

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE-1

FACULTE DES SCIENCES EXACTES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



N° d'ordre :

N° de série :

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de
Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)

Spécialité : Chimie organique

Option : Phytochimie

Thème

**Etude phytochimique de deux espèces *Crataegus azarolus* L. (Rosaceae) et
Dioscorea communis L. (Dioscoreaceae)**

Par : **Amina BOUDJADA**

Devant le jury :

Pr. A. DEBACHE	Université Frères Mentouri Constantine-1	Président
Pr. S. RHOUATI	Université Frères Mentouri Constantine-1	Rapporteur
Dr. A.TOUIL	Université Frères Mentouri Constantine-1	Examineur
Pr. S. AKKAL	Université Frères Mentouri Constantine-1	Examineur
Pr. A. ZELAGUI	Université Larbi Ben ' Mhidi (OEB)	Examineur

Soutenu le : 16-09-2018

Dédicaces

Cette thèse est dédiée . . .

A la mémoire de mon grand-père (Khelfi Abd el kader)

A ma mère, ma tante nazihia et ma grand-mère, aux êtres qui me sont les plus chers dans ce monde, qui ont fait des sacrifices immenses pour moi et ma sœur sans qu'ils attendent en retours.

A mon mari Salah, qui m'a toujours soutenu et encouragé, je te remercie pour ta grande patience.

A ma sœur wissem que j'aime énormément.

A mes deux anges Aness et Assil, vous êtes toute ma vie.

A toute ma famille.

A tous mes amis et collègue.

A toute personne qui me connais.



Amina

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

*Je tiens à remercier mon directeur de thèse Monsieur le Professeur **Salah RHOUATI** pour son accueil au sein de son laboratoire et d'avoir dirigé ce travail. Je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer toutes mes reconnaissances à Monsieur **Ahmed TOUIL**, Docteur à l'université des frères Mentouri, Constantine-1, pour son aide précieux tous au long de la préparation de ce travail, pour l'interprétation de tous les résultats obtenus, pour sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et de m'avoir fait confiance, qu'il trouve ici toute ma gratitude et ma sympathie.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **Abd El Majid DEBACHE**, Professeur à l'Université des frères Mentouri, Constantine-1 d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération à Monsieur **Salah AKKAL**, Professeur à l'université des frères Mentouri, Constantine-1 et Monsieur **Amar ZELAGUI**, Professeur à l'université d'Oum El bouagui d'avoir accepté de faire partie du jury.*

*Je tiens à marquer un grand merci à Monsieur **Bendif HAMDI**, Docteur à l'université de Mohamed Boudiaf, Msila, pour son aide précieux sur les diverses activités.*

*Je voudrais sincèrement remercier Monsieur **Chawki BENSSOUICI**, Docteur et chef du laboratoire de biochimie dans le centre de recherche de biotechnologie de Constantine (CRBT), qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui a mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de mes activités biologiques qu'il trouve ici mon respect et reconnaissance.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur **Redouane LEMOUI**, Maître-assistant à l'Ecole Normale Supérieure de Constantine, pour son soutien et sa grande générosité. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Une pensée particulière pour M. **Ali BOUDJADA**, Professeur à l'université des Frères Mentouri, Constantine-1, tu été toujours à mes côté et vous m'avais toujours apporté le soutien. Pour cela, je vous remercie chaleureusement.*

*Un merci collectif à tous mes collègues et amies pour leur soutien et plus précisément **Wafia HAMRI**, **Djamila MAANANI**, **Amina BOUAROURA** et **Amina DAIKH** pour leurs amitiés.*

Mes remerciements les plus forts reviennent également à ma famille qui m'a soutenu et qui a toujours été présente à chaque fois que cela était nécessaire.

*Je voudrais enfin exprimer ma sincère reconnaissance envers le groupe de « **Scientific-Translation** » pour leurs aides précieuses et sympathies.*

Merci 

Abréviations et symboles :

Solvants et réactifs

AcOEt	Acétate d'éthyle
AlCl ₃	Chlorure d'aluminium
BuOH	Butanol
CD ₃ OD	Methanol deutéré
CHCl ₃	Chloroforme
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
DMSO -d ₆	Dimethylsulfoxyde deutéré
H ₃ BO ₃	Acide borique
HCl	Acide chlorhydrique
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
MeOH	Methanol
NaOAc	Acetate de sodium
NaOH	Hydroxide de sodium

Techniques chromatographiques

CCM	Chromatographie sur couche mince
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
CPP	Chromatographie sur plaque préparative
VLC	Chromatographie liquide sous vide
R _f	Facteur de rétention

Détermination structurale

DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfert
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet de doublets
Glc	Glucose
Gal	Galactose
Rha	Rhamnose
GC/SM	Analyse par Chromatographie gazeuse couplé à la Spectrométrie de Masse
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Connectivity
NOESY	Nuclear Overhauser Exchange spectroscopy
<i>J</i> (Hz)	Constante de couplage exprimée en Hertz
<i>m</i>	Multiplet
ppm	partie par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<i>s</i>	Singulet
δ _C	Déplacement chimique du carbone en ppm
δ _H	Déplacement chimique du proton en ppm
IE	ElectroSpray Ionization (ionisation par électronubélisation)
HR	Haute résolution
<i>m/z</i>	Masse/charge

SM	Spectrométrie de Masse
UV	Ultra-Violet
λ_{\max}	longueur d'onde maximale

Activités biologiques

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity
DPPH	2,2-DiPhenyl-1-Picryl-Hydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Antioxydant Power.
CI ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
A _{0,5}	Concentration à 0,5 d'absorbance
AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyrylcholinesterase
PAF	Platelet Activating Factor
t-PA	tissue-type plasminogen activator

Table des matières

Introduction générale.....	1
Références bibliographiques.....	3

Partie A : Etude phytochimique

Chapitre 1 : Aperçue bibliographique

I.1. La famille des Rosacées.....	4
I.1.1. Présentation botanique et géographique.....	4
I.1.2. Description.....	4
I.2. Le genre <i>Crataegus</i>	4
I.2.1. Présentation.....	4
I.2.2. Répartition géographique.....	5
I.2.3. Etudes phytochimiques antérieurs sur les espèces du genre <i>Crataegus</i>	5
I.2.4. Les propriétés pharmacologiques des espèces du genre <i>Crataegus</i>	9
I.2.5. Utilisations traditionnels.....	10
I.3. Présentation de l'espèce <i>Crataegus azarolus</i> (L.).....	11
I.3.1. Définition.....	11
I.3.2. Classification botanique.....	11
I.3.3. Origine et répartition géographique.....	11
I.3.4. Description.....	12
I.3.5. Composition chimique.....	13
II.1. La famille des Dioscoreacés.....	15
II.1.1. Présentation botanique et géographique.....	15
II.2.2. Description.....	15
II.2. Le genre <i>Dioscorea</i>	15
II.2.1. Présentation.....	15
II.2.2. Répartition géographique.....	16
II.2.3. Etudes phytochimiques antérieurs sur les espèces du genre <i>Dioscorea</i>	16
II.2.4. Les propriétés pharmacologiques des espèces du genre <i>Dioscorea</i>	23
II.3. Présentation de l'espèce <i>Dioscorea communis</i> (L.) Caddick & Wilkin.....	24
II.3.1. Définition.....	24
II.3.2. Classification botanique.....	24
II.3.3. Origine et répartition géographique.....	25

II.3.4. Description.....	25
II.3.5. Utilisations traditionnelles et médicales.....	26
II.3.6. Travaux phytochimiques antérieurs.....	26
II.3.7. Données pharmacologiques.....	31
II.3.8. Données toxicologiques.....	31
Références bibliographiques.....	32

Chapitre 2 : Les flavonoïdes et les phénanthrènes

I. Les flavonoides.....	42
I.1. Définition.....	42
I.2. Classification des flavonoides.....	42
I.2.1. Flavones et flavonols.....	42
I.2.2. Flavanones et dihydroflavonols.....	42
I.2.3. Isoflavones.....	43
I.2.4. Chalcones et aurones	43
I.2.5. Anthocyanines et anthocyanidines.....	44
I.3. Distribution et localisation des flavonoïdes dans les plantes et le règne végétal.....	45
I.4. Le rôle des flavonoïdes dans les plantes.....	46
I.5. Propriétés thérapeutiques des flavonoides.....	46
I.6. Etude chimique des flavonoides.....	48
I.6.1. Extracation.....	48
I.6.2. Séparation et purification.....	48
I.7. Les techniques d'identification structurale.....	49
I.7.1. Généralité.....	49
I.7.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique.....	49
I.7.3. La fluorescence sous lumière UV.....	49
I.7.4. La résonance magnétique nucléaire (RMN).....	50
I.7.5. La spectroscopie UV –Vis.....	50
I.7.6. Spectres UV-Vis avec addition de réactifs (série spectrale UV-Vis).....	52
I.7.7. L'hydrolyse acide des hétérosides.....	54
I.7.8. La spectrométrie de masse.....	55
II. Les phénanthrènes.....	55
II.1. Définition.....	55

II.2. Classification des phénanthrènes.....	56
II.3. Occurrence des phénanthrènes.....	57
III.4. Activités biologiques des différents phénanthrènes.....	58
II.5. Etude chimique et méthode d'analyse des phénanthrènes.....	60
Références bibliographiques.....	61

Chapitre 3 : Description des travaux

I. Etude chimique de l'espèce <i>Crataegus azarolus</i> (L.).....	65
I.1. Récolte du matériel végétal.....	65
I.2. Macération et extraction.....	65
I.3. Séparation chromatographique.....	66
I.3.1. Séparation et purification des composés de l'extrait chloroformique.....	66
I.3.2. Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle.....	68
I.3.3. Séparation et purification des composés de l'extrait butanolique.....	70
II. Etude chimique de l'espèce <i>Dioscorea communis</i> (L.).....	73
II.1. Récolte du matériel végétal.....	73
II.2. Macération et extraction.....	73
II. 3. Séparation et purification des composés de l'extrait éther diéthylique.....	75

Chapitre 4 : Résultats et discussion

I. Identification des produits isolés de <i>Crataegus azarolus</i>	81
I.1. Produits identifiés dans l'extrait CHCl ₃ de <i>C. azarolus</i>	81
I.2. Identification des produits isolés de l'extrait AcOEt de <i>C. azarolus</i>	84
I.2.1. Elucidation structurale du produit 4-61.....	84
I.2.2. Elucidation structurale du produit 4-62.....	89
I.3. Identification des produits isolés de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>C. azarolus</i>	92
I.3.1. Elucidation structurale du produit 1.....	92
I.3.2. Elucidation structurale du produit 2.....	96
I.3.3. Elucidation structurale du composé 3.....	100
II. Identification des produits isolés de <i>Dioscorea communis</i>	104
II.1. Elucidation structurale du produit 8A.....	104
II.2. Elucidation structurale du produit 24B3.....	108
II.3. Elucidation structurale du produit 24C.....	111
II.4. Elucidation structurale du produit 51b.....	114

II.6. Elucidation structurale du produit 74	118
II.7. Elucidation structurale du produit 24d.....	123
II.8. Elucidation structurale du composé 51d.....	126

Partie B : Etude biologique

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

I. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	129
I.1. Dosage des composés phénoliques totaux (TCP).....	129
I.1.1.Principe.....	129
I.1.2. Protocole.....	129
I.1.3.Expression des résultats.....	130
I.1.4.Courbe d'étalonnage.....	130
I.2.Dosage des flavonoïdes (TCF).....	131
I.2.1.Principe.....	131
I.2.2.Protocole.....	131
I.2.3. Courbe d'étalonnage.....	132
II. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	132
II.1.Test antiradicalaire au DPPH.....	132
II.2. Test du piégeage de l'ABTS.....	133
II.3. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	134
II.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	135
II.5. Test de blanchissement du β -carotène.....	135
III. Activité anti-cholonestérase.....	136
IV. Analyses statistiques.....	136
Références bibliographiques.....	137

Chapitre 2 : Résultats et discussion

I. Dosage des polyphénols totaux (TPC) de <i>C.azarolus</i>	138
II. Dosage des flavonoides (TFC) de <i>C.azarolus</i>	138
III. Activité antioxydante.....	138
III.1. Extraits et composés de <i>C.azarolus</i>	139

III.1.1. Test DPPH.....	139
III.1.2. Test ABTS.....	140
III.1.3. Test FRAP.....	141
III.1.4. Test CUPRAC	142
III.1.5. Activité de blanchissement du β -carotène.....	143
III.2. Extraits et composés de <i>D.communis</i>	145
III.2.1. Test DPPH.....	145
III.2.2. Test ABTS.....	146
III.2.3. Test FRAP.....	147
III.2.4. Test CUPRAC.....	148
III.2.5. Test de blanchissement du β -carotène.....	149
IV. Activité anti-cholinestérase des extraits et produits de <i>D.communis</i>	150
IV.1. Acétylcholinestérase.....	150
IV.2. Butyrylcholinestérase.....	151
Références bibliographiques	153
Conclusion générale.....	154

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les composés isolés des espèces du genre <i>Crataegus</i>	6
Tableau 2 : Activité pharmacologique de quelques espèces du genre <i>Crataegus</i>	10
Tableau 3 : Teneur en éléments minéraux des fruits de <i>Crataegus</i>	14
Tableau 4 : Les phénantrènes et les dihydrophénantrènes.....	27
Tableau 5 : Sources alimentaires des flavonoides.....	46
Tableau 6 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques.....	50
Tableau 7 : Maximum d'absorption des bandes I et II dans le MeOH de quelques types de flavonoïde.....	51
Tableau 8 : Résultats des séries spectrales UV après addition de réactifs.....	54
Tableau 9 : Occurrence des phénanthrènes.....	57
Tableau 10 : Résultats de séparation par CC de l'extrait CHCl ₃ de <i>C.azarolus</i>	67
Tableau 11 : Résultats de séparation par CC de l'extrait AcOEt de <i>C.azarolus</i>	68
Tableau 12 : Résultats de séparation de la fraction E	69
Tableau 13 : Résultats de séparation de la fraction G	69
Tableau 14 : Résultats de séparation par CC de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>C.azarolus</i>	71
Tableau 15 : Résultats de séparation de la fraction H	72
Tableau 16 : Résultats de séparation par CC de l'extrait Et ₂ O des rhizomes de <i>D.communis</i>	76
Tableau 17 : Résultats de séparation de la fraction 24	77
Tableau 18 : Résultats de séparation de la sous fraction F 24b	77
Tableau 19 : Résultats de séparation de la fraction F 51	78
Tableau 20 : Résultats de séparation de la fraction F 54	79
Tableau 21 : Données spectroscopiques UV-Visible du produit 4-61	84
Tableau 22 : Données RMN-1H (250 MHz, CD ₃ OD) du produit 4-61	84
Tableau 23 : Données spectroscopiques UV-Visible du produit 4-62	89
Tableau 24 : Données RMN-1H (250 MHz, CD ₃ OD) du produit 4-62	89
Tableau 25 : Données spectroscopiques UV-Visible du produit 1	92
Tableau 26 : Données RMN-1H (250 MHz, CD ₃ OD) du produit 1	92
Tableau 27 : Données RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) du produit 2	96
Tableau 28 : Données RMN- ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) du produit 2	96
Tableau 29 : Données spectroscopiques UV-visible du produit 3	100

Tableau 30 : Données RMN- ¹ H (250 MHz, CD ₃ OD) du produit 3	100
Tableau 31 : Données RMN- ¹³ C (75.5 MHz, CD ₃ OD) du produit 3	100
Tableau 32 : Données RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du produit 8A	104
Tableau 33 : Données RMN- ¹³ C (75.5 MHz, CDCl ₃) du produit 8A	104
Tableau 34 : Données RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du produit 24B3	108
Tableau 35 : Données RMN- ¹³ C (75.5 MHz, CDCl ₃) du produit 24B3	108
Tableau 36 : Données RMN-1H (300 MHz, CDCl ₃) du composé 24C	111
Tableau 37 : Données RMN-13C (75.5MHz, CDCl ₃) du composé 24C	111
Tableau 38 : Données RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) du produit 51b	114
Tableau 39 : Données RMN- ¹³ C (75.5MHz, CDCl ₃) du produit 51b	114
Tableau 40 : Données de la RMN-1D et 2D (CD ₃ OD, 600 MHz) du produit 74	118
Tableau 41 : Données RMN-1H (300 MHz, CDCl ₃) du composé 24d	123
Tableau 42 : Données RMN-13C (75.5MHz, CDCl ₃) du composé 24d	123
Tableau 43 : Données RMN-1H (300 MHz, CDCl ₃) du composé 51d	126
Tableau 44 : Polyphénols totaux de <i>C. azarolus</i>	138
Tableau 45 : Flavonoïdes totaux de <i>C. azarolus</i>	138
Tableau 46 : Inhibition du radical DPPH par les extraits et composés de <i>C. azarolus</i>	139
Tableau 47 : Activité antiradicalaire (ABTS) des extraits et composés de <i>C. azarolus</i>	140
Tableau 48 : Activité FRAP des extraits et composés de <i>C. azarolus</i>	141
Tableau 49 : Activité CUPRAC des extraits et composés de <i>C. azarolus</i>	142
Tableau 50 : Activité de blanchissement du β-carotène par les extraits de <i>C.azarolus</i>	143
Tableau 51 : Inhibition du radical DPPH par les extraits et composés de <i>D.communis</i>	145
Tableau 52 : Activité antiradicalaire (ABTS) des extraits et composés de <i>Dioscorea communis L</i>	146
Tableau 53 : Activité FRAP des extraits et composés de <i>D. communis</i>	147
Tableau 54 : Activité CUPRAC des extraits et composés de <i>D. communis</i>	148
Tableau 55 : Activité de blanchissement du β-carotène par les extraits de <i>D. communis</i> ...	149
Tableau 56 : Inhibition de l'AChE par les extraits et composés de <i>D.communis</i>	150
Tableau 57 : Inhibition de BChE par les extraits et composés de <i>D.Communis</i>	151

Liste des figures

Figure 1 : Exemples des produits majoritaires des espèces du genre <i>Crataegus</i>	8
Figure 2 : Les diverses activités pharmacologiques du genre <i>Crataegus</i>	9
Figure 3 : Aire de répartition du <i>C.azarolus</i> en Algérie.....	12
Figure 4 : Arbre et fruits du <i>C. azarolus</i>	13
Figure 5 : Types d'aglycones stroidiques présent dans les Dioscoréacées.....	17
Figure 6 : Structure de la Dioscine et de la Diosgénine.....	17
Figure 7 : Structure de la Protodioscine.....	18
Figure 8 : Structure des Dioscorésides A et B.....	18
Figure 9: Structures des Dioseptemlosides E et G.....	18
Figure 10 : Structure des différents alcaloïdes présents dans les <i>Dioscorea</i>	19
Figure 11: Structure des Diosbulbines A-G, Diosbulbinoside D-E, Bafoudiosbulbines A, B, D, F et G isolés de <i>Dioscorea</i>	20
Figure 12 : Structures de quelques stilbènes isolés de <i>Dioscorea</i>	21
Figure 13: Structures des majeurs phénanthrènes, dihydrophénanthrènes et des naphtofuranoxépines (Dioscorealides A et B) isolés de <i>Dioscorea</i>	22
Figure 14 : Aspect morphologique de la plante <i>Dioscora communis</i>	25
Figure 15 : Structure des Stérols A, B et de l'Histamine C.....	30
Figure 16 : Structures des deux Furanocoumarines.....	30
Figure 17: 2-phénylchromane.....	42
Figure 18 : Exemples des flavones.....	42
Figure 19 : Exemples de flavanones et dihydroflavanols.....	43
Figure 20 : Exemples d'isoflavones.....	43
Figure 21 : Exemples de chalcones.....	44
Figure 22: Exemple des aures.....	44
Figure 23 : Structure de base de cation flavylum.....	44
Figure 24 : Les différentes classes des flavonoïdes.....	45
Figure 25 : Les deux bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.....	51
Figure 26 : Formation de complexe après addition de H_3BO_3	53
Figure 27 : Squelette de base des phénanthrènes.....	55
Figure 28 : Les différentes classes des phénanthrènes.....	56
Figure 29: Différentes étapes d'extraction des parties aériennes de <i>C. azarolus</i>	66

Figure 30 : Protocole de séparation de l'extrait AcOEt de <i>C. azarolus</i>	70
Figure 31 : Carte CCM bidimensionnelle (cellulose) de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	71
Figure 32 : Protocole de séparation de l'extrait <i>n</i> -BuOH de l'espèce <i>C. azarolus</i>	73
Figure 33 : Racines de <i>D. communis</i>	74
Figure 34 : Protocole d'extraction des rhizomes de <i>D. communis</i>	75
Figure 35 : CCM sous 254 nm pour les bandes de F24b	78
Figure 36 : CCM sous 254 nm pour les bandes de F54	79
Figure 37 : Protocole de séparation de l'extrait Et ₂ O de <i>D. communis</i>	80
Figure 38 : Spectre SM- IE du produit A	81
Figure 39 : Spectre SM-IE du produit B	82
Figure 40 : Spectre SM-IE du produit C	82
Figure 41 : Spectre SM-IE du produit D	83
Figure 42 : Spectre SM-IE du produit E	83
Figure 43 : Série spectrale UV-Visible du produit 4-61	87
Figure 44 : Spectre de masse du produit 4-61	87
Figure 45 : Spectre RMN-1H du produit 4-61	88
Figure 46 : Spectre RMN- ¹³ C du produit 4-61	88
Figure 47 : Comparaison entre les produits 46-1 et 46-2	90
Figure 48 : Spectre de masse du produit 4-62	91
Figure 49 : Spectre RMN-1H du produit 4-62	91
Figure 50 : Série spectrales UV-visible du produit 1	95
Figure 51 : Spectre RMN- ¹ H du produit 1	95
Figure 52 : Spectre RMN- ¹ H du produit 2	97
Figure 53 : Etalement du spectre RMN- ¹ H du produit 2	98
Figure 54 : Spectre RMN- ¹³ C du produit 2	98
Figure 55 : Spectre Dept 135 du produit 2	99
Figure 56 : Série spectrales UV-visible du produit 3	102
Figure 57 : Spectre RMN 1H du composé 3	102
Figure 58 : Spectre RMN- ¹³ C du produit 3	103
Figure 59 : Spectre UV-Visible du produit 8A	106
Figure 60 : Spectre IR du produit 8A	106
Figure 61 : Spectre SM-IE du produit 8A	106
Figure 62 : Spectre RMN- ¹ H du produit 8A	107
Figure 63 : Spectre RMN- ¹³ C du composé 8A	107

Figure 64 : Spectre SM-IE du produit 24b3	109
Figure 65 : Spectre RMN- ¹ H du produit 24b3	110
Figure 66 : Spectre RMN- ¹³ C du produit 24b3	110
Figure 67 : Spectre SM-IE du produit 24C	112
Figure 68 : Spectre RMN- ¹ H du produit 24C	113
Figure 69 : Spectre RMN- ¹³ C du produit 24C	113
Figure 70 : Spectre RMN- ¹ H du produit 51b	116
Figure 71 : Spectre RMN- ¹³ C du produit 51b	116
Figure 72 : Spectre DEPT 135 du produit 51b	117
Figure 73 : Spectre RMN- ¹ H du produit 74	120
Figure 74 : Spectre RMN-13C du produit 74	120
Figure 75 : Spectre HMQC du produit 74	121
Figure 76 : Spectre HMBC du produit 74	121
Figure 77 : Spectre NOESY du produit 74	122
Figure 78 : Spectre IR et UV du produit 74	122
Figure 79 : Spectre SM-IE du produit 24d	124
Figure 80 : Spectre RMN- ¹ H du produit 24d	125
Figure 81 : Spectre RMN- ¹³ C du produit 24d	125
Figure 82 : Spectre RMN- ¹ H du produit 51d	127
Figure 83 : Structure de l'acide gallique.....	129
Figure 84 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	130
Figure 85 : Structure de la quercétine.....	131
Figure 86 : Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes.....	132
Figure 87 : Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits et composés de <i>C.azarolus</i>	139
Figure 88 : Activité ABTS des extraits et composés de <i>C.azarolus</i>	140
Figure 89 : Activité FRAP des extraits et composés de <i>C.azarolus</i>	141
Figure 90 : Activité CUPRAC des extraits et composés de <i>C.azarolus</i>	142
Figure 91 : Activité du blanchissement β-carotène des extraits et composés de <i>C.azarolus</i>	143
Figure 92 : Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits et composés de <i>D.communis</i>	145
Figure 93 : Activité ABTS des extraits et composés de <i>D.communis</i>	146
Figure 94 : Activité FRAP des extraits et composés de <i>D.communis</i>	147
Figure 95 : Activité CUPRAC des extraits et composés de <i>D.communis</i>	148

Figure 96 : Activité du blanchissement β -carotène des extraits et composés de <i>D.communis</i>	149
Figure 97 : Inhibition de l'AChE par les extraits et composés de <i>D.communis</i>	151
Figure 98 : Inhibition de la BChE par les extraits et composés de <i>D.communis</i>	152

Partie A

Etude phytochimique

Chapitre 1

Aperçu bibliographique

Introduction générale

Depuis l'antiquité, l'homme n'a cessé de chercher à subvenir de ses besoins en puisant dans la nature qui lui assure non seulement ses besoins nutritionnels et vestimentaires mais également médicamenteux.

Au cours du temps, les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Ainsi, jusqu'au début du XX^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient d'origine végétale.

De nos jours, malgré les progrès réalisés en médecine, plusieurs populations, notamment celle des pays en voie de développement, ont recours aux plantes pour se soigner, soit par inaccessibilité aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont donné des résultats thérapeutiques très encourageants lors de leur utilisation.

Ces plantes médicinales sont devenues par la suite une source principale de découverte de nouveaux principes actifs, déjà environ 170000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes. A titre d'exemple, on peut citer la quinine, la digitaline, la morphine, la colchicine, l'artémisinine et le taxol..., pourtant, moins de la moitié des plantes ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques.

La flore algérienne compte près de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques [1,2]. Ce potentiel floristique, d'intérêt biomédical a poussé les chercheurs Algériens à explorer ces ressources sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre du programme de recherche de notre laboratoire et consiste à la valorisation de la flore du Nord et du Sahara algérien, par la recherche de nouveaux composés à débouchés thérapeutiques.

*Pour notre part, nous avons choisi d'étudier les deux espèces *Crataegus azarolus* de la famille des Rosaceae qui est un arbre fruitier cultivé dans la région méditerranée [3] et connu dans l'est de l'Algérie sous le nom de « Zaarour » et *Dioscorea communis* de la famille des Dioscoreaceae connu en Algérie sous le nom de « el karma souda » [3], en fixant comme principal objectif, l'extraction, la séparation et l'identification des métabolites*

secondaires des deux espèces ainsi d'étudier les divers activités biologiques des extraits et produits isolés.

Ainsi, ce manuscrit est divisé en deux parties (**A**, **B**) :

- **La première partie (A)** concerne l'étude phytochimique des deux plantes et elle est composée de quatre chapitres :

Le premier chapitre comporte une description botanique et l'étude bibliographique sur les familles, genres et espèces étudiée (*Cratagus azarolus* et *Dioscorea communis*).

Le deuxième chapitre nous aborderons un aperçu général sur les flavonoïdes et les phénanthrènes.

Le troisième chapitre sera consacré à la description de nos travaux.

Le dernier chapitre de cette partie sera consacré aux résultats et la détermination structurale des composés des deux espèces en combinant les différentes méthodes spectroscopiques (IR, UV, SM, RMN mono et bidimensionnelles).

- **La deuxième partie (B)** de cette étude concerne l'étude biologique des extraits et produits isolés des deux espèces et elle est composé de deux chapitre :

Le premier chapitre comprend des généralités sur les activités ainsi les méthodes utilisées dans l'évaluation de ses activités: Dosage des composés phénolique (TPC, TFC), activité antioxydante (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, β -carotene), activité anticholinestérase.

Le second chapitre comprend les différents résultats obtenu des différentes activités étudiées.

Enfin, une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus.

Références bibliographiques

[1] Gaussen H., Leroy H.F. (1982). Précis de Botanique (végétaux supérieurs). 2^{ème} E^d, pp.426.

[2] Ozenda P. (1977). Flore du Sahara. Ed CNRS. Paris. France, 250-259.

[3] Quezel P., Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertique méridionales. Tome 2. Paris: CNRS, pp. 459.

Partie A

Etude phytochimique

Chapitre 1

Aperçu bibliographique

I.1. la famille des Rosacées

I.1.1. Présentation botanique et géographique

La famille des Rosacées doit son nom à la rose sauvage (genre *Rosa*) et comporte environ 3370 espèces réparties en plus d'une centaine de genres.

Cette famille cosmopolite est surtout représentée dans les régions tempérées de l'hémisphère nord. Les genres les plus importants sont *Potentilla* (500 espèces), *Cotoneaster* (260 espèces), *Rubus* et *Alchemilla* (250 espèces), *Prunus* (200 espèces), *Sorbus* (193 espèces), *Crataegus* (200 à 1200 espèces), *Rosa* (150 espèces). Les Rosacées sont une famille par enchaînement, ce qui explique la diversité de l'appareil végétatif et reproducteur [1].

I.1.1. Description

Les Rosacées sont des plantes herbacées vivaces comme le fraisier ou plus rarement annuelles comme l'Aphane et les trois quarts des plantes ligneuses à l'écorce lisse, sous forme d'arbrisseaux ou d'arbustes (rosiers, ronces dont les poils épidermiques se lignifient et en aiguillons), d'arbres (cerisier, prunier, pêcher, pommier dont certains rameaux peuvent se transformer en épines) à feuilles caduques ou persistantes se transforment.

Les tiges, souvent épineuses, sont dressées, plus rarement étalées ou rampantes. Elles sont dotées souvent de poils simples ou étoilés, comme les feuilles.

Les fleurs sont souvent grandes, régulières, à symétrie rayonnée, presque toujours bisexuées et pentamères. Elles présentent parfois, sous le calice, un calicule (appelé aussi épicalice) de 3 ou 5 pièces (genres *Fragaria*, *Potentilla*, *Alchemilla*).

Les fruits sont très divers : Peut-être un follicule (ex : follicule spiralé de *Spiraea*), une drupe (*Prunus*), un akène (*Rosa*), un polyakène (*Potentilla*), des drupéoles multiples (*Rubus*) ou un faux-fruit (telle la pomme constituée du réceptacle charnu), mais jamais une gousse ; les graines, petites et exalbuminées, sont dispersées par zoochorie ou anémochorie [2].

I.2. Le genre *Crataegus*

I.2.1. Présentation

Crataegus est un genre d'arbres ou arbustes épineux de l'hémisphère nord appartenant à la famille des Rosacées. Le nombre d'espèces appartenant au genre est difficile à déterminer compte tenu de la facilité avec laquelle les différentes espèces de *Crataegus* s'hybrident entre

elles en générant des variétés polyploïdes se reproduisant par apomixie. La classification dépend donc des différentes interprétations taxonomiques et varie de 200 à 1200 espèces [3], sans compter les cultivars ornementaux. Voici quelques caractéristiques à retenir pour tout le genre *Crataegus*.

Feuilles : Petites, reluisantes, parfois lobées, simples, alternes, à dents aiguës de deux tailles.

Fleurs : Blanches, voyantes, regroupées en corymbes, à cinq pétales ronds, floraison en Mai.

Fruits : De rouge à orange à jaune, peuvent aller jusqu'au bleu ou noir selon les espèces ; ressemblent à des pommes miniatures ; persistent souvent tout l'hiver ; contiennent de une à cinq graines, selon les espèces.

I.2.2. Répartition géographique

Le genre *Crataegus* s'installe dans les fermes abandonnées, aux bords des ruisseaux et des fossés, dans les clairières, en plein soleil ; aime un sol riche en calcium. Pousse souvent en massifs épais. On la retrouve partout en Europe, en Afrique ; Asie centrale et nord ; cultivée comme haie en Angleterre ; Retrouvée dans toutes les zones tempérées nordiques. Plus de 100 espèces indigènes en Amérique du Nord, dont une trentaine au Canada, retrouvées surtout au sud de l'Ontario à la Nouvelle-Écosse. Dans L'inde, il est trouvé dans l'himalaya tempéré, le Cachemire et Himachal Pradesh, à une altitude de 1800-3000 m [4]. En Algérie, elle est commune dans les forêts et les maquis de l'Atlas Tallien [5].

I.2.3. Etudes phytochimiques antérieurs sur les espèces du genre *Crataegus*

Plusieurs travaux ont été réalisés pour déterminer la composition chimique des espèces de *Crataegus* afin d'expliquer son pouvoir traitant et ses applications médicales et pharmaceutiques.

Crataegus est caractérisé par sa richesse en acides organiques (3-6%), tels que l'acide caféique, maléique, tartrique, citrique et chlorogénique [6]. L'augmentation de ces acides permet de stabiliser les substances phénoliques au cours du stockage [6,7].

Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. D'où, les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits.

Les flavonoïdes sont responsables de l'amertume des fruits attardés et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée. Les flavonoïdes et les oligomères procyanidiniques sont présent surtout dans les feuilles et les

fleurs, mais ils sont plus faibles dans les fruits : environ (0.1-0.5)%, ainsi la vitexine et la vitexine 2''-rhamnoside ne sont présents qu'en traces [8].

Les constituants non phénoliques sont les acides triterpéniques pentacycliques de (0.5-1.4)%, comme l'acide ursolique, l'acide oléanolique et l'acide crataegolique (2- α -hydroxy oléanolique) [9, 10].

Le tableau-1 et la fig.1 présentent la majorité des produits isolés des espèces du genre *Crataegus*.

Tableau-1 : Les composés isolés des espèces du genre *Crataegus*

Espèce	Les constituants chimiques	Nom des composés	Références
<i>C. monogyna</i>	Les composés phénoliques, di-C-glycosides	Proanthocyanidine (1), vitexine-2-O-rhamnoside(3), hyperoside (4), anthocyanine, acide chlorogénique(5), epicatechin, apigénin-6,8-di-C-glycosides.	[11,12]
<i>C. aronia</i>	Les composés phénoliques	Oligomère proanthocyanidin, flavonoides,(vitexine-2-O-rhamnoside(3) hyperoside(4))	[13]
<i>C. pseudoheterophylla</i>	Les composés phénoliques	Oligomère proanthocyanidin, flavonoides (vitexine-2-O-rhamnoside (3), hyperoside (4))	[14]
<i>C. pinnatifida</i>	Flavonoïde glycoside, furanoflavonoides, acide triterpénique, flavonoïde ketohexosefuranosides, diphenyle glucoside	Pinnatifin C (6), pinnatifin D (7), acide oléanolique (8), acide ursolique(9), pinnatifinoside A (10), pinnatifinoside B (11), pinnatifinoside C (12), pinnatifinoside D (13), shanyenoside A (5, 4'-diméthoxy-biphényl-4-ol-3-O- β -D-glucoside)	[15-18]
<i>C. laevigata</i>	Les oligomères procyanidines	Picatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →6)-epicatechin, pentamer of (-)-epicatechin units linked through C-4 β /C-8 bonds	[19]
<i>C. microphylla</i>	Flavonoides	Hesperetin (14), apigénine (15), vitexine (2), vitexin-4'-O-rhamnoside	[20]
<i>Crataegi folium</i>	Les composés phénoliques	Catechin (16), naringénine (17), acide galique (18), acide coumarinique (19), acide caféique	[21]
<i>C. scabrifolia</i>	Carbohydrates	Sucre, acides	[22]
<i>C. davisii</i>	Flavonoides	Hyperoside (4), vitexin-2-O-rhamnoside(3), vitexin-4'-O-rhamnoside, rutine (20), quercétine (21)	[23]
<i>C. macrocarpa</i>	Flavonoides	Eriodictyol-7-glucuronide, luteolin-7-O-glucuronide	[24]

Suite tableau-1:

<i>C. pentaegyna</i>	Les composés phénoliques	Flavonoides	[14]
<i>C. opaca</i> , <i>C. aestivalis</i> , <i>C. rufula</i>	Les composés volatiles	Linalool (22), hexanal, butyl hexanoate, pentylhexanoate, methyl hexanoate (23)	[25]
<i>C. meyeri</i>	Carbohydrates	polysaccharides	[26]
<i>C. curvisepala</i>	Flavonoïde	Cratenacin	[27]
<i>C. orientalis</i>	Carbohydrates	Polysaccharides	[28]
<i>C. turkestanica</i>	Phospholipides	Phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol	[29]
<i>C. jackii</i> , <i>C. robesoniana</i> , <i>C. flabellata</i>	Les huiles essentielles	Decane, linalool (22), syringaldehyde B, syringaldehyde C, syringaldehyde D, caryophylleneoxide, squalene, eicosane,	[30]
<i>C. oxyacatha</i>	Flavonoides, Oligomère procyanid-ines, Cardiotonique amines, triterpenes, dérivées de la purine	Heptahydroxyflavan glycoside, flavan polymers, quercetin (21), hyperoside (4), rutin (20), flavonoglycosyls, vitexin-4'-rhamnoside, epicatechol, tyramine, isobutylamine, O-methoxy phenylethylamine, acide ursolique (9), acide oleanolique (8), acide cratègolique, adenosine, adenine, guanine, acid caffèique, polyphenols	[4,31-33]
<i>C. sanguine</i>	Flavonoïde	Acetyl vitexin	[34]
<i>C. azarolus</i> var. <i>euazarolus</i> , <i>C. aronia</i>	Polyphenols	Acide chlorogénique (5), hyperoside (4), quercétine (21), rutine (20), spiraeoside, epicatechin	[35]
<i>C. sinaica</i>	Polyphenols	Anthocyanin	[36]
<i>Crataegi folium cum Flore</i>	Flavonoides, flavone	Flavonol 8-méthoxykaempferol 3-O-(6"-malonyl)β-D-glucopyranoside	[37,38]
<i>C. cuneata</i>	Triterpénoïde	Cuneataol	[39]
<i>C. flava</i>	Eudesmanolide	1β,9α-dihydroxyeudesm-3-en-5β,6α,7α,11αH-12,6-olide	[40]
<i>C. macrocarpa</i>	Flavonoides	Vitexine(2), isovitexin, rutine(20) hyperoside(4), isoquercitrin (R)- et (S)-eriodictyol-7-O-β-D-glucuronide et luteolin-7-O-β-D-glucuronide	[24]
<i>C. pubescens</i>	Polymère des acides sucrés	Pectinméthylesterase (PME)	[41]
<i>C. maximowiczii</i>	Flavonoides	8-méthoxykaempferol, vitexin (2), hyperoside (4), quercétine (21)	[42]

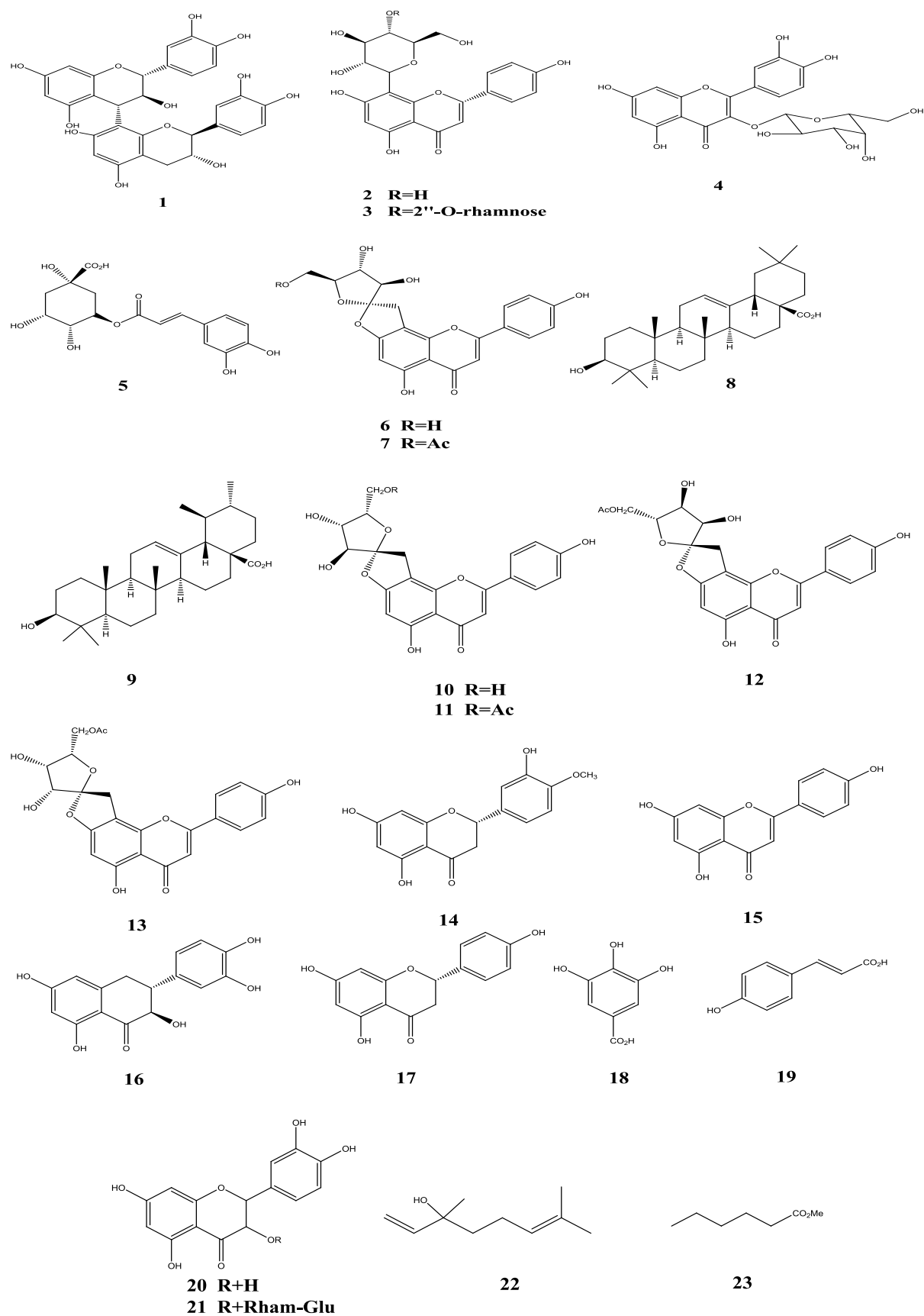


Figure 1 : Exemples des produits majoritaires des espèces du genre *Crataegus*

I.2.4. Les propriétés pharmacologiques des espèces du genre *Crataegus*

Les plantes du genre *Crataegus* possède des activités médicinales immenses, quelques espèces de ce genre ont été examinées pour leurs activités biologiques. *Crataegus* peut améliorer le flux sanguin, les troubles cardiovasculaires comme l'arythmie, l'infarctus du myocarde ainsi l'insuffisance cardiaque congestive [43-47].

Les espèces de *Crataegus* empêche aussi l'élimination de lipides plasma comme le cholestérol total, il peut être employé comme agent anti-incendiaire, protecteur de gastro, antimicrobien et utilisé comme un agent hepatoprotective [45,48], ce genre de plante a montré aussi des activités antioxydantes et immunostimulantes très importante. Elle est aussi employée dans l'anxiété et la dépression douce [49].

Les résultats expérimentaux ont montré un large effet et le tableau-2 montre les activités pharmacologiques de quelques espèces de ce genre, ses activités sont résumées dans la (fig.2).

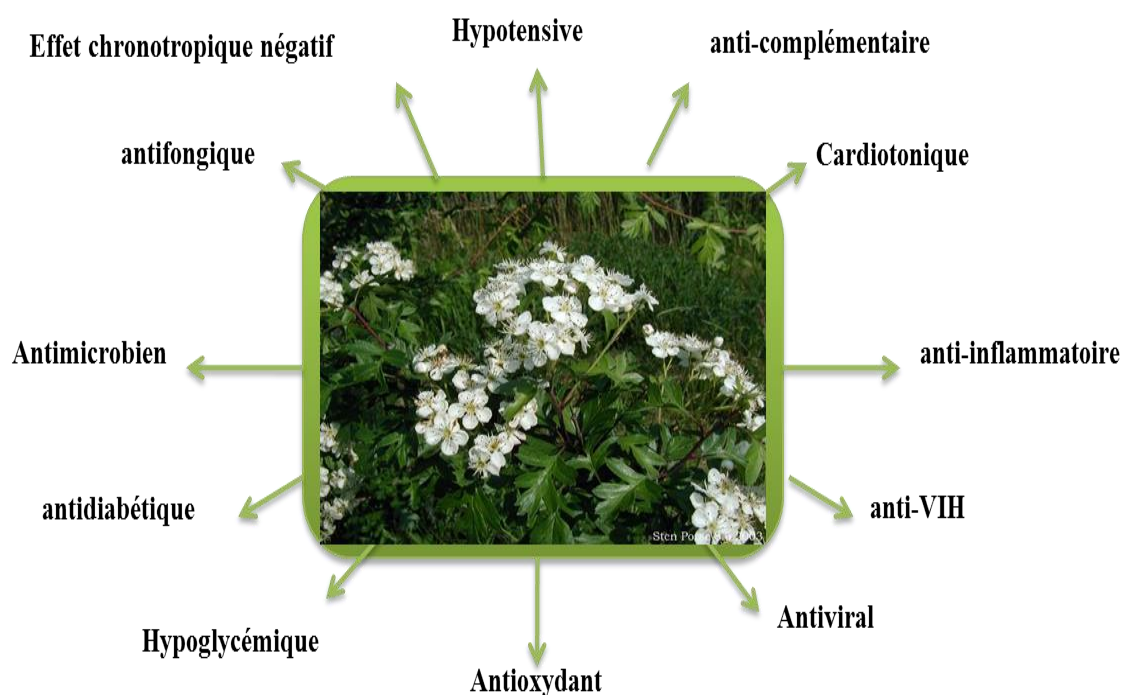


Figure 2 : Les diverses activités pharmacologiques du genre *Crataegus*

Tableau -2 : Activité pharmacologique de quelques espèces du genre *Crataegus*

Espèces	La partie de la plante /Extrait	Effets pharmacologiques	Références
<i>C. oxyacantha</i>	Feuilles, tiges	Effet chronotropique négatif, cardiotonique, traitement d'insuffisance cardiaque congestive; anti-inflammatoire, gastroprotective et activités antimicrobiennes; traitement d'infarctus du myocarde, antioxydante, inhibition de thromboxane A2.	[43-46,50]
<i>C. aronia</i>	Feuilles, fleurs. (aqueuse)	Antioxydante; antidiabétique.	[51,52]
<i>C. laevigata</i>	Fruits (CHCl ₃ et Méthanol)	Antioxydante.	[53]
<i>C. monogyna</i>	Fleurs portant branches, fruits (CHCl ₃ , éthanol)	Antioxydante, effet chronotropique négatif.	[44,53]
<i>Crataegi folium</i>	Feuilles (acétone, méthanol, eau)	Antioxydante.	[21]
<i>C. mexicana</i>	Racines, feuilles (hexane)	Hypoglycémique.	[54,55]
<i>C. pseudoheterophylla</i> , <i>C. aronia</i> , <i>C. monogyna</i>	Feuilles, fruits (éthanol)	Antibactérienne, antifongique, antivirale, antidiabétique.	[14]
<i>C. tanacetifolia</i>	Feuilles (eau)	Hypotensive, antimicrobienne.	[56]
<i>C. pentagyna</i>	Fruits (méthanol, aqueux)	Antioxydante.	[57]
<i>C. microphylla</i>	Fruits (méthanol)	Radio protective.	[13]
<i>C. sinaica</i>	Fruits, feuilles (acétone, éthyle acétate, butanol, eau)	Antiviral, y compris anti-VIH, antioxydante, anti-complémentaire.	[58,59]
<i>Crataegus spp.</i>	Fruits, feuilles	Inhibiteur de diurétique.	[60]
<i>C. azarolus var. eu-azarolus</i>	Fleurs (éthyle acétate)	Antioxydante, traitement d'arrêt du cœur (d'insuffisance cardiaque).	[35]
<i>C. bornmulleri</i>	Fruits (éthyle acétate)	Antimicrobienne.	[61]

I.2.5. Utilisations traditionnels

Le genre *Crataegus* a été utilisé traditionnellement depuis l'Antiquité. En outre, il a des effets thérapeutiques avantageux. Une décoction de feuilles et de fruits non mûrs de *Crataegus aronia* est utilisée pour traiter des maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et la faiblesse sexuelle dans la médecine traditionnelle arabe [62]. Au Mexique, le diabète est traité avec des extraits d'aubépine. Un tel traitement peut être d'avantage considérable particulièrement pendant les stades précoces de la maladie [63]. Dans la médecine populaire,

plusieurs espèces de *Crataegus* ont principalement été utilisées pour traiter des maladies cardiovasculaires incluant *Crataegus pinnatifida* (l'aubépine chinoise), *C. pubescens* (l'aubépine mexicaine), *C. cuneata* (l'aubépine japonaise), *C. laevigata* et *C. monogyna* (l'Europe), *C. oxycantha* et *C. aronica* (le Moyen-Orient), *C. phaenopyrum* (hawtorn américain) et *C. ambigua* (l'aubépine russe) [64,52]. (*C. pinnatifida*) est un fruit comestible utilisé dans la médecine chinoise traditionnelle pour baisser les lipides plasma [16]. Les fruits secs de *C. Pinnatifida* ont été utilisés traditionnellement comme médicament orientale et pour fabriquer des boissons non alcoolisée local en Taïwan [65].

I.3. Présentation de l'espèce *Crataegus azarolus* (L.)

I.3.1. Définition

Azérolier ou **Épine d'Espagne** (*Crataegus azarolus*) est un arbre fruitier du genre *Crataegus* appartenant à la famille des *Rosaceae*, originaire du bassin méditerranéen.

I.3.2. Classification botanique

La position taxonomique de *C. azarolus* est comme suite :

- **Règne** : Végétale
- **Sous-règne** : Cormophytes (plantes à axe ou plantes vasculaires)
- **Embranchement** : Spermaphytes (plantes à graines)
- **Sous-embranchement** : Angiospermes (plantes à fruits)
- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous-classe** : Dialypétales (Choripétales)
- **Ordre** : Rosales
- **Famille** : Rosacées
- **Tribu** : Pirées
- **Genre** : *Crataegus*

I.3.3. Origine et répartition géographique

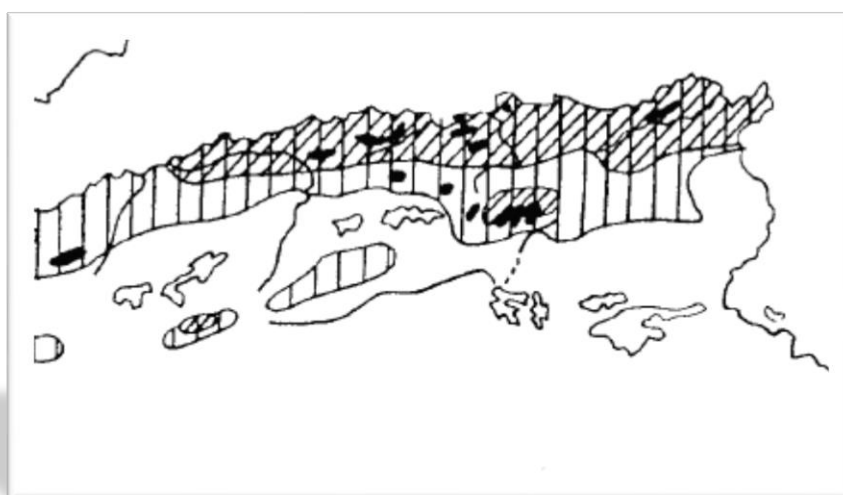
C. azarolus est originaire de la méditerranée orientale [66], sud de l'Europe, Afrique du nord et de l'Asie (de la Crète au Turkestan) et il est présent à l'état sauvage dans tous les pays méditerranéens [67].

En Algérie, *C. azarolus* est localisé surtout dans les régions de Constantine (fig.3), d'une façon spontanée en forme de forêts assez rares et parfois planté en haies ou en clôture

dans les jardins en zone rurales. En plus de *C. azarolus* il existe d'autres espèces en Algérie telle que: *Crataegus oxyacantha* L. (boumekherri ou babaadjina), *Crataegus monogyna* jacq. (ssp de *C. oxyacantha*), *Crataegus maura* et l'hybride $azarolus \times oxyacantha = C. ruscinonensis$ Gren et (Azerolier du Roussillon) [68], ce dernier existe dans la région de Constantine, il se diffère de *C. azarolus* par ses fruits plus petits (10-15mm) au lieu de 15 à 30 mm [69].

La présence de *C. azarolus* a pu être confirmée dans les régions suivantes [70] :

- ✚ Constantine : Djebel El Meridj, El Khroub et Ain Abid ;
- ✚ Guelma : Oued Zenati, Ras el Akba ;
- ✚ Souk Ahras : Bouchegouf ;
- ✚ Sétif : Bougaa, Ain Roua, Ain Kbira, Beni Aziz, djebel Boutaleb et Ouled Tebène ;



▨ *C. azarolus*.

||| *C. oxyacantha*.

Figure 3 : Aire de répartition du *C. azarolus* en Algérie

I.3.4. Description

C. azarolus est un petit arbre de (4-6m), plus rarement (jusqu'à 12m). Ecorce lisse et gris clair, devenant brunâtre avec gerçures. Rameaux pourpres foncés, peu épineux (parfois sans épines), les jeunes blanchâtres cotonneux, bourgeons globuleux.

Feuilles caduques, alternes, à pétiole poilu-cotonneux (au moins à la base), de 2 à 5 cm de longueur, en forme d'éventail profondément divisées en 3-5 lobes entiers ou peu dentés, poilus, de couleur verte blanchâtre en dessous (fig.4).

Fleurs blanches ou rosées (avril-mai), odorantes, en bouquets terminaux en inflorescences denses, de 10 à 20 petites fleurs à pédoncules velus-cotonneux. Sépales à-peu-près aussi larges que longs, à deux styles (parfois un seul style).

Fruits assez gros mûrissent en Septembre Octobre ressemblât à des pommes miniature, de forme ovoïde 1,5 à 2 cm de diamètre, rouge vermillon ou jaunâtre vire au blanc crème, a la chair pulpeuse parfumée, d'un gout acidule, agréable, a 2 noyaux osseux, planes à la face intérieure, parfois trois noyaux triangulaires rainurés, ou un seul noyau entier [71].



Figure 4 : Arbre et fruits du *C. azarolus*

I.3.5. Composition chimique

Plusieurs travaux ont été réalisés pour déterminer la composition chimique de *C. azarolus* afin d'expliquer son pouvoir traitant et ses applications médicales et pharmaceutiques.

Les fruits de *C. azarolus* contiennent 15.9% des sucres totaux, les oses simples majoritaires sont le fructose, glucose et rhamnose [72].

Les travaux sur plusieurs variétés de *C. azarolus* [67], montrent sa richesse en saccharose dans quelques variétés et son absence chez certains.

Selon l'étude réalisée sur la fraction glucidique de *C. azarolus* Algérien qui provient de la région de Mila [73], les sucres solubles sont d'une teneur de 9.86% de la matière sèche, où 3.03% présente des sucres réducteurs et 6.83% du saccharose. Concernant les polysaccharides, cette espèce renferme 6.86% de pectine et 11.97% de cellulose, de la matière fraîche du fruit [74]. Son apport énergétique est de 37.98 Kcal [73].

Le contenu des fruits secs de *C. azarolus* en acides aminés totaux varie entre 3 à 6%, caractérisé par des acides aminés aromatiques [6].

Les lipides sont présents en trace [7], des travaux sur *C. azarolus* de la région de N'gaous [75] ont abouti au contenu de 0.67% matière grasse par matière sèche. D'où le grand pourcentage de cette matière sont des lipides insaponifiables, les acides gras dominants sont l'acide oléique et l'acide linoléique.

Concernant les éléments minéraux, le tableau-3 présente les principaux éléments de la partie charnue de *Crataegus spp* et ceux de *C. azarolus* de la willaya de Batna [76].

Tableau-3 : Teneur en éléments minéraux des fruits de *Crataegus*

Élément	Teneur (ppm)	
	[71]	[76]
Ca	3046.37±199.90	4349.6±0.00
P	1477.88±53.15	131.1±14.8
K	13531.96±501.38	2502.6±17.0
Mg	1502.55±120.06	4746.9±4.9
Na	312.18±13.39	137.0±0.00
Fe	32.77±2.46	45.6±7.2

Les analyses réalisées sur la pulpe de *C. azarolus* [77] ont permis la détermination de quarante-quatre composés volatils dominés par les aldéhydes aliphatiques et aromatiques, les cétones, les alcools, les monoterpènes et les triterpènes.

Les majeurs métabolites secondaires de cette espèce sont des flavonoïdes (1-2%) et des proanthocyanidines (2-3%) [78]. On rencontre de la rutine, hypéroside, orientine, vitexine, et leur dérivé vitexine-2''-O- rhamnoside (flavonoïde principal des fleurs), acétylevitexine-2''rhamnoside (accompagné chez quelque espèce) [78]. Dans l'inflorescence, des flavonoïdes glycosides essentiellement quercétol-3 galactoside, hypéroside, spiréoside et rutinoside sont présents [79,7 ,10].

Dans les feuilles, les proanthocyanidines sont caractéristiques ; procyanidol di, tri, tetra et oligomeres d' (-) épicatechine et /ou (+) catéchine, avec des liaisons de type (4 β →8), (4 β →6) [7]. Les procyanidines représentent 0,2% de la matière sèche de *C.azarolus* et aussi deux oligomères procyanidines ont été identifié ; un trimère: épicatechine (4 β →8) épicatechine (4 β →6) épicatechine et un pentamere constitue d'unites (-) épicatechine liées par des liaisons (4 β →8) [80,81].

II.1. La famille des Dioscoreacés

II.1.1. Présentation botanique et géographique

La famille des Dioscoreacés comprend environ 880 espèces localisées principalement dans les régions tropicales, mais parfois dans les régions tempérées et qui sont réparties en huit genres : *Avetra*, *Borderea*, *Dioscorea*, *Nanarepentia*, *Rajania*, *Stenomeris*, *Trichopus*, dont le genre *Dioscorea* est le plus important avec 850 espèces (97 %) [82].

II.2.2. Description

Les Dioscoreacés sont des plantes vivaces, à corne pérenne portant un ou plusieurs tubercules diversement conformés. La tige est annuelle et presque toujours volubile, très rarement dressée. Les feuilles sont souvent alternes, rarement opposées, palminerves, souvent cordées, entières ou plus rarement palmatilobées ou composées palmées. Le pétiole est souvent élargi ou épaissi à la base et embrassant la tige par deux auricules épaisses. Les plantes sont dioïques (elles produisent des fleurs mâles et des fleurs femelles sur des pieds séparés). Les inflorescences mâles sont en grappes ou en épis simples ou composés, axillaires, isolés ou fasciculés en petit nombre, parfois groupés en panicule au sommet des rameaux. Les fleurs sont petites et de couleur terne et se trouvent à l'aisselle d'une bractée. Les fleurs femelles, trimères, à ovaire infère triloculaire donnent des samares à trois ailes. Le fruit capsulaire est triptère et trivalve. Les graines sont au nombre de deux par loge. Elles sont comprimées, ailées et albuminées et à embryon très petit [83].

II.2. Le genre *Dioscorea*

II.2.1. Présentation

Le nom *Dioscorea* a été donné par Linné en l'honneur de Pediones Dioscorides, médecin et botaniste grec de l'époque de Néron (1^{er} siècle av. J.-C.), qui est l'auteur d'un très important traité sur les plantes « *De materia medica* ». Chez les espèces de ce genre, à l'aisselle des feuilles se développent des bulbilles pouvant servir à la multiplication de la plante, et qui sont parfois consommables comme dans le cas de *Dioscorea bulbifera*.

Les ignames commencent à se développer au début de la saison des pluies. Les tiges et les feuilles se dessèchent et meurent lors de la saison sèche.

Les tubercules de forme variable, ovoïde à oblongue, parfois aplatie ou en forme de massue allongée, peuvent atteindre 1 m de longueur et leur poids est généralement de 3 à 5

kg, mais peut aller jusqu'à 15 kg. La peau est généralement jaune, mais peut être presque blanche ou plus foncée (de brunâtre à noirâtre). La chair est généralement blanche, parfois jaunâtre.

II.2.2. Répartition géographique

Le genre *Dioscorea* est largement réparti et se trouve principalement dans les régions tropicales (pays chauds et humides) : en Afrique, Asie, Amérique centrale et Amérique du Sud. Leur origine est très diverse et les différentes espèces s'adaptent à divers écosystèmes [84].

- *D. trifida* a comme origine l'Amérique tropica.
- *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. bulbifera* et *D. dumetorum* sont originaires de l'Afrique de l'Ouest.
- *D. alata*, *D. esculenta* et *D. opposita* proviennent d'Asie.
- *D. opposita* et *D. japonica* viennent de Chine et du Japon.

II.2.3. Etudes phytochimiques antérieurs sur les espèces du genre *Dioscorea*

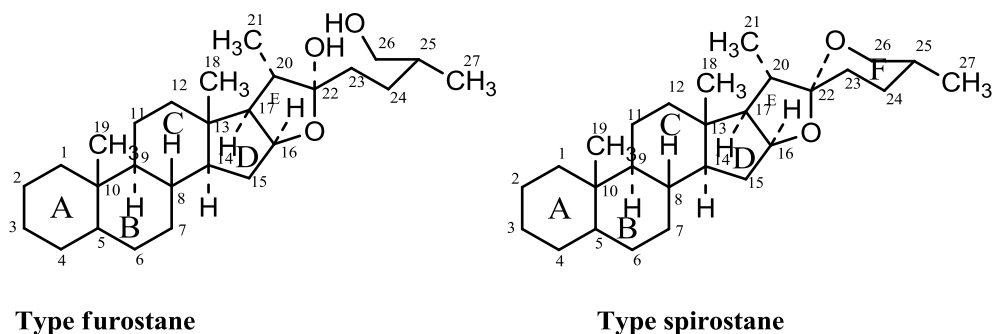
Depuis le début du 20^{ème} siècle de nombreuses études phytochimiques ont été consacrées aux *Dioscorea*, en particulier aux constituants des tubercules de *D. bulbifera*. De façon générale, les substances qui ont été isolées des *Dioscorea* se répartissent principalement en quatre classes qui seront examinées successivement : les saponosides nommés parfois saponines, les diterpénoïdes, les dérivés du stilbène ou du phénanthrène, et les alcaloïdes.

