

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

UNIVERSITE DES FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

THESE

PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT
TROISIEME CYCLE (LMD)

SPECIALITE: CHIMIE PHARMACEUTIQUE

INTITULÉ:

Composants et potentiel biologique de *Cotula anthemoides* L et *Pentzia monodiana* MAIRE. (Asteraceae)

PAR

Wafa TADRENT épouse LAOUADI

Soutenue publiquement le 25/10/2018 devant le jury :

Pr. Ahmed KABOUCHE	(U. des frères Mentouri-Constantine 1)	Président
Pr. Zahia KABOUCHE	(U. des frères Mentouri-Constantine 1)	Rapporteur
Pr. Zahia Semra	(U. Salah Boubnider –Constantine 3)	Examineur
MCA. Djemaa BERREHAL	(U. des frères Mentouri-Constantine 1)	Examineur
Pr. Abdelmalik BELKHIRI	(U. Salah Boubnider –Constantine 3)	Examineur

Dédicaces

A la mémoire de mon cher père

A ma chère mère

A mon Mari Amine

A mon petit fils Raid Mohamed Safwane

A mes sœurs et mon frère Hichem

A ma Belle mère et beau Père

A mes beaux frères et très chère belle sœur Malek

A mes neveux et mes nièces

A tous mes amies et collègues

Wafa

Remerciements

*Je tiens à exprimer mes sincères et vifs remerciements à Madame la Professeure **Zahia KABOUCHE**, ma directrice de thèse pour m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques, et surtout pour la confiance qu'elle m'a accordée dans la réalisation de ce travail, sa disponibilité, ses conseils éclairés et son concours constant dans cette thèse.*

*Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le Professeur **Ahmed KABOUCHE** de l'Université de Constantine 1, pour son aide, ses conseils et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*J'aimerais également remercier Monsieur le Professeur **Abdelmalik BELKHIRI** de l'Université de Constantine 3 pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Je suis très honorée de la présence en tant qu'examineur de Madame **Zahia Semra**, Professeure à l'université de Constantine 3, je la remercie sincèrement.*

*J'adresse également mes remerciements à Madame **Djemaa BERREHAL**, MCA, à l'Université de Constantine 1, pour avoir accepté de juger ce travail.*

*J'ai eu la chance et aussi le plaisir d'effectuer une partie de ce travail de recherche dans le Laboratoire de Pharmacognosie, groupe Isolement et Structure, Faculté de Pharmacie de l'Université de Reims, sous la direction du Professeure **Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO**. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de pharmacognosie, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans de meilleures conditions tout en me laissant une grande liberté, pour son soutien, sa gentillesse et sa grande générosité.*

*Je remercie aussi Monsieur le Professeur **Mehmet ÖZTÜRK** de l'Université Sitki Koçman-Turquie, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, afin de réaliser une partie des activités biologique de ma thèse.*

*Je remercie en particulier Mon Mari **Mohamed amine LAOUADI** docteur de l'université Setif 1 pour son encouragement, son soutien moral, son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit.*

*Mes remerciements les plus forts reviennent également à ma famille surtout **ma mère** qui m'a encouragée et soutenue.*

L'ensemble de mes collègues du laboratoire LOST trouvera ici l'expression de toute ma sympathie, pour avoir su me soutenir et m'encourager au cours de ce travail.

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

Table des Matières

Introduction Générale	XXI
-----------------------------	-----

PARTIE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: Aperçu bibliographique sur les Asteraceae	2
I. 1. Généralités sur les Asteraceae	3
I. 1.1. Introduction	3
I. 1.2. Description botanique	3
I. 1.3. Répartition géographique des Asteraceae	5
I. 1.4. Position systématique de la famille des Asteraceae APG IV (<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>)	5
I. 1.5. Composition chimique des Asteraceae	6
I. 1.6. Utilisation économique et thérapeutique des Asteraceae	6
I. 2. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Cotula</i>	7
I. 2.1. Présentation du genre <i>Cotula</i>	7
I. 2.2. Description botanique	7
I. 2.3. Répartition géographique	8
I. 2.4. Les métabolites isolés du genre <i>Cotula</i>	8
I. 2.5. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Cotula</i>	14
I. 2.6. Activités biologiques reconnues du genre <i>Cotula</i>	14
I. 3. Aperçu bibliographique sur l'espèce <i>Cotula anthemoides</i> L	15
I. 3.1. Présentation de l'espèce <i>Cotula anthemoides</i> L	15
I. 3.2. Description botanique de l'espèce <i>Cotula anthemoides</i> L	15
I. 3.3. Répartition géographique de l'espèce <i>Cotula anthemoides</i> L	16
I. 3.4. Classification systématique de l'espèce <i>Cotula anthemoides</i> L	16
I. 3.5. Les travaux antérieurs de l'espèce <i>Cotula anthemoides</i> L	17
I. 3.6. Utilisation de l'espèce <i>Cotula anthemoides</i> L en médecine traditionnelle	18
I. 4. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Pentzia</i>	18
I. 4.1. Généralités sur le genre <i>Pentzia</i>	18
I. 4.2. Description botanique du genre <i>Pentzia</i>	18
I. 4.3. Répartition géographique du genre <i>Pentzia</i>	18

I. 4.4. Métabolites isolés du genre <i>Pentzia</i>	19
I. 4.5. Les activités biologiques du genre <i>Pentzia</i>	21
I. 5. Aperçu bibliographique sur l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> Maire	22
I. 5.1. Présentation de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> Maire	22
I. 5.2. Description botanique de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> Maire	22
I. 5.3. Position systématique de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> Maire	23
I. 5.4. Répartition géographique de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> Maire	23
I. 5.5. Utilisation de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> Maire en médecine traditionnelle...24	
I. 5.6. Travaux antérieurs de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> Maire	24
 CHAPITRE II : Aperçu bibliographique sur les lignanes	26
II. 1. Présentation des Lignanes	27
II. 2. Diversité structurale des lignanes	27
II. 3. Activités pharmacologiques des lignanes	28
I. 3.1. Activité anti-cancérogène	28
I. 3.2. Activité antioxydante	29
I. 3.3. Activité anti-inflammatoire	29
II. 4. Rôle des lignanes chez les plantes.....	29
II. 5. Biosynthèse des lignanes.....	29
 CHAPITRE III : Généralités sur les activités biologiques	31
III. 1. Radicaux libres	32
III. 1.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	32
III. 1.1.1. Les espèces oxygénées réactives radicalaires	32
III. 1.1.2. Les espèces oxygénées non radicalaires	33
III. 1.2. Les espèces réactives azotées (ERN)	33
III.1.2.1. Espèces radicalaires azotées	33
III.1.2.2. Espèces non radicalaires azotées	33
III. 2. Activité antioxydante	34
III. 2.1. Les antioxydants	34
III. 2.1.1. Les antioxydants naturels	34
III. 2.1.2. Les antioxydants de synthèse	37

III. 2.2. Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante	37
III. 2.2.1. Méthode du DPPH [·]	37
III. 2.2.2. Piégeage de l'ABTS ^{•+}	38
III. 2.2.3. Méthode du CUPRAC	38
III. 2.2.4. Chélation des ions métalliques	39
III. 3. Dosage des polyphénols	39
III. 4. Activité Anticholinestérase	39
III. 4.1. Évaluation de l'activité inhibitrice AChE en utilisant la méthode d'Ellman.....	40
III. 5. Activité Antityrosinase	41
III. 5.1. Évaluation de l'activité inhibitrice de la tyrosinase	42

PARTIE II: MATÉRIEL ET METHODES

CHAPITRE I : Matériel Utilisé	44
I. 1. Matériel végétal.....	45
I. 1.1. Récolte de la plante <i>Cotula anthemoides</i> L.....	45
I. 1.2. Récolte de la plante <i>Pentzia monodiana</i> Maire.....	45
I. 2. Matériel Chromatographique	46
I. 2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	46
I. 2.2. Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	46
I. 2.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC, <i>vacuum</i> liquid chromatography)....	46
I. 2.4. Flash Chromatographie.....	47
I. 2.5. Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	47
I. 3. Méthodes physico-chimiques.....	47
I. 3.1. Hydrolyse acide.....	47
I. 3.2. Spectrométrie de masse (MS)	48
I. 3.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	48
I. 4. Les activités biologiques.....	48
CHAPITRE II : Extraction, Séparation et purification des métabolites secondaires	49
II. 1. <i>Cotula anthemoides</i> L.....	50
II. 1.1. Extraction	50
II. 1.2. Séparation et purification de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	52

II. 2. <i>Pentzia monodiana</i> Maire.....	56
II. 2.1. Extraction	56
II. 2.2. Séparation et purification de l'extrait acétone.....	58
CHAPITRE III : Activités Biologiques: antioxydante, anticholinestérase et antityrosinase	66
III. 1. Activité Antioxydante.....	67
III. 1.1. Protocole du test DPPH.....	67
III. 1.2. Protocole du test ABTS.....	68
III. 1.3. Protocole du test CUPRAC.....	69
III. 1.4. Protocole du test de chélation des ions ferreux.....	69
III. 2. Activité Anticholinestérase.....	69
III. 3. Activité Antityrosinase.....	70

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : Élucidation Structurale des métabolites secondaires isolés de <i>Cotula anthemoides</i> L	73
I. 1. Elucidation Structurale de Ca1	74
I. 2. Elucidation Structurale de Ca2	82
I. 3. Elucidation Structurale de Ca3	86
I. 4. Elucidation Structurale de Ca4	90
I. 5. Elucidation Structurale de Ca5	94
I. 6. Elucidation Structurale de Ca6	98
I. 7. Elucidation Structurale de Ca7.....	102
I. 8. Elucidation Structurale de Ca8	107
I. 9. Elucidation Structurale de Ca9.....	111
I. 10. Elucidation Structurale de Ca10	116
I. 11. Elucidation Structurale de Ca11.....	120
I. 12. Elucidation Structurale de Ca12.....	124
I. 13. Elucidation Structurale de Ca13	125
I. 14. Elucidation Structurale de Ca14.....	130
I. 15. Elucidation Structurale de Ca15	137

CHAPITRE II : Éluclation Structural des métabolites secondaires isolés de <i>Pentzia monodiana</i> Maire.	144
II. 1. Elucidation Structurale de Pm1.....	145
II. 2. Elucidation Structurale de Pm2.....	151
II. 3. Elucidation Structurale de Pm3.....	154
II. 4. Elucidation Structurale de Pm4.....	157
II. 5. Elucidation Structurale de Pm5.....	162
II. 6. Elucidation Structurale de Pm6.....	165
II. 7. Elucidation Structurale de Pm7.....	168
II. 8. Elucidation Structurale de Pm8.....	174
CHAPITRE III : Dosage des polyphénols et Activités biologiques : Antioxydante, Anticholinestérase et Antityrosinase.....	185
III. 1. Etude des activités biologiques des extraits.....	186
III. 1.1. Dosage des polyphénols.....	186
III. 1.2. Activité Antioxydante des extraits de <i>Cotula anthemoides</i> L. et de <i>Pentzia monodiana</i> Maire.....	187
III. 1.2.1. Activité anti-radicalaire DPPH [•]	187
III. 1.2.2. Essai de décoloration du radical cation ABTS ^{•+}	188
III. 1.2.3. La réduction cuprique (CUPRAC).....	188
III. 1.2.4. Chélation des ions ferreux.....	188
III. 1.3. Activité anticholinestérase.....	191
III. 2. Etude des activités biologiques des produits isolés.....	192
III. 2.1. Activité antioxydante des produits isolés.....	192
III. 2.2. Activité anti-tyrosinase des produits isolés.....	193
Conclusion Générale.....	195
Références.....	200

Liste des Figures

Figure 1.1: Types de fleurs des Asteraceae	4
Figure 1.2: Le fruit de <i>Taraxacum campylodes</i> (Asteraceae)	4
Figure 1.3: Cartes de répartition mondiale et la richesse en espèces d'Asteraceae	5
Figure 1.4: Position des Astéracées par rapport à la classe des Angiospermes	6
Figure 1.5: Répartition géographique du genre <i>Cotula</i> dans le nord Africain	8
Figure 1.6: Répartition géographique de l'espèce <i>Cotula anthemoides</i> dans l'Afrique du Nord	16
Figure 1.7: Carte de répartition des espèces du genre <i>Pentzia</i> en Afrique australe	19
Figure 1.8: Eléments microscopique présents dans les parties aériennes de <i>Pentzia monodiana</i> Maire	22
Figure 1.9: Carte de répartition de l'espèce <i>Pentzia monodiana</i> Maire en Afrique australe...	23
Figure 1.10: Différents groupes structuraux fondamentaux des lignanes	28
Figure 1.11: Biosynthèse des lignanes chez la plupart des angiospermes	30
Figure 1.12: Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux.....	34
Figure 1.13: Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols	35
Figure 1.14: Mécanismes d'action antioxydante de la vitamine E sur les radicaux LOO [•]	35
Figure 1.15: Exemples de carotène et xanthophylle	35
Figure 1.16: Mécanismes traduisant l'activité antioxydante des caroténoïdes, cas des ROO [•]	36
Figure 1.17: Structure chimique du 2- phénylbenzopyrane	36
Figure 1.18: Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques	36
Figure 1.19: Structure des antioxydants synthétiques	37
Figure 1.20: Piégeage du radical DPPH [•] avec l'antioxydant (AH)	37
Figure 1.21: Oxydation de l'ABTS avec K ₂ S ₂ O ₈ et sa génération	38
Figure 1.22: Réduction du complexe chromogène de Cu ⁺² -Nc	38
Figure 1.23: Structure chimique du Ferrozine	39
Figure 1.24: Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman.....	40
Figure 1.25: Biosynthèse de la mélanine	42
Figure 2.1: <i>Cotula anthemoides</i> L.	45
Figure 2.2: <i>Pentzia monodiana</i> Maire	45

Figure 2.3: Plaque bidimensionnelle de l'extrait AcOEt (1) et de l'extrait <i>n</i> -BuOH (2) de <i>Cotula anthemoides</i> L	51
Figure 2.4: Extraction de <i>Cotula anthemoides</i> L.	51
Figure 2.5: Profil CCM sur gel de silice normale de l'extrait <i>n</i> -BuOH	53
Figure 2.6: Chromatogramme CLHP analytique (gradient de 10% à 90% MeCN/H ₂ O) de la fraction F6(A), la fraction F7(B), la fraction F9+11 (C) et de la fraction F10 (D) de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>Cotula anthemoides</i>	54
Figure 2.7: Schéma de purification de la fraction F6-7	54
Figure 2.8: CCM de purification de la fraction F6-7	54
Figure 2.9: Schéma de purification de la fraction F9-11	55
Figure 2.10: CCM de purification de la fraction F9-11	55
Figure 2.11: Schéma de séparation de l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>Cotula anthemoides</i> L	56
Figure 2.12: Plaque bidimensionnelle de l'extrait acétone (a) et de l'extrait <i>n</i> -BuOH (b) de <i>Pentzia monodiana</i> Maire	57
Figure 2.13: Extraction de <i>Pentzia monodiana</i> Maire	58
Figure 2.14: Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait acétone	59
Figure 2.15: Chromatogramme CLHP analytique (gradient de 20% à 90% MeCN/H ₂ O) de la fraction C17(a), la fraction C22(b), la fraction C24 (c) et la fraction C25 (d) de l'extrait acétone de <i>Pentzia monodiana</i> Maire	60
Figure 2.16: Schéma de purification de la fraction C17	61
Figure 2.17: CCM de purification de la fraction C17	61
Figure 2.18: Chromatogramme Flash (gradient CHCl ₃ /MeOH) de la fraction C17	62
Figure 2.19: CCM de purification de la fraction C22	62
Figure 2.20: Chromatogramme Flash (gradient MeOH/H ₂ O) de la fraction C24-25	63
Figure 2.21: CCM de purification de la fraction C24-25	64
Figure 2.22: Schéma de purification de la fraction C24-25-22	64
Figure 2.23: CCM de purification de la fraction C24-25-22.....	64
Figure 2.24 : Schéma de séparation de l'extrait acétone de <i>Pentzia monodiana</i> Maire.....	65
Figure 3.1: Spectre UV du composé Ca1.....	74
Figure 3.2: Spectre de masse HR-SMIE du composé Ca1.....	74
Figure 3.3: Spectre RMN- ¹ H du composé Ca1 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	76
Figure 3.4: Spectre COSY du composé Ca1 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	76
Figure 3.5: Spectre HSQC du composé Ca1 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	77
Figure 3.6: Spectre HMBC du composé Ca1 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	77

Figure 3.7: Importantes corrélations HMBC (H-C) du composé Ca1	78
Figure 3.8: Spectre COSY du composé Ca1	78
Figure 3.9: Spectre HMBC du composé Ca1	80
Figure 3.10: Spectre ROESY du composé Ca1	80
Figure 3.11: Spectre RMN ¹³ C du composé Ca1 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	81
Figure 3.12: Spectre de masse HR-MS -ESI du composé Ca2	82
Figure 3.13: Spectre RMN ¹ H du composé Ca2 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	83
Figure 3.14: Spectre COSY du composé Ca2 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	84
Figure 3.15: Spectre HMBC du composé Ca2 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	84
Figure 3.16: Spectre RMN ¹³ C du composé Ca2 (CD ₃ OD, 125 MHz).....	84
Figure 3.17: Spectre HSQC du composé Ca2	85
Figure 3.18: Spectre HR-ESI-MS du composé Ca3	86
Figure 3.19: Spectre RMN ¹ H du composé Ca3 (CD ₃ OD, 500MHz)	87
Figure 3.20: Spectre RMN ¹³ C du composé Ca3 (CD ₃ OD, 125MHz).....	87
Figure 3.21: Spectre COSY du composé de la partie osidique du composé Ca3	88
Figure 3.22: Spectre HSQC du composé Ca3	88
Figure 3.23: Spectre HMBC du composé Ca3	89
Figure 3.24: Spectre HR-ESI-MS du composé Ca4	90
Figure 3.25: Spectre RMN ¹ H du composé Ca4 (CD ₃ OD, 500MHz).....	91
Figure 3.26: Spectre COSY du composé Ca4	91
Figure 3.27: Spectre HSQC <i>J</i> modulé du composé Ca4	92
Figure 3.28: Spectre RMN ¹³ C- <i>J</i> modulé du composé Ca4 (CD ₃ OD, 125MHz).....	92
Figure 3.29: Spectre HMBC du composé Ca4	93
Figure 3.30: Spectre HR-ESI-MS du composé Ca5	94
Figure 3.31: Spectre RMN ¹ H du composé Ca5 (CD ₃ OD, 500MHz).....	95
Figure 3.32: Spectre COSY du composé Ca5	95
Figure 3.33: Spectre HSQC <i>J</i> modulé de la partie osidique du composé Ca5	96
Figure 3.34 : Spectre HSQC <i>J</i> modulé de la partie génine du composé Ca5	96
Figure 3.35: Spectre HMBC du composé Ca5	97
Figure 3.36: Spectre RMN ¹³ C- <i>J</i> modulé du composé Ca5 (CD ₃ OD, 125MHz).....	97
Figure 3.37: Spectre RMN ¹ H du composé Ca6 (DMSO, 500 MHz).....	99
Figure 3.38: Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> modulé du composé Ca6 (DMSO, 125Hz).....	99
Figure 3.39: Spectre COSY du composé Ca6	100
Figure 3.40: Spectre HSQC du composé Ca6	100

Figure 3.41: Spectre HMBC du composé Ca6	100
Figure 3.42: Spectre HMBC du composé Ca6 (partie étalé 3.2-5.5 ppm)	101
Figure 3.43: Spectre ROESY du composé Ca6	101
Figure 3.44: Spectre de masse HR-MS –ESI du composé Ca7	102
Figure 3.45: Spectre RMN- ¹ H du composé Ca7 (CD ₃ OD, 500 MHz)	103
Figure 3.46: Spectre COSY du composé Ca7 (CD ₃ OD, 500 MHz)	103
Figure 3.47: Spectre HSQC du composé Ca7 (CD ₃ OD, 500 MHz)	104
Figure 3.48 : Spectre HMBC étalé du composé Ca7 (CD ₃ OD, 500 MHz)	104
Figure 3.49: Importantes corrélations HMBC (H-C) du composé Ca7	104
Figure 3.50: Spectre HMBC du composé Ca7 (CD ₃ OD, 500 MHz)	105
Figure 3.51: corrélations ROESY (H-H) du composé Ca7	106
Figure 3.52: Spectre ROESY du composé Ca7 (CD ₃ OD, 500 MHz)	106
Figure 3.53: Spectre ¹³ C- <i>J</i> mod du composé Ca7 (CD ₃ OD, 125 MHz)	106
Figure 3.54: Spectre de masse HR-MS –ESI du composé Ca8	107
Figure 3.55: Spectre de RMN- ¹ H du composé Ca8 (CD ₃ OD, 500MHz)	108
Figure 3.56: Spectre de RMN ¹³ C du composé Ca8 (CD ₃ OD, 125MHz)	108
Figure 3.57: Spectre HSQC du composé Ca8	109
Figure 3.58: Spectre COSY du composé Ca8	109
Figure 3.59: Spectre HMBC du composé Ca8	110
Figure 3.60: Spectre de masse HR-MS –ESI du composé Ca9	111
Figure 3.61: Spectre RMN ¹ H du composé Ca9 (CD ₃ OD, 600MHz)	112
Figure 3.62: Spectre COSY du composé Ca9	112
Figure 3.63: Spectre HSQC du composé Ca9	113
Figure 3.64: Spectre HMBC partie aromatique du composé Ca9	114
Figure 3.65: Spectre HMBC partie osidique du composé Ca9	114
Figure 3.66 : Importantes corrélations HMBC observées pour le composé Ca9	114
Figure 3.67: Spectre RMN ¹³ C du composé Ca9 (CD ₃ OD, 150MHz)	115
Figure 3.68: Spectre de masse HR-MS –ESI du composé Ca10	116
Figure 3.69: Spectre de RMN ¹ H du composé Ca10 (CD ₃ OD, 500MHz)	117
Figure 3.70: Spectre COSY du composé Ca10	117
Figure 3.71: Spectre HSQC du composé Ca10	117
Figure 3.72: Spectre de RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Ca10 (CD ₃ OD, 125MHz)	118
Figure 3.73: Spectre de HMBC du composé Ca10	118
Figure 3.74: Spectre de ROESY du composé Ca10	119

Figure 3.75: Spectre de RMN ^1H du composé Ca11 (CD_3OD , 600MHz)	120
Figure 3.76: Spectre de RMN ^{13}C du composé Ca11 (CD_3OD , 150MHz)	121
Figure 3.77: Spectre HSQC du composé Ca11	121
Figure 3.78: Spectre HMBC du composé Ca11	122
Figure 3.79: Spectre COSY du composé Ca11	123
Figure 3.80: Spectre de RMN ^1H du composé Ca12 (CD_3OD , 600 MHz)	124
Figure 3.81: Spectre de RMN ^{13}C du composé Ca12 (CD_3OD , 150 MHz)	125
Figure 3.82: Spectre de masse HR-MS-ESI du composé Ca13	126
Figure 3.83: Spectre de RMN ^1H du composé Ca13 (CD_3OD , 500 MHz)	126
Figure 3.84: Spectre de RMN ^{13}C du composé Ca13 (CD_3OD , 125 MHz)	127
Figure 3.85: Spectre de COSY du composé Ca13	127
Figure 3.86: Spectre de HSQC du composé Ca13	128
Figure 3.87: Spectre de HMBC du composé Ca13	129
Figure 3.88: Spectre de ROESY du composé Ca13	129
Figure 3.89: Spectre de masse HR-MS-ESI du composé Ca14	130
Figure 3.90: Spectre RMN ^1H du composé Ca14 (CD_3OD , 500MHz)	131
Figure 3.91: Spectre COSY de la partie osidique du composé Ca14	131
Figure 3.92: Spectre HSQC de la partie osidique du composé Ca14	131
Figure 3.93: Spectre RMN ^{13}C du composé Ca14 (CD_3OD , 125MHz)	132
Figure 3.94: Spectre HSQC du composé Ca14	132
Figure 3.95: Spectre COSY de la partie aglycone du composé Ca14	134
Figure 3.96: Spectre HMBC du composé Ca14	135
Figure 3.97: Spectre HMBC du composé Ca14 (Importantes corrélations)	136
Figure 3.98: Spectre ROESY du composé Ca14	136
Figure 3.99: Spectre de masse HR-MS-ESI du composé Ca15	137
Figure 3.100: Spectre RMN- ^1H du composé Ca15 (CD_3OD , 500MHz)	138
Figure 3.101: Spectre RMN- ^{13}C du composé Ca15 (CD_3OD , 125MHz)	139
Figure 3.102: Spectre HSQC du composé Ca15	139
Figure 3.103: Spectre HSQC du composé Ca15 (partie étalé 6.20-7.65ppm)	140
Figure 3.104: Spectre COSY de la partie aromatique du composé Ca15	140
Figure 3.105: Spectre COSY du composé Ca15	141
Figure 3.106: Spectre HMBC de la partie aromatique du composé Ca15	141
Figure 3.107: Spectre HMBC du composé Ca15	142
Figure 3.108 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé Pm1	145

Figure 3.109 : Spectre de RMN- ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Pm1 (CD ₃ OD, 125 MHz)	146
Figure 3.110 : Spectre de RMN- ¹ H du composé Pm1 (CD ₃ OD, 500 MHz)	146
Figure 3.111 : Spectre de COSY du composé Pm1	147
Figure 3.112 : Spectre de HSQC <i>J</i> -modulé du composé Pm1	147
Figure 3.113 : Spectre de HMBC du composé Pm1	148
Figure 3.114 : Spectre de HMBC du composé Pm1 (partie étalé 130-170ppm)	149
Figure 3.115 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé Pm2	151
Figure 3.116 : Spectre RMN ¹ H du composé Pm2 (CD ₃ OD, 500MHz)	151
Figure 3.117 : Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Pm2	152
Figure 3.118 : Spectre HMBC du composé Pm2	152
Figure 3.119 : Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Pm2 (CD ₃ OD, 125MHz)	153
Figure 3.120 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé Pm3	154
Figure 3.121 : Spectre RMN ¹ H du composé Pm3 (CD ₃ OD, 500MHz)	155
Figure 3.122 : Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Pm3 (CD ₃ OD, 125MHz)	155
Figure 3.123 : Spectre COSY du composé Pm3	156
Figure 3.124 : Spectre HMBC du composé Pm3 (partie 6.63-7.05ppm)	156
Figure 3.125 : Spectre HMBC du composé Pm3 (partie 3.10-4.80ppm)	156
Figure 3.126 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé Pm4	158
Figure 3.127 : Spectre RMN ¹ H du composé Pm4 (CD ₃ OD, 500MHz)	158
Figure 3.128 : Spectre COSY du composé Pm4	159
Figure 3.129 : Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Pm4 (CD ₃ OD, 125MHz)	159
Figure 3.130 : Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Pm4	160
Figure 3.131 : Spectre HMBC du composé Pm4	160
Figure 3.132 : Spectre NOESY du composé Pm4	161
Figure 3.133 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé Pm5	162
Figure 3.134 : Spectre RMN ¹ H du composé Pm5 (CD ₃ OD, 500MHz)	163
Figure 3.135 : Spectre RMN ¹³ C <i>J</i> -modulé du composé Pm5 (CD ₃ OD, 125MHz)	163
Figure 3.136 : Spectre HSQC du composé Pm5	164
Figure 3.137 : Spectre HMBC du composé Pm5	164
Figure 3.138 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé Pm6	165
Figure 3.139 : Spectre RMN ¹ H du composé Pm6 (CD ₃ OD, 500MHz)	166
Figure 3.140 : Spectre COSY du composé Pm6	166
Figure 3.141 : Spectre HSQC du composé Pm6	167
Figure 3.142 : Spectre HMBC du composé Pm6	167

Figure 3.143 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé Pm7	169
Figure 3.144 : Spectre RMN ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Pm7 (CD ₃ OD, 125MHz)	169
Figure 3.145 : Spectre RMN ^1H du composé Pm7 (CD ₃ OD, 500MHz)	170
Figure 3.146 : Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Pm7	170
Figure 3.147 : Spectre COSY du composé Pm7 (séquence 1)	171
Figure 3.148 : Spectre COSY du composé Pm7 (séquence 2)	172
Figure 3.149 : Spectre HMBC du composé Pm7	173
Figure 3.150 : Spectre HMBC du composé Pm7	173
Figure 3.151 : Spectre NOESY du composé Pm7	173
Figure 3.152 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé Pm8	175
Figure 3.153 : Spectre RMN ^1H du composé Pm8 (CD ₃ OD, 500MHz)	175
Figure 3.154 : Spectre RMN ^1H du composé Pm8 (partie 3.20-3.95ppm)	176
Figure 3.155 : Spectre RMN ^{13}C <i>J</i> -modulé du composé Pm8 (CD ₃ OD, 125MHz)	177
Figure 3.156 : Spectre COSY du composé Pm8	177
Figure 3.157 : Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Pm8	178
Figure 3.158 : Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Pm8 (0.90-2.60ppm)	179
Figure 3.159 : Spectre HMBC du composé Pm8 (partie 0.90-2.60ppm)	180
Figure 3.160 : Spectre HMBC du composé Pm8	180
Figure 3.161 : Spectre COSY du composé Pm8 (partie osidique)	181
Figure 3.162 : Spectre HSQC <i>J</i> -modulé du composé Pm8 (partie osidique)	181
Figure 3.163 : Spectre HMBC du composé Pm8 (partie osidique)	182
Figure 3.164 : Spectre ROESY du composé Pm8	182

Liste des Tableaux

Tableau 2.1 : Rendement des extraits de <i>Cotula anthemoides</i> L	50
Tableau 2.2 : Fractionnement de la phase <i>n</i> -BuOH sur VLC	52
Tableau 2.3 : Rendements des extraits <i>Pentzia monodiana</i> Maire.	57
Tableau 2.4 : Fractionnement de l'extrait acétone sur CC.....	59
Tableau 2.5: Flash chromatographie de la fraction C22 sur colonne de gel de silice normale....	62
Tableau 2.6: Flash chromatographie de la fraction C24-25 sur colonne greffée C ₁₈	63
Tableau 3.1: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Ca1 dans CD ₃ OD.	81
Tableau 3.2: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Ca2 dans CD ₃ OD.....	85
Tableau 3.3: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (600 MHz) et RMN ¹³ C (150 MHz) du composé Ca3 dans CD ₃ OD.....	89
Tableau 3.4: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du Composé Ca4 dans CD ₃ OD.....	93
Tableau 3.5: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Ca5 dans CD ₃ OD.....	98
Tableau 3.6 : Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Ca6 dans DMSO.....	101
Tableau 3.7: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Ca7 dans CD ₃ OD.....	107
Tableau 3.8: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Ca8 dans CD ₃ OD.....	110
Tableau 3.9: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (600 MHz) et RMN ¹³ C (150 MHz) du composé Ca9 dans CD ₃ OD.....	115
Tableau 3.10: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Ca10 dans CD ₃ OD.....	119
Tableau 3.11: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (600 MHz) et RMN ¹³ C (150 MHz) du composé Ca11 dans CD ₃ OD.....	123
Tableau 3.12: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (600 MHz) et RMN ¹³ C (150 MHz) du composé Ca12 dans CD ₃ OD.....	125
Tableau 3.13: Déplacements chimiques en RMN ¹ H (500 MHz) et RMN ¹³ C (125 MHz) du composé Ca13 dans CD ₃ OD.....	129

Tableau 3.14: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Ca14 dans CD_3OD	137
Tableau 3.15: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Ca15 dans CD_3OD	143
Tableau 3.16: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Pm1 dans CD_3OD	150
Tableau 3.17: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Pm2 dans CD_3OD	153
Tableau 3.18: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Pm3 dans CD_3OD	157
Tableau 3.19: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Pm4 dans CD_3OD	161
Tableau 3.20 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Pm5 dans CD_3OD	165
Tableau 3.21: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Pm6 dans CD_3OD	168
Tableau 3.22: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Pm7 dans CD_3OD	174
Tableau 3.23: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Pm8 dans CD_3OD	183

Liste des Abréviations

Solvants et réactifs :

AcOEt	acétate d'éthyle
MeCN	acétonitrile
NaOAc	Acétate de sodium
TFA	acide trifluoroacétique
BHT	Hydroxytoluène butylé
BHA	Hydroxyanisole butylé
EDTA	Acide Ethylenediaminetetraacetic

Techniques de chromatographie :

CCM	chromatographie sur Couche Mince
CLHP	chromatographie Liquide Haute Performance
VLC	chromatographie liquide sous vide
L	litre
mL	millilitre
min	minute
Rdt	rendement

Détermination structurale :

COSY	COrelated SpectroscopY
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublets
<i>ddd</i>	doublet de doublets de doublets
<i>dddd</i>	quintuplet de doublet
<i>dt</i>	doublet de triplets
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Connectivity
rOe	rotation Overhauser effect
ROESY	ROtating Overhauser Effect SpectroscopY
<i>J</i> (Hz)	constante de couplage exprimée en Hertz
<i>m</i>	multiplet
ppm	parties par million
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<i>s</i>	singulet
<i>t</i>	triplet
<i>td</i>	triplet de doublets

HR-FAB-MS High Resolution Fast-Atom Bombardment Mass Spectroscopy;

m/z masse/charge électrique

UV Ultra-Violet

δ_C Déplacement chimique du carbone en ppm

δ_H Déplacement chimique du carbone en ppm

Activités biologiques :

IC₅₀ Inhibition Concentration (Concentration inhibitrice à 50%)

Codes des extraits

EBCA Extrait *n*-Butanol de *Cotula anthemoides* L

EACA Extrait Acétate d'éthyle de *Cotula anthemoides* L

ECCA Extrait Chloroforme *Cotula anthemoides* L

EBPM Extrait *n*-Butanol de *Pentzia monodiana* Maire

EAPM Extrait Acétate d'éthyle *Pentzia monodiana* Maire

EACPM Extrait Acétone *Pentzia monodiana* Maire

ECPM Extrait Chloroforme *Pentzia monodiana* Maire

Ca Produit isolé de *C anthemoides*

Pm Produit isolé de *Pentzia monodiana*

Introduction Générale

La recherche de nouvelles molécules naturelles d'intérêt thérapeutique et le développement de nouvelles méthodologies de synthèse de molécules actives, constituent à juste titre deux axes majeurs de la recherche en chimie organique. Ainsi, l'industrie pharmaceutique moderne s'inspire largement de métabolites secondaires végétaux, pour la recherche de principes actifs nouveaux. Le taxol, la morphine et la vinblastine pour ne citer que ces composés, sont des exemples révélateurs.

Dans cette perspective, notre laboratoire d'obtention des substances thérapeutiques a entrepris un programme de recherche destiné à la valorisation de la flore algérienne, par la découverte des principes actifs originaux qui ont toujours pris une part importante dans la découverte de médicaments majeurs (Newman & Cragg 2007). En effet, de nombreuses sources naturelles (champignons, micro-organismes, organismes marins) sont à l'origine de nouveaux principes actifs "chef de file", mais les plantes sont historiquement les plus utilisées : on estime que parmi les 303 000 espèces de plantes terrestres connues (Dupont et al., 2012), à peine 1% d'entre elles ont fait l'objet d'études pharmacologiques. Il reste donc potentiellement de nombreux principes actifs à découvrir.

La flore algérienne compte près de 3139 espèces naturelles et près de 5128 espèces exotiques introduites représentées surtout par des espèces ornementales [1], plus de 900 d'entre elles sont rares, très rares ou endémiques, dont certaines n'ont pratiquement jamais fait l'objet d'études phytochimiques poussées et encore moins d'études pharmacologiques, comme c'est le cas de l'espèce *Pentzia monodiana* que nous avons abordée dans cette étude. Parmi les familles botaniques les mieux représentées en Algérie, on distingue les Asteraceae avec plus de 400 espèces. La flore du Sahara central est estimée à 480 espèces de plantes vasculaires, plus de la moitié d'entre elles sont rencontrées dans le massif du Hoggar (Ozenda 1991), dont une trentaine sont des plantes aromatiques.

Notre travail vise principalement à valoriser une bioressource originale de l'extrême sud algérien en démontrant le potentiel thérapeutique de deux espèces de plantes aromatiques sahariennes *Cotula anthemoides* L et *Pentzia monodiana* Maire

Le présent travail consiste à effectuer :

- ❖ L'extraction, l'isolement et l'identification des métabolites secondaires des deux plantes *Cotula anthemoides* et *Pentzia monodiana* de la famille des Asteraceae
- ❖ Les activités biologiques des extraits de ces deux espèces.

❖ L'activité antioxydante et antityrosinase des métabolites secondaires obtenus

Le manuscrit comprend trois parties :

➤ La première a été consacrée à des généralités et données bibliographiques, comportant une présentation botanique et phytochimique de la famille des Asteraceae, des genres *Cotula* et *Pentzia* et des espèces *Cotula anthemoides* et *Pentzia monodiana*.

➤ La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans nos travaux d'extraction, d'isolement et de purification des métabolites secondaires de l'espèce *Cotula anthemoides* et *Pentzia monodiana*, puis les tests biologiques effectués sur les deux espèces.

➤ La troisième partie comprend les résultats et discussion : l'identification des métabolites isolés des deux plante *Cotula anthemoides* et *Pentzia monodiana* ainsi que l'étude des activités antioxydante et anticholinestérase des extraits des plantes étudiées puis l'activité antioxydante et antityrosinase des produits purs isolés.

PARTIE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Aperçu bibliographique sur les Asteraceae

I. 1. Généralités sur les Asteraceae

I. 1.1. Introduction

Asteraceae vient du mot « Aster » du grec qui signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. La famille des Asteraceae est la plus large famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 24 000 espèces réparties en 1700 genres (Kadereit & Jeffrey 2007). En Algérie, cette famille compte environ 109 genres et plus de 408 espèces (Quezel & Santa 1963).

Les Asteraceae ont une distribution mondiale, étant trouvée partout sauf en Antarctique. Elles sont surtout nombreuses aux régions tropicales et subtropicales semi-arides, à la Toundra alpine et arctique et aux régions tempérées. Elles sont, en revanche, peu présentes dans la forêt tropicale. Ce sont presque toujours des plantes herbacées avec souvent des racines charnues : rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes (Crete 1965).

I. 1.2. Description botanique

Cette famille présente des caractères morphologiques divers : herbes annuelles ou vivaces, plus rarement des arbustes, arbres ou plantes grimpantes et quelques fois, plantes charnues (Bonnier 1934). Généralement, se sont des plantes herbacées à feuilles isolées (Crete 1965).

Les Asteraceae ont la caractéristique commune d'avoir des fleurs réunies en capitules c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige ou entourées d'une structure formée par des bractées florales. Cette structure en forme de coupe ou de collerette est appelée un involucre (Barkely et al., 2006) .

La fleur des Asteraceae est très particulière: les étamines sont soudées par leurs anthères déhiscentes vers l'intérieur. Sous les stigmates sont situées des "brosses à pollen". Ceci est adapté à un mode de pollinisation «à piston». La croissance rapide du style permet un brossage du pollen et sa récupération. Une fois que le stigmate a traversé le tube formé par les anthères, les stigmates se déplient et exposent leur face gluante au pollen. Il faut considérer qu'à ce moment-là, du nectar est sécrété.

Cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques: le capitule. Ce dernier est formé uniquement de fleurs tubulées (artichaut), ligulées (pissenlit) ou de fleurons périphériques ligulés entourant un disque de fleurons tubulés (marguerite) sous-tendu par un involucre de bractées disposées sur un à plusieurs rangs (figure 1.1) [2]. Les bractées peuvent être herbacées, scarieuses ou

épineuses. Sur le réceptacle, les bractéoles, si elles sont présentes, peuvent prendre la forme d'écaillés, de soies ou de paillettes. Le capitule est entouré à la base généralement par 1 à 6 séries de bractées dont l'ensemble forme l'involucre.

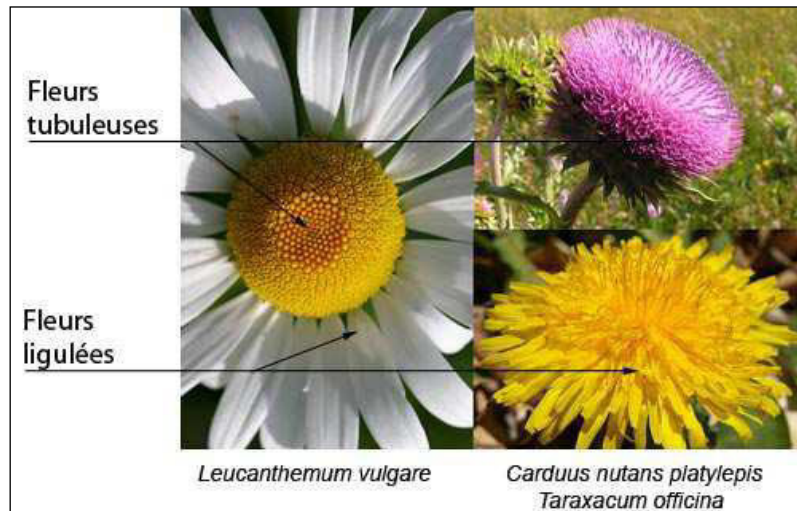


Figure 1.1: Types de fleurs des Asteraceae [2]

Les feuilles sont souvent alternes, et parfois en face, ou verticillées. Elles peuvent être simples, mais sont souvent profondément lobées ou incisées. Les marges peuvent être entières ou dentées.

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée Pappus qui favorise la dispersion des graines par le vent (figure 1.2) [3]

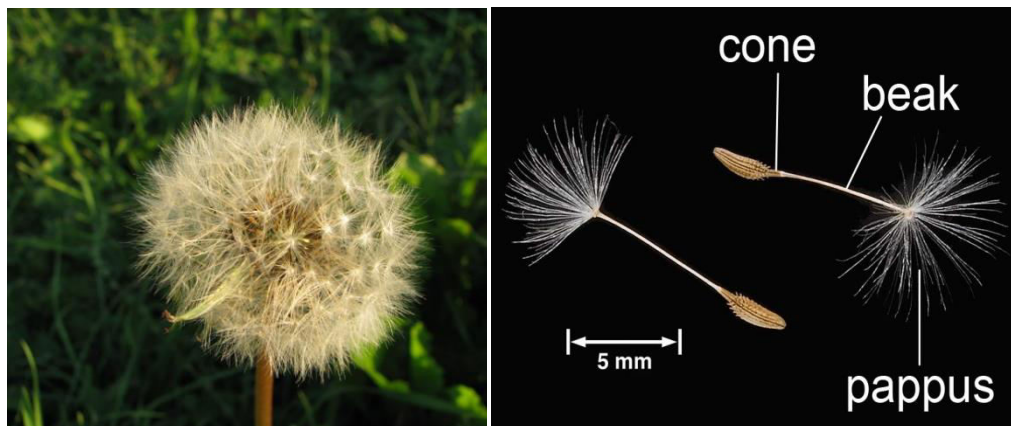


Figure 1.2: Le fruit de *Taraxacum campylodes* (Asteraceae) [3]

Les racines des Asteraceae sont pivotantes et quelquefois fibreuses alors que les tiges sont généralement droites, mais tombent quelque fois au fait de s'élever. Quelques espèces ont des tiges souterraines dans la forme de caudices ou de rhizomes, ceux-ci peuvent être charnus ou boisés selon les espèces.

I. 1.3. Répartition géographique des Asteraceae

Les Asteraceae ont une distribution mondiale, étant trouvée partout sauf en Antarctique. Ils sont surtout nombreux dans les régions tropicales et subtropicales. L'Amérique du Sud compte le plus grand nombre d'espèces d'Asteraceae avec 6316 suivies par l'Asie (6016 spp.), l'Amérique du Nord (5404 spp.), l'Afrique (4631 spp.), l'Europe (2283 spp.), l'Océanie (1444 spp.), et la région Pacifique de l'Islande (174 spp.) (Figure 1.3).

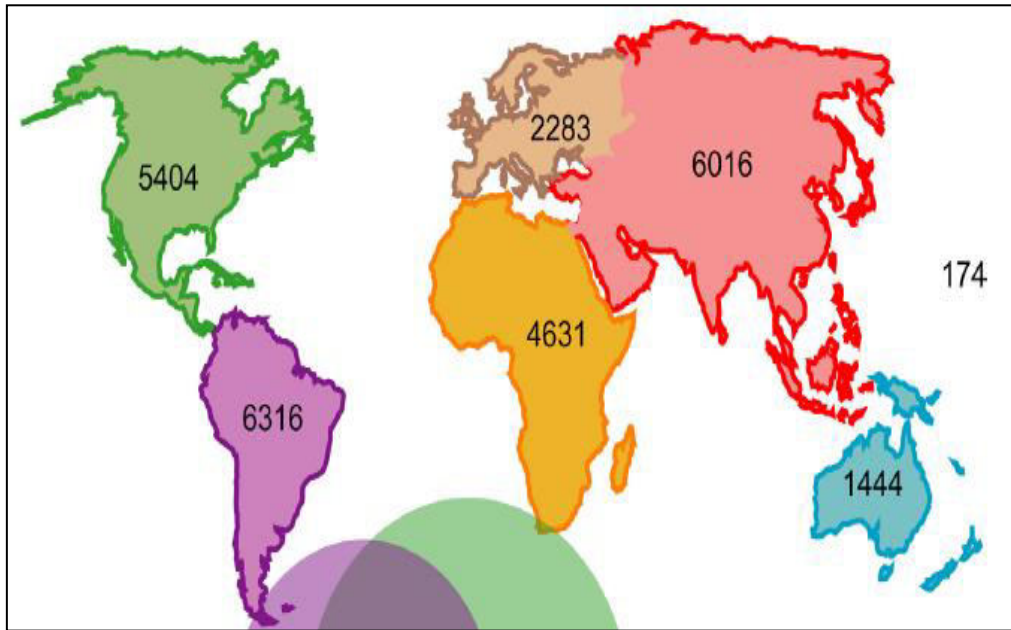


Figure 1.3: Cartes de répartition mondiale et la richesse en espèces d'Asteraceae (Panero & Crozier 2016 ; [4]).

I. 1.4. Position systématique de la famille des Asteraceae APG IV (*Angiosperm Phylogeny Group*)

Selon la classification phylogénétique III, les Asteraceae peuvent être subdivisées en cinq sous-familles: Barnadésioïdées, Mutisioïdées, Carduoïdées, Cichorioïdées et Astéroïdées (*Asteroideae*) cette dernière qui appelée également Radiées et regroupent plus de 60% des espèces d'Asteraceae, qui ne possèdent pas de laticifères et qui partagent toutes le caractère "radié" de leur capitule. Celui-ci, comporte au centre des fleurs tubulées jaunes et à la périphérie des fleurs à ligules tridentées blanches ou jaunes. Elle comporte aussi des espèces ayant perdu secondairement leurs fleurs ligulées (Dupont et al. 2012), et d'après le NCBI (National Center for Biotechnology Information), vingt tribus constituent cette sous-famille : *Anthemideae*, *Astereae*, *Athroismeae*, *Bahieae*, *Calenduleae*, *Chaenactideae*, *Coreopsideae*, *Doronicaceae*, *Eupatorieae*, *Gnaphalieae*, *Helenieae*, *Heliantheae*, *Inuleae*, *Madieae*, *Neurolaeneae*, *Perityleae*, *Plucheeae*, *Polymnieae*, *Senecioneae* et *Tageteae* [5].

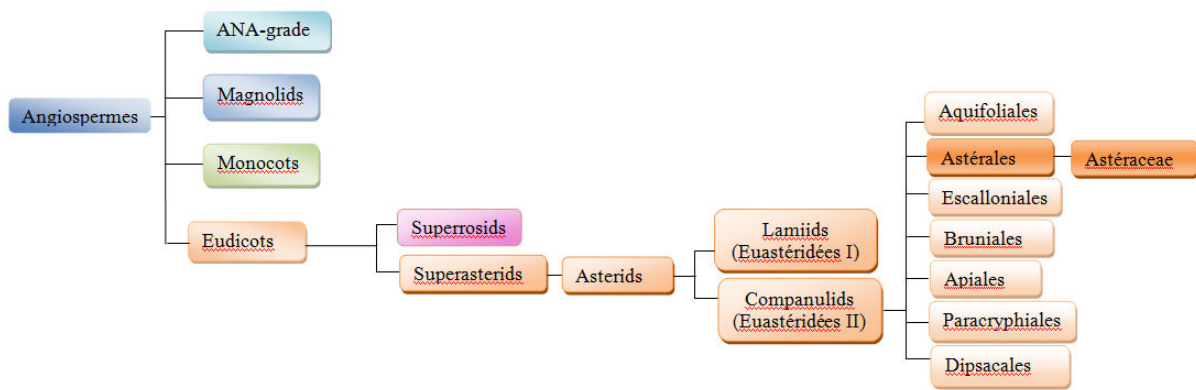


Figure 1.4: Position des Asteraceae par rapport à la classe des Angiospermes (Chase et al., 2016 ; Cole et al., 2018).

I. 1.5. Composition chimique des Asteraceae

La biosynthèse des métabolites secondaires des espèces de cette famille capables de les prémunir efficacement contre les prédateurs semble s'orienter de plus en plus vers les lactones sesquiterpéniques (Seaman 1982 ; Hristozov et al., 2007 ; Staneva et al., 2008), les diterpènes (Safer et al., 2011), les triterpènes (Calabria et al., 2008) et les dérivés polyacétyléniques (Christensen 1992 ; Christensen & Lam 1991). Pratiquement, les alcaloïdes pyrrolizidiniques qui sont seulement synthétisés chez quelques espèces d'Asteraceae comme *Eupatorium cannabinum*, *Senecio jacobaea*, *Senecio vulgaris* et *Tussilago farfara* (Bruneton 2009). L'autre caractéristique phytochimique de cette grande famille botanique est son aptitude à élaborer plus de 800 flavonoïdes différents, regardés par certains auteurs comme des marqueurs chimiotaxonomiques pertinents dans la classification des espèces au sein des Asteraceae (Emerenciano et al., 2001 ; Bohm & Stuessy 2001 ; Williams et al., 2001), comme les lactones sesquiterpéniques (Hristozov et al., 2007 ; Staneva et al., 2008).

I. 1.6. Utilisation économique et thérapeutique des Asteraceae

Cette large famille possède des vertus thérapeutiques et économiques importantes :

- Un intérêt économique important, elle fournit des plantes alimentaires: telle que la laitue qui est la plante la plus cultivée de la famille, suivie de l'artichaut, de l'endive, du salsifis, de la chicorée, de l'estragon et du tournesol (Brighenti 2007 ; Adolphi et al., 2009).
- Une utilisation ornementale, telle que la marguerite, le dahlia, le zinnia, le cosmos, le chrysanthème et l'aster (Pavelaa et al., 2010 ; Rugutt et al., 1999)
- Utilisées en pharmacie comme l'Arnica (*Arnica montana* L.), la camomille (*Matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.), le pied de chat (*Antenaria*

Djioca Gartn), le tussilage (*Tussilago farfara* L.) (Alaniz et al., 2010 ; Chenuet 2007)

Certains, comme le genre *Pyrethrum*, fournissent un insecticide, d'autres (genre *Artemisia*) sont utilisés comme plantes médicinales et dans la fabrication de liqueurs comme l'absinthe ou le génépi (Gaussen & Leroy 1982).

I. 2. Aperçu bibliographique sur le genre *Cotula*

La flore algérienne comprend plus de 400 espèces d'Asteraceae groupées en 109 genres (Quézel & Santa 1962 ; Baba aissa 1999). Sur les 95 espèces d'Asteraceae sahariennes, 46 sont présentes au Sahara central et une vingtaine d'espèces ont été signalées au Hoggar (Ozenda 1991). Parmi les plantes médicinales les plus fréquentes de cette famille, nous avons observé et collecté des échantillons de deux espèces *Cotula anthemoides* L. et *Pentzia monodiana* Maire.

I. 2.1. Présentation du genre *Cotula*

Cotula c'est le plus large genre de la tribu des *Anthemideae* et l'un des genres les plus évolués de la famille des Asteraceae. Il comprend environ 80 espèces (Heywood et al., 1977), parmi ces espèces trois sont représentées dans la flore algérienne : *C. cinerea* Del., *C. coronopifolia* L et *C. anthemoides* L (Dendougui et al., 2012 ; Tadrent et al., 2014a, b).

I. 2.2. Description Botanique

Herbes poilues annuelles ou vivaces à croissance lente, parfumées, avec des feuilles alternées, parfois opposées ou rosulées. Involucre bi-sérié, phyllaries subégales, marge scarieuse. Capitule petit à médiocre, pédonculé, hétérogames ou homogames, disciforme ou discoïde, rarement rayonnant, terminal solitaire. Réceptacle plat à conique. Fleurs externes ou rayons femelles, fertiles, uni- à multi-sériés, plus nombreuses que les fleurons discoïdes, sans ou avec une corolle courte, à 2-4 dents, conique. Disc-fleurons bisexués, peu pédicellés, fertiles ou stériles, avec un tube jaune à 4 dents. Anthères obtus, entiers, ovés-appendiculaires. Branches de style obtuses ou tronquées, incluses. Les fruits stipitent, dorsalement comprimées, ailées ou marginées, Akènes souvent ailés, glabres, à 1-4 nervures et chauves (Lloyd 1972 ; [6]).

I. 2.3. Répartition géographique

Les espèces du genre *Cotula* sont trouvées en Nouvelle Zélande, en Afrique du Sud et certaines sont également étendues à l'Australie, l'Asie, l'Amérique du Sud, l'Afrique du Nord

et la Nouvelle-Guinée (Van Royen & Lloyd 1975) et seulement trois espèces sont rapportées au Pakistan (Shabbir & Mujahid 2017).

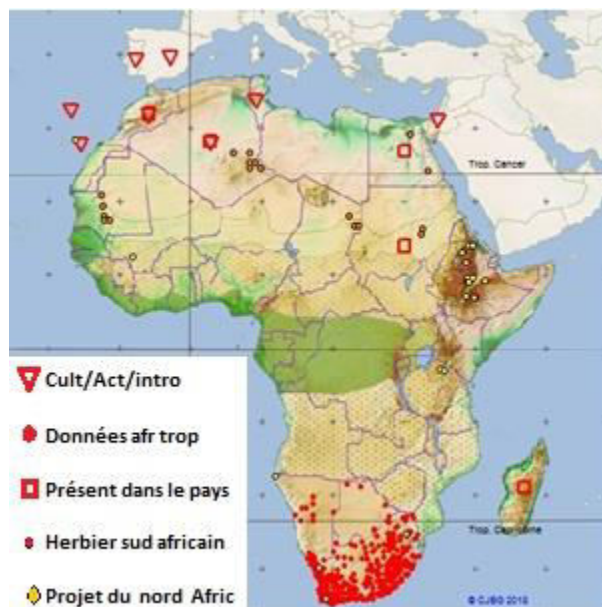
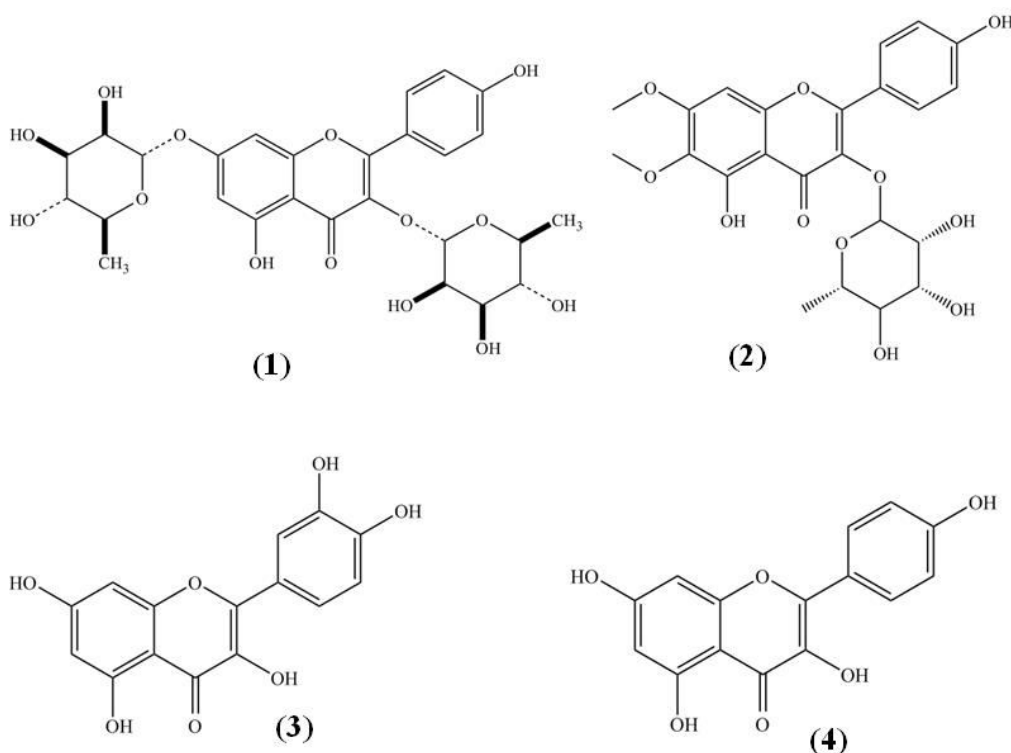


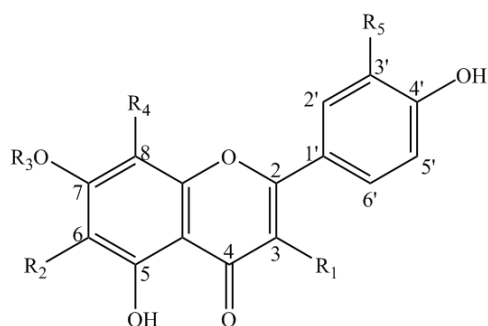
Figure 1.5 : Répartition géographique du genre *Cotula* dans le nord Africain [7]

I. 2.4. Les métabolites isolés du genre *Cotula*

Une étude chimique réalisée sur la partie aérienne de *C. cinerea* L., qui pousse en Egypte, a permis d'identifier les composées suivants : kaempferitine (1), quercétrine (2), quercétine (3), et kaempferol (4) (Mahran et al., 1976).

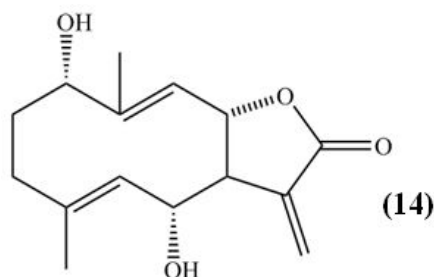


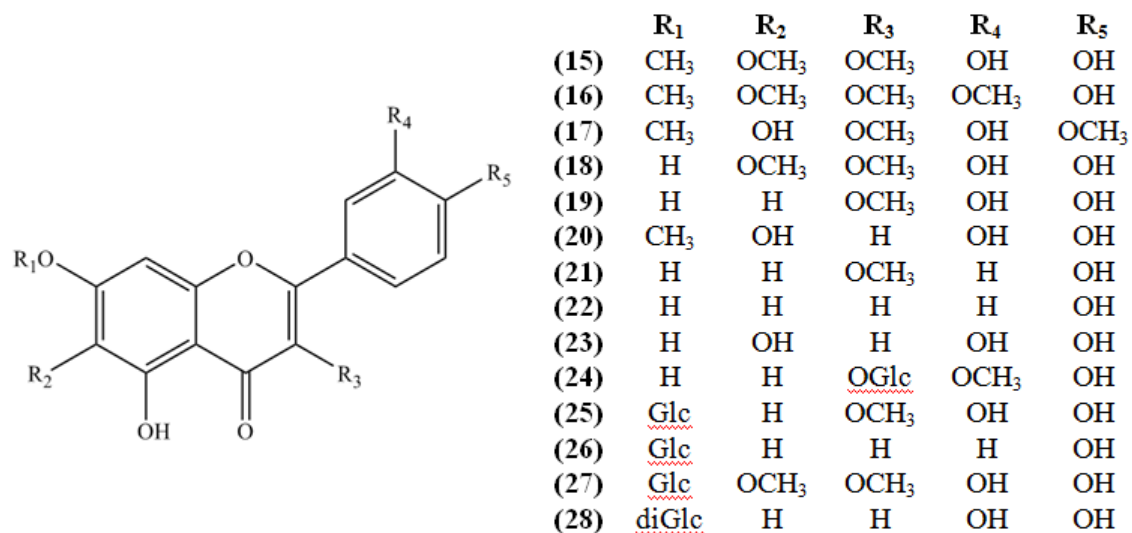
L'espèce égyptienne *C. cinerea* (L.) a également fait l'objet d'une autre investigation chimique qui a abouti à l'isolement de la lutéoline (5), et ses dérivées : lutéoline-7-O-β-D-glucoside (6) et lutéoline 6-hydroxy-7-O-β-D-glucoside (7), lutéoline 7-O-β-D-diglucoside (8), ainsi que l'apigénine-7-O-α-L-rhamnoside (9), Ces structures, avec l'isoschaftoside (10), sont les principaux constituants flavoniques de cette espèce en plus des dérivés de la quercétine : 3-O-β-D-glucoside (11), 3-O-β-D-galactoside (12), et 7-O-β-D-glucoside (13). (Ahmed et al., 1987).



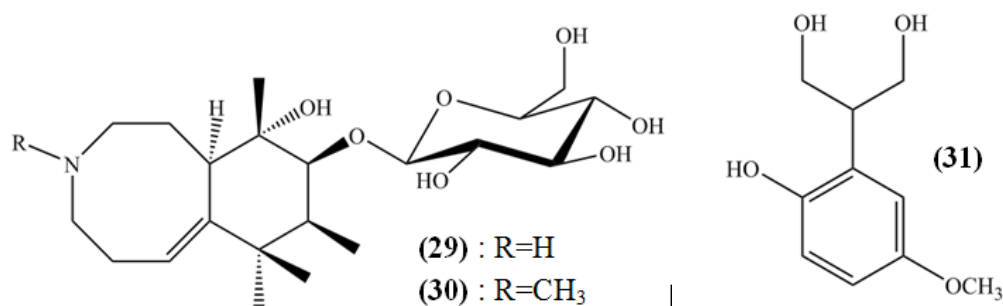
	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅
(5)	H	H	H	H	OH
(6)	H	H	Glc	H	OH
(7)	H	OH	Glc	H	OH
(8)	H	H	Glc-Glc	H	OH
(9)	H	H	RHa	H	H
(10)	H	Ara	H	Glc	H
(11)	O-Glc	H	H	H	OH
(12)	O-Gal	H	H	H	OH
(13)	OH	H	Glc	H	OH

Une étude phytochimique des parties aériennes de *Cotula cinerea* poussant en Algérie (Dendougui et al., 2012) a conduit à l'identification d'un germacranolide : 1α,6α-dihydroxygermacra-4E,9Z,11(13)-trien-12,8α-olide (14) et 17 flavonoïdes: chrysospenol-D (15), chrysosplenétine (16), oxyyanine-B (17), axillarine (18), 3-méthylquercétine (19), pedaletine (20), Isokaempferid (21), apigénine (22), lutéoline (5), 6-hydroxylutéoline (23), 3-glucosylisorhamnétine (24), 3-méthyl-7-glucosylquercétine (25), 7-O-α-D-glucosylapigénine (26), 7-O-β-D-glucosyllutéoline (6), 7-O-β-D-glucosylquercétine (13), 7-O-α-D-glucosylaxillarine (27), 7-O-β-D-diglucosyl lutéoline (28).

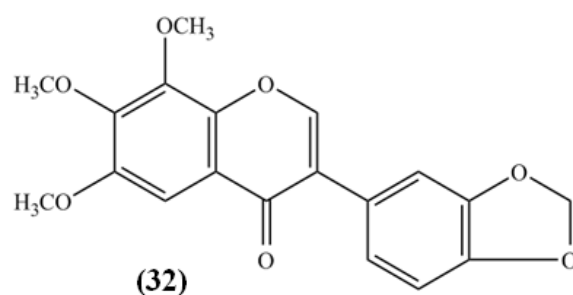




Deux alcaloïdes : Cotuzine A **(29)** et B **(30)** et un dérivé phénolique (2-(2'-hydroxy-5'-methoxyphenyl) propane-1,3-diol) (corimen) **(31)** ont été isolés de l'espèce *Cotula coronopifolia* (Mahjoub et al., 2012).

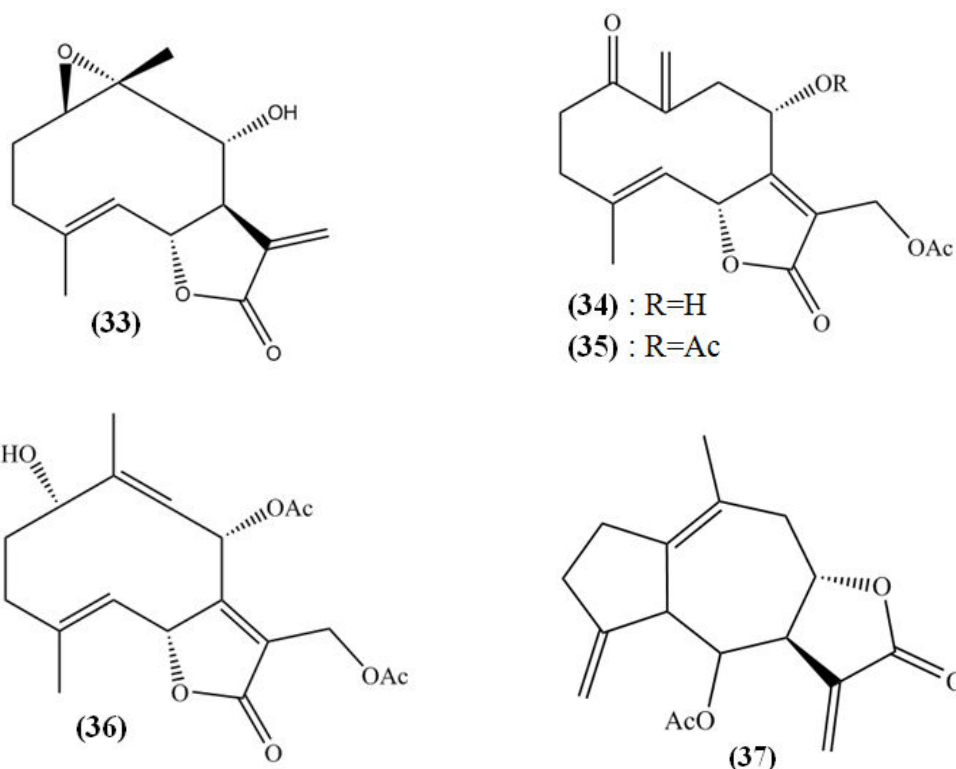


Une étude de la plante *Cotula hispida* a permis d'isoler un nouveau isoflavonoïde : 3β-Isovaleryloxycostunolide **(32)** (Bohlmann & Zdero 1979).

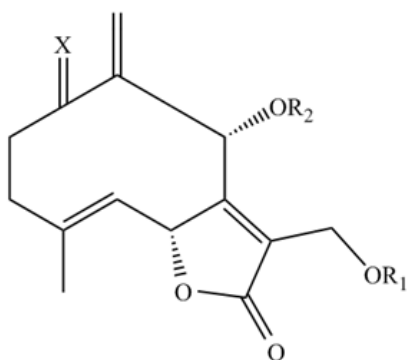
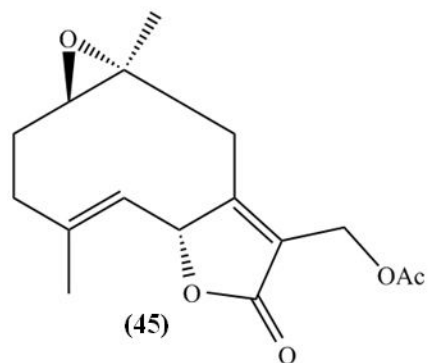
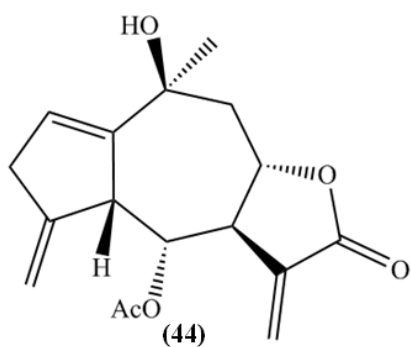
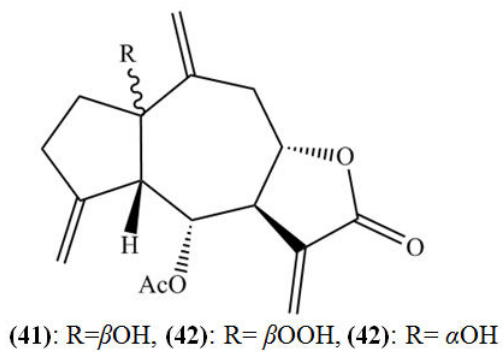
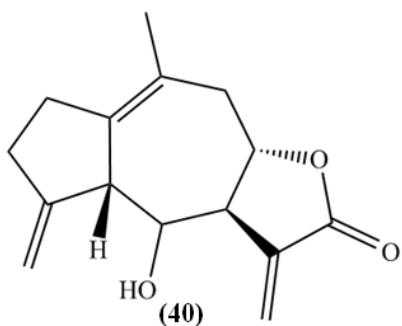
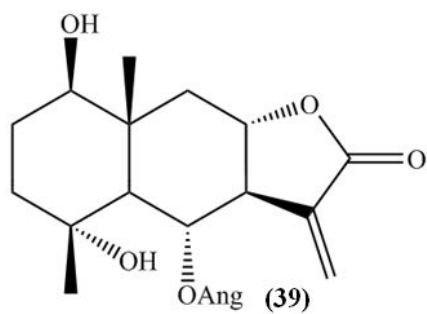
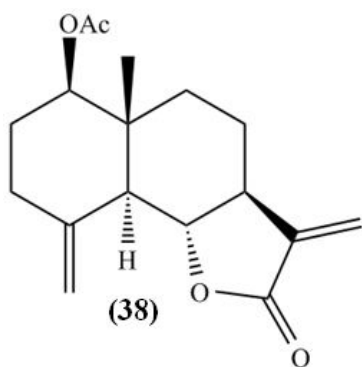


D'autres études effectuées sur *Cotula cinerea* à partir des parties aériennes a permis d'isoler cinq sesquiterpènes dont 4 germacranolide et un guaïanolide (Metwally et al., 1986) : Deacetyl tulipinolide-1β,10α-epoxide **(33)** ; 13-Acetoxy-8-α-hydroxy-7,11-dehydro-11,13-dihydroanhydro-verlotorin **(34)** ; 8α,13-diacetyloxy-7,11-dehydro-11,13-dihydroanhydro-

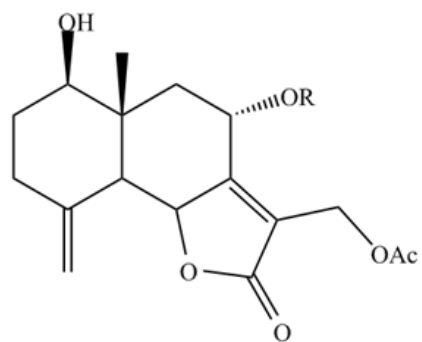
velotorin **(35)** ; 8 α ,13-diacetoxy-1 α -hydroxygermacro-4E, 7(11), 9Z-trien-6 α , 12-olide **(36)** ; 6-*epi*-1,10-dehydro-10,14-dihydrochrysostamolide acétate **(37)**.

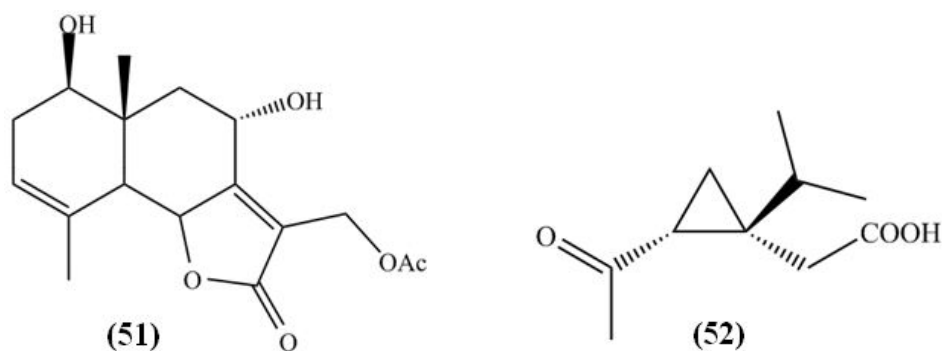


D'autres sesquiterpènes lactones ont été détectés dans l'espèce *Cotula cinerea* parmi eux deux eudesmanolides, cinq guaianolides et sept glaucolides, trois d'entre eux avec un squelette eudesmane et quatre avec un squelette germacrane : Reynosin acetate **(38)**; 6 α -angeloyloxy-1 β ,4 α -dihydroyeudesm-11(13)-en-8 α ,12-olide **(39)**; 6 α -hydroxyguaia-1(10),4(15),11(13)-trien-8 α ,12-olide **(40)**; 6 α -acetoxy-1 β -hydroxyguaia-4(15),10(14),11(13)-trien-8 α ,12-olide **(41)**; 6 α -acetoxy-1 β -hydroxyperoxyguaia-4(15),10(14),11(13)-trien-8 α ,12-olide **(42)**; 6 α -acetoxy-1 α -hydroxyguaia-4(15),10(14),11(13)-trien-8 α ,12-olide **(43)**; 6 α -acetoxy-10 β -hydroxyguaia-1, 4(15), 11 (13)-trien-8 α ,12-olide **(44)** ; 13-acetoxy-9 β -hydroxy-1 β ,10 α -epoxygermacra-4,7(11)-dien-6 α ,12-olide **(45)** ; 8 α ,13-diacetoxy-1 α -hydroxygermacra-4,7(11),10(14)-trien-6 α , 12-olide **(46)** ; 8 α ,13-diacetoxy-1 β -hydroxygermacra-4,7(11),10(14)-trien-6 α ,12-olide **(47)** ; 8 α ,13-dihydroxy-1-oxo-germacra-4,7(11), 10 (14)-trien-6 α ,12-olide **(48)** ; 13-acetoxy-1 β ,8 α -dihydroyeudesma-4(15),7(13)-dien-6 α ,12-olide **(49)**; 8 α ,13-diacetoxy-1 β -hydroxyeudesma 4(15), 7(13)-dien-6 α ,12-olide **(50)**; 13-acetoxy-1 β ,8 α -dihydroxyeudesma-3,7(13)-dien-6 α ,12-olide **(51)**; seco-thujene **(52)** (Jakupovic et al., 1988).

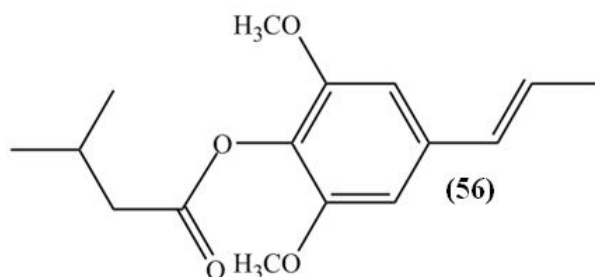
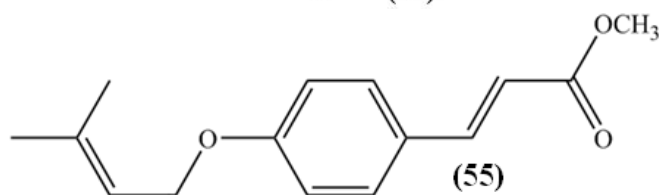
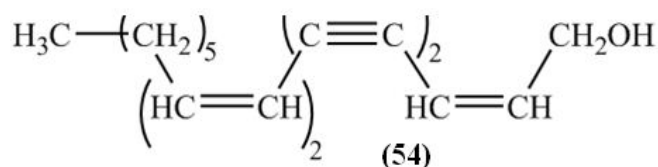
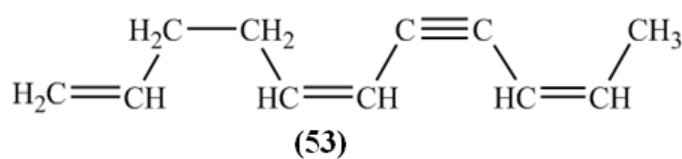


	R ₁	R ₂	X
(46)	Ac	Ac	H
(47)	Ac	Ac	H
(48)	α OH, H	β OH, H	O





Soerensen et col. (Soerensen et al., 1968) ont étudié sept espèces du genre *Cotula* de l'Australie. Deux composés acétyléniques ont été isolés de *C. bipinnata* comportant un pentadeca-2,8,10,14-tetraene-4,6-diyne (**53**) alors que 2-*cis*-heptadeca-2,8,10-triene-4,6-diyne-1-ol (**54**) a été isolé de *C. plumosa*. L'étude de l'espèce *C. filicula* a permis d'isoler les composés méthyl-4-isopentenoxyacinnamate (**55**) et le 3,5-diméthoxy-1- α -propenylphényl-4-isovalérate (**56**).



L'étude des chémotypes d'huiles essentielles de genre *Cotula* a montré que le santolinatriène, le thujone et le camphre sont principalement communs dans la composition des huiles essentielles de ce genre (Fournier et al., 1989 ; Tadrent et al., 2014a,b ; El Bouzidi et al., 2011).

I. 2.5. Utilisation en médecine traditionnelle du genre *Cotula*

Les plantes du genre *Cotula* sont largement utilisées en médecine populaire, telle que *Cotula cinerea*, connue sous le nom «Al gartoufa», qui est utilisée en médecine traditionnelle marocaine comme anti-inflammatoire, antalgique, antiseptique et pour le traitement du système digestif (Bellakhdar 1997). En plus, elles sont indiquées pour les coliques, les diarrhées, la toux et le refroidissement bronchopulmonaire (Ould El Hadj et al., 2003).

I.2.6. Activités biologiques reconnues du genre *Cotula*

Le genre *Cotula* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées.

L'étude des extraits ainsi que le principe actif isolé « 6-méthoxy-1-benzofuran-4-ol » de la plante aquatique *Cotula coronopifolia* L présentent des effets antibactériennes et antifongiques (Liouane et al., 2012). Une étude biologique *in vitro* sur l'huile essentielle de la même plante a montré une activité antioxydante et antifongique (Kether et al., 2012).

Le comportement anticorrosif des parties aériennes de *C. cinerea* a été évalué par la méthode de polarisation potentiodynamique. Les résultats ont révélé que la plante pourrait servir d'inhibiteurs efficaces avec un pourcentage d'inhibition de (95%). (Dakmouche et al., 2012 ; Benmenine et al., 2011).

Des études biologiques ont été effectuées sur les extraits de la plante *Cotula cinerea* (L.) poussant en Maroc. Les résultats ont révélé que l'extrait hydro-alcoolique est très actif contre *Bulinus truncatus* (Redwane et al., 1998). La même espèce a été testée contre les larves de moustiques *Anopheles labranchiae* présentant une activité larvicide élevée avec les valeurs de LC₅₀ (24h) allant de 28 à 325 ppm (Markouk et al., 2000). Une autre étude a montré que cette espèce possède des effets antipyrétiques (Larhsini et al., 2002). Markouk et ses collaborateurs en 1999 ont mis en évidence l'effet antiprotozoaire significatif des extraits éther éthylique, acétate d'éthyle et *n*-butanol de *C. cinerea* L. contre deux espèces de *Trichomonas*: *Trichomonas intestinalis* et *Trichomonas vaginalis* (Markouk et al., 1999a). L'effet analgésique était significatif pour l'extrait éther éthylique, seulement (Markouk et al., 1999b).

L'huile essentielle de *C. cinerea* présente plusieurs activités biologiques antibactérienne et antifongique (Boussoula et al., 2016 ; El Bouzidi et al., 2011).

Une étude récente a évalué la toxicité aigüe et l'activité analgésique des extraits et de l'huile essentielle de *cotula cinerea* récoltée en Maroc. L'extrait *n*-butanol a montré une diminution significative de la douleur pour les deux tests : Tail-flick (14.69 sec) et Hot plate

(25.56 sec) produisant la réduction la plus élevée par rapport à la morphine (12.58 sec; 24.13 sec) respectivement. En plus, tous les extraits de *Cotula cinerea* administrés par voie orale possèdent un effet analgésique chez les animaux traités. Donc, Les extraits et l'huile essentielle de cette espèce pourraient être suggérés comme un médicament pour le traitement de la douleur (Guaouguaou et al., 2017).

I.3. Aperçu bibliographique sur l'espèce *Cotula anthemoides* L.

I. 3.1. Présentation de l'espèce *Cotula anthemoides* L.

Nos travaux phytochimiques concernent l'espèce *Cotula anthemoides* L, c'est une plante également connue sous le nom vernaculaire: Babunaj, son synonyme *Nananthae tassiliensis* Batt (Ozenda 1958).

I. 3.2. Description botanique de l'espèce *Cotula anthemoides* L.

Plante herbacée annuelle, droite jusqu'à 30 cm. Feuilles alternes, pinnatisectes à 2 pinnatis avec des lobes dentés, lancéolées dans leur contour, base semi-amplexicaule. Capitules soit hétérogames radiés, soit homogames et parfois dioïques ou polygames-dioïques, porté sur un pédoncule court, de 0.6-1.3 cm de long. Réceptacle variable mais le plus souvent nu. Anthères obtuses à la base, non caudiculées. Fleurs hermaphrodites à style à branches aplaties ou planes-convexes, sans couronne terminale de poils mais plus ou moins poilues sur la face externes. Stigmates en deux lignes marginales non confluentes au sommet au delà duquel les branches se prolongent en appendice. Akènes à aigrette nulle ou variable. Sa floraison est en mars-juillet. La plante est aromatique et ressemble à *Anthemis cotula* [8].

I. 3.3. Répartition géographique de l'espèce *Cotula anthemoides* L.

L'espèce *Cotula anthemoides* L. est très rencontrée dans tout le Sahara, elle pousse dans les ergs et les sols peu ensablés, c'est une espèce saharo-arabique, plus fréquente au Sahara septentrional et Sahara central. Elle est aussi connue dans les régions Sud comme la carte sur la figure 1.6 montre la répartition de cette espèce dans les pays du nord d'Afrique [7].

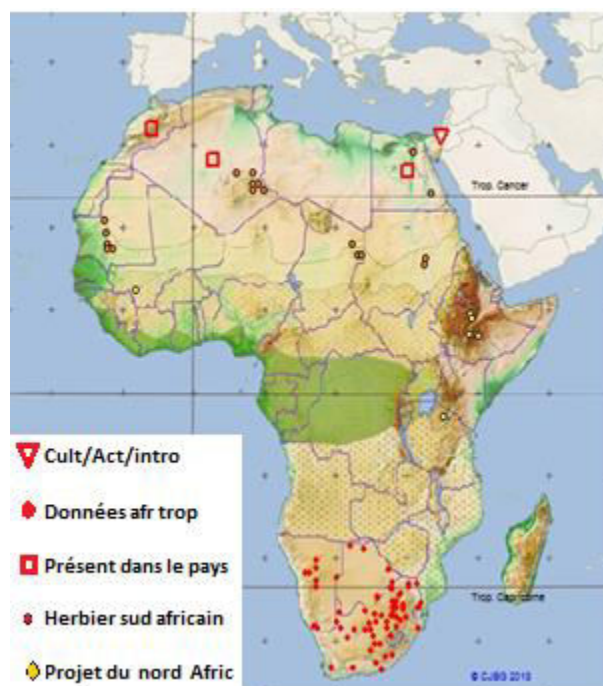


Figure 1.6 : Répartition géographique de l'espèce *Cotula anthemoides* dans l'Afrique du Nord [7]

I. 3.4. Classification systématique de l'espèce *Cotula anthemoides* L.

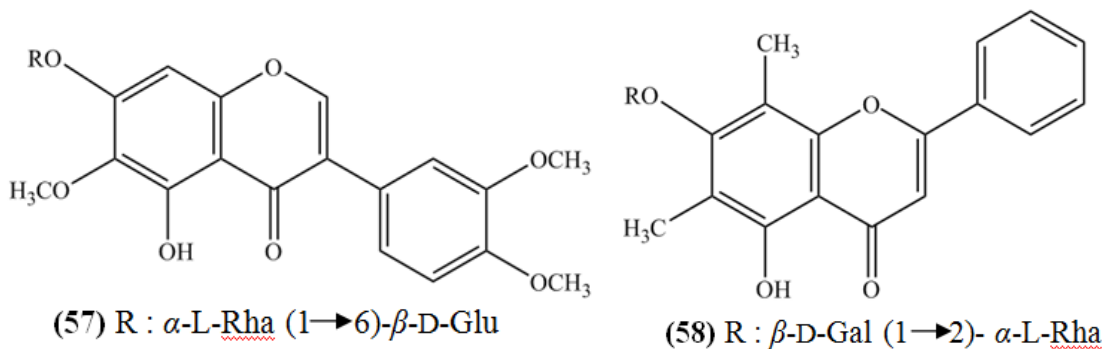
La Taxonomie*(Oberprieler et al., 2007) du *Cotula anthemoides* L dans la classification systématique comme suit :

Famille	Asteraceae
Sous-famille	Asteroideae
Tribu	Anthemideae
Sous-tribu	Cotulinae
Genre	<i>Cotula</i>
Espèce	<i>Cotula anthemoides</i> L

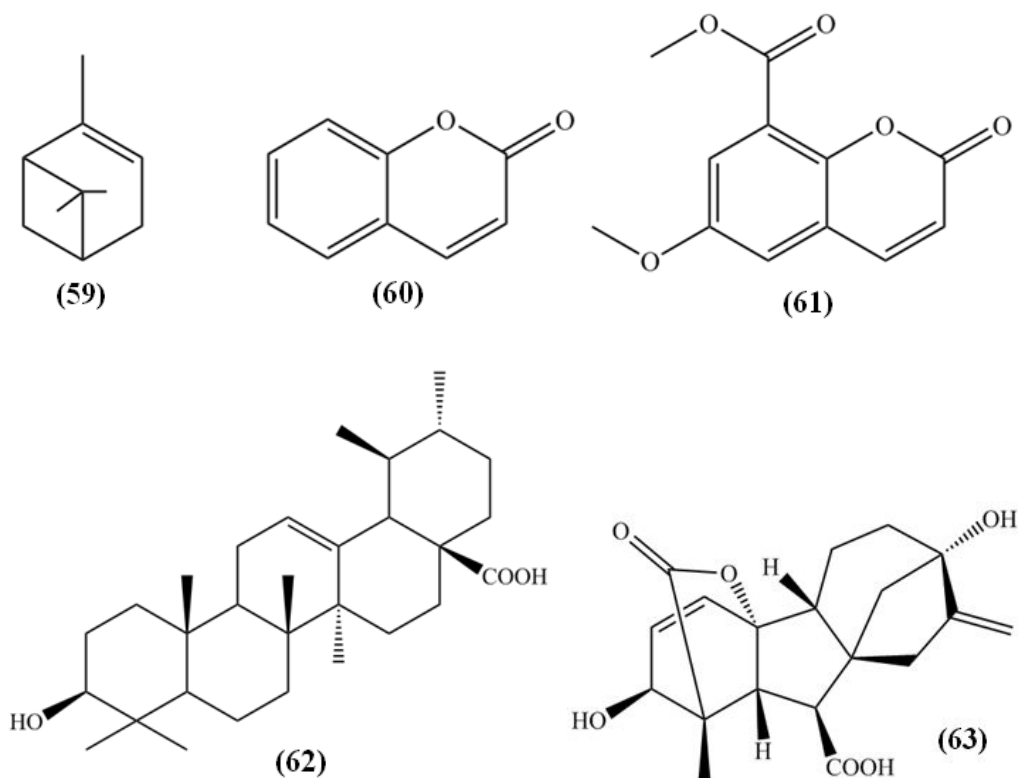
* Selon NCBI

I. 3.5. Travaux antérieurs de l'espèce *Cotula anthemoides* L

Une recherche bibliographique a montré que l'espèce *C. anthemoides* a été très peu étudiée chimiquement. Une étude phytochimique réalisé par Yadava et Barsainya sur les graines, a abouti à la mise en évidence d'un isoflavone glycoside : 5-hydroxy-6,3',4'-trimethoxyisoflavone 7-O- β -D-glucopyranosyl(1—6)- α -L-rhamnopyranoside (**57**) (Yadava & Barsainya 1998a) et un flavone : 5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-3-methoxyflavone 7-O- β -D-galactopyranosyl-(1—2)- α -L-rhamnopyranoside (**58**) (Yadava & Barsainya 1998b).



Une autre étude phytochimique récente de la plante *C. anthemoides*, effectuée par Showkat (Showkat 2012), a abouti à l'identification de 5 composés : α -Pinene (59), coumarin (60), 6-methoxy-2-oxo-2H-chromene-8-carboxylic acid methyl ester (61), l'acide Ursolique (62), et l'acide Gibberliue (63).



L'investigation biologique de la plante *C. anthemoides* a révélé que l'huile essentielle a un potentiel antibactérien sur les bactéries *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Proteus mirabilis* (Tadrent et al., 2014a).

I. 3.6. Utilisation de l'espèce *Cotula anthemoides* L. en médecine traditionnelle

En ce qui concerne son utilisation en médecine traditionnelle, les racines sont prises au Lesotho pour les coliques (Bentham 1867 ; Guillardmod 1971). En Afrique du Sud, il s'agit d'un remède contre le rhume de cerveau. Elle a été largement utilisées dans l'épidémie de

grippe mondiale de 1919 et parfois les feuilles sont écrasées et enflammées dans le nez (Greger & Hofer, 1985). Elle est aussi utilisée sous forme d'une pâte pour l'inflammation résultant de fractures, et infusion contre les troubles pulmonaires et gastriques, elle est principalement cultivée à des fins ornementales (Guillarmod 1971).

I.4. Aperçu bibliographique sur Le genre *Pentzia*

I.4.1. Généralités sur le genre *Pentzia*

Pentzia est le principal genre de la sous-tribu des Pentziinae et à une prédominance sud-africaine. La plupart des espèces de ce genre sont des plantes fourragères importantes dans les zones arides, en particulier pour les moutons (Parsons 2012).

I.4.2. Description botanique du genre *Pentzia*

Plantes herbacées à rameaux blanchâtres portant des feuilles vertes. Les capitules sont isolés à l'extrémité de rameaux grêles. Le réceptacle du capitule est bombé, en hémisphère ou bien en cône. Fleur non ligulées à la périphérie, de couleur blanche ou jaune. Akène n'ayant pas d'aigrette formée d'une touffe d'écailles membraneuses blanches ou roses (Magee et al., 2015).

I.4.3. Répartition géographique du genre *Pentzia*

Le genre *Pentzia* comprend environ 27 espèces de sous arbrisseaux aromatiques pour la plupart localisées en Afrique australe (Magee & Tilney 2012) alors que quatre autres espèces sont signalées ailleurs, telles que *Pentzia arabica* au sud du Yémen, *P. somalensis* en Somalie (Thulin 2001), *P. hesperidum* au Maroc (Maire 1936), *P. monodiana* en Algérie et au Tchad dans les plus hautes montagnes du Sahara central (Maire 1929) (figure 1.5).

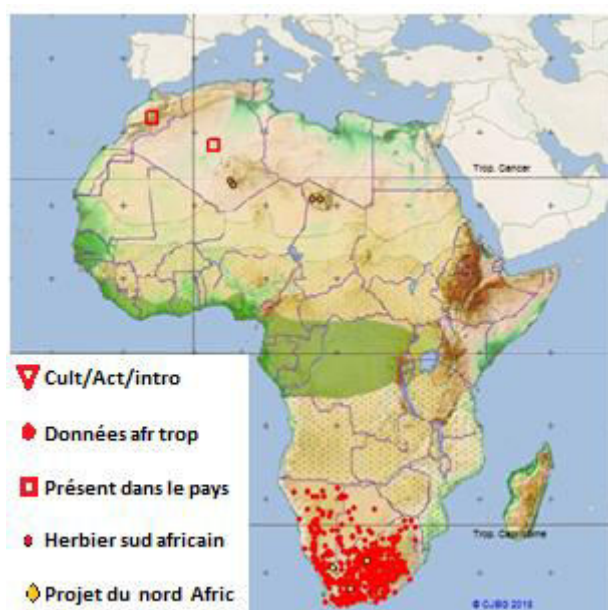
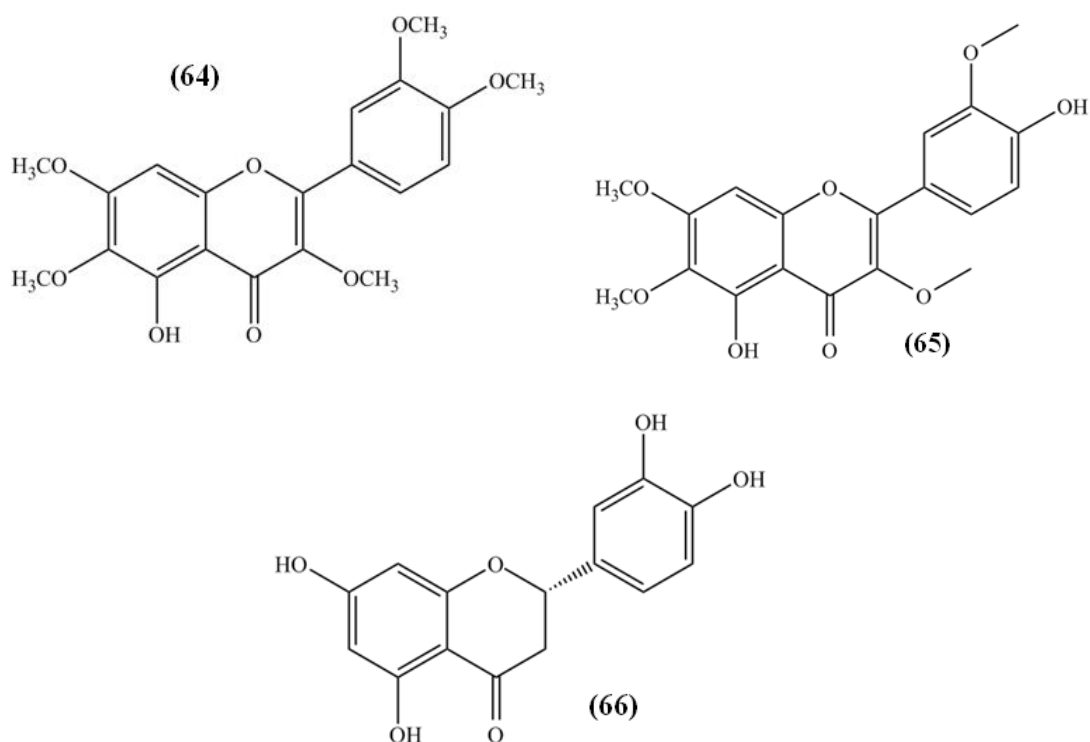


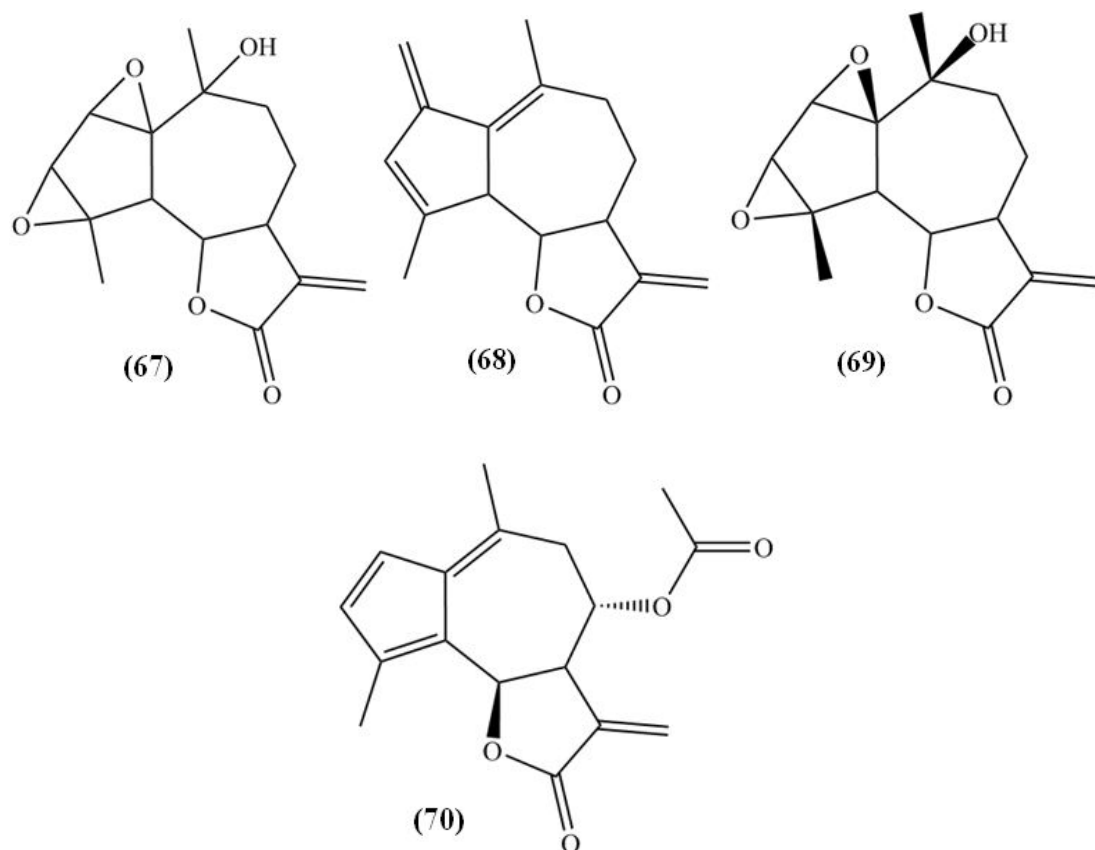
Figure 1.7 : Carte de répartition des espèces du genre *Pentzia* en Afrique australe [7]

I.4.4. Métabolites isolés du genre *Pentzia*

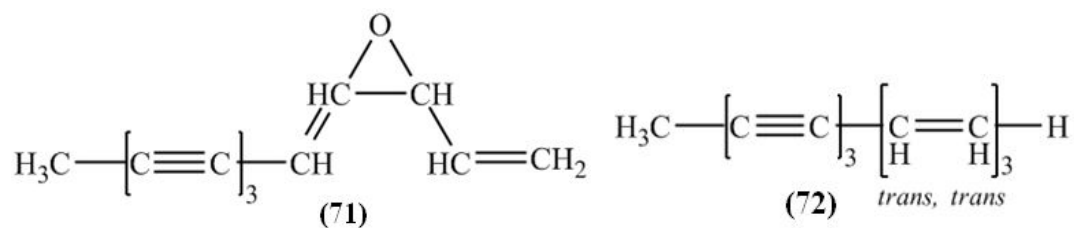
Les dérivés acétyléniques sont des métabolites très fréquents chez le genre *Pentzia* ; au point de constituer de véritables marqueurs chimiotaxonomiques (Christensen 1992). Comme chez la plupart des Asteraceae, les espèces du genre *Pentzia* synthétisent des flavonoïdes tels que l'artémétine (64), la chryso splénétine (65) et l'ériodictyol (66) (Zdero & Bohlmann 1990).

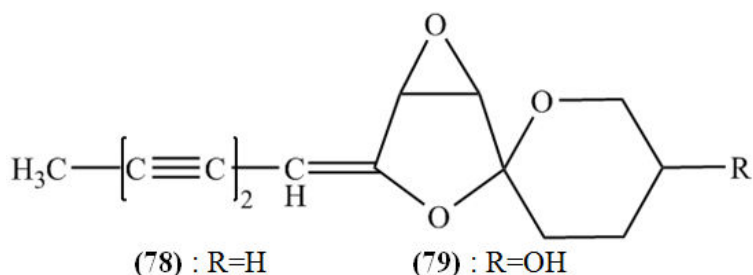
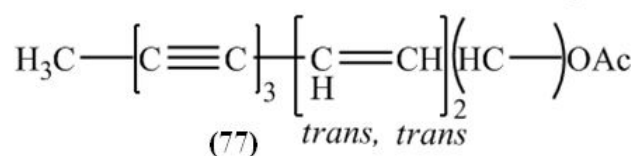
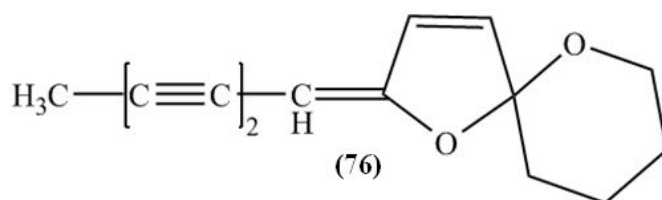
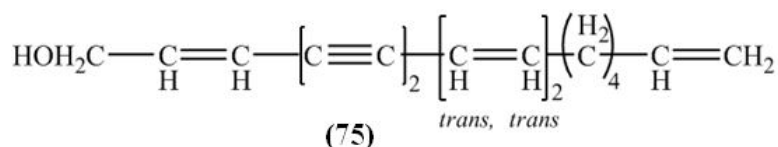
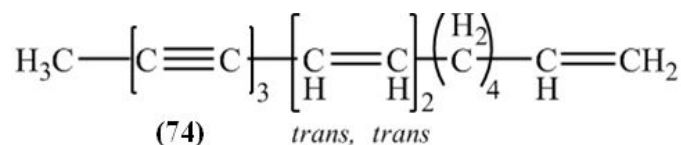
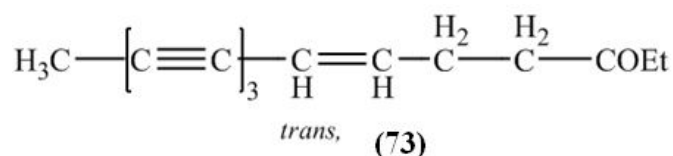


De nombreuses lactones sesquiterpéniques ont été identifiées par Bohlmann & Zdero, appartenant notamment aux groupes des glaucolides, des fulvénoguaianolides, des guaianolides et des germacranolides. Nous indiquerons en particulier l'artécane (67), la mésoatlantine E (68) (Bohlmann & Zdero 1972), la canine (69), du penziafulvénolide (70) (Zdero & Bohlmann 1990).



D'autres sesquiterpènes lactones, détectés par Bohlmann & Zdero (Bohlmann & Zdero 1978), sont comme suit : Les composés (71) et (72-75) sont obtenus à partir des racines et la partie aérienne de *P. tenelle* DC. alors que les racines de *P. cooperi* HARV produisent (76), (77), (78) et (79). Ainsi, les parties aériennes de *P. annua* DC synthétisent seulement (77) et ceux de *P. incana* O. Kuntz donnent (73).





I. 4.5. Les Activités biologiques du genre *Pentzia*

Les études pharmacologiques concernant le genre *Pentzia* sont très rares. Une certaine activité antiparasitaire a été décelée chez divers extraits de *Pentzia globosa*, cette dernière est une espèce rencontrée en Afrique du Sud (Hata 2014).

Pour évaluer et prévoir la digestibilité et la valeur énergétique des plantes du genre *Pentzia*. Botha a effectué une étude sur les moutons et a montré que la digestibilité des glucides de *P. sphaerocephala* variait de modérément élevée à extrêmement (Botha 1938a), en plus, la valeur nutritive de la plante *P. incana* est supérieure à celle du lucerne coupé au stade pré-floraison (Botha 1938b).

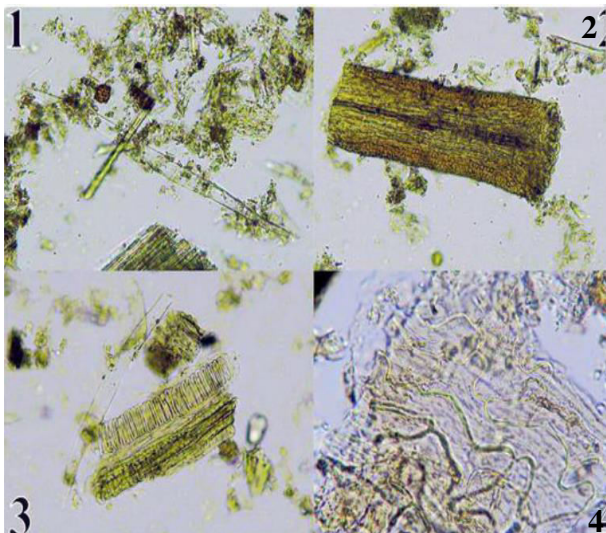
I.5. Aperçu bibliographique sur l'espèce *Pentzia monodiana* Maire

I.5.1. Présentation de l'espèce *Pentzia monodiana* Maire

Ce genre a été dédié à l'herboriste suédois Hendrik Christian Pentz (1738-1803) par Carl Peter Thunberg (1743-1828) et Maire a nommé l'espèce en référence à Théodore Monod (Boukhalfa 2017) et vu le nombre restreint sur le plan national et international de travaux phytochimiques, pharmacologiques et botaniques effectués. En effet, cet échantillon de plante est endémique des hautes montagnes du Sahara septentrionale. Se situant au-delà de 2000 m jusqu'aux plus hauts sommets, cet étage se caractérise par une baisse relative de l'aridité du fait de la fraîcheur de ces altitudes, ce qui se traduit par un couvert végétal permanent et assez dense où prédominent.

