

# ***Dédicace***

Cette thèse est dédiée ...

A la mémoire du professeur **Mourad BENSARI** qui nous a quittés avant même que je n'aie eu l'occasion de le remercier pour m'avoir donnée l'opportunité d'avancer dans mes recherches et d'avoir cru en moi. Que Dieu l'Accueille dans Son vaste paradis,

A mes parents et particulièrement à ma tante qui m'ont soutenue tout au long de mes études et qui ont toujours été présents pour moi,

A mon frère et mes sœurs,

A ma famille

## ***Remerciements***

En préambule, je souhaite rendre grâce à Dieu Le Miséricordieux de m’Avoir Donné la chance, le pouvoir et la force de mener à bien ce travail

Ce travail a été effectué entre le Laboratoire d’Obtention de Substances Thérapeutiques, département de Chimie, Faculté des Sciences exactes de l’Université des frères Mentouri-Constantine sous la direction du Professeur **Zahia KABOUCHE** et l’Institut de Chimie Moléculaire de Reims groupe Isolement et Structure, CNRS de Reims sous la direction du Professeur **Laurence VOUTQUENE-NAZABADIOKO**.

Tout d’abord je tiens à remercier madame la professeure **Zahia KABOUCHE** ma directrice de thèse pour m’avoir accueillie dans son groupe, pour ces nombreux conseils tant scientifiques que techniques, de m’avoir donné la possibilité de présenter mes travaux dans différents congrès internationaux et pour toute l’aide qu’elle m’a apportée pour la réalisation de mes publications scientifiques et la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à exprimer ma gratitude à madame la Professeure **Laurence VOUTQUENE-NAZABADIOKO** de m’avoir donné l’opportunité de me former en phytochimie avec des appareils modernes et d’apprendre les différentes méthodes de pointe de la chimie analytique utilisées dans ce travail et ce dans les meilleures conditions qui soient. Je vous remercie également pour tout ce que j’ai appris de vous en matière de détermination structurale des molécules et pour tout le temps que vous m’avez accordé.

Mes remerciements vont également aux membres du Jury, le Professeur **Ahmed KABOUCHE** (Université des frères Mentouri –Constantine), en qualité de président, le Professeur **Salah AKKAL** de l’université Frères Mentouri, le professeur **Abdelmalik BELKHIRI** de l’Université Salah Boubnider-Constantine 3 et le professeur **Ammar ZELLAGUI** de l’Université Larbi Ben M’hidi, Oum El Bouaghi, en qualité d’examineurs.

J’aimerais également citer ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour plusieurs aspects de ce travail. Je remercie Madame le docteur **Habiba MOKKADEM** (Université Badji Mokhtar-Annaba) et le Professeur **Mehmet OZTURK** (Université Sitki Kocman-Turquie) pour leur aide concernant la réalisation de l’étude des activités antioxydante et anticholinésterase, Monsieur le Docteur **Amin ABEDINI** (Institut de Chimie

Moléculaire de Reims) pour sa réalisation des tests antimicrobiens, pour sa générosité et son amitié ainsi que Monsieur **Kamel KABOUCHE** pour l'identification botanique.

Je remercie tout les membres du groupe Isolement et Structure de Reims : Madame le professeur **Catherine LAVAUD**, le professeur **Jean-Marc NUZILLARD** , **Nicolas BORIE**, **Agathe MARTINEZ**, **Anthony ROBERT** et en Particulier **Charlotte SAYAGH** pour s'être montrée disponible à chaque fois que je l'ai sollicitée en HPLC, **Benjamin BERTAUX** pour sa sympathie tout au long de ma période de stage.

Un remerciement particulier pour celui qui m'a aidée dans la finalisation de ma thèse et qui m'a été d'un grand soutien, **Mr. Khalil Moncef SLOUGUI (M.M.C)**.

Je ne voudrais pas oublier tous mes collègues du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques ainsi que notre ingénieur de Laboratoire, **Hichem SERRAA**.

## Table des matières

<b>Introduction générale</b>	P 1
<b>Partie 1: Revue bibliographique</b>	P 4
<b>Chapitre 1: Aperçu bibliographique sur le genre <i>Abies</i></b>	P 5
1.1. Introduction sur la famille des Pinaceae	P 6
1.2. Position systématique de la famille des Pinaceae	P 6
1.3. Présentation du genre <i>Abies</i> et de l'espèce <i>A. numidica</i>	P 6
1.4. Utilisation en médecine traditionnelle du genre <i>Abies</i>	P 8
1.5. Quelques activités biologiques reconnues du genre <i>Abies</i>	P 8
1.6. Métabolites isolés du genre <i>Abies</i>	P 11
1.6.1. Terpènes	P 11
1.6.1.1. Triterpènes	P 11
1.6.1.2. Diterpènes	P 19
1.6.1.3. Sesquiterpènes et monoterpènes	P 23
1.6.2. Flavonoides	P 27
1.6.3. Lignanes	P 29
1.6.4. Phénols	P 32
<b>Chapitre 2: Aperçu bibliographique sur le genre <i>Cedrus</i></b>	P 33
2.1. Présentation du genre <i>Cedrus</i> et l'espèce <i>C. atlantica</i>	P 34
2.2. Utilisation du genre <i>Cedrus</i> en médecine traditionnelle	P 35
2.3. Quelques activités biologiques reconnues du genre <i>Cedrus</i>	P 36
2.4. Métabolites isolés du genre <i>Cedrus</i>	P 37
2.4.1. Terpènes	P 37
2.4.1.1. Sesquiterpènes	P 37
2.4.1.2. Diterpènes	P 38
2.4.2. Flavonoides	P 40
2.4.3. Lignanes	P 41
2.4.4. Phénols	P 42
2.4.5. Autre composé	P 42
<b>Chapitre 3: Généralités sur les activités antioxydante, anticholinestérase et antimicrobienne</b>	P 43
3.1. Introduction	P 44

3.2. Activité antioxydante	P 44
3.2.1. Les radicaux libres	P44
3.2.2. Les antioxydants	P 44
3.2.3. Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante	P 45
3.2.3.1. Méthode du DPPH	P 45
3.2.3.2. Piégeage de l'ABTS <sup>+</sup>	P 46
3.2.3.3. Méthode du CUPRAC	P 47
3.2.3.4. Chélation des ions métalliques	P 47
3.2.3.5. Blanchissement du $\beta$ -carotène	P 48
3.3. Activité anticholinestérase	P 48
3.4. Activité antimicrobienne	P 49
3.4.1. La méthode par diffusion	P 49
3.4.1.1. La méthode de diffusion à partir de disques imprégnés (Méthode de Kirby – Baner)	P 49
3.4.1.2. La méthode de diffusion à partir des puits	P 50
3.4.2. Méthodes de dilution	P 50
3.4.2.1. Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide	P 50
3.4.2.2. Méthode de contact direct sur milieu liquide	P 50
3.4.3. Bioautographie	P 51
<b>Partie 2: Matériel et méthodes</b>	P 53
<b>Chapitre 1: Matériel utilisé</b>	P 54
1.1. Matériel végétal	P 55
1.1.1. Récolte de la plante <i>Abies numidica</i> de Lannoy	P 55
1.1.2. Récolte de la plante <i>Cedrus atlantica</i> (Endl) Manetti	P 55
1.2. Matériel chromatographique	P 56
1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	P 56
1.2.2. Chromatographie liquide haute performance (CLPH)	P 56
1.2.3. Flash chromatographie	P 57
1.3. Méthodes physico-chimiques	P 57
1.3.1. Spectrométrie de masse	P 57
1.3.2. Spectroscopie de RMN	P 57
1.3.3. Pouvoir rotatoire	P 58
1.3.4. Analyse statistique	P 58

<b>Chapitre 2: Extractions et séparations des métabolites secondaires de la</b>	
<b>plante <i>Abies numidica</i> de Lannoy</b>	P 59
2.1. Chimie extractive	P 60
2.2. Séparation et purification des fractions	P 60
2.2.1. Etude de la fraction F60 :40	P 60
2.2.2. Etude de la fraction F80 :20	P 61
2.2.3. Etude de la fraction F100 :0	P 62
<b>Chapitre 3 : Extraction et séparation des métabolites secondaire de la plante</b>	
<b><i>Cedrus atlantica</i> (Endl) Manetti</b>	P 64
3.1. Extraction	P 65
3.2. Séparation et purification	P 65
3.2.1. Etude de la fraction C40 :60	P 65
3.2.2. Etude de la fraction C60 :40	P 66
3.2.3. Etude de la fraction C80 :20	P 67
3.2.4. Etude de la fraction C100 :0	P 68
<b>Chapitre 4: Dosage des polyphénols et activités biologiques</b>	P 71
4.1. Dosage des polyphénols	P 72
4.1.1. Mode opératoire	P 72
4.2. Activité antioxydante	P 72
4.2.1. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	P 73
4.2.2. Activité de blanchissement du $\beta$ -carotène	P 73
4.2.3. Activité du piégeage de l'ABTS	P 73
4.3. Activité anticholinestérase	P 74
4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne	P 75
4.4.1. Préparations des différentes concentrations	P 75
4.4.2. Préparation des souches microbiennes et culture <i>in vitro</i>	P 75
4.4.3. Bioautographie	P 77
4.4.3.1. Mode opératoire	P 77
4.4.4. Détermination de la CMI en microplaque	P 78
4.4.4.1. Mode opératoire	P 78
<b>Partie 3: Résultats et discussion</b>	P 80
<b>Chapitre 1: Identification des produits isolés d'<i>Abies numidica</i></b>	P 81
1.1. Détermination structurale des diterpènes isolés des cônes d' <i>A.numidica</i>	P 82
1.1.1. Identification de composé <b>A1</b>	P 82
1.1.2. Identification du composé <b>A2</b>	P 91
1.1.3. Identification du composé <b>A3</b>	P 95
1.1.4. Identification du composé <b>A4</b>	P 99

1.1.5. Identification du composé <b>A5</b>	P 104
1.1.6. Identification du composé <b>A6</b>	P 108
1.1.7. Identification du composé <b>A7</b>	P 112
1.1.8. Identification du composé <b>A8</b>	P 118
<b>Chapitre 2 : Identification des produits isolés de <i>Cedrus atlantica</i></b>	<b>P 125</b>
2.1. Détermination structurale des composés isolés de <i>C. atlantica</i>	P 126
2.1.1. Détermination structurale des acides tocotrienoléiques <b>C1-C3</b>	P 126
2.1.1.1. Identification du composé <b>C1</b>	P 126
2.1.1.2. Identification du composé <b>C2</b>	P 136
2.1.1.3. Identification du composé <b>C3</b>	P 143
2.1.2. Détermination structurales des composés flavonoïdes <b>C4-C6</b>	P 149
2.1.2.1. Identification du composé <b>C4</b>	P 149
2.1.2.2. Identification du composé <b>C5</b>	P 159
2.1.2.3. Identification du composé <b>C6</b>	P 162
2.1.3. Détermination structurale des neolignanes <b>C7-C9</b>	P 169
2.1.3.1. Identification du composé <b>C7</b>	P 169
2.1.3.2. Identification du composé <b>C8</b>	P 175
2.1.3.3. Identification du composé <b>C9</b>	P 178
2.1.4. Détermination structurale des composés diterpéniques	P 183
2.1.4.1. Elucidation structurale des composés <b>C10-C13</b>	P 183
2.1.4.1.1. Identification du composé <b>C10</b>	P 183
2.1.4.1.2. Identification du composé <b>C11</b>	P 190
2.1.4.1.3. Identification du composé <b>C12</b>	P 193
2.1.4.1.4. Identification du composé <b>C13</b>	P 195
2.1.4.2. Elucidation structurale des composés <b>C14-C17</b>	P 199
2.1.4.2.1. Identification du composé <b>C14</b>	P 199
2.1.4.2.2. Identification du composé <b>C15</b>	P 204
2.1.4.2.3. Identification du composé <b>C16</b>	P 208
2.1.4.2.4. Identification du composé <b>C17</b>	P 212
2.1.4.3. Elucidation structurale des composés <b>C18-C21</b>	P 216
2.1.4.3.1. Identification du composé <b>C18</b>	P 216
2.1.4.3.2. Identification du composé <b>C19</b>	P 221
2.1.4.3.3. Identification du composé <b>C20</b>	P 225
2.1.4.4. Elucidation structurale du composé <b>C21</b>	P 228
<b>Chapitre 3: Dosage des polyphénols et activités biologiques</b>	<b>P 235</b>
3.1. Dosage des polyphénols	P 236
3.2. Activité antioxydante des fractions VLC d' <i>Abies numidica</i>	P 236
3.2.1. Essai de décoloration du radical cation ABTS <sup>+</sup>	P 237
3.2.2. Activité de blanchissement du β-carotène	P 237
3.2.3. La réduction cuprique (CUPRAC)	P 238
3.3. Activité anticholinestérase des extraits <i>A. numidica</i> et <i>C. atlantica</i>	P 239

3.4. Activité antimicrobienne	P 241
3.4.1. Activité antibactérienne des extraits	P 241
3.4.2. Activité antifongique des extraits	P 243
3.4.3. Activité antibactérienne des produits isolés	P 244
<b>Conclusion générale</b>	P 249
<b>Références bibliographiques</b>	P 253

## Liste des figures :

<b>Figure 1</b> : <i>Abies numidica</i> de Lannoy	P 7
<b>Figure 2</b> : <i>Cedrus atlantica</i> (Endl) Manetti	P 35
<b>Figure 3</b> : Structure d'antioxydants	P 45
<b>Figure 4</b> : Piégeage du radical DPPH <sup>·</sup> avec l'antioxydant (AH)	P 46
<b>Figure 5</b> : Oxydation de l'ABTS avec K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> et génération du radical ABTS <sup>·+</sup>	P 46
<b>Figure 6</b> : Réduction du complexe chromogène de Cu <sup>+2</sup> -Nc.	P 47
<b>Figure 7</b> : Réaction de test FRAP (Ferric reducing Antioxydant power)	P 48
<b>Figure 8</b> : Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman	P 49
<b>Figure 9</b> : Inhibition de la croissance bactérienne dans la bioautographie.	P 52
<b>Figure 10</b> : Cônes d' <i>Abies numidica</i> de Lannoy	P 55
<b>Figure 11</b> : Cônes de <i>Cedrus atlantica</i> (Endl) Manetti	P 56
<b>Figure 12</b> : Appareil Flash chromatographie Reveleris	P 57
<b>Figure 13</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction <b>F60 :40</b>	P 60
<b>Figure 14</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction SF7	P 61
<b>Figure 15</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction SF9	P 62
<b>Figure 16</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction SF2	P 62
<b>Figure 17</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction SF4	P 63
<b>Figure 18</b> : Schéma d'extraction et de purification des composés des cônes d' <i>Abies numidica</i>	P 63
<b>Figure 19</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction <b>C40 :60</b>	P 65
<b>Figure 20</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction <b>C60 :40</b>	P 66
<b>Figure 21</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction <b>C80 :20</b>	P 67
<b>Figure 22</b> : Chromatogramme CLHP analytique de la fraction <b>C100 :0</b>	P 68
<b>Figure 23</b> : Schéma d'extraction et de purification des composés des cônes de <i>Cedrus atlantica</i>	P 70
<b>Figure 24</b> : Préparation des dilutions	P 77
<b>Figure 25</b> : Plaque de microdilution	P 78
<b>Figure 26</b> : Spectre RMN <sup>1</sup> H du composé <b>A1</b>	P 82
<b>Figure 27</b> : Spectre RMN <sup>13</sup> C du composé <b>A1</b>	P 83
<b>Figure 28</b> : Spectre COSY du composé <b>A1</b>	P 84
<b>Figure 29</b> : Spectre HSQC de δ <sub>H</sub> 1.1 à 2.6 ppm du composé <b>A1</b>	P 85
<b>Figure 30</b> : Spectre HSQC de δ <sub>H</sub> 4.65 à 7.50 ppm du composé <b>A1</b>	P 86

<b>Figure 31</b> : Corrélations COSY et HMBC du composé <b>A1</b>	P 87
<b>Figure 32</b> : Corrélations COSY et HMBC du composé <b>A1</b>	P 87
<b>Figure 33</b> : Corrélations HMBC du composé <b>A1</b>	P 88
<b>Figure 34</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 20 à 180ppm du composé <b>A1</b>	P 88
<b>Figure 35</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 120 à 185ppm du composé <b>A1</b>	P 89
<b>Figure 36</b> : Spectre NOESY du composé <b>A1</b>	P 90
<b>Figure 37</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>A2</b>	P 91
<b>Figure 38</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>A2</b>	P 92
<b>Figure 39</b> : Spectre COSY du composé <b>A2</b>	P 92
<b>Figure 40</b> : Spectre HSQC du composé <b>A2</b>	P 93
<b>Figure 41</b> : Spectre HMBC du composé <b>A2</b>	P 93
<b>Figure 42</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>A3</b>	P 95
<b>Figure 43</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>A3</b>	P 95
<b>Figure 44</b> : Spectre COSY du composé <b>A3</b>	P 96
<b>Figure 45</b> : Spectre HSQC du composé <b>A3</b>	P 96
<b>Figure 46</b> : Spectre HMBC de $\delta_H$ 0.8 à 3.1 ppm du composé <b>A3</b>	P 97
<b>Figure 47</b> : Spectre HMBC de $\delta_H$ 7.4 à 8.1 ppm du composé <b>A3</b>	P 98
<b>Figure 48</b> : Spectre $^1H$ du composé <b>A4</b>	P 99
<b>Figure 49</b> : Spectre $^{13}C$ du composé <b>A4</b>	P 100
<b>Figure 50</b> : Spectre COSY du composé <b>A4</b>	P 100
<b>Figure 51</b> : Spectre HSQC du composé <b>A4</b>	P 101
<b>Figure 52</b> : Corrélations COSY et HMBC du composé <b>A4</b>	P 101
<b>Figure 53</b> : Spectre HMBC du composé <b>A4</b>	P 102
<b>Figure 54</b> : Spectre NOESY du composé <b>A4</b>	P 103
<b>Figure 55</b> : Spectre $^1H$ du composé <b>A5</b>	P 105
<b>Figure 56</b> : Spectre $^{13}C$ du composé <b>A5</b>	P 105
<b>Figure 57</b> : Spectre COSY du composé <b>A5</b>	P 106
<b>Figure 58</b> : Spectre HSQC du composé <b>A5</b>	P 106
<b>Figure 59</b> : Corrélation HMBC du composé <b>A5</b>	P 107
<b>Figure 60</b> : Spectre HMBC du composé <b>A5</b>	P 107
<b>Figure 61</b> : Spectre $^1H$ du composé <b>A6</b>	P 109
<b>Figure 62</b> : Spectre $^{13}C$ du composé <b>A6</b>	P 109
<b>Figure 63</b> : Spectre COSY du composé <b>A6</b>	P 110

<b>Figure 64</b> : Spectre HSQC du composé <b>A6</b>	P 110
<b>Figure 65</b> : Spectre HMBC du composé <b>A6</b>	P 111
<b>Figure 66</b> : Spectre $^1\text{H}$ du composé <b>A7</b>	P 113
<b>Figure 67</b> : Spectre $^{13}\text{C}$ du composé <b>A7</b>	P 113
<b>Figure 68</b> : Spectre COSY du composé <b>A7</b>	P 114
<b>Figure 69</b> : Spectre HSQC du composé <b>A7</b>	P 114
<b>Figure 70</b> : Corrélations HMBC du composé <b>A7</b>	P 115
<b>Figure 71</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{H}}$ 0.6 à 3.2ppm du composé <b>A7</b>	P 116
<b>Figure 72</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{H}}$ 7.1 à 8.0 ppm du composé <b>A7</b>	P 117
<b>Figure 73</b> : Spectre $^1\text{H}$ du composé <b>A8</b>	P 119
<b>Figure 74</b> : Spectre $^{13}\text{C}$ du composé <b>A8</b>	P 119
<b>Figure 75</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 0 à 2.5ppm du composé <b>A8</b>	P 120
<b>Figure 76</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 0 à 6.8 ppm du composé <b>A8</b>	P 120
<b>Figure 77</b> : Spectre HSQC du composé <b>A8</b>	P 121
<b>Figure 78</b> : Corrélations COSY et HMBC du composé <b>A8</b>	P 122
<b>Figure 79</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 0 à 75 ppm du composé <b>A8</b>	P 122
<b>Figure 80</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 20 à 200 ppm du composé <b>A8</b>	P 123
<b>Figure 81</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé <b>C1</b>	P 126
<b>Figure 82</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C1</b>	P 127
<b>Figure 83</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C1</b>	P 128
<b>Figure 84</b> : Corrélations COSY du composé <b>C1</b>	P 129
<b>Figure 85</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 1.5 à 2.9 ppm du composé <b>C1</b>	P 129
<b>Figure 86</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 1.5 à 7 ppm du composé <b>C1</b>	P 130
<b>Figure 87</b> : Spectre HSQC de $\delta_{\text{H}}$ 1.2 à 2.8 ppm du composé <b>C1</b>	P 131

<b>Figure 88</b> : Spectre HSQC de $\delta_H$ 1.5 à 7 ppm du composé <b>C1</b>	P 131
<b>Figure 89</b> : Corrélation HMBC du noyau aromatique du composé <b>C1</b>	P 132
<b>Figure 90</b> : Corrélations HMBC du noyau chromane du composé <b>C1</b>	P 132
<b>Figure 91</b> : Corrélation HMBC du composé <b>C1</b>	P 133
<b>Figure 92</b> : Spectre de $\delta_C$ 115 à 170 ppm HMBC du composé <b>C1</b>	P 133
<b>Figure 93</b> : Spectre de $\delta_C$ 15 à 45ppm HMBC du composé <b>C1</b>	P 134
<b>Figure 94</b> : Spectre de $\delta_C$ 20 à 150 ppm HMBC du composé <b>C1</b>	P 134
<b>Figure 95</b> : Corrélations NOESY du composé <b>C1</b>	P 135
<b>Figure 96</b> : Spectre NOESY de $\delta_H$ 1.2 à 2.8 ppm du composé <b>C1</b>	P 135
<b>Figure 97</b> : Spectre NOESY de $\delta_H$ 3.5 à 6.5 ppm du composé <b>C1</b>	P 136
<b>Figure 98</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé <b>C2</b>	P 137
<b>Figure 99</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C2</b>	P 137
<b>Figure 100</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>C2</b>	P 138
<b>Figure 101</b> : Corrélations COSY du noyau aromatique du composé <b>C2</b>	P 138
<b>Figure 102</b> : Spectre COSY de $\delta_H$ 0.9 à 2.7 ppm du composé <b>C2</b>	P 139
<b>Figure 103</b> : Spectre COSY de $\delta_H$ 1.0 à 6.5 ppm du composé <b>C2</b>	P 139
<b>Figure 104</b> : Spectre HSQC du composé <b>C2</b>	P 140
<b>Figure 105</b> : Corrélations HMBC du composé <b>C2</b>	P 140
<b>Figure 106</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 15 à 75 ppm du composé <b>C2</b>	P 141
<b>Figure 107</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 110 à 180 ppm du composé <b>C2</b>	P 142
<b>Figure 108</b> : Spectre NOESY du composé <b>C2</b>	P 143
<b>Figure 109</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé <b>C3</b>	P 144
<b>Figure 110</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C3</b>	P 144
<b>Figure 111</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>C3</b>	P 145

<b>Figure 112</b> : Spectre COSY de $\delta_H$ à 0.8 à 2.8 ppm du composé <b>C3</b>	P 145
<b>Figure 113</b> : Spectre COSY de $\delta_H$ 3 à 6.5 ppm du composé <b>C3</b>	P 146
<b>Figure 114</b> : Spectre HSQC du composé <b>C3</b>	P 146
<b>Figure 115</b> : Corrélations COSY et HMBC du composé <b>C3</b>	P 147
<b>Figure 116</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 15 à 75 ppm du composé <b>C3</b>	P 147
<b>Figure 117</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 115 à 180 ppm du composé <b>C3</b>	P 148
<b>Figure 118</b> : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé <b>C4</b>	P 150
<b>Figure 119</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C4</b>	P 151
<b>Figure 120</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>C4</b>	P 152
<b>Figure 121</b> : Corrélations COSY du composé <b>C4</b>	P 153
<b>Figure 122</b> : Spectre COSY du composé <b>C4</b>	P 153
<b>Figure 123</b> : Spectre HSQC de $\delta_C$ 55 à 105 ppm du composé <b>C4</b>	P 154
<b>Figure 124</b> : Spectre HSQC de $\delta_C$ 90 à 145 ppm du composé <b>C4</b>	P 154
<b>Figure 125</b> : Corrélation HMBC du composé <b>C4</b>	P 155
<b>Figure 126</b> : Corrélation HMBC du composé <b>C4</b>	P 155
<b>Figure 127</b> : Corrélation HMBC du composé <b>C4</b>	P 156
<b>Figure 128</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 55 à 105 ppm du composé <b>C4</b>	P 157
<b>Figure 129</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 114 à 134 ppm du composé <b>C4</b>	P 157
<b>Figure 130</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 146 à 168 ppm du composé <b>C4</b>	P 158
<b>Figure 131</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C5</b>	P 159
<b>Figure 132</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>C5</b>	P 159
<b>Figure 133</b> : Spectre COSY du composé <b>C5</b>	P 160
<b>Figure 134</b> : Spectre HSQC du composé <b>C5</b>	P 161
<b>Figure 135</b> : Spectre HMBC du composé <b>C5</b>	P 161

<b>Figure 136</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C6</b>	P 163
<b>Figure 137</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C6</b>	P 164
<b>Figure 138</b> : Spectre COSY du composé <b>C6</b>	P 164
<b>Figure 139</b> : Spectre HSQC du composé <b>C6</b>	P 165
<b>Figure 140</b> : Spectre HMBC du composé <b>C6</b>	P 166
<b>Figure 141</b> : Spectre NOESY du composé <b>C6</b>	P 167
<b>Figure 142</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C7</b>	P 169
<b>Figure 143</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C7</b>	P 170
<b>Figure 144</b> : Corrélations COSY du composé <b>C7</b>	P 171
<b>Figure 145</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 1.8 à 4.0ppm du composé <b>C7</b>	P 171
<b>Figure 146</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 6.6 à 7.0 ppm du composé <b>C7</b>	P 171
<b>Figure 147</b> : Spectre HSQC du composé <b>C7</b>	P 172
<b>Figure 148</b> : Corrélations HMBC du composé <b>C7</b>	P 172
<b>Figure 149</b> : Corrélations HMBC du composé <b>C7</b>	P 173
<b>Figure 150</b> : Corrélations HMBC du composé <b>C7</b>	P 173
<b>Figure 151</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 30 à 90 ppm du composé <b>C7</b>	P 174
<b>Figure 152</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 110 à 150 ppm du composé <b>C7</b>	P 174
<b>Figure 153</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C8</b>	P 175
<b>Figure 154</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C8</b>	P 175
<b>Figure 155</b> : Spectre COSY du composé <b>C8</b>	P 176
<b>Figure 156</b> : Spectre HSQC du composé <b>C8</b>	P 176
<b>Figure 157</b> : Spectre HMBC du composé <b>C8</b>	P 177
<b>Figure 158</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C9</b>	P 178
<b>Figure 159</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C9</b>	P 178

<b>Figure 160</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 3.40 à 4.10 ppm du composé <b>C9</b>	P 179
<b>Figure 161</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 2.5 à 5.5 ppm du composé <b>C9</b>	P 179
<b>Figure 162</b> : Spectre HSQC du composé <b>C9</b>	P 180
<b>Figure 163</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 55 à 90 ppm du composé <b>C9</b>	P 181
<b>Figure 164</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 110 à 155 ppm du composé <b>C9</b>	P 181
<b>Figure 165</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C10</b>	P 183
<b>Figure 166</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C10</b>	P 184
<b>Figure 167</b> : Corrélations COSY du composé <b>C10</b>	P 185
<b>Figure 168</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 1.0 à 5 ppm du composé <b>C10</b>	P 185
<b>Figure 169</b> : Spectre COSY de $\delta_{\text{H}}$ 7.10 à 7.25 ppm du composé <b>C10</b>	P 185
<b>Figure 170</b> : Spectre HSQC de $\delta_{\text{H}}$ 1.0 à 2.9 ppm du composé <b>C10</b>	P 186
<b>Figure 171</b> : Spectre HSQC de $\delta_{\text{H}}$ 3.7 à 7.25 ppm du composé <b>C10</b>	P 186
<b>Figure 172</b> : Corrélations HMBC au niveau de cycle aromatique	P 187
<b>Figure 173</b> : Corrélations du composé <b>C10</b>	P 187
<b>Figure 174</b> : Corrélations HMBC du composé <b>C10</b>	P 188
<b>Figure 175</b> : Corrélations du composé <b>C10</b>	P 188
<b>Figure 176</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 15 à 75 ppm du composé <b>C10</b>	P 189
<b>Figure 177</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 125 à 175 ppm du composé <b>C10</b>	P 189
<b>Figure 178</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C11</b>	P 190
<b>Figure 179</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C11</b>	P 191
<b>Figure 180</b> : Spectre COSY du composé <b>C11</b>	P 191
<b>Figure 181</b> : Spectre HMBC du composé <b>C11</b>	P 192
<b>Figure 182</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C12</b>	P 193
<b>Figure 183</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C12</b>	P 193

<b>Figure 184</b> : Spectre COSY du composé <b>C12</b>	P 194
<b>Figure 185</b> : Spectre HMBC du composé <b>C12</b>	P 195
<b>Figure 186</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C13</b>	P 196
<b>Figure 187</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C13</b>	P 196
<b>Figure 188</b> : Spectre COSY du composé <b>C13</b>	P 197
<b>Figure 189</b> : Spectre HMBC du composé <b>C13</b>	P 197
<b>Figure 190</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C14</b>	P 199
<b>Figure 191</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C14</b>	P 200
<b>Figure 192</b> : Corrélations COSY du composé <b>C14</b>	P 200
<b>Figure 193</b> : Spectre COSY du composé <b>C14</b>	P 201
<b>Figure 194</b> : Spectre HSQC du composé <b>C14</b>	P 201
<b>Figure 195</b> : Corrélations HMBC du composé <b>C14</b>	P 202
<b>Figure 196</b> : Corrélations HMBC du composé <b>C14</b>	P 202
<b>Figure 197</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 15 à 45 ppm du composé <b>C14</b>	P 203
<b>Figure 198</b> : Spectre HMBC de $\delta_{\text{C}}$ 125 à 180 ppm du composé <b>C14</b>	P 203
<b>Figure 199</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C15</b>	P 204
<b>Figure 200</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C15</b>	P 205
<b>Figure 201</b> : Spectre COSY du composé <b>C15</b>	P 205
<b>Figure 202</b> : Spectre HSQC du composé <b>C15</b>	P 206
<b>Figure 203</b> : Spectre HMBC du composé <b>C15</b>	P 207
<b>Figure 204</b> : Spectre HMBC du composé <b>C15</b>	P 207
<b>Figure 205</b> : Spectre RMN $^1\text{H}$ du composé <b>C16</b>	P 208
<b>Figure 206</b> : Spectre RMN $^{13}\text{C}$ du composé <b>C16</b>	P 209
<b>Figure 207</b> : Spectre COSY du composé <b>C16</b>	P 209

<b>Figure 208</b> : Spectre HSQC du composé <b>C16</b>	P 210
<b>Figure 209</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 15 à 70 ppm du composé <b>C16</b>	P 211
<b>Figure 210</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 110 à 180 ppm du composé <b>C16</b>	P 211
<b>Figure 211</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C17</b>	P 212
<b>Figure 212</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>C17</b>	P 213
<b>Figure 213</b> : Spectre COSY du composé <b>C17</b>	P 213
<b>Figure 214</b> : Spectre HSQC du composé <b>C17</b>	P 214
<b>Figure 215</b> : Spectre HMBC du composé <b>C17</b>	P 214
<b>Figure 216</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C18</b>	P 216
<b>Figure 217</b> : Spectre RMN $^{13}C$ <i>J</i> -modulé du composé <b>C18</b>	P 217
<b>Figure 218</b> : Spectre COSY de $\delta_H$ 0.8 à 2.9 ppm du composé <b>C18</b>	P 218
<b>Figure 219</b> : Spectre COSY de $\delta_H$ 3.0 à 7.2 ppm du composé <b>C18</b>	P 218
<b>Figure 220</b> : Spectre HSQC de $\delta_C$ 15 à 45 ppm du composé <b>C18</b>	P 219
<b>Figure 221</b> : Spectre HSQC de $\delta_C$ 70.2 à 126.5 ppm du composé <b>C18</b>	P 219
<b>Figure 222</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 15 à 70 ppm du composé <b>C18</b>	P 220
<b>Figure 223</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 122 à 148 ppm du composé <b>C15</b>	P 221
<b>Figure 224</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C19</b>	P 222
<b>Figure 225</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>C19</b>	P 222
<b>Figure 226</b> : Spectre COSY du composé <b>C19</b>	P 223
<b>Figure 227</b> : Spectre HSQC de $\delta_C$ 16 à 42 ppm du composé <b>C19</b>	P 223
<b>Figure 228</b> : Spectre HSQC de $\delta_C$ 68 à 130 ppm du composé <b>C19</b>	P 224
<b>Figure 229</b> : Spectre HMBC du composé <b>C19</b>	P 224
<b>Figure 230</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C20</b>	P 225
<b>Figure 231</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>C20</b>	P 226

<b>Figure 232</b> : Spectre COSY du composé <b>C20</b>	P 226
<b>Figure 233</b> : Spectre HSQC du composé <b>C20</b>	P 227
<b>Figure 234</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 15 à 70 ppm du composé <b>C20</b>	P 227
<b>Figure 235</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 120 à 200 ppm du composé <b>C20</b>	P 228
<b>Figure 236</b> : Spectre RMN $^1H$ du composé <b>C21</b>	P 229
<b>Figure 237</b> : Spectre RMN $^{13}C$ du composé <b>C21</b>	P 229
<b>Figure 238</b> : Spectre COSY du composé <b>C21</b>	P 230
<b>Figure 239</b> : Spectre HSQC de $\delta_H$ 1.0 à 2.9 ppm du composé <b>C21</b>	P 230
<b>Figure 240</b> : Spectre HSQC de $\delta_H$ 4.2 à 7.25 ppm du composé <b>C21</b>	P 231
<b>Figure 241</b> : Spectre HMBC de $\delta_C$ 20 à 70 ppm du composé <b>C21</b>	P 232
<b>Figure 242</b> : Spectre HMBC $\delta_C$ 125 à 165 ppm du composé <b>C21</b>	P 232
<b>Figure 243</b> : Les composés isolés d' <i>Abies numidica</i> testés en activité antibactérienne	P 245
<b>Figure 244</b> : Les composés isolés de <i>Cedrus atlantica</i> testés en activité antibactérienne	P 248

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Les triterpènes isolés du genre <i>Abies</i>	P 16
<b>Tableau 2</b> : Les diterpènes isolés du genre <i>Abies</i>	P 21
<b>Tableau 3</b> : Les sesquiterpènes isolés du genre <i>Abies</i>	P 25
<b>Tableau 4</b> : Les Flavonoides isolés du genre <i>Abies</i>	P 28
<b>Tableau 5</b> : Les lignanes isolés du genre <i>Abies</i>	P 30
<b>Tableau 6</b> : Les phénols isolés du genre <i>Abies</i>	P 32
<b>Tableau 7</b> : Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la <b>F60 :40</b>	P 60
<b>Tableau 8</b> : Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la <b>F80 :20</b>	P 61
<b>Tableau 9</b> : Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la <b>F100 :0</b>	P 62
<b>Tableau 10</b> : Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la <b>C40 :60</b>	P 66
<b>Tableau 11</b> : Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la <b>C60 :40</b>	P 66
<b>Tableau 12</b> : Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la <b>C80 :20</b>	P 67
<b>Tableau 13</b> : Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la <b>C100 :0</b>	P 68
<b>Tableau 14</b> : Les souches testées	P 76
<b>Tableau 15</b> : Déplacements chimiques RMN $^1\text{H}$ (600 MHz) et $^{13}\text{C}$ (150 MHz) du composé <b>A1</b> dans le $\text{CD}_3\text{OD}$	P 91
<b>Tableau 16</b> : Déplacements chimiques RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) et $^{13}\text{C}$ (125 MHz) du composé <b>A2</b> dans le $\text{CD}_3\text{OD}$	P 94
<b>Tableau 17</b> : Déplacements chimiques RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) et $^{13}\text{C}$ (125 MHz) du composé <b>A3</b> dans le $\text{CD}_3\text{OD}$	P 99
<b>Tableau 18</b> : Déplacements chimiques RMN $^1\text{H}$ (500 MHz) et $^{13}\text{C}$ (125 MHz) du composé <b>A4</b> dans le $\text{CD}_3\text{OD}$	P 104
<b>Tableau 19</b> : Déplacements chimiques RMN $^1\text{H}$ (600 MHz) et $^{13}\text{C}$ (150 MHz) du composé <b>A5</b> dans le $\text{CD}_3\text{OD}$	P 108
<b>Tableau 20</b> : Déplacements chimiques RMN $^1\text{H}$ (600 MHz) et $^{13}\text{C}$ (150 MHz) du composé <b>A6</b> dans le $\text{CD}_3\text{OD}$	P 112
<b>Tableau 21</b> : Déplacements chimiques RMN $^1\text{H}$ (600 MHz) et $^{13}\text{C}$ (150 MHz) du composé <b>A7</b> dans le $\text{CDCl}_3$	P 118
<b>Tableau 22</b> : Déplacements chimiques RMN $^1\text{H}$ (600 MHz) et $^{13}\text{C}$ (150 MHz) du composé <b>A8</b> dans le $\text{CD}_3\text{OD}$	P 124
<b>Tableau 23</b> : Déplacement chimiques en RMN $^1\text{H}$ (600 MHz) et $^{13}\text{C}$ (150 MHz) des composés <b>C1- C3</b> dans le $\text{CD}_3\text{OD}$	P 148

<b>Tableau 24</b> : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) et <sup>13</sup> C (150 MHz) des composés <b>C4- C6</b> dans le CD <sub>3</sub> OD	P 168
<b>Tableau 25</b> : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) et <sup>13</sup> C (150 MHz) des composés <b>C7-C9</b> dans le CD <sub>3</sub> OD	P 182
<b>Tableau 26</b> : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) et <sup>13</sup> C (150 MHz) des composés <b>C7- C10</b> dans le CD <sub>3</sub> OD	P 198
<b>Tableau 27</b> : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) et <sup>13</sup> C (150 MHz) des composés <b>C14-C17</b> dans le CD <sub>3</sub> OD	P 215
<b>Tableau 28</b> : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) et <sup>13</sup> C (150 MHz) des composés <b>C18-C21</b> dans le CD <sub>3</sub> OD	P 233
<b>Tableau 29</b> : Teneur en polyphénols totaux des fractions VLC d' <i>Abies numidica</i>	P 236
<b>Tableau 30</b> : Pouvoir d'inhibition de l'ABTS <sup>+</sup> par les fraction <i>Abies</i>	P 237
<b>Tableau 31</b> : Pouvoir d'inhibition des fractions étudiées sur le β-carotène/ acide linoléique	P 238
<b>Tableau 32</b> : Inhibition du CUPRAC par les fractions d' <i>A. numidica</i>	P 238
<b>Tableau 33</b> : Inhibition de l'Acétylcholinestérase par les extraits étudiés	P 240
<b>Tableau 34</b> : Inhibition de l'enzyme butyrylcholinestérase par les extraits testés	P 240
<b>Tableau 35</b> : Activité antibactérienne des extraits étudiés (CMI)	P 242
<b>Tableau 36</b> : Activité antifongique des extraits étudiés (CMI)	P 243
<b>Tableau 37</b> : Activité antibactérienne des composés isolés d' <i>A. numidica</i>	P 244
<b>Tableau 38</b> : CMI des produits isolés de <i>Cedrus atlantica</i>	P 246

## Liste des abréviations

### Solvants et réactifs

ACN	Acétonitrile
CD <sub>3</sub> OD	Méthanol deutéré
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
SiO <sub>2</sub>	Silice normale
RP18	Silice phase inverse
TFA	Acide trifluoroacétique

### Technique de chromatographie

CCM	Chromatographie sur Mouche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
VLC	Vacuum Liquid Chromatography

### Détermination structurale

ESIMS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
HRESIMS	High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry
<i>m/z</i>	Masse/Charge électrique
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub>	Pouvoir rotatoire spécifique

### Activités biologiques

IC <sub>50</sub>	Inhibition Concentration (Concentration inhibitrice à 50%)
CMI	Concentration minimale inhibitrice
AChE	Acétylcholinestérase
BChE	Butyrylcholinestérase

### Autres abréviations

Rha	Rhamnose
Rut	Rutinoside

# **Introduction générale**

Bien avant l'apparition de la science, de la médecine ou encore du médicament tel qu'il est connu de nos jours, l'espèce humaine par son instinct de survie, a appris à exploiter la nature et à tirer profit de ses bienfaits pour se soigner.

Au fil du temps, des cultures et des civilisations, l'homme a acquis par ses expériences les connaissances nécessaires pour créer son propre remède, on retrouvera des traces écrites qui remontent à l'Inde, à la Chine, à la Mésopotamie et à l'Égypte, tel que le fameux traité « *Papyrus Ebers* » découvert en 1862 datant de 1600 ans avant J-C, dans lequel environs 800 préparations à base de plantes sont inscrites.

Au cours des siècles, l'esprit scientifique se développa et la phytochimie également, à rappeler que cette dernière est la science qui étudie les méthodes d'extraction et de purification des substances naturelles afin de trouver de nouvelles molécules susceptibles de posséder des propriétés biologiques, telles que la morphine isolée au début du XIX siècle du pavot ou encore la quinine extraite de l'écorce de *Quinquina*.

En se basant sur l'utilisation des plantes appartenant à la famille Pinaceae en médecine traditionnelle et sur leur grande richesse et diversité en métabolites secondaires essentiellement des composés terpéniques, lignanes et composés phénoliques, faisant d'elles une source essentielle de principes actifs, notre recherche a été effectuée sur deux espèces de cette famille, *Abies numidica* Lannoy et *Cedrus atlantica*(Endl) Manetti. A noter que le genre *Abies* est connu pour ses bienfaits contre les indigestions, les maux d'estomac et les maladies pulmonaires (Fujita et al., 1995) et le genre *Cedrus* pour ses vertus médicinales, notamment en aromathérapie où ses huiles essentielles ont été testées pour leur pouvoir anti-inflammatoire, antimicrobien (Hammer et al., 1999) ou encore contre la chute des cheveux (Ormero et al., 2000).

Dans le cadre d'une investigation phytochimique et intérêts biologiques sur les deux espèces *Abies numidica* et *Cedrus atlantica*, notre présent travail se résume en l'utilisation de méthodes chromatographique pour l'isolement et la purification des métabolites secondaires, suivie de l'identification des structures de ces derniers et enfin la détermination de leur potentiel biologique, le tout résumé dans ce manuscrit divisé en trois parties :

- La première partie comprend une étude bibliographique sur la famille Pinaceae, le genre *Abies*, sur le genre *Cedrus* et sur les activités antioxydante ; anticholinestérase et antimicrobienne. On abordera également les métabolites secondaires qui

caractérisent ces deux genres et les différentes activités biologiques pour lesquelles ils ont été testés.

- La deuxième partie décrit le matériel utilisé et résume les différentes étapes de l'extraction et de la purification des molécules des deux espèces *A. numidica* et *C. atlantica* ainsi que les activités biologiques expérimentées, à savoir, l'activité antioxydante, l'activité anticholinestérase et l'activité antimicrobienne.
- La troisième partie consiste à la détermination structurale des produits isolés et la discussion des résultats obtenus des tests biologiques réalisés sur les composés purs ainsi que sur les extraits de plantes tout en effectuant une étude comparative entre les deux espèces.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale et la liste des références bibliographique.

# **PARTIE 1**

## **Revue bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Aperçu bibliographique sur le genre *Abies***

## 1.1. Introduction sur la famille des Pinaceae

La famille des Pinaceae est une famille de conifères distribués essentiellement dans l'hémisphère nord. Il s'agit souvent d'arbres résineux à cônes allongés qui peuvent atteindre une grande taille (plus de 80 mètres) et qui sont constitués d'écaillés disposées d'une manière spirale (Quezel et Santa., 1962). La famille des Pinaceae compte entre 220 et 250 espèces réparties en onze genres : *Abies*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudolarix*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Keteleeria* et *Nothotsuga* (Farjon., 2001). En Algérie, les genres *Abies*, *Cedrus* et *Pinus* sont les plus abondants.

## 1.2. Position systématique de la famille des Pinaceae

Hart (1987) a divisé la famille Pinaceae en deux groupes:

- Le premier groupe caractérisé par la présence de canaux de résine dans la polyémbryonie de clivage et qui regroupe : *Abies*, *Cedrus*, *Keteleeria*, *Pseudolarix* et *Tsuga*.
- Le deuxième est caractérisé par la présence de canaux de résine dans le xylème secondaire et les feuilles ayant un endoderme avec des bandes épaisses de Casparian et il regroupe : *Cathaya*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* et *Pseudotsuga*.

D'autre part, sur la base des structures morphologiques, végétatives et sur la base des organes, Frankis (1989), on distingue quatre sous-familles (Farjon., 1990):

- Pinoideae (*Pinus*)
- Piceoideae (*Picea*)
- Laricoideae (*Cathaya*, *Larix* et *Pseudotsuga*)
- Abietoideae (*Abies*, *Cedrus*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Pseudolarix* et *Tsuga*).

## 1.3. Présentation du genre *Abies* et de l'espèce *A. numidica* de Lannoy

*Abies* (Sapin) est le deuxième genre de la famille Pinaceae après *Pinus* et le plus grand genre dans la sous-famille abietoideae (Farjon., 2010) puisqu'il compte 50 espèces distribuées majoritairement en Afrique du Nord (Maroc et Algérie), dans certains pays d'Europe (Espagne et Grèce), en Asie et en Amérique du Nord (Kukina et Shmidt., 2011). D'après la littérature, le genre *Abies* est riche en une large gamme de métabolites secondaires, essentiellement des terpenes (diterpènes et triterpènes), d'acides gras, de polyphénols ; de flavonoïdes et de lignanes.

La détermination taxonomique du genre *Abies* s'est basée sur deux approches ; la première répondant à des critères morphologiques et qui consiste à distinguer quatre groupes : les sapins à aiguilles pointues et piquantes, les sapins à aiguilles émoussées, molles et souvent émarginées à l'apex, les sapins pontiques et le quatrième groupe qui est constitué d'*Abies Alba* et *Abies borisii-regis*. La seconde approche est plutôt basée sur des critères biogéographiques et qui consiste à diviser les sapins méditerranéen en deux groupes : les sapins méridionaux (*Abies pinsapo*, *A. maroccana*, *A. numidica* et *A. cilicica*) dont la bractée est incluse dans le cône et les sapins du revers septentrional méditerranéen, *Abies alba* inclus, dont les bractées sont exsertes (Durcey et Oswald., 1990)

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'espèce *Abies numidica* de Lannoy qui a été le sujet de notre étude phytochimique et pharmacologique. Il s'agit d'un arbre atteignant 20 m dont les branches sont verticillées et étalées horizontalement avec les dernières qui sont généralement dressées. Ces cônes sont oblongs-cylindriques, obtus, de 13-20 cm de long. Les feuilles sont obtuses, raides et à face supérieure plane en plus de celle disposées de part et d'autre des rameaux inférieurs et moyens et qui sont toutes très tordues à la base.

*A. numidica* de Lannoy se trouve généralement dans les forêts humides des hautes montagnes comme celle de Babor et Tababort. Il est également connu sous l'appellations : *Sapin de Numidie*, *Sapin du Babor* ou « *Taoument* » (Figure 1)( Quezel et Santa., 1962).



**Figure 1.** *Abies numidica* de Lannoy [1]

#### 1.4. Utilisation en médecine traditionnelle du genre *Abies*

Certaines espèces du genre *Abies* ont été utilisées en médecine traditionnelle pour leurs vertus thérapeutiques telles que :

- *A. numidica* : ses cônes ont été utilisés contre l'indigestion, les maux d'estomac, les maladies pulmonaires, vasculaires et vénériennes (Fujita et al., 1995).
- *A. cilicica* : sa résine est utilisée pour apaiser les maux d'estomac et contre l'abcès par l'application directe de la résine, ce qui favorise la suppuration (Sezik et al., 2001).
- *A. Bommuliriana* Mattf : La résine de cette espèce est aussi utilisée contre les maux d'estomac et l'indigestion. Elle est également utilisée pour la guérison des plaies en la faisant bouillir avec les racines râpées de *Salvia aethiopsis*, le beurre et la cire d'abeille, le mélange est ensuite appliqué comme pommade tous les jours sur les blessures pendant 5 à 10 jours (Fujita et al., 1995).

#### 1.5. Quelques activités biologiques reconnues du genre *Abies*

Les espèces du genre *Abies* ont été sujettes à plusieurs études scientifiques mettant en avant leurs propriétés et leurs intérêts biologiques. Nous rapportons dans notre étude bibliographique certaines activités du genre *Abies* :

- **Activité de l'hormone juvénile des insectes** : En 1965, des études ont été menées par Slama et Williams sur l'extrait d'*A. Balsamea*. Les larves de l'insecte européen *Pyrrhocoris apterus* exposées aux extraits sont mortes avant la fin de la métamorphose et avant d'atteindre la maturité sexuelle. Le composé actif a été isolé et identifié à la juvabione en 1996 (Bowers et al., 1996 ; Manville et Kriz., 1977).
- **Activité antitumorale** : La préparation aqueuse de parties mélangées de *A. alba* et *Viscum album* a montré des effets antiprolifératifs sur les cellules L-1210. De plus, les extraits prolongent significativement la durée de vie et réduisent la croissance tumorale des rats traités (Karkabounas et al., 2000).
- **Activité antibactérienne** : Les extraits de résines brutes d'*A. cilicica* se sont révélés très actifs contre sept bactéries. L'activité était similaire à l'antibiotique standard, l'amoxicilline (Kizil et al., 2002). Dans une autre étude, les extraits de chloroforme, d'acétone et de méthanol des feuilles, résines, écorces, cônes et fruits de cette espèce

ont inhibé le développement de onze bactéries (Digrak et al., 1999). Les huiles essentielles des espèces d'*Abies* ont été trouvées pour la plupart avoir des activités antibactériennes. Les huiles essentielles des espèces *A. alba* et *A. firma* ont montré une activité modeste, et celles des espèces *A. koreana*, *A. cilicica* subsp. *cilicica*, *A. cilicica* subsp. *isaurica*, *A. nordmanniana* subsp. *nordmanniana* et *A. nordmanniana* subsp. *bornmuelleriana* ont manifesté une activité puissante contre les bactéries et les levures testées (Bagci et Digrak., 1991). Dernièrement, l'huile essentielle d'*A. balsamea* a montré une activité contre *Staphylococcus aureus*. Les composés actifs sont trois constituants mineurs, l' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -caryophyllène et l'humulène (Pichette et al., 2006). Les composés isolés d'*A. mariesii* et d'*A. sachalinensis* ont montré une activité bactérienne contre les bactéries Gram (+) et contre les actinomycètes (Hasegawa et al., 1985 ; Kuroyanagi et al., 2000).

- **Activité antifongique** : La croissance mycélienne de plusieurs champignons comestibles a été fortement inhibée par l'extrait lipophile et l'huile volatile de *A. sachalinensis* (Yoneyama et al., 1989). A partir de l'huile de bois volatile, un principe actif a été isolé et identifié à la juvabione, qui a fortement inhibé la croissance mycélienne de six champignons testés à une application de 300 mg / mL (Yoneyama et al., 1990). En se basant sur ce résultat, l'extrait brut d'hexane et l'huile volatile provenant du bois d'*A. sachalinensis*, ainsi que leurs produits saponifiés, ont été analysés pour des activités antifongiques contre six espèces de champignons pathogènes provoquant des maladies du gazon. A une concentration de 200 mg/g, toutes les substances testées présentaient des inhibitions faibles ou complètes des croissances de cinq espèces (Aoyama et Dois., 1992).
- **Activité anti-ulcérogène** : Dans une expérience utilisant l'ulcère induit par l'aspirine sur des rats albinos, l'éther de pétrole, le benzène et les extraits de chloroforme d'*A. pindrow* ont joué un rôle protecteur (Singh et al., 2000).
- **Activité anti-inflammatoire** : Dans les modèles d'inflammation aiguë ou subaiguë, l'œdème de la patte du rat a été inhibé de manière significative par cinq extraits différents de feuilles d'*A. pindrow* (Singh et al., 1998 ; Singh et Pandey., 1996 ; Singh et Pandey., 1997) . En outre, les différents extraits de cette plante ont pu réduire la poche de granulome induite par l'agent phlogistique à la fois exsudat, volume et le

poinds du tissu glanulome (Singh et Pandey., 1997). L'extrait de benzène d'*A. pindrow* avait une action significative de protection des mastocytes (Singh et al., 2000). Les extraits de MeOH et d'éther de pétrole des feuilles d'*A. webbiana* ont également montré un effet anti-inflammatoire dans l'œdème de la patte induite par le carraghénine (Nayak et al., 2004).

- **Activité anti-hypertensive** : L'extrait d'éther de pétrole de feuilles d'*A. Pindrow* a provoqué une chute transitoire de la tension artérielle sans changement significatif de la fréquence cardiaque et de la respiration d'un chien anesthésié, mais cette chute de la pression artérielle a pu être bloquée par l'atropine (Bhakuni et al., 1971 ; Singh et al., 1998).
- **Activité antitussive** : L'extrait méthanolique d'*A. webbiana* a présenté une activité antitussive significative d'une manière dose-dépendante sur un modèle de toux induit par le gaz SO<sub>2</sub> chez les souris. L'extrait a montré une inhibition maximale de la fréquence de la toux de 71,69 et 78,67%, respectivement, par rapport au groupe témoin, et était comparable à la codéine phosphate, un prototype antitussif (Nayak et al., 2003). Dans une autre expérience sur le bronchospasme induit par l'histamine chez les cobayes, les extraits de benzène, d'acétone et d'EtOH des feuilles d'*A. pindrow* ont montré des activités bronchoprotectrices (Singh et al., 2000).
- **Activité analgésique** : Le prétraitement de 200 mg/kg, i.p., de cinq extraits différents de feuilles d'*A. pindrow* a montré des activités analgésiques significatives après 45 à 90 min d'administration (Singh et al., 1998).
- **Activité anxiolytique** : Dans plusieurs paradigmes expérimentaux de l'anxiété, l'extrait éthanolique des feuilles d'*A. pindrow* a montré des effets anxiolytiques significatifs (Kumar et al., 2000).
- **Toxicité** : Les valeurs de DL<sub>50</sub> des extraits d'éther de pétrole, de benzène, de CHCl<sub>3</sub>, d'acétone et d'EtOH des feuilles d'*A. Pindrow* étaient respectivement de 360 ; 250 ; 325 ; 850 ; 425 mg/kg (Singh et al., 1998). Les valeurs DL<sub>50</sub> de MeOH, CHCl<sub>3</sub> et d'éther de pétrole des feuilles d'*A. webbiana* étaient de 985.67 ; 1387.14 et plus de 3200 mg/kg (Nayak et al., 2004).

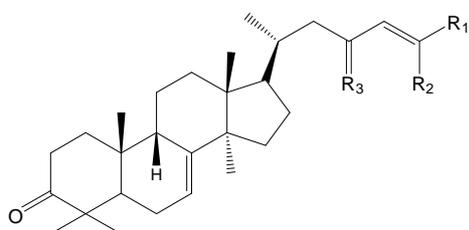
## 1.6. Métabolites isolés du genre *Abies*

Les investigations phytochimiques des plantes du genre *Abies* menées depuis 1938 ont conduit à la détermination des principaux métabolites secondaires du genre et qui sont majoritairement des composés terpéniques essentiellement des triterpènes (Tableau 1), des diterpènes (Tableau 2), un bon nombre de sesquiterpènes (Tableau 3), de lignanes (Tableau 4) et de flavonoïdes (Tableau 5).

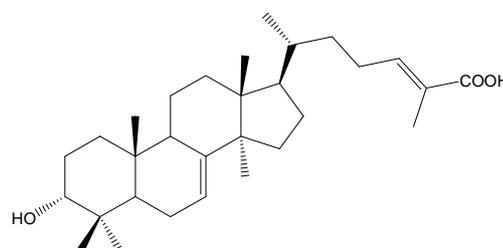
### 1.6.1. Terpènes :

#### 1.6.1.1. Triterpènes :

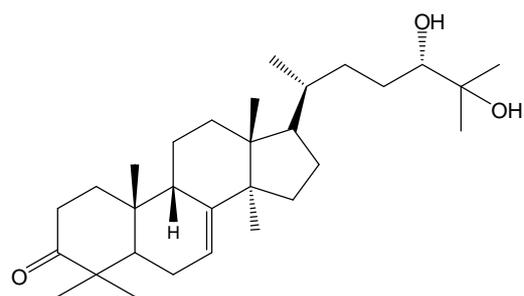
Les espèces du genre *Abies* renferment majoritairement les triterpènes de type lanostane. Les composés **1** à **57** sont des triterpénoïdes de lanostane, parmi lesquels **1** à **12** sont des 9 $\beta$ -lanost-7-énoïdes isolés principalement d'*A. firma* et *A. sibirica*; **13** -**20** sont des 3,4-seco-9 $\beta$ -lanost-7-énoïdes; **21** à **30** sont des lanost-8-énoïdes isolés d'*A. mariesii* et *A. sibirica*; **31** à **33** sont trois lanost-9 (11)- énoïdes isolés d'*A. veitchii*, *A. faxoniana* et *A. alba*, respectivement; **34** et **35** sont deux lanosta-7,9 (11) -diènes isolés d'*A. pindrow* et *A. veitchii*; **36** et **37** sont 7 (8, 9) abo-lanostanes, deux lactones triterpéniques de migration inhabituelle, isolées à partir des écorces de tige d'*A. mariesii*. **38** à **41** sont des 8 (14, 13R) abœso-17,13-friedo-9 $\beta$ -lanostanes; **42** à **50** sont des 3,4-seco-8 (14,13R) -bœo-17,13- Friedo-9 $\beta$ -lanostanes, isolés principalement d'*A. alba*, *A. sibirica* et *A. sachalinensis*; **51** et **52** sont deux 13,17-friedo-9-lanostanes isolés de *A. mariesii*; **53**- **56** sont des mariésianoïdes et **57** est un 3,4-secomariésianoïde, qui ont été proposés pour un nouveau type de composés qui partagent le même squelette C avec l'acide mariésiique A (**53**). Les composés **58** à **64** sont des cycloartanes. Des gammaceranes, **65** à **67**, et deux hopanes, **68** et **69**, ont été isolés des espèces *A. mariesii* et *A. veitchii* (Tableau 1).



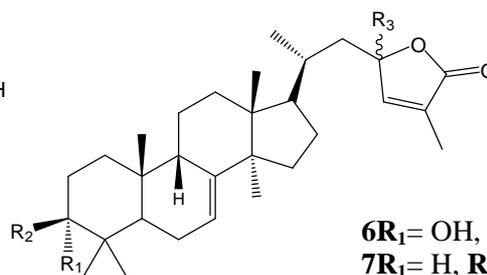
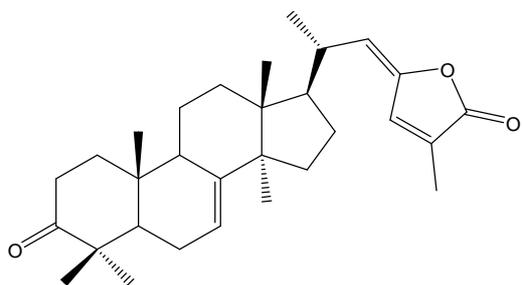
- 1** R<sub>1</sub> = COOH, R<sub>2</sub> = Me, R<sub>3</sub> = O  
**2** R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = COOH, R<sub>3</sub> = O  
**3** R<sub>1</sub> = HOCH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = Me, R<sub>3</sub> = H<sub>2</sub>



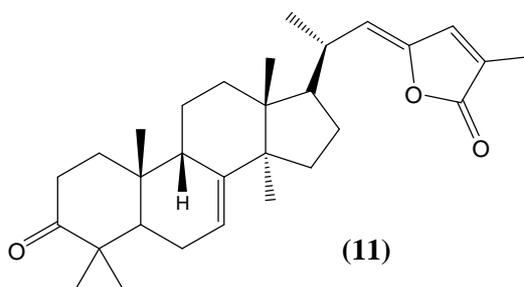
(4)



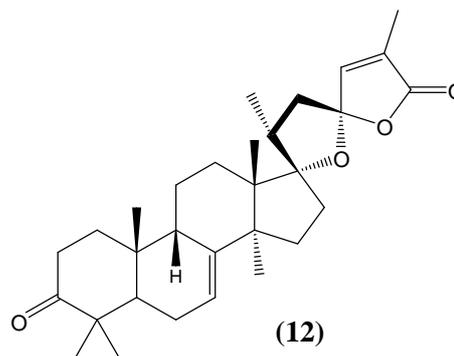
(5)

**6**  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = \alpha-H$ **7**  $R_1 = H$ ,  $R_2 = OH$ ,  $R_3 = \alpha-H$ **8**  $R_1 = MeO$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = \alpha-H$ **9**  $R_1 = MeO$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = \beta-H$ 

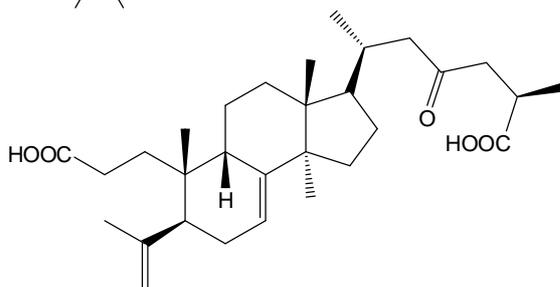
(10)



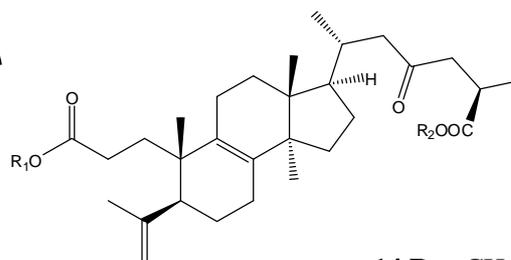
(11)

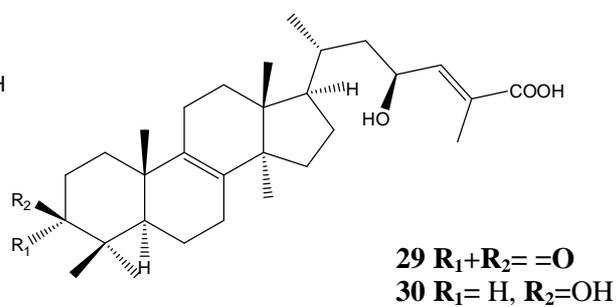
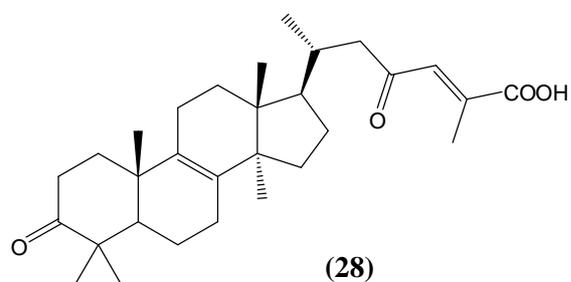
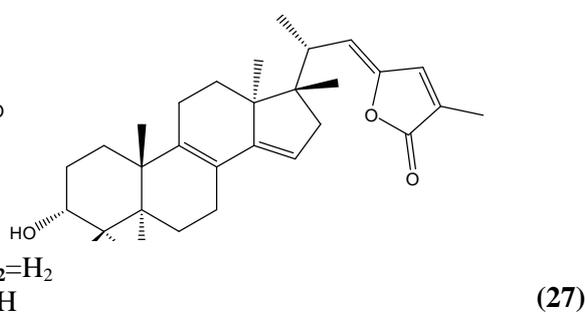
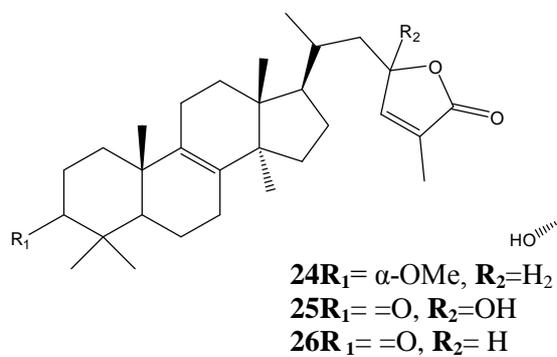
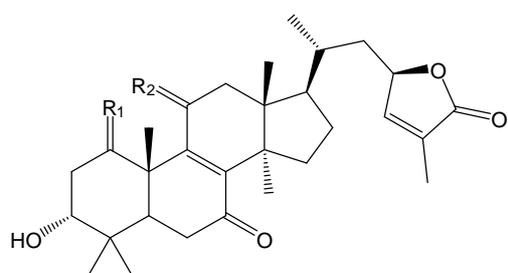
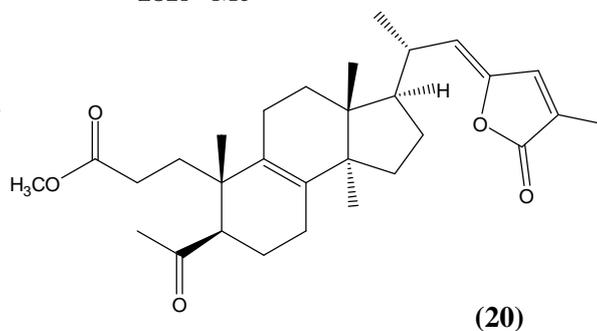
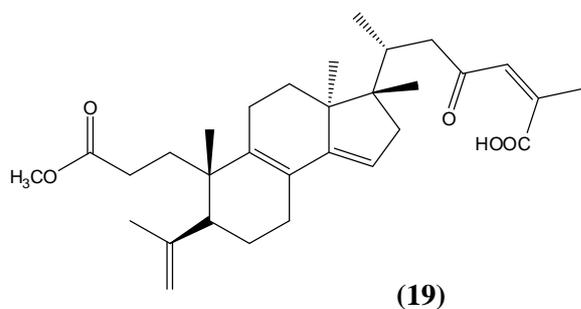
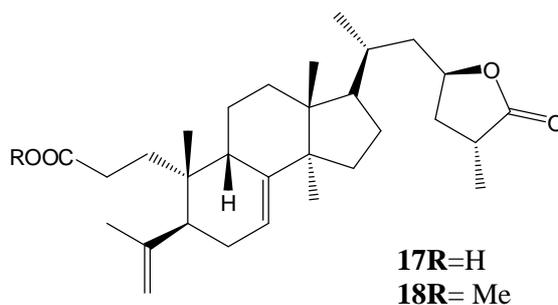


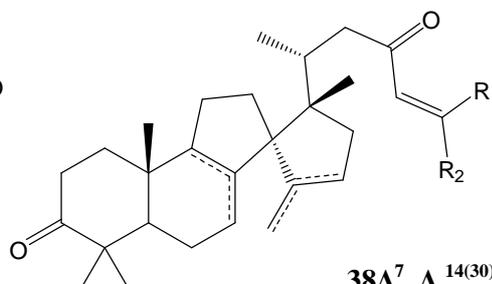
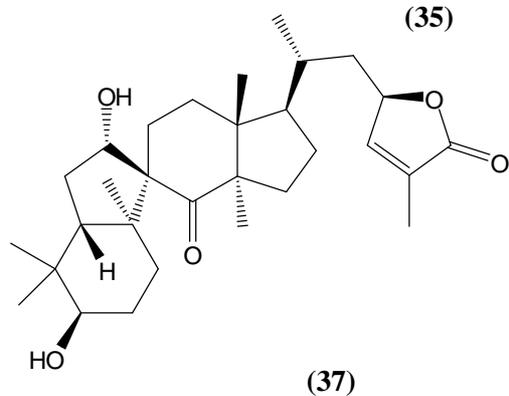
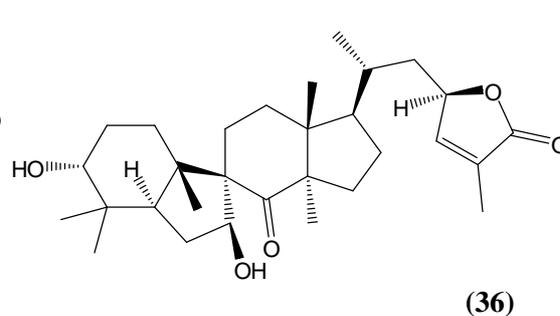
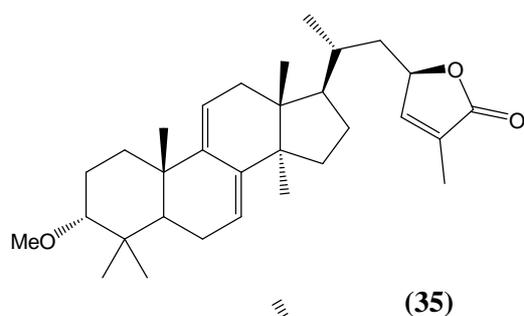
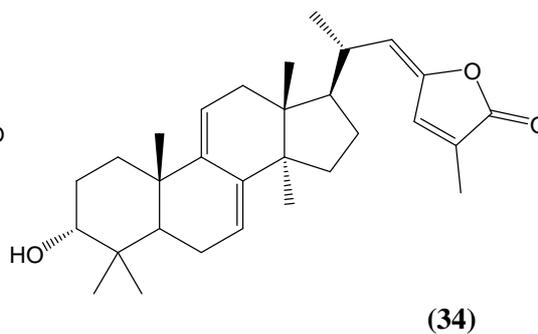
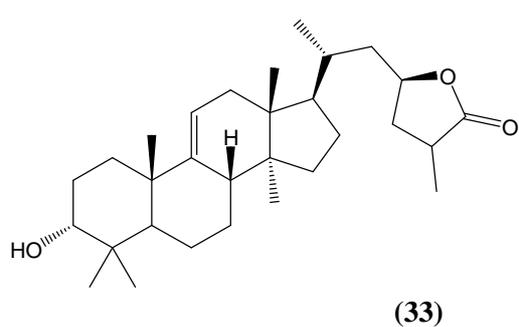
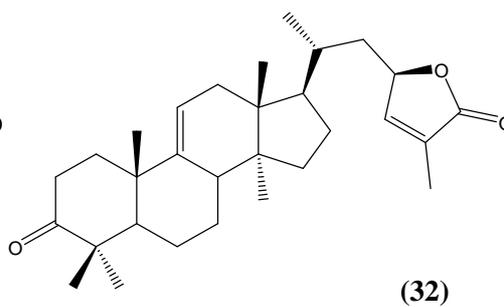
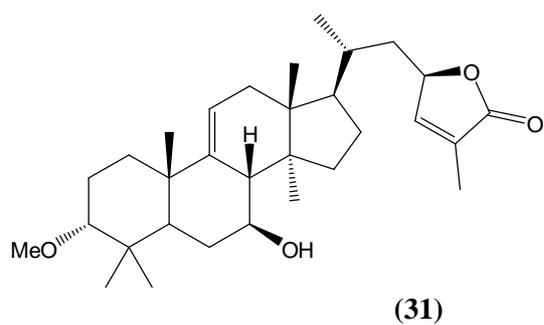
(12)



(13)

**14**  $R_1 = CH_3$ ,  $R_2 = H$ **15**  $R_1 = R_2 = CH_3$ **16**  $R_1 = Et$ ,  $R_2 = H$



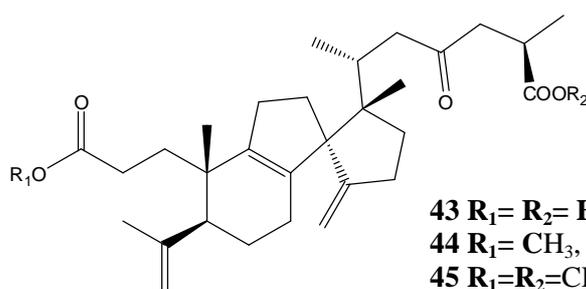
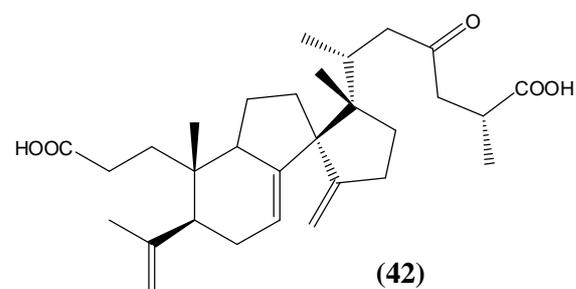


38 $\Delta^7$ ,  $\Delta^{14(30)}$   $R_1 = \text{Me}$ ,  $R_2 = \text{COOH}$

39 $\Delta^7$ ,  $\Delta^{14}$   $R_1 = \text{Me}$ ,  $R_2 = \text{COOH}$

40 $\Delta^8$ ,  $\Delta^{14(30)}$   $R_1 = \text{COOH}$ ,  $R_2 = \text{Me}$

41 $\Delta^8$ ,  $\Delta^{14(30)}$   $R_1 = \text{Me}$ ,  $R_2 = \text{COOH}$

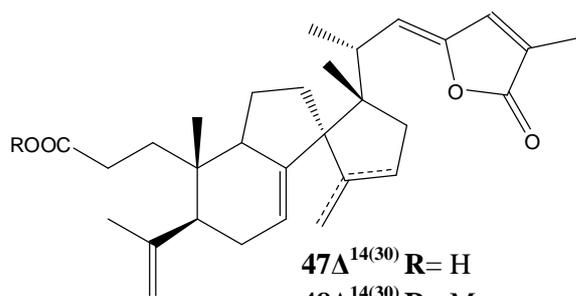


43  $R_1 = R_2 = \text{H}$

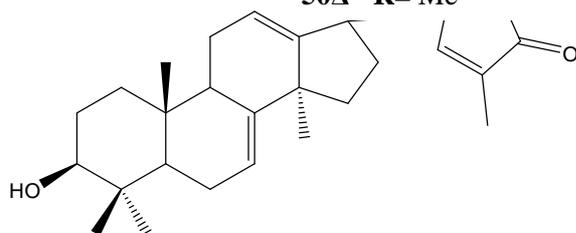
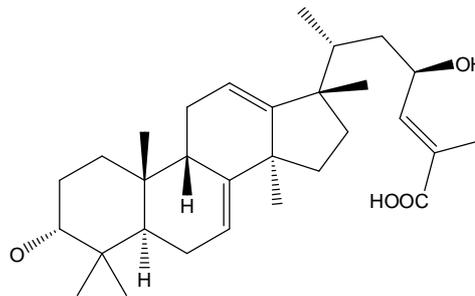
44  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$

45  $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$

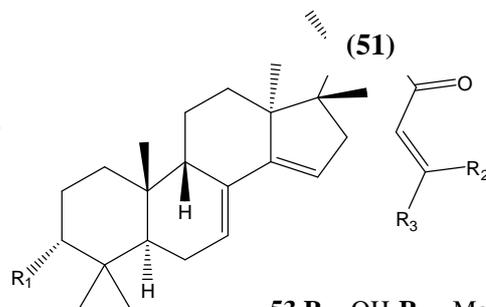
46  $R_1 = \text{Et}$ ,  $R_2 = \text{H}$



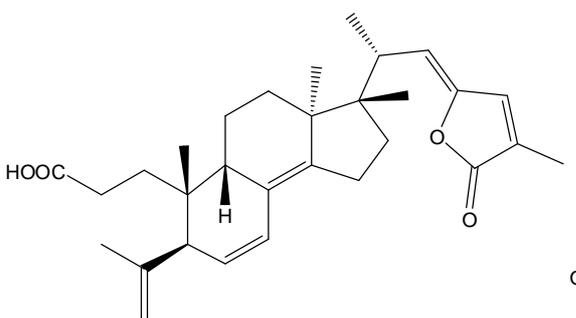
**47 $\Delta^{14(30)}$**  R= H  
**48 $\Delta^{14(30)}$**  R= Me  
**49 $\Delta^{14}$**  R= H  
**50 $\Delta^{14}$**  R= Me



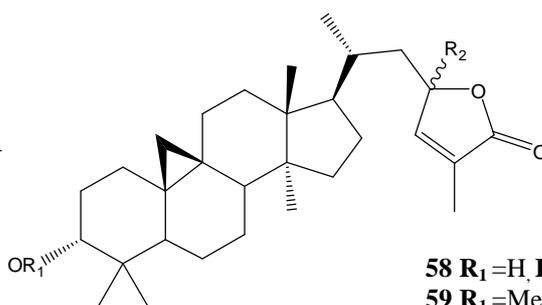
**(52)**



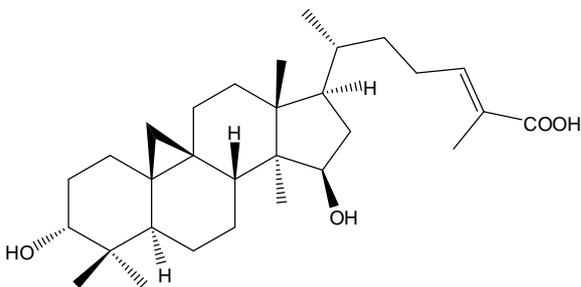
**53** R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>= Me, R<sub>3</sub>= COOH  
**54** R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>= COOH, R<sub>3</sub>= Me  
**55** R<sub>1</sub>=MeO, R<sub>2</sub>= COOH, R<sub>3</sub>= Me  
**56** R<sub>1</sub>= $\beta$ -OH, R<sub>2</sub>= Me, R<sub>3</sub>= COOH



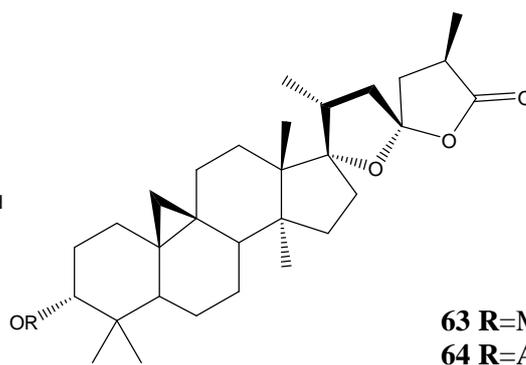
**(57)**



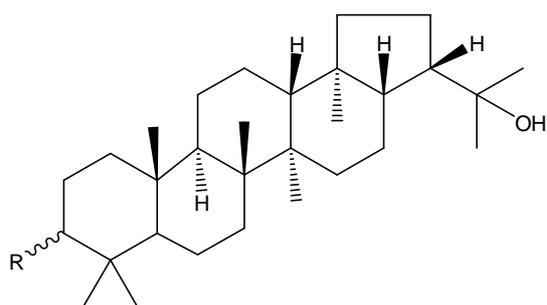
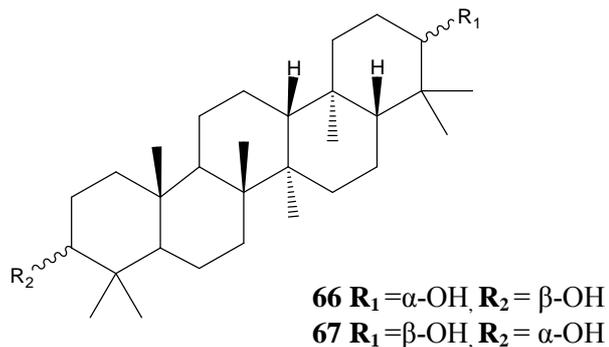
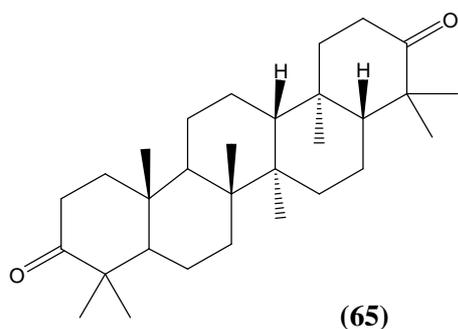
**58** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=  $\alpha$ -H  
**59** R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>= $\alpha$ -H  
**60** R<sub>1</sub>=Ac, R<sub>2</sub>=  $\alpha$ -H  
**61** R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>=  $\beta$ -H



**(62)**



**63** R=Me  
**64** R=Ac



**Tableau 1.** Les triterpènes isolés du genre *Abies*

No.	Nom	Source	Références
1	Acide Firmanoïque	<i>A. sibirica</i>	(Raldugin et al., 1987 ; Roshchin et al., 1987)
2	Acide (24Z)-3,23-Dioxo-9 $\beta$ -lanosta-7,24-dien-26-oïque	<i>A. sibirica</i>	(Raldugin et al. 1989 ; Roshchin et al., 1987)
3	(24E)-3-Oxo-9 $\beta$ -lanosta-7,24-dien-26-ol	<i>A. koreana</i>	(Kim et al., 2004)
4	Abiesatrine K	<i>A. faxoniana</i>	(Wang et al., 2015)
5	(24S)-3-Oxo-9 $\beta$ -lanost-7-ene-24,25-diol	<i>A. sachalinensis</i>	(Wada et al., 2002)
6	(23R)-3 $\alpha$ -Hydroxy-9 $\beta$ -lanosta-7,24-dien-26,23-olide	<i>A. sibirica</i> <i>A. veitchii</i>	(Yaroshenko et Raldugin., 1989)
7	(23R)-3 $\beta$ -Hydroxy-9 $\beta$ -lanosta-7,24-dien-26,23-olide	<i>A. firma</i> <i>A. mariesii</i> <i>A. veitchii</i>	(Tanaka et Matsunaga., 1991b) et (Ohira et Yatagai., 1992) (Tanaka et Matsunaga., 1991a)

Aperçu bibliographique sur le genre *Abies*

8	Abieslactone	<i>A. amabilis</i> <i>A. grandis</i> <i>A. mariesii</i>	(Uyeo et al., 1968) (Allen et al., 1971) (Ohira et Yatagai., 1992 ; Uyeo et al., 1968 ; Takahashi., 1938 ; Takayasu et al., 1990)
		<i>A. procera</i> <i>A. sibirica</i>	(Norin., 1972) (Yaroshenko et Raldugin., 1989)
		<i>A. veitchii</i>	(Tanaka et Matsunaga., 1990)
9	Grandisolide	<i>A. grandis</i>	(Allen et al., 1971)
10	Neoabieslactone I	<i>A. faxoniana</i>	(Wang et al., 2015)
11	(22Z)-3-Oxo-9 $\beta$ -lanosta-7,22,24-trien-26,23-olide	<i>A. sibirica</i> <i>A. koreana</i>	(Raldugin et al., 1989) (Kim et al., 2001)
12	Firmanolide	<i>A. firma</i>	(Hasegawa et al. 1987a)
13	Acide (25R)-23-Oxo-3,4-seco-9b-lanosta-4(28),7-diene-3,26-dioïque	<i>A. alba</i>	(Leibyuk et al., 1991)
14	Abifarine M	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
15	Abifarine N	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
16	Abifarine O	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
17	Abifarine D	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
18	Acide abiesolidique	<i>A. sibirica</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Raldugin et al., 1986) (Wada et a. 2002)
19	Methyl (23R,25R)-3,4-Seco-9 $\beta$ -lanosta-4(28),7- dien-26,23-olid-3-oate	<i>A. sachalinensis</i>	(Wada et al., 2002)
20	Abifarine Q	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
21	(23R)-3 $\alpha$ -Hydroxy-7-oxolanosta-8,24-dien-26,23-olide	<i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 2000)
22	(23R)-3 $\alpha$ -Hydroxy-7,11-dioxolanosta-8,24- dien-26,23-olide	<i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 2000)
23	(23R)-3 $\alpha$ -Hydroxy-1,7,11-trioxolanosta-8,24- dien-26,23-olide	<i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 2000)
24	Neoabieslactone	<i>A. mariesii</i>	(Ohira et al., 1992)
25	23-hydroxyl-3-oxolane-osta-8,24-dien-26, Z3-olide	<i>A. chensiensis</i>	(Zhao et al., 2016)
26	Neoabieslactone G	<i>A. faxoniana</i>	(Wang et al., 2015)

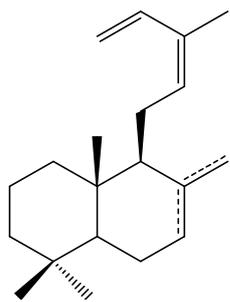
Aperçu bibliographique sur le genre *Abies*

27	Abifarine F	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
28	Acide (24E)-3,23-Dioxolanosta-8,24-dien-26-oïque	<i>A sibirica</i>	(Raldugin et al., 1988)
29	Abifarine K	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
30	Abifarine L	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
31	Veitchiolide	<i>A. veitchii</i>	(Tanaka et Mtsunaga., 1990)
32	Neoabieslactone H	<i>A. faxoniana</i>	(Wang et al., 2015)
33	3 $\alpha$ -Hydroxylanost-9(11)-en-26,23-olide	<i>A. alba</i>	(Muller et Ourisson., 1974)
34	Pindrolactone	<i>A. pindrow</i>	(Tripathi et al., 1996)
35	(23R)-3 $\alpha$ -Methoxylanosta-7,9(11),24-trien-26,23-olide	<i>A. veitchii</i>	(Tanaka et al., 1991a)
36	Spiromarienonol A	<i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 2004)
37	Spiromarienonol B	<i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 2004)
38	Acide mariesiique C	<i>A. mariesii</i>	(Hasegawa et al., 1987b)
49	Acide isomariesiique C	<i>A. mariesii</i>	(Hasegawa et al., 1987b)
40	Acide (24Z)-8(14,13)-abeo-17,13-friedo-3,23-Dioxo-9 $\beta$ -lanosta-8,14(30),24-trien-26-oïque	<i>A. sibirica</i>	(Raldugin et al., 1992)
41	Acide (24E)-8(14,13)-abeo-17,13-friedo-3,23-Dioxo-9 $\beta$ -lanosta-8,14(30),24-trien-26-oïque	<i>A. sibirica</i>	(Raldugin et al., 1992)
42	Acide (25R)-23-Oxo-3,4-secoabiesa-4(28),7,14(30)-triene-3,26-dioïque	<i>A. alba</i>	(Leibyuk et al., 1991)
43	Abifarine G	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
44	Abifarine H	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
45	Abifarine I	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
46	Abifarine J	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
47	Abiesanolide A	<i>A. sachalinensis</i>	(Kuroyanagi et al., 2000)
48	Abiesanolide B	<i>A. sachalinensis</i>	(Kuroyanagi et al., 2000)
49	Abiesanolide C	<i>A. sachalinensis</i>	(Kuroyanagi et al., 2000)
50	Abiesanolide D	<i>A. sachalinensis</i>	(Kuroyanagi et al., 2000)
51	Acide mariesiique B	<i>A. mariesii</i>	(Hasegawa et al., 1987b)
52	Neoabieslactone K	<i>A. faxoniana</i>	(Wang et al., 2015)

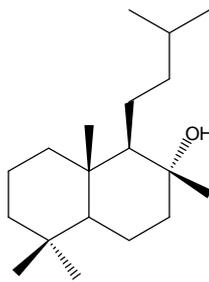
53	Acide 23-Oxomariesiiique A	<i>A. sibirica</i> <i>A. mariesii</i> , <i>A. firma</i>	(Raldugin et al., 1987b) (Hasegawa et al., 1987b) (Hasegawa et al., 1987b)
54	Acide(3R,20R,24Z)-3-Hydroxy-23-oxomariesia-7,14,24-trien-26-oïque	<i>A. sibirica</i>	(Raldugin et al., 1987b)
55	Acide (3R,20R,24Z)-3-Methoxy-23-oxomariesia-7,14,24-trien-26-oïque	<i>A. sibirica</i>	(Shevtsov et Raldugin., 1989)
56	Abiesatrine L	<i>A. faxoniana</i>	(Wang et al., 2015)
57	Acide anhydrosibirique	<i>A. sibirica</i>	(Shevtsov et Raldugin., 1989)
58	(23R)-3 $\alpha$ -Hydroxy-9,19-cyclo-9 $\beta$ -lanost-24-en-26,23-olide	<i>A. sachalinensis</i> <i>A. marocana</i>	(Kuroyanagi et al., 2000) (Barrero et al., 1992 ; Barrero et al., 1994)
59	Cyclograndisolide	<i>A. grandis</i> <i>A. alba</i>	(Allen et al., 1971 ; Kutney et al., 1973) (Muller et Ourisson., 1974)
60	(23R)-3 $\alpha$ -Acetoxy-9,19-cyclo-9 $\beta$ -lanost-24-en-26,23-olide	<i>A. marocana</i> <i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1994) (Barrero et al., 1993)
61	Epicyclograndisolide	<i>A. grandis</i> <i>A. alba</i>	(Allen et al., 1971 ; Kutney et al., 1973) (Muller et Ourisson., 1950)
62	Abifarine R	<i>A. fargeii</i>	(Wu et al., 2016)
63	Abietospiran	<i>A. alba</i>	(Steglich et al., 1979)
64	(23S,25R)-3 $\alpha$ -Acetoxy-17,23-epoxy-9,19-cyclo-9 $\beta$ -lanostan-26,23-olide	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1996; Barrero et al., 1994)
65	Gammacerane-3,21-dione	<i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 1994)
66	Gammacerane-3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -diol	<i>A. veitchii</i> <i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 1992) (Tanaka et al., 1994)
67	Gammacerane-3 $\alpha$ ,21 $\beta$ -diol	<i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 1994)
68	Hopane-3 $\alpha$ , 22-diol	<i>A. veitchii</i> <i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 1992) (Tanaka et al., 1994)
69	Hopane-3 $\beta$ , 22-diol	<i>A. mariesii</i>	(Tanaka et al., 1994)

### 1.6.1.2. Diterpènes :

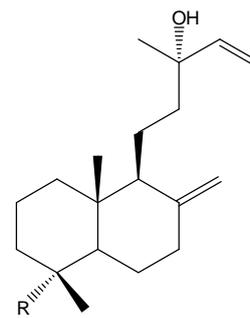
Les composés **70** à **103** sont trois types de diterpénoïdes. Parmi ces **33** composés, **70-79** sont des labdanes, **80 - 102** sont des abietanes, et **103** est le seul pimarane. Ces diterpénoïdes ont été isolés principalement d'*A. marocana*(Tableau 2).



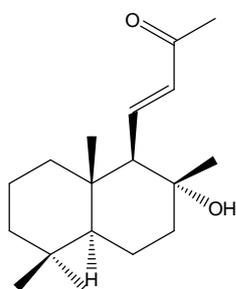
70  $\Delta^7$   
71  $\Delta^{8(17)}$



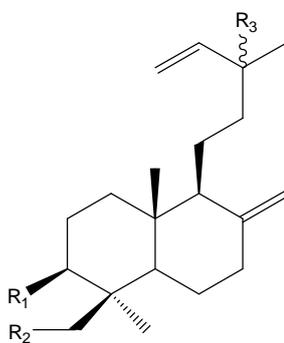
(72)



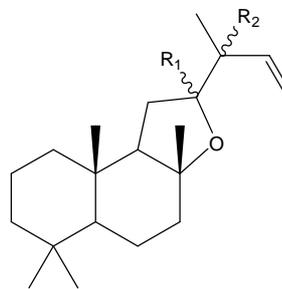
73  $R = \text{CH}_2\text{OH}$   
74  $R = \text{CH}_2\text{-O-CO-(CH}_2)_2\text{-COOH}$



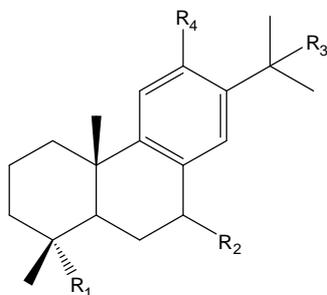
(75)



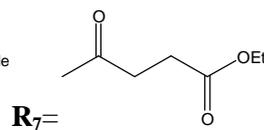
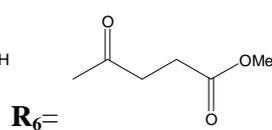
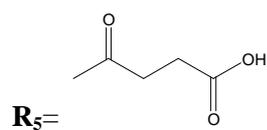
76  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}, R_3 = \alpha\text{-OH}$   
77  $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \beta\text{-OH}$

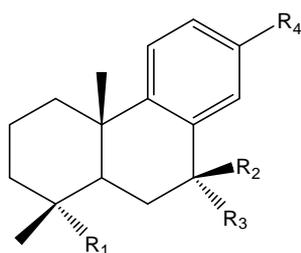


78  $R_1 = \alpha\text{-OH}, R_2 = \alpha\text{-OH}$   
79  $R_1 = \beta\text{-OH}, R_2 = \beta\text{-OH}$

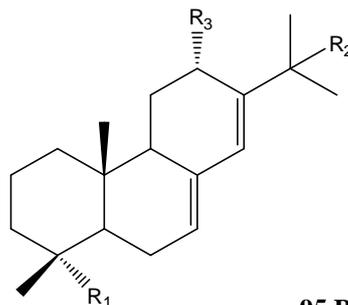


- 80  $R_1 = \text{Me}, R_2 = \text{H}_2, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}$   
81  $R_1 = \text{COOH}, R_2 = \text{H}_2, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}$   
82  $R_1 = \text{AcOCH}_2, R_2 = \text{H}_2, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}$   
83  $R_1 = \text{CH}_2\text{OR}_5, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}$   
84  $R_1 = \text{CH}_2\text{OR}_6, R_2 = \text{H}_2, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{H}$   
85  $R_1 = \text{COOH}, R_2 = \text{H}_2, R_3 = \text{OMe}, R_4 = \text{H}$   
86  $R_1 = \text{COOH}, R_2 = \alpha\text{-OH}, R_3 = \text{OMe}, R_4 = \text{H}$   
87  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{H}$   
88  $R_1 = \text{COOH}, R_2 = =\text{O}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}$   
89  $R_1 = \text{CH}_2\text{OR}_7, R_2 = =\text{O}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{H}$   
90  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}, R_2 = \text{H}_2, R_3 = \text{OEt}, R_4 = \text{H}$

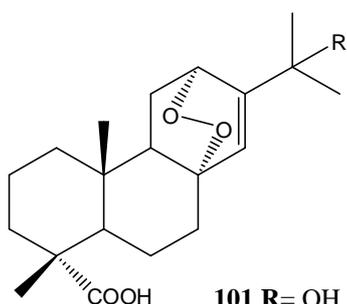




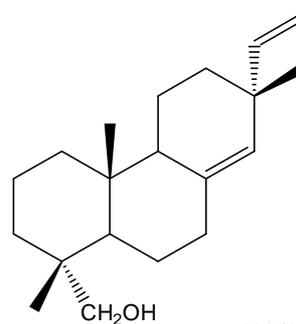
- 91**  $R_1 = CH_2OR_5$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H$ ,  $R_4 = OH$   
**92**  $R_1 = COOH$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = OH$ ,  $R_4 = Ac$   
**93**  $R_1 = COOH$ ,  $R_2 + R_3 = =O$ ,  $R_4 = Ac$   
**94**  $R_1 = CH_2OR_5$ ,  $R_2 + R_3 = =O$ ,  $R_4 = Ac$



- 95**  $R_1 = AcOCH_2$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H_2$   
**96**  $R_1 = COOMe$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H_2$   
**97**  $R_1 = COOH$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H_2$   
**98**  $R_1 = CHO$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H_2$   
**99**  $R_1 = HOCH_2$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H_2$   
**100**  $R_1 = CH_2OR_5$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H_2$



- 101**  $R = OH$   
**102**  $R = H$



(103)

**Tableau 2.** Les diterpènes isolés du genre *Abies*

No.	Nom	Source	Référence
<b>70</b>	(12Z)-Labda-7,12,14-triene	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1992)
<b>71</b>	(12Z)-Labda-8(17),12,14-triene	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1992)
<b>72</b>	15-nor-8-labdanol	<i>A. Faxoniana</i>	(Wang et al., 2016)
<b>73</b>	Torreferol	<i>A. Faxoniana</i>	(Wang et al., 2016)
<b>74</b>	Abiesadine X	<i>A. Faxoniana</i>	(Wang et al., 2016)
<b>75</b>	8-Hydroxy-14, 15-dinorr-11-labden-13-one	<i>A. georgei</i>	(Yang et al., 2010) (Yang et al., 2008)
<b>76</b>	Manool	<i>A. lasiocarpa</i>	(Manville et al., 1977)
<b>77</b>	3β-Hydroxy-13-epimanool	<i>A. sachalinensis</i>	(Numata et al., 1992)
<b>78</b>	(8R,12S,13S)-13-Hydroxy-8,12-epoxylabd-14-ene	<i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1993)
		<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1994)

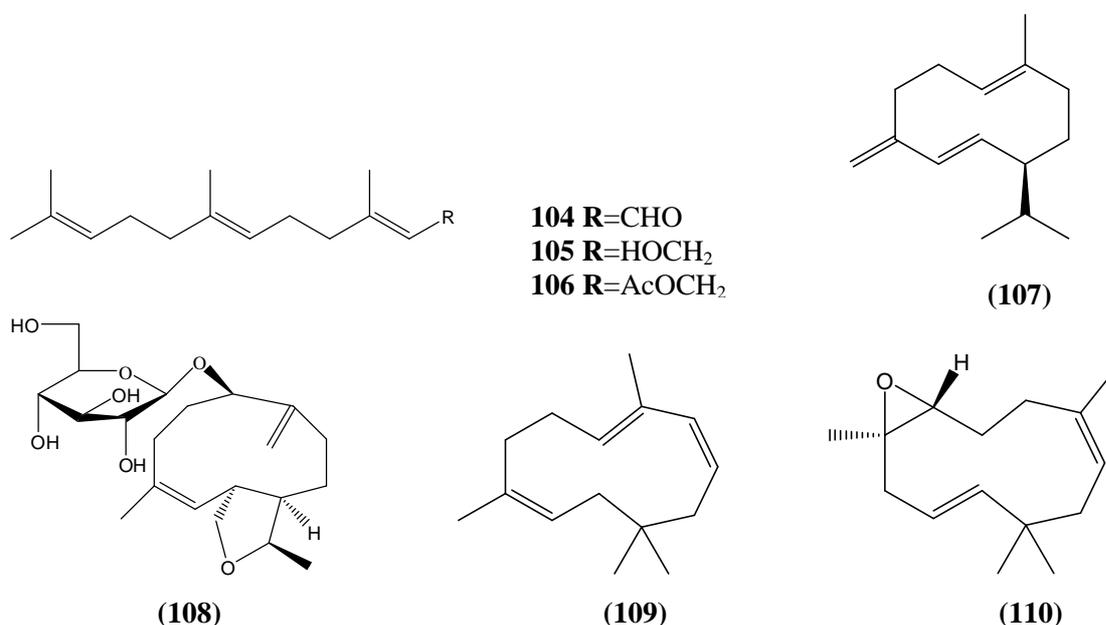
Aperçu bibliographique sur le genre *Abies*

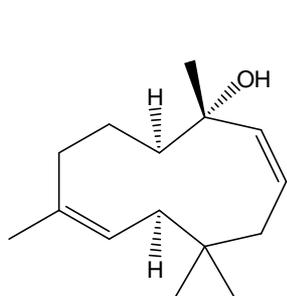
79	(8 <i>R</i> ,12 <i>R</i> ,13 <i>R</i> )-13-Hydroxy-8,12-epoxylabd-14-ene	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1996 ; Barrero et al., 1994)
80	Dehydroabietane	<i>A. alba</i>	(Ribo et al., 1974)
81	Acide dehydroabietique	<i>A. marocana</i> <i>A. firma</i> <i>A. sibirica</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Barrero et al., 1994) (Kaneko et al., 1985) (Raldugin et al., 1987b) (Ohira et Yatagai., 1994)
82	18-Acetoxyabieta-8,11,13-triene	<i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1993)
83	Abiesadine F	<i>A. georgei</i>	(Yang et al., 2010)
84	Abiesadine K	<i>A. georgei</i>	(Yang et al., 2010)
85	Abiesadine N	<i>A. georgei</i>	(Yang et al., 2010)
86	Abiesadine O	<i>A. georgei</i>	(Yang et al., 2010)
87	Daturabietatriene	<i>A. marocana</i> <i>A. georgei</i>	(Barrero et al., 1994) (Yang et al., 2010)
88	Acide 7-oxocallitrisique	<i>A. georgei</i>	(Yang et al., 2010)
89	Ethyl 7-oxo-8,11,13-abietatrien-18-yl succinate	<i>A. fabri</i>	(Li et al., 2015)
90	15-ethoxy-8,11,13-abietatrien-18-ol	<i>A. fabri</i>	(Li et al., 2015)
91	Abiesanordine J	<i>A. georgei</i>	(Yang., 2008)
92	Abiesanordine K	<i>A. georgei</i>	(Yang., 2008)
93	Acide 17-Nor-7,15-dion-8,11, 13-abietatriene-18-oïque	<i>A. georgei</i>	(Yang., 2008)
94	Abiesanordine N	<i>A. georgei</i>	(Yang., 2008)
95	18-Acetoxyabieta-7,13-diene	<i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1993)
96	Methyl abietate	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al. 1991)
97	Acide abietique	<i>A. firma</i> <i>A. nordmanniana</i> <i>A. sibirica</i>	(Kaneko et al., 1985) (Sakar et al., 1999) (Raldugin et al., 1987b)
98	Abietinal	<i>A. nordmanniana</i> <i>A. firma</i>	(Sakar et al., 1999) (Kaneko et al., 1985)
99	Abietinol	<i>A. firma</i>	(Kaneko et al., 1985)

<b>100</b>	Acide abietinol-18-succinique	<i>A. georgei</i>	(Yang et al., 2010)
<b>101</b>	Acide 15-Hydroxy-8,12 $\alpha$ -epidioxyabiet-13-en-18-oïque	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1996 ; Barrero et al., 1994)
<b>102</b>	Acide 8,12 $\alpha$ -Epidioxyabiet-13-en-18-oïque	<i>A. marocana</i> <i>A. sibirica</i>	(Barrero et al. 1991 ; Barrero et al., 1994) (Leibyuk et al., 1991)
<b>103</b>	Isopimarinol	<i>A. firma</i>	(Kaneko et al., 1985)

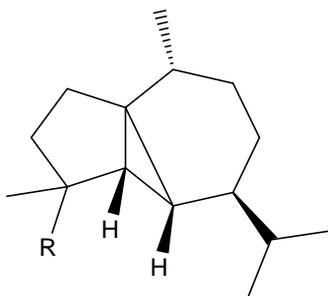
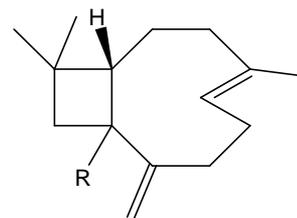
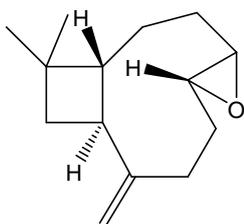
### 1.6.1.3. Sesquiterpènes et monoterpènes :

Ces deux types de composés sont pour la plupart des constituants volatils. Bien que des centaines de ces composants aient été identifiés à partir des huiles essentielles (Bagci et al., 1999 ; Baran et al., 2007 ; Khan et al., 1988 ; Ohira et a., 1992), peu d'entre eux étaient isolés, en particulier les monoterpénoïdes. Actuellement, seulement deux monoterpènes **132** et **133** (Yang et al., 2014), ont été isolés du genre *Abies*. Les composés **113- 131** sont des sesquiterpènes rapportés d'espèces *Abies*. Spécifiquement, **104 - 106** sont trois sesquiterpènes acycliques isolés d'*A. alba* et *A. firma*; **107** et **108** sont les seuls germacrane rapportés d'*A. pinsapo* et *A. delavayi*; **109- 110** sont des humulanes, la plupart trouvés dans *A. alba*; **111** est un himachalane isolé d'*A. alba*; **112-113** sont des guayanes rapportés d'*A. alba* également; **114** à **116** sont des dodécane isolés principalement d'*A. alba*; **117-126** sont des bisabolanes isolés principalement d'*A. sachalinensis*; **127- 128** sont des eudesmanes trouvés principalement dans *A. firma*; **129** sont des cadinanes d'*A. marocana*; **130** et **131** sont deux autres types de sesquiterpènes rapportés d'*A. magnifica*, *A. alba* et *A. pinsapo* (Tableau 3).

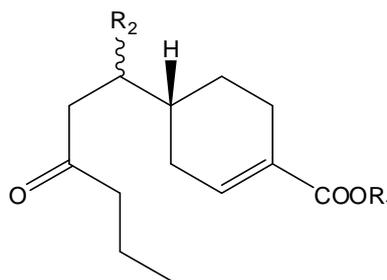
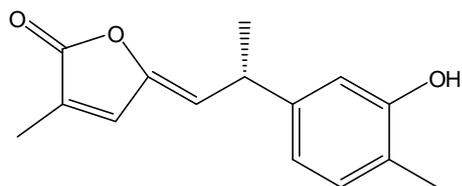




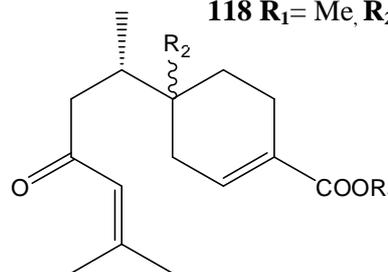
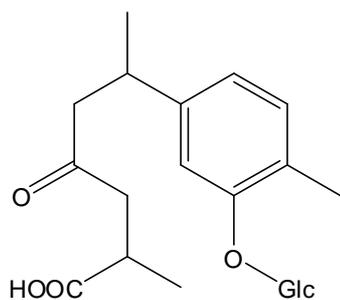
(111)

112 R=β-OH  
113 R=α-OH114 R=β-H  
115 R=α-H

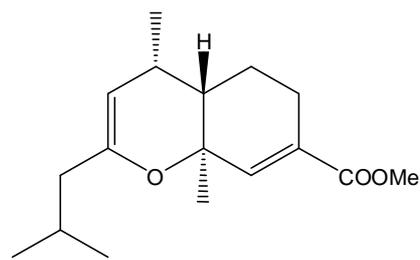
(116)

117 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=β-Me  
118 R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>=β-Me

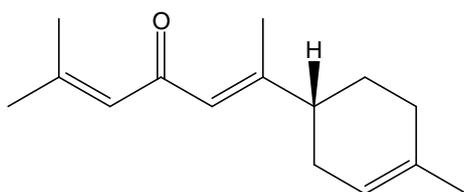
(119)

120 R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=β-H  
121 R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>=α-H

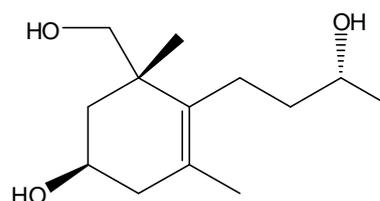
(122)



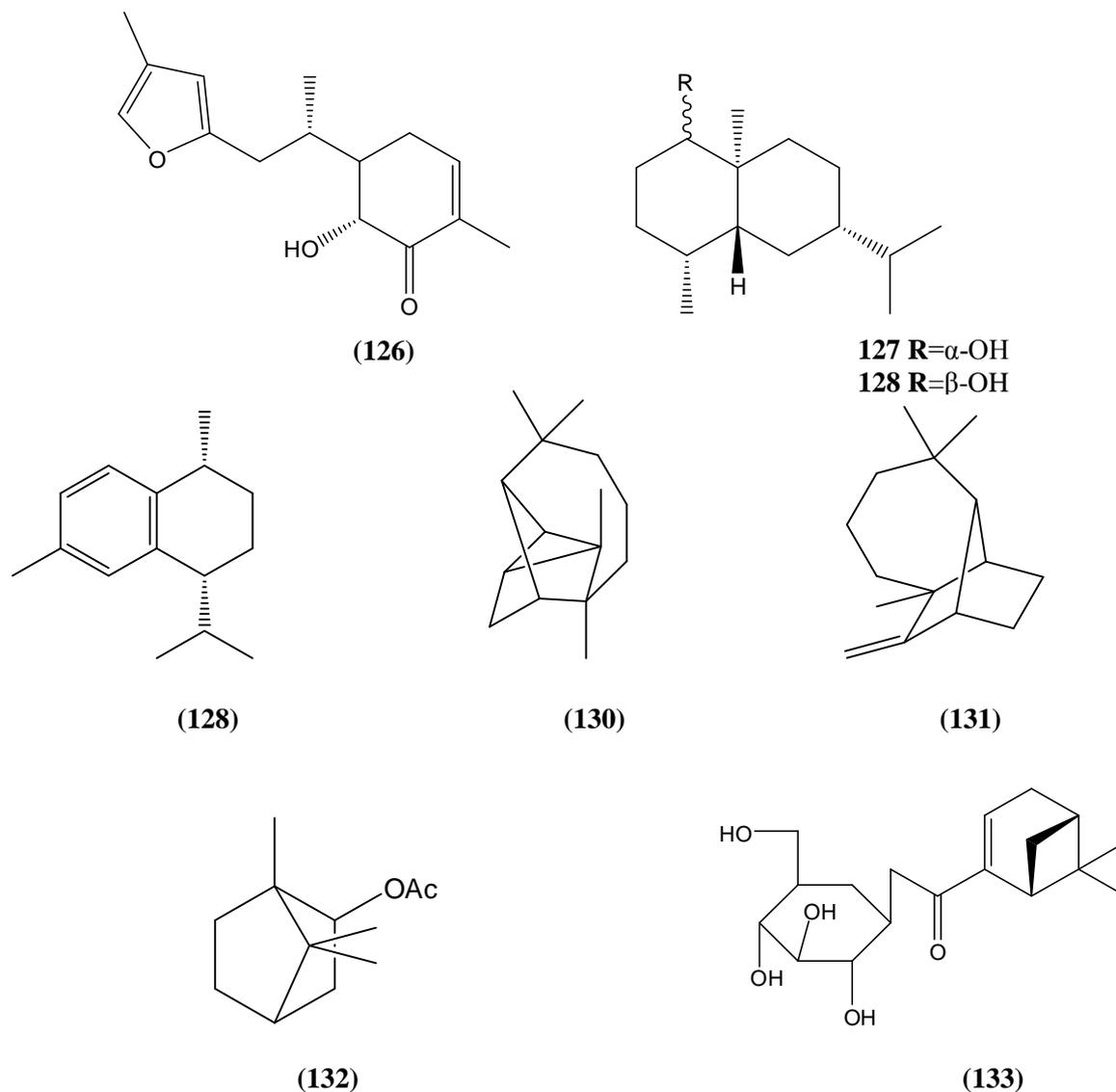
(123)



(124)



(125)



**Tableau 3.** Les sesquiterpènes isolés du genre *Abies*

No.	Nom	Source	Référence
104	Farnesal	<i>A. firma</i>	(Kaneko et al., 1985)
105	Farnesol	<i>A. firma</i>	(Kaneko et al., 1985)
106	Farnesyl acetate	<i>A. firma</i>	(Kaneko et al., 1985)
107	Germacrene D	<i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1993)
108	(4Z)-6α, 12-epoxy-4,10(15)-dien-7αH, 13αH-germacrane 1β-O-β-D-glucopyranoside	<i>A. delavayi</i>	(Yang et al., 2014)

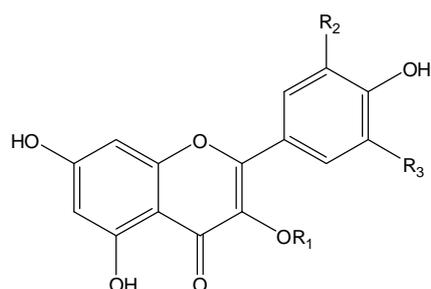
Aperçu bibliographique sur le genre *Abies*

109	$\alpha$ -Humulene	<i>A. firma</i> <i>A. pinsapo</i> <i>A. alba</i>	(Kaneko et al., 1985) (Barrero et al., 1993) (Khan et Pentegova., 1988)
110	Humulene epoxide II	<i>A. nordmanniana</i>	(Sakar et al., 1999)
111	Himachalol	<i>A. alba</i>	(Khan et Pentegova., 1988)
112	Cubebol	<i>A. alba</i>	(Khan et Pentegova., 1988)
113	4-Epicubebol	<i>A. alba</i>	(Khan et Pentegova., 1988)
114	Epicaryophyllene	<i>A. alba</i>	( et Pentegova., 1988)
115	Caryophyllene	<i>A. alba</i> <i>A. firma</i> <i>A. marocana</i>	(Khan et Pentegova., 1988) (Kaneko et al., 1985) (Barrero et al., 1992)
116	Caryophyllene oxide	<i>A. alba</i>	(Khan et Pentegova., 1988)
117	Acide Todomatuique	<i>A. nordmanniana</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Sakar et al., 1999) (Tsuchihashi et al., 1940)
118	Juvabione	<i>A. balsamea</i> <i>A. lasiocarpa</i> <i>A. pinsapo</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Bowers et al., 1996) (Manville et al., 1977) (Barrero et al., 1993) (Numata et al., 1983)
119	Abiesesquine A	<i>A. holophylla</i>	(Xia et al., 2012)
120	Acide 4'-Dehydroepitodomatuique	<i>A. marocana</i> <i>A. pinsapo</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Barrero et al., 1994) (Barrero et al., 1989) (Numata et al., 1992)
121	4'-Dehydroepijuvabione	<i>A. marocana</i> <i>A. pinsapo</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Barrero et al., 1994) (Barrero et al., 1993) (Numata et al., 1990)
122	9-oxo-1,3,5-bisabolatrien-12-oic acide	<i>A. delavayi</i>	(Yang et al., 2014)
123	Epijuvabienol ether	<i>A. sachalinensis</i>	(Numata et al., 1992)
124	( <i>E</i> )- $\alpha$ -Atlantone	<i>A. lasiocarpa</i>	(Manville et al., 1977 ; Manville et al., 1989)

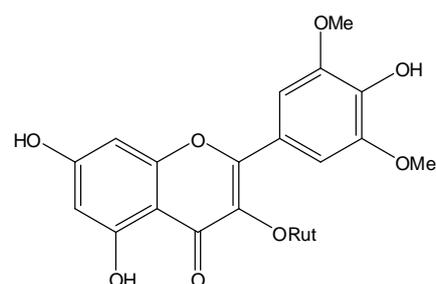
125	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 9 <i>S</i> )-megastigman-5-en-3,9,11-triol	<i>A. delavayi</i>	(Yang et al., 2014)
126	Lasiocarpenol	<i>A. lasiocarpa</i>	(Manville et al., 1989)
127	$\alpha$ -Eudesmol	<i>A. firma</i>	(Kaneko et al., 1985)
128	$\beta$ -Eudesmol	<i>A. firma</i>	(Kaneko et al., 1985)
129	<i>cis</i> -Calaménène	<i>A. marocana</i> <i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1992) (Barrero et al., 1993)
130	Longicyclene	<i>A. magnifica</i>	(Smedman et al., 1968)
131	Longifolene	<i>A. alba</i> <i>A. pinsapo</i>	(Khan et Pentegova., 1988) (Barrero et al., 1993)
<b>Monoterpènes</b>			
132	Bornyl acetate	<i>A. firma</i>	(Kaneko et al., 1985)
133	$\beta$ - D-glucopyranosyl myrtenate	<i>A. delavayi</i>	(Yang et al., 2014)

### 1.6.2. Flavonoïdes :

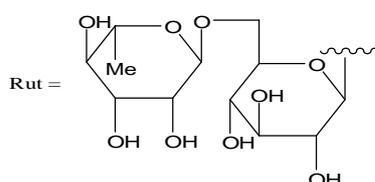
Les composés **134** à **144** sont 10 flavonoïdes isolés du genre *Abies*. Parmi ces composés, **134- 138** sont des flavones trouvées principalement dans *A. amabilis*, **139** est une biflavone isolée d'*A. Webbiana* et **140- 144** sont quatre chalcones rapportées d'*A. pindrow* (Tableau 4).

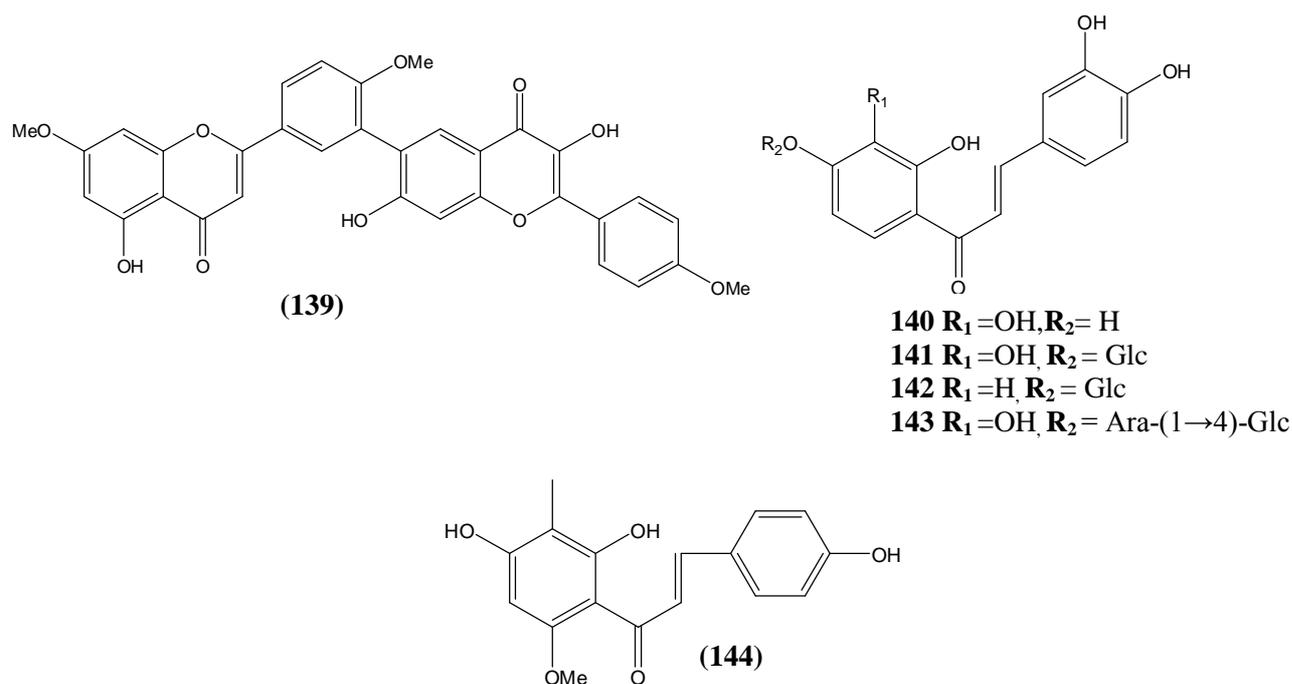


- 134**  $R_1 = \text{Rut}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$   
**135**  $R_1 = \text{Rha}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$   
**136**  $R_1 = \text{Glc}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$   
**137**  $R_1 = \text{Gal}$ ,  $R_2 = \text{MeO}$ ,  $R_3 = \text{H}$



(138)

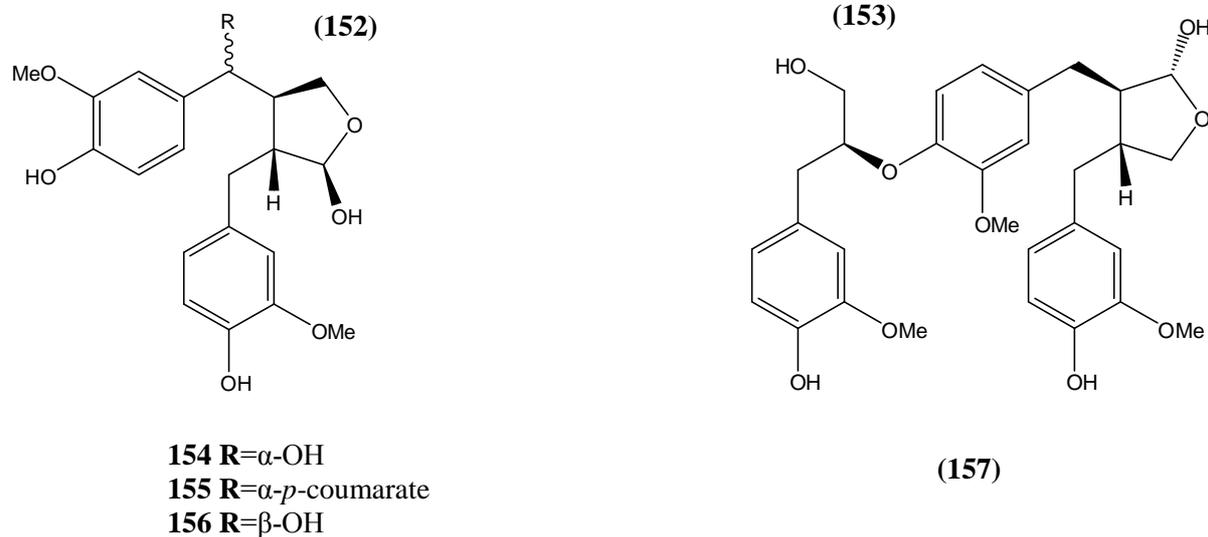
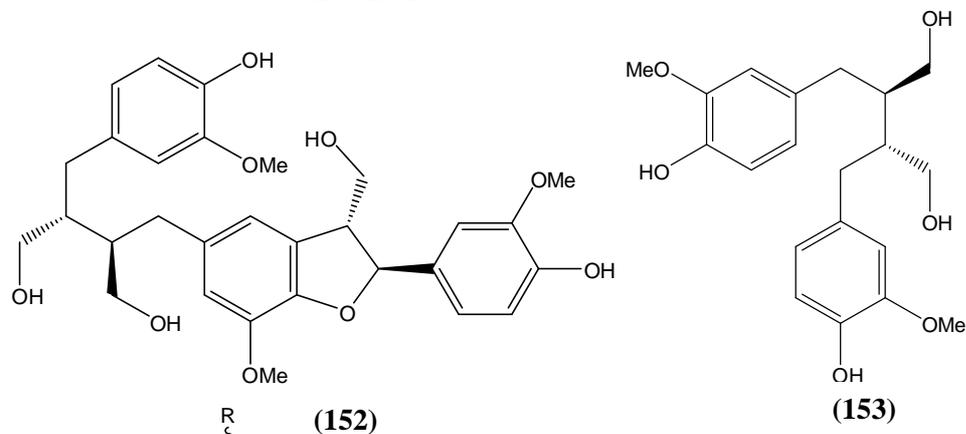
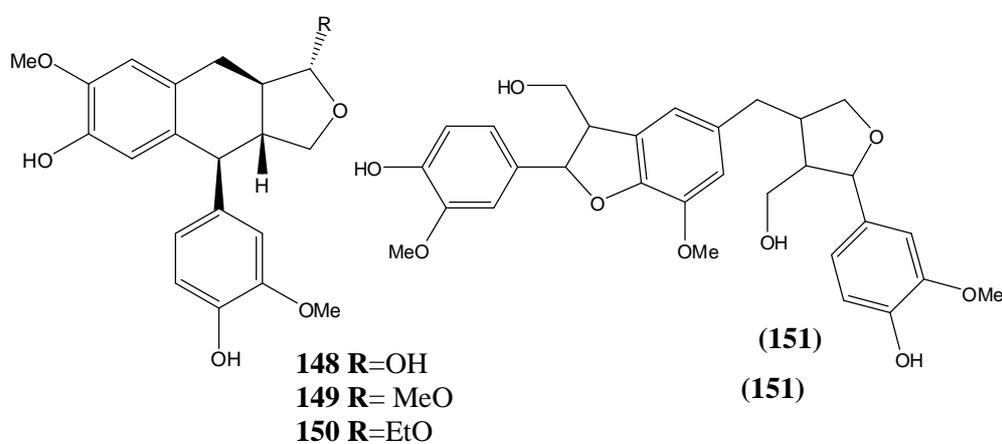
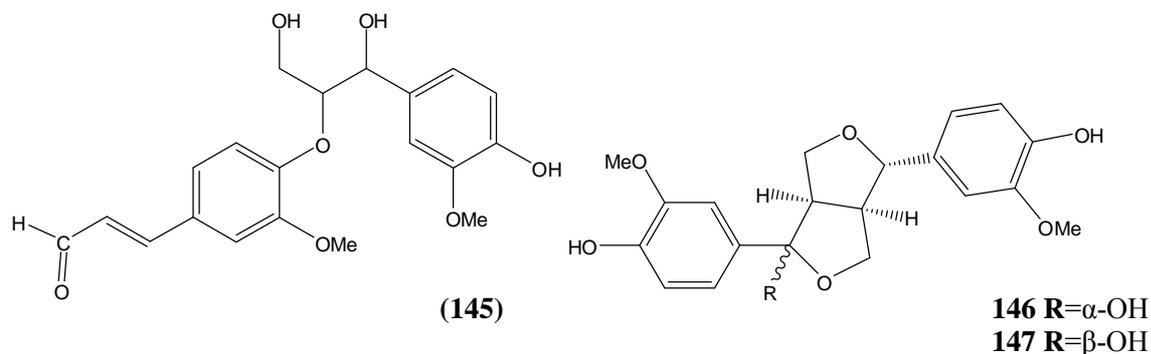


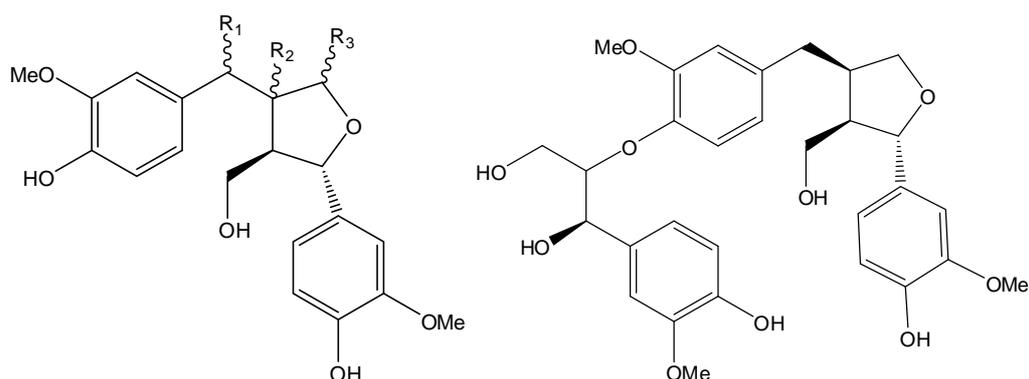
**Tableau 4.** Les Flavonoïdes isolés du genre *Abies*

N°	Nom	Source	Références
134	Kaempferol 3-O-rutinoside	<i>A. amabilis</i>	(Parker et al., 1979)
135	Quercetin 3-O-rhamnoside	<i>A. amabilis</i>	(Parker et al., 1979)
136	Quercetin 3-O-glucoside	<i>A. amabilis</i>	(Parker et al., 1979)
137	Isorhamnetin 3-O-galactoside	<i>A. amabilis</i>	(Parker et al., 1979)
138	Syringetin-3-O-rutinoside	<i>A. amabilis</i>	(Parker et al., 1979)
139	Abiesine	<i>A. webbiana</i>	(Chatterjee et al., 1984)
140	Okanine	<i>A. pindrow</i>	(Tiwari et al., 1980)
141	Okanin-4'-O-fl-d-glucopyranoside	<i>A. pindrow</i>	(Tiwari et al., 1980)
142	Butein-4'-O-fl-d-glucopyranoside	<i>A. pindrow</i>	(Tiwari et al., 1980)
143	2', 3', 4', 3,4-pentahydroxychalcone-4' (L-arabinofuranosyl- $\alpha$ -1-4- $\beta$ -D-glucopyranoside)	<i>A. pindrow</i>	(Tiwari et al., 1980)
144	7,9,4'-trihydroxy-5-methoxy-8-methylchalcone	<i>A. delavayi</i>	(Yang et al., 2014)

**1.6.3. Lignanes :**

Un 8-O-4'-neolignane(**145**), deux ditetrahydrofuranes**146** et **147**, trois dérivés de 4-phényltétrahydronaphtalène**148-150**, deux benzofurannes**151-152**, dix autres **153-163** ont été isolés de plusieurs espèces d'*Abies* (Tableau 5).



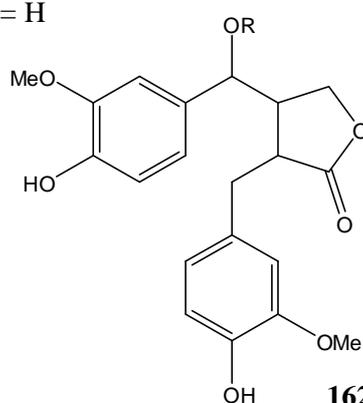


**158**  $R_1 = \beta\text{-OH}$ ,  $R_2 = \alpha\text{-H}$ ,  $R_3 = \text{H}$

**159**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \alpha\text{-H}$ ,  $R_3 = \alpha\text{-OH}$

**160**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \alpha\text{-H}$ ,  $R_3 = \text{H}$

(161)



**162**  $R = 4\text{-OH-C}_6\text{H}_4\text{-CO}$

**163**  $R = \text{vanilloyl}$

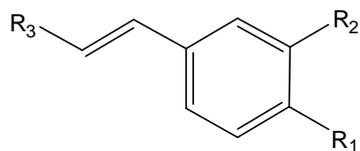
**Tableau 5.** Les lignanes isolés du genre *Abies*

N°	Nom	Source	Référence
145	Guaiacylglycerol-coniferyl ether	aldehyde <i>A. sachalinensis</i>	(Sasaya et al., 1980)
146	(+)-pinoresinol	<i>A. koreana</i> <i>A. marocana</i> <i>A. nephrolepis</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Kim et al., 1994) (Barrero et al., 1996) (Leont'eva et al., 1975) (Numata et al., 1992; Ozawa et Tabei., 1988b ; Sasaya et al., 1980)
147	(+)-Epipinoresinol	<i>A. sachalinensis</i>	(Numata et al., 1992 ; Ozawa et Tabei., 1988b)
148	Todolactol B	<i>A. mariesii</i>	(Omori et al., 1994)
149	Todolactol C	<i>A. koreana</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Kim et al., 1994) (Ozawa et Sasaya., 1988a)

150	Todolactol D	<i>A. sachalinensis</i>	(Ozawa et Sasaya., 1988a)
151	Abiesol A	<i>A. sachalinensis</i>	(Ozawa et Sasaya., 1991)
152	Sesquipinsapol B	<i>A. marocana</i> <i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1996) (Barrero et al., 1994 ; Barrero et al., 1993)
153	Secoisolariciresinol	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1996)
154	Todolactol A	<i>A. mariesii</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Omori et al., 1994) (Ozawa et Tabei., 1988b)
155	Todolactol-A- $\alpha$ - <i>p</i> -coumarate	<i>A. mariesii</i>	(Omori et al., 1994)
156	(7'S)-Todolactol A	<i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1994)
157	Sesquipinsapol C	<i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1994)
158	8'-Epitanegool	<i>A. sachalinensis</i>	(Sasaya et al., 1980 ; Ozawa et al., 1988)
159	(9'R)-9'-Hydroxylariciresinol	<i>A. marocana</i> <i>A. pinsapo</i>	(Barrero et al., 1996) (Barrero et al., 1994)
160	(+)-Lariciresinol	<i>A. marocana</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Barrero et al., 1996) (Ozawa et al., 1988)
161	Sesquimarocanol A	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1996)
162	4,4'-dihydroxy-7-(4''-hydroxybenzoyloxy)-3,3'-dimethoxylignan-9,9'-olide	<i>A. nephrolepis</i> <i>A. sibirica</i>	(Leont'eva et al., 1977)
163	4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxy-7-(vanilloyloxy)lignan-9,9'-olide	<i>A. nephrolepis</i> <i>A. sibirica</i>	(Leont'eva et al., 1977)

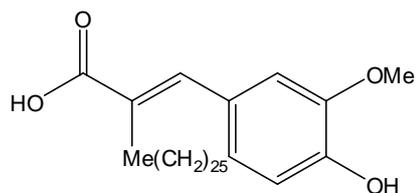
#### 1.6.4. Phénols :

De **164-167** sont des phénols qui ont été isolées de différentes espèces *Abies* (Tableau 6).

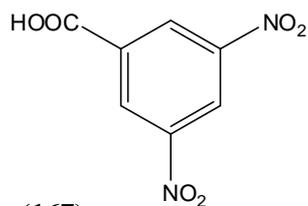


164  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = COOH$

165  $R_1 = MeO$ ,  $R_2 = MeO$ ,  $R_3 = CHO$



(166)



(167)

**Tableau 6.** Les phénols isolés du genre *Abies*

N°	Nom	Source	Références
164	Acide coumarique	<i>A. nephrolepis</i> <i>A. sachalinensis</i>	(Gromova et al., 1977) (Numata et al., 1983)
165	3,4-diméthoxycinamaldehyde	<i>A. marocana</i>	(Barrero et al., 1996)
166	Hexacosylferulate	<i>A. koreana</i>	(Kim et al., 2001)
167	Acide 3,5-dinitrobenzoïque	<i>A. alba</i>	(Kaneko et al., 1985)

## **Chapitre 2**

### **Aperçu bibliographique sur le genre *Cedrus***

## 2.1. Présentation du genre *Cedrus* et l'espèce *C.atlantica*(Endl) Manetti

Le genre *Cedrus* est un genre ancien connu depuis le tertiaire avec une large répartition mais qui est plus au moins concentrée en trois grandes zones, au Liban (160 000 ha), en Himalaya (500 000 ha), au Maroc et en Algérie.

Le nom *Cedrus* est un nom d'origine grec « kedros », il est classé parmi les spermatophytes (plantes à graines) et plus précisément les gymnospermes (plantes à ovules nus). Il porte des cônes (*Coniferophyta*) constitués d'écaillés disposées en spirale. Une partie de ces feuilles souvent un peu incurvées est isolée sur les jeunes rameaux longs et les autres fasciculées en rosette sur les rameaux courts latéraux. Ses cônes sont caractérisés par des écaillés minces qui finissent souvent par se désarticuler et tomber (Quezel et Santa., 1962).

La classification actuelle du genre *Cedrus* est basée sur la répartition géographique avec quatre espèces : (Emberger et al., 1998)

- le cèdre de l'Atlas ou *Cedrus atlantica* Manetti, endémique des montagnes nord africaines
- le cèdre du Liban ou *Cedrus libani* A. Rich, présent en Asie mineure, au Liban et en Turquie
- le cèdre de Chypre ou *Cedrus brevifolia* Henry, ne couvre que quelques dizaines d'hectares dans l'île de Chypre
- le cèdre de l'Himalaya ou *Cedrus deodara* G. Don est la plus répandue des espèces, elle peuple une partie de l'Inde, de l'Afghanistan et du Népal (Toth., 2005)

Une partie de notre étude est basée sur l'investigation phytochimique des cônes de *Cedrus atlantica* (Endl) Manetti synonyme de *Cedrus libanotica* ssp *atlantica* nommé également « *arz el Atlas* » en Arabe ou « *Idil* » en berbère.

C'est l'une des espèces les plus importantes du point de vue économique et écologique de la montagne méditerranéenne. Le cèdre de l'Atlas est un arbre de grande taille pouvant dépasser les 40 mètres de hauteur, avec des aiguilles de 1 à 2.5cm de taille, des cônes dont la longueur est de 5 à 8cm et de 3 à 5cm de diamètre. Ces graines sont de 0.8 à 1.3cm de longueur. Dans de bonnes conditions, le Cèdre de l'Atlas est capable de vivre plusieurs siècles. Des spécimens presque millénaires sont recensés au Maroc.



**Figure2.** *Cedrus atlantica*(Endl) Manetti[2]

## 2.2. Utilisation du genre *Cedrus* en médecine traditionnelle

Les espèces du genre *Cedrus* sont souvent utilisées dans la médecine traditionnelle et cela pour différents usages, à titre d'exemple :

- *C. deodara* est recommandée dans le traitement de diverses affections comme les rhumatismes, le diabète, l'obésité, la gonorrhée, la bronchite chronique, les maux d'estomac et les maladies cardiovasculaires. Egalement, L'huile et la gomme de *Cedrus deodara* ont une valeur médicinale et sont utilisées dans le traitement de la dyspepsie, de l'insomnie, hoquet, fièvre, écoulement urinaire, ozoéna, bronchite, démangeaisons, glandes tuberculeuses, leucoderma, troubles de l'esprit, maladies de la peau et du sang. Les feuilles sont utilisées dans le traitement de l'inflammation et sont appliquées contre les glandes tuberculeuses. Le bois est amer et est utilisé comme diurétique, diaphorétique, carminatif. L'huile extraite du bois est utilisée comme analgésique, alexipharmique, diaphorétique et est utilisée dans le traitement des bleus, lésions des articulations, des furoncles, des glandes tuberculeuses, et contre les ulcères. Les écorces sont utilisées pour soulager la fièvre, la diarrhée et la dysenterie (Shah., 2006). *Cedrus deodara* est utilisée en préparation De V-gel, couramment utilisée comme antiseptique (Pandey., 2000)
- *C. libani* est également utilisée en médecine traditionnelle contre les ulcères (Sezik et al., 2001).

## 2.3. Quelques activités biologiques reconnues du genre *Cedrus*

Les espèces du genre *Cedrus* ont été testées pour différentes activités biologiques, on citera quelques activités:

- **Activité antibactérienne :** L'activité antibactérienne de l'extrait hydroalcoolique d'aiguilles de *Cedrus deodara* a été évaluée sur cinq bactéries d'origine alimentaire. L'analyse *in vitro* a montré que l'extrait possède une activité antibactérienne remarquable contre *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*, avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (MBC) de 0,78-12,5 mg / mL et 1,56-25 mg / mL, respectivement. D'autre part, et dans un jus de tomate fraîchement pressée, il a été observé que l'extrait possédait une capacité efficace pour contrôler le total des comptes de bactéries viables. L'acide shikimique a été isolé de l'extrait et identifié comme le composé antibactérien principal (Zeng et al., 2012).

- **Activité antifongique :** Les résultats obtenus de l'activité antifongique des extraits *n*-hexane et chloroformique de *C. deodara* contre *Candida albicans*, *Issatchenkia orientalis*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. sydowii* et *Trichophyton rubrum* ont présenté une concentration inhibitrice minimale (CMI) et une concentration minimale microcicide (MMC) dans la gamme de 200-6400 µg / mL et 400-6400 µg / mL. Les deux extraits ont présenté une activité contre tous les champignons sauf *C. albicans* et *I. orientalis*. Cependant, l'extrait *n*-hexane a montré une meilleure inhibition d'*A. ochraceus*, *A. parasiticus* et *A. sydowii* avec une CMI et MMC de 400 µg / mL et 800 µg / mL, respectivement (Chaudhary et al., 2012).

- **Activité hyperglycémiant :** L'extrait éthanolique du bois de *Cedrus deodara* a présenté une activité antihyperglycémiant sur des rats diabétiques induits par la streptozotocine de 1 à 7 h. L'abaissement maximal de la tension artérielle s'est avéré être de 7 h. Post-traitement (Ahmed et al., 2008), dans une expérience à dose unique sur des rats diabétiques induits par la streptozotocine (Gupta et al., 2005 ; Upadhyay et al., 2004), *Cedrus deodara* a présentée une baisse significative de 6% du taux de glucose sanguin. En 2009, Shivanand et al ont formulé et évalué une préparation antihyperglycémiant obtenue à partir de l'extrait éthanolique de *Cedrus deodara* (Shivanand et al., 2009).

- **Activité anxiolytique :** L'extrait alcoolique de bois de cœur (50, 100 et 200 mg / kg Poids corporel) de *Cedrus deodara* a été évalué pour son activité anxiolytique par le modèle de labyrinthe plus élevé, le modèle clair-sombre et l'actéphotomètre. Les résultats suggèrent que l'extrait alcoolique réduit la crainte de l'aversion et produit une activité anxiolytique de manière dose-dépendante. L'estimation du GABA dans le cerveau de rat après administration

d'extrait a montré une modulation significative des taux de GABA. Ces résultats suggèrent que l'extrait alcoolique de bois de cœur de *Cedrus deodara* possède un effet anxiolytique significatif par modulation des taux de GABA dans le cerveau (Dhayabaran et al., 2010 ; Viswanatha et al., 2009).

- **Activité anticholinestérase :** Les extraits acétate d'éthyle, éthanol et cétone des racines et des tiges de *Cedrus Libani* ont été testés pour l'activité inhibitrice des enzymes acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase. Les résultats ont montré une meilleure activité contre l'acétylcholinestérase pour l'extrait éthanolique des tiges [(44.07±0.2)%] à 100µg/ml comparé aux autres extraits alors que pour la butyrylcholinestérase, l'extrait acétone des tiges a montré la plus forte inhibition [(67.54±0.3)%] (Senol et al., 2015).

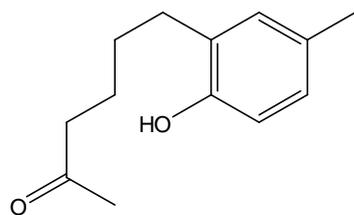
## 2.4. Métabolites isolés du genre *Cedrus*

Les espèces du genre *Cedrus* ont fait l'objet de peu de recherches phytochimiques, ainsi les principaux constituants en terme de métabolites secondaires du genre *Cedrus* sont essentiellement des terpènes, des flavonoïdes et des lignanes outre les travaux réalisés sur les huiles essentielles (Bouarene et al., 2004 ; Loizzo et al., 2007 ; Rhafouri et al., 2015).

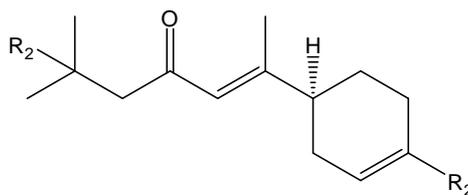
### 2.4.1. Terpènes :

#### 2.4.1.1. Sesquiterpènes

Les composés sesquiterpéniques sont majoritairement des bisabolènes isolés principalement des extraits apolaires du bois de *C. deodara* : Himasecolone (**168**) (Agrawal et al., 1981), atlantolone (**169**), (*E*)- $\alpha$ -atlantone (**124**), (*E*)-(2*S*, 3*S*, 6*R*)-atlantone-2,3-diol (**172**), (*E*)-(2*S*, 3*S*, 6*S*)-atlantone-2,3,6-trio (**173**) (Chaudhary et al., 2012) et de *C. libani*:  $\alpha$ -torosol (**177**),  $\beta$ -torosol (**178**), andirolactone (**176**) et *trans*- atlantone-6-ol (**171**) (Avcibash et al., 1987), acide atlantonique (**170**), acide dihydroatlantonique (**174**) et acide libanotique (**175**) (Avcibash et al., 1988).

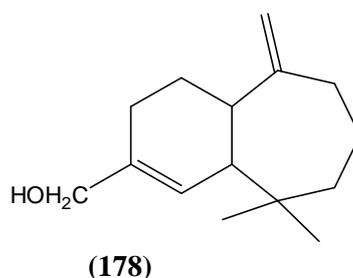
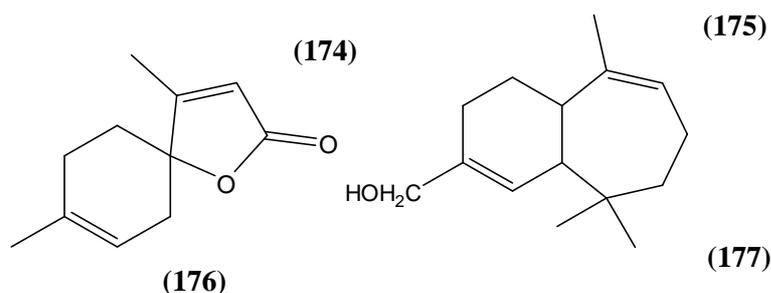
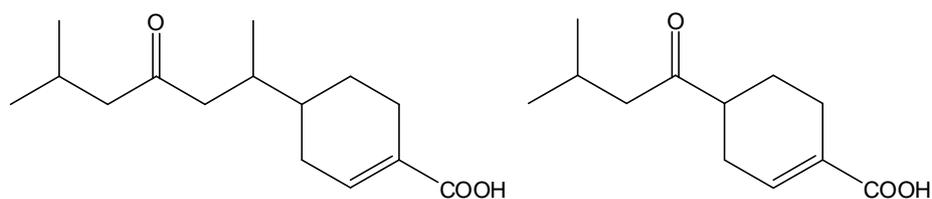
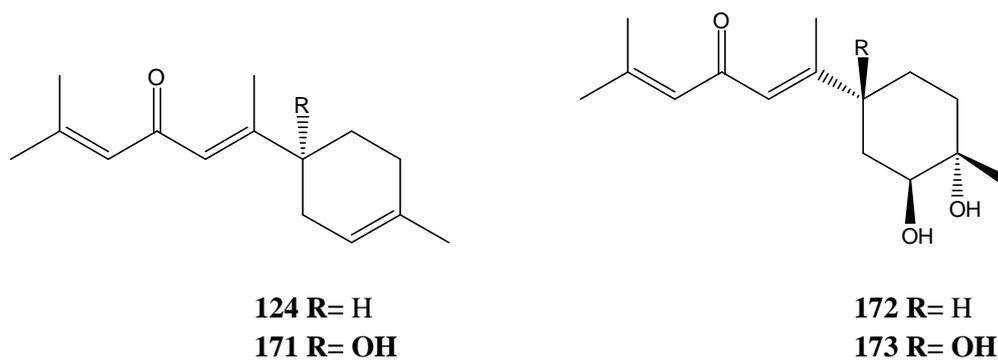


(168)



**169** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub>

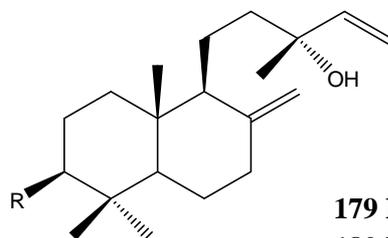
**170** R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= COOH



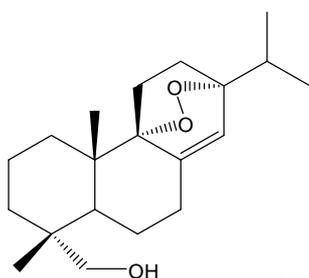
#### 2.4.1.2. Diterpènes

Des composés diterpénique de squelette labdane : 13-epi-manool (**179**) et 3 $\beta$ -hydroxy-13-epi-manool (**180**), de squelette abietane non aromatique : 9 $\alpha$ ,13 $\alpha$ -epidioxiabiet-8(14)-en-18-ol (**181**), 7 $\alpha$ ,18- diacetoxy, 9 $\beta$ ,13 $\beta$ -epidioxiabiet-8(14)-ene (**182**), 7 $\alpha$ ,18-diacetoxyabiet-8(14)-en-13 $\beta$ -ol (**183**), 7 $\alpha$ ,18-diacetoxy-13 $\beta$ -methoxyabiet-8(14)-ene (**184**), 13 $\beta$ -hydroxyabiet-8(14)-en-7-one (**185**), 13 $\beta$ ,18-diacetoxyabiet-8(14)-en-7-one (**186**), acide néoabietique (**187**), abietinal (**98**), abietinol (**99**), acide abiétique (**188**) et palustradien-18-ol (**189**) ainsi que des abietanes à cycle aromatique : dehydroabietinal (**190**), dehydroabietinol (**191**), 7-oxo-dehydroabietinol (**192**), 15-hydroxydehydroabietinol (**193**), 7 $\alpha$ -

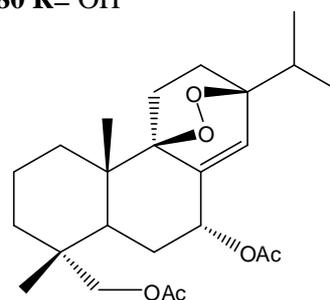
hydroxydehydroabietinol (**194**) et acide déhydroabiétique (**195**) ont été isolés des cônes de *Cedrus atlantica* et *C. libani* (Barrero et al., 2005 ; Crowden et al., 1971).



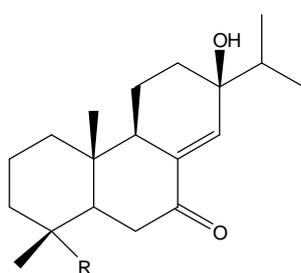
**179** R= H  
**180** R= OH



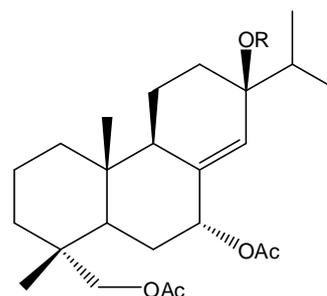
(181)



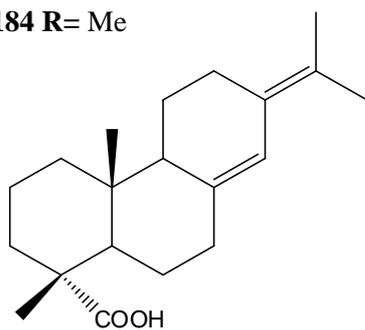
(182)



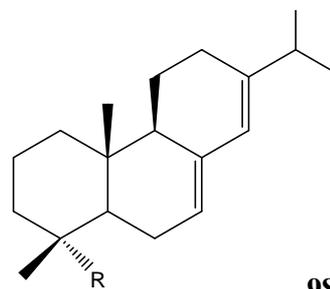
**183** R= H  
**184** R= Me



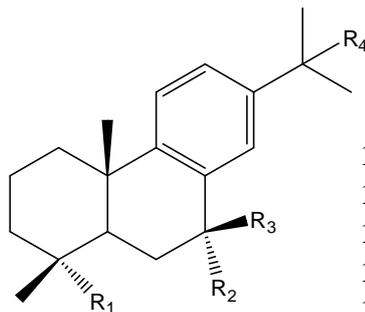
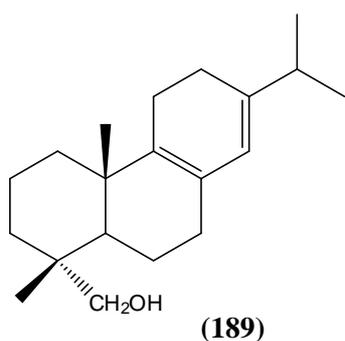
**185** R= Me  
**186** R= CH<sub>2</sub>OAc



(187)



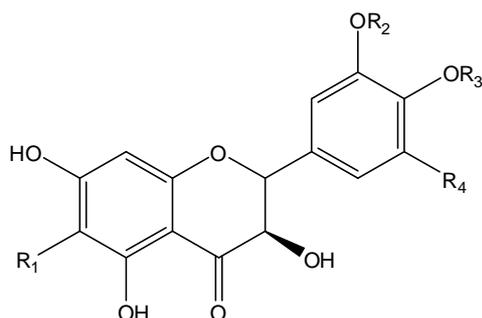
**98** R= CHO  
**99** R= CH<sub>2</sub>OH  
**188** R= COOH



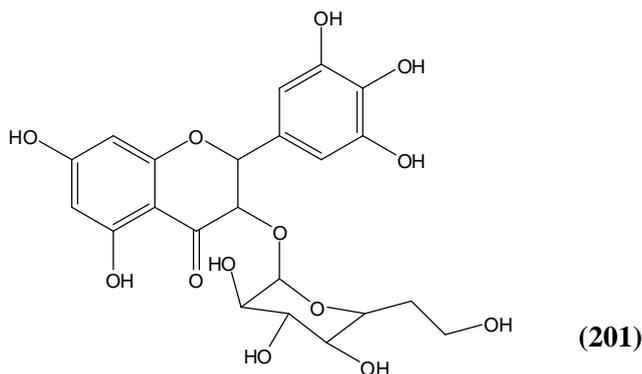
- 190**  $R_1 = \text{CHO}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
**191**  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
**192**  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 + R_3 = =\text{O}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
**193**  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{OH}$   
**194**  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{H}$   
**195**  $R_1 = \text{COOH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{H}$

### 2.4.2. Flavonoïdes

Principalement des dihydroflavonols isolés de l'extrait de bois de *C. deodara* : taxifoline (**196**), cedeodarine (**197**), dihydromyricetine (**198**), cedrine (**199**) et cedrinoside (**200**) (Agrawal et al., 1980b) et des aiguilles de cette espèce : myricetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**201**) (Wu et al., 2015).



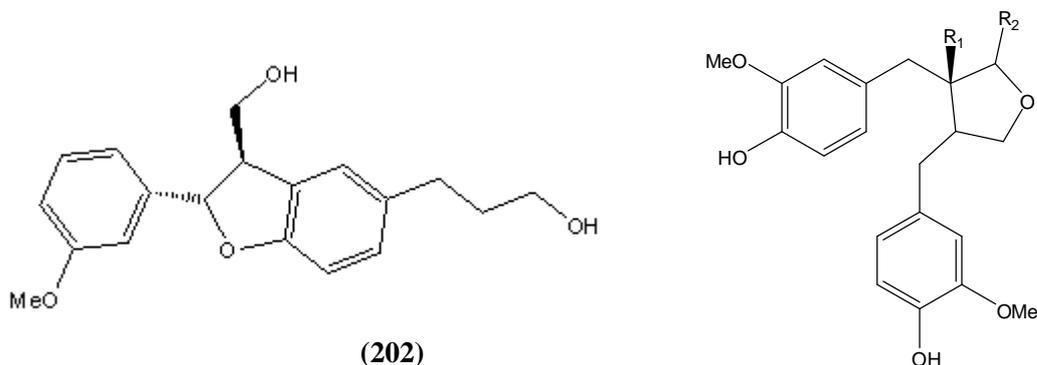
- 196**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$   
**197**  $R_1 = \text{Me}$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$   
**198**  $R_1 = \text{Me}$ ,  $R_2 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{OH}$   
**199**  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{OH}$   
**200**  $R_1 = \text{Me}$ ,  $R_2 = \text{Glc}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 = \text{OH}$



### 2.4.3. Lignanes

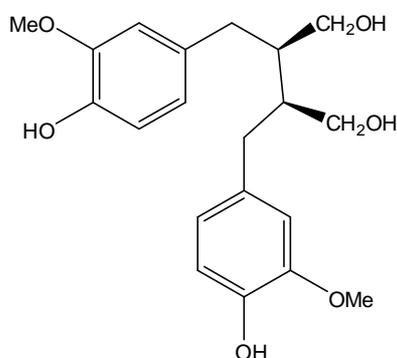
Les lignans sont des molécules présentes chez la pluparts des Pinaceae. Celles isolées du genre *Cedrus*, et plus précisément des extraits de bois de *C. deodara*, sont des benzofuranes : Cedrusinine (**202**) (Agrawal et al., 1980a) et des dibenzylbutanes : Matairesinol

(203), Nortracheogenin (204), Dibenzylbutyrolactollignane (205) (Tiwari et al., 2001) et secoisolariciresinole (206) (Agrawal et al., 1982).



(202)

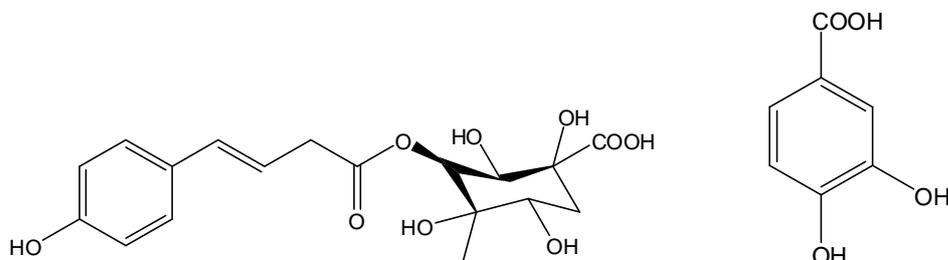
203  $R_1 = H$ ,  $R_2 = =O$   
 204  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = =O$   
 205  $R_1 = H$ ,  $R_2 = OH$



(206)

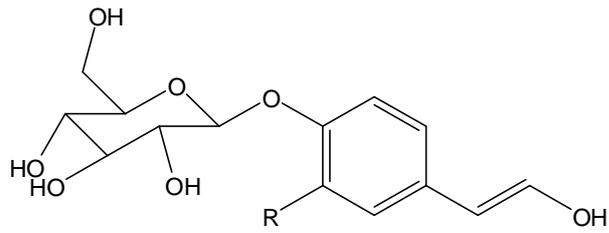
#### 2.4.4. Les phénols :

Une étude phytochimique réalisée par Wu et al. en 2015 a révélé la richesse des aiguilles de *C. deodara* en composés phénoliques et qui a abouti à l'extraction d'un nouveau composé : Acide 3-*p-trans*-coumaroyl-2-hydroxyquinique (207) en plus de l'acideprotocatechuique(208), acidetrans-*p*-coumaric-*O*-β-D-glucopyranoside(209) et l'acide *trans*-ferulic-*O*-β-D-glucopyranoside (210).



(207)

(208)

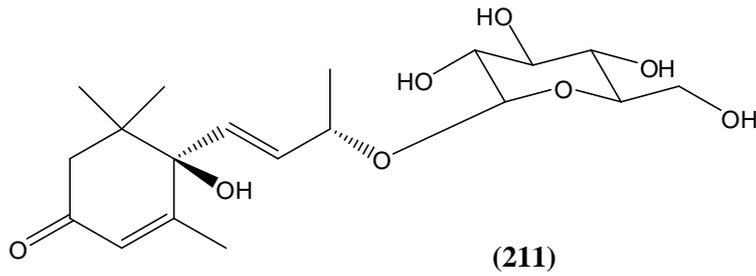


**209** R= H

**210** R= OMe

#### 2.4.5. Autre composé :

Le composé (6*S*,9*R*)-roseoside (**211**) a été isolé de *Cedrus deodara* (Wu et al., 2015).



**(211)**

## **Chapitre 3**

# **Généralités sur les activités antioxydante, anticholinestérase et antimicrobienne**

### 3.1. Introduction

Les plantes médicinales sont les sujets les plus importants en matière d'activités biologiques. En effet, une plante est souvent soumise à plusieurs tests afin de déterminer son rôle ainsi que celui de ces composants dans la prévention ou l'inhibition des différentes pathologies. Parmi ces activités, on citera les activités antioxydante, anticholinestérase ou encore antimicrobiennes qui ont été étudiées dans nos travaux de recherche.

### 3.2. Activité antioxydante

Le stress oxydant, les radicaux libres et les anti-oxydants sont des termes de plus en plus utilisés dans le domaine de la recherche scientifique ou dans le domaine de la santé. En effet, plusieurs maladies apparaissant avec l'âge résultant du stress oxydant, car c'est en vieillissant que nos défenses antioxydantes diminuent et que la production des radicaux libres augmente tel que le cancer, l'œdème pulmonaire, le diabète, les maladies cardiovasculaires ou encore la maladie d'Alzheimer où le rôle des antioxydants a été observé dans le retardement de cette dernière (Favier., 2003).

#### 3.2.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce indépendante contenant un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés) (Halliwell et Gutteridge., 1995). Les radicaux libres se forment généralement par division hémolytique de liaison covalente ou par transfert mono-électroniques.

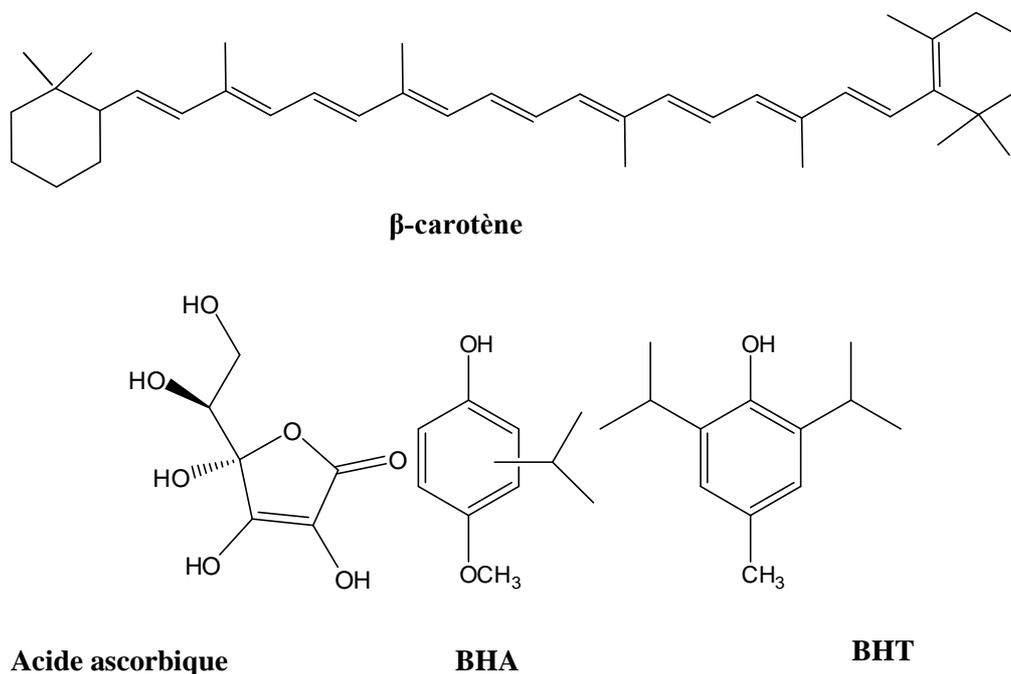
La réactivité des radicaux libres demeure dans le fait qu'ils réapparaissent leur électron célibataire par la recherche d'un électron, ce qui entraîne la création d'un nouveau radical libre et donc l'extension et la prolifération du phénomène, ce qui va engendrer des réactions en chaînes entraînant la destruction ou la mutation cellulaire (Gardès-Albert, 2003).

#### 3.2.2. Les antioxydants

Un antioxydant est un composé chimique dont le rôle est la prévention ou le ralentissement de l'oxydation d'un substrat tendant à être oxydé et cela même en faible concentration par rapport à ce dernier (Halliwell., 1995; Halliwell et Gutteridge., 1989 ;Sies., 1993).

Les antioxydants peuvent être naturels tels que l'acide ascorbique (vitamine C), les tocophérols (vitamine E), le  $\beta$ -carotène (provitamine A) ainsi que les composés

phénoliques représentés par les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les coumarines et les lignanes ou encore synthétiques tels que le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA) ou encore la tétrabutylhydroquinone (TBHQ) qui sont largement utilisés (Figure 3). En effet, la plupart des antioxydants synthétiques ou d'origine naturelle sont caractérisés par la présence de groupements hydroxyphénoliques dans leurs structures et qui sont responsables des propriétés antioxydantes qui leur sont attribuées ainsi qu'à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^\bullet$ ) (Antolovich et al., 2002 ; Bartosz., 2003 ; Burda et Oleszek., 2001 ; Rice-Evans et al., 1995).



**Figure 3.** Structures d'antioxydants

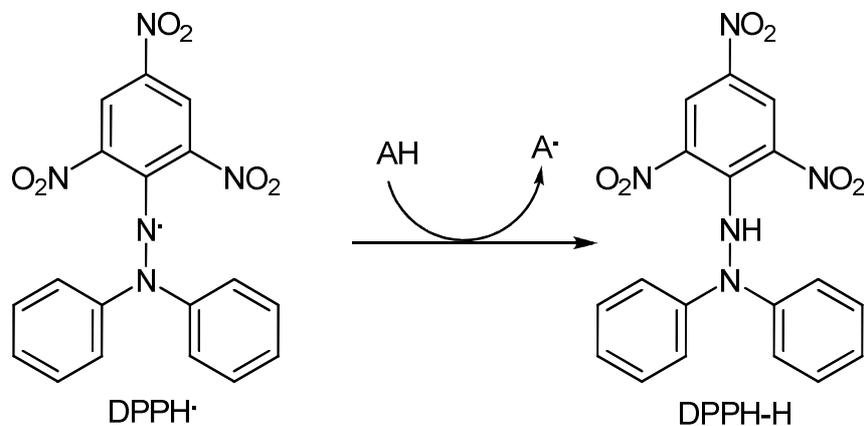
### 3.2.3. Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes qui ont été mises au point pour l'estimation *in vitro* du pouvoir antioxydant d'un échantillon, on citera les méthodes les plus utilisées :

#### 3.2.3.1. Méthode du DPPH $^\bullet$

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH $^\bullet$ ) est un radical stable et de couleur violette en solution, il fut l'un des premiers radicaux libres utilisés dans l'étude visant à déterminer la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois., 1958 ; Brand-Williams et al., 1995). Le DPPH est réduit en présence d'une substance réductrice

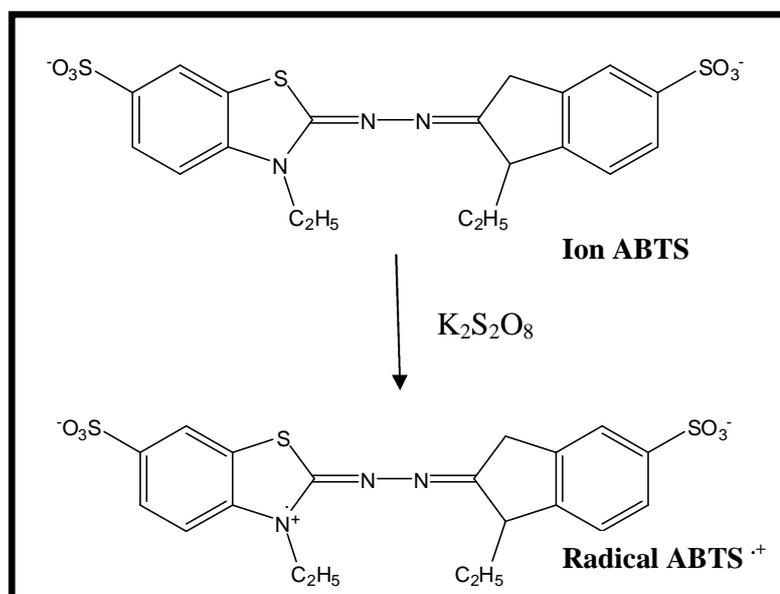
(antioxydante) pour donner la couleur jaune du diphenylpicrylhydrazine (Blois., 1958). Cette réduction est suivie par spectrophotométrie UV, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm ; ce qui nous permet de mesurer le pouvoir antiradicalaires de l'échantillon testé (Figure 4).



**Figure 4.** Piégeage du radical DPPH• avec l'antioxydant (AH)

### 3.2.3.2. Piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup>

La méthode ABTS est basée sur la capacité d'un antioxydant à inhiber le radical libre ABTS<sup>•+</sup> obtenu à partir de l'ABTS [sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] et cela en le comparant à un antioxydant de référence (Re et al., 1999). La génération du cation radical ABTS<sup>•+</sup> est la base de l'une des méthodes spectrophotométriques qui ont été appliquées pour déterminer l'activité antioxydante des composés hydrophiles ou lipophiles (Sánchez-Moreno, 2002) (Figure 5).

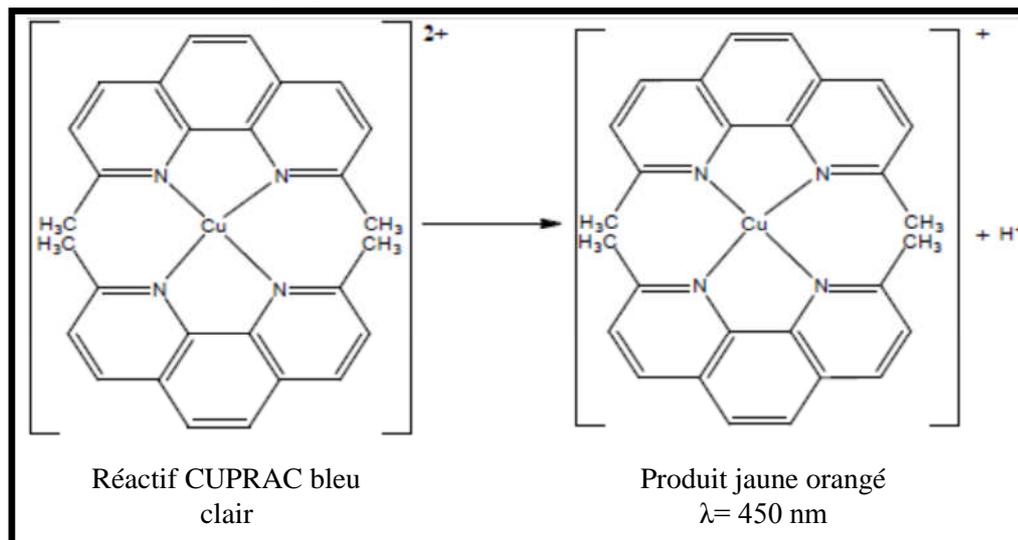


**Figure 5.** Oxydation de l'ABTS avec K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> et génération du radical ABTS<sup>•+</sup>

### 3.2.3.3. Méthode du CUPRAC

La méthode CUPRAC (cupric ion ReducingAntioxidantCapacity) (Apaket al., 2004) est utilisée pour la réduction du Cu(II) et 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 par la réduction du complexe  $\text{Cu}^{2+}$ -Nc, produisant un complexe chromogène de  $\text{Cu}^{+}$ -Nc qui absorbe à 450 nm (Figure 6).

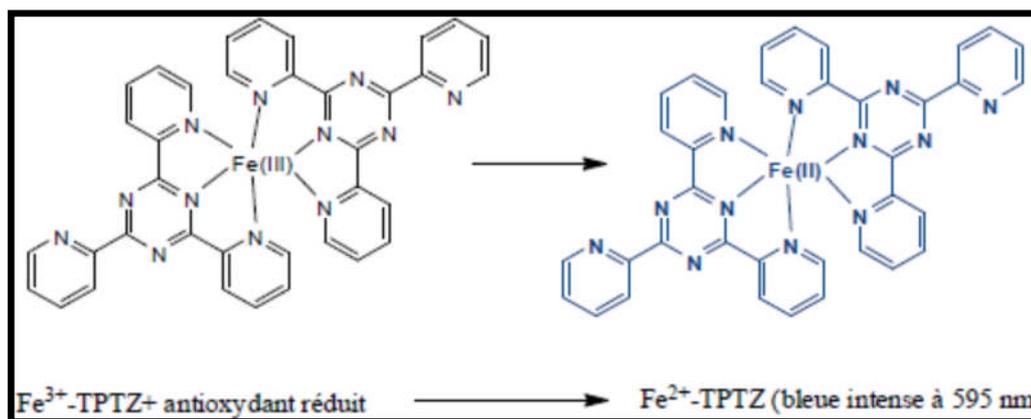


**Figure 6.** Réduction du complexe chromogène de  $\text{Cu}^{2+}$ -Nc

### 3.2.3.4. Chélation des ions métalliques

Cette méthode a été développée pour l'évaluation de la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en présence d'un antioxydant.

Selon la méthode de Decker et Welch, la mesure d'absorbance de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine est déterminée après le traitement des échantillons avec les ions  $\text{Fe}^{2+}$ . Ces derniers forment un complexe [Ferrozine -  $\text{Fe}^{2+}$ ] qui absorbe à  $\lambda$  595 nm (Decker et Welch., 1990) (Figure 7).



**Figure 7.** Réaction de test FRAP (Ferric reducing Antioxydant power) (Prior et al., 2005).

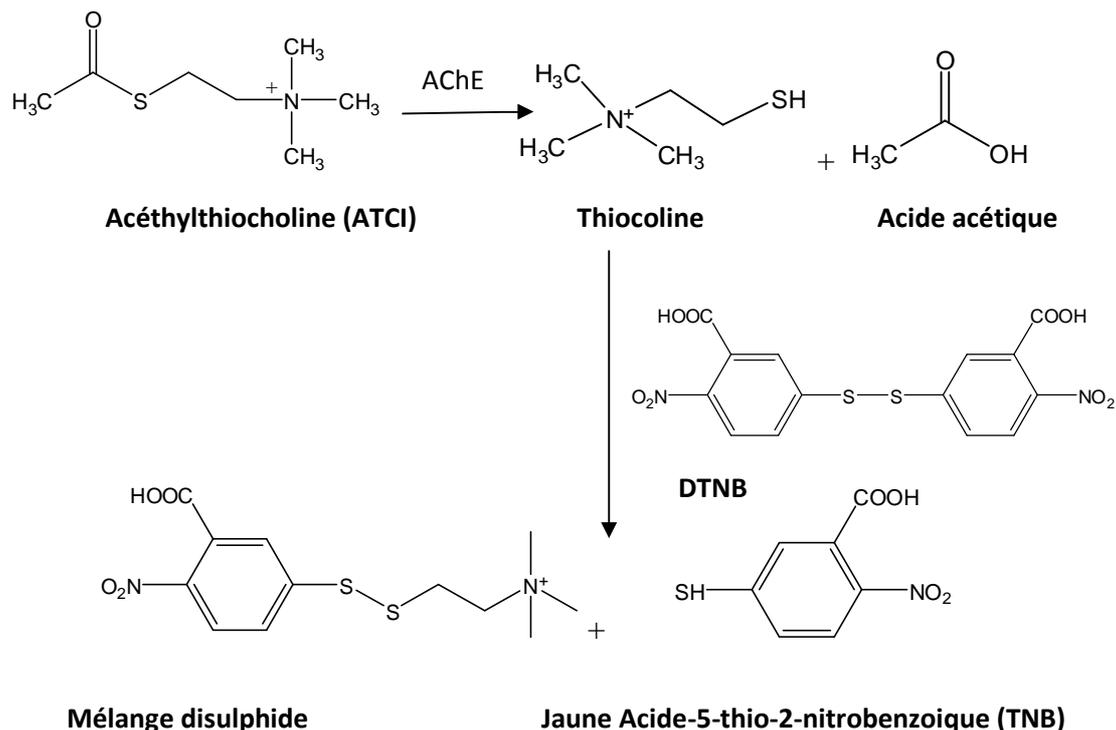
### 3.2.3.5. Blanchissement du $\beta$ -carotène

Cette méthode spectrophotométrique développée par Miller (Miller., 1971), consiste à mesurer la décoloration du  $\beta$ -carotène issu de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique à 470nm. Cette méthode est simple et rapide.

## 3.3. Activité Anticholinestérase

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative évolutive qui se caractérise par une dégénérescence cognitive et fonctionnelle (Amieva et al., 2007). Lors de l'évolution de cette maladie, la concentration d'acétylcholine diminue (Gonzalez-Gross et al., 2001 ; Venters Jr. et al., 1997). Une cholinestérase est une enzyme qui joue le rôle de catalyseur dans la réaction d'hydrolyse d'un ester de la choline (acétylcholine, butyrylcholine) en choline et en acide acétique (Figure 8). L'inhibition de cette enzyme va provoquer une diminution du turnover de l'acétylcholine et donc diminution des symptômes de la maladie d'Alzheimer ; car il a été démontré qu'il existe une baisse de la concentration d'acétylcholine, substance importante pour la mémoire, chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer.

L'activité anticholinestérase d'une substance ou d'un extrait est déterminée par la méthode Ellman (Ellman et al., 1961).



**Figure 8.** Mécanisme chimiques de la méthode d'Ellman

### 3.4. Activité antimicrobienne

L'évolution de la multi-résistance des bactéries pathogènes aux antibiotiques due à une utilisation de ces derniers d'une manière abusive et anarchique, incite les chercheurs à étudier les plantes à vertus thérapeutiques y compris leurs huiles essentielles visant la recherche de nouvelles molécules possédant un pouvoir antibactérien élevé.

Pour cela plusieurs méthodes sont utilisées pour l'évaluation du pouvoir antibactérien d'extraits de plantes, d'huiles essentielles ou de produits purs, on citera :

#### 3.4.1. La méthode par diffusion :

##### 3.4.1.1. La méthode de diffusion à partir de disques imprégnés (Méthode de Kirby – Baner) (Bauer et al., 1966 ; Ericsson et Sherris., 1971)

Le principe de cette méthode se résume en disque de papier imprégné de l'extrait ou de l'antibiotique à différentes concentrations déposé directement sur la gélose, uniformémentensemencée avec le germe à tester. La croissance du germe est inhibée à une distance du disque par rapport à sa sensibilité à l'extrait ou à l'antibiotique diffusé. La limite de la zone d'inhibition est détectée à l'œil nu et s'accorde à l'endroit où la croissance bactérienne commence.

L'interprétation de la zone d'inhibition se fait soit par rapport au diagramme de références superposable aux zones d'inhibition, soit à l'aide d'une règle en fonction des diamètres donnés dans un tableau fournis par structures reconnues par l'Organisation Mondiale de la Santé, ainsi les germes sont classés en « sensibles », « intermédiaires » ou « résistantes ».

#### **3.4.1.2. La méthode de diffusion à partir des puits :**

Le principe de cette méthode est similaire à celui de la méthode des disques, il consiste à réaliser des puits dans la gélose de 2.5mm de profondeur, qui sont par la suite remplis d'extraits ou d'antibiotique à tester (Carbonnelle., 1980 ; Colins et Lync., 1976 ; Vandepitte et al., 1994).

La lecture des zones d'inhibition se fait de la même manière que dans la méthodes des disques.

#### **3.4.2. Méthodes de dilution**

Les techniques de dilution sont utilisées en milieu solide ou liquide. Le principe de ces méthodes consiste à mettre en contact un inoculum bactérien standardisé avec des concentrations croissantes de la substance antimicrobienne testée selon une progression bien définie afin de déterminer la CMI de cette dernière (Burnichon et Texier., 2003).

##### **3.4.2.1. Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide**

Comme il est indiqué, le but de cette méthode est la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de toute croissance visible après 18 à 24h d'incubation en milieu solide à partir de différentes concentrations de la substance antimicrobienne testée (Collins et Lync., 1976). Les essais sont effectués selon le protocole standard de dilution sur Muller Hinton agar pour les bactéries et sur la gélose Sabouraud supplémentée de glucose (2%) lorsqu'il s'agit de levure (Burnichon et Texier., 2003).

##### **3.4.2.2. Méthode de contact direct sur milieu liquide**

La technique en milieu liquide est utilisée dans le but de déterminer et de tester la sensibilité de la souche bactérienne par rapport à des concentrations critiques supérieures ou inférieures des substances antimicrobiennes ou uniquement par rapport à des concentrations

critiques inférieures. L'inoculation des galeries et la lecture des résultats peuvent être réalisées manuellement ou par l'utilisation d'automates : technique en 4h (1 à 2 dilutions) ou en 24h (à 2 dilutions) (Burnichon et Texier., 2003).

### 3.4.3. Bioautographie

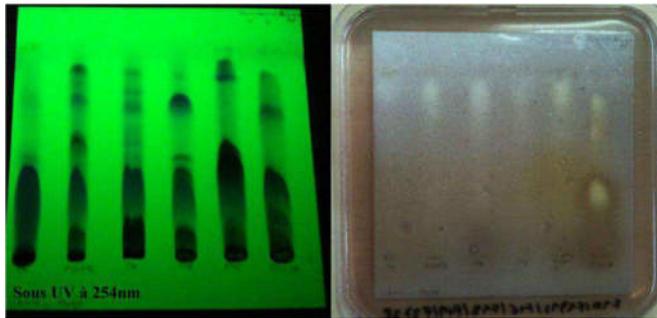
La méthode de bioautographie est utilisée afin de détecter les composés antimicrobiens au sein d'un extrait de plante (Rahalison et al., 1991). C'est une technique qui vise à identifier les substances responsables de l'inhibition de la croissance des organismes d'essai dans des mélanges complexes. La bioautographie est basée sur la détermination de l'activité biologique de l'analyte (antibactérienne, antifongique, antiprotozoaire, anti-tumorale ou autres).

Les principaux domaines d'application de la bioautographie sont:

- La recherche de nouveaux composés actifs et de nouvelles substances antibiotiques par l'étude des activités biologiques des substances issues de plantes, de micro-organismes ou de la chimie combinatoire. L'étude des antibiotiques et d'autres composés biologiquement actifs dans l'eau potable, les eaux usées, également des liquides organiques et des aliments. Le contrôle de qualité des médicaments antibiotiques.
- La détermination ou la détection de la toxicité (par exemple, les aflatoxines) ou de la phototoxicité (par exemple des furocoumarines) des composés.

La bioautographie fait partie des méthodes de dépistage pour la détection de l'activité biologique. Il existe trois grandes techniques de bioautographie :

- **La bioautographie directe** : dans ce cas, la poussée des micro-organismes se fait directement sur les plaques de chromatographie sur couche mince.
- **La bioautographie de contact** : où les plaques de chromatographie (CCM) sont mises en contact, pendant un certain temps, avec le milieu de culture. Les composés antimicrobiens sont transférés de la plaque CCM au milieu de culture. Les zones d'inhibition sont observées à ces endroits de transfert.
- **La bioautographie d'immersion** : Dans cette méthode, une géloseensemencée est appliquée sur la plaque CCM (Rahalison et al., 1991). Cette technique peut être considérée comme un hybride de bioautographie directe et de contact



A- Résultat de bioautographie pour des fractions déposées sur la plaque CCM après migration.



B- Résultat de bioautographie pour des composés purs déposés sur la plaque CCM sans migration.

**Figure 9.**Inhibition de la croissance bactérienne dans la bioautographie.

# **PARTIE 2**

## **Matériel et méthodes**

# **Chapitre 1**

## **Matériel utilisé**

## 1.1. Matériel végétal

### 1.1.1. Récolte de la plante *Abies numidica* de Lannoy

Les cônes d'*Abies numidica* ont été récoltés en Novembre 2013 dans la région de Djebel El Ouehch Constantine (Est Algérien), la plante a été récoltée et identifiée par Mr Kamel Kabouche.



**Figure 10.** Cônes d'*Abies numidica* de Lannoy ex carrière [3]

### 1.1.2. Récolte de la plante *Cedrus atlantica*(Endl) Manetti ex carrière

Les cônes de *Cedrus atlantica* ont été récoltés en Avril 2013 dans la région de Khenchla (Est Algérien). La plante a été identifiée par Mr Kamel Kabouche.



**Figure 11.** Cônes de *Cedrus atlantica*(Endl) Manetti ex carrière [4]

## 1.2. Matériel chromatographique

### 1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique utilisée dans toutes les étapes de l'étude phytochimique afin de vérifier l'état de pureté des produits isolés.

Dans notre partie expérimentale, nous avons utilisé pour l'analyse qualitative des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium ou en verre (Merck) : en phase normale, Kieselgel 60 F254 Merck, 250  $\mu\text{m}$  et en phase inverse, RP 18 F254S, 200  $\mu\text{m}$ Merck.

Pour la chromatographie préparative, nous avons travaillé avec des plaques en verre (20 x 20cm) recouvertes de gel de siliceRp 18 F254S, 200  $\mu\text{m}$ Merck.

Les plaques sont visualisées après élution sous UV (254 et 365 nm) puis révélées par l'acide sulfurique dilué à 50% dans l'eau.

### 1.2.2. Chromatographie liquide haute performance (CLPH)

Les analyses CLPH ont été effectuées sur un appareil Dionex munie d'un échantillonneur automatique ASI-100, d'une pompe Ultimate 3000 avec dégazeur intégré, d'un détecteur à barrettes de diodes UVD 240S. L'appareil est piloté par un logiciel Chromeleon® version 1 et 2. Nous avons utilisé une colonne de phase inverse

(SolanuminterchromUptishere, C18-5 $\mu\text{m}$ , prép-colonne 0,0 $\mu\text{m}$ ) pour une CLPH semi-préparative avec un éluant à gradient binaire ( $\text{H}_2\text{O}$  (pH 2,4 avec TFA), ACN) et un débit de 4 mL / min; Le chromatogramme a été surveillé à 205, 225, 254 et 350 nm.

### 1.2.3. Flash Chromatographie

La flash chromatographie a été effectuée sur des colonnes C18 (phase inverse) (Reveleris C18 phase inverse 40 g; CV 45 mL/min; 45 mg-1.35g d'extrait) et sur gel de silice normale (Revelerissilica 40  $\mu$ m, 12 g; CV 17-36 mL/min; 45 mg-2.4g d'extrait).



**Figure 12.** Appareil Flash chromatographie Reveleris

## 1.3. Méthodes physico-chimiques

### 1.3.1. Spectrométrie de masse :

Les spectres ESIMS et HRESIMS ont été enregistrés en mode positif et négatif sur un spectromètre Micromass Q-TOF (MANCHESTER, UK).

### 1.3.2. Spectroscopie de RMN :

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ( $^1\text{H}$ ) et du carbone (RMN- $^{13}\text{C}$ ) ont été enregistrés sur un spectromètre RMN BRUKER AVANCE DRX III 500 ( $^1\text{H}$  à 500 MHz et  $^{13}\text{C}$  à 125 MHz) et spectromètre RMN BRUKER AVANCE DRX 600 ( $^1\text{H}$  à 600 MHz et  $^{13}\text{C}$  à 150 MHz). Des expériences de RMN 2D ont été réalisées en utilisant un étalon équipé de microgrammes Bruker.

Les constantes de couplage ont été exprimées en Hz et les déplacements chimiques ( $\delta$ ) en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

### 1.3.3. Pouvoir rotatoire :

Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) dans une cuve de 10 cm à 20°C. Le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D^{20}$  est exprimé en degré, et il est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D^{20} = 100 \cdot \alpha / c$$

$\alpha$ : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre.

l : longueur de la cuve de mesure.

c : concentration de la molécule en solution en g/100 ml.

### 1.4. Analyse statistique

Les résultats des activités antioxydante et anticholinestérases ont été exprimés en moyennes  $\pm$  SD d'analyses en trois essais. Les valeurs de IC<sub>50</sub> (Concentration d'inhibition à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)], les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA univarié et par " student's t-test". Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05

## **Chapitre 2**

# **Extractions et séparations des métabolites secondaires de la plante *Abies numidica* de Lannoy**

## 2.1. Chimie extractive

Les cônes séchés et pulvérisés (1kg) sont mis à macérer à température ambiante dans un mélange hydroéthanolique (EtOH/H<sub>2</sub>O, 80/20, v/v) en répétant l'opération 3fois après chaque 24h (24heure/3fois). Après évaporation et concentration, 20g de l'extrait brut obtenu sont soumis à une VLC sur phase inverse éluée par un gradient de polarité du système MeOH/H<sub>2</sub>O (20 :80-100 :0).

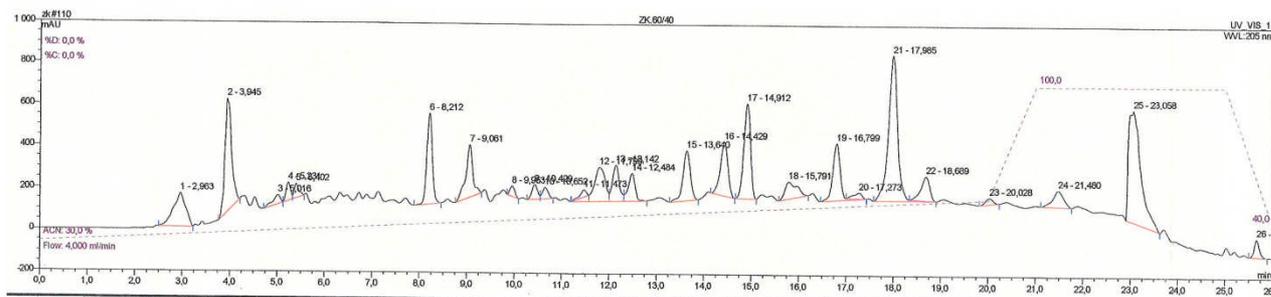
Les fractions résultantes sont concentrées sous pression réduite à sec, passées en CLHP analytique pour déterminer leur richesse.

Après une analyse qualitative, les fractions **F60 :40**(2.47g), **F80 :20**(1.8g) et **F100:0** (13g) (MeOH/H<sub>2</sub>O) ont été sujets de l'étude phytochimique des cônes d'*Abies numidica*.

## 2.2. Séparation et purification des fractions:

### 2.2.1. Etude de la fraction F60 :40

La fraction F60 :40 (1,2g) a été chromatographiée sur une flash colonne de phase inverse (C<sub>18</sub>) avec un gradient de système MeOH/H<sub>2</sub>O (20 :80 à 100). Les fractions obtenues ont été recueillies et regroupées selon leur profil CCM pour donner 6 sous fractions (Figure 13, Tableau7).



**Figure 13.** Chromatogramme CLHP analytique de la fraction **F60 :40**

**Tableau 7.** Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la **F60 :40**

Fraction	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6
Poids (mg)	18	12,2	12	15,6	23,3	25,8

Après un passage en CLPH analytique, les sous fractions 5 et 6 ont été traitées par CLPH semi-préparative en phase inverse par un gradient de système ACN/H<sub>2</sub>O (40 :60 à 100 :0 et 45 :55 à 0 :100 ; 4mL/min, respectivement) pour l'obtention des composés **A1** (1,8 mg), **A2** (1mg) et **A3** (3,5mg).

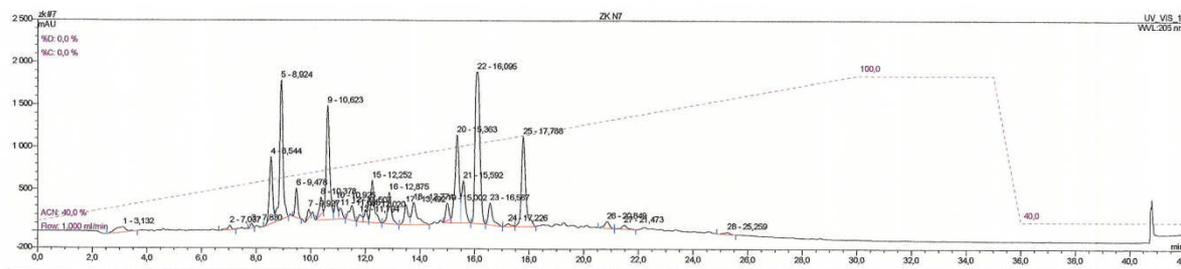
### 2.2.2. Étude de la fraction F80 :20 :

La fraction F80 :20 (1.8g) a été traitée en premier temps par une flash-colonne de gel de silice normale avec un gradient de polarité du système cyclohexane/CHCl<sub>3</sub>/MeOH (60:40:0 à 0:0:100) pour obtenir 12 sous fractions. Après regroupement par profil en CCM (Tableau 2). Seules les sous fractions 7 et 9 ont été étudiées après une analyse qualitative en CLPH analytique.

**Tableau 8.** Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la **F80 :20**

Fractions	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7	SF8	SF9	SF10
Poids(mg)	40,1	22,1	32,3	36,5	40,5	18,6	80,3	21,2	75,6	19,6

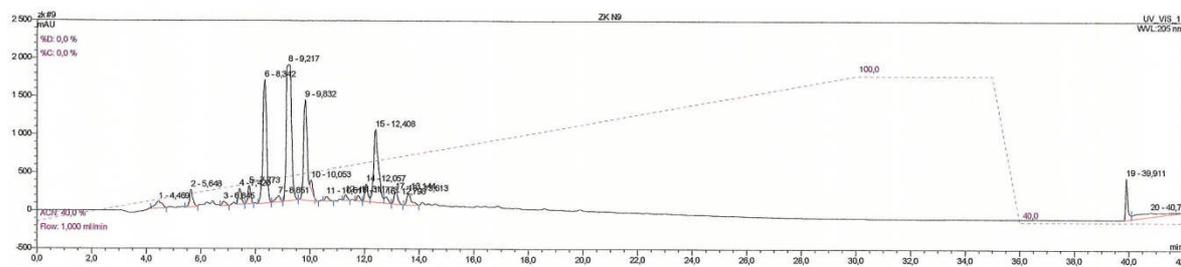
- La sous fraction 7 a été fractionnée par flash-chromatographie sur une colonne de phase inverse éluée par un gradient de système MeOH/H<sub>2</sub>O (50 :50 à 100 :0) (Figure 14), les sous fractions 7-SF1 et 7-SF7 ont été traitées par HPLC semi-préparative sur colonne de gel de silice RP18 avec un système isocratique ACN/H<sub>2</sub>O (57 : 43 ; 4ml/min) et un gradient ACN/H<sub>2</sub>O (71,5 : 28,5 à 80 :20 ; 4ml/min) respectivement ce qui a permis la séparation des produits **A1** (1,8mg), **A4** (3,8mg) et **A5** (1,9mg).



**Figure 14.** Chromatogramme CLPH analytique de la fraction SF7

- La sous fraction 9 a été pré-séparée par une flash-chromatographie sur une colonne de gel de silice phase inverse avec un gradient de système MeOH/H<sub>2</sub>O

(45 :55 à 100 :0) (Figure 15), après regroupement des sous fractions, seule la sous fraction 9-SF3 a été étudiée par passage en CLHP semi-préparative avec un gradient de système ACN/H<sub>2</sub>O (43 :57 à 100; 4ml/min) et une purification sur une plaque préparative de phase inverse pour obtenir les composés **A1**(1,8mg) et **A6** (1,4mg).



**Figure 15.** Chromatogramme CLHP analytique de la fraction SF9

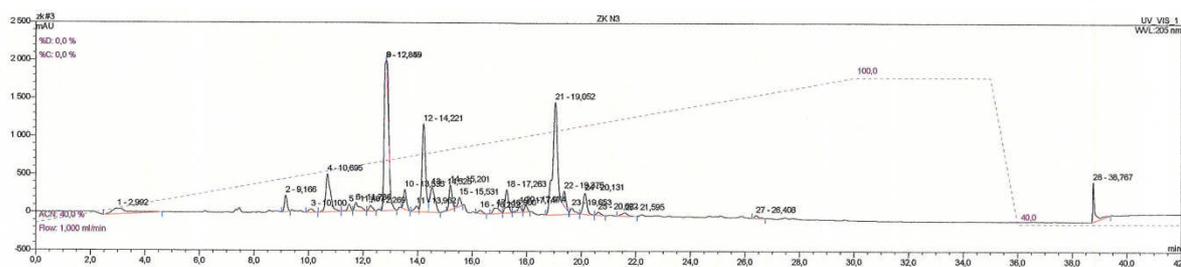
### 2.2.3. Etude de la fraction F100 :0 :

La fraction F100% (2g) a été pré-séparée sur une flash-colonne de gel de silice C<sub>18</sub> avec un gradient de polarité du système MeOH/H<sub>2</sub>O (60 :100) pour obtenir 7 sous fractions. Après regroupement par profil CCM (Tableau 9). Seules les sous fractions 2 et 4 ont été étudiées après une analyse en CLHP analytique révélant leurs richesses.

**Tableau 9.** Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la **F100 :0**

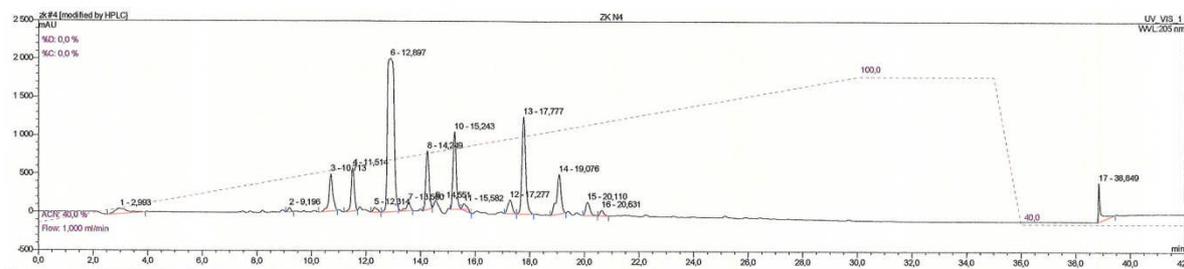
Fractions	SF1	SF2	SF3	SF4	SF5	SF6	SF7
Poids (mg)	22,5	32,2	17,8	38,3	21	19,4	38,7

- La sous fraction 2 a été étudiée par CLHP semi-preparative par colonne de silice C<sub>18</sub> éluée par un gradient de polarité du système ACN /H<sub>2</sub>O(60 :40 à 85 : 15 ; 4ml/min) (Figure 16) pour obtenir le composé **A7** (1,3mg).



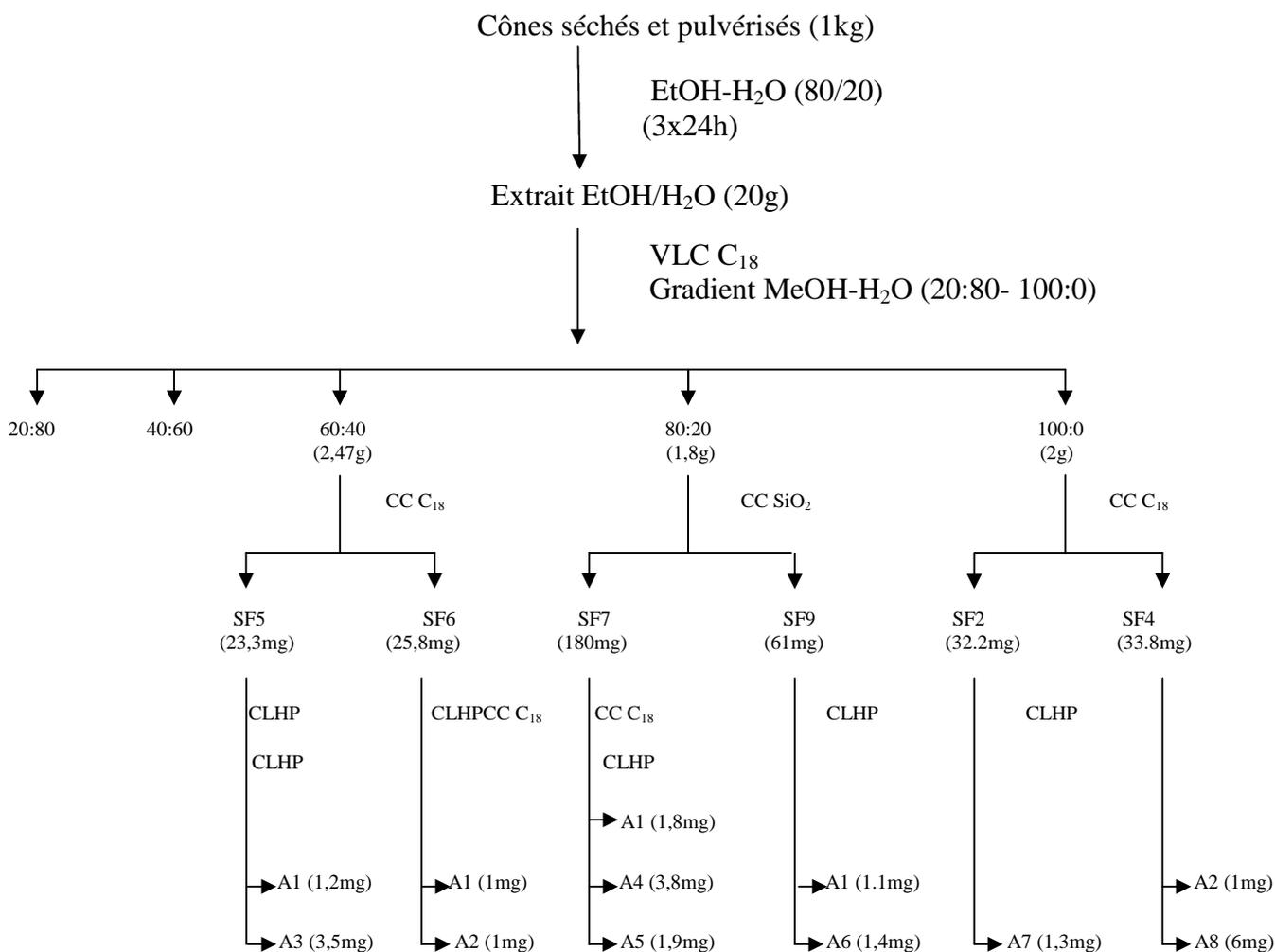
**Figure 16.** Chromatogramme CLHP analytique de la fraction SF2

- La sous fraction 4 a été séparée par CLHP semi-préparative en phase inverse, l'éluion est réalisée par un gradient de système ACN /H<sub>2</sub>O (51 :49 à 88 :12 ; 4ml/min) (Figure 17) ce qui a permis l'obtention des deux composés **A2** (1mg) et **A8** (6mg).



**Figure 17.** Chromatogramme CLHP analytique de la fraction SF4

Toutes les étapes d'extractions et les composés résultants sont résumés dans le schéma suivant :



**Figure 18.** Schéma d'extraction et de purification des composés des cônes d'*Abies numidica*

## **Chapitre 3**

# **Extractions et séparations des métabolites secondaires de la plante *Cedrus atlantica* (Endl) Manetti**

### 3.1. Extraction :

1kg de matériel végétal récolté est séché, broyé et mis à macérer dans 1l du système EtOH/H<sub>2</sub>O pendant 24h, l'opération est répétée 3fois pour une extraction totale des métabolites secondaires polaires et apolaires.

L'étude de 20g de l'extrait hydroéthanolique est entamée par une VLC sur gel de silice greffée C<sub>18</sub> avec un gradient de système MeOH/H<sub>2</sub>O (20 :80 - 100 :0) ce qui permet d'avoir quatre fractions **C40 :60** (0,8g), **C60 :40**(2,43g), **C80 :20**(2,7g) et **C100 :0**(13g) (MeOH/H<sub>2</sub>O).

Chaque fraction est passée en CLHP analytique pour déterminer son profil chromatographique et avoir une idée sur sa richesse.

### 3.2. Séparation et purification :

#### 3.2.1. Etude de la fraction C40 :60

La fraction C40 :60 (0,80g) est pré-séparée par flash chromatographie sur une colonne de phase inverse avec un gradient de polarité du système ACN/H<sub>2</sub>O (10 :90 à 100 :0) ce qui permet de la fractionner en 7 sous fractions (Figure 19, Tableau 10). Après une analyse en CHPLC analytique et en plaque CCM, seule la sous fraction SF19-43 a été traitée.

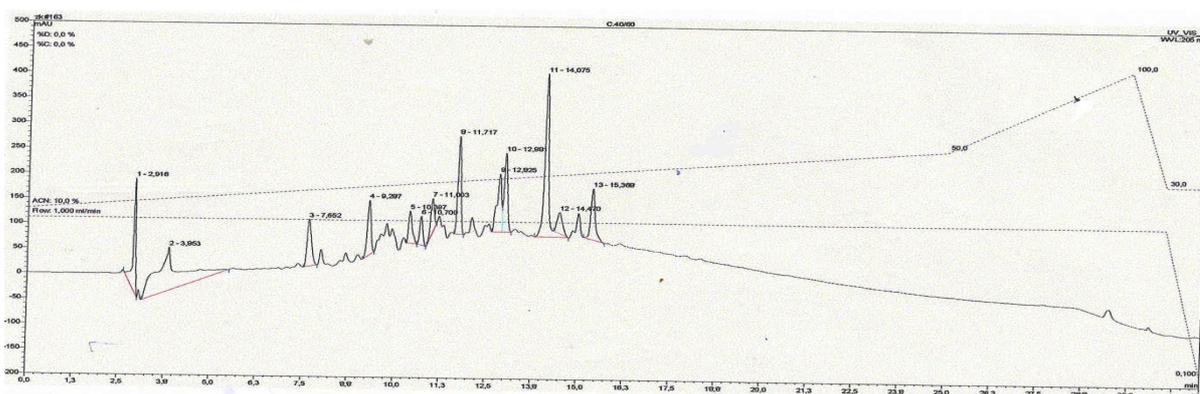


Figure 19. Chromatogramme CLHP analytique de la fraction **C40 :60**

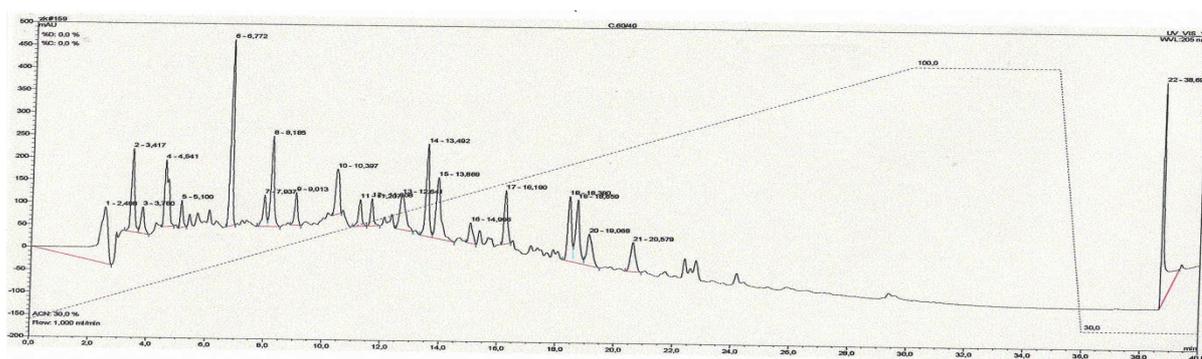
**Tableau 10.** Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la **C40 :60**

Fractions	1-6	7-18	19-43	44-60	61-69	70-90	91-100
Poids (mg)	32,9	23,7	73	36,8	35,7	48,4	80,9

- 3 composés sont isolés par CLPH semi- préparative de la sous fractions SC19-43 en phase inverse par un gradient de système ACN/H<sub>2</sub>O (18 :82 à 30 :70 ; 4ml/min) ce qui a permis l'isolement des composés **C6** (1.3mg, Rt= 15.207 min), **C7** (3mg, Rt= 12.861 min) et **C9** (1.1mg, Rt= 8.641 min).

### 3.2.2. Etude de la fraction **C60 :40**

La fraction C60 :40 (0,6g) a subi une séparation sur une colonne de gel de silice greffée éluée par le système ACN/H<sub>2</sub>O (25 :75 à 60 :40) (Figure 20) pour donner après regroupement par profil CCM 8 sous fractions (Tableau 11) dont la SC 24-35 a été purifiée.

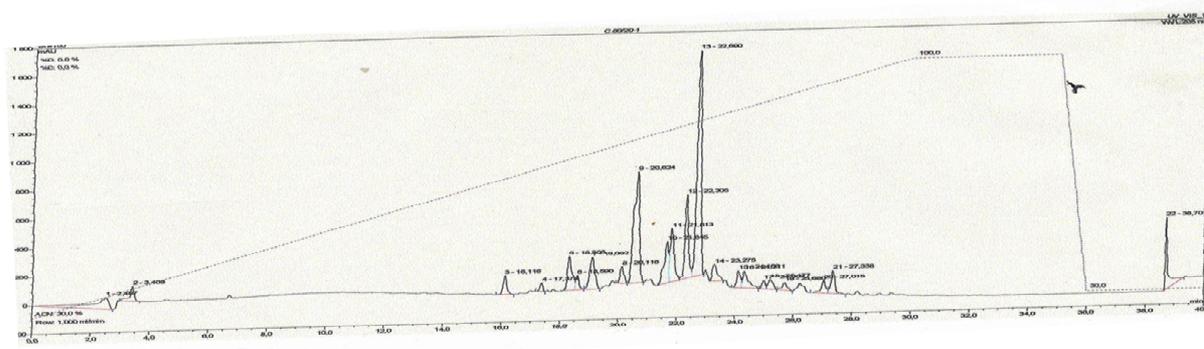
**Figure 20.** Chromatogramme CLHP analytique de la fraction **C60 :40****Tableau 11.** Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la **C60 :40**

Fractions	1-7	8-11	12-19	20-23	24-35	36-39	40-42	43-48
Poids (mg)	26,1	25	35,2	13,3	64,8	31,8	22,6	75,6

- De la même manière que la sous fraction précédente mais avec un système isocratique ACN/H<sub>2</sub>O (30 :70; 4ml/min), SC24-35 est purifiée pour obtenir le composé **C8**(4.8mg, Rt= 8.692 min).

### 3.2.3. Etude de la fraction C80 :20

La fraction C80 :20 (1,8g) est chromatographiée sur une flash colonne de gel de silice normale avec  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (100 :0 à 0 :100%) (Figure 21) comme phase mobile, ce qui a permis de la fractionner en 11 sous fractions (Tableau 12).



**Figure 21.** Chromatogramme CLHP analytique de la fraction C80 :20

**Tableau 12.** Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la C80 :20

Fractions	Poids (mg)
1-5	36,4
6-18	180
19-25	24
26-60	152
61-67	148,8
68-71	148,2
72-74	61
75-80	51,6
81-89	40,7
90-106	25,6
107-Fin	101,7

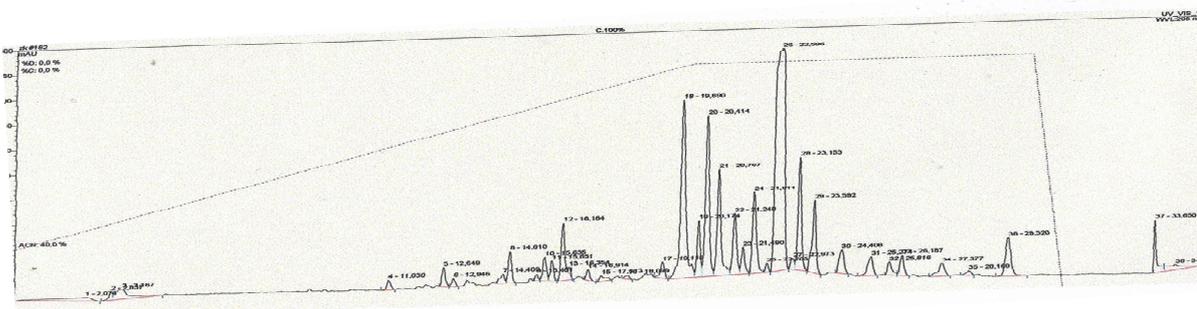
- Du point de vue de sa richesse après une analyse en CLHP analytique, la sous fraction SC 6-18 est traitée par une flash chromatographie sur gel de silice greffée  $\text{C}_{18}$  par un gradient de système  $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$  (40 :60 à 100 :0). Deux des sous fractions résultantes ont permis l'obtention et la purification par HPLC semi-préparative en colonne de phase inverse des composés **C12** (2.1mg,  $R_t$ =

13.11 min), **C15** (3.1g, Rt= 13.83 min), **C17** (2.4mg, Rt= 12.24 min)et **C20**(2.3mg, Rt= 14.27 min).

- la SC 61-67 (148.8mg) a subi une séparation sur une flash colonne avec comme phase stationnaire le gel de silice normale éluée par un gradient de système Hexane/ACOET/MeOH. 4 composés ont été extraits d'une des sous fractions par HPLC semi-préparative par un système isocratique ACN/H<sub>2</sub>O (55 :45, 4ml/min)**C4**(2.2mg, Rt= 15.93 min), **C5** (4.7mg, Rt= 14.56 min) et **C13**(4mg, Rt= 7.03 min).
- La SC 72-74 a été séparée et purifiée et a permis l'extraction des composés **C8**(0.9mg, 5.98 min) et **C11**(1.8mg, Rt= 15.99 min).
- Le composé **C16** (1.9mg, Rt= 17.03 min) a été extrait et purifié de la SC 75-80.

### 3.2.4. Etude de la fraction C100 :0

2g de la fraction C100 :0 a subi une séparation sur flash colonne de silice normale éluée par un gradient de système Hexane/CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10 :0 :0 à 0 :0 :1).



**Figure 22.** Chromatogramme CLHP analytique de la fraction **C100 :0**

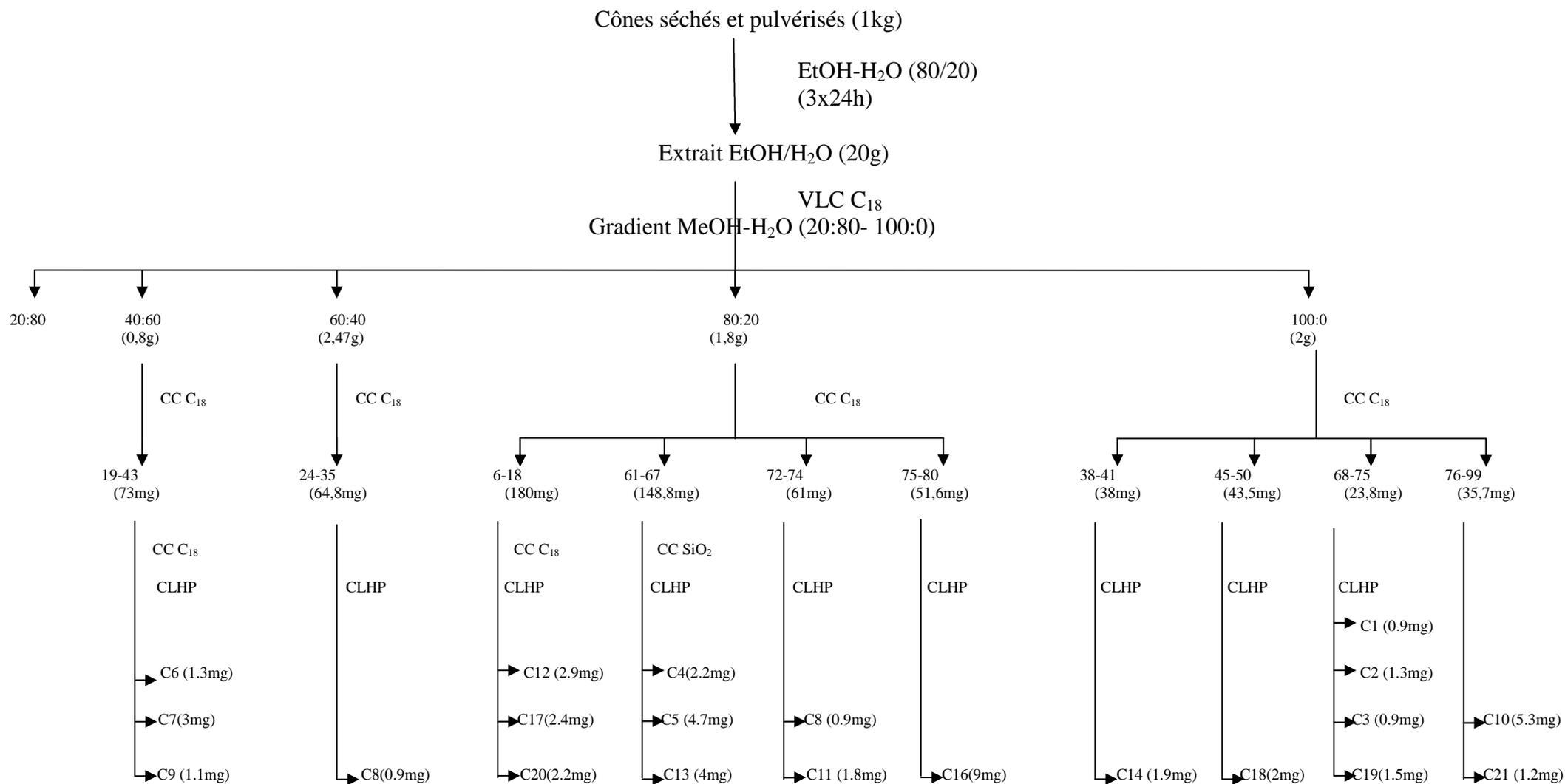
**Tableau 13.** Sous-Fractions obtenues par flash chromatographie de la **C100 :0**

Fractions	1-37	38-41	42-44	45-50	51-62	63-67	68-75	76-99
Poids (mg)	44,6	38	35,9	43,5	48,7	75,7	23,8	35,7

- Une CLPH semi-préparative a été réalisée pour la séparation et la purification de la SC38-41. Un seul composé a été isolé **C14**(1.9mg).
- Le composé **C18** (2mg, Rt= 11.24 min) est isolé de la sous fraction SC45-50.

- SC68-75 est séparée et purifiée par CLHP semi-préparative avec un système isocratique ACN/H<sub>2</sub>O (80 :20 ; 4ml/min), ce qui a permis l'isolement des deux composés nouveaux **C1** (0.9mg, Rt= 13.81 min), **C2** (1.3mg, Rt= 16.03 min) en plus de **C3**(0.9mg, Rt= 14.98 min) et **C19**(1.5mg, Rt= 7.30 min)
- Les composés **C10**(5.3mg, Rt= 10.92 min) et **C21**(1.2mg, Rt= 6.53) ont été isolés de la sous fraction SC76-99.

Le travail phytochimique décrit ci-dessus est résumé dans le schéma suivant :

Extractions et séparations des métabolites secondaires de la plante *Cedrus atlantica* (Endl) ManettiFigure 23. Schéma d'extraction et de purification des composés des cônes de *Cedrusatlantica*

## **Chapitre 4**

# **Dosage des polyphénols et activités biologiques**

## 4.1. Dosages des polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols totaux est réalisée par le test de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999 ; Djeridane et al., 2006). Une courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalence d'acide gallique. Ces tests ayant comme principe le phénomène d'oxydo-réduction ne sont pas spécifiques à une classe de polyphénols et souffrent d'interférences avec les acides aminés de type tyrosine et d'autres composés non phénoliques tels que l'acide ascorbique (Dykes et al., 2006).

Nous avons dosé les polyphénols totaux des extraits des fractions résultantes de la VLC des cônes d'*abies numidica* (F40 :60, F60 :40, F80 :20).

### 4.1.1. Mode opératoire

Le contenu en polyphénols totaux des fractions extraits d'*Abies numidica* est estimé par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi. Cette méthode consiste à réduire le réactif FCR constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) et qui se traduit par une coloration bleue en présence de polyphénols indiquant leur oxydation. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

Un volume de 125  $\mu$ l de solution d'extrait est préparé à partir d'1 mg dans 1 ml d'eau distillée auquel sont ajoutés 500  $\mu$ L d'eau distillée puis 125  $\mu$ L du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min, 1250  $\mu$ l de carbonate de sodium (20 g/L) sont additionnés. la lecture est faite à 760 nm après 90 minutes de repos dans l'obscurité et à température ambiante. L'acide gallique (50-500  $\mu$ g/mL) est le standard utilisé pour établir la courbe d'étalonnage à partir de laquelle la concentration des polyphénols totaux des fractions est calculée. Le résultat est exprimé en  $\mu$ g d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait)

## 4.2. Activité antioxydante

L'étude de l'activité antioxydante des différentes fractions des extraits VLC des cônes d'*abies numidica* est testée selon trois méthodes différentes : Piégeage de l'ABTS, méthode CUPRAC, blanchissement du  $\beta$ -carotène.

#### 4.2.1. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été mesurée par la méthode CUPRAC décrite par Apak et al. 2004. Une solution de : 50  $\mu\text{L}$  Cu (II) (10 mM), 50  $\mu\text{l}$  neocuprine (7,5 mM), et 60  $\mu\text{L}$  de solution tampon  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (1 M, pH = 7,0) est préparée. Différentes concentrations d'extrait ont été ajoutées au mélange initial jusqu'à un volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. L' $\alpha$ -tocophérol et le BHT ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,5}$  ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

#### 4.2.2. Activité de blanchissement du $\beta$ -carotène

L'activité de blanchissement du  $\beta$ -carotène des fractions VLC de l'extrait hydroéthanolique d'*Abies numidica* a été évaluée en utilisant le système modèle de l'acide  $\beta$ -carotène-linoléique (Decker et Welch., 1990). Une solution est préparée à partir de 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dissoute dans 1 mL de chloroforme à laquelle est ajouté un volume de 25  $\mu\text{L}$  d'acide linoléique et de 200 mg de Tween 40. Après concentration et évaporation du chloroforme sous vide, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène, ont été additionnés avec agitation vigoureuse. L'absorbance de la solution du  $\beta$ -carotène doit être comprise entre 0.8 et 0.9 nm. Un volume de 40  $\mu\text{L}$  d'extrait à différentes concentrations a été ajouté à 160  $\mu\text{L}$  de la solution préparée précédemment. L'absorbance a été mesurée à 470 nm en utilisant un lecteur de microplaque. Les résultats ont été comparés à ceux du BHA et l' $\alpha$ -tocophérol.

#### 4.2.3. Activité du piégeage de l'ABTS

L'activité de piégeage de l' $\text{ABTS}^{*+}$  a été déterminée selon le procédé de Re et al 1999, avec de légères modifications. L' $\text{ABTS}^{*+}$  a été produit par la réaction entre 2,45 M de persulfate de potassium et 7 mM de l'ABTS dans l'eau, la solution est stockée dans l'obscurité à température ambiante pour une durée de 12 h. L'oxydation de l'ABTS commence immédiatement mais l'absorption n'est pas maximale et se stabilise après 6 heures de temps. Le radical cation est stable sous cette forme depuis plus de 2 jours dans l'obscurité à température ambiante. Avant utilisation, l'ABTS a été dilué pour obtenir une absorbance de  $0,708 \pm 0,025$  à 734 nm avec de l'éthanol. Ensuite, 40  $\mu\text{L}$  de la solution d'extrait dissout dans l'éthanol à différentes concentrations est additionnée à 160  $\mu\text{L}$  de la solution de l' $\text{ABTS}^{*+}$ . Après une attente de 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits.

Les pourcentages d'inhibition ont été mesurés pour chaque concentration par rapport à une absorbance à blanc de l'éthanol. La capacité de piégeage de L'ABTS<sup>•+</sup> a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{ABTS inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

### 4.3. Activité anti-cholinestérase

Les activités acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) des deux extraits hydroalcoolique des plantes *Abies numidica* et *Cedrus atlantica* ont été mesurées par la méthode spectrophotométrique décrite par Ellman (Ellman et al., 1961) avec une légère modification. AChE de l'anguille électrique ainsi que la BChE du sérum de cheval ont été utilisés, tandis que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure de butyrylthiocholine ont été employés comme substrats. Le DTNB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a été utilisé pour la mesure de l'activité de la cholinestérase. L'éthanol a été utilisé comme solvant pour dissoudre les composés d'essai 0 et les contrôles. Un volume de 150 µL de tampon phosphate de sodium (100Mm, pH 8,0), 10 µL d'une solution d'échantillon dissoute dans de l'éthanol à différentes concentrations et un volume de 20 µL d'AChE ( $5,32 \times 10^{-3}$ U) ou BChE ( $6,85 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés et incubés pour une durée de 15 min à 25<sup>0</sup>C puis 10 µL de DTNB (0,5mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été additionnée par 20 µL d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) ou le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM). Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie par la formation d'une couleur jaune d'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, selon le résultat de la réaction de DTNB avec thiocholine, libéré par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou le chlorure de butyrylthiocholine, respectivement, à une longueur d'onde de 412 nm, en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (SpectraMax PC340, MolecularDevices, États-Unis). Les mesures et les calculs ont été évalués en utilisant le logiciel PRO Softmax v5.2. Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule (E - S) / E x100, où E est l'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai, et S, est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test. Les expériences ont été réalisées en triple. La galantamine a été utilisée comme composé de référence.

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

#### 4.4. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Dans notre étude, le test de l'activité antimicrobienne a été testé en premiers temps sur les extraits hydroéthanoliques des deux plantes *Abies numidica* et *Cedrus atlantica*. Une fois que les résultats étaient positifs, les composés isolés ont été testés à leur tour afin de déterminer les produits actifs et responsables de l'activité.

L'activité antimicrobienne des extraits d'*A. numidica* et de *C. atlantica* a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu solide et liquide afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette dernière désignera la concentration minimale après 18 à 24h d'incubation à 37 °C d'extrait qui inhibe toute croissance visible en milieu solide.

Les composés isolés ont été évalués par la méthode de bioautographie pour déterminer ceux qui sont actifs avant de passer à la détermination de la CMI de chaque produit par la méthode de diffusion en milieu liquide.

L'étude biologique a été réalisée contre 17 bactéries et cinq levures (appartenant au genre *Candida*) en culture *in vitro* (Tableau 14).

##### 4.4.1. Préparations des différentes concentrations :

Les extraits hydroalcoliques sont préparés à des concentrations de 1,00 %, 0,50 %, 0,25 %, 0,12 %, 0,06 % et 0,03 % (de 10 mg/mL à 0,3mg/mL).

Pour obtenir la concentration de 1 %, 2 mL d'extrait de concentration 1,1 g/mL sont mis dans une boîte de Petri, à laquelle sont ajoutés 18 mL de gélose de Mueller Hinton (MHA) à chaud (donc à l'état liquide), l'ensemble est homogénéisé, la gélose se durcit en refroidissant. Pareil, pour la concentration de 1,5 %, 1 ml d'extrait est introduit dans une boîte de Petri avec 19 ml de gélose.

Pour les quatre autres concentrations restantes, quatre tubes contenant chacun 5mL d'eau distillée sont préparés. 1 ml de chaque tube est déposé dans une boîte de Pétri à laquelle 19 ml de gélose sont ajoutés.

##### 4.4.2. Préparation des souches microbiennes et culture *in vitro* :

Après la sélection des différentes bactéries, résistantes ou non aux antibiotiques, 22 souches microbiennes dont 8 bactéries Gram (-), 9 Gram (+) et cinq levures appartenant au genre *Candida* ont été testées dans la détermination de l'activité antimicrobienne des deux extraits hydroéthanoliques d'*A. numidica* et *C. atlantica* (Tableau 14).

Les micro-organismes sont cultivés, dans des tubes contenant un milieu MHA, à partir desuspension des souches contenues dans un milieu liquide BH (Brain Heartcystéiné),après incubation d'une durée de 24 heures à température 37°C, pour obtenir la suspension microbienne, 10 mL de liquide RC (Ringer Cystéine) sont additionnés aux tubes MHA, il est nécessaire de bien mélanger pour assurer une répartition homogène des micro-organismes. Une goutte de chaque suspension estrécupérée pour être ajoutée dans un tube contenant 10 mL de solution RC.

Pour finaliser la culture dans les boîtes de Pétri, un volume de 1 mL de suspension de chaque tube est prélevépour remplir les puits de la plaque de l'ensemenceur automatique (Appareil de STEERS). La surface de la gélose est ensemencée avec un *inoculum* des souches à étudier(l'inoculateur à têtes multiples de l'appareil de STEERS, permet l'ensemencementd'au maximum36 souches différentes par boîte). Deux boîtes témoin "avant" et "après"l'ensemencement ont été réalisées pour vérifier la stabilité des concentrations des *inocula*. La culture des micro-organismes se fait par incubation des boîtes de Pétri, pour une durée de 24 heures, à 37 °C. Après ce temps, les colonies sur les boîtes de Pétri seront dénombrées visuellement. Cette méthode permet de connaître le nombre d'unités prélevées pouvant former une colonie (UFC). Cette technique ne tient compte que des micro-organismes viables qui peuvent se développer dans les conditions de croissance utilisées.

**Tableau 14.** Les souches testées.

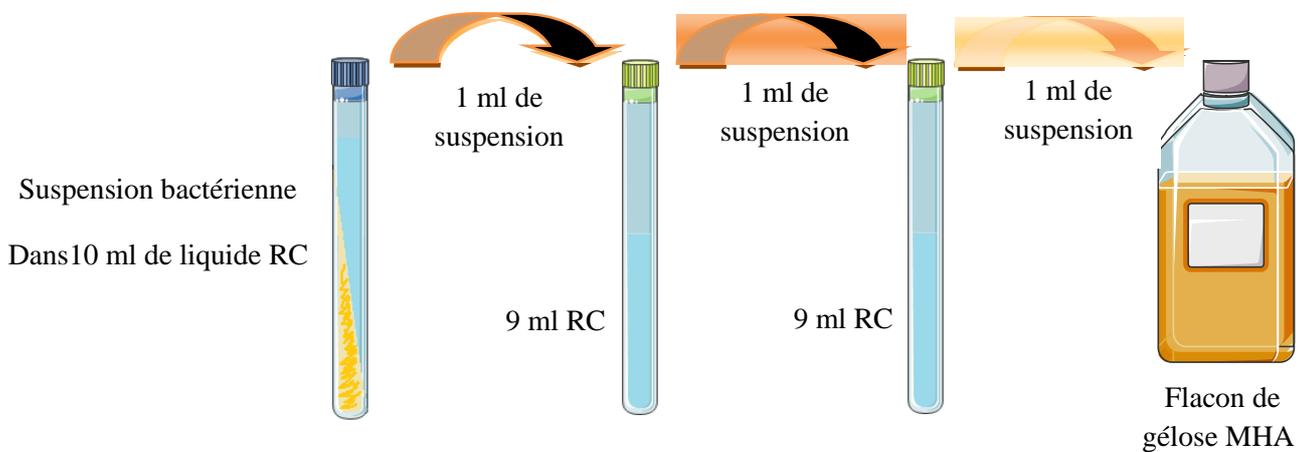
Type	Gram (+)	Gram( -)	Levures
<b>Souches</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> CIP 54.127	<i>Candida glabrata</i>
	<i>Enterococcusfaecalis</i> ATCC 1034	<i>Salmonellaenterica</i>	<i>Candida tropicalis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	<i>Serratiamarcescens</i>	<i>Candida kefyr</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiellapneumoniae</i>	<i>Cryptococcusneoformans</i>
	<i>Micrococcusluteus</i>	<i>Providenciastuartii</i>	
	<i>Listeria innocua</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Shigellasonerii</i>	
	<i>Enterobactercloaceae</i>		

### 4.4.3. Bioautographie:

C'est une méthode qui permet de détecter les composés antimicrobiens au sein d'un extrait de plante. En effet, la bioautographie est une méthode de laboratoire qui vise à découvrir les substances qui affectent les taux de croissance des organismes d'essai dans des mélanges complexes.

#### 4.4.3.1. Mode opératoire :

- Préparation de la plaque CCM (déposer l'extrait sur la plaque et faire la migration ; composés purs sans migration)
- Mettre la plaque dans le dessiccateur pour stériliser
- Pour l'obtention d'une concentration bactérienne de  $10^4$ /mL, les micro-organismes sont cultivés dans des tubes en milieu MHA (Mueller-Hinton Agar). Après un jour, 10 mL de liquide RC (Ringer Cystéine) sont additionnés aux tubes. Ensuite, des dilutions sont réalisées selon l'explication sur la figure suivante :



**Figure 24.** Préparation des dilutions

- Les CCM développées et stérilisées sont déposées dans des boîtes de culture de forme carrées auxquelles est ajoutés 30 ml de suspension gélose-bactérienne. L'incubation se fait pour une durée de 24 heures à température  $37^{\circ}\text{C}$ .

Les résultats sont observés par une solution de para-iodonitrotétrazolium (INT) à 2 mg/mL qui est vaporisée sur la surface de la gélose et incubée de nouveau pendant quatre heures. L'INT est alors transformé par une déshydrogénase en un composé d'une couleur

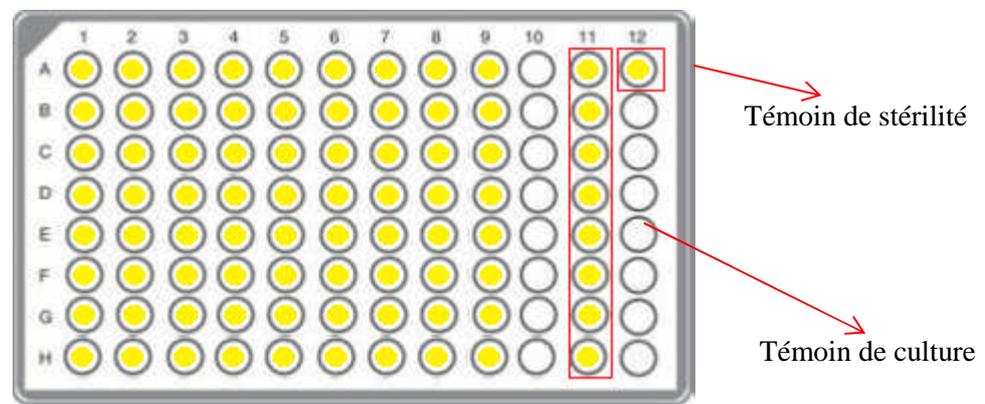
rouge foncé. L'inhibition de la croissance bactérienne est révélée par la présence de zones claires

#### 4.4.4. Détermination de la CMI en microplaque

La méthode de dilution en milieu liquide est une méthode qui permet la détermination des paramètres (CMI) d'inhibition de la croissance microbienne par les extraits ou les composés actifs. Chaque microplaque est utilisée pour mesurer l'activité microbienne d'un extrait (ou d'un composé) contre maximum 8 souches bactériennes.

##### 4.4.4.1. Mode opératoire :

- Un volume de 100  $\mu\text{L}$  de MH (milieu liquide de Mueller Hinton) est introduit dans les puits A1 à H9, ainsi que dans les puits A11 à H11 et dans le puits A12.



**Figure 25.** Plaque de microdilution

Les puits A1 à H9 représentent les dilutions de différentes souches bactériennes, les puits A11 à H11 représentent les témoins de culture des bactéries et enfin le puits A12 représente le témoin de stérilité du milieu de culture.

- déposer 100  $\mu\text{L}$  d'extrait végétal (ou composé actif) dans les puits A1 à H1. Faire des dilutions de raison 2 (100  $\mu\text{L}$  de A1 dans A2 et ainsi de suite).
- Un volume de 100  $\mu\text{L}$  de souche bactérienne est mis dans les puits A1 à H9 et A11 à H11 (désinfecter la microplaque à l'alcool, vortexer le tube contenant la souche avant de l'ajouter).
- Les plaques sont mises à incubation à l'étuve pendant 24 heures et à 37°C.
- La lecture est faite à 24 heures par turbidité du milieu, et pour avoir une lecture plus précise, on peut pulvériser la microplaque par le réactif de l'INT.

Le composé est préparé à neuf concentrations de 500 $\mu$ g/mL à 1,9 $\mu$ g/mL.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\mu$ g/ml	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	-	TC	TS

(TC : Témoin de culture, TS : Témoin de stérilité)

# **PARTIE 3**

## **Résultats et discussion**

**Chapitre I**  
**Identification des produits isolés d'*Abies***  
***numidica***

## 1.1. Détermination structurale des diterpènes isolés des Cônes d'*Abies numidica*

L'étude phyto-chimique des fractions VLC **F60 :40**, **F80 :20** et **F100 :0** de l'extrait hydroéthanolique des cônes d'*Abies numidica* a permis la séparation de huit diterpènes purs (**A1-A8**) qui ont été identifiés grâce aux méthodes spectrales (RMN). Ces derniers sont des dérivés abiétatriènes déjà identifiés dans le genre *Abies*.

### 1.1.1. Identification du composé **A1** :

- Analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **A1** (Figure 26) on repère les signaux suivants :

- Quatre méthyles sous forme de quatre singulets résonnant entre  $\delta_{\text{H}}$  1.16 et 1.54 ppm attribuables aux protons H-16, H-17, H-19 et H-20.
- Un massif de protons observé entre  $\delta_{\text{H}}$  1.51 et 2.51 ppm correspondant aux protons CH et CH<sub>2</sub> des cyclohexanes
- Un signal déblindé sous forme d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  4.71 ppm attribuable à un CH-OH avec une constante de couplage  $J = 4.7\text{Hz}$  indiquant une configuration  $\alpha$  en position 7
- Trois signaux aromatiques raisonnant entre  $\delta_{\text{H}}$  7.26 et 7.45 ppm sous forme de doublets (H-11,  $J = 8.4\text{Hz}$  et H-14,  $J = 2.2\text{ Hz}$ ) et d'un doublet de doublets (H-12,  $\delta_{\text{H}}$  7.36 ppm,  $J = 8.3$  et  $2.2\text{ Hz}$ ) indiquant des couplages ortho et méta.

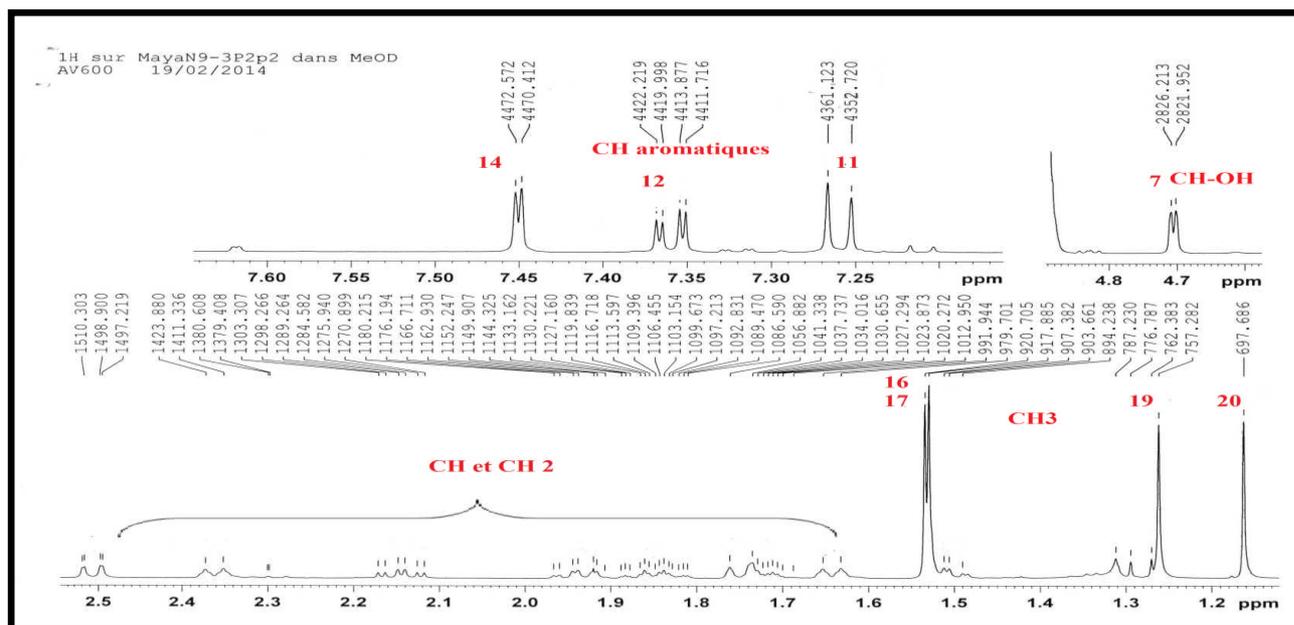
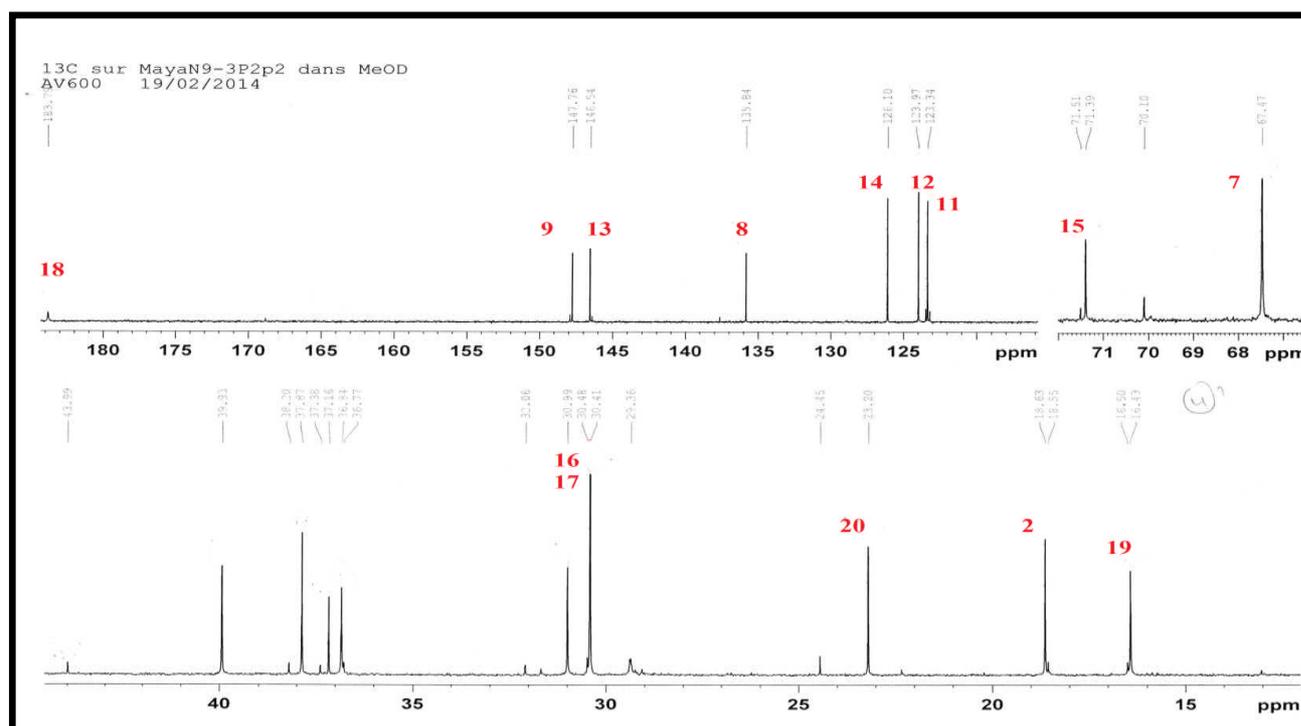


Figure 26. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **A1**

**• Analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$** 

Sur le spectre  $^{13}\text{C}$  (Figure 27), les signaux repérés sont :

- Quatre méthyles apparaissant de  $\delta_{\text{C}}$  16.3 à 30.5 ppm attribuables respectivement aux carbones C-19, C-20, C-16 et C-17.
- Un ensemble de carbones entre  $\delta_{\text{C}}$  18.6 et 48 ppm attribuables aux carbones  $\text{CH}_2$  (C-1, C-2, C-3, C-6), CH (C-5) et aux C quaternaires (C-4, C-10) des cyclohexanes.
- Un signal résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  67.5 ppm attribuables au CH-OH en position 7
- Un carbone quaternaire déblindé vers  $\delta_{\text{C}}$  71.4 ppm indiquant la présence d'un groupement hydroxyle (C-15)
- Un ensemble de carbones dont le déplacement chimique entre  $\delta_{\text{C}}$  123.3 et 126.1 ppm attribuables aux carbones tertiaires aromatiques C-11, C-12 et C-14 et entre  $\delta_{\text{C}}$  135.8 et 147.8 ppm attribuables aux carbones quaternaires C-8, C-9 et C-13.
- Un carbonyle observé à  $\delta_{\text{C}}$  183.8 ppm indiquant la présence d'un acide ou d'un ester (C-18).



**Figure 27.** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé A1

### • Analyse du spectre COSY

Le spectre COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permet l'identification des protons présentant un couplage spin-spin par des pics diagonaux ou croisés, en un sens, cette expérience est la réalisation simultanée de toutes les expériences de découplage qui permettent la visualisation des protons aliphatiques.

Après l'identification des protons caractéristiques sur le spectre RMN  $^1\text{H}$ , l'expérience COSY (Figure 28) va nous permettre la localisation des protons non analysables sur le spectre proton et qui apparaissent pour la plupart entre  $\delta_{\text{H}}$  1.51 et 2.51 ppm (Tableau 15)

Les corrélations observées sont :

- Les protons H-2 corrélient à la fois avec les protons vicinaux H-1 et H-3
- Les deux protons H-6 vicinaux aux protons H-5 et H-7
- Le proton H-12 montre une tache indiquant sa corrélation avec le proton H-11 avec une constante de couplage ( $J = 8.4\text{Hz}$ ) indiquant sa position ortho et avec le proton H-14 ( $J = 2.2\text{Hz}$ ) indiquant sa position méta.

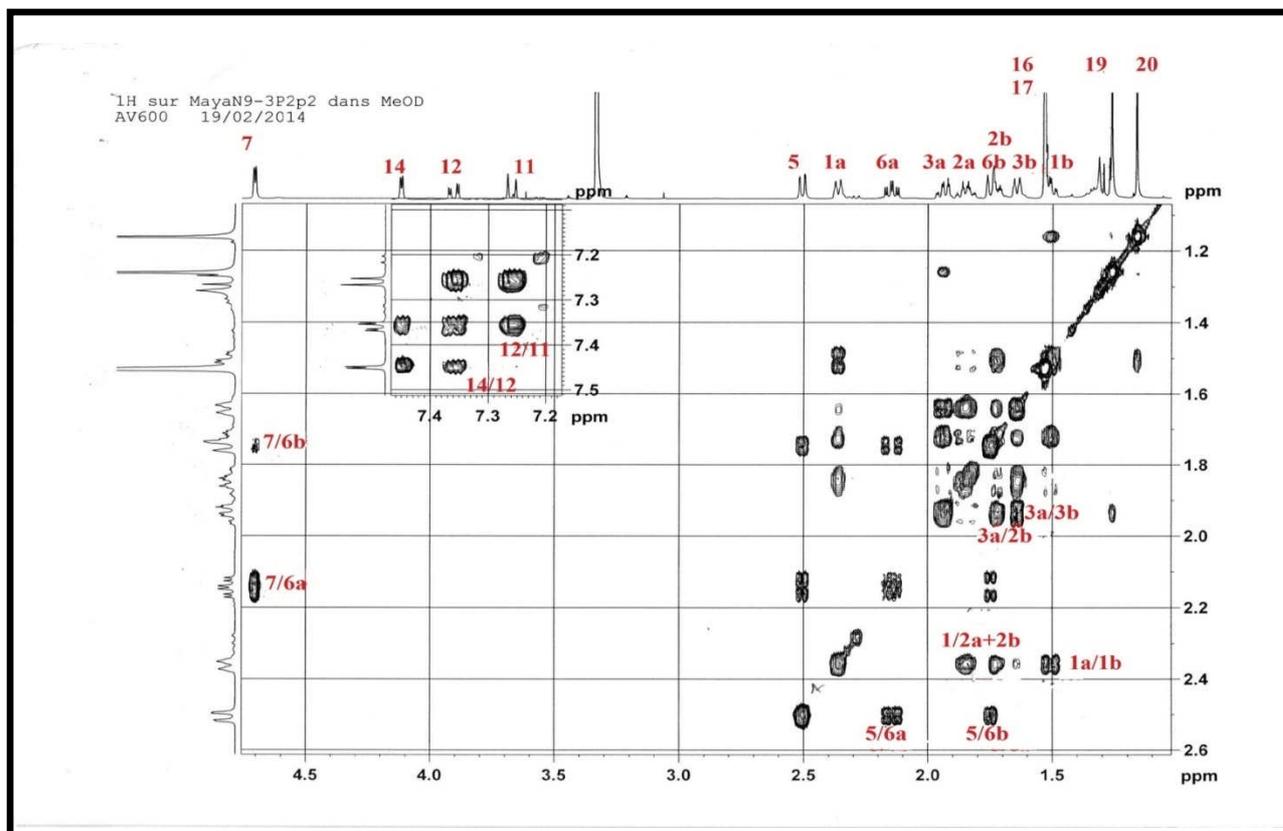
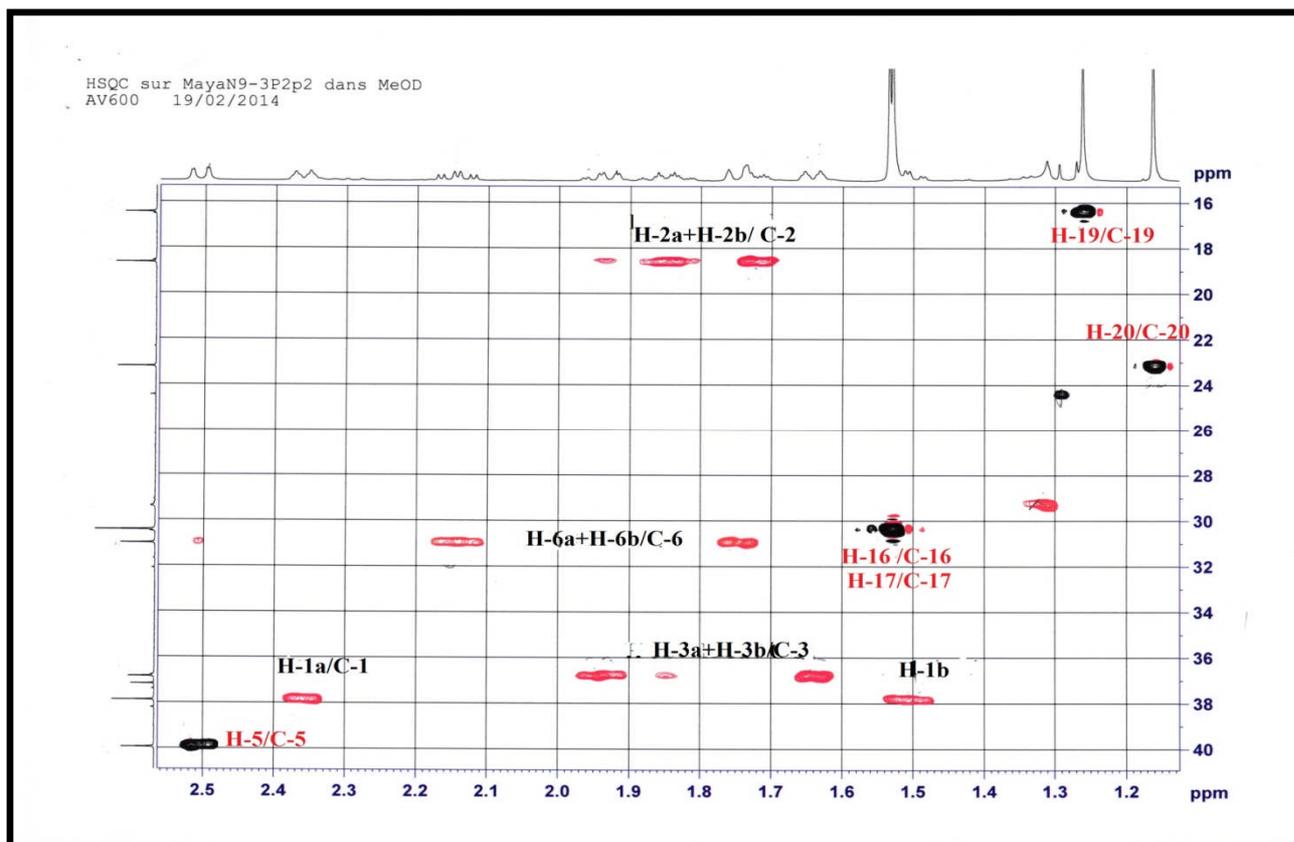


Figure 28. Spectre COSY du composé A1

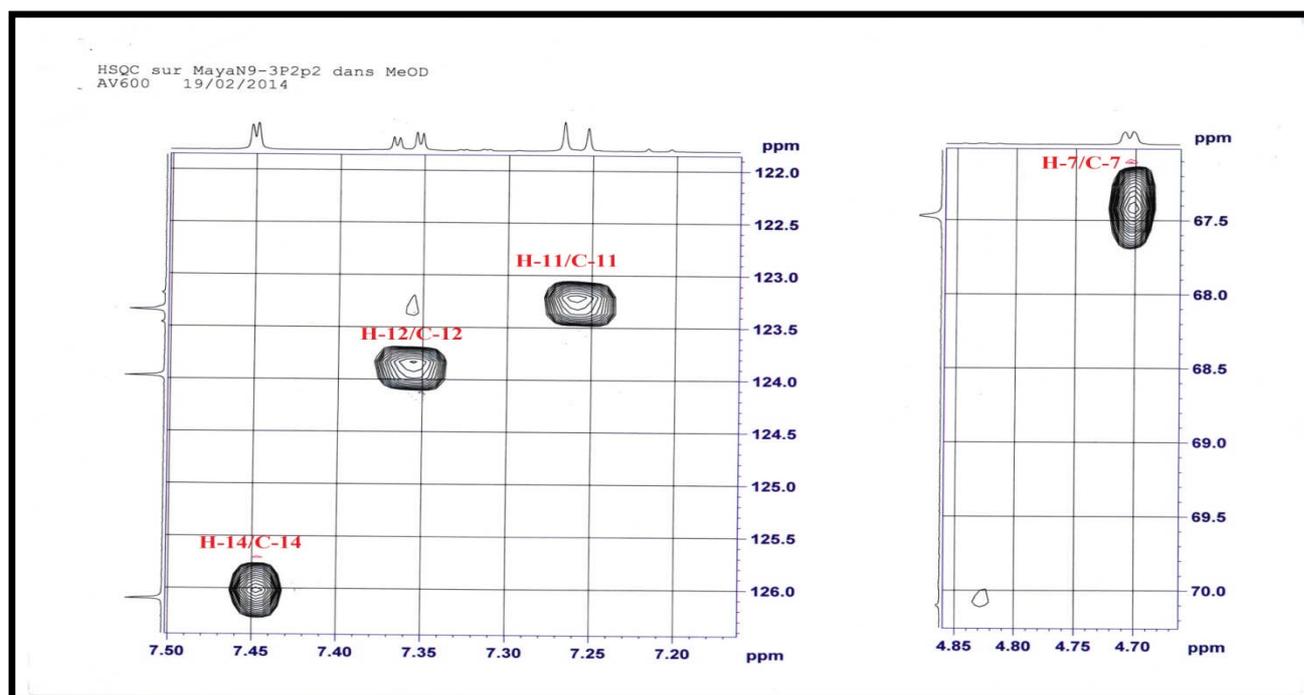
- **Analyse du spectre HSQC  $J$ -modulé**

Après la localisation des protons hybridés  $sp^3$ , l'analyse des corrélations hétéronucléaires  $^1J_{H-C}$  observée sur le spectre HSQC  $J$ -modulé permet l'identification et l'attribution des déplacements chimiques des carbones les portant (C-1, C-2, C-3, C-5, C6 et C-11, C-12 et C-14) (Figures 29-30).

Les valeurs des  $\delta_C$  sont répertoriées dans le tableau 15.



**Figure 29.** Spectre HSQC de  $\delta_H$  1.1 à 2.6 ppm du composé **A1**



**Figure 30.** Spectre HSQC de  $\delta_H$  4.65 à 7.50 ppm du composé **A1**

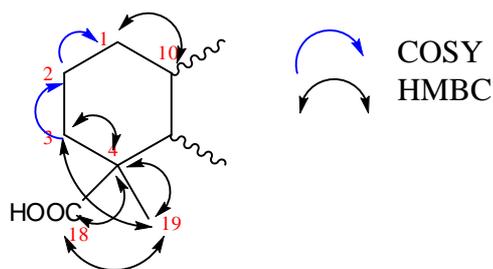
- **Analyse du spectre HMBC**

L'analyse HMBC détecte les couplages à deux, trois et même quatre liaisons ( $^2J_{H-C}$ ,  $^3J_{H-C}$  et  $^4J_{H-C}$ ) entre protons et carbones et permet de corrélérer les carbones quaternaires avec les protons voisins.

L'analyse du spectre HMBC du composé **A1** (Figures 34-35) montre:

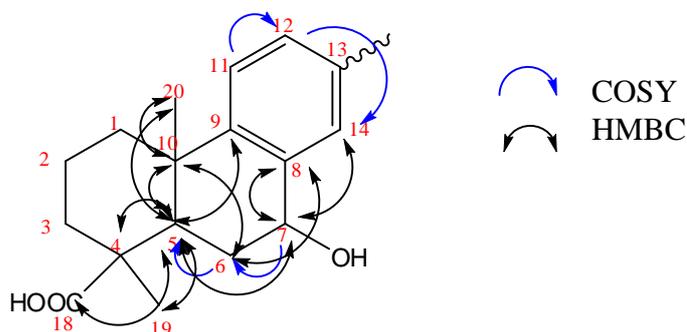
- Une corrélation du proton H-1 avec le C-10.
- Des taches de corrélation du proton H-3 avec le carbone quaternaire C-4 et le méthyle C-19.
- Les protons H-19 montrent une corrélation avec le C-4 et le C-18.

Par ces corrélations, on détermine la position du C-19 et du carbonyle C-18 qui sont portés par le carbone quaternaire C-4 et sur la nature du C-18 qui est un acide.



**Figure 31.** Corrélations COSY et HMBC du composé **A1**

- Le proton H-5 corrèle avec les carbones quaternaires C-4 et C-10, les deux méthyles C-19 et C-20, avec le carbonyle C-18 et avec le carbone quaternaire aromatique C-9 respectivement.
- Les protons H-6 corrèlent avec les carbones quaternaires C-4 et C-10 et avec le carbone quaternaire aromatique C-8.
- Le proton H-7 corrèle avec les trois carbones aromatiques C-8, C-9 et C-14 et avec le carbone C-5.
- les protons H-20 montrent une corrélation avec les carbones quaternaires C-10 et C-9.



**Figure 32.** Corrélations COSY et HMBC du composé **A1**

- Les protons aromatiques H-12 et H-14 corrèlent avec le carbone quaternaire C-15 qui par son déplacement chimique déblindé ( $\delta_C$  71.39ppm) indique qu'il est directement attaché au cycle aromatique et à un groupement hydroxyle.
- les protons méthyliques H-16 et H-17 sont repérés par leurs corrélations avec le carbone C-15.

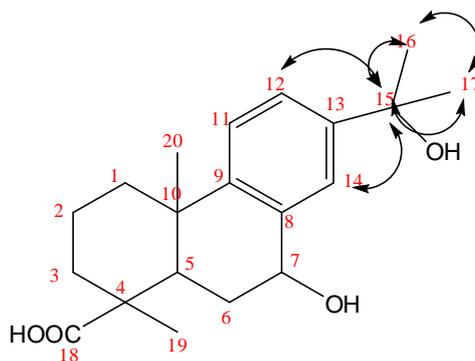
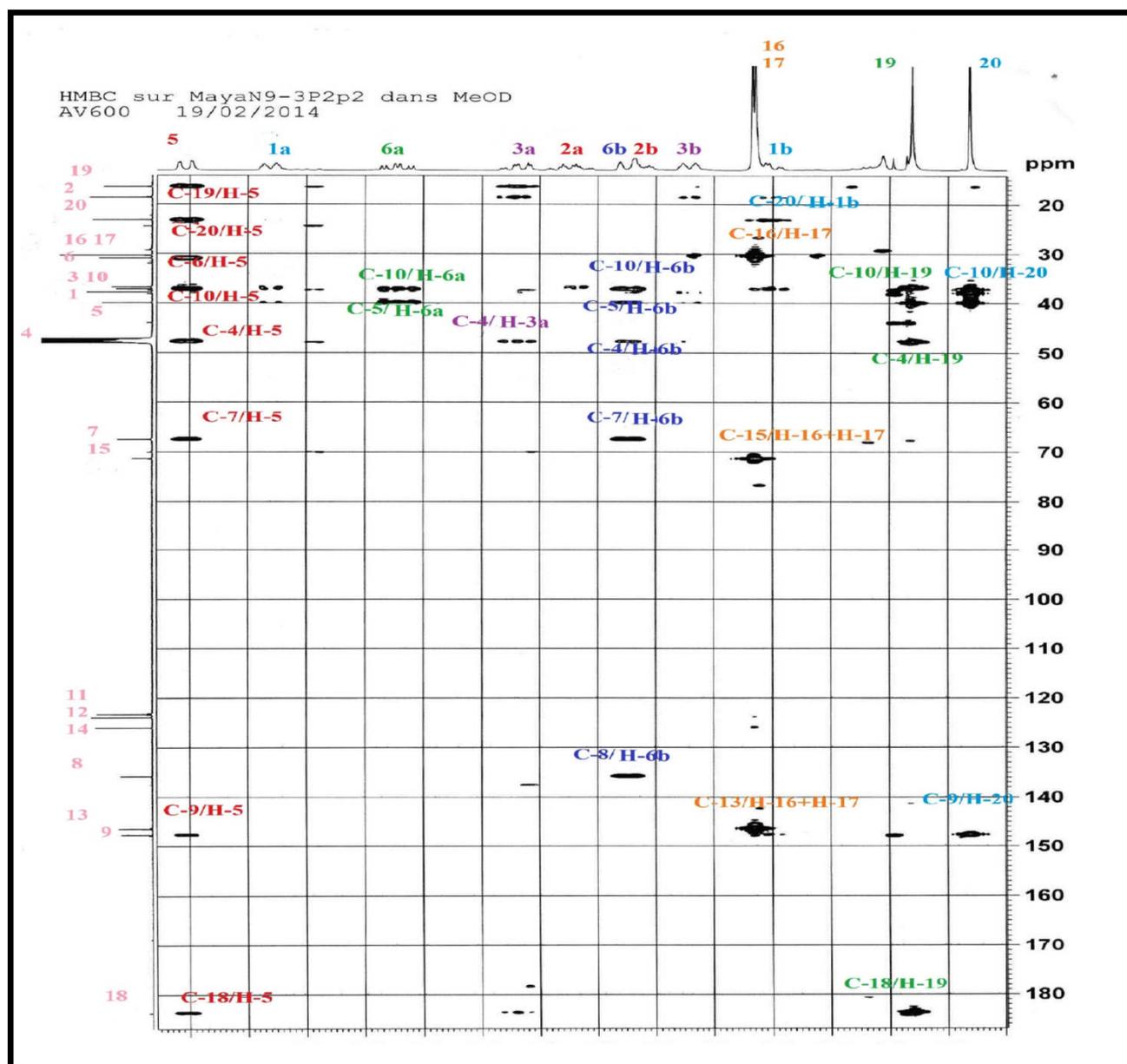
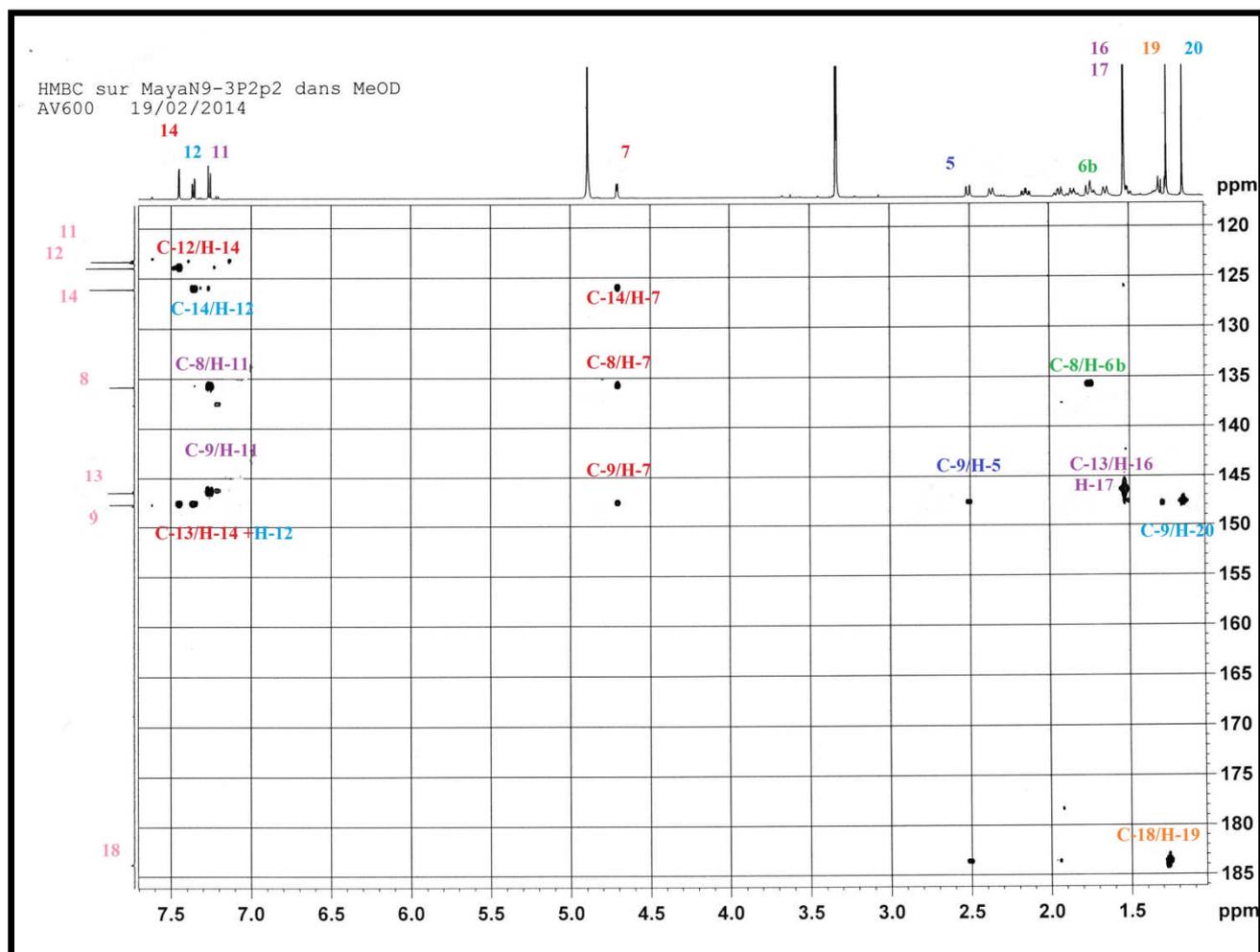


Figure 33. Corrélations HMBC du composé A1

Figure 34. Spectre HMBC de  $\delta_c$  20 à 180ppm du composé A1

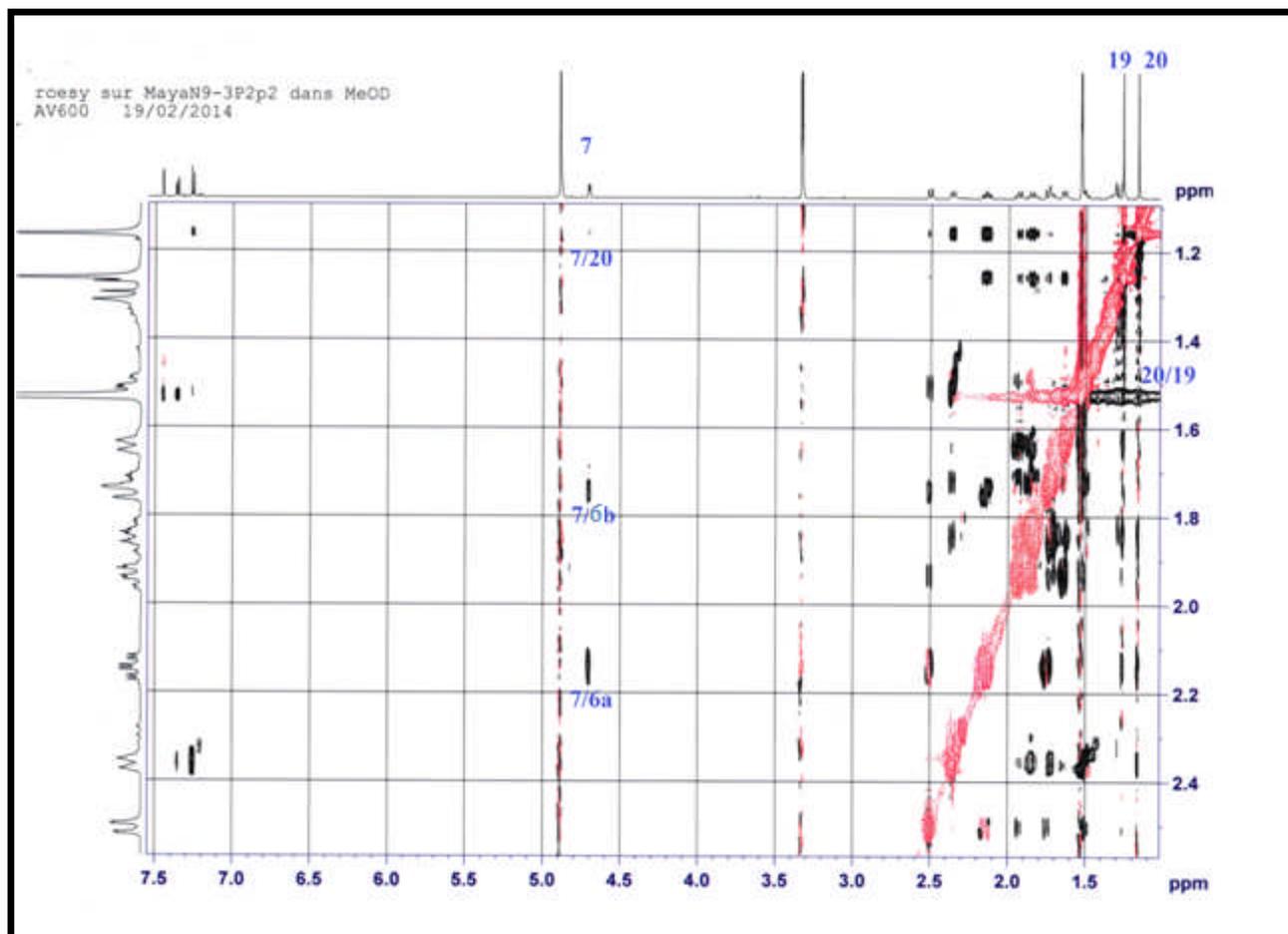


**Figure 35.** Spectre HMBC de  $\delta_C$  120 à 185ppm du composé **A1**

- **Analyse du spectre NOESY**

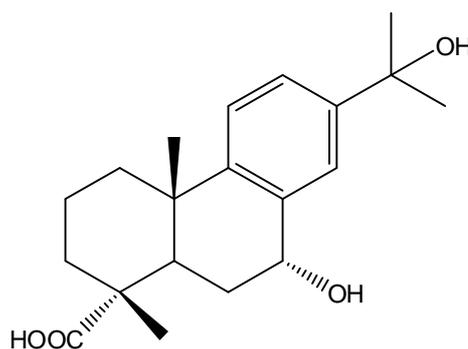
L'analyse du spectre NOESY du composé **A1**, nous permet de déterminer la configuration de l'hydroxyle en position 7.

La constante de couplage du proton H-7 $\beta$  ( $J = 4.7\text{Hz}$ ) indique qu'il est en position équatoriale en plus de sa corrélation avec les protons méthyliques H-20, H-6a et H-6b et à la corrélation entre le proton méthylique H-20 et le méthyle H-19.



**Figure 36.** Spectre NOESY du composé **A1**

Toutes ces données nous permettent de proposer la structure : Acide  $7\alpha$ , 15-dihydroxydehydroabietique nommé également acide  $7\alpha$ , 15-dihydroxy-8, 11, 13-abietatrien-18-oïque (Prinz et al., 2002) isolé précédemment d'*Abies georgei* Orr (Yang et al., 2010)



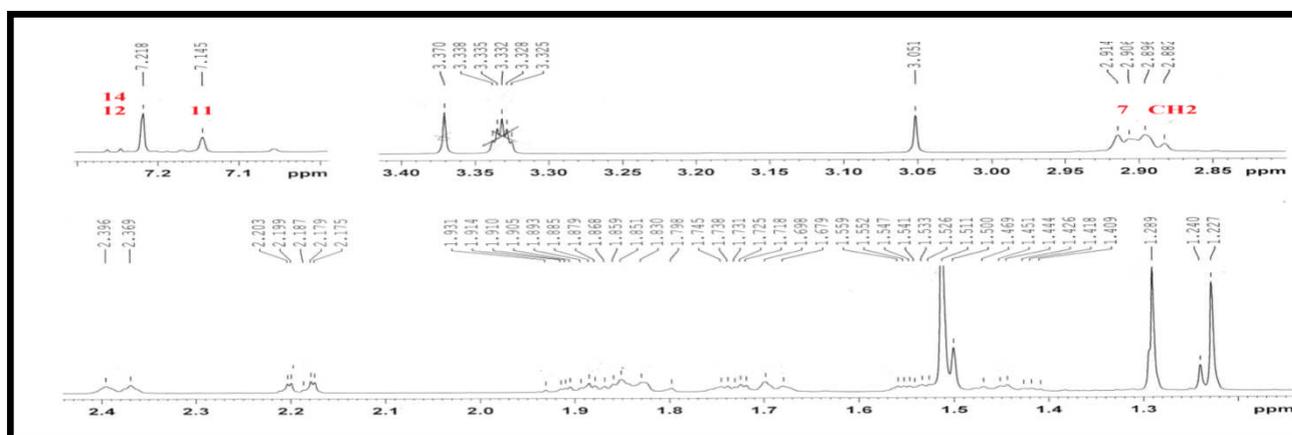
**A1** : Acide  $7\alpha$ , 15-dihydroxydehydroabietique

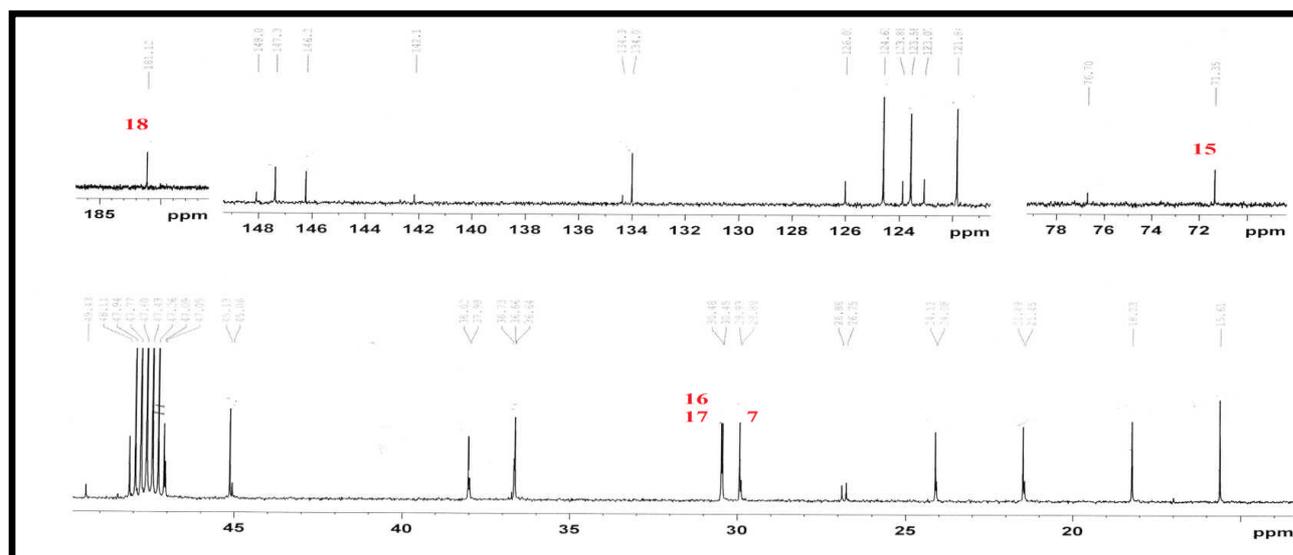
**Tableau 15.** Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé **A1** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, $J$ (Hz)	N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, $J$ (Hz)
1	38.2	1a : 2.36, d, 12.5 1b : 1.51, dd, 13.1 ; 3.7	11	123.3	7.26, d, 8.4
2	18.6	2a : 1.85, m 2b : 1.71, m	12	123.9	7.36, dd, 8.3; 2.2
3	36.8	3a : 1.94, dd, 13.0; 3.8 3b : 1.64, d, 12.2	13	146.5	-
4	48	-	14	126.2	7.45, d, 2.2
5	39.9	2.51, dd, 13.1 ; 1.7	15	71.4	-
6	30.9	6a : 2.14, td, 13.5 ; 5.0 6b : 1.75, d, 15.5	16	30.5	1.54, s
7	67.5	4.71, d, 4.7	17	30.4	1.53, s
8	135.8	-	18	183.8	-
9	147.8	-	19	16.4	1.26, s
10	37.2	-	20	23.2	1.16, s

**1.1.2. Identification du composé A2 :**

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du produit **A2** (Figures 37-38) sont très proches de ceux du composé **A1** (Figures 26-27) avec tous les signaux caractéristiques sauf pour le signal du proton H-7 qui est localisé à  $\delta_{\text{H}}$  2.90 ppm sous forme d'un multiplet au lieu de  $\delta_{\text{H}}$  4.71 ppm indiquant la présence d'un  $\text{CH}_2$  en position 7 au lieu d'un CH et le blindage des signaux des protons et du carbone C-6 dû à la perte de l'hydroxy à C-7 du composé **A1**, ce qui est montré dans le spectre HSQC (Figure 40) et par ses corrélations COSY (Figure 39).

**Figure 37.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **A2**

Figure 38. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé A2

- Analyse du spectre COSY

Le spectre COSY (Figure 39) du composé A2 montre les mêmes corrélations que du composé A1.

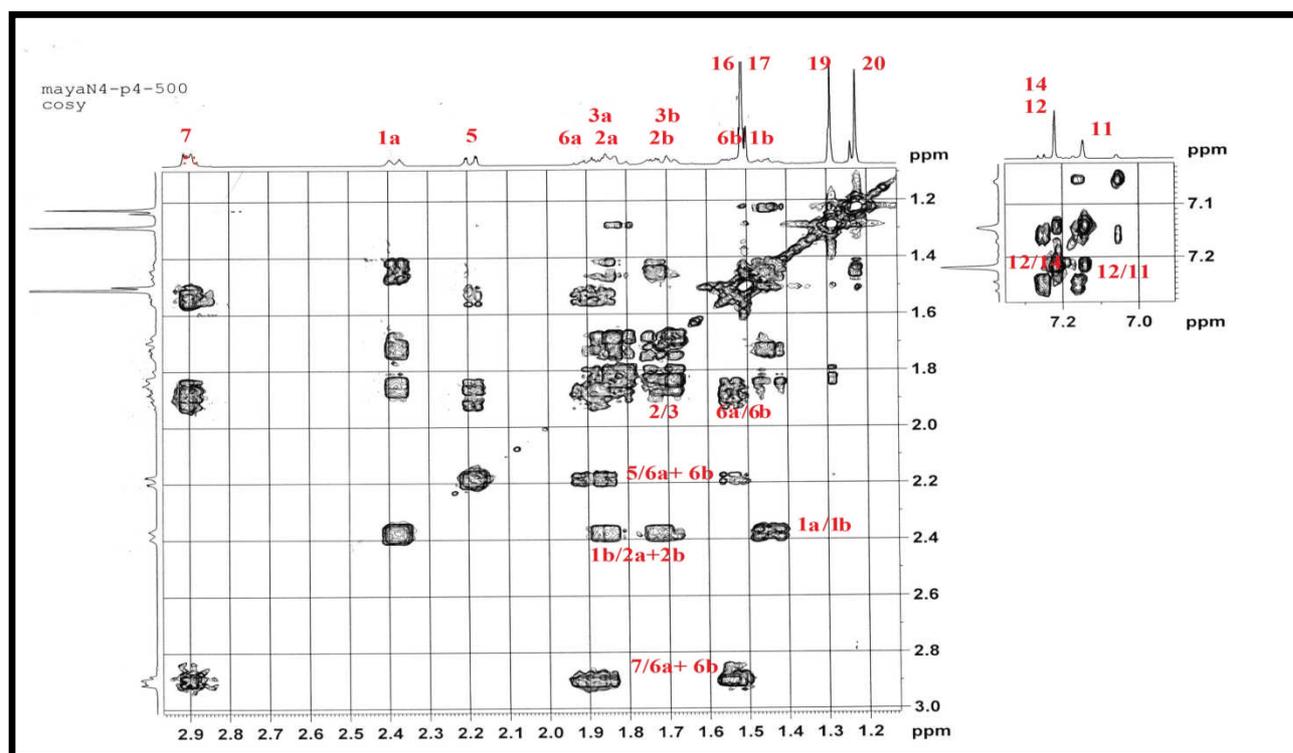


Figure 39. Spectre COSY du composé A2

- **Analyse du spectre HSQC**

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau 16.

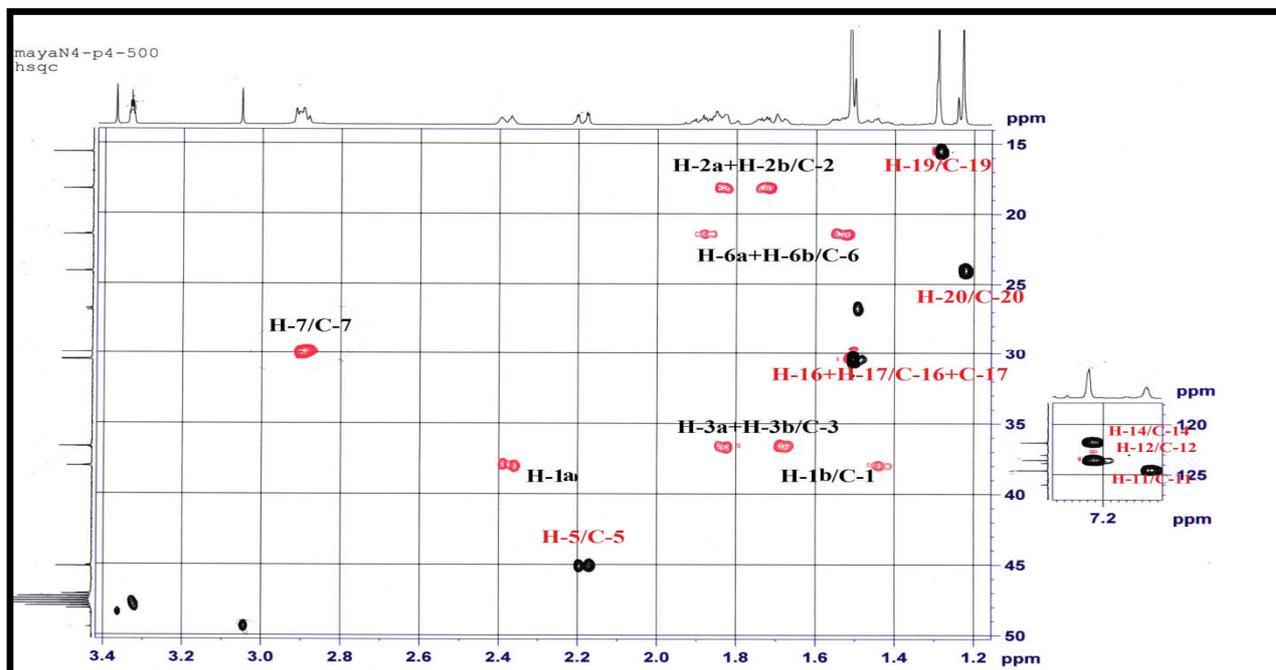


Figure 40. Spectre HSQC du composé A2

- **Analyse du spectre HMBC**

Le spectre HMBC (Figure 41) du composé A2 montre les mêmes corrélations que celui du composé A1.

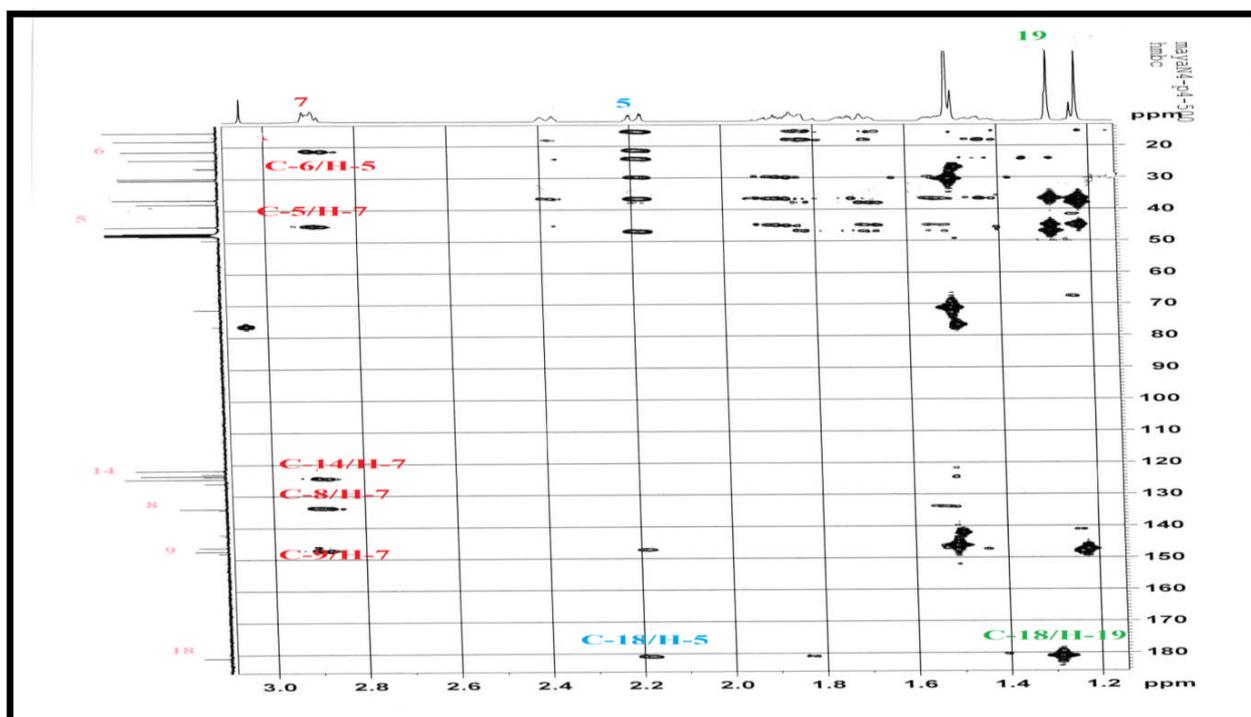
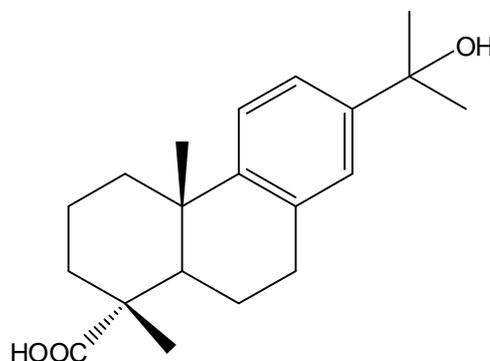


Figure 41. Spectre HMBC du composé A2

L'ensemble des données nous a permis d'établir la structure du composé **A2** comme étant : Acide 15-hydroxydehydroabietique (Cheung et al., 1993), isolé également d'*Abies georgei* et déjà identifié dans la famille Pinaceae dans *Pinus massoniana* (Cheung et al., 1993) et *Larix kaempferi* (Tanaka et al., 1997).



**A2** : Acide 15-hydroxydehydroabietique

**Tableau 16.** Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **A2** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, $J$ (Hz)	N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, $J$ (Hz)
1	38.0	1a : 2.38, d 1b : 1.45, d	11	124.6	7.14, d
2	18.2	2a : 1.85, m 2b : 1.72, m	12	123.6	7.22
3	36.7	3a : 1.85, m 3b : 1.69, m	13	146.2	-
4	47.3	-	14	121.8	7.22
5	45.1	2.19, dd	15	71.3	-
6	21.5	6a : 1.88, m 6b : 1.54, m	16	30.5	1.51, s
7	29.9	2.90, m	17	30.4	1.51, s
8	134.0	-	18	181.1	-
9	147.4	-	19	15.6	1.29, s
10	37.9	-	20	24.1	1.23, s



- Analyse du spectre COSY

Le spectre COSY (Figure 44) du composé **A3** montre les mêmes corrélations que le composé **A1** avec seule différence l'absence de corrélations liées au proton H-7.

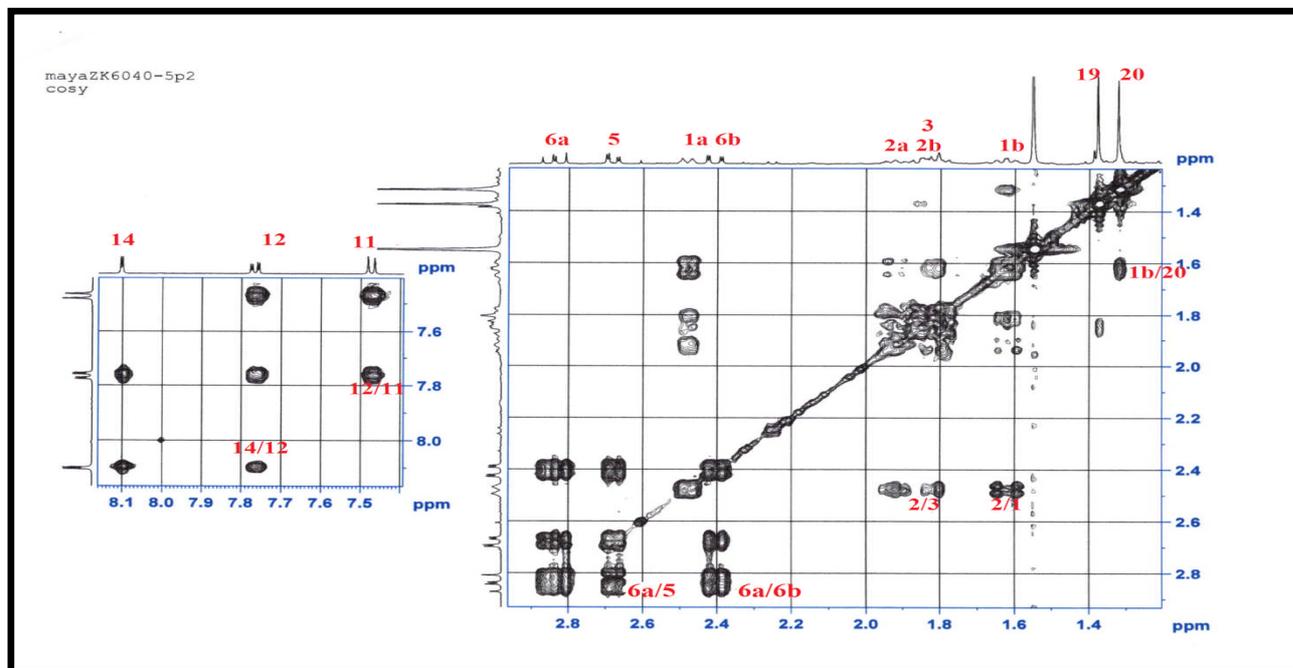


Figure 44. Spectre COSY du composé **A3**

- Analyse du spectre HSQC

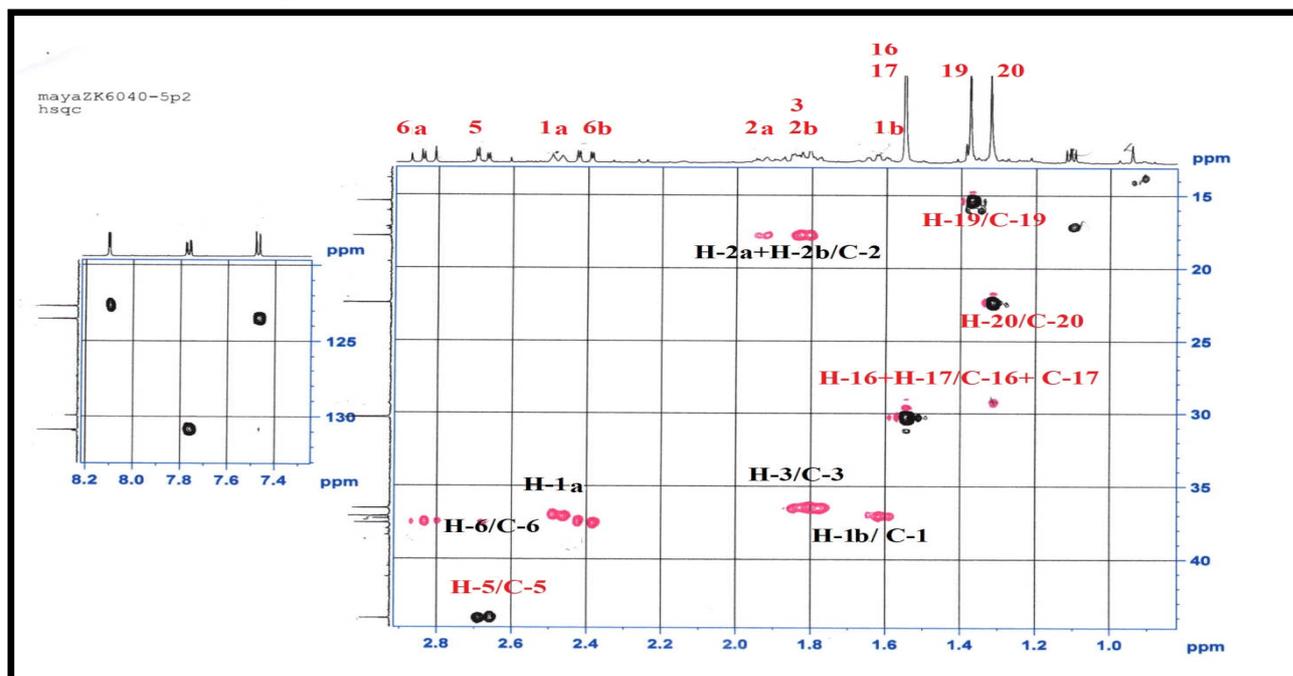


Figure 45. Spectre HSQC du composé **A3**

- Analyse du spectre HMBC

Pour la détermination de la position de la fonction cétone, le spectre HMBC montre les corrélations suivantes (Figures 46-47) :

- Les protons H-6 et H-5 corrélient avec le carbone portant la fonction cétone
- Les protons aromatiques H-11 et H-14 montrent une tache de corrélation avec le carbone à 199.3 ppm.

D'après ces observations, la fonction cétone est localisée en position 7ce qui explique le déblindage des protons H-6.

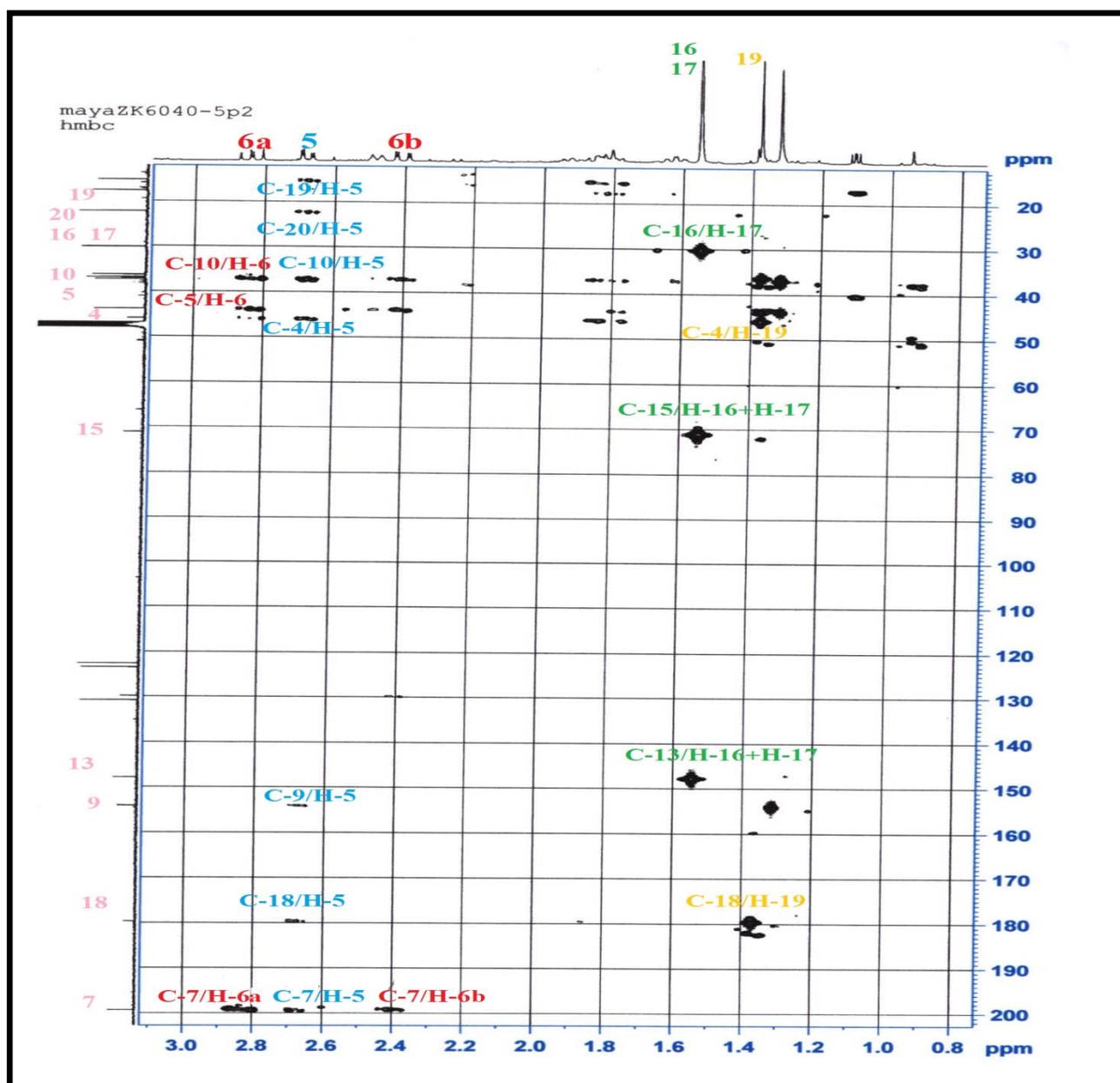


Figure 46. Spectre HMBC de  $\delta_H$  0.8 à 3.1 ppm du composé A3

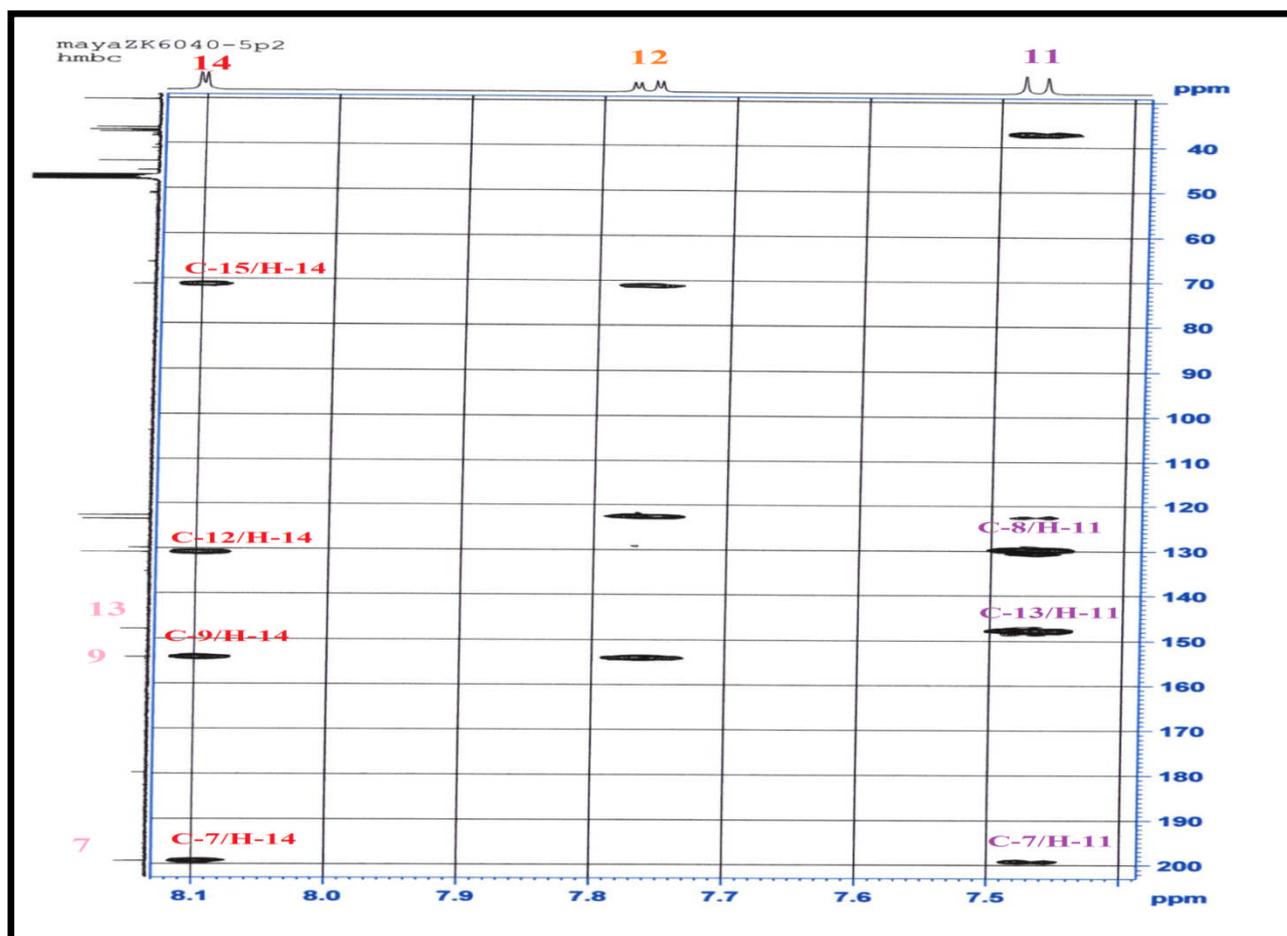
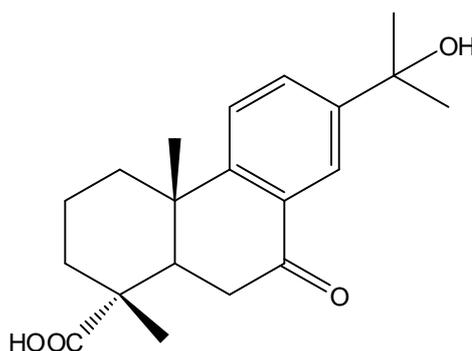


Figure 47. Spectre HMBC de  $\delta_H$  7.4 à 8.1 ppm du composé **A3**

Ainsi la structure du composé **A3** a été établie comme : Acide 15-hydroxy-7-oxo- 8, 11,13-abietatrien-18-oïque (Matsumoto et al., 1988) isolé uniquement d'*Abies georgei* Orr.



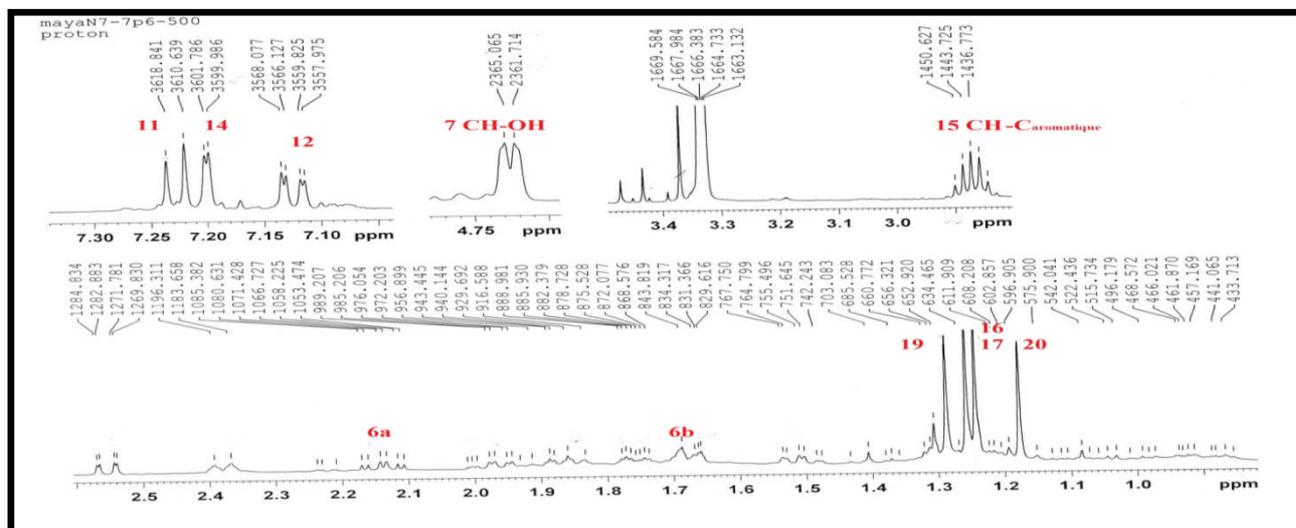
**A3** : Acide 15-hydroxy-7-oxo- 8, 11,13-abietatrien-18-oïque

**Tableau 17.** Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **A3** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

N°	$\delta_{\text{C}} \text{ ppm}$	$\delta_{\text{H}} \text{ ppm, Mult, J (Hz)}$	N°	$\delta_{\text{C}} \text{ ppm}$	$\delta_{\text{H}} \text{ ppm, Mult, J (Hz)}$
1	37.1	1a : 2.48, d, 13.0 1b : 1.62, td, 12.9; 2.1	11	123.5	7.48, d
2	17.8	2a : 1.95, m 2b : 1.82, m	12	130.9	7.76, dd, 8.2; 2.2
3	36.5	3a : 1.83 3b : 1.79	13	147.9	-
4	46.1	-	14	122.7	8.10, d, 2.1
5	44.1	2.68, dd, 14.2; 3.1	15	71.2	-
6	37.5	6a : 2.84, dd, 17.7; 3.5 6b : 2.41, dd, 17.7; 3.1	16	30.3	1.56, s
7	199.3	-	17	30.3	1.56, s
8	129.9	-	18	179.7	-
9	154.1	-	19	15.4	1.37, s
10	37.5	-	20	22.4	1.32, s

#### 1.1.4. Identification du composé **A4**

Pour l'identification du composé **A4**, les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 48) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 49) ont été comparés à ceux du produit **A1** (Figures 26-27) qui sont très proches avec un septuplet en plus à  $\delta_{\text{H}}$  2.97/ $\delta_{\text{C}}$  33.5 et l'absence du signal correspondant au carbone quaternaire C-15 à  $\delta_{\text{C}}$  71.39 ppm pour le produit **A4**.

**Figure 48.** Spectre  $^1\text{H}$  du composé **A4**

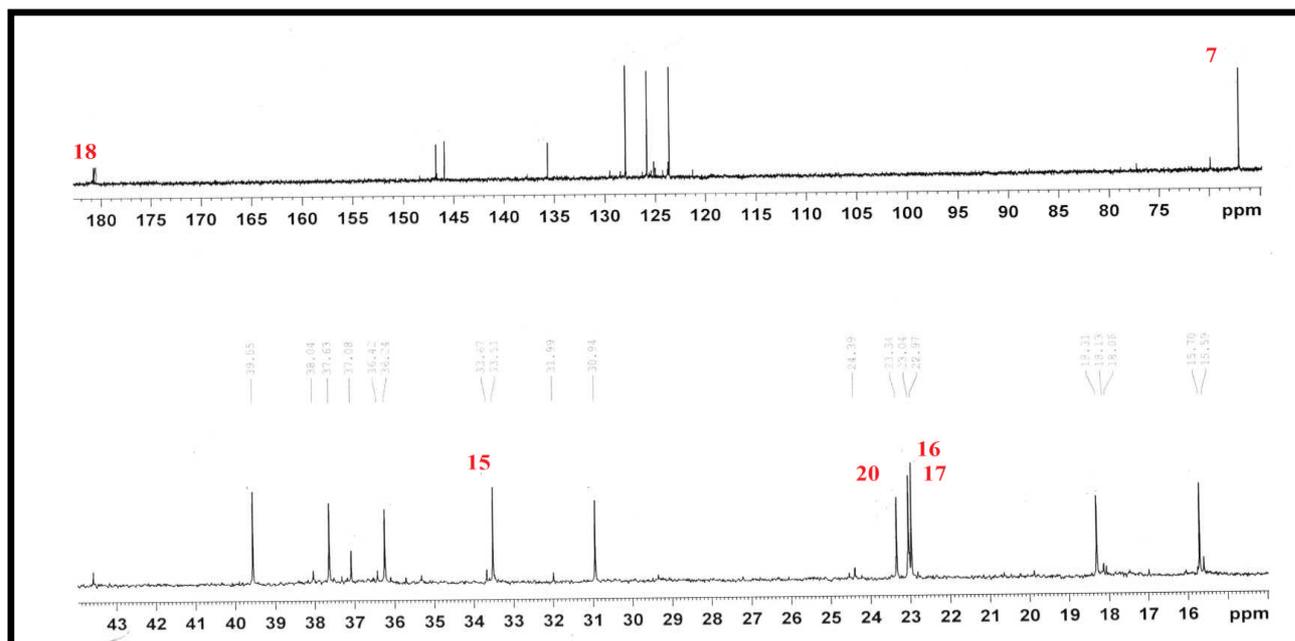


Figure 49. Spectre  $^{13}\text{C}$  du composé A4

- Analyse du spectre COSY

En plus des corrélations observées précédemment sur le spectre COSY (Figure 28) du composé A1. L'analyse COSY du produit A4 (Figure 50) permet de mettre en évidence la corrélation entre les protons H-16 et H-17 avec le signal déblindé apparu sur le spectre  $^1\text{H}$  indiquant qu'il s'agit du proton H-15.

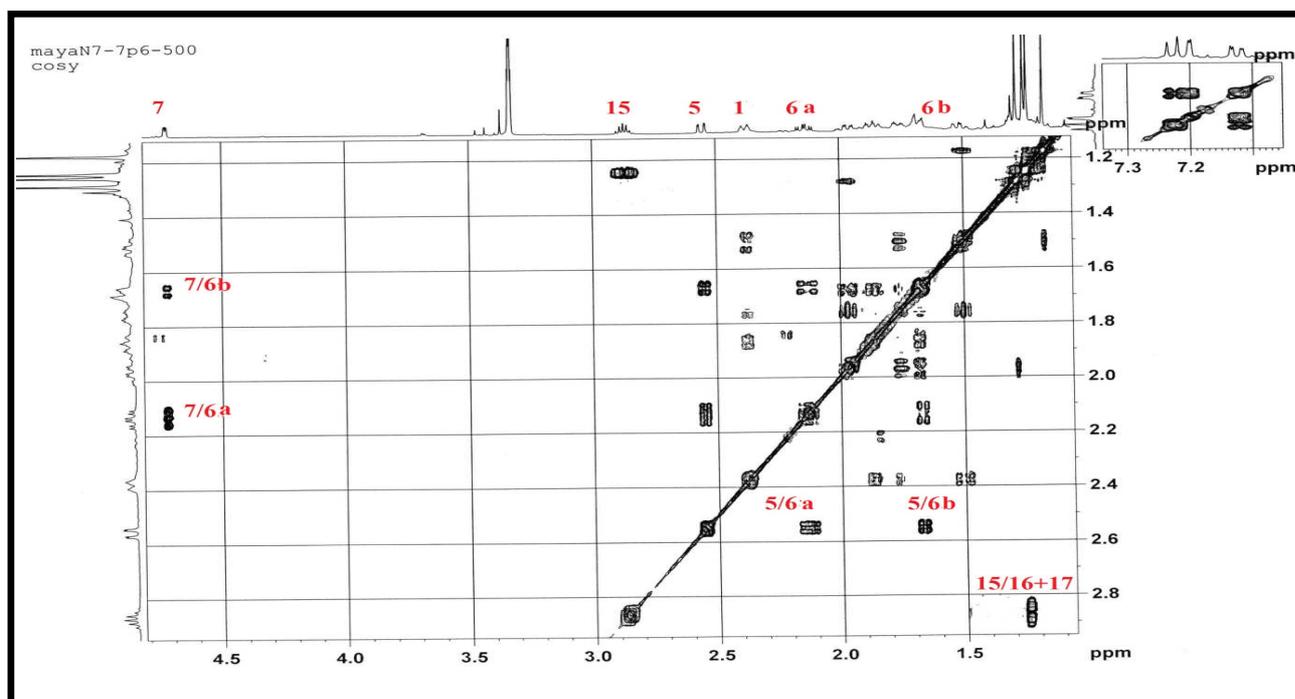
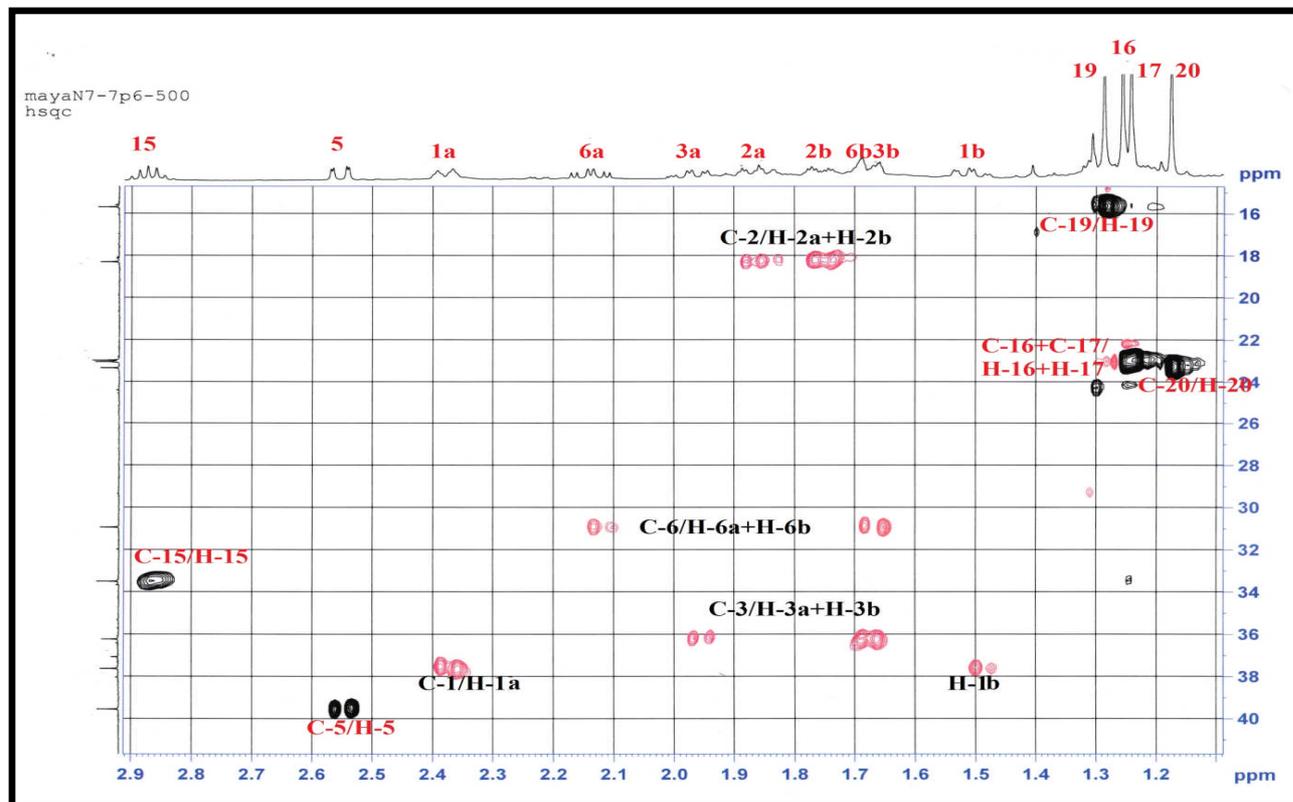


Figure 50. Spectre COSY du composé A4

- **Analyse du spectre HSQC *J*-modulé:**

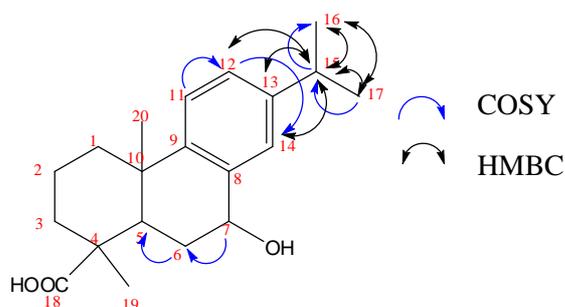
L'analyse du spectre HSQC (Figure 51) permet l'attribution du déplacement chimique du carbone portant le proton à  $\delta_H$  2.97 ppm avec sa corrélation au signal  $\delta_C$  33.5 ppm et qui correspond à un CH en position 15.



**Figure51.** Spectre HSQC du composé **A4**

- **Analyse du spectre HMBC :**

L'analyse du spectre HMBC (Figure 53) du produit **4** confirme la localisation du proton H-15 avec sa corrélation aux carbones méthyliques C-16 et C-17 ainsi que les carbones aromatiques C-12, C-13 et C-14 ce qui explique son déplacement chimique déblindé.



**Figure52.** Corrélations COSY et HMBC du composé **A4**

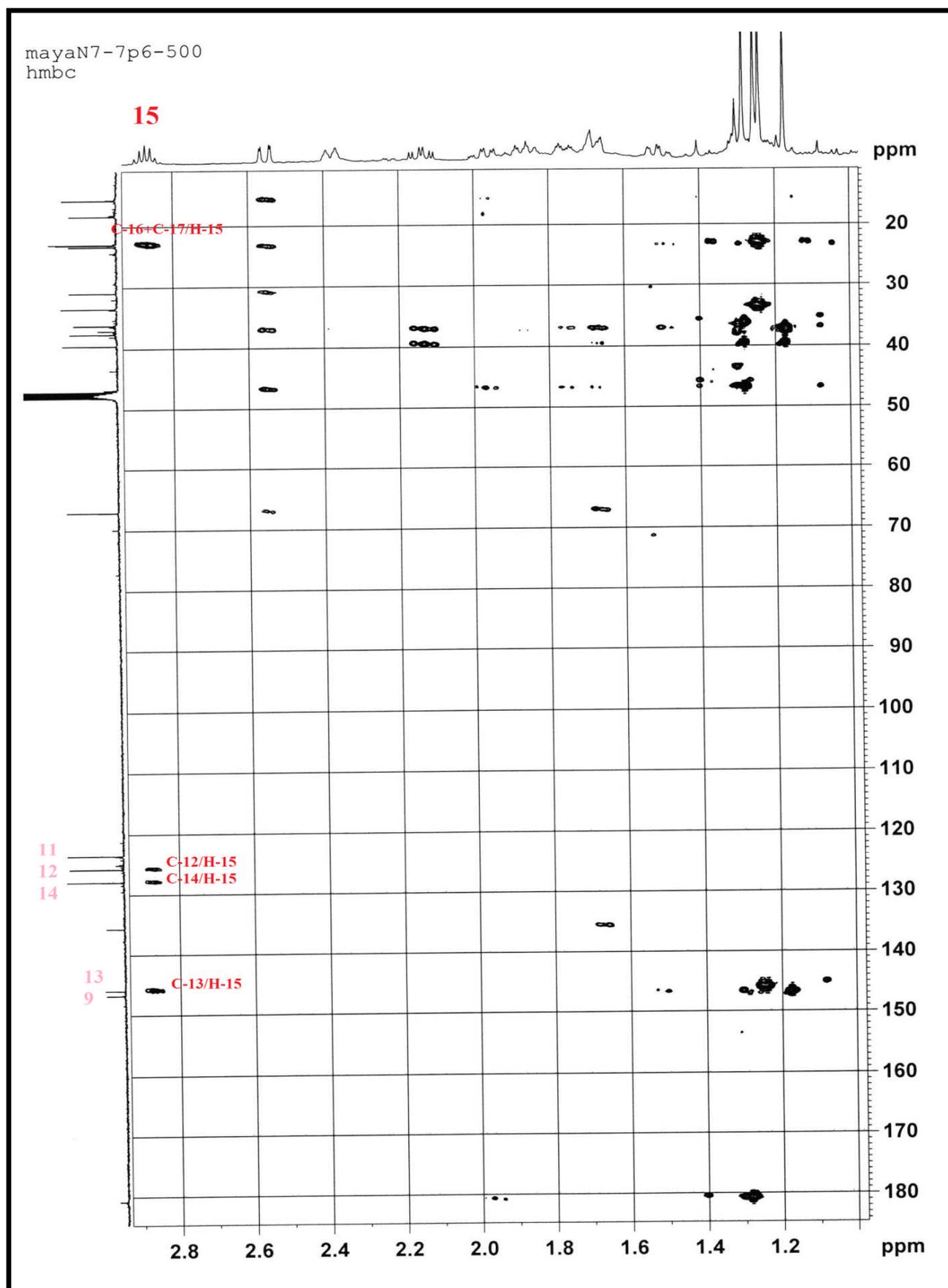
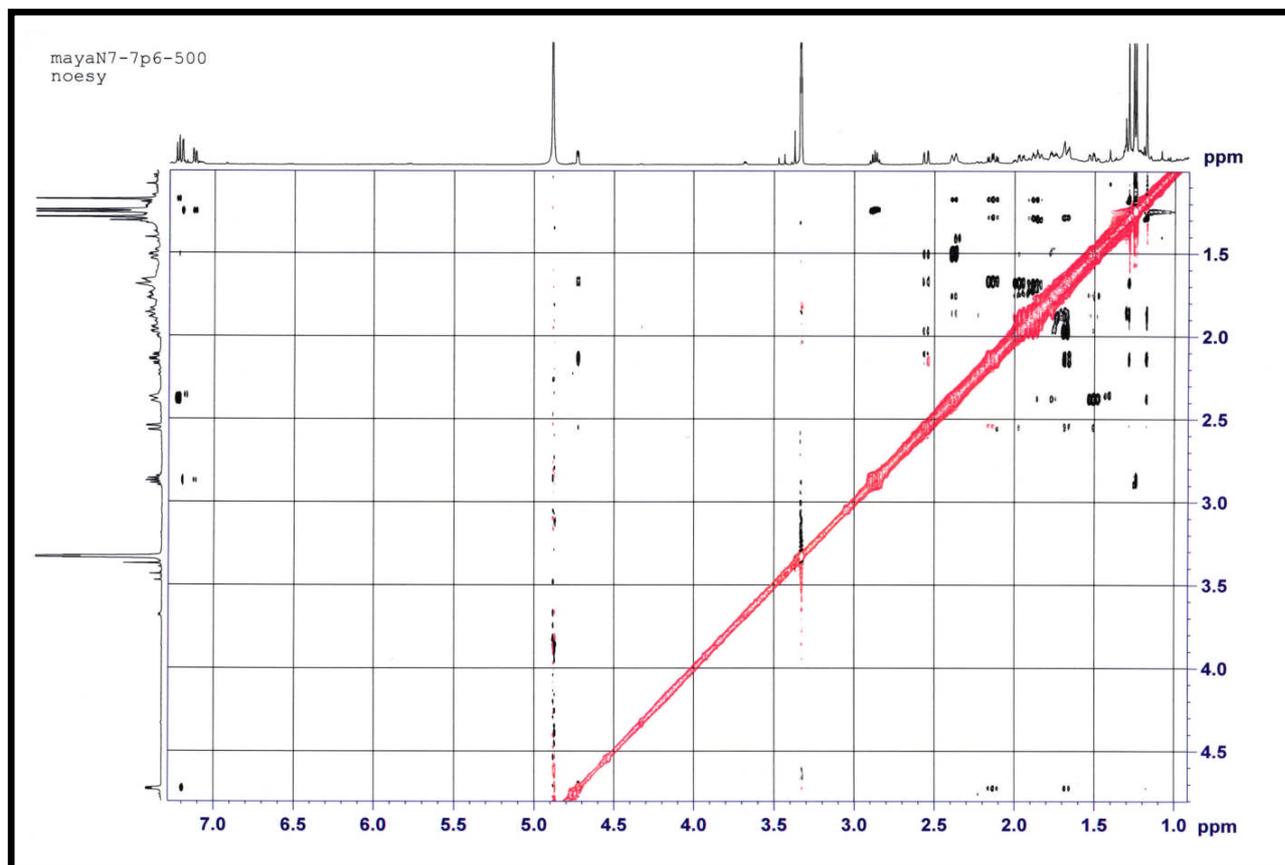


Figure 53. Spectre HMBC du composé A4

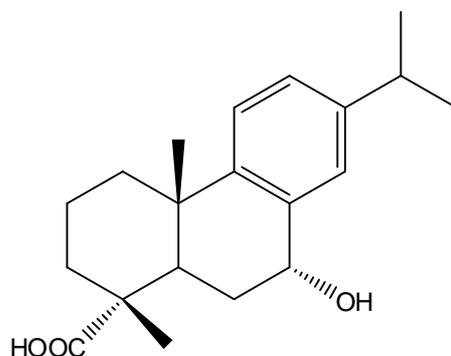
- **Analyse du spectre NOESY**

Le spectre NOESY (Figure 54) montre les memes corrélations que le composé **A1** (Figure 30)



**Figure 54.** Spectre NOESY du composé **A4**

La structure du composé **A4** a pu être établie comme : Acide 7 $\alpha$ -hydroxydehydroabietique (Miguel Del Corral et al., 1994) isolé d'*Abies gerogeii*, *Abies nukiangensis* (Li et al., 2014) *Larixkaempferi* (Tanak et al., 1997) et de l'espèce *Callicarpa kwangtungensis* de la famille Verbenaceae (Xu et al., 2016).



**A4** : Acide 7 $\alpha$ -hydroxydehydroabietique

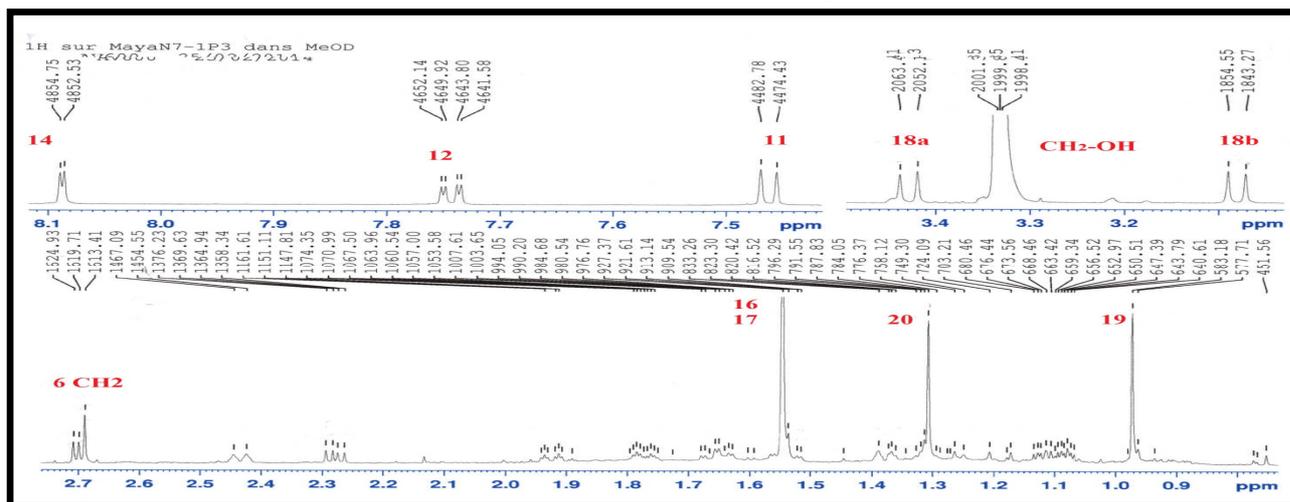
**Tableau 18.** Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **A4** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, J (Hz)	N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, J (Hz)
1	37.6	1a : 2.38, d, 12.6 1b : 1.52, dd, 13.1 ; 3.7	11	123.6	7.22, d, 8.2
2	18.3	2a : 1.87, dd, 13.7 ; 3.3 2b : 1.76, dt, 13.8 ; 3.0	12	125.8	7.13, dd, 8.2; 1.9
3	36.2	3a : 1.95, dd, 13.1; 4.0 3b : 1.67, dd, 4.7; 1.7	13	145.9	-
4	37.1	-	14	127.9	7.21, d, 1.8
5	39.5	2.55, dd, 13.0; 1.95	15	33.5	2.97, m
6	30.9	6a : 2.14, td, 13.9; 4.7 6b : 1.69, m	16	23.7	1.27, s
7	67.1	4.72, d, 3.3	17	22.9	1.25, s
8	135.7	-	18	180.8	-
9	146.8	-	19	15.7	1.29, s
10	37.6	-	20	23.3	1.18, s

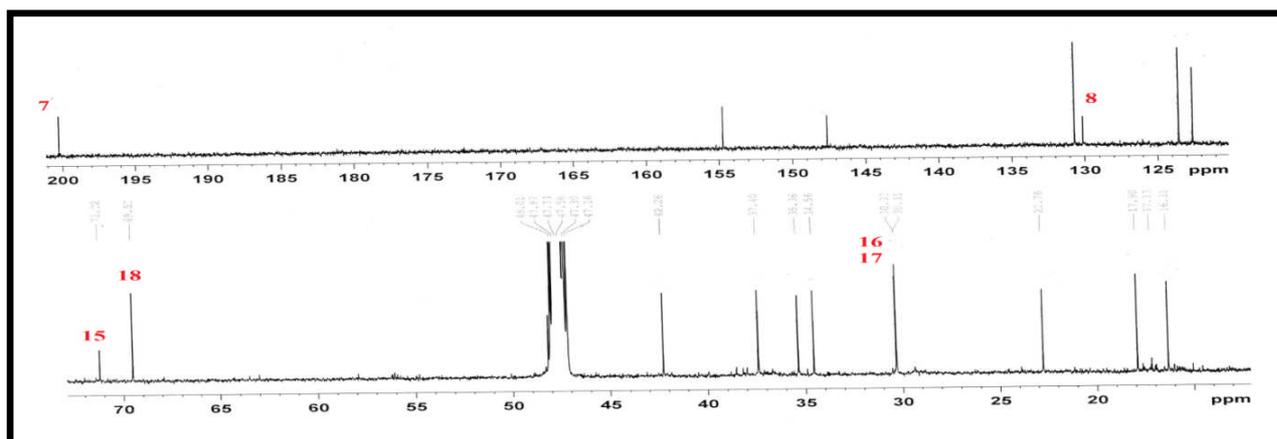
**1.1.5. Identification du composé A5 :**

La détermination structurale du composé **A5** a été basée sur la comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 55) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 57) avec ceux du composé **A3**.

- Sur le spectre RMN proton du composé **A5** (Figure 55) on note la présence de deux doublet à  $\delta_{\text{H}}$  3.43- 3.08 ppm en plus des signaux similaires déjà identifiés sur le spectre  $^1\text{H}$  du composé **A3** (Figure 42).

Figure 55. Spectre  $^1\text{H}$  du composé **A5**

- Une comparaison avec le spectre  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure 43) du composé **A3** décrit précédemment montre l'absence du pic caractéristique du carbonyle  $\delta_{\text{C}}$  179.7 ppm (C-18) et l'apparition d'un pic à  $\delta_{\text{C}}$  69.5 ppm indiquant la présence d'un  $\text{CH}_2\text{-OH}$ .

Figure 56. Spectre  $^{13}\text{C}$  du composé **A5**

- **Analyse du spectre COSY :**

Le spectre COSY du produit **A5** (Figure 57) montre les mêmes corrélations observées sur le spectre COSY du composé **A3** (Figure 45) avec en plus une tache de corrélation entre les deux protons (H-18a et H-18b) du méthylène à  $\delta_{\text{H}}$  3.43 et 3.08 ppm ce qui nous laisse supposer qu'il est attaché à un carbone quaternaire.

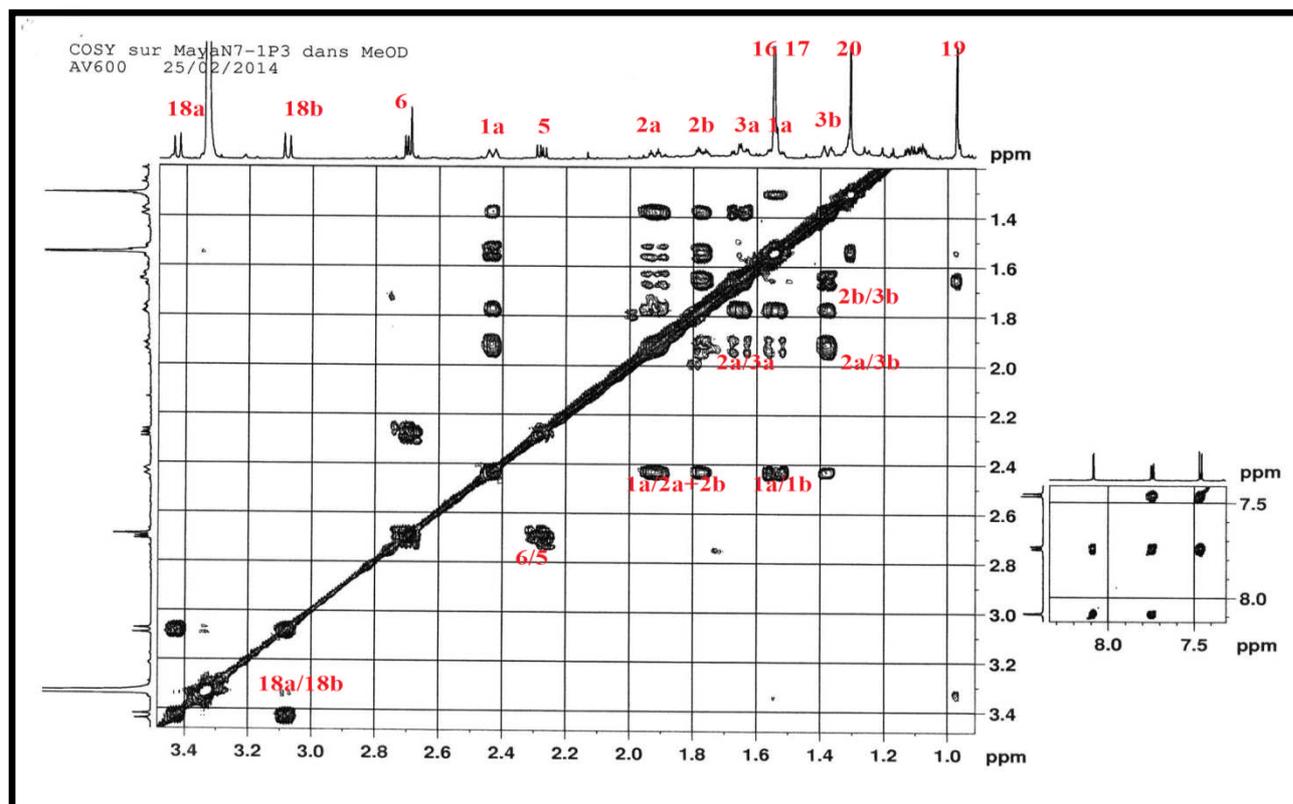


Figure 57. Spectre COSY du composé A5

- Analyse du spectre HSQC :

Par le spectre HSQC (Figure 58) on détermine le déplacement chimique du proton H-18 ( $\delta_H$  3.34-3.08ppm /  $\delta_C$  69.5 ppm)

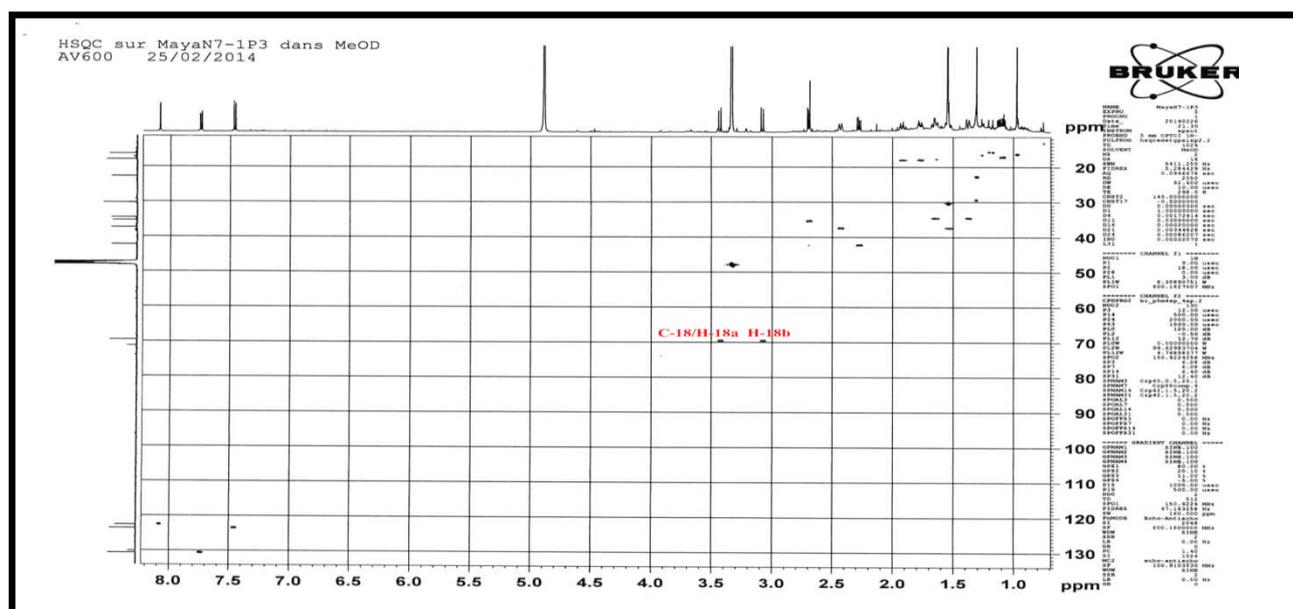
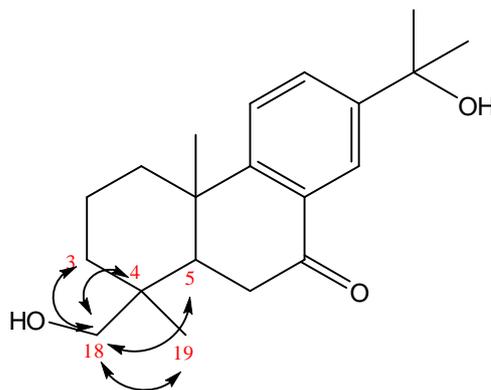


Figure 58. Spectre HSQC du composé A5

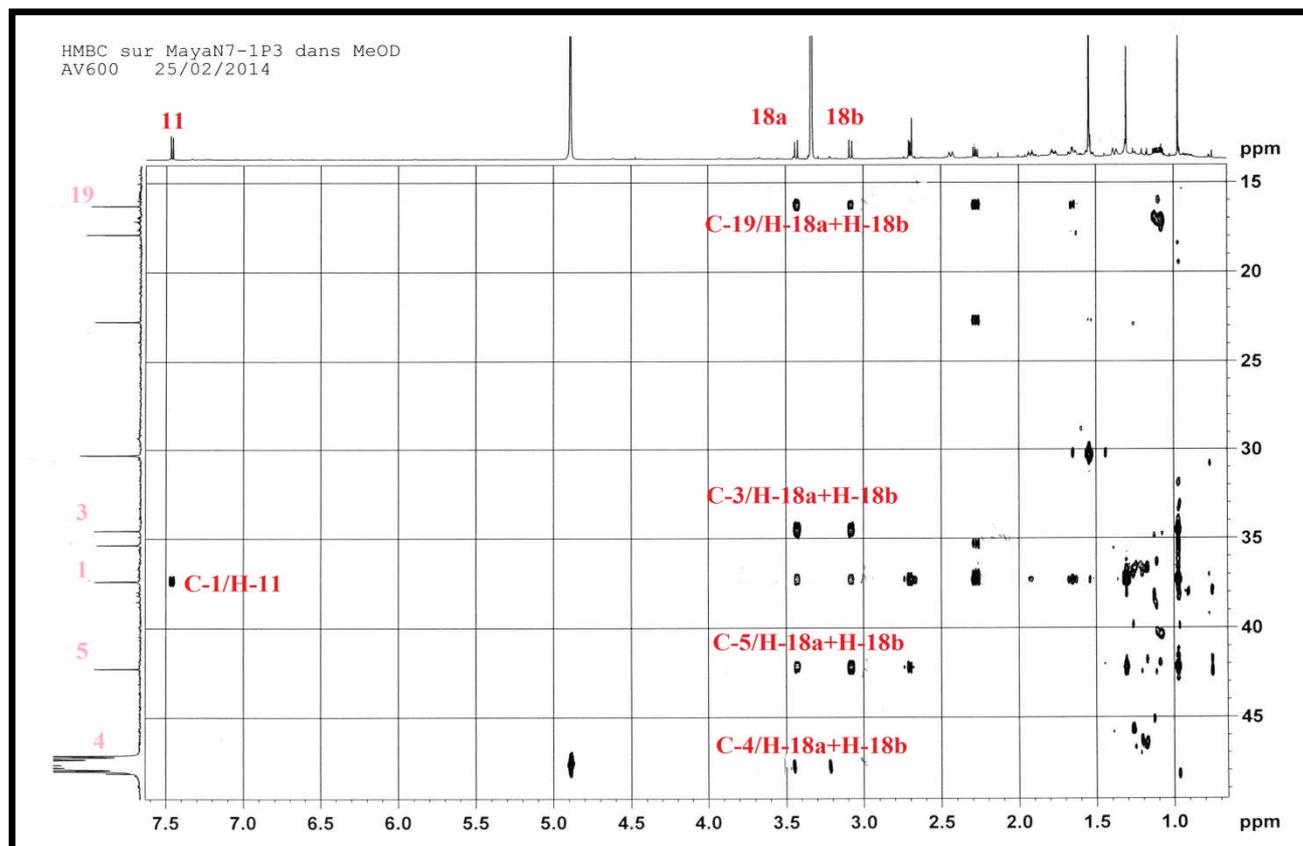
- **Analyse du spectre HMBC :**

La corrélation  $^3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC (Figure 60)

- Les protons  $CH_2$  résonnant à  $\delta_H$  3.43 – 3.08ppm corrélient avec les carbones C-4  $\delta_C$  47.9 ppm, C-19 à  $\delta_C$  16.3ppm, C-5 à  $\delta_C$  42.3 ppm et avec C-3 à  $\delta_C$  34.6 ppm. Ceci indique que le  $CH_2-OH$  est attaché à la génine en position 4.

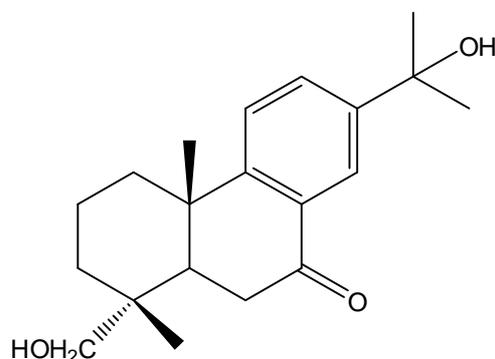


**Figure 59.** Corrélation HMBC du composé A5



**Figure 60.** Spectre HMBC du composé A5

L'ensemble des données précédentes nous permet d'établir la structure du composé **A5** comme : 7-oxodehydroabietinol (Tannaka et al., 1997) isolé de *Cedrus atlantica* (Barreo et al., 2005) et d'*Abies nukiangensis* (Li et al., 2014).



**A5** : 7-oxodehydroabietinol

**Tableau 19.** Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé **A5** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, J (Hz)	N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, J (Hz)
1	37.4	1a : 2.43, d, 12.5 1b : 1.52, d, 3.6	11	123.5	7.46, d, 8.3
2	17.9	2a : 1.93, dd, 13.8; 3.3 2b : 1.77, dquad, 10.4; 3.4	12	130.7	7.74, dd, 8.3; 2.2
3	34.6	3a : 1.65, dd, 13.6; 4.9 3b : 1.38, dt, 12.8; 3.1	13	147.6	-
4	47.8	-	14	122.6	8.09, d, 2.2
5	42.3	2.28, dd, 11.3; 6.6	15	71.2	-
6	35.4	2.7, dd, 11.5; 5.2	16	30.3	1.54, s
7	200.2	-	17	30.3	1.54, s
8	130.1	-	18	69.5	18a : 3.43, d, 11.3 18b : 3.08, d, 11.3
9	154.7	-	19	16.3	0.97, s
10	37.4	-	20	22.8	1.31, s

### 1.1.6. Identification du composé **A6** :

Les spectres  $^1\text{H}$  (Figure 61) et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure 62) révèlent la présence de 28 protons et 21 carbones. Une comparaison avec les spectres  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé

**A1** (Figures 26-27) décrit précédemment met en avant la présence d'un singulet à  $\delta_H$  3.07 /  $\delta_C$  49.5 ppm correspondant à un groupement méthoxyle (O-CH<sub>3</sub>).

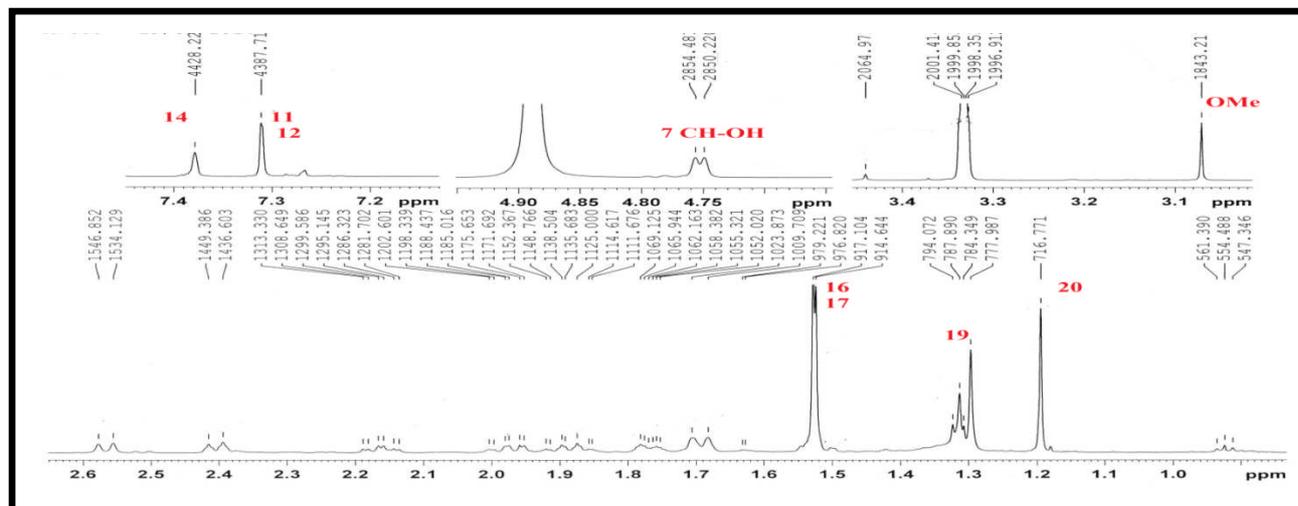


Figure 61. Spectre <sup>1</sup>H du composé **A6**

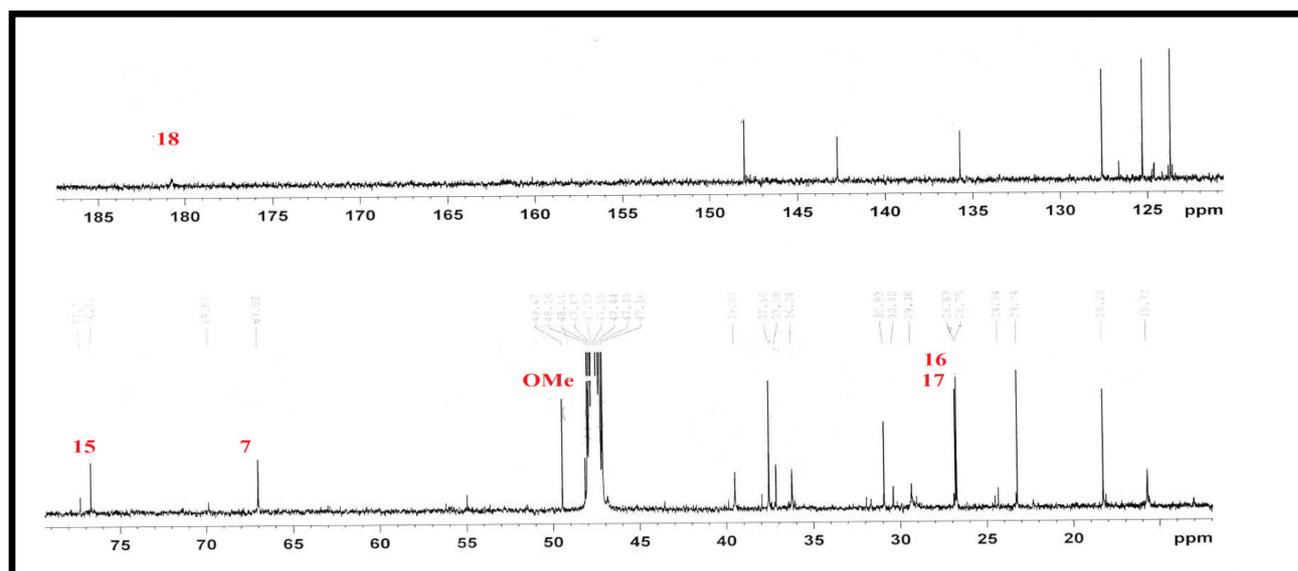


Figure 62. Spectre <sup>13</sup>C du composé **A6**

- **Analyse du spectre COSY :**

Le spectre COSY du composé **A6** (Figure 63) montre les mêmes corrélations observées sur le spectre COSY du composé **A1** (Figure 28) avec l'absence de corrélation du singulet à  $\delta_H$  3.07 /  $\delta_C$  49.5 ppm, ce qui nous indique qu'il peut être attaché un carbone quaternaire.

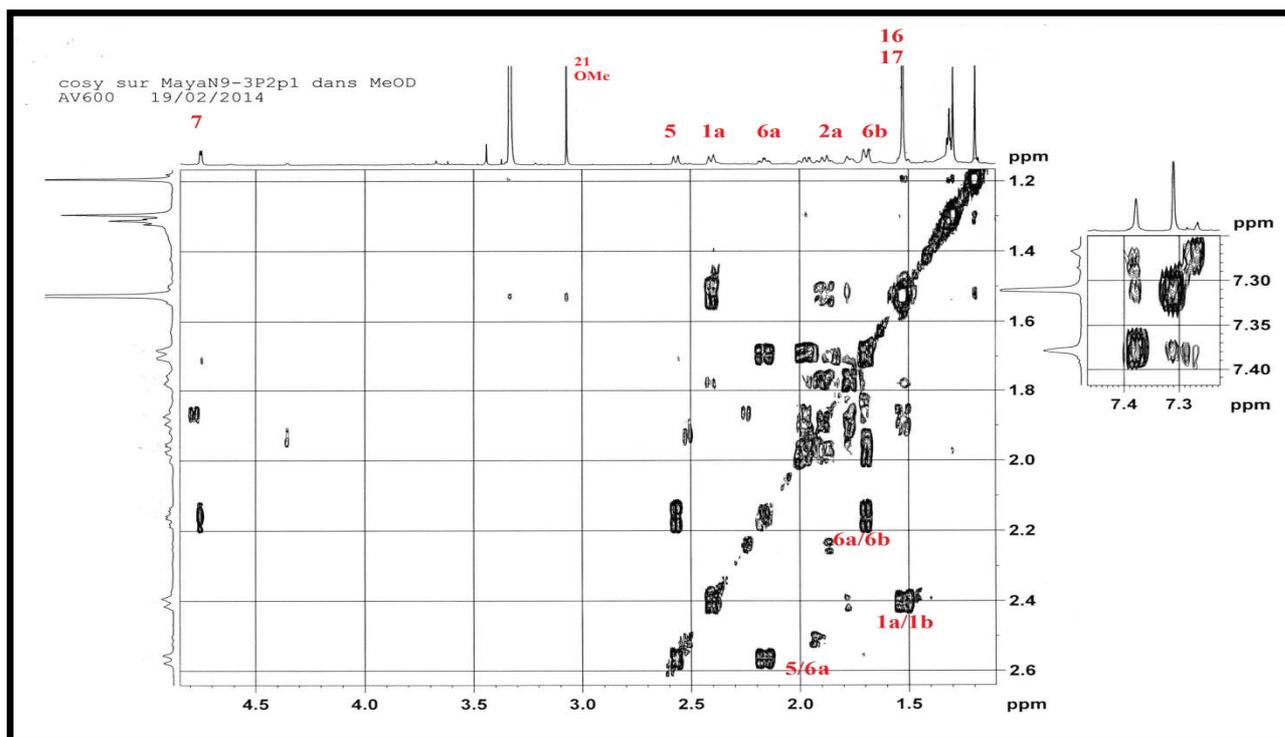


Figure 63. Spectre COSY du composé A6

- Analyse du spectre HSQC :

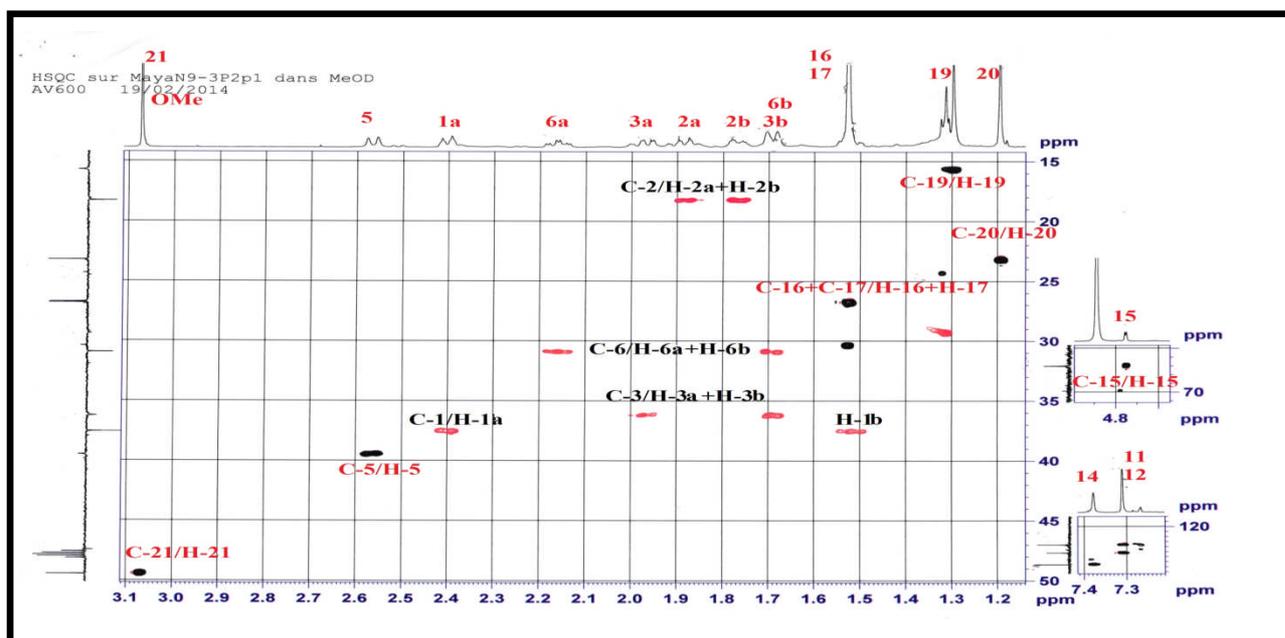
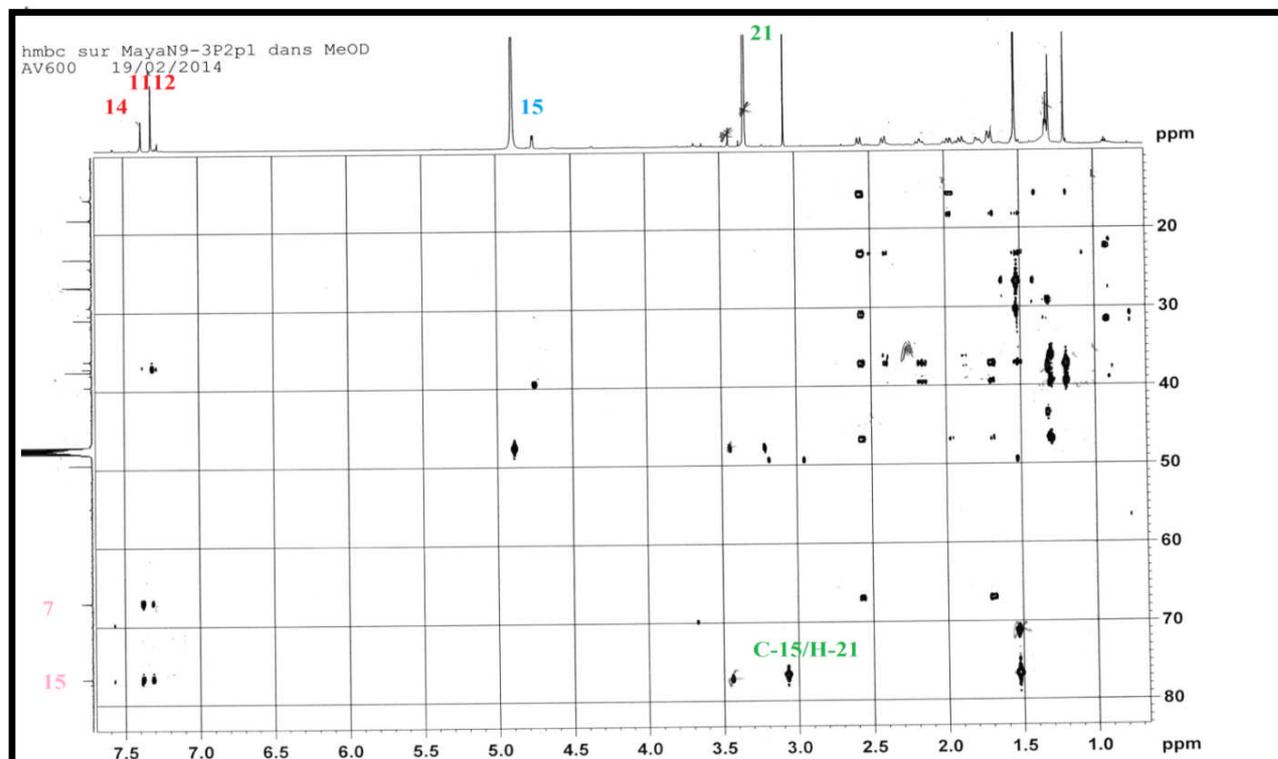


Figure 64. Spectre HSQC du composé A6

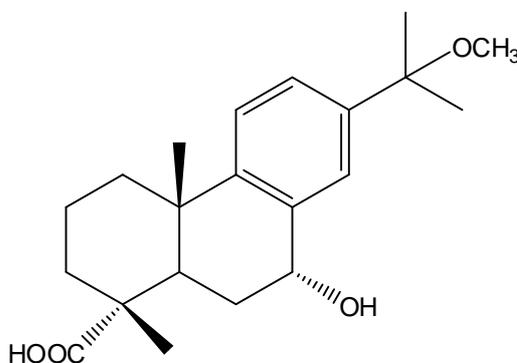
- **Analyse du spectre HMBC**

La corrélation en  $^3J_{H-C}$  observée sur le spectre HMBC (Figure 65) entre le proton du groupement méthoxyle et le carbone C-15 ( $\delta_c$  77.3 ppm) de la génine, montre que ce méthoxyle est porté par le carbone quaternaire C-15.



**Figure 65.** Spectre HMBC du composé **A6**

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé **A6** : Acide  $7\alpha$ -hydroxy-15-méthoxy-dehydroabietiquenommé Abiesadine O isolé pour la première fois d'*Abies georgeii* Orr (Yan et al., 2010). Les déplacements chimiques du composé **A6** sont répertoriés dans le tableau 20.



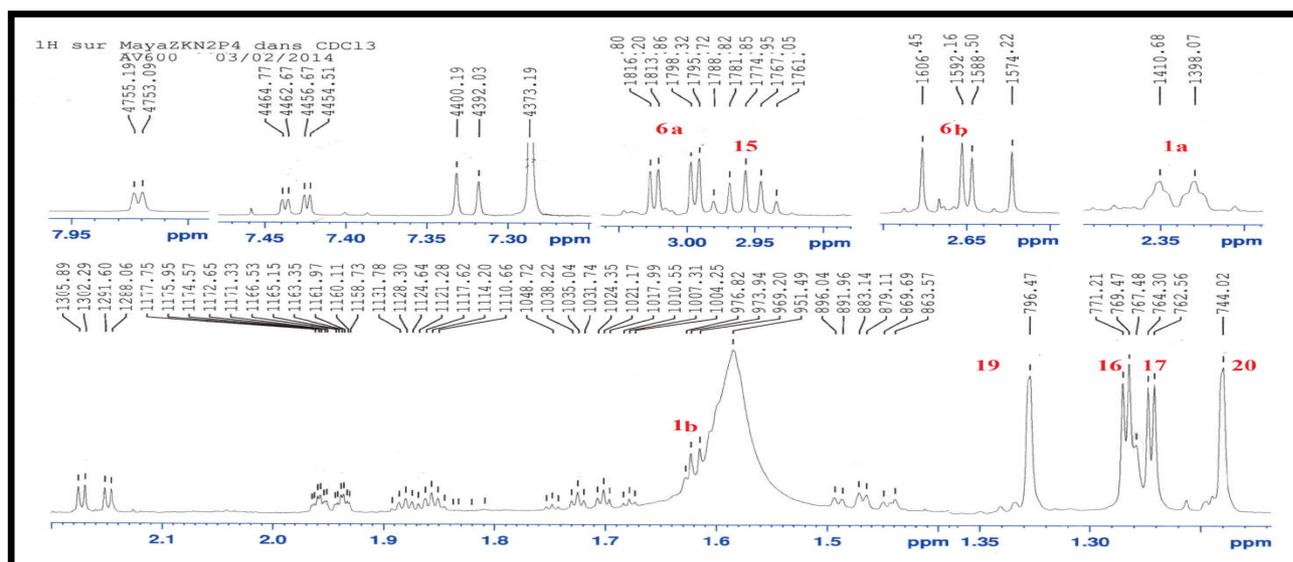
**A6** : Abiesadine O

**Tableau 20.** Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé **A6** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, J (Hz)	N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, J (Hz)
1	37.6	1a : 2.36, d, 12.5 1b : 1.51, dd, 13.1 ; 3.7	12	125.7	7.36, dd, 8.3; 2.2
2	18.3	2a : 1.85, m 2b : 1.76, dquad, 10.7; 3.2	13	142.7	-
3	36.2	3a : 1.94, dd, 13.0; 3.8 3b : 1.64, d, 12.2	14	127.6	7.45, d, 2.2
4	43.4	-	15	77.3	-
5	39.5	2.51, dd, 13.1; 1.7	16	26.8	1.54, s
6	30.9	6a : 2.14, td, 13.5; 5.0 6b : 1.75, d, 15.5	17	26.8	1.53, s
7	67.0	4.71, d, 4.7	18	180.9	-
8	135.7	-	19	15.7	1.26, s
9	148.0	-	20	13.2	1.16, s
10	37.2	-	21	49.5	3.07, s
11	123.81	7.26, d, 8.40	-	-	-

**1.1.7. Identification du composé A7 :**

Le spectre  $^1\text{H}$  (Figure 66) du produit **A7** montre certaines similitudes avec ceux du produit **A4** (Figure 48). En effet la présence des signaux caractéristiques aux protons aromatiques entre  $\delta_{\text{H}}$  7.33 et 7.92 ppm, les méthyles sous forme de doublets entre  $\delta_{\text{H}}$  1.24 et 1.33 ppm attribuables aux protons H-16, H-17 et H-19 et H-20 et le signal sous forme de septuplet à  $\delta_{\text{H}}$  2.95 ppm attribuable à H-15. Cependant l'absence du proton H-7 à  $\delta_{\text{H}}$  4.72 ppm et le déblindage des signaux à  $\delta_{\text{H}}$  3.02-2.65 ppm pour les H<sub>2</sub>-6 suggère l'oxydation du carbone C-7.

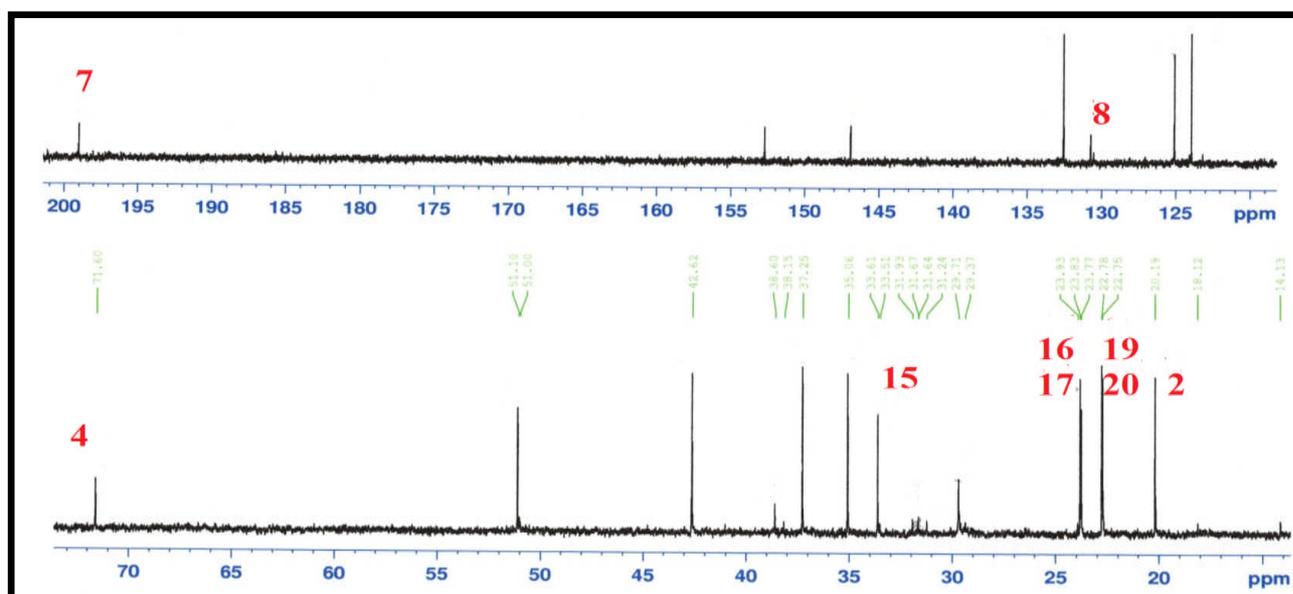
Figure 66. Spectre<sup>1</sup>H du composé A7

Cette hypothèse est confirmée par l'analyse du spectre <sup>13</sup>C- modulé (Figure 67) avec

- l'apparition d'un pic à  $\delta_C$  200 ppm attribuable à une fonction cétone (C-7)
- disparition du pic à  $\delta_C$  180.8 ppm caractéristique de la fonction acide.

En plus de

- l'apparition d'un pic à 71.6 ppm attribuable à un carbone quaternaire oxygéné (C-4)

Figure 67. Spectre <sup>13</sup>C du composé A7

- analyse du spectre COSY :

Le spectre COSY du composé A7 est semblable à celui du composé A4 (Figure 50) avec l'absence de corrélation du proton H-7 comme seule différence.

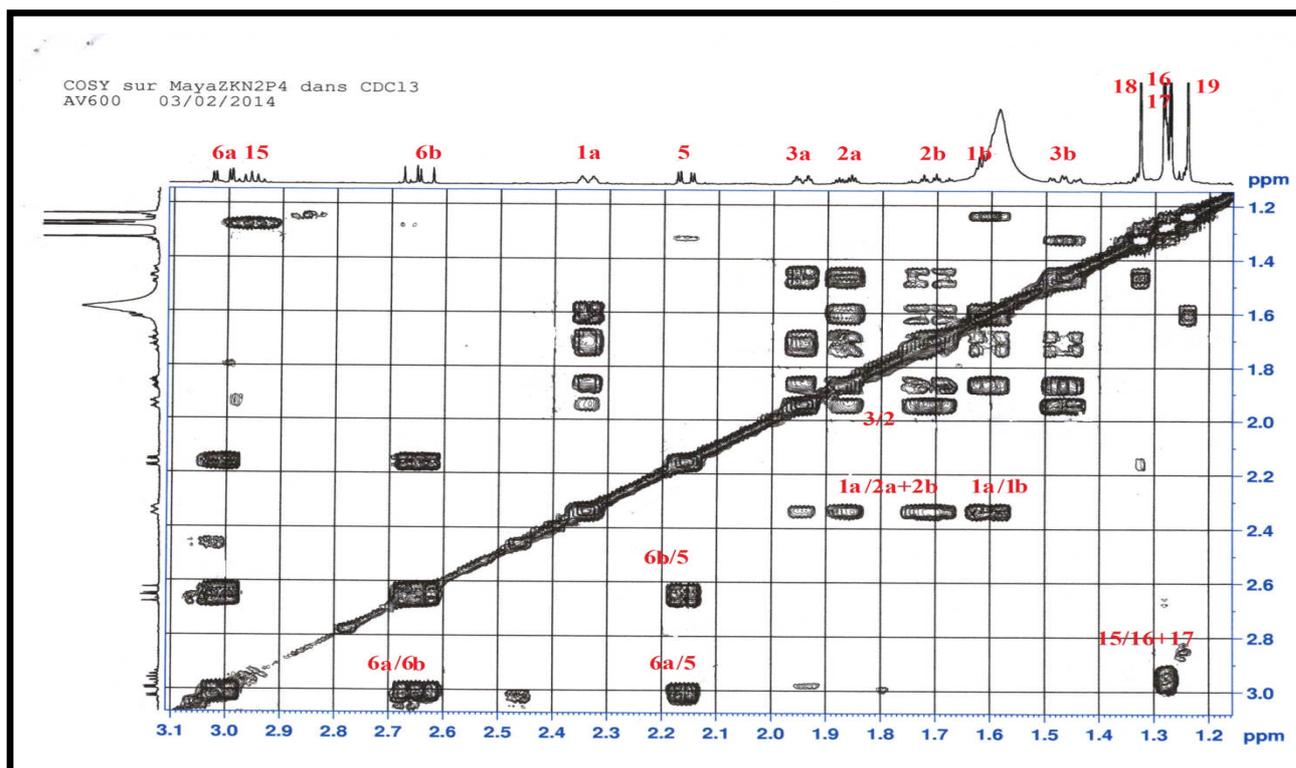


Figure 68. Spectre COSY du composé A7

- analyse du spectre HSQC :

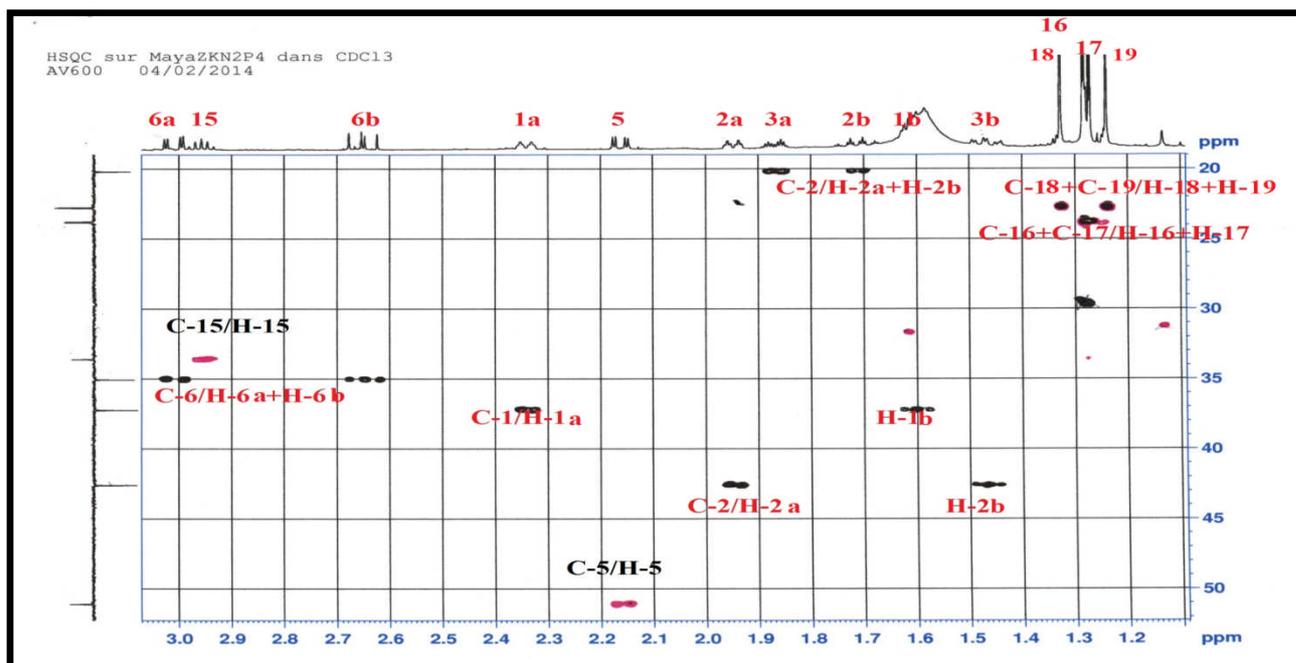


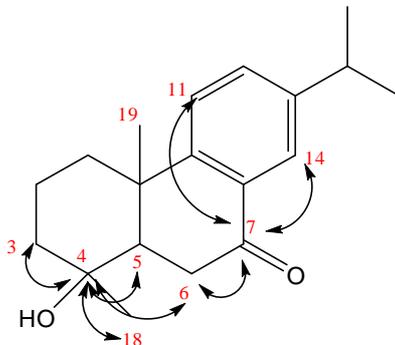
Figure 69. Spectre HSQC du composé A7

- Analyse du spectre HMBC :

En plus des corrélations notées sur le produits A4, par l'analyse HMBC (Figure 53), la fonction cétone est localisée et confirmée sur le carbone C-7 par l'observation des taches de

corrélation avec les protons H-5, H-6 et avec les protons aromatiques H-11 et H-14 sur le spectre HMBC du composé **A7** (Figure 71-72).

On note également une corrélation entre les protons H<sub>2</sub>-3, H-5, H<sub>2</sub>-6 et H<sub>3</sub>-19 avec le carbone quaternaire observé à  $\delta_C$  71.6 ppm ce qui nous indique qu'il s'agit du carbone oxygéné C-4.



**Figure 70.** Corrélations HMBC du composé **A7**

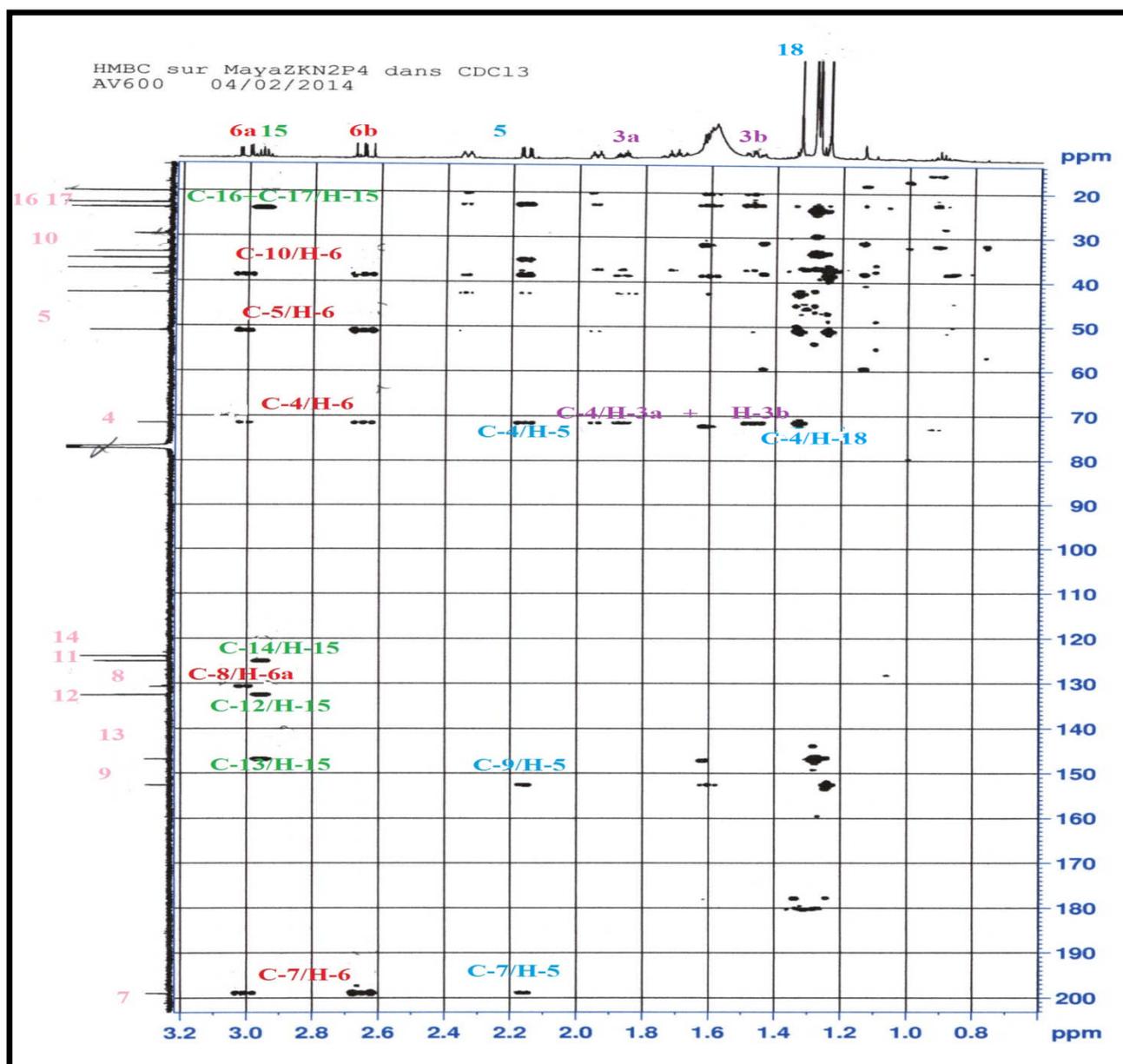


Figure 71. Spectre HMBC de  $\delta_H$  0.6 à 3.2 ppm du composé A7

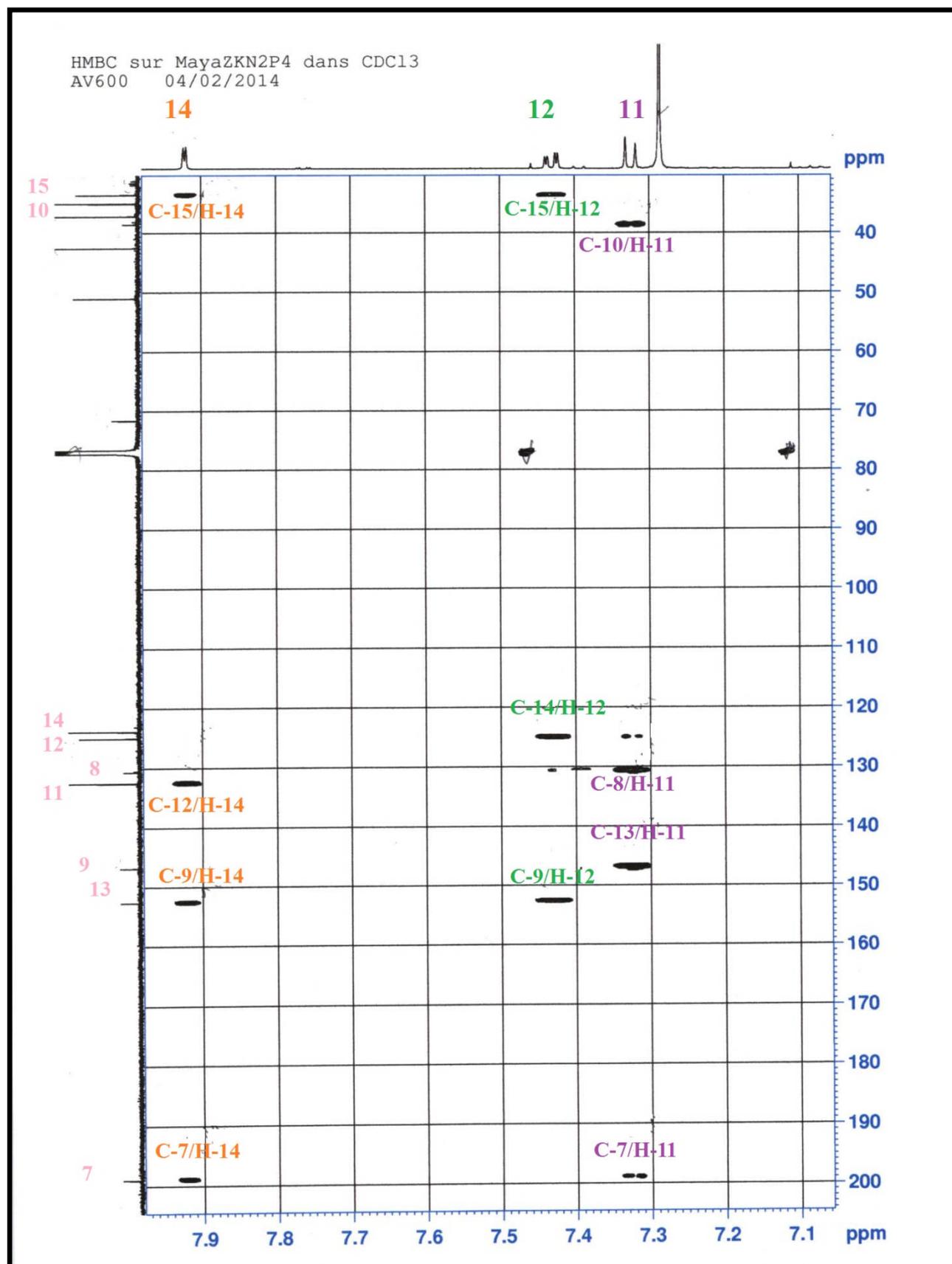
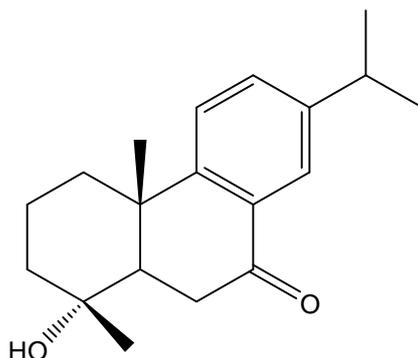


Figure 72. Spectre HMBC de  $\delta_H$  7.1 à 8.0 ppm du composé A7

Le composé **A7** est donc identifié : 4-hydroxy-18-nor-8,11, 13-abietatriene-7-one (Lee et al., 1995)



**A7**: 4-hydroxy-18-nor-8,11, 13-abietatriene-7-one

**Tableau21.**Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé **A7** dans le  $\text{CDCl}_3$

N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, $J$ (Hz)	N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, $J$ (Hz)
1	37.2	1a : 2.34, d, 2.6 1b : 1.62, m	11	123.9	7.33, d, 8.1
2	20.2	2a : 1.87, dquad, 14.1; 3.5 2b : 1.72, qt, 10.4; 3.2	12	132.5	7.43, dd, 8.2; 2.2
3	42.6	3a : 1.96, ddt, 10.68; 2.8 3b : 1.48, td, 12.4; 4.0	13	146.9	-
4	71.6	-	14	125.1	7.92, d, 2.1
5	51.1	2.16, dd, 14.3; 3.6	15	33.6	2.95, m
6	35.1	6a: 3.02, dd, 17.9; 3.6 6b: 2.65, dd, 14.3; 4.7	16	23.8	1.28, d, 1.64
7	199.0	-	17	23.8	1.27, d, 1.74
8	130.7	-	18	-	-
9	152.7	-	19	22.8	1.33, s
10	38.6	-	20	22.8	1.24, s

### 1.1.8. Identification du composé **A8**

L'analyse du spectre  $^1\text{H}$  (Figure 73) du composé **A8** montre certaines similitudes avec les spectres des produits déjà identifiés tel qu'il a été décrit précédemment avec les signaux des quatre méthyles entre  $\delta_{\text{H}}$  0.89 et 1.28 ppm, les signaux des CH,  $\text{CH}_2$  entre  $\delta_{\text{H}}$  1.24 et 2.45

ppm. Cependant, la différence est notée par l'absence des signaux aromatiques et la présence d'un triplet à  $\delta_H$  6.71 ppm attribuable à un proton éthylenique (H-14,  $J = 2.4$  MHz).

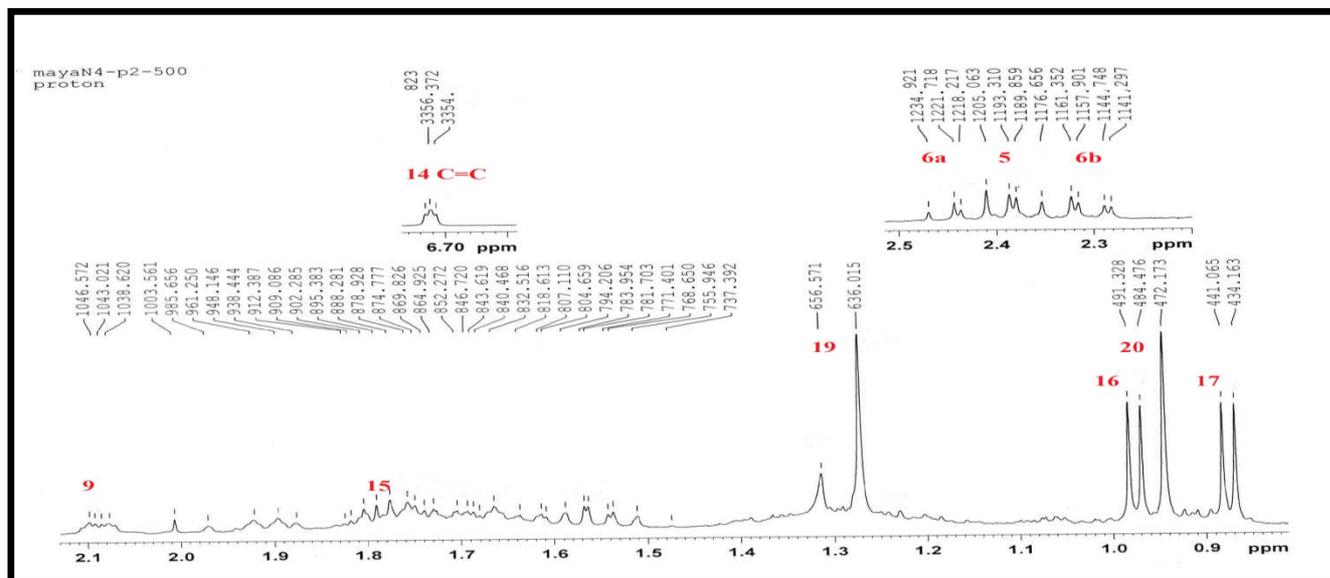


Figure 73. Spectre  $^1H$  du composé A8

L'analyse combinée des spectres RMN $^{13}C$  (Figure 74) et HSQC (Figure 77) permet de compter 20 atomes de carbones se répartissant entre les quatre méthyles entre  $\delta_C$  13.4 et 16.29 ppm, des CH $_2$ , CH et les carbones quaternaires entre  $\delta_C$  17.5 et 51.8 ppm, un carbone quaternaire oxygéné (C-13) à  $\delta_C$  71.1 ppm, deux carbones éthyleniques à  $\delta_C$  138.1 (C-8) et  $\delta_C$  140.6 ppm (C-14), un carbonyle à  $\delta_C$  180.3 ppm et une cétone à  $\delta_C$  200.6 ppm.

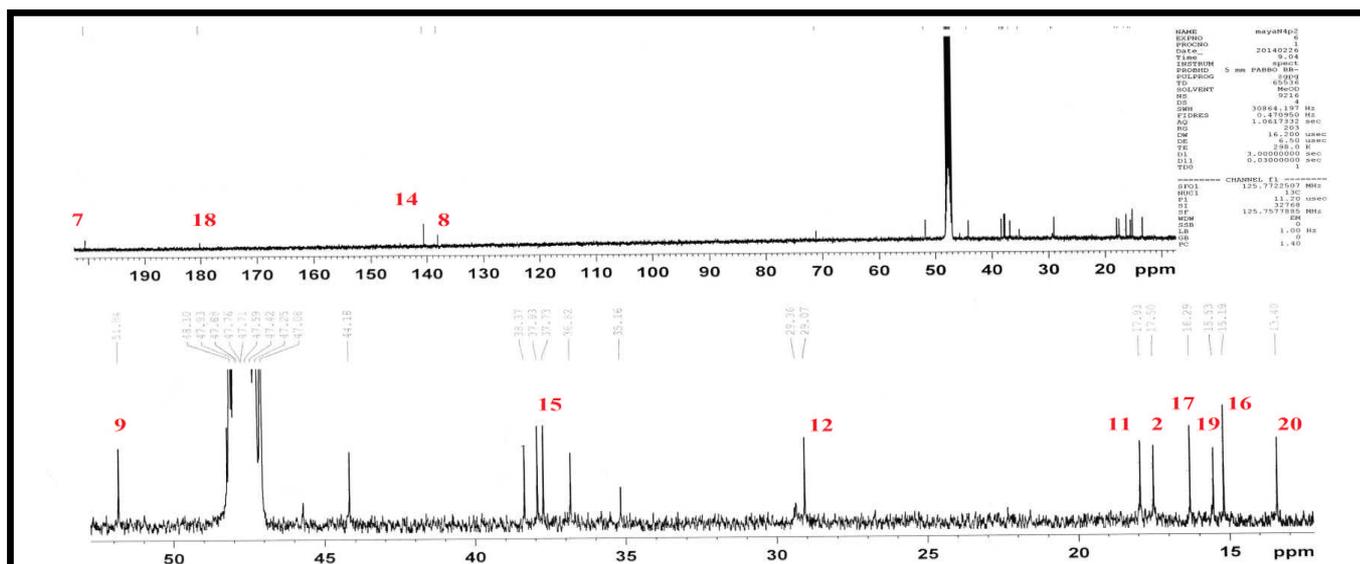
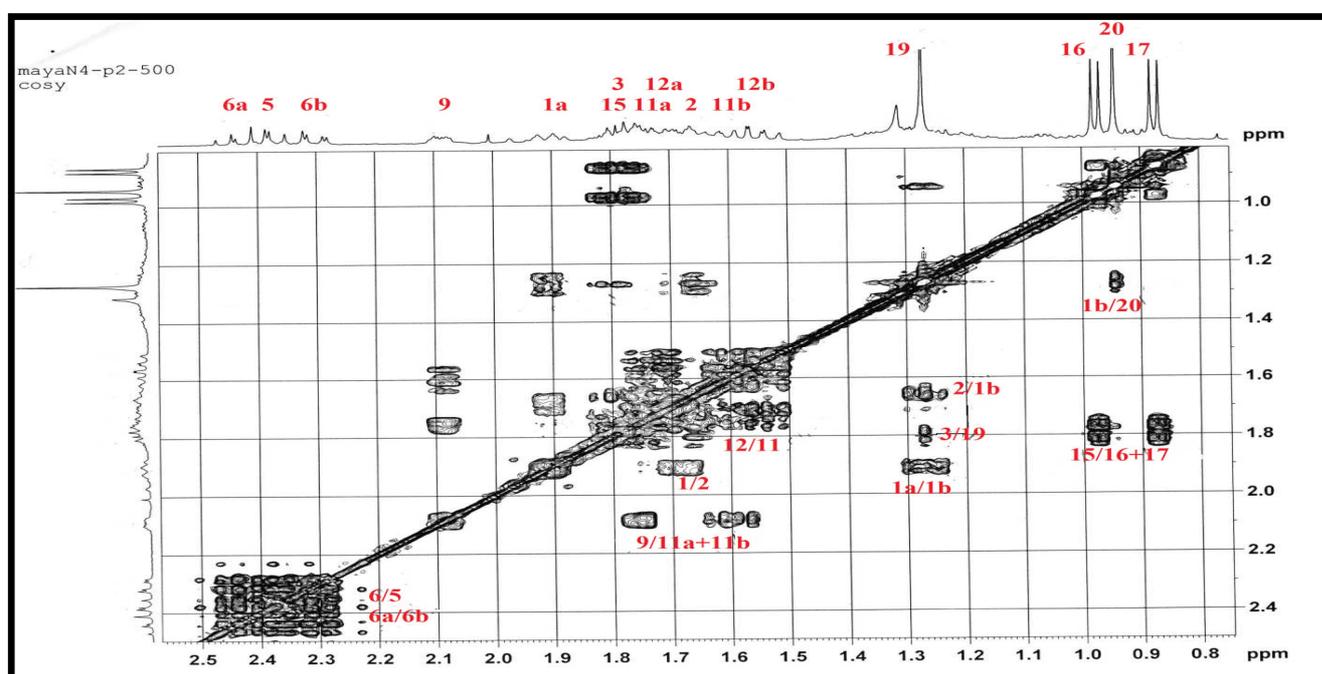


Figure 74. Spectre  $^{13}C$  du composé A8

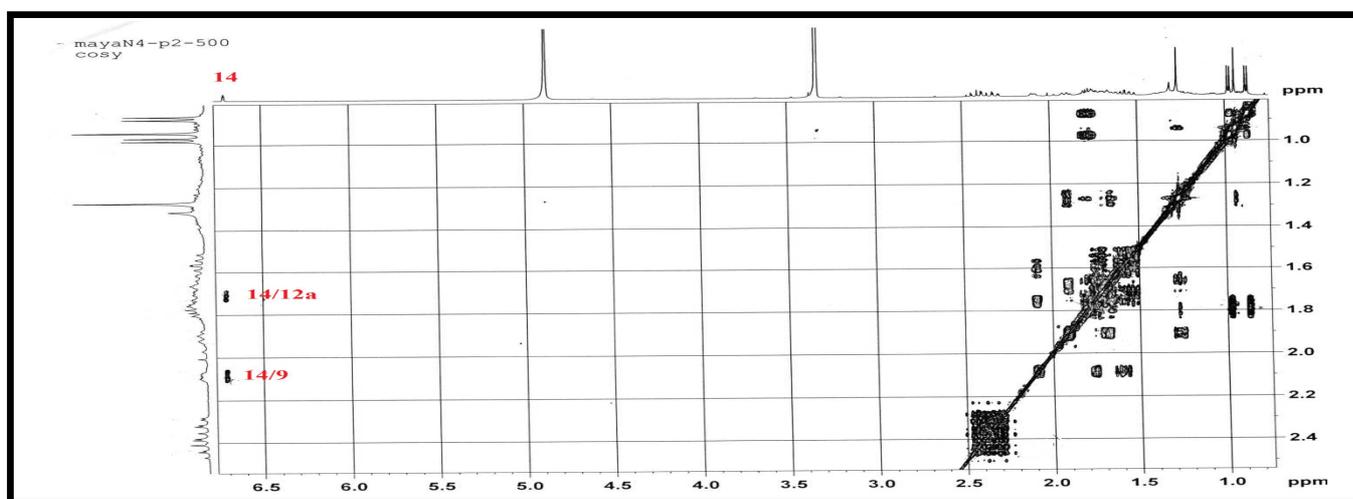
- **Analyse du spectre COSY :**

L'analyse du spectre COSY (Figures 75-76) permet de visualiser les corrélations suivantes :

- Les protons H<sub>2</sub>-1 avec les protons H<sub>2</sub>-2 et le méthyle H-20.
- Les protons H<sub>2</sub>-3 avec le méthyle H<sub>3</sub>-19 et H<sub>2</sub>-2
- Le proton H-9 avec les protons H<sub>2</sub>-11
- Le proton H-15 avec les deux méthyles H-16 et H-17
- Le proton éthylénique H-14 avec les protons H-12 et H-9 d'où le déplacement chimique déblindé de ce dernier ( $\delta_C$  51.8 ppm).



**Figure 75.** Spectre COSY de  $\delta_H$  0 à 2.5ppm du composé A8

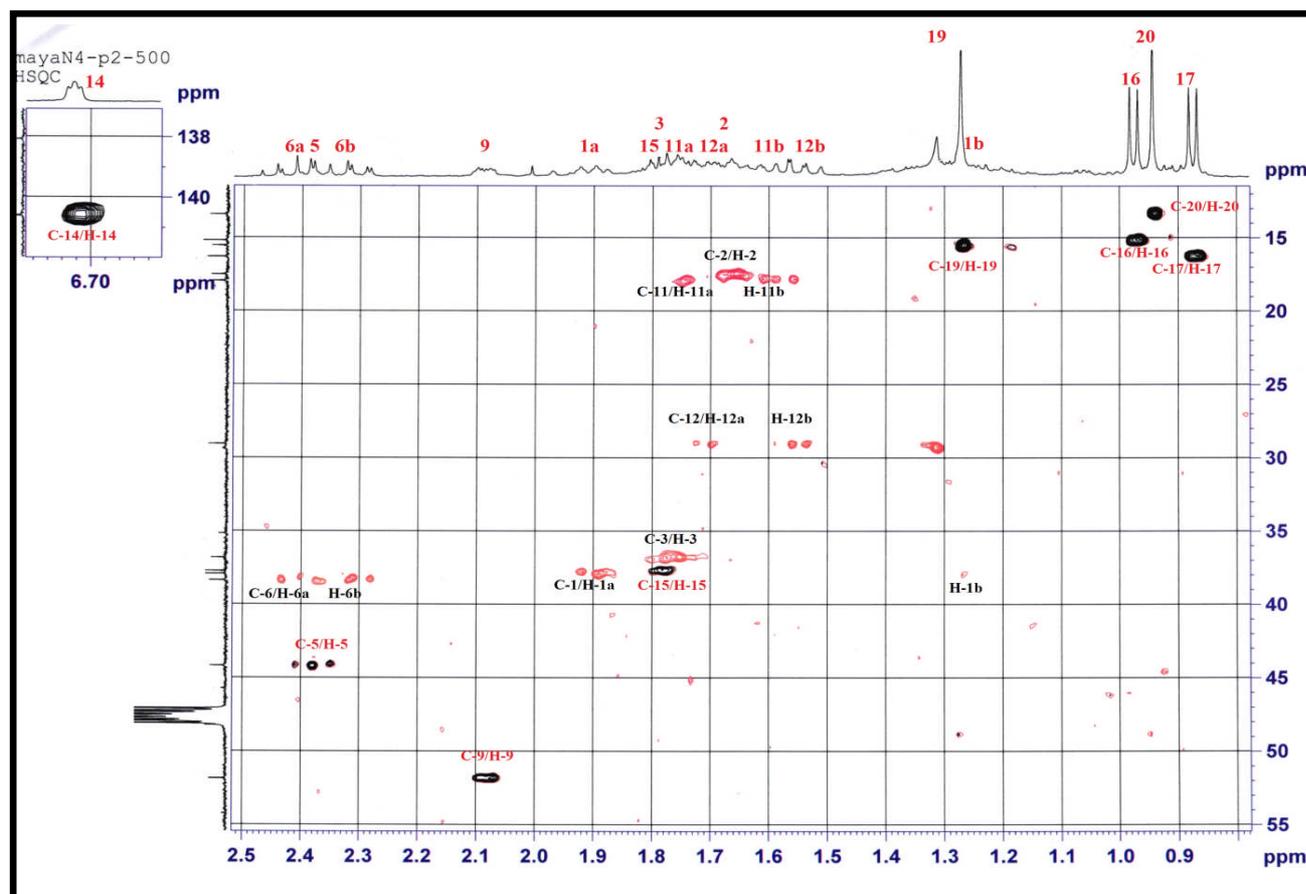


**Figure 76.** Spectre COSY de  $\delta_H$  0 à 6.8 ppm du composé A8

- **Analyse du spectre HSQC**

Après la localisation des protons cycliques, l'analyse des corrélations hétéronucléaires  $^1J_{H-C}$  observée sur le spectre HSQC permet l'identification et l'attribution des déplacements chimiques des carbones les portant (C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-9, C-11, C-12 et C-14) (Figure 77).

Les valeurs des  $\delta_C$  sont répertoriées dans le tableau 22.



**Figure 77.** Spectre HSQC du composé **A8**

- **Analyse du spectre HMBC**

L'analyse du spectre HMBC (Figures 79-80) va nous permettre la localisation de la double liaison, du carbone quaternaire oxygéné, du carbonyle et de la fonction cétone.

En plus des corrélations communes déjà observées sur les spectres des produits 1-7, on note :

- Une tache de corrélation entre les protons H-16, H-17 et H-15 et le carbone quaternaire oxygéné C-13 est observée
- Une corrélation entre les protons H-5 et H-6 et le carbone à  $\delta_C$  200.6 ppm
- Le méthyle H-19 corrèle avec les carbonyles à  $\delta_C$  180.3 ppm.

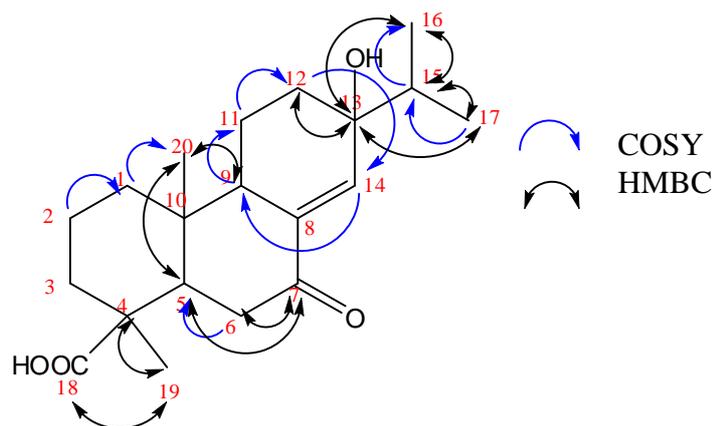
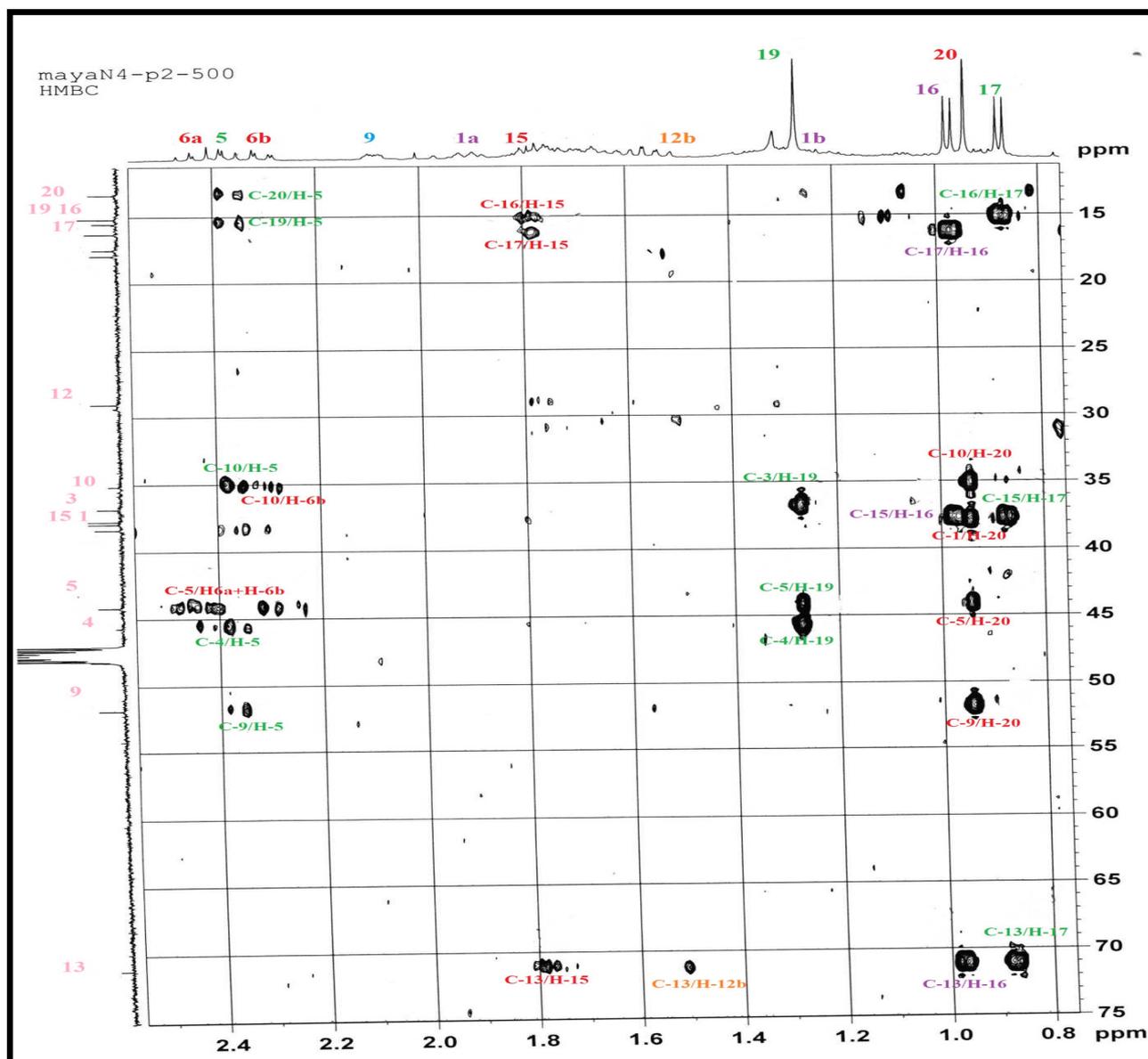


Figure 78. Corrélations COSY et HMBC du composé A8

Figure 79. Spectre HMBC de  $\delta_C$  0 à 75 ppm du composé A8

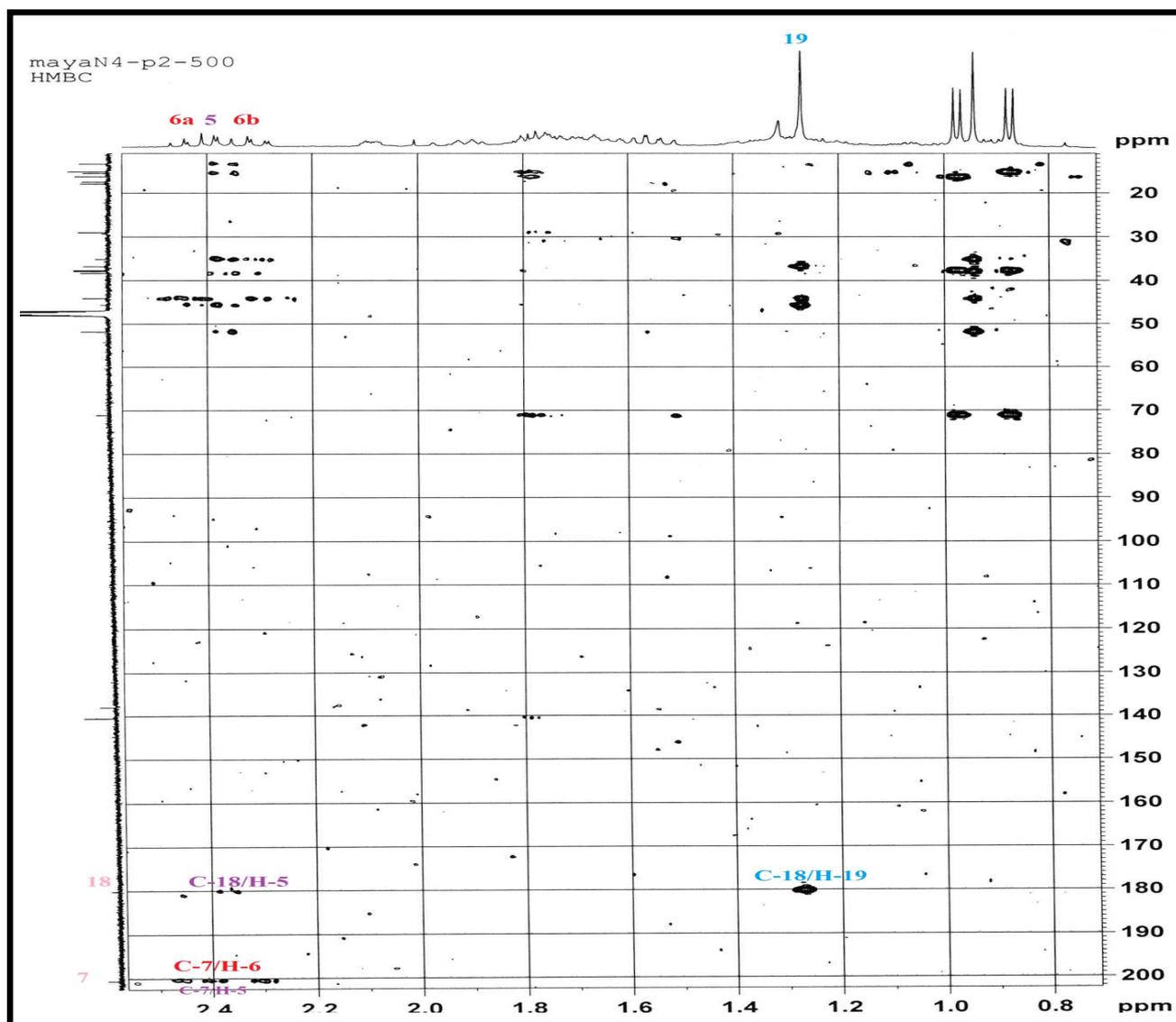
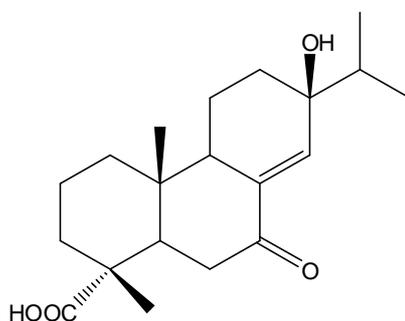


Figure 80. Spectre HMBC de  $\delta_C$ 20 à 200 ppm du composé **A8**

La structure du composé **A8** est : Acide 13 $\beta$ -hydroxy-7oxo-8, 14-abieten-18-oïque isolé *Larix kaempferi* (Ohtsu et al., 2000) et d'*Abies georgii* Orr (Yang et al., 2010)



**A8**:Acide 13 $\beta$ -hydroxy-7oxo-8, 14-abieten-18-oïque

**Tableau 22.** Déplacements chimiques RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) du composé **A8** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, J (Hz)	N°	$\delta_{\text{C}}$ ppm	$\delta_{\text{H}}$ ppm, Mult, J (Hz)
1	37.9	1a : 1.91, d, 13.1 1b : 1.24, m	11	17.9	11a: 1.76, m 11b: 1.6, m
2	17.5	1.67, m	12	29.1	12a: 1.7, m 12b: 1.53, m
3	36.8	1.77, m	13	71.1	-
4	45.8	-	14	140.6	2.72, d, 2.4
5	44.2	2.39, dd, 11.7; 3.5	15	37.7	1.78, m
6	38.4	6a: 2.45, dd, 16.7; 3.5 6b: 2.31, dd, 16.6; 3.4	16	15.2	0.98, d, 6.8
7	200.6	-	17	16.3	0.89, d, 6.9
8	138.1	-	18	180.3	-
9	51.8	2.09, m	19	15.5	1.28, s
10	33.2	-	20	13.4	0.95, s

**Chapitre 2**  
**Identification des produits isolés de *Cedrus***  
***atlantica*(Endl) Manetti**

## 2.1. Détermination structurale des composés isolés de cônes de *Cedrus atlantica*

La détermination structurale des produits isolés des fractions VLC C<sub>18</sub> de l'extrait hydroethanolique des cônes de *Cedrus atlantica* **F40 :60, F60 :40, F80 :20 et F100 :0** a été basée sur l'analyse des spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) monodimensionnelle <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, bidimensionnelle homonucléaire <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY, et hétéronucléaires <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC, sur l'analyse des spectres de masse haute résolution HR-ESI ainsi que sur la comparaison avec les données de la littérature. L'étude phytochimique des cônes de *C. atlantica* a permis la séparation de trois acides tocotrienoliques (**C1-C3**), trois flavonoides (**C4-C6**), trois lignanes glycosides (**C7- C9**) et douze diterpènes abietanes (**C10- C21**).

### 2.1.1. Détermination structurale des acides tocotrienoliques C1-C3 :

#### 2.1.1.1 Identification du composé C1

- Analyse du spectre de masse

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS en mode positif (figure 81) du produit **C1**, montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  479.2766 [M+Na]<sup>+</sup>, soit une masse moléculaire égale à 456.27 correspondant à une formule brute en C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub>.

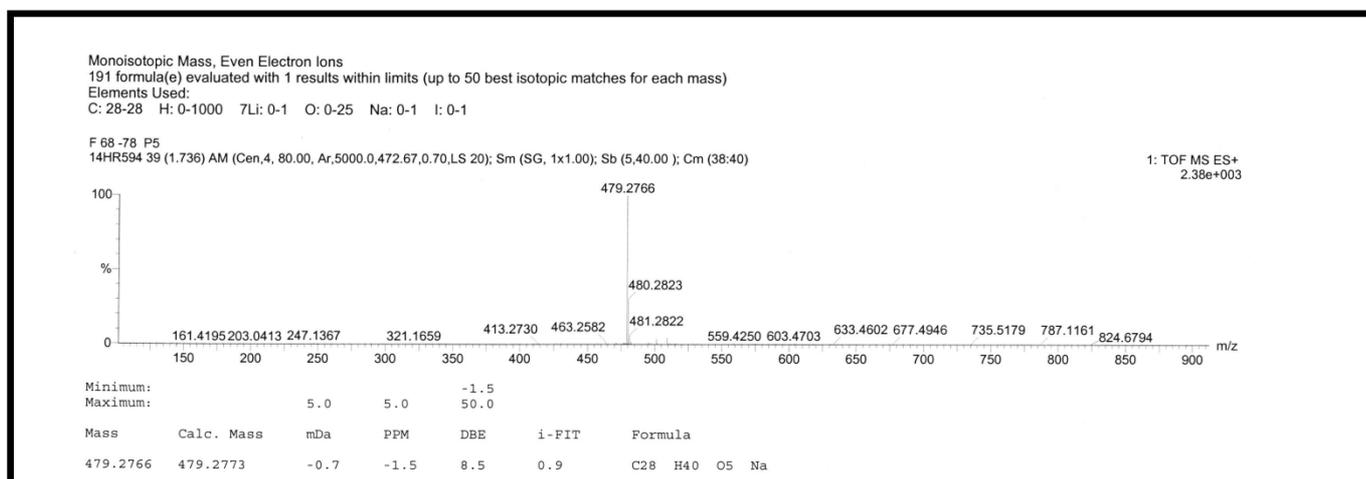


Figure 81 : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé C1

- Analyse du spectre H<sup>1</sup>

Sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H du composé **C1** (Figure 82), les signaux repérés sont :

- Un ensemble de CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> entre δ<sub>H</sub>1.27 et δ<sub>H</sub>2.29 ppm
- Un proton aromatique sous forme d'un singulet résonant à δ<sub>H</sub>6.51 indiquant la substitution des autres positions du cycle.

- Trois protons éthyléniques H-11 ( $\delta_H$  5.27ppm), H-15 ( $\delta_H$  5.25 ppm) et H-19 ( $\delta_H$  6.74) ppm
- Un pic à  $\delta_H$  3.76 ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle (O-CH<sub>3</sub>) attribuable à H-26.

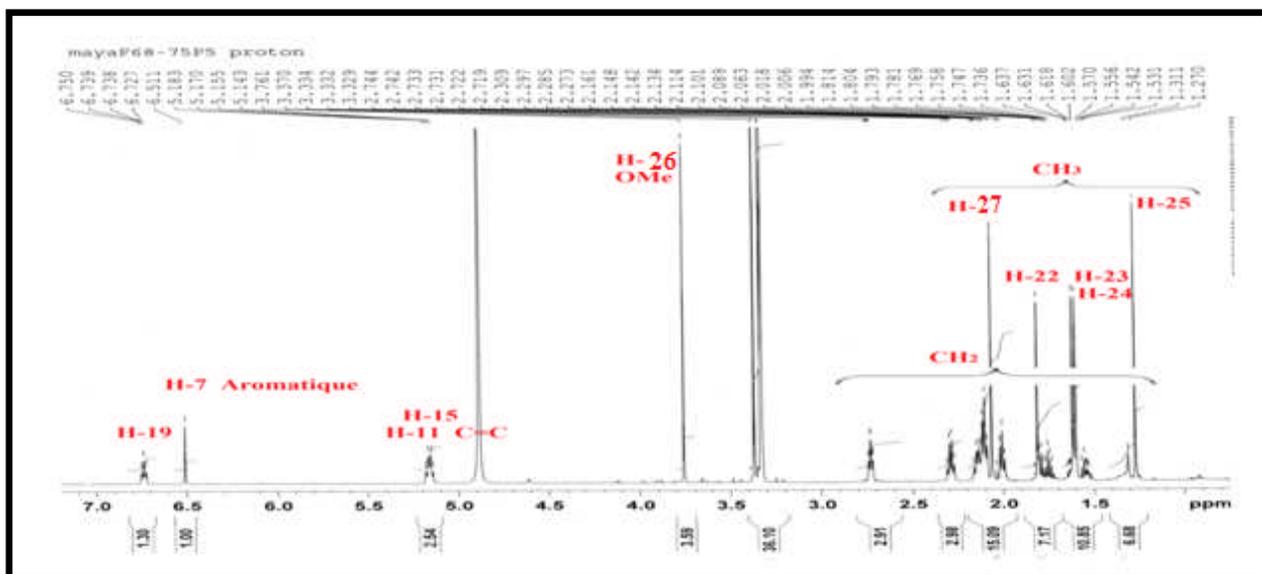


Figure 82. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé C1

- **Analyse du spectre RMN <sup>13</sup>C**

Le spectre RMN <sup>13</sup>C (Figure 83) montre :

- Des CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> observés entre  $\delta_C$  12.6 et  $\delta_C$  40.7 ppm
- Un ensemble de CH et C quaternaires entre  $\delta_C$  117.1 et  $\delta_C$  146.2 ppm
- Trois signaux caractéristiques à des carbones éthyléniques à  $\delta_C$  125.9 ppm,  $\delta_C$  126.2 ppm et à  $\delta_C$  143 ppm attribuables aux C-11, C-15 et C-19.
- Un signal vers  $\delta_C$  75.9 ppm attribuable à un carbone quaternaire oxygéné (C-2).
- Un pic résonnant à  $\delta_C$  172.4 ppm caractéristique d'un acide ou d'un ester.
- Un O-CH<sub>3</sub> résonnant à  $\delta_C$  60.4 ppm assignable au C-26.

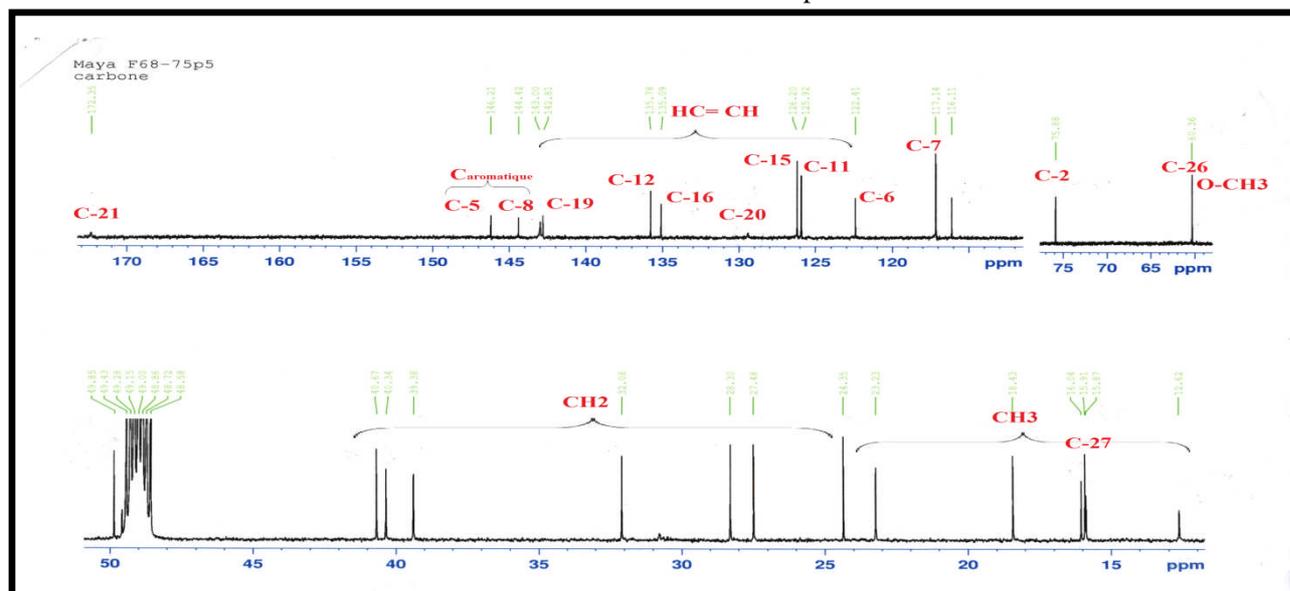


Figure 83. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C1

- **Analyse du spectre COSY**

Après l'analyse de masse en HR-ESI-MS mode positif, qui nous oriente vers une structure  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_5$  et l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 82) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 83) nous révélant la présence d'un noyau aromatique, de carbones éthyléniques, d'un groupement méthoxy et d'une fonction carbonyle, l'analyse RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY) nous permet la détermination structurale du composé.

Les corrélations  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  observées sur le spectre COSY (Figures 85-86) sont :

- Une corrélation entre le proton H-4 et le proton H-3
- Le proton H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  1.56 ppm) corrèle avec le proton H-10
- Une tache de corrélation entre H-13 et H-14
- Une corrélation entre les protons H-17 et H-18

On relève également les corrélations des protons éthyléniques (Figure 86):

- H-11 avec les protons H-10 et les protons méthyliques H-24.
- H-15 avec H-14 et avec le méthyle H-23
- H-19 avec le proton H-18 et avec les protons portés par le méthyle H-22.

En plus d'une tache de corrélation entre le proton aromatique H-7 et le proton méthylique H-27.

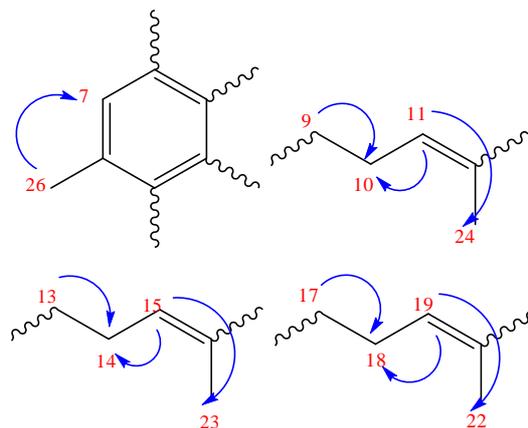


Figure 84. Corrélations COSY du composé C1

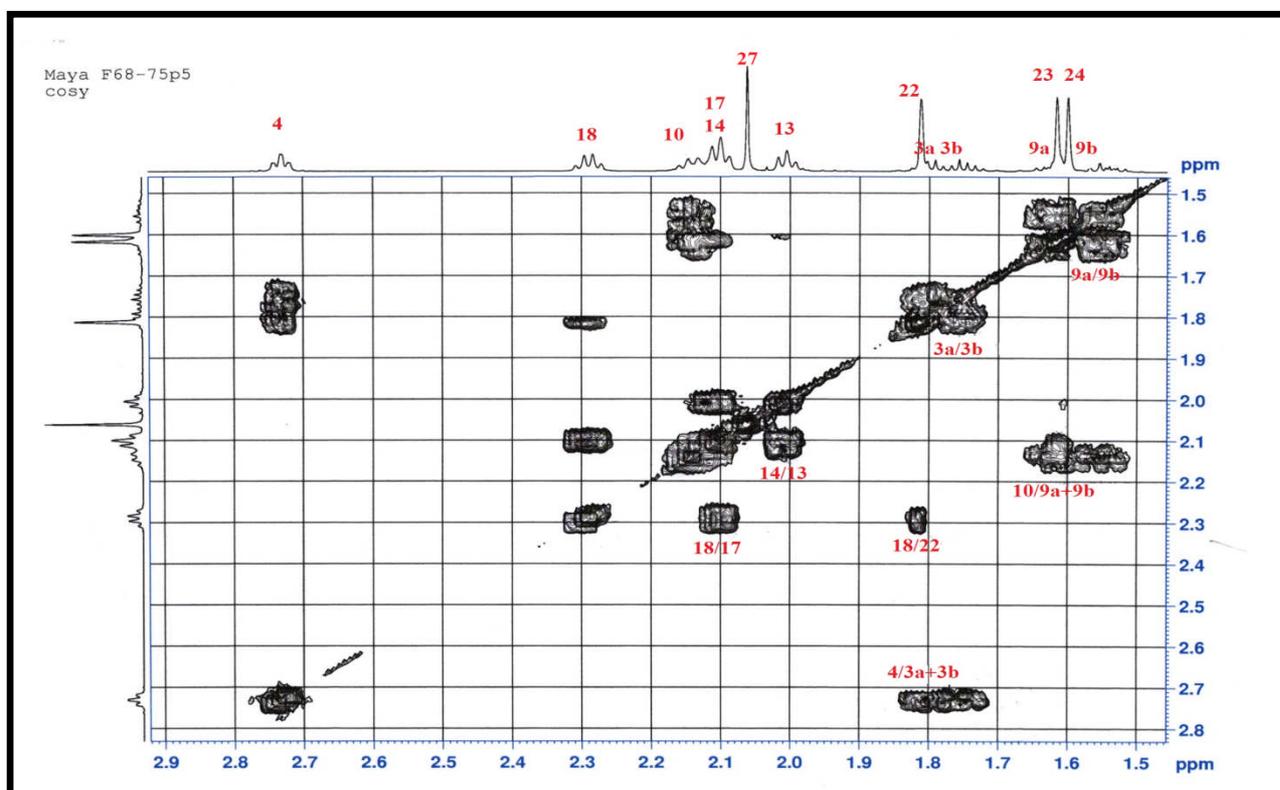
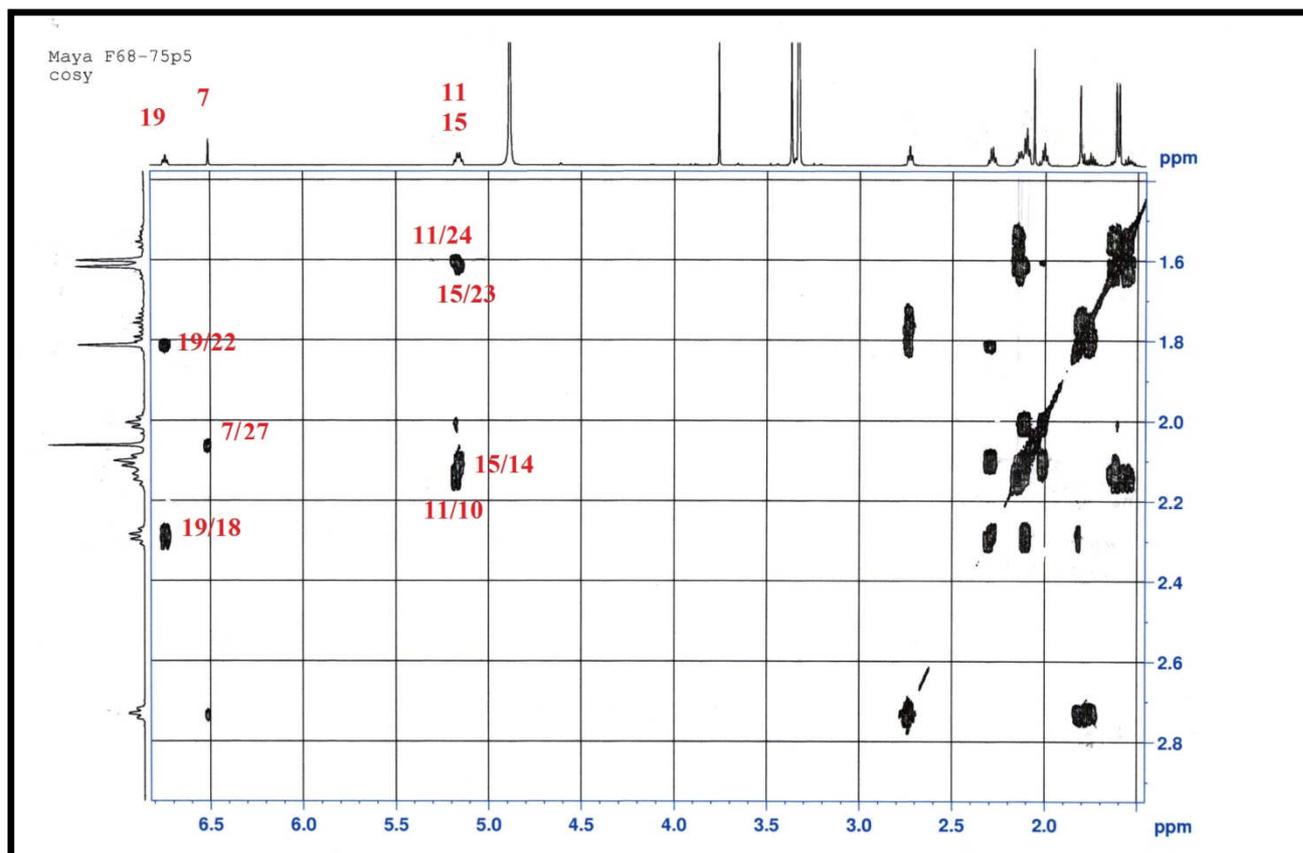


Figure 85. Spectre COSY de  $\delta_H$  1.5 à 2.9 ppm du composé C1



**Figure 86.** Spectre COSY de  $\delta_H$  1.5 à 7 ppm du composé C1

- **Analys des spectres HSQC**

L'analyse des spectres HSQC (Figures 87-88) permet de déterminer les déplacements chimiques des carbones portant les protons aliphatiques identifiés sur les spectres COSY ( $H_2C$  : C-3, C-4, C-9, C-10, C-13, C-14, C-17, C-18 et  $H_3C$  : C-22, C-23, C-24, C-25, C-26 et C-27).

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau 23.

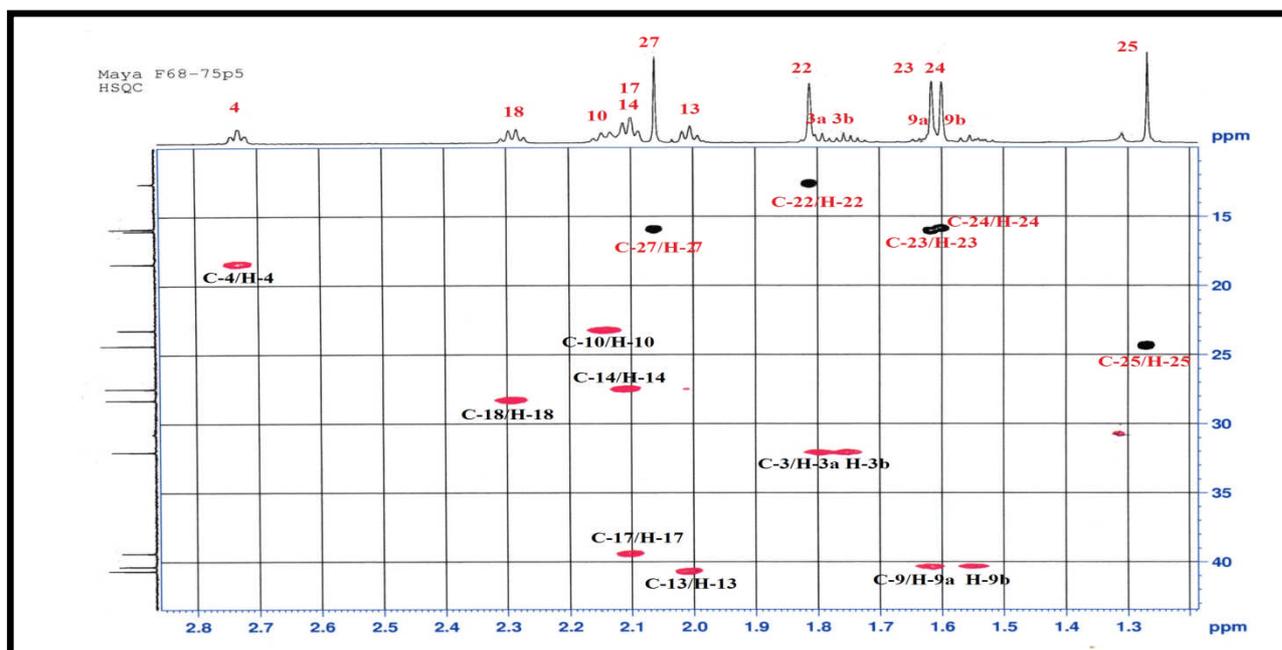


Figure 87. Spectre HSQC de  $\delta_H$  1.2 à 2.8 ppm du composé C1

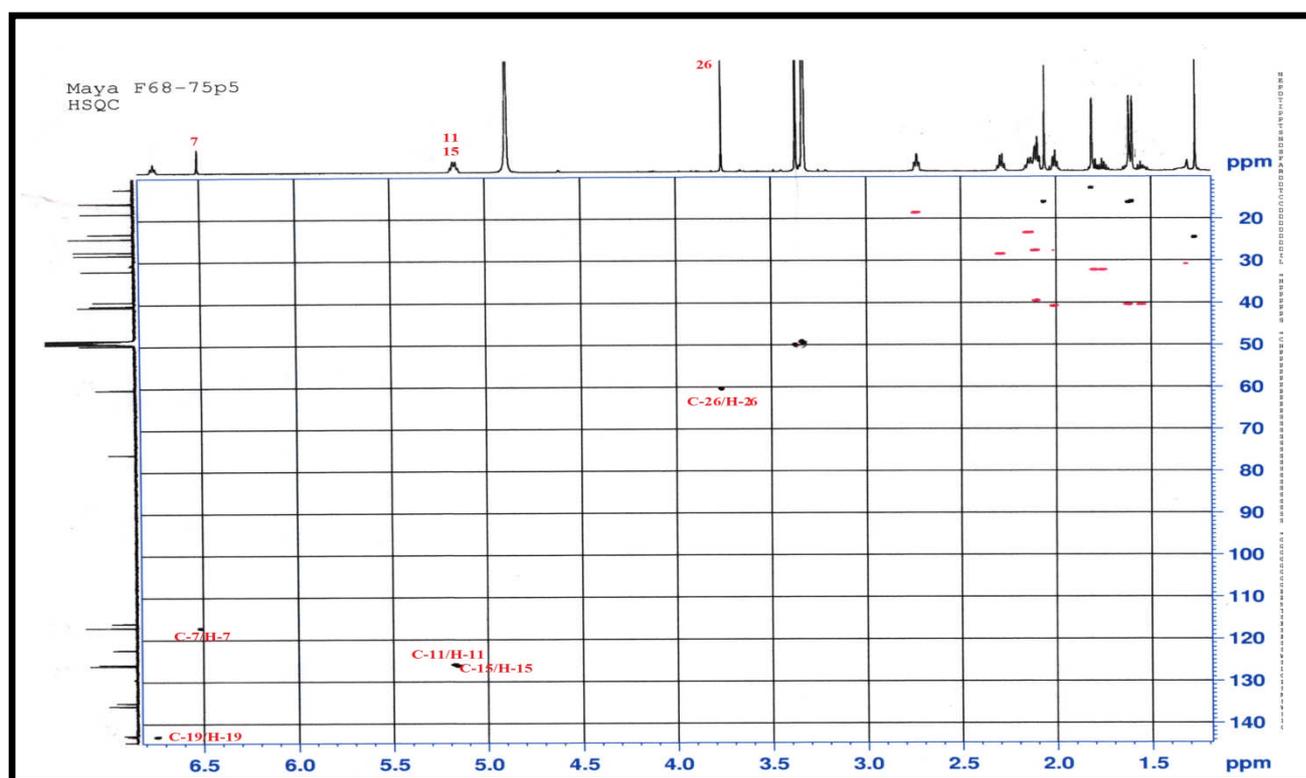


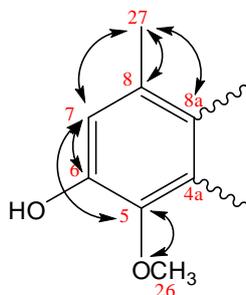
Figure 88. Spectre HSQC de  $\delta_H$  1.5 à 7 ppm du composé C1

- **Analyse du spectre HMBC**

Les corrélations  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observées sur les spectres HMBC (Figures 92-94) sont :

- Des taches de corrélations entre le proton aromatique H-7 résonnant à  $\delta_H$  6.51 ppm avec les carbones aromatiques C-8a, C-5, C-6 et avec le méthyle C-27

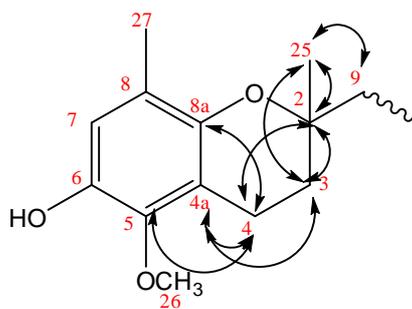
- Le proton H-26 (O-CH<sub>3</sub>) apparaissant à  $\delta_H$  3.76 ppm montre une tache de corrélation avec le carbone aromatique C-5 ce qui détermine sa position.
- Le proton méthylique H-27 corrèle avec les carbones quaternaires aromatiques C-7 ( $\delta_C$  117.1 ppm), C-8a ( $\delta_C$  146.2 ppm) et C-8 ( $\delta_C$  122.4 ppm). Ceci nous indique qu'il est rattaché au cycle aromatique par le carbone C-8.



**Figure 89.** Corrélation HMBC du noyau aromatique du composé **C1**

On note également :

- Une corrélation entre le proton H-3 et les carbones quaternaires C-2 et C-4a résonnant respectivement à  $\delta_C$  75.9 ppm et  $\delta_C$  116.1 ppm.
- Le proton H-4 corrèle avec les carbones aromatiques C-4a, C-5 et C-8a et avec le carbone quaternaire C-2
- Une corrélation entre le proton méthylique H-25 et le carbone quaternaire oxygéné C-2 ( $\delta_C$  75.9 ppm), C-3 ( $\delta_C$  32.1 ppm) et le méthylène C-9 ( $\delta_C$  40.3 ppm).



**Figure 90.** Corrélations HMBC du noyau chromane du composé **C1**

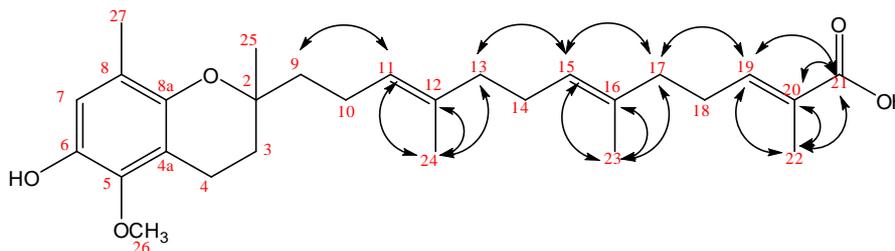
Les corrélations des protons méthyléniques sont :

- H-22/ C-19, C-20 et avec le carbonyle C-21 ( $\delta_C$  172.3 ppm)
- H-23/ C-15, C-16 et C-17
- H-24 / C-11, C-12 et C-13

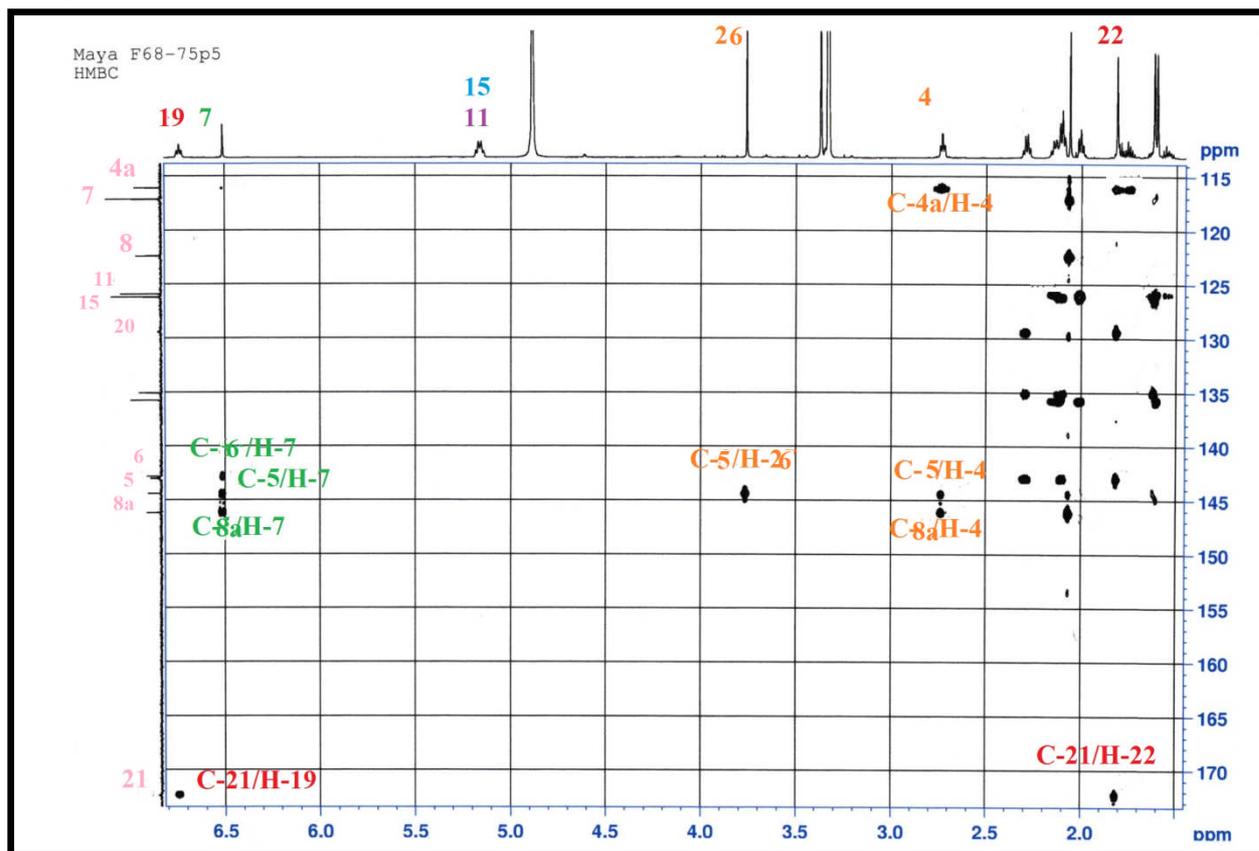
Et enfin les corrélations des protons éthyléniques :

- H-11 ( $\delta_H$  5.25 ppm)/ C-9 et C-24
- H-15 ( $\delta_H$  5.26 ppm)/ C-13, C-17 et C-23

- H-19  $\delta_H$  6.73 ppm/ C-17, C-18, C-21 (COOH) et C-22.



**Figure 91.** Corrélation HMBC du composé C1



**Figure 92.** Spectre de  $\delta_C$ 115 à 170 ppm HMBC du composé C1

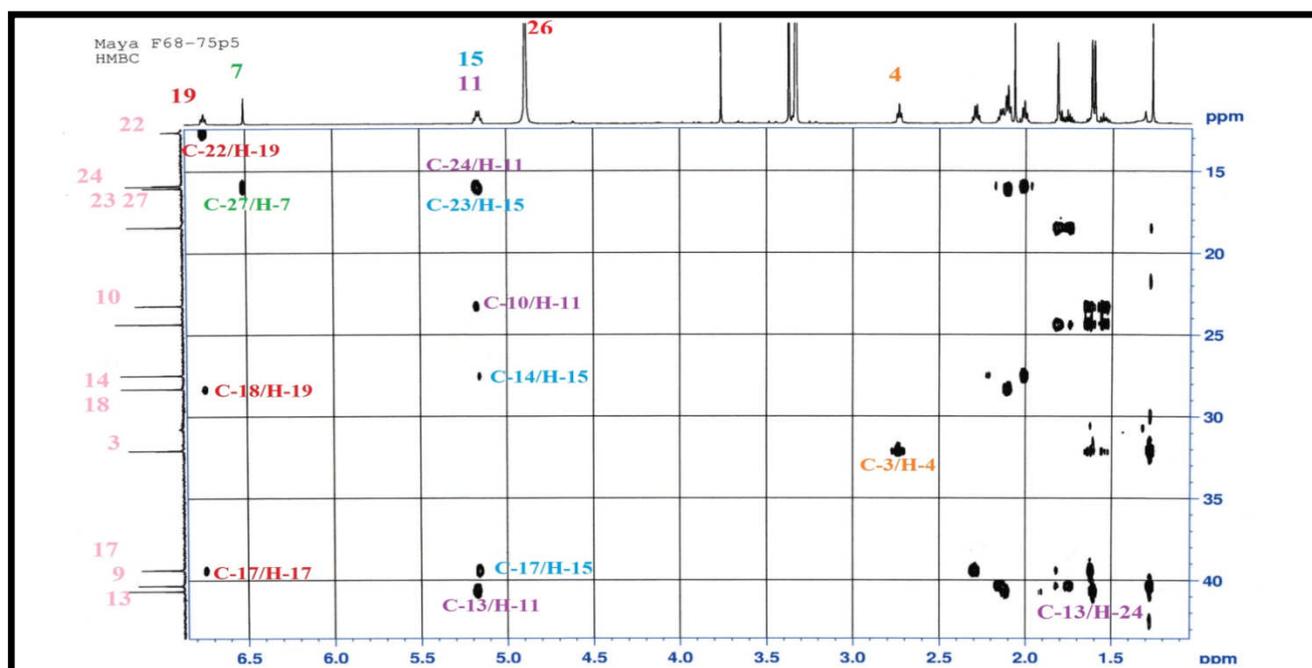


Figure 93. Spectre de  $\delta_C$  15 à 45 ppm HMBC du composé C1

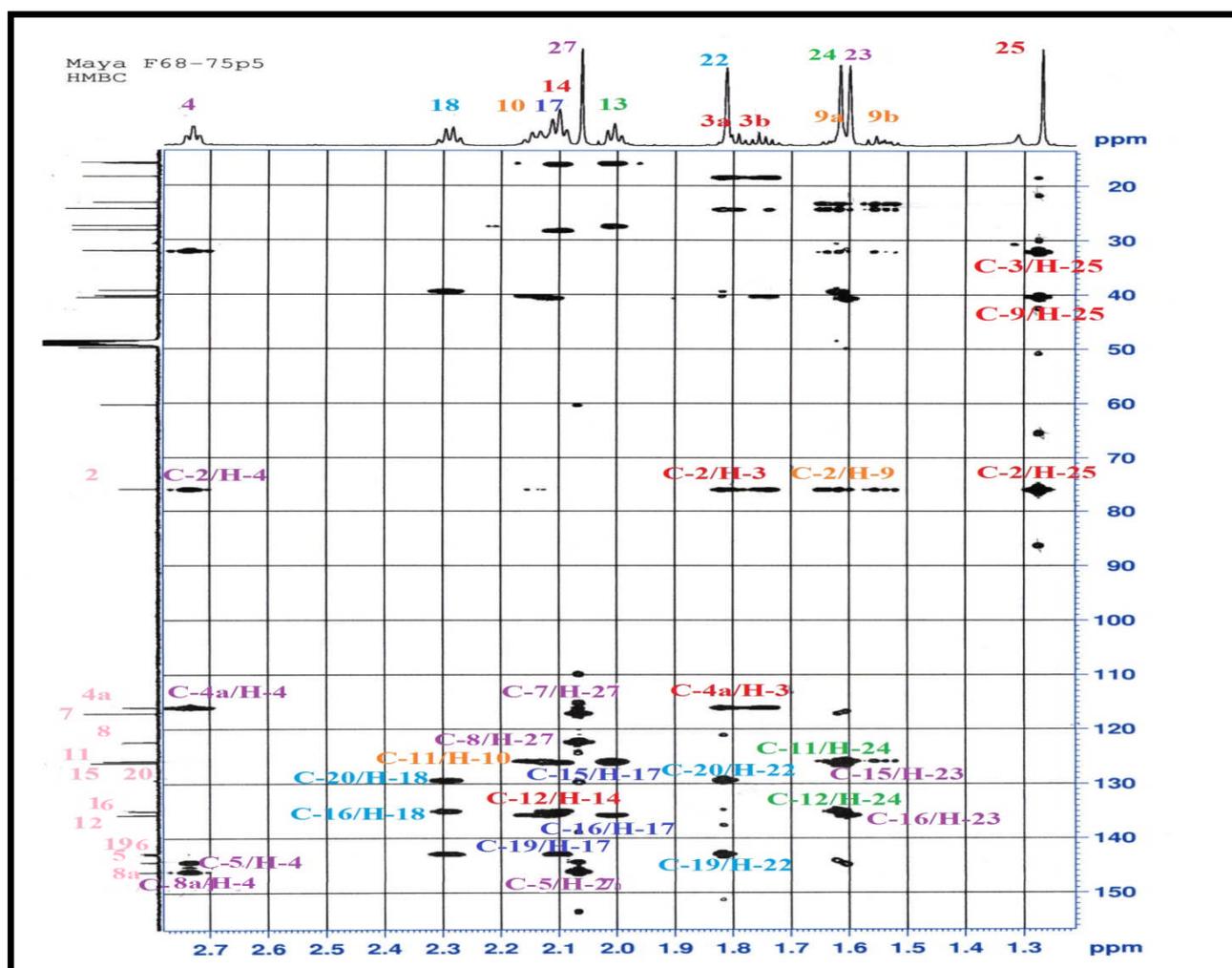


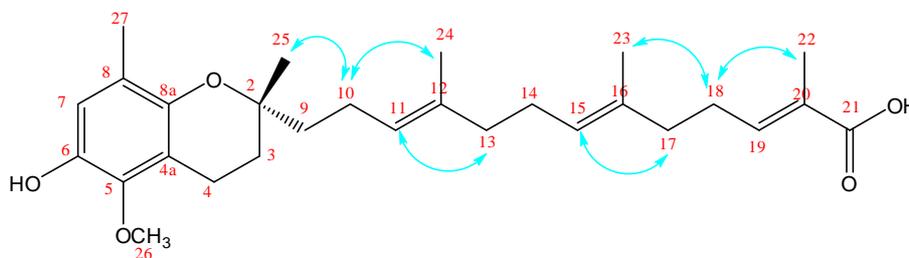
Figure 94. Spectre de  $\delta_C$  20 à 150 ppm HMBC du composé C1

- **Analyse de spectre NOESY**

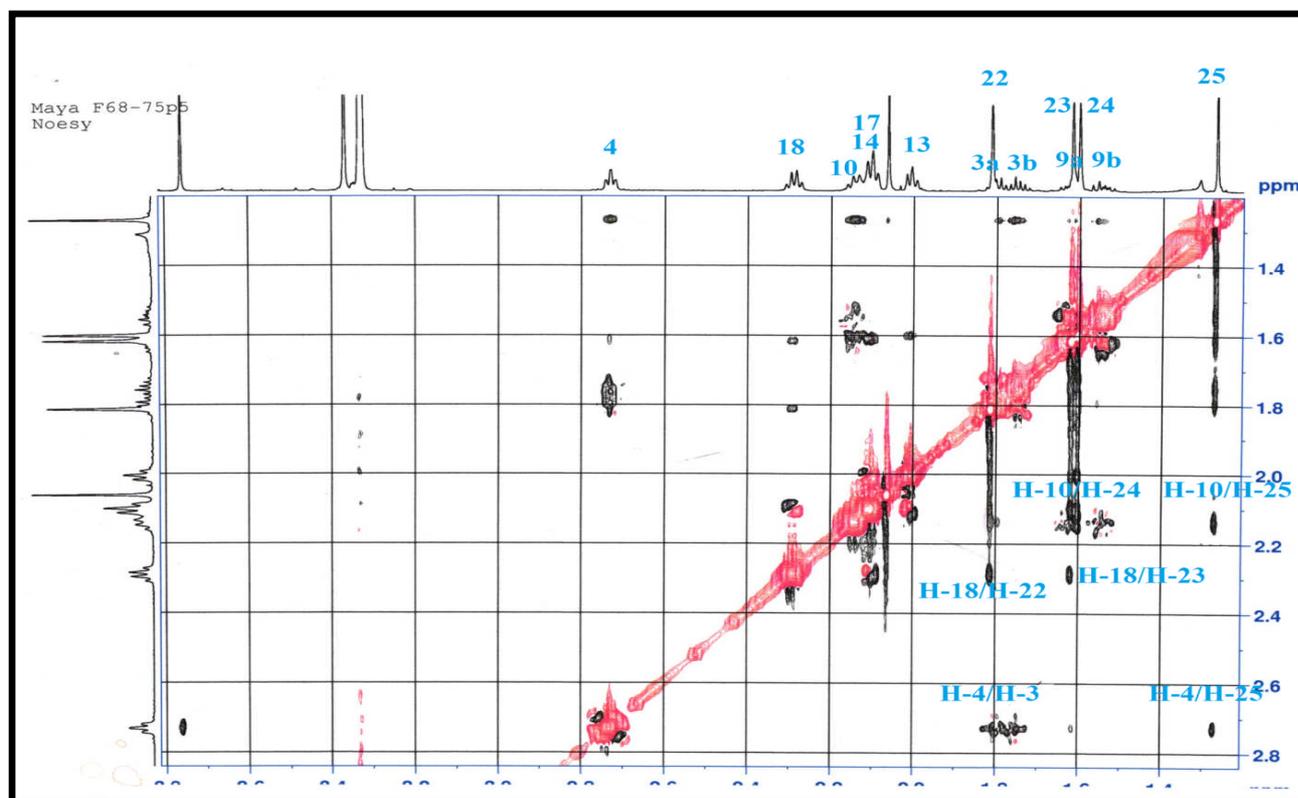
Sur les spectres NOESY (Figures 96-97), les corrélations observées sont:

- Une corrélation entre le proton H-10 et les protons méthyliques H-24 et H-25
- Le proton H-18 corrèle avec les protons méthyliques H-22 et H-23.
- Une corrélation entre le proton H-11 et H-13
- Une corrélation entre les protons H-15 et H-17
- Une corrélation entre H-4 et les protons du méthoxyle (H-26) ce qui confirme encore une fois sa localisation sur le C-5.

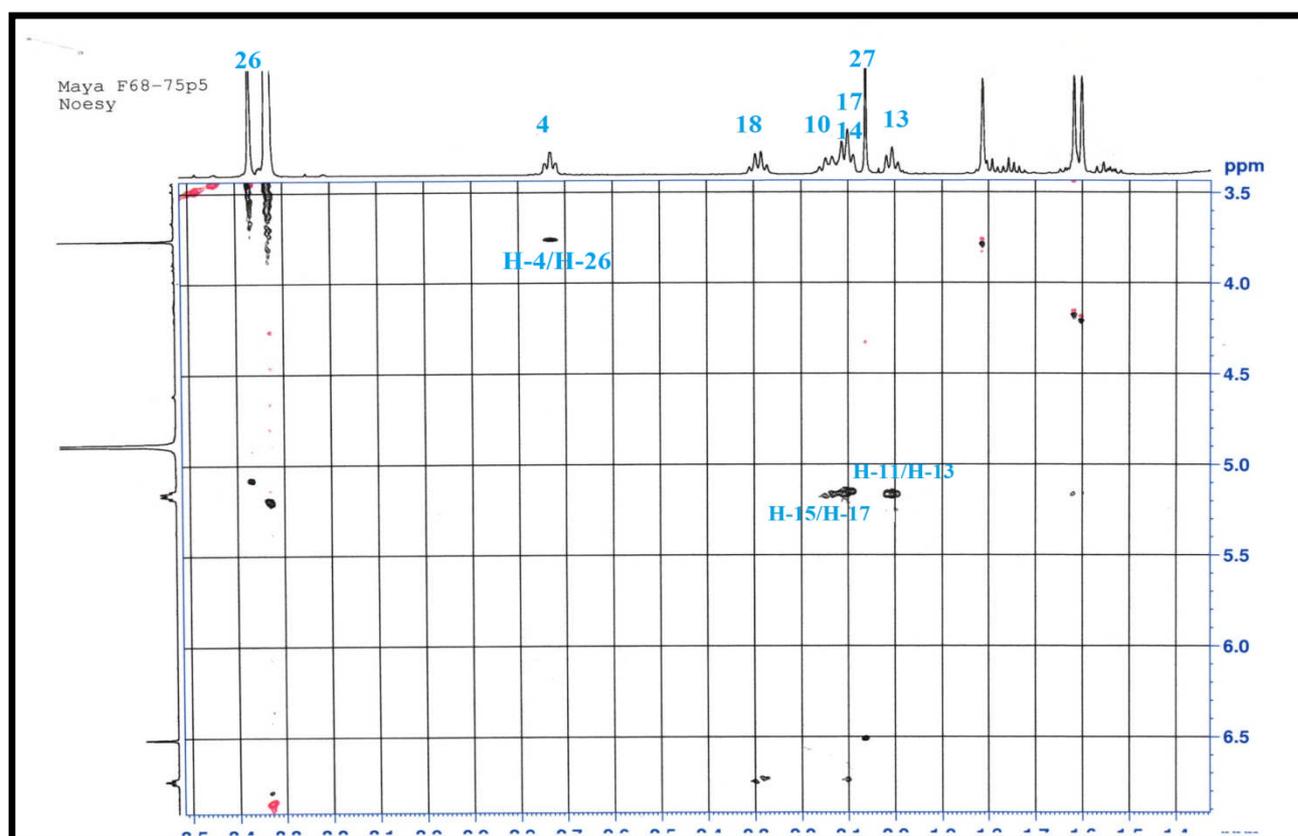
Parallèlement, aucune corrélation entre les protons H-10 et H-14 et entre ce dernier et H-18. Cela indique que toute la chaîne du diterpène est de *trans*configuration (Min-Cheol et al., 2011) et par les données littéraire, la configuration du carbone asymétrique C-2 est définie comme *R* (Drotleff & Ternes 2001).



**Figure 95.** Corrélations NOESY du composé C1

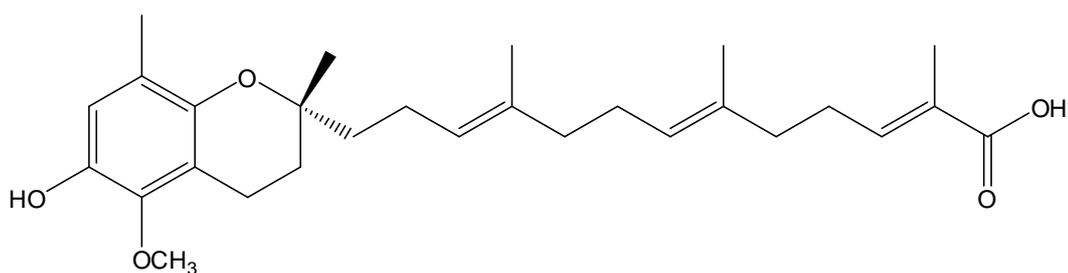


**Figure 96.** Spectre NOESY de  $\delta_H$  1.2 à 2.8 ppm du composé C1



**Figure 97.** Spectre NOESY de  $\delta_H$  3.5 à 6.5 ppm du composé **C1**

Ainsi, toute cette analyse spectrale en plus d'un pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20}$  égale à  $-0.8^\circ$  permet d'attribuer la structure nouvelle suivante au composé **C1** : acide 11*E*-15*E*-19*E*-9-(2*R*,8-diméthyl-5-méthoxy-chroman-6-ol)-12,16,20-triméthyl-11,15,19-tridécatriénoïque nommé également acide cedratlantique.

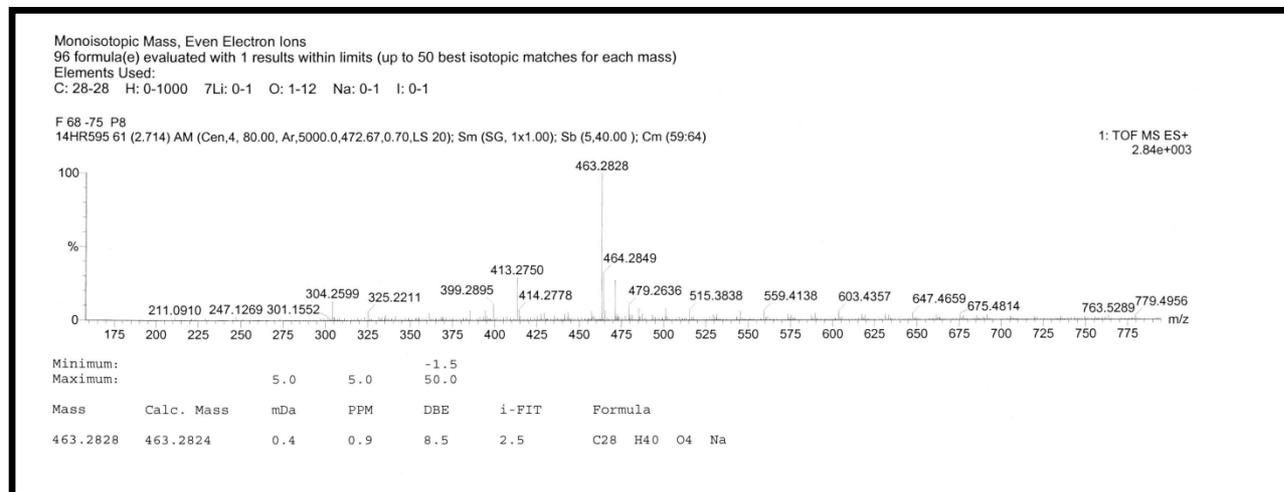


**C1** : acide 11*E*-15*E*-19*E*-9-(2*R*,8-diméthyl-5-méthoxy-chroman-6-ol)-12,16,20-triméthyl-11,15,19-tridécatrien-21-oïque (acide cedratlantique)

### 2.1.1.2 Identification du composé **C2**

- Analyse du spectre de masse

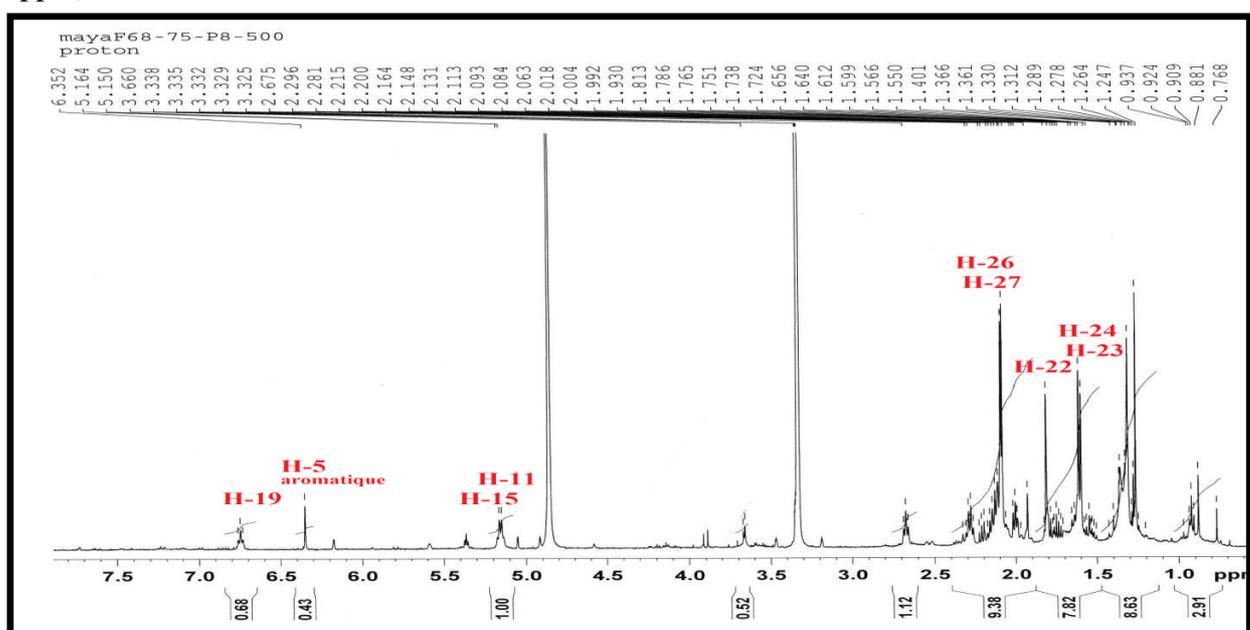
Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS en mode positif (figure 74) du produit **C2**, montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  463.2828  $[M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 440.29 correspondant à une formule brute en  $C_{28}H_{40}O_4$ .



**Figure 98** : Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **C2**

- **Analyse des spectres RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C**

Les spectres RMN <sup>1</sup>H (Figure 99) et <sup>13</sup>C (Figure 100) du composé **C2** présentent une similitude avec les spectres du composé **C1**. La différence réside dans l'absence du signal correspondant au méthoxyle et la présence d'un signal attribuable à un CH<sub>3</sub> ( $\delta_H$  2.8/  $\delta_C$  10.6ppm).



**Figure 99.** Spectre RMN<sup>1</sup>H du composé **C2**

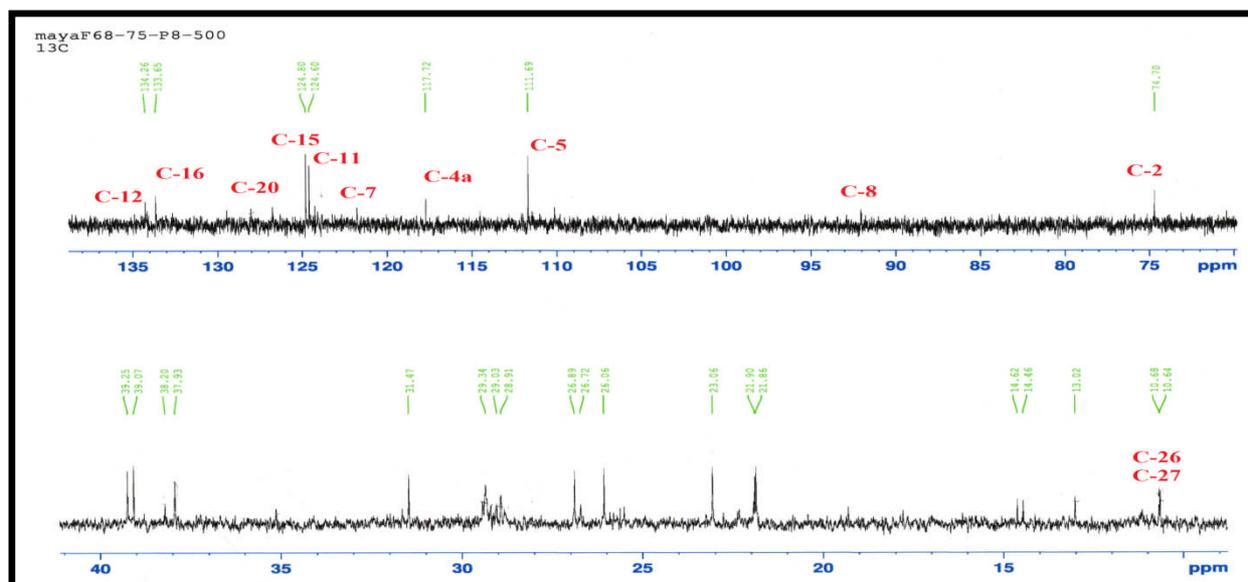


Figure 100. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **C2**

- Analyse du spectre COSY

Les spectres COSY (Figures 102-103) du composé **C2** présentent une grande similitude avec les spectres COSY (Figures 85-86) du composé **C1** décrits précédemment avec comme seules différences, la corrélation du proton aromatique H-5 avec les protons méthyliques H-26 et le protons H-4 avec les protons méthyliques H-27 (Figure 101).

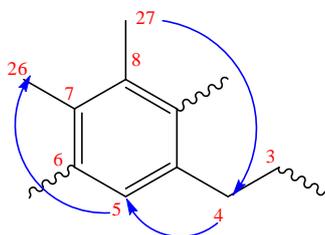


Figure 101. Corrélations COSY du noyau aromatique du composé **C2**

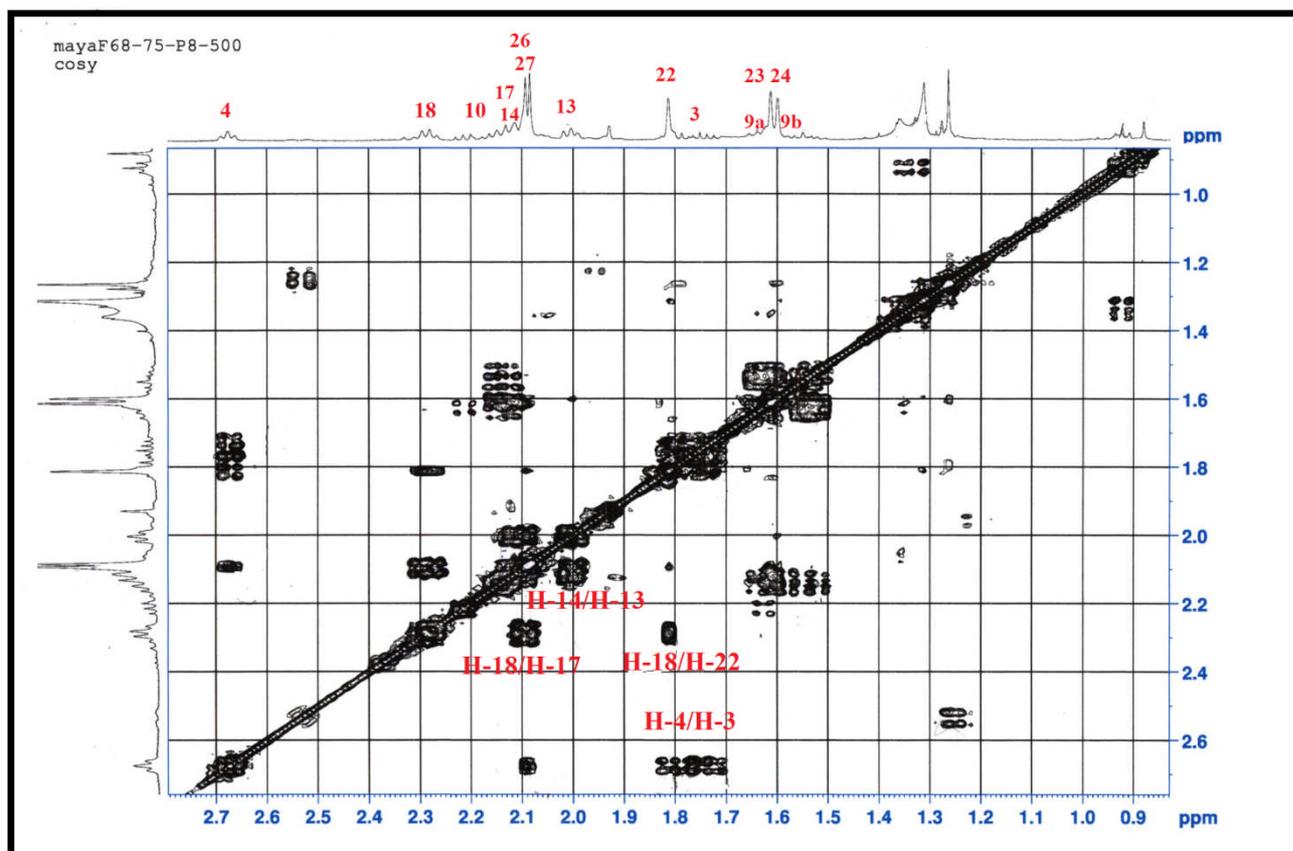


Figure 102. Spectre COSY de  $\delta_H$  0.9 à 2.7 ppm du composé C2

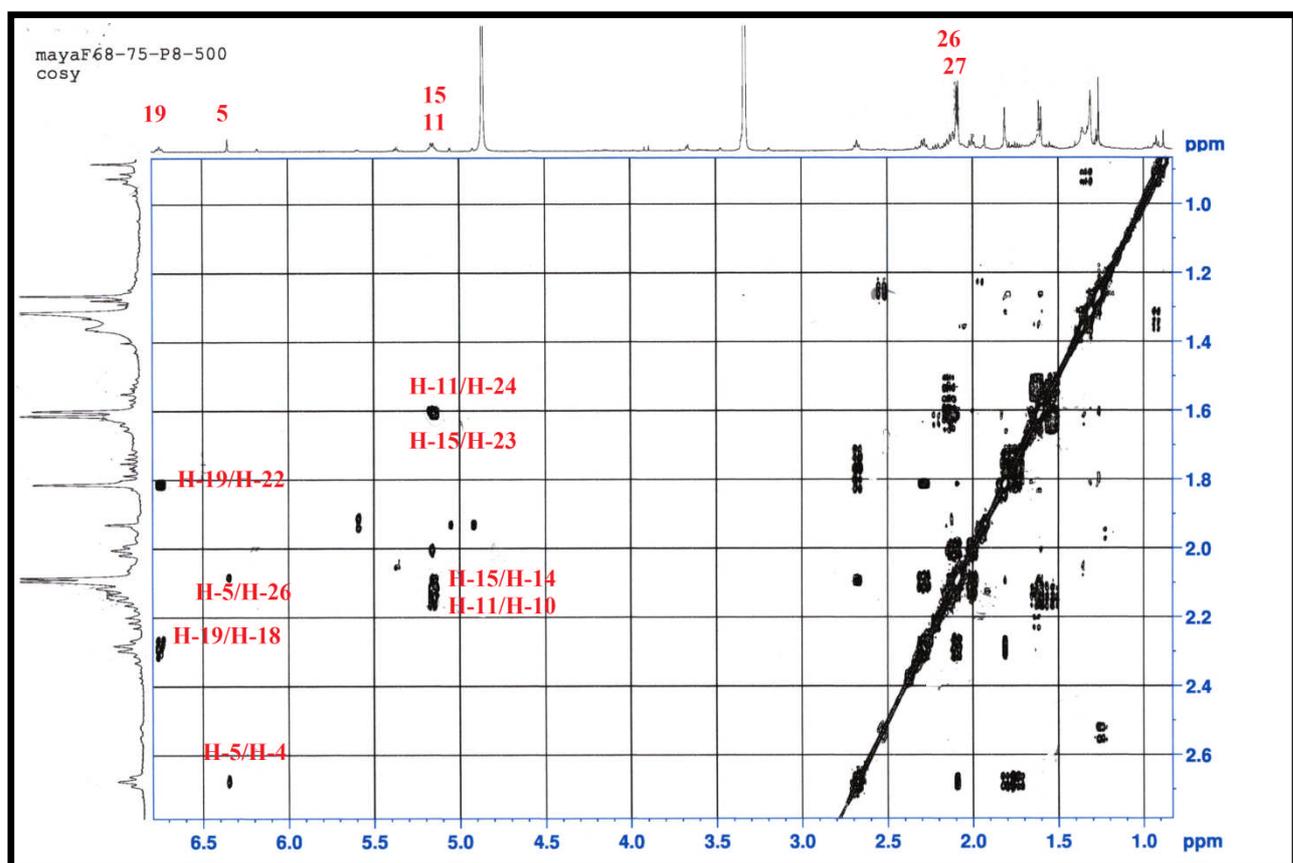


Figure 103. Spectre COSY de  $\delta_H$  1.0 à 6.5 ppm du composé C2

- Analyse du spectre HSQC

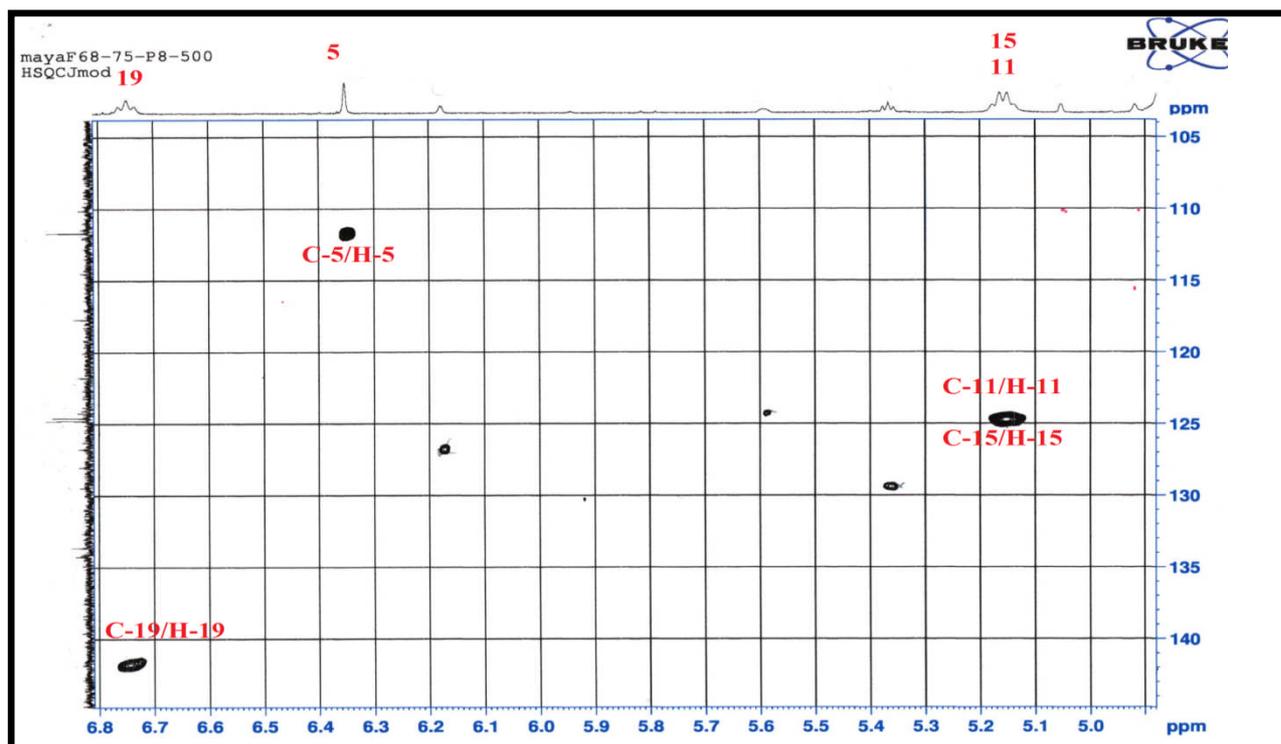


Figure 104. Spectre HSQC du composé C2

- Analyse du spectre HMBC

L'analyse des spectres HMBC (Figures 106-107) montre les memes taches de corrélation que le composé C1 (Figure 94), la seule différence réside au niveau du cycle aromatique avec les corrélations des deux méthyls 26 et 27 :

- H-26 corrèle avec les carbones aromatiques C-5, C-6, C-7 et le C-8 ce qui nous indiquera position sur le C-7.
- H-27 montre des taches de corrélation avec les carbones aromatiques C-4a, C-7, C-8 et C-8a ce qui le positionne sur le carbone quaternaire C-8.

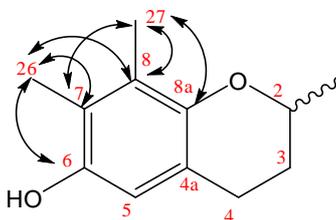


Figure 105. Corrélations HMBC du composé C2

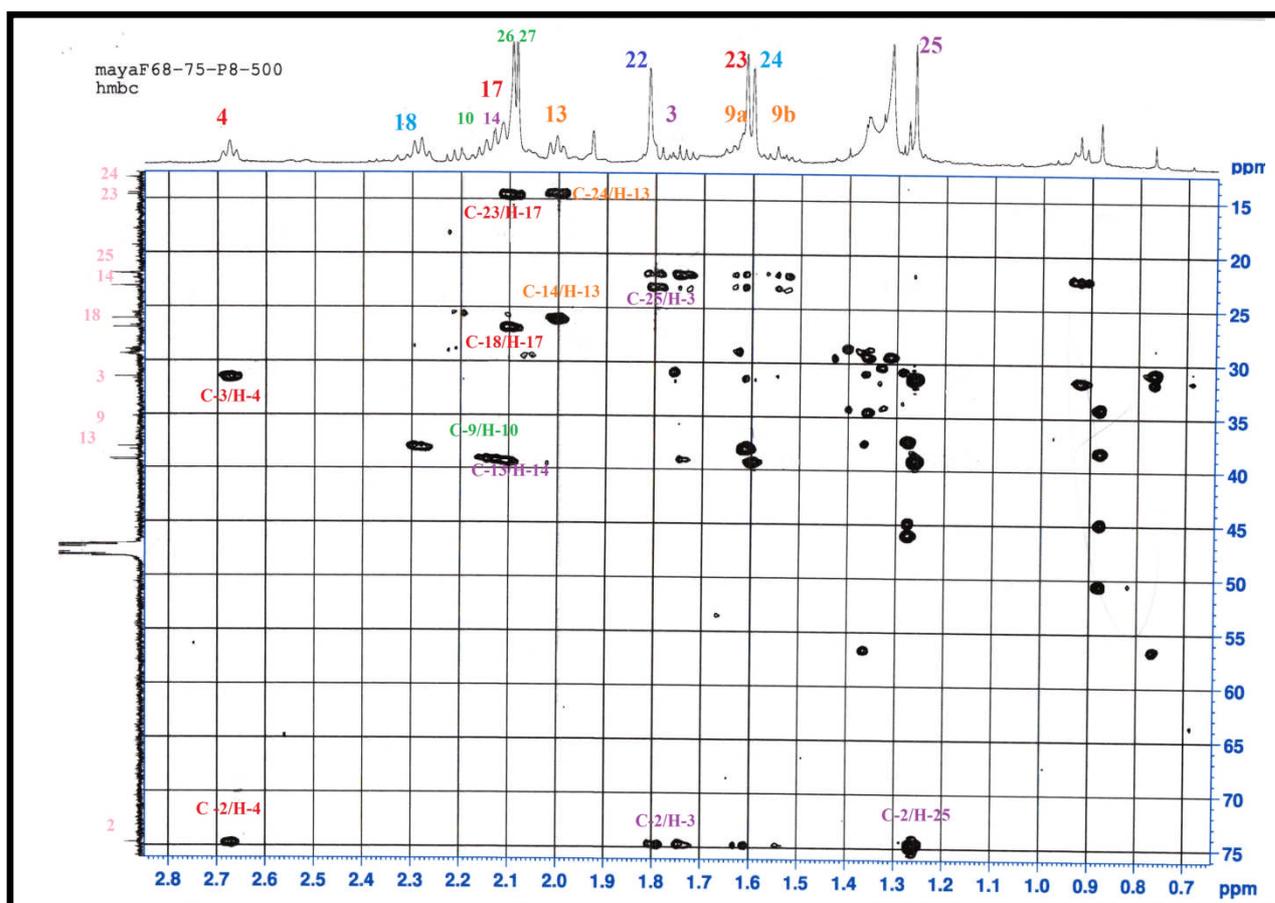


Figure 106. Spectre HMBC de  $\delta_{\text{C}}$  15 à 75 ppm du composé C2

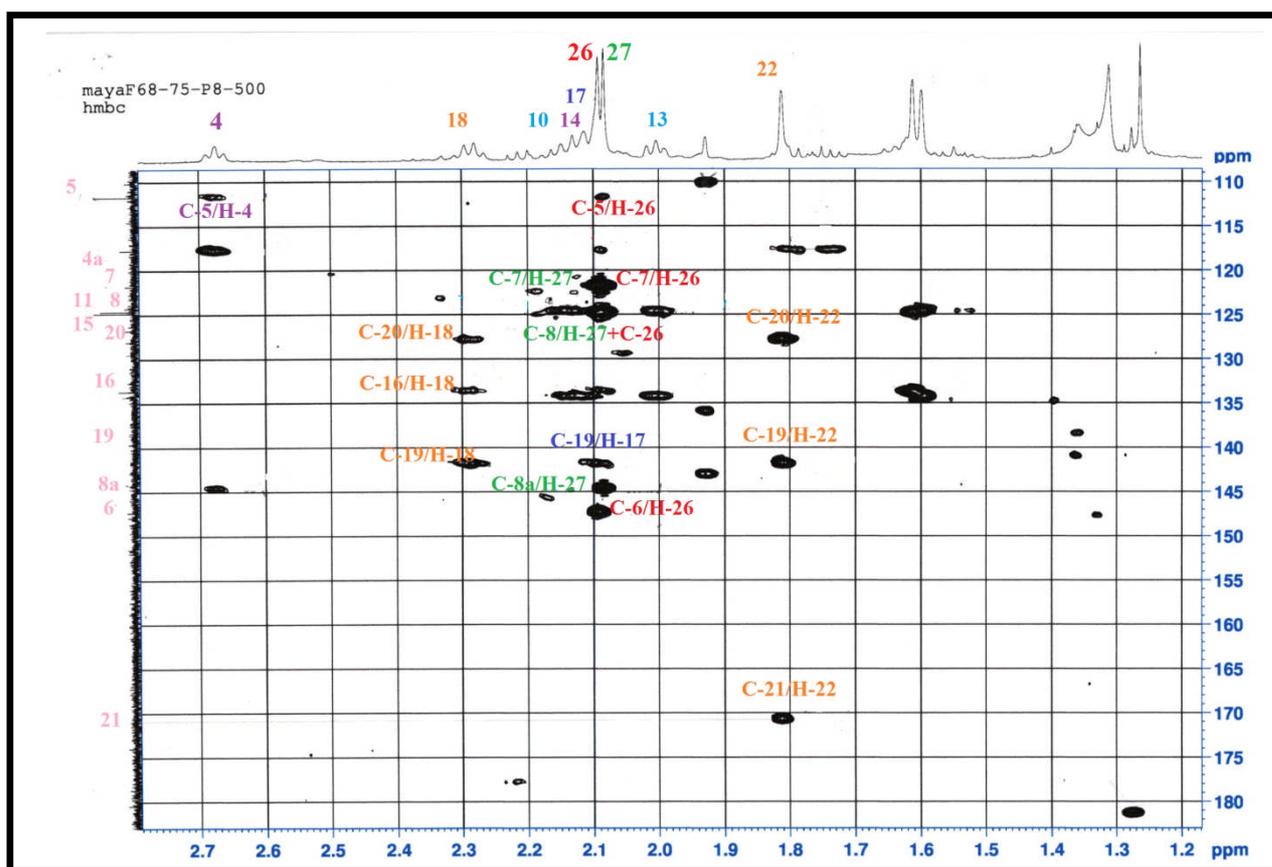


Figure 107. Spectre HMBC de  $\delta_{\text{C}}$  110 à 180 ppm du composé C2

- Analyse du spectre NOESY

L'analyse du spectre NOESY (Figure 108) du composé C2 est similaire à celle du composé C1 décrit précédemment avec une configuration *trans* de la chaîne sesquiterpénique et la configuration *R* du carbone asymétrique C-2.

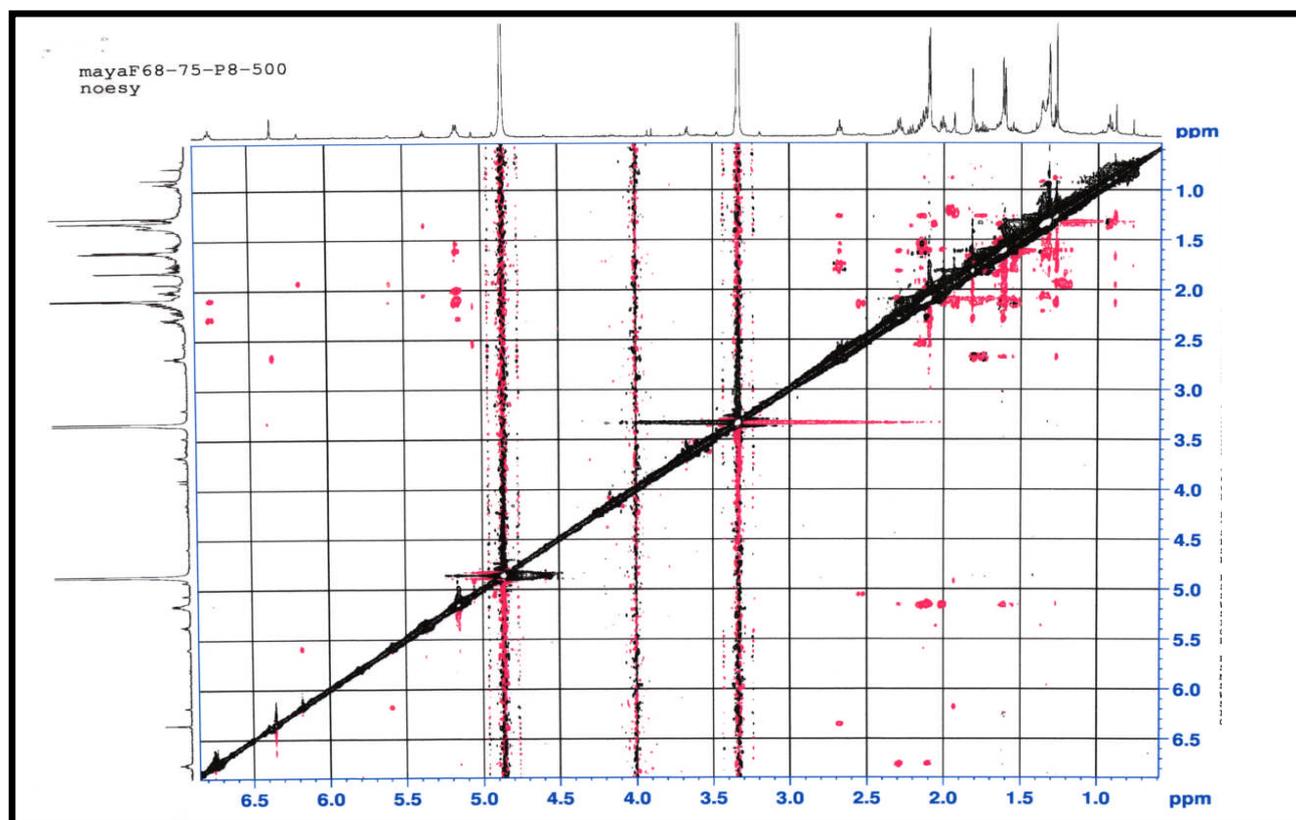
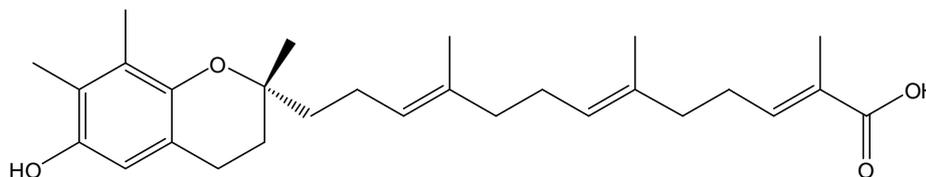


Figure 108. Spectre NOESY du composé C2

Avec un  $[\alpha]_D^{20}$  de valeur  $-0.5^\circ$ , la structure du composé C2 a été identifiée comme Acide  $\gamma$ -garcinoïque isolé précédemment de *Garcinia amplexicaulis* (Alsabil et al., 2016).



C2 : Acide  $\gamma$ -garcinoïque.

### 2.1.1.3. Identification du composé C3

#### • Analyse du spectre de masse

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS en mode positif (figure 109) du produit C3, montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  430.3046  $[M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 390.31 correspondant à une formule brute en  $C_{27}H_{41}O_3$

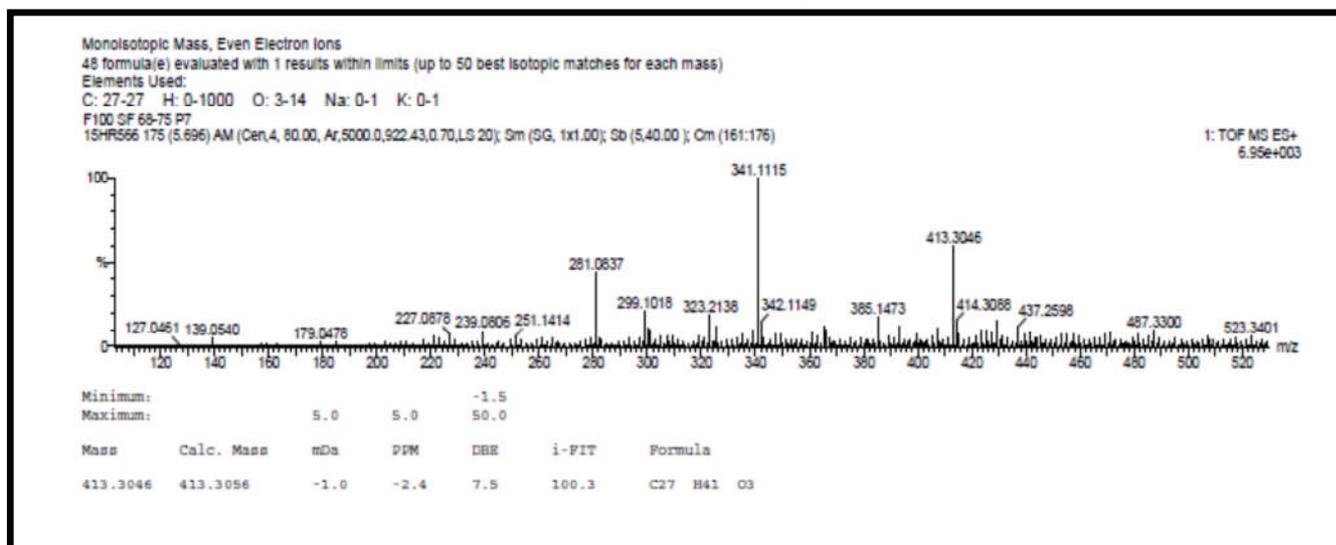


Figure 109. Spectre de masse HR-ESI-MS du composé C3

- Analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$

le composé C3 montre une forte ressemblance avec le composé C1 décrit précédemment au niveau des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Figures 82-83). Cependant la différence est observée au niveau du noyau aromatique avec deux signaux attribuables à C-5 ( $\delta_{\text{H}} 6.34 / \delta_{\text{C}} 113.6$  ppm) et C-7 ( $\delta_{\text{H}} 6.43 / \delta_{\text{C}} 116.6$  ppm) avec une constante de couplage  $J = 2.8$  Hz indiquant une position méta et la substitution des positions 6 et 8. On note également l'absence d'un méthyle (C-27) et du signal attribuable au groupement carbonyle et la présence d'un  $\text{CH}_2\text{-OH}$  sous forme d'un singulet résonnant à  $\delta_{\text{H}} 3.92 / \delta_{\text{C}} 69.0$  ppm (Figures 110-111)

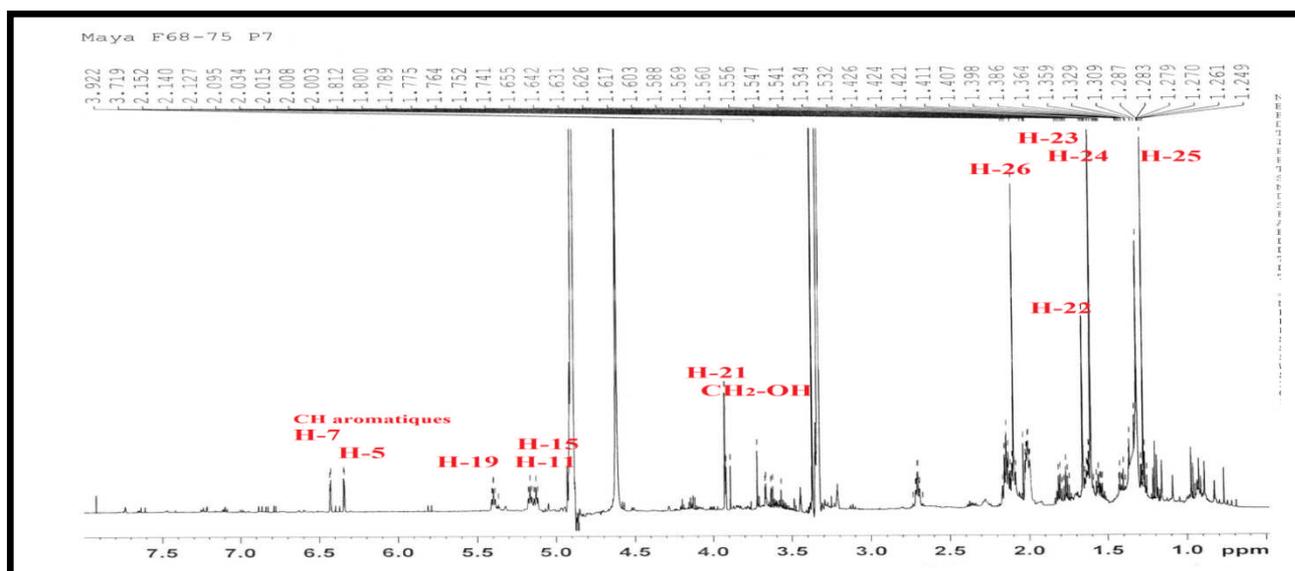


Figure 110. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C3

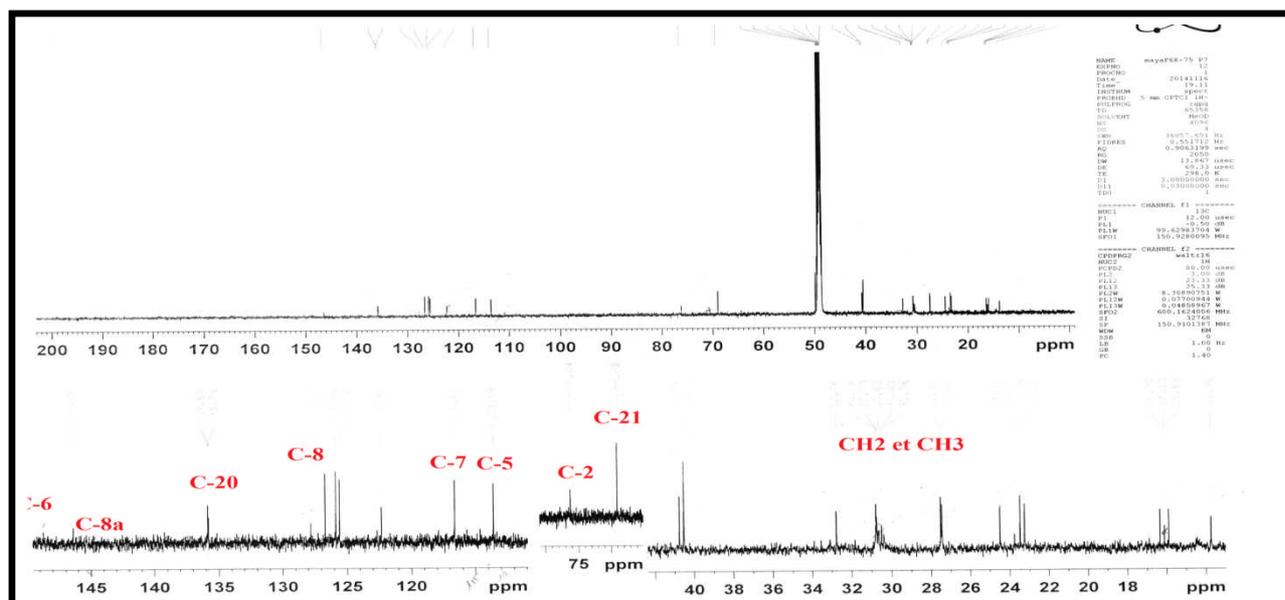


Figure 111. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C3

- Analyse du spectre COSY

Une comparaison avec les spectres COSY (Figures 85-86) du composé C1 montre les memes corrélation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figures 112-113). les seules différences notables sont :

- La corrélation des deux protons aromatiques H-5 et H-7
- Corrélation du proton méthylique H-26 avec le proton H-7
- Corrélation des protons H-21 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ) avec le methyle H-22 (Figure 113).

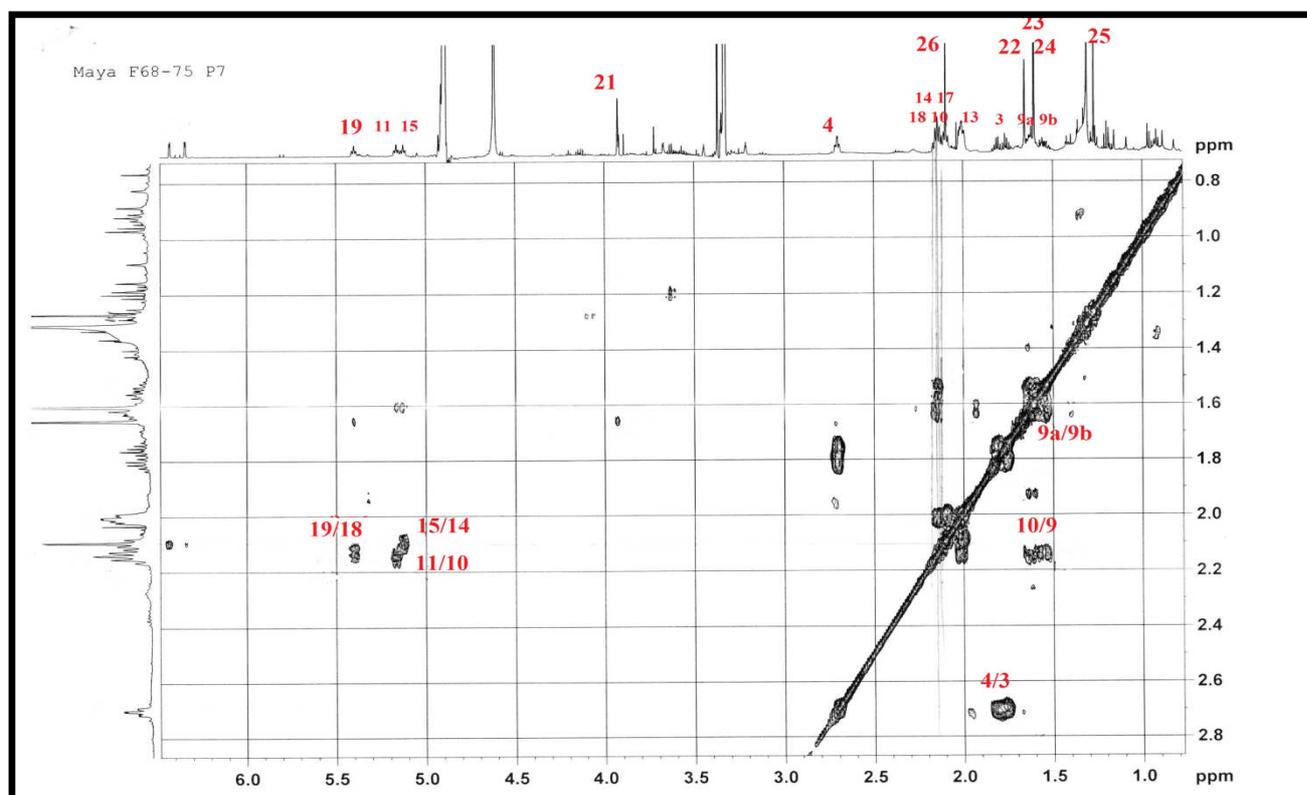


Figure 112. Spectre COSY de  $\delta_{\text{H}}$  à 0.8 à 2.8 ppm du composé C3

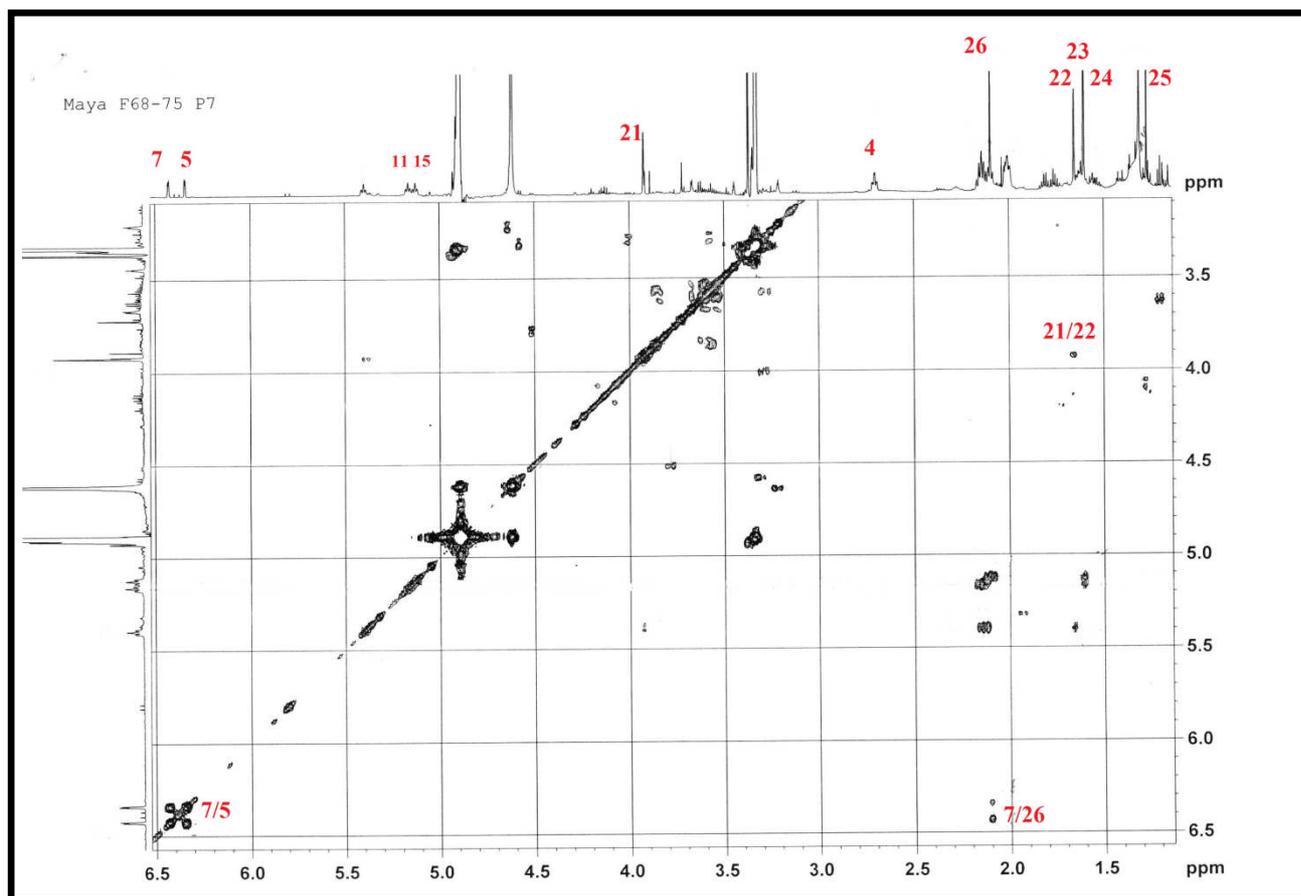


Figure 113. Spectre COSY de  $\delta_H$  3 à 6.5 ppm du composé C3

- Analyse du spectre HSQC

Par l'analyse du spectre HSQC (Figure 114), on détermine les déplacements chimiques des carbones portant les protons aromatiques (C-5 et C-7) ainsi que les  $CH_2-OH$  (C-21) (Tableau 23).

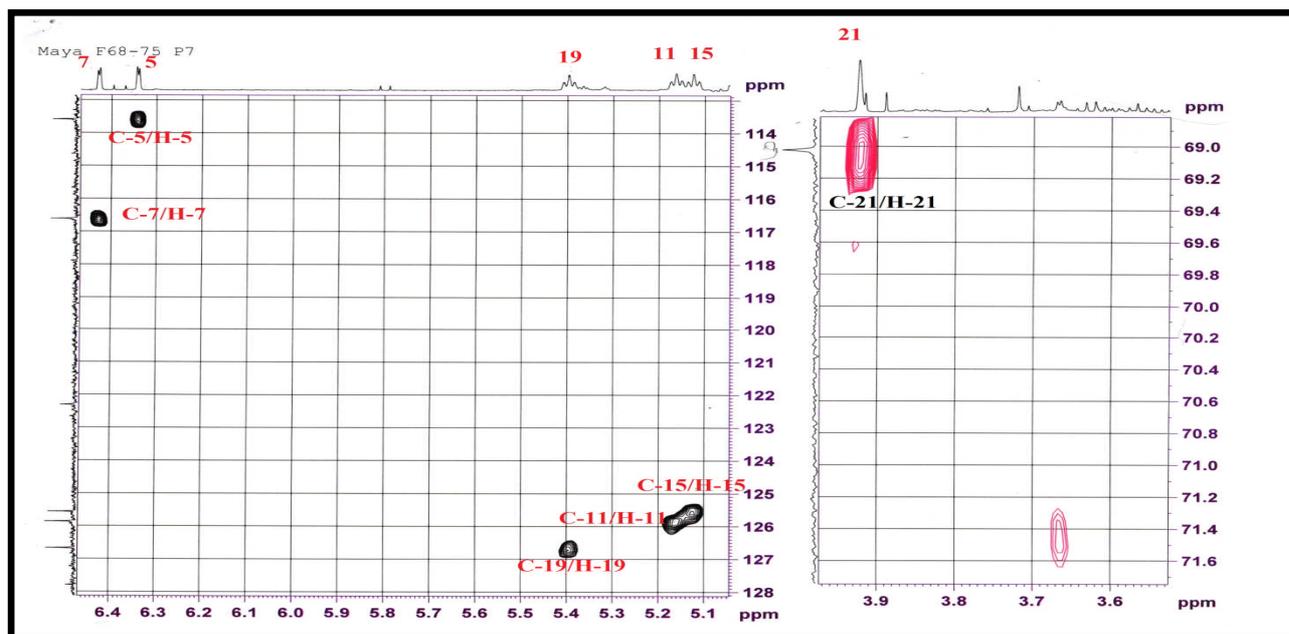


Figure 114. Spectre HSQC du composé C3

### • Analyse du spectre HMBC

Les corrélations apparentes sur les spectres HMBC (Figures 116-117) sont pour la plupart semblables à celles du composé **C1** décrit précédemment avec une différence au niveau du cycle aromatique et avec le remplacement du carbonyle par le CH<sub>2</sub>-OH :

- Le proton méthylique H-26 corrèle avec les carbones aromatiques C-6, C-7, C-8 et C-8a.
- Le proton H-21 (CH<sub>2</sub>-OH) résonnant à  $\delta_H$  3.92 ppm montre des taches de corrélations avec les carbones éthyléniques C-19 ( $\delta_C$  126.7 ppm), C-20 ( $\delta_C$  135.8 ppm) et avec le méthyl C-22 ( $\delta_C$  13.7 ppm).

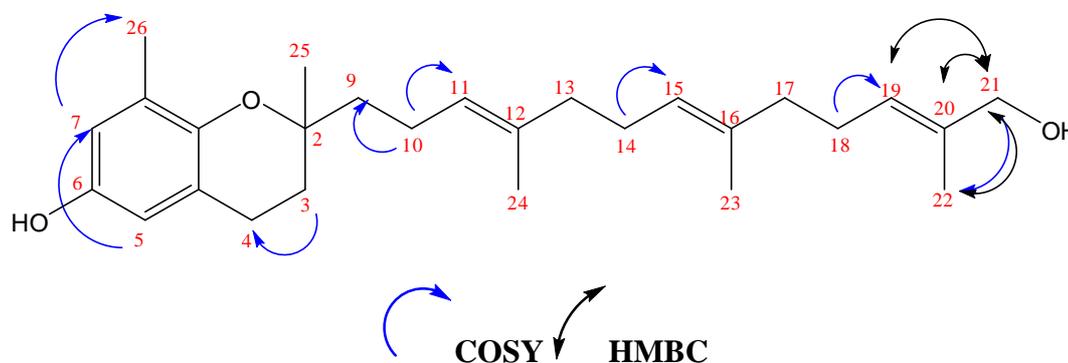


Figure 115. Corrélations COSY et HMBC du composé **C3**

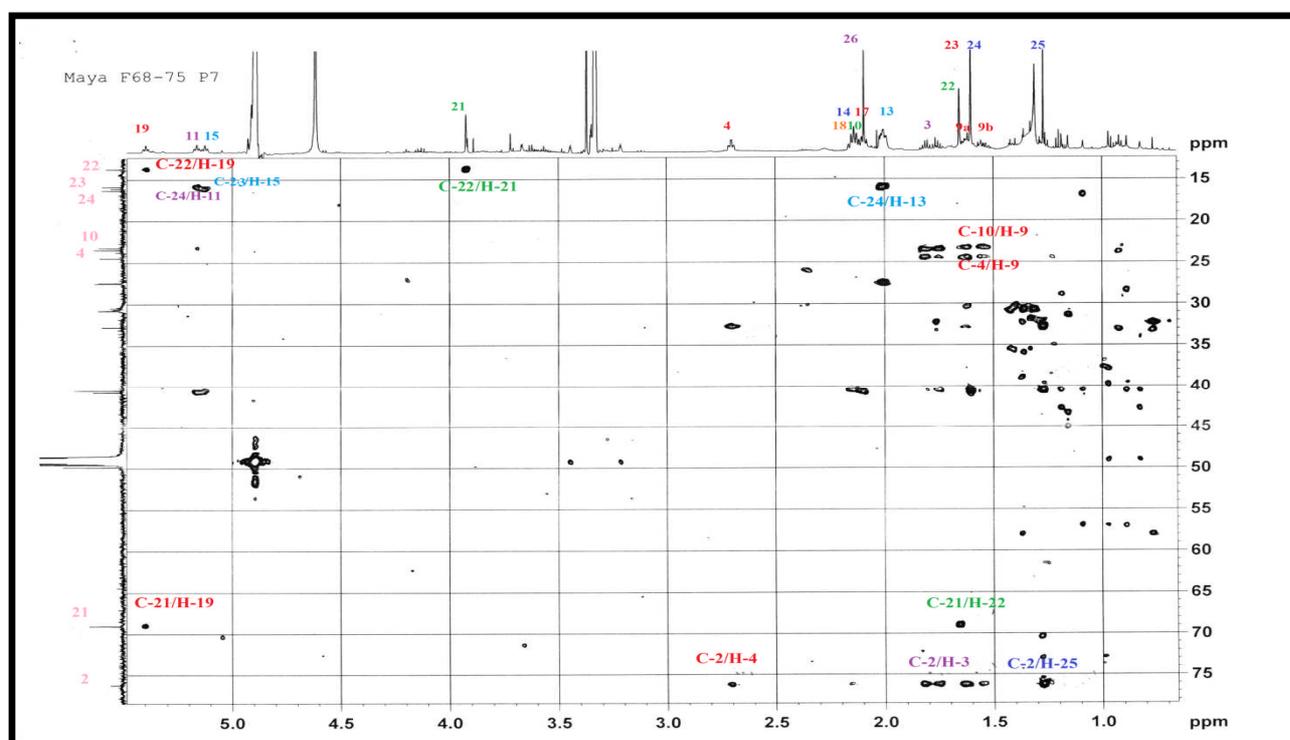


Figure 116. Spectre HMBC de  $\delta_C$  15 à 75 ppm du composé **C3**

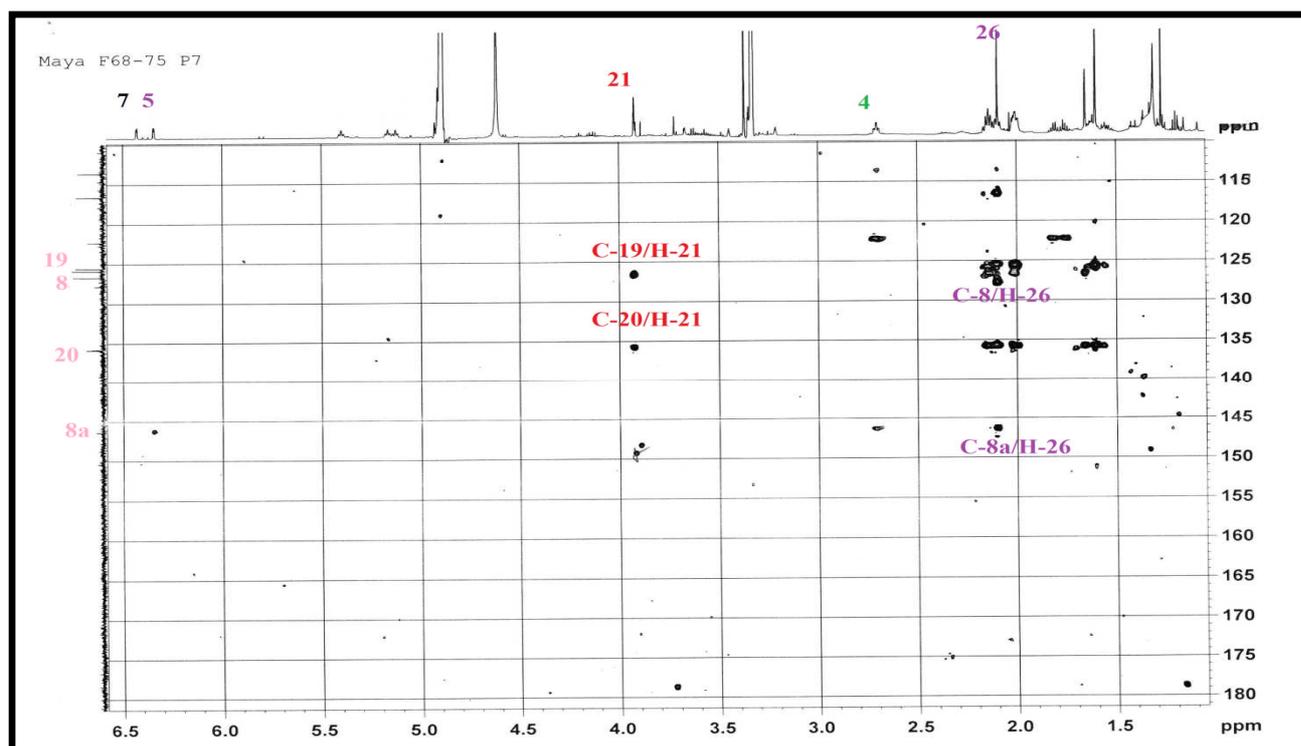
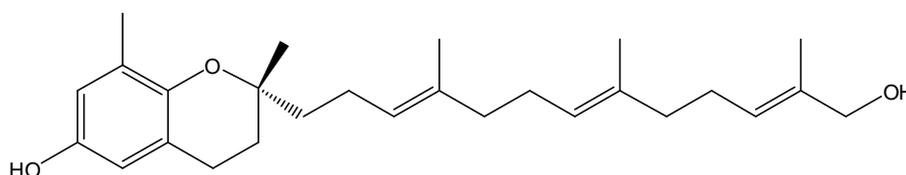


Figure 117. Spectre HMBC de  $\delta_C$  115 à 180 ppm du composé **C3**

L'analyse des spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMBC permet d'identifier le composé **C3** comme étant  $\delta$ -(*E*)- deoxy- amplexichromanol (Lavaud et al., 2015)



**C3** :  $\delta$ -(*E*)- deoxy- amplexichromanol

Tableau 23. Déplacement chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) des composés **C1**- **C3** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

Atome	<b>C1</b>		<b>C2</b>		<b>C3</b>	
	$\delta_H$ , mult., <i>J</i> (Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult., <i>J</i> (Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult., <i>J</i> (Hz)	$\delta_C$
<b>1</b>	-	-	-	-	-	-
<b>2</b>	-	75.9	-	74.7	-	76.2
<b>3</b>	3a: 1.79, dd, 13.7, 6.8 3b: 1.71, dd, 13.7, 6.8	32.1	3a: 1.73, m 3b: 1.78, m	31.5	3a : 1.81, dd,13.7; 6.9 3b : 1.76, dd, 13.4; 6.7	32.8
<b>4</b>	2.73, td, 6.8, 1.5	18.4	2.68, t, 7.1	21.9	2.7, td,7.3; 3.2	23.7
<b>4a</b>	-	116.1	-	117.7	-	122.3
<b>5</b>	-	144.4	6.35 s	111.7	6.34, d, 2.8	113.6
<b>6</b>	-	142.8	-	147.3	-	148.9

Identification des produits isolés de *Cedrus atlantica*

7	6.51, s	117.1	-	121.8	6.43, d, 2.8	116.6
8	-	122.4	-	124.3	-	127.8
8a	-	146.2	-	144.8	-	146.5
9	9a: 1.62, m 9b: 1.56, m	40.3	9a: 1.61, m 9b: 1.52, m	39.1	9a : 1.62, m 9b : 1.55, m	40.7
10	2.14, q, 7.8	23.2	2.14, q, 7.7	21.9	2.14, t, 15.1	23.2
11	5.27, t, 7.6	125.9	5.14, q, 5.8	124.6	5.17, t, 6.3	125.9
12	-	135.8	-	134.3	-	135.8
13	2.01, t, 7.3	40.7	2.00, t, 6.4	39.3	2.01 m	40.5
14	2.10, m	27.5	2.10, m	26.1	14a: 2.1, m 14b: 2.01, m	27.5
15	5.25, t, 7.4	126.2	5.15, q, 5.8	124.8	5.12, t, 7.2	125.6
16	-	135.1	-	133.7	-	135.8
17	2.10, m	39.4	2.10, m	37.9	2.01, m	40.7
18	2.29, q, 7.4	28.3	2.29, q, 7.1	26.9	2.13, m	27.5
19	6.74, t, 6.6	143.0	6.74, t, 6.6	141.9	5.4, td, 7.3 ; 7.1	126.7
20	-	129.5	-	129.5	-	135.8
21	-	172.4	-	171.0	3.92 s	69.0
22	1.82, s	12.6	1.81, s	13.0	1.65 s	13.7
23	1.62, s	16.0	1.61, s	14.6	1.6 s	16.1
24	1.60, s	15.9	1.60, s	14.5	1.6 s	15.9
25	1.27, s	24.4	1.26, s	23.1	1.27 s	24.5
26	3.76, s	60.4	2.90, s	10.7	2.09 s	16.3
27	2.06, s	15.9	2.80, s	10.7	-	-

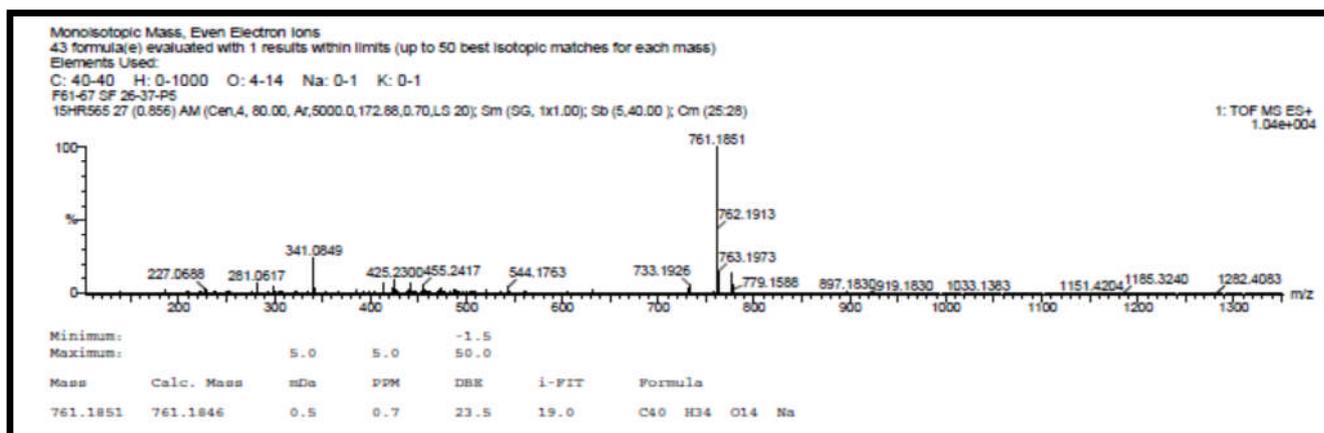
### 2.1.2. Détermination structurale des composés flavonoides C-4-C6

Parmi les molécules extraites des cônes de *C. atlantica*, trois flavonoides (C4- C6) ont été isolés à partir des fractions **F80 :20** et **F40 :60** dont un possède une structure nouvelle (C4).

#### 2.1.2.1. Identification du composé C4

- Analyse du spectre de masse du composé C4

Le spectre de masse haute résolution obtenu en HR-ESI-MS mode positif (Figure 118) du composé **C4**, montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z$  761.1851  $[M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 738.2 correspondant à une formule brute en  $C_{40}H_{34}O_{14}$



**Figure 118.** Spectre de masse HR-ESI-MS du composé **C4**

### • Analyse du spectre RMN $^1\text{H}$

L'analyse du spectre  $^1\text{H}$  (Figure 119) du produit **C4** montre :

- Deux doublets à  $\delta_{\text{H}}$  6.15ppm et le second à  $\delta_{\text{H}}$  6.31ppm avec des constantes de couplage  $J= 1.9\text{Hz}$  attribuables respectivement à H-6 et H-8 confirmant l'oxydation des positions 5 et 7.
- Trois signaux aromatiques attribuables aux protons du cycle B : H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.85ppm, d,  $J= 1.9\text{Hz}$ ), H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.89 ppm, d,  $J= 8,4\text{Hz}$ ) et H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  7.6ppm, dd,  $J= 8.4 ; 1.9\text{Hz}$ ) indiquant sa substitution en position 3' et 4'.
- Un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  3.95ppm caractéristique d'un groupement méthoxyle.

Ces données nous orientent vers l'origine de la partie aglycone : isorhamnetine (Mabry et al., 1970; Markham., 1994).

Cette proposition sera confirmée par la suite par l'analyse des spectres RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY).

- Un proton anomérique sous forme d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  5.48ppm avec une constante de couplage  $J= 7.9\text{Hz}$  caractéristique d'une  $\beta$ - configuration (Mabry et al., 1970).
- Un ensemble de protons résonnant entre  $\delta_{\text{H}}$  3.62 et  $\delta_{\text{H}}$  5.2 ppm correspondant aux déplacements chimiques d'un glucose (Kosuge et al., 1985)
- Quatre protons éthyléniques sous forme de doublets à  $\delta_{\text{H}}$  6.66 ppm,  $\delta_{\text{H}}$  6.29ppm,  $\delta_{\text{H}}$  7.80ppm et  $\delta_{\text{H}}$  7.48ppm avec des constantes de couplages  $J = 16\text{Hz}$  attribuables aux H-2''', H-2''', H-3''' et H-3''' en configuration *trans* (Markham, 1982; Markham and Geiger, 1994; Abdel-Shafeek et al., 2000; Hosny and Rosazza, 1998).
- Des protons aromatiques entre  $\delta_{\text{H}}$  7.44 et  $\delta_{\text{H}}$  7.66ppm attribuables à deux cycles aromatiques symétriques.

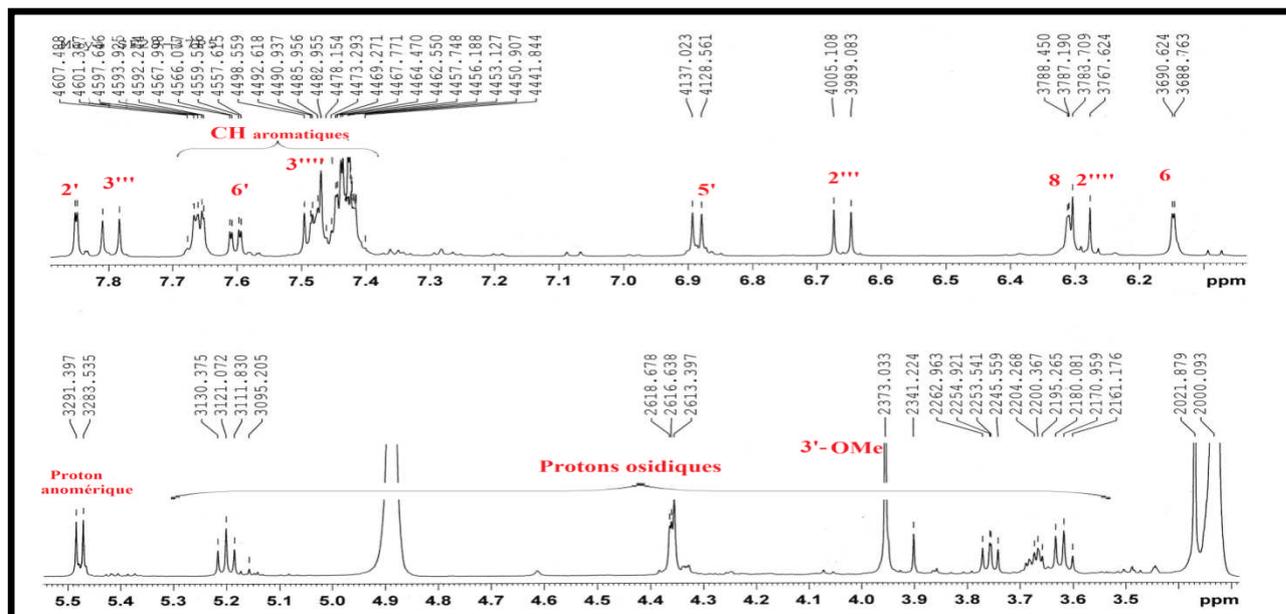


Figure 119. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C4

• Analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$

Sur le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure 120), les signaux caractéristiques suivants sont observés:

- Un signal vers  $\delta_{\text{C}}$  177.9 ppm indiquant la présence d'une flavone.
- Les carbones quaternaires C-5 et C-7 résonnant respectivement vers  $\delta_{\text{C}}$  161.6 et à  $\delta_{\text{C}}$  164.6 ppm confirmant leur hydroxylation.
- Les pics à  $\delta_{\text{C}}$  157.5 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  157 ppm attribuables aux C-2 et C-8a. Et les pics à  $\delta_{\text{C}}$  93.4 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  98.6 ppm et vers  $\delta_{\text{C}}$  104.2 ppm correspondent aux carbones C-8, C-6 et C-4a du noyau A.
- Les carbones aromatiques du noyau B à  $\delta_{\text{C}}$  112.8 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  122.6 ppm attribuables à C-2' et C-5' respectivement et ceux à  $\delta_{\text{C}}$  121.5 et  $\delta_{\text{C}}$  114.6 ppm attribuables aux C-1' et C-6'.
- Un pic caractéristique d'un O-CH<sub>3</sub> à  $\delta_{\text{C}}$  55.3 ppm.
- Un proton anomérique à  $\delta_{\text{C}}$  102.2 ppm
- Un massif de carbone entre  $\delta_{\text{C}}$  62.7 et  $\delta_{\text{C}}$  77.6 ppm attribuables aux carbones du sucre caractéristiques d'un exose (sucre).
- Deux pics à  $\delta_{\text{C}}$  166.9 ppm et à  $\delta_{\text{C}}$  166.6 ppm indiquant la présence soit de carbonyles d'acide soit d'esters (C-1''', C-1''')
- Quatre carbones éthyléniques vers ppm  $\delta_{\text{C}}$  117.7 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  116.8,  $\delta_{\text{C}}$  145.1 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  145 ppm attribuables au C-2''', C-2''', C-3''' et C-3''' respectivement.

- Des C-H et des carbones quaternaires entre  $\delta_C$  127.9 -134.5ppm assignable aux deux cycles aromatiques.

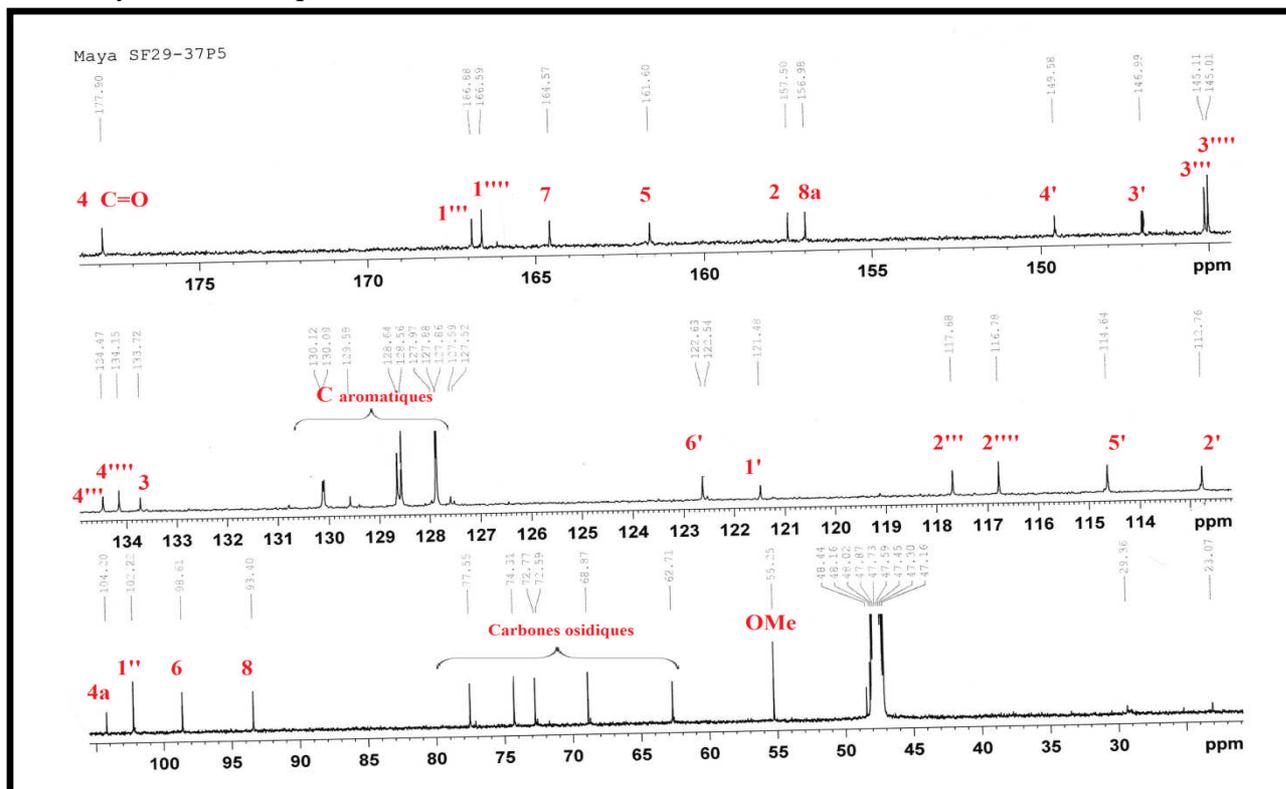


Figure 120. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C4

L'analyse RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  est en faveur d'un squelette flavonoïde de type : isorhamnetine par la présence de méthoxyle ( $\delta_{\text{H}}3.95/\delta_{\text{C}}55.2$  ppm) et d'une partie osidique identifié comme un glucose par les déplacements chimiques, en plus de la présence de deux cycles aromatiques.

- **Analyse du spectre COSY**

Sur le spectre COSY (Figure 122), les corrélations observées sont :

- Le proton H-6 corrèle avec le H-8 du noyau aromatique.
- Des taches de corrélation du proton H-6' avec les deux protons H-2' et H-5' du noyau aromatique B.
- Des corrélations entre les protons du sucre : 1''/2'', 2''/3'', 3''/4'', 4''/5'' et 5''/6''.
- Une corrélation entre 2''''/3'''' et entre 2''''/3''''.
- Corrélations des protons des cycles aromatiques 5''''/6'''' et 5''''/6''''', 8''''/7''''', 9'''' et 8''''/7''''', 9''''.

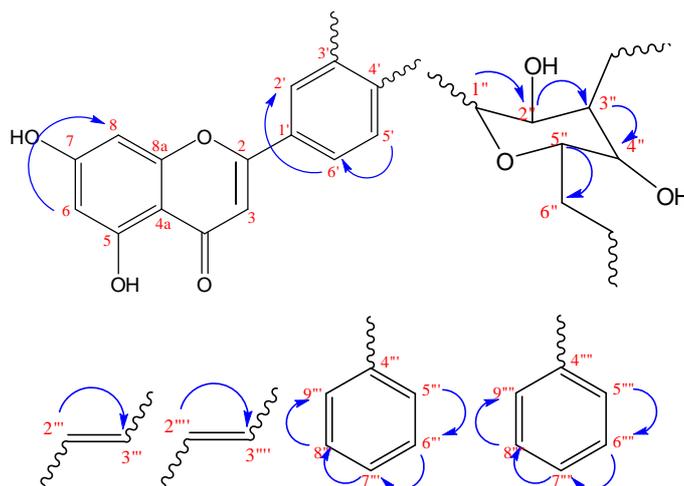


Figure 121. Corrélations COSY du composé C4

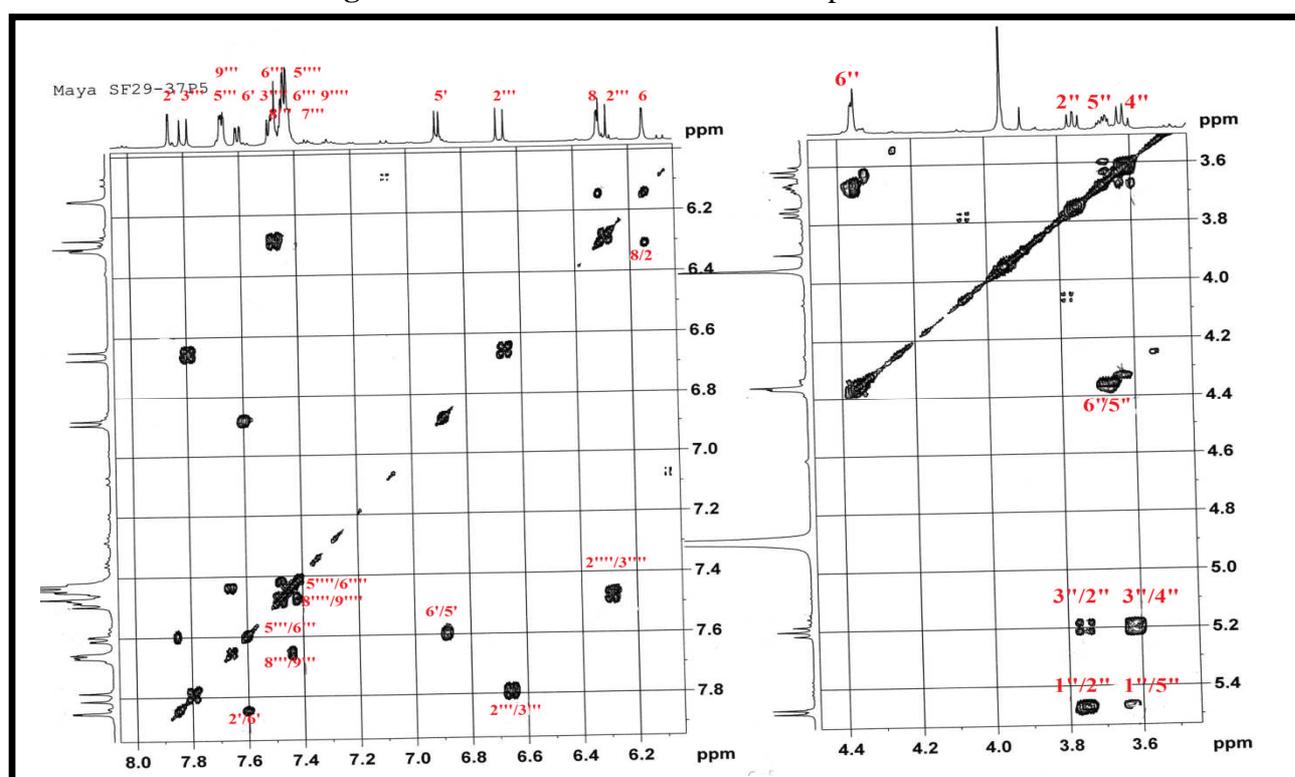


Figure 122. Spectre COSY du composé C4

- **Analyse des spectres HSQC**

L'analyse des corrélations hétéronucléaires  $^1J_{\text{H-C}}$  sur les spectres HSQC des produits C4 (Figures 123-124) permet d'identifier et d'attribuer les déplacements chimiques aux carbones du sucre et des cycles aromatiques correspondant aux protons déjà identifiés par l'analyse COSY.

Les valeurs de  $\delta_{\text{C}}$  sont répertoriées dans le tableau 24.

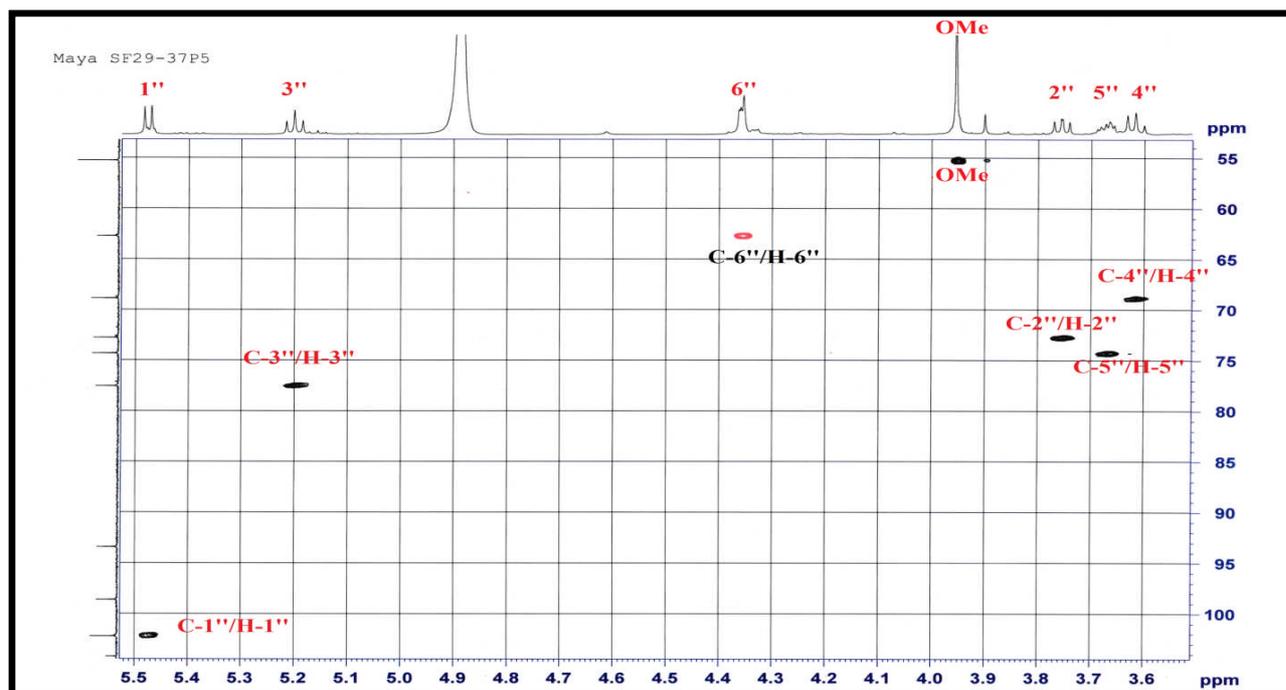


Figure 123. Spectre HSQC de  $\delta_C$  55 à 105 ppm du composé C4

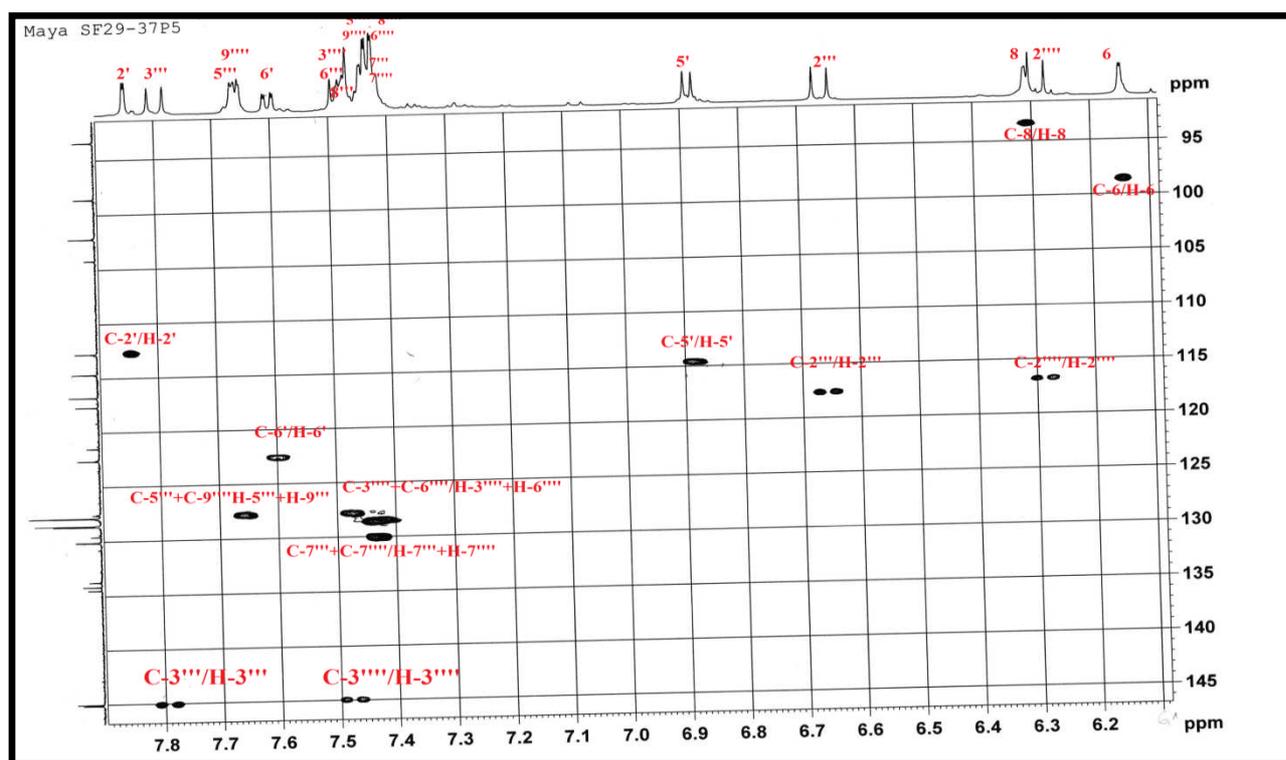


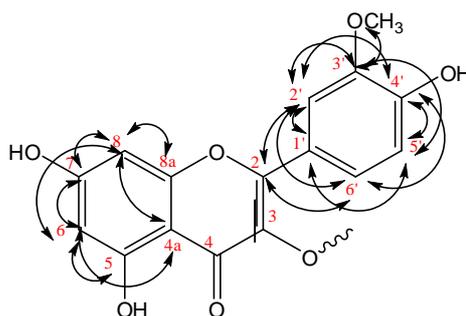
Figure 124. Spectre HSQC de  $\delta_C$  90 à 145 ppm du composé C4

- **Analyse du spectre HMBC**

L'analyse des spectres HMBC (Figure 128-130) nous permet la confirmation de la partie aglycone, l'identification de la fonction carbonyle et la localisation de cette dernière ainsi que les liaisons éthyléniques et les cycles aromatiques.

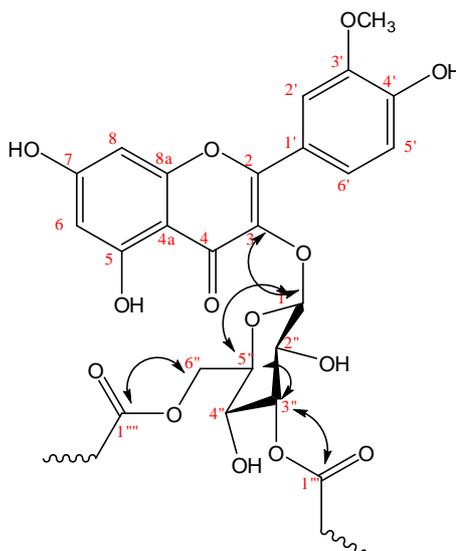
Les corrélations repérées sont :

- Corrélations du noyau A, proton H-6 avec les carbones C-4a, C-5, C-7, C-8 et C-8a et le proton H-8 avec C-4a, C-6, C-7 et C-8a.
- Des tache de corrélation entre les protons du noyau B : H-2' /C-2, C-1', C-3' et C-4' ; proton H-5' /C-1', C-3', C-4' et enfin la corrélation du proton H-6' avec C-2, C-2' et C-4'.
- La corrélation du méthoxyle avec le carbone C-3' confirmant ainsi la partie aglycone comme étant : isorhamnetine.



**Figure 125.** Corrélation HMBC du composé **C4**

- Le proton anomérique H-1'' corrèle avec le carbone C-3 indiquant ainsi sa position par rapport à la génine.
- Corrélations du sucre : H-2'' /C-3'' et C-1'' ; H-4'' /C-3'' ; C-3'' et C-6'' ; H-5''/C-1'' et C-3'', également les corrélations des protons H-3'' et H-6'' avec les carbonyls C-1''' et C-1''' respectivement, indiquant que les deux carbonyles sont attachés au sucre en position 3 et 6.



**Figure 126.** Corrélation HMBC du composé **C4**

- Les protons éthyléniques montrent les corrélations suivantes : H-2''' corrèle avec les carbone quaternaire C-1''' et le carbone quaternaire aromatique C-4''' ; H-3''' avec C-1''', C-2''', avec le carbone quaternaire aromatique C-4''' et C-5''' ; le proton H-2'''' corrèle avec les carbones C-1'''' et C-4'''' et le proton H-3'''' avec C-1'''' et C-4'''' .

Par ces corrélations, on conclut que les carbonyles sont des esters et non des acides liés au glucose d'un côté et aux carbones éthyléniques C-3''' et C-3'''' d'un autre côté d'où leurs déplacements chimiques déblindés et que ces derniers sont attachés aux cycles aromatiques.

Et enfin les corrélations des deux cycles aromatiques avec :

- Corrélation du proton H-5''' avec les carbones C-6''' et C-7'''
- Corrélation du proton H-5'''' avec les carbones C-6'''' et C-7''''.

Ces corrélations confirment la présence d'acide cinnamique (Atta-ur-Rahman et al., 1998; Hosny and Rosazza, 1998).

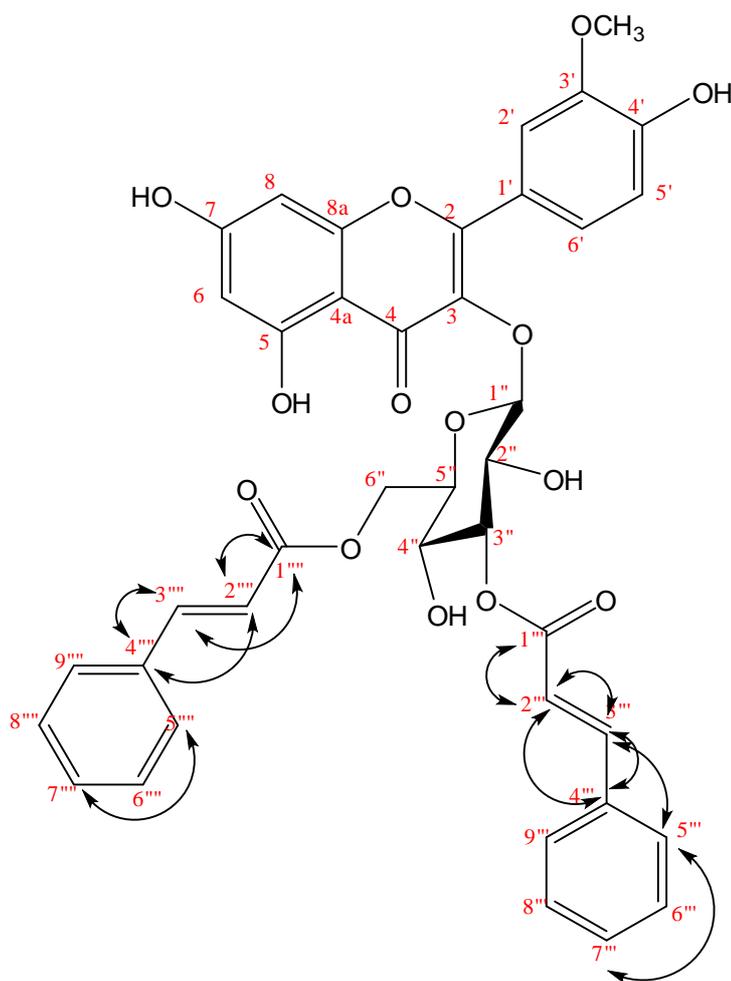


Figure 127. Corrélation HMBC du composé C4

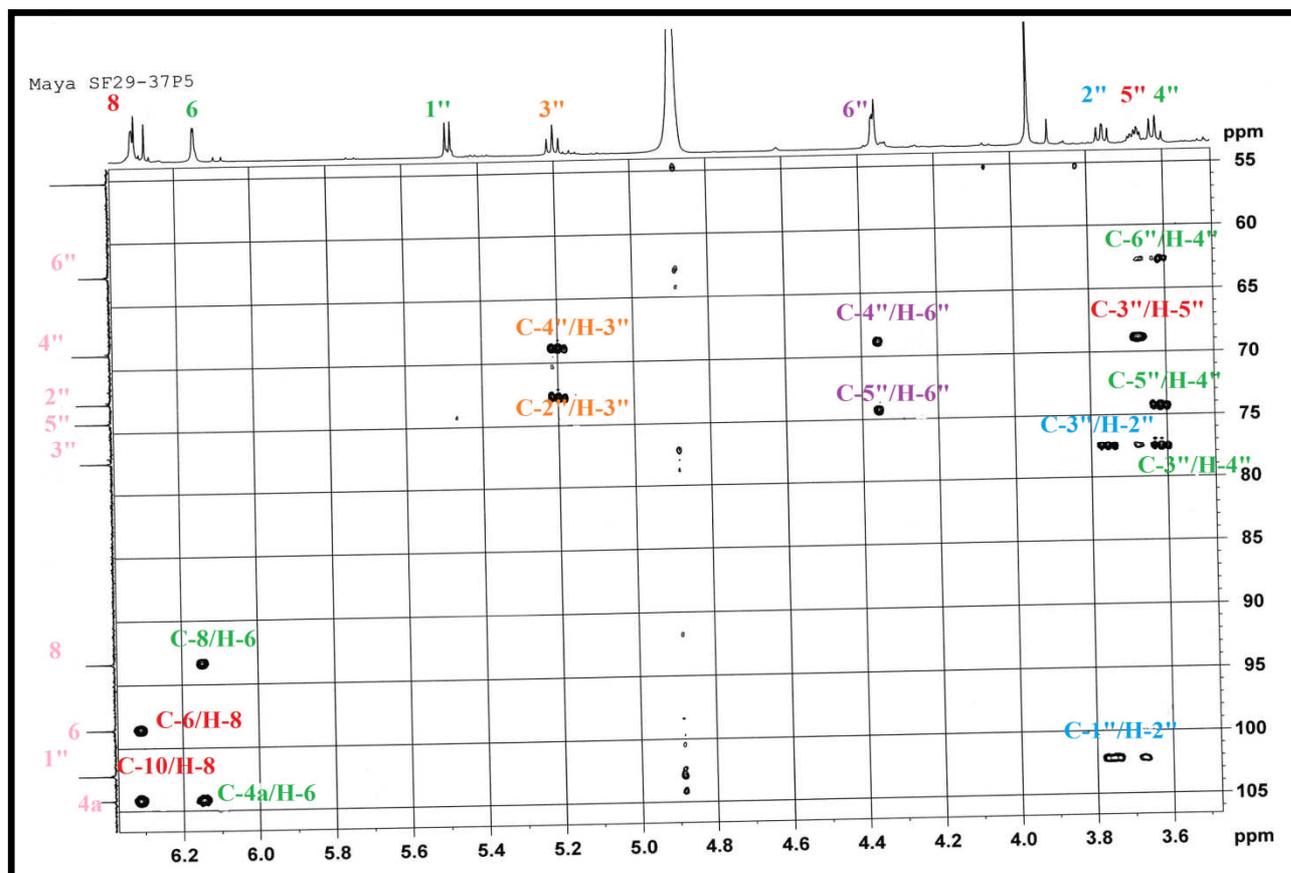
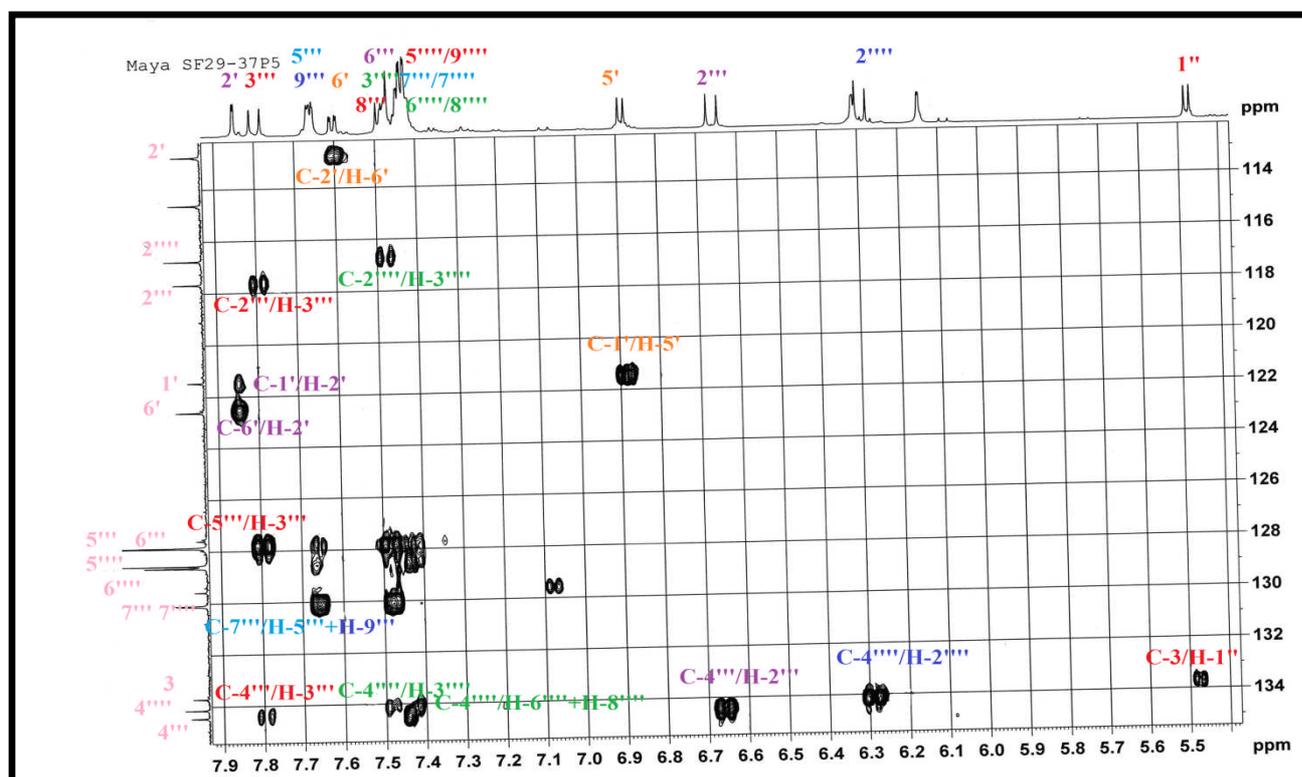
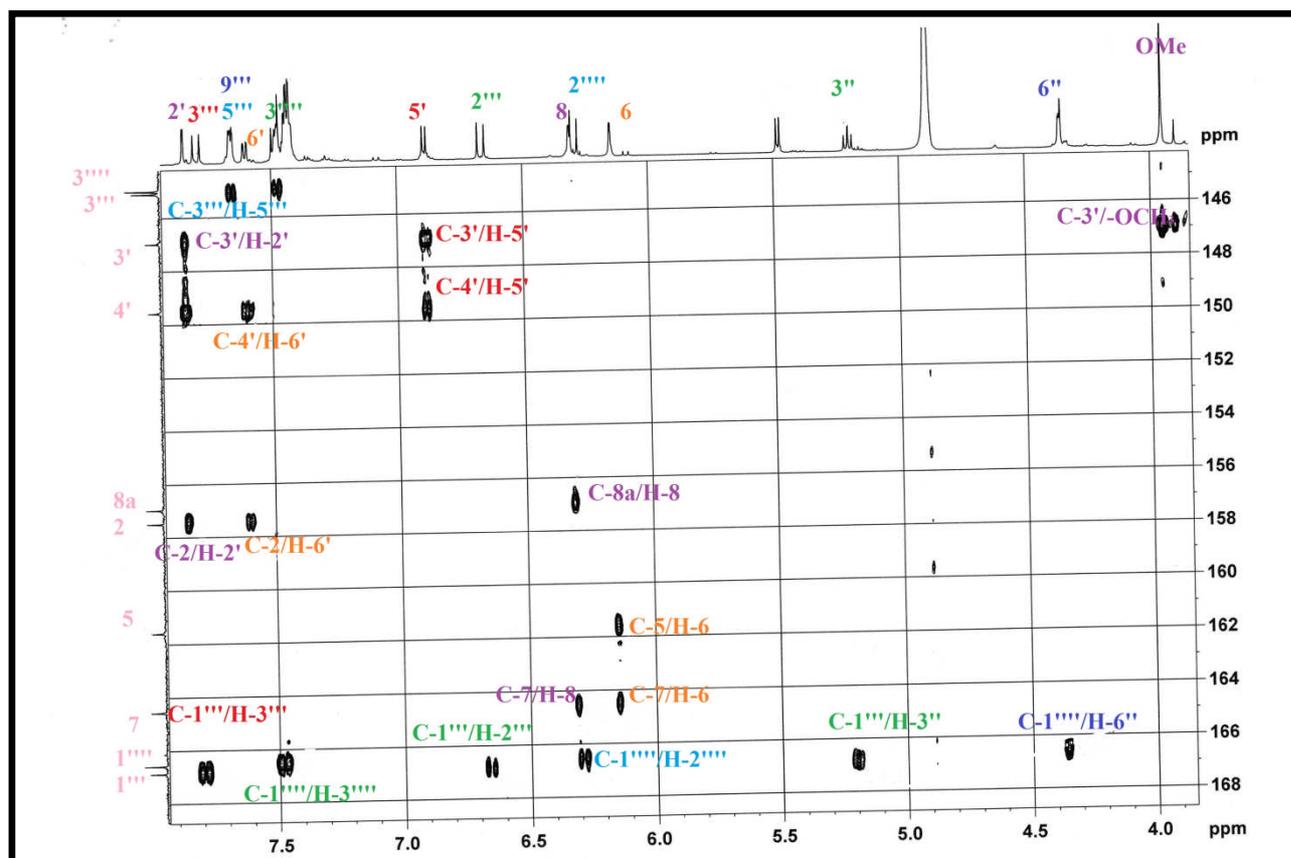
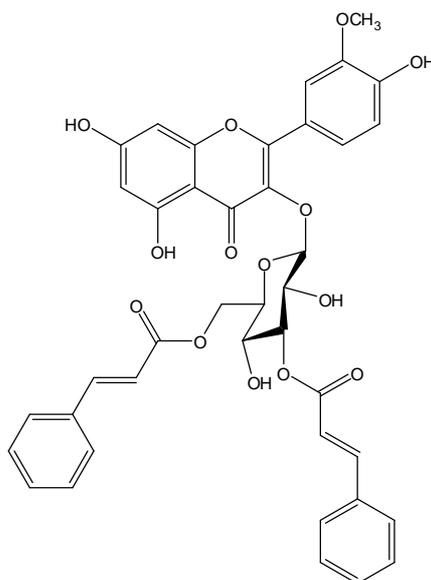
Figure 128. Spectre HMBC de  $\delta_C$  55 à 105 ppm du composé C4

Figure 129. Spectre HMBC de  $\delta_C$  114 à 134 ppm du composé **C4**Figure 130. Spectre HMBC de  $\delta_C$  146 à 168 ppm du composé **C4**

La structure du composé **C4** a pu être établie comme étant une structure nouvelle : isorhamnetin (3,6-*O*-di-*E*-cinnamoyl)-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside nommé également cedratlanticoside.



**C4** : isorhamnetin (3,6-*O*-di-*E*-cinnamoyl)-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (cedratlanticoside).

### 2.1.2.2. Identification du composé C5

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 131) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 132) du composé **C5**, nous révèle une grande ressemblance avec ceux du composé **C4** identifié précédemment avec l'absence du méthoxyle (C-7') comme différence notable dans le produit **C5** par rapport au composé **C4**. Ainsi cinq protons aromatiques attribuables à H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  8.3/ $\delta_{\text{C}}$  130.9 ppm, d,  $J=8.9\text{Hz}$ ), H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  6.86/ $\delta_{\text{C}}$  114.7 ppm, d,  $J=10.1\text{Hz}$ ), H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.87/ $\delta_{\text{C}}$  114.6 ppm, d,  $J=8.8\text{Hz}$ ) et H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  8.3/ $\delta_{\text{C}}$  130.8 ppm, d,  $J=8.8\text{Hz}$ ) indiquant sa substitution en position 4' sont identifiés, ce qui nous oriente vers l'origine de la partie aglycone qui est identifiée en kampférol (Krauze-Baranowska et al., 2013)

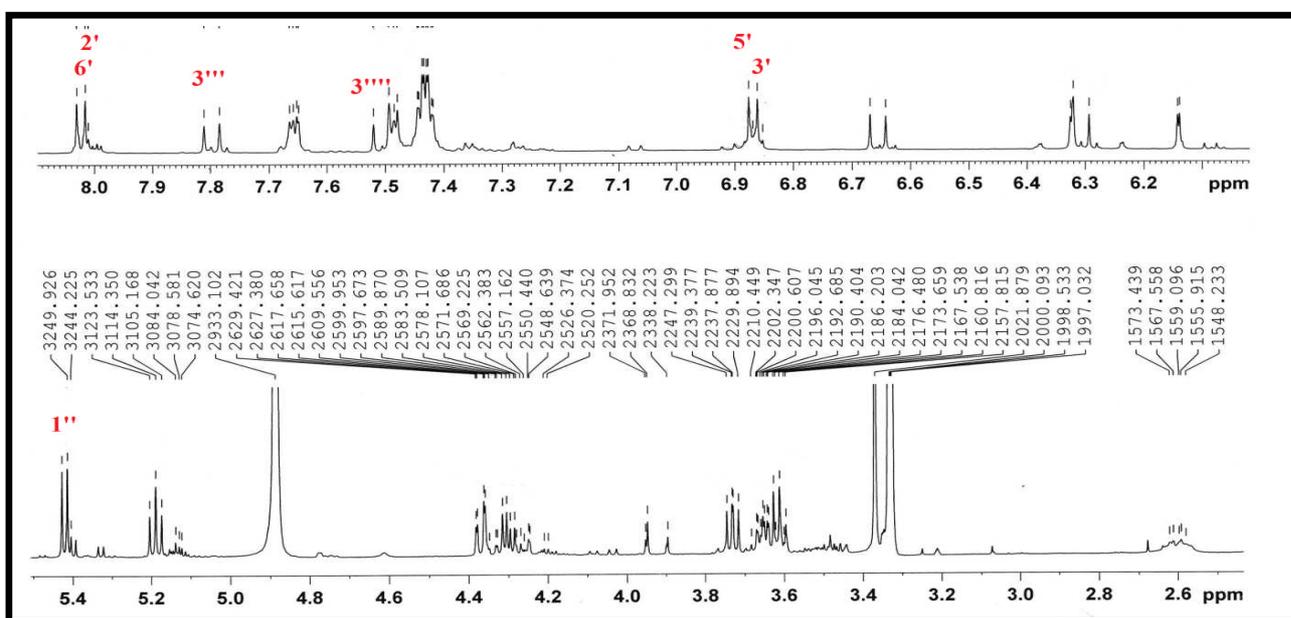


Figure 131. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **C5**

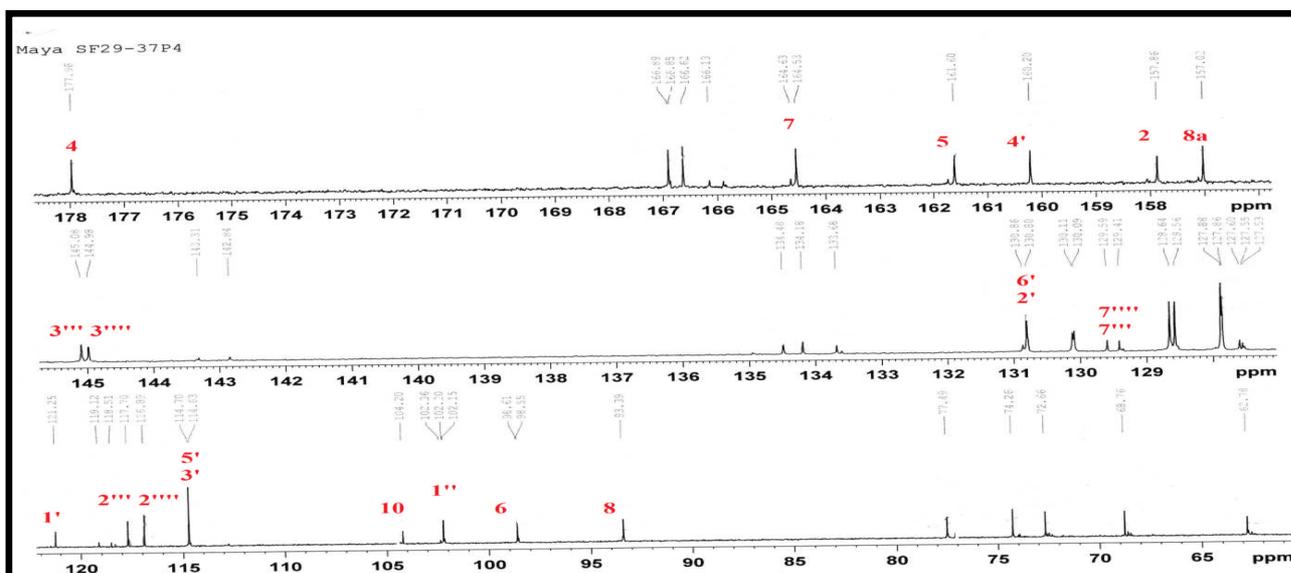


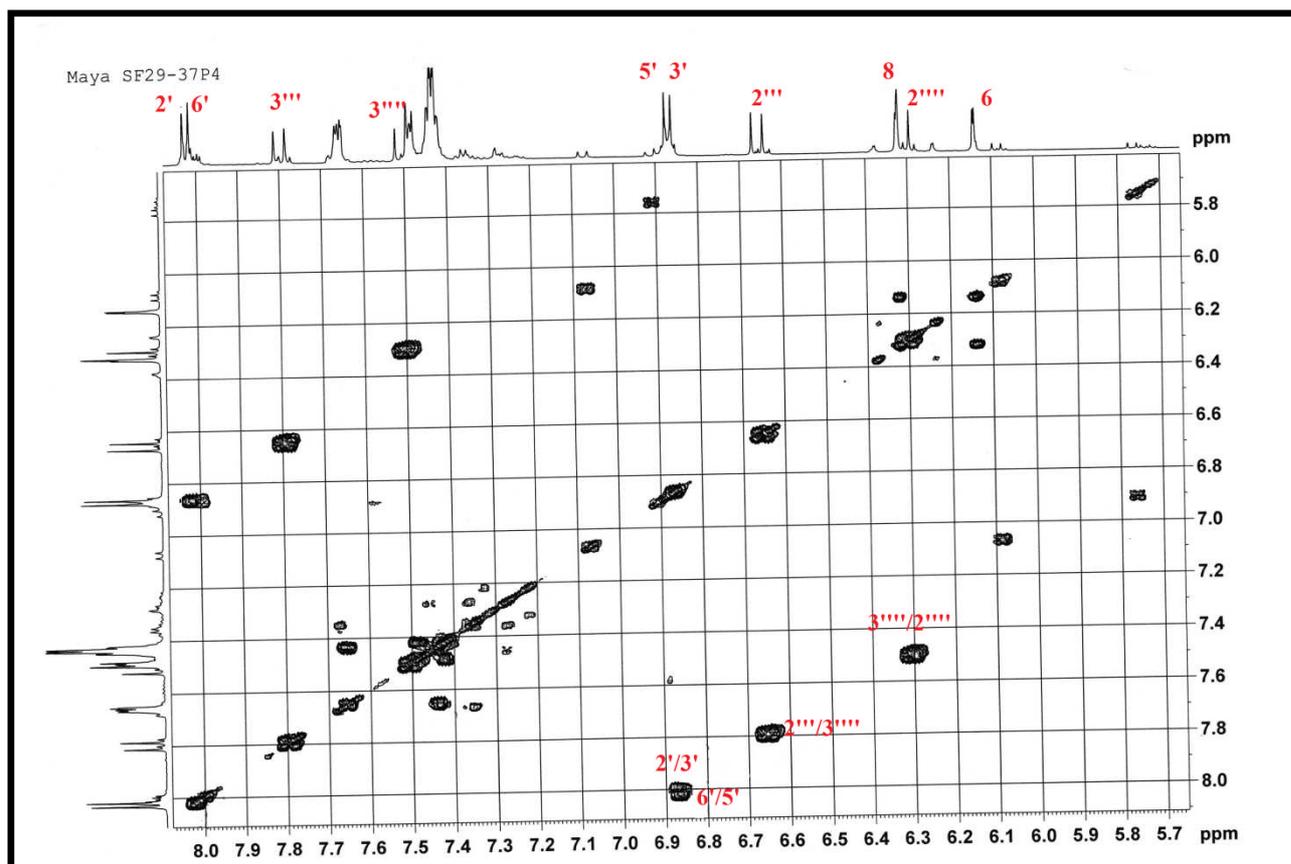
Figure 132. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **C5**

- **Analyse du spectre COSY**

Le spectre COSY (Figure 133) du produit **C5** est semblable à celui du produit **C4**, sauf pour les corrélations des protons du noyau B en raison de l'absence de substituant en position 3.

Les corrélations observées en plus de celles déjà observées précédemment sont :

- Corrélation entre H-2' et H-3'
- Corrélation entre H-5' et H-6'



**Figure 133.** Spectre COSY du composé **C5**

- Analyse du spectre HSQC

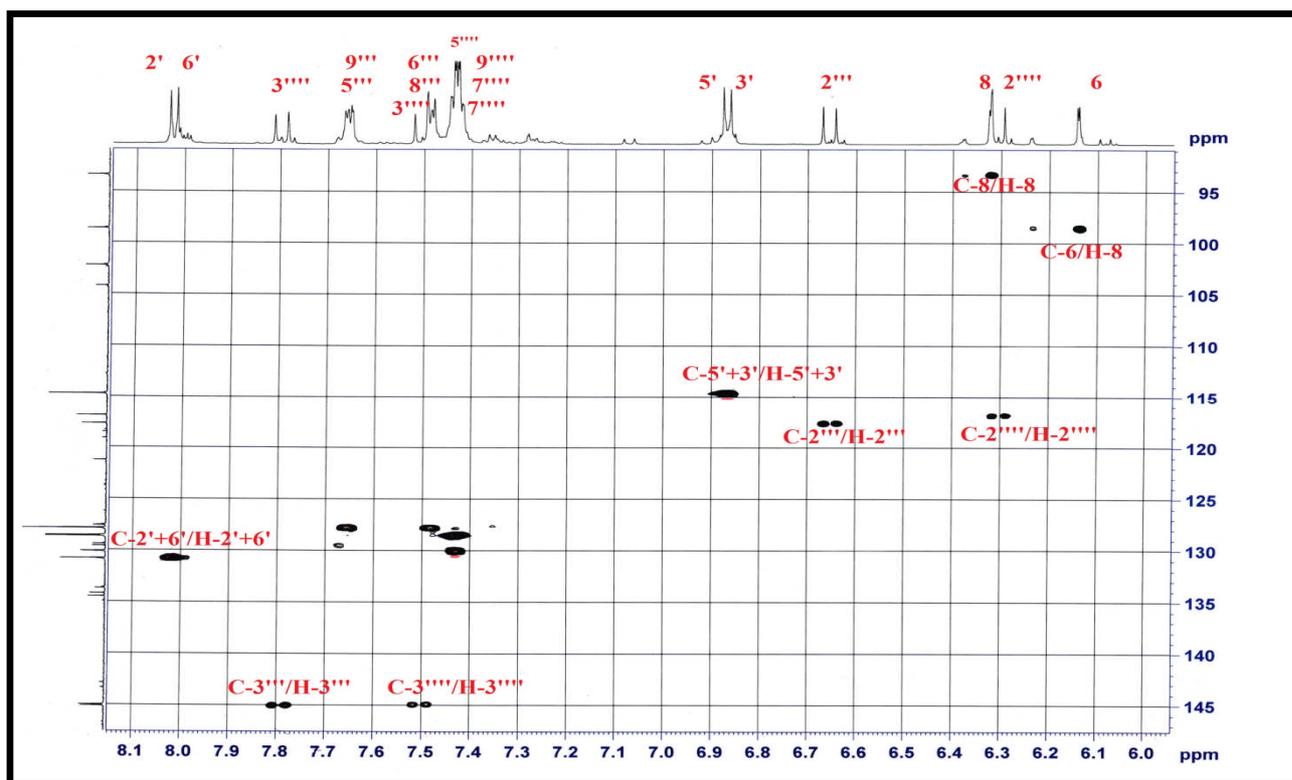


Figure 134. Spectre HSQC du composé C5

- Analyse du spectre HMBC

La seule différence entre le spectre HMBC (Figure 135) du produit C5 et les spectres HMBC du composé C4 décrit précédemment réside dans l'absence de groupement méthoxyle attaché au carbone C-3' et donc l'absence de corrélation confirmant ainsi la partie aglycone comme étant : le kampférol.

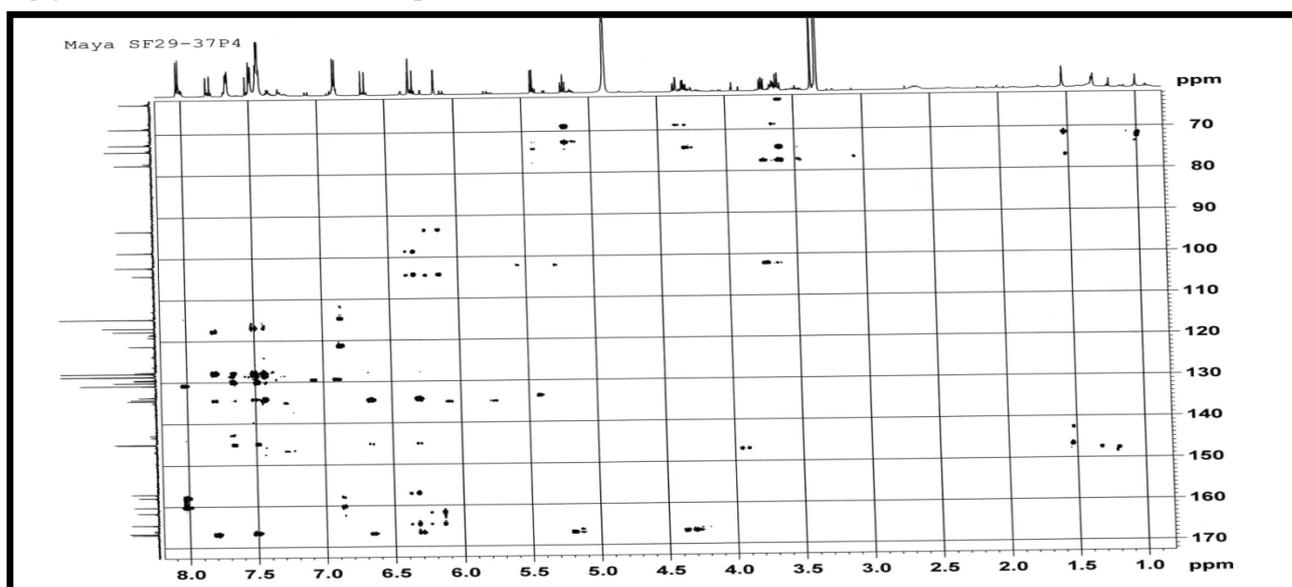
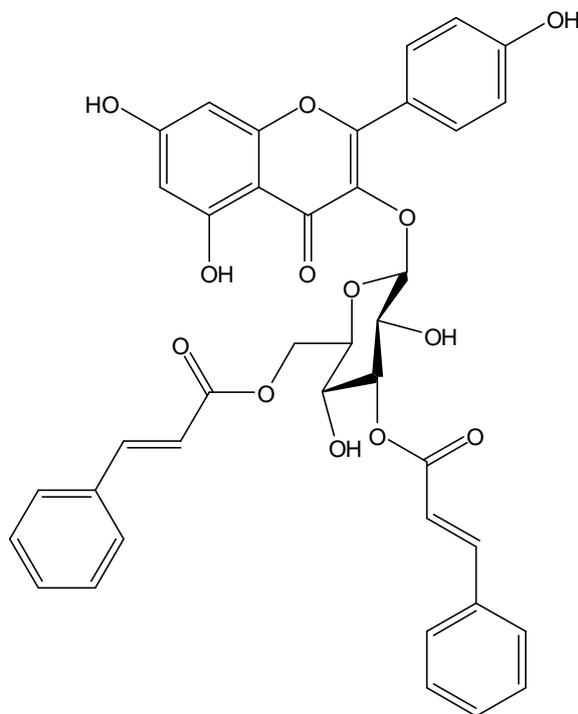


Figure 135. Spectre HMBC du composé C5

Ainsi le composé **C5** est identifié comme étant : Daglesioside IV, isolé uniquement de l'espèce *Pseudotsuga menziesii*(Pinaceae) (Krauze-Baranowska et al., 2013) et jamais identifié dans le genre *Cedrus*.



**C5:** Daglesioside IV

### 2.1.2.3. Identification du composé C6

#### • Analyse du spectre RMN<sup>1</sup>H

Le spectre <sup>1</sup>H du produit **C6** (Figure 136) montre :

- Deux doublets à  $\delta_H$  5.9ppm ( $J= 2.1$ Hz) et  $\delta_H$  5.94ppm ( $J= 2.10$ Hz) attribuables aux H-8 et H-6.
- Deux doublets déblindés, le premier à  $\delta_H$  4.94 ppm ( $J= 11.5$ Hz) et le second à  $\delta_H$  4.52ppm ( $J= 11.5$  Hz) attribuables aux deux méthines oxygénés H-2 et H-3 indiquant une *trans*-configuration.
- Trois signaux aromatiques,  $\delta_H$  6.82ppm (d,  $J=8.1$ Hz),  $\delta_H$  6.87 ppm (dd,  $J=8.2$  Hz ; 1.9Hz) et un doublet à  $\delta_H$  6.98 ( $J= 1.9$ Hz) attribuables respectivement aux protons du noyau B ; H-5', H-6' et H-2'.

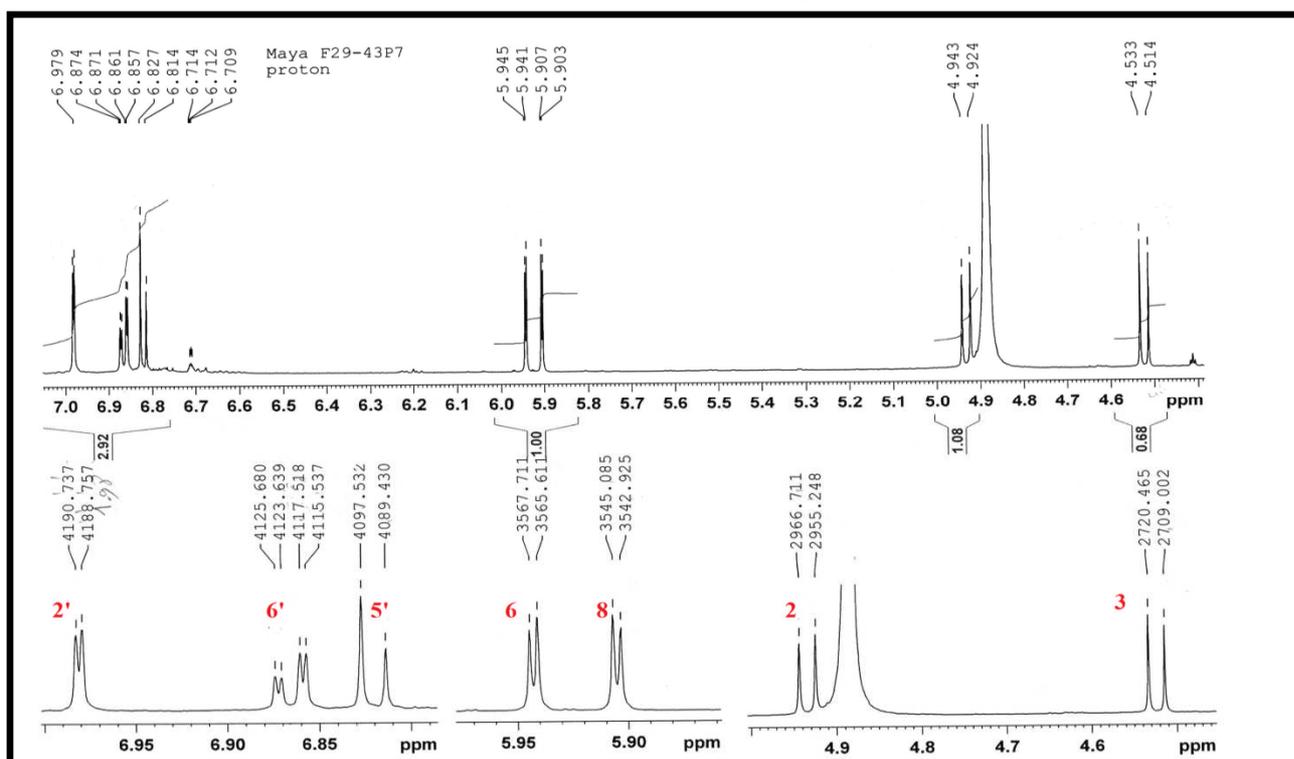
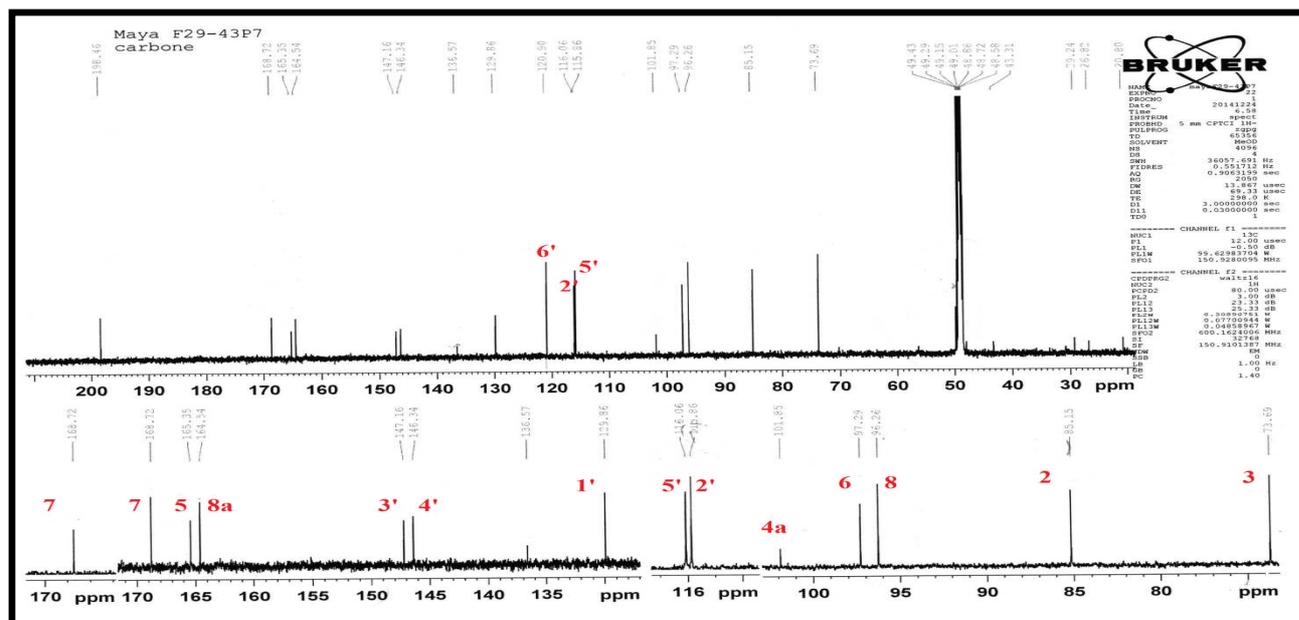


Figure 136. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C6

• **Analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$**

L'analyse combinée des spectres  $^{13}\text{C}$  (Figure 137) révèle les signaux suivants :

- Les CH aromatiques du noyau C : C-6 et C-8 apparaissant à  $\delta_{\text{C}}$  97.3 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  96.3 ppm respectivement, et ceux du noyau B à  $\delta_{\text{C}}$  115.9ppm,  $\delta_{\text{C}}$  116.1 et  $\delta_{\text{C}}$  120.9 ppm attribuables à C-2', C-5'et C-6'.
- Cinq carbones quaternaires aromatiques oxygénés entre  $\delta_{\text{C}}$  145-168.7 ppm attribuables aux carbones C-3', C-4', C-8a, C-5 et C-7.
- Deux signaux assignables au carbones C-2 et C-3 à  $\delta$  85.1 ppm et 73.7 ppm respectivement.
- Un carbone quaternaire observé à  $\delta$ 198.5 ppm caractéristique d'un carbonyle fr flavonone (C-4)

Figure 137. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C6

- Analyse du spectre COSY

Le spectre COSY (Figure 138) permet d'observer :

- Une corrélation entre les protons H-6 et H-8.
- Le proton H-6' corrèle avec les protons H-2' et H-5'.
- Corrélation du proton H-2 avec le proton H-3.

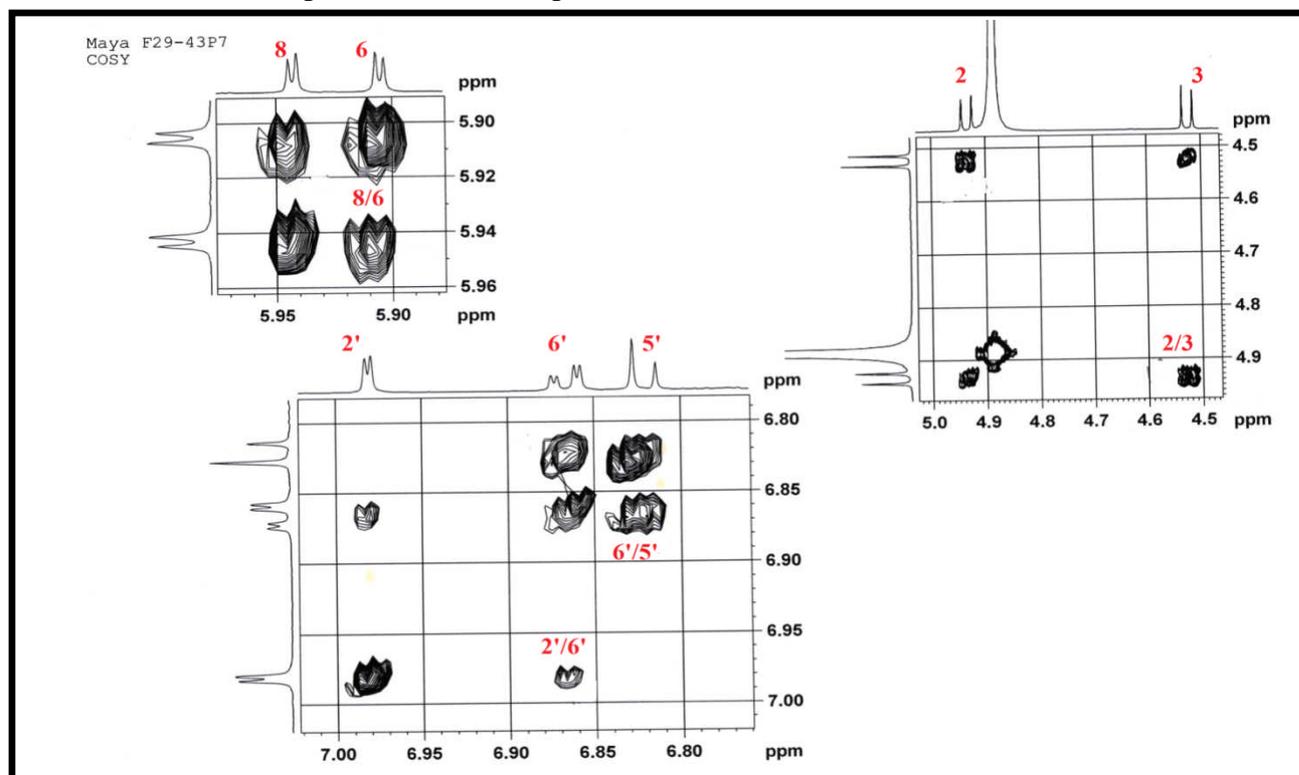


Figure 138. Spectre COSY du composé C6

- Analyse du spectre HSQC

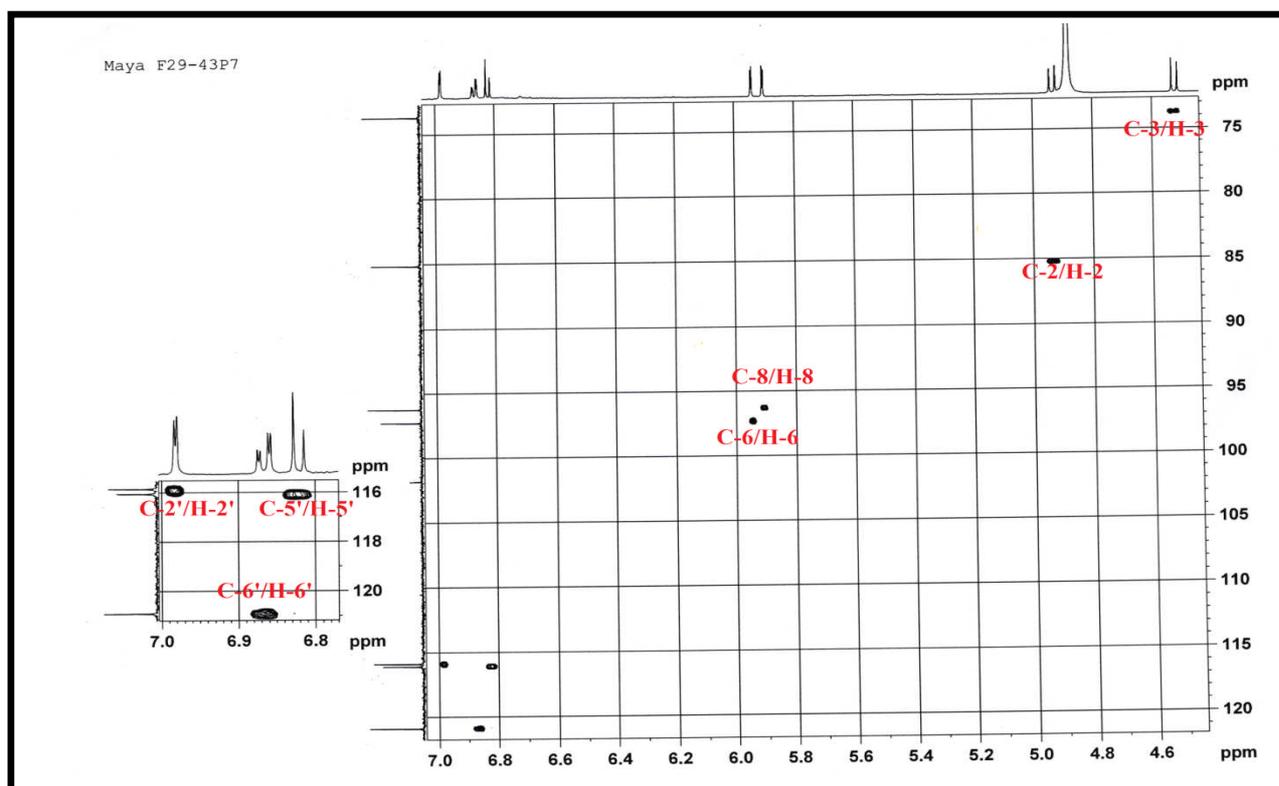


Figure 139. Spectre HSQC du composé C6

- Analyse du spectre HMBC

L'analyse du spectre HMBC (Figure 140) montre :

- Une tache de corrélation du proton H-2 avec les carbones C-3, C-4 et C-1'.
- Le proton H-3 montre des corrélations avec les carbones C-2, C-4, C-1', C-2' et C-6'.
- Des corrélations entre le proton H-6 et C-4a, C-5, C-7 et C-8.
- Corrélations du proton H-8 avec les carbones C-6, C-7 et C-8a.

Pour le noyau aromatique B, les corrélations observées sont :

- H-2' corrèle avec C-2, C-3', C-4' et C-6'.
- H-5' corrèle avec C-1', C-3', C-4' et C-6'.
- H-6' corrèle avec C-2, C-2', C-3' et C-4'.

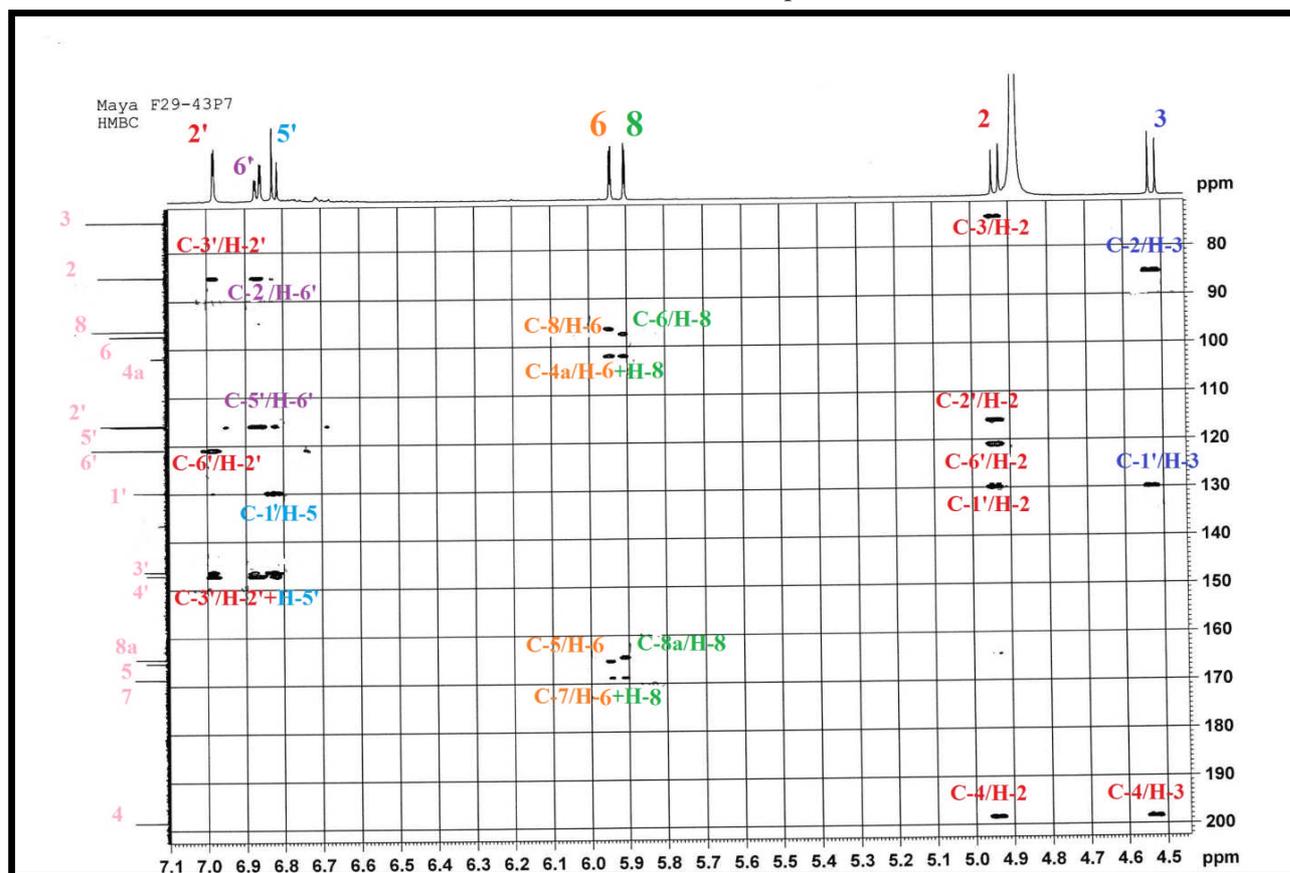
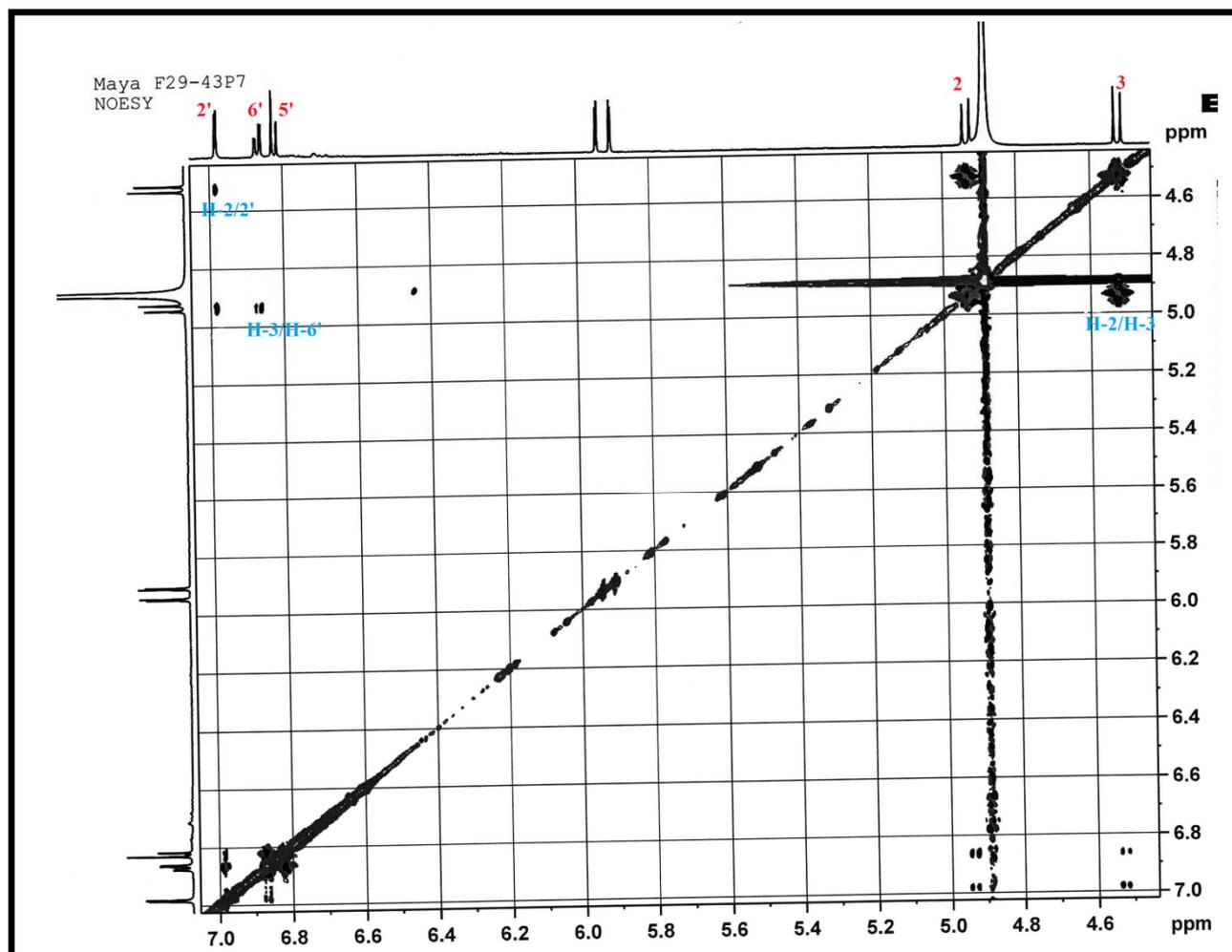


Figure 140. Spectre HMBC du composé C6

- Analyse du spectre NOESY

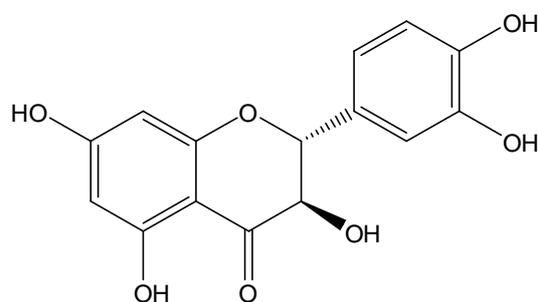
Les corrélations observées sur le spectre NOESY (Figure 141) sont :

- Corrélation entre les deux protons H-2 et H-3
- Corrélation entre le H-2', H-2 et le H-3
- Corrélation du proton H-3 avec le proton aromatique H-6'



**Figure 141.** Spectre NOESY du composé **C6**

L'analyse des spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY et HMBC en plus d'un pouvoir rotatoire positif, permet d'identifier le composé **C6** comme étant : (+) Taxifoline (Agrawal et al., 1981) isolé précédemment de *Cedrus deodara* (Awad et al., 2015), d'*Abies alba* (Benkovic et al., 2014).



**C6 :** (+) Taxifoline

**Tableau 24.** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) des composés **C4- C6** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

Atome	C4		C5		C6	
	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1						
2	-	157.5	-	157.9	4.52, d, 11.5	85.1
3	-	133.7	-	133.7	4.94, d, 11.5	73.7
4	-	177.9	-	177.9	-	198.5
4a	-	104.2	-	104.2	-	101.8
5	-	161.6	-	161.6	-	165.3
6	6.15, d, 1.9	98.6	6.14, d, 2.0	98.6	5.94, d, 2.1	97.3
7	-	164.6	-	164.5	-	168.7
8	6.31, d, 1.3	93.4	6.32, d, 2.9	93.4	5.9, d, 2.2	96.3
8a	-	156.9	-	157.0	-	164.5
1'	-	121.5	-	121.2	-	129.9
2'	7.85, d, 1.9	112.8	8.3, d, 8.9	130.9	6.98, d, 1.9	115.9
3'	-	146.9	6.86, d, 10.1	114.7	-	147.2
4'	-	149.6	-	160.2	-	146.3
5'	6.89, d, 8.5	114.6	6.87, d, 8.8	114.6	6.82, d, 8.1	116.1
6'	7.6, dd, 8.4; 1.9	122.6	8.3, d, 8.8	130.8	6.87, dd, 8.2 ; 2.9	120.9
7'	3.95 s	55.2	-	-	-	-
1''	5.48 d 7.9	102.2	5.3, d, 5.7	102.2	-	-
2''	3.75, td, 9.4 ; 1.38	72.8	3.74, td, 9.4 ; 1.5	72.7	-	-
3''	5.2, t, 9.3	74.3	5.2, t, 9.2	77.5	-	-
4''	3.62, t, 9.1	68.9	3.62, m	68.8	-	-
5''	3.68, m	77.5	3.65, m	74.3	-	-
6''	4.5, t, 2.0	62.7	6a : 4.38, dd, 11.8 ; 2.0 6b : 4.1, m	62.8	-	-
1'''	-	166.9	-	166.9	-	-
2'''	6.65, d, 16.0	116.8	6.65, d, 16.0	116.9	-	-
3'''	7.8, d, 16.0	145.0	7.8, d, 15.9	144.9	-	-
4'''	-	134.5	-	134.5	-	-
5'''	7.66, m	127.9	7.48, m	127.9	-	-
6'''	7.44, m	127.9	7.44, m	127.9	-	-
7'''	7.42, m	130.1	7.45, m	130.1	-	-
8'''	7.44, m	127.9	7.44, m	128.6	-	-
9'''	7.66, dd, 7.4; 3.7	127.9	7.44, m	128.6	-	-
1''''	-	166.6	-	166.6	-	-
2''''	6.29, d, 16.2	117.7	6.3, d, 16.2	117.7	-	-
3''''	7.48, d, 16.2	145.1	7.51, d, 16.1	145.1	-	-
4''''	-	134.1	-	134.2	-	-
5''''	7.48	128.6	7.65, dd, 7.6; 3.9	128.6	-	-
6''''	7.42	128.6	7.42, d, 1.6	128.6	-	-
7''''	7.43	130.1	7.45, dd, 14.5; 1.4	130.1	-	-
8''''	7.44	128.6	7.42, d, 1.6	128.6	-	-
9''''	7.44	128.6	7.65, dd, 7.6; 3.9	128.6	-	-

### 2.1.3. Détermination structurale des neolignanes :

Trois produits (C7- C9) de type neolignanes ont été isolés des fractions **F40 :60** et **F80 :20** des cônes de *Cedrusatlantica*(Endl) Manetti ex carrière

#### 2.1.3.1. Identification du composé C7

##### • Analyse du spectre H<sup>1</sup>

L'analyse des spectres <sup>1</sup>H (Figure 102) des trois composés montrent :

- Cinq protons aromatiques entre  $\delta_H$  5.59 ppm et  $\delta_H$  7.0 ppm.
- Un doublet vers  $\delta_H$  5.51 ppm caractéristique d'un CH-OH attribuable au H-7
- Deux CH<sub>2</sub> à  $\delta_H$  2.58 ppm et  $\delta_H$  1.81 ppm assignable aux protons H-7' et H-8' respectivement
- Deux signaux déblindés qui apparaissent à  $\delta_H$  3.58 et à  $\delta_H$  3.77-3.87 ppm attribuables aux deux CH<sub>2</sub>-OH : H-9' et H-9
- Un méthoxyles qui résonne à  $\delta_H$  3.84 ppm.

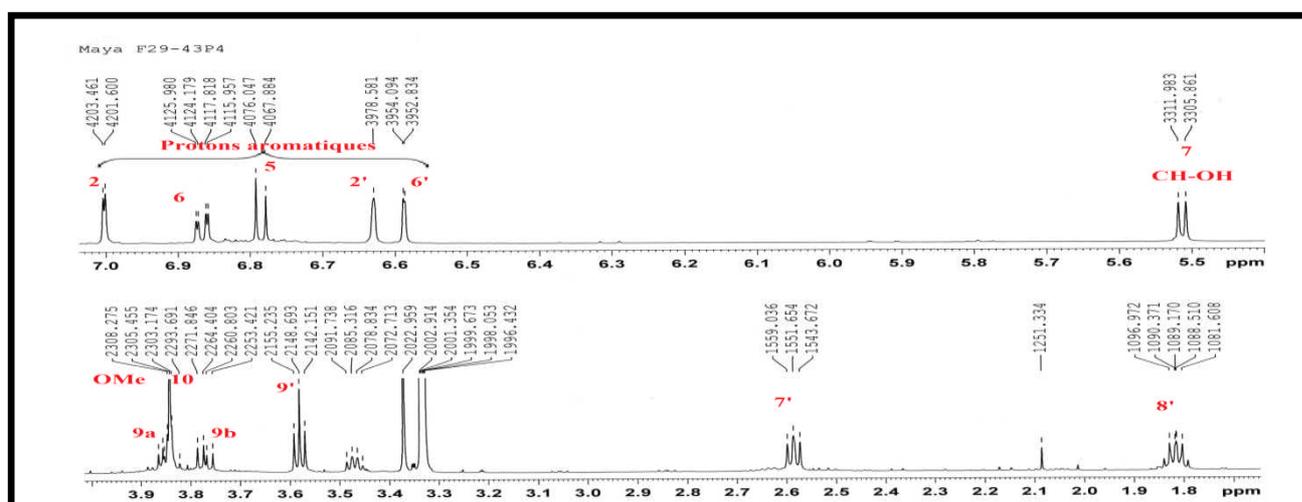


Figure 142. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé C7

##### • Analyse du spectre RMN<sup>13</sup>C

Sur les spectres <sup>13</sup>C (Figure 143) les signaux observés sont :

- Cinq carbones résonnant entre  $\delta_C$  110.5 et  $\delta_C$  119.7 ppm attribuables aux CH aromatiques
- Un ensemble de carbones quaternaires aromatiques observés entre  $\delta_C$  129.8 ppm et  $\delta_C$  136.7 ppm et entre  $\delta_C$  141.9 ppm et  $\delta_C$  149.1 ppm pour les carbones oxygénés.
- Deux pics résonnant à  $\delta_C$  62.3 ppm et  $\delta_C$  65.1 ppm assignable aux deux CH<sub>2</sub> oxygénés C-9' et C-9.

- Un CH<sub>3</sub>-OH à  $\delta_C$  56.3 ppm.

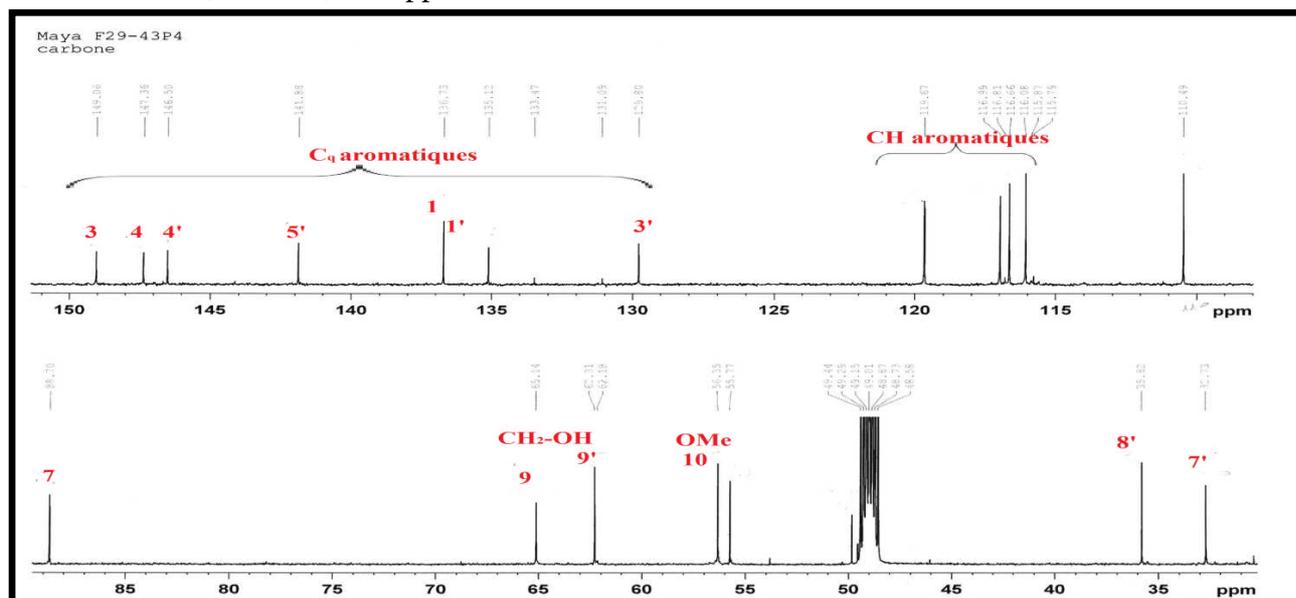


Figure 143. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé C7

Après l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C, l'identification structurale de composé C7 se poursuit avec l'étude des spectres RMN 2D.

- **Analyse du spectre COSY**

L'analyse des spectres COSY (Figures 145-146) permet l'identification des protons aliphatiques par les corrélations <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H.

Les corrélations observées sont :

- Corrélations des protons aromatiques : H-6/ H-5 en position ortho ( $J= 8.2$  Hz) et avec H-2 en position méta ( $J= 8.8$ Hz)
- H-2' corrèle avec les protons H-6' et avec le proton H-7'.
- Les protons H-8' corrèle avec le H-7' et avec les protons H-9' (CH<sub>2</sub>-OH).
- Une tache de corrélation entre H-8 et les protons H-7 et H-9
- Les protons H-10 du méthoxyle corrèle avec le H-2 aromatique.

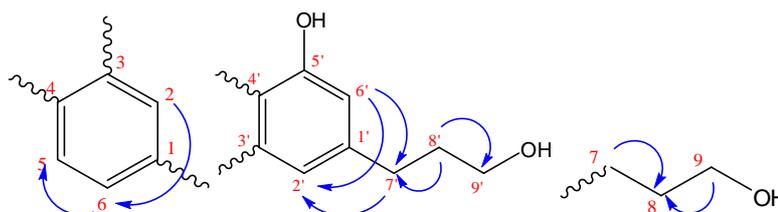


Figure 144. Corrélations COSY du composé C7

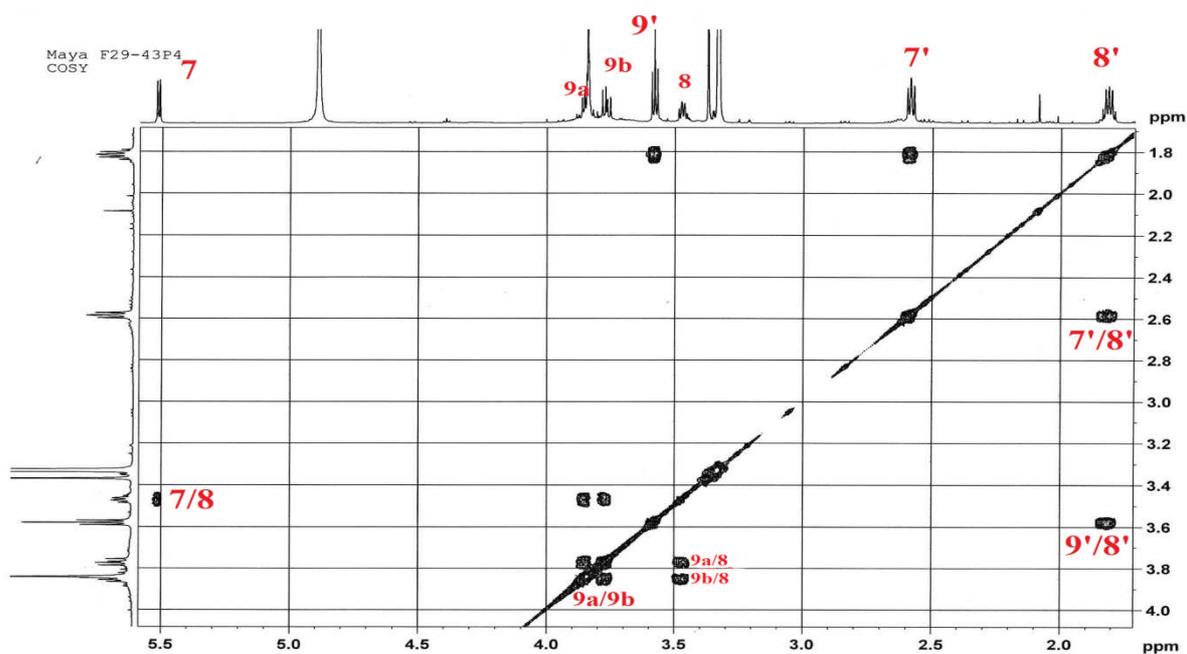


Figure 145. Spectre COSY de  $\delta_H$  1.8 à 4.0ppm du composé C7

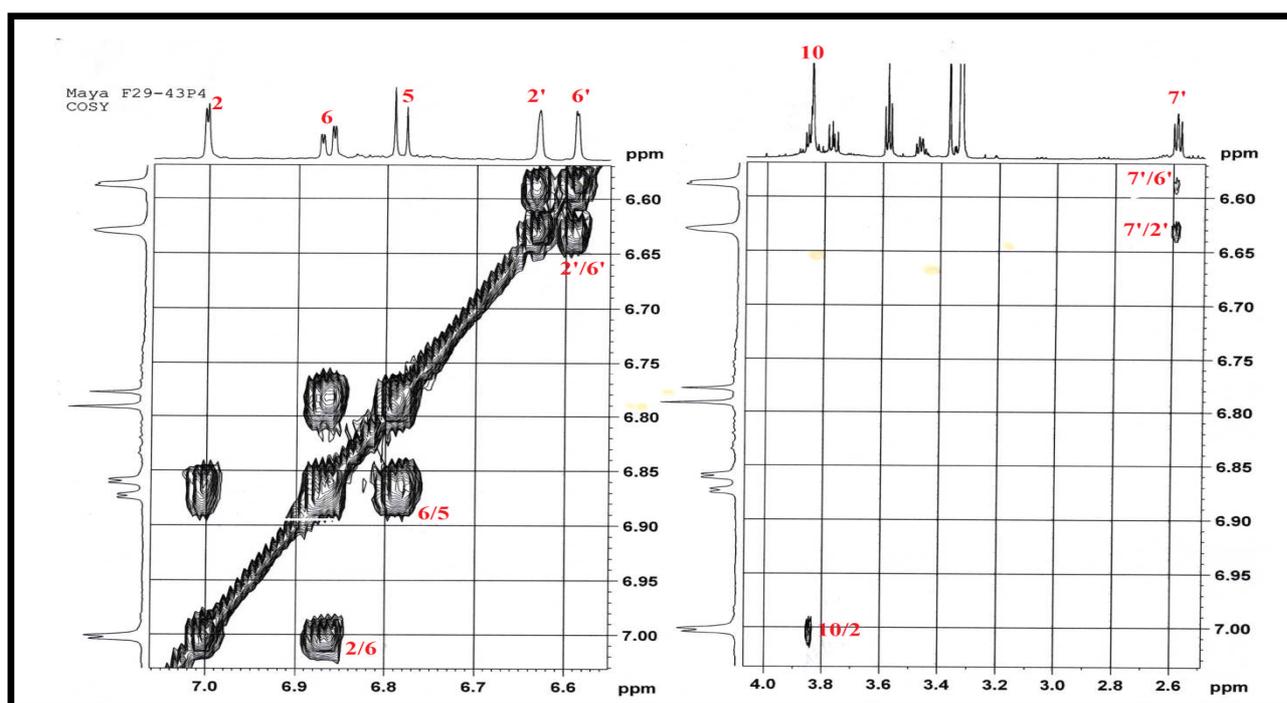


Figure 146. Spectre COSY de  $\delta_H$  6.6 à 7.0 ppm du composé C7

- **Analyse des spectres HSQC**

Le spectre HSQC (Figure 147) permet l'identification des carbones portant les protons déjà identifiés sur le spectre COSY.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau 25.

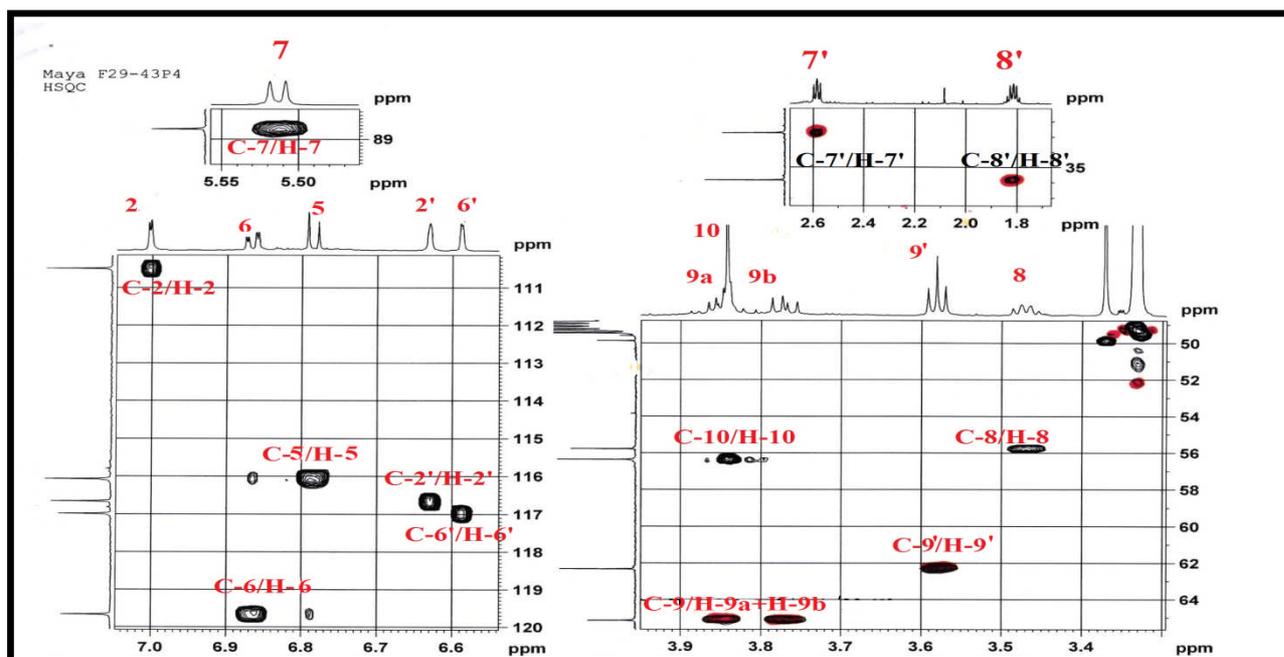


Figure 147. Spectre HSQC du composé C7

#### • Analyse du spectre HMBC

Sur le spectre HMBC (Figures 151-152), on note :

- Des corrélations entre le proton H-2 et les carbones C-1, C-3, C-4, C-6 et C-7.
- Une tache de corrélation du proton H-5 avec les carbones C-1, C-3 et C-4
- Le proton H-6 corréle avec les carbones C-2, C-4 et C-7
- Le H-10 (O-CH<sub>3</sub>) montre une tache de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique C-3 ce qui détermine sa position.

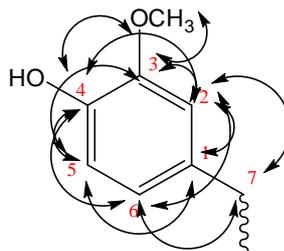
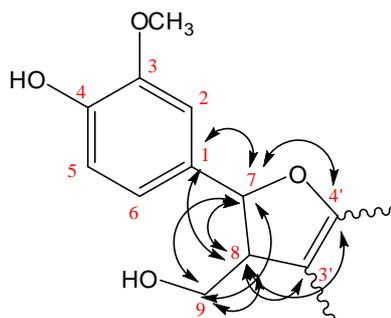


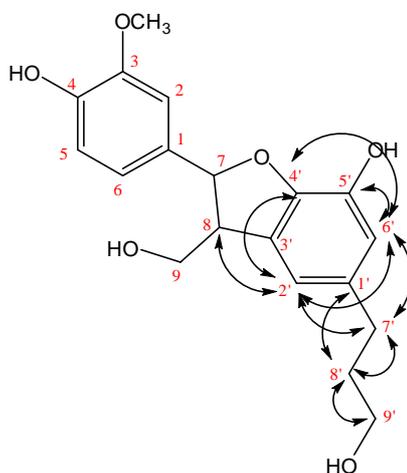
Figure 148. Corrélations HMBC du composé C7

- H-7 montre une corrélation avec les carbones C-1, C-2, C-6, C-8, C-9, C-3' et C-4'
- Le proton H-8 corréle avec les carbones C-1, C-7, C-9, C-2', C-3' et C-4'
- Corrélation entre les protons H-9, C-8, C-7 et C-3'.

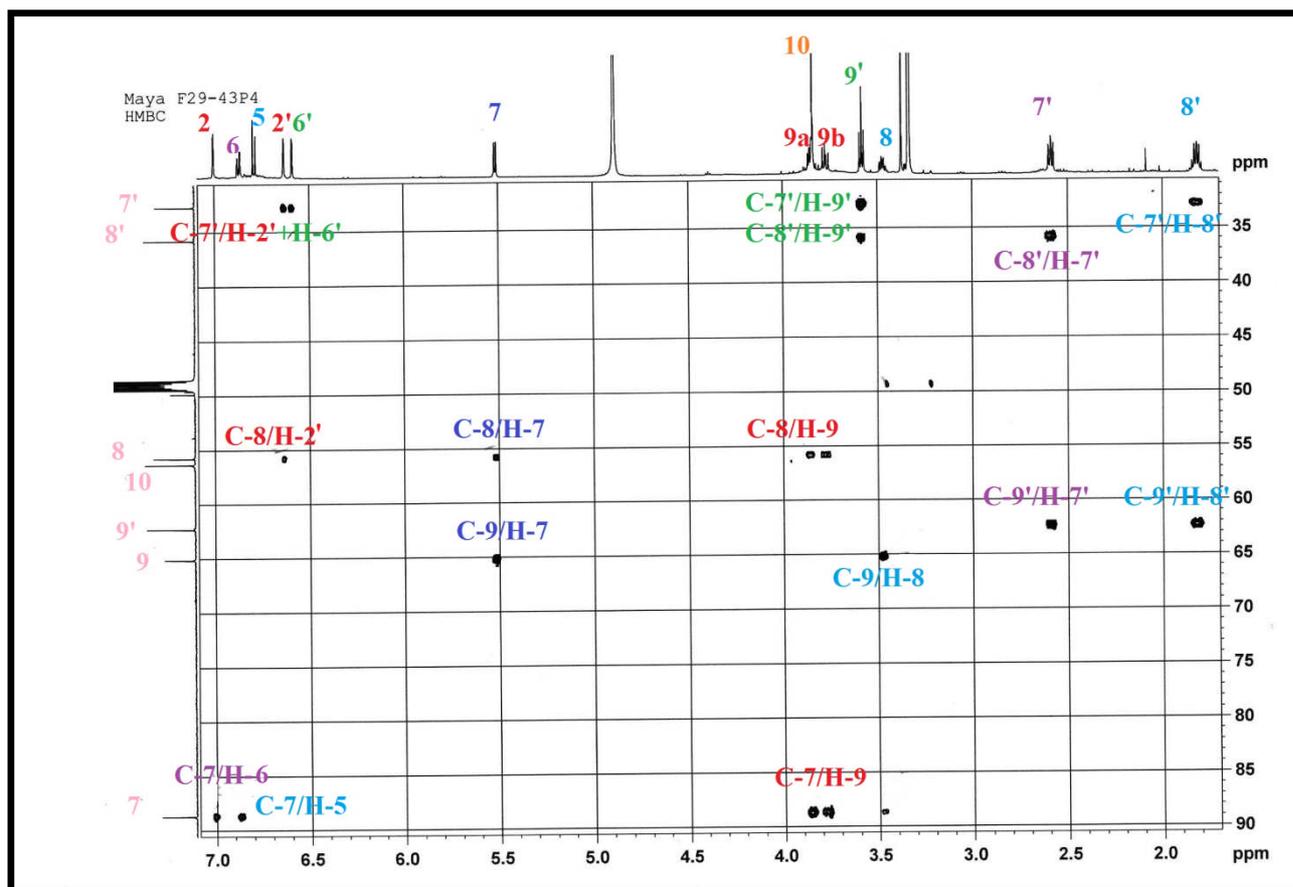
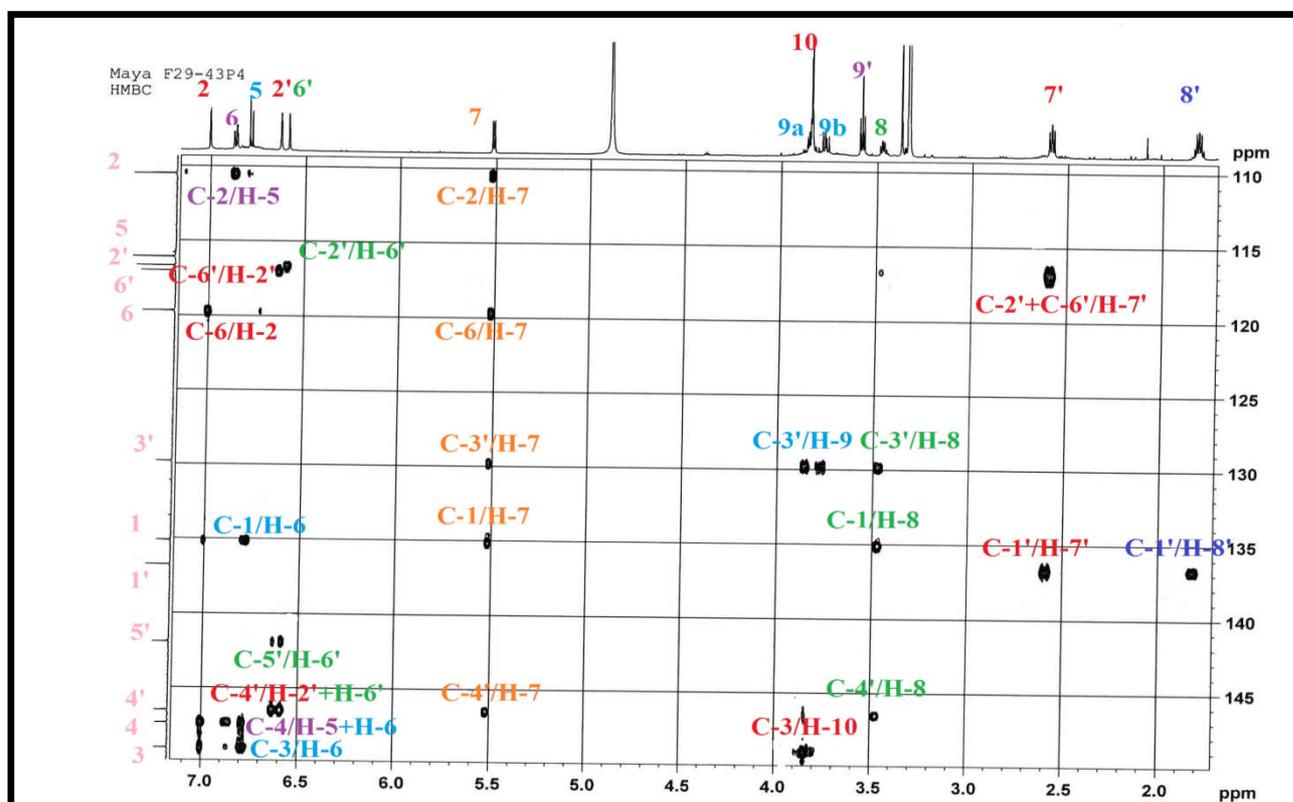


**Figure 149.** Corrélations HMBC du composé **C7**

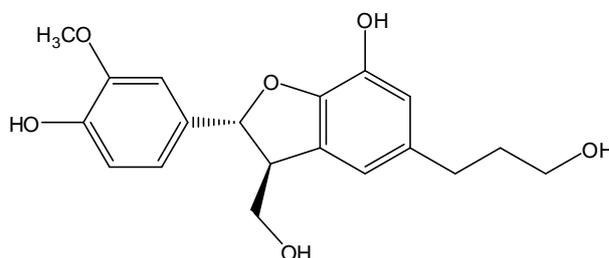
- Le H-2' corrèle avec C-8, C-4', C-5', C-6' et C-7'
- Le proton H-6' montre une tache de corrélation avec les C-2', C-4', C-5' et C-7'.
- Le proton H-8' corrèle avec le carbone C-1', C-7' et C-9'.



**Figure 150.** Corrélations HMBC du composé **C7**

Figure 151. Spectre HMBC de  $\delta_C$  30 à 90 ppm du composé C7Figure 152. Spectre HMBC de  $\delta_C$  110 à 150 ppm du composé C7

Ainsi la structure du composé **C7** a été identifiée comme étant *ent*-cedrusine isolée pour la première fois de *Cedrus deodara* (Agrawal et al., 1980a) et déjà identifié dans le genre *Abies*, *Abiesholophyla* Maxim. (Kim et al., 2013)



**C7** : *ent*-Cedrusine

### 2.1.3.2. Identification du composé C8

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 153) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 154) du composé **C8** présentent les mêmes signaux des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **C7** avec en plus la présence d'un signal  $\delta_{\text{H}} 3.84 / \delta_{\text{C}} 55.3$  ppm attribuable à un second méthoxyle  $\text{CH}_3\text{-OH}$ .

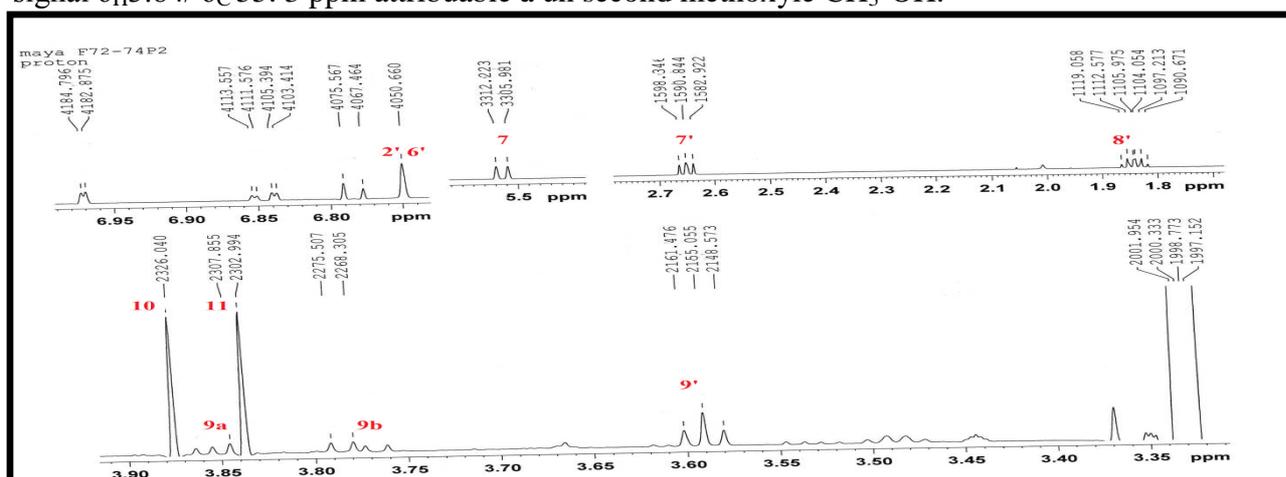


Figure 153. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **C8**

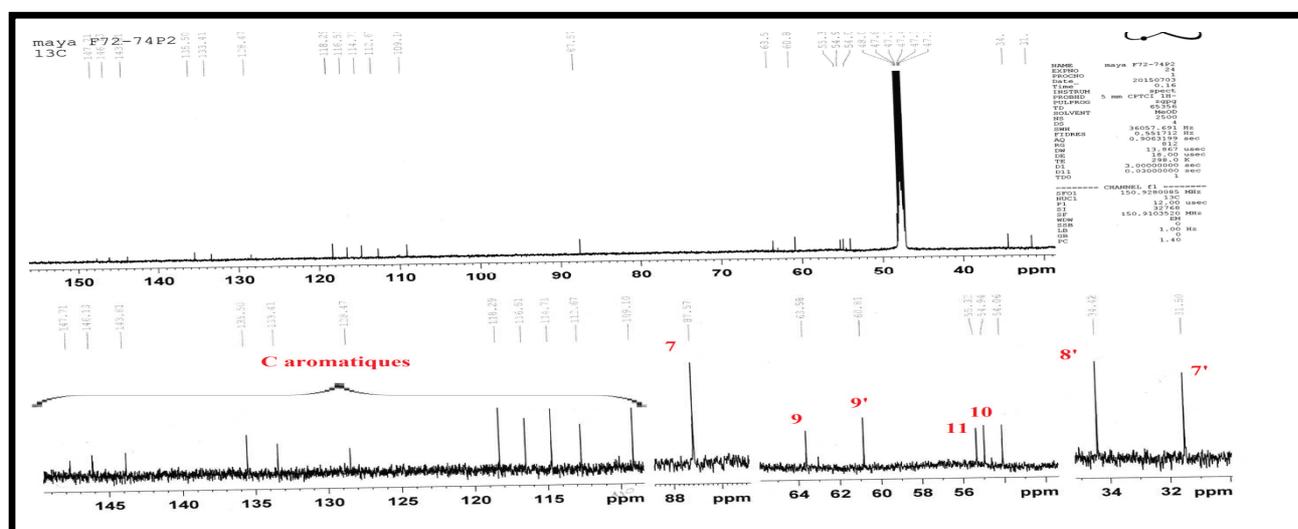


Figure 154. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **C8**

- Analyse du spectre COSY

Le spectre COSY du produit isolé C8 (Figure 155) montre les mêmes corrélations du spectre COSY du produit C7 déjà décrit (Figures 145-146).

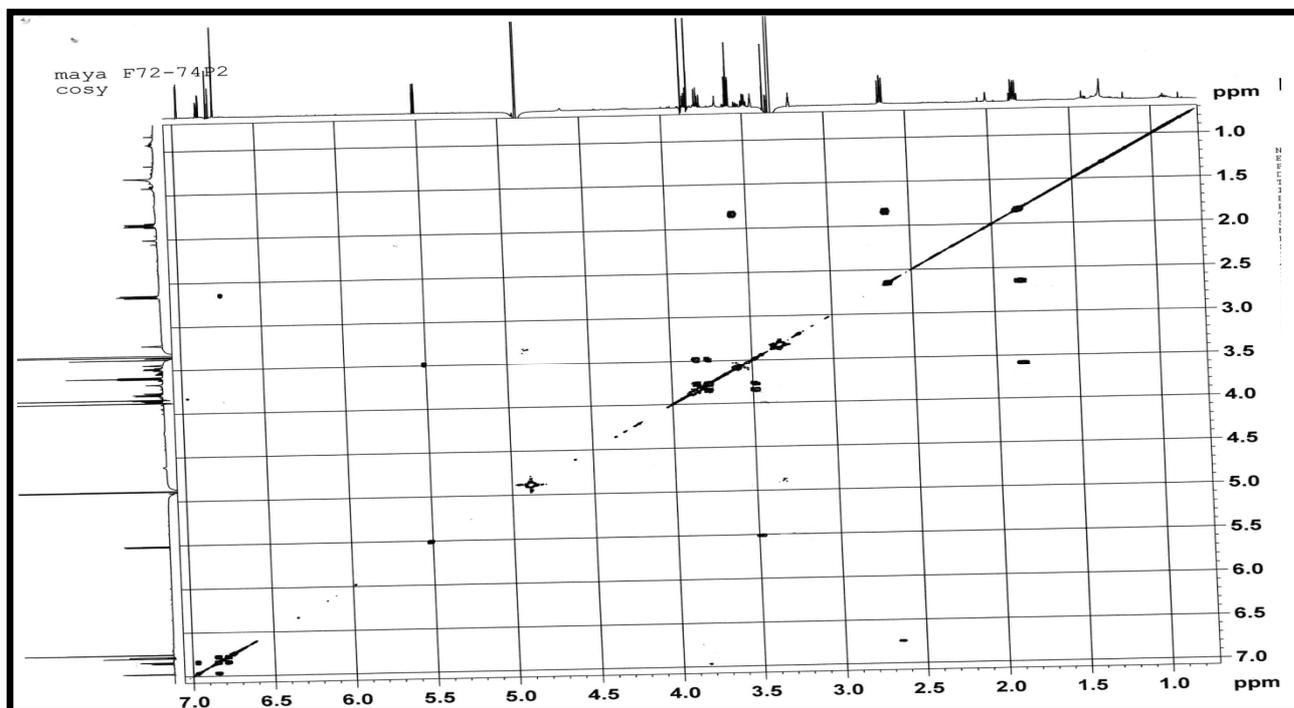


Figure 155. Spectre COSY du composé C8

- Analyse du spectre HSQC

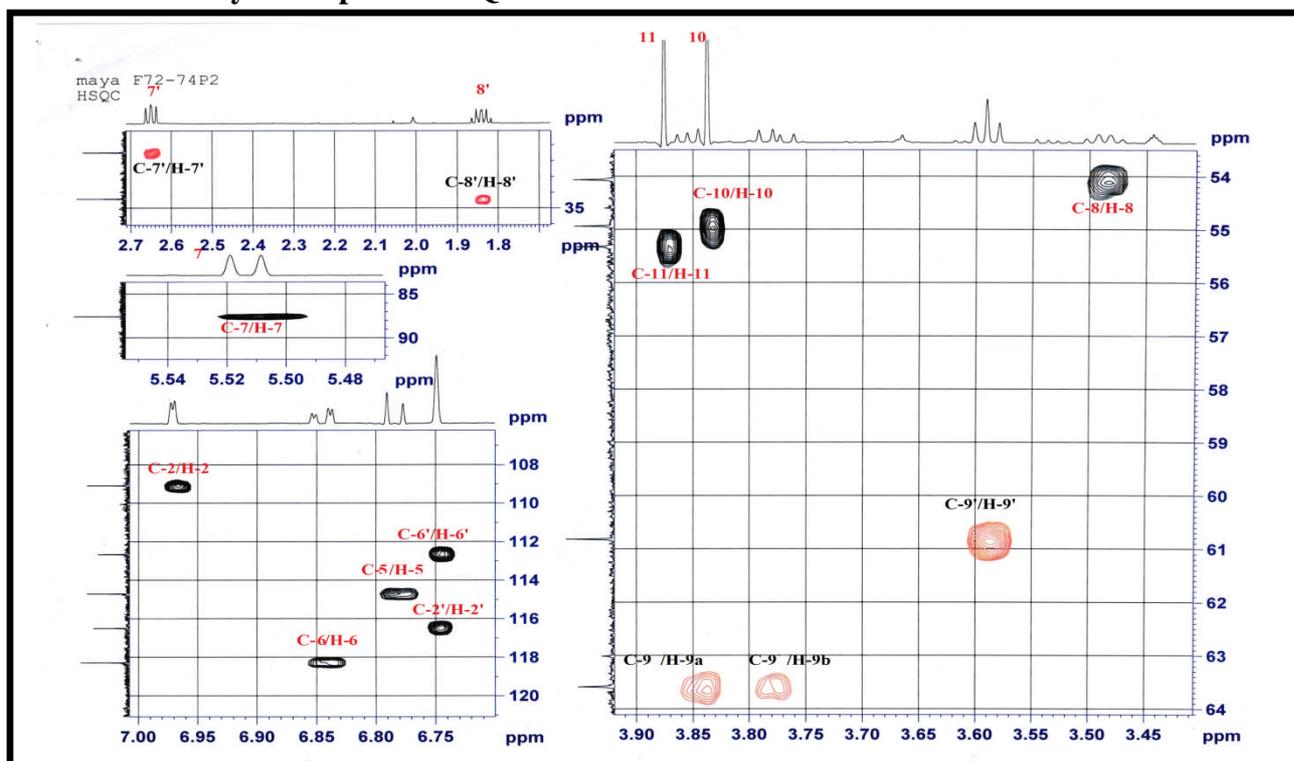


Figure 156. Spectre HSQC du composé C8

- Analyse du spectre HMBC

Sur le spectre HMBC (Figure 157), on relève les mêmes taches de corrélations observées avec le produit **C7** avec en plus la corrélation du proton du méthoxyle H-11 avec le carbone quaternaire aromatique C-5'.

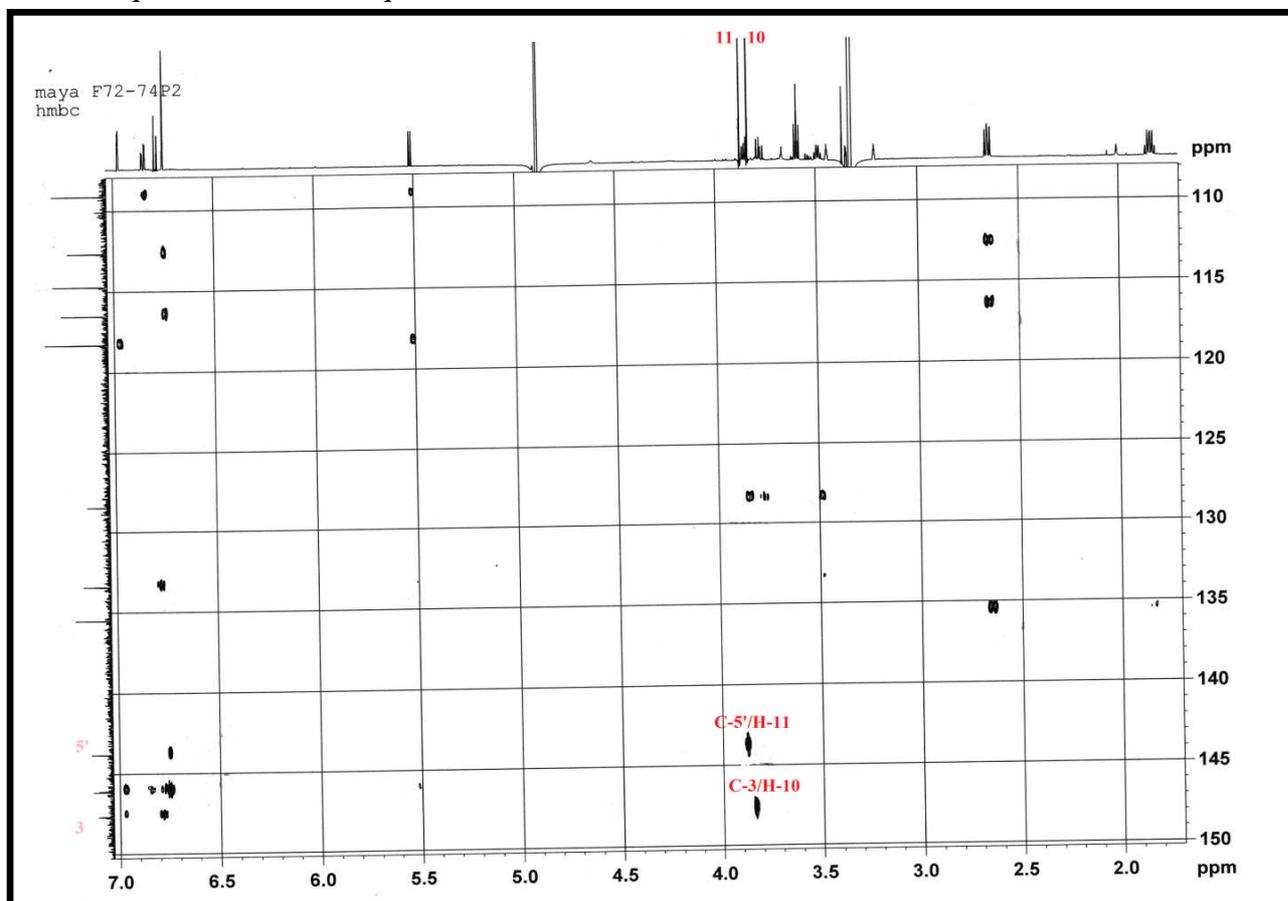
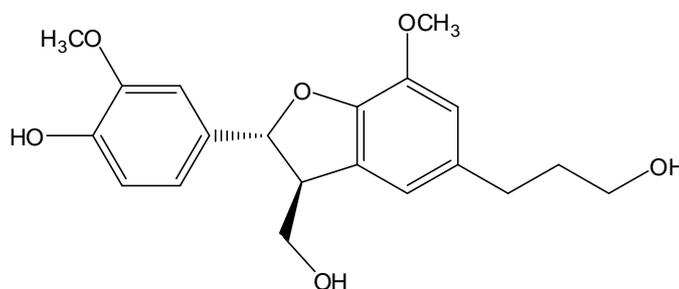


Figure 157. Spectre HMBC du composé **C8**

Le composé **C8** a été identifié comme étant (*7R*, *8S*)dihydrodehydrodiconiférol (Fukuyama et al., 1996). Ce neolignane a déjà été séparé de *Cedrus deodora* (Agrawal et al., 1980a).



**C8** : (*7R*, *8S*)dihydrodehydrodiconiférol

### 2.1.3.3. Identification du composé C9

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 158) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 159) du composé **C9** montre les mêmes signaux caractéristiques du composé **C7** avec en plus :

- Un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  5.36/ $\delta_{\text{C}}$  101.4 ppm avec une constante de couplage  $J= 1.5\text{Hz}$  attribuable à un proton anomérique de  $\alpha$ -configuration.
- Deux signaux caractéristiques d'un sucre entre  $\delta_{\text{H}}$  3.45 - 4.08ppm et entre  $\delta_{\text{C}}$ 70.8- 73.3 ppm avec un doublet attribuable à un  $\text{CH}_3$  à  $\delta_{\text{H}}$  1.2/ $\delta_{\text{C}}$  17.9 ppm indiquant la nature du sucre comme :  $\alpha$ -rhamnose.

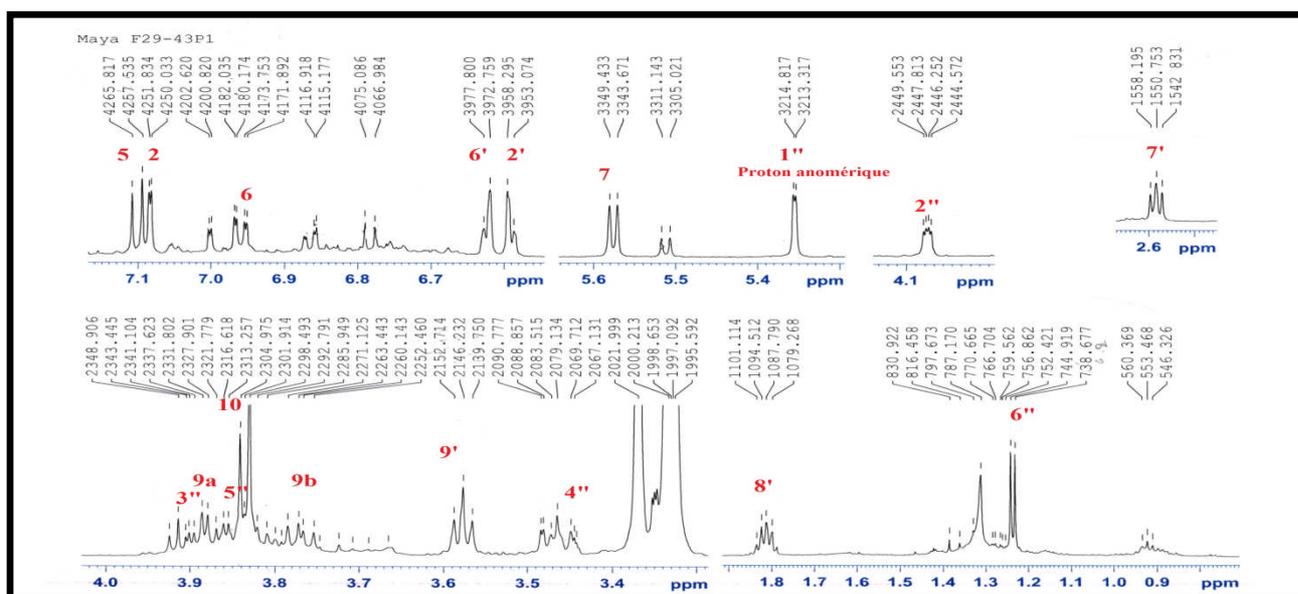


Figure 158. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C9

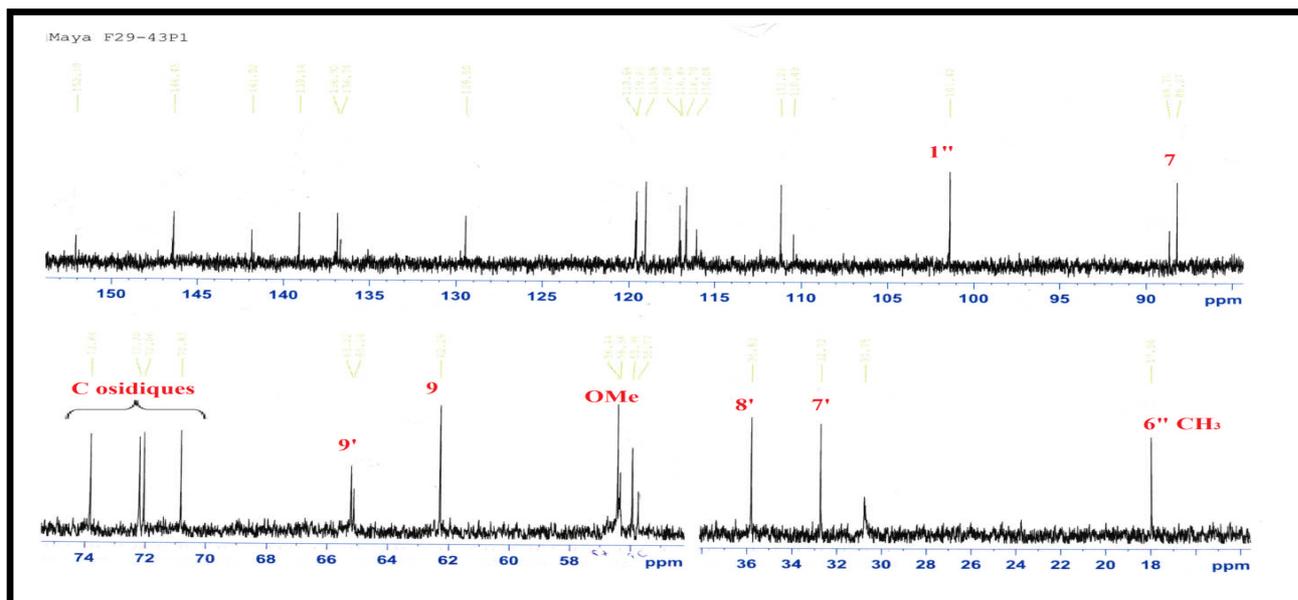
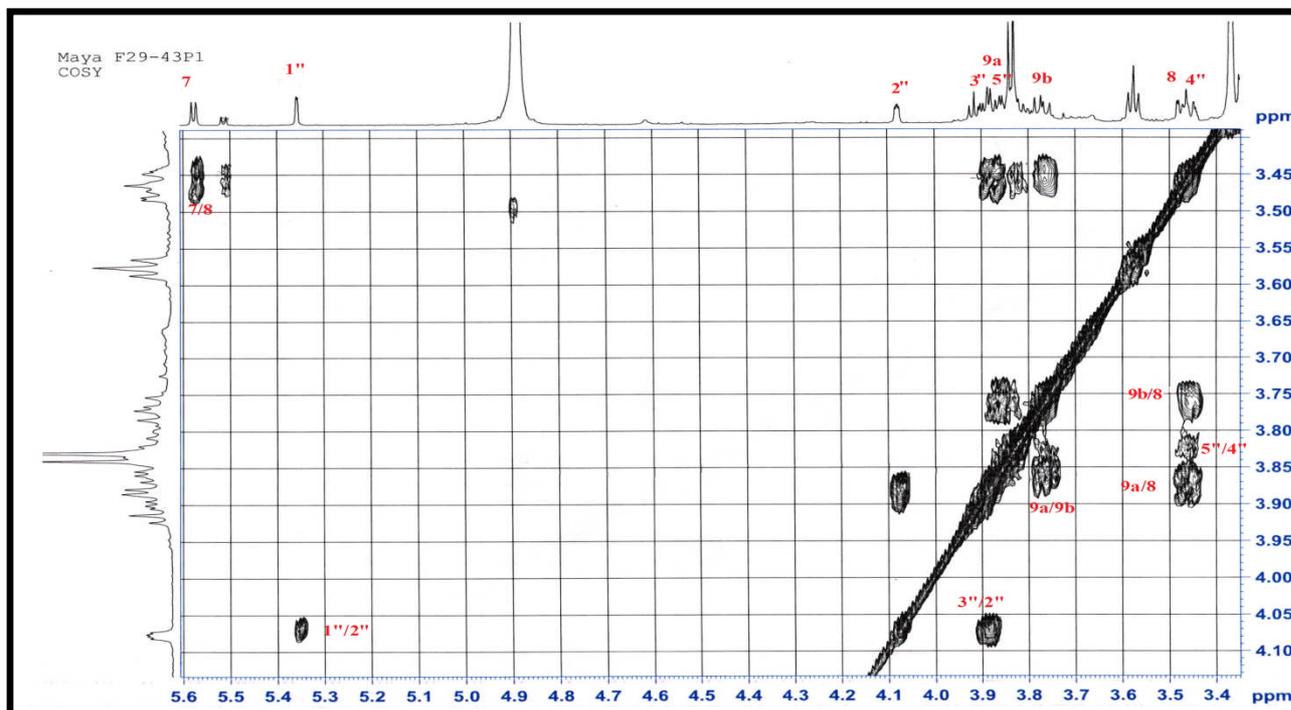


Figure 159. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C9

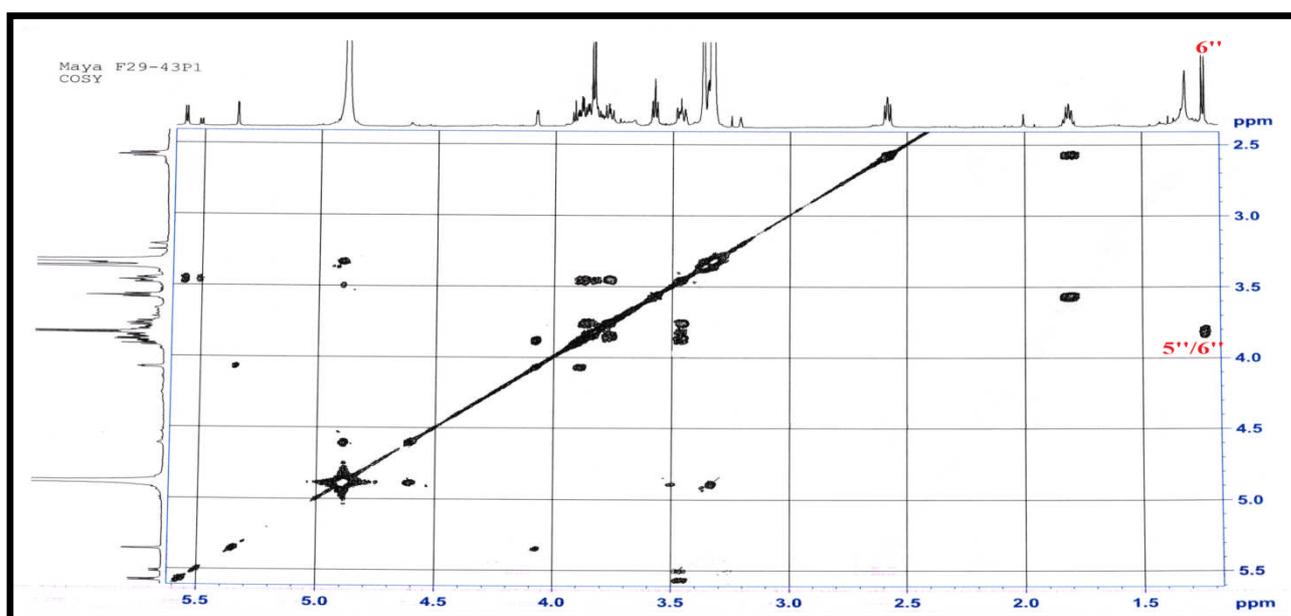
- **Analyse du spectre COSY**

En plus des corrélations déjà observées sur les spectres COSY du composé **C7**, les spectres COSY (Figures 160-161) du produit **C9** montrent en plus les corrélations entre les protons du sucre :

- Une corrélation entre le proton H-2'' et les protons H-1'' et H-3''
- La corrélation du proton H-5'' avec les protons H-4'' et H-6'' confirmant ainsi la nature du sucre : le rhamnose.



**Figure 160.** Spectre COSY de  $\delta_H$  3.40 à 4.10 ppm du composé **C9**

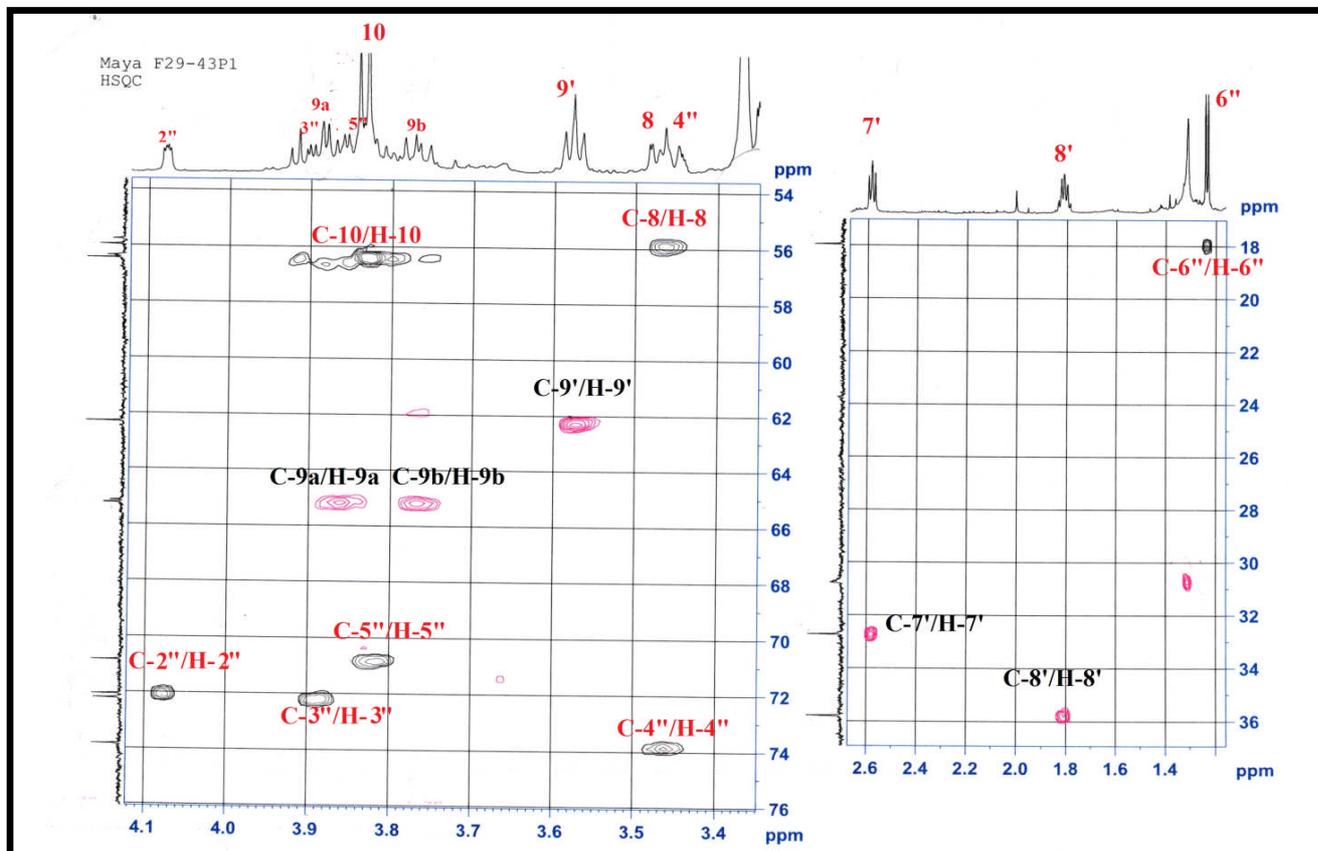


**Figure 161.** Spectre COSY de  $\delta_H$  2.5 à 5.5 ppm du composé **C9**

- **Analyse des spectres HSQC**

Les spectres HSQC (Figure 162) permettent l'identification des carbones portant les protons identifiés et les protons osidiques.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau 25.



**Figure 162.** Spectre HSQC du composé **C9**

- **Analyse du spectre HMBC**

L'analyse des spectres HMBC (Figures 163-164) révèle des corrélations similaires avec le composé **C7** avec en plus les corrélations intermoléculaires des atomes du rhamnose :

- Le proton H-7 corrèle avec les carbones C-2, C-4', C-6, C-1'' et C-9,
- Le proton anomérique H-1'' montre des taches de corrélations avec les carbones C-3'', C-4 et C-5 confirmant sa liaison au carbone quaternaire aromatique C-4.
- Corrélations entre le proton H- 4'' et les carbones C-2'', C-5'' et C-6''.

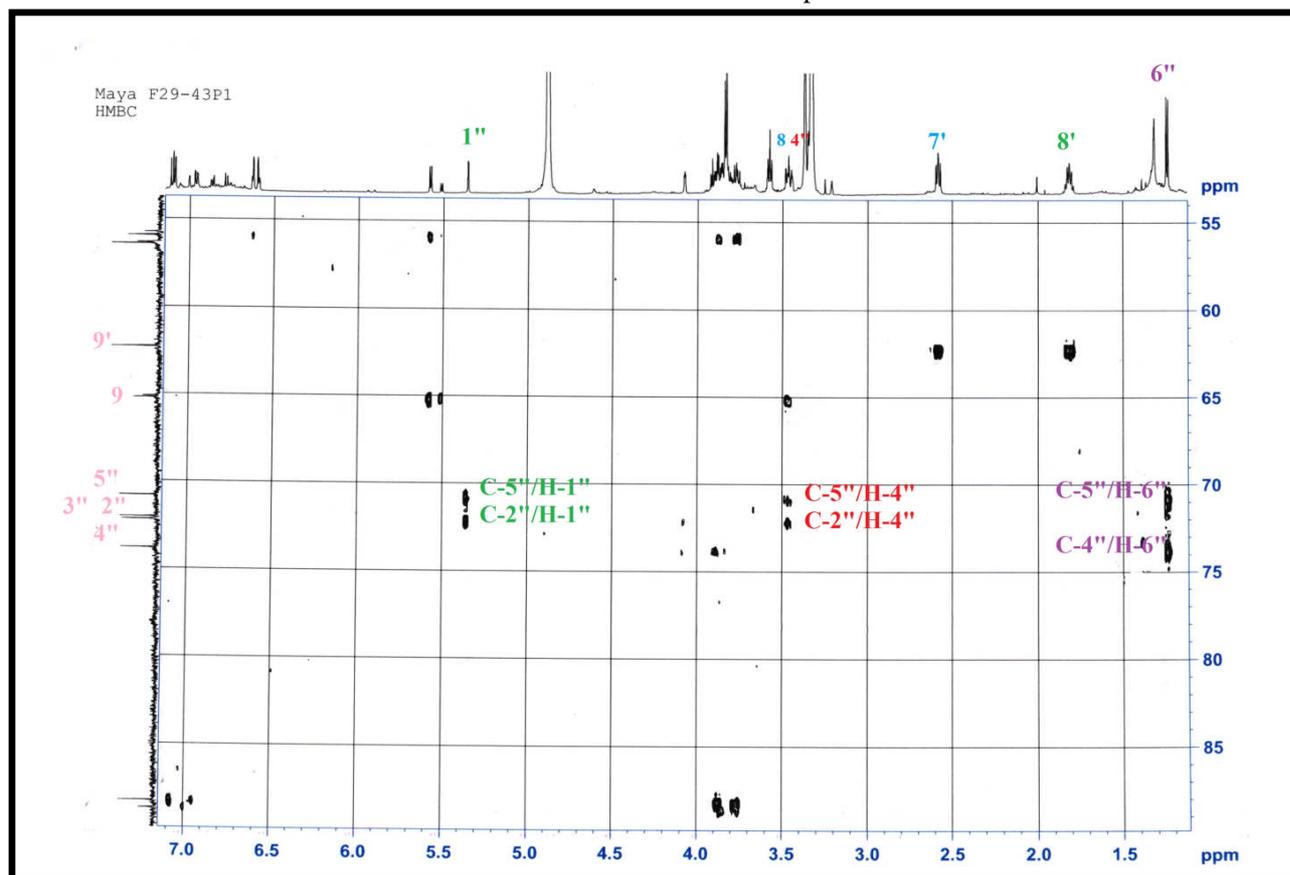


Figure 163. Spectre HMBC de  $\delta_C$  55 à 90 ppm du composé C9

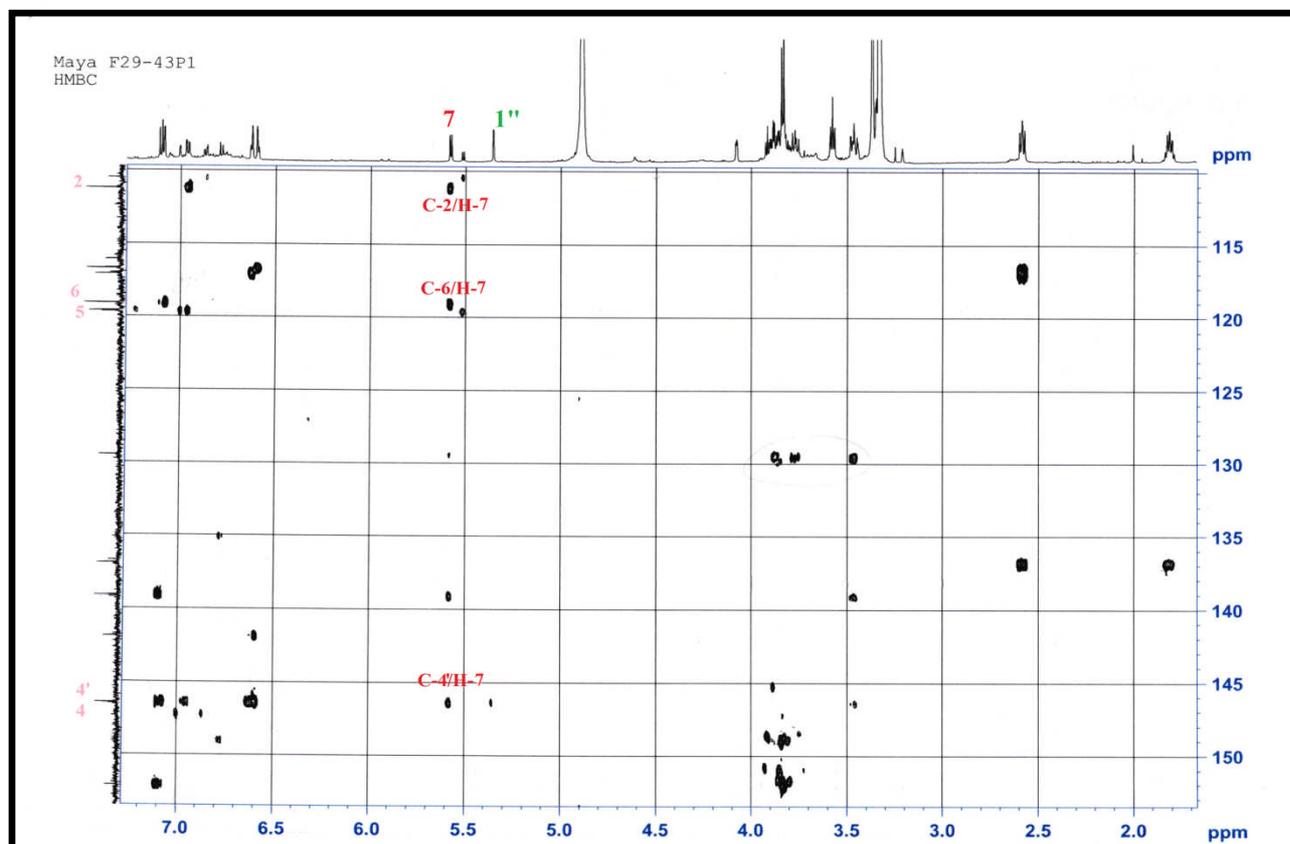
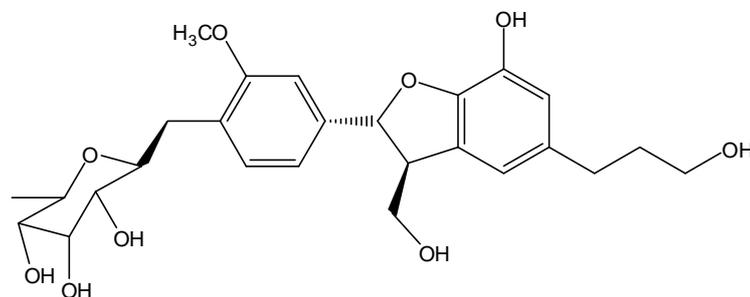


Figure 164. Spectre HMBC de  $\delta_C$  110 à 155 ppm du composé C9

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé **C9** : isomassonianoside B (He et al., 2011) isolé précédemment de *Keteleeria evelyniana* (He et al., 2011) et de *Santalum album* L. (Santalaceae) (Kim et al., 2005).



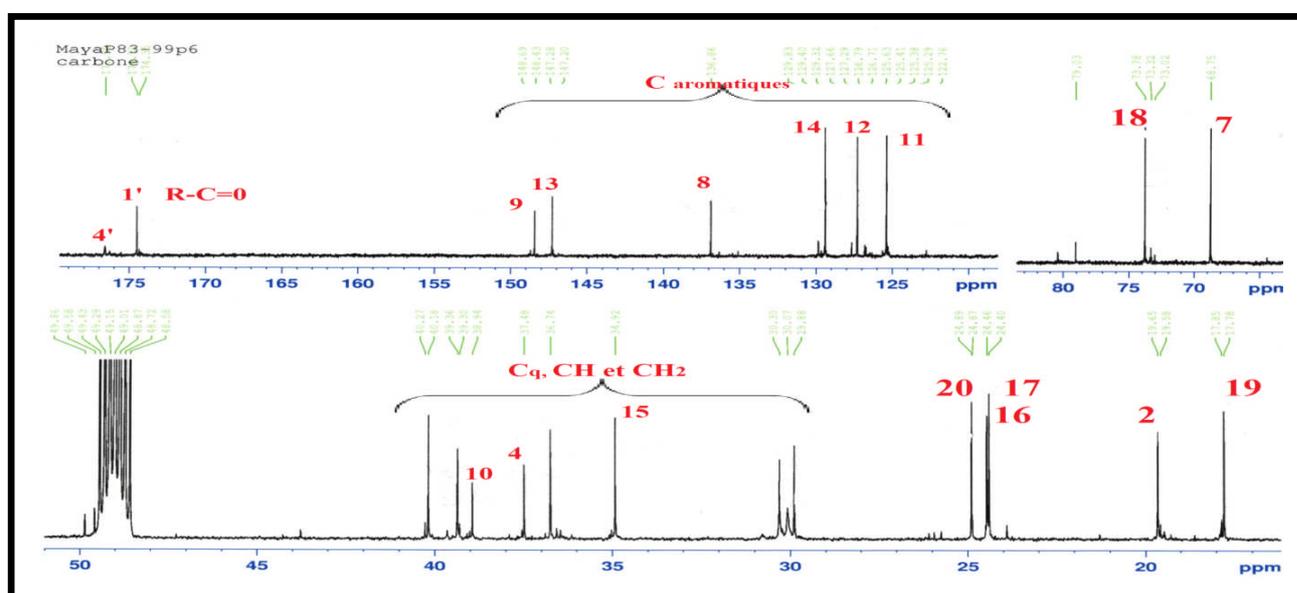
**C9** : Isomassonianoside B

**Tableau 25.** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) des composés **C7-C9** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

Atome	<b>C7</b>		<b>C8</b>		<b>C9</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	135.1	-	133.4	-	139.1
2	7.0, d, 1.9	110.5	6.97, d, 1.9	109.1	7.08, d, 1.8	111.2
3	-	149.1	-	147.7	-	152.1
4	-	147.4	-	146.1	-	146.4
5	6.78, d, 8.2	116.1	6.78, d, 8.1	114.7	7.1, d, 8.3	119.7
6	6.9, dd, 8.2; 1.8	119.7	6.85, dd, 8.2; 1.9	118.3	6.96, dd, 8.2; 2.0	119.6
7	5.51, d, 6.1	88.7	5.51, d, 6.2	87.6	5.58, d, 5.7	88.3
8	3.47, dd, 12.9 ; 6.3	55.8	3.49, m	54.1	3.48, m	55.9
9	9a :3.87, m 9b: 3.77, dd, 11.0; 7.4	65.1	9a: 3.85, t 9b: 3.78, t, 12.9	63.6	9a: 3.88, m 9b: 3.8, m	65.2
10	3.84, s	56.3	3.87, s	54.9	3.84, s	56.4
11	-	-	3.84, s	55.3	-	-
1'	-	136.7	-	135.5	-	129.5
2'	6.63, d, 0	116.7	6.75, s	116.5	6.59, d, 5.2	117.1
3'	-	129.8	-	128.5	-	136.9
4'	-	146.5	-	146.1	-	146.4
5'	-	141.9	-	143.8	-	141.9
6'	5.59, d, 1.1	116.9	6.75, s	112.7	6.62, d, 5.1	116.9
7'	2.58, t, 15.4	32.7	2.65, t, 15.4	31.5	2.59, t, 15.4	32.7
8'	1.81, m	35.8	1.84, m	34.4	1.82, dd, 13.3 ; 6.6	35.8
9'	3.58 t, 13.1	62.3	3.59, t, 12.9	60.8	3.58, t, 12.9	62.3
1''	-	-	-	-	5.36, d, 1.5	101.4
2''	-	-	-	-	4.08, dd, 3.3 ; 1.7	72.1
3''	-	-	-	-	3.92, d, 5.4	72.1
4''	-	-	-	-	3.45, m	73.8
5''	-	-	-	-	3.86, d, 5.3	70.8
6''	-	-	-	-	1.23, d, 6.2	17.9



- Quatre méthyles attribuables à C-19 et C-20 qui résonnent respectivement à  $\delta_C$  17.8 et à  $\delta_C$  24.9 ppm et C-16 et C-17 à  $\delta_C$  24.4 ppm.
- Un ensemble de carbones observé entre  $\delta_C$  19.7 et  $\delta_C$  40.3 ppm attribuables à des  $C_{quat}$ , CH et  $CH_2$ .
- Six carbones aromatiques entre  $\delta_C$  125.4 et  $\delta_C$  148.4 ppm
- Un signal déblindé vers  $\delta_C$  68.8 ppm caractéristique d'un CH-O attribuable à C-7.
- Un  $CH_2$  oxygéné attribuable au C-18 raisonnant vers  $\delta_C$  73.8 ppm
- Deux carbonyles caractéristiques d'un acide ou d'un ester résonnant à  $\delta_C$  172ppm et  $\delta_C$  176.6 ppm attribuables aux C-1' et C-4'.



#### • Analyse du spectre COSY

L'analyse des spectres COSY (Figure168-169) du composé C10 montrent les corrélations  $^1H$ - $^1H$  suivantes :

- Une corrélation entre le proton aromatique H-12 avec le proton H-11 et H-14 (Figure 169)
- Des taches de corrélation entre les protons H-2 et les protons H-1 et H-3
- Une corrélation entre les protons H-6 et le proton H-5
- Une tache de corrélation entre les protons H-7 et les protons H-6.
- Une corrélation entre le proton H-15 avec les protons méthyliques H-16 et H-17
- Une corrélation entre les protons H-2' et H-3'

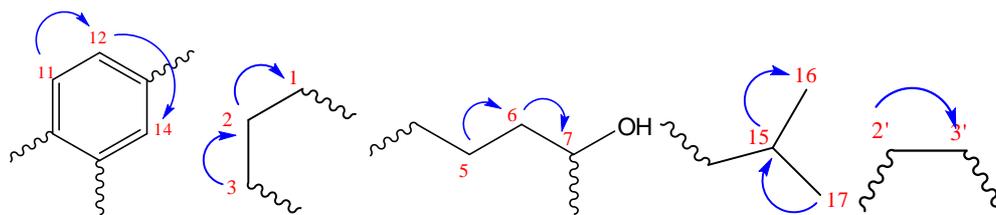


Figure 167. Corrélations COSY du composé C10

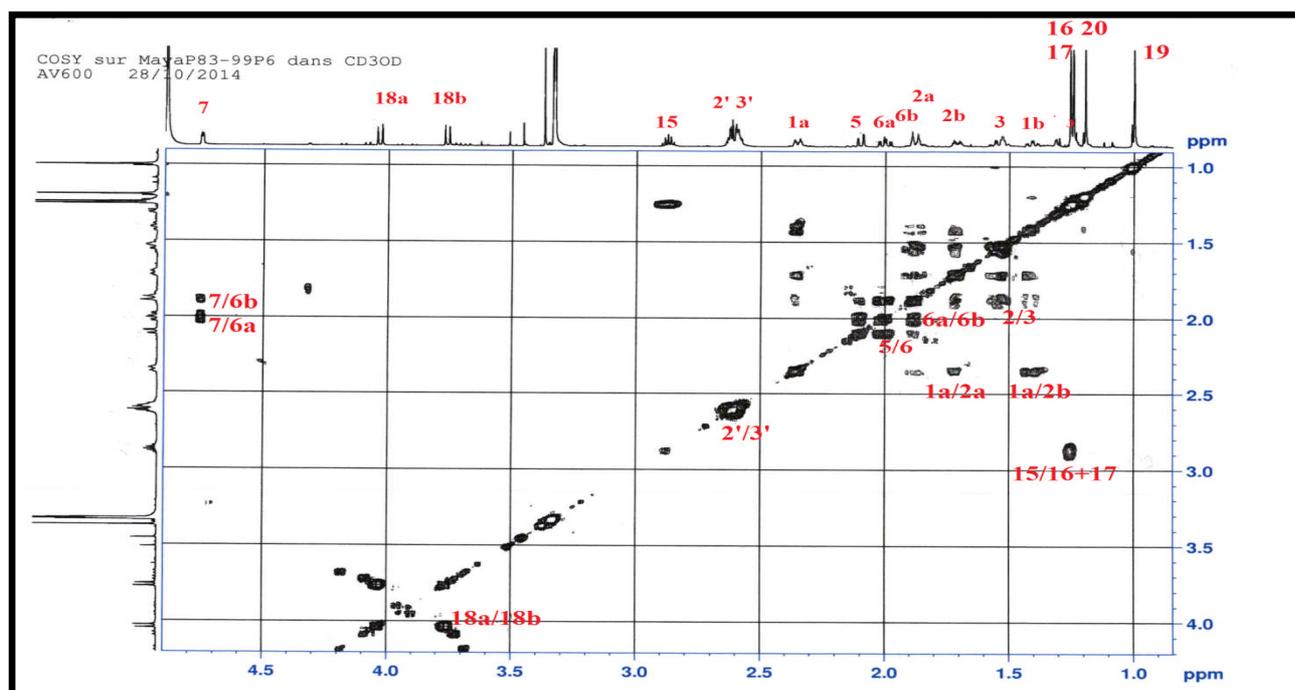


Figure 168. Spectre COSY de  $\delta_H$  1.0 à 5 ppm du composé C10

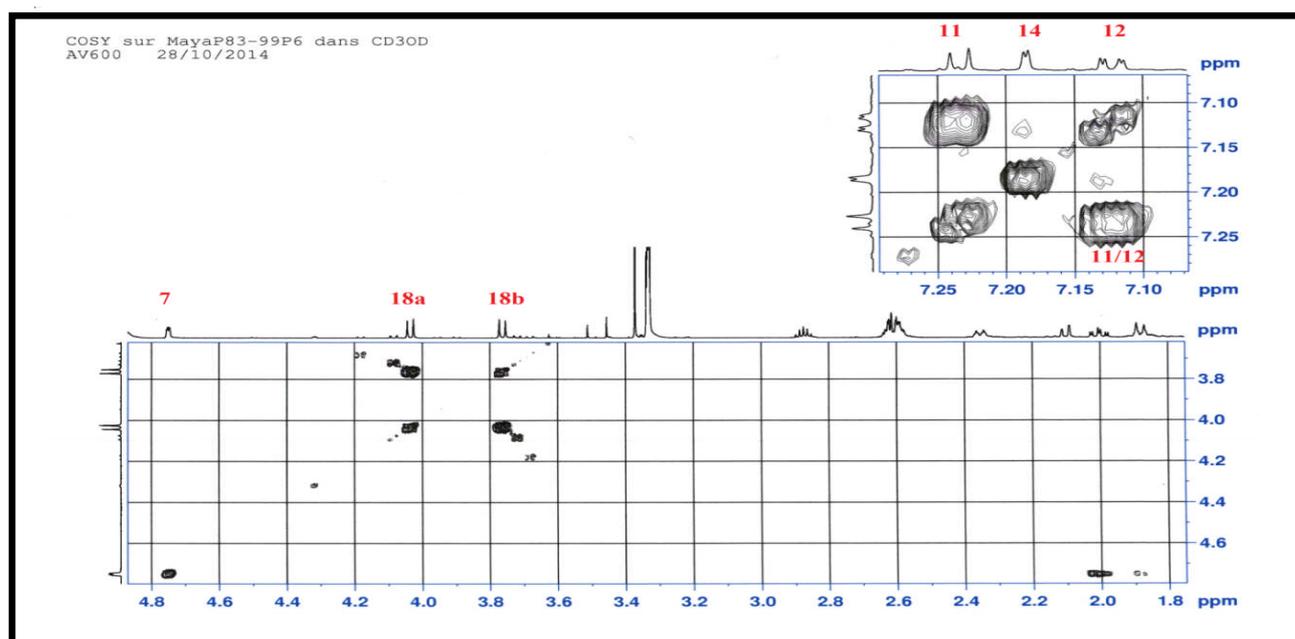
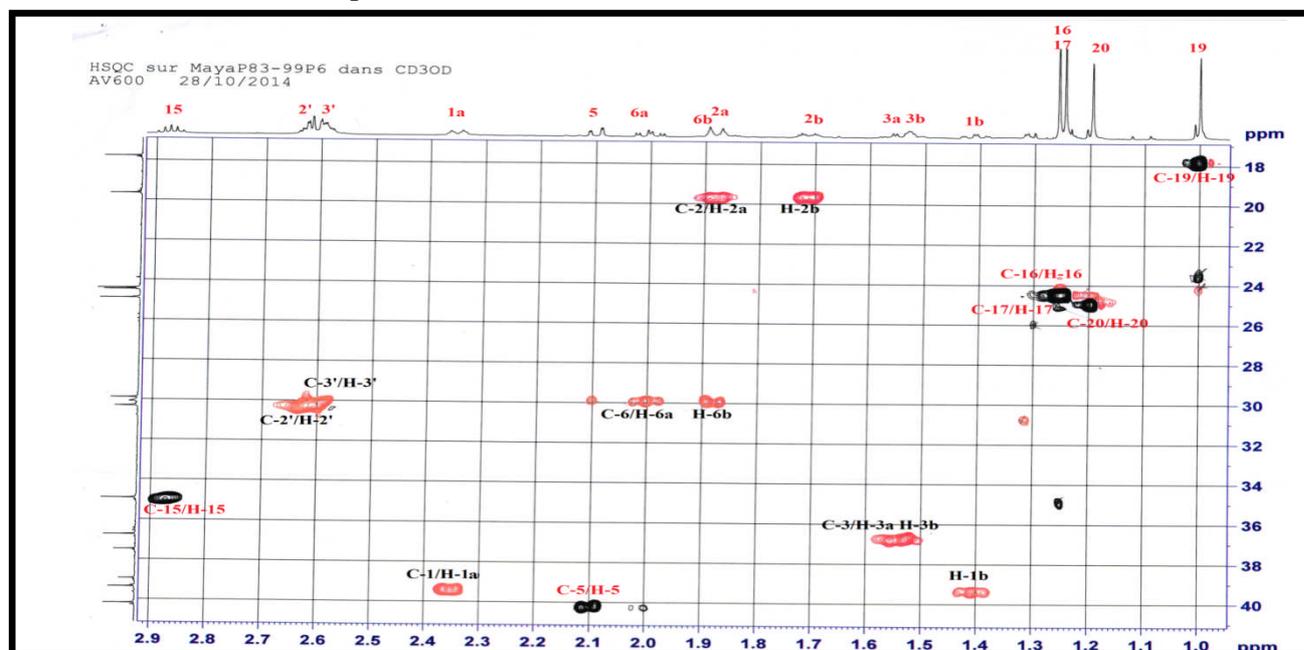


Figure 169. Spectre COSY de  $\delta_H$  7.10 à 7.25 ppm du composé C10

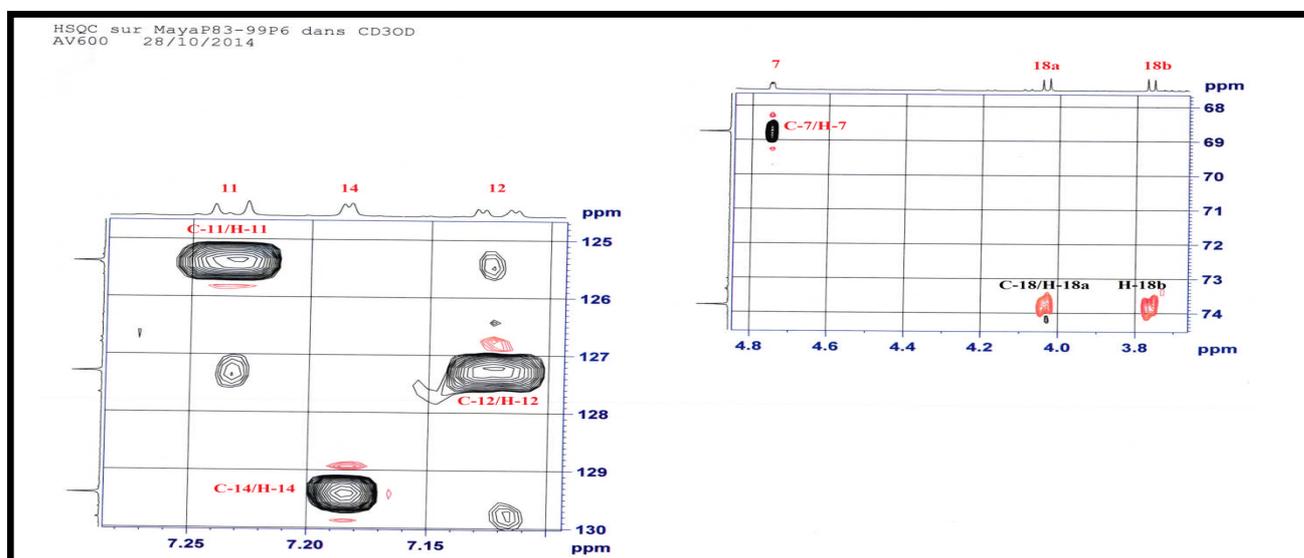
- **Analyse du spectre HSQC**

L'analyse des corrélations hétéronucléaires  $^1J_{H-C}$  observées sur le spectre HSQC (Figures 170-171) permet d'identifier et d'attribuer les déplacements chimiques des carbones portant les protons aliphatiques déjà localisés (C-1, C-2, C-3, C-5, C-6)

Les valeurs des  $\delta_C$  sont répertoriées dans le tableau 26



**Figure 170.** Spectre HSQC de  $\delta_H$  1.0 à 2.9 ppm du composé **C10**

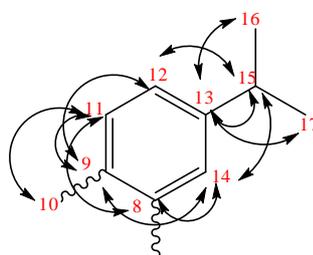


**Figure 171.** Spectre HSQC de  $\delta_H$  3.7 à 7.25 ppm du composé **C10**

- **Analyse du spectre HMBC**

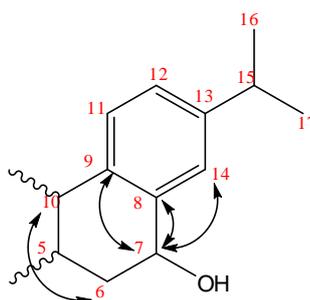
Les corrélations observées sur les spectres HMBC (Figures 176-177) sont :

- Les corrélations du proton aromatique H-11 avec les carbones aromatiques C-12, C-13, C-14, C-8 et le carbone C-10.
- Une tache de corrélation entre le proton aromatique H-12 et les carbones C-9, C-14 et C-15.
- Une tache de corrélation entre le proton aromatique H-14 et le carbone quaternaire C-13 en plus de cC-9 et C-13.
- Le proton H-15 montre une tache de corrélation avec les carbones aromatiques C-12, C-13 et C-14 indiquant sa position sur le carbone quaternaire C-13 d'où son effet déblindé.
- Les protons méthyliques H-16 et H-17 corrérent avec le carbone quaternaire aromatique C-13.



**Figure 172.** Corrélations HMBC au niveau de cycle aromatique

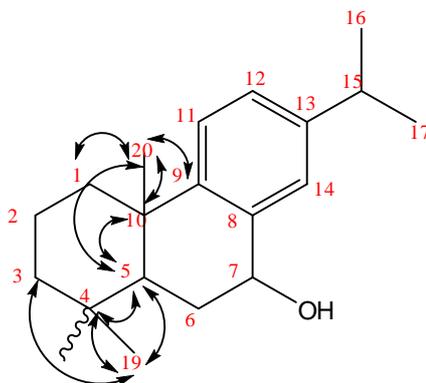
- Le proton H-7 (CH-OH) corréle avec les carbones aromatiques C-8, C-9 et C-14 indiquant son attachement au cycle aromatique.
- Le proton H-6 montre une corrélation avec le carbone C-5 et le carbone quaternaire C-10



**Figure 173.** Corrélations du composé **C10**

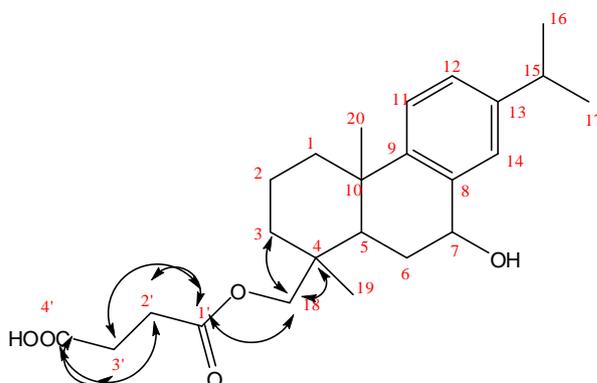
- Le proton H-5 corréle avec les carbones quaternaires C-4 et C-10 et avec les carbones méthyliques C-19 et C-20.
- Le proton méthylique H-19 montre des taches de corrélation avec les carbones C-3, C-5, C-18 et avec le carbone quaternaire C-4 indiquant sa localisation.

- Le proton méthylique H-20 corrèle avec le carbone aromatique C-9, avec les carbones C-1 et C-5 et avec le carbone quaternaire C-10.



**Figure 174.** Corrélations HMBC du composé **C10**

- Les protons H-18 montrent des taches de corrélations avec Les carbones C-3, C-4 et C-5, avec le carbone méthylique C-19 et le carbonyle C-1 indiquant ainsi sa position liée au C-4 et au carbonyle.
- Le proton H-2'corrèle avec le C-3' et le carbonyle C-1' indiquant qu'il s'agit d'un ester.
- Le proton H-3' corrèle avec le carbonyle C-4' indiquant qu'il s'agit d'un acide.



**Figure 175.** Corrélations du composé **C10**

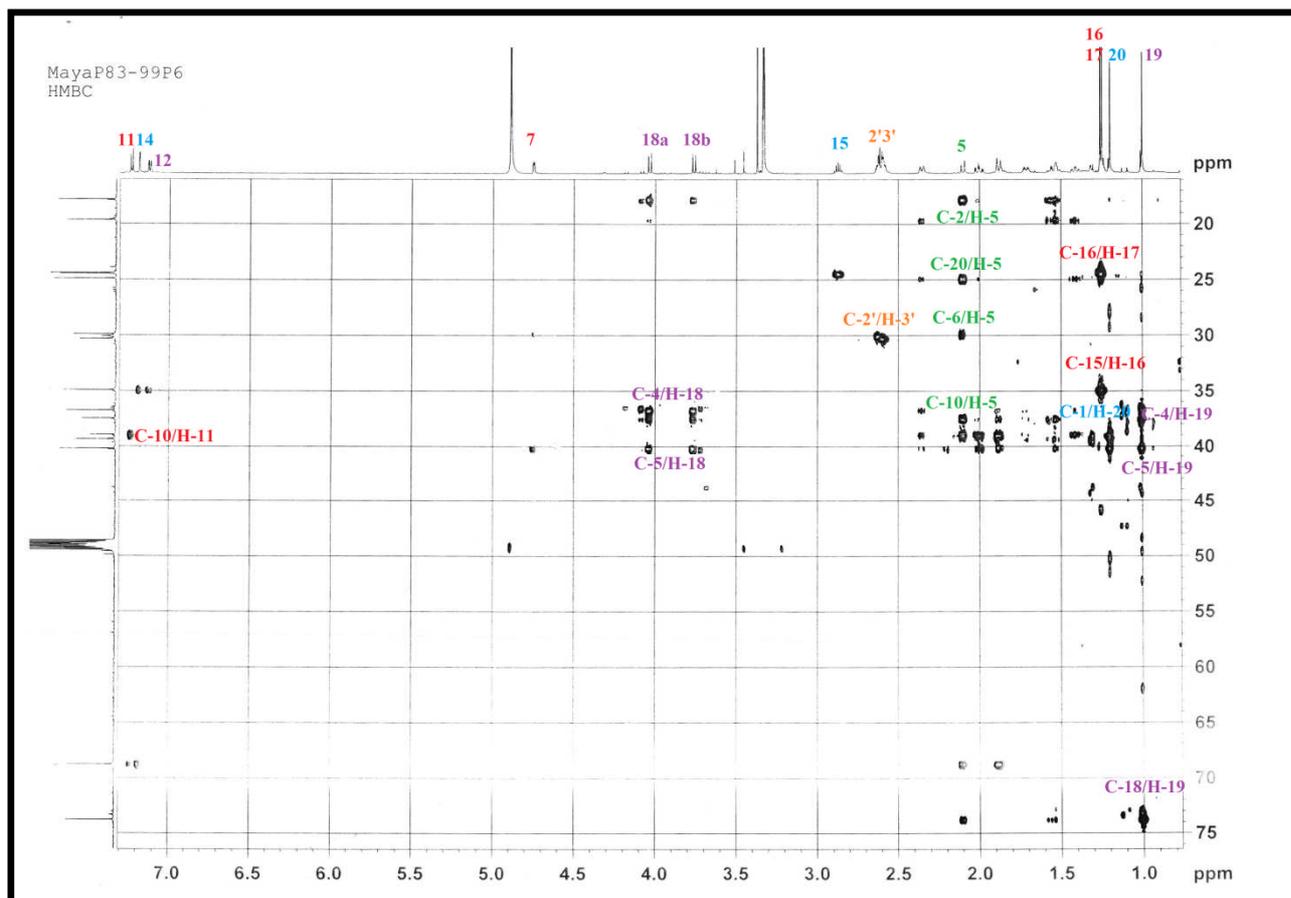


Figure 176. Spectre HMBC de  $\delta_C$  15 à 75 ppm du composé C10

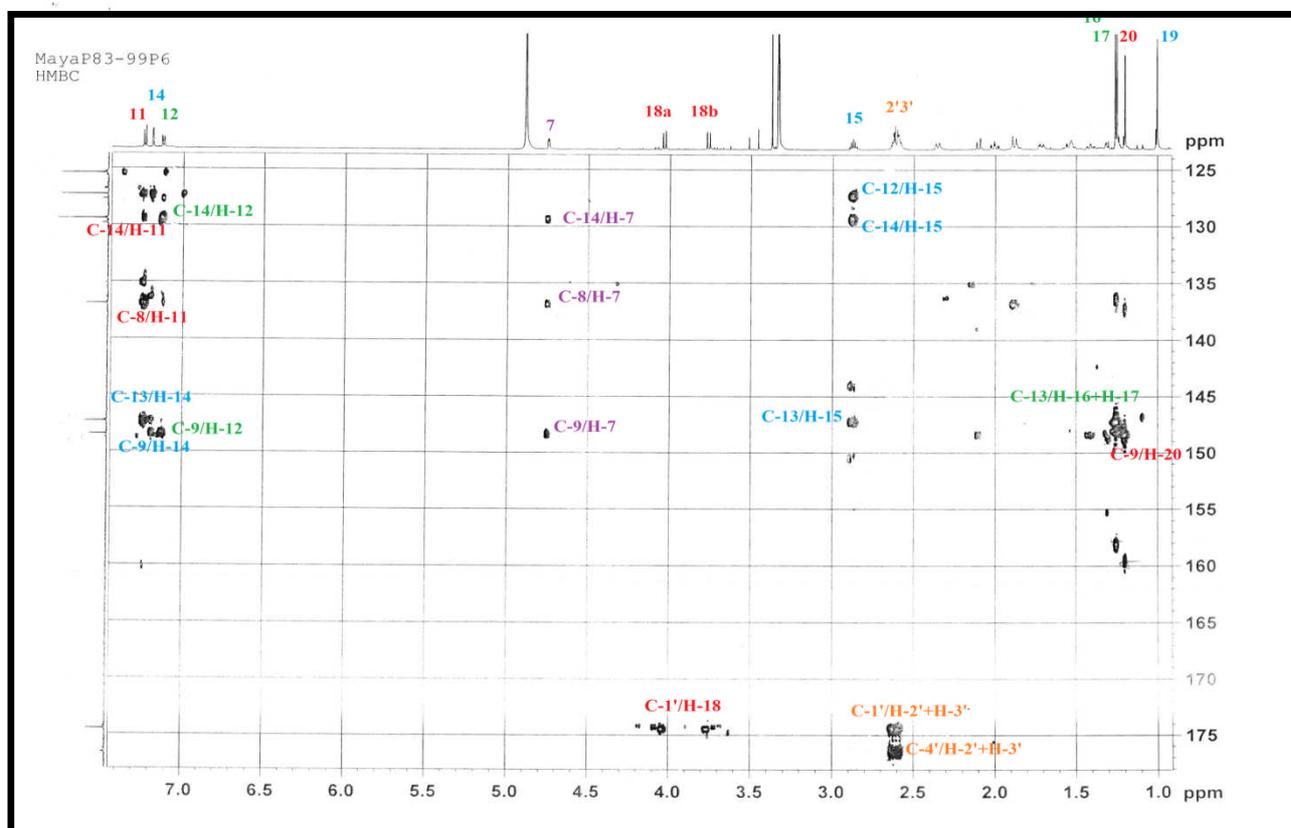
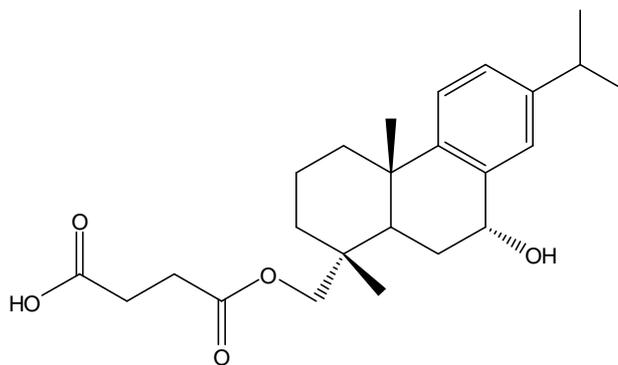


Figure 177. Spectre HMBC de  $\delta_C$  125 à 175 ppm du composé C10

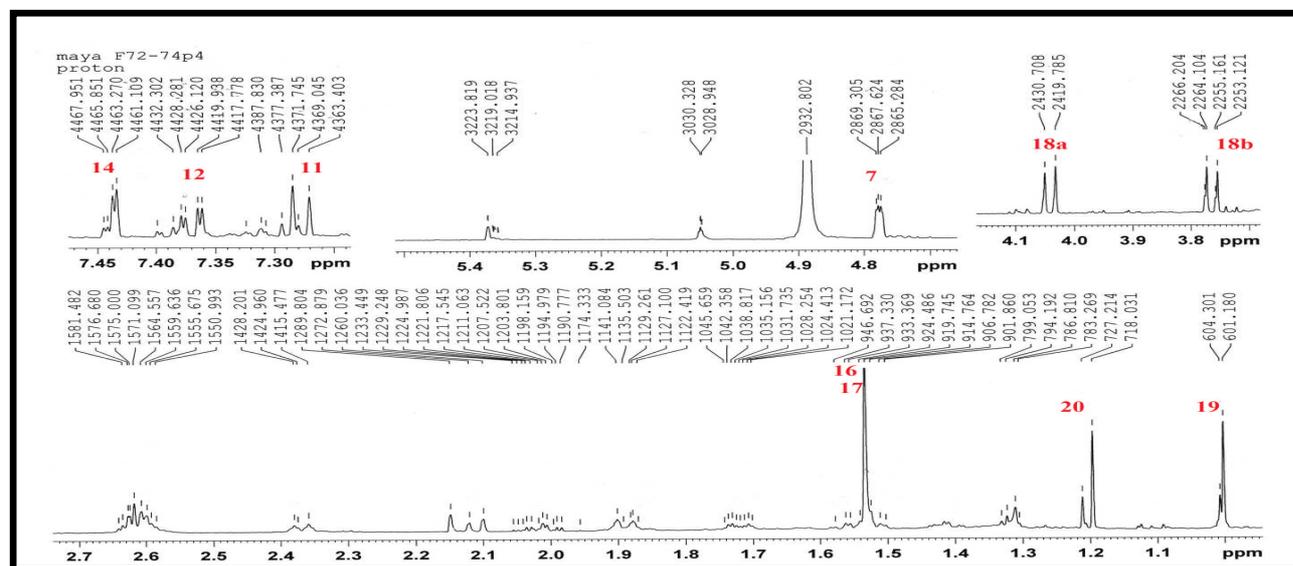
Le diterpene **C10** est donc identifié comme abiesadine F isolé pour la première fois d'*Abies georgei* Orr (Xian-Wen et al., 2010) et jamais dans le genre *Cedrus*.



**C10** : Abiesadine F

#### 2.1.4.1.2. Identification du composé C11

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 178) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 179) du composé **C11** montrent une forte ressemblance avec ceux du composé **C10** identifié précédemment. La seule différence est notée au niveau du carbone C-15, qui par son déplacement chimique déblindé sur le spectre  $^{13}\text{C}$  du composé **C11** ( $\delta_{\text{C}}$  71.4 ppm) et par l'absence de signal correspondant sur le spectre  $^1\text{H}$  indiquant son oxydation.



**Figure 178.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **C11**

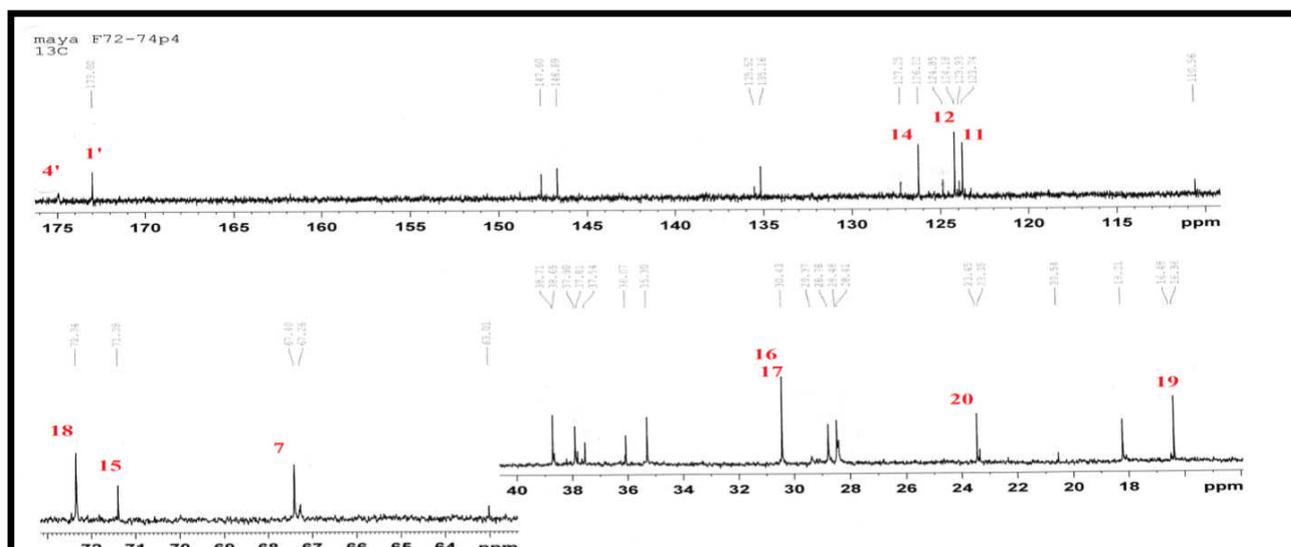


Figure 179. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C11

- Analyse du spectre COSY

Les corrélations observées sur le spectre COSY (Figure 180) du composé C11 sont similaires à celles déjà décrites dans le composé C10 avec une seule différence notable sur l'absence des taches de corrélations liées au proton H-15.

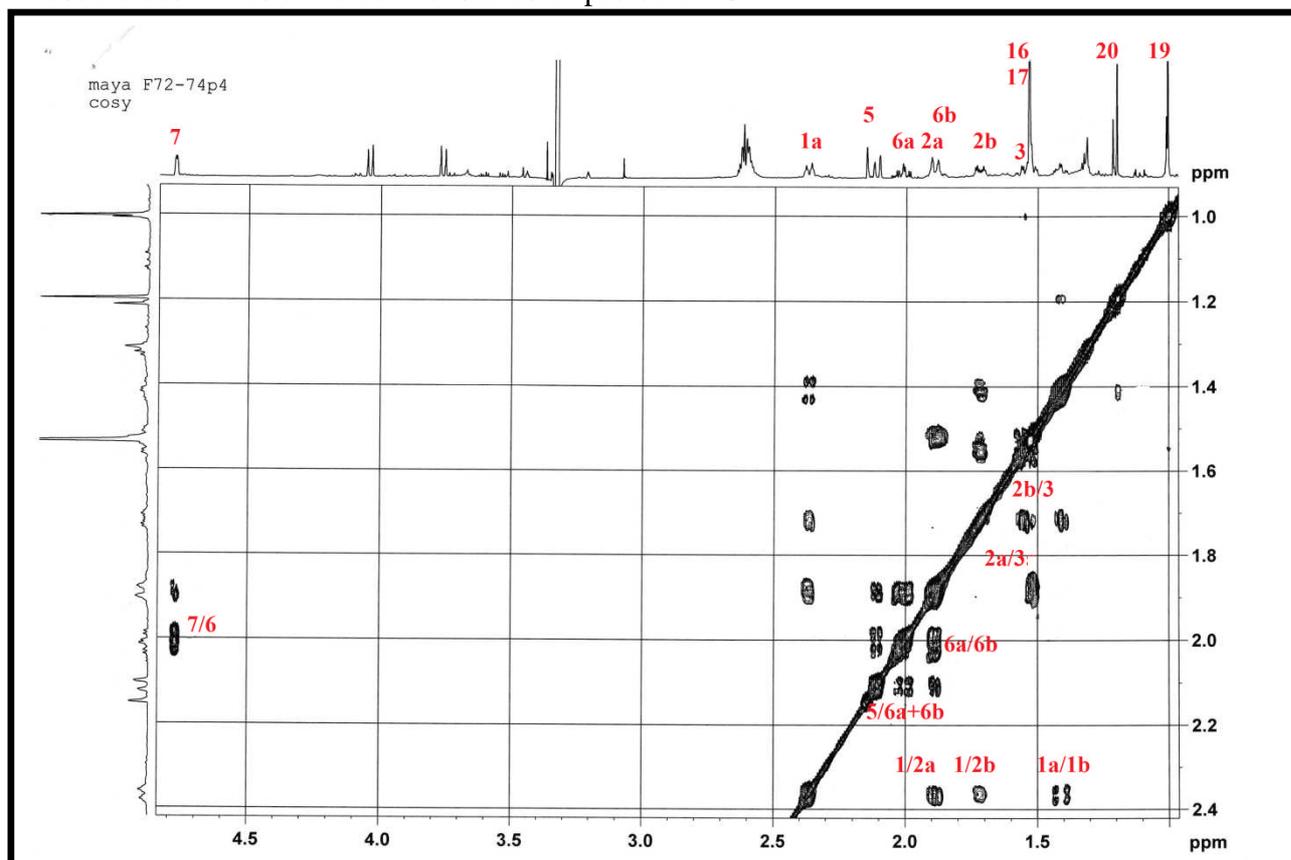
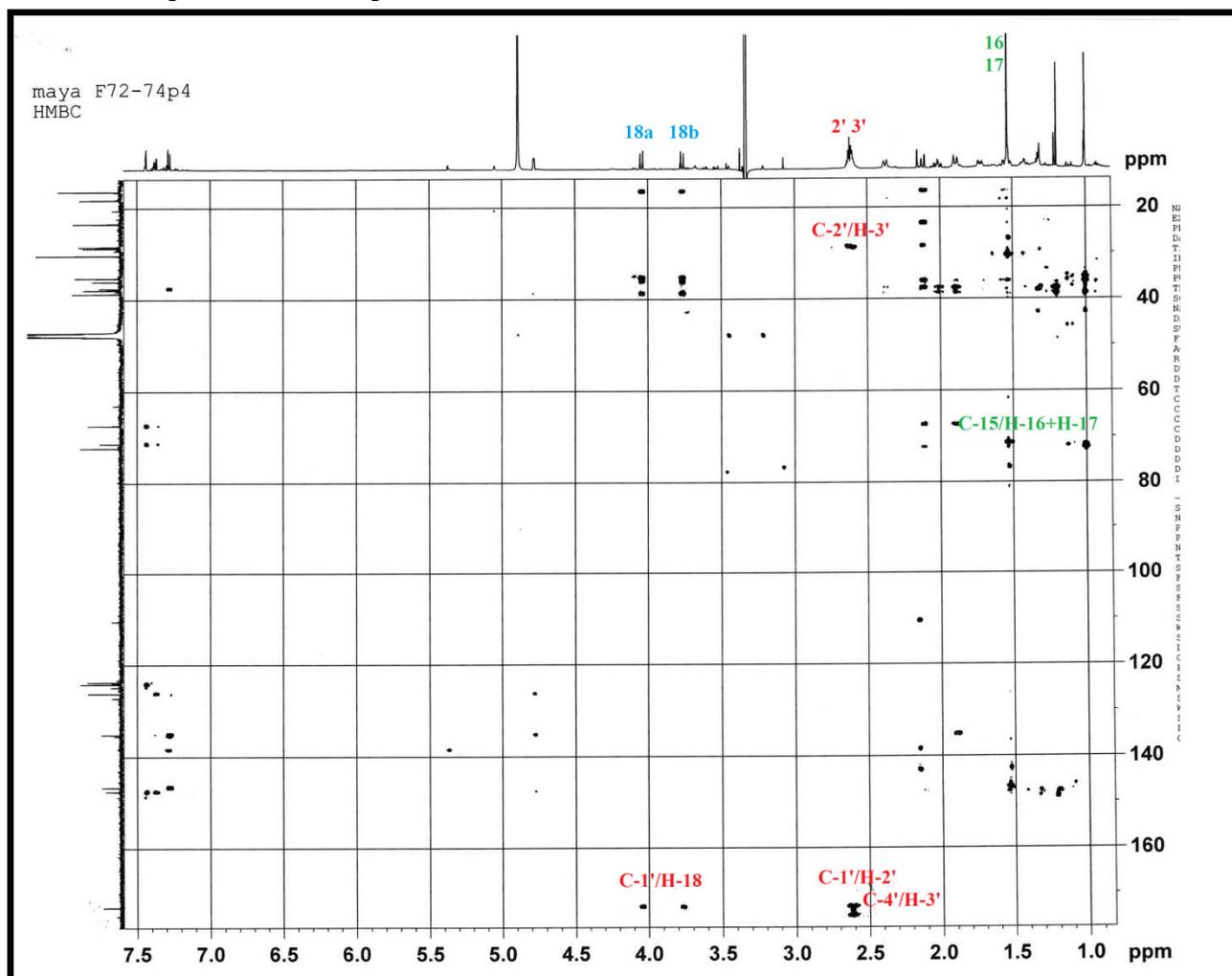


Figure 180. Spectre COSY du composé C11

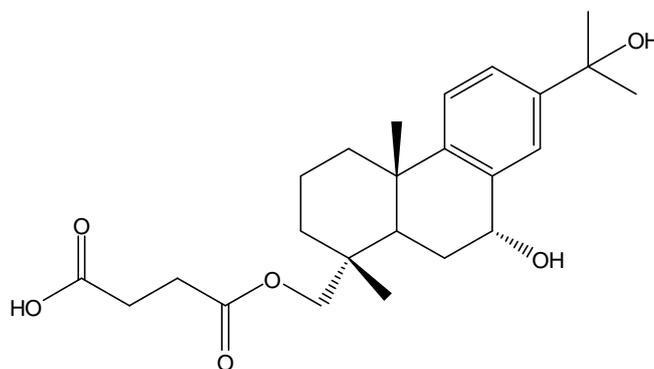
- Analyse du spectre HMBC

Les corrélations du spectre HMBC (Figure 181) du composé **C11** sont identiques à celle du composé **C10** décrit précédemment.



**Figure 181.** Spectre HMBC du composé **C11**

Ainsi le composé **C11** est identifié comme étant l'abiesadine L isolé uniquement d'*Abies georgei* (Xian-Wen et al., 2010).



**C11: Abiesadine L**

### 2.1.4.1.3. Identification du composé C12

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Figure 182-183) révèle que le composé **C12** diffère du composé **C10** par l'absence de signal qui correspond au CH-7 ( $\delta_{\text{H}} 4.75/\delta_{\text{C}} 68.8$  ppm) et la présence d'un signal à  $\delta_{\text{C}} 199.9$  ppm assignable à une cétone.

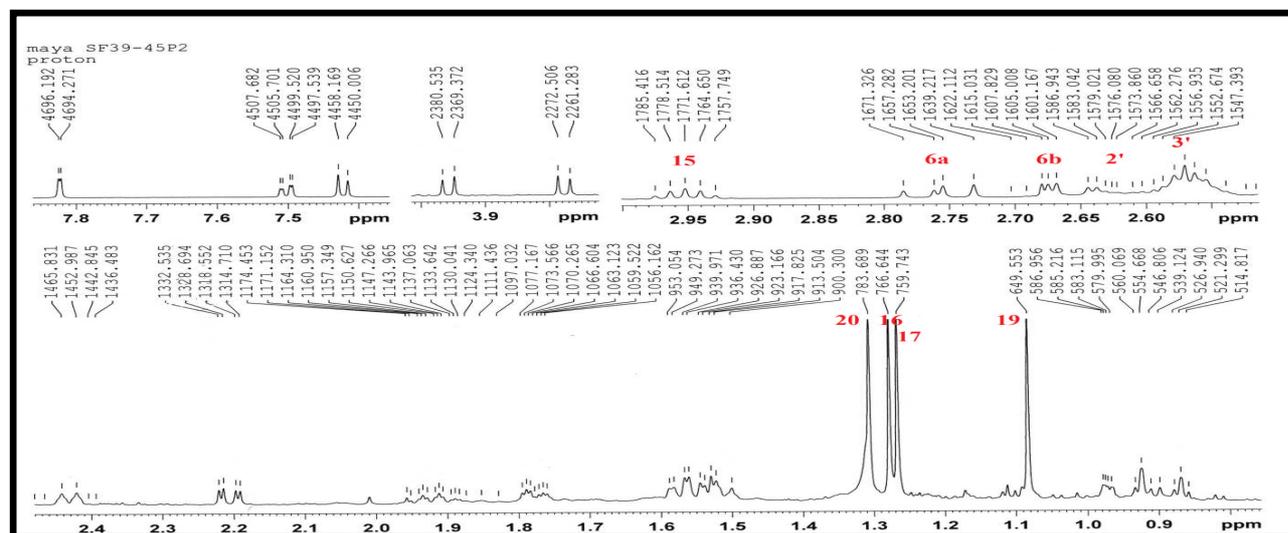


Figure 182. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **C12**

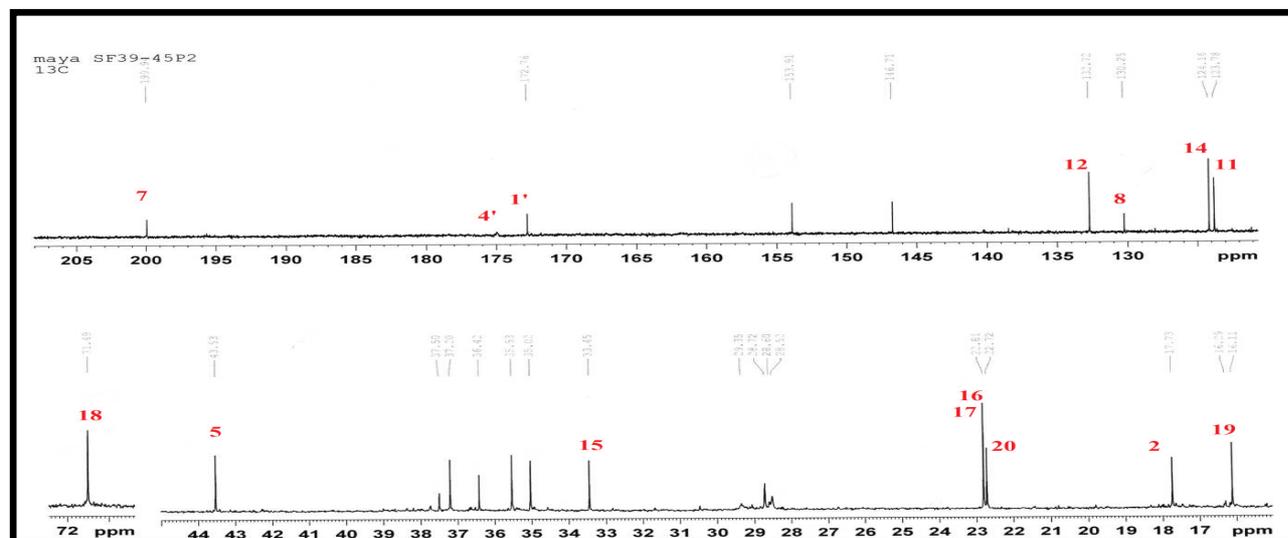


Figure 183. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **C12**

- Analyse du spectre COSY

Les corrélations observées sur le spectre RMN COSY (Figure 184) du composé **C12** sont semblables à celles déjà décrites dans le composé **C10** avec l'absence des taches de

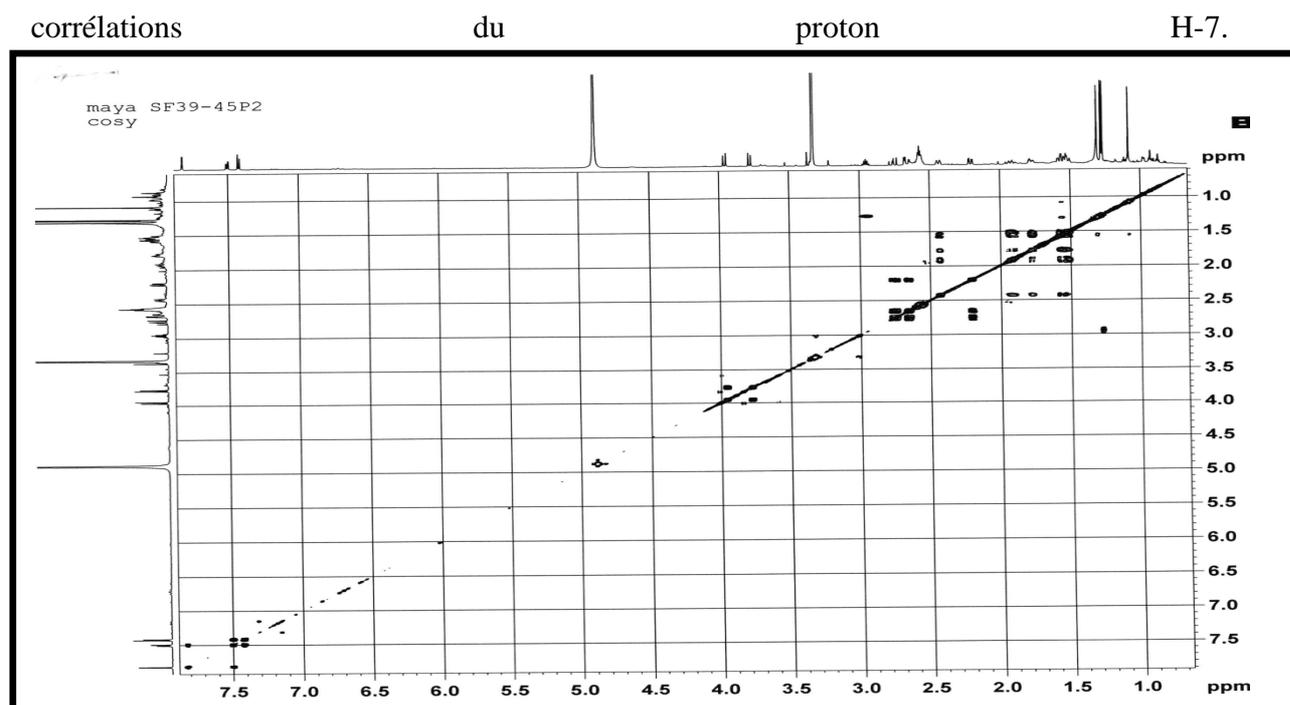


Figure 184. Spectre COSY du composé C12

- **Analyse du spectre HMBC**

L'analyse du spectre HMBC (Figure 185) met en évidence des taches de corrélations semblables à celles identifiées sur le spectre HMBC du composé C10 (Figures 176-177). Cependant il diffère par l'apparition d'un carbonyle à 199.9 ppm attribuable à C-7 par les corrélations suivantes :

- Une corrélation entre les deux protons aromatiques H-11 et H-14 avec le carbonyle C-7 à  $\delta_C$  199.9ppm
- Une corrélation entre les deux protons vicinaux H-5 et H-6 avec le C-7.

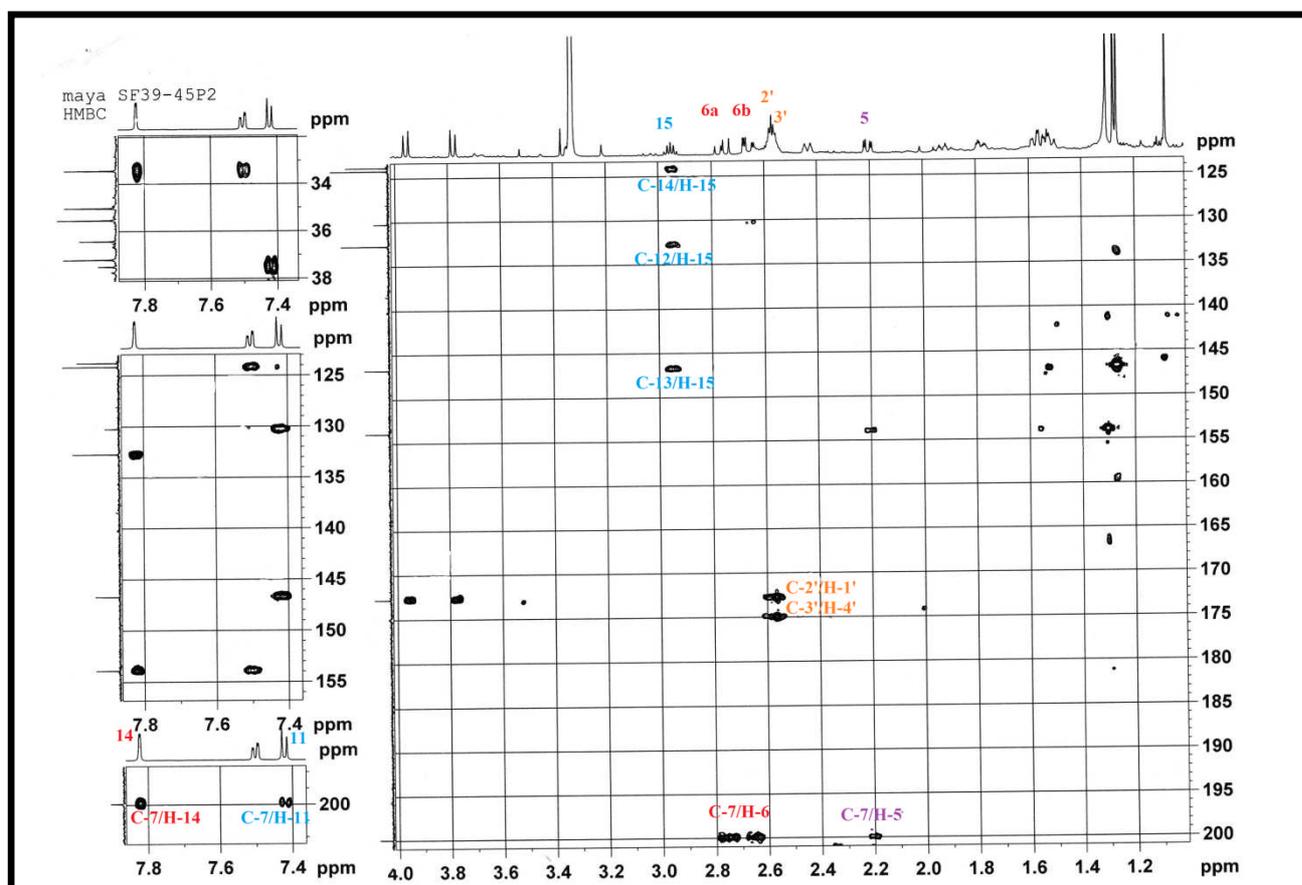
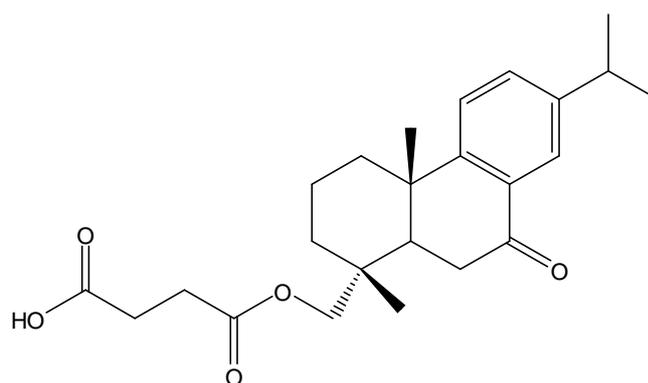


Figure 185. Spectre HMBC du composé **C12**

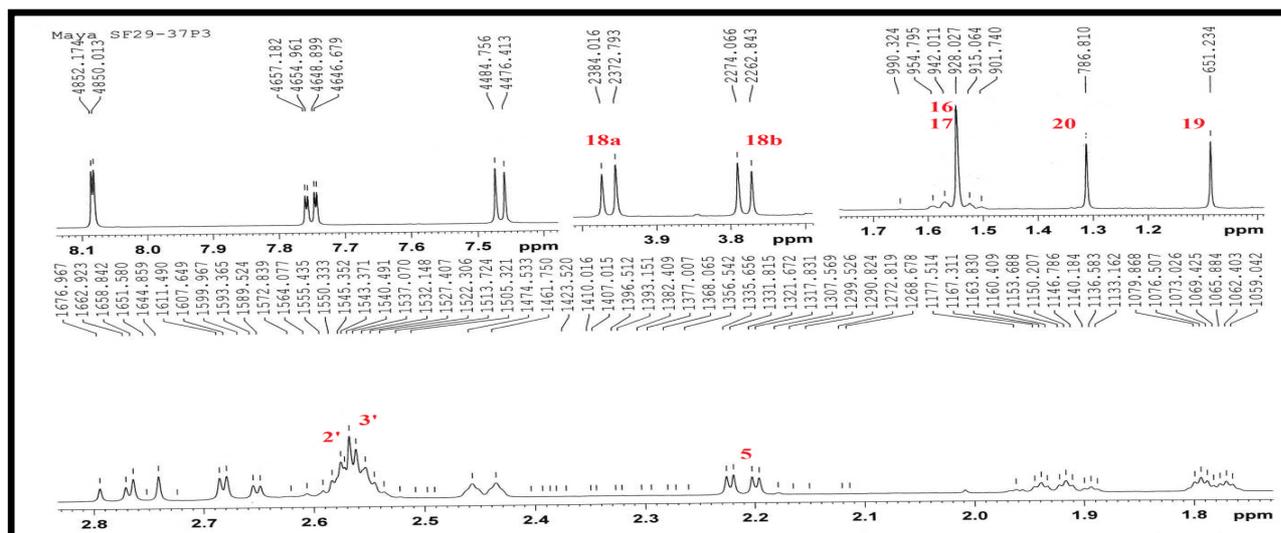
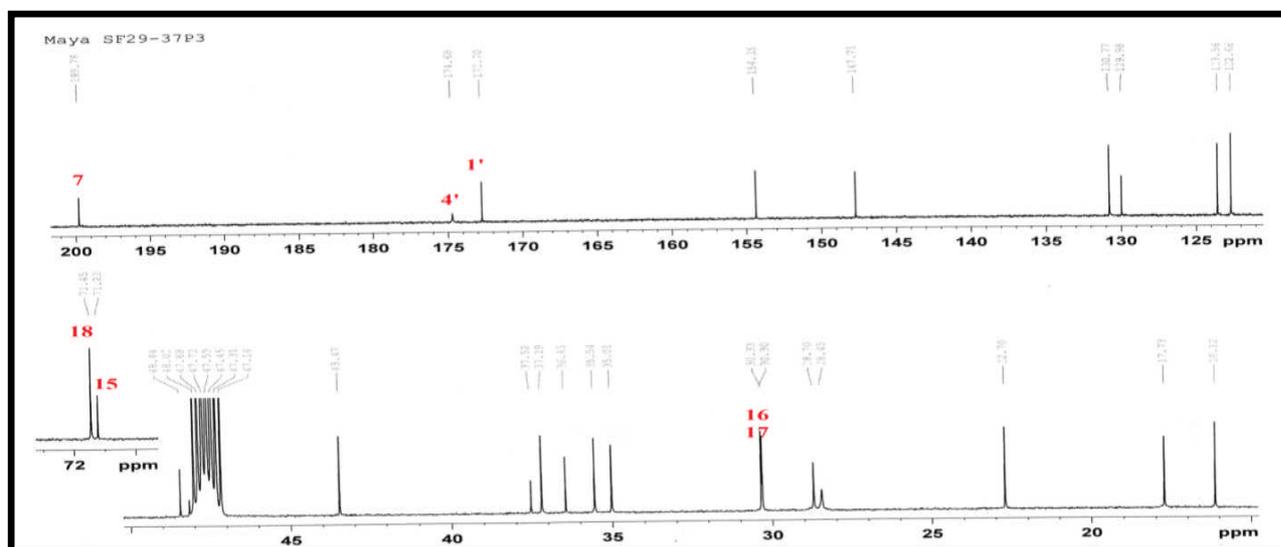
L'analyse spectrale a permis l'identification du composé **C12** comme étant l'abiesadine Q isolé également pour la première fois d'*Abies gerogei* Orr (Xian-Wen et al., 2010).



**C12** : Abiesadine Q

#### 2.1.4.1.4. Identification du composé **C13**

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 186) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 187) du composé **C13** ressemblent aux spectres du composé **C11** par la présence du carbone C-15 oxygéné ( $\delta_{\text{C}}$  71.2ppm) et à ceux du composé **C12** par la présence de la fonction cétone ( $\delta_{\text{C}}$  199.8ppm).

Figure 186. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C13Figure 187. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C13

- Analyse du spectre COSY

Sur le spectre COSY du produit C13 (Figure 188), on relève les mêmes taches de corrélation que celles décrites dans le produit C11 (Figure 180), avec l'absence des corrélations liées au proton H-15 du fait de son oxydation.

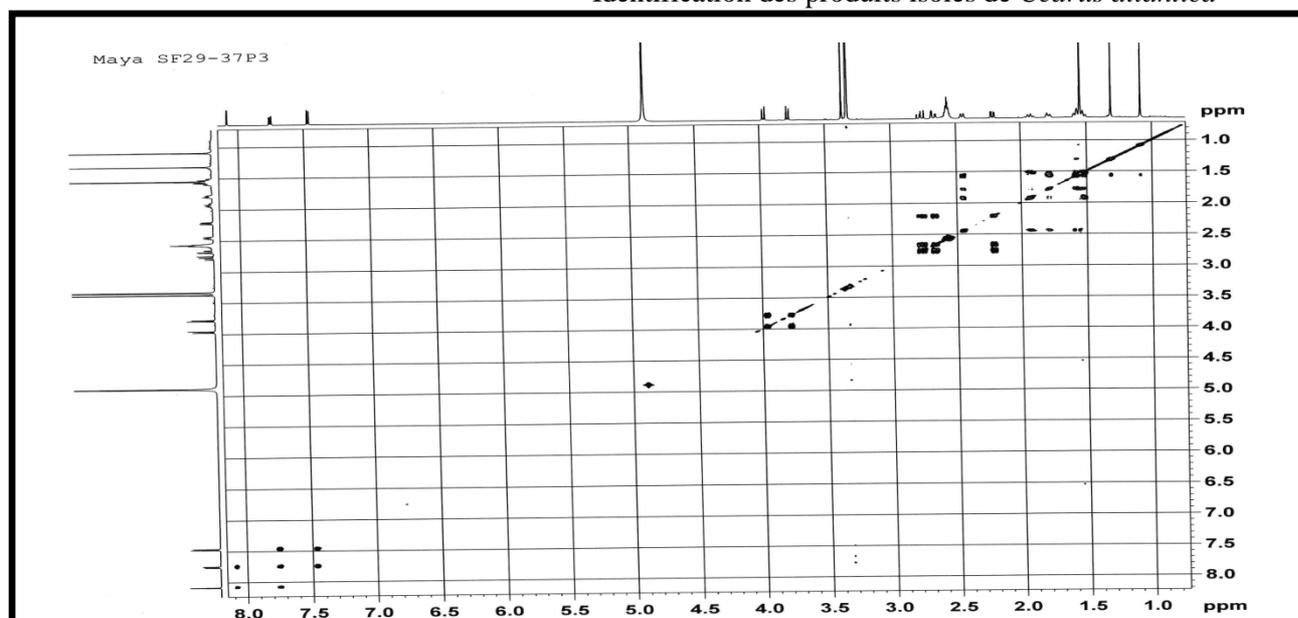


Figure 188. Spectre COSY du composé C13

- Analyse du spectre HMBC

Le spectre HMBC (Figure 189) du composé C13 montre des taches similaires à celle du composé C11 (Figure 181), la seule différence réside dans :

- La corrélation entre les deux protons aromatiques H-11 et H-14 avec le carbonyle C-7.
- La corrélation entre les deux protons vicinaux H-5 et H-6 avec le C-7.

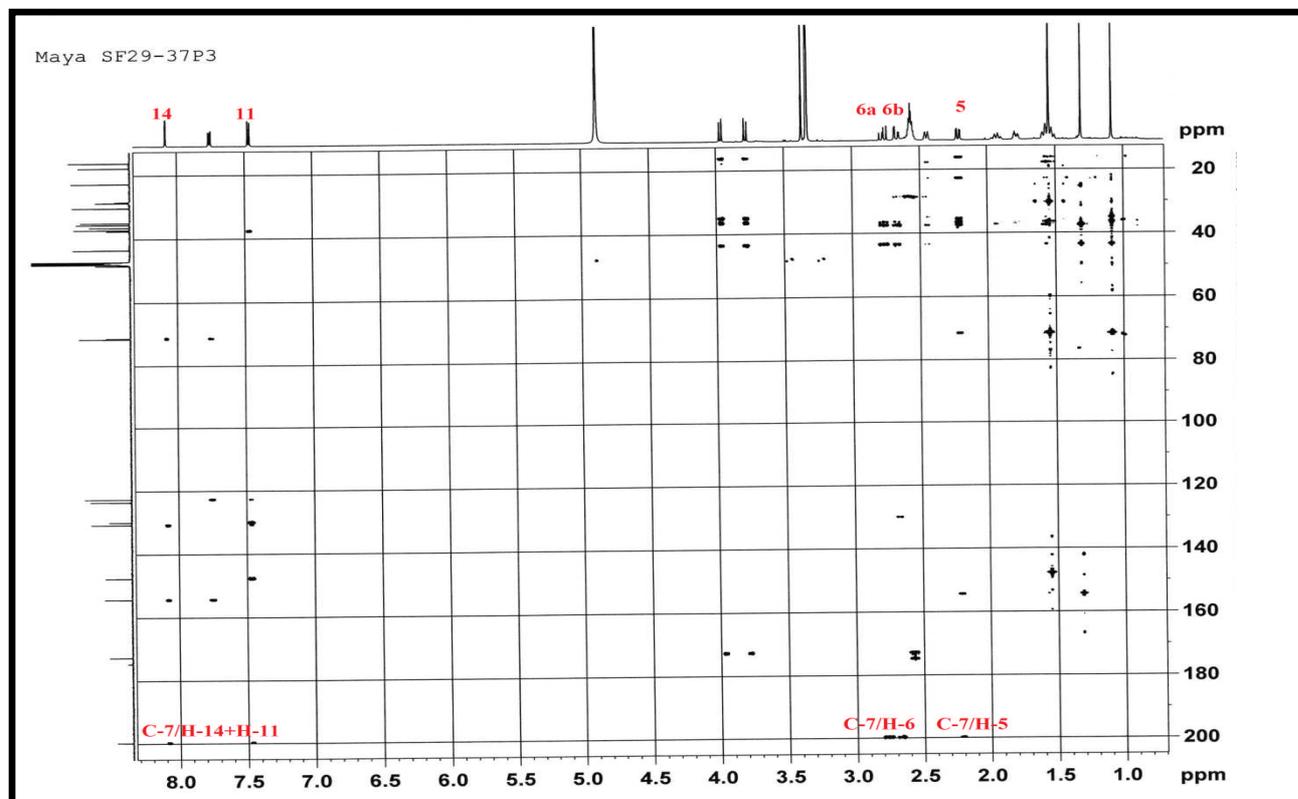
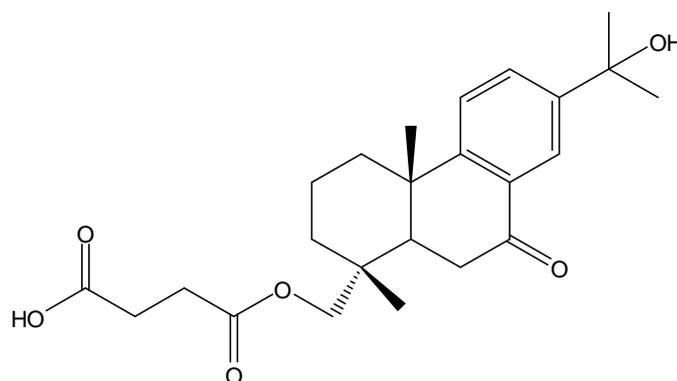


Figure 189. Spectre HMBC du composé C13

Le composé **C13** a été identifié à l'abiesadine R, identifié pour la première et unique fois dans *Abies georgeii* (Xian-Wen et al., 2010).



**C13** : Abiesadine R

**Tableau 26.** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) des composés **C7**- **C10** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

Atome	<b>10</b>		<b>11</b>		<b>12</b>		<b>13</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1a: 2.35, dt, 12.7; 2.9 1b: 1.4, td, 13.1; 3.7	39.4	1a: 2.37, dt, 12.8; 3.2 1b: 1.4, dt	37.9	1a: 2.43, dl, 12.8 1b: 1.56, td, 13.1; 3.8	37.2	1a: 2.44, dl, 12.8 1b: 1.57, m	37.2
2	2a: 1.88, m 2b: 1.71, dm, 14.0	19.67	2a: 1.9, m 2b: 1.72, dm, 14.4	18.2	2a: 1.93, qt, 13.6; 3.4 2b: 1.78, dm, 14.1	17.7	2a: 1.93 qt, 13.6; 3.4 2b: 1.78, dm, 14.4	17.7
3	1.55 m	36.7	3a: 1.56, m 3b: 1.52, m	35.3	3a: 1.56, td, 13.1; 3.8 3b: 1.52, m	35.0	3a: 1.58, m 3b: 1.52, m	35.0
4	-	37.5	-	36.1	-	36.4	-	36.5
5	2.1 dd, 12.8; 1.7	40.3	2.13, dl, 12.8	38.7	2.1, dd, 13.9; 3.8	43.5	2.21, dd, 10.1; 3.8	43.8
6	6a: 2.0, td, 13.8; 4.1 6b : 1.8, m	29.9	6a: 2.02, td, 14.3; 4.3 6b: 1.88, m	28.5	6a : 2.75, dd, 18.1; 14.0 6b : 2.66, dd, 18.1; 3.8	35.5	6a : 2.77, dd, 18.1; 14.0 6b : 2.67, dd, 18.1 ; 3.8	35.5
7	4.75 dd; 14.0 ; 1.6	68.8	4.77, dd, 4.0 ; 1.7	67.4	-	199.9	-	199.8
8	-	136.9	-	135.2	-	130.2	-	129.9
9	-	148.4	-	147.6	-	153.9	-	154.3
10	-	38.9	-	37.5	-	37.5	-	37.5
11	7.23, d, 8.2	125.4	7.28, d, 8.3	123.7	7.42, d, 8.1	123.8	7.47, d, 8.3	122.7
12	7.12, dd,	126.8	7.37, dd,	124.2	7.5, dd, 8.1;	132.7	7.75, dd, 8.3;	130.8

	8.2; 1.9		8.3; 2.1		1.9		2.2	
13	-	147.3	-	146.7	-	146.7	-	147.7
14	7.18, d, 1.9	129.4	7.44, d, 2.1	126.2	7.82, d, 1.9	124.2	8.08, d, 2.2	123.6
15	2.87, sept, 6.9	34.9	-	71.4	2.95, sept, 6.9	33.4	-	71.2
16	1.25, d, 6.9	24.4	1.53, s	30.4	1.27, d, 6.9	22.8	1.54, s	30.3
17	1.25, d, 6.9	24.4	1.53, s	30.4	1.27, d, 6.9	22.8	1.54, s	30.3
18	18a : 4.03, d, 11.0 18b: 3.76, d, 11.0	73.8	18a: 4.04, d, 10.9 18b: 3.76,d, 11.0	72.3	18a: 3.96, d, 11.2 18b:3.78, d, 11.2	71.5	18a: 3.97, d, 11.2 18b: 3.78, d, 11.2	71.4
19	1.0 s	17.8	1.0, s	16.4	1.08, s	16.1	1.08, s	16.1
20	1.19 s	24.9	1.2, s	23.4	1.3,s	22.7	1.31, s	22.7
1'	-	174.5	-	173.0	-	172.8	-	172.7
2'	2.62 m	30.3	2.62, m	28.8	2.58, m	28.7	2.57, m	28.7
3'	2.6 m	30.1	2.6, m	28.4	2.56, m	28.5	2.56, m	28.4
4'	-	176.6	-	175.0	-	175	-	174.7

### 2.1.4.2. Elucidation structurale des composés C14-C17

#### 2.1.4.2.1. Identification du composé C14

##### • Analyse du spectre RMN $^1\text{H}$

Le spectre RMN proton du produit C14 (Figure 190) montre :

- Un ensemble de CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> entre  $\delta_{\text{H}}$  1.21 et 2.36 ppm
- Deux protons aromatiques avec une constante de couplage nulle indiquant une position para résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  7.17,  $\delta_{\text{H}}$ 6.98 et 6.87 ppm attribuables au H-11, H-12 et H-14.
- Un multiplet attribuable au H-15 observé à  $\delta_{\text{H}}$  2.8

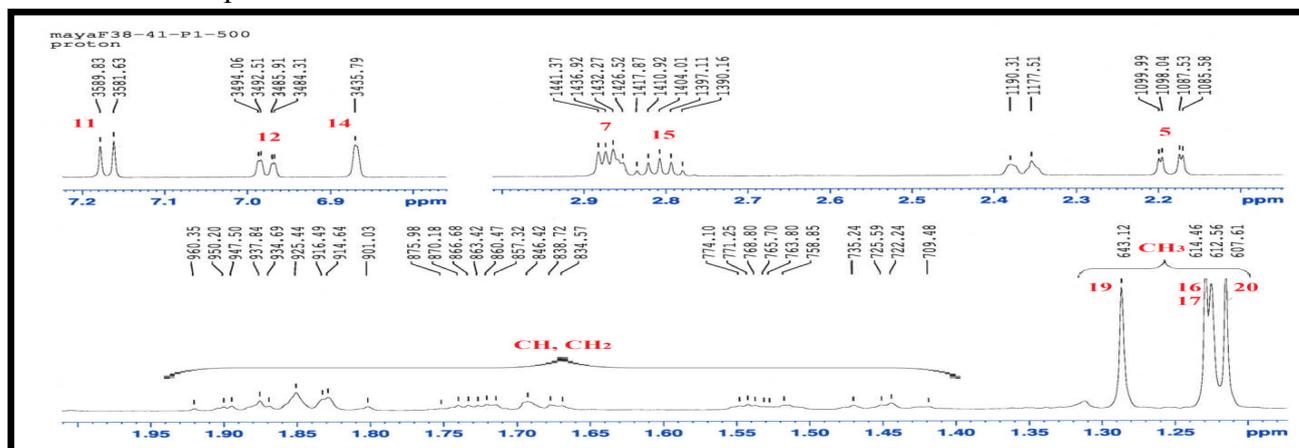
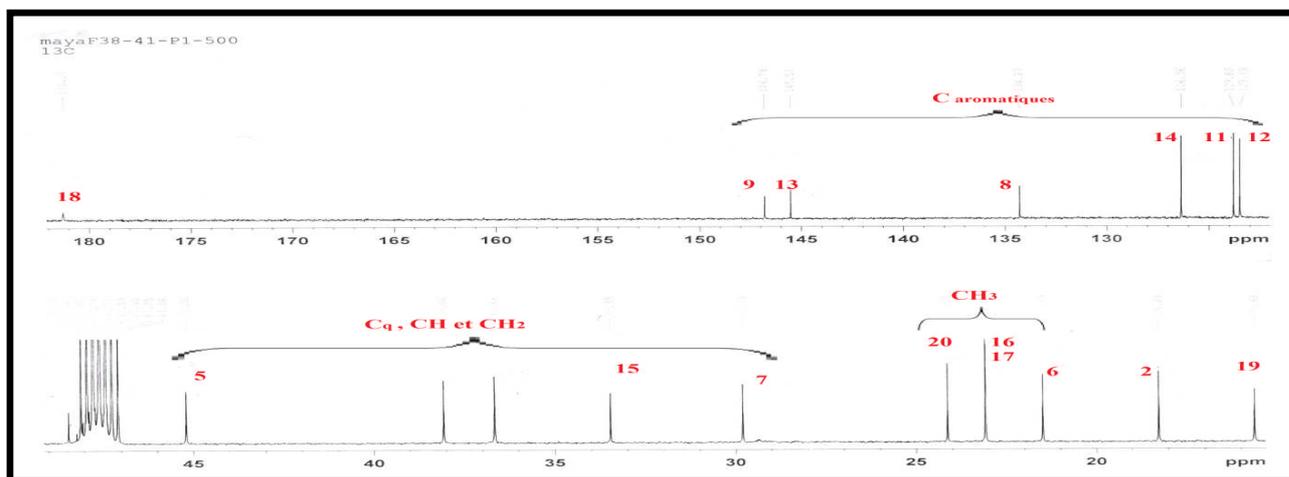


Figure 190. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C14

- **Analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$**

Sur le spectre  $^{13}\text{C}$  (Figure 191) :

- Des carbones quaternaires, des CH,  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$  résonnant entre  $\delta_{\text{C}}$  15.6 et 45.2 ppm
- Un ensemble de carbones aromatiques entre  $\delta_{\text{C}}$  123.5 et 145.5 ppm
- Un pic caractéristique d'une fonction acide ou ester qui résonne vers  $\delta_{\text{C}}$  181.3 ppm

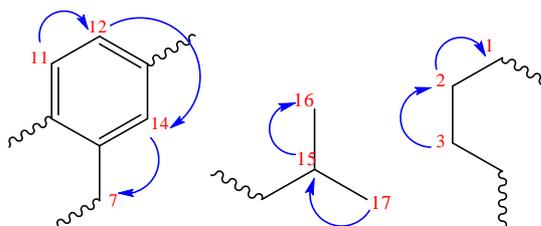


**Figure 191.** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C14

- **Analyse du spectre COSY**

Sur le spectre COSY (Figure 193), les corrélations observées sont :

- Le proton H-2 corrèle avec les protons H-1 et H-3 et ce dernier avec le proton du méthyle C-19
- Le proton H-5 corrèle avec les protons H-6 et H-19
- Le proton H-7 corrèle avec H-6 et le proton aromatique H-14
- Le proton aromatique H-12 sous forme d'un doublet de doublet corrèle avec les deux protons aromatiques H-11 en méta ( $J= 8.2\text{Hz}$ ) et avec H-14 en ortho ( $J= 1.6\text{Hz}$ )
- Le H-15 corrèle avec les protons des deux méthyles H-16 et H-17 qui corrèlent entre eux.



**Figure 192.** Corrélations COSY du composé C14

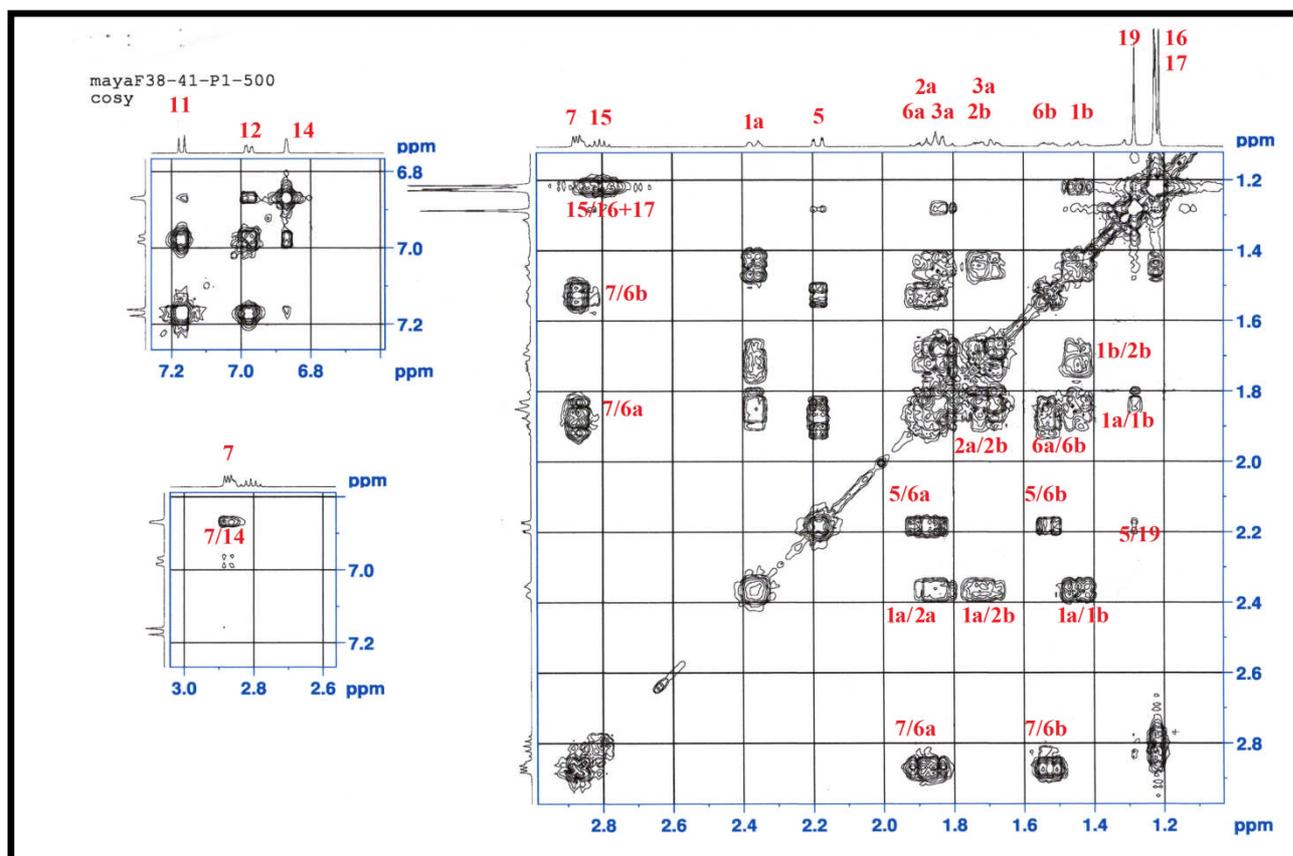


Figure 193. Spectre COSY du composé C14

- Analyse du spectre HSQC

L'analyse des spectres HSQC (Figure 194) nous permet d'identifier les carbones quaternaires (C-4, C-10, C-8 et C-9), les C-H (C-5, C-7, C-11, C-12, C-14 et C-15), les CH<sub>2</sub> (C-1, C-2, C-3 et C-6) et les CH<sub>3</sub> (C-16, C-17, C-19 et C-20) et leurs déplacements chimiques (Tableau 27).

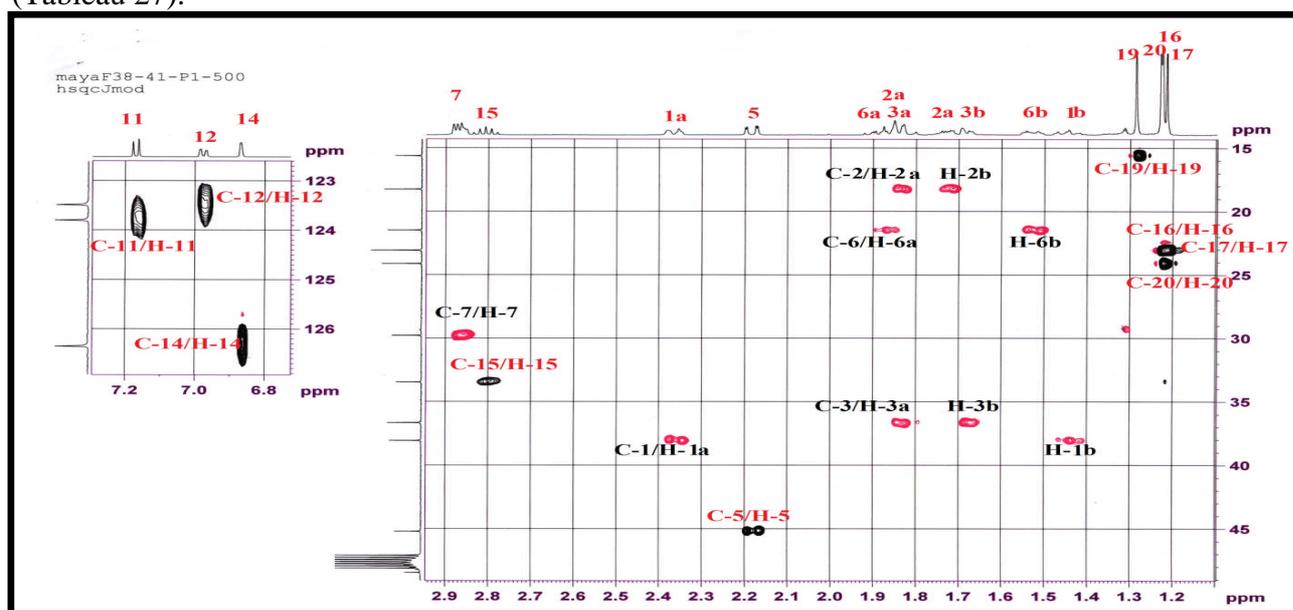
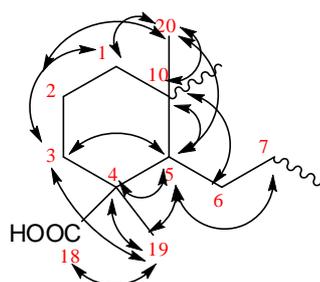


Figure 194. Spectre HSQC du composé C14

• **Analyse du spectre HMBC**

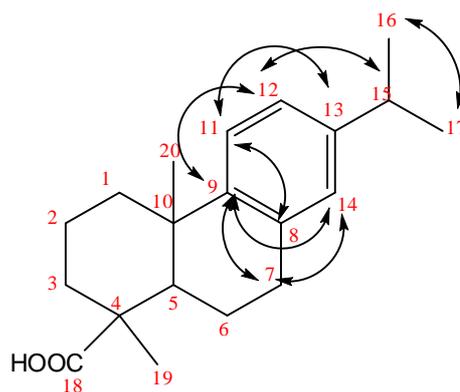
Sur les spectres HMBC (Figures 197-198), on observe les corrélations suivantes :

- H-19/ C-3, C-4, C-5, C-10 et C-18
- H-20/ C-2, C-5 et C-10.
- H-1/ C-3, C-20
- H-3/ C-1, C-5, C-19 et C-20
- H-5/ C-4, C-6, C-10, C-19 et C-20
- H-6/ C-5, C-7 et C-10



**Figure 195.** Corrélations HMBC du composé **C14**

- H-7/ C-6, C-9 et C-14
- H-11/ C-8 et C-13
- H-12/ C-9 et C-15
- H-14/ C-7, C-9 et C-15
- H-15/ C-12, C-13, C-14, C-16 et C-17



**Figure 196.** Corrélations HMBC du composé **C14**

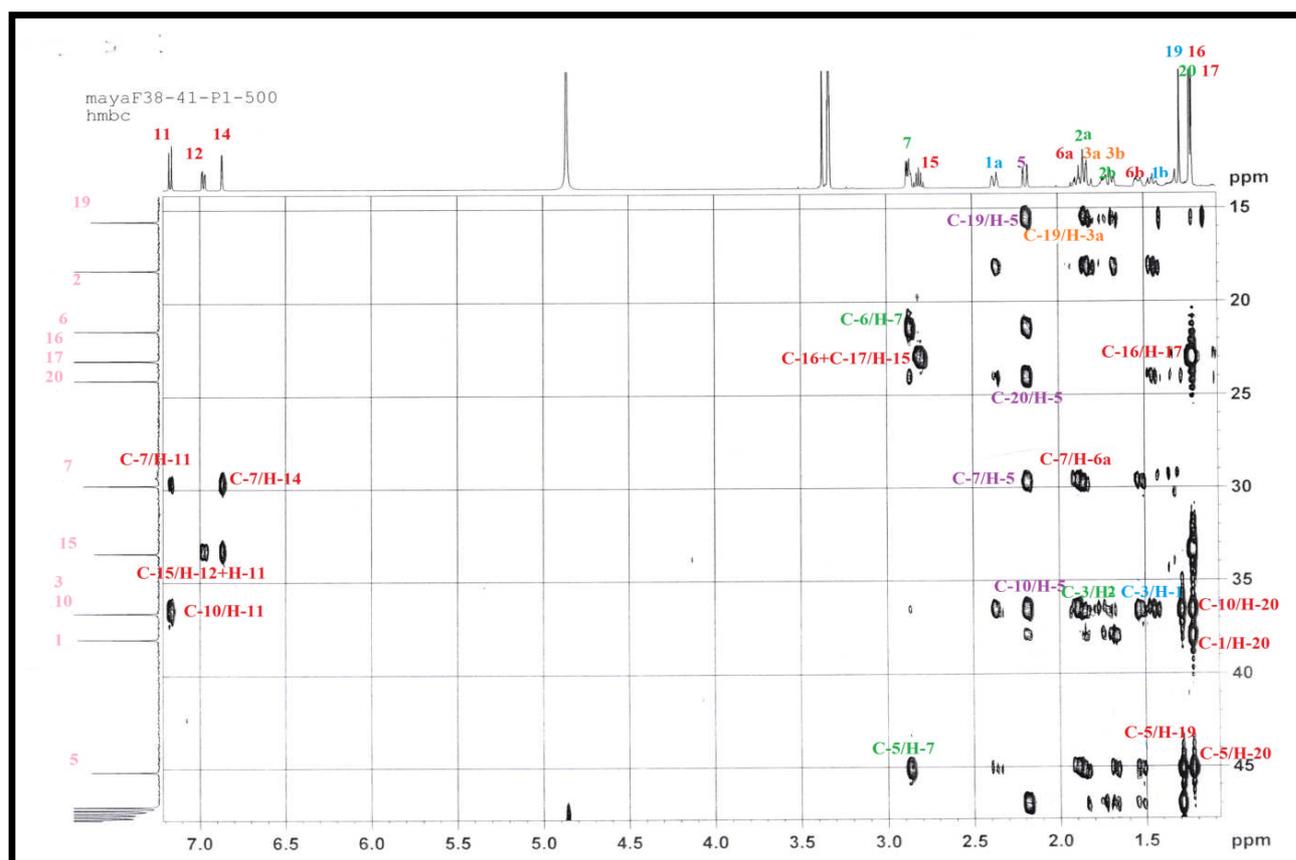


Figure 197. Spectre HMBC de  $\delta_C$  15 à 45 ppm du composé C14

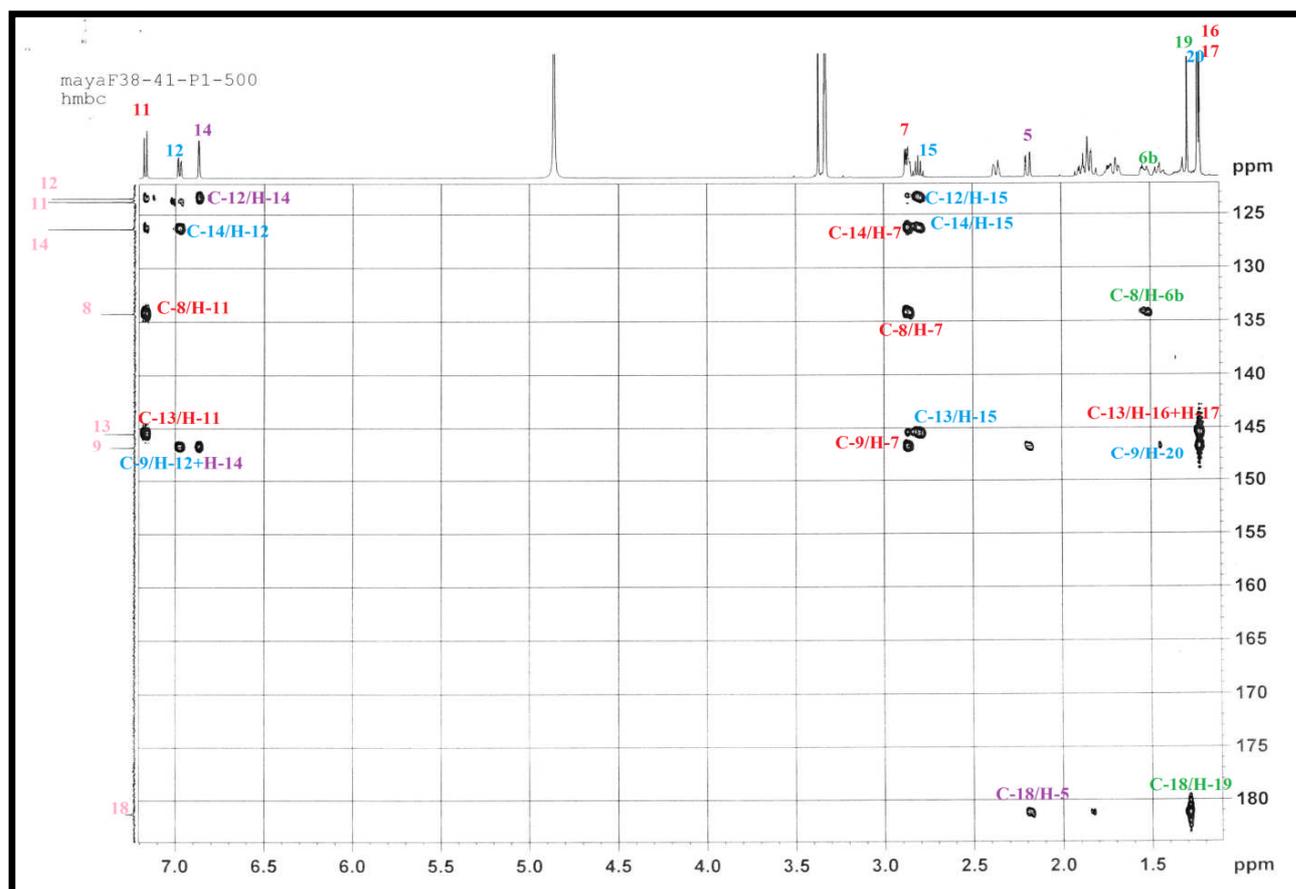
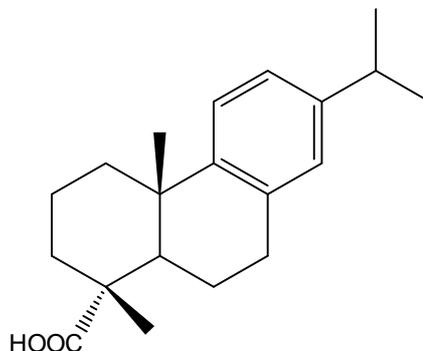


Figure 198. Spectre HMBC de  $\delta_C$  125 à 180 ppm du composé C14

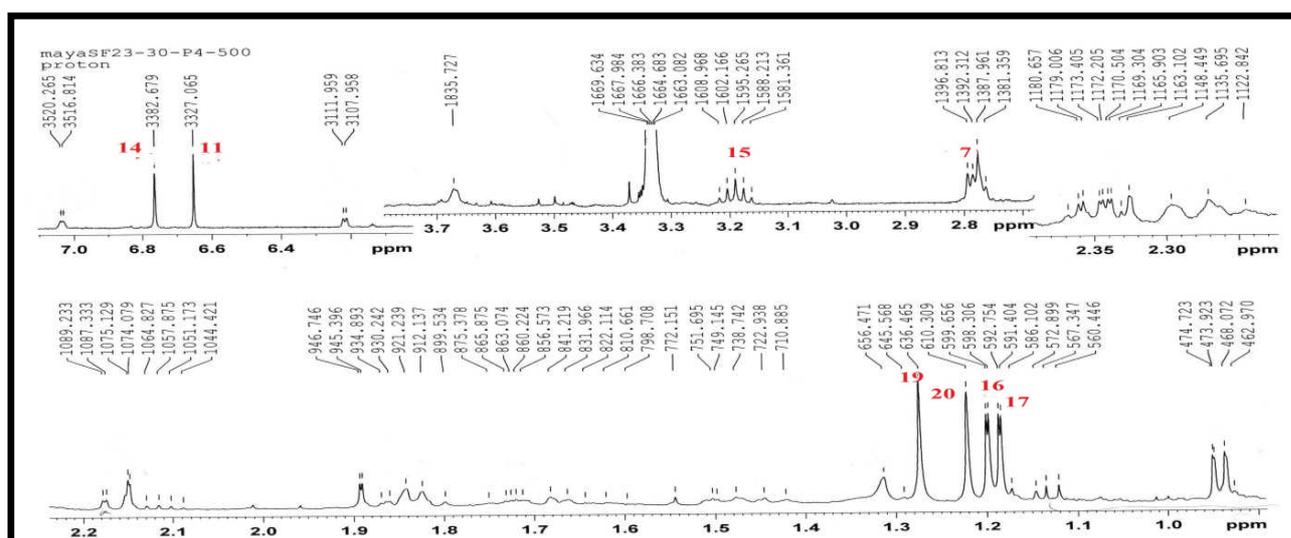
Toutes ces données nous permettent de proposer pour le composé **C14**, la structure suivante : Acide déhydroabietique (Cheung et al., 1993) isolé auparavant de *Cedrus libanotica* (Avcibash et Al., 1987), de *Cedrus atlantica* (Norin et Winell., 1971), de *Pinus monticola* (Conner et al., 1980).



**C14** : Acide déhydroabietique

#### 2.1.4.2.1. Identification du composé C15

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 199) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 200) du composé **C15** montrent les mêmes signaux caractéristiques du composé **C14**. Cependant, la différence est notée au niveau du cycle aromatique avec seulement deux protons aromatiques avec une très faible constante de couplage indiquant une position *para* et le déplacement déblindé du carbone aromatique C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  152.0 ppm) indiquant son oxydation.



**Figure 199.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **C15**

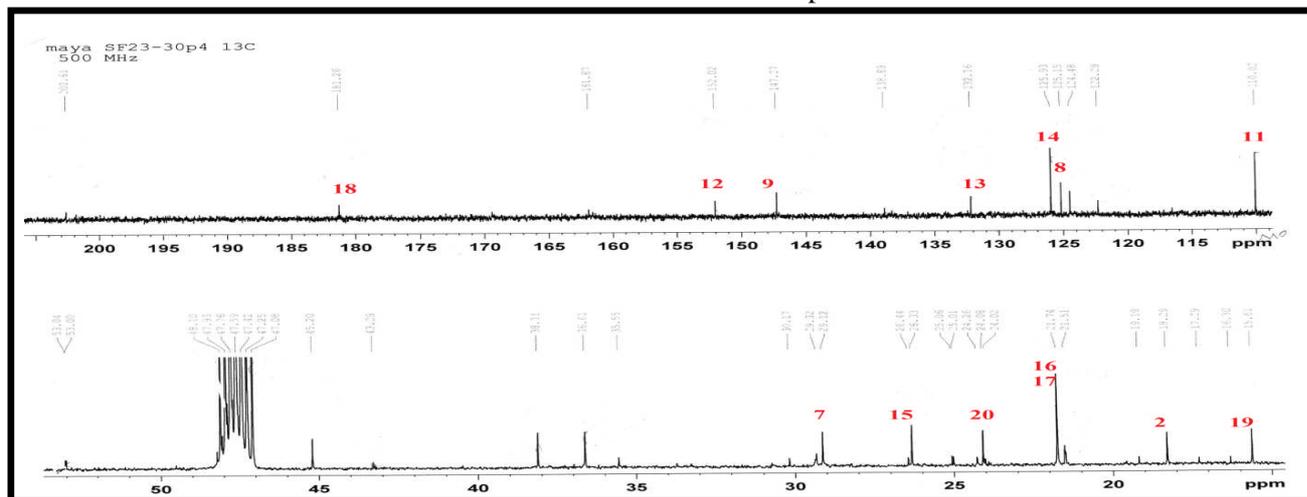


Figure 200. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C15

- Analyse du spectre COSY

Avec uniquement deux protons aromatiques, les corrélations  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figure 201) sont similaires à celles du composé C14 avec comme seule différence l'absence de corrélation des protons aromatiques.

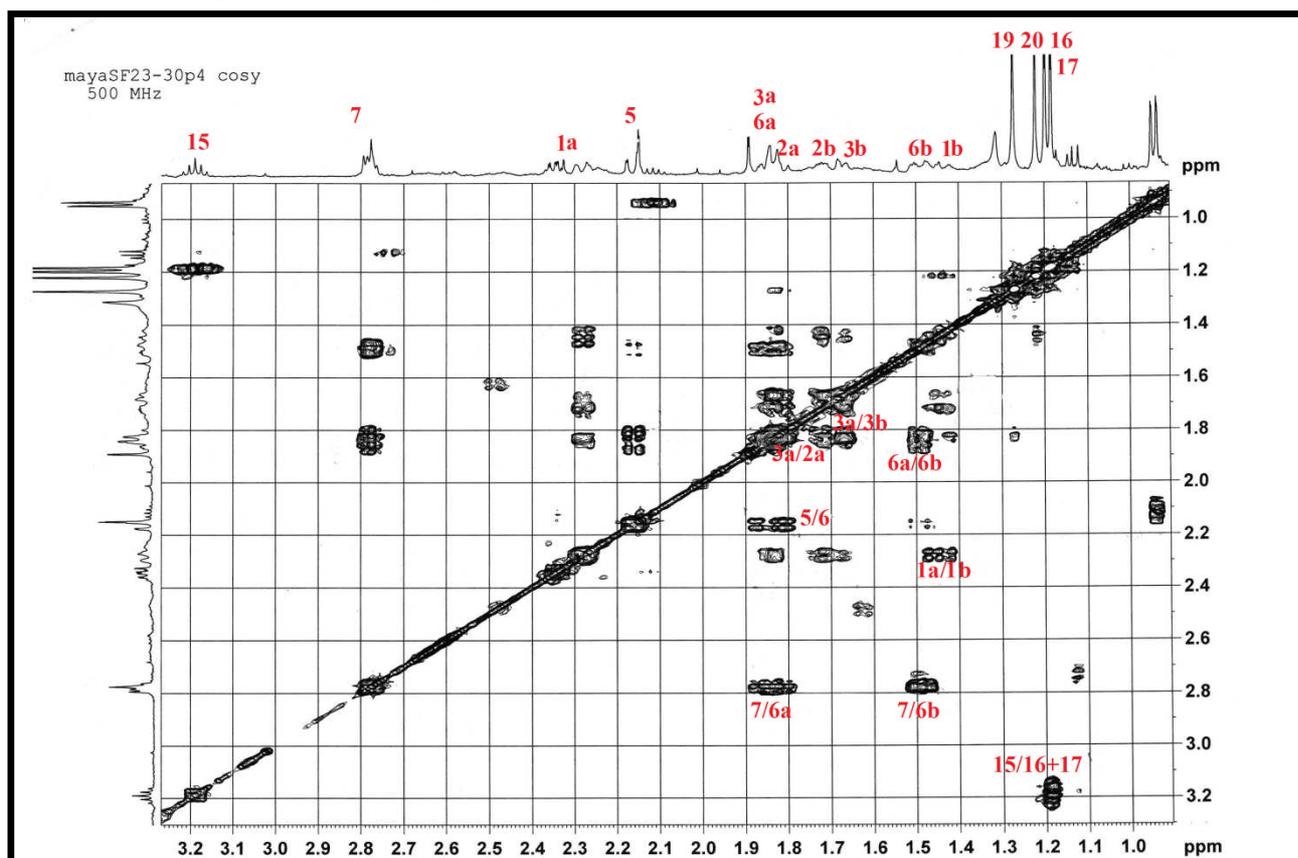


Figure 201. Spectre COSY du composé C15

- Analyse du spectre HSQC

Le spectre HSQC (Figure 202) permet d'identifier le carbone aromatique C-12 comme carbone quaternaire raisonnant à  $\delta_C 152.0$  ppm caractérisant son oxydation.

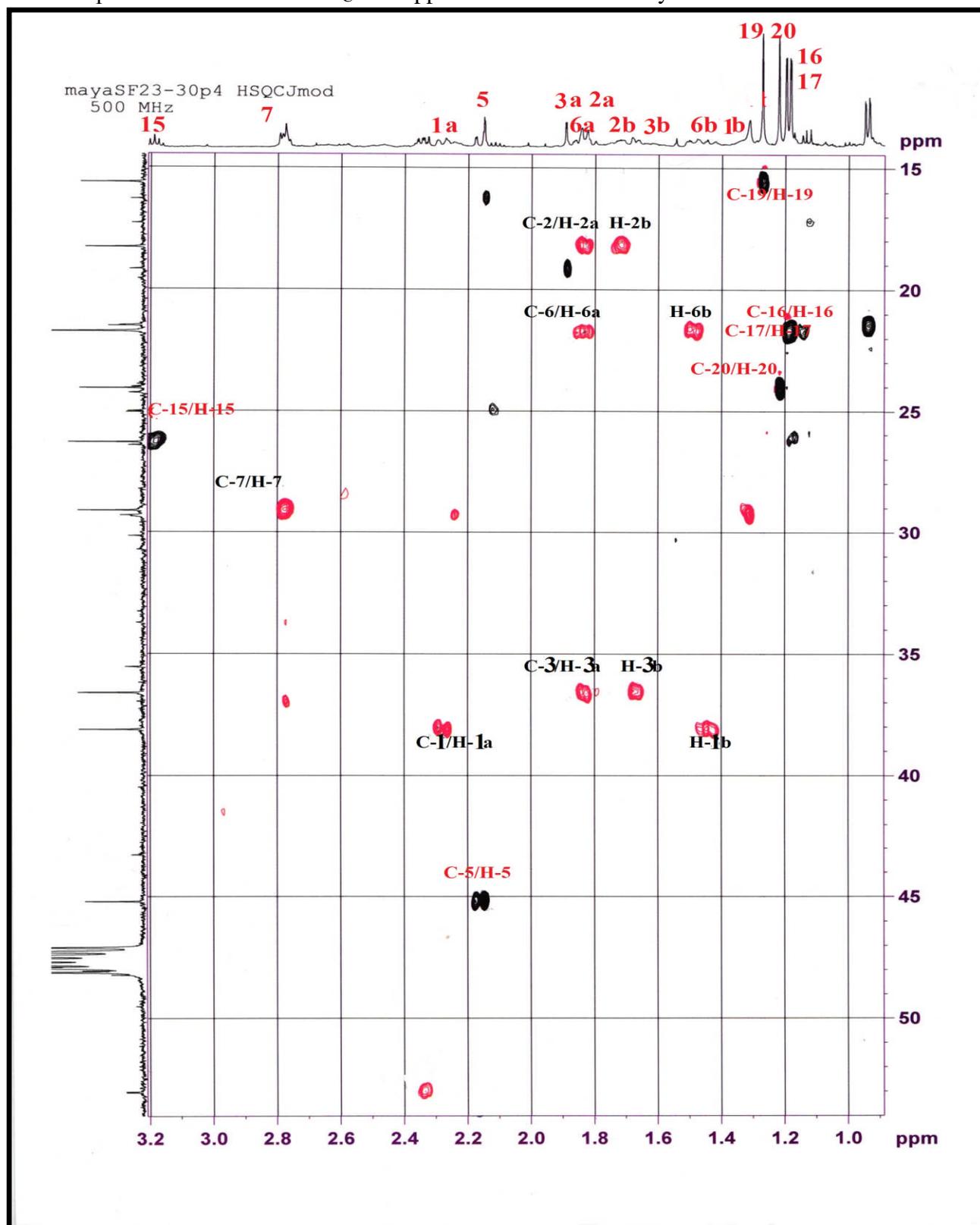


Figure 202. Spectre HSQC du composé C15

- Analyse du spectre HMBC

L'analyse du spectre HMBC (Figures 203-204) montre les mêmes corrélations que sur le spectre HMBC du composé C14 déjà identifié.

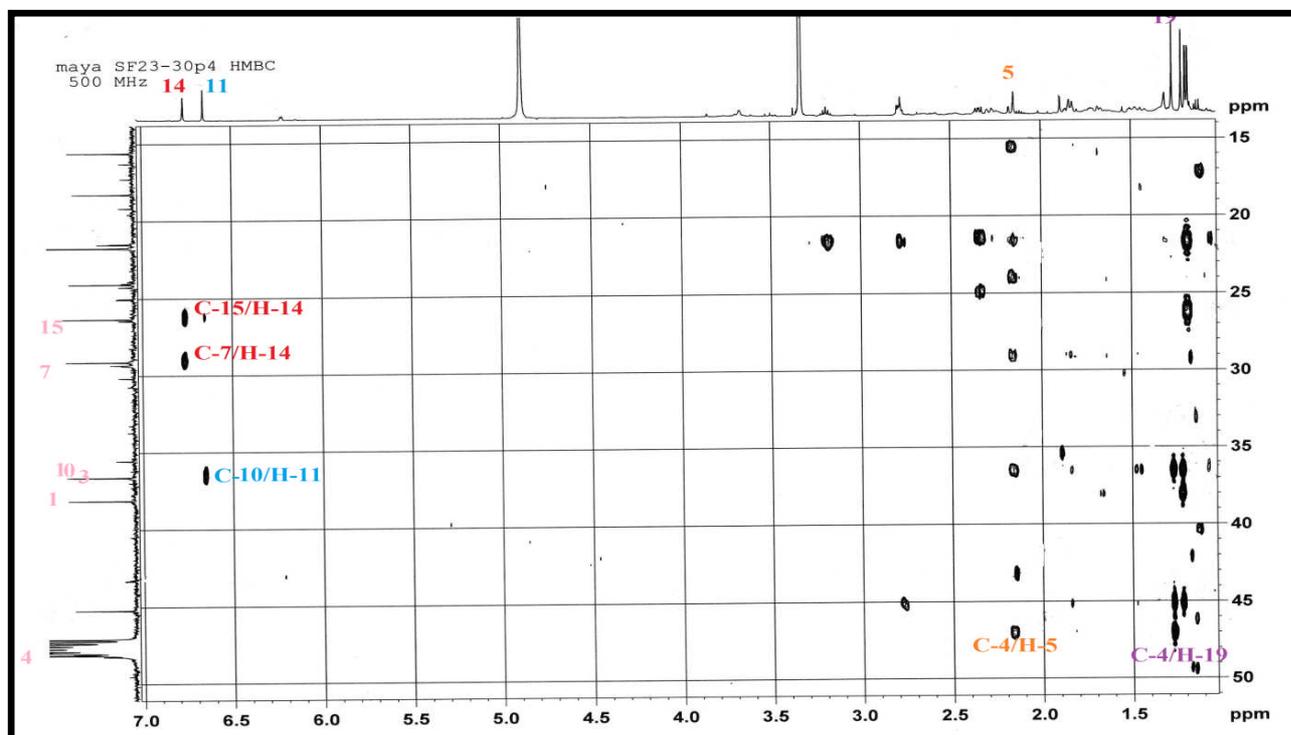


Figure 203. Spectre HMBC du composé C15

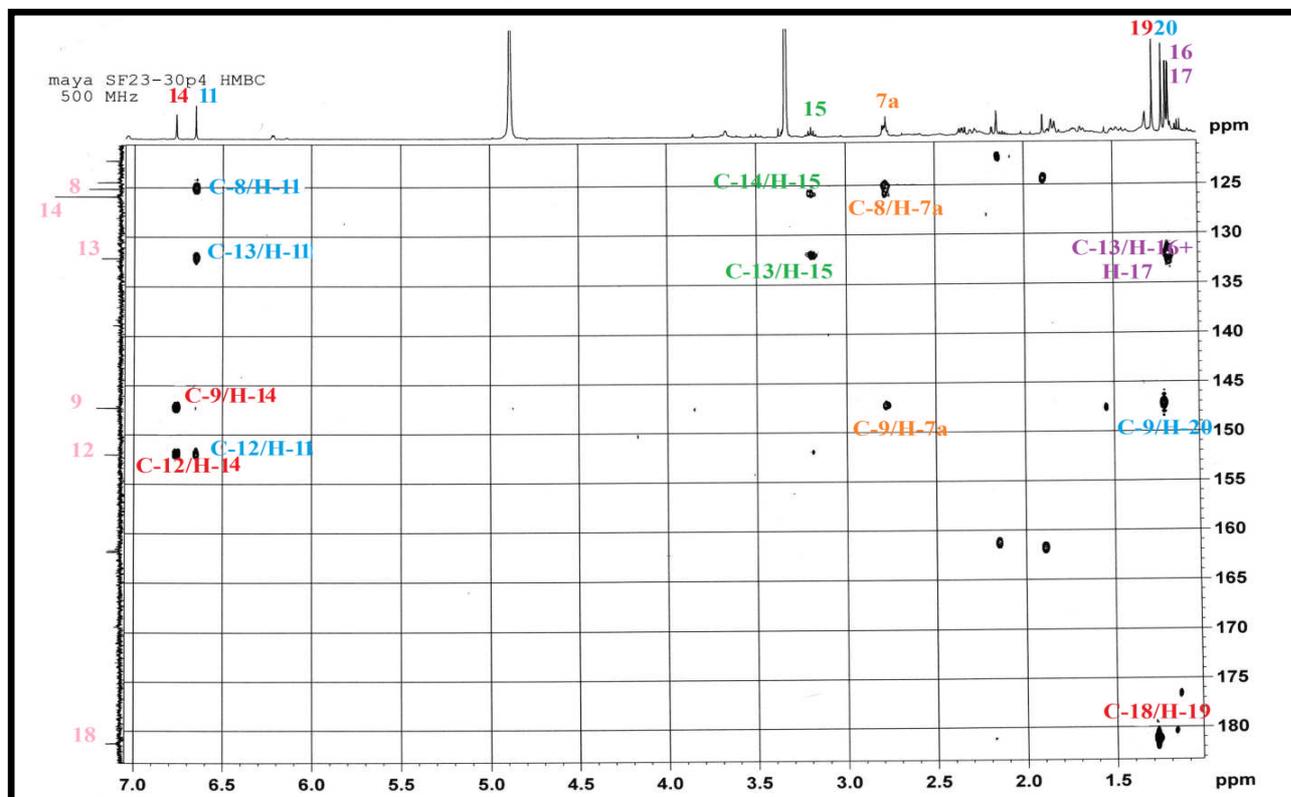


Figure 204. Spectre HMBC du composé C15



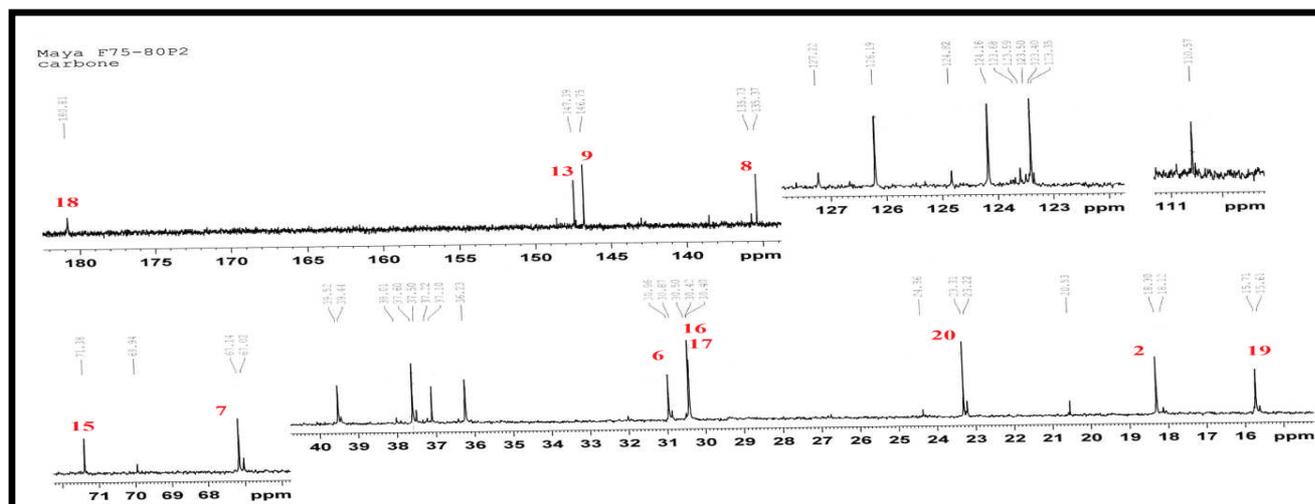


Figure 206. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C16

- Analyse du spectre COSY

Le spectre COSY (Figure 207) montre les mêmes corrélations que le spectre COSY du composé C14 avec l'absence de la tache de corrélation entre H-15 et les deux méthyles H-16 et H-17.

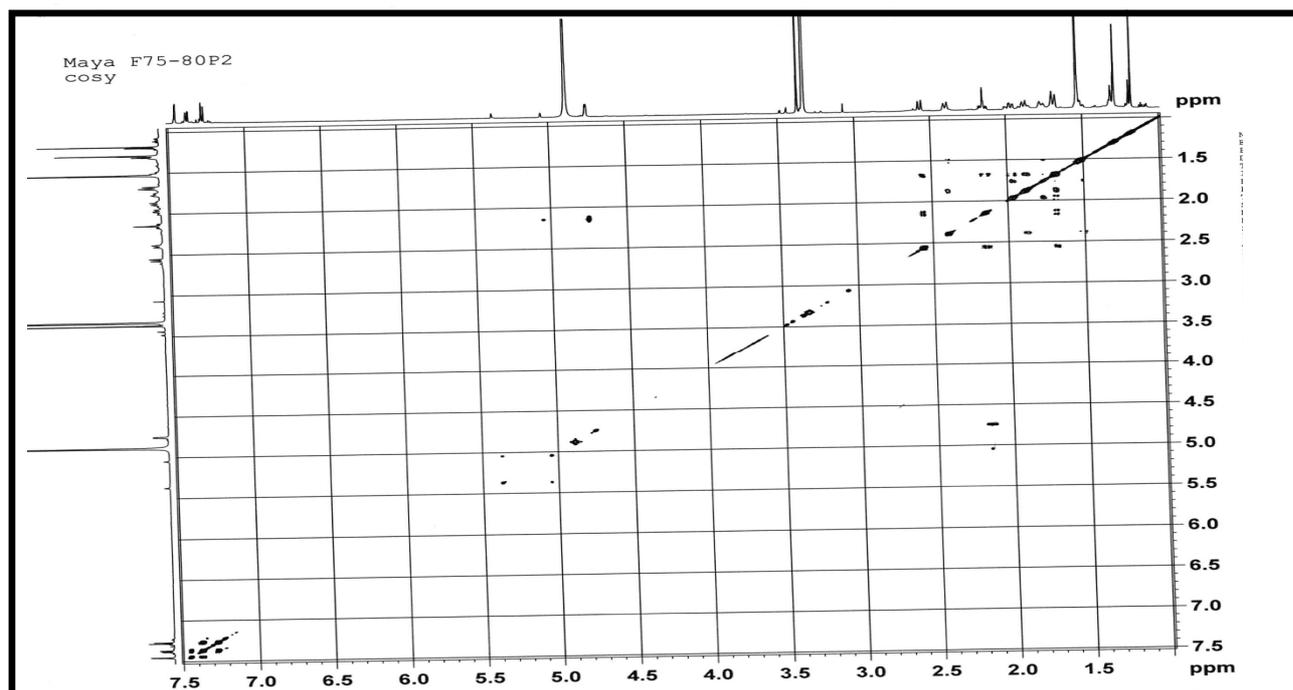


Figure 207. Spectre COSY du composé C16

- Analyse du spectre HSQC

L'analyse du spectre HSQC (Figure 208) permet d'identifier les carbones H-7 et H-15 comme étant un CH et un carbone quaternaire et de déterminer leurs déplacements chimiques. (Tableau 27)

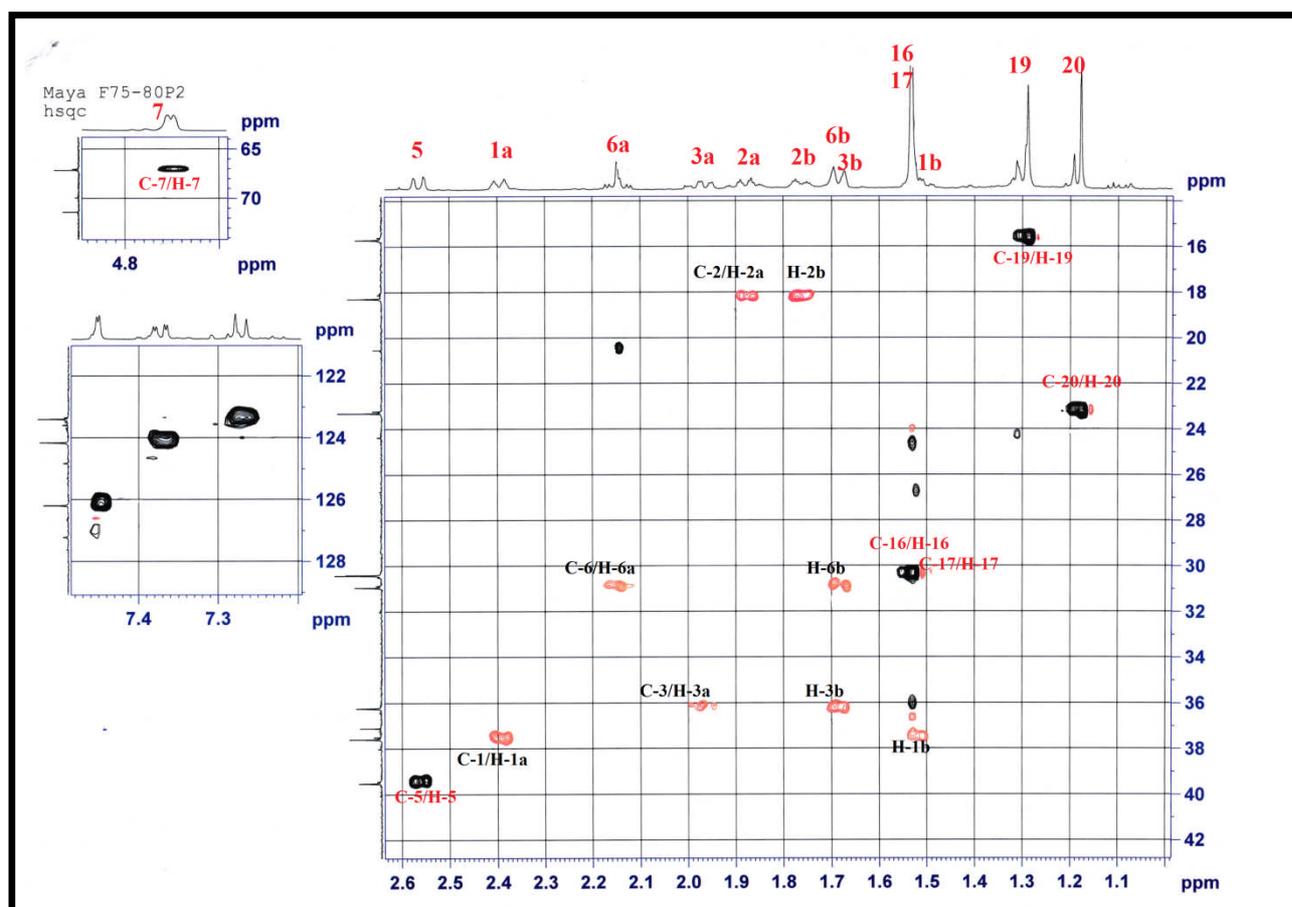


Figure 208. Spectre HSQC du composé **C16**

- **Analyse du spectre HMBC**

Les spectres HMBC (Figures 209-210) du composé **C16** révélant les mêmes corrélations que le composé **C14** tout en confirmant la position du CH oxygéné ( $\delta_H$  4.75/  $\delta_C$  67.1 ppm) par la corrélations entre le proton H-7 et les carbones C-5, C-8, C-9 et C-14 et la position du carbone quaternaire oxygéné C-15 ( $\delta_C$  71.4 ppm) par sa corrélation aux protons aromatiques H-12 et H-14 et aux protons des deux méthyles H-16 et H-17.

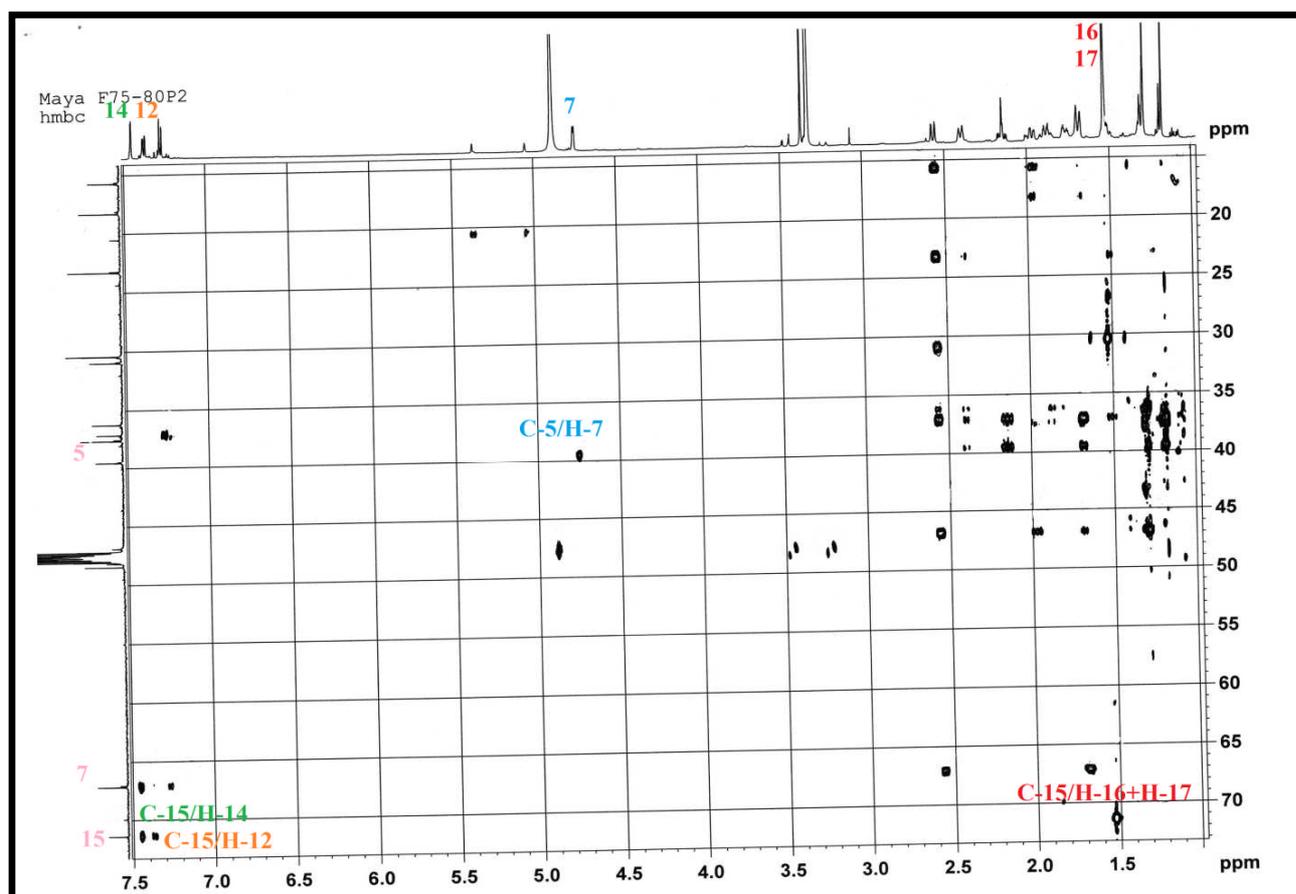


Figure 209. Spectre HMBC de  $\delta_c$  15 à 70 ppm du composé C16

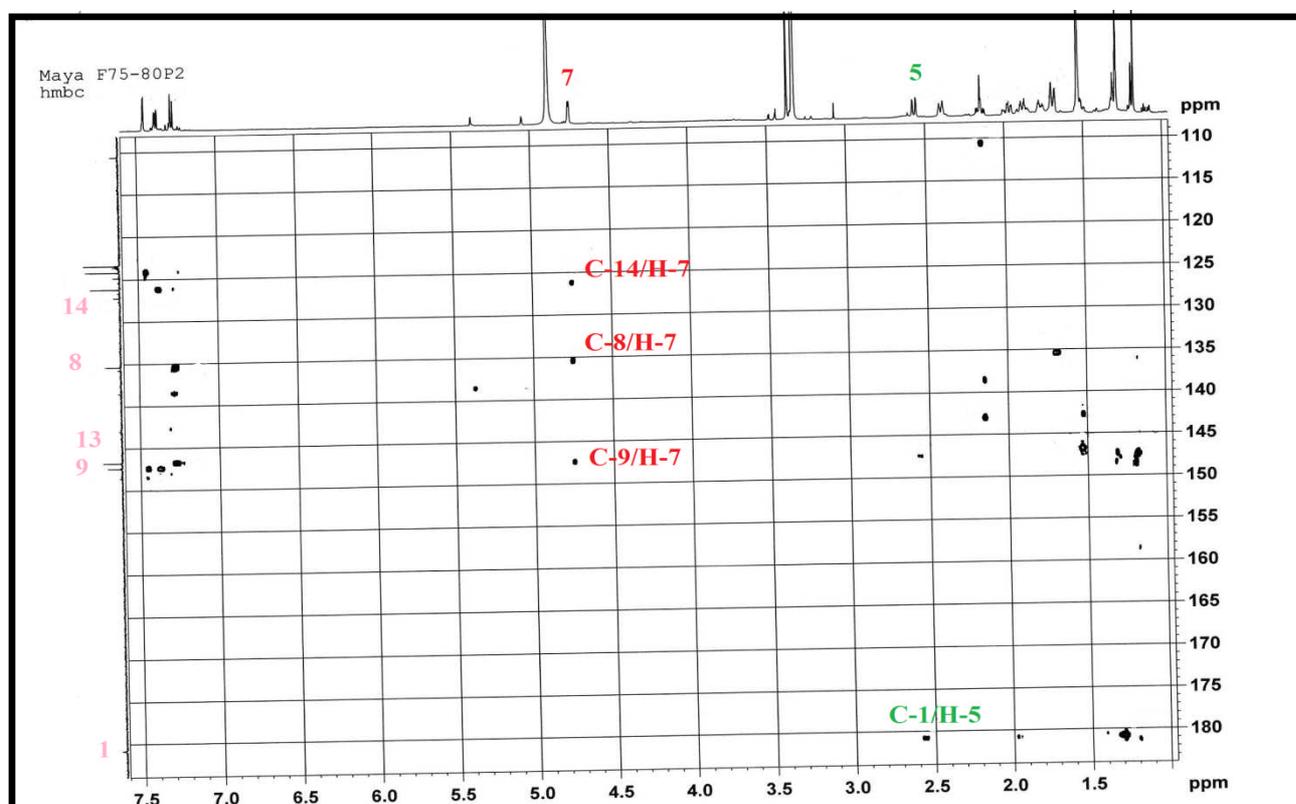
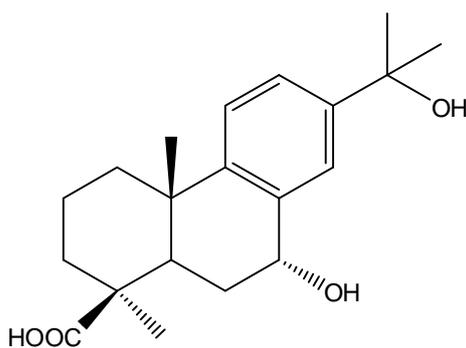


Figure 210. Spectre HMBC de  $\delta_c$  110 à 180 ppm du composé C16

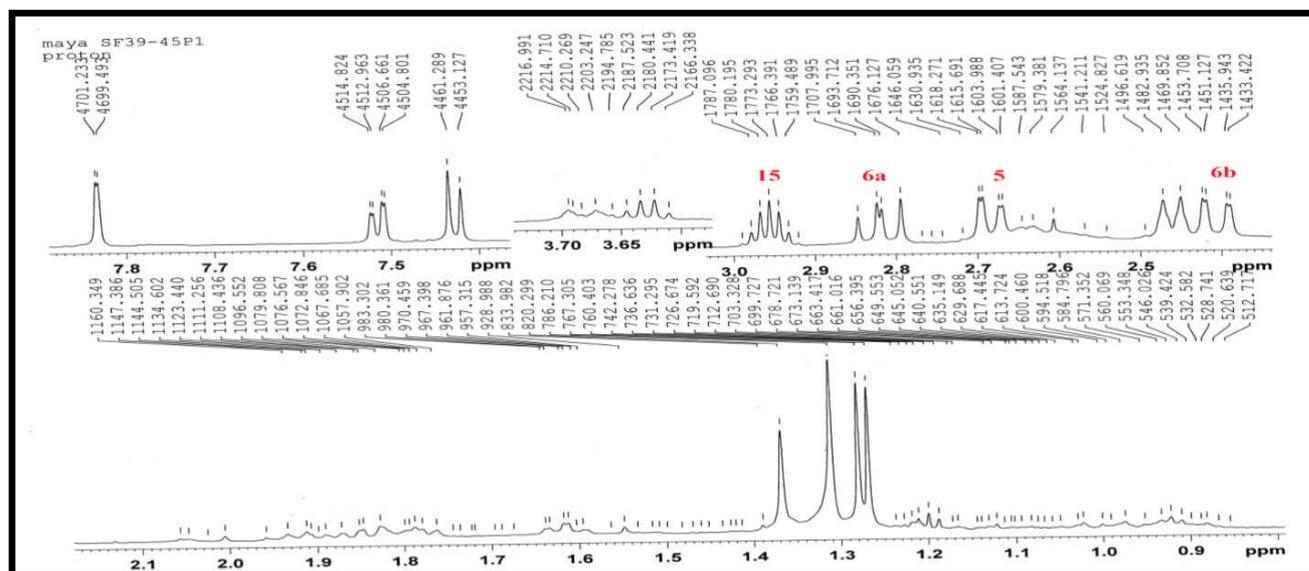
Ainsi, la molécule est identifiée sous le nom d'acide 7 $\alpha$ , 15-dihydroxy-8,11,13-abietatrien-18-oïque (Prinz et al., 2002).



**C16** : Acide 7 $\alpha$ , 15-dihydroxy-8,11,13-abietatrien-18-oïque

### 2.1.4.2.3. Identification du composé C17

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 211) et  $^{13}\text{C}$  (figure 212) du composé **C17** montrent une forte ressemblance avec ceux du composé **C14**, la seule différence réside dans l'apparition d'un signal vers  $\delta_{\text{C}}$  199.7ppm indiquant la présence d'une fonction cétone et le déblindage des carbones C-5 ( $\delta_{\text{H}}$  2.68/  $\delta_{\text{C}}$  44.1ppm) et le C-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2.40-2.80ppm /  $\delta_{\text{C}}$  37.1 ppm).



**Figure 211.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **C17**

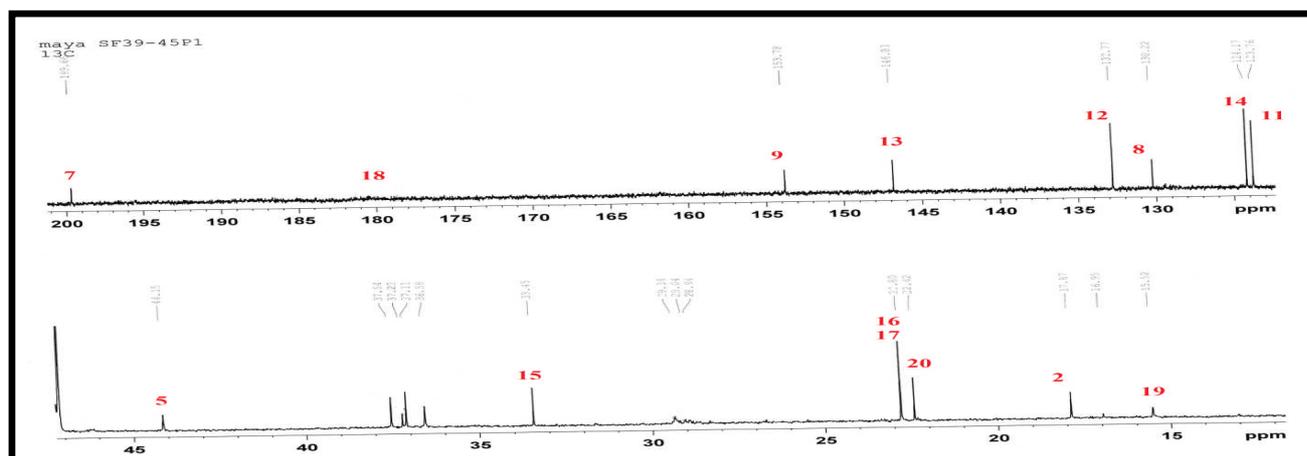


Figure 212. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C17

- **Analyse du spectre COSY**

L'analyse du spectre COSY (Figure 213) montre les corrélations suivantes :

- Corrélation entre le proton H-1 et les protons H-2 et H-3
- Le proton H-5 corrèle avec le proton H-6
- Le proton aromatique H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  7.52, dd,  $J= 1.8 ; 8.1\text{Hz}$ ) corrèle avec le proton H-11 (7.43, d,  $J= 8.1\text{Hz}$ ) en méta et avec le proton H-14 (7.83, d,  $J= 1.7\text{Hz}$ ) en position ortho.

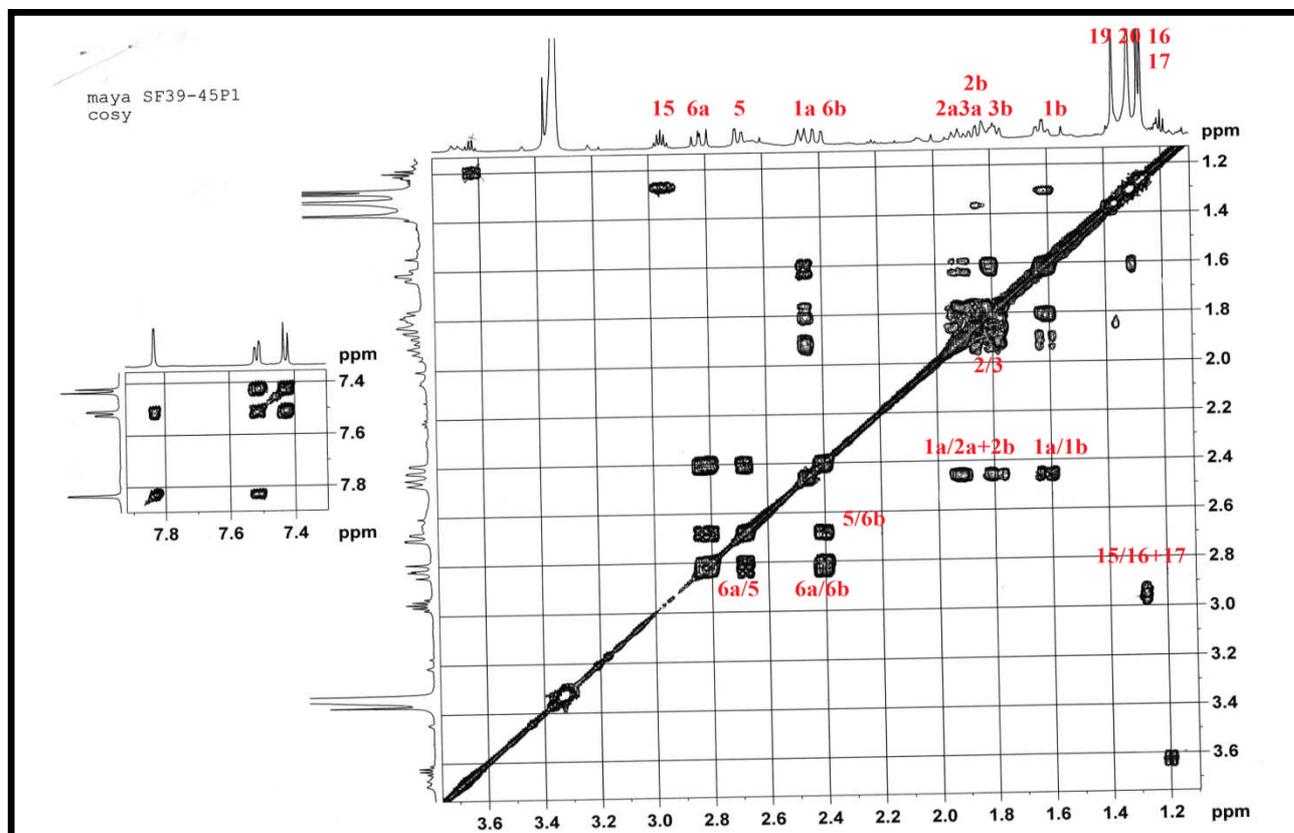


Figure 213. Spectre COSY du composé C17

- Analyse du spectre HSQC

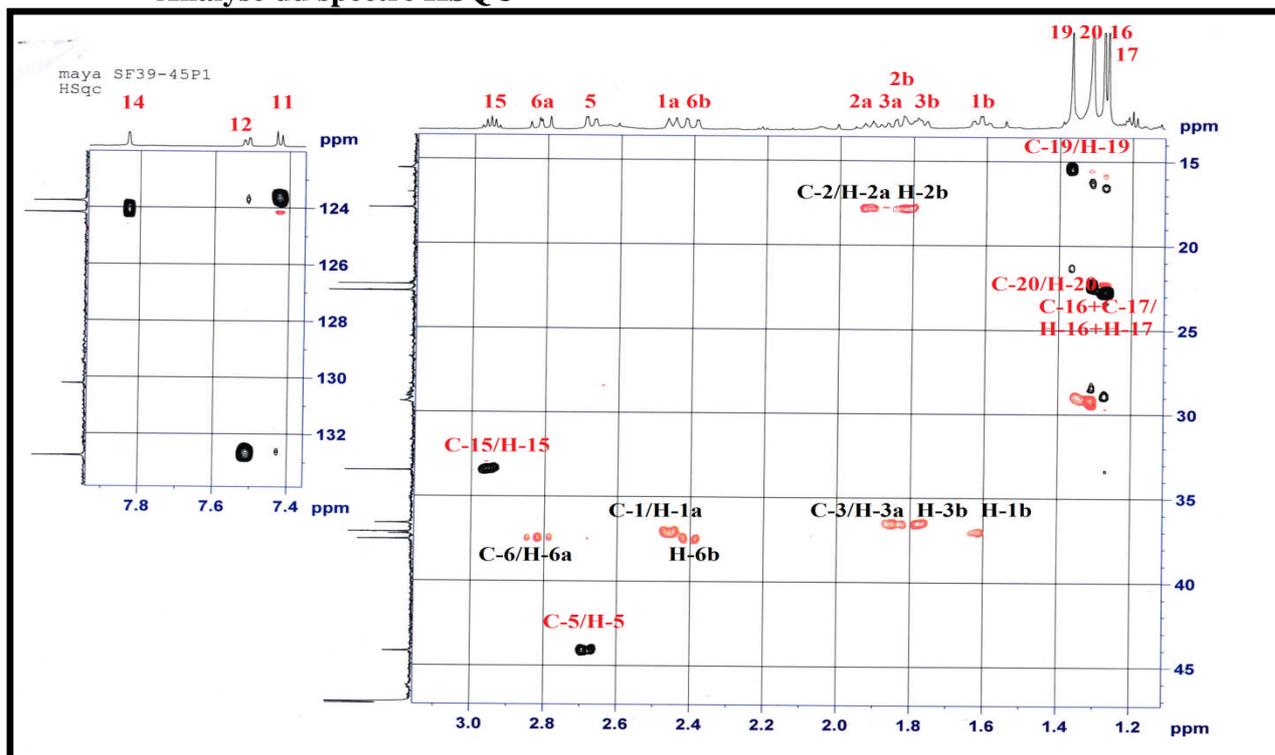


Figure 214. Spectre HSQC du composé C17

- Analyse du spectre HMBC

Par le spectre HMBC (Figure 215), la position de la fonction cétone est déterminée par la corrélation des protons H-14 et H-6 avec le carbone à  $\delta_C$  199.7 ppm indiquant ainsi sa position en C-7.

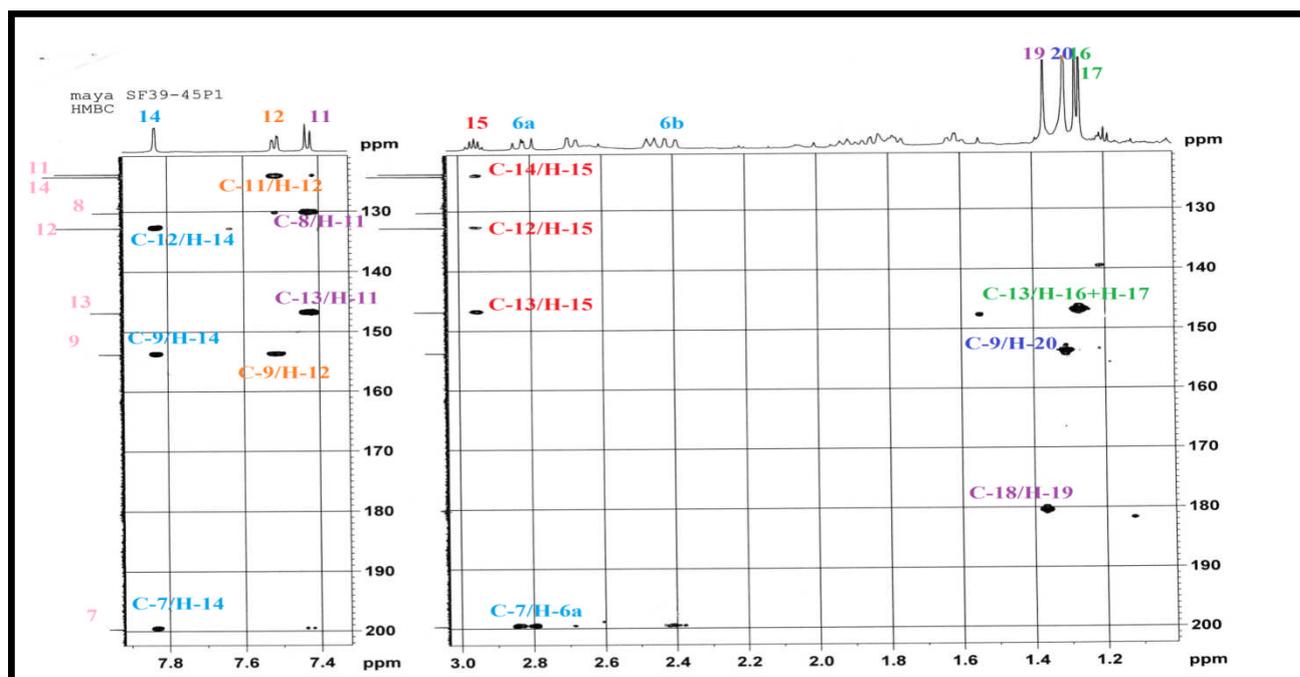
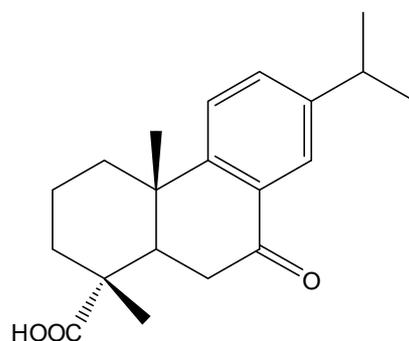


Figure 215. Spectre HMBC du composé C17

Après toutes ces analyses, le composé **C17** a été identifié à l'acide 7-oxodehydroabiétique (Yang et al., 2010) précédemment isolé d'*Abies georgei* (Yang et al., 2010) mais c'est la première fois qu'il est isolé du genre *Cedrus*.



**C17** : Acide 7-oxodehydroabiétique

**Tableau 27.** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) des composés **C14-C17** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

Atome	<b>C14</b>		<b>C15</b>		<b>C16</b>		<b>C17</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1a: 2.36, dl, 12.8 1b: 1.45, dt, 13.0; 3.4	38.1	1a: 2.27, m 1b: 1.45, m	36.6	1a: 2.4, dl, 12.8 1b: 1.52, m	37.6	1a: 2.46, d, 13.2 1b: 1.61, td, 12.6; 2.4	37.5
2	2a: 1.85, m 2b: 1.72, m	18.3	2a: 1.83, m 2b: 1.72, m	18.3	2a: 1.88, qt, 16.7; 3.1 2b: 1.75, dm, 13.9	18.3	2a: 1.91, m 2b: 1.82, m	17.9
3	3a: 1.83, m 3b: 1.68, dd, 11.8; 4.2	36.7	1a: 1.83, m 1b: 1.68, m	38.1	3a: 1.98, td, 13.3; 3.5 3b: 1.68, m	36.2	3a: 1.84, m 3b: 1.79, m	36.6
4	-	47.7	-	47.1	-	46.9	-	46
5	2.19, dd, 10.5; 1.9	45.2	2.16, dd, 14.1; 1.9	45.2	2.57, dl, 13.2	39.5	2.68 dd, 14.2; 2.4	44.1
6	6a: 1.90, m 6b: 1.54, m	21.5	6a: 1.83, m 6b: 1.5, m	21.7	6a: 2.15, td, 13.9; 4.9 6b: 1.68, m	31.0	6a: 2.80, dd, 17.4; 14.4 6b: 2.40, dd, 17.4; 3.0	37.1
7	2.88, m	29.8	7a: 2.78, m	29.1	4.75, d, 3.6	67.1	-	199.7
8	-	134.3	-	125.1	-	135.4	-	130.2
9	-	146.8	-	147.3	-	147.4	-	153.8
10	-	36.7	-	36.6	-	37.5	-	37.2
11	7.17, d, 8.2	123.8	6.65, s	110.0	7.27, d, 8.4	123.4	7.43, d, 8.1	123.8
12	6.98, dd, 8.1; 1.6	123.5	-	152.0	7.37, dd, 8.3; 2.1	124.2	7.52, dd, 8.1 ; 1.8	132.8
13	-	145.5	-	132.2	-	146.8	-	146.8
14	6.87, sl	126.4	6.78, s	125.9	7.45, d, 2.0	126.2	7.83, d, 1.7	124.2
15	2.82, sept, 6.9	33.4	3.2, sept, 6.9	26.3	-	71.4	2.95, sept, 7.2	33.4

16	1.22, d, 6.9	23.1	1.19, dd, 6.9; 1.4	21.7	1.53, s	30.4	1.27, d, 7.2	22.8
17	1.22, d, 6.9	23.1	1.19, dd, 6.9; 1.4	21.7	1.53, s	30.4	1.27, d, 7.2	22.8
18	-	181.3	-	181.3	-	180.8	-	180
19	1.21, s	15.6	1.27, s	15.6	1.18, s	15.7	1.37 s	15.5
20	1.8, s	24.1	0.94, s	24.1	1.29, s	23.3	1.31 s	22.4

### 2.1.4.3. Elucidation structurale des composés C18 – C21

#### 2.1.4.3.1. Elucidation structurale du composé C18

##### • Analyse du spectre RMN $^1\text{H}$

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C18 (Figure 216) montre :

- Quatre méthyles résonnant entre  $\delta_{\text{H}}$  0.88 ppm et 1.22 ppm attribuables aux méthyles H-16 et H-17 sous forme de doublets d'une constante de couplage  $J=6.9\text{Hz}$  et aux H-19 et H-20 sous forme de singulets.
- Un ensemble de CH,  $\text{CH}_2$  entre  $\delta_{\text{H}}$  1.35 et 2.32 ppm
- Trois protons aromatiques observés à  $\delta_{\text{H}}$  7.16 (H-11, d,  $J=8.2\text{Hz}$ ),  $\delta_{\text{H}}$  6.96 ppm (H-12, d,  $J=8.2$ ;  $1.6\text{Hz}$ ) et à  $\delta_{\text{H}}$  6.87 (H-14, d,  $J=1.1\text{Hz}$ ).
- Un doublet de doublet caractéristique d'un  $\text{CH}_2$  -OH résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  3.12-3.46 ppm attribuable au H-18.
- Un septuplet attribuable au H-15 d'un déplacement chimique  $\delta_{\text{H}}$  2.80 ppm.

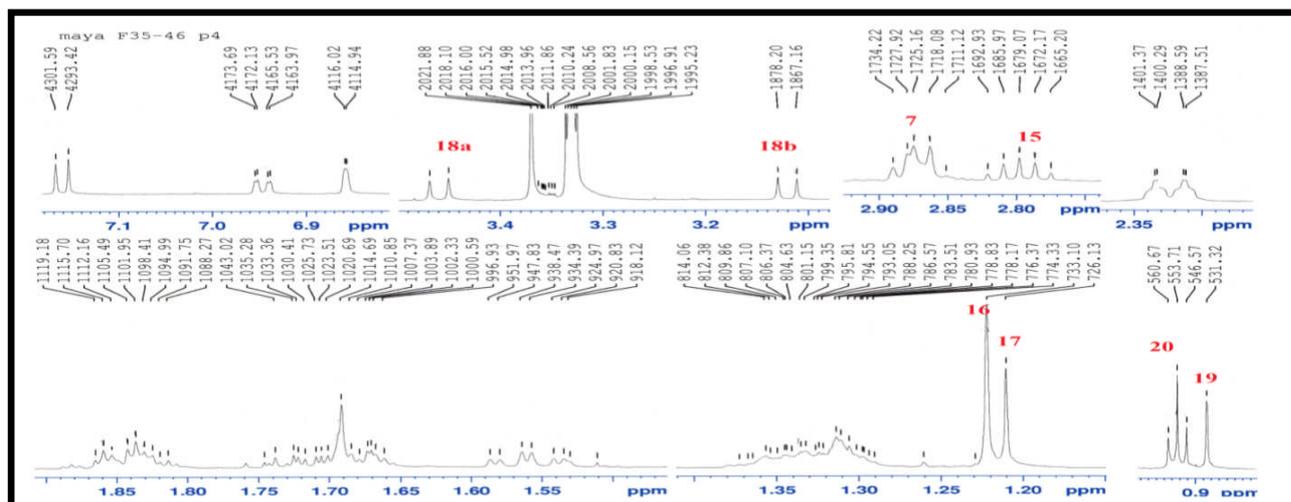


Figure 216. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C18

##### • Analyse du spectre RMN $^{13}\text{C}$ -J modulé

Sur le spectre  $^{13}\text{C}$  (Figure 217) :

- Quatre méthyles qui résonnent entre  $\delta_{\text{C}}$  16.6 ppm et 24.4 ppm attribuables aux méthyles H-16, H-17, H-19 et H-20.

- Des carbones quaternaires, des CH et des CH<sub>2</sub> observés entre  $\delta_C$  18.4 et 43.5 ppm.
- Un ensemble de carbones aromatiques apparaissant entre  $\delta_C$  123.2 et 147.0 ppm
- Un signal résonnant à  $\delta_C$  70.5 ppm attribuable au C-18 (CH<sub>2</sub>- OH).

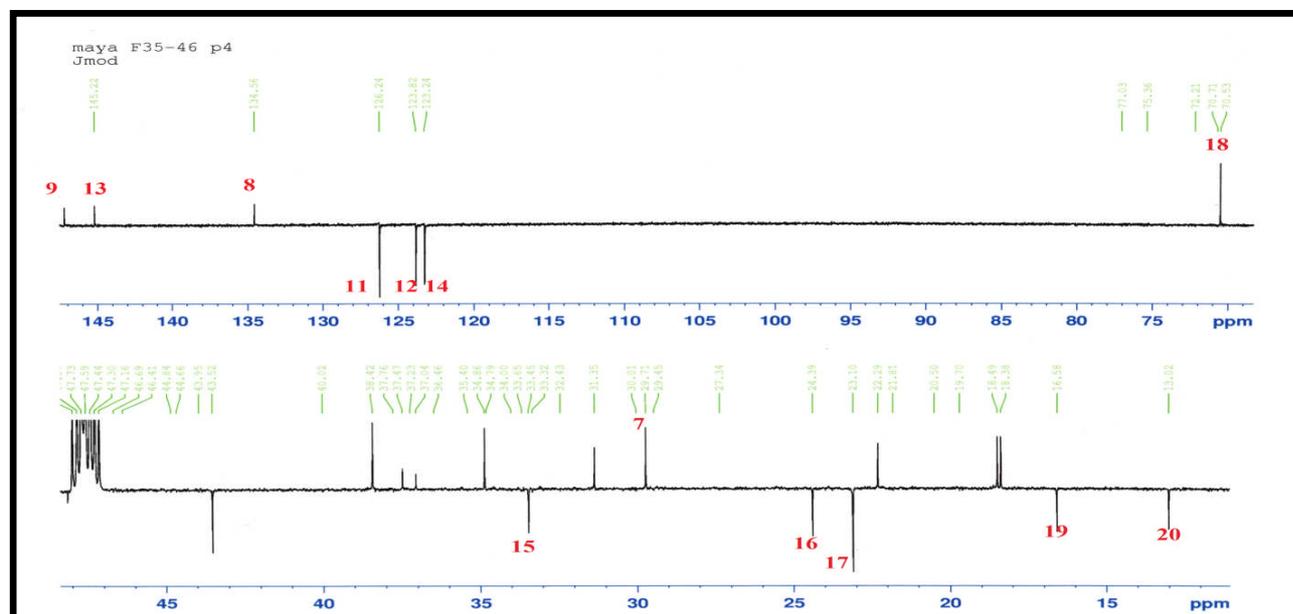


Figure 217. Spectre RMN <sup>13</sup>CJ-modulé composé C18

- **Analyse du spectre COSY**

Les spectres COSY (Figures 218-219), les corrélations observées sont :

- Le proton H-2 corrèle avec les protons H-1 et H-3.
- Le proton H-5 corrèle avec les protons H-6.
- Le proton H-7 corrèle avec le proton H-6
- Le proton aromatique H-12 sous forme d'un doublet de doublet corrèle avec les deux protons aromatiques H-11 en méta ( $J= 8.2\text{Hz}$ ) et avec H-14 en ortho ( $J= 1.6\text{Hz}$ )
- Le H-15 corrèle avec les protons des deux méthyles H-16 et H-17 qui corrèlent entre eux.

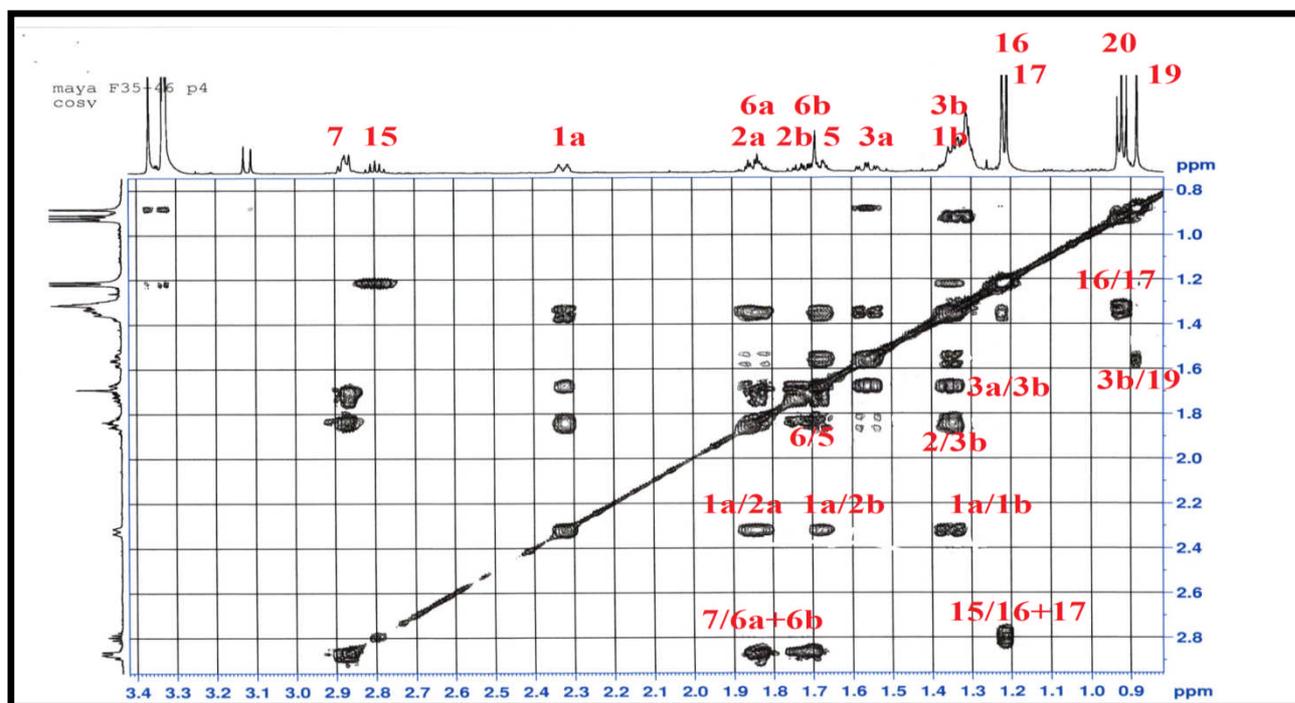


Figure 218. Spectre COSY de  $\delta_H$  0.8 à 2.9 ppm du composé C18

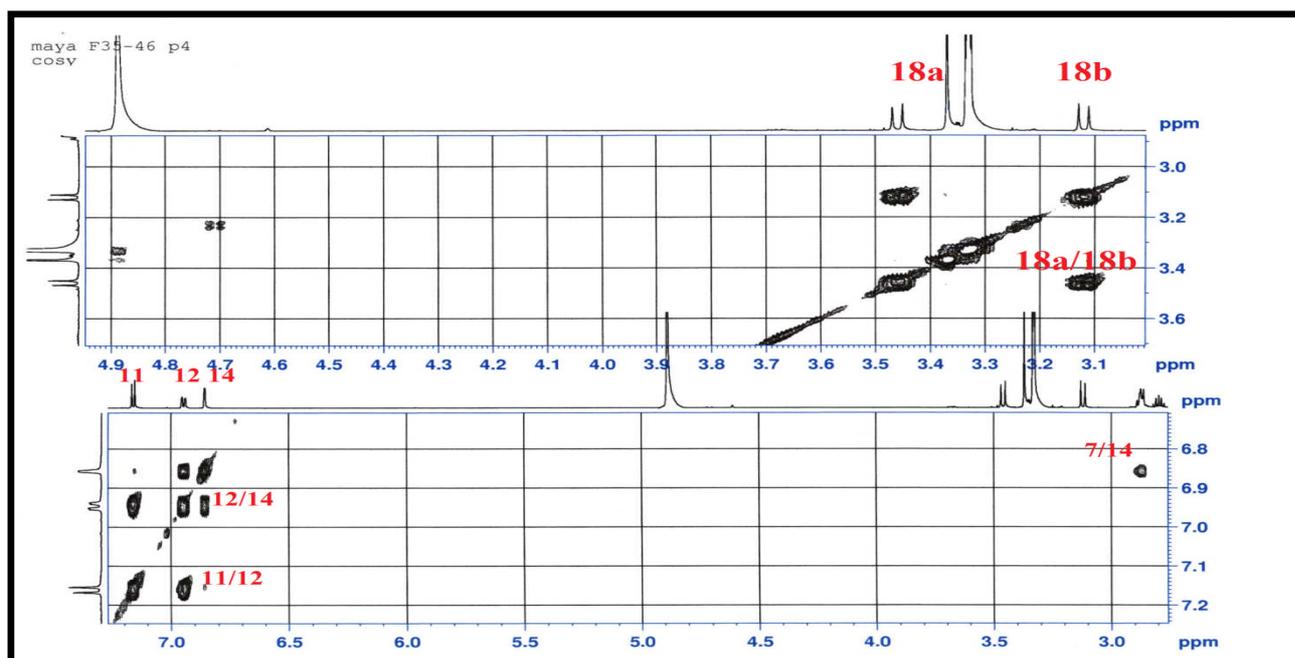


Figure 219. Spectre COSY de  $\delta_H$  3.0 à 7.2 ppm du composé C18

- Analyse du spectre HSQC

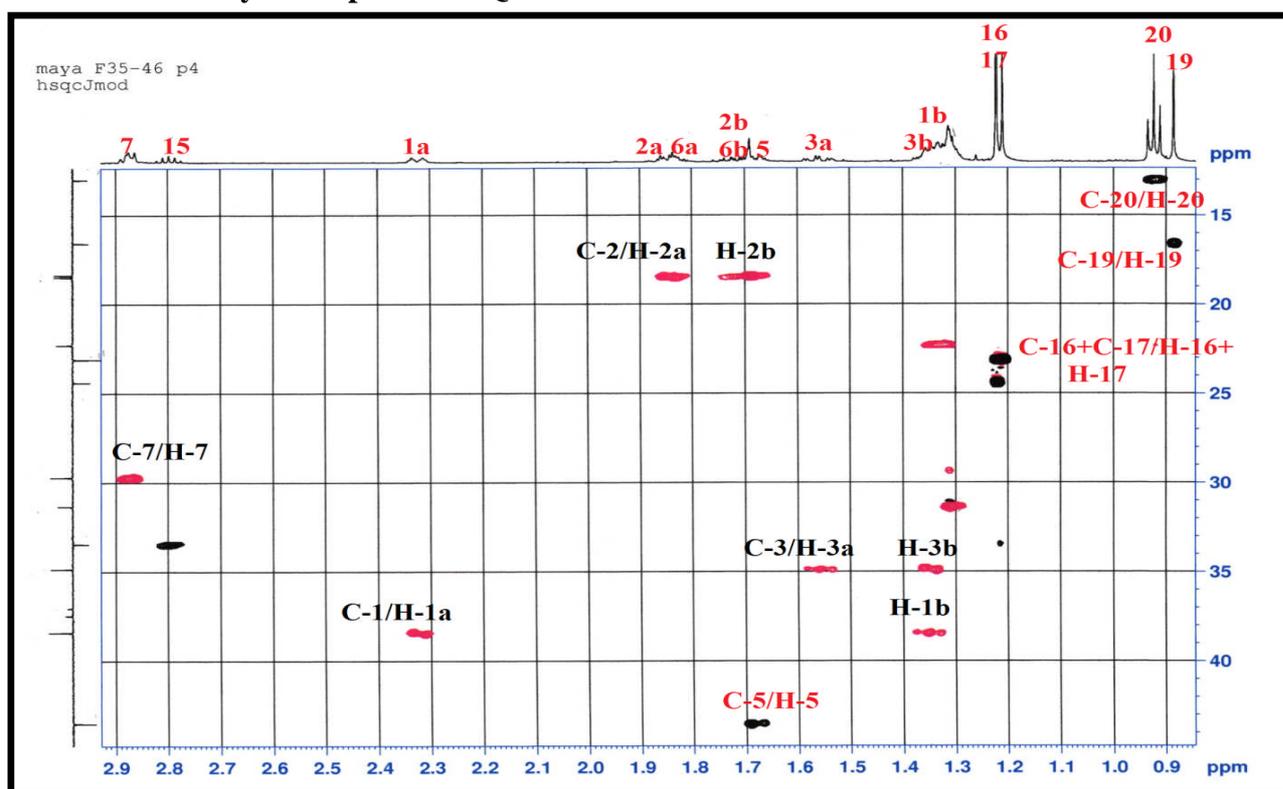


Figure 220. Spectre HSQC de  $\delta_C$  15 à 45 ppm du composé C18

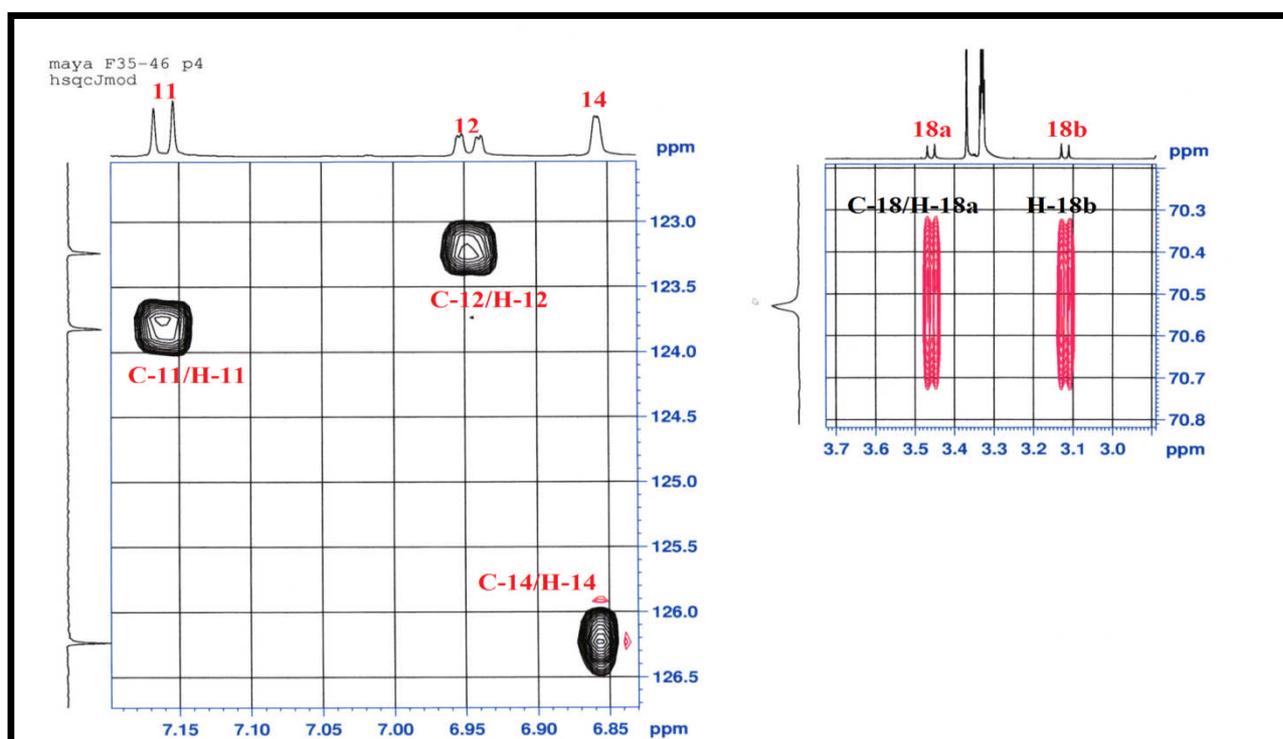


Figure 221. Spectre HSQC de  $\delta_C$  70.2 à 126.5 ppm du composé C18

- Analyse du spectre HMBC

Sur les spectres HMBC (Figures 222-223), on observe les corrélations suivantes :

- H-1/ C-3, C-20
- H-3/ C-1, C-5, C-19 et C-20
- H-5/ C-4, C-6, C-10, C-19 et C-20
- H-6/ C-5, C-7, C-8 et C-10
- H-11/ C-8, C-10 et C-13
- H-12/ C-9 et C-15
- H-14/ C-7, C-9, C-12 et C-15
- H-15/ C-12, C-13, C-14, C-16 et C-17
- H-18/C-3,C-4, C-5 et C-19
- H-20/ C-2, C-5 et C-10.

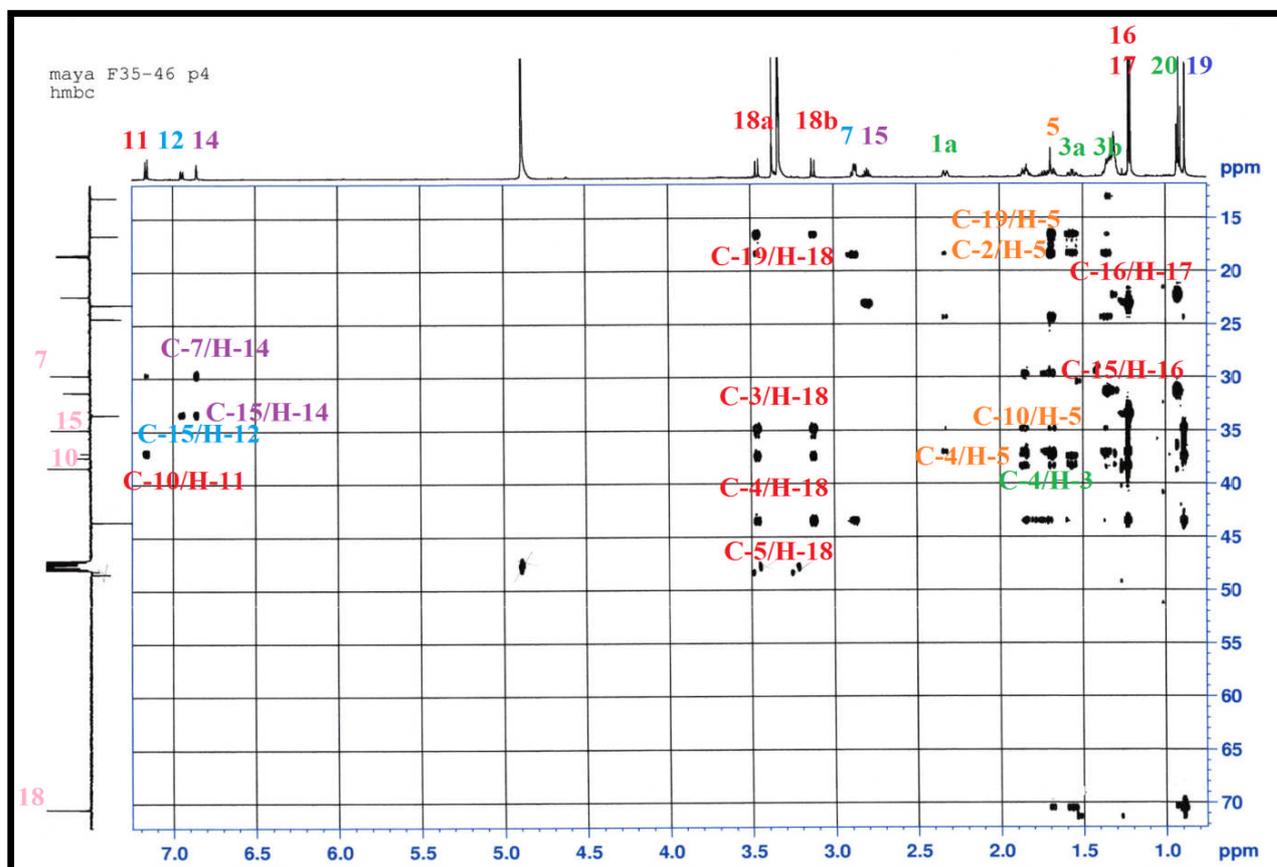
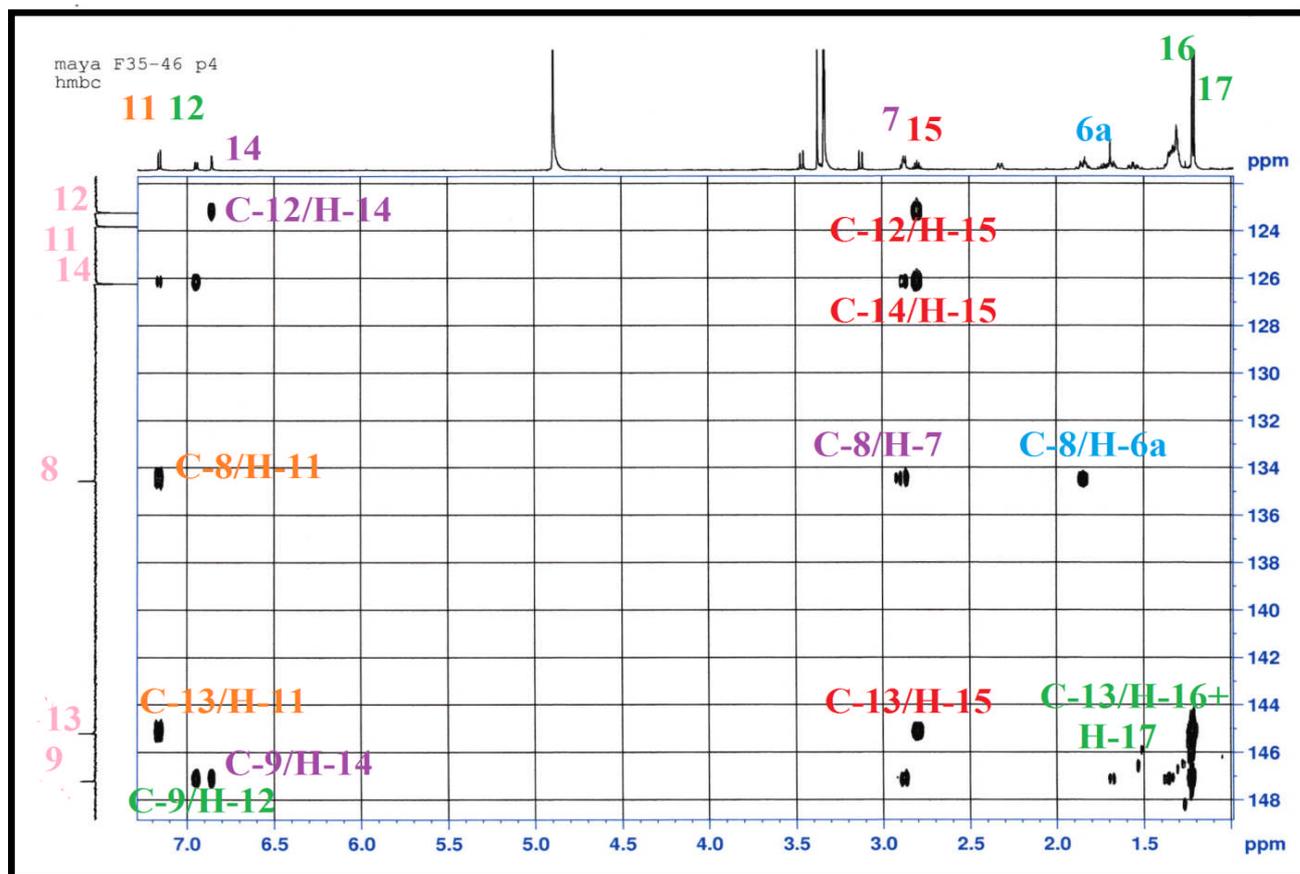
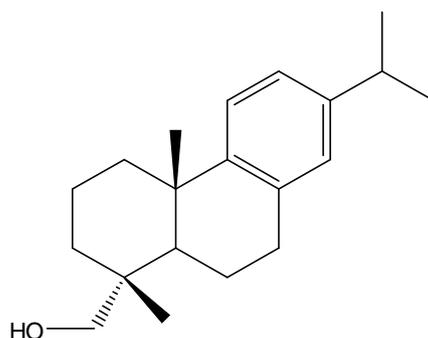


Figure 222. Spectre HMBC de  $\delta_C$  15 à 70 ppm du composé C18



**Figure 223.** Spectre HMBC de  $\delta_C$  122 à 148 ppm du composé **C15**

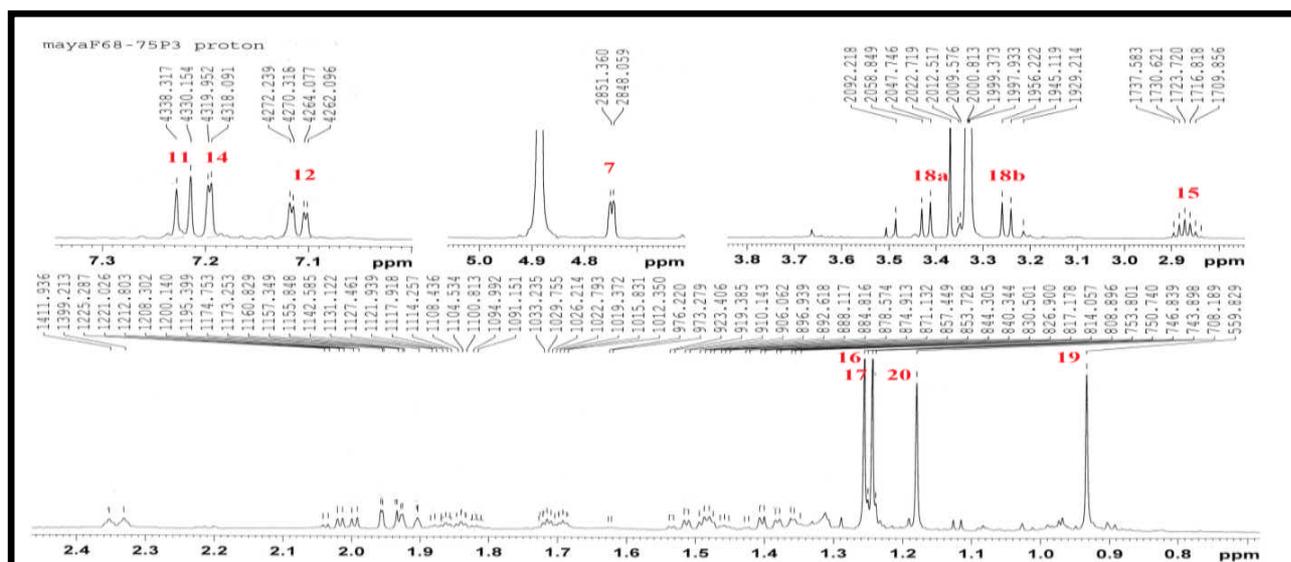
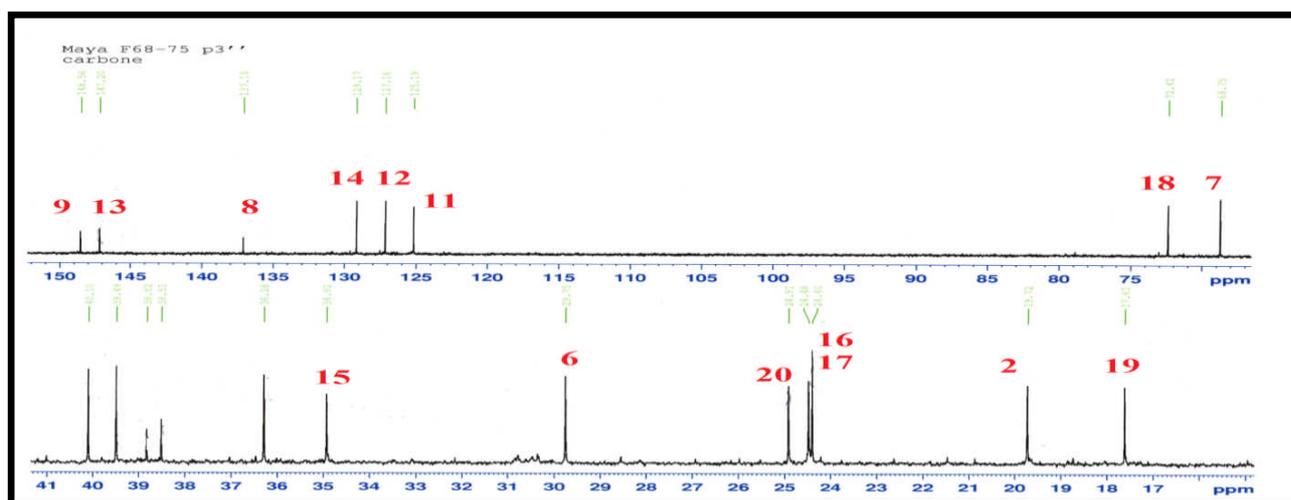
Cette analyse spectrale permet d'assigner la structure suivante pour le composé **C18**: pomiferine A (Fraga et al., 1994), isolé d'*Abies georgeii* (Yang et al., 2010).



**C18 : Pomiferine A**

#### 2.1.4.3.2. Identification du composé C19

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **C19** (Figures 224-225) sont semblables à ceux du composé **C18**, cependant ils diffèrent par l'absence du signal attribuable au  $\text{CH}_2$  en position 7 à  $\delta_{\text{H}}$  2.87 /  $\delta_{\text{C}}$  29.7 ppm et par l'apparition d'un CH oxygéné à  $\delta_{\text{H}}$  4.75 /  $\delta_{\text{C}}$  68.9.

Figure 224. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C19Figure 225. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C19

- Analyse du spectre COSY

L'analyse du spectre COSY (figure 226) montre une tache de corrélation entre le proton H-7 $\alpha$  ( $J= 3.3\text{Hz}$ ) et les protons H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  1.94 ppm) et H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2.01-1.92 ppm) en plus des taches déjà observées pour le composé C18.

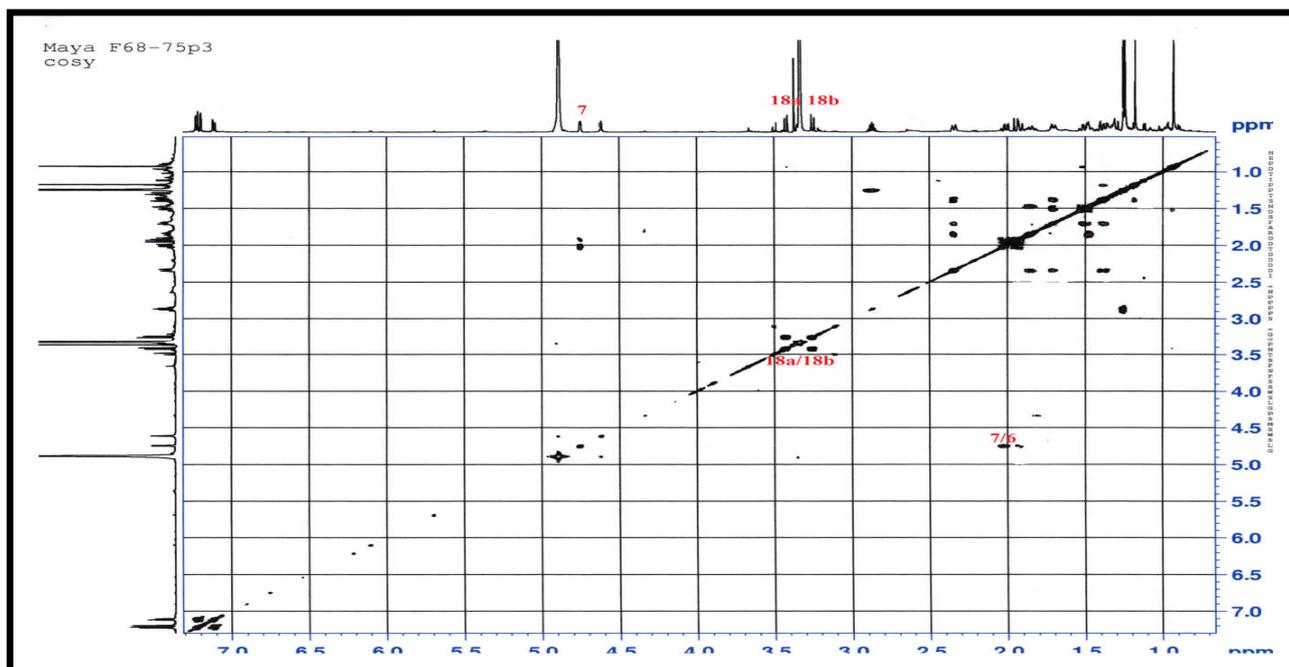
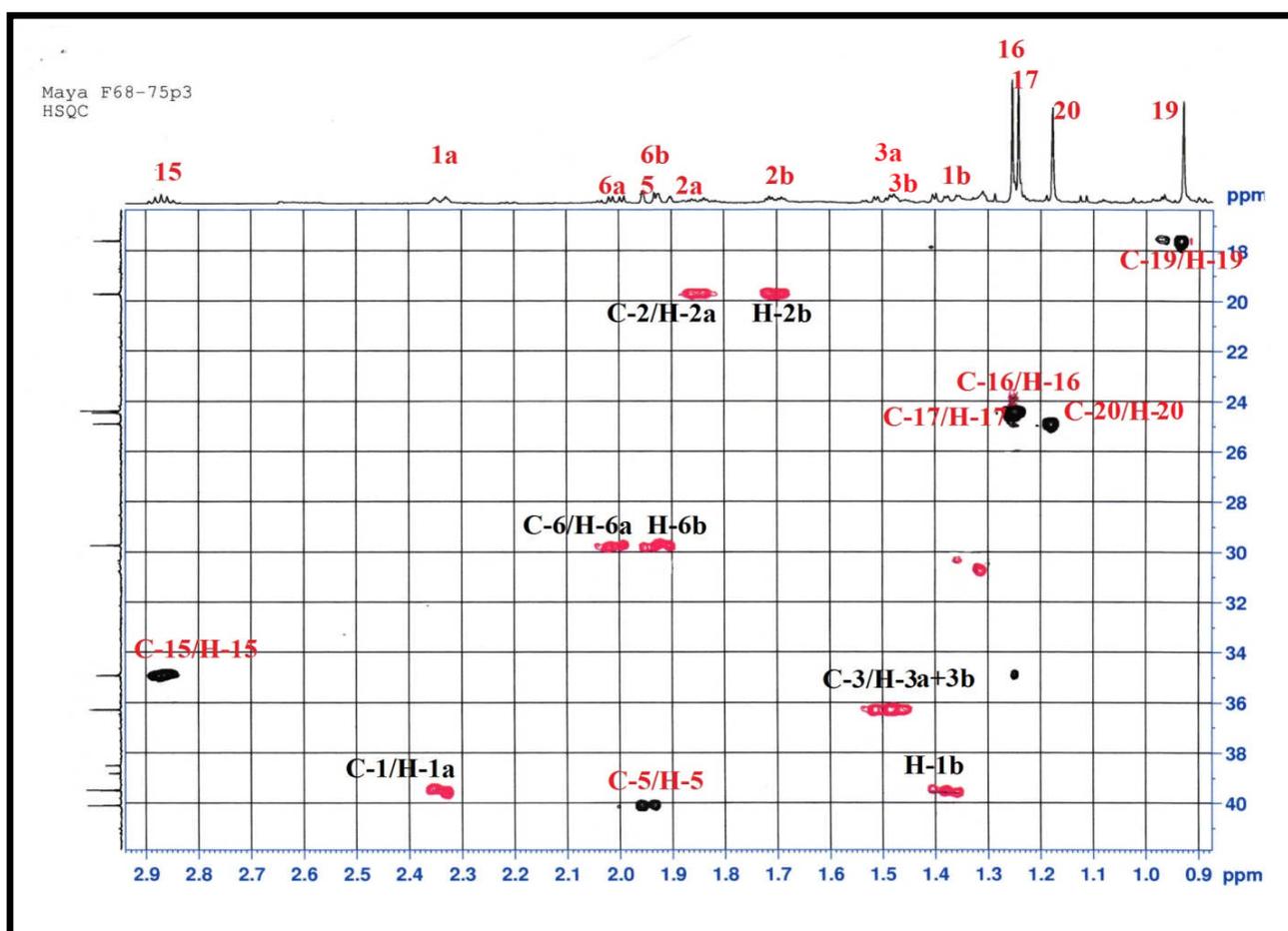


Figure 226. Spectre COSY du composé C19

- Analyse du spectre HSQC

Figure 227. Spectre HSQC de  $\delta_c$  16 à 42 ppm du composé C19

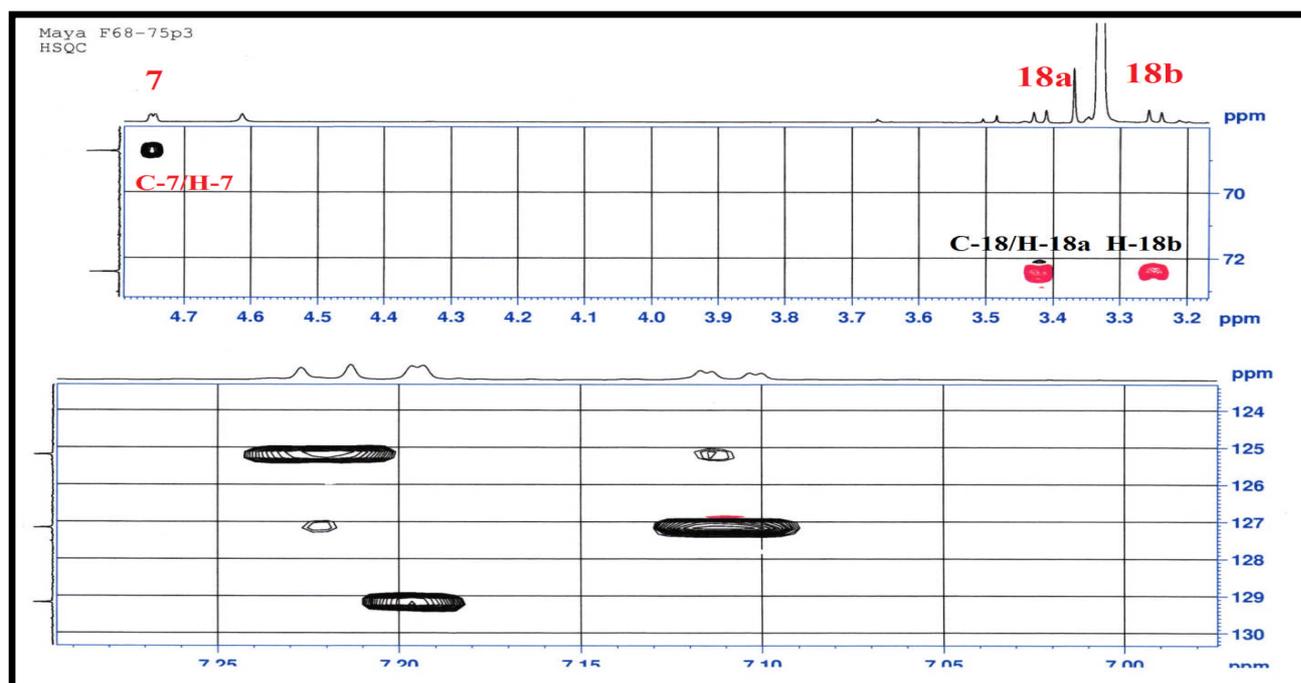


Figure 228. Spectre HSQC de  $\delta_C$  68 à 130 ppm du composé **C19**

- **Analyse du spectre HMBC**

Les corrélations du spectre HMBC du composé **C19** (Figure 229) montrent les mêmes corrélations que le spectre HMBC du composé **C18** avec la corrélation du proton déblindé H-7 ( $\delta_H$  4.75/  $\delta_C$  68.9 ppm) avec le carbone C-5 et les carbones aromatiques C-8, C-9 et C-14 confirmant ainsi sa position 7.

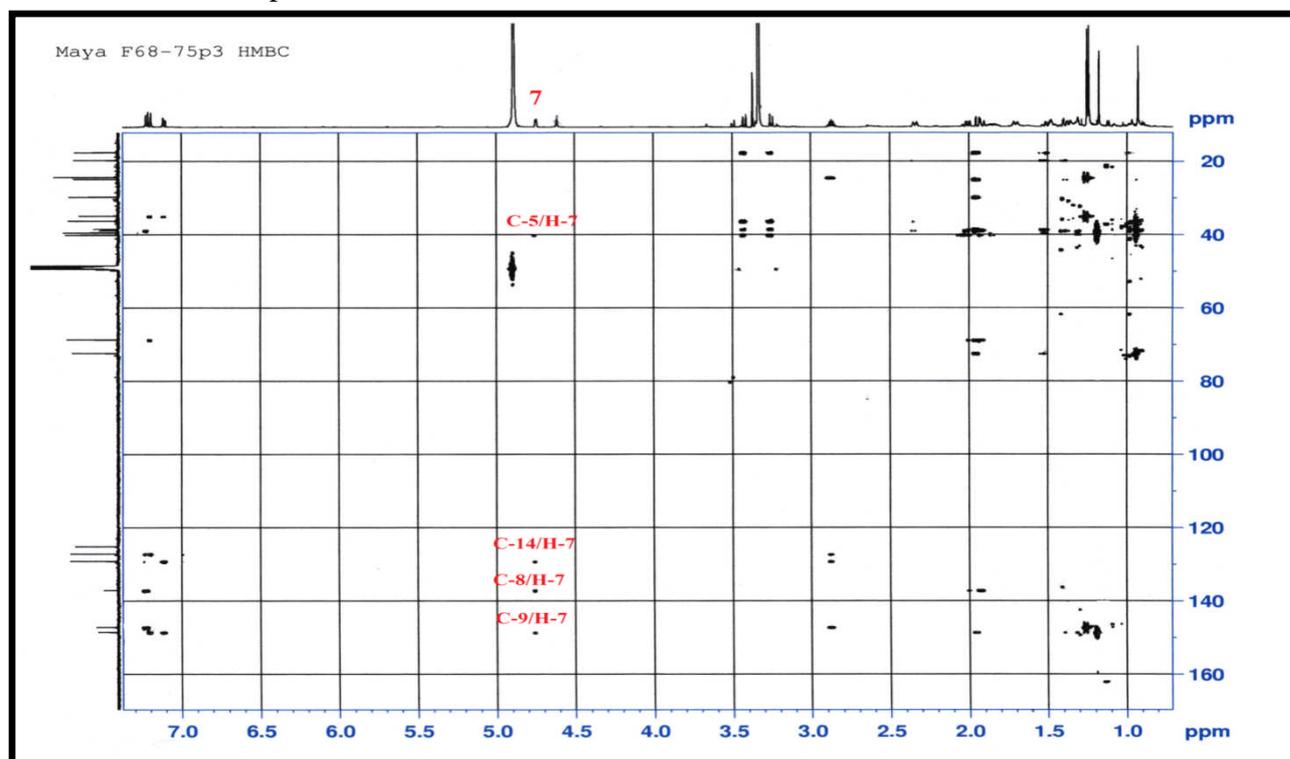
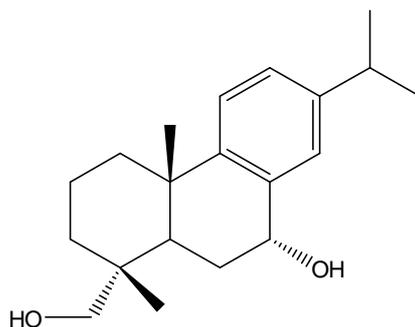


Figure 229. Spectre HMBC du composé **C19**

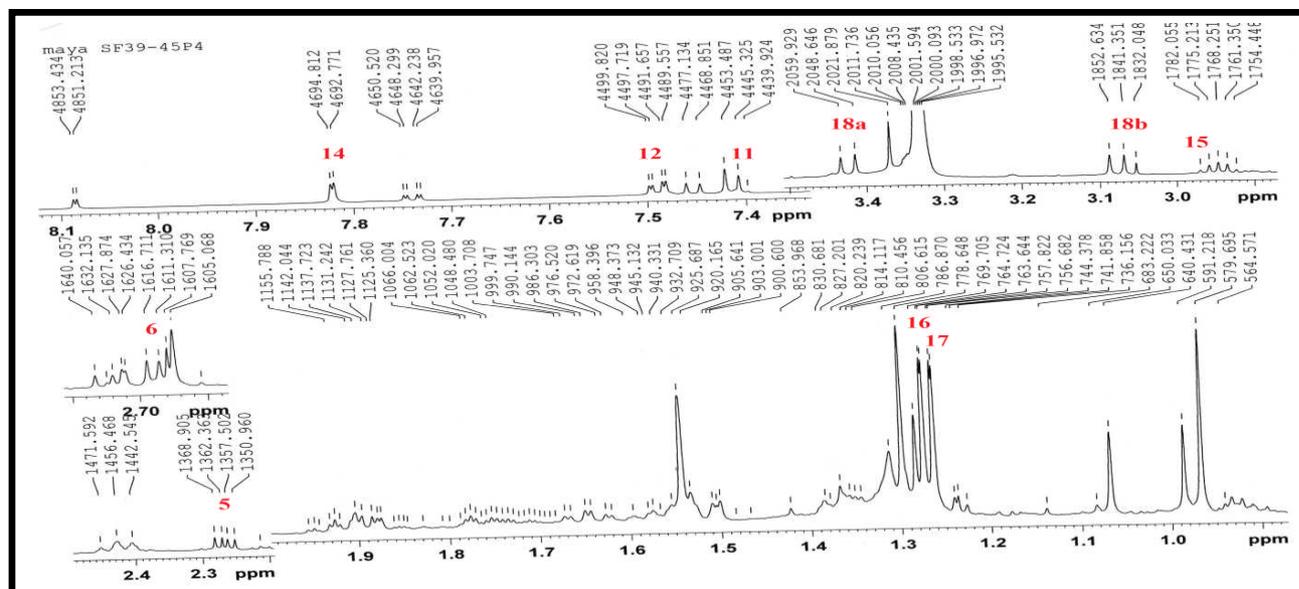
Ainsi, le composé **C19** est identifié en : 8,11,13-abietatriène-7 $\alpha$ , 18-diol (Barrero et al., 1992)



**C19** : 8,11,13-abietatriène-7 $\alpha$ , 18-diol

### 2.1.4.3.3. Identification du composé C20

Le composé **C20** ressemble en grande majorité au composé **C18**, d'après les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Figures 230-231) avec un  $\text{CH}_2\text{OH}$  en position 18. La seule différence se situe au niveau de la position 7, avec l'apparition d'un pic à  $\delta_{\text{C}}$  200.4 ppm attribuable à une fonction cétone.



**Figure 230.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **C20**

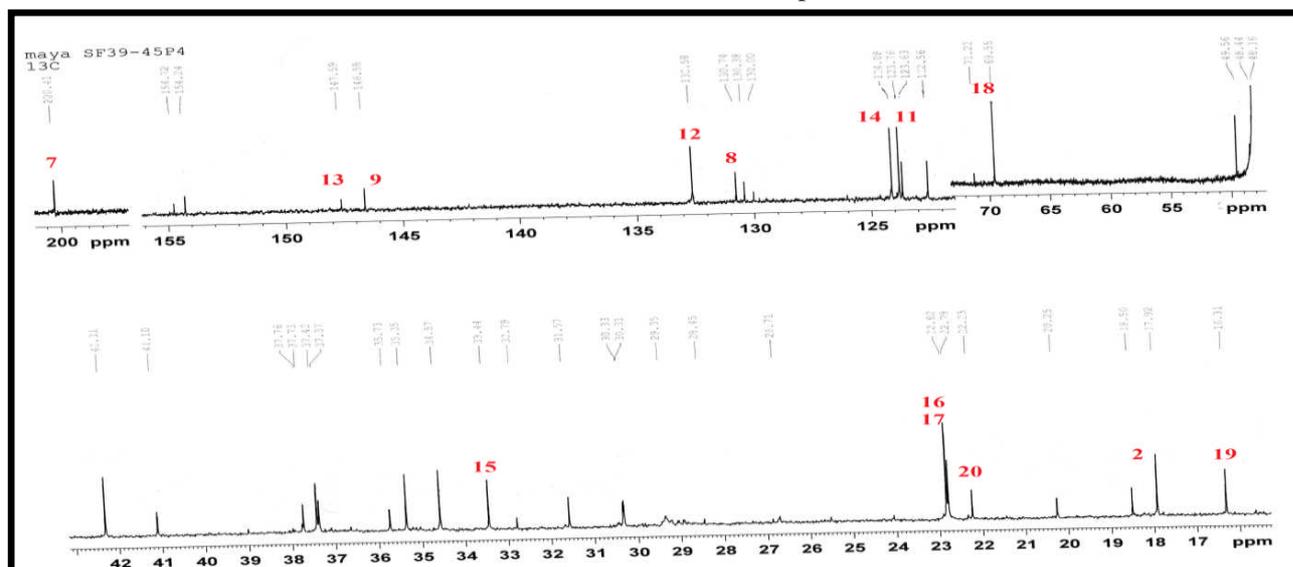


Figure 231. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C20

- Analyse du spectre COSY

Le spectre COSY (Figure 232) montre les mêmes corrélations que le spectre COSY du composé C18 avec l'absence des corrélations du proton H-7.

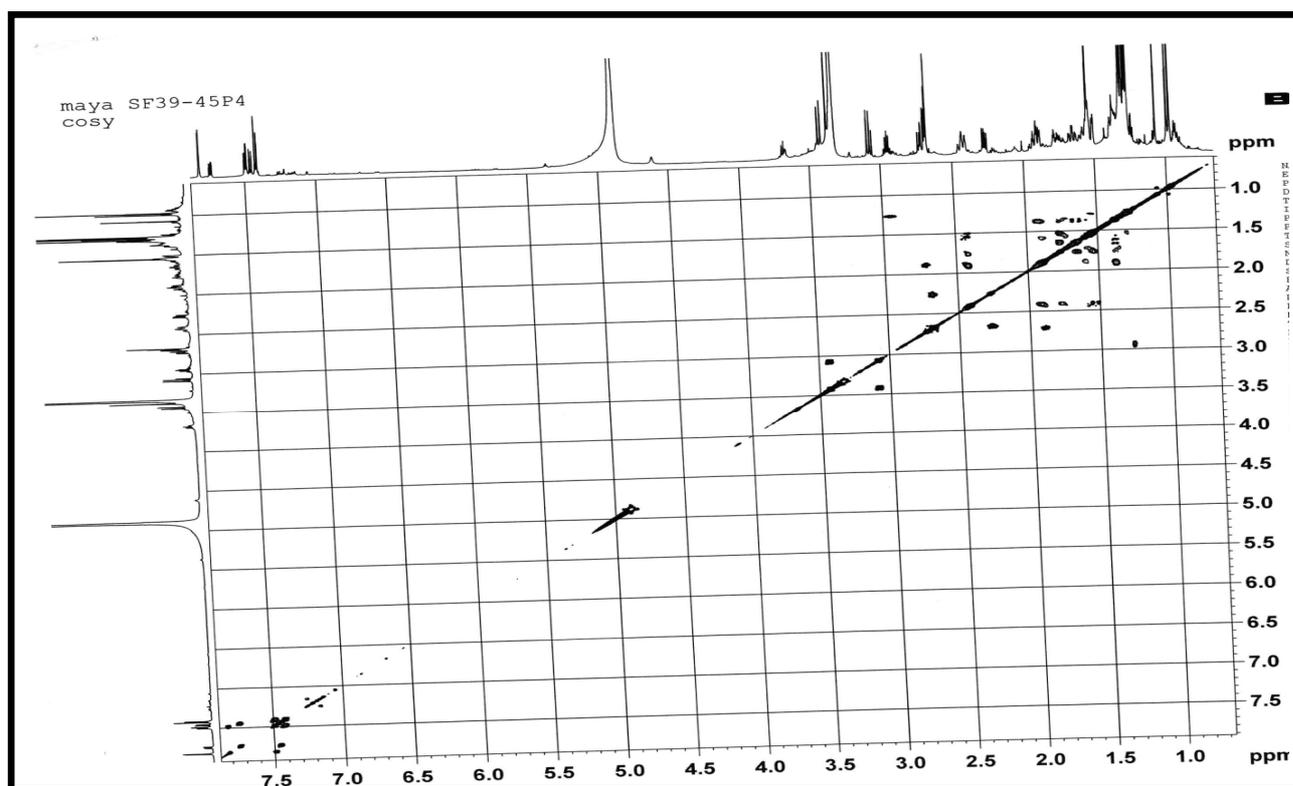


Figure 232. Spectre COSY du composé C20

- Analyse du spectre HSQC

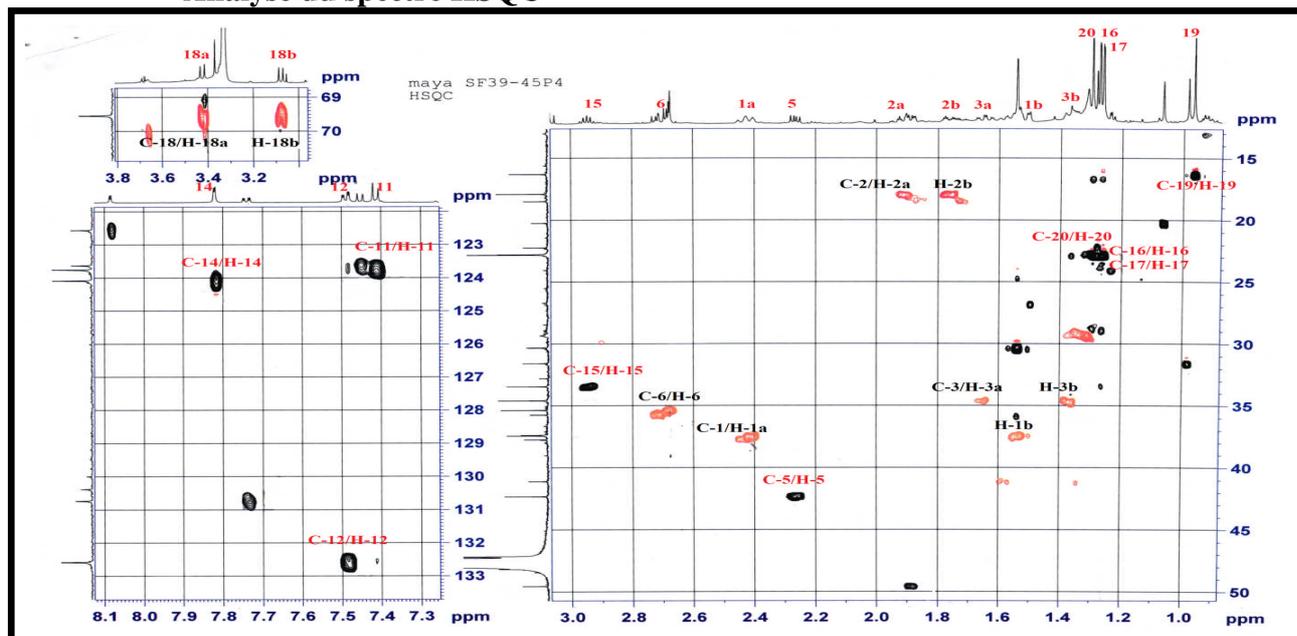


Figure 233. Spectre HSQC du composé C20

- Analyse du spectre HMBC

Par les spectres HMBC (Figures 234-235), la position de la fonction cétone est déterminée par la corrélation des protons H-14 et H-6 avec le carbone à  $\delta_C$  200.4 ppm indiquant ainsi sa position en C-7.

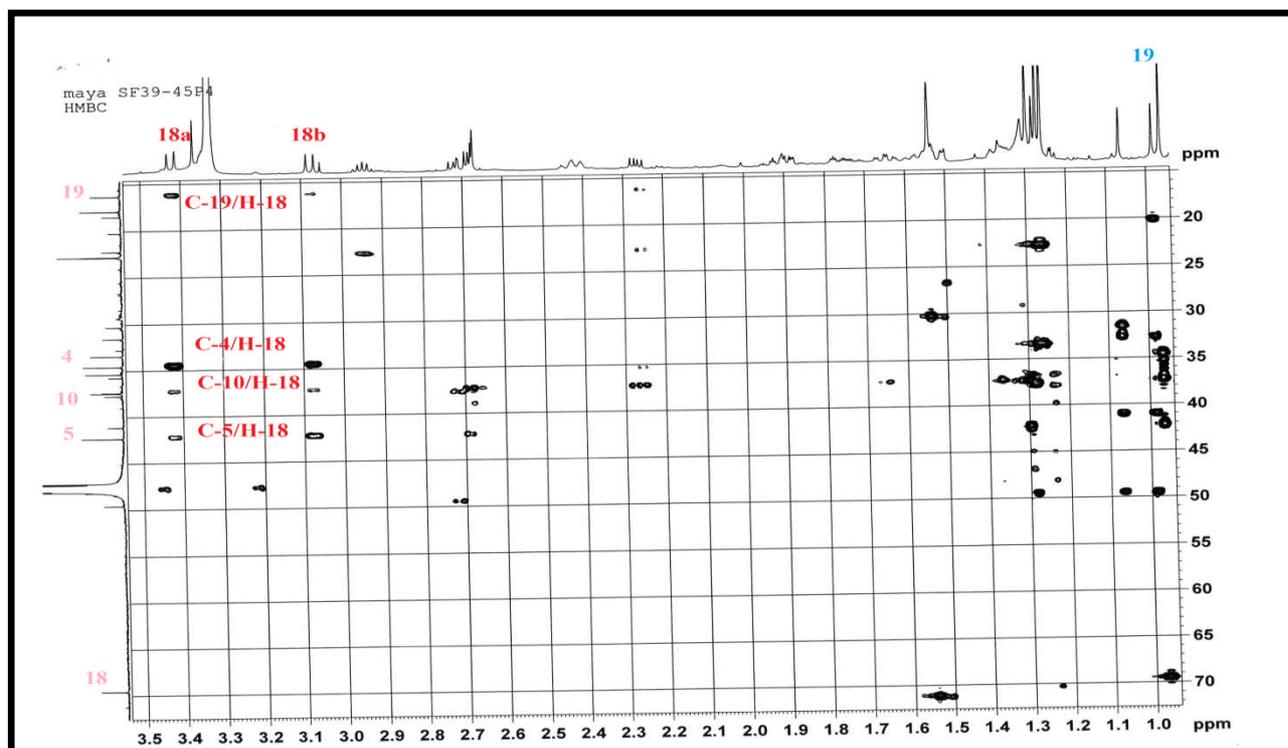


Figure 234. Spectre HMBC de  $\delta_C$  15 à 70 ppm du composé C20

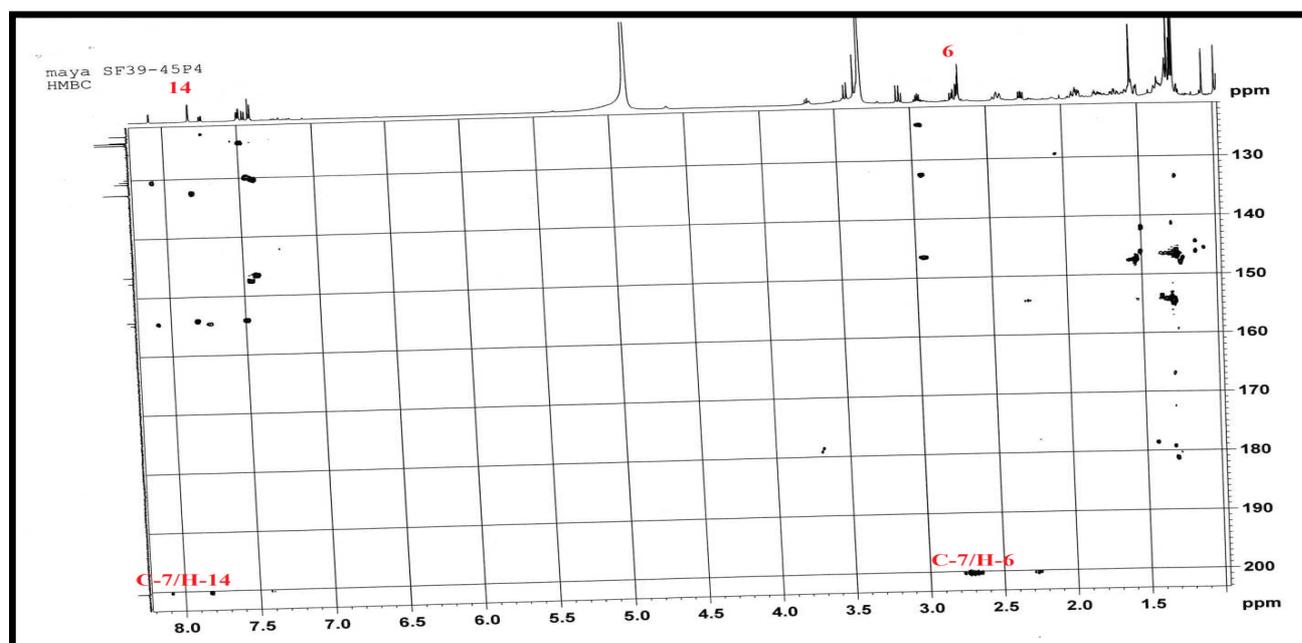
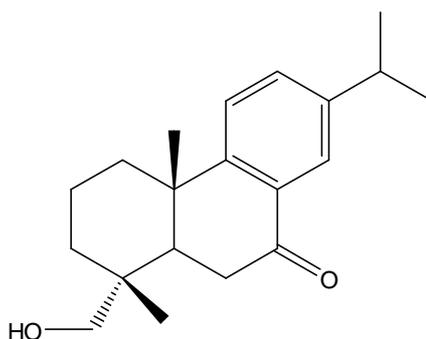


Figure 235. Spectre HMBC de  $\delta_C$  120 à 200 ppm du composé **C20**

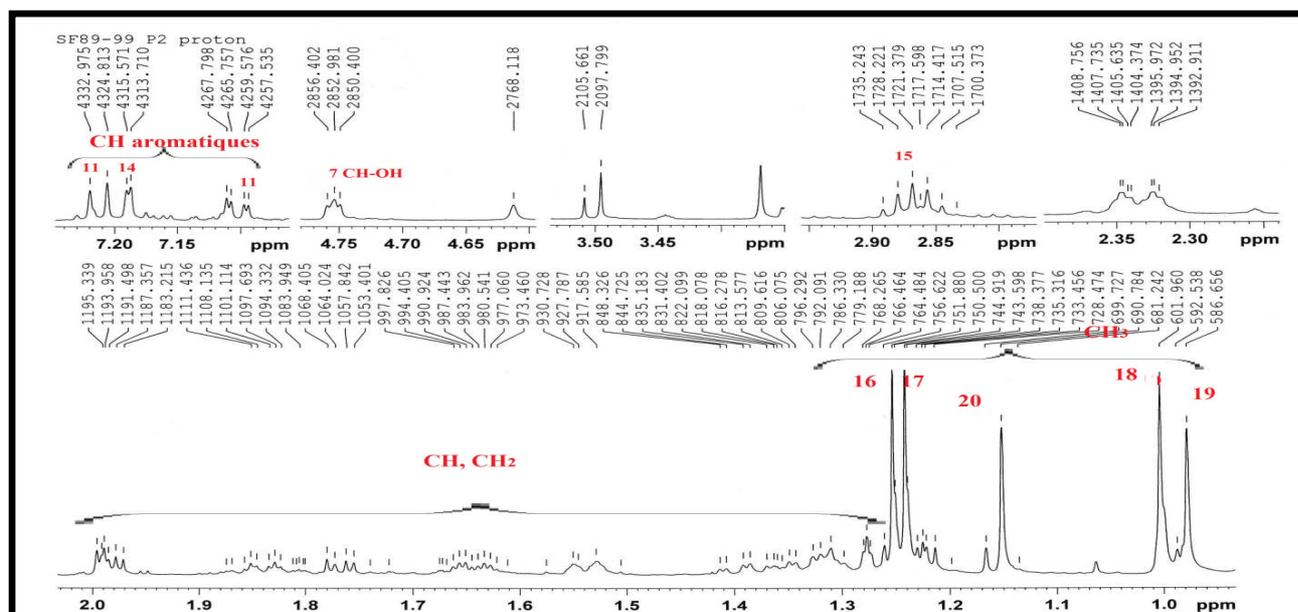
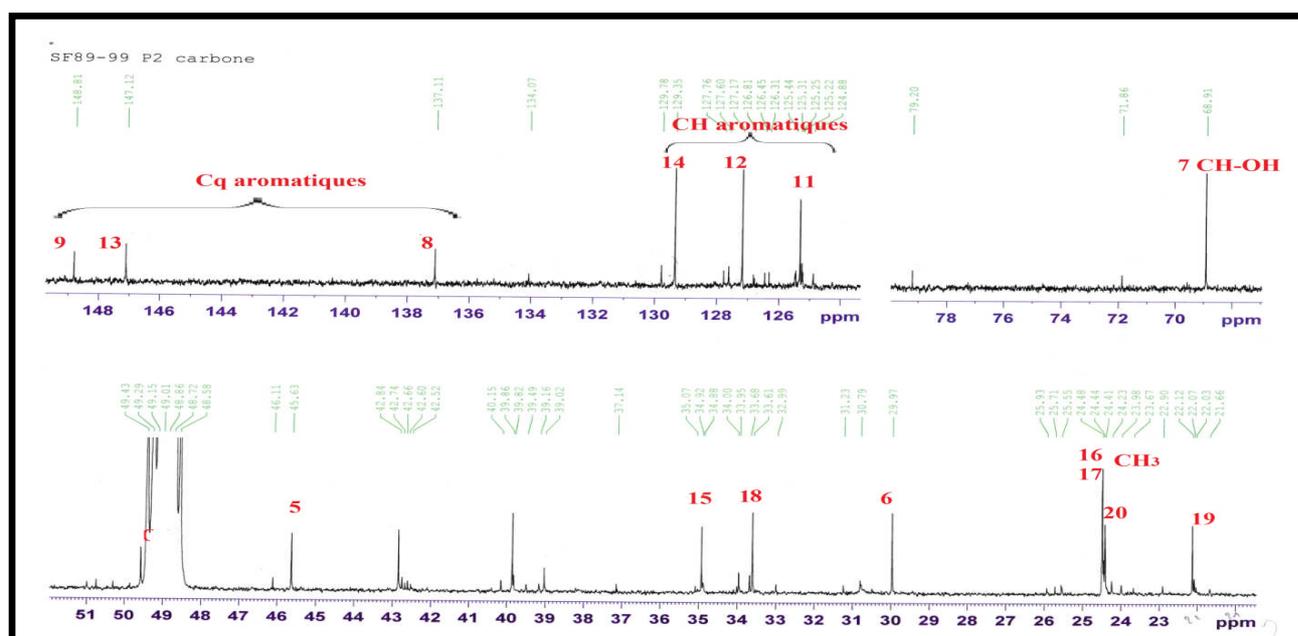
La structure du composé **C20** est identifiée au: 7-oxodehydroabietinol (Row et al., 1971) isolé de *Cedrus atlantica* (Barrero et al., 2005), *d'Abies georgeii* (Yang et al., 2010) et de *Pinus banksiana* (Georges et al., 2012).



**C20** : 7-oxodehydroabietinol.

#### 2.1.4.4. Elucidation structurale du composé **C21**

D'après les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure 236) et  $^{13}\text{C}$  (Figure 237), le composé **C21** montre des similitudes avec le composé **C18**. Cependant la différence est notée dans l'absence du signal vers  $\delta_H$  3.46-3.12 ppm /  $\delta_C$  70.5 ppm attribuable au  $\text{CH}_2\text{-OH}$  du composé **C18** qui est remplacé par un méthyle résonnant à  $\delta_H$  1.0 ppm /  $\delta_C$  33.6 ppm.

Figure 236. Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé C21Figure 237. Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé C21

- **Analyse du spectre COSY**

Le spectre COSY du composé C21 (Figure 238) montre les mêmes corrélations que le spectre COSY du composé C18 avec la corrélation des protons du méthyle C-18 avec les protons du méthyl C-19.

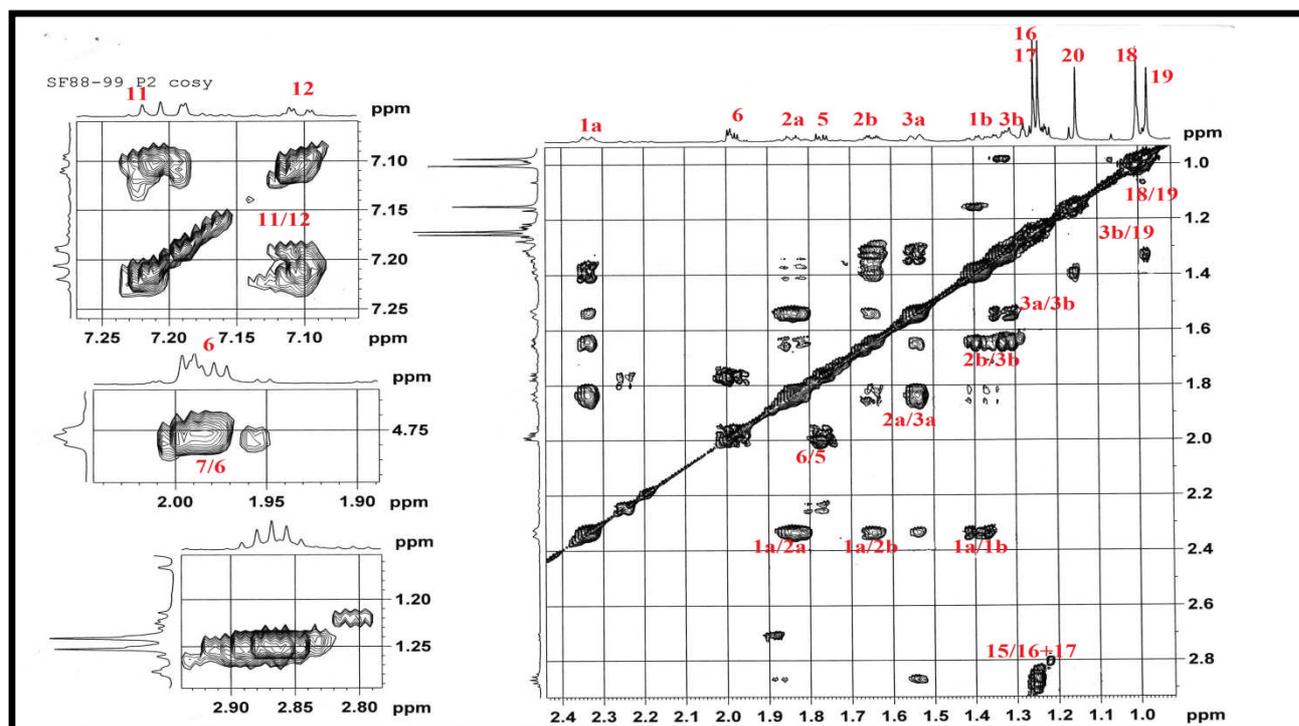
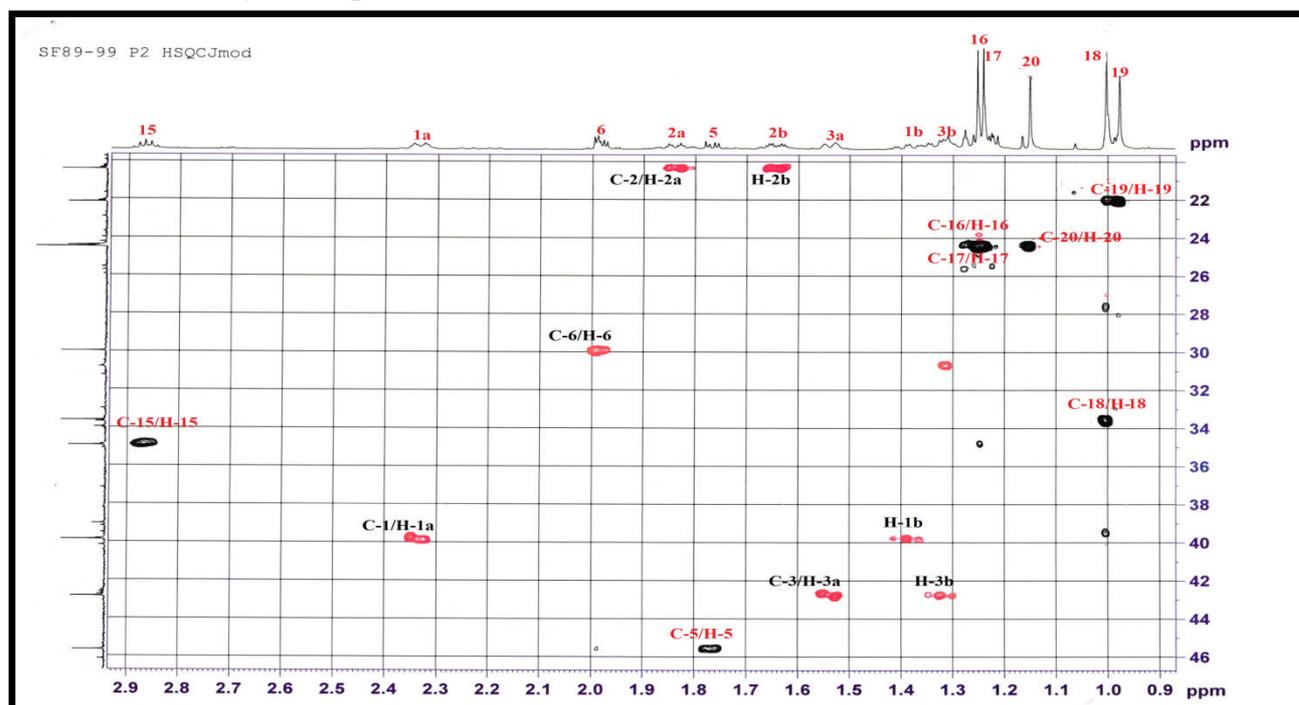


Figure 238. Spectre COSY du composé C21

- Analyse du spectre HSQC

Figure 239. Spectre HSQC de  $\delta_H$  1.0 à 2.9 ppm du composé C21

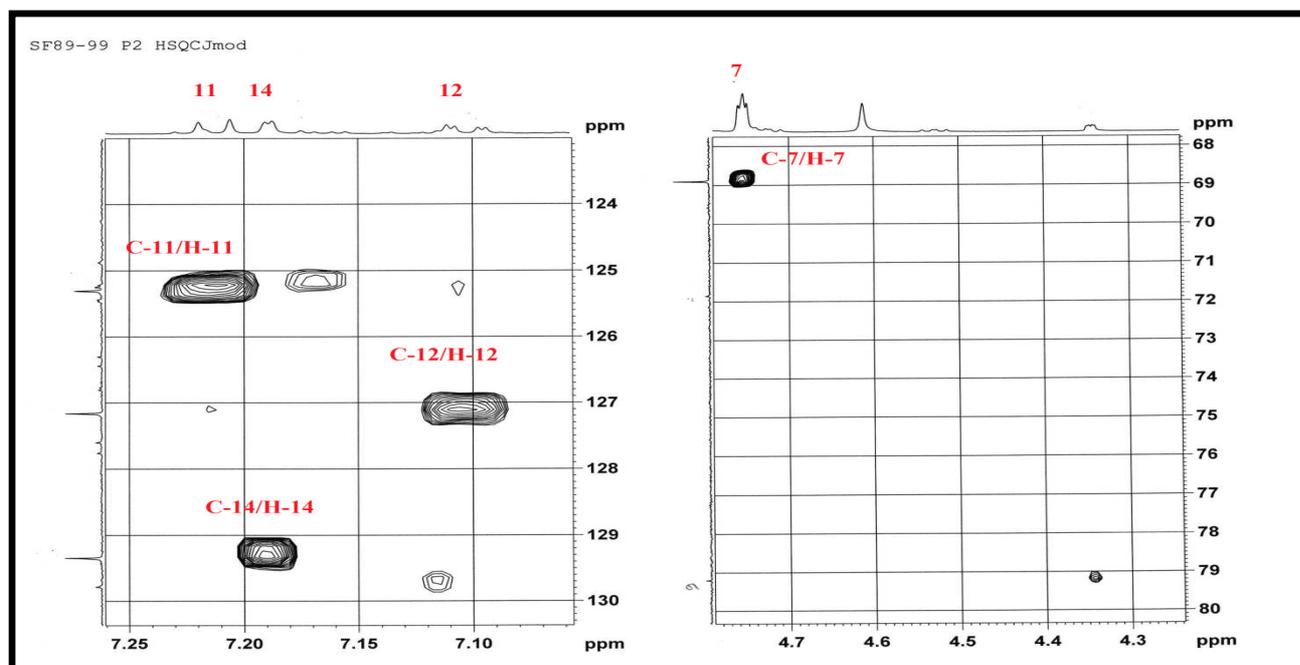


Figure 240. Spectre HSQC de  $\delta_H$  4.2 à 7.25 ppm du composé **C21**

- **Analyse du spectre HMBC**

Les spectres HMBC du composé **C21** (Figures 241-242) montrent les mêmes corrélations que le composé **C18** avec entre autres :

- Corrélation entre les protons H-18 avec le carbone méthylique C-19
- Des taches de corrélations entre les protons H-3 et les deux méthyles H-18 et H-19
- Corrélations entre les deux méthyles H-18 et H-19 avec le carbone quaternaire C-4, indiquant ainsi leur position.

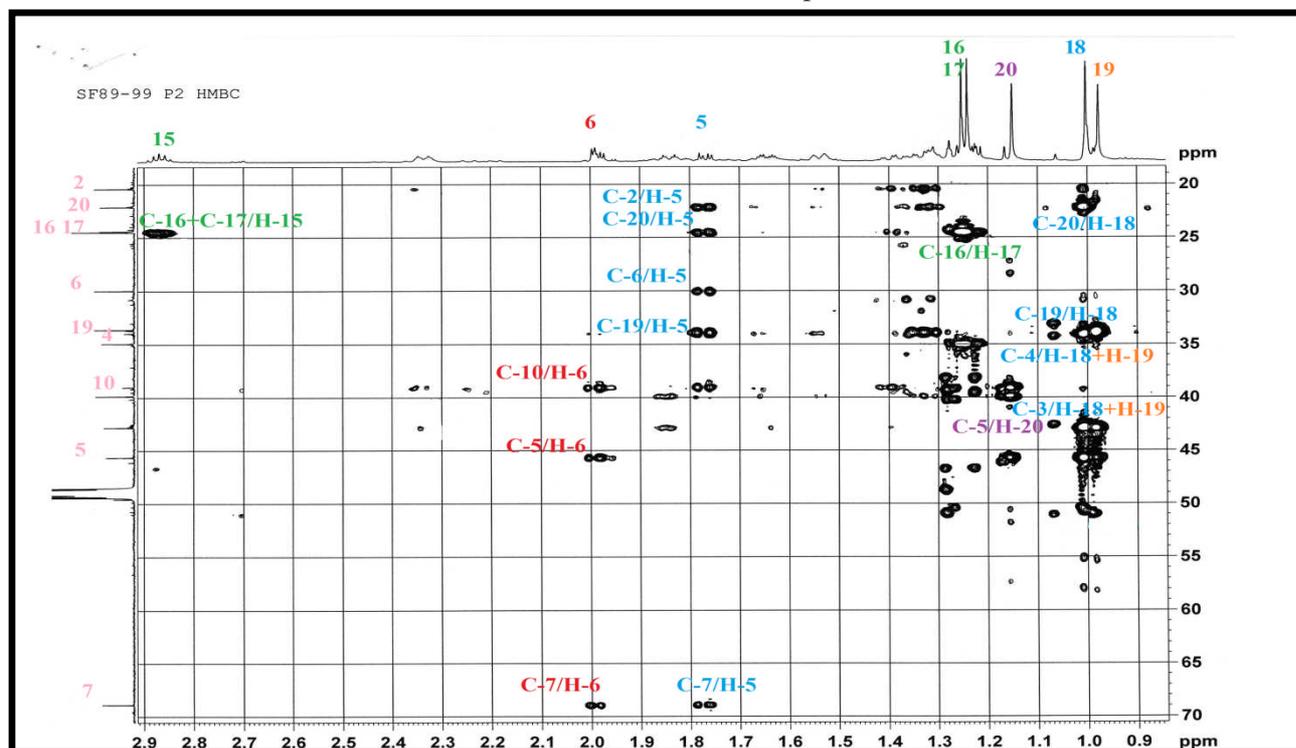


Figure 241. Spectre HMBC de  $\delta_C$  20 à 70 ppm du composé C21

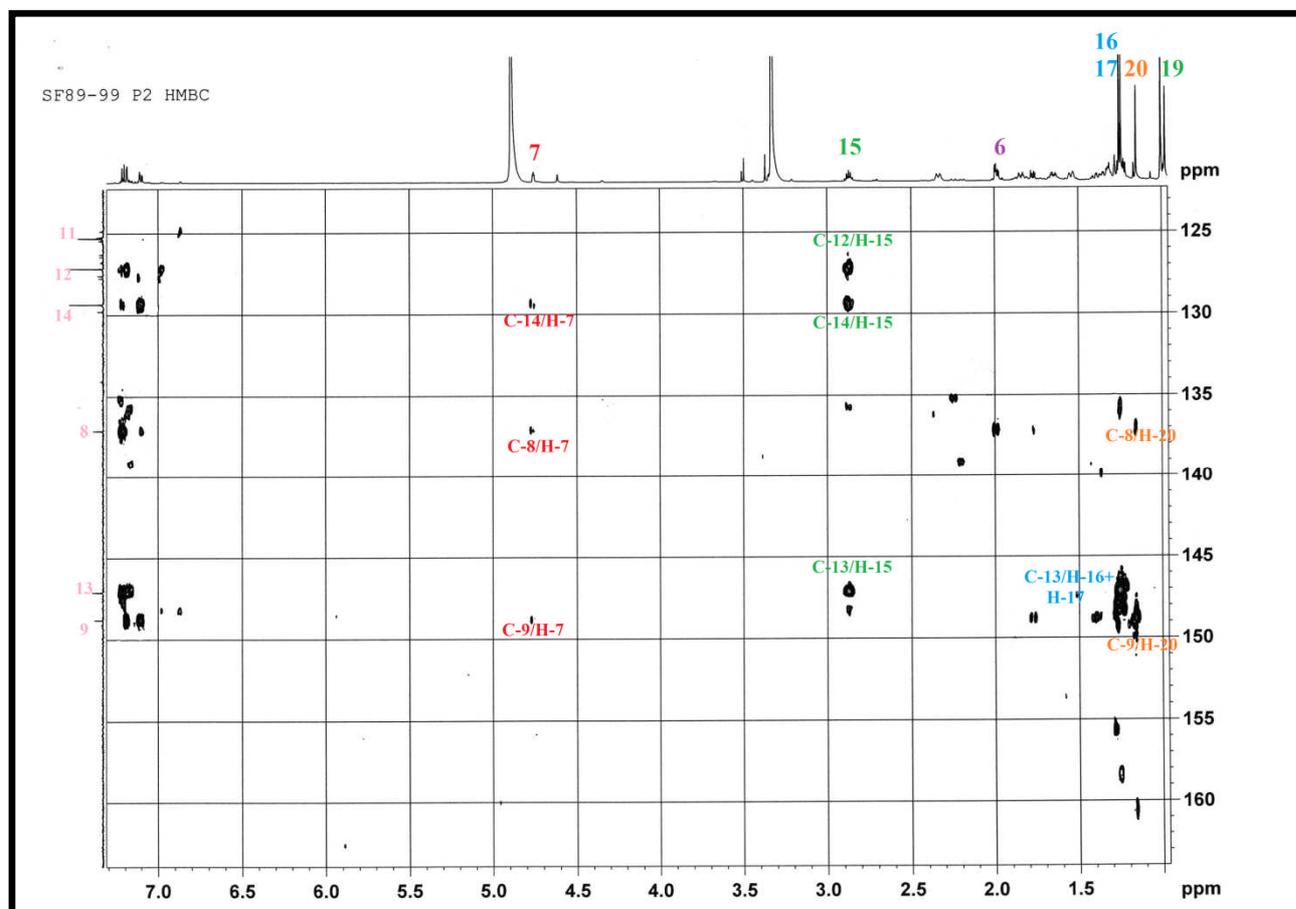
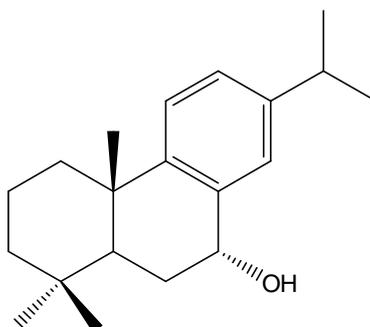


Figure 242. Spectre HMBC  $\delta_C$  125 à 165 ppm du composé C21

Après une comparaison des données spectrales du composé **C21** avec celles de la littérature et avec l'absence de corrélation entre le proton H-7 et les méthyles H-18 et H-19 on conclut qu'il est de configuration  $\alpha$ .

Le composé **C21** a été identifié au : abieta-8,11,13-triène-7 $\alpha$ -ol isolé d'écorces de *Pinus monticola* (Conner et al., 1980) et d'*Abies holophylla* (Kim et al., 2016)



**C21:** abieta-8,11,13-triène-7 $\alpha$ -ol

**Tableau 28.** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) des composés **C18-C21** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$

Atome	<b>C18</b>		<b>C19</b>		<b>C20</b>		<b>C21</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult., $J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1a: 2.32, dt, 12.8; 1.08 1b: 1.35, m	38.4	1a: 2.34, dl, 12.7 1b: 1.38, td, 13.4; 3.6	39.5	1a: 2.42, d, 13.9 1b: 1.53, m	37.4	1a: 2.33, dt, 12.8; 1.0 1b: 1.39, td, 13.1; 3.6	38.1
2	2a: 1.85, qt, 13.7; 3.5 2b: 1.68, m	18.4	2a: 1.84, qt, 13.4; 3.7 2b: 1.7, dm, 13.9	19.7	2a: 1.92, m 2b: 1.78, m	17.9	2a: 1.84, qt, 14.4; 6.8 2b: 1.65, dm, 13.9	18.5
3	3a: 1.56 td, 13.5, 4.1 3b: 1.35, m	34.9	3a: 1.51, td, 13.4, 4.0 3b: 1.47, m	36.3	3a: 1.65, td, 13.4; 3.9 3b: 1.37, m	34.6	3a: 1.53, dt, 13.1; 2.9 3b: 1.32, m	42.8
4	-	37.5	-	38.5	-	34.6	-	34.0
5	1.67 m	43.5	1.94, dd, 7.4; 1.5	40.1	2.27, dd, 11.4; 6.5	42.3	1.77, dd, 10.6; 4.4	45.6
6	6a: 1.84 m 6b: 1.71, m	18.5	6a: 2.01, dd, 12.7; 4.5 6b: 1.92, dl, 18.2	29.8	2.69, dd, 6.2; 2.7	35.3	1.98, m	29.9
7	2.87, m	29.7	4.75, d, 3.3	68.9	-	200.4	4.75, m	68.9
8	-	134.6	-	137.1	-	130.7	-	137.1
9	-	147.0	-	148.6	-	146.6	-	148.8
10	-	37.0	-	38.8	-	37.4	-	39.0
11	7.16, d, 8.2	123.8	7.22, d, 8.2	125.2	7.41, d, 8.1	123.8	7.21, d, 8.2	125.3
12	6.95, dd, 8.2,	123.2	7.11, dd,	127.2	7.49, dd,	132.6	7.1, dd,	127.2

Identification des produits isolés de *Cedrus atlantica*

	1.6		8.2; 1.9		8.1; 2.1		8.2;2.0	
13	-	145.2	-	147.2	-	147.6	-	147.1
14	6.87, d, 1.1	126.2	7.19, d, 1.2	129.2	7.82, d, 2.0	124.1	7.19, d, 2.3	129.4
15	2.80, sept, 7.0	33.5	2.87, sept, 6.9	34.9	2.95, sept, 6.9	33.4	2.87, sept, 6.9	34.9
16	1.21, d, 7.0	24.4	1.25, d, 6.9	24.5	1.27, d, 6.9	22.8	1.24, d, 6.9	24.5
17	1.21, d, 7.0	23.1	1.25, d, 6.9	24.4	1.26, d, 6.9	22.8	1.24, d, 6.9	24.5
18	18a: 3.46, d, 11.0	70.5	18a: 3.42, d, 11.1	72.4	18a: 3.42, d, 11.3	69.5	1.00, s	33.6
	18b: 3.12, d, 11.0		18b: 3.24, d, 11.1		18b: 3.07, d, 11.2			
19	0.88, s	16.6	0.93, s	17.6	0.97, s	16.3	0.98, s	22.1
20	1.22, s		1.18, s	19.7	1.29, s	22.2	1.15, s	24.4

# **Chapitre 3**

## **Dosage des polyphénolset activités biologiques**

### 3.1. Dosage des polyphénols

Les fractions résultantes de la VLC de l'extrait hydroéthanolique d'*Abies numidica* **F40 :60**, **F60 :40** et **F80 :20** ont été soumises au test du dosage des polyphénols en utilisant la méthode colorimétrique (Folin-Ciocalteu). La teneur en polyphénols des extraits varie entre  $47.44 \pm 0.0$  à  $157.64 \pm 0.2$   $\mu\text{g/g}$  de matière sèche (Tableau 29). Les résultats ont montré une plus grande richesse en polyphénols dans la fraction **F60 :40** ( $157,64 \pm 0,2$   $\mu\text{g GAE / g}$  de masse sèche) par rapport à **F40 : 60** ( $138,24 \pm 0,82$   $\mu\text{g GAE / g}$  de masse sèche) et à **F80 :20** qui présente la plus faible teneur ( $47,44 \pm 0,0$   $\mu\text{g GAE / g}$ ).

**Tableau 29.** Teneur en polyphénols totaux des fractions VLC d'*Abies numidica*

Fracions	Teneur en polyphénols totaux ( $\mu\text{g/g}$ de matière sèche)
F40:60	$138.24 \pm 0.82$
F60:40	$157.64 \pm 0.2$
F80:20	$47.44 \pm 0.0$

Les résultats obtenus montrent une plus grande teneur en polyphénols par rapport à ceux obtenus des extraits d'aiguilles et de racines d'*A.burnmulleriana* qui a été de  $13.09 \pm 1.64$  à  $45.48 \pm 4.21$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait et de  $24.24 \pm 0.12$  à  $73.33 \pm 1.52$   $\mu\text{g/g}$  d'extrait respectivement avec la plus grande teneur pour l'extrait hydroéthanolique (Senol et al., 2015).

### 3.2. Activité antioxydante des fractions VLC d'*Abies numidica*

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits. La complexité chimique des extraits, la polarité et le comportement chimique, pourraient conduire à des résultats positifs, en fonction du test utilisé. Dans cette étude, l'activité antioxydante des fractions **F40 :60**, **F60 :40** et **F80 :20** d'*Abies numidica* a été déterminée par trois méthodes, à savoir, ABTS<sup>+</sup>, le blanchissement du  $\beta$ -carotène et le test de réduction CUPRAC. Les résultats ont été enregistrés à la concentration 50% d'inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) sauf pour le test du CUPRAC. L' $\alpha$ -tocophérol et le BHA ont été utilisés comme standards.

### 3.2.1. Essai de décoloration du radical cation ABTS<sup>•+</sup>

La fraction **F60 :40** a montré une excellente activité d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> ( $IC_{50} < 3 \mu\text{g/mL}$ ) comparée à **F40 :60** ( $IC_{50} = 12.85 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ ) et **F80 :20** ( $IC_{50} = 77.85 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ ) Et meilleure que celles de l' $\alpha$ -tocophérol ( $IC_{50} = 4.31 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ ) et le BHT ( $IC_{50} = 4.1 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ) qui sont utilisés comme références (Tableau 30).

**Tableau30.** Pouvoir d'inhibition de l'ABTS<sup>•+</sup> par les fraction *Abies*

Fractions	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
F40 :60	12.85±0.12
F60 :40	1.29± 0.02
F80 :20	77.85±0.21
$\alpha$ -Tocopherol	4.31± 0.1
BHT	4.1±0.06

Les extraits dichlorométhane, méthanol et acétone d'*Abies pindrow* (Gupta et al., 2011) ont également montré une bonne activité avec l'ABTS<sup>•+</sup> mais qui reste toujours inférieure aux résultats obtenus avec les fractions de notre étude ( $IC_{50} = 8 \pm 0.0 \mu\text{g/mL} - 99 \pm 0.004 \mu\text{g/mL}$ ).

### 3.2.2. Activité de blanchissement du $\beta$ -carotène/acide linoléique

La détermination de l'activité antioxydante des fractions VLC d'*A. numidica* par la méthode de blanchissement du  $\beta$ -carotène/ acide linoléique a montré une fois encore que la fraction **F60 :40** ( $IC_{50}$ :  $18.6 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ ) est plus active que les fractions **F40 :60** ( $IC_{50}$ :  $113.8 \pm 2.1 \mu\text{g/mL}$ ) et **F80 :20** ( $IC_{50}$ :  $125.6 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ ).

Cependant les résultats obtenus restent inférieure aux valeurs des standards :  $\alpha$ -tocophérol et BHT (Tableau 31).

**Tableau31.** Pouvoir d'inhibition des fractions étudiées sur le  $\beta$ -carotène/ acide linoléique

Fractions	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
F40:60	113.81±2.08
F60:40	18.59±1.09
F80:20	125.56±1.23
$\alpha$ -Tocopherol	2.1±0.08
BHT	1.34±0.04

### 3.2.3. La réduction cuprique (CUPRAC)

Dans l'essai CUPRAC, les résultats sont représentés par  $A_{0,5}$  correspondant à la concentration par rapport à l'absorbance 0.5, car selon la loi de Beer, la linéarité est très précise entre les valeurs d'absorbance 0.2 et 0.8. L'absorbance augmente avec la concentration croissante des fractions. Dans cet essai, les fractions **F40 :60** et **F60 :40** se sont avérés très proches l'une de l'autre ( $A_{0,5}$ :  $31.2 \pm 0.1$  µg/mL,  $A_{0,5}$ :  $33.8 \pm 0.2$  µg/mL, respectivement). La fraction **F80 :20** a révélé la plus faible capacité antioxydante ( $A_{0,5}$ :  $183.0 \pm 0.4$  µg/mL). Cependant, les résultats restent inférieurs à ceux des standards (Tableau 32).

**Tableau32.** Inhibition du CUPRAC par les fractions d'*A. numidica*

Fractions	A <sub>0.5</sub> (µg/mL)
F40:60	31.15±0.08
F60:40	33.83±0.20
F80:20	183.0±0.40
$\alpha$ -Tocopherol	2.55 ± 0.01
BHT	3.80 ± 0.01

Les conclusions tirées des trois méthodes utilisées dans la détermination de la capacité antioxydante des fractions issues de la VLC de l'extrait hydroéthanolique des cônes d'*Abies numidica* sont :

- Avec le test de l'ABTS<sup>+</sup>, une excellente activité a été notée surtout pour la fraction **F60 :40** (IC<sub>50</sub>:  $1.29 \pm 0.02$  µg/mL) qui a manifesté un pouvoir antioxydant supérieur à celui des standards  $\alpha$ -tocophérol (IC<sub>50</sub>:  $4.31 \pm 0.1$  µg/mL) et BHT (IC<sub>50</sub>:  $4.1 \pm 0.06$  µg/mL). La

- fraction **F40 :60** a également présenté une très bonne activité ( $IC_{50}$ :  $12.85 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ ) comparée à la troisième fraction **F80 :20** ( $IC_{50}$ :  $77.85 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$ ).
- Avec le test du blanchissement du  $\beta$ -carotène, la fraction **F60 :40** s'est avérée la plus active ( $IC_{50}$ :  $18.59 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$ ) par rapport aux fractions **F40 :60** et **F80 :20** ( $IC_{50}$ :  $113.81 \pm 2.08 \mu\text{g/mL}$  et  $IC_{50}$ :  $125.56 \pm 1.23 \mu\text{g/mL}$ ). Les valeurs restent inférieures à celles des standards.
  - Avec la méthode du CUPRAC, les fractions **F40 :60** et **F60 :40** présentent une activité antioxydante modérée ( $IC_{50}$ :  $31.15 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$  et  $IC_{50}$ :  $33.83 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$ ) par rapport à la fraction **F80 :20** ( $IC_{50}$ :  $183.0 \pm 0.40 \mu\text{g/mL}$ ) mais qui reste bien faible comparé aux standards.
  - Dans les trois méthodes utilisées pour la détermination du pouvoir oxydant des fractions d'*Abies numidica*, la fraction **F60 :40** a manifesté la meilleure activité sauf dans l'essai CUPRAC où elle était en seconde position après la fraction **F40 :60** avec une légère différence, Ceci s'explique d'un côté par la différence de polarité des fractions et d'un autre par leurs richesse en polyphénols. En effet, les résultats obtenus dans l'activité antioxydante s'accordent avec les résultats recueillis précédemment du test de la teneur en polyphénols où la fraction **F60 :40** a montré la plus grande teneur suivie de la **F40 :60** et enfin de la fraction la moins polaire **F80 :20**.

### 3.3. Activité anticholinestérase

L'activité a été réalisée contre deux enzymes, à savoir l'acétyl et la butyrylcholinestérase, qui sont les principales enzymes de la maladie d'Alzheimer. Dans notre étude, nous avons testé pour cette activité les fractions VLC d'*Abies numidica* **F40 :60**, **F60 :40** et **F80 :20** ainsi que l'extrait hydroéthanolique de *Cedrus atlantica* (EHMCA) tout en effectuant une étude comparative des résultats obtenus.

Contre l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), l'EHMCA a montré la plus forte capacité d'inhibition ( $IC_{50}$ :  $130 \mu\text{g/mL}$ ) comparée à la fraction **F40 :60** ( $IC_{50}$ :  $927.38 \pm 2.41 \mu\text{g/mL}$ ) et à la fraction **F60 :40** ( $IC_{50}$ :  $5816.88 \pm 3.20 \mu\text{g/mL}$ ) d'*Abies numidica*. La fraction **F80 :20** n'a montré aucune activité contre l'AChE. Cependant, l'activité manifestée par l'EHMCA reste bien faible par rapport au standard utilisé, à savoir la galantamine ( $IC_{50}$ :  $5.01 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ ) qui est utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Tableau 33).

**Tableau 33.** Inhibition de l'Acétylcholinestérase par les extraits étudiés

Plantes	Extraits	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>A. numidica</i>	F40:60	927.38± 2.41
	F60:40	5816.88± 3.20
	F80:20	N.A.
<i>C. atlantica</i>	EHMCA	130± 1.2
Standard	Galantamine	5.01 ± 0.10

Dans l'inhibition de la butyrylcholinestérase (BChE), une activité modérée a été observée (tableau 34) surtout pour la fraction **F80 :20** d'*Abies numidica* qui a présenté la meilleure activité inhibitrice de l'enzyme parmi les autres avec une valeur IC<sub>50</sub> de 83.8 ± 0.8 µg / mL suivie des deux fractions **F60 :40** et **F40 :60** dont les résultats étaient assez proches (IC<sub>50</sub>: 176.58±1.30 µg/mL et 187.82±2.10 µg/mL) respectivement et dernière position, l'EHMCA qui a présenté une très faible activité (IC<sub>50</sub>: 1125 µg/mL).

**Tableau34.** Inhibition de l'enzyme butyrylcholinestérase par les extraits testés

Plantes	Fractions	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>A. numidica</i>	F40:60	187.82± 2.10
	F60:40	176.58± 1.30
	F80:20	83.85± 0.84
<i>C. atlantica</i>	EHMCA	1125± 0.67
Standard	Galantamine	53.9 ± 0.56

Les résultats de l'activité anticholinestérase et de l'activité antioxydante étaient différents en ce sens qu'ils étaient incapables de se soutenir mutuellement, comme indiqué dans la littérature (Orhanet et al., 2007). Ici, étant donné qu'elle possédait une puissante activité antioxydante, on s'attendait à ce que la fraction **F60 :40** ait la meilleure activité anticholinestérase. Cependant, la fraction **F80 :20** qui présentait la moindre concentration phénolique et indiquait la moindre activité antioxydante présentait la meilleure activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase. Cela montre que les polyphénols présents dans les fractions étudiées ne sont pas les seuls responsables de l'activité anticholinestérase..

Dans une étude réalisée récemment sur les extraits acétone, acétate d'éthyle et éthanolique des aiguilles et des racines d'*Abies burnmulleriana* et de *Cedrus libani*(Senol et

a., 2015) contre l'activité anticholinestérase et butyrylcholinestérase. Les résultats de l'inhibition de l'AChE étaient entre  $2.93 \pm 0.75\%$  et  $29.31 \pm 0.98\%$  pour *A. burnmulleriana* et entre  $1.91 \pm 0.48\%$  et  $44.07 \pm 0.20\%$  pour les extraits de *C. libani*. Comparé à la galantamine ( $92.72 \pm 0.15\%$ ), l'extrait hydroéthanolique des racines de *C. libani* montre une activité modérée et meilleure que celle de l'extrait hydroéthanolique des cônes de *C. atlantica* testé dans notre étude.

D'autre part, les résultats obtenus dans l'activité inhibitrice de l'enzyme BChE étaient meilleurs que ceux de l'AChE avec des pourcentages entre  $26.26 \pm 2.41\%$  et  $47.77 \pm 1.38\%$  pour les extraits d'*A. burnmulleriana* témoignant d'une meilleure activité contre la BChE par rapport à l'AChE et entre  $21.84 \pm 1.0\%$  et  $67.54 \pm 0.30\%$  pour les extraits de *Cedrus libanici* qui manifestent une meilleure activité inhibitrice de la BChE comparés aux extraits de *C. atlantica* de notre étude et une activité un peu plus proche que celle de la galantamine ( $89.95 \pm 0.87\%$ ) (Senol et al., 2015).

### 3.4. Activité antimicrobienne

#### 3.4.1. Activité antibactérienne des extraits

Dans la littérature, les études antimicrobiennes concernent souvent un nombre limité de souches d'une ou de deux espèces. Dans notre étude, le potentiel antimicrobien des extraits hydroéthanoliques des cônes d'*A. numidica* et de *C. atlantica* a été évalué contre 22 microorganismes incluant les bactéries Gram-positif et Gram-négatif ainsi que les champignons par l'évaluation de la CMI dans des milieux solides et liquide (Tableau 35) ce qui peut nous permettre de découvrir le potentiel antimicrobien des extraits à grande échelle.

➤ **L'extrait hydrométhanique des cônes d'*A. numidica*** : il était actif à différents degrés contre 12 souches bactériennes, en particulier des bactéries Gram-positif. Aucune activité antimicrobienne n'a été observée contre les souches bactériennes Gram-négatif, *Escherichia coli* CIP 54.127, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* et *Providencia stuartii* (Tableau 35).

Cet extrait présentait la meilleure activité antibactérienne contre six microorganismes, à savoir *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* 8325-4, *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, *Micrococcus luteus* et *Listeria innocua* avec des valeurs de CMI sur agar inférieures à 0,3 mg / mL. Les mesures de CMI de l'extrait par des essais de microdilution contre ces six souches bactériennes (Tableau 20) révèlent une très forte activité contre *Bacillus subtilis* (CMI = 62,5 µg/mL) par rapport à *Staphylococcus aureus* 8325-4,

*Micrococcus luteus*, *Listeria innocua* (CMI = 125µg/mL ) et à *Enterococcus faecalis* ATCC 1034 et *Staphylococcus aureus* CIP 53.154 (CMI= 250 µg/mL). Cette activité est très intéressante pour un extrait brut.

➤ **L'extrait hydroéthanolique des cônes de *C. atlantica*** : l'extrait hydrométhanique des cônes de *Cedrus atlantica* était actif à différentes concentrations contre 13 souches, dix d'entre elles sont des bactéries Gram (+) et il n'a présenté aucune activité contre *E.coli* CIP 53-127, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica* 2011, *Serratia marcescens* et *Klebsiella pneumoniae*.

Par ailleurs, l'extrait a manifesté une très bonne activité contre les souches *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus pyogenes* et contre *Shigella sonnei* à Gram (-) avec une CMI inférieure à 0.3 mg/mL. D'autre part, l'extrait a présenté une bonne activité inhibitrice contre la souche *Staphylococcus epidermidis* avec une valeur CMI de 0.62 mg/mL et une activité modérée contre *Staphylococcus aureus* CIP 8325-4, *Staphylococcus aureus* CIP 53-154 et *Listeria innocua* avec une CMI égale à 1.25mg/mL.

L'activité antimicrobienne est considérée forte lorsque la CMI est comprise entre 100 à 500 µg / mL, elle est bonne de 500 à 1000 µg/mL, alors qu'elle est faible lorsque la CMI est > 1000 µg/mL, l'extrait a une activité faible (Holetz et al., 2002). Compte tenu de cette classification, l'extrait hydrométhanologique d'*A. numidica* a une très forte activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis* (CMI = 62,5 µg/mL) et une bonne activité antimicrobienne contre *E. faecalis*, *S. aureus* 8325-4, *S. aureus* CIP 53.154, *M. luteus* Et *L. Innocua* (CMI ≤ 250 µg/mL) alors que l'extrait de *C.atlantica* est très actif contre *Bacillus subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *Streptococcus pyogenes* et *Shigella sonnei* (CMI ≤ 0.3mg/mL) (Tableau 35).

**Tableau 35.** Activité antibactérienne des extraits étudiés (CMI)

Microorganismes	CMI (mg/mL) en milieu solide		CMI (µg/mL) en milieu liquide
	<i>A. numidica</i>	<i>C.atlantica</i>	<i>A. numidica</i>
<b>Bactéries (Gram positif)</b>			
<i>Bacillus subtilis</i>	≤ 0.3	≤ 0.3	62.5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 1034	≤ 0.3	≤ 0.3	250
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325-4	≤ 0.3	1.25	125
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53.154	≤ 0.3	1.25	250
<i>Micrococcus luteus</i>	≤ 0.3	≤ 0.3	125

<i>Listeria innocua</i>	≤ 0.3	1.25	125
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.6	≤ 0.3	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.6	0.62	-
<b>Bacteries (Gram negatif)</b>			
<i>Escherichia coli</i> CIP 54.127	NA <sup>a</sup>	NA	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	NA	NA	-
<i>Salmonella enterica</i>	NA	NA	-
<i>Serratia marcescens</i>	10	10	-
<i>Proteus vulgaris</i>	10	10	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NA	NA	-
<i>Providencia stuartii</i>	NA	10	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10	10	-
<i>Shigella sonnei</i>	10	≤ 0.3	-

<sup>a</sup>NA : Non Actif

### 3.4.2. Activité antifongique des extraits

L'activité antifongique *in vitro* a également été testée contre *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* et *Candida albicans*.

- **L'extrait hydroéthanolique d'*A. numidica*** était uniquement actif contre les levures *Candida* en milieu solide. Les meilleurs résultats ont été obtenus contre *Candida glabrata* avec 5mg/mL de valeur de CMI et était moins actif contre *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* et *Candida albicans* avec 10 mg/mL de valeur de CMI (Tableau 36).
- **L'extrait hydroéthanolique de *C. atlantica*** a montré d'activité qu'avec *C. glabrata* (CMI= 1.25 mg/mL).

**Tableau 36.** Activité antifongique des extraits étudiés (CMI)

Les levures	MIC (mg/mL) en milieu solide	
	<i>A. numidica</i>	<i>C. atlantica</i>
<i>Candida glabrata</i>	5	1.25
<i>Candida tropicalis</i>	10	NA
<i>Candida kefyr</i>	10	NA
<i>Candida albicans</i>	10	NA
<i>Cryptococcus neoformans</i>	NA <sup>a</sup>	NA

<sup>a</sup>NA : Non Actif

### 3.4.3. Activité antibactérienne des produits isolés

➤ **Les composés isolés d'*A. numidica*** : Pour identifier les composés ayant une activité antibactérienne dans l'extrait hydroéthanolique, un test de bioautographie a été effectué contre *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, l'un des microorganismes les plus sensibles. La bioautographie a montré que l'acide 7 $\alpha$ -hydroxydehydroabietique(**A4**) était le composé le plus actif et indiquait une moindre activité pour l'acide 7 $\alpha$ , 15-dihydroxy-8, 11, 13-abietatriene-18-oïque(**A1**), acide 15-hydroxydehydroabietique (**A2**), acide 15-hydroxy-7oxo-8, 11, 13-abietatrien-18 oïque(**A3**), abiesadine O (**A6**) et 4-hydroxy-18-nor-8,11, 13-abietatrien-7-one (**A7**) (Tableau 37). Par conséquent, ces composés ont été testés séparément en milieu liquide contre *S. aureus* CIP53-154, *L. innocua* et *E. Faecalis* ATCC1034 (Tableau 22). En accord avec les résultats de la bioautographie, les composés **A4** et **A6** ont montré la plus grande activité contre *S. aureus* et *L. innocua* (MIC = 62,5  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ), qui est très proche des CMI des antibiotiques. Cependant Ils étaient moins actifs contre *E. faecalis* (CMI = 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

D'autre part, le composé **A1** présentait une activité trop élevée contre *L. innocua* (CMI = 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et une bonne activité contre *S. aureus* et *E. faecalis* (CMI = 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

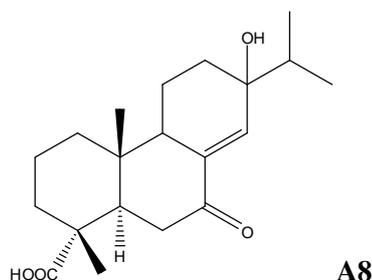
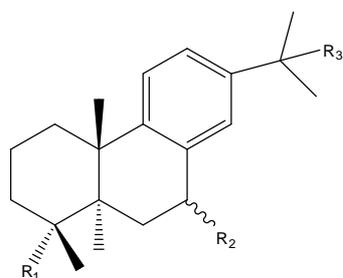
Les composés **A2**, **A3** et **A7**présentaient une activité modérée avec des CMI comprises entre 125 et 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  et les composés 7-oxodehydroabietinol(**A5**)et l'acide 13 $\beta$ -hydroxy-7oxo-8(14)-abieten-18-oïque(**A8**)ne présentaient aucune activité.

Ces résultats suggèrent que la présence du groupe hydroxyle en position 7 $\alpha$  (**A1**, **A4**, **A6**) peut augmenter l'activité antimicrobienne des dérivés d'acide déshydroabiétique par rapport à un groupe cétonique (**A2**, **A3**, **A5**, **A7**), comme l'ont observé Gouiric et al. (2004). D'autre part, un groupe carboxyle en position C-18 dans des dérivés d'acide déshydroabiétique semble être plus sélectif vis-à-vis de l'activité antibactérienne (Figure 243).

**Tableau37.** Activité antibactérienne des composés isolés d'*A. numidica*

Composés	Bioautographie	CMI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	<i>S. aureus</i> CIP 53.154	<i>S. aureus</i> CIP 53.154	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i> ATCC 1034
<b>A1</b>	+++	125	62.5	125
<b>A2</b>	+++	125	125	125
<b>A3</b>	++	250	125	250
<b>A4</b>	++++	62.5	62.5	125

<b>A5</b>	-	-	-	-
<b>A6</b>	+++	62.5	62.5	125
<b>A7</b>	+	250	125	500
<b>A8</b>	-	-	-	-



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>A1</b>	COOH	α-OH	OH
<b>A2</b>	COOH	H	OH
<b>A3</b>	COOH	=O	OH
<b>A4</b>	COOH	α-OH	H
<b>A5</b>	CH <sub>2</sub> OH	=O	OH
<b>A6</b>	COOH	α-OH	OMe
<b>A7</b>	OH	=O	H

**Figure 243.** Les composés isolés d'*Abies numidica* testés en activité antibactérienne

➤ **Les composés isolés de *C. atlantica*** : Les composés isolés de *Cedrus* ont été à leur tour testés contre *S. aureus* CIP 53.154 en bioautographie en premier lieu et contre *E. faecalis* ATCC 1034, *S. aureus* CIP 53.154, *E. coli* CIP 54.127, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa* ATCC 9027 en milieu liquide pour déterminer leurs CMI. Les résultats, donnés dans le tableau 23, ont montré une activité anti-staphylococcale pour tous les composés. Les diterpènes abietane **C10-C15**, **C17**, **C18**, **C19** et **C21** ont révélé une forte activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zones d'inhibition supérieur à 1,5 cm.

Parallèlement, pour mesurer la CMI des composés actifs, une méthode de dilution en série a été utilisée contre trois bactéries Gram-positif (*Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* CIP 53.154 et *Staphylococcus epidermidis*) et deux bactéries Gram-négatif (*Escherichia coli* CIP 54.127 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Les CMI variaient de 15,1 µg/mL à la concentration limite de 500 µg/mL. Les résultats obtenus sont en

accord avec ceux de la bioautographie, les composés dont les zones d'inhibition sont supérieures à 1,5 cm en bioautographie affichent clairement des valeurs de CMI plus faibles que les autres. L'acide déhydroabietique (**C14**) a été considéré comme étant le composé le plus actif ayant la valeur de CMI la plus faible (15,1 µg/ml) contre *E. faecalis* ATCC 1034 (résistante aux deux antibiotiques testés), une bactérie commensale résistante aux amputés qui peut causer des infections mortelles chez l'homme. Les résultats présentent cette souche comme la plus sensible parmi les cinq bactéries testées. Les abietanedièterpènes : Abiesadine L (**C11**), abiesadine Q(**C12**), abiesadine R(**C13**), pomiférine A (**C18**) et 8,11,13-abietatriène-7 $\alpha$ , 18-diol(**C19**) présentaient une activité antibactérienne plus importante que les autres composés avec des CMI comprises entre 31,2 et 250 µg/mL. A partir de laquelle l'abiesadine R (**C13**) était le composé le plus actif contre *S. epidermidis* (MIC = 31,2 µg / mL) et *P. aeruginosa* ATCC 9027 (CMI = 62,5 µg/mL). Selon le tableau 38, dans vingt et un cas, on a obtenu une forte activité antibactérienne (CMI = 15,1 à 62,5 µg/mL) qui est très proche des CMI des antibiotiques. En comparant l'activité de l'acide déhydroabietique(**C14**) avec celles de l'acide 12-hydroxydéhydroabietique (**C15**) et l'acide 7-oxodéhydroabiétique (**C17**), on remarque que la présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire sur le cycle aromatique en position C-12 (**C15**) diminue l'activité plus qu'un groupe cétone en position C-6 (**C17**)(Figure 244). Les dérivés d'acide tocotrienolique : l'acide 11E-15E-19E-9-(2,8-diméthyl-5-méthoxy-chroman-6-ol)-12,16,20-triméthyl-11,15,19-tridécatrienolique (**C1**) et l'acide  $\gamma$ -garcinoïque (**C2**) ont été modérément actifs contre les cinq bactéries testées avec des CMI allant de 62 à 500 µg/mL. Cette activité est plus contre les bactéries Gram-positif (Tableau 38).

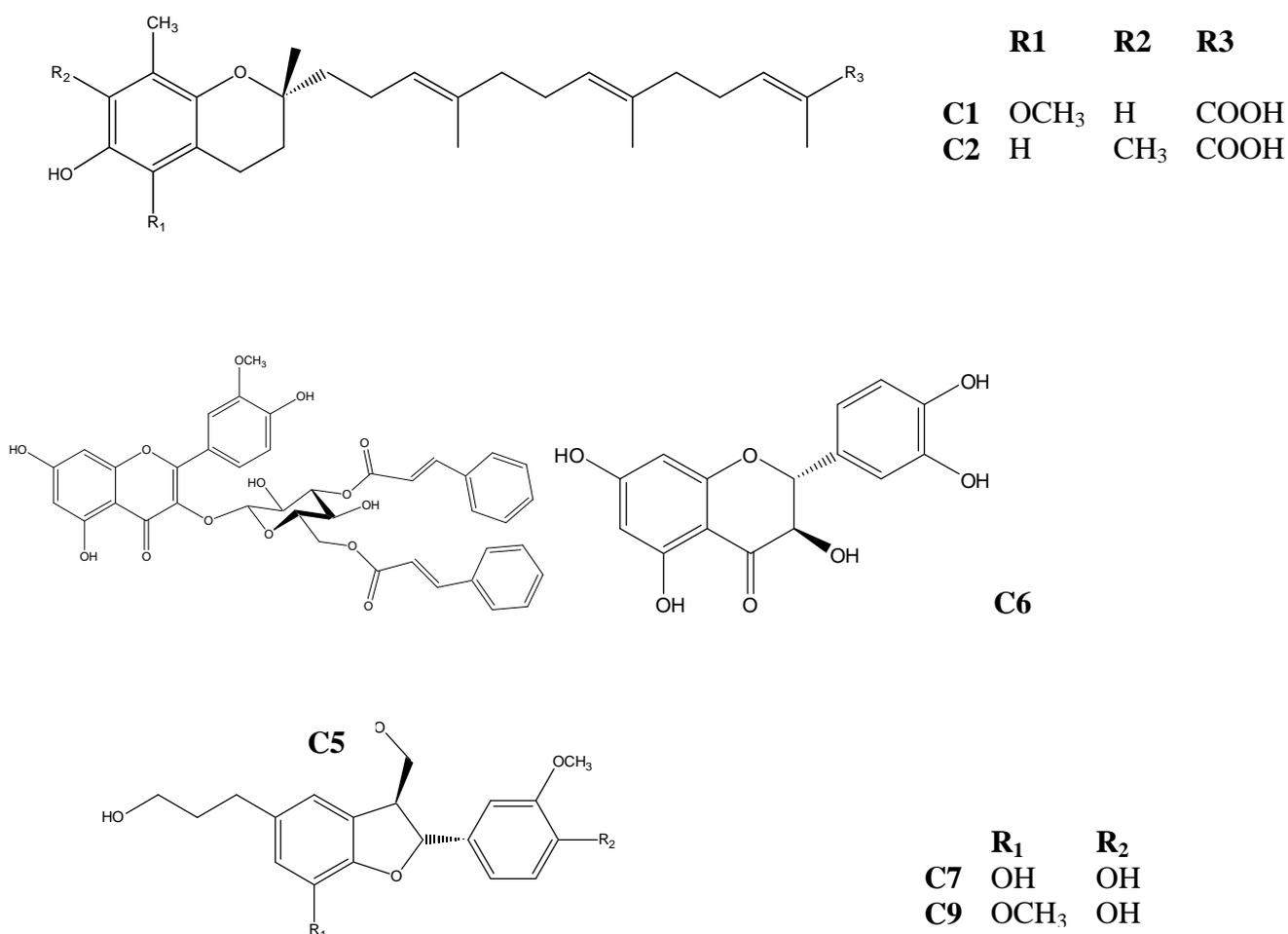
**Tableau 38.** CMI des produits isolés de *Cedrus atlantica*.

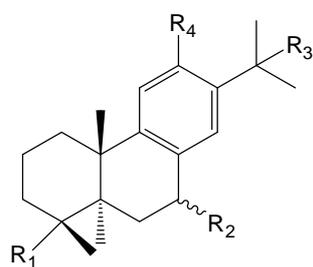
Composés	Bioautography contre <i>S. aureus</i> CIP 53.154	CMI (µg/ml)				
		<i>E. faecalis</i> ATCC C 1034	<i>S. aureus</i> CIP 53.154	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i> CIP 54.127	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
<b>C1</b>	++	125	125	250	500	500
<b>C2</b>	+++	62.5	125	125	250	125
<b>C5</b>	++	250	250	62.5	250	125
<b>C6</b>	+++	125	250	250	250	250
<b>C7</b>	++	125	125	62.5	250	250
<b>C8</b>	+	250	250	500	NA	NA
<b>C10</b>	+++	62.5	62.5	125	250	250

<b>C11</b>	++++	31.2	31.2	250	250	250
<b>C12</b>	++++	31.2	62.5	125	125	250
<b>C13</b>	+++	62.5	125	31.2	125	62.5
<b>C14</b>	++++	15.1	31.2	125	125	125
<b>C15</b>	+++	62.5	125	250	250	250
<b>C17</b>	++++	62.5	62.5	125	125	250
<b>C18</b>	++++	31.2	31.2	125	250	250
<b>C19</b>	++++	31.2	62.5	125	250	125
<b>C21</b>	++	500	250	NA	NA	NA
<b>Gentamycine</b>	++	R	S	S	S	S
<b>Vencomycine</b>	NT	R	S	S	R	R

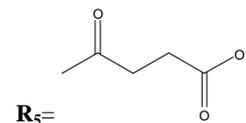
(+): effect significatif, de + (0.5 cm zone d'inhibition) à ++++ (> 1.5 cm zone d'inhibition);

NA: Non actif; NT: non testé; R: resistant; S: sensible





	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>
<b>C10</b>	CH <sub>2</sub> OR <sub>5</sub>	α-OH	H	H
<b>C11</b>	CH <sub>2</sub> OR <sub>5</sub>	α-OH	OH	H
<b>C12</b>	CH <sub>2</sub> OR <sub>5</sub>	= O	OH	H
<b>C13</b>	CH <sub>2</sub> OR <sub>5</sub>	= O	H	H
<b>C14</b>	COOH	H	H	H
<b>C15</b>	COOH	H	H	OH
<b>C16</b>	COOH	α-OH	OH	H
<b>C17</b>	COOH	= O	H	H
<b>C18</b>	CH <sub>2</sub> OH	H	H	H
<b>C19</b>	CH <sub>2</sub> OH	α-OH	H	H
<b>C20</b>	CH <sub>2</sub> OH	=O	H	H
<b>C21</b>	CH <sub>3</sub>	α-OH	H	H



**Figure 244.** Les composés isolés de *Cedrus atlantica* testés en activité antibactérienne.

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

L'étude phytochimique des cônes d'*Abies numidica* de Lannoy et de *Cedrus atlantica* (Endl) Manetti a permis l'extraction de **29** composés au total. La détermination structurale a été réalisée par les méthodes spectroscopiques de RMN mono et bi-dimensionnelle, par la spectrométrie de masse (ESIMS et HRESIMS) ainsi que par la comparaison avec les données de la littérature.

- Huit composés diterpéniques de squelette abiétane déjà identifiés dans le genre *Abies* ont été isolés des cônes d'*Abies numidica* :
  - **Acide 7 $\alpha$ , 15-dihydroxy-8, 11,13- abietatrien-18-oïque (Acide 7 $\alpha$ , 15-dihydroxydehydroabietique)**
  - **Acide 15-hydroxydehydroabietique**
  - **Acide 15-hydroxy-7-oxo- 8, 11,13-abietatrien-18-oïque**
  - **Acide 7 $\alpha$ - hydroxydehydroabietique**
  - **7-oxodehydroabietinol**
  - **Abiesadine O (Acide 7 $\alpha$ -hydroxy-15-methoxy-dehydroabietique)**
  - **4-hydroxy-18-nor-8,11, 13-abietatriene-7-one**
  - **Acide 13 $\beta$ -hydroxy-7oxo-8, 14-abieten-18-oïque**
  
- Vingt et un composés ont été isolés des cônes de *Cedrus atlantica* comprenant :
  - Trois acides tocotrienoliques :
    - ✚ **Acide cedratlantique (Acide 11E-15E-19E-9-(2,8-diméthyl-5-méthoxy-chroman-6-ol)-12, 16, 20-triméthyl-11, 15, 19-tridécatrienoïque)** (nouvelle molécule)
    - ✚ **Acide  $\gamma$ -garcinoïque** (Isolé pour la première fois dans la famille Pinaceae)
    - ✚  **$\delta$ -(E)- deoxy- amplexichromanol**(isolé pour la première fois dans la famille des Pinaceae)
  
  - Trois flavonoides:
    - ✚ **Cedratlanticoside (Isorhamnetin (3,6-O-di-E-cinnamoyl)-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside)** (nouvelle molécule)
    - ✚ **Daglesioside IV** (isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
    - ✚ **(+) taxifoline**

- Trois néolignanes :
  - ✚ **ent-Cedrusine**
  - ✚ **(7R, 8S)-Dihydrodehydrodiconiférol**
  - ✚ **Isomassonianoside B** (isolé pour la première du genre *Cedrus*)
  
- Douze composés diterpéniques déjà identifiés dans la famille Pinaceae:
  - ✚ **Abiesadine F** (isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
  - ✚ **Abiesadine L** (isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
  - ✚ **Abiesadine Q**(isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
  - ✚ **Abiesadine R**(isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
  - ✚ **Acide déhydroabietique**
  - ✚ **Acide12-hydroxydehydroabietique**(isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
  - ✚ **Acide 7 $\alpha$ , 15-dihydroxy-8,11,13-abietatrien-18-oïque**(isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
  - ✚ **Acide 7-oxodehydroabiétique**
  - ✚ **Pomiferine A**
  - ✚ **8,11,13-abietatriene-7 $\alpha$ , 18-diol**
  - ✚ **7-oxodehydroabietinol** (isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
  - ✚ **abieta-8,11,13-triène-7 $\alpha$ -ol** (isolé pour la première fois du genre *Cedrus*)
  
- L'activité antioxydante des fractions de l'extrait hydroéthanolique des cônes d'*Abies numidica* a été déterminée par le test de l'ABTS<sup>•+</sup>, le blanchissement du  $\beta$ -carotène et le test de réduction CUPRAC. Les fraction ont montré une très bonne inhibition de l'ABTS<sup>•+</sup> en particulier la fraction **F60 :40** comparée aux résultats obtenus dans la réduction de CUPRAC et le blanchissement du  $\beta$ -carotène où les fractions ont montré la plus faible activité.
  
- L'activité anticholinestérase des fractions d'*Abies numidica* et de l'extrait hydroéthanolique de *Cedrus atlantica* été réalisée contre deux enzymes,l'acétyl- et la butyrylcholinestérase. Les résultats obtenus contre l'acétylcholinestérase montrent que l'extrait de *Cedrus* est plus actif que les fractions d'*Abies* mais qui reste tout de même faible comparé a celle du standard utilisé, par contre la fraction **F80 :20** a montré une forte

inhibition de la butyrylcholinestérase suivie par les deux fractions **F60 :40** et **F40 :60** et enfin l'extrait hydroéthanolique des cônes de *Cedrus*.

- Les extraits d'*Abies* et de *Cedrus* ont montré une très bonne activité antibactérienne contre des souches majoritairement à Gram (+) à savoir, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* 8325-4, *Staphylococcus aureus* CIP 53.154, *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua* et *Streptococcus pyogenes*. avec des valeurs de CMI sur agar inférieure à 0,3 mg / mL. La meilleure inhibition antifongique des deux extraits a été révélée contre *Candida glabrata*.
- L'activité antibactérienne des composés isolés diterpéniques isolés des cônes d'*Abies numidica* a été évaluée par la méthode de la bioautographie suivie du test de la détermination de la CMI en milieux solide et liquide contre *S. aureus*, *L. innocua* et *E. faecalis*. Les résultats obtenus ont montré que l'acide 7 $\alpha$ -hydroxydehydroabietique (**A4**), abiesadine O (**A6**) et l'acide 7 $\alpha$ , 15-dihydroxy-8, 11,13-abietatrien-18-oïque (**A1**) sont très actifs, alors que l'acide 15-hydroxydehydroabietique (**A8**) et le 7-oxodehydroabietinol (**A5**) n'ont manifesté aucune activité antibactérienne.
- Avec la même méthode, les composés diterpéniques isolés de *Cedrus atlantica* (**C10-C20**) étaient les composés les plus actifs. L'abiesadine L (**C11**) et l'acide déhydroabietique (**C14**) ont manifesté une très forte activité contre *E. faecalis* ATCC 1034 et *S. aureus* CIP 53.154 alors que l'abiesadine Q (**C12**) a présenté la plus grande inhibition contre *S. epidermidis* et *P. aeruginosa* ATCC 9027.

# **Références bibliographiques**

Abdel-Shafeek KA., El-Menssiry M M., Shahat A A., Apers S., Peters L., El-Nasr M., 2000. A new acylated flavonol triglycoside from *Carrichtera annua*. *J. Nat. Prod.*, 63, 845-847.

Agrawal PK., Agrawal SK., Rastogi RP., 1980a. A new neolignan and other phenolic constituents from *Cedrus deodara*. *Phytochemistry*, 19, 1260-1261.

Agrawal PK., Agrawal SK., Rastogi RP., 1980b. Dihydroflavonols from *Cedrus deodara*. *Phytochemistry*, 19, 893-896

Agrawal PK., Agrawal SK., Rastogi RP., Osterdahal, BG., 1981. Dihydroflavonols from *Cedrus deodara*, A <sup>13</sup>C NMR study. *Plantamedica*, 43, 82-85.

Agrawal PK., Rastogi RP., 1982. Two lignans from *Cedrus deodara*. *Phytochemistry*, 21, 1459 -1461.

Agrawal PK., Rastogi RP., 1981. Terpenoids from *Cedrus deodara*. *Phytochemistry*, 20, 1319-1321.

Ahmad R., Srivastava PS., Maurya R., Rajendran SM., Aryan KR., Srivastava AK. 2008. Mild antihyperglycaemic activity in *Eclipta alba*, *Berberis aristata*, *Betula utilis*, *Cedrus deodara*, *Myristica fragrans* and *Terminalia chebula* Indian. *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 5, 1-6.

Allegrini J., Simmeon de Buochberg M., Billot A., 1973. Emulsions d'huiles essentielles, fabrication et application en microbiologie. *Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier*, 33, 73-86.

Allen FH., Kutney JP., Trotter J., Westcott ND., 1971. The structures and absolute stereochemistry of cyclograndisolid and epicyclograndisolid, novel triterpene lactones from *Abies grandis*. *Tetrahedron Lett.*, 12, 283-286.

Alsabil K., Suor-Cherer S., Koeberle A., Viault G., Lavaud A., Temml V., Waltenberger B., Schuster D., Litaudon M., Lorkowski S., de Vaumas R., Helesbeux J J., Guilet D., Stuppner H., Werz O., Seraphin D., Richomme P., 2016. Semisynthetic and Natural Garcinoic Acid Isoforms as New mPGES-1 Inhibitors. *Planta Medica*, 82, 1110-1116.

Amieva H., Andrieu S., Berr C., Buée L., Checler F., Clément S., Dartigues JF., 2007. *Maladie d'Alzheimer: enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux*. Paris Institut National de la Santé et de la Recherche Médical.

Antolovich M., Prenzler PD., Patsalides E., McDonald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.

Aoyama M., Doi S., 1992. Antifungal activities of wood extractives of todomatsu, *Abies sachalinensis* Masters, against pathogenic fungi causing turfgrass diseases. *Mokuzai Gakkaishi*, 38, 101-105.

Apak R., Guclu K., Owyurek M., Karademir SE., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970-7981.

Atta-ur-Rahman KF., Nighat F., Shabbir M., Hemalal KD., Tillerkerante LM., 1998. Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. *Phytochemistry*, 48, 377 – 383.

Avcibash H., Anil H., Toprak M., 1987. Four terpenoids from *Cedrus atlantica*. *Phytochemistry*, 10, 2852-2854.

Avcibash H., Anil H., Toprak M., 1988. Terpene acids from *Cedrus libani*. *Phytochemistry*, 27, 3967-3968.

Awad E., Awaad AS., Esteban MA., 2015. Effects of dihydroquercetin obtained from deodar (*Cedrus deodara*) on immune status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *fish shellfish immun.*, 43, 43-50.

Bagci E., Digrak M., 1991. Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* species from Turkey. *Flavour Frag. J.*, 11, 251-256.

Barrero AF., Alvarez-Manzaneda EJ., Alvarez-Manzaneda R., Chahboun R., Mencses R., Marta Aparicio B., 1999. Ring a functionalization of terpenoids by the unusual Baeyer-Villiger rearrangement of aliphatic aldehydes. *Synlett.*, 6, 713-716.

Barrero AF., Haidour A., Dorado MM., Cuerva JM., 1996. Two sesquignans from the wood of *Abies marocana*. *Phytochemistry*, 41, 605-609.

Barrero AF., Quilez del Moral JF., Mar Herrador M., Arteaga JF., Akssira M., Benharref A., Dakir M., 2005. Abietane diterpenes from the cones of *Cedrus atlantica*. *Phytochemistry*, 66, 105-111.

Barrero AF., Sanchez JF., Alvarez-Manzaneda EJ., Dorado MM., 1989. *Phytochemistry*, 28, 2617.

Barrero AF., Sanchez JF., Alvarez-Manzaneda EJ., Dorado MM., Haidour A., 1991. Diterpenoids endoperoxyde et d'autres constituants d'*Abies marocana*. *Phytochemistry*, 30, 593-597.

Barrero AF., Sanchez JF., Alvarez-Manzaneda EJ., Dorado MM., Haidour A., 1994. Terpenoids of the wood of *Abies marocana*. *Phytochemistry*, 35, 1271-1274.

Barrero AF., Sanchez JF., Alvarez-Manzaneda EJ., Dorado MM., Hirose Y., 1993. Terpenoids and sterols from the wood of *Abies pinsapo*. *Phytochemistry*, 32, 1261-1265.

Barrero AF., Sanchez JF., Alvarez-Manzaneda EJ., Munoz M., Haidour A., 1992. Diterpenoids and cyclolanostanolides from *Abies marocana*. *Phytochemistry*, 31, 615-620.

Bartosz G. 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.

Bauer A., 1966. W. and others Antibiotic susceptibility testing by standardised single disc method. *Am. J. Clin. Pathol*, 45, 493.

Benkovic TE., Grohar T., Zigon D., Svajger U., Janes D., Kreft S., Strukelj B., 2015. Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol and its antioxidant activity. *Ind. Crops. Prod.*, 52, 23–28.

Bhakuni DS., Dhar ML., Dhar MM., Dhawan BN., Gupta B., Srimal RC., 1971. Screening of Indian plants for biological activity. *Indian J. Exp. Biol.*, 9, 91-102.

Blois MS., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

Boudarene L., Baaliouamer A., Meklati BY., Scharff C., 2004. Chemical composition of the *Cedrus atlantica* (ENDL.) manetti ex carrière seeds essential oil in function of their germination stages. *J Essent Oil Res*, 16, 61-63.

Bowers WS., Fales HM., Thompson MJ., Uebel EC., 1996. Juvenile hormone: identification of an active compound from *balsam fir*. *Science*, 154, 1020-1021.

Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technology*, 28, 25-30.

Burda S., Oleszek W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774-2779.

Burnichon N., Texier A., 2003. L'antibiogramme: La détermination de la sensibilité aux antibiotiques. DES bactériologie.

Carbannelle B., 1988. Bactériologie médicale, techniques usuelles. Paris, 330.

Chatterjee A., Kotoky J., Das KK., Banerji J., Chakraborty T., 1984. Abiesin, A biflavonoid of *Abies webbiana*. *Phytochemistry*, 23, 704-705.

Chaudhary A., Sood S., Kaur P., Kumar N., Thakur A., Gulati A., Singh B., 2012. Antifungal Sesquiterpenes from *Cedrus deodara*. *Plant Med.*, 78, 186–188.

Cheung HTA., Miyase T., Lenguyen MP., Smal MA., 1993. Further acidic constituents and neutral components of *pinus massoniana* Resin. *Tetrahedron*, 49, 7903–7915.

Collins., Lync., 1976. Microbiological methods. 4<sup>th</sup> edition, 234-247.

Conner AH., Nagasampagi BA., Rowe JW., 1980. Terpenoid and other extractives of western white *Pine* bark. *Phytochemistry*, 19, 1121-1131.

Crowden RK., Grubb MJ., 1971. Anthocyanins from five species of the podocarpaceae. *Phytochemistry*, 10, 2821-2822.

Dall'Acqua S., Minesso P., Babu Shresta B., Comai S., Jha P.K., Gewali M.B., Greco E., Cervellati R., Innocenti G., 2012. Phytochemical and Antioxidant-Related Investigations on Bark of *Abies spectabilis* (D. Don) Spach. Nepal. *Molecules*, 17, 1686-1697.

Dayal B., Purohit R.M., 1971. Screening of some Indian essential oils for their antifungal activity. *The flavor industry*, 2, 484-485.

Decker EA., Welch B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 674-677.

Dhayabaran D., Jeyaseeli FE., Nanda K., Puratchikody A., 2010. Anxiolytic and anticonvulsant activity of alcoholic extract of heart wood of *Cedrus deodara* Roxb. in rodents. *J. Med. Plant. Res.*, 4, 1374-1381.

Dıgrak M., Ilcim A., Alma M.H., 1999. Antimicrobial activities of several parts of *Pinus brutia*, *Juniperus oxycedrus*, *Abies cilicica*, *Cedrus libani* and *Pinus nigra*. *Phytother. Res.*, 13, 584-587.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97, 654-660.

Dorman HJD., Deans SG., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Applied Microbiol.*, 88, 308-316.

Drotleff AM., Ternes W., 2001. Determination of RS. E/Z-tocotrienols by HPLC. *J. Chromatogr. A.*, 909, 215–223.

Ducrey M., Oswald H., 1990. Séminaire international: Sapins méditerranéens. Avignon : I.U.F.R.O et C.I.H.E.A.M. 18.

Dykes L., Rooney LW., 2006. Sorghum and millet phenols and antioxidants, *Rev. J. Cereal. Sci.*, 44, 236–251.

Elman GL., Courtney KD., Andres V., Featherston RM., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.

Emberger L., 1998. Contribution à la connaissance des Cèdres et en particulier du Deodora et de Cèdre de l'Atlas. *Bol. SEA.*, 24, 107.

Ericsson HM., Sherris JC., 1971. Antibiotic sensitivity testing. *Acta Pathol. Microbial, Scand., suppl.*, 217.

Farjon A., 1990. Pinaceae, Drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany.

Farjon A., 2001. Word checklist and bibliography of Conifers . 2<sup>nd</sup>. Ed. Kew, Royal botanical garden.

Farjon A., 2010. A handbook of the world's conifers. Leiden, Brill academic publishers.

Favier A., 2003. Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-111.

Fraga BM., Mestres T., Diaz CE., Arteaga JM., 1994. Dehydroabietane diterpenes from *Nepeta teydea*. *Phytochemistry*, 35, 1509-1512.

Frankis MP., 1989. Generic inter-relationships in Pinaceae. Notes from the Royal Botanic Garden. *Edinburgh*, 45, 527-548

Fujita T., Sezik E., Tabata M., Yesilada E., Honda G., Takeda Y., Tanaka., T, Takaishi Y., 1995. Traditional Medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and West Black sea regions. *Econ. Bot.*, 49, 406-422.

Fukuyama Y., Nakahara M., Minami H., Kodama M., 1996. Two new benzofuran-type lignans from the wood of *Viburnum awabuki*. *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 1418-1420.

Gardès-Albert M., Bonne font-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité Chimique*, 91-95.

Georges P., Legault J., Lavoie S., Grenon C., Pichette A., 2012. Diterpenoids from the buds from *Pinus banksiana* Lamb. *Molécules*, 17, 9716-9727.

Ghafouri R., Satrani B., Zair T., Ghanmi M., Bou-Idra M., El Omari M., Bentayeb A., 2015. *Inter J Recent Advances in Multidisciplinary Res*, 2, 993.

Gonzalez-Gross M., Marcos A., Pietrzik K., 2001. Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *Br J Nutr.*, 86, 313-321.

Gouiric SC., Feresin GE., Tapia AA., Rossomando PC., Schmeda-Hirschmann G., Bustos DA., 2004. 1 $\beta$ ,7 $\beta$ - Dihydroxydehydroabietic acid, a new biotransformation product of dehydroabietic acid by *Aspergillus niger*. *World J Microbiol Biotech.*, 20, 281–284.

Gromova AS., Lutskii VI., Tyukavkina NA., 1977. Phenolic acids of the phloem of *Abies nephrolepis*, *Pinus sibirica* and *P. sylvestris*. *Chem. Nat. Compd.*, 13, 237-238.

Gupta D., Bhardwaj R., Gupta R K., 2011. *In Vitro* Antioxidant Activity of Extracts from the Leaves of *Abies Pindrow* Royle. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern Med.*, 8, 391–397.

Gupta RK., Kesari AN., Murthy PS., Chandra R., Tandon V., Watal G., 2005. Hypoglycemic and hypoglycemic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.*, 99, 75-81.

Halliwel B., 1995. Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49, 1341–1348.

Halliwel B., Gutteridge JMC., 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. Clarendon Press, Oxford.

Halliwel B., Gutteridge JMC., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.*, 18, 125–126.

Hammer KA., Carson CF., Riley TV., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 985–990.

Hart JA., 1987. A cladistic analysis of conifers: preliminary results. *J. Arnold Arbor.*, 68, 269-307.

Hasegawa S., Kaneko N., Hirose Y., 1987a. Triterpenes from the seed of *Abies firma*. *Phytochemistry*, 26, 1095-1099.

Hasegawa S., Miura T., Hirose Y., Iitaka Y., 1985. A new rearranged lanostanoid, mariesiic acid A from the seed of *Abies mariesii*. *Chem. Lett.*, 1589-1592.

Hasegawa S., Miura T., Kaneko N., Hirose Y., Iitaka Y., 1987b. Further new rearranged lanostanoids from the seeds of *Abies mariesii* and *A. firma*. *Tetrahedron*, 43, 1775-1784.

He WJ., Fu ZH., Han HJ., Yan H., Zeng GZ., Ji CJ., Chu HB., Zhang YM., Tan NH., 2011. Benzoic acid allopyranosides and lignin glycosides from the twigs of *Keteleeria evelyniana*. *Z. Naturforsch*, 66b, 733-739.

Holetz FB., Pessini GL., Sanches NR., Cortez DAG., Nakamura CV., Filho BPD., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Me. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 97, 1027–1031.

Hosny M., Rosazza JPN., 1998. Gmelinosides A – L, twelve acylated iridoid glycosides from *Gmelina arborea*. *Phytochemistry*, 47, 845–850.

Howes MJR., Perry NSL., Houghton PJ., 2003. Plants with traditional uses and activities relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders, *Phytother. Res.*, 17, 1-18.

Kalyoncu F., Cetin B., Saglam H., 2006. Antimicrobial activity of common madder (*Rubia tinctorum* L.). *Phytother. Res.*, 20, 490-492.

Kaneko N., Hasegawa S., Hirose Y., 1985. Terpenoids from seeds of *Abies firma*. *Phytochemistry*, 24, 185-186.

Karkabounas S., Assimakopoulos D., Malamas M., Skaltsounis AL., Leonce S., Zelovitis J., Stefanou D., Evangelou A., 2000. Antiproliferative and anticarcinogenic effects of an aqueous preparation of *Abies alba* and *Viscum album se abies*, on a L-1210 malignant cell line and tumor-bearing Wistar rats. *Anticancer Res.*, 20, 4391-4395.

Khan VA., Pentegova VA., 1988. Volatile components of the oleoresin of *Abies alba*. *Chem. Nat. Compd.*, 24, 162-166.

Khan VA., Tkachev AV., Pentegova VA., 1988. New sesquiterpenoids from the oleoresin of *Abies alba*. *Chem. Nat. Compd.*, 24, 606-611.

Kim HJ., Choi EH., Lee IS., 2004. Two lanostane triterpenoids from *Abies koreana*. *Phytochemistry*, 65, 2545-2549.

Kim HJ., Le QK., Lee MH., Kim TS., Lee HK., Kim YH., Bae K., Lee IS., 2001. A cytotoxic secocycloartenoid from *Abies koreana*. *Arch. Pharm. Res.*, 24, 527-531.

Kim TH., Ito H., Hayashi K., Hasegawa T., Machiguchi T., Yoshida T., 2005. Aromatic constituents from the *Santalum album* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 641-644.

Kim YG., Lee H., Ozawa S., Sasaya T., Moon C K., 1994. Lignans of *Abies koreana* Wilson. *Mokuzai Gakkaishi*, 40, 414-418.

Kinouchi Y., Ohtsu H., Tokuda H., Nishino H., Matsunaga S., Tanaka R., 2000. Potential antitumor-promoting diterpenoids from the stem bark of *Picea glehni*. *J. Nat. Prod.*, 63, 817-820.

Kizil M., Kizil G., Yavuz M., Aytakin Ç., 2002. Antimicrobial activity of resins obtained from the roots and stems of *Cedrus libani* and *Abies Cilicia*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38, 144-146.

Kosuge T., Yokota M., Sugiyama K., Mure T., Yamazawa H., Yamamoto T., 1985. Studies on bioactive substances in crude drugs used for arthritic diseases in traditional Chinese medicine, III. Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 5355-5357.

Krauze-Baranowska M., Sowiński P., Kawiak A., Spazak B., 2013. Flavonoids from *Pseudotsuga menziesii*. *Z. Naturforsch.*, 68 c, 87 – 96.

Kumar V., Singh RK., Jaiswal AK., Bhattacharya SK., Acharya SB., 2000. Anxiolytic activity of Indian *Abies pindraw* royle leaves in rodents: an experimental study. *Indian J. Exp. Biol.*, 38, 343-346.

Kuroyanagi M., Sugiyama K., Kanazawa M., Kawahara N., 2000. Novel A-seco-rearranged lanostane triterpenoids from *Abies sachalinensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 1917-1920.

Kutney JP., Grierson DS., Knowles GD., Westcott ND., Rogers IH., 1973. Studies on constituents of *Abies grandis*: The structures and absolute stereochemistry of

cyclograndisolid and epicyclograndisolid, novel cyclopropane triterpene lactones. *Tetrahedron*, 29, 13-20.

Lavaud A., Richomme P., Gatto J., Aumond MC., Poullain C., Litaudon M., Andriantsitohaina R., Guilet D., 2015. A tocotrienol series with an oxidative terminal prenyl unit from *Garcinia amplexicaulis*. *Phytochemistry*, 109, 103–110.

Lee CK., Fang JM., Cheng YS., 1994. Abietanes from leaves of *Juniperus chinensis*. *Phytochemistry*, 35, 983-986.

Lee CK., Fang JM., Cheng YS., 1995. Norditerpenes from *Juniperus chinensis*. *Phytochemistry*, 39, 391–394.

Leibyuk TV., Shevtsov SA., Raldugin VA., 1991. Triterpenoids from *Abies* species X. Two new 3,4-secotriterpene acids from the oleoresin of the silver fir. *Chem. Nat. Compd.*, 26, 651-655.

Leont'eva VG., Modonova LD., Tyukavkina NA., 1975. Lignans from *Abies nephrolepis* and *picea ajanensis*. *Chem. Nat. Compd.*, 9, 252-253.

Leont'eva VG., Modonova LD., Tyukavkina NA., Puntusova EG., 1977. O-acetylated lignans from the wood of *Abies* species. *Chem. Nat. Compd.*, 13, 288-290.

Li YL., Gao YX., Jin HZ., Shan L., Liang XS., Xu XK., Yang XW., Wang N., Steinmetz A., Chen Z., Zhang W D., 2014. Chemical Constituents of *Abies nukiangensis*. *Phytochemistry*, 106, 116-123.

Li YL., Gao YX., Jin HZ., Zhang WD., 2015. Chemical constituents of *Abies fabri*. *Phytochemistry*, 117, 135-143.

Liu RH., 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 517 –520.

Loizzo MR., Saab AM., Statti GA., Menichini F., 2007. Composition and alpha-amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*. *Fitoterapia*, 78, 323-326.

Mabry TJ., Markham KR., Thomas MB., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. *Springer-Verlag: New York*, 41-164.

Manville JF., Fraser T., Tracey AS., 1989. Characterization of lasiocarpenonol and conformation of four sesquiterpenoids from lapine fire. *Phytochemistry*, 28, 3073-3080.

Manville JF., Kriz CD., 1977. Juvabione and its analogues.: IV. Isolation, identification, and occurrence of juvabione, juvabiol, and epijuvabiol from the whole wood of *Abies lasiocarpa*. *Can. J. Chem.*, 55, 2547-2553.

Markham KR., 1982. Techniques of Flavonoids Identification. *Academic Press, London, UK*, 36-49 et 72-93.

Markham KR., 1989. Flavones, flavonols and their glycosides. In *Methods in Plant Biochemistry*; Harborne, J. B., Ed.; Academic: New York, 1, 197-236.

Markham KR., Geiger H., 1994. <sup>1</sup>H nuclear magnetic spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: *The Flavonoids. Advances in Research since 1986* (Harborne J. B., ed.). *Chapman and Hall, London, UK*, 44 – 497.

Martinez-Nadal G., Montalvo AE., Seda M., 1973. Antimicrobial properties of bay and other phenolic essential oils. *Cosm. & perfume*, 88, 37-38.

Matsumoto T., Imai S., Sunaoka Y., Yoshinari T., 1988. The conversion of (+)-dehydroabietic acid into steroidal hormones. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61, 723–727.

Miguel Del Corral JM., Gordaliza M., Salinero MA., San Feliciano A., 1994. <sup>13</sup>C NMR data for abieta-8,11,13- triene diterpenoids. *Magn Reson Chem.*, 32, 774–781.

Miller HM., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 91.

Min-Cheol K., Hak-Cheol K., Su Nam K., Hyung Seop K., Byung Hun U., 2011. Plastoquinones from *Sargassum yezoense*; Chemical structures and effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor Gamma. *Chem. Pharm. Bull.*, 59, 834-838.

Muller JC., Ourisson G., 1974. New relative of grandisolide from *Abies alba*. *Phytochemistry*, 13, 1615-1616.

Nayak SS., Ghosh AK., Debnath B., Vishnoi SP., Jha T., 2004. Synergistic effect of methanol extract of *Abies webbiana* leaves on sleeping time induced by standard sedatives in mice and anti-inflammatory activity of extracts in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 93, 397-402.

Nayak SS., Ghosh AK., Srikanth K., Debnath B., Jha T., 2003. Antitussive activity of *Abies webbiana* Lindl. leaf extract against sulphur dioxide-induced cough reflex in mice. *Phytother. Res.*, 17, 930-932.

Norin T., 1972. Some aspects of the chemistry of the order Pinales. *Phytochemistry*, 11, 1231-1242.

Norin T., Winell B., 1971. Diterpenoids of cones from two *cedrus* species.

*Phytochemistry*, 10, 2818-1821.

Numata A., Hokimoto K., Takemura T., Matsunaga S., Morita R., 1983. Plant constituents biologically active to insects. II. Juvabione Analogs from *Abies sachalinensis* MQST. *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 436-442.

Numata A., Kawai K., Takahashi C., 1990. Juvabione Analogs from *Abies sachalinensis* (FR. SCHM.) MAST. II. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 2570-2573.

Numata A., Kawai K., Takahashi C., Miyamoto T., 1992. Occurrence of epijuvabione-type sesquiterpenoids in *Abies sachalinensis*. *Phytochemistry*, 31, 3773-3780.

Ohira T., Yatagai M., 1992. Extractives of *Abies mariesii* Masters. *Mokuzai Gakkaishi*, 38, 180-185.

Ohtsu H., Tanaka R., In Y., Matsunaga S., Tokuda H., Nishino H., 2000. New abietane diterpenoids from the cones of *Larix kaempferi*. *Can. J. Chem.*, 78, 31-40.

Ohtsu H., Tanaka R., Matsunaga S., 1998. 18-nor-Abietatrienes from the Cones of *Larix kaempferi*. *J. Nat. Prod.*, 61, 406-408.

Omori S., Ozawa S., Taneda K., 1994. The extractives of Aomori todomatsu (*Abies mariesii* Masters). Isolations of lignans from the heartwood. *Mokuzai Gakkaishi*, 40, 1107-1118.

Ormero A., Hay I., Jamieson M., 2000. Treatment of hair loss. PCT Int. Appl. PIXXD2 WO 2000007553 A1 20000217.

Ozawa S., Sasaya T., 1988a. Extractives of todomatsu *Abies sachalinensis* Masters IV. New cyclolignans containing a lactol ring from the wood of *Abies sachalinensis*. *Mokuzai Gakkaishi*, 34, 169-175.

Ozawa S., Sasaya T., Tabei Y., 1988. Extractives of todomatsu *Abies sachalinensis* Masters VI. Dihydrobenzofurans and tetrahydrofurans from the wood of *Abies sachalinensis*. *Mokuzai Gakkaishi*, 34, 942-946.

Ozawa S., Tabei Y., 1988b. Extractives of todomatsu *Abies sachalinensis* Masters IV. A novel dibenzylbutyrolactol from the wood of *Abies sachalinensis*. *Mokuzai Gakkaishi*, 34, 851-857.

Ozawa, S., Sasaya, T., 1991. Extractives of todomatsu *Abies sachalinensis* Masters VII. New phenylpropane trimers from the wood of *Abies sachalinensis*. *Mokuzai Gakkaishi*, 37, 69–75.

Pandey S., 2000. Efficacy of V-gel in vaginitis and cervicitis. *The antiseptic*, 5, 155-160.

Parker WH., Maze J., McLachlan DG., 1979. Flavonoids of *Abies amabilis* needles. *Phytochemistry*, 18, 508-510.

Pichette A., Larouche PL., Lebrun M., Legault J., 2006. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytother. Res.*, 20, 371-373.

Prinz S., Mullner U., Heilmann J., Winkelmann K., Sticher O., Haslinger E., Hufner A., 2002. Oxidation products of abietic acid and its methyl ester. *J Nat Prod.*, 65, 1530–1534.

Prior RL., Wu X., Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements . *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290-4302.

Quezel P., Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Paris : C.N.R.S. 38.

Rahalison L., Hamburger M., Hostettmann K., Monod M., Frenk E.. 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem Anal.*, 2, 199-203.

Raldugin VA., Gatilov YG., Rybalova TV., Rashkes YV., 1986. Triterpenoids from species of *Abies* hill. II. Abiesolidic acid — A new 3,4-secolanostanoid from the oleoresin of *Abies sibirica*. *Chem. Nat. Compd.*, 22, 645-651.

Raldugin VA., Kukina TP., Yaroshenko NI., Pentegova VA., 1987. *Chem. Nat. Compd.*, 23, 259-262.

Raldugin VA., Shakirov MM., Leibyuk TV., Shevtsov SA., 1992. Triterpenoids from *Abies* species. *Chem. Nat. Compd.*, 27, 444-449.

Raldugin VA., Shevtsov SA., Roshchin VI., Pentegova VA., 1988. Triterpenoids from *Abies* spp. VI. "Isofirmanic" and (24E)-lanosta-8,24-diene-3,23-dion-26-oic acids from Siberian fir needles. *Chem. Nat. Compd.*, 24, 694-698.

Raldugin VA., Shevtsov SA., Roshchin VI., Pentegova VA., 1989. Triterpenoids from *Abies* ssp. VI. 'Isofirmanic' and (24E)-lanosta-8,24-diene-3,23-dion-26-oic acids from Siberian fir needles. *Chem. Nat. Compd.*, 24, 694.

Raldugin VA., Shevtsov SA., Shakirov MM., Roshchin VI., Pentegova VA., 1989. Triterpenoids from *Abies* species VII. New lanostane lactones from Siberian fir needles. *Chem. Nat. Compd.*, 25, 176-181.

Raldugin VA., Shevtsov SA., Yaroshenko NI., Gatilov YV., Bagryanskaya IY., Demenkova LI., Pentegova VA., 1987. Triterpenoids from *Abies* species. IV. New triterpene acids from the needles of *Abies sibirica*. *Chem. Nat. Compd.*, 23, 684-690.

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, 1231-1237.

Ribo JM., Mitja MR., Ramentol J., 1974. Diterpenoids in *Abies alba*. *Phytochemistry*, 13, 1614.

Riboli E., Norat T., 2003. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 559–569.

Rice-Evans CA., Miller NJ., Bolwell PG., Bramley PM., Pridham JB., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free.Radic. Res. commun.*, 22, 375-383.

Roshchin VI., Raldugin VA., Baranova RA., Pentegova VA., 1987. New triterpene acids from *Abies sibirica* needles. *Chem. Nat. Compd.*, 22, 613-614.

Row J., Nagasampagi BA., Burgstahler AW., 1971. Derivatives of nordehydroabietane from pine bark. *Phytochemistry*, 10, 1647-1651.

Sakar MK., Ercil D., Olmo ED., Feliciano AS., 1999. Constituents of *Abies nordmanniana* ssp. *bornmuelleriana*. *Fitoterapia*, 70, 103-105.

Sánchez-Moreno C., 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.*, 8, 121-137.

Sasaya T., Takehara T., Kobayashi T., 1980. Extractives of todomatsu *Abies sachalinensis* master II. *Mokuzai Gakkaishi*, 26, 759-764.

Senol FS., Orhan IE., Ustum O., 2015. In vitro cholinesterase inhibitory and antioxidant effect of selected coniferous tree species. *Asian Pac J Trop Med.*, DOI: 10.1016/S1995-7645 (14)60329-1, 269-275.

Sezik E., Yesilada E., Honda G., Takaishi Y., Takeda Y., Tanaka T., 2001. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J. Ethnopharmacol.*, 75, 95–115.

Shah R., 2006. Nature's medicinal and plant of Uttaranchal. *Nainital: Gyanodaya prakhasan*, 1, 15-16.

Shevtsov SA., Raldugin VA., 1989. Triterpenoids from *Abies* species VIII. A new methoxymariesionoid and two 3,4-secomariesionoids from *Abies sibirica* needles. *Chem. Nat. Compd.*, 25, 182-187.

Shivanand P., Viral D., Goyani M., Vaghani S., Jaganathan K., 2009. Formulation and evaluation of *Cedrus deodara* Loud. extract. *Inter. J. Chem. Tech. Res.*, 1, 1145-1152.

Sies H., 1993. Strategies of antioxidant defence. *Eur. J. Biochem.*, 215, 213-219.

Singh RK., Bhattacharya SK., Acharya SB., 2000. Pharmacological activity of *Abies pindrow*. *J. Ethnopharmacol.*, 73, 47-51.

Singh RK., Nath G., Goel RK., Bhattacharya SK., 1998. Pharmacological actions of *Abies pindrow* Royle leaf. *Indian J. Exp. Biol.*, 36, 187-191.

Singh RK., Pandey BL., 1996. Anti-inflammatory potential of *Pongamia pinnata* root extracts in experimentally induced inflammation in rats. *J. Basic. Appl. Biomed.*, 4, 21-24.

Singh RK., Pandey BL., 1997. Further study of anti-inflammatory effects of *Abies pindrow*. *Phytother. Res.*, 11, 535-37.

Singleton VL., Orthofer R., Lamuela-Raventos RM., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Met. Enzym.*, 299, 152-178.

Slama K., Williams CM., 1965. Juvenile hormone activity for the bug *Pyrrhocoris apterus*. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 411-414.

Smedman L., Zavarin E., 1968. *Cyclosativene* - a tetracyclic sesquiterpene *Abies Magnifica* Murray. *Tetrahedron Lett.*, 9, 3833-3835.

Steglich W., Klaar M., Zechlin L., Hechi H J., 1979. Abietospiran, the Triterpene from the Bark of the White Fir (*Abies alba*). *Angew. Chem*, 91, 751.

Sugita K., Ouchi J., Okajima T., Watanabe H., 2004. Topical nonstroidale anti-inflammatory agents containing essential oils and body warming substances. JPN.Kokai Tokyo. JP2004175723 A2 20040624.

Takahashi T., 1938. A crystalline constituent of the bark of *Abies mariesii*. *J. Pharm. Soc. Jpn.*, 58, 888-901.

Takayasu J., Tanaka R., Matsunaga S., Eyama HU., Tokuda H., Hasegawa T., Nishino A., Nishino H., Iwashima A., 1990. Anti-tumor-promoting activity of derivatives of abieslactone, a natural triterpenoid isolated from several *Abies* genus. *Cancer Lett.*,53, 141-144.

Tanaka R., Aoki H., Mizota T., Wada S., Matsunaga S., Tokuda H., Nishino H., 2000. Three new delta 8-lanostane-type triterpene lactones (1), (2) and (3) were isolated from the stem bark of *Abies mariesii* M. *Planta Med.*, 66, 163-168.

Tanaka R., Matsunaga S., 1990. Veitchiolide, a tetracyclic triterpene lactone from *Abies veitchii*. *Phytochemistry*, 29, 3267-3269.

Tanaka R., Matsunaga S., 1991a. 9 $\beta$ -Lanostane-Type Triterpene Lactones from the Stem Bark of *Abies veitchii*. *J. Nat. Prod.*, 54, 1337-1344.

Tanaka R., Matsunaga S., 1991b. Triterpene lactones from the stem bark of *Abies firma*. *Phytochemistry*, 30, 1983-1987.

Tanaka R., Matsunaga S., 1992. Saturated hopane and gammacerane triterpene diols from the stem bark of *Abies veitchii*. *Phytochemistry*, 31, 3535-3539.

Tanaka R., Mizota T., Matsunaga S., 1994. Saturated gammaceranes from the stem bark of *Abies mariesii*. *J. Nat. Prod.*, 57, 761-766.

Tanaka R., Wada SI., Aoki H., Matsunaga S., Yamori T., 2004. Spiromarienols A and B: two lanostane-type triterpene lactones from the stem bark of *Abies mariesii*. *Helv. Chim. Acta.*, 87, 240-249.

Tanaka R., Ohtsu H., Matsunaga S., 1997. Abietane diterpene acids and other constituents from the leaves of *Larix kaempferi*. *Phytochemistry*, 46, 1051-1057.

Tharib SM., Gnan SO., Veitch GBA., 1983. Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. *J. Food. Prot.*, 46, 681-685.

Tiwari AK., Srinivas PV., Kumar SP., Rao JM., 2001. Free radical scavenging active components from *Cedrus deodara*. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4642-4645.

Tiwari KP., Minocha PK., 1980. A chalcon glycoside from *Abies pindrow*. *Planta*, 19, 2501-2503.

Toth J., 2005. *Le cèdre de France. Etude approfondie de l'espèce*. Paris, Biologie, Ecologie, Agronomie. *L'Harmattan*, 207.

Tripathi M., Jain L., Pandey VB., 1996. Flavonoids of *Abies pindrow* leave. *Fitoterapia*, 67, 477-479.

- Tsuchihashi R., Hanzawa T., 1940. *Nippon Kagaku Kaishi*, 61, 1041.
- Upadhy S., Shanbhag KK., Suneetha G., Balachandra N., 2004. A study of hypoglycemic and antioxidant activity of *Aegle marmelos* in alloxan induced diabetic rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 48, 476-480.
- Uyeo S., Okada J., Matsunaga S., Rowe JW., 1968. The structure and the stereochemistry of abieslactone. *Tetrahedron*, 24, 2859-3166.
- Vandepitte J., Engbaek E., Plot P., Heuk CC., 1994. Bactériologie clinique: techniques de base pour le laboratoire O.M.S. Genève, 62-64.
- Vasincu A., Crețu E., Geangalău I., Amalinei RL., Miron A., 2013. Polyphenolic content and antioxidant activity of an extractive fraction from *Abies alba* bark. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasii.*, 117, 545-50.
- Venters HD., Bonilla LE., Jensen T., 1997. Heme from Alzheimer's brain inhibits muscarinic receptor binding via thiyl radical generation. *Brain Res.*, 764, 93- 100.
- Viswanatha GL., Kumar KN., Shylaja H., Ramesh C., Rajesh S., Srinath R., 2009. Anxiolytic and anticonvulsant activity of alcoholic extract of heart wood of *Cedrus deodara* Roxb. in rodents. *J. Pharm. Res. Health Care.*, 1, 217-239.
- Wada SI., Iida A., Tanaka R., 2002. Triterpenoid constituents isolated from the bark of *Abies sachalinensis*. *J. Nat. Prod.*, 65, 1657-1659.
- Wang GW., Lv C., Yuan X., Ye J., Jin HZ., Shan L., Xu XK., Shen YH., Zhang WD., 2015. Lanostane-type triterpenoids from *Abies faxoniana* and their DNA topoisomerase inhibitory activities. *Phytochemistry*, 116, 221-229.
- Wu W., Chen Xu., Liu Y., Wang Y., Tian T., Zhao X., Li J., 2016. Triterpenoids from the branch and leaf of *Abies fargesii*. *Phytochemistry*, 130, 01-312.
- Wu YP., Liang X., Liu XY., Zhong K., Gao B., Huang YN., Gao H., 2015. *Cedrus deodara* pine needle as a potential source of natural antioxidants: Bioactive constituents and antioxidant activities. *J. Functional foods.*, 14, 605-612.
- Xia JH., Zhang SD., Li YL., Wu L., Zhu ZJ., Yang XW., Zeng HW., Li HL., Wang N., Streinmetz A., Zhang WD., 2012. Sesquiterpenoids and triterpenoids from *Abies holophyllas* and their bioactivities. *Phytochemistry*, 74, 178-184.

Xu J., Li S., Sun X., Ma J., Liu F., Tong L., Lee D., Ohizumi Y., Tuerhong M., Guo Y., 2016. Diterpenoids from *Callicarpa kwangtungensis* and their NO inhibitory effects. *Fitoterapia*, 113, 151-157.

Yang XW., Li SM., Feng L., Shen YH., Tian JM., Liu XH., Zeng HW., Zhang C., Zhang WD., 2008. Abiesanordines A-N: fourteen new norditerpenes from *Abies georgei*. *Tetrahedron*, 64, 4354-4362.

Yang XW., Li SM., Li YL., Feng L., Shen YH., Lin Shen., Tian JM., Zeng HW., Wang N., Steinmetz A., Liu Y., Zhang WD., 2014. Chemical constituents of *abies delavayi*. *Phytochemistry*, 105, 164-170.

Yang XW., Feng L., Li SM., Liu XH., Li YL., Wu L., Shen YH., Tian JM., Zhang X., Liu XR., Wang N., Liu Y., Zhang WD., 2010. Isolation, structure, and bioactivities of abiesadines A-Y, 25 new diterpenes from *Abies georgei* Orr. *Bioorg.Med. Chem.*, 18, 744-754.

Yaroshenko NI., Raldugin VA., 1989. Triterpenoids from *Abies* sp. IX. Triterpene lactones from *Abies sibirica* bark. *Chem. Nat. Compd*, 25, 188-192.

Yoneyama S., Togashi I., Honma S., Aoyama M., 1989. Inhibitory effects of extracts of todomatsu, *Abies sachalinensis* Mast., on the mycelial growth of edible fungi (in Japanese). *J HokkaidoFor Prod. Res. Inst.*, 3, 16-22.

Yoneyama S., Togashi I., Oikawa H., Aoyama M., 1990. An antifungal substance in the volatile wood-oil of todomatsu, *Abies sachalinensis* Mast. *Mokuzai Gakkaishi*, 36, 777-780.

Zeng WC., He Q., Sun Q., Zhong K., Gao H., 2012. Antibacterial activity of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara*. *Inter. J. Food Microbiology.*, 153, 78-84.

Zhao QQ., Wang SF., Li Y., Song QY., Gao K., 2016. Terpenoids with anti-inflammatory activity from *Abies chensiensis*. *Fitoterapia*, 111, 87-94.

## Références web

[1][https://www.google.dz/search?q=cedrus+atlantica&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMi8bk4LftAhXIShQKH8cArIQ\\_AUIBigB&biw=1366&bih=677#tbm=isch&q=abies+numidica+de+lannoy&imgrc=zUyKJLXfHWju3M](https://www.google.dz/search?q=cedrus+atlantica&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMi8bk4LftAhXIShQKH8cArIQ_AUIBigB&biw=1366&bih=677#tbm=isch&q=abies+numidica+de+lannoy&imgrc=zUyKJLXfHWju3M). Vu le 14.11.2016

[2][https://www.google.dz/search?q=cedrus+atlantica&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMi8bk4LftAhXIShQKH8cArIQ\\_AUIBigB&biw=1366&bih=677#tbm=isch&q=cedrus+atlantica+cedre+de+l'atlas&imgrc=GeWa94EvID4jAM](https://www.google.dz/search?q=cedrus+atlantica&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMi8bk4LftAhXIShQKH8cArIQ_AUIBigB&biw=1366&bih=677#tbm=isch&q=cedrus+atlantica+cedre+de+l'atlas&imgrc=GeWa94EvID4jAM). Vu le 14.11.2016.

[3][https://www.google.dz/search?q=cones+de+abies+numidica&biw=1366&bih=677&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjqiJWZnMbQAhUKfRoKHetWB\\_MQ\\_AUIB#imgc=aox6-60yPjGCdM%3A](https://www.google.dz/search?q=cones+de+abies+numidica&biw=1366&bih=677&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjqiJWZnMbQAhUKfRoKHetWB_MQ_AUIB#imgc=aox6-60yPjGCdM%3A). Vu le 14.11.2016.

[4][https://www.google.dz/search?q=cones+de+abies+numidica&biw=1366&bih=677&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjqiJWZnMbQAhUKfRoKHetWB\\_MQ\\_AUIB#tbn=isch&q=cones+de+cedrus+atlantica&imgc=05\\_6Sr0pNiGj3M%3A](https://www.google.dz/search?q=cones+de+abies+numidica&biw=1366&bih=677&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjqiJWZnMbQAhUKfRoKHetWB_MQ_AUIB#tbn=isch&q=cones+de+cedrus+atlantica&imgc=05_6Sr0pNiGj3M%3A). Vu le 14.11.2016.

## ملخص

أدى الفصل والتنقية بالطرق الكروماتوغرافية إلى عزل 8 مركبات من نوع abietane diterpene من اقماع الشوح نوميدي *Abies numidica* و 21 مركب من اقماع *Cedrus atlantica* منها 3 احماض tocotrienoliques منهم واحد جديد و 3 مركبات فلافونويدية منها فلافونيد جديد و 3 neolignanes و abietane. 12 diterpenes تم التحديد البنوي لهذه المركبات باستخدام تقنيات الرنين المغناطيسي النووي (NOESY و 1D و 2D (<sup>13</sup>D, <sup>1</sup>H), COSY H-H, HSQC, HMBC, قياس طيف الكتلة (HRESI-MS) (ESI-MS) والمقارنة مع المراجع. خلال تقييم النشاط المضاد للأكسدة للكسور الناتجة من *Abies numidica* VLC أظهر المستخلص الهيدروميتانولي نشاطا أفضل من كسر F60:40 في اختبار +ABTS، تليها كسور F40:60 و F80:20 وعلاوة على ذلك، فإن الكسر F60:40 أظهر أفضل تثبيط لإنزيم Acetylcholinesterase في حين تبين أن نشاط الكسر F80:20 أفضل ضد Butyrylcholinesterase. يتميز المستخلص الهيدروميتانولي و المركبات المعزولة بنشاط جيد ضد طائفة واسعة من البكتيريا ايجابية الجرام و ضد الفطريات (*Candida*) التي تم اختبارها.

**كلمات مفتاحية:** Pinaceae, *Abies numidia*, *Cedrus atlantica*, diterpenes, احماض, lignanes, فلافونويدات, tocotrienolique, نشاط حيوي.

## Résumé

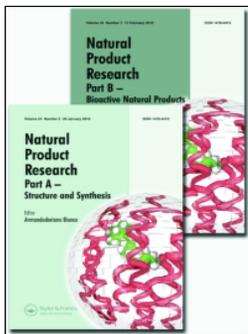
Les séparations et les purifications par des méthodes chromatographiques ont permis d'isoler **8** composés de type abietane-ditépènes des cônes d'*Abies numidica* de Lannoy et **21** composés des cônes de *Cedrus atlantica* (Endl) Manetti incluant **3** acides tocotrienoliques dont un inédit, **3** flavonoides dont un nouveau, **3** neolignanes et **12** abiétane-ditépènes. La détermination structurale des composés isolés de ces deux Pinaceae a été basée sur l'utilisation des techniques RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY H-H, HSQC, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse (ESI-MS et HRESI-MS) et sur la comparaison avec les données bibliographiques. L'évaluation de l'activité antioxydante des fractions issues de la VLC de l'extrait hydrométhanolique des cônes d'*A. numidica* a montré une meilleure activité de la fraction **F60:40** dans le test de l'ABTS<sup>·+</sup>, suivie des fractions **F40:60** et **F80:20**. Par ailleurs, la fraction **F60:40** de l'extrait hydrométhanolique des cônes d'*A. numidica* a montré un meilleur pouvoir inhibiteur de l'enzyme acétylcholinestérase alors que la fraction **F80:20** a manifesté une meilleure activité contre la butyrylcholinestérase. Les extraits des deux plantes étudiées et les composés isolés ont montré une bonne activité antimicrobienne contre un large spectre de bactéries Gram-positif et contre les champignons (*Candida*) testés.

**Mots clés :** Pinaceae, *Abies numidica*, *Cedrus atlantica*, ditépènes, acides tocotrienoliques, flavonoides, lignanes, activités biologiques.

## Abstract

Separations and purifications by chromatographic methods allowed us to isolate **8** abietane-diterpene compounds from the cones of *Abies numidica* de Lannoy and **21** compounds from the cones of *Cedrus atlantica* (Endl) Manetti including **3** tocotrienolic acids from which one is new, **3** flavonoids from which one is new, **3** neolignanes and **12** abietane-diterpenes. The structural determination of the isolated compounds from these two Pinaceae was based on the use of 1D and 2D NMR techniques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY HH, HSQC, HMBC and NOESY), mass spectrometry (ESI-MS and HRESI-MS) and on comparison with literature data. Evaluation of the antioxidant activity of the fractions derived from the VLC of the hydromethanolic extract of the cones of *A. numidica* showed a higher activity of the **F60:40** fraction in the ABTS<sup>·+</sup> test, followed by fractions **F40:60** and **F80:20**. Furthermore, the **F60:40** fraction of the hydromethanolic extract of the cones of *A. numidica* was the best inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase whereas the **F80:20** fraction showed the highest activity against butyrylcholinesterase. The extracts of the two studied plants and the isolated compounds showed a good antimicrobial activity against a large spectrum of Gram-positive bacteria and on the tested fungi (*Candida*).

**Keywords:** Pinaceae, *Abies numidica*, *Cedrus atlantica*, diterpenes, tocotrienolic acids, flavonoids, lignanes, biological activities.



# Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

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

## Abietane diterpenes from the cones of *Abies numidica* de Lannoy ex Carrière (Pinaceae) and in vitro evaluation of their antimicrobial properties

Maya Belhadj Mostefa, Amin Abedini, Laurence Voutquenne-Nazabadioko, Sophie C. Gangloff, Ahmed Kabouche & Zahia Kabouche

To cite this article: Maya Belhadj Mostefa, Amin Abedini, Laurence Voutquenne-Nazabadioko, Sophie C. Gangloff, Ahmed Kabouche & Zahia Kabouche (2017) Abietane diterpenes from the cones of *Abies numidica* de Lannoy ex Carrière (Pinaceae) and in vitro evaluation of their antimicrobial properties, *Natural Product Research*, 31:5, 568-571, DOI: [10.1080/14786419.2016.1190723](https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1190723)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1190723>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 30 May 2016.

 Submit your article to this journal [↗](#)

 Article views: 40

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)

 Citing articles: 2 View citing articles [↗](#)

SHORT COMMUNICATION

## Abietane diterpenes from the cones of *Abies numidica* de Lannoy ex Carrière (Pinaceae) and *in vitro* evaluation of their antimicrobial properties

Maya Belhadj Mostefa<sup>a</sup>, Amin Abedini<sup>b</sup>, Laurence Voutquenne-Nazabadioko<sup>b</sup>,  
Sophie C. Gangloff<sup>c</sup>, Ahmed Kabouche<sup>a</sup> and Zahia Kabouche<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Département de chimie, Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (L.O.S.T), Université des frères Mentouri-Constantine, Constantine, Algeria; <sup>b</sup>Groupe Isolement et Structure, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR), CNRS UMR 7312, Reims, France; <sup>c</sup>Laboratoire de Microbiologie, UFR de Pharmacie, Reims, France

### ABSTRACT

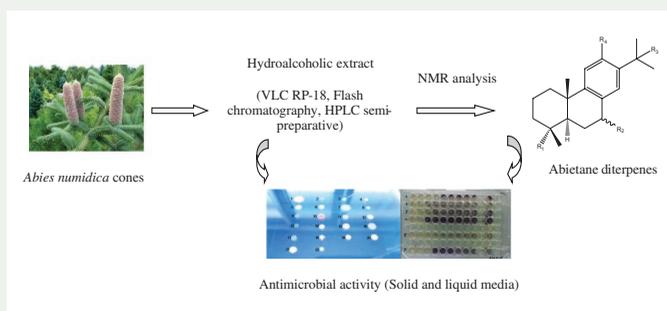
Eight known abietane diterpenes (**1–8**) were isolated for the first time from *Abies numidica* cones (Pinaceae). The structures of all compounds were established by means of 1D and 2D NMR, and UV spectral analyses. The hydromethanolic extract of *A. numidica* cones was tested for its antimicrobial activity against 17 gram-positive and gram-negative bacteria and against five yeasts by the use of liquid and solid medium and bioautography methods. The best antimicrobial activity was found against gram-positive bacteria (MIC  $\leq$  0.3 mg/mL) *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* 8325.4, *S. aureus* CIP 53.154, *Micrococcus luteus* and *Listeria innocua* and against *Candida* yeasts. The determination of MIC's of isolated products showed a high activity of compounds **4** and **6** against *S. aureus*, *L. innocua* (MIC = 62.5  $\mu$ g/mL) and *E. faecalis* (MIC = 125  $\mu$ g/mL).

### ARTICLE HISTORY

Received 30 January 2016  
Accepted 30 April 2016

### KEYWORDS

*Abies numidica*; Pinaceae; abietane diterpenes; antimicrobial activity; solid medium; liquid medium; bioautography



## 1. Introduction

*Abies* is an important genus of the Pinaceae family. About 50 species are distributed in North Africa, Europe, North and Middle America and highlands of Asia (Zheng & Fu 1978).

**CONTACT** Zahia Kabouche ✉ [zahiakabouche@umc.edu.dz](mailto:zahiakabouche@umc.edu.dz)

 Supplemental data for this article can be accessed at <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1190723>.

Triterpenoids, steroids, flavonoids, phenols, fatty acids and lignans have been previously reported (Yang et al. 2008). *Abies* species have exhibited several activities, including antitumour (Kim et al. 2004), anti-inflammatory, antihypertensive, anti-ulcerogenic (Singh et al. 2000), antibacterial (Vishnoi et al. 2007), antifungal (Aoyama & Doi 1992), antitussive (Nayak et al. 2003) and central nervous system activities (Nayak et al. 2004). The cones of *Abies numidica* de Lannoy ex Carrière were used in folk medicine against cold, indigestion, stomach ache, pulmonary, vascular and venereal diseases (Fujita et al. 1995). We report here the phytochemical composition and the *in vivo* antimicrobial activity of the cones of *A. numidica*.

## 2. Result and discussion

Chromatography of the hydromethanolic extract of the cones of *A. numidica* afforded eight known compounds (1–8). They were unambiguously identified as follows: 7 $\alpha$ ,15-dihydroxydehydroabietic acid (1) (Prinz et al. 2002), 13 $\beta$ -hydroxy-7-oxo-8(14)-abieten-18-oic acid (2) (Ohtsu et al. 2000), 15-hydroxy-7-oxo-dehydroabietic acid (3) (Matsumoto et al. 1988), 7 $\alpha$ -hydroxydehydroabietic acid (4) (Miguel Del Corral et al. 1994), 7-oxodehydroabietinol (5) (Tanaka et al. 1997), 7 $\alpha$ -hydroxy-15-methoxy-dehydroabietic acid (6) (Xian-Wen et al. 2010), 4-hydroxy-18-nor-8,11,13-abietatrien-7-one (7) (Lee et al. 1995) and 15-hydroxydehydroabietic acid (8) (Cheung et al. 1993) (figure S1) by comparison of their spectroscopic data with literature values.

The antimicrobial potential of the hydromethanolic extract of *A. numidica* cones was evaluated against 22 microorganisms including gram-positive and gram-negative bacteria as well as fungi by the MIC's evaluation in solid and liquid medium (Acebey-Castellon et al. 2011; Abedini et al. 2014). In solid media, the hydromethanolic extract was active at different degrees against 12 bacterial strains, particularly gram-positive bacteria (Table S1). No antimicrobial activity was found against the gram-negative bacteria strains, *Escherichia coli* CIP 54.127, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* and *Providencia stuartii*. The best antibacterial activity was obtained against six microorganisms, namely *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* ATCC 1034, *Staphylococcus aureus* 8325-4, *S. aureus* CIP 53.154, *Micrococcus luteus* and *Listeria innocua* with MIC's values on agar below  $\leq 0.3$  mg/mL. The exact MIC values, in the liquid media, against these six bacterial strains, revealed that the hydromethanolic extract have a strong activity against *B. subtilis* (MIC = 62.5  $\mu$ g/mL) and a good antimicrobial activity against *E. faecalis*, *S. aureus* 8325-4, *S. aureus* CIP 53.154, *M. luteus* and *L. innocua* (MIC  $\leq 250$   $\mu$ g/mL). This activity is very interesting for a crude extract (Toyang et al. 2012). To identify the compounds having an antibacterial activity in this extract, a bioautography assay (Acebey-Castellon et al. 2011; Abedini et al. 2013) was performed with the pure compounds (1–8) against *S. aureus* CIP 53.154, one of the most sensitive microorganisms. Bioautography showed a good-to-moderate activity for the five dehydroabietic acid derivatives (1, 3, 4, 6, and 8) and a low activity for compound 7. (Table S2). Therefore, these compounds were tested separately in liquid medium against *S. aureus* CIP53-154, *L. innocua* and *E. faecalis* ATCC 1034 (Table S2). Like bioautography, 4 and 6 showed the greatest activity against *S. aureus* and *L. innocua* (MIC = 62.5  $\mu$ g/mL) which is very close to MICs of antibiotics. They were less active against *E. faecalis* (MIC = 125  $\mu$ g/mL). Compound 1 showed a good activity against *L. innocua* (MIC = 62.5  $\mu$ g/mL) and a moderate activity against *S. aureus* and *E. faecalis* (MIC = 125  $\mu$ g/mL). Compounds 3, 7 and 8 exhibited a

moderate activity with MICs ranging between 125 and 500 µg/mL. These results suggest that the presence of hydroxyl group in 7 $\alpha$  position (**1**, **4**, **6**) may increase the antimicrobial activity of dehydroabietic acid derivatives compared to a ketone group (**2**, **3**, **5**, **7**), as observed by Gouiric et al. (2004). On the other hand, a carboxyl group in C-18 position in dehydroabietic acid derivatives seems to be more selective to the antibacterial activity.

The *in vitro* antifungal activity of the hydromethanolic extract was also tested against five yeasts and was active at 5 mg/mL MIC's value against *Candida glabrata* and at 10 mg/mL MIC's value against *Candida tropicalis*, *Candida kefyr* and *Candida albicans* (Table S1).

### 3. Conclusion

Eight abietane diterpenes (**1–8**) were isolated for the first time from the cones of *A. numidica*. The hydromethanolic extract was screened for its antibacterial and antifungal activities and demonstrated antibacterial activity against *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. aureus* 8325-4, *S. aureus* CIP 53.154, *M. luteus* and *L. innocua* with MIC's ranging from 62.5 to 250 µg/mL. Compounds **4** and **6** showed a strong activity against *S. aureus* 8325-4 and *L. innocua* (MIC = 62.5 µg/mL), and compounds **1**, **3**, **7** and **8** showed a good antimicrobial activity. This work reveals that this plant can be used as a potent source of new antimicrobial agents against bacteria which are increasingly becoming resistant to traditional antibiotics.

### Acknowledgements

The authors are grateful to ATRSS and DGRSDT (MESRS, Algeria), to university Mentouri Constantine-Algeria and to Groupe Isolement et Structure of the Institut de Chimie Moléculaire de Reims, France for providing their financial support and facilities during the study. We also acknowledge Janick Madoux (Laboratory of Bacteriology, CHU Reims) for accessing to multiple inoculators material, Pr Jerome Depaquit (Laboratory of parasitology-Mycolology) for providing yeasts and Chantal Grimplet for technical support.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### References

- Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse A, Rivière C, Sahpaz S, Bailleul F, Neut C, Hennebelle T. 2013. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). Evidence-Based Complementary Altern Med. 604536, 11 pages. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/604536>.
- Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Gohari A, Farimani MM, Rivière C, Samaillie J, Sahpaz S, Bailleul F, Neut C, Hennebelle T. 2014. Antimicrobial activity of selected Iranian medicinal plants against a broad spectrum of pathogenic and drug multiresistant micro-organisms. Lett Appl Microbiol. 59:412–421.
- Acebey-Castellon IL, Voutquenne-Nazabadioko L, Doan Thi Mai H, Roseau N, Bouthagane N, Muhammad D, Le Magrex-Debar E, Gangloff S, Litaudon M, Sevenet T, et al. 2011. Triterpenoids saponins from *Symplocos lancifolia*. J Nat Prod. 74:163–168.
- Aoyama M, Doi S. 1992. Antifungal activities of wood extractives of todomatsu, *Abies sachalinensis* Masters against pathogenic fungi causing turfgrass diseases. Mokuzai Gakkaishi. 38:101–105.
- Cheung HTA, Miyase T, Lenguyen MP, Smal MA. 1993. Further acidic constituents and neutral components of *pinus massoniana* Resin. Tetrahedron. 49:7903–7915.

- Fujita T, Sezik E, Tabata M, Yesilada E, Honda G, Takeda Y, Tanaka T, Takaishi Y. 1995. Traditional medicine in Turkey. VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions. *Econ Bot.* 49:406–422.
- Gouiric SC, Feresin G.E, Tapia AA, Rossomando PC, Schmeda-Hirschmann G, Bustos DA. 2004. 1 $\beta$ ,7 $\beta$ -Dihydroxydehydroabietic acid, a new biotransformation product of dehydroabietic acid by *Aspergillus niger*. *World J Microbiol Biotech.* 20:281–284.
- Kim HJ, Choi EH, Lee IS. 2004. Two lanostane triterpenoids from *Abies koreana*. *Phytochemistry.* 65:2545–2549.
- Lee CK, Fang JM, Cheng YS. 1995. Norditerpenes from *Juniperus chinensis*. *Phytochemistry.* 39:391–394.
- Matsumoto T, Imai S, Sunaoka Y, Yoshinari T. 1988. The conversion of (+)-dehydroabietic acid into steroidal hormones. *Bull Chem Soc Jpn.* 61:723–727.
- Miguel Del Corral JM, Gordaliza M, Salinero MA, San Feliciano A. 1994. 13C NMR data for abieta-8,11,13-triene diterpenoids. *Magn Reson Chem.* 32:774–781.
- Nayak SS, Ghosh AK, Debnath B, Vishnoi SP, Jha T. 2004. Synergistic effect of methanol extract of *Abies webbiana* leaves on sleeping time induced by standard sedatives in mice and anti-inflammatory activity of extracts in rats. *J Ethnopharmacol.* 93:397–402.
- Nayak SS, Ghosh AK, Srikanth K, Debnath B, Jha T. 2003. Antitussive activity of *Abies webbiana* Lindl. leaf extract against sulphur dioxide-induced cough reflex in mice. *Phyther Res.* 17:930–932.
- Ohtsu H, Tanaka R, In Y, Matsunaga S, Tokuda H, Nishino H. 2000. New abietane diterpenoids from the cones of *Larix kaempferi*. *Can J Chem.* 78:31–40.
- Prinz S, Müllner U, Heilmann J, Winkelmann K, Sticher O, Haslinger E, Hüfner A. 2002. Oxidation products of abietic acid and its methyl ester. *J Nat Prod.* 65:1530–1534.
- Singh RK, Bhattacharya SK, Acharya SB. 2000. Pharmacological activity of *Abies pindrow*. *J Ethnopharmacol.* 73:47–51.
- Tanaka R, Ohtsu H, Matsunaga S. 1997. Abietane diterpene acids and other constituents from the leaves of *Larix kaempferi*. *Phytochemistry.* 46:1051–1057.
- Toyang NJ, Ateh EN, Keiser J, Vargas M, Bach H, Tane P, Sondengam LB, Davis H. 2012. Toxicity, antimicrobial and anthelmintic activities of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) crude extracts. *J Ethnopharmacol.* 144:700–704.
- Vishnoi SP, Ghosh AK, Debnath B, Samanta S, Gayen S, Jha T. 2007. Antibacterial activity of *Abies webianna*. *Fitoterapia.* 78:153–155.
- Xian-Wen Y, Lin F, Su-Mei L, Xiao-Hua L, Yong-Li L, Liang W, Yun-Heng S, Jun-Mian T, Xi Z, Xin-Ru L, et al. 2010. Isolation, structure and bioactivities of abiesadines A-Y, 25 new diterpenes from *Abies georgei* Orr. *Bioorg Med Chem.* 18:744–754.
- Yang XW, Li SM, Feng L, Shen YH, Tian JM, Liu XH, Zeng HW, Zhang C, Zhang WD. 2008. *Abies* anordines A-N: fourteen new norditerpenes from *Abies georgei*. *Tetrahedron.* 64:4354–4362.
- Zheng WJ, Fu LG. 1978. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae K* [Editorial Committee of *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*]. In: Wu ZY, editor. *Cupressus Linn.* Beijing: Science Press; p. 55.