En outre, la découverte en 1943, par le chimiste américain Russell Marker, de la diosgénine précurseur pour la production d'une hormone femelle, la progestérone, dans la fabrication des contraceptifs, a stimulé les recherches phytochimiques sur les *Dioscorea* [85].

➤ Les saponosides

A partir du genre *Dioscorea*, ils ont identifiés un grand nombre et ainsi dans la période 2000-2006, plus de 50 saponosides ont été découverts et caractérisés de 13 espèces étudiées [86].

Deux types d'aglycones ou génines stéroïdiques se rencontrent principalement dans la famille des Dioscoreaceae : ce sont les génines pentacycliques de type furostane et les génines hexacycliques de type spirostane [87].

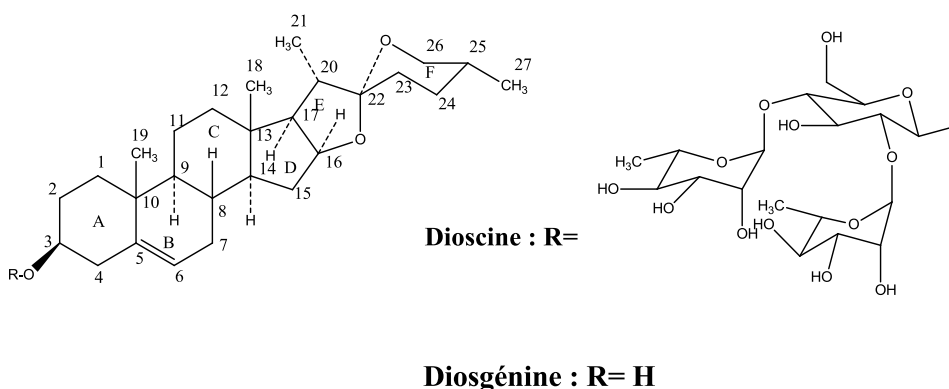


Type furostane

Type spirostane

Figure 5 : Types d'aglycones stéroïdiques présent dans les Dioscoréacées

La structure des saponosides de type spirostane est dérivée de celle de la diosgénine. Cette génine stéroïdique tient la première place, car elle est très utilisée dans l'industrie pharmaceutique comme source de synthons pour la synthèse d'hormones stéroïdes. Elle a été isolée principalement à partir des racines d'ignames sauvages de *D. villosa* et *D. balcanica* [88].



Dioscine : R=

Diosgénine : R= H

Figure 6 : Structure de la Dioscine et de la Diosgénine

A partir de *D. nipponica*, la dioscine et différents saponosides stéroïdiques de type furostane tels la protodioscine ont été caractérisés, principalement par des études en spectrométrie de masse [89].

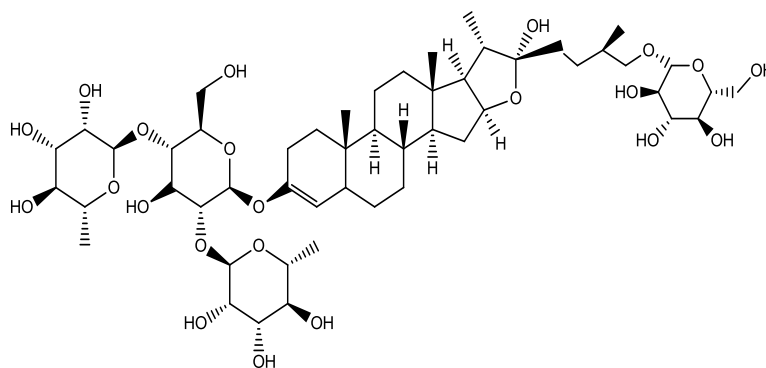


Figure 7 : Structure de la Protodioscine

D'autres saponosides stéroïdiques, les dioscorésides A et B ont été identifiés chez *D. panthaica*.

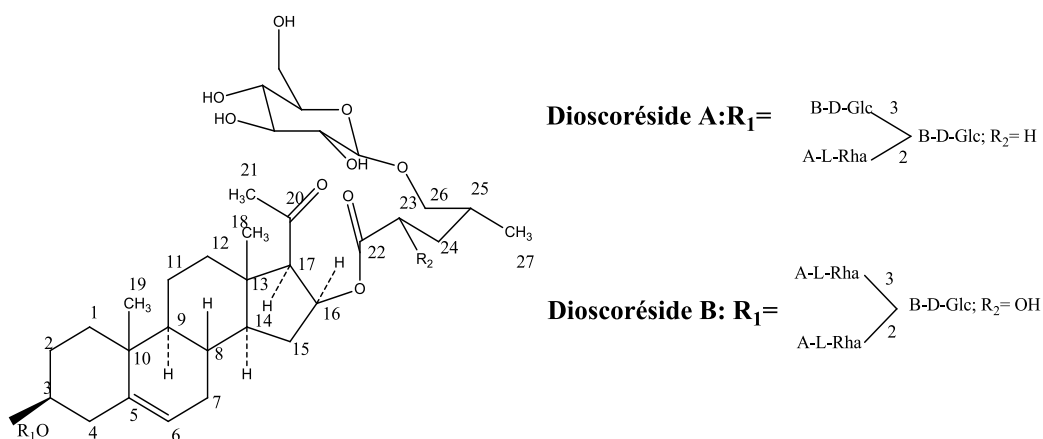


Figure 8 : Structure des Dioscorésides A et B

Une série de saponosides de type spirostane : Dioseptemlosides E et G, ont été caractérisés dans les tubercules de *D. polygonoides*, ainsi que dans ceux de *D. septemloba* [90].

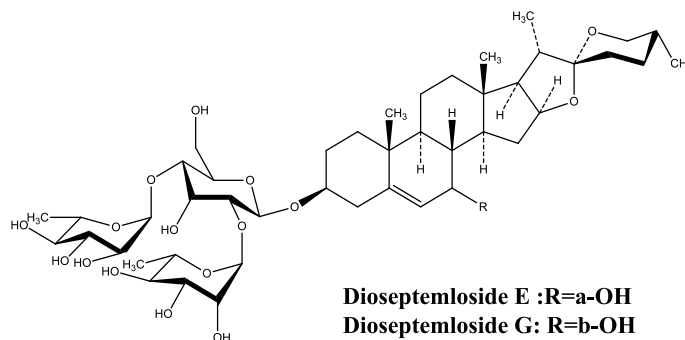


Figure 9: Structures des Dioseptemlosides E et G

➤ Les alcaloïdes

Quelques rares alcaloïdes ont été isolés de divers *Dioscorea*. Il s'agit de :

- ✓ **Dumétorine**, cet alcaloïde a été obtenu de *D. dumetorum* [91].
- ✓ **Dioscorine** est un alcaloïde de type quinocludinique qui a été isolé de nombreuses espèces de *Dioscorea*, tels *D. dumetorum* et *D. bulbifera*. Accompagnée de la dihydrodioscorine, elle a été isolée de *D. hispida* Dennst.
- ✓ **Crinamine** est un alcaloïde de type isoquinoléine qui a d'abord été obtenu à partir des Amaryllidaceae du genre *Crinum* où il est fréquent et caractéristique, mais a été également isolé de façon inattendue à partir des tubercules de *D. dregeana* [92].

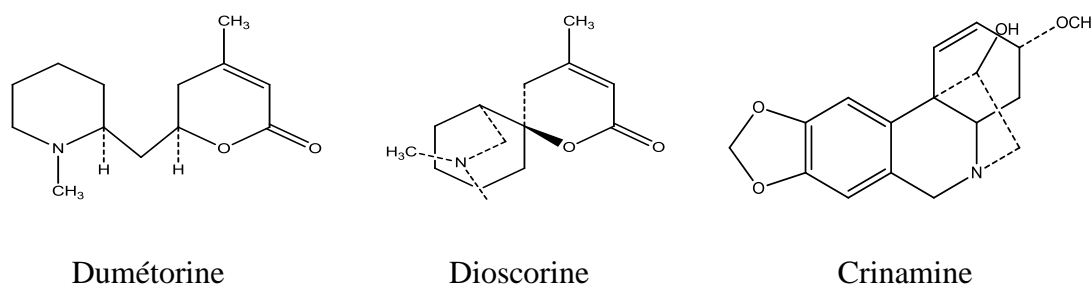


Figure 10 : Structure des différents alcaloïdes présents dans les *Dioscorea*

➤ Les diterpénoïde

A partir des tubercules de *D. bulbifera* var. *spontanea*, une série de diterpènes originaux de type Diosbulbines ont été isolées [93-95].

Deux Diosbulbinsides D et E ont été caractérisés, où un glucose est lié à la position 6 des diosbulbines D et E [96].

Aussi, des bafoudiosbulbines A, B, D, F et G qui sont des diterpènes de type nor-clérodane, ont été isolés de *D. bulbifera* var *sativa* qui présentent des activités antibactériennes contre les *salmonellesbh* [97].

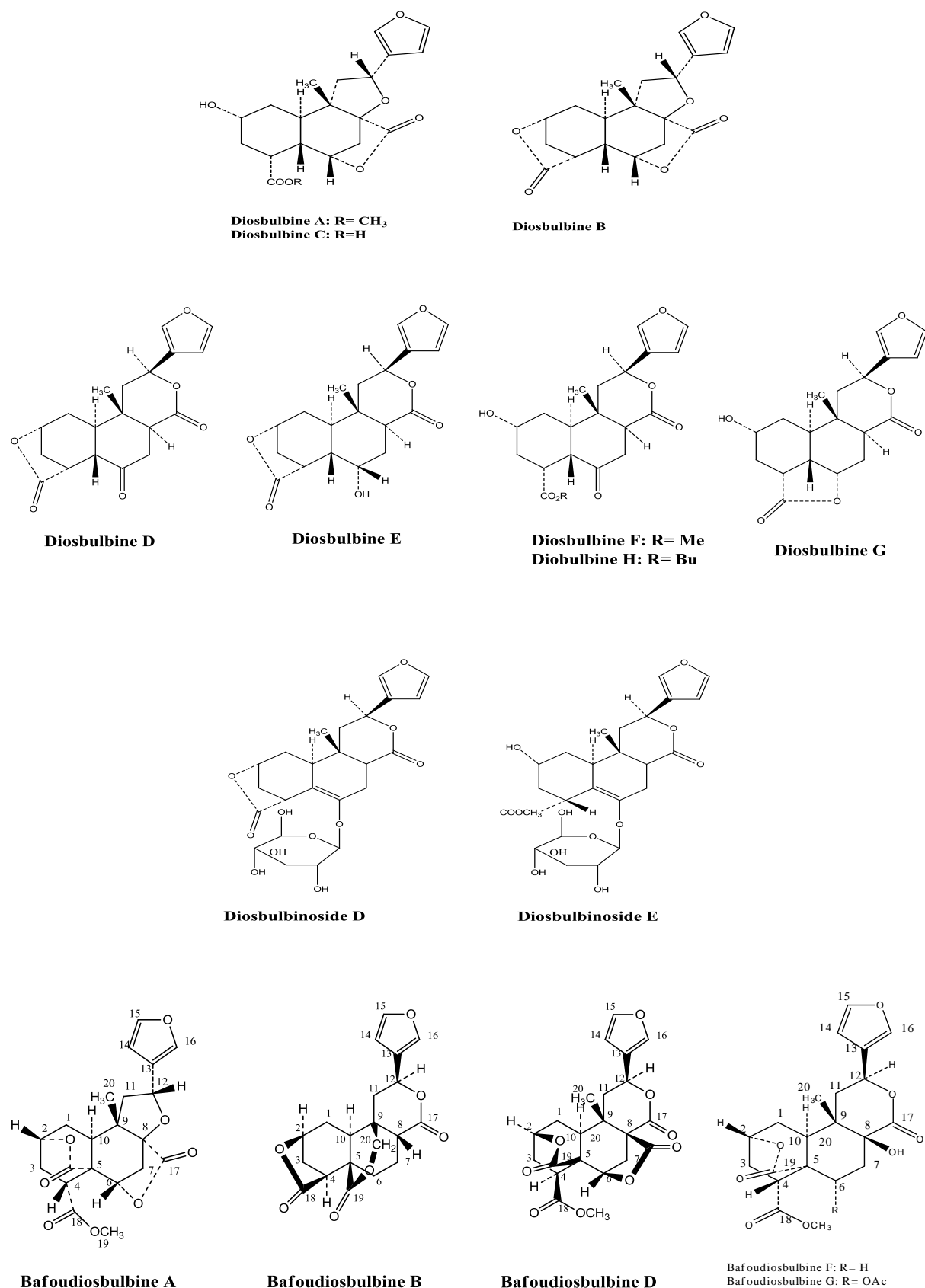


Figure 11 : Structure des Diosbulbines A-G, Diosbulbinoside D-E, Bafoudiosbulbines A, B, D, F et G isolés de *Dioscorea*

➤ Les phénanthrènes et stilbènes

Les phénanthrènes forment un groupe relativement restreint de composés naturels aromatiques qui sont vraisemblablement formés par couplage oxydatif des cycles aromatiques de précurseurs de type stilbène. C'est pour cette raison qu'ils seront présentés ensemble. Toutefois, certains phénanthrènes sont issus de l'aromatisation de précurseurs diterpéniques. La plupart des phénanthrènes ont été isolés de plantes supérieures de la famille des Orchidaceae, mais un certain nombre ont été obtenus chez les Betulaceae, les Combretaceae et les Dioscoreaceae.

Une série de dihydrostilbènes a été isolée des tubercules de différents *Dioscorea*, uniquement lorsqu'ils étaient infectés par le champignon *Botrydipodia*, et certains de ces composés qui ont montré une activité antifongique contre une série de moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*) et antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli*, sont considérés comme des phytoalexines induites par le champignon. Ainsi, la dihydropinosylvine a été isolée de *D. batatas*, *D. rotundata* et *D. magenotiana* et le dihydroresvératrol de *D. bulbifera* et *D. dumentorum*. Les batatasines III et IV et leurs dérivés déméthylés l'ont été de *D. rotundata* et *D. alata* [97-99]. Enfin, le 4,2'-dihydroxy-3,5-diméthoxydihydrostilbène des tubercules de *D. magenotiana* infectés par *Botrydipodia teobromae*, pathogène des ignames [100].

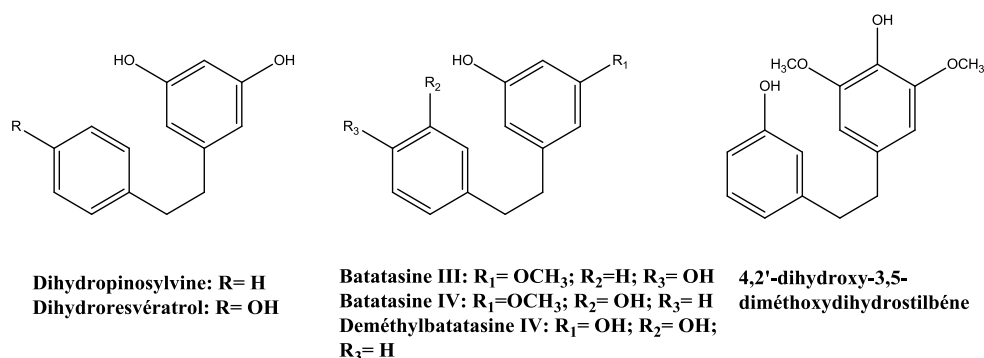
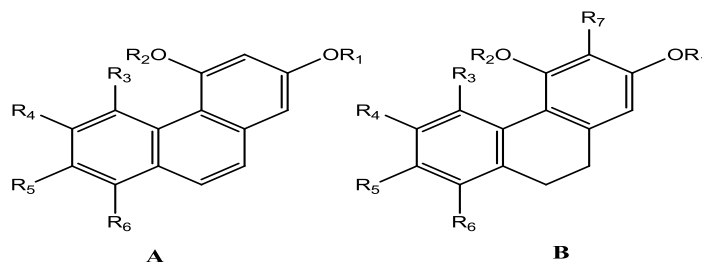


Figure 12 : Structures de quelques stilbènes isolés de *Dioscorea*

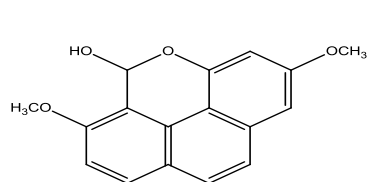
Des dérivés du phénanthrène et du dihydrophénanthrène ont été caractérisés dans les tubercules de *Dioscorea*, tels que l'Hircinol et le 7-hydroxy-2,4,6- triméthoxyphénanthrène de *D. rotundata*, le 2,7-dihydroxy-1,3,5-triméthoxy-9,10- dihydrophénanthrène de *D. descipiens*, le Prazérol de *D. prazeri*, la Batatasine I et ses analogues à partir de *D. batatas* [101,102].

Une quinone (6,7-dihydroxy-2-méthoxy-1,4-phénanthrènedione) a été caractérisé dans la partie aérienne de *D. opposita* [103]. Aussi une phénanthraquinone (Diocoreanone E) et des naphtofuranoxépines (Dioscorealides A et B) ont été isolées de *D. membranacea*.

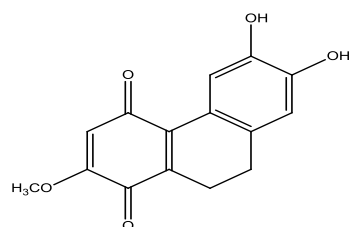
Ainsi, la Dioscorone A, composé tétracyclique a été caractérisée chez *D. futschauensis* [104].



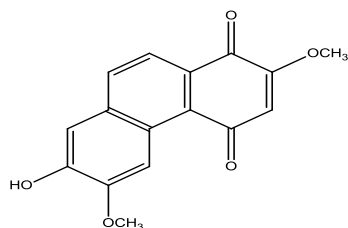
Structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Phénanthrènes (A) Batatasine I	CH ₃	CH ₃	H	OH	H	OCH ₃	
Dihydrophénanthrènes (B) Hircinol	H	CH ₃	OH	H	H	H	H
(B) Prazérol	CH ₃	CH ₃	OH	OH	H	H	OCH ₃



C: Dioscorone A



D: 6,7-Dihydroxy-2-méthoxy-1,4-phénanthrènedione



E: Dioscoreanone

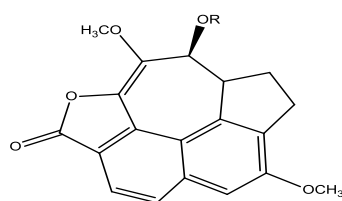
F: Dioscorealide A: R = CH₃
G: Dioscorealide B: R = H

Figure 13 : Structures des majeurs phénanthrènes, dihydrophénanthrènes et des naphtofuranoxépines (Dioscorealides A et B) isolés de *Dioscorea*

II.2.4. Les propriétés pharmacologiques des espèces du genre *Dioscorea*

Le genre *Dioscorea* a été largement étudié du point de vue de leurs activités biologiques et thérapeutiques potentielles. Les recherches ont été entreprises soit avec des extraits bruts, soit avec des fractions ou encore avec les composés isolés.

- **Activités cytotoxiques**

Plusieurs espèces, utilisées seules ou faisant partie des ingrédients de remèdes traditionnels, ont été étudiées pour leurs activités cytotoxiques :

- *D. bulbifera* : La fraction soluble dans l'AcOEt de l'extrait EtOH à 75% révèle un effet inhibiteur de promoteur de tumeur des cellules épidermiques JB6 de souris [105].

- *D. panthaica* : Les Dioscorésides A et B (saponosides stéroïdiques), ont montré une activité cytotoxique, *in vitro*, sur les lignées cellulaires HeLa, A 375-52 et L929 [106].

- *D. collettii* var *hypoglauca* : La Protonéodioscine est toxique contre les principales lignées cellulaires de leucémie, du cancer du système nerveux central et du cancer de la prostate [107]. La méthyl-protodioscine (NSC-698790) a un effet anti-prolifératif sur les cellules cancéreuses hépatiques Hep G2 (possibilité d'une activité antimittotique).

- *D. membranacea* et *D. birmanica* : Les extraits aqueux et EtOH ont révélé des activités cytotoxiques élevées et sélectives contre différents types cellulaires [108].

- **Activités anti-oxydantes**

Des extraits d'ignames sauvages (*Dioscorea sp.*) du Népal, renfermant des composés phénoliques, ont montré des propriétés anti-oxydantes intéressantes [109].

- **Activités anti-inflammatoire**

La phénanthraquinone (dioscoréanone) ainsi les deux dioscoréalides A et B isolés de *D. membranacea* : présentent une activité potentielle contre le TNF- α libéré. Ces toxines ont conduit à l'utilisation de la plante par les médecins traditionnels pour le traitement des maladies inflammatoires [89].

- **Propriétés antivirales**

L'extrait aqueux de *D. birmanica* et l'extrait EtOH de *D. membranacea* ont montré des effets inhibiteurs contre la HIV-1 intégrase (CI₅₀ respectives de 4,5 et 4,7 $\mu\text{g/ml}$). L'extrait

EtOH de *D. membranacea* a révélé une activité contre la HIV-1 protéase (CI₅₀ = 48 µg/ml) [110].

- **Propriétés antifongiques**

La prosapogénine A de la dioscine, isolée de *D. cayenensis*, a montré une activité antifongique contre des levures pathogènes pour l'homme : *Candida albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*, avec des CMI respectives de 20,8, 6,2 et 25,0 µg/ml [111].

- **Propriétés antibactériennes**

L'extrait dichlorométhane ainsi que les deux clérodanes (Bafoudiosbulbines A et B) isolés de *D. bulbifera* L. *sativa* ont révélés des activités antibactériennes significatives contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S.paratyphi A* et *S.paratyphi B* [97], aussi les extraits MeOH aqueux et AcOEt de *D.dregeana* ont été actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* [112].

II.3. Présentation de l'espèce *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin

II.3.1. Définition

D. communis est une plante herbacée vivace sauvage, commune en Europe, en Asie et dans le Nord de l'Afrique de la famille des Dioscoréacée, prend différents noms communs tel que El-Karma Saouda, herbe aux femmes battues, raisin du diable, black bryony, blackeye, albarri, brionia negra, nueza negra, lady's seal et siyah akasma.

II.3.2. Classification botanique

La classification botanique de *D. communis* est présentée comme suite selon [113].

- **Régne** : Plantae
- **Division** : Magnoliophyta
- **Classe** : Liliopsida
- **Ordre** : Liliales
- **Famille** : Dioscoreaceae
- **Genre** : *Dioscorea*

II.3.3. Origine et répartition géographique

D. communis est une plante originaire d'Afrique du Nord, Asie occidentale, Europe centrale et méridionale et Proche-Orient, son demeure dans les bois et sous-bois, les haies, les taillisbroussailles, barrières, à basse altitude [114]. Concernant le Maroc et l'Algérie on la rencontre dans le Tell et les hautes buttes [115].

II.3.4. Description

D. communis est une plante herbacée vivace, rhizomateuse, grimpante, lianescente de 2 à 3 m d'hauteur, dioïque, glabre, à tige grêle, cylindrique, striée, dépourvue de vrilles ; la racine est grosse noirâtre tubérisée, ressemblant à un gros navet et pouvant peser plusieurs kilos. Les feuilles sont alternes en forme de fer de lance ou cordiformes très effilées en pointe, aux nervures fortement marquées et pourvues de deux stipules épineux [116]. La floraison aura lieu au printemps (Avril-Juin selon le climat). Les fleurs femelles étoilées (5-7 mm) de couleur jaune verdâtre, les mâles sont réunis en panicules [117]. Les fruits sont sous forme de baies charnues rouges, juteuses, renfermant 5 graines sphériques (fig.14)



Plante



Rhizome



Feuilles



Fruits

Figure 14: Aspect morphologique de la plante *Dioscorea communis*

II.3.5. Utilisations traditionnelles et médicales

D. communis est dans son ensemble un gros rhizome noirâtre contient un lait astringent (oxalates de calcium) qui peut provoquer des dermatites de contact [118].

La pulpe était autrefois prescrite comme purgatif et diurétique, est principalement utilisée pour ses propriétés antinévralgiques en usage externe sous forme de cataplasme (racine cuite) pour traiter les hématomes et les ecchymoses [114].

Les racines sont douées d'activité diurétique, hémolytique, émétique, cathartique et rubéfiante. Elle est même recommandée dans le traitement de la coqueluche, bronchite et contusions [119].

Les rhizomes et tubercules sont utilisés en médecine folklorique comme rubéfiant, dans le traitement du rhumatisme, arthrose, lumbago et dermatose [120].

Les fruits de *D. communis* doués d'activité anti-inflammatoire sont frottés sur la peau pour soulager les douleurs arthritiques et rhumatismales [121].

D'autres parts, différentes parties de la plante sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des tumeurs et polypes [122].

II.3.6. Travaux phytochimiques antérieurs

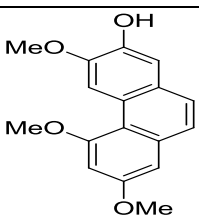
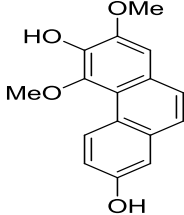
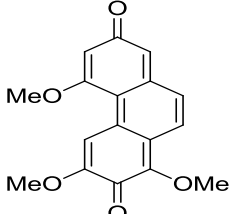
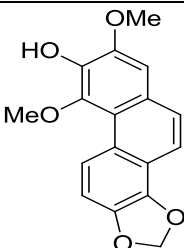
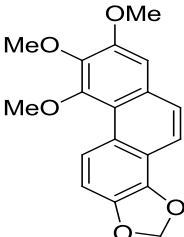
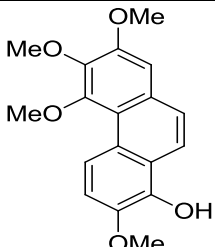
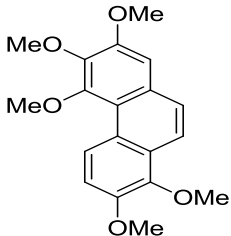
Les investigations phytochimiques réalisées sur *D. communis* ont indiqué la présence de nombreux composants tels que : Spirostanes, furostanes, glycosides, stérols (les plus importants identifiés sont : β -sitostérol, Stigmastérol, Campesterol), caroténoïdes et substitués hydroxy/alkoxyphénanthrènes [123,124].

Cette espèce renferme ainsi des cristaux d'oxalate de calcium, des histamines [118] et des flavonoïdes telles que : La diosgénine, kaempferol-3,4'-di-O- α -L-rhamnopyranoside et trois flavonoïdes connus, kaempférol-4'-O- α -L-rhamnopyranoside, kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside, et serpyllin, qui ont été isolées pour la première fois à partir de cette plante [125,126].

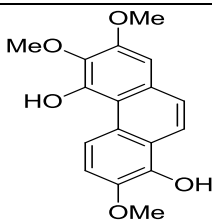
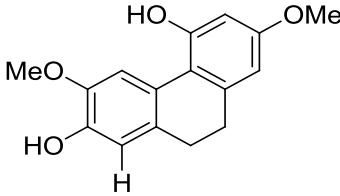
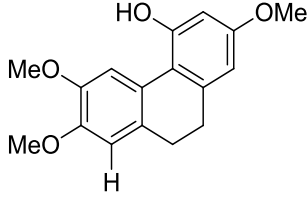
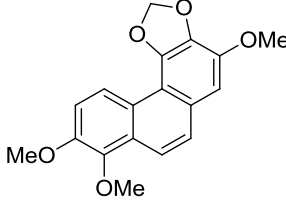
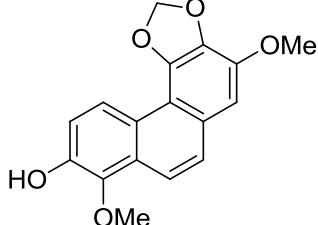
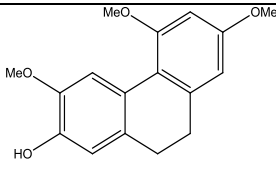
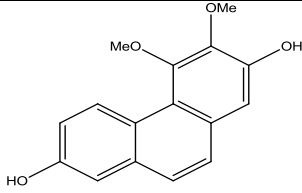
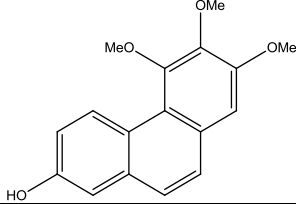
Les principes actifs seraient surtout les phénanthrènes et les saponosides dérivés de la diosgénine, qui sont responsables de plusieurs effets biologiques [120].

Les phénanthrènes et leurs dérivés ont été également isolés des extraits de rhizomes de *D. communis*, cas du 3-hydroxy-2,4-diméthoxy-7,8-méthylendioxyphénanthrène et du 2,7-dihydroxy-1-méthyl-5-vinylphénanthrène [127, 128,122] et le tableau-4 représente la majorité des phénanthrènes et dihydrophénanthrènes isolés de notre espèce.

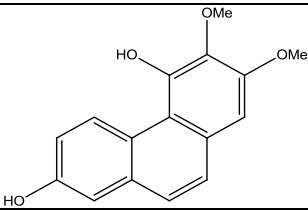
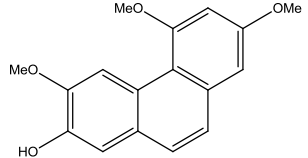
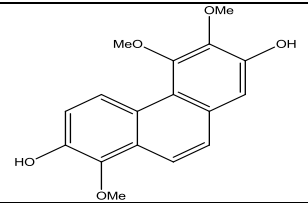
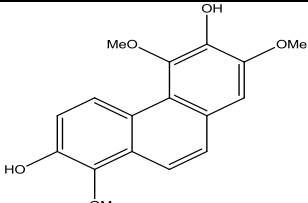
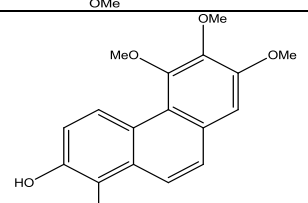
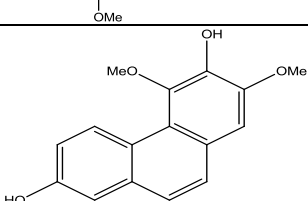
Tableau-4 : Les phénantrènes et les dihydrophénantrènes

Nom	Structure	Référence
2-hydroxy-3,5,7-trimethoxyphénantrène		[124]
3,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphénantrène		[124]
1,3,5-trimethoxyphénanthrene-2,7-dione		[124]
3-hydroxy-2,4-dimethoxy-7,8-méthylénedioxyphénantrène		[124]
2, 3,4-trimethoxy-7,8-méthylénedioxyphénantrène		[124]
8-hydroxy-2,3,4,7-tetraméthoxyphénantrène		[124]
2, 3, 4, 7,8-pentaméthoxyphénantrène		[124]

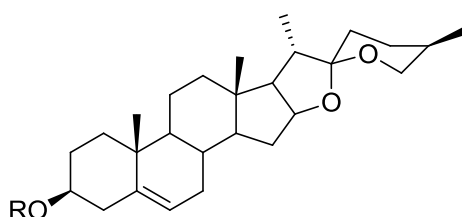
Suite tableau-4 :

4,8-dihydroxy-2, 3,7-trihydroxyphénantrène		[124]
4,7-dihydroxy-2,6-dimethoxydihydrophénantrène		[129]
4-hydroxy-2, 6,7-trimethoxyphénantrène		[129]
2,7,8-trimethoxy-3,4-méthylènedioxyphénantrène		[127,130]
7-hydroxy-2,8- dimethoxy-3,4-méthylènedioxyphénantrène		[127,130]
7-hydroxy-2,4,6-trimethoxydihydrophénantrène		[122]
2,7-dihydroxy-3,4-diméthoxyphénantrène		[131]
7-hydroxy-2,3,4-triméthoxyphénantrène		[131]

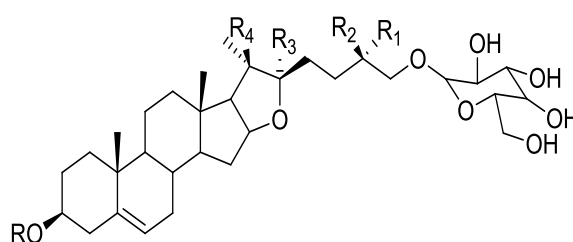
Suite Tableau-4 :

4,7-dihydroxy-2,3-dimethoxyphénantrène		[124]
7-hydroxy-2,4,6-trimethoxyphénantrène		[124]
2,7-dihydroxy-3,4,8-trimethoxyphénantrène		[131]
3,7-dihydroxy-2,4,8-trimethoxyphénantrène		[131]
7-hydroxy-2,3,4,8-tetramethoxyphénantrène		[122]
3,7dihydroxy-2,4-dimethoxyphénantrène		[129,124]

Les **spirostanes** et les **furostanes** glycosides qui sont caractéristique de la famille Dioscoréacées (1, 2, 3a - 3d) [130].



1 R=Glu-Rha2
2 R=Glu2-Rha



	R	R1	R2	R3
3a	glu-rha2	H	CH3	OCH3
3b	glu-rha2	CH3	H	OCH3
3c	glu-rha2	H	CH3	$\Delta_{20,22}$
3d	glu-rha2	H	CH3	OCH3

D'autre investigation phytochimique ont indiqué la présence des **stérols A, B** et **Histamine C** dans cette plante [121,125].

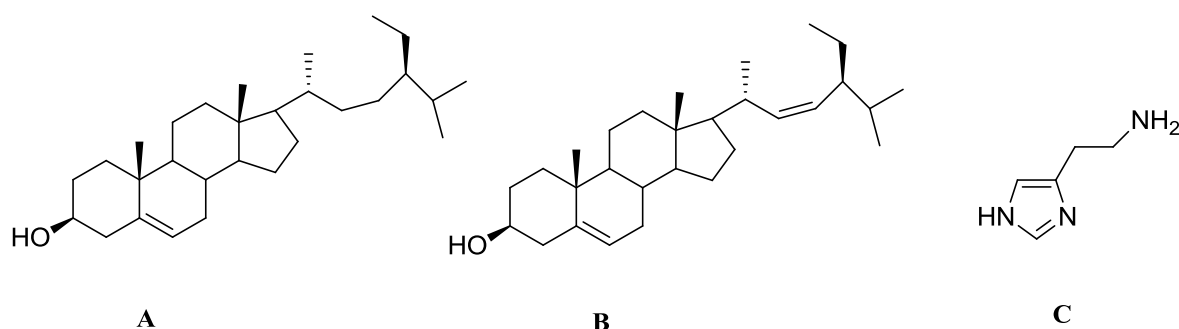


Figure 15 : Structure des Stérols A, B et de l'Histamine C

Récemment deux furanocoumarines ont été isolé à partir de l'extrait methanolique [132].

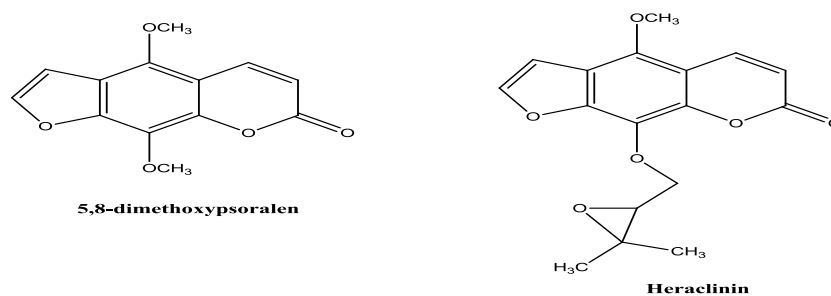


Figure 16 : Structures des deux Furanocoumarines

II.3.7. Données pharmacologiques

Des études ont démontré que des extraits de rhizomes de *D. communis* contiennent des glycosides stéroïdiens et phénanthrènes ayant un potentiel cytotoxique, anticancéreux, antiviraux antimicrobiens et anti-inflammatoires [122].

II.3.8. Données toxicologiques

Les tubercules de *D. communis* peuvent provoquer une irritation une fois frottée sur la peau. La plante bénéficie d'une réputation, totalement usurpée, d'action curatrice des ecchymoses ; cet usage est à proscrire formellement, les risques de dermatites étant bien supérieurs aux bénéfices attendus [118]. Les analyses chimiques ont montré la présence d'histamine dans le mucilage de rhizome de *D. communis*, ce qui peut contribuer à des réactions de dermatite de contact chez l'homme [125]. En outre, les glycosides stéroïdes et les phénanthrènes isolés des rhizomes de *D. communis* suggèrent que ces éléments exercent une activité cytotoxique chez les animaux, mais leurs effets sur l'homme ne sont pas encore connus [122]. La racine, dont la pulpe est rubéfiante et vésicante provoque des ampoules sur la peau.

Références bibliographiques

- [1] Rodolphe-Edouard S., Vincent V., Savolainen., Murielle F., Daniel J. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. Presses polytechniques et universitaires romandes, pp. 188.
- [2] Gurcharan S. (2004). Plant Systematics : an Integrated Approach, Science Publishers, pp.419.
- [3] Christensen K. I. (1992). Revision of *Crataegus* sect. *Crataegus* and *nothosect. Crataeguineae* (Rosaceae-Maloideae) in the Old World. Systematic botany monographs. Ann Arbor, Mich, American Society of Plant Taxonomists, 35.
- [4] Verma SK., Jain V., Verma D., Khamesra R. (2007). *Crataegus oxyacantha*- A cardioprotective herb. J Herbal Med Toxicol, 1, 65-71.
- [5] Farhat R. (2007). Etude de la fraction lipidique et la composition en acides gras des huiles des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Ziziphus lotus* L. Mémoire de magister. Université El Hadj-Lakhder, Batna, pp. 109.
- [6] Chang Q., Zuo Z., Chow M.S.S., Ho W. K. K. (2006). Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) fruits and a hawthorn drink. Food chemistry, 98, 426-430.
- [7] Bruneton J. (1999). Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales, (3^{ème} éd). Tec & Doc (Ed). Paris, pp. 1120.
- [8] Wichtel M., Anton R. (1999). Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale. Science et thérapeutique. Tec&Doc (Ed).
- [9] Chang Q., Zuo Z., Harrison F., Chow M.S.S. (2002). Hawthorn. J clinical pharmacology, 42, 605-612.
- [10] Fong Harry H.S., Bouman J.L. (2002). Hawthorn. J of cardiovascular nursing, 16, 1-8.
- [11] Bahorun T., Aumjaud E., Ramphul H., Rycha M., Luximon-Ramma A., Trotin F. , Aruoma OI. (2003). Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. Nahrung, 47, 191-198.
- [12] Nikolov NT., Vodenicharov RI. (2003). Di-C-glycosides from *Crataegus monogyna*. Chem Nat Compd, 11, 436-437.
- [13] Hosseinimehr SJ., Azadbakht M., Mousavi SM., Mahmoudzadeh A., Akhlaghpour S. (2007). Radioprotective effects of hawthorn fruit extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. J Radiat Res, 48, 63-67.
- [14] Orhan I., Ozcelik B., Kartal M., Ozdeveci B., Duman H. (2007). HPLC Quantification of vitexine-2-O-rhamnoside and hyperoside in three *Crataegus* species and their antimicrobial and antiviral activities. Chromatographia, 66, 153-157.

- [15] Maurya R., Yadav P.P. (2005). Furanoflavonoids: An overview. *Nat Prod Rep*, 22, 400-424.
- [16] Lin Y., Vermeer M.A., Trautwein E.A. (2009). Triterpenic acids present in hawthorn lower plasma cholesterol by inhibiting intestinal ACAT activity in hamsters. *eCAM* 1-9: doi:10.1093/ecam/nep007.
- [17] Chen J., Song S., He J., Xu S. (2008). A study of the chemical constituents of the leaves of *Crataegus pinnatifida*. *Asian J Trad Med*, 3, 80-83.
- [18] Zhang PC., Xu XU. (2001). Flavonoid ketohexosefuranosides from the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E.Br. *Phytochemistry*, 57, 1249-1253.
- [19] Svedstrom U., Vuorela H., Kostianen R., Tuominen J., Kokkonen J., Rauha JP., Laakso I., Hiltunen R. (2002). Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry*, 60, 821- 825.
- [20] Melikoglu G., Bitis L., Mericli AH. (2004). Flavonoids of *Crataegus microphylla*. *Nat Prod Res*, 18, 211-213.
- [21] Demiray S., Pintado M.E., Castro P.M.L. (2009). Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Acad Sci Eng Technol*, 54, 312-317.
- [22] Liu P., Kallio H., Lu D., Zhou C., Ou S., Yang B. (2010). Acids, sugars, and sugar alcohols in chinese hawthorn (*Crataegus spp.*) fruits. *J Agric Food Chem*, 58, 1012-1019.
- [23] Sozer U., Donmez A.A., Mericli A.H. (2006). Constituents from the leaves of *Crataegus davisii* Browicz. *Sci Pharm*, 74, 203-208.
- [24] Ringl A., Prinz S., Huefner A., Kurzmann M., Kopp B. (2007). Chemosystematic value of flavonoids from *Crataegus x macrocarpa* (Rosaceae) with special emphasis on (R)- and (S)-eriodictyol-7-O-glucuronide and luteolin-7-O-glucuronide. *Chem Biodivers*, 4, 154-162.
- [25] Horvat R.J., Chapman G.W. (2007). Identification of volatile compounds from ripe Mayhaw fruit (*Crataegus opaca*, *C. aestivalis*, and *C. rufula*). *J Food Quality*, 14, 307- 312.
- [26] Kuliev V.B., Poletaeva L.V. (1984). Polysaccharides of *Crataegus* Dinesh Kumar et al. *Rev. Bras.Farmacogn. / Braz. J. Pharmacogn.* II. Polysaccharides of the fruit of *Crataegus meyeri*. *Chem Nat Compd*, 20, 100-101.
- [27] Batyuk V.S. (1966). Structure of the flavonoids of *Crataegus curvisepala*. *Chem Nat Compd*, 2, 233-234.
- [28] Kuliev V.B., Poletaeva L.V. (1983). Polysaccharides of *Crataegus*. II. Polysaccharides of the fruit of *Crataegus meyeri*. *Chem Nat Compd*, 18, 612-613.
- [29] Gazizov F.Y., Glushenkova A.I. (1996). Phospholipids of the pericarp of *Crataegus turkestanica*. *Chem Nat Compd*, 31, 465-466.

- [30] Kovaleva A.M., Goncharov N.F., Komissarenko A.N. (2009). GC/ MS study of essential oil components from flowers of *Crataegus jackii*, *C. robesoniana*, and *C. flabellate*. Chem Nat Compd ,45, 582-584.
- [31] Bersin T., Muller A., Schwarz H. (1955). Ingredients of *Crataegus oxyacantha* L. III.Heptahydroxyflavan glycoside. Arzneimittelforschung, 5, 490-491.
- [32] Rewerski W., Lewak S. (1967). Some pharmacological properties of flavan polymers isolated from hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). Arzneimittelforschung, 17, 490-491.
- [33] Aneta W., Oszmianski J. (2007). Influence of polyphenols isolated from *Scutellaria baicalensis Georgi* and *Crataegus oxyacantha* on the oxidative stability of cholesterol in butter stored in various conditions. Eur Food Res Technol, 224, 635-642.
- [34] Kashnikova M.V. (1984). Flavonoids of the flowers of *Crataegus sanguinea*. Chem Nat Compd ,20, 105-106.
- [35] Bahri-Sahloul R., Ammar S., Fredj R.B., Saguem S., Gree S., Trotin F., Skhiri F.H. (2009). Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties. Pakistan J Biol Sci, 12, 660-668.
- [36] Maharik N., Elgengaihi S., Taha H. (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica boiss*. Int J Acad Res, 1, 30-34.
- [37] Amanzadeh Y., Khanavi M., Khatamsaz M., Rajabi A., Ebrahimi S.E.S. (2007). High performance thin-layer chromatographic fingerprints of flavonoids and phenol carboxylic acids for standardization of Iranian species of the genus *Crataegus* L. Iranian J Pharm Sci, 3, 143-152.
- [38] Rayyan S., Fossen T., Nateland H.S., Andersen O.M . (2005). Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug '*Crataegi folium cum flore*' (*hawthorn*). Phytochem Anal, 16, 334-41.
- [39] Ikeda T., Ogawa Y., Nohara T. (1999). A new triterpenoid from *Crataegus cuneata*. Chem Pharm Bull ,47, 1487-1488.
- [40] Ahmed A.A., Khattab A.M., Grace M.H., Sahl M.M. (2001). A new eudesmanolide from *Crataegus flava* fruits. Fitoterapia ,72, 756-759.
- [41] Vivar-Vera M.A., Salazar-Montoya J.A., Calva-Calva G., Ramos- Ramirez E.G. (2007). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. Food Sci Technol, 40,278- 284.
- [42] Bykov V.I., Glyzin V.I. (1972). Flavonoids of the genus *Crataegus*. Chem Nat Compd, 8, 672-673.
- [43] Long S.R., Carey R.A., Crofoot K.M., Proteau P.J., Filtz T. M. (2006). Effect of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. Phytomedicine, 13, 643-650.

- [44] Degenring F.H., Suter A., Weber M., Saller R. (2003). A randomized double blind placebo controlled clinical trial of a standardised extract of fresh *Crataegus* berries (Crataegisan®) in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine*, 10, 363-369.
- [45] Tadic V.M., Dobric S., Markovic G.M., Sofija M., Tanja S. (2008). Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radicalscavenging and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *J Agr Food Chem*, 56, 7700- 7709.
- [46] Jayalakshmi R., Thirupurasundari C.J., Niranjali D.S. (2006). Pretreatment with alcoholic extract of *Crataegus oxyacantha* (AEC) activates mitochondrial protection during isoproterenol -induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem*, 292, 59-67.
- [47] Garjani A., Nazemiyeh H., Maleki N., Valizadeh H. (2000). Effects of extracts from flowering tops of *Crataegus meyeri* A. Pojark.on ischaemic arrhythmias in anaesthetized rats. *Phyther Res*, 14, 428-431.
- [48] Kao E.S., Wang C.J., Lin W.G., Yin Y.F., Wang C.P., Tseng T.H. (2005). Anti-inflammatory potential of flavonoid contents from dried fruit of *Crataegus pinnatifida* in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*, 53,430-436.
- [49] Hanus M., Lafon J., Mathieu M. (2004). Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders. *Curr Med Res Opin*, 20,63-71.
- [50] Anna S., Oszmian J., Aneta W. (2007). Antioxidant activity of phenolic compounds of Hawthorn, pine, skullcap. *Food Chemistry*, 103, 853-859.
- [51] Ljubuncic P., Azaizeh H., Cogan U., Bomzon A. (2006). The effects of a decoction prepared from the leaves and unripe fruits of *Crataegus aronia* in streptozotocininduced diabetic rats. *J Complement Med*, 3: 6. doi: 10.2202/1553-3840.1027.
- [52] Ljubuncic P., Portnaya I., Cogan U., Azaizeh H., Bomzon A. (2005). Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *J Ethnopharmacol*, 101, 153-161.
- [53] Kirakosyan A., Seymour E., Kaufman BP., Warber S., Bolling S., Chang C.S. (2003). Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *J Agr Food Chem*, 51, 3973-3976.
- [54] Andrade-Cetto A., Heinrich M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*, 99, 325-348.
- [55] Arrieta J., Siles-Barrios D., García-Sánchez J., Reyes-Trejo B., Sanchez-Mendoza M. (2010). Relaxant effect of the extracts of *Crataegus mexicana* on guinea pig tracheal smooth muscle. *Pharmacogn J*, 2, 40-46.

- [56] Kocoyildiz Z.C., Birman H., Olgac V., Akgun-Dar K., Meliko G., Mericli A.H. (2006). *Crataegus tanacetifolia* leaf extract prevents L-NAME-induced hypertension in rats: a morphological study. *Phytother Res*, 20, 6-70.
- [57] Ebrahimzadeh M.A., Bahramian F. (2009). Antioxidant activity of *Crataegus pentagyna* fruit extract used as traditional medicine in Iran. *Pakistan J Biol Sci*, 12, 413-419.
- [58] Shahat A.A., Hammouda F., Ismail S.I., Azzam S.A., De Bruyne T., Lasure A., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J. (1996). Anti-complementary activity of *Crataegus sinaica*. *Planta Med*, 62, 10-13.
- [59] Shahat A., Ismail S., Hammouda F. (1998). Anti-HIV activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Phytomedicine*, 2, 133-136.
- [60] Schroder D., Weiser M., Klein P. (2003). Efficacy of a homeopathic *Crataegus* preparation compared with usual therapy for mild (NYHA II) cardiac insufficiency: results of an observational cohort study. *Eur J Heart Fail*, 5, 319-26.
- [61] Guven K., Yucel E., Cetintas F. (2006). Antimicrobial activities of fruits of *Crataegus* and *Pyrus*. Species. *Pharm Biol*, 44, 79-83.
- [62] Ju L.Y. (2005). *Crataegus oxyacantha* (aubepine) in the use as herb medicine in France. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 30, 634-40.
- [63] Rigelsky J.M., Sweet B.V. (2002). Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses. *Am J Health Syst Pharm*, 59, 417- 422.
- [64] Khalil R., Abuharfeil N., Shabsoug B. (2008). The effect of *Crataegus aronica* aqueous extract in rabbits fed with high cholesterol diet. *Eur J Sci Res*, 22, 352-360.
- [65] Kao E.S., Wang C.J., Lin W.L., Chu C.Y., Tseng T.H. (2007). Effects of polyphenols derived from fruit of *Crataegus pinnatifida* on cell transformation, dermal edema and skin tumor formation by phorbol ester application. *Food Chem Toxicol*, 45, 1795-1804.
- [66] Mazzocchi J., Dalioche G., Frenot U. (1999). *Glaner dans le midi*. Tetrass (Ed). Paris, pp. 169.
- [67] Bignami C., Poalocci A., Scossa A., Bertazza G. (2000). Preliminary evaluation of nutritional and medicinal component of *Crataegus azarolus* fruits. *Journal of food Engineering*, 5, 241-247.
- [68] Gloaguen J.C. (1982). *Connaitre et reconnaitre les arbres et les arbustes des forêts et compagnes*. Ouest France (Ed). Paris, pp. 222.
- [69] Quezel P., Santa S. (1962). *Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques Méridionales*. Tome1. Centre National de la Recherche scientifique (Ed). Paris, pp. 566.
- [70] Abdssemmed H. (2009). *Etude de d'activité biologique des extraits du fruit de Crataegus azarolus L.* Mémoire de magistère, pp.04.

- [71] Ozcan M., Haciseferogullari H., Maracoglu T., Arslan D. (2005). Hawthorn (*crataegus spp.*) fruit: some physical and chemical properties. J of food Engineering, 68, 409-413.
- [72] Dzhangaliev A. O., Salova T. N., Turekhannova P. M. (2002). The wild fruit and nut plants of Kazakhstan. Horticultural Reviews, Jules Janick Kazakhstan, 29, 306.
- [73] Saadoudi M. (2008). Etude de la fraction glucidique des fruits de : *Celtis australis L.*, *Crataegus azarolus L.*, *Crataegus monogyna Jacq.*, *Elaeagnus angustifolia L* et *Ziziphus lotus L*. Mémoire de Magister. Université El Hadj-Lakhder, Batna, pp.80.
- [74] Baba Aissa F. (1999). Les plantes médicinales en Algérie. Bouchène et Addiwen (Ed). Alger, pp. 181.
- [75] Ferhat R. (2008). Etude de la fraction lipidique et la composition en acides gras des fruits de : *Celtis australis L.*, *Crataegus azarolus L.*, *Crataegus monogyna Jacq.*, *Elaeagnus angustifolia L* et *Ziziphus lotus L*. Mémoire de Magistère. Université El Hadj-Lakhder, Batna, pp.102.
- [76] Boudraa S. (2008). Etude de la fraction minérale et vitaminique des fruits de : *Celtis australis L.*, *Crataegus azarolus L.*, *Crataegus monogyna Jacq.*, *Elaeagnus angustifolia L* et *Ziziphus lotus L*. Mémoire de Magistère Université El Hadj-Lakhder, Batna, pp.137.
- [77] Hadjimitsi E., Zabitakis I. (2005). The Aroma of jam prepared from fruits of masphilla (*Crataegus azarolus L.*). Favour and Fragrance J, 20(5), 507-511.
- [78] Rita Bilia A., Eterno F., Bergorizi M. C., Mazzi G., Vencieri F. F. (2007). Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures and tinctures: the case of *Crataegus oxyacantha L.* and *Hieracium pilosella L.* J of Pharmaceutical and Biomedical analysis, 44, 70-78.
- [79] Bruneton J. (1993). Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales, (2e éd). Tec & Doc (Ed). Paris, pp. 520.
- [80] Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Tuominen J., Kokkonen J., Rauha J.P., Laakso I., Hiltunen R. (2002a). Isolation and identification of oligomeric procyanidines from *Crataegus* leaves and flowers. Photochemistry, 60(8), 821-825.
- [81] Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Huovinen K., Laakso I., Hiltunen R. (2002b). High performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidines from dimers up to the hexamer in hawthorn. J of chromatography "A", 968, 53-60.
- [82] Mabberley (1997). The plant book, 2nd 2^d. Cambridge University Press.
- [83] Burkill I.H., Perrier de la Bâthie H. (1950). La flore de Madagascar et des Comores. 44^{ème} famille : Dioscoreaceae. Muséum National d'Histoire Naturelle (Phanérogamie), Paris.
- [84] FAO (1991). Racines, tubercules, plantains et bananes dans la nutrition humaine. Collection FAO Nutrition, 24.

- [85] Laveaga G.S. (2005). Uncommon trajectories : steroid hormones, Mexican peasants, and the search for a wild yam. *Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed.Sci.* 36, 743-760.
- [86] Sautour M., Mitaine-Offer A-C., Lacaille-Dubois M-A. (2007). The *Dioscorea* genus : a review of bioactive steroid saponins. *J. Nat. Med.*, 61, 91-101.
- [87] Sautour M., Miyamoto T., Lacaille-Dubois M.A. (2006). Steroidal saponins and flavan-3-ol glycosides from *Dioscorea villosa*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 34(1), 60-63.
- [88] Savikin-Fodulovic K., Grubisic D., Culafic L., Menkovic N., Ristic M. (1998). Diosgenin and phytosterols content in five callus lines of *Dioscorea balcanica*. *Plant Science*, 135, 63-67.
- [89] Tewtrakul S., Itharat A. (2007). Characterisation of steroidal saponins in crude extract from *Dioscorea nipponica* Makino by liquid chromatography tandem multi-stage mass spectrometry. *Anal.Chim. Acta*, 599, 98-106.
- [90] Liu X.T., Wang Z.Z., Xiao W., Zhao H.W., Hu J., Yu B. (2008). Cholestane and spirostane glycosides from the rhizomes of *Dioscorea septemloba*. *Phytochemistry*, 69, 1411-1418.
- [91] Amarasekara A.S., Hassner A. (1987). Stereospecific and stereochemical structure confirmation of dumetorine. *Tetrahedron Lett*, 28 (27), 3151-3154.
- [92] Mulholland D.A., Crouch N., Decker B., Smith M.T. (2002). The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana*. *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 183-185.
- [93] Kawasaki T., Komori T., Setoguchi S. (1968). Furanoid norditerpenes from Dioscoreaceae plants. I. Diosbulbins A, B and C from *Dioscorea bulbifera* L. forma *spontaneae* Makino et Nemoto. *Chem. Pharm. Bull.* 16 (12), 2430-2435.
- [94] Komori T., Arita M., Ida Y., Fujikura T., Kawasaki T., Sekine K. (1973). Furanoid norditerpene aus Pflanzen der familie Dioscoreaceae, zur stuktur des diosbulbine -A, -B und - C. *Liebigs Ann. Chem.* 978-992.
- [95] Ida Y., Komori T., Kawasaki T. (1978a). Furanoid-norditerpene aus Pflanzen der Familie Dioscoreaceae. VI Kristallstrukturanalyse von diosbulbin-G. *Liebigs Ann. Chem.* 834-838.
- [96] Ida Y., Noda N., Kubo S., Komori T., Kawasaki T. (1978c). Furanoid-norditerpenes from *Dioscorea* *Chem. Pharm. Bull.* 26, 435-439.
- [97] Teponno R.B., Tapondjou A.L., Gatsing D., Djoukeng J.D., Abou-Mansour E., Tabacchi R., Tane P., Stoekli-Evans H., Lontsi D. (2006). Bafoudiosbulbins A and B two anti-salmonellal clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var *sativa*. *Phytochemistry*, 67, 1957-1963.
- [98] Takasugi M., Kawashima S., Monde K., Katsui N., Masamune T., Shirata A. (1987). Antifungal compounds from *Dioscorea batatas* inoculated with *Pseudomonas cichorii*. *Phytochemistry*, 26, 371-375.

- [99] Adesanya S.A., Ogundana S.K., Roberts M.F. (1989). Dihydrostilbene phytoalexins from *Dioscorea bulbifera* and *Dioscorea dumentorum*. *Phytochemistry*, 28, 773-774.
- [100] Kaganda N.G., Adesania S.A. (1990). A new dihydrostilbene from diseased *Dioscorea mangenotiana*. *J. Nat. Prod*, 53, 1345-1346.
- [101] Coxon D.T., Ogundana S.K., Dennis C. (1982). Antifungal phenanthrenes in yam tubers. *Phytochemistry*, 21, 1389-1392.
- [102] Biswas M., Som U.K., Ghosh P.K., Dutta C.P., Banerji A. (1988). Prazerol, a new 9,10- dihydrophenanthrene derivative isolated from *Dioscorea prazeri*. *Tetrahedron* ,44, 4871- 4876.
- [103] Ma C., Wang W., Chen Y.Y., Liu, R.N., Wang R.F., Du L.J. (2005). Neuroprotective and antioxidant activity of compounds from the aerial parts of *Dioscorea opposita*. *J. Nat.Prod*, 68, 1259-1261.
- [104] Liu H.W., Wang S.L., Cai B., Yao X. (2003). Two new non-steroidal constituents from *Dioscorea futschauensis* R. Knuth. *Pharmazie*, 58, 214-215.
- [105] Gao H., Kuroyanagi M., Wu L., Kawahara N., Yasuno T., Nakamuray Y. (2002). Antitumor-promoting constituents from *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 mouse epidermal cells. *Biol. Pharm. Bull*, 25, 1241-1243.
- [106] Dong M., Feng X., Wang B., Wu L., Ikejima T. (2001). Two novel furostanol saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* Prain et Burkill and their cytotoxic activity. *Tetrahedron*, 57, 501-506.
- [107] Hu K., Yao X. (2002). The cytotoxicity of protoneodioscin (NSC-698789), a new furostanol saponin from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var *hypoglauca*, against human cancer cells *in vitro*. *Phytomedicine*, 9, 560-565.
- [108] Itharat A., Houghton P.J., Eno-Amooquayne E., Burke P.J., Sampson J.H., Raman A. (2004). *In vitro* cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacol*, 90, 33-38.
- [109] Bhandari M.R., Kawabata J. (2004). Organic acid, phenolic content and antioxidant activity of wild yam (*Dioscorea spp.*) tuber of Nepal. *Food Chemistry*, 88, 163-168.
- [110] Tewtrakul S., Itharat A., Rattanasuwan P. (2006). Anti-HIV-1 protease and HIV-1 integrase activities of Thai medicinal plants known as Hua-Khao-Yen. *J. Ethnopharmacol*, 105, 312-315.
- [111] Sautour M., Mitaine-Offer A.C., Miyamoto T., Wagner H., Lacaille-Dubois M.A. (2004). A new phenanthrene glycoside and other constituents from *Dioscorea opposita*. *Chem. Pharm. Bull*, 52, 1235-1237.
- [112] Kelmanson J.E., Jäger A.K., Van Staden J. (2000). Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*, 69, 241-246.
- [113] Caddick L.R., Wilkin P., Rudall P.J., Hedderson T.A.J., Chase M.W. (2002). Yams reclassified : a recircumscription of Dioscoreaceae and Dioscreales. *Taxon*, 51, 103-114.

- [114] Kovačcs A., Forgo P., Zupko I., la Re'thy B., Falkay G., Szabo' P., Hohmann J. (2007). Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, 68, 687–691.
- [115] Maire R. (1959). Flore de l'afrigue du nord Vol VI publié par les soins de P. Quézel. Eds. Lechevalier Paris, pp.394.
- [116] Boullard B. (2003). Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Paris. pp, 1092-1107.
- [117] Schols P., Furness C.A., Wilkin P., Smets E., Cielen V., Huysmans S. (2003). Pollen morphology of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) and its relation to systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 143,375-390.
- [118] Schmidt R.J., Moulst S.P. (1983). The dermatitic properties of black bryony (*Tamus communis* L). *Contact Dermatitis*, 9, 390-396.
- [119] Capasso F., Mascolo N., Autore G., De Simone F., Senatore F. (1983). Anti-inflammatory and analgesic activity in alcoholic extract of *Tamus communis* L. *J Ethnopharmacol*, 8, 321-325.
- [120] Leporatti M.L., Ivancheva S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J. Ethnopharmacol*, 87,123-142.
- [121] Guarrera P.M., Leporatti M.L. (2007). Ethnobotanical remarks on central and southern Italy. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3,23.
- [122] Abdollahi A., Karimpour H., Monsef-Esfehani H. (2003). Antinociceptive effects of *Teucriumpolium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. *Pharmacol. Re*, 48,31-35.
- [123] Goodwin T.W. (1955). Studies in Carotenogenesis a survey of the polyenes in a number of ripe berries. *Biochemistry*, 62, 347-352.
- [124] Reish J., Bathory M., Szendrei K., Novaku M.E. (1973) .Weitere phenanthrene aus dem rhizom von *Tamus communis*. *Phytochemistry*, 12, 228-229.
- [125] Capasso F., De Simone F., Senatore F.S. (1983). Sterol constituents of *Tamus communis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 8, 327-329.
- [126] Shaheen F., Ali L., Ali S., Erdemoglu N., Sener B. (2009). Antioxidant flavonoids from *Tamus communis* ssp. *Cretica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 346-349.
- [127] Aquino R., Behar I., de Simone F., Pizza C., Senatoe F. (1985). Phenanthrene derivatives from *Tamus communis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 13, 251–252.
- [128] Dellagreca M., Fiorentinob A., Isidorib M., Lavorgna M., Monaco P., Previtiera L., Zarrelli A. (2002). Phenanthrenoids from the wetland. *Juncus acutus*. *Phytochemistry*, 60, 633–638.

[129] Aquino R., Behar I., de Simone F., Pizza C. (1985). Natural dihydrophenanthrene derivatives from *Tamus communis*. J. Nat. Prod, 48, 811-813.

[130] Aquino R., Conti C., de Simone F., Ors, N., Pizza C., Stein M.L. (1991). Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. J. Chemother, 3, 305–309.

[131] Re'thy B., Kova'cs A., Zupko'I., Forgo P., Vasas A., Falkay Hohmann J. (2006). Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis*. Planta Med, 72, 767–770.

[132] Zerargui F., Boumerfeg S., Charef N., Baghiani A., Djarmouni M., Khennouf S., Arrar L., Abu Zarga M.H., Mubarak M.S. (2015). Antioxidant potentials and xanthine oxidase inhibitory effect of two furanocoumarins isolated from *Tamus communis* L. Med Chem, 11, 506–513.

Chapitre 2

Les flavonoides et les phénanthrènes

I. Les flavonoïdes

I.1. Définition

Les flavonoïdes font partie de la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments universels des végétaux. Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (fig.17) [1].

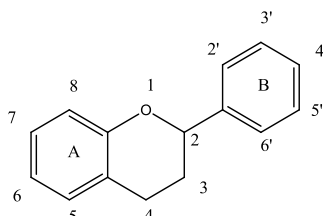


Figure 17: 2-phénylchromane

I.2. Classification des flavonoïdes

I.2.1. Flavones et flavonols

Les flavones sont caractérisées par la présence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 de l'hétérocycle du squelette flavane, et un groupement carbonyle en position 4. Le cycle aromatique B est attaché à la position 2 et généralement la position 3 du flavone reste libre. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en position C3 (fig.18).

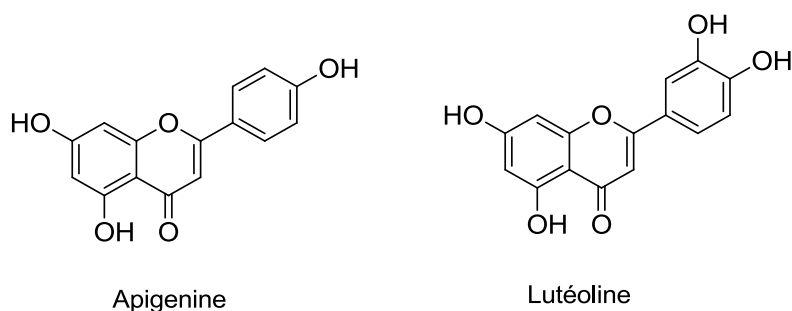


Figure 18 : Exemples des flavones

I.2.2. Flavanones et dihydroflavonols

Les flavanones présentent des structures uniques qui diffèrent des autres flavonoïdes, par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2, à l'exception des 3-hydroxyflavanones ou les dihydroflavonols qui sont caractérisés par deux carbones chiraux en positions 2 et 3.

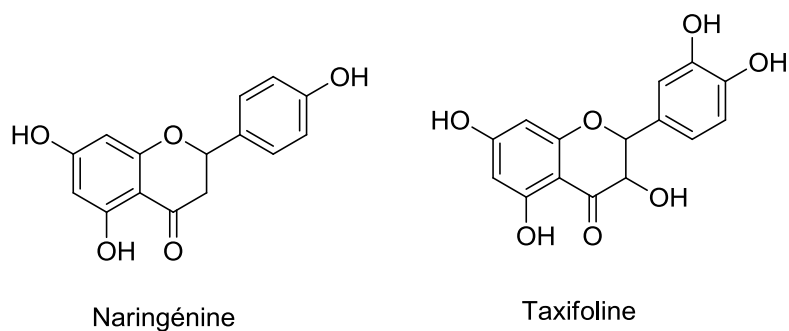


Figure 19 :Exemples de flavanones et dihydroflavanols

I.2.3. Isoflavones

Les isoflavones constituent une spécifique branche des flavonoides, qui diffèrent des autres par la position du noyau phénolique B. Jusqu'à présent, plus de 1600 isoflavonoides aglycones et glycosides ont été identifiés, dont la grande majorité se trouvent chez la famille des légumineuses [2].

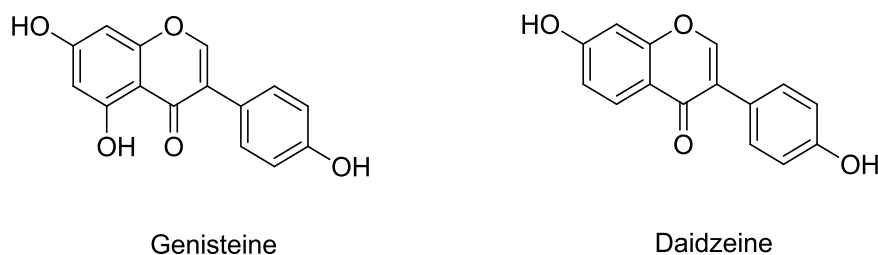


Figure 20: Exemples d'isoflavones

I.2.4. Chalcones et aurones

Les chalcones représentent une des classes majeures des produits naturels appartenant à la famille des flavonoides. Chimiquement, elles sont constituées par deux unités aromatiques, reliées par une chaîne tricarbonée, ouverte, cétonique et α , β insaturée. Ces substances naturelles sont souvent polyhydroxylées sur les cycles phénoliques, ainsi le noyau catechol est présent chez de nombreuses chalcones [3,4].

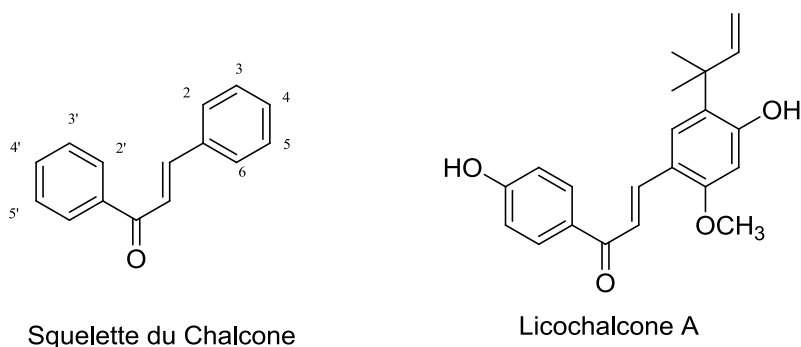


Figure 21: Exemples de chalcones

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidene-coumaran-3-one, renfermant plusieurs fonctions hydroxyles sur leurs cycles aromatiques.

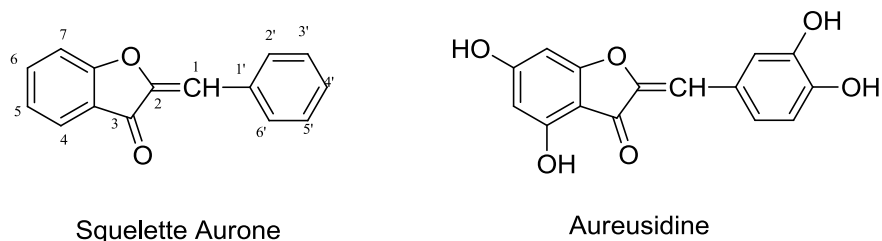


Figure 22: Exemple des aurones

I.2.5. Anthocyanines et anthocyanidines

Les anthocyanines représentent les pigments les plus importants des plantes, ces pigments sont visibles à l'œil nu. Les anthocyanines désignent un vaste groupe des flavonoides, se sont les glucosides des polyhydroxy et polymétoxy des dérivés de 2-phenylbenzopyrylium ou les sels de flavylium.

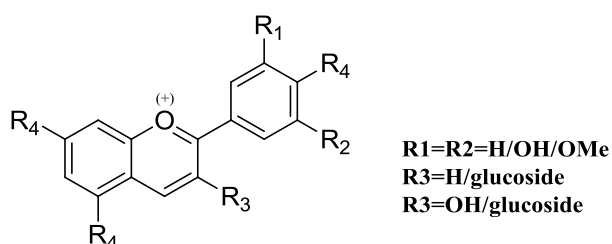


Figure 23: Structure de base de cation flavylium

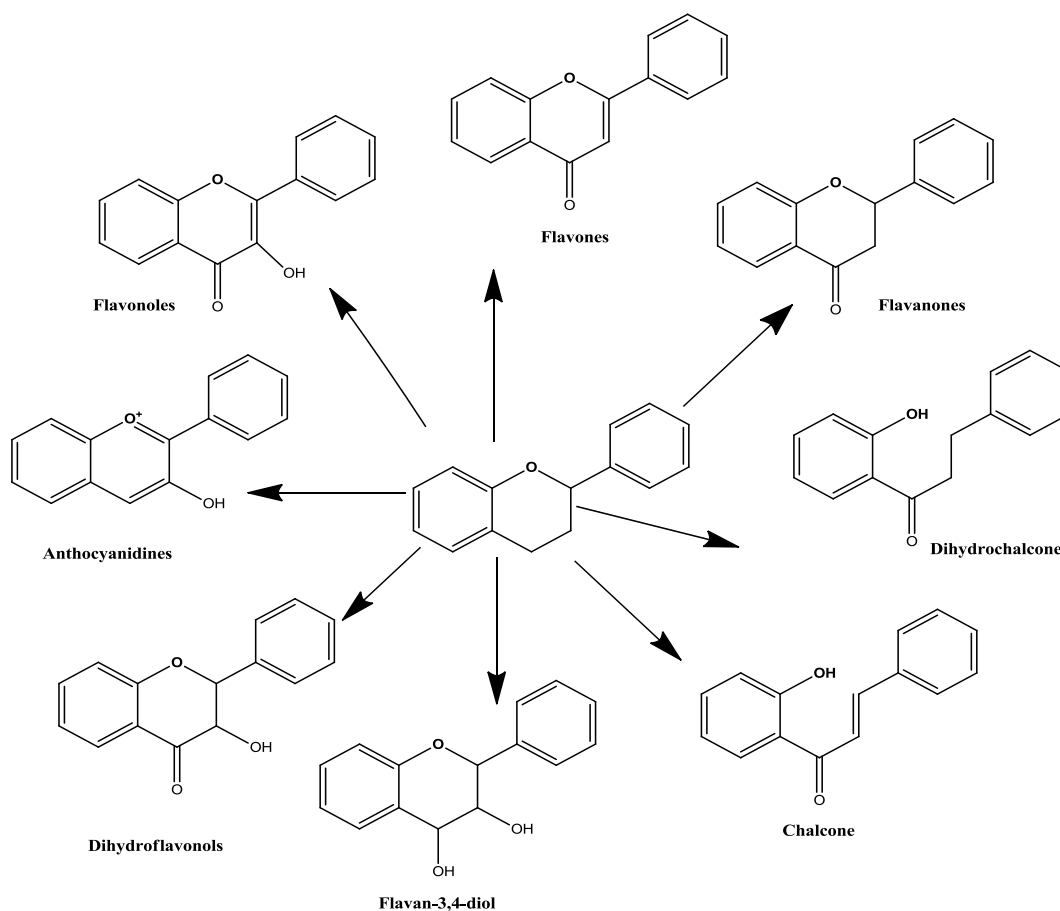


Figure 24: Les différentes classes des flavonoïdes

I.3. Distribution et localisation des flavonoïdes dans les plantes et le règne végétal

Seules les plantes, de rares exceptions, ont la capacité de biosynthétiser les flavonoïdes, ces derniers peuvent être présents dans toutes les parties de la plante, ils sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant ainsi leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, dans l'épiderme et le mésophylle des feuilles, dans les parenchymes des tiges et racines [1].

Il est à noter que les flavanones et flavones sont souvent présentes dans la même plante, flavones et flavonols ne se trouvent généralement pas ensemble, pas plus que flavanols et anthocyanes [5].

La présence de composés flavonoïdiques a été rapportée chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et chez les Angiospermes [6]. Cette distribution quasiubiquitaire dans les plantes, alliée à leur relative stabilité, leur relative facilité d'identification et la forte tendance des plantes taxonomiquement proches à produire les

mêmes types de flavonoïdes, ont fait des flavonoïdes des marqueurs chimiotaxonomiques de choix pour la classification végétale [7,8]. Récemment, de nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones [9-11].

Le Tableau-5 regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes dans quelques plantes alimentaires.

Tableau-5: Sources alimentaires des flavonoïdes

Flavonoïdes	Aliments
Flavanones Naringénine	Fruits du genre citrus.
Flavones Chrysin Apigénine Lutéoline	Peau des fruits. Persil, thym, romarin, céleri.
Flavonol Kaempférol Quercétine Myricétine	Radis, brocoli, Oignon, pomme, olive, vin rouge, Canneberge, vin rouge, Thé noir, tomate.
Flavan-3-ols Epicatechine Catéchine	Thé vert, thé noir.

I.4. Le rôle des flavonoïdes dans les plantes

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est la coloration des fleurs, ces couleurs exercent un effet attracteur sur les insectes dans les feuilles, ces composés sont associés à de nombreux processus physiologiques et survivaux des plantes ; ainsi, les flavonoïdes protègent la plante vis-à-vis des radiations UV-B, et des pathogènes fongiques. De plus les flavonoïdes sont impliqués dans la photosensibilisation, le transfert d'énergie, et le développement des plantes, en interagissant avec les diverses hormones, et régulateurs de croissance [12,13].

I.5. Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités : antivirales, anti-tumorales, anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs et diurétiques, antioxydants. On peut citer quelques exemples d'activités :

➤ **Effets anti-allergiques.**

Les flavonoides sont connus pour leurs effets anti-allergiques, ces effets sont attribués à l'influence des flavonoides sur la production d'histamine, en fait les flavonoides inhibent les enzymes qui augmentent l'apparition de l'histamine dans les cellules mastocytes et des basophiles, par exemple l'ATPase Ca^{+2} dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules[3].

➤ **Effets anti-inflammatoires**

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes [14]. Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase.

➤ **Effets antiulcéreux**

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes. D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production du PAF qui est un agent ulcérogène potentiel. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoides[3].

➤ **Effets anticancéreux**

La catéchine présente pratiquement dans tous les types de thé et en particulier dans le thé vert a montré une activité anti-tumorale [15]. Une telle activité est attribuée à la capacité de ce flavonoïde d'inactiver le t-PA en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la

matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones [16]. La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres [3]. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène [17] et inhibe l'activité de la collagénase [18]. Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase [19]. La myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques [20, 21]. Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [22]. Les effets antiviraux des flavonoïdes ont été également démontrés [23]

I.6. Etude chimique des flavonoïdes

I.6.1. Extraction

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes [1,24]. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire, les étapes essentielles sont macération répétée du matériel végétal dans une solution hydroalcoolique.

Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. Les solvants les plus utilisés sont : le dichlorométhane ou le chloroforme qui permettent l'extraction des aglycones méthoxylés et hydroxylés, l'acétate d'éthyle qui permet l'extraction des aglycones polyhydroxylés et monoglycosylés, et en dernier le *n*-butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés. Les extraits obtenus sont ensuite évaporés à sec et pesés pour un éventuel traitement.

I.6.2. Séparation et purification

La séparation des composés phénoliques est fondée essentiellement sur les différentes techniques chromatographiques telles que :

La chromatographie liquide sur colonne (CC) : Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire comme le gel de silice, la cellulose ou le polyamide et une phase mobile constituée par divers systèmes de solvants comme éluant. Elle est la plus utilisée pour la séparation des quantités de mélanges importantes et complexes.

La chromatographie préparative sur papier (CP) : Basée sur l'utilisation d'une surface plane de cellulose considérée comme support maintenant par imprégnation une phase stationnaire liquide.

La chromatographie sur couche mince (CCM) : Elle est utilisée aussi bien pour la séparation que pour la purification en utilisant les diverses phases stationnaires et les systèmes de solvants appropriés.

I.7. Les techniques d'identification structurale

I.7.1. Généralité

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopiques telles que la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) avec ses différents modes (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, etc...), la spectrométrie de masse (SM) ainsi que la spectrophotométrie UV-Visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés. Elle donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde et son mode de substitution. Toutefois, la fluorescence sous lumière UV et les valeurs de leur R_f dans différents systèmes de solvants donnent des informations utiles[25, 26].

I.7.2. Facteur de retardement et comportement chromatographique

Ce facteur symbolisé par R_f est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part. La valeur du R_f varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique[25].

I.7.3. La fluorescence sous lumière UV

L'absorption des substances flavoniques sous lumière UV à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau-6 montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [25].

Tableau-6 : Relation entre la fluorescence sous lumière de Wood et les structures flavoniques

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5, 6,7 ou 5,7, 8 trihydroxyflavone Flavonol avec 3-OR. Chalcones.
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5. Flavanone avec OH en 3 ou flavanol. Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH.
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

I.7.4. La résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est très employée dans la détermination des structures flavoniques. Cette méthode renferme plusieurs techniques :

- **La RMN du proton:** Elle informe sur l'environnement des protons flavoniques et permet de connaître la position et le nombre de divers protons portés par le flavonoïde, le nombre de substituants méthoxyles porté par le squelette flavonique ainsi le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.
- **La RMN du carbone 13:** Donne des informations utiles et parfois nécessaires pour identifier la molécule telles que le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement. La connaissance de type des liaisons -C et / ou -O sucres.

I.7.5. La spectroscopie UV –Visible

La technique de spectroscopie UV-Visible est une méthode simple et rapide qui fournit des informations sur la nature chimique, les propriétés structurales et les caractéristiques optiques des composés.

C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque chromophore absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules.

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques, Elle est basée sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales (Fig.25)[27].

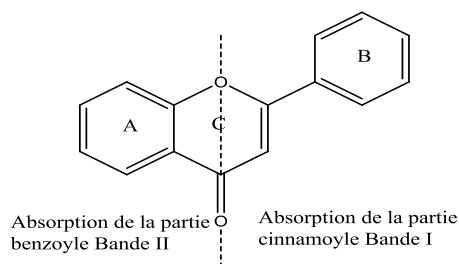


Figure 25: Les deux bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

Bande I: Présentant un maximum d'absorption entre 300-400nm, est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2-C3) et le noyau B, elle donne, alors des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.

Bande II: Présentant un maximum d'absorption entre 240-280nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A. Elle nous informe sur les variations structurales du cycle A. L'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes est donné sur le tableau-7:

Tableau-7: Maximum d'absorption des bandes I et II dans le MeOH De quelques types de flavonoïde

Type de composé flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	320-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavanone	300-330	245-275
Isoflavone	300-330	245-275

L'interprétation des spectres dans le méthanol et/ou en présence de réactifs spécifiques s'appuie sur des règles très connues pour les flavonoïdes.

En général, une bonne exploitation des données de cette technique additionnée aux valeurs des R_f dans les systèmes de solvant appropriés conduit à une approche structurale qui pourrait être complète si l'on tient compte de la couleur de la fluorescence de ce type de composés une fois exposé à la lumière de Wood ($\Delta = 366$ nm). Cette dernière donnée est

également très utile car elle permet de faire la distinction entre les différentes classes de flavonoïdes très rapidement.

II.7.6. Spectres UV-Vis avec addition de réactifs (série spectrale UV-Visible)

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH, NaOAc, H₃BO₃, HCl et AlCl₃. Ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles en formant des complexes qui se traduiront sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

➤ Spectre en présence de NaOH

NaOH ou (NaOMe), une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes I et II. Cet effet est plus important sur la bande I.

Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'. Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande I renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en 7.

Cependant, l'effet de NaOH sur les flavones et les flavonols est de détecter les groupements hydroxyles dans les positions 3 et/ou 4'.

Dans le cas des isoflavones hydroxylées sur le noyau A, le spectre montre après addition de NaOH un effet bathochrome des deux bandes I et II. Si l'isoflavone est *orthodihydroxylée* en 3' et 4' le spectre UV montre une réduction d'intensité avec le temps[25].

➤ Spectre en présence de NaOAc

L'acétate de sodium, NaOAc, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

Un faible déplacement bathochrome de la bande II des flavones, et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8.

Dans le cas des isoflavones, le NaOAc ionise spécialement l'hydroxyle en position 7, ceci se traduit par un déplacement bathochrome de la bande II.

Si ce déplacement n'est pas significatif cela veut dire que le carbone 6 est oxygéné [25].

➤ **Spectre en présence de NaOAc+H₃BO₃**

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (H₃BO₃), est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système *orthodihydroxyle* sur le cycle B (3',4') ou sur le cycle A (6,7 ou 7,8) suite à la formation de chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande I [25] (Fig.26).

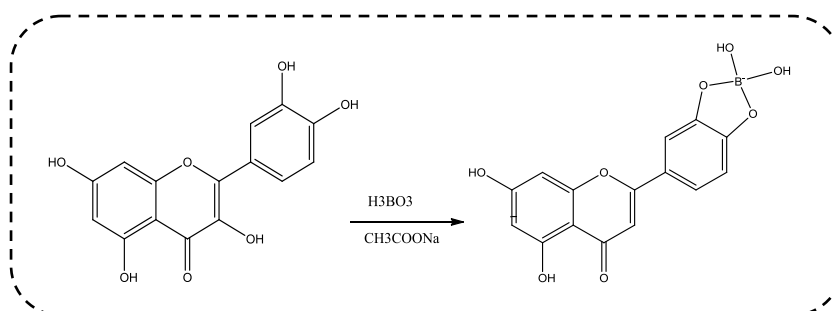


Figure 26: Formation de complexe après addition de H₃BO₃

➤ **Spectre en présence d'AlCl₃ et AlCl₃+HCl**

La présence du chlorure d'aluminium (AlCl₃) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles *ortho* du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande I par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre AlCl₃ et les groupes *orthodihydroxyles* des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl[28], par contre, ceux formés entre AlCl₃ et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables. Ces effets se manifestent par un déplacement hypsochrome de la bande I sur le spectre UV en présence d'AlCl₃ + HCl par rapport au spectre après addition d'AlCl₃ et un déplacement bathochrome de la bande I du spectre en présence d'AlCl₃ moins important par rapport au spectre dans le MeOH en cas d'oxygénation de la position 6 (Tableau-8).

Tableau-8 : Résultats des séries spectrales UV après addition de réactifs

Réactifs	Déplacement (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350 330-360 350-385	250-280 250-280 250-280	Flavone Flavonol (3-OR) Flavonol (3-OH)
NaOMe (NaOH)	+40 à 60 avec stabilité d'intensité +50 à 60 avec diminution d'intensité -Faible déplacement avec diminution d'intensité -Apparition d'une nouvelle bande entre BI et BII -Absence de bande entre 320-335 -Transformation de la bande I en une inflexion.		4'-OH 3-OH et 4'OR 4'-OR 7-OH 7-OR 5-OH (seul hydroxyle libre)
AlCl ₃ /MeOH	+20 à 45 +60		5-OH 3-OH
AlCl ₃ +HCl/AlCl ₃	-30 à -40 -20 à -25		- <i>Ortho</i> di OH sur le noyau B - <i>Ortho</i> di OH sur le noyau A (en plus)
AlCl ₃ +HCl/MeOH	+35 à 55 +17 à 20 +50 à 60		5-OH 5-OH (avec 6-oxygénation) 3-OH ou 3-OH et 5-OH
NaOAc/MeOH	+5 à 20 -Déplacement très faible -Diminution d'intensité avec le temps -Le spectre se décompose avec le Temps		7-OH 7-OR 6,7; 7,8 ou 3',4'di OH 5, 6,7 ; 5, 7,8 ou 3, 3',4' -tri OH
NaOAc+H ₃ BO ₃	+12 à 36 +5 à 10		3',4' di OH 6,7 ou 7,8 di OH

I.7.7. L'hydrolyse acide des hétérosides

Cette manipulation concerne les flavonoïdes O-glycosylés, elle renseigne sur la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des échantillons authentiques par CCM, CP et CPG.

Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés.

I.7.8. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus.

Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduite dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés.

L'ensemble de ces ions constituent le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation parmi eux nous citons:

- L'Electrospray ou l'ionisation par électro nébulisation (ESI).
- L'ionisation par impact électronique (IE).
- L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).
- Le FastAtomBombardment (FAB).

II. Les phénanthrènes

II.1. Définition

Les phénanthrènes dont le nom provenant de deux noms phényle et anthracène sont des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), composés de trois cycles benzène fusionnés (C6- C2-C6) et de formule brute $C_{14}H_{10}$.

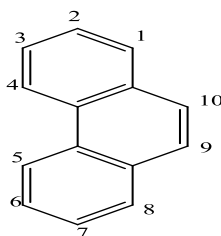


Figure 27 : Squelette de base des phénanthrènes

Le phénanthrène est à la base de nombreux composés comme la morphine ou le cholestérol. C'est un composé organique (toxique) qui fait partie des polluants organique

persistants (POPs). On le trouve dans l'environnement surtout dans les sols et les sédiments, et il est essentiellement produit avec les goudrons, par une mauvaise combustion des hydrocarbures ou du bois (inserts, foyers fermés faiblement alimentés en air). Il n'est pas considéré comme très toxique parmi les HAP, mais il a peu été étudié de ce point de vue. Très peu soluble dans l'eau et dans l'air (à température ambiante), il est peu mobile dans le sol ou il s'adsorbe sur les particules grasses ou la matière organique (lipides notamment)

II.2. Classification des phénanthrènes

A partir des phénanthrènes connus jusqu'à présent on peut les classer en trois grands groupes : Le groupe des monophénanthrènes qui se divise en sous-groupes selon le nombre et le type des substituants, ensuite le groupe des diphénanthrènes qui se classe selon le type de liaison entre les deux phénanthrènes et enfin le groupe des triphénanthrènes qui jusqu'à présent est constitué par un seul produit obtenu à partir des tubercules d'une orchidée (*Cremastra. appendiculata*) [29].

La majorité des phénanthrènes connus sont isolés chez les espèces de la famille des Orchidaceae.

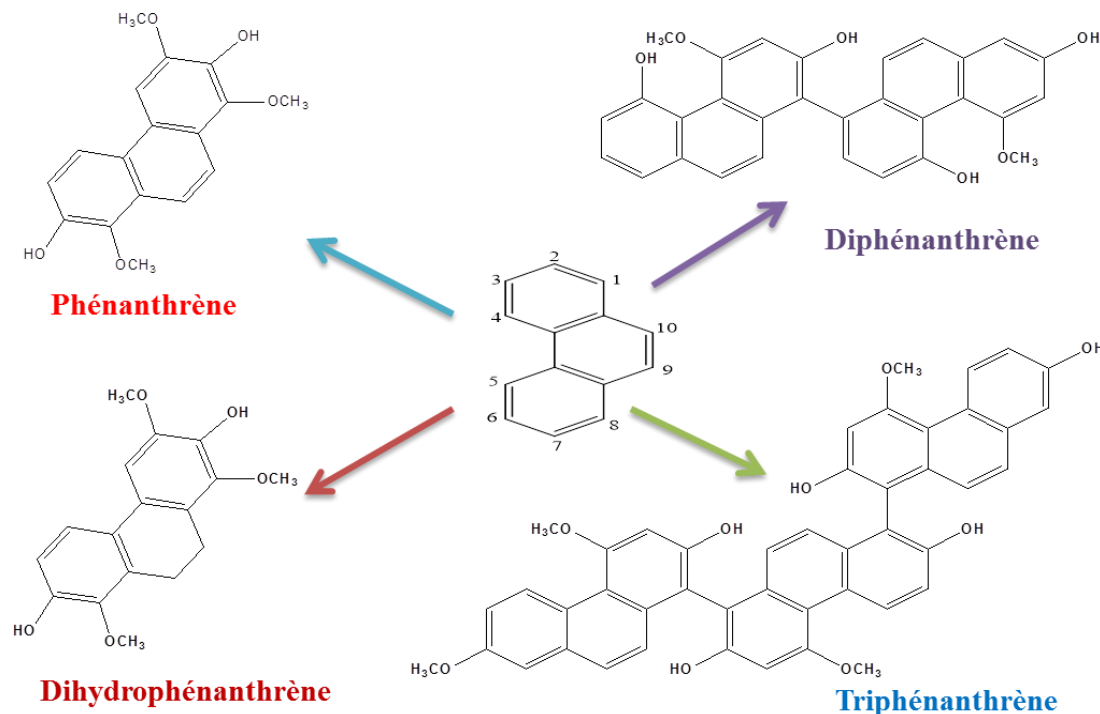


Figure 28 : Les différentes classes des phénanthrènes

II.3. Occurrence des phénanthrènes

Un assez grand nombre de phénanthrènes ont été identifié dans les plantes, principalement chez la famille des Orchidaceae, dans 49 espèces: en particulier *Dendrobium*, *Bulbophyllum*, *Eria*, *Maxillaria*, *Bletilla*, *Coelogyne*, *Cymbidium*, *Ephemeranthaet* *Epidendrum*.

Quelques phénanthrènes ont été trouvés dans les familles Hepaticae, Dioscoreaceae, Combretaceae et les Betulaceae (Tableau-9)[30]. Les phénanthrènes étaient principalement isolés des plantes entières, mais dans certains cas, ils ont été séparés des tubercules ou des tiges. Le plus grand nombre de phénanthrènes a été séparé à partir de l'espèce *Juncus* et quelques autres ont été isolés chez *Bletilla striata* et *Bulbophyllum vaginatum*.

Tableau-9 : Occurrence des phénanthrènes

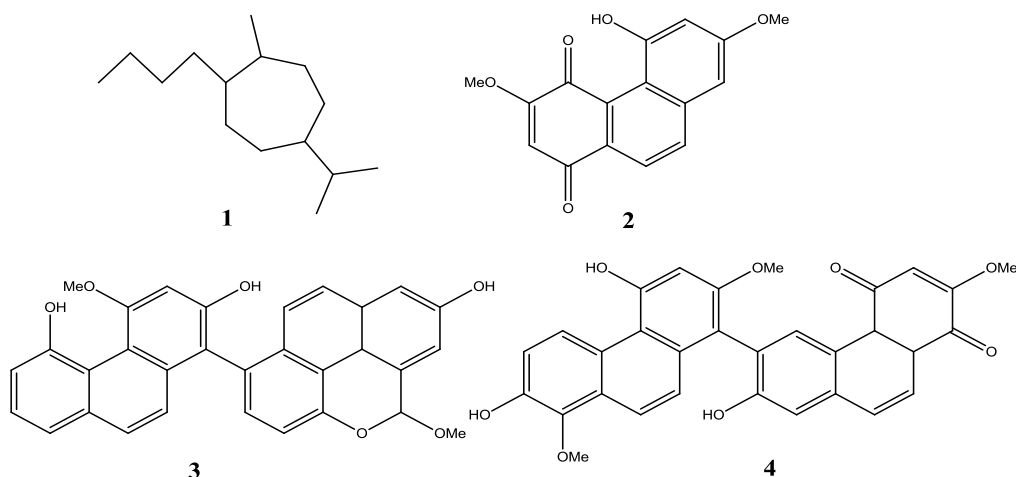
Famille	Espèce
Berberidaceae	<i>Epimedium koreanum</i>
Betulaceae	<i>Alnus maximowiczii</i> (H)
Combretaceae	<i>Combretum apiculatum</i> (C), <i>Combretum caffrum</i> (C) <i>Combretum psidioides</i> (C) <i>Combretum molle</i> (C)
Dioscoreaceae	<i>Dioscorea batatas</i> <i>Dioscorea bulbifera</i> <i>Dioscorea decipiens</i> (R) <i>Dioscorea aprazeri</i> (Tu,I) <i>Dioscorea rotundata</i> (Tu,I) <i>Tamus communis</i> (R)
Euphorbiaceae	<i>Domohinea</i> (T) <i>Micrandropsis scleroxylon</i> (BT) <i>Sagotia racemosa</i> (BT)
Juncaceae	<i>Juncus acutus</i> (PA) <i>Juncus effuses</i> (PA) <i>Juncus roemerianus</i> (R)
Lamiaceae	<i>Plectranthus species</i>
Rhodomelaceae	<i>Polysyphonia ferulacea</i>
Stemonaceae	<i>Stemona collinsae</i> , <i>Stemona pierrei</i> , <i>Stemona tuberosa</i>
Orchideae	<i>Agrostophyllum callosum</i> (Pa) <i>Agrostophyllum khasianum</i> (Pa) <i>Arundina graminifolia</i> (R) <i>Dendrobium chrysanthum</i> (H) <i>Dendrobium densiflorum</i> (T) <i>Dendrobium loddigesii</i> (T) <i>Dendrobium moniliforme</i> (T) <i>Gymnadenia conopsea</i> (Tu) <i>Eria flava</i> (Pa) , <i>Eria stricta</i> (Pa) , <i>Eulophia nuda</i> (Tu)

H : Herbe, C : Cortex, R : Racine, Tu : Tubercule, I : Ignames, T : Tige, Pa : Partie aérienne.

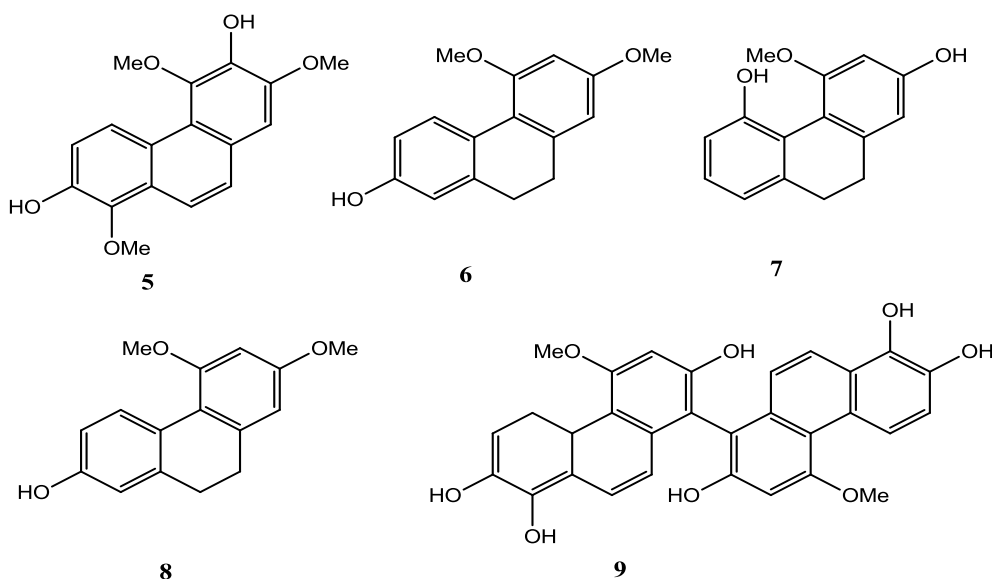
III.4. Activités biologiques des différents phénanthrènes

De nombreuses plantes contenant les phénanthrènes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle à travers le monde, surtout en Chine, les enquêtes phytochimiques et pharmacologiques qui ont conduit à l'identification des phénanthrènes comme principes actifs ont apporté un support pour l'utilisation de ces plantes dans la pratique ethnomédicale.

Dans les années 1970, les activités inhibitrices de la croissance cellulaire des phénanthrènes de *Combretum caffrum* ont été testées sur des lignées cellulaires. Ensuite, de nombreuses plantes et leurs constituants ont été étudiés. La Lusianthridine (1) et la Denbinobine (2) isolées à partir de *Dendrobium nobilese* sont avérées avoir des effets cytotoxiques à la fois *in vitro* et *in vivo*, sur les cellules A549 (carcinome épithélial basal alvéolaire humain); SK- OV-3 (adénocarcinome d'ovaire humain) et des lignées cellulaires HL-60 (leucémie promyélocytaire humaine) [31].



Deux phénanthrènes dimériques [Denthyrsinol (3), Denthyrsinone (4)] et Denthirsinine (5) ont montré une cytotoxicité significative sur les cellules HeLa, K-562 (leucémie myelogene humaine immortalisée) et les cellules MCF-7[32]. La Moscatine (6) et l'Hircinol (7) étaient moins efficaces sur les cellules HeLa et MCF-7 que le Denthyrsinol (3). Les analyses de la relation structure-activité ont montré que la dimérisation des phénanthrènes est un facteur très important pour l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses. Ce constat a été soutenu par une étude sur les mono-, bi- et triphenanthrenes de *Cremastra appendiculata*. Les monophenanthrenes extraits étaient inactifs sur toutes les lignées cellulaires testées. Les biphenanthrenes et le triphenanthrene inusuel se sont avérés être des composés actifs dans cette étude [29].



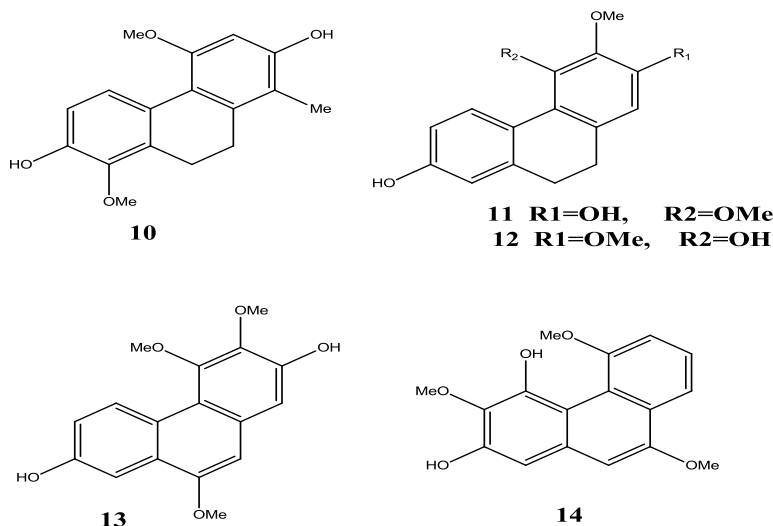
Des composés extraits de *Domohineaperrieriet* des hydroxybenzyl-phénanthrènes de *Spiranthes sinensis* ont montré une activité cytotoxique *in vitro* sur un certain nombre de lignées de cellules cancéreuses [33,34].

Les tubercules de *Bletilla striata* ont été étudiés, à cause de leur utilisation en médecine traditionnelle Chinoise, pour traiter les pneumorrhagias et pneumonophthisis. Bien que les extraits méthanoliques de *B. striata* et la Lusianthridine (1) sont principalement actifs contre les bactéries gram-positives, mais faiblement active contre certains champignons, les biphenanthrènes étaient actifs contre les bactéries Gram-positives, Tandis que le Blestriarène B (9) était le composé le plus actif sur les deux organismes testés [35].

Le dihydrophénanthrène Stemanthrene D (10) extrait de *Stemona collinsae* avait une faible activité sur les champignons.

L'effet inhibiteur de la réplication virale des phénanthrènes extraits de *D. communis* a été testé sur des virus à ARN: le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) et le rhinovirus humain de sérotype 1B (VRC 1B). Les résultats du dépistage ont révélé une action inhibitrice remarquable sur la formation de la plaque pour le VSV. Pour le VRC, ces composés ont induit une faible diminution de la multiplication virale [36].

Les effets spasmolytiques des phénanthrènes isolés de *Scaphyglottis livida*, [37] de *Maxillaria densa* [38] et d'*Epidendrum boothii* [39] ont été étudiés. *S. livida* et *M. densa* sont utilisées par les populations indigènes dans les forêts tropicales du Mexique. L'herbe moulue de *S. livida* est utilisée pour éliminer les ectoparasites. La décoction est utilisée également pour le traitement des maux d'estomac et même pour éviter l'avortement. *M. densa* est utilisée pour les mêmes objectifs. Dans tous les cas, l'effet spasmolytique est confirmé.



La Denbinobine (2), un phénanthraquinone de *Dendrobium moniliforme*, a montré une activité anti-inflammatoire *in vitro*[40].

Les phénanthrènes des espèces de *Stemona* ont été testés dans un essai *in vivo* d'inhibition de la biosynthèse des leucotriènes. L'efficacité des phénanthrènes dans ce système d'essai suggère que ces substances pourraient être des anti-inflammatoires et anti-asthmatiques des espèces de *Stemona*[41].

La Gymnopusine (13) et l'Erianthridine (11) de *Maxillaria densa* ont inhibé l'élongation radicale des semis d'*Amaranthus hypochondriacus*. Les deux dérivés des phénanthrènes ont montré une cytotoxicité modérée sur toutes les cellules de mammifères testées. Des composés d'Ephemeranthol-A (12) et de Fibrinol A (14) extraits à partir d'*E. rigidum* ont également montré une phytotoxicité remarquable sur *A. hypochondriacus* [42].

Les activités algicides de 41 phénanthrènes monomériques et 5 phénanthrènes dimériques ont été évaluées sur *Selenastrum capricornutum* dans de nombreuses études. Ils ont observés que les activités algicides des phénanthrènes dimériques étaient plus importantes que celles des 9,10-dihydrophénanthrènes [43-47].

II.6. Etude chimique et méthode d'analyse des phénanthrènes

Les phénanthrènes sont généralement des produits apolaires donc leur extraction se fait par des solvants apolaires tels que l'éther de pétrole, n-hexane, chloroforme. Leur séparation se fait par les techniques chromatographiques (CC, CCM, CP...) comme on a mentionné précédemment dans la séparation des flavonoides. Leur identification se fait aussi par UV, IR, RMN (H, C) et M.S comme on a entamé dans l'identification des flavonoides.

Références bibliographiques

- [1] Bruneton J., (1999). *Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3ème édition, Ed. Tec et Doc Lavoisier, Paris, pp.1120.
- [2] Veitch N.(2007). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat. Prod. Rep*,24, 417–464.
- [3] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci*, 65, 337-53.
- [4] Dhar D.N.(1981). « The Chemistry of Chalcones and Related Compounds». John Wiley. New York, pp. 85.
- [5] Merken H.M., Beecher G.R.(2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatograph. *J. Agric. Food. Chem*, 48(3), 577-599.
- [6] Markham K.R., (1988). Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In the *Flavonoids: Advances in research since 1980*, Ed. J. B. Harborne Chapman and Hall. London, 427-468.
- [7] Gillian A., Cooper-Driver G.A., Bhattacharya M. (1998). Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry*, 49(5), 1165-1174.
- [8] Grayer R.J., Chase M.W., Simmonds M.S.J. (1999). A comparison between the chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's *Chemotaxonomie der pflanzen*. *Biochem.System.Ecol*, 27(4), 369-393.
- [9] Bronner W.E., Beecher G.R. (1995). Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *J. Chromato. A*, 705, 247-256.
- [10] Hollman P.C.H., Hertog M.G.L., Katan M.B.(1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food. Chem*, 57, 43-46.
- [11] Crozier A., Jensen E., Lean M. J., McDonald. M. S. (1997), Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatography A*, 761, 315-321.
- [12] Middleton Jr.E., Chithan K. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. « The flavonoids: advances in research since 1986». London, UK: Chapman and Hall.
- [13] Harborne J.B., Baxter H. (1999). « The handbook of natural flavonoids», Chichester, UK: John Wiley and Sons, Vols 1 and 2.
- [14] Landolfi R., Mower R. L., Steiner M.(1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations, *Biochem Pharmacol*, 33, 1525-1530.

- [15] Bracke M., Vyncke B., Opdenakker G., Foidart J. M., De Pestel G., Mareel M. (1991). Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro, *Clin Exp Metastasi*, 9, 13-25
- [16] Larocca L. M., Giustacchini M., Maggiano. N., Ranelletti F. O., Piantelli M., Alcini E., Capelli. A. (1994). Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas, *J. Urol*, 152, 1029-1033.
- [17] Scutt A., Meghji S., Canniff J. P., Harvey W. (1987). Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia*, 43, 391- 393.
- [18] Makimura M., Hirasawa M., Kobayashi K., Indo J., Sakanaka S., Taguchi T., Otake S. (1993). Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity, *J. Periodontol*, 64, 630-636.
- [19] Chaudhry P. S., Cabrera J., Juliani H. R., Varma S.D. (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin, *Biochem Pharmacol*, 32, 1995-1999.
- [20] Ong K. C., Khoo H. E. (1997). Biological effects of myricetin. *General Pharmacol*, 29, 121-126.
- [21] Ong K. C., Khoo H. E. (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci*, 67, 1695-1705.
- [22] Hertog M. G., Feskens E. J., Hollman P. C., Katan M. B., Kromhout D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- [23] Chu S. C., Hsieh Y. S., Lin. J. Y. (1992). Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J. Nat. Prod*, 55, 179-183.
- [24] Ribereau-Gayou J.B. (1968). *The phenolic compounds of vegetals*, Edition Dundo, Paris.
- [25] Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag New York, Heidelberg, 254.
- [26] Harborne J.B. (1966). In «*Comparative Phytochemistry*» (Goodwin, T.W.ed). Academic Press London.
- [27] Jurd L., Hovowitz R. (1962). *Spectral properties of flavonoïd compounds*. Peragamon Press, Oxford, 107, 2055.

- [28] Markham K.R., Mabry T.J. (1968). A procedure for the ultraviolet spectral detection of *ortho*-dihydroxyl groups in flavonoids. *Phytochemistry*, 7(7), 1197-1200.
- [23] Xue Z., Li S., Wang S., Wang Y., Yang Y., Shi J., He .(2006). Mono-, BI-, and triphenantrenes from the tubers of *Cremastra appendiculata*. *J.Nat.Prod*, 69,907-913.
- [30] Kova ´cs A., Vasas A., Hohmann J. (2008). Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry*, 69, 1084–1110.
- [31] Lee YH., Park J.D., Baek N.I., Kim S.I., Ahn B.Z. (1995). *In vitro* and *in vivo* antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med*, 61, 178-180.
- [32] Zhang G.N., Zhong L.Y., Bligh S.W.A., Guo Y.L., Zhang C.F., Zhang M., Wang Z.T., Xu L.S.(2005). Bi-cyclic and bi-tricyclic compounds from *Dendrobium thyrsiflorum*. *Phytochemistry*,66,1113-1120.
- [33] Long L., Lee S.K., Chai H.B., Rasoanaivo P., Gao Q., Navarro H., Wall M.E., Wani M.C., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D.(1997). Novel bioactive phenanthrene derivatives from *Domohinea perrieri*. *Tetrahedron*, 53, 15663-15670.
- [34] Lin Y.L., Huang R.L., Don M.J., Kuo Y.H. (2000). Dihydrophenantrenes from *Spiranthes sinensis*. *J. Nat. Prod*, 63(12), 1608-1610.
- [35] Kostecki K., Engelmeier D., Pacher T., Hofer O., Vajrodaya S., Greger H.(2004). Dihydrophenanthrenes and other antifungal stilbenoids from *Stemona cf. pierrei*. *Phytochemistry*,65(1),99-106.
- [36] Estrada S., Rojas A., Mathison Y., Israel A., Mata R. (1999). Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyl from *Scaphyglottis livida*. *Planta Med*,65(2), 109-114.
- [37] Estrada S., López-Guerrero J.J., Villalobos-Molina R., Mata R. (2004). Spasmolytic stilbenoids from *Maxillaria densa*. *Fitoterapia*, 75,690-695.
- [38] Hernandez-Romero Y., Rojas J.I., Castillo R., Rojas A., Mata R. (2004). Spasmolytic effects, mode of action, and structure–activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *J. Nat. Prod*, 67,160-167.
- [39] Lin Y.L., Wang W.Y., Kuo Y.H., Liu Y.H. (2001). Homocyclotirucallane and two dihydrophenantrenes from *spiranthes sinensis*. *Chem. Pharm. Bull*, 49 (9), 1098-1101.
- [40] Matsuda H., Morikawa T., Xie H., Yoshikawa M.(2004). Antiallergic phenantrenes and stilbenes from the tubers of *Gymnadenia conopsea*. *Planta Med*, 70(9), 847-855.
- [41] Bordat P., Tarroux R., Charveron M., David B. (2006). Phenanthrene derivatives, their synthesis, anti-inflammatory activity, and use in treating inflammatory skin diseases. FRXXBL FR 2882357 A1 20060825.

- [42] Hernandez-Romero Y., Acevedo L., de Sanchez M., Shier WT., Abbas HK., Mata R. (2005). Phytotoxic activity of bibenzyl derivatives from the orchid *Epidendrum rigidum* J. Agric. Food Chem, 53, 6276-6280.
- [43] DellaGreca M., Fiorentino A., Mangoni L., Molinaro A., Monaco P., Previtiera L. (1993). Cytotoxic 9,10-dihydrophenanthrenes from *Juncus effusus* L. Tetrahedron, 49(16), 3425-3432.
- [44] DellaGreca M., Fiorentino A., Monaco P., Previtiera L., Zarrelli A. (1995). Effusides I-V: 9,10-dihydrophenanthrene glucosides from *Juncus effusus*. Phytochemistry, 40, 533-535.
- [45] DellaGreca M., Monaco P., Previtiera L., Zarrelli A., Pollio A., Pinto G., Fiorentino A. (1997). Minor bioactive dihydrophenanthrenes from *Juncus effusus*. J. Nat. Prod, 60, 1265-1268.
- [46] DellaGreca M., Fiorentino A., Isidori M., Lavorgna M., Monaco P., Previtiera L., Zarrelli A. (2002). Phenanthrenoids from the wetland *Juncus acutus*. Phytochemistry, 60, 633-638.
- [47] DellaGreca M., Fiorentino A., Monaco P., Previtiera L., Temussi F., Zarrelli A. (2003). Benzocoumarins from the rhizomes of *Juncus acutus*. Tetrahedron, 59, 2317-2324.

Chapitre 3

Description des travaux

I. Etude chimique de l'espèce *Crataegus azarolus* (L.)

I.1. Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée de la région de Mila en 2013, pendant la période de florisation (Mai-juin) et identifié par Mr. Laouar Houcine (enseignant à l'université de Sétif). Après séchage dans un endroit sec et à l'abri de la lumière, les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées (300 g).

I.2. Macération et extraction

Le matériel végétal sec (300 g) a subi une macération dans un mélange (MeOH / H₂O, 80:20) pendant 24 heures. La macération est répétée quatre fois avec renouvellement du solvant, dont la dernière macération à chaud.

Les divers extraits récupérés sont ensuite réunis et évaporés sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un résidu sirupeux, ce dernier est repris par de l'eau bouillante, puis laissé au repos à froid pendant une nuit pour décantation.

Après filtration sous vide, on obtient une solution aqueuse. Cette dernière a subi une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme (CHCl₃), puis l'acétate d'éthyle (AcOEt) et en enfin le *n*-butanol (*n*-BuOH). L'extraction est répétée trois fois avec chaque solvant.

Les trois phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées pour obtenir enfin :

- L'extrait CHCl₃ (0.8 g).
- L'extrait AcOEt (1.2 g).
- L'extrait *n*-BuOH (8 g).

Ces trois extraits ont subi des tests chromatographiques CCM de gel de silice et de cellulose avec quelques systèmes d'élution dont le but est de valoriser leurs richesses en produits et pour choisir le bon système de séparation en chromatographie de colonne.

Les différentes étapes d'extraction sont représentées sur la (fig.29).

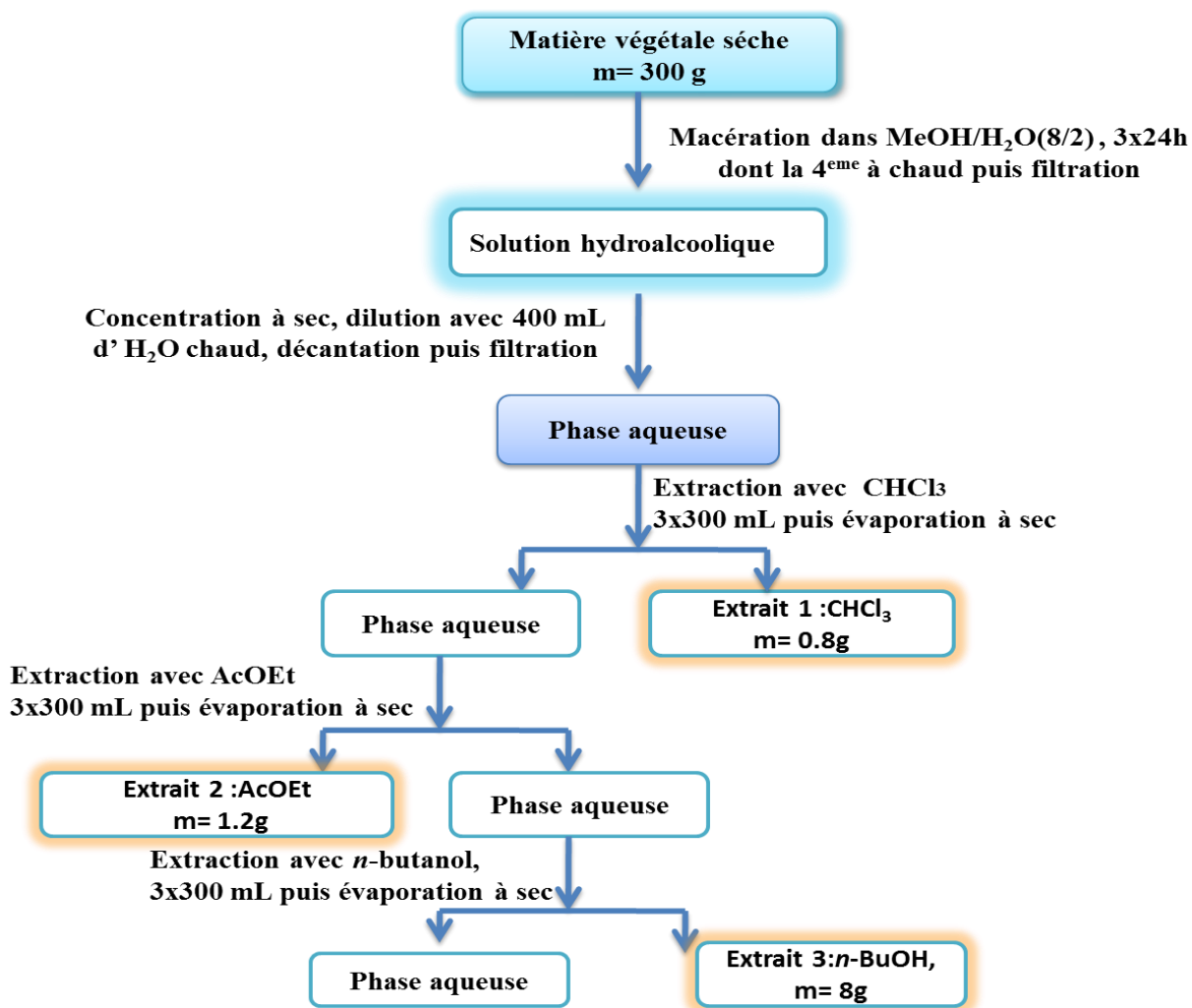


Figure 29 : Différentes étapes d'extraction des parties aériennes de *C. azarolus*

I.3. Séparation chromatographique

I.3.1. Séparation et purification des composés de l'extrait chloroformique

Plusieurs tests chromatographiques avec plusieurs systèmes de solvants ont mené au système de séparation (cyclohexane/acétate d'éthyle).

L'extrait chloroformique (0.8 g) est déposé sur une colonne de gel de silice (20-45 μm , Merck) préparée dans le cyclohexane. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système cyclohexane-acétate d'éthyle en commençant par le cyclohexane pur avec un fractionnement tous les 50 mL (Tableau 12). Le suivi de ces fractions est effectué par CCM de gel de silice et les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm).

Tableau 10 : Résultats de séparation par CC de l'extrait CHCl₃ de *C.azarolus*

Fraction	Nom de la fraction	Système d'élution	Observations
F1-F6	A	Cyclohexane 100%	Mélange en faible quantité
F7-F14	B	Cyclohexane-AcOEt (90 /10)	Mélange en faible quantité
F15-F28	C	Cyclohexane-AcOEt (80/20)	Mélange de produits
F29-F32	D	Cyclohexane-AcOEt (70/30)	Mélange en faible quantité
F33-F37	E	Cyclohexane-AcOEt (60/40)	Mélange en faible quantité
F38-F56	F	Cyclohexane-AcOEt (50/50)	Mélange de produits
F57-F72	G	Cyclohexane-AcOEt (40/60)	Mélange de produits
F73-F80	H	Cyclohexane-AcOEt (30/70)	Mélange inséparable
F81-F90	I	Cyclohexane-AcOEt (20/80)	Mélange de produits
F91-F100	J	Cyclohexane-AcOEt (100%)	Mélange inséparable

- **Analyse de la fraction C par GC-MS**

La fraction C éluée avec 20% d'acétate d'éthyle a été soumise à une analyse GC-MS en utilisant la chromatographie en phase gazeuse avec un appareil VARIAN 3900 avec auto-injecteur CP-8400 couplé à un spectromètre de masse (VARIAN Saturn 2000 MS-MS) et une colonne de DB-1 (30 m x 0.25 mm i.d, épaisseur de film 0.25 µm) ayant comme interface un détecteur à trappe d'ions (ITD ; software 4.1). Les paramètres MS étant :

- Température de trappe d'ions : 230 °C.
- Rapport split : 1:10.
- Potentiel d'ionisation : 70 ev.
- Courant d'ionisation : 60 mA.
- Bande de scans : 40-300 u.
- Temps de scan : 1s.

Les données de contrôle d'instrument et de spectrométrie de masse étaient gérées par un ordinateur exécutant le logiciel Saturn GC-MS WorkStation (version 6.30). L'identification des pics chromatographiques des produits (A, B, C, D, E) a été réalisée par

comparaison de leur spectre de masse avec celle de la base des données NIST (National Institute of Standards and Technology library).

L'étude de l'extrait chloroformique de l'espèce *C.azarolus* a permis d'identifier cinq produits qui sont nouveaux dans notre espèce.

I.3.2. Séparation et purification des composés de l'extrait acétate d'éthyle

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons procédé à des tests CCM de gel de silice et de cellulose, ainsi la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant CH₂Cl₂-MeOH.

L'extrait acétate d'éthyle (1.2 g) est déposé sur une colonne de gel de silice (20-45 µm). L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système CH₂Cl₂-MeOH en commençant par le CH₂Cl₂ avec un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par CCM de gel de silice. Les plaques sont visualisées sous lumière UV et la progression de la colonne est résumée dans le tableau-11.

Tableau 11 : Résultats de séparation par CC de l'extrait AcOEt de *C.azarolus*

Fraction	Nom de la fraction	Système d'élution	Observations
F1-F9	A	CH ₂ Cl ₂ 100%	Mélange en faible quantité
F10-F19	B	CH ₂ Cl ₂ - MeOH (90 /10)	Mélange en faible quantité
F20-F28	C	CH ₂ Cl ₂ - MeOH (80/20)	Mélange en faible quantité
F29-F32	D	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (70/30)	Mélange en faible quantité
F33-F34	E	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (60/40)	Mélange séparable
F35-F79	F	CH ₂ Cl ₂ – MeOH (50/50)	Mélange de produits en faible quantité
F80-F148	G	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (40/60)	Probable flavonoïde majoritaire en mélange
F149-F157	H	CH ₂ Cl ₂ -MEOH (30/70)	Mélange complexe
F158-F179	I	MeOH (100%)	Mélange complexe

On a procédé à la séparation des fractions **E** et **G** seulement par rapport à leur simplicité et leur poids relativement important par rapport aux autres.

- **Séparation de la fraction E**

La fraction E a subi une séparation sur colonne de gel de silice avec le système de solvants CHCl_3 -MeOH (6/1) en mode isocratique. Les sous fractions de colonne récoltées sont regroupés selon les résultats des tests CCM sur gel de silice pour enfin obtenir six principales sous fractions d'E1-E6 (Tableau-12).

Tableau 12 : Résultats de séparation de la fraction E

Sous fraction	Remarques
E1	Mélange de produits
E2	Mélange de produits séparables
E3	Mélange de produits
E4	Mélange de produits séparables
E5	Mélange de produits
E6	Mélange de produits

La sous fraction E2 est séparée sur CCM de gel de silice avec le system CHCl_3 -MeOH (5/1), deux produits **231** et **232** sont obtenues mais à faibles quantités, la fraction E4 est séparée de la même façon et avec le même système, le produit **4** est obtenu.

- **Séparation de la fraction G**

Cette fraction a été séparée sur colonne de gel de silice avec le system d'élution CHCl_3 -MeOH (3/1). Plusieurs sous fractions sont récoltées et regroupées selon les résultats des tests CCM pour aboutir à quatre sous fractions principales (Tableau-13).

Tableau 13 : Résultats de séparation de la fraction G

Sous fraction	Remarques
G1	Mélange de produits à très faible quantité
G2	Mélange de produits à très faible quantité
G3	Mélange complexe
G4	Mélange de produits

La sous fraction majoritaire **G4** est séparée sur des plaques CCM de gel de silice avec le system d'élution AcOEt/MeOH/H₂O (8 : 1 : 1), deux produits sont séparés **461** et **462** et sont purifiés sur une colonne de Sephadex en utilisant le méthanol comme éluant.

Cinq produits sont séparés à partir de l'extrait AcOEt, mais seulement deux produits sont partiellement identifiés (**4-61** et **4-62**) par manque de quantités suffisantes et d'analyses spectroscopiques.

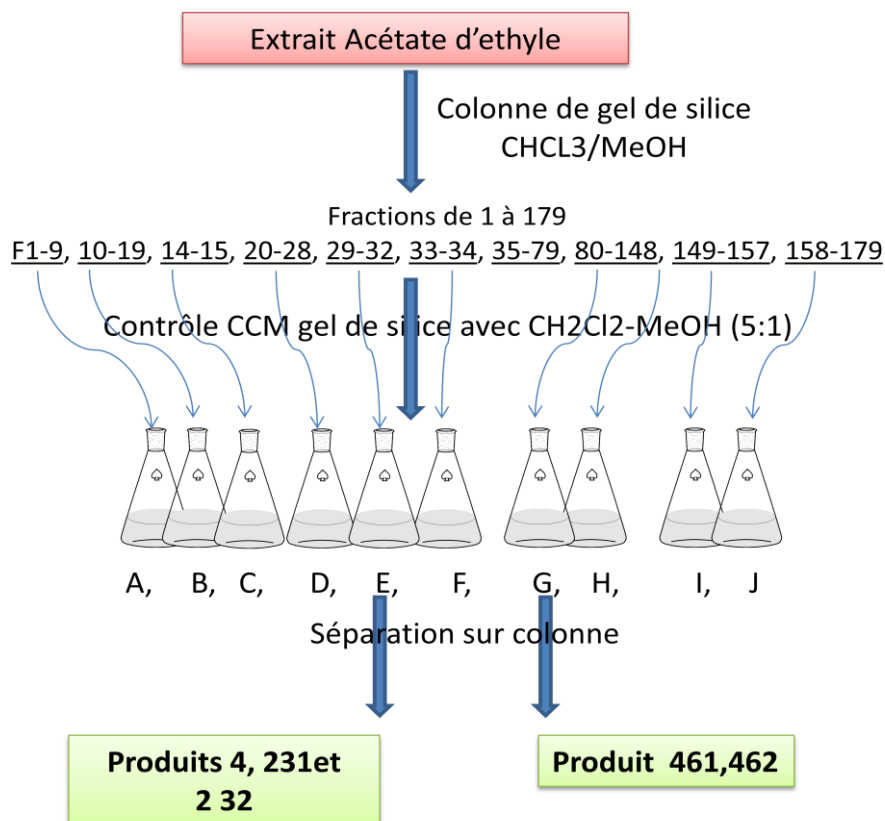


Figure 30 : Protocole de séparation de l'extrait AcOEt de *C. azarolus*

I.3.3. Séparation et purification des composés de l'extrait butanolique

Au début, on a réalisé des tests CCM (cellulose et gel de silice) pour l'extrait butanolique dont le but est de valoriser sa richesse en flavonoïdes et de trouver le bon éluant pour la séparation sur colonne chromatographique.

Alors on a réalisé un CCM bidimensionnelle sur cellulose (fig.31) avec le BAW (*n*-butanol-eau-acide acétique, 4:1:5) et AcOH 15% (acide acétique-eau, 15:85), après développement de la plaque CCM on peut constater que l'extrait butanolique de cette plante est riche en flavonoides glycosides et que tous ces produits sont soit des flavones ou des flavonols substitués en position C3, d'après leur colorations sous UV.

On remarque sur cette carte la présence de cinq taches de couleur violette noire qui correspondent à des flavonoides mono- et polyglycosides.

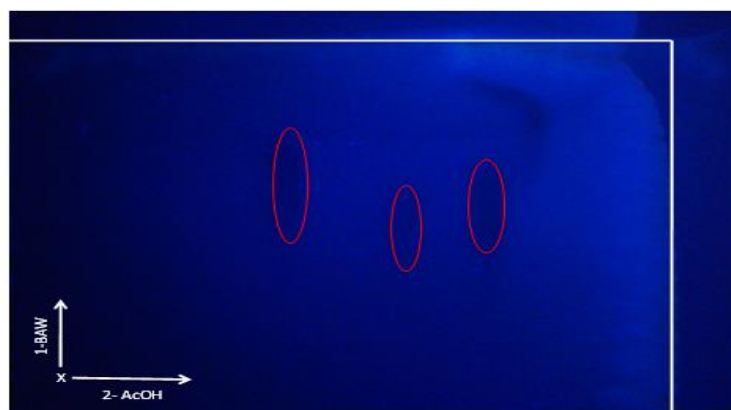


Figure 31 : Carte CCM bidimensionnelle (cellulose) de l'extrait *n*-BuOH

Environ 4 g de l'extrait butanolique est déposé sur une colonne de polyamide SC6 (90 x 3 cm). L'éluion a été réalisée par un gradient d'eau-méthanol, en commençant par l'eau pure, plusieurs fractions de 100 mL ont été collectées. Le suivi de la composition des fractions a été effectué par CCM de gel de silice et de cellulose.

Les plaques sont visualisées sous lumière UV à 365 nm et les fractions de même composition sont rassemblées. La progression de la colonne est résumée dans le tableau-14.

Tableau 14 : Résultats de séparation par CC de l'extrait *n*-BuOH de *C.azarolus*

Lot de Fractions	N° de la Fraction	System d'éluion	Observations
1-5	A	H ₂ O 100%	Mélange en faible quantité
6-14	B	H ₂ O 100%	Mélange en faible quantité
15-18	C	H ₂ O 100%	Mélange séparable
19-56	D	H ₂ O 100%	Mélange en faible quantité
57-68	E	H ₂ O-MeOH (95/5)	Mélange de produits
69-78	F	H ₂ O-MeOH (90/10)	Mélange complexe
79-83	G	H ₂ O-MeOH (80/20)	Mélange en faible quantité
84-90	H	H ₂ O-MeOH (70/30)	Mélange de produits
91-96	I	H ₂ O-MeOH (60/40)	Mélange de produits
97-102	J	H ₂ O-MeOH (50/50)	Mélange complexe
103-110	K	H ₂ O-MeOH (40/60)	Mélange complexe
111-119	L	H ₂ O-MeOH (0/100)	Mélange séparable

Parmi les 12 fractions obtenues, on a procédé à la séparation des fractions **H**, **L** à cause de leur simplicité et leur poids relativement important.

- **Séparation de la fraction H**

C'est la fraction la plus importante du point de vue masse, c'est la raison pour laquelle nous avons procédé directement à une deuxième séparation sur colonne de gel de silice avec le système CHCl₃-MeOH, 9:1, en mode isocratique. Après regroupement des sous fractions obtenues selon les tests CCM, on a obtenu quatre sous fractions principales, les résultats sont dressés dans le tableau-15.

Tableau 15 : Résultats de séparation de la fraction **H**

Sous fraction	Remarques
H1	Flavonoïde majoritaire en mélange
H2	Flavonoïde majoritaire en mélange
H3	Mélange de produits
H4	Mélange de produits

Ensuite les deux sous fractions H1 et H2 ont été purifiées sur Sephadex LH-20 avec MeOH comme éluant, pour obtenir les deux produits **1** et **2**.

- **Séparation de la fraction L**

Avec cette fraction un précipité s'est formé et après recristallisation on a obtenu le produit pur **3**.

L'étude de l'extrait butanolique de l'espèce *C. azarolus* a permis d'isoler trois produits purs.

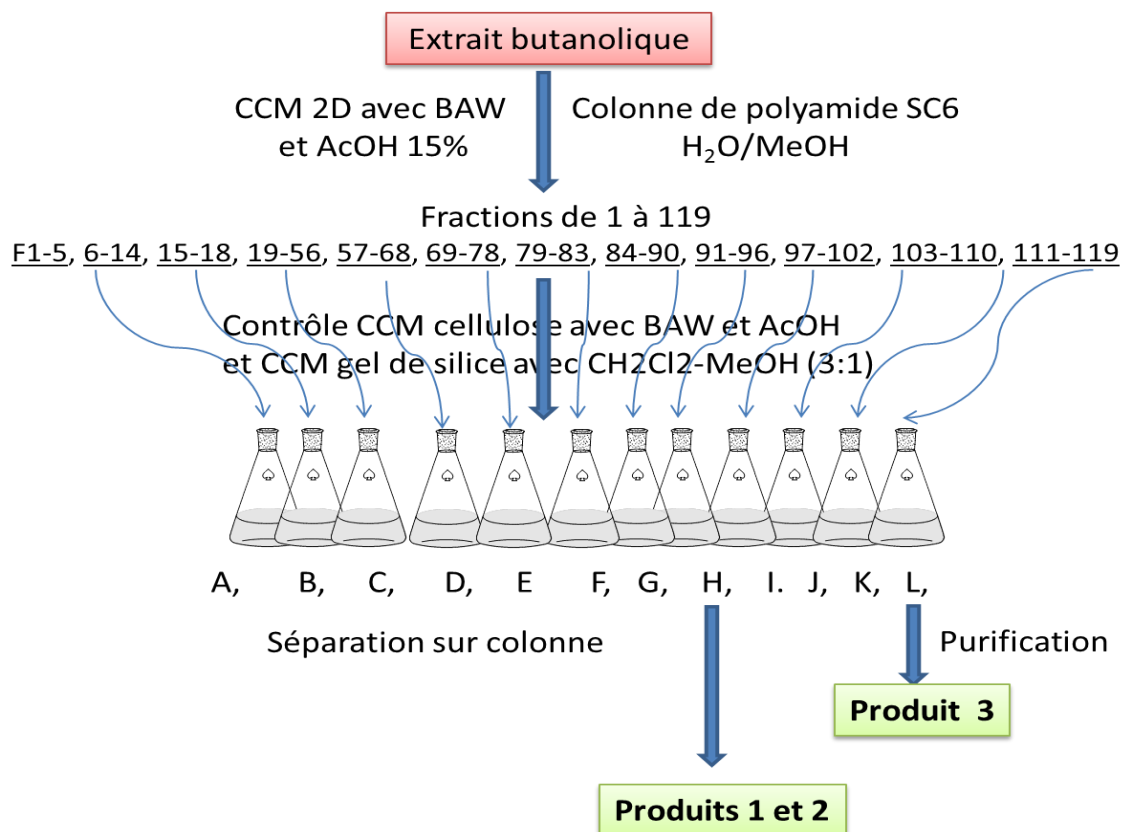


Figure 32 : Protocole de séparation de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *C. azarolus*

II. Etude chimique de l'espèce *Dioscorea communis* (L.)

II.1. Récolte du matériel végétal

Les rhizomes frais de la plante ont été récoltés de la région d'El Milia (Jijel) et identifiés par Mr. Laouar Houcine (enseignant à l'université de Sétif). Ils ont été râpés et pesés (2 kg).

II.2. Macération et extraction

2 kg des rhizomes ont subi une macération dans 3 L d'éther diéthylique pendant 48 heures à température ambiante, la solution obtenue après filtration est évaporée à sec sous pression réduite, cette opération est répétée trois fois et les extraits sont réunis pour donner 3.24 g de l'extrait éther diéthylique après évaporation.



Figure 33 : Racines de *D. communis*

Dans une deuxième étape, le matériel végétal (marc) est de nouveau macéré dans une solution MeOH-H₂O (7:3) pendant 48 heures à température ambiante, après filtration, le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite, l'opération est répétée trois fois, l'extrait hydroalcoolique sec est repris avec 500 ml d'eau distillée chaude et laisser au repos pendant une nuit.

Après filtration, la solution aqueuse obtenue a subi des séparations liquide-liquide dans une ampoule à décanter avec des solvants de polarité croissante, premièrement on ajoute 200 ml de CHCl₃ à la solution aqueuse, après décantation on récupère la phase organique, l'opération est répétée trois fois, les phases organiques sont réunies et évaporée à sec pour donner 2.2 g d'extrait CHCl₃. Ensuite on ajoute 200 ml d'AcOEt à la solution aqueuse précédente après décantation on récupère la phase organique, l'opération est répétée deux fois et les phases organiques sont réunies et évaporée à sec.

A la fin de cette étape, on a obtenu trois extraits :

- Extrait Et₂O (3.24 g).
- Extrait CHCl₃ (2.2 g).
- Extrait AcOEt (12 g).

Ces trois extraits ont subi des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice GF254 avec quelques systèmes d'élution, dont le but est de valoriser leurs richesses et pour choisir le bon système de séparation à utiliser en chromatographie de colonne, les systèmes utilisés sont :

S1 = CHCl₃

S2 = Cyclohexane-AcOEt (7:3)

S3 = CHCl₃-Acétone (19:1)

Ces tests ont montré que les deux extraits éther diéthylique et chloroformique sont identiques et riches en produits.

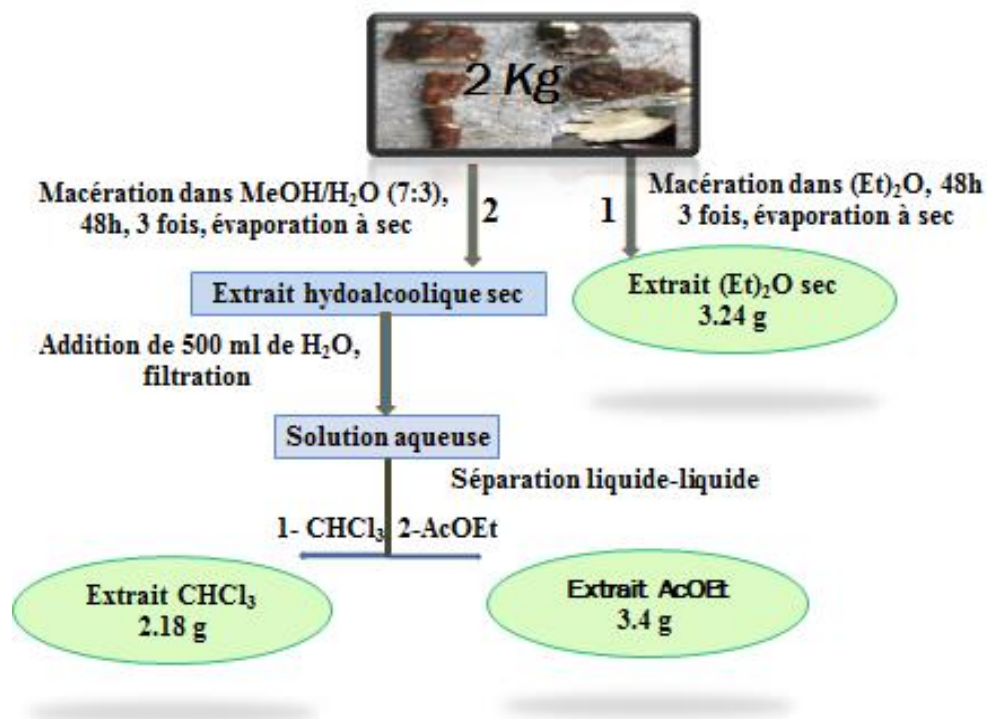


Figure 34 : Protocole d'extraction des rhizomes de *D. communis*

II.3. Séparation et purification des composés de l'extrait éther diéthylique

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait Et_2O , nous avons procédé à des tests CCM de gel de silice, la meilleure séparation obtenue était avec le système de solvant cyclohexane- $AcOEt$.

L'extrait Et_2O (3 g) est déposé sur une colonne de gel de silice. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système cyclohexane- $AcOEt$ en commençant par le cyclohexane pur avec un fractionnement tous les 50 mL. Le suivi de la progression (tableau-16) est effectué par CCM de gel de silice. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm).

Parmi les fractions obtenues, on a choisi la séparation des fractions ; F8, F16, F24, F51, F54, F74. Ce choix est établi par rapport à leurs poids et richesse en métabolites secondaires, la séparation a été faite sur des petites colonnes chromatographiques et par CCM de gel de silice.

Tableau 16 : Résultats de séparation par chromatographie sur CC de l'extrait Et₂O des rhizomes de *D. communis*

Lots de fractions	N° de la fraction	System d'éluion	Observation
1-2	F1	Cyclohexane (100%)	
3-4	F4	Cyclohexane/AcOEt (90/10)	Mélange
5-7	F5	≠	≠
8- 9	F8	≠	Produit pur
10-15	F10	≠	≠
16	F16	≠	Produit pur
17-23	F17	≠	Mélange
24-33	F24	Cyclohexane/ AcOEt (85/15)	Mélange separable
34- 37	F34	≠	Mélange complexe
38-40	F38	Cyclohexane/ AcOEt (70/30)	≠
41-43	F41	≠	Mélange
44-51	F44	Cyclohexane/ AcOEt (60/40)	≠
52-53	F52	≠	Mélange séparable
54-55	F54	≠	Mélange séparable
56-58	F56	≠	Mélange complexe
59	F59	AcOEt 100%	Mélange complexe
60-65	F60	≠	≠
66-73	F66	≠	≠
74	F74	≠	Produit majoritaire

➤ **Séparation de la fraction F8**

La fraction F8 a été purifiée sur une colonne de séphadex LH-20 en utilisant le MeOH comme éluant. Cette fraction a donné six sous fractions et après contrôle par CCM analytique, la sous fraction 8A a donné un produit pur **8 A**.

➤ **Séparation de la fraction F24**

La fraction F24 a subit une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'éluion : cyclohexane/AcOEt (7:3), six principales bandes sont délimitées: **24a**, **24b**, **24c**, **24d**, **24e**, **24f**.

La pureté des produits séparés est contrôlée par des tests CCM sur gel de silice (Fig.35) alors **24c**, **24d**, **24f** sont des produits purs tandis que **24b** est un mélange qui sera séparé ultérieurement par CCM de gel de silice GF254 avec le système S2 (cyclohexane-AcOEt) (7/3) encore cinq bandes sont récoltées dont le produit majoritaire est **24b3**. Les résultats sont dressés dans les deux tableaux 19, 20.

Tableau 17 : Résultats de séparation de la fraction **24**

Sous fraction	Remarque
24a	-
24b	produit majoritaire
24c	Produit pure
24d	Produit pure
24e	-
24f	Produit pure

Tableau 18 : Résultats de séparation de la sous fraction **F 24b**

Sous fraction	Remarque
24b1	-
24b2	-
24b3	Produit pure
24b4	-
24b5	-

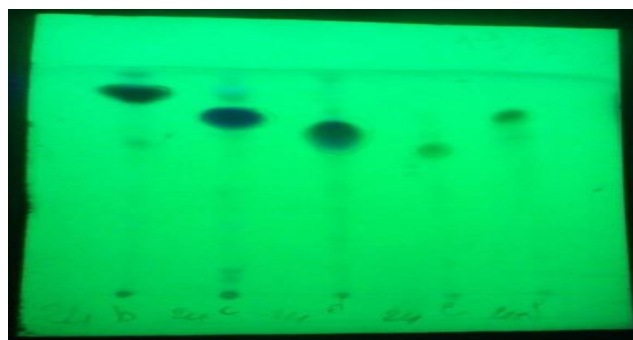


Figure 35 : CCM sous 254 nm pour les bandes de **F24b**

➤ **Séparation de la fraction F52**

La fraction F52 a subi une séparation sur plaque de gel de silice, en utilisant comme système d'éluion : cyclohexane /AcOEt (7:3), six bandes : **52a**, **52b**, **52c**, **52d**, **52e** et **52f** sont délimitées dont le produit **52b** est le produit majoritaire. La pureté des produits séparés est contrôlée par CCM de gel de silice, alors on a induit que **51b**, **51c**, **51d** sont des produits purs et les résultats sont dressés dans le tableau 21.

Tableau 19 : Résultats de séparation de la fraction **F 52**

Sous fraction	Remarque
52a	-
52b	Produit pur
52c	Produit pur
52d	Produit pur
52e	-
52f	-

➤ **Séparation de la fraction F54**

De même que les fractions précédentes, une quantité de la fraction **54** est séparée sur plaques de gel de silice GF254 avec le système S3 (Chloroforme/Acétone, 19:1), sept bandes sont séparées (**54a**, **54b**, **54c**, **54d**, **54e**, **54f** et **54g**) dont **54b** est un produit pur après contrôle de pureté par CCM analytique (Fig.42). Les résultats sont dressés dans le tableau-20.

Tableau 20 : Résultats de séparation de la fraction **F 54**

Sous fraction	Remarque
54a	-
54b	Produit pur
54c	-
54d	-
54e	-
54f	-
54g	-

**Figure 36** : CCM sous 254 nm pour les bandes de **F54**

➤ **Séparation des fractions F74**

La fraction F78 a été purifiée sur une colonne de Sephadex LH-20 on utilisant MeOH comme éluant. Alors elle a donné sept sous fractions dont les sous fractions **74f** et **74g** correspondent au produit pur **74f**.

Enfin à partir de l'extrait éther éthylique des rhizomes de *D.communis*, on a pu isoler plus de dix produits purs, dont on a pu identifier sept d'entre eux.

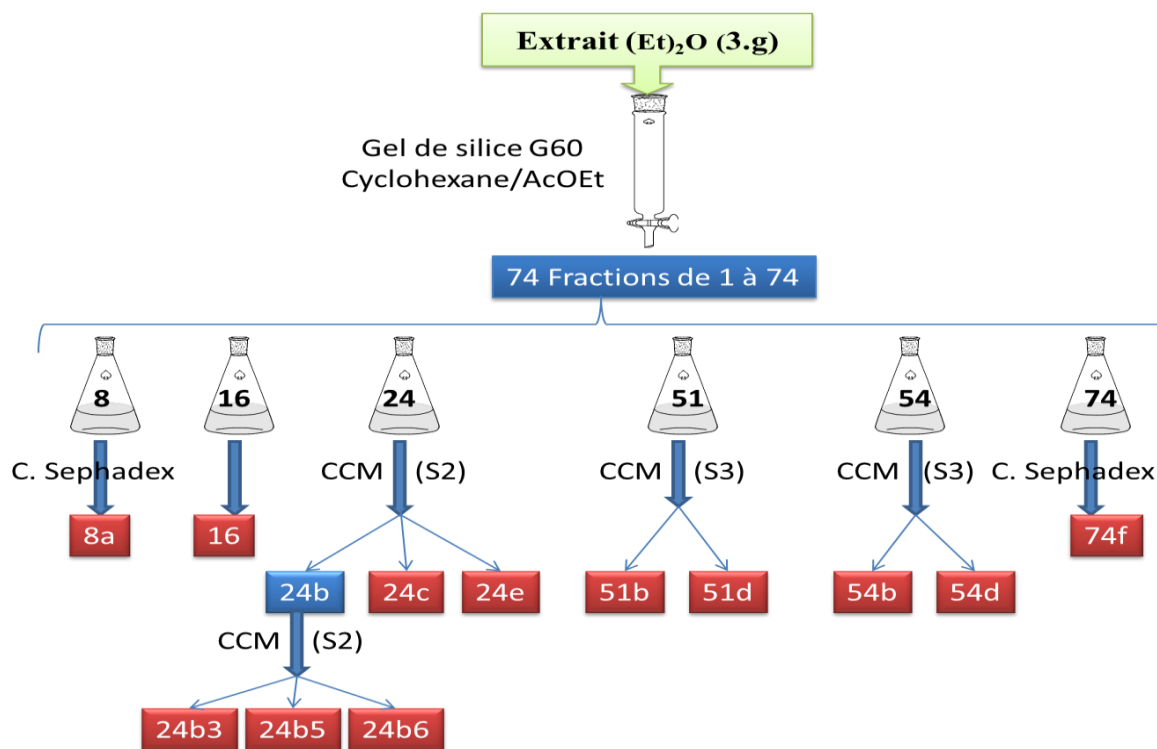


Figure 37 : Protocole de séparation de l'extract Et_2O de *D. communis*

Chapitre 4

Résultats et discussion

L'identification des produits isolés est basée sur leurs propriétés chromatographiques (coloration sous UV et R_f), les analyses spectrales : IR, UV-visible, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HMQC, HMBC, NOESY ainsi que la spectrométrie de masse (SM) et l'hydrolyse acide pour les flavonoïdes glycosylés et enfin la comparaison des données obtenues avec la littérature.

I. Identification des produits isolés de *Crataegus azarolus*

I.1. Produits identifiés dans l'extrait CHCl_3 de *C. azarolus*

Cinq produits volatiles (A-E) ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec la base de données NIST. A savoir que ces produits sont identifiés pour la première fois dans l'espèce *C. azarolus*.

- Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 25.103 min avec $m/z = 206(\text{M}^+)$ et les fragments : 191, 163, 115, 74, 57 a été identifié comme étant : **2,4-Bis (2-méthyl-2-propanyl) phénol**, (Produit A) (fig.38).

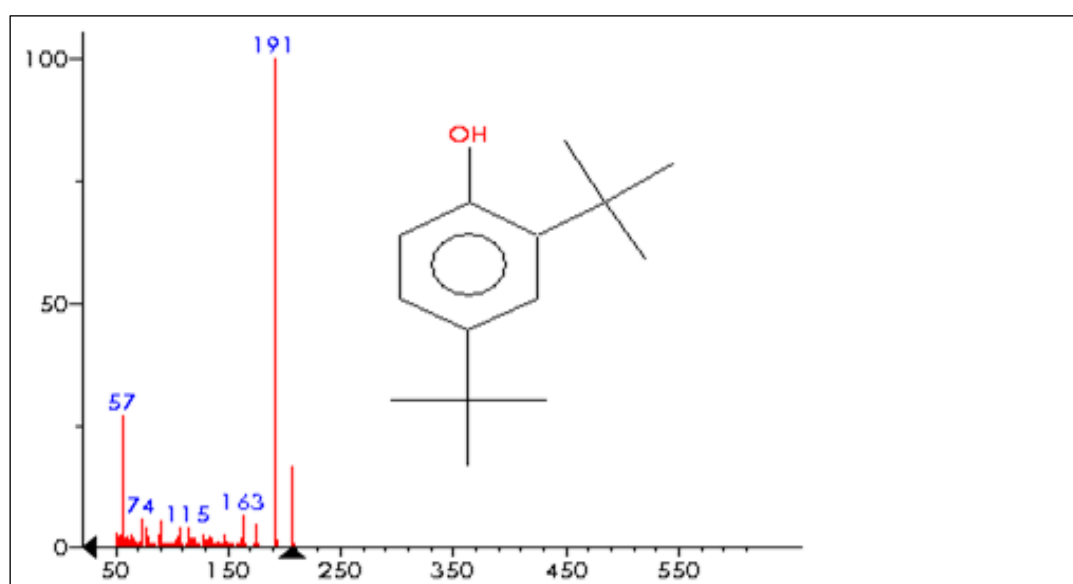


Figure 38: Spectre SM-IE du produit A

- Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 33.013 min avec $m/z = 242(\text{M}^+)$ et les fragments : 199, 143, 87, 74, 55 a été identifié comme étant : **12-Méthyltridécanoate de méthyle** (Produit B) (fig.39).

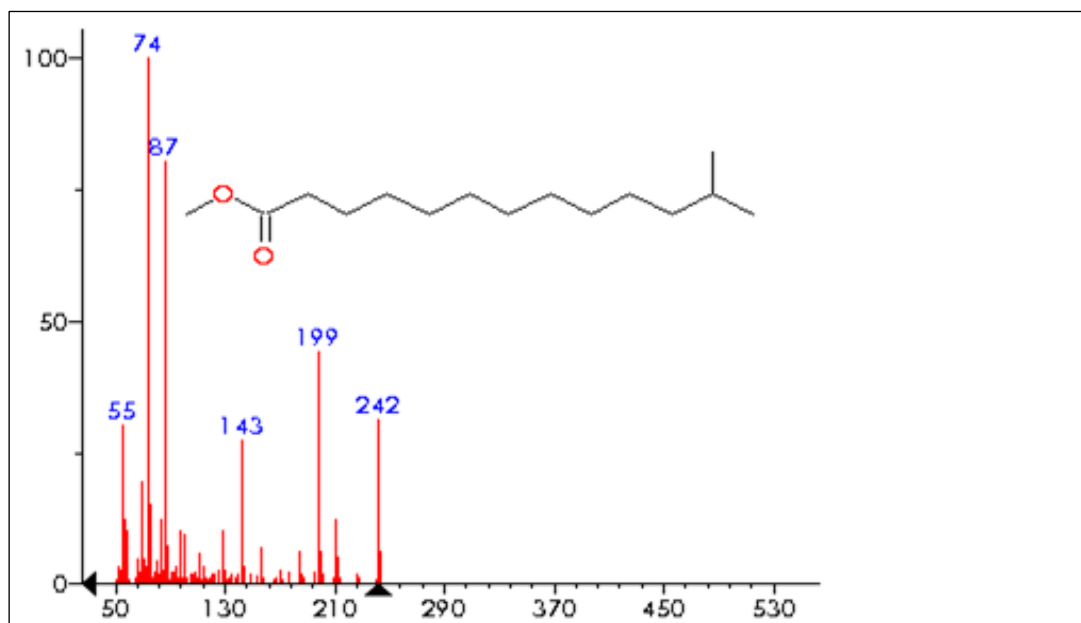


Figure 39 : Spectre SM-IE du produit B

- Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 33.034 min avec $m/z = 348(M^+)$ et les fragments : 293,223,167,149,104,76,57 a été identifié comme étant : **Phtalate d'isobutyle et de nonyle** (Produit C) (fig.40).

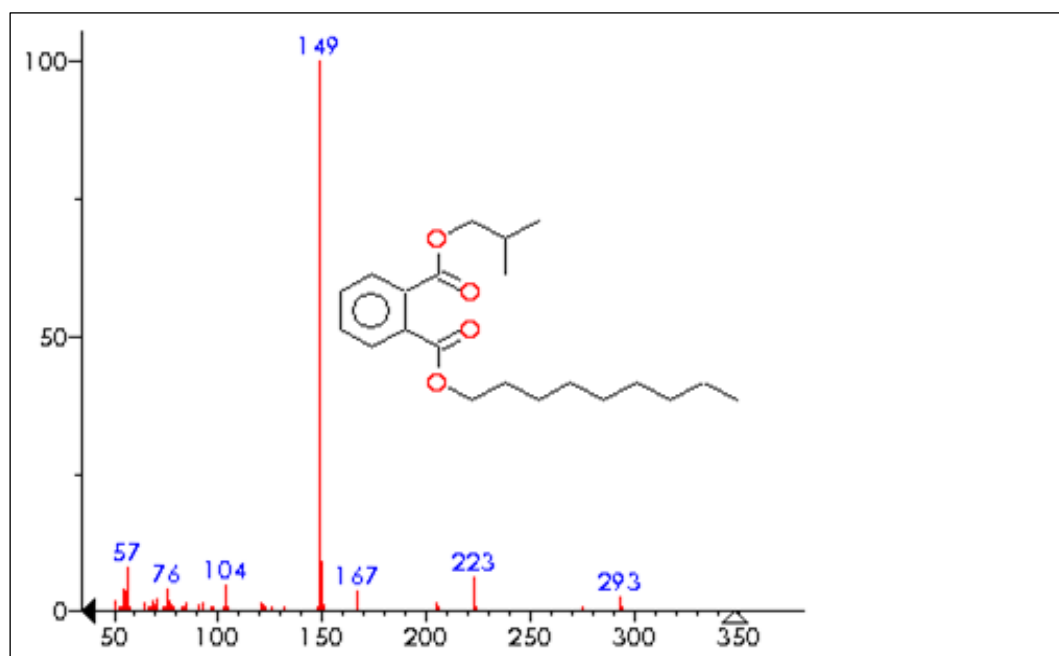


Figure 40 : Spectre de SM-IE du produit C

- ✚ Le pic qui apparaît à un temps de rétention de 34.067 min avec $m/z = 270$ (M^+) et les fragments : 227, 185, 143, 87, 74, 55 a été identifié comme étant : **14-Méthylpentadécanoate de méthyle** (Produit **D**) (fig.41).

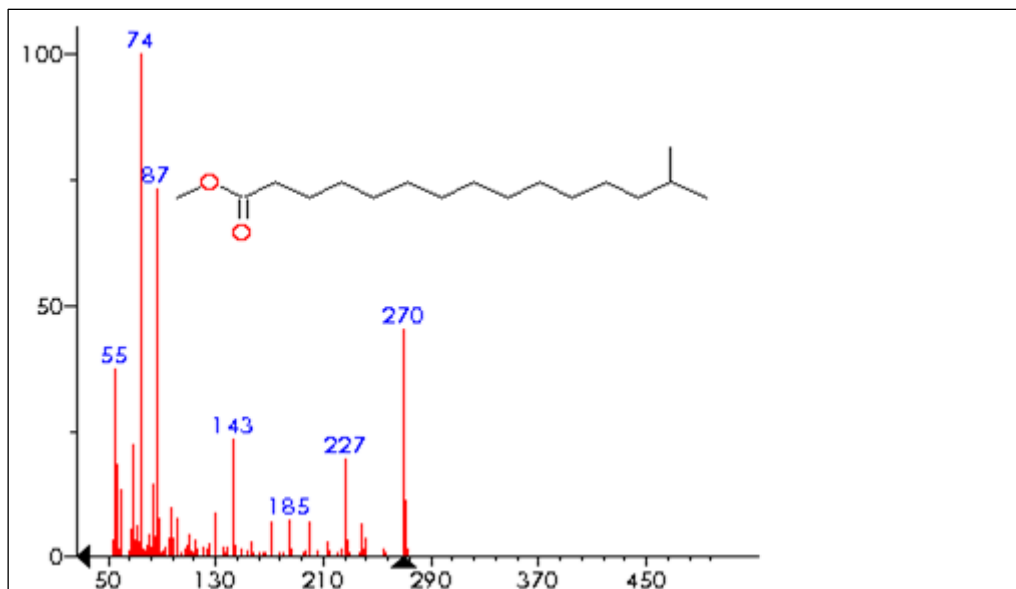


Figure 41: Spectre de SM-IE du produit **D**

- Le qui apparaît à un temps de rétention de 37.330 min avec $m/z = 296$ (M^+) et les fragments : 264, 222, 180, 83, 69, 55 a été identifié comme étant : **(8E)-8-octadécénoate de méthyle** (Produit **E**) (fig.42).

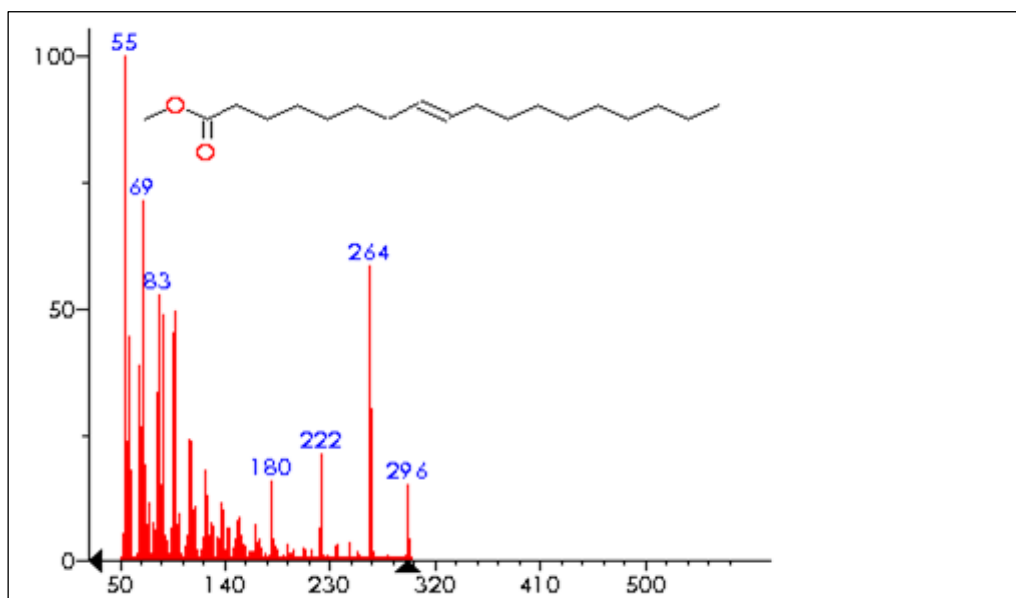


Figure 42 : Spectre de SM-IE du produit **E**

I.2. Identification des produits isolés de l'extrait AcOEt de *C. azarolus*

I.2.1. Elucidation structurale du produit 4-61

- Propriétés chromatographiques et spectroscopiques

Aspect : Poudre jaune

Fluorescence sous UV : Violette

Tableau-21 : Données spectroscopiques UV-Visible du produit 4-61

Réactif	λ max (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	333	270	Flavone
MeOH+NaOH	396 329	280	4'-OH et 7-OH
MeOH+AlCl ₃	383 343 304sh	278	5-OH
MeOH+AlCl ₃ +HCl	385 345 300sh	278	Pas d' <i>ortho</i> -di-OH
MeOH+NaOAc	384 305sh	280	7-OH
MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃	333	270	Pas d' <i>ortho</i> -di-OH

Tableau-22 : Données RMN-1H (250 MHz, CD₃OD) du produit 4-61

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
7.96	<i>d</i>	2H	8.8	H-2', H-6'
6.92	<i>d</i>	2H	8.8	H-3', H-5'
6.50	<i>s</i>	1H	-	H-3
6.13	<i>s</i>	1H	-	H-6/ H-8
5.14	<i>d</i>	1H	9.9	H-1''
5.08	<i>d</i>	1H	1.2	H-1'''
0.72	<i>d</i>	3H	6.11	H-6'''

SM (ES⁺, 150eV): 651 [M+H]⁺, 579 [M+H-72]⁺, 433 [M+H-72-146]⁺, 313 [M+H-72-146-120]⁺.

- Interprétation

La couleur violette du produit 4-61 et la valeur de la bande I à 333 nm sont en faveur d'une flavone. Après addition de NaOH, on remarque un effet bathochrome (+63 nm) avec augmentation de l'intensité optique ce qui indique la présence d'un OH en position 4', tandis que la présence d'un OH en position 7 est indiqué par l'apparition d'une nouvelles bande à 329 nm, ceci est confirmé par l'effet bathochrome (+10 nm) de la bande II après l'addition de NaOAc par rapport à sa valeur dans le MeOH.

La comparaison des spectres AlCl_3 et AlCl_3+HCl au niveau de la bande I (pas d'effet hypsochrome) montre l'absence d'un système *ortho* di-OH, ceci est confirmé par l'absence d'effet bathochrome de la bande I après l'addition de H_3BO_3 par rapport au spectre MeOH. Finalement, la présence d'un effet bathochrome (+52 nm) on comparant le spectre AlCl_3+HCl avec le spectre MeOH au niveau de la bande I, montre la présence d'un OH en position 5. On déduire que le produit a un squelette d'apigénine avec des hydroxyles en positions 5, 7 et 4' (fig.43).

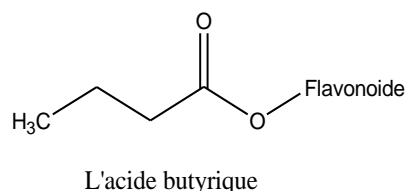
Le squelette apigénine du produit **4-61** est confirmé par le spectre RMN- ^1H qui présente deux signaux sous forme de doublets ($J \sim 9$ Hz) chacun d'intégration 2H, le premier vers 7.96 ppm est attribué à couple H2' et H6' et le deuxième vers 6.92 ppm pour le couple de protons H-3', H-5'. Deux autres signaux sous forme de singulets le premier à 6.50 ppm est attribué au proton H-3 du flavone, alors que le deuxième 6.13 ppm est attribué au proton H-6 ou H-8 (fig.45), page 88.

Le spectre de masse (ES^+) en mode positif (fig.44) donne un pic quasimoléculaire à m/z 651 correspond à $[\text{M}+\text{H}]^+$ avec des pics de fragmentation à m/z 579 qui correspond à $[\text{M}+\text{H}-72]^+$ suite à la perte de l'acide butyrique, un pic à m/z 433 qui correspond à $[\text{M}+\text{H}-72-146]^+$ suite à la perte du sucre rhamnose ce qui montre que le rhamnose est lié par un pont oxygéné, enfin un pic à m/z 313 qui correspond à $[\text{M}+\text{H}-72-146-120]^+$ caractéristique de la présence d'un C-hexose. Le spectre SM du produit dévoile que le produit **4-61** est un flavonoïde diglycosylé, le premier sucre est un hexose lié à l'aglycone par une liaison C-C et le deuxième sucre est le rhamnose qui est lié à un hydroxyle de l'hexose. Puisque tous les hydroxyles de l'aglycone sont libres d'après l'analyse des spectres UV-Visible.

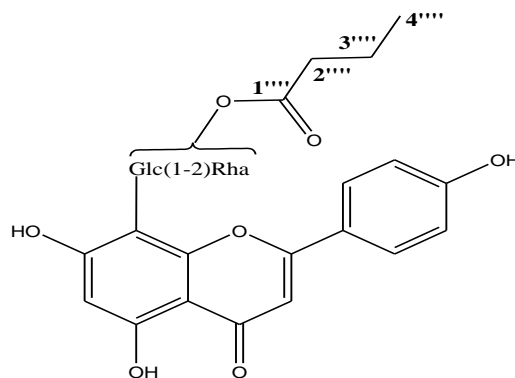
En revenant au spectre RMN- ^1H on remarque la présence des signaux de la partie osidique du produit qui sont deux signaux pour des protons anomériques sous forme de doublet le premier à 5.14 ppm pour l'hexose avec une constante de couplage ($J=9.9$ Hz) qui confirme que l'hexose est β lié à l'aglycone et le deuxième à 5.08 ppm avec $J=1.2$ Hz (jonction α) et qui constitué avec le doublet ($J=6.11$ Hz) à 0.72 ppm et d'intégration 3H (groupement CH_3) les signaux caractéristiques du sucre rhamnose. Les déplacements chimiques pour les protons anomériques révèlent que le premier sucre est lié à l'aglycone par une liaison C-C [1]. L'acide butyrique est représenté par un signale sous forme de triplet vers 3.1 ppm pour CH_2 , un multiplet vers 2.6 ppm pour l'autre CH_2 et enfin un signale large vers 1.3 ppm pour le CH_3 .

Le dédoublement des signale des protons H2' et H6' indique que l'hexose est lié en position 8 (et non en position 6) à l'aglycone par une jonction C-C.

Le spectre RMN-¹³C du produit **4-61** (non complet) confirme la présence de l'acide butyrique par la présence des pics caractéristiques à 15.87, 24.2, 30.5 et 179.46 ppm pour les groupements $\underline{\text{C}}\text{H}_3$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CO}$ et $\underline{\text{C}}=\text{O}$ respectivement (fig.46). Par manque d'analyses poussées comme la RMN-2D, la position de l'acide butyrique reste indéfinie.



Le spectre-¹³C montre aussi l'existence d'un pic à 18.14 ppm caractéristique du groupement CH_3 du rhamnose et neuf autres pics pour des carbones osidique entre (61.7-82.61 ppm) et la comparaison des données RMN-¹H et ¹³C avec la littérature [1] confirme que le rhamnose est lié en position 2'' de l'hexose, ce dernier est identifié au glucose par comparaison avec la littérature [2]. Alors le produit **4-61** est partiellement identifié au **vitéxine-2''-rhamnoside substitué par l'acide butyrique**.



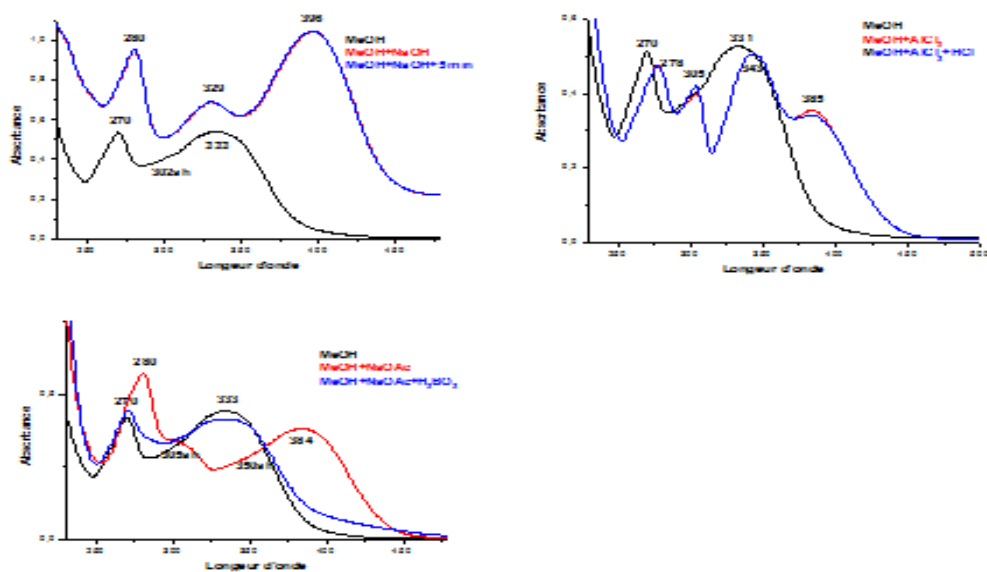


Figure 43 : Série spectrale UV-Visible du produit 4-61

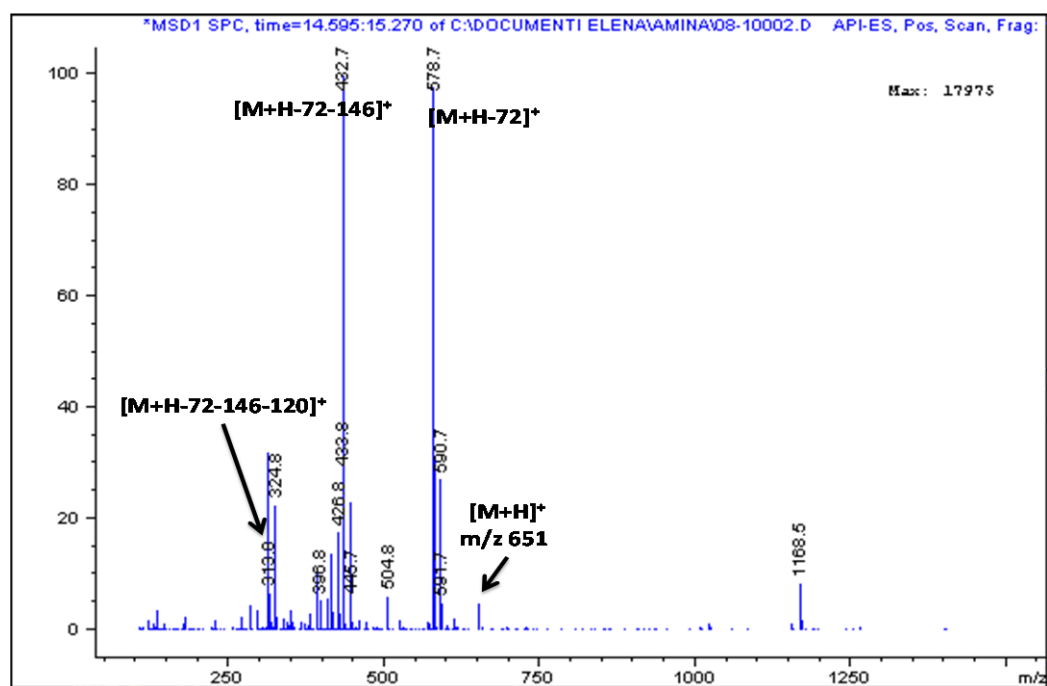


Figure 44 : Spectre de masse du produit 4-61

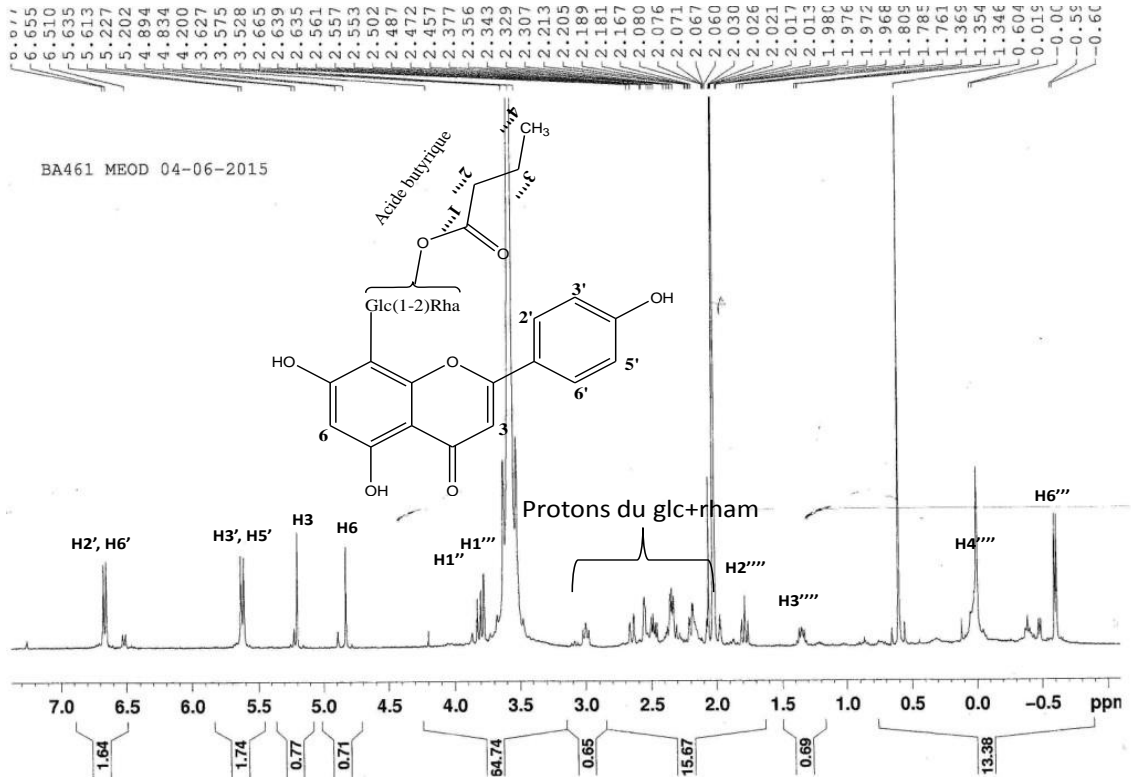


Figure 45 : Spectre RMN-1H du produit 4-61

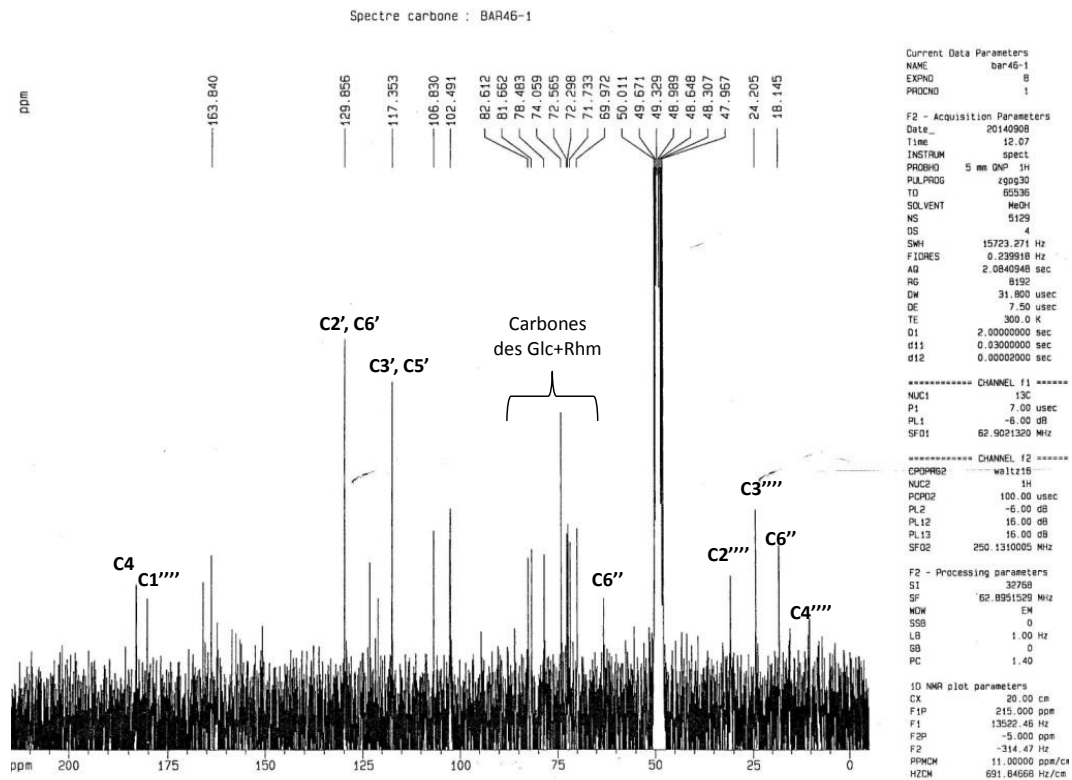


Figure 46 : Spectre RMN-13C du produit 4-61

I.2.2. Elucidation structurale du produit 4-62

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Aspect : **Poudre jaune**

Fluorescence sous UV : **Violette**

Tableau-23 : Données spectroscopiques UV-Visible du produit **4-62**

Réactif	λ max (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	332	268	Flavone
MeOH+NaOH	397 326	279	4'-OH et 7-OH
MeOH+AlCl ₃	381 340 309sh	280	5-OH
MeOH+AlCl ₃ +HCl	383 343 298sh	278	Pas d' <i>ortho</i> -di-OH
MeOH+NaOAc	383 307sh	281	7-OH
MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃	331	271	Pas d' <i>ortho</i> -di-OH

Tableau-24 : Données RMN-1H (250 MHz, CD₃OD) du produit **4-62**

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
7.85	<i>d</i>	2H	9.2	H-2', H-6'
6.80	<i>d</i>	2H	8.8	H-3', H-5'
6.38	<i>s</i>	1H	-	H-3
6.00	<i>s</i>	1H	-	H-6/ H-8
5.01	<i>d</i>	1H	9.9	H-1''
4.99	<i>s</i>	1H	-	H-1'''
0.59	<i>d</i>	3H	6.0	H-6'''

SM (ES⁺, 150 eV): 651 [M+H]⁺, 579 [M+H-72 (acide butyrique)]⁺, 409 [M+H-72-170]⁺.

- **Interprétation**

Les spectres UV-Visible du produit **4-62** sont identiques au produit précédent **4-61** et montrent qu'il contient des hydroxyles libres en positions 5, 7, 4' (squelette d'apigénine). De son côté le spectre RMN-1H (Fig.49) est semblable aussi à celui du produit précédent, ce qui montre qu'ils sont deux isomères. La comparaison par HPLC des deux produits (Fig.47) montre qu'ils sont différents l'un de l'autre.

Le spectre SM-ES⁺ du produit **4-62** (Fig.48) présente un pic quasimoléculaire [M+H]⁺ à m/z 651 et les pics de fragmentations [M+H-72]⁺ à m/z 579 qui correspond au perte de l'acide butyrique et un pic à m/z 409.

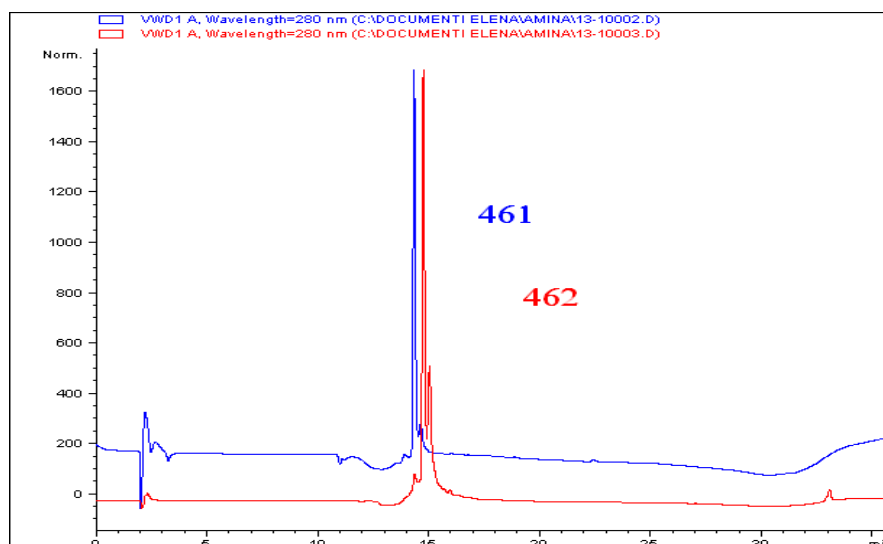
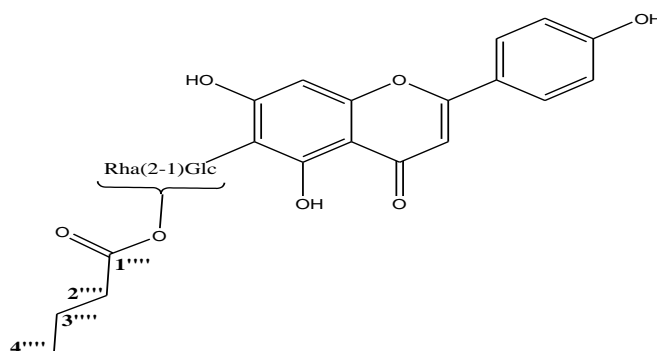


Figure 47 : Comparaison entre les produits 46-1 et 46-2

Par manque d'analyse et par comparaison avec le produit 4-61 nous proposons la structure suivante pour le produit 4-62 est l'isovitexine 2''-rhamnoside substitué par l'acide butyrique.



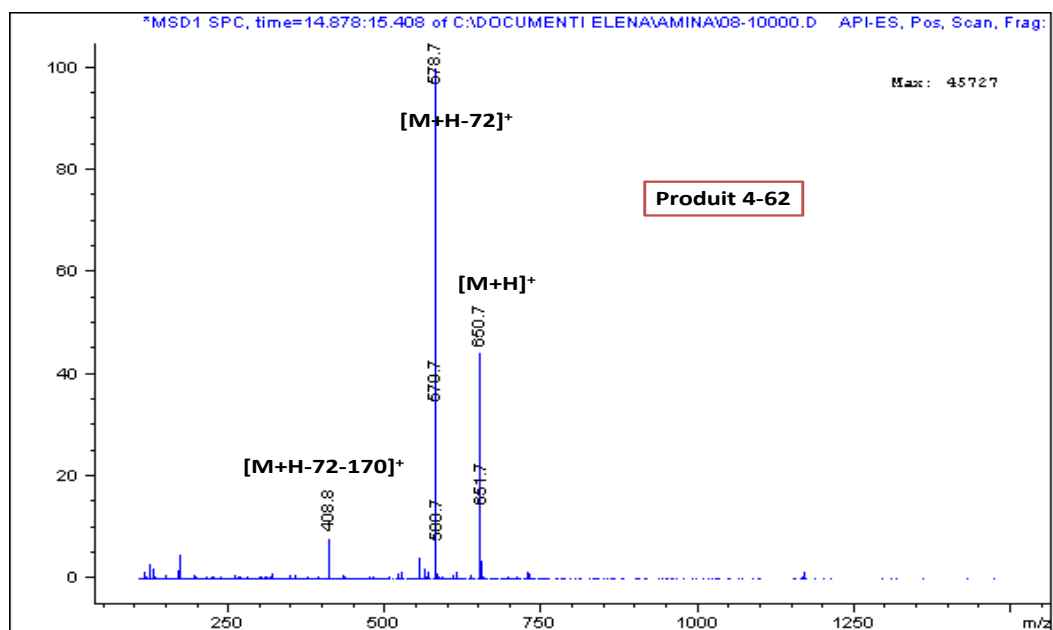


Figure 48 : Spectre de masse du produit 4-62

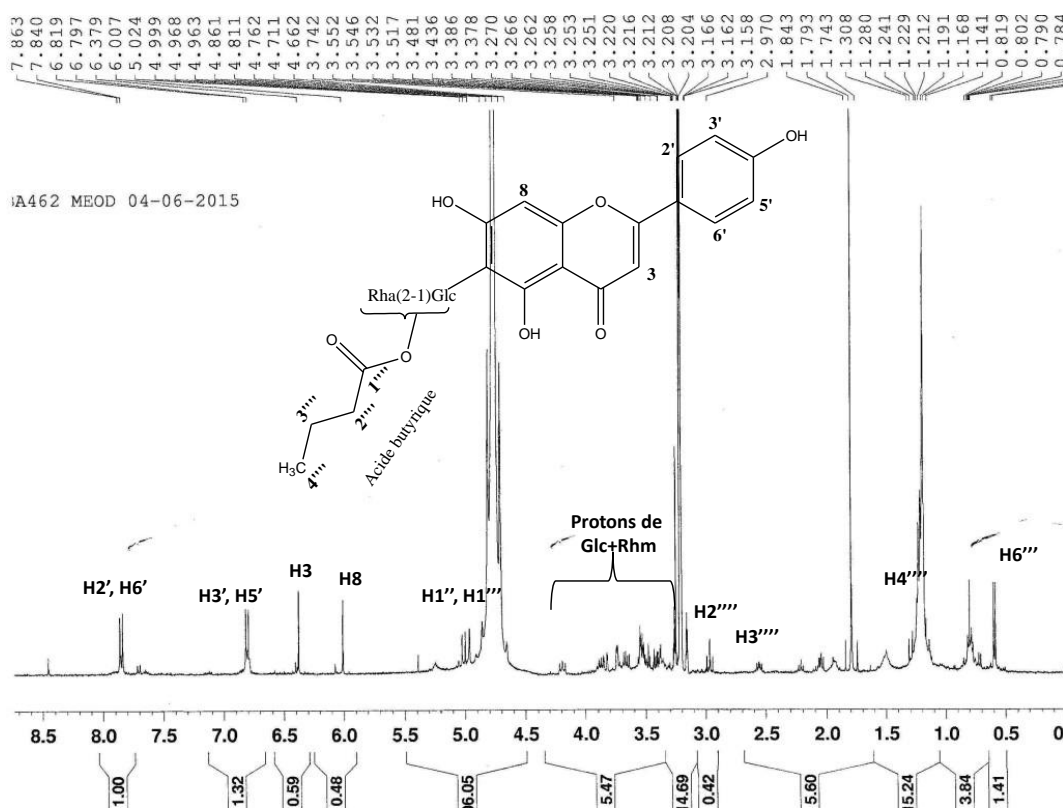


Figure 49 : Spectre RMN-1H du produit 4-62

I.3. Identification des produits isolés de l'extrait *n*-butanol de *C. azarolus*

I.3.1. Elucidation structurale du produit 1

Propriétés chromatographiques et spectroscopiques

Aspect : **Poudre jaune**

Fluorescence sous UV : **Noire-violette**

$R_f = 0.15$ (CHCl₃-MeOH, 3:1), $R_f = 0.92$ (BAW), $R_f = 0.3$ (AcOH 15%)

Tableau-25 : Données spectroscopiques UV-Visible du produit 1

Réactif	λ max (nm)		Interprétation
	Bande I	Bande II	
MeOH	359	270sh 257	3-OR
MeOH+NaOH	409 327	271	4'-OH et 7-OH
MeOH+NaOH+5 min.	397 330	280	Spectre stable
MeOH+AlCl ₃	434 300sh	275	5-OH
MeOH+AlCl ₃ +HCl	402 363 300	269	<i>Ortho</i> -di-OH
MeOH+NaOAc	394 318sh	274	OH libre en 7
MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃	382 318sh	264	<i>Ortho</i> -di-OH

Tableau-26 : Données RMN-1H (250 MHz, CD₃OD) du produit 1

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	<i>J</i> (Hz)	Attribution
7.83	<i>d</i>	1H	2.1	H-2'
7.59	<i>dd</i>	1H	8.4 et 2.1	H-6'
6.88	<i>d</i>	1H	8.4	H-5'
6.41	<i>d</i>	1H	1.5	H-8
6.21	<i>d</i>	1H	1.5	H-6
5.18	<i>d</i>	1H	7.5	H-1''
3.3-4	<i>m</i>	6H	-	glucose

• Interprétation

Ce produit se présente sous forme d'une poudre jaune, qui donne une couleur noire-violette sous une lampe UV. Son comportement chromatographique avec le système AcOH 15 % ($R_f = 0.3$) indique que le produit 1 est un glycoside. Son spectre UV-Visible réalisé dans le MeOH montre la présence de deux maxima d'absorption à 353 et 269 nm (fig.50) caractéristique d'un flavonol substitué en position 3.

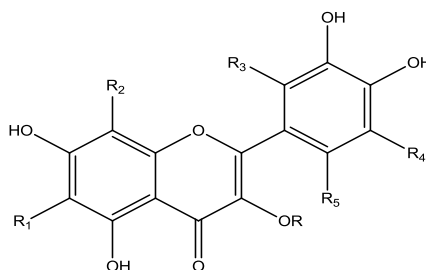
L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda = +48$ nm) de la bande I avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre enregistré dans le

méthanol révèle la présence d'un OH libre en position 4' et l'apparition d'une nouvelle bande à 327 nm est révélatrice de la présence d'un OH libre en position 7, ceci est confirmé par l'effet bathochrome au niveau de la bande II du produit après l'ajout de NaOAc par rapport au spectre méthanol.

Le déplacement bathochrome ($\Delta\lambda = +54$ nm) de la bande I enregistré avec $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ comparativement à celui enregistré dans le méthanol indique la présence d'un OH libre en position 5.

Le déplacement hypsochrome ($\Delta\lambda = -30$ nm) de la bande I enregistré après l'ajout du HCl par rapport au spectre AlCl_3 montre l'existence d'un système *ortho* di-OH sur le cycle B, ceci est confirmée par le déplacement bathochrome de la bande I en comparant le spectre $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ du produit avec son spectre méthanol (Tableau-25).

Les observations ci-dessus permettent de proposer une première hypothèse structurale pour le produit **1** comme étant un flavonol substitué en position 3, possédant des groupements hydroxyles en positions 5, 7, 3' et 4'.



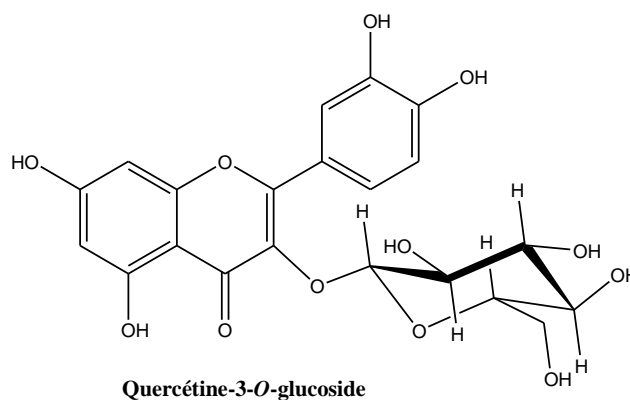
L'examen du spectre RMN-¹H (fig.51) montre la présence d'un doublet d'intégration 1 H à $\delta = 7.84$ ppm ($J = 2.1$ Hz) attribuable à H-2' suite à son couplage *mé*ta avec H-6'. Un doublet dédoublé d'intégration 1H à $\delta = 7.59$ ppm ($J = 8.4$ et 2.1 Hz) attribuable à H-6' (*ortho* et *mé*ta couplé avec H-5' et H-2' respectivement). Un doublet d'intégration 1H à $\delta = 6.88$ ppm ($J = 8.4$ Hz) attribuable à H-5' (*ortho* couplé avec H6'). Ces trois signaux confirment la di-substitution du noyau B de l'aglycone.

Le spectre RMN-¹H montre aussi l'existence de deux signaux sous forme de deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta = 6.41$ et 6.21 ppm ($J = 1.5$ Hz) attribuables à H-8 et H-6 du noyau A respectivement. Ces données confirment que la structure de l'aglycone est la quercétine.

Enfin, un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à $\delta = 5.18$ ppm ($J = 7.5$ Hz) attribuable au proton anomérique (H-1'') du sucre, tandis que les autres protons du sucre se situent dans l'intervalle 3.3-4 ppm (Tableau-26).

La nature de la partie osidique du produit **1** a été déterminée par hydrolyse acide réalisée avec 2N HCl à 100 ° C pendant une demi-heure et qui a donné le glucose (co-chromatographie avec témoins).

Au vu des différentes données spectrales discutées et le résultat de l'hydrolyse acide, ainsi que la comparaison avec la littérature [3], la structure proposée pour le produit **1** est : Quercétine-3-*O*-glucoside.



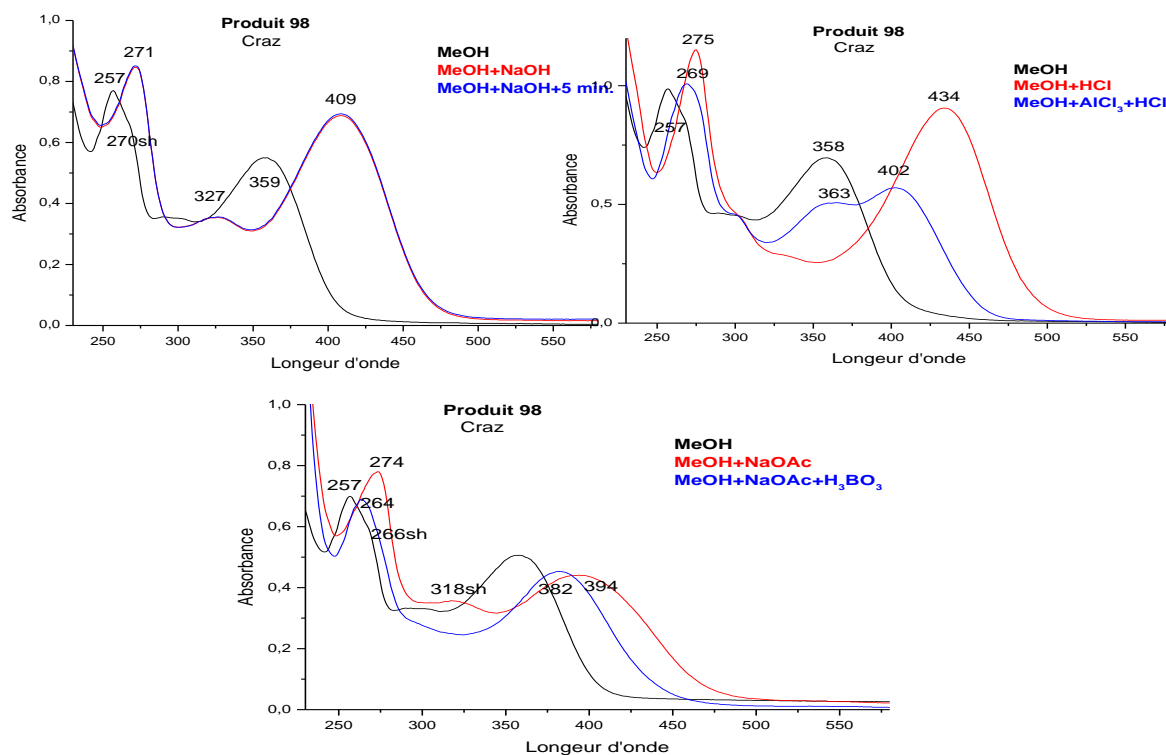
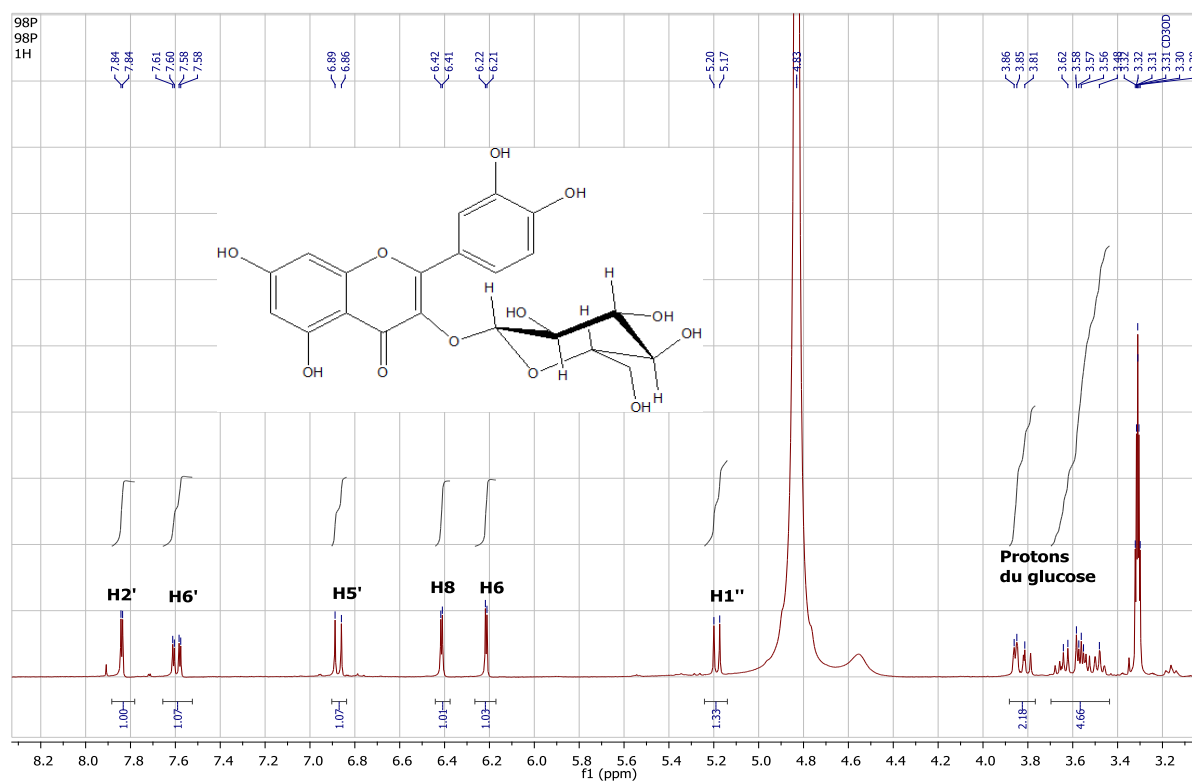


Figure 50 : Série spectrales UV-visible du composé 1

Figure 51 : Spectre RMN-¹H du composé 1

I.3.2. Elucidation structurale du produit 2

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Aspect : **Poudre jaune**

Fluorescence sous UV : **Noire-violette**

Tableau-27 : Données RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) du produit 2

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	<i>J</i> (Hz)	Attribution
7.6	<i>dd</i>	1H	8.2	H-6'
7.48	<i>d</i>	1H	2	H-2'
6.75	<i>d</i>	1H	8.2	H-5'
6.26	<i>d</i>	1H	2	H-8
6.06	<i>d</i>	1H	2	H-6
5.29	<i>d</i>	1H	7.6	H-1''
3.1-3.9	<i>m</i>	6H	-	galactose

Tableau-28 : Données RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) du produit 2

δ (ppm)	Carbone	DEPT	δ (ppm)	Carbone	DEPT
177	C-4	C	115.7	C-5'	CH
161	C-7	C	115.2	C-2'	CH
156.5	C-5	C	102.1	C-1'', C-10	CH, C
155.8	C-9	C	99.3	C-6	CH
154	C-2	C	93.8	C-8	CH
148.8	C-4'	C	75.8	C-5''	CH
144.9	C-3'	C	73.2	C-3''	CH
133.3	C-3	C	71.2	C-2''	CH
121.8	C-6'	CH	67.9	C-4''	CH
120.8	C-1'	C	60.1	C-6''	CH ₂

- **Interprétation**

Le produit 2 se présente aussi sous forme d'une poudre jaune, son comportement chromatographique (fluorescence et *R_f*) et spectroscopique (UV-visible et RMN-¹H) étaient semblables à celui du produit 1 précédent. La co-chromatographie du produit de l'hydrolyse acide du produit 2 HCl (2N) à 100 C°, 30 min, avec témoins donne une tache correspondant au sucre galactose. La nature de l'ose est confirmée par le spectre RMN-¹³C (fig.53) et le spectre DEPT 135 (fig.54) de ce produit réalise dans le DMSO-*d*₆ et qui présente les pics caractéristiques du galactose [4].

Au vu des différentes données spectrales et par comparaison avec la littérature [3,4], nous proposons la structure 'Quercétine-3-*O*-galactoside' pour le produit 2.

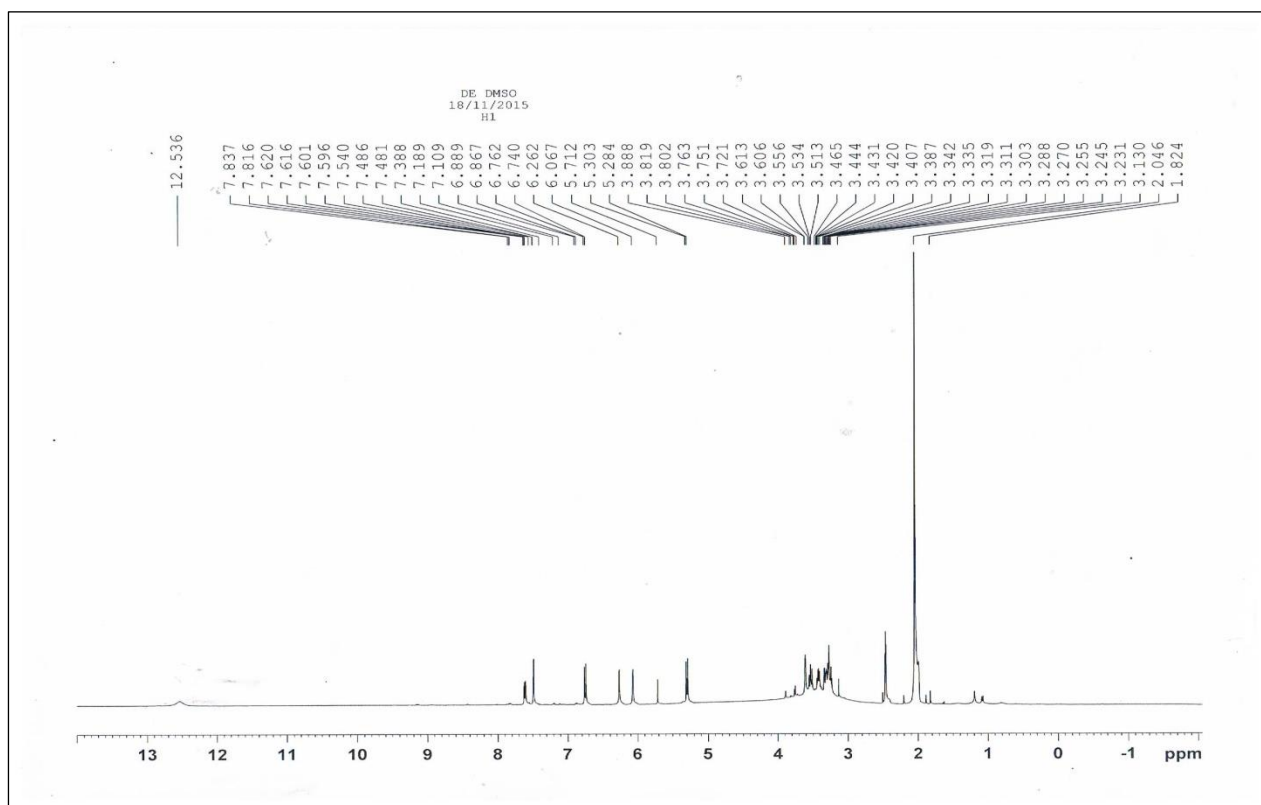
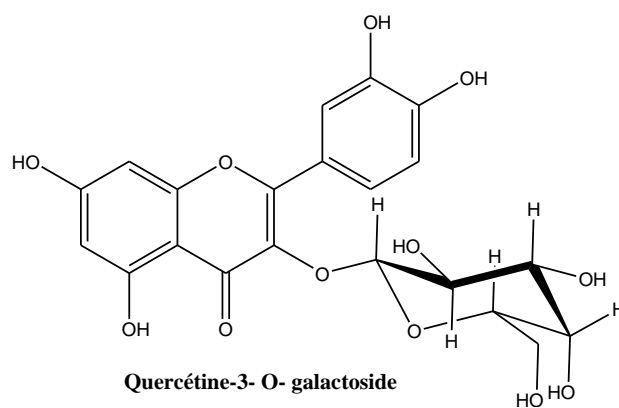
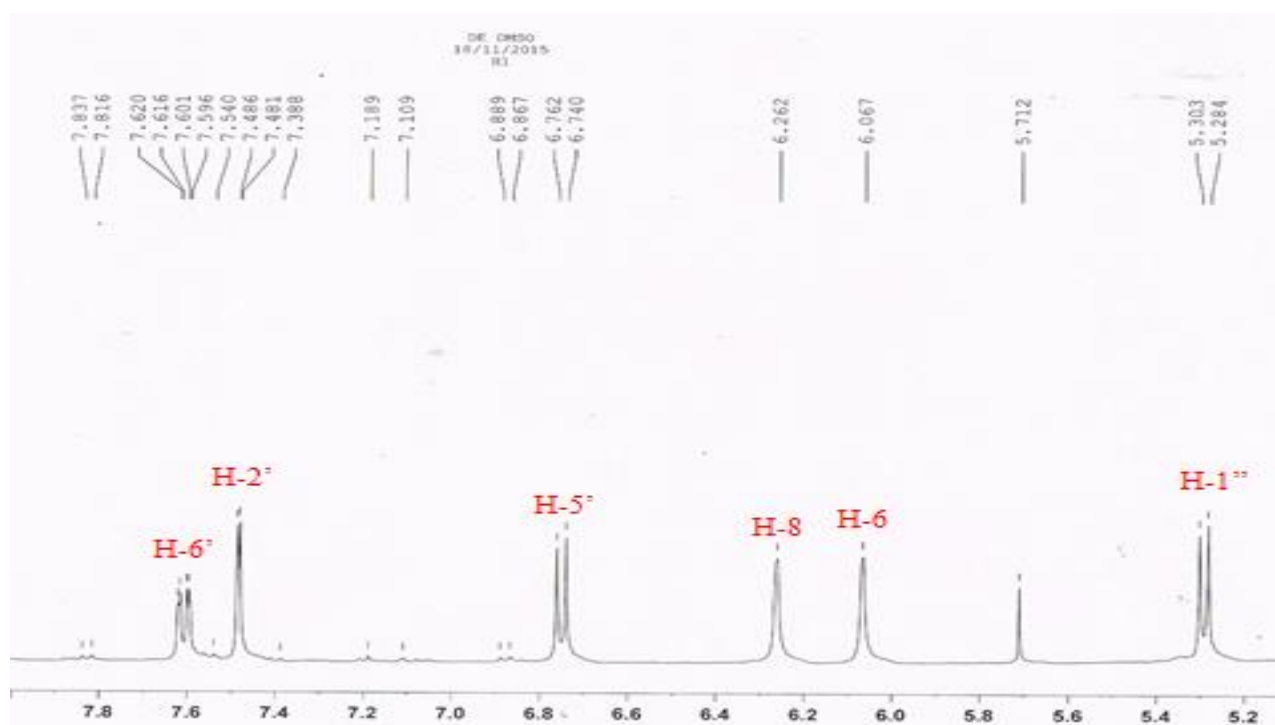
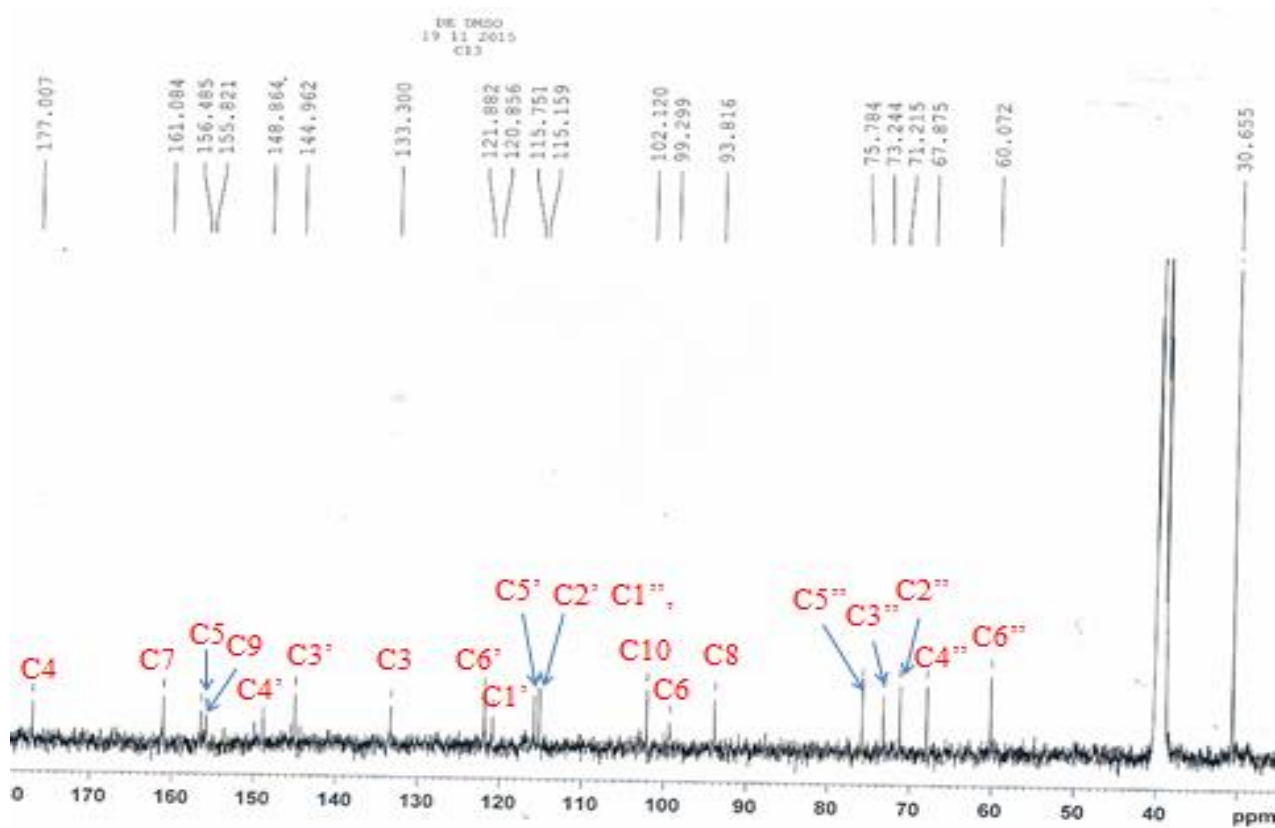


Figure 52 : Spectre RMN-¹H du produit 2

Figure 53 : Etalement du spectre RMN-¹H du produit 2Figure 54 : Spectre RMN-¹³C du produit 2

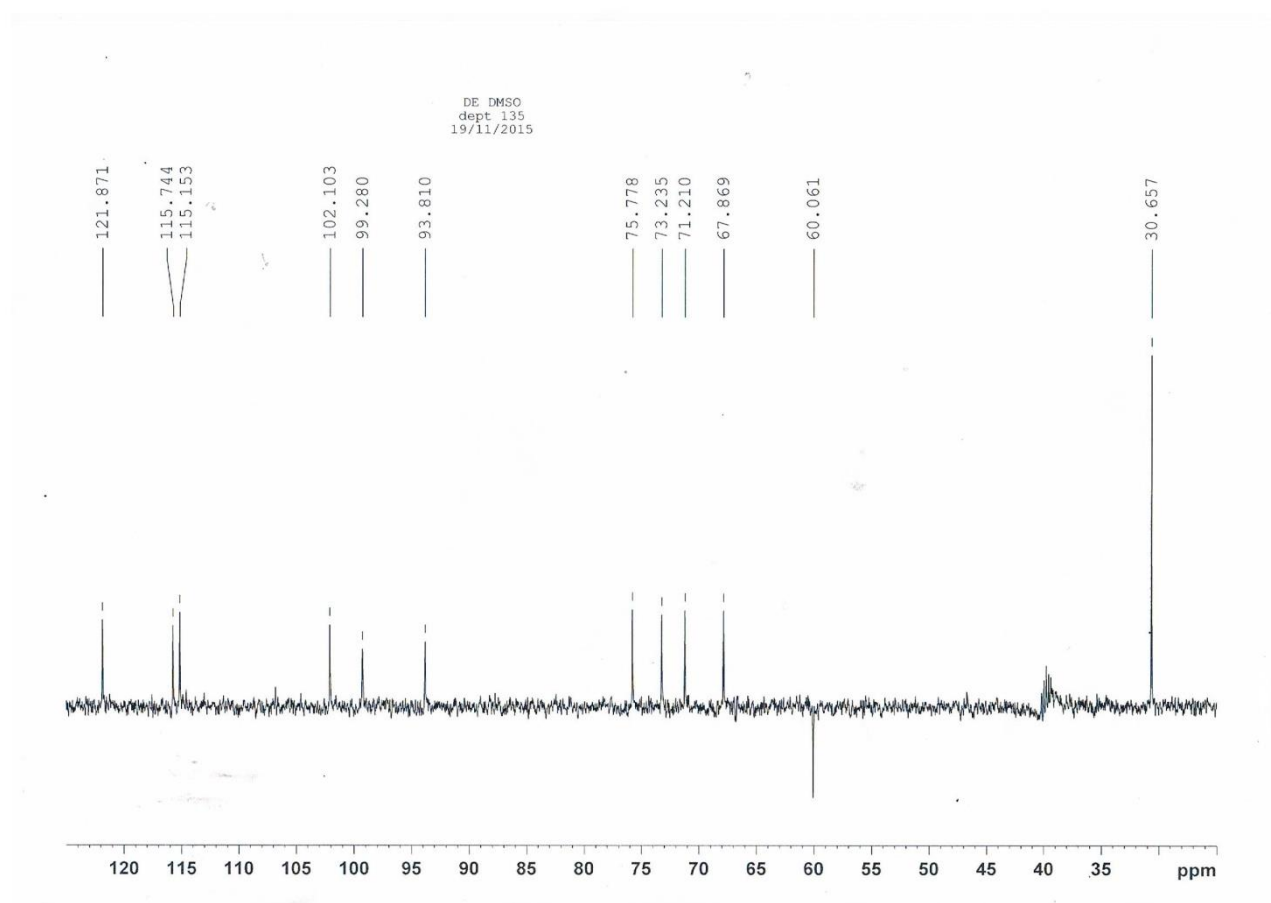


Figure 55 : Spectre Dept 135 du produit 2

I.3.3. Elucidation structurale du produit 3

- Propriétés chromatographiques et spectroscopiques

Aspect : Poudre jaune

Fluorescence sous UV : Noire-violette

 $R_f = 0.15$ (CHCl₃/MeOH, 3:1), $R_f = 0.56$ (BAW) et $R_f = 0.5$ (AcOH 15%)

Tableau-29 : Données spectroscopiques UV-visible du produit 3

Réactif	λ max (nm)		$\Delta\lambda$	Interprétation
	Bande I	Bande II		
MeOH	360	269sh 257	-	3-OR
MeOH+NaOH	413 329	272	+53	4-OH, 7-OH
MeOH+NaOH+5 min.	397 330	280	+52	Spectre stable
MeOH+AlCl ₃	434 300sh	275	+41	5-OH
MeOH+AlCl ₃ +HCl	401 364sh	269	-33	Ortho-di-OH
MeOH+NaOAc	390 322	274	+17	7-OH
MeOH+NaOAc+H ₃ BO ₃	390	264	+30	Ortho-di-OH

Tableau-30 : Données RMN-¹H (250 MHz, CD₃OD) du produit 3

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
7.87	<i>d</i>	1H	1.5	H-2'
7.6	<i>dd</i>	1H	8.4 et 1.5	H-6'
6.9	<i>d</i>	1H	8.4	H-5'
6.4	<i>d</i>	1H	1.5	H-8
6.2	<i>d</i>	1H	1.5	H-6
5.1	<i>d</i>	1H	7.8	H-1''
4.5	<i>s</i> (large)	1H	-	H-1'''
1.1	<i>d</i>	3H	5.7	H-6'''
3.3-4.0	-	10H	-	Glucose+rhamnose

Tableau-31 : Données RMN-¹³C (75.5 MHz, CD₃OD) du produit 3

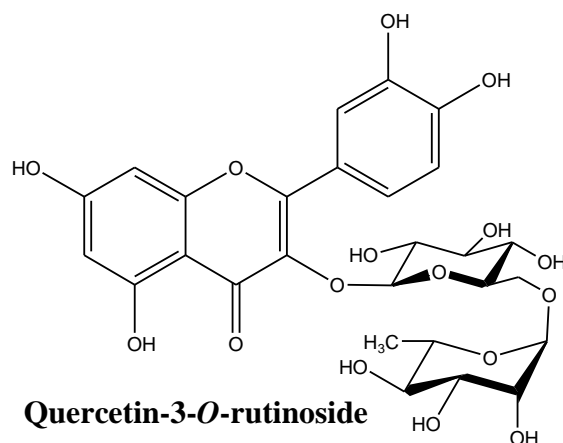
δ (ppm)	C	δ (ppm)	C	δ (ppm)	C	δ (ppm)	C
179.74	4	123.33	6'	96.14	8	69.76	4'''
166.43	7	123.09	1'	75.35	3''	67.43	6''
163.19	5	118.25	5'	75.13	5''	18.23	6'''
159.25	2	116.41	2'	73.92	2''		
158.73	9	106.24	10	73.18	3'''		
150.27	4'	106.02	1'''	72.33	4''		
146.01	3'	102.2	1''	72.09	2'''		
136.14	3	100.28	6	70.24	5'''		

- **Interpretation**

Encore une fois le produit **3** se présente sous forme de poudre jaune, son comportement chromatographique avec le système AcOH 15% (CCM de cellulose) indique que c'est un polyglycoside. La série spectrale UV-Visible du produit **3** (Tableau-29 et Fig.56) avec les différents réactifs est identique au deux produits précédents ce qui montre que l'aglycone est la quercétine.

Le spectre RMN-¹H du produit **3** (Tableau-30 et fig.57) confirme la nature de l'aglycone par la présence des signaux caractéristiques des protons de la quercétine, tandis que la partie osidique du produit est représentée par la présence de deux signaux des protons anomériques, l'un sous forme de doublet ($J = 7.8$ Hz) à 5.1 ppm qu'on a attribué au proton anomérique (H1'') du sucre lié à l'aglycone et son constante de couplage est en faveur d'un β -glucose où β -galactose. L'autre signal sous forme d'un singulet large à 4.5 ppm, qu'on a attribué au proton anomérique (H-1''') du deuxième sucre, qui donne aussi un signal sous forme de doublet ($J = 5.7$ Hz) à 1.1 ppm caractéristique du sucre rhamnose. Le déplacement chimique du H-1''' (<5 ppm) confirme que le rhamnose est lié au sucre primaire et non à l'aglycone.

Le spectre RMN-¹³C du produit **3** réalisé dans CD₃OD confirme sa structure et la nature de la partie osidique par la présence des pics caractéristiques de la quercétine, du glucose et du rhamnose. La liaison du rhamnose à la position 6 du glucose est confirmée par la présence d'un signal vers 67.43 ppm au lieu de 60 ppm. Enfin, la comparaison des données chromatographiques et spectrales avec la littérature [3,5] et la co-chromatographie du produit **3** avec témoin (la rutine) dans plusieurs systèmes CCM nous a confirmé que le produit **3** est une Quercétin-3-*O*-rhamnosyl(1-6)-glucoside (Quercétine-3-*O*-rutinoside ou rutine).



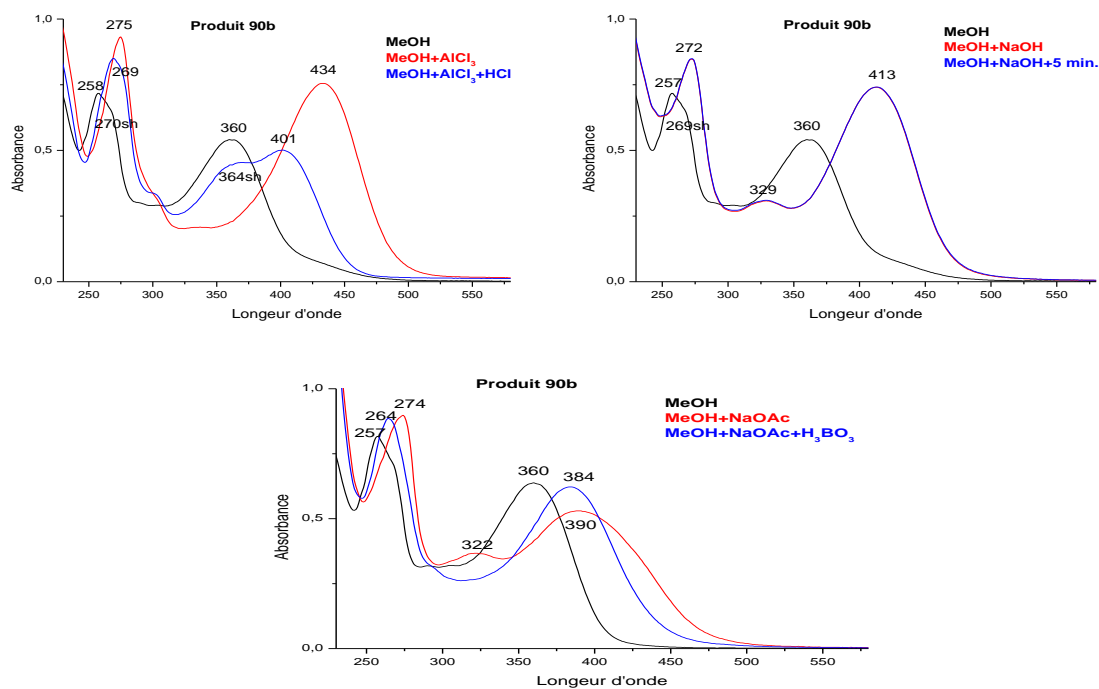


Figure 56 : Série spectrales UV-visible du produit 3

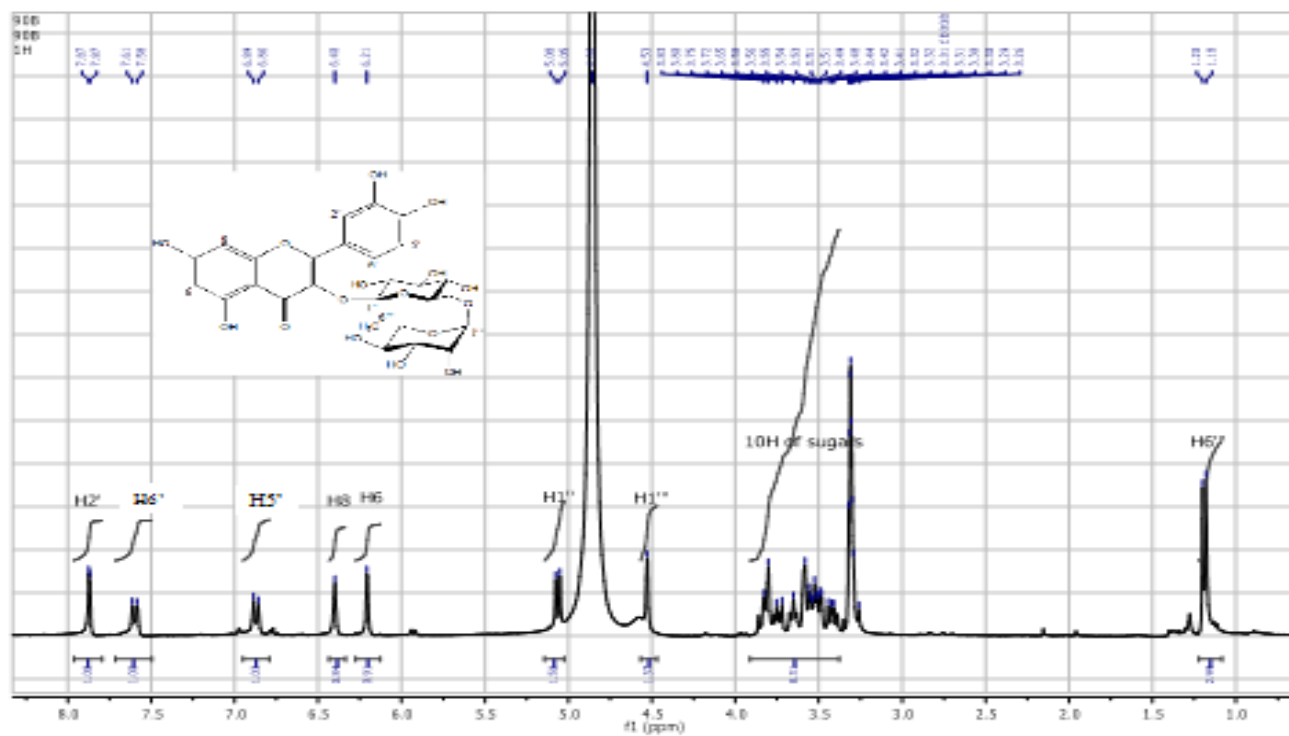


Figure 57 : Spectre RMN 1H du composé 3

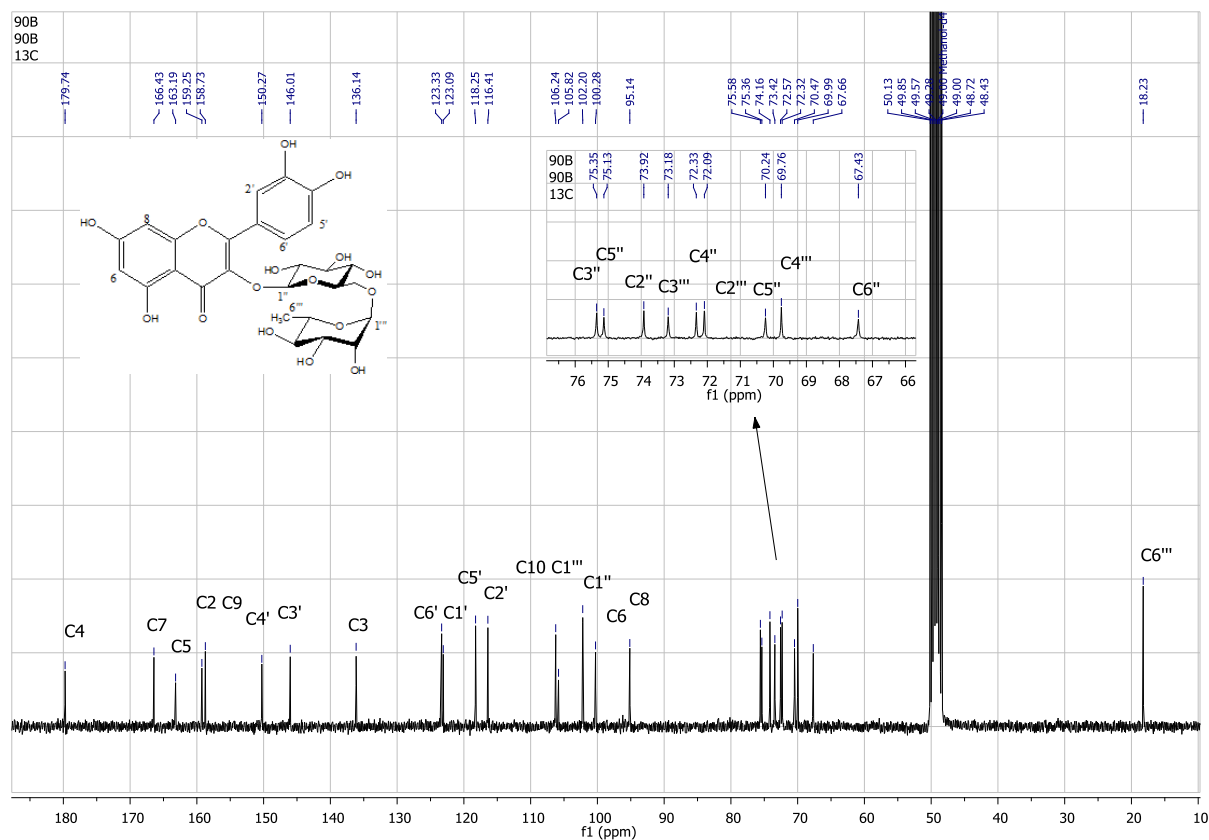


Figure 58 : Spectre RMN-¹³C du produit 3

II. Identification des produits isolés de *Dioscorea communis*

Pour cette plante on a séparé des produits de l'extrait Et₂O, très riche en phénanthrènes et dihydrophénanthrènes. A savoir que les produits **24d** et **51d** sont séparés pour la première fois de cette espèce tandis que le produit **74** est séparé pour la première fois de la famille Dioscoreaceae.

II.1. Elucidation structurale du produit **8A**

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Aspect : **Cristaux amorphes incolores**

Fluorescence sous UV (256 nm) : **Mauve**

$R_f = 0.83$ (Cyclohexane/AcOEt, 7:3)

IR (v, cm⁻¹): 3364 (O-CH₃), 2932 (C-H), 1608 (C=C), 1474

UV (MeOH, λ_{max}): 203, 224, 232, 268, 293, 357, 374

SM (IE, 70 eV): 312.3 (M⁺), 297.0 (M⁺ - CH₃), 267.3 (M⁺ - 3 × CH₃)

Tableau-32 : Données RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) du composé **8A**

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J(Hz)	Attribution
9.12	<i>d</i>	1H	9	H5
7.68	<i>d</i>	1H	8.7	H9
7.53	<i>d</i>	1H	8.7	H10
7.23	<i>d</i>	1H	9.3	H6
7.04	<i>s</i>	1H	-	H1
6.15	<i>s</i>	2H	-	OCH ₂ O
4.04	<i>s</i>	3H	-	3-OCH ₃
4.01	<i>s</i>	3H	-	2-OCH ₃
3.99	<i>s</i>	3H	-	4-OCH ₃

Tableau-33 : Données RMN-¹³C (75.5 MHz, CDCl₃) du composé **8A**

δ (ppm)	Interprétation	δ (ppm)	Interprétation
151.90	C2	120.45	C5
151.84	C4	119.17	C4b
143.32	C7	118.47	C9
143.07	C3	117.51	C4a
142.20	C8	108.8	C6
128.98	C10a	105.72	C1
127.03	C10	101.34	OCH ₂ O
124.05	C8a	61.13, 60.03, 55.74	3xOCH ₃

- **Interprétation**

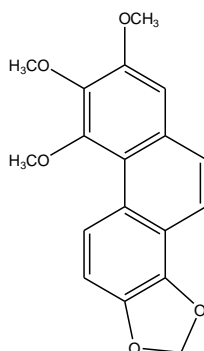
Le produit **8A** se présente sous forme de cristaux amorphes incolore avec une couleur mauve sous UV (254 nm). Le spectre UV-Visible du produit (fig.59) réalisé dans le MeOH est en faveur d'un dérivé de phénanthrène [**6**]. Le spectre IR du produit (fig.60) donne des pics caractéristiques des fonctions (O-CH₃) à 3364 cm⁻¹, (C-H) à 2932 cm⁻¹, (C=C) à 1608 cm⁻¹ et le spectre SM-IE de ce produit donne un pic moléculaire à m/z = 312.3 qui correspond à une formule brute C₁₈H₁₆O₅ (fig.61).

Le spectre RMN-¹H du produit **8A** (fig.62, tableau-32) présente neuf signaux, quatre sous forme de doublets chacun d'intégration 1H vers 9.12, 7.68, 7.53 et 7.23 ppm (*J*~9 Hz) attribuées aux protons H5, H9, H10 et H6 respectivement [**7,8**]. Cinq signaux sous forme de singulets dont un aromatique d'intégration 1H vers 7.04 ppm attribué à H1 et un signal vers 6.15 ppm d'intégration 2H attribué aux protons du groupement (OCH₂O) et enfin trois singulets, chacun d'intégration 3H vers 4.04, 4.01 et 3.99 ppm attribués à trois groupements méthoxyles.

Le spectre RMN-¹³C du produit **8A** (fig.63, tableau-33) présente 18 pics, trois d'entre eux (61.13, 60.03 et 55.74 ppm) correspondent aux groupements méthoxyles, un pic vers 101.34 ppm pour le groupement (OCH₂O), tandis que les autres représentent des carbones aromatiques dont cinq sont des carbones oxygénés (151.90, 151.84, 143.32, 143.07 et 142.20).

Finalement, par comparaison des données obtenues pour le produit **8A** avec la littérature [**9**], nous suggérons la structure :

2, 3, 4-triméthoxy-7,8-méthylènedioxy-phénanthrène.



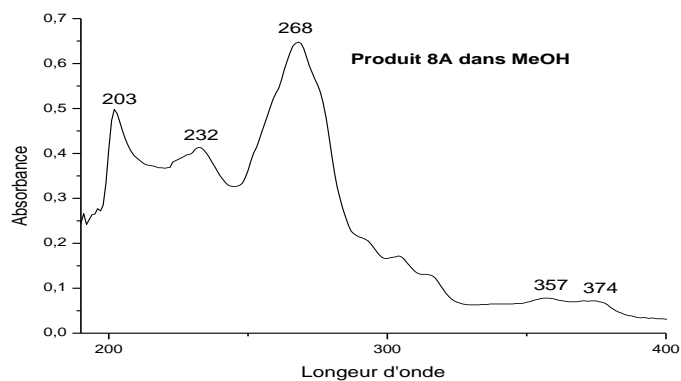


Figure 59 : Spectre UV-Visible du produit 8A

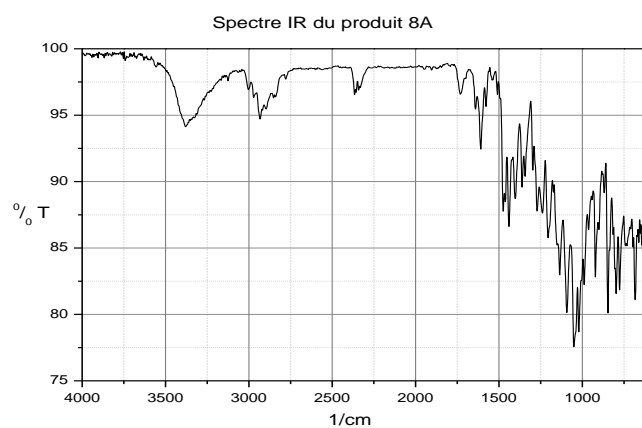


Figure 60 : Spectre IR du produit 8A

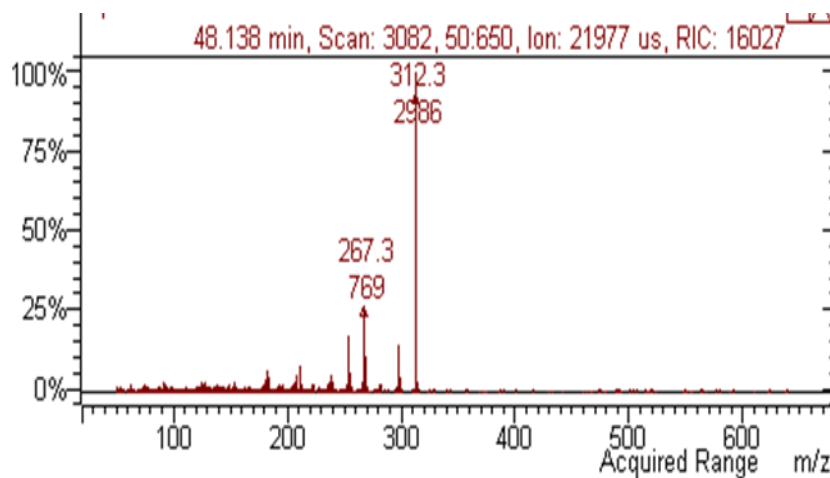
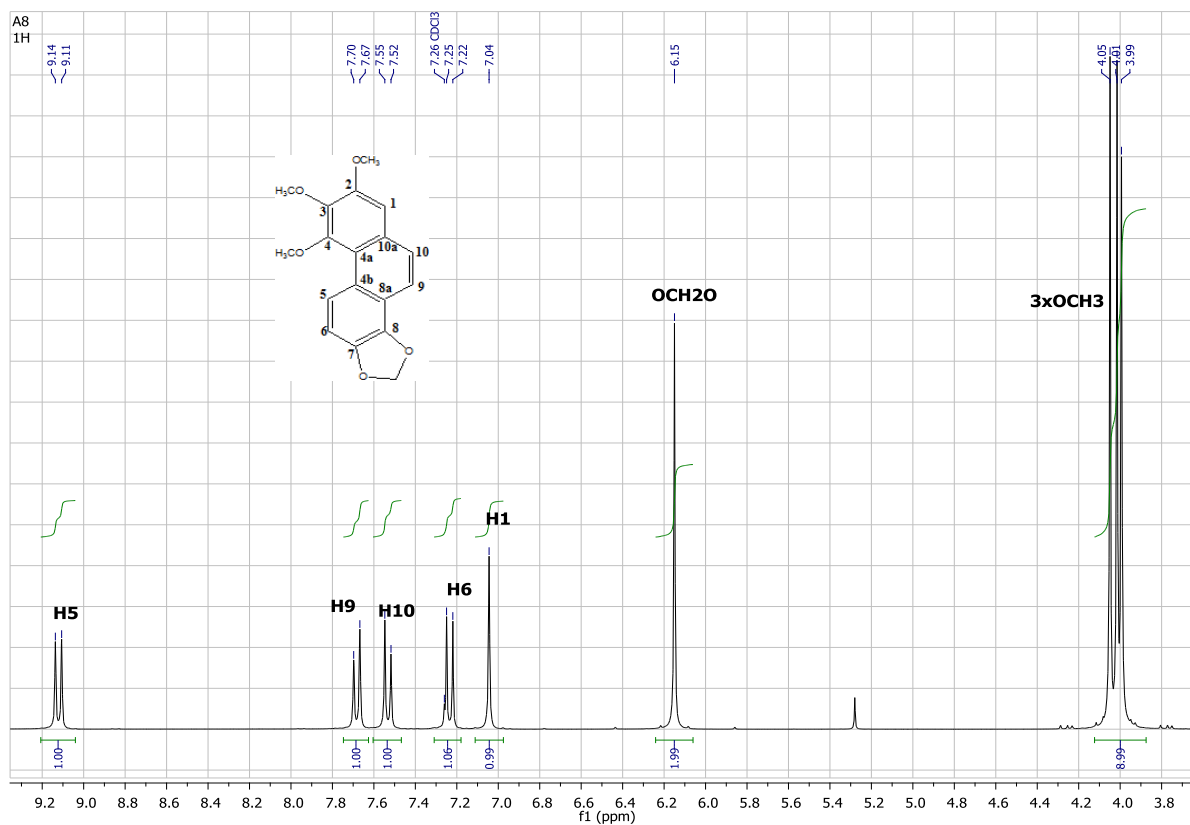
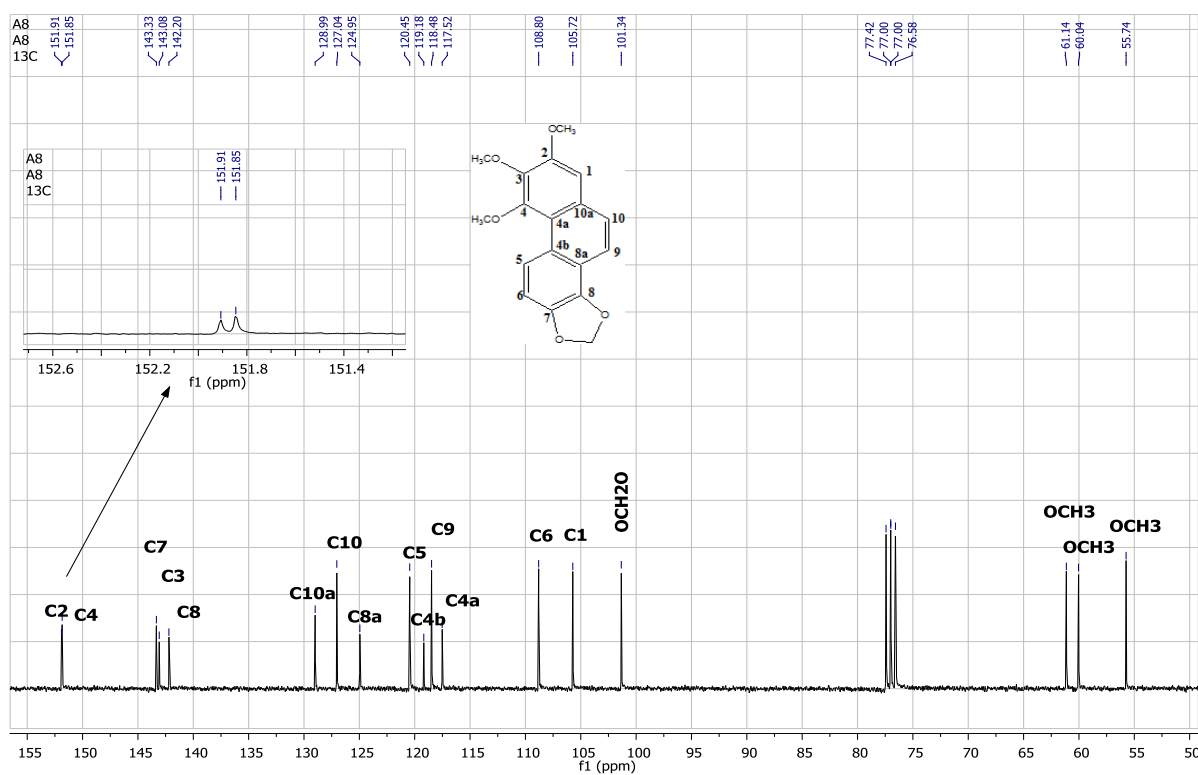


Figure 61 : Spectre SM-IE du produit 8A

Figure 62 : Spectre RMN- ^1H du produit **8A**Figure 63 : Spectre RMN- ^{13}C du produit **8A**

II.2. Elucidation structurale du produit 24B3

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Aspect : **Cristaux marron-blanc**

Fluorescence sous UV (256 nm) : **Mauve**

$R_f = 0.32$ (Cyclohexane/AcOEt, 7:3)

IR (ν , cm^{-1}) : 3373, 2916, 1608, 1473

SM-IE (70 eV, m/z): 298.3 (M^+)

Tableau-34 : Données RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) du produit **24B3**

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	$J(\text{Hz})$	Attribution
9.03	<i>d</i>	1H	9	H5
7.63	<i>d</i>	1H	9	H9
7.54	<i>d</i>	1H	9	H10
7.22	<i>d</i>	1H	9	H6
7.06	<i>s</i>	1H	-	H1
6.16	<i>s</i>	2H	-	OCH ₂ O
6.01	<i>s</i>	1H	-	OH
4.04	<i>s</i>	3H	-	4-OCH ₃
3.94	<i>s</i>	3H	-	2-OCH ₃

Tableau-35 : Données RMN- ^{13}C (75.5 MHz, CDCl_3) du produit **24B3**

δ (ppm)	Interprétation	δ (ppm)	Interprétation
146.75	C2	119.08	C4b
144.18	C4	117.85	C4a
143.50	C7	117.21	C9
142.23	C8	108.8	C6
139.44	C3	105.37	C1
127.30	C10	101.43	-OCH ₂ O-
125.96	C10a	59.75	4-OCH ₃
124.57	C8a	56.15	2-OCH ₃
120.38	C5		

- **Interprétation**

Le produit **24B3** se présente sous forme de cristaux avec coloration mauve sous UV (254 nm) et le spectre IR présente les mêmes pics du produit précédent **8A**, cela indique la présence des fonctions (O-H) à 3373 cm^{-1} , (C-H) à 2916 cm^{-1} , (C=C) à 1608 cm^{-1} .

Le spectre RMN- ^1H du produit **24B3** (fig.65) est identique à celui du produit **8A** et la seule différence est le remplacement d'un groupement OCH₃ par un groupement OH. La

présence de groupe OH est confirmé par l'existence d'un signal sous forme d'un singulet large à 6.01 ppm d'intégration 1H.

De son côté le spectre RMN-¹³C du produit (fig.66) est semblable à celui du produit **8A** et la seule différence est la présence de deux pics pour les groupements OCH₃ au lieu de trois avec le produit **8A**. Ces propositions sont confirmées par le spectre SM-IE (fig.64) du produit qui donne un pic moléculaire à m/z = 298.3 qui correspond à la formule brute C₁₇H₁₄O₅ confirmant encore une fois la présence d'un OH au lieu d'un OCH₃.

Enfin, on comparant les données de ce produit avec la littérature [9], la structure : **3-hydroxy-2,4-diméthoxy-7,8-méthylènedioxyphénanthrène** est proposé pour le produit **24b3**.

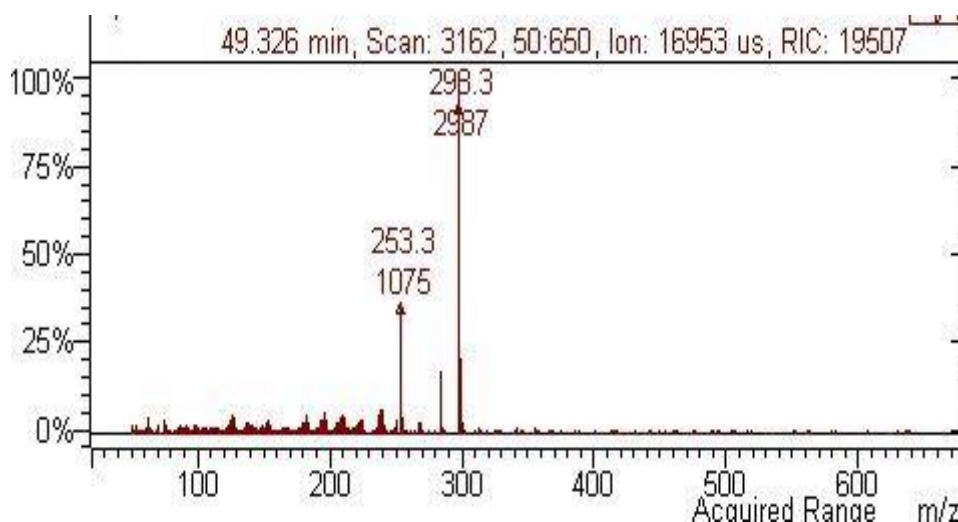
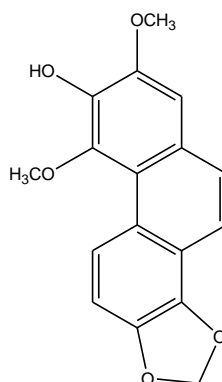
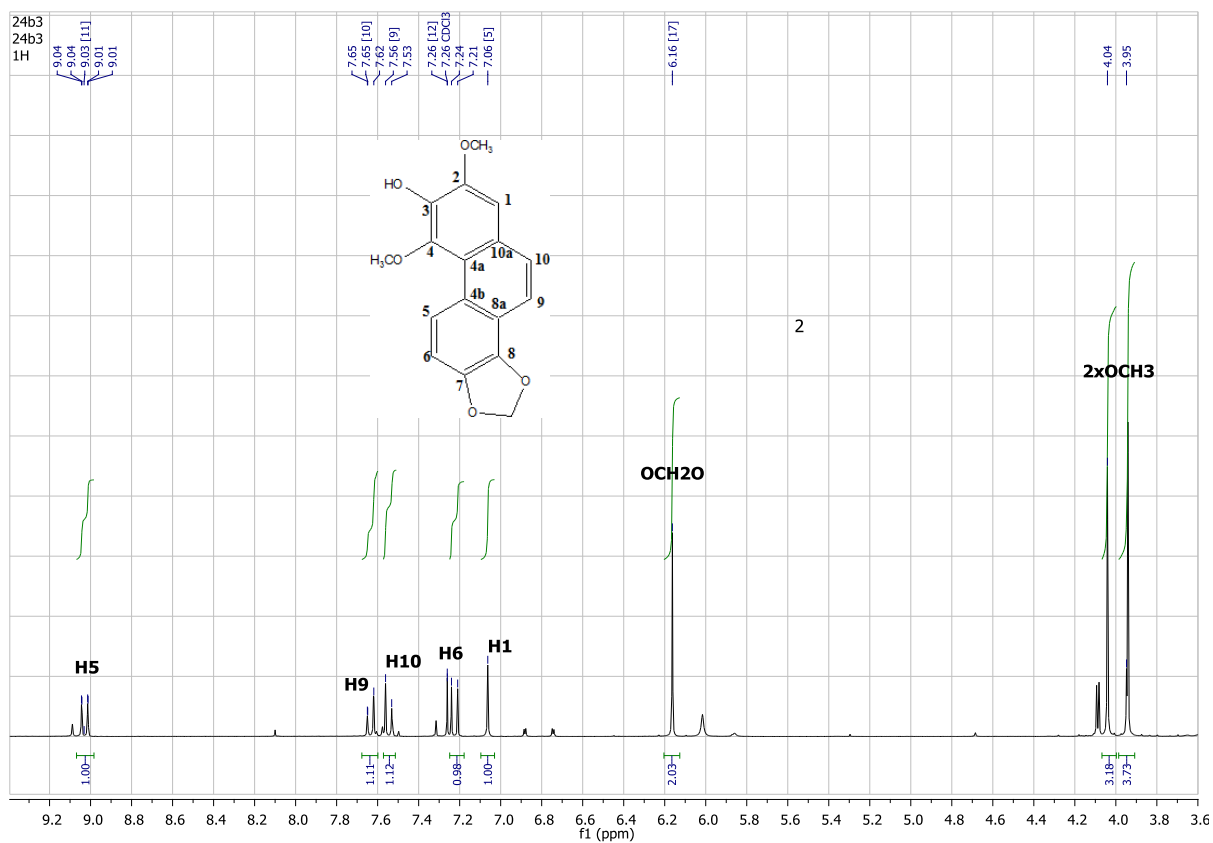
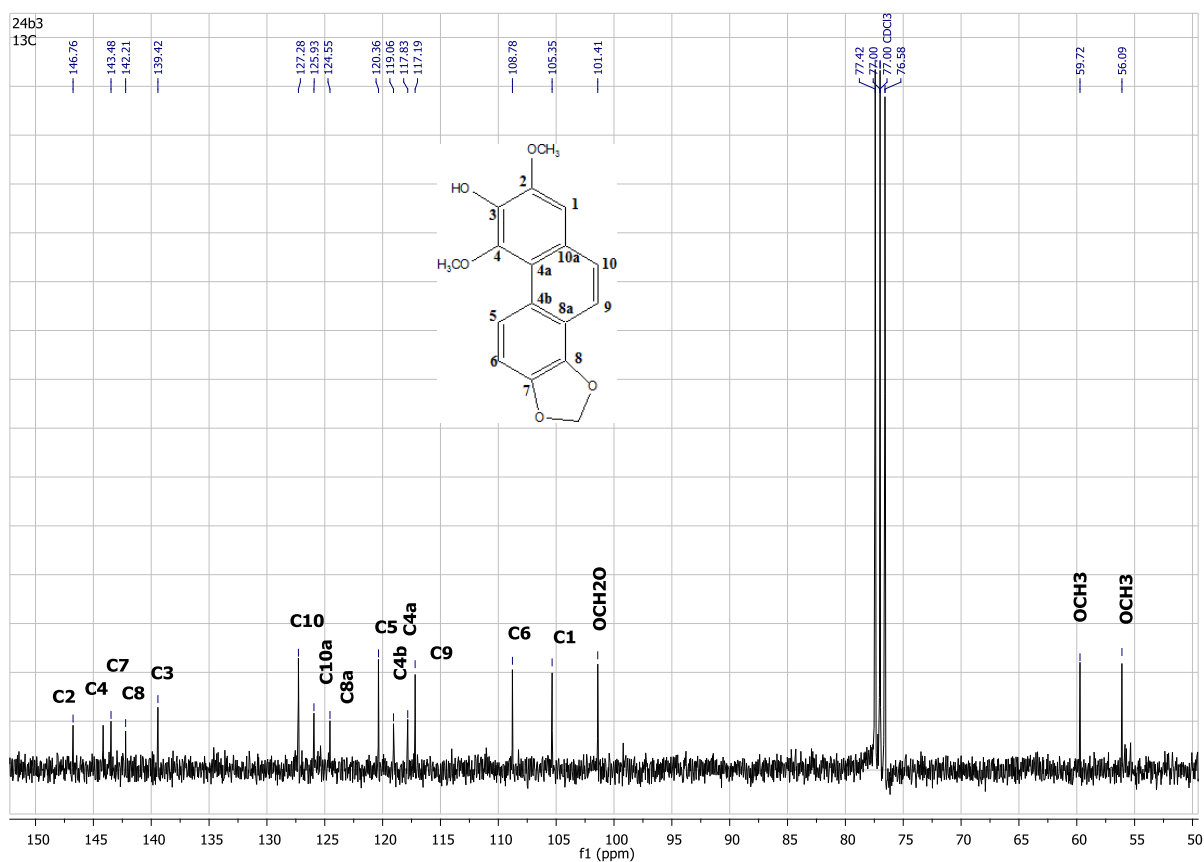


Figure 64 : Spectre SM-IE du produit **24b3**

Figure 65 : Spectre RMN-¹H du produit 24b3Figure 66 : Spectre RMN-¹³C du produit 24b3

II.3. Elucidation structurale du produit 24C

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Fluorescence sous UV (265 nm) : **Mauve**

$R_f = 0.78$ (CHCl_3 / Acétone, 19:1)

SM-IE (70eV, m/z): 314.2 (M⁺), 299 (M⁺ -15), 271.

Tableau-36 : Données RMN-1H (300 MHz, CDCl_3) du composé **24C**

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
9.24	<i>d</i>	1H	9.6	H5
7.88	<i>d</i>	1H	9	H9
7.63	<i>d</i>	1H	9	H10
7.30	<i>d</i>	1H	9.3	H6
7.10	<i>s</i>	1H	-	H1
5.04	<i>s</i> (large)	1H	-	OH
4.02	<i>s</i>	3H	-	OCH ₃
4.01	<i>s</i>	3H	-	OCH ₃
4.00	<i>s</i>	3H	-	OCH ₃
3.97	<i>s</i>	3H	-	OCH ₃

Tableau-37 : Données RMN-13C (75.5MHz, CDCl_3) du composé **24C**

δ (ppm)	Interprétation	δ (ppm)	Interprétation
151.92	C4,C2	119.38	C4a
145.48	C7	119.30	C9
143.08	C3	116.21	C6
140.84	C8	105.32	C1
128.76	C10a	61.90	8-OCH ₃
127.31	C10	61.24	3-OCH ₃
126.36	C8a	60.18	4-OCH ₃
124.78	C4b	55.86	2-OCH ₃
124.17	C5		

- **Interprétation**

Le spectre RMN-¹H de ce produit (Tableau-36, fig.68) présente quatre signaux à 9.24, 7.88, 7.63 et 7.30 ppm sous forme de doublets ($J \sim 9\text{Hz}$) chacun d'intégration 1H attribués à H5, H9, H10 et H6 respectivement semblable à ceux des produits précédents. Cinq signaux sous forme de singulets, le premier à 7.10 ppm d'intégration 1H attribué à H1, quatre signaux vers 4.02, 4.01, 4.0 et 3.97 ppm, d'intégration 3H pour chacun, représentent quatre groupements OCH₃. Finalement, on remarque l'apparition d'un signal large vers 5.04 ppm d'intégration 1H attribué au proton d'un groupement hydroxyle.

Sur le spectre RMN- ^{13}C (Tableau-37, fig.69) on trouve 18 pics représentant 18 types de carbones, quatre à 61.90, 61.24, 60.18, 55.86 ppm pour des groupements méthoxyles. Les autres pics représentent des carbones aromatiques, cinq d'entre eux sont des carbones oxygénés (151.92, 145.48, 143.08, 140.84 et 128.76 ppm). Par comparaison des données spectroscopiques du produit **24C** avec les données des produits précédents et les données de la littérature [10,9], la structure :

7-Hydroxy-2, 3, 4,8-tetraméthoxyphénanthrène est proposé pour **24C**, qui est connu aussi sous le nom « **Chrysotoxene** ».

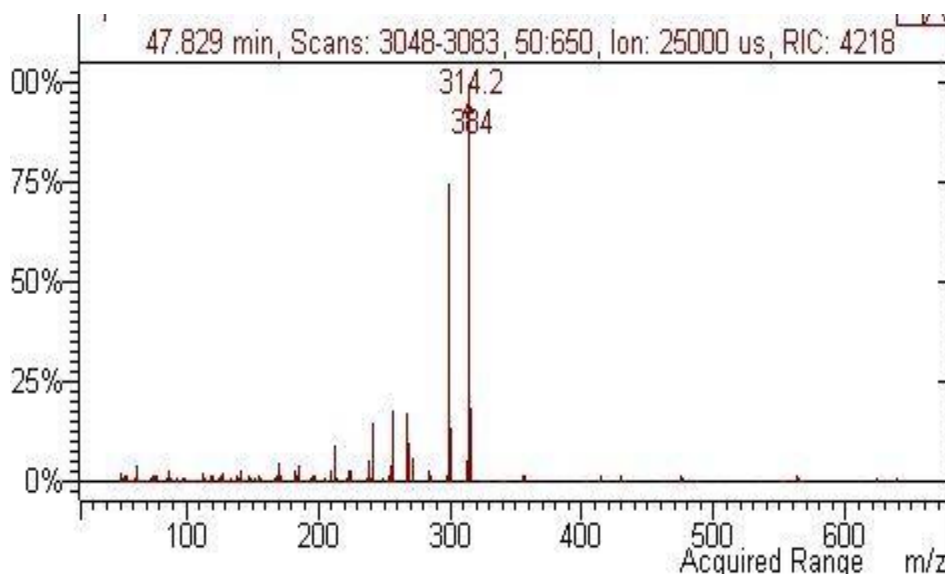
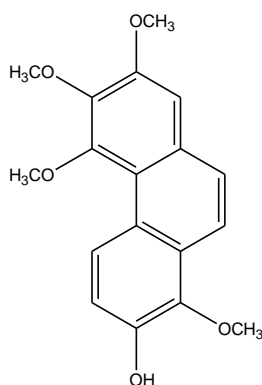
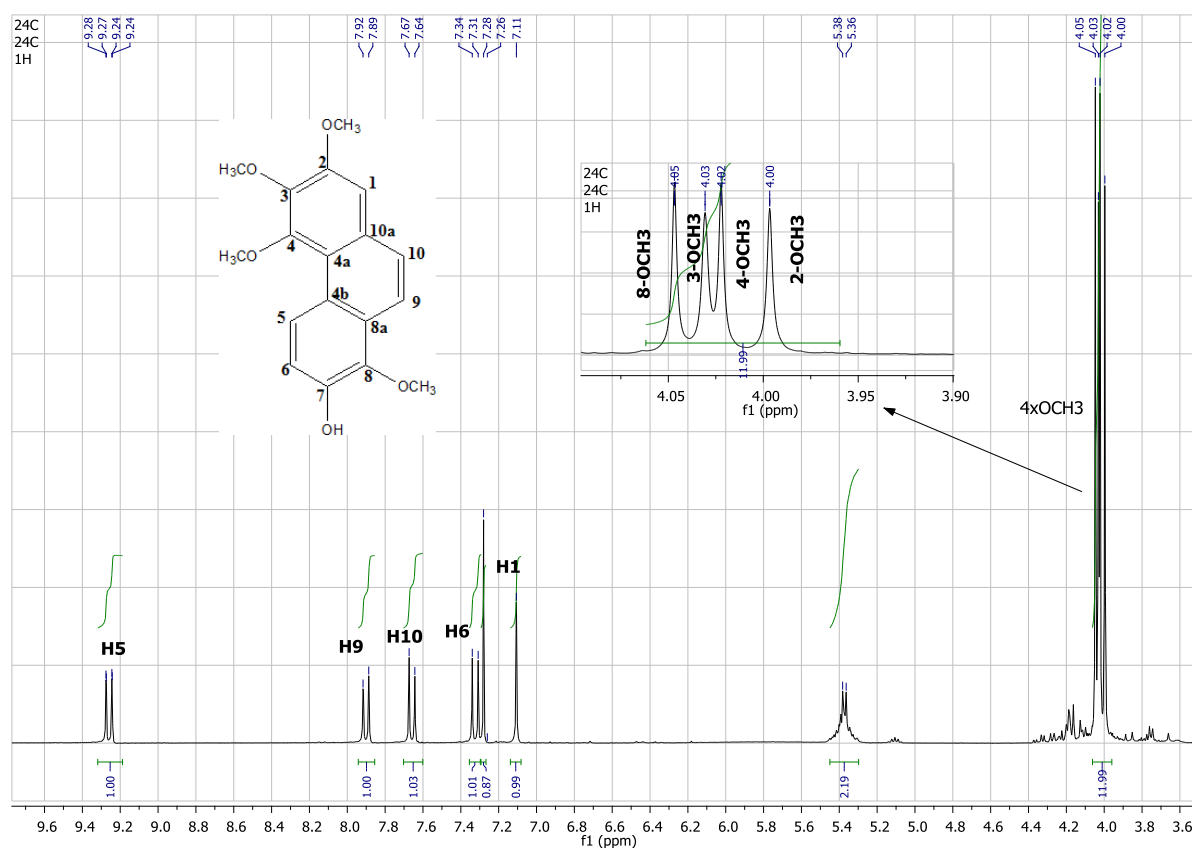
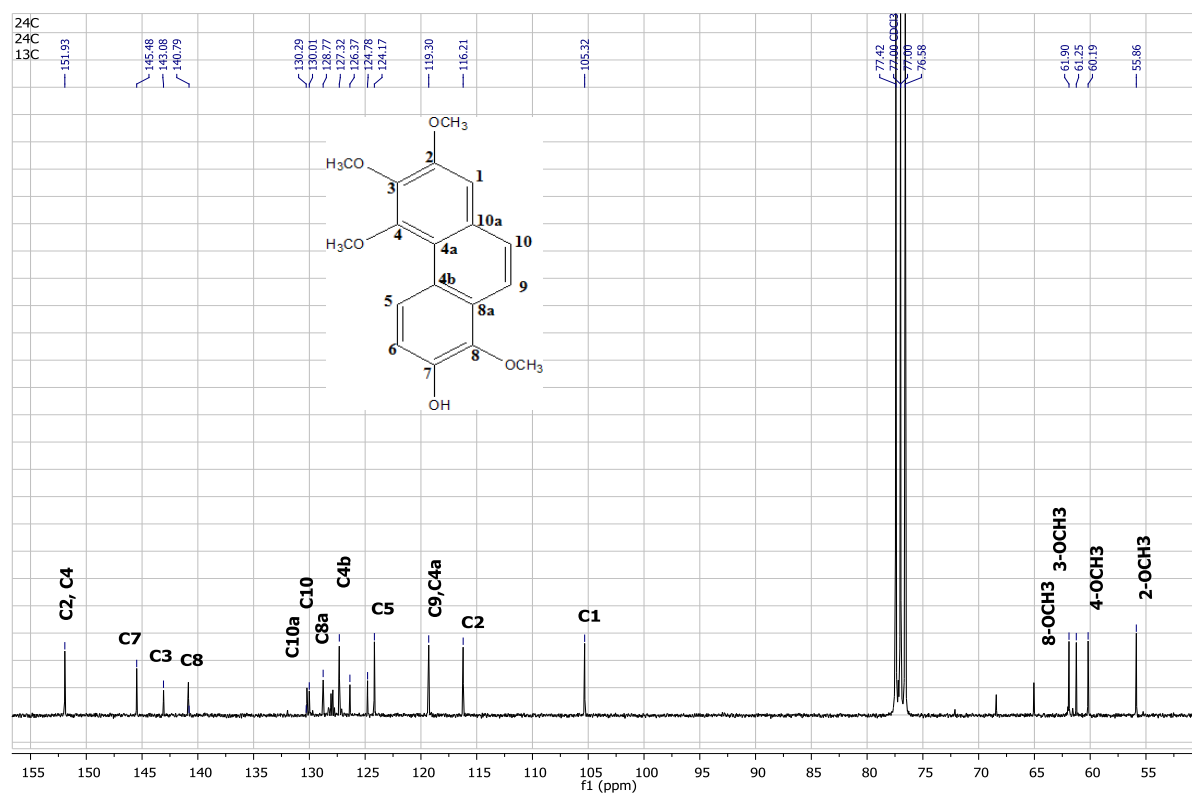


Figure 67 : Spectre SM-IE du produit **24C**

Figure 68 : Spectre RMN- ^1H du produit 24CFigure 69 : Spectre RMN- ^{13}C du produit 24C

II.4. Elucidation structurale du produit 51b

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Fluorescence sous UV (265 nm) : **Mauve**

$R_f = 0.50$ (CHCl₃/Acétone, 19:1)

IR (ν , cm⁻¹) : 3477, 3423, 2931, 1611, 1476, 1436, 1093, 1045, 801

Tableau-38 : Données RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) du produit **51b**

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
9.16	<i>d</i>	1H	9.3	H5
7.82	<i>d</i>	1H	9	H9
7.62	<i>d</i>	1H	9	H10
7.31	<i>d</i>	1H	9.3	H6
7.08	<i>s</i>	1H	-	H1
6.09	<i>s</i> (large)	1H	-	OH
5.98	<i>s</i> (large)	1H	-	OH
4.03	<i>s</i>	3H	-	OCH ₃
3.98	<i>s</i>	3H	-	OCH ₃
3.94	<i>s</i>	3H	-	OCH ₃

Tableau-39 : Données RMN-¹³C (75.5MHz, CDCl₃) du produit **51b**

Interprétation	δ (ppm)	Interprétation	δ (ppm)
C2	146.79	C4b	124.19
C7	145.55	C5	123.94
C4	144	C4a	119.12
C8	140.77	C9	117.9
C3	139.30	C6	116.1
C10	127.44	C1	104.89
C10a	126.59	3 × OCH ₃	61.82, 59.76, 56.07
C8a	125.67		

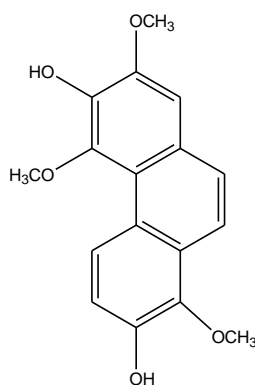
- **Interprétation**

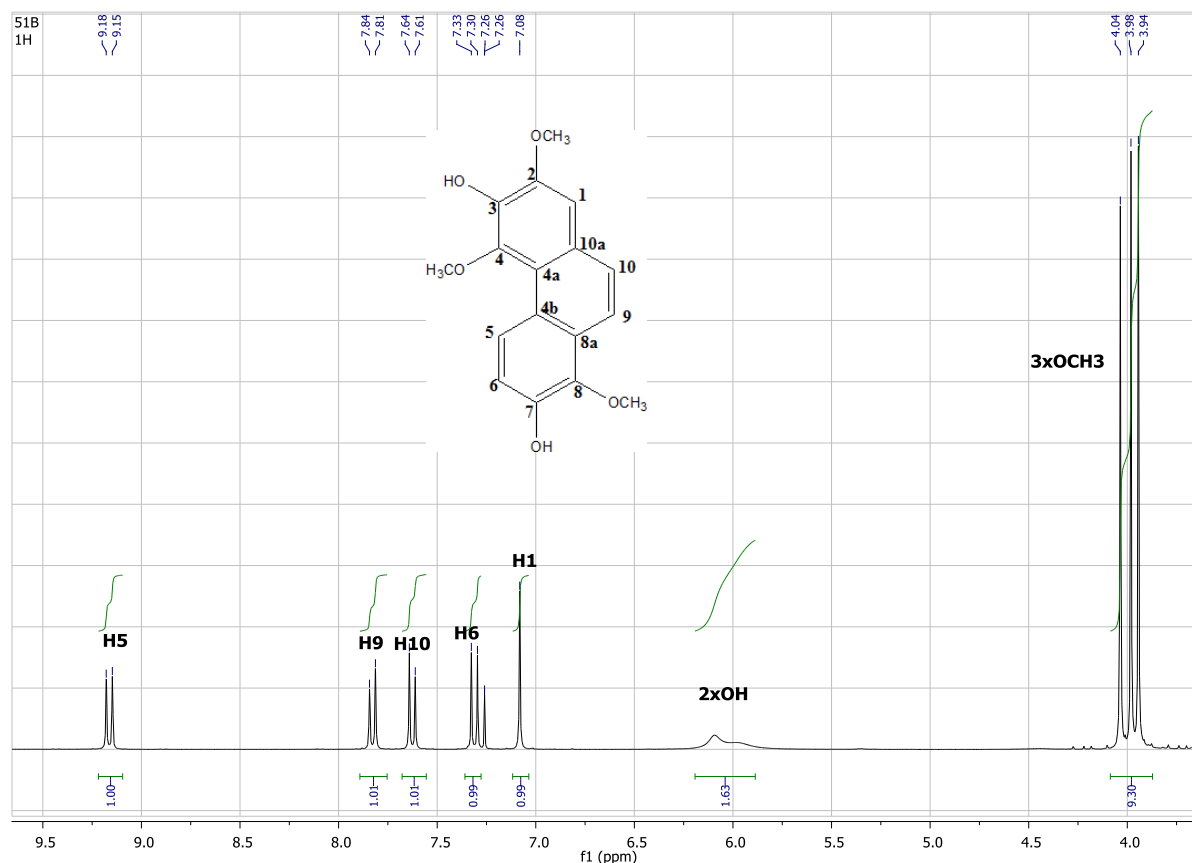
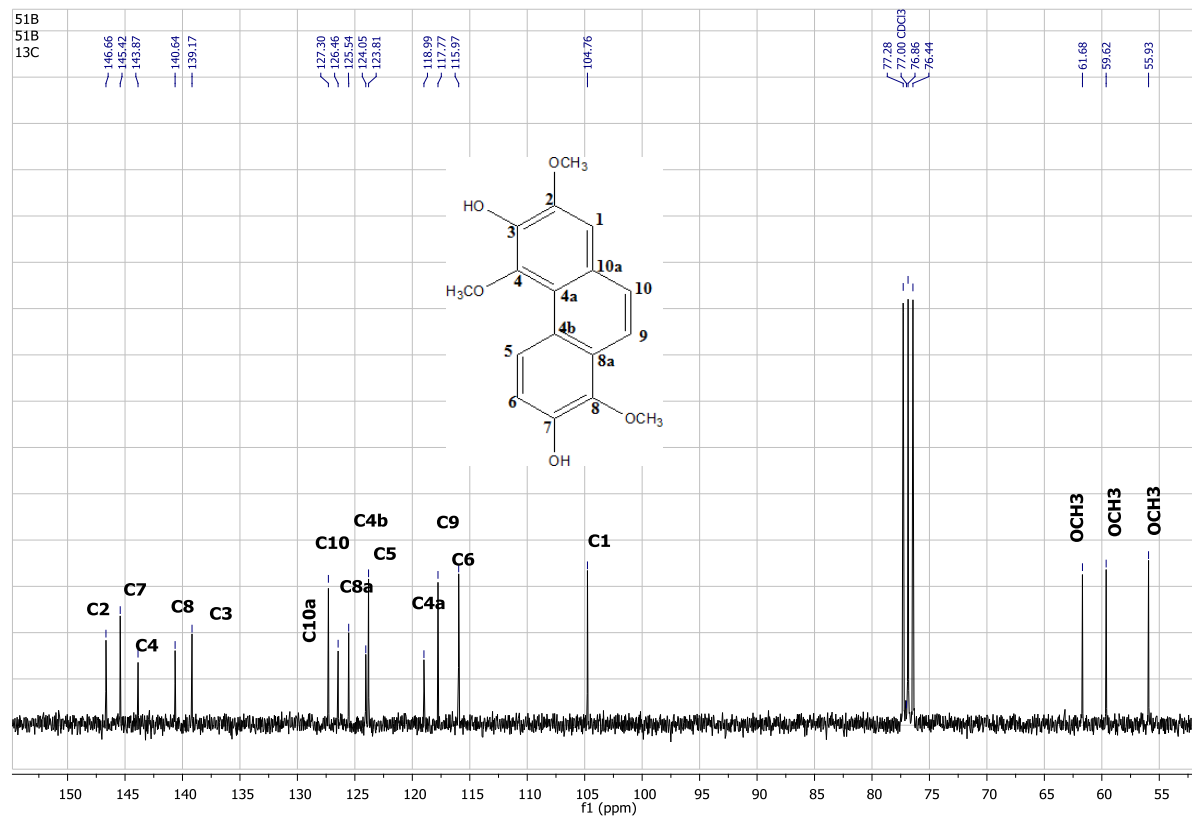
Le spectre RMN-¹H de ce produit (fig.70) présente quatre signaux à 9.16, 7.82, 7.62 et 7.31 ppm sous forme de doublets ($J \sim 9$ Hz) chacun d'intégration 1H attribués à H5, H9, H10 et H6 respectivement [7,8]. Quatre signaux sous forme de singulets, le premier à 7.08 ppm d'intégration 1H attribué à H-1, trois signaux vers 4.03, 3.98 et 3.94 ppm, d'intégration 3H pour chacun, représentent trois groupements OCH₃. L'apparition de deux signaux larges vers

6.09 et 5.98 ppm d'intégration 1H pour chacun représentent les protons de deux groupements hydroxyles.

Le spectre RMN-¹³C (fig.71) présente 17 pics, trois à 61.82, 59.76 et 56.07 ppm sont attribués à des groupements OCH₃, les autres pics représentent des carbones aromatiques dont cinq d'entre eux sont des carbones oxygénés (146.79, 145.55, 144.00, 140.78 et 139.30 ppm), tandis que le spectre DEPT 135 (Fig.72) montre la présence de cinq pics CH (C1, C5, C9 et C10) et trois pics CH₃ correspondent aux groupements méthoxyles.

Par comparaison des données spectroscopiques de ce produit avec ceux du produit précédent et aussi avec les données de la littérature [11,12] la structure proposé au produit **51b** serai '**3,7-dihydroxy-2,4,8-triméthoxyphénanthrène**'.



Figure 70 : Spectre RMN- ^1H du produit 51bFigure 71 : Spectre RMN- ^{13}C du produit 51b

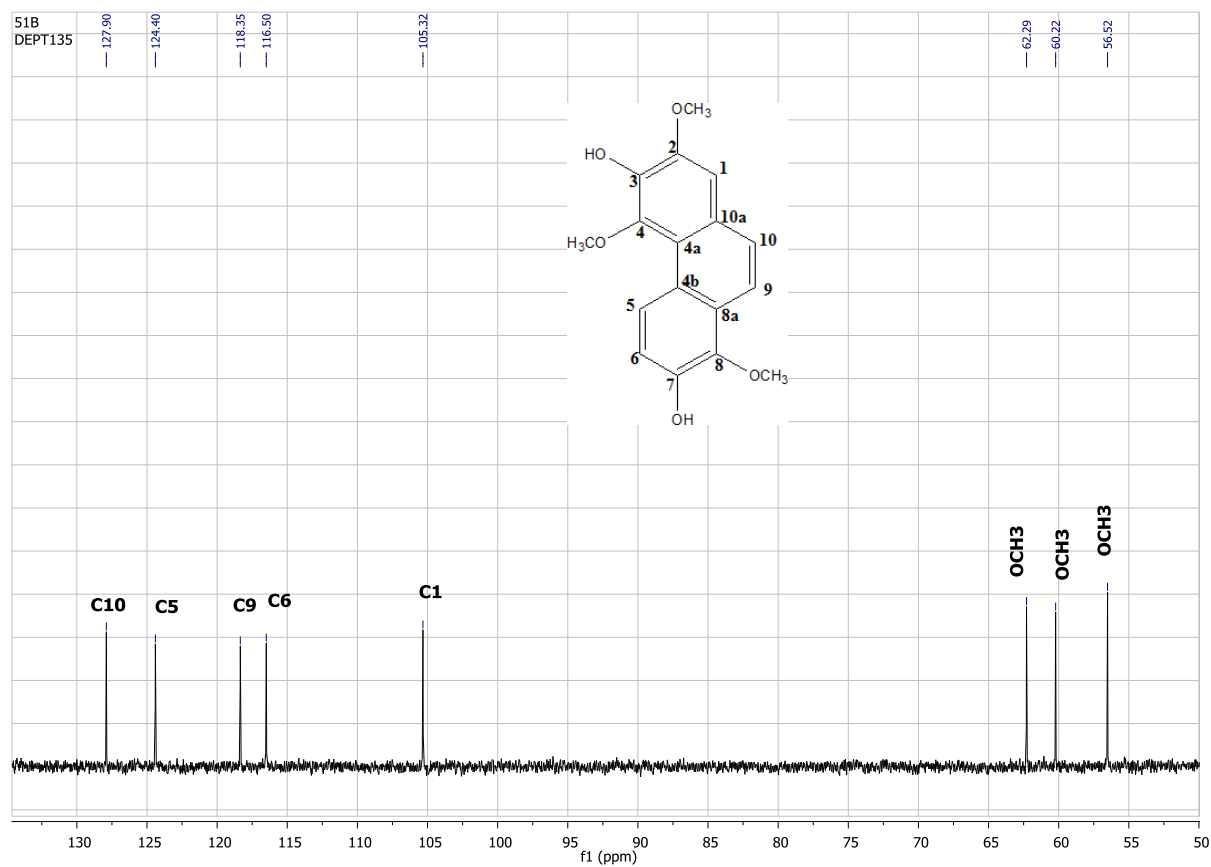


Figure 72 : Spectre DEPT 135 du produit 51b

II.6. Elucidation structurale du produit 74

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Fluorescence sous UV (265 nm) : **Mauve-noire**

$R_f = 0.48$ (CHCl₃-MeOH, 9:1)

IR (ν , cm⁻¹): 3500, 2920, 2852, 2360, 1606, 1457, 1160, 1060, 831

UV (MeOH, λ_{max}): 365, 347, 312, 265, 261, 205

Tableau-40 : Données de la RMN-1D et 2D (CD₃OD, 600 MHz) du produit **74**

	δ_C	δ_H	HMBC H → C	NOESY H → H
1	135.39	-		
2	143.12	-		
3	145.58	-		
4	113.28	9.27 (<i>s</i>)	C2, C3, C4b, C10a, C4a	5-OMe
4a	117.96	-		
4b	116.36	-		
5	160.23	-		
6	99.50	6.73 (<i>d</i> , 1.9 Hz)	C8, C4b, C7, C5	5-OMe et 7-OMe
7	158.15	-		
8	101.89	6.77 (<i>d</i> , 1.9 Hz)	C6, C4b, C9, C7	H-9 et 7-OMe
8a	126.02	-		
9	125.26	7.20 (<i>d</i> , 9 Hz)	C8, C4b, C10a, C1	H-8, H10
10	126.15	6.98 (<i>d</i> , 9 Hz)	C8a, C4a, C1	
10a	128.28	-		
5-OMe	56.05	4.12 (<i>s</i>)		
7-OMe	55.76	3.87 (<i>s</i>)		

- **Interprétation**

Le spectre UV-Visible du produit **74** (fig.78) réalisé dans le MeOH est en faveur d'un dérivé de phénanthrène [6]. Son spectre IR (fig.78) donne des pics caractéristiques des fonctions (O-H) à 3500 cm⁻¹, (C-H) à 2920 cm⁻¹, (C=C) à 1606 cm⁻¹.

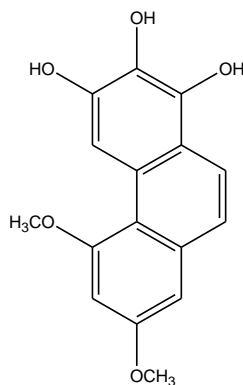
Le spectre RMN-¹H (fig.73) du produit présente un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à 9.27 ppm dans un champ faible loin des autres signaux attribué soit à H-4 avec oxygénation en C-5 ou à H5 avec oxygénation en C-4 [7,8]. Deux doublets ($J = 9$ Hz) à 7.20, 6.98 ppm chacun d'intégration 1H attribué aux protons H-9 et H-10 respectivement. Deux doublets à 6.77 et 6.73 ppm chacune d'intégration 1H avec $J = 1.9$ Hz (*ortho* couplage) assigné à H-8 et H-6 respectivement, finalement deux singulets à 4.12, 3.87 ppm chacun d'intégration 3H pour deux groupements méthoxyles. Chaque proton est lié à son carbone après analyse du spectre HSQC de ce produit.

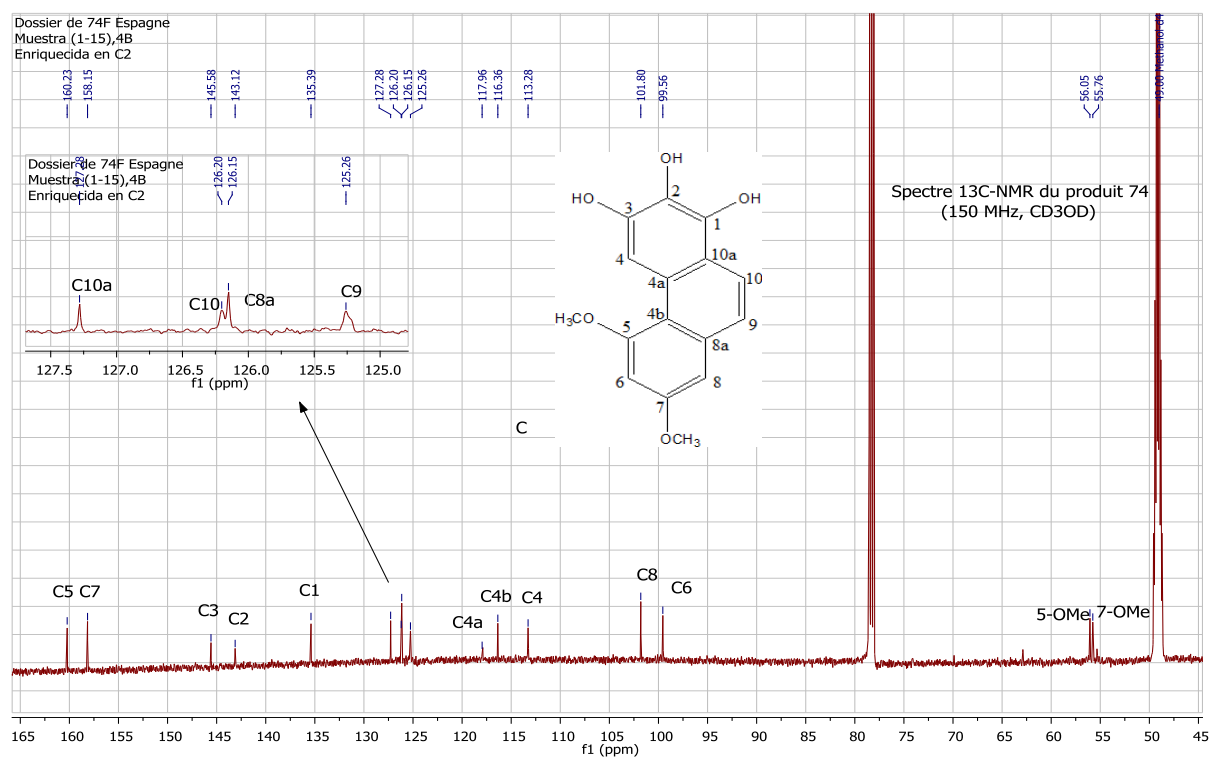
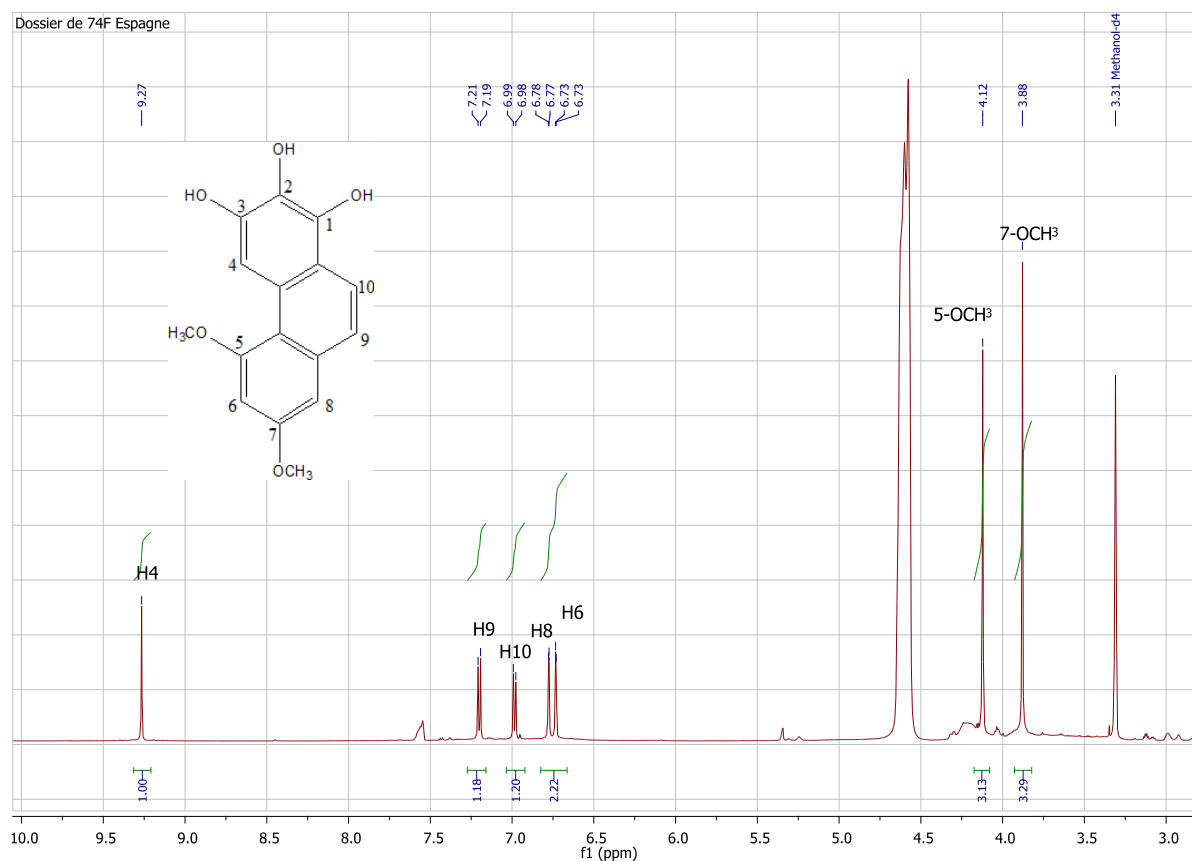
Le spectre RMN-¹³C de ce produit (fig.74) présente 14 signaux attribués au squelette d'un dérivé de phénanthrène, dont cinq sont des carbones oxygénés (135.39, 143.12, 145.58, 158.15 et 160.23 ppm) et deux signaux à 56.05, 55.76 ppm pour deux groupements méthoxyles.

Le spectre HMBC du produit **74**, nous montre que le proton H-4 (9.27 ppm) corrélé avec les atomes de carbone C-2, C-3, C-4b, C-10a et C-4a. Le proton H-10 (6.98 ppm) corrélé avec les atomes de carbone C-8a, C-4a et C-1, tandis que le proton H-9 (7.2 ppm) corrélé avec les atomes de carbone C-8, C-4b, C-10a et C-1 et le proton H-8 (6.77 ppm) avec C-6, C4b, C-9 et C-7 et enfin le proton H-6 (6.73 ppm) avec C-8, C-4b, C-7 et C-5.

Les positions des deux groupements OCH₃ sont déterminées après l'analyse du spectre NOESY du produit. On remarque que le proton H-4 (9.27 ppm) corrélé avec le méthoxyle à 4.12 ppm, le proton H-6 (6.73 ppm) corrélé avec les deux groupes méthoxyles à 4.12 et 3.87 ppm, tandis que le proton H-8 (6.77 ppm) corrélé avec le méthoxyle à 3.87 ppm (7-OMe) et avec le proton à 7.20 ppm (H-9). Enfin, le proton H-9 (7.20 ppm) corrélé avec les protons H-8 (6.77 ppm) et H-10 (6.98 ppm). Ces constatations confirment que les deux groupements méthoxyles sont portés par les atomes de carbone 5 et 7 et alors les trois groupements OH sont portés par les atomes de carbone 1, 2 et 3 (Tableau 42).

Alors, la structure du produit **74** a été établie comme étant : **1,2,3-trihydroxy-5,7-diméthoxyphénanthrène (Herorensol) [13]**. Ce produit est identifié pour la première chez la famille Dioscoreaceae.





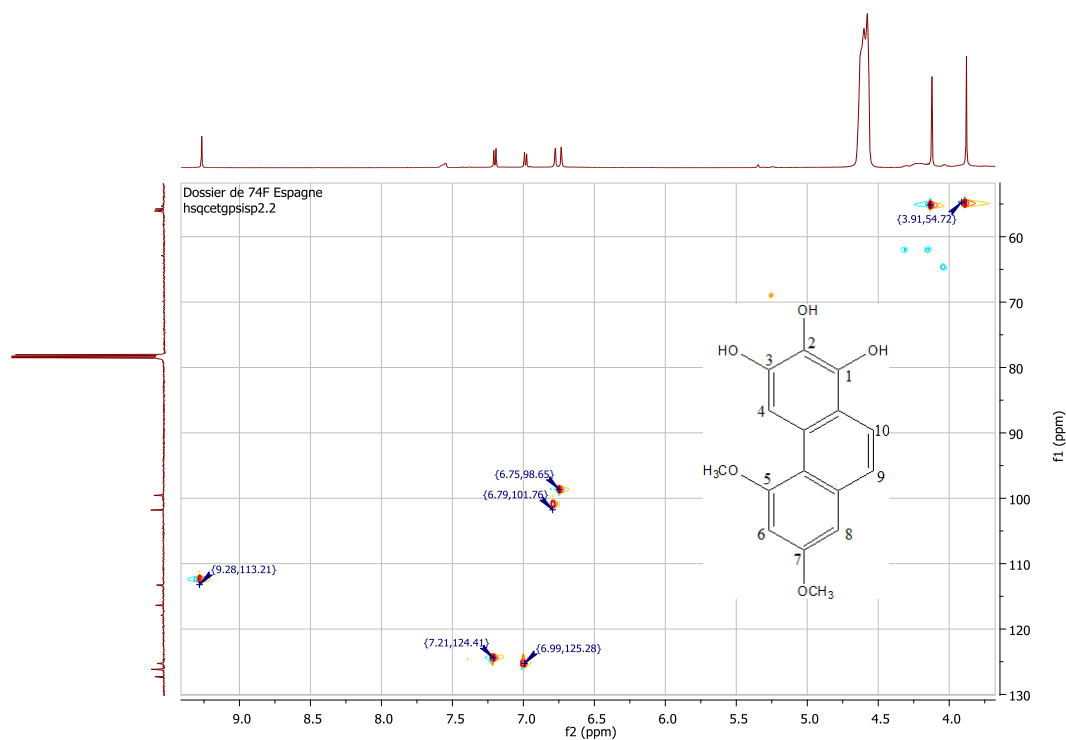


Figure 75 : Spectre HMBC du produit 74

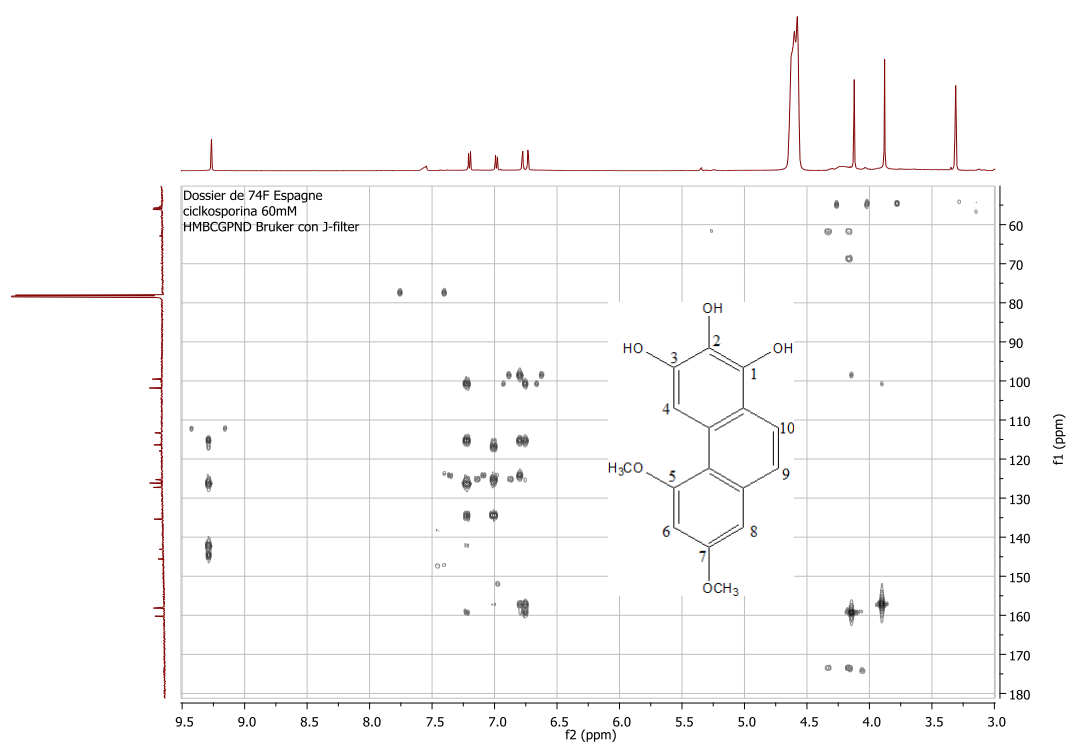
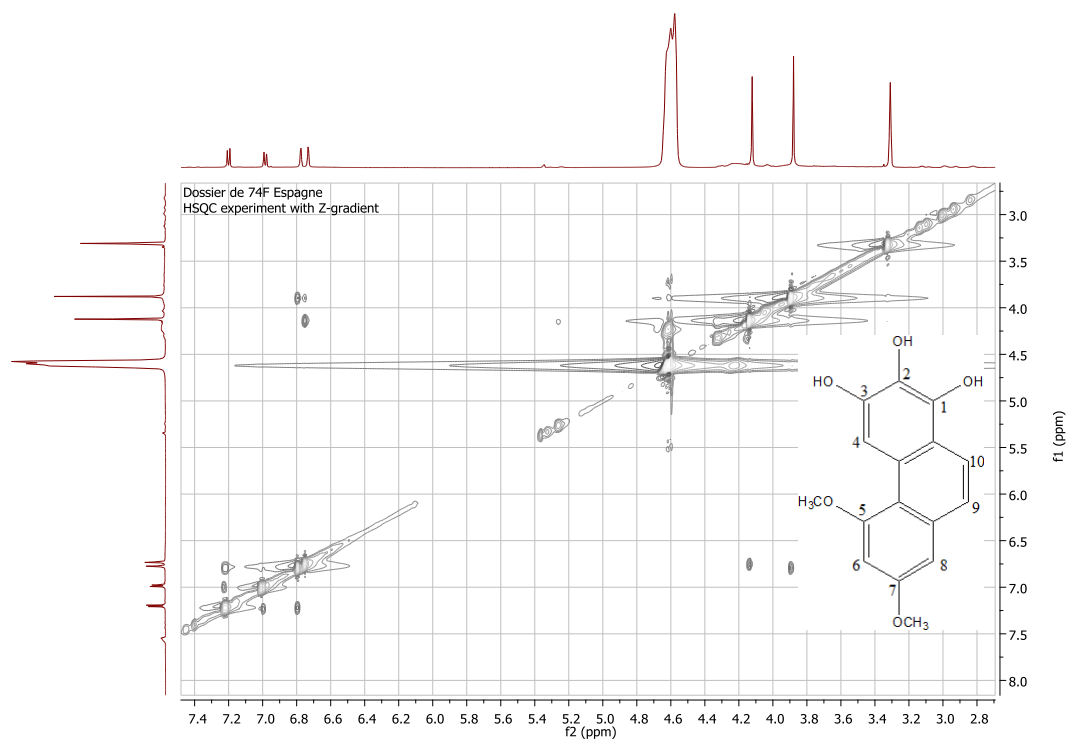
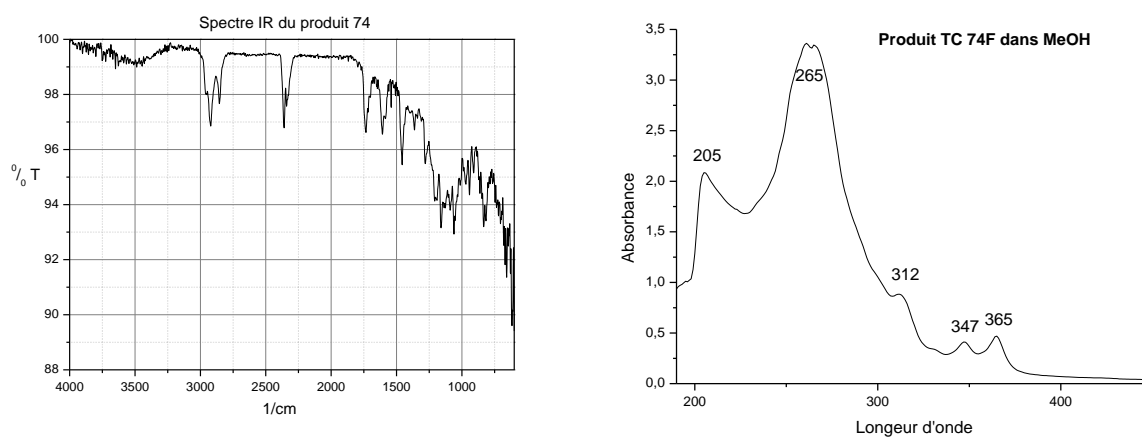


Figure 76 : Spectre HMBC du produit 74

**Figure 77 : Spectre NOESY du produit 74****Figure 78 : Spectre IR et UV du produit 74**

II.7. Elucidation structurale du produit 24d

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Fluorescence sous UV : **Mauve**

$R_f = 0.80$ (CHCl₃ / Acétone, 19:1)

UV-Visible : λ_{\max} 279, 292

SM (EI, 70 eV) : 256.1, 241.2, 213, 128

Tableau-41 : Données RMN-1H (300 MHz, CDCl₃) du composé **24d**

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J(Hz)	Attribution
8.12	<i>d</i>	1H	8.4	H5
6.72	<i>dd</i>	1H	8.4, 2.7	H6
6.70	<i>d</i>	1H	2.7	H8
6.46	<i>d</i>	1H	2.4	H3
6.42	<i>d</i>	1H	2.4	H1
2.73	<i>m</i>	4H	-	H9,H10
3.87	<i>s</i>	3H	-	2-OCH ₃
3.84	<i>s</i>	3H	-	4-OCH ₃

Tableau-42 : Données RMN-13C (75.5MHz, CDCl₃) du composé **24d**

Interprétation	δ (ppm)	Interprétation	δ (ppm)
C2	158.59	C8	114.26
C4	157.63	C6	112.78
C7	153.60	C1	104.91
C10a	140.66	C3	97.63
C8a	139.70	OCH ₃	55.49
C5	129.10	OCH ₃	55.27
C4b	125.55	C10	30.74
C4a	116.61	C9	29.90

- **Interprétation**

Le spectre SM-IE (fig.79) de ce produit présente un pic moléculaire à m/z 256.1 qui correspond à une formule C₁₆H₁₆O₃. Le spectre UV-Visible réalisé dans le MeOH présente deux maxima d'absorptions à 279 et 292 indicatif d'un dihydrophénanthrène [6].

Dans le spectre RMN-¹H de ce composé (Tableau-41, fig.80) le proton H-5 donne un signal à 8.12 ppm sous forme d'un doublet ($J = 8.4$ Hz) à cause de son couplage *ortho* avec le proton H-6 qui donne un signal à 6.70 ppm sous forme de doublet dédoublé ($J = 8.4$ et 2.7 Hz) à cause de son couplage *ortho* avec H-5 et *mé*ta avec H-8, alors que ce dernier proton

donne un signal à 6.46 ppm sous forme de doublet ($J = 2.7$ Hz) à cause de son couplage *métab* avec H-6.

Le déplacement chimique de H-5 à 8.12 ppm (vers un champ fort) est en faveur d'un dérivé de dihydrophénanthrène au lieu de dérivé de phénanthrène [7,8], ceci est confirmé par la présence d'un signal sous forme de multiplet d'intégration 4H attribué aux protons H-9 et H-10. Deux autres doublets ($J = 2.4$ Hz) à 6.46 et 6.42 ppm, chacun d'intégration 1H sont attribués aux protons H-3 et H-1 respectivement. Enfin, on remarque l'apparition d'un signal large vers 5.30 ppm d'intégration 1H qui représente le proton d'un groupement hydroxyle.

De son côté le spectre RMN- ^{13}C (Tableau-42, fig.81) présente 16 pics, deux à 55.49 et 55.27 ppm pour deux groupement OCH_3 et 14 pics pour les carbones d'un squelette dihydrophénanthrène, dont trois carbones aromatiques oxygénés et deux carbones (CH_2).

Par comparaison des données spectrales du produit **24d** avec la littérature [14,15], nous proposons la structure : 7-hydroxy-2,4-diméthoxydihydrophénanthrène, connu surtout sous le nom orchinol et qui est isolé pour la première fois de cette espèce.

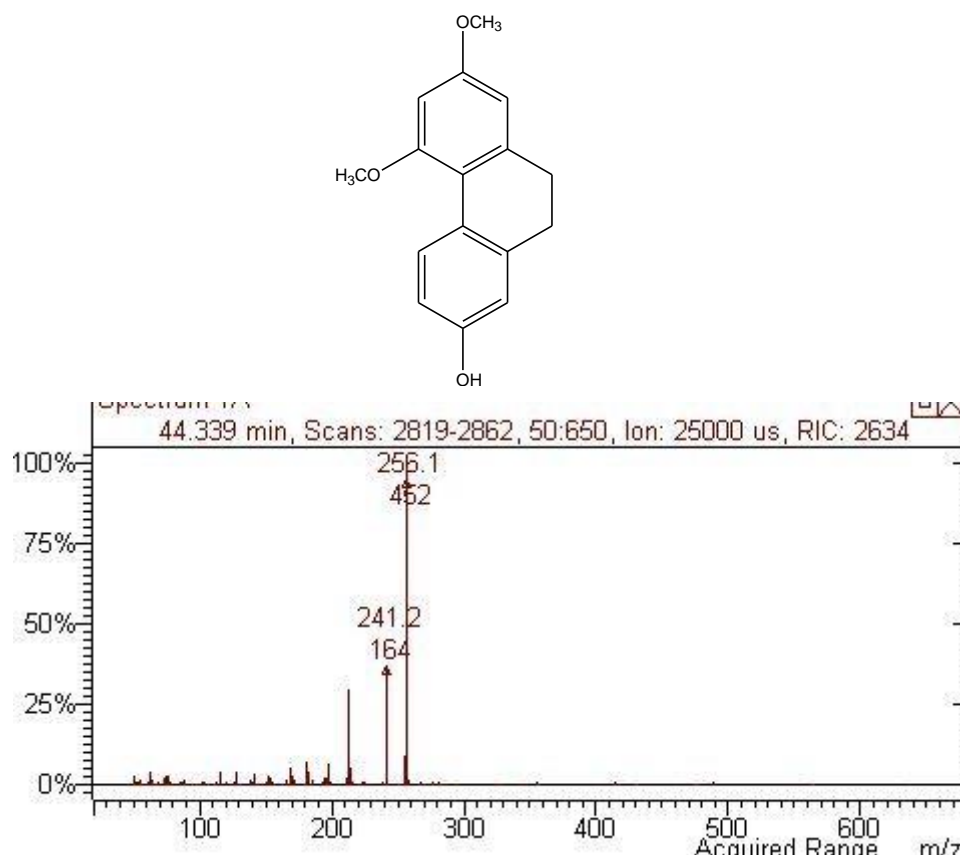
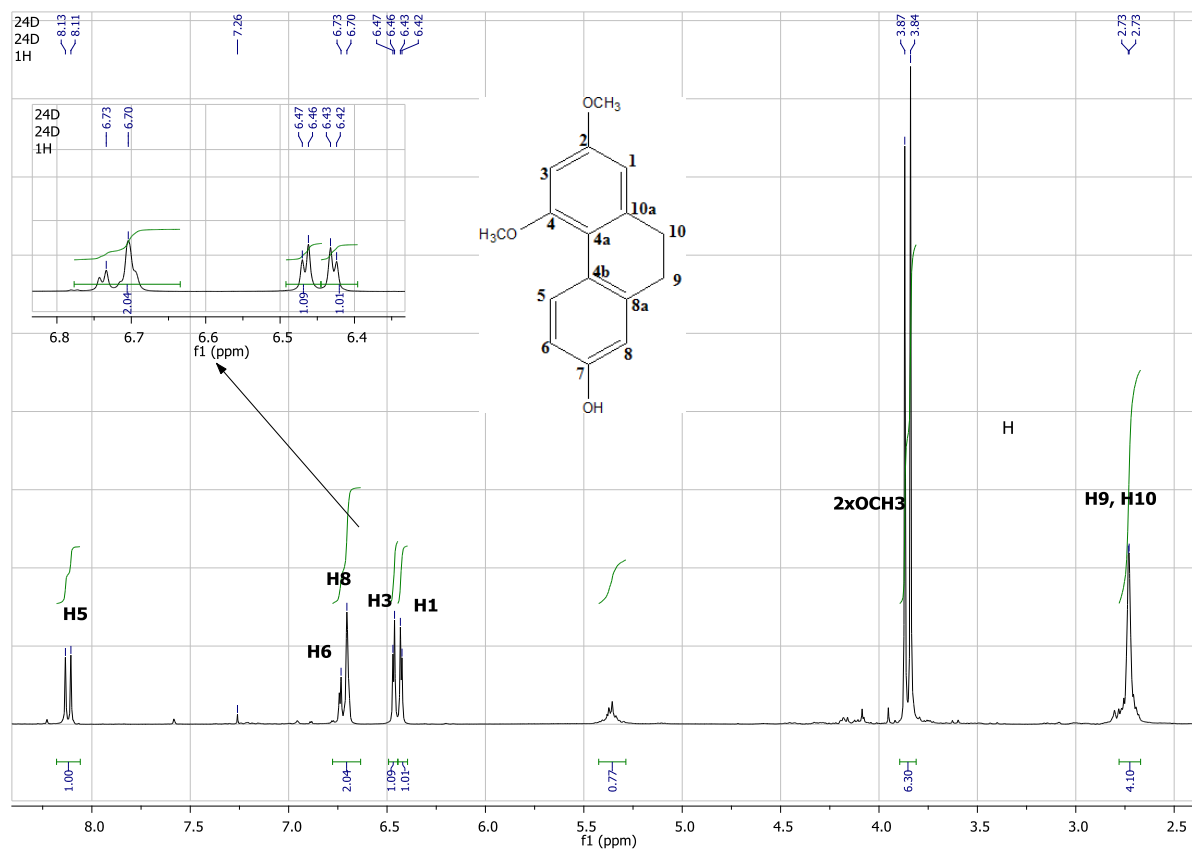
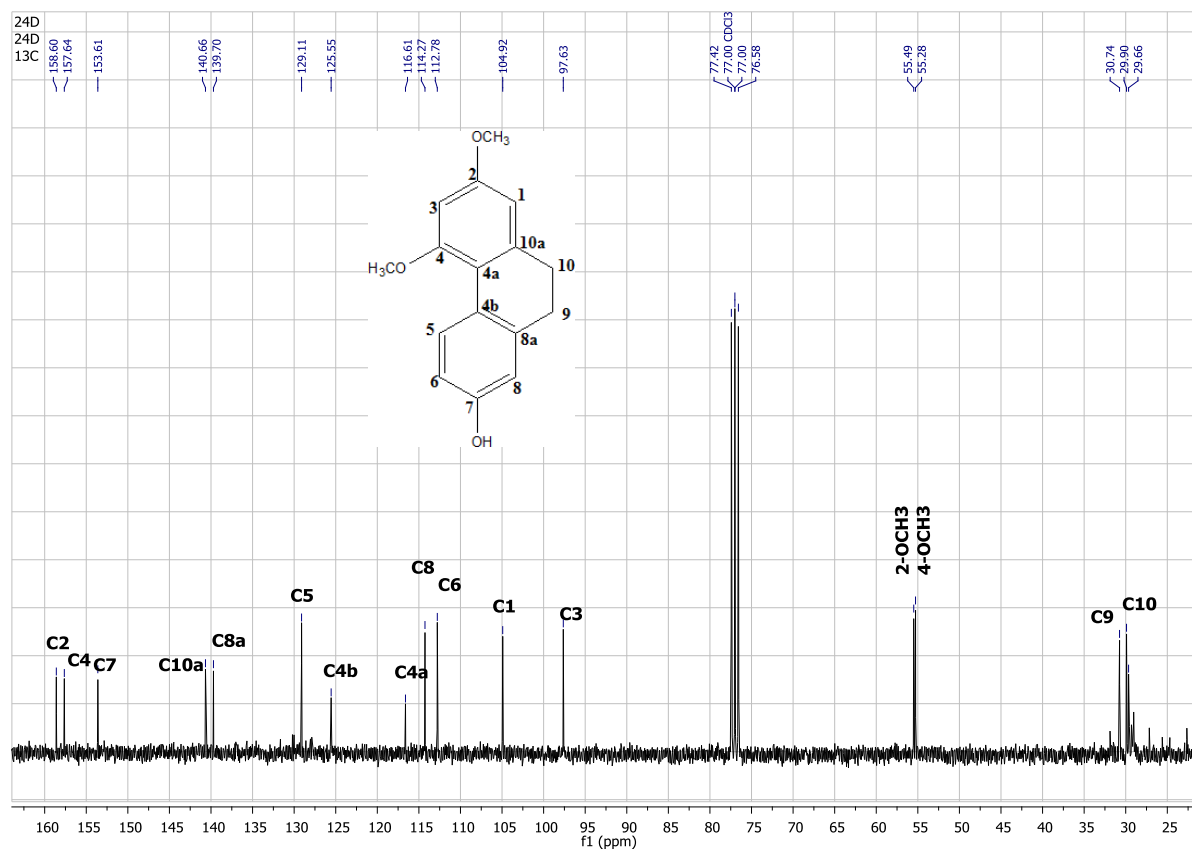


Figure 79 : Spectre SM-IE du produit **24d**

Figure 80 : Spectre RMN-¹H du produit 24dFigure 81 : Spectre RMN-¹³C du produit 24d

II.8. Elucidation structurale du composé 51d

- **Propriétés chromatographiques et spectroscopiques**

Fluorescence sous UV : **Mauve**

$R_f = 0.31$ (CHCl₃/ Acétone, 19:1)

Les données RMN-1H sont présents dans le tableau suivant:

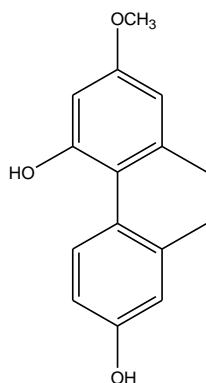
Tableau-43 : Données RMN-1H (300 MHz, CDCl₃) du composé **51d**

δ (ppm)	Multiplicité	Intégration	J (Hz)	Attribution
8.10	<i>d</i>	1H	8.7	H5
6.71	<i>m</i>	1H	-	H6
6.69	<i>d</i>	1H	-	H8
6.41	<i>d</i>	1H	2.4	H1
6.34	<i>d</i>	1H	2.4	H3
2.7	<i>m</i>	4H	-	H9, H10
3.86	<i>s</i>	3H	-	2-OCH ₃

- **Interprétation**

Le spectre RMN-¹H du composé **51d** (Fig.82) se diffère de celui du produit précédent **24d** par la présence d'un seul signal pour le groupement OCH₃ à 3.86 ppm sous forme de singulet. Les signaux des autres protons ont les mêmes formes et déplacements chimiques que ceux du produit **24d**. Sauf le proton H3 qui est déplacé vers un champ à 6.34 ppm au lieu de 6.41 ppm et par comparaison de ces données avec la littérature [16] nous proposons pour le produit **51d** la structure :

'**4,7-dihydroxy-2-méthoxydihydrophénanthrène**', connu sous le nom '**lusianthridin**' est qui est identifié pour la première fois chez cette espèce.



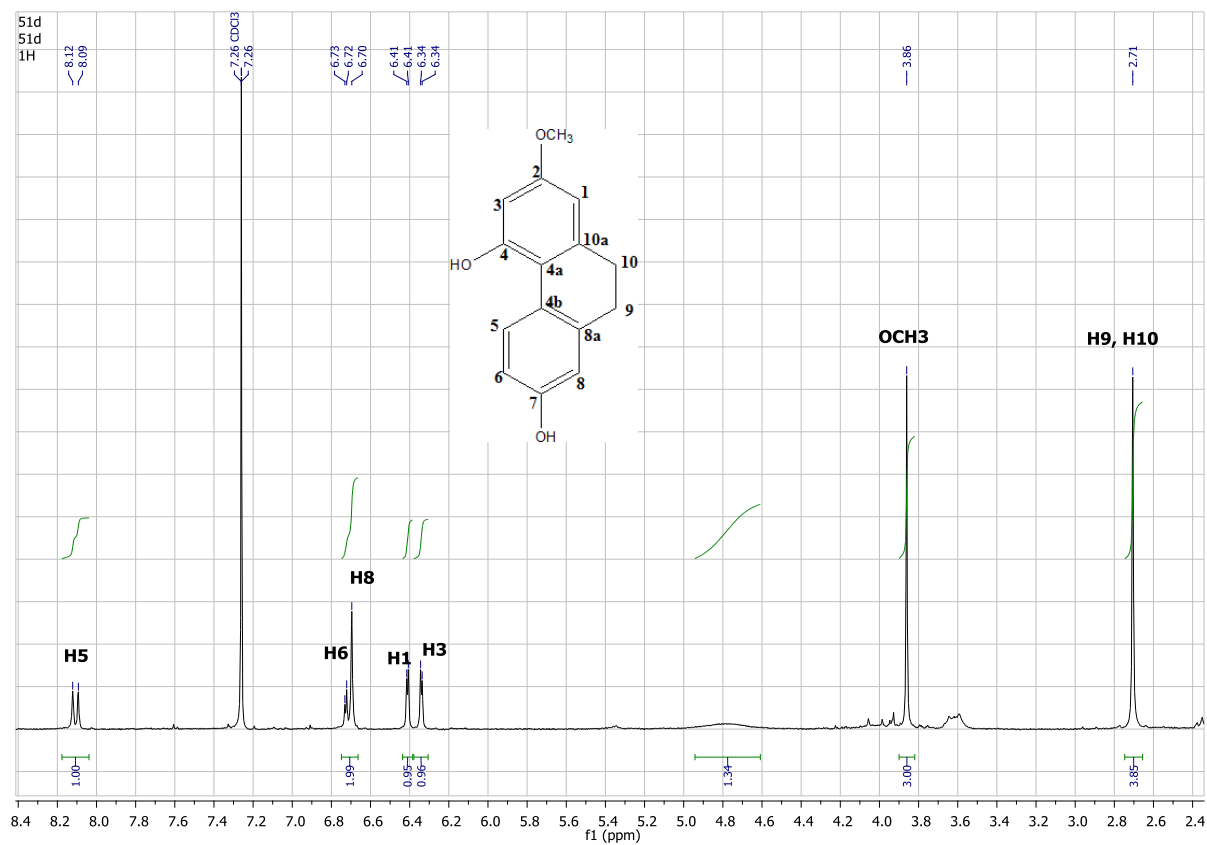


Figure 82 : Spectre RMN- ^1H du produit 51d

Références bibliographiques

- [1] Harborne J.B. (1994). The flavonoids advances in research since 1986, Springer Sciences, GB.
- [2] Harborne J.B., Mabry T.J. (1982). The flavonoids : Advances in research, Chapman and Hall, NY.
- [3] Markham K.R., Geiger H.(1994). ¹H NMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides in DMSO-d₆, (In The Flavonoids: Advances in research since 1986). Chapman and Hall, London .
- [4] Markham K.R., Chari V.M. (1982).The carbon 13-NMR spectroscopy of flavonoids (In flavonoids: Advances in research). Chapman and Hall, London.
- [5] Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York.
- [6] Letcher R. M., Nhamo L. R. M. (1971). Chemical constituents of the combretaceae. Part I. Substituted phenanthrenes and 9,10-dihydrophenanthrenes from the heartwood of *Combretum apiculatum*. J. Chern. Soc. C, 0,3070-3076
- [7] Letcher R. M., Wong K.M. (1978). Structure and synthesis of the phenanthrenes Tal and TaV from *Tamus communis*. J.Chem. Sot. Perkin Trans. I,7,739-742.
- [8] Majumder P. L., Kar A.(1987). Confusarin and Confusaridin, two phenanthrene derivatives of the orchid *Eria confusa*. Phytochemistry, 26, 1127.
- [9] Kovács A., Forgo P., Zupko I., Réthy B., Falkay G., Szabo P., Hohmann J. (2007).Phenanthrenes and a dihydrophenanthrenes from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. Phytochemistry, 68, 678-691.
- [10] Radix S., Barret R. (2007). Total synthesis of two natural phenanthrenes: Confusarin and a regioisomer. Tetrahedron, 63, 12379-12387.
- [11] Réthy B., Kovács A., Zupko I., Forgo P., Vasas A., Falkay G., Hohmann J. (2006). Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis*. Planta Med, 72, 767-770.
- [12] Tuchinda P., Udchachon J., Khumtaveeporn K., Taylor W.C., Eng elhardt L.M., Whiter A.H. (1988). Phenanthrenes of *Eulopha nuda*. Phytochemistry, 27, 3267-3271.
- [13] Katerere D.R., Gray A.I., Nash R.J., Waigh R.D.(2012). Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. Fitoterapia, 83, 932-940.
- [14] Stoessl A., Stothers J.B. (1982). Carbon-13 spectra of several polyhydroxylated 9,10-dihydro-phenanthrene and phenanthrene derivatives. Org Magn Reson, 20, 166-169.
- [15] Tezuka Y., Ueda M., Kikuchi T. (1989). Studies on the constituents of Orchidaceous plants. VIII. Constituents of *Spiranthes sinensis* (Pers.) AMES var. *amoena* (M. Bieberson) HARA: Isolation and structure elucidation of Spiranthol-A, Spirnthol-B and Spirasineol-A, new isopentenylidihydrophenanthrenes. Chem Pharm Bull, 37, 3195-3199.
- [16] Majumder PL., Lahiri S. (1990). Lusianthrin and Lusianthridin, two stilbenoids from the orchid *Lusia indivisa*. Phytochemistry, 29, 621-624.

Partie B
Etude biologique

Chapitre 1

Matériel et méthodes

I. Analyse quantitative des composés phénoliques

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux, des flavonoïdes des différents extraits sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnages et exprimées en μg équivalent/ mg de la matière végétale sèche. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribuées [1].

I.1. Dosage des composés phénoliques totaux (TCP)

I.1.1. Principe

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides : L'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux [2].

La quantification des polyphénols totaux a été faite à l'aide d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax$), réalisée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon, en utilisant l'acide gallique comme standard (fig.83).

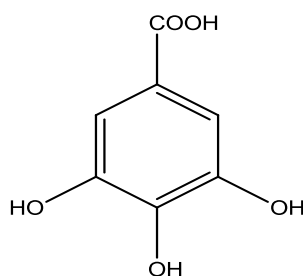


Figure 83 : Structure de l'acide gallique

I.1.2. Protocole

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par Singleton [3], avec une légère modification.

A un volume de 125 μl de solution d'extrait (1mg/1ml), on ajoute 500 μL d'eau distillée puis 125 μl du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 1250 μl de carbonate de sodium

(20 g/L) et 1 ml d'eau distillé sont additionnés. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 90 minutes à température ambiante, puis la lecture est faite à 760 nm. L'acide gallique (50-500 µg/ml) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en µg d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

I.1.3. Expression des résultats

Le total des composés phénoliques est déterminé selon l'équation suivante [4]:

$$T = C.V/m.d$$

T : Total des composés phénoliques (mg EAG / g d'Ex)

C : Concentration de l'extrait établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg / mL)

V : Volume de l'extrait (mL)

m : Masse de l'extrait (g)

d : Coefficient de dilution

I.1.1.4. Courbe d'étalonnage

A partir d'une solution mère de l'acide gallique de 500 µg/mL, une série de solutions filles est ainsi préparée, de concentrations allant de 50 à 500 µg/mL. Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure ci-dessous :

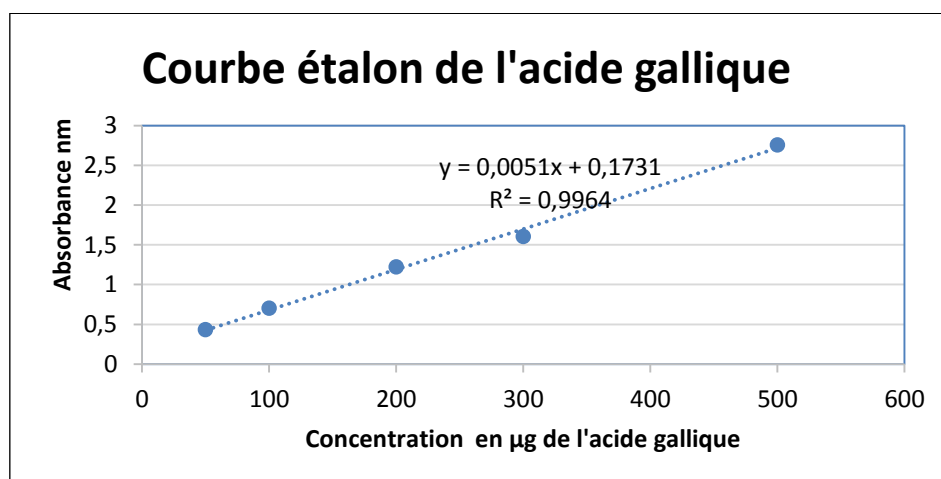


Figure 84: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

I.2. Dosage des flavonoïdes (TCF)

I.2.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle ($C=O$) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs, $AlCl_3$ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements *ortho* dihydroxyyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes. L'absorbance est mesurée au voisinage de 420 nm et les résultats sont exprimés en équivalents de quercétine (fig.85) [5].

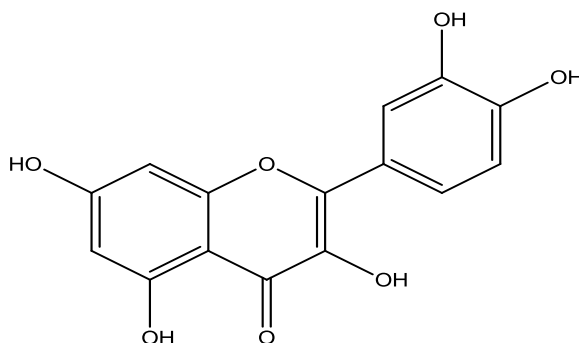


Figure 85 : Structure de la quercétine

I.2.2. Protocole

La méthode adoptée pour le dosage des flavonoïdes totaux est celle décrite par Turkoglu [6] avec une légère modification.

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution (S_1), 500 μ L de (S_1) on lui ajoute 1900 μ L (MeOH) puis 50 μ L (S_2)(CH_3COOK) et 50 μ L ($Al(NO_3)_2 \cdot 9H_2O$). Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 40 minutes à température ambiante, puis la lecture est faite à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (500 μ L extrait + 2 mL méthanol). La quercétine (25-200 μ g/mL) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des flavonoïdes totaux des extraits est calculée. Le résultat est exprimé en μ g d'équivalents de la Quercétine par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

I.2.3. Courbe d'étalonnage

A partir d'une solution mère de la quercétine de 200 µg/mL, une série de solutions filles est ainsi préparée, de concentrations allant de 25 à 200µg/mL. Ensuite, nous avons suivi le même protocole entrepris pour doser les échantillons.

La courbe d'étalonnage de la quercétine est représentée dans la figure ci-dessous :

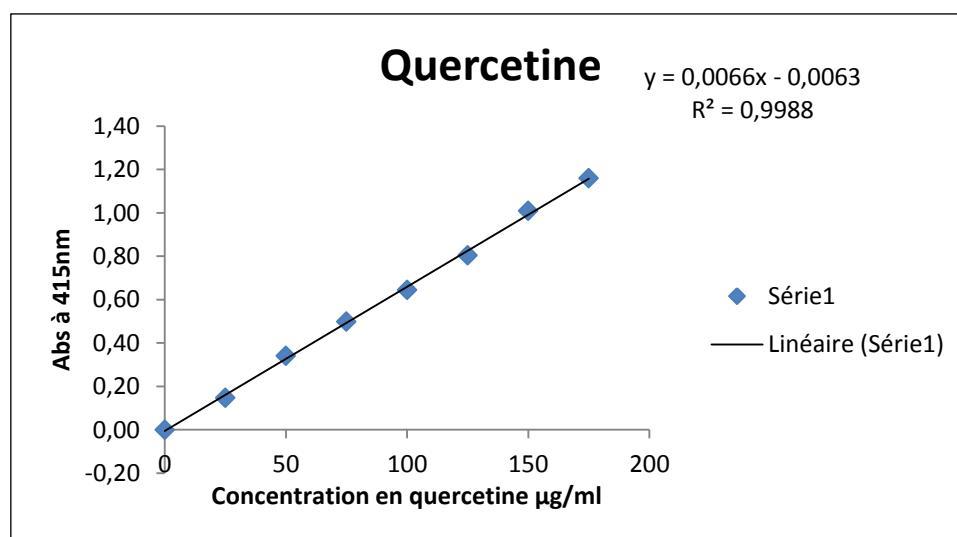


Figure 86: Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes

II. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro* comme le cas de notre travail.

L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits et produits des deux plantes *Crataegus azarolus* (L.) et *Dioscorea communis* (L.) est testée selon cinq méthodes: piégeage du radical libre DPPH, piégeage de l'ABTS, méthode CUPRAC, pouvoir réducteur du fer FRAP et blanchissement du β-carotène en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puis (Spectra Max PC340, MolecularDevices, USA).

II.1. Test antiradicalaire au DPPH

L'activité du DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par Blois [7], le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de

la réduction par un antioxydant, son absorption diminue. Brièvement, une solution de 0,4 mM de DPPH est préparée dans le méthanol et 160 µL de cette solution ont été ajoutés à 40 µL d'échantillon dilué dans des solutions de méthanol à des concentrations différentes. Trente minutes plus tard, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHT et BHA ont été utilisés comme normes anti-oxydantes, pour la comparaison de l'activité avec les extraits utilisés. La faible valeur d'absorbance de la réaction du mélange indique une activité de piégeage des radicaux libres supérieure.

La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

A_{Blanc} est l'absorbance de la réaction contenant que les réactifs.

A_{Extrait} est l'absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI_{50}), plus la valeur de (CI_{50}) est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

II.2. Test du piégeage de l'ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^{\bullet+}$ de coloration bleu verdâtre. Ce radical cationique est formé suite à l'oxydation de l'ABTS initialement incolore avec les différents composés comme le phosphate de potassium (KH_2PO_4). Ainsi, la réaction se déroule en deux étapes :

Au cours de la première étape, le radical $ABTS^{\bullet+}$ est formé par arrachement d'un électron(e^-) à un atome d'azote de l'ABTS.

La deuxième se déroule en présence d'antioxydant donneur de H^{\bullet} , le radical d'azote concerné piège un H^{\bullet} , conduisant à l' $ABTS^{\text{H}^+}$, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

L' $ABTS^{\bullet+}$ a été produit par la réaction entre 7 mM de l'ABTS dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium est stockée dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 h. L'oxydation de l'ABTS commence immédiatement mais l'absorption n'est pas maximale et se stabilise après 6 heures de temps. Le radical cation est stable sous cette forme depuis plus de 2 jours dans l'obscurité à température ambiante. Avant utilisation, l'ABTS a été dilué pour obtenir une absorbance de $0,708 \pm 0,025$ à 734 nm avec de l'éthanol. Ensuite, 160 µL de la

solution de L'ABTS^{•+} ont été ajoutés à 40µl de la solution d'extrait dissout dans le méthanol à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. Le BHT et BHA ont été utilisés comme normes anti-oxydantes [8].

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage de L'ABTS^{•+} a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

L'expression des résultats (CI₅₀) sont déterminées sur le même mode que celui décrit pour le test DPPH.

II.3. Test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés.

A 10 µL de solution d'échantillon à différentes concentrations, on ajoute 40 µl de tampon phosphate (0,2M : pH 6,6) puis 50 µl de potassium hexacyanoferrate [K₃Fe (CN)₆] 1% dans l'eau distillée. L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 50 µl d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté ainsi 40 µL d'eau distillée et 10 µL de FeCl₃ 1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée ont été ajoutés. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le méthanol.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [9].

Les résultats ont été donnés en A_{0.5} (µg / mL) correspondant à la concentration indiquant une intensité d'absorbance de 0,5. L'augmentation du pouvoir réducteur par l'extrait et l'étalon a été calculée comme suit:

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Blanc}}) - 1] \times 100$$

A_{Extrait} : Absorbance de la réaction contenant les réactifs et l'extrait.

A_{Blank} : Absorbance de la réaction ne contenant que les réactifs.

II.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par Apak [10]. Une solution de 40 μl des échantillons est préparée avec le mélange des volumes de : 60 μl de solution tampon NH_4Ac (1 M, $\text{pH} = 7,0$), 50 μl neocuprine (7,5 mM) et 50 μL Cu (II) (10 mM) ajouter respectivement. Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles de BHA et du BHT. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0,5}$ ($\mu\text{g} / \text{ml}$) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

II.5. Test de blanchissement du β -carotène

L'activité de blanchissement de β -carotène des deux plantes a été évaluée en utilisant le système de modèle de l'acide β -carotène-linoléique [11]. Une masse de 0,5 mg de β -carotène dissoute dans 1 mL de chloroforme puis ajouté à un volume de 25 μL d'acide linoléique et de 200 mg de Tween 40, en donnant un mélange émulsifiant. Après évaporation du chloroforme sous vide, 50 mL d'eau distillée saturée en oxygène, ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. L'absorbance de la solution du β -carotène doit être comprise entre 0.8 et 0.9 nm. Un volume de 160 μl de cette solution préparée, a été ajouté à un volume de 40 μL d'extrait pour les différentes concentrations. L'absorbance a été mesurée à 470 nm chaque 30 minute en utilisant un lecteur de microplaque. Le BHA et BHA ont été utilisés comme standards.

Le blanchissement de β -carotène est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$R = \text{Log} (A_0 / A_t) / t$$

A_0 : Absorbance à 0 minute.

A_t : Absorbance à 120 minutes.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(R_{\text{Blanc}} - R_{\text{Extrait}}) / R_{\text{Blanc}}] \times 100$$

III. Activité anti-cholinestérase

Les activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées avec une modification légère de la méthode spectrophotométrique décrite par Ellman [12].

AChE de l'anguille électrique et BChE du sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été employés comme substrats. Le DTNB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a été utilisé pour la mesure de l'activité cholinestérase. L'éthanol a été utilisé comme solvant pour dissoudre les composés d'essai et les contrôles. Brièvement, 150 µl de tampon phosphate de sodium (100Mm, pH 8,0), 10 µl d'une solution d'échantillon dissoute dans de l'éthanol à différentes concentrations et un volume de 20 µl l'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 250 C° puis 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 20 µl l'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, selon le résultat de la réaction de DTNB avec thiocholine, libéré par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou le chlorure de butyrylthiocholine, respectivement, à une longueur d'onde de 412 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule $(E - S) / E \times 100$, où E est l'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai, et S, est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test. Les expériences ont été réalisées en trois essais. La galantamine a été utilisé comme composé de référence.

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

IV. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD d'analyses en trois essais. Les valeurs de CI₅₀ (Concentration d'inhibition à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test

ANOVA univarié Les différences sont considérée statistiquement significatives au seuil de 0.05.

Références bibliographiques

- [1] Bendif H. (2017). Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques *in vitro* des extraits actifs de quelques Lamiaceae: *Ajuga iva* (L.) Schreb., *Teucrium polium* L., *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr. Thèse de doctorat, pp. 52.
- [2] Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot J.M. (2005). Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agri. Food Chem*, 53, 1370-1373.
- [3] Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Met.Enzym*, 299, 152-178.
- [4] Adesegun S.A., Fajana A., Orabueze C.I., Coker H.A.B. (2007). Evaluation of antioxidant properties of *Phaulopsis fascisepala* CBCl. (Acanthaceae). *Oxford J*, 6, 227-213.
- [5] Woisky R. G., Salatino A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Agri. Res*, 37, 99 – 105.
- [6] Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus* (Bull.)Murrill. *Food Chem*, 101, 267–273.
- [7] Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200.
- [8] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med*, 26, 1231–1237.
- [9] Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr*, 44, 307–315.
- [10] Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agri.Food Chem*, 52, 7970–7981.
- [11] Marco G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 45, 594–598.
- [12] Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherston R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem.Pharmacol*, 7, 88–95.

Chapitre 2

Résultats et discussion

I. Dosage des polyphénols totaux (TCP) de *C.azarolus*

Le tableau-44 montre que les deux extraits sont riches en polyphénols mais l'extrait butanolique (EBCA) est plus riche que l'extrait chloroformique (ECCA).

Tableau-44: Polyphénols totaux de *C. azarolus*

Extraits	Total phénolique (μg EAG/mg d'extrait)
EBCA	307.33 \pm 2.33
ECCA	118.0 \pm 1.52

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures \pm Ecart type.

II. Dosage des flavonoides (TCF) de *C.azarolus*

Le tableau-45 montre que l'extrait butanolique (EBCA) est riche en flavonoides, par contre l'extrait chloroformique (ECCA) contient une faible quantité de flavonoides.

Tableau-45: Flavonoides totaux de *C. azarolus*

Extraits	Total flavonoides (μg EAG/mg d'extrait)
EBCA	143.0 \pm 2.12
ECCA	7.33 \pm 0.47

Dans cette étude on a trouvé que les valeurs de TCP et de TCF sont bien au-dessus des valeurs rapportées dans d'autres études [1,2], cela peut-être expliqué par la différence de la période de récolte de la plante ainsi la région et la méthode d'extraction.

III. Activité antioxydante

Il existe de nombreuses méthodes qui diffèrent sur le plan de leurs principes d'analyse et les conditions expérimentales et les antioxydants ont des contributions différentes au potentiel antioxydant total. Pour cette raison l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits.

Cinq méthodes précédemment décrits ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits CHCl_3 (ECCA), n-BuOH (EBCA) de *C. azarolus* ainsi que les extraits Et_2O (EEDC), AcOEt (EADC) de *D.communis* avec quelques produits isolés de chaque plante.

Les résultats de l'activité sont représentés par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration ainsi que les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (CI_{50}) (DPPH, ABTS, blanchissement de β carotène), la concentration d'absorbance 0,5 ($\text{A}_{0.50}$) (CUPRAC, FRAP).

III.1. Extraits et composés de *C.azarolus*

III.1.1. Test DPPH

L'extrait **EBCA** présente une excellente activité ($CI_{50} = 11.11 \pm 0.22 \mu\text{g/mL}$) par rapport au standard **BHT** ($CI_{50} = 22.32 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$), cet extrait a été trouvé le plus riche en polyphénols qui sont probablement responsables du taux élevé d'inhibition du radical DPPH^{*}, par contre l'extrait **ECCA** été moins actif ($CI_{50} : 54.42 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$) par rapport aux deux standard **BHT** ($CI_{50} = 22.32 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$) et **BHA** ($CI_{50} = 5.73 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$).

Le deux produits **3** ($CI_{50} = 6.77 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$) et **2** ($CI_{50} = 9.10 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$) présentent une activité élevé par rapport au standanrd **BHT**. Cependant le standard **BHA** présente une activité proche du produit **3**.

Le tableau-46 regroupe les résultats de l'activité antiradicalaire DPPH de différentes concentrations des extraits et produits purs de *C.azarolus*.

Tableau-46 : Inhibition du radical DPPH par les extraits et produits de *C. azarolus*

Extraits 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$	% Inhibition							
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	$CI_{50} \mu\text{g/mL}$
ECCA	3.47 \pm 1.14	9.26 \pm 0.36	14.43 \pm 0.36	31.18 \pm 0.93	48.64 \pm 1.93	74.61 \pm 1.86	87.63 \pm 0.56	54.42 \pm 0.77
EBCA	11.62 \pm 0.59	21.20 \pm 2.50	58.18 \pm 1.03	79.05 \pm 1.18	79.56 \pm 0.15	80.07 \pm 0.15	81.93 \pm 0.00	11.11 \pm 0.22
2	21.84 \pm 0.28	42.10 \pm 0.00	62.37 \pm 3.90	80.65 \pm 0.25	82.47 \pm 0.28	83.11 \pm 0.00	83.70 \pm 0.49	9.10 \pm 0.00
3	21.36 \pm 0.84	42.75 \pm 0.28	70.19 \pm 0.37	80.70 \pm 0.16	81.18 \pm 0.70	81.45 \pm 0.25	81.45 \pm 0.37	6.77 \pm 0.09
BHT	11,69 \pm 1,88	22,21 \pm 1,30	37,12 \pm 1,80	52,63 \pm 2,70	56,02 \pm 0,53	83,60 \pm 0,23	87,28 \pm 0,26	22.32 \pm 1.19
BHA	28,95 \pm 1,16	54,33 \pm 1,59	76,76 \pm 1,65	84,09 \pm 0,35	87,53 \pm 0,82	87,73 \pm 0,15	88,43 \pm 0,23	5.73 \pm 0.41

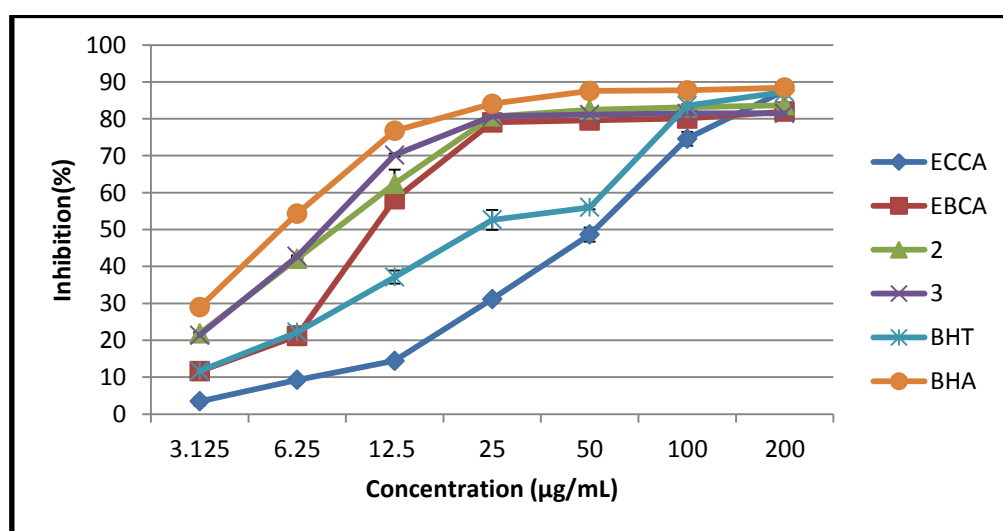


Figure 87 : Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits et composés de *C.azarolus*

III.1.2. Test ABTS

La meilleure activité a été manifestée à l'extrait **EBCA** ($CI_{50} = 4.99 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$), l'extrait **ECCA** ($IC_{50} = 13.89 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) ainsi que les deux produits **3** ($CI_{50} = 10.63 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$) et **2** ($CI_{50} = 11.46 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$) ont été beaucoup moins actifs par rapport aux deux standards **BHT** ($CI_{50} = 1.29 \pm 0.30 \mu\text{g/mL}$) et **BHA** ($CI_{50} = 1.81 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$) $\mu\text{g/mL}$.

Le tableau-47 montre les pourcentages d'inhibition (I %) des produits testés par la méthode de l'ABTS•+ à différentes concentrations.

Tableau-47 : Activité antiradicalaire (ABTS) des extraits et composés de *C. azarolus*

Extraits 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$	% Inhibition							$CI_{50} \mu\text{g/mL}$
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
ECCA	20.30 \pm 1.36	36.01 \pm 0.12	49.9 \pm 50.12	67.70 \pm 0.59	85.24 \pm 0.12	89.46 \pm 1.84	90.4 \pm 10.20	13.89 \pm 0.03
EBCA	37.85 \pm 0.59	60.15 \pm 0.12	88.24 \pm 0.12	91.16 \pm 0.66	91.30 \pm 0.42	91.57 \pm 0.31	91.64 \pm 0.94	4.99 \pm 0.06
2	20.2 \pm 50.19	30.0 \pm 70.93	53.9 \pm 60.00	83.2 \pm 60.58	88.3 \pm 50.46	90.50 \pm 0.32	91.2 \pm 50.25	11.46 \pm 0.00
3	18.3 \pm 20.25	32.11 \pm 0.19	57.5 \pm 00.56	82.7 \pm 21.02	88.8 \pm 40.34	91.0 \pm 90.37	91.90 \pm 0.19	10.63 \pm 0.12
BHT	59.22 \pm 0.59	78.55 \pm 3.43	90.36 \pm 0.00	92.18 \pm 1.27	93.37 \pm 0.86	94.87 \pm 0.87	96.68 \pm 0.39	1.29 \pm 0.30
BHA	83.42 \pm 4.09	93.52 \pm 0.09	93.58 \pm 0.09	93.63 \pm 0.16	93.63 \pm 0.95	94.20 \pm 0.90	95.39 \pm 2.62	1.81 \pm 0.10

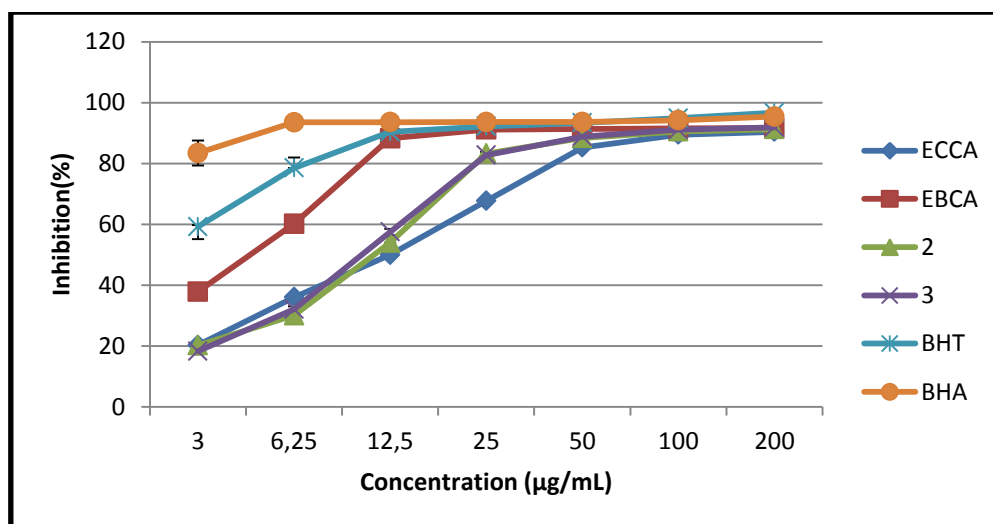


Figure 88 : Activité ABTS des extraits et composés de *C. azarolus*

III.1.3. Test FRAP

Les deux extraits **ECCA** ($A_{0,5} = 96.93 \pm 2.65 \mu\text{g/mL}$) et **EBCA** ($A_{0,5} = 42.33 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$) sont beaucoup moins actifs par rapport au standard acide ascorbique ($A_{0,5} = 6.77 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$).

Les deux produits **3** ($A_{0,5} = 22.87 \pm 0.29 \mu\text{g/mL}$) et **2** ($A_{0,5} = 45.67 \pm 3.30 \mu\text{g/mL}$) présentent une activité moins actifs par rapport au standard acide ascorbique ($A_{0,5} = 9.01 \pm 1.46 \mu\text{g/mL}$).

Le tableau-48 regroupe les résultats de l'activité FRAP de différentes concentrations des extraits et produits purs.

Tableau-48 : Activité FRAP des extraits et composés de *C. azarolus*

Extraits 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$	Absorbance							$A_{0,5}\mu\text{g/mL}$
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
ECCA	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01	0.2 \pm 0.01	0.36 \pm 0.02	0.53 \pm 0.00	0.72 \pm 0.00	96.93 \pm 2.65
EBCA	0.16 \pm 0.00	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.02	0.49 \pm 0.00	0.54 \pm 0.00	0.68 \pm 0.22	0.89 \pm 0.02	42.33 \pm 0.31
2	0,14 \pm 0,00	0,19 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02	0,40 \pm 0,01	0,4 \pm 0,00	0,5 \pm 0,01	45.67 \pm 3.30
3	0,1 \pm 0,02	0,1 \pm 0,01	0,16 \pm 0,03	0,2 \pm 0,03	0,38 \pm 0,01	0,54 \pm 0,01	0,6 \pm 0,00	22.87 \pm 0.29
A- ascorbique 1mg	0.09 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.16 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04	0.76 \pm 0.16	2.02 \pm 0.23	3.87 \pm 0.27	9.01 \pm 1.46
A- ascorbique 4mg	0.35 \pm 0.05	0.46 \pm 0.03	0.84 \pm 0.12	0.93 \pm 0.30	1.18 \pm 0.34	1.44 \pm 0.21	1.37 \pm 0.20	6.77 \pm 1.15

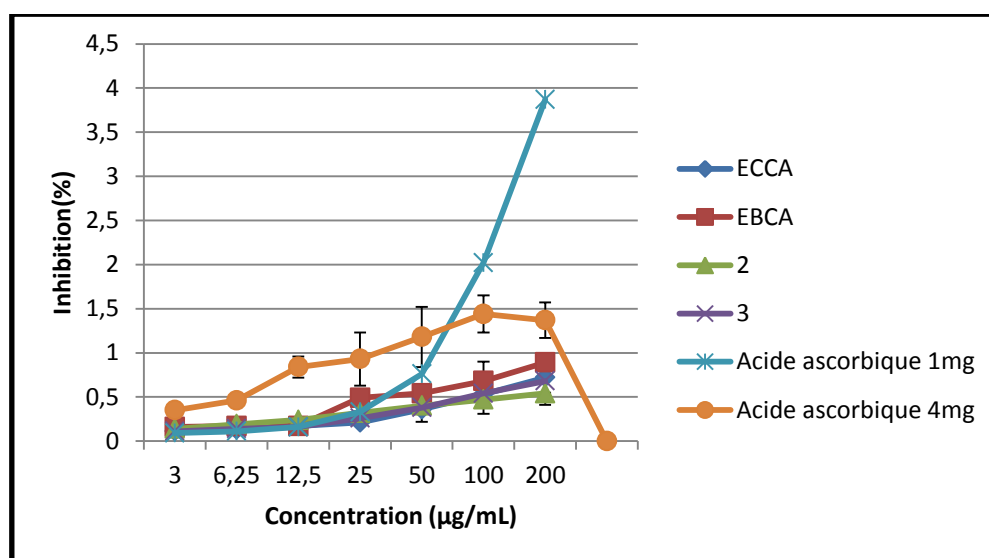


Figure 89 : Activité FRAP des extraits et composés de *C. azarolus*

III.1.4. Test CUPRAC

La capacité antioxydante (CUPRAC) basée sur la mesure de l'absorbance à 450 nm par la formation d'un complexe stable entre la Neocuproïne et le cuivre (I), ce dernier est formé par la réduction du cuivre (II) en présence de Neocuproïne.

L'extrait **EBCA** présente une excellente activité ($A_{0,5} = 8.95 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$) qui est très proche à celle du standard **BHT** ($A_{0,5} = 9.62 \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$), l'extrait **ECCA** ($A_{0,5} = 29.67 \pm 0.17 \mu\text{g/mL}$) ainsi les deux produits **3** ($A_{0,5} = 15.02 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$) et **2** ($A_{0,5} = 20.87 \pm 0.64 \mu\text{g/mL}$) sont moins actifs par rapports au deux standard **BHT** ($A_{0,5} = 9.62 \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$) et **BHA** ($A_{0,5} = 3.64 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$).

L'ensemble des valeurs d'absorbance obtenus est reporté dans le tableau-49.

Tableau-49: Activité CUPRAC des extraits et composés de *C. azarolus*

Extraits 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$	Absorbance							$A_{0,5} \mu\text{g/mL}$
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
ECCA	0.1 \pm 0.01	0.2 \pm 0.01	0.30 \pm 0.00	0.44 \pm 0.01	0.7 \pm 0.01	1.0 \pm 0.09	1.58 \pm 0.17	29.67 \pm 0.17
EBCA	0.24 \pm 0.01	0.45 \pm 0.01	0.62 \pm 0.01	1.07 \pm 0.05	1.84 \pm 0.17	2.84 \pm 0.12	3.31 \pm 0.28	8.95 \pm 0.03
2	0.16 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	0.39 \pm 0.00	0.57 \pm 0.00	0.7 \pm 0.01	1.120 \pm .03	1.7 \pm 0.14	20.87 \pm 0.64
3	0.2 \pm 0.00	0.35 \pm 0.01	0.48 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01	0.97 \pm 0.13	1.45 \pm 0.04	2.25 \pm 0.18	15.02 \pm 0.47
BHT	0.19 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04	0.66 \pm 0.07	1.03 \pm 0.07	1.48 \pm 0.09	2.04 \pm 0.14	2.32 \pm 0.28	9.62 \pm 0.87
BHA	0.46 \pm 0.00	0.78 \pm 0.01	1.34 \pm 0.08	2.36 \pm 0.17	3.45 \pm 0.02	3.76 \pm 0.03	3.93 \pm 0.01	3.64 \pm 0.19

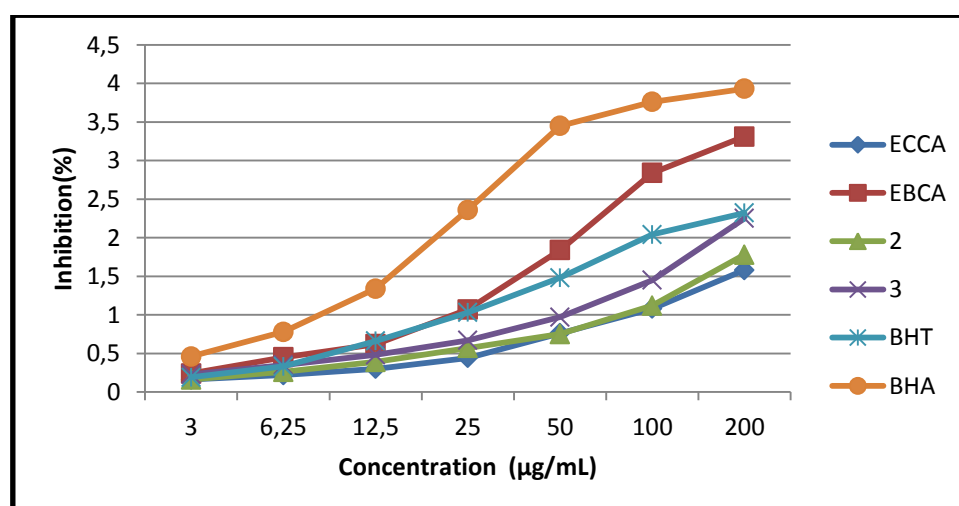


Figure 90 : Activité CUPRAC des extraits et composés de *C. azarolus*

III.1.5. Activité de blanchissement du β -carotène

L'extrait **EBCA** présente une excellente activité (CI_{50} : $5.29 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$) mais moins actif par rapport aux deux standards **BHT** (CI_{50} : $1.05 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) et **BHA** (CI_{50} : $0.90 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$). L'extrait **ECCA** est beaucoup moins actif (CI_{50} : $68 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) par rapports au deux standards.

Le tableau-50 regroupe les résultats de l'activité de blanchissement β -carotène de différentes concentrations des extraits.

Tableau-50 : Activité de blanchissement du β -carotène par les extraits de *C.azarolus*

Extraits 1 μg /1 μl	% Inhibition							
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
ECCA	13.03 \pm 1.97	17.94 \pm 1.05	25.14 \pm 0.28	34.07 \pm 0.30	48.99 \pm 1.12	58.1 \pm 0.11	73.4 \pm 60.77	68 \pm 0.01
EBCA	39.8 \pm 00.00	54.5 \pm 20.25	63.1 \pm 30,00	73.6 \pm 12.42	82.8 \pm 90.15	88.6 \pm 61.40	98.3 \pm 50.19	5.29 \pm 0.04
BHT	81.14 \pm 0.84	86.0.9 \pm 1.04	87.52 \pm 4.24	91.67 \pm 0.52	94.11 \pm 0.42	94.41 \pm 0.32	95.28 \pm 3.25	1.05 \pm 0.01
BHA	84.23 \pm 1.14	90.11 \pm 0.68	94.59 \pm 0.77	96.09 \pm 0.02	97.35 \pm 1.08	99.59 \pm 0.14	99.76 \pm	0.90 \pm 0.02

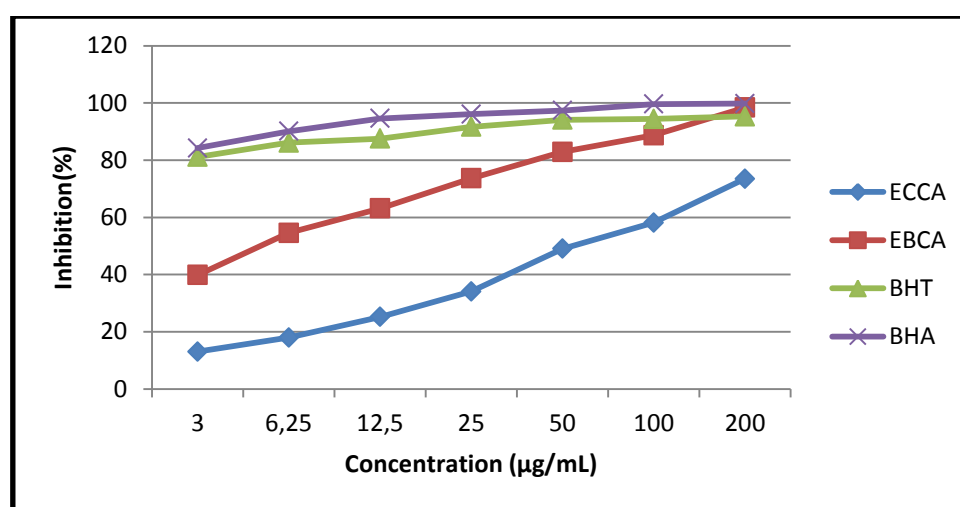


Figure 91 : Activité du blanchissement β -carotène des extraits et composés de *C.azarolus*

- **Conclusion :**

Les résultats de cette étude préliminaire montrent que les tests utilisés pour l'évaluation de l'activité antioxydante sont en bonne corrélation.

En comparant l'activité antioxydante mesurée par les cinq méthodes on voit que l'EBCA est plus puissant que l'ECCA et cela avec tous les tests utilisés, comme on a trouvé précédemment que l'extrait butanolique est riche en flavonoïdes et polyphénol donc on peut conclure qu'il y'a une corrélation entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques.

Le composé **3** est plus actif par rapport au composé **2** avec presque toutes les méthodes utilisées. En outre, les valeurs de (CI₅₀, A_{0.5}) pour l'extrait *n*-BuOH et le composé **3** étaient généralement proches des normes des standard utilisés.

Cette conclusion est en accord avec quelques études des espèces du genre *Crataegus* [1,3, 4, 5].

III.2. Extraits et produits de *D.communis*

III.2.1. Test DPPH

L'extrait **EEDC** présente une excellente activité ($CI_{50} = 8.70 \pm 0.97 \mu\text{g/mL}$) par rapport au standard **BHT** ($CI_{50} = 22.32 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$), par contre l'extrait **EADC** été moins actif ($CI_{50} = 40.17 \pm 0.26 \mu\text{g/mL}$) par rapports aux deux standard **BHT** ($CI_{50}: 22.32 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$) et **BHA** ($CI_{50} = 5.73 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$).

Le produit **51B** présente une très bonne activité ($CI_{50} = 5.97 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$) qui est presque similaire au standard **BHA**. Le produit **24C** est beaucoup moins actif ($CI_{50} = 61.25 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$) par rapport aux deux standards. Le produit **8A** n'est pas actif ($CI_{50} < 200$).

Le tableau-51 regroupe les résultats de l'activité antiradicalaire DPPH de différentes concentrations des extraits et produits purs.

Tableau -51: Inhibition du radical DPPH par les extraits et composés de *D.communis*

Extraits 1 μg /1 μl	% Inhibition							
	3,125 μg	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
EEDC	22.73 \pm 0.00	35.83 \pm 1.36	71.18 \pm 8.45	73.62 \pm 2.43	85.24 \pm 0.12	87.93 \pm 0.19	88.38 \pm 0.61	8.70 \pm 0.97
EADC	1.68 \pm 1.74	7.10 \pm 0.64	18.55 \pm 0.07	36.33 \pm 0.50	59.73 \pm 0.36	84.16 \pm 0.29	85.53 \pm 1.30	40.17 \pm 0.26
8A	NA	NA	NA	NA	3,30 \pm 0,00	8,56 \pm 1,38	17,14 \pm 1,9 7	<200
24C	10,19 \pm 0,09	18,71 \pm 0,75	22,51 \pm 0,28	35,91 \pm 0,99	49,70 \pm 0,00	61,96 \pm 0,80	69,94 \pm 0,47	61.25 \pm 1.09
51B	36,35 \pm 0,85	58,98 \pm 1,41	67,82 \pm 1,22	76,39 \pm 0,56	80,79 \pm 0,85	83,07 \pm 0,56	83,45 \pm 0,52	5.97 \pm 0.20
BHT	11,69 \pm 1,88	22,21 \pm 1,30	37,12 \pm 1,80	52,63 \pm 2,70	56,02 \pm 0,53	83,60 \pm 0,23	87,28 \pm 0,26	22.32 \pm 1.19
BHA	28,95 \pm 1,16	54,33 \pm 1,59	76,76 \pm 1,65	84,09 \pm 0,35	87,53 \pm 0,82	87,73 \pm 0,15	88,43 \pm 0,23	5.73 \pm 0.41

NA : Note absorbance

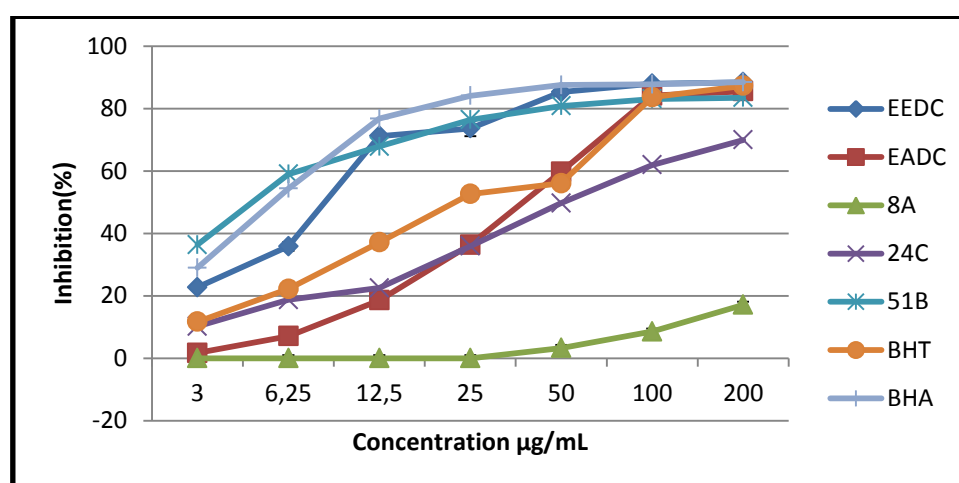


Figure 92 : Activité antiradicalaire (DPPH) des extraits et composés de *D.communis*

III.2.2. Test ABTS

L'extrait **EEDC** présente une activité ($CI_{50}= 7.60\pm 0.05 \mu\text{g/mL}$) supérieure à celle de l'extrait **EADC** ($CI_{50}= 11.63 \pm 0.04\mu\text{g/mL}$) et qui est moins actif par rapport aux deux standards **BHT** ($CI_{50}= 1.29\pm 0.30 \mu\text{g/mL}$) et **BHA** ($CI_{50}= 1.81\pm 0.1030 \mu\text{g/mL}$).

Le produit **51B** présente une excellente activité qui est proche de celle des deux standards, le produit **24C** est moins actif par rapport au produit **8A** n'est pas actif.

Le tableau-52 montre les pourcentages d'inhibition (I %) des extraits et produits testés par la méthode de l'ABTS•+ à différentes concentrations.

Tableau-52: Activité antiradicalaire (ABTS) des extraits et composés de *Dioscorea communis L*

Extraits 1 μg /1 μl	% Inhibition							$CI_{50} \mu\text{g/mL}$
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
EEDC	23.01 \pm 1.80	48.14 \pm 0.96	74.07 \pm 1.87	91.05 \pm 0.53	91.17 \pm 0.00	91.30 \pm 0.11	91.60 \pm 0.38	7.60 \pm 0.05
EADC	19.21 \pm 1.05	38.52 \pm 2.12	61.07 \pm 0.21	77.50 \pm 0.42	86.39 \pm 3.58	89.46 \pm 0.85	90.1 \pm 90.74	11.63 \pm 0.04
8A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	<200
24C	8.31 \pm 0.38	21.550 \pm .56	28.71 \pm 0.00	27.35 \pm 3.48	65.39 \pm 0.75	89.26 \pm 0.00	90.18 \pm 0.09	19.60 \pm 0.03
51B	31.15 \pm 1.05	63.81 \pm 0.30	90.83 \pm 0.34	91.05 \pm 0.09	91.27 \pm 1.51	91.43 \pm 0.36	91.54 \pm 0.53	2.44 \pm 0.10
BHT	59.22 \pm 0.59	78.55 \pm 3.43	90.36 \pm 0.00	92.18 \pm 1.27	93.37 \pm 0.86	94.87 \pm 0.87	96.681.29 \pm 0.300.39	1.29 \pm 0.30
BHA	83.42 \pm 4.09	93.52 \pm 0.09	93.58 \pm 0.09	93.63 \pm 0.16	93.63 \pm 0.95	94.20 \pm 0.90	95.39 \pm 2.62	1.81 \pm 0.10

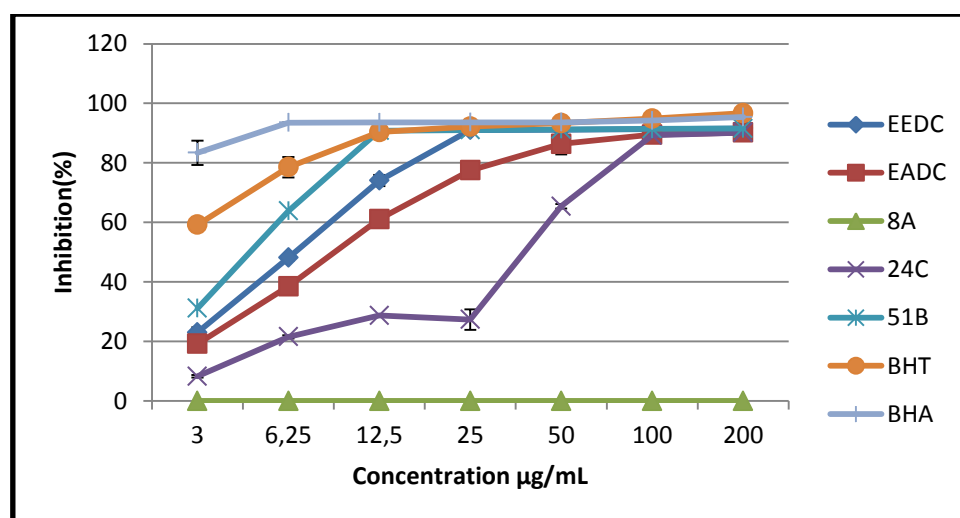


Figure 93 : Activité ABTS des extraits et composés de *D. communis*

III.2.3. Test FRAP

Les deux extraits **EEDC** ($A_{0,5} = 44.89 \pm 3.66 \mu\text{g/mL}$) et **EADC** ($A_{0,5} = 79.00 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$) sont moins actifs par rapport au standard acide ascorbique ($A_{0,5} = 6.77 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$). Le produit **51B** présente une excellente activité ($A_{0,5} = 9.94 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$) qui est presque similaire au standard acide ascorbique ($A_{0,5} = 9.01 \pm 1.46 \mu\text{g/mL}$), les deux produits **24C** et **8E** ne sont pas actifs ($A_{0,5} < 50$).

Le tableau-53 regroupe les résultats de l'activité FRAP de différentes concentrations des extraits et produits purs.

Tableau-53 : Activité FRAP des extraits et composés de *D. communis* .

Extraits 1 μg /1 μl	Absorbance							$A_{0,5} \mu\text{g/mL}$
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
EEDC	0.14 \pm 0.01	0.24 \pm 0.03	0.27 \pm 0.09	0.34 \pm 0.03	0.5 \pm 0.05	0.62 \pm 0.18	0.70 \pm 0.08	44.89 \pm 3.66
EADC	0.13 \pm 0.01	0.16 \pm 0.02	0.17 \pm 0.03	0.28 \pm 0.07	0.45 \pm 0.00	0.55 \pm 0.02	0.69 \pm 0.03	79.00 \pm 0.00
8A	0.08 \pm 0.09	0.0 \pm 70.01	0.08 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.08 \pm 0.01	0.10 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	<50
24C	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.17 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	0.29 \pm 0.00	0.32 \pm 0.05	0.9 \pm 0.01	<50
51B	0.15 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	0.33 \pm 0.01	0.43 \pm 0.02	0.56 \pm 0.04	0.6 \pm 0.05	0.62 \pm 0.02	9.94 \pm 1.02
A-ascorbique 1mg	0.09 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.16 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04	0.76 \pm 0.16	2.02 \pm 0.23	3.87 \pm 0.27	9.01 \pm 1.46
A-ascorbique 4mg	0,35 \pm 0,05	0,46 \pm 0,03	0,84 \pm 0,12	0,93 \pm 0,30	1,18 \pm 0,34	1,44 \pm 0,21	1,37 \pm 0,20	6.77 \pm 1.15

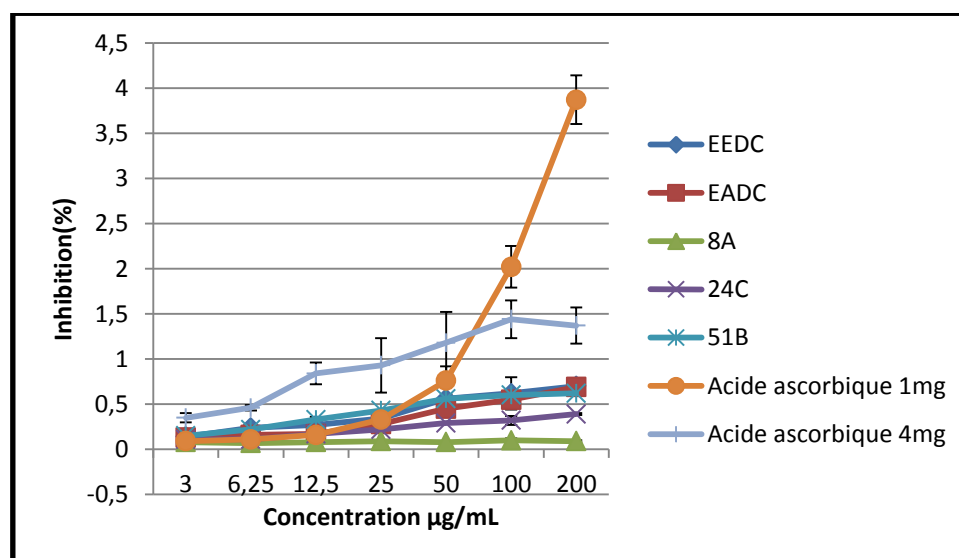


Figure 94 : Activité FRAP des extraits et composés de *D.communis*

III.2.4. Test CUPRAC

La capacité antioxydante (CUPRAC) basée sur la mesure de l'absorbance à 450 nm par la formation d'un complexe stable entre la Neocuproïne et le cuivre (I), ce dernier est formé par la réduction du cuivre (II) en présence de Neocuproïne.

L'extrait **EEDC** présente une bonne activité ($A_{0,5} = 10.11 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$) qui est supérieure à celle de l'extrait **EADC** ($A_{0,5} = 20.85 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$) et presque similaire au standard **BHT** ($A_{0,5} = 9.62 \pm 0.87 \mu\text{g/mL}$).

Le produit **51B** présente une excellente activité par rapports aux deux produits **24C** et **8A** mais qui est moins actif par rapport au deux standards.

L'ensemble des valeurs d'absorbance obtenus est reporté dans le tableau-54.

Tableau-54 : Activité CUPRAC des extraits et composés de *D. communis*

Extraits 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$	Absorbance							$A_{0,5}\mu\text{g/mL}$
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
EEDC	0.2 \pm 0.01	0.35 \pm 0.00	0.60 \pm 0.01	1.00 \pm 0.05	1.64 \pm 0.05	2.50 \pm 0.20	3.02 \pm 0.44	10.11 \pm 0.21
EADC	0.16 \pm 0.00	0.23 \pm 0.00	0.36 \pm 0.00	0.59 \pm 0.01	0.950 \pm ,04	1.540 \pm .10	2.61 \pm 0.21	20.85 \pm 0.53
8A	0.07 \pm 0.00	0.07 \pm 0.00	0.08 \pm 0.00	0.10 \pm 0.00	0.13 \pm 0.00	0.22 \pm 0.04	0.28 \pm 0.05	<200
24C	0.11 \pm 0.02	0.15 \pm 0.04	0.17 \pm 0.00	0.22 \pm 0.01	0.31 \pm 0.01	0.42 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01	194 \pm 0.00
51B	0.23 \pm 0.00	0.35 \pm 0.01	0.48 \pm 0.02	0.67 \pm 0.01	0.97 \pm 0.13	1.45 \pm 0.04	2.25 \pm 0.18	15.02 \pm 0.47
BHT	0.19 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04	0.66 \pm 0.07	1.03 \pm 0.07	1.48 \pm 0.09	2.04 \pm 0.14	2.32 \pm 0.28	9.62 \pm 0.87
BHA	0.46 \pm 0.00	0.78 \pm 0.01	1.34 \pm 0.08	2.36 \pm 0.17	3.45 \pm 0.02	3.76 \pm 0.03	3.93 \pm 0.01	3.64 \pm 0.19

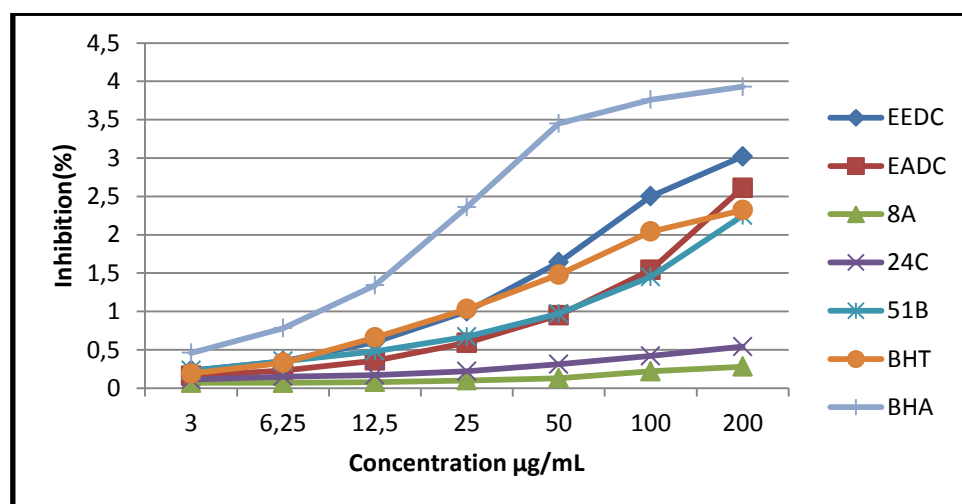


Figure 95 : Activité CUPRAC des extraits et composés de *D. communis*.

III.2.5. Test de blanchissement du β -carotène

Les deux extraits **EEDC** ($CI_{50} = 88.43 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$) et **EADC** ($CI_{50} = 120.94 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$) présente une activité beaucoup moins actifs par rapport aux deux standards **BHT** ($CI_{50} = 1.05 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) et **BHA** ($CI_{50} = 0.90 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$).

Le tableau-55 regroupe les résultats de l'activité de blanchissement β -carotène de différentes concentrations des extraits.

Tableau-55 : Activité de blanchissement du β -carotène par les extraits de *D. communis*

Extraits 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$	% Inhibition							$CI_{50} \mu\text{g/mL}$
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	
EEDC	NA	NA	2.64 \pm 0.01	16.73 \pm 0.50	35.37 \pm 0.46	54.35 \pm 0.27	69.21 \pm 1.19	88.43 \pm 0.52
EADC	NA	NA	NA	NA	22.98 \pm 0.38	47.97 \pm 0.57	74.87 \pm 0.48	120.94 \pm 1.3
BHT	81.14 \pm 0.84	86.0.9 \pm 1.04	87.52 \pm 4.24	91.67 \pm 0.52	94.11 \pm 0.42	94.41 \pm 0.32	95.28 \pm 3.25	1.05 \pm 0.01
BHA	84.23 \pm 1.14	90.11 \pm 0.68	94.59 \pm 0.77	96.09 \pm 0.02	97.35 \pm 1.08	99.59 \pm 0.14	99.76 \pm	0.90 \pm 0.02

NA : Pas d'absorbance

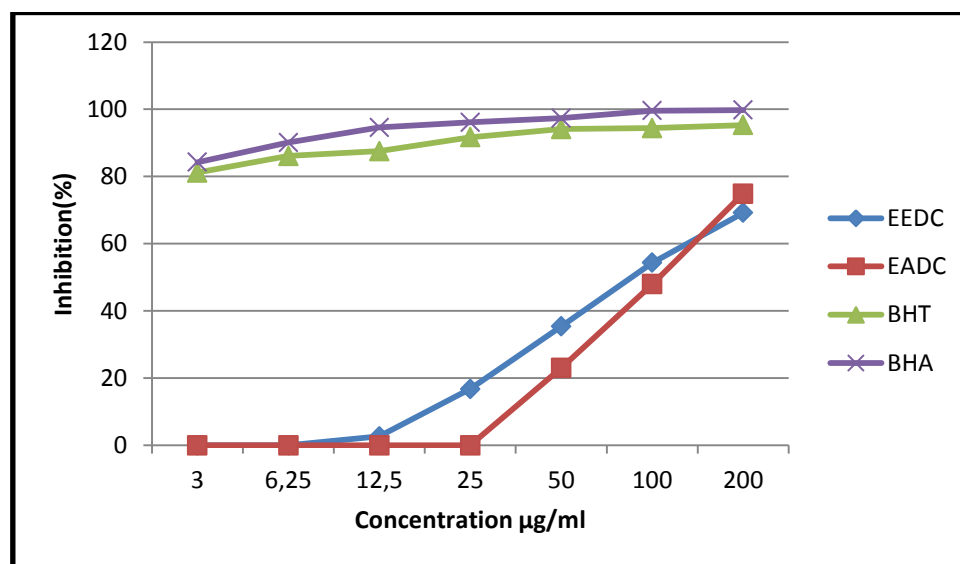


Figure 96 : Activité du blanchissement β -carotène des extraits et composés de *D. communis*

- **Conclusion :**

Dans cette étude on a trouvé une bonne corrélation entre les différents tests utilisés. Ses résultats ont montré que l'extrait l'éther diéthylique a une activité antioxydante supérieure à celle de l'extrait d'acétate d'éthyle avec tous les tests utilisés on utilisant les CI_{50} et $A_{0.5}$. Le composé **5** était particulièrement efficace et a démontré la meilleure activité antioxydante par rapport au composé **4**, tandis que le composé **2** a donné un résultat négatif avec tous les tests.

En outre, cette étude a apporté des preuves supplémentaires, que le nombre de groupes hydroxyle sur le squelette du phénanthrène semble être essentiel pour l'activité antioxydante puisque le composé **5** contenant deux groupements OH était plus actif que le composé **4** avec seulement un groupe OH, tandis que le composé **2** qui n'a pas de groupes OH n'était pas actif.

IV. Activité anti-cholinestérase des extraits et produits de *D.communis*

IV.1. Acétylcholinestérase

Les extraits et produits de *D.communis* sont testés pour la première fois contre l'AChE et BChE.

Les deux extraits **EEDC**, **EADC** ainsi que les produits **8A**, **24B3** et **24C** été inactifs pour les différentes concentrations, seulement le produit **51B** ($CI_{50} = 69.41 \pm 2.46 \mu\text{g/ml}$) a présenté une activité contre L'AChE mais qui est faible par rapport au standard galantamine ($CI_{50} = 6.27 \pm 1.15 \mu\text{g/ml}$), utilisée comme médicament contre la maladie d'Alzheimer (Tableau-56, fig .97).

Tableau-56 : Inhibition de l'AChE par les extraits et composés de *D.communis*

Extrait/ composés	Inhibition %							
	3.125 μg	6.25 μg	12.5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	$CI_{50} \mu\text{g/mL}$
EEDC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EADC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
51B	15.15 \pm 2.8 7	17.23 \pm 1.9 9	23.48 \pm 1.7 7	30.24 \pm 1.7 7	45.86 \pm 0.2 2	56.38 \pm 1.9 9	68.77 \pm 1. 33	69.41 \pm 2.46
24C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24B3	NA	NA	NA	10.15 \pm 2.2 1	22.96 \pm 1.7 7	34.31 \pm 1.5 5	42.53 \pm 0. 72	>200
8A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	11.30 \pm 0. 34	>200
Galantamin e	35.93 \pm 2.28	43.77 \pm 0.00	68.50 \pm 0.31	80.69 \pm 0.41	85.78 \pm 1.63	91.80 \pm 0.20	94.77 \pm 0.34	6.27 \pm 1.15

NA : Pas d'absorbance

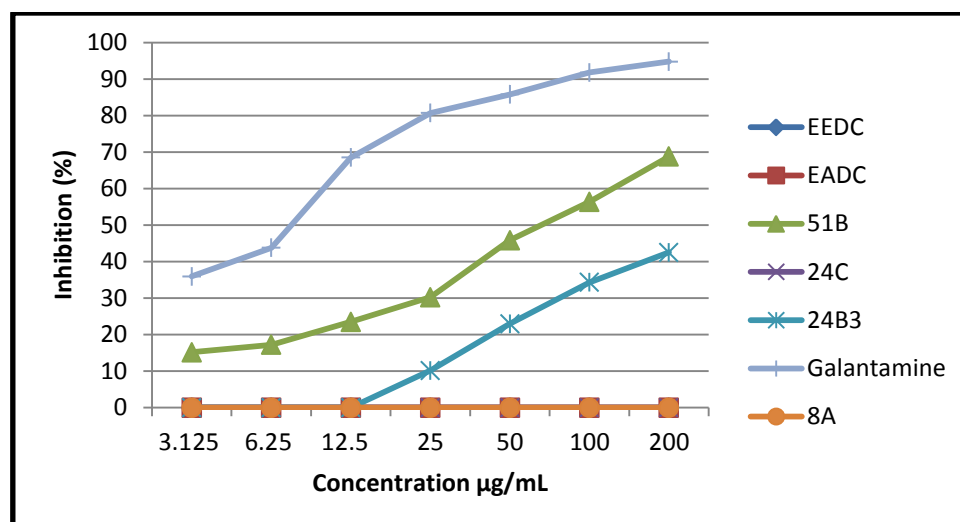


Figure 97 : Inhibition de l'AChE par les extraits et composés de *D. communis*

IV.2. Butyrylcholinestérase

L'EEDC ($CI_{50} = 14.34 \pm 0.66 \mu\text{g/ml}$) ainsi que les produits 51B ($CI_{50} = 14.60 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$) et 24B3 ($CI_{50} = 11.40 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$) ont présentés une activité inhibitrice contre la BChE, plus élevée que celle du standard galantamine ($CI_{50} = 34.75 \pm 1.99 \mu\text{g/ml}$), les deux produits (24C, 8A) ($IC_{50} > 200$) présente une légère activité inhibitrice contre la BChE. Par contre l'EADC est inactif.

Tableau-57 : Inhibition de la BChE par les extraits et composés de *D. communis*

Extrait/ composés	Inhibition%							$IC_{50} \mu\text{g/mL}$
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	
EEDC	31.18±2.6 6	41.85±1.3 8	47.03±1.6 2	66.52±2.9 5	80.91± 2.31	90.05±1.2 6	92.16±2.6 8	14.34±0.6 6
EADC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
51B	28.39±1.4 3	30.78±3.0 5	47.98±3.4 1	71.14±0.2 2	81.61±2.6 7	92.69± 0.93	94.35± 1.65	14.60±0.5 6
24C	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8,03±1,54	>200
24B3	15.44±2.8 6	36.11±1.2 3	53.21± 0.66	59.53±1.6 0	70.05±1.1 0	77.67±1.9 8	77.72±2.3 1	11.40±0.2 4
8A	NA	NA	NA	NA	22.80± 0.01	31.66± 0.01	37.51±2.9 7	>200
Galantamin e	3.26± 0.62	6.93± 0.62	24.03± 2.94	45.13± 2.60	63.87± 2.85	73.57± 0.77	78.95± 0.58	34.75±1.9 9

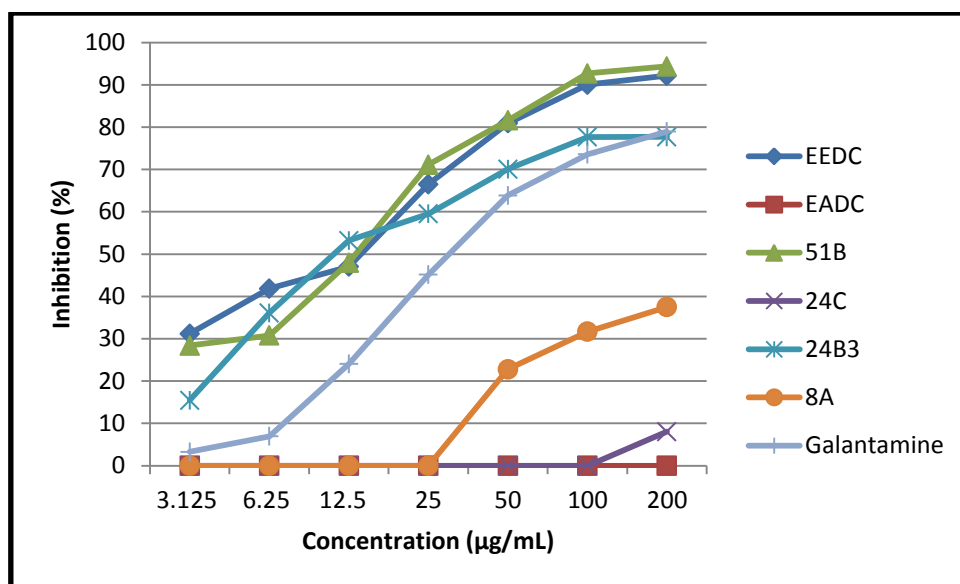


Figure 98 : Inhibition de la butyrylcholinestérase par les extraits et composés de *D.communis*

Références bibliographiques

- [1] Bahri-Sahloul R., Ammar S., Fredj R.B., Saguem S., Grec S., Trotin F. (2009). Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. Varieties. Pak. J. Biol. Sci, 12, 660-668.
- [2] Bahri-Sahloul R., Ammar S., Grec S., Skhiri F.H. (2009). Chemical characterization of *Crataegus azarolus* (L.) fruit from 14 genotypes found in Tunisia. J. Hortic. Sci. Biotech ,84, 23-28.
- [3] Belkhir M., Rebai O., Dhaouadi K., Sioud B., Amri M., Fattouch S.(2013). Antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian Azarole (*Crataegus azarolus* L.) leaves and fruit pulp/peel polyphenolic extracts. In. J. Food Prop, 16, 1380-1393.
- [4] Bignami C., Paolucci M., Scossa A., Bertazza G. (2003). Preliminary evaluation of nutritional and medicinal components of *Crataegus azarolus* fruits. Acta Hort,597,95-100.
- [5] Bahorun T., Aumjaud E., Ramphul H., Rycha M., Luximon-Ramma A., Trotin F. (2003). Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. Nahrung, 47, 191-198.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le cadre de recherche de substances naturelles biologiquement actives, deux espèces algérienne endémiques : *Crataegus azarolus* (Rosaceae) et *Dioscorea comunis* (Dioscoreaceae), ont fait l'objet d'une étude phytochimique et biologique (Activités antioxydante, anticholinestérase).

Nos travaux d'extraction des parties aériennes de l'espèce endémique *Crataegus azarolus*, suivie de séparation chromatographiques successives, nous ont permis d'isoler et identifier, grâce aux techniques d'analyses spectroscopiques (RMN-1D) et par la comparaison avec les données de la littérature, trois flavonoïdes glycosilés

- ✚ **Quercétine-3-O-galactoside.**
- ✚ **Quercétine-3-O-glucoside (isoquercétine).**
- ✚ **Quercétine-3-O-rutinoside (rutine).**

Cinq autres produits volatils ont été identifiés par analyse GC-MS (isolé pour la 1^{ère} fois de l'espèce) :

- ✚ **2,4-Bis (2-méthyl-2-propanyl) phénol.**
- ✚ **Phtalate d'isobutyle et de nonyle.**
- ✚ **12-Méthyltridécanoate de méthyle.**
- ✚ **14-Méthylpentadécanoate de méthyle.**
- ✚ **(8E)-8-octadécénoate de méthyle.**

L'activité antioxydante des flavonoïdes isolés ainsi les extraits chloroformique et *n*-butanol de l'espèce *C. azarolus* a été réalisé par cinq méthodes (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP et β -Carrotène), dont L'extrait butanolique et la rutine ont montré une meilleure activité et généralement proches des normes des standard utilisés.

L'investigation phytochimique des racines de l'espèce *Dioscorea communis* a conduit à l'isolement de 7 composés. La détermination structurale a été réalisée par les méthodes spectroscopiques de RMN mono et bi-dimensionnelle, par la spectrométrie de masse (ESI-MS), ainsi que par la comparaison avec les données de la littérature.

Les produits identifiés sont des dérivés de phénanthrène et dihydrophénanthrène qui sont :

- ✚ **2, 3, 4-Triméthoxy-7,8-méthylène-dioxyphénanthrène.**
- ✚ **3-hydroxy-2,4-diméthoxy-7,8-méthylènedioxyphénanthrène.**
- ✚ **3,7-dihydroxy-2,4,8-triméthoxyphénanthrène.**

- ✚ **1, 2, 3-trihydroxy-5,7-diméthoxyphénanthrène (herorensol)** (isolé pour la 1^{ère} fois de la famille des Dioscoreaceae).
- ✚ **7-hydroxy-2,3,4,8-tétra méthoxyphénanthrène (chrysotoxene).**
- ✚ **7-hydroxy-2,4-diméthoxydihydrophénanthrène (orchinol)** (isolé pour la 1^{ère} fois de l'espèce).
- ✚ **4,7-dihydroxy-2-méthoxydihydrophénanthrène (lusianthridin)** (isolé pour la 1^{ère} fois de l'espèce).

L'activité antioxydante des produits purs ainsi les extraits acétate d'éthyle et ether diéthylique de l'espèce *Dioscorea comunis* a été réalisés par cinq méthodes : radicale libre DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, blanchissement du β carotène. Les produits ont montrés une très bonne activité antioxydante par rapport aux standards utilisés et l'extrait ether diéthylique a donné la meilleure activité par rapport à l'extrait acétate d'éthyle, en outre cette étude a apporté des preuves supplémentaires, que le nombre de groupes hydroxyle sur le squelette du phénanthrène semble être essentiel pour l'activité antioxydante.

L'activité anticholinestérase des deux extraits éther diéthylique et acétate d'éthyle ainsi les produits isolés de l'espèce *D. communis* a été réalisé par l'utilisation de deux enzymes cholinestérase AChE et BChE. Les deux extraits ainsi les phénanthrènes été inactif contre l'AChE par contre l'extrait éther diéthylique et les phénanthrènes ont présenté une activité inhibitrice contre la BChE et même plus élevée que celle du standard galantamine.

Résumé

Ce travail fait l'objet d'une étude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales, appartenant à deux différentes familles :

1. *Crataegus azarolus* (L.), de la famille des Rosaceae :

Après macération des parties aériennes de la plante *C.azarolus* dans une solution méthanolique, puis extraction par des solvants de polarité croissante, trois extraits sont obtenus. Les extraits sont séparés en utilisant les méthodes chromatographiques de séparation et de purification pour aboutir enfin à des produits purs.

L'analyse GC-MS d'une fraction de l'extrait CHCl_3 nous a permis d'identifier cinq produits volatils (identifier pour la première fois dans notre espèce), par comparaison de leurs spectres de masses avec la littérature (base des données NIST).

De l'extrait AcOEt cinq produits sont séparés dont deux flavonoides glycosides acétylé qui sont identifiés pour la première fois dans la plante.

A partir de l'extrait *n*-BuOH, trois flavonoides glycosylés sont séparés par CC et CCM. Leurs structures sont élucidées grâce aux méthodes d'analyses spectroscopiques.

L'activité antioxydant des extraits et produits est évaluée en utilisant cinq différentes méthodes (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP et β -carotène).

2. *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin, de la famille des Dioscoreaceae :

Aussi, après macération des rhizomes de *Dioscorea communis* dans Et_2O . L'extrait Et_2O obtenu a été séparé par les techniques chromatographiques (CC, CCM) pour enfin aboutir à plusieurs produits, sept d'entre eux sont identifiés par des analyses spectroscopiques (SM, IR, UV, RMN-1D et 2D).

Trois d'entre eux sont identifiés pour la première fois dans cette espèce. L'activité antioxydante des extraits Et_2O , AcOEt et les produits isolés a été évalué on utilisant cinq différentes méthodes (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP et β -Carotène), aussi ces extraits et produits sont testés pour la première fois envers acétylcholinesterase (AChE) et butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. Cette étude a confirmé que la présence des groupements OH sur le squelette des phénanthrènes est essentielle pour son activité antioxydante et anticholinesterase.

Mots clés : *Crataegus azarolus*, *Dioscorea communis*, flavonoides, phénanthrènes, dihydrophénanthrènes, activité antioxydante, activité anticholinesterase.

Abstract

This work is the subject of a phytochemical and biological study of two medicinal plants belonging to two different families.

1. *Crataegus azarolus* (L.), belonging to Rosaceae family:

After maceration of the aerial parts of the plant *Crataegus azarolus* in a methanolic solution and extraction with solvents of increasing polarity, three extracts are obtained. The extracts are separated using chromatographic methods of separation and purification, to lead finally to pure compounds. Then, the GC-MS analysis of a fraction of the CHCl₃ extract allowed us to identify five volatile compounds for the first time from this species by comparing their mass spectra with the literature (NIST database).

From the AcOEt extract five compounds were isolated, where two acetylated flavonoid glycosids were identified for the first time from the species.

From the *n*-BuOH extract, three flavonoid glycosides are separated by CC and TLC. Their structures are elucidated through spectroscopic analysis methods.

The antioxidant activity of the extracts and compounds is evaluated using five different methods (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP and β -carotene).

2. *Dioscorea communis* (L.) Caddick & Wilkin, belonging to Dioscoreaceae family:

Also, after maceration of the rhizomes of *Dioscorea communis* in diethyl ether solvent. The Et₂O extract obtained was separated by chromatographic techniques (CC, TLC) to finally result in several compounds, seven of which are identified by spectroscopic methods of analyzes (MS, IR, UV, 1D and 2D NMR), where three of them are identified for the first time from this species.

Et₂O, AcOEt Extracts and some isolated compounds have shown an antioxidant activity by using five different methods (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP and β -Carrotene), also these extracts and compounds are tested for the first time against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. This study confirmed that the presence of OH groups on the phenanthrene skeleton is essential for its antioxidant and anticholinesterase activities.

Key words: *Crataegus azarolus*, *Dioscorea communis*, flavonoides, phenanthrenes, dihydrophenanthrenes, antioxidant activity, anticholinesterase activity.

المخلص

إن موضوع هذا العمل هو دراسة كيميائية وبيولوجية لنبتين طبيين تنتميان لعائتين مختلفتين وهما:

1- نبات *Crataegus azarolus* (L.) من العائلة **Rosaceae** والمعروف شعبيا بشجرة الزعرور بعد نقع الأجزاء الهوائية الجافة من النبات في محلول كحولي وإجراء عملية استخلاص بمذيبات مندرجة القطبية تم الحصول على ثلاث مستخلصات، هذه الأخيرة تم فصل مكوناتها وتنقية المركبات المفصلة باستعمال الطرق الكروماتوغرافية.

فمن مستخلص الكلوروفورم تم التعرف على خمسة مركبات طيارة (volatile compounds) بعد تحليل أحد الكسور باستعمال تقنية GC-MS وتم ذلك بمقارنة طيف الكتلة لها مع بنك المعلومات (NIST database)، جميع هذه المركبات تم التعرف عليها لأول مرة من النبات.

من مستخلص أسيتات الإيثيل تم فصل خمسة مركبات فلافونيدية، لكن مركبين منهم فقط تم التعرف عليهم وبشكل غير كلي وذلك لنقص التحاليل الطيفية.

أخيرا من مستخلص بيوتانول تم فصل ثلاثة مركبات فلافونيدية والتعرف عليها باستعمال التحاليل الطيفية المختلفة والمركبات

من جهة أخرى تم تقييم الفعالية ضد الأكسدة لمستخلصات النبات و مركبين منه وذلك باستعمال خمسة طرق مختلفة وهي: DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP and β -carotene

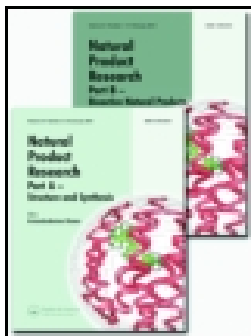
2- نبات *Dioscorea communis* (L.) **Caddick & Wilkin** من عائلة **Dioscoreaceae** والمعروف شعبيا بالكرمة السوداء.

يعد نقع جذور النبات في مذيب الإيثيل، تم فصل المستخلص المحصل عليه باستعمال التقنيات الكروماتوغرافية والحصول على عدة مركبات أين تم التعرف على سبعة مركبات منها باستعمال التحاليل الطيفية (MS, IR, UV, NMR) منها ثلاث مركبات تم التعرف عليها لأول مرة من النبات والمركبات هي:

من جهة أخرى تم تقييم الفعالية ضد الأكسدة لمستخلصات النبات وبعض المركبات باستخدام خمس طرق مختلفة وهي: DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP and β -carotene، كذلك تم ولأول مرة تقييم هذه المستخلصات والمركبات ضد أنزيمات acetylcholinesterase (AChE) و butyrylcholinesterase (BChE) حيث أظهرت الدراسة أن فعالية مستخلصات ومركبات جذور هذا النبات مما يؤكد استعماله الطبي.

الكلمات المفتاحية:

Crataegus azarolus, *Dioscorea communis*, flavonoides, phenanthrenes, dihydrophenanthrenes, antioxidant activity, anticholinesterase activity.



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


Phenanthrene and dihydrophenanthrene derivatives from *Dioscorea communis* with anticholinesterase, and antioxidant activities

Amina Boudjada, Ahmed Touil, Chawki Bensouici, Hamdi Bendif & Salah Rhouati



To cite this article: Amina Boudjada, Ahmed Touil, Chawki Bensouici, Hamdi Bendif & Salah Rhouati (2018): Phenanthrene and dihydrophenanthrene derivatives from *Dioscorea communis* with anticholinesterase, and antioxidant activities, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2018.1468328](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468328)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468328>

 View supplementary material 

 Published online: 04 May 2018.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



Phenanthrene and dihydrophenanthrene derivatives from *Dioscorea communis* with anticholinesterase, and antioxidant activities

Amina Boudjada^a, Ahmed Touil^a , Chawki Bensouici^b, Hamdi Bendif^c and Salah Rhouati^a

^aLaboratory of Natural Product from Plants and Organic Synthesis, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Mentouri-Constantine, Constantine, Algeria; ^bCentre de Recherche en Biotechnologie, Constantine, Algeria; ^cDepartment of Natural and Life Sciences, Faculty of Sciences, University of Mohamed Boudiaf, M'sila, Algeria.

ABSTRACT

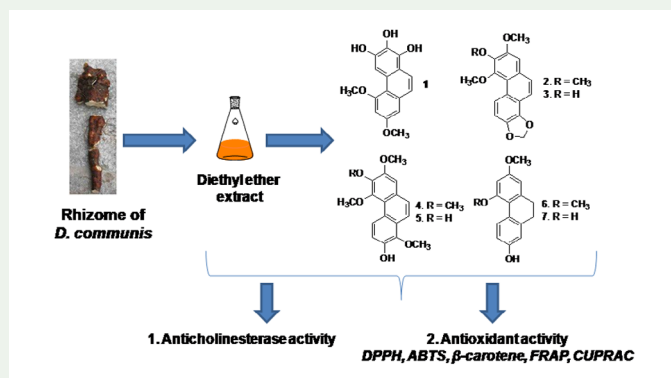
Five phenanthrene and two dihydrophenanthrene derivatives were isolated from the diethyl ether extract of fresh rhizomes of *Dioscorea communis* (L.), among them a phenanthrenetriol **1** reported for the first time from Dioscoreaceae family and two dihydrophenanthrene derivatives **6** and **7** reported also for the first time from *Dioscorea* species. The structures of isolated compounds were elucidated using UV, IR, 1D-, 2D-NMR, and MS techniques. The anticholinesterase activity of extracts and four compounds was evaluated for the first time against acetylcholinesterase (AChE), and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes using Ellman method. Moreover, the antioxidant activity of extracts and three compounds has been investigated using DPPH radical scavenging, ABTS cation radical decolorization, CUPRAC, reducing power and β -carotene bleaching assays.

ARTICLE HISTORY


Received 20 October 2017
Accepted 19 April 2018

KEY WORDS

Dioscorea communis;
phenanthrenes;
dihydrophenanthrenes;
anticholinesterase activity;
antioxidant activity



CONTACT Ahmed Touil  ahmedtouil@yahoo.fr

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468328>.

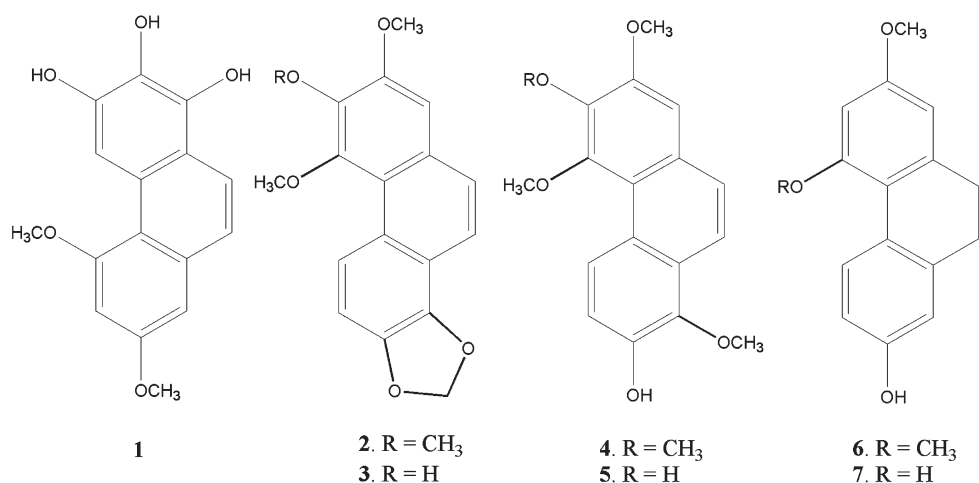


Figure 1. Chemical structures of compounds 1–7 isolated from *D. communis*.

1. Introduction

Dioscorea communis (L.) Caddick & Wilkin (Syn. *Tamus communis* (L.)) is a perennial herbaceous climber with large tubers, belonging to Dioscoreaceae family and commonly known in Algeria as 'Elkarma souda' (Quezel and Santa 1963). All the parts of the plant are purgative, diuretic, resolvent, emetic and rubefacient. The cataplasm of powdered root is used in Algerian folk medicine for contusions and rheumatism. Furthermore, the juice of fresh rhizome is applied directly for rheumatism pains (Boulous 1983).

A literature survey shows that the main constituents of *Dioscorea* species are phenanthrene and dihydrophenanthrene derivatives (Aquino, Behar et al. 1985; Aquino, Behar, Senatore et al. 1985; Aquino et al. 1991; Réthy et al. 2006; Kovács et al. 2007; Lu et al. 2010; Zheng et al. 2014), flavonoid glycosides and phenolic acids (Shaheen et al. 2009; Barros et al. 2011; Barreira et al. 2013), furanocoumarins (Zerargui et al. 2015), and steroidal saponin (Sun et al. 2003; Zhao et al. 2011).

There is an increasing attention throughout the world about the use of natural antioxidants from plants for the treatment of several diseases. Alzheimer's disease is the severe form of dementia, which is treated with acetylcholinesterase inhibitor drugs. Since used drugs have serious side effects, finding new safe drugs are now desired. Herein, the aim of this research was to undertake a phytochemical study of the rhizome of *D. communis* and evaluate the anticholinesterase and antioxidant activities of its extracts and compounds.

2. Results and discussion

2.1. Identification of isolated compounds

The phytochemical study of fresh *D. communis* rhizomes revealed the presence of five phenanthrene derivatives (1–5) and two dihydrophenanthrene derivatives (6, 7) in the diethyl ether extract. The structures (Figure 1) were elucidated using spectroscopic techniques (UV, IR, 1D and 2D-NMR experiments) and MS as well as comparisons with literature data (Supplementary). Therefore, the compounds were found to be herorensol 1 (Katerere et al.

2012), 2,3,4-trimethoxy-7,8-methylenedioxyphenanthrene **2** (Kovács et al. 2007), 2,4-dimethoxy-7,8-methylenedioxy-3-phenanthrenol **3** (Kovács et al. 2007), chrysotoxene **4** (Radix and Barret 2007; Kovács et al. 2007), 2,4,8-trimethoxy-3,7-phenanthrenediol **5** (Tuchinda et al. 1988; Réthy et al. 2006), orchinol **6** (Stoessel and Stothers 1982; Tezuka et al. 1989) and lusianthridin **7** (Majumder and Lahiri 1990).

2.2. Anticholinesterase activity

Because of lack of sufficient quantities for some compounds, only compounds **2–5** and extracts of *D. communis* were tested against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes inhibitory using the spectrophotometric method (Ellman et al. 1961), where galantamine was used as the standard. As shown in Table S1, only compound **5** exhibited an AChE inhibitory activity ($IC_{50} = 69.41 \mu\text{g/mL}$). However, compounds **3**, **5** and diethyl ether extract inhibited BChE ($IC_{50} = 11.40$, 14.60 and $14.34 \mu\text{g/mL}$, respectively), largely less than the standard ($IC_{50} = 34.75 \mu\text{g/mL}$). Whilst, compounds **2** and **4** presented mild BChE inhibitory activity, ethyl acetate extract was inactive.

2.3. Antioxidant activity

The antioxidant activity was determined for extracts, and compounds **2**, **4** and **5** of *D. communis* (insufficient amounts of the others compounds), by using the DPPH radical scavenging (Blois 1958), ABTS cation radical decolorization (Re et al. 1999), CUPRAC (Apak et al. 2004), FRAP (Oyaizu 1986) and β -carotene bleaching (Marco 1968) assays with minor modifications (Tel et al. 2012). The results in Table S2 showed that the diethyl ether extract has higher antioxidant activity compared to ethyl acetate extract in all methods used by means of IC_{50} and $A_{0.5}$. Whereas, the pure compound **5** was particularly effective and proved the best antioxidant activity compared to compounds **4**, while compound **2** was not effective with all assays. The results obtained confirm that there is a correlation between antioxidant and anticholinesterase activities (Atta-ur-Rahman and Choudhary, 2001). In addition, this study affords further evidence that the number of hydroxyl groups on the phenanthrene skeleton seems to be essential for anticholinesterase and antioxidant activities since compound **5** containing two OH groups was most active than compound **4** with only one OH group, while compound **2** which lack OH groups was not active.

In a previous study, it was established that the antioxidant activity of *D. communis* rhizomes extracts, is a result of the occurrence of polyphenol compounds especially flavonoids, and it was found that the ethyl acetate extract was more active than the chloroform extract. In contrast, the polyphenols and flavonoids contents of the former extract were less than the last (Boumerfeg et al. 2009), which is an incorrect conclusion. In addition, the presence of flavonoids in *D. communis* rhizomes is doubtful according to earlier studies. Finally, given the complexity of the antioxidant process, a single method (TRAP) cannot reflect the antioxidant profile of the plant.

3. Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first report of the isolation of compounds **6** and **7** from the species *D. communis* and compound **1** from Dioscoraceae family. Furthermore,

the anticholinesterase activity of *D. communis* extracts and phenanthrene derivatives (2–5) was determined for the first time beside the antioxidant activity of compounds 2, 4 and 5. The results obtained in this study showed that diethyl ether extract and compound 5 have a great potential antioxidant activity, and inhibited cholinesterase enzymes especially BChE. The study indicated that the presence of OH groups on phenanthrene skeleton is important for anticholinesterase and antioxidant activities.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Ahmed Touil  <http://orcid.org/0000-0001-6098-904X>

References

- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*. 52:7970–7981.
- Aquino R, Behar I, De Simone F, Pizza C, Senatore F. 1985. Phenanthrene derivatives from *Tamus communis*. *Biochem Syst Ecol*. 13:251–252.
- Aquino R, Behar I, de Simone F, Pizza C. 1985. Natural dihydrophenanthrene derivatives from *Tamus communis*. *J Nat Prod*. 48:811–813.
- Aquino R, Conti C, De Simone F, Orsi N, Pizza C, Stein ML. 1991. Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. *J Chemother*. 3:305–309.
- Atta-ur-Rahman, Choudhary MI. 2001. Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. A theory of memory. *Pure Appl Chem*. 73:555–560.
- Barreira JCM, Pereira E, Dueñas M, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. 2013. *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera periclymenum* fruits: Characterization in phenolic compounds and incorporation of their extracts in hydrogel formulations for topical application. *Ind Crop Prod*. 49:169–176.
- Barros L, Dueñas M, Ferreira ICFR, Carvalho AM, Santos-Buelga C. 2011. Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. *Food Chem*. 127:169–173.
- Blois MS. 1958. Antioxydant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199–1200.
- Boulous L. 1983. Medicinal plants of North Africa. Algonac (MI): References Publication Inc. p. 82.
- Boumerfeg S, Baghiani A, Messaoudi D, Khennouf S, Arrar L. 2009. Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effect of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytother Res*. 23:283–288.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 7:88–95.
- Katerere DR, Gray AI, Nash RJ, Waigh RD. 2012. Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. *Fitoterapia*. 83:932–940.
- Kovács A, Forgo P, Zupko I, Réthy B, Falkay G, Szabo P, Hohmann J. 2007. Phenanthrenes and dihydrophenanthrenes from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*. 68:678–691.
- Lu D, Liu J, Li P. 2010. Dihydrophenanthrenes from the stems and leaves of *Dioscorea nipponica* Makino. *Nat Prod Res*. 24:1253–1257.
- Majumder PL, Lahiri S. 1990. Lusianthrin and lusianthridin, two stilbenoids from the orchid *Lusia indivisa*. *Phytochemistry*. 29:621–624.
- Marco GJ. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*. 45:594–598.
- Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*. 44:307–315.

- Quezel P, Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, [New Flora of Algeria and the southern desert regions]. Paris (France): CNRS. p. 218. French.
- Radix S, Barret R. 2007. Total synthesis of two natural phenanthrenes: confusarin and a regioisomer. *Tetrahedron*. 63:12379–12387.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*. 26:1231–1237.
- Réthy B, Kovács A, Zupkó I, Forgo P, Vasas A, Falkay G, Hohmann J. 2006. Cytotoxic phenanthrenes from the rhizomes of *Tamus communis*. *Planta Med*. 72:767–770.
- Shaheen F, Ali L, Ali S, Erdemoglu N, Sener B. 2009. Antioxidant flavonoids from *Tamus communis* ssp. *cretica*. *Chem Nat Comp*. 45:346–349.
- Stoessl A, Stothers JB. 1982. Carbon-13 spectra of several polyhydroxylated 9,10-dihydro-phenanthrene and phenanthrene derivatives. *Org Magn Reson*. 20:166–169.
- Sun W, Tu G, Zhang Y. 2003. A new steroidal saponin from *Dioscorea zingiberensis* wright. *Nat Prod Res*. 17:287–292.
- Tel G, Apaydin M, Duru ME, Öztürk M. 2012. Antioxidant and cholinesterase inhibition activities of three *Tricholoma* species with total phenolic and flavonoid contents: the edible mushrooms from Anatolia. *Food Anal Methods*. 5:495–504.
- Tezuka Y, Ueda M, Kikuchi T. 1989. Studies on the constituents of Orchidaceous plants. VIII. Constituents of *Spiranthes sinensis* (Pers.) AMES var. *amoena* (M. Bieberson) HARA: Isolation and structure elucidation of Spiranthol-A, Spirnthol-B and Spirasineol-A, new isopentenylidihydrophenanthrenes. *Chem Pharm Bull*. 37:3195–3199.
- Tuchinda P, Udchachon J, Khumtaveeporn K, Taylor WC, Engelhardt LM, White AH. 1988. Phenanthrenes of *Eulophia nuda*. *Phytochemistry*. 27:3267–3271.
- Zerargui F, Boumerfeg S, Charef N, Baghiani A, Djarmouni M, Khenouf S, Arrar L, Abu Zarga MH, Mubarak MS. 2015. Antioxidant potentials and xanthine oxidase inhibitory effect of two furanocoumarins isolated from *Tamus communis* L. *Med Chem*. 11:506–513.
- Zhao XL, Ma XJ, Jing WG, Zhang QW, Wang ZM, Liu A. 2011. A new steroidal saponin from *Dioscorea panthaica*. *J Asian Nat Prod Res*. 13:659–664.
- Zheng KYZ, Zhang ZX, Zhou W, Cao H, Xiang FJ. 2014. New phenanthrene glycosides from *Dioscorea opposita*. *J Asian Nat Prod Res*. 16:148–152.

PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS, PHENOLIC CONTENTS, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF
CRATAEGUS AZAROLUS EXTRACTSBOUDJADA AMINA¹, TOUIL AHMED^{1*}, BENDIF HAMDI², BENSOUICI CHAWKI³, RHOUATI SALAH¹

¹Laboratory of Natural Product from Plant and Organic Synthesis, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Mentouri-Constantine, Route Ain el-Bey, 25000, Constantine, Algeria. ²Department of Natural and Life Science, Faculty of Science, Mohamed Boudiaf University, BP 166 M'sila 28000, Algeria. ³Centre de Recherche en Biotechnologie, Ali Mendjli, UV 03, BP E73, Constantine, Algeria. Email: Ahmedtouil@yahoo.fr

Received: 18 November 2017, Revised and Accepted: 23 December 2017

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was the isolation and identification of secondary metabolites from *Crataegus azarolus* (L.) and the antioxidant evaluation of its extracts and compounds.

Methods: The air-dried powdered parts of the plant were extracted with 70% methanol and fractionated by chloroform, ethyl acetate, and n-butanol. The n-butanol extract was separated using polyamide SC6 column and silica gel TLC. In addition, a fraction of silica gel column of the CHCl₃ extract was analyzed by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). The total phenolic and total flavonoid contents of CHCl₃ and n-butanol extracts were estimated. Furthermore, the antioxidant activities of CHCl₃, n-butanol extracts, and two flavonoids were evaluated according to five different methods.

Results: Eight compounds were identified in CHCl₃ and n-butanol extracts, among them, five volatile compounds identified by GC-MS for the 1st time from the species, as well as three known flavonol glycosides identified by spectral analysis (ultraviolet, ¹H-nuclear magnetic resonance [NMR], and ¹³C-NMR) and by comparison with literature data. The n-butanol extract showed the higher content of polyphenols (307.33 ± 2.33 mg (gallic acid equivalents)/g extract) and flavonoids (143.0 ± 2.12 mg QE/g extract) and it proves the highest antioxidant activity with all assays used.

Conclusion: Five volatile compounds were identified for the 1st time from the *C. azarolus* and the antioxidant potential of plant extracts was measured using five different methods.

Keywords: *Crataegus azarolus* (L.), Volatile compounds, Flavonol glycosides, Phenolic contents, Antioxidant activity.

© 2018 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i4.23724>

INTRODUCTION

Crataegus species (Rosaceae) known as "Hawthorn" are shrubs or small tree usually with thorns with about 200 species commonly distributed throughout the Northern temperate region [1]. *Crataegus* extracts from leaves, flowers, and fruits are generally used for heart diseases such as hypertension, angina, arrhythmia, and congestive heart failure. In traditional Arabic medicine, the leaf and fruit extract of *Crataegus aronia* are used for cardiovascular diseases, sexual weakness, cancer, and diabetes treatment [2]. Some *Crataegus* species are currently officially listed as herbal drugs in the pharmacopeias of many countries such as France, China, England, and Germany [3-5]. The species *Crataegus azarolus* (L.) is a fruit tree cultivated in the Mediterranean region [6], it is known in the east of Algeria as "Zaarour" and its fresh fruits are consumed during the autumn season.

Previous phytochemical studies on *C. azarolus* have revealed the presence of polyphenols including flavonoids from the species collected from Tunisia [7-10] and volatile oils from the species from Algeria [11]. The present paper aimed at the exploration of the richness of secondary metabolites of *C. azarolus* as a possible source of compounds having beneficial biological activities as well as the evaluation of its antioxidant activity. As a result, eight compounds were identified from the plant, where five volatile compounds are reported for the first time from *Crataegus* genus with three flavonol glycosides, also the total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and the antioxidant activity were evaluated.

METHODS

Plant material

Aerial parts of *C. azarolus* were collected from Mila region in the east of Algeria during flowering period in 2013. A voucher specimen was deposited under number CA 022 in our laboratory.

Extraction and isolation

Air-dried powdered aerial parts (300 g) of *C. azarolus* were extracted 3 times with a solution of 70% methanol during 24 h. The combined extracts were evaporated under reduced pressure and temperature. The residue was dissolved in hot distilled water (300 ml), and left in cold overnight. After filtration, the aqueous extract was successively extracted by solvents with increasing polarity and evaporated under reduced pressure to yield chloroform (0.8 g), ethyl acetate (1.2 g), and n-butanol (8 g). The n-butanol extract (4 g) was subjected to a polyamide SC6 column chromatography using H₂O-MeOH as the system of elution to give 100 fractions of 100 ml each. Similar fractions were combined according to their TLC (cellulose) properties using 15% HOAc (H₂O-acetic acid, 85:15) and BAW (n-butanol-acetic acid-water, 4:1:5, upper phase) as eluent to give 12 main fractions (A-L). Compounds 1 and 2 were separated from fraction G by silica gel TLC using CH₂Cl₂-MeOH (9:1) as eluent, while compound 3 was obtained from fraction L as a yellow solid by repeated crystallization from methanol.

Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) analysis

The chloroform extract (0.8 g) was fractionated by a silica gel column, eluted with a gradient of cyclohexane-ethyl acetate with increasing

polarity to give 10 main fractions (1–10). The fraction 3 (eluted with 20% ethyl acetate) was subjected to GC–MS analysis using a gas chromatograph VARIAN 3900 with CP-8400 autoinjector coupled to MS (VARIAN Saturn 2000 MS-MS). A Factor Four VF-5 ms fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 µm, Varian) was used. Oven temperature was programmed at 5°C/min. From 45°C to 280°C, the oven was maintained at 280°C for 5 min. The injector temperature was set at 230°C and 1 µl aliquots were injected with a split ratio of 1:10. Helium was used as carrier gas with a flow rate of 1 ml/min. The ion trap MS was operated in EI mode at 70 eV. The analyses were performed with a filament–multiplier delay of 9 min and data acquisition was done in the range 50–650 m/z in full scan mode. The transfer line was maintained at 250°C, the manifold and trap temperatures were set at 80°C and 150°C, respectively. Instrument control and MS data were managed by a personal computer running the Saturn GC–MS WorkStation software (6.30 version). Identification of the chromatographic peaks of compounds (4–8) was realized by comparison of their mass spectra with those present in literature including a comparison with National Institute of Standards and Technology library (NIST).

Biological studies

TPC

Folin-Ciocalteu assay was carried out by the procedure [12], with minor modifications. Gallic acid solution at various concentrations was used for calibration (Table 1). The TPC of samples was expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/g extract) by means of a dose-response curve for gallic acid ($Y=0.0051x+0.1731$, ($R^2: 0.9964$)).

TFC

The TFC was based on the complexation with Al^{3+} . Quercetin at various concentrations was used for calibration [13] (Table 1). The TFC of samples was expressed as quercetin equivalents (mg QE/g extract) by means of a dose-response curve for quercetin ($Y=0.06648x-0.01586$, ($R^2: 0.9972$)).

Antioxidant activity

Free radicals are regularly generated in the body during the metabolic process. Once the production of these free radicals in the body exceeds its antioxidant mechanism, they cause wide damage to the cells may lead to many degenerative diseases [14]. It is also known that plants extracts rich in polyphenols are having varying antioxidant activity and there are many methods to determine antioxidant capacity. These methods differ in terms of their assay principles and experimental conditions [15]. Therefore, the antioxidant activities of *C. azarolus* extracts, as well as two pure compounds were evaluated using five assays.

Free radical scavenging activity by 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) assay

The DPPH assay was determined by the method described previously with some modifications [16,17]. A solution of 40 µl of the sample (extracts, pure compounds, and standards) at various concentrations was added to 160 µl of the methanolic solution of DPPH (0.1 mM). Blanks were prepared using the solvent in addition to the DPPH reagent. After incubation at 37°C for 30 min, the absorbance of each solution was determined at 517 nm using a microplate reader. Butyl hydroxyl toluene (BHT) and butyl hydroxyanisole (BHA) were used as standards for comparison of the activity. The free radical scavenging activity of each solution was calculated as percent inhibition according to the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{blank}}} \right] \times 100$$

Where, A_{blank} and A_{sample} are the absorbance of initial and remaining concentrations of the DPPH in the presence of samples and standards, respectively. The extract concentration providing 50% radical scavenging activity half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was

calculated from the graph of DPPH radical scavenging effect percentage against extract concentration (Table 2).

2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical cation decolorization assay

ABTS decolorization assay was determined by the method described previously [18]. ABTS^{•+} solution was prepared by mixing 7 mM of ABTS^{•+} in water with 2.45 mM potassium persulfate. The mixture was left in the dark at room temperature for 12 h before use. The dilution of the obtained solution was adjusted to obtain the absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. Then, to 40 µl of the sample solution in methanol at different concentrations was added 160 µl of ABTS^{•+} solution. The mixture was left at ambient temperature for 10 min and then the absorbance was measured at 734 nm using a 96-well microplate reader. The percentage inhibitions were calculated for each concentration relative to a blank absorbance (methanol). The scavenging capability of ABTS^{•+} was calculated using the following equation:

$$\% \text{ Scavenging effect} = \left[\frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{blank}}} \right] \times 100$$

Where, A_{blank} is the initial concentration of the ABTS^{•+} and A_{sample} is the absorbance of the remaining concentration of ABTS^{•+} in the presence of the sample. The extract concentration providing 50% radical scavenging activity (IC_{50}) was calculated from the graph of ABTS^{•+} scavenging effect percentage against sample concentrations. BHT and BHA were used as antioxidant standards (Table 2).

Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The CUPRAC was determined according to the method described previously with minor changes [17,19]. To 50 µl of Cu (II) solution (10 mM) was added 50 µl of neocuproine solution (7.5 mM) and 60 µl of NH_4Ac buffer (1 M, pH 7.0) solution. To the above mixture was added, 40 µl of the sample solutions (extracts and pure compounds) at different concentrations. After 60 min, the absorbance at 450 nm was recorded against a reagent blank using a 96-well microplate reader. The results were given as $A_{0.5}$ (µg/ml) corresponding to the concentration indicating 50% absorbance intensity and were compared with those of the standards BHA and BHT (Table 2).

Reducing power assay

The reducing power was measured with small changes according to [17,20]. Briefly, a solution (10 µl) of the sample at various concentrations was mixed with 40 µl of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 50 µl of potassium ferricyanide (10 mg/ml). The obtained solution was incubated at 50°C for 20 min. Then, the solution was mixed with 50 µl of trichloroacetic acid solution (100 mg/ml), 10 µl of ferric chloride solution (1.0 g/l), and finally diluted with 40 µl of distilled water. The absorbance was measured at 700 nm using a 96-well microplate reader. Ascorbic acid, tannic acid, α -tocopherol, BHA, and BHT were used as standards. The results were given as $A_{0.5}$ (µg/ml) corresponding to the concentration indicating 50% absorbance intensity (Table 2). The increase of reducing power by the extract and standard was calculated as follows:

$$\% \text{ Reducing power} = \left[\frac{(A_{\text{test}} / A_{\text{blank}}) - 1}{A_{\text{blank}}} \right] \times 100$$

Where, A_{test} and A_{blank} are absorbance of sample and blank solutions, respectively.

β -carotene bleaching assay

The assay was carried out as described previously with minor modifications [17,21]. A stock solution of β -carotene/linoleic acid was initially prepared by mixing a solution of β -carotene (5 mg) in chloroform (1 ml) with linoleic acid (25 µl) and Tween 40 emulsifier (200 mg). The mixture was evaporated under vacuum to remove chloroform. Then, 100 ml of water saturated with oxygen was added to the above mixture by agitation. A volume of 40 µl of the samples (in ethanol) at different concentrations was mixed with 160 µl of the above

Table 1: Total phenolic and flavonoid contents of *C. azarolus* extracts

Extract (1 mg/ml)	Phenolic content (mg GAE/g extract)*	Flavonoid content (mg QE/g extract)*
Chloroform	118.0±1.52	7.33±0.47
n-butanol	307.33±2.33	143.0±2.12

*Values were expressed as means±SD. (n=3). SD: Standard deviation, *C. azarolus*: *Crataegus azarolus*, GAE: Gallic acid equivalent

Table 2: Antioxidant activities of chloroform, n-butanol extracts, and two compounds from *C. azarolus*

Extract/Compound	DPPH* IC50 µg/ml	ABTS* IC50 µg/ml	CUPRAC* A0.50 µg/ml	Reducing power* A0.50 µg/ml	β-carotene* IC50 µg/ml
Chloroform	54.42±0.77	13.89±0.03	29.67±0.17	96.93±2.65	68.0±0.01
n-butanol	11.11±0.22	4.99±0.06	8.95±0.03	42.33±0.31	5.29±0.04
Compound 2	9.10±0.00	11.46±0.00	20.87±0.64	45.67±3.30	/
Compound 3	6.77±0.09	10.63±0.12	15.02±0.47	22.87±0.29	/
Standards					
BHT (1 µg/µl)	22.32±1.19	1.29±0.30	9.62±0.87	>50	1.05±0.01
BHA (1 µg/µl)	5.73±0.41	1.81±0.10	3.64±0.19	8.41±0.67	0.90±0.02
Ascorbic acid (1 µg/µl)				9.01±1.46	
Ascorbic acid (4 µg/µl)				6.77±1.15	
Tannic acid (4 µg/µl)				5.39±0.91	
α-tocopherol (4 µg/µl)				34.93±2.38	

*Values were expressed as means±SD. Of three parallel measurements, (p<0.05). SD: Standard deviation, *C. azarolus*: *Crataegus azarolus*, BHT: butyl hydroxyl toluene, BHA: Butyl hydroxyl anisole, DPPH: 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), IC50: Half maximal inhibitory concentration

mixture. Immediately, the absorbance at zero time (A_0) was measured at 470 nm using a 96-well microplate reader. The plate was incubated at 50°C for 2 h, and then, the absorbance (A_t) of the mixture was measured again at 470 nm. BHA and BHT were used as antioxidant standards. Ethanol was used as the blank solution (Table 2). The bleaching rate of β-carotene was calculated according to the equation:

$$R = \ln(A_0 / A_t) / t$$

Where, A_0 and A_t are absorbance at time zero and $t = 120$ min, \ln is the natural logarithm. The antioxidant activity was calculated in terms of percentage inhibition relative to the blank using the equation:

$$\% \text{ Antioxidant activity} = [(R_{\text{blank}} - R_{\text{sample}}) / R_{\text{blank}}] \times 100$$

Statistical analyses

All the experimental results are mentioned as a mean ± standard deviation of three trials.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical contents

The structures of the flavonoid glycosides 1, 2, and 3 (fig. 1) isolated from the n-butanol extract were identified by spectral analysis (ultraviolet [UV], ^1H , and ^{13}C -nuclear magnetic resonance [NMR]), acid hydrolysis and by comparison with literature data:

Quercetin-3-*O*-β-galactoside (1): Yellow powder, UV (λ , nm): MeOH 256 268sh 361, +NaOH 370 327 410, +AlCl₃ 273 298sh 430, +HCl 267 310sh 400, NaOAc 275 317sh 372, +H₃BO₃ 262 326sh 380. ^1H -NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ , ppm): 7.6 (1H, *dd*, 8.2 Hz, H-6'), 7.48 (1H, *d*, 2 Hz, H-2'), 6.75 (1H, *d*, 8.8 Hz, H-5'), 6.26 (1H, *d*, 2 Hz, H-8), 6.06 (1H, *d*, 2 Hz, H-6), 5.29 (1H, *d*, 7.6 Hz, H-1''), 3.1-3.9 (6H, *m*, protons of galactose). ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ , ppm): 177.0 (C-4), 161.0 (C-7), 156.5 (C-5), 155.8 (C-9), 154.0 (C-2), 148.8 (C-4'), 144.9 (C-3'), 133.3 (C-3), 121.8 (C-6'), 120.8 (C-1'), 115.7 (C-5'), 115.2 (C-2'), 102.1 (C-1''), C-10), 99.3 (C-6), 93.8 (C-8), 75.8 (C-5''), 73.2 (C-3''), 71.2 (C-2''), 67.9 (C-4''), 60.1 (C-6'').

Quercetin-3-*O*-β-glucoside (2): Yellow powder, UV (λ , nm): MeOH 257 270sh 359, +NaOH 271 327 409, +AlCl₃ 275 300sh 434, +HCl 269 300 363 402, +NaOAc 274 318sh 394, +H₃BO₃ 264 318sh 382. ^1H -NMR (250 MHz,

CD₃OD, δ , ppm): 7.83 (1H, *d*, 2.1 Hz, H-2'), 7.59 (1H, *dd*, 8.4, 2.1 Hz, H-6'), 6.88 (1H, *d*, 8.4 Hz, H-5'), 6.41 (1H, *d*, 1.5 Hz, H-8), 6.21 (1H, *d*, 1.5 Hz, H-6), 5.18 (1H, *d*, 7.5 Hz, H-1''), 3.3-4.0 (6H, *m*, protons of glucose).

Quercetin-3-*O*-rutinoside (3): Yellow powder, UV (λ , nm): MeOH 257 269sh 360, +NaOH 272 329 413, +AlCl₃ 275 300sh 434, +HCl 269 364sh 401, +NaOAc 274 322 390, +H₃BO₃ 264 390. ^1H -NMR (250 MHz, CD₃OD, δ , ppm): 7.87 (1H, *d*, 1.5 Hz, H-2'), 7.60 (1H, *dd*, 8.4, 1.5 Hz, H-6'), 6.9 (1H, *d*, 8.4 Hz, H-5'), 6.4 (1H, *d*, 1.5 Hz, H-8), 6.2 (1H, *d*, 1.5 Hz, H-6), 5.1 (1H, *d*, 7.8 Hz, H-1''), 4.5 (1H, *br.s*, H-1'''), 1.1 (3H, *d*, 5.7 Hz, H-6'''), 3.3-4.0 (10H, *m*, protons of glucose and rhamnose).

Compounds 1-3 were obtained as a yellow powder and their chromatographic behavior indicated that are flavonoid glycosides. The UV-visible spectra in MeOH and with reagents revealed the presence of quercetin skeleton as aglycone for the three compounds by the presence of free OH groups at positions 5, 7, 3', and 4' and the presence of a substituted hydroxy group in position 3.

The nature of glycosidic moiety of the compounds was determined by acid hydrolysis with 2N HCl at 100°C for 30 min of compounds 1 and 2 which gave galactose and glucose, respectively, while compound 3 gave glucose and rhamnose [22-24]. The sugars were identified by co-TLC on silica gel with authentic samples, using acetone-H₂O (9:1) as eluent and aniline malonate as detection reagent. The ^1H -NMR spectra of the three compounds showed the existence of five aromatic protons: H2' (1H, *d*, J=2 Hz), H5' (1H, *d*, J=8.5 Hz), H6' (1H, *dd*, J=8.5, 2 Hz) for B-ring and two meta-coupled protons H6 (1H, *d*, J=2 Hz) and H8 (1H, *d*, J=2 Hz) for A-ring, characteristic of a quercetin aglycone.

In addition, the ^1H -NMR spectrum of compounds 1 showed the presence of an anomeric proton H1'' (1H, *d*, J=7.6 Hz) at δ 5.29 and a bulk of six other protons between 3.1 and 3.9 ppm confirmed the presence of galactosyl moiety. Finally, the structure of compound 1 was confirmed by its ^{13}C -NMR spectrum that gave characteristic peaks of quercetin-3-*O*-galactoside compared to literature data [25,26]. The ^1H -NMR spectrum of compound 2 revealed the presence an anomeric proton H1'' (1H, *d*, J=7.5 Hz) at δ 5.18 attributed to glucosyl moiety and a bulk of six other protons between 3.3 and 4.0 ppm which confirm the structure of compound 2 as quercetin-3-*O*-glucoside [26]. The ^1H -NMR spectrum of compound 3 showed the existence of two anomeric protons, the first (1H, *d*, J=7.8 Hz) at δ 5.1 attributed to glucose (H1'') at position 3 and the second (1H, *br. s*) for rhamnose (H1''') at δ 4.5 with the

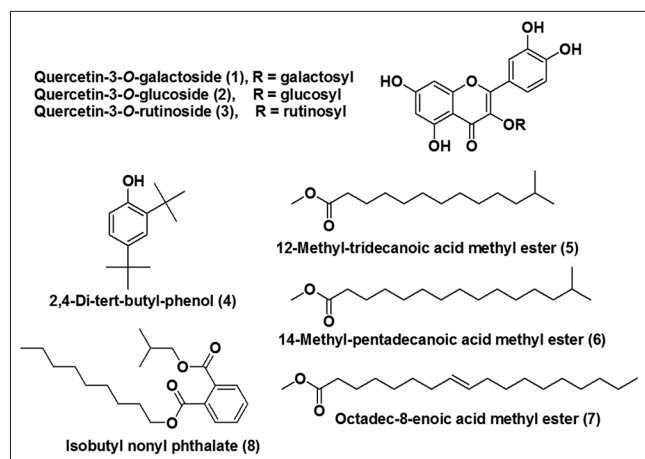


Fig. 1: Chemical structures of identified compounds 1-8

characteristic signal (3H, *d*, *J*=5.7 Hz) at δ 1.1 of their methyl (H6^{'''}). The upfield of H1^{'''} indicated that rhamnose is a terminal sugar. The linkage of rhamnose to position 6 of glucose was deduced by comparison of our data with the literature [24,26]. The structure of compound 3 was confirmed to be quercetin-3-O-rutinoside.

Moreover, the compounds 4-8 were identified by comparison of their mass spectra obtained by GC/MS analysis with literature data (NIST library) to be 2,4-bis (1,1-dimethyl ethyl)-phenol (4), tridecanoic acid 12-methyl-methyl ester (5), pentadecanoic acid 14-methyl-methyl ester (6), 8-octadecanoic acid methyl ester (7), and isobutyl nonyl phthalate (8) as shown in Fig. 1. Compounds 4-8, which are volatile compounds are reported for the first time from the *Crataegus* genus.

Total phenolic and TFC

The estimation of TPC and TFC using methods described above indicates that *C. azarolus* was very rich in phenolic and flavonoid compounds (Table 1). The TPC and TFC of the n-butanol extract reached 30.7% (expressed as GAE) and 14.3% (expressed as QE) of the weight of extract, respectively, and were largely higher than chloroform extract contents. Furthermore, the TPC and TFC values, in this study, are well above the values reported in other studies [7,8] about the species, which can be explained by the difference in the period and region of plant collection and the method of extraction.

Antioxidant activity

Fruits and vegetables are highly potent antioxidants, easily available, inexpensive, and more reliable than any synthetic marketed medicament do not have side effects and possess high safety index. Many research studies have confirmed the importance of antioxidants from plants [27]. In this study, it was necessary to evaluate *C. azarolus* extracts through several tests to get more informative results on its antioxidant potential. It was necessary to evaluate its extracts through several tests. Consequently, the antioxidant activity was carried out using five different assays: DPPH free radical scavenging, ABTS cation radical decolorization, CUPRAC, reducing power activity, and β -carotene bleaching activity. The results in Table 2 revealed that the n-butanol extract was more potent than the CHCl₃ extract with all used assays. This is evident for n-butanol extract because there is a close relationship between the phenolic and flavonoid contents and the antioxidant activity. The results in Table 2 confirmed that compound 3 was the most active compared to compound 2 with almost used methods. In addition, IC₅₀ values for the n-butanol extract and compound 3 were in generally close to those of used standards. This finding is in agreement with other studies about other species of *Crataegus* genus collected in other countries [7,9,28,29].

CONCLUSION

We report, herein, for the first time, the identification of five volatile compounds (4-8) from the aerial parts of *C. azarolus* (Rosaceae)

by GC-MS. From obtained results, the highest level of TPC and TFC was found in the n-butanol extract. The antioxidant activities of the chloroform, n-butanol extracts, and the pure compounds 2 and 3 have been determined using five assays. The n-butanol extract shown a powerful antioxidant activity, which can be ascribed to its richest in phenolic compounds. However, further studies are required to isolate other phytochemical constituents and subjecting it to biological evaluation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

CONFLICTS OF INTERESTS

All authors have none to declare.

REFERENCES

- Donmez AA. The genus *Crataegus* L. (*Rosaceae*) with special reference to hybridization and biodiversity in Turkey. *Turk J Bot* 2004;28:29-37.
- Said O, Khalil K, Fulder S, Azaizeh H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan heights and the west bank region. *J Ethnopharmacol* 2002;83:251-65.
- Chang Q, Zuo Z, Harrison F, Chow MS. Hawthorn. *J Clin Pharmacol* 2002;42:605-12.
- Chemical Industry Press. State pharmacopoeia commission of the people's republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. 8th ed. Beijing: Chemical Industry Press; 2005.
- The Council of Europe. *European pharmacopoeia*. 5th ed. Strasbourg, France: European Directorate for the quality of Medicines (EDQM); 2005.
- Quezel P, Santa S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertique méridionales*. Tome 2. Paris: CNRS; 1963. p. 459.
- Bahri-Sahloul R, Ammar S, Fredj RB, Saguem S, Grec S, Trotin F, et al. Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. Varieties. *Pak J Biol Sci* 2009;12:660-8.
- Bahri-Sahloul R, Ammar S, Grec S, Skhiri FH. Chemical characterization of *Crataegus azarolus* (L.) fruit from 14 genotypes found in Tunisia. *J Hortic Sci Biotech* 2009;84:23-8.
- Belkhir M, Rebai O, Dhaouadi K, Congiu FG, Tuberoso CI, Amri M, et al. Comparative analysis of Tunisian wild *Crataegus azarolus* (yellow azarole) and *Crataegus monogyna* (red azarole) leaf, fruit, and traditionally derived syrup: Phenolic profiles and antioxidant and antimicrobial activities of the aqueous-acetone extracts. *J Agric Food Chem* 2013;61:9594-601.
- Belkhir M, Rebai O, Dhaouadi K, Sioud B, Amri M, Fattouch S. Antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian azarole (*Crataegus azarolus* L.) leaves and fruit pulp/peel polyphenolic extracts. *Indian J Food Prop* 2013;16:1380-93.
- Lakache Z, Tigrine-Kordjani N, Tigrine C, Kameli A, Meklati BY. Volatile constituents, phenolic compounds and antioxidant activity of *Crataegus azarolus* leaves and flowers growing in Algeria. *Chem Nat Comp* 2014;50:1132-5.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999;299:152-78.
- Turkoglu A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus* (Bull.) Murrill. *Food Chem* 2007;101:267-73.
- Sakat S, Juvekar AR, Gambhire MN. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci* 2010;2:146-55.
- Indu H, Seenivasan R. *In vitro* antioxidant activity of selected seaweeds from southeast coast of India. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013;5:474-84.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;26:1199-200.
- Tel G, Apaydin M, Duru ME, Öztürk M. Antioxidant and cholinesterase inhibition activities of three *Tricholoma* species with total phenolic and flavonoid contents: The edible Mushrooms from Anatolia. *Food Anal Methods* 2012;5:495-504.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay free radical. *Bio Med* 1999;26:1231-7.

19. Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC. Method J Agric Food Chem 2004;52:7970-81.
20. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutr 1986;44:307-15.
21. Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 1968;45:594-8.
22. Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H. The Flavonoids. London: Chapman and Hall; 1975.
23. Markham KR. Techniques of Flavonoids Identification. London: Academic Press; 1982.
24. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. New York: Springer-Verlag; 1970.
25. Markham KR, Chari VM. The Carbon 13-NMR Spectroscopy of Flavonoids (In flavonoids: Advances in research). London: Chapman and Hall; 1982.
26. Markham KR, Geiger H. ¹H NMR spectroscopy of flavonoids and their glycosides in DMSO-d₆. (In The Flavonoids: Advances in research since 1986). London: Chapman and Hall; 1994.
27. Mayura AK, Suparna MB, Pratima K. Role of antioxidants and nutrition in oxidative stress. Int J App Pharm 2015;7:1-4.
28. Bignami C, Paolucci M, Scossa A, Bertazza G. Preliminary evaluation of nutritional and medicinal components of *Crataegus azarolus* fruits. Acta Hort 2003;597:95-100.
29. Bahorun T, Aumjaud E, Ramphul H, Rycha M, Luximon-Ramma A, Trotin F, et al. Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. Nahrung 2003;47:191-8.