90, dd (12.1, 5.1)	
rha'						
1	5.19, d (1.4)	101.1	5.19, brs	100.8	5.19, d (1.6)	101.0
2	3.95, dd (3.5, 1.5)	70.9	3.98, dd (3.3, 1.5)	70.9	3.96, dd (3.3, 1.6)	70.8
3	3.72, dd (9.7, 3.5)	70.8	3.97, dd (9.2, 3.3)	70.8	3.73, dd (9.3, 3.3)	70.7
4	3.41, t (9.7)	72.6	3.64, t (9.2)	82.3	3.42, t (9.3)	72.5
5	4.02, ^a	68.6	4.13, m	67.2	4.04, ^a	68.5
6	1.27, d (6.2)	16.5	1.35, d (6.2)	16.6	1.27, d (6.3)	16.4
glc'						
1			4.61, d (7.6)	104.3	4.47, d (7.6)	104.6
2			3.22, dd (8.9, 7.6)	74.7	3.30, ^a	73.8
3			3.38, t (8.9)	76.7	3.38, t (8.9)	76.6
4			3.31, t (8.9)	70.1	3.29, t (8.9)	69.9
5			3.27, m	76.6	3.33, ^a	76.5
6			3.71, dd (12.0, 5.2)	61.3	3.68, dd (12.0, 5.4)	61.2
			3.86, dd (12.0, 2.3)		3.86, dd (12.0, 2.3)	
glc (at C-28)						
1	5.37, d (8.1)	94.4	5.37, d (8.2)	94.4	5.37, d (8.1)	94.3
2	3.34, t (8.1)	72.5	3.35, t (8.2)	72.4	3.36, t (8.1)	72.5
3	3.42, dd (9.6, 8.1)	76.8	3.44, t (8.2)	76.7	3.44, m	76.8
4	3.44, t (9.6)	69.5	3.45, t (8.2)	69.5	3.46, t (9.6)	69.5
5	3.52, m	76.4	3.52, m	76.4	3.53, m	76.4
6	3.78, dd (11.4, 4.3)	68.1	3.79, dd (11.4, 4.7)	68.1	3.79, dd (11.8, 4.1)	68.1
	4.13, dd (11.4, 1.8)		4.14, dd (11.4, 1.7)		4.13, dd (11.8, 2.1)	
glc'						
1	4.36, d (7.8)	103.3	4.36, d (7.8)	103.2	4.36, d (7.8)	103.1
2	3.22, t (7.8)	73.6	3.22, t (7.8)	73.7	3.23, dd (8.5, 7.8)	73.6
3	3.37, dd (8.9, 7.8)	76.7	3.37, dd (8.3, 7.8)	76.8	3.37, m	76.3
4	3.30, t (8.9)	70.1	3.31, t (8.3)	70.1	3.32, t (8.5)	70.0
5	3.24, m	76.3	3.29, m	76.6	3.27, m	76.5
6	3.69, dd (11.8, 5.4)	61.2	3.67, dd (11.9, 5.5)	61.3	3.68, dd (12.0, 5.4)	61.2
	3.86, dd (11.8, 2.5)		3.86, ^a		3.86, dd (12.0, 2.3)	

^a Overlapped signals.

that the pentasaccharide [glc'-(1 → 4)-rha'-(1 → 3)-xyl-(1 → 3)-rha-(1 → 2)-ara] was linked to the C-3 of the aglycone. Based on all these evidences, the structure of scabiostellatocide C (**3**) was elucidated as 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 3)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-α-L-arabinopyranosyl]-28-O-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 6)-β-D-glucopyranosyl]-oleanolic acid.

Scabiostellatocide D (**4**) had the same molecular formula of **3** (C₇₀H₁₁₄O₃₄), deduced from the quazi-molecular ion peak at *m/z* 1521.7096 [M+Na]⁺ in the HRESIMS spectrum (calcd for 1521.7089). The ¹H and ¹³C NMR spectra of **4** displayed many similarities with those of **3**, especially for the resonances assigned to oleanolic acid, three β-D-glucopyranose units (glc, glc' and glc''), two α-L-rhamnopyranose units (rha and rha') and one β-D-

xylopyranose unit (xyl') (Tables 2 and 4). The identities of the monosaccharides were determined by a combination of ¹H-¹H-COSY, TOCSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC and ROESY NMR experiments. As in **2**, starting from the anomeric proton at $\delta_{\text{H}-1}$ 4.39 (d, *J* = 7.1 Hz), 2D-NMR spectra analysis led to the assignment of the set of proton and carbon signals of a 2-monosubstituted β-D-xylopyranose unit (xyl'). Furthermore, all sites of glycosidations were also established by a HMBC experiment showing long-range correlations between glc'-H-1/glc-C-6, glc-H-1/aglycone-C-28, glc'-H-1/rha'-C-4, rha'-H-1/xyl'-C-3, xyl'-H-1/rha-C-3, rha-H-1/xyl-C-2, and xyl-H-1/aglycone-C-3. Consequently, the structure of scabiostellatocide D (**4**) was elucidated as 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 3)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-β-D-xylopyranosyl]-28-O-[β-D-

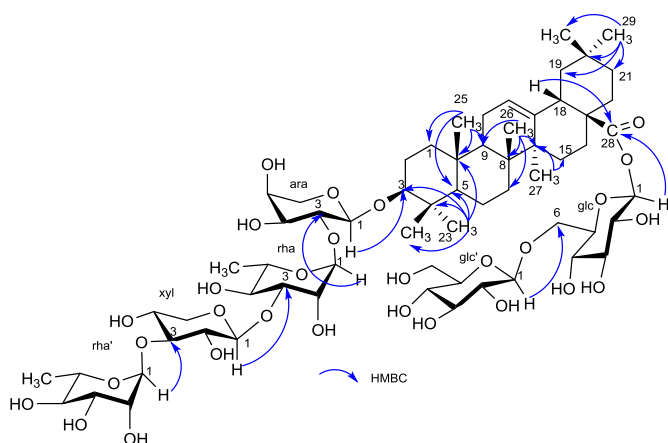


Fig. 2. Key HMBC correlations for compound 1.

glucopyranosyl-(1 → 6)-β-D-glucopyranosyl]-oleanolic acid.

Scabiostellatocide E (**5**) displayed an $[M+Na]^+$ ion peak at m/z 1521.7075 in the positive HRESIMS, corresponding to the molecular formula $C_{70}H_{114}O_{34}$ (calcd for 1521.7089), suggesting an additional hexose unit compared to **1**. Comparing the NMR data of **5** with those of **3** (Table 1) showed that it had the same aglycone part

(oleanolic acid). The 1H and ^{13}C NMR spectra of **5** indicated the presence of seven sugar units which displayed seven anomeric protons and carbons, as in **3** (Table 2). The detailed analysis of the 2D-NMR spectra led to the identification, as in **3**, of one α-L-arabinopyranosyl unit [δ_{H-1} 4.55 (d, $J = 6.9$ Hz, ara)], two α-L-rhamnopyranosyl units [δ_{H-1} 5.26 (d, $J = 1.8$ Hz, rha); 5.19 (d, $J = 1.6$ Hz, rha')], one β-D-xylopyranosyl [δ_{H-1} 4.49 (d, $J = 7.7$ Hz, xyl)], and three β-D-glucopyranosyl units [δ_{H-1} 5.37 (d, $J = 8.1$ Hz, glc); 4.36 (d, $J = 7.8$ Hz, glc'); 4.47 (d, $J = 7.6$ Hz, glc'')] (Table 2). The deshielded signal of the C-4 carbon (δ_C 78.1) ($\Delta +10.4$ ppm) of the α-L-arabinopyranosyl residue in **5**, when compared to this in **3**, suggested that the glc'' unit was attached to ara-C-4. An HMBC experiment made clear all interglycosidic connectivities showing correlations between glc'-H-1/glc-C-6 (δ_C 68.1), glc-H-1/aglycone-C-28 (δ_C 176.6), glc''-H-1/ara-C-4 (δ_C 78.1), rha'-H-1/xyl-C-3 (δ_C 82.0), xyl-H-1/rha-C-3 (δ_C 80.5), rha-H-1/ara-C-2 (δ_C 75.2), and ara-H-1/aglycone-C-3 (δ_C 89.1). Consequently, the structure of scabiostellatocide E (**5**) was concluded to be 3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 3)-β-D-xylopyranosyl-(1 → 3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-{β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-}α-L-arabinopyranosyl]-28-O-[β-D-glucopyranosyl-(1 → 6)-β-D-glucopyranosyl]-oleanolic acid.

Scabiostellatocide F (**6**) had the same molecular formula of **5** ($C_{70}H_{114}O_{34}$), deduced from the quasi-molecular ion peak at m/z 1521.7080 (calcd for $C_{70}H_{114}O_{34}Na$, 1521.7089). Comparing the NMR data of **6** with those of **2** and **4** (Tables 3 and 4) and the analysis of

Table 3

N NMR spectroscopic data for the aglycone moieties for compounds **2**, **4** (500 MHz, CD_3OD) and **6** (600 MHz, CD_3OD).

Position	2		4		6	
	δ_H m (J in Hz)	δ_C	δ_H m (J in Hz)	δ_C	δ_H m (J in Hz)	δ_C
1	0.98, m 1.62, m 1.69, m	38.7 25.9	1.00, m 1.62, m 1.72, m	38.6 25.8	0.98, m 1.62, m 1.69, m	38.7 25.9
2	1.82, dt (13.5, 3.2) 3.14, dd (11.5, 4.0)	88.9 38.9	1.82, dt (13.1, 3.5) 3.15, dd (11.8, 3.5)	88.8 38.8	1.82, dt (13.5, 3.2) 3.14, dd (11.5, 4.0)	88.9 38.6
3	—	—	—	—	—	—
4	0.78, brd (12.2)	55.9	0.80, brd (12.3)	55.8	0.78, brd (12.2)	55.9
5	1.42, td (13.9, 3.8) 1.56, m 1.33, m 1.51, m	18.0 32.5	1.42, td (13.9, 3.8) 1.55, m 1.34, m 1.51, m	17.9 31.7	1.42, td (13.9, 3.8) 1.56, m 1.33, m 1.51, m	18.0 32.5
6	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—
8	—	39.3	—	39.2	—	39.3
9	1.59, m	47.9	1.59, m	47.6	1.59, m	48.4
10	—	36.5	—	36.4	—	36.5
11	1.91, m	23.2	1.91, m	23.1	1.91, m	23.1
12	5.27, t (3.5)	122.4	5.27, t (3.8)	122.3	5.27, t (3.5)	121.8
13	—	143.5	—	143.4	—	143.5
14	—	41.4	—	41.4	—	41.6
15	1.10, m 1.80, m 1.73, m	27.5 22.6	1.10, dt (13.1, 3.5) 1.81, td (13.1, 3.5) 1.73, m	27.4 22.6	1.06, m 1.82, m 1.62, m	27.6 22.8
16	2.07, td (13.7, 3.0)	—	2.07, td (13.8, 3.7)	—	1.98, td (13.7, 3.0)	—
17	—	46.7	—	46.6	—	46.7
18	2.88, dd (13.8, 3.9)	41.2	2.88, dd (13.7, 4.9)	41.1	2.88, dd (13.8, 3.9)	41.6
19	1.17, m 1.72, m	45.9	1.17, m 1.74, m	45.8	1.13, m 1.70, m	45.9
20	—	30.1	—	30.1	—	30.1
21	1.23, m 1.40, m	33.5	1.24, m 1.41, m	33.4	1.20, m 1.40, m	33.7
22	1.61, m 1.73, m	31.8	1.61, m 1.73, td (12.5, 3.5)	32.5	1.56, m 1.76, m	31.8
23	1.07, s	27.5	1.07, s	27.0	1.07, s	27.5
24	0.88, s	15.8	0.88, s	15.8	0.88, s	15.8
25	0.98, s	14.8	0.98, s	14.7	0.98, s	14.6
26	0.82, s	16.4	0.82, s	16.6	0.86, s	16.5
27	1.18, s	24.9	1.18, s	24.8	1.18, s	24.9
28	—	176.7	—	176.6	—	179.8
29	0.93, s	32.1	0.93, s	32.0	0.93, s	32.3
30	0.96, s	22.6	0.96, s	22.6	0.96, s	22.7

Table 4
NMR spectroscopic data of the sugar moieties for compounds **2**, **4** (500 MHz, CD₃OD) and **6** (600 MHz, CD₃OD).

position	2		4		6	
	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} m (J in Hz)	δ_{C}
xyl at C-3						
1	4.39, d (7.1)	105.0	4.39, d (7.1)	104.9	4.40, d (7.2)	105.0
2	3.40, ^a	76.8	3.34, dd (8.1, 7.0)	76.7	3.40, dd (8.2, 7.2)	76.8
3	3.44, t (8.2)	77.4	3.45, t (8.0)	77.4	3.45, t (8.2)	77.4
4	3.47, brt (8.2)	70.2	3.47, ^a	70.2	3.48, ^a	70.2
5	3.19, dd (11.4, 9.0)	65.2	3.21, dd (10.5, 9.1)	65.1	3.19, dd (10.5, 9.1)	65.1
	3.86, dd (11.4, 5.1)		3.85, dd (10.5, 5.2)		3.86, dd (10.5, 5.2)	
rha						
1	5.39, d (1.7)	99.9	5.38, d (1.7)	99.9	5.38, d (1.7)	99.9
2	4.13, dd (2.9, 1.7)	70.2	4.13, dd (3.1, 1.7)	70.1	4.13, dd (3.0, 1.7)	70.1
3	3.90, dd (9.5, 2.9)	80.8	3.90, dd (9.5, 3.1)	80.7	3.90, dd (9.5, 3.0)	80.7
4	3.58, t (9.5)	71.4	3.58, t (9.5)	71.3	3.53, t (9.5)	71.4
5	4.00, dq (8.4, 6.9)	68.4	4.01, m	68.5	3.99, m	68.5
6	1.25, d (6.9)	16.6	1.25, d (6.2)	16.6	1.25, d (6.2)	16.6
xyl'						
1	4.48, d (7.7)	105.1	4.47, d (7.7)	105.0	4.47, d (7.7)	105.0
2	3.40, dd (8.9, 7.7)	74.4	3.40, dd (8.8, 7.7)	74.4	3.40, dd (8.8, 7.7)	74.5
3	3.48, t (8.9)	82.1	3.49, t (8.8)	81.6	3.49, t (8.8)	81.7
4	3.54, brt (8.9)	68.6	3.53, ^a	68.3	3.53, ^a	68.3
5	3.22, dd (10.9, 8.0)	65.7	3.24, dd (11.4, 10.1)	65.6	3.24, dd (11.3, 10.0)	65.7
	3.90, ^a		3.88, dd (11.4, 2.3)		3.88, dd (11.3, 2.3)	
rha'						
1	5.20, d (1.7)	101.1	5.21, d (1.6)	100.7	5.21, brs	100.7
2	3.96, dd (3.3, 1.7)	70.9	3.97, dd (3.3, 1.6)	70.8	3.98, dd (3.3, 1.2)	70.8
3	3.72, dd (9.5, 3.3)	70.8	3.96, dd (9.2, 3.3)	70.7	3.97, dd (9.2, 3.3)	70.9
4	3.41, t (9.5)	72.6	3.64, t (9.2)	82.2	3.63, t (9.2)	82.6
5	4.03, dq (9.5, 6.5)	68.4	4.12, ^a	67.1	4.13, ^a	67.1
6	1.28, d (6.5)	16.5	1.34, d (6.2)	16.3	1.34, d (6.2)	16.6
glc'						
1			4.61, d (7.9)	104.6	glc' at rha'-C-4 4.64, d (7.9)	104.2
2			3.22, t (8.4)	74.6	3.29, t (8.5)	74.4
3			3.39, t (8.4)	76.6	3.55, t (8.4)	75.2
4			3.33, ^a	71.3	3.61, t (8.4)	79.1
5			3.30, m	76.5	3.42, m	75.2
6			3.68, dd (11.9, 5.5)	61.2	3.90, ^a	60.4
			3.86, dd, (11.9, 2.2)		3.90, ^a	
glc (at C-28)						
1	glc at C-28 5.37, d (8.0)	94.4	glc at C-28 5.37, d (8.1)	94.3	glc at glc'-C-4 4.48, d (8.0)	103.0
2	3.34, ^a	72.5	3.35, ^a	72.4	3.31, dd (8.5, 8.0)	73.3
3	3.43, t (8.5)	76.8	3.44, t (8.8)	76.6	3.55, t (8.5)	74.8
4	3.44, t (8.5)	69.5	3.42, t (8.8)	69.4	3.61, t (8.5)	78.8
5	3.52, m	76.4	3.51, m	76.3	3.49, m	75.2
6	3.78, dd (11.7, 5.0)	68.1	3.79, dd (11.7, 5.0)	68.0	3.83, ^a	60.1
	4.14, dd (11.7, 2.0)		4.14, dd (11.7, 1.6)		3.93, ^a	
glc'						
1	glc' → glc-C-6 4.36, d (7.8)	103.2	glc' → glc-C-6 4.36, d (7.8)	103.2	glc' at glc-C-4 4.42, d (7.9)	103.2
2	3.21, dd (8.6, 7.8)	73.7	3.22, dd (8.4, 7.8)	73.6	3.24, dd (8.6, 7.9)	73.5
3	3.37, t (8.6)	76.6	3.38, t (8.4)	76.8	3.38, t (8.6)	76.4
4	3.31, t (8.6)	70.2	3.31, t (8.5)	70.1	3.33, ^a	69.9
5	3.27, m	76.6	3.27, m	76.5	3.36, m	76.6
6	3.68, dd (12.0, 5.5)	61.3	3.68, dd (11.9, 5.5)	61.2	3.68, dd (11.8, 5.5)	61.0
	3.86, dd (12.0, 2.0)		3.86, dd (11.9, 2.2)		3.90, dd (11.8, 2.2)	

^a Overlapped signals.

the NMR spectra showed that **6** was a heptasaccharide derivative of oleanolic acid [δ_{C} 88.9 (C-3); 179.8 (C-28)] (Table 3). The sugar part of **6** consists of seven residues as evidenced by ¹H and ¹³C NMR spectra which displayed seven anomeric proton and carbon signals, respectively (Table 4). Detailed analysis of the 2D-NMR spectra of **6** and comparing its NMR data with those of **2** and **4** allowed identification of two β -D-xylopyranosyl units [$\delta_{\text{H-1}}$ 4.40 (d, $J = 7.2$ Hz, xyl); 4.47 (d, $J = 7.7$ Hz, xyl')], two α -L-rhamnopyranosyl units [$\delta_{\text{H-1}}$ 5.38 (d, $J = 1.7$ Hz, rha); 5.21 (brs, rha')] and three β -D-glucopyranosyl units [$\delta_{\text{H-1}}$ 4.48 (d, $J = 8.0$ Hz, glc); 4.42 (d, $J = 7.9$ Hz, glc'); 4.64 (d, $J = 7.9$ Hz, glc'')] (Table 4). The deshielded signals of glc-C-4 (δ_{C} 78.8) and glc'-C-4 (δ_{C} 79.1) suggested that both of them were 4-monosubstituted. This assumption was confirmed by the HMBC correlations observed between glc'-H-1/glc-C-4 (δ_{C} 78.8), and glc-

H-1/glc'-C-4 (δ_{C} 79.1). In addition, the HMBC correlations observed between glc'-H-1/rha'-C-4 (δ_{C} 82.6) rha'-H-1/xyl'-C-3 (δ_{C} 81.7), xyl'-H-1/rha-C-3 (δ_{C} 80.7), rha-H-1/xyl-C-2 (δ_{C} 76.8) and xyl-H-1/aglycone-C-3 (δ_{C} 88.9), defined the locations of the sugar units in the molecule. Therefore, scabiostellatoside F (**6**) was assigned as 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-oleanolic acid.

Scabiostellatoside G (**7**) exhibited an $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion peak at m/z 1157.5363 in the HRESIMS spectrum, consistent with the molecular formula of C₅₄H₈₆O₂₅ (calcd for C₅₄H₈₆O₂₅Na, 1157.5356). The ¹³C NMR spectrum (Table 5) showed 54 carbon signals, of which 24 were assigned to four sugar moieties and 30 to the aglycone

et al., 2007). The large coupling constant between the vicinal diol H-2 and H-3 ($J = 9.5$ Hz) indicated that these protons adopted a quasi *trans*-diaxial relationship. The location of the primary hydroxyl group (δ_{H} 3.30 and 3.70) at C-23 was deduced from the chemical shift of C-24 at δ_{C} 13.6 characteristic of an axial position, and by comparison of the ^{13}C NMR spectrum with that of asiatic acid (Acebey-Castellon et al., 2007). The α -equatorial orientation of H-23 was confirmed by the correlations observed in the ROESY spectrum between H-23 and H-3 and H-5 and between H-3/H-5 and H-5/H-9 α -axial oriented. In the same manner, the ROESY correlations observed between H-2/H-24, H-25 and between H-25/H-26, confirmed the β -axial orientation of these CH_3 and H-2. The assignments of other proton and carbon signals of the aglycone were accomplished by extensive 2D-NMR analyses (Table 5). The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **8** indicated the presence of three anomeric protons at δ_{H} 4.55 (d, $J = 7.5$ Hz), 5.34 (d, $J = 1.6$ Hz), and 5.37 (d, $J = 8.1$ Hz) (Table 6). Complete assignments of each glycoside proton system were achieved by analysis of 2D-NMR experiments. A β -D-glucopyranose unit (glc) was identified starting from the anomeric proton at δ_{H} 5.37. The second monosaccharide whose anomeric proton resonates at δ_{H} 4.55 was identified as a β -D-glucuronic acid (glcA) as in **7** (Table 6). The third sugar unit was identified as α -L-rhamnopyranose (rha) as in compounds **1** and **2** (Tables 2 and 6). In the HMBC experiment, the cross-peaks observed between rha-H-1/glcA-C-2 (δ_{C} 78.0), glcA-H-1/aglycone-C-3 (δ_{C} 86.1) and glc-H-1/aglycone-C-28 (δ_{C} 176.7) led to the assignment of compound **8** as 3-O- $[\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-28-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl]-asiatic acid.

The known compounds were elucidated as 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-28-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl]-hederagenin (palustrosides III) (Udayama et al., 1998) (**9**), ursolic acid (**10**) (Mahato and Kundu, 1994), and 3-O- $[3$ -O-acetyl-6-O-(*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]-kaempferol (**11**) (Christopoulou et al., 2008). Their spectroscopic data were in perfect agreement with those reported in the literature.

Compounds **1–8** were evaluated for their cytotoxicity against human fibrosarcoma HT1080 cell line by using the metabolic WST1 cell viability assay (Lehbili et al., 2017). Doxorubicin was used as a positive control (IC_{50} 0.59 ± 0.05 μM). Among the tested compounds, the monodesmoside **6** exhibited a moderate antiproliferative activity (IC_{50} 12.0 ± 0.2 μM). The bidesmosides **2**, **4** and **5** were less active (IC_{50} 49.0 ± 0.7 , 40.0 ± 0.7 and 38.0 ± 0.8 μM , respectively). The asiatic acid derivative (**8**) exhibited also a low cytotoxicity (IC_{50} 40 ± 0.8 μM). Compounds **1**, **3** and **7** were not active at the concentration of 50 μM . Comparison of IC_{50} values of compounds **2** and **4** with those of **1** and **3** suggested that the cytotoxic activity may be related to the nature of the sugar residue attached at C-3 of the aglycone; xylose in **2** and **4** and arabinose in **1** and **3**. Comparison of IC_{50} values of compounds **3** and **5** bearing an arabinose moiety attached to C-3 of aglycone suggested that the presence of a ramified sugar chain in **5** (IC_{50} 38.0 ± 0.8 μM) is more favorable to cytotoxic activity than a linear chain in **3**.

In summary, eleven compounds were isolated from the 70% EtOH extract of the whole plant of *Scabiosa stellata*, among them eight previously undescribed triterpenoid saponins. Compounds **1–6** were derivatives of oleanolic acid, compounds **7** and **9** were bidesmosides of hederagenin with glucuronic acid linked to C-3 of aglycone, and **8** was a bidesmoside of ursolic acid. Comparison of compounds **1–9** with saponins previously identified in *Scabiosa* species indicated that oleanolic saponins (**1–5**) were similar to scabiosaponins A–K and hookeroside A isolated from *S. tshiliensis* (Zheng et al., 2004) with a gentiobiose attached to the aglycone in C-28. The presence of a glucuronic acid linked to C-3 of the aglycone (compounds **7–9**) was observed for the first time in *Scabiosa* saponins in which xylose or arabinose unit was generally linked to C-

3 as in compounds **1–6** and in scabroside A–D (Baykal, 1999; Baykal et al., 1997, 1998), songoroside A (Akimaliev et al., 1988), songoroside C, G, I, M and O (Akimaliev et al., 1976a,b). Their cytotoxic activity against fibrosarcoma cell line (HT1080) were evaluated. The monodesmoside **6** exhibited a moderate antiproliferative activity.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Optical rotations were measured on a Perkin Elmer model 341 polarimeter (589 nm, 20 °C). IR spectra were obtained on a Nicolet Avatar 320 FT-IR spectrometer with KBr disks. NMR data were performed in CD_3OD on Bruker Avance 500 or 600 spectrometer. HRESIMS data were gained using a Micromass Q-TOF high-resolution mass spectrometer. Mass spectra were recorded in the positive-ion mode in the range m/z 100–2000, with a mass resolution of 20000 and an acceleration voltage of 0.7 kV. CC was carried out on HP-20 resin (Sigma Aldrich). Flash chromatography was conducted on a Grace Reveleris system equipped with dual UV and ELSD detection using Grace® cartridges (Silica gel or RP-C₁₈). HPLC separations were performed on a Dionex apparatus equipped with an ASI-100 autosampler, an Ultimate 3000 pump, a STH 585 column oven, a diode array detector UVD 340 S and a Chromeleon software. A prepacked RP-C₁₈ column (Phenomenex 250 \times 15 mm, Luna 5 μ) was used for semi-preparative HPLC. The eluting mobile phase consisted of H_2O with TFA (0.0025%) and CH_3CN with a flow rate of 5 mL/min and the chromatogram was monitored at 205 and 210 nm. TLC were carried out using silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated aluminium plates (0.2 mm, Merck). Spots were visualized through developing agent (CHCl_3 :MeOH: H_2O , 14:6:1) and chromogenic agent (50% aq. H_2SO_4) subsequent heating.

3.2. Plant material

The whole plant *Scabiosa stellata* L. was collected at in June 2015 from Djebel El-Ouahch at Constantine (North eastern of Algeria) at altitude of 970 m (latitude 006°66'41.5"E and longitude 036°40'30.14"N). The plant was identified by Kamel Kabouche and a voucher specimen (LOST.Ss.06.15) has been deposited at the University of Constantine, Algeria.

3.3. Extraction and isolation

The dried and powdered *S. stellata* whole plant (653 g) was macerated in 70% EtOH (3 \times 3 L, 24 h) at room temperature. After filtration and concentration under low pressure, the 70% EtOH extract (118 g) was separated on a Diaion HP-20 resin column (4.3 \times 40 cm), eluted with H_2O -MeOH (0, 25, 50, 75 and 100%, each 2 L), to give fractions A–E, respectively. Fraction D (8.3 g) (the saponin-containing fraction) was purified by flash chromatography over silica gel, eluted by a gradient system of CHCl_3 -MeOH- H_2O (10:0:0 to 4:6:0.5), in 35 min to afford 40 sub-fractions (f_1 – f_{40}). Fraction f_{31} (300 mg) was submitted to a flash chromatography over RP-C₁₈, eluted by a gradient system of 18–60% CH_3CN , in 32 min to afford compound **1** (4.5 mg). Fraction f_{33} (105 mg) was purified by semi-prep. HPLC using a gradient from 25% to 35% CH_3CN in 10 min, then isocratic elution at 35% CH_3CN for 20 min to yield 7 mg of compound **2** (t_{R} 21.9). Fraction f_{34} (154 mg) was purified by flash chromatography over RP-C₁₈, eluted with MeOH: H_2O (30%–100%, in 30 min) to yield 4 mg of compound **8**. The purification by semi-prep. HPLC of subfractions 36–38 obtained from f_{34} led to compounds **3** (t_{R} 11.5, 7 mg) and **4** (t_{R} 12.6, 8 mg) (isocratic elution with 35% CH_3CN). Fraction f_{35} (150 mg) was subjected to flash chromatography over RP-C₁₈, eluted with MeOH: H_2O (10%–60%, in

30 min) to yield compounds **5** (5 mg), **6** (3 mg) and **9** (3 mg). Fraction f_{36} (500 mg) was purified by flash chromatography over RP-C₁₈, eluted with MeOH: H₂O (10%–60%, in 30 min) to give compound **7** (4 mg). Fraction E was submitted to flash chromatography over silica gel, eluted by a gradient system of CHCl₃-MeOH (10:0 to 4:6), in 32 min to afford **10** (15 mg) and **11** (18 mg).

3.4. Acid hydrolysis

Acid hydrolysis was carried out to obtain the sugar residues of compounds **1**–**8**. An aliquot of the saponin-containing fraction (100 mg of fraction D) was treated with 2 N TFA (trifluoroacetic acid, aqueous solution, 15 mL) at 90 °C for 6 h. After extraction with CH₂Cl₂ (10 mL x 3), the water-soluble layer was evaporated to dryness. The sample (55 mg) was purified by preparative Si gel TLC (MeCOEt:iso-PrOH:Me₂CO:H₂O, 20:10:7:6) to afford rhamnose [2.5 mg, $R_f = 0.73$, $[\alpha]^{20}_D + 11$ (c 0.21, H₂O)]; arabinose [2 mg, $R_f = 0.59$, $[\alpha]^{20}_D + 43$ (c 0.17, H₂O)]; xylose [1.9 mg, $R_f = 0.52$, $[\alpha]^{20}_D + 18$ (c 0.2, H₂O)]; glucose [4 mg, $R_f = 0.48$, $[\alpha]^{20}_D + 30$ (c 0.33, H₂O)] and glucuronic acid [0.9 mg, $R_f = 0.1$, $[\alpha]^{20}_D + 29.2$ (c 0.08, H₂O)].

3.5. Cell proliferation assay

The fibrosarcoma cells (HT1080) were cultured in Minimum Essential Media (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin Streptomycin (PS) at 37 °C with 5% CO₂ and harvested every three days for maintenance. Compounds **1**–**8** were dissolved in DMSO. For treatment, cells were plated at a density of 10⁴ cells/mL in 24-well plates at 37 °C. After 24 h, the culture medium was discarded and cells were treated with the compounds in a fresh culture medium at various concentrations for 72 h, while the same dilution volume of DMSO was added in negative control wells. The concentration of DMSO did not exceed 0.1% to avoid significant toxicity on the tested cells. Therefore, the cells were washed once with 1 mL of D-PBS and then detached with 0.2% Trypsin/EDTA. Cell counting was carried out on a KOVA[®] slide and with a phase contrast microscope as indicated by the manufacturer. Cell growth was calculated in percentage as the fraction of cell number in treated and control cells. IC₅₀ was determined as the concentration of each compound which induced 50% inhibition of cell growth. The values represent averages of three independent experiments. Doxorubicin was used as a positive control agent.

3.6. Scabiostellatoside A (**1**)

amorphous white powder; $[\alpha]^{20}_D - 20.8$ (c 0.35, MeOH); IR ν_{\max} 3342 (OH), 2950 (CH), 1733 (C=O ester), 1610, 1375 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) data, see [Tables 1 and 2](#); HRESIMS m/z 1359.6552 (calcd for C₆₄H₁₀₄O₂₉Na, 1359.6561).

3.7. Scabiostellatoside B (**2**)

amorphous white powder; $[\alpha]^{20}_D - 25$ (c 0.20, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3344 (OH), 2940 (CH), 1725 (C=O ester), 1611, 1372 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) data, see [Tables 3 and 4](#); HRESIMS m/z 1359.6548 (calcd for C₆₄H₁₀₄O₂₉Na, 1359.6561).

3.8. Scabiostellatoside C (**3**)

amorphous white powder; $[\alpha]^{20}_D - 27.8$ (c 0.18, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3340 (OH), 2943 (CH), 1729 (C=O ester), 1612, 1375 cm⁻¹; ¹H (600 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) data, see

[Tables 1 and 2](#); HRESIMS m/z 1521.7097 (calcd for C₇₀H₁₁₄O₃₄Na, 1521.7089).

3.9. Scabiostellatoside D (**4**)

amorphous white powder; $[\alpha]^{20}_D - 24.3$ (c 0.28, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3345 (OH), 2941 (CH), 1731 (C=O ester), 1609, 1370 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) data, see [Tables 3 and 4](#); HRESIMS m/z 1521.7096 (calcd for C₇₀H₁₁₄O₃₄Na, 1521.7089).

3.10. Scabiostellatoside E (**5**)

amorphous white powder; $[\alpha]^{20}_D - 26$ (c 0.26, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3341 (OH), 2948 (CH), 1730 (C=O ester), 1610, 13,774 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) data, see [Tables 1 and 2](#); HRESIMS m/z 1521.7075 (calcd for C₇₀H₁₁₄O₃₄Na, 1521.7089).

3.11. Scabiostellatoside F (**6**)

amorphous white powder; $[\alpha]^{20}_D - 10$ (c 0.1, MeOH); IR (KBr) ν_{\max} 3348 (OH), 2945 (CH), 1729 (C=O ester), 1613, 1375 cm⁻¹; ¹H (600 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) data, see [Tables 3 and 4](#); HRESIMS m/z 1521.7080 (calcd for C₇₀H₁₁₄O₃₄Na, 1521.7089).

3.12. Scabiostellatoside G (**7**)

amorphous white powder; $[\alpha]^{20}_D - 11.8^\circ$ (c 0.28, MeOH); IR ν_{\max} 3342 (OH), 2950 (CH), 1733 (C=O ester), 1718 (C=O carboxylic acid), 1611, 1380 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) data, see [Tables 5 and 6](#); HRESIMS m/z 1157.5363 (calcd for C₅₄H₈₆O₂₅Na, 1157.5356).

3.13. Scabiostellatoside H (**8**)

amorphous white powder; $[\alpha]^{20}_D - 20^\circ$ (c 0.21, MeOH); IR ν_{\max} 3345 (OH), 2952 (CH), 1735 (C=O ester), 1716 (C=O carboxylic acid), 1610, 1383 cm⁻¹; ¹H (500 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) data, see [Tables 5 and 6](#); HRESIMS m/z 995.4836 (calcd 955.4828, C₄₈H₇₆O₂₀Na).

Acknowledgements

The authors are grateful to MESRS Algeria for the PNE grant to Ms Meryem Lehbili, to CNRS, CRCA, Conseil Général de la Marne, MESR in France, and to the PIANET CPER project for financial support.

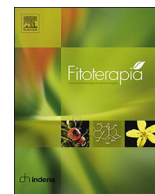
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.03.005>.

References

- Acebey-Castellon, L., Voutquenne-Nazabadioko, L., Doan Thi Mai, H., Roseau, N., Bonet, M.A., Vallès, J., 2007. Ethnobotany of montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): plants used in veterinary medicine. *J. Ethnopharmacol.* 110, 130–147.
- Akimaliyev, A., Alimbaeva, P.K., Mzhel'skaya, L.G., Abubakirov, N.K., 1976a. Triterpene glycosides of *Scabiosa soongorica*. III. Structure of songorosides M and O. *Khim. Prirod. Soedin.* 4, 476–479.
- Akimaliyev, A., Alimbaeva, P.K., Mzhel'skaya, L.G., Abubakirov, N.K., 1976b. Triterpene glycosides of *Scabiosa soongorica*. II. Structure of songorosides C, G, and I. *Khim. Prirod. Soedin.* 4, 472–476.

- Akimaliev, A.A., Putieva, Z.M., Alimbaeva, P.K., Abubakirov, N.K., 1988. Triterpene glycosides of *Scabiosa soongorica*. V. β -Sitosterol β -D-glucopyranoside and soongoroside A. *Khim. Prir. Soedin.* 6, 885–886.
- Alabdul Magid, A., Voutquenne, L., Moretti, C., Long, C., Lavaud, C., 2006. Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar glabrum*. *J. Nat. Prod.* 69, 196–205.
- Alabdul Magid, A., Morjani, H., Madoulet, C., Dumontet, V., Lavaud, C., 2015. Triterpenoid glycosides from the leaves of *Meliosma henryi*. *Phytochemistry* 109, 49–56.
- Alimbaeva, P.K., Akimaliev, A., Mukhamedzhev, M.M., 1977. Triterpene glycosides of some representatives of the Dipsacaceae family. *Khim. Prir. Soedin.* 5, 708–709.
- Bammi, J., Douira, A., 2002. Medicinal plants in the forest of Achach (central plateau, Morocco). *J. Acta Bot. Mal.* 27, 131–145.
- Baykal, T., 1999. Two monodesmosidic triterpenoid saponins from *Scabiosa rotata* Bieb. *J. Fac. Pharm. Gazi. Univ.* 16, 1–6.
- Baykal, T., Panayir, T., Sticher, O., Çalis, I., 1997. Scabioside A: a new triterpenoid saponoside from *Scabiosa rotata*. *J. Fac. Pharm. Gazi. Univ.* 14, 31–36.
- Baykal, T., Panayir, T., Tasdemir, D., Sticher, O., Çalis, I., 1998. Triterpene saponins from *Scabiosa rotata*. *Phytochemistry* 48, 867–873.
- Carlson, S.E., Linder, H.P., Donoghue, M.J., 2012. The historical biogeography of *Scabiosa* (dipsacaceae): implications for old world plant disjunctions. *J. Biogeogr.* 39, 1086–1100.
- Chang, X.L., Li, W., Jia, Z.H., Satou, T., Fushiya, S., Koike, K., 2007. *J. Nat. Prod.* 70, 179–187.
- Christopoulou, C., Graikou, K., Chinou, I., 2008. Chemosystematic value of chemical constituents from *Scabiosa hymettia* (Dipsacaceae). *Chem. Biodivers.* 2, 318–323.
- Garaev, E.A., Movsumov, I.S., Isaev, M.I., 2008. Flavonoids and oleanolic acid from *Scabiosa caucasia*. *Chem. Nat. Compd.* 44, 520–521.
- Lehbili, M., Alabdul Magid, A., Kabouche, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Abedini, A., Morjani, H., Sarazin, T., Gangloff, S.C., Kabouche, Z., 2017. Oleanane-type triterpene saponins from *Calendula stellata*. *Phytochemistry* 144, 33–42.
- Lehbili, M., Magid, Alabdul, Hubert, J.A., Kabouche, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Renault, J.H., Nuzillard, J.M., Morjani, H., Abedini, A., Gangloff, S.C., Kabouche, Z., 2018. Two new bis-iridoids isolated from *Scabiosa stellata* and their antibacterial, antioxidant, anti-tyrosinase and cytotoxic activities. *Fitoterapia* 125, 41–48.
- Mahato, S.B., Kundo, A.P., 1994. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517–1575.
- Papalexandrou, A., Magiatis, P., Perdetzoglou, D., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., Harvala, C., 2003. Iridoids from *Scabiosa variifolia* (dipsacaceae) growing in Greece. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 91–93.
- Polat, E., Alankus-Caliskan, Ö., Karayildirim, T., Bedir, E., 2010. Iridoids from *Scabiosa atropurpurea* L. subsp. *maritima* Arc. (L.). *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 253–255.
- Pottier-Alapetite, G., 1981. Flore of Tunisia. Angiosperms-dicotyledons-gamopetals. Tunis. In: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture, p. 926.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. New flora of Algeria and the desert regions Meridional. Tome II. Paris. In: French National Center for Scientific Research, pp. 890–893.
- Rahmouni, N., Pinto, D.C.G.A., Santos, S.A.O., Beghidja, N., Silva, A.M.S., 2017. Lipophilic composition of *Scabiosa stellata* L.: an underexplored plant from Batna (Algeria). *Chem. Pap.* <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0308-3>.
- Tabatadze, N., Elias, R., Faure, R., Gerken, P., De Pauw-Gillet, M.C., Kemertelidze, E., Chea, A., Olivier, E., 2007. Cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Cephalaria gigantea*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 102–105.
- Udayama, M., Ohkawa, M., Yoshida, N., Kinjo, J., Nohara, T., 1998. Structures of three new oleanene glucuronides isolated from *Lathyrus palustris* var. *pilosus* and hepatoprotective activity. *Chem. Pharm. Bull.* 46, 1412–1415.
- Yusifova, J.Y., Movsumov, I.S., 2015. Flavonoids and triterpenoid saponins of *Scabiosa hyrcanica* Stev., growing in Azerbaijan. *Khimiya. Rastitel'nogo. Syr'ya* 2, 261–264.
- Zheng, Q., Koike, K., Han, L.K., Okuda, H., Nikaido, T., 2004. New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*. *J. Nat. Prod.* 67, 604–613.



Two new bis-iridoids isolated from *Scabiosa stellata* and their antibacterial, antioxidant, anti-tyrosinase and cytotoxic activities



Meryem Lehbili^{a,b}, Abdulmagid Alabdul Magid^{b,*}, Jane Hubert^b, Ahmed Kabouche^a, Laurence Voutquenne-Nazabadioko^b, Jean-Hugues Renault^b, Jean-Marc Nuzillard^b, Hamid Morjani^c, Amin Abedini^{b,d}, Sophie C. Gangloff^d, Zahia Kabouche^a

^a Université des frères Mentouri-Constantine, Département de chimie, Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Campus Chaabet-Ersas, 25000 Constantine, Algeria

^b ICMR-UMR CNRS 7312, Groupe Isolement et Structure, Campus Sciences, Bât. 18, BP 1039, 51687 Reims, France

^c MEDyC UMR CNRS 7369, URCA, Faculté de Pharmacie, SFR CAP Santé, 1, Rue du Maréchal-Juin, 51096 Reims, France

^d EA 4691, Biomatériaux et inflammation en site osseux, Laboratoire de microbiologie, UFR de pharmacie, 1, Rue du Maréchal-Juin, 51096 Reims, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Scabiosa stellata
Caprifoliaceae
Bis-iridoid glucoside
Antibacterial activity
Cytotoxic activity
Dereplication

ABSTRACT

This study presents the chemical profile investigation of a 70% ethanol extract obtained from *Scabiosa stellata*, a medicinal herbaceous traditionally used to treat heel cracks. A ¹³C NMR-based dereplication methodology was firstly applied on centrifugal partition chromatography-generated fractions in order to quickly identify the major compounds of the extract. The dereplication process was then completed by semi-preparative high-performance liquid chromatography in order to identify unknown or minor compounds. Two new bis-iridoids, namely 7-*O*-caffeoyl-sylvestroside I (1) and 7-*O*-(*p*-coumaroyl)-sylvestroside I (2), together with ten known compounds (3–12) were isolated. Their structures were elucidated by spectroscopic methods including NMR and HR-ESI-MS. The antibacterial, anti-tyrosinase and DPPH radical scavenging activities of the crude extract, fractions, and isolated compounds were evaluated. A significant antibacterial activity was observed for nine isolated compounds, particularly 1 and 2 which yielded MIC values of 31.2 µg/mL against *Enterococcus faecalis* and 62.5 µg/mL against *Staphylococcus epidermidis*. The cytotoxic activity of these new bis-iridoids was evaluated on a fibrosarcoma cell line (HT1080) and only compound 1 exhibited a moderate cytotoxic activity (IC₅₀ 35.9 µg/mL).

1. Introduction

The genus *Scabiosa* belongs to the Caprifoliaceae family and comprises about 100 species. The majority of *Scabiosa* species occurs in the Mediterranean region [1] and among them 12 species grows in Algeria [2]. In Catalonia (Spain), the decoction of the aerial part of *S. columbaria* is traditionally used against diphtheria [3]. In Algeria, *S. arvensis* is used in folk medicine against diarrhea, inflammation, microbial infections and skin disorders [4]. In Moroccan folk medicine, the leaves and flowers of *S. stellata* are used against heel cracks [5]. Many extracts obtained from *Scabiosa* species have already demonstrated antibacterial activities, such as *S. atropurpurea* [6], *S. hymettia* [7], *S. columbaria* [8], or *S. arenaria* [9]. The extracts of *S. arenaria* and *S. tschiliensis* have shown antioxidant properties [10,11].

Up to date, chemical investigations of *Scabiosa* species have mainly revealed the presence of saponins [12,13], flavonoids, and coumarins [14]. Previous studies have also reported that the genus *Scabiosa*

characteristically contains bis- and mono-iridoid glucosides [15,16].

Scabiosa stellata Cav., known with the common name starflower pincushions, is an herbaceous, bristly-hairy annual plant (20–60 cm). The lower leaves are 7–12 cm long, spoon-shaped in outline, tapered at the base, the margins with blunt teeth irregular in size and placement. The outer florets are light gray-blue, irregularly shaped. The central florets are smaller and subtended each by a rounded translucent bract with a green midrib [4]. In this work, we have investigated the chemical profile of *S. stellata* and the antibacterial, tyrosinase inhibitory, DPPH radical scavenging and cytotoxic activities of the crude extract, fractions and isolated compounds.

2. Results and discussion

The antibacterial activity of the 70% EtOH extract obtained from the whole plant *S. stellata* was evaluated against 22 µ-organisms including 17 Gram-positive and Gram-negative bacteria and 5 yeasts. The

* Corresponding author.

E-mail address: abdulmagid.alabdulmagid@univ-reims.fr (A. Alabdul Magid).

Table 1
Antimicrobial activity of 70% ethanol extract of *S. stellata* and fractions A–E (solid medium).

Micro-organisms	70% EtOH extract MIC (mg/mL)	Fractions MIC (mg/mL)					Positive controls MIC (µg/mL)		
		A	B	C	D	E	G	V	Am
Gram positive bacteria									
<i>Bacillus subtilis</i>	5	> 10	2.5	2.5	10	> 10	0.12	2	NT
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1034	> 10	> 10	1.2	2.5	10	> 10	16	> 64	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	> 10	> 10	0.6	1.2	10	> 10	0.5	4	NT
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154	> 10	> 10	0.6	1.2	10	> 10	4	> 64	NT
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.5	10	1.2	1.2	5	5	0.25	4	NT
<i>Micrococcus luteus</i>	2.5	10	1.2	2.5	5	5	0.5	4	NT
<i>Listeria innocua</i>	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	0.5	≤ 4	NT
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.2	10	1.2	2.5	5	5	2	1	NT
Gram negative bacteria									
<i>Escherichia coli</i> CIP 54.127	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	≤ 4	> 16	NT
<i>Enterobacter cloacae</i>	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	≤ 4	> 16	NT
<i>Salmonella enterica</i>	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	≤ 4	> 16	NT
<i>Serratia marcescens</i>	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	0.5	> 64	NT
<i>Proteus vulgaris</i>	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	≤ 4	> 16	NT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	> 64	> 64	NT
<i>Providencia stuartii</i>	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	2	> 64	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	8	> 64	NT
<i>Shigella sonnei</i>	> 10	> 10	> 10	10	> 10	> 10	0.5	8	NT
Yeast									
<i>Candida albicans</i>	5	10	0.6	1.5	5	10	> 64	> 64	0.5
<i>Candida glabrata</i>	2.5	10	2.5	2.5	10	10	> 64	> 64	0.25
<i>Candida tropicalis</i>	5	> 10	1.5	1.5	5	10	> 64	> 64	0.25
<i>Candida kefyr</i>	2.5	5	1.2	1.2	5	5	> 64	> 64	0.25
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2.5	5	1.2	1.2	5	5	> 64	> 64	0.5

MIC: minimum inhibitory concentration, NT: not tested. Positive controls: G: Gentamicin, V: Vancomycin and Am: Amphotericin B.

Table 2
DPPH radical scavenging and mushroom tyrosinase inhibition of 70% MeOH extract, fractions A–E and compounds isolated from *S. stellata*.

	DPPH radical scavenging activity IC ₅₀ (µg/mL)	Mushroom tyrosinase inhibition IC ₅₀ (µg/mL)
70% MeOH extract	86.0 ± 1.8	(40%) ^a
Fraction A	133 ± 2.6	(45%) ^a
Fraction B	48.7 ± 1.1	(15%) ^a
Fraction C	25.0 ± 0.8	1330 ± 23
Fraction D	64.3 ± 1.5	1000 ± 19
Fraction E	> 200	1330 ± 22
6	7.1 ± 0.4	> 665
7	7.2 ± 0.4	> 665
8	8.5 ± 0.5	> 665
10	16.0 ± 0.6	> 665
Ascorbic acid ^b	6.3 ± 0.1	
Kojic acid ^b		6.8 ± 0.1

^a % Inhibition at 1330 µg/mL.

^b The positive control.

MIC determination method in solid media was used [17]. The results are presented in Table 1. The highest antimicrobial activity was observed against *Streptococcus pyogenes* (MIC 1.2 mg/mL), whereas a moderate to low antimicrobial activity was observed against *Staphylococcus epidermidis* or *Micrococcus luteus* (MIC 2.5 mg/mL) and *Bacillus subtilis* (MIC 10 mg/mL). Regarding antifungal activity, the crude extract showed a moderate activity (MIC 2.5 to 5 mg/mL). A moderate DPPH radical scavenging activity was also observed for this extract (IC₅₀ 86.0 µg/mL), as well as a moderate tyrosinase inhibitory activity when tested on an *in vitro* mushroom tyrosinase assay (40% inhibition at 1.33 mg/mL) (Table 2).

In order to isolate potentially active compounds, a bioassay-guided fractionation strategy was applied throughout the separation procedure. The 70% ethanol extract of the whole plant *S. stellata* was subjected to a Diaion HP-20 column, eluting with 0%, 25%, 50%, 75% and

100% MeOH, yielding five fractions (A–E, respectively). These fractions were evaluated for their antimicrobial, antioxidant and anti-tyrosinase activities (Tables 1 and 2). Fraction C exhibited the best antimicrobial activity against the 22 microorganisms (MIC 1.2 to 10 mg/mL). Whereas fraction B was active only against the gram-positive bacteria (except against *Listeria innocua*) and yeasts (MIC 0.6 to 2.5 mg/mL) (Table 1). Fractions B and C showed also the best DPPH radical scavenging activity (IC₅₀ 48.7 and 25 µg/mL, respectively) (Table 2). Fraction C showed also a significant anti-tyrosinase activity (IC₅₀ 1.33 mg/mL) and was slightly less active than fraction D (IC₅₀ 1 mg/mL) (Table 2). Therefore, the chemical profiles of fractions B and C were investigated in order to determine which compounds were responsible for these activities (Fig. 1). Fractions B (2 g) and C (3 g) were subjected separately to CPC fractionation. The biphasic solvent system M₁BE/CH₃CN/water (3/3/4, v/v/v) was selected to recover moderately polar compounds. After pooling the collected fractions on the basis of TLC profile similarities, adjacent sub-fractions B₁–B₂₃ and C₁–C₂₁ containing simplified mixtures or even pure compounds were obtained. Fractions B₁–B₂₃ and C₁–C₂₁ were all analyzed by ¹³C NMR for dereplication [18]. Automatic peak picking and binning of ¹³C signals across spectra resulted in two tables (one table for each CPC separation of B and C) which were independently submitted to Hierarchical Clustering Analysis (HCA) for pattern recognition. In this way, statistical correlations between ¹³C NMR signals belonging to individual structures within the fraction series were visualized as “chemical shift clusters” on the resulting two-dimensional HCA correlation heat maps in front of the corresponding dendrograms. As illustrated in Fig. 2, several well-defined clusters were intensely colored in yellow. After entering the chemical shift values of cluster 1 located in sub-fractions B_{4–8} and C_{7–14} into the database, the molecular structure of isoorientin (**8**) [19] was proposed. By means of the same database search strategy, cluster 2 present in sub-fractions B_{2–4} and C_{3–6} was identified as hyperin (**10**) [20], cluster 3 present in sub-fractions B_{20–23} and C_{11–14} was identified as eustomoside (**6**) [21], cluster 4 present in sub-fractions C_{8–9} corresponded to a bis-iridoid structure containing loganic acid and caffeic

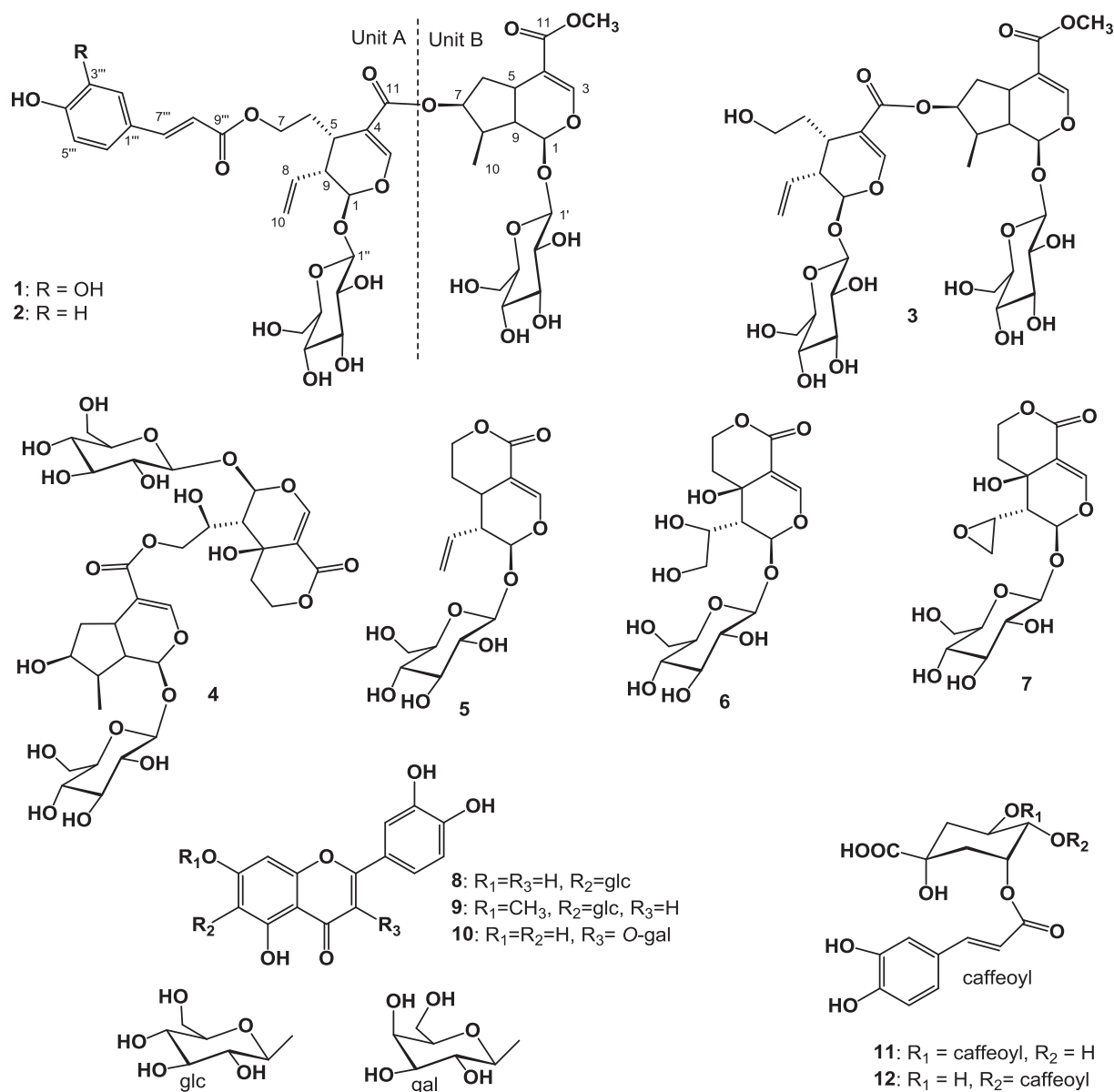


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–12 isolated from *Scabiosa stellata*.

acid moieties, cluster 5 present in sub-fractions B_{19–22} and C_{15–21} was identified as sweroside (5) [22], cluster 6 present in sub-fractions C_{6–8} was identified as swertajaponin (9) [19]. Cluster 7 present in sub-fractions C_{2–3} corresponded to a mixture of 3,5-dicaffeoylquinic acid (11) and 4,5-dicaffeoylquinic acid (12) [11]. Cluster 8 present in sub-fractions B_{13–15} corresponded to eustomoside (7) [23]. Cluster 9 present in sub-fractions B_{9–12} was identified as caffeic acid. For the sub-fractions B_{4–9}, B_{20–23} and C_{8–9}, the database proposed a complex mixture of bis-iridoid derivatives, partially composed of loganin, demethylsecologanol and sweroside units, which could not be identified unambiguously (cluster 10). Further purifications of the fractions containing the products corresponding to the remaining unidentified clusters were performed using silica gel flash chromatography, RP-18 flash chromatography and semi-preparative RP-18 HPLC, leading to the identification of two previously undescribed bis-iridoid glucosides (1–2) and two known bis-iridoid glucosides; sylvestroside I (3) [24] and septemfidoside (4) [25] (Fig. 1).

Compound 1 was obtained as yellowish solid with a molecular formula of C₄₂H₅₄O₂₂, deduced from the positive HR-ESI-MS analysis (*m/z* 933.2997, [M + Na]⁺). The IR spectrum indicated the presence of

hydroxyl groups (3420 cm⁻¹) and α , β -unsaturated ester carbonyl groups (1697 cm⁻¹). The UV spectrum showed the characteristic absorption of β -alkoxyacrylic acid or its ester at 228 nm and absorption at 326 nm characteristic of a cinnamic acid derivatives. The ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data of compound 1 showed two distinct parts, units A and B (Fig. 1). The ¹H NMR spectrum showed signals for unit A that indicated the presence of an olefinic proton β -alkoxyacrylic acid at δ_H 7.42 (s, H-3a), a set of three protons on vinyl group at δ_H 5.84 (ddd, *J* = 17.3, 10.3, 8.7 Hz, H-8a), 5.36 (d, *J* = 17.3 Hz, H-10a₁) and 5.30 (d, *J* = 10.3 Hz, H-10a₂), and an acetal proton at δ_H 5.60 (d, *J* = 6.5 Hz, H-1a) which were characteristic of a secoiridoid moiety. The ¹³C NMR spectrum showed signals for carboxyl carbon (δ_C 167.8, C-11a), two alkenyl carbons [δ_C 151.3 (C-3a) and 110.4 (C-4a) due to the β -alkoxyacrylic ester group, and two others δ_C 134.3 (C-8a) and 118.2 (C-10a) due to the vinyl group], one acetal carbon (δ_C 96.3, C-1a) and one hydroxyl-methyl carbon (δ_C 62.7, C-7a). 2D-NMR analysis indicated that unit A was an open form of the lactone moiety of sweroside. Furthermore, two anomeric protons resonances corresponding to O-linked sugars were observed in the ¹H NMR spectrum of 1 as two doublets at δ_H 4.74 (*J* = 7.9 Hz) and 4.68 (*J* = 7.9 Hz). The sugar units

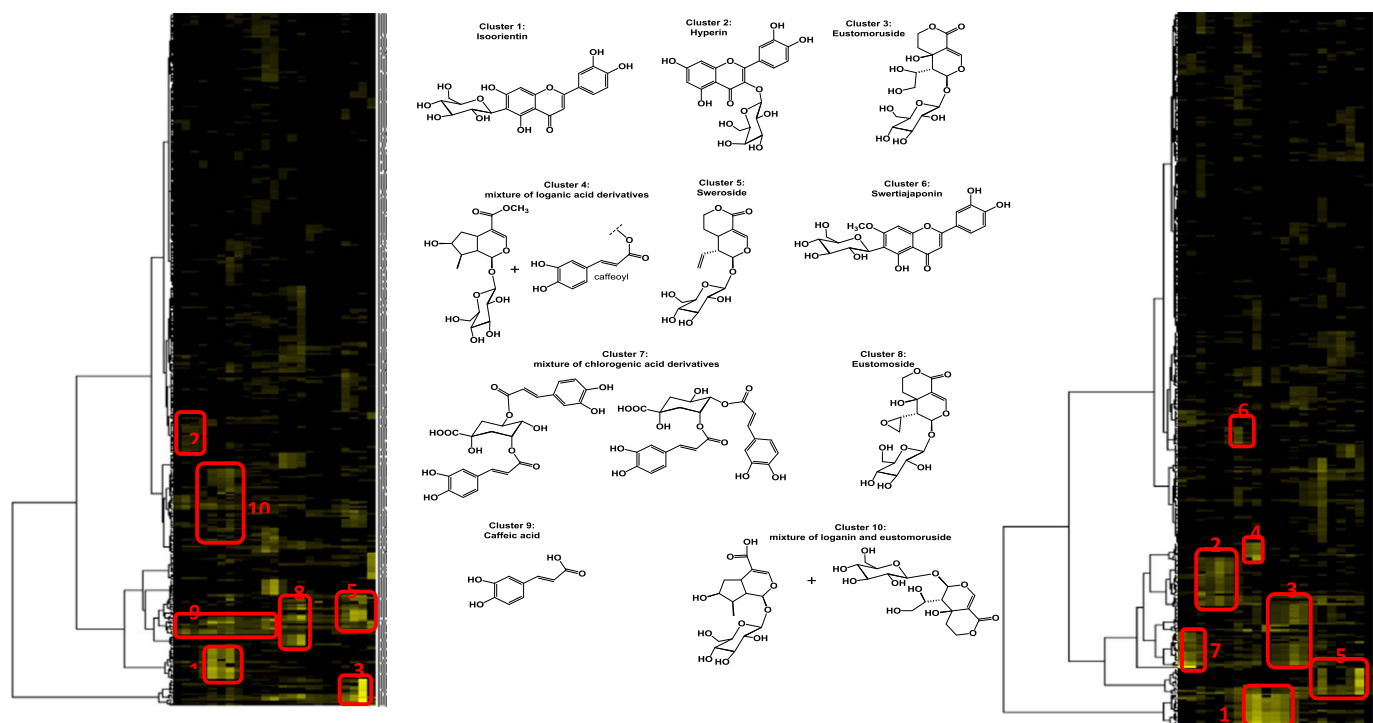


Fig. 2. ^{13}C NMR chemical shift clusters obtained by applying HCA on CPC fractions B (left) and C (right) of *Scabiosa stelata*.

were elucidated as two β -D-glucopyranoses [glc-A ($\delta_{\text{H}} - 1'$ 4.74 and $\delta_{\text{C}} - 1'$ 96.8) and glc-B ($\delta_{\text{H}} - 1''$ 4.68 and $\delta_{\text{C}} - 1''$ 96.8) (Table 3) based on the results of the acid hydrolysis of fraction C from which compound **1** was obtained, by the magnitudes of their $J_{1,2}$ coupling constants, interpretation of COSY, HSQC and HMBC spectra, and by comparing the ^{13}C NMR chemical shifts with those of related systems reported in the literature [26]. The glc-A unit was linked to C-1a as deduced from the long-range correlation observed between H-1' and C-1a in the HMBC spectrum. The spectroscopic data of unit A were almost identical to demethylsecologanol [22,27,28] except for the low-frequency shift of H-7a (δ_{H} 4.21 and 4.26) and C-7a (δ_{C} 62.7) and the high-frequency shift of C-11a (δ_{C} 167.8). In the ^1H NMR spectrum of **1**, a set of signals belonging to a *E*-caffeoyl moiety was detected with two coupled *trans* double-bond protons [δ_{H} 6.24, H-8'' and 7.55, H-7'', each d, $J = 16.0$ Hz] and three coupled aromatic protons [δ_{H} 6.80 (d, $J = 8.1$ Hz, H-5''), 6.96 (dd, $J = 8.1, 2.0$ Hz, H-6'') and 7.05 (d, $J = 2.0$ Hz, H-2'')]. The presence of an *E*-caffeoyl moiety was evident by the connectivities observed in the HMBC spectrum between the *trans* double-bond and the 1,3,4-substituted aromatic ring as well as to an ester carbonyl (δ_{C} 167.9, C-9'') and its ^1H and ^{13}C resonances were assigned using 2D-NMR experiments (COSY, HSQC, and HMBC) (Table 3). An HMBC correlation was observed between H-7a and the carbonyl carbon C-9'', indicating that demethylsecologanol was esterified by the *E*-caffeoyl moiety. Thus, unit A was identified as grandifloroside [29]. The second half, unit B, was easily assigned to a loganic acid-type iridoid [22,27,28] due to a methyl group at δ_{H} 1.10 (d, $J = 6.9$ Hz, H-10b), olefinic signal at δ_{H} 7.53 (s, H-3b) together with δ_{C} 152.3, 111.6 and 166.9 which were ascribed to C-3b, C-4b and C-11b, respectively (Table 3). This was verified by the correlations in ^1H - ^1H COSY spectrum observed between the protons signals at δ_{H} 3.14 (H-5b), 2.08 (H-9b), 5.28 (H-1b) and 2.19 (H-8b), between the methyl group at δ_{H} 1.10 (H-10b) and H-8b and between signal at δ_{H} 5.24 (H-7b), and H-8b. The structure of loganic acid moiety was confirmed by the HMBC correlations observed between H-3b/C-1b, C-4b, C-5b and C-11b, H-7b/C-5b and H-1b/C-10b and the anomeric carbon C-1'' of Glc B. Additionally, in the HMBC spectrum, the proton signal at δ_{H} 7.53 (H-3b), 3.68 (-OCH₃, H-12b) and 3.14 (H-5b) showed long-range correlations

with the carbon resonance at δ_{C} 166.9 (C-11b) indicating the location of a methoxy group at C-11b. The spectroscopic data of unit B were almost identical to loganin [28,29] except for the downfield shifts of H-7b (δ_{H} 5.24) and C-7b (δ_{C} 77.0). The connectivity between A and B units was found to be an ester linkage between the C-7b hydroxyl group of unit B and the carboxyl group (C-11a) as deduced by the HMBC correlation observed between H-7b and C-11a. The relative configuration of **1** was further determined on the basis of coupling constants and by the ROESY experiment. The ROESY correlations of δ_{H} 2.95 (H-5a) with 2.72 (H-9a), 2.08 (H-9b) with 1.10 (H-10b), 3.14 (H-5b) with 2.08 (H-9b) and 5.24 (H-7b) with 2.19 (H-8b) revealed the relative configuration of **1**. Therefore, the structure of **1** was elucidated as 7-*O*-(*E*-caffeoyl)-sylvestroside **1** shown in Fig. 1 and differs from sylvestroside **1**, reported in *Dipsacus laciniatus* [24], with an additional *E*-caffeoyl group at C-7a.

Compound **2** displayed an $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion peak at m/z 917.3063, corresponding to the molecular formula $\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_{21}$ (calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_{21}\text{Na}$, 917.3055), suggesting the lack of one hydroxyl group compared to **1**. Comparison of ^1H and ^{13}C NMR values and the analysis of the ^1H - ^1H -COSY, ROESY, HSQC and HMBC showed that **1** and **2** contained the same skeleton (sylvestroside **1**) (Table 3). Thus, the difference between **1** and **2** should be located at the cinnamoyl derivative substituent. This latter was represented on the ^1H NMR spectrum by two *trans*-coupled double-bond protons at δ_{H} 7.61 and 6.30 (each 1H, d, $J = 16.0$ Hz) assignable to H-7'' and H-8'', respectively and four aromatic protons at δ_{H} 7.47 and 6.83 (each 2H, d, $J = 8.6$ Hz) assignable to H-2''/6'' and H-3''/5'' respectively, as well as to an ester carbonyl (δ_{C} 167.9) in the ^{13}C NMR spectrum. These data were consistent with the presence of an *E*-coumaroyl moiety (Table 1) [30] and its ^1H and ^{13}C resonances were assigned using 2D-NMR experiments (COSY, HSQC, and HMBC). The coumaroyl moiety was linked to the C-7a of the secologanin moiety as deduced from the HMBC correlation between the H-7a (δ_{H} 4.21 and 4.26) and the carbonyl carbon of coumaroyl group (δ_{H} 167.9, C-9''). Thus, the structure of compound **2** was concluded to be 7-*O*-(*E*-p-coumaroyl)-sylvestroside **1** as shown in Fig. 1.

In order to screen the antibacterial potential of the compounds **1**–**12** isolated from the active fractions B and C, a bioautography assay was applied on a sensitive strain of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* CIP

Table 3
NMR spectroscopic data of the compounds **1–2** in CD₃OD.

	1	δ_c	2	δ_c
	δ_{H1} m (J in Hz)		δ_{H1} m (J in Hz)	
Unit A				
1a	5.60 d (6.5)	96.3	5.60 d (6.5)	96.3
3a	7.43 s	151.3	7.42 s	151.2
4a	–	110.4	–	110.3
5a	2.95 q (6.2)	30.1	2.95 q (6.2)	30.3
6a	1.92 ddd (13.8, 7.8, 6.6)	28.9	1.92 ddd (13.8, 7.5, 6.8)	28.9
7a	2.10 m	62.7	2.10 m	62.7
	4.21 m		4.21 m	
	4.26 m		4.26 m	
8a	5.84 ddd (17.3, 10.3, 8.7)	134.3	5.82 ddd (17.3, 10.5, 8.0)	134.3
9a	2.72 m	44.0	2.71 dt (8.0, 6.2)	44.0
10a	5.30 d (10.3)	118.2	5.30 d (10.5)	118.2
	5.36 d (17.3)		5.36 d (17.3)	
11a	–	167.8	–	167.8
1a-O-glc				
1'	4.74 d (7.9)	96.8	4.74 d (7.9)	98.8
2'	3.23 t (8.0)	73.3	3.23 t (8.0)	73.3
3'	3.39 t (8.8)	76.6	3.39 t (9.0)	76.6
4'	3.29 t (8.9)	70.2	3.29 t (9.5)	70.2
5'	3.33 m	76.9	3.33 m	76.9
6'	3.68 dd (12.0, 5.6)	61.4	3.68 dd (12.0, 5.6)	61.4
	3.92 dd (12.0, 2.2)		3.92 dd (12.0, 2.2)	
	7a-p-coumaroyl		7-O-p-coumaroyl	
1''	–	126.3	–	125.7
2''	7.05 d (2.0)	113.7	7.47 d (8.6)	129.8
3''	–	145.4	6.83 d (8.6)	115.4
4''	–	148.2	–	148.2
5''	6.80 d (8.1)	115.1	6.83 d (8.6)	115.4
6''	6.96 dd (8.1, 2.0)	121.6	7.47 d (8.6)	129.8
7''	7.55 d (16.0)	145.5	7.61 d (16.0)	145.1
8''	6.24 d (16.0)	113.7	6.30 d (16.0)	113.8
9''	–	167.9	–	167.9
Unit B				
1b	5.28 d (5.3)	96.3	5.28 d (5.3)	96.3
3b	7.53 s	152.3	7.53 s	152.3
4b	–	111.6	–	111.7
5b	3.14 q (8.2)	31.5	3.14 q (8.2)	31.5
6b	1.76 ddd (13.8, 8.2, 5.1)	38.9	1.76 ddd (13.5, 8.0, 5.2)	38.9
	2.34 dd (13.8, 8.1)		2.34 dt (13.8, 8.0)	
7b	5.24 t (5.1)	77.0	5.24 t (4.5)	77.0
8b	2.19 m	39.7	2.16 m	39.7
9b	2.08 m	45.7	2.08 m	45.7
10b	1.10 d (6.9)	12.6	1.10 d (6.9)	12.6
11b	–	166.9	–	166.9
OCH₃	3.68 s	50.3	3.68 s	50.3
1b-O-glc				
1'''	4.68 d (7.9)	96.8	4.68 d (7.9)	98.7
2'''	3.23 t (8.0)	73.2	3.23 t (8.0)	73.2
3'''	3.39 t (9.0)	76.6	3.39 t (9.0)	76.6
4'''	3.31 t (8.8)	70.1	3.31 t (8.8)	70.1
5'''	3.33 m	77.0	3.33 m	77.0
6'''	3.68 dd (12.0, 5.6)	61.4	3.68 3.68 dd (12.1, 5.6)	61.4
	3.92 dd (12.0, 2.2)		3.92 dd (12.1, 2.0)	

53.154). *S. aureus* is a Gram-positive cocci bacterium frequently found on the skin and in the respiratory tract, and can be responsible for nosocomial infections. Compounds **1–4**, **6**, **8**, **9**, **11** and **12** were the only active compounds as revealed by the white inhibition zones observed on the TLC plate around the compound spots. A serial liquid dilution technique in 96-well microtiter plates was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of these eight active compounds against *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, *Escherichia coli* CIP 54.127, *Staphylococcus epidermidis*, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Table 4). The results showed a good inhibitory effect of compounds **1** and **2** against *E. faecalis* (MIC 31.2 µg/mL), *S. epidermidis* (MIC 31.2 µg/mL), and *S. aureus* (MIC 62.5 µg/mL). Compound **6** exhibited a good inhibitory effect against *E. faecalis* and *S. aureus* (MIC 62.5 µg/mL). Only compound **3**

Table 4
Minimum inhibitory concentration (MIC) values of compounds isolated from *S. stellata* in liquid medium.^a

Compounds	MIC (µg/mL)				
	<i>E. faecalis</i> (ATCC 1054)	<i>S. aureus</i> (CIP53.154)	<i>E. coli</i> (CIP 54.127)	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC9027)
1	31.2	62.5	250	31.2	125
2	31.2	62.5	125	31.2	125
3	500	62.5	62.5	125	125
4	125	250	500	250	250
6	62.5	62.5	125	250	125
8	125	250	125	125	125
9	250	250	125	125	125
11	250	250	> 500	250	125
12	125	125	500	125	62.5

^a No bacterial growth inhibition observed in bioautography assay for compounds **5**, **7** and **10**.

showed an antibacterial activity against *E. coli* in addition to *S. aureus* (MIC 62.5 µg/mL). Compounds **4**, **8**, **9** and **11** showed a low antibacterial activity against the five tested bacteria with MIC values ranging from 125 to 500 µg/mL (Table 4).

All isolated compounds (**1–12**) were then evaluated for their DPPH radical scavenging effect. As summarized in Table 2, only compounds **6**, **7**, **8** and **10** exhibited IC₅₀ values ranging from 7.1 ± 0.2 to 16.0 ± 0.4 µg/mL whereas for the other compounds the 50% DPPH inhibition could not be reached even at 200 µg/mL. These values were very close to that obtained with ascorbic acid used as positive control (IC₅₀ 6.3 ± 0.1 µg/mL). Compounds **1–12** were also evaluated for their mushroom tyrosinase inhibitory activity. None of the isolated compound **1–12** was active at the concentration of 665 µg/mL (Table 2). Finally, the cytotoxic activity of previously undescribed compounds **1** and **2** was evaluated *in vitro* using a fibrosarcoma cell line (HT1080). Only compound **1** exhibited a moderate cytotoxic activity with an IC₅₀ value of 35.9 ± 0.06 µg/mL, while compound **2** was inactive (IC₅₀ > 100 µg/mL).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

Optical rotations of pure compounds were measured in CH₃OH using a Perkin-Elmer 341 Polarimeter. HR-ESI-MS experiments were performed using a Micromass Q-TOF micro instrument (Manchester, UK). Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated aluminum plates (0.2 mm, Merck), using the system CHCl₃/MeOH/H₂O (14/6/1, v/v) as the mobile phase. The spots were visualized under UV light (254 and 366 nm) and sprayed with 50% H₂SO₄ followed by heating. Flash chromatography was carried out on a Grace Reveleris system equipped with dual UV and ELSD detection and using Grace® cartridges (Silica gel or RP-C₁₈).

3.2. Plant material

The plant *Scabiosa stellata* Cav. (Caprifoliaceae) was collected from Djebel El-Ouahch at Constantine (North eastern of Algeria) in June 2015 and authenticated by Mr. Kamel Kabouche. A Voucher specimen (LOST.Cs.06.15) was deposited at the Constantine University Herbarium (Algeria).

3.3. Extraction and isolation

The dried and powdered *S. stellata* whole plant (653 g) was

macerated in 70% EtOH (3 × 3 L, 24 h) at room temperature, followed by rotary evaporation at 40 °C under reduced pressure. The dried extract (118 g) dissolved in water (1 L) and then loaded onto a Daion HP-20 open column (40 cm 4.3 cm; the volume of the column was 363 mL) and sequentially eluted with a methanol gradient beginning with 100% water and increasing to 25, 50, 75, and finally 100% methanol (2 L of each solvent mixture) to provide fractions A-E, respectively.

3.3.1. Centrifugal partition chromatography

Centrifugal partition chromatography (CPC) experiments were carried out using a lab-scale FCPE300® column of 303 mL capacity (Rousselet Robatel Kromaton, Annonay, France) containing 7 circular partition disks and engraved with a total of 231 partition twin-cells (≈ 1 mL per twin cell). The liquid phases were pumped by a KNAUER Preparative 1800 V7115 pump (Berlin, Germany). The column was coupled on-line with a UVD 170 S detector set at 210, 254, 280 and 366 nm (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Fractions of 15 mL were collected by a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala, Sweden). The solvent system was MtBE/CH₃CN/water in the ratio 3/3/4 (v/v/v). The column was filled with the lower phase of the biphasic solvent system at 500 rpm. The rotation speed was then increased up to 1200 rpm.

Fractions B and C were subjected separately to CPC; each one was dissolved in 30 mL of a mixture of both lower phase (20 mL) and upper phase (10 mL). For the separation of fraction B (1.8 g injected), the upper phase of the biphasic solvent system was pumped for 100 min in the ascending mode at 20 mL/min. Then the column was extruded by pumping the organic phase in the descending mode at 20 mL/min. Fractions of 20 mL were collected over the whole experiment. For the separation of fraction C (3 g), the CPC method was identical, except for the extrusion step which was performed between 80 and 100 min. All fractions were analyzed by TLC and HPLC and then pooled, giving sub-fractions B₁–B₂₃ and C₁–C₂₁.

3.3.2. NMR analyses and dereplication of the major metabolites

As a first step in this developed ¹³C NMR-based dereplication method [18], structures and names of metabolites already described in the genus *Scabiosa* were collected from the reports available in the literature. In total, 12 metabolites were found. The predicted ¹³C NMR chemical shifts of each one was then stored into a local database already comprising 2700 structures of natural compounds (NMR Workbook Suite 2012, ACD/Labs, Ontario, Canada). In the second step, all the sub-fractions of the both CPC experiments were dried under vacuum and each aliquot (≈ 20 mg) was dissolved in 600 μ L of methanol-*d*₄ and analyzed by ¹³C NMR. NMR spectra were recorded at 298 K on a Bruker Avance AVIII-600 spectrometer (Karlsruhe, Germany) equipped with a TXI cryoprobe. ¹³C NMR spectra were acquired at 150.91 MHz. A standard zgpg pulse sequence was used with an acquisition time of 0.9 s and a relaxation delay of 3 s. For each sample, a total of 1024 scans were added to obtain a satisfactory signal-to-noise ratio. The spectral width was 240 ppm and the receiver gain was set to the highest possible value. Spectra were then manually phased, baseline corrected using the TOPSPIN3.2 software (Bruker), and calibrated on the central resonance of methanol-*d*₄ (δ 49.10 ppm).

The last step consisted in the binning of all ¹³C NMR signals followed by the visualization of the whole dataset as a heat map. For this purpose, the absolute intensities of all ¹³C NMR signals detected in the spectra of the fraction series were automatically collected and each resulting peak list was stored as a text file. The binning step was performed by using a locally developed computer script written in Python language. Its principle was to divide the ¹³C spectral width (from 0 to 240 ppm) into regular chemical shift windows ($\Delta\delta = 0.2$ ppm), and to associate the absolute intensity of each peak to the corresponding bin. The resulting table was imported into the PermutMatrix version 1.9.3 software (LIRMM, Montpellier, France) and submitted to Hierarchical Clustering Analysis (HCA) for data visualization. Then the chemical shifts clusters regrouped with the HCA were compared to a database to

identify the compounds. In order to confirm the structures of the identified compounds, additional 1D and 2D NMR experiments (¹H NMR, HSQC, HMBC, and ¹H-¹H-COSY).

3.3.3. HPLC, flash chromatography and column chromatography analyses

Analytical HPLC experiments were performed using a Thermofisher Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific, Villebon sur Yvette, France), equipped with a 4 ways pump LPG 3400 SD, an automatic injector WPS 3000 SL and a UV/visible diode array detector 3000. The mobile phase was composed of H₂O with TFA (0.0025% v/v) and CH₃CN. A gradient elution method was applied from 10% to 50% of CH₃CN in 30 min with a flow rate of 1 mL/min. The chromatographic column used was a Kinetex C₁₈ (4.6 × 100 mm 2.6 μ , Phenomenex, France). A prepacked RP-C₁₈ column (Phenomenex Luna 250 × 15 mm, 5 μ) was used for semi-preparative HPLC. The mobile phase consisted of H₂O with TFA (0.0025%) and CH₃CN with a flow rate of 5 mL/min and the chromatogram was monitored at 210, 254, 280 and 366 nm.

Sub-fractions C_{2–4} were purified through RP-C₁₈ semi-prep HPLC with gradient system (18–45% CH₃CN, 25 min) to yield compounds **8** (*t*_R 7.9, 6 mg), **11** (*t*_R 13.4, 6 mg) and **12** (*t*_R 14.2, 16 mg). Compounds **1** (7 mg) and **2** (23 mg) were purified by a flash chromatography from the sub-fraction C_{20–21} (293 mg) on reversed phase using a gradient 10–50% CH₃CN in water as a mobile phase. Compounds **10** (36 mg) and **9** (7 mg) were obtained as a yellow precipitate from the sub-fractions C₁₀ and C₁₃ respectively. Sub-fractions C₁₈ (398 mg) was subjected to flash chromatography over silica gel, eluted by gradient system of CHCl₃-MeOH (10:0–7:3) to give compounds **3** (15 mg) and **4** (3 mg). Compounds **5** (4 mg), **6** (6 mg) and **7** (5 mg) were obtained from sub-fractions C₂₀ using both the same method and eluent as for the sub fraction B_{21–22}.

3.4. 7-O-(E-caffeoyl)-sylvestroside I (1)

Yellowish solid; [α]_D²⁵-36.5 (c 0.23, MeOH); UV_{max} (MeOH): 228, 326; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 3; HR-ESI-MS *m/z*: 933.2997 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₂H₅₄O₂₂Na, 933.3004).

3.5. 7-O-(E-p-coumaroyl)-sylvestroside I (2)

Yellowish solid; [α]_D²⁵-77.2 (c 0.25, MeOH); IR (KBr) ν _{max} (cm⁻¹): 3420, 1697; UV_{max} (MeOH): 228, 312; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 3; HR-ESI-MS *m/z*: 917.3063 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₂H₅₄O₂₁Na, 917.3055).

3.6. Bioassay procedure

3.6.1. Antimicrobial activity

3.6.1.1. Antimicrobial screening of the 70% EtOH extract and fractions A-E of *S. stellata* against a panel of 22 microbial strains. The antimicrobial screening was performed on a total of 17 bacteria obtained from the Laboratory of Microbiology, faculty of pharmacy from the University of Reims Champagne-Ardenne including the following Gram-positive bacteria: *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* 8325-4, *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua*, *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus epidermidis*, and the following Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* CIP 54.127, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Shigella sonnei*, as well as five yeasts obtained from the Laboratory of Parasitology-Myecology (Transmission Vectorielle et Epidémiologie-surveillance des Maladies Parasitaires, EA 4688) of the University of Reims Champagne-Ardenne: *Candida glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. albicans* and *Cryptococcus neoformans*. The 17 bacteria and 5 yeasts were incubated overnight at 37 °C in tubes containing Mueller-Hinton (MH) broth medium. The bacteria were then diluted with MH-broth by means of

serial dilution to finally reach a concentration of 10^5 bacteria/mL. The same process was performed for bacteria and yeasts. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the crude ethanol extract of *S. stellata* was studied using MH agar in square Petri dishes seeded by multiple inoculators as described in a previous work [17,31]. The crude extract was tested at six final concentrations (10, 5, 2.5, 1.2, 0.6, and 0.3 mg/mL) against the 22 microorganisms. The agar plates were incubated for 24 h at 37 °C. The activity was then visually estimated by the presence or absence of colonies. MIC values were recorded as the lowest concentrations of compounds enabling growth inhibition. Solvents were checked for absence of antimicrobial activity. Positive antimicrobial controls were used for bacteria (gentamicin and vancomycin) and yeasts (amphotericin B).

3.6.1.2. Evaluation of the antibacterial activity of the isolated compounds against *Staphylococcus aureus* by bioautography. As described in a previous work [31], an aliquot of each compound (2 mg) was solubilized in 1 mL methanol. A part of the resulting solutions (25 μ L) were spotted onto Merck 60 F₂₅₄ pre-coated silica gel plates (10 \times 10 cm). Methanol and Gentamicin (50 μ g) were also spotted on the plates as negative and positive control, respectively. The TLC plates were directly dried without migration and sterilized. The plates, placed in square Petri dishes were then covered by Mueller-Hinton (MH) agar medium containing a *Staphylococcus aureus* 53.154 suspension of 10^5 bacteria/mL. After incubation for 24 h at 37 °C, bacterial growth was revealed by a 2 mg/mL solution of thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) and growth inhibition zones were measured. White stains indicated where reduction of MTT to the colored formazan did not take place due to the absence of bacterial growth.

3.6.1.3. MIC determination of the most active compounds against *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermis* and *P. aeruginosa* by broth microdilution. A serial liquid dilution technique in 96-well microliter plates was used to determine the MIC values of the most promising compounds as revealed by bioautography [32]. For this purpose, nine concentrations of the most active fractions, from 500 μ g/mL to 2 μ g/mL were tested in presence of bacterial suspensions (10^5 bacteria/mL) giving a final volume of 200 μ L in MH media. Two wells were represented as bacteria culture control (positive control) and medium sterility control (negative control). The plates were incubated overnight at 37 °C, sprayed with a 0.2 mg/mL MTT solution and incubated again at 37 °C for 30 min. Bacterial growth was indicated by a violet color whatever the color intensity, while bacterial growth inhibition was admitted only for wells which remained clear. MIC values were determined as the lowest concentrations of samples having an inhibitory effect on bacteria growth (clear wells).

3.6.2. Free radical scavenging activity

The antioxidant activity of crude extracts, fractions and purified compounds was measured in terms of hydrogen donating or radical scavenging ability using the stable radical DPPH method [33]. 5 μ L of different concentrations of the samples were added to 95 μ L of a DPPH solution (158 μ M, dissolved in EtOH 50%). The reaction proceeded for 30 min at 37 °C on a 96-well microplate and the absorbance was then read at 515 nm. The DPPH inhibition percentage was calculated as followed: % inhibition $[(Ab_{\text{control}} - Ab_{\text{sample}})/Ab_{\text{control}}] \times 100$. A DPPH solution in EtOH 50% was used as a control. The curve of the % scavenging activity against the concentration of sample was prepared by MSEXcel based program to obtain the IC₅₀. Samples were prepared at concentrations of 100, 50, 25, 6.2 and 3.1 μ g/mL. Ascorbic acid was used as a positive control. All the tests were conducted in triplicate. Ascorbic acid was used as a positive control agent.

3.6.3. Tyrosinase enzyme assay

The tyrosinase inhibitory activity was determined according to the method described previously [34]. L-DOPA was used as the substrate in

this experiment. Samples were prepared at concentrations of 400, 100, 50, 25 and 12.5 μ g/mL in 10% DMSO in aqueous solution and 100 μ L of each concentration were added to 96-well plate and then 100 μ L of 135 U/mL fungal tyrosinase in phosphate buffer solution (PBS, pH 6.8) were added. After pre-incubation at 25 °C for 10 min, 100 μ L of L-DOPA (0.5 mM, PBS pH 6.8) were added into 96-well plate. The reaction mixture was incubated for another 5 min at 25 °C. The amount of dopachrome in the mixture was determined by the measurement of the absorbance of each well at 475 nm. Kojic acid was used as positive control agent. The inhibitory percentage of tyrosinase was calculated according to the following equation: % inhibition = $\{[(A - B) - (C - D)]/(A - B)\} \times 100$ (A: Ab without test substance; B: Ab without test substance and tyrosinase; C: Ab with test substance; D: Ab with test substance, but without tyrosinase). All the tests were conducted in triplicate and IC₅₀ was determined by interpolation of concentration % inhibition curve obtained by MSEXcel based program.

3.6.4. Cell proliferation assay

The fibrosarcoma cells (HT1080) were cultured in Minimum Essential Media (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin Streptomycin (PS) at 37 °C with 5% CO₂ and harvested every three days for maintenance. Compounds 1 and 2 were dissolved in DMSO. For treatment, cells were plated at a density of 10^4 cells/mL in 24-well plates at 37 °C. After 24 h, the culture medium was discarded and cells were treated with the compounds in a fresh culture medium at various concentrations for 72 h, while the same dilution volume of DMSO was added in negative control wells. The concentration of DMSO did not exceed 0.1% to avoid significant toxicity on the tested cells. Therefore, the cells were washed once with 1 mL of D-PBS and then detached with 0.2% Trypsin/EDTA. Cell counting was carried out on a KOVA® slide and with a phase contrast microscope as indicated by the manufacturer. Cell growth was calculated in percentage as the fraction of cell number in treated and control cells. IC₅₀ was determined as the concentration of each compound which induced 50% inhibition of cell growth.

4. Conclusions

Twelve compounds were identified and isolated from crude 70% EtOH crude extract of *S. stellata* among them seven showed good to moderate inhibitory activity against *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* and *S. epidermidis*. And only four compounds showed DPPH radical scavenging activity. A new bis-iridoid showed a cytotoxic activity against fibrosarcoma cell line (HT1080). All structures were unambiguously assigned based on NMR, HRESIMS data which afforded the new bis-iridoids (1–2) and known compounds 3–12 structures. Iridoids and bis-iridoids, found in a large number of plants of the Caprifoliaceae family and the major components were derived from loganin or scologanin with a sugar unit at C-1 and bis-iridoids heterodimers [11,35]. Interestingly, in the present work, all bis-iridoids (1–4) isolated from *S. stellata* were found to possess secoiridoid/iridoid-subtype skeletons, which are closely related to the bis-iridoids catelyoside isolated from *Scabiosa variifolia* [15] and dipsanoside C-G isolated from *Dipsacus asper* [36]. Also, sylvestroside I (3) was previously isolated from the genus *Dipsacus* [24]. This indicates a close relationship between the two genera *Scabiosa* and *Dipsacus*. Septemfidioside (4), eustomorusside (6) and eustomoside (7) are reported for the first time in the Caprifoliaceae family.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to MESRS Algeria for the PNE grant to Ms.

Meryem Lehibili, to CNRS, Conseil Régional de Champagne Ardenne (CRCA), Conseil Général de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR) in France, and to the PLANET CPER project for financial support. The authors warmly thank Chantal Grimplet for her technical assistance and Pr. Jérôme Depaquit for access to some of the microbial strains.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.12.018>.

References

- [1] S.E. Carlson, H.P. Linder, M.J. Donoghue, The historical biogeography of *Scabiosa* (Dipsacaceae): implications for Old World plant disjunctions, *J. Biogeogr.* 39 (2012) 1086–1100.
- [2] P. Quezel, S. Santa, *New Flora of Algeria and the Southern Desert Regions*, CNRS, Paris, 1963.
- [3] M. Rigat, M.A. Bonet, S. Garcia, T. Garnatje, J. Valles, Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula), *J. Ethnopharmacol.* 113 (2007) 267–277.
- [4] A. Chorfi, A. Ziriat, A. Bagot, S. Boulé, *Illustrated Guide of the Algerian Flora*. Wilaya d'Alger, Mairie de Paris, Délégation Générale aux Relations Internationales, Paris, 2012.
- [5] J. Bammi, A. Douira, Medicinal plants of the achach forest in Morocco, *Acta Botanica Malacitana* 27 (2002) 131–145.
- [6] R.W. Bussmann, A. Malca-García, D. Glenn, D. Sharon, G. Chait, D. Díaz, K. Pourmand, B. Jonat, S. Somogy, G. Guardado, C. Aguirr, R. Chan, K. Meyer, A. Kuhlman, A. Townesmith, J. Effio-Carbajal, F. Frías-Fernandez, M. Benito, Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies, *J. Ethnopharmacol.* 132 (2010) 101–108.
- [7] C. Christopoulou, K. Graikou, I. Chinou, Chemosystematic value of chemical constituents from *Scabiosa hymettia* (Dipsacaceae), *Chem. Biodivers.* 5 (2008) 318–323.
- [8] S.F. Van Vuuren, D. Naidoo, An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections, *J. Ethnopharmacol.* 103 (2010) 552–558.
- [9] B.M. Hlila, H. Mosbah, K. Majouli, A. Ben Nejma, H. Ben Jannet, M. Mastouri, M. Aouni, B. Selmi, Antimicrobial activity of *Scabiosa arenaria* Forssk. Extracts and pure compounds using bioguided fractionation, *Chem. Biodivers.* 13 (2016) 1262–1272.
- [10] B.M. Hlila, H. Mosbah, K. Mssada, H.B. Jannet, M. Aouni, B. Selmi, Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk, *Ind. Crop. Prod.* 67 (2015) 62–69.
- [11] J. Wang, K. Liu, X. Li, K. Bi, Y. Zhang, J. Huang, R. Zhang, Variation of active constituents and antioxidant activity in *Scabiosa tschiliensis* Grunning from different stages, *J. Food Sci. Technol.* 54 (2017) 2288–2295.
- [12] T. Aykal, T. Panayir, D. Tasdemir, O. Sticher, I. Çalis, Triterpene saponins from *Scabiosa rotata*, *Phytochemistry* 48 (1998) 867–873.
- [13] Q. Zheng, K. Koike, L.K. Han, H. Okuda, T. Nikaido, New biologically active triterpenoid saponins from *Scabiosa tschiliensis*, *J. Nat. Prod.* 67 (2004) 604–613.
- [14] E.A. Garaev, I.S. Movsumov, M.I. Isaev, Flavonoids and oleanolic acid from *Scabiosa caucasica*, *Chem. Nat. Compd.* 44 (2008) 520–521.
- [15] A. Papalexandrou, P. Magiatis, D. Perdetzoglou, A.L. Skaltsounis, I.B. Chinou, C. Harvala, Iridoids from *Scabiosa variifolia* (Dipsacaceae) growing in Greece, *Biochem. Syst. Ecol.* 31 (2003) 91–93.
- [16] E. Polat, Ö. Alankus-Caliskan, T. Karayildirim, E. Bedir, Iridoids from *Scabiosa atropurpurea* L. subsp. *maritima* Arc. (L.), *Biochem. Syst. Ecol.* 38 (2010) 253–255.
- [17] A. Abedini, S. Chollet, A. Angelis, N. Borie, J.M. Nuzillard, A.L. Skaltsounis, R. Reynaud, S.C. Gangloff, J.H. Renault, J. Hubert, Bioactivity-guided identification of antimicrobial metabolites in *Alnus glutinosa* bark and optimization of oregonin purification by Centrifugal Partition Chromatography, *J. Chromatogr. B* 1029–1030 (2016) 121–127.
- [18] S.K. Oettl, J. Hubert, J.M. Nuzillard, H. Stuppner, J.H. Renault, J.M. Rollinger, Dereplication of depsides from the lichen *Pseudevernia furfuracea* by centrifugal partition chromatography combined to ¹³C nuclear magnetic resonance pattern recognition, *Anal. Chim. Acta* 846 (2014) 60–67.
- [19] D. Davoust, M. Massias, D. Molho, Carbon-13 NMR investigation of flavonoid C-β-glucosides. Detection of a conformational equilibrium, *Magn. Reson. Chem.* 13 (1980) 218–219.
- [20] C. Pereira, C.B. Barreto Júnior, R.M. Kuster, N.K. Simas, C.M. Sakuragai, A. Porzel, L. Wessjohann, Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae), *Química Nova* 35 (2012) 1123–1126.
- [21] F.Y. Huang, J.J. Wu, G.P. Li, A. New Secoiridoid, Glycoside from *Swertia cincta*, *Chin. Herb. Med.* 6 (2014) 73–75.
- [22] D. Prasad, V. Juyal, R. Singh, V. Singh, G. Pant, M.S.M. Rawat, A new secoiridoid glycoside from *Lonicera angustifolia*, *Fitoterapia* 71 (2000) 420–424.
- [23] M.E. Mpondo, J. Garcia, A. Chulia, Secoiridoid glucosides from *Gentiana campestris*, *Phytochemistry* 29 (1990) 1687–1688.
- [24] M.A. Abdallah, Phenolic glucoside and other constituents of *Dipsacus laciniatus*, *Phytochemistry* 30 (1991) 2805–2806.
- [25] I. Çalis, T. Irsoz, Septemfidoside: a new bis-iridoid diglucoside from *Gentiana septemfida*, *J. Nat. Prod.* 55 (1992) 385–388.
- [26] P.K. Agrawal, NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides, *Phytochemistry* 31 (1992) 3307–3330.
- [27] M. Kitajima, N. Fujii, F. Yoshino, H. Sudo, K. Saito, N. Aimi, H. Takayama, Camptothecins and two new monoterpene glucosides from *Ophiorrhiza liukuensis*, *Chem. Pharm. Bull.* 53 (2005) 1355–1358.
- [28] A. Kocsis, L.F. Szabo, B. Podanyi, New bis-iridoids from *Dipsacus laciniatus*, *J. Nat. Prod.* 56 (1993) 1486–1499.
- [29] A. Itoh, K. Fujii, S. Tomatsu, C. Takao, T. Tanahashi, N. Nagakura, C.C. Chen, Six secoiridoid glucosides from *Adina racemosa*, *J. Nat. Prod.* 66 (2003) 1212–1216.
- [30] D.P.A. Gossan, A. Alabdul Magid, P.A. Yao-Kouassi, A. Ahibo Coffy, D. Harakat, L. Voutquenne-Nazabadioko, New acylated flavonol glycosides from the aerial parts of *Gouania longipetala*, *Phytochem. Lett.* 11 (2015) 306–310.
- [31] A. Benmerache, M. Benteldjoun, A. Alabdul Magid, A. Abedini, D. Berrehal, A. Kabouche, S.C. Gangloff, L. Voutquenne-Nazabadioko, Z. Kabouche, Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of aerial parts of *Tamarix balansae*, *J. Gay Nat. Prod. Res.* 10 (2017) 1–8.
- [32] A. Benmerache, A. Alabdul Magid, D. Berrehal, A. Kabouche, L. Voutquenne-Nazabadioko, S. Messaili, A. Abedini, D. Harakat, Z. Kabouche, Chemical composition, antibacterial, antioxidant and antityrosinase activities of glycosides from aerial parts of *Eryngium tricuspdatum* L., *Phytochem. Lett.* 18 (2016) 23–28.
- [33] P. Sientzoff, J. Hubert, C. Janin, L. Voutquenne-Nazabadioko, J.H. Renault, J.M. Nuzillard, D. Harakat, A. Alabdul Magid, Fast identification of radical scavengers from *Securigera varia* by combining ¹³C NMR-based dereplication to bioactivity-guided fractionation, *Molecules* 20 (2015) 14970–14984.
- [34] Y. Wu, Y. Yin, Y. Li, F. Guo, G. Zhu, Secoiridoid/iridoid subtype bis-iridoids from *Pteroccephalus hookeri*, *Magn. Reson. Chem.* 52 (2014) 734–738.
- [35] Y.M. Zhao, Y.P. Shi, Phytochemicals and biological activities of *Dipsacus* species, *Chem. Biodivers.* 8 (2011) 414–430.
- [36] X.Y. Tian, Y.H. Wang, H.Y. Liu, S.S. Yu, W.S. Fang, On the chemical constituents of *Dipsacus asper*, *Chem. Pharm. Bull.* 55 (2007) 1677–1681.



Antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities of triterpenes and flavonoids from the aerial parts of *Salvia barrelieri* Etl.

Meryem Lehibil^{a,b}, Abdulmagid Alabdul Magid^b, Ahmed Kabouche^a, Laurence Voutquenne-Nazabadioko^b, Amin Abedini^{b,c}, Hamid Morjani^d, Sophie C. Gangloff^c and Zahia Kabouche^a

^aLaboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Département de chimie, Université des frères Mentouri-Constantine, Constantine, Algeria; ^bICMR-UMR CNRS 7312, Groupe Isolement et Structure, Reims, France; ^cLaboratoire de microbiologie, UFR de pharmacie, EA «Biomatériaux et inflammation en site osseux», Reims, France; ^dFaculté de Pharmacie, MEDyC UMR CNRS 7369, Reims, France

ABSTRACT

From the aerial parts of *Salvia barrelieri* Etl. (Lamiaceae), 12 compounds including a new triterpene, 3 β -acetoxy-olean-18-ene-2 α -ol, were isolated. Their structures were established by the combination analyses of spectroscopy including 1D-, 2D-NMR and HRESIMS and in comparison with the reported data in the literature. The antibacterial activity of these compounds was evaluated by bioautography on *Staphylococcus aureus* followed by the determination of MIC values by serial dilution technique against five bacteria. Three compounds were active against *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC 15.1 to 125 μ g/mL). Two compounds showed moderate DPPH radical scavenging activity (IC₅₀ 79.1 and 21.2 μ g/mL). These compounds did not show significant tyrosinase inhibitory activities (IC₅₀ > 1.5 mg/mL). Their cytotoxic activity was evaluated against promyelocytic leukaemia (HL60), human erythromyeloblastoid leukaemia (K562) and fibrosarcoma (HT1080) cell lines and four compounds exhibited a moderate cytotoxic activity (IC₅₀ 28.75 to 85.0 μ M).

ARTICLE HISTORY

Received 22 June 2017
Accepted 22 August 2017

KEYWORDS

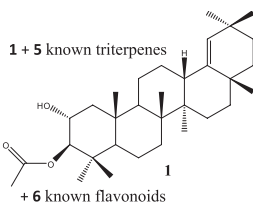
Salvia barrelieri; lamiaceae; triterpenoids; flavonoids; antibacterial activity; cytotoxic activity; radical scavenging activity



Salvia barrelieri Etl.
(Lamiaceae)


Exudate

80% EtOH
extract



- 3 compounds with antibacterial activity
- 2 compounds with DPPH radical scavenging activity
- 3 compounds with cytotoxic activity (HL60, K562 and HT1080 cells)

CONTACT Abdulmagid Alabdul Magid  abdulmagid.alabdulmagid@univ-reims.fr

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1378207>.

1. Introduction

The genus *Salvia* (Lamiaceae) comprises more than 900 species widely distributed, of which 23 species are distributed in Algeria (Kabouche and Kabouche 2008). Some *Salvia* species such as *Salvia officinalis* and *Salvia miltiorrhiza* have been applied as medicinal plants and used for the preparation of various remedies in various countries (Wang et al. 2007; Wu et al. 2012). *Salvia barrelieri* Etl. has been used as diuretic, emmenagogue and to treat gastric disorders and microbial infections in Algeria (Kolak et al. 2009). The anticholinesterase, neuroprotective, anticancer, antiviral, anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of *Salvia* plants were summarised in many review papers (Salah et al. 2006; Wu et al. 2012; Jassbi et al. 2015). Other reviews were interested on diterpenoids and triterpenoids isolated from *Salvia* (Kabouche et al. 2008; Jassbi et al. 2015; Gorai et al. 2016; Jash et al. 2016). *S. barrelieri* is a herbaceous perennial plant found in northern Africa, Algeria, Morocco, Tunisia and south-western Spain. It grows 1–2 m tall, with large, wavy, gray-green leaves. The inflorescence is a verticillaster and can grow nearly one meter tall, with flowers of light lavender or sky blue (Quezel and Santa 1963).

In continuation of our studies on the *Salvia* genus (Kabouche et al. 2003, 2007, 2008; Lakkhal et al. 2014), we have now investigated the aerial parts of *S. barrelieri*, from the root of which seven abietane diterpenoids have been previously isolated, and evaluated for their antioxidant activity (Kolak et al. 2009, 2007). Herein, we report the isolation and structural characterisation of one new triterpene together with 11 known compounds from the aerial parts of this plant. Taking into account the use of this plant to treat gastric disorders and microbial infections, the antibacterial activities of isolated compounds were evaluated. In addition, the antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of *Salvia* plants encouraged us to evaluate the DPPH radical scavenging rates and tyrosinase inhibitory activity. The cytotoxic activity of isolated compounds was evaluated against promyelocytic leukaemia (HL60), human erythromyeloblastoid leukaemia (K562) and fibrosarcoma (HT1080 cell lines).

2. Results and discussion

Chromatographic separations of exudate and the 80% EtOH extract of the aerial parts of *S. barrelieri* led to the isolation of 12 compounds (1–12). Six triterpenoids (1–6), including a previously undescribed 3 β -acetoxy-olean-18-ene-2 α -ol (1), were isolated from the exudate, whereas from the EtOH 80% extract, six flavonoid glycosides were isolated (7–12). The elucidation of their structures was performed by NMR analysis (¹H and ¹³C NMR, ¹H-¹H-COSY, HSQC and HMBC) and high-resolution mass spectrometry (HRESIMS).

The known compounds were identified as *epi*-germanidiol (2) (Ageta and Ageta 1984), olean-18-ene-1 β ,2 α ,3 β -triol (3) (Habibi et al. 2012), germanicol (4) (Mahato and Kundu 1994), micromeric acid (5) (Ikuta and Itokawa 1989), ursolic acid (6) (Jang et al. 2014), salvigenin (7) (Saeidnia et al. 2009), apigenin-7-*O*- β -D-glucuronopyranoside methyl ester (8) (Lee et al. 2002), apigenin-7-*O*- β -D-glucopyranoside (9) (Gohari et al. 2011), apigenin-7-*O*- β -D-glucuronopyranoside (10), apigenin (11) and cynaroside (12) (Han et al. 2007; Gohari et al. 2011) (Figure 1). Their spectroscopic data were in perfect agreement with those reported in the literature.

Compound 1 was obtained as white solid. Its molecular formula was determined as C₃₂H₅₂O₃ from the pseudo-molecular [M + Na]⁺ ion peak observed at *m/z* 507.3820 in the positive HRESIMS (Calcd C₃₂H₅₂O₃Na, 507.3814). The ¹H NMR spectrum of 1 showed typical

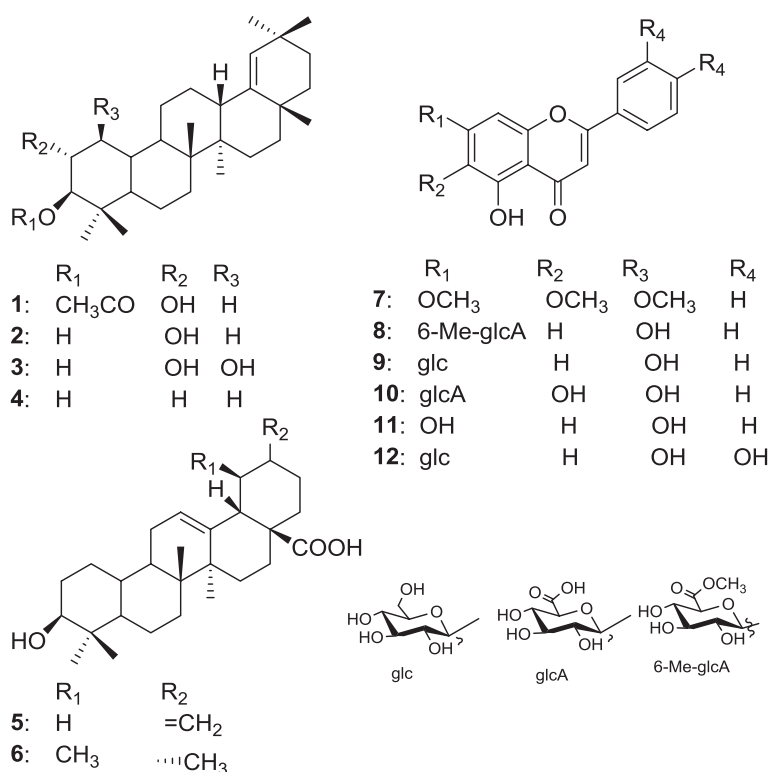


Figure 1. Chemical structures of compounds 1–12 isolated from *Salvia barrelieri*.

signals of eight tertiary methyl groups (each, 3H, s) at δ_{H} 0.76 (H-27), 0.88 (H-24), 0.90 (H-23), 0.96 (H-29), 0.97 (H-30), 0.98 (H-25), 1.04 (H-28) and 1.09 (H-26), one olefinic proton at δ_{H} 4.89 (*brs*, H-19), two oxygenated methines at δ_{H} 3.84 (td, $J = 10.5, 4.3$ Hz, H-2) and 4.52 (d, $J = 10.5$ Hz, H-3) and one acetoxy group at δ_{H} 2.16 (3H, s) (see experimental part). Analysis of the ^{13}C NMR and HSQC spectra of compound **1** revealed 32 signals, 30 of which were typical for a germanicol-type triterpene in addition to acetoxy group (δ_{C} 172.4 and 21.2). The ^{13}C NMR spectrum revealed two olefinic carbons of tri-substituted double bond (δ_{C} 129.9 and 142.5), two oxygenated methine carbons (δ_{C} 67.9 and 85.0) and eight quaternary methyl carbons (δ_{C} 14.6, 16.1, 17.5, 17.9, 25.2, 28.4, 29.2 and 31.3). All proton and carbon signals of **1** were assigned by analysis of 2D-NMR, including HSQC, HMBC and ^1H - ^1H -COSY. The HMBC correlations of H₃-23 and H₃-24 to C-3 (δ_{C} 85.0), C-4 (δ_{C} 39.3) and C-5 (δ_{C} 55.4) indicated the location of the oxygenated carbon and *gem*-dimethyl groups at C-3 and C-4 in A ring, respectively. The correlation observed in the ^1H - ^1H COSY spectrum between H-2 (δ_{H} 3.84)/H₂-1 [δ_{H} 0.92 (dd, $J = 11.4, 10.5$); 2.23 (dd, $J = 11.4, 4.3$)] and H-2/H-3 (δ_{H} 4.52) indicated that the second hydroxyl was located at C-2 (δ_{H} 67.9) which was confirmed by the long-range correlations in HMBC spectrum between H-2 (δ_{H} 3.84) and C-1 (δ_{C} 48.3) and C-3 (δ_{C} 85.0). Similarly, the HMBC correlations between H₃-25/C-1, C-10, C-9 and C-5, H₃-26/C-7, C-8, C-9 and C-14, H₃-27/C-8, C-13, C-14 and C-15, H₃-28/C-16, C-17, C-18, C-22, H₃-29 and H₃-30/C-19, C-20 and C-21 confirmed some aspects of the structure. The HMBC correlation between the carbon methyl signal of C-27 at δ_{C} 14.6 and the proton at δ_{H} 2.28 (*brd* ($J = 11.4$ Hz) attributed to the angular methine proton H-13 and the HMBC correlations between this proton H-13 and the

two ethylenic carbons at δ_c 129.9 (C-19) and δ_c 142.5 (C-18) suggested a Δ^{18} -unsaturated oleanene skeleton as in germanidiol or *epi*-germanidiol (**2**) (Ageta and Ageta 1984). The long-range 4J 1H - 1H COSY correlation observed between H-19 and H-13 in addition to the HMBC correlations observed between H-19/C-13, C-17, C-20, C-21, C-29 and C-30 confirmed the position of the double bond at C-18/C-19. The acetoxy group was assigned at C-3 as deduced from the HMBC correlation observed between H-3 and H₃-acetyl to the carboxyl carbon at δ_c 172.5. Thus, the aglycone of **1** was considered to be 3-acetoxy-olean-18-ene-2-ol. The 2- α and 3- β orientations of hydroxy and acetoxy groups were deduced from the value of the vicinal coupling constant ($J_{2-3} = 10.5$ Hz) and by comparison with spectroscopic data with those reported in the literature for compounds possessing 3 β -acetoxy and 2 α -hydroxyl substitution ($J_{H3\alpha/H2\beta} = 10.0$ Hz) (Bruno et al. 1987) and with *epi*-germanidiol (2 α ,3 β -di-OH, $J_{2-3} = 10.0$ Hz) and germanidiol (2 α ,3 α -di-OH, $J_{2-3} = 3.0$ Hz) (Ageta and Ageta 1984). The β orientation of H-13 was deduced by comparison of the vicinal coupling constant value and by comparison with spectroscopic data with those reported in the literature of germanidiol and *epi*-germanidiol (**2**) (Ageta and Ageta 1984). The large vicinal coupling constant value between H-12ax and H-13 ($J_{12ax-13} = 11.6$ Hz) suggested a quasi *trans*-diaxial relationship, like in 2 α ,3 β ,21 β ,23-tetrahydroxyolean-18-en-28-oic (Gossan et al. 2016). Consequently, the structure of **1** was elucidated as 3 β -acetoxy-olean-18-ene-2 α -ol, or 3-acetyl *epi*-germanidiol.

The antibacterial activity of the exudate and the 80% EtOH extract obtained from the aerial parts of *S. barrelieri* were initially tested for their antibacterial capacity using TLC bioautography method against *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, a Gram-positive cocci bacterium frequently found on the skin and in the respiratory tract that can be responsible for nosocomial infections. The results showed good activity for the 80% EtOH extract and a milder activity for the exudate by comparison with the reference gentamicin. Subsequently, the test was repeated for compounds **1–12** isolated from the 80% EtOH extract and the exudate and only compounds **2, 5, 6, 8, 10** and **12** were active. The minimum inhibitory concentration values (MIC) of these compounds were measured by a serial dilution technique using 96-well plates against three Gram-positive (*Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *S. aureus* CIP 53.154 and *Staphylococcus epidermidis*) and two Gram-negative (*Escherichia coli* CIP 54.127 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) bacteria (Table 1). The results showed a high inhibitory effect of compound **10** against *P. aeruginosa* (MIC 15.1 μ g/mL), *E. faecalis*, *S. epidermidis* and *E. coli* (MIC 31.2 μ g/mL). Compound **12** was also active against these four bacteria (MIC 31.2 μ g/mL). The triterpenes **1–6** were less active compared to flavonoids **10** and **12**. Only compound **6** showed a high antibacterial activity against *E. faecalis* (MIC 31.2 μ g/mL). Triterpene **2** showed also good antibacterial activity against the five tested bacteria (MIC 62.5–125 μ g/mL) (Table 1). A low antibacterial activity against the five tested bacteria (MIC 125–250 μ g/mL) was obtained with compounds **5** and **8**.

The DPPH radical scavenging activity of 80% EtOH extract and exudate obtained from the aerial parts of *S. barrelieri* was measured. In this assay, antioxidants were able to reduce the stable radical DPPH to the yellow coloured diphenyl-picrylhydrazine. Only the 80% EtOH showed a DPPH radical scavenging activity (IC_{50} 50.1 μ g/mL). Subsequently, the test was repeated for compounds **7–12** isolated from this extract. Compounds **10** and **12** exhibited moderate to good DPPH radical scavenging activity (IC_{50} 79.1 and 21.2 μ g/mL, respectively) compared with the reference ascorbic acid (IC_{50} 11.2 μ g/mL). The five other compounds showed low or no antiradical activity.

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) values in liquid medium and cytotoxic activity against HL60 and K562 and HT1080 cell lines of compounds isolated from *S. barrelieri*.

Compounds	Antibacterial activity					Cytotoxic activity		
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					IC ₅₀ (μM)		
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	HL60	K562	HT1080
1	>500	>500	>500	>500	>500	>100	>100	28.75 \pm 0.4
2	125	62.5	125	62.5	62.5	54 \pm 0.8	85 \pm 1.6	50 \pm 0.9
3	>500	>500	>500	>500	>500	>100	>100	>100
4	>500	>500	>500	>500	>500	42 \pm 0.6	82 \pm 1.4	37.5 \pm 0.6
5	125	250	250	125	250	52 \pm 0.9	82 \pm 1.0	41.5 \pm 0.7
6	31.2	125	500	250	125	>100	>100	>100
7	>500	>500	>500	>500	>500	>100	>100	>100
8	500	125	500	500	250	>100	>100	>100
9	>500	>500	>500	>500	>500	>100	>100	>100
10	31.2	125	31.2	31.2	15.1	>100	>100	>100
11	>500	>500	>500	>500	>500	>100	>100	>100
12	31.2	250	31.2	31.2	31.2	>100	>100	>100
Gentamicin ^a	16	4	4	0.25	8	–	–	–
Vancomycin ^a	>64	>64	16	4	>64	–	–	–
Camptothecin ^a	–	–	–	–	–	0.25 \pm 0.03	0.30 \pm 0.05	0.35 \pm 0.05

^aused as positive control.

The tyrosinase inhibitory activity of the 80% EtOH extract and the exudate obtained from the aerial parts of *S. barrelieri* was tested. The 80% EtOH extract showed a low tyrosinase inhibitory activity at the dose of 1.5 mg/mL (27% inhibition). The test was repeated for compounds **7–12** isolated from this extract and 50% inhibition was not achieved at the concentration of 1.5 mg/mL. Kojic acid was used as positive control (IC₅₀ 20 $\mu\text{g/mL}$).

The cytotoxic activity of compounds **1–12** was evaluated *in vitro* using tumour cell lines, promyelocytic leukaemia (HL60), human erythromyeloblastoid leukaemia (K562) and fibrosarcoma (HT1080). The resulting IC₅₀ values are listed in Table 1. Compounds **2**, **4** and **5** showed a moderate cytotoxic activity against HL60 (IC₅₀ 54.0, 42.0, 52.0 μM , respectively) and against K562 cell lines (IC₅₀ 85.0, 82.0, 82.0 μM , respectively). Compound **1** showed good cytotoxic activity against HT1080 (IC₅₀ 28.75 μM), whereas compounds **2**, **4** and **5** showed moderate cytotoxic activity against HT1080 (IC₅₀ 50, 37.5 and 41.5 μM , respectively).

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

HRESIMS experiments were performed using a Micromass Q-TOF micro-instrument (Manchester, UK). Optical rotations of pure compounds were measured in CHCl₃ using a Perkin-Elmer 341 Polarimeter. NMR spectra were recorded in CD₃OD or CDCl₃ on a Bruker Avance III 500 spectrometer (¹H at 500 MHz and ¹³C at 125 MHz). 2D-NMR experiments were performed using standard Bruker microprograms (TopSpin 3.2 software). Flash chromatography was carried out on a Grace Reveleris system equipped with dual UV and ELSD detection using Grace® cartridges (Silica gel or RP-C₁₈). HPLC separations were performed on a Dionex apparatus equipped with an ASI-100 autosampler, an Ultimate 3000 pump, a STH 585 column oven, a diode array detector UVD 340S and a Chromeleon software. A prepacked RP-C₁₈ column (Phenomenex 250 \times 15 mm, Luna 5 μ) was used for semi-preparative HPLC. The

eluting mobile phase consisted of H₂O with TFA (0.0025%) and CH₃CN with a flow rate of 5 mL/min and the chromatogram was monitored at 205 and 210 nm. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out using silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated aluminium plates (0.2 mm, Merck). After developing with solvent systems, spots were visualised under UV light (254 and 366 nm) and sprayed with 50% H₂SO₄ followed by heating. An Armen instrument equipped with an AP 250/500 pump, ACC 250/500 sampler and a Merck UV-detector K-2501 was used for preparative HPLC. A Lichrospher RP18 prepacked column (Merck 250 × 50 mm, 12 μm) was used with binary gradient eluent (H₂O and CH₃CN) and a flow rate of 50 mL/min; the chromatogram was monitored at λ 250 nm.

3.2. Plant material

The aerial parts of *S. barrelieri* Etl. (Lamiaceae) were collected from Constantine (North-Eastern of Algeria), in April 2014 and it was authenticated by Mr. Kamel Kabouche. A voucher specimen (LOST.Sb.04.14) was deposited in the department of chemistry of the university of Constantine, Algeria.

3.3. Extraction and isolation

The fresh aerial parts of *S. barrelieri* (7 kg) were first immersed in CHCl₃ for 20 s. After filtration and evaporation of the solvent under reduced pressure, 48 g of exudate were obtained. Then, the powdered air-dried aerial parts were macerated in EtOH–H₂O (8:2, 7 L); three time (each 24 h) at room temperature. The combined extracts were concentrated under reduced pressure and the residue was suspended in H₂O (1 L) to be partitioned successively with CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH (3 × 300 mL each) to yield, respectively, 1.8, 2.7 and 11 g of each fraction.

A portion of the exudate (10 g) was fractionated by silica gel-*vacuum* liquid chromatography (VLC) (235 g, 10 cm × 6 cm) using a step-gradient solvent system from 100% *n*-hexane to 100% EtOAc with a 10% increment to obtain 21 fractions, each 1.5 L [E1–E21]. Fraction E5 (129 mg) was subjected to flash chromatography on RP18 using a gradient 90–100% of MeOH in water in 30 min, affording compound **4** (32 mg). Fraction E11 (380 mg) was further purified by flash chromatography on RP18, eluted with MeOH from 80 to 100% in water to yield compound **1** (67 mg). Fraction E14 (1.28 g) was also subjected to flash chromatography on RP18 eluted with the same system of the previous fraction (E11) to give compounds **2** (23.3 mg), **5** (10.5 mg) and **6** (8 mg). Compound **3** (1.5 mg) was obtained from the flash chromatography over silica gel of the fraction E16 (1.47 g), eluted by gradient system toluene–acetone (100:0–80:20).

A part of the *n*-BuOH fraction (2 g) was submitted to a VLC over RP18 eluted with MeOH:H₂O solvent system (from 0% MeOH to 100% MeOH) to give six fractions. The 60% MeOH fraction (310 mg) was subjected to flash chromatography over silica gel, eluted by a gradient system of CHCl₃–MeOH (100:0–90:10), in 25 min, affording compounds **7** (4.6 mg), **8** (6.8 mg), **9** (18.5 mg) and **11** (6.4 mg). The 20% MeOH fraction (200 mg) was subjected to preparative HPLC, eluted by a gradient system of CH₃CN:H₂O (from 10% to 40% CH₃CN), in 30 min to give compound **10** (*t*_R 15.5 min, 13.8 mg). The first sub-fraction (98.7 mg) was further purified by semi-prep HPLC (22% CH₃CN) to yield compound **12** (*t*_R 19.0 min, 2 mg).

3.4. Antibacterial assay

An immersion bioautography method was adopted to identify the most active compounds (Benmerache et al. 2016). Gentamicin was used as a positive control. A serial dilution technique using 96-well microliter plates was used to determine the MIC values of the active compounds revealed by bioautography (Benmerache et al. 2016). MIC values were determined as the lowest concentrations of samples having an inhibitory effect on bacteria growth. This test was performed in duplicates. Gentamicin and vancomycin were used as positive controls.

3.5. DPPH radical scavenging activity

The scavenging activity of isolated compounds against DPPH was investigated by spectrophotometric methodology (Benmerache et al. 2017). Ascorbic acid was used as positive control.

3.6. Tyrosinase enzyme assay

Tyrosinase activity inhibition was determined spectrophotometrically (Tadrent et al. 2016). Kojic acid was used as positive control agent.

3.7. Cytotoxicity assay

Compounds **1–12** were tested for their cytotoxicity against promyelocytic leukaemia (HL60), human erythromyeloblastoid leukaemia (K562) and fibrosarcoma HT1080 cells by mean of the MTT method (Gossan et al. 2016).

3.8. 3 β -acetoxy-olean-18-ene-2 α -ol (compound 1)

$[\alpha]_D^{20}$ – 3 (c 0.1, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ_H 0.92 (dd, J = 11.4, 10.5 Hz, H-1a), 2.23 (dd, J = 11.4, 4.3 Hz) (H-1b), 3.84 (td, J = 10.5, 4.3 Hz, H-2), 4.52 (d, J = 10.5 Hz, H-3), 0.94 (m, H-5), 1.43, 1.53 (each m, H₂-6), 1.37, 1.52 (each m, H₂-7), 1.36 (m, H-9), 1.37, 1.60 (each m, H₂-11), 1.20, 1.51 (each m, H₂-12), 2.28 (brd, J = 11.6 Hz, H-13), 1.21 (m, H-15a), 1.82 (td, J = 13.6, 4.8 Hz, H-15b), 1.42, 1.46 (each m, H₂-16), 4.89 (brs, H-19), 1.43, 1.47 (each m, H₂-21), 1.34, 1.45 (each m, H₂-22), 0.90 (s, H₃-23), 0.88 (s, H₃-24), 0.98 (s, H₃-25), 1.09 (s, H₃-26), 0.76 (s, H₃-27), 1.04 (s, H₃-28), 0.96 (s, H₃-29), 0.97 (s, H₃-30), 2.16 (s, H₃-acetyl); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_C 48.3 (C-1), 67.9 (C-2), 85.0 (C-3), 39.3 (C-4), 55.5 (C-5), 18.2 (C-6), 34.4 (C-7), 40.8 (C-8), 51.1 (C-9), 38.4 (C-10), 21.3 (C-11), 26.1 (C-12), 38.3 (C-13), 43.4 (C-14), 27.5 (C-15), 37.7 (C-16), 34.3 (C-17), 142.5 (C-18), 129.9 (C-19), 32.4 (C-20), 33.3 (C-21), 37.4 (C-22), 28.4 (C-23), 17.5 (C-24), 17.9 (C-25), 16.1 (C-26), 14.6 (C-27), 25.2 (C-28), 31.3 (C-29), 29.2 (C-30), 172.5 (acetyl-C-1), 21.2 (acetyl-C-2); HRESIMS m/z : 507.3820 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₂H₅₂O₃Na, 507.3814).

4. Conclusions

The present paper reported the isolation and structural characterisation of a new triterpene 3 β -acetoxy-olean-18-ene-2 α -ol, along with 11 known compounds from the aerial parts of

S. barrelieri. The antibacterial potential evaluated initially using TLC bioautography method followed by a serial dilution technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) showed moderate activity for compounds **2**, **10** and **12**. The DPPH scavenging and tyrosinase inhibitory effects of the exudate, the 80% EtOH extract and flavonoids (**7–12**) isolated from the 80% EtOH extract were evaluated. Only the 80% EtOH extract showed moderate antioxidant activity and low tyrosinase inhibitory activity. Flavonoids **10** and **12** exhibited moderate to good DPPH radical scavenging activity. Flavonoids **7–12** did not show significant tyrosinase inhibitory activity. The cytotoxic activity of isolated compounds evaluated *in vitro* using tumour cell lines, the promyelocytic leukaemia (HL60), the human erythromyeloblastoid leukaemia (K562) and fibrosarcoma (HT1080), showed that compounds **1**, **2**, **4** and **5** had a moderate cytotoxic activity. The overall results may support the use of this plant in traditional medicine for the treatment of gastric disorders and microbial infections.

Supplementary material

Supplementary material relating to the NMR and HR-ESI-MS spectra of new compound **1** and NMR data of **2–12**.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the MESRS Algeria for the PNE grant to Ms. Meryem Lehbili, to CNRS, Conseil Régional de Champagne Ardenne (CRCA), Conseil Général de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR) in France and to the PIANET CPER project for financial support.

References

- Ageta H, Ageta T. 1984. Erecaceous constituents: seventeen triterpenoids isolated from the buds of *Rhododendro macrocephalum*. Chem Pharm Bull. 32:369–372.
- Benmerache A, Alabdul Magid A, Berrehel D, Kabouche K, Voutquenne-Nazabadioko L, Messaili S, Abedini A, Harakat D, Kabouche Z. 2016. Chemical composition, antibacterial, antioxidant and antityrosinase activities of glycosides from aerial parts of *Eryngium tricuspdatum* L. Phytochem Lett. 18:23–28.
- Benmerache A, Benteldjoune M, Alabdul Magid A, Abedini A, Berrehel D, Kabouche A, Gangloff SC, Voutquenne-Nazabadioko L, Kabouche Z. 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of aerial parts of *Tamarix balansae*. J Gay Nat Prod Res. 10:1–8.
- Bruno M, Savona G, Hueso-Rodriguez JA, Pascual C, Rodriguez B. 1987. Ursane and oleanane triterpenoids from *Salvia argentea*. Phytochemistry. 26:497–501.
- Gohari AR, Ebrahimi H, Saeidnia S, Foruzan M, Ebrahimi P, Ajani Y. 2011. Flavones and flavone glycosides from *Salvia macrosiphon* Boiss. Iran J Pharm Res. 10:247–251.
- Gorai D, Jash SK, Roy R. 2016. Ursane's of the genus *Salvia*. Indo Am J Pharm Res. 6:4242–4253.
- Gossan DPA, Alabdul Magid A, Yao-Kouassi PA, Josse J, Gangloff SC, Morjani H, Voutquenne-Nazabadioko L. 2016. Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from the roots of *Combretum racemosum*. Fitoterapia. 110:89–95.
- Habibi Z, Cheraghi Z, Ghasemi S, Yousefi S. 2012. A new highly hydroxylated triterpene from *Salvia atropatana* Bunge. Nat Prod Res. 26:1910–1913.

- Han XH, Hong SS, Hwang JS, Lee MK, Hwang BY, Ro JS. 2007. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. Arch Pharm Res. 30:13–17.
- Ikuta A, Itokawa H. 1989. 30-Noroleanane saponins from callus tissues of *Akebia quinata*. Phytochemistry. 28:2663–2665.
- Jang SE, Jeong JJ, Hyam SR, Han MJ, Kim DH. 2014. Ursolic acid isolated from the seed of *Cornus officinalis* ameliorates colitis in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 on macrophages. J Agric Food Chem. 62:9711–9721.
- Jash SK, Gorai D, Roy R. 2016. *Salvia* genus and triterpenoids IJPSR. 7:4710–4732.
- Jassbi AR, Zare S, Firuzi O, Xiao J. 2015. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. Phytochem Rev. 15:829–867.
- Kabouche A, Kabouche Z. 2008. Bioactive diterpenoids of *Salvia* Species. Stud Nat Prod Chem. 35:753–833.
- Kabouche A, Boutaghane N, Kabouche Z, Seguin E, Tillequin F, Benlabed K. 2003. Components and antibacterial activity of the roots of *Salvia jaminiana*. Fitoterapia. 76:450–452.
- Kabouche A, Kabouche Z, Öztürk M, Kolak U, Topçu G. 2007. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. Food Chem. 102:1281–1287.
- Kabouche A, Kabouche Z, Touzani R, Bruneau C. 2008. Diterpenes and sterols from the roots of *Salvia verbenaca* subsp. *clandestina*. Chem Nat Compds. 44:824–825.
- Kolak U, Kabouche A, Öztürk M, Kabouche Z, Topçu G, Ulubelen A. 2009. Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. Phytochem Anal. 20:320–327.
- Lakhal H, Kabouche A, Alabdul Magid A, Voutquenne-Nazabadioko L, Harakat D, Kabouche Z. 2014. Triterpenoids from *Salvia argentea* var. *aurasiaca* (Pomel) Batt. & Trab. and their chemotaxonomic significance. Phytochemistry. 102:145–151.
- Lee MH, Son YK, Han YN. 2002. Tissue factor inhibitory flavonoids from the fruits of *Chaenomeles sinensis*. Arch Pharm Res. 25:842–850.
- Mahato SB, Kundu AP. 1994. 13C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. Phytochemistry. 37:1517–1575.
- Quezel, P, Santa, S. 1963. New flora of Algeria and the Southern Desert Regions. Vol, 1–2. Paris : CNRS.
- Saeidnia S, Moradi-Afrapoli F, Gohari AR, Malmir R. 2009. Cytotoxic flavonoid from *Achillea talagonica* Bioss. J Med Plants. 8:52–56.
- Salah KB, Mahjoub MA, Ammar S, Michel L, Millet-Clerc J, Chaumont JP, Mighri Z, Aouni M. 2006. Antimicrobial and antioxidant activities of the methanolic extracts of three *Salvia* species from Tunisia. Nat Prod Res. 20:1110–1120.
- Tadrent W, Alabdul Magid A, Kabouche A, Harakat D, Voutquenne-Nazabadioko L, Kabouche Z. 2016. A new sulfonylated flavonoid and other bioactive compounds isolated from the aerial parts of *Cotula anthemoides* L. Nat Prod Res. 28:1–9.
- Wang X, Morris-Natschke SL, Lee, KH. 2007. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of tanshen. Med Res Rev. 27:133–148.
- Wu YB, Ni ZY, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, Cong B. 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. Chem Rev. 112:5967–6026.

ملخص

أدت الدراسة الفيتوكيميائية لثلاثة نباتات جزائرية: *Scabiosa*، *Calendula stellata* Cav. إلى فصل وتحديد 55 مركبا منها 16 مركبات تم التعرف عليها لأول مرة في المملكة النباتية. حيث تمت تنقيتها باستعمال تقنيات كروماتوغرافية مختلفة، وكذلك عن طريق كروماتوغرافيا الطرد المركزي (CPC). تنتمي هذه المركبات المعزولة إلى خمس عائلات: 27. saponosides و 7 triterpens و 11 flavonoïds و 7 iridoïds و 2 مشتقات حمض chlorogenic. تم تحديد هياكل هذه المركبات بواسطة التحليل الطيفي 2D-1D NMR وكذلك مطياف الكتلة (ESIMS و HRESIMS)، والبيانات الطيفية في الأشعة تحت الحمراء والأشعة فوق البنفسجية، بالإضافة إلى المقارنة مع المراجع المتوفرة.

تمت دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات والمركبات المعزولة النقية. من بين المركبات التي تم اختبارها، يظهر 2 iridoïds و 2 flavonoïds فعالية جيدة مضادة للأكسدة (IC_{50} بين 7 و 16 μ M). في حين تبين ان أربعة عشر مركبًا أظهر نشاطًا مهمًا مضادًا للبكتيريا، مع قيم IC_{50} بين 15 و 125 μ g/ml. أظهرت المركبات الجديدة نشاط سمية خلوية من منخفضة إلى متوسطة ضد جميع الخلايا التي تم اختبارها، باستثناء Scabiostellatoside F الذي تم الحصول عليه من *Scabiosa stellata* والذي له تأثير جيد ضد HT1080 ($IC_{50} = 12 \mu$ M).

الكلمات المفتاحية: الفعالية البيولوجية، مضادة للأكسدة، مضادة للبكتيريا، سمية خلوية،

Calendula stellata Cav., *Scabiosa stellata* L., *Salvia barrelieri* Etl., saponoside, iridoïdes, triterpenes, flavonoïdes.

Résumé

L'étude phytochimique des trois espèces : *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata* et *Salvia barrelieri* a permis d'isoler, à l'aide de différentes méthodes chromatographiques de séparation et de purification, sur support solide ou liquide, **55** composés dont **16** nouveaux répartis en 27 saponosides, 7 triterpénoïdes, 7 iridoïdes, 11 flavonoïdes et 2 dérivés de l'acide chlorogénique. L'activité anti-radicalaire des extraits et de certains composés isolés purs a montré que deux mono-iridoïdes et deux flavonoïdes possèdent une activité importante (CI_{50} : 7-16 μ M). Quatorze composés ont manifesté une bonne activité antibactérienne (CMI : 15-125 μ g/mL). Parmi les produits purs testés, seul le Scabiostellatoside F, isolé de *Scabiosa stellata*, a présenté un bon effet antiprolifératif contre HT1080 (CI_{50} = 12 μ M).

Mots clés : *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata*, *Salvia barrelieri*, saponosides, iridoïdes, triterpénoïdes, flavonoïdes, activité antioxydante, activité antimicrobienne, cytotoxicité.

Abstract

The phytochemical study of three species: *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata* and *Salvia barrelieri* led to the isolation of **55** compounds, from which **16** were new, by the use of different chromatographic methods of separation and purification on solid or liquid support. The isolated compounds were distributed through 27 saponosids, 7 triterpenes, 11 flavonoids, 7 iridoids and 2 chlorogenic acid derivatives. Two mono-iridoids and two flavonoids showed an important antiradical activity (IC_{50} : 7-16 μ M). Fourteen compounds exhibited a good antibacterial activity (MIC: 15- 125 μ g/mL). The new compounds showed a low to moderate cytotoxic activity against all tested cell lines, except for the monodesmoside, obtained from *Scabiosa stellata* (Scabiostellatoside F) which exhibited a good antiproliferative effect against HT1080 (IC_{50} = 12 μ M).

Keywords : *Calendula stellata*, *Scabiosa stellata*, *Salvia barrelieri*, saponosids, iridoids, triterpenes, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxicity.