

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

Série :

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en science
Spécialité : Chimie Organique
Option : Phytochimie

Par
Manel BOUMARAF épouse DJENDLI

Intitulé

**Contribution phytochimique à la valorisation de deux plantes
médicinales : *Echinops spinosus* et *Pulicaria undulata*.
Recherche et détermination structurale de leurs principales
substances bioactives.**

Soutenu le : 05/12/2016

Devant le jury :

Pr. BENAYACHE Samir	Université Frères Mentouri, Constantine	Président
Dr. BENYAHIA Samira	Ecole Supérieure des Technologies Industrielles (ESTI)-Annaba	Directrice de thèse, Rapporteur
Pr. BENAYACHE Fadila	Université Frères Mentouri, Constantine	Examinatrice
Pr. MEKKIOU Ratiba	Université Frères Mentouri, Constantine	Examinatrice
Pr. ISMAIL Fadel	Université Badji Mokhtar, Annaba	Examineur
Pr. BOUKHARI Abbas	Université Badji Mokhtar, Annaba	Examineur

2016



Dédicaces

A Ceux qui me sont les plus chers au monde, mes parents que Dieu les protège.

Qu'ils sachent, en témoignage de ma profonde affection, que ce travail est en partie le fruit de leurs soutiens.

A mon très cher mari Hamza, que Dieu le protège, le garde pour moi et pour nos filles ; que nos chemins soient commun et sereins. Je lui dédie ce travail en témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A mes très chères filles : Basma, Darine et Bouchra ;

A mes frères ;

A mes sœurs ainsi que mes beaux-frères ;

A ma belle-famille ;

A tous mes ami(e)s.

A tous ceux qui m'ont témoigné leur affection et leur soutien durant ces longues années.

Remerciements.

Je remercie ma directrice de thèse, Madame **Samira BENYAHIA** Maître de Conférences à l'ESTI d'Annaba, pour avoir jugé et corrigé ce travail et pour ses conseils importants et pertinents.

Je tiens à remercier vivement Monsieur le Professeur **Samir BENAYACHE** directeur de l'unité de recherche (VARENBIOMOL) de l'université des frères Mentouri Constantine, de m'avoir accueillie dans son équipe au sein de son laboratoire, ce qui m'a permis de réaliser ce travail, pour son concours dans l'extraction et l'analyse de l'huile essentielle de l'espèce *pulicaria undulata* et également pour m'avoir honoré en acceptant d'être président de ce jury et pour ses précieux conseils.

Mes remerciements s'adressent également à Madame **Fadila BENAYACHE**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine pour m'avoir encouragé et conseillé, pour son soutien, pour sa constante disponibilité et son concours dans l'interprétation de certaines de mes molécules et sa grande générosité, qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail.

*J'*exprime mes vifs remerciements à mademoiselle **Ratiba MEKKIOU** Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine, d'avoir participé dans l'évolution de ce travail, pour sa gentillesse et de m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury.

Mes sincères remerciements s'adressent à Madame le Professeur **Souad AMEDDAH** et Monsieur le Professeur **Ahmed MENNAD** de l'université des frères Mentouri Constantine, pour leurs aides et leurs contributions efficaces dans la recherche des activités biologiques de mes plantes médicinales.

*J'*exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude à **Margherita GAVEGNIN** Docteur à « Istituto di chimica Biomolecolari » au CNR (Napolie-Italie), pour son accueil, son extrême sollicitude et sa disponibilité constante durant mon séjour au sein de son laboratoire.

Je n'oublie pas non plus de remercier les membres de son équipe : **Marianna CARBONE**, **Maria Letizia CIAVATA**, **Domenic MALEK** pour leur soutien et également la disponibilité des moyens et équipements nécessaires dans la réalisation de ce travail.

Je remercie également Messieurs les Professeurs de l'université d'Annaba :

❖ **Abbes BOUKHARI**

❖ **Fadhel ISMAIL**

Qui m'ont honoré en acceptant de lire et de juger ce travail.

*Je remercie également **Jean-claude CHALCHAT, Pierre CHALARD** Professeurs à l'école Nationale Supérieure de Chimie, de Clermont-France pour l'analyse de l'huile essentielle d'une de mes plantes médicinales.*

*Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Gérard De BELAIR** de l'université, d'Annaba pour l'identification du matériel végétal.*

*Je remercie **Iñaki IBROUARD** Professeur à « Instituto de Productos Naturales y Agrobiologia» de la Laguna (Tenerife-Espagne), pour la réalisation d'une partie des spectres RMN.*

Je n'oublie pas, également, de remercier la Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRSDT), Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS), qui m'a permis de finaliser l'ensemble de mes travaux de recherche et d'effectuer le maximum d'analyse, en m'octroyant deux stages d'une durée d'un mois chacun.

ABRÉVIATIONS

ADN ou DNA : Acide-Desoxyribo-Nucléique.
CCM : Chromatographie sur couche mince
COSY: Correlated Spectroscopy
CPG-MS : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
ECD: Electronic Circular Dicroism (Dicroïsme Circulaire Electronique)
EE : Ether diéthylique
EP : Ether de Pétrole
DEPT: Distortionless-Enhancement by- Polarization-Transfer.
Glc: Glucose
HE : Huiles-Essentielles.
HMBC: Heteronuclear- Multiple Bond Correlation.
CPLH : Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance
IC₅₀ : Concentration-Inhibitrice de 50% de cellules.
Me : Méthyle
MHz : Méga Hertz
NOE difference: Nuclear Overhauser Effect
NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
Rf : Facteur de retardement (Retardation factor)
SD : Ecart-type
SM : Spectroscopie de Masse.
TLC : Thin-Layer-Chromatography.
UV : Ultra-Violet
ppm : partie par million
 δ : Déplacement chimique
 $J(\text{Hz})$: Constante de couplage exprimée en Hertz
s : singulet
d : doublet
dd : doublet de doublet
dl : doublet large
dt : doublet de triplet
Cq : Carbone quaternaire
m : multiplet
mult. : multiplicité
 m/z : masse/charge électrique

g : gramme

mg : milligramme

μg : microgramme

°C : Température en degrés Celsius

ml : millilitre

mM : millimole

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
Références bibliographiques	3
CHAPITRE I. LES GENRES <i>ECHINOPS</i> ET <i>PULICARIA</i>.	
Introduction.....	5
I. Critères de sélection des plantes.....	5
I.1 Utilisation en médecine traditionnelle	5
I.2 Observation du matériel végétal sur terrain	5
I.3 Aspects botanique et chimiotaxonomique	6
I.4 la littérature	6
I.4 Le hasard	6
II. La famille des Asteraceae (composées)	7
II.1 Généralités	7
II.2 Description botanique	7
II.3 Le genre <i>Echinops</i>	8
II.3.1 Propriétés de la plante	8
II.3.2 Indication de la plante entière (Phytothérapie).....	9
II.3.3 Etude phytochimique.....	9
II.3.4 Distribution des sesquiterpènes lactone poliacétylénique thiophène isolés des racines de quelque espèces du genre <i>Echinops</i>	9
II.4 Le genre <i>Pulicaria</i>	11
II.4.1 Introduction	11
II.4.2 Etude phytochimique.....	11
1. Dérivés phénoliques	12
2. Monoterpènes	12
3. Les squiterpenoides	12
4. Les flavonoides.....	14
5. Les triterpénoides	14
6. Les stéroïdes	14
7. Les huiles essentielles	15
II.4.3 Activité biologiques de différentes espèces du genre <i>Pulicaria</i>	31
Conclusion	33
Références bibliographiques	34

CHAPITRE II. ANALYSES DE L'HUILES ESSENTIELLES DE LA PLANTE *PULICARIA UNDULATA*.

I. Introduction	41
II. Composition chimique des plantes aromatiques	41
III. Fraction volatile des plantes aromatiques	42
IV. Phénomènes physico-chimique et facteurs produisant l'altération des huiles essentielles.....	42
V. Mode d'obtention de l'huile essentielle.....	44
V.1 Préparation d'une huile essentielle par entraînement à la vapeur	44
VI. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles.....	45
VII. Chromatographie à deux dimensions heart-cutting CPG/SM	45
VIII. Etude de l'huile essentielle de la plante <i>Pulicaria undulata</i>	46
VIII.1 Extraction de l'huile	46
VIII.2 Analyse de l'huile par GC et GC-MS.....	46
VIII.3 Résultats et discussion	47
IX. Conclusion	49
Références bibliographiques.....	50

CHAPITRE III. PARTIE EXPERIMENTALE.

I. Etude phytochimique de l'espèce <i>Echinops spinosus</i>	54
I.1 Description botanique	54
I.2 Place dans la systématique	54
I.3 Matériel végétal.....	54
I.4 Macération.....	54
I.5 Séparation et purification des produits.....	55
I.5.1 Etude de l'extrait Acétate d'éthyle	56
1. Etude des fractions F1, F6.....	57
2. Etude de la fraction F8	57
I.5.2 Etude l'extrait butanolique.....	57
1. Etude de la fraction F5	58
2. Etude de la fraction F8	58
3. Etude de la fraction F9	58
4. Etude de la fraction F10	59
II. Etude phytochimique de l'espèce <i>Pulicaria undulata</i>	60
II.1 Description botanique	60
II.2 Place dans la systématique.....	60

II.3 Matériel végétale.....	60
II.4 Macération	61
II.5 Séparation et purification des produits	62
II.5.1 Etude de l'extrait chloroformique	62
II.5.1.1 Etude des sept fractions sélectionnées.....	63
1. Etude de la fraction F4	63
2. Etude des fractions F6 et F8	63
3. Etude de la fraction F7	64
4. Etude de la fraction F9	64
5. Etude des fractions F10 et F11	64
Références bibliographiques.....	66

CHAPITRE IV. RESULTATS ET DISCUSSION.

Introduction.....	68
A. Identification structurale des composés isolés de l'espèce <i>Echinops spinosus</i> L	68
A.I. Les différents composés isolés de la phase AcOEt	68
I.1 Identification structurale du composé A-1	68
I.2 Identification structurale du composé A-2	72
I.3 Identification structurale du composé A-3	76
A.II. Les différents composés isolés de la phase <i>n</i> -butanol.....	81
II.1 Identification structurale du composé B-1	81
II.2 Identification structurale du composé B-2	91
II.3 Identification structurale du composé B-3	98
II.4 Identification structurale du composé B-4	103
A.III. Conclusion sur l'étude structurale des composés issus de l'espèce <i>Echinops spinosus</i> L	111
B. Identification structurale des produits isolés de la phase chloroformique de l'espèce <i>Pulicaria undulata</i>	113
B.I. Identification structurale du composé M	113
B.II. Identification structurale des composés T et A avec ses isomères B, C, D	120
II.1 Identification structurale du composé A	120
II.2 Identification structurale du composé B, C et D	127
II.2.1 Identification structurale du composé B	127
II.2.2 Identification structurale du composé C	132
II.2.3 Identification structurale du composé D	137

II.3 Identification structurale du composé T	141
B.III. Identification structurale du composé E	146
B.IV. Identification structurale des deux isomères F et G	151
IV.1 Configuration absolue des carbones C-6 et C-7 du composé G	159
IV.2 Configuration absolue des carbones C-6 et C-7 du composé F	162
B.V. Identification structurale du composé H	164
B.VI. Conclusion sur l'étude structurale des composés issus de l'espèce <i>Pulicaria undulata</i> L.....	171
Références bibliographique	174

CHAPITRE V. ACTIVITES BIOLOGIQUES.

A. Activité antioxydante des extraits CHCl ₃ , EtOAc et n-BuOH de l'espèce <i>Echinops spinosus</i> L	178
I. Introduction	178
II. Mécanisme d'action	178
III. Evaluation du pouvoir antioxydant.....	178
IV. Matériels et méthodes.....	179
IV.1 Activité scavenger du radical DPPH.....	179
IV.2 Activité scavenger du radical hydroxyle (OH•)	180
IV.3 Teste de blanchissement du mélange β-Carotène/acide linolique	181
IV.4 Résultats et discussions	181
IV.4.1 Activité scavenger du radical DPPH.....	181
IV.4.2 Activité scavenger du radical hydroxyle (OH•)	182
IV.4.3 Teste de blanchissement du mélange β-Carotène/acide linolique	183
V. Conclusion	183
B. Activité anti-inflamatoire de l'extrait chloroformique de l'espèce <i>Pulicaria undulata</i> L.....	184
I. Introduction	184
II. L'inhibition de la dénaturation de l'albumine.....	184
III. Œdèmes de la patte induit par la carraghénane.....	185
IV. Résultats et discussions	185
IV.1 L'inhibition de la dénaturation de l'albumine.....	185
IV.2 Œdèmes de la patte induit par la carraghénane	187
V. Conclusion	187
Références bibliographique	188
Conclusion générale.....	190

Introduction générale.

Au début de l'humanité les plantes faisaient partie de l'alimentation de l'homme, qui découvrit plus tôt que ces plantes pouvaient soulager voir guérir un certain nombre de maux. Ainsi en se basant sur le savoir empirique et ancestrale, l'usage traditionnel et thérapeutique par les plantes s'est transmis oralement au cours des siècles. Les chimistes du XIX siècle firent de la phytothérapie un pas géant par les découvertes des véritables principes actifs. Depuis quatre-vingt ans, les progrès de la chimie d'extraction puis, la chimie de synthèse permettent d'obtenir les principes actifs à l'état pur.

Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles a résulté dans la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines [1].

Dans le monde, 80% des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, les plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages [2].

La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant des plantes médicinales. Cette approche permet de sélectionner des espèces potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs.

L'Algérie pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique appartenant à plusieurs familles botaniques [3].

Ce travail, fruit d'une collaboration entre l'Unité de Recherche : (VARENBIOMOL), Université de Constantine-Algérie et l'Institut de Chimie Biomoléculaire, CNR, Italy, s'inscrit

dans le cadre de la recherche de nouveaux composés qui peuvent trouver une application thérapeutique.

Cette thèse est consacrée à l'étude aussi bien phytochimique que biologique de deux plantes Algériennes, *Echinops spinosus* L. et *Pulicaria undulata* L., de la famille des Asteraceae et sa rédaction est répartie en cinq chapitres.

Dans le premier chapitre, nous présenterons une étude bibliographique sur les espèces *Echinops spinosus* L. et *Pulicaria undulata* L., où sont développés les métabolites secondaires les plus connus ainsi que l'utilisation thérapeutique de ces deux espèces.

Le second chapitre est consacré à l'analyse des huiles essentielles de la plante *Pulicaria undulata*.

Le troisième chapitre renferme toutes les étapes qui ont mené aux produits purs, en passant par la macération, suivie de la séparation sur colonne chromatographique, sur plaques CCM préparatives, par HPLC et en terminant par la purification.

Dans le quatrième chapitre, nous décrivons l'identification des composés isolés dans le chapitre précédent en utilisant les différentes méthodes physico chimiques d'analyse et les méthodes spectroscopiques modernes (UV-visible, IR, RMN mono et bidimensionnelle (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY et NOE "difference"), la spectrométrie de masse à haute résolution HRESIMS(+) et la spectroscopie chiroptique (Polarimétrie, Dichroïsme Circulaire Electronique ECD) ainsi que la discussion des résultats obtenus.

Dans le dernier chapitre nous présenterons les résultats des tests biologiques effectués sur les deux plantes *Echinops spinosus* et *Pulicaria undulata*. Et nous finirons le tout par une conclusion générale qui essayera de faire le point sur les principaux résultats.

Références.

[1] Gurib-Fakim A. Medicinal plants. Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 2006, 27, 1-93.

[2] Pelt J.M., Les nouveaux actifs naturels. Marabout. Paris 2001.

[3] Gaussen H., and Leroy H. F., Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2^{ème} Ed., 1982, 426.

CHAPITRE I

LES GENRES *ECHINOPS* ET *PULICARIA*

Introduction :

Isoler des substances nouvelles de plantes pouvant trouver une application thérapeutique est un travail de recherche assez laborieux. Il convient ainsi de sélectionner avec soin les plantes et leurs extraits à analyser. Certains critères sont à prendre en considération par le phytochimiste pour mener à bien son étude.

I. Critères de sélection des plantes :

Le choix du matériel végétal dépend en grande partie de la réussite du travail entrepris par le phytochimiste et plusieurs critères peuvent guider ce choix, parmi eux :

- ✓ L'utilisation en médecine traditionnelle.
- ✓ L'observation du matériel végétal sur le terrain.
- ✓ Aspects botaniques et chimiotaxonomiques.
- ✓ La littérature.
- ✓ Et par moment le hasard.

I.1. Utilisations en médecine traditionnelle :

L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle est l'un des principaux critères de choix pour un phytochimiste. En effet, depuis la nuit des temps, les plantes ont été utilisées aussi bien comme médicament que comme poison de chasse. Cependant, il faut garder à l'esprit que les résultats obtenus lors de notre étude et l'application en médecine traditionnelle ne doivent pas systématiquement être mis en relation et ceux pour plusieurs raisons. D'une part, les moyens de diagnostic en médecine traditionnelle et en médecine moderne diffèrent largement et si une explication scientifique devrait être donnée à l'utilisation d'une plante en médecine traditionnelle, une cible biologique doit être trouvée et la mise au point d'un test pharmacologique correspondant à la maladie à traiter s'impose. D'autre part, la thérapie en médecine traditionnelle s'appuie sur des rites qui sont associés à la pathologie concernée, ceci relève du domaine ethno-anthropologique et le traiter dépasse notre compétence [1].

I.2. Observations du matériel végétal sur le terrain :

Les observations du matériel végétal et son milieu lors de sa cueillette peuvent donner des informations précieuses. Ainsi, une plante qui pousse dans un milieu tropical riche en microorganismes (champignons, bactéries, etc.) et parasites divers et qui ne présente aucun signe d'attaque par ces microorganismes, serait susceptible de produire des métabolites secondaires (substances chimiques synthétisées par les plantes) qui lui permettront de faire face à ces agressions. Une telle plante peut être une source inestimable de nouveaux produits

possédant des activités biologiques intéressantes : antifongique, antibactérienne, anti-parasitaire ou antioxydante [2].

I.3. Aspects botaniques et chimiotaxonomiques :

Quand la classification des végétaux en s'appuyant sur les caractères morphologiques fait défaut, l'utilisation des métabolites secondaires pour les classer en taxon sera utilisée. C'est ce qu'on appelle classification chimique ou chimiotaxonomique. Actuellement, le recours aux séquences de gènes ou d'ADN par les systématiciens (systématique moléculaire) pour la classification, complète les deux approches précédentes.

Les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines et qui poussent dans le même biotope sont susceptibles de synthétiser les mêmes molécules chimiques. De plus, si ces substances sont particulièrement connues pour leur pouvoir thérapeutique, l'appuie sur les critères chimiotaxonomiques pour étudier une espèce faisant partie de telles familles aura de fortes chances d'aboutir à l'isolement d'au moins un composé susceptible de nous intéresser.

L'endémicité des espèces est aussi à prendre en considération. Sachant que la distribution géographique de telles espèces est restreinte et que des études phytochimiques antérieures effectuées sur ces espèces sont rares, la probabilité d'obtenir de nouvelles molécules serait grande [3].

I.4. La littérature :

Avant d'entreprendre une investigation phytochimique d'une espèce végétale donnée et dans le but d'isoler de nouvelles substances qui peuvent avoir un intérêt en thérapeutique, il est nécessaire de faire une recherche approfondie de littérature. Ainsi, il est plus judicieux de choisir pour notre travail une plante peu ou pas étudiée. Cependant, même pour une plante largement étudiée, pour laquelle une approche différente serait employée dont le procédé analytique est différent et les cibles biologiques différentes, etc..., les résultats obtenus peuvent être prometteurs.

I.5. Le hasard :

La grande diversité des métabolites secondaires synthétisés par les plantes constitue un énorme potentiel pour les phytochimistes de trouver de nouveaux produits. En effet, sur environ 300.000 à 500.000 espèces végétales [4] (Principe, 1989), seule une petite partie a été étudiée. De ce fait, le hasard doublé d'une bonne intuition augmente fortement notre chance d'aboutir à de nouveaux composés.

II. La famille des Asteraceae (Composées) :

II.1. Généralités :

Le mot « Aster » du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. Quant au mot Asteraceae (anciennement appelées Composées), il désigne une famille de composés appartenant aux Dicotylédones comprenant plus de 1500 genres et plus de 25000 espèces décrites dont 750 endémiques. En Algérie, cette famille compte environ 109 genres et plus de 408 espèces [5]. C'est une des familles la plus importante des Angiospermes. Ce sont presque toujours des plantes herbacées avec souvent des racines charnues : rhizomateuses, tubéreuses ou pivotantes [6].

II.2. Description botanique :

Cette famille présente des caractères morphologiques divers : herbes annuelles ou vivaces, plus rarement des arbustes, arbres ou plantes grimpantes et quelques fois, plantes charnues [7]. Bien que généralement ce sont des plantes herbacées à feuilles isolées [6]. L'aspect de l'appareil végétatif est trop variable pour caractériser les Asteraceae sur ce seul critère.

En revanche, cette famille est très homogène au niveau de ses inflorescences très caractéristiques dans le capitule.

Les fleurs des composées sont toujours groupées en une inflorescence (groupe de fleurs sur la même tige) appelée tête ou capitule qui fonctionne comme une fleur unique. Chez la moitié des espèces, les petites fleurs centrales sont tubuleuses, en forme de minuscules disques, alors que celles de la périphérie ont des corolles en forme de languettes évasées vers l'extérieur, comme autant de pétales, qui attirent les insectes pollinisateurs. Les corolles sont entourées à la base de bractées. Le calice (ou Pappus) de chacune des fleurs est formé d'écailles ou de longs poils favorisant la dispersion des graines. Chez le pissenlit, le Pappus se compose de fines aigrettes qui permettent au fruit de flotter dans la brise [8, 9, 10].

Les pétales des capitules sont soudés à la base en une corolle tubulaire. Les anthères se rejoignent pour former un tube que traverse le style (partie médiane du pistil entre l'ovaire et le stigmate). Les anthères déversent le pollen dans le tube et le style s'allonge pour pousser le pollen hors du tube pollinique et le rendre accessible aux insectes pollinisateurs ou faciliter sa dispersion par le vent.

Le stigmate (partie supérieure du pistil recevant le pollen) se rétracte après l'allongement du style pour éviter l'autopollinisation, ce qui arrive parfois lorsque le stigmate s'incurve dans le tube pollinique. Après la fécondation, le pistil portant l'ovaire de la fleur et d'autres éléments floraux se développe pour constituer un fruit à enveloppe dure et à graine unique [8, 9, 10].

Le fruit est un akène généralement surmonté d'un Pappus provenant du calice.

II.3. Le genre *Echinops* :

Le nom *Echinops* signifie en grec « qui a l'apparence d'un hérisson » et l'aspect hérissé est souvent comparé aussi aux oursins (hérisson de mère). Le genre *Echinops* appartient à la famille des Asteraceae et contient environ 120 espèces signalées en Europe, les régions méditerranéennes l'Asie centrale et l'Afrique tropicale [11].



Figure-1 : Echinops spinosus L.

L'*Echinops spinosus* L., connue aussi sous le nom de Teskra, est une espèce vivace à souche ligneuse (longue pivote) sur laquelle s'élève une tige rameuse (haute de 1 à 2 m) plus au moins cotonneuse.

Les feuilles caulinaires, sessiles, ovales, pennatiséquées mesurent de 5 à 15 cm et leurs segments sont terminés par de longues épines jaunâtres.

Les inflorescences à têtes globuleuses, sphériques, d'un diamètre de 4 à 6 cm ponctuées de bleu, sont constituées de fleurs toutes bisexuées.

Les fruits de la Teskra sont des akènes turbinés à couronne raide et laciniée [12].

II.3.1 Propriétés de la plante :

L'*Echinops spinosus* L. est une herbe des sols arides d'Afrique du nord, d'Afrique tropicale et d'Arabie ; elle renferme de l'echinopsine, stimulant du système nerveux, et contribue donc à la circulation sanguine, grâce à la présence de dérivés de l'apigénol et du chrysoériol notamment.

La Teskra est connue depuis longtemps comme un tonique nerveux [13]. Elle est également recommandée en médecine traditionnelle pour soigner l'asthénie, le diabète, les douleurs stomacales. Quant à la plante pulvérisée on la dit dépurative, diurétique et efficace en cas d'affection hépatiques [12].

Par ailleurs, pour son effet contracturant de l'utérus et abortif, les capitules de la Teskra sont utilisées en Afrique pour faciliter l'accouchement et l'expulsion du placenta et la mise bas des animaux [13].

II.3.2 Indication de la plante entière (phytothérapie) [13] :

- ✓ Trouble de la mémoire (Alzheimer ?)
- ✓ Hypertension artérielle.
- ✓ Insuffisance veineuse.
- ✓ Ptôse utérine.

II.3.3 Etude phytochimique :

Les investigations phytochimiques réalisées sur ce genre de plantes montrent la présence de polyacétylène thiophènes [14], d'alkaloides [15], de flavones glycosides [16] et de benzothiophène glycoside [17].

Une recherche bibliographique réalisée sur l'espèce *Echinops spinosus* a montré très peu d'études sur cette plante. La seule étude phytochimique, relativement récente, a été effectuée sur les racines de la plante par un groupe de chercheurs chinois [18] et a permis l'isolement de deux sesquiterpènes : Equinopsine (A) **1** et (B) **2**, représentés ci-dessus :

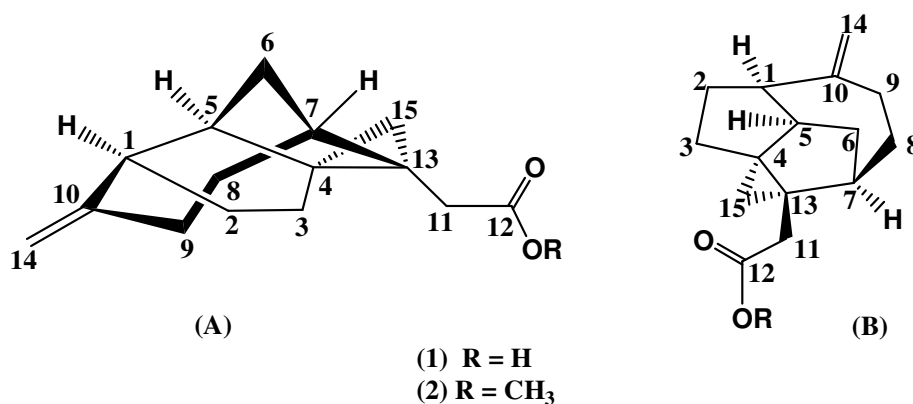


Schéma-1 : Sesquiterpènes de l'Echinops spinosus.

II.3.4 Distribution des sesquiterpènes lactone et polyacétyléniques thiophènes isolés des racines de quelque espèces du genre *Echinops* :

La littérature chimique révèle que 24 espèces de l'*Echinops* ont été soumises à des degrés d'investigation variable, tel La présence de flavonoïdes [19-20] et d'alkaloïdes quinoléine [21-22] dans *E. echinatus* Roxb., *E. ritro* L. et *E. sphaerocephalus* L.

Bohlmann et al. [23] ont également montré la présence de 20 composés polyacétyléniques thiophènes issues d'*E. sphaerocephalus*.

Par contre, un composé thiophène polyacétylénique a été isolé des espèces *E. giganteus* A.Rich. [24] [25] d'Afrique tropicale (Cameroun), et *E. sphaerocephalus* [23], et deux Lignanes, qui sont :

- ✓ (+)-4-(3-méthylbutanoyl)-2,6-di-(3,4-diméthoxy)phényl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane ;
- ✓ (+)-4-hydroxy-2,6-di-(3,4-diméthoxy)phényl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane [25].

Le schéma suivant montre la structure de quelques-uns de ces composés thiophènes polyacétyléniques issus de quelques espèces d'*Echinops*.

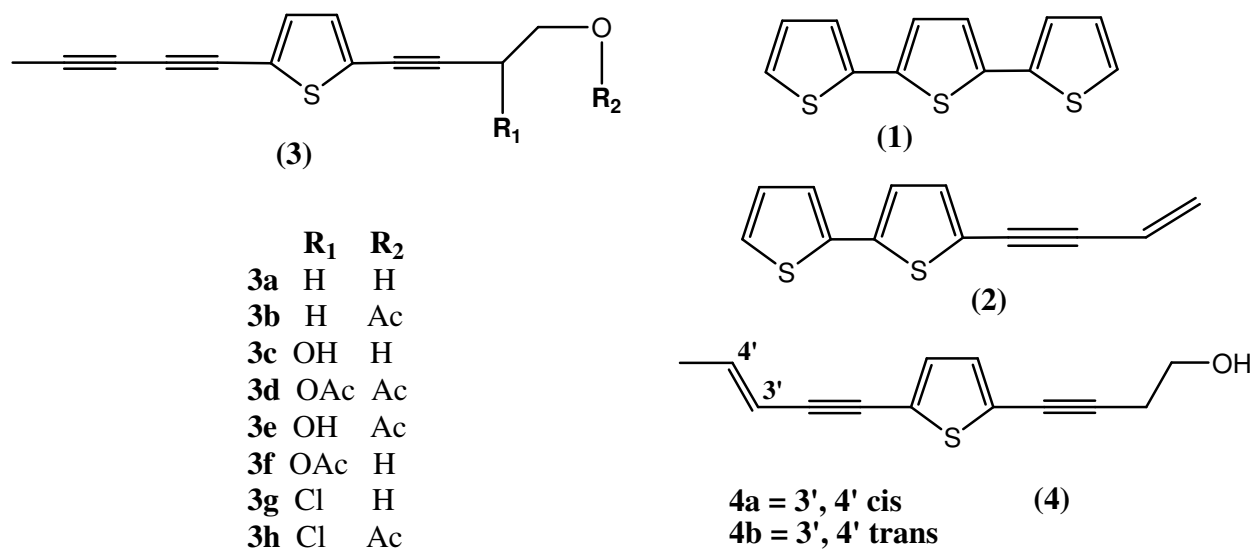


Schéma-2 : Structure de quelques composés thiophène polyacétyléniques issus de quelques espèces d'*Echinops*.

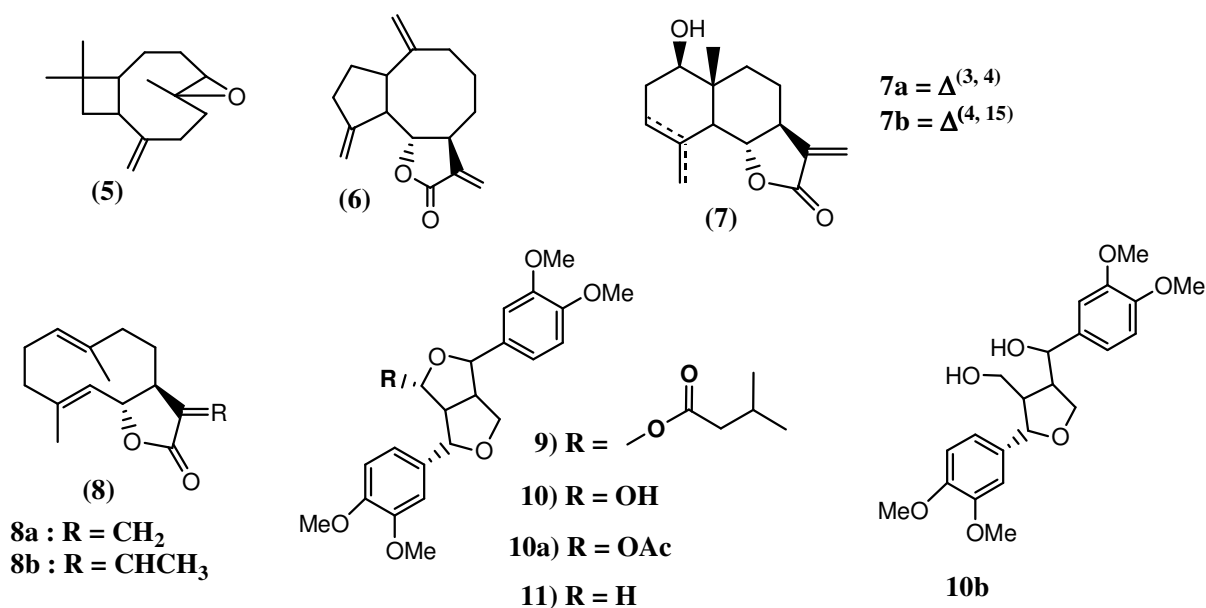


Schéma-2-suite : Structure d'autre composés issus de quelques espèces d'*Echinops*.

II.4. Le genre *Pulicaria* :

II.4.1 Introduction :

Appartenant à la tribu Inuleae de la famille des Astéraceae, le genre *Pulicaria* compte environ 100 espèces réparties en Europe, au nord d'Afrique, d'Asie et plus particulièrement autour de la méditerranée [26].



Figure-2 : Pulicaria undulata.

Pulicaria undulata est une espèce des zones désertiques d'Afrique du Nord et également largement distribuée dans toutes les régions du Moyen-Orient. La plante est utilisée comme un insectifuge, galactagogue, antiépileptique, et comme tonique en médecine populaire [27]. Les activités antibactériennes et sédatifs des huiles de *P. undulata* ont été aussi rapportés [28], [29].

Un certain nombre d'investigations phytochimiques sur cette espèce, indique la présence de flavonoïdes, de sesquiterpènes avec un squelette soit de guaiane ou eudesmane [30] ; et également une composition variée dans les huiles essentielles de *P. undulata* d'Arabie Saoudite [31], d'Egypte [28], du Soudan [32], d'Iran [33] et du Yémen [34].

II.4.2 Etude phytochimique :

Certaines espèces de ce genre sont utilisées dans la médecine traditionnelle, telles :

- La *P. crista*, couramment connue comme (gethgethe), utilisée par les Egyptien et l'Arabie saoudite pour traiter les inflammations. Elle est également utilisée comme insecticide et aussi comme un thé [35].
- La *P. odora* L., (connue par ouden el hallouf), est une plante médicinale marocaine souvent utilisée contre l'inflammation, le mal du dos, le désordre intestinal, les crampes menstruelles. Elle est également associée à un remède traditionnel nommé (Mssakhen) que l'on donne à la femme après l'accouchement.

➤ La *P.dysenterica*, répandue pour son efficacité dans le traitement de la dysenterie en UK [36] ; et sa décoction est utilisée comme un agent antidiarrhéique en Iran [37] .

Des investigations phytochimiques réalisées sur certaines espèces de pulicaria montrent la présence de flavonoïdes, de terpénoïdes, de sesquiterpénoïdes et diterpénoïdes. Il a été démontré que ces composés naturels sont potentiellement bioactifs et pourraient être des produits à valeur ajoutée, prometteurs pour le développement de médicaments [30].

La première investigation phytochimique sur le genre pulicaria a été effectuée en 1968 [38]. Depuis ce temps, divers types de constituants chimiques du genre *Pulicaria* ont été rapportés, à savoir : des dérivés phénoliques, des dérivés de monoterpènes, des sesquiterpènes, des diterpènes, des flavonoïdes, des triterpènes, des stéroïdes, des huiles essentielles...

Jusqu'en 2008, 230 composés ont été isolés de 21 espèces de *Pulicaria* [30]. Leurs structures représentées dans le schéma-2, leurs noms et leurs sources végétales indiqués dans le tableau-1, sont réparties selon les sept familles suivantes :

1. **Dérivés phénoliques** : Onze composés ont été séparés et sont numérotés de 1 à 11 ;
2. **Monoterpènes** : Dix composés ont été séparés, numérotés de 12 à 19 dont des dérivés de thymol où les groupes OH sont parfois acylés avec un acide isobutyrique. Quant aux composés isomères 20 et 21, ils sont isolés à partir des huiles essentielles de *P. undulata* [52,54].
3. **Les sesquiterpénoïdes** : ce sont les principales composantes du genre *Pulicaria* ; ils présentent une variété de squelettes carbonés, tel que : les germacrane, les xanthane, les pseudoguaiane, les guaiane, les eudesmane, les caryophyllane, les bisabolane, etc.

a) Les germacrane :

A partir des parties aériennes de la *P.canariensis*, onze nouveaux dérivés sesquiterpéniques, pulicanadiènes : 22, 23, et 24, pulicanone 25, pulicanol 26, pulicanarals : 27, 28, et 29, pulicanadienals : 30 et 31, et pulicanadienol 32, ont été signalés par Triana et ses collègues en 2005 [55].

Une étude phytochimique de l'extrait d'hexane des parties aériennes de *P. glutinosa Gaertn.* montre la présence de deux nouveaux sesquiterpènes germacrane, nommés : puliglène (33) et epoxypuliglène (34) dont les signaux RMN indiquent des conformations mobiles à température ambiante. Par ailleurs leur structure a été confirmée par une analyse complémentaire monocristallin X-ray [54].

b) Xanthanolides :

L'espèce la plus représentative qui a produit ce type de sesquiterpénoïde est la *P. crispa* où douze xanthanolides, ont été isolés.

En 1979, les neuf xanthanolides : **35** à **38**, **42**, **45** à **48** ont été isolés à partir de la *P. crispa* d'Assuitt par El-Emary et ses collègues [57].

Un extrait de la même plante cueillie sur la route d'Elkuraïemat-Elzafarana (désert oriental, en Egypte) au mois d'Avril 1987, a produit huit composés : **35** à **38**, **40** et **42** à **44** [58].

Ainsi d'un point de vue chimiotaxonomique, il convient de souligner que les métabolites secondaires de cette espèce dépendent des bases génétiques plutôt que des environnements écologiques.

Par ailleurs dans les parties aériennes de la *P. sicula*, six xanthanolides ont été obtenus : **35** et **37** à **41** [49]. Ce type de squelette a également été trouvé chez d'autres espèces, telles que les composés **39** et **41** à partir de la *P. incisa* [61], et **36** de l'espèce sur laquelle porte notre étude la *P. undulata* [59].

c) Pseudoguaianolides :

Seuls quatre pseudoguaianolides ont été isolés des espèces du genre *Pulicaria*, qui sont principalement distribués dans l'espèce *crispa*. L'extrait éther de pétrole de la *P. crispa* d'Egypte a offert trois composés : 8-epiconfertin (**49**), 10 α -hydroxy-8-epiconfertin (**51**), et pulicariolid (**52**) [58].

Une investigation plus approfondie sur la même espèce mais qui provient de la zone de KSIR Kebd du Koweït a conduit à l'isolement d'un pseudoguaianolide **50**, dont la structure est : 5,10-épi-2,3-dihydroaromatine [35]. D'autres espèces de *Pulicaria* ont produit également des composés avec le même type de squelette, par exemple : *P. undulata* [59] et *P. laciniata* [62], les deux ont donné le composé **49**, tandis que la *P. paludosa* a donné le composé **52** [63].

d) Guaianolides :

L'étude de l'espèce *P. crispa* cueillie de différentes localités a conduit à l'isolement de neuf guaianolides à savoir : les composés **53**, **54**, **56**, **58**, et **59** par Dendougui et al. [60], les composés **53**, **57** et **63** par Stavri et al. [35], ainsi que les composés **53**, **61**, et **62** par Abdel-Mogib et al. [58]. Les composés **53**, **56**, **61** ont également été isolés de la *P. sicula* cueilli au printemps 1987 à Qatar, en plus du guaiane (**64**) [49].

Compte tenu du potentiel chimio taxonomique de ces deux plantes, il est intéressant de relever une similitude des xanthanolides et des guaianolides isolés de ces deux espèces ; ceci est probablement lié au fait que l'espèce *sicula* et l'espèce *crispa* sont apparentées.

e) Eudesmanes :

L'investigation phytochimique des espèces du genre *Pulicaria* a donné seulement sept sesquiterpènes eudesmane, numérotés de **70** à **76**. Quatre de ces sesquiterpènes sont similaires par la présence du groupement OH en C2 et de la cyclisation de la γ -lactone en C8 : il s'agit du composé **70** isolé des deux espèces *crispa* [67] et *undulata* [59], des composés **71** et **72** isolés de *P. undulata* [59], et du composé **73** isolé de *P. crispa* [68].

Quant aux composé **74** et les deux composés isomères **75** et **76**, ils ont été isolés respectivement des espèces *canariensis* [55] et *paludosa* [48, 50, 51]

f) Caryophyllanes :

C'est le plus grand groupe de sesquiterpénoïdes connus dans le genre *Pulicaria*. Sur un total de **121** sesquiterpénoïdes, il y'a **42** caryophyllanes, dont six dimères sesquiterpènes. Dans ce groupe, tous les composés montrent des structures similaires (4/9-bicyclique C-squelette) avec une double liaison C=C en C2 .

g) Bisabolènes :

En 1992, El-Feraly et ses co-auteurs [30] ont rapporté la présence de quatre bisabolènes sesquiterpènes, (**119**, **120**, **121** et **122**), iolés de l'espèce *glutinosa*. A ce jour, seule cette espèce offre ces quatre composés sesquiterpéniques.

4. Les flavonoïdes :

Un total de **46** flavonoïdes, de **171** à **216**, ont été identifiés depuis la première étude sur le genre *Pulicaria*, et qui représentent un grand groupe de composés connus dans ce genre. Cette classe, dans ce genre, peut être divisée en quatre sous-groupes : les dérivés de flavones, les dérivés flavonols, les dérivés de flavanone, et les dérivés de flavanonol.

5. Triterpenoids :

Sept composés triterpéniques, **217** à **223**, ont été trouvés dans le genre *Pulicaria*, indiqués dans le tableau-1.

6. Stéroïdes :

Six composés stéroïdes, numérotés de **224** à **229**, ont été isolés de différentes espèces du genre *Pulicaria*.

7. Huiles essentielles : Ce sont les constituants importants du genre *Pulicaria*, isolés de plusieurs espèces [93-95].

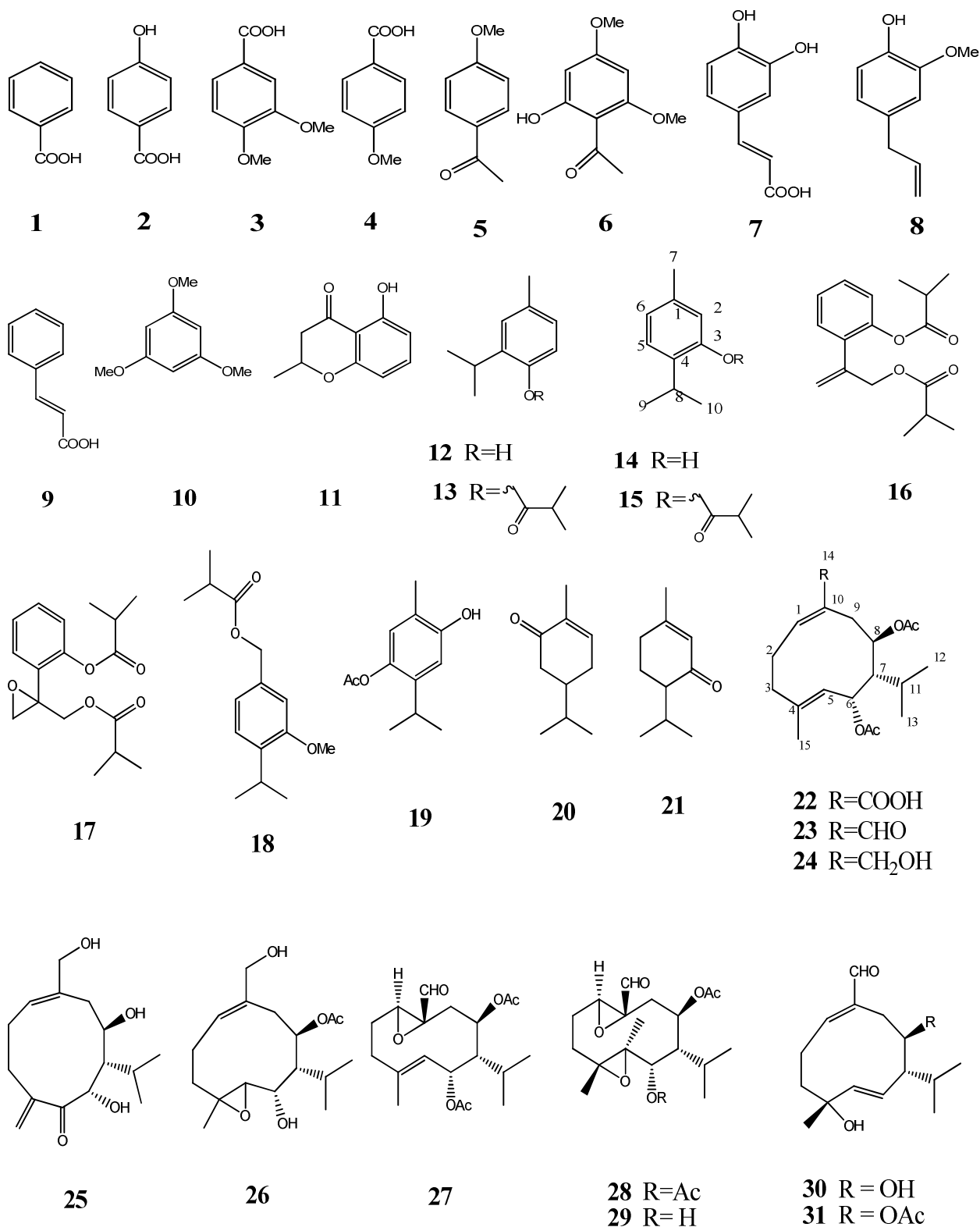


Schéma-3 : Structure des composés issus de différentes espèces du genre *Pulicaria*.

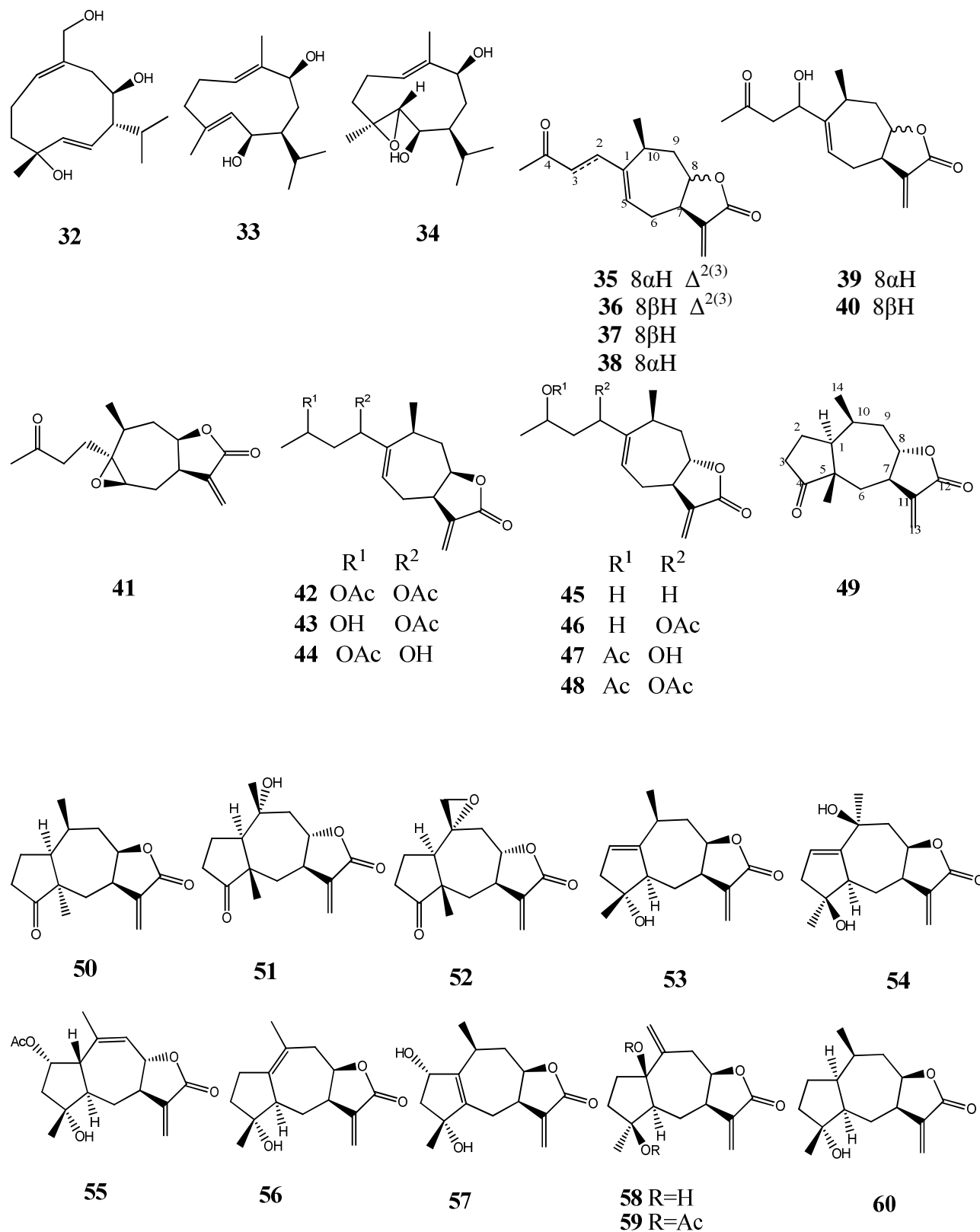
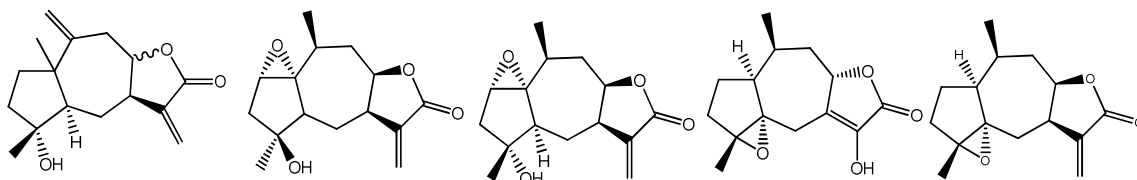


Schéma-3-suite : Structure des composés issus de différentes espèces du genre Pulicaria.



61 8βH
62 8αH

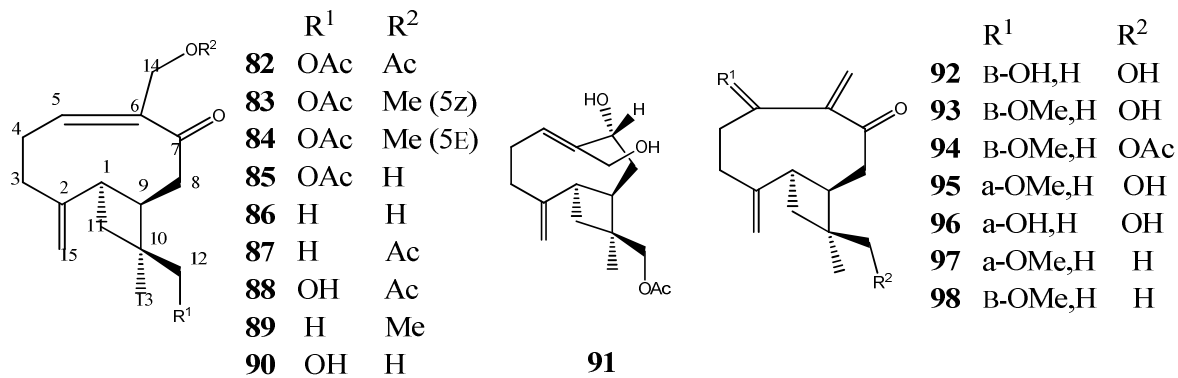
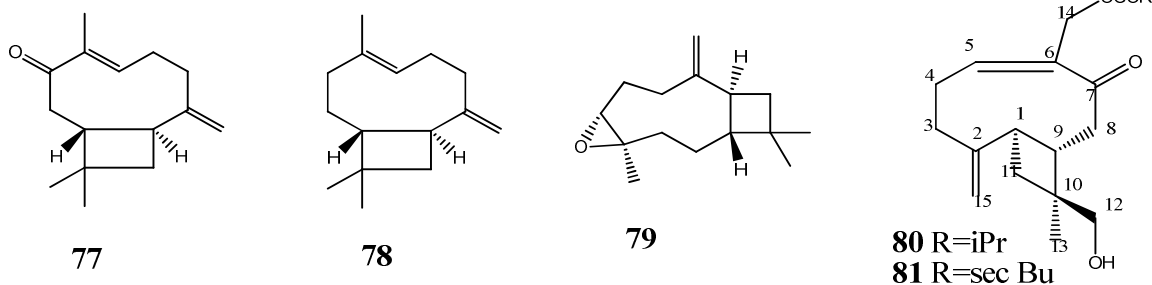
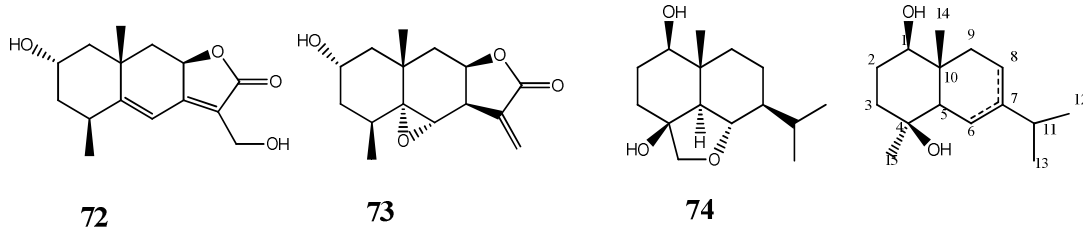
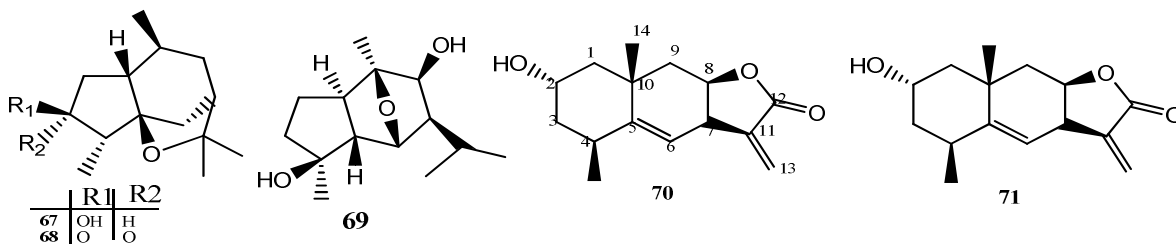
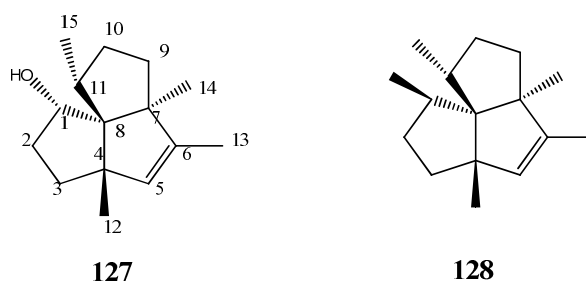
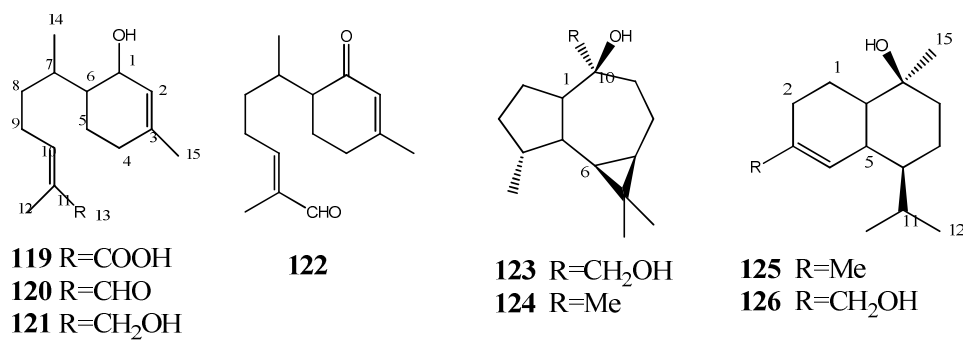
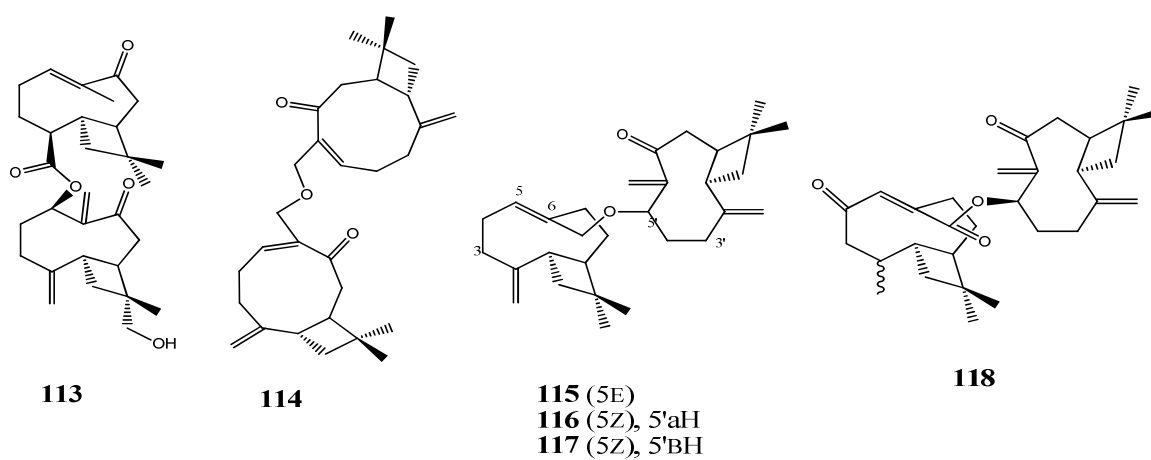
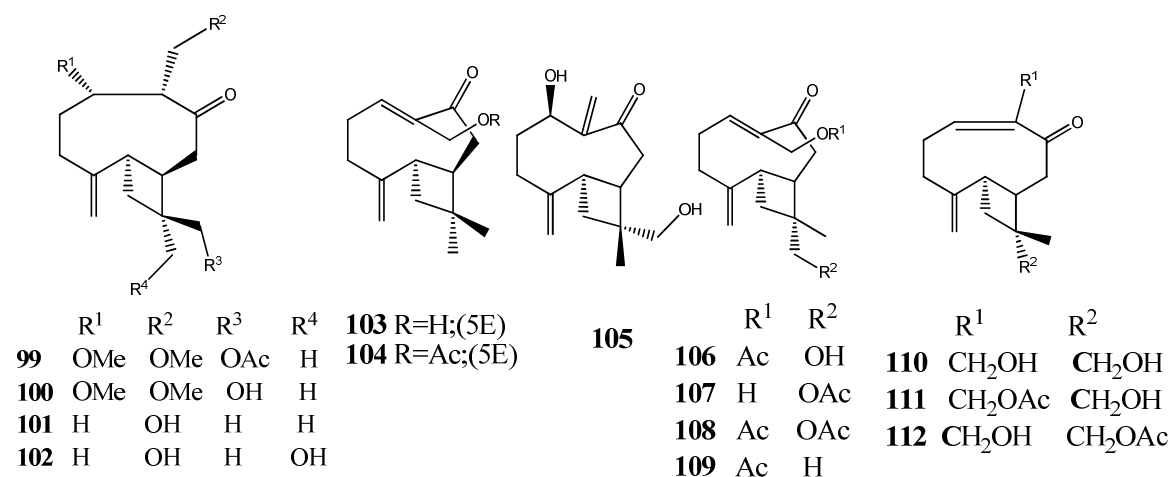


Schéma-3-suite : Structure des composés issus de différentes espèces du genre *Pulicaria*.

Schéma-3-suite : Structure des composés issus de différentes espèces du genre *Pulicaria*.

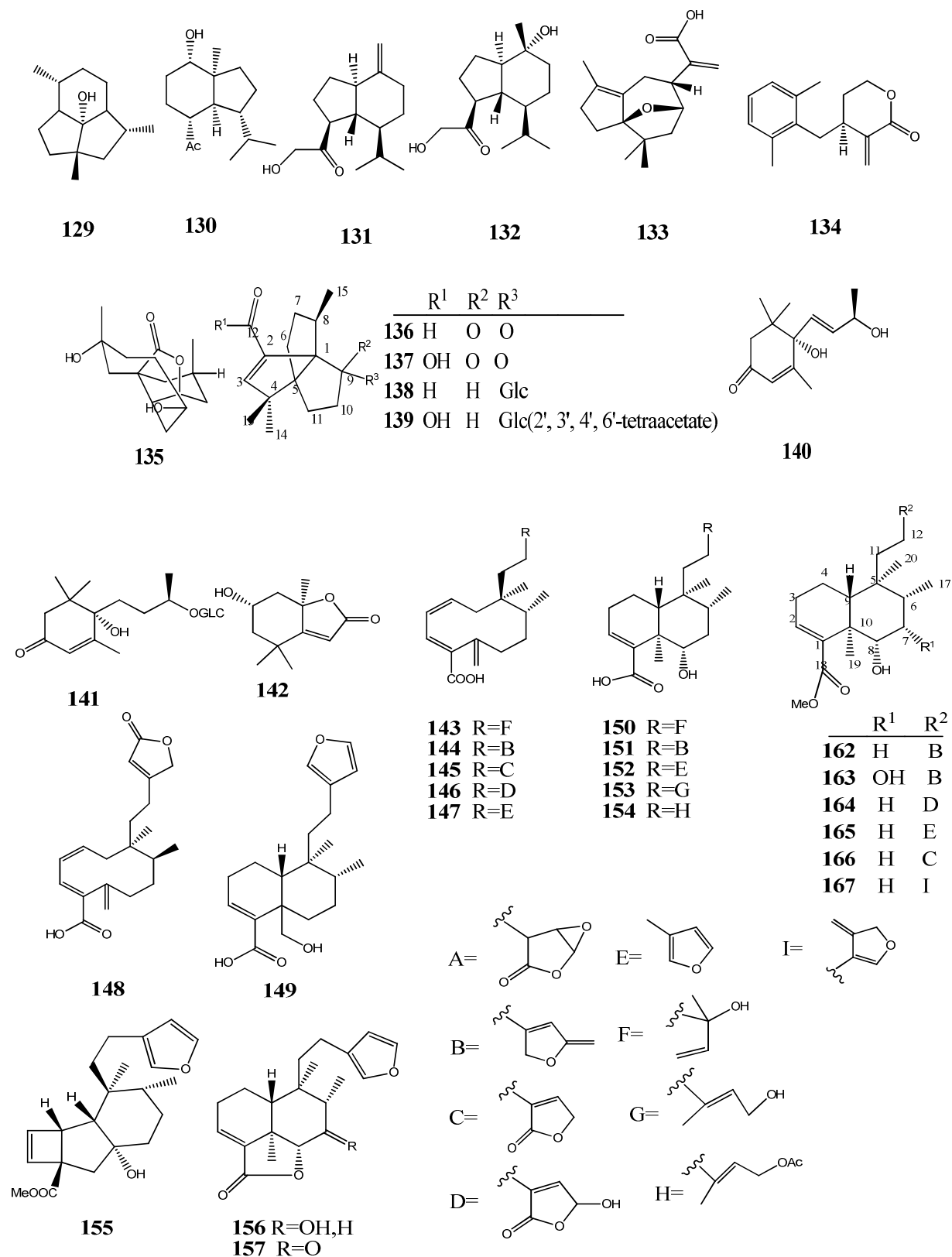


Schéma-3-suite : Structure des composés issus de différentes espèces du genre *Pulicaria*.

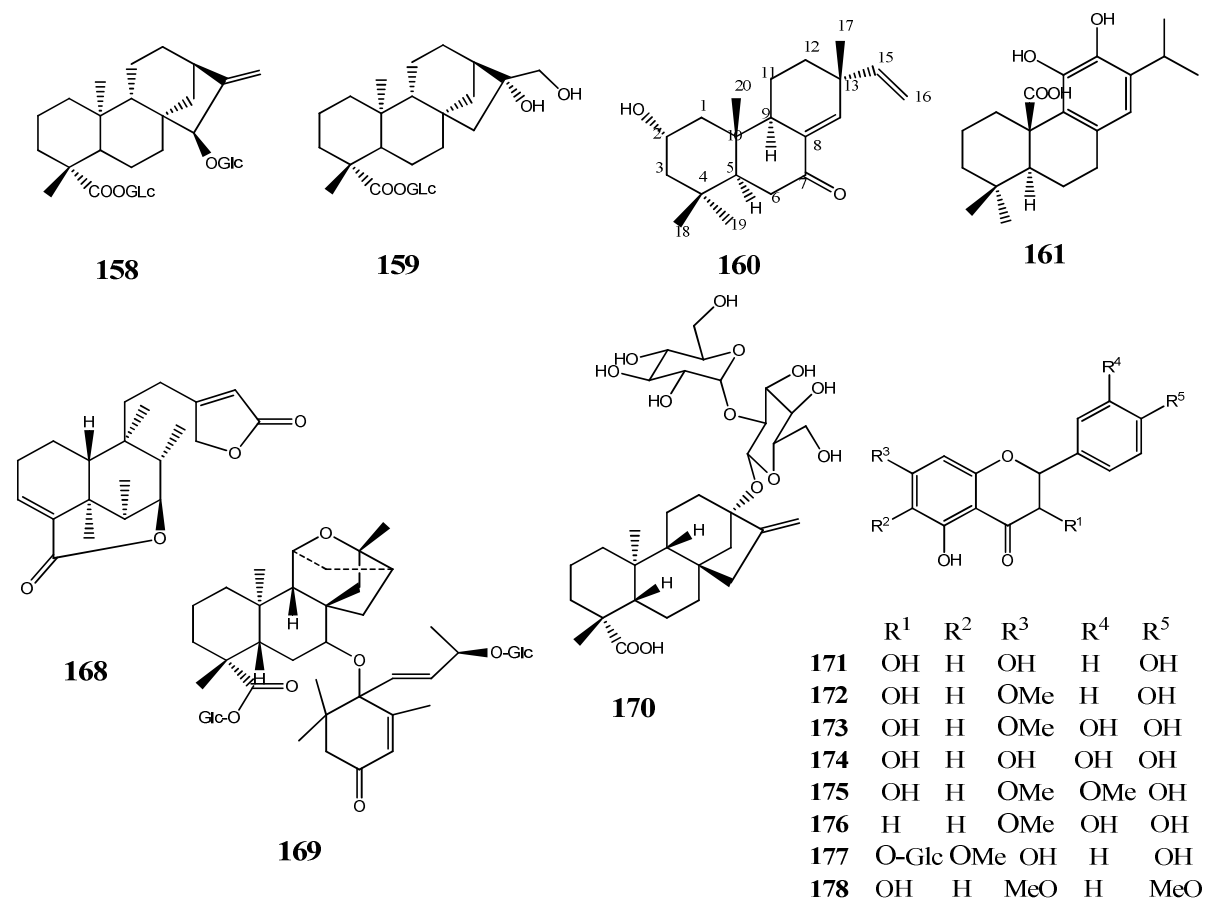
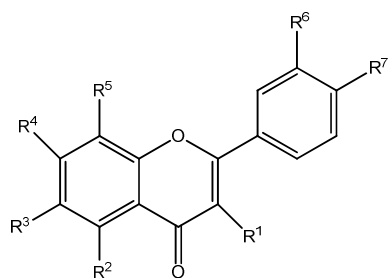


Schéma-3-suite : Structure des composés issus de différentes espèces du genre *Pulicaria*.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
179	OH	OH	H	OH	H	OH	OH
180	O-Glc	OH	H	OH	H	OH	OH
181	OH	OH	H	OH	H	H	OH
182	OMe	OH	H	OH	H	OH	OH
183	OMe	OH	H	OH	H	H	OH
184	OMe	OH	H	OMe	H	H	OH
185	OMe	OH	H	OH	H	OMe	OH
186	OMe	OH	H	OMe	H	OH	OH
187	O-GLc	OH	H	OH	H	H	OH
188	OMe	OH	OMe	OH	H	H	OH
189	OH	OH	H	OH	H	OMe	OH
190	OMe	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OH
191	OMe	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OMe
192	OMe	OH	OH	OMe	OH	OH	OH
193	OMe	OMe	OH	OMe	H	OH	OH
194	OMe	OMe	OH	OMe	H	OMe	OH
195	OMe	OH	OMe	OH	H	OH	OH
196	OH	OH	OMe	OH	H	H	OH
197	O-Glc	OH	OMe	OH	H	H	OH
198	OMe	OH	O-Glc	OH	H	H	OH
199	OH	OH	H	O-Glc	H	OH	OH
200	OMe	OH	OMe	OMe	H	OMe	OH
201	H	OH	OH	OMe	H	H	OH
202	OMe	OH	OMe	OMe	H	OH	OH
203	OMe	OH	OH	OMe	H	OH	OMe
204	H	OH	OH	OH	H	H	OH
205	OMe	OH	OH	OMe	H	H	OH
206	OMe	OH	OMe	OMe	H	H	OH
207	H	OH	OH	OMe	H	H	OH
208	H	OH	OH	OMe	OH	H	OMe
209	OMe	OH	OMe	OMe	H	OMe	OMe
210	OMe	OH	OH	OMe	H	OH	OMe
211	OMe	OH	OMe	OMe	H	OH	OMe
212	OMe	OH	H	OH	H	OMe	OMe
213	OMe	OMe	OH	OMe	H	OH	OMe

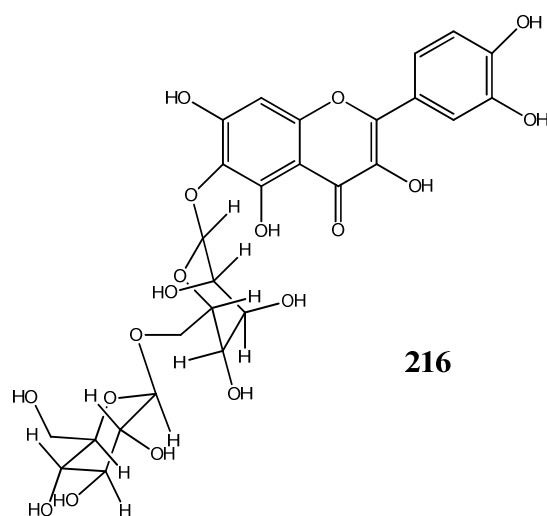
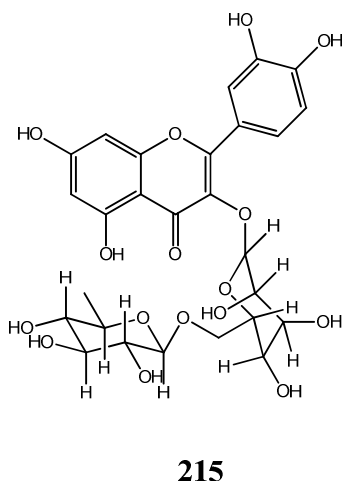
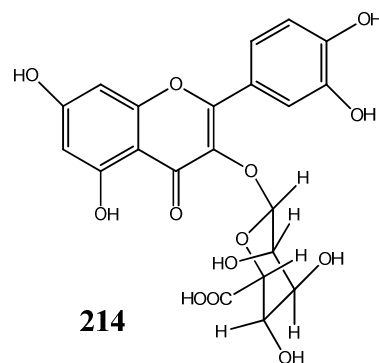


Schéma-3-suite : Structure des composés issus de différentes espèces du genre *Pulicaria*.

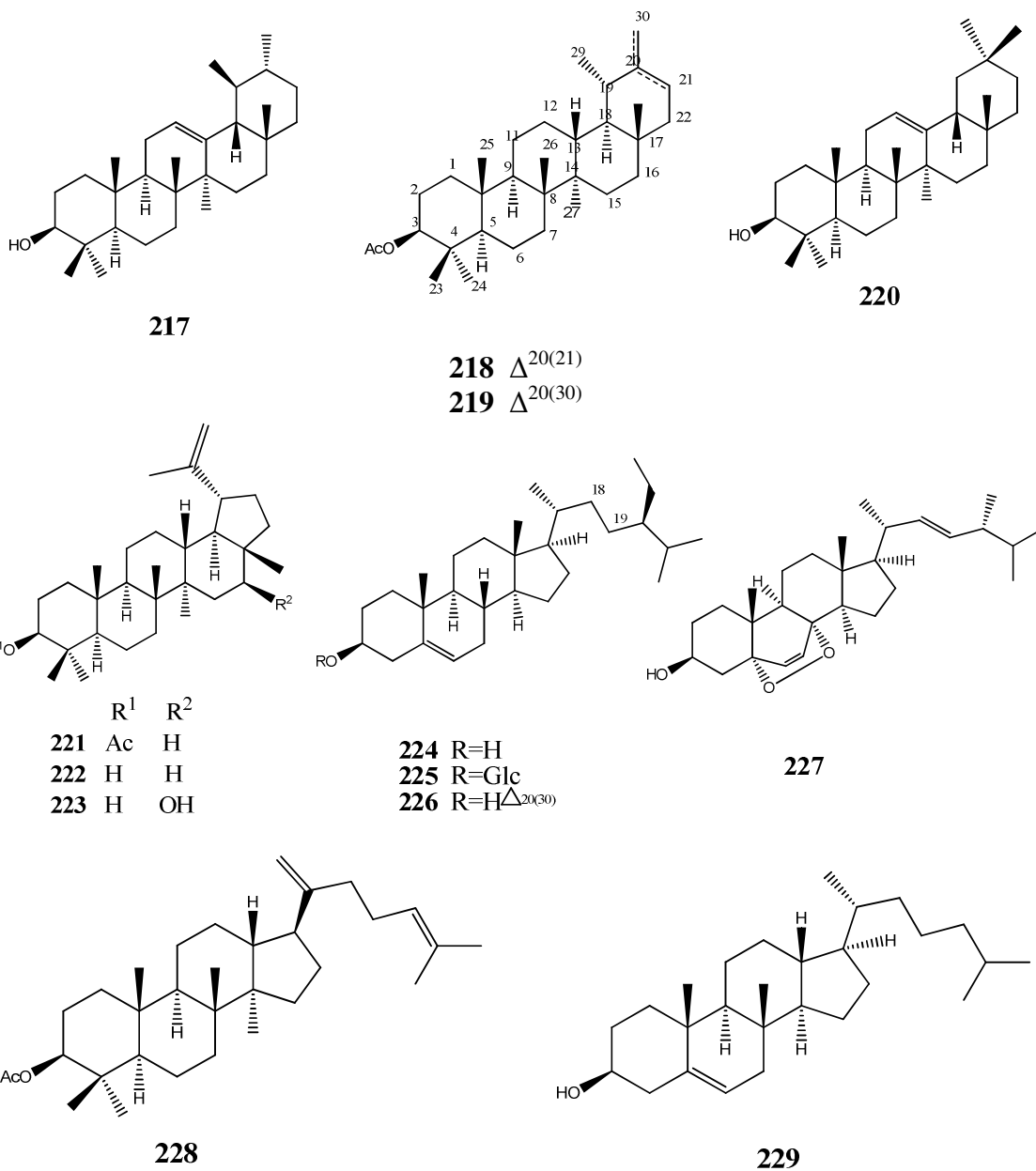
Schéma-3-suite : Structure des composés issus de différentes espèces du genre *Pulicaria*.

Tableau-1 : Les constituants chimiques du genre *Pulicaria*.

N°	Nom du composé	source	réf
Les dérivés phénoliques			
1	L'acide Benzoïque	<i>P. angustifolia</i>	[39]
2	L'acide p-Hydroxybenzoïque	<i>P. paludosa</i>	[40]
3	Acide Veratrique	<i>P. paludosa</i>	[41]
4	Acide Anisique	<i>P. paludosa</i>	[41]
5	p-Methoxyacétophénone	<i>P. paludosa</i>	[41]
6	1-Acetyl-2-hydroxy-4,6-diméthoxybenzène	<i>P. incisa</i>	[42]
		<i>P. undulata</i>	[43]
		<i>P. arabica</i>	[44]
7	Acide caféique	<i>P. dysenterica</i>	[38]
8	Eugénol	<i>P. paludosa</i>	[40]
9	Acide cinamique	<i>P. paludosa</i>	[40]
10	1, 3,5-Triméthoxybenzène	<i>P. Laciniata</i>	[45]
11	5-Hydroxy-2-méthyl-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one-	<i>P. Wightiana</i>	[46]
Monoterpènes			
12	2-Isopropyl-4-méthylphénol	<i>P. odora</i>	[47]
13	2-Isopropyl-4-méthylphénolisobutiriate	<i>P. odora</i>	[47]
14	Thymol	<i>P. arabica</i>	[48]
15	Thymol isobutiriate	<i>P. arabica</i>	[48]
16	10-(Isobutyryloxy)-8,9-didehydrothymol isobutiriate	<i>P. sicula</i>	[49]
17	10-(Isobutyryloxy)-8,9-époxythymol isobutiriate	<i>P. sicula</i>	[49]
		<i>P. arabica</i>	[48]
		<i>P. dysenterica</i>	[50] [51]
18	4-Isopropyl-3-méthoxybenzyl isobutyrate	<i>P. dysenterica</i>	[50] [51]
19	4-Hydroxy-2-isopropyl-5-méthylphényl acétate	<i>P. undulata</i>	[52] [53]
		<i>P. undulata</i>	[53]
20	2-Méthyl-5-(propan-2-yle)cyclohex-2-ène-1-one(Carvotanacétone)	<i>P. undulata</i>	[52] [54]
21	3-Méthyl-6-(propan-2-yl)cyclohex-3-ène-1-one	<i>P. undulata</i>	[53]
Germacrane			
22	Acide (1E, 4E)-7βH-6α, 8β-Diacétoxygermacra-1(10),4-diène-14-oique (Pulicanadiène A)	<i>P. canariensis</i>	[55]
23	(1E,4E)-7βH-6 α,8β-Diacétoxygermacra-1(10),4-diène-14-al (Pulicanadiène B)	<i>P. canariensis</i>	[55]
24	(1E,4E)-7βH-6 α,8β-Diacétoxygermacra-1(10),4-diène-14-ol (Pulicanadiène C)	<i>P. canariensis</i>	[55]
25	(1E)-7βH-6 α,8β,14-Trihydroxygermacra-1(10),4(15)-diène-5-one (Pulicanone)	<i>P. canariensis</i>	[55]
26	(1E)-7βH-4 α,5β-Epoxy-8β-acétoxygermacr-1(10)-ène-6a,14-diol (Pulicanol)	<i>P. canariensis</i>	[55]
27	(4E)-7βH-1β,10 α -Epoxy-6a,8β-diacétoxygermacr-4-ène-14-al (Pulicanaral A)	<i>P. canariensis</i>	[55]
28	7βH-1β,10 α;4a,5β-Diépoxy-6 α,8β-diacétoxygermacran-14-al (Pulicanaral B)	<i>P. canariensis</i>	[55]
29	7βH-1β,10 α;4 α,5β-Diépoxy-8β-acétoxy-6 α -hydroxygermacran-14-al (Pulicanaral C)	<i>P. canariensis</i>	[55]
30	(1E,5E,8R)-7βH-4 α,8β-Dihydroxygermacra-1(10),5-diène-14-al (Pulicanadienal A)	<i>P. canariensis</i>	[55]
31	(1E,5E)-7βH-8β-Acétoxy-4 α -hydroxygermacra-1(10),5-diène-14-al (Pulicanadienal B)	<i>P. canariensis</i>	[55]

N°	Nom du composé	source	Réf
32	(1E,5E)-7βH-Germacra-1(10),5-diène-4α,8β,14-triol (Pulicanadienol)	<i>P.canariensis</i>	[55]
33	Puliglène	<i>P. glutinosa</i>	[56]
34	Epoxyguliglène	<i>P. glutinosa</i>	[56]
Xanthanes			
35	8-Epixanthatine	<i>P.crispa</i> <i>P.sicula</i>	[57][58] [49]
36	Xanthatine	<i>P.crispa</i> <i>P.undulata</i>	[57][58] [49]
37	Xanthosine	<i>P.crispa</i> <i>P.sicula</i>	[57][58][60] [49]
38	Tomentosine	<i>P.crispa</i> <i>P.sicula</i>	[57][58][60] [49]
39	7αH,8αH,10αH-2-Hydroxy-4-oxoxanth-11(13)-èn-12,8β-olide	<i>P.sicula</i> <i>P.incisa</i>	[49] [61]
40	7αH,8βH,10αH-2-Hydroxy-4-oxoxanth-11(13)-èn-12,8α-olide-	<i>P.sicula</i> <i>P.crispa</i>	[49] [58]
41	7αH,8αH,10αH-1β,5β-Epoxy-4-oxoxanth-11(13)-èn-12,8β-olide	<i>P.sicula</i> <i>P.incisa</i>	[49] [61]
42	7αH,8αH,10αH-2,4-Diacetoxanth-11(13)-èn-12,8β-olide (acétate Grafin)	<i>P.crispa</i>	[57] [58]
43	7αH,8αH,10αH-4-Hydroxy-2-acetoxanth-11(13)-èn-12,8β-olide	<i>P.crispa</i>	[58]
44	7αH, 8αH, 10αH-2-Hydroxy-4-acetoxanth-11(13)-èn-12,8β-olide	<i>P.crispa</i>	[58]
45	7αH,8αH,10αH-4-Hydroxyxanth-11(13)-èn-12,8α-olide (Desacétyle xanthanole)	<i>P.crispa</i>	[57][58]
46	7αH,8αH,10αH-4-Hydroxy-2-acetoxanth-11(13)-èn-12,8α-olide	<i>P. crispa</i>	[57]
47	7αH,8αH,10αH-2-Hydroxy-4-acetoxanth-11(13)-èn-12,8α-olide	<i>P. crispa</i>	[57]
48	7αH,8αH,10αH-2,4-Diacetoxanth-11(13)-èn-12,8α-olide (acétate Xanthanole)	<i>P.crispa</i>	[57]
Pseudoguaianes			
49	8-Epiconfèrtine	<i>P.crispa</i> <i>P.undulata</i> <i>P.laciniata</i>	[58] [59] [62]
50	2,3-Dihydro-5,10-épiaromatine	<i>P.crispa</i>	[35]
51	10α-Hydroxy-8-épiconfertine	<i>P.crispa</i>	[58]
52	10α, 14-époxy-8-épiconfortine (pulicariolide)	<i>P.crispa</i> <i>P.pulidosa</i>	[57][58] [63]
Guaianes			
53	1,2-Dehydro-1,10a-dihydropseudoivaline	<i>P.crispa</i> <i>P.sicula</i>	[35][58][60] [49]
54	5αH-4β,10β-Dihydroxyguaia-1(2),11(13)-dièn-12,8α-olide	<i>P.crispa</i>	[60]
55	Gaillardine	<i>P.uliginosa</i>	[64]
56	5αH-4α-Hydroxyguaia-1(10),11(13)-dièn-12,8α-olide	<i>P.crispa</i> <i>P.sicula</i>	[60] [49]
57	7αH,8αH,10αH-2α,4α-Dihydroxyguaia-1(5),11(13)-dièn-12,8β.olide	<i>P. crispa</i>	[35]
58	5αH-1β,4β -Dihydroxyguaia-10(14),11(13)-dièn-12,8α-olide	<i>P.crispa</i>	[60]
59	5αH-1β,4β -Diacétoxyguaia-10(14),11(13)-dièn-12,8α-olide	<i>P.crispa</i>	[60]
60	1αaH,5αH-4α-Hydroxyguai-11(13)-èn-12,8α-olide	<i>P.incisa</i>	[61]

N°	Nom du composé	source	réf
61	4a-Hydroxy-5aH-guaia-10(14),11(13)-dièn-12,8b-olide	<i>P.crispa</i> <i>P.sicula</i> <i>P.incisa</i>	[58] [49] [61]
62	5aH-4a-Hydroxyguaia-10(14),11(13)-dièn-12,8a-olide	<i>P.crispa</i>	[58]
63	5aH,7aH,8aH,10aH-1a,2a-époxy-4b-hydroxyguai-11(13)-èn-12,8b-olide	<i>P.crispa</i>	[35]
64	5aH,7aH,8aH,10aH-1a,2a-époxy-4a-hydroxyguai-11(13)-èn-12,8b-olide	<i>P.sicula</i>	[49]
65	1aH,10aH-11-Hydroxy-4a,5a-époxy-13-norguai-7(11)-èn-12,8a-olide	<i>P.undulata</i> <i>P.undulata</i>	[59] [59]
66	1aH,10aH-4a,5a-époxyguai-11(13)-èn-12,8a-olide	<i>P.laciniata</i>	[62]
67	liguloxid-3b-ole	<i>P.paludosa</i>	[65]
68	Liguloxid-3-one	<i>P.paludosa</i>	[65]
69	Cycloépoxyguligène	<i>P.glutinosa</i>	[66]
Eudesmanes			
70	2a-Hydroxalantolactone	<i>P. crisper</i> <i>P.undulata</i>	[67] [59]
71	2 α -Hydroxyeudesma-4(5),11(13)-dièn-12,8 β -olide	<i>P.undulata</i>	[59]
72	<i>Pulicaria glaucolide</i>	<i>P.undulata</i>	[59]
73	2 α -Hydroxy-5 α ,6 α -époxyalantolactone	<i>P.crispa</i>	[68]
74	1 β ,4 β -Dihydroxy-6,15 α -époxyeudesmane	<i>P.canariensis</i>	[55]
75	Oplodirole	<i>P.paludosa</i>	[48]
76	Isoplodirole	<i>P.paludosa</i>	[50] [51]
caryophyllanes			
77	Buddledine C	<i>P.prostrata</i>	[69]
78	Caryophyllène	<i>P.paludosa</i> <i>P.dysenterica</i>	[40][63] [62]
79	Caryophyllène epoxyde	<i>P.angustifolia</i>	[39]
80	(5Z)-12-Hydroxy-14-isobutanoyloxycaryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.paludosa</i>	[65]
81	(5Z)-12-Hydroxy-14-(2-methylbutanoyloxy)caryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.paludosa</i>	[65]
82	(1S,5Z,9R)-12,14-Diacétoxcaryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i> <i>P.arabica</i>	[50] [48]
83	(1S,5Z,9R,11S)-14-Methoxy-12-acetoxycaryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[50]
84	(1S,5E,9R,11S)-14-Methoxy-12-acétoxcaryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i> <i>P.arabica</i>	[50] [48]
85	(1S,5Z,9R)-12-Acétoxy-14-hydroxycaryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i> <i>P.arabica</i> <i>P.paludosa</i>	[50] [48] [65]
86	(5Z)-14-Hydroxycaryophyllène-7-one	<i>P.arabica</i> <i>P.scabra</i> <i>P.paludosa</i>	[48] [70] [63]
87	(5Z)-14-Acétoxcaryophyllène-7-one	<i>P.arabica</i> <i>P.dysenterica</i> <i>P.scabra</i> <i>P.paludosa</i>	[48] [50] [70] [63]

N°	Nom du composé	source	Réf
88	(1S,5Z,9R)-12-Hydroxy-14-acétoxycaryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i> <i>P.arabica</i>	[50] [48]
89	(1S,5Z,9R)-14-Methoxycaryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[50]
90	(1S,5Z,9R)-12,14-Dihydroxycaryophylla-2(15),5-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i> <i>P. paludosa</i>	[50] [65]
91	(1S,9R)-7βH-12-Acétoxycaryophylla-2(15),5E-diène-7,14-diol	<i>P.dysenterica</i> <i>P. arabica</i>	[50] [48]
92	(1S,9R)-5αH-5,12-Dihydroxycaryophylla-2(15),6(14)-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i> <i>P. Arabica</i>	[50] [48]
93	5αH-12-Hydroxy-5-methoxycaryophylla-2(15),6(14)-dièn-7-one	<i>P.arabica</i>	[48]
94	5αH-12-Acétoxy-5-methoxycaryophylla-2(15),6(14)-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i> <i>P.arabica</i>	[50] [48]
95	5βH-12-Acétoxy-5-methoxycaryophylla-2(15),6(14)-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i> <i>P.arabica</i>	[50] [48]
96	5βH-5,12-dihydroxycaryophylla-2(15),6(14)-dièn-7-one	<i>P.arabica</i> <i>P.paludosa</i>	[48] [65]
97	5βH-5-Methoxycaryophylla-2(15),6(14)-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[50]
98	5αH-5-Methoxycaryophylla-2(15),6(14)-dièn-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[50]
99	(1S,5S,6S,9R,11S)-5,4-Dimethoxy-12-acétoxycaryophyll-2(15)-èn-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[50]
100	(1S,5S,6S,9R,11S)-5,4-Dimethoxy-12-hydroxycaryophyll-2(15)-èn-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[50]
101	(1S,6R,9R)-14-Hydroxycaryophyll-2(15)-èn-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[50]
102	(1S,6R,9R,11R)-13,14-Dihydroxycaryophyll-2(15)-èn-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[50]
103	(5E)-14-Hydroxycaryophyllène-7-one	<i>P. scabra</i>	[70]
104	14-Aétoxy-5,6-trans-caryophyllène-7-one	<i>P. scabra</i>	[70]
105	6,14-Didehydro-5,6-dihydro-5,13-dihydroxycaryophyllène-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[51]
106	14-Acétoxy-13-hydroxycaryophyllène-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[51]
107	13-Acétoxy-14-hydroxycaryophyllène-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[51]
108	13,14-Diacétoxycaryophyllène-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[51]
109	14-Acétoxycaryophyllène-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[51]
110	(5Z)-13,14-Dihydroxycaryophyllène-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[51]
111	(5Z)-14-Acétoxy-13-hydroxycaryophyllène-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[51]
112	(5Z)-13-Acétoxy-14-hydroxycaryophyllène-7-one	<i>P.dysenterica</i>	[51]
113	Pulidysenterine	<i>P.dysenterica</i>	[51]
114	Bis-[(5Z)-7-oxocaryophyllène]-14-O-ether	<i>P. arabica</i>	[48]
115	Puliscabrine	<i>P. scabra</i>	[70]
116	(5Z)-Puliscabrine	<i>P. scabra</i>	[70]
117	(5Z)-5'-Epipuliscabrine	<i>P. scabra</i>	[70]
118	2,15-Dihydropuliscabrin-4,14-dione	<i>P. scabra</i>	[70]
Bisabolènes			
119	Acide puliglutoïque	<i>P. glutinosa</i>	[71]
120	puliglutale	<i>P. glutinosa</i>	[66][71]
121	Puliglutole	<i>P. glutinosa</i>	[66][71]
122	Puliglutone	<i>P. glutinosa</i>	[66]
Autre terpènes			
123	Alloaromadendrane-10β, 14- diole	<i>P.paludosa</i>	[65]
124	Viridiflorole	<i>P.paludosa</i>	[65]
125	T-Cadinole	<i>P.paludosa</i>	[65]

N°	Nom du composé	source	réf
126	14-Hydroxy-T-cadinole	<i>P. paludosa</i>	[65]
127	1 α -Hydroxyisocomène	<i>P. scabra</i>	[40]
128	1 β -Hydroxyisocomène	<i>P. dysenterica</i>	[51]
129	Presilphiperfolanole	<i>P. dysenterica</i>	[51]
130	Paludolone	<i>P. paludosa</i>	[63]
131	15-Hydroxyoplop-10(14)-èn-4-one (Pulioplopanone A)	<i>P. canariensis</i>	[55]
132	10 α ,15-Dihydroxyoplop-4-one (Pulioplopanone B)	<i>P. canariensis</i>	[55]
133	2-(3,4,5,6,7,8,9,10-Octahydro-2,6-diméthyl-5,8-oxaazulen-9-yl)acide acrylique (Lacitemzine)	<i>P. laciniata</i>	[45]
134	Secocrispiolide	<i>P. crispa</i>	[57]
135	2 α ,6 α -Diméthyltetracyclodecal-3-ène-2,12-diol-13,8b-olide (Pulicrispiolide)	<i>P. crispa</i>	[72]
136	Pulicarale	<i>P. paludosa</i>	[41]
137	Acide pulicarique	<i>P. paludosa</i>	[41]
138	9-Glucopyranosylpropanopentalène-3-carboxaldehyde	<i>P. paludosa</i>	[41]
139	9-(2',3',4',6'-Tetraacétylglycopyranosyle)oxypropanopentalène-3-acide carboxylique	<i>P. paludosa</i>	[41]
140	Corchoionole C	<i>P. undulata</i>	[73]
141	Roséoside A	<i>P. undulata</i>	[73]
142	Loliolide	<i>P. incisa</i>	[61]
Diterpénoides			
143	(1E,3Z)-6 α ,7 α -Diméthyl-10-méthylidène-6-[2-(3-oxo-2,6-dioxabicyclo[3.1.0]hex-4-yl)éthyl]cyclodeca-1,3-dinène-1-acide carboxylique	<i>P. angustifolia</i>	[39]
144	(1E,3Z)-6 α ,7 α -Diméthyl-10-méthylidène-6-[2-(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)éthyl]cyclodeca-1,3-diène-1-acide carboxylique	<i>P. angustifolia</i>	[39]
145	15-Acide Deoxypulique	<i>P. angustifolia</i>	[39]
		<i>P. glutinosa</i>	[71]
146	Acide polique	<i>P. glutinosa</i>	[71]
147	Acide strictique	<i>P. glutinosa</i>	[71]
148	(1E,3Z)-6 α ,7 β -Diméthyl-10-méthylidène-6-[2-(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)éthyl]cyclodeca-1,3-diène-1-acide carboxylique	<i>P. somalensis</i>	[74]
149	acide Hautriwaique	<i>P. salviifolia</i>	[75]
150	acide trans-6 α ,13-Dihydroxycyleroda-3(4),13(14)-diène-18-oïque (Salvicinoline)	<i>P. salviifolia</i>	[76]
151	acide trans-6 α -Hydroxycyleroda-3(4),13(14)-diène-15-olid-18-oïque (Salvicinolide)	<i>P. salviifolia</i>	[76]
152	Acide Hardwickiique	<i>P. salviifolia</i>	[77]
153	Salvicine	<i>P. salviifolia</i>	[78]
154	acide trans-15-Acétoxy-6 α -hydroxycyleroda-3,13-diène-18-oïque (Salvicinine)	<i>P. salviifolia</i>	[79]
155	Méthyl 5 α -hydroxyconyscabroate	<i>P. angustifolia</i>	[39]
156	Salvinine	<i>P. salviifolia</i>	[77]
157	Acide 6-Hydroxy-7-oxohardwickiique lactone	<i>P. gnaphalodes</i>	[80]
158	Crispioside A	<i>P. crispa</i>	[58]
		<i>P. incisa</i>	[61]
159	Crispioside B	<i>P. crispa</i>	[58]
		<i>P. incisa</i>	[61]
160	2 α -Hydroxyisopimara-8(14),15-diène-7-one	<i>P. wightiana</i>	[81]
161	Salvine	<i>P. salviifolia</i>	[77]
162	Salvicinolide méthyle ester	<i>P. wightiana</i>	[46][82]

N°	Nom du composé	Source	Réf
163	Methyl (4aR,5R,6S,7S,8R,8aR)-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-7,8-dihydroxy-5,6,8a-trimethyl-5-[2-(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3yl)ethyl]naphthalène-1-carboxylate	<i>P.wightiana</i>	[45][82]
164	Methyl (4aR,5S,6R,8S,8aR)-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-8-hydroxy-5-[2-(5-hydroxy-2-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)ethyl]-5,6,8a-trimethylnaphthalène-1-carboxylate	<i>P.wightiana</i>	[46]
165	Methyl (4aR,5S,6R,8S,8aR)-5-[2-(furan-3yl)ethyl]3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-8-hydroxy-5,6,8a-trimethylnaphthalène-1-carboxylate	<i>P.wightiana</i>	[45][82]
166	Methyl (4aR,5S,6R,8S,8aR)-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-8hydroxy-5,6,8a-trimethyl-5-[2-(2-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)ethyl]naphthalène-1-carboxylate	<i>P.wightiana</i>	[82]
167	Methyl (4aR,5S,6R,8S,8aR)-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-8hydroxy-5,6,8a-trimethyl-5-[2-(2,5-dihydrofuran-3-yl)ethyl]-naphthalène-1-carboxylate	<i>P.wightiana</i>	[82]
168	3,4,9,5,6,7,8,8a-Octahydro-8 α -hydroxy-5 α ,6 α ,8a α -trimethyl-5 β -[2-(5-oxo-2,5-dihydrofuran-3-yl)]ethyl]naphthalène-18,7 β -olide	<i>P.wightiana</i>	[46]
169	Pulicaroside B	<i>P. undulata</i>	[73]
170	Steviobioside	<i>P.incisa</i>	[42]
Flavonoïdes			
171	Dihydrokaempférol	<i>P. orientalis</i> <i>P. arabica</i> <i>P. undulata</i>	[83] [44] [52]
172	7-O-Methylaromadendrine	<i>P.incisa</i> <i>P.undulata</i>	[42] [52][53]
173	7-methyl ether taxifoline	<i>P. icisa</i> <i>P.undulata</i>	[84] [52]
174	Dihydroquercétine	<i>P.arabica</i> <i>P.undulata</i>	[44] [52]
175	3',7-dimethyle éther dihydroquercétine	<i>P.undulata</i> <i>P.canariensis</i>	[52] [55]
176	7-O-Methyleriodictyole	<i>P.undulata</i>	[53]
177	Undulatoside	<i>P.undulata</i>	[85]
178	7,4'-Di-O-methyldihydrokaempferole	<i>P.canariensis</i>	[55]
179	Quercétine	<i>P.orientalis</i> <i>P.incisa</i> <i>P.arabica</i> <i>P.crispa</i>	[83] [42] [44] [86]
180	3-monoglucoside quercétine	<i>P.orientalis</i> <i>P.incisa</i> <i>P.arabica</i> <i>P.crispa</i>	[83] [84] [87] [86]
181	Kaempférol	<i>P.orientalis</i> <i>P.incisa</i> <i>P.arabica</i>	[83] [42] [44]
182	3-methyl ether quercetine	<i>P.orientalis</i> <i>P.incisa</i> <i>P.arabica</i> <i>P.crispa</i>	[83] [42][84] [44] [86]

N°	Nom du composé	source	réf
183	3-méthyle ether Kaempférol	<i>P.orientalis</i> <i>P.incisa</i> <i>P.arabica</i> <i>P.undulata</i>	[83] [42][84] [44] [52]
184	3,7-diméthyle ether Kaempférol	<i>P.orientalis</i> <i>P.arabica</i>	[83] [44]
185	3,3'-diméthyle ether quercétine	<i>P.incisa</i>	[42]
186	3,7-diméthyle ether quercétine	<i>P.incisa</i> <i>P. Arabica</i> <i>P.undulata</i>	[84] [44] [52]
187	3-glucoside kaempférol (Trifoliine)	<i>P.incisa</i> <i>P.dysenterica</i>	[84] [38]
188	3-méthyle ether-6-méthoxykaempférol	<i>P.paludosa</i>	[65]
189	3'-Méthyle quercétine	<i>P.arabica</i>	[88]
190	4'-Hydroxy-3,5,6,7,3'-pentaméthoxyflavone	<i>P.arabica</i>	[88]
191	3,5,6,7,3',4'-Hexaméthoxyflavone	<i>P.arabica</i>	[88]
192	3,7-diméthyle ether quercétagine	<i>P.arabica</i> <i>P.dysenterica</i>	[87] [89]
193	3,5,7-triméthyle ether quercétagine	<i>P.arabica</i>	[87]
194	3,5,7,3'-tetraméthyle ether quercétagine	<i>P.arabica</i>	[87]
195	3,6-diméthyle ether Quercétagine (Axillarine)	<i>P.undulata</i> <i>P.crispa</i>	[85] [68]
196	6-Méthoxykaempférol	<i>P.undulata</i>	[85]
197	3-glucoside 6-Méthoxykaempférol	<i>P.undulata</i>	[85]
198	3-méthyle ether 6-glucoside 6-Hydroxykaempférol	<i>P.dysenterica</i>	[89]
199	Quercimétrine	<i>P.crispa</i>	[86]
200	3,6,7,3'-tetraméthyle ether quercétagine	<i>P.somalensis</i>	[74]
201	Ladanetine	<i>P.uliginosa</i>	[64]
202	3,6,7-triméthyle ether quercétagine	<i>P.somalensis</i>	[74]
203	3',5,6-Trihydroxy-3,4',7-triméthoxyflavone	<i>P.wightiana</i>	[46]
204	scutéllareine	<i>P.dysenterica</i>	[89]
205	3,7-diméthyle ether 6-Hydroxykaempférol	<i>P.dysenterica</i>	[89]
206	3,6,7-triméthyle ether 6-Hydroxykaempférol	<i>P.dysenterica</i>	[89]
207	5,6-Dihydroxy-4',7-diméthoxyflavone	<i>P.paludosa</i>	[65]
208	5,6,8-Trihydroxy-4',7-diméthoxyflavone	<i>P.paludosa</i>	[65]
209	Artemisetine	<i>P.arabica</i>	[88]
210	3,7,4'-triméthyle ether Quercétagine	<i>P.dysenterica</i>	[38]
211	3,6,7,4'-tetraméthyle ether Quercétagine	<i>P.somalensis</i>	[74]
212	5,7-Dihydroxy-3,3',4'-triméthoxyflavone	<i>P.canariensis</i>	[55]
213	3',6-Dihydroxy-3,4',5,7-tetraméthoxyflavone	<i>P.salviifolia</i>	[90]
214	3-glucuronide quercétine	<i>P.arabica</i>	[87]
215	3-rhamnoglucoside quercétine	<i>P.salviifolia</i>	[78]
216	pulicaroside	<i>P.undulata</i>	[85]
triterpenoides			
217	α -Amyrine	<i>P.incisa</i>	[42]
218	acétate pseudotaraxasteryl	<i>P.paludosa</i>	[63]
219	acétate traxasteryle	<i>P.angustifolia</i> <i>P.paludosa</i> <i>P.undulata</i> <i>P.salviifolia</i>	[39] [63] [52] [91]

N°	Nom du composé	source	réf
220	Amyrine B	<i>P.crispa</i>	[92]
221	Acétate lupéol	<i>P.incisa</i>	[42]
222	Lupéol	<i>P.angustifolia</i>	[39]
		<i>P.undulata</i>	[52]
223	Calenduladio	<i>P.canariensis</i>	[91]
Steroides			
224	β -Sitostérol	<i>P.angustifolia</i>	[39]
		<i>P.arabica</i>	[48]
		<i>P. crisper</i>	[92]
		<i>P.salviifolia</i>	[91]
225	3-O- β -glucoside Sitostérol	<i>P.incisa</i>	[61]
226	Stigmastérol	<i>P.angustifolia</i>	[39]
		<i>P.paludosa</i>	[63]
227	peroxide Ergostérol	<i>P.canariensis</i>	[55]
228	acétate Dammaradiényle	<i>P.arabica</i>	[48]
229	Cholestérol	<i>P.salviifolia</i>	[91]

Suite à une investigation phytochimique récente ; d'autres composés chimiques ont été ajoutés à la liste précédente et qui sont décrits dans des articles allant de 2008 à 2013.

- Hatem Ghouila et al. ont pu isoler, en 2008 et 2009, deux composés (**230**) [96] et (**231**) [97] de type sesquiterpène d'une espèce Tunisienne *Pulicaria laciniata* (Coss. et Kral.)
- En 2010 Sheng-Zhuo Huang et al. [98] ont pu isoler de *Pulicaria insignis* un composé de type Trinorsesquiterpène, dont la structure (**232**) est rarement signalée ainsi que son précurseur le sesquiterpène (**233**). Bien qu'il n'y ait pas d'études pour soutenir les activités suivantes, cette plante est traditionnellement utilisée pour réduire les symptômes de la grippe et le rhume, et également dans le traitement de la fièvre et le soulagement de la douleur.

Ces composés représentés dans le schéma-4, sont :

- **230** : acide sesquiterpénique nommé lacitemzine ;
- **231** : pseudo-guaianolide type sesquiterpène lactone nommé pulicazine ;
- **232** : rel-(4aR,5S,8aR)-4a,5,6,7,8,8a-Hexahydro-4a-hydroxy-5,8a-diméthyl-naphthalène-2(1H)-one
- **233** : rel-(5R,8aS,9aS)-6,7,8,8a,9,9a-Hexahydro-3-(hydroxyméthyl)-5,8a-diméthyl-naphtho[2,3-b]furane-2(5H)-one.

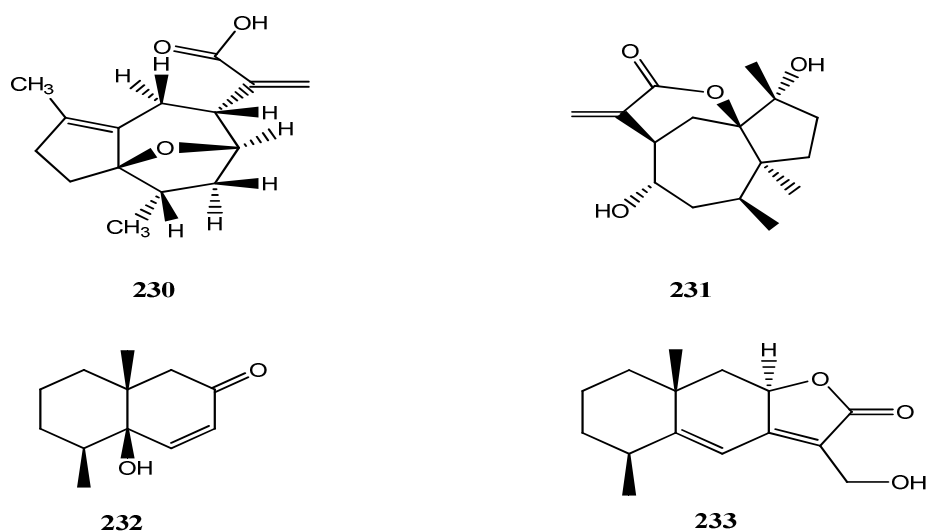


Schéma-4: Structure des composés issus des espèces *Pulicaria laciniata* et *insignis*.

II.4.3 Activités biologiques de différentes espèces du genre *Pulicaria* [30] :

1. Activités antimicrobiennes :

Les trois extraits : aqueux, méthanolique et chloroformique des parties aériennes de *P. dysenterica* ont été testés pour leurs activités antibactériennes contre six agents pathogènes (*Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*) en utilisant la technique de dosage disque-diffusion. Ces tests ont montré que l'extrait méthanolique est le plus efficace contre trois des bactéries testées (*S. aureus*, *B. cereus*, et *V. cholera*), alors que tous les extraits ont été actifs contre uniquement la bactérie *V. choléra* [65].

L'huile essentielle de *P. odora* L. a été testée contre sept bactéries (*Bacillus cereus* (IPL 58605), *Streptococcus C* (IPT 2-035), *Proteus vulgaris* (CIP 58605), *Enterococcus faecalis* (CIP 103214), *Escherichia coli* (CIP 54127), *Pseudomonas aeruginosa* (CIPA 22), et *Enterococcus faecalis*) à différentes concentrations ; et les résultats ont montrés que l'huile essentielle à une activité antibactérienne significative. Avec une quantité minimale (5mg/disque), l'huile essentielle de *P. odora* L. a montré une zone d'inhibition contre toutes les bactéries. Une forte activité antibactérienne des espèces *E. faecalis* et *P. vulgaris* a été également observée contre *Streptococcus C*, *B. cereus* [64]. Il en est de même pour l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *P. stephanocarpa* [66]. Quant à l'extrait éthanolique de *P. orientalis*, il a montré une très faible activité antibactérienne [67].

L'activité antibactérienne des composés 162 et 168 a également été démontrée. Ces composés ont montré une activité modérée contre les organismes à Gram positif, *Bacillus subtilis* (MTCC-441), *Bacillus sphaericus* (MTCC-511), et *Staphylococcus aureus* (MTCC-96).

Cependant, ils étaient moins actifs contre *Klebsiella aerogenes* (MTCC-39) et *Chromobacterium violaceum* (MTCC-2656), et inactif contre *Pseudomonas aeruginosa* [16] [52].

Six souches de bactéries ont été testées : *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971), *Vibrio cholerae* (ATCC 14033), et *Streptococcus pyogenes* (HITM 100), ainsi qu'une souche de champignon *Candida albicans* (HITM22) par la méthode de diffusion.

Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *P. odora* ainsi que le composé **12**, possèdent une activité inhibitrice contre les bactéries et les levures testées avec MIC allant de 1 à 2 µl/ml, à l'exception de *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Alors que, le composé **13** était inactif contre tous les organismes testés [17].

Le composé **50** a exposé une faible activité antimyco-bactérienne contre la *Mycobacterium phlei* avec une valeur de MIC₀, 52 mM .

Les composés **145**, **119**, **147** et **121** ont été testés pour des activités antimicrobiennes, et seulement l'acide strictique a montré une activité modérée contre les bactéries à Gram positif et la levure *C. albicans* [41]. Quant au composé **70**, il a été testé contre cinq micro-organismes, *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 10662), *Salmonella sp.* Et *Candida et albicans* (NCTC 3153), et n'a montré qu'une seule légère activité contre uniquement le *S. aureus* (MIC₀, 625 mg/ml) [37].

2. Activités cytotoxiques :

Les composés isolés de *P. canariensis* ont été testés pour leurs activités cytotoxiques contre la lignée de cellules de leucémie myéloïde humaine HL-60 par le dosage MTT. Les résultats ont montré que l'acétylation des composés : pulicanone (**25**), pulicanol (**26**), pulicanarals A et B (**27** et **28**, resp.), et pulioplopanone A (**131**), indiquent une faible activité cytotoxique avec des valeurs IC₅₀ (en µM) de 20±7 ; 298±22 ; 115±18 ; 264±6, et 242±80, respectivement.

Cependant, le triacétate de pulicanone a montré un potentiel cytotoxique puissant, par sa capacité à induire l'apoptose qui a été déterminée par la microscopie de changements nucléaires, l'activation des caspases, et le clivage de la PARP-1 [poly (ADP-ribose) polymérase-1] [25].

En 2008, le composé **50** de l'espèce *P. crispa*, a été évalué *in vitro* pour son activité anticancéreuse prometteuse contre une certaine lignée cellulaire de carcinome de la vessie EJ-138 ; avec un IC_{50} de $5,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

Le composé **70** étant cytotoxique ($0,2 \mu\text{g/ml}$ dans 9 **KB**; $2 \mu\text{g/ml}$ dans 9 **PS**), a présenté une activité contre une lignée de cellules lymphatiques de la leucémie, la murine P-388 (T/C de 123% à 75 mg/kg) [37]. Quant au composé **73**, il s'est révélé être cytotoxique des cellules KB en culture ($ED_{50} = 0,4 \mu\text{g/ml}$), devant le composé **70** qui s'est révélé être actif à peu près au même niveau ($ED_{50} = 0,33 \mu\text{g/ml}$) [38].

Conclusion :

Concernant le genre *Pulicaria*, on constate une grande variété des composés issus uniquement de 21 de ses espèces sur les 100 connues. Par ailleurs une étude poussée sur certains composés de quelques-unes de ces espèces a permis de mettre en évidence leurs diverses et importantes activités biologiques.

Quant à l'espèce *Echinops spinosus* L., on constate que très peu de travaux ont été effectués sur cette espèce.

Notre travail consiste donc à poursuivre cette recherche phytochimique guidée par la recherche de l'activité biologique de ces deux plantes qui poussent en Algérie dont *Pulicaria undulata* L. qui est une espèce endémique des zones désertiques d'Afrique du Nord.

Dans les chapitres qui vont suivre, nous présenterons les résultats expérimentaux concernant la composition des huiles essentielles de la *Pulicaria undulata* d'une part et les dérivés sesquiterpéniques et phénoliques isolés, respectivement, des deux plantes : *Pulicaria undulata* et *Echinops spinosus* d'autre part ; suivis des discussions relatives à l'identification structurales de ces composés et leurs activités biologiques éventuelles.

Références I.

- [1] Hostettmann, K. *Tout Savoir sur le Pouvoir des Plantes, Sources de Médicaments*. (1997). Editions Favre SA, Lausanne.
- [2] Richter, G. *Métabolisme des Végétaux – Physiologie et Biochimie*. Presses polytechniques et universitaires romandes, (1993) Lausanne, p. viii.
- [3] Grayer R.J., Chase M.W., and Simmonds M.S.J. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Biochemical Systematics and Ecology* (1999) 27(4), 369-393.
- [4] Principe, P.P. The economic significance of plants and their constituents as drugs. In: Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth N.R. (eds.), *Economic and Medicinal Plant Research*, (1989). Volume 3. Academic Press, London.
- [5] Quezel. P and Santa. S, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales*, 1963, Tome 1, C.N.R.S. Paris.
- [6] Crete P.: *Précis de botanique*. Masson, Paris, 1965 édition 2, P 429.
- [7] Bonnier. *Flore complète de France, Suisse et Belgique*. 1934, édition 10, P 118.
- [8] Guignard. J. L, *Abrégé botanique*, 1994, 9ème édition, 203-204.
- [9] Gaussen. H; Leroy. F, *Précis de botanique (Végétaux supérieurs)*, 1982, 2ème édition, 424- 426.
- [10] Frère Marie-Victorin, 1885-1944, *Flore Laurentienne*, 547.
- [11]. Cufodontis, G. "Enumeratio Plantarum Aethiopiae", sequentia. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 37, Suppl. 1967, 1115-1193.
- [12] Bernard Boullard, *plantes médicinales du monde(croyances et réalité)*, ed. Estem, 2001 P. 204.
- [13] Bezanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M., Trottin F., *plantes médicinales des régionstempérés*,ed.Maloine-Paris 1980.P.398.
- [14]. (a) Guo, D.; Cui, Y.; Lou, Z.; Gao, C.; Huang, L. *Chin. Trad. Herb. Med.*1992, 23, 3-5. (b) Guo, D.; Cui, Y.; Lou, Z.; Wang, D.; Huang, L.,*Chin. Trad. Herb. Med.*, 1992, 23, 512-514. (c) Lam, J.; Christensen, L. P.; Thomasen, T. *Phytochemistry*, 1991,30, 1157-1159.
- [15] Chaudhuri, P. K. *J. Nat. Prod.* 1992, 55, 249-259.
- [16] Ram, S. N.; Roy, R.; Singh, B.; Singh, R. P.; Pandey, V. B. *Planta Med.* 1996,62, 187.
- [17]Koike, K. K.; Jia, Z. H.; Nikaido, T.; Liu, Y.; Zhao, Y. Y.; Guo, D. A. *Org. Lett.* 1999, 1, 197-198.

- [18] Mei dong et all. organic latters 2008, 10,701-704.
- [19] Chaudhuri, P. K. *Phytochemistry*, 1987, 26, 587.
- [20] Bankovskii, A. I., Perelson, M. E. and Shevlev, V. A. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 1963, 148, 1073.
- [21] Schroder, P. and Luckner, M. *Arch. Pharm.* 1968, 301, 39.
- [22] Chevrier, M.; *Fitoterapia*, 1976, 47, 115.
- [23] Bohlmann, F., Arndt, C., Kleine, K. and Bornowski, H., *Chem. Ber.*, 1965, 98, 155.
- [24] Nguimatsia, F., Huet, J. and Girre, L., *PlantMed. Phytoter.* ,1980, 14, 170.
- [26] Matieu Tene, Pierre Tane Beibane L. Sondengam, Jiseph D. Connolly, *Phytochemistry*, 2004,65,2101-2105.
- [24] C. A. Williams, J. B. Harborne, J. R. Greenham, R. J. Grayer, G. C. Kite, J. Eagles, *Phytochemistry* 2003, 64, 275.
- [27] Ghazanfar, S.A.,. *Handbook of Arabian Medicinal Plants*. CRC press, Inc., USA, 1994, p. 98.
- [28] Ali, A.A., Makboul, M.A., Assaf, M.H., Anton, R.. Essential oil of *Pulicaria undulata* L. growing in Egypt and its effect on animal behaviour. *Bull. Pharm. Sci, Assiut University* 1987, 10, 37–49.
- [29] EL-Kamali, H.H., Ahmed, A.H., Mohammed, A.S., Yahia, A.A.M., El- Tayeb, I.H., Ali, A.A., Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. *Fitoterapia*, 1998, 69, 77–78.
- [30] Liu, L.L., Yang, J.L., Shi, Y.P.,. Phytochemicals and biological activities of *Pulicaria* species. *Chem Biodivers*, 2010, 7, 327–349.
- [31] Mossa, J.S., Hifnawy, M.S., Al-Yahya, M.A., Al-Meshal, I.A., Mekkawi, A.G., Aromatic plants of Saudi Arabia – GC/MS analysis of essential oils of *Pulicaria arabica* and *P. undulata*. *Pharm. Biol.* 1987, 25, 113–119.
- [32] EL-Kamali, H.H., Yousif, M.O., Ahmed, O.I., Sabir, S.S., Phytochemical analysis of the essential oil from aerial parts of *Pulicaria undulata* (L.) Kostel from Sudan. *Ethnobot. Leaflets*, 2009, 13, 467–471.
- [33] Nematollahi, F., Rustaiyan, A., Larijani, K., Nadimi, K.M., Masoudi, S., Essential oil composition of *Artemisia biennis* Willd. and *Pulicaria undulata* (L.) C.A. Mey., two Compositae herbs growing wild in Iran. *J. Essent. Oil Res.*, 2006, 18, 339–341.

- [34] Awadh Ali, N.A., Sharopov, F.S., Alhaj, M., Hill, G.M., Porzel, A., Arnold, N., Setzer, W.N., Schmidt, J., Wessjohann, L., Chemical composition and biological activity of essential oil from *Pulicaria undulata* from Yemen. *Nat. Prod. Comm.*, 2012, 7, 257–260.
- [35] M. Stavri, K. T. Mathew, A. Gordon, S. D. Shnyder, R. A. Falconer, S. Gibbons, 2008 *Phytochemistry*, 69, 1915.
- [36] C. A. Williams, J. B. Harborne, *J. Greenham, Biochem. Syst. Ecol.* 2000, 28, 679.
- [37] B. Nickavar, F. Mojab, *Fitoterapia* 2003, 74, 390.
- [38] K. E. Schulte, G. R_cker, F. M_ller, *Arch. Pharm.*, 1968, 301, 115.
- [39] P. Singh, M. C. Sharma, K. C. Joshi, F. Bohlmann, *Phytochemistry* 1985, 24, 190.
- [40] N. Diaz, T. Ortega, M. P. Pardo, *Anal. Real Acad. Farm.* 1988, 54, 526.
- [41] A. San Feliciano, M. Medarde, M. Gordaliza, E. Del Olmo, J. M. Miguel Del Corral, *J. Nat. Prod.*, 1988, 51, 1153.
- [42] Z. Z. Ibraheim, F. M. M. Darwish, *Bull. Fac. Pharm. (Cairo Univ.)* 2002, 40, 167.
- [43] S. M. H. Ayoub, O. E. Ellassam, *Fitoterapia* 1981, 52, 247.
- [44] M. A. Ramadan, *Bull. Pharm. Sci. (Assiut Univ.)* 1998, 21, 103.
- [45] H. Ghouila, A. Beyaoui, H. Ben Jannet, B. Hamdi, A. Ben Salah, Z. Mighri, *Tetrahedron Lett.* 2008,49, 5721.
- [46] B. Das, M. R. Reddy, R. Ramu, N. Ravindranath, H. Harish, K. V. S. Ramakrishna, Y. K. Rao, K. Harakishore, U. S. N. Murthy, *Phytochemistry* 2005, 66, 633.
- [47] A. Ezoubeiri, C. A. Gadhi, N. Fdil, A. Benharref, M. Jana, M. Vanhaelen, *J. Ethnopharmacol.* 2005,99, 287.
- [48] S. Hafez, T. M. Sarg, M. M. El-Domiaty, A. A. Ahmed, F. R. Melek, F. Bohlmann, *Phytochemistry* 1987, 26, 3356.
- [49] C. Zdero, F. Bohlmann, A. M. Rizk, *Phytochemistry* 1988, 27, 1206.
- [50] J. A. Marco, J. F. Sanz, R. Albiach, *Phytochemistry* 1992, 31, 2409.
- [51] F. Bohlmann, C. Zdero, *Phytochemistry* 1981, 20, 2529.
- [52] M. Abdel-Mogib, A. M. Dawidar, M. A. Metwally, M. *Abou-Elzahab, Pharmazie* 1989, 44, 801.
- [53] M. Metwally, A. A. Dawidar, S. Metwally, *Chem. Pharm. Bull.* 1986, 34, 378.
- [54] E. I. Karim, K. E. Ishag, A. A. B. Elegami, E. N. Mahmoud, I. A. Alfutuh, *Fitoterapia* 1992, 63,281.
- [55] J. Triana, M. Lo´pez, F. J. Pérez, J. Gonza´lez-Platas, J. Quintana, F. Este´vez, F. León, J. Bermejo, *J.Nat. Prod.* 2005, 68, 523.

- [56] J. S. Mossa, M. A. Al-Yahya, M. S. Hifnawy, A. A. Shehata, F. S. El-Feraly, C. D. Hufford, D. R. McPhail, A. T. McPhail, *Phytochemistry* 1990, 29, 1595.
- [57] F. Bohlmann, K.-H. Knoll, N. A. El-Emary, *Phytochemistry* 1979, 18, 1231.
- [58] M. Abdel-Mogib, J. Jakupovic, A. M. Dawidar, M. A. Metwally, M. Abou-Elzahab, *Phytochemistry* 1990, 29, 2581.
- [59] A. Rustaiyan, Z. Habibi, M. Saberi, J. Jakupovic, *Phytochemistry* 1991, 30, 2405.
- [60] H. Dendougui, S. Benayache, F. Benayache, J. D. Connoly, *Fitoterapia* 2000, 71, 373.
- [61] F. M. M. Darwish, *Alexandria J. Pharm. Sci.* 2001, 15, 21.
- [62] M. C. Aberkane, A. Dibi, H. Haba, M. Benkhaled, A. Benkouider, M. Mokhtari, P. Mosset, P. Pale, *Asian J. Chem.* 2007, 19, 4954.
- [63] A. San Feliciano, M. Medarde, M. Gordaliza, E. Del Olmo, J. M. Miguel del Corral, *Anal. Quim., Ser. C: Quim. Org. Bioquim.* 1987, 83, 283.
- [64] K. A. Eshbakova, M. K. Makhmudov, G. V. Sagitdinova, B. Tashkhodzhaev, *Khim. Prir. Soedin.* 1996, 202; K. A. Eshbakova, M. K. Makhmudov, G. V. Sagitdinova, B. Tashkhodzhaev, *Chem. Nat. Compd.* 2005, 32, 180.
- [65] A. San Feliciano, M. Medarde, M. Gordaliza, E. Del Olmo, J. M. Miguel del Corral, *Phytochemistry* 1989, 28, 2717.
- [66] J. S. Mossa, I. Muhammad, F. S. El-Feraly, C. D. Hufford, D. R. McPhail, A. T. McPhail, *Phytochemistry*, 1992, 31, 575.
- [67] M. A. Al-Yahya, S. Khafagy, A. Shihata, J. F. Kozlowski, M. D. Antoun, J. M. Cassady, *J. Nat. Prod.*, 1984, 47, 1013.
- [68] M. A. Al-Yahya, A. M. El-Sayed, J. S. Mossa, J. F. Kozlowski, M. D. Antoun, M. Ferin, J. M. Cassady, *J. Nat. Prod.*, 1988, 51, 621.
- [69] D. T. Sadyrbekov, G. A. Atazhanova, A. T. Kulyyasov, V. A. Raldugin, Y. V. Gatilov, M. M. Shakirov, T. T. Edilbaeva, K. M. Turdybekov, S. M. Adekenov, *Chem. Nat. Compd.* 2006, 42, 41.
- [70] F. Bohlmann, M. Ahmed, J. Jakupovic, *Phytochemistry*, 1982, 21, 1659.
- [71] I. Muhammad, F. S. El-Feraly, J. S. Mossa, A. F. Ramadan, *Phytochemistry*, 1992, 31, 4245.
- [72] M. Stavri, K. T. Mathew, S. Gibbons, *Nat. Prod. Commun.* 2008, 3, 1.
- [73] N. Rasool, V. U. Ahmad, N. Shahzad, M. A. Rashid, A. Ullah, Z. Hassan, M. Zubair, R. B. Tareen, *Nat. Prod. Commun.* 2008, 13, 141.
- [74] H. M. G. Al-Hazimi, H. Z. Al-Khathlan, *J. King Saud Univ. (Sci.)* 1993, 5, 141.
- [75] K. A. Eshbakova, A. I. Saidkhodzhaev, *Chem. Nat. Compd.* 2002, 38, 326.

- [76] K. A. Eshbakova, G. V. Sagitdinova, M. G. Levkovich, B. F. Rasulev, N. D. Abdullaev, V. M. Malikov, *Chem. Nat. Compd.* 1997, 33, 458.
- [77] M. R. Nurmukhamedova, S. Z. Kasimov, N. D. Abdullaev, G. P. Sidiyakin, M. R. Yagudaev, *Khim. Prir. Soedin.* 1985, 201; M. R. Nurmukhamedova, S. Z. Kasimov, N. D. Abdullaev, G. P. Sidiyakin, M. R. Yagudaev, *Chem. Nat. Compd.* 1985, 21, 188.
- [78] M. R. Nurmukhamedova, N. D. Abdullaev, G. P. Sidiyakin, *Khim. Prir. Soedin.* 1986, 299; M. R. Nurmukhamedova, N. D. Abdullaev, G. P. Sidiyakin, *Chem. Nat. Compd.* 1986, 22, 277.
- [79] G. V. Sagitdinova, K. A. Eshbakova, V. M. Malikov, *Khim. Prir. Soedin.* 1994, 246; G. V. Sagitdinova, K. A. Eshbakova, V. M. Malikov, *Chem. Nat. Compd.* 1994, 30, 226.
- [80] A. Rustaiyan, E. Simozar, A. Ahmadi, M. Grenz, F. Bohlmann, *Phytochemistry* 1981, 20, 2772.
- [81] Y. G. Chiplunkar, B. A. Nagasampagi, *J. Nat. Prod.* 1992, 55, 1328.
- [82] B. Das, R. Ramu, K. Venkateswarlu, Y. K. Rao, M. R. Reddy, K. V. S. Ramakrishna, K. Harakishore, U. S. Murty, *Chem. Biodiversity* 2006, 3, 175.
- [83] Z. Z. Ibraheim, H. A. Salem, *Bull. Pharm. Sci. (Assiut Univ.)* 2002, 25, 189.
- [84] R. M. A. Mansour, A. A. Ahmed, F. R. Melek, N. A. M. Saleh, *Fitoterapia* 1990, 61, 186.
- [85] V. U. Ahmad, N. Rasool, M. A. Abbasi, M. A. Rashid, F. Kousar, M. Zubair, A. Ejaz, M. I. Choudhary, R. B. Tareen, *Pol. J. Chem.* 2006, 80, 745.
- [86] A. M. Rizk, F. M. Hammouda, S. I. Ismail, H. A. Hussiney, *Qatar Univ. Sci. J.* 1993, 13, 51.
- [87] S. I. El-Negoumy, R. M. A. Mansour, N. A. M. Saleh, *Phytochemistry* 1982, 21, 953.
- [88] F. R. Melek, M. El-Ansari, A. Hassan, A. Regaila, A. A. Ahmed, T. J. Mabry, *Rev. Latinoam. Quim.* 1988, 19, 3.
- [89] J. O. Pares, S. Oksuz, A. Ulubelen, T. J. Mabry, *Phytochemistry* 1981, 20, 2057.
- [90] G. V. Sagitdinova, K. A. Eshbakova, Z. A. Khushbaktova, V. M. Malikov, V. Olimov, *Khim. Prir. Soedin.* 1992, 328.
- [91] K. A. Eshbakova, A. I. Saidkhodzhaev, *Chem. Nat. Compd.* 2001, 37, 196.
- [89] T. M. Sarg, *Egyptian J. Pharm. Sci.* 1975, 16, 421.
- [93] S. A. Ross, K. A. El Sayed, M. A. El Sohly, M. T. Hamann, O. B. Abdel-Halim, A. F. Ahmed, M. M. Ahmed, *Planta Med.* 1997, 63, 479.
- [94] F. E. L. Hanbali, M. Akssira, A. Ezoubeyri, C. A. Gadhi, F. Mellouki, A. Benherraf, A. M. Blazquez, H. Boira, *J. Ethnopharmacol.* 2005, 99, 399.

- [95] A. Basta, O. Tzakou, M. Couladis, M. Pavlovic', *J. Essent. Oil Res.* 2007, 19, 333.
- [96] H. Ghouila, A. Beyaoui , H.Ben Jannet , B. Hamdi, A. Ben Salah, Z. Mighri, *Tetrahedron Letters*, 2008, 49, 5721–5723.
- [97] H. Ghouila, A. Beyaoui , H.Ben Jannet , B. Hamdi, A. Ben Salah, Z. Mighri, *Tetrahedron Letters* , 2009, 50, 1563–1565
- [98] S. Zhuo Huang, L.Bo Lia, J. Si-Ping, C. Xu-Lin, Z. Hua-Jie, *Helvetica Chimica Acta.* 93, 2010, 1808-1811.

CHAPITRE II
ANALYSES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE
LA PLANTE *PULICARIA UNDULATA* L.

I. Introduction :

La valorisation des huiles essentielles considérées comme des ressources naturelles importantes, peut avoir des retombées économiques considérables pour notre pays. En effet, différentes plantes contiennent des huiles essentielles composées de molécules ayant des activités biologiques avec de fortes valeurs ajoutées.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont 300 environ sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums [1].

Ce chapitre résume l'étude qualitative et quantitative des composés de l'huile essentielle de la plante *Pulicaria undulata*, dont l'analyse a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC et GC-MS).

II. Composition chimique des plantes aromatiques :

La composition chimique complexe des plantes aromatiques est constituée de deux fractions.

- Première fraction :

La première fraction dite volatile est présente dans différents organes de la plante selon la famille. Elle est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle.

Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires où les molécules très volatiles sont synthétisées à partir d'unités isoprène (méthyl-2-buta-1,3-diène) et où la combinaison de ces unités conduit aux terpènes, sesquiterpènes, diterpènes et leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques. L'ensemble de ces produits est accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique [2].

- Deuxième fraction :

La deuxième fraction dite non volatile de la plante est formée essentiellement de composés organiques non volatils tels : les coumarines, flavonoïdes [3], composés acétyléniques ainsi que de lactones sesquiterpéniques, phénols ou polyphénols qui jouent un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante [1].

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier considérablement :

- ✓ Dans une même plante selon les organes (feuille, fleur, fruit, bois) ;
- ✓ Dans l'année selon la saison pour une même plante ;
- ✓ Selon les conditions de culture pour une même espèce végétale (ensoleillement, humidité, longueur du jour, fertilité du sol) ;

- ✓ Selon les races chimiques (ou chémotypes) pour une même espèce (l'exemple classique est le thym avec sept races chimiques).

III. Fraction volatile des plantes aromatiques :

Les huiles essentielles vont servir de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou de réguler son environnement (rôle écologique), tels : attraction des insectes pollinisateurs, action répulsive sur les prédateurs, inhibition de la germination des graines. Ces huiles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à huile essentielle, poils sécréteurs (comme dans la menthe), canaux sécréteurs et ont vraisemblablement un rôle défensif, tel : protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores [2].

Les huiles essentielles sont des substances odorantes concentrées, obtenues à partir de plantes selon deux procédés différents :

- ✓ Par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation ou l'hydrodiffusion ;
- ✓ Par expression.

Le terme huile essentielle a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin suisse Paracelsus Von Hohenheim afin de désigner le composé actif d'un remède naturel [4].

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme un produit obtenu à partir d'une matière première végétale par la méthode classique qui est l'entraînement à la vapeur d'eau, où l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

La majorité des huiles essentielles sont des liquides très peu colorés, volatils à température ambiante. Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique elles sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes et sont, en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes. Une petite partie persiste dans l'eau du distillat et lui communique une odeur, on parlera ainsi d'eau aromatique, à ne pas confondre l'hydrolat, eau distillée aromatisée (parfois artificiellement) à laquelle on ajoute parfois de l'alcool, des stabilisants chimiques ou des conservateurs.

IV. Phénomènes physico-chimiques et facteurs produisant l'altération des huiles essentielles :

Au cours de l'hydrodistillation, le milieu aqueux qui possède un pH compris entre 4 et 7 (résultat de l'immersion du matériel végétal), atteint occasionnellement des valeurs inférieures à 4 pour certains fruits. Les constituants de l'essence native sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur, et peuvent subir des conversions chimiques [5].

La matière chimique présente dans le végétal fait l'objet de réactions chimiques diverses, parmi elles : l'hydrolyse, la déprotonation, l'hydratation et la cyclisation qui peuvent être catalysées par les métaux présents à l'état de traces dans la plante, provoquant ainsi des transformations chimiques des constituants des huiles essentielles de la plante [6].

L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit durant le chauffage du végétal. Elle conduit à la formation d'acides organiques qui à leur tour catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation. La dégradation du sabinène donne un exemple des transformations chimiques de l'huile essentielle lors de l'hydrodistillation.

Ces fréquentes modifications chimiques du sabinène ont été étudiées par Koedam *et al.* [6].

Ils constatèrent qu'en milieu acide dilué ce composé se transforme en terpinèn-4-ol, réaction déjà signalée par Wallach *et al.* [7].

Divers auteurs ont confirmé ce résultat et ont montré que le réarrangement du sabinène produit en plus du terpinèn-4-ol, de l' α -terpinène, du γ -terpinène, et du terpinolène.

Il est préconisé de maintenir le pH proche de la neutralité et de minimiser la durée d'hydrodistillation, il est bien connu que la dégradation de la matière végétale induit la formation d'un milieu acide.

En résumé, parmi les constituants sujets aux artefacts, les auteurs signalent particulièrement :

- ✓ Les monoterpènes (mono et bicycliques),
- ✓ Les alcools monoterpéniques,
- ✓ Les amino-acides soufrés et les oxydes sesquiterpéniques.

Les étapes successives conduisant à l'isolement d'une essence et les diverses transformations susceptibles de l'accompagner se traduisent par la modification de la teneur en certains constituants ou par la formation de nouveaux composés, d'où la grande variabilité de sa composition. Ainsi de profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte.

La période de récolte, les conditions de transport, de séchage et de stockage peuvent aussi engendrer des dégradations enzymatiques. D'autres facteurs tels que les traitements survenus avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle [8].

V. Modes d'obtention de l'huile essentielle :

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique. Dans notre travail, nous nous intéressons aux procédés d'extraction à partir d'un système solide, la plante. Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et nouvelles (développées plus récemment) [11].

- Extraction par solvant organique volatil [9].
- Extraction à l'eau surchauffée [9].
- Extraction par CO₂ super critique [9].
- Extraction par micro-ondes [10].
- Extraction par ultrasons [9].
- L'hydrodistillation [9].
- Distillation par entraînement à la vapeur d'eau [9].

Parmi les techniques conventionnelles, on trouve l'entraînement à la vapeur [9].

V.1. Préparation d'une huile essentielle par entraînement à la vapeur :

L'entraînement à la vapeur est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles [12]. L'avantage de cette technique réside en l'abaissement de la température de distillation; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition [13].

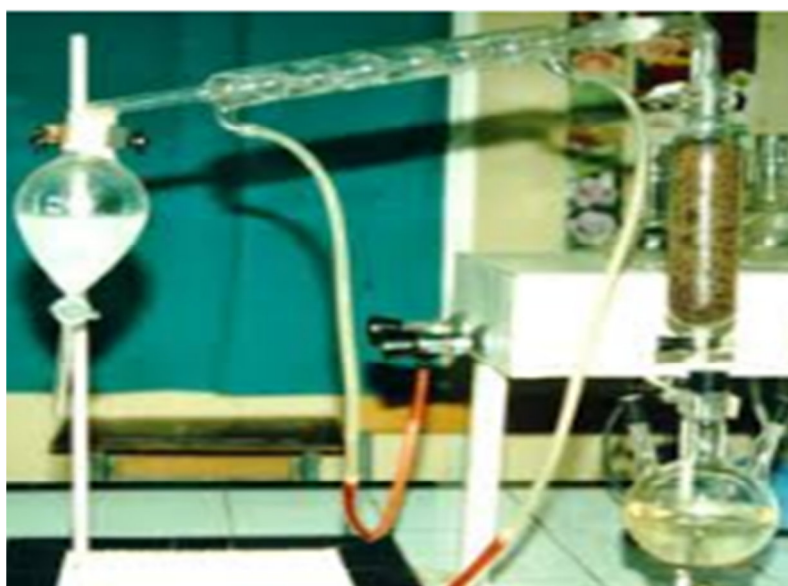


Figure-1 : Appareillage utilisé pour l'extraction d'une huile essentielle par entraînement à la vapeur [12].

VI. Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles :

Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants.

VII. Chromatographie à deux dimensions heart-cutting CPG/SM :

La CPG-CPG était la première méthode de chromatographie bidimensionnelle. Cette méthode consiste à sélectionner une fraction du chromatogramme qui est mal résolu sur la première colonne pour la séparer sur la seconde colonne [14].

Cette méthode consiste également à utiliser deux colonnes, deux détecteurs et un système de piégeage.

Le plus souvent, la première colonne est une colonne apolaire de dimensions classiques. La seconde colonne est alors polaire, mais bien plus courte et de plus faible diamètre pour permettre une élution rapide. Il est également fréquent d'utiliser une colonne chirale comme seconde colonne [15]. Les deux colonnes peuvent être placées dans le même four ou non.

Le piégeage d'une fraction à la sortie de la première colonne se fait le plus souvent à l'aide d'une trappe cryogénique. Elle permet de stocker les composés élués de la fraction jusqu'à ce que la seconde colonne soit disponible pour l'analyse.

L'analyse des constituants d'une huile essentielle est basée sur l'utilisation de deux techniques conjointes : La CPG et CPG/SM-IE (figure-2) adaptées particulièrement pour ce type de composés.

Le calcul des indices de rétention, polaires et apolaires, et la quantification des composés s'effectuent par CPG.

Quant à l'analyse par CPG/SM, elle permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, selon deux approches :

- a) L'une recherchée au laboratoire si le spectre de masse du constituant et ses indices de rétention correspondent à ceux d'un composé présent dans les bibliothèques du laboratoire.
- b) La seconde recherchés dans les banques de données commerciales (König-Joulain [16, 17] Wiley [18], Adams [19], Nist [20]), ou répertoriés dans la littérature ; si les données spectrales et les indices de rétention du constituant ne correspondent à aucun des composés de la bibliothèque propre au laboratoire.

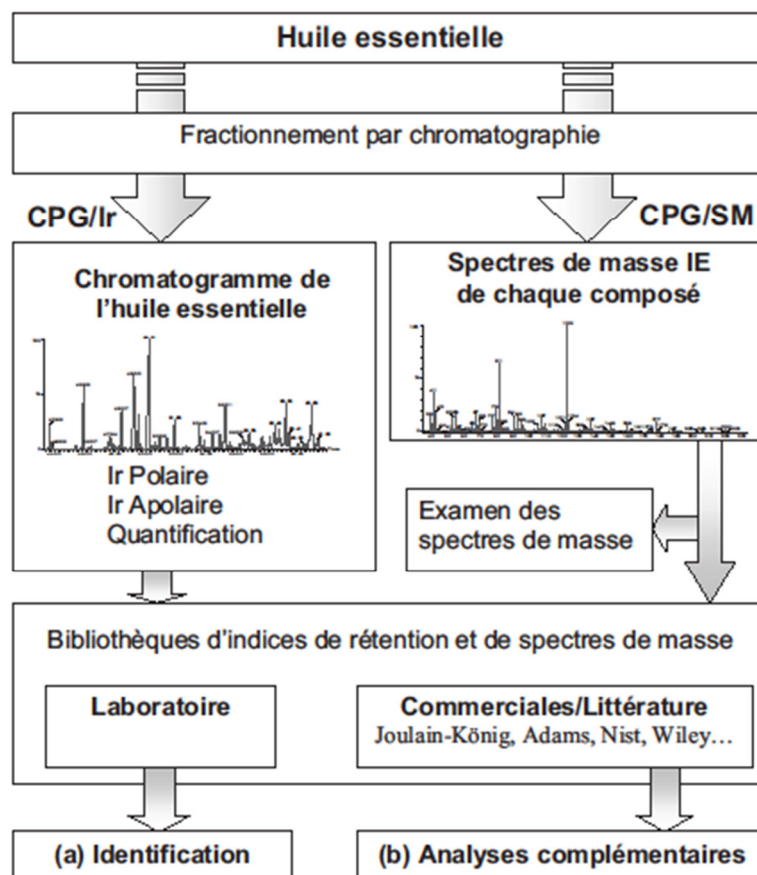


Figure-2 : Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM [21].

VIII. Etude de l'huile essentielle de la plante *Pulicaria undulata* L.

VIII.1. Extraction de l'huile :

Les parties aériennes (200 g) de *Pulicaria undulata* ont été soumis à une hydrodistillation dans un appareil de Kaiser Lang, pendant trois heures. L'huile essentielle recueillie, est séchée sur du sulfate de sodium anhydre, puis maintenue à 4 ° C jusqu'à son analyse.

Le rendement de l'huile a été calculé en fonction du poids sec de la plante.

VIII.2. Analyse de l'huile par GC et GC-MS :

L'huile essentielle a été analysée sur un chromatographe en phase gazeuse agilent (GC-FID) modèle 6890, équipé d'une colonne capillaire de silice HP-5ms condensé (5% -phényl), avec comme phase stationnaire le méthylpolysiloxane (25 m× 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm). La température a été programmée à partir de 50 °C pour une prise initiale de 5 mn, puis de 250°C à 3 °C / mn, maintenue pendant 10 mn.

Les températures de l'injecteur et du détecteur d'ionisation de flamme ont été programmé à 280 °C et 300 °C, respectivement.

L'huile essentielle a été diluée dans de l'acétone à 3,5% (v / v) et injectés dans le mode split (1/60), avec de l'hydrogène comme gaz porteur (1,0 mL / mn).

Les solutions des alcanes standards (C8-C20) ont été analysés dans les mêmes conditions pour le calcul de leurs indices de rétention (RI) avec l'équation de Van den Dool et Kratz.

La spectrométrie de masse a été effectuée sur un chromatographe de Agilent gaz-spectromètre masse (CGMS) modèle 7890/5975, équipé de HP-5 colonne capillaire (25 m × 0,25 mm, épaisseur film de 0,25 µm) programmée avec les mêmes conditions que pour GC-FID.

Le spectromètre de masse (SM) est en mode impact d'électron à 70 eV et le multiplicateur d'électrons est à 2200 V. La source d'ions quadripolaire SM et la température étaient de 230 °C et 180 °C, respectivement.

Les données spectrales de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans l'intervalle (m/z 33–450). Les constituants des huiles essentielles ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (RI) à celles des composés de référence à partir de banques telles que : Adams [19] et McLafferty et Stauffer [22].

Les proportions des composés identifiés ont été calculées par normalisation interne.

VIII.3. Résultats et discussion :

L'hydrodistillation des parties aériennes de *P. undulata* a donné 1,2% (w/w) d'une huile jaunâtre avec une odeur parfumée. Trente et un (31) des constituants représentant environ 68,4% de l'huile essentielle totale de la plante ont été identifiés, dont 74,3% de composés oxygénés.

Tous les composés identifiés sont énumérés dans le tableau-1 dans l'ordre de leurs temps de rétention expérimentale et de leurs indices de rétention. Les principaux constituants sont carvotanacétone (14,8%), suivie par δ -cadinène (8,2%), α -cadinol (4,7%), thujanol (4,7%), epi- α -cadinol (3,4%), le carvacrol (3,14%) et 14 -hydroxy- α murolène (3,1%).

Une revue de la littérature a montré que la carvotanacétone a été rapporté comme composante majeure de l'huile essentielle de *P. undulata* du Yémen du Sud et le Soudan (91,4% et 55,87% respectivement) [23-24]. Ce composé est également accumulé en tant que composant majeur dans d'autres espèces de *Pulicaria* telles que *P. inuloides* et *P. jaubertii* du Yémen (47,3% et 63,9% respectivement [25-26], *P. mauritanica* du Maroc (87,3%) [27] et *P. jaubertii* de l'Arabie Saoudite (98,6%) [28].

Nos résultats (tableau-1) ont montré des différences significatives avec les études antérieures sur ce genre.

En effet, la carvotanacétone ne représente que 14,8% de la composition totale de l'huile, tandis que les autres composantes principales de notre échantillon sont : δ -cadinène (8,2%), α -cadinol (4,7%), épi- α -cadinol (3,4%) et thujanol (4,7%).

Ces principales composantes sesquiterpéniques oxygénés de notre échantillon semblent être spécifiques à l'espèce algérienne et sont décrites pour la première fois dans l'espèce *undulata*.

Tableau-1: Temps de rétention, indices de rétention et composition en pourcentage de l'huile essentielle de *Pulicaria undulata*.

Pic N°	TR	^b IR	^a Composant	%
1	8,753	1099	Linalol	2,4
2	8,839	1103	Thujol	0,9
3	9,556	1142	camphre	0,2
4	10,016	1166	bornéol	0,8
5	10,214	1177	terpinèn-4-ol	2,8
6	10,379	1186	thujanol	4,7
7	10,491	1192	cis mentan-2-one	0,7
8	10,626	1199	trans menthan-2-one	0,6
9	10,805	1209	transpiperitol	1,5
10	11,546	1252	carvotanacétone	14,8
11	12,438	1303	carvacrol	3,1
12	14,082	1404	2,5-dimethoxy-p-cymène	0,8
13	14,238	1414	β -caryophyllène	0,8
14	15,111	1472	γ -muurolène	0,9
15	15,266	1482	amorpha-4,7(11)-diène	1,0
16	15,345	1487	épi-cubebol	1,1
17	15,469	1495	α -muurolène	2,1
18	15,676	1509	γ -cadinène	1,9
19	15,811	1518	δ -cadinène	8,2
20	16,103	1539	α -cadinène	0,4
21	16,204	1546	α -calacorène	0,2
22	16,561	1570	palustrol	0,3
23	16,628	1575	épi-globulol	0,7
24	16,783	1586	oxyde de caryophyllène	1,2
25	17,051	1605	oplopène	0,8
26	17,127	1610	Humulèneépoxyde II	1,3
27	17,381	1630	cadina-4,1(10)-diène-7- β -ol	0,8
28	17,548	1642	épi- α -cadinol	3,4
29	17,571	1644	épi- α -muurolol	2,2
30	17,753	1658	α -cadinol	4,7
31	19,707	1804	14-hydroxy- α -muurolène	3,1

a : Les composés sont énumérés dans l'ordre de leur IR.

b : IR (indice de rétention) mesuré par rapport à n-alcanes (C8-C20) en utilisant HP-5 ms.

IX. Conclusion :

L'huile essentielle de *P. undulata*, cueillie dans la région de Djanet est caractérisée par la présence principale de : carvotanacétone (14,8%), δ -cadinène (8,2%), α -cadinol (4,7%), epi- α -cadinol (3,4%) et thujanol (4,7%).

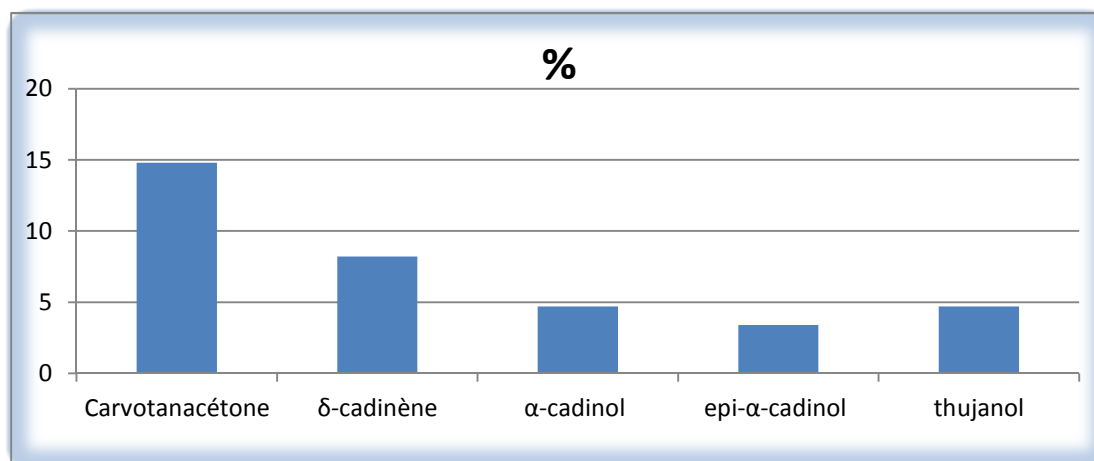


Figure 3 : Schéma récapitulatif des principaux composants chimiques de l'huile essentielle de l'espèce *Pulicaria undulata*.

Nous notons également que la composition chimique de l'échantillon algérien diffère de celle rapportée dans la littérature, où le taux de la carvotanacétone dans notre échantillon est faible. Quant aux autres composantes principales de notre espèce algérienne, elles sont détectées pour la première fois dans l'espèce *undulata*. Ces variations peuvent être expliquées par les différents climats, les saisons, géographiques et les conditions du sol ainsi que les différences d'altitude et les périodes de récolte.

Cette étude qualitative et comparative des huiles essentielles de *P. undulata*, a fait l'objet d'une publication internationale [29].

Références II.

- [1] Essawi, T., Srour, M., Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 70, 343-349.
- [2] Cisowski W., Flavonoid compounds in *Myrrhis odorata* (L.) Scop. *Herba Polonica.*, 1985, 3, 13-19.
- [3] Kubeczka K.H., Bartsch A., Ullmann I., Recent studies on essential oils of Apiaceae. In *Aetherische Oele*, K. H. Kubeczka (Ed.), 158–187, George Thieme Verlag, Stuttgart 1982.
- [4] Bruneton J., Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, 1999, 1120.
- [5] Koedam A., The influence of some distillation conditions on essential oil composition. *World Crops: Produc Utiliza, Desc.*, 1982, 7, 229-236.
- [6] Koedam A., Scheffer J.J.C., Svendsen A.B., Comparison of isolation procedures for essential oils. VI. Rosemary and sage. *Riechstoffe, Aromen, Kosmetica.*, 1980, 30, 271-276.
- [7] Wallach O., Sabinene and its relationship to the terpinenes. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft.*, 1907, 40, 585-595.
- [8] Lehotay S.J., Hajslova J., Application of gas chromatography in food analysis. *Tren in Anal Chem.*, 2002, 21, 686-697.
- [9] Bruneton, J. pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes, TEC-DOC, 1999, 3 , 484.
- [10] Lucchesi, M. E., Smadja, J., Baradshaw, S., Louw, W., Chemat, F. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food. Engineer.*, 2007, 79, 1079.
- [11] M.D. Luque de Castro and L.E. Garcia-Ayuso, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta* 369 (1998) 1-10.
- [12] M. Hadolin, A. R. Hras, Davorin Bauman and Zeljko Knez, Isolation and concentration of natural antioxidants with high-pressure extraction, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5 (2) (2004) 245-248.
- [13] A. P. Carnat, A. Carnat, D. Fraisse, L. Ricoux and J. L. Lamaison, The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72 (5) (1998), 301-305.
- [14] Dunn M., Shellie R., Morrison P., Marriott P., Rapid sequential heart-cut multidimensional gas chromatographic analysis. *J. chromatogr A.*, 2004, 1056, 163-169.

- [15] Beens J., Brinkman U.A.T., Comprehensive two-dimensional gas chromatography—a powerful and versatile technique. *Analyst.*, 2005, 130, 123-127.
- [16] Joulain D., König W.A., The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hambourg, 1998.
- [17] König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., Terpenoids and related constituents of essential oils, University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, 2001.
- [18] Mc Lafferty F.W., Stauffer D.B., Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed. Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co., Newfield, 1994.
- [19] Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois. 1995.
- [20] National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, The Perkin Elmer Corporation, 1999.
- [21] Julien PAOLINI. Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*
- [22] Mc Lafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5th Edition, J. Wiley and Sons, New York, 1991.
- [23] Ali NAA, Sharopov FS, Alhaj M, Hill GM, Porzel A, Arnold N, Setzer WN, Schmidt J, Wessjohann L. Chemical composition and biological activity of essential oil from *Pulicaria undulata* from Yemen. *Nat. Prod. Commun.*2012; 7: 257–260.
- [24] El-Kamali HH, Yousif MO, Ahmed OI, Sabir SS. Phytochemical analysis of the essential oil from aerial parts of *Pulicaria undulata* (L.) Kostel from Sudan. *Ethnobot. Leaf.* 2009; 13:467–471
- [25] Al-Hajj NQM, Ma C, Thabit R, Al-alfarga A, Gasmalla MAA, Musa A, Aboshora W, Wang H. Chemical composition of essential oil and mineral contents of *Pulicaria inuloides*. *J. Acad. Indust. Res.*, 2014; 2:675–678.
- [26] Algabr MN, Ameddah S, Menad A, Mekkiou R, Chalchat JC, Benayache S, Benayache F. Essential oil composition of *Pulicaria jaubertii* from Yemen. *Int. J. Med. Aromat. Plants* 2012; 2: 688–690.
- [27] Cristofaril G, Znini M, Majidi L, Bouyanzer A, Al-Deyab SS, Paolinil J, Hammouti B, Costal J. Chemical Composition and Anti-Corrosive Activity of *Pulicaria Mauritanica*

Essential Oil against the Corrosion of Mild Steel in 0.5 M H₂SO₄. Int. J. Electrochem. Sci. 2011; 6:6699 – 6717.

[28] Fawzy GA, Al Ati HY, El Gamal AA. Chemical composition and biological evaluation of essential oils of *Pulicaria jaubertii*. Pharmacogn. Mag. 2013; 9:28–32.

[29] Manel Boumaraf, and all., Essential Oil Composition of *Pulicaria undulata* (L.) DC. (Asteraceae) Growing in Algeria. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 2016; 8(5); 746-749.

CHAPITRE III

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Etude phytochimique de l'espèce *Echinops spinosus* :

I.1. Description botanique :

L'Echinops spinosus est une plante vivace à souche ligneuse (longue pivote) sur laquelle s'élève une tige rameuse (haute de plus ou moins 1 à 2 cm) blanche et cotonneuse.

Les feuilles caulinaires, sessiles, ovales, pénnatiséquées mesurent de 5 à 15 cm et leurs segments sont terminés par de longues épines jaunâtres.

Les inflorescences à tête globuleuse, sphérique, d'un diamètre de 4 à 6 cm, ponctuées de bleu, sont constituées de fleurs toutes bisexuées. Les fruits de *Teskra* sont des akènes turbinés à couronne raid et laciniée [1, 2].

I.2. Place dans la systématique :

- EmbranchementSpermatophytes
- Sous-embranchement..... Angiospermes
- ClasseDicotylédones
- Ordre.....Astérales
- Famille..... Asteraceae
- Genre..... *Echinops*
- Espèce.....*Spinosus*.
- Nom latin.....*Echinops spinosus* L. (LINNE 1767)

I. 3. Matériel végétal :

La récolte de la plante a été effectuée en période de floraison au mois d'Avril 2009 dans la région Nord-Est d'Algérie (entre Annaba et Constantine). Elle a été identifiée par le Pr. Gérard De Bélair de l'Université Badji Mokhtar-Annaba, selon « Quezel et Santa, 1963 ».

I.4. Macération :

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les composants. C'est une extraction qui peut se faire à température ambiante.

1200 g de la matière végétale, séchée et broyée, est macérée avec un mélange hydro-alcoolique : Méthanol/Eau ; (80/20 ; (v/v) pendant 48 heures à température ambiante puis filtrée et concentrée sous pression réduite. Cette opération a été répétée trois fois.

L'extrait ainsi obtenu est dilué dans de l'eau distillée puis laissé au repos pendant 24 h avant de le filtrer.

La phase aqueuse obtenue après filtration, subit une extraction liquide–liquide par différents solvants en commençant par le chloroforme puis l'acétate d'éthyle et enfin le *n*-Butanol.

Les phases organiques : chloroformique, acétate d'éthyle et *n*-butanol, une fois obtenues sont séchées sur du sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau, puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite puis pesées.

Les différentes étapes d'extraction de la partie aérienne de l'*Echinops spinosus* sont représentées dans le schéma suivant :

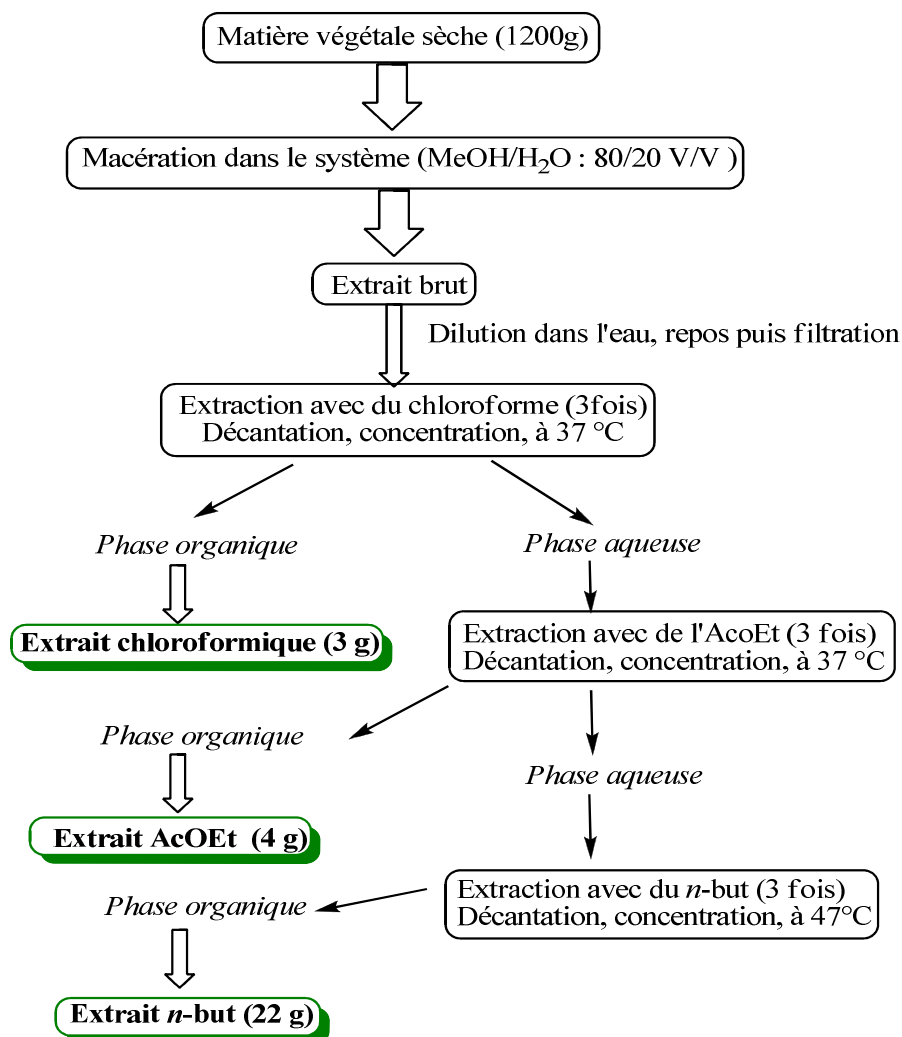


Schéma-1- Protocole d'extraction des parties aérienne de l'espèce *Echinops spinosus*.

I.5. Séparation et purification des produits :

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une analyse de chaque extrait par chromatographie analytique sur couche mince, afin de mettre au point le système d'éluion qui pourrait mener à de bonnes séparations. Les résultats de ces tests analytiques nous ont poussés à sélectionner pour cette plante l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait butanolique.

I.5.1. Etude de l'extrait acétate d'éthyle :

3g de l'extrait acétate d'éthyle sont dissout dans du méthanol, mélangés avec une petite quantité de gel de silice, puis séché sous vide jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène.

Cette dernière est déposée sur une colonne préparée avec 100 g de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans du chloroforme puis éluée par le même solvant enrichi progressivement par le méthanol.

Des fractions de 25 ml sont recueillies puis testés par chromatographie sur couche mince (CCM) et révélées sous UV, afin de permettre de rassembler les fractions identiques.

Les résultats de ces différents fractionnements sont reportés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les différentes fractions issues de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de l'*Echinops spinosus*.

Lot de fraction	Solvant MeOH (%)	N° de fraction
1 - 25	0	F1
26 - 34	2	F2
35 -65	4	F3
66 - 79	6	F4
80 - 95	8	F5
90 - 120	12	F6
121 - 180	14	F7
181 - 190	15	F8
191 - 204	20	F9
205 - 216	25	F10
217 - 230	30	F11
231 - 264	35	F12
265 - 280	40	F13
281 - 287	50	F14
288 - 295	70	F15
296 - 300	100	F16

Le test chromatographique de ces différentes fractions, a montré une richesse de l'extrait acétate d'éthyle révélé sous UV-visible par une trainée de plusieurs taches empêtrées les unes aux autres. Leur séparation s'est avérée difficile à réaliser ; pour cela on a procédé à un choix sélectif des fractions les moins complexes qui sont **F1, F6 et F8**.

Ces fractions sont séparées et purifiées par chromatographie préparative sur couche mince de gel de silice.

1. Etude des fractions F1 et F6 :

Les fractions F1, F6, de masses respectives (14,5 et 18 mg) et qui apparaissent sous forme d'une poudre blanche, sont purifiées par lavage successif à l'aide du méthanol. Leurs spectre RMN ^1H révèle deux produits purs que nous noterons **A-1 (10,2mg)** et **A-2 (12,5 mg)**.

2. Etude de la fraction F8 :

La fraction **F8** (30 mg), a subi une séparation sur plaques de gel de silice, éluées dans le système: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8/2), menant au composé majoritaire **A-3 (13,8 mg)**.

I. 5. 2. Etude de l'extrait butanolique :

L'extrait brut butanolique, de masse 14 g, a été dissous dans le méthanol et mélangé avec un peu de gel de silice puis évaporé à sec. La poudre solide obtenue est déposée sur une colonne de gel de silice préparé dans le système ($\text{AcOEt}/\text{Acide acétique}/\text{H}_2\text{O}$) avec les proportions (8/1/1). L'élution a été effectuée avec le même système en mode isocratique.

Un suivi de chacune des fractions de 250 ml est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium, et visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis chauffée pendant 3 mn à 100°C après avoir été révélée avec de l'acide sulfurique.

Ces tests nous ont permis de rassembler les fractions similaires au nombre de 18 représentées dans le tableau suivant :

Tableau-2 : Les différentes fractions issues de la chromatographie sur colonne de l'extrait n-butanol de l'Echinops spinosus.

Volume de fraction	Lot de fraction	N° de fraction
500	1 – 2	F1
	3 – 4	F2
750	5 - 7	F3
	8 – 10	F4
	11 – 13	F5
	14 – 16	F6
1000	17 – 21	F7

Tableau-2-suite : Les différentes fractions issues de la chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol de l'*Echinops spinosus*.

Volume de fraction	Lot de fraction	N° de fraction
500	22 – 23	F8
	24 – 25	F9
250	26	F10
	27	F11
500	28 – 30	F12
	31 – 32	F13
	33 – 34	F14
1000	35 – 36	F15
	37 – 40	F16
	41 – 44	F17
	45 – 48	F18

Les tests chromatographique de ces différentes fractions, ont montrés une richesse de l'extrait *n*-butanol révélé sous lumière UV-visible par une trainée de plusieurs taches mélangées les unes aux autres. Leurs séparation s'est avérée difficile à réaliser ; pour cela on a procédé à un choix sélectif des fractions les moins complexes qui sont : **F5, F8, F9 et F10**.

1. Etude de la fraction F5 :

La fraction **F5** de masse 2,3 g a été re-chromatographiée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) puis éluée en mode isocratique dans le système (AcOEt/Acide acétique/H₂O) avec les proportions (8/1/1) pour donner 10 fractions.

Environ 1,6 g de la quatrième fraction sous forme d'une poudre marron a été purifié par un lavage successif à l'aide du méthanol, dont le spectre RMN ¹H révèle un produit pur que nous noterons **B-1** (1g).

2. Etude de la fraction F8 :

Après analyse sur plaque analytique, la fraction F8 (300 mg) a subit une séparation sur plaque de gel de silice HF254 avec le système éluant (chloroforme/MeOH : 8,5/1,5), pour donner trois bandes. La purification de la deuxième bande dans le même système a permis l'obtention du produit F8-2 (50 mg) à l'état pur que nous noterons **B-2**.

3. Etude de la fraction F9 :

L'analyse de cette fraction sur plaque analytique de gel de silice normale, montre une tache intense et majoritaire après élution. La fraction F9 (107 mg) a été purifiée sur plaque préparative de gel de silice HF254 éluée dans le système : (chloroforme/MeOH : 8/2). Le produit F9-3 de 45mg est à l'état pur ; on le notera **B-3** (45mg).

4. Etude de la fraction F10 :

Après une analyse sur plaques analytiques de gel de silice, la fraction F10 (123.2 mg) subit une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF254 avec le système : (chloroforme/MeOH : 8/2), pour donner cinq bandes dont une est plus marquée que les autres. La purification de cette deuxième bande dans le même système a permis l'obtention du produit F10-2 (62mg) à l'état pur que nous noterons **B-4**.

En résumé, la séparation et la purification « classique » des fractions issues du fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait acétate d'éthyle et de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de l'*Echinops spinosus* L., aboutissent à la séparation et la purification de sept produits :

✓ Trois produits issus de l'extrait acétate d'éthyle ; nommés : **A-1**, **A-2** et **A-3**.

✓ Quatre produits de l'extrait *n*-butanol ; nommés : **B-1**, **B-2**, **B-3** et **B-4**.

Les deux modes de fractionnement qui nous ont permis d'aboutir à séparer ces sept composés, sont résumés dans les schémas 2 et 3 :

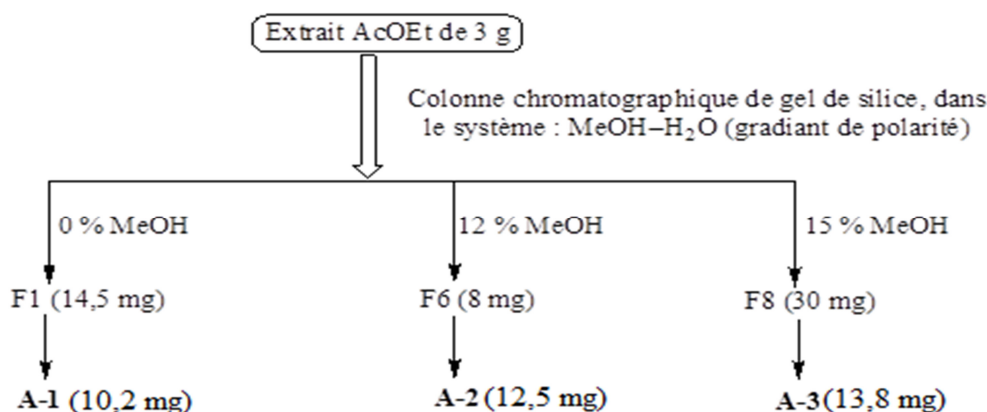


Schéma-2-Fractionnement récapitulatif de l'extrait acétate d'éthyle de l'E. spinosus.

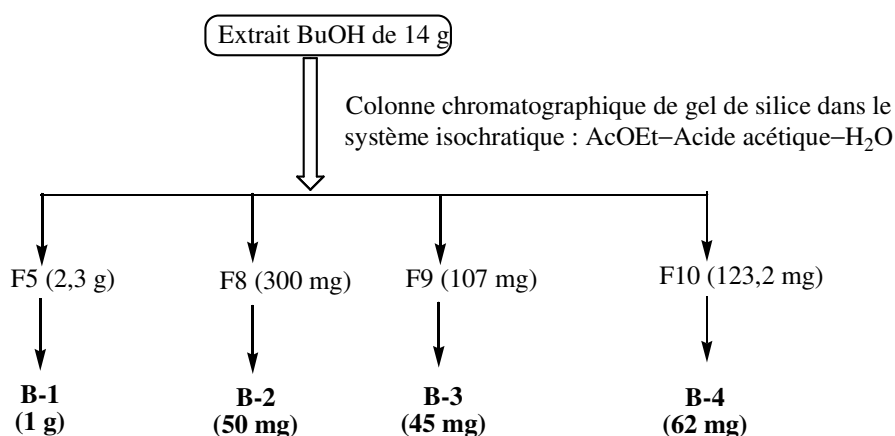


Schéma-3- Fractionnement récapitulatif de l'extrait butanolique de l'E. spinosus.

II. Etude phytochimique de l'espèce *Pulicaria undulata* L. :

II.1. Description botanique :

L'espèce *Pulicaria undulata* L. (figure-1), est une herbe laineuse couchées, densément ramifiée, peut parfois se comporter comme une plante vivace de courte durée et atteindre une hauteur de 50 cm. Les feuilles sont nombreuses, alternées, velues, sessiles, de 3 à 4 cm de long, avec des frontières ondulantes. L'inflorescence, à la fin de chaque tige, est une tête en forme de disque avec des fleurs tubulaires jaunes sur le réceptacle et ligules jaunes sur le bord extérieur. Le capitule ne dépasse pas 3 cm de diamètre. Les fruits sont de petits akènes surmontés avec une ou deux rangées de poils. La plante entière a une odeur très agréable. Elle fleurit au début du printemps dans le nord du Sahara de l'Algérie, et à tout moment après la pluie dans le centre du Sahara algérien [3,4].



Figure-1: L'espèce *Pulicaria undulata*.

II.2. Place dans la systématique :

- EmbranchementAngiospermes
- ClasseDicotylédones
- Ordre.....Astérales
- Famille..... Asteraceae
- Tribu Inuleae
- Genre..... *Pulicaria*
- Espèce.....*undulata*

II.3. Matériel végétal :

La plante a été cueillie au mois d'avril 2011 dans la région de Djanet (Tassili) willaya d' Illizi, dans le sud-est du Sahara algérien et authentifié par le Pr. Gérard De Bélair, Université Badji Mokhtar, Annaba, selon Quezel et Santa [4]. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri de la lumière directe du soleil, les parties aériennes de la plante sont coupées en petits morceaux, broyées et pesées.

II.4. Macération :

Le matériel végétal, de masse 1Kg, subit une macération dans un mélange hydro-alcoolique (EtOH/Eau : 80/20) trois fois avec renouvellement du solvant.

Après filtration et concentration de la solution à une température environ 37°C, on ajoute de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1Kg de matière sèche. La solution obtenue après filtration est affrontée, successivement, dans une ampoule à décanter de 2 L par trois types de solvants de polarité croissante, à savoir : le trichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Les extraits obtenus sont évaporés à secs puis pesés.

Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma 4.

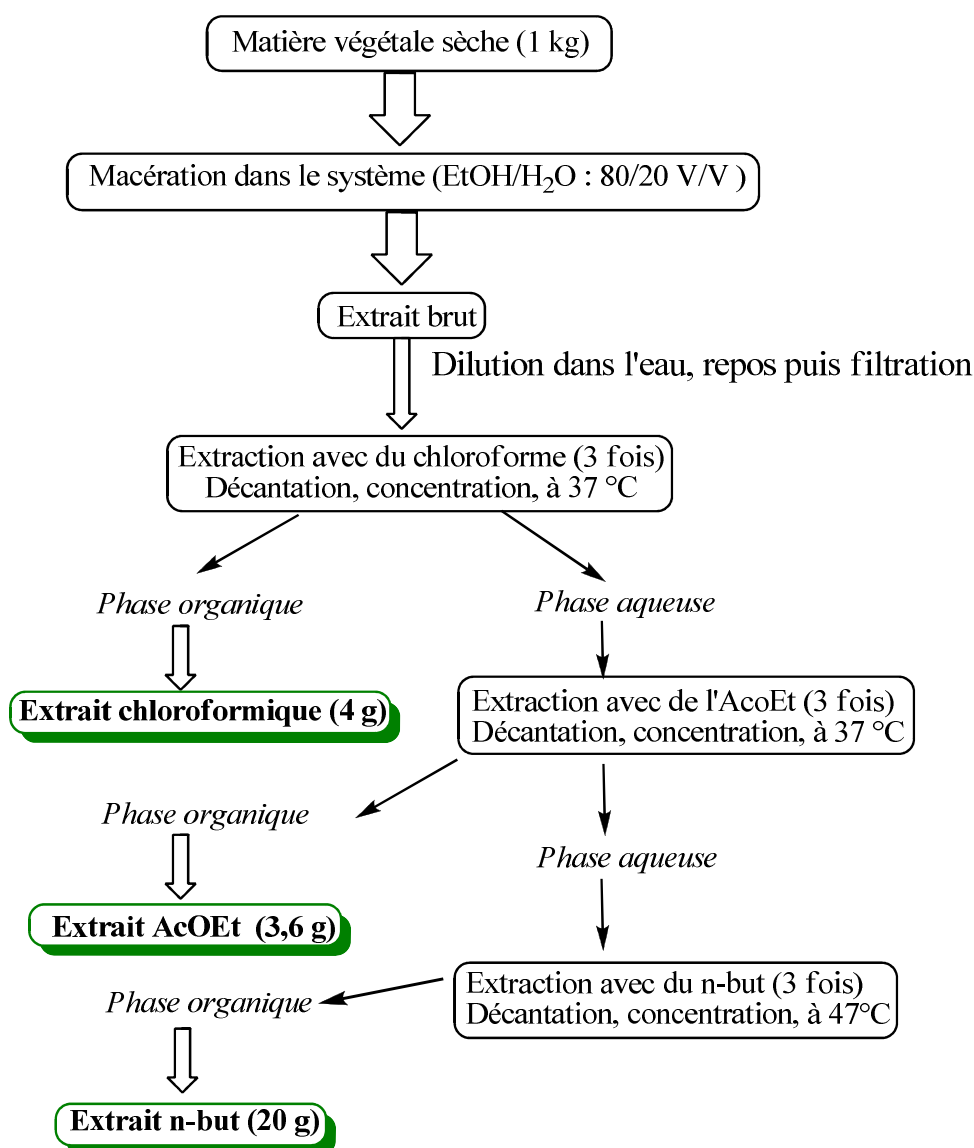


Schéma-4- Protocole d'extraction des parties aériennes de l'espèce *Pulicaria undulata* L.

II.5. Séparation et purification des produits :

Pour l'ensemble des extraits, nous avons débuté le traitement par une chromatographie analytique sur couche mince pour mettre au point le système d'élution qui donnerait les meilleurs résultats.

Les résultats de nos travaux analytiques nous ont poussés à sélectionner pour cette plante l'extrait chloroformique.

II.5.1. Etude de l'extrait chloroformique :

Une aliquote (334 mg) de cet extrait est dissoute dans du méthanol puis mélangée avec une petite quantité de gel de silice et l'ensemble est séché sous vide jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est soumise à un traitement par chromatographie sur colonne de gel de silice (type 60, 230–400 mesh, Merck) en utilisant de l'éther de pétrole léger/éther diéthylique, comme système d'élution pour donner 16 fractions qui sont collectées et rassemblées selon leurs profils CCM.

Le tableau 3 montre les résultats obtenus.

Tableau-3: Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroformique.

Lot de fraction (100ml)	Eluant : Ether de pétrole–diéthyle éther.	Poids (mg)
F1	100 % éther de pétrole	8,02
F2	90/10	1,16
F3	80/20 (a)	6,18
F4	80/20 (b)	17,0
F5	70/30	14,4
F6	60/40	20,9
F7	10/10	37,2
F8	40/60	63,8
F9	30/70	11
F10	20/80 (a)	16,1

(a) : le premier volume (100ml)

(b) : le deuxième volume (100ml) dans le même système d'élution de (a)

Tableau-3-suite : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroformique.

Lot de fraction (de 100ml)	Eluant : Ether de pétrole–diéthyle éther.	Poids (mg)
F11	20/80 (b)	17,6
F12	10/90	14,1
F13	100 % diethyl ether	9,4
F14	100 % CHCl ₃	2,3
F16	100 % MetOH	61,3

Les fractions sélectionnées selon leurs intérêts (profil CCM) ont été analysées par RMN ¹H et soumis à des purifications sur couche mince ou/et par HPLC. Le profil des fractions 6 et 8 (en particulier) indiquent la présence de métabolites majoritaires que nous noterons A et C, respectivement, alors que les fractions restantes montrent des mélanges plus complexes.

II.5.1.1. Etude des sept fractions sélectionnées :

1. Etude de la fraction F4:

Une portion de la fraction F4 (10 mg) a été purifiée sur plaque préparative de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0.2 mm) dans le système de solvant : éther de pétrole /diéthyle éther : (3/7), pour donner le composé M (2,5 mg).

2. Etude des fractions F6 et F8 :

Les fractions F6 et F8 sont sous forme de poudre blanche avec des masses respectives de (20,9 et 63,8 mg). Chacune des deux fractions indique une tache unique et intense qui a été révélée avec de l'acide sulfurique après un test sur plaque analytique de gel de silice en phase normale, élué dans le système éther de pétrole / diéthyle éther avec les proportions (8/2).

Une portion de la fraction F6 (5 mg) a été purifiée sur plaque préparative de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0.2 mm) dans le système de solvant : éther de pétrole /diéthyl éther : (3/7), pour donner le composé A à l'état pur (3,2mg).

Le spectre RMN ¹H et le spectre de masse de ce composé A et celui de la fraction F8, que nous noterons C, indiquent qu'on est en présence de produits purs.

3. Etude de la fraction F7:

Une partie de la fraction F7 (20 mg) a été purifiée par HPLC sur une colonne Supelco C8 Discovery Bio Wide Pore (250 × 10; 5 µm) en utilisant comme éluant en mode isocratique le MeOH/H₂O : 4/6; avec un débit de 2 mL/mn et un détecteur UV à $\lambda = 210$ et 254 nm. Cette fraction a fourni quatre produits purs notés **B**, **C**, **E** et **T**.

Le chromatogramme HPLC de la fraction 7 est représenté dans la figure-2 suivante :

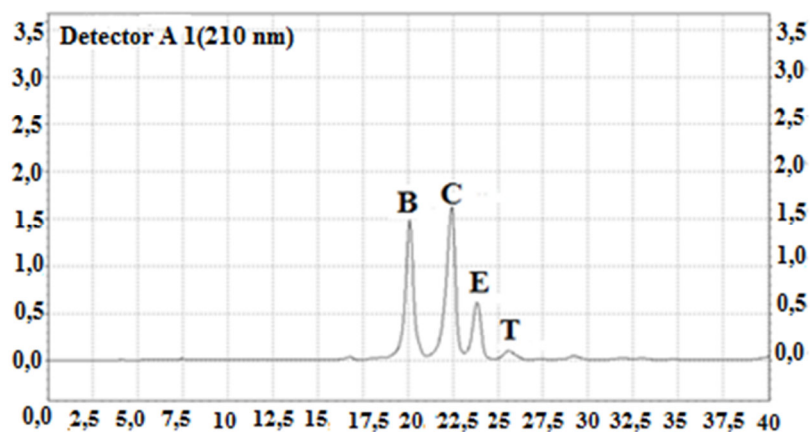


Figure-2 : Profil HPLC de la fraction F7.

4. Etude de la fraction F9 :

La fraction F9 (11,0 mg) a été purifiée sur plaque préparative de gel de silice (Merck Kieselgel 60 F254, 0,2 mm) dans le système d'éluion : éther de pétrole/diéthyle éther : 3/7, pour donner le composé F de 0,5 mg.

5. Etude des fractions F10 et F11 :

La fraction F10 (16,1 mg) et une aliquote de la fraction F11 (8,0 mg) ont été purifiées par HPLC sur une colonne Supelco C8 Discovery Bio Wide Pore (250 × 10; 5 µm) en utilisant comme éluant en mode isocratique : MeOH / H₂O : 25/75; avec un débit de 2,5 ml/mn et un détecteur UV à $\lambda = 210$ et 254 nm. La fraction F10 nous a fourni le composé **G** (1,5 mg), le composé **C** (2,8 mg) et le composé **D** (1 mg).

Quant au composé **H** (1,6 mg) il a été séparé de la fraction **F11**.

Les chromatogrammes HPLC des fractions 10 (profil de gauche) et 11 (profil de droite) sont représentés dans les figures-3 suivantes.

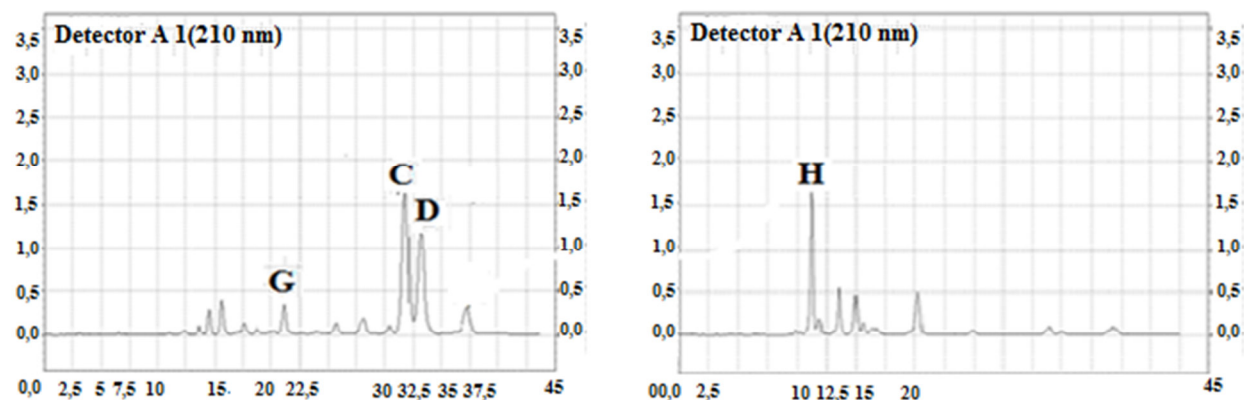


Figure-3 : Profils HPLC des fractions F10 et F11, respectifs.

Ainsi, à l'issue de l'étude phytochimique uniquement de l'extrait chloroformique, 10 produits purs ont été isolés dont le mode de fractionnement est résumé dans le schéma-5:

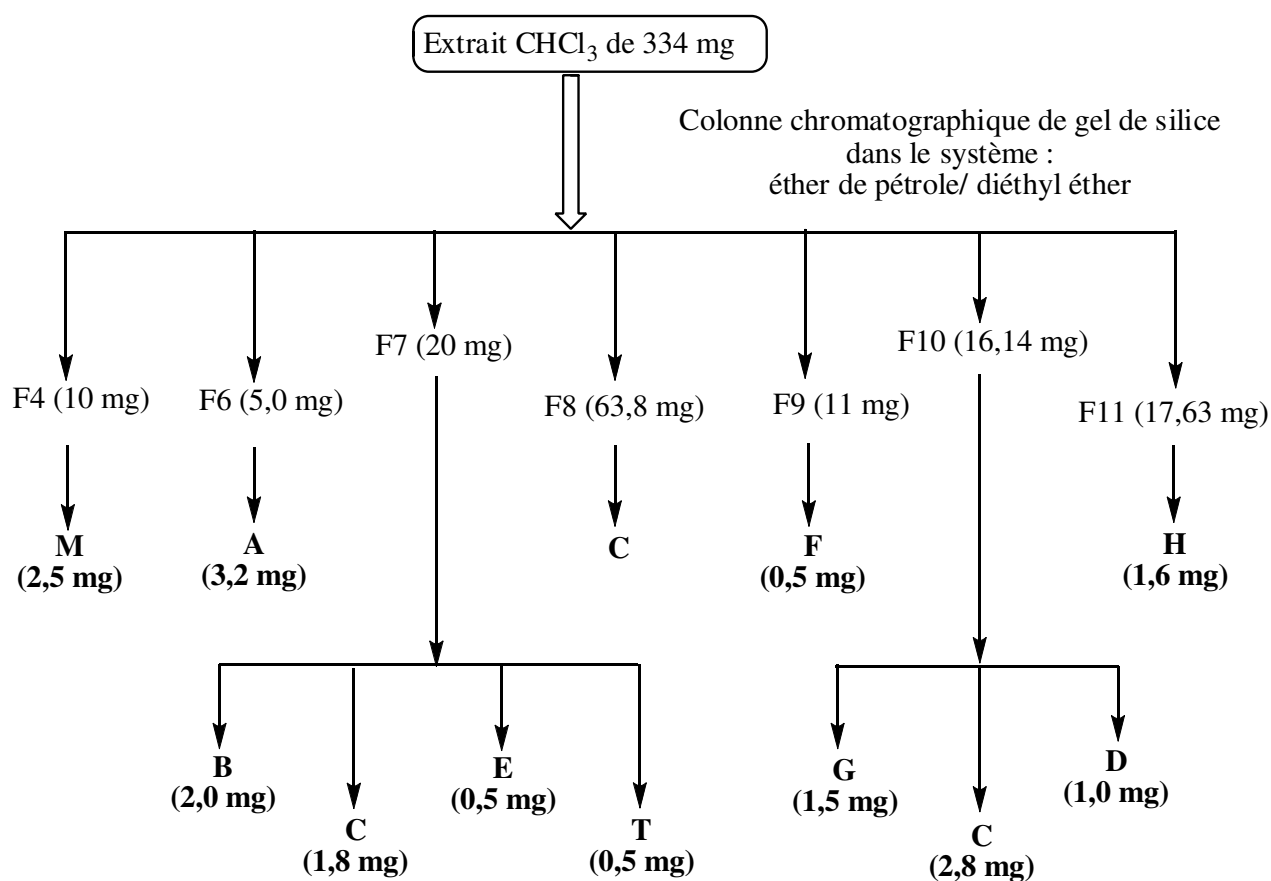


Schéma-5 : Fractionnement récapitulatif de l'extrait chloroformique de l'espèce *Pulicaria undulata* L.

Références III.

- [1] Bezanger, L., Beauquesne, L., Pinkas M., Torck M., Trottin F. Plantes médicinales des régions tempérés. Ed. Maloine-Parie 1980. P. 398.
- [2] Boullard, B., Plantes médicinales du monde (Croyances et réalité), ed.Estem-Parie 2001. P.204.
- [3] Benhouhou, S. A guide to medicinal plants in north Africa IUCN, Spain, 2005, p.223.
- [4] Quezel, P. et santa, S. Nouvelle flore de l'Algerie et des régions désertique méridionales CNRS, Paris, Tome II, 1963, p.947.

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

Introduction :

Pour déterminer les structures des produits isolés, les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés suivant : CDCl_3 , DMSO-d_6 et CD_3OD ; puis analysés par les différentes méthodes d'analyse spectroscopique dont la résonance magnétique nucléaire et ces différentes applications (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C avec sa séquence DEPT-135 , COSY, HSQC, HMBC, NOESY et NOE « difference ») ainsi que la spectrométrie de masse à haute résolution, l'UV, IR et la spectroscopie chiroptique (Polarimétrie et Dichroïsme Circulaire Électronique ECD).

Les analyses de RMN effectuées sur l'espèce *Pulicaria undulata* ont été enregistrées au centre ICB-RMN (Italie) sur un spectromètre Bruker DRX 600 MHz qui est équipé d'une cryosonde TXI TM et sur un spectromètre Bruker Avance-400 MHz en utilisant une sonde inverse muni d'un gradient le long de l'axe Z, selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée. Quant aux analyses effectuées sur l'espèce *Echinops spinosus*, elles ont été enregistrées au centre de recherche « Instituto de Productos Naturales y Agrobiologia » de la Laguna (Tenerife-Espagne),

A- Identification structurale des composés isolés de l'espèce *Echinops spinosus L.* :

A-I Les différents produits isolés de la phase AcOEt :

I.1 Identification structurale du composé A-1 :

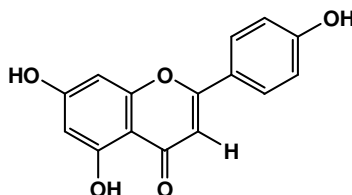


Figure-1 : Composé A-1.

a. Analyse spectroscopique dans l'UV :

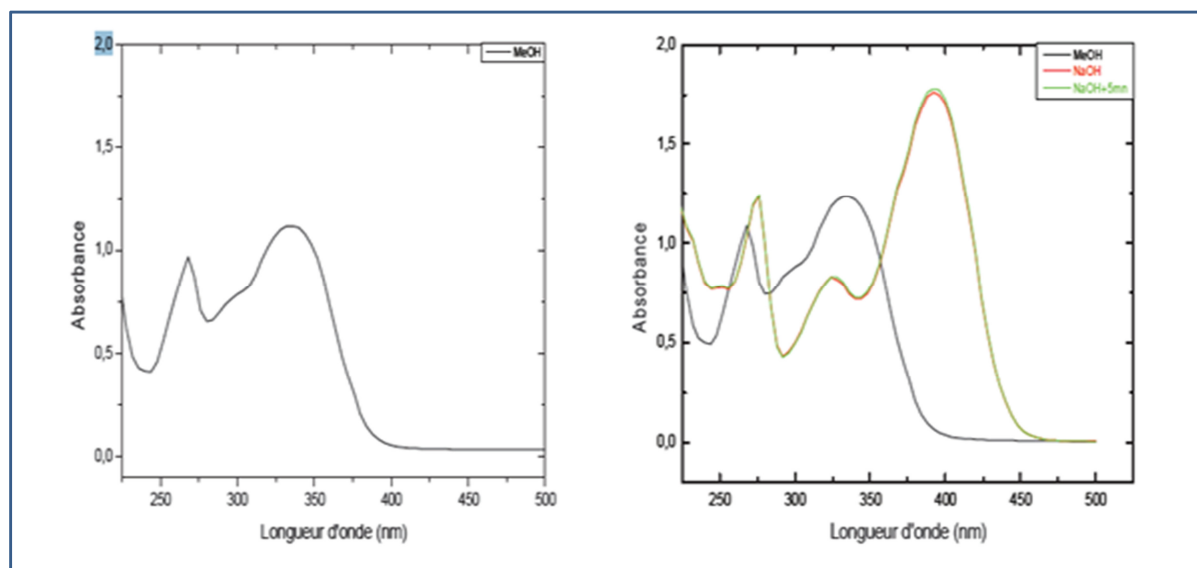
L'étude de la série spectrale UV, spectre-1, a permis de dégager les points suivants :

- ✓ Le maximum d'absorption de la bande I à 335 nm dans le spectre enregistré dans le méthanol et une fluorescence noire violette du composé A-1 sous lumière de Wood, indiquent qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone.
- ✓ L'effet bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 57$ nm) dans NaOH avec augmentation de l'intensité lumineuse indiquent la présence d'un groupement OH libre en position 4'. Quant à l'apparition d'une nouvelle bande à 324 nm, elle suppose la présence d'un groupement OH libre en position 7.
- ✓ Par ailleurs, comparé au spectre enregistré dans le méthanol, l'addition du réactif NaOAc provoque un déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 8$ nm) et confirme ainsi la présence du groupement OH libre en position 7.

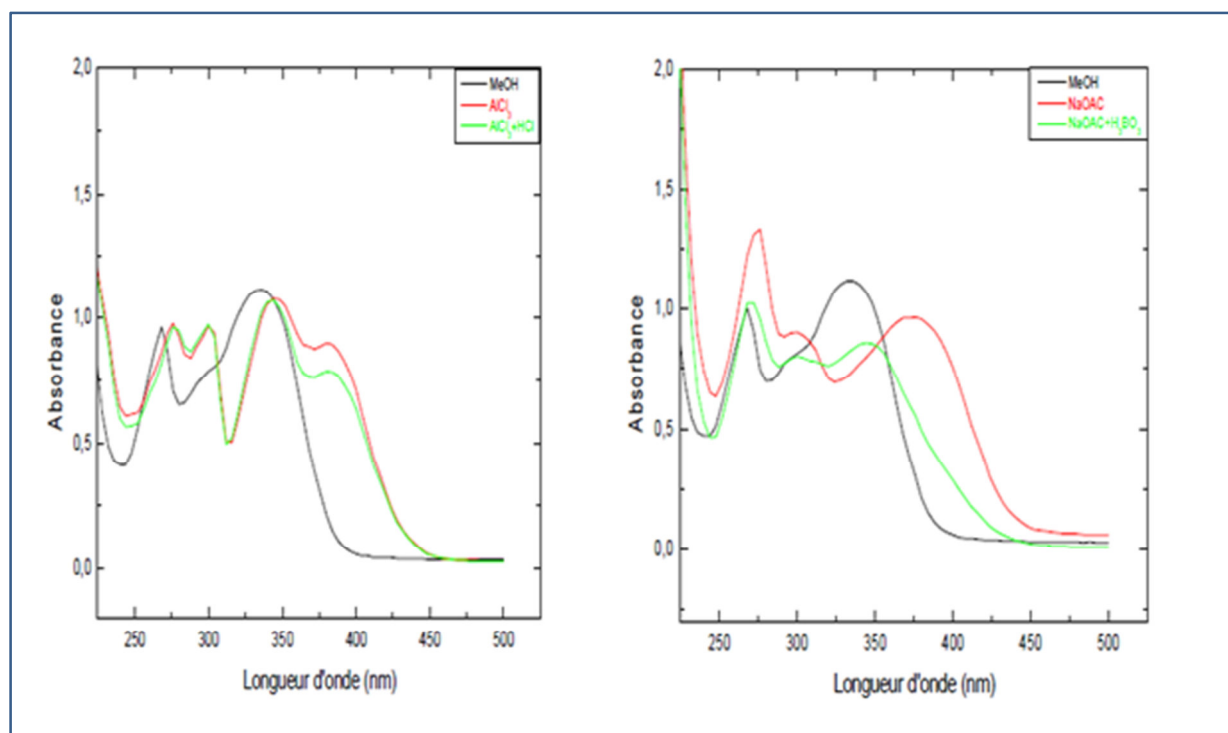
- ✓ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 45$ nm) enregistré dans le réactif ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparé à celui enregistré dans le méthanol, indique la présence d'un groupement OH libre en position 5.
- ✓ En comparant les spectres dans ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) et AlCl_3 ; l'absence du déplacement hypsochrome de la bande I laisse prévoir l'absence du système ortho di-hydroxylé sur le cycle B. L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau-1 :

Tableau-1: Données de la série spectrale UV du composé A-1.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	335	/	268	Flavone
+ NaOH	392		274	OH libre en 4'
		324		OH libre en 7
Spectre stable dans NaOH après 5 mn				
+ AlCl_3	382	348 ; 300	274	OH libre en 5
+ AlCl_3/HCl	380	334 ; 300	274	Pas d'ortho di-OH sur le cycle B
+NaOAc	380	306	276	OH libre en 7
+NaOAc/ H_3BO_3	338	/	269	/



Spectres-1 : Série spectrale UV du composé A-1



Spectres-1-suite : Série spectrale UV du composé A-1

b. Analyse RMN :

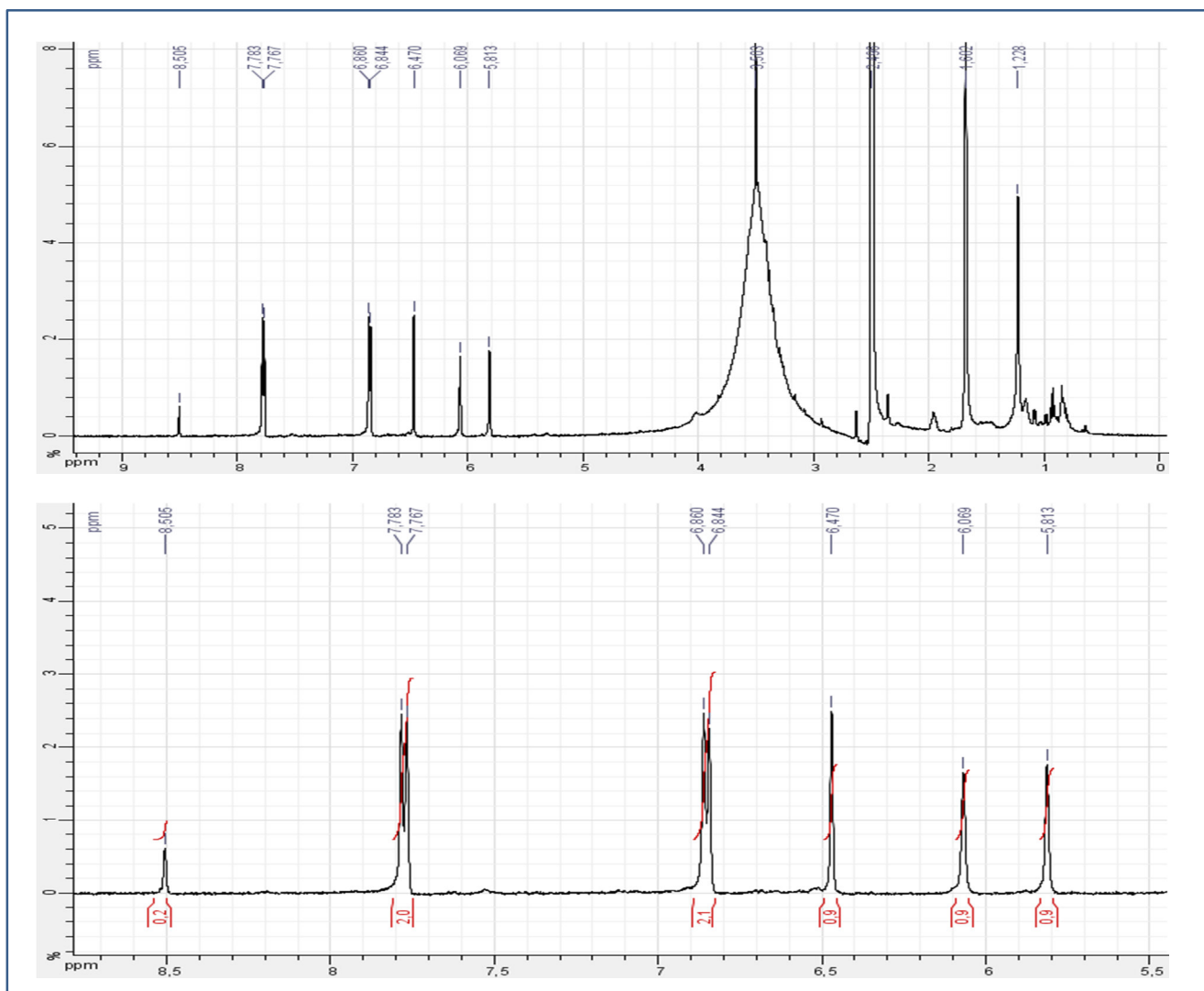
L'examen du spectre RMN ^1H , spectre-2, montre:

- ✓ Un singulet à $\delta = 6,4$ ppm attribuable au proton H-3 qui confirme la structure d'une flavone.
- ✓ Deux singulets larges d'intégration 1H chacun à $\delta = 6,1$ ppm et à $\delta = 5,8$ ppm attribuables respectivement aux protons H-8 et H-6.
- ✓ La constante de couplage $J = 8,5$ Hz du doublet qui apparaît à $\delta = 6,8$ ppm, permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H aux protons H-3' et H-5', quant à la constante de couplage $J = 8,5$ Hz du doublet qui apparaît à $\delta = 7,7$ ppm elle permet l'attribution de ce signal d'intégration 2H aux protons H-2' et H-6'.

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau-2.

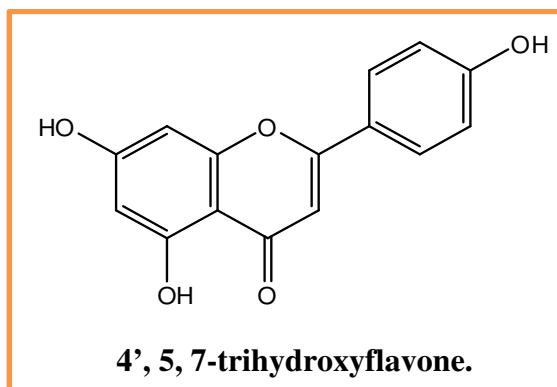
Tableau-2: Données de la RMN ^1H du composé A-1.

Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicités (J (Hz))	Attributions
7,7	2H	d (8,5)	H-2'; H-6'
6,8	2H	d (8,5)	H-3'; H-5'
6,4	1H	s	H-3
6,1	1H	sl	H-8
5,8	1H	sl	H-6



Spectres-2 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé A-1.

La combinaison des données de la spectrophotométrie UV et de la spectroscopie RMN ^1H oriente vers le composé : **4', 5, 7-trihydroxyflavone** connue sous le nom d'**apigénine** [1].



I.2 Identification structurale du composé A-2 :

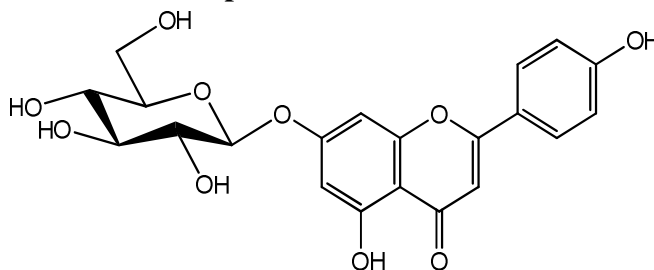


Figure-2 : Composé A-2.

a. Analyse spectroscopique dans l'UV :

Un examen des données de la série spectrale UV (spectres-3, tableau-3) montrent :

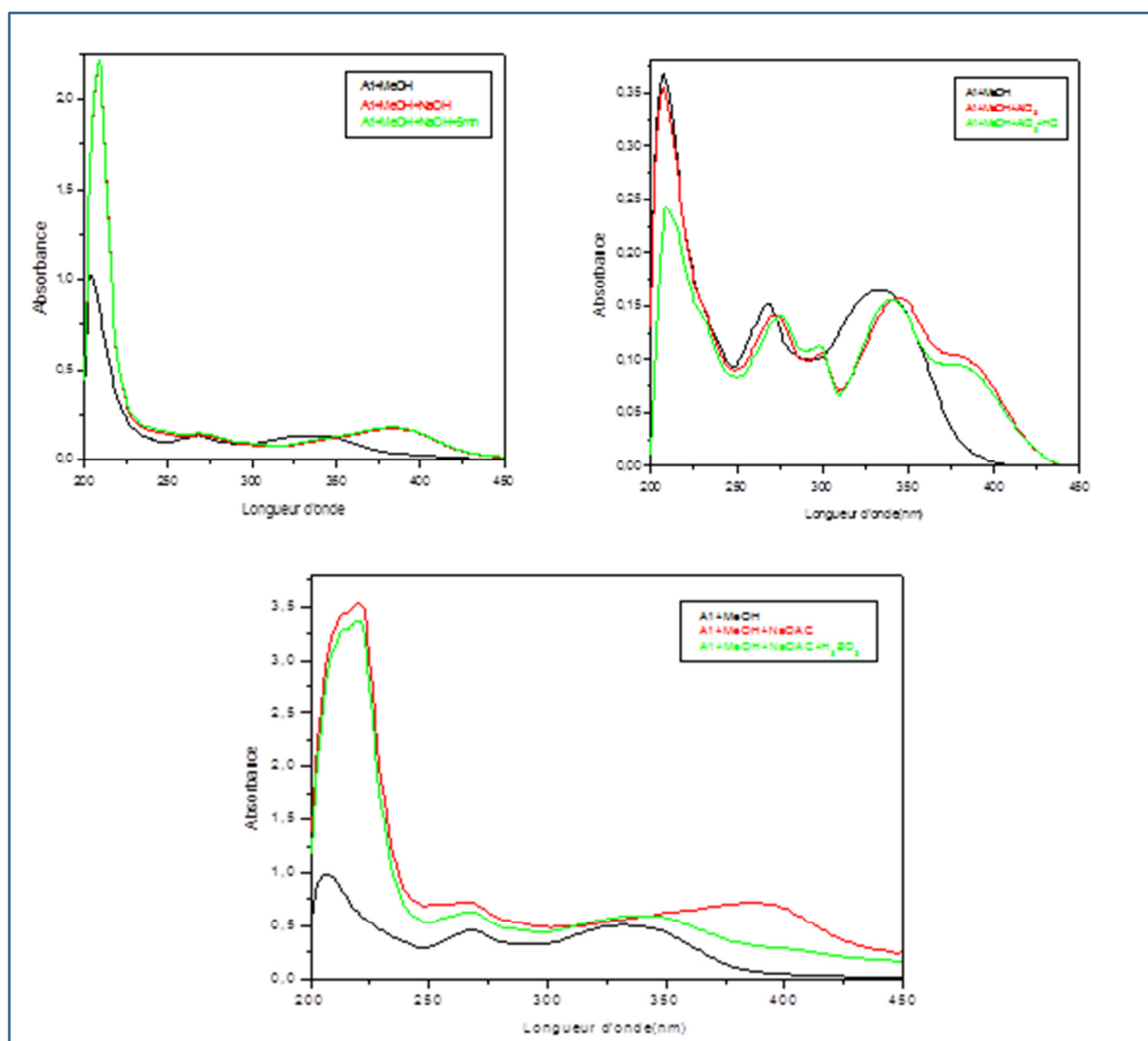
- ✓ Un maximum d'absorption de la bande I à 336 nm et une fluorescence violette sous lumière de Wood sont en faveur d'une structure flavone.
- ✓ Un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 52$ nm) et une augmentation de son intensité lumineuse suite à l'addition de NaOH, sont caractéristiques d'un groupement OH libre en position 4'.

Par ailleurs l'absence d'une nouvelle bande dans la zone [320–335 nm] suppose une substitution de la position 7 (7- OR) ce qui est confirmée suite à l'addition du réactif NaOAc où la bande II, comparé au spectre méthanolique, ne se déplace pratiquement pas.

- ✓ Un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 44$ nm) enregistré dans le solvant (AlCl_3+HCl) comparé au spectre méthanolique, indique la présence d'un groupement OH libre en position 5.
- ✓ Le faible déplacement de la bande I en comparant les spectres dans (AlCl_3+HCl) et AlCl_3 , laisse prévoir l'absence du système ortho di-hydroxylé sur le cycle B.

Tableau-3: Données de la série spectrale UV du composé A-2.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	336	/	269	Flavone
+NaOH	388	/	268	OH libre en 4'
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				
+ AlCl_3	381	345 ; 299	272	OH libre en 5 Pas d'ortho di-OH sur le cycle B
+ AlCl_3/HCl	380	341 ; 298	276	
+NaOAc	386	/	269	7-OR
+NaOAc/ H_3BO_3	340	/	269	/



Spectres-3 : Série spectrale UV du composé A-2.

b. Analyse RMN :

L'examen du spectre RMN proton (spectre-4, *c.f.*, p-76) montre :

- ✓ Un singulet à $\delta = 6,82$ ppm attribuable au proton H-3, ce qui confirme la structure d'une flavone.
- ✓ Deux singulets d'intégration 1H chacun à $\delta = 6,63$ ppm et à $\delta = 6,50$ ppm attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.
- ✓ Deux autres signaux larges sous forme de doublets d'intégration 2H chacun avec une constante de couplage $J = 8,6$ Hz. Le premier signal est à $\delta = 7,86$ ppm attribuable aux protons H-2', H-6' et le second à $\delta = 6,88$ ppm attribuable aux protons H-3' et H-5'.
- ✓ La valeur du déplacement chimique du noyau relatif au doublet d'intégration 1H à $\delta = 5,08$ ppm est en faveur d'un proton anomérique d'un sucre lié à l'aglycone par une liaison C-O. Quant à la valeur de sa constante de couplage ($J = 7,7$ Hz), elle oriente vers une configuration β du carbone anomérique.

Les données de la RMN ^1H sont résumées dans le tableau-4 suivant :

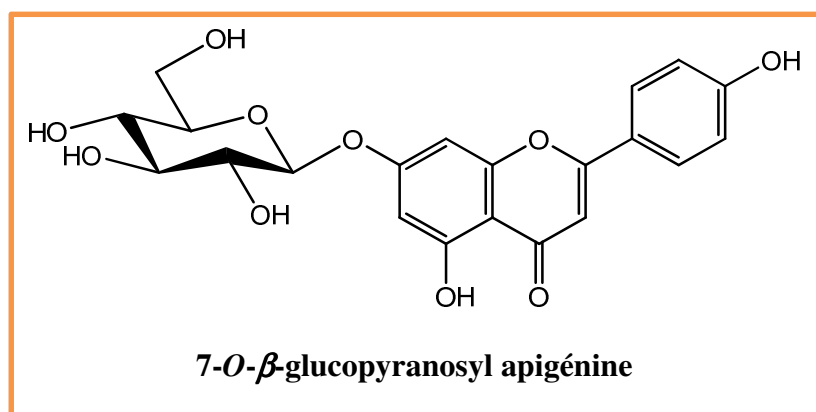
Tableau-4: Données de la RMN ^1H du composé A-2.

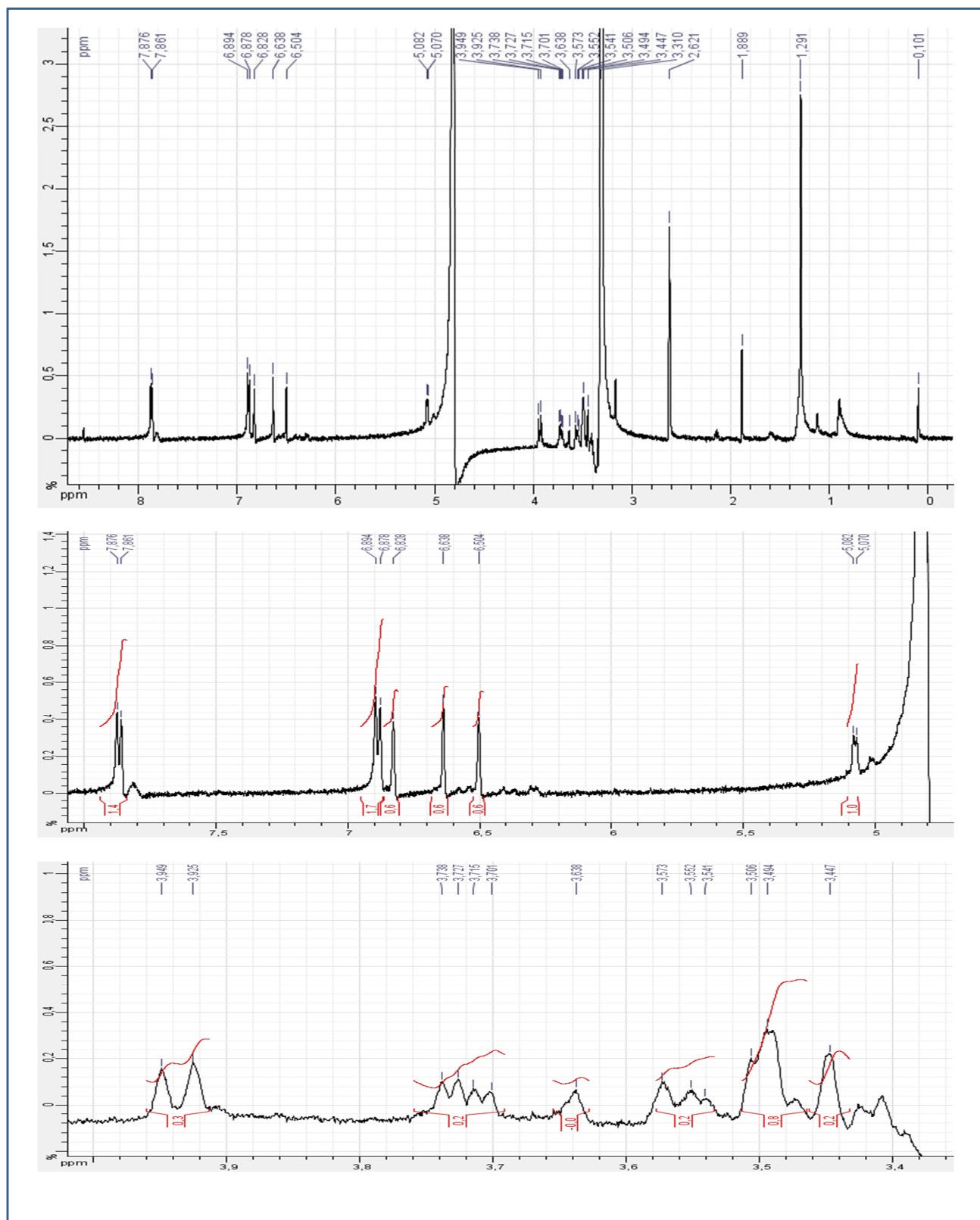
Déplacement chimique (ppm)	Intégration	Multiplicité (J (Hz))	Attributions
7,86	2H	<i>d</i> (8,6)	H-2'; H-6'
6,88	2H	<i>d</i> (8,6)	H-3'; H-5'
6,82	1H	<i>s</i>	H-3
6,63	1H	<i>sl</i>	H-8
6,50	1H	<i>sl</i>	H-6
5,08	1H	<i>d</i> (7,7)	H-1''
3,93	1H	<i>dl</i> (12,0)	H-6''a
3,72	1H	<i>dd</i> , (11,5; 5,5)	H-6''b

Les déplacements relevés dans la zone 3,66–3,38 ppm sont en faveur des protons d'un sucre dont la nature a été vérifiée par hydrolyse acide et une co-chromatographie avec des échantillons de référence.

Toutes ces données nous amènent vers la structure du composé A-2 qui est le :
5,7,4'-trihydroxyflavone-7-*O*- β -D-glucopyranoside connue sous le nom de :

7-*O*- β -glucopyranosyl apigénine [2].





Spectres-4 : RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) du composé A-2

I.3 Identification structurale du composé A-3 :

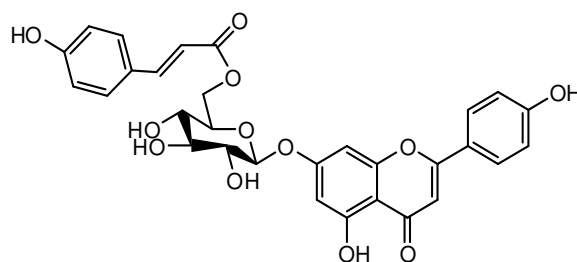
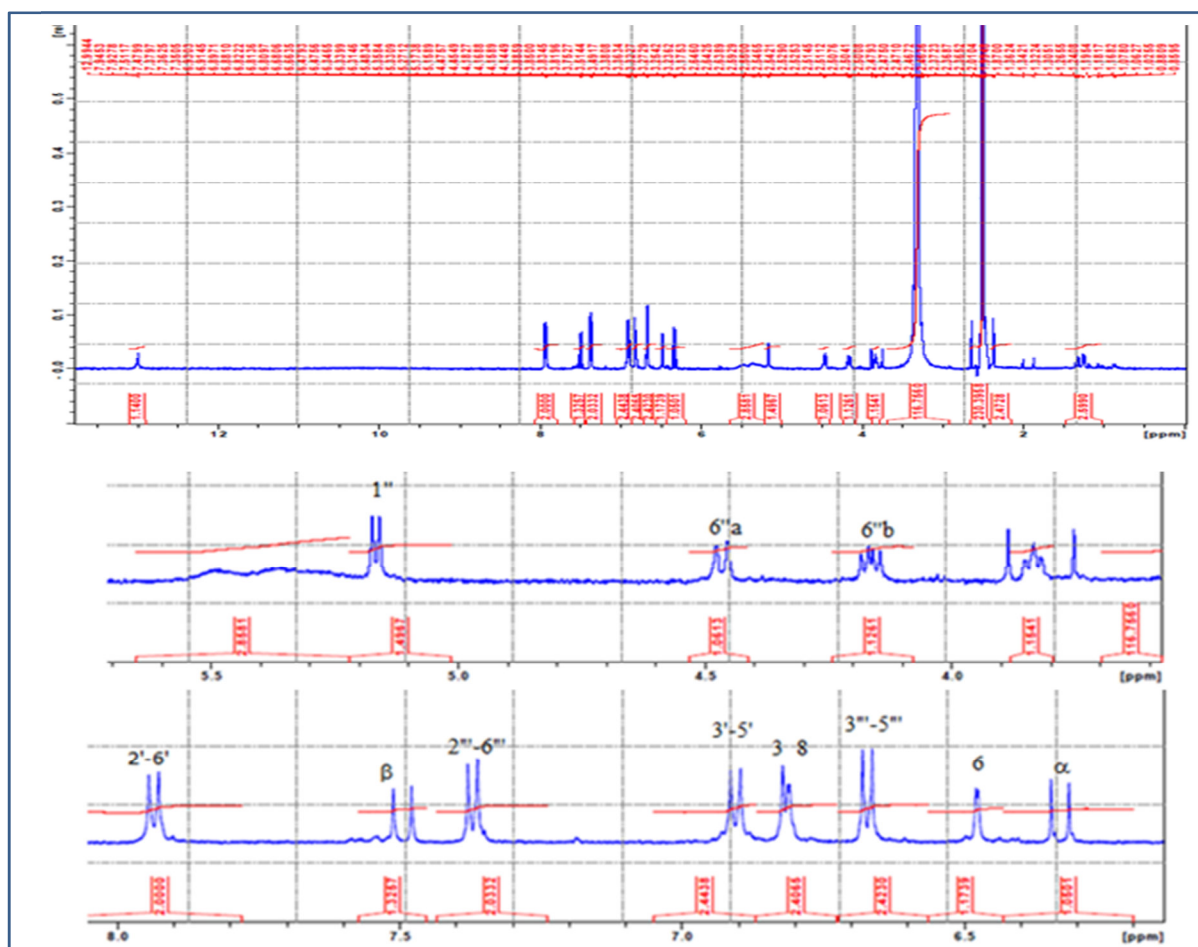


Figure-3 : Composé A-3.

Dans le spectre RMN ^1H (spectre-5) du composé **A-3**, on relève de nombreux pics avec des déplacements chimiques allant de $\delta = 6,3$ ppm à $\delta = 8,0$ ppm qui laissent prévoir la présence de plusieurs noyaux aromatiques dans la molécule.

L'étalement du spectre-5 fait apparaître un doublet à $\delta = 5,17$ ppm attribuable à un proton anomérique et la valeur de sa constante de couplage $J = 7,1$ Hz oriente vers une configuration β du carbone anomérique de la génine. Par ailleurs la présence d'un seul ose est confirmée par les signaux qui apparaissent dans la zone : $\delta = 3,5$ ppm et 4,5 ppm.



Spectre-5 : RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé A-3.

Une analyse approfondie et comparative des signaux aromatiques du spectre RMN ^1H et celui du ^{13}C du composé A-3 avec les données de la littérature de composés polyphénoliques variés, a permis de confirmer les deux parties de notre composé correspondant au squelette de base de l'apigénine et son substituant l'acide *p-E*-coumarique y compris le sucre glucose substituant l'hydroxyle en position 7 de l'apigénine.

L'ensemble de ces données sont représentés dans le tableau-5 suivant :

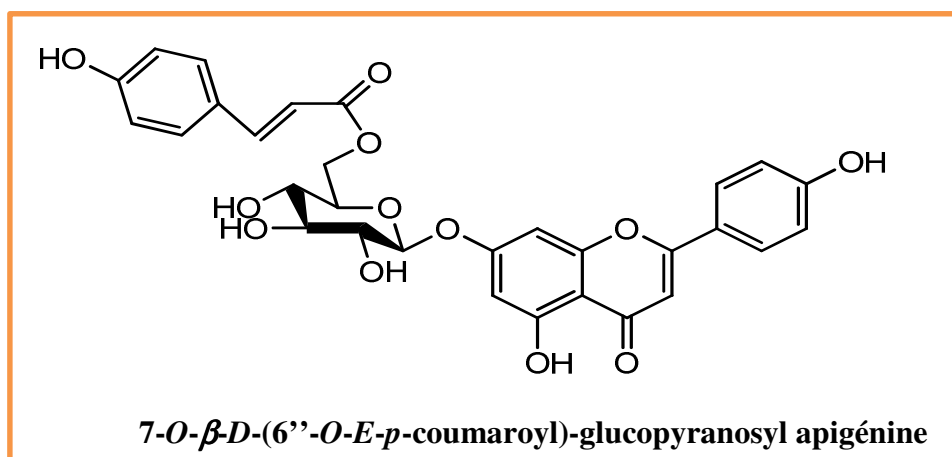
Tableau-5 : Données comparatives des spectres RMN ^1H ((DMSO- d_6) et ^{13}C ((D $_2$ O) du composé A-3 avec ceux de deux polyphénols, composés soit du squelette de l'apigénine ou du substituant l'acide *p-E*-coumarique.

	Composé A-3		7-O- β -D-(3''-E-p-coumaroyl)-glucopyranosyl chrysoéryol [3]		7-O- β -D-glucopyranosyl apigénine [4,5]	
	RMN ^1H	^{13}C	RMN ^1H	^{13}C	RMN ^1H	^{13}C
	δ_{H} , multi., (J (Hz))	δ_{C}	δ_{H} , multi., (J (Hz))	δ_{C}	δ_{H} , multi., (J (Hz))	δ_{C}
génine	δ (ppm)					
2	-	164,7	-	-	-	164,7
3	6,82 <i>s</i>	103,5	-	-	6,85 <i>s</i>	102,7
4	-	182,4	-	-	-	182,5
5	-	161,9	-	-	-	160,4
6	6,48 <i>d</i> (2,0)	99,9	-	-	6,48 <i>d</i> (2,1)	-
7	-	163,1	-	-	-	162,8
8	6,82 <i>d</i> (2,0)	95,1	-	-	6,86 <i>d</i> (2,1)	96,0
9	-	157,4	-	-	-	156,9
10	-	105,8	-	-	-	106,0
1'	-	121,3	-	-	-	121,1
2'-6'	7,94 <i>d</i> (8,8)	129,0	-	-	7,96 <i>d</i> (8,8)	128,4
3'-5'	6,93 <i>d</i> (8,8)	116,1	-	-	6,96 <i>d</i> (8,8)	116,1
4'	-	161,6	-	-	6,96 <i>d</i> (8,8)	160,4

<i>E-p-coumaroyl</i>	δ (ppm)					
α	6,33 <i>d</i> (15,9)	114,1	6,45 <i>d</i> (16)	114,7	-	-
β	7,49 <i>d</i> (15,9)	145,4	7,60 <i>d</i> (16)	144,4	-	-
1''	-	125,3	-	125,2	-	-
2'''-6'''	7,36 <i>d</i> (8,5)	130,6	7,60 <i>d</i> (9)	130,1	-	-
3'''-5'''	6,67 <i>d</i> (8,5)	116,2	6,96 <i>d</i> (8,7)	115,7	-	-
4'''	-	160,3	-	159,6	-	-
CO	-	166,9	-	-	-	-

L'ensemble de ces données nous oriente vers la structure suivante du composé A-3 :

7-*O*- β -D-(6''-*O*-*E-p*-coumaroyl)-glucopyranosyl apigénine. Ce composé connu sous le nom de terniflorine, a été isolé pour la première fois de l'espèce *Clematis terniflora* [6].



Les déplacements chimiques, aussi bien de notre composé A-3 que celui de la littérature [6], relevés sur les spectres RMN ^1H et ^{13}C , sont reportés dans le tableau-6 suivant :

Tableau-6: Données comparatives avec la littérature de la RMN ^1H (DMSO- d_6) et ^{13}C (D_2O) du composé A-3.

7-O-β-D-(6''-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside apigénine			
Isolé de l'espèce <i>E. spinosus</i>		Isolé de l'espèce <i>Clematis terniflora</i> [6]	
RMN ^1H δ_{H}, mult, (J (Hz))		^{13}C (δ_{C})	
apigénine	δ (ppm)		
2	-	164,7	162,7
3	6,82 <i>s</i>	103,5	103,0
4	-	182,4	181,9
5	-	161,9	156,8
6	6,47 <i>d</i> (2,0)	99,9	99,5
7	-	163,1	164,3
8	6,81 <i>d</i> (2,0)	95,1	94,7
9	-	157,4	161,3
10	-	105,8	105,3
1'	-	121,3	121,0
2'-6'	7,94 <i>d</i> (8,8)	129,0	128,5
3'-5'	6,93 <i>d</i> (8,8)	116,1	116,0
4'	-	161,6	161,1
5-OH	12,99		
glucose	δ (ppm)		
1''	5,16 <i>d</i> (7,5)	99,9	99,5
2''	-	-	73,0
3''	-	-	76,3
4''	-	-	70,0
5''	-	-	73,8
6''b	4,16 <i>dd</i> (10,4 ; 6,9)	63,9	63,4
6''a	4,46 <i>dl</i> (10,4)		

<i>E-p-coumaroyl</i>	δ (ppm)		
α	6,33 <i>d</i> (15,9)	114,1	113,7
β	7,49 <i>d</i> (15,9)	145,4	144,9
1'''	-	125,3	124,9
2'''-6'''	7,36 <i>d</i> (8,6)	130,6	131,7
3'''-5'''	6,67 <i>d</i> (8,6)	116,2	115,7
4'''	-	160,3	159,7
CO	-	166,9	166,4

A.II Les différents produits isolés de la phase *n*-butanol :

II.1 Identification structurale du composé B-1 :

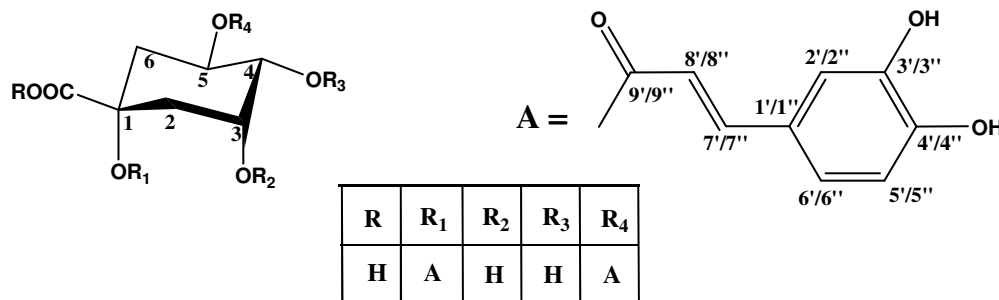
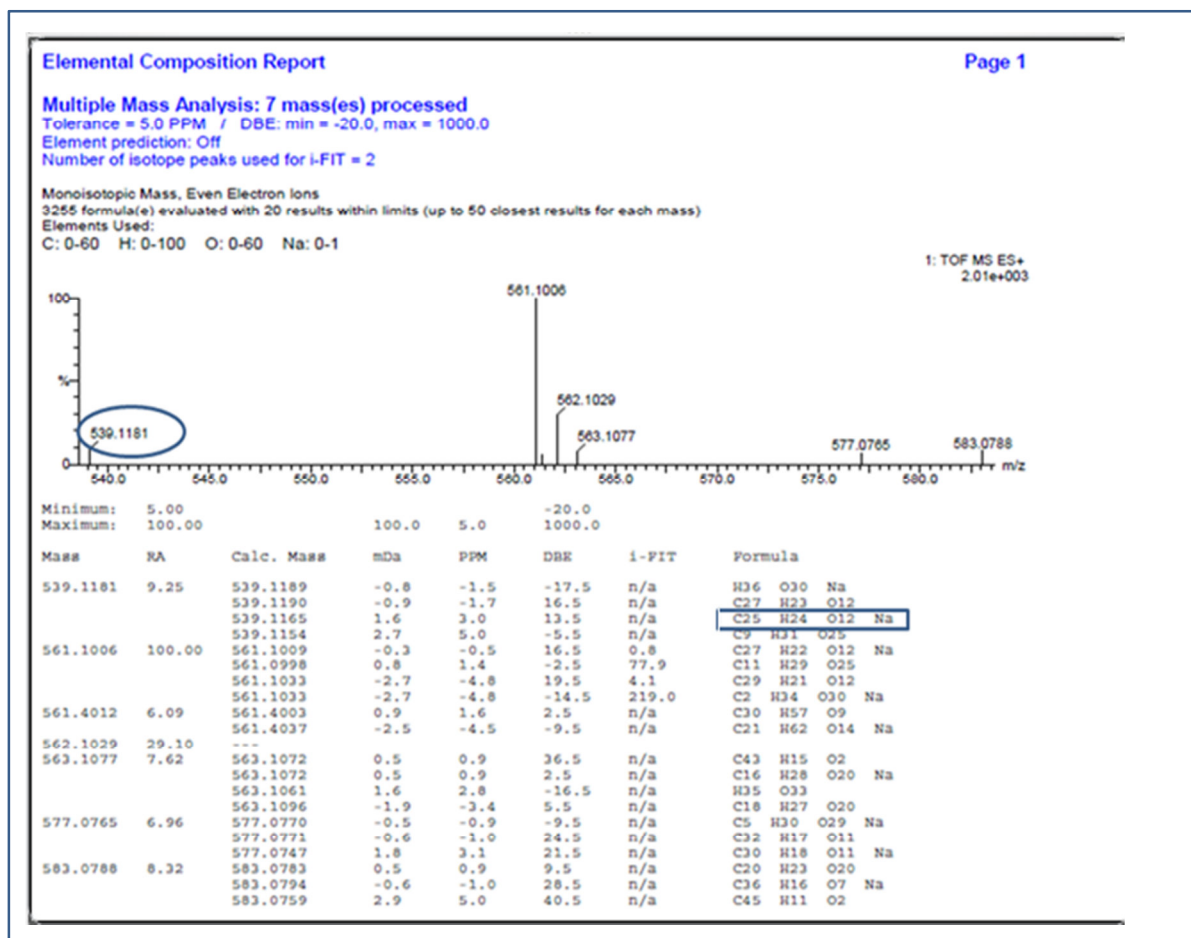


Figure-4 : Composé B-1.

Le spectre de masse du composé B-1 enregistré en mode électronébulisation (+) sur un spectromètre à haute résolution et muni d'un analyseur à temps de vol (TOF-HR-ESI-MS (+)) (spectre-6), montre un pic quasi moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 539,1181$ Da.

La recherche à haute résolution de la composition élémentaire donne une formule brute : $C_{25}H_{24}O_{12}Na$, calculée pour 539,1165 Da et orientant vers une formule brute de : $C_{25}H_{24}O_{12}$, relative à une molécule avec quatorze insaturations.



Spectre-6 : Spectre TOF-HR-ESIMS(+) du composé B-1

Les 25 atomes carbones du composé B-1, sont confirmés par une analyse simultanée du spectre RMN ^{13}C avec sa séquence DEPT-135, (spectre-7). Parmi ces atomes de carbones, on a :

✓ Dix carbones quaternaires dont :

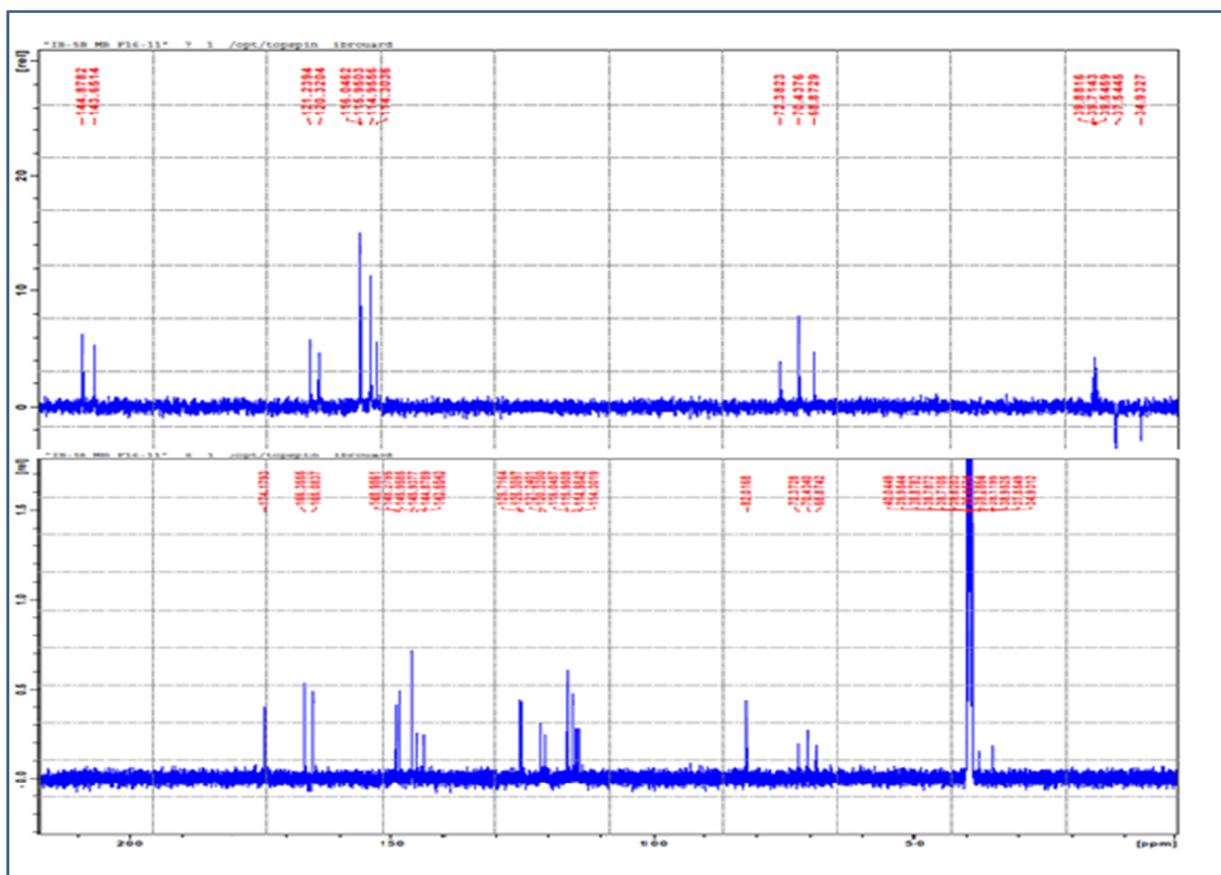
- Huit carbones oxygénés avec un hybridé sp^3 et sept hybridés sp^2 parmi lesquels trois groupements carbonyles, l'un à $\delta_{\text{C}} = 174,18$ ppm attribuable à un acide carboxylique et deux à $\delta_{\text{C}} = 166,35$ ppm et le second à $\delta_{\text{C}} = 165,08$ ppm attribuables à des fonctions esters conjuguées avec des systèmes éthyléniques ;
- Deux carbones non oxygénés hybridés sp^2 ;

✓ Dix groupements CH éthyléniques ;

✓ Trois méthines oxygénés, hybridés sp^3 ;

✓ Deux groupements méthylènes (CH_2) non oxygénés ;

En tenant compte uniquement des oxygènes du groupement acide et ceux des deux esters, le décompte des atomes nous mènera à la formule brute partielle $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{O}_6$. Comparé à la formule brute réelle de $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$, on déduit la présence de 6 groupements hydroxyles que nous aurons à placer en plus de la fonction acide et des deux fonctions esters.



Spectre-7 : Spectres ^{13}C avec sa séquence DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d_6) du composé B-1

L'analyse simultanée des spectres suivants : RMN ^1H (spectre-8), COSY (spectre-9) et HSQC (spectre-10), montre :

- ✓ Un groupement CH_2 dont les deux protons magnétiquement non équivalents résonnent, l'un sous forme d'un triplet à $\delta_{\text{H}} = 1,84$ ppm ($J = 10,5$ Hz) et le second sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 2,37$ ppm ($J = 10,3$ Hz).
- ✓ Les protons de ce même groupement CH_2 ($\delta_{\text{C}} = 37,55$ ppm), montre sur le spectre COSY une tache de corrélation avec le proton d'un premier groupement CH ($\delta_{\text{C}} = 70,44$ ppm) qui résonne sous forme d'un doublet dédoublé ($J = 14,3 ; 9,5$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5,28$ ppm.

Le proton de ce groupement CH , corréle à son tour avec le proton d'un second groupement CH ($\delta_{\text{C}} = 72,38$ ppm) qui résonne sous forme d'un doublet dédoublé à $\delta_{\text{H}} = 3,55$ ppm ($J = 9,0; 2,6$ Hz). Le proton de ce second CH montre une tache de corrélation avec celui d'un troisième groupement CH hybridé sp^3 ($\delta_{\text{C}} = 68,87$ ppm) qui résonne sous forme d'un doublet à $\delta_{\text{H}} = 4,04$ ppm ($J = 2,7$ Hz).

- ✓ Ce troisième groupement CH montre des tâches de corrélation avec les protons d'un second groupement CH_2 à $\delta_{\text{C}} = 34,93$ ppm, ces deux protons sont magnétiquement non équivalents l'un résonne sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 2,21$ ppm ($J = 12,3$ Hz) et le second sous forme d'un multiplet à 2,50 ppm.

L'ensemble de ces observations additionnées aux valeurs des déplacements chimiques de ces trois groupements CH permettent de proposer l'enchainement reporté dans la figure-5 suivante :

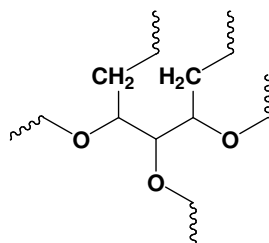


Figure-5 : Première entité faisant partie de la structure du composé B-1

Par ailleurs, vu la valeur des déplacements chimiques des deux groupements CH_2 et l'absence de corrélation sur le spectre COSY entre les protons de ces deux groupements avec d'autres protons, nous pouvons alors prévoir un carbone quaternaire oxygéné hybridé sp^3 comme intermédiaire entre ces deux groupements, ce qui mène à un cycle à six carbones, dérivé du cyclohexane oxygéné en C-1, C-3, C-4 et C-5 (figure-6).

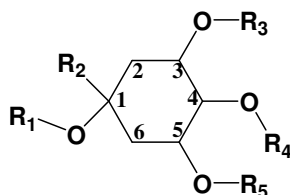
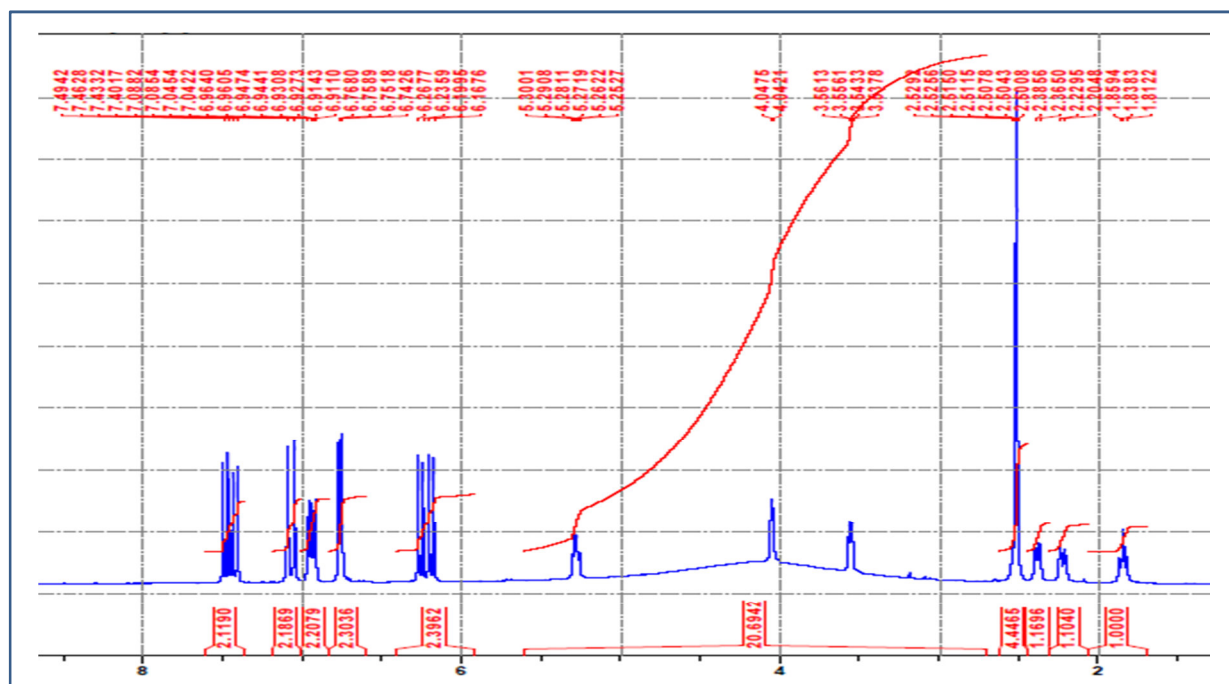
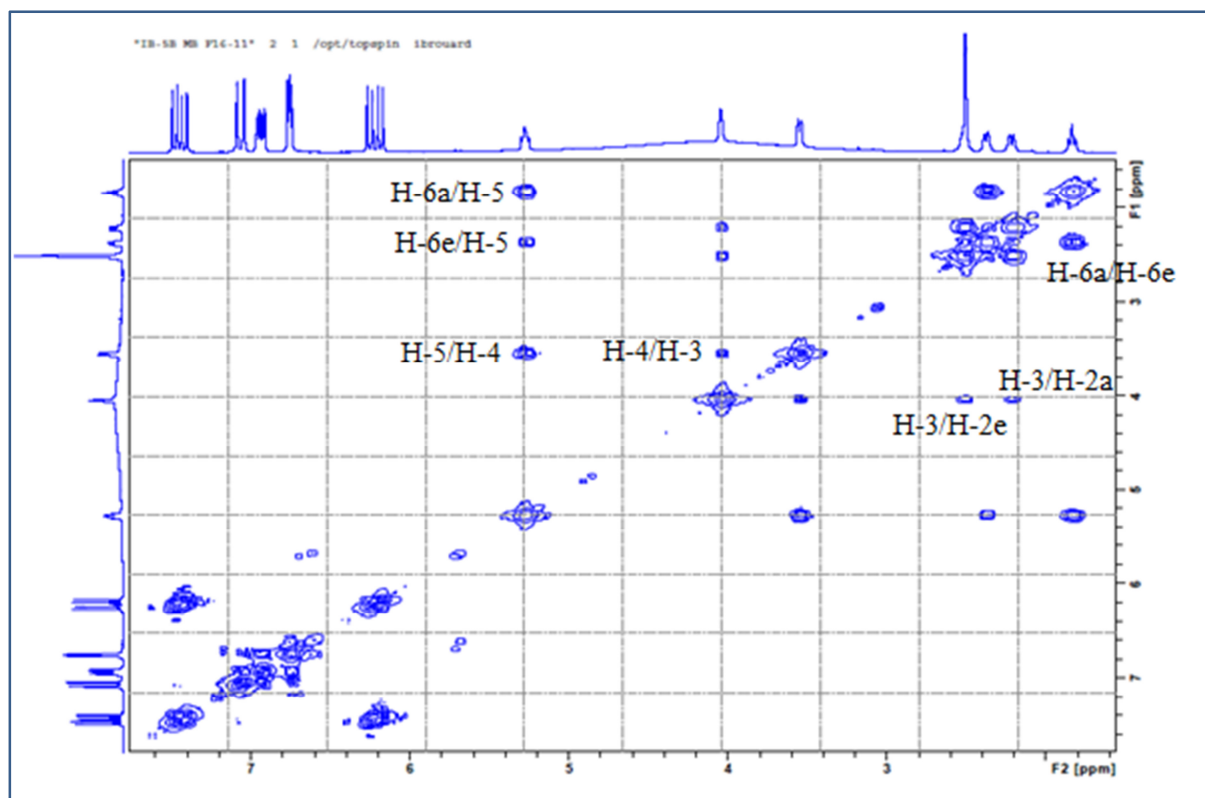


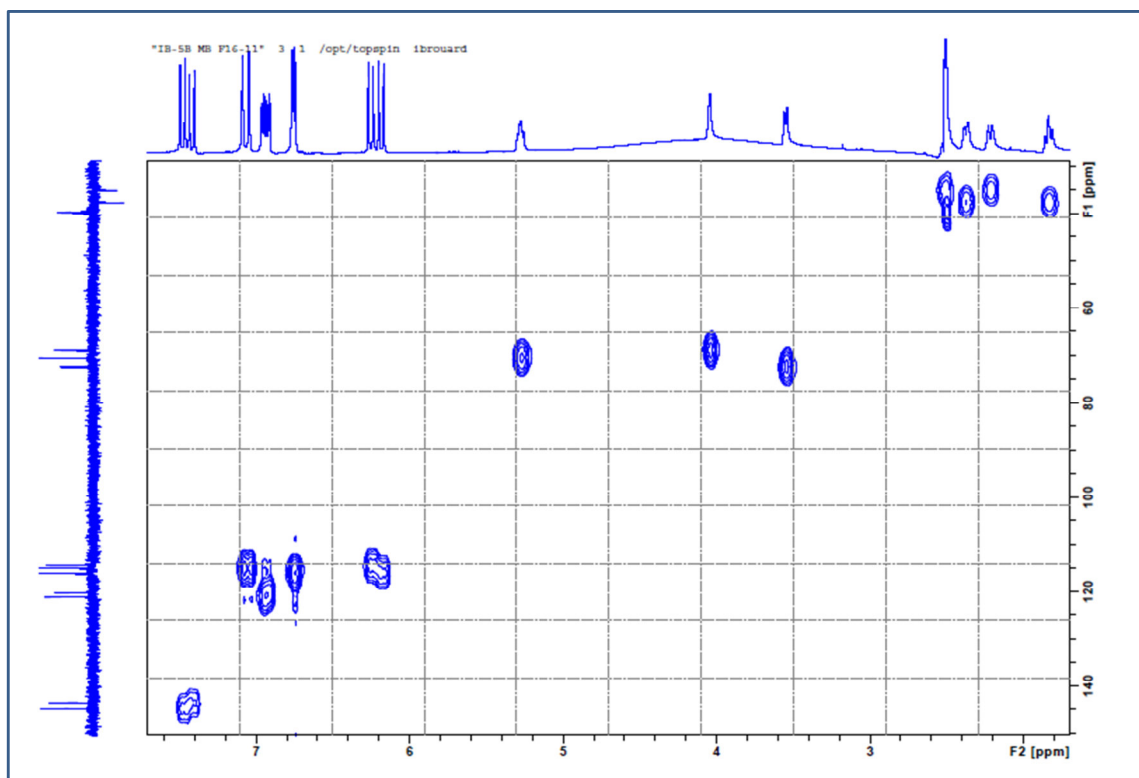
Figure-6 : Deuxième entité faisant partie de la structure du composé B-1



Spectre-8 : Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé B-1



Spectre-9 : Spectre COSY (500 MHz, DMSO- d_6) du composé B-1.



Spectre-10 : Spectre HSQC (500MHz, DMSO- d_6) du composé B-1.

L'examen simultané du spectre COSY (spectre-9) et ceux étalés : RMN ^1H , HSQC (spectres-11), montrent la présence de deux groupements éthyléniques $\text{CH}=\text{CH}$ de configuration *trans*.

Les deux protons du premier groupement à $\delta_{\text{H}} = 6,18$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 7,41$ ppm ($J = 15,9$ Hz) liés respectivement aux carbones à $\delta_{\text{C}} = 116,04$ et $\delta_{\text{C}} = 144,88$ ppm, montrent une tache de corrélation sur le spectre HMBC (spectre-12) avec le carbone du carbonyle de l'ester qui résonne à $\delta_{\text{C}} = 165,08$ ppm.

Il en est de même pour les deux protons du second groupement éthyléniques $\text{CH}=\text{CH}$ à $\delta_{\text{H}} = 6,25$ ppm et $\delta_{\text{H}} = 7,49$ ppm ($J = 15,9$ Hz) liés respectivement aux carbones à $\delta_{\text{C}} = 114,30$ ppm et $\delta_{\text{C}} = 143,65$ ppm ; ces deux protons corrélient avec le carbonyle du groupement ester qui résonne à $\delta_{\text{C}} = 166,35$ ppm.

Ces observations indiquent la présence de deux groupements esters conjugués chacun avec une double liaison de configuration *trans* (figure-7).

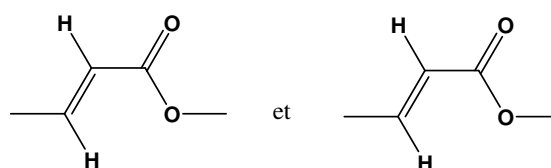
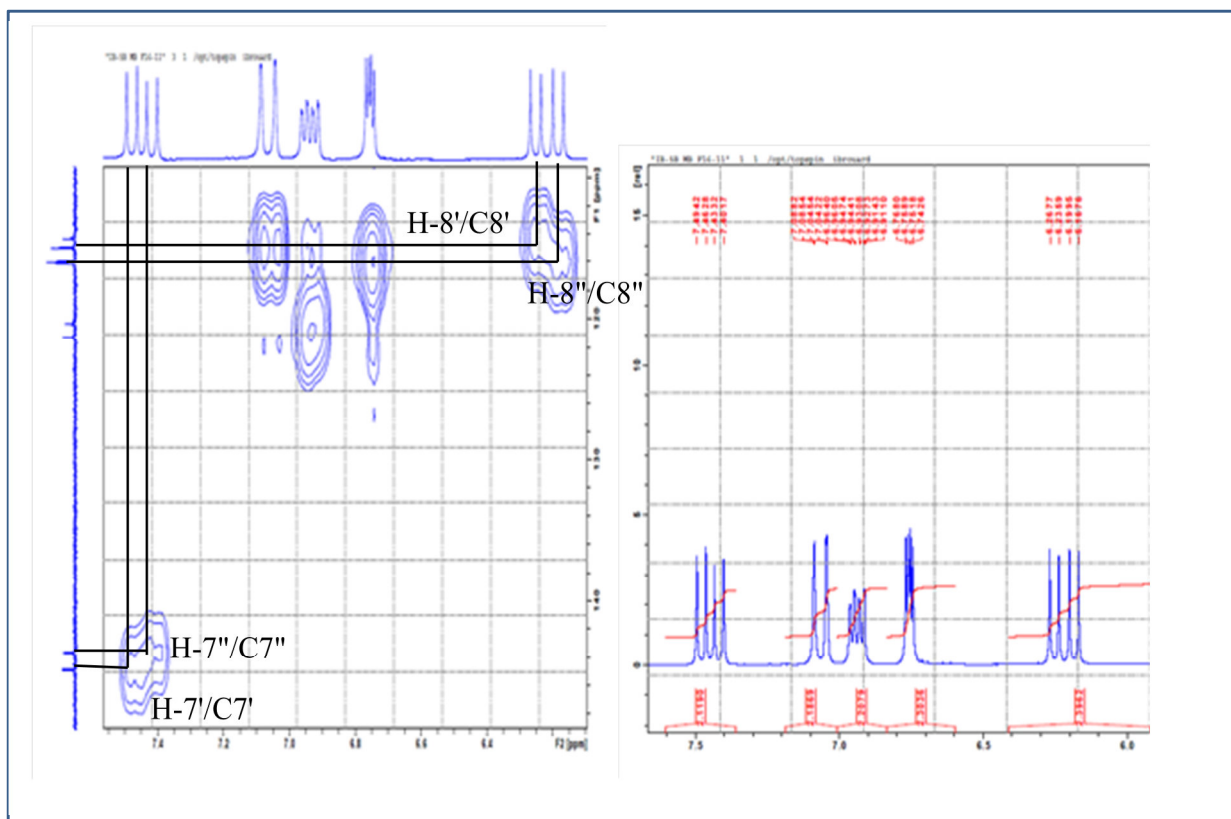
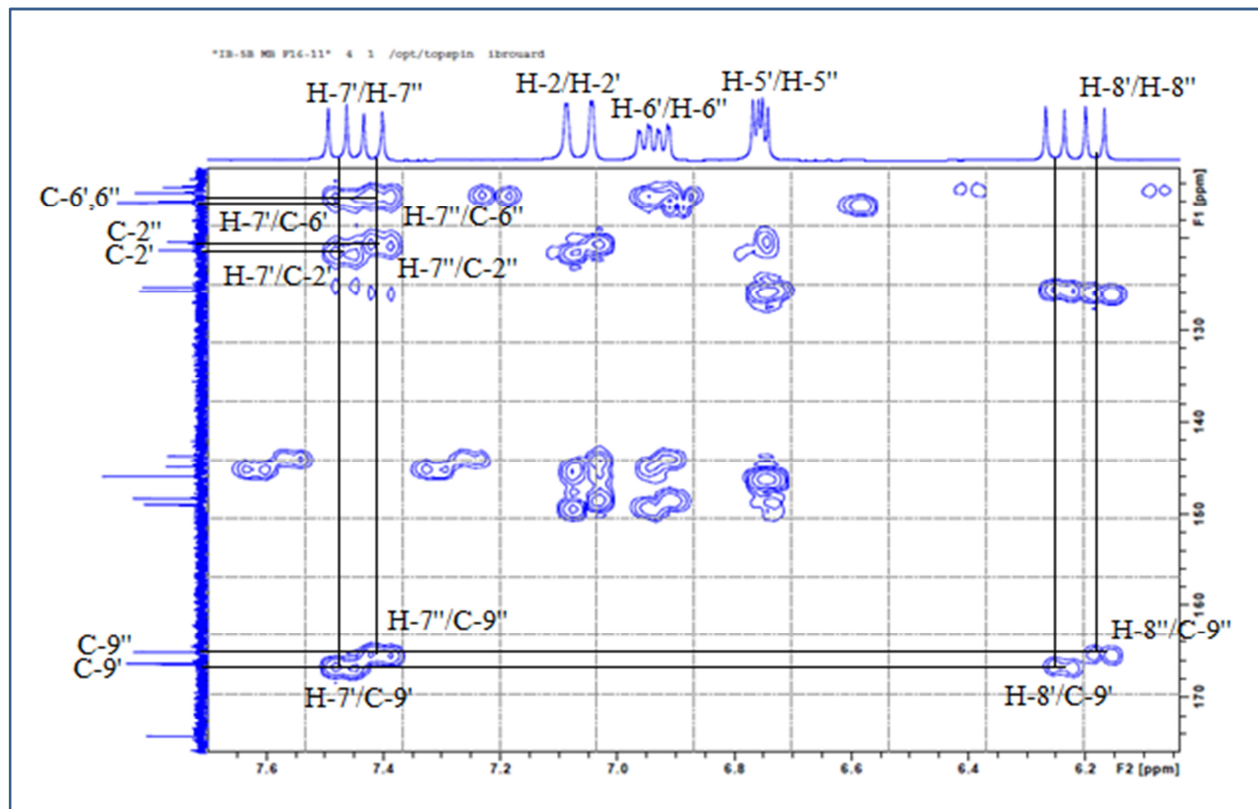


Figure-7: Troisième entité faisant partie de la structure du composé B-1



Spectres-11 : Spectres HSQC et RMN¹H (500 MHz, DMSO-d₆) du composé B-1.

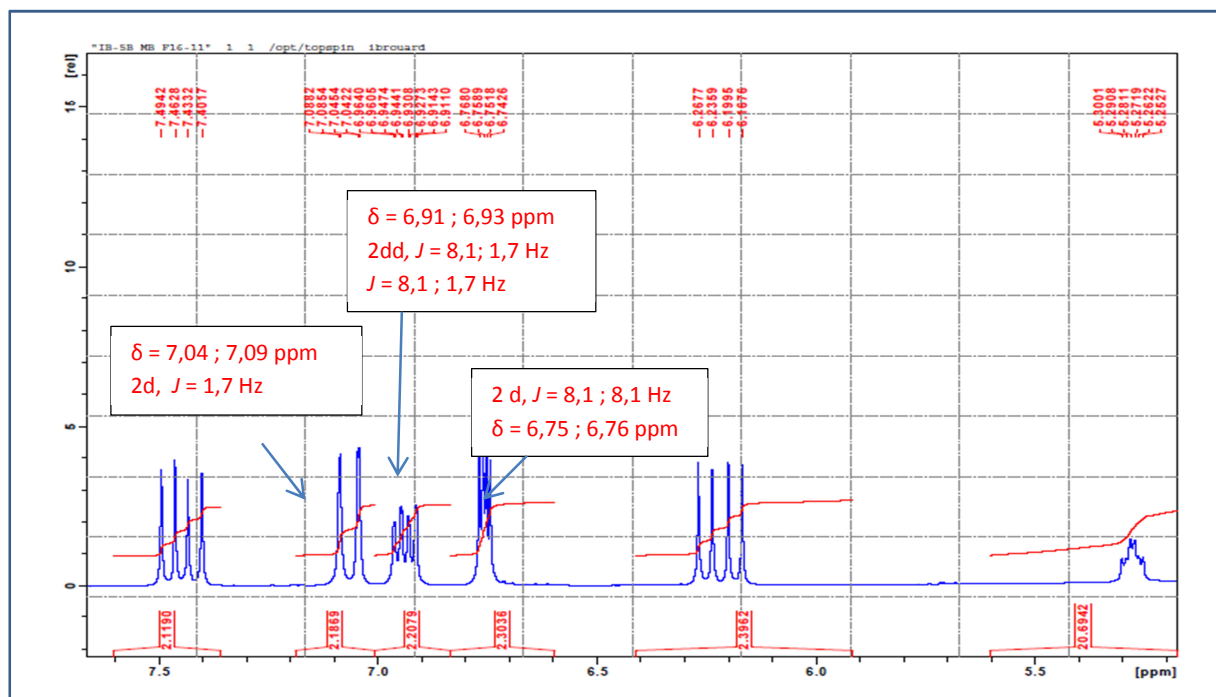


Spectre-12 : Spectre HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) du composé B-1

Un examen du spectre RMN du proton étalé (spectre-13) montre la présence de deux séries de trois protons aromatiques qui résonnent sous forme de :

- ✓ Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 7,09$ ppm ($J = 1,7$ Hz) et $\delta_H = 7,04$ ppm ($J = 1,7$ Hz).
- ✓ Deux doublets dédoublés à $\delta_H = 6,93$ ppm ($J = 8,1$; $J = 1,7$ Hz) et $\delta_H = 6,91$ ppm ($J = 8,1$; $1,7$ Hz).
- ✓ Deux doublets à $\delta_H = 6,76$ ppm ($J = 8,1$ Hz) et $\delta_H = 6,75$ ppm ($J = 8,1$ Hz).

Ces déplacements chimiques et les valeurs des constantes de couplage orientent vers la présence de deux noyaux aromatiques tous deux tri substitués dans les positions : 1, 3 et 4 car nous avons pour chaque cycle aromatique un premier proton qui montre uniquement un couplage méta, un second qui montre uniquement un couplage ortho et un troisième qui montre deux couplages un ortho et un méta.



Spectre-13 : Spectre RMN ^1H étalé (500MHz, DMSO- d_6) du composé B-1.

Par ailleurs sur le spectre HMBC (spectre-12), les protons des doubles liaisons éthyléniques à $\delta_H = 7,41$ ppm et $\delta_H = 7,49$ ppm corrélient avec les carbones aromatiques porteurs des H à $\delta_H = 7,04$ ppm et $\delta_H = 7,09$ ppm et également avec les carbones aromatiques porteurs des protons à $\delta_H = 6,91$ ppm et à $\delta_H = 6,93$ ppm. Ces observations indiquent que la double liaison éthylénique est reliée, dans les deux cas, au noyau aromatique. On peut également en déduire si l'on affecte la numérotation 1' et 1'' aux carbones des noyaux aromatiques liés aux doubles liaisons que les carbones porteurs des protons précédents seront numérotés 2' et 6' pour le premier noyau aromatique et 2'' et 6'' pour le deuxième noyau aromatique.

La multiplicité des signaux des protons H-2' et H-2'' oriente vers la substitution des positions C-3' et C-4' du premier noyau aromatique et également la substitution des positions C-3'' et C-4'' du deuxième noyau aromatique.

Vu la multiplicité (*dd*) des signaux des protons H-6' et H-6'', les positions C-5' et C-5'' sont occupées par des protons dans les deux cycles. Ceci est d'ailleurs clair, aussi bien sur le spectre COSY que sur les spectres RMN proton et HMBC. En effet, H-5' et H-5'' correspondent aux signaux indiqués plus haut qui sont des doublets à $\delta_H = 6,75$ ppm et 6,76 ppm.

À ce stade de notre analyse nous pouvons proposer la présence dans cette molécule de deux fois l'entité reportée dans la figure-8, qui correspond à une entité cinnamoyle substituée dans les positions 3 et 4.

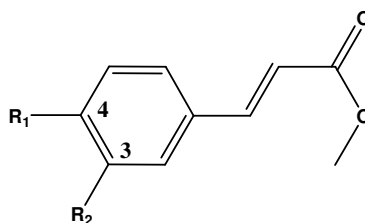


Figure-8 : Quatrième entité faisant partie de la structure du composé B-1.

Le spectre RMN ^{13}C de ce composé (spectre-7) montre clairement la présence de quatre carbones aromatiques oxygénés. Ceci oriente vers les positions C-3' et C-3'', C-4' et C-4'' oxygénées et un retour vers la formule $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ impose des groupements hydroxyles dans ces positions.

Ces données mènent à la présence dans cette molécule de deux fois l'entité reportée dans la figure-8, représentées par deux groupements caféoyles collés à l'entité reportée dans la figure-6 mise en évidence d'après les données précédentes.

Par ailleurs, les déplacements chimiques de l'ensemble des atomes de carbone et la formule brute de notre composé indiquent que le groupement carboxylique présent dans cette molécule ne peut être placé qu'en position C-1 du squelette cyclohexanique. Ainsi cette observation indique que nous sommes en présence d'un acide quinique di-O-caféoyle.

L'acide quinique libre est connu pour avoir les orientations suivantes de ces groupements :

- ✓ Les orientations, équatoriale du groupement carboxylique et axiale de l'hydroxyle en C-1.
- ✓ Une orientation axiale de l'hydroxyle en C-3.
- ✓ Une orientation équatoriale de l'hydroxyle en C-4.
- ✓ Une orientation équatoriale de l'hydroxyle en C-5.

Dans le cas de notre molécule, l'acide quinique n'étant pas libre, ses deux hydroxyles sont remplacés par des groupements caféoyles.

L'examen du spectre COSY (spectre-9) et des données de la littérature [7-8] permet de localiser le proton H-5 à $\delta_H = 5,28$ ppm grâce à son couplage avec le proton H-6 axial à $\delta_H = 1,84$ ppm (t , $J = 10,5$ Hz). La valeur du déplacement chimique du proton H-5 suffit pour placer un groupement caféoyle en C-5. L'attribution du proton H-5 permet de localiser celui de H-4 à $\delta_H = 3,55$ ppm et ce dernier permet également de localiser le proton H-3 à $\delta_H = 4,04$ ppm.

Les valeurs des déplacements chimiques des deux protons (H-3 et H-4) restent très similaires à celles de l'acide quinique libre (H-3 et H-4) [7,8]. Ceci indique que les deux positions (C-3 et C-4) ne sont pas estérifiées ; de ce fait, on peut donc placer le deuxième groupement caféoyle en position C-1. Cette attribution est appuyée par la valeur du déplacement chimique du carbone C-1 qui résonne à $\delta_C = 82,02$ ppm. Le déplacement chimique de ce carbone serait inférieur à cette valeur s'il était seulement hydroxylé.

L'ensemble de ces données résumées dans les tableaux-7 et 8, mène à la structure du composé B-1 indiqué ci-dessous et connu sous le nom de **cynarine** :

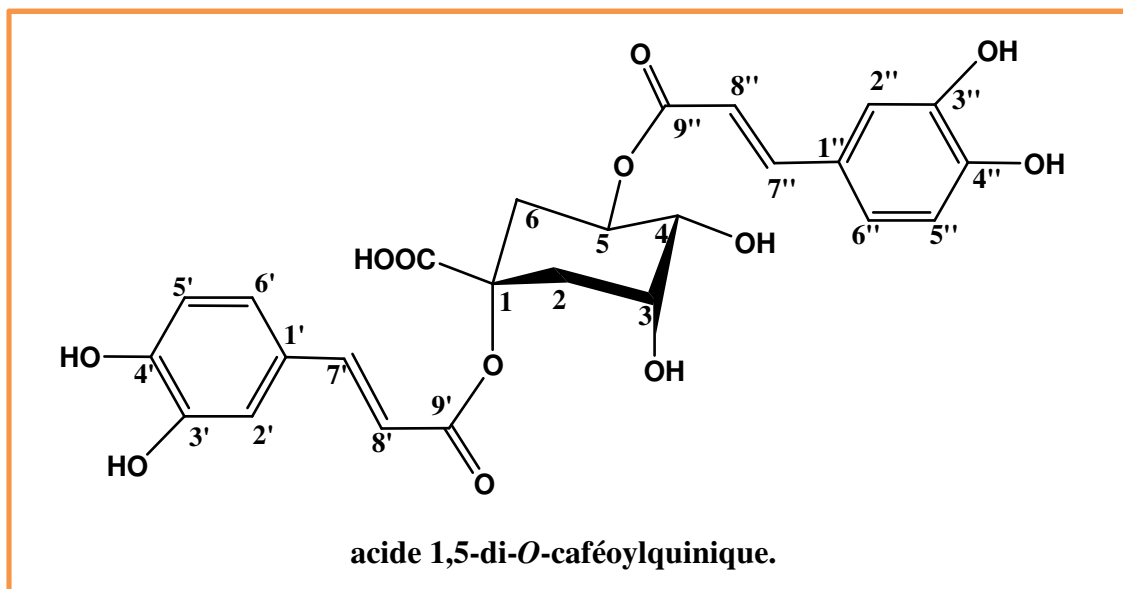


Tableau-7 : Données de la RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) du composé B-1.

Position	acide 1,5-di-O-caféoylquinique	acide quinique [7]
	δ_H (ppm), multi., J (Hz)	
2eq	2,50 <i>m</i>	(2,09)
2ax	2,21 <i>dl</i> (12,3)	(2,02) <i>m</i>
3	4,04 <i>d</i> (2,7)	4,08 <i>ddd</i>
4	3,55 <i>dd</i> (9,0 ; 2,6)	3,39 <i>dd</i>
5	5,28 <i>ddd</i> (14,3 ; 9,5 ; 4,6)	3,99 <i>ddd</i>
6eq	2,37 <i>dl</i> (10,3)	(2,12)
6ax	1,84 <i>t</i> (10,5)	(1,85) <i>dd</i>
2' (2'')	7,09 (7,04) <i>d</i> (1,7)	
5' (5'')	6,76 (6,75) <i>d</i> (8,1)	
6' (6'')	6,93 (6,91) <i>dd</i> (8,1 ; 1,7)	
7' (7'')	7,49 (7,41) <i>d</i> (15,9)	
8' (8'')	6,25 (6,18) <i>d</i> (15,9)	

Tableau-8 : Données de la RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) du composé B-1.

Position	acide 1,5-di-O-caféoylquinique	acide quinique [7]
	δ_C (ppm)	
1	82,02	77,1
2	34,93	38,4
3	68,87	68,0
4	72,38	76,9
5	70,44	72,0
6	37,55	42,4
7	174,18	177,6
1' (1'')	125,71 (125,30)	
2' (2'')	114,95 (114,95)	
3' (3'')	145,95 (145,93)	
4' (4'')	148,98 (148,27)	
5' (5'')	116,04 (115,95)	
6' (6'')	121,23 (120,32)	
7' (7'')	143,65 (144,88)	
8' (8'')	114,30 (116,04)	
9' (9'')	166,35 (165,08)	

II.2 Identification structurale du composé B-2 :

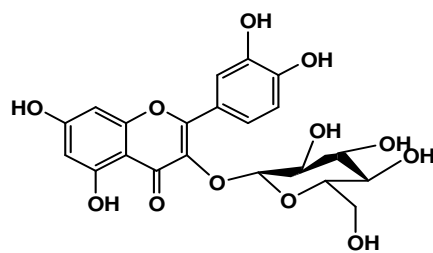


Figure-9 : Composé B-2.

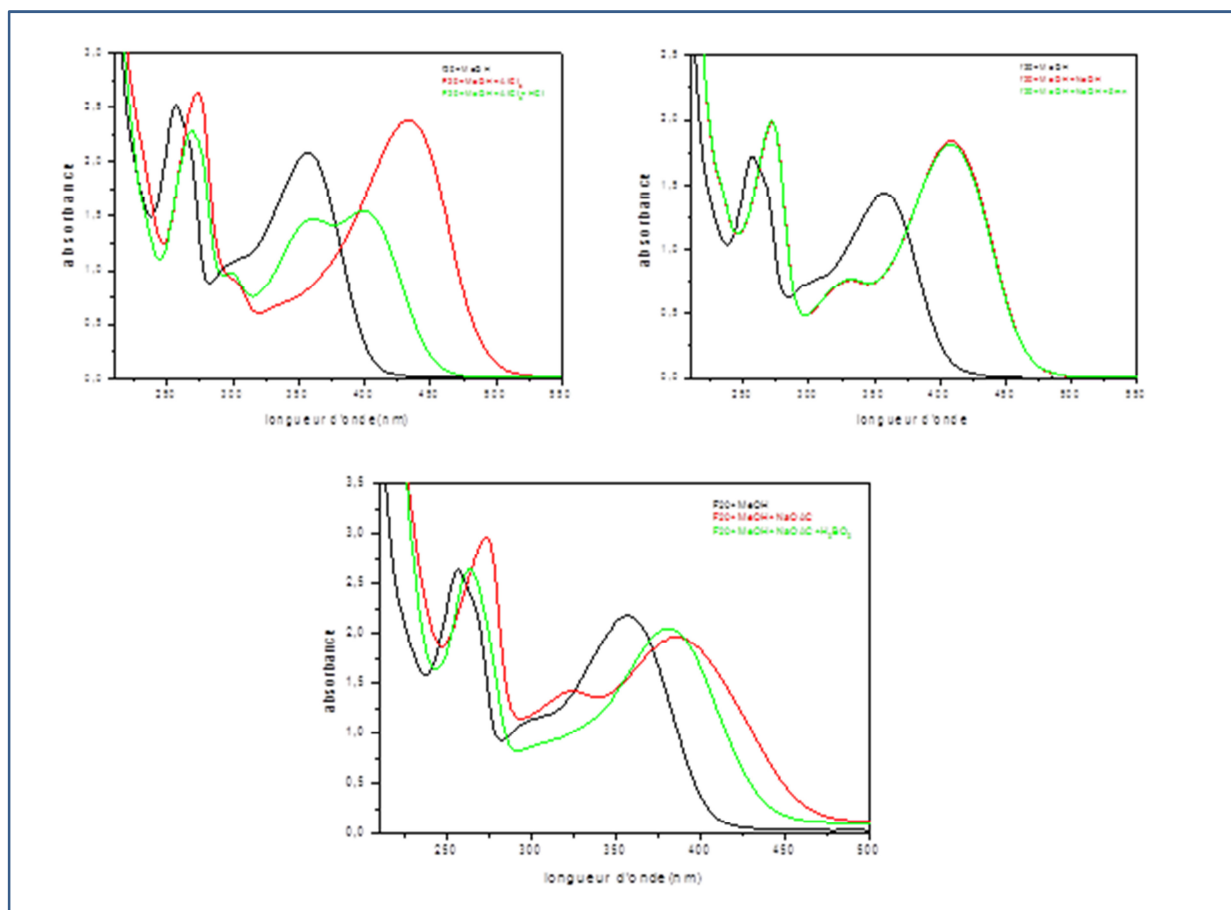
Un examen des données de la série spectrale UV du composé B-2 (spectres-14, tableau-9) montrent :

- ✓ Un maximum d'absorption de la bande I à 358 nm et de la bande II à 256 nm caractéristiques d'un flavonol substitué en position 3.
- ✓ Un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 51$ nm) et une augmentation de son intensité lumineuse après addition de NaOH, sont en faveur d'un groupement OH libre en position 4'. Par contre l'apparition d'une nouvelle bande à 331 nm suppose la présence d'un groupement OH libre en position 7.
- ✓ L'addition du réactif NaOAc provoque un effet bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 28$ nm), comparé au spectre méthanolique, confirmant ainsi la présence d'un groupement OH libre en position 7.
- ✓ Un déplacement bathochrome de la bande I enregistré dans le milieu ($\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$) comparé à celui enregistré dans le méthanol ($\Delta\lambda = + 41$ nm) indique la présence d'un groupement OH libre en 5.
- ✓ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 23$ nm) dans $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ comparé au spectre méthanolique, oriente vers un système ortho di-hydroxylé sur le cycle B.

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

Tableau-9 : Données de la série spectrale UV du composé B-2.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	358	/	256	flavonole
+ NaOH	409		272	OH libre en 4'
		331		OH libre en 7
Spectre stable dans NaOH après 5 mn				
+AlCl ₃	433	302	273	OH libre en 5
+AlCl ₃ / HCl	399	300	269	
+NaOAc	386	325	274	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	381	/	264	ortho di-OH sur le cycle B



Spectres-14 : Série spectrale UV du composé B-2.

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :

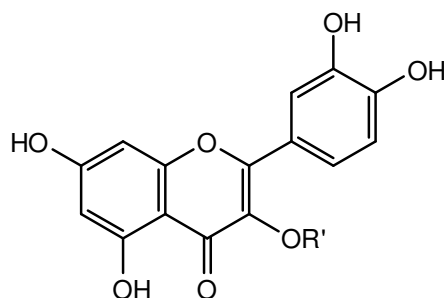
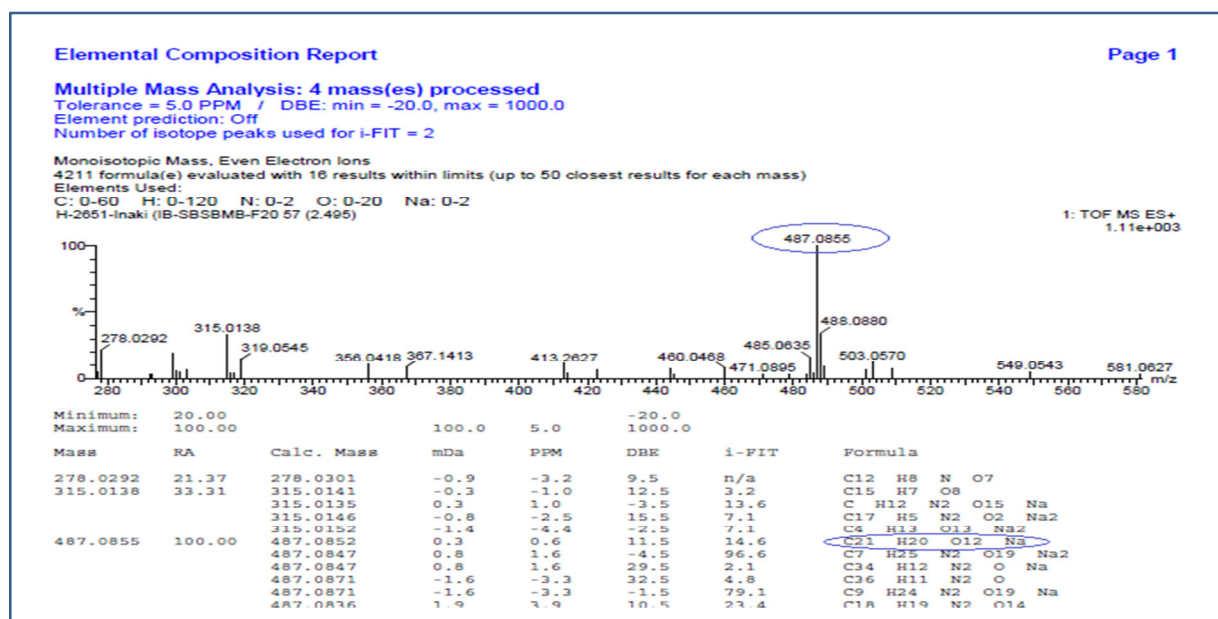


Figure-10 : Squelette flavonol du composé B-2.

L'examen du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électrobulbion positive (TOF-HRESI-MS (+)) (spectre-15), montre la présence d'un ion quasi-moléculaire $[M+Na]$ à $m/z = 487,0855$ Da.

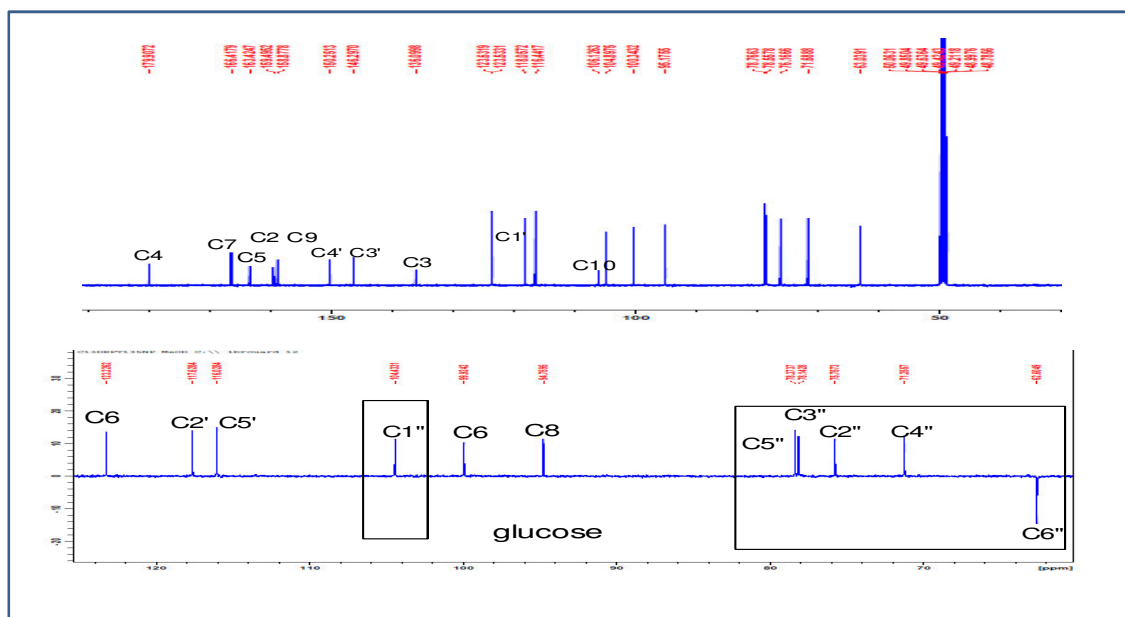
La recherche à haute résolution de la composition élémentaire donne la formule brute : $C_{21}H_{20}O_{12}Na$ (calculée pour 487,0852 Da) orientant vers une formule brute de la molécule de $C_{21}H_{20}O_{12}$, avec douze insaturations.



Spectre-15 : Spectre TOF-HRESI-MS (+) du composé B-2.

Le spectre de RMN ^{13}C du composé B-2, (spectre-16), confirme la présence de vingt et un atome de carbone et révèle les signaux caractéristiques d'une génine type quercétine. L'ensemble des carbones de cette génine sont répartis comme suit [9, 10] :

- ✓ Un signal à $\delta_{\text{C}} = 179,90$ ppm caractéristique d'un groupement carbonyle ;
- ✓ Neuf carbones quaternaires, dont huit qui résonnent dans la zone allant de : $\delta_{\text{C}} = 120$ ppm à 170 ppm et un à $\delta_{\text{C}} = 106,12$ ppm ;
- ✓ Cinq CH aromatiques ;
- ✓ Des signaux caractéristiques d'un glucopyranoside ($\delta_{\text{C}} = 78,3, 78,1, 75,7, 71,2$ et 62,6 ppm) relatifs, respectivement, aux atomes de carbones : C-5'', C-3'', C-2'', C-4'' et C-6''.



Spectres-16 : Spectres ^{13}C et DEPT-135 (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$) du composé B-2.

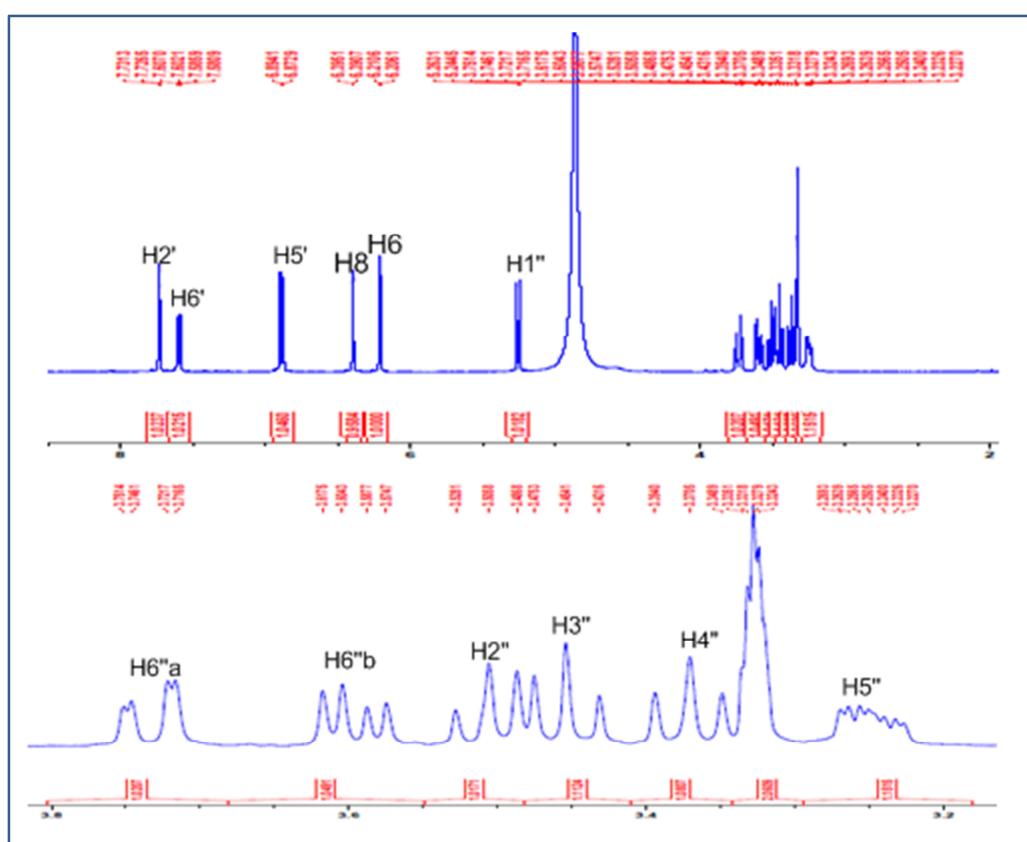
L'étude du spectre RMN- ^1H (spectre-17) dans la zone correspondante aux protons de la génine a permis d'attribuer les différents signaux aux protons suivants :

- ✓ Un doublet ($J = 2,0$ Hz) d'intégration 1H, à $\delta = 7,72$ ppm attribuable à H-2'.
- ✓ Un doublet dédoublé ($J = 8,5 ; 2,0$ Hz) d'intégration 1H à $\delta = 7,59$ ppm attribuable à H-6'
- ✓ Un doublet ($J = 8,5$ Hz) d'intégration 1H, à $\delta = 6,88$ ppm attribuable à H-5'.

Ces signaux confirment l'hydroxylation des positions 3' et 4' du cycle B.

- ✓ Un doublet ($J = 1,8$ Hz) d'intégration 1H, à $\delta = 6,21$ ppm attribuable à H-6.
- ✓ Un doublet ($J = 1,8$ Hz) d'intégration 1H, à $\delta = 6,39$ ppm attribuable à H-8.

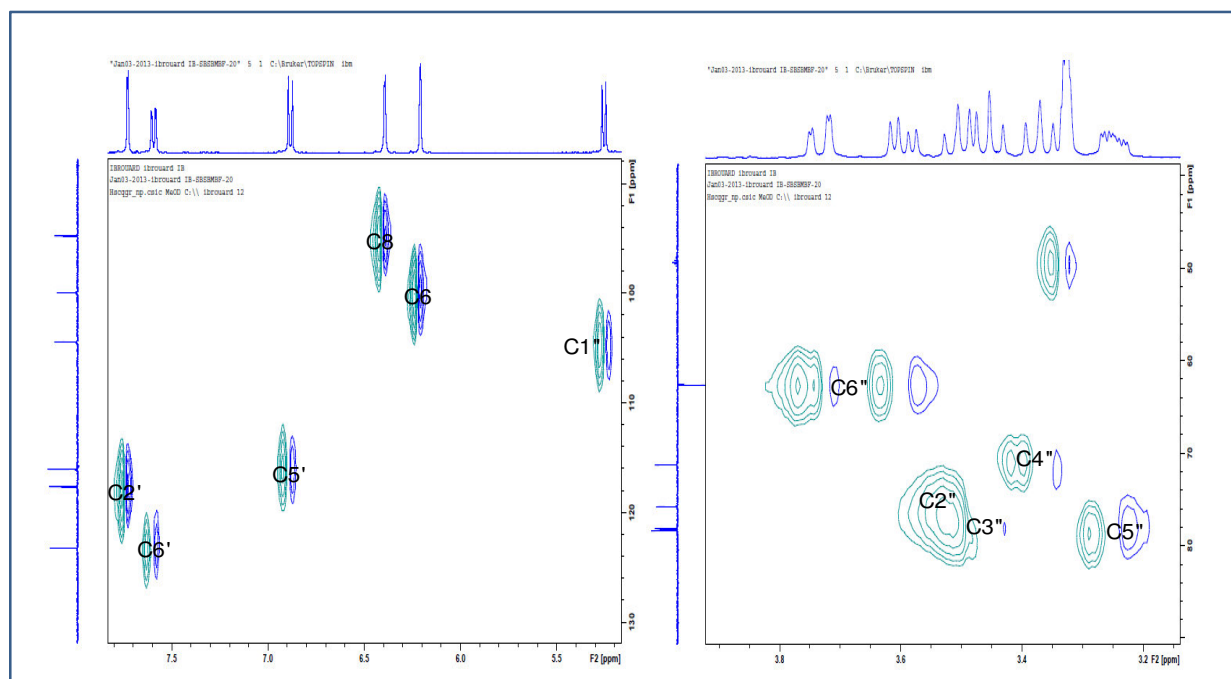
Par ailleurs le proton anomérique résonne sous forme d'un doublet à $\delta = 5,25$ ppm et la valeur de sa constante de couplage : $J = 7,5$ Hz suggère une configuration β osidique.



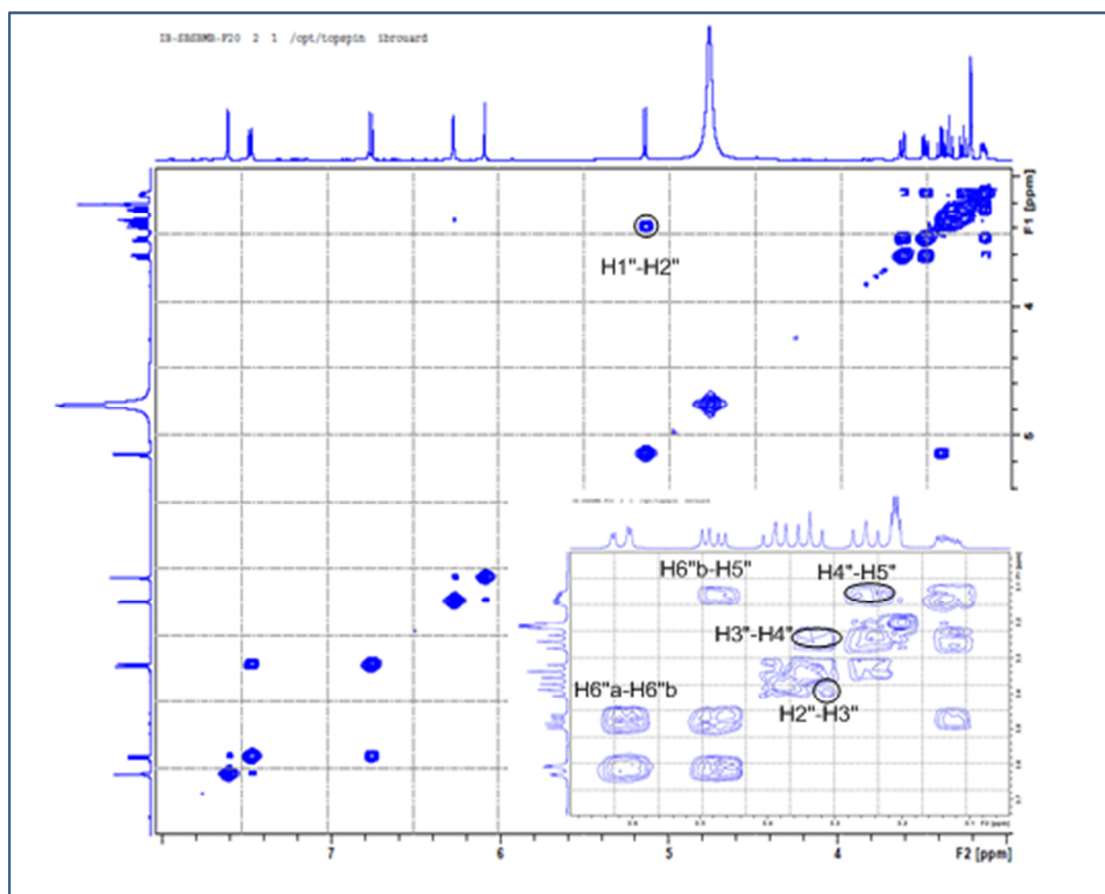
Spectres-17 : Spectre RMN ^1H (400MHz, MeOD- d_4) du composé B-2.

Les grandes valeurs des constantes de couplages des protons du sucre **H2''** : $3,50 t$ (9,0 Hz) ; **H3''** : $3,45 t$ (9,0 Hz) ; **H3''** : $3,37 d$ (9,0 Hz), indique une orientation axiale des protons d'un glucose.

L'étude du spectre HSQC (spectre-18) nous a permis également de déduire les déplacements chimiques des protons de ce sucre, qui montrent clairement des taches de corrélations entre eux dans le spectre COSY (spectre-19).

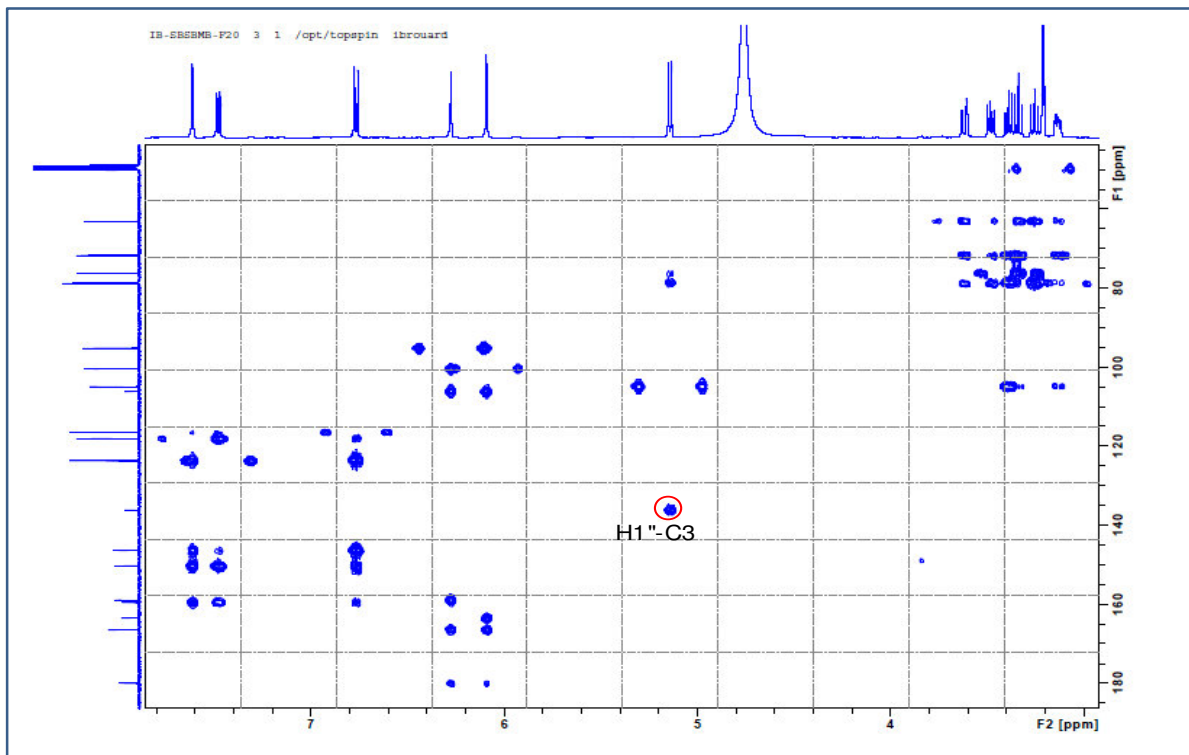


Spectres-18: Spectre de HSQC (400 MHz, MeOD-d₄) du composé B-2.



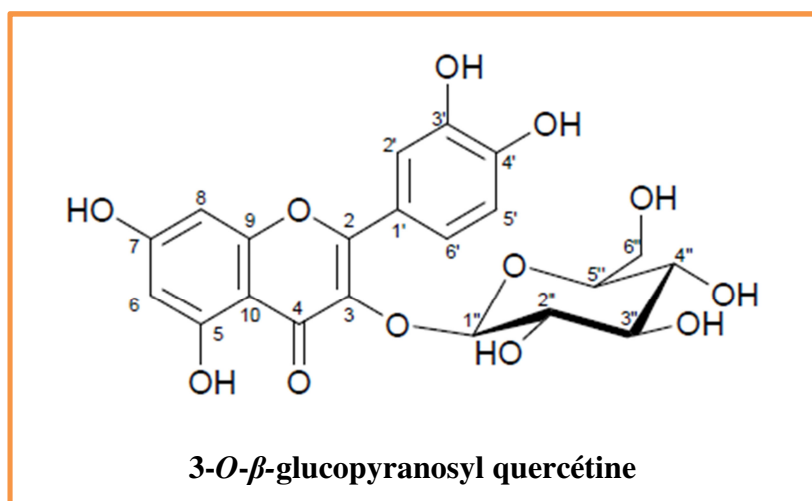
Spectre-19 : Spectre COSY (400 MHz, MeOD-d₄) du composé B-2.

Enfin, le spectre HMBC (spectre-20) montre une tache de corrélation entre le proton anomérique du glucopyranose H-1'' et le carbone C-3 de la génine.



Spectre-20: Spectre HMBC (400 MHz, MeOD-d₄) du composé B-2.

Ces données, en accord avec celles de la littérature [11], nous ont permis d'identifier le composé B-2 comme étant la : 3-O- β -glucopyranosyl quercétine connue sous le nom d'isoquercitrine.



Les données de la RMN ¹H et du ¹³C avec sa séquence DEPT-135, de cette molécule, sont résumées dans le tableau-10 suivant :

Tableau-10 : Données de la RMN ¹H et ¹³C du composé B-2.

position	3-O- β-glucopyranoside quercétine	
	δ _C (ppm); (DEPT)	δ _H (ppm), multi., J (Hz)
2	159,49 (C)	-
3	136,09 (C)	-
4	179,90 (C)	-
5	136,09 (C)	-
6	100,34 (CH)	6,21 <i>d</i> (1,8)
7	166,41 (C)	-
8	95,17 (CH)	6,39 <i>d</i> (1,8)
9	158,87 (C)	-
10	106,12 (C)	-
1'	123,53 (C)	-
2'	118,05 (CH)	7,72 <i>d</i> (2,0)
3'	146,26 (C)	-
4'	150,25 (C)	-
5'	116,44 (CH)	6,88 <i>d</i> (8,5)
6'	123,63 (CH)	7,59 <i>dd</i> (8,5; 2,0)
1''	104,89 (CH)	5,25 <i>d</i> (7,4)
2''	76,16 (CH)	3,50 <i>t</i> (9,0)
3''	78,55 (CH)	3,45 <i>t</i> (9,0)
4''	71,68 (CH)	3,37 <i>t</i> (9,0)
5''	78,76 (CH)	3,25 <i>m</i>
6''a	63,03 (CH ₂)	3,73 <i>dd</i> (11,8; 2,1)
6''b	-	3,59 <i>d</i> (11,8 ; 5,3)

II.3- Identification structurale du composé B-3 :

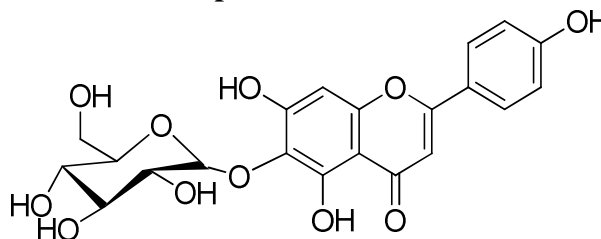
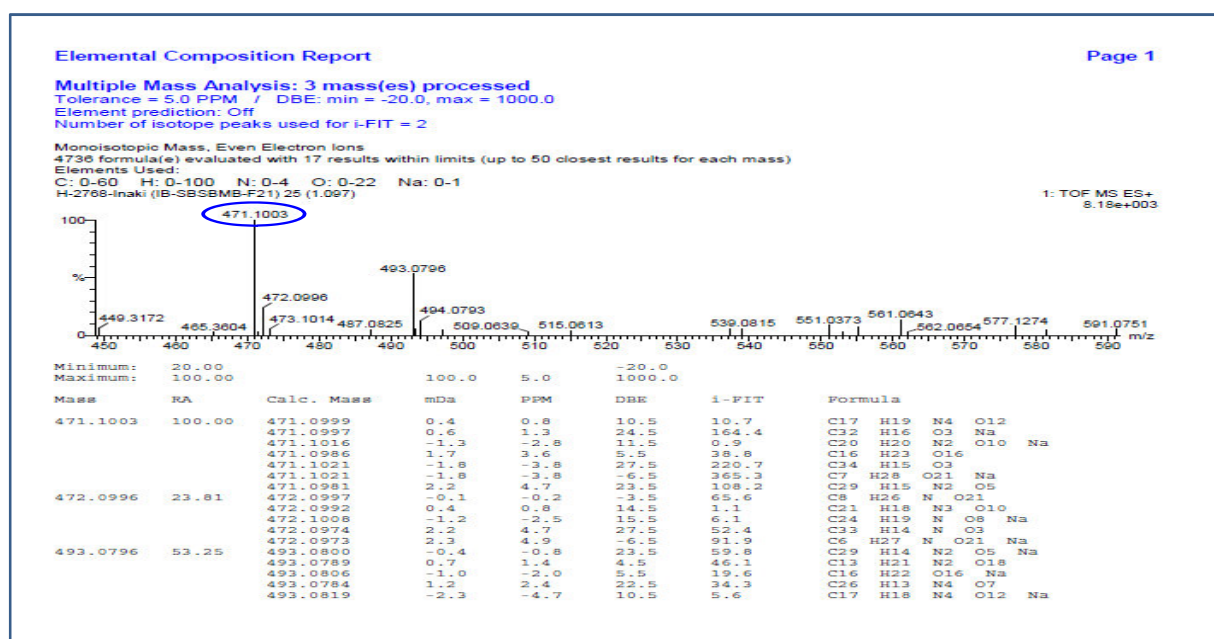


Figure-11 : Composé B-3.

La fluorescence noire violette sous lumière de Wood du composé B-3 est caractéristique d'une structure flavone ou d'un flavonol 3-OR.

Le spectre de masse à haute résolution ESI-TOF-MS en mode positif (spectre-21) donne la formule brute : $C_{21}H_{20}O_{11}Na$, sur la base de l'ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ observé à $m/z = 471,1003$ Da qui oriente vers une formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$ pour cette molécule soit une structure de masse 448 Da comportant 12 insaturations.

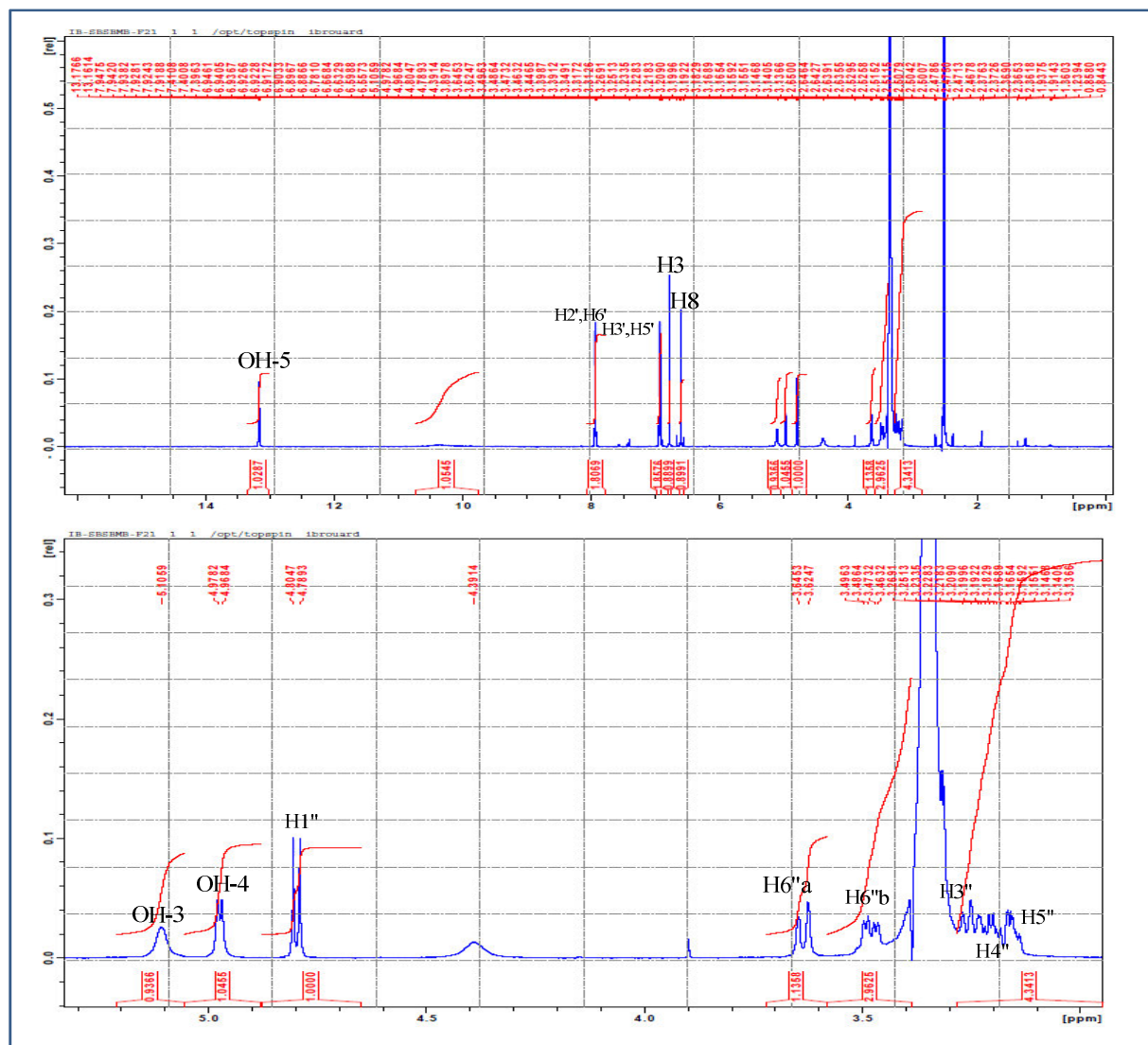


Spectre-21 : Spectre TOF-HRESI-MS (+) du composé B-3.

Le spectre de RMN-¹H du composé B-3, (spectre-22), montre :

- ✓ Deux doublets à $\delta_H = 7,93$ et $6,93$ ppm chacun avec une constante de couplage ($J = 8,8$ Hz), typiques d'un couplage *ortho* sur un cycle aromatique. Ces signaux attribués aux protons H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement, sont caractéristiques du cycle B d'un flavonoïde substitué en C-4' ;
- ✓ Un singulet à $\delta_H = 6,59$ ppm attribuable au proton aromatique H-8 du cycle A ;
- ✓ Un singulet à $\delta_H = 6,78$ ppm attribuable au proton aromatique H-3 du cycle C ;

- ✓ Un doublet d'intégration 1 H à $\delta_H = 4,79$ ppm relatif à un proton anomérique et sa constante de couplage $J = 7,7$ Hz est caractéristique d'une orientation β du sucre.
- ✓ Des signaux résonants entre 3,0–3,7 ppm relatifs aux autres protons osidiques.

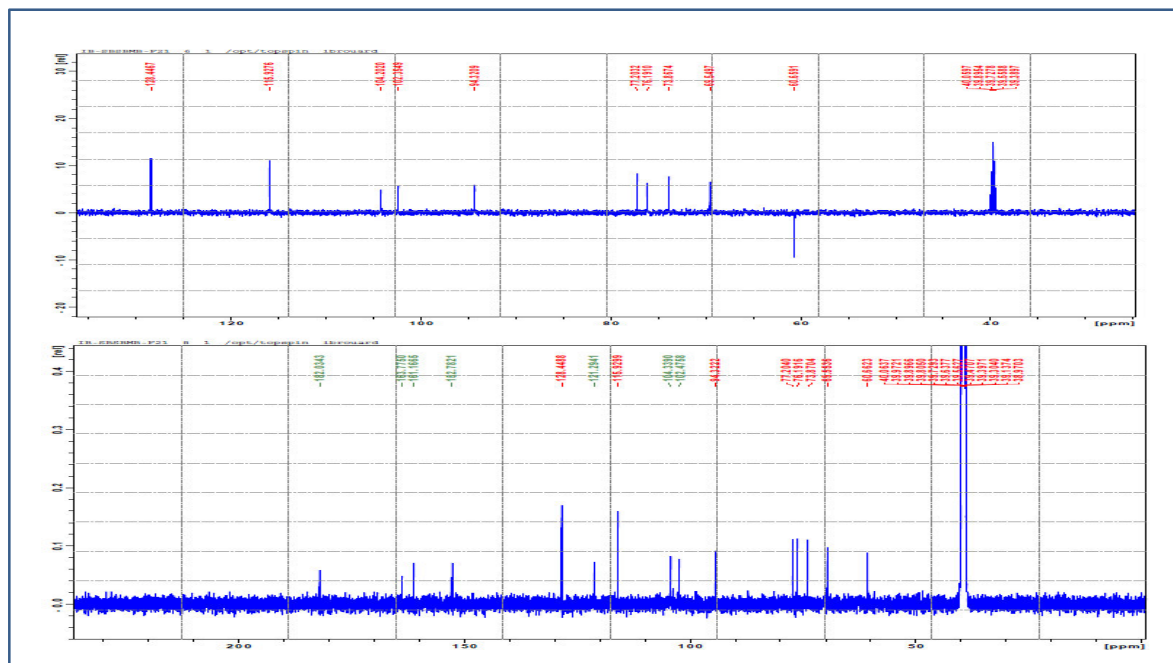


Spectre-22: Spectre RMN 1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé B-3.

Sur le spectre RMN- ^{13}C (spectre-23) on dénombre la présence de 21 atomes de carbone répartis comme suit :

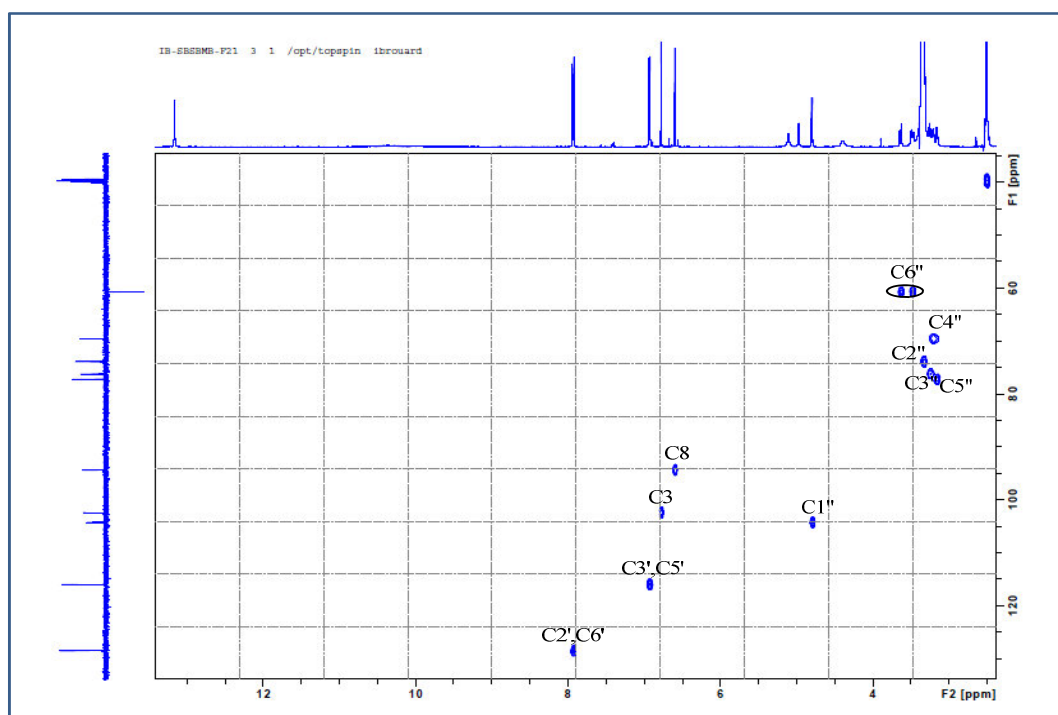
- ✓ Six attribuables à un glucoside ;
- ✓ Quinze autres atomes de carbone correspondants aux ceux de la génine.

Les déplacements chimiques de l'ensemble des noyaux ^{13}C sont reportés dans le tableau-11, (c.f., p.103).

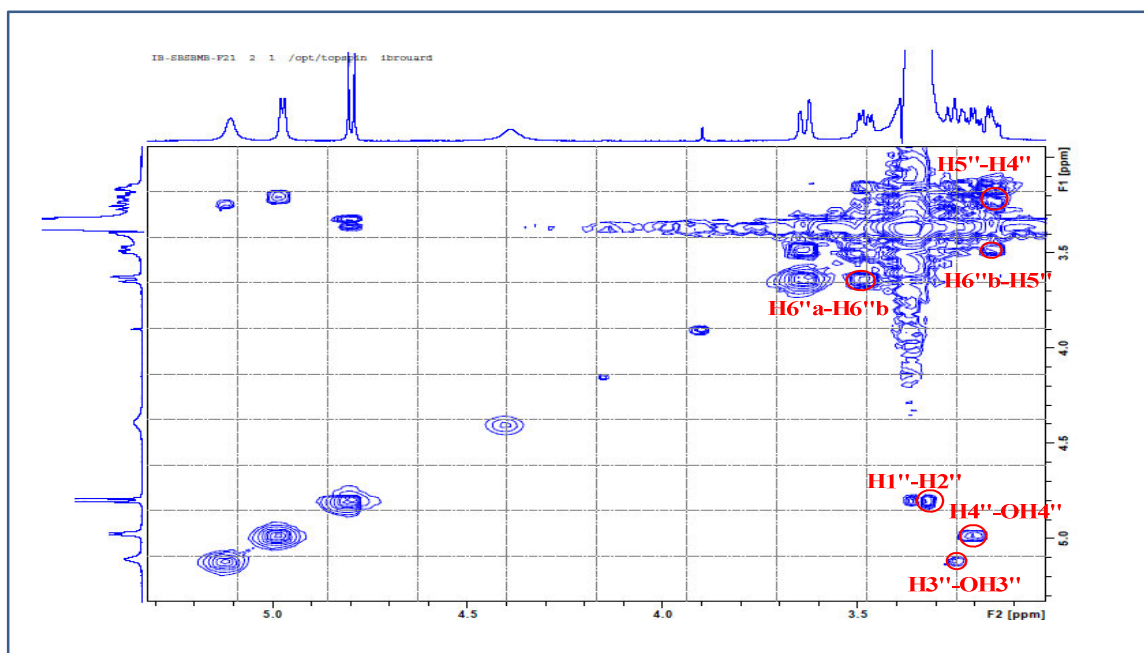


Spectre-23: Spectres RMN ^{13}C avec sa séquence DEPT-135 (125 MHz, DMSO- d_6) du composé B-3.

L'étude des spectres HSQC (spectre-24) et COSY (spectre-25), nous a permis de déduire la nature du sucre, le glucose et également d'attribuer les différents déplacements chimiques des protons de ce sucre y compris le proton H-2'' partiellement dissimulé par le signal à 3,36 ppm du solvant H_2O présent dans le DMSO- d_6 . Le déplacement chimique de l'ensemble des protons osidiques sont reportés dans le tableau-11.

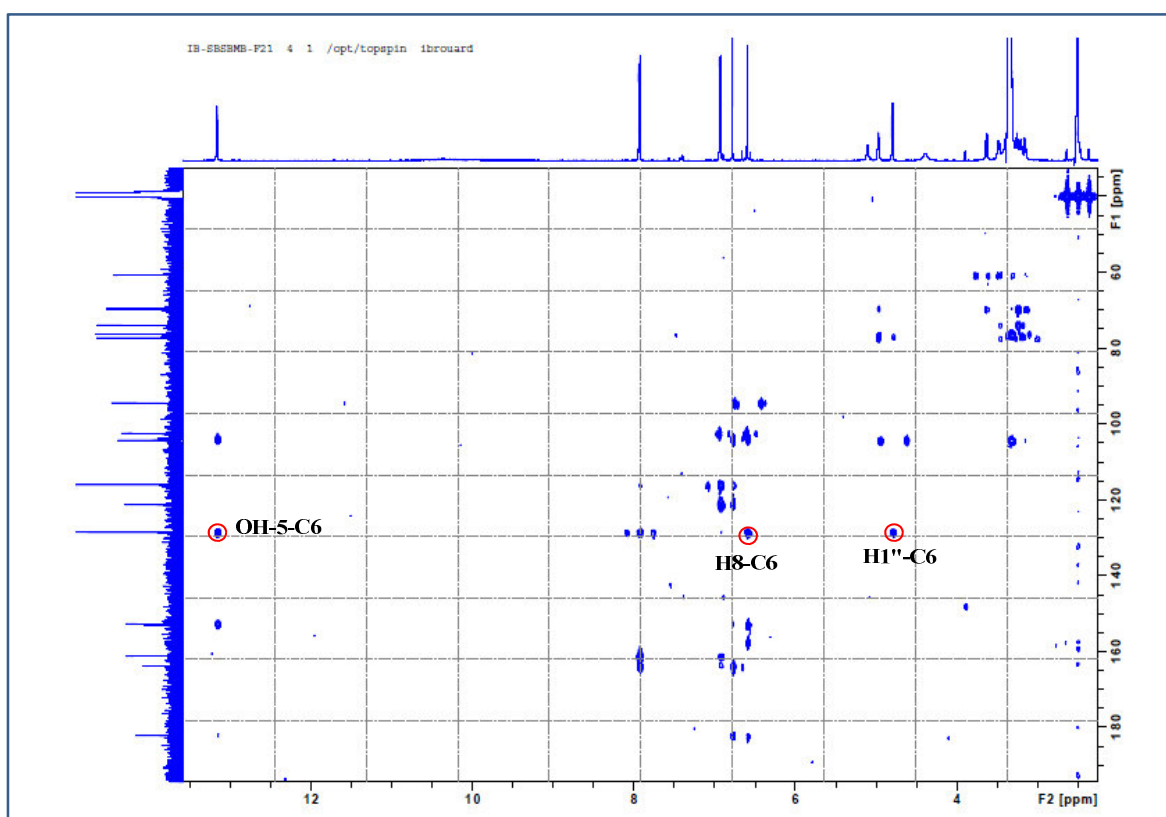


Spectre-24: Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- d_6) du composé B-3.



Spectre-25: Spectre COSY (500 MHz, DMSO-d₆) du composé B-3.

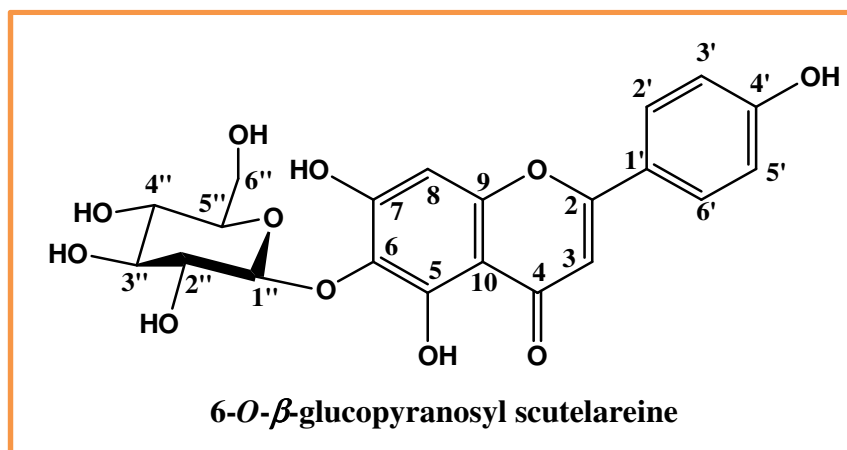
L'analyse du spectre HMBC (spectre-26) a permis de confirmer la position du glucose sur le squelette de la génine, par la présence d'une tache de corrélation entre le proton anomérique de ce sucre et le carbone C-6 de la flavone.



Spectre-26 : Spectre HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) du composé B-3.

Toutes ces données spectrales nous ont conduites à identifier le composé B-3 à la molécule :

6-*O*- β -glucopyranosyl scutelareine. Ce composé naturel est très rare par sa jonction C-O en position 6 de son sucre, au lieu de la jonction C-C habituel [12] ; il a été isolé pour la première fois de l'espèce *Haplopappus rengifoanus* (*Compositae*) [13] et également dans le genre *Echinops*.



Les données de la RMN ^1H et du ^{13}C avec sa séquence DEPT-135 sont résumées dans le tableau-11:

Tableau-11 : Données de la RMN ^1H et du ^{13}C du composé B-3.

Positions	6- <i>O</i> - β -glucopyranosyl scutelareine	
	δ_{C} (ppm), (DEPT)	δ_{H} (ppm), multi., <i>J</i> (Hz)
2	163,77 (C)	-
3	102,35 (CH)	6,78 <i>s</i>
4	182,03 (C)	-
5	152,64 (C)	-
6	128,45, (C)	-
7	156,00; (C)	-
8	94,32 (CH)	6,59 <i>s</i>
9	152,78 (C)	-
10	103,20 (C)	-
1'	121,29 (C)	-
2', 6'	128,45 (CH)	7,93 <i>d</i> (8,8)
4'	161,17 (C)	-
3', 5'	115,93 (CH)	6,93 <i>d</i> (8,8)
1''	104,20 (CH)	4,79 <i>d</i> (7,7)
2''	73,87 (CH)	3,20
3''	76,19 (CH)	3,24 <i>t</i> (8,3)
4''	69,55 (CH)	3,37 <i>dt</i> (8,3 ; 4,6)
5''	77,20 (CH)	3,14 <i>m</i>
6''a	60,66 (CH ₂)	3,63 <i>dl</i> (11,5)
6''b		3,47 <i>d</i> (11,5 ; 4,9)

II.4 Identification structurale du composé B-4 :

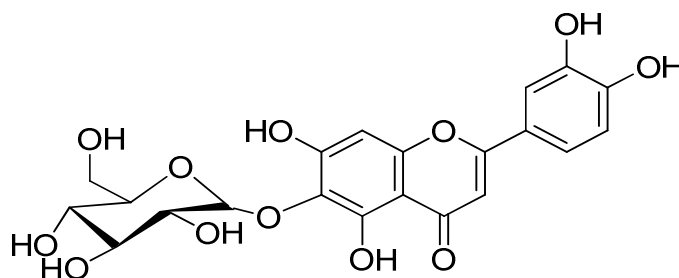


Figure-12 : Composé B-4.

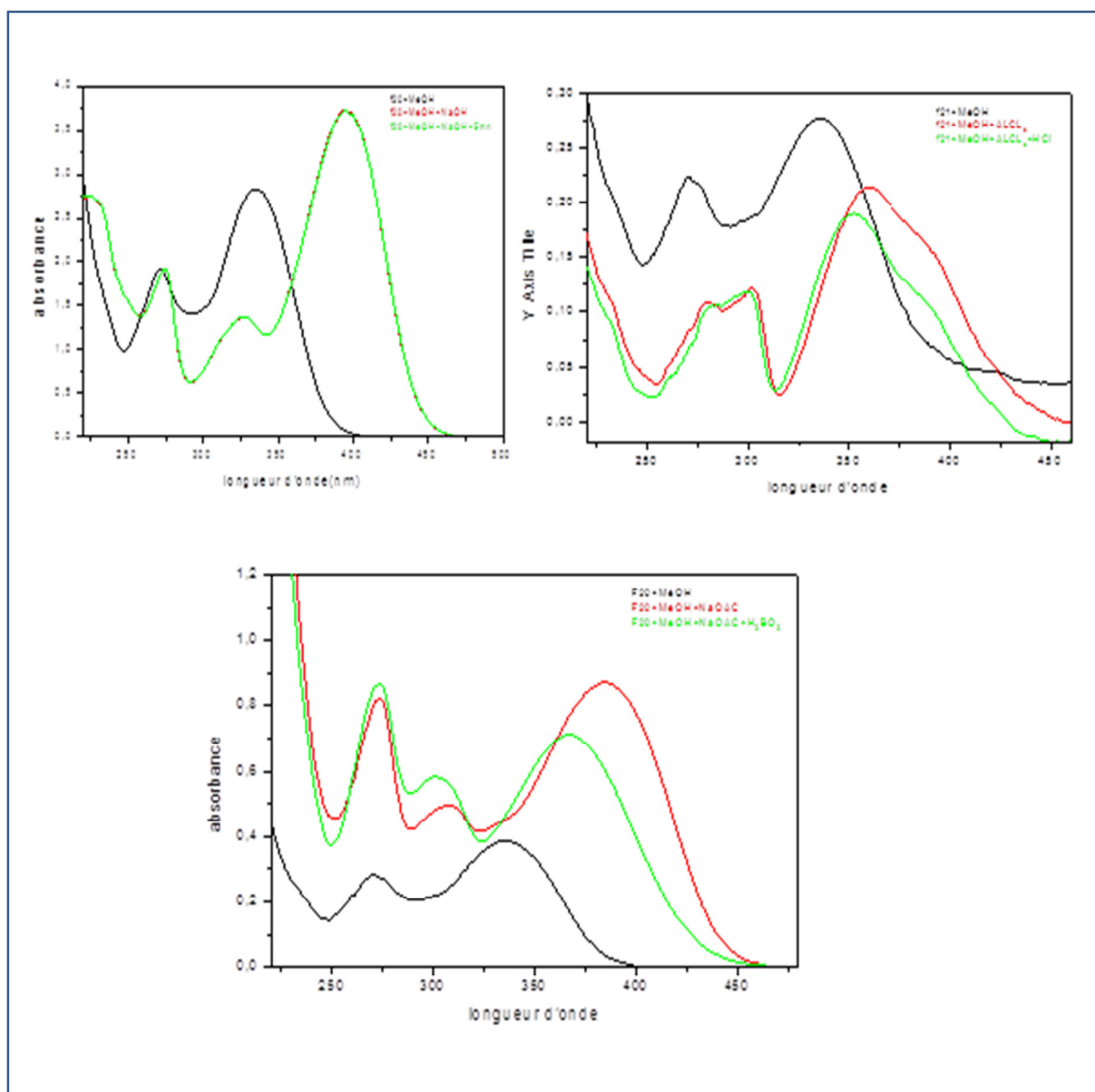
Une analyse de la série spectrale UV (spectres-26) du composé B-3, montrent :

- ✓ Un maximum de la bande I à 335 nm et celui de la bande II à 271 nm du spectre enregistré dans le MeOH, suggère une structure flavonique de type flavone [14];
- ✓ L'ajout du réactif NaOH provoque un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda = + 59$ nm) de la bande I par rapport au spectre enregistré dans le MeOH, révélant ainsi la présence d'un groupement OH libre en position 4'. Quant à l'apparition d'une autre bande à 327 nm, elle suggère la présence d'un groupement OH libre en position 7.
- ✓ Le faible déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda = + 3$ nm) en présence du NaOAc, par rapport au spectre MeOH confirme la présence du groupement 7-OH.
- ✓ Le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 17$ nm) dans AlCl_3+HCl par rapport au spectre dans MeOH indique un 5-OH et une 6-oxygénation.
- ✓ Le faible déplacement de la bande I ($\Delta\lambda = - 21$ nm) en comparant les spectres AlCl_3 et AlCl_3+HCl , laisse prévoir la présence du système ortho di hydroxylé sur le cycle B.
- ✓ Alors que le déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = + 32$ nm) dans $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$ comparé au spectre méthanolique, oriente vers un système ortho di-hydroxylé sur le cycle B.

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau-12 suivant :

Tableau-12 : Données de la série spectrale UV du composé B-4.

Réactifs	Bande I	Autres bandes	Bande II	Commentaires
MeOH	335	/	271	flavone
+ NaOH	394		274	OH libre en 4'
		327		OH libre en 7
Spectre stable avec NaOH après 5 mn				
+AlCl ₃	361	302, 386	281	OH libre en 5 ortho di-OH sur le cycle B
+AlCl ₃ / HCl	382	299, 352	282	
+NaOAc	386	308	274	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	367	301	274	ortho di-OH sur le cycle B

**Spectre-27 : Série spectrale UV du composé B-4.**

Ces données permettent la proposition de la structure partielle suivante :

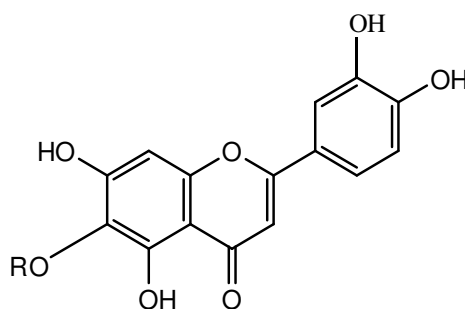
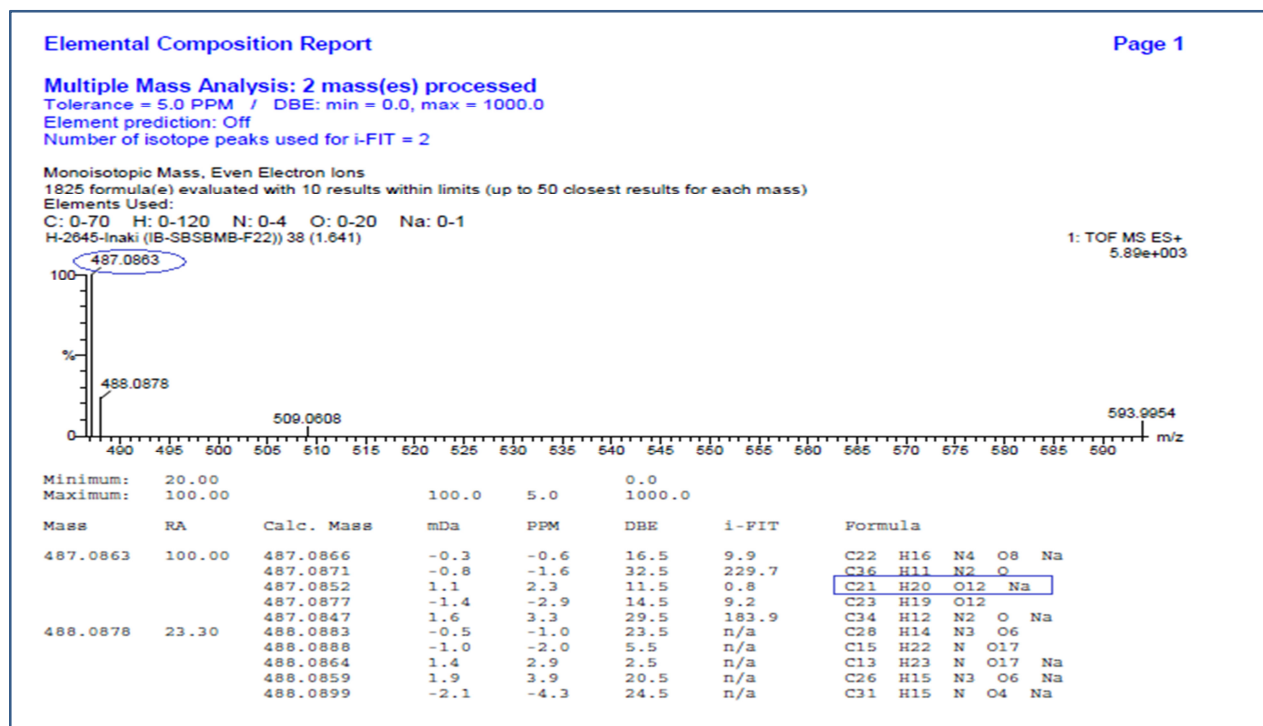


Figure-13 : Squelette flavone du composé B-4.

Le spectre de masse à haute résolution HRESI-MS en mode positif (spectre-28), indique un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 487,0863$ Da (calculée à 487,0852) dont la composition élémentaire oriente vers une formule brute de $C_{21}H_{20}O_{12}Na$ relative à la formule brute de notre composé de $C_{21}H_{20}O_{12}$; soit une structure de masse de 464 Da comportant douze insaturations. Notons que ce composé ne diffère du composé B-3 que par la présence d'un oxygène supplémentaire que l'on peut attribuer au groupement OH supplémentaire sur le cycle B du squelette flavonique.

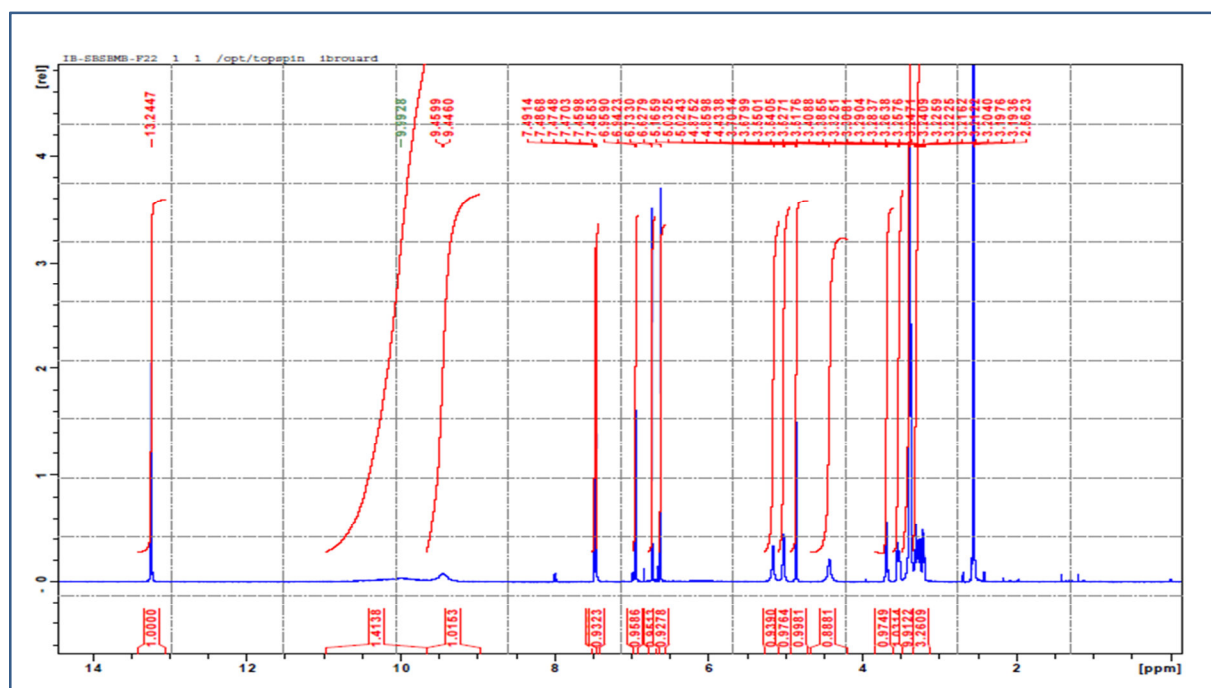


Spectre-28 : Spectre TOF-HRESI-MS (+) du composé B-4.

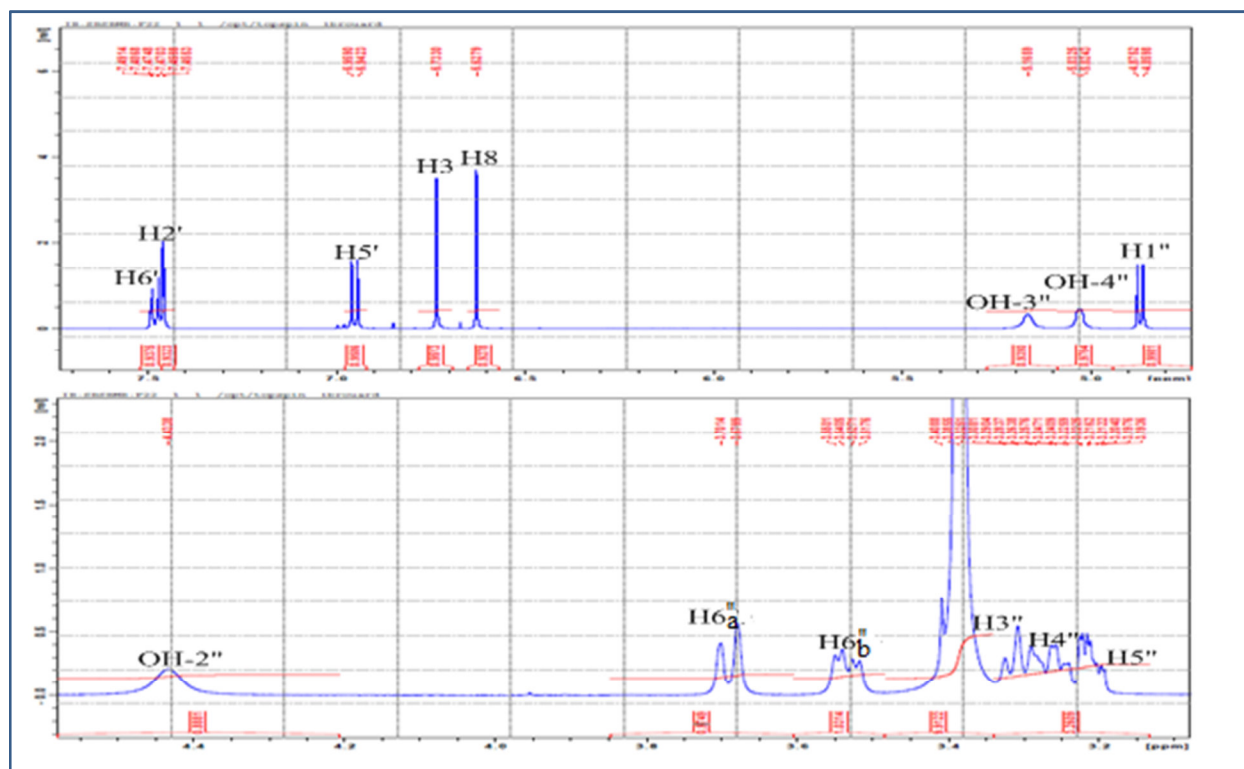
En effet, les protons du cycle B d'un flavonoïde sont visibles sur le spectre RMN 1H (spectre-29.a) entre 6,7 et 7,9 ppm [15], confirmant la présence de ce groupement OH supplémentaire dans le composé B-4.

Une étude approfondie de ce spectre RMN du proton (spectre-29.b) confirme la grande similitude avec celui du composé B-3 à la différence des déplacements chimiques des trois protons sur le cycle B reconnaissable par :

- ✓ Un doublet dédoublé à $\delta = 7,48$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-6'. Les deux constantes de couplages, l'une de $J = 8,3$ Hz indique un couplage ortho et la seconde de $J = 2,3$ Hz un couplage méta ;
- ✓ Un doublet à $\delta = 7,46$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-2' et sa constante de couplage de $J = 2,3$ Hz oriente vers un couplage méta;
- ✓ Un doublet à $\delta = 6,95$ ppm d'intégration 1H attribuable à H-5', avec une constante de couplage de $J = 8,3$ Hz orientant vers couplage ortho ;
- ✓ Un singulet à $\delta = 13,24$ ppm d'intégration 1H attribuable au groupement OH se trouvant en position 5 du cycle A.
- ✓ Deux singulets à $\delta = 6,73$ et $6,63$ ppm d'intégration 1H chacun, attribuables respectivement aux protons H-3 et H-8.
- ✓ Un doublet à $\delta = 4,86$ ppm d'intégration 1H caractéristique du proton anomérique H-1'' du sucre. La valeur de la constante de couplage $J = 7,7$ Hz définit la forme β osidique.
- ✓ Des signaux dont le déplacement chimique est compris entre 3,1 et 3,8 ppm, (spectre-29-b), indiquant sans nul doute les protons de la partie osidique de notre composé.



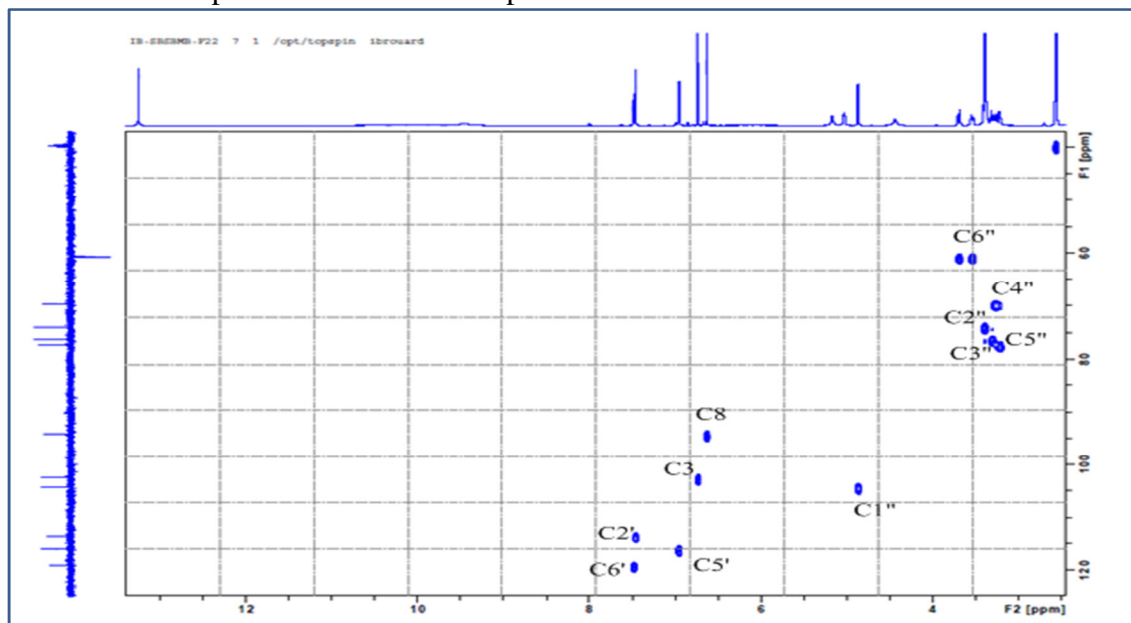
Spectre-29.a : Spectre RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) du composé B-4.



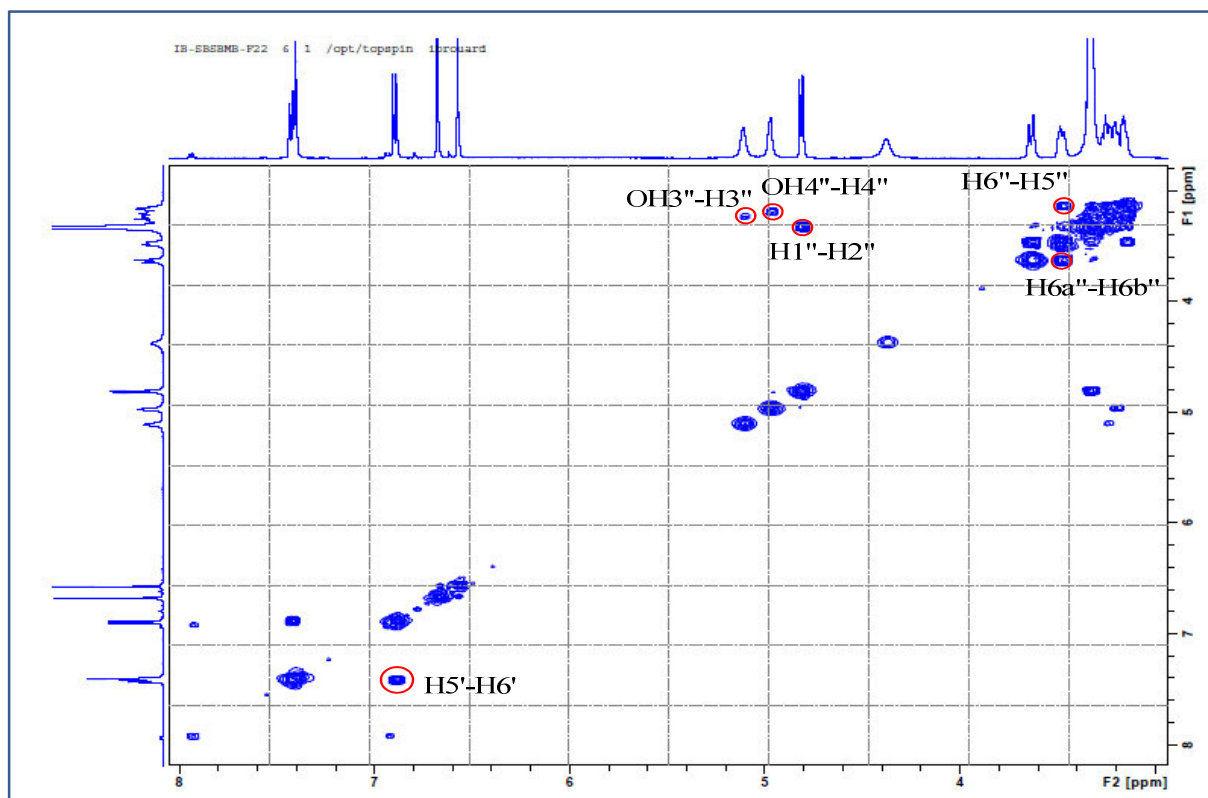
Spectre-29.b : Spectre RMN ^1H étalé (500 MHz, DMSO- d_6) du composé B-4.

L'attribution des signaux caractéristiques aux différents noyaux, a été confirmée par une analyse RMN du spectre HSQC (spectre-30) et COSY (spectre-31).

En effet, dans le spectre HSQC apparaissent clairement les corrélations entre les protons H-2', H-6' et H-5' avec les carbones respectifs C-2', C-6' et C-5'. Ces corrélations indiquent sans nul doute la présence du groupement OH supplémentaire en position 3', confirmées par la corrélation dans le spectre COSY entre les protons H-5' et H-6'.



Spectre-30 : Spectre HSQC (500 MHz, DMSO- d_6) du composé B-4.



Spectre-31 : Spectre COSY (500MHz, DMSO-d6) du composé B-4.

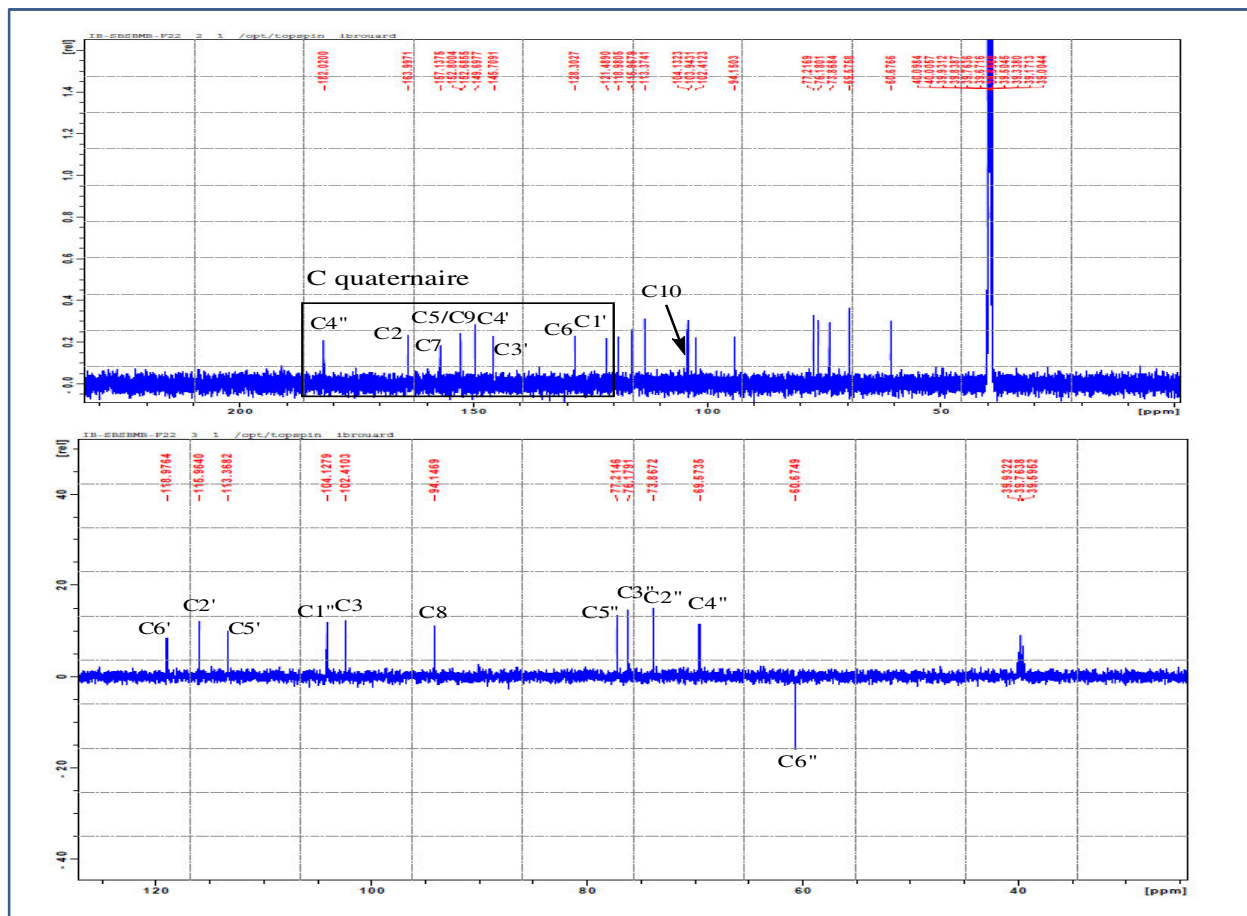
Par ailleurs, une analyse du spectre RMN ^{13}C avec sa séquence DEPT-135 du composé B-4 (spectre-32), indique vingt et un signaux distincts dont quinze sont attribuables aux signaux d'un flavonoïde, répartis comme suit :

- ✓ Dix carbones quaternaires dont un groupement carbonyle à $\delta_{\text{C}} = 182,02$ ppm ;
- ✓ Cinq CH aromatiques.

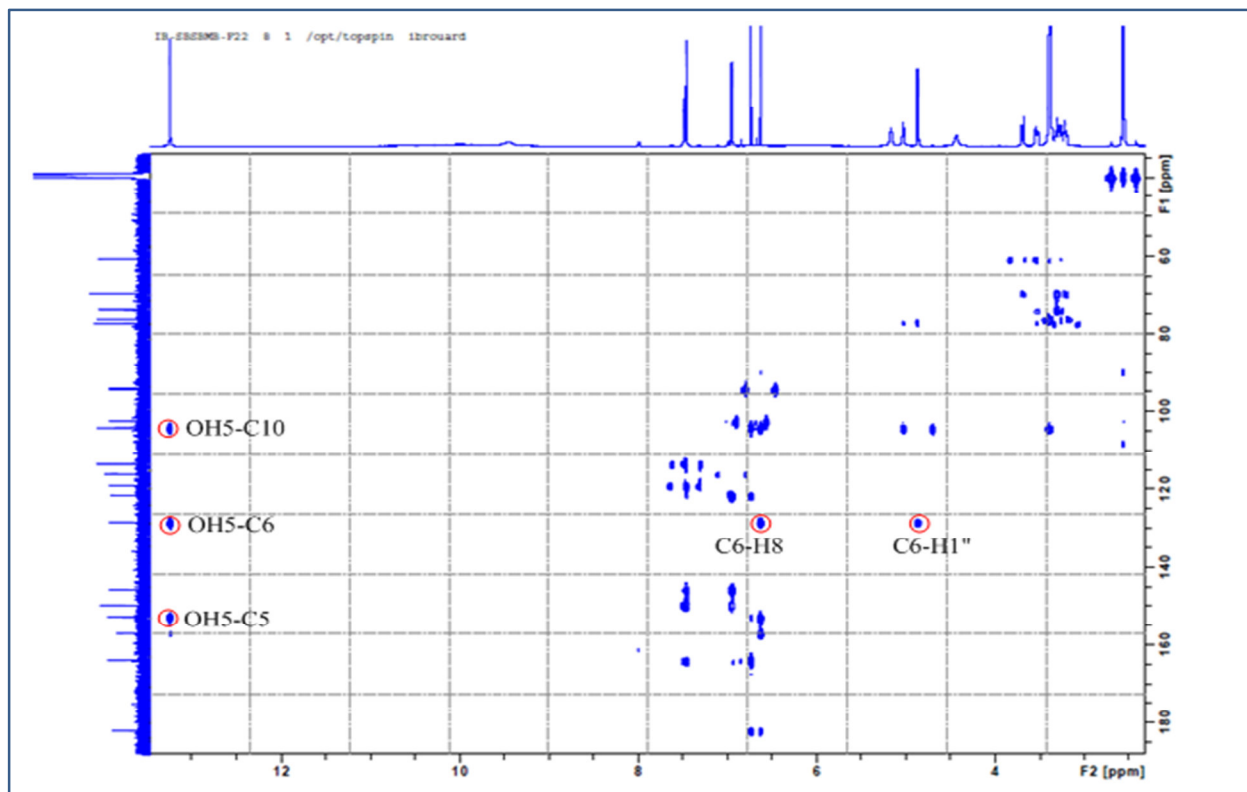
En dehors de la zone du sucre, ces quinze signaux comparés à ceux du composé B-3 indiquent que la génine du composé B-4 est la lutéoline substituée en position 6.

Cette observation est confirmée par une analyse complémentaire des spectres RMN hétéronucléaires HMBC (spectres-30.a et b), qui montrent que le carbone C-6 est substitué.

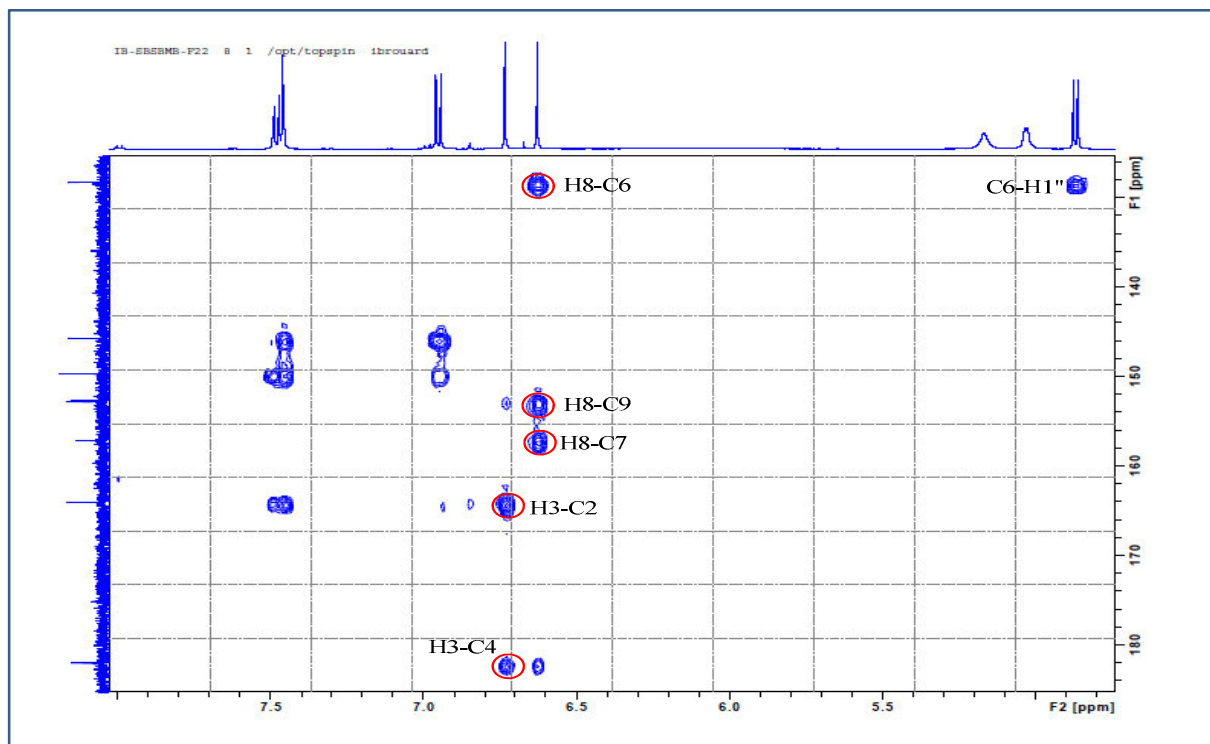
En effet, d'une part la substitution de cette position apparaît clairement par l'absence de corrélation entre le carbone C-5 et un proton et d'autre part l'interaction à longue distance du carbone C-6 avec le proton H-8 à $\delta_{\text{H}} = 6,63$ ppm et le proton du groupement OH en position 5 à $\delta_{\text{H}} = 13,24$ ppm.



Spectre-32: Spectres RMN ^{13}C avec sa séquence DEPT-135 (125MHz, DMSO- d_6) du composé B-4.

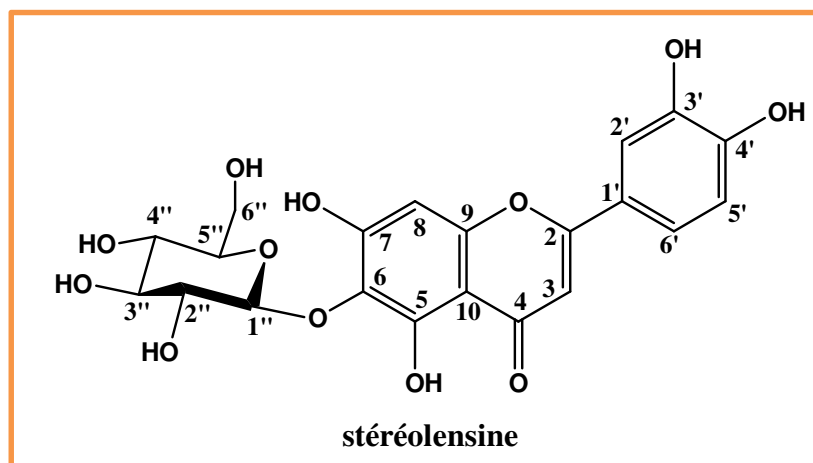


Spectre-33.a : Spectre HMBC (500 MHz, DMSO- d_6) du composé B-4.



Spectre-33.b: Spectre HMBC étalé (500 MHz, DMSO-d6) du composé B-4.

Le composé B-4 a donc été identifié comme étant la stéréolensine qui a été identifié pour la première fois dans l'espèce *Stereospermum suaveolens* [16] et dans le genre *Echinops* de notre plante. Ce composé naturel est très rare pour la même jonction relevée dans le composé B-3[13].



Le tableau-13, réuni l'ensemble des données de la RMN du proton et du ^{13}C avec sa séquence DEPT-135 de la stéréolensine.

Tableau -13: Données de la RMN ¹H et ¹³C du composé B-4.

Positions	stéréolinsine	
	δ_C (ppm), (DEPT)	δ_H (ppm), mlti., J(Hz)
2	163,99 (C)	-
3	102,41 (C)	6,73 s
4	182,02 (C)	-
5	152,80 (C)	-
6	128,30 (C)	-
7	157,13 (C)	-
8	94,15 (CH)	6,63 s
9	152,68 (C)	-
10	105,00 (C)	-
1'	121,48 (C)	-
2'	115,96 (CH)	7,46 d (2,3)
3'	145,70 (C)	-
4',	149,69 (C)	-
5'	113,36 (CH)	6,95 d (8,3)
6'	118,97 (CH)	7,48 dd (8,3; 2,3)
1''	115,93 (C)	4,86 d (7,7)
2''	104,12 (CH)	3,38m
3''	76,17 (CH)	3,30 t (8,5)
4''	69,57 (CH)	3,24 td (8,5 ; 3,1)
5''	77,21 (CH)	3,20 m
6''a	60,67 (CH ₂)	3,69 dl (10,7)
6''b	-	3,53 dd (11,5 ; 4,8)

A.III. Conclusion sur l'étude structurale des composés issus de l'espèce *Echinops spinosus* :

A l'issue de l'étude de la composition chimique des deux extraits acétate d'éthyle et butanolique de l'espèce *Echinops Spinosus*, sept composés phénoliques ont été isolés dont un flavonoïde aglycone, cinq flavonoïdes glycosides et un acide quinique ; ces molécules sont :

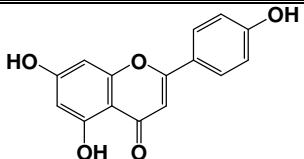
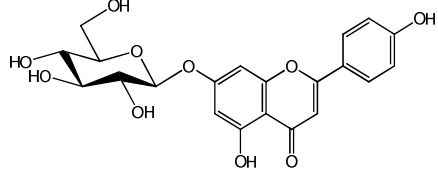
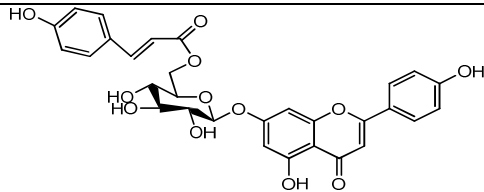
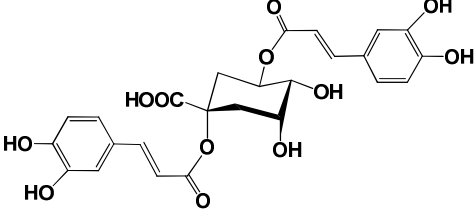
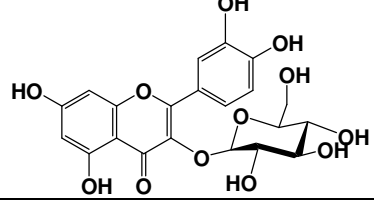
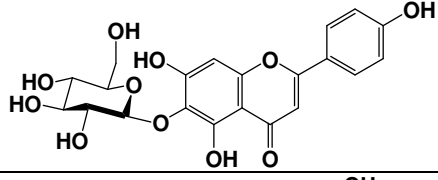
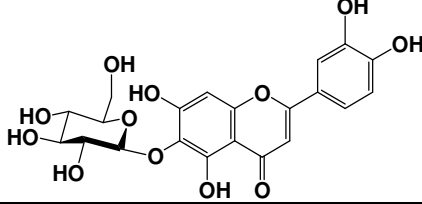
- **A-1** : apigénine;
- **A-2** : 7-O- β -glucopyranosyl apigénine;
- **A-3** : 7-O- β -D-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucopyranosyl apigénine;
- **B-1** : acide 1,5-di-O-caféoylquinique;
- **B-2** : 3-O- β -glucopyranosyl quercétine;
- **B-3** : 6-O- β -glucopyranosyl scutelareine;
- **B-4** : stéréolensine.

La présence de la génine libre, l'apigénine, dans l'extrait acétate d'éthyle est en accord avec les deux composés glycosylés isolés du même extrait et qui ont pour squelette de base cette même génine.

Tous ces composés naturels ont été identifiés pour la première fois dans l'espèce *Spinopus*, mise à part les deux derniers qui sont isolés pour la première fois dans le genre *Echinops*.

Le tableau-14, rassemble l'ensemble de ces structures qui ont fait l'objet de deux publications internationales :

Tableau-14 : Les différents composés isolés de l'espèce *Echinops Spinopus*.

Extraits	Composés	Formule Brute	Structure du composé	Références
AcOEt	A-1	$C_{15}H_{10}O_5$		[1]
	A-2	$C_{21}H_{20}O_{10}$		[11]
	A-3	$C_{32}H_{24}O_{12}$		[6]
BuOH	B-1	$C_{25}H_{24}O_{12}$		[7,8]
	B-2	$C_{21}H_{20}O_{12}$		[11]
	B-3	$C_{21}H_{20}O_{11}$		[14]
	B-4	$C_{21}H_{20}O_{12}$		[16]

B. Identification structurale des produits isolés de la phase chloroformique de la plante *Pulicaria undulata* L.

B.I Identification structurale du composé M :

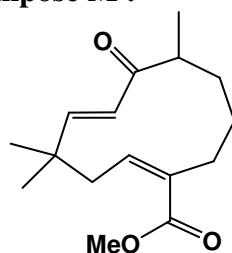
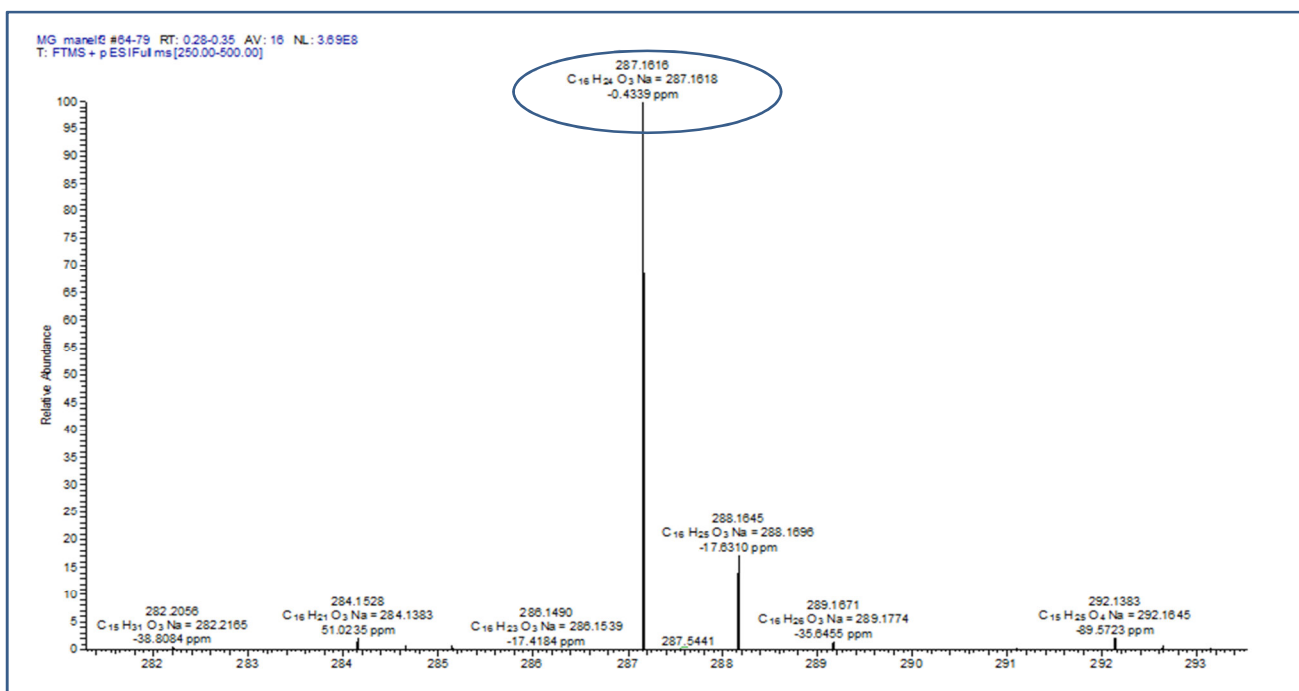


Figure-14 : Composé M.

L'examen du spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronébulisation positive (TOF-HRESI-MS (+)) (spectre-34) montre la présence d'un ion quasi-moléculaire $[M+Na]$ à $m/z = 287,1616$ Da correspondant à la formule $C_{16}H_{24}O_3Na$ (calculée 287,1618 Da), indiquant une formule brute $C_{16}H_{24}O_3$ pour cette molécule soit une structure de masse 264 Da comportant cinq insaturations.



Spectre-34: Spectre TOF-HRESI-MS(+) du composé M.

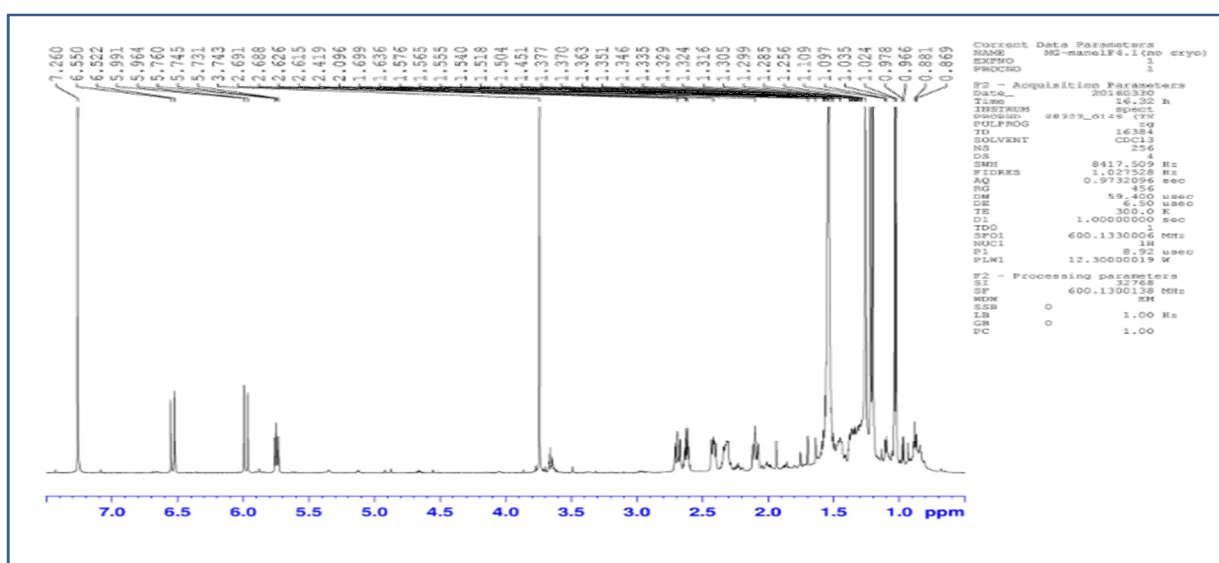
L'étude simultanée des spectres, RMN 1H (spectre-35), RMN ^{13}C (spectre-36) et HSQC (spectre-37) du composé M, montre la présence de seize atomes de carbone que nous pouvons répartir comme suit :

✓ Quatre groupements CH dont :

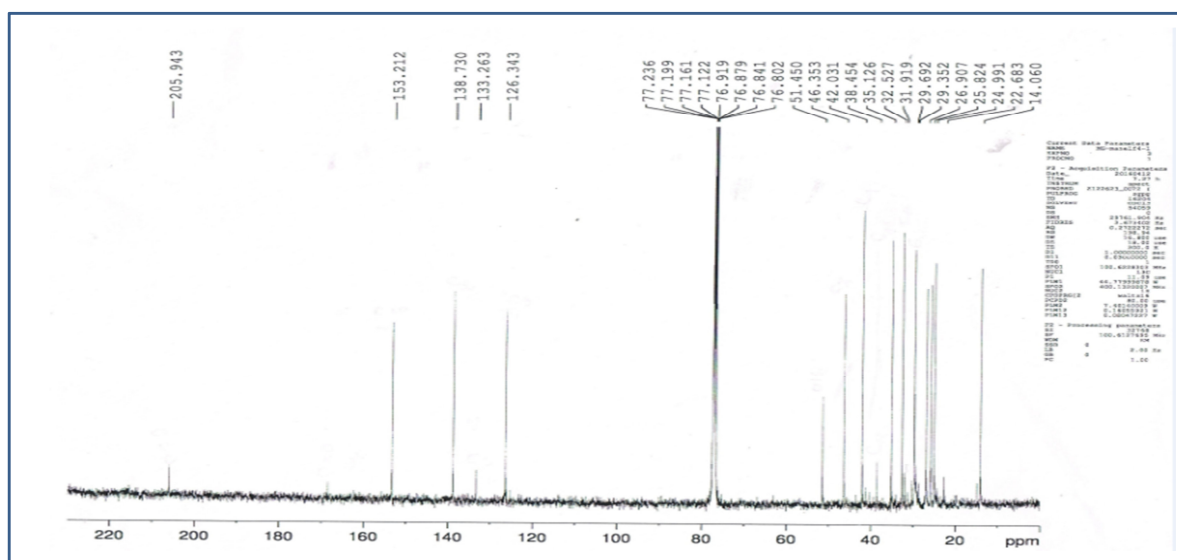
- Un CH non oxygéné à $\delta_C = 46,3$ ppm ;
- Trois CH éthyléniques à $\delta_C = 126,0$; $153,1$ et $138,5$ ppm ;

- ✓ Quatre groupements méthylènes à $\delta_C = 41,8 ; 34,4 ; 24,8$ et $32,5$ ppm ;
- ✓ Trois groupements méthyles à $\delta_C = 13,9 ; 26,3$ et $26,3$ ppm ;
- ✓ Un groupement méthoxyle à $\delta_C = 51,1$ ppm ;
- ✓ Quatre carbones quaternaires dont :
 - Deux groupements carbonyles CO, le premier à $\delta_C = 168,1$ ppm caractéristique d'un ester α, β -insaturé, le second à $\delta_C = 205,94$ ppm appartenant à une cétone ;
 - Deux carbones quaternaires l'un à $\delta_C = 133,1$ ppm attribuable à un carbone hybridé sp^2 non oxygéné et le second à $\delta_C = 38,3$ ppm attribuable à un carbone hybridé sp^3 également non oxygéné.

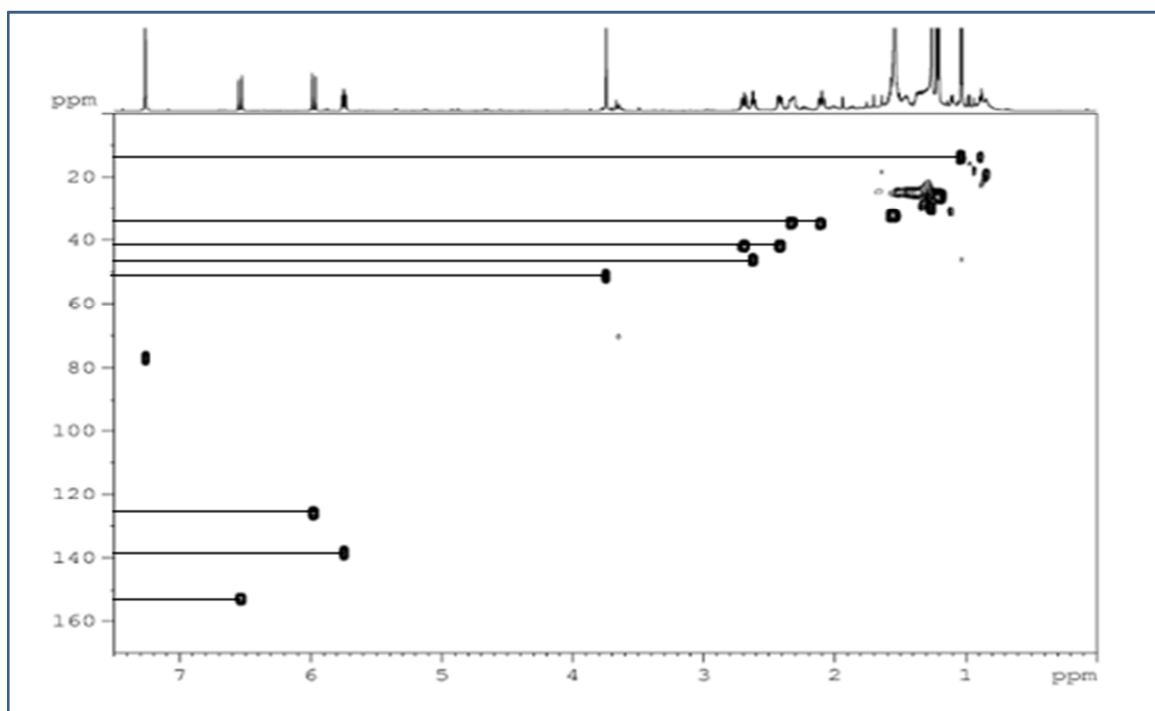
Ces observations consomment au moins quatre insaturations sur les cinq attendues.



Spectre-35 : Spectre RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$) du composé M.



Spectre-36 : Spectre de RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) du composé M.



Spectre-37 : Spectre de HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) du composé M.

Le spectre HSQC (spectre-37) permet de localiser deux protons de deux groupements éthyléniques à $\delta_c = 126,0$ et $153,1$ ppm. Ces protons résonnent, respectivement, dans le spectre RMN 1H sous forme d'un doublet chacun à $\delta_H = 5,98$ ppm ($J = 16,5$ Hz) et $\delta_H = 6,54$ ppm ($J = 16,5$ Hz) et montrent dans le spectre COSY une tache de corrélation très clair qui mène à construire la première entité suivante :

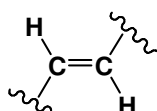


Figure-15 : Entité-1 faisant partie de la structure du composé M.

Sur le spectre HMBC (spectre-38) ces mêmes protons éthyléniques montrent des taches de corrélations avec le carbonyle de la cétone à $\delta_c = 205,7$ ppm qui corréle également avec un groupement méthyle à $\delta_c = 13,9$ ppm.

Par ailleurs, le carbone de ce groupement méthyle indique sur le spectre HSQC une tache de corrélation avec ses protons qui résonnent à $\delta_H = 1,03$ ppm sous forme d'un doublet ($J = 6,6$ Hz). Cela suppose que ce méthyle est porté par un groupement CH.

Cette observation est confirmée par une analyse du spectre COSY (spectre-39) qui montre une tache de corrélation entre les protons de ce méthyle et celui de ce groupement CH à $\delta_H = 2,62$ ppm, qui se résonne à $\delta_c = 46,3$ ppm et qui ne peut être lié qu'au groupement carbonyle, cité plus haut, à $\delta_c = 205,7$ ppm.

Ainsi on peut compléter la construction de la première entité de notre composé selon la figure suivante :

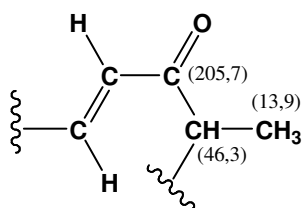
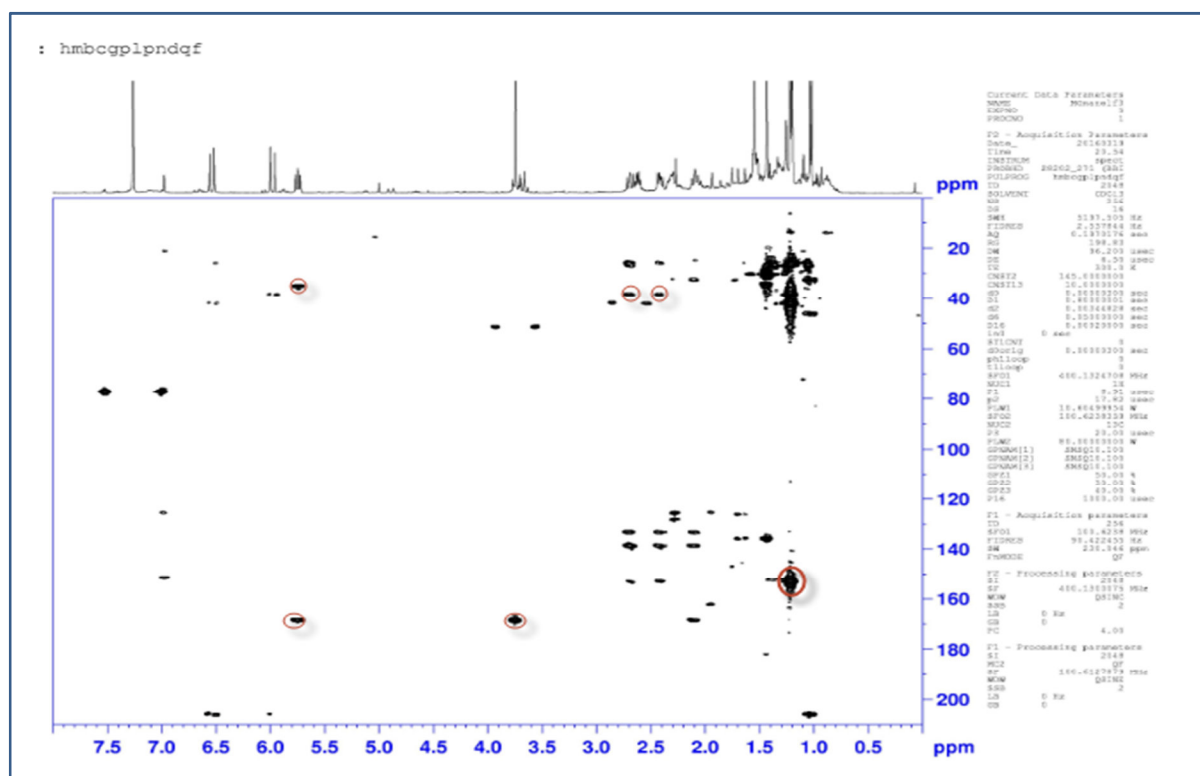


Figure-16 : Entité-2 faisant partie de la structure du composé M (δ (ppm)).



Spectre-38 : Spectre HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) du composé M.

Un retour sur le spectre HMBC, indique une tache de corrélation entre les protons du méthyle positionner antérieurement et le carbone d'un groupement CH_2 à $\delta_C = 32,5$ ppm ce qui place ce dernier en position vicinale par rapport au groupement CH, repéré plus haut, à $\delta_C = 46,3$ ppm.

Sur le même spectre, on relève une tache de corrélation entre le proton éthylénique à $\delta_H = 5,98$ ppm et l'unique carbone quaternaire hybridé sp^3 à $\delta_C = 38,3$ ppm, ce qui permet de le placer au voisinage du carbone éthylénique à $\delta_C = 153,1$ ppm représenté dans la figure-16.

Par ailleurs le spectre proton montre la présence de deux singulets à $\delta_H = 1,20$ et $1,22$ ppm qui correspondent à deux groupements méthyles, cela suppose qu'ils sont portés par le carbone quaternaire hybridé sp^3 . De même le carbone éthylénique à $\delta_C = 153,1$ ppm montre une grosse tache de corrélation sur le spectre HMBC englobant les signaux des deux méthyles, cette observation les places obligatoirement sur le même carbone quaternaire à $\delta_C = 38,3$ ppm.

A ce stade nous pouvons proposer la présence de l'entité-3 suivante :

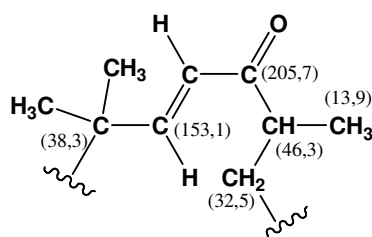
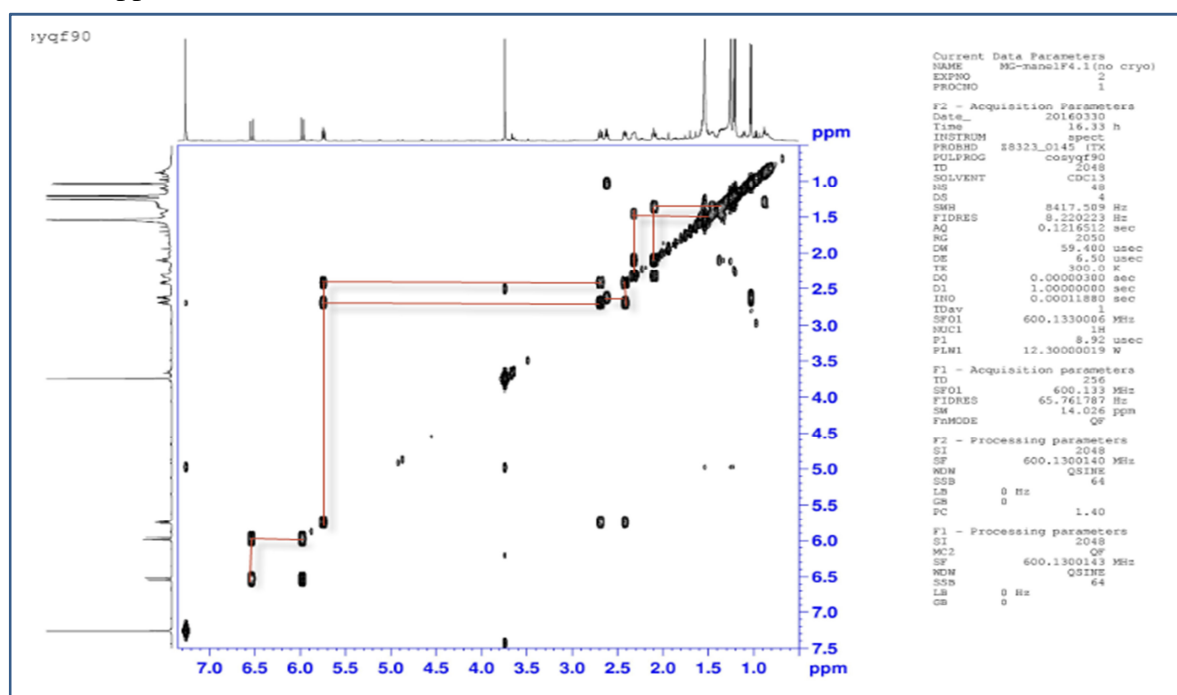


Figure-17 : Entité-3 faisant partie de la structure du composé M (δ (ppm)).

Le spectre HSQC permet de localiser les protons d'un groupement CH_2 à $\delta_{\text{C}} = 41,8$ ppm qui résonnent sous forme de doublet de doublet à $\delta_{\text{Ha}} = 2,69$ ppm ($J = 12,0 ; 10,0$ Hz) et $\delta_{\text{Hb}} = 2,41$ ppm ($J = 10,0 ; 8,0$ Hz). Ces deux protons montrent sur le spectre HMBC des taches de corrélations claires avec les carbones des groupements méthyles, ce qui place ce groupement CH_2 en position vicinale par rapport au carbone quaternaire porteur des deux groupements méthyles.

Sur le spectre COSY les deux protons de ce dernier CH_2 montrent des taches de corrélations avec un proton éthylénique résonant sous forme d'un triplet large à $\delta_{\text{H}} = 5,7$ ppm ($J = 8,5$ Hz) ; ce qui le place en position vicinale au groupement CH_2 à $\delta_{\text{C}} = 41,8$ ppm.

Revenant au spectre HMBC, ce proton éthylénique montre une tache de corrélation avec le carbone du groupement carbonyle de l'ester, résonant à $\delta_{\text{C}} = 168,1$ ppm, qui à son tour montre une tache de corrélation nette avec les protons du groupement méthoxy résonant à $\delta_{\text{H}} = 3,74$ ppm.



Spectre-39 : Spectre de COSY (600 MHz, CDCl_3) du composé M.

Toujours sur le spectre HMBC, le proton éthylénique à $\delta_H = 5,7$ ppm corrèle également avec le carbone d'un groupement CH_2 qui se déplace à $\delta_C = 34,4$ ppm ; cette corrélation indique que la double liaison qui porte ce proton éthylénique est délimitée par un carbone éthylénique quaternaire, en l'occurrence le carbone qui se déplace à $\delta_C = 133,1$ ppm et qui est lié au groupement CH_2 dont les protons résonnent à $\delta_{\text{Ha}} = 2,33$ ppm et $\delta_{\text{Hb}} = 2,09$ ppm.

Ces observations supposent, donc la présence de l'entité-4 suivante :

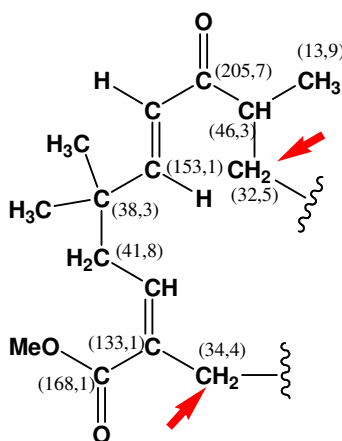


Figure-18 : Entité-4 faisant partie de la structure du composé M.

A ce stade de notre analyse nous avons utilisé les quatre insaturations, établies plus haut, sur les cinq attendues, il ne nous reste plus qu'à placer le groupement CH_2 résonant à $\delta_C = 24,8$ ppm ; ceci implique que la cinquième insaturation ne peut se faire qu'à travers un cycle, autrement dit le dernier groupement CH_2 ne peut être placé qu'entre les deux CH_2 indiqués sur l'entité -4.

La fermeture de ce cycle mène ainsi à un squelette de type humulène, de ce fait nous pouvons conformément à la bibliographie de ce type de sesquiterpène, proposer la numérotation reportée dans la figure suivante :

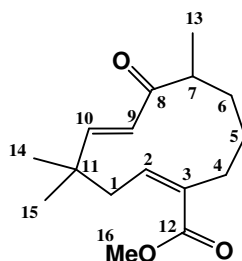


Figure-19 : Numérotation du squelette humulène relatif au composé M.

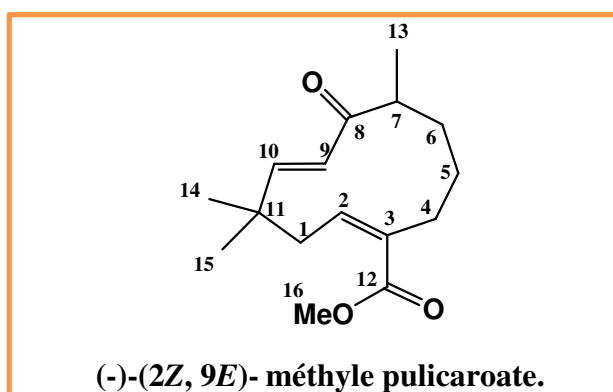
Une étude stéréochimique complémentaire a été effectuée sur ce composé et a montré :

- ✓ La géométrie de la double liaison Δ^2 est de configuration **Z** conformément aux valeurs des déplacements chimiques des carbones C-1 ($\delta_C = 41,8$ ppm) et C-4 ($\delta_C = 34,4$ ppm) dont les

déplacement auraient été beaucoup plus faible pour une configuration *E* [17], alors que celle de la double liaison Δ^9 , elle est de configuration *E*, indiquée par la valeur de la constante de couplage entre les protons H-9 / H-10 qui est de : $J_{H9-H10} = 16,5$ Hz.

- ✓ Quand a la stéréochimie du carbone C-7 elle reste pour le moment non établie.
- ✓ Le pouvoir rotatoire spécifique positif du composé M a été mesuré avec un polarimètre digitale (Jasco DIP 370), sa valeur est de : $[\alpha]_D = -8,14$ (C = 0,25 g/mL ; CHCl₃).

La structure du composé M ainsi établie, est décrite pour la première fois dans la littérature et son nom a été donné en se référant à celui du genre de la plante.



Toutes les données de la RMN ¹H et ¹³C, de ce nouveau composé, sont reportées dans le tableau-15, suivant :

Tableau-15 : Données de la spectroscopie RMN ¹H (400 Mz, CDCl₃) ; ¹³C (150 MHz, CDCl₃) du composé M.

Position	(-)-(2 <i>Z</i> ,9 <i>E</i>)-méthyle pulicarate		
	δ_C (ppm), (DEPT)	δ_H (ppm), multi., <i>J</i> (Hz)	Corrélation HMBC
1b	41,8 (CH ₂)	2,41 <i>dd</i> (10,0; 8,0)	-
1a	-	2,69 <i>dd</i> (12,0; 10,0)	-
2	138,5 (CH)	5,74 <i>tl</i> (9,0)	-
3	133,1 (C)	-	-
4 a	34,4 (CH ₂)	2,09 <i>m</i>	C-4/H-2
4 b	-	2,33 <i>m</i>	-
5 a	24,8 (CH ₂)	1,37 <i>m</i>	-
5 b	-	1,45 <i>m</i>	-
6	32,5 (CH ₂)	1,53 <i>m</i>	C-6/H ₃ -13
		2,62 <i>m</i>	-
7	46,3 (CH)	-	-
8	205,7 (C)	-	C-8/H ₃ -13
9	126,0 (CH)	5,98 <i>d</i> (16,5)	-
10	153,1 (CH)	6,54 <i>d</i> (16,5)	C-10/H ₃ -14; H ₃ -15
11	38,3 (C)	-	C-11/H-9
12	168,1 (C)	-	C-12/H-2; 6-OMe
13	13,9 (CH ₃)	1,03 <i>d</i> (6,6)	-
14	26,3 (CH ₃)	1,20 <i>s</i>	-
15	26,3 (CH ₃)	1,22 <i>s</i>	-
12-OMe	51,1 (CH ₃)	3,74 <i>s</i>	-

B.II Identification structurale des composés T et A avec ses isomères B, C, D :

Les spectres RMN ^1H enregistré dans le CDCl_3 des composés **A**, **B**, **C**, **D** et **T** indiquent, en se basant sur les données de la littérature, un ensemble de signaux qui nous oriente vers le squelette d'une lactone sesquiterpénique, appartenant au groupe astérisculolide.

En tenant compte de la numérotation du squelette d'un astérisculolide, l'attribution des signaux observés pour chaque produit a été effectuée en comparant les déplacements chimiques de nos composés (A, et ses isomères B, C et D) avec ceux de la littérature, isolés pour la toute première fois par San Feliciano et al. de l'*Asteriscus aquaticus* [17-19] puis retrouvés plus tard dans différentes espèces appartenant aux deux proches genres *Asteriscus* et *Nauplius* [20-24]. Il est en de même pour le dérivé (T) le tétrahydro-asteriscunolide, [23, 25].

La stéréochimie, définie, de nos composés naturels a été comparé avec les asteriscunolides synthétisés décrit dans la littérature [26-29] qui en fait l'objet, en particulier, d'études de synthèses stéréospécifiques.

II.1 Identification structurale du composé A :

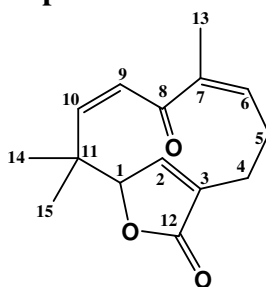
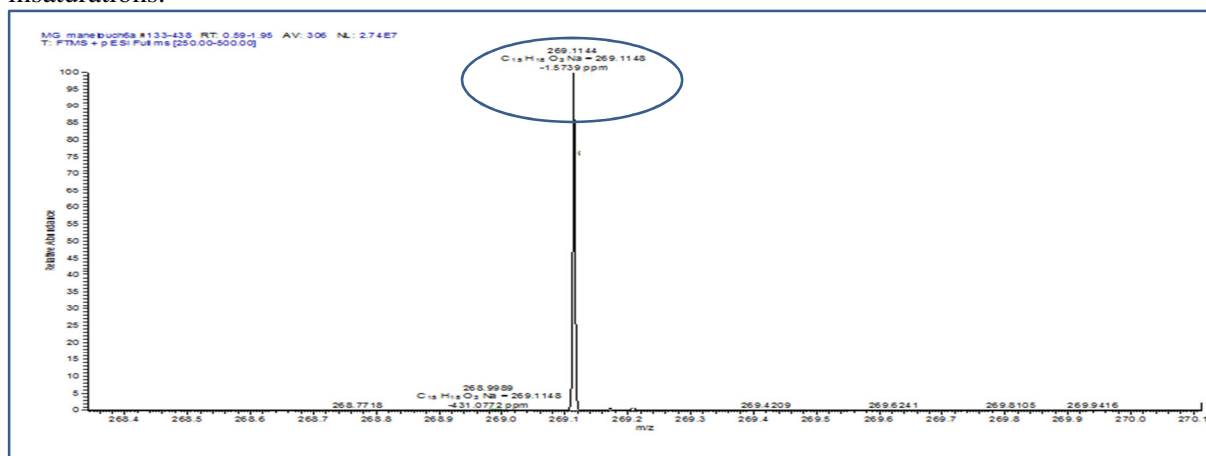


Figure-20 : Le composé A.

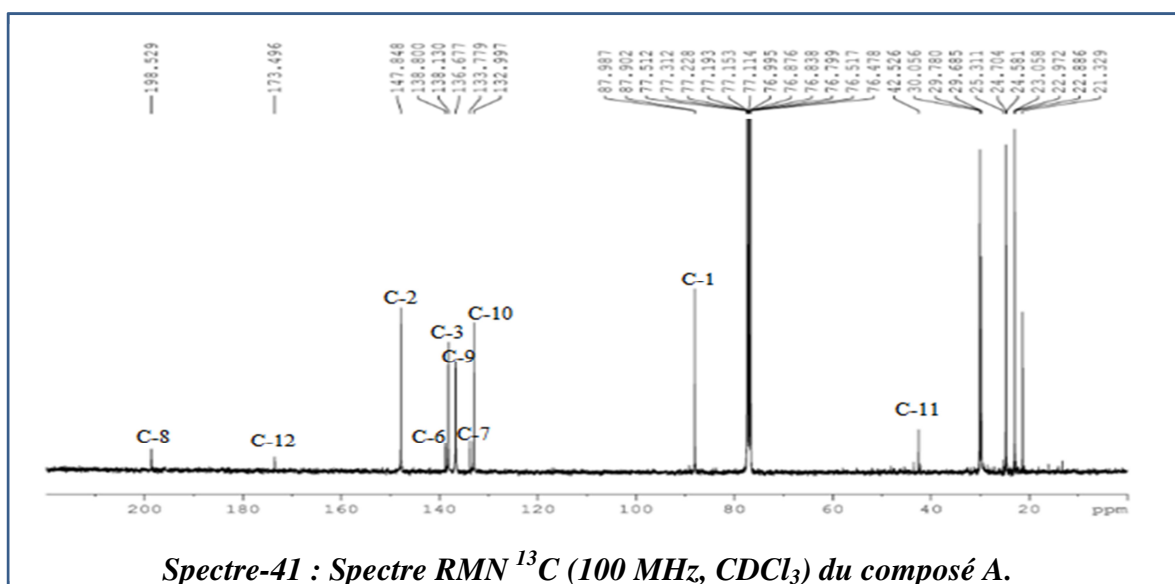
L'examen de son spectre de masse à haute résolution enregistré en mode électronebulisation positive (TOF-HRESI-MS(+)) (spectre-40) montre la présence d'un ion *quasi*-moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à $m/z = 269,1144$ Da, correspondant à la formule $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$ (calculée 269,1148 Da), indiquant une formule brute de $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$ pour cette molécule soit une structure de masse de 246 Da comportant sept insaturations.



Spectre-40 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé A.

L'examen simultané des spectres de RMN ^{13}C (spectre-41), spectre RMN ^1H (spectre-42) et HSQC (spectre-43), confirme la présence des quinze atomes de carbone répartis comme suit :

- ✓ Trois groupements CH_3 à $\delta_{\text{C}} = 20,9$; $24,3$ et $29,7$ ppm ;
- ✓ Deux groupements CH_2 non oxygénés hybridé sp^3 à $22,4$ ppm et $29,4$ ppm ;
- ✓ Cinq CH dont quatre groupements éthylénique à $\delta_{\text{C}} = 133,3$; $136,8$; $138,0$; $148,2$ ppm et un CH hybridé sp^3 qui résonne à $87,8$ ppm.
- ✓ cinq carbones quaternaires dont :
 - Un carbonyle d'une cétone conjuguée à $\delta_{\text{C}} = 198,53$ ppm ;
 - Un carbonyle caractéristique d'une γ - lactone à $\delta_{\text{C}} = 173,49$ ppm ;
 - Un Cq hybridé sp^3 à $\delta_{\text{C}} = 41,8$ ppm ;
 - Deux Cq hybridés sp^2 à $\delta_{\text{C}} = 133,9$ et $137,8$ ppm.

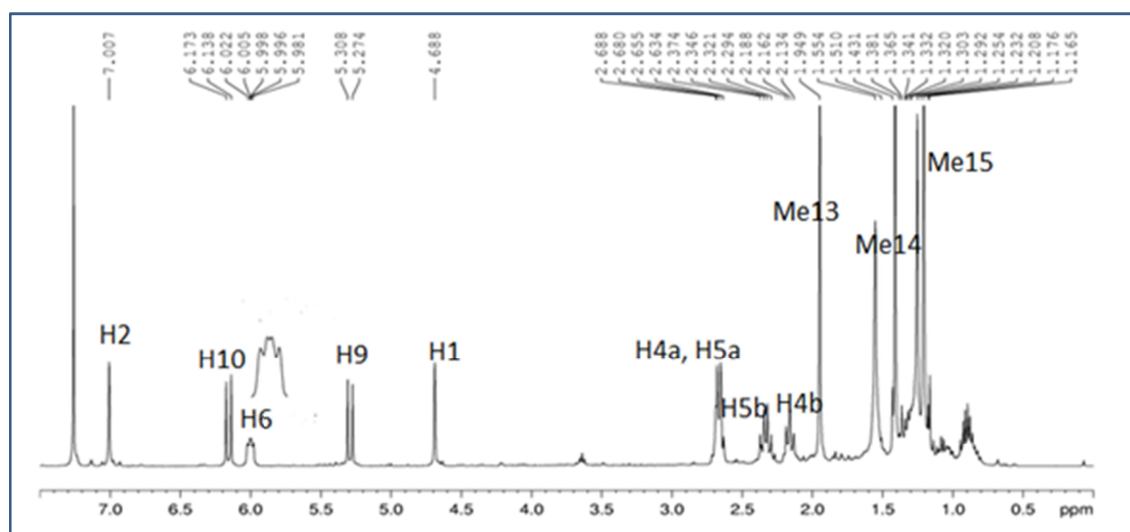


Un examen approfondie du spectre RMN ^1H du composé A, montre un ensemble de signaux qui sont les suivants :

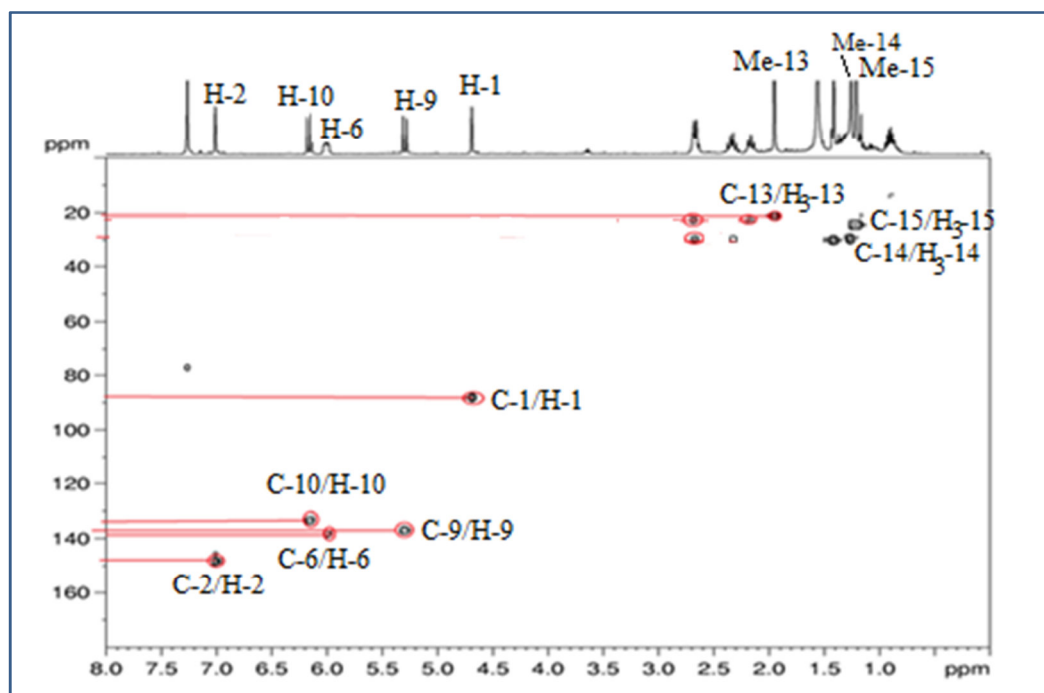
- ✓ Un singulet large résonant à $\delta_{\text{H}} = 7,00$ ppm attribuable à H-2 ;
- ✓ Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,16$ ppm avec ($J = 13,9\text{Hz}$) attribuable à H-10 ;
- ✓ Un doublet de doublet à $\delta_{\text{H}} = 6,00$ ppm avec ($J = 10,0$; $6,4$ Hz) attribuable à H-6 ;
- ✓ Un doublet à $\delta_{\text{H}} = 5,29$ ppm avec ($J = 13,9$ Hz) attribuable à H-9 ;
- ✓ Un singulet large résonant à $\delta_{\text{H}} = 4,96$ ppm attribuable à H-1 ;
- ✓ Trois singulets d'intégration 3H chacun à $1,95$; $1,41$ et $1,21$ ppm attribuable à trois groupements méthyles.

Un retour vers le spectre hétéronucléaire (^1H - ^{13}C) : HSQC à courte distance, permet de distinguer les déplacements chimiques des carbones aux déplacements respectifs de leurs protons établis plus haut :

- ✓ C-2 ($\delta_H = 7,00$; $\delta_c = 148,2$) ;
- ✓ C-10 ($\delta_H = 6,16$; $\delta_c = 133,3$) ;
- ✓ C-6 ($\delta_H = 6,00$; $\delta_c = 138,0$) ;
- ✓ C-9 ($\delta_H = 5,29$; $\delta_c = 136,8$) ;
- ✓ C-1 ($\delta_H = 4,96$; $\delta_c = 87,8$) ;
- ✓ C-14 ($\delta_H = 1,41$; $\delta_c = 29,7$) ;
- ✓ C-15 ($\delta_H = 1,21$; $\delta_c = 24,3$) ;
- ✓ C-13 ($\delta_H = 1,95$; $\delta_c = 20,9$) ;

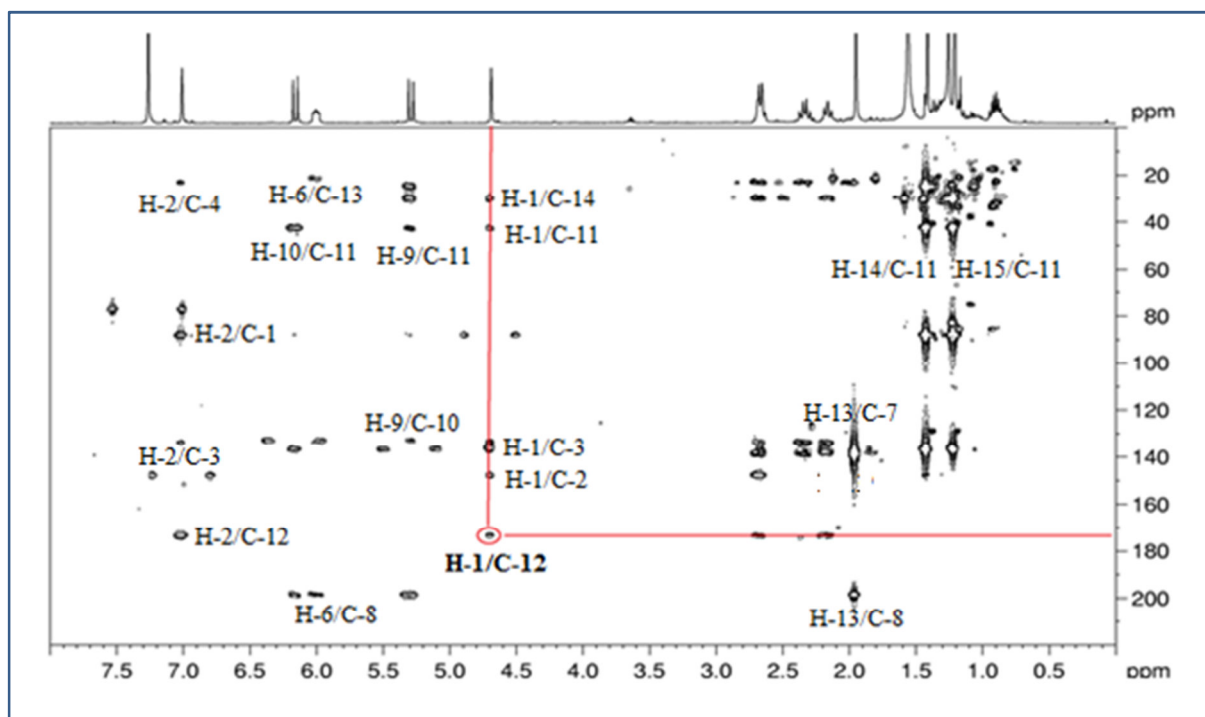


Spectre-42 : Spectre RMN 1H ($CDCl_3$; 400 MHz) du composé A.



Spectre-43 : Spectre HSQC ($CDCl_3$; 400 MHz) du composé A.

Quant à la présence du cycle γ -lactonique dans ce composé, il est confirmé par la présence sur le spectre HMBC (spectre-44) d'une tache de corrélation entre le carbone C-12 du carbonyle à $\delta_c = 173,3$ ppm et le proton H-1 du groupement méthine oxygéné à $\delta_H = 4,69$ ppm ($\delta_c = 87,8$ ppm).



Spectre-44: Spectre HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) du composé A

Une analyse approfondie a été effectuée simultanément sur le spectre homonucléaire COSY et hétéronucléaire HMBC, afin de reconstruire cette molécule et confirmer l'attribution de l'ensemble de ces atomes (protons et carbones).

Le spectre COSY (spectre-45) montre une tache de corrélation entre le proton H-1 du groupement méthine oxygéné et le proton H-2 du groupement CH éthylénique à $\delta_H = 7,00$ ppm ($\delta_c = 148,2$ ppm). Ce proton éthylénique montre également deux taches de corrélations sur le spectre HMBC, l'une avec le carbone C-12 du carbonyle qui résonne à $\delta_c = 173,4$ ppm et la seconde avec le carbone C-4 du groupement méthylène qui se déplace à $\delta_c = 22,4$ ppm. Ceci indique sans nul doute que la double liaison qui porte ce proton éthylénique est délimitée par un carbone quaternaire éthylénique, en l'occurrence le C-3 ($\delta_c = 137,8$ ppm) qui montre une tache de corrélation avec ce même proton éthylénique, et que ce carbone quaternaire éthylénique est lié au groupement CH_2 ($\delta_{Ha} = 2,68$; $\delta_{Hb} = 2,16$ ppm) d'une part et au groupement carbonyle ($\delta_c = 173,3$ ppm) d'autre part.

Un retour sur le spectre (COSY), indique la présence d'un second groupement méthylène dont les deux protons magnétiquement non équivalents et qui résonnent sous forme de deux

multiplets chacun à ($\delta_{\text{H}} = 2,68$ et $2,37$ ppm), montrent deux taches de corrélations : l'une avec les protons du groupement antérieur CH_2 et la seconde avec le proton H-6 d'un autre groupement CH éthylénique, résonnant sous forme d'un doublet de doublets à $\delta_{\text{H}} = 6,00$ ppm ($J = 10,0 ; 6,4$ Hz).

A ce stade de notre analyse, on peut proposer l'entité-1 suivante :

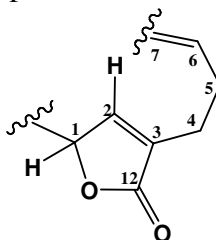
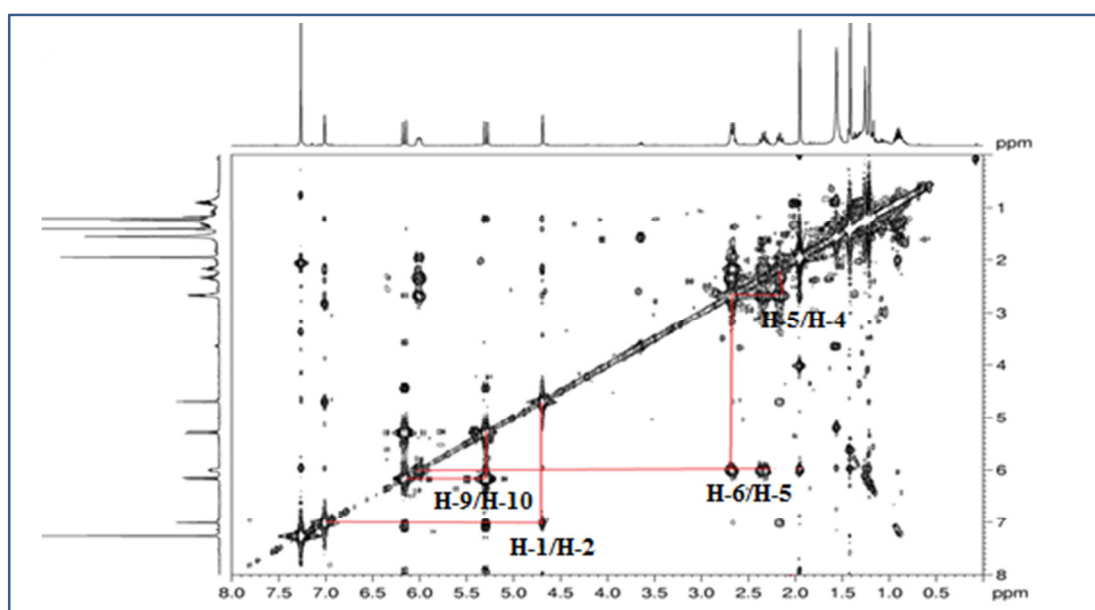


Figure-21 : Entité-1 du composé A.



Spectre-45: Spectre COSY (400 MHz, CDCl_3) du composé A.

Par ailleurs, un retour vers le spectre HMBC montre une tache de corrélation entre le proton H-1 du groupement CH de la fermeture de la lactone, avec un carbone quaternaire à $\delta_{\text{C}} = 41,8$ ppm, en l'occurrence le C-11. Ce dernier corrèle clairement avec les protons des deux groupements méthyles qui résonnent sous formes de deux singulets chacun à $\delta_{\text{H}} = 1,41$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 29,7$ ppm) et $\delta_{\text{H}} = 1,21$ ppm ($\delta_{\text{C}} = 24,3$ ppm), ce qui place ces deux groupements méthyle sur ce carbone, le C-11, en position vicinale au carbone C-1 de la fermeture de la lactone.

Le carbone quaternaire (C-11) montre également deux taches de corrélations avec les deux protons des deux groupements éthyléniques CH ($\delta_{\text{C}-9} = 133,3$ ppm, $\delta_{\text{C}-10} = 136,8$ ppm) qui résonnent, respectivement, sous formes de doublet chacun à : $\delta_{\text{H}-9} = 6,16$ ppm ($J = 13,9$ Hz) et

$\delta_{H-10} = 5,29$ ppm ($J = 13,9$ Hz) et qui corrèlent entre eux dans le spectre COSY ; ceci place la double liaison en position vicinale de ce carbone quaternaire le C-11.

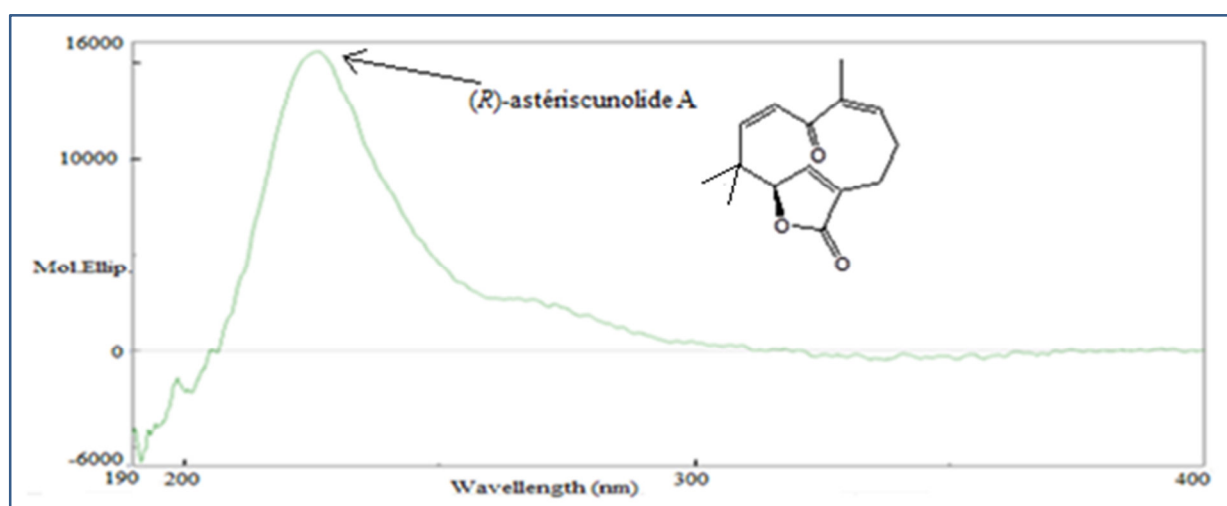
Par ailleurs, ces deux protons éthyléniques montre sur le spectre HMBC, deux taches de corrélation avec le carbonyle d'une cétone ce qui la place en position vicinale de la double liaison qui porte ces deux protons. Quant à ce carbonyle, il corrèle avec les protons d'un troisième groupement méthyle à $\delta_H = 1,95$ ppm, à savoir le Me-13, et les protons de ce dernier corrèlent à leur tour avec le carbone quaternaire éthylénique C-7 à $\delta_c = 133,9$ ppm.

Ainsi, la corrélation de ce groupement carbonyle avec les protons du méthyle dont la multiplicité du signal (singulet) est en faveur de la présence de ce carbone quaternaire éthylénique C-7 placé entre ce carbonyle à $\delta_c = 198,4$ ppm et le groupement CH éthylénique à $\delta_c = 138,0$ ppm dont le proton, en l'occurrence le H-6 corrèle avec ce Me-13 à $\delta_c = 20,9$ ppm.

L'analyse spectrale du composé A, nous a enfin permis de construire la structure de notre molécule (figure-20), et en complément à cette étude, une analyse stéréochimique a montré les résultats suivants :

✓ La valeur positive du pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D = + 62,7$ ($C = 0,11$ mg/L; $CHCl_3$) et le profil du spectre DCE (dichroïsme circulaire électronique), (spectre-46) du composés A, sont opposés aux données de la littérature [17, 19].

Donc l'effet Cotton positif et $[\alpha]_D > 0$, indiquent que ce nouveau astériscunolide ne peut-être que l'énantiomère de celui rapporté dans la littérature à savoir le : (-)-(1*S*)-astériscunolide, notre composé serait donc le : (+)-(1*R*)-astériscunolide A.

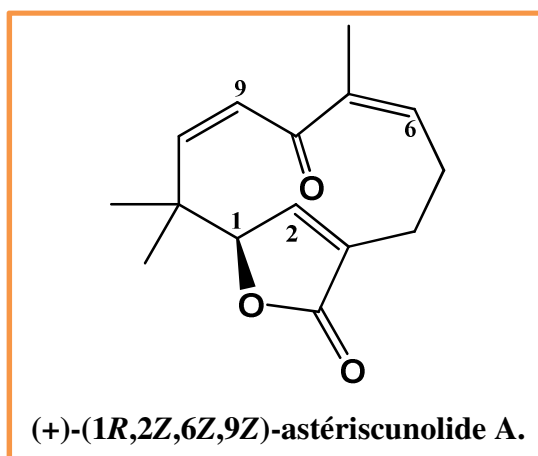


Spectre-46 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé A (*n*-hexane).

✓ Par ailleurs, la géométrie de la double liaison Δ^2 est de configuration *Z* typique d'un cycle γ -lactonique.

- ✓ Et la géométrie de la double liaison Δ^9 est de configuration *Z* conformément aux valeurs : de la constante de couplage ($J_{H-9, H-10} = 13,9$ Hz) et des déplacements chimiques en RMN ^{13}C des carbones allyliques C-9 ($\delta_c = 136,8$ ppm) et C-10 ($\delta_c = 133,3$ ppm).
- ✓ Quant à la géométrie de la double liaison Δ^6 , elle est de configuration *Z* due aux valeurs des déplacements chimiques RMN ^{13}C du carbone allylique C-6 ($\delta_c = 138,0$ ppm) et du carbone du groupement méthyle C-13 ($\delta_c = 20,9$ ppm).

L'ensemble de ces données mènent à la structure finale du composé **A**, reportée dans la figure suivante :



Les données spectroscopiques relatives à cette molécule sont rassemblées dans le tableau-16, suivant :

Tableau-16 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (400 Mz, CDCl_3) et ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) du composé A.

Positions	(+)-(1R,2Z,6Z,9Z)-asteriscunolide A		
	δ_c (ppm), (DEPT)	δ_H (ppm), mult., <i>J</i> (Hz)	Corrélation HMBC
1	87,8 (CH)	4,69 <i>s</i>	C-1/H-2
2	148,2 (CH)	7,00 <i>s</i>	C-2/H-1
3	137,8 (C)	-	C-3/H-1
4 a	22,4 CH ₂	2,68 <i>m</i>	C-4/H-2
4 b	-	2,16 <i>m</i>	-
5 a	29,4 (CH ₂)	2,68 <i>m</i>	-
5 b	-	2,37 <i>m</i>	-
6	138 (CH)	6,00 <i>dd</i> (6.4, 10)	-
7	133,9 (C)	-	C-7/H ₃ -13
8	198,4 (C)	-	C-8/H ₃ -13
9	136,8 (CH)	5,29 <i>d</i> (13.9)	-
10	133,3 (CH)	6,16 <i>d</i> (13.9)	C-10/H-9
11	41,8 (C)	-	C-11/H-1; H-9; H-10; H ₃ -14; H ₃ -15
12	173,3 (C)	-	C-12/H-1
13	20,9 (CH ₃)	1,95 <i>s</i>	-
14	29,7 (CH ₃)	1,41 <i>s</i>	-
15	24,3 (CH ₃)	1,21 <i>s</i>	-

II.2 Identification structurale des composés B, C et D :

L'examen des spectres de masse à haute résolution des composés respectifs B, C et D enregistré en mode électronébulisation positive (TOF-HRESI-MS(+)) montre la présence d'un même ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ correspondant à la même formule brute $C_{15}H_{18}O_3$ que le composé A.

Cependant, l'analyse des spectres RMN du proton et du carbone ^{13}C des composés B, C et D a révélé une relation structurale étroite avec le composé A, indiquant la présence d'un ensemble de signaux relatifs à la même structure plane. Les seules différences structurales résident dans la géométrie des doubles liaisons Δ^6 , Δ^9 et/ou dans les valeurs de certains déplacements chimiques en RMN ^{13}C et RMN 1H .

II.2.1 Identification structurale du composé B :

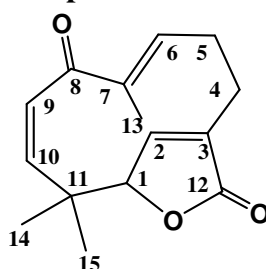
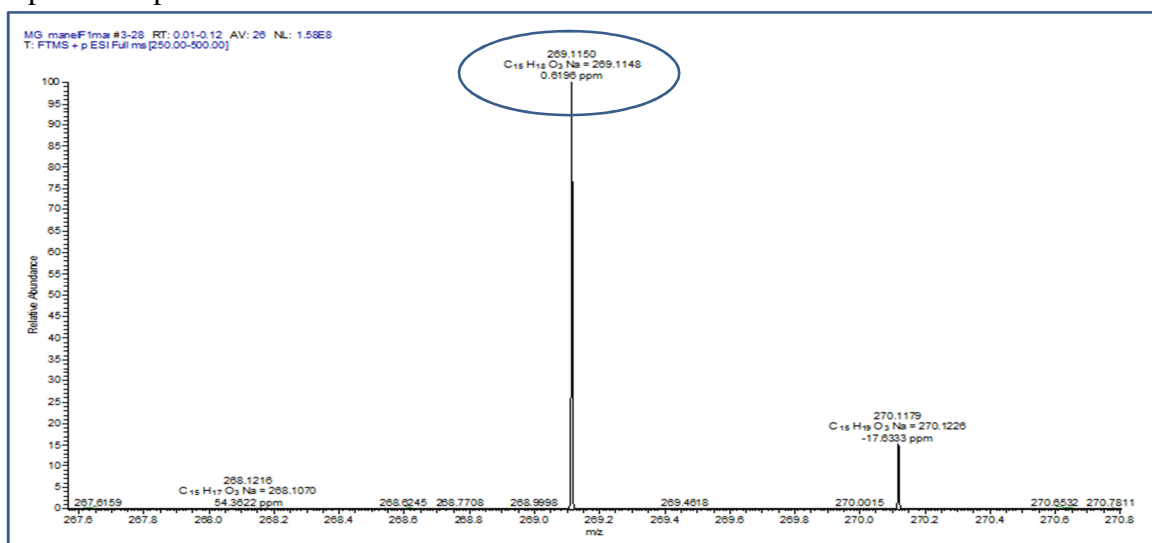


Figure-22 : Le composé B.

L'asteriscunolide B (composé-B) a la même formule moléculaire ($C_{15}H_{18}O_3$) que le composé A, indiqué par la présence d'un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ dans le spectre de masse à haute résolution (TOF-HRESI-MS(+)) (spectre-47), à $m/z = 269,1150$ Da correspondant à la formule brute de $C_{15}H_{18}O_3Na$ (calculée 269,1148 Da), soit une structure de masse de 246 Da comportant sept insaturations.



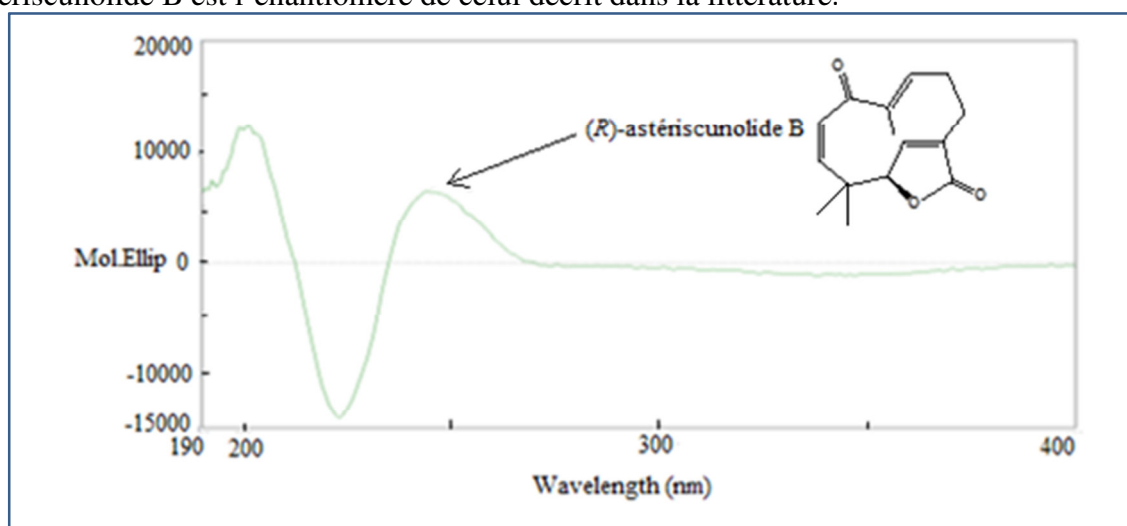
Spectre-47: Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé B.

Une analyse comparative entre les données spectrales de la RMN ^1H et ^{13}C , (tableau-17), des composés A et B, montre qu'il s'agit de deux structures identiques qui ne diffèrent que par la géométrie de la double liaison trisubstituée Δ^6 , en particulier, où le déplacement chimique du carbone C-6 à $\delta_c = 152,8$ ppm est nettement plus élevée et celui du carbone C-13 à $\delta_c = 10,6$ ppm nettement plus faible, comparées à ceux du composé A. Ces observations indiquent clairement que le composé B est l'isomère **6E** du composé A.

Quant à l'analyse stéréochimique complémentaire, elle indique :

- ✓ Une valeur du pouvoir rotatoire spécifique positive : $[\alpha]_D = +7,4$ ($C = 0,14$ mg/L; CHCl_3)
- ✓ Un effet Cotton positif dans le spectre DCE (spectre-48) du composés B.

Ces données sont opposés à ceux de la littérature [17-19]; ceci montre que notre asteriscunolide B est l'énantiomère de celui décrit dans la littérature.



Spectre-48 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé B (*n*-hexane).

Ainsi, l'originalité de notre composé B réside uniquement dans son activité optique, il est l'inverse optique de celui décrit dans la littérature. Sa structure est la suivante :

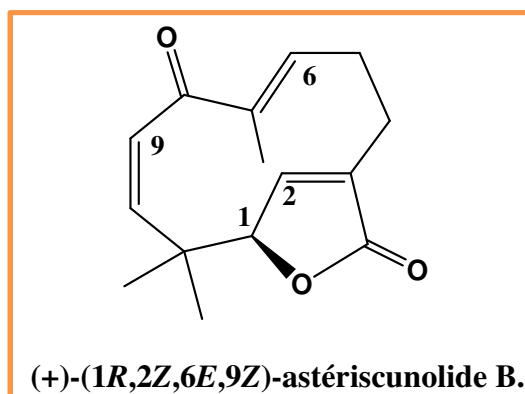
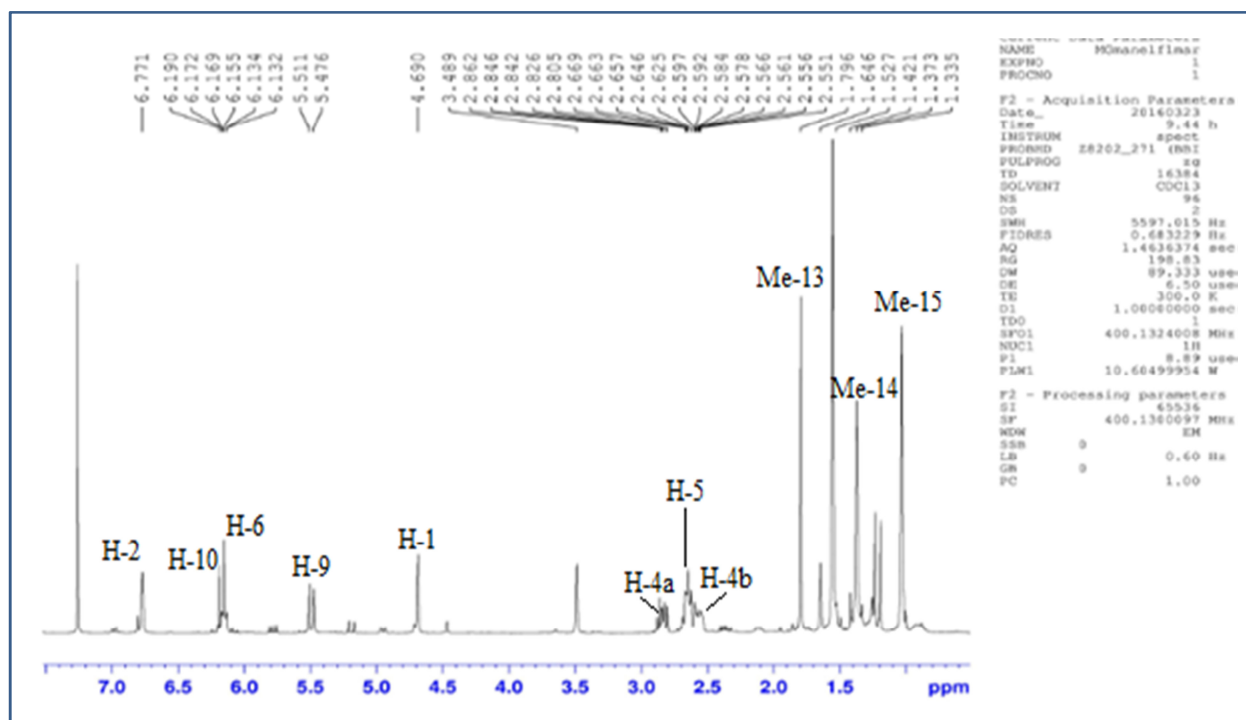


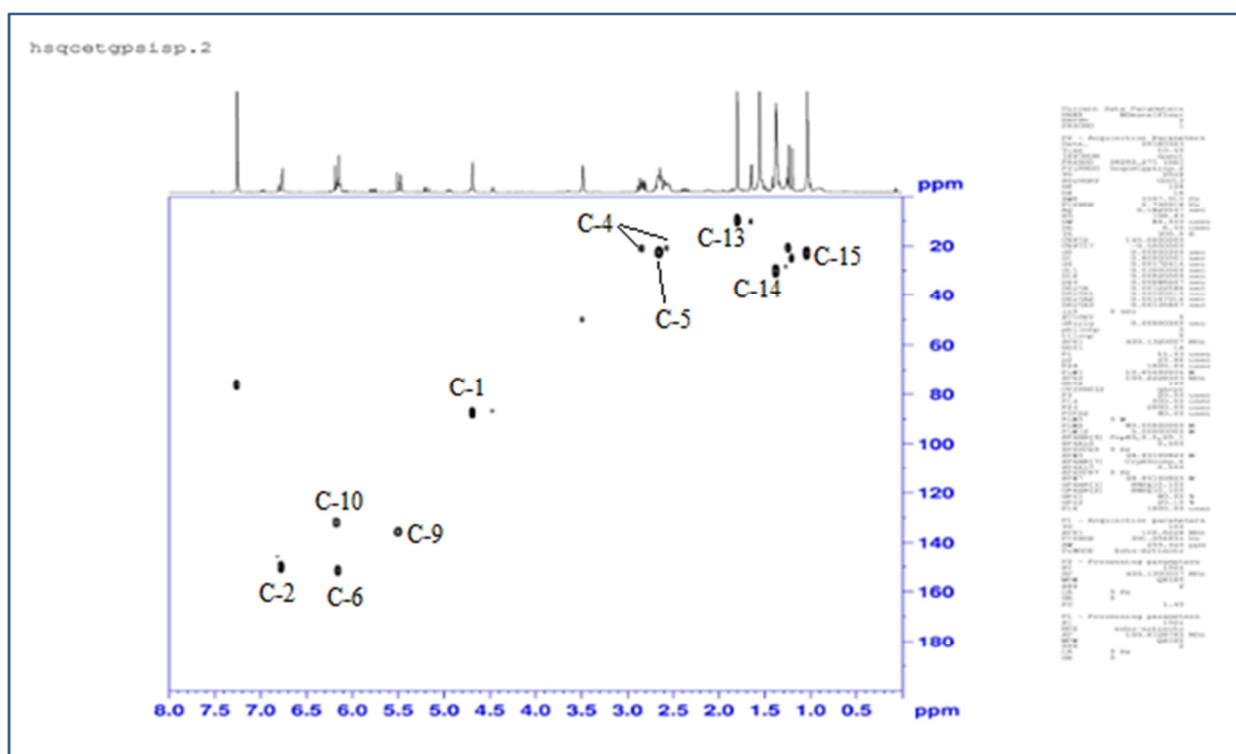
Tableau-17 : Données de la spectroscopie de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), et ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) des composés A et B.

Positions	Composé A (+)-(1R,2Z,6Z,9Z)-asteriscunolide A.		Composé B (+)-(1R,2Z,6E,9Z)-asteriscunolide B.	
	δ (ppm); J (Hz)			
	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mult., J	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mult., J
1	87,8 (CH)	4,69 <i>s</i>	88,1 (CH)	4,69 <i>s</i>
2	148,2 (CH)	7,00 <i>s</i>	151,3 (CH)	6,77 <i>s</i>
3	137,8 (C)	-	136,8 (C)	-
4 a	22,4 (CH_2)	2,68 <i>m</i>	21,9 (CH_2)	2,84 <i>m</i>
4 b		2,16 <i>m</i>		2,56 <i>m</i>
5 a	29,4 (CH_2)	2,68 <i>m</i>	23,4 (CH_2)	2,65 <i>m</i>
5 b		2,37 <i>m</i>		2,65 <i>m</i>
6	138 (CH)	6,00 <i>dd</i> (6,4; 10)	152,8 (CH)	6,15 <i>m</i>
7	133,9 (C)	-	137,9 (C)	-
8	198,4 (C)	-	199,4 (C)	-
9	136,8 (CH)	5,29 <i>d</i> (13,9)	136,6 (CH)	5,49 <i>d</i> (14,1)
10	133,3 (CH)	6,16 <i>d</i> (13,9)	132,6 (CH)	6,17 <i>d</i> (14,1)
11	41,8 (C)	-	42,1 (C)	-
12	173,3 (C)	-	173,1 (C)	-
13	20,9 (CH_3)	1,95 <i>s</i>	10,6 (CH_3)	1,80 <i>sl</i>
14	29,7 (CH_3)	1,41 <i>s</i>	31,1 (CH_3)	1,37 <i>s</i>
15	24,3 (CH_3)	1,21 <i>s</i>	23,8 (CH_3)	1,03 <i>s</i>

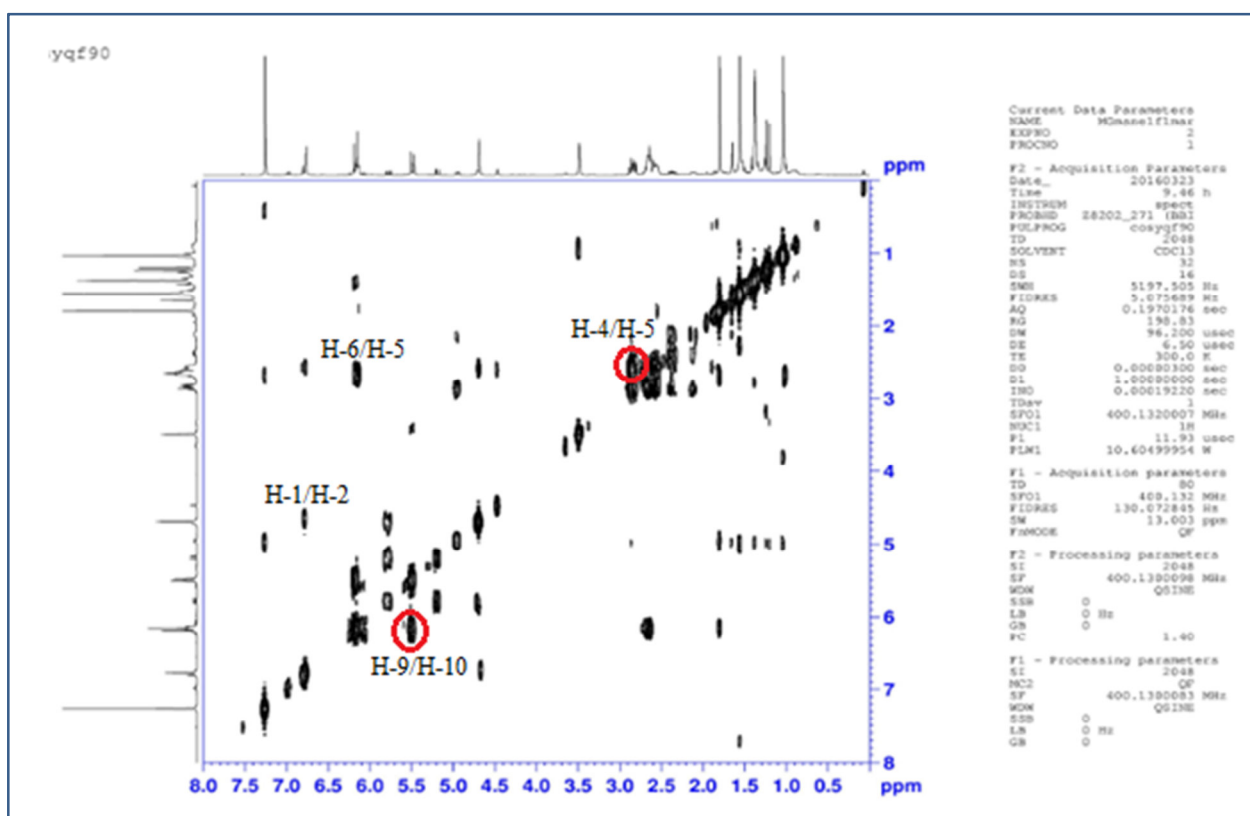
Les séries spectrale RMN mono et bidimensionnelle du composé B, sont reportées ci-dessous :



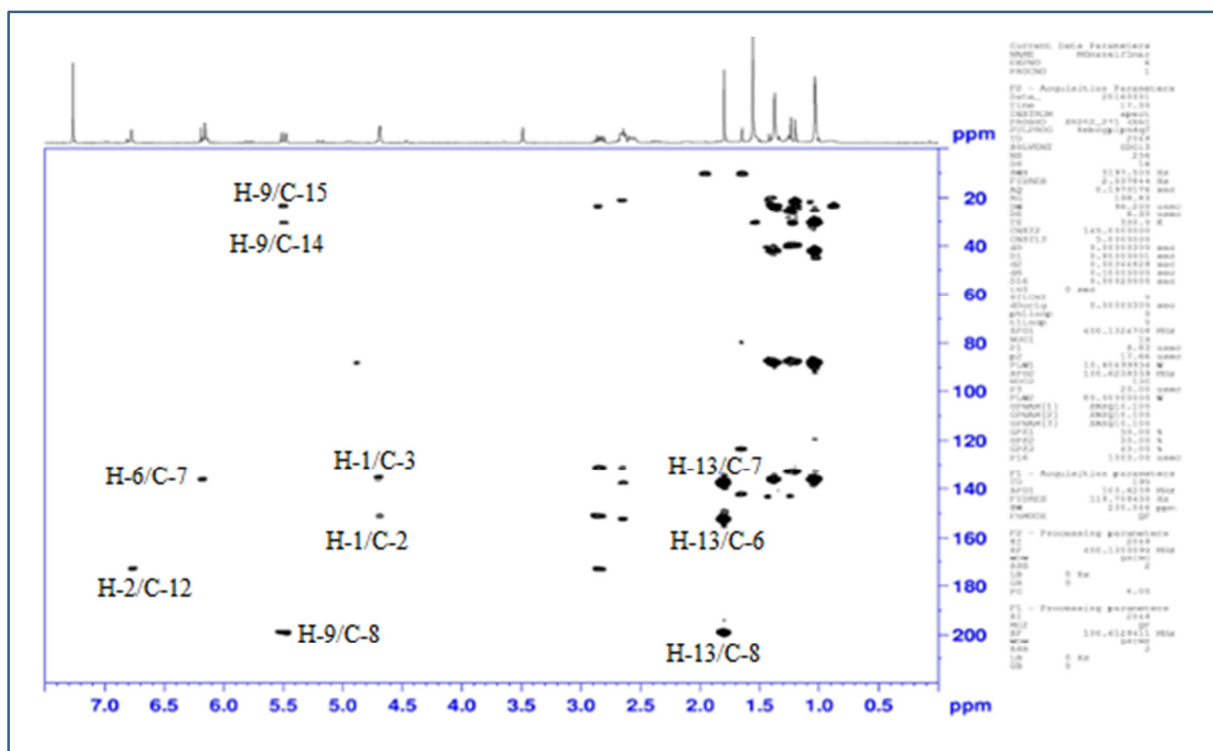
Spectre-49 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) du composé B.



Spectre-50 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃) du composé B.



Spectre-51 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé B.



Spectre-52 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃) du composé B.

II.2.2 Identification structurale du composé C :

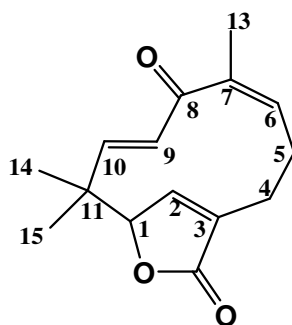
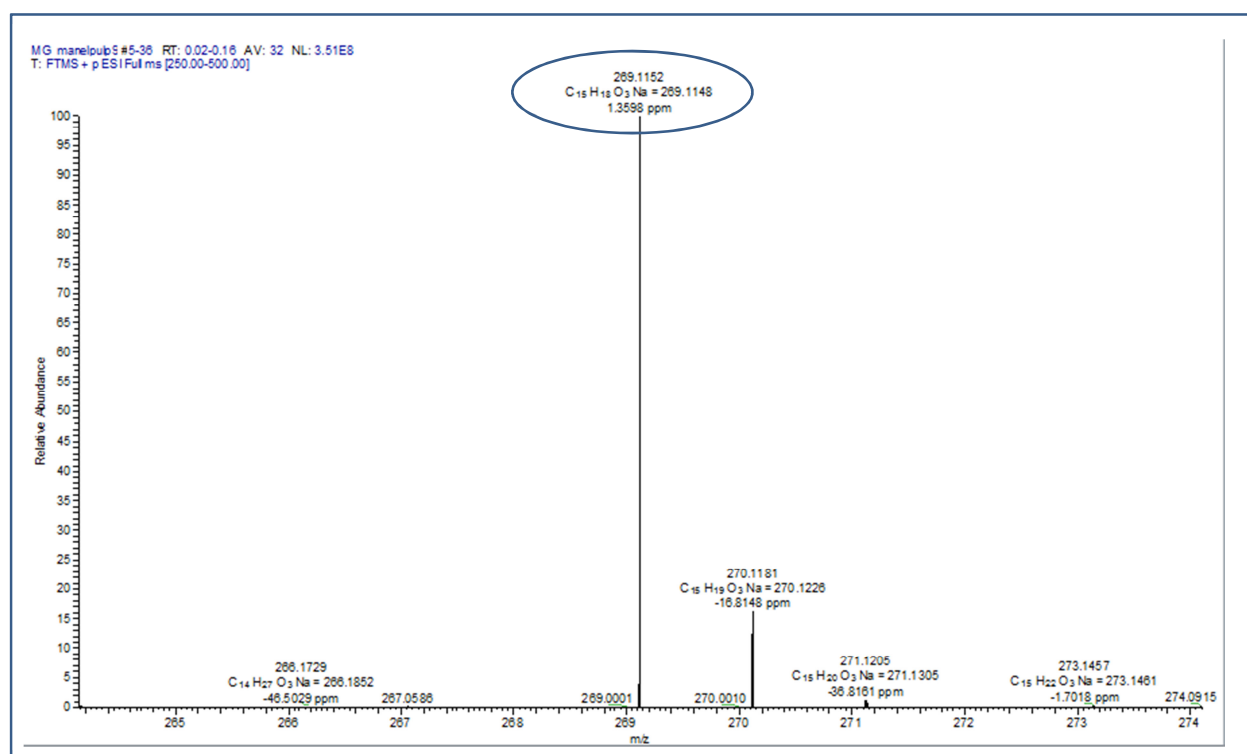


Figure-23 : Le composé C.

L'asteriscunolide B et le composé C possède la même formule brute de $C_{15}H_{18}O_3$ que l'asteriscunolide A ; soit une structure de masse de 246 Da comportant sept insaturations.

En effet le spectre de masse à haute résolution (TOF-HRESI-MS (+)) du composé C (spectre-53), indique le même ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 269,1152$ Da correspondant à la formule de $C_{15}H_{18}O_3Na$ (calculée 269,1148 Da).



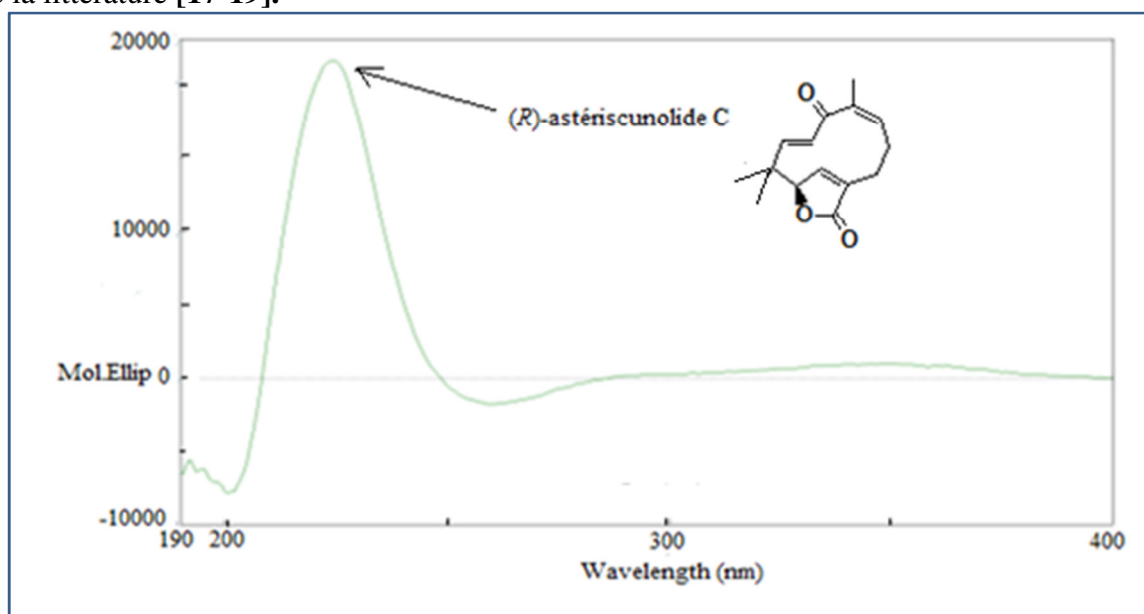
Spectre-53 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé C.

Une analyse comparative entre les données des spectres de RMN 1H et ^{13}C du composé C avec ceux du composé A, (tableau-18), montre une grande similitude à l'exception des valeurs des déplacements chimiques dans la RMN ^{13}C du : carbone C-9 à $\delta_c = 129,0$ ppm, plus faible et du carbone C-10 à $\delta_c = 156,0$ ppm nettement plus élevée, devant celles du composé A.

Par ailleurs la valeur de la constante de couplage de la double liaison Δ^9 , disubstituée, du composé C de : $J_{H9-H10} = 16,8$ Hz est caractéristique d'une géométrie configurationnelle *E*.

Ces données indiquent donc que le composé C, est l'isomère **9E** du composé A.

Quant à la valeur positive du pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D = +109,2$ ($C = 0,11$ mg/L; CHCl_3) et l'effet Cotton positif dans le spectre DCE (spectre-54), ils sont opposés aux données de la littérature [17-19].



Spectre-54 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé C (n-hexane).

L'ensemble de ces données, permet d'établir la structure du composé C, ci-dessous, et d'indiquer que cette nouvelle molécule est l'inverse optique de celle décrite dans la littérature qui est le :(-)-(1*S*)-(2*Z*,6*Z*,9*E*)-asteriscunolide.

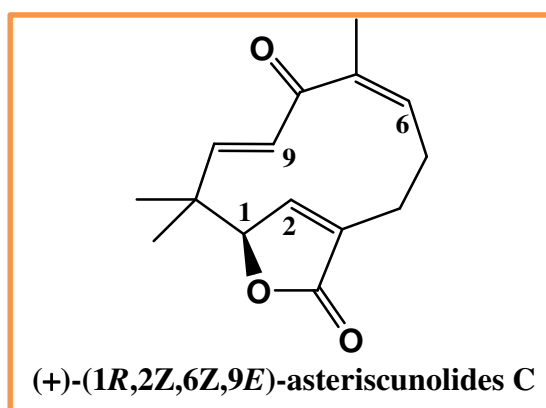
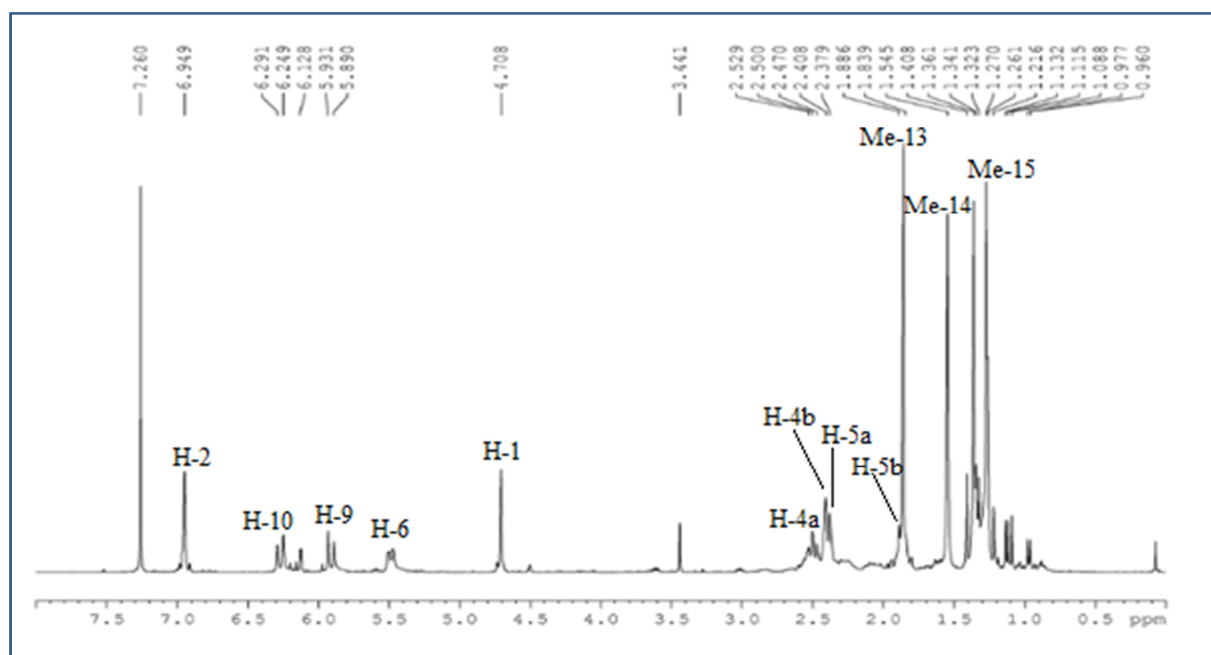


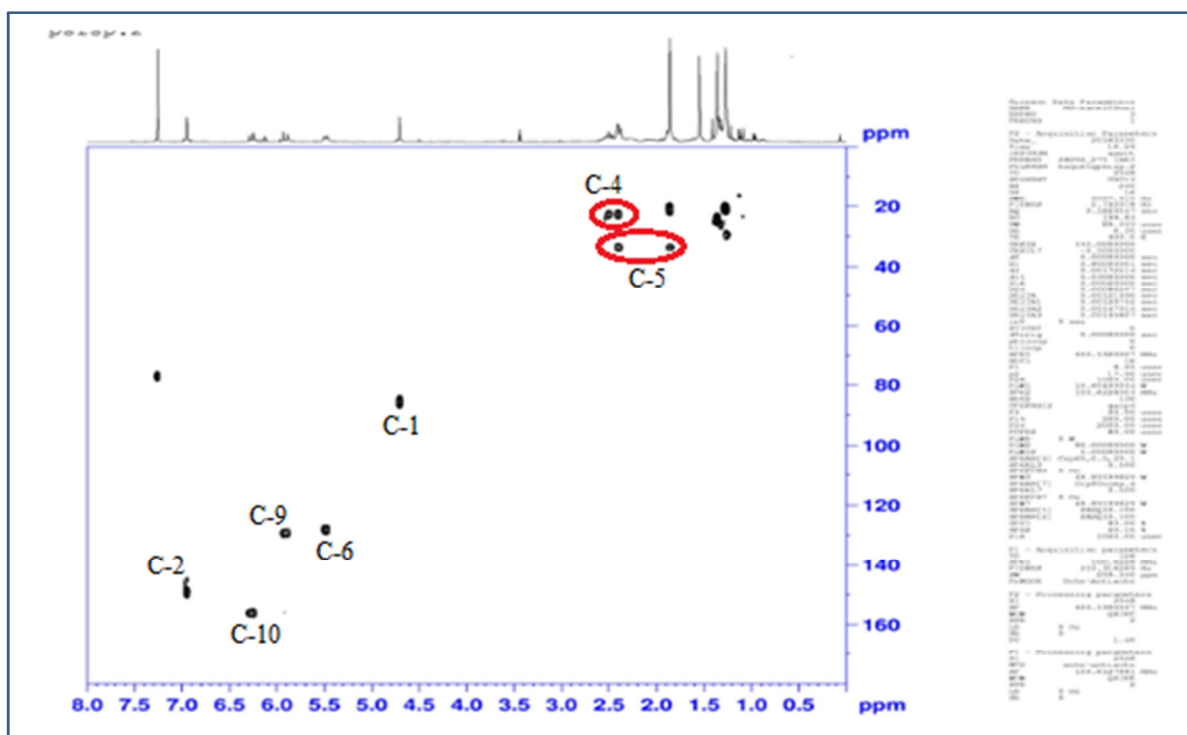
Tableau-18 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) et ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) des composés A et C.

Positions	Composé A (+)-(1R,2Z,6Z,9Z)-asteriscunolide A.		Composé C (+)-(1R,2Z,6Z,9E)-asteriscunolide C.	
	δ (ppm); J (Hz)			
	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mult., J	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mult., J
1	87,8 (CH)	4,69 <i>s</i>	85,7 (CH)	4,71 <i>s</i>
2	148,2 (CH)	7,00 <i>s</i>	149,3 (CH)	6,95 <i>sl</i>
3	137,8 (C)	-	138 (C)	-
4 a	22,4 (CH_2)	2,68 <i>m</i>	22,7 (CH_2)	2,50 <i>m</i>
4 b		2,16 <i>m</i>		2,41 <i>m</i>
5 a	29,4 (CH_2)	2,68 <i>m</i>	33,5 (CH_2)	2,41 <i>m</i>
5 b		2,37 <i>m</i>		1,85 <i>m</i>
6	138 (CH)	6,00 <i>dd</i> (6,4; 10)	128,2 (CH)	5,49 <i>bd</i> (12,2 Hz)
7	133,9 (C)	-	136,7 (C)	-
8	198,4 (C)	-	202,4 (C)	-
9	136,8 (CH)	5,29 <i>d</i> (13,9)	129,0 (CH)	5,91 <i>d</i> (16,8)
10	133,3 (CH)	6,16 <i>d</i> (13,9)	156,0 (CH)	6,27 <i>d</i> (16,8)
11	41,8 (C)	-	40,2 (C)	-
12	173,3 (C)	-	173,2 (C)	-
13	20,9 (CH_3)	1,95 <i>s</i>	21,2 (CH_3)	1,86 <i>sl</i>
14	29,7 (CH_3)	1,41 <i>s</i>	24,3 (CH_3)	1,36 <i>s</i>
15	24,3 (CH_3)	1,21 <i>s</i>	20,9 (CH_3)	1,27 <i>s</i>

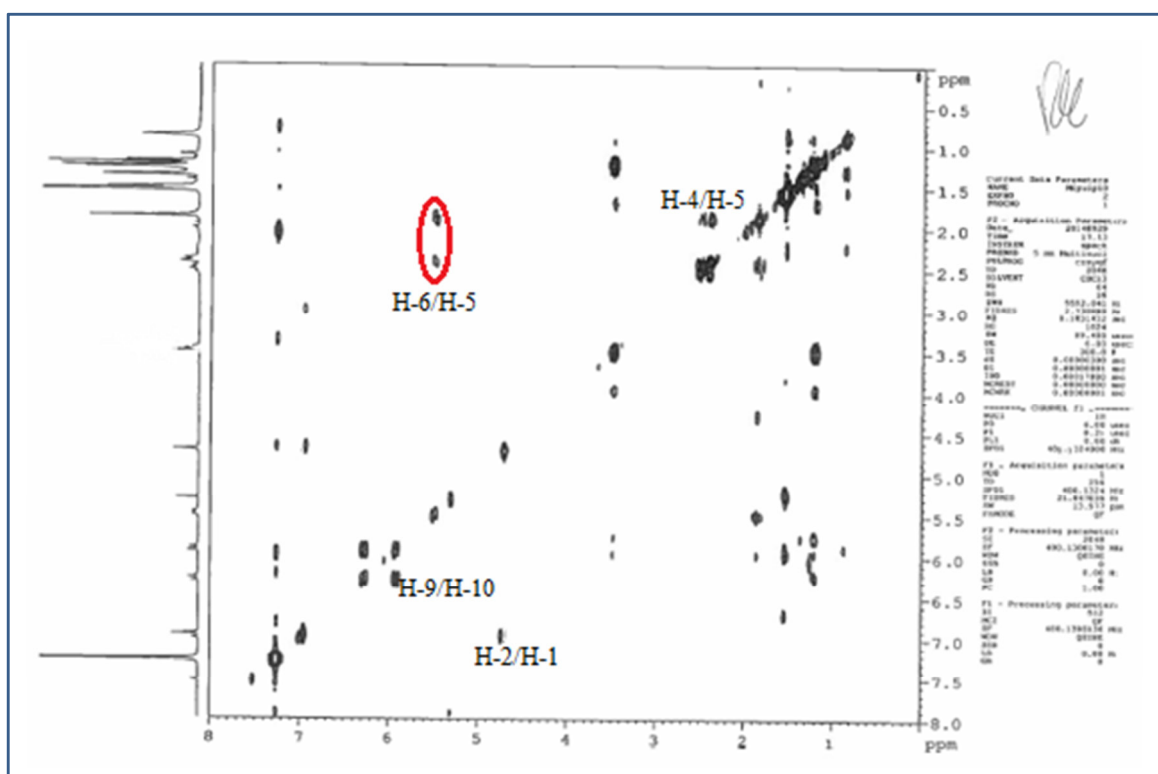
Les séries spectrale RMN mono et bidimensionnelle du composé C, sont reportées ci-dessous :



Spectre-55 : Spectre de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) du composé C.



Spectre-56 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃) du composé C.



Spectre-57 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé C.

II-2-3- Identification structurale du composé D :

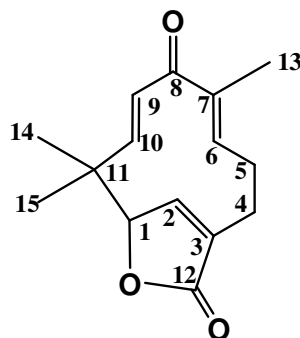


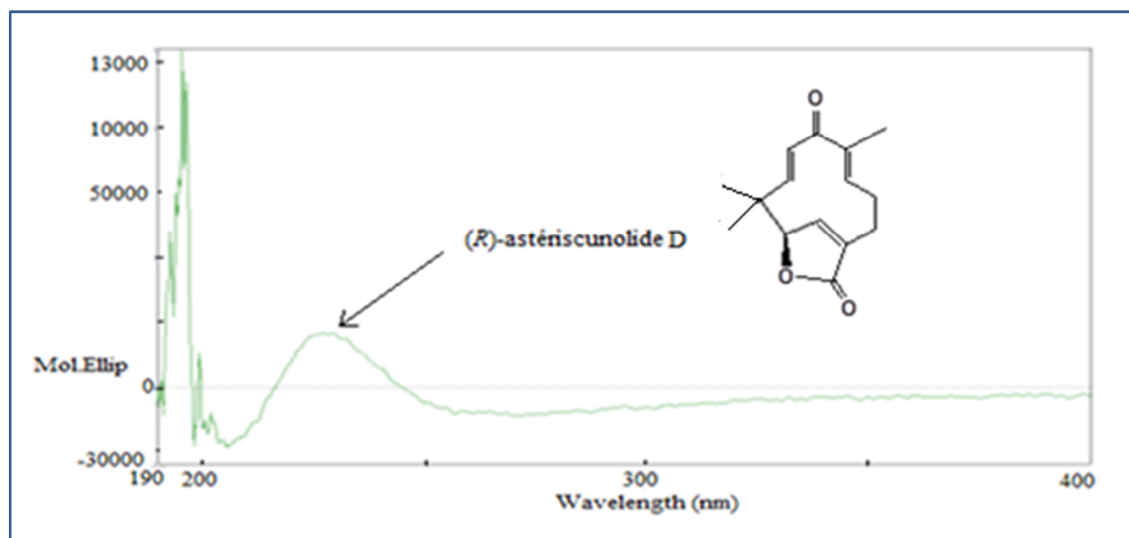
Figure-24 : Le composé D.

Le spectre de masse à haute résolution du composé D montre la même formule moléculaire $C_{15}H_{18}O_3$ que l'astérisculolide A, l'astérisculolide B et l'astérisculolide C.

Cependant, l'analyse des données spectrales RMN 1H et ^{13}C (tableau-19) du composé D, montre clairement quelques différences avec ceux de l'astérisculolide A. En effet les déplacements chimiques en RMN ^{13}C des carbones allyliques : C-10 ($\delta_c = 155,4$ ppm), C-9 ($\delta_c = 129,8$ ppm), C-6 ($\delta_c = 144,9$ ppm), puis la valeur de la constante de couplage ($J_{9,10} = 16,7$ Hz) et le déplacement chimique du carbone C-13 ($\delta_c = 12,2$ ppm) ; sont en faveur d'une géométrie des doubles liaisons Δ^6 et Δ^9 toutes deux de configuration *E* [17-19]. Ces observations indiquent clairement que le composé D est l'isomère **6E, 9E** du composé A.

Par ailleurs, la valeur positive du pouvoir rotatoire spécifique : $[\alpha]_D = +37,1$ ($C = 0,10$ mg/L; $CHCl_3$) et l'effet Cotton positif dans le profil DCE du composé D (spectre-59) opposés aux données de la littérature [17-19], indiquent que le composé D est l'énantiomère du composé : (-)-(1*S*,2*Z*,6*E*,9*E*)-astérisculolides, décrit dans la littérature.

Donc notre composé, nouveau, est : (+)-(1*R*, 2*Z*, 6*E*, 9*E*)-astérisculolides D.



Spectre-59 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé D (*n*-hexane).

Toutes ces données nous ont conduits à la structure finale de ce nouveau composé D ci- dessous :

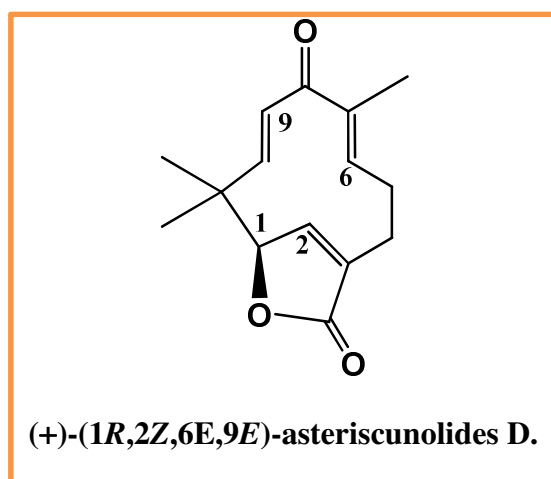
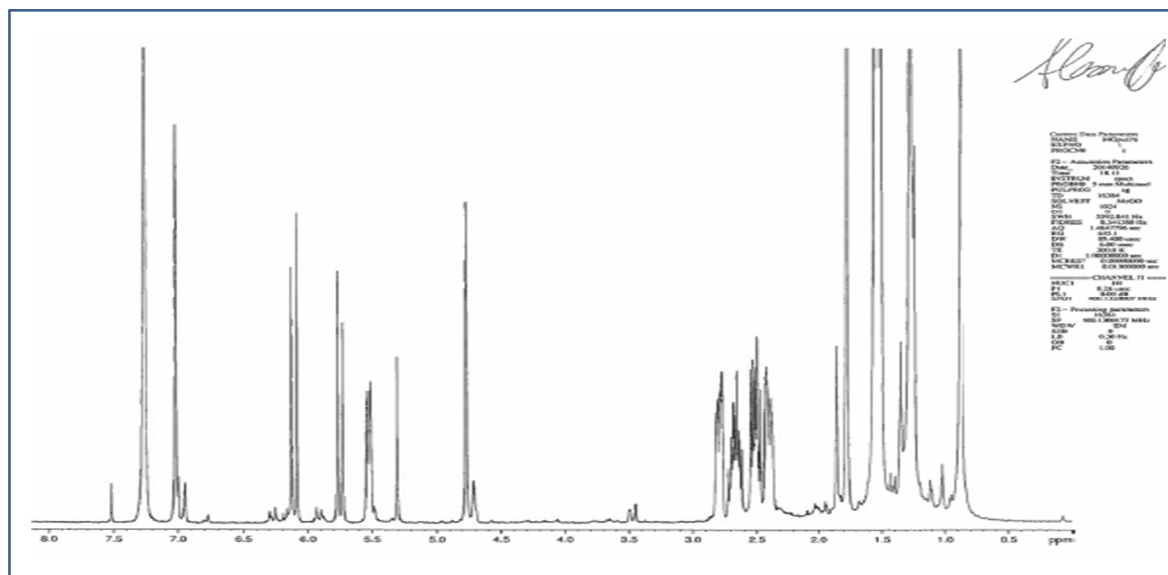


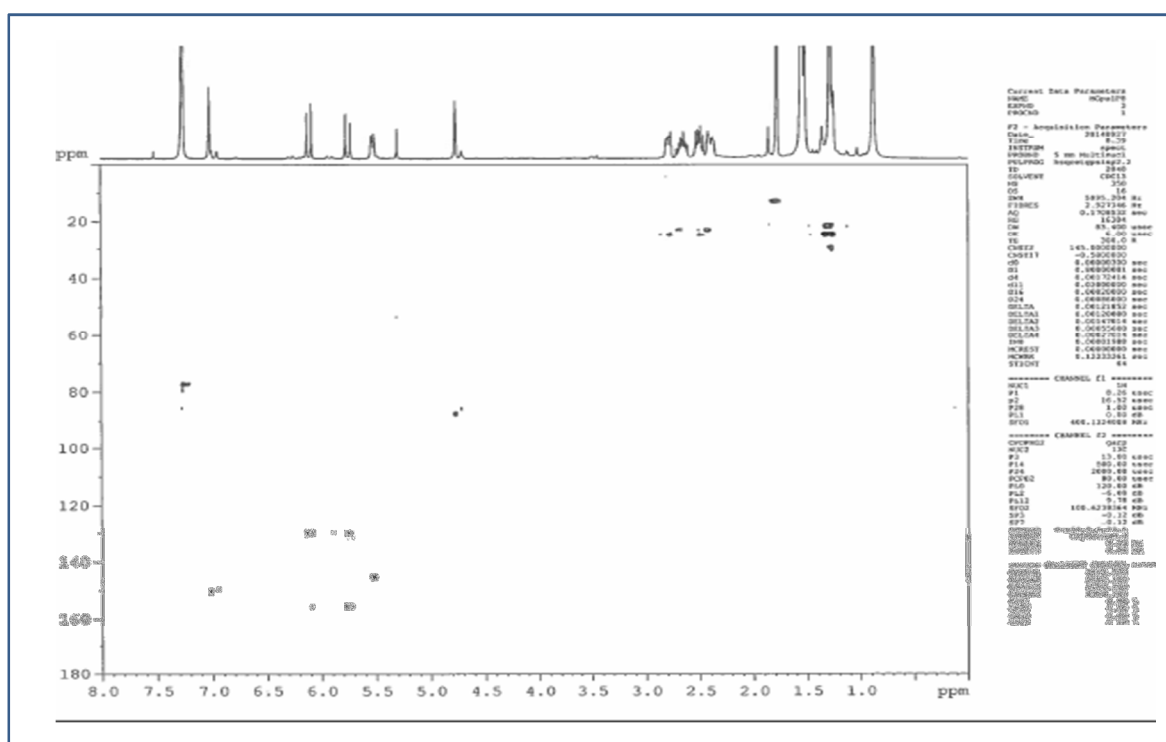
Tableau-19 : Données de la spectroscopie RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), et ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) des composés A et D.

Positions	Composé A (+)-(1R,2Z,6Z,9Z)-asteriscunolide A.		Composé D (+)-(1R,2Z,6E,9E)-asteriscunolide D.	
	δ (ppm); J (Hz)			
	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mult., J	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mult., J
1	87,8 (CH)	4,69 <i>s</i>	87,2 (CH)	4,71 <i>s</i>
2	148,2 (CH)	7,00 <i>s</i>	150,2 (CH)	7,02 <i>sl</i>
3	137,8 (C)	-	139,3 (CH)	-
4 a	22,4 (CH ₂)	2,68 <i>m</i>	24,6 (CH ₂)	2,79 <i>m</i>
4 b		2,16 <i>m</i>		2,50 <i>m</i>
5 a	29,4 (CH ₂)	2,68 <i>m</i>	22,6 (CH ₂)	2,65 <i>m</i>
5 b		2,37 <i>m</i>		2,39 <i>m</i>
6	138 (CH)	6,00 <i>dd</i> (6,4; 10)	144,9 (CH)	5,52 <i>dl</i> (9,1)
7	133,9 (C)	-	139,3 (C)	-
8	198,4 (C)	-	203,6 (C)	-
9	136,8 (CH)	5,29 <i>d</i> (13,9)	129,8 (CH)	5,74 <i>d</i> (16,7)
10	133,3 (CH)	6,16 <i>d</i> (13,9)	155,4 (CH)	6,10 <i>d</i> (16,7)
11	41,8 (C)	-	41,0 (C)	-
12	173,3 (C)	-	172,2 (C)	-
13	20,9 (CH ₃)	1,95 <i>s</i>	12,2 (CH ₃)	1,78 <i>sl</i>
14	29,7 (CH ₃)	1,41 <i>s</i>	21,3 (CH ₃)	1,29 <i>s</i>
15	24,3 (CH ₃)	1,21 <i>s</i>	24,4 (CH ₃)	1,28 <i>s</i>

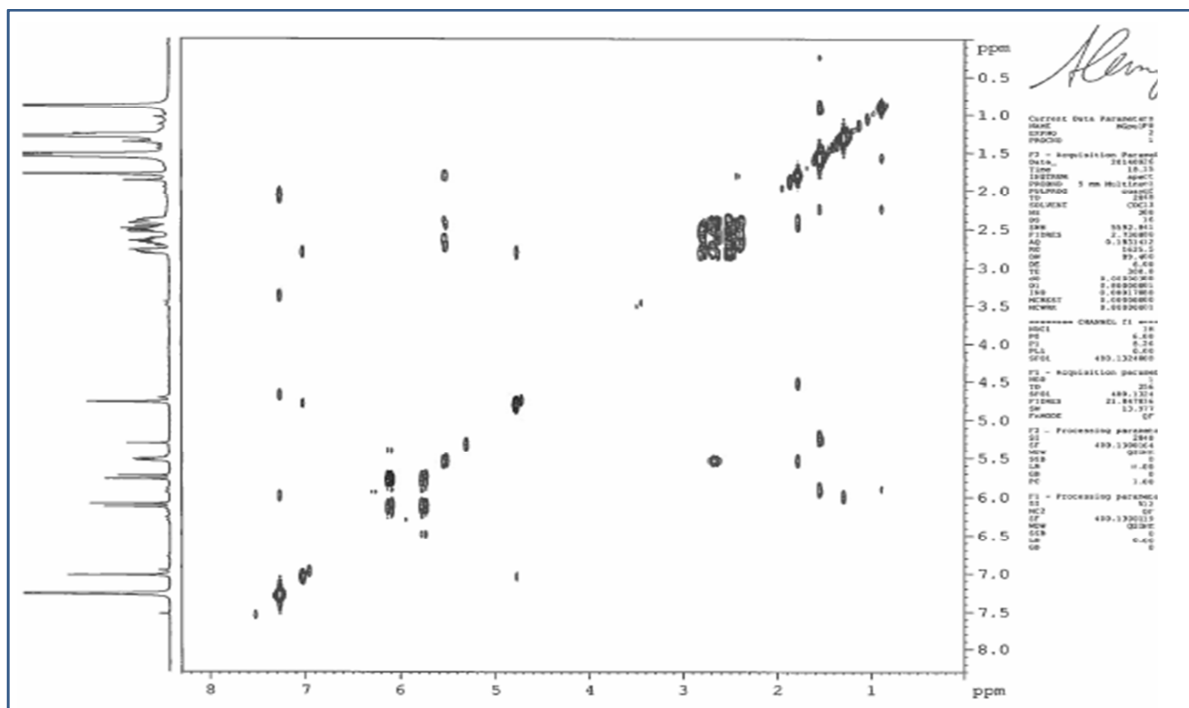
Les séries spectrale RMN mono et bidimensionnelle du composé D, sont reportées ci-dessous :



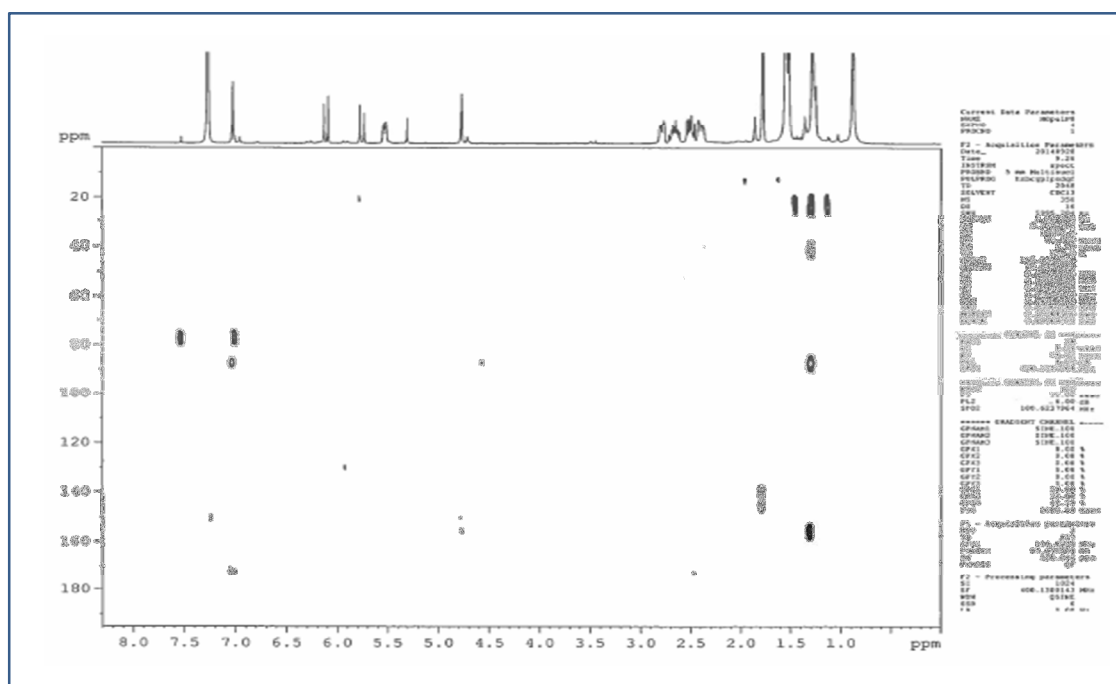
Spectre-60 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) du composé D.



Spectre-61 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃) du composé D.



Spectre-62 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé D.



Spectre-63 : Spectre HMBC (400 MHz, CDCl₃) du composé D.

II.3 Identification structurale du composé T :

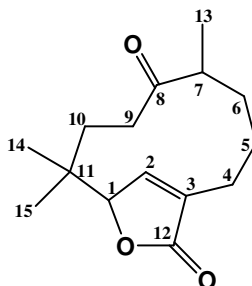
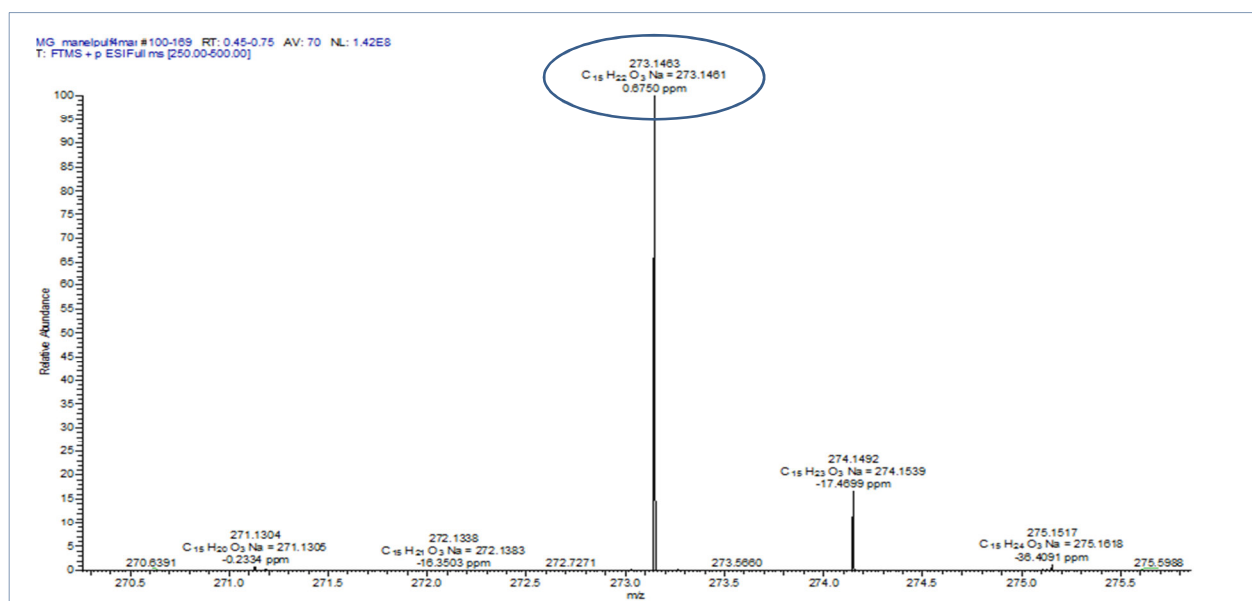


Figure-25 : Le composé T.

Le spectre de masse du composé T à haute résolution enregistré en mode (TOF-HRESI-MS (+)) (spectre-64) montre la présence d'un ion quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 273,1463$ Da correspondant à la formule $C_{15}H_{22}O_3Na$ (calculée 273,1461 Da), indiquant une formule brute de $C_{15}H_{22}O_3$ pour cette molécule ; soit une structure de masse de 250 Da comportant cinq insaturations. Comparé aux asteriscunolide A, B, C et D, on relève deux différences:

- ✓ La présence de quatre hydrogènes supplémentaires.
- ✓ Deux insaturations en moins.



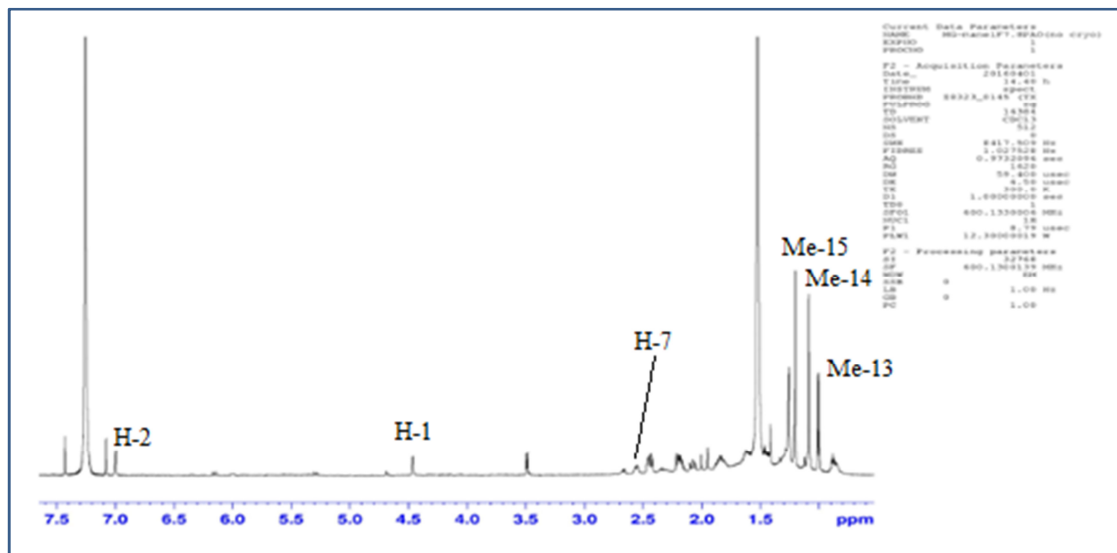
Spectre-64 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé T.

L'examen des spectres RMN 1H des deux composés (A et T), relativement similaires, montre deux nettes différences qui s'expliquent par la présence de ces quatre atomes d'hydrogènes supplémentaires :

- ✓ Le spectre RMN 1H du composé T (spectre-65), ne comporte pas les signaux caractéristiques de la double liaison Δ^9 des asteriscunolides ;

✓ Le signal sous forme d'un doublet d'intégration 3H à $\delta_H = 1,0$ ppm ($J = 7,0$ Hz), est caractéristique d'un groupement méthyle porté par un méthine CH.

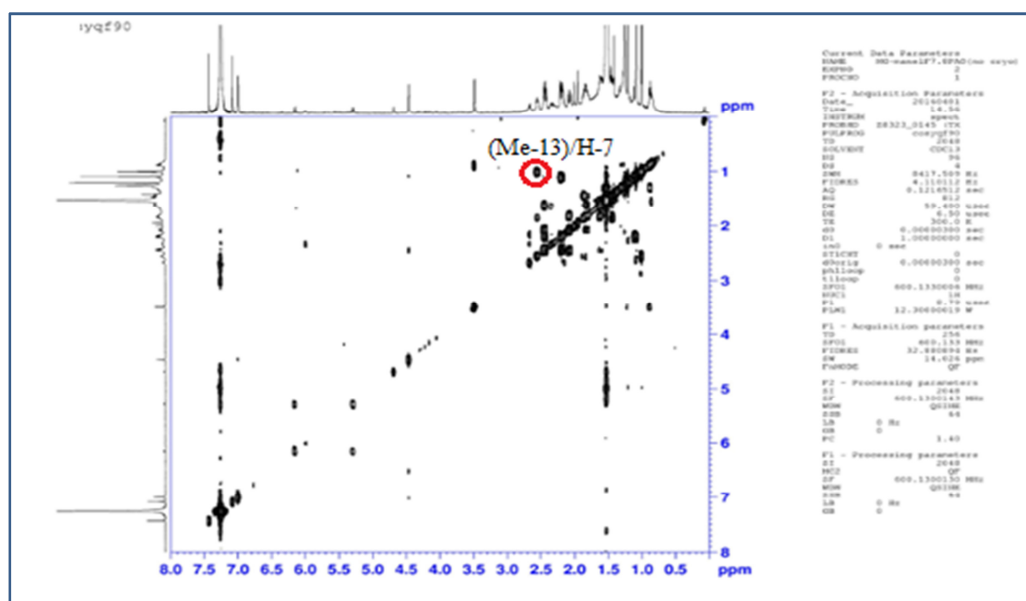
Ces données indiquent, sans nul doute, qu'il y'a eu une réduction des deux doubles liaisons Δ^6 et Δ^9 du squelette astériscunolide.



Spectre-65 : Spectre de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) du composé T.

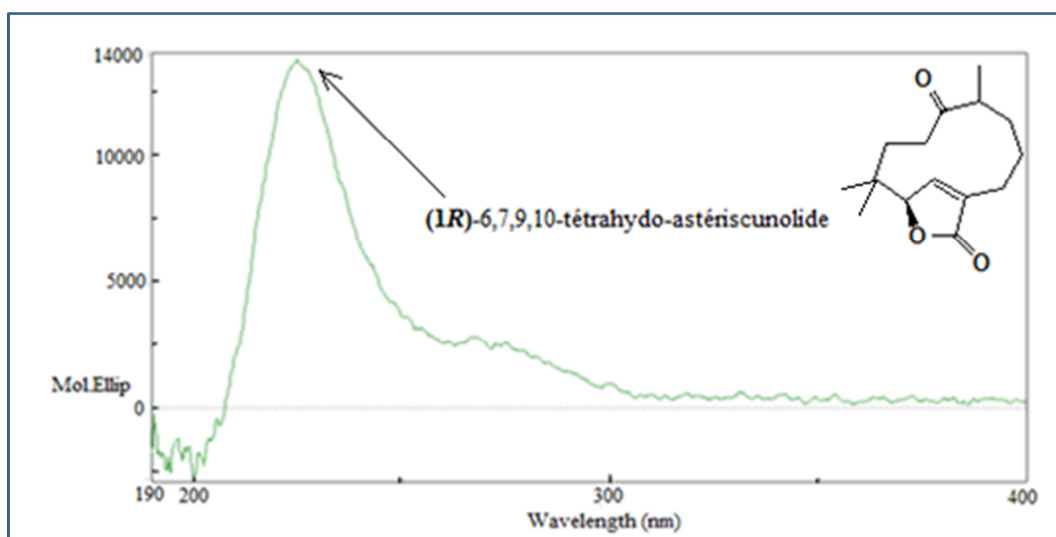
En effet la multiplicité du signal (doublet à $\delta_H = 1,0$ ppm), attribuée au couplage des protons du Me-13 avec l'hydrogène en position 7 et leurs corrélation relevée sur le spectre COSY (spectre-66), confirment que le groupement méthine en position 7 est bien porteur du groupement méthyle, le Me-13.

Ainsi la réduction de la double liaison Δ^6 , a fait apparaitre un second carbone chiral, en l'occurrence le carbone C-7.



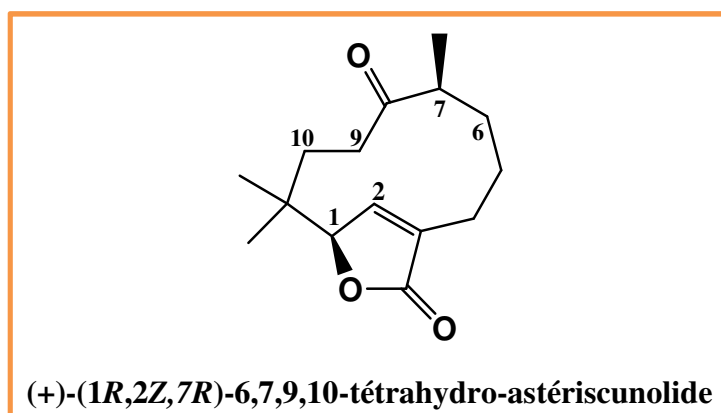
Spectre-66 : Spectre COSY (600 MHz, CDCl_3) du composé T

Le profil du spectre DCE (spectre-67) opposé aux données de la littérature [23-25,29,30] et la valeur du pouvoir rotatoire positive $[\alpha]_D = +8,1$ ($C = 0,25$; CHCl_3) ; indiquent sans ambiguïté que le composé T est l'énantiomère de celui décrit dans la littérature



Spectre-67 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé T (*n*-hexane).

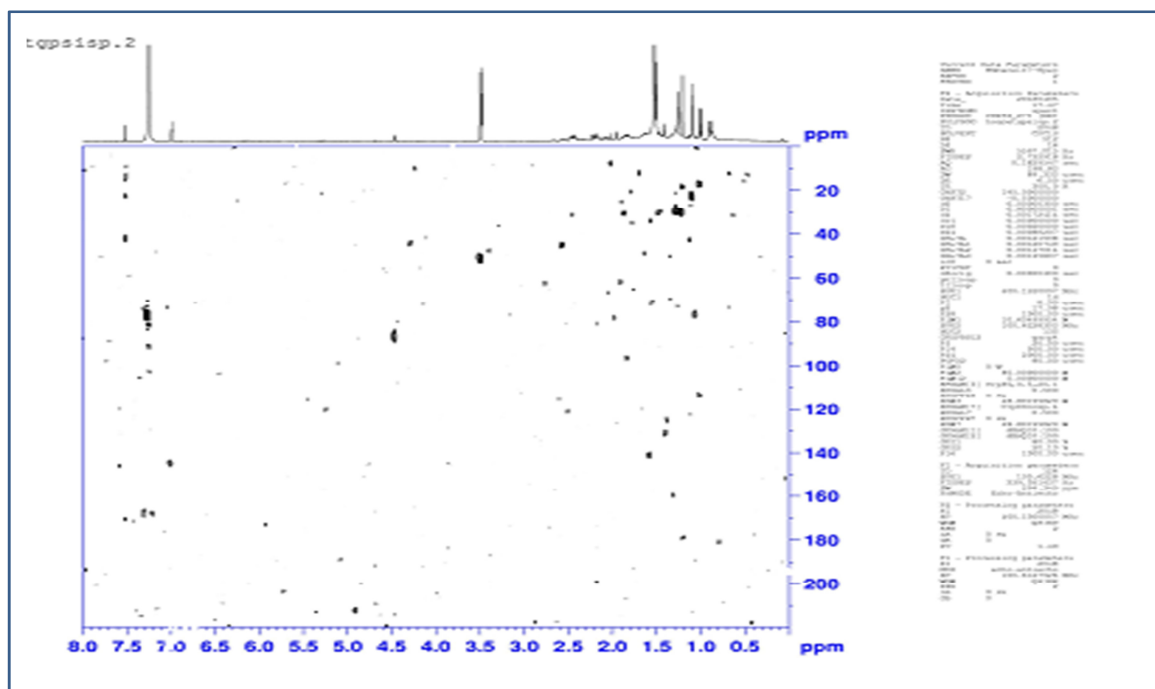
L'ensemble de ces informations mène à la structure du composé T, décrite pour la première fois, suivante :



Les données de la RMN ^1H et ^{13}C relatives à cette molécule, sont représentées dans le tableau-20-Quant à ses spectres hétéronucléaires : HSQC (spectre-68) et HMBC (spectre-69), ils sont également représentés ultérieurement dans ce tableau récapitulatif.

Tableau-20: Données de la spectroscopie RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), et ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) des composés T et A.

Positions	Composé A (+)-(1R,2Z,6Z,9Z)-astérisculolide A.		Composé T (+)-(1R,2Z,7R)-6,7,9,10-tétraahydro-astérisculolide	
	δ (ppm); J (Hz)			
	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mult., J	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mult., J
1	87,8 (CH)	4,69 <i>s</i>	86,0 (CH)	4,47 <i>s</i>
2	148,2 (CH)	7,00 <i>s</i>	144,8 (CH)	7,00 <i>bs</i>
3	137,8 (C)	-	144,9 (C)	-
4 a	22,4 (CH ₂)	2,68 <i>m</i>	26,3 (CH ₂)	2,44 <i>m</i>
4 b	-	2,16 <i>m</i>	-	2,07 <i>m</i>
5 a	29,4 (CH ₂)	2,68 <i>m</i>	26,3 (CH ₂)	2,81 <i>m</i>
5 b	-	2,37 <i>m</i>	-	2,62 <i>m</i>
6	138 (CH)	6,00 <i>dd</i> (6,4; 10)	30,6 (CH ₂)	1,86 <i>m</i>
		-	-	1,43 <i>m</i>
7	133,9 (C)	-	45,4 (CH)	2,55 <i>m</i>
8	198,4 (C)	-	211,1 (C)	-
9	136,8 (CH)	5,29 <i>d</i> (13,9)	36,8 (CH ₂)	2,44 <i>m</i>
	-		-	2,20 <i>m</i>
10	133,3 (CH)	6,16 <i>d</i> (13,9)	26,3 (CH ₂)	2,19 <i>m</i>
	-	-	-	1,10 <i>m</i>
11	41,8 (C)	-	38,1 (C)	-
12	173,3 C)	-	/(C)	-
13	20,9 (CH ₃)	1,95 <i>s</i>	16,7 CH ₃)	1,00 <i>d</i> (7,0)
14	29,7 (CH ₃)	1,41 <i>s</i>	22,5 (CH ₃)	1,09 <i>s</i>
15	24,3 (CH ₃)	1,21 <i>s</i>	29,4 (CH ₃)	1,20 <i>s</i>



Spectre-68 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl_3) du composé T.

B.III Identification structurale du composé E :

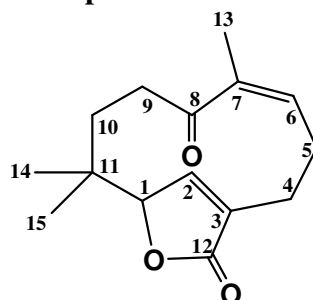
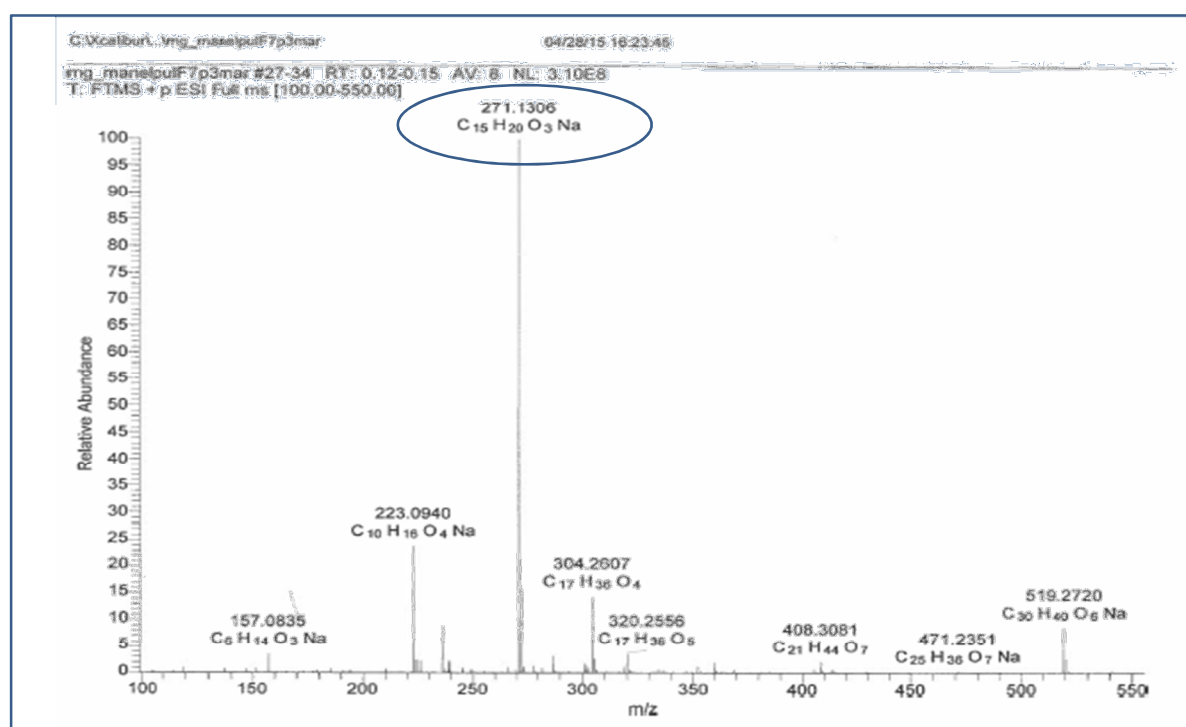


Figure-26 : Le composé E.

Le spectre de masse à haute résolution du composé E (TOF-HRESI-MS(+)), (spectre-70), montre un pic quasi-moléculaire $[M+ Na]^+$ à m/z 271,1306 Da, correspondant à la formule brute de cette molécule $C_{15}H_{20}O_3$ soit une structure de masse de 248 Da avec six insaturations dont une en moins comparés aux astérisculolides A, B, C et D de formule brute $C_{15}H_{18}O_3$.

Le spectre IR montre deux bandes d'absorption importantes à 1768 et 1643 cm^{-1} indiquant la présence de deux groupements carbonyles caractéristiques, respectivement, d'une γ -lactone α,β -insaturés et d'une cétone α,β -insaturés.

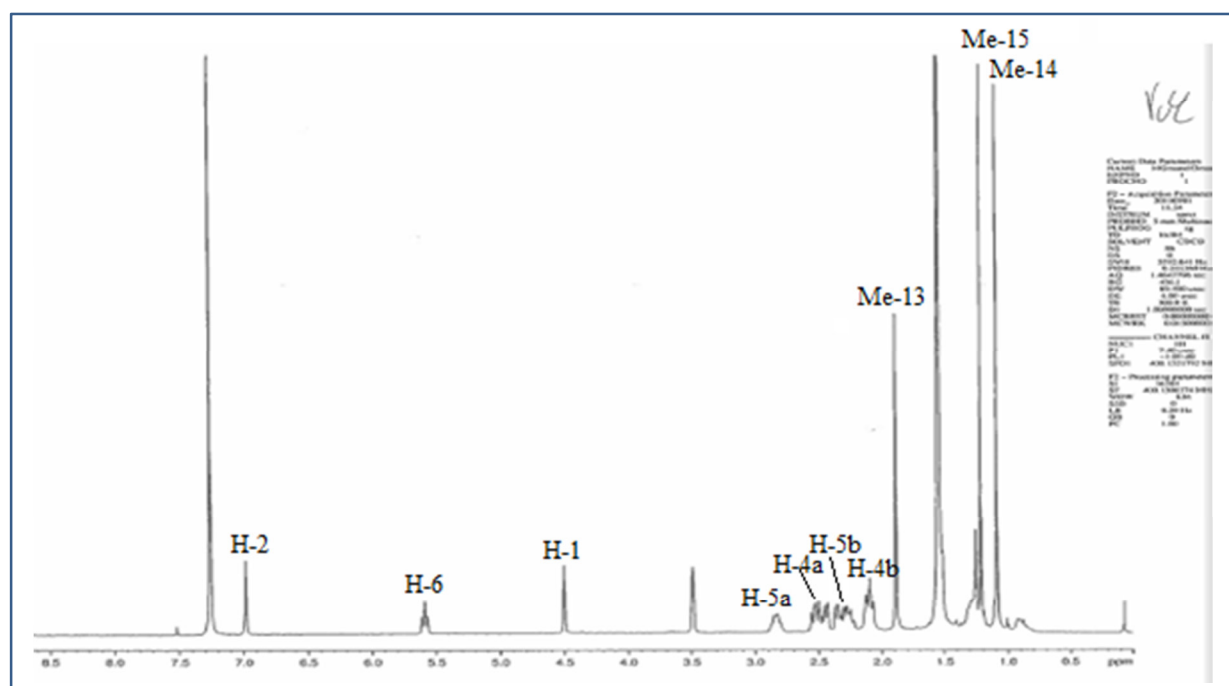


Spectre-70 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé E.

La comparaison du spectre RMN du proton du composé E avec ceux des astérisculolides A-D suggère clairement que cet astérisculolide présente une double liaison Δ^9 réduite, confirmé par l'absence des deux doublets dans la zone : [5–6 ppm].

Une analyse du spectre RMN ^1H (spectre-71), indique des signaux caractéristiques d'un squelette astériscunolide, que l'on reparti comme suit :

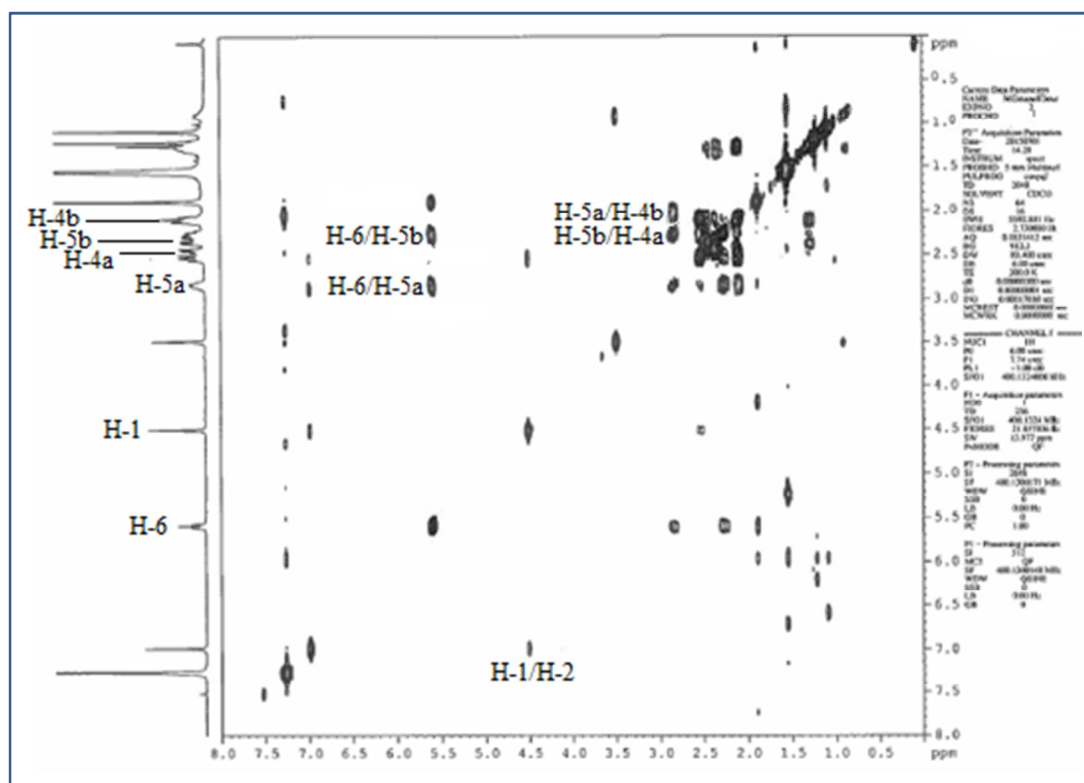
- ✓ Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 6,99$ ppm attribuable au proton H-2 ;
- ✓ Un singulet à $\delta_{\text{H}} = 4,50$ ppm attribuable au proton H-1 ;
- ✓ Un large triplet ($J = 8,5$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 5,59$ ppm attribuable au proton H-6 ;
- ✓ Trois singulets d'intégrations 3H chacun, dont deux à $\delta_{\text{H}} = 1,09$; $1,22$ ppm relatifs aux protons H₃-14 ; H₃-15 et un à $\delta_{\text{H}} = 1,89$ ppm attribuable aux protons H₃-13 ;
- ✓ Des multiplets à $\delta_{\text{H}} = 1,29$ (H-10b) ; $2,09$ (H-10a et H-4b) ; $2,26$ (H-5b) ; $2,53$ (H-4a) et $2,84$ (H-5a) ; relatifs à la présence de trois groupes méthylènes ;
- ✓ Deux doublets de doublet de doublet, l'un à $\delta_{\text{H}} = 2,33$ ppm ($J = 17,6$; $8,7$ et $2,6$ Hz) attribuable au proton H-9b et le second à $\delta_{\text{H}} = 2,46$ ppm ($J = 17,6$; $9,4$ et $2,9$ Hz) attribuable au proton H-9a. Ces deux signaux sont relatifs au quatrième groupe méthylène.



Spectre-71 : Spectre RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) du composé E.

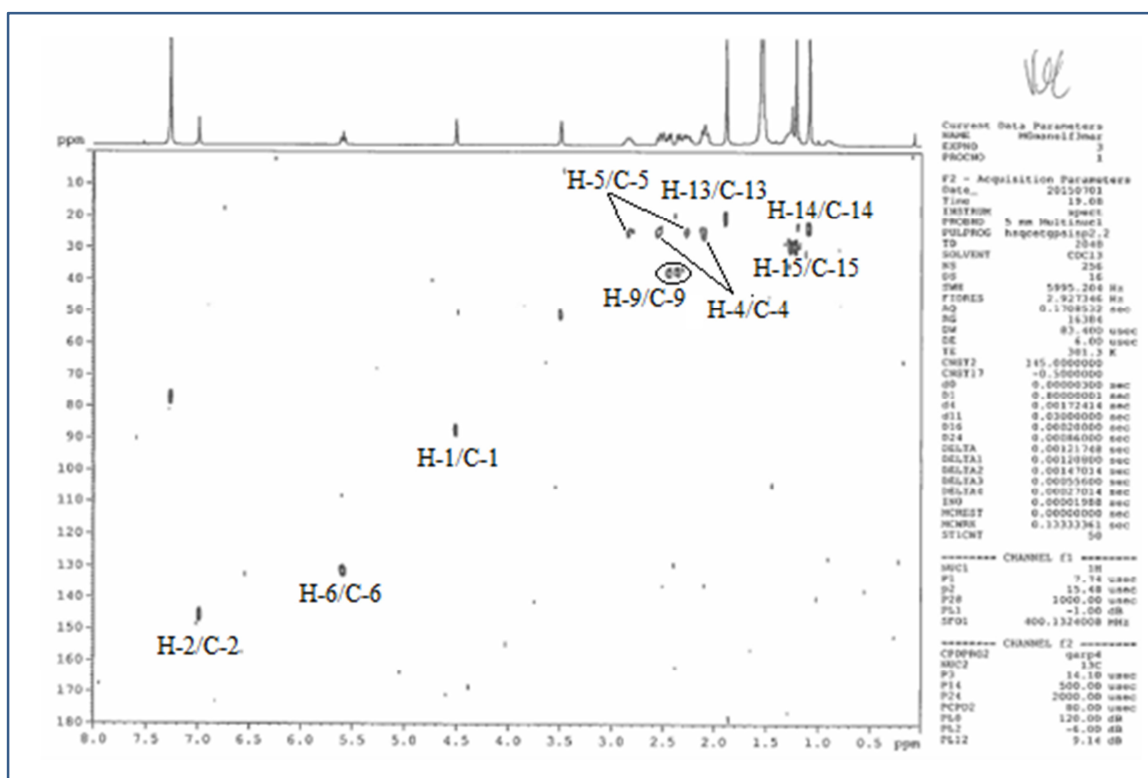
Ces quatre groupements méthylènes sont confirmés par l'examen du spectre COSY (spectre-72) qui montre la présence de deux systèmes spin isolés $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ relatif à (H₂-9 / H₂-10) et (H₂-4 / H₂-5) dans la zone allant de $1,29$ ppm à $2,84$ ppm

En effet sur ce spectre on relève des taches de corrélations très nettes des deux protons H₂-5 avec les deux protons H₂-4 d'une part et avec le proton éthylénique H-6 d'autre part.



Spectre-72 : Spectre COSY (600 MHz, $CDCl_3$) du composé E.

La structure, dans un premier temps proposée, est compatible avec les signaux RMN ^{13}C (tableau-21) attribués aux noyaux ^{13}C , suite à une combinaison des données des spectres HSQC (spectre-73) et HMBC (spectre-74).



Spectre-73 : Spectre HSQC (600 MHz, $CDCl_3$) du composé E.

Cette structure proposée est également confirmée par les taches de corrélations caractéristiques observées sur le spectre HMBC : du carbone C-1 avec les deux groupements méthyles Me-14 et Me-15 ; du carbone C-12 avec le proton H-4 et le proton H-2 ; et du carbone C-8 avec les deux protons H-6 et H-9.

Ces données sont compatibles avec le squelette : 9,10- dihydrohumulen-1, 12-olide suivant :

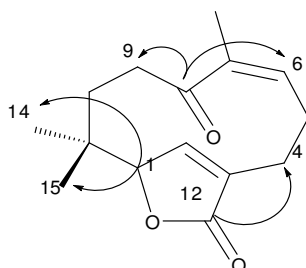
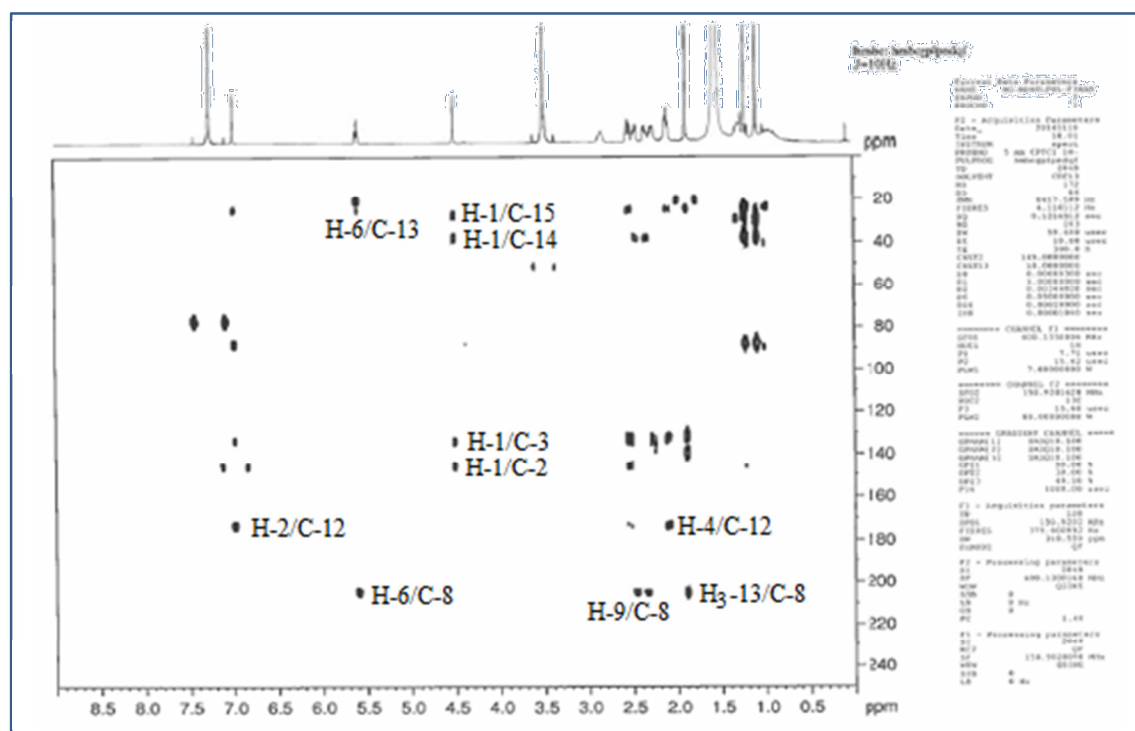


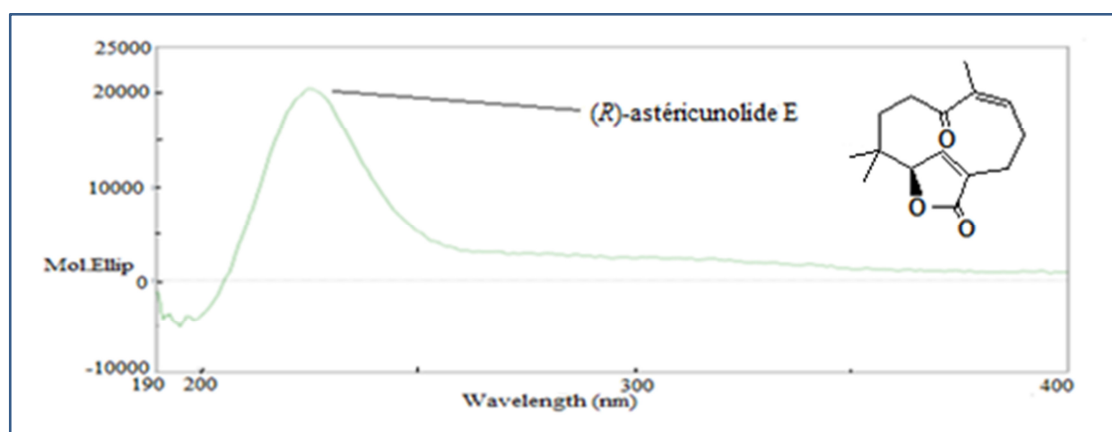
Figure-27 : Corrélations HMBC dans le composé E.



Spectre-74 : Spectre HMBC (600 MHz, CDCl₃) du composé E

Une analyse stéréochimique indique :

- ✓ Une géométrie **Z** de la double liaison Δ⁶ caractérisée par le déplacement chimique du carbone C-13 résonnant à 20,3 ppm [17] ;
- ✓ Un pouvoir rotatoire spécifique positif : $[\alpha]_D = +50,2$ (C = 0,02 mg/L; CHCl₃)
- ✓ Une configuration absolue **R** du carbone asymétrique C-1 indiquée par l'analyse de la courbe du dichroïsme circulaire électronique (spectre-75) qui montre un effet Cotton positif à (~ 218 nm) associé à la transition π-π* de la lactone conjuguée, observé pour tous les (+)-asteriscunolides A-D.



Spectre-75 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé E (n-hexane).

Cet astérisculolide décrit pour la première fois dans la littérature sera nommé : (+)-astérisculolide E et ses données complètes de la RMN ^1H et ^{13}C sont reportées dans le tableau-21:

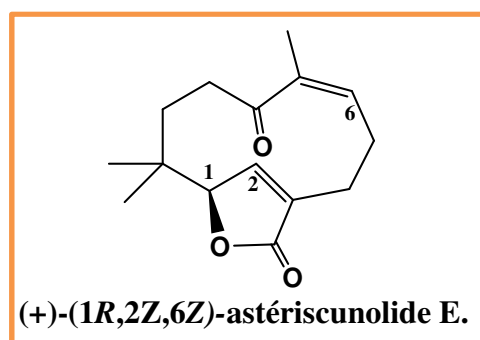
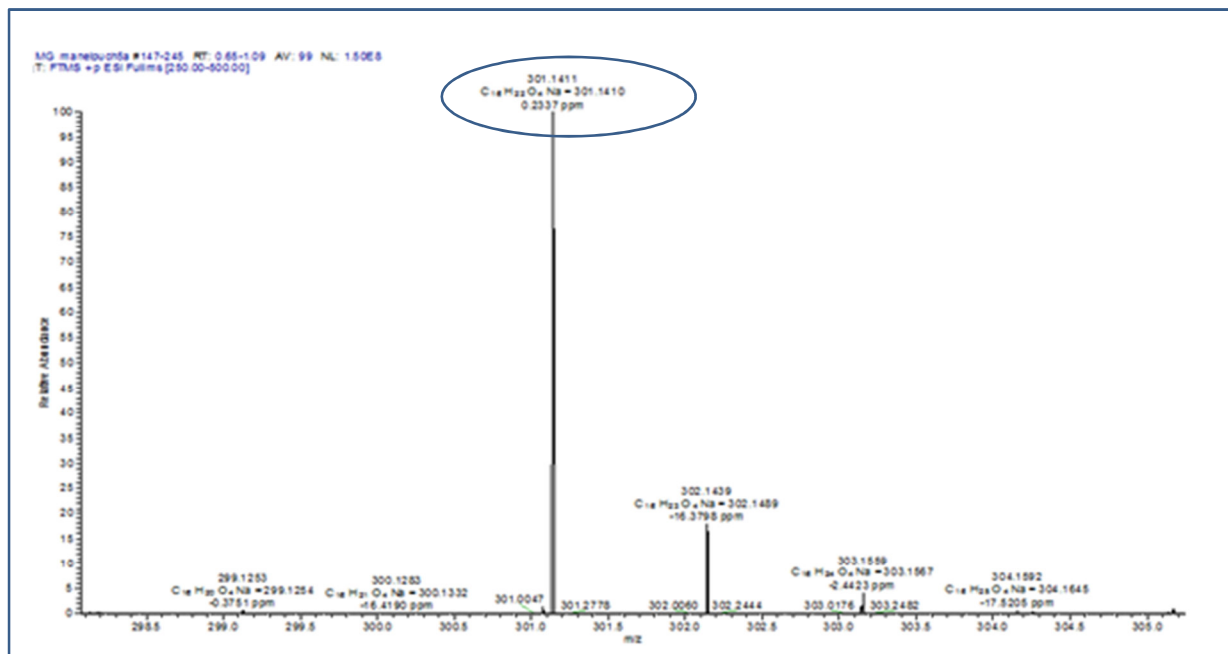


Tableau-21 : Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C du composé E.

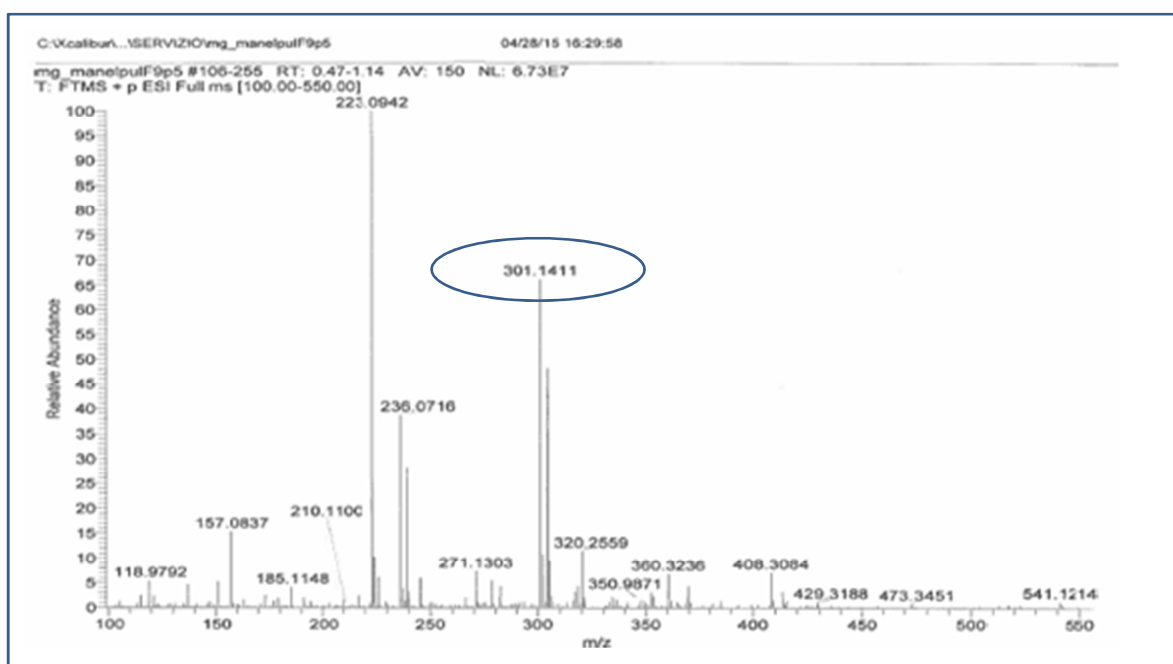
Positions	(+)-(1R,2Z,6Z)-astérisculolide E.	
	δ (ppm)	
	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , multi., J (Hz)
1	87,7 (CH)	4,50 <i>s</i>
2	145,9 (CH)	6,99 <i>s</i>
3	134,1 (C)	-
4 a	24,2 (CH ₂)	2,53 <i>m</i>
4 b		2,09 <i>m</i>
5 a	24,9 (CH ₂)	2,84 <i>m</i>
5 b		2,26 <i>m</i>
6	131,7 (CH)	5,59 <i>tl</i> (8,5)
7	139,8 (C)	-
8	205,1 (C)	-
9a	37,4 (CH ₂)	2,46 <i>ddd</i> (17,6; 8,7; 2,9)
9b		2,33 <i>ddd</i> (17,6; 9,4; 2,9)
10a	27,6 (CH ₂)	2,09 <i>m</i>
10b		1,29 <i>m</i>
11	37,6 (C)	-
12	173,3 (C)	-
13	20,3 (CH ₃)	1,89 <i>s</i>
14	29,3 (CH ₃)	1,22 <i>s</i>
15	24,7 (CH ₃)	1,09 <i>s</i>

B.IV Identification structurale des deux isomères F et G :

Le spectre de masse à haute résolution (TOF-HRESI-MS(+)) de chacun des composés F et G (spectres-76 et 77), indique le même pic quasi-moléculaire à $m/z = 301,1411$ Da orientant vers la même formule brute $C_{16}H_{22}O_4$ qui correspond à une structure de masse de 278 Da comportant six insaturations. Comparés aux astériscolides A-D, ces deux composés possèdent une insaturation en moins et six atomes supplémentaires dont un carbone, quatre hydrogènes et un oxygène.



Spectre-76 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé F.



Spectre-77 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé G.

L'analyse simultanée de ces spectres de masse à haute résolution et ceux de la RMN indiquent clairement que ces composés sont des astérisculolides isomères, figure-27.

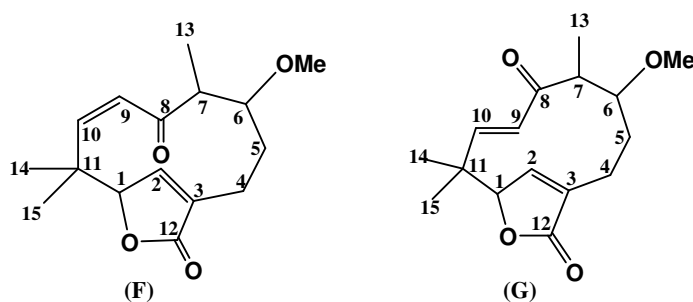


Figure-27 : Les composés F et G.

La présence des deux groupements cétone α,β -insaturée et de la γ -lactone, est indiquée dans les spectres RMN ^1H (spectres 78 et 79) respectifs des composés F et G, par les signaux suivant :

- ✓ Des signaux attribuables à une double liaison isolée Δ^9 conjuguée avec la fonction cétone en position C-8, à savoir :
 - Deux doublets l'un à $\delta_{\text{H}} = 6,14$ ppm (1H, *d*, $J = 13,7$ Hz, H-9), et le second à $\delta_{\text{H}} = 5,58$ ppm (1H, *d*, $J = 13,7$ Hz, H-10) pour le composé F.
 - Deux doublets l'un à $\delta_{\text{H}} = 6,17$ ppm (1H, *d*, $J = 16,4$ Hz, H-9), et le second à $\delta_{\text{H}} = 6,04$ ppm (1H, *d*, $J = 16,4$ Hz, H-10) pour le composé G.

A ce stade, la différence qui apparait entre ces deux composés est la valeur de la constante de couplage $J_{\text{H}9-\text{H}10}$ qui indique que la double liaison Δ^9 est de géométrie configurationnelle *Z* dans le composé F ($J = 13,7$ Hz) et *E* dans le composé G ($J = 16,4$ Hz).

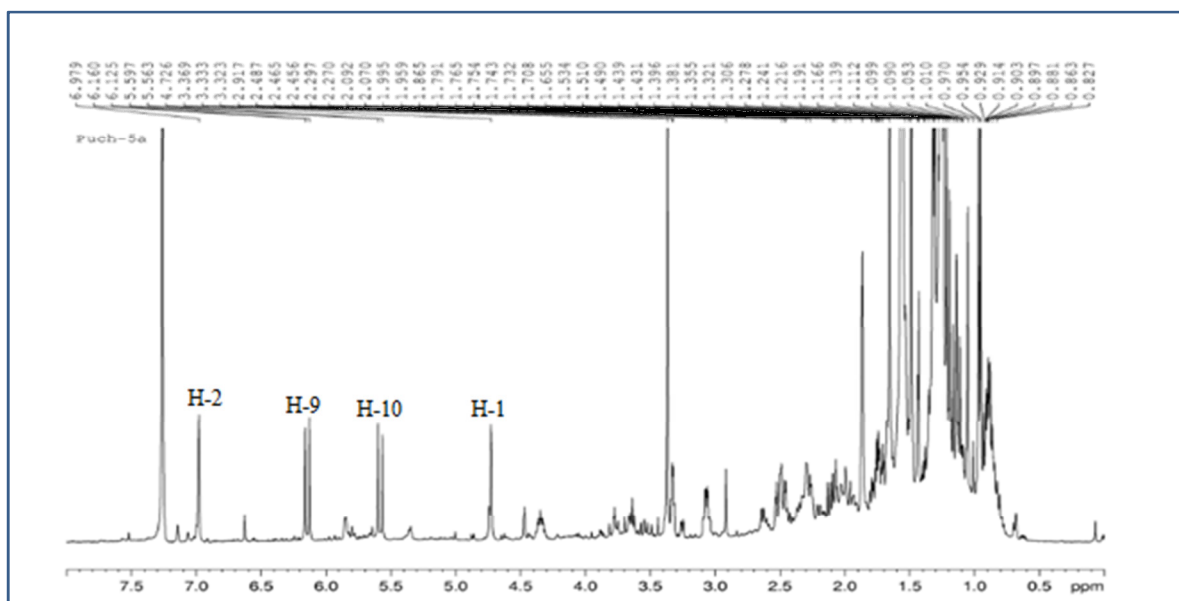
- ✓ Des signaux attribuables à la fonction γ -lactone qui sont :
 - Deux singulets l'un à $\delta_{\text{H}} = 6,98$ ppm (1H, *s*, H-2) et $\delta_{\text{H}} = 4,72$ ppm (1H, *s* large, H-1) pour le composé F
 - Deux singulets l'un à $\delta_{\text{H}} = 6,98$ ppm (1H, *s*, H-2) et $\delta_{\text{H}} = 4,70$ ppm (1H, *s* large, H-1) pour le composé G.

Quant à l'insaturation en moins dans ces deux composés par rapport aux astérisculolides A-D, elle s'explique par la réduction de la double liaison Δ^6 qui est représentée par le signal du groupement Me-13 qui résonne sous forme d'un doublet, à :

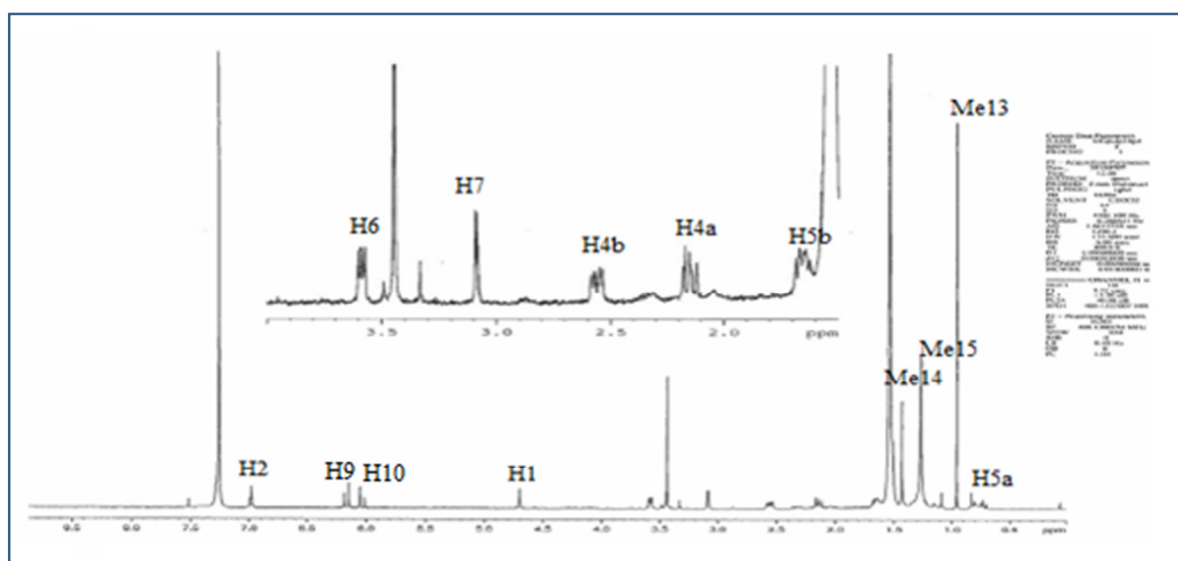
- ✓ $\delta_{\text{H}} = 0,96$ ppm (3H, *d*, $J = 6,6$ Hz) pour le composé F.
- ✓ $\delta_{\text{H}} = 0,97$ ppm (3H, *d*, $J = 6,6$ Hz) pour le composé G.

Ceci est en faveur d'un groupement CH porteur de ce groupement méthyle.

Le spectre RMN ^1H indique également la présence d'un singulet supplémentaire d'intégration 3H dont le déplacement est caractéristique de la présence d'un groupement méthoxyle, qui résonne respectivement pour les composés F et G à $\delta_{\text{H}} = 3,36$ ppm et à $\delta_{\text{H}} = 3,44$ ppm.

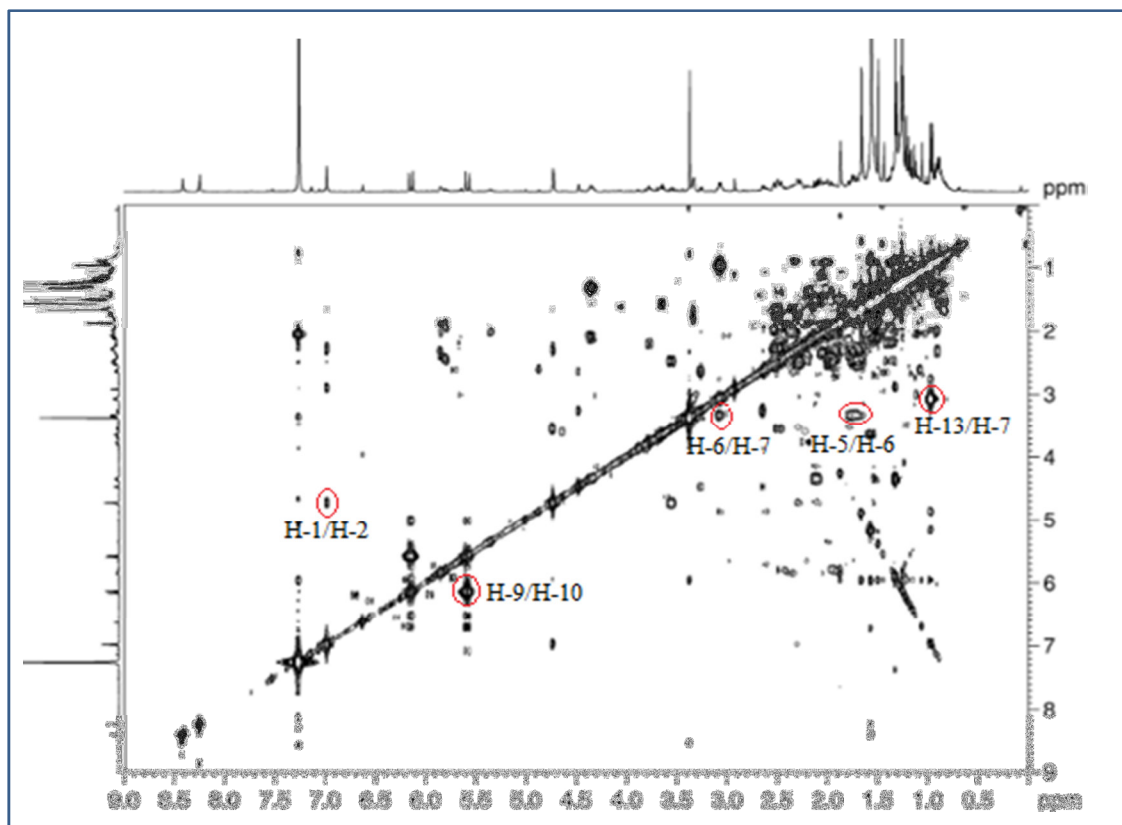


Spectre-78 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) du composé F.

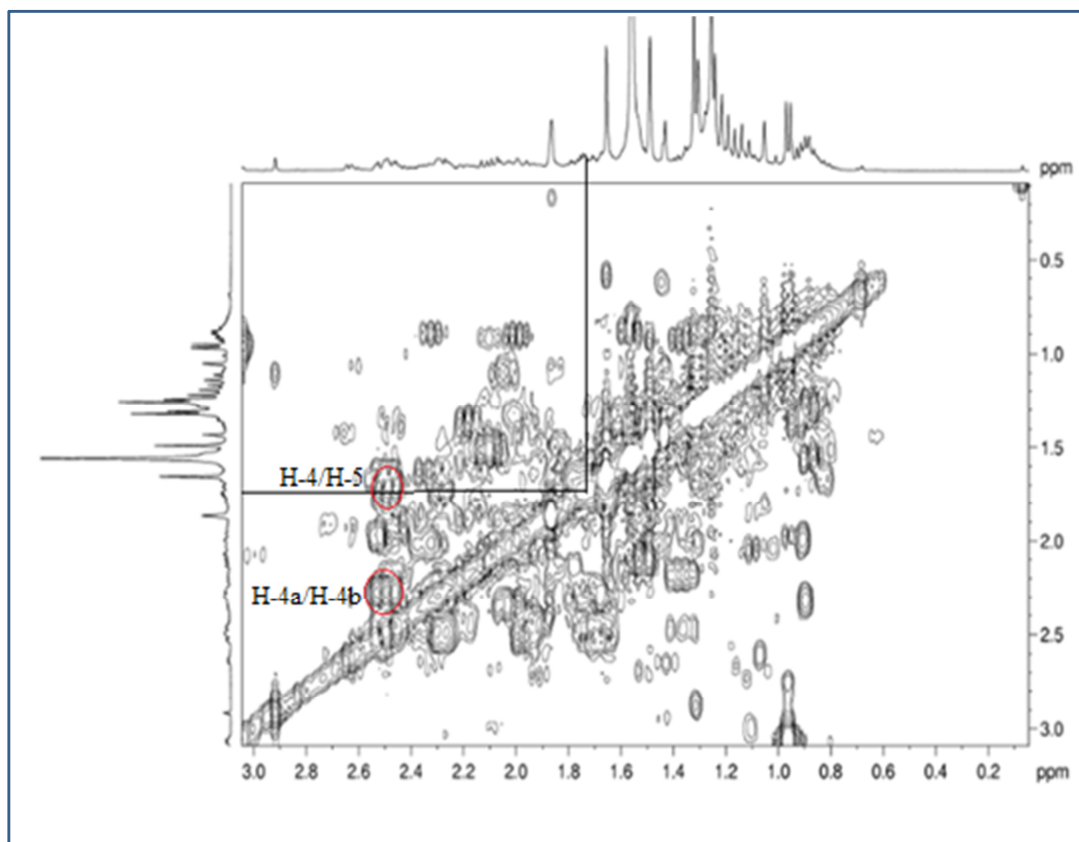


Spectre-79 : Spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) du composé G

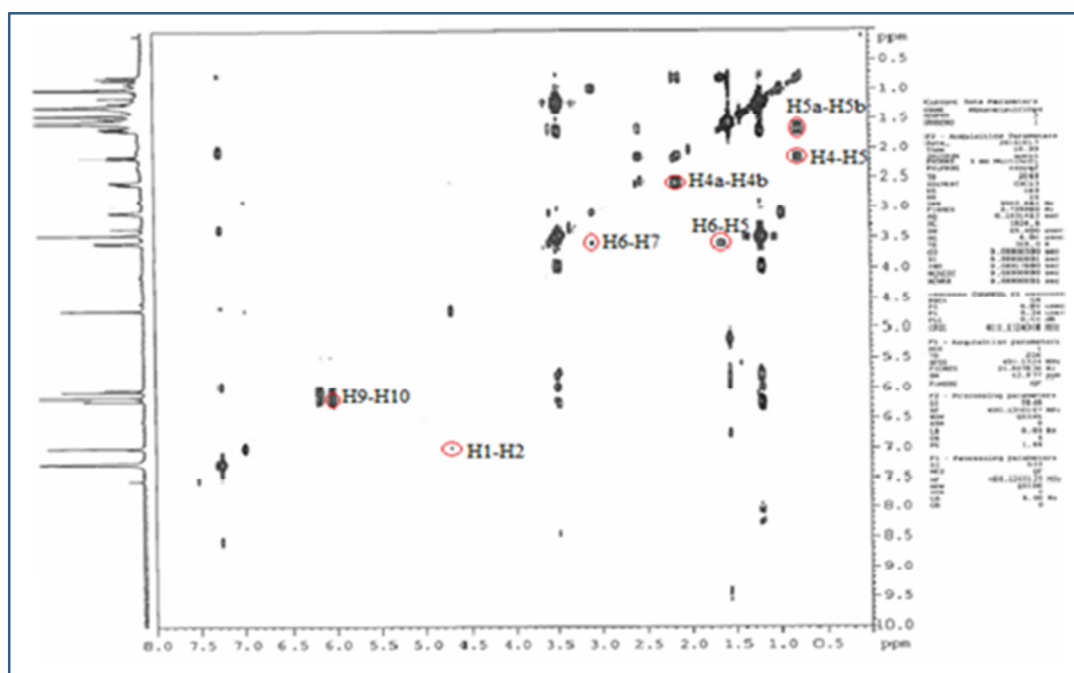
L'examen des spectres COSY (spectres-80a-b et 81) de ces deux composés, montre clairement la présence d'un système de spin $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, qui séquentiellement relie les protons $\text{H}_2\text{-4}$ et $\text{H}_2\text{-5}$ entre eux. Par ailleurs, les protons $\text{H}_2\text{-5}$ corrélient avec le proton H_6 qui à son tour corrélie avec le proton H_7 . Ceci confirme sans nul doute que le groupement méthine CH_7 est porteur du groupement Me-13 .



Spectre-80a: Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé F.