I. 5.2. Description botanique de l'espèce *Pentzia monodiana* Maire

Cette espèce est endémique du Sahara, elle est présente dans les oueds pierreux (Hoggar, Tassili des Ajjer Tibesti). C'est une herbe de 20 à 35 cm, à tiges très rameuses et un peu ligneuses à la base, donnant des rameaux dressés blanchâtres velus, ciliés et couverts de poils appliqués comme sur les feuilles, celles-ci sessiles, auriculées à la base, de taille moyenne profondément divisées, capitules petits, 5-8 mm, isolés au sommet des rameaux, à fleurs toutes tubuleuses jaunes d'or ou un brunâtres (Ozenda 2004).



- 1-Poil tecteur « en navette » à pied court et à branches droites lancéolées.
- 2-Fragment de style et de stigmate avec nombreuses papilles
- 3-Débris de poil tecteur à côté d'un fragment de paroi de l'ovaire avec cellules à mucilage.
- 4-Fragment d'épiderme formé de cellules à paroi sinuée portant un poil glandulaire.

Figure 1.8 : Eléments microscopique présents dans les parties aériennes de *Pentzia monodiana* Maire (Dali Yahia 2017).

I. 5.3. Position systématique de l'espèce *Pentzia monodiana* Maire

Cette espèce est connue sous le nom vernaculaire Tihatit (Tamahek) et aussi Gaada dans la région d'El Oued (Bouallala et al., 2014). Selon (Quezel & Santa 1963 ; Dupont & Guignard 2007), la classification du *Pentzia monodiana* Maire est comme suite :

Famille	Asteraceae
Sous-famille	Asteroideae
Tribu	Anthemideae
Sous-tribu	<i>Pentziinae</i>
Genre	<i>Pentzia</i>
Espèce	<i>Pentzia monodiana</i> Maire

I. 5.4. Répartition géographique de l'espèce *Pentzia monodiana* Maire

Cette espèce Endémique des massifs volcaniques (Figure 1.9) du Sahara central (Tibesti, Hoggar). Rencontrée dans les pentes granitiques, les ravins pierreux et le long des oueds, à partir de 2000 mètres d'altitude. En Algérie, elle est protégée par décret D.E. n° 12-03 du 4 janvier 2012 fixant la liste des espèces végétales non cultivées protégées rares (journal officiel de la république algérienne N°03 18 janvier 2012.p12).

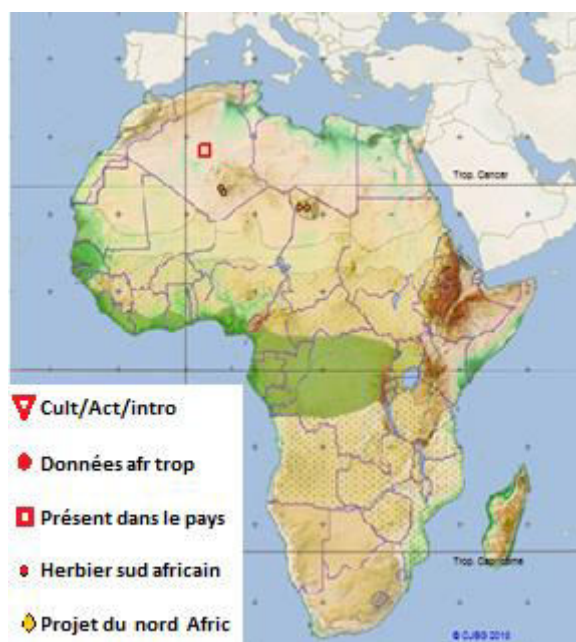


Figure 1.9 : Carte de répartition de l'espèce *Pentzia monodiana* Maire en Afrique australe [7]

I. 5.5. Utilisation de l'espèce *Pentzia monodiana* Maire en médecine traditionnelle

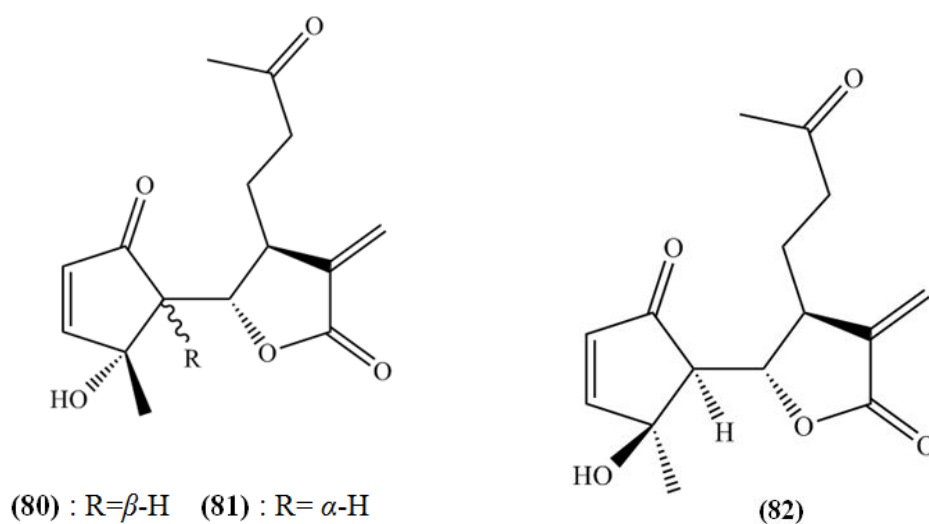
Bien qu'apparemment non toxique, cette plante aromatique n'a fait l'objet d'aucun intérêt thérapeutique et ne figure pas dans la pharmacopée traditionnelle. C'est une plante fourragère recherchée par les bergers lors de la transhumance.

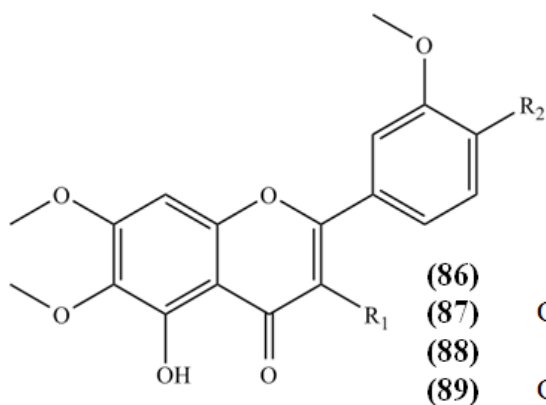
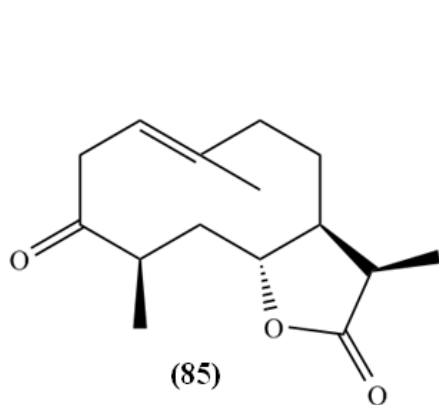
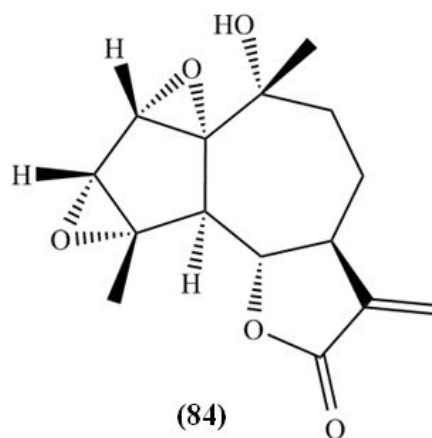
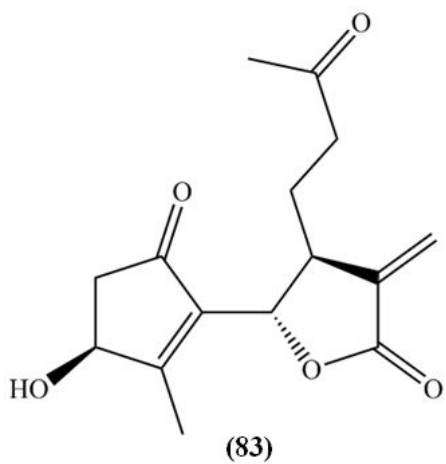
I. 5.6. Travaux antérieurs de l'espèce *Pentzia monodiana* Maire

Selon une investigation phytochimique et biologique récente, l'extrait aqueux des parties aériennes de *Pentzia monodiana* présenterait un pouvoir antioxydant modéré en corrélation avec la présence de flavonoïdes (Chaib et al., 2015).

D'après l'étude de Boukhalfa, le rendement de l'huile essentielle des parties aériennes de *Pentzia monodiana* est faible, celle-ci est majoritairement constituée de monoterpènes oxygénés (36.4 %) et de sesquiterpènes (37.4%) (Boukhalfa 2017).

Une étude phytochimique récente sur la plante *P. monodiana* poussant en Algérie a confirmé l'identité de ces composés : 5 β -H seco-tanapartholide (**80**), seco-tanapartholide A (**81**), seco-tanapartholide B (**82**), iso-seco-tanapartholide(**83**), artecanin (**84**), ketopelenolide B(**85**). 3'-O-methyleupatorin (**86**) artemetin (**87**), cirsilineol (**88**) et chrysosplenetin (**89**) et évaluer que deux méthoxyflavones, la 3'-O-méthyleupatorine et l'artémétine ont montré une affinité accrue pour l'hème (Ortiz et al., 2017).





R ₁	R ₂
H	OCH ₃
OCH ₃	OCH ₃
H	OH
OCH ₃	OH

CHAPITRE II

Aperçu bibliographique sur les lignanes

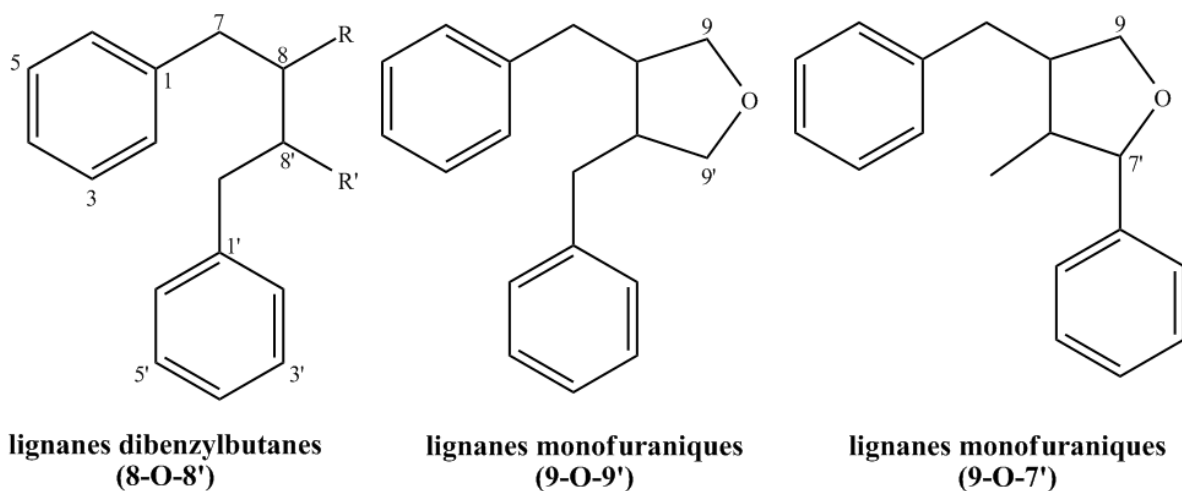
II. 1. Présentation des lignanes

Le terme lignane a été introduit par Haworth (Haworth 1936) qui désigne les composés dimères de phénylpropanoïdes dont le squelette résulte d'une dimérisation oxydante de deux unités de phénylpropanes (C_6C_3) en C-8 des chaînes latérales propényles, et implique la formation de la liaison C8 –C8'. Alors que Le terme neolignane qui est introduit par Gottlieb (Gottlieb 1972), est employé pour définir tous les autres types de liaisons. Lorsqu'il n'y a pas de liaison directe C–C entre les unités de phénylpropanes mais liés par un atome d'oxygène d'éther. Il existe aussi d'autres types de lignanes tels que les sesquiolignanes (ayant trois unités de C_6C_3) et les dinéolignanes.

Ces métabolites constituent une classe importante au sein du règne végétal en raison de leurs activités biologiques (MacRae & Towers 1984 ; Ayres & Loike 1990) et leurs propriétés physicochimiques (Lewis 1999). Leur distribution botanique est large dans la mesure où ils existent dans environ 70 familles (Bruneton 1999) et près de 308 espèces différentes (Ayres & Loike 1990). Chez les gymnospermes, ils sont surtout rencontrés dans le bois alors que chez les angiospermes, ils sont localisés dans tous les tissus (Bruneton 1999).

II. 2. Diversité structurale des lignanes

Huit groupes structuraux fondamentaux sont distingués, les plus simples sont les composés à squelette dibenzylbutane (liaison 8-8'). Leur éventuelle cyclisation peut conduire à d'autres types de lignanes (Umezawa 1990). (Figure 1.10).



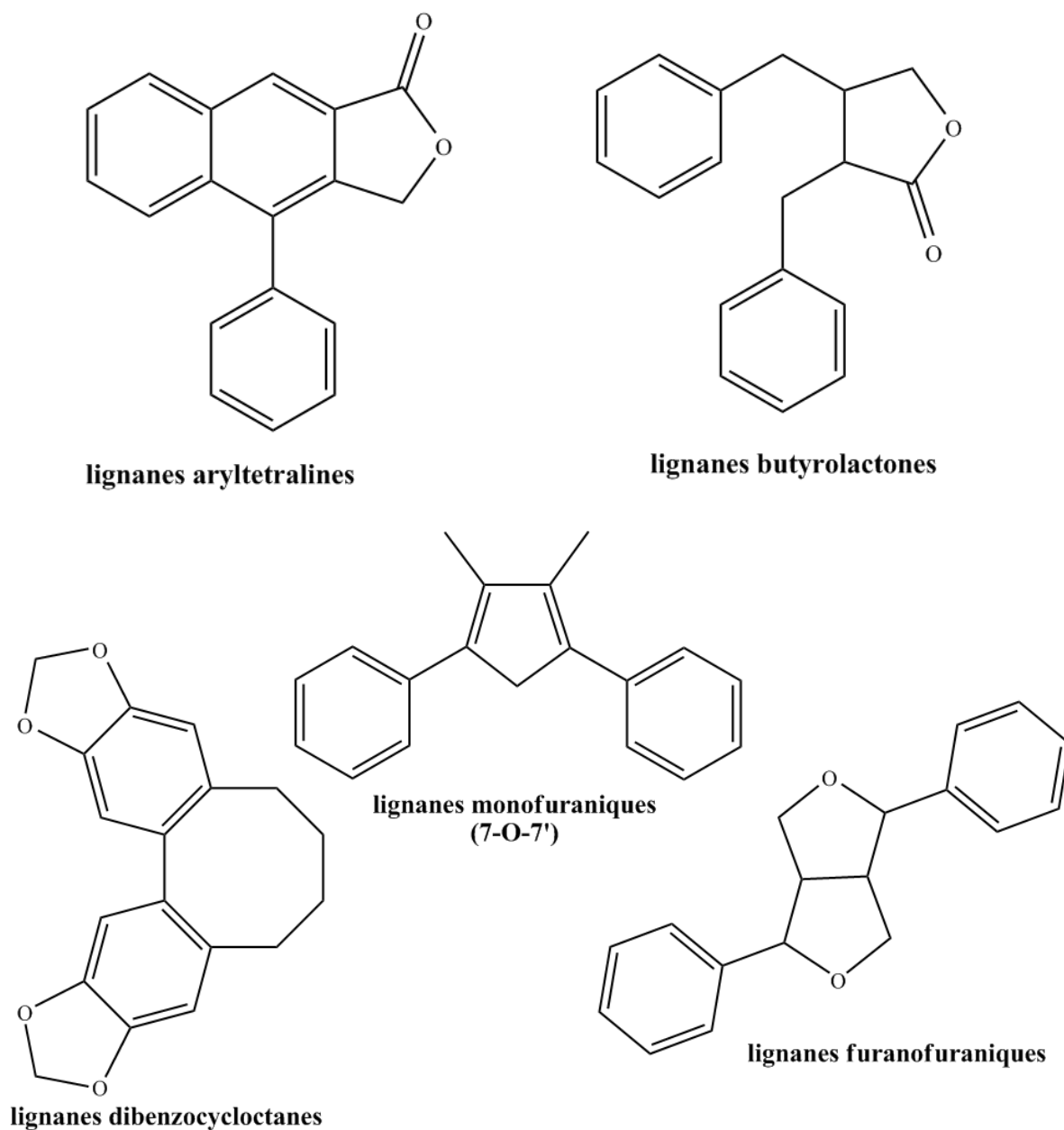


Figure 1.10: différents groupes structuraux fondamentaux des lignanes

II. 3. Activités pharmacologiques des lignanes

II. 3.1. Activité cytotoxique

Les lignanes présentent des propriétés biologiques intéressantes. Ils agissent comme des agents anticancéreux. des études ont montré que tous les aliments végétaux riches en lignanes, peuvent diminuer le risque de cancer de la prostate, cancer du sein (Pelucchi et al., 2004). Ils jouent aussi comme des agents de protection contre toutes les maladies liées aux troubles oestrogéniques tels que l'ostéoporose (Booth et al., 2004).

II. 3.2. Activité antioxydante

Ce sont des agents antioxydants spéciaux et ont des effets bénéfiques sur la santé. Une étude a montré que les lignanes possédant des oxygènes secondaires, disposent un grand pouvoir antioxydant (Yamauchi et al., 2007). D'autres travaux ont montré que l'activité antioxydante augmente quand les lignanes présentent sur le noyau aromatique des groupements donneurs d'électrons (Eklund et al., 2005).

II. 3.3. Activité anti-inflammatoire

De nombreux travaux ont été faits sur le pouvoir anti inflammatoire des lignanes parmi eux l'investigation menée sur l'extrait acétate d'éthyles des racines de *Tripterygium wilfordii* Hook F. (Celastraceae) (Ma et al., 2007). Des travaux ont montré l'activité anti inflammatoire des lignanes suivants : phyltetraline, nirtetraline et niranthine, isolés de *Phyllanthus amarus* (Kassuya et al., 2006).

Les lignanes présentent aussi des activités analgésiques (Borsato et al., 2000 ; Küpeli et al., 2003 ; da Silva et al., 2005), antiparasitaires contre les parasites du genre *Leishmania* (Barata et al., 2000 ; da Silva Filho et al., 2008) et le genre *Trypanosoma* (Felippe et al., 2008; da Silva et al., 2008) En plus, ils agissent contre le lupus, le diabète et diminuent les taux élevés de cholestérol (Raffaelli et al., 2002).

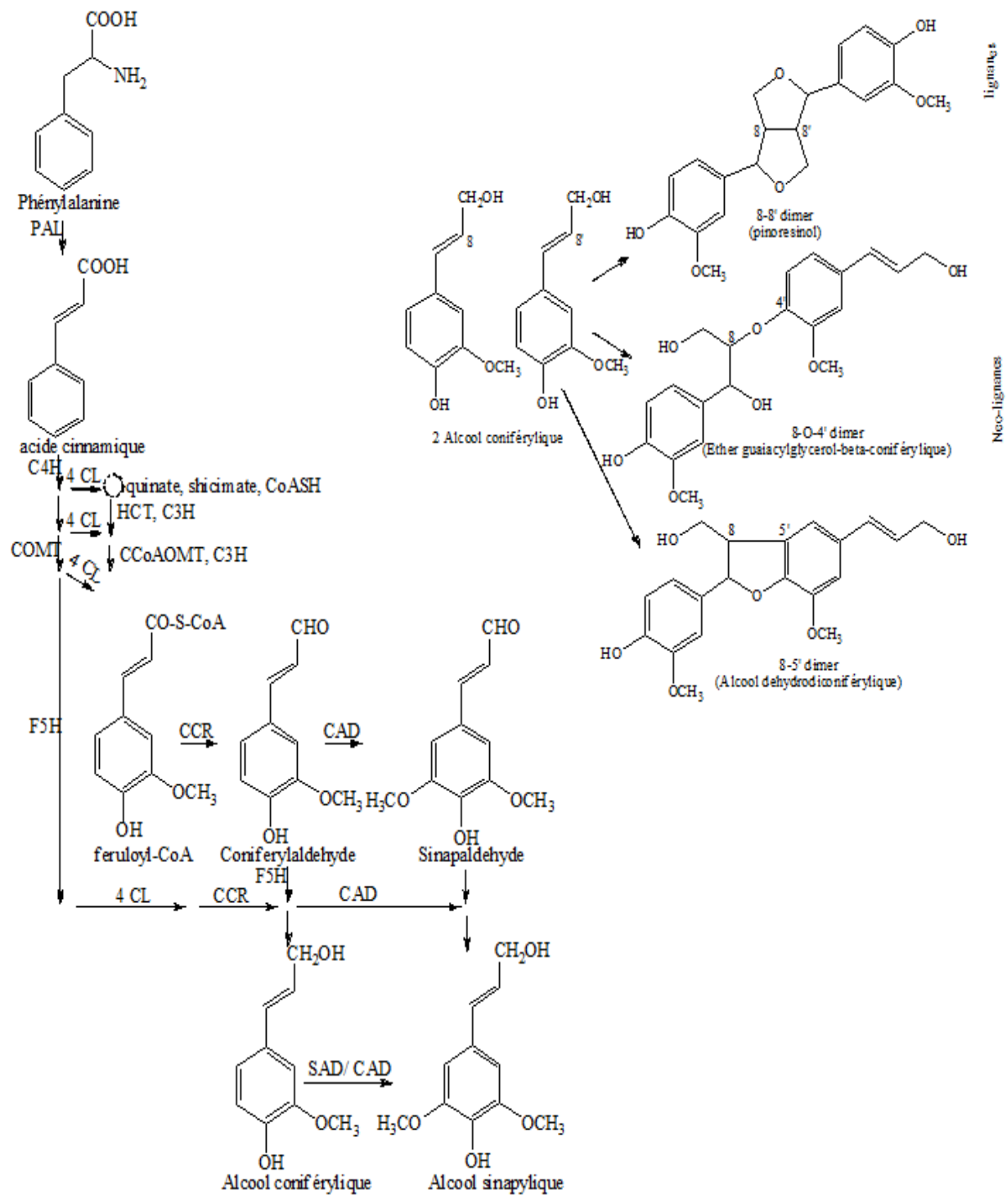
II.4. Rôle des lignanes chez les plantes

les lignanes pourraient être des molécules de défense protégeant la plante contre les herbivores et les pathogènes (Gang et al., 1999). Dans ce contexte, il y a des travaux qui étudient les propriétés insecticides (Gao et al., 2004 ; Kozawa et al., 1982 ; Harmatha & Nawrot 1984), antifongique (Belmares et al., 1979 ; Gang et al., 1999), antibactérienne et antivirale (Markkanen et al., 1981 ; McRae & Towers 1984).

Les lignanes possèdent aussi des propriétés antioxydantes (Kitts et al., 1999, Fauré et al., 1990). Leur accumulation dans certaines graines oléagineuses (les graines de lin), protègent les acides gras contre toute oxydation.

II. 5. Biosynthèse des lignanes

La synthèse des lignanes est issue par voie enzymatique à partir de l'alcool coniférylique. Celui ci dérive de la phénylalanine via la voie des phénylpropanoïdes puis celle des monolignols (Hoffmann et al., 2004 ; Shadle et al., 2007). La condensation de deux radicaux conduirait à une méthinequinone dont la cyclisation intramoléculaire permet d'obtenir les lignanes et neolignanes (figure 1.11).



PAL: Phénylalanine Ammonialyase;
C4H: Cinnamate-4-Hydroxylase;
4CL: 4-coumarate: CoA-ligase;
HCT: Hydroxycinnamoyltransferase;
C3H: *p*-Coumarate-3-Hydroxylase;
F5H: ferulate 5-hydroxylase;

CCoAOMT: Caffeyol-CoA O-Methyltransferase;
COMT: Acide Caféiques O-Methyltransferase;
CCR: Cinnamoyl-CoA Reductase;
CAD: Alcool Cinnamique dehydrogenase;
SAD: Alcool Sinapylique dehydrogenase.

Figure 1. 11: Biosynthèse des lignanes chez la plupart des angiospermes (Beejmohun et al., 2007).

CHAPITRE III

Généralités sur les activités biologiques

Introduction

Les polyphénols ont une grande importance par leurs nombreux effets bénéfiques sur la santé (Koechlin-Ramonatxo 2006). En effet, ils permettent à l'organisme de lutter contre les agressions et ses pathologies associées, ce qui suscite un intérêt majeur pour la prévention et le traitement des maladies plurifactorielles telles que: le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes (Montagnier et al., 1997), les cancers (Weiguang et al., 2005), les maladies inflammatoires (Aruoma 1994), cardiovasculaires (Scalbert et Williamson, 2000 ; Stoclet et al., 2004; Leifert & Abeywardena 2008) et neurodégénératives (Ramassamy 2006)

III. 1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O_2) présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre $O \cdot - \cdot O$, en raison de ses deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales de plus grande énergie.

L'oxyde d'azote (NO) est un radical ne possédant qu'un seul électron sur ses orbitales, peu réactif, synthétisé à partir d'un atome d'azote et d'une molécule d'oxygène.

Dans les phénomènes de stress oxydant, prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (EOR ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS).

III. 1.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent (Delattre et al., 2005).

III. 1.1.1. Les espèces oxygénées réactives radicalaires

L'**anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)** est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe^{3+}), l'ascorbate et surtout le superoxyde dismutase.

Le **radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot})** est le plus réactif que le précédent, obtenu après protonation de ce dernier à pH inférieur à 4.8 ($pK_a (HO_2^{\cdot} / O_2^{\cdot-}) = 4,8$).

La réduction monoélectronique du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 donne naissance au **radical hydroxyle HO^\bullet** et à l'anion basique non radicalaire OH^- en présence d'un catalyseur (réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^\bullet + Fe^{3+} OH^-$). Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (Hennebelle 2006).

Le **radical peroxyte RO_2^\bullet** est un radical secondaire issu de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le radical R^\bullet . Sa réactivité se situe entre l'anion radical superoxyde et le radical hydroxyle.

Le **radical secondaire alkoxytes RO^\bullet** est produit suite à la décomposition de l'hydroperoxyde RO_2H , issu de l'oxydation de substrat RH , par des cations métalliques.

III. 1.1.2. Les espèces oxygénées non radicalaires

L'**oxygène singulet 1O_2** , qui est la forme diamagnétique¹⁹ de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Choe & Min 2005; Hennebelle 2006).

Le **peroxyde d'hydrogène H_2O_2** sous sa forme moléculaire, est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques Fe^{2+} et Cu^+ , lors de réactions de type « Fenton » (Wardman & Candeias 1996).

La myéloperoxydase convertit le peroxyde d'hydrogène en **acide hypochlorique (HOCl)** à des concentrations physiologiques. Ce dernier peut réagir avec les fonctions aminées des protéines pour former des chloramines (Sumaya Martinez 2004).

III. 1.2. Les espèces réactives azotées (ERN)

III.1.2.1. Espèces radicalaires azotées

Apparu au cours de la dernière décennie, le monoxyde d'azote (NO^\bullet) a pris une place considérable en biologie. Malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation et ses effets anti-inflammatoires, il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives.

III. 1.2.2. Espèces non radicalaires azotées

Caractérisé par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire

peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO_2) ($2 \cdot\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$), lequel peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3) ($\cdot\text{NO} + \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO_2^-) ($\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+$). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxyde nitrite (ONOO^-) ($\cdot\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques).

III. 2. Activité antioxydante

III. 2.1. Les antioxydants

Sont des molécules capables d'empêcher l'oxydation d'autres molécules, ou toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat (Halliwell & Gutteridge 1989; Halliwell 1995; Sies, 1993).

III. 2.1.1. Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (McCall & Frei 1999).

La **vitamine C** (ou **acide ascorbique**) est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes. Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire (Retsky et al., 1999). Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH^-) qui peut réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AscH^\cdot), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protoné radicalaire faiblement réactive est privilégiée ($\text{Asc}^{\cdot-}$) (Figure 1.12) (Valko et al., 2004).

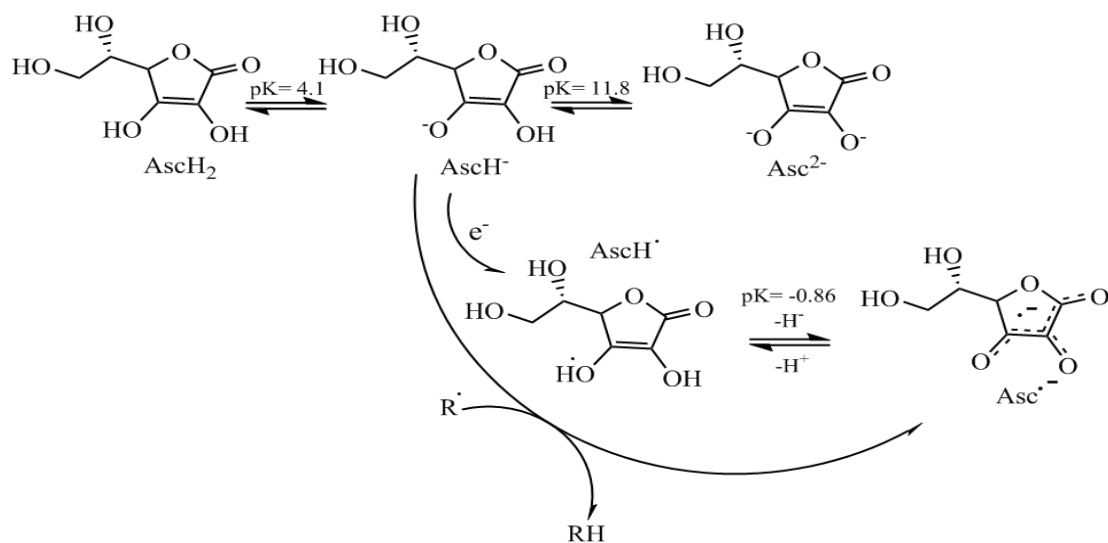


Figure 1.12 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux

La **vitamine E** est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (8 molécules dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols), (Figure 1.13). Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant, est très important. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO[•] (Figure 1.14) (Kaiser et al., 1990; Yoshida et al., 1993).

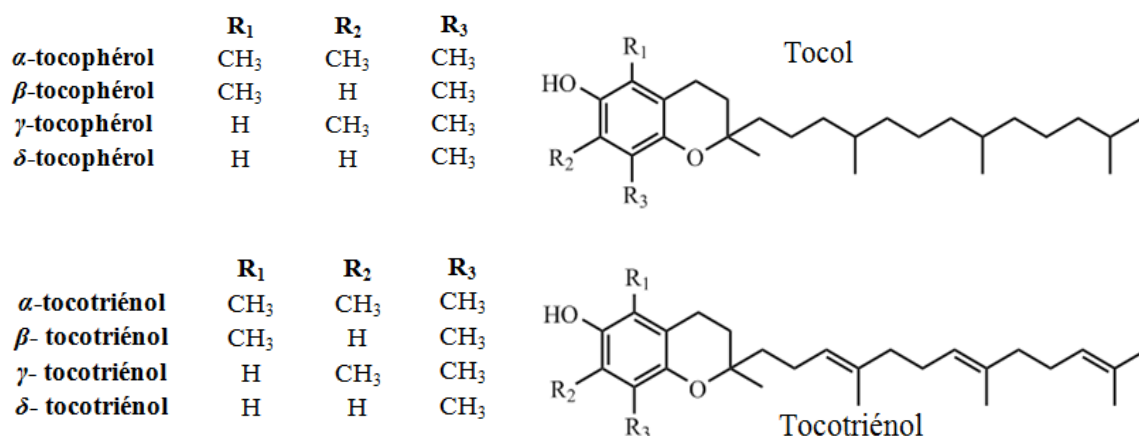


Figure 1.13: Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols

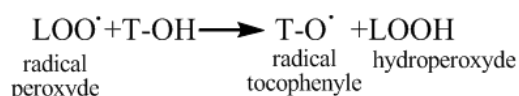


Figure 1.14 : Mécanismes d'action antioxydante de la vitamine E sur les radicaux LOO[•]

Les **caroténoïdes** sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles (Figure 1.15). On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO[•], HO[•], O₂^{-•}, R[•] (Figure 1.16). Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko et al., 2006).

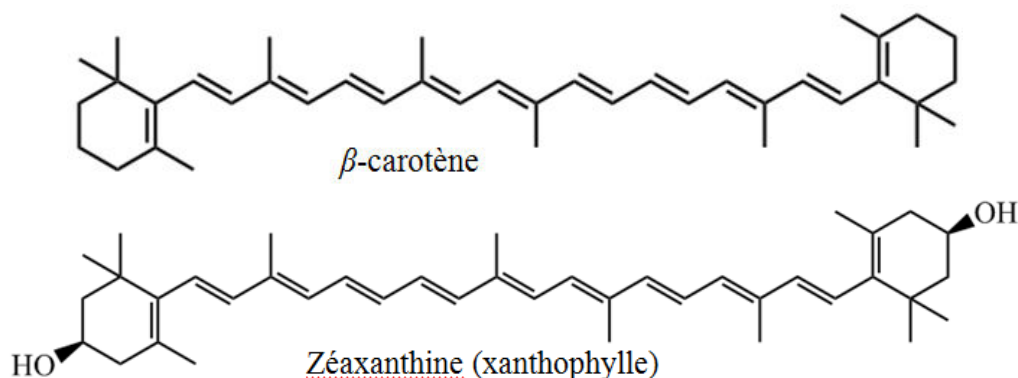


Figure 1.15 : Exemples de carotène et xanthophylle

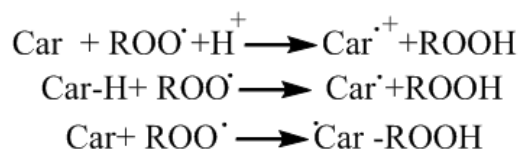


Figure 1.16 : Mécanismes traduisant l'activité antioxydante des caroténoïdes, cas des ROO^\bullet

Les **flavonoïdes** sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane (Figure 1.17). Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à «Stopper » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition, capables de catalyser la peroxydation lipidique (Figure 1.18) (Schroeter et al., 2002; Leopoldini et al., 2011).

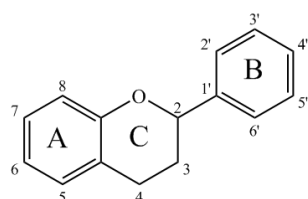


Figure 1.17 : Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane

L'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants (Schroeter et al., 2002).

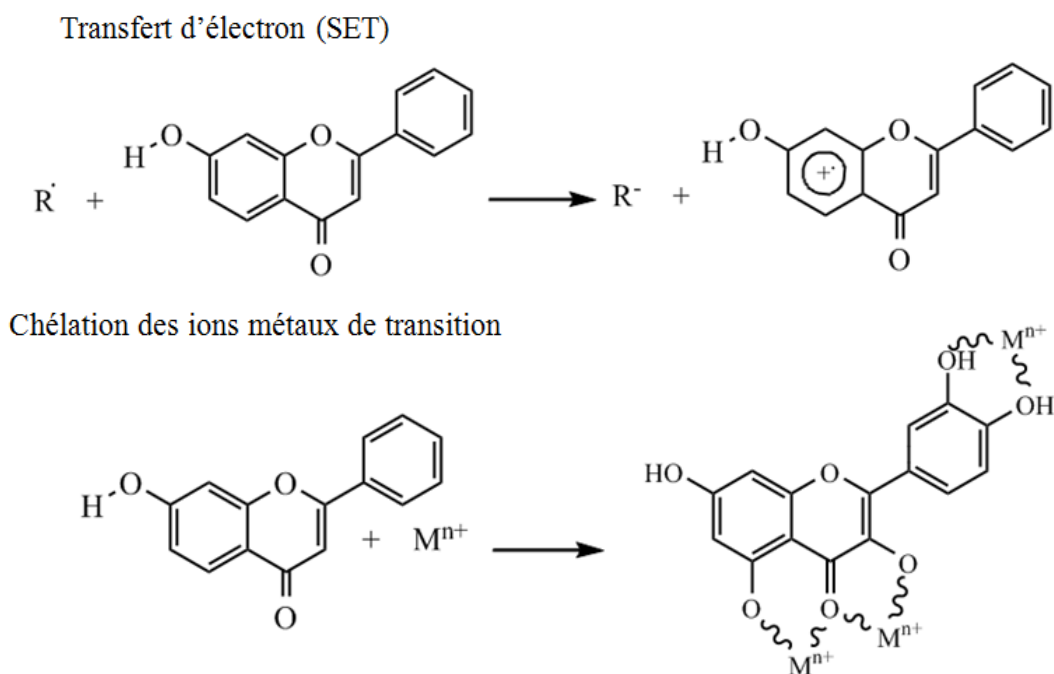


Figure 1.18 : Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques (Leopoldini et al., 2011)

III. 2.1.2. Les antioxydants de synthèse

Les antioxydants synthétiques sont des composés phénoliques toujours substitués par un alkyle pour améliorer leurs solubilité dans les graisses et les huiles tels que Hydroxyanisole butylé (BHA), Hydroxytoluène butylé (BHT), tert-butylhydroquinone (TBHQ) et Gallate de propyle (GP) (Figure 1.19). (Hudson 1990).

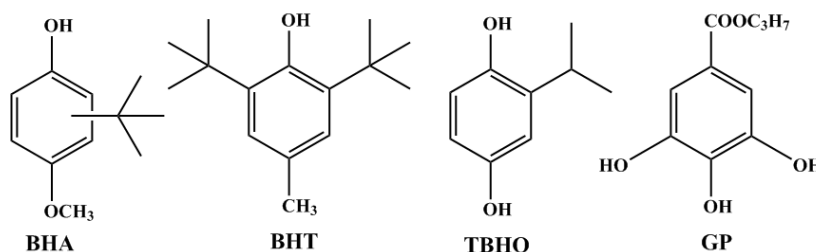


Figure 1.19 : Structure des antioxydants synthétiques.

III. 2.2. Les méthodes les plus fréquemment utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante

Diverses méthodes de dosage de l'activité antioxydante *in vitro* induisent la mesure de l'inhibition de l'oxydation des lipides et des lipoprotéines. Celles-ci ne seront pas abordées, ni celles mesurant le pouvoir antioxydant *in vivo* (sur l'animal ou chez l'Homme). Cette étude se focalisera sur les méthodes *in vitro* témoignant de l'aptitude d'une molécule ou d'un extrait naturel à piéger des radicaux libres (par transfert d'électron et/ou de proton) issus de phénomènes d'oxydations (Prior et al., 2005).

III. 2.2.1. Méthode du DPPH[·]

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[·]) est un radical stable de couleur violette en solution qui change vers le jaune en présence d'une substance réductrice (antioxydante) et devient le diphényl- picrylhydrazine (Blois 1958). Cette réduction est suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant le maximum de son absorption à λ 517nm ; ce qui nous permet de mesurer le pouvoir antiradicalaires de l'échantillon testé (Figure 1.20).

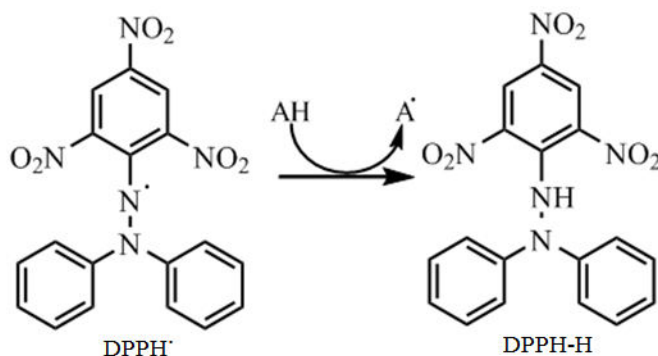


Figure 1.20 : Piégeage du radical DPPH[·] avec l'antioxydant (AH).

III. 2.2.2. Piégeage de l'ABTS^{•+}

La méthode ABTS est utilisée pour déterminer l'activité antioxydante des composés hydrophiles ou lipophiles (Re et al., 1999). Cette méthode est basée sur la capacité de l'antioxydant à inhiber le radical libre ABTS^{•+} obtenu à partir de l'ABTS [sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)]. La génération du cation radical ABTS^{•+} est la base de l'une des méthodes spectrophotométrique qui ont été appliquées pour mesurer l'activité antioxydante totale des substances pures ou des mélanges (Gülçin et al., 2009) (Figure 1.21).

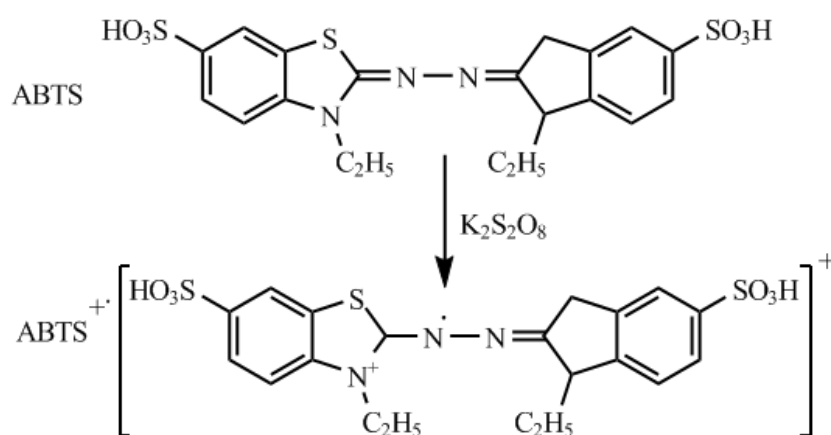


Figure 1.21 : Oxydation de l'ABTS avec K₂S₂O₈ et génération du radical ABTS^{•+} (Lien et al., 1999)

III. 2.2.3. Méthode du CUPRAC

La méthode CUPRAC (cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) (Apak et al., 2004) est utilisée sur la réduction du Cu (II) suivi par le traitement du Cu (I) avec un réactif chromogène Néocuproïne (NC) (2,9 -diméthyl- 1,10-phénanthroline) (Gouda et al., 2010). Le principe de cette méthode est basé sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu⁺²-Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu⁺¹-Nc qui absorbe à $\lambda = 450$ nm (figure 1.22).

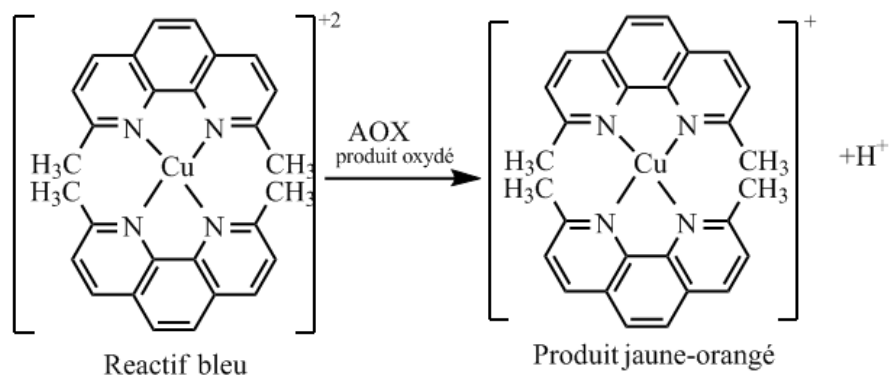


Figure 1.22 : Réduction du complexe chromogène de Cu⁺²-Nc (Özyürek et al., 2011)

III. 2.2.4. Chélation des ions métalliques

Cette méthode est basée sur la mesure d'absorbance de la formation du complexe [Fe(II)-Ferrozine] (Figure 1.23) après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} (Deker & Welch, 1990). Ce complexe [Ferrozine - Fe^{2+}] est formé par le Ferrozine et les ions libre Fe^{2+} pour donner un chromophore rouge qui absorbe à $\lambda = 562$ nm (Gülçin 2012).

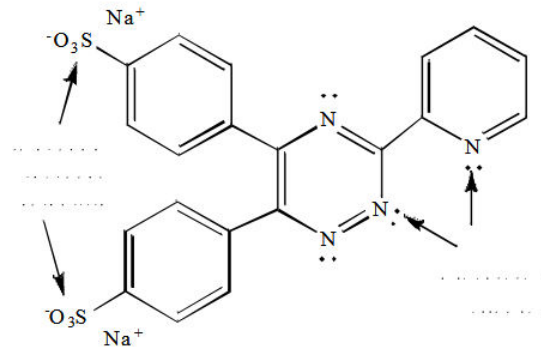


Figure 1.23 : Structure chimique du Ferrozine

III. 3. Dosage des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques sont très poussées en raison de leurs propriétés physiologiques divers comme les activités anti-allergique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007). La détermination de la teneur en phénols totaux des extraits bruts des plantes *Cotula anthemoides* L et *Pentzia monodiana* Maire a été faite en utilisant la méthode colorimétrique (Folin-Ciocalteux).

III. 4. Activité Anticholinestérase

La maladie d'Alzheimer (MA) est devenue un problème de santé publique. Outre le nombre de personnes atteintes de la maladie est déjà très élevé, ne devrait cesser de s'alourdir car sa prévalence croît d'une manière exponentielle avec la croissance de l'espérance de vie. Il est à retenir que la majeure partie des recherches pharmacologiques réalisées sur le traitement de MA a été guidée par l'existence d'une relation entre le déficit des neurotransmissions cholinergiques et les différents symptômes, en particulier cognitifs. Les recherches ont donc eu pour but essentiel, jusqu'à présent, d'augmenter l'activité cholinergique centrale (Schneider & Tariot 1994).

Il existe deux types de cholinestérase: l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase. Bien que toutes deux soient présentes dans le cerveau, l'acétylcholinestérase prédominante au

niveau central est la principale responsable du métabolisme de l'acétylcholine dans le cerveau, alors que la butyrylcholinestérase a principalement une action périphérique et peut aussi être à l'origine d'effets périphériques indésirables (Crismon 1998).

Un cholinestérase est un enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse d'un ester de la choline (acétylcholine, butyrylcholine) en choline et en acide acétique.

La détermination de l'activité acétylcholinestérase est devenue un outil important dans la découverte des médicaments, ainsi que dans les pathologies neurodégénératives. Une grande variété de méthodes ont été développées au cours des dernières décennies pour la quantification de l'activité inhibitrice AChE (Abou-Donia et al., 2014; Miao et al., 2010; Pohanka 2011).

La révélation de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) est réalisée avec la méthode spectrophotométrique d'Ellman (Ellman et al., 1961) (Figure 1.24). Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE de sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction (AChE et BChE respectivement). en milieu aqueux pour libérer la Thiocholine qui, en agissant avec l'acide DTNB (Acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque), donne une coloration jaune, ainsi que la Galanthamine a été utilisé comme référence (Gülseven et al., 2010).

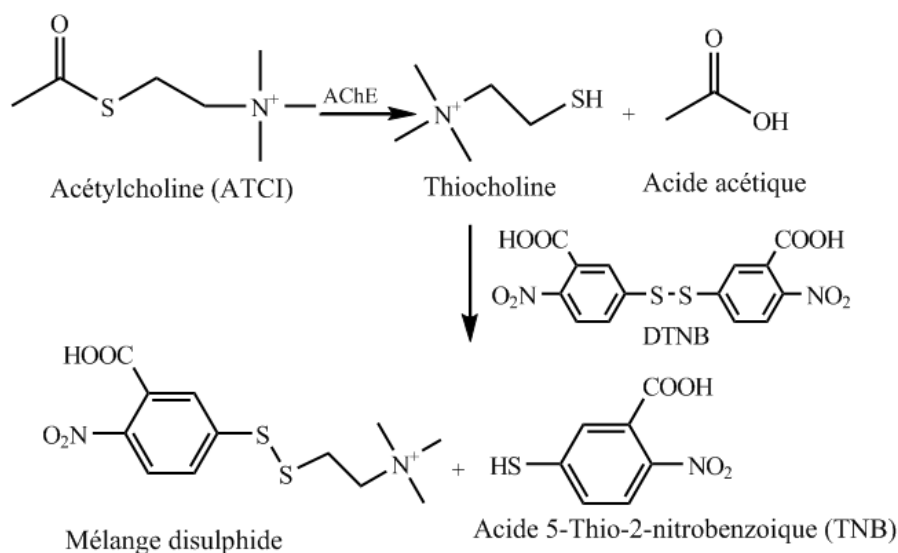


Figure 1.24 : Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman's (Benchekroun 2014)

III. 3.4.1. Évaluation de l'activité inhibitrice AChE en utilisant la méthode d'Ellman

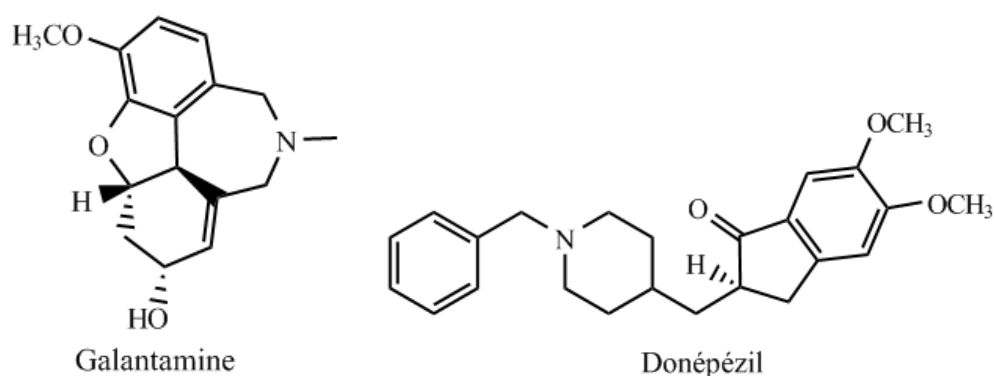
L'activité inhibitrice AChE est basée sur la méthode d'Ellman, le principe chimique de la réaction est représenté sur la Figure 1.24. L'enzyme hydrolyse le substrat ATCI pour donner

la thiocholine et l'acide acétique. La thiocholine est autorisée à réagir avec le DTNB, et cette réaction donne une coloration jaune (Ali-Shtayeh et al., 2014).

La perte ou la dégradation de l'acétylcholine (ACh) joue un rôle vital dans la perturbation de mémoire chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. L'acétylcholine est une molécule organique libérée au niveau des terminaisons nerveuses comme un neurotransmetteur. Elle est produite par la choline acétyltransférase qui utilise acétylcoenzyme A et la choline en tant que substrats pour la formation de l'acétylcholine dans les cellules spécifiques appelées neurones cholinergiques (Greenblatt 1999).

La précoce thérapie de la MA est donc basée principalement sur les inhibiteurs AChE tels que la galanthamine (synthétique) et le donépézil (isolé à partir de bulbes de narcisses) (Shah et al., 2008). Cependant, ces médicaments sont connus pour leur courte vie et des effets secondaires défavorables (y compris les troubles gastro-intestinaux) et les problèmes liés à la biodisponibilité (Wszelaki et al., 2010; Sung et al., 2002; Knapp et al., 1994), ce qui nécessite l'intérêt à trouver d'autres inhibiteurs AChE des ressources naturelles (Nicolson 2003).

La galantamine inhibe de façon réversible et compétitive l'acétylcholinestérase. Elle potentialise l'action de l'acétylcholine en empêchant sa dégradation.



III. 5. Activité Antityrosinase

La tyrosinase est une métallo-enzyme à cuivre (polyphénoloxidase) responsable du phénomène de brunissement enzymatique végétale (figure 1.25). Chez l'homme, elle est impliquée dans la biosynthèse de la mélanine en catalysant deux réactions oxydatives successives : l'oxydation de la tyrosine en L-DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine), elle-même oxydée en dopaquinone (dopachrome), qui sera transformée en mélanine grâce à une série de réactions de cyclisation et d'oxydation. Ces réactions peuvent conduire à deux dérivés différents de mélanine (Schallreuter et al., 1998): l'eumélanine aux propriétés protectrices contre les radiations UV, produite spontanément au pH physiologique, et la phoemélanine formée en présence de cystéine et de glutathion.

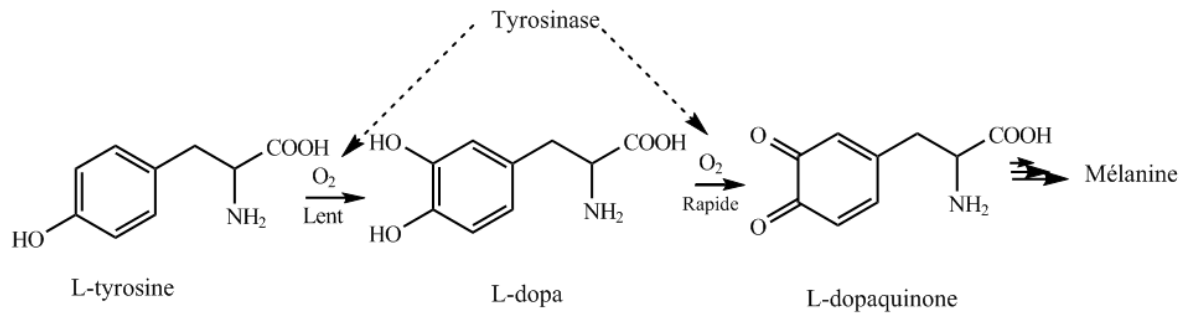


Figure 1.25 : Biosynthèse de la mélanine.

La phoemélanine est capable de produire des radicaux libres aux propriétés nocives (Peles & Simon 2010) plutôt que protectrices, en plus de troubles hyperpigmentaires provoqués par des médicaments, produits chimiques ou bien certaines maladies.

Les inhibiteurs de la tyrosinase sont des agents potentiels pour le traitement de l'hyperpigmentation en médecine comme en cosmétologie, ainsi que des additifs conservateurs dans l'industrie agroalimentaire.

Afin de satisfaire aux exigences réglementaires des molécules utilisées dans les produits alimentaires et médicamenteux, la recherche de nouvelles molécules bioactives s'oriente vers les ressources naturelles durables en particulier celles du règne végétal.

Plusieurs études ont montré les activités inhibitrices de l'acide bétulinique (Ullah et al., 2007; Sultana & Lee 2007) et de la bétuline (Magid et al., 2008) vis à vis de la tyrosinase.

Les produits phénoliques, en plus d'être de meilleurs antioxydants, se sont avérés également de bons inhibiteurs de la tyrosinase, tels que les catéchines (Nagendra et al., 2009 ; Gao et al., 2008), gallocatéchines (Ko et al., 2011), les flavonoïdes (quercétine (Kubo et al., 1995), kaempférol) ayant un 3-OH libre qui sont capables de chélater le cuivre du site actif de l'enzyme (Kubo & Kinst-Hori 1999).

III. 5.1. Evaluation de l'activité inhibitrice de la tyrosinase

L'activité anti-tyrosinase a été évaluée grâce à une méthode colorimétrique basée sur la mesure de la densité optique du dopachrome obtenu à partir de L-DOPA (substrat) sous l'action de la tyrosinase T3824-50KU.

La tyrosinase (T3824-50KU) isolée du champignon *Agaricus bisporus*, a une grande ressemblance avec celle de l'homme (Schoot Uiterkamp & Mason 1973) et est utilisée pour évaluer l'activité anti-tyrosinase en exploitant une méthode spectrophotométrique applicable au test de screening en plaque 96 puits.

PARTIE II

MATÉRIEL ET METHODES

Chapitre I
Matériel Utilisé

I. 1. Matériel végétal

I. 1.1. Récolte de la plante *Cotula anthemoides* L

La partie aérienne du matériel végétal étudié a été récolté en Mars 2012 à Tiguentourine, Ain Amenas, l'Est du Sahara Algérienne. L'espèce a été identifiée par le professeur Gérard De Belair (Université Annaba). Un échantillon a été déposé au laboratoire d'obtention de substances thérapeutiques (LOST) (LOST Ca 03/12). Après le séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes sont broyées. (Figure 2.1).



Figure 2.1: *Cotula anthemoides* L [9]

I. 1.2. Récolte de la plante *Pentzia monodiana* Maire

Les parties aériennes de *Pentzia monodiana* Maire ont été récoltées en novembre/décembre 2011 à Tiguentourine, Ain Amenas. L'espèce a été identifiée par le Professeur Gérard De Belair (Université d'Annaba) (Figure 2.2). Après le séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes sont broyées.



Figure 2.2: *Pentzia monodiana* Maire [10]

I. 2. Matériel Chromatographique

I. 2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Utilisés à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice Silicagel 60 F254 (Merck). Le développement des plaques s'effectue avec un éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont les suivants (les proportions sont données en volume) :

- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCOOH}$ (80:20:10)
- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (98:2), (95:5), (85:15), (80:5)
- $\text{AcOet}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (100:10:5)

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par l'acide sulfurique dilué à 50% dans l'eau.

I. 2.2. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Pour cette méthode plusieurs types de phases ont été mises en œuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

Dans notre cas, la phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale SDS 60 Å 70-200 μm et l'élution est réalisée par simple gravité avec le système $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$. La quantité de silice utilisée est généralement 30 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide.

Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

I. 2.3. Chromatographie liquide sous vide (VLC, *vacuum liquid chromatography*)

La chromatographie liquide sous vide (VLC) est réalisée à l'aide d'un verre fritté fixé sur une fiole à vide et une pompe Büchi 688. Ce verre est rempli soit avec de la silice en phase normale, soit avec de la silice en phase inverse, soit en polyamide.

L'échantillon est introduit sous forme solide mélangé à la phase stationnaire. Les systèmes d'élution utilisés sont généralement des mélanges binaires dans des proportions variables au cours de l'élution. Nous avons utilisé le polyamide SC₆ comme phase stationnaire alors que la phase mobile est le système Toluène: MeOH.

I. 2.4. Flash Chromatographie

La chromatographie flash est, comme la VLC, une méthode de séparations préparatives. Elle est souvent utilisée pour fractionner grossièrement des fractions issues de VLC ou de chromatographie d'exclusion stérique.

Notre travail a été effectué sur des colonnes C18 (phase inverse) (Reveleris C18 phase inverse 40g; CV 40mL/min; 45mg-1.35g d'extrait) et sur gel de silice normale (Reveleris@silica 4g; CV 18 mL/min; 15 mg-800mg d'extrait).

I. 2.5. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les analyses CLHP/UV(DAD) ont été effectuées à l'aide d'un appareil Dionex muni d'une pompe Ultimate 3000 avec dégazeur intégré et d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD-UV) 340S pilotés par le logiciel Chromeleon® version 1 et 2.

Nous avons utilisé une colonne de phase inverse de type RP-18 (Phenomenex) (250x15 mm, 5µm) pour une CLHP semipréparative. L'éluant utilisé est à gradient binaire (H₂O (pH 2,4 avec TFA), MeCN) et le débit est fixé à 4 mL/min. Le chromatogramme a été surveillé à 205, 210, 254 et 360 nm.

I. 3. Méthodes physico-chimiques

I. 3.1. Hydrolyse acide

Cette méthode est utilisée pour l'identification des unités de sucres présents dans les chaînes oligosaccharidiques par comparaison à des sucres standards. La procédure consiste à rompre les liaisons osidiques (300mg de l'extrait *n*-BuOH) par l'hydrolyse acide (10mL de TFA (2N)) à haute température (90°C), pendant 3h. L'hydrolysate est ensuite extrait par l'AcOEt (3x10mL). La phase aqueuse acide est neutralisée par évaporations successives à l'aide de méthanol. Les monosaccharides libérés sont identifiés par comparaison avec des sucres standards en CCM dans le système d'élution MeCOEt:*iso*-PrOH:Me₂CO:H₂O

(20:10:7:6). Par ailleurs, Le résidu de monosaccharides (100 mg) a été soumis à une CCM préparative en utilisant le même solvant.

I. 3.2. Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse ont été enregistrés en mode positif et négatif sur un spectromètre Q-TOF Micromass (MANCHESTER, UK). Ces analyses ont été menées par le laboratoire d'Isolement et Structure de l'université Champagne-Ardenne de Reims.

I. 3.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ont été enregistrés au service commun de RMN de Champagne-Ardenne de Reims sur des appareils de type Brüker Avance DRX III 500 (1H à 500 MHz et 13C à 125 MHz) et Brüker Avance DRX 600 (1H à 600 MHz et 13C à 150 MHz) selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, CD_3OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

I. 4. Les activités biologiques

Les tests des activités antioxydante et antityrosinase ont été utilisés sur des plaques 96 puits (Greiner® F bottom), L-Dopa (Sigma®), acide kojique (Alfa Aesar® GmbH&Co KG), Tyrosinase (Sigma Aldresh®), pHmètre (pH 510, Syberscan, EUtech instruments) et la lecture a été réalisée sur le lecteur de microplaque (*FLUOstar*® Omega). Ils sont exprimés en moyenne \pm écart type. Les valeurs de la concentration inhibitrice à 50% (IC50) 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 "student's t-test" et ANOVA univariée pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives.

Chapitre II
***Extraction, Séparation et
purification des métabolites
secondaires***

II. 1. *Cotula anthemoides* L

II. 1.1. Extraction

1400g des parties aériennes de la plante pulvérisée sont mises à macérer à température ambiante dans un mélange hydroalcoolique (Éthanol/Eau, 80/20, V/V), en répétant cette opération 3fois avec renouvellement du solvant (24 à 48 heures/3fois). L'extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température n'excédant pas 40°C, puis dilué avec de l'eau distillée 560mL. Une décantation pendant une nuit permet le dépôt des composés hautement lipophiles (la chlorophylle, les cires, les résines, les boues terpéniques, le sable etc...). La solution ainsi dégraissée subit une filtration pour obtenir une solution aqueuse claire. Cette dernière a subi des extractions de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol (**figure 2.4**).

Les phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Les rendements d'extraction sont donnés dans le tableau 2.1

Tableau 2.1 : Rendement des extraits de *Cotula anthemoides* L.

	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
1400g <i>C.anthemoides</i>	Éther de pétrole	0.4g	0.03
	chloroforme	1.5 g	0.11
	Acétate d'éthyle	0.55 g	0.04
	<i>n</i> -butanol	21.7 g	1.55

Chaque extrait subit une chromatographie sur couche mince afin d'avoir une idée sur les produits à isoler et donc pouvoir choisir l'extrait à étudier.

Notre choix s'est porté sur celui de l'extrait *n*-BuOH, riche en flavonoïdes, qui a subi une chromatographie bidimensionnelle sur plaque de polyamide dans les systèmes S1 [Toluène-MeOH-MEC (4:3:3)] et S2 [H₂O-MeOH-MEC-acétylacétone (13:3:3:1)], pour avoir les empreintes flavoniques et avoir une idée sur les bons systèmes de séparation de cet extrait (figure 2.3).

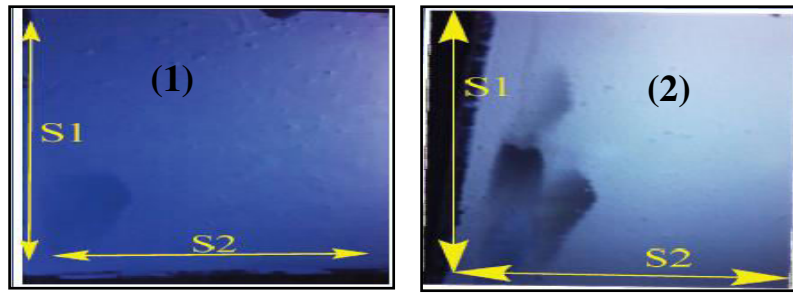


Figure 2.3: Plaque bidimensionnelle de l'extrait AcOEt (1) et de l'extrait *n*-BuOH (2) de *Cotula anthemoides* L.

La plaque de polyamide bidimensionnelle de l'extrait *n*-BuOH montre un bon nombre de composés flavonique, leurs couleurs sous la lampe UV indiquent que ce sont des flavones ou des flavonols substitués en position 3, alors que leur migration dans le système aqueux suggère qu'il y a des hétérosides greffés sur le squelette flavonique.

L'extraction de *C. anthemoides* L est résumée dans l'organigramme suivant (figure 2.4) :

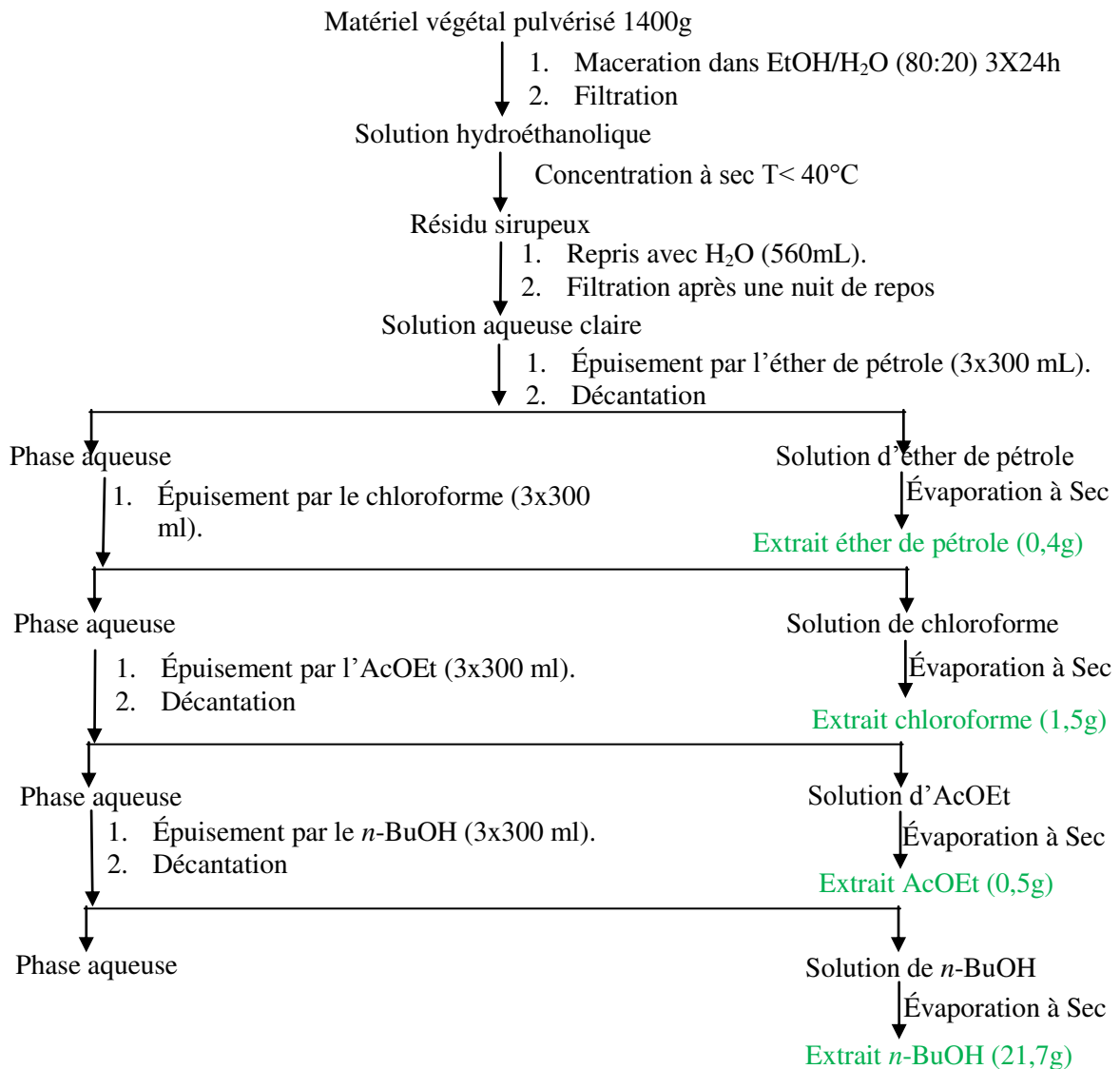


Figure2. 4: Extraction de *Cotula anthemoides* L.

II. 1.2. Séparation et purification de l'extrait *n*-butanol

18g de l'extrait butanolique sont dissous dans le méthanol puis mélangés à quelques grammes de gel de polyamide, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. La poudre a été soumise à une chromatographie liquide sous vide (VLC) de gel de polyamide SC6 préparée dans le toluène. L'élution est réalisée par un gradient de polarité du système toluène-méthanol en commençant par le toluène pur et en terminant par le méthanol pur. Les fractions obtenues sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique en couche mince (CCM), puis révélées à l'acide sulfurique et chauffées à plus de 100°C pendant quelques minutes.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 2.2 suivant :

Tableau 2.2 : Fractionnement de l'extrait *n*-BuOH sur VLC.

N° lot	Fraction	Masse (mg)	Système d'élution		Observations
			Toluene%	MeOH %	
1-7	F1	23.1	100	0	Traces
8-12	F2	21.9	95	5	Traces
13-15	F3	11.9	90	10	Mélange de faible quantité
16-17	F4	4.3	85	15	Mélange de faible quantité
18-19	F5	5.1	80	20	Mélange de faible quantité
20-26	F6	844.7	70	30	Mélange séparable
27-29	F7	639.0	60	40	Mélange séparable
30	F8	145.8	50	50	Précipité majoritaire Ca2
31-36	F9	534.6	30	70	Mélange séparable
37	F10	73.5	20	80	Mélange séparable
38-42	F11	218.9	10	90	Mélange séparable
43-46	F12	847.6	0	100	Trainé

Les fractions obtenues ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique (figure 2.5) afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer et donc pouvoir choisir les fractions à étudier.

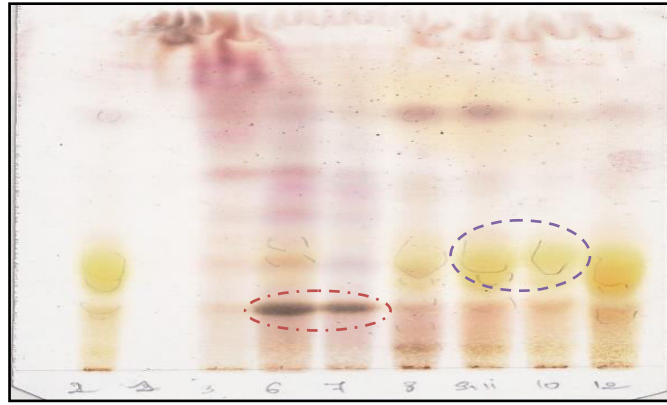
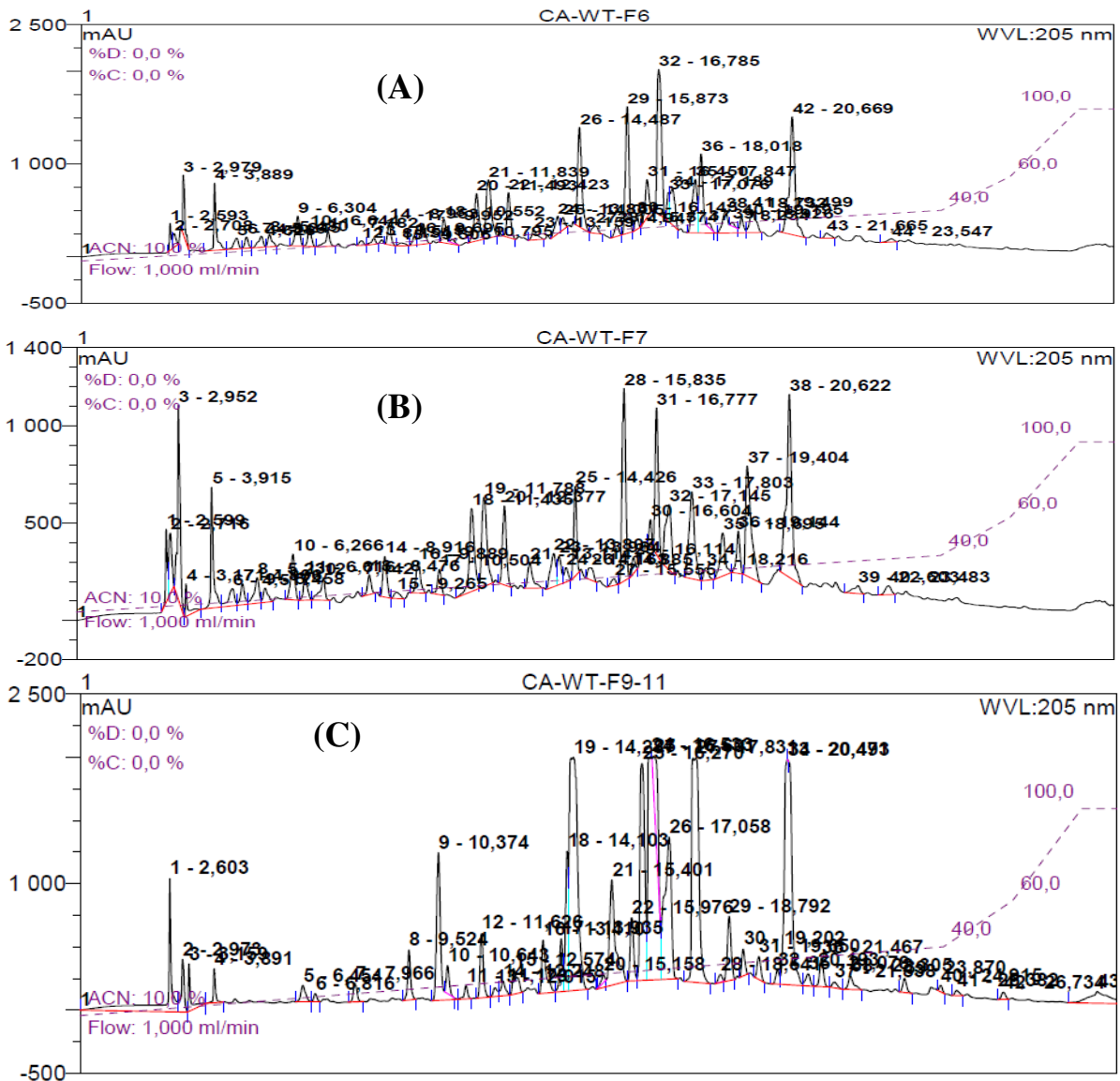


Figure 2.5: Profil CCM sur gel de silice normale de l'extrait *n*-BuOH

Les deux fractions **F6** et **F7** ont été mélangées de même que les fractions **F9**, **F10** et **F11** vu qu'elles partagent les mêmes produits majoritaires (figure 2.6) (Profil par CLHP analytique).



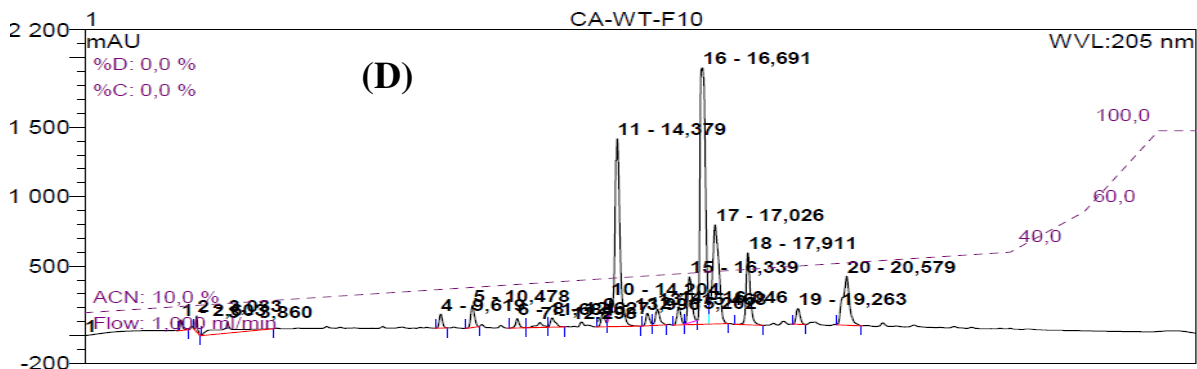


Figure 2.6 : Chromatogramme CLHP analytique (gradient de 10% à 90% MeCN/H₂O) de la fraction **F6**(A), la fraction **F7**(B), la fraction **F9+11** (C) et de la fraction **F10** (D) de l'extrait *n*-BuOH de *Cotula anthemoides*.

La fraction **F8** contient un précipité jaune le composé (**Ca2**) (200mg) qui a été purifié par le MeOH. Les fractions **F6-7** (figure 2.7 schéma de purification) et **F9-11** (figure 2.9 schéma de purification) sont soumises par la suite à des opérations de purification en utilisant la CLHP préparative, et la CLHP semi-préparative.

Ainsi, **15** composés ont été isolés (figures 2.7-2.11)

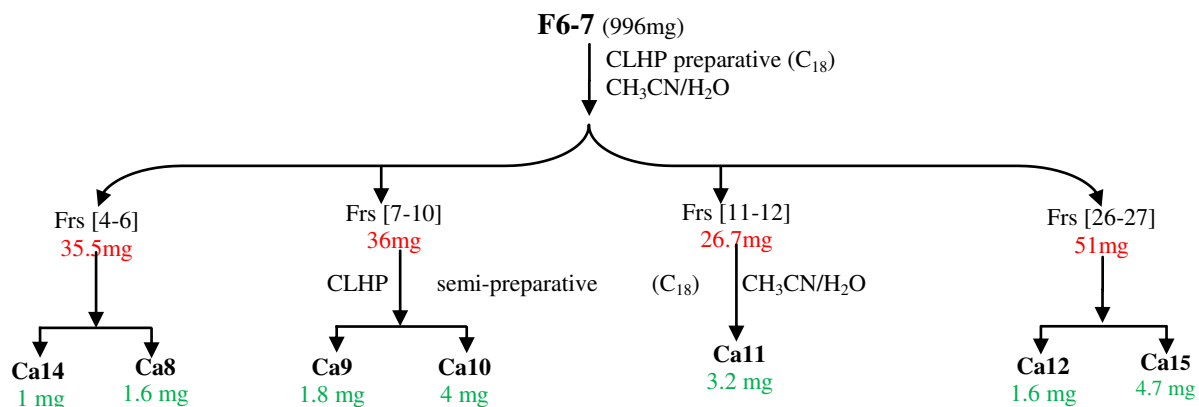


Figure 2.7: Schéma de purification de la fraction **F6-7**.

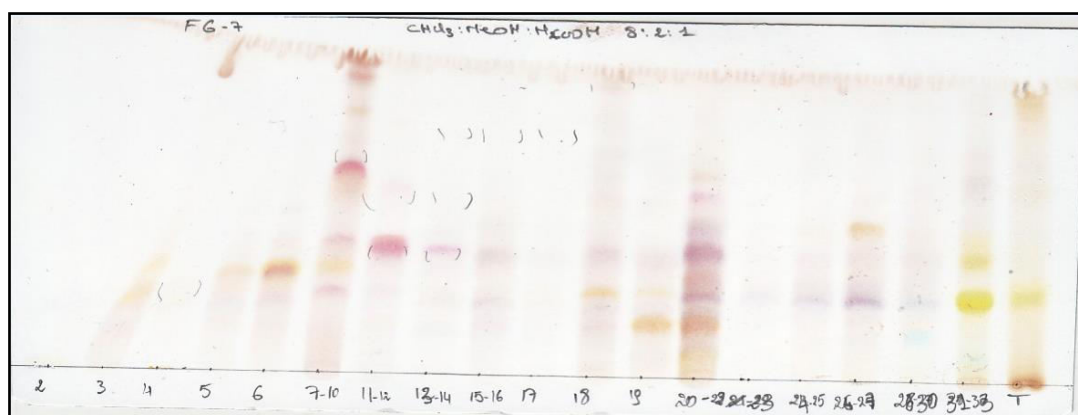


Figure 2.8: CCM de purification de la fraction **F6-7**.

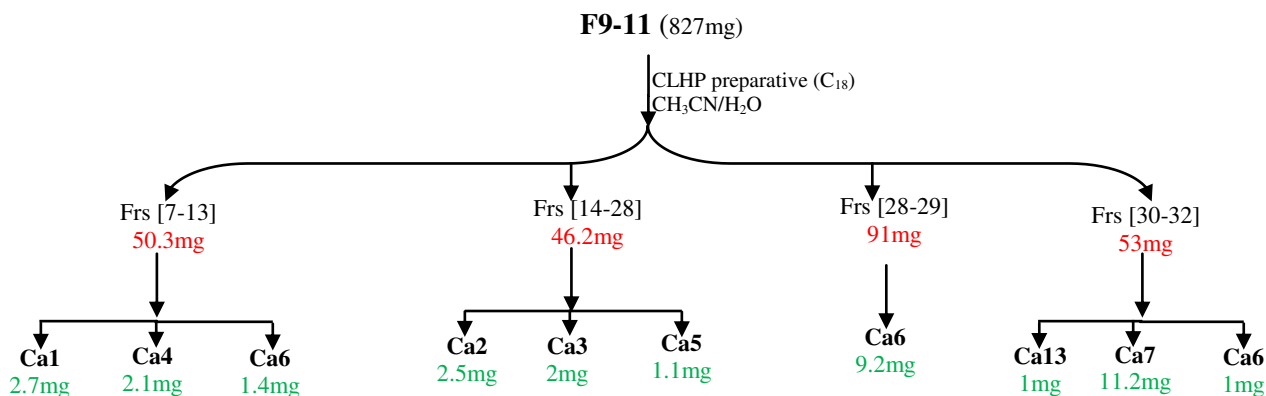


Figure 2.9: Schéma de purification de la fraction **F9-11**.

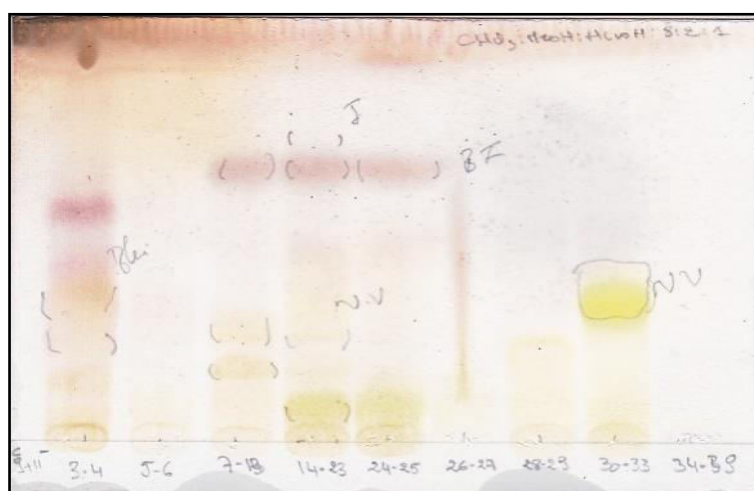


Figure 2.10: CCM de purification de la fraction **F9-11**.

La différence de couleur de ces composés isolés (**Ca1-Ca16**) sur plaque CCM, après révélation par l'acide sulfurique puis chauffage à plus de 100 °C, pendant quelques minutes, montre que ce sont différents métabolites et pas seulement des flavonoïdes.

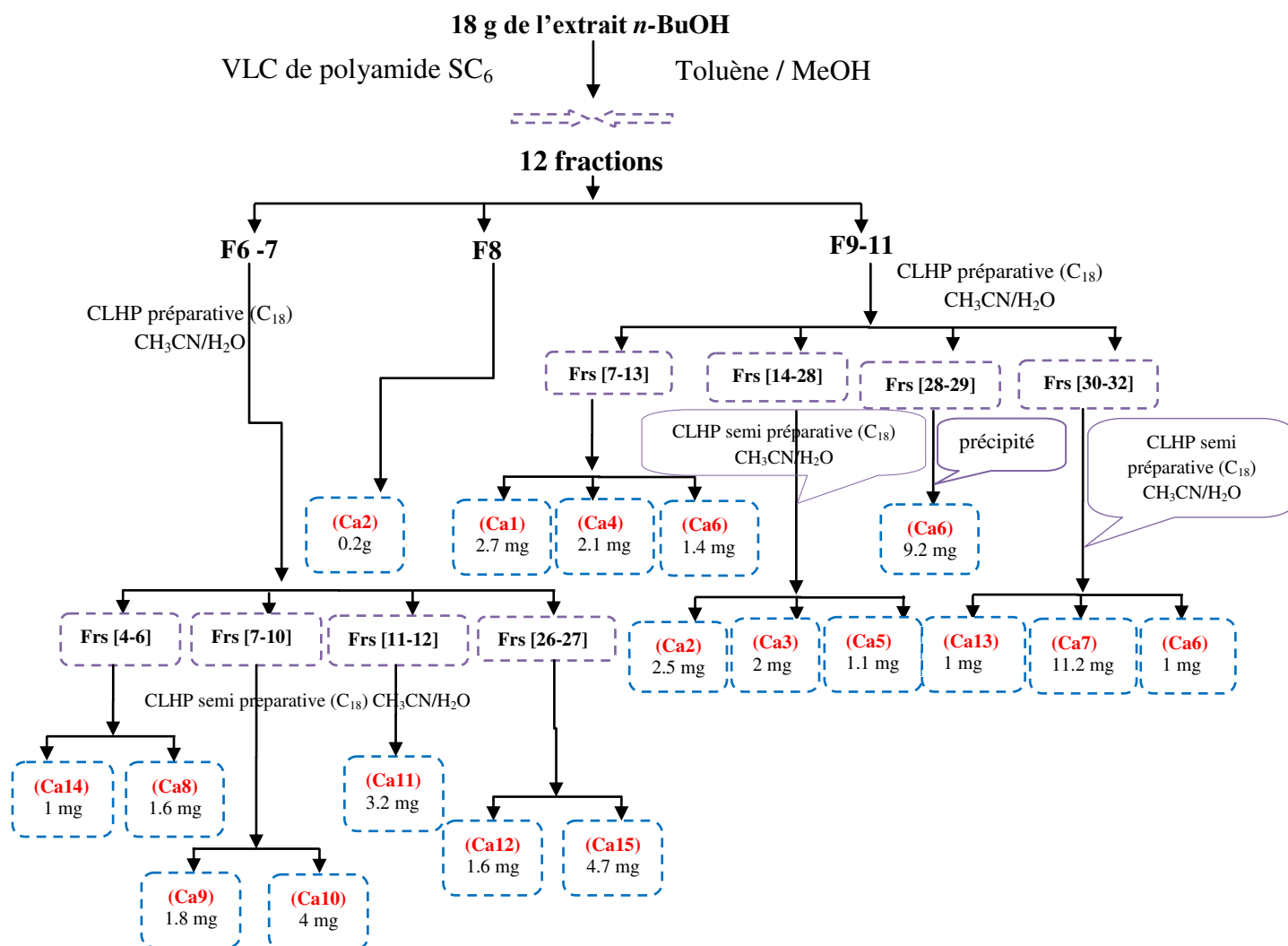


Figure 2.11: Schéma de séparation de l'extrait *n*-BuOH de *Cotula anthemoides* L.

II. 2. *Pentzia monodiana* Maire

II. 2.1. Extraction

1350 g des parties aériennes de l'espèce *Pentzia monodiana* Maire sont broyés et extraits par le soxhlet trois fois dans le chloroforme, les fractions chloroformiques obtenues sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite à une température, n'excédant pas 35°C pour obtenir 22 g d'extrait chloroformique.

Les marcs ainsi obtenus ont subi une extraction à chaud par l'acétone (trois fois). Les solutions acétone obtenues sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite à une température, n'excédant pas 30°C pour obtenir 14 g d'extrait Acétone.

Les marcs ainsi obtenus ont subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (MeOH/Eau : 70/30 : V/V) pendant 48h, en répétant cette opération 3 fois. Le macérât obtenu est filtré puis concentré à sec sous pression réduite et à une température modérée (environ

45°C). L'extrait brut obtenu est repris avec de l'eau distillée pour obtenir une solution aqueuse, cette dernière subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant l'acétate d'éthyle puis le *n*-butanol.

Les phases organiques obtenues sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Les rendements d'extraction sont donnés dans le tableau 2.3:

Tableau 2.3 : Rendements des extraits *Pentzia monodiana* Maire.

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
1350g	CHCl ₃	22	1.63
	AcOH	14	1.04
	AcOEt	0.2	0.01
	<i>n</i> -BuOH	0.8	0.06

Chaque extrait subit une CCM afin d'avoir une idée sur les produits à isoler et donc pouvoir choisir l'extrait à étudier.

Les deux extraits Acétone et *n*-BuOH ont subi une chromatographie bidimensionnelle sur plaque de polyamide dans les systèmes S1 [Toluène-MeOH-MEC (4:3:3)] et S2 [H₂O-MeOH-MEC-acétylacétone (13:3:3:1)], pour avoir les empreintes flavoniques et avoir une idée sur les bons systèmes de séparation de ces extraits (figure 2.12).

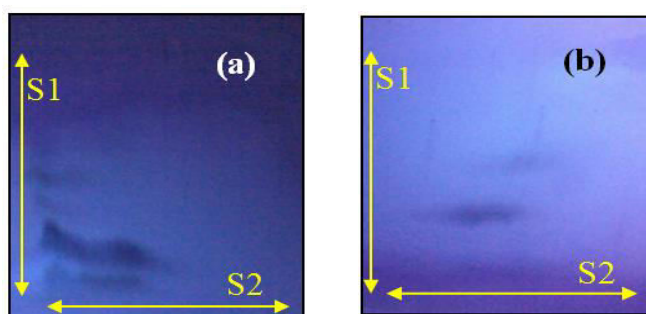


Figure 2.12: plaque bidimensionnelle de l'extrait acétone (a) et de l'extrait *n*-BuOH (b) de *Pentzia monodiana* Maire.

Notre choix s'est porté sur celui de l'extrait acétone qui est riche en flavonoïdes et même sa quantité est importante.

L'extraction de *P. monodiana* Maire est résumée dans l'organigramme suivant (figure 2.13) :

Matériel végétal pulvérisé 1350g

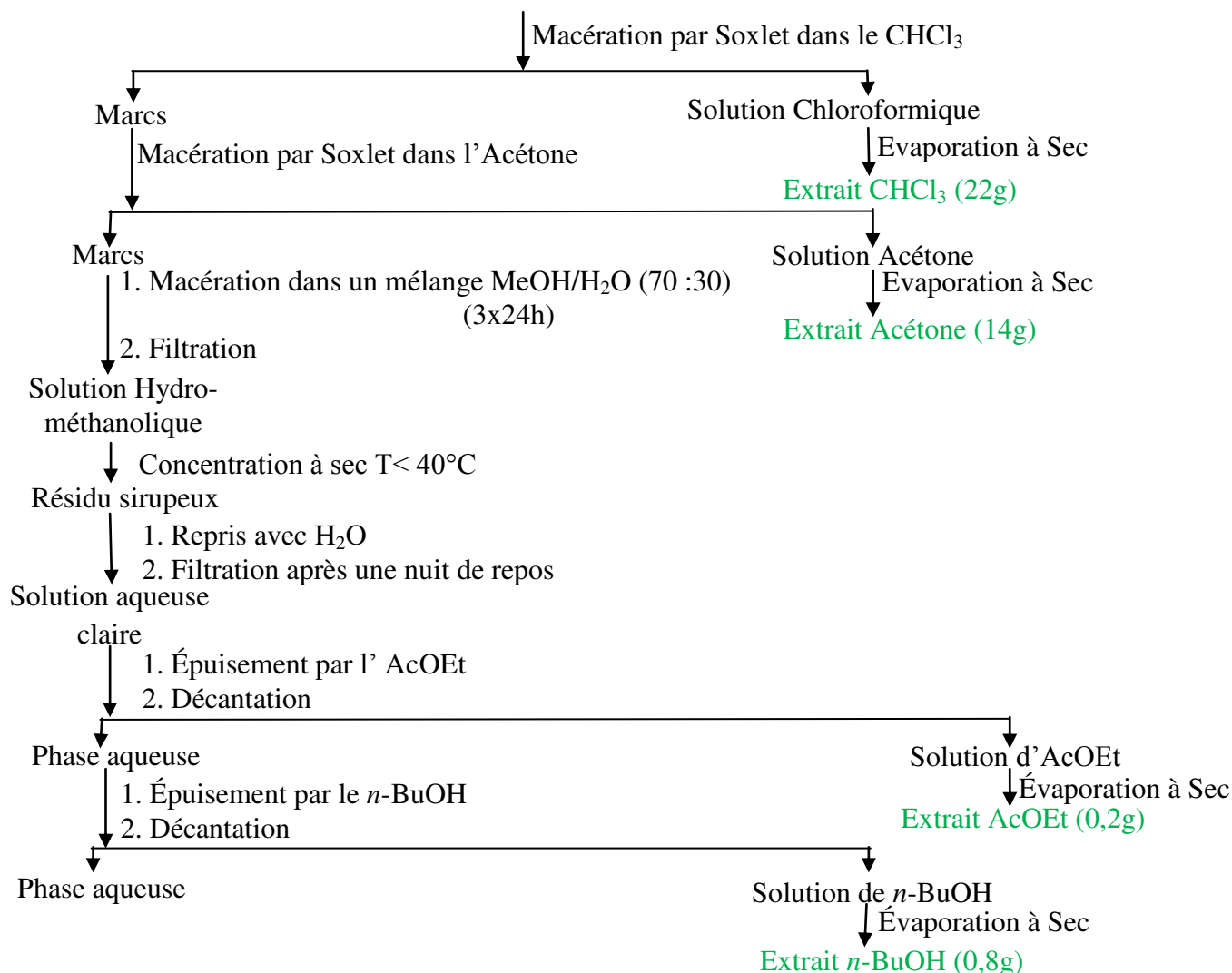


Figure 2.13: Extraction de *Pentzia monodiana* Maire.

II. 2.2. Séparation et purification de l'extrait acétone

Avant d'entamer la séparation chromatographique sur colonne de cet extrait, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice, la meilleure séparation obtenue était avec l'éluant CHCl₃/MeOH.

Une masse de 12g de l'extrait acétone est déposée sur une colonne chromatographique de gel de silice 60 (63-200µm) préparée dans le CHCl₃, avec un gradient d'éluant CHCl₃/MeOH (1:0 à 0 :1). Des fractions de 50 ml ont été recueillies et regroupées en fonction de leurs profil en CCM visualisées sous lampe UV (254 et 365nm) puis révélées à l'acide sulfurique en chauffant les plaques à plus de 100°C pendant quelques minutes, pour obtenir 16 fractions (tableau 2.4).

Tableau 2.4 : Fractionnement de l'extrait acétone sur CC.

N° lot	Fraction	Masse (mg)	Système d'éluion		Observations
			CHCl ₃ %	MeOH %	
1-20	C1-C13	3.7	100	0	Traces
21-33	C14	10.3	98	2	Traces
34-48	C15	19.3	95	5	Traces
49-60	C16	15.2	90	10	Mélange de faible quantité
61-75	C17	76.3	90	10	Mélange séparable
76-88	C18	7.8	85	15	Mélange de faible quantité
89-100	C19	5.1	80	20	Mélange de faible quantité
101-115	C20	22.6	75	25	Mélange séparable
116-122	C21	14.1	70	30	Précipité de faible quantité
123-130	C22	84.2	60	40	Mélange séparable
131-139	C23	10.8	50	50	Mélange de faible quantité
140-148	} C24 C25	108.0	40	60	Mélange séparable
149-152		688.7	30	70	Mélange séparable
153-160	C26	10.9	20	80	Mélange de faible quantité
161-175	C27	14.8	10	90	Mélange de faible quantité
176-194	C28	20.1	0	100	Mélange de faible quantité

Ces fractions obtenues ont été analysées par CCM et CLHP analytique (figure 2.14) afin d'avoir une idée sur le nombre de produits à séparer et donc pouvoir choisir les fractions à étudier.

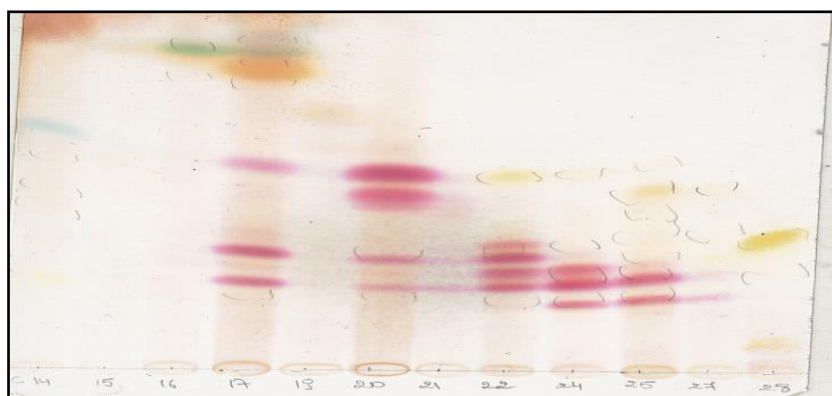


Figure 2.14: Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait acétone

Parmi les 16 fractions obtenues, seules les fractions C17, C22, C24-25 ont été traitées (figure 2.15).

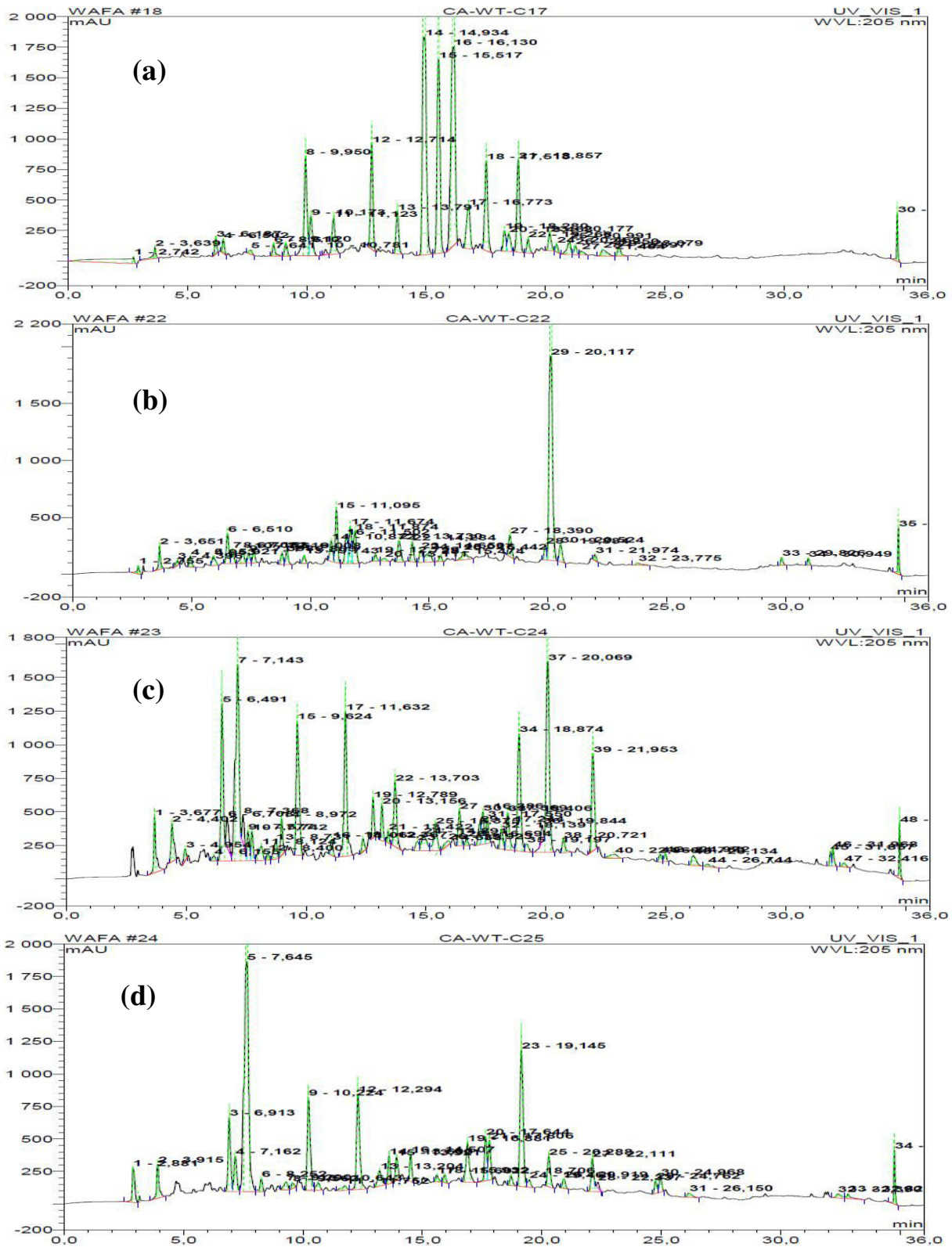


Figure 2.15 : Chromatogramme CLHP analytique (gradient de 20% à 90% MeCN/H₂O) de la fraction C17(a), la fraction C22(b), la fraction C24 (c) et la fraction C25 (d) de l'extrait acétone de *Pentzia monodiana* Maire.

➤ **Etude de La fraction C17 :**

Cette fraction a été chromatographiée par CLHP semi préparative en phase inverse C_{18} selon le schéma suivant (Figure 2.16) et analysées par CCM (Figure 2.17):

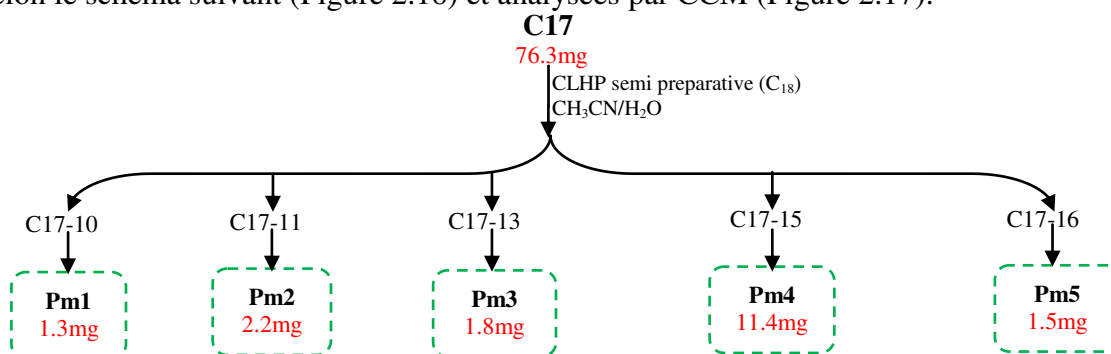


Figure 2.16: Schéma de purification de la fraction C17.

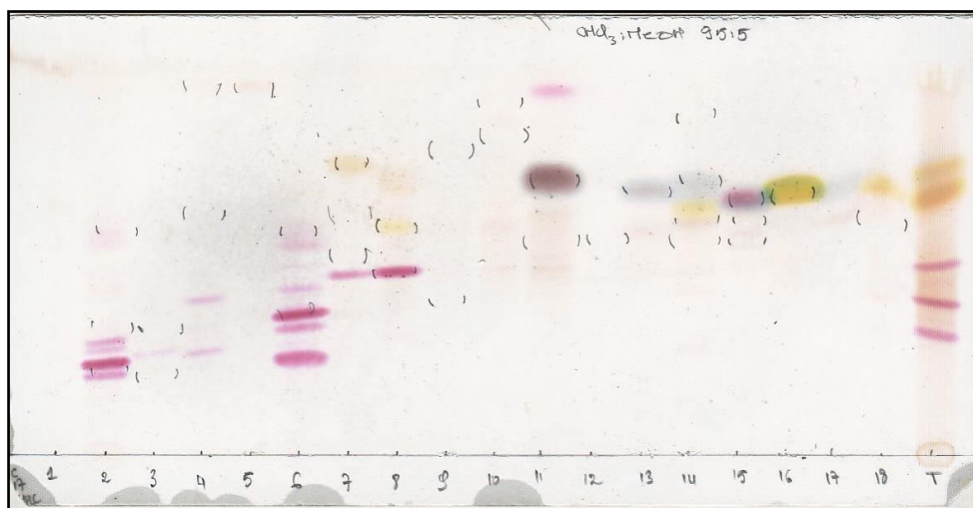


Figure 2.17: CCM de purification de la fraction C17.

Les deux fractions C22, C24-25 ont subi des séparations en utilisant le système de flash chromatographie qui permet de réaliser des séparations et purifications de façon automatisée, ce qui apporte à l'utilisateur un gain de temps, une économie de solvant et une meilleure reproductibilité.

➤ **Etude de La fraction C22 :**

Une cartouche de 4g de gel de silice en phase normale a été utilisée pour le sous fractionnement de 32.5mg de la fraction C22 par flash chromatographie en utilisant comme système de séparation gradient $CHCl_3:MeOH$. Des fractions de 25 mL par minute ont été récoltées et regroupées selon leur profil en CCM en phase normale fournissant 13 sous fractions (tableau 2.5) (figure 2.18).

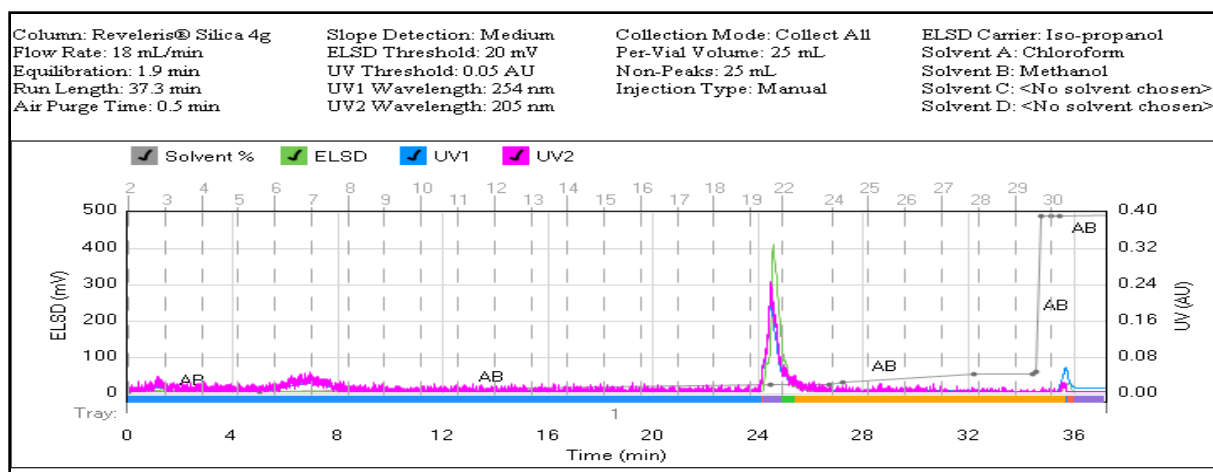


Figure 2.18: Chromatogramme Flash (gradient $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) de la fraction C17.

Tableau 2.5: Flash chromatographie de la fraction C22 sur colonne de gel de silice normale.

N°lot	fraction	Masse (mg)	N°lot	fraction	Masse (mg)
1-4	C22-1	0.6	22	C22-8	32.5
5	C22-2	0.7	23	C22-9	15.5
6-9	C22-3	1.4	24	C22-10	9.4
10-15	C22-4	3.4	25	C22-11	1
16-18	C22-5	0.9	26	C22-12	1.6
19-20	C22-6	36.4	27-33	C22-13	46.5
21	C22-7	0.6			

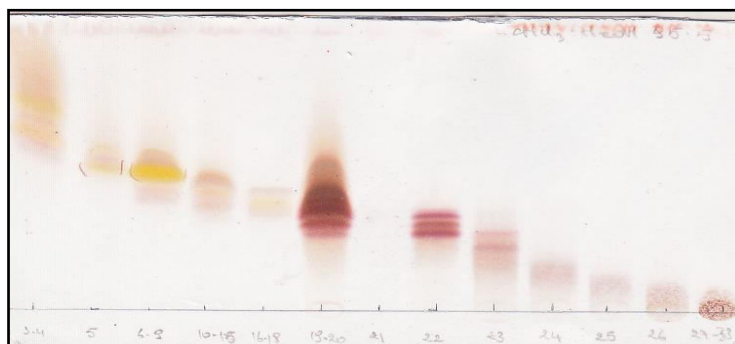


Figure 2.19: CCM de purification de la fraction C22.

Après cette séparation, on a obtenu le composé **Pm6** (1,4mg) pur dans la fraction **C22-3** de cette colonne.

➤ Etude de La fraction C24-25 :

Une cartouche de 40 g de gel de silice greffée C18 a été choisie pour le fractionnement de 790mg de la fraction C24-25, par flash chromatographie éluée avec le système $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$. Des fractions de 25 mL par minute ont été récoltées et regroupées selon leur profil en CCM en phase normale, conduisant à 30 sous fractions (tableau 2.6) (figure 2.20).

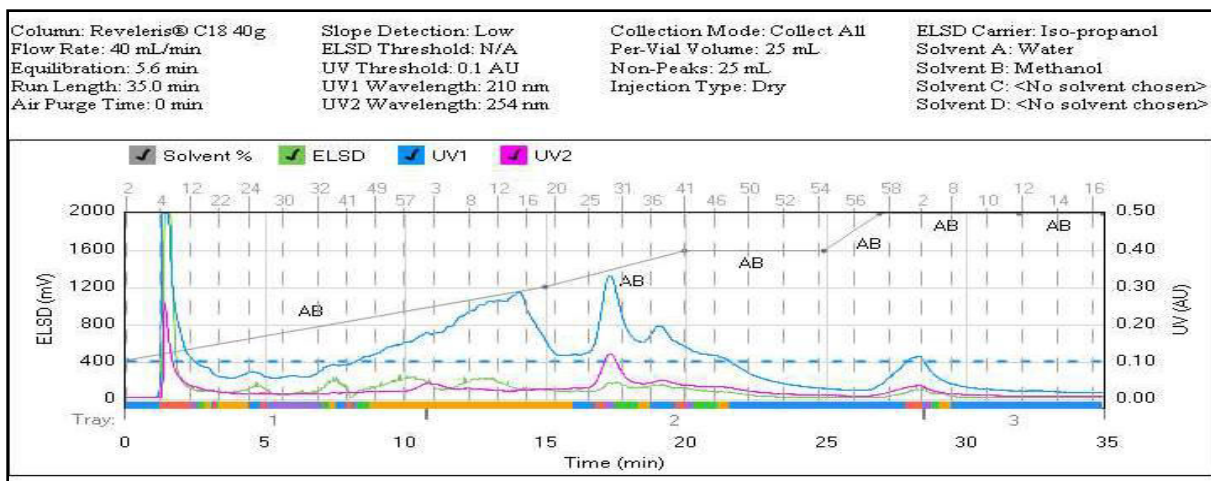
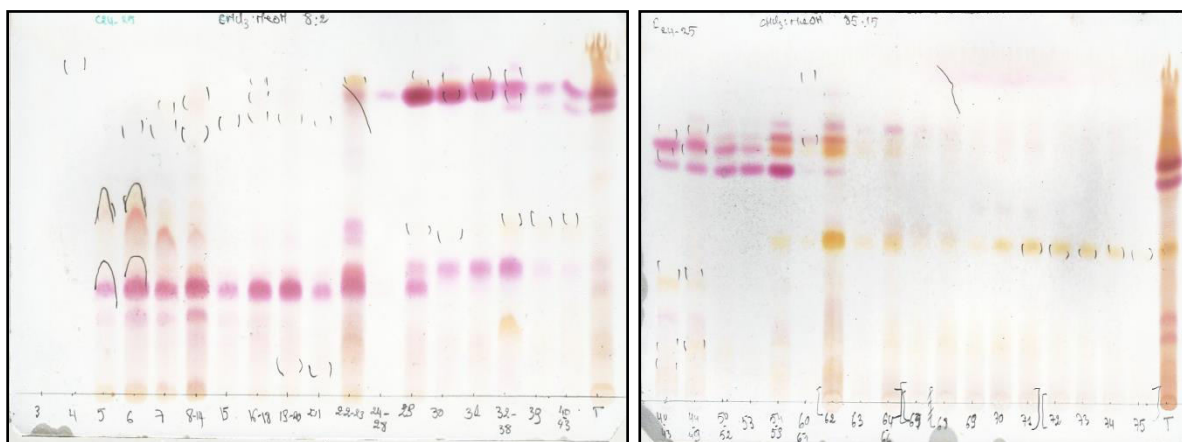


Figure 2.20 : Chromatogramme Flash (gradient MeOH/H₂O) de la fraction C24-25.

Tableau 2.6: Flash chromatographie de la fraction C24-25 sur colonne greffée C₁₈

N°lot	Fraction	Masse (mg)	N° lot	Fraction	Masse (mg)
1-3	C24-25-1	0.9	53	C24-25-16	3.3
4	C24-25-2	13.8	54-59	C24-25-17	28.3
5-14	C24-25-3	30	60-61	C24-25-18	7.8
15	C24-25-4	1.6	62-63	C24-25-19	5.8
16-18	C24-25-5	4.5	64-66	C24-25-20	14.6
19-20	C24-25-6	3.7	67	C24-25-21	7.2
21	C24-25-7	1.3	68-75	C24-25-22	51.8
22-23	C24-25-8	15.5	76	C24-25-23	6.7
24-28	C24-25-9	1.3	77	C24-25-24	5.3
29	C24-25-10	5.6	78-79	C24-25-25	4.5
30-31	C24-25-11	0.5	80-81	C24-25-26	8.2
32-38	C24-25-12	14.9	82	C24-25-27	2.4
39	C24-25-13	17	83-87	C24-25-28	11.3
40-49	C24-25-14	6	88-93	C24-25-29	16.6
50-52	C24-25-15	5.5	94-136	C24-25-30	37.9



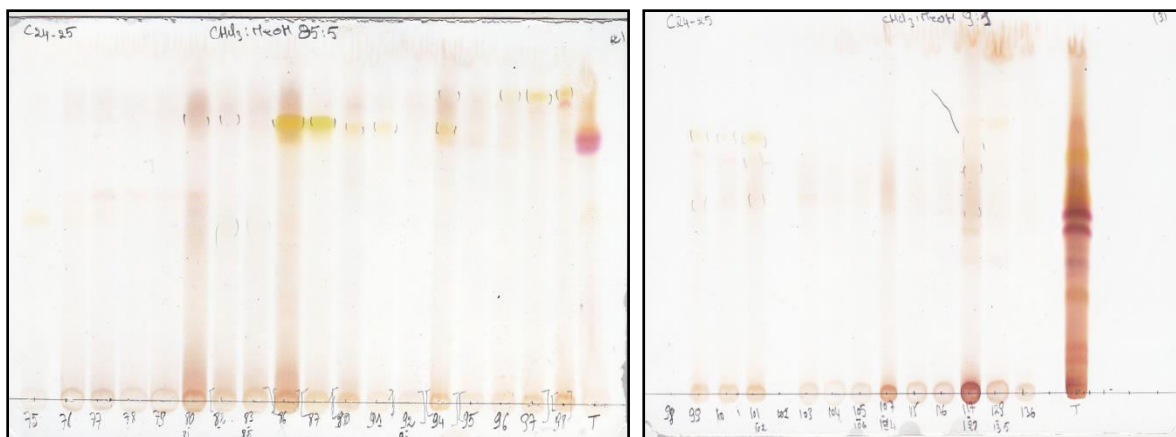


Figure 2.21: CCM de purification de la fraction **C24-25**.

Après cette séparation, on a obtenu le composé **Pm10** (16.6mg) pur dans la fraction **C24-25-29** de cette colonne.

- ✓ 51.8mg de la sous fraction **C24-25-22** ont été chromatographie sur CLHP semi préparative en phase inverse pour donner **trois** produits purs selon les figures (2.22-2.23)

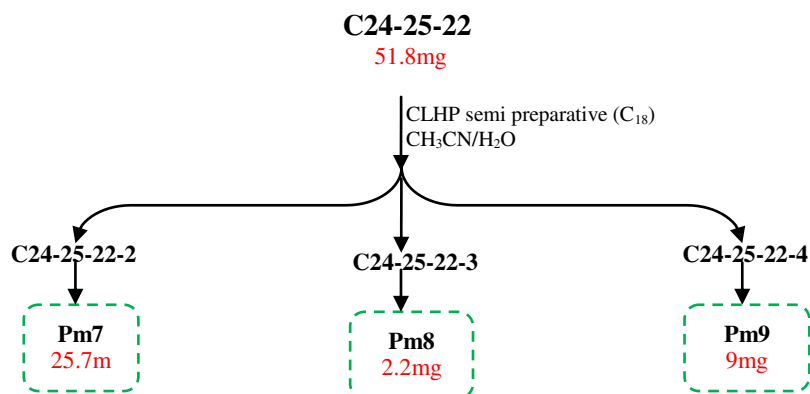


Figure 2.22: Schéma de purification de la fraction **C24-25-22**.

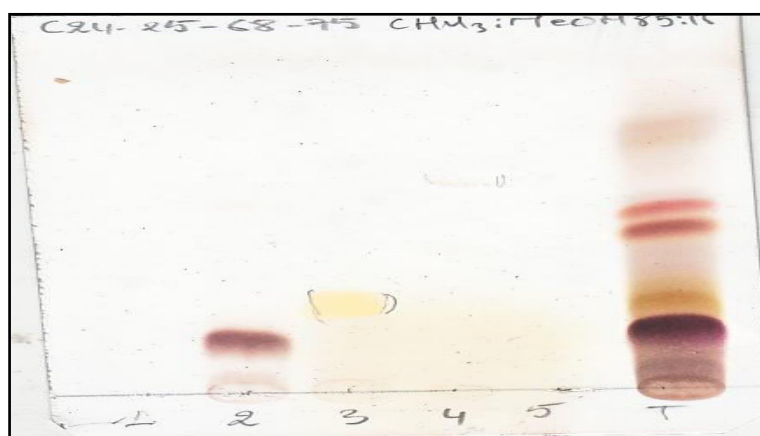


Figure 2.23: CCM de purification de la fraction **C24-25-22**.

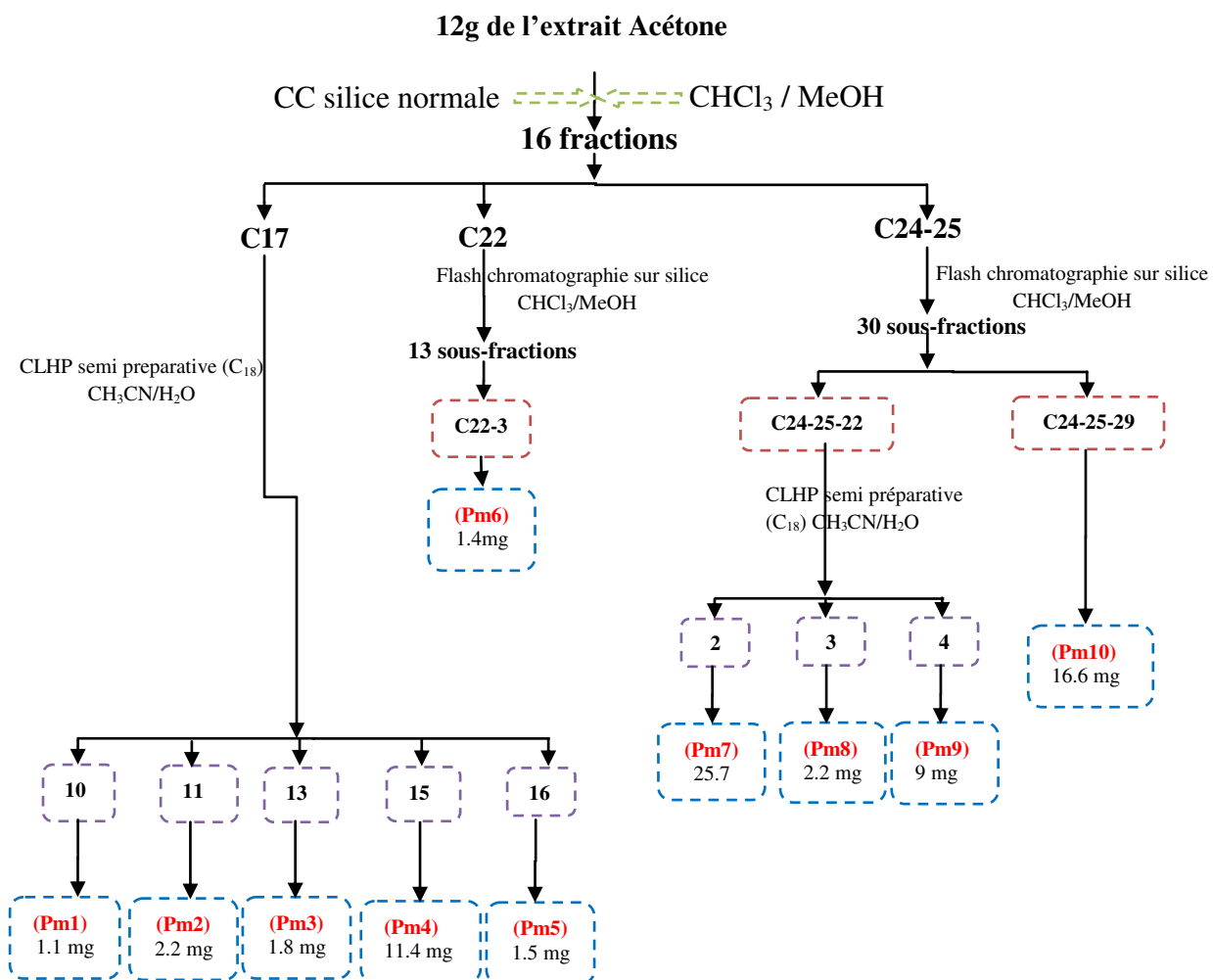


Figure 2.24 : Schéma de séparation de l'extrait acétone de *Pentzia monodiana* Maire.

Chapitre III

Activités Biologiques: antioxydante, anticholinestérase et antityrosinase

III. 1. Activité Antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits/produits peut se réaliser selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude nous avons choisi d'évaluer l'activité antioxydante par quatre tests (DPPH, ABTS, CUPRAC et test de chélation des ions ferreux).

L'IC₅₀ montre la concentration du substrat qui cause l'inhibition de 50% de l'activité de DPPH[•] et ABTS^{•+}.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, en pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des échantillons testés.

Pour le test du CUPRAC, les résultats sont exprimés par des absorbances et comparé avec celles du BHA et α -tocophérol qui représentent des standards d'antioxydants.

Pour le test de chélation des ions ferreux, l'EDTA (l'acide éthylène diamine tétraacétique) a été utilisé comme un standard d'antioxydant.

Durant cette étude, nous avons testé l'activité antioxydante des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de la plante *Cotula anthemoides* L, et des extraits Acétone et *n*-butanol de la plante *Pentzia monodiana* Maire ainsi que les produits purs isolés de ces deux plantes.

Les solutions d'échantillons sont préparées en série de 7 dilutions à partir d'une solution mère de 500ppm.

A partir de la solution mère (S1) (500 ppm), on a effectué des dilutions pour S2 au 1/2, S3 au 1/4, S4 au 1/8, S5 au 1/16, S6 au 1/32 et S7 au 1/64. De la même façon, on a préparé la gamme des concentrations des standards.

III. 1.1. Protocole du test DPPH

La méthode utilisée est celle de Blois (Blois 1958) avec quelques modifications (Öztürk et al., 2011).

Une solution mère de DPPH est préparée à 0.4 μ M (160mg dans 100mL d'éthanol ensuite 2mL de cette dernière ont été dilués avec 50mL du MeOH). Elle peut être conservée pendant un mois maximum à 4°C à l'abri de la lumière.

Dans les puits de 200 μ L, nous introduisons 40 μ L de solution d'échantillon, ou du témoin (ac. Ascorbique, α -tocophérol ou BHA) puis 160 μ L de solution DPPH à 0.4 μ M. Pour chaque échantillon (préparés en triplicates), nous préparons des puits contrôle (sans extrait c'est-à-dire 40 μ L de MeOH) pour éliminer l'absorbance propre à l'échantillon.

La lecture des plaques se fait à $\lambda=517$ nm en mode cinétique pendant 30 minutes.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution. Celui-ci est calculé en utilisant la formule suivante :

$$DPPH^{\bullet} \% d'inhibition = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100$$

$A_{\text{Contrôle}}$: Absorbance de la réaction témoin contenant du DPPH.

A_{Extrait} : Absorbance de la réaction contenant de l'extrait /des standards.

III. 1.2. Protocole du test ABTS

Ce test est déterminé selon la méthode de Re (Re et al., 1999) avec une légère modification. (Öztürk et al., 2011).

Une solution d'ABTS^{•+} est le produit de la réaction de 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS (9.6mg d'ABTS+2.5mL d'eau) mélangé à 2.45 mM de persulfate de potassium, le tout est conservé dans l'obscurité et à température ambiante durant 12-16h avant l'utilisation. La solution obtenue est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,708 \pm 0,025$ à 734nm.

160 μ L de cette solution ont été ajoutés à 40 μ L des différentes concentrations de chaque échantillon, ainsi que l'antioxydant standard α -tocophérol déposé déjà en triplicata sur une microplaque à 96 puits (200 μ L). Après 10 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 734nm. Le témoin (Contrôle) est préparé de la même manière mais avec 40 μ L de méthanol.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé pour chaque concentration de l'absorbance du blanc (éthanol).

La capacité de piéger l'ABTS^{•+} est calculée par la formule suivante :

$$ABTS^{\bullet+} \% d'inhibition = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100$$

Où :

$A_{\text{Contrôle}}$: Absorbance de la réaction témoin contenant l'ABTS^{•+}.

A_{Extrait} : Absorbance de la réaction contenant de l'extrait /des standards.

III. 1.3. Protocole du test CUPRAC

Selon la méthode d'Apak (Apak et al., 2004). La capacité antioxydante de réduction cuprique des extraits a été déterminée.

Dans chaque puits 200µL, 40µL d'extrait de chaque concentration ont été ajoutés au mélange (50µL (10 Mm) de Cu (II) + 50µL (7.5 Mm) de neocuproïne et 60µL du tampon NH₄Ac (1 M, pH=7.0)).

Après 1h d'incubation l'absorbance à 450nm a été enregistrée.

III. 1.4. Protocole du test de chélation des ions ferreux

L'activité de chélation des ions Fe²⁺ a été mesurée en utilisant La Ferrine avec une légère modification (Decker & Welch 1990)

40µL de différentes concentrations des extraits ont été ajoutés à: 40µL EtOH, 40µL FeCl₂ (0.2mM) et 80µL feréne (0.5mM).

Le mélange a été secoué vigoureusement et laissé à température ambiante pendant 10 min. Après que le mélange a atteint l'équilibre, l'absorbance a été mesurée à 562 nm.

L'activité de chélation du métal a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Effet de chélation du métal \%} = (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}} / A_{\text{contrôle}}) \times 100$$

Où :

A_{contrôle} : est l'Absorbance du contrôle exempt d'échantillon

A_{échantillon} : est l'Absorbance d'échantillon en présence du chélateur.

III. 2. Activité Anticholinestérase

Les activités inhibitrices de l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) ont été mesurées en modifiant légèrement la méthode spectrophotométrique d'Ellman et al. (1961).

Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE de sérum de cheval ont été utilisés, ainsi que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction (AChE et BChE respectivement) avec l'acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque (DTNB), pour la mesure de l'activité anticholinestérase. Pour mesurer l'activité inhibitrice AChE, un volume de: 130 µL du tampon de phosphate de sodium (100 mM, pH = 8), 10 µL de l'extrait à différentes concentrations, et 20 µL de l'enzyme AChE (5.32 x 10⁻³ U), ont été incubés pendant 15 min à 25°C, puis 20 µL de DTNB (0.5 mM) ont

été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 20 µL d'iodure d'acétylthiocholine (0.71 mM). L'analyse de l'activité inhibitrice BChE a été déterminée suivant les mêmes étapes de celles de l'AChE, en utilisant l'enzyme BChE (6.85×10^{-3} U) et le substrat chlorure butyrylthiocholine (0.2 mM). L'hydrolyse de ces substrats a été surveillée par spectrophotométrie de la coloration jaune de 5-thio-2-nitrobenzoate formé par la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou de chlorure de butyrylthiocholine. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque 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 :

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

Où : $A_{\text{Contrôle}}$ est l'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai,
 A_{Extrait} est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test.

III. 3. Activité Antityrosinase

L'activité antityrosinase a été évaluée grâce à une méthode colorimétrique basée sur la mesure de la densité optique du dopachrome obtenu à partir de L-DOPA (substrat) sous l'action de la tyrosinase (Ngoc et al., 2009).

La tyrosinase (T3824-50KU) isolée du champignon *Agaricus bisporus*, a une grande ressemblance avec celle de l'homme (Schoot Uiterkamp & Mason 1973)

Le dopachrome (dopaquinone), indicateur de l'activité oxydative de la tyrosinase, absorbe la lumière à 475nm, donc la formation de cette molécule peut être suivie par spectrophotométrie.

Le pH est ajusté par pH-mètre à 6.8, le tampon PBS est préparé à partir d'une solution de phosphate disodique (Na_2HPO_4 , 12 H_2O) à 0.02M et d'une solution d'acide citrique monohydrate ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, H_2O) à 0.01M.

La L-Dopa (Sigma®) à 0.5mM dans le PBS, utilisée comme substrat de l'enzyme.

Une solution mère de la tyrosinase à 1350 U/mL dans le PBS (conservée pendant 2 jours dans le congélateur), la solution de test à 135 U/mL est à préparer extemporanément par une dilution au 1/10.

Une gamme de dilution de l'acide kojique ($C_6H_6O_4$, inhibiteur de référence) dans le PBS à 1mM, 0.5mM, 0.25mM, 0.125mM et 0.0625mM a été préparée.

Les échantillons: les solutions mères sont préparées dans le DMSO 10% dans l'eau pour les produits purs (1mg/mL).

➤ Préparation des plaques

Dans la plaque à 96 puits, 100 μ L de chaque solution de composé testé (dissous dans 10% de DMSO) a été mélangé avec 100 μ L de solution de tyrosinase (135 U/mL de tyrosinase champignon dans une solution tampon de phosphate (PBS, pH 6.8)).

Après pré-incubation à 25°C pendant 10min, 100 μ L de L-DOPA (0.5 mM, PBS pH 6.8) a été ajouté.

Le mélange réactionnel a été incubé pendant encore 5 min à 25°C.

Le pourcentage de l'inhibition est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = [(A-B)-(C-D)] / (A-B) \times 100$$

D'ou:

A: Absorbance à 475 nm sans produits à tester.

B: Absorbance à 475 nm sans le produits à tester et tyrosinase.

C: Absorbance à 475 nm avec le produits à tester.

D: Absorbance à 475 nm avec le produit à tester mais sans la tyrosinase.

Partie III
RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I

Élucidation Structurale des métabolites secondaires isolés de *Cotula anthemoides* L

I. 1. Elucidation Structurale de Ca1

La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en C-3, cela est confirmé par le spectre UV (figure 3.1) enregistré dans le méthanol qui montre deux bandes d'absorption, une bande I à 350 nm et l'autre bande II à 260 nm pour le composé Ca1.

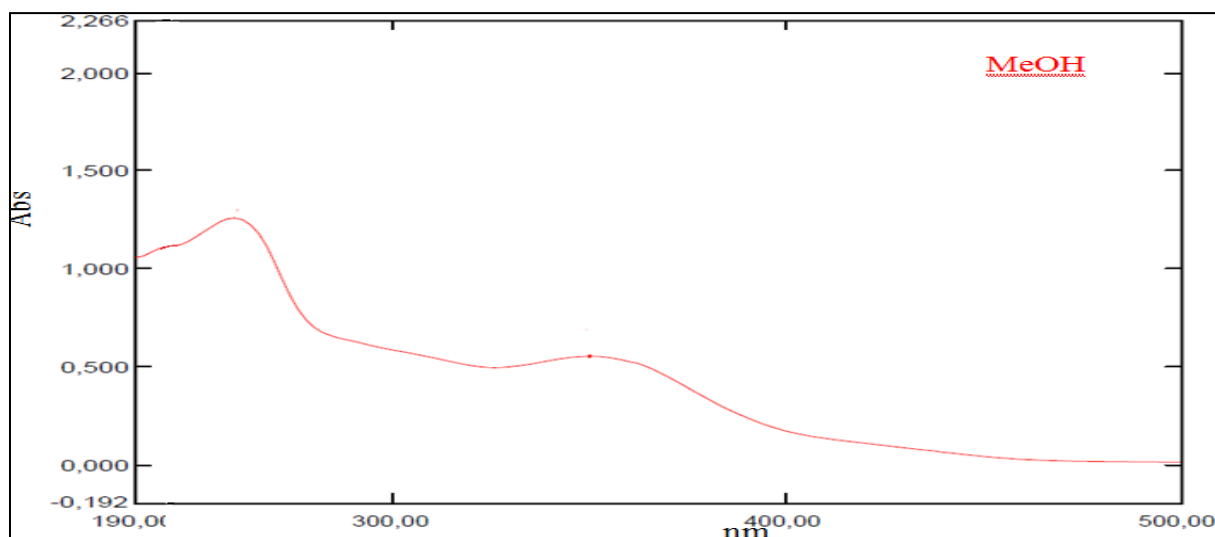


Figure 3.1: Spectre UV du composé Ca1.

L'analyse par spectrométrie de masse, réalisée à haute résolution en mode électrospray positif du composé Ca1 (figure 3.2), montre la présence d'un ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z=681.0744$ ce qui indique une masse moléculaire de 658, suggérant aussi la formule brute $C_{26}H_{26}O_{18}S$.

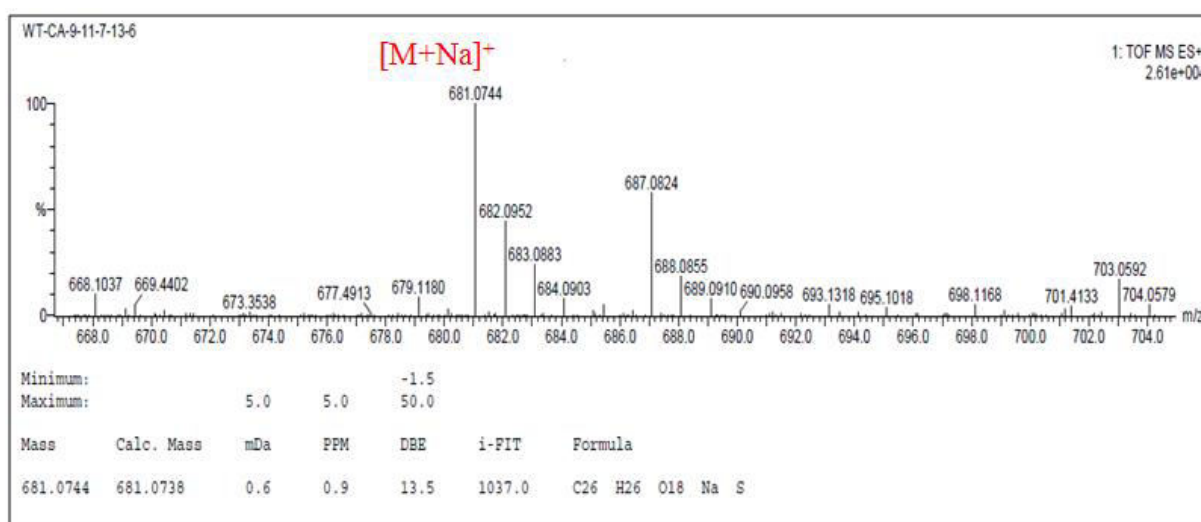


Figure 3.2: Spectre de masse HR-SMIE du composé Ca1.

Le spectre RMN ^1H de ce composé (figure 3.3) enregistré dans CD_3OD , montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavonoïde que l'on peut identifier par :

-Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6.26\text{ppm}$ et à $\delta_{\text{H}} = 6.38\text{ppm}$ attribuables respectivement à H-6 et H-8. Ces signaux couplent entre eux en *mé*ta, caractéristiques d'un cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7.

- Concernant le cycle B, ses protons résonnent généralement entre 6.70ppm et 7.90ppm. Sur le présent spectre nous observons deux singulets à 7.43ppm et 7.85ppm caractéristiques respectivement des protons H-3', H-6'. Ceci indique que ce cycle aromatique est substitué en positions 2', 4' et 5' (Marco et al., 1988).

Le spectre montre aussi :

- Un singulet à 1.90ppm d'intégration 3H attribuable au méthyle d'un groupement acyle.

-Un doublet de doublet d'intégration 1H à 3.45ppm ($J = 14.1$ et 6.8Hz) correspondant à un proton d'un $\text{CH}_2\text{-SO}_2$.

-Un multiplet à 3.56ppm d'intégration 1H attribuable au second proton d'un $\text{CH}_2\text{-SO}_2$.

- Un doublet de doublet à 5.42ppm d'intégration 1H ($J = 6.5$ et 4.1Hz) attribuable au proton d'un CH-O.

On observe aussi un doublet à $\delta_{\text{H}} = 5.07\text{ppm}$ ($J = 7.4\text{Hz}$) caractéristique d'un proton anomérique et des signaux entre $\delta_{\text{H}} = 3.40\text{ppm}$ et $\delta_{\text{H}} = 4.05\text{ppm}$ indiquant la présence d'une partie osidique.

La constante de couplage ($J = 7.4\text{Hz}$) observée du signal du proton anomérique de C1 suggère une liaison de configuration β entre le sucre et la génine.

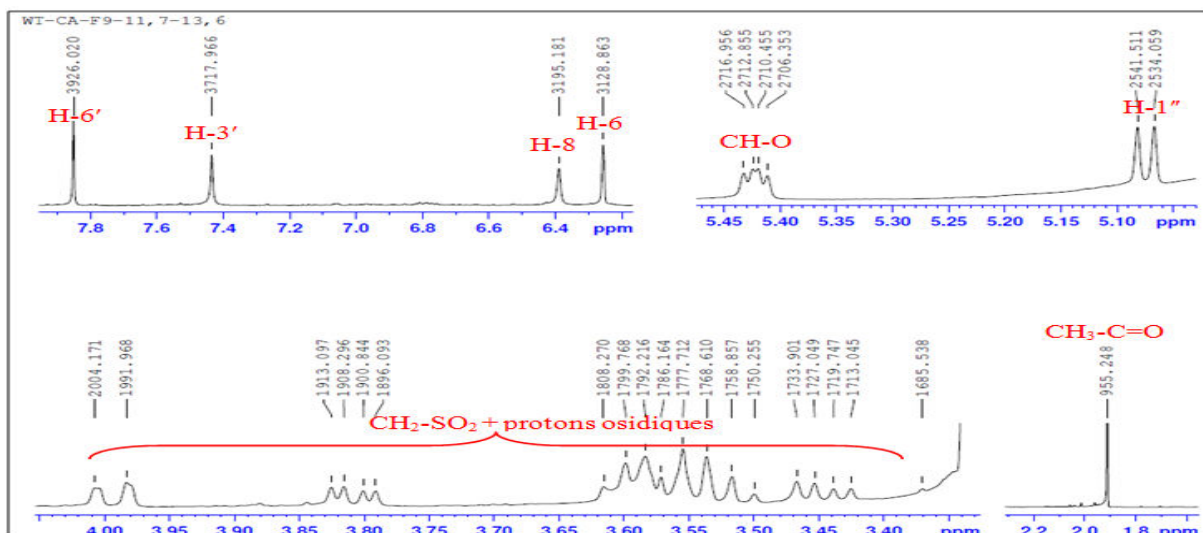


Figure 3.3: Spectre RMN-¹H du composé Ca1 (CD₃OD, 500 MHz).

Dans le spectre COSY (figure 3.4), on observe les sept protons du sucre qui couplent entre eux avec de grandes valeurs de constante de couplage (> 7Hz). Les carbones liés à ces protons sont attribués à l'aide du spectre HSQC (figure 3.5). Des déplacements chimiques des protons et des carbones correspondants sont caractéristiques d'un β -D-glucopyranoside (Abdulmagid et al., 2008)

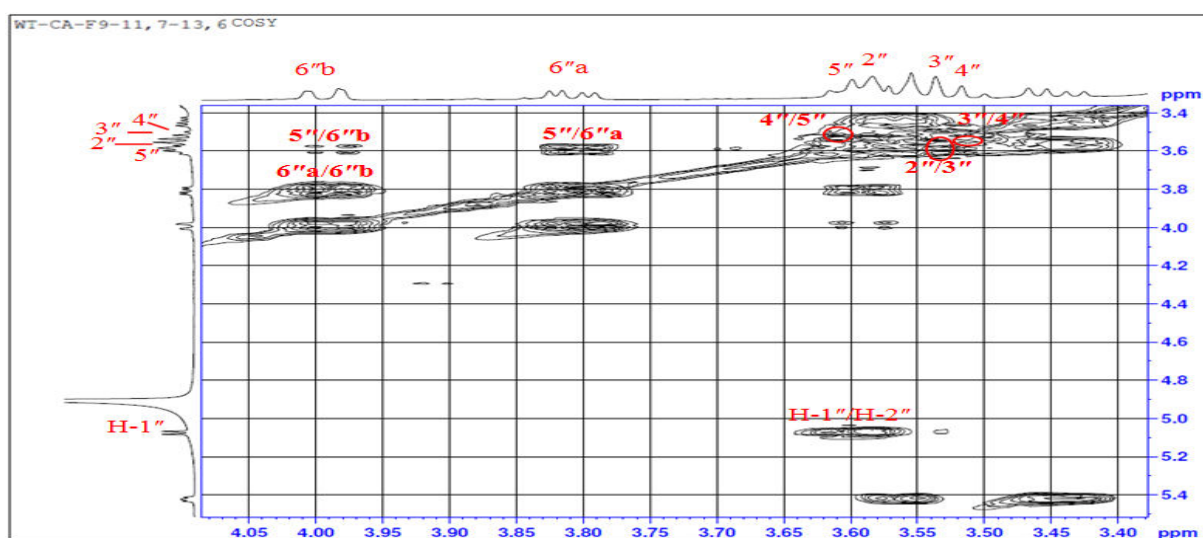


Figure 3.4: Spectre COSY du composé Ca1 (CD₃OD, 500 MHz).

Les carbones de la partie aromatique et de la chaîne aliphatique sont également attribués à l'aide du spectre HSQC Jmod (figure 3.5).

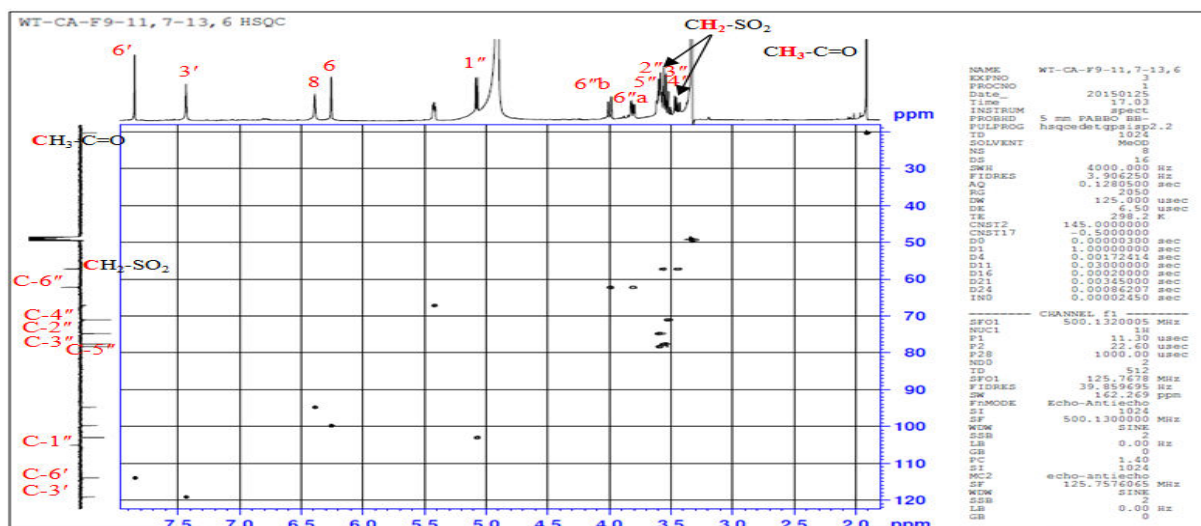


Figure 3.5: Spectre HSQC du composé **Ca1** (CD₃OD, 500 MHz).

Des corrélations sont observées entre les protons H-6', H-3' et un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_c = 151.1$ ppm qui pourrait être que le carbone C-4'.

Un autre carbone quaternaire oxygéné dont le déplacement chimique δ_c est de 148.9 ppm est corrèle aux protons H-6' et H-3' et au proton anomérique du glucose déjà identifié. Ce proton anomérique est corrèle au proton H-6' dans le spectre de ROESY indiquant que le carbone porteur du glucose et le proton H-6 sont en position *ortho*. Les déplacements chimiques des carbones du cycle B sont en accord avec celui du 3'-O- β -D-glucopyranosyle luteoline en tenant compte de la numérotation dans les deux produits (Boutaghane 2013) excépté pour le carbone C-2' car dans notre cas il est substitué comme nous l'avons mentionné. (Figure 3.6 ; 3.7 ; 3.10).

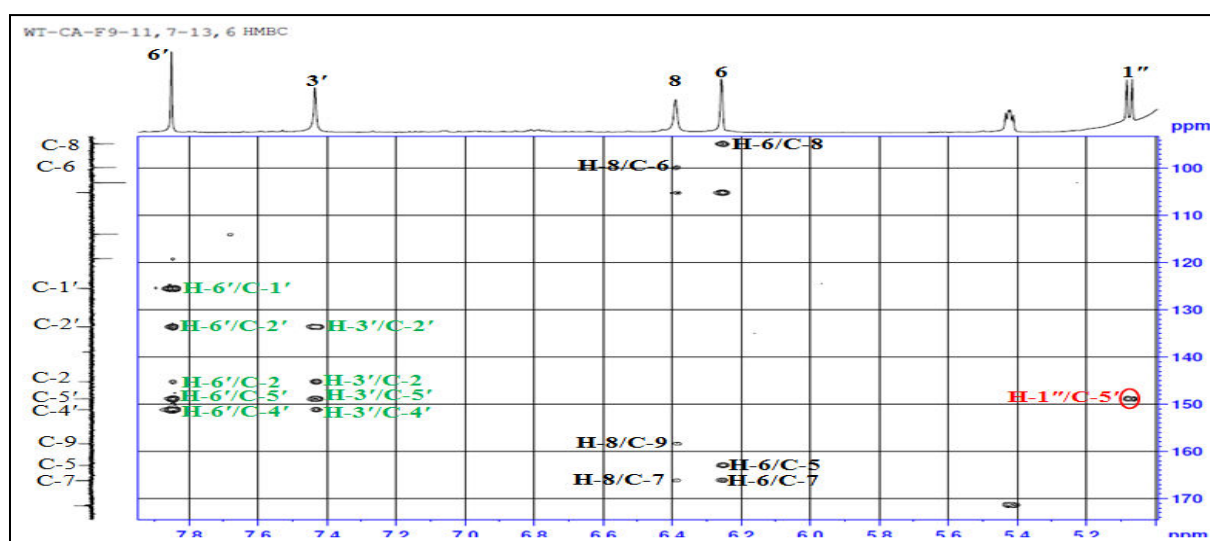


Figure 3.6: Spectre HMBC du composé **Ca1** (CD₃OD, 500 MHz).

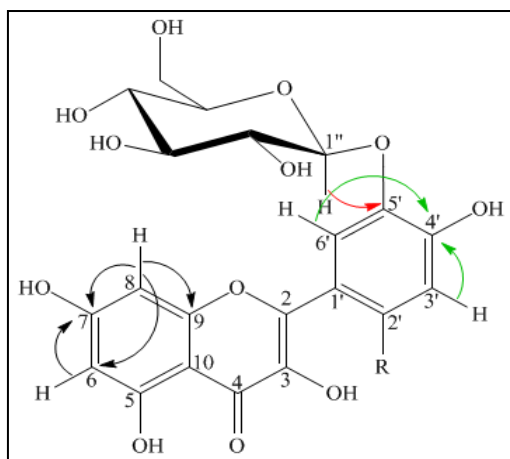


Figure 3.7: Importantes corrélations HMBC (H-C) du composé **Ca1**.

L'analyse du spectre HMBC (figure 3.9) montre que les protons méthylènes CH₂ résonnant à $\delta_H = 3.45\text{ppm}$ et 3.56ppm corrélient avec le carbone résonne à $\delta_C = 67.1\text{ppm}$ (C-2'') ainsi qu'avec le carbonyle de la fonction acide à $\delta_C = 171.5\text{ppm}$ (C-1''). D'autre part sur le spectre COSY (figure 3.8) une tâche de corrélation entre ce proton méthyne CH-2'' et les protons méthylènes CH₂-3'' indiquent qu'ils sont vicinaux.

Ces observations ont permis de suggérer le fragment de structure suivant :

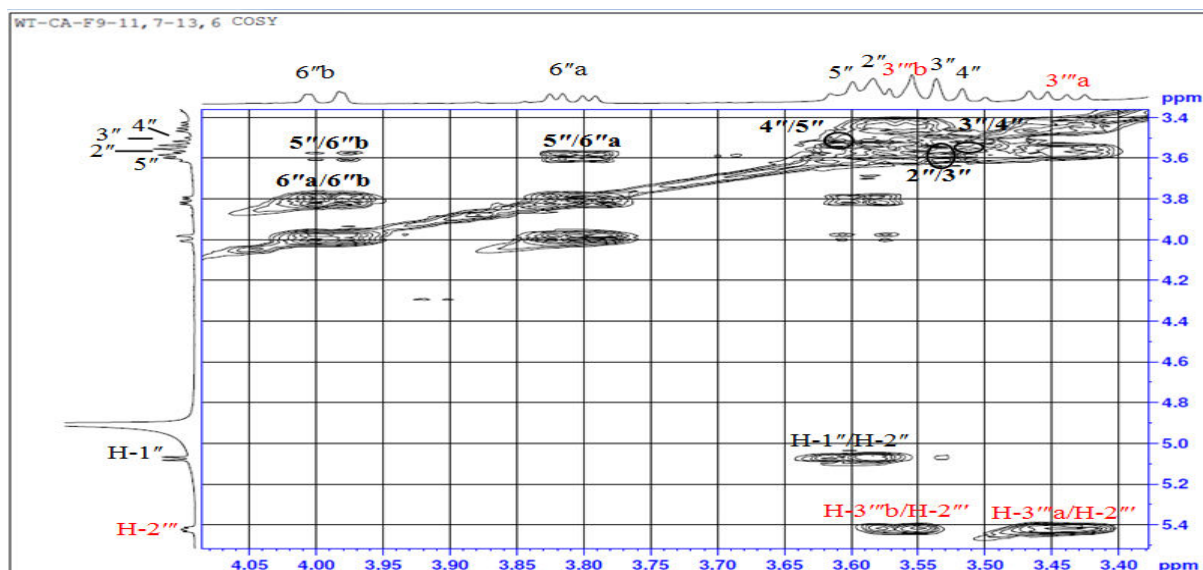
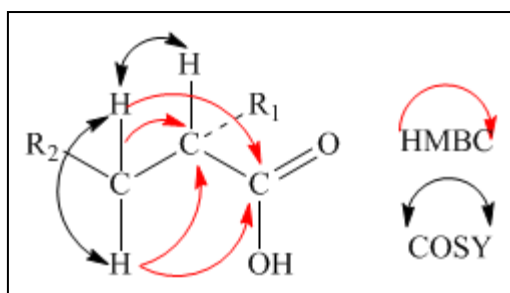
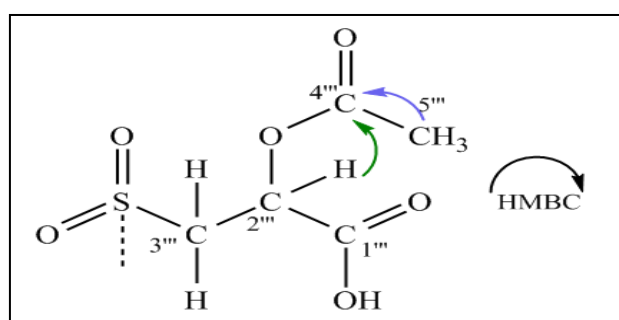


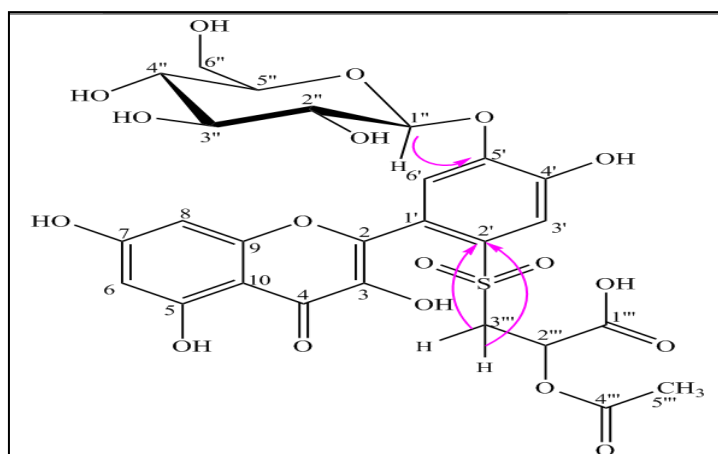
Figure 3.8: Spectre COSY du composé **Ca1**.

Sur le même spectre HMBC (figure 3.9) on observe aussi une tâche de corrélation entre les protons de CH_3 resonnant à $\delta_{\text{H}} = 1.90$ ppm (C-5''') et le carbonyle à $\delta_{\text{C}} = 171.3$ ppm (C-4'''), ce dernier corrèle avec le proton du CH resonnant à $\delta_{\text{H}} = 5.42$ ppm (C-2'''). Ce qui permet de placer ce groupement CH_3CO sur CH (C-2'''). Le déblindage des deux protons méthylènes et du carbone qui les porte permet de suggérer que ce dernier est lié à un hétéroatome. De la formule brute proposée on peut déduire que le carbone C-3''' est attaché au groupement sulfonyle (SO_2).

Toutes ces observations ont permis de suggérer la structure du radical R « 2'''acetoxy-3'''sulfonyl propanoic acide ».



Le spectre HMBC (figure 3.9) indique également le point d'attachement du groupement « 2'''acetoxy-3'''sulfonyl propanoic acide » au cycle B du flavonoïde par la corrélation entre les protons du C-3''' et le C-2'.



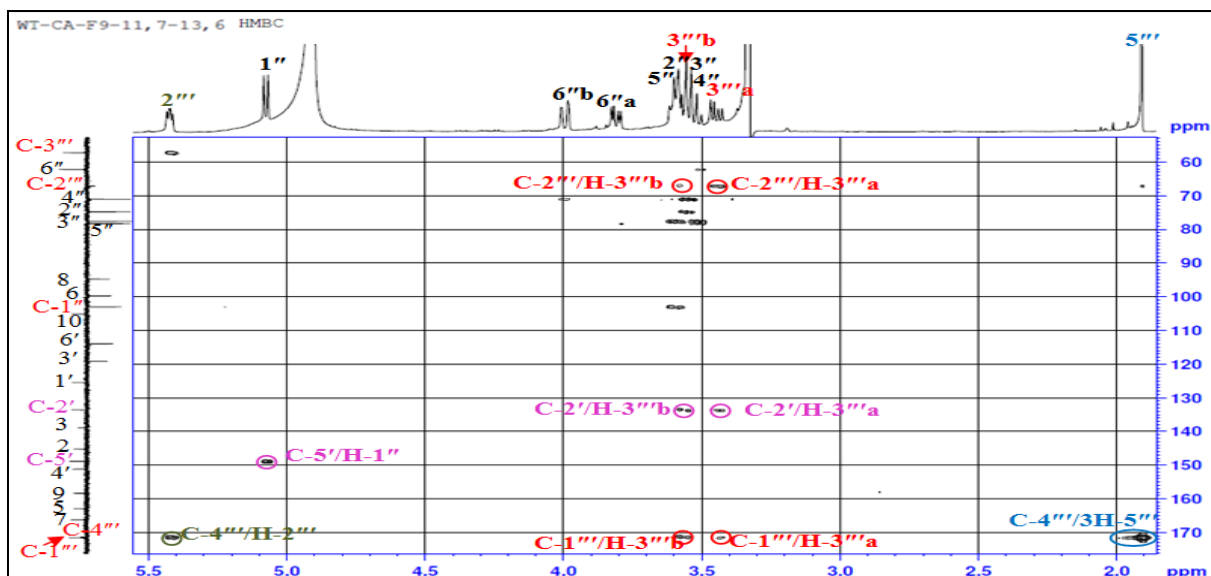


Figure 3.9: Spectre HMBC du composé **Ca1**.

La stéréochimie du composé **Ca1** est mise en évidence par les observations des effets overhauser (rOe) à travers l'espace obtenues sur le spectre ROESY (figure 3.10). En effet il présente des corrélations α -axiaux entre H-1''/H-3'' et H-1''/H-5'' ce qui confirme la configuration β de la partie osidique.

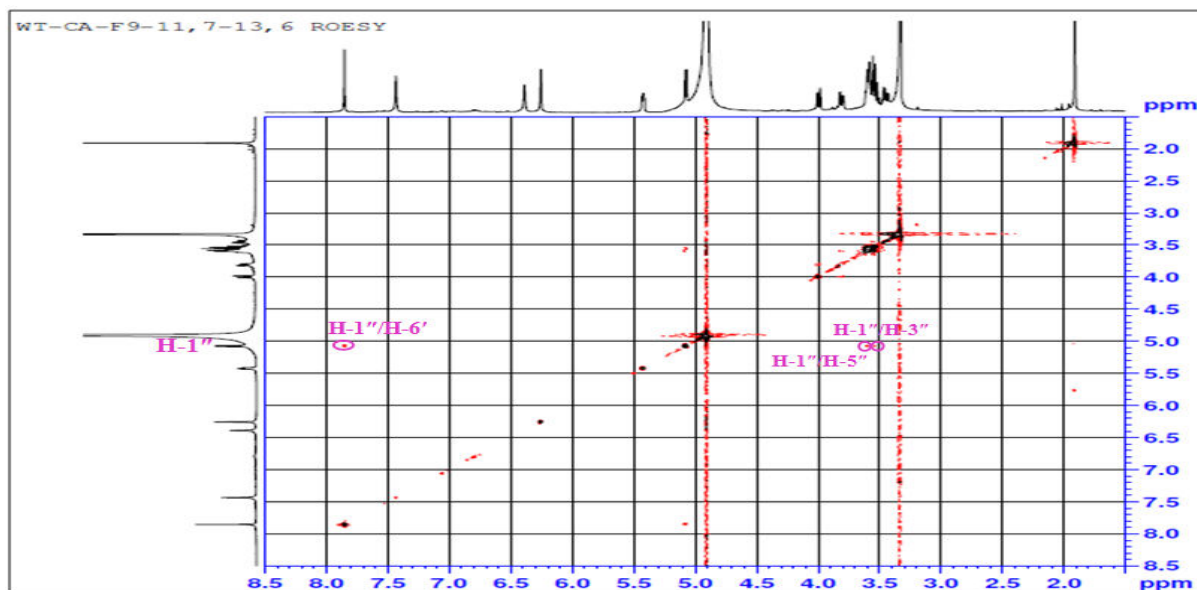


Figure 3.10: Spectre ROESY du composé **Ca1**.

Le spectre ^{13}C montre l'attribution de tous les carbones du composé **Ca1** (figure 3.11)

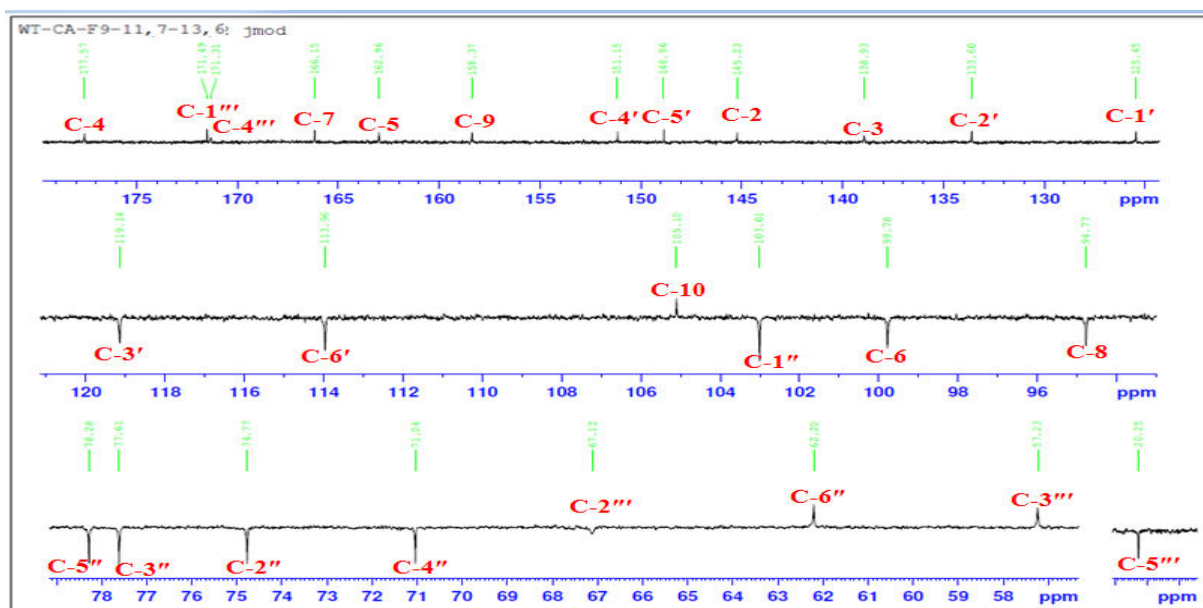


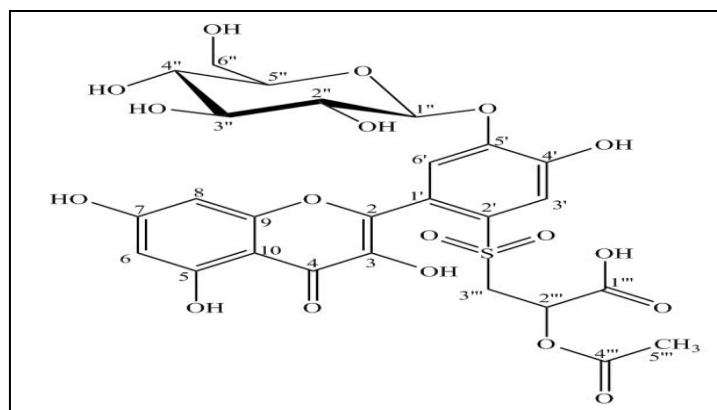
Figure 3.11: Spectre RMN ^{13}C du composé **Ca1** (CD_3OD , 125 MHz).

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones sont dressées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Ca1** dans CD_3OD .

N°	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm (m, J Hz)	N°	δ_{C} ppm	δ_{H} ppm (m, J Hz)
2	145.2	-	6'	113.9	7.85 (1H, s)
3	138.9	-	Glucose en 5'		
4	177.6	-	1''	103.0	5.07 (1H, d, $J=7.4$)
5	162.9	-	2''	74.7	3.59 (1H, dd, $J=8.9/7.4$)
6	99.8	6.28 (1H, s)	3''	77.6	3.56 (1H, t, $J=8.6$)
7	166.1	-	4''	71.0	3.52 (1H, t, $J=8.6$)
8	94.7	6.38 (1H, s)	5''	78.3	3.60 (1H, m)
9	158.4	-	6''	62.2	3.81 (1H, dd, $J=12.2/4.8$) 4.00 (1H, dd, $J=12.2/2.5$)
10	105.1	-	Groupe 2'''-acetoxy-1'''-sulfonyl propanoic acide		
1'	125.4	-	1'''	171.5	3.45 (1H, dd, $J=14.1/6.8$) 3.56 (1H, m)
2'	133.6	-	2'''	67.1	5.42 (1H, dd, $J=6.5/4.1$)
3'	119.1	7.43 (1H, s)	3'''	57.2	-
4'	151.1	-	4'''	171.3	-
5'	148.9	-	5'''	20.5	1.90 (1H, s)

Toutes ces données nous permettent de proposer pour le composé **Ca1**, la nouvelle structure de: **5, 7, 4',5'-tetrahydroxyflavonol -2'-[propanoic acid-(2'''-acetoxy-3'''-sulfonyl)]-5'-O- β -D-glucopyranoside.**



5, 7, 4',5'-tetrahydroxyflavonol -2'-[propanoic acid-(2'''-acetoxy-3'''-sulfonyl)]-5'-O- β -D-glucopyranoside (**Ca1**)

I. 2. Elucidation Structurale de Ca2

La fluorescence noire violette sous lumière de Wood est caractéristique d'un flavone ou d'un flavonol substitué en C-3.

L'analyse du spectre HR-SM-ESI du composé Ca2 (figure 3.12), donne trois ions pseudomoléculaires à $m/z = 470.9$ $[M+Na]^+$, à $m/z = 918.9$ $[2M+Na]^+$ et $m/z = 486.9$ $[M+K]^+$, caractéristiques à la formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$.

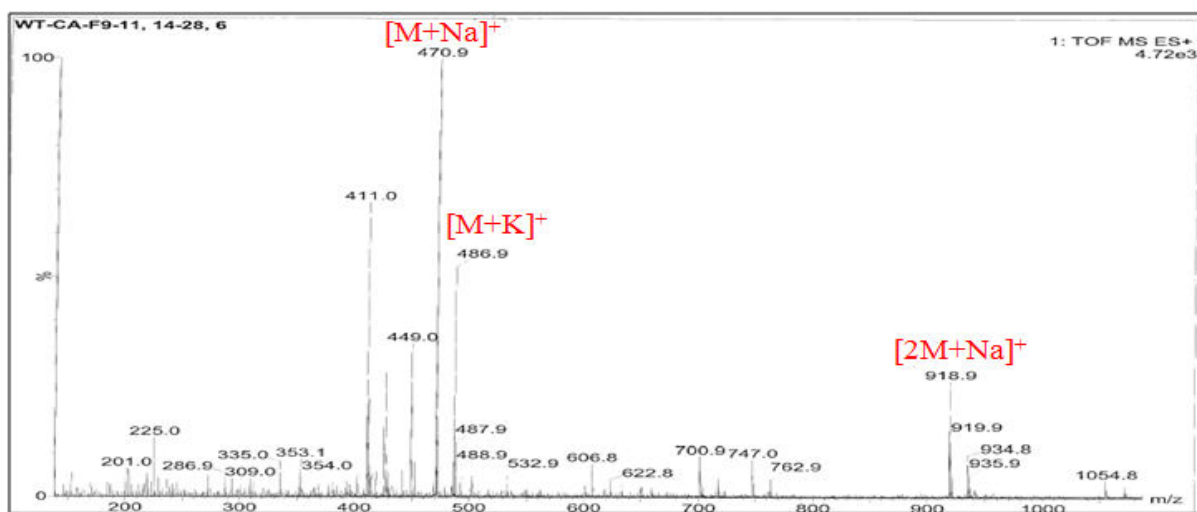


Figure 3.12: Spectre de masse HR-MS -ESI du composé **Ca2**.

Le spectre RMN 1H du composé Ca2 (figure 3.13) montre les six signaux des six protons caractéristiques de la lutéoline :

- Deux doublets couplent entre eux en méta ($J = 1.8\text{Hz}$), intégrant chacun pour 1H à $\delta_H = 6.53\text{ppm}$ (H-6) et $\delta_H = 6.83\text{ppm}$ (H-8).

- Un doublet résonne à $\delta_H = 7.43\text{ppm}$ ($J = 1.8\text{Hz}$) et un doublet de doublet à $\delta_H = 7.46\text{ppm}$ ($J = 8.2$ et 1.8Hz) respectivement dûs aux protons H-2' et H-6' et un doublet dû à H-5' apparaissant à $\delta_H = 6.93\text{ppm}$ ($J = 8.2\text{Hz}$).

- Un singulet observé à $\delta_H = 6.64\text{ppm}$ est dû à la résonnance de H-3.

L'apparition d'un doublet à $\delta_H = 5.09\text{ppm}$ ($J = 7.0\text{Hz}$) caractéristique d'un proton anomérique et des signaux entre $\delta_H = 3.40\text{ppm}$ et $\delta_H = 4.00\text{ppm}$ indiquent la présence d'un sucre.

La constante de couplage ($J = 7.0\text{Hz}$) observée pour le proton anomérique de Ca2 suggère une liaison de configuration β entre le sucre et la lutéoline.

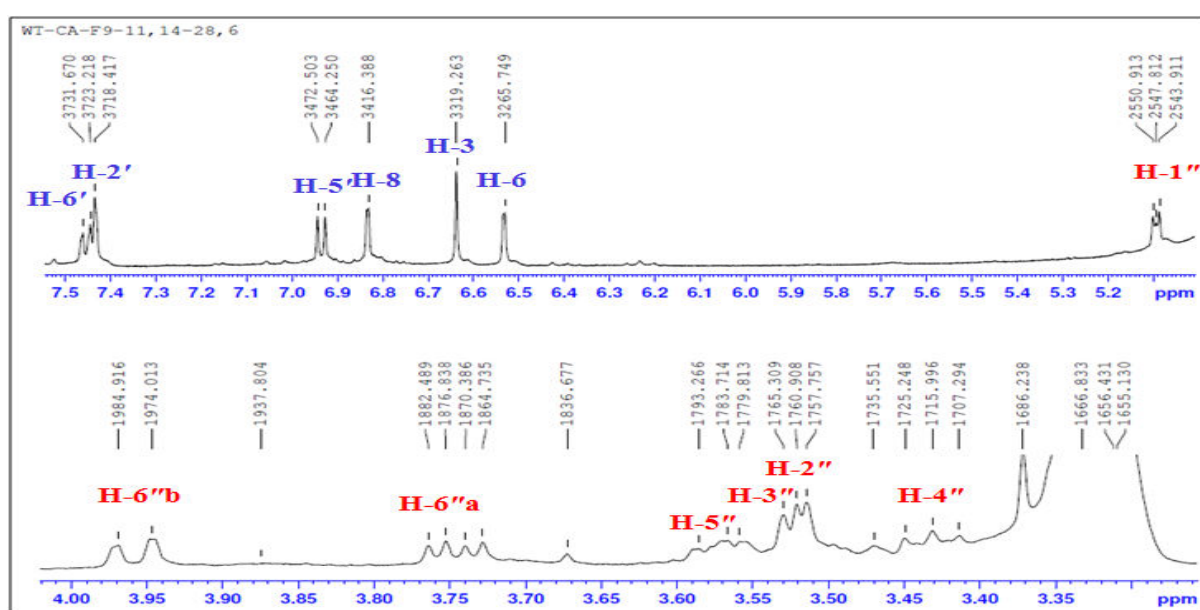


Figure 3.13: Spectre RMN ^1H du composé **Ca2** (CD_3OD , 500 MHz).

On observe dans le spectre COSY (figure 3.14) les protons du sucre qui couplent entre eux avec de grandes valeurs de constante de couplage ($> 7\text{Hz}$). Leurs déplacements chimiques ainsi que les déplacements de leurs carbones (figure 3.16) sont caractéristiques d'un glucose (Agrawal 1989).

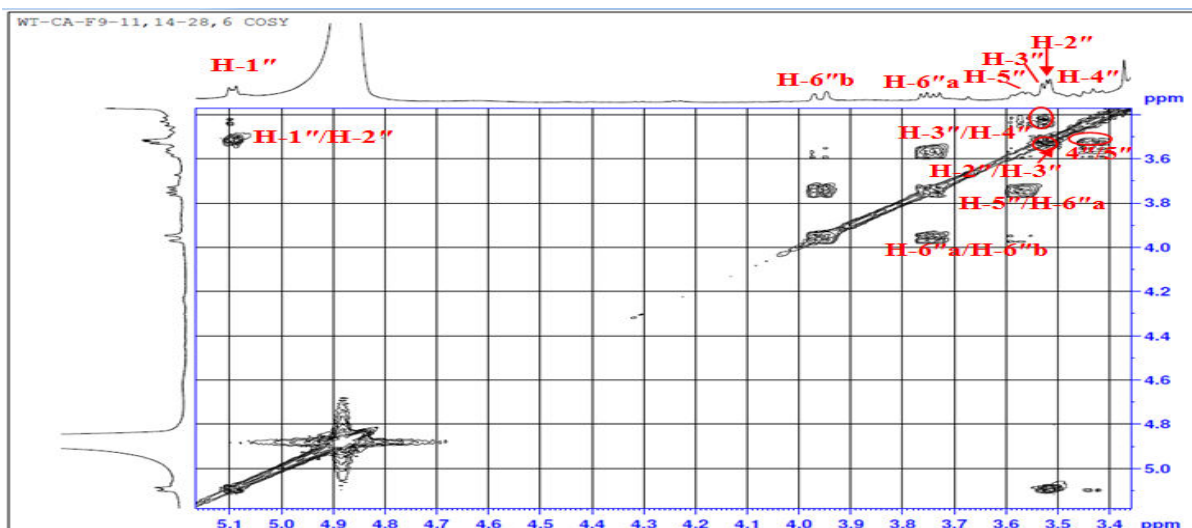


Figure 3.14: Spectre COSY du composé Ca2 (CD₃OD, 500 MHz).

La corrélation observée sur le spectre HMBC (figure 3.15) entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-7 confirme que le glucose est attaché à la génine en position 7.

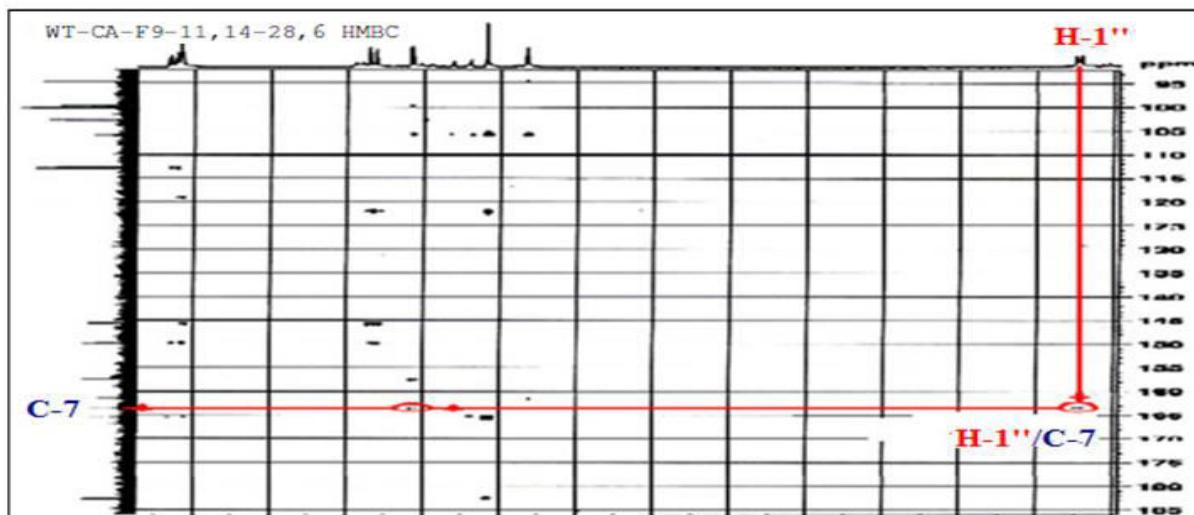


Figure 3.15: Spectre HMBC du composé Ca2 (CD₃OD, 500 MHz).

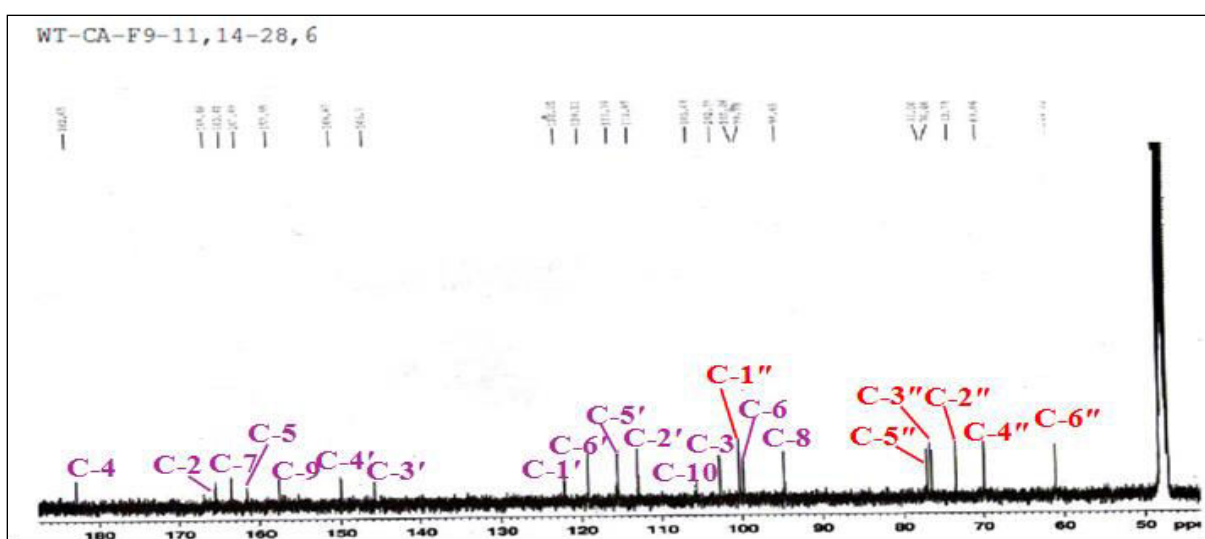


Figure 3.16: Spectre RMN¹³C du composé Ca2 (CD₃OD, 125 MHz).

La combinaison des spectres HSQC (figure 3.17) et HMBC (figure 3.15) permet l'attribution de tous les carbones. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C (figure 3.16) sont dressés dans le tableau 3.2.

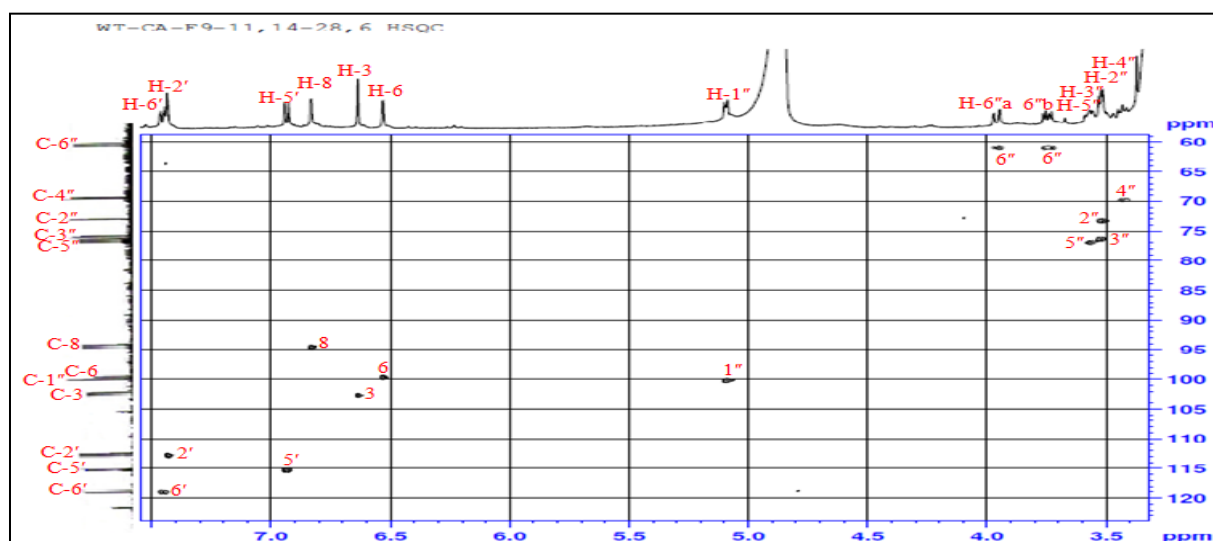
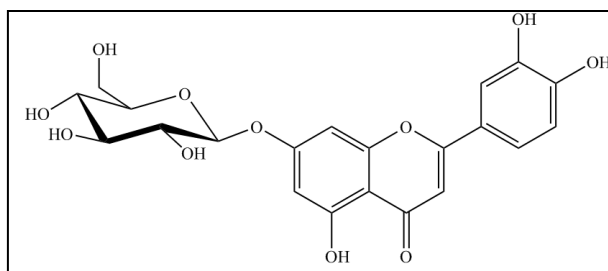


Figure 3.17: Spectre HSQC du composé Ca2.

Tableau 3.2: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Ca2 dans CD_3OD (Orhan et al., 2012).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm (ref)	δ_{H} ppm (m, J/Hz)	δ_{H} ppm (m, J/Hz) (ref)	N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm (ref)	δ_{H} ppm (m, J/Hz)	δ_{H} ppm (m, J/Hz) (ref)
2	165.5	165.5	-	-	3'	149.9	146.5	-	-
3	102.8	103.8	6.63(1H, s)	6.73(1H, s)	4'	154.7	150.6	-	-
4	182.7	182.6	-	-	5'	115.4	116.7	6.93 (1H,d,8.2)	6.88 (1H,d,8.4)
5	161.5	161.8	-	-	6'	119.1	119.9	7.46 (1H,dd,8.2/1.8)	7.42 (1H,dd,8.4/2.1)
6	99.8	100.2	6.53 (1H,d,1.8)	6.42 (1H,d,1.8)	Glucose en 7				
7	163.4	163.6	-	-	1''	100.3	100.5	5.09 (1H,d,7.0)	5.05 (1H,d,7.3)
8	94.7	95.4	6.83(1H,d,1.8)	6.77 (1H,d,1.8)	2''	73.3	73.8	3.51 (1H, m)	3.14-3.63 (5H,m)
9	157.6	157.6	-	-	3''	76.5	77.0	3.53 (1H, m)	
10	105.7	106.0	-	-	4''	69.9	70.2	3.44 (1H,t,9.2)	
1'	122.1	122.0	-	-	5''	77.0	77.8	3.57 (1H, m)	
2'	112.9	114.2	7.43 (1H,d,1.8)	7.39 (1H, d,1.8)	6''	61.1	61.3	3.75 (1H,dd,12.1/5.6) 3.96 (1H,dd,12.1/2.0)	3.69 (1H,dd,10.2/-)

Ces données sont en accord avec celles de la littérature (Orhan et al., 2012) permettent d'identifier la structure du composé Ca2 comme étant : **Lutéoline-7-O- β -D-glucopyranoside**



Lutéoline-7-*O*- β -D-glucopyranoside (**Ca2**)

I. 3. Elucidation Structurale de Ca3

L'analyse du spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS du composé Ca3 (figure 3.18), révèle deux ions pseudo-moléculaires à m/z 617.0 $[M+Na]^+$ (calculé 617.0 et m/z 595.0 $[M+H]^+$, caractéristiques des flavonoïdes *C*-glycosides. En soustrayant la masse de l'apigénine (270 *uma*), il reste 324 *uma* (2 x 162 *uma*) soit l'équivalent de deux hexoses.

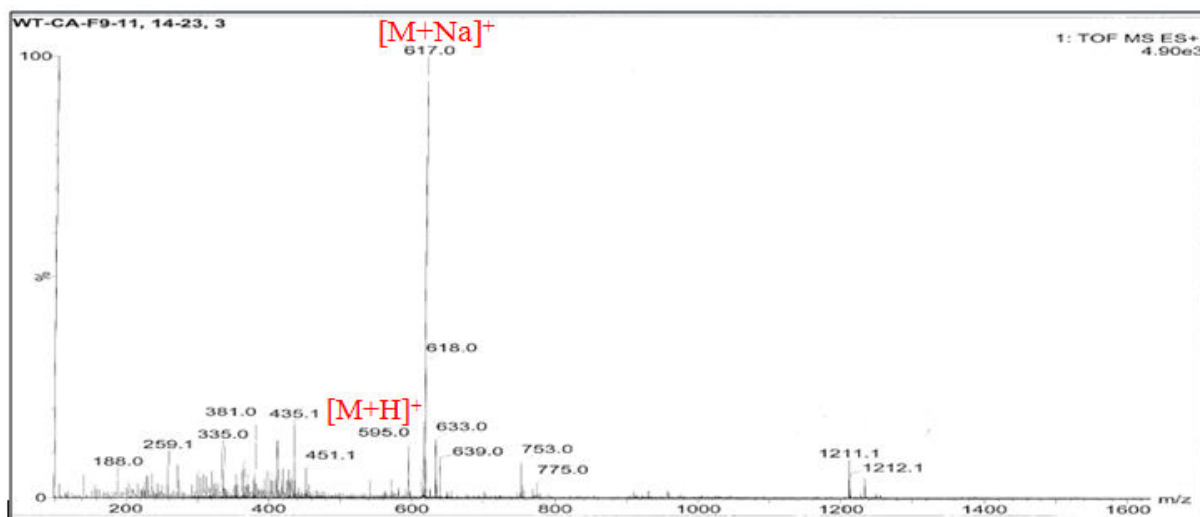


Figure 3.18: Spectre HR-ESI-MS du composé **Ca3**.

L'examen du spectre RMN 1H (figure 3.19) montre la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un apigénine reconnaissable par :

- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 6.65$ ppm attribuable à H-3, ce qui confirme la structure d'un apigénine.
- Un système A_2X_2 caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B, ainsi les doublets à $\delta_H = 7.98$ ppm et $\delta_H = 6.98$ ppm ($J = 8.8$ Hz) d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2',6' et H-3',5' respectivement.

Sur le même spectre on remarque la présence de deux signaux sous forme des doublets à 5.05ppm et 5.07ppm avec une constante de couplage ($J = 9.8$ Hz) caractérisant de deux protons anomériques de deux sucres ainsi que les autres signaux de ces sucres entre $\delta_H =$

3.40ppm et $\delta_H = 4.20\text{ppm}$. L'absence des autres signaux dans la zone du champ déblindé c'est-à-dire des protons aromatiques indique que le cycle A hexasubstitué.

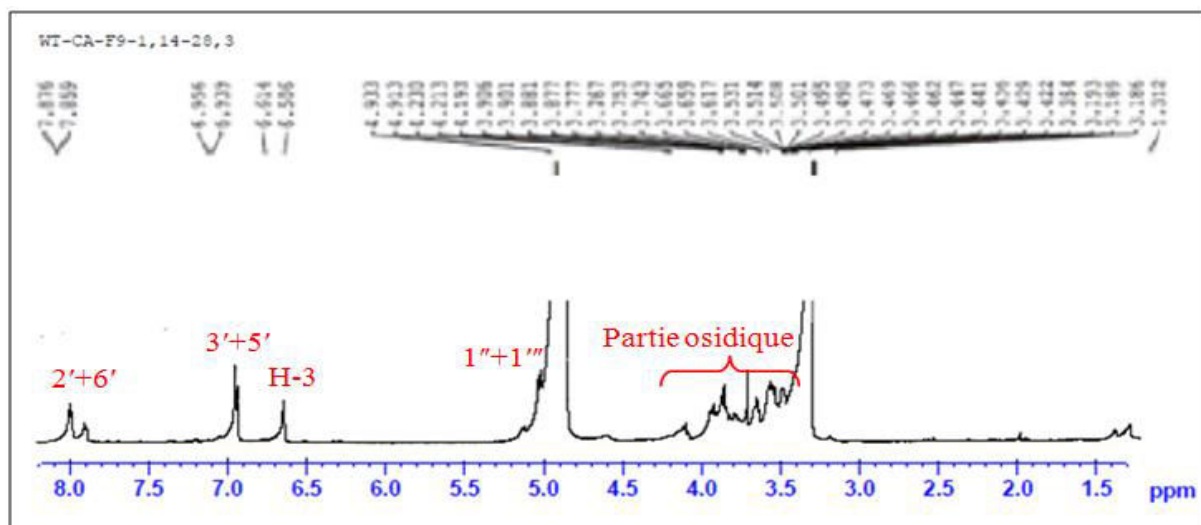


Figure 3.19: Spectre RMN ^1H du composé **Ca3** (CD_3OD , 500MHz).

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3.20) montre des singulets à $\delta_C = 160.6$; 162.8 ; 157.9 et 105.7ppm caractéristiques respectivement des carbones C-5, C-7, C-9 et C-10 du cycle A de l'apigénine.

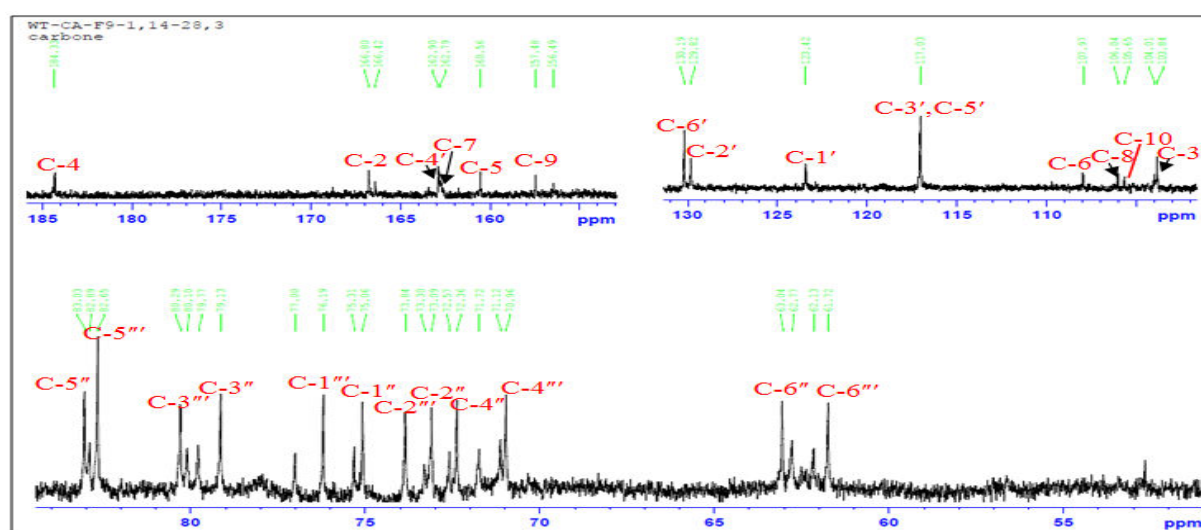


Figure 3.20: Spectre RMN ^{13}C du composé **Ca3** (CD_3OD , 125MHz).

Les protons des sucres sont identifiés par l'analyse du spectre COSY (figure 3.21) qui permet d'identifier que les deux sucres sont des glucoses en se basant sur les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplages de ces protons.

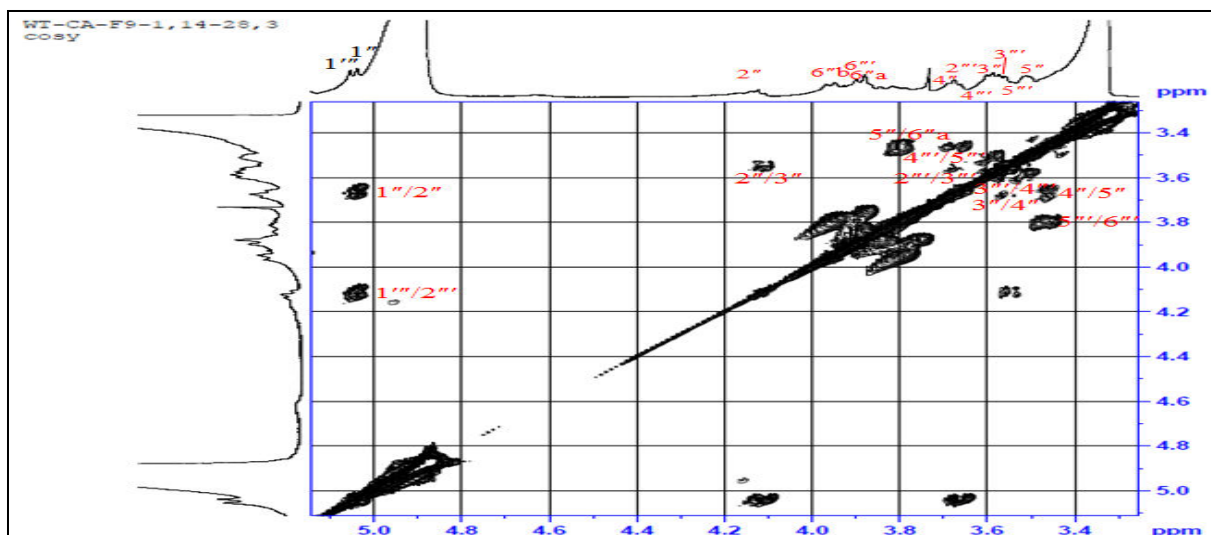


Figure 3.21: Spectre COSY du composé de la partie osidique du composé **Ca3**.

Les déplacements chimiques blindés des carbones portant les protons anomériques obtenues par l'analyse de l'expérience HSQC (figure 3.22) indiquent celle d'un groupement CH lié a un seul atome d'oxygène, ce qui suppose que la jonction génine-sucre est une liaison de type C-C.

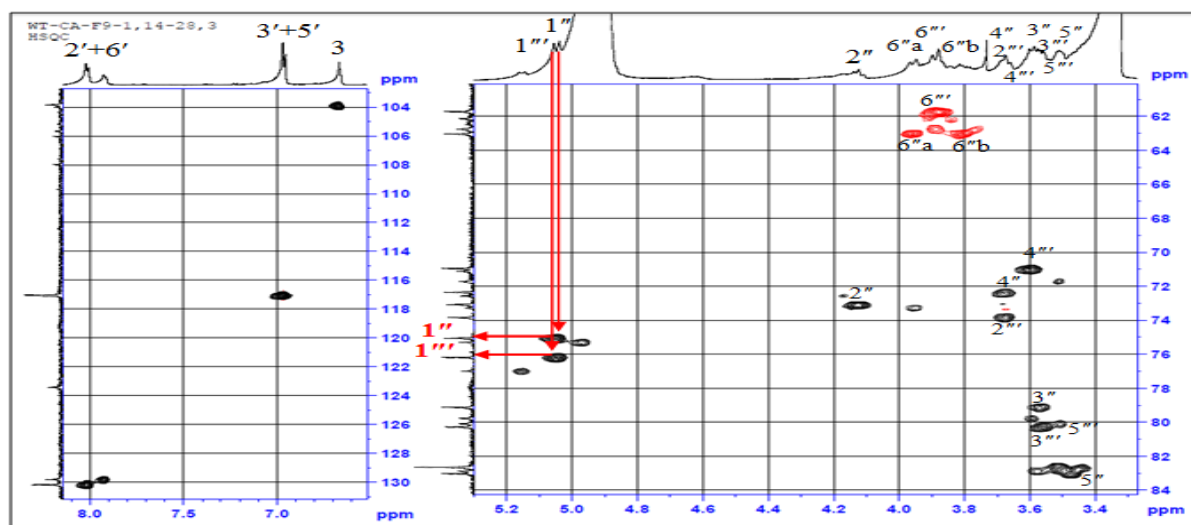


Figure 3.22: Spectre HSQC du composé **Ca3**.

Sur le spectre HMBC (figure 3.23), vu la valeur des déplacements chimiques du C-6 (107.9ppm) et C-8 (106.0ppm) la substitution du C-6 et C-8 par des glucoses *via* une liaison C-C est confirmé d'une part par des corrélations observées entre le proton anomérique à $\delta_H=5.05$ ppm (H-1'') et les carbones C-7 (162.8ppm) et C-5 (160.6ppm) et d'autre part par le proton anomérique à $\delta_H=5.05$ ppm (H-1''') avec les carbones C-7 (162.8ppm) et C-9 (157.9 ppm).

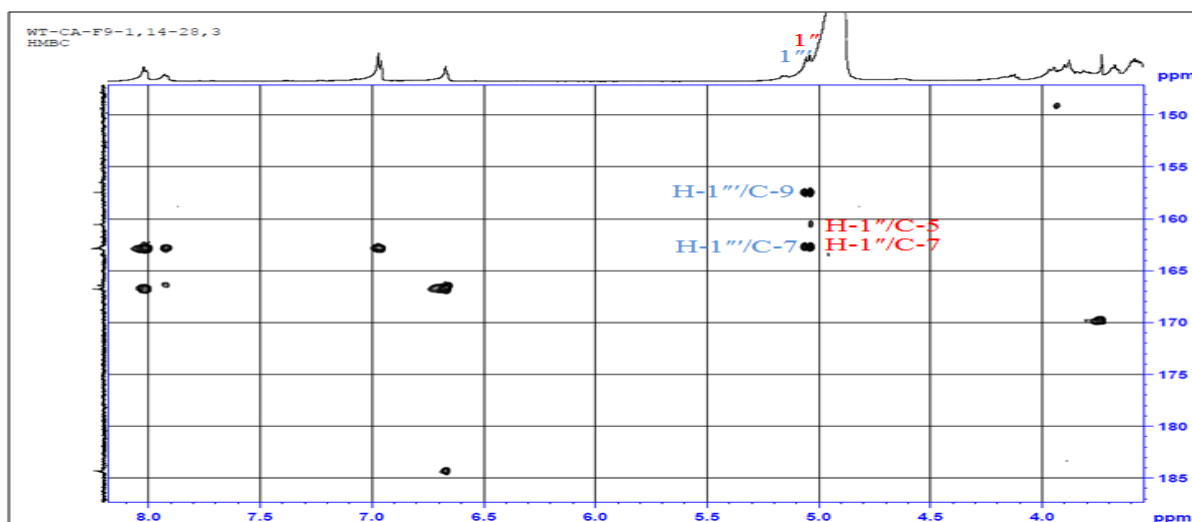


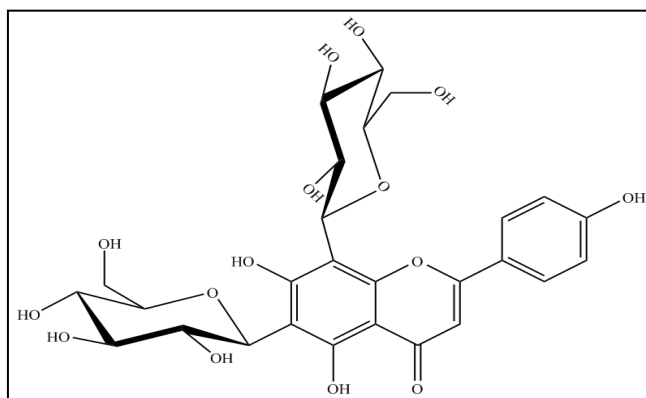
Figure 3.23: Spectre HMBC du composé **Ca3**.

Par ailleurs, l'analyse de l'ensemble des spectres (RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) ainsi que la comparaison avec la littérature ont permis de faire toutes les attributions des signaux (tableau 3.3).

Tableau 3.3: Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) du composé **Ca3** dans CD_3OD (Lu & Foo 2000).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm (ref)	δ_{H} ppm (m, J/Hz)	δ_{H} ppm (ref)	N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm (ref)	δ_{H} ppm (m, J/Hz)	δ_{H} ppm (m, J/Hz) (ref)
2	166.8	164.1	-	-	Glucose en 6				
3	103.8	102.9	6.65 (1H, s)	6.59 (1H, s)	1''	75.1	74.3	5.05 (1H, d, $J=9.8$)	4.76 (1H, d, $J=9.8$)
4	184.3	182.3	-	-	2''	73.1	71.9	4.17 (1H, t, $J=8.8$)	3.86 (1H, t, $J=8.7$)
5	160.6	159.6	-	-	3''	79.1	78.7	3.59 (1H, m)	3.32 (1H, m)
6	107.9	108.5	-	-	4''	72.4	70.3	3.69 (1H, m)	3.32 (1H, m)
7	162.8	162.8	-	-	5''	83.0	81.4	3.48 (1H, m)	3.30 (1H, m)
8	106.0	104.8	-	-	6''	63.0	61.1	3.98 (1H, dd, $J=11.9/7.8$) 3.80 (1H, d, $J=7.8$)	3.58 (1H, dd, $J=11.9/7.8$) 3.70 (1H, d, $J=11.0$)
9	157.9	155.2	-	-	Glucose en 8				
10	105.7	103.6	-	-	1'''	76.2	74.5	5.05 (1H, d, $J=9.8$)	4.88 (1H, d, $J=9.8$)
1'	123.4	122.0	-	-	2'''	73.8	71.9	3.68 (1H, t, $J=8.7$)	3.86 (1H, t, $J=8.7$)
2'	130.2	128.9	7,98 (1H, d, $J=8.8$)	7.92 (1H, d, $J=8.7$)	3'''	80.3	79.1	3.58 (1H, m)	3.38 (1H, m)
3'	117.0	116.3	6,98 (1H, d, $J=8.8$)	6.91 (1H, d, $J=8.5$)	4'''	70.9	70.8	3.60 (1H, m)	3.42 (1H, m)
4'	162.9	161.4	-	-	5'''	82.6	81.8	3.52 (1H, m)	3.35(1H, m)
5'	117.0	116.3	6,98 (1H, d, $J=8.8$)	6.91 (1H, d, $J=8.5$)	6'''	61.7	61.5	3.90 (2H, m)	3.58 (1H, dd, $J=11.9/7.8$) 3.76 (1H, d, $J=11.0$)
6'	130.2	128.9	7,98 (1H, d, $J=8.8\text{Hz}$)	7.92 (1H, d, $J=8.7\text{Hz}$)					

Le composé Ca3 est identifié comme étant le **Vicenin-2** : Apigenin-6,8-di-C- β -D-glucopyranoside (Lu & Foo 2000)



Apigenin-6,8-di-C- β -D-glucopyranoside (Vicenin-2) (**Ca3**).

I. 4. Elucidation Structurale de Ca4

Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-MS-ESI (figure 3.24) montre un ion pseudo-moléculaire à m/z 463.0889 $[M+H]^+$ (calculé 463.0889) qui correspond à la formule brute $C_{21}H_{18}O_{12}$.

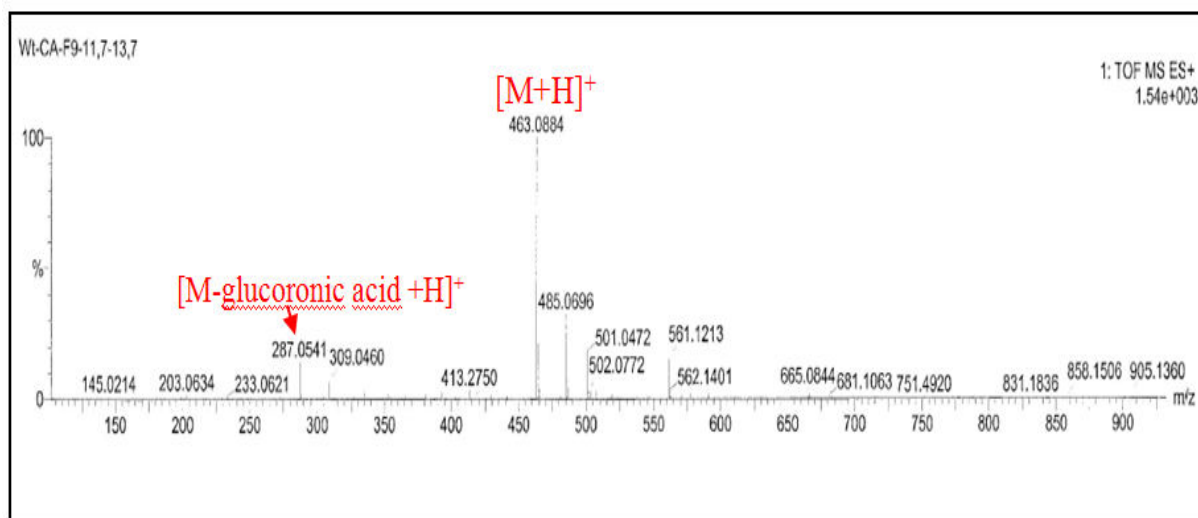


Figure 3.24: Spectre HR-ESI-MS du composé **Ca4**.

L'examen du spectre RMN 1H (figure 3.25), enregistré dans CD_3OD , montre la présence des signaux caractéristiques de la lutéoline :

- Un singulet observé à $\delta_H = 6.64$ ppm d'intégration 1H dû à la résonance H-3.
- Deux doublets couplent entre eux en méta ($J = 1.8$ Hz), intégrant chacun pour 1H à 6.52ppm (H-6) et 6.81ppm (H-8).

- Un doublet résonne à $\delta_H = 7.46\text{ppm}$ ($J = 2.1\text{Hz}$) et un doublet de doublet à $\delta_H = 7.43\text{ppm}$ ($J = 8.2$ et 2.1Hz) respectivement dues aux protons H-2' et H-6', un doublet due à H-5' apparaissant à $\delta_H = 6.93\text{ppm}$ ($J = 8.2\text{Hz}$) dont les constantes de couplages indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B de la luteoline.

Une partie osidique caractérisée par un proton anomérique à $\delta_H = 5.20\text{ppm}$ ainsi que les autres signaux du sucre entre $\delta_H = 3.50\text{ppm}$ et $\delta_H = 4.44\text{ppm}$.

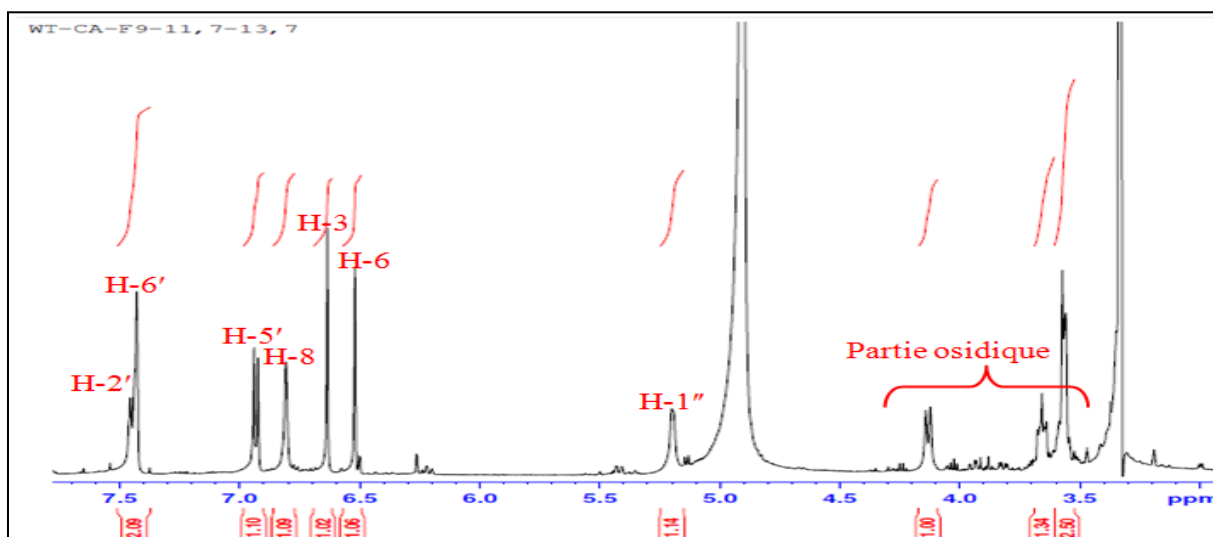


Figure 3.25: Spectre RMN ^1H du composé **Ca4** (CD_3OD , 500MHz).

Les cinq protons de la partie osidique sont identifiés par l'analyse du spectre COSY (figure 3.26) combinée avec HSQC J_{mod} (figure 3.27) qui permettent d'identifier que le sucre est un glucuronic acide. Ce dernier est confirmé par l'ion moléculaire à m/z 287.0541 [$\text{M-Glucuronic acid} + \text{H}$] $^+$ dans le spectre de masse (figure 3.24).

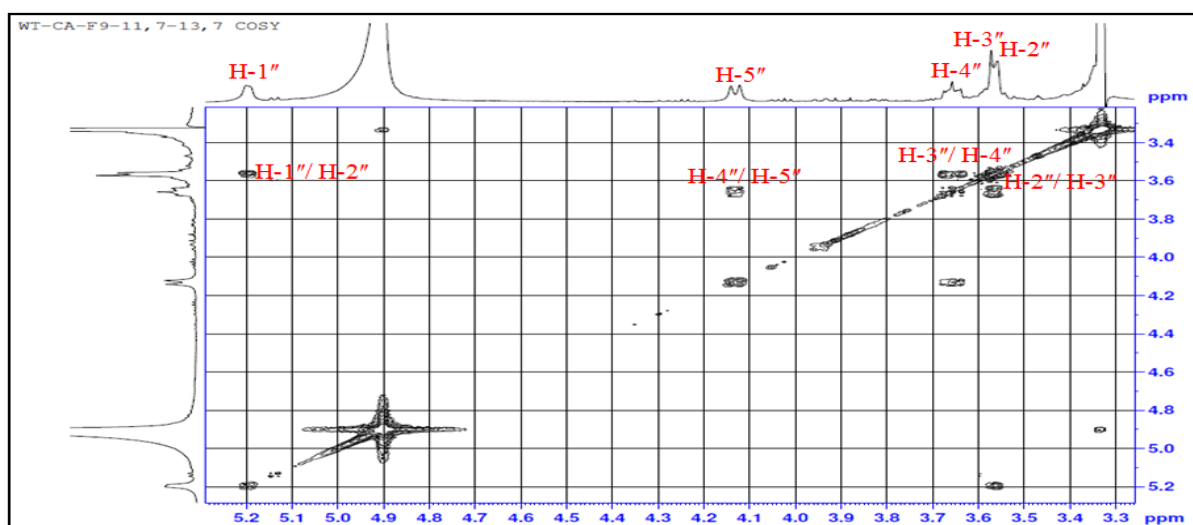


Figure 3.26: Spectre COSY du composé **Ca4**.

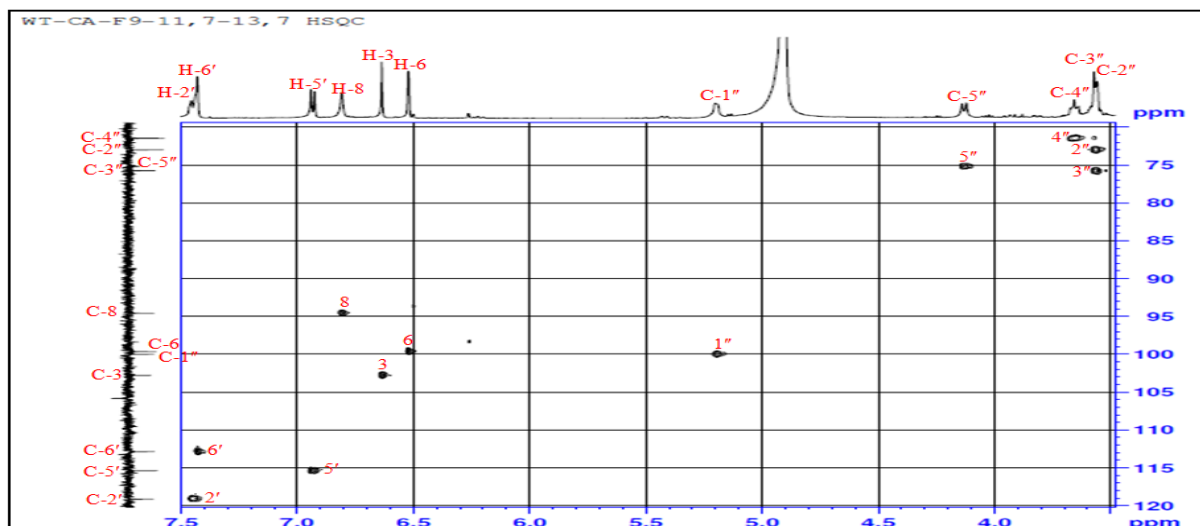


Figure 3.27: Spectre HSQC *J* modulé du composé **Ca4**.

Le reste des signaux des carbones (figure 3.28) est attribué à l'aide de l'analyse du spectre HMBC (figure 3.29)

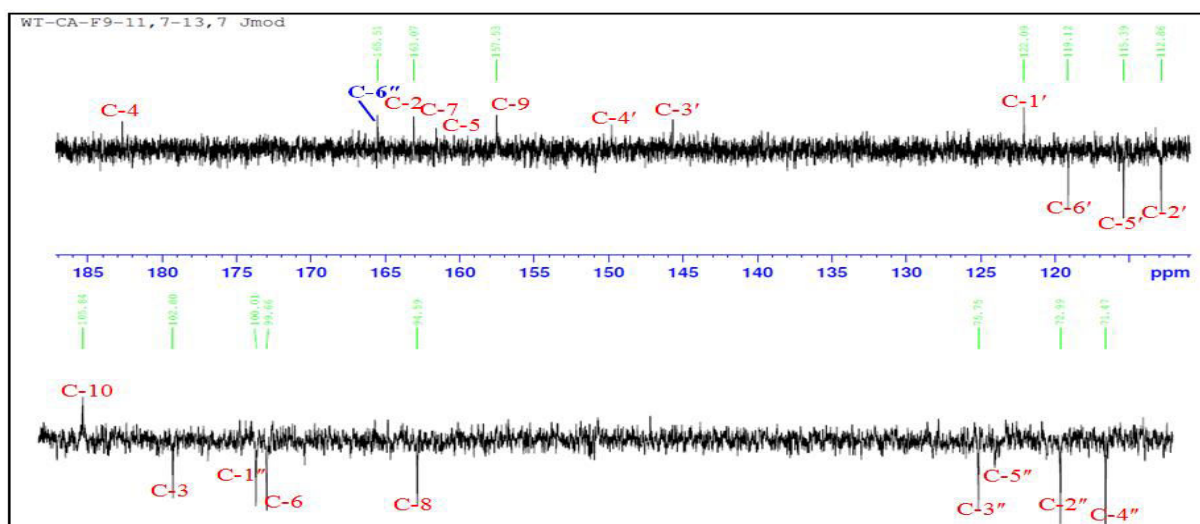


Figure 3.28: Spectre RMN ^{13}C -*J* modulé du composé **Ca4** (CD_3OD , 125MHz).

La corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1'' de l'acide glucuronique et le carbone C-7 confirme que l'acide glucuronique est attaché à la génine en position 7 (figure 3.29).

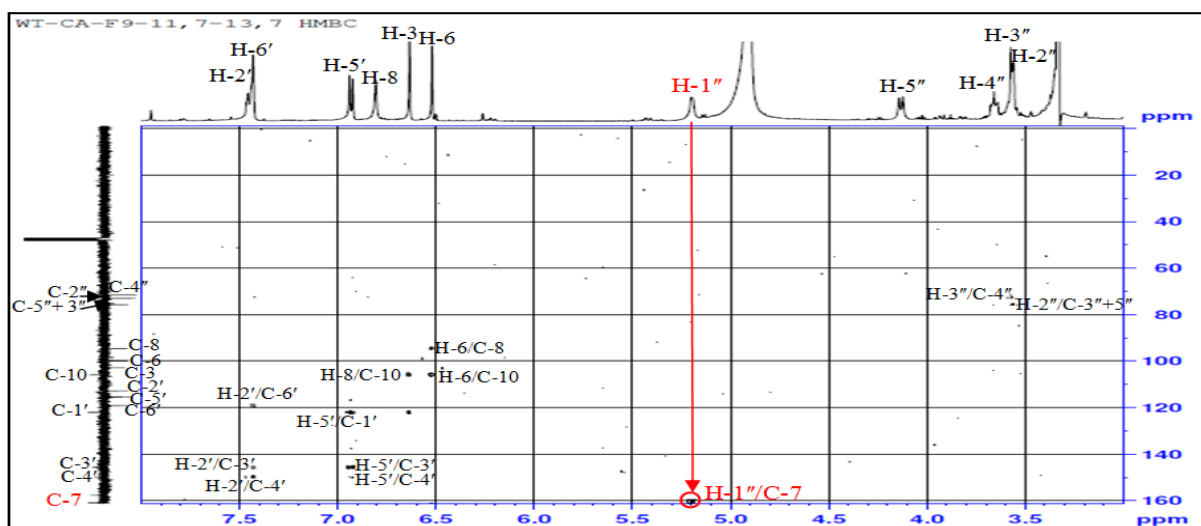


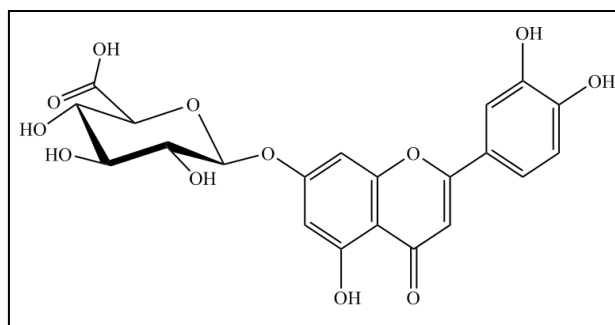
Figure 3.29: Spectre HMBC du composé **Ca4**.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du composé **Ca4** sont dressées dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du Composé **Ca4** dans CD_3OD (Iwashina et al., 2011).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm (ref)	δ_{H} ppm (m, J/Hz)	δ_{H} ppm (ref) pyridine- d_5	N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm (ref)	δ_{H} ppm (m, J/Hz)	δ_{H} ppm(m, J/Hz) (ref) pyridine- d_5
2	163.1	165.6	-	-	3'	145.5	147.5	-	-
3	102.8	104.0	6.64 (1H, s)	6.82 (1H, s)	4'	149.8	151.6	-	-
4	182.5	183.1	-	-	5'	115.4	116.9	6.52 (1H, d, $J=8.2$)	7.26 (1H, d, $J=8.3$)
5	159.5	162.1	-	-	6'	119.1	120.0	7.43 (1H, dd, $J=8.2/2.1$)	7.51 (1H, dd, $J=8.3/1.5$)
6	99.6	100.9	6.52 (1H, d, $J=1.8$)	6.77 (1H, d, $J=2.1$)	Glucuronic acid				
7	161.6	164.2	-	-	1''	100.0	101.8	5.20 (1H, d, $J= ?$)	5.73 (1H, d, $J=7.2$)
8	94.6	95.6	6.81 (1H, d, $J=1.8$)	7.04 (1H, d, $J=1.7$)	2''	72.9	74.5	3.56 (2H, m)	4.24 (1H, m)
9	157.5	158.1	-	-	3''	75.7	77.8		4.32 (2H, t, $J=8.8$)
10	105.8	104.0	-	-	4''	71.5	73.5	6.52 (1H, t, $J=9.3$)	4.54 (1H, t, $J=8.4$)
1'	122.1	122.8	-	-	5''	75.3	76.5	4.13 (1H, d, $J=9.3$)	-
2'	112.9	114.5	7.46 (1H, d, $J=2.1$)	7.82 (1H, d, $J=2.3$)	6''	165.5	174.7	-	-

Toutes ces données nous permettent de proposer pour le composé **Ca4**, la structure connue de : **luteoline-7-O- β -D-glucuronopyranoside** (Iwashina et al., 2011).



luteoline-7-O- β -D-glucuronopyranoside (**Ca4**)

I. 5. Elucidation Structurale de Ca5

Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-MS -ESI (figure 3.30) montre deux ions pseudo-moléculaires à m/z 487.0848 $[M+Na]^+$ (calculé 487.0848 et m/z 465.1031 $[M+H]^+$, qui correspondent à la formule brute $C_{21}H_{20}O_{12}$.

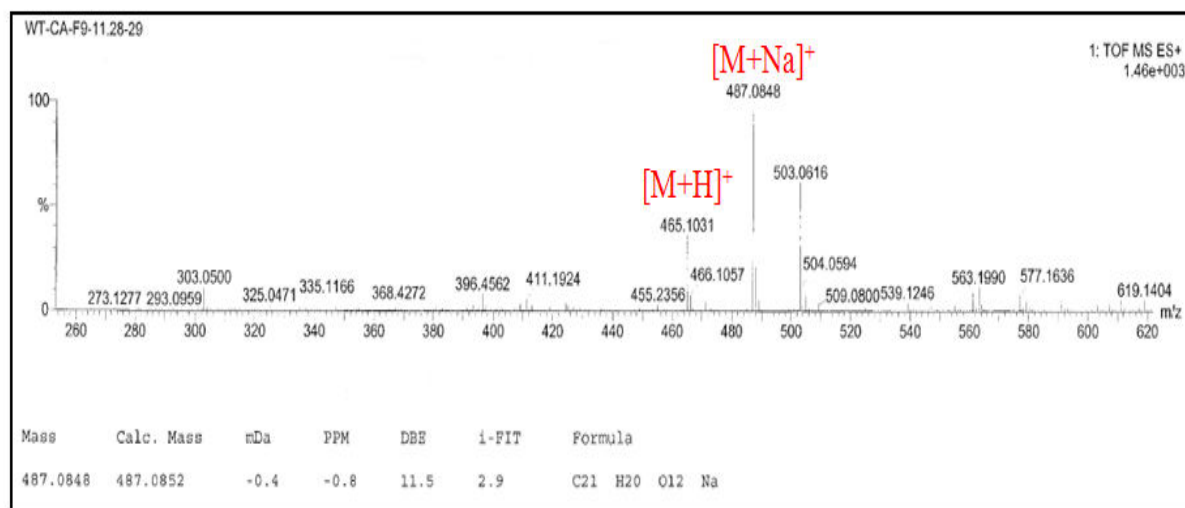


Figure 3.30: Spectre HR-ESI-MS du composé **Ca5**.

L'examen du spectre RMN 1H (figure 3.31), enregistré dans CD_3OD , montre la présence des signaux caractéristiques d'un lutéoline que l'on peut identifier par :

- Un singulet observé à $\delta_H = 6.58$ ppm d'intégration 1H dû à la résonance de H-3.
- Un système ABX sur le cycle B révèle par un doublet résonne à $\delta_H = 7.40$ ppm ($J = 2.2$ Hz) et un doublet de doublet à $\delta_H = 7.42$ ppm ($J = 8.1$ et 2.2 Hz) respectivement dûs aux protons H-2' et H-6', un doublet dû à H-5' apparaissant à $\delta_H = 6.91$ ppm ($J = 8.1$ Hz).
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 6.99$ ppm attribuable soit à H-6 soit à H-8, indiquant ainsi la substitution du cycle A en positions 5,6 et 7 ou bien 5,7 et 8.

Une partie osidique caractérisée par le proton anomérique $\delta_H = 5.07\text{ppm}$ ($J = 7.4\text{Hz}$) ainsi que les autres signaux de ce sucre entre $\delta_H = 3.42\text{ppm}$ $\delta_H = 4.50\text{ppm}$.

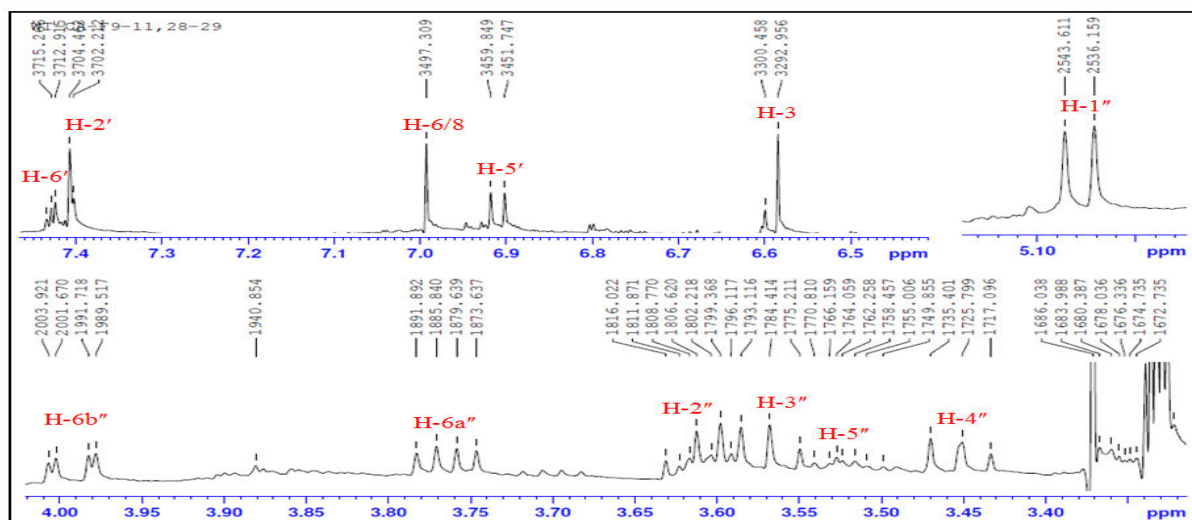


Figure 3.31: Spectre RMN ^1H du composé **Ca5** (CD_3OD , 500MHz).

Le sucre est identifié en tant que glucose à partir du proton anomérique et l'analyse du spectre COSY (figure 3.32) qui permet de mettre en évidence la présence de sept proton d'un hexose, la grande valeur de la constante de couplage ($>7\text{Hz}$) révèle qu'il est axial, caractéristique d'un $\beta\text{-D-glucopyranose}$ (Aquino et al., 2002).

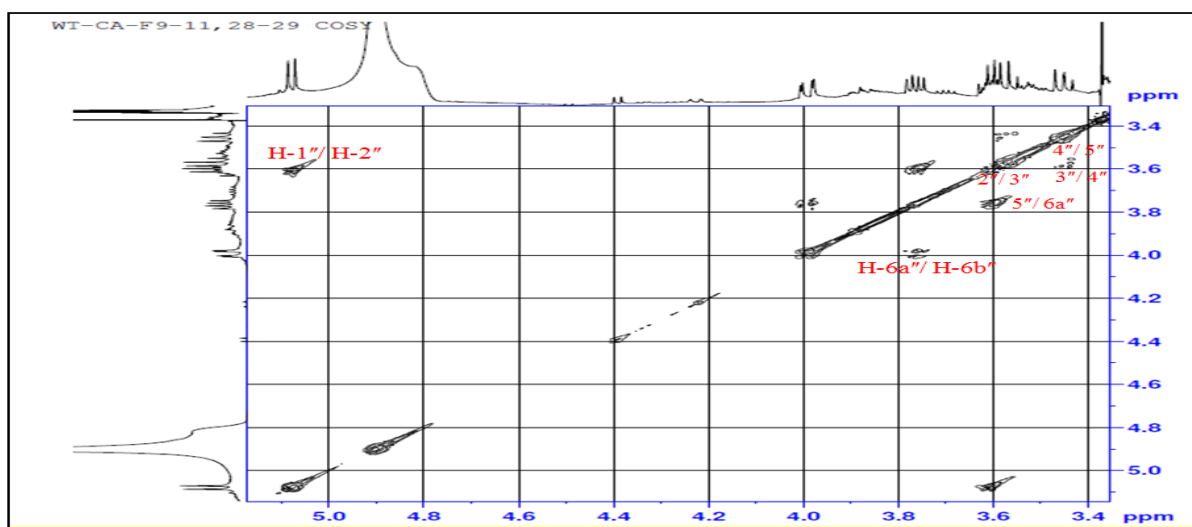


Figure 3.32: Spectre COSY du composé **Ca5**.

Les carbones respectifs aux protons du glucose ainsi que ceux de la partie aromatique, sont attribués à l'aide du spectre HSQC (figures 3.33, 3.34). En particulier, le proton H-6 ou H-8 est corrèle au carbone résonnant à $\delta_C = 95.7\text{ppm}$ caractéristique du carbone C-8. De plus, les carbones C-5, C-7 et C-9 résonnant dans les champs blindés à $\delta_C = 147.9$; 152.7 et 151.3ppm respectivement est en accord avec un cycle 5, 6,7-trihydroxylé.

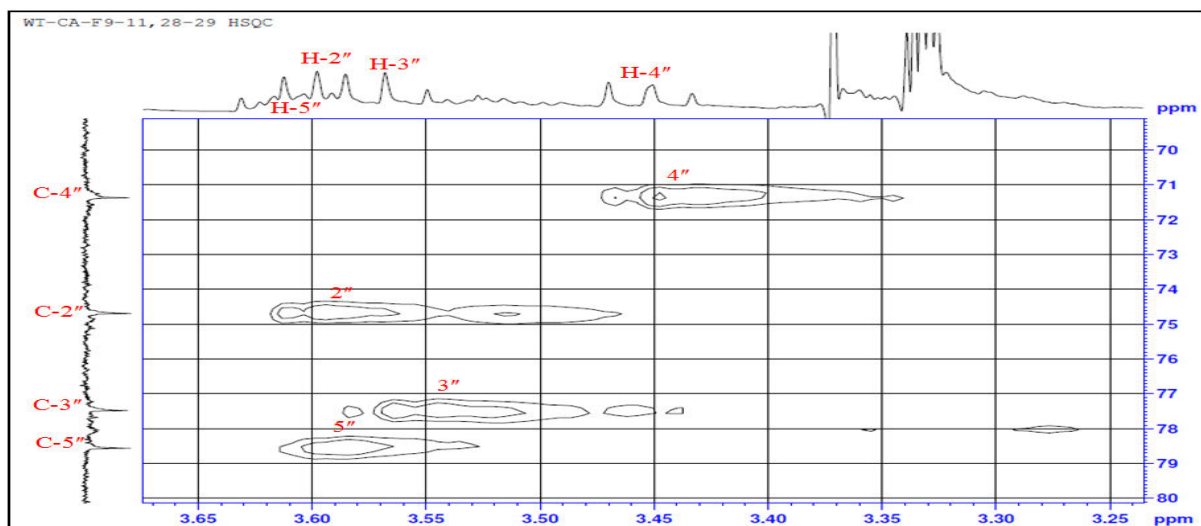


Figure 3.33: Spectre HSQC *J*modulé de la partie osidique du composé **Ca5**.

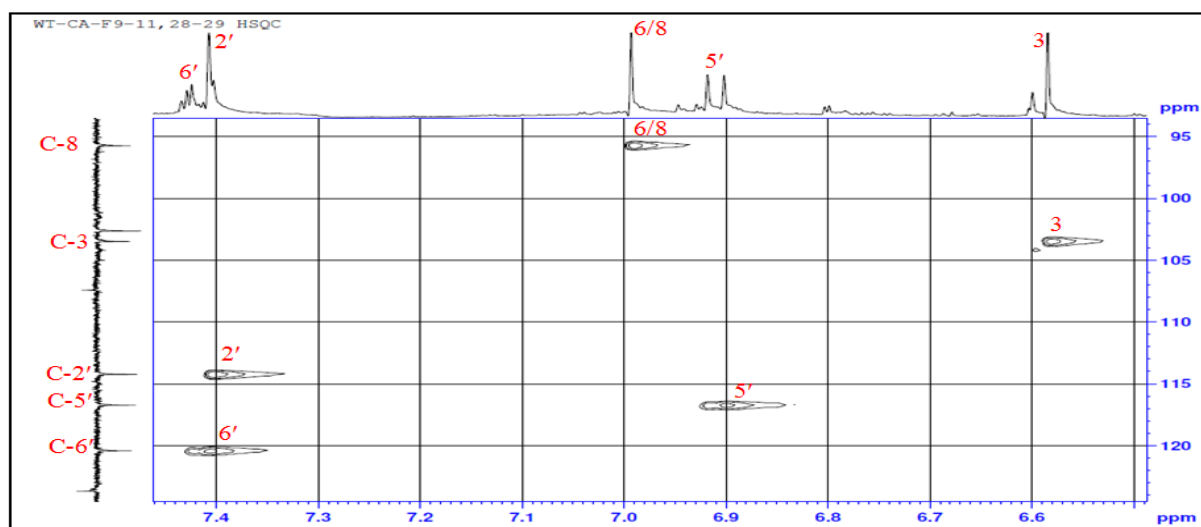


Figure 3.34 : Spectre HSQC *J*modulé de la partie génine du composé **Ca5**.

Sur le spectre HMBC (figure 3.35) le proton H-8 donne deux taches de corrélations H-C avec deux atomes de carbones oxygénés.

Une tâche de corrélation est observée entre le proton H-8 et un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_H = 131.8\text{ppm}$ qui ne peut être que le carbone C-6 (Lu & Foo 2000).

Ce même spectre (figure 3.35) montre une corrélation entre le carbone C-7 et le proton anomérique H-1'' du glucose. Ceci confirme la fixation de la partie osidique en position 7.

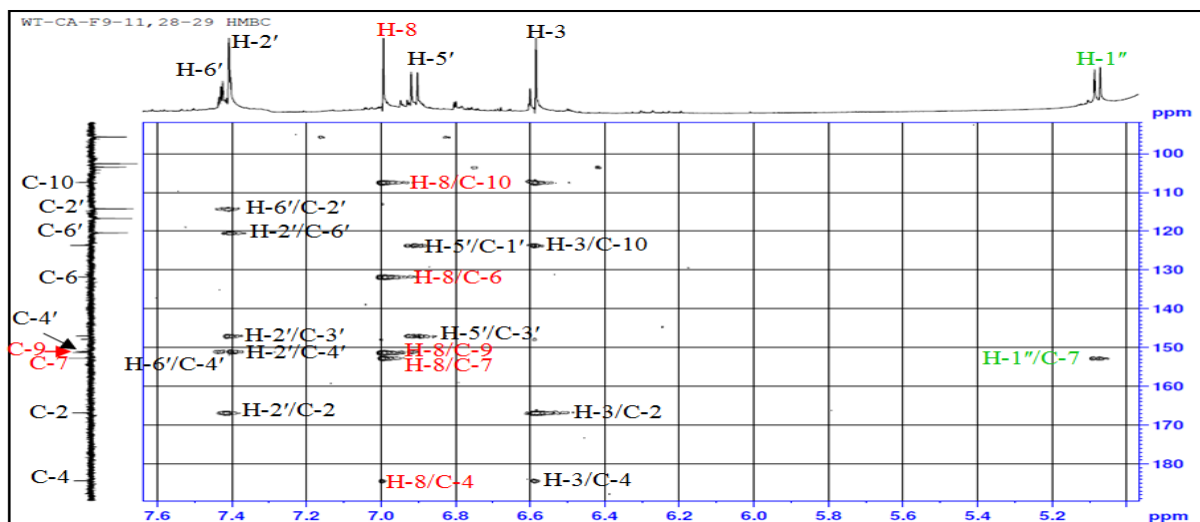


Figure 3.35: Spectre HMBC du composé **Ca5**.

Le spectre RMN ^{13}C montre l'attribution de tous les carbones du composé **Ca5** (figure 3.36)

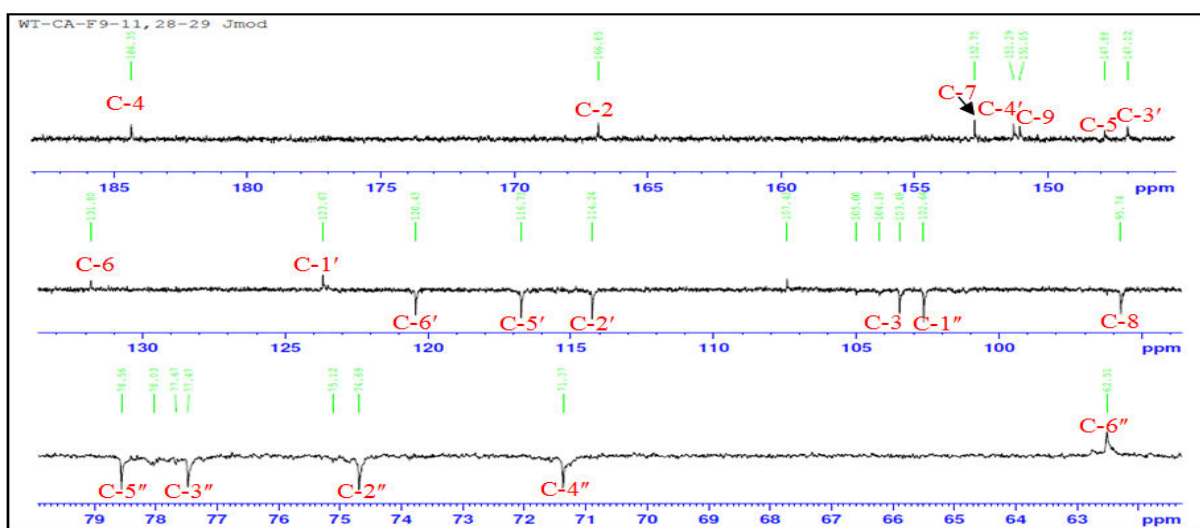
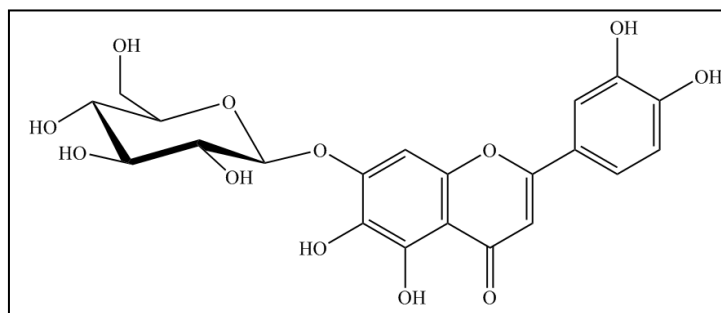


Figure 3.36: Spectre RMN ^{13}C -Jmodulé du composé **Ca5** (CD_3OD , 125MHz).

Le composé **Ca5** est identifié comme étant le **6-Hydroxyluteolin-7-O- β -D-glucopyranoside** (Lu & Foo 2000).



6-Hydroxyluteolin-7-O- β -D-glucopyranoside (**Ca5**)

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones sont dressées dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Ca5** dans CD_3OD (Lu & Foo 2000).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm ref	δ_{H} ppm (m, J/Hz)	δ_{H} ppm ref	N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm ref	δ_{H} ppm (m, J/Hz)	δ_{H} ppm ref
2	166.8	164.6	-	-	3'	147.0	146.1	-	-
3	103.5	102.9	6.58 (1H, s)	6.69 (1H, s)	4'	151.3	150.3	-	-
4	184.3	182.6	-	-	5'	116.7	116.3	6.91 (1H, d, $J=8.1$)	6.90 (1H, d, $J=6.8$)
5	147.9	146.9	-	-	6'	120.4	119.3	7.42 (1H, dd, $J=8.1/2.2$)	7.41 (1H, d, $J=7.0$)
6	131.8	130.8	-	-	Glucose en C-7				
7	152.7	151.7	-	-	1''	102.6	101.3	5.07 (1H, d, $J=7.4$)	5.01 (1H, d, $J=5.6$)
8	95.7	94.4	6.99 (1H, s)	6.97 (1H, s)	2''	74.7	73.6	3.61 (1H, m)	3.22-3.44 (4H, m)
9	151.3	149.4	-	-	3''	77.5	77.6	3.59 (1H, m)	
10	107.4	106.2	-	-	4''	71.4	70.0	3.45 (1H, t, $J=8.7$)	
1'	123.7	122.0	-	-	5''	78.6	76.2	3.51 (1H, m)	
2'	114.2	113.8	7.40 (1H, d, $J=2.1$)	7.40 (1H, s)	6''	62.5	61.0	3.76 (1H,dd, $J=12.2/6.0$) 3.99 (1H,dd, $J=12.2/2.2$)	-

I. 6. Elucidation Structurale de Ca6

Une grande similitude est observée entre les spectres RMN ^1H (figure 3.37) et ^{13}C - J -modulé (figure 3.38) du composé Ca6 et ceux du composé Ca1. On retrouve tous les signaux caractéristiques du composé Ca1 : les deux singulets des H-6' et H-3' à $\delta_{\text{H}} = 7.70$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 6.54$ ppm respectivement, les deux doublets d'intégration 1H attribuable à H-6, H-8 résonnant à $\delta_{\text{H}} = 6.18$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 6.51$ ppm ($J = 1.8$ Hz) respectivement. Le spectre RMN ^1H montre également les signaux des protons du glucose.

La différence réside en la disparition des signaux des protons du radical substitué en C-2' « 2''-acetoxy-3''-sulfonyl propanoic acide » du composé Ca1 (CH_3 à 1.90 ppm (3H, s) et $\text{CH}_2\text{-SO}_2$ à 3.45 ppm-3.56 ppm). Cela indique que le cycle B est substitué en position 2' par un hydroxyle, ainsi que l'apparition d'un singulet d'intégration 1H du proton H-3 à $\delta_{\text{H}} = 7.05$ ppm.

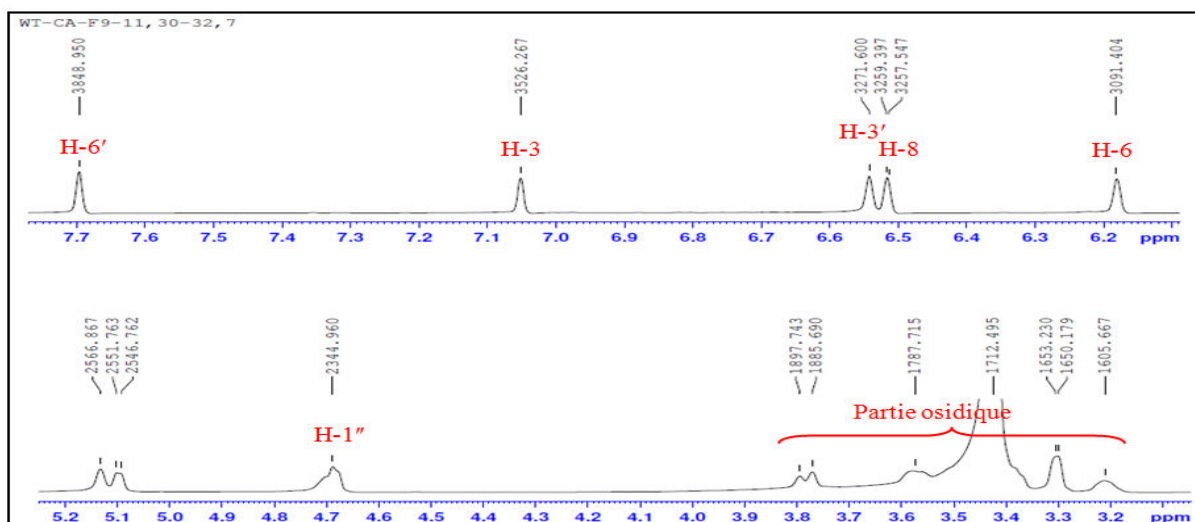


Figure 3.37: Spectre RMN ^1H du composé **Ca6** (DMSO, 500 MHz).

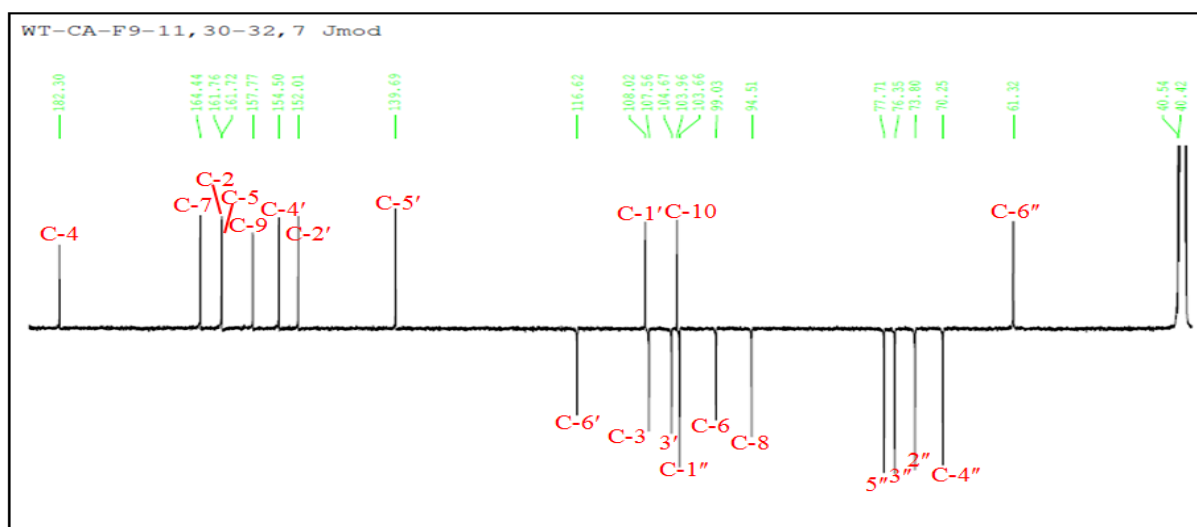


Figure 3.38: Spectre RMN ^{13}C J modulé du composé **Ca6** (DMSO, 125Hz).

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des corrélations homo-nucléaires COSY (figure 3.39), hétéronucléaires HSQC (figure 3.40), HMBC (figure 3.41, figure 3.42) et ROESY (figure 3.43).

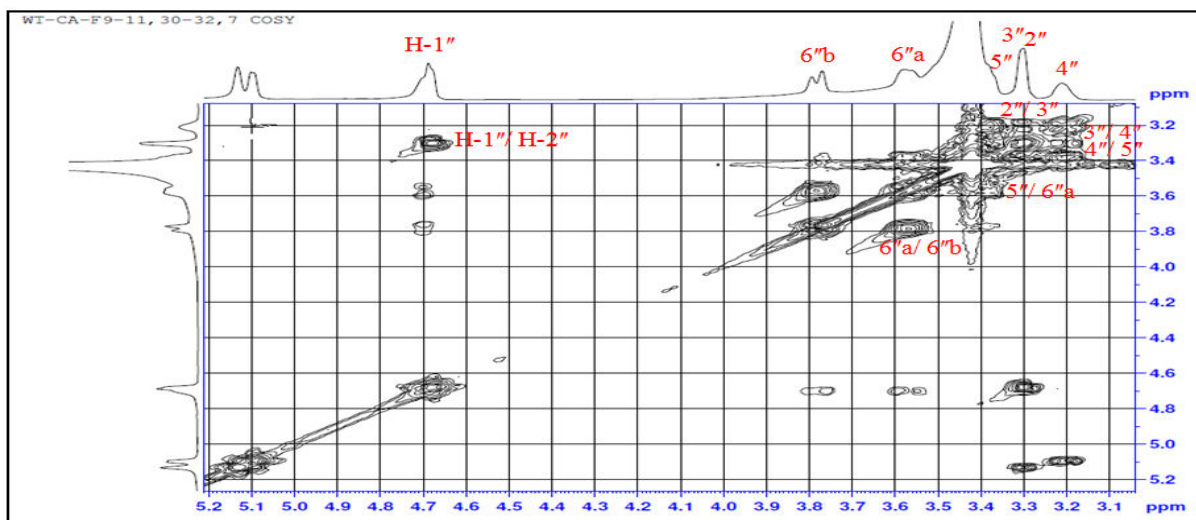


Figure 3.39: Spectre COSY du composé Ca6.

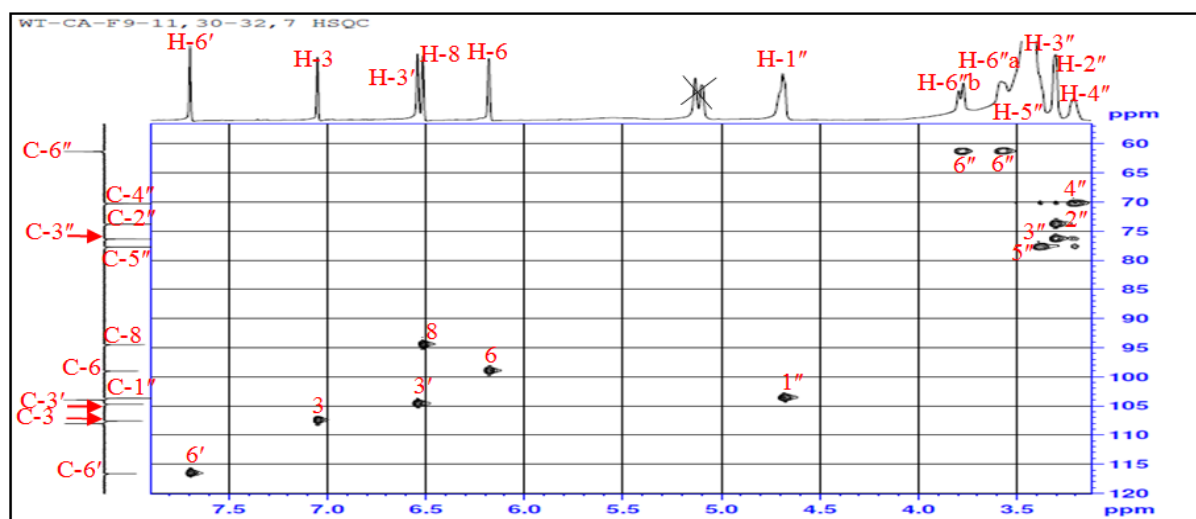


Figure 3.40: Spectre HSQC du composé Ca6.

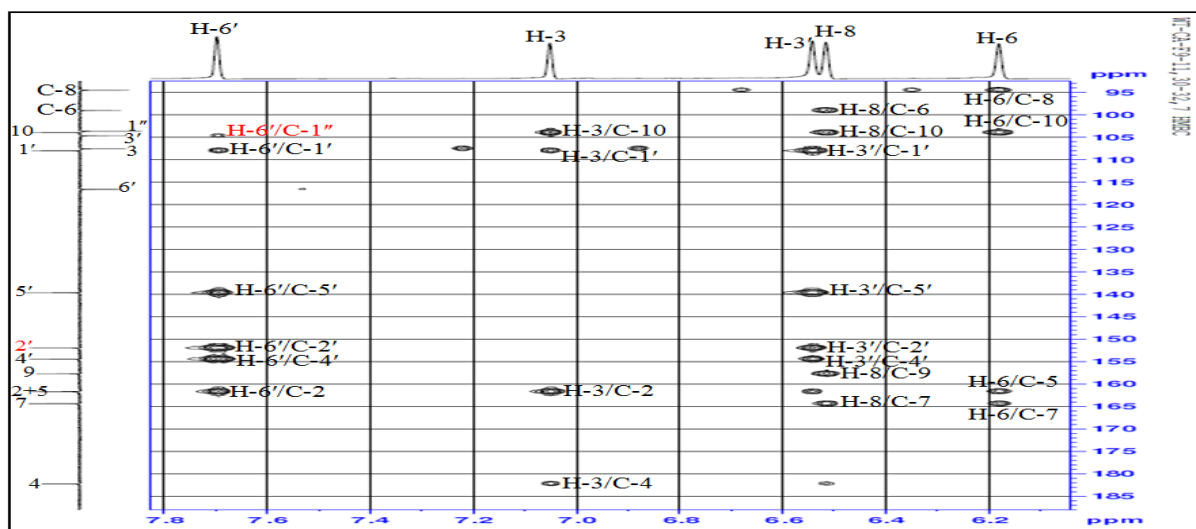


Figure 3.41: Spectre HMBC du composé Ca6.

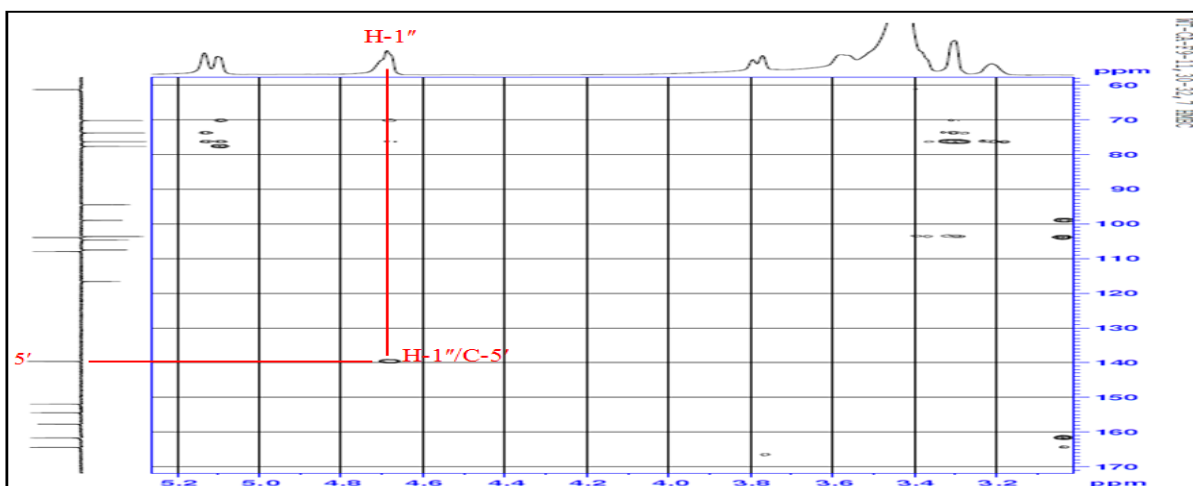


Figure 3.42: Spectre HMBC du composé **Ca6** (partie étalé 3.2-5.5 ppm).

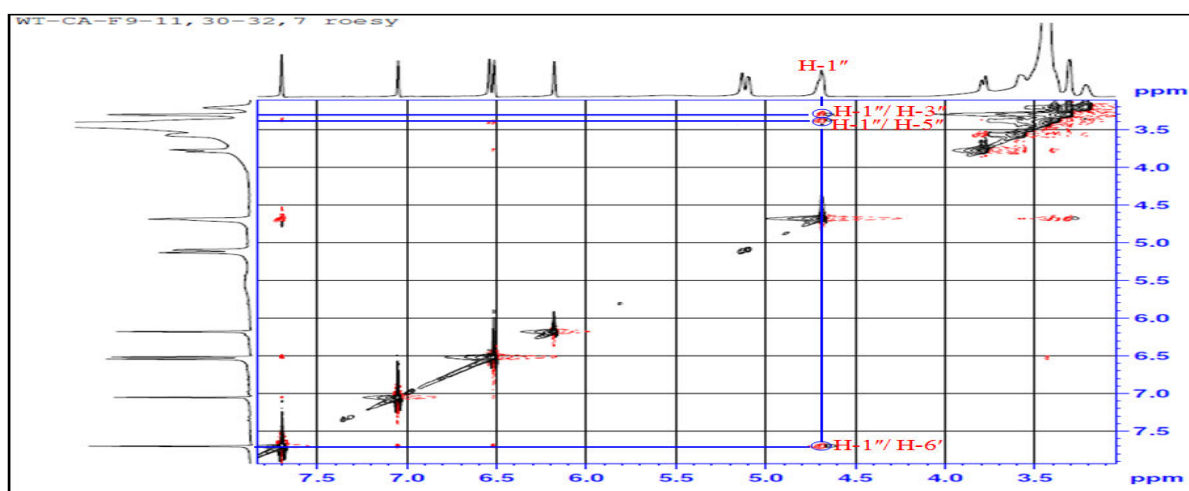
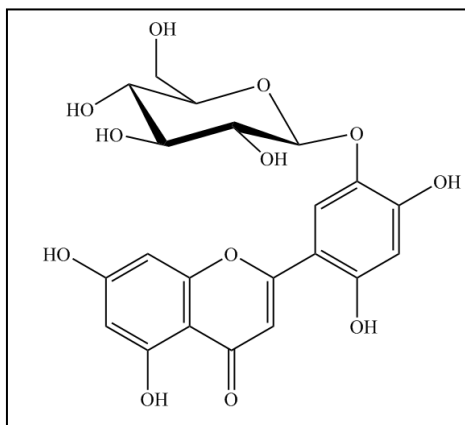


Figure 3.43: Spectre ROESY du composé **Ca6**.

Tableau 3.6 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Ca6** dans DMSO (Marco et al., 1988).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm ref	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) ref	N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm ref	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) ref
2	161.8	161.6	-	-	3'	104.7	104.4	6.54(1H, s)	6.51(1H, s)
3	107.6	107.4	7.05(1H, s)	7.03(1H, s)	4'	154.5	154.2	-	-
4	182.3	182.1	-	-	5'	139.7	139.5	-	-
5	161.7	161.2	-	-	6'	116.6	116.5	7.70(1H, s)	7.67(1H, s)
6	99.0	98.8	6.18(1H, d, J=1.8)	6.15(1H, d, J=2.0)	Glucose en 5' (Gawronska-Grzywacz & Krzaczek 2009)				
7	164.4	164.1	-	-	1''	103.6	101.0	4.69(1H, d, J = 7.0)	4.66(1H, d, J = 7.3)
8	94.5	94.4	6.51(1H, d, J=1.8)	6.49(1H, d, J=2.0)	2''	73.8	73.1	3.15-3.42(1H, m)	3.20-3.50(1H, m)
9	157.7	157.6	-	-	3''	76.3	76.3		
10	103.9	103.8	-	-	4''	70.2	69.4		
1'	108.0	107.8	-	-	5''	77.7	77.1		
2'	152.0	151.9	-	-	6''	61.3	60.5	3.70(1H, br d, J=12.0)	3.70(1H, brd, J=10.1)

Le composé **Ca6** est identifié comme étant l'**Isoetin-5'-O- β -D-glucoopyranoside** (Marco et al., 1988 ; Gawronska-Grzywacz & Krzaczek 2009).



Isoetin-5'-O- β -D-glucoopyranoside (**Ca6**)

I. 7. Elucidation Structurale de Ca7

L'analyse du spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS du composé **Ca7** (figure 3.44), révèle deux ions pseudo-moléculaires à m/z 325.0 $[M+Na]^+$ (calculé 325.0) et m/z 627.1 $[2M+Na]^+$ qui correspondent à la formule brute $C_{13}H_{18}O_8$.

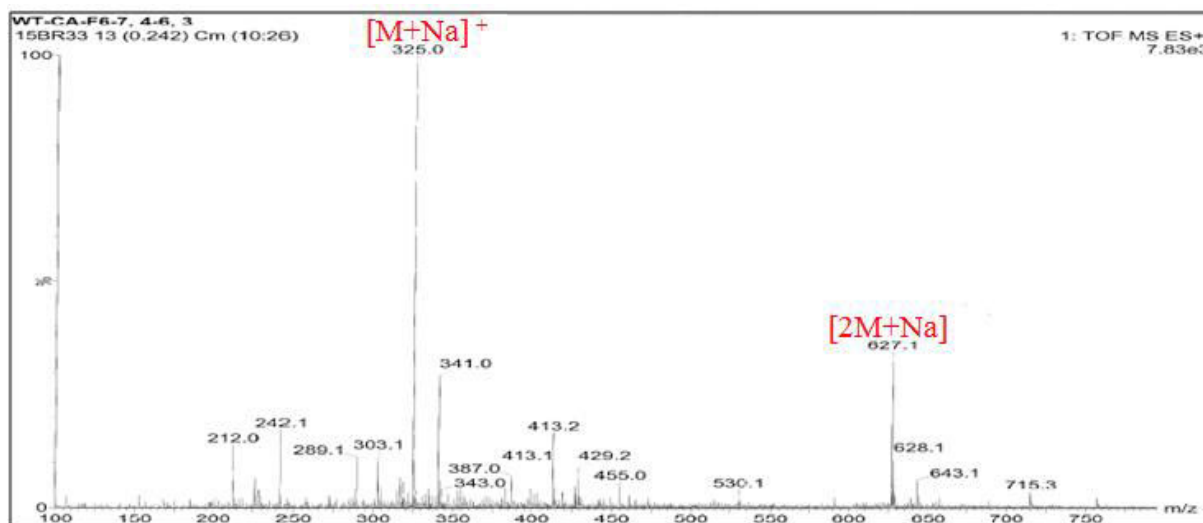


Figure 3.44: Spectre de masse HR-MS –ESI du composé **Ca7**.

L'examen du spectre RMN- 1H (figure 3.45) montre la présence des signaux caractéristiques d'un cycle benzène 1, 2, 4-trisubstitué que l'on peut identifier par :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 6.83\text{ppm}$ ($J = 2.6$ Hz), à $\delta_H = 6.71\text{ppm}$ ($J = 8.6$ Hz) et un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 6.61\text{ppm}$ ($J = 8.6/2.6\text{Hz}$) attribuables respectivement à H-3, H-6 et H-5.
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta_H = 3.85\text{ppm}$ attribuable à un groupement méthoxyle.

- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 4.76\text{ppm}$ ($J = 7.3\text{Hz}$) attribuable à un proton anomérique.

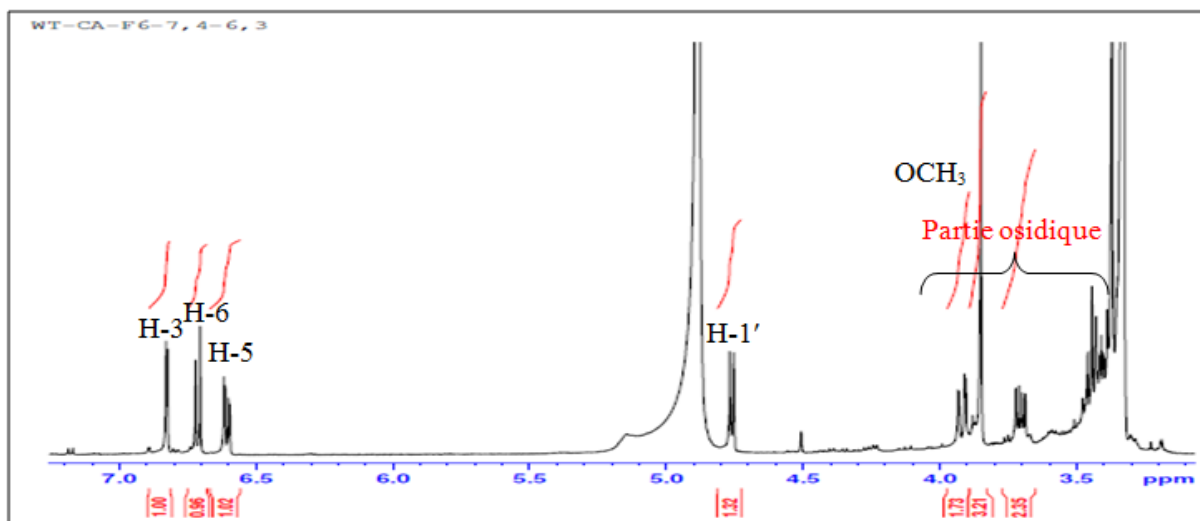


Figure 3.45: Spectre RMN-¹H du composé **Ca7** (CD₃OD, 500 MHz).

Les protons du sucre sont attribués à partir de son proton anomérique et l'analyse du spectre COSY (figure 3.46) permet de mettre en évidence la présence de sept protons d'un hexose et la grande valeur de la constante de couplage du proton anomérique (>7Hz) de révéle qu'il est axial, caractéristique d'un β -D-glucopyranose.

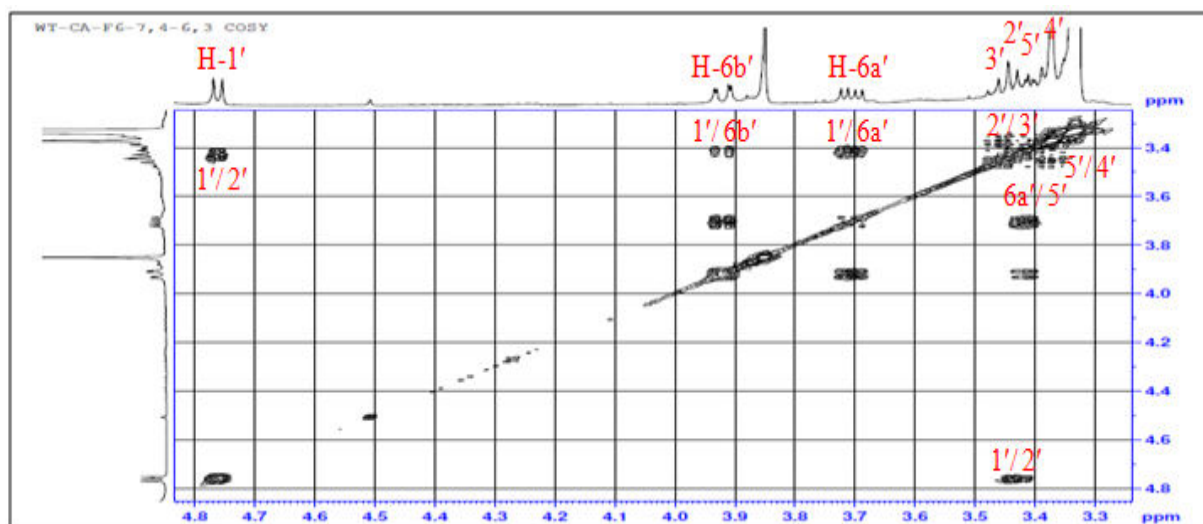


Figure 3.46: Spectre COSY du composé **Ca7** (CD₃OD, 500 MHz).

Les carbones respectifs aux protons du sucre ainsi que ceux de la partie aromatique, sont attribués à l'aide du spectre HSQC (figures 3.47).

La combinaison des données spectrales du spectre COSY avec les déplacements chimiques des carbones de l'hexose suggère la présence du glucose.

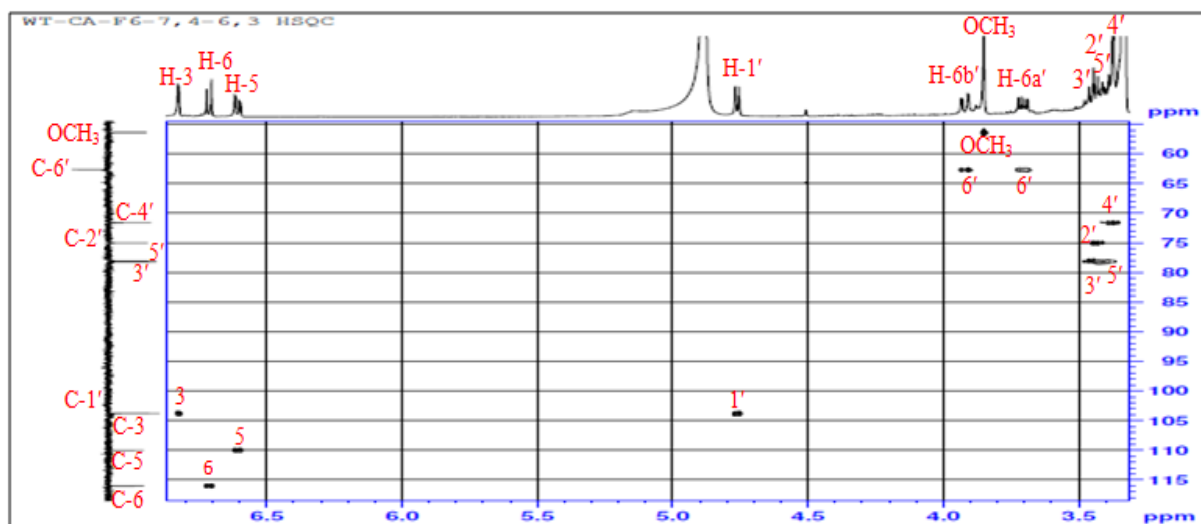


Figure 3.47: Spectre HSQC du composé **Ca7** (CD₃OD, 500 MHz).

Le spectre HMBC (figure 3.48) montre que les carbones quaternaires C-4 ($\delta_C = 152.8\text{ppm}$), C-2 ($\delta_C = 149.6\text{ppm}$), C-1 ($\delta_C = 143.0\text{ppm}$) corrélient en $^2J_{\text{H-C}}$ et en $^3J_{\text{H-C}}$ avec les protons H-3, H-5, H-6 ce qui suggère la formation d'un cycle à 6 (figure 3.49).

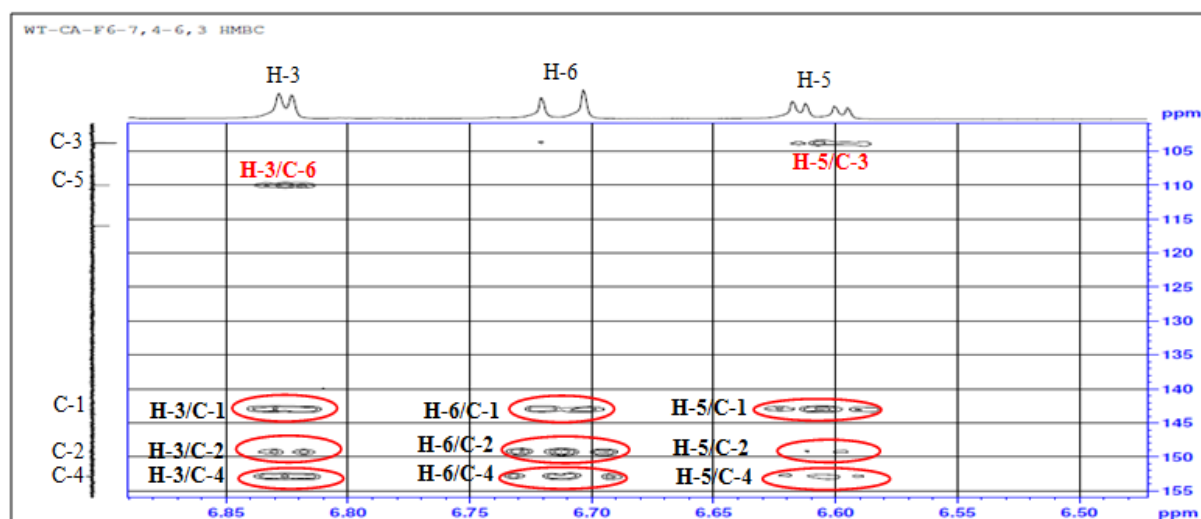


Figure 3.48 : Spectre HMBC étalé du composé **Ca7** (CD₃OD, 500 MHz).

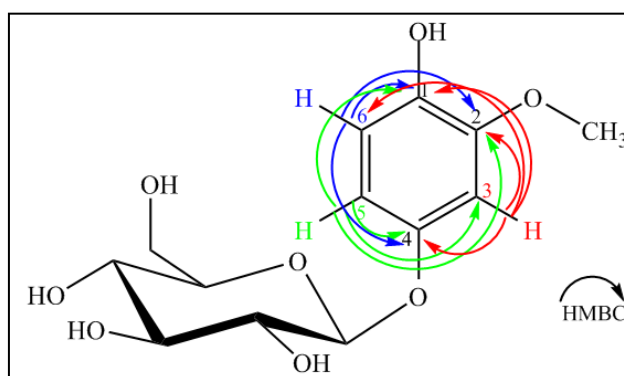


Figure 3.49: Importantes corrélations HMBC (H-C) du composé **Ca7**.

On remarque sur ce même spectre HMBC (figure 3.50) que le groupement méthoxyle corrèle avec le carbone C-2 ($\delta_C = 149.6\text{ppm}$) indiquant que ce carbone est substitué par le méthoxyle.

On observe aussi des taches de corrélations C-H entre le proton H-1' du glucose et le carbone C-4 du benzène qui est déblindé indiquant sa substitution **O- β -D-glucopyranoside**.

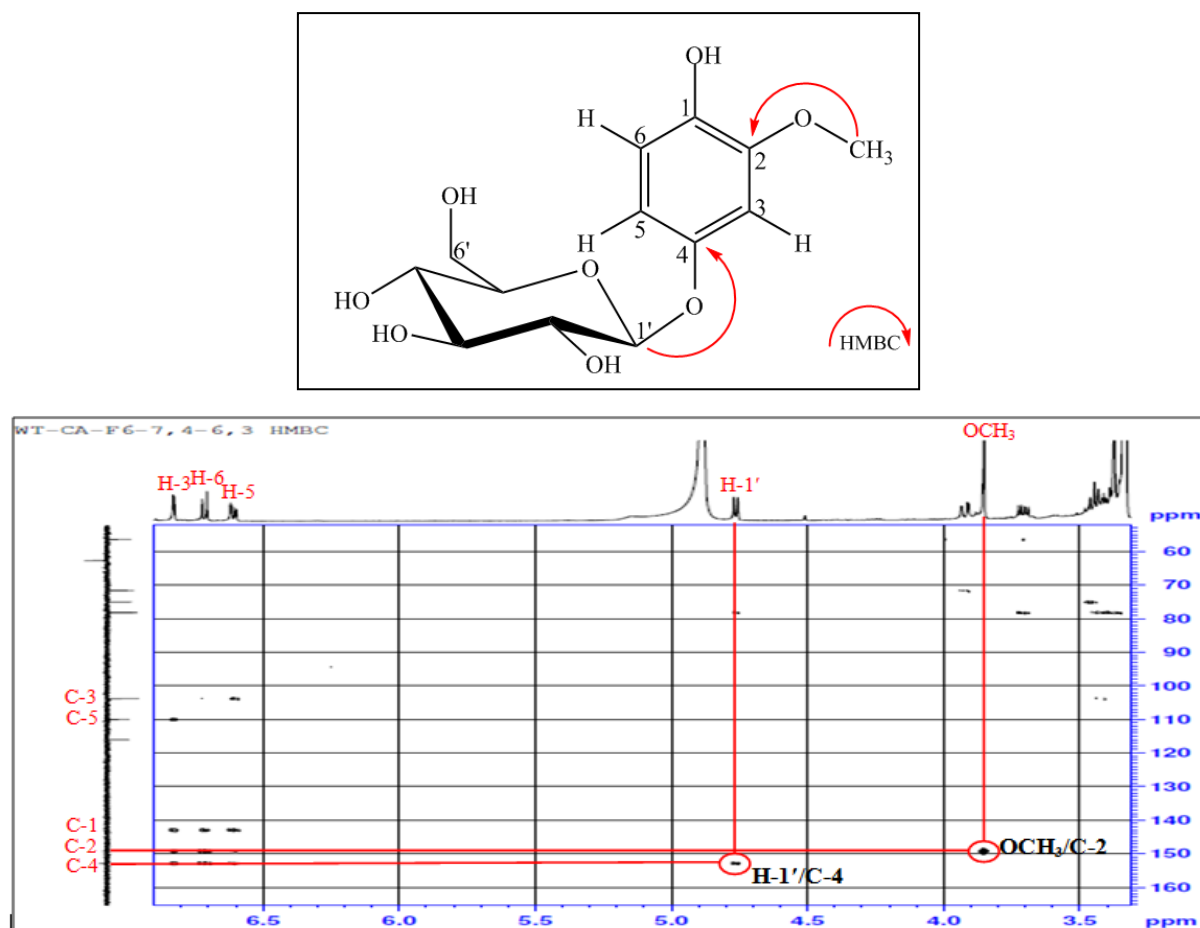


Figure 3.50: Spectre HMBC du composé Ca7 (CD_3OD , 500 MHz).

Le spectre ROESY (figure 3.52) confirme la fixation de la partie osidique en position 4 par les tâches de corrélation entre le proton anomérique H-1' et les protons H-5 et H-3, ainsi que la fixation du méthoxyle en position 2 par la corrélation entre le méthoxyle et le proton 3 comme suit (figure 3.51):

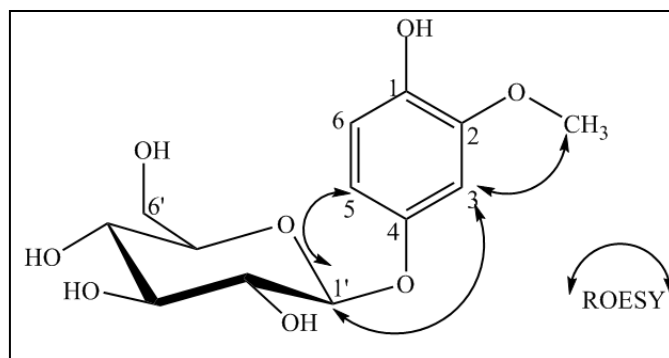


Figure 3.51: corrélations ROESY (H-H) du composé Ca7.

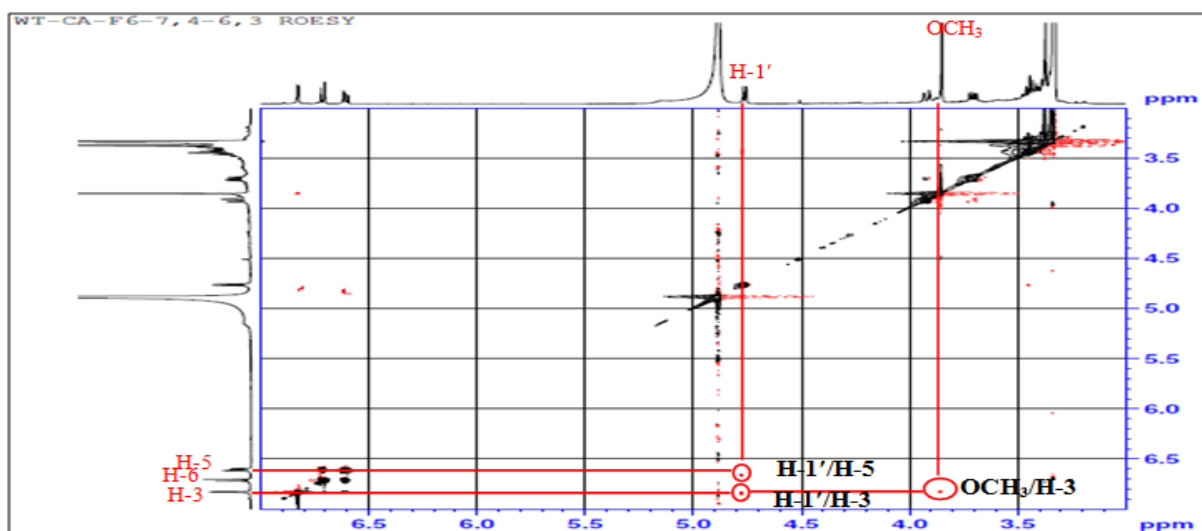


Figure 3.52: Spectre ROESY du composé Ca7 (CD₃OD, 500 MHz).

Le spectre ¹³C-*J*-modulé montre l'attribution de tous les carbones du composé Ca7 (figure 3.53)

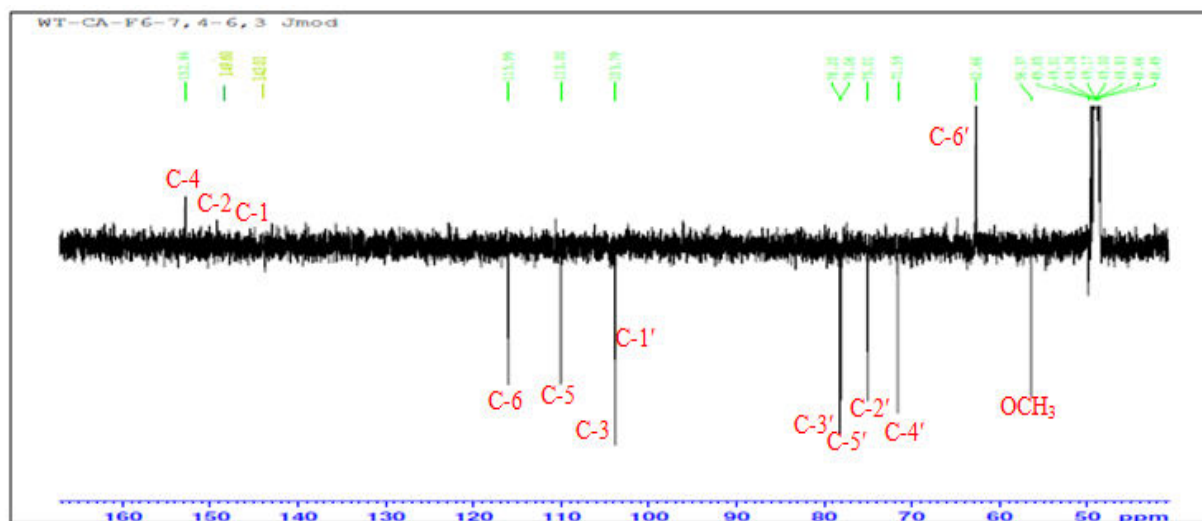


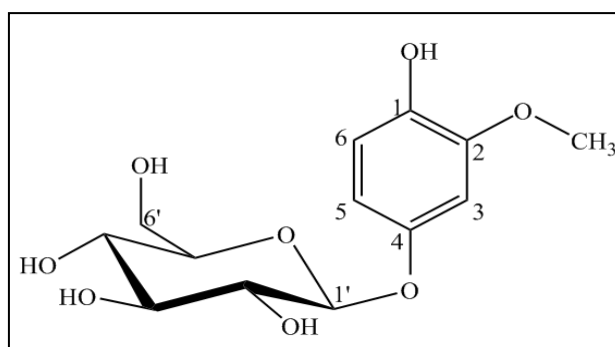
Figure 3.53: Spectre ¹³C-*J*mod du composé Ca7 (CD₃OD, 125 MHz).

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones sont dressées dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Ca7** dans CD_3OD (Inshiri et al., 1987).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	143.0	141.2	-	-
2	149.6	147.7	-	-
3	103.8	102.4	6.83 (1H, d, 2.6)	7.16 (1H, d, 2.5)
4	152.8	150.6	-	-
5	110.0	107.9	6.61 (1H, dd, 8.6/2.6)	7.15 (1H, d, 8.0)
6	116.0	115.1	6.71 (1H, d, 8.6)	7.05 (1H, dd, 8.0/2.5)
OCH₃	56.4	55.4	3.85 (1H, s)	3.71 (1H, s)
1'	103.6	101.6	4.76 (1H, d, 7.3)	5.55 (1H, d, 7.0)
2'	75.0	73.2	3.37-3.47 (4H, m)	4.29-4.45 (3H, m)
3'	78.2	76.9		
4'	71.6	69.9		
5'	78.1	76.6		
6'	62.7	60.8	6'a : 3.71 (1H, dd, 12.0/5.8) 6'b : 3.92 (1H, dd, 12.0/2.1)	6'a : 4.40 (1H, dd, 10.0/5.0) 6'b : 4.59 (1H, brd, 10.0)

Le composé **Ca7** est identifié comme étant le **tachioside** : **Methoxyhydroquinone-4-O- β -D-glucopyranoside** (Inshiri et al., 1987).



Tachioside : Methoxyhydroquinone-4-O- β -D-glucopyranoside (**Ca7**).

I. 8. Elucidation Structurale de Ca8

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 3.54) montre une masse égale à 323.1 correspondant à $[\text{M}+\text{Na}]^+$ donnant la formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_8$.

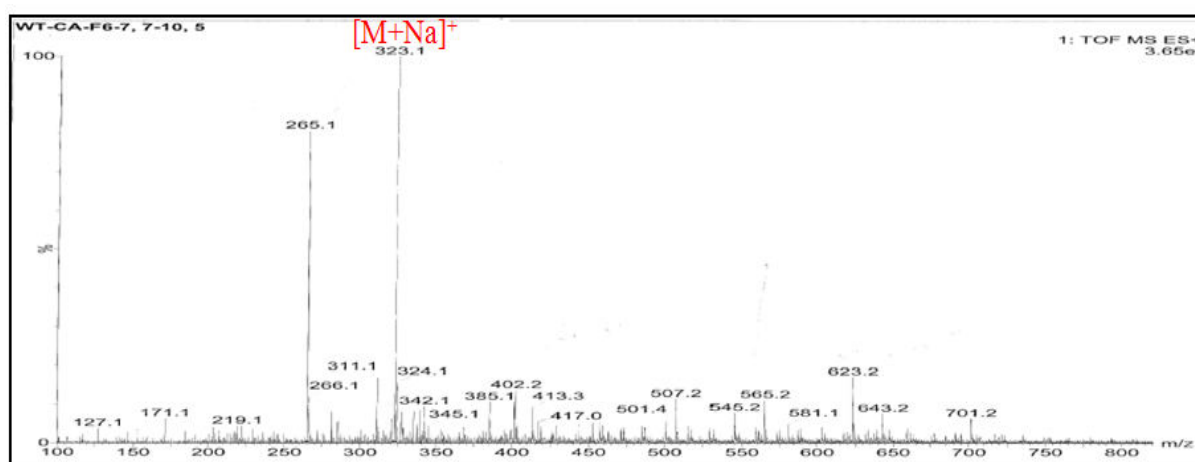


Figure 3.54: Spectre de masse HR-MS –ESI du composé **Ca8**

L'examen du spectre RMN-¹H (figure 3.55) et RMN ¹³C (figure 3.56) montrent la présence des signaux caractéristiques d'un cycle benzène *para*-disubstitué que l'on peut identifier par :

- Deux doublets d'intégration 2H chacun à $\delta_H = 7.18\text{ppm}$ ($J = 8.8\text{Hz}$) et à $\delta_H = 8.01\text{ppm}$ ($J = 8.8\text{Hz}$) sur le spectre du proton et deux singulets à $\delta_C = 115.7\text{ppm}$ et $\delta_C = 131.3\text{ppm}$ sur le spectre du carbone attribuables respectivement aux atomes (3 et 5) et (2 et 6).
- Un groupement carbonyle à $\delta_C = 168.5\text{ppm}$.
- Un proton anomérique à $\delta_H = 5.03\text{ppm}$ (d, $J = 7.5\text{Hz}$).

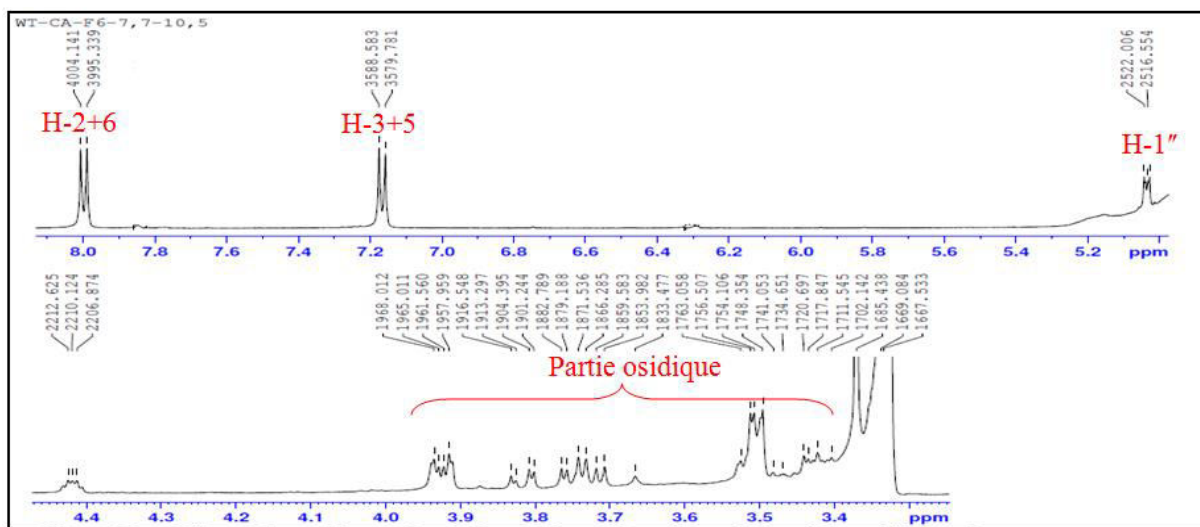


Figure 3.55: Spectre de RMN-¹H du composé **Ca8** (CD₃OD, 500MHz)

Les spectres RMN ¹³C (figure 3.56) et HSQC (figure 3.57) montrent les déplacements chimiques de tous les carbones de composé Ca8:

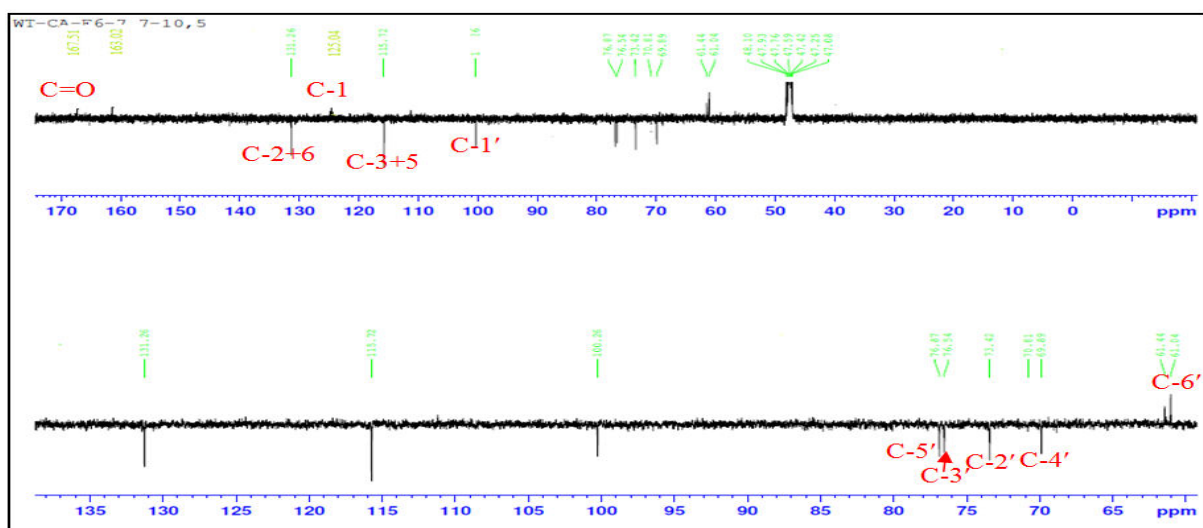


Figure 3.56: Spectre de RMN ¹³C du composé **Ca8** (CD₃OD, 125MHz)

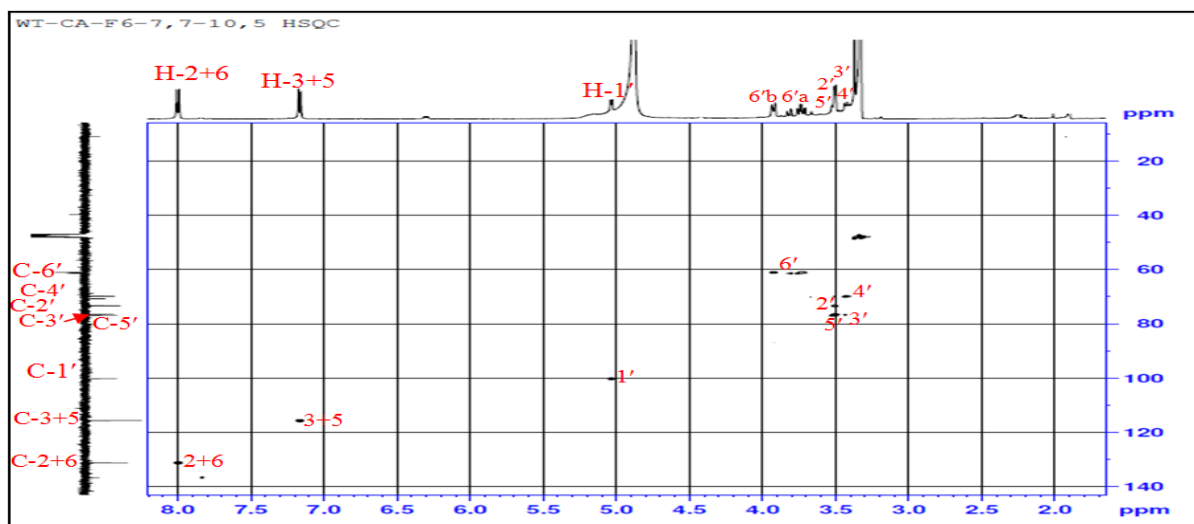


Figure 3.57: Spectre HSQC du composé Ca8

L'hydrolyse acide du composé Ca8 et la Co-chromatographie avec les oses de références, confirment que le sucre est un D-glucose lié à l'aglycone par un pont oxygéné C-O et les protons du sucre sont identifiés par l'analyse du spectre COSY (figure 3.58).

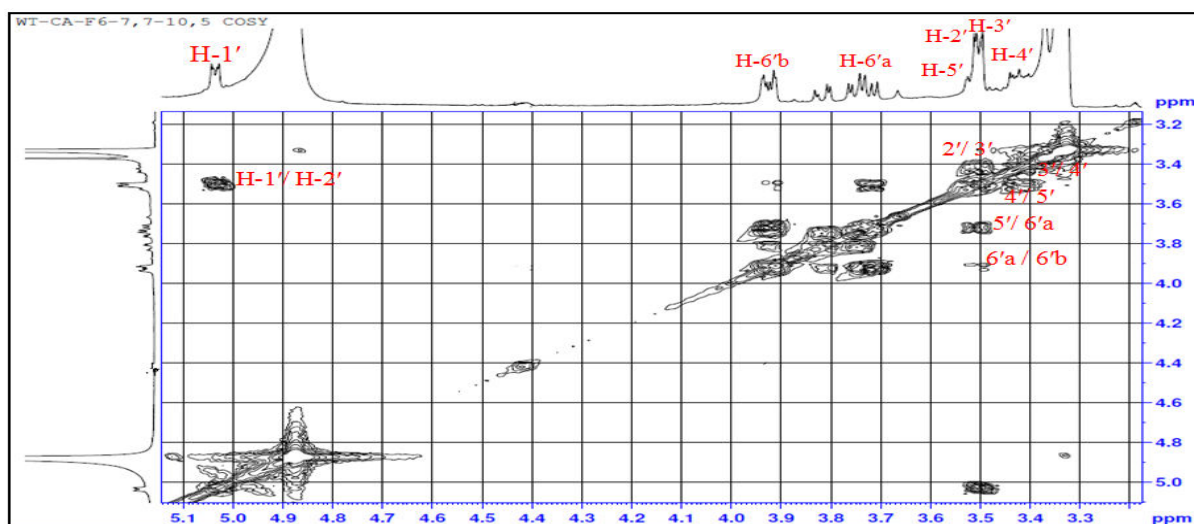


Figure 3.58: Spectre COSY du composé Ca8

Le spectre HMBC (figure 3.59) montre des corrélations en $^2J_{H-C}$ et en $^3J_{H-C}$ entre le carbone quaternaire oxygéné C-4 ($\delta_C = 163.0\text{ppm}$), avec les deux paires de protons (H-2, H-6) et (H-3 H-5). Ainsi qu'une corrélation observée entre le proton anomérique H-1' et le carbone C-4 suggère que le glucose est attaché en position 4. L'autre carbone quaternaire C-1 ($\delta_C = 125.0\text{ppm}$) est corrélé aux protons H-3 et H-5 ce qui confirme la formation d'un cycle à six carbones. Cependant la corrélation entre le carbone à $\delta_C = 168.5\text{ppm}$ et les protons H-2 et H-5 indique la présence d'un groupement carboxyle attaché au carbone C-1 du cycle aromatique.

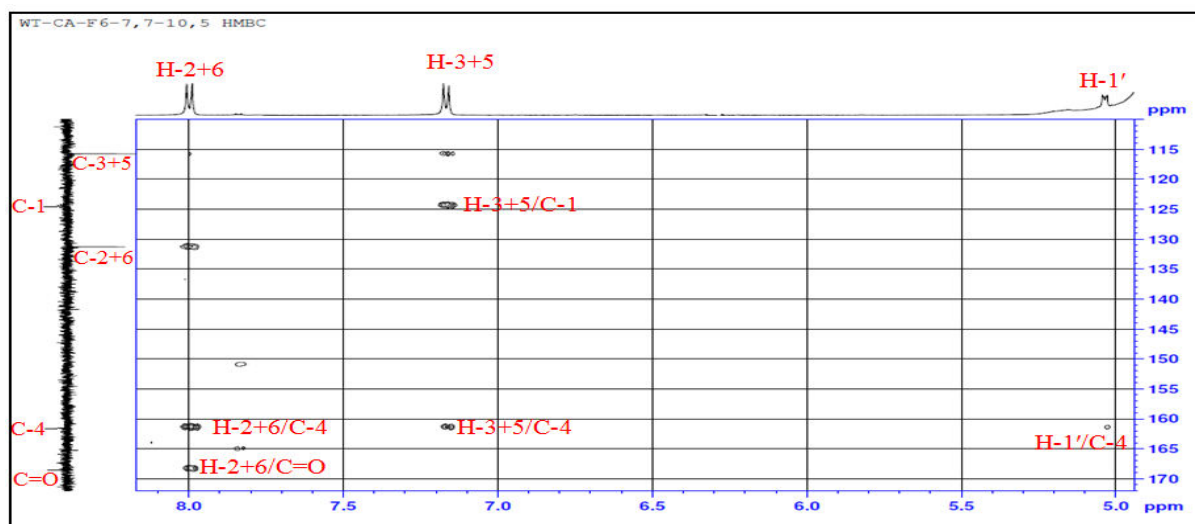


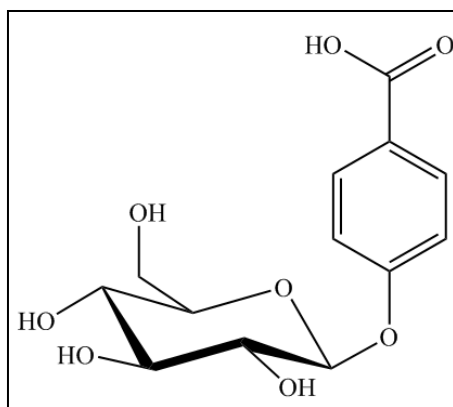
Figure 3.59: Spectre HMBC du composé **Ca8**

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du ^1H et du ^{13}C sont dressés dans le tableau 3.8

Tableau 3.8: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Ca8** dans CD_3OD (Dirks & Herrmann 1984).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	125.0	128.1	-	-
2	131.3	134.1	8.01 (1H, d, 8.8)	8.00 (1H, d)
3	115.7	119.0	7.18 (1H, d, 8.8)	7.20 (1H, d)
4	163.0	163.3	-	-
5	115.7	119.0	7.18 (1H, d, 8.8)	7.20 (1H, d)
6	131.3	134.1	8.01 (1H, d, 8.8)	8.00 (1H, d)
COOH	168.5	173.7	-	-
1'	100.2	102.5	5.03 (1H, d, 7.5)	5.20 (1H, d)
2'	73.4	75.8	3.50 (1H, m)	3.50-4.50 (6H, m)
3'	76.5	79.2	3.48 (1H, m)	
4'	69.9	72.4	3.42 (1H, m)	
5'	76.9	78.5	3.49 (1H, m)	
6'	61.0	63.5	6'a : 3.72 (1H, dd, 7.6)	
			6'b : 3.92 (1H, dd,)	

Ces données permettent d'attribuer sans ambiguïté au composé **Ca8** la structure connue par **Benzoic acid-4-O- β -D-glucopyranoside** (Dirks & Herrmann 1984).



Benzoic acid-4-O- β -D-glucopyranoside (**Ca8**)

I. 9. Elucidation Structurale de Ca9

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 3.60) montre un ion pseudo-moléculaire à $m/z = 383.0$ correspondant à $[M+Na]^+$ donnant la formule brute $C_{16}H_{24}O_9$.

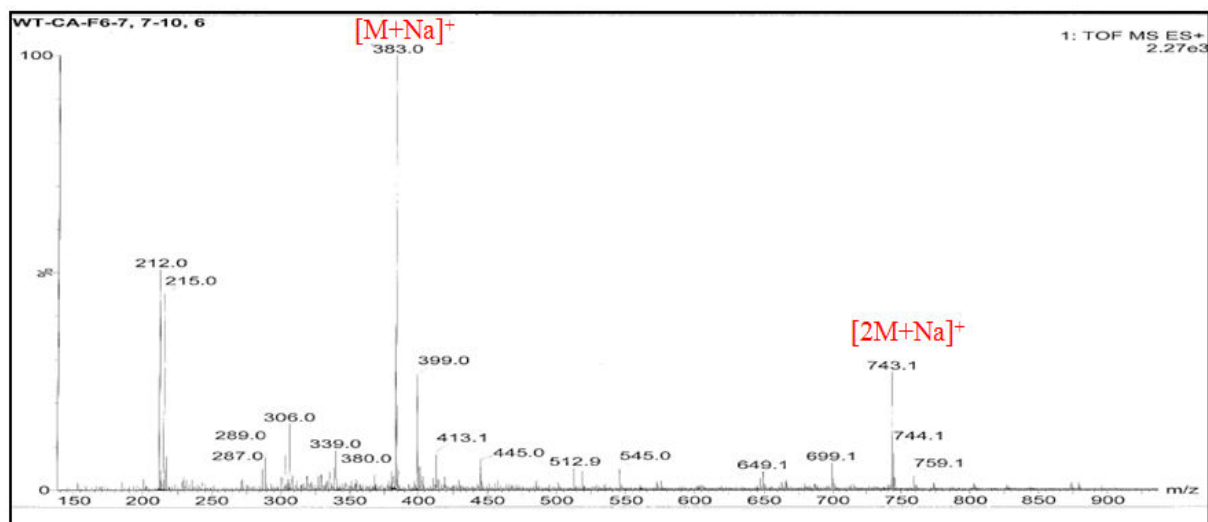


Figure 3.60: Spectre de masse HR-MS –ESI du composé **Ca9**.

Le spectre de RMN 1H (figure 3.61) du composé **Ca9** est très proche de celui du composé **Ca7**. En effet, on reconnaît pratiquement tous les signaux du cycle aromatique trisubstitué, les protons de la partie osidique et le groupement méthoxyle. La différence notable consiste en l'apparition d'un multiplet à $\delta_H = 3.02$ ppm et quatre doublets de doublet résonnants à 3.84 ppm (dd , $J = 9.7$ et 5.6 Hz), 4.13 ppm (dd , $J = 9.8$ et 5.6 Hz), 3.80 ppm (dd , $J = 10.9$ et 6.2 Hz) et 3.91 ppm (dd , $J = 10.9$ et 6.4 Hz).

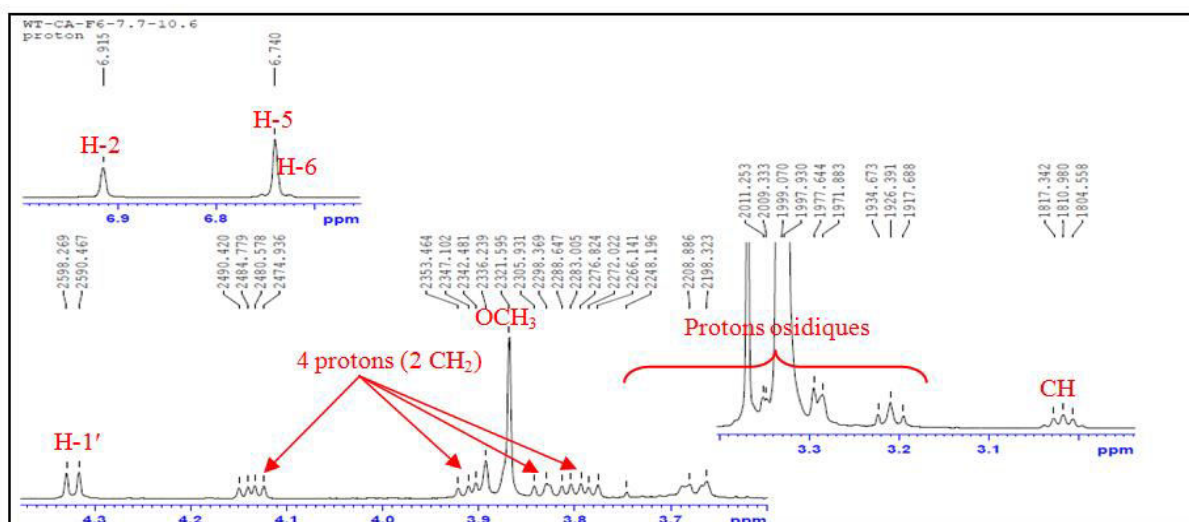


Figure 3.61: Spectre RMN ^1H du composé **Ca9** (CD_3OD , 600MHz).

A partir de la valeur de la constante de couplage du proton anomérique ($J=7.8\text{Hz}$) ainsi que l'analyse du spectre du COSY H-H (figure 3.62) qui montre sept proton d'un hexose couplant entre eux avec de grande valeurs de constante de couplage ($>7\text{Hz}$), la partie osidique est identifiée comme étant le $\beta\text{-D-glucopyranose}$.

Sur le spectre COSY (figure 3.62), des corrélations entre les deux protons H-8 résonnant à 3.84ppm et 4.13ppm et les deux protons H-9 résonnant à 3.80ppm et 3.91ppm avec le proton H-7 résonnant à 3.02ppm permettent de suggérer la présence d'un fragment propane dans la structure du produit.

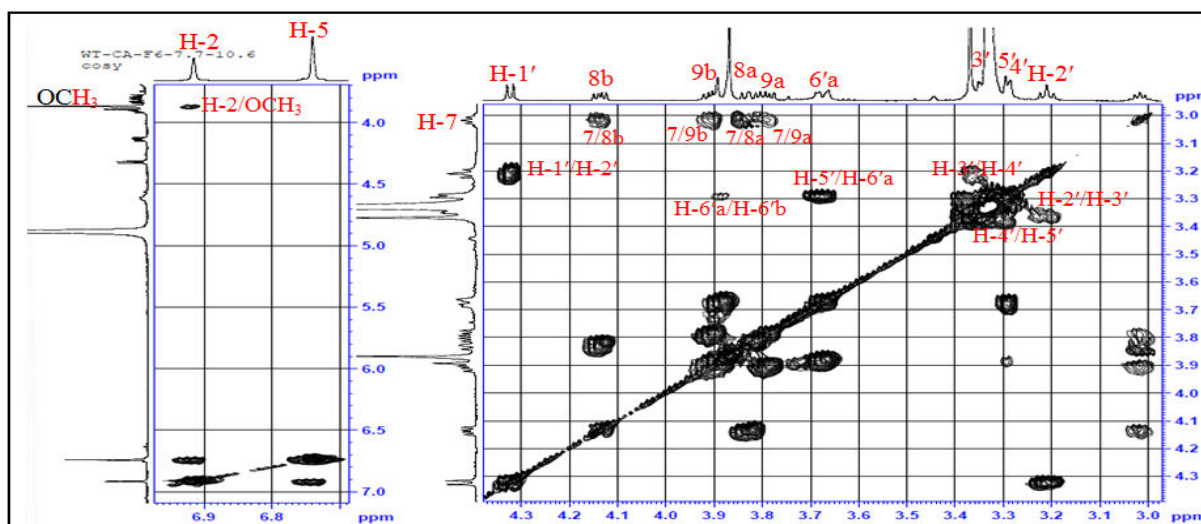


Figure 3.62: Spectre COSY du composé **Ca9**

L'expérience HSQC (figure 3.63) permet de détecter un méthine à 49.5ppm et deux méthylènes oxygénés à 72.4ppm et 64.9ppm respectivement. Ces observations orientent et confirmant la présence du fragment propane proposé.

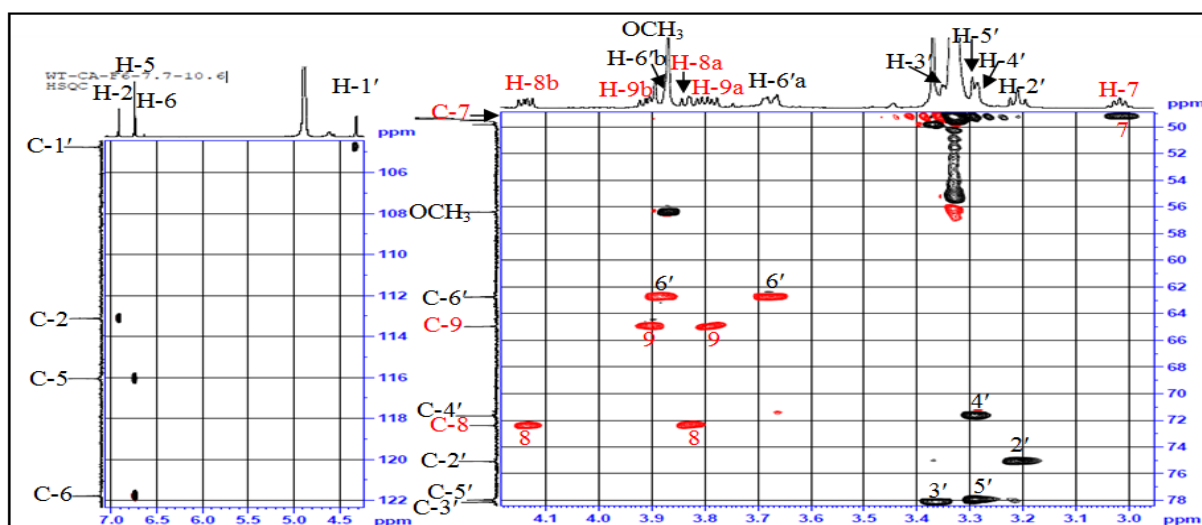
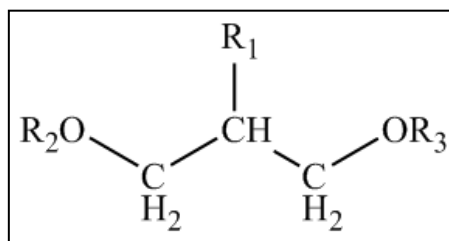


Figure 3.63: Spectre HSQC du composé Ca9

Des corrélations $^3J_{H-C}$ est visualisée sur le spectre HMBC (figure 3.64) entre le proton H-7 et les carbones C-2 (113.1ppm), C-6 (121.8ppm) et C-1 (133.5ppm) indiquant la fixation du groupement propane en position **1** du cycle aromatique ceci est confirmé par des corrélations entre les protons H₂-8, H₂-9 et le carbone **1**(figure 3.66).

On observe aussi une tâche de corrélation entre le groupement méthoxyle et C-3 (148.8ppm) ce qui confirme la substitution en **3** par OCH₃ (figure 3.66).

Ce même spectre HMBC (figure 3.65) montre une tâche de corrélation entre le proton anomérique H-1' du glucose et le carbone C-8 indiquant la fixation de ce β -D-glucopyranoside en position **8** (figure 3.65).

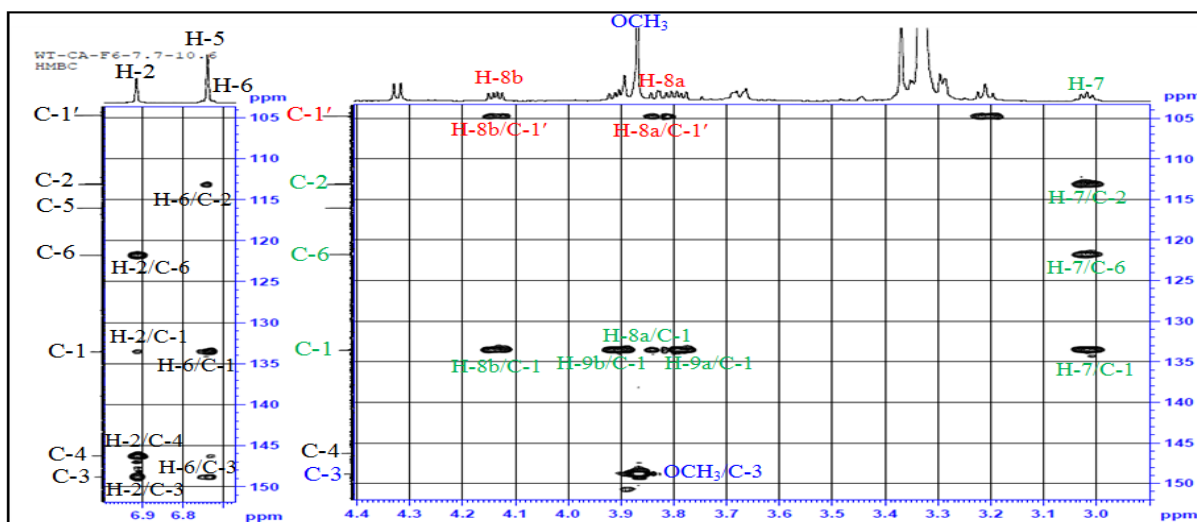


Figure 3.64: Spectre HMBC partie aromatique du composé Ca9

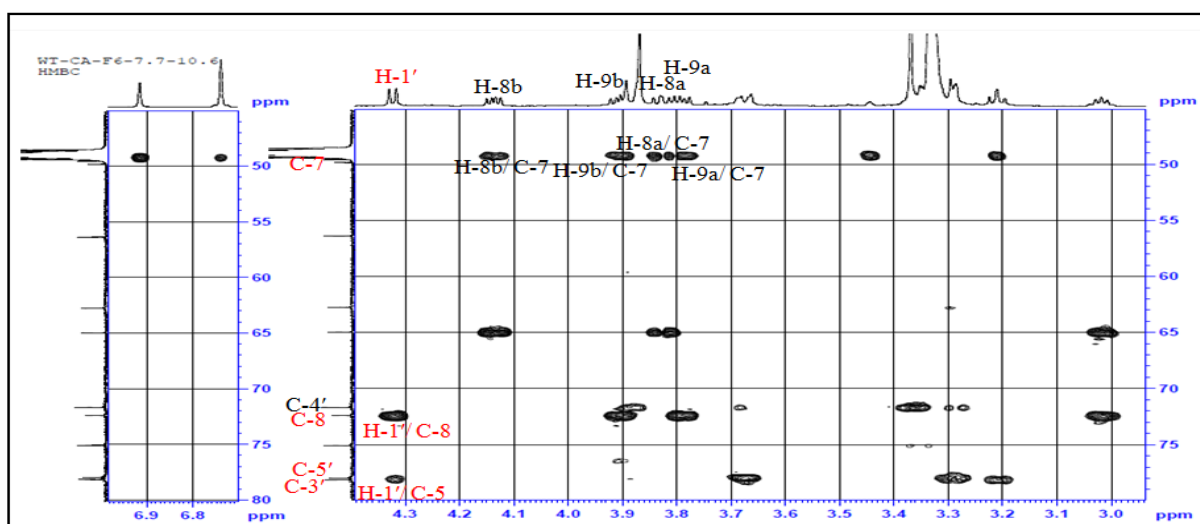


Figure 3.65: Spectre HMBC partie osidique du composé Ca9

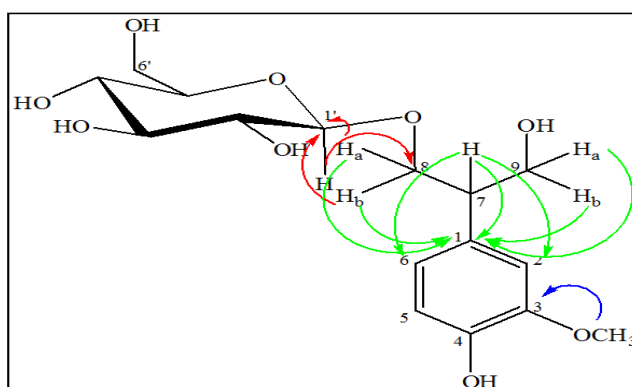


Figure 3.66 : Importantes corrélations HMBC observées pour le composé Ca9.

Les expériences HSQC, COSY H-H et HMBC combinées, permettent d'identifier tous les carbones de la partie aromatique ainsi que la partie osidique (figure 3.67) (tableau 3.9).

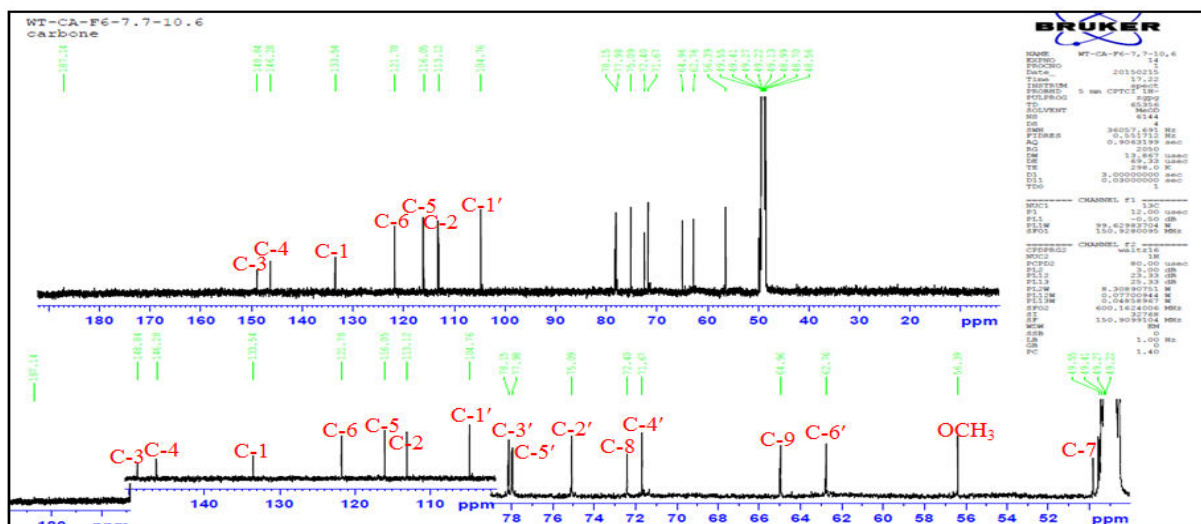
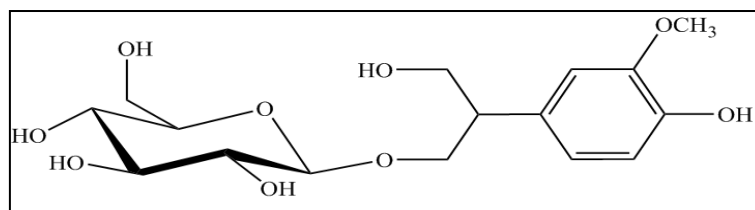


Figure 3.67: Spectre RMN ^{13}C du composé Ca9 (CD_3OD , 150MHz)

Tableau 3.9: Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) du composé Ca9 dans CD_3OD (Aruneet al., 2014; Comte et al., 1997).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf (2014)	δ_{C} ppm réf (1997)	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf (2014)	δ_{H} (ppm) (m, J Hz) réf (1997)
1	133.5	132.2	133.6	-	-	-
2	113.1	112.6	113.3	6.91 (1H, brs)	6.83 (1H, d, 2.0)	6.88 (1H, d, 1.1)
3	148.8	147.1	148.9	-	-	-
4	146.3	144.8	146.3	-	-	-
5	116.0	115.0	116.1	6.74 (1H, brs)	6.67 (1H, d, 8.0)	6.72 (1H, d, 8.1)
6	121.8	120.2	121.1	6.55 (1H, brs)	6.65 (1H, dd, 8.0/2.0)	6.70 (1H, dd, 8.1/1.1)
7	49.5	47.4	49.8	3.02 (1H, m)	2.85 (1H, m)	2.99 (1H, m)
8	72.4	70.1	72.4	3.84 (1H, dd, 9.7/5.6) 4.13 (1H, dd, 9.8/5.6)	3.65 (1H, dd, 9.5/7.0) 3.93 (1H, dd, 9.5/6.5)	3.80 (1H, dd, 9.9/7.4) 4.10 (1H, dd, 9.9/5.6)
9	64.9	63.1	65.0	3.80 (1H, dd, 10.9/6.2) 3.91 (1H, dd, 10.9/6.4)	3.68 (1H, dd, 11.5/6.0) 3.57 (1H, dd, 11.5/6.0)	3.76 (1H, dd, 11.0/6.1) 3.88 (1H, dd, 11.0/6.5)
OCH ₃	56.4	55.5	56.5	3.87 (1H, s)	3.74 (1H, s)	3.84 (1H, s)
1'	104.8	103.2	104.8	4.32 (1H, d, 7.8)	4.14 (1H, d, 8.0)	4.30 (1H, d, 7.9)
2'	75.1	73.4	75.1	3.21 (1H, t, 8.7)	-	3.18 (1H, dd, 9.1/7.8)
3'	78.1	76.8	78.2	3.45 (1H, m)	-	3.35 (1H, m)
4'	71.7	70.6	71.7	3.35 (1H, m)	-	3.27 (1H, m)
5'	78.0	76.7	78.0	3.29 (1H, m)	-	3.26 (1H, m)
6'	62.8	61.1	62.8	6'a : 3.89 (1H, m) 6'b : 3.67 (1H, dd, 10.5/4.8)	-	6'a : 3.65 (1H, dd, 11.8/5.2) 6'b : 3.85 (1H, dd, 11.8/1.6)

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer au composé Ca9 la structure de : **1- β -D-glucosyloxy-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl-propane-1,3-diol** ou **Junipediol A 8-O- β -D-glucopyranoside** (Aruneet al., 2014; Comte et al., 1997).



Junipediol A 8-O- β -D-glucopyranoside (**Ca9**)

I. 10. Elucidation Structurale de Ca10

Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-MS-ESI (figure 3.68) montre un ion pseudo-moléculaire à m/z 353.0853 $[M+Na]^+$ (calculé : 353.0853) qui correspond à la formule brute $C_{14}H_{18}O_9$.

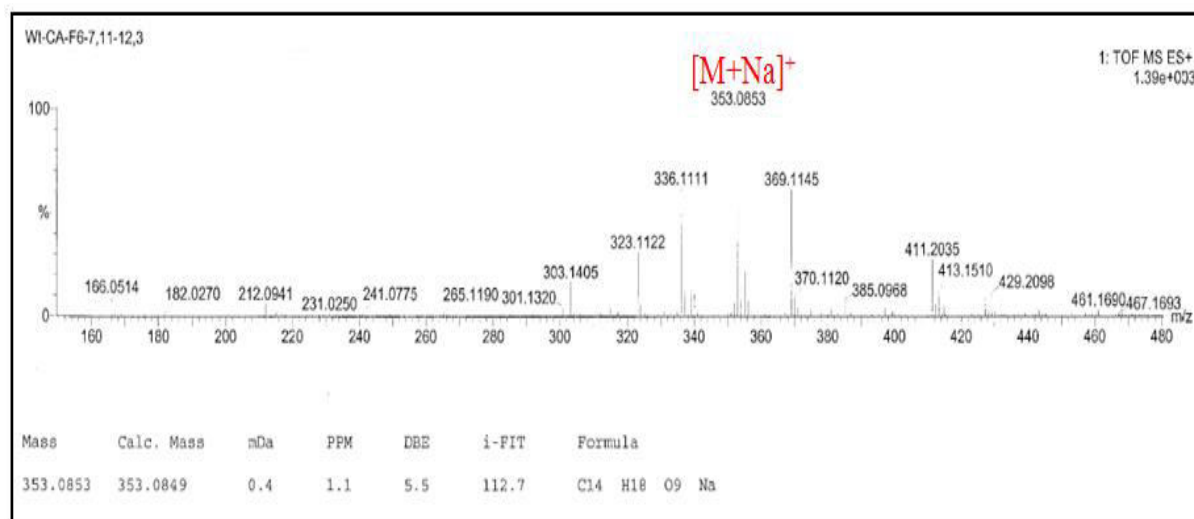


Figure 3.68: Spectre de masse HR-MS –ESI du composé **Ca10**

L'examen des spectres RMN 1H (figures 3.69) et ^{13}C (figure 3.72) du composé Ca10 montre les mêmes signaux présentés dans les spectres du composé Ca8 sauf l'apparition du méthoxyle sur le spectre du composé Ca10 à $\delta_H = 3.78\text{ppm}$, $\delta_C = 56.7\text{ppm}$ ainsi que des signaux d'un système ABX à $\delta_H = 7.23\text{ppm}$, 7.64ppm et 7.66ppm caractéristiques respectivement des protons H-5' (d, $J = 8.5\text{Hz}$), H-2' (d, $J = 1.7\text{Hz}$) et H-6' (dd, $J = 8.4/1.9\text{Hz}$) cela indique que le cycle phenyl est trisubstitué. Le spectre RMN- 1H montre également les signaux des protons du glucose dont la structure a été établie à l'aide du spectre COSY.

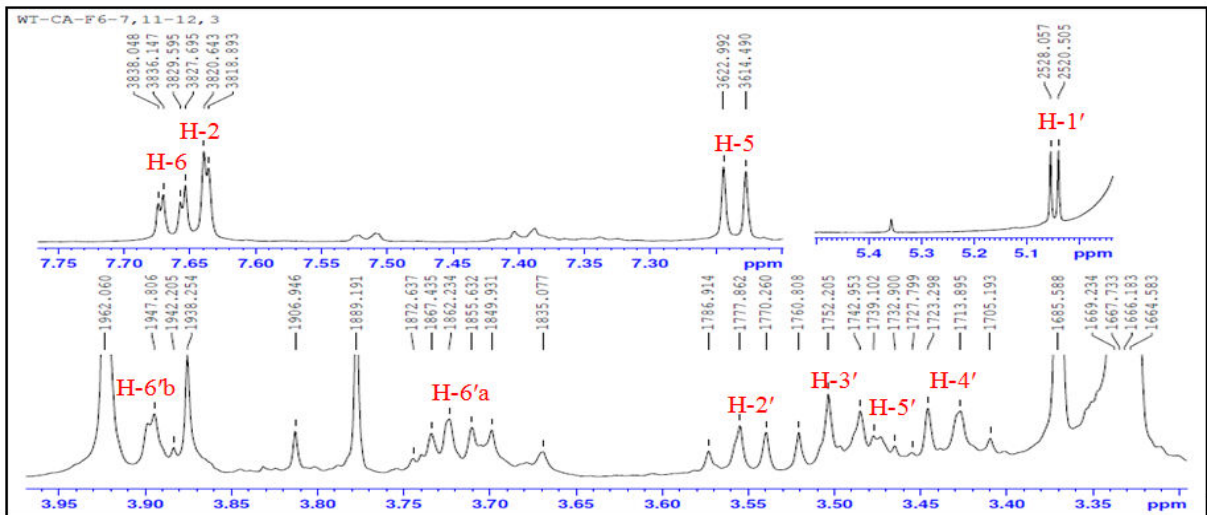


Figure 3.69: Spectre de RMN ^1H du composé **Ca10** (CD_3OD , 500MHz).

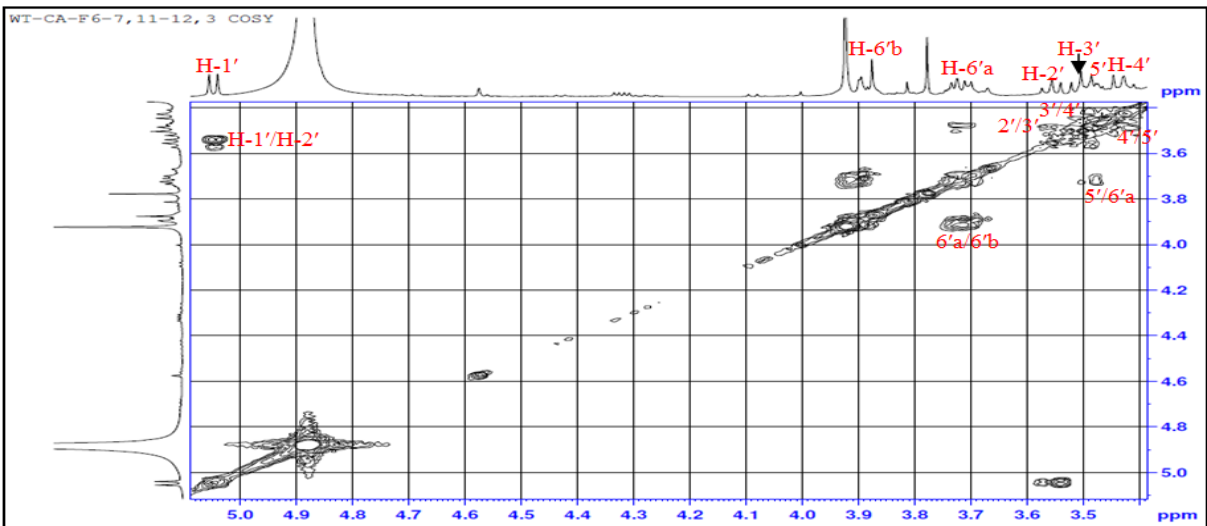


Figure 3.70: Spectre COSY du composé **Ca10**.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des corrélations homonucléaires COSY (figure 3.70) et hétéronucléaires HSQC (figure 3.71)

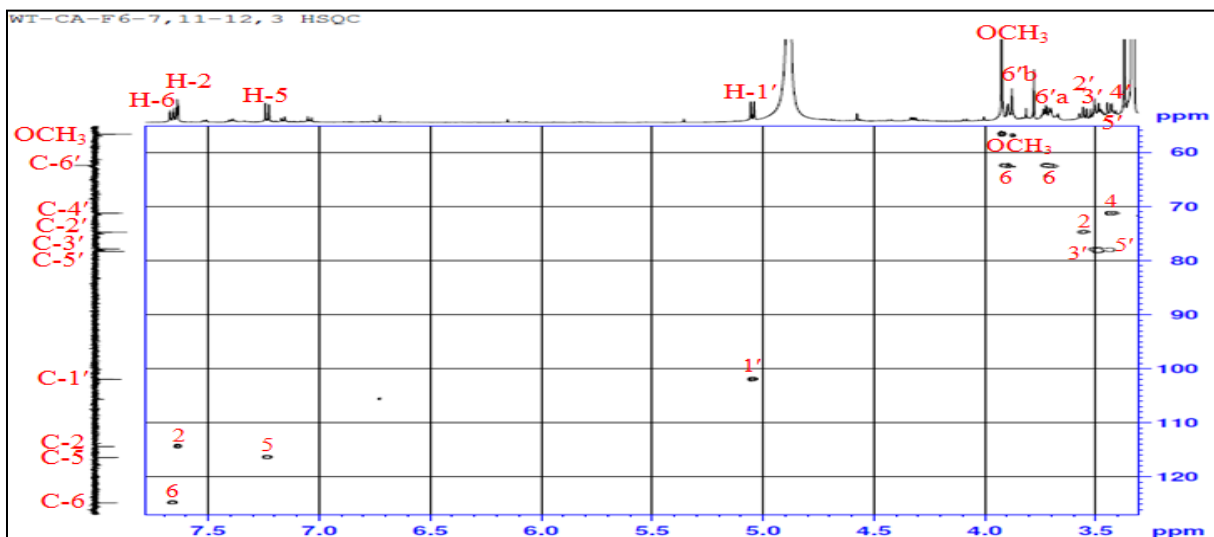


Figure 3.71: Spectre HSQC du composé **Ca10**.

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3.72) montre l'emplacement de tous les carbones du composé Ca10.

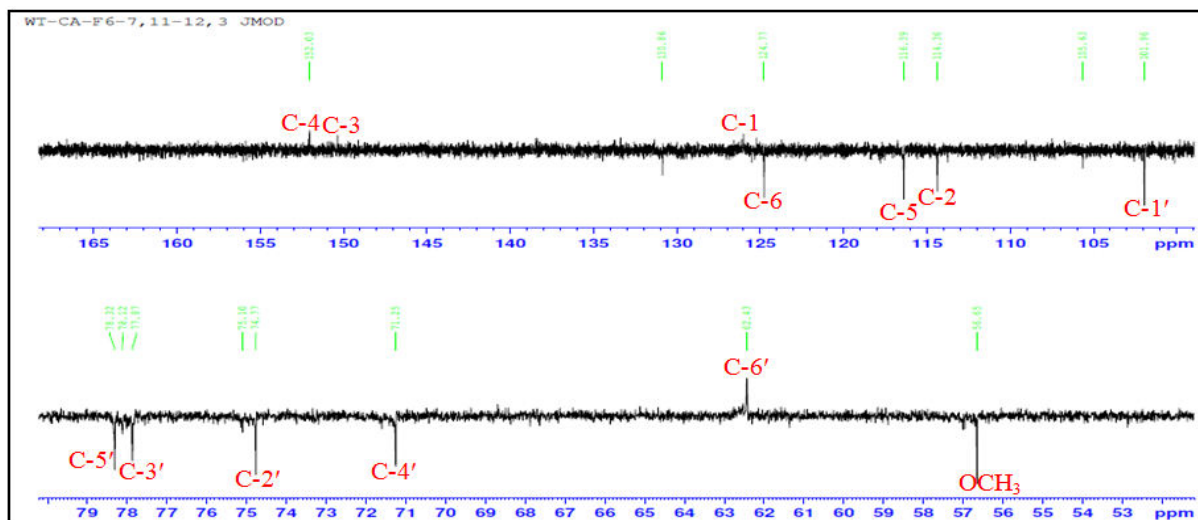


Figure 3.72: Spectre de RMN ^{13}C J -modulé du composé **Ca10** (CD_3OD , 125MHz).

Le spectre HMBC (figure 3.73) montre des corrélations entre :

- Les protons H-2 et H-5 et le carbone oxygéné à $\delta_{\text{C}} = 150.5\text{ppm}$ indiquant qu'il s'agit du carbone C-3 celui-ci est aussi corrèle aux protons du methoxy (OCH_3) ce qui permet leur localisation sur C-3.
- Les protons H-2, H-6 et H-5 sont corrélés au carbone oxygéné resonnant à $\delta_{\text{C}} = 152.0\text{ppm}$ indiquant qu'il s'agit du carbone C-4 celui-ci est aussi corrèle au proton anomerique ce qui permet la localisation du glucose sur C-4.
- Le proton H-2 et le carbonyle à $\delta_{\text{C}} = 169.5\text{ppm}$.

Ces observations confirment la structure trisubstitué du cycle phenyle, En outre, indique l'attachement du β -D-glucopyranoside au carbone C-4 et le methoxyle au carbone C-3.

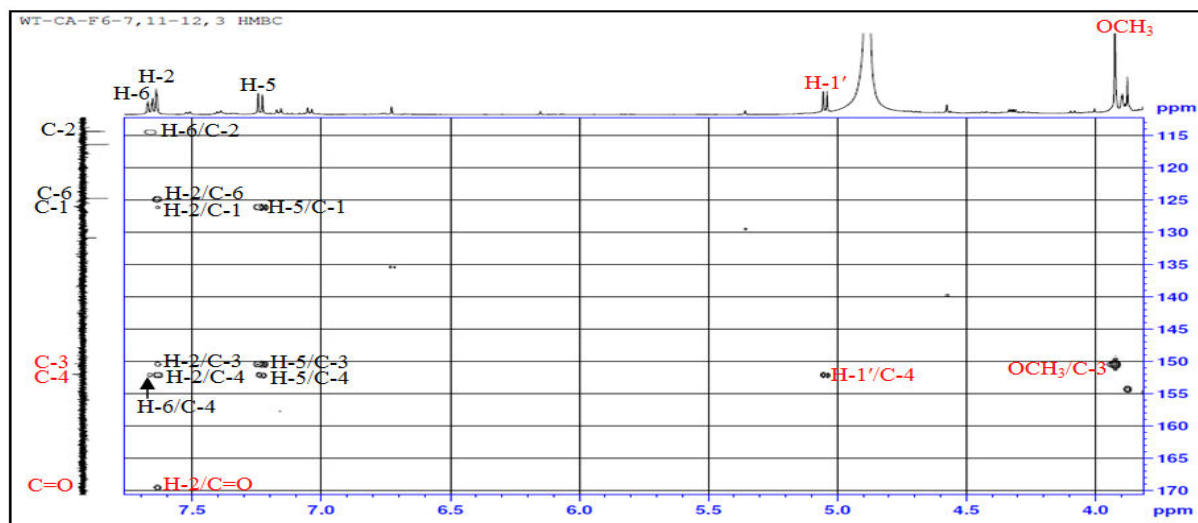
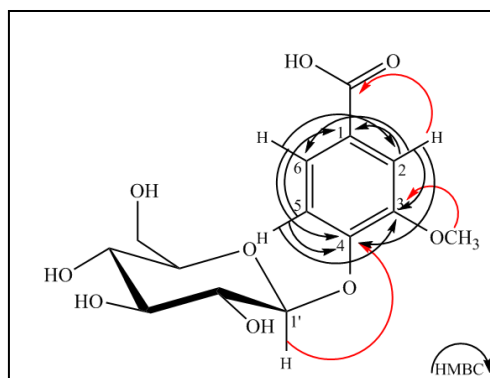


Figure 3.73: Spectre de HMBC du composé **Ca10**.



Importantes corrélations HMBC observées pour le composé **Ca10**.

Le spectre de l'expérience ROESY (figure 3.74) a montré des interactions spatiales entre le proton anomérique H-1' et le proton H-5 du phényle ainsi que le méthoxyle et le H-2, ce qui confirme la fixation du β -D-glucopyranoside en C-4 et le méthoxyle en C-3.

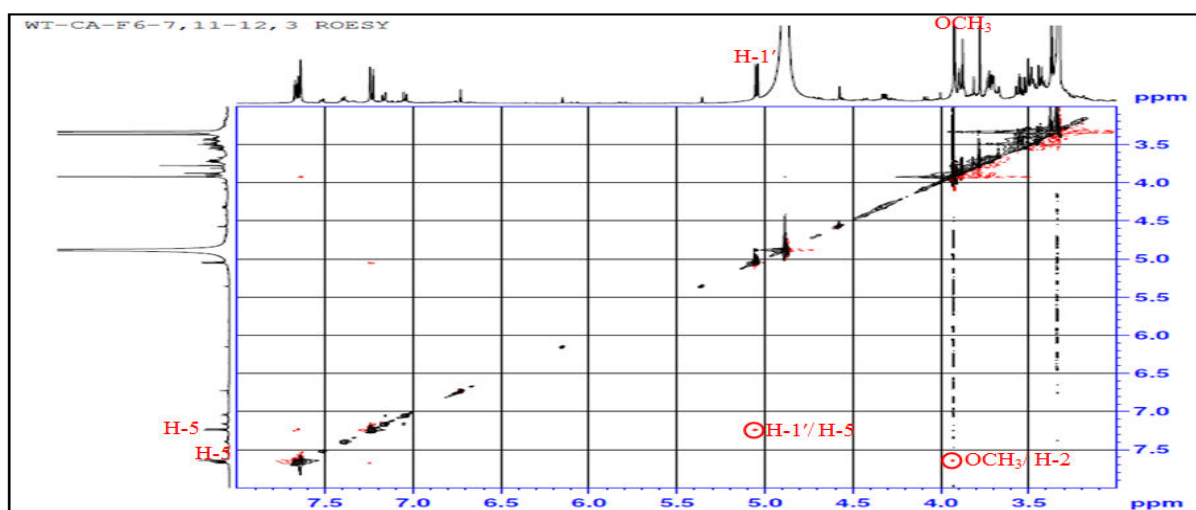
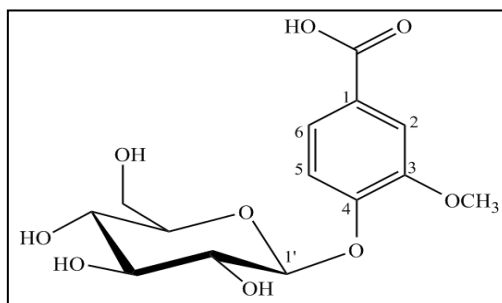


Figure 3.74: Spectre de ROESY du composé **Ca10**.

Tableau 3.10: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Ca10** dans CD_3OD (Sakushima et al., 1995).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} pp) (m, J Hz) réf
1	126.0	126.1	-	-
2	114.4	114.4	7.64 (1H, d, 1.7)	7.63 (1H, d, 7.3)
3	150.5	150.4	-	-
4	152.0	152.4	-	-
5	116.4	116.4	7.23 (1H, d, 8.5)	7.20 (1H, d, 8.3)
6	124.8	124.7	7.66 (1H, dd, 8.4/1.9)	7.60 (1H, dd, 8.3/2.0)
COOH	169.5	169.7	-	-
OCH₃	56.6	56.7	3.78 (3H, s)	3.80(3H, s)
1'	102.0	102.0	5.05 (1H, d, 7.5)	5.02 (1H, d, 7.3)
2'	74.8	74.8	} 3.39-3.59 (4H, m)	} 3.38-3.55 (5H, m)
3'	78.3	77.9		
4'	71.2	71.3		
5'	77.9	78.3		
6'	62.4	62.4	6'a : 3.71 (1H,dd, 12.3/5.2) 6'b : 3.89 (1H,dd, 12.3/5.6)	6' :3.69 (1H, dd, 11.7/5.5)

L'analyse des spectres de RMN ^1H , ^{13}C (tableau 3.10) de **Ca10** est en accord avec celle trouvée dans la littérature et permet d'attribuer à ce composé la structure de : **3-methoxy-4-glycosyl-benzoic acid** ou **Vanillic acid -4-O- β -D-glucopyranoside** (Sakushima et al., 1995).



Vanillic acid -4-O- β -D-glucopyranoside (**Ca10**)

I. 11. Elucidation Structurale de Ca11

Les signaux présents sur le spectre RMN ^1H (figure 3.75) du composé Ca11 enregistré dans CD_3OD dans la région des protons aromatiques sont en faveur d'un noyau phényle monosubstitué, en effet :

- Un multiplet d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} = 7.38\text{ppm}$ (t, $J=7.5\text{Hz}$) attribuable H-3' et H-5'.
- Un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 7.33\text{ppm}$ (dl, $J=7.5\text{Hz}$) attribuables à H-2' et H-6' et un triplet à $\delta_{\text{H}} = 7.32\text{ppm}$ (t, $J=8.7\text{Hz}$) attribuable à H-4'.
- Trois doublets de doublet d'intégration 1H de chacun à $\delta_{\text{H}} = 3.09\text{ppm}$ ($J= 14.5/8.5\text{Hz}$), $\delta_{\text{H}} = 3.36\text{ppm}$ ($J= 9.5/4.7\text{Hz}$) et $\delta_{\text{H}} = 4.01\text{ppm}$ ($J= 8.0/4.7\text{Hz}$).

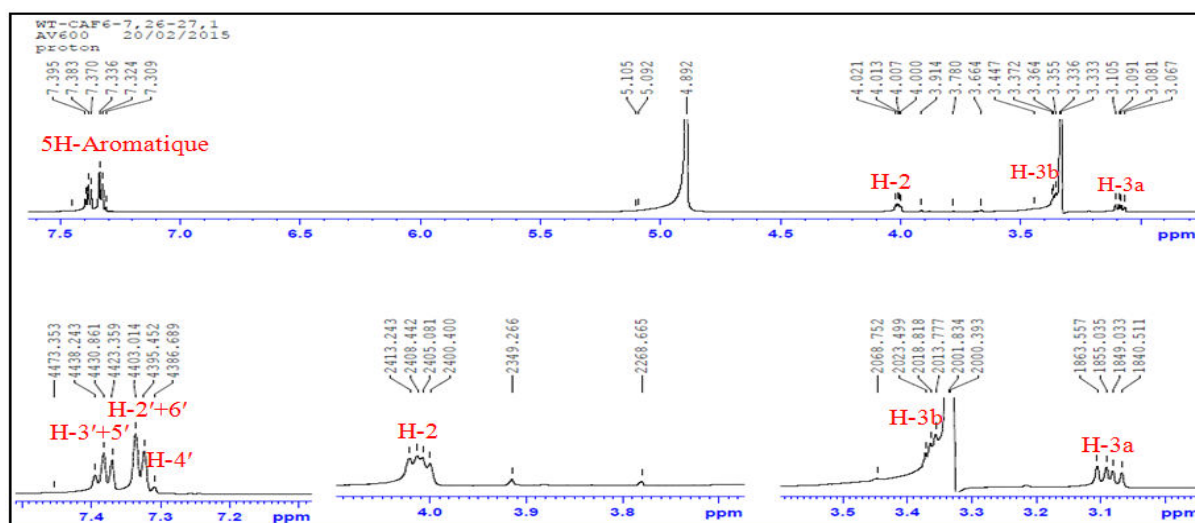


Figure 3.75: Spectre de RMN ^1H du composé **Ca11** (CD_3OD , 600MHz).

Les spectres RMN ^{13}C (figure 3.76) et HSQC (figure 3.77) montrent la présence d'un groupement méthylène C-3 ($\delta_{\text{C}} = 37.9\text{ppm}$) correspondant aux signaux présentés, dans le

spectre RMN ^1H par deux doublets de doublets à $\delta_{\text{H}} = 3.09\text{ppm}$ et $\delta_{\text{H}} = 3.36\text{ppm}$, et un groupement méthyne C-2 ($\delta_{\text{C}} = 56.5\text{ppm}$) correspond au doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 4.01\text{ppm}$. Ces spectres montrent aussi deux carbones quaternaires un à $\delta_{\text{C}} = 172.6\text{ppm}$ attribuable à un carbonyle et autre $\delta_{\text{C}} = 136.5\text{ppm}$ attribuable à C-1 aromatique.

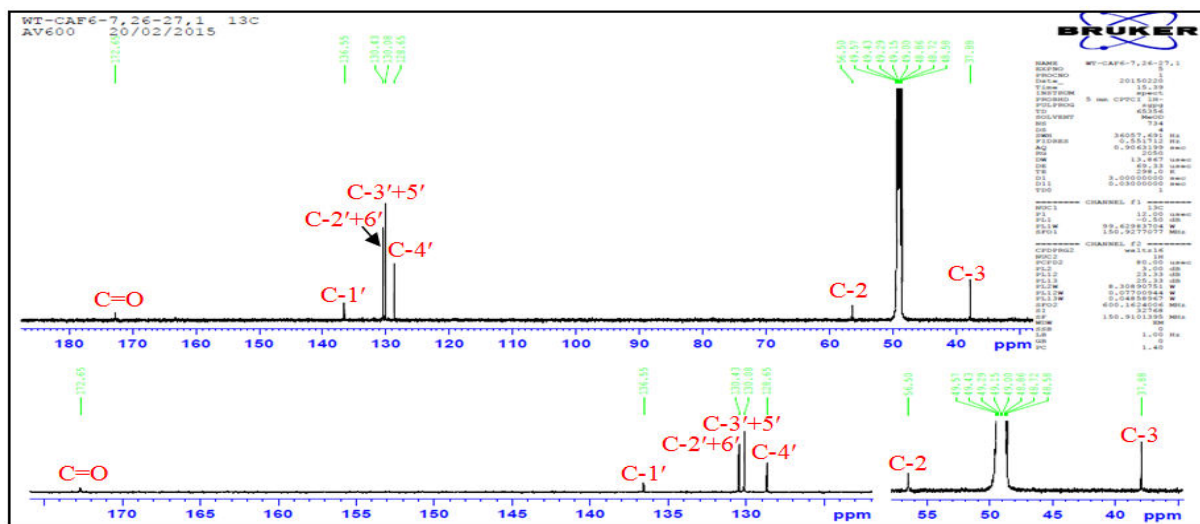


Figure 3.76: Spectre de RMN ^{13}C du composé Ca11 (CD_3OD , 150MHz).

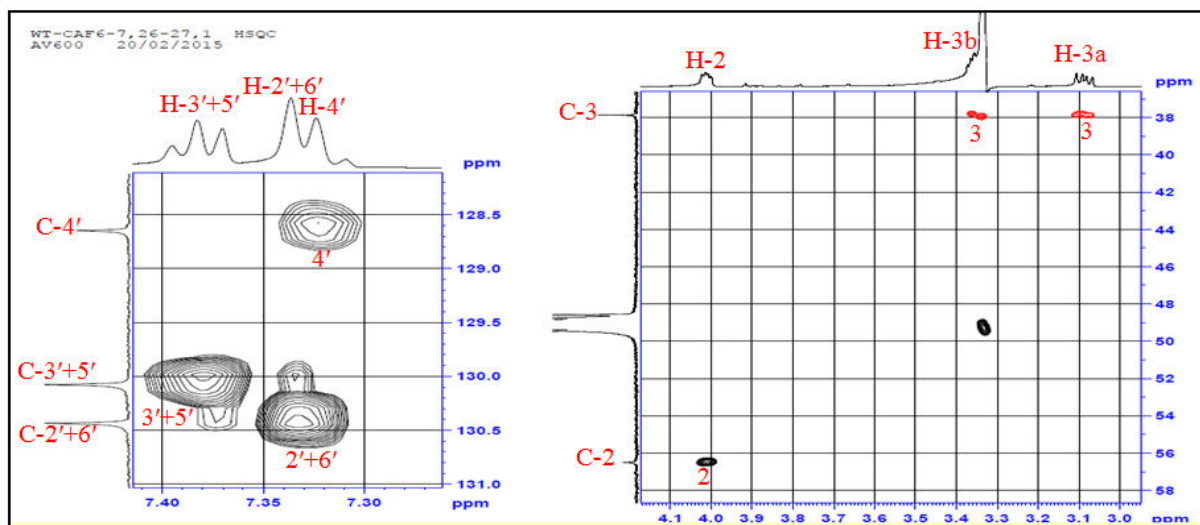
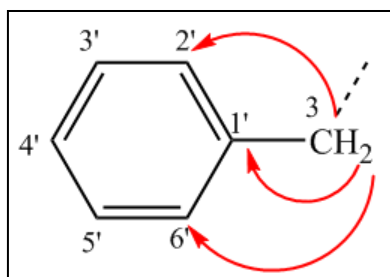


Figure 3.77: Spectre HSQC du composé Ca11.

L'expérience du spectre HMBC (figure 3.78) montre des corrélations $^2J_{\text{H-C}}$ et $^3J_{\text{H-C}}$ entre les protons $\text{H}_2\text{-3}$ ($\delta_{\text{H}} = 3.09\text{ppm}$ et $\delta_{\text{H}} = 3.36\text{ppm}$), le signal C-2'+C-6' et le carbone quaternaire C-1' résonnant à $\delta_{\text{C}} = 136.5\text{ppm}$. Ces observations confirment que le phényle est substitué par CH_2 .



Ces mêmes protons H₂-3 corrélient avec le carbone C-2 ($\delta_C = 56.5\text{ppm}$) et le groupement carbonyle C-1 ($\delta_C = 172.6\text{ppm}$).

En outre, des corrélations sont observées entre le proton H-2 ($\delta_H = 4.01\text{ppm}$) et le carbone C-3 ($\delta_C = 37.9\text{ppm}$) et le carbonyle C-1 indiquant l'attachement du CH₂ à ce carbone C-3 et C=O et le carbone aromatique C-1' ($\delta_C = 136.5\text{ppm}$), ceci est confirmé par le spectre COSY (figure 3.79). Toutes ces informations indiquent la substitution du phényle est en position 1.

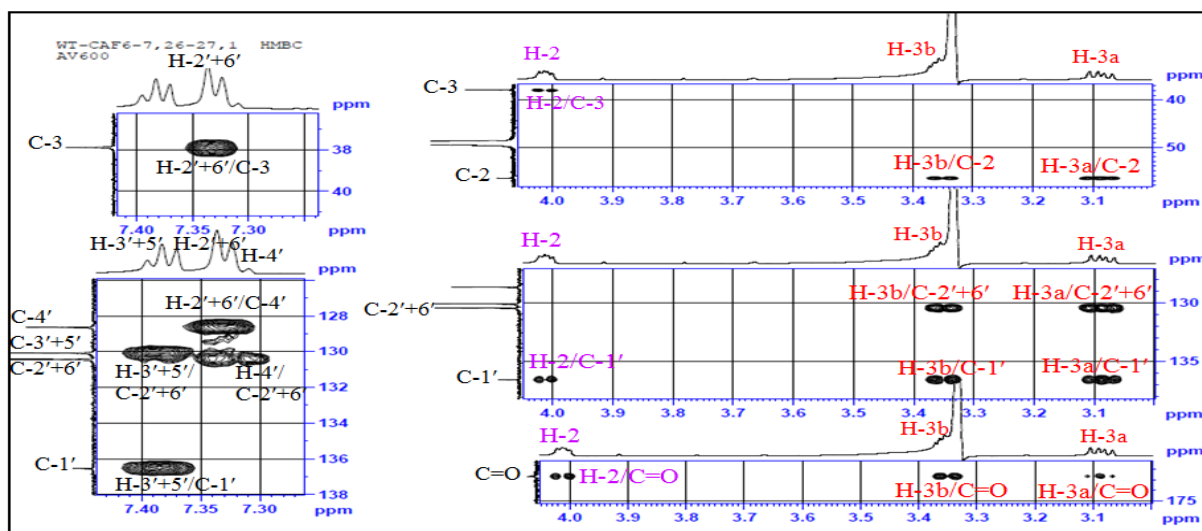
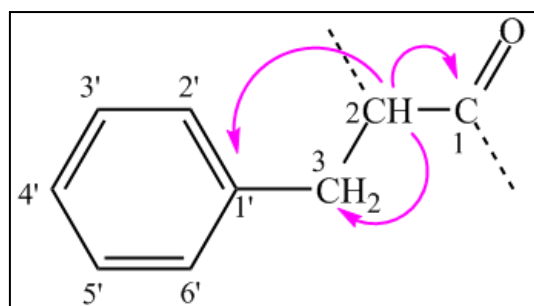


Figure 3.78: Spectre HMBC du composé Ca11.

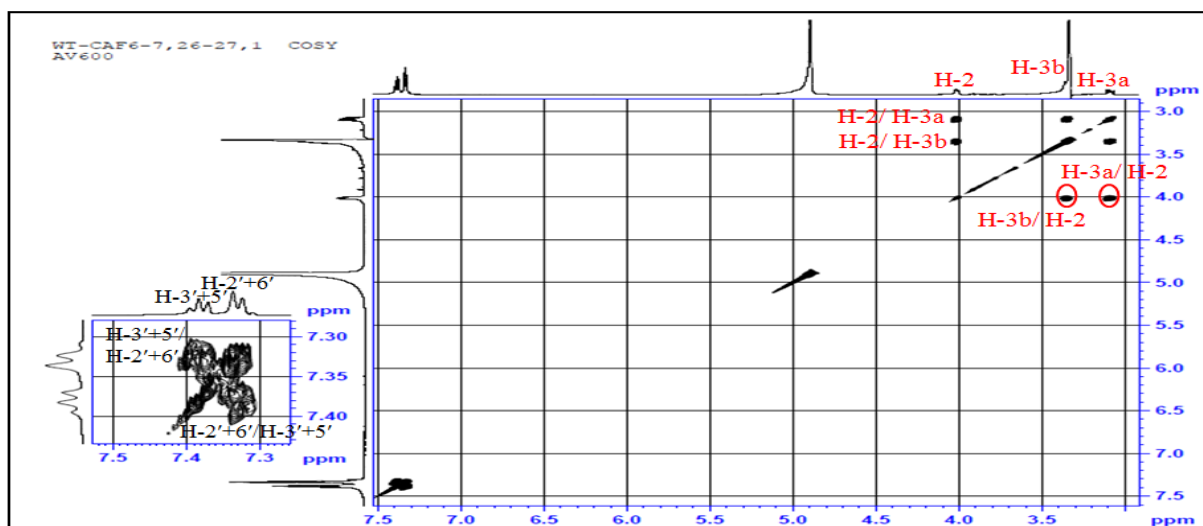


Figure 3.79: Spectre COSY du composé **Ca11**

Vu la valeur des déplacements chimiques du C-2 et du groupement carbonyle (C=O) les substituants ne peuvent être que sous forme d'un groupement NH₂ et une fonction carboxyle.

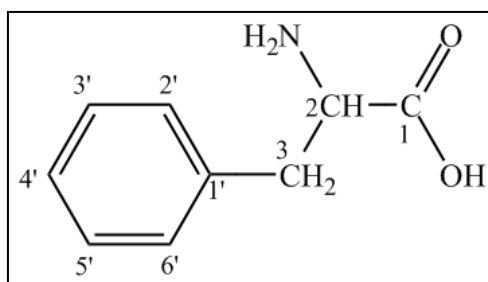
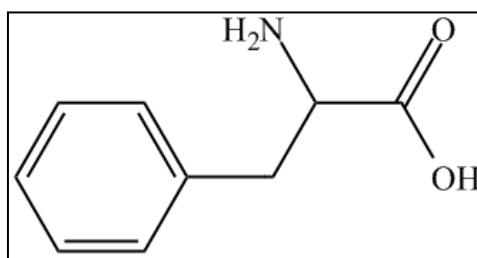


Tableau 3.11: Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) du composé **Ca11** dans CD₃OD (Govindaraju et al., 2000 ; Wang et al., 2012).

N°	δ_c ppm	δ_c ppm ref 2012 (D ₂ O)	δ_H ppm (m, J Hz)	δ_H ppm ref 2012 (D ₂ O)	δ_H ppm (m, J Hz) ref 2000 (D ₂ O)
1	172.6	173.9	-	-	-
2	56.5	56.1	4.01 (1H,dd, 8.0/4.7)	4.79 (1H,s)	3.98 (1H,dd, 8.0/5.2)
3	37.9	36.4	3.09 (1H,dd, 14.5/8.5) 3.36 (1H,dd, 14.5/4.7)	3.29-3.34(1H, q, 6.0) 4.00-4.03(1H, q, 6.0)	3.11 (1H,dd, 14.5/8.0) 3.28 (1H,dd, 14.5/5.2)
1'	136.5	135.1	-	-	-
2'	130.1	129.1	7.33 (1H, dl, 7.6)	7.35-7.47 (5H, m)	7.32 (m, 7.9)
3'	130.4	129.4	7.38 (1H, t, 7.5)		7.42 (m, 1.5)
4'	128.6	127.7	7.32 (1H, t, 8.7)		7.36 (m, 7.2)
5'	130.4	129.4	7.38 (1H, t, 7.5)		7.42 (m, 1.5)
6'	130.1	129.1	7.33 (1H, dl, 7.6)		7.32 (m, 7.9)

Les expériences RMN ¹H, ¹³C, HSQC, COSY H-H et HMBC combinées, Ainsi que la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer au composé **Ca11** la

structure : **Acide -2-amino-3-phénylpropanoïque** (Govindaraju et al., 2000 ; Wang et al., 2012).



Acide -2-amino-3-phénylpropanoïque (**Ca11**)

I. 12. Elucidation Structurale de Ca12

Le spectre de RMN ^1H (figure 3.80) du composé Ca12 rappelle sans ambiguïté celui de Ca10. La comparaison des spectres des deux composés permet de reconnaître pratiquement tous les signaux de la partie aromatique. Il s'agit donc d'un benzoïque acide substitué en position **3** et **4**. La différence entre ces deux composés réside dans la disparition des substituants : la partie osidique ainsi que le groupement méthoxyle.

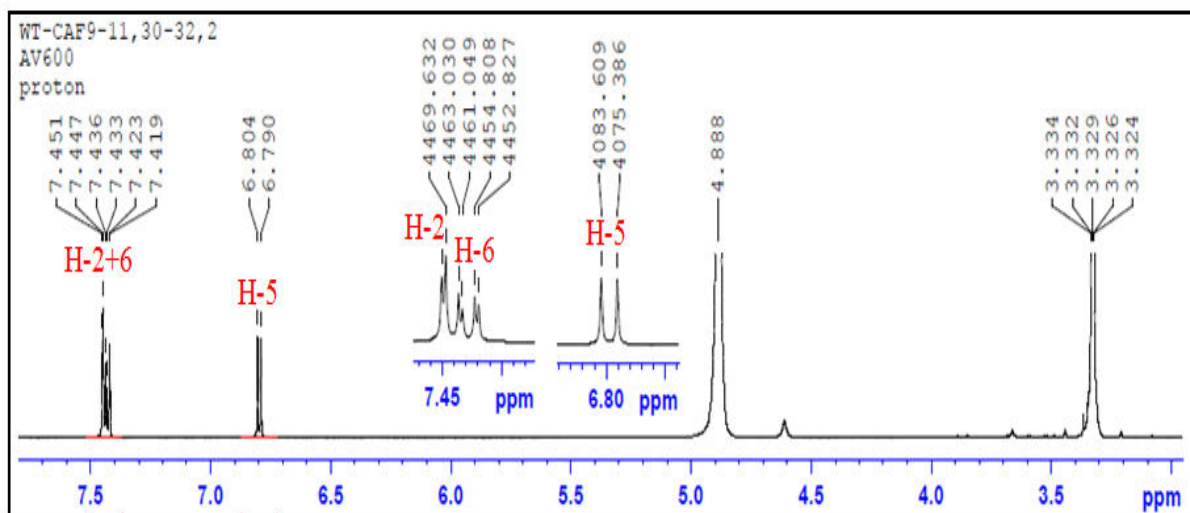


Figure 3.80: Spectre de RMN ^1H du composé **Ca12** (CD_3OD , 600 MHz).

Le spectre RMN ^{13}C (figure 3.81), montre la présence de 7 carbones dont 6 aromatique et un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 169.8\text{ppm}$ attribuable à un carbonyle d'un groupement carboxyle. Cela suggère la substitution en 3 et 4 par des hydroxyles.

Toutes ces informations indiquent une structure d'un 3,4-dihydroxy benzoïque acide.

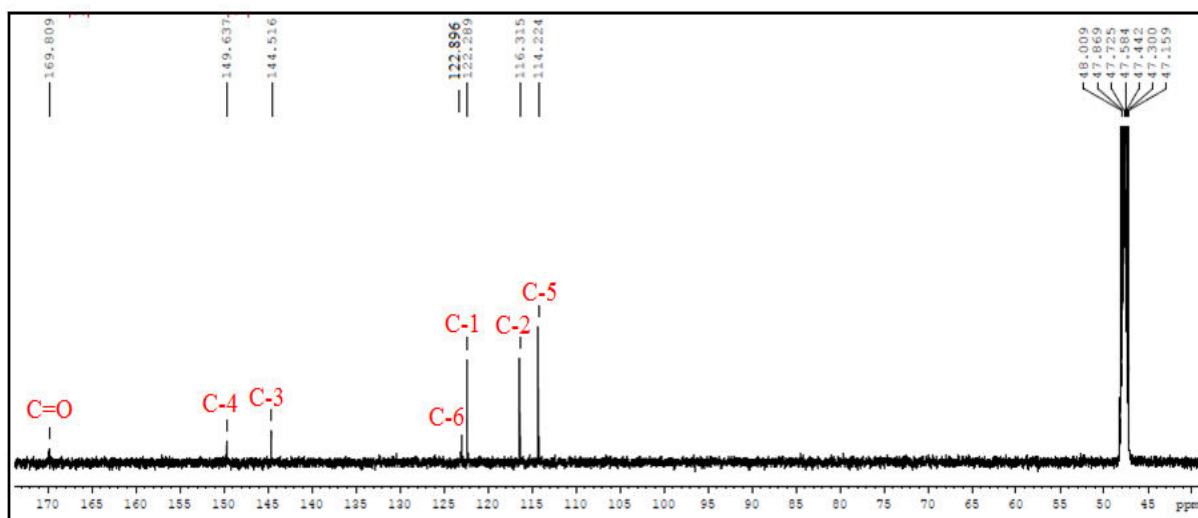
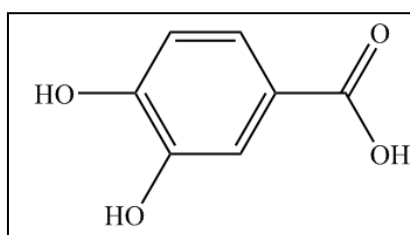


Figure 3.81: Spectre de RMN ^{13}C du composé **Ca12** (CD_3OD , 150 MHz).

Tableau 3.12: Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) du composé **Ca12** dans CD_3OD (Hui-Li et al., 1998).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	122.3	121.6	-	-
2	116.3	116.5	7.45 (1H,d, 2.0)	7.33 (1H,d, 1.8)
3	144.5	144.8	-	-
4	149.6	150.0	-	-
5	114.2	115.1	6.79 (1H,d, 8.2)	6.79 (1H,d, 8.5)
6	122.9	121.9	7.43 (1H,dd, 8.2/2.0)	7.28 (1H,dd, 8.5/1.8)
COOH	169.8	167.2	-	-

Par conséquent le composé Ca12 est identifié comme étant : **3,4-Dihydroxy benzoïque acide** ou **Protocatechuic Acide** (Hui-Li et al., 1998).



Protocatechuic Acide (**Ca12**)

I. 13. Elucidation Structurale de Ca13:

Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-MS-ESI (figure 3.82) montre un ion pseudo moléculaire à $m/z = 267.0$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculé 267.0) qui correspond à la formule brute $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$.

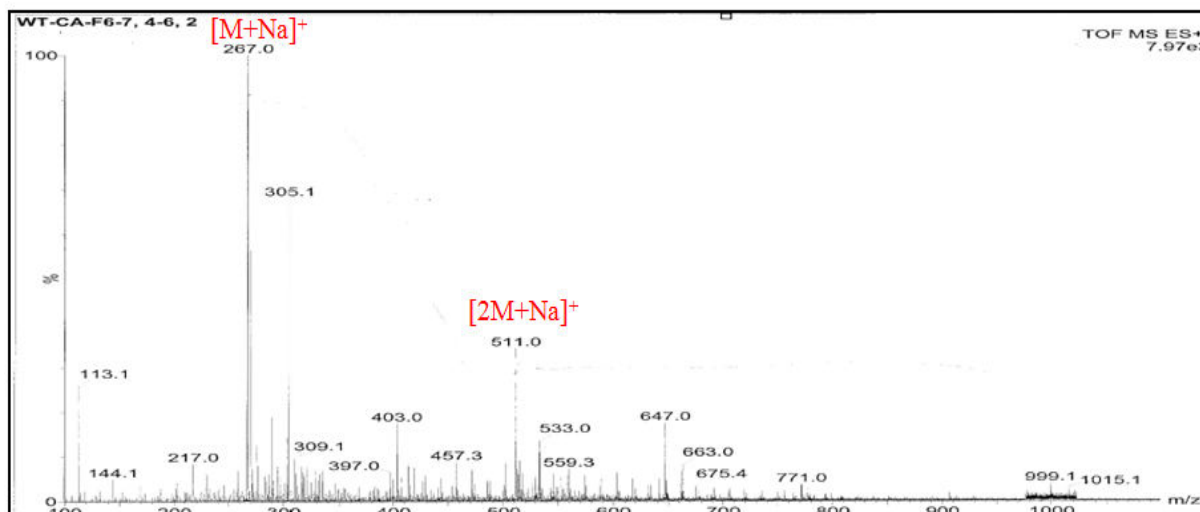


Figure 3.82: Spectre de masse HR-MS-ESI du composé **Ca13**.

Le spectre RMN ^1H (figure 3.83) du composé **Ca13** montre la présence :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 5.72\text{ppm}$ ($J = 8.1\text{Hz}$) et $\delta_{\text{H}} = 8.03\text{ppm}$ ($J = 8.1\text{Hz}$) attribuables à deux protons aromatiques H-5 et H-6.
- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 5.92\text{ppm}$ ($J = 4.6\text{Hz}$) et des signaux dans l'intervalle $\delta_{\text{H}} = 3.71\text{ppm}$ et $\delta_{\text{H}} = 4.24\text{ppm}$ indiquant la présence d'une partie osidique dans la structure.

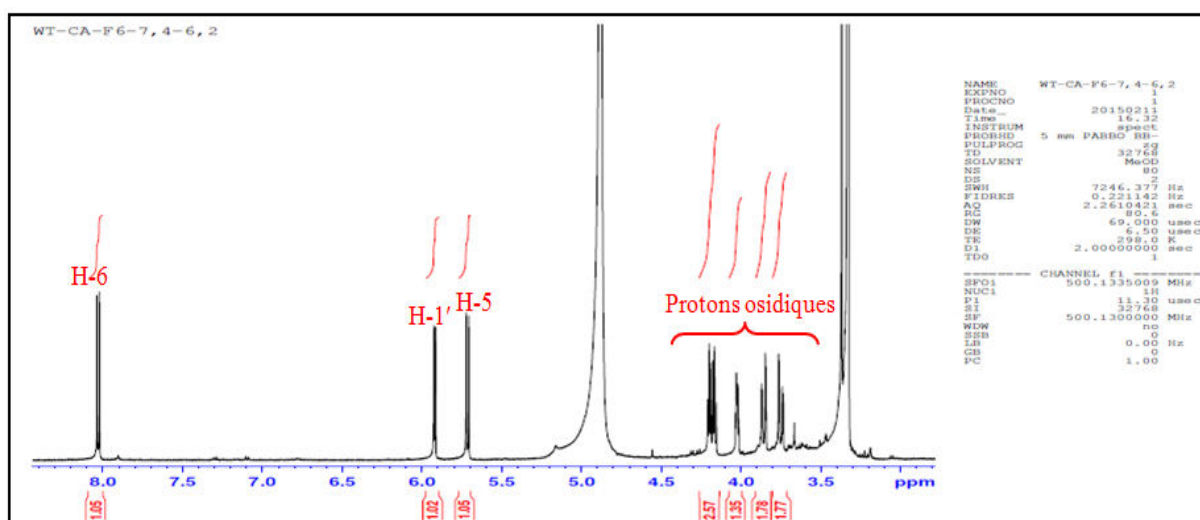


Figure 3.83: Spectre de RMN ^1H du composé **Ca13** (CD_3OD , 500 MHz).

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (figure 3.84) montre également la présence de 9 carbones :

- Deux carbones à $\delta_{\text{C}} = 166.1\text{ppm}$ et $\delta_{\text{C}} = 152.5\text{ppm}$ qui pourrait être à deux groupements carbonyles
- Deux carbones d'une double liaison conjugué à $\delta_{\text{C}} = 142.7\text{ppm}$ et $\delta_{\text{C}} = 102.6\text{ppm}$.
- Un carbone anomérique à $\delta_{\text{C}} = 90.7\text{ppm}$ et quatre autres osidiques ce qui indique la présence d'un pentose.

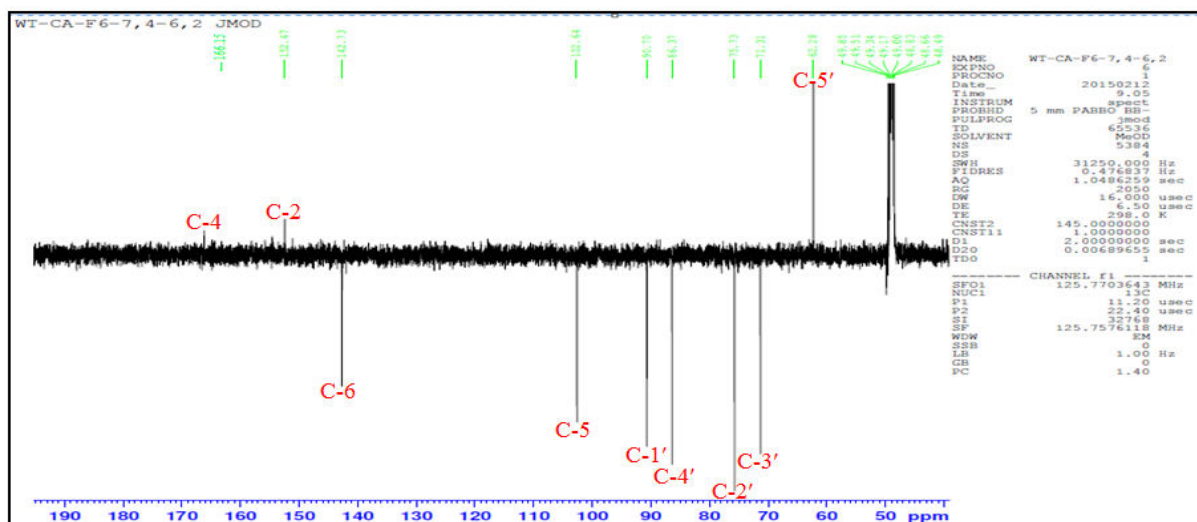


Figure 3.84: Spectre de RMN ^{13}C du composé **Ca13** (CD_3OD , 125 MHz).

Le spectre COSY (figure 3.85) montre des corrélations H-H entre les deux protons oléfiniques en position 5 et 6, ce qui indique qu'ils sont voisins. Ce même spectre montre six protons qui couplent entre eux avec une valeur de constante de couplage ($<7\text{Hz}$). Le spectre HSQC (figure 3.86) permet d'attribuer tous les carbones correspondant à ces protons et qui sont similaires à ce de l' $\alpha\text{-D-Ribose}$ (Agrawal 1992).

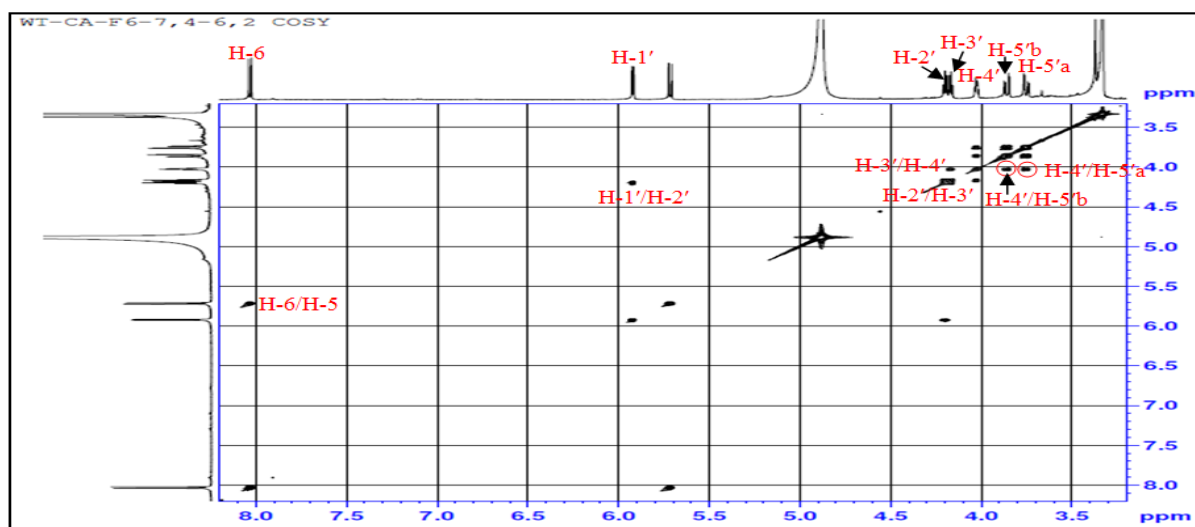


Figure 3.85: Spectre de COSY du composé **Ca13**.

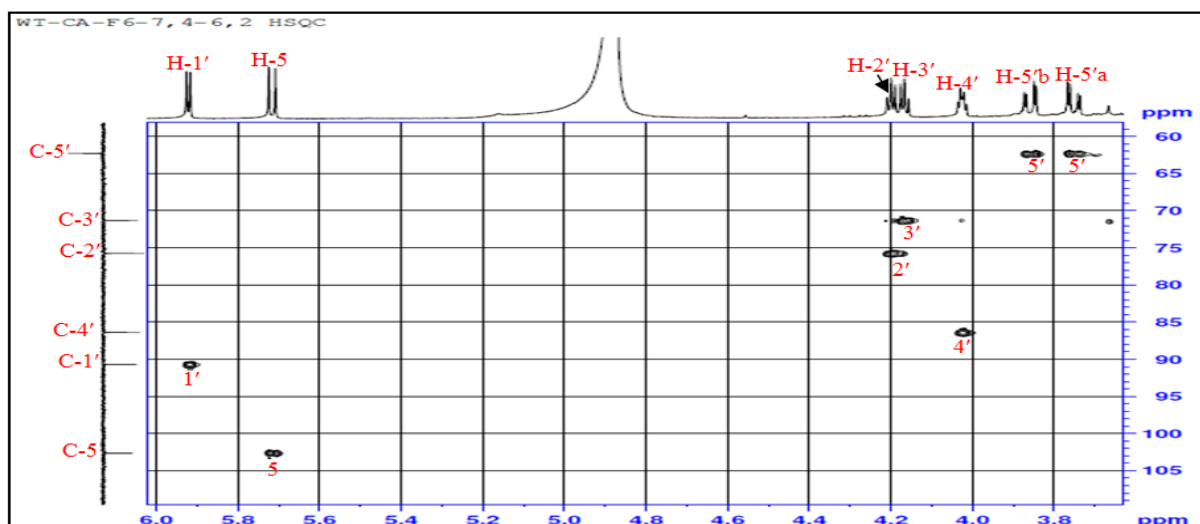
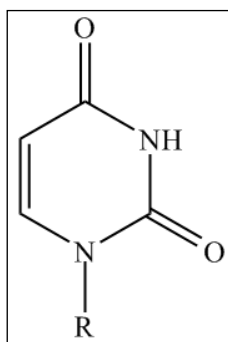


Figure 3.86: Spectre de HSQC du composé **Ca13**.

L'expérience du spectre HMBC (figure 3.87) montre des corrélations $^3J_{H-C}$ entre le proton H-5 ($\delta_H = 5.72$ ppm) et les carbones C-6 ($\delta_C = 142.7$ ppm) et C-4 ($\delta_C = 166.1$ ppm) ainsi que le proton H-6 résonnant à $\delta_H = 8.03$ ppm avec les carbones C-2 ($\delta_C = 152.5$ ppm), C-4 ($\delta_C = 166.1$ ppm) et C-5 ($\delta_C = 102.6$ ppm).

La présence de quatre carbones et deux protons seulement dans les champs déblindés et des corrélations entre ces atomes mentionnés ci-dessus et l'existence de deux atomes d'azotes et deux atomes d'oxygènes dans la formule brute permet de suggérer la structure du fragment Uracile.



Ce même spectre montre des corrélations entre le proton anomérique H-1' résonnant à $\delta_H = 5.92$ ppm avec les carbones C-6 et C-2 ce qui indique que la fixation du ribose sur l'uracile.

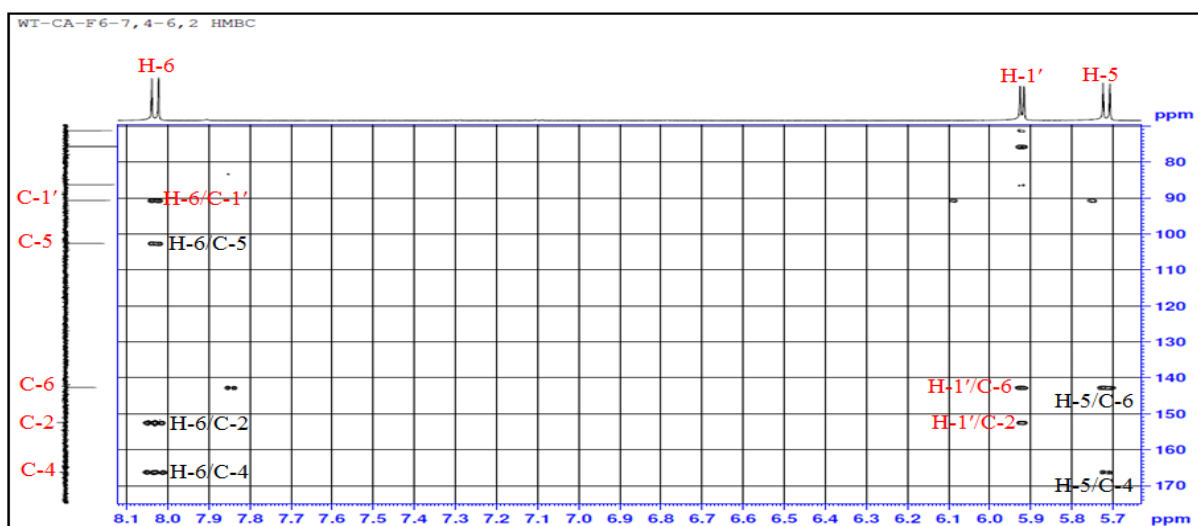


Figure 3.87: Spectre de HMBC du composé Ca13.

L'orientation α du proton anomérique H-1' est déterminée par l'effet rOe entre ce proton et le proton H-5 (figure 3.88)

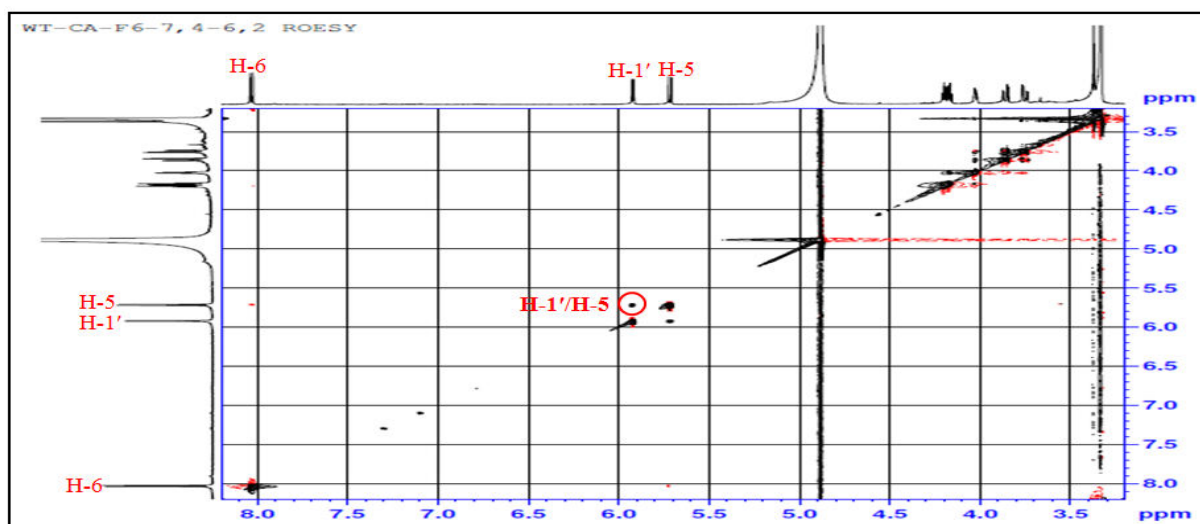
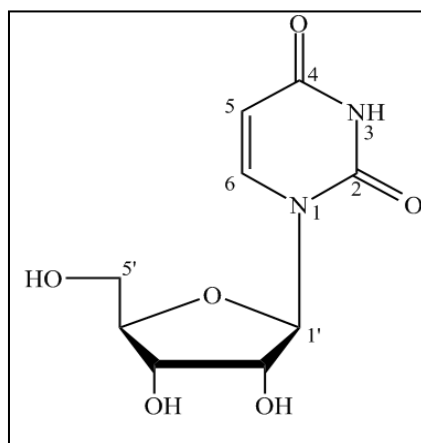


Figure 3.88: Spectre de ROESY du composé Ca13.

Tableau 3.13: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé Ca13 dans CD_3OD (Yalçin et al., 2003).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	-	-	-	-
2	152.5	152.0	-	-
3	-	-	-	-
4	166.1	166.1	-	-
5	102.6	102.6	5.72 (1H,d, 8.1)	5.69 (1H,d, 8.1)
6	142.7	142.7	8.03 (1H,d, 8.1)	8.02 (1H,d, 8.1)
1'	90.7	90.3	5.92 (1H,d, 4.6)	5.40 (1H,d, 4.4)
2'	75.7	75.4	4.20 (1H, dd, 5.1/4.8)	4.16 (1H,m)
3'	71.3	71.3	4.17 (1H, dd, 5.1/4.7)	4.16 (1H,m)
4'	86.4	86.4	4.02 (1H,m)	4.01 (1H,m)
5'	62.3	62.3	3.75 (1H,dd, 12.2/3.1) 3.86 (1H,dd, 12.2/2.7)	3.75 (1H,dd, 12.5/2.7) 3.85 (1H,dd, 12.2/2.7)

La structure finale du composé **Ca13** est ainsi déterminée comme étant l'**Uridine** (Yalçin et al., 2003).



Uridine (**Ca13**)

I. 14. Elucidation Structurale de Ca14

La formule moléculaire brute $C_{18}H_{28}O_9$ du composé Ca14 a été déduite à partir du spectre de masse haute résolution HR-MS -ESI (figure 3.89). Il montre en effet un pic de l'ion moléculaire à m/z 411.0 $[M+Na]^+$, correspondant à une masse moléculaire égale à 388 *uma*.

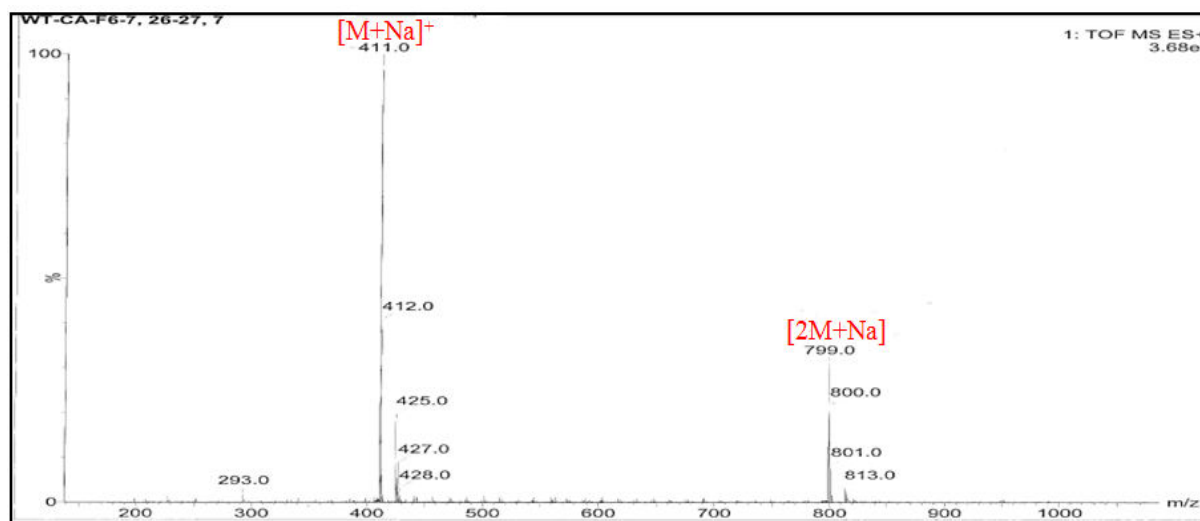


Figure 3.89: Spectre de masse HR-MS-ESI du composé **Ca14**.

Le spectre RMN 1H (figure 3.90) du composé Ca14 enregistré dans CD_3OD montre la présence d'un doublet à $\delta_H = 4.30$ ppm ($J = 7.8$ Hz) d'intégration 1H et des signaux dans l'intervalle $\delta_H = 3.16$ ppm et $\delta_H = 3.89$ ppm indiquant la présence d'une partie osidique dans la structure qui est identifié comme étant le β -D-glucopyranoside à partir de l'analyse des spectres COSY (figure 3.91) et HSQC (figure 3.92) qui permet de mettre en évidence la présence de sept protons d'un hexose ainsi que les constantes de couplages vicinales mesurées à partir du spectre RMN 1H étalé, qui sont toutes supérieures à 7Hz, ce qui indique que les sept protons du sucre sont tous *tans*- diaxiaux.

Le spectre montre aussi la présence de 16 protons de la partie aglycone dont deux signaux d'intégration 1H chacun, attribuables à deux protons oléfiniques ($\delta_H = 5.44\text{ppm}$ et $\delta_H = 5.55\text{ppm}$).

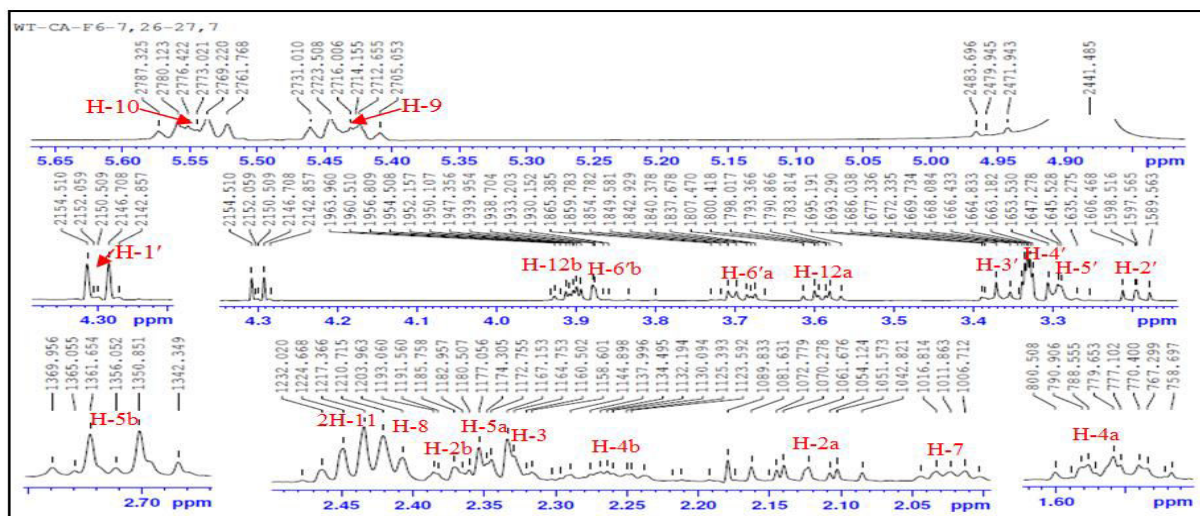


Figure 3.90: Spectre RMN ^1H du composé Ca14 (CD_3OD , 500MHz).

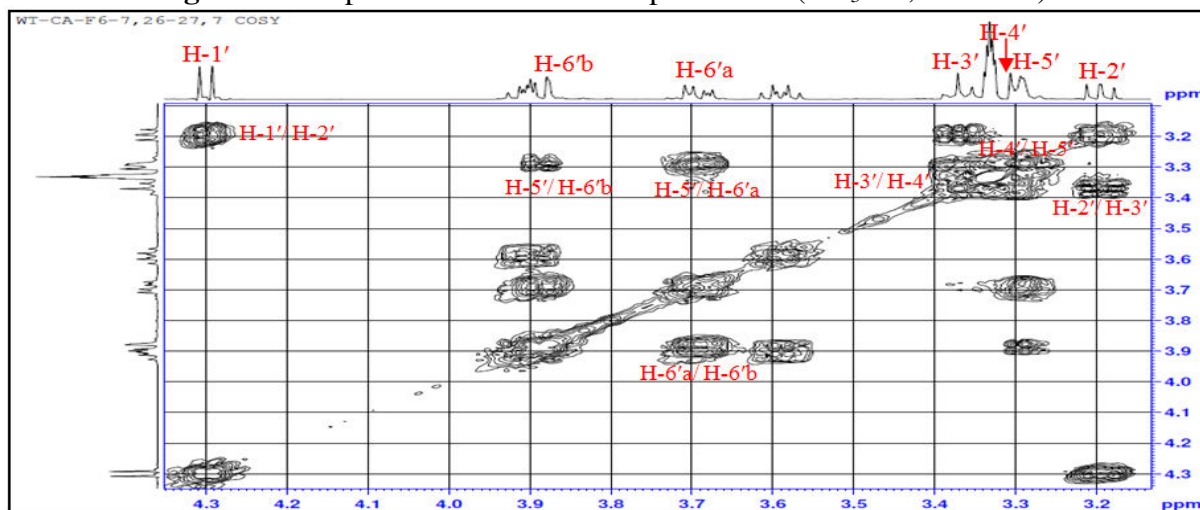


Figure 3.91: Spectre COSY de la partie osidique du composé Ca14.

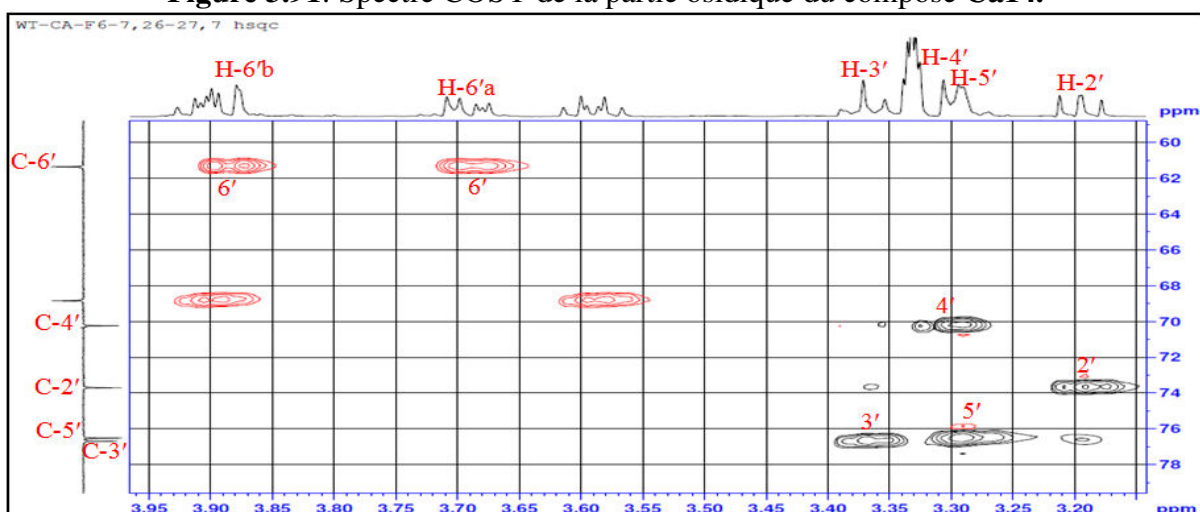


Figure 3.92: Spectre HSQC de la partie osidique du composé Ca14.

Les spectres RMN ^{13}C (figure 3.93) et HSQC (figure 3.94) montrent la présence de 12 carbones de la partie aglycone :

- 6 CH_2 ($\delta_{\text{C}} = 25.2, 26.8, 27.6, 37.3, 38.4, 70.2$ ppm) dont un oxygéné.
- 2 CH ($\delta_{\text{C}} = 37.7$ et 53.7 ppm)
- 2 carbones insaturés ($\delta_{\text{C}} = 127.8$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 127.5$ ppm).
- 2 groupements carbonyles ($\delta_{\text{C}} = 174.7$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 220.4$ ppm).

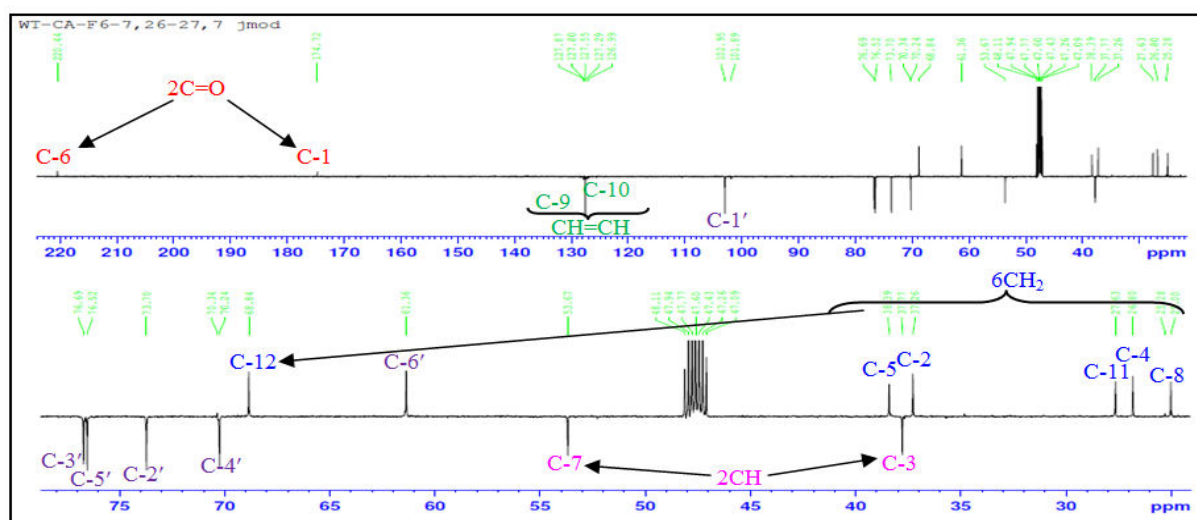


Figure 3.93: Spectre RMN ^{13}C du composé Ca14 (CD $_3$ OD, 125MHz).

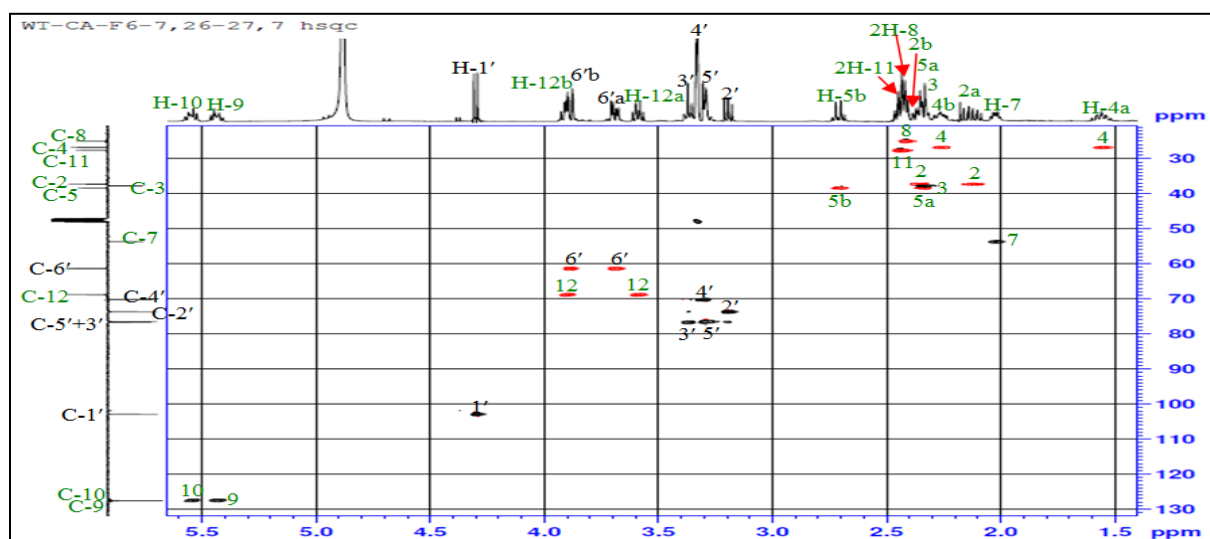
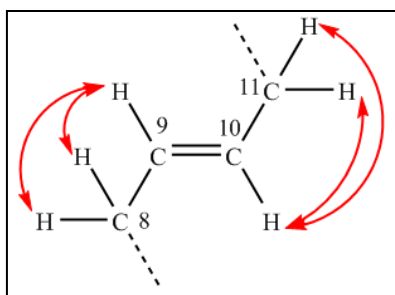
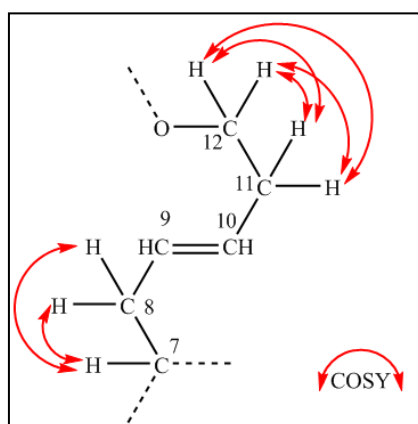


Figure 3.94: Spectre HSQC du composé Ca14.

Le spectre COSY (figure 3.95) montre des corrélations H-H entre les deux protons oléfiniques en position 9 et 10, ce qui indique qu'ils sont voisins. Ces protons montrent aussi des corrélations avec les protons résonnant à $\delta_{\text{H}} = 2.40$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 2.44$ ppm attribuables respectivement au 2H-8 et 2H-11.

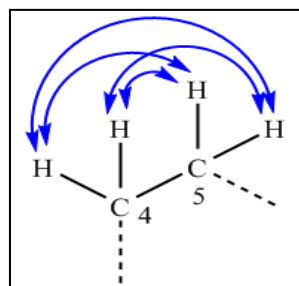


Ces derniers (2H-11) corrént avec les protons résonnant à 3.59ppm et 3.90ppm attribuables à CH₂-O alors que les protons 2H-8 sont corrélé avec le proton H-7 résonné à $\delta_H=2.04-2.05$ ppm. Ceci nous permettent de proposer une structure partielle (I) de composé Ca14 comme suite



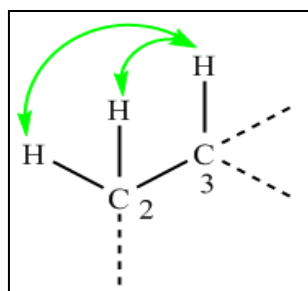
Structure partielle (I)

On observe sur ce même spectre (figure 3.95) des corrélations entre les protons résonant à $\delta_H=3.34-3.37$ ppm, $\delta_H=3.71$ ppm attribuable à 2H-5 et 2H-4 résonant à $\delta_H=1.56$ ppm et 2.26ppm. Ce qui conduit de proposer cette portion (II) de la structure ci-dessous



Portion (II)

On observe aussi (figure 3.95) des corrélations entre les deux protons 2H-2 résonnant à $\delta_H=2.19$ ppm, $\delta_H=2.39$ ppm et le proton H-3 à $\delta_H=2.30-2.34$ ppm. Cela permet de donner cette portion (III)



Portion (III)

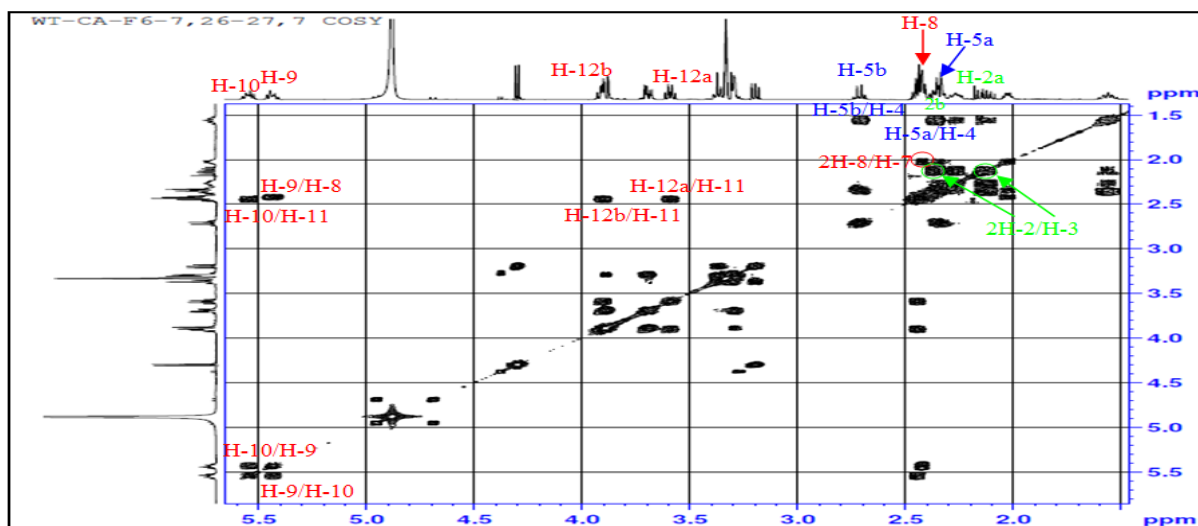


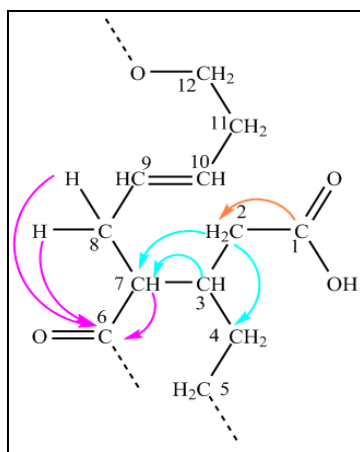
Figure 3.95: Spectre COSY de la partie aglycone du composé **Ca14**.

Toutes ces informations sont confirmées par l'expérience HMBC (figure 3.96) qui montre des corrélations entre :

- Les protons 2H-8 et les carbones C-7, C-9 et inversement, entre le carbone C-8 et les protons H-7, H-9.
- Le carbone C-11 et les protons H-10 et 2H-12 et inversement.
- Les protons 2H-5 et le carbone C-4 et inversement.
- Les protons 2H-2 et le carbone C-3 et inversement.

L'expérience du spectre HMBC (figure 3.95) montre aussi des corrélations entre les protons 2H-8 et le carbone quaternaire attribuable à un carbonyle (C-6) résonnant à $\delta_C = 220.4\text{ppm}$ qui corrèle ce dernier avec H-7.

Ce même spectre (figure 3.96) montre des corrélations entre le carbone quaternaire attribuable à un carboxyle (C-1) résonnant à $\delta_C = 174.7\text{ppm}$ et les protons 2H-2 ($\delta_H = 2.19\text{ppm}$ et 2.39ppm). Ces derniers qui sont corrélés avec C-7, C-4 ainsi que le C-3 qui corrèle avec le H-7. Ces informations indiquent la structure suivante



Importantes corrélations HMBC des portions I, II, III du composé **Ca14**

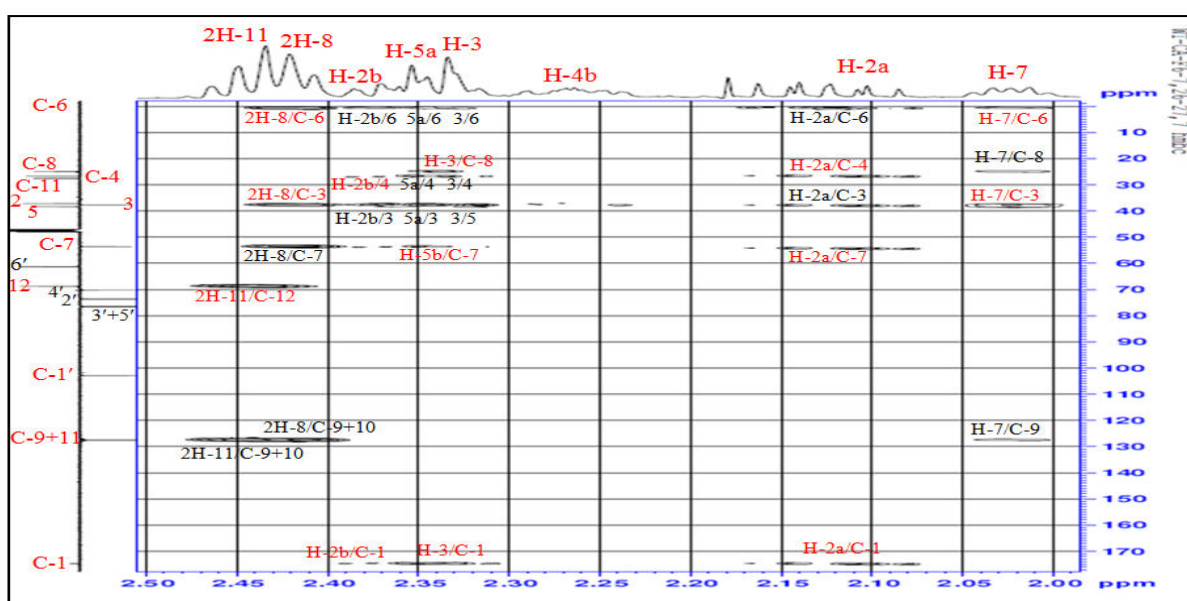
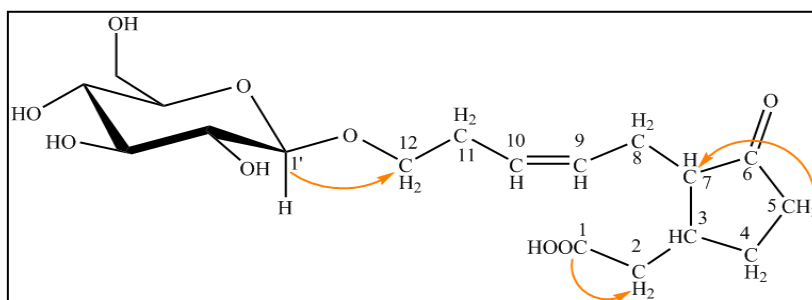


Figure 3.96: Spectre HMBC du composé **Ca14**.

On observe aussi sur ce même spectre HMBC (figure 3.97) des corrélations entre les protons de 2H-5 et le carbone C-7 donc le CH₂-5 est situé entre C-6 et C-4 formant un cycle de 5 atomes. Ainsi que des corrélations entre le proton anomérique et le carbone C-12. Cela permet de relier le β-D-glucopyranoside en position 12 de la molécule.



Importantes corrélations HMBC du composé **Ca14**

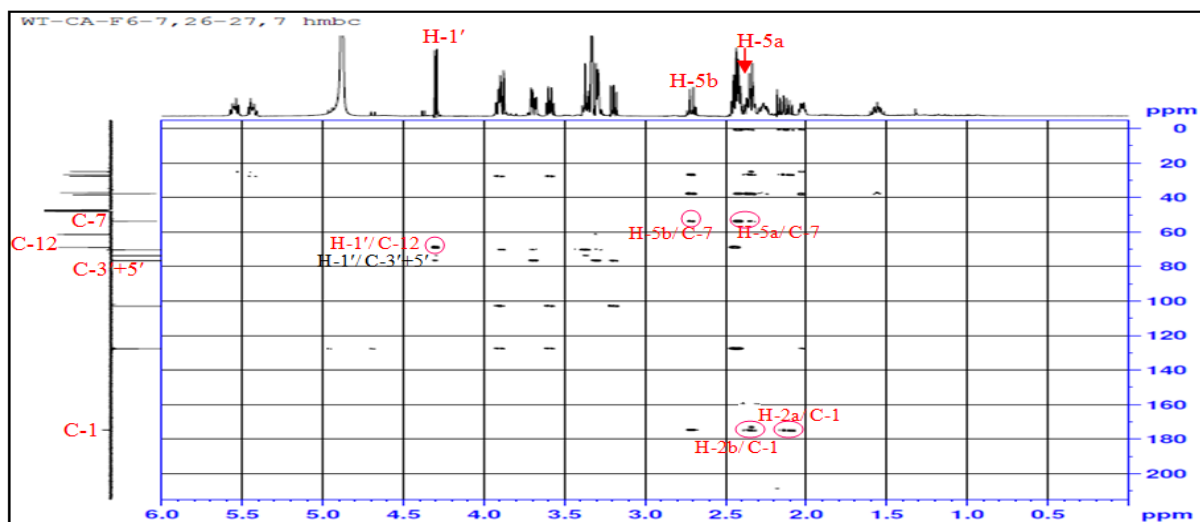


Figure 3.97: Spectre HMBC du composé Ca14 (Importantes corrélations).

L'orientation β -axiale du proton H-1' est déterminée par l'effet rOe entre ce proton et les protons H-12 (figure 3.98)

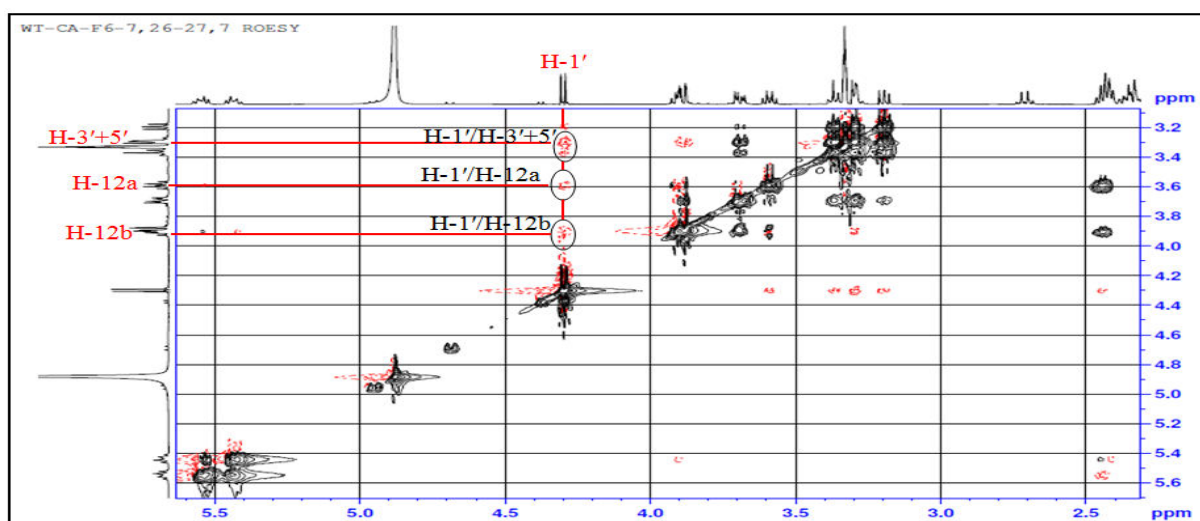
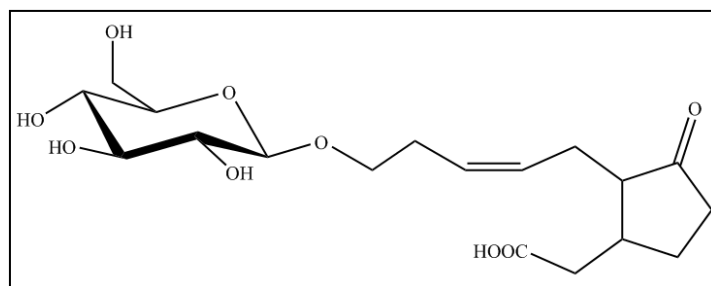


Figure 3.98: Spectre ROESY du composé Ca14.

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer au composé Ca14 la structure de : **Tuberic acid 12-O- β -D-glucopyranoside** isolé précédemment de l'espèce *Solanum tuberosum* Linn (Solanaceae) (Yoshihara et al., 1989) et pour la première fois de la famille d'Asteraceae.



Tuberic acid 12-O- β -D-glucopyranoside (Ca14)

Tableau 3.14: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Ca14** dans CD_3OD . (Yoshihara et al., 1989)

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	174.7	-	-	-
2	37.3	36.5	2.19 (1H, m) 2.39 (1H, m)	2.05-2.20 (1H, m) 2.35-2.45 (1H, m)
3	37.7	38.1	2.30-2.34 (1H, m)	2.80 (1H, m)
4	26.8	27.0	1.56 (1H, m) 2.26 (1H, m)	1.88 (1H, m) 2.00-2.05 (1H, m)
5	38.4	36.3	3.71 (1H, dd, 10.8/ 5.6) 2.34-2.37 (1H, m)	2.24 (2H, m)
6	220.4	-	-	-
7	53.7	54.4	2.04-2.05 (1H, m)	2.35-2.45 (1H, m)
8	25.2	24.2	2.40 (2H, m)	2.05-2.20 (1H, m) 2.30-2.35 (1H, m)
9	127.8	128.6	5.44 (1H, td, 10.8/7.6/7.5)	5.47 (1H, m)
10	127.5	129.5	5.55 (1H, dt, 10.9/7.4)	5.47 (1H, m)
11	27.6	26.8	2.44 (2H, dd, 13.4/6.7)	2.35-2.45 (2H, m)
12	70.2	70.5	3.59 (1H, dd, 14.2/7.1) 2.44 (1H, m)	3.55 (1H, m) 3.86 (1H, m)
Glucose en C-12				
1'	102.9	104.4	4.30 (1H, d, 7.8)	4.26 (1H, d, 8.0)
2'	73.7	75.4	3.16 (1H, m)	3.16
3'	76.7	78.2	3.37 (1H, m)	3.35
4'	70.3	72.0	3.30 (1H, m)	3.26
5'	76.5	78.4	3.30 (1H, m)	3.26
6'	61.4	63.1	6'a : 3.69 (1H, dd, 11.8/5.0) 6'b : 3.87 (1H, dd, 11.8/1.2)	6' a: 3.68 6' b: 3.88

I. 15. Elucidation Structurale de Ca15

Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-MS-ESI (figure 3.99) montre un ion pseudo moléculaire à $m/z = 383.0749$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculé 383.0749) qui correspond à la formule brute $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$.

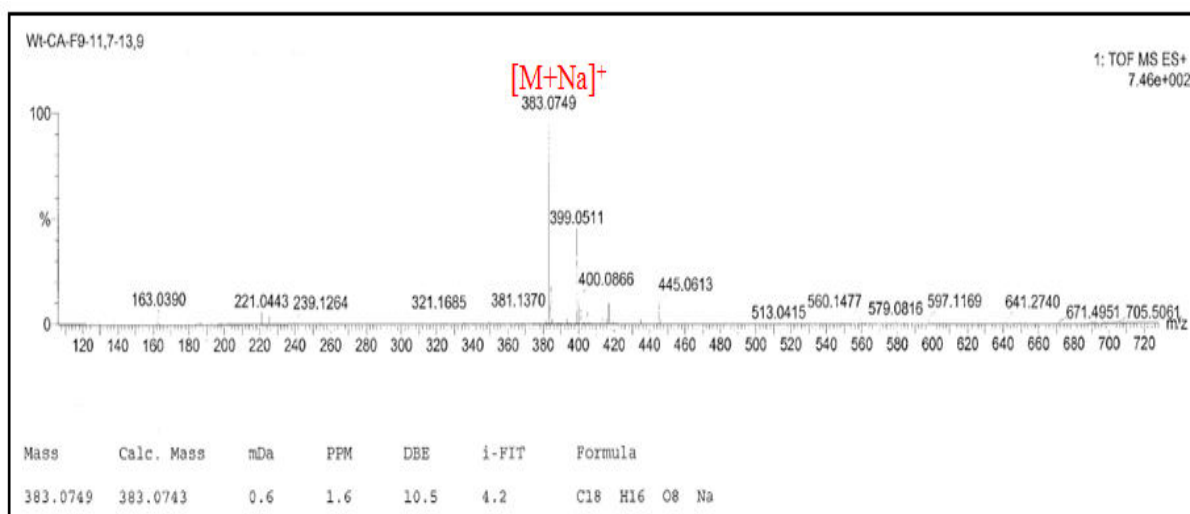


Figure 3.99: Spectre de masse HR-MS-ESI du composé **Ca15**.

Le spectre RMN ^1H (figure 3.100) enregistré dans CD_3OD du composé Ca15, montre dans la région des aromatiques, la présence de deux systèmes ABX des cycles aromatiques, on observe pour le premier système

- deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 7.06\text{ppm}$ ($J = 1.9\text{Hz}$), $\delta_{\text{H}} = 6.80\text{ppm}$ ($J = 8.1\text{Hz}$) attribuables respectivement aux protons H-2, H-5.
- un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6.97\text{ppm}$ ($J = 8.1$ et 1.9Hz) attribuable au proton H-6.

Et le deuxième système

- deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6.77\text{ppm}$ ($J = 1.9\text{Hz}$) et $\delta_{\text{H}} = 6.72\text{ppm}$ ($J = 8.1\text{Hz}$) attribuables respectivement aux protons H-2', H-5'.
- un doublet de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6.63\text{ppm}$ ($J = 8.0$ et 1.9Hz) attribuable au proton H-6'.

Ceci indique que ces deux cycles aromatiques sont substitués en positions 1, 3 et 4.

Le spectre montre aussi :

- Deux doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 7.57\text{ppm}$ ($J = 15.8\text{Hz}$) et $\delta_{\text{H}} = 6.29\text{ppm}$ ($J = 15.8\text{Hz}$) attribuables à un pair *trans*-oléfinique de protons H-7 et H-8 respectivement.
- trois doublets de doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 3.04\text{ppm}$ ($J = 14.3$ et 8.4Hz), $\delta_{\text{H}} = 3.12\text{ppm}$ ($J = 14.3$ et 4.2Hz) et $\delta_{\text{H}} = 5.21\text{ppm}$ ($J = 8.3$ et 4.3Hz) attribuables aux deux protons H-2-7' et H-8' respectivement. Ceci indique la présence de $\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-}$.

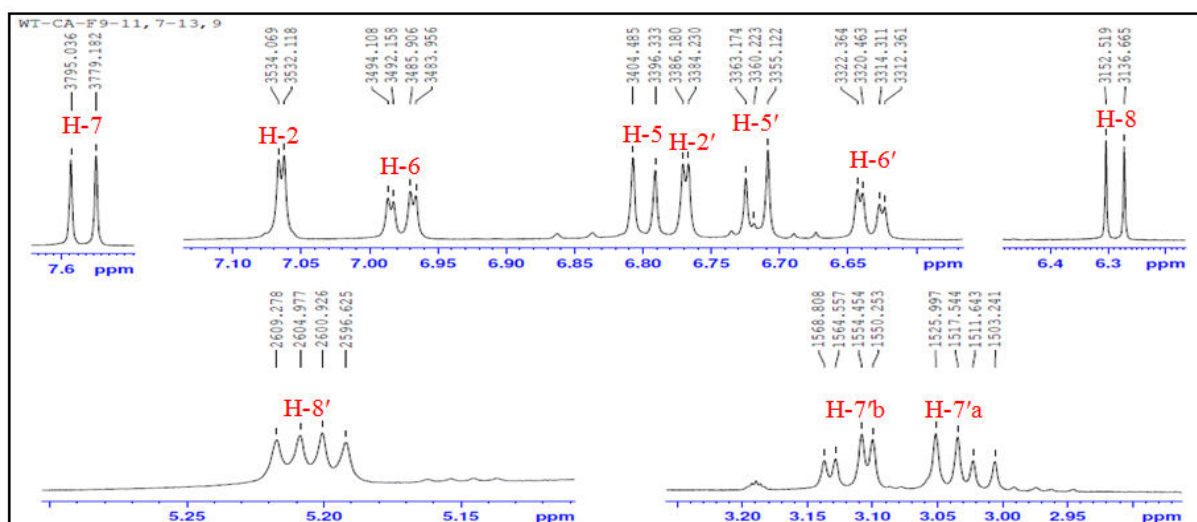


Figure 3.100: Spectre RMN- ^1H du composé Ca15 (CD_3OD , 500MHz).

Les spectres RMN ^{13}C J -modulé (figure 3.101) et HSQC (figure 3.102, 3.103) montrent la présence de 18 carbones répartis comme suit :

- 2 groupements carbonyles à $\delta_C = 173.4\text{ppm}$ et $\delta_C = 168.4\text{ppm}$ dont un carboxylique acide (C-9') et autre carbonyle ester (C-9).
- 12 carbones aromatiques dont six tertiaires (C-2, 5, 6, et 2', 5', 6') et six autre quaternaires qui comportent ces derniers 4 phénoxyles carbones (C-3, 4, 3', 4'). Ceci confirmer la présence de deux cycles aromatiques trisubstitués.
- Deux carbones oléfiniques à $\delta_C = 147.7$ (C-7) et 114.4ppm (C-8).
- Un méthine oxygéné à $\delta_C = 74.6\text{ppm}$ (C-8').
- Un méthylène à $\delta_C = 37.9\text{ppm}$ (C-7').

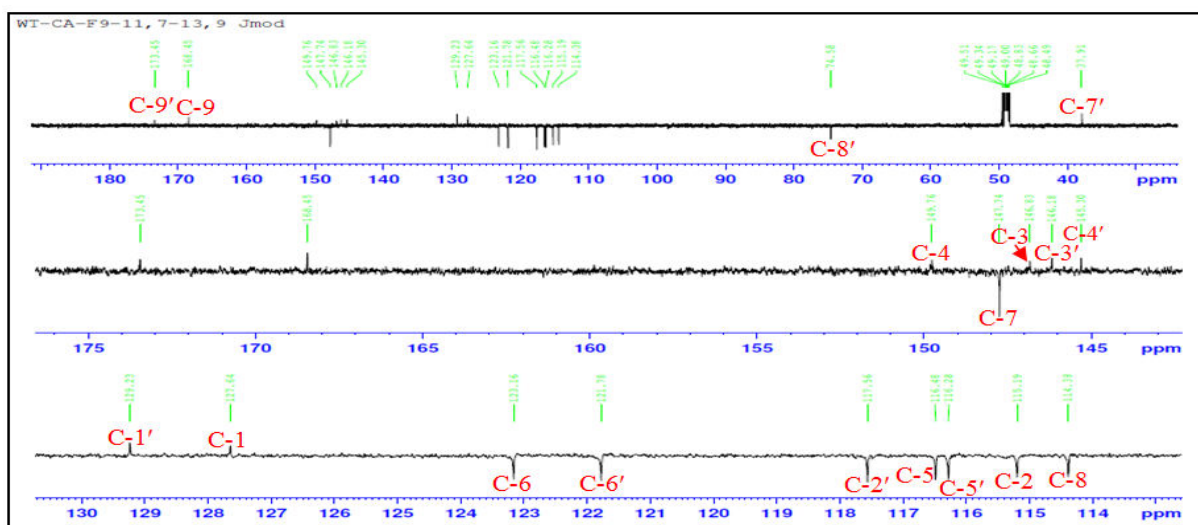


Figure 3.101: Spectre RMN- ^{13}C du composé Ca15 (CD_3OD , 125MHz).

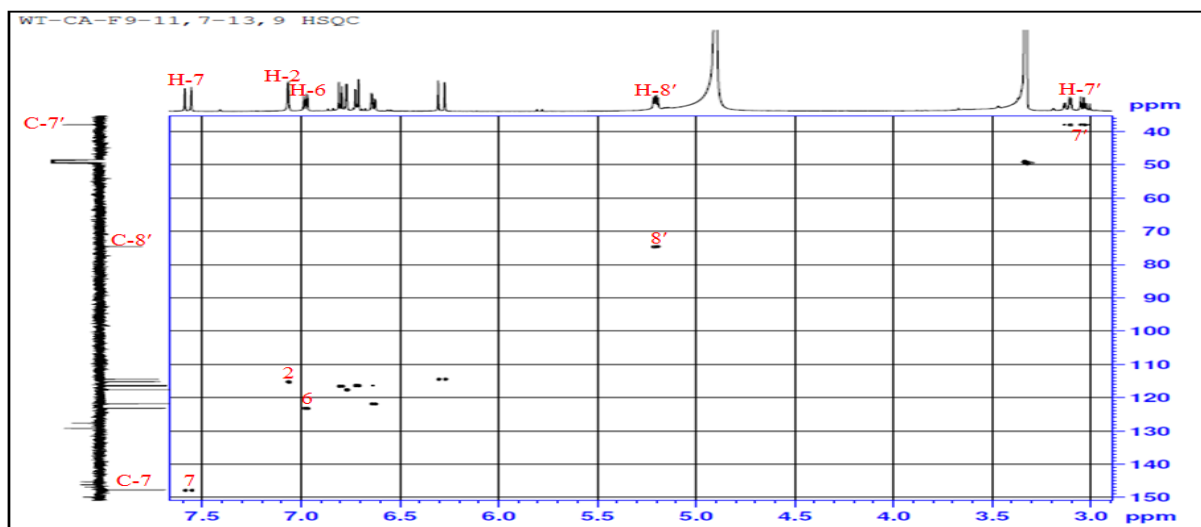


Figure 3.102: Spectre HSQC du composé Ca15.

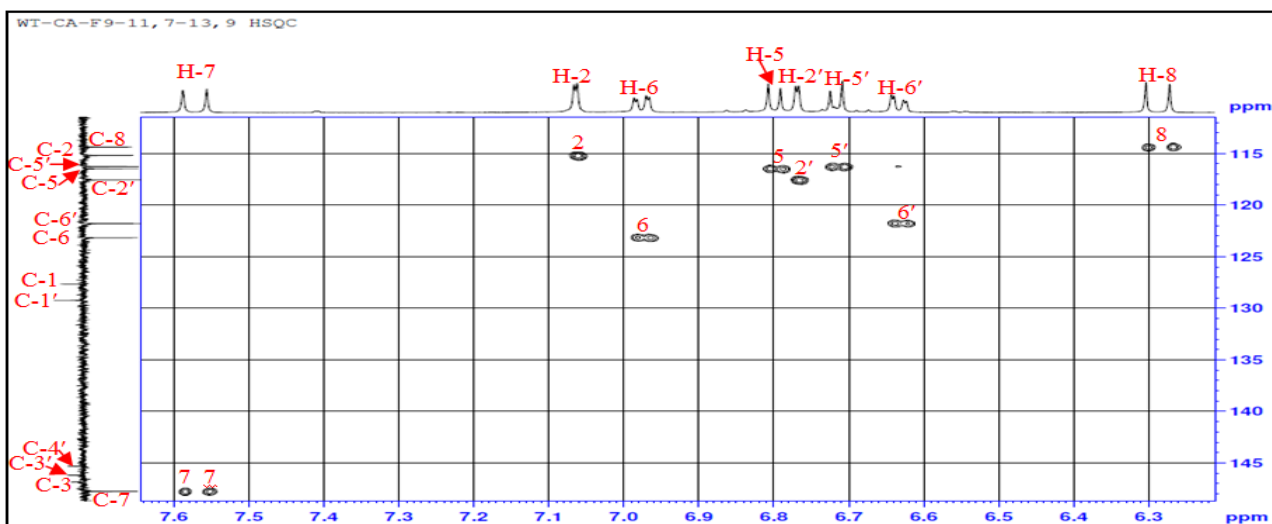


Figure 3.103: Spectre HSQC du composé **Ca15** (partie étalé 6.20-7.65ppm).

L'examen du spectre COSY (figure 3.104, 3.105) montre des corrélations entre les protons de chaque cycle aromatique entre eux (H-2, H-5 et H-6) ainsi que (H-2', H-5' et H-6'). On remarque aussi :

- Une corrélation entre les protons oléfiniques à $\delta_H = 7.57\text{ppm}$ (H-7) et $\delta_H = 6.29\text{ppm}$ (H-8) ce qui suggère que ces deux atomes de carbones sont voisins.
- Les protons à $\delta_H = 3.04\text{ppm}$, $\delta_H = 3.12\text{ppm}$ (H_{2-7'}) corrélient entre eux et avec $\delta_H = 5.21\text{ppm}$ (H-8') ce qui indique qu'ils sont vicinaux.

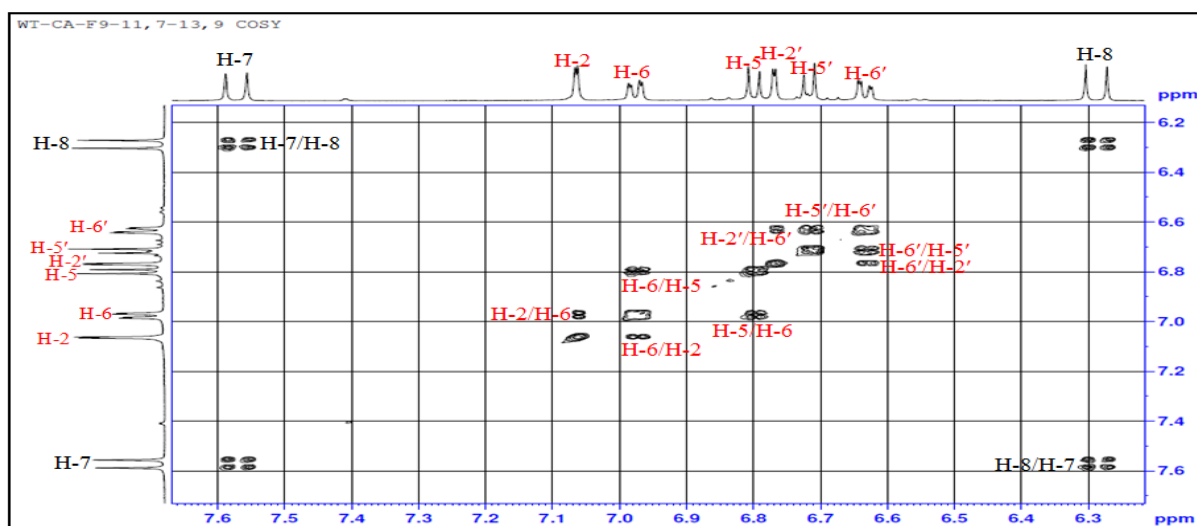


Figure 3.104: Spectre COSY de la partie aromatique du composé **Ca15**

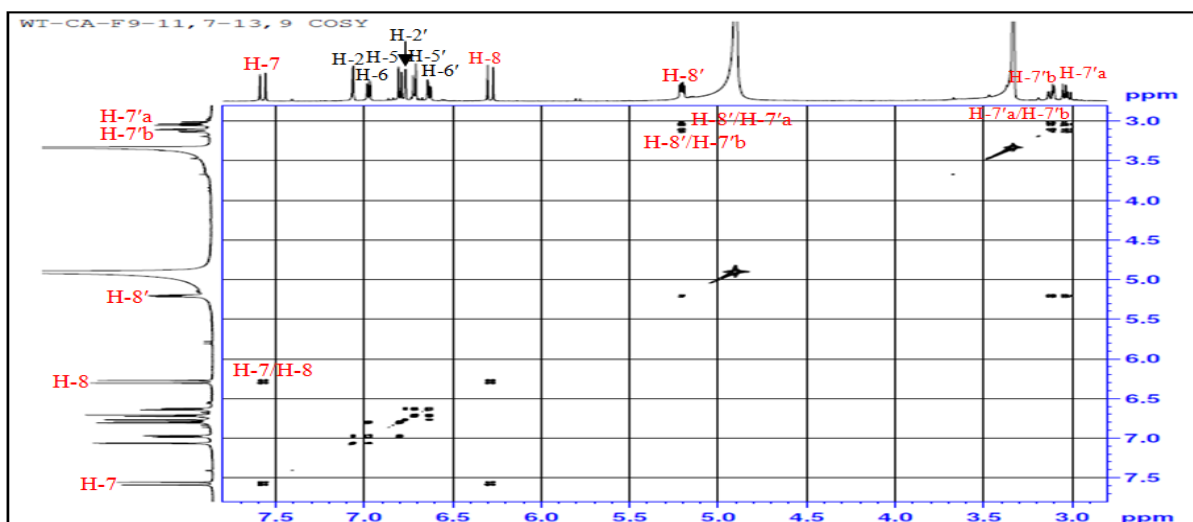


Figure 3.105: Spectre COSY du composé Ca15.

L'examen du spectre HMBC (figure 3.106) permet d'observer :

- Des taches de corrélations entre le proton
 - H-2 avec C-4, C-6 et C-7
 - H-5 avec C-1, C-3 et C-6
 - H-6 avec C-2, C-4 et C-7
 - H-7 avec C-1, C-2, C-6 et C-9
 - H-8 avec C-1 et C-9

Mettant en évidence la présence d'un groupement **caféiyle**

- Des taches de corrélations entre le proton
 - H-2' avec C-4', C-6' et C-7'
 - H-5' avec C-1', C-3' et C-4'
 - H-6' avec C-2', C-4' et C-7'
 - 2H-7' avec C-1', C-6', C-8' et C-9'
 - H-8' avec C-1', C-7' et C-9'

Permettent de suggérer la présence du groupement **3,4-dihydroxyphenyl glycérique acide**

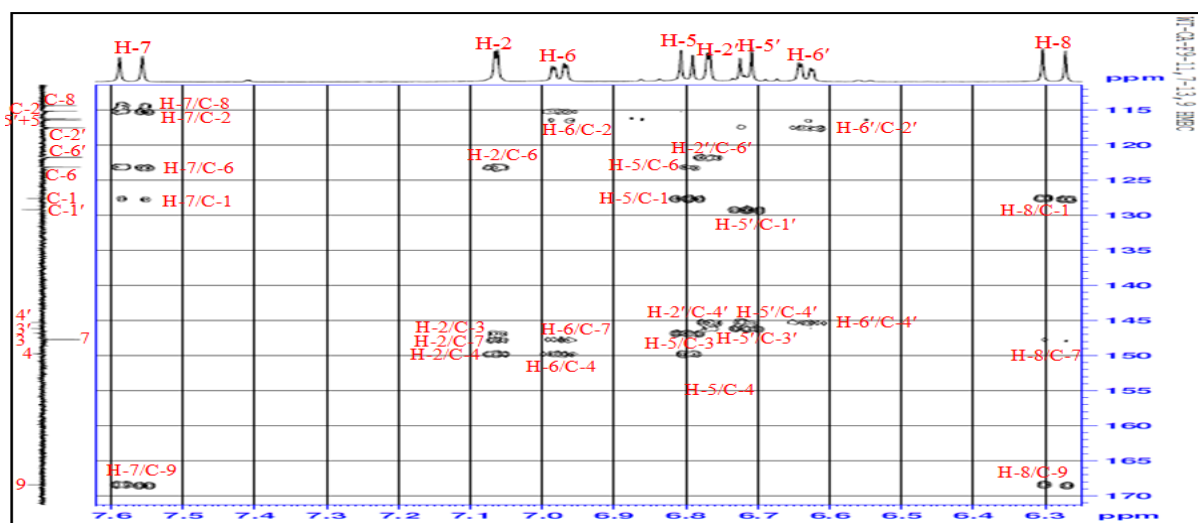
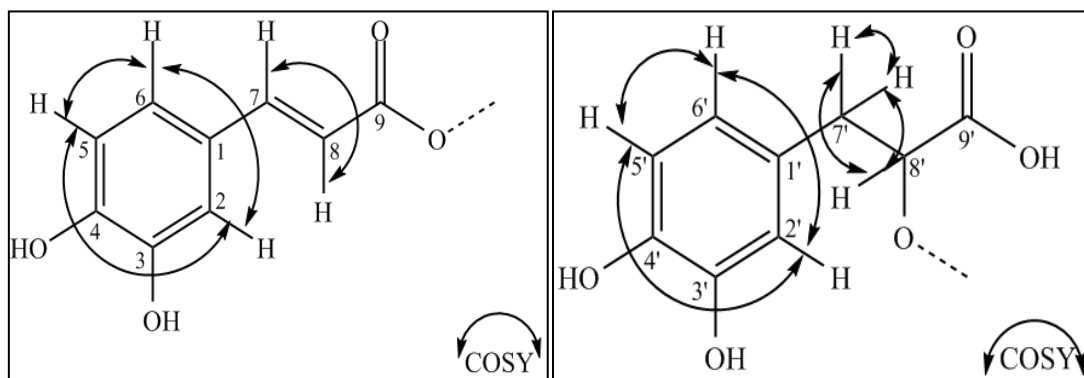


Figure 3.106: Spectre HMBC de la partie aromatique du composé Ca15.

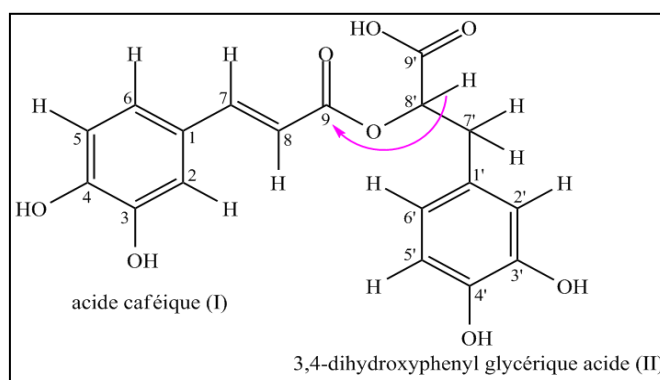
Le déblindage des protons du premier système ABX peut être dû à la substitution du cycle aromatique par un groupement tricyclique conjugué à une fonction carbonyle.



Acide caféique (I)

3,4-dihydroxyphenyl glycérique acide (II)

Le même spectre HMBC (figure 3.107) montre aussi une corrélation entre le proton H-8' et le carbonyle ester C-9 qui indique la fixation des deux parties de la molécule c'est-à-dire entre l'acide caféique (I) et 3,4-dihydroxyphenyl glycérique acide (II) en C-8'.



Importante corrélation HMBC du composé **Ca15**

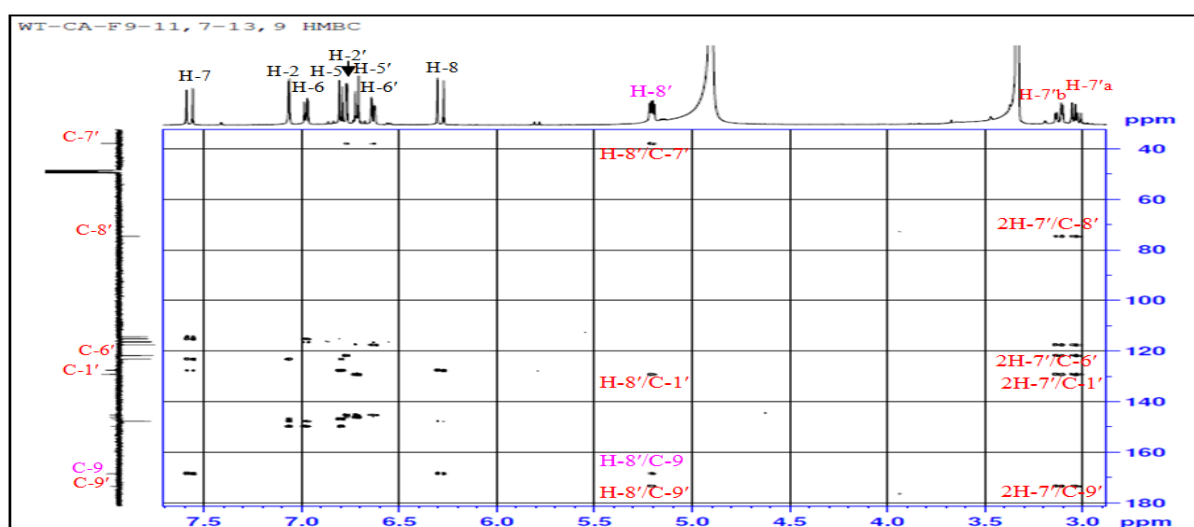
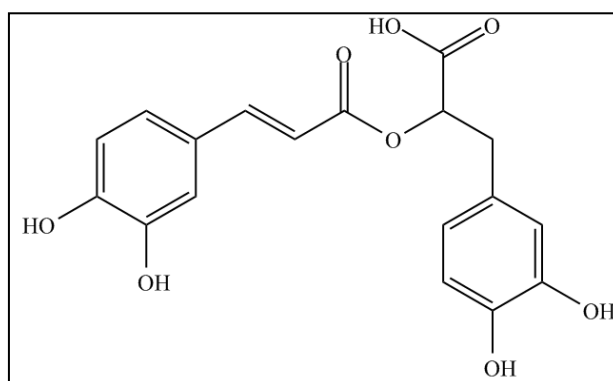


Figure 3.107: Spectre HMBC du composé **Ca15**.

Tableau 3.15: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Ca15** dans CD_3OD (Gohari et al., 2009)

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	127.6	126.3	-	-
2	115.2	115.8	7.06 (1H, d, 1.9)	7.05 (1H, d, 1.4)
3	146.8	146.7	-	-
4	149.8	149.4	-	-
5	116.5	116.8	6.80 (1H, d, 8.1)	6.77 (1H, d, 8.1)
6	123.2	121.8	6.97 (1H, dd, 8.2/1.9)	6.94 (1H, dd, 8.2/1.5)
7	147.7	145.4	7.57 (1H, d, 15.8)	7.40 (1H, d, 15.8)
8	114.4	115.5	6.29 (1H, d, 15.8)	6.20 (1H, d, 15.9)
9	168.4	167.1	-	-
1'	129.2	130.4	-	-
2'	117.6	117.5	6.77 (1H, d, 1.9)	6.69 (1H, d, 1.5)
3'	146.2	145.8	-	-
4'	145.3	144.5	-	-
5'	116.3	116.3	6.72 (1H, d, 8.0)	6.60 (1H, d, 8.0)
6'	121.8	120.5	6.63 (1H,dd, 8.0/1.9)	6.50 (1H,dd, 8.0/1.5)
7'	37.9	37.9	7'a : 3.04 (1H,dd, 14.3/8.4) 7'b : 3.12 (1H,dd, 14.3/4.2)	7'a : 2.81 (1H,dd, 10.0/10) 7'b : 3.05 (1H,d, 10)
8'	74.6	74.4	5.21 (1H,dd, 8.3/4.3)	4.92 (1H,dd, 10/2.8)
9'	173.4	174.0	-	-

Toutes ces données mènent à la structure de : l'acide rosmarinique (Gohari et al., 2009)



Acide rosmarinique (**Ca15**)

Chapitre II

Élucidation Structural des métabolites secondaires isolés de *Pentzia monodiana* Maire.

II. 1. Elucidation Structurale de Pm1

L'analyse du spectre de masse haute résolution électro-spray en mode d'ionisation positif (figure 3.108) montre un pic pseudo moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 441.1524$ correspondant à la formule brut $C_{22}H_{26}O_8$. Donc ce composé présente dix insaturations.

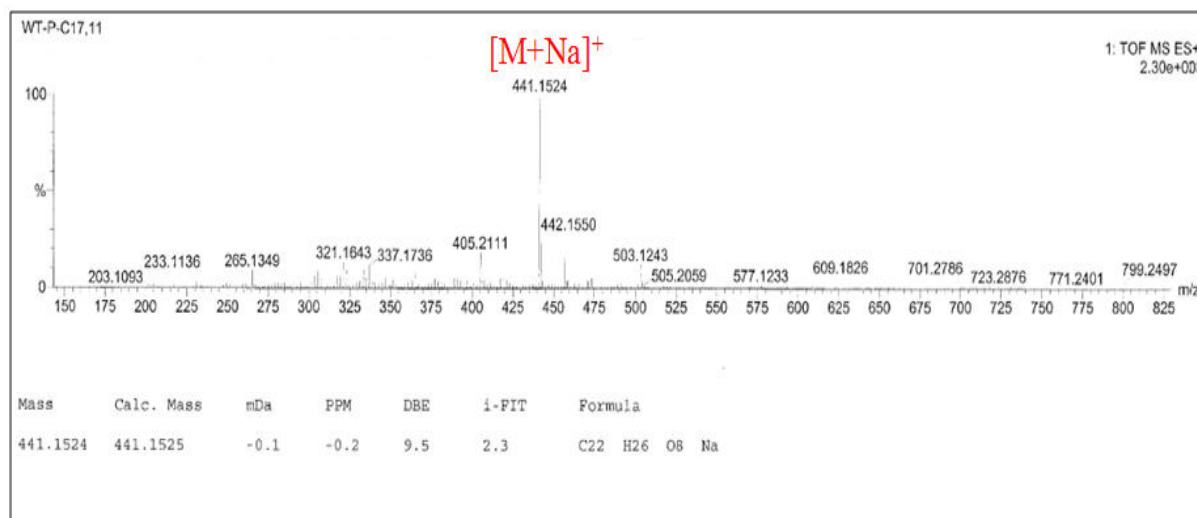
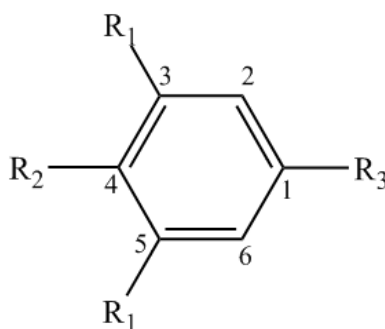


Figure 3.108 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **Pm1**

Le spectre RMN ^{13}C - J -modulé (Figure 3.109) indique la présence de 4 signaux dans la zone des carbones aromatiques dont 3 correspondant à des carbones quaternaires et un correspond à des carbones tertiaires. En revanche, le spectre RMN 1H montre un seul singulet à $\delta_H=6.68$ ppm cela pourrait indiquer la présence d'un cycle aromatique 1, 3, 4, 5-tetrasubstitué (fragment 1) si on pense que les deux signaux manquants sont superposés avec deux des quatre signaux mentionnés.



Fragment 1

Du fait de la symétrie du cycle proposé, on y observe un singulet dans le spectre RMN 1H (Figure 3.110) correspondant aux deux protons H-2 et H-6.

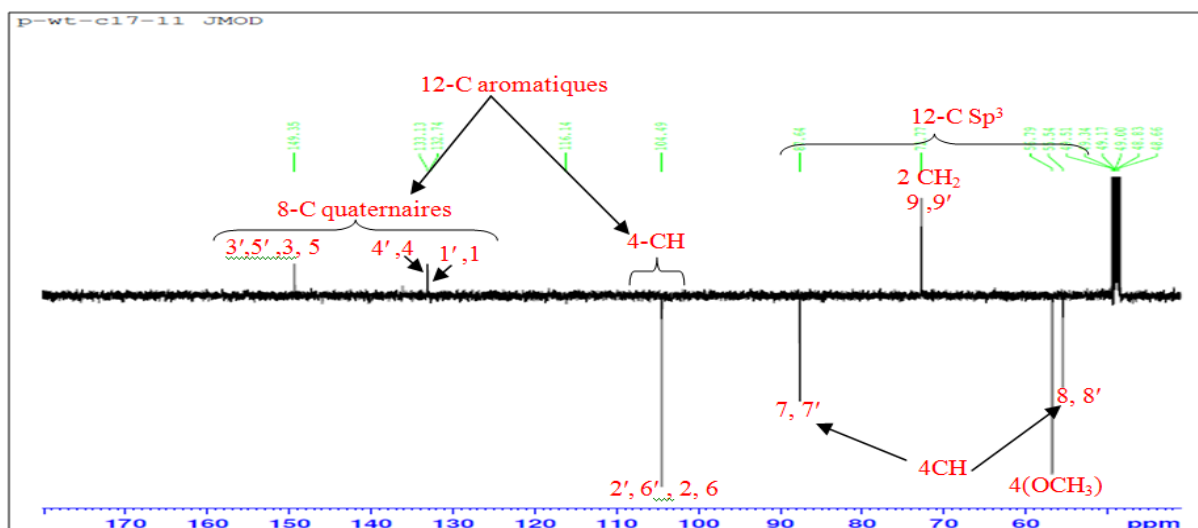


Figure 3.109 : Spectre de RMN- ^{13}C J-modulé du composé **Pm1** (CD_3OD , 125 MHz).

Le spectre RMN ^1H (Figure 3.110) montre aussi des signaux résonant à $\delta_{\text{H}} = 6.65$; 4.74 ; 4.29 ; 3.87 et 3.11 ppm intégrant pour 4H ; 2H ; 2H ; 2H ; 12H et 2H respectivement. En tout il y a 24 protons en tenant compte de la formule brute de ce composé. Les deux protons restants seraient probablement dus à la présence de 2 hydroxyles qui n'apparaissent pas sur le spectre. La somme des protons proposé par cette integration indique la présence d'un deuxième fragment identique au fragment 1.

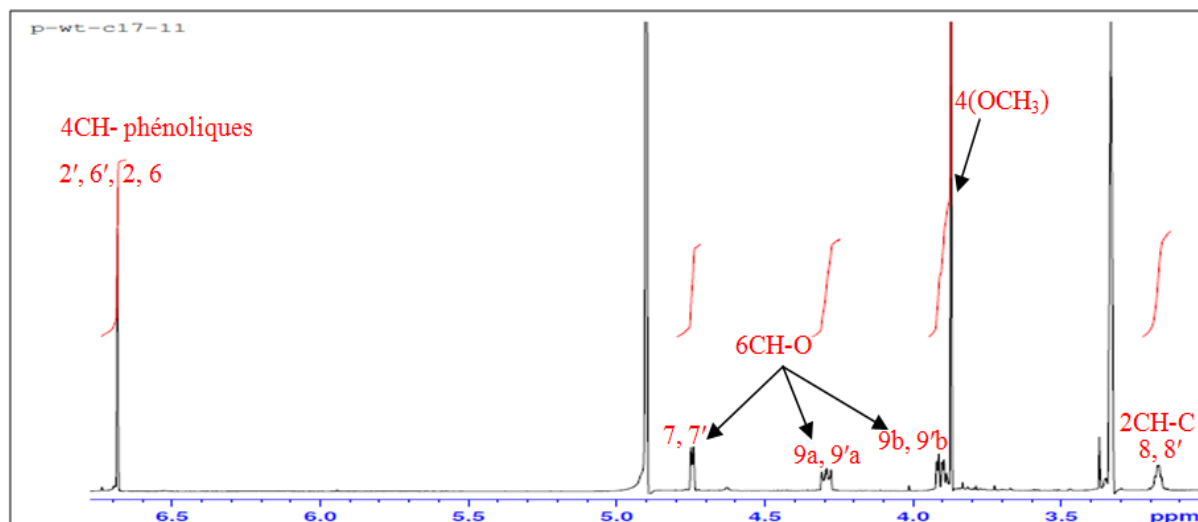


Figure 3.110 : Spectre RMN- ^1H du composé **Pm1** (CD_3OD , 500 MHz).

Dans le spectre COSY homonucléaires (figure 3.111) de ce composé, on observe le couplage H-H entre les deux protons méthines résonnant à $\delta_{\text{H}} = 4.74$ ppm et les protons à $\delta_{\text{H}} = 3.16$ ppm. Ce dernier corrèle avec les protons des deux groupements CH_2 résonnant à $\delta_{\text{H}} = 3.91$ et 4.29 ppm, qui sont corrélés entre eux. Ce qui permet de construire le fragment

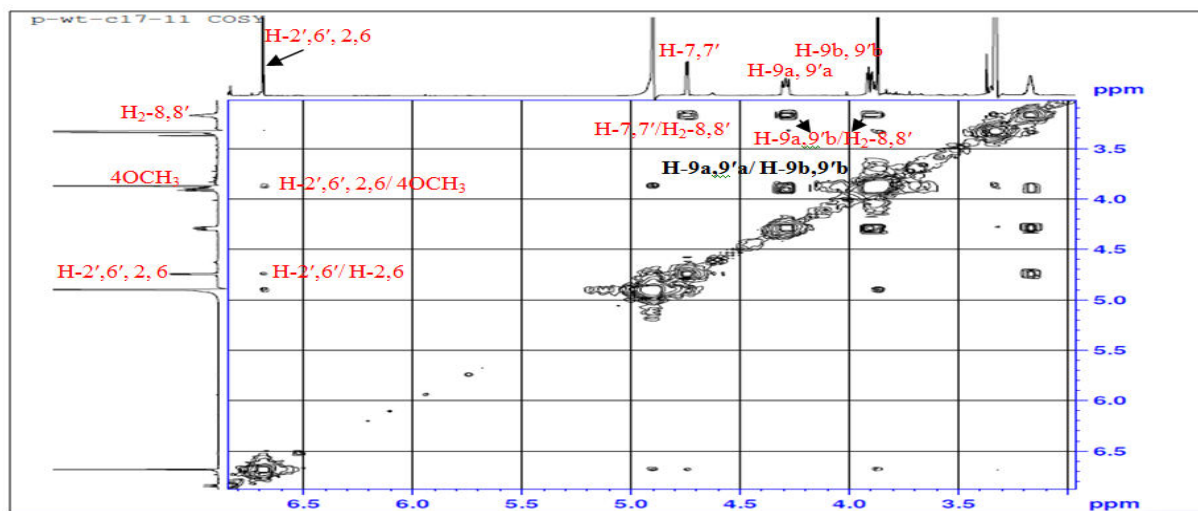
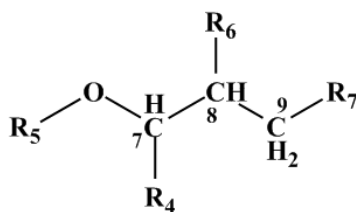


Figure 3.111 : Spectre COSY du composé **Pm1**

Le spectre HSQC *J*-modulé (figure 3.112) permet d'attribuer le carbone du méthylène (-CH₂-O-R₇) à $\delta_H = 3.87$ et 4.29 ppm et les deux méthynes (R₅-O-CH-R₄) et (-CH-R₆-) à $\delta_H = 4.74$ ppm et $\delta_H = 3.11$ ppm, respectivement. De plus, on attribue au méthoxyle à $\delta_H = 3.87$ ppm le carbone résonant à $\delta_C = 56.8$ ppm. Les deux fragments 1 et 2 permettent de compter 9 carbones si on ajoute au cycle aromatique deux méthoxyles à cause de la symétrie qu'il a présenté, il en résulte 11 atomes de carbones. Sachant que le composé **Pm1** possède 22 atomes de carbones, il devrait contenir une partie qui est dédoublée ou un centre de symétrie. C'est-à-dire, nous avons deux cycles aromatiques substitués par deux méthoxyles chacun plus deux fragment de trois carbones chacun.

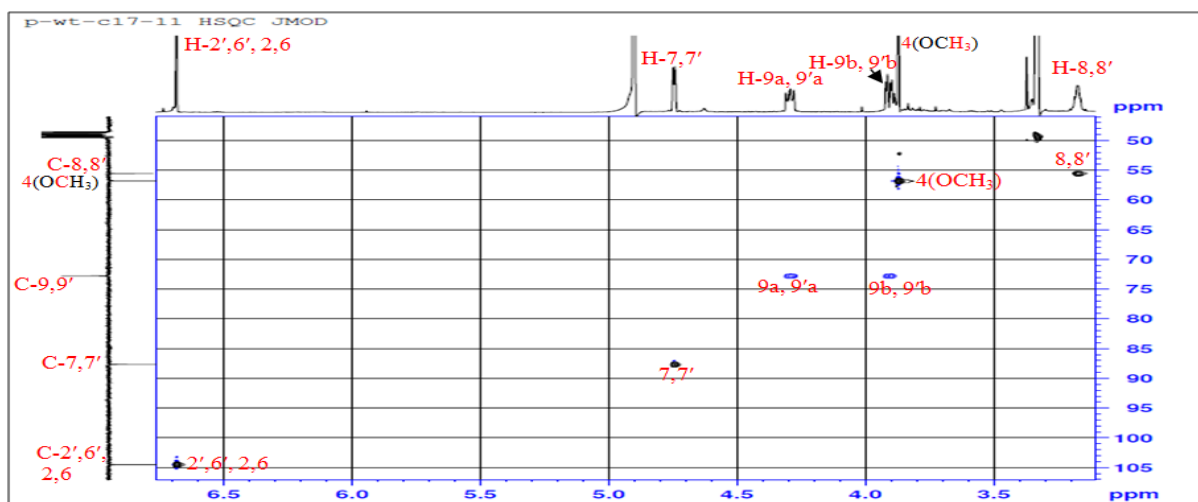


Figure 3.112 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Pm1**

En effet, on observe sur le spectre HMBC (figure 3.113, 3.114) une corrélation entre le proton H-7 et les carbones C-2 et C-6, ce qui permet de placer le premier noyau aromatique en C-7 donc **R**₄ représente le cycle aromatique.

La corrélation des deux carbones à $\delta_C = 149.3$ ppm et les protons des méthoxyles à $\delta_H = 3.87$ ppm, de plus la corrélation du type $^4J_{C-H}$ des carbones C-2 et C-6 et des mêmes méthoxyles précédents permet d'attribuer les carbones à $\delta_C = 149.3$ ppm à C-3 et C-5. Le carbone oxygéné C-4 à $\delta_C = 135.5$ ppm corréle avec les protons H-2 et H-6. Tous les signaux des spectres RMN-¹H et RMN-¹³C ont été attribués et ont conduit à la structure partielle ci-dessous C₁₁H₁₃O₄. La formule brute de Pm1 de C₂₂H₂₆O₈ indique la présence d'une symétrie dans la molécule.

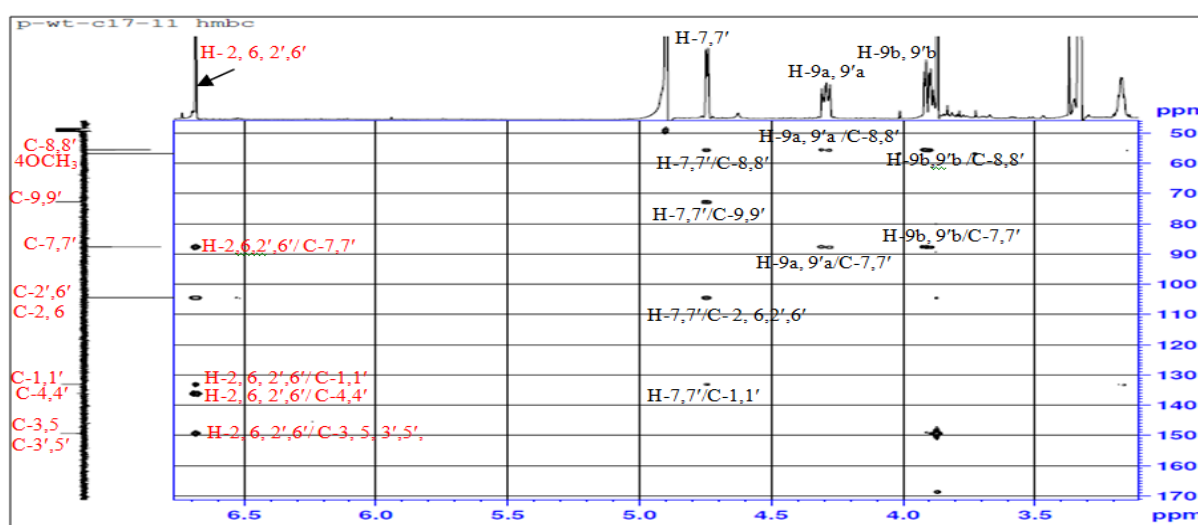
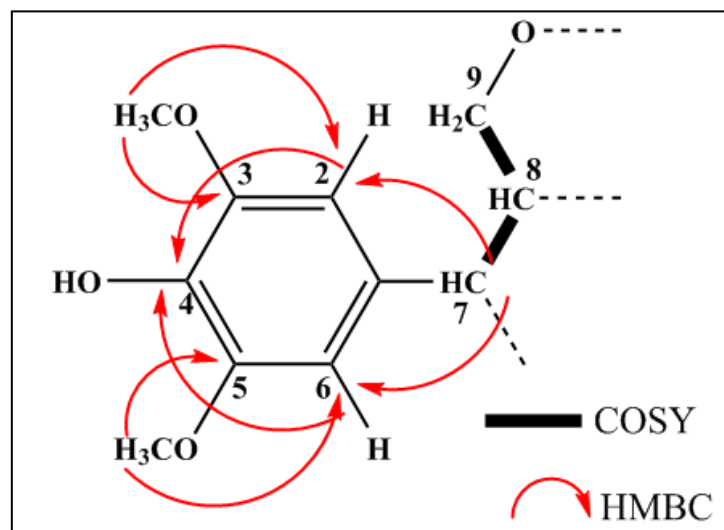


Figure 3.113 : Spectre HMBC du composé Pm1

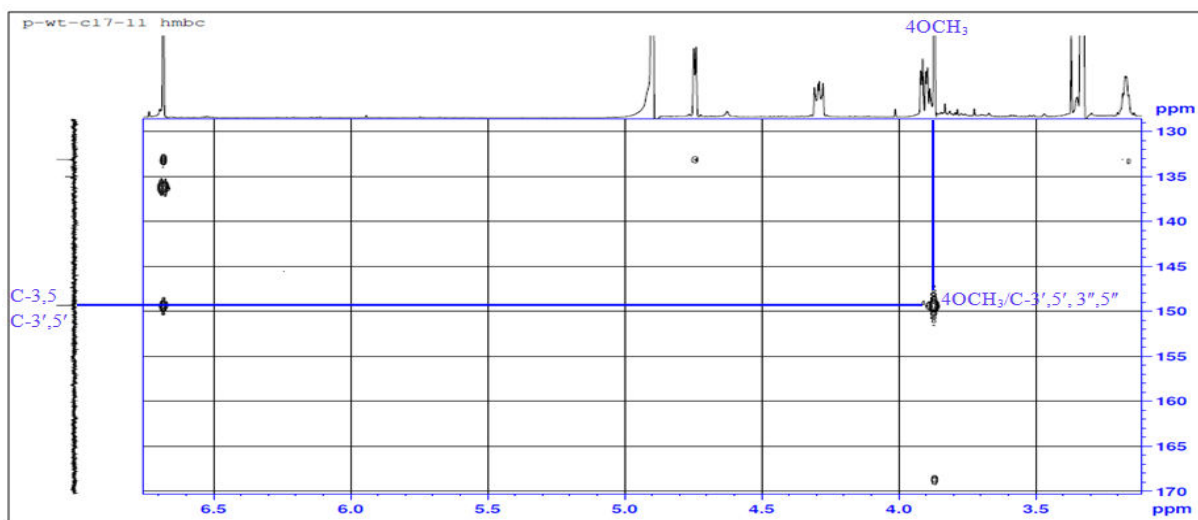
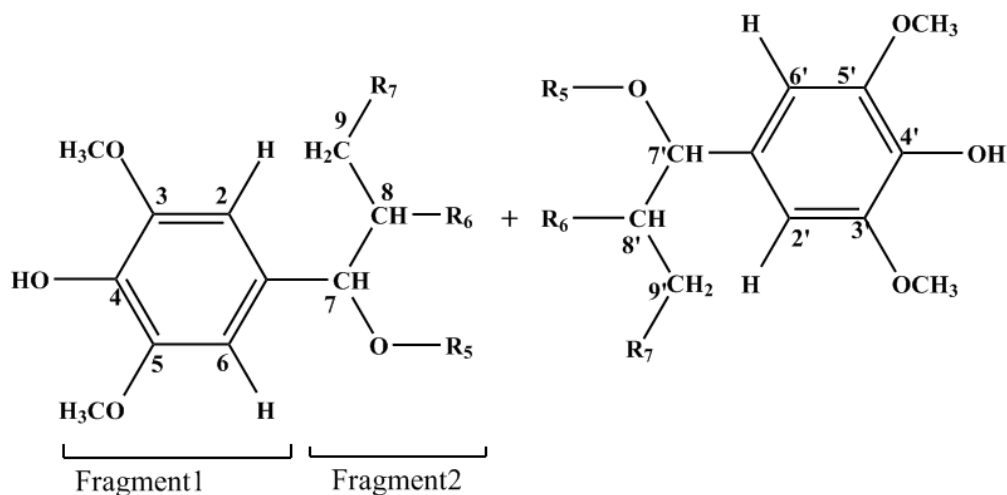
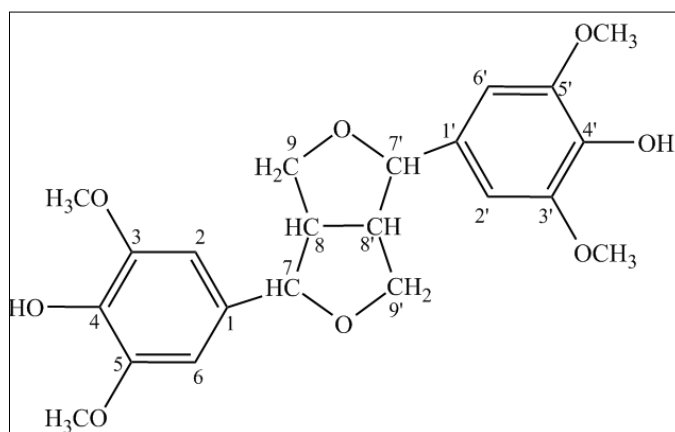


Figure 3.114 : Spectre HMBC du composé **Pm1** (partie étalé 130-170 ppm)

Donc on peut suggérer la connection suivante entre les deux fragments 1 et 2 :

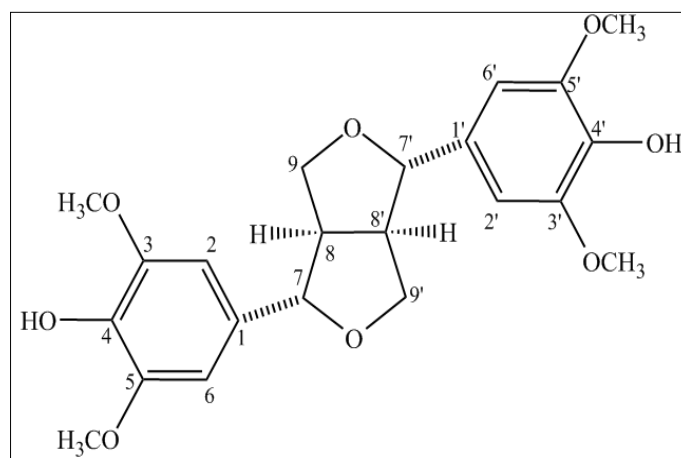


Le fragment symétrique ajouté à celui obtenu permet de conduire au produit **Pm1**



Les corrélations des carbones 8 et 8' avec les protons H-7' ; H-9'a, b ; et H-7 ; H-9a, b sur le spectre HMBC (figure 3.113) confirment la condensation des deux fragments et la formation d'un **Furofurane**.

L'analyse spectrale combinée (RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY, HMBC), qui est en accord avec celle indiquée dans la littérature, mène à la structure de **Syringarésinol** pour le composé **Pm1** (Chen et al., 2010).



Syringarésinol (**Pm1**)

L'ensemble des valeurs des déplacements chimiques est regroupé dans le tableau 3.18 :

Tableau 3.16: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Pm1** dans CD_3OD (Chen et al., 2010).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	133.1	132.0	-	-
2	104.5	102.7	6.68 (1H, s)	6.58 (1H, s)
3	149.3	147.1	-	-
4	135.5	134.3	-	-
5	149.3	147.1	-	-
6	104.5	102.7	6.68 (1H, s)	6.58 (1H, s)
7	87.6	86.0	4.74 (1H, d, 4.2)	4.73 (1H, d, 4.4)
8	55.5	54.2	3.16 (1H, m)	3.09 (1H, m)
9	72.8	71.7	4.29 (1H, dd, 8.9/6.7) 3.91 (1H, dd, 8.9/3.3)	4.28 (1H, dd, 9.1/6.9) 3.92 (1H, m)
1'	133.1	132.0	-	-
2'	104.5	102.7	6.68 (1H, s)	6.58 (1H, s)
3'	149.3	147.1	-	-
4'	135.5	134.3	-	-
5'	149.3	147.1	-	-
6'	104.5	102.7	6.68 (1H, s)	6.58 (1H, s)
7'	87.6	86.0	4.74 (1H, d, 4.2)	4.73 (1H, d, 4.4)
8'	55.5	54.2	3.16 (1H, m)	3.09 (1H, m)
9'	72.8	71.7	4.29 (1H, dd, 8.9/6.7) 3.91 (1H, dd, 8.9/3.3)	4.28 (1H, dd, 9.1/6.9) 3.92 (1H, m)
3-OCH ₃	56.8	56.3	3.87 (1H, s)	3.89 (1H, s)
5-OCH ₃	56.8	56.3	3.87 (1H, s)	3.89 (1H, s)
3'-OCH ₃	56.8	56.3	3.87 (1H, s)	3.89 (1H, s)
5'-OCH ₃	56.8	56.3	3.87 (1H, s)	3.89 (1H, s)

II. 2. Elucidation Structurale de Pm2

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS en mode positif (figure 3.115) du composé Pm2, montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 411.1423 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 388.14 correspondant à une formule brute en $C_{21}H_{24}O_7$.

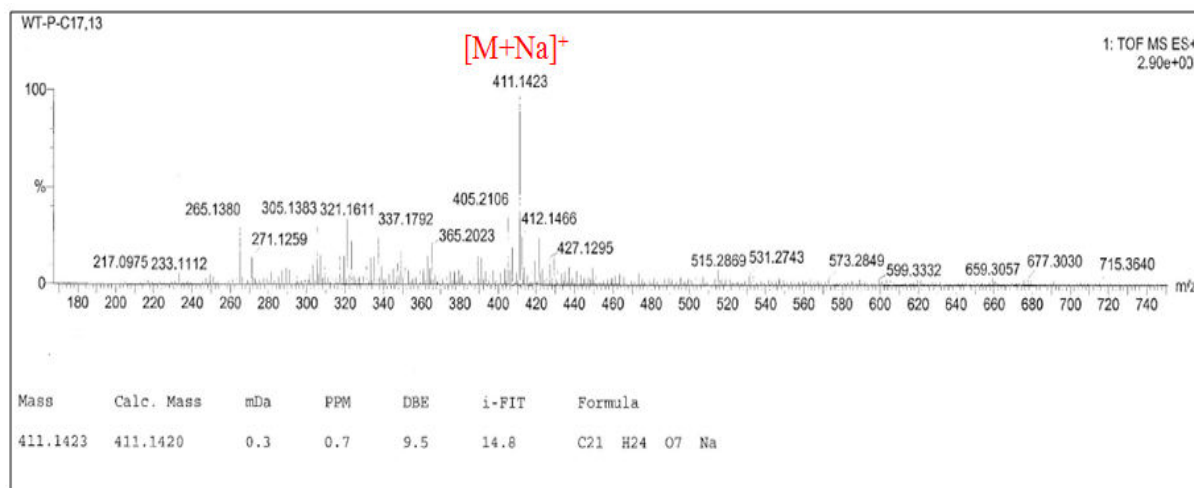


Figure 3.115 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **Pm2**

L'examen des spectres RMN 1H (Figure 3.116) et du ^{13}C (Figure 3.119) du **Pm2** montre une grande ressemblance avec les spectres du composé **Pm1** notamment les signaux des protons et carbones non aromatiques.

En effet, on reconnaît pratiquement tous les signaux du syringaresinol. La différence notable consiste en l'apparition dans la région des protons aromatiques, trois signaux sous forme de deux doublets d'intégration 1H de chacun, résonant à $\delta_H = 6.97$ ppm ($J=1.8$ Hz) et $\delta_H = 6.79$ ppm ($J=8.1$ Hz), et un doublet de doublet d'intégration 1H, résonant à $\delta_H = 6.84$ ppm ($J=8.1/1.8$ Hz), correspondant respectivement aux H-2', H-5', H-6' attribuables au trois protons du cycle aromatique 1, 3, 4- trisubstitué, en plus du singulet résonant à $\delta_H = 3.87$ ppm déjà observé dans le composé **Pm1**.

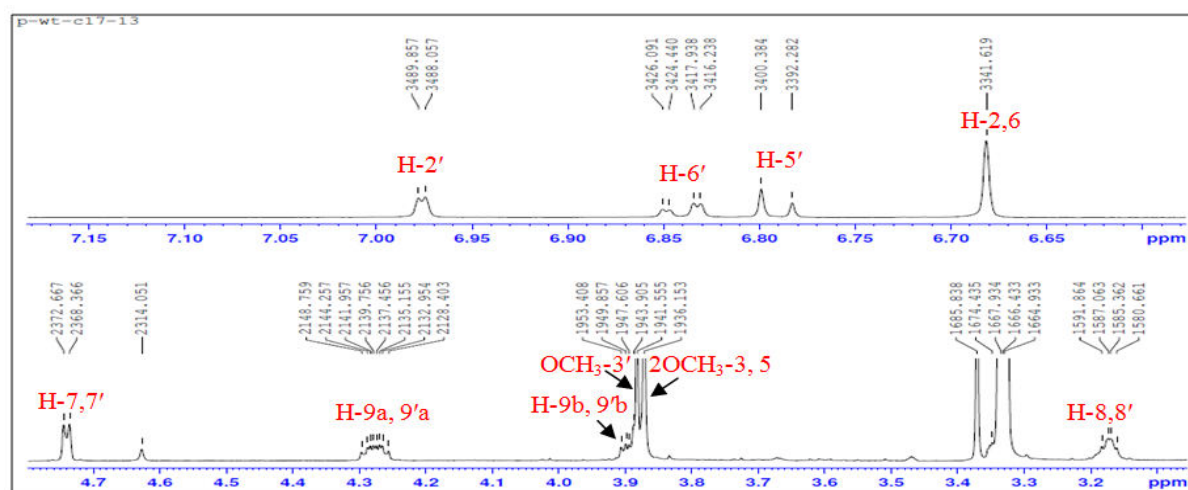


Figure 3.116 : Spectre RMN 1H du composé **Pm2** (CD_3OD , 500 MHz)

L'expérience HSQC *J*-modulé (figure 3.117) permet de détecter ses carbones à 111.0, 116.1 et 120.1 ppm en plus des carbones C-2 et C-6 à 104 ppm, confirmant la présence d'un système ABX, en plus du cycle aromatique déjà observé dans le composé Pm1. Ceci a conduit à la perte de la symétrie dans la molécule qui se traduit par un dédoublement de certains signaux des carbones.

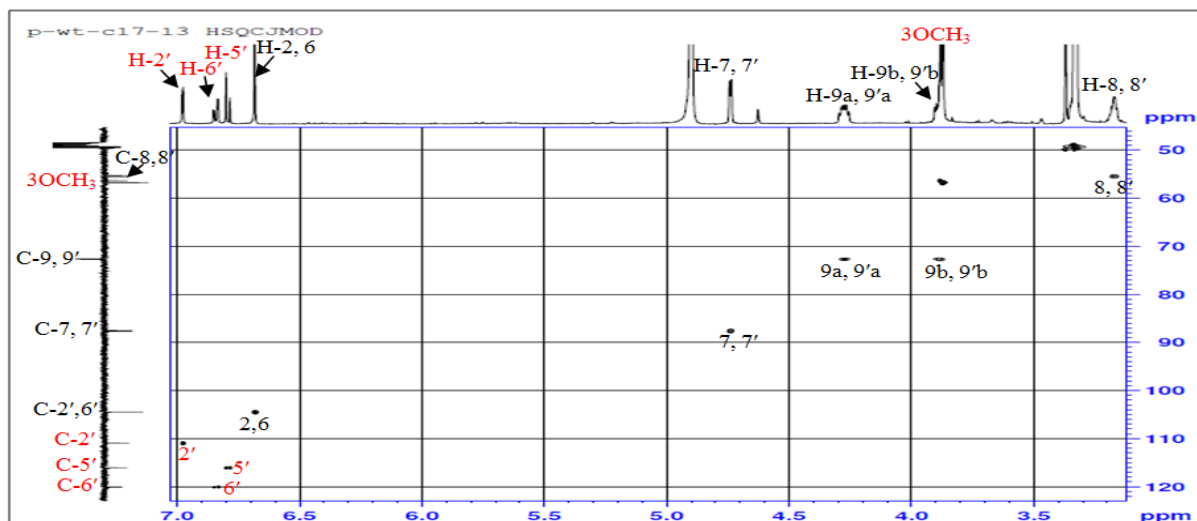


Figure 3.117 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé Pm2

L'analyse du spectre HMBC (figure 3.118) montre des corrélations $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ entre les trois protons H-2', H-5' et H-6' et les carbones C-1' (134.0ppm), C-3' (148.7ppm) et C-4' (147.3ppm), ce qui confirme que le cycle aromatique est 1, 3, 4- trisubstitué.

Ce même spectre montre aussi deux tâches de corrélation entre les protons des les deux singulets résonnant à 3.87 et 3.88 ppm correspondant au trois groupement méthoxyles et les carbones 3, 5 et 3' résonnant à 149.4 et 148.7 ppm respectivement, ce qui laisse logiquement déduire que ces groupements OCH₃ sont fixés au carbone C-3, C-5 et C-3'.

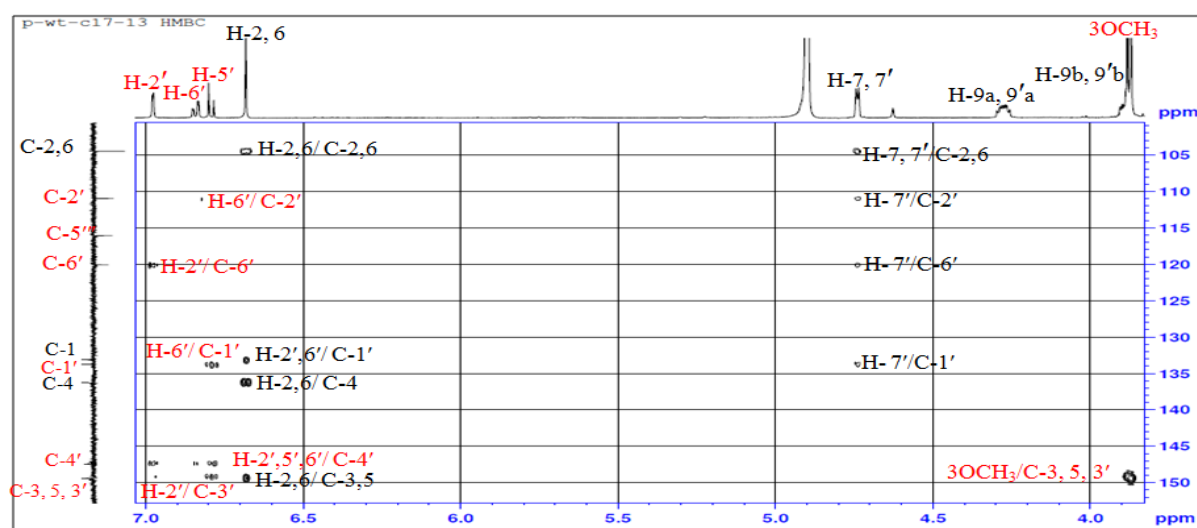


Figure 3.118 : Spectre HMBC du composé Pm2

Les expériences RMN ^1H , HSQC J -modulé, et HMBC combinées, permettent d'identifier tous les carbones du squelette (figure 3.119) (tableau 3.17).

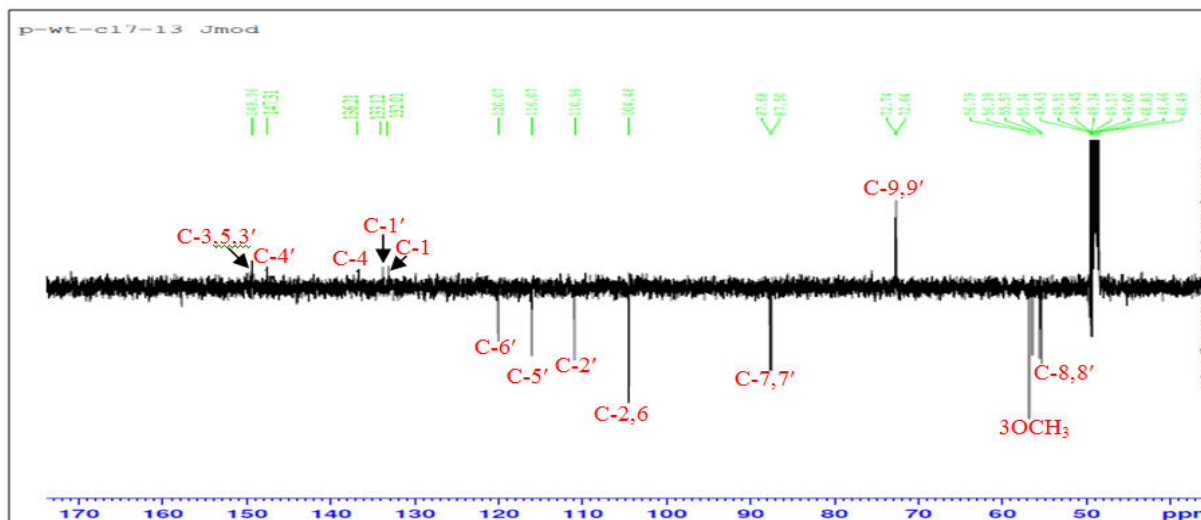
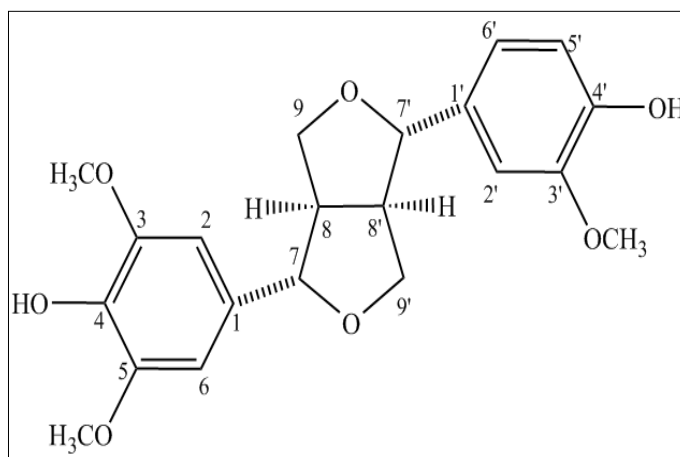


Figure 3.119 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **Pm2** (CD_3OD , 125 MHz)

Tableau 3.17: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Pm2** dans CD_3OD .

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	133.1	132.0/133.1	-	-
2	104.5	102.7	6.68 (1H, s)	6.59 (1H, s)
3	149.4	147.1	-	-
4	136.2	134.0	-	-
5	149.4	147.1	-	-
6	104.5	102.7	6.68 (1H, s)	6.59 (1H, s)
7	87.5/87.7	85.8/86.1	4.74 (1H, d, 4.3)	4.72/4.75 (1H, d, 4.5)
8	55.3/55.6	54.1/54.4	3.17 (1H, m)	3.11 (1H, m)
9	72.6/72.7	71.9/72.6	4.27 (1H, m) 3.88 (1H, m)	4.27 (1H, m) 3.87 (1H, m)
1'	134.0	132.0/133.1	-	-
2'	111.0	108.0	6.97/6.98 (1H, d, 1.8)	6.90 (1H, d, 1.5)
3'	149.4	147.1	-	-
4'	147.3	145.0	-	-
5'	116.1	114.3	6.79 (1H, d, 8.1)	6.92 (1H, d, 8.1)
6'	120.1	118.9	6.84 (1H, dd, 8.1/1.8)	6.84 (1H, dd, 8.1/1.5)
7'	87.5/87.7	85.8/86.1	4.74 (1H, d, 4.3)	4.72/4.75 (1H, d, 4.5)
8'	55.3/55.6	54.1/54.4	3.17 (1H, m)	3.11 (1H, m)
9'	72.6/72.7	71.9/72.6	4.27 (1H, m) 3.88 (1H, m)	4.27 (1H, m) 3.87 (1H, m)
3-OCH ₃	56.8	56.4	3.87 (1H, s)	3.91 (1H, s)
5-OCH ₃	56.8	56.4	3.87 (1H, s)	3.91 (1H, s)
3'-OCH ₃	56.4	56.0	3.88 (1H, s)	3.92 (1H, s)

Toutes ces données spectrales du composé **Pm2** est en accord avec celle trouvée dans la littérature et permet d'attribuer à ce composé la structure du **médioresinol** (Kaikaew & Mahabusarakam 2010)



Médioresinol (**Pm2**)

II. 3. Elucidation Structurale de Pm3

Le composé **Pm3** présente une formule moléculaire en $C_{20}H_{22}O_6$. Cette formule est déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-MS-ESI obtenu en mode positif qui présente un pic pour l'ion pseudo-moléculaire à m/z 381.1 $[M+Na]^+$ (figure 3.120), correspondant à une masse moléculaire égale à 358, soit une perte de 60 *uma*, ce qui suggère le manque de deux groupements méthoxyles supplémentaires par rapport au composé **Pm1**.

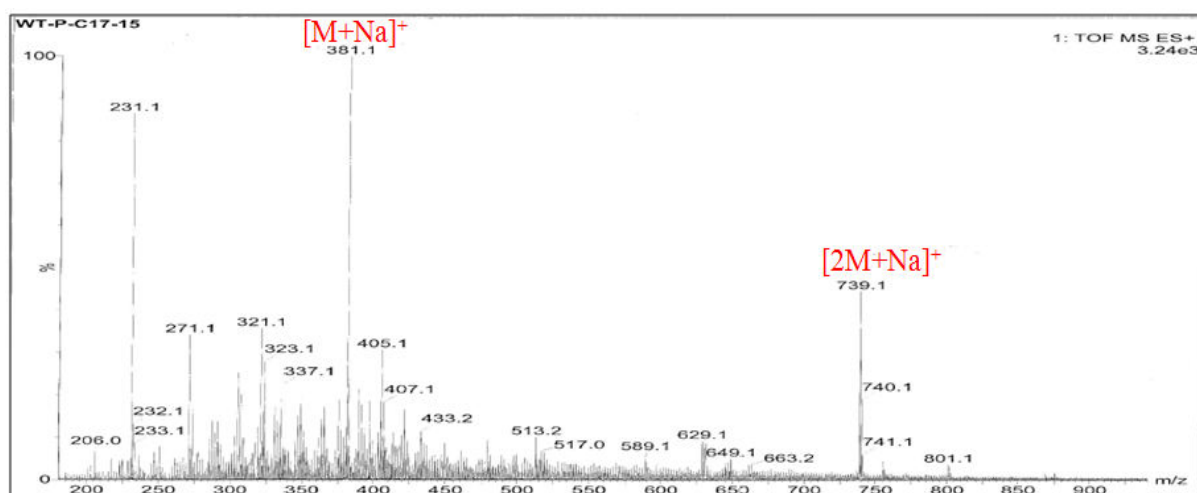


Figure 3.120: Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **Pm3**

Le spectre RMN 1H (Figure 3.121) du composé **Pm3**, enregistré dans le CD_3OD , est similaire à celui du composé **Pm1**. Les protons non aromatiques attestent la présence de la partie furofurane du produit **Pm2** avec absence du singulet correspondant au proton aromatique. En effet on observe :

- les signaux attribuables aux groupements méthines résonnant à δ_H 3.17 (2H, m, H-8/H-8'), 4.73 (2H, d, $J = 4.3\text{Hz}$, H-7/H-7'); méthylènes résonnant à δ_H 3.86 (2H, dd, $J = 9.1/3.6\text{Hz}$, H-9b/H-9'b) et 4.26 (2H, dd, $J = 9.1/6.8\text{Hz}$, H-9a/H-9'a) correspondant aux -CH et -CH₂ du noyau tétrahydrofuro [3,4-*c*]furane.

- le signal singulet résonnant à δ_H 3.88 (6H, s, 2-OCH₃) correspondant à deux substituant méthoxyle.

-un système ABX, les signaux d'intégration 2H de chacun résonnant à δ_H 6.97 (d, $J = 1.7\text{ Hz}$, H-2/ H-2'), 6.79 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, H-5/ H-5') et 6.84 (dd, $J = 8.1/1.8\text{ Hz}$, H-6/ H-6') caractéristiques de deux cycles phényles 1, 3, 4-trisubstitués.

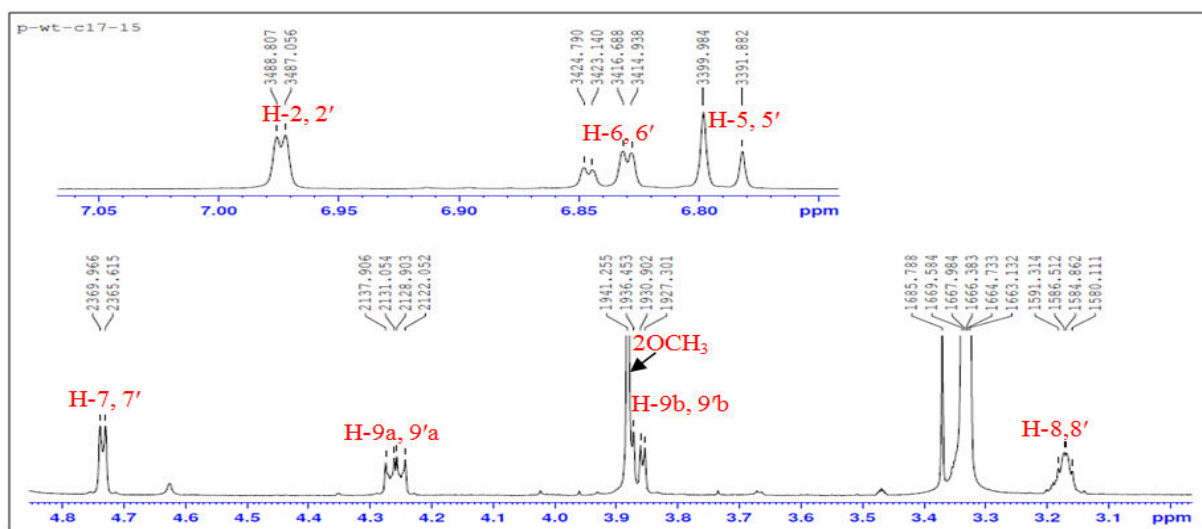


Figure 3.121 : Spectre RMN ¹H du composé **Pm3** (CD₃OD, 500 MHz)

Le spectre RMN ¹³C *J*-modulé (figure 3.122) est quasi similaire à celui du composé **Pm1**, toutefois la différence notable par rapport à la molécule **Pm3** apparaît au niveau de la partie aromatique où on trouve trois signaux résonnants à δ_C 111.0, 116.1 et 120.1 ppm, attribuables respectivement à C-2/2', C-5/5' et C-6/6'. Ce qui confirme que les cycles phényles sont substitués en position 1, 3 et 4.

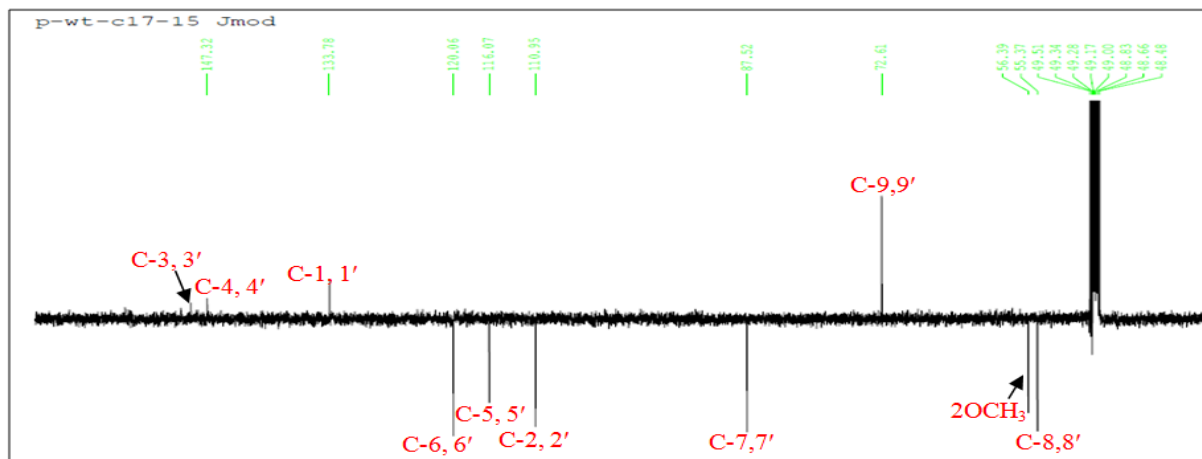


Figure 3.122 : Spectre RMN ¹³C *J*-modulé du composé **Pm3** (CD₃OD, 125 MHz)

Cette suggestion est confirmée d'une part, par le spectre COSY H-H (figure 3.123) qui montre des corrélations entre le proton H-2 avec H-6 et H-5 ainsi que le proton H-2' avec H-6' et H-5', et d'autre part par le spectre HMBC (figures 3.124, 3.125) qui montre des corrélations entre les protons H-2/2', H-5/5', H-6/6' avec les carbones C-7 et C-7' et aussi les groupements méthoxyles avec les carbones C-3 et C-3'.

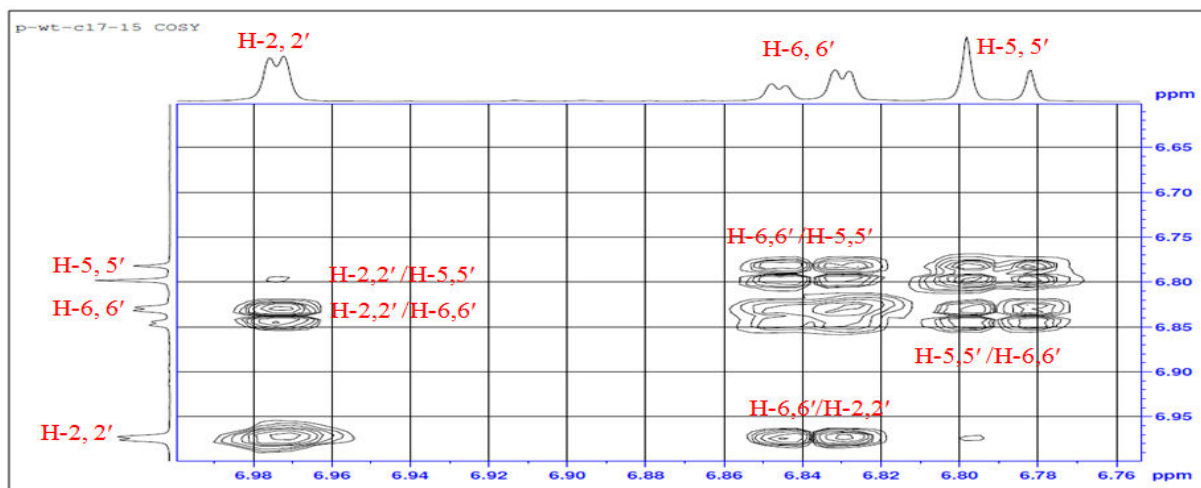


Figure 3.123 : Spectre COSY du composé Pm3

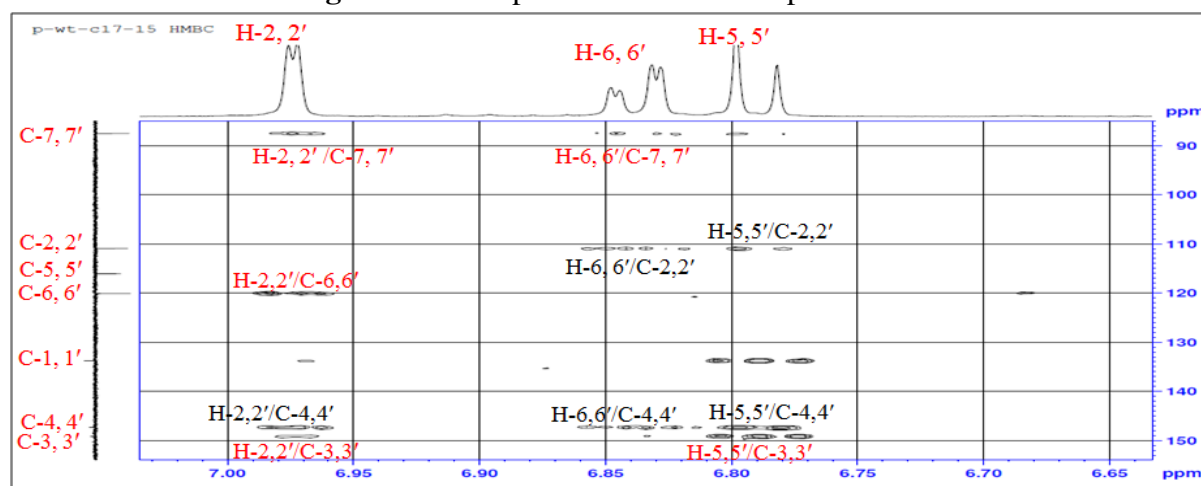


Figure 3.124 : Spectre HMBC du composé Pm3 (partie 6.63-7.05 ppm)

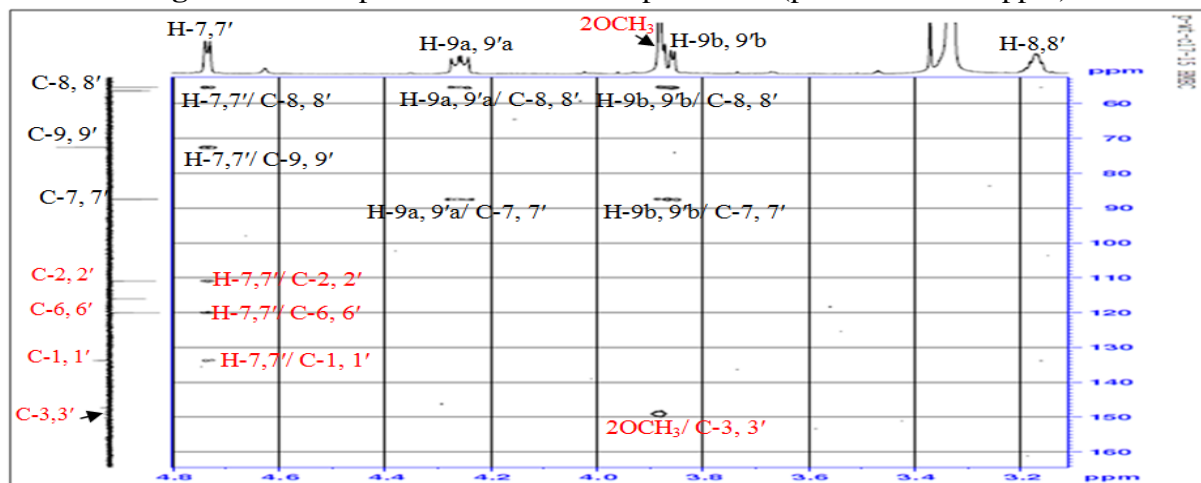
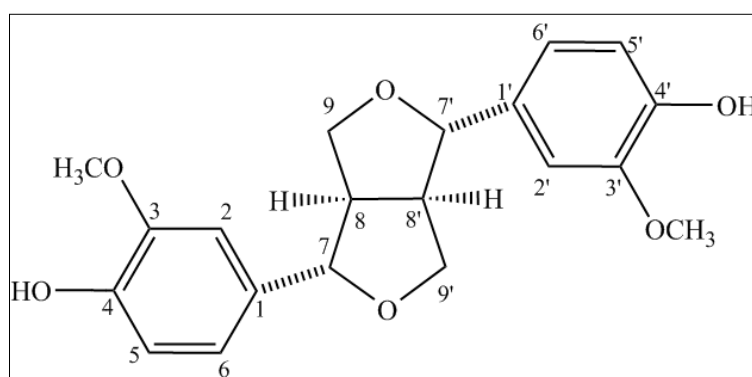


Figure 3.125 : Spectre HMBC du composé Pm3 (partie 3.10-4.80 ppm)

Tableau 3.18: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Pm3** dans CD_3OD (Xie et al., 2003).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	133.8	133.8	-	-
2	111.0	111.0	6.97 (1H, d, 1.8)	6.93 (1H, d, 1.7)
3	149.0	149.0	-	-
4	147.3	147.3	-	-
5	116.1	116.1	6.79 (1H, d, 8.1)	6.75 (1H, d, 8.0)
6	120.1	120.1	6.84 (1H, dd, 8.1/1.8)	6.79 (1H, dd, 8.0/1.7)
7	87.5	87.5	4.73 (1H, d, 4.3)	4.69 (1H, d, 4.4)
8	55.4	55.4	3.17 (1H, m)	3.12 (1H, m)
9	72.6	72.6	4.26 (1H, dd, 9.1/3.6) 3.86 (1H, dd, 9.1/6.8)	4.21 (1H, dd, 8.9/3.6) 3.83 (1H, dd, 8.9/6.8)
1'	133.8	133.8	-	-
2'	111.0	111.0	6.97 (1H, d, 1.8)	6.93 (1H, d, 1.7)
3'	149.0	149.0	-	-
4'	147.3	147.3	-	-
5'	116.1	116.1	6.79 (1H, d, 8.1)	6.75 (1H, d, 8.0)
6'	120.1	120.1	6.84 (1H, dd, 8.1/1.8)	6.79 (1H, dd, 8.0/1.7)
7'	87.5	87.5	4.73 (1H, d, 4.3)	4.69 (1H, d, 4.4)
8'	55.4	55.4	3.17 (1H, m)	3.12 (1H, m)
9'	72.6	72.6	4.26 (1H, dd, 9.1/3.6) 3.86 (1H, dd, 9.1/6.8)	4.21 (1H, dd, 8.9/3.6) 3.83 (1H, dd, 8.9/6.8)
3-OCH ₃	56.4	56.4	3.88 (1H, s)	3.84 (1H, s)
3'-OCH ₃	56.4	56.4	3.88 (1H, s)	3.84 (1H, s)

L'analyse des spectres de RMN ^1H , ^{13}C , (tableau 3.18) COSY, HMBC de **Pm3** montre que ce composé est identique au lignane **Pinoresinol** (Xie et al., 2003).



Pinoresinol (**Pm3**)

II. 4. Elucidation Structurale de Pm4

Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-MS-ESI (figure 3.126) montre un ion pseudo moléculaire à $m/z = 369.0579$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculé 369.0579) qui correspond à la formule brute $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_8$.

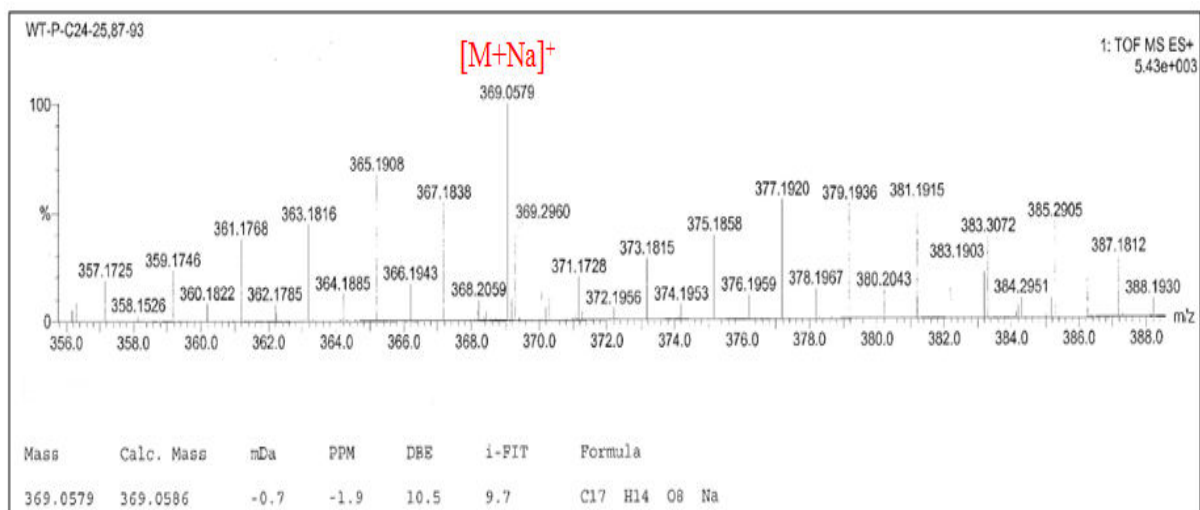


Figure 3.126 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé **Pm4**

Le spectre RMN ^1H (figure 3.127), enregistré dans CD_3OD , du composé **Pm4** permet d'observer :

- Un système ABX : deux doublets à $\delta_{\text{H}} = 7.65$ ppm ($J = 1.8\text{Hz}$), $\delta_{\text{H}} = 6.92$ ppm ($J = 8.4$ Hz) et un doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 7.55$ ppm ($J = 8.4/1.8\text{Hz}$) d'intégration 1H chacun attribuables successivement aux protons aromatiques H-2', H-5' et H-6' du cycle aromatique B et indiquant la trisubstitution en position 1', 3' et 4'.
- Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6.50$ ppm attribuable soit à H-6 soit à H-8 indiquant la présence de 2^{ème} noyau aromatique A est substitué pentasubstitué.
- On observe aussi deux singulets d'intégration 3H chacun à $\delta_{\text{H}} = 3.80, 3.90$ ppm correspondant aux deux groupements méthoxyles.

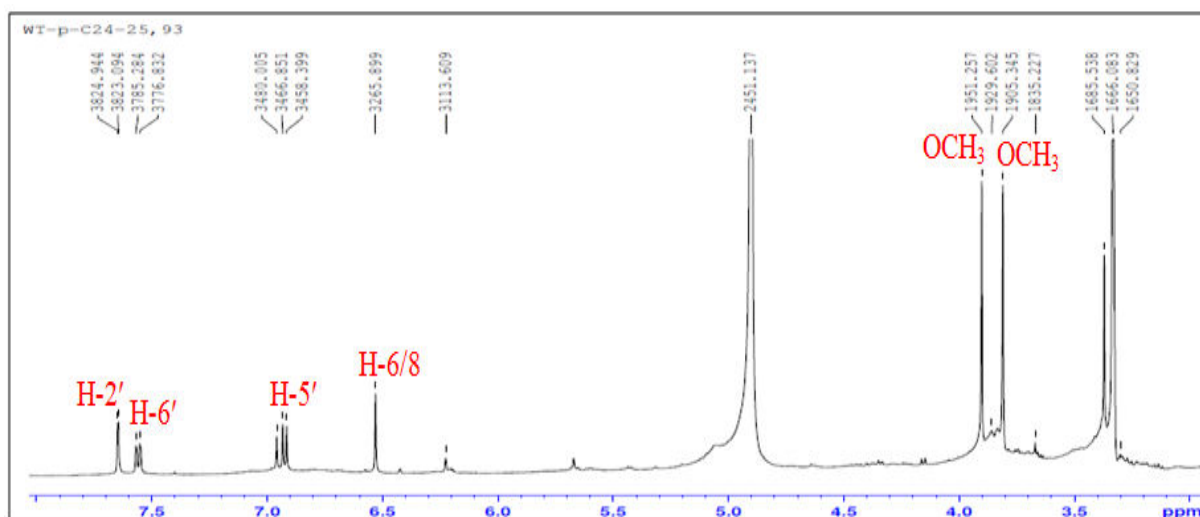


Figure 3.127 : Spectre RMN ^1H du composé **Pm4** (CD_3OD , 500 MHz)

L'analyse des spectres COSY H-H (figure 3.128) montre des corrélations entre les protons H-2' avec H-5' et H-6' confirmant le couplage entre les protons du cycle B.

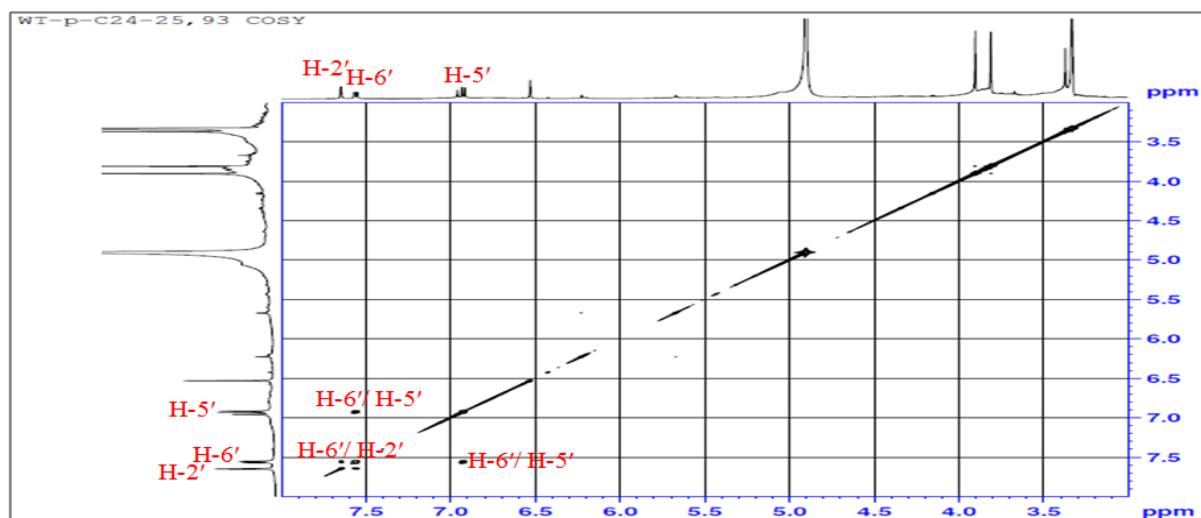


Figure 3.128 : Spectre COSY du composé **Pm4**

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 3.129) montre la présence de 17 atomes de carbones dont deux sont méthoxyles indiquant une structure d'un flavonoïde substitué par deux méthoxyles.

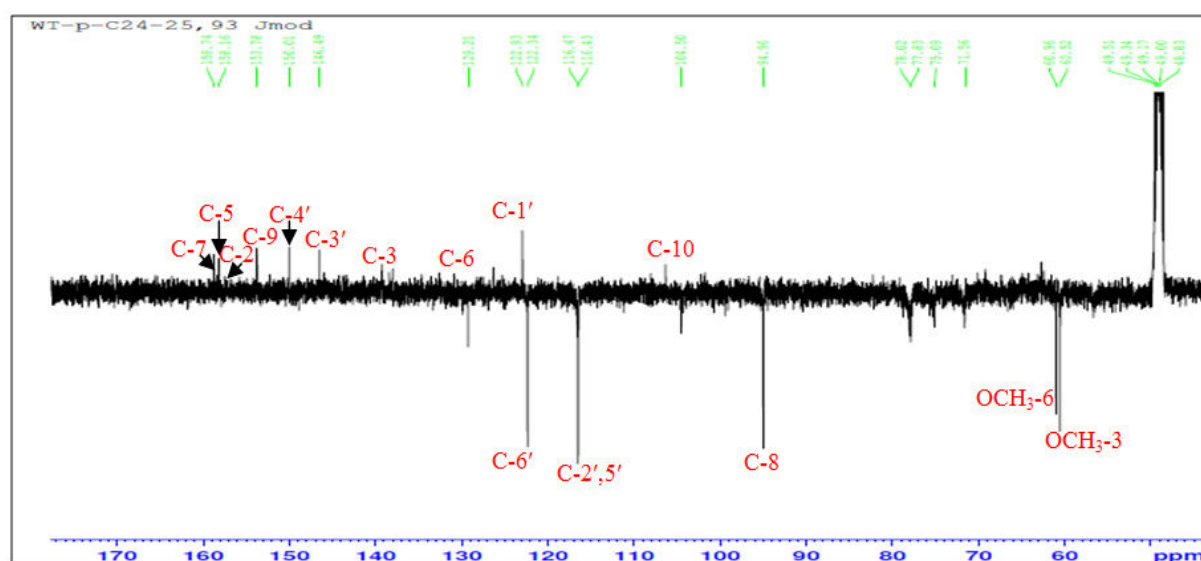


Figure 3.129 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **Pm4** (CD_3OD , 125 MHz)

L'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (figure 3.130) permet d'attribuer chaque proton au carbone qui le porte : le proton résonant à $\delta_{\text{H}} = 6.50$ ppm correspond au carbone résonant à $\delta_{\text{C}} = 95$ ppm indiquant ainsi qu'il est en position C-8 du cycle A (Horie et al., 1998)

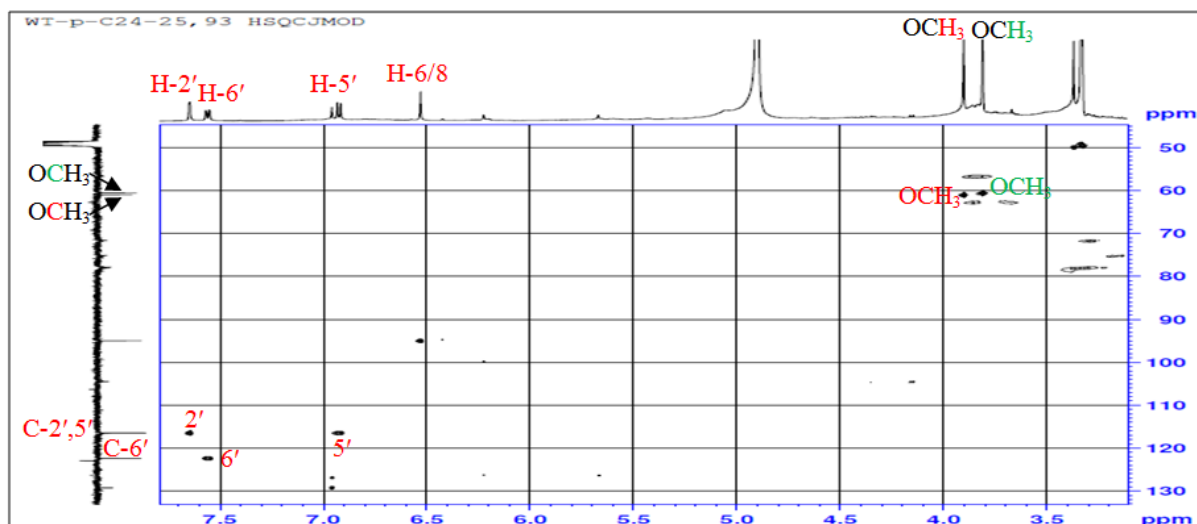


Figure 3.130 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Pm4**

Sur le spectre HMBC (figure 3.131), la corrélation entre les protons du méthoxy à $\delta_H = 3.90$ ppm avec le carbone résonant à $\delta_C = 132.0$ ppm indique que celui-ci est substitué par un méthoxy et sa corrélation avec le proton H-8 permet sa localisation en C-6 car si le méthoxy était substitué en C-7 son déplacement chimique aurait été plus déblindé (Horie et al., 1998).

Le carbone oxygéné à $\delta_C = 146.5$ ppm est attribué à C-3' par ces corrélations sur le spectre HMBC avec les protons H-2', H-5'. De la même manière le carbone C-4' ($\delta_C = 150.0$ ppm) est attribué par ces corrélations avec les protons H-2', H-6' et H-5'.

Les carbones C-5, C-7 étant déblindés, les protons du méthoxy résonnant à $\delta_H = 3.81$ ppm et qui corrélerent avec le carbone à $\delta_C = 139.0$ ppm ne pourraient être localisés qu'en position C-3.

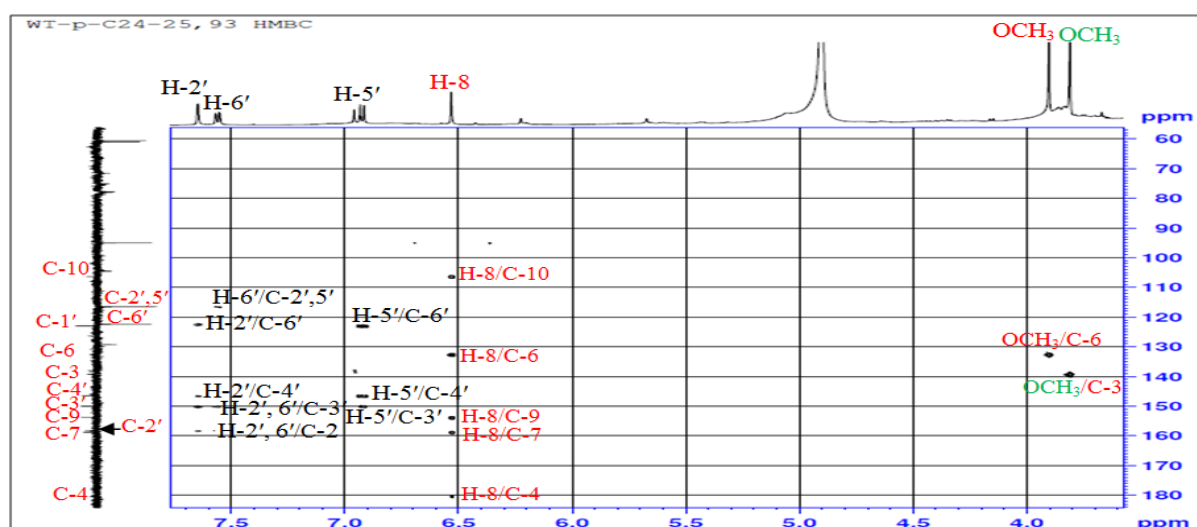


Figure 3.131 : Spectre HMBC du composé **Pm4**

Cette dernière suggestion est bien confirmée sur le spectre NOESY (figure 3.132) où on peut observer des corrélations entre le méthoxyle résonnant à $\delta_H = 3.81$ ppm attaché sur le carbone C-3 et les carbones C-2' et C-6' du cycle B du flavonoïde.

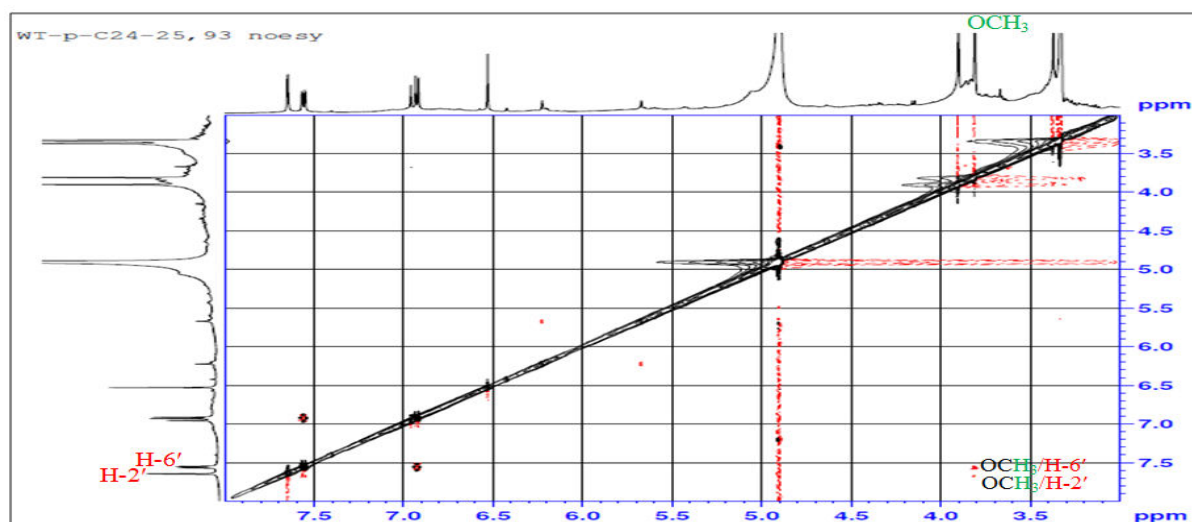


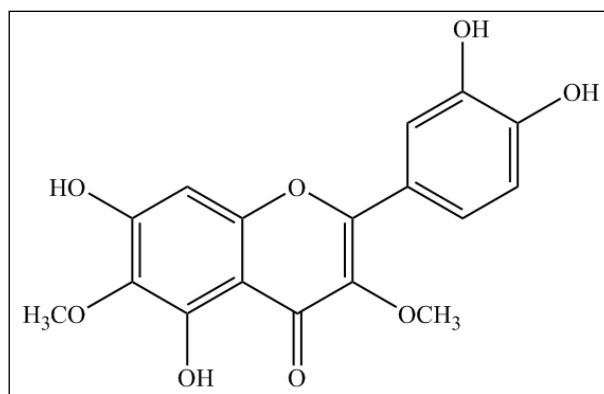
Figure 3.132 : Spectre NOESY du composé **Pm4**

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones sont dressées dans le tableau 3.19.

Tableau 3.19: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Pm4** dans CD_3OD (Mohamed 2016).

N°	δ_C ppm	δ_C ppm réf	δ_H ppm (m, J Hz)	δ_H ppm (m, J Hz) réf
2	157.1	147.7	-	-
3	139.0	135.4	-	-
4	180.9	176.0	-	-
5	153.8	151.7	-	-
6	132.0	130.8	-	-
7	158.7	157.2	-	-
8	95.0	93.6	6.50 (1H, s)	6.52 (1H, s)
9	153.8	151.3	-	-
10	104.5	103.3	-	-
1'	122.9	121.9	-	-
2'	116.4	115.0	7.65 (1H, d, 1.8)	6.67 (1H, d, 1.5)
3'	146.5	146.9	-	-
4'	150.0	145.0	-	-
5'	116.5	115.5	6.92 (1H, d, 8.4)	6.88 (1H, d, 8.5)
6'	122.3	120.0	7.55 (1H, dd, 8.4/1.8)	7.55 (1H, dd, 8.5/1.5)
3-OCH ₃	60.5	60.0	3.81 (1H, s)	3.76 (1H, s)
6-OCH ₃	61.0	62.9	3.90 (1H, s)	3.96 (1H, s)

Toutes ces données mènent à la structure de : l'**axillarine (Quercétagetin-3,6-diméthyl ether)** (Mohamed 2016).



Axillarine (Quercétagein-3,6-diméthyl ether) (**Pm4**)

II. 5. Elucidation Structurale de Pm5

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure 3.133) montre deux ions pseudo-moléculaires $m/z = 353.0632$ correspondant à $[M+Na]^+$ et $m/z = 331.0848$ correspondant à $[M+H]^+$ donnant la formule brute $C_{17}H_{14}O_7$.

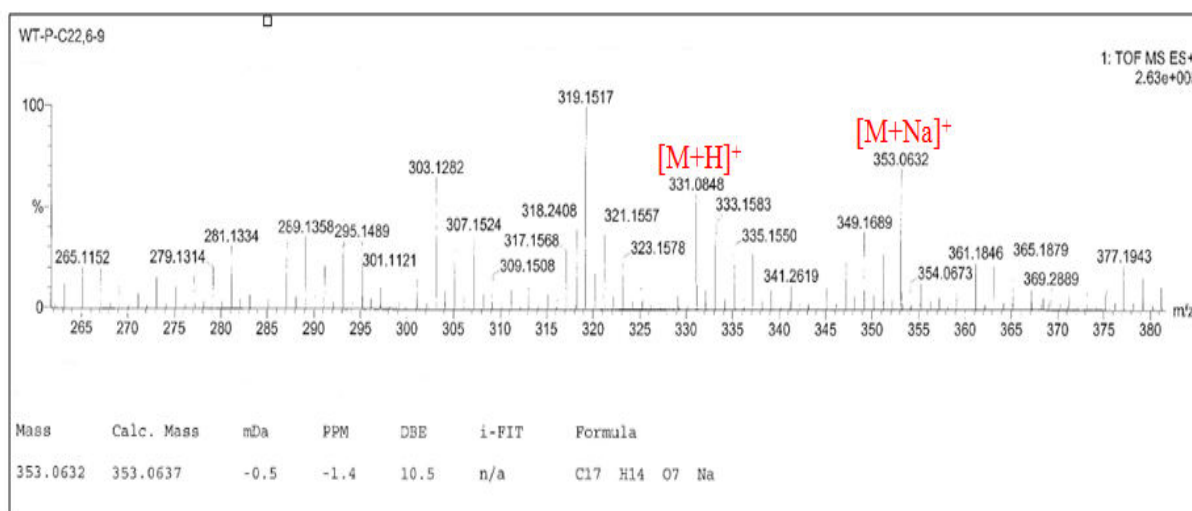


Figure 3.133 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé **Pm5**

L'examen des spectres RMN 1H (figure 3.134) et RMN ^{13}C J -modulé (figure 3.135) du composé Pm5 montre les mêmes signaux présentés dans les spectres du composé Pm4, à savoir trois singulet à $\delta_H = 6.54$ ppm, $\delta_H = 3.80$ ppm et $\delta_H = 3.90$ ppm attribués à H-8, 6-OCH₃ et 3-OCH₃ respectivement, et à la place d'un système ABX un système A₂X₂ qui est caractérisé par les doublets à $\delta_H = 8.01$ ppm et $\delta_H = 6.95$ ppm ($J = 9.1$ Hz) d'intégration 2H chacun sont attribuables à H-2',6' et H-3',5' respectivement. Cela indique que le noyau B est substitué en position 4'.

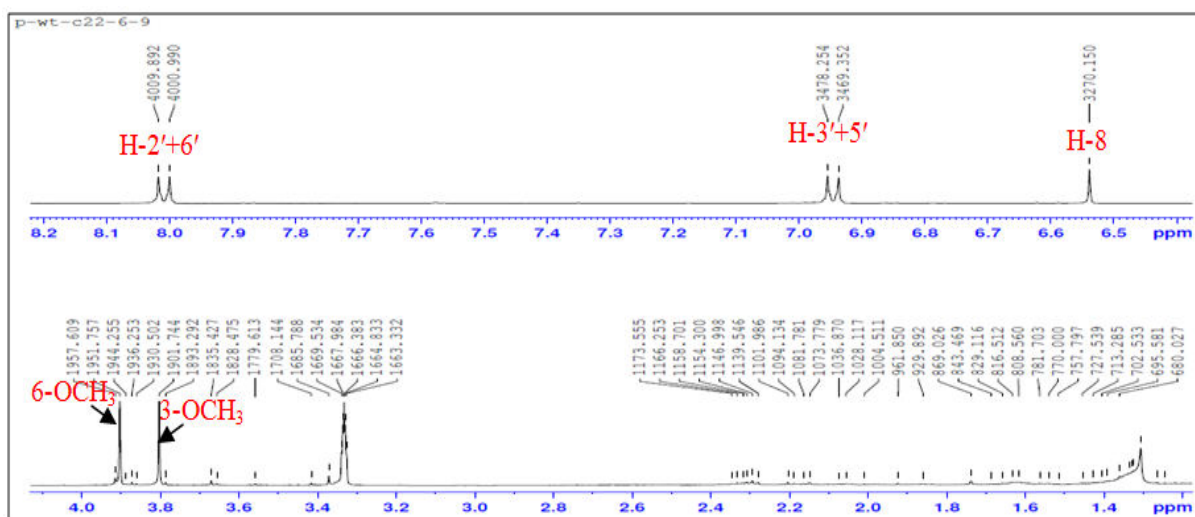


Figure 3.134 : Spectre RMN ^1H du composé **Pm5** (CD_3OD , 500 MHz)

D'une façon analogue le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 3.135) du composé **Pm5** montre des signaux ayant des déplacements chimiques similaires à ceux du composé **Pm4** excepté les signaux relatifs au système A_2X_2 et celui du carbone C-4' qui apparaît à un champ plus déblindé ($\delta_{\text{C}} = 161.8$ ppm).

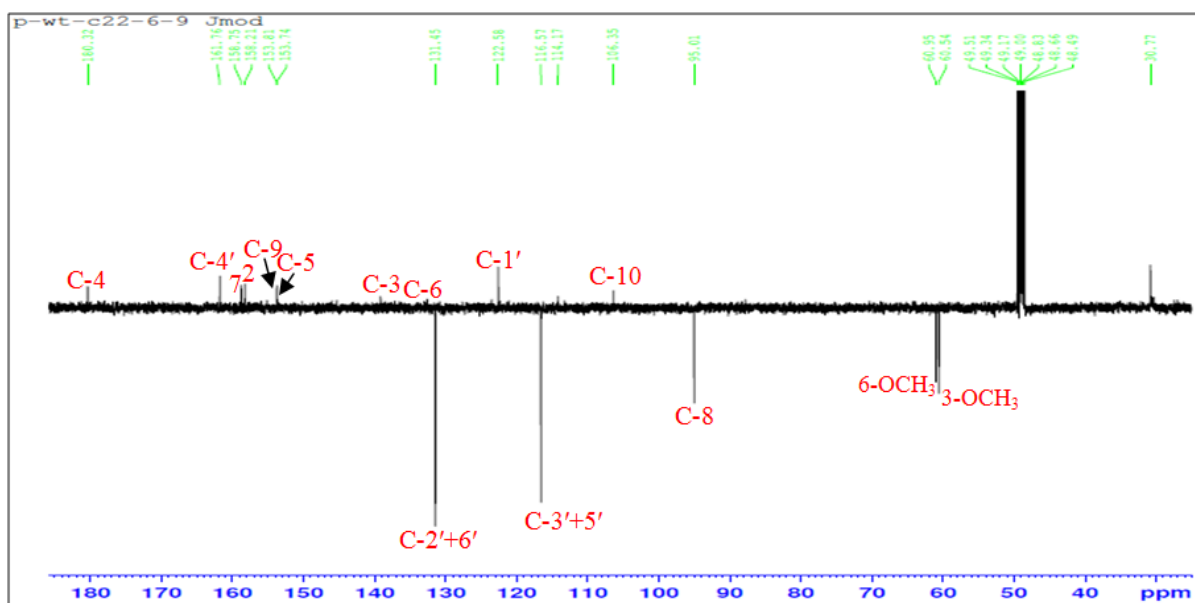


Figure 3.135 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **Pm5** (CD_3OD , 125 MHz)

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse combinée des corrélations hétéronucléaires HSQC (figure 3.136) et HMBC (figure 3.137).

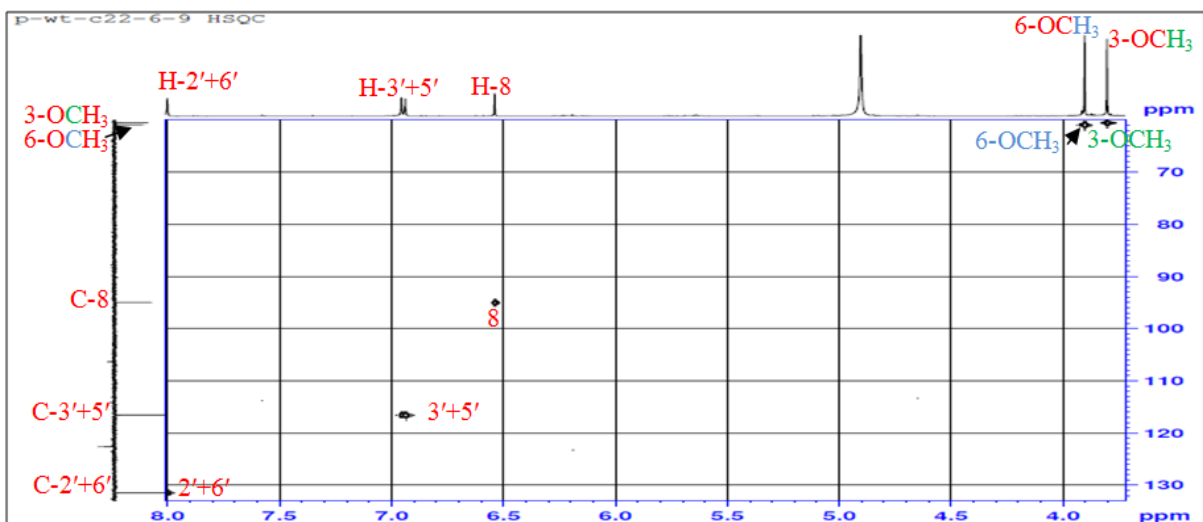


Figure 3.136 : Spectre HSQC du composé **Pm5**

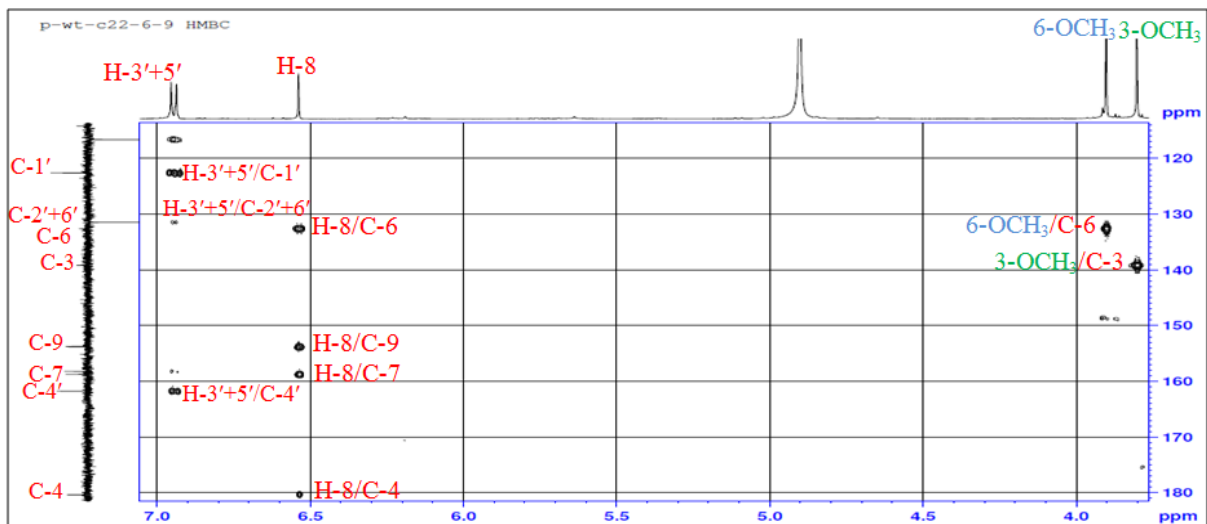
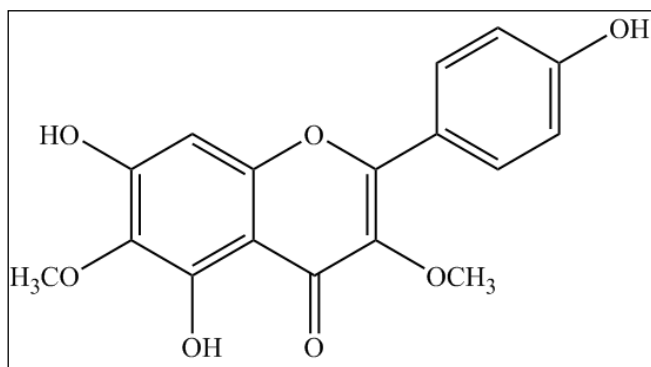


Figure 3.137 : Spectre HMBC du composé **Pm5**

Ces données permettent d'attribuer sans ambiguïté au composé **Pm5** la structure connue de: **galetin-3,6-dimethyl ether (5, 7, 4',-Trihydroxy-3,6-dimethoxyflavone)** (Dillon & Mabry, 1977).



galeitin-3,6-dimethyl ether (**Pm5**)

Tableau 3.20 : Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Pm5** dans CD_3OD (Van Heerden et al., 2000).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
2	158.2	161.8	-	-
3	139.3	139.2	-	-
4	180.3	180.4	-	-
5	153.7	158.2	-	-
6	132.8	132.6	-	-
7	158.7	158.7	-	-
8	95.0	95.1	6.54 (1H, s)	6.45 (1H, s)
9	153.8	153.8	-	-
10	106.3	106.4	-	-
1'	122.6	122.7	-	-
2'	131.4	131.5	8.01 (1H, d, 9.1)	7.90 (1H, d, 9.0)
3'	116.6	116.6	6.95 (1H, d, 9.1)	6.88 (1H, d, 9.0)
4'	161.8	153.7	-	-
5'	116.6	116.6	6.95 (1H, d, 9.1)	6.88 (1H, d, 9.0)
6'	131.4	131.5	8.01 (1H, d, 9.1)	7.90 (1H, d, 9.0)
3OCH ₃	60.5	60.0	3.80 (1H, s)	3.75 (1H, s)
6-OCH ₃	60.9	62.9	3.90 (1H, s)	3.86 (1H, s)

II. 6. Elucidation Structurale de Pm6

Le spectre de masse haute résolution obtenu par HR-MS-ESI (figure 3.138) montre un ion pseudo moléculaire à $m/z = 501.1$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ qui correspond à la formule brute $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$.

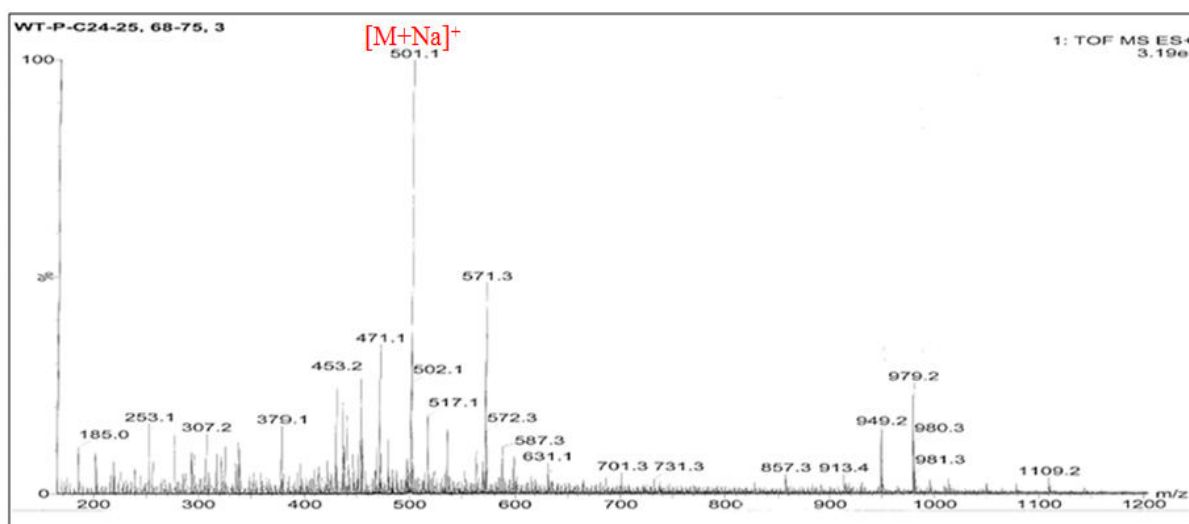


Figure 3.138 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé **Pm6**

Une grande similitude est observée entre les spectres RMN ^1H (figure 3.139) du composé **Pm6** et ceux du composé **Pm5**. On retrouve tous les signaux caractéristiques du composé **Pm5** : les deux doublets des (H-3'+5') et (H-2'+6') à $\delta_{\text{H}} = 6.90$ ppm ($J = 8.8$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 8.09$ ppm ($J = 8.8$ Hz) respectivement, le singulet d'intégration 1H attribuable à H-8 résonnant à $\delta_{\text{H}} = 6.55$ ppm et le singulet d'intégration 3H du groupement méthoxyle à $\delta_{\text{H}} = 3.91$ ppm. La

différence réside en la disparition d'un groupement méthoxyle résonnant à $\delta_H = 3.80\text{ppm}$ sur le spectre du composé Pm5 qui est attaché en position 3 du cycle C, ainsi que l'apparition d'un doublet d'intégration 1H à $\delta_H = 5.31\text{ ppm}$ ($J=7.2\text{Hz}$), et des signaux dans l'intervalle $\delta_H = 3.22\text{-}3.72\text{ ppm}$ indiquant la présence d'une partie osidique. Cela indique que le cycle C du composé Pm6 est substitué en position 3 par une unité osidique. L'analyse des spectres COSY (figure 3.140) et HSQC (figure 3.141), a permis de mettre en évidence la présence de sept protons d'un hexose ainsi que les constantes de couplages vicinaux mesurées à partir du spectre RMN ^1H étalé, qui sont toutes supérieures à 7Hz.

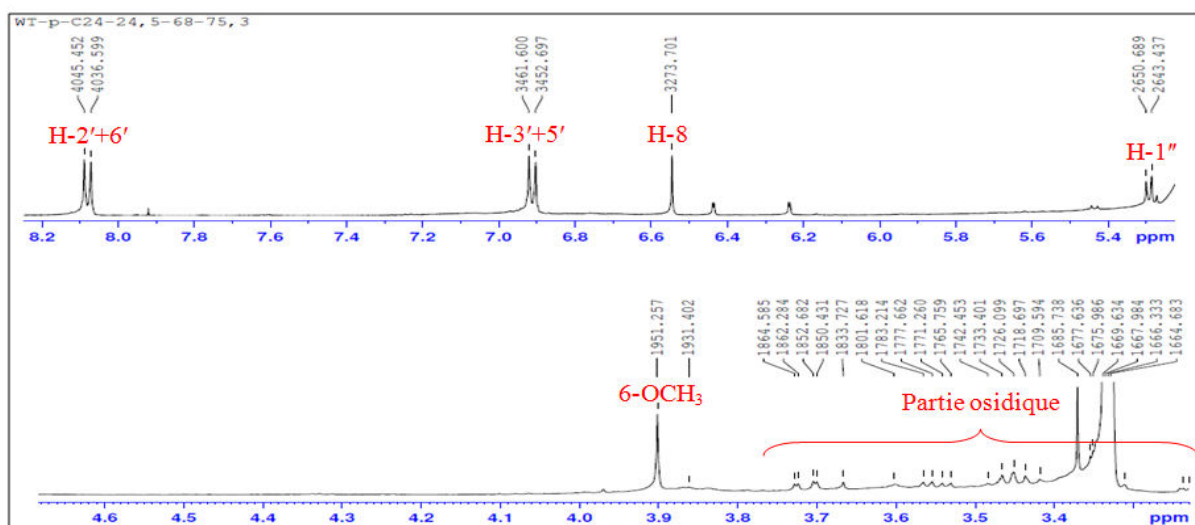


Figure 3.139 : Spectre RMN ^1H du composé Pm6 (CD_3OD , 500 MHz)

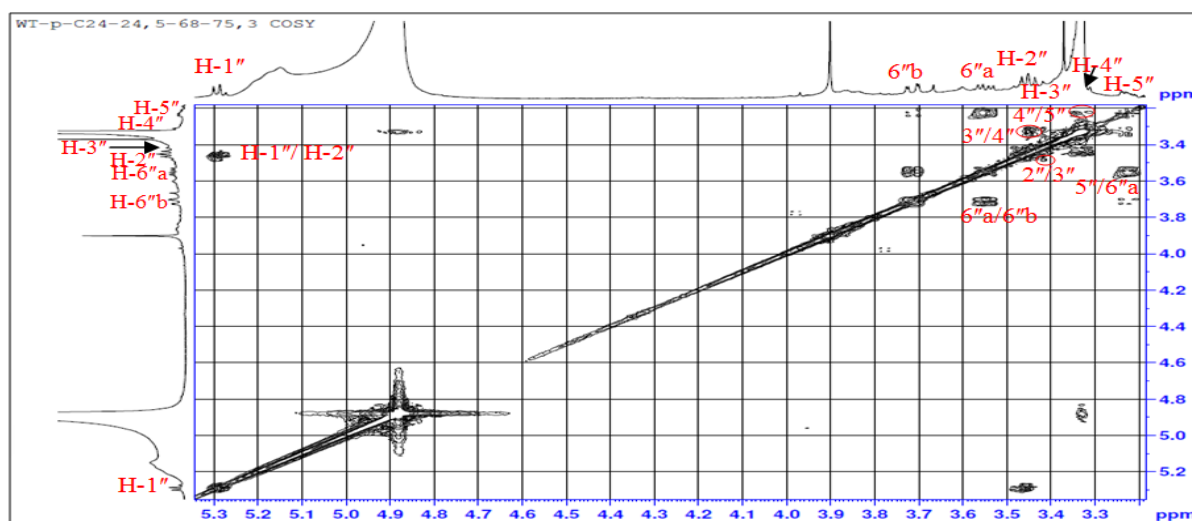


Figure 3.140 : Spectre COSY du composé Pm6

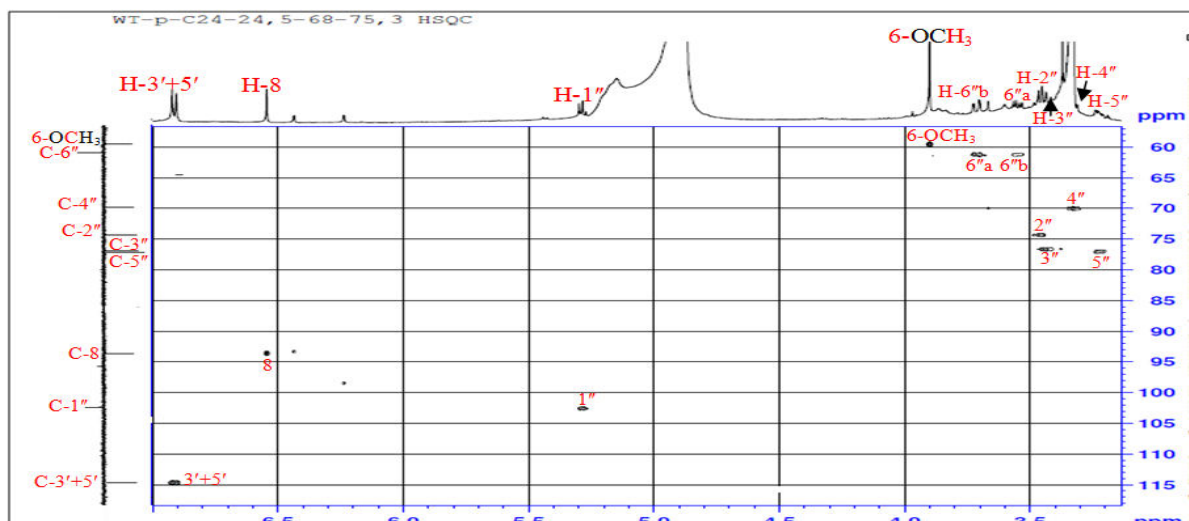


Figure 3.141 : Spectre HSQC du composé **Pm6**

L'expérience du spectre HMBC (figure 3.142) montre une corrélation $^3J_{H-C}$ entre le proton anomérique ($\delta_H = 5.31$ ppm) et le carbone C-3 ($\delta_C = 133.5$ ppm), ce qui confirme l'attachement du glucose à ce carbone C-3. L'ensemble des résultats est répertorié dans le tableau 3.21.

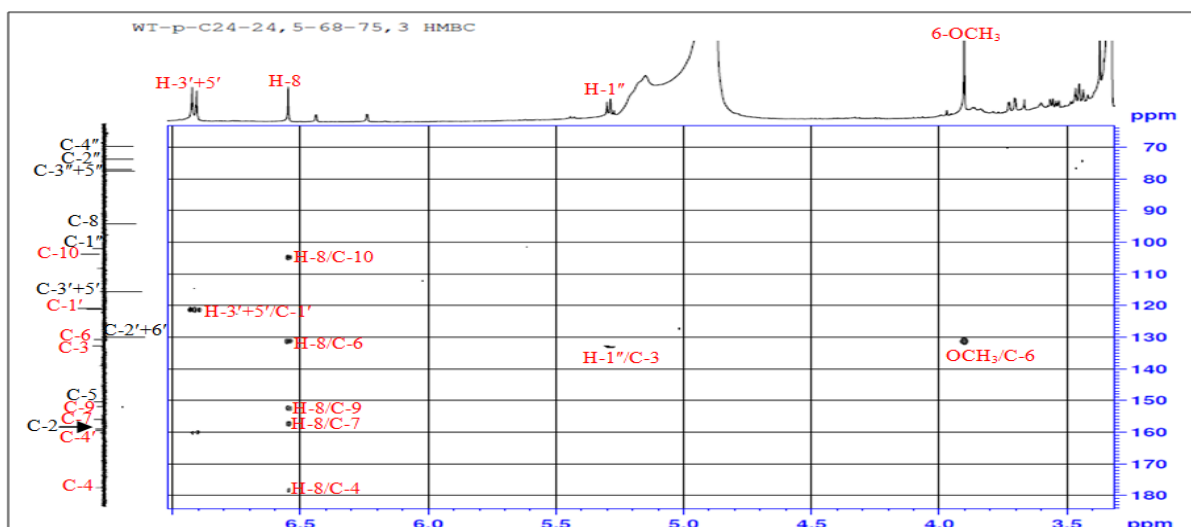
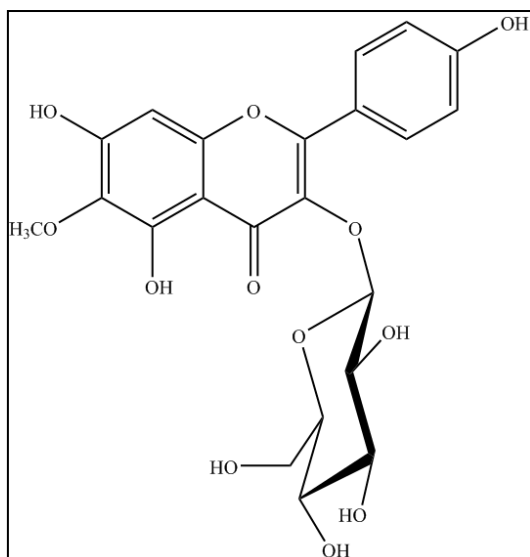


Figure 3.142 : Spectre HMBC du composé **Pm6**

Par conséquent le composé **Pm6** est identifié comme étant : **6-methoxykaemférol-3-O- β -D-glucopyranoside** isolé déjà de l'espèce *Paepalanthus macropodus* (Eriocaulaceae) (De Andrade et al., 2002).



6-methoxykaempférol-3-O- β -D-glucopyranoside (**Pm6**)

Tableau 3.21: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Pm6** dans CD_3OD (Pereira do Amaral et al., 2012).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
2	161.0	160.1	-	-
3	133.4	133.6	-	-
4	179.1	178.0	-	-
5	150.1	150.0	-	-
6	131.0	131.0	-	-
7	158.0	157.1	-	-
8	93.8	94.9	6.55 (1H, s)	6.32 (1H, s)
9	152.0	152.0	-	-
10	104.1	104.6	-	-
1'	121.1	121.0	-	-
2'	131.4	132.1	8.09 (1H, d, 8.8)	8.11 (1H, d, 8.6)
3'	114.8	115.8	6.91 (1H, d, 8.8)	6.80 (1H, d, 8.6)
4'	160.0	157.1	-	-
5'	114.8	115.8	6.91 (1H, d, 8.8)	6.80 (1H, d, 8.6)
6'	131.4	132.1	8.09 (1H, d, 8.8)	8.11 (1H, d, 8.6)
6-OCH ₃	59.5	60.7	3.91 (1H, s)	3.87 (1H, s)
1''	102.5	103.1	5.31 (1H, d, 7.2)	5.33 (1H, d, 8.8)
2''	74.3	75.4	3.46 (1H, m)	3.54 (1H, dd, 8.8/9.0)
3''	76.8	77.4	3.43 (1H, m)	3.46 (1H, dd, 9.0/9.0)
4''	70.0	71.5	3.32 (1H, m)	3.15 (1H, dd, 9.0/9.0)
5''	77.0	76.1	3.22 (1H, m)	3.26 (1H, m)
6''	61.1	65.5	3.55 (1H, dd, 11.8/5.5) 3.71 (1H, dd, 11.8/2.2)	3.95 (1H, dd, 12.0/2.5) 4.41 (1H, dd, 12.0/2.5)

II. 7. Elucidation Structurale de Pm7

La formule moléculaire brute $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$ du composé a été déduite à partir du spectre de masse haute résolution HR-MS-ESI (figure 3.143). Il montre en effet un pic de l'ion

pseudomoléculaire à $m/z = 285.1$ $[M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire égale à 262 *uma*.

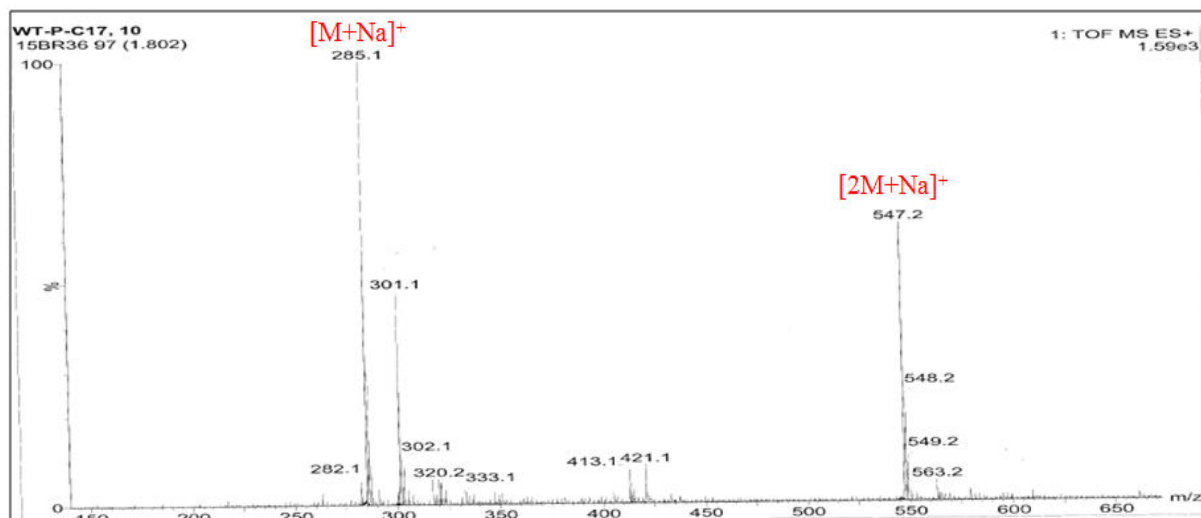


Figure 3.143 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé **Pm7**

L'étude du spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 3.144) de ce composé montre la présence de 15 atomes de carbone :

- 3 groupements carbonyles résonant à $\delta_C = 212.4, 207.3$ et 170.1 ppm.
- 4 carbones oléfiniques dont un méthylénique résonant à $\delta_C = 177.0, 139.9, 137.3$ et 123.9 ppm.
- Un carbone oxygéné résonant à $\delta_C = 80.3$ ppm.
- 4 groupements CH_2 résonant à $\delta_C = 28.6, 32.8, 35.2,$ et 49.4 ppm
- 2 groupements CH_3 résonant à $\delta_C = 17.7$ et 30.4 ppm
- Un méthyne CH résonant à $\delta_C = 43.9$ ppm

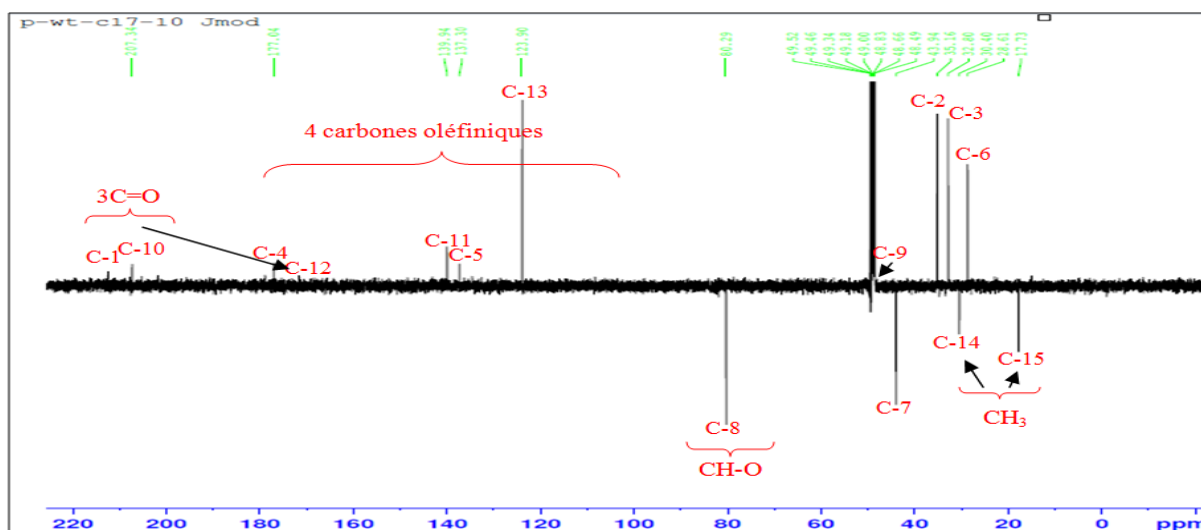


Figure 3.144 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **Pm7** (CD_3OD , 125 MHz)

Ces observations permettent de recenser 18 atomes d'hydrogène. On remarque d'après l'analyse du spectre RMN ^1H (figure 3.145):

- deux doublets d'intégration 1H chacun résonnant à $\delta_{\text{H}} = 5.69$ et 6.20 ppm ($J = 2.4\text{Hz}$) attribuable à un méthylène exocyclique.
- un multiplet à $\delta_{\text{H}} = 4.64$ ppm d'intégration 1H attribuable à un CH oxygéné.
- deux doublets de doublet d'intégration 1H chacun résonnant à $\delta_{\text{H}} = 2.73$ et 2.87 ppm ($J = 17.4/5.9$ Hz) attribuable à un $\text{CH}_2\text{-CO}$
- 2 singulets d'intégrations 3H chacun résonnant à $\delta_{\text{H}} = 2.14$, 2.16 ppm attribuables aux deux groupements méthyles.
- des multiplets entre $\delta_{\text{H}} = 2.40$ et 3.06 ppm attribuables à un CH et trois CH_2 .

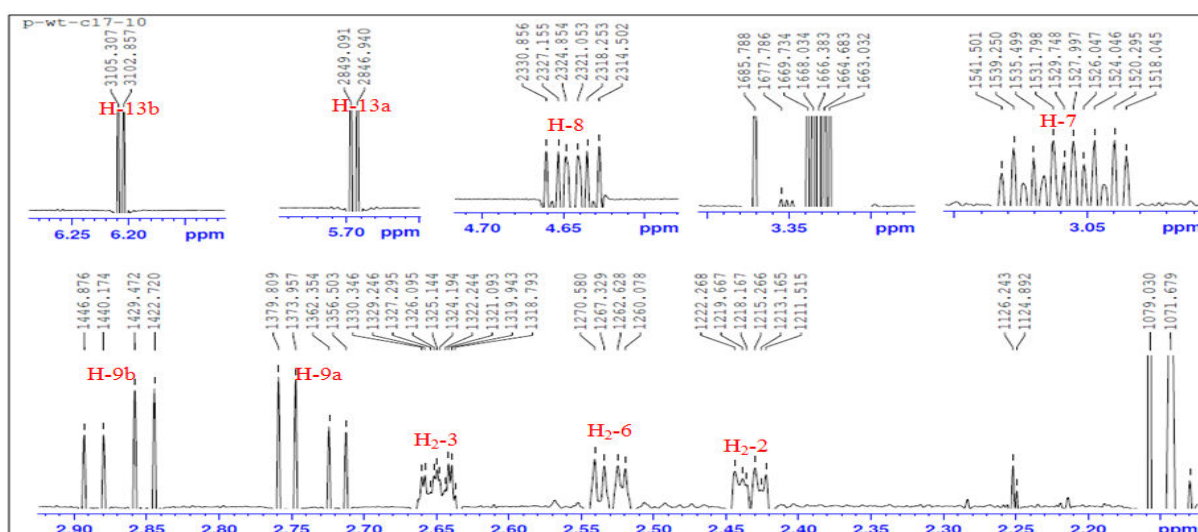


Figure 3.145 : Spectre RMN ^1H du composé **Pm7** (CD_3OD , 500 MHz)

L'analyse du spectre HSQC J -modulé (figure 3.146) permet de corréler chaque carbone à son proton correspondant.

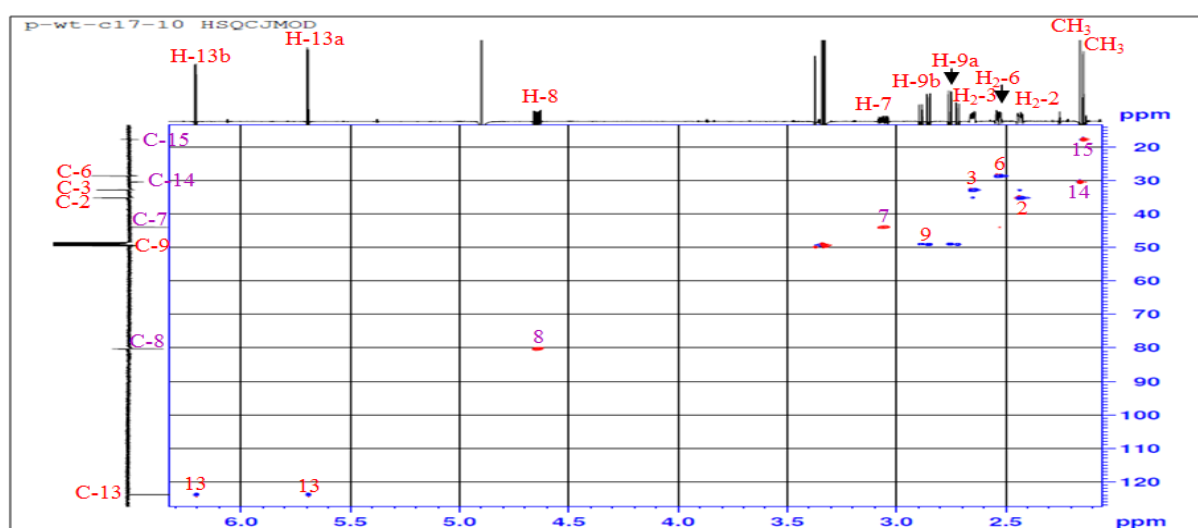


Figure 3.146 : Spectre HSQC J -modulé du composé **Pm7**

Toutes les données mentionnées ci-dessus suggèrent que ce composé pourrait être un **Séco-guaianolide**.

La présence du groupement (**α -méthylène- γ -lactone**) est confirmée par l'apparition d'une paire de doublets déblindés à (5.69 ppm, d, 2.4 Hz) et (6.20 ppm, d, 2.4 Hz), et aussi un signal attribué au proton lactonique à 4.64 ppm (ddd, 8.9 Hz ; 6.5 Hz et 3.7 Hz). Ces derniers avec le proton résonnant à 3.06 ppm indiquant qu'il s'agit d'une structure **1, 10-secoguaianolide** (Huneck et al., 1986 ; Zan et al., 2012).

Pour confirmer cette proposition, les corrélations COSY (H-H) et HMBC (C-H) ont été analysées.

L'examen du spectre COSY (figure 3.147, 3.148) révèle deux séquences de couplage, la première est déterminée par des corrélations à partir de H₂-6 jusqu'à H₂-9 suggérant que le proton H-7 résonnant à 3.06 ppm corrèle avec H₂-6 (2.53 ppm), H-8 (4.64 ppm) et les protons du groupement éthylénique CH₂-13 (5.69 et 6.20 ppm) alors que la seconde est définie par les corrélations entre les protons H₂-2 (2.43 ppm) et H₂-3 (2.65 ppm) avec CH₃-15 (2.14 ppm).

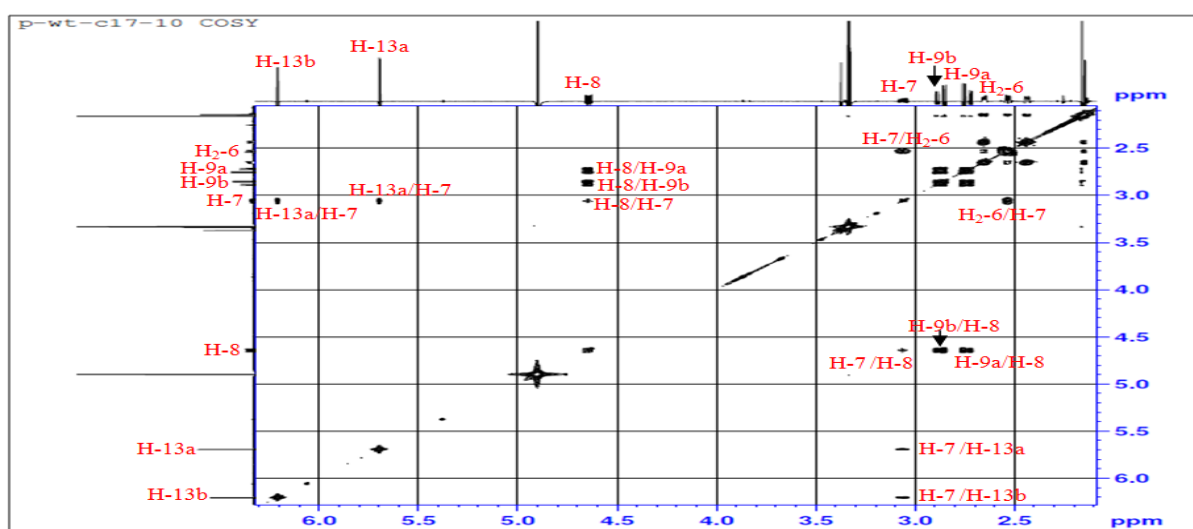
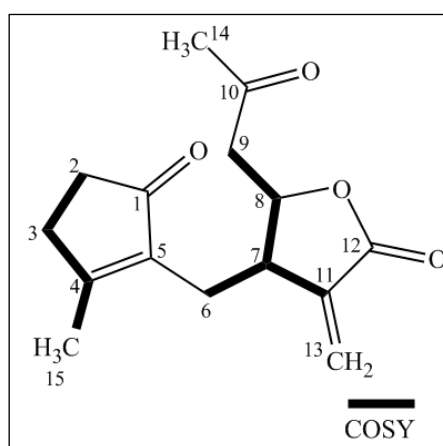


Figure 3.147 : Spectre COSY du composé **Pm7** (séquence 1)



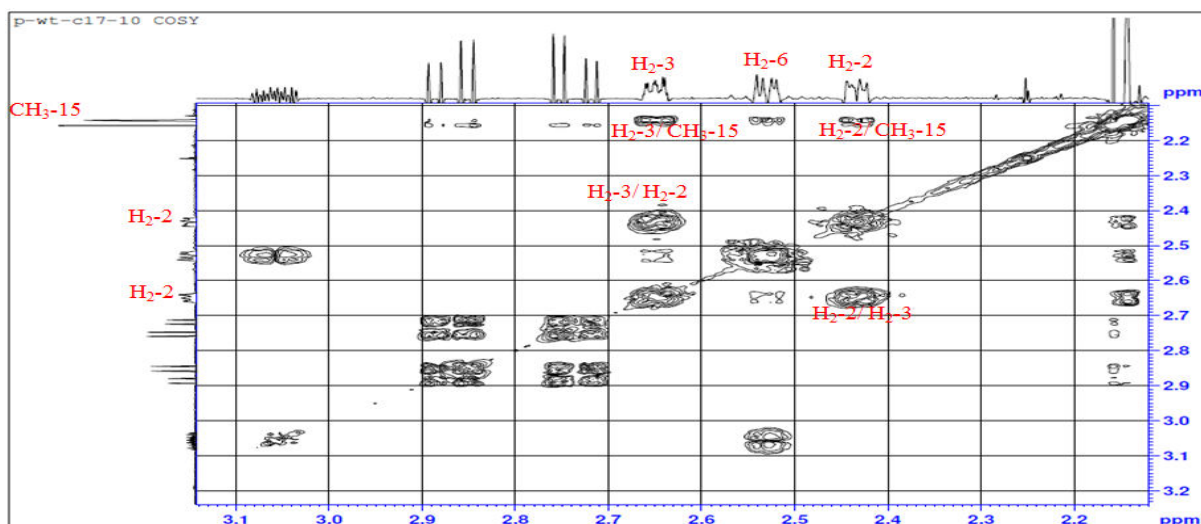
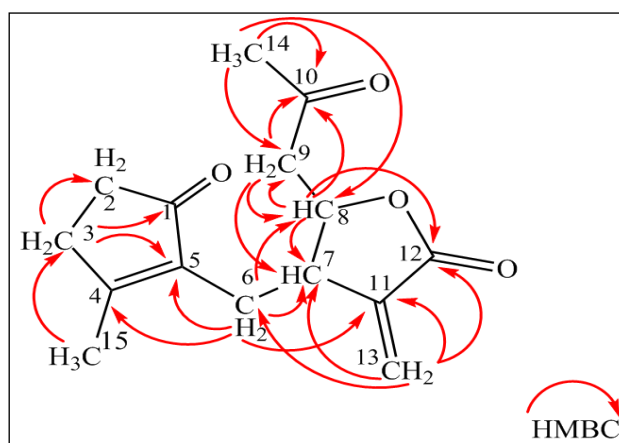


Figure 3.148 : Spectre COSY du composé **Pm7** (séquence 2)

L'examen du spectre HMBC (figures 3.149, 3.150) confirme toutes ces suggestions, on observe :

- des tâches de corrélations entre les protons de méthyle CH₃-15 (2.14ppm) et les carbones C-5 (137.3 ppm), C-3 (32.8 ppm) et le groupement carbonyle C-1 (212.2 ppm).
- une corrélation entre les protons H₂-3 et le carbonyle (C-1).
- des corrélations entre les protons H₂-6 et les carbones C-1, C-4(177.0ppm), C-5, C-7 (43.9 ppm), C-8 (80.3 ppm) et C-11 (139.9 ppm), ces trois derniers carbones montrent ainsi des corrélations avec les protons H₂-9.
- les protons du méthylène exocyclique H₂-13 montrent des corrélations avec C-6 (28.6 ppm), C-7, C-11 et le carbonyle C-12 (170.1 ppm).
- les protons du second méthyle CH₃-14 (2.16 ppm) corrélient avec C-10 (207.3 ppm), C-9 (49.4 ppm) et C-8.



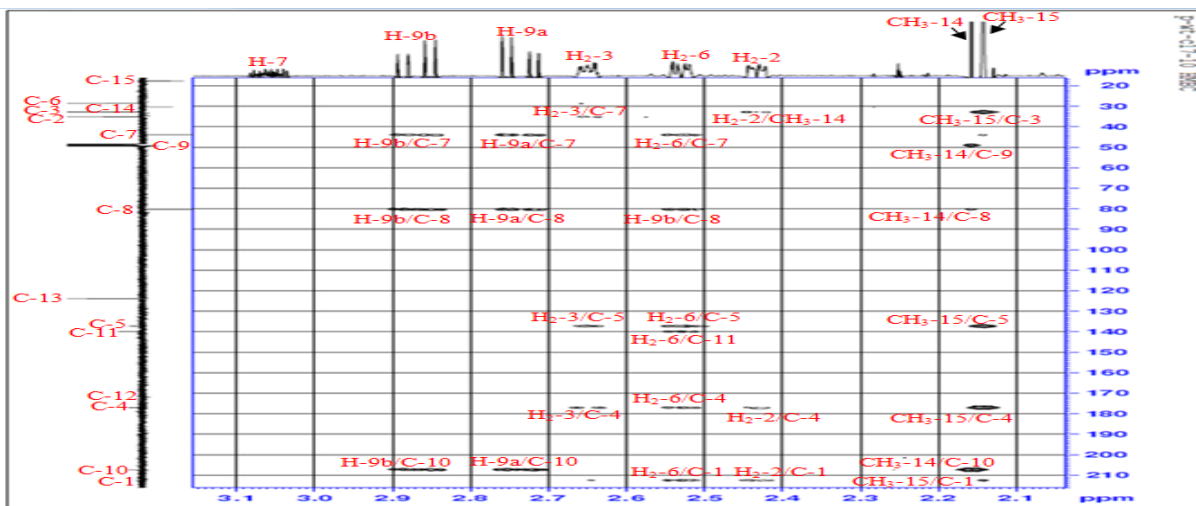


Figure 3.149 : Spectre HMBC du composé Pm7

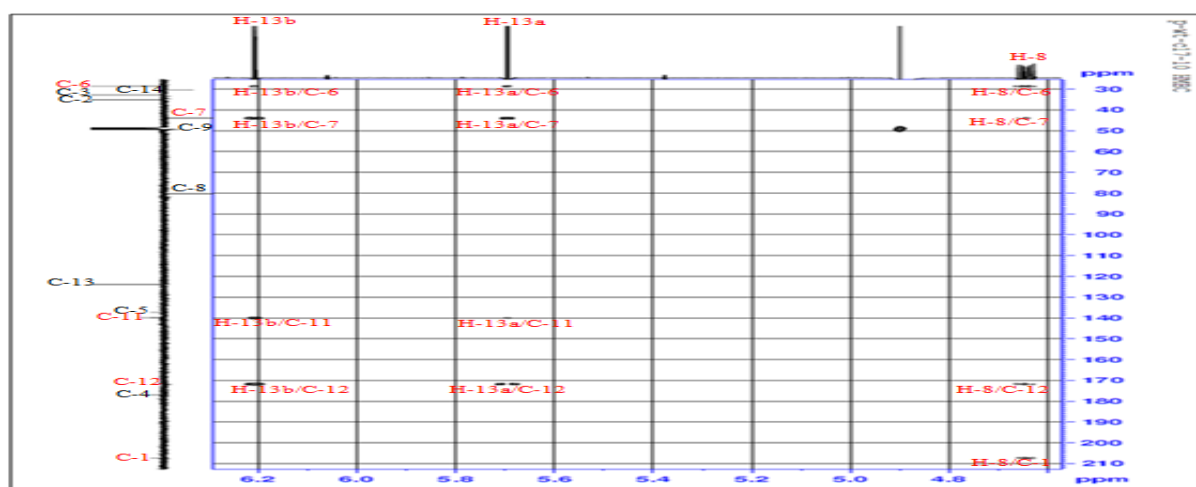


Figure 3.150 : Spectre HMBC du composé Pm7

Le spectre NOESY (figure 3.151) de ce composé montre une corrélation entre H-7 et les protons du H₂-6 et aussi une corrélation entre H-8 et H₂-9. Ce même spectre montre qu'il n'y a aucune corrélation du H-7 avec le proton H-8 ce qui indique la configuration *trans* de ces noyaux

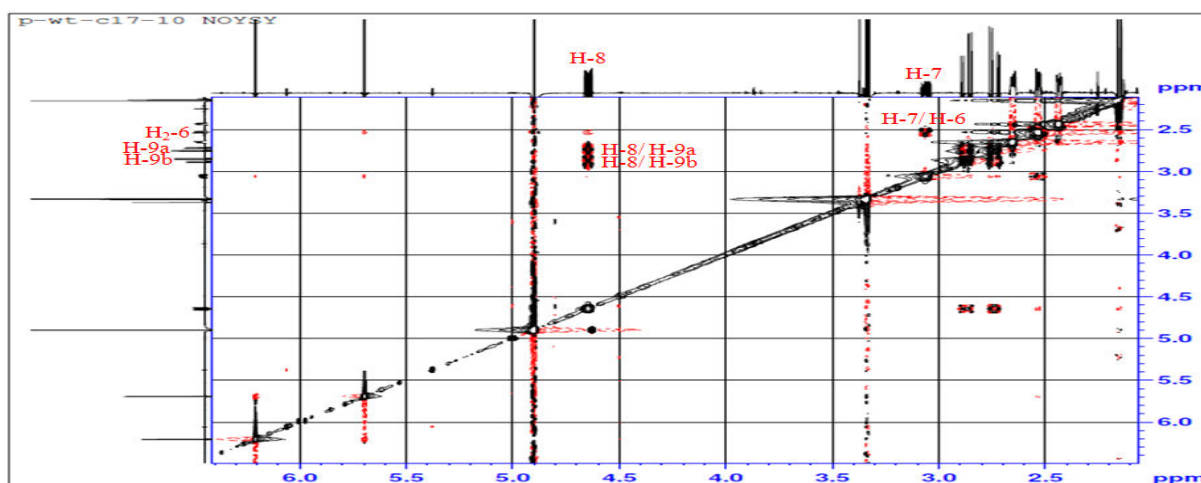
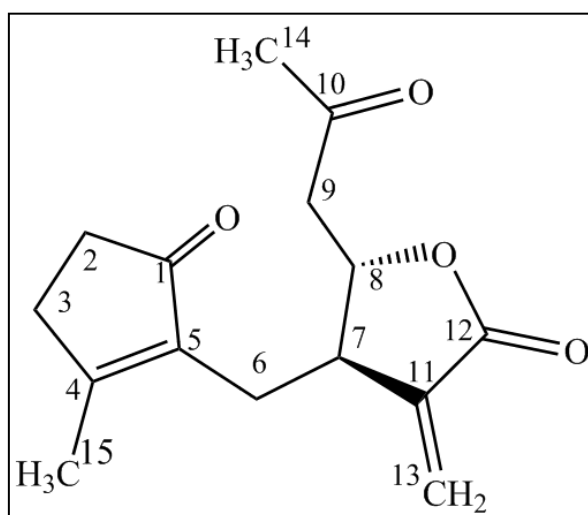


Figure 3.151 : Spectre NOESY du composé Pm7

Tableau 3.22: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Pm7** dans CD_3OD (Cheng et al., 2011).

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	212.2	209.4	-	-
2	35.2	34.2	2.43 (2H, m)	2.40 (2H, m)
3	32.8	31.9	2.65 (2H, m)	2.60 (2H, m)
4	177.0	173.2	-	-
5	137.3	136.2	-	-
6	28.6	28.4	2.53 (2H, m)	2.45 (2H, m)
7	43.9	42.4	3.06 (1H, m)	3.10 (1H, m)
8	80.3	78.3	4.64 (1H, dt, 8.9/6.5/3.7)	4.58 (1H, dt, 8.0/6.4/3.5)
9	49.4	48.7	2.87 (1H, dd, 17.4/5.9) 2.73 (1H, dd, 17.4/6.3)	2.80 (1H, m) 2.56 (1H, m)
10	207.3	204.5	-	-
11	139.9	138.1	-	-
12	170.1	169.0	-	-
13	123.9	123.4	5.69 (1H, d, 2.4) 6.20 (1H, d, 2.4)	5.58 (1H, d, 2.2) 6.27 (1H, d, 2.2)
14	30.4	30.8	2.16 (3H, s)	2.10 (3H, s)
15	17.7	17.6	2.14 (3H, s)	2.07 (3H, s)

L'analyse des spectres de RMN ^1H , ^{13}C J -modulé, (tableau 3.22) HSQC J -modulé, COSY et HMBC de Pm7 est en accord avec celle trouvée dans la littérature et permet d'attribuer à ce composé la structure de: **Postia secoguaianolide**, isolé précédemment de l'espèce *Postia bombycina* Boiss. et Haussk. (Rustaiyan et al., 1989).



Postia secoguaianolide (**Pm7**)

II. 8. Elucidation Structurale de Pm8

L'examen du spectre de masse (figure 3.152) montre deux fragments à m/z 503.2 correspondant à $[\text{M-hexose}+\text{Na}]^+$ et m/z 319.2 qui correspond à $[\text{M-2hexose}+\text{H}]^+$, ceci

indique la présence de deux sucres du type hexose dans la molécule. L'indice de déficience en hydrogène est de 8

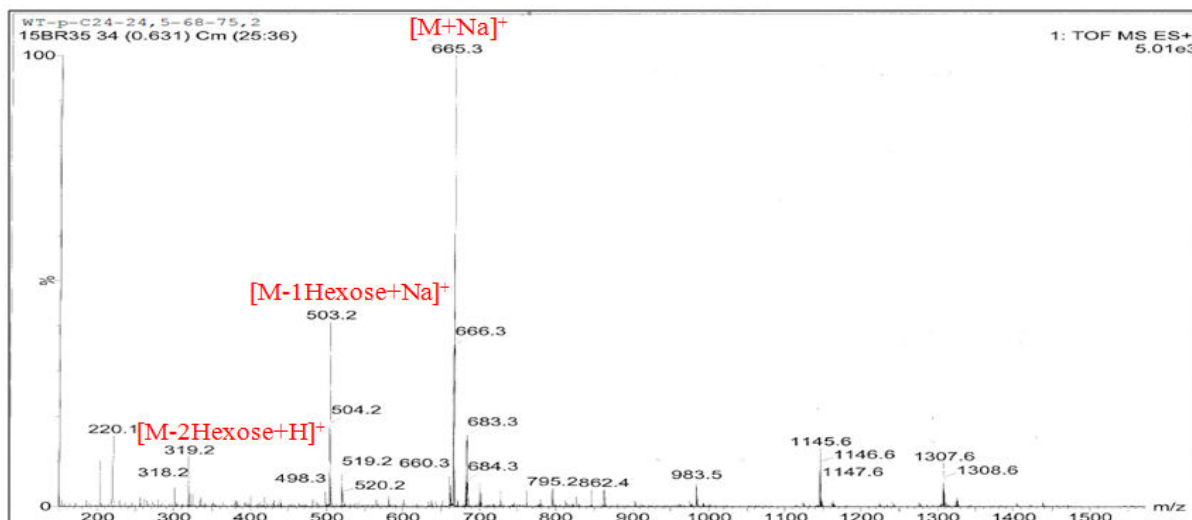


Figure 3.152 : Spectre de masse HR-MS-ESI du composé **Pm8**

L'analyse du spectre de RMN ¹H (figure 3.153, 3.154) montre la présence de :

- deux singulets d'intégrations trois protons chacun résonnant à δ_H 1.00 ppm et δ_H 1.24 ppm correspondant à deux groupements méthyles.
- deux protons oléfiniques résonnant à δ_H = 4.95 et 5.31 ppm attribuables aux protons éthyléniques d'un groupement méthylène exocyclique.
- deux protons anomériques à δ_H = 4.46 ppm (*d*, *J* = 7.8 Hz) et 5.43 ppm (*d*, *J* = 7.9 Hz)
- la zone variant de δ_H = 0.90 ppm à δ_H = 2.60 ppm correspond aux protons de huit groupements méthylène (CH₂) et trois méthines (CH).

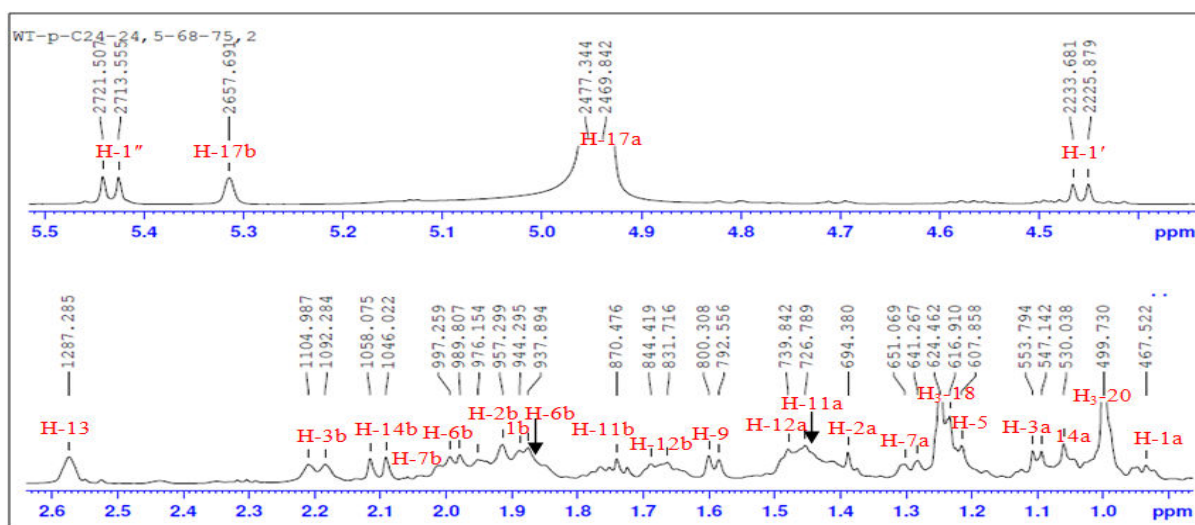


Figure 3.153 : Spectre RMN ¹H du composé **Pm8** (CD₃OD, 500 MHz)

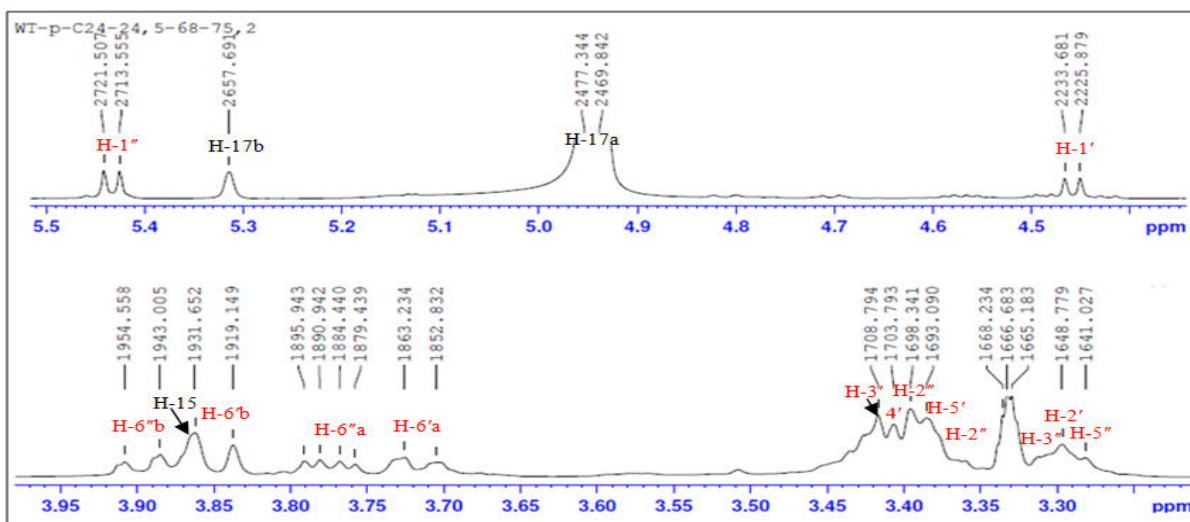


Figure 3.154 : Spectre RMN ^1H du composé **Pm8** (partie 3.20-3.95 ppm)

Le spectre de RMN ^{13}C *J*-modulé (figure 3.155) confirme la présence de 32 atomes de carbones. On distingue quelques carbones caractéristiques :

- deux carbones méthylénique résonnant entre $\delta_{\text{C}}=16.7$ et 29.1 ppm
- deux carbones oléfiniques résonnant entre $\delta_{\text{C}}=106.3$ et 157.4 ppm
- deux carbones anomériques résonnant à $\delta_{\text{C}}=95.5$ et 106.2 ppm confirmant la présence de deux sucres
- un carbone tertiaire oxygéné résonne à $\delta_{\text{C}}=91.7$ ppm
- un ester groupe résonne à $\delta_{\text{C}}=178.6$ ppm
- un ensemble de carbones résonnant entre $\delta_{\text{C}}=19.0$ et 78.8 ppm, attribuables aux CH_2 , CH et C quaternaires.

Lorsqu'on soustrait 12 carbones des deux sucres de 32 carbones de la formule brute, il en résulte 20 carbones de la partie aglycone. En comptant les doubles liaisons de l'oléfine et du carbonyle de l'ester et les 2 cycles des deux hexoses, il manque encore quatre sites d'insaturations pour valoir l'indice de déficience d'hydrogène de 8. Ils ne pourraient être dus qu'à la présence de 4 cycles insaturés. On peut suggérer que l'aglycone est un **diterpène tetracyclique**

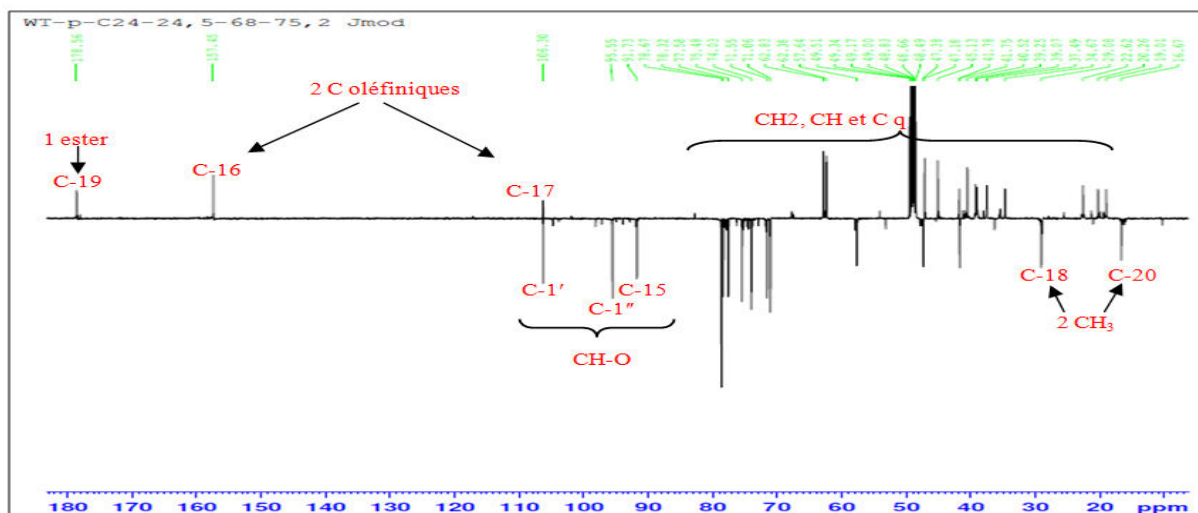


Figure 3.155 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **Pm8** (CD_3OD , 125 MHz)

L'examen du spectre COSY (figure 3.156) montre également des tâches de corrélations entre :

- les protons du CH_2 en position 3 ($\delta_{\text{H}}=1.10$ et 2.20 ppm) et les protons en position 2 ($\delta_{\text{H}}=1.41$ et 1.91 ppm), lesquels corrént avec un autre CH_2 en position 1 ($\delta_{\text{H}}=0.94$ et 1.90 ppm).
- le proton en position 5 ($\delta_{\text{H}}= 1.22$ ppm) et les protons du CH_2 en position 6 ($\delta_{\text{H}}=1.84$ et 1.98 ppm), ces derniers corrént avec un CH_2 en position 7 ($\delta_{\text{H}}=1.30$ et 2.01 ppm).
- le proton H-9 résonnant à $\delta_{\text{H}}=1.59$ ppm et les protons du CH_2 -11 ($\delta_{\text{H}}=1.45$ et 1.75 ppm), Ce dernier CH_2 montre une corrélation avec le CH_2 en position 12 ($\delta_{\text{H}}=1.47$ et 1.66 ppm).
- le proton H-12a à $\delta_{\text{H}}=1.47\text{ppm}$ corréle avec le proton H-13 à $\delta_{\text{H}}=2.57$ ppm ce dernier corréle à son tour avec le proton H-14a à $\delta_{\text{H}}=1.02$ ppm.

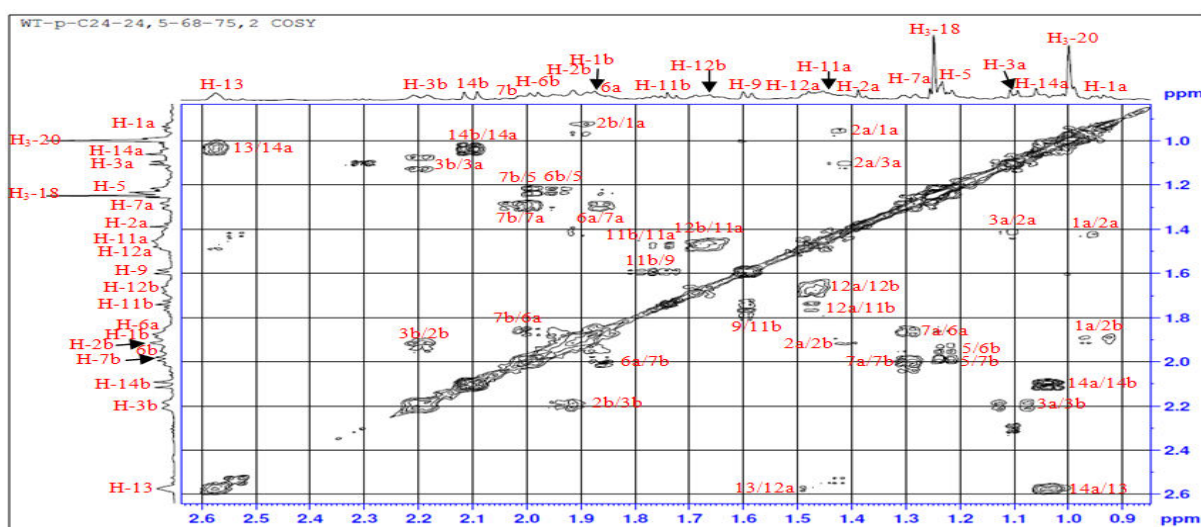
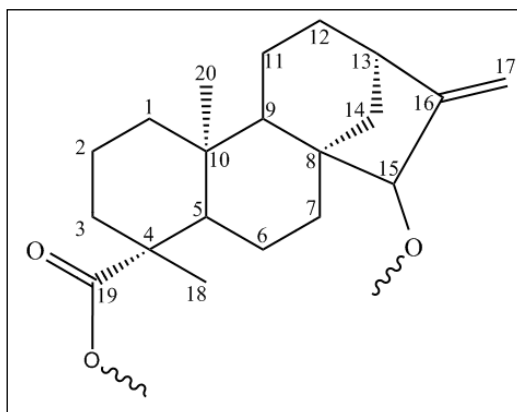


Figure 3.156 : Spectre COSY du composé **Pm8**

Ces observations permettent de suggérer que le diterpène tetracyclique est de type **kaurane**.



L'analyse des couplages hétéronucléaires $^1J_{H-C}$ visualisés sur le spectre HSQC *J*-modulé (figure 3.157, 3.158) permet de déterminer les déplacements chimiques des protons et leurs carbones correspondants. Ce spectre permet aussi de distinguer :

- une double liaison exocyclique plus huit CH_2 aliphatique
- un méthine oxygéné et 3 autres méthines angulaires

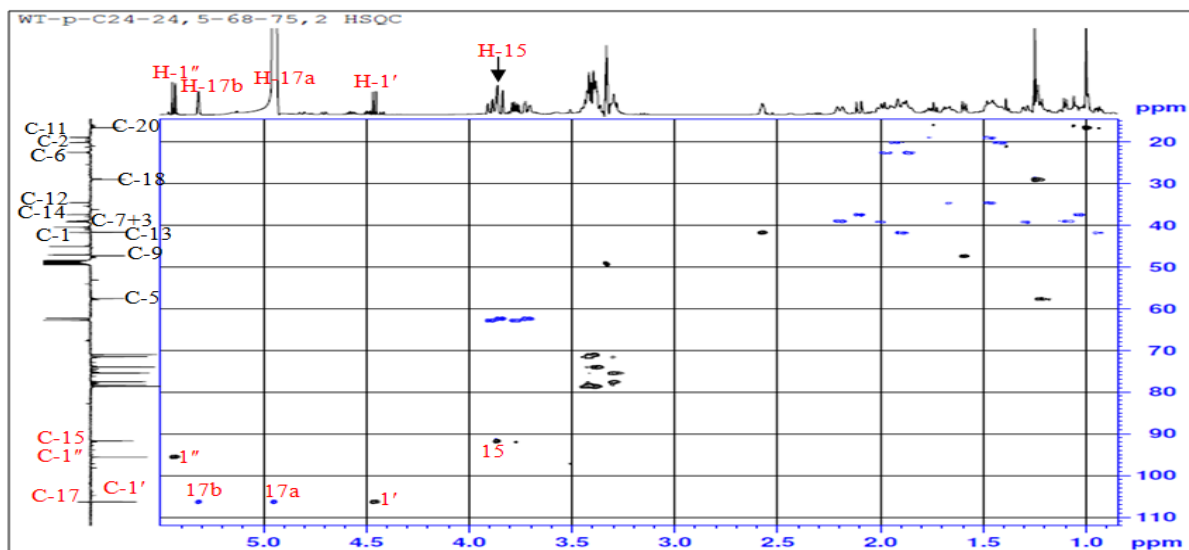


Figure 3.157 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Pm8**

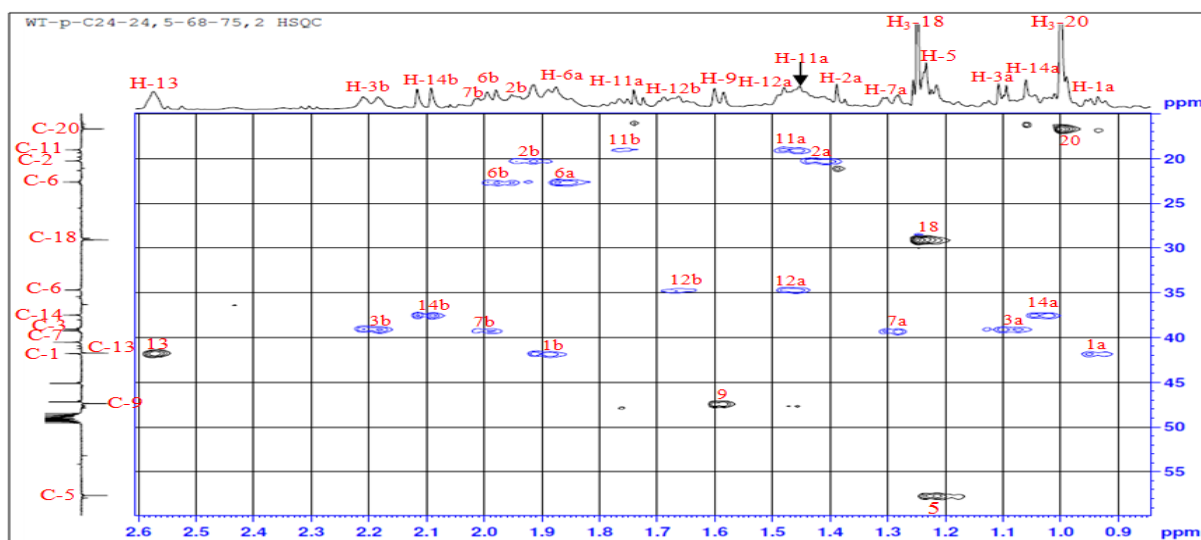
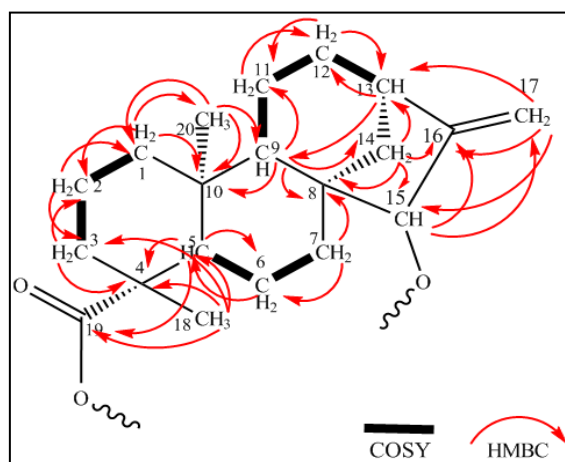


Figure 3.158 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Pm8** (0.90-2.60 ppm)

L'expérience HMBC (figure 3.159, 3.160) confirme cette suggestion par la présence des corrélations $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$ entre les signaux du kaurane squelette. En l'occurrence les corrélations de C-13 avec les deux protons de H-17 (H-17a e H-17b), et le carbone C-17 avec le proton du méthine oxygéné H-15, et l'autre carbone C-16 de la double liaison (C₁₆=C₁₇) avec le même proton H-15 et le proton H-14, localisant ainsi la double liaison et le méthine oxygéné sur le quatrième cycle du kaurane.

Le spectre HMBC (figure 3.159, 3.160) permet d'observer aussi des corrélations entre les méthyles H₃-20 et H₃-18/ H₃-19 et le carbone C-5. Des autres corrélations du méthyle H₃-18/ H₃-19 avec les carbones C-3, C-4 et C-19/C-18 sont également détectées. La dernière corrélation indique que l'un des carbone C-18 ou C-19 est oxydé en carboxyle confirmant la présence de la fonction ester en cette position.



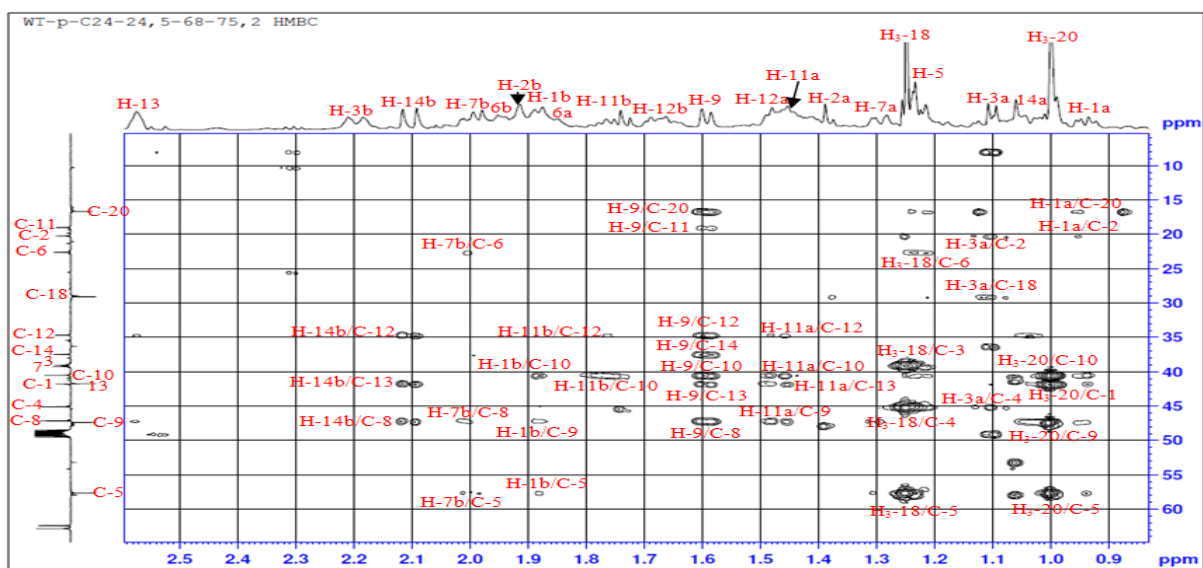


Figure 3.159 : Spectre HMBC du composé **Pm8** (partie 0.90-2.60 ppm)

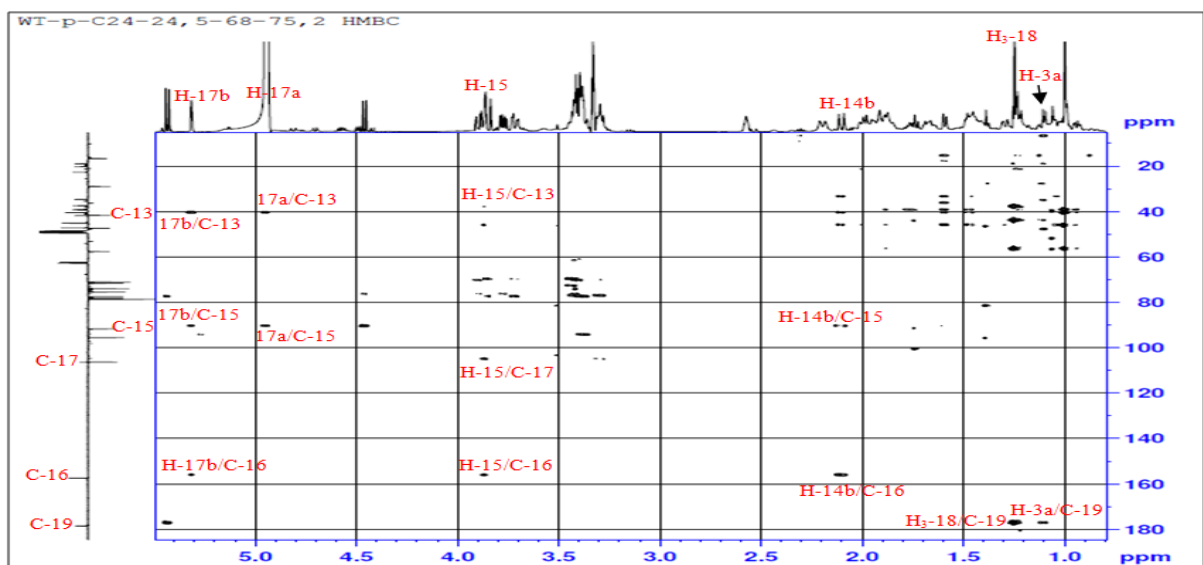


Figure 3.160 : Spectre HMBC du composé **Pm8**

L'examen de la partie glycoside sur les spectres COSY (figure 3.161) et HSQC (figure 3.162) permet d'identifier la nature des sucres. En effet, A partir des valeurs des constantes de couplages des deux protons anomériques ($J_{H-1'} = 7.8$ Hz et $J_{H-1''} = 7.9$ Hz) ainsi que l'analyse du spectre COSY (figure 3.161) qui montre sept protons chacun des deux hexoses couplent entre eux avec de grande valeurs de constante de couplage (>7 Hz), les deux parties osidiques sont identifiées comme étant le **β -D-glucopyranose**.

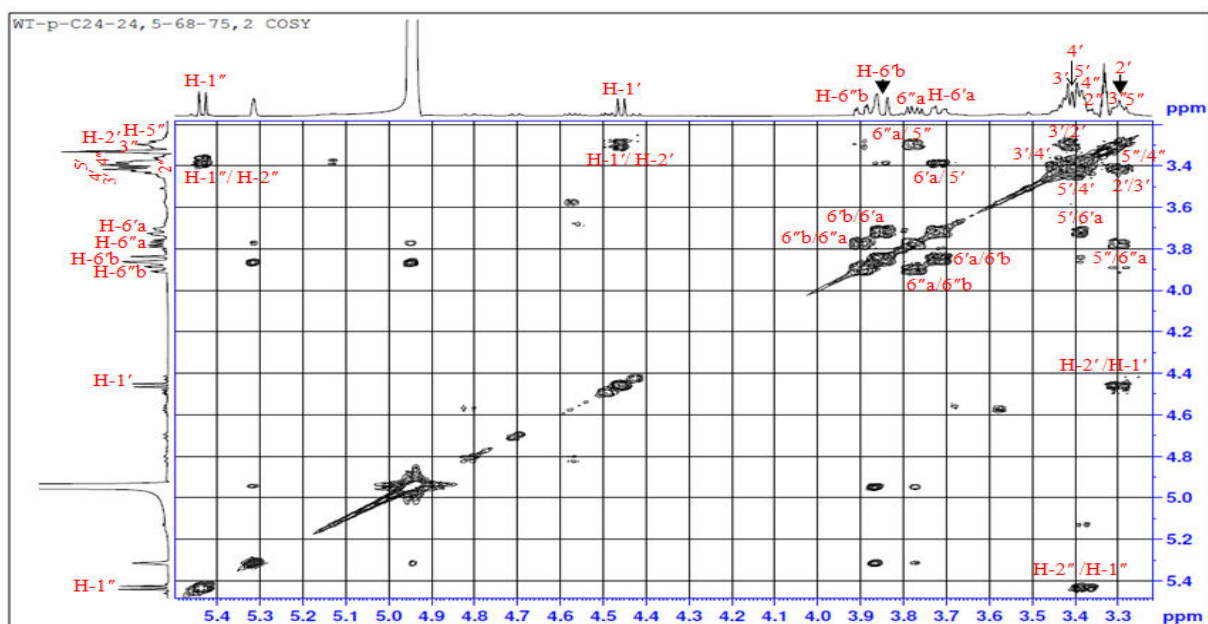


Figure 3.161 : Spectre COSY du composé **Pm8** (partie osidique)

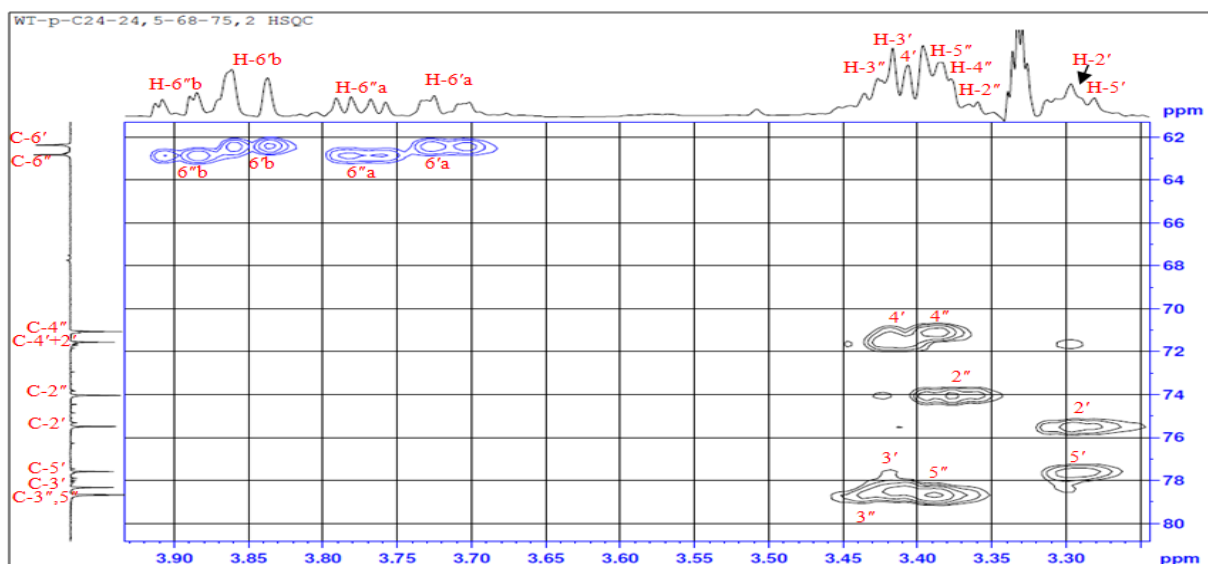


Figure 3.162 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Pm8** (partie osidique)

L'examen du spectre HMBC (figure 3.163) montre la position de ces deux sucres où on trouve une corrélation entre le carbonyle de la fonction ester ($\delta_C = 178.6$ ppm) et le proton à $\delta_H = 5.43$ ppm ce qui indique que le sucre est attaché à un ester C-19. Alors que l'autre est fixé à C-15 où on observe une corrélation entre le proton à $\delta_H = 4.46$ ppm avec le carbone oxygéné à $\delta_C = 91.7$ ppm ($\delta_H = 3.86$ ppm).

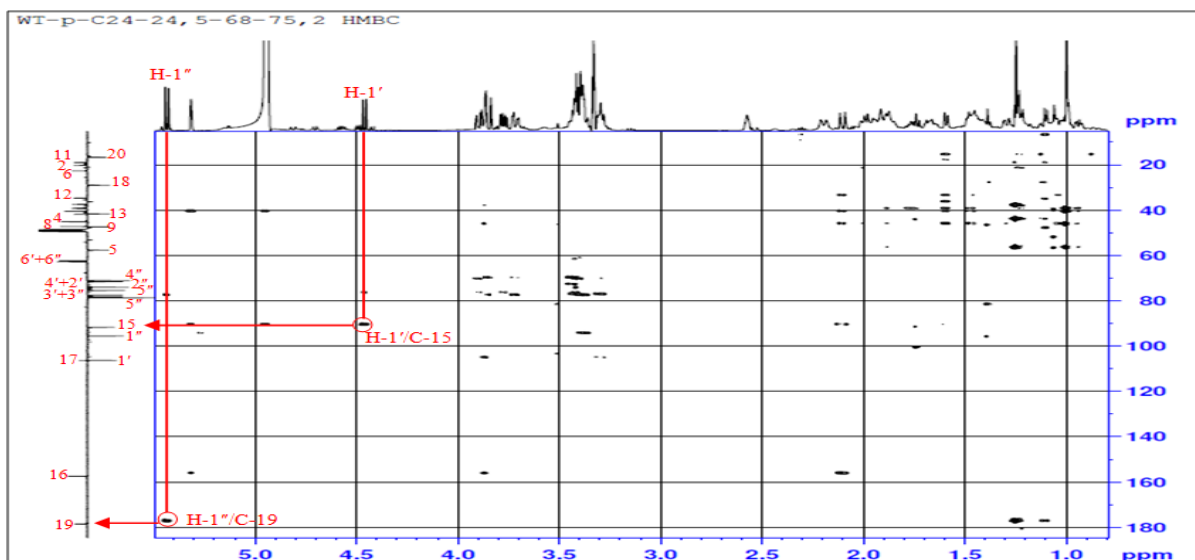


Figure 3.163 : Spectre HMBC du composé **Pm8** (partie osidique)

Le spectre ROESY (figure 3.164) permet d'observer les corrélations entre le proton H-15 et les deux protons H-14 indiquant ainsi une orientation α du proton H-15.

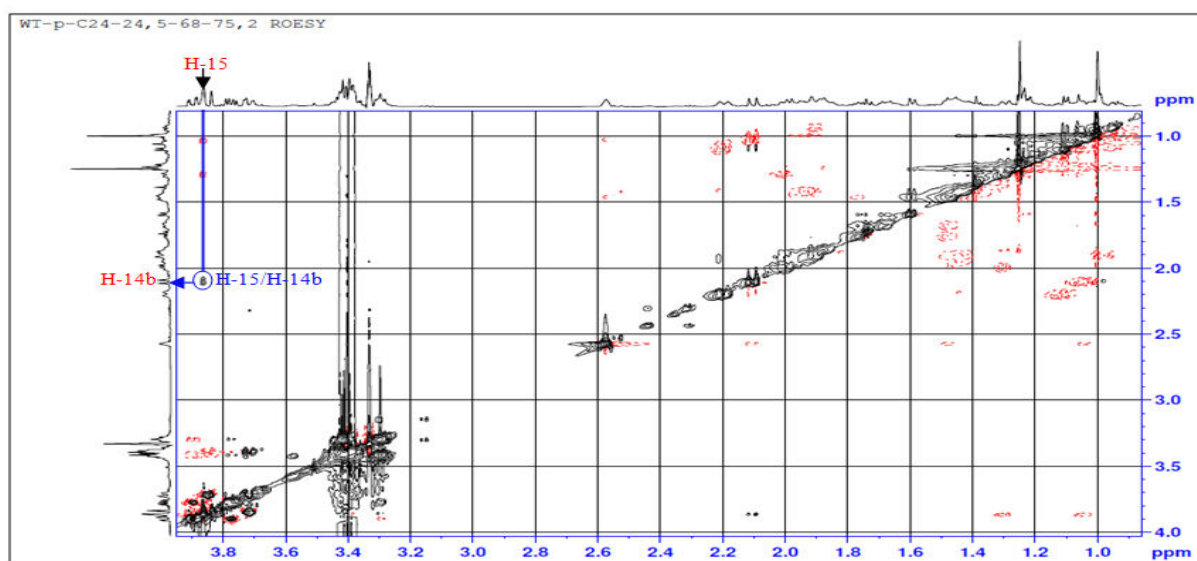


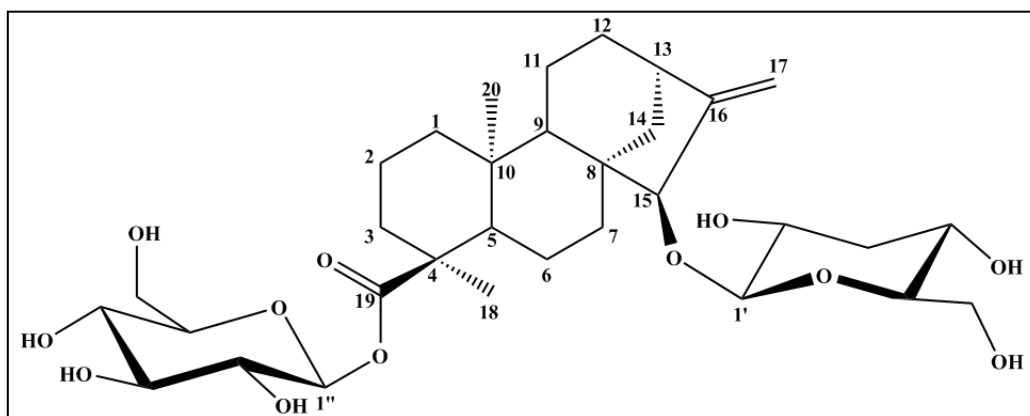
Figure 3.164 : Spectre ROESY du composé **Pm8**

Tableau 3.23: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé **Pm8** dans CD_3OD (Hussien et al., 2016)

N°	δ_{C} ppm	δ_{C} ppm réf	δ_{H} ppm (m, J Hz)	δ_{H} ppm (m, J Hz) réf
1	41.8	37.9	0.94 (1H, m) 1.90 (1H, m)	1.94 (1H, m) 1.28 (1H, m)
2	20.3	19.0	1.41 (1H, m) 1.91 (1H, m)	1.38 (1H, ddd, 17.1/4.4/2.2) 1.34 (1H, ddd, 17.1/4.4/2.2)
3	39.1	37.8	1.10 (1H, dd, 6.6/-) 2.20 (1H, dd, 12.7/-)	2.13 (1H, m) 1.04 (1H, m)
4	45.1	46.2	-	-
5	57.6	46.0	1.22 (1H, dd, 9.0/-)	1.53 (1H, m)
6	22.6	21.3	1.84 (1H, m) 1.98 (1H, dd, 8.0/-)	1.80 (1H, dd, 14.2/6.8) 1.78 (1H, dt, 14.2/3.2)
7	37.5	36.2	1.30 (1H, m) 2.01 (1H, m)	1.40 (1H, m) 0.98 (1H, m)
8	47.2	43.9	-	-
9	47.4	56.3	1.59 (1H, d, 7.7)	1.18 (1H, m)
10	40.5	39.2	-	-
11	19.0	17.7	1.45 (1H, m) 1.75 (1H, m)	1.43 (1H, m) 1.40 (1H, m)
12	34.7	33.4	1.47 (1H, m) 1.66 (1H, m)	1.41 (1H, m) 0.99 (1H, m)
13	41.7	40.4	2.57 (1H, br s)	2.52 (1H, m)
14	39.2	40.5	2.11 (1H, dd, 12.0/-) 1.02 (1H, m)	1.86 (1H, m) 0.90 (1H, br s)
15	91.7	90.4	3.86 (1H, br s)	3.81 (1H, dd, 3.0/2.0)
16	158.0	151.3	-	-
17	106.5	105.1	5.31 (1H, br s) 4.95 (1H, br s)	5.26 (1H, d, 3.0) 4.90 (1H, d, 3.0)
18	178.6	175.1	1.24 (3H, s)	1.20 (3H, s)
19	29.1	27.8	-	-
20	16.7	15.4	1.00 (3H, s)	0.94 (3H, s)
1'	106.2	104.6	4.46 (1H, d, 7.9)	5.38 (1H, d, 8.0)
2'	75.5	72.7	3.29 (1H, m)	3.25 (1H, dd, 9.5/8.5)
3'	78.3	76.2	3.42 (1H, m)	5.27 (1H, dd, 9.5/9.5)
4'	71.1	70.2	3.41 (1H, m)	3.35 (1H, dd, 9.5/9.5)
5'	77.6	72.7	3.27 (1H, m)	3.37 (1H, m)
6'	62.4	61.1	3.71 (1H, dd, 12.5/-) 3.85 (1H, dd, 12.5/-)	3.67 (1H, dd, 12.5/2.5) 3.65 (1H, dd, 12.5/5.0)
1''	95.5	94.2	5.43 (1H, d, 7.9)	4.41 (1H, d, 8.0)
2''	74.0	74.1	3.37 (1H, m)	3.28 (1H, dd, 9.5/8.0)
3''	78.7	76.2	3.43 (1H, m)	3.34 (1H, dd, 9.5/9.5)
4''	70.8	79.7	3.38 (1H, m)	3.31 (1H, dd, 9.5/9.5)
5''	78.7	77.0	3.39 (1H, m)	3.21 (1H, m)
6''	62.8	77.3	3.77 (1H, dd, 11.5/5.0) 3.90 (1H, dd, 11.5/-)	3.89 (1H, dd, 12.5/5.0) 3.88 (1H, dd, 12.5/5.0)

Selon la littérature, cette molécule est proche à « **Paniculoside V** » qui est isolé par différentes plantes (Bustos-Brito et al., 2015) la différence est signifiée dans la configuration du C-15, donc le composé **Pm8** est un epimère en C-15 du Paniculoside V.

La structure finale du composé **Pm8** est ainsi déterminée comme étant **Crispioside A** (*ent*-**15-β-D-glucopyranosyloxy-kaur-16-en-19-oic acid-β-D-glucopyranosyl ester**) (Abdel-Mogib et al., 1990 ; Hussien et al., 2016)



Crispioside A (**Pm8**)

Chapitre III

Dosage des polyphénols et Activités biologiques : Antioxydante, Anti cholinestérase et Anti tyrosinase

Afin de valoriser et promouvoir l'usage de *Cotula anthemoides* L et *Pentzia monodiana* Maire de la famille des Asteraceae, nous avons essayé d'investiguer les extraits et/ou composés isolés qui pourraient posséder des activités biologiques en nous basant sur les données bibliographiques précédemment citées.

Le dosage des polyphénols puis les activités antioxydantes et anticholinestérase ont été évaluées sur les extraits des parties aériennes des plantes alors que les composés purs obtenus en quantité suffisante sont soumis à l'évaluation de l'activité antioxydante et antityrosinase.

III. 1. Etude des activités biologiques des extraits

III. 1.1. Dosage des polyphénols

La détermination de la teneur en phénols totaux des extraits bruts de la partie aérienne de *C. anthemoides* et *P. monodiana* a été faite en utilisant la méthode colorimétrique (Folin-Ciocalteux). La teneur en polyphénols des extraits : *n*-butanol (EBCA), acétate d'éthyle (EACA) de la plante *C. anthemoides*, *n*-butanol (EBPM), acétone (EACPM) de l'espèce *P. monodiana* varie entre 130.2±1.7 et 167.0±1.0 mg/g de matière sèche (Tableau 3.26). Les résultats montrent que les extraits *n*-BuOH des deux plantes sont riches en polyphénols suivis par l'extrait acétate d'éthyle (EACA) de la plante *C. anthemoides* et l'extrait acétone de l'espèce *P. monodiana*. Par comparaison, les extraits EBCA et EACA de *C. anthemoides* sont les plus riches en polyphénols (154.5±0.9mg/g, 167.0±1.0 mg/g) que ceux de *P. monodiana* (Tableau 3.24).

Tableau 3.24 : Teneur en phénols totaux des plantes *C. anthemoides* et *P. monodiana*

Plantes	Extraits	Teneur en phénols totaux (mg/g)
<i>C. anthemoides</i> (parties aériennes)	EBCA	167.0±1.0
	EACA	154.5±0.9
<i>P. monodiana</i> (parties aériennes)	EBPM	160.6±1.9
	EACPM	130.2±1.7

Les résultats obtenus montrent une plus grande teneur en polyphénols par rapport à ceux des extraits des parties feuilles de *C. cinerea* et de *P. monodiana* qui sont été de 22.2 ± 0.4 mg/g et de 9.9 ± 0.8 mg/g respectivement (Belyagoubi-Benhammou et al., 2014), mais elles sont inférieures à celle des partie aérienne de *C. coronopifolia* qui a été de 248.5 mg/g (Bel Hadj Kether et al., 2014).

III. 1.2. Activité Antioxydante des extraits de *Cotula anthemoides*. L et de *Pentzia monodiana*. Maire

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antioxydante. Dans cette étude, les propriétés antioxydantes des extraits de *C. anthemoides* (ECCA, EACA et EBCA) et de *P. monodiana* (ECPM, EACPM, EAPM et EBPM) ont été déterminées par quatre essais complémentaires, à savoir, l'inhibition des radicaux DPPH^{*}, ABTS^{*+}, le test de réduction CUPRAC et le test par chélation des ions ferreux. Les résultats ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition (IC₅₀), à l'exception du test CUPRAC. Les valeurs des IC₅₀ exprimées en µg/mL calculées graphiquement à partir des droites de régression obtenues, représentent les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de chaque extrait testé. L' α -tocophérol, le BHA et de l'EDTA sont utilisés comme standards.

III. 1.2.1. Activité anti-radicalaire DPPH^{*}

L'extrait EACPM (IC₅₀ = 5.08±0.11µg/mL) a présenté un meilleur pouvoir anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH^{*} (Tableau 3.25), et même supérieur à celui des deux standards l' α -tocophérol (IC₅₀= 7.31±0.17 µg/mL) et BHA (IC₅₀= 45.37±0.47µg/mL). De plus, les autres extraits (EBCA, EACA, EBPM et EAPM) ont montré une bonne activité par rapport au BHA mais inférieure à celle de l' α -tocophérol. Par contre, l'extrait ECCA de *C. anthemoides* n'a montré aucune activité alors que l'autre ECPM de *P. monodiana* a manifesté une très faible activité anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH^{*} (tableau 3.27).

Donc, les concentrations d'inhibition du radical DPPH révèlent que l'extrait EACPM possède des propriétés anti-radicalaires intéressantes malgré sa composition faible en polyphénols.

Belyagoubi-Benhammou et al ont montré que la concentration EC₅₀ de l'extrait méthanolique de *C. cinerea* est de l'ordre de 462.186 mg d'antioxydant/g DPPH qui inférieure à celles de l'acide ascorbique (39.53 mg/g), le trolox (49.21 mg/g) et même du BHT (13.47 mg/g). En plus, l'évaluation du potentiel antioxydant de l'espèce *P. monodiana* vis à vis du DPPH^{*} montre que la valeur EC₅₀ calculée après 30 min de l'extrait méthanolique est égale à 10.044 mg/mL. Cette activité antioxydante est faible par rapport aux contrôles qui présentent des concentrations de 0.088, 0.090 et 0.133 de l'acide ascorbique, le trolox et le BHT respectivement (Belyagoubi-Benhammou et al., 2014).

III. 1.2.2. Essai de décoloration du radical cation ABTS^{•+}

Les extraits des deux plantes ont montré une activité d'inhibition du radical ABTS modérée variant de 10.47 à 149.92 µg/mL, mais qui sont inférieures aux valeurs des standards α -tocophérol ($IC_{50}= 4.31\pm 0.10$ µg/mL) et BHA ($IC_{50}= 4.10\pm 0.06$ µg/mL) (Tableau 3.25).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait EACPM est le plus actif (10.47 ± 0.83 µg/mL) suivi par EBPM (11.63 ± 0.15 µg/mL) de la plante *P. monodiana*. Par ailleurs, l'étude phytochimique de *P. monodiana* a conduit à l'isolement de plusieurs métabolites à partir de l'extrait EACPM.

Ces métabolites sont des flavonoïdes, lignanes, diterpènes et sesquiterpènes lactones (de type guaiane) ce qui sont responsables de cette activité intéressante avec l'essai de décoloration du radical cation ABTS^{•+}.

III. 1.2.3. La réduction cuprique (CUPRAC)

Les deux extraits EBCA, EACA de la plante *C. anthemoides* ont montré une forte activité inhibitrice du CUPRAC ($A_{0.5}= 0.25\pm 0.07$ µg/mL) et ($A_{0.5}= 0.57\pm 0.34$ µg/mL) respectivement, qui sont meilleures que celle des deux standards utilisés (tableau 3.25). Le classement des extraits testés comparativement avec les deux témoins, l' α -tocophérol et le BHA selon leur activité antioxydante par ordre décroissant est comme suit :

EBCA (0.25 µg/mL) > EACA (0.57 µg/mL) > EACPM (2.28 µg/mL) (Tableau 3.25).

D'après ce classement, on remarque que l'extrait EBCA a une meilleure activité inhibitrice du CUPRAC que l'extrait EACPM. Ce qui confirme que les flavonoïdes sont généralement responsables du taux élevé d'inhibition du CUPRAC (Balasundram et al., 2006).

III. 1.2.4. Chélation des ions ferreux

La capacité des extraits à la chélation des métaux a été évaluée par rapport aux valeurs de la concentration d'inhibition du standard EDTA (Tableau 3.27).

Les extraits EACPM, EAPM, EBCA et EBPM ont montré une excellente activité de chélation du métal (Tableau 3.25), même supérieure à la valeur du standard EDTA.

Le classement des extraits testés par ordre décroissant est comme suit :

EACPM (22.69 µg/mL) > EAPM (41.42 µg/mL) > EBCA (61.79 µg/mL) > EBPM (63.90 µg/mL) (Tableau 3.25).

Il a été rapporté que le pouvoir réducteur des extraits hydro-méthanoliques de *Cotula cinerea* et *Pentzia monodiana* possèdent une bonne activité antioxydante (1.174 ± 0.047 mg/mL) et (3.640 ± 0.509 mg/mL) respectivement, en comparant avec l'acide ascorbique (0.063 ± 0.002 mg/mL) (Belyagoubi-Benhammou et al., 2014).

Tableau 3.25 : Activité Antioxydante des extraits étudiés par quatre essais complémentaires

Plantes	Extraits	DPPH [*] IC ₅₀ (µg/mL)	ABTS ^{**} IC ₅₀ (µg/mL)	CUPRAC A _{0,5} (µg/mL)	les ions Chélates IC ₅₀ (µg/mL)
<i>C. anthemoides</i>	EBCA	11.41±2.98	12.83±0.93	0.25±0.07	61.79±0.85
	EACA	29.33±1.11	33.74±1.08	0.57±0.34	ND ^d
	ECCA	ND ^d	ND ^d	ND ^d	ND ^d
<i>P. monodiana</i>	EBPM	20.91±1.37	11.63±0.15	39.18±1.74	63.90±1.60
	EACPM	5.08±0.11	10.47±0.83	2.73±0.27	22.69±1.48
	EAPM	24.29±0.14	18.89 ±1.69	38.44 ±0.47	41.42±0.21
	ECPM	104.46 ±0.67	149.92±0.50	153.00 ±0.93	ND
Standards	α-tocophérol ^a	7.31±0.17	4.31±0.10	0.54±0.01	-
	BHA ^{a, b}	45.37±0.47	4.10±0.06	1.41±0.7	-
	EDTA ^{a, c}	-	-	-	92.5±1.4

^a : Standard, ^b : butylatedhydroxyl anisole, ^c : Ethylenediaminetetraacetic acid,

^d : Non déterminé, A_{0,5} : la concentration à l'absorbance 0.50.

De ces résultats d'étude de l'activité antioxydante, par les quatre méthodes complémentaire, il apparaît que :

- **Avec le DPPH^{*}**: *P. monodiana* était plus active que *C. anthemoides* où l'EACPM était le plus actif (IC₅₀: 5.08±0.11 µg/mL), meilleur que le standard, l'α- tocophérol (IC₅₀: 7.31±0.17 µg/mL), alors que la meilleure activité de *C. anthemoides* a été manifestée par l'EBCA (IC₅₀: 11.41±2.98 µg/mL). Les extraits polaires de *P. monodiana* étaient plus actifs que ceux de *C. anthemoides* malgré la teneur en polyphénols totaux qui était plus grande dans l'EBCA (167.0±1.0 mg/g de matière sèche) et EACA (154.5±0.9 mg/g de matière sèche) que dans l'EACPM (130.2±1.7 mg/g de matière sèche) et EBPM (160.6±1.9 mg/g de matière sèche) qui possèdent une activité antioxydante remarquable.

- **Avec le test de l'ABTS^{•+}**: l'activité la plus élevée a été présentée par l'EACPM (IC₅₀: 10.47±0.83 µg/mL) suivi par EBPM (IC₅₀: 11.63±0.15 µg/mL). L'extrait EACPM riche en flavonoïdes ce qui explique son activité antioxydante remarquable.
- **Avec la méthode CUPRAC**: Contrairement aux autres testes, la plante *C. anthemoides* a présenté une excellente activité où les extraits EBCA (A_{0.5}: 0.25±0.07 µg/mL) et EACA (A_{0.5}: 0.57±0.34 µg/mL) ont montré une meilleur absorbance et même supérieure que celle des standards l'α- tocophérol (A_{0.5}: 0.54±0.01 µg/mL) et le BHA (A_{0.5}: 1.41±0.70 µg/mL). Cette activité peut être expliquée par la richesse de ces extraits en polyphénols.
- **Avec la méthode de chélation par les ions ferreux**: les extraits EACPM, EAPM, EBPM et EBCA présentaient une meilleure inhibition (22.69±1.48 µg/mL, 41.42±0.21 µg/mL, 63.90±1.60 µg/mL et 61.79±0.85 µg/mL, respectivement) avec la méthode de chélation par les ions ferreux qui est supérieure à celle d'EDTA (92.5±1.4 µg/mL), utilisé comme standard.

Selon les résultats enregistrés, les extraits EBCA et EBPM sont moins actif malgré leur composition en polyphénols suggérant que la chélation ne dépend pas de la composition en polyphénols.

Dans les quatre méthodes utilisées pour la détermination du pouvoir oxydant des deux plantes *C. anthemoides* et *P. monodiana*, les extraits issus de *P. monodiana* possèdent une bonne activité antioxydante sauf dans le test CUPRAC où ils étaient en seconde position après les extraits de *C. anthemoides*. Ceci peut s'expliquer par la richesse des extraits de *P. monodiana* par différentes classes de métabolites secondaires (Sesquiterpènes lactones, lignanes, diterpène et flavonoïdes).

Pour les extraits des plantes, leurs comportements à céder le proton ou l'électron pour exprimer les propriétés antioxydantes sont différents. Ce résultat a été corroboré par (Miliauskas *et al.*, 2004) qui ont montré qu'un antioxydant efficace dans un test n'est pas forcément efficace dans un autre d'une part. D'autre part, les activités antioxydantes sont plus variables dans les espèces de la plante (inter-espèce) que dans la même espèce (intra-espèce) (Ksouri *et al.*, 2008).

III. 1.3. Activité anticholinestérase

Dans l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), le tableau 3.26 montre que les extraits EBCA (IC_{50} : $3.14 \pm 1.56 \mu\text{g/mL}$) et EACA (IC_{50} : $6.39 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$) présentent une excellente activité inhibitrice de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) comparées à celle du standard la galantamine (IC_{50} : $5.00 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$) qui est utilisée comme médicament contre la maladie d'Alzheimer. Cependant, l'activité manifestée par les autres extraits ECCA, EBPM, EACPM, EAPM, et ECPM est faible par rapport au standard.

Contre l'enzyme butyrylcholinestérase (BChE), les extraits EBCA (IC_{50} : $2.59 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$), EACA (IC_{50} : $2.23 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$), ECCA (IC_{50} : $1.23 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$), EBPM (IC_{50} : $8.23 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$), et EACPM (IC_{50} : $33.31 \pm 0.76 \mu\text{g/mL}$) possèdent un pouvoir inhibiteur meilleur que celui du standard (IC_{50} : $50.8 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 3.26 : Inhibition de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase par les extraits étudiés

Plantes	Extraits	Inhibition de l'AChE IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition de l'BChE IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. anthemoides</i>	EBCA	3.14 ± 1.56	2.59 ± 0.16
	EACA	6.39 ± 0.47	2.23 ± 0.27
	ECCA	14.21 ± 1.99	1.23 ± 0.25
<i>P. monodiana</i>	EBPM	46.32 ± 0.68	8.23 ± 1.20
	EACPM	62.53 ± 1.08	33.31 ± 0.76
	EAPM	63.36 ± 0.14	69.54 ± 2.41
	ECPM	59.96 ± 1.09	76.87 ± 1.41
Standard	Galantamine ^a	5.00 ± 0.10	50.80 ± 0.90

^a : Standard

Il est à noter que les extraits de *C. anthemoides* (EBCA, EACA, ECCA) possèdent une meilleure inhibition contre l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) tandis que les extraits de *P. monodiana* (EBPM, EACPM, EAPM, ECPM) ont montré une capacité inhibitrice modérée contre l'enzyme butyrylcholinestérase (BChE) et faible contre l'acétylcholinestérase (AChE), ce qui peut être expliqué par la richesse de *C. anthemoides* en polyphénols.

Ceci est confirmé par une étude effectuée par Kim et al sur des polyphénols, suggère que ces composés pourraient être utiles dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Kim et al., 2004).

III. 2. Etude des activités biologiques des produits isolés

III. 2.1. Activité antioxydante des produits isolés

Pour identifier les composés ayant une activité antioxydante dans les extraits *n*-BuOH de *C. anthemoides* (EBCA) et Acétone de *P. monodiana* (EACPM), un test de DPPH a été effectué.

Les composés isolés de *C. anthemoides*: Le pouvoir anti-radicalaire vis-à-vis du DPPH des composés **Ca1-Ca15** de *C. anthemoides* (tableau 3.27) montre que le composé 6-Hydroxylutéoline-7-O- β -D-glucopyranoside (**Ca5**) est le plus actif ($9.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$), suivi par les composés acide rosmarinique (**Ca15**) ($12.7 \pm 0.3 \mu\text{M}$); 5,7,4',5'-tetrahydroxyflavonol-2'-[propanoic acid-(2'''-acetoxy-3'''-sulfonyl)]-5'-O- β -D-glucopyranoside (**Ca1**) ($22.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$); lutéoline-7-O- β -D-glucuronopyranoside (**Ca4**) ($25.1 \pm 0.7 \mu\text{M}$); Tachioside (**Ca7**) ($27.6 \pm 1.1 \mu\text{M}$); et lutéoline-7-O- β -D-glucopyranoside (**Ca2**) ($29.9 \pm 1.3 \mu\text{M}$) qui ont présenté une activité modérée par rapport au standard, l'acide ascorbique ($7.4 \pm 0.05 \mu\text{M}$). Ceci peut être expliqué par la présence du groupement hydroxyle (OH) en C-6 qui augmente l'activité antioxydante du composé **Ca5** par rapport à **Ca1**, **Ca2** et **Ca4** (Rice-Evans et al., 1996). En plus, Les composés **Ca2** et **Ca4** partagent la même aglycone qui est substituée en 3' et 4'-di-OH dans le cycle B (squelette de la lutéoline), cette substitution est particulièrement importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes (Arora et al., 1998), alors que la différence était dans la nature du groupe lié en C-7 qui était β -D-glucopyranose (**Ca2**) et β -D-glucuronopyranose (**Ca4**), ce qui suggère que l'acide glucuronique peut contribuer légèrement à l'augmentation du pouvoir "scavenger" des radicaux DPPH.

Les composés isolés de *P. monodiana*: le potentiel antioxydant des composés **Pm1-Pm8** de *P. monodiana* (tableau 3.29) a été comparé avec celui du standard l'acide ascorbique ($\text{EC}_{50} = 7.4 \pm 0.05 \mu\text{M}$), montrant que le classement des composés actifs par ordre décroissant est comme suit : *épi*-syringarésinol **Pm 1** ($10.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$) > Axillarin **Pm 4** ($16.3 \pm 0.8 \mu\text{M}$) > galetin-3,6-dimethyl ether **Pm 5** ($25.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$) > Médiioresinol **Pm 2** ($47.5 \pm 2.2 \mu\text{M}$)

D'après ce classement, on remarque que les lignanes ont une activité meilleure que celles des flavonoïdes. La comparaison des lignanes entre eux **Pm 1**, **Pm 2** et **Pm 3** indique que la substitution en symétrie en 3', 4', 5' / 3'', 4'', 5'' par les groupements (OCH₃-OH-OCH₃ respectivement) est probablement responsable de la meilleure activité antioxydante. Cependant, la présence du groupement méthoxyle (OCH₃) en C-6 du flavonoïde augmente l'activité antioxydante du **Pm 4** par rapport à **Pm 5**. Ainsi que, la nature du substituant lié en

C-3 qui était un OCH₃ (**Pm4** et **Pm5**) et un β -D-glucopyranose (**Pm6**) était importante pour l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes.

Finalement, les sesquiterpènes lactones et diterpènes n'ont montré aucune activité antioxydante.

D'après les résultats enregistrés précédemment sur l'activité antioxydante des extraits, la richesse de l'extrait EACPM de *P. monodiana* en lignanes avec les flavonoïdes peut être responsable du pouvoir d'inhibition du DPPH qui est supérieur à celui de l'extrait EBCA de *C. anthemoides*, ce dernier qui est riche en flavonoïdes et autres polyphénols.

Tableau 3.27 : Activité Antioxydante des produits isolés par l'essai DPPH

Plante	Produits testés	DPPH* EC ₅₀ (μM)	Plante	Produits testés	DPPH* EC ₅₀ (μM)
<i>C. anthemoides</i>	Ca 1	22.8 ± 0.5	<i>C. anthemoides</i>	Ca 13	ND
	Ca 2	29.9 ± 1.3		Ca 14	ND
	Ca 3	ND		Ca 15	12.7 ± 0.3
	Ca 4	25.1 ± 0.7	<i>P. monodiana</i>	Pm1	10.6 ± 0.5
	Ca 5	9.1 ± 0.4		Pm2	47.5 ± 2.2
	Ca 6	ND		Pm3	ND
	Ca 7	27.6 ± 1.1		Pm4	16.3 ± 0.8
	Ca 8	ND		Pm5	25.0 ± 0.9
	Ca 9	ND		Pm6	ND
	Ca 10	ND		Pm7	ND
	Ca 11	ND		Pm8	ND
	Ca 12	ND			
Standard	Acide ascorbique ^a	7.4 ± 0.05	Standard	Acide ascorbique ^a	7.4 ± 0.05

^a : Standard, ND = EC₅₀ non atteinte à la concentration 100 μg/mL.

III. 2.2. Activité anti-tyrosinase des produits isolés

Nous avons étudié l'activité antityrosinase des produits isolés des extraits EBCA de la plante *C. anthemoides* et EACPM de la plante *P. monodiana* et leurs valeurs d'IC₅₀ sont indiquées dans le tableau 3.28.

Les composés isolés de *C. anthemoides* : Les résultats (tableau 3.28) montrent que les composés 5,7,4',5'-tetrahydroxyflavonol-2'-[propanoic acid-(2'''-acetoxy-3'''-sulfonyl)]-5'-O- β -D-glucopyranoside (**Ca1**), Benzoic acid-4-O- β -D-glucopyranoside (**Ca8**) et vanillic acid-4-O- β -D-glucopyranoside (**Ca10**) de *C. anthemoides* présentent une légère inhibition de la tyrosinase et le composé le plus actif est **Ca10** (IC₅₀= 85 ± 0.8 μM) suivi par **Ca8** (IC₅₀= 95 ±

1.5 μM) et **Ca1** ($\text{IC}_{50} = 100 \pm 0.5 \mu\text{M}$). L'activité supérieure du composé **Ca10** par rapport à celle de **Ca8** peut être expliquée par la combinaison d'un groupement méthoxyle avec la fonction acide. Alors que Les flavonoïdes isolés se sont avérés inactifs à l'exception du composé **Ca1** ce que nous pouvons justifier par le fait qu'ils soient hydroxylé en C-3.

Produits isolés de *P. monodiana* : les composés Médioresinol (**Pm2**) ($\text{IC}_{50} = 75.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$), Pinoresinol (**Pm3**) ($\text{IC}_{50} = 87.7 \pm 1.6 \mu\text{M}$), Axillarin (**Pm4**) ($\text{IC}_{50} = 97.2 \pm 2.2 \mu\text{M}$) et galetin-3,6-dimethyl ether (**Pm5**) ($\text{IC}_{50} = 65.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$) ont présenté des activités faibles assez proches, à l'exception du composé Postia secoguaianolide (**Pm7**) qui a montré une activité importante avec $\text{IC}_{50} = 45.4 \pm 0.7 \mu\text{M}$ par rapport à l'acide kojique ($\text{IC}_{50} = 6.4 \pm 0.04 \mu\text{M}$) (tableau 3.28).

Tableau 3.28 : Activité Anti-tyrosinase des produits isolés

Plante	Produits testés	Anti-tyrosinase IC_{50} (μM)	Plante	Produits testés	Anti-tyrosinase IC_{50} (μM)
<i>C. anthemoides</i>	Ca 1	100 ± 0.5	<i>C. anthemoides</i>	Ca 13	ND
	Ca 2	ND		Ca 14	ND
	Ca 3	ND		Ca 15	ND
	Ca 4	ND	<i>P. monodiana</i>	Pm1	ND
	Ca 5	ND		Pm2	75.4 ± 1.2
	Ca 6	ND		Pm3	87.7 ± 1.6
	Ca 7	ND		Pm4	97.2 ± 2.2
	Ca 8	95 ± 1.5		Pm5	65.0 ± 0.9
	Ca 9	ND		Pm6	ND
	Ca 10	85 ± 0.8		Pm7	45.4 ± 0.7
	Ca 11	ND		Pm8	ND
	Ca 12	ND			
Standard	Acide kojique ^b	6.4 ± 0.04	Standard	Acide kojique ^b	6.4 ± 0.04

^b : Standard, ND = IC_{50} non atteinte à la concentration 100 $\mu\text{g/mL}$.

Nous rapportons pour la première fois que les plantes *C. anthemoides* et *P. monodiana* présentent à la fois une légère activité inhibitrice de la tyrosinase. L'extrait EACPM de *P. monodiana* est plus efficace que celui de *C. anthemoides*, mais il est plus faible que l'acide kojique.

Conclusion Générale

Conclusion générale

A l'issue de ce travail de recherche qui a porté sur la valorisation phytochimique et biologique de deux plantes médicinales de la famille des Asteraceae: *Cotula anthemoides* L. et *Pentzia monodiana* Maire., des composés naturels ont été isolés et identifiés et une relation structure-activité a été également démontrée.

Ce manuscrit comprend une introduction, trois parties et une conclusion

La première partie qui est une revue bibliographique divisée en 3 chapitres

- Dans le premier chapitre des données bibliographiques sur la famille des Asteraceae, des genres *Cotula* et *Pentzia* d'un point de vue descriptif, usage traditionnels, activités biologiques et métabolites secondaires.
- Le second chapitre a été consacré à un aperçu bibliographique sur les lignanes (distribution à travers les plantes, intérêts thérapeutiques.....)
- Dans le troisième chapitre des généralités sur les activités biologiques : L'activité antioxydante est estimée par quatre méthodes à savoir les tests DPPH, ABTS, CUPRAC et Chélation des ions métalliques ; activité anticholinestérase et activité antityrosinase.

La deuxième partie décrivant le matériel et les méthodes, comprend trois chapitre

- Le premier chapitre a été consacré à la description du matériel utilisé (matériel végétale, chromatographique et appareils)
- Le chapitre deux traite la partie expérimentale de nos travaux, en effet, il décrit d'une part l'extraction des parties aériennes de *C. anthemoides* L., par une solution hydroethanolique puis fractionnement de l'extrait qui en résulte par des solvants de polarité croissante. La fraction butanolique a subi des séparations sur une colonne de polyamide suivie de purification par HPLC préparative et semi préparative conduisant 15 composés purs. D'autre part l'extraction des parties aériennes de l'espèce *P. monodiana* Maire. par le chloroforme et l'acétone successivement dans un soxhlet. Les marcs résultants sont traités par des solvants de polarité croissante. L'extrait acétone a fait l'objet d'investigation poussée sur colonne de gel de silice suivie de flash chromatographie et enfin purification par HPLC semi préparative permettant d'obtenir 8 composés purs.
- Le troisième chapitre décrit les protocoles des tests du DPPH, ABTS, CUPRAC en plus chélation des ions ferreux conduisant à l'évaluation de l'activité antioxydante. Les

modes opératoires d'évaluation des activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase sont exposés selon la méthode d'Ellman et enfin l'activité antityrosinase est évaluée aussi par une méthode colorimétrique mesurant la densité optique du dopachrome à 475nm.

La troisième partie englobant les résultats obtenus comprend 3 chapitres :

Les **deux premiers chapitres** décrivent l'élucidation structurale des produits isolés respectivement de *C anthemoides* L. (quinze produits) et *P. monodiana* Maire (huit produits) grâce aux combinaisons des méthodes spectroscopiques d'UV-Visible, RMN mono- et bidimensionnelles, homo- et hétéronucléaires (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, ROESY) et masse à haute résolution HR-FAB-MS.

➤ De l'espèce *C anthemoides* L. :

- ❖ 6 flavonoïdes dont 5 flavones glucosylés et 1 flavonol glucosylé nouveau dans le règne végétale.
- ❖ 3 dérivés acides phénoliques en C₆-C₁ dont deux glucosylés
- ❖ Acide 2-amino-3-phénylpropanoïque
- ❖ Un phénolglucosylé
- ❖ Acide tubéronique 12-O-β-D-glucopyranoside
- ❖ Un nucléoside

➤ De l'espèce *Pentzia monodiana* Maire.

- ❖ 3 Lignanes
- ❖ 3 Flavones substitué en C-3
- ❖ 1 Secoguaianolide
- ❖ 1 Diterpène glucosylé de type Kaurene

Le **troisième chapitre** comprend la discussion sur les activités biologiques étudiées

➤ Tout d'abord **les extraits obtenus** des deux plantes ont été testés suivis par **les produits purs** isolés en quantité suffisante.

- L'étude du potentiel antioxydant des extraits de *Cotula anthemoides* L. et de *Pentzia monodiana* Maire. a été déterminée par 4 méthodes différentes: DPPH, ABTS, CUPRAC et par la méthode de chélation par des ions ferreux. Les extraits issus de *P. monodiana* possèdent une bonne activité antioxydante sauf dans le test CUPRAC où ils étaient en seconde position après les extraits de *C. anthemoides*. Ceci était différent des résultats révélés par le dosage des

polyphénols totaux, ce qui nous permis de justifier l'activité du *P. monodiana* par sa richesse en différentes métabolites : lignanes, flavonoïdes, sesquiterpènes lactones...etc.

- Les résultats de l'activité anticholinestérase de *Cotula anthemoides* L. et de *Pentzia monodiana* Maire. qui a été réalisée contre deux enzymes, l'acétyl- et la butyrylcholinestérase montrent que les extraits de *C. anthemoides* possèdent une meilleure inhibition contre ces deux enzymes (AChE) et (BChE) Alors que les extraits de *P. monodiana* ont montré une capacité inhibitrice modérée contre l'enzyme butyrylcholinestérase (BChE) et faible contre l'acétylcholinestérase (AChE) ce qui ne peut être expliqué que par la richesse de *C. anthemoides* en polyphénols.

Deux activités ont été mises en évidence pour **les produits purs** isolés de ces deux plantes, une activité antioxydante par l'essai DPPH et une activité anti-tyrosinase.

- Le test DPPH effectué sur les produits isolés en quantité suffisante, a montré que les flavonoïdes possédant un groupement orthodihydroxylé sur le cycle B et en particulier ceux qui de plus sont substitué en C-6 et/ou C-3 ont une très bonne activité antiradicalaire. Cependant, seulement les lignanes qui dérivent d'un alcool sinaplique ont également une très bonne activité antiradicalaire.
- L'extrait acétone de *P. monodiana* a montré une activité anti-tyrosinase modéré, cette activité peut être expliquée par les effets synergiques des lignanes et sesquiterpènes lactones (secoguaianolide), ce dernier ayant un $IC_{50} = 45.4 \mu M$. Une activité anti-tyrosinase faible du vanillic acid-4-O- β -D-glucopyranoside et aussi les flavonoïdes isolés seulement le nouveau composé 5, 7, 4',5'-tetrahydroxyflavonol-2'-[propanoicacid-(2'''-acetoxy-3'''-sulfonyl)]-5'-O- β -D-glucopyranoside qui donné une faible activité.

A ce stade nous pouvons conclure que les deux espèces *Cotula anthemoides* L. et *Pentzia monodiana* Maire. présentent toutes les deux un profil phytochimique et des activités antioxydantes, anticholinestérase et antityrosinase intéressantes.

Donc ces deux espèces pourraient être considérées comme des nouvelles sources d'exploitation dans les domaines cosmétique et médical.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons proposer quelques perspectives :

- Afin de compléter ce travail, une étude phytochimique sur les extraits chloroformiques obtenus devrait être réalisée.
- Il est important tout de même d'évaluer d'autres activités biologiques des composés obtenus tel que l'activité neuroprotectrice pour les lignanes, anti inflammatoire....etc
- La plupart des composés obtenus ont montré des vertus thérapeutiques intéressantes, d'où l'intérêt de développer des méthodes de purification de ces composés applicables à l'échelle industrielle (CPC et EPC).

REFERENCES

- Abdel-Mogib M., Jakupovic J., Dawidar AM., Metwally MA., Abou-Elzahab M. 1990. Sesquiterpene lactones and kaurane glycosides from *Francoeuria crispa*. *Phytochemistry*, 29 (8), 2581-2584.
- Abdulmagid AM., Voutquenne-Nazabadioko L., Bontemps G., Litaudon M., Lavaud C. 2008. Tyrosinase inhibitors and sesquiterpene diglycosides from *Guioa villosa*. *Planta Med.*, 74(01), 55–60.
- Abou-Donia A.H., Darwish F.A., Toaima S.M., Shawky E., Takla S.S. 2014. A new approach to develop a standardized method for assessment of acetylcholinesterase inhibitory activity of different extracts using HPTLC and image analysis. *J. Chromatogr. B.*, 955, 50-57.
- Adolphi B., Scholz-Ahrens KE., de Vrese M., Açil Y., Laue C., Schrezenmeir J. 2009. Short-term effect of bedtime consumption of fermented milk supplemented with calcium, inulin-type fructans and caseinphosphopeptides on bone metabolism in healthy, postmenopausal women. *Eur. J. Nutr.*, 48(1), 45-53.
- Agrawal PK. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligo-saccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10), 3307-3330.
- Agrawal, PK. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Central Institute of Medical and Aromatic Plants, India. Édition Elsevier, New York.
- Ahmed AA., El-Sayed NH., el-Negoumy SI., Mabry TJ. 1987. Flavonoids of *Cotula cinerea*. *J. Nat. Prod.*, 50(3), 519-520.
- Alaniz FS., Mazzarini LA., Demo MS., Sabini LI., Maldonado AM. 2010. Derivated products from *Achyrocline satureioides* and *Arnica Montana*, with immunomodulating effects. *Mol. Med. Chem.*, 20, 121-124.
- Ali-Shtayeh MS., Jamous RM., Abu Zaitoun YS., Qasem IB. 2014. *In-vitro* screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Funct. Foods Health Dis.*, 4(9), 381-400.
- 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 (26), 7970-7981.
- Aquino R., Cáceres A., Morelli S., Rastrelli L. 2002. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *J. Nat. prod.*, 65 (12), 1773-1776.
- Arora A, Nair MG, Strasburg GM. 1998. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free. Radic. Biol. Med.*, 24(9), 1355-1363.
- Arunee S., Kaoru U., Hiroshi N., Pharkphoom P. 2014. Identification of a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor from *Thai edible plants*. *Food Chem.* 165, 92–97.
- Aruoma OI. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol.*, 32(7), 671-683.
- Ayres DC., Loïke JD. 1990. Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties. *Cambridge University Press, United Kingdom.*, 402 pages.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food. chem.*, 99(1), 191-203.
- Barata LES., Santos LS., Ferri PH., Phillipson JD., Paine A., Croft SL. 2000. Antileishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry.*, 55(6), 589–595.
- Barkely TM., Brouillet L., Strother JL. 2006. Flora of North America- Asteraceae. *Oxford Univ. Press, New York .*, 19, 3-69.
- Beejmohun V., Fliniaux O., Hano C., Pilard S., Grand E., Lesur D., Cailleu D., Lamblin F., Lainé E., Kovensky J., Fliniaux MA., Mesnard F. 2007. Coniferin dimerisation in lignan biosynthesis in flax cells. *Phytochemistry.*, 68(22-24), 2744-2752.
- Bel Hadj Kether F., mahjoub MA., ammar S., majoli K., Helal AN., mighri Z. 2014. Biological properties of extracts of *Cotula coronopifolia* L. growing in Tunisia. *Int J Cur Sci Res.*, 5(2), 1156 -1160
- Bellakhdar J. 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Encyclopaedia of World Medicinal Plants.*, 29, 30.

- Belmares H., Barrera A., Castillo E., Ramos LF., Hernandez F., Hernandez V. 1979. New rubber antioxidants and fungicides derived from *Larrea tridentate* (creosote bush). *Ind. Prod. Res. Dev.*, 18(3): 220-226
- Belyagoubi-Benhammou N., Belyagoubi L., Bekkara FA. 2014. Phenolic contents and antioxidant activities *in vitro* of some selected Algerian plants. *J. Med. Plants. Res.*, 8(40): 1198-1207.
- Benchekroun M. 2014. Synthèse multicomposants et évaluation pharmacologique de nouveaux adduits de Ugi et de Passerini pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté.
- Benmenine AK., Ouahrani MR., Gherraf N., Sekirifa ML., Baameu L. 2011. Potentiodynamic investigation of the anticorrosive action of *Cotula cinerae* extracts on mild steel X52 in 20% H₂SO₄ solution. *J. Chem. Pharm. Res.*, 3(3), 666-669.
- Bentham G. 1867. *Flora Australiensis*, Reeve, London. 3, 1873.
- Blois MS., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.*, 81, 1199-1200.
- Bohlmann F., Zdero C. 1972. Zwei neue sesquiterpen-lactone aus *lidbeckia pectinata* berg. Und *pentzia elegans* DC. *Tetrahedron Lett.*, 13(7), 621-624.
- Bohlmann F., Zdero C. 1978. Naturally occurring terpene derivatives. Part 135. New sesquiterpenes and acetylenes from *Athanasia* and *Pentzia* species. *Phytochemistry.*, 17(9), 1595-1599.
- Bohlmann F., Zdero C. 1979. Naturally occurring terpene derivatives. Part 175. 3 β -Isovaleryloxycostunolide, a new germacranolide from *Cotula hispida*. *Phytochemistry.*, 18(2), 336-337.
- Bohm BA., Stuessy TF. 2001. Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). *New York: Springer Science & Business Media.*, 831.
- Bonnier G. 1934. Flore complète de France, Suisse et Belgique. *Édition 10*, 118.
- Booth NL., Dejan N., Richard B., Stacie E. 2004. *Clin. Pharmacol. Therap.*, 76, 511.
- Borsato MLC., Graef CFF., Souza GEP., Lopes NP. 2000. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry.*, 55(77), 809 – 813.

- Botha JP. 1938a. The digestibility and nutritive value of karroo pasture plants. VII. Berg gansie [*Pentzia sphaerocephala*]. *Farming in South Africa.*, 3, 358-369.
- Botha JP. 1938b. The digestibility and nutritive value of karroo pasture plants. VI. Groot gansie [*Pentzia incana*]. *Farming in South Africa.*, 13, 305-306.
- Bouallala M., Bradai L., Abid M. 2014. *Revue El-Wahat pour les Recherches et les Etudes.* 7n (2), 18-26
- Boukhalfa D. 2017. Contribution à l'étude des plantes aromatiques et médicinales de la région de l'Ahaggar. *Université Benyoucef Benkhedda d'Alger centre.*
- Boussoula E., Ghanmi M., Satrani B., Alaoui MB., Rhafouri R., Farah A., Nadine A., Abdelaziz C. 2016. Chemical quality, antibacterial and antifungal activities of *Cotula cinerea* essential oil from South Morocco. *Environmental Sci.*, 12(5), 209-216.
- Boutaghane N. 2013. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales Algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae).
- Brighenti F. 2007. Dietary fructans and serum triacylglycerols: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Nutr.*, 137(11), 112.
- Bruneton J. 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition revue et augmentée. Paris Cachan: Éd. Tec & doc Éd. médicales internationales, 1269.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie (phytochimie, plantes médicinales). Tec et Doc, Paris.
- Bustos-Brito C., Sánchez-Castellanos M., Esquivel B., Calderón JS., Calzada F., Yépez-Mulia L., Joseph-Nathan P., Cuevas G., Quijano L. 2015. *ent*-Kaurene Glycosides from *Ageratina cylindrica*. *J. Nat. Prod.*, 78(11), 2580-2587.
- Calabria LM., Piacente S., Kapusta I., Dharmawardhane SF., Segarra FM., Pessiki PJ., Mabry TJ. 2008. Triterpene saponins from *Silphium radula*. *Phytochemistry.*, 69(4), 961-972.
- Chaib F., Sahki R., Sabaou N., Rached W., Bennaceur M. 2015. Phytochemical Investigation and Biological Activities of Some Saharan Plants from Hoggar. *J. Agric Sci.*, 7(7), 163.

- Chase MW., Christenhusz MJM., Fay MF., Byng JW., Judd WS., Soltis DE., Mabberley DJ., Sennikov AN., Soltis PS., Stevens PF. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.*, 181(1), 1-20.
- Chen GY., Dai CY., Wang TS., Jiang CW., Han CR., Song XP. 2010. A new flavonol from the stem-bark of *Premna fulva*. *Arkivoc.*, 2, 179-185.
- Cheng X., Zeng Q., Ren J., Qin J., Zhang S., Shen Y., Zhu J., Zhang F., Chang R., Zhu Y., Zhang W., Jin H. 2011. Sesquiterpene lactones from *Inula falconeri*, a plant endemic to the Himalayas, as potential anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 46(11), 5408-5415.
- Chenuet G. 2007. La santé par les plantes. *Phytothérapie. Digest Sélection du Reader.*, 320.
- Choe E., Min DB. 2005. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *J. Food. Sci.*, 70(9), R142-R159.
- Christensen LP. 1992. Acetylenes and related compounds in anthemideae. *Phytochemistry.* 31(1), 7-49.
- Christensen LP., Lam J. 1991. Acetylenes and related compounds in Astereae. *Phytochemistry.*, 30(8), 2453-2476.
- Cole TCH., Hilger HH., Stevens PF., Kainulainen K. 2018. Angiosperm Phylogeny Poster - *Flowering Plant Systematics*, APweb – www.mobot.org/MOBOT/research/APweb.
- Comte G., Allais DP., Chulia AJ., Vercauteren J., Pinaud N. 1997. Three phenylpropanoids from *Juniperus phoenicea*. *Phytochemistry.*, 44(6), 1169-1173.
- Crete P. 1965. Précis de botanique: Systématique des angiospermes. *Masson-Paris.*, Édition 2, 429.
- Crismon ML. 1998. Pharmacokinetics and Drug interaction of cholinesterase Inhibitors Administered in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy.*, 18(2P2), 47-54.
- da Silva Filho AA., Costa ES., Cunha WR., Silva MLE., Nanayakkara NPD., Bastos JK. 2008. *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother. Res.*, 22(10), 1307–1310.

- da Silva R., de Souza GHB., da Silva AA., de Souza VA., Pereira AC., Royo VA., Silva MLA., Donate PM., Ara újo ALSM., Carvalho JCT., Bastos JK. 2005. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15(4), 1033–1037.
- da Silva R., Saraiva J., de Albuquerque S., Curti C., Donate P.M., Bianco TNC., Bastos, JK., Silva MLA. 2008. Trypanocidal structure–activity relationship for *cis*- and *trans*-methylpluviatolide. *Phytochemistry.*, 69(9), 1890 – 1894.
- Dakmouche M., Ladjel S., Gherraf N., Saidi M., Hadjaj M., Ouahrani M R. 2009. Inhibition effect of some plant extracts on the corrosion of mild steel in H₂SO₄ medium. *Asian. J. Chem.*, 21(8), 6176-6180.
- Dali Yahia MK. 2017. Etude phytochimique bioguidée de plantes aromatiques sahariennes. Thèse DESM. Université de Tlemcen 2017.
- De Andrade FDP., Rastrelli L., Pizza C., Sano PT., Vilegas W. 2002. Flavonol glycosides and a naphthopyranone glycoside from *Paepalanthus macropodus* (Eriocaulaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 30(3), 275-277.
- Decker EA., Welch B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agr. Food Chem.*, 38(3), 674-677.
- Décret exécutif n° 12-03 du 10 Safar 1433 correspondant au 4 janvier 2012 fixant la liste des espèces végétales non cultivées protégées. 18 janvier 2012. *Journal officiel de la République algérienne.*, 3, 12.
- Delattre J., Beaudoux JL., Bonnefont-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. 1- 23.
- Dendougui H., Seghir S., Jay M., Benayache F., Benayache S. 2012. Flavonoides from *Cotula cinerea* Del. *Int. J. Med. Arom. Plants.*, 2(4), 589-595.
- Dillon MO., Mabry TJ. 1977. Flavonoid aglycones from *Flourensia*. *Phytochemistry.*, 16(8), 1318-1319.
- Dirks U., Herrmann K. 1984. 4-(β -D-glucopyranosyloxy) benzoic acid, a characteristic phenolic constituent of the Apiaceae. *Phytochemistry.*, 23(8), 1811-1812.
- Dupont F., Guignard JL. 2007. Abrèges botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée, Masson.

- Dupont F., Guignard JL., Pelt JM. 2012. Botanique : les familles de plantes. 15^{ème} édition. Issyles-Moulineaux: Elsevier Masson, 300.
- Eklund PC., Långvik OK., Wärnå JP., Salmi TO., Willför SM., Sjöholm RE. 2005. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org. Biomol. Chem.*, 3(18), 3336-3347.
- El Bouzidi L., Abbad A., Fattarsi K., Hassani L., Leach D., Markouk M., Legendre L., Bekkouche K. 2011. Chemical composition and anticandidal properties of the essential oil isolated from aerial parts of *Cotula cinerea*: a rare and threatened medicinal plant in Morocco. *Nat. Prod. Com.*, 6(10), 1491-1494.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7(2), 88-95.
- Emerenciano VP., Militão JSLT., Campos CC., Romoff P., Kaplan MAC., Zambon M., Brant AJC. 2001. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29(9), 947-957.
- Felippe LG., Baldoqui DC., Kato MJ., Bolzani VS., Guimarães EF., Cicarelli RMB., Furlan M. 2008. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry.*, 69(2), 445–450.
- Fournier G., Baghdadi H., Ahmed SS., Paris M. 1989. Contribution to the study of *Cotula cinerea* essential oil. *Planta Med.*, 55(6), 580.
- Gang DR., Kasahara H., Xia ZQ., Vander Mijnsbrugge K., Bauw G., Boerjan W., Van Montagu M., Davin LB., Lewis NG. 1999. Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *J. Biol. Chem.*, 274(11), 7516-7527.
- Gao DF., Zhang YJ., Yang CR., Chen KK., Jiang HJ. 2008. Phenolic antioxidants from green tea produced from *Camellia taliensis*. *J. Agric. Food. Chem.*, 56 (16), 7517-7521.
- Gao R., Gao C., Tian X., Yu X., Di X., Xiao H., Zhang X. 2004. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L, and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. *Pest. Manag. Sci.* 60(11), 1131-1136.
- Gaussen H., Leroy F., Ozenda P. 1982. Précis de botanique (Végétaux supérieurs). 2ème édition., 273-274.

- Gawronska-Grzywacz M., Krzaczek T. 2009 .Flavonoids and coumarins from *Hieracium Pilosella* L. (Asteraceae). *Acta. Soc. Bot. Pol.*, 78 (3), 189-195.
- Gohari AR., Saeidnia S., Shahverdi AR., Yassa N., Malmir M., Mollazade K., Naghinejad AR. 2009. Phytochemistry and antimicrobial compounds of *Hymenocrater calycinus*. *Eur. Asia. J. Bio. Sci.*, 3(9), 64-68.
- Gottlieb OR. 1972. Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry.*, 11(2), 1537-1570.
- Govindaraju V., Young K., Maudsley AA. 2000. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed: Int. J. Develop. Appli. Magn. Reson. In Vivo.*, 13(3), 129-153.
- Greenblatt HM., Kryger G., Lewis T., Silman I., Sussman JL. 1999. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 resolution. *Febs. Lett.*, 463(3), 321-326.
- Greger H., Hofer O. 1985. Sesquiterpene-coumarin ethers and polyacetylenes from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry.*, 24(1), 85-88.
- Guaouguauou F., Taghzouti K., Ahl Bebaha M., Es-Safi N. 2017. Toxicité aigue et activité analgésique des extraits et de l'huile essentielle de *cotula cinerea*. *CIJC 18-19 Décembre, Faculté des Sciences- Tétouan (Maroc)-Communications Orales.*, 28.
- Guillarmod AJ. 1971. Flora of Lesotho Lehre, Allemagne, Cramer., 474.
- Gülçin İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch. Toxicol.*, 86(3), 345-391.
- Gülçin İ., Elias R., Gepdiremen A., Taoubi K., Köksal E. 2009. Antioxidant secoiridoids from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *Wood. Sci. Technol.*, 43(3-4), 195–212.
- Halliwell B. 1995. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49(10), 1341-1348.
- Halliwell B., Gutteridge JMC. 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. *Clarendon Press, Oxford*.
- Harmatha J., Nawrot J. 1984. Comparison of the feeding deterrent activity of some sesquiterpene lactones and a lignan lactone towards selected insect storage pests. *Biochem. Sys. Ecol.*, 12(3), 95-98

- Hata Y. 2014. Discovery of antiprotozoal compounds from medicinal plants. Thèse de doctorat. Université de Basel.
- Haworth RD. 1936. Natural resins. *Ann. Rep. Prog. Chem.*, 33(4), 266-279.
- Hennebelle T. 2006. Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat., 303.
- Heywood VB., Harborne JB., Turner BL. 1977. The Biology of the Compositae. Ed Academic Press, New York., 914.
- Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B., Legrand M. 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme a shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell.*, 16(6), 1446–1465.
- Horie T., Ohtsuru Y., Shibata K., Yamashita K., Tsukayama M., Kawamura Y. 1998. ¹³C-NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones. *Phytochemistry.*, 47(5), 865-874.
- Hristozov D., Da Costa FB., Gasteiger J. 2007. Sesquiterpene lactones-based classification of the family asteraceae using neural networks and k-nearest neighbors. *J. Chem. Inf. Model.*, 47(1), 9-19.
- Hudson JF. 1990. Food antioxidants. *Elsevier Applied Science*, London
- Hui-Li Z., Akito N., Harumi O., Hajim M., Jinsaku S. 1998. Sesquiterpene glycosides from *Cotton oil cake*. *Phytochemistry.*, 48(4), 665-668.
- Huneck S., Zdero C., Bohlmann F. 1986. Seco-guaianolides and other constituents from *Artemisia* species. *Phytochemistry.*, 25(4), 883-889.
- Hussien TA., El-Toumy SA., Hassan HM., Hetta MH. 2016. Cytotoxic and antioxidant activities of secondary metabolites from *Pulicaria undulate*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8 (9), 150-155.
- Inoshiri S., Sasaki M., Kohda H., Otsuka H., Yamasaki K. 1987. Aromatic glycosides from *Berchemia racemosa*. *Phytochemistry.*, 26(10), 2811-2814.

- Iwashina T., Setoguchi H., Kitajima J. 2011. Flavonoids from the leaves of *Vitex rotundifolia* (Verbenaceae), and their qualitative and quantitative comparison between coastal and inland populations. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci.*, Series B, 37, 87-94.
- Jakupovic J., Abdel Aal M., Eid F., Bohlmann F., El-Dahmy S., Sarg T. 1988. Further glaucolides and other sesquiterpene lactones from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry.*, 27(7), 2219-2224.
- Kadereit JW., Jeffrey C. 2007. The families and Genera of Vascular Plants, *Flowering Plants. Eudicots: Asterales*. Berlin: Springer-Verlag., 8, 61-86.
- Kaikaew K., Mahabusarakam W. 2010. Furofuran lignans from the stem bark of *Fagraea fragrans* Roxb. In *Proceedings of the 7th IMT-GT UNINET and the 3rd International PSU-UNS Conferences on Bioscience*.
- Kaiser S., Di Mascio P., Murphy M. E., Sies H. 1990. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archi. Biochem. Biophys.*, 277(1), 101-108.
- Kassuya CA., Silvestre A., Menezes-de-Lima O., Marotta DM., Rehder VLG., Calixto JB. 2006. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*: evidence for interaction with platelet activating factor receptor. *Eur. J. pharmacology.*, 546(1), 182-188.
- Kether FBH., Mahjoub MA., Mahjoub SA., Salah KB., Helal AN., Mighri, Z. 2012. Chemical composition, in vitro antifungal and antioxidant activities of essential oil from *Cotula coronopifolia* L. growing in Tunisia. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6(20), 4388-4395.
- Kim HK., Kim M., Kim S., Kim M., Chung JH. 2004. Effects of Green Tea Polyphenol on Cognitive and Acetylcholinesterase Activities. *Biosci. Biothechnol. Biochem.*, 68, 1977-1979.
- Knapp MJ., Knopman DS., Solomon PR., Pendlebury WW., Davis CS., Gracon SI., Apter JT., Lazarus CN., Baker KE., Barnett M. 1994. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 271(13), 985-991.
- Ko RK., Kim GO., Hyun CG., Jung DS., Lee NH. 2011. Compounds with Tyrosinase Inhibition, Elastase Inhibition and DPPH Radical Scavenging Activities from the Branches of *Distylium racemosum* Sieb. & Zucc. *Phytother. Res.*, 25(10), 1451-1456.

- Koechlin-Ramonatxo C. 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutr. Clin. Métabol.*, 20(4), 165-177.
- Kozawa M., Baba K., Matsuyama Y., Kido T., Sakai M., Takemoto M. 1982. Components of the Root of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. II. Insecticidal Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 30(5), 2885-2888
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol. Bioch.*, 45 (3-4), 244-249.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdelly, C. 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian *halophytes*. *Comptes Rendus Biologies.*, 331(11), 865-873.
- Kubo I., Kinst-Hori I. 1999. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, 47(10), 4121-4125.
- Kubo I., Yokokawa Y., Kinst-Hori I. 1995. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. *J. Nat. Prod.*, 58(5), 739-743.
- Küpeli E., Erdemoğlu N., Yeşilada E., Şener B. 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. *J. Ethnopharmacol.*, 89(2-3), 265 – 270.
- Larhsini M., Markouk M., Jaouhari JT., Bekkouche K., Lazrek HB., Jana M. 2002. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother. Res.*, 16 (1), S97-98.
- Leifert WR., Abeywardena MY. 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr. Res*, 28(11), 729-737.
- Leopoldini M., Russo N., Toscano M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food. Chem.*, 125(2), 288-306.
- Lewis NG. 1999. Lignans: biosynthesis and function. *Comp. Nat. Prod. Chem.*, 1, 639-712.
- Lien EJ., Ren S., Bui HH., Wang R. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med.*, 26(3-4), 285–294.

- Liouane K., Bel Hadj Salah K., Ben Abdelkader H., Mahjoub MA., Aouni M., Said K., Mighri Z. 2012. Antibacterial and antifungal activities of *Cotula coronopifolia* L. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6(22), 4662-4666.
- Lloyd DG. 1972. Breeding Systems in *Cotula* L. (Compositae, Anthemideae). *New Phytologist.*, 71(6), 1181-1194.
- Lu Y., Foo LY. 2000. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry.*, 55 (3), 263-267.
- Ma J., Dey M., Yang H., Poulev A., Pouleva R., Dorn R., Lipsky PE., Kennelly EJ., Raskin I., 2007. Anti-inflammatory and immunosuppressive compounds from *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry.*, 68(8), 1172-1178.
- Magee AR., Nicolas AN., Tilney PM., Plunkett G. 2015. Phylogenetic relationships and generic realignments in the early diverging subtribe *Pentziinae* (Asteraceae, Anthemideae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 178(4), 633–647.
- Magee AR., Tilney PM. 2012. A taxonomic revision of *Pentzia* (Asteraceae, Anthemideae) I: the *P. incana* group in southern Africa, including the description of the new species *P. coppositifolia* Magee. *South. Afr. J. Bot.*, 79, 148-158.
- Mahjoub MA., Ammar S., Majouli K., Mighri Z. 2012. Two new alkaloids and a new polyphenolic compound from *Cotula coronopifolia*. *Chem. Nat. Compd.*, 47(6), 955-958.
- Mahran GH., Ahmed Salah M., Ansary SM. 1976. A pharmacognostical study of *Cotula cinerea* del. growing in Egypt. I. Roots, stems and leaves. *Bull. Fac. Pharm. Cairo. Univ.*, 14(1), 247-258.
- Maire R. 1929. *Pentzia monodiana* Maire n. sp. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord.*, 20, 25-26.
- Maire R. 1936. *Pentzia hesperidum* Maire & Wilczek. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord.*, 27, 235.
- Marco JA., Barbera O., Rodriguez S., Domingo C., Adell J. 1988. Flavonoids and other phenolics from *Artemisia hispanica*. *Phytochemistry.*, 27(10), 3155-3159.
- Markkanen T., Makinen ML., Maunuksela E., Himanen P. 1981. Podophyllotoxin lignans under experimental antiviral research. *Drug. Exp. Clin. Res.*, 7(1), 711-718

- Markouk M., Bekkouche K., Larhsini M., Bousaid M., Lazrek HB., Jana M. 2000. Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. *J. Ethnopharmacol.*, 73(1-2), 293-297.
- Markouk M., Lazrek H B., Jana M. 1999b. Analgesic effect of extracts from *Cotula cinerea* (L). *Phytother. Res.*, 13(3), 229-30.
- Markouk M., Lazrek HB., Larhsini M., Bekkouche K., Jana M. 1999a. Preliminary screening of antiprotozoal activity of extracts from *Cotula cinerea* L. *Therapy.*, 54(6), 759-761.
- McCall MR., Frei B. 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans. *Free Rad. Biol. Med.*, 26(7-8), 1034-1053.
- McRae DW, Towers GHN. 1984. Biological activities of lignans. *Phytochemistry.*, 23(6), 1207-1220.
- Metwally MA., El-Dahmy S., Jakupovic J., Bohlmann F., Dawidar AM., Metwally SA. 1986. Glaucolide-like sesquiterpene lactones from *Cotula cinerea*. *Phytochemistry.*, 25(1), 255-257.
- Miao Y., He N., Zhu JJ. 2010. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chem. Rev.*, 110(9), 5216-5234.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol rev.*, 52(4), 673-751.
- Miliauskas G., Venskutonis PR., van Beek TA. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food. Chem.*, 85(2), 231-237.
- Mohamed GA. 2016. Tagenols A and B: new lipoxygenase inhibitor flavonols from *Tagetes minuta*. *Phytochem. Lett.*, 16, 141-145.
- Montagnier L., Olivier R., Pasquier C. 1997. Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases. *CRC Press.*, 409-427
- Nagendra PK., Yang B., Yang S., Chen Y. 2009. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from *litchi* (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. *Food. Chem.*, 116(1), 1-7.

- Ngoc TM., Lee I., Ha DT., Kim HJ., Min BS., Bae KH. 2009. Tyrosinase-inhibitory constituents from the twigs of *Cinnamomum cassia*. *J. Nat. Prod.*, 72(6), 1205-1208.
- Nicolson GL. 2003. Lipid replacement as an adjunct to therapy for chronic fatigue, anti-aging and restoration of mitochondrial function. *J. Am. Nutraceutical. Assoc.*, 6(3), 22-28.
- Oberprieler C., Himmelreich S., Vogt R. 2007. A new subtribal classification of the tribe Anthemideae (Compositae). *Willdenowia.*, 37(1), 89-114.
- Orhan F., Barış Ö., Yanmış D., Bal T., Güvenalp Z., Güllüce M. 2012. Isolation of some luteolin derivatives from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* and determination of their genotoxic potencies. *Food. chem.*, 135(2), 764-769.
- Ortiz S., Dali-Yahia K., Vasquez-Ocmin P., Grougnet R., Grellier P., Michel S., Alexandre M., Boutefnouchet S. 2017. Heme-binding activity of methoxyflavones from *Pentzia monodiana* Maire (Asteraceae). *Fitoterapia.*, 118, 1-5.
- Ould El Hadj MD., Hadj-Mahammed M., Zabeirou H., Chehma A. 2003. Importance des plantes spontanées médicinales dans la pharmacopée traditionnelle de la région de Ouargla (sahara septentrional - est algérien)., *Sci. Technol. C. Biotechnol.*, 20, 73-78.
- Ozenda P. 1958. Flore du Sahara septentrional et central. Paris: CNRS.
- Ozenda P. 1991. Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition mise à jour et augmentée. Paris: CNRS, 662.
- Öztürk M., Kolak U., Topcu G., Oksuz S., Choudhary MI. 2011. Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical scavenging activity-guided fractionation. *Food. Chem.*, 126(1), 31-38.
- Özyürek M., Güçlü K., Apak R. 2011. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends Anal. Chem.*, 30(4), 652-664.
- Panero JL., Crozier BS. 2016. Macroevolutionary dynamics in the early diversification of Asteraceae. *Mol. Phylogenetics. Evol.*, 99, 116–132.
- Parsons RF. 2012. The deliberate introduction to Australia of the shrub genus *Pentzia* (Asteraceae) and its subsequent persistence and spread. *Cunninghamia.*, 12(4), 239-246.

- Pavelaa R., Sajfrtová M., Sovová H., Bárnét M., Karban J. 2010. The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. Extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Ind. Crops. Prod.*, 31(3), 449-454.
- Peles DN., Simon JD. 2010. The Ultraviolet Absorption Coefficient of Melanosomes Decreases with Increasing Pheomelanin Content. *J. Phys. Chem. B.*, 114(29), 9677-9683.
- Pelucchi C., Talamini R., Galeone, C., Negri E., Franceschi S., Dal Maso L., Montella M., Conti E., La Vecchia C. 2004. Fibre intake and prostate cancer risk., *Int. J. Cancer.*, 109(2), 278-280.
- Pereira do Amaral F., Napolitano A., Masullo M., Campaner dos Santos L., Festa M., Vilegas W., Pizza C., Piacente S. 2012. HPLC-ESIMS (n) profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. *J. Nat. Prod.*, 75(4), 547-556.
- Pohanka M. 2011. Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: implication and counteracting of melatonin. *J. Appl. Biomed.*, 9(4), 185-196.
- Prior RL., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agricult. Food. Chem.*, 53(10), 4290-4302.
- Quézel P., Santa S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris- CNRS., 1170.
- Raffaelli B., Hoikkala A., Leppälä E., Wähälä KJ. 2002. Enterolignans., *J. Chromatogr. B.*, 777(1-2), 29-43.
- Ramassamy C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacology.*, 545(1), 51-64.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free. Radic. Biol. Med.*, 26(9-10), 1231-1237.
- Redwane A., Markouk M., Lazrek HB., Amarouch H., Jana M. 1998. Laboratory evaluation of molluscicidal activity of extracts from *Cotula cinerea* (L) and *Quercus lusitania* var. *infectoria galls* (Oliv.). *Ann. Pharm. Fr.*, 56(6), 274-276.

- Retsky KL., Chen K., Zeind J., Frei B. 1999. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation., *Free. Rad. Biol. Med.*, 26(1-2), 90-98.
- Rice-Evans CA., Miller NJ., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free. Radic. Biol. Med.*, 20(7), 933-956.
- Rugutt JK., Henry CW., Franzblau SG., Warner IM. 1999. NMR and Molecular Mechanics Study of Pyrethrins I and II. *J. Agric. Food. Chem.*, 47(8), 3402-3410
- Rustaiyan A., Zare K., Biniyaz T., Fazlalizadeh G. 1989. A seco-guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Postia bombycina*. *Phytochemistry.*, 28(11), 3127-3129.
- Safer S., Cicek SS., Pieri V., Schwaiger S., Schneider P., Wissemann V., Stuppner H. 2011. Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of ¹H NMR and HPLC–ESI-MS. *Phytochemistry.*, 72(11-12), 1379-1389.
- Sakushima A., Coşkun M., Maoka T. 1995. Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*. *Phytochemistry.*, 40(1), 257-261.
- Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130(8), 2073S-2085S.
- Schallreuter K., Slominski A., Pawelek JM., Jimbow K., Gilchrest BA. 1998. What controls melanogenesis?. *Exp. Dermatol.*, 7(4), 143-150.
- Schneider LS., Tariot PN. 1994. Emerging drugs for Alzheimer's disease: mechanisms of actions and prospects for cognitive enhancing medications. *Med. Clin. North. Am.*, 78(4), 911-934.
- Schoot Uiterkamp AJM., Mason HS. 1973. Magnetic dipole-dipole coupled copper (II) pairs in nitric oxide-treated tyrosinase: A Structural relationship between the active sites of tyrosinase and hemocyanin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70(4), 993-996.
- Schroeter H., Boyd C., Spencer JPE., Williams RJ., Cadenas E., Rice-Evans C. 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging.*, 23(5), 861-880.
- Seaman FC. 1982. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot Rev.*, 48(2), 121-594.

- Shabbir A., Mujahid I. 2017. First record of *Cotula australis* (asteraceae): addition to the alien flora of Pakistan. *J. New. Biol. Rep.*, 6(2), 86-89.
- Shadle G., Chen F., Reddy MSS., Jackson L., Nakashima J., Dixon RA. 2007. Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality. *Phytochemistry.*, 68(11), 1521–1529.
- Shah RS., Lee HG., Xiongwei Z., Perry G., Smith MA., Castellani RJ. 2008. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomed. Pharmacother.*, 62(4), 199-207.
- Showkat R. 2012. Chemoprofiling of medicinal plants and value addition of their principle constituents through synthetic modifications. Srinagar.
- Soerensen JS., Ve B., Anthonsen T., Soerensen NA. 1968. Naturally occurring acetylene compounds. XXXIV. Some Australian members of the genus *Cotula* L. *Aust. J. Chem.*, 21(8), 2037-2051.
- Staneva JD., Todorova MN., Evstatieva LN. 2008. Sesquiterpene lactones as chemotaxonomic markers in genus *Anthemis*. *Phytochemistry.*, 69(3), 607-618.
- Stoclet JC., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak MH., El Bedoui J., Chataigneau M., Schini-Kerth VB. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharmacology.*, 500(1-3), 299-313.
- Sultana NN, Lee H. 2007. Antielastase and free radical scavenging activities of compounds from the stems of *Cornus kousa*. *Phytother. Res.*, 21(12), 1171-1176.
- Sumaya Martinez MT. 2004. Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation. Microbiologie Doctorat, 188.
- Sung SY., Kang SY., Lee KY., Park MJ., Kim JH. 2002. (+)- α -Viniferin, a stilbene Trimer from *Caranga chamlague* inhibits acetylcholinesterase. *Biol. Pharm. Bull.*, 25(1), 125-127.
- Tadrent W., Benteldjoune M., Laggoune S., Benmerache A., Kabouche A., Semra Z., Kabouche Z. 2014a. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *cotula anthemoides* L. *Chem. Nat. Compd.*, 50 (4), 744-746.

- Tadrent W., Kabouche A., Touzani R., Kabouche Z. 2014b. Chemotypes investigation of essential oils of “*Guertoufa*” herbs. *J. Mater. Environ. Sci.*, 5(4), 1200-1205.
- Thulin M. 2001. *Pentzia* (Asteraceae-Anthemideae) in the Horn of Africa region. *Nord. J. Bot.*, 21(3), 249-252.
- Ullah F., Hussain H., Hussain J., Bukhari I.A. 2007. Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*. *Phytother. Res.*, 21(11), 1076-1081.
- Umezawa T., Davin LB., Lewis NG. 1990. Formation of the lignan, (-) secoisolariciresinol, by cell free extracts of *Forsythia intermedia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171(3), 1008-1014.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes CJ., Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 266(1-2), 37-56.
- Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160(1), 1-40.
- Van Heerden FR., Viljoen AM., Van Wyk BE. 2000. The major flavonoid of *Dodonaea angustifolia*. *Fitoterapia.*, 71(5), 602-604.
- Van Royen P., Lloyd D., 1975. The genus *Cotula* (Asteraceae) in New Guinea, Sertulum Papuanum 21. *Blumea.*, 22(2), 197-206.
- Wang B., Liu Y., Zhang D., Feng Y., Li J. 2012. Efficient kinetic resolution of amino acids catalyzed by lipase AS ‘Amano’ via cleavage of an amide bond. *Tetrahedron: Asymmetry.*, 23(18-19), 1338-1342.
- Wardman P., Candeias LP. 1996. Fenton chemistry: An introduction. *Radiat. Res.*, 145(5), 523-531.
- Weiguang Y., Fischer J., Akoh CC. 2005. Study of anticancer activities of muscadine grape phenolics *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, 53(22), 8804-8812.
- Williams CA., Greenham J., Harborne JB. 2001. The role of lipophilic and polar flavonoids in the classification of temperate members of the Anthemideae. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29(9), 929-945.

- Wszelaki N., Kuciun A., Kiss A. 2010. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharmaceutica.*, 60(1), 119-128.
- Xie LH., Akao T., Hamasaki K., Deyama T., Hattori M. 2003. Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem. Pharm. Bull.*, 51(5), 508-515.
- Yadava RN., Barsainya D. 1998a. A new isoflavone glycoside from seeds of *Cotula anthemoids* Linn. *J. Inst. Chemists.*, 70(4), 128-131.
- Yadava RN., Barsainya D. 1998b. A novel flavone glycoside from the seeds of *Cotula anthemoides*. *Fitoterapia.*, 69(5), 437-438
- Yalçın FN., Ersoz T., Akbay P., Caliş İ., 2003. Phenolic, megastigmane, nucleotide, acetophenon and monoterpene glycosides from *Phlomis samia* and *P. carica*. *Turk. J. Chem.*, 27(6), 703-711.
- Yamauchi S., Sugahara T., Matsugi J., Someya T., Masuda T., Kishida T., Akiyama K., Maruyama M. 2007. *Biosys. Biotechnol. Biochem.*, 71(9), 2283-2290.
- Yoshida H., Kajimoto G., Emura S. 1993. Antioxidant effects of *d*-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. *J. Americ. Oil. Chem. Soc.*, 70(10), 989-995.
- Yoshihara T., Omer E A., Koshino H., Sakamura S., Kikuta Y., Koda Y. 1989. Structure of a Tuber-inducing Stimulus from *Potato Leaves (Solanum tuberosum L)*. *Agric. Biol. Chem.*, 53 (10), 2835-2837.
- Zan K., Xiao-Qing C., Peng-Fei T. 2012. A new 1, 10-secoguaianolide from the aerial parts of *Artemisia anomala*. *Chin. J. Nat. Med.*, 10(5), 358-362.
- Zdero C., Bohlmann F. 1990. Glaucolides, fulvenoguaianolides and other sesquiterpene lactones from *Pentzia* species. *Phytochemistry.*, 29(1), 189-194.

REFERENCES WEB

- [1] <https://www.cbd.int/doc/world/dz/dz-nr-04-fr.pdf> (Consulté en 2018) Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie. Quatrième rapport national sur la mise en œuvre de la convention sur la diversité biologique au niveau national. Ministère de l'Aménagement du territoire, de l'Environnement et du Tourisme-Algerie. 2009.
- [2] <http://sequoia.tela-botanica.org/herbiera/herbiernum/familles.php>
- [3] <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-74895-synthese>
- [4] <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (Consulté en 2018) Stevens PF. 2017. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14. University of Missouri, St Louis.
- [5] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Consulté en 2018) NCBI: National Center for Biotechnology Information.
- [6] http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=108176 (Consulté en 2018) Flora of Pakistan. 2002a. *Pakistan.*, 207, 31.
- [7] <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa> (Consulté en 2018)
- [8] http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=200023720 (Consulté en 2018) Flora of Pakistan. 2002b. *Pakistan.*, 207, 32.
- [9] <http://www.sahara-nature.com/plantes.php?plante=cotula%20anthemoides&aff=nom>
- [10] <http://www.sahara-nature.com/plantes.php?aff=tamahaq&plante=pentzia%20monodi%20ana>

RESUME

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique des parties aériennes de deux plantes médicinales algériennes de la famille des Asteraceae : *Cotula anthemoides* L et *Pentzia monodiana* Maire. Cette étude a permis d'isoler et d'identifier **quinze** composés de *Cotula anthemoides* et **huit** composés de *Pentzia monodiana*. Les composés isolés comprennent **cinq** acides phénoliques, **neuf** flavonoïdes dont un nouveau, **trois** lignanes, **un** sesquiterpène lactone, **deux** glycosides phénoliques, **un** acide glycoylé, **un** diterpène et **un** nucléoside. La détermination structurale des composés isolés a été réalisée à l'aide des techniques spectroscopiques de RMN 1D et 2D (H^1 , C^{13} , COSY, HSQC, HMBC et ROESY), par la spectrométrie de masse (ESI-MS et HRESI-MS) et par comparaison avec les données bibliographiques.

L'évaluation de l'activité antioxydante par 4 méthodes (DPPH, ABTS, CUPRAC et la chélation par des ions ferreux), effectuée sur les différents extraits obtenus, a montré une bonne activité des extraits issus de *P. monodiana* par rapport à ceux de *C. anthemoides*. De plus, les extraits de *C. anthemoides* ont donné une activité anticholinestérase intéressante.

Cependant, pour les composés isolés des deux plantes, on a trouvé que les lignanes avec le flavonol et les flavones substitués en C-3, ont manifesté une meilleure activité antityrosinase et antiradicalaire, comparés à certains flavones qui agissent tant que antiradicalaires seulement.

Mots Clés : *Cotula anthemoides* L, *Pentzia monodiana* Maire, Asteraceae, lignanes, flavonoïdes, sesquiterpènes lactones, activité antioxydante, activité anticholinestérase, activité antityrosinase.

ABSTRACT

The present work concerns the phytochemical and biological studies of areal parts of two Algerian plants belonging to the Asteraceae family: *Cotula anthemoides* L. and *Pentzia monodiana* Maire. This study led to the isolation and identification of **fifteen** compounds of *Cotula anthemoides* and **eight** compounds of *Pentzia monodiana* including **five** phenolic acids, **nine** flavonoids from which one is new, **three** lignans, **one** sesquiterpene lactone, **two** glycosyl phenolics, **a** glycosyl acid, **a** diterpene and **an** nucleoside. The structural determination of the isolated compounds was established by the use of 1D and 2D NMR spectroscopic techniques (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC and ROESY), by mass spectrometry (ESI-MS and HRESI-MS) and by comparison with the literature data.

The evaluation of the antioxidant activity by 4 methods (DPPH, ABTS, CUPRAC and chelating by ferrous ions) of the various extracts, showed a good activity of extracts from *P. monodiana* compared to those of *C. anthemoides*. Furthermore, extracts of *C. anthemoides* showed an interesting anticholinesterase activity. However, both of lignanes, flavonol and flavones substituted in C-3, exhibited better antityrosinase and antiradical activities than some flavones only.

Key words: *Cotula anthemoides* L, *Pentzia monodiana* Maire, Asteraceae, lignanes, flavonoïdes, sesquiterpenes lactones, antioxidant activity, anticholinesterase activity, antityrosinase activity.

ملخص

أدت الدراسة الفيتوكيميائية لنبتتين جزائريتين من عائلة Asteraceae : *Cotula anthemoides* L و *Pentzia monodiana* Maire إلى فصل وتحديد 15 مركبا من *Cotula anthemoides* و 8 مركبات من *Pentzia monodiana* تشمل 5 أحماض, 9 فلافونويدات منهم واحد جديد, 3 lignanes, 1 sesquiterpene كذلك 2 فينول غليكوزيد, 1 حمض غليكوزيدي, diterpène ونوكليوزيد. تم التعرف عليها باستعمال تقنيات مطيافية الرنين النووي المغناطيسي أحادية وثنائية البعد (ROESY, ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) مطيافية الكتلة و كذلك بالمقارنة مع البيانات الببليوغرافية. واستخدمت 4 طرق لتقييم فعالية ضد الأكسدة (DPPH, ABTS, CUPRAC) وطريقة chélation (par des ions ferreux) للنبتتين *Cotula anthemoides* L و *Pentzia monodiana* Maire وكانت مستخلصات نبتة *Pentzia monodiana* أكثر فعالية بالمقارنة مع مستخلصات *Cotula anthemoides*. كذلك أعطت مستخلصات نبتة *Cotula anthemoides* نشاطا مثيرا للاهتمام ضد الكولينستراز. بالمقابل أظهرت lignanes مضافة للفلافانول و الفلافونات المستبدلة في الكربون 3, فعالية ضد التيروسيناز و ضد الأكسدة أحسن من الفلافونات وحدها.

الكلمات المفتاحية: Asteraceae , *Pentzia monodiana* Maire و *Cotula anthemoides* L, فلافونويدات, sesquiterpene , lignanes, ضد الأكسدة , ضد الكولينستراز و ضد التيروسيناز.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/311064865>

A new sulfonylated flavonoid and other bioactive compounds isolated from the aerial parts of Cotula...

Article *in* Natural Product Research · November 2016

DOI: 10.1080/14786419.2016.1261342

CITATIONS

0

READS

15

6 authors, including:



Abdulmagid Alabdul Magid

Université de Reims Champagne-Ardenne

39 PUBLICATIONS 224 CITATIONS

SEE PROFILE



Ahmed Kabouche

University of Constantine 1

149 PUBLICATIONS 877 CITATIONS

SEE PROFILE



Laurence Voutquenne

Université de Reims Champagne-Ardenne

75 PUBLICATIONS 661 CITATIONS

SEE PROFILE



Zahia Kabouche

University of Constantine 1

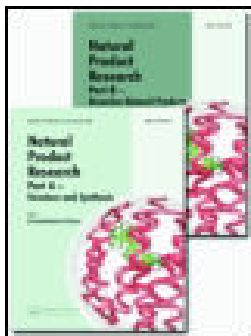
174 PUBLICATIONS 1,263 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Evaluation of the biological potential of medicinal and food plants [View project](#)



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

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


A new sulfonlated flavonoid and other bioactive compounds isolated from the aerial parts of *Cotula anthemoides* L.

Wafa Tadrent, Abdulmagid Alabdul Magid, Ahmed Kabouche, Dominique Harakat, Laurence Voutquenne-Nazabadioko & Zahia Kabouche



To cite this article: Wafa Tadrent, Abdulmagid Alabdul Magid, Ahmed Kabouche, Dominique Harakat, Laurence Voutquenne-Nazabadioko & Zahia Kabouche (2016): A new sulfonlated flavonoid and other bioactive compounds isolated from the aerial parts of *Cotula anthemoides* L., *Natural Product Research*

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1261342>

 View supplementary material 

 Published online: 28 Nov 2016.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

A new sulfonlated flavonoid and other bioactive compounds isolated from the aerial parts of *Cotula anthemoides* L.

Wafa Tadrent^a, Abdulmagid Alabdul Magid^b, Ahmed Kabouche^a, Dominique Harakat^c, Laurence Voutquenne-Nazabadioko^b and Zahia Kabouche^a

^aDépartement de chimie, Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (L.O.S.T), Université des frères Mentouri Constantine, Constantine, Algeria; ^bGroupe Isolement et Structure, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), Reims, France; ^cService Commun d'Analyses, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), Reims, France

ABSTRACT

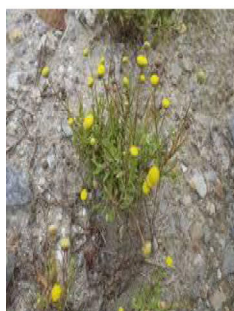
A new sulfonlated flavonol glucoside, 5,7,4',5'-tetrahydroxyflavonol 2'-[propanoic acid-(2'''-acetoxy-1'''-sulfonyl)]-5'-O-β-D-glucopyranoside (**1**) was isolated from the aerial parts of *Cotula anthemoides* L. in addition to 15 known compounds (**2–16**). The structure elucidation of these compounds was based on analyses of spectroscopic data including 1D-, 2D-NMR and HR-ESI-MS techniques and by comparing their NMR data with those reported in the literature. These compounds were evaluated for their DPPH radical scavenging and tyrosinase inhibitory activity. Compound **6** showed a high DPPH radical scavenging with EC₅₀ value of 9.1 ± 0.4 μM. Compound **11**, **9** and **1** exhibited a mild tyrosinase inhibitory activity with IC₅₀ values of 85 ± 0.8, 95 ± 1.5 and 100 ± 0.5 μM, respectively.

ARTICLE HISTORY

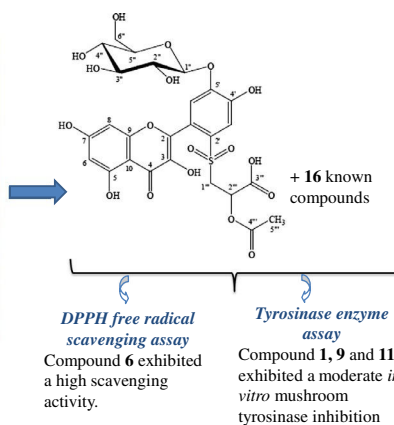
Received 21 July 2016
Accepted 1 November 2016

KEYWORDS

Cotula anthemoides;
Asteraceae; antioxidant
activity; tyrosinase inhibitory
activity



Cotula anthemoides L.



1. Introduction

The genus *Cotula* (Asteraceae) consists of approximately 80 species, among them, three are distributed in Algeria (Ozenda 1958). Plants of this genus are used in traditional medicine for their anti-inflammatory, analgesic, antiseptic properties (Jana et al. 1992) and as aromatic and digestive substance in tea (Bellakhdar 1997). In addition, it has been reported as antipyretic (Larhsini et al. 2002), bacteriostatic (Jana et al. 1992), antiprotozoal (Markouk et al. 1999) and anticorrosive (Benmenine et al. 2011). Several flavonoids (Mahran et al. 1976; Ahmed et al. 1987), alkaloids (Mahjoub et al. 2012), sesquiterpene lactones (Metwally et al. 1985; Jakupovic et al. 1988) and coumarins (Greger & Otmar 1985) were isolated from this genus. *Cotula anthemoides* L commonly known as 'Babunaj' in Algeria is used for colic and as a remedy for head and chest colds (Abhay & Tripathi 2011). Previous phytochemical investigation on *C. anthemoides* led to the isolation of coumarin derivatives: 6-methoxy-2-oxo-2H-chromene-8-carboxylic acid methyl ester, α -pinene, ursolic acid and gibberellic acid (Showkat 2012), 5-hydroxy-6,3',4'-trimethoxyisoflavone-7-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)- α -L-rhamnopyranoside and 5,7-dihydroxy-6,8-dimethyl-3-methoxyflavone-7-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranoside (Yadava & Barsainya 1998). The present work describes the isolation and structural identification of 16 compounds from *C. anthemoides* that grows wild in Algerian Sahara; 14 are reported here for the first time from the aerial parts of *C. anthemoides* L. and one new compound is described here for the first time. In addition, the radical scavenging ability (DPPH assay) and the tyrosinase inhibitory activity of all compounds were investigated for the first time, from this plant.

2. Results and discussion

The *n*-BuOH extract of the aerial parts of *C. anthemoides* was separated by combined chromatographic methods to obtain a new sulfonyl flavonol glucoside (**1**) (Figure 1), in addition to 15 known compounds (**2–16**) which were elucidated as luteolin-7-O- β -D-glucopyranoside (**2**) (Furkan et al. 2012), vicanin 2 (**3**) (Yinrong & Yeap foo 2000), luteolin-7-O- β -D-glucuronopyranoside (**4**) (Tsukasa et al. 2011), apigenin-7-O- β -D-glucuronopyranoside (**5**) (Xiao et al. 2006), 6-hydroxyluteolin-7-O- β -D-glucopyranoside (**6**) (Yinrong & Yeap foo 2000), isoetin-5'-O- β -D-glucopyranoside (**7**) (Marco et al. 1988), tachioside (**8**) (Shogo et al. 1987), pseudolaroside A (**9**) (Peng et al. 2006), junipediol A 8-O- β -D-glucopyranoside (**10**) (Gilles et al. 1997; Arunee et al. 2014), vanillic acid-4-O- β -D-glucopyranoside (**11**) (Akiyo et al. 1995), 2-hydroxy-3-phenylpropionamide (**12**) (Zhi-gang et al. 2012), protocatechuic acid (**13**) (Hui-Li et al. 1998), uridine (**14**) (Yalçin et al. 2003), tuberonic acid β -D-glucopyranoside (**15**) (Baoliang et al. 1993) and rosmarinic acid (**16**) (Gohari et al. 2009) (Figure S1). Their structural assignments were made by HR-ESI-MS, 1D-, and 2D-NMR analyses and by comparison with spectral data from the literature values. To the best of our knowledge, compounds **3–16** were isolated for the first time from the genus *Cotula*.

Compound **1** was isolated as a yellow amorphous powder. The positive HR-ESI-MS showed a molecular ion peak m/z 681.0744 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{26}H_{26}NaO_{18}S$, 681.0744) enabling to determine the molecular formula $C_{26}H_{26}O_{18}S$. The carbon NMR indicated the presence of 1 methyle (δ_c 20.2), 2 oxygenated methylenes (δ_c 57.2 and 62.2), 10 methines (δ_c 67.1, 71.0, 74.7, 77.6, 78.3, 94.7, 99.8, 103.0, 113.9 and 119.1), 10 aromatic quaternary carbons (δ_c 105.1, 125.4, 133.6, 138.9, 145.2, 148.9, 151.1, 158.4 and 162.9) and 3 carbonyls (δ_c 171.3, 171.5 and

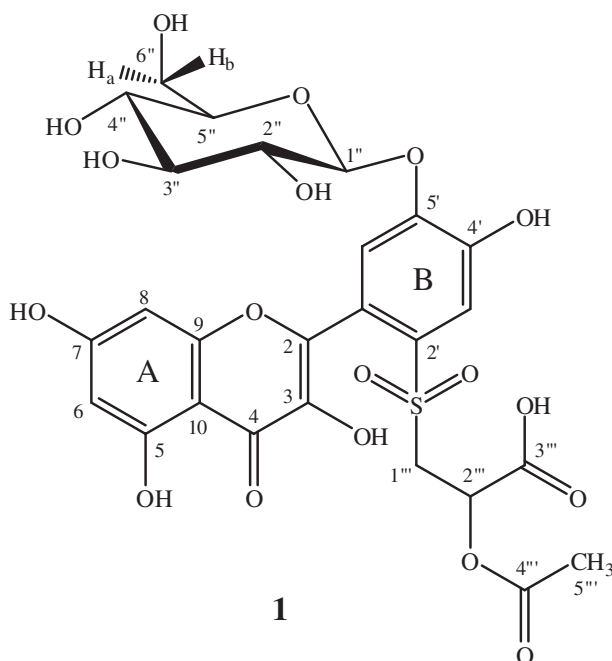


Figure 1. Chemical structure of compound **1** isolated from *C. anthemoides* L.

177.6). The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **1** showed characteristic signals indicating the presence of one sugar unit and one flavonol moiety (Özbek et al. 2016). The presence of the latter is confirmed by the UV spectrum which revealed absorption bands at 206, 260 and 350 nm. A complete acid hydrolysis of the *n*-butanol extract liberated β -D-glucose and glucuronic acid which were identified by TLC tests in the presence of authentic samples and by the use of optical rotation. Signals arising from one anomeric proton at δ_{H} 5.07 (1H, d, $J = 7.4$ Hz) and other protons of sugar moiety in the range of (δ_{H} 3.5–4.0 ppm) showed the presence of β -D-glucose on the basis of the large coupling constants between H-1''/H-2'', H-2''/H-3'', H-3''/H-4'' and H-4''/H-5'' and the carbons chemical shifts of the glucose moiety (see experimental) (Magid et al. 2008). Complete assignments of osidic protons and carbons were determined by the analysis of COSY, HSQC and HMBC experiments. The relative configuration of β -D-glucopyranosyl moiety was further confirmed by analysis of the ROESY correlations from the α -axial protons H-1''/H-3'' and H-1''/H-5''. The A-ring of the flavonol was represented by two *meta*-coupled resonances at δ_{H} 6.26 (1H, s) and δ_{H} 6.38 (1H, s) assigned to H-6 and H-8, respectively. The ^1H NMR data (See experimental part) exhibited two singlet signals at δ_{H} 7.43 (1H, s) and δ_{H} 7.85 (1H, s) assignable to H-3' and H-6', respectively, which were correlated in the HSQC spectrum with their aromatic carbons at δ_{C} 119.1 and δ_{C} 113.9 ppm, respectively. All these data led us to the identification of an aglycone trisubstituted in the cycle B as in the isoetin-5'-O- β -D-glucopyranoside (Marco et al. 1988), but the substituent in the C-2 (δ_{C} 133.6) was not a hydroxyl group. In addition, one methyl proton appeared at δ_{H} 1.90 (3H, s) together with a set of three aliphatic protons δ_{H} 3.45 (1H, dd, $J = 14.1, 6.8$ Hz), 3.56 (1H, m) and 5.42 (1H, dd, $J = 6.5, 4.1$ Hz). The ^1H and ^{13}C NMR signals of compound **1** were completely assigned by a combination of HSQC, HMBC and ^1H - ^1H COSY experiments. The ^1H - ^1H COSY correlation between H₂-1''' (δ_{H} 3.45, 3.56) and H-2''' (δ_{H} 5.42) and the

Table 1. Antiradical potential and anti-tyrosinase activity of compounds **1–16** isolated from the aerial parts of *C. anthemoides* L.

Compounds	DPPH radical scavenging activity EC ₅₀ ± S.D. (µM) ^a	Tyrosinase inhibitory activity IC ₅₀ ± S.D. (µM) ^a
1	22.8 ± 0.5	100 ± 0.5
2	29.9 ± 1.3	– ^b
3	– ^b	– ^b
4	25.1 ± 0.7	– ^b
5	29.5 ± 0.1	– ^b
6	9.1 ± 0.4	– ^b
7	– ^b	– ^b
8	27.6 ± 1.1	– ^b
9	– ^b	95 ± 1.5
10	– ^b	– ^b
11	– ^b	85 ± 0.8
12	– ^b	– ^b
13	– ^b	– ^b
14	– ^b	– ^b
15	– ^b	– ^b
16	12.7 ± 0.3	– ^b
Ascorbic acid ^c	7.4 ± 0.05	–
Kojic acid ^c		6.4 ± 0.04

^aValues are presented as mean ± S.D. (*n* = 3). ^b50% inhibition not achieved at the concentration of 100 µg/mL. ^cUsed as a positive control.

cross-peaks in the HMBC spectrum (Figure S17) between H₂-1'''/C-2''' (δ_C 67.1) and C-3''' (δ_C 171.5), H-2'''/C-3''', C-1''' (δ_C 57.2), and C-4''' (δ_C 171.3) and H₃-5''' (δ_H 1.90)/C-4''', indicated the presence of propanoic acid-2'''-acetoxy-1'''-sulfonyl moiety. The chemical shift of C-1''' (δ_C 57.2) in addition to the molecular formula indicated a sulfonyl group. The site of linkage of the glucopyranosyl and the sulfonyl groups in **1** was determined by cross-peaks observed in the HMBC experiment between H-1'' of glucose (δ_H 5.07) and C-5' (δ_C 148.9) of the aglycone, and between H₂-1''' (CH₂SO₂) of the sulfonyl group and C-2' (δ_C 133.6) of the aglycone. Thus, the structure of compound **1** was characterised as 5,7,4',5'-tetrahydroxyflavonol 2'-[propanoic acid-(2'''-acetoxy-1'''-sulfonyl)]-5'-O-β-D-glucopyranoside.

Several biological activities of extracts and essential oils of *Cotula* were reported however, the biological potential of isolated pure compounds has not been investigated. Thus, the isolated compounds **1–16** were tested for their DPPH radical scavenging and anti-tyrosinase activities.

In order to assess the antioxidative properties of **1–16**, the DPPH radical scavenging activity of these compounds was measured. According to the results (Table 1), compounds **1**, **2**, **4–6**, **8** and **16** have a slightly radical scavenging potential (EC₅₀ ranging from 9.1 to 29.9 µM) compared with ascorbic acid, used as positive control (EC₅₀ 7.4 µM). The di-OH substitution at 3' and 4' in the B ring is particularly important to the antiradical activity of flavonoids (Arora et al. 1998). The trend is consistent with the less active flavonoid **5** compared with **4**. The free 3-OH was also found to be important for the antioxidant activity of rosmarinic acid **16** (3-OH) comparing to tachioside **8** (3-OCH₃) (Sawai & Moon 2000). Comparison of the DPPH radical scavenging activity of **6** with **1**, **2** and **4** showed that the presence of the hydroxyl group at C-6 increased the activity. Compounds **2** and **4** shared a common aglycone which is 3' and 4'-di-OH substituted in the B ring (luteolin skeleton), the only difference was in the nature of the group linked at C-7 which was β-D-glucopyranose (**2**) and β-D-glucuronopyranose (**4**), suggesting that the glucuronic acid may contribute slightly to the increase of the DPPH radical scavenging activity. Thus, we can conclude that the hindrance effect due to the presence of a hydroxy group at C-6, a β-D-glucose or β-D-glucuronic acid linked at C-7 in a luteolin skeleton is determinant in the scavenging of the DPPH free radical.

The tyrosinase inhibitory activity of isolated pure compounds **1–16** was performed using L-DOPA (L-dopamine) as substrate and kojic acid, a well-known strong tyrosinase inhibitor, as a positive control (Kim et al. 2001; Kim et al. 2006; Xie et al. 2003; Kim & Uyama 2005; Demirkiran et al. 2013). The results (Table 1) showed that compounds **1**, **9** and **11** exhibited a mild tyrosinase inhibition. The most active compound was **11** (IC_{50} 85 μ M) followed by **9** (IC_{50} 95 μ M) and **1** (IC_{50} 100 μ M).

In summary, one new sulfonyl flavonol glucopyranoside, along with 15 known compounds, were isolated from the aerial parts of *C. anthemoides*. The DPPH radical scavenging activity assay showed a high activity for compound **6** compared with ascorbic acid used as a positive control. Compounds **1**, **9** and **11** exhibited a mild *in vitro* mushroom tyrosinase inhibition compared with kojic acid, used as a positive control.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

NMR spectra were carried in CD_3OD and $DMSO-d_6$ on Bruker Avance DRX III 500 instruments. HR-ESI-MS experiments were performed using a Micromass Q-TOF micro instrument. Biological assays were read on a Fluostar Omega microplate reader (BMG labtech), the amounts for DPPH assay were 100 μ L (95 μ L DPPH solution and 5 μ L sample) and for tyrosinase inhibitory activity are 300 μ L (100 μ L of sample, 100 μ L of mushroom tyrosinase solution and 100 μ L of L-DOPA). 96-well polystyrene microlitre clear plates were used. Thin layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated silica-gel 60 F_{254} Merck and compounds were observed under UV light at 254 and 365 nm or visualized by spraying the dried plates with 50% H_2SO_4 , followed by heating. CC was carried out on Kieselgel 60 (63–200 mesh) or LiChroprep RP-18 (40–63 mm) Merck. HPLC was performed on a Dionex apparatus equipped with an ASI-100 autosampler, an Ultimate 3000 pump, a diode array detector UVD 340S and Chromeleon software. RP-18 column (Phenomenex 250 \times 15 mm, Luna 5 μ) was used for semi-preparative HPLC with binary gradient eluent (H_2O (pH 2.4 with trifluoroacetic acid (TFA)); MeCN) and a flow rate of 4 mL/min; the chromatogram was monitored at 205, 210, 254 and 360 nm. Absorbance (Ab) values in the DPPH free radical scavenging and antityrosinase assay were read on a Fluostar omega microplate reader (BMG labtech).

3.2. Plant material

The aerial parts of *C. anthemoides* L. were collected in March 2012 from Tinguentourine, Ain Amenas, Eastern Algerian Sahara. The plant has been authenticated by Prof. Gérard De Belair (Annaba University, Algeria) and a voucher specimen (LOST Ca03/12) was deposited at the herbarium of the Laboratory of Therapeutic Substances (LOST), Faculty of Sciences, Université des Frères Mentouri-Constantine-Algeria.

3.3. Extraction and isolation

The powdered dry aerial parts of *C. anthemoides* (1400 g) were macerated at room temperature in methanol 80% (3 \times 7.5 L, 24 h). The extract was concentrated under low pressure, diluted with H_2O (560 mL), then successively extracted with petroleum ether (PE) (3 \times 300 mL), chloroform (3 \times 300 mL), ethyl acetate (3 \times 300 mL) and *n*-butanol (3 \times 300 mL). After

evaporation of the solvents, 0.4 g of PE, 1.5 g of CHCl_3 , 0.55 g of EtOAc and 21.7 g of *n*-BuOH extracts were obtained. The *n*-BuOH extract was subjected to VLC over polyamid SC6 (9 cm \times 5 cm) eluted with toluene–methanol with increasing polarity to give 12 fractions (F1–F12, respectively). Fractions F6–7 were combined (1.4 g) and subjected to HPLC preparative using (10–25% MeCN in 60 min) to yield 19 fractions. Frs [4–6] (35.5 mg) were purified by semi-prep. HPLC (5–15% MeCN, in 20 min) affording compounds **14** (R_t 9.9 min, 4 mg) and **8** (R_t 13.8 min, 3 mg). Frs [7–10] (36 mg) were purified by semi-prep. HPLC (5–15% MeCN, in 20 min) yielding compounds **9** (R_t 16.5 min, 7 mg) and **10** (R_t 21.5 min, 4 mg). Frs [11–12] (26.7 mg) were purified by semi-prep. HPLC (10–25% MeCN, in 20 min) leading to compound **11** (R_t 6.3 min, 3.2 mg). Frs [26–27] (51 mg) were purified by semi-prep. HPLC (15–35% MeCN, in 20 min) to afford compounds **12** (R_t 8.5 min, 1.6 mg) and **15** (R_t 16.5 min, 4.7 mg). Frs [36–44] (42 mg) were purified by semi-prep. HPLC (10–40% MeCN, in 25 min) yielding compounds **16** (R_t 25.9 min, 4.2 mg). The combined fractions F9–11 (827 mg) were subjected to a preparative HPLC (10–40% MeCN in 60 min) to obtain 35 fractions. Frs [7–13] (50.3 mg) were purified by semi-prep. HPLC (15–35% MeCN, in 20 min) yielding compounds **1** (R_t 13.1 min, 7 mg), **4** (R_t 14.2 min, 5 mg) and **16** (R_t 18.2 min, 1.4 mg). Frs [14–28] (46.2 mg) were purified by semi-prep. HPLC (15–35% MeCN, in 20 min) leading to compounds **3** (R_t 8.0 min, 4.0 mg), **2** (R_t 13.7 min, 3.5 mg) and **5** (R_t 15.1 min, 4.1 mg). Compound **6** (17.1 min, 9.2 mg) was purified from Frs [28–29] by semi-prep. HPLC (15–35% MeCN, in 20 min). Frs [30–32] were purified by semi-prep. HPLC (15–35% MeCN, in 30 min) affording compounds **13** (R_t 6.3 min, 1 mg) and **7** (R_t 26.4 min, 11.2 mg).

3.3.1. 5,7,4',5'-tetrahydroxyflavonol 2'-[propanoic acid-(2'''-acetoxy-1'''-sulfonyl)]-5'-O- β -D-glucopyranoside

Yellow amorphous powder; $\alpha_D^{20} + 26.8$ (c 0.25, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} (ab.): 206 (2.1), 260 (1.3), 350 (0.55). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 6.26 (bs, H-6), 6.38 (bs, H-8), 7.43 (s, H-3'), 7.85 (s, H-6'), 5.07 (d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 3.59 (dd, $J = 8.97.4$ Hz, H-2''), 3.56 (t, $J = 8.6$ Hz, H-3''), 3.52 (t, $J = 8.6$ Hz, H-4''), 3.60 (m, H-5''), 3.81 (dd, $J = 12.24.8$ Hz, H-6''a), 4.00 (dd, $J = 12.22.5$ Hz, H-6''b), 3.45 (dd, $J = 14.16.8$, H-1'''a), 3.56 (m, H-1'''b), 5.42 (dd, $J = 6.54.1$, H-2'''), 1.90 (s, H-5'''). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ_{C} 145.2 (C-2), 138.9 (C-3), 177.6 (C-4), 162.9 (C-5), 99.8 (C-6), 166.1 (C-7), 94.7 (C-8), 158.4 (C-9), 105.1 (C-10), 125.4 (C-1'), 133.6 (C-2'), 119.1 (C-3'), 151.1 (C-4'), 148.9 (C-5'), 113.9 (C-6'), 103.0 (C-1''), 74.7 (C-2''), 77.6 (C-3''), 71.0 (C-4''), 78.3 (C-5''), 62.2 (C-6''), 57.2 (C-1'''), 67.1 (C-2'''), 171.5 (C-3'''), 171.3 (C-4'''), 20.2 (C-5'''). HR-ESI-MS $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 681.0744 (calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{NaO}_{18}\text{S}$, 681.0744).

3.3.2. Acid hydrolysis

A part of the *n*-BuOH extract (300 mg) was refluxed (90 °C) with 10 mL of 2 M TFA for 3 h. After extraction with ethyl acetate (3 \times 10 mL), the aqueous layer evaporated to furnish the monosaccharide residue (100 mg). Two sugars were identified as glucose and glucuronic acid by comparison with authentic samples on TLC in MeCOEt:*iso*-PrOH:Me₂CO:H₂O (20:10:7:6). The monosaccharide residue (100 mg) was subjected to a preparative TLC using the same solvent. The optical rotation of each purified sugar was measured and compared with authentic samples to afford D-glucose and D-glucuronic acid.

3.4. Biological activities

3.4.1. Free radical scavenging assay

The scavenging activity of isolated compounds against DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) was investigated by spectrophotometric methodology, as previously described (Gossan et al. 2015). Briefly, 5 μL of either the standard or sample solutions (dissolved in DMSO) was mixed with 95 μL of DPPH solution (158 μM , dissolved in absolute EtOH). After mixing gently and incubating for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, the optical density was measured at λ 515 nm. The percentage of absorbance inhibition at λ 515 nm was calculated using the following equation: % inhibition $[(\text{Abcontrol} - \text{Absample})/\text{Abcontrol}] \times 100$. DPPH solution in EtOH was used as a control. The curve of the % scavenging activity against the concentration of sample was prepared by the MS Excel-based program to obtain the EC_{50} . All the tests were conducted in triplicate. The experimental data were expressed as mean \pm standard deviation.

3.4.2. Tyrosinase enzyme assay

Tyrosinase activity inhibition was determined by spectrophotometric methodology, as previously described (Ngoc et al. 2009). About 100 μL of each tested compound solution (dissolved in 10% DMSO) was added to the 96-well plate and then mixed with 100 μL of mushroom tyrosinase solution (135 U/mL mushroom tyrosinase in phosphate buffer solution (PBS, pH 6.8)). After pre-incubation at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min, 100 μL of L-DOPA (0.5 mM, PBS pH 6.8) was added to the 96-well plate. The reaction mixture was incubated for another 5 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. The amount of dopachrome in the mixture was determined by the measurement of the absorbance of each well at 475 nm. The inhibitory percentage of tyrosinase was calculated according to the following equation: % inhibition = $\{[(A - B) - (C - D)]/(A - B)\} \times 100$. A: Ab at 475 nm without test substance; B: Ab at 475 nm without test substance and tyrosinase; C: Ab at 475 nm with test substance; D: Ab at 475 nm with test substance, but without tyrosinase. Kojic acid was used as positive control agent. All the tests were conducted in triplicate and IC_{50} was determined by interpolation of concentration % inhibition curve obtained by MS Excel-based program. The experimental data were expressed as mean \pm standard deviation.

Supporting Information

Figure S1, HR-ESI-MS, ^1H and ^{13}C NMR, COSY, HMBC, HSQC and ROESY spectra for compound 1.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by DGRSDT and ATRSS (MESRS, Algeria), to university Frères Mentouri-Constantine; and to Groupe Isolement et Structure of the Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), France.

References

- Abhay KP, Tripathi NN. 2011. Aromatic plants of Gorakhpur division: Their antimycotic properties and medicinal value. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 7:142–147.
- Ahmed AA, el-Sayed N, el-Negoumy S, Mabry JT. 1987. Flavonoids of *Cotula cinerea*. *J Nat Prod.* 50:519–520.
- Akiyo S, Maksut C, Takashi M. 1995. Hydroxyl benzoic acids from *Boreava orientalis*. *Phytochemistry.* 40:257–261.
- Arora A, Nair MG, Strasburg GM. 1998. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med.* 24:1355–1363.
- Arunee S, Kaoru U, Hiroshi N, Pharkphoom P. 2014. Identification of a new angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor from Thai edible plants. *Food Chem.* 165:92–97.
- Baoliang C, Motoyuki N, Junei K, Toshihiro N. 1993. Chemical constituents of *Astragali semen*. *Chem Pharm Bull.* 41:178–182.
- Bellakhdar J. 1997. *La Pharmacopée marocaine traditionnelle*. vol 1. Paris: Ibis press.
- Benmenine AK, Ouahrani MR, Gherraf N, Sekirifa ML, Baameur L. 2011. Potentiodynamic investigation of the anticorrosive action of *Cotula cinerea* extracts on mild steel X 52 in 20% H₂SO₄ Solution. *J Chem Pharm Res.* 3:666–669.
- Chang TS. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci.* 10:2440–2475.
- Demirkiran O, Sabudak T, Ozturk M, Topcu G. 2013. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of flavonoids from *Trifolium nigrescens* subsp. *petrisavi*. *J Agr Food Chem.* 61:12598–12603.
- Furkan O, özlem B, Derya Y, Tuğba B, Zuhaf G, Medine G. 2012. Isolation of some luteolin derivatives from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsps *longifolia* and determination of their genotoxic potencies. *Food Chem.* 135: 764–769.
- Gilles C, Daovy PA, Albert JC, Joseph V, Noel P. 1997. Three phenylpropanoids from *Juniperus phœnicea*. *Phytochemistry.* 64:1169–1173.
- Gohari AR, Saeidnia S, Shahverdi AR, Yassa N, Malmir M, Mollazade K, Naghinejad AR. 2009. Phytochemistry and antimicrobial compounds of *Hymenocrater calycinus*. *Eur Asia J Bio Sci.* 3:64–68.
- Gossan DPA, Alabdul Magid A, Yao-Kouassi PA, Coffy AA, Harakat D, Voutquenne-Nazabadioko L. 2015. New acylated flavonol glycosides from the aerial parts of *Gouania longipetala*. *Phytochem Lett.* 11:306–310.
- Greger H, Otmar H. 1985. Sesquiterpene-coumarin ethers and polyacetylenes from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry.* 24:85–88.
- Hui-Li Z, Akito N, Harumi O, Hajim M, Jinsaku S. 1998. Sesquiterpene glycosides from Cotton oil cake. *Phytochemistry.* 48:665–668.
- Jakupovic J, Aal MA, Eid F, Bohlmann F, El-Dahmy S. 1988. Further glaucolides and other sesquiterpene lactones from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry.* 27:2219–2224.
- Jana M, Lazrek HB, Markouk M. 1992. Effets bactériostatiques des extraits flavoniques de *Cotula cinerea*. *El Bayrounia Rev Mar Pharm.* 8:89–96.
- Kim YJ, Uyama H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci.* 62:1707–1723.
- Kim DS, Kim SY, Moon SJ, Chung JH, Kim KH, Cho KH. 2001. Ceramide inhibits cell proliferation through Akt/PKB inactivation and decreases melanin synthesis in Mel-Ab Cells. *Pigm Cell Res.* 14:110–115.
- Kim D, Park J, Kim J, Han C, Yoon J, Kim N. 2006. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem.* 54:935–941.
- Larhsini M, Markouk M, Jaouhari JT, Bekkouche K, Lazrek HB, Jana M. 2002. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother Res.* 16:97–98.
- Magid A, Voutquenne-Nazabadioko L, Bontemps G, Litaudon M, Lavaud C. 2008. Tyrosinase inhibitors and sesquiterpene diglycosides from *Guioa villosa*. *Planta Med.* 74:55–60.
- Mahjoub MA, Ammar S, Majouli K, Mighri Z. 2012. Two new alkaloids and a new polyphenolic compound from *Cotula coronopifolia*. *Chem Nat Compd.* 47:955–958.
- Mahran GH, Salah Ahmed M, Ansari SA. 1976. A study of the flavonoid content of *Cotula cinerea*. *Bull Fac Pharm Cairo Univ.* 14:237–246.

- Marco JA, Barbera O, Rodriguez S, Domingo C, Adell J. 1988. Flavonoids and other phenolics from *Artemisia hispanica*. *Phytochemistry*. 27:3155–3159.
- Markouk M, Lazrek HB, Jana M. 1999. Analgesic effects from *Cotula cinerea*. *Phytother Res*. 13:229–230.
- Matsuda H, Higashino M, Chen W, Tosa H, Inuma M, Kubo M. 1995. Studies of cuticle drugs from natural sources. III. Inhibitory effect of *Myrica rubra* on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull*. 18:1148–1150.
- Metwally MA, El-Dahmy S, Jakupovic J, Bohlmann F, Dawidar AM, Metwally SA. 1985. Glaucolide-like sesquiterpene lactones from *Cotula cinerea*. *Phytochemistry*. 25:255–257.
- Ngoc TM, Lee I, Ha DT, Kim HJ, Min BS, Bae KH. 2009. Tyrosinase-inhibitory constituents from the twigs of *Cinnamomum cassia*. *J Nat Prod*. 72:1205–1208.
- Özbek H, Güvenalp Z, Kuruüzüm-Uz A, Kazaz C, Ömür Demirezer L. 2016. β -Hydroxydihydrochalcone and flavonoid glycosides along with triterpene saponin and sesquiterpene from the herbs of *Pimpinella rhodantha* Boiss. *Nat Prod Res*. 30:750–754.
- Ozenda P. 1958. *Flore du Sahara septentrional et central*. Paris: CNRS.
- Peng L, Hongzhu G, Yin T, Qiao W, Dean G. 2006. Benzoic acid allopyranosides from the bark of *Pseudolarix kaempferi*. *Phytochemistry*. 67:1395–1398.
- Sawai Y, Moon JH. 2000. NMR analytical approach to clarify the molecular mechanisms of the antioxidative and radical-scavenging activities of antioxidants in tea using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem*. 48:6247–6253.
- Shogo I, Manami S, Hiroshi K, Hideaki O, Kazuo Y. 1987. Aromatic glycosides from *Berchemia racemosa*. *Phytochemistry*. 26:2811–2814.
- Showkat R. 2012. Chemoprofiling of medicinal plants and value addition of their principle constituents through synthetic modifications. Srinagar.
- Tsukasa I, Hiroaki S, Junichi K. 2011. Flavonoids from the leaves of *Vitex rotundifolia* (Verbenaceae) and their qualitative and quantitative comparison between Coastal and Inland populations. *Bull Natl Mus Nat Sci*. 37:87–94.
- Xiao JB, Ren FL, Xu M. 2006. Flavones from *Marchantia convoluta*: Isolation of apigenin-7-O- β -D-glucuronide and 5-hydroxyl-7-methoxyl-2-methylchromone. *J Pharm All Sci*. 3:310–313.
- Xie LP, Chen QX, Huang H, Wang HZ, Zhang RQ. 2003. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*. 68:487–491.
- Yadava RN, Barsainya D. 1998. A novel flavone glycoside from the seeds of *Cotula anthemoides*. *Fitoterapia*. 69:437–438.
- Yalçın FN, Ersöz T, Akbay P, Çaliş İ. 2003. Phenolic, megastigmane, nucleotide, acetophenone and monoterpene glycosides from *Phlomis samia* and *P. carica*. *Turk J Chem*. 27:703–711.
- Yinrong L, Yeap foo L. 2000. Flavonoids and phenolic glucosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*. 55:263–267.
- Zhi-gang W, Hai-yan X, Qiong M, Ye C, Jian-nan M, Chao-mei M. 2012. Isolation, identification and quantification of unsaturated fatty acids, amides, phenolic compounds and glycoalkaloids from Potatoes peel. *Food Chem*. 135:2425–2429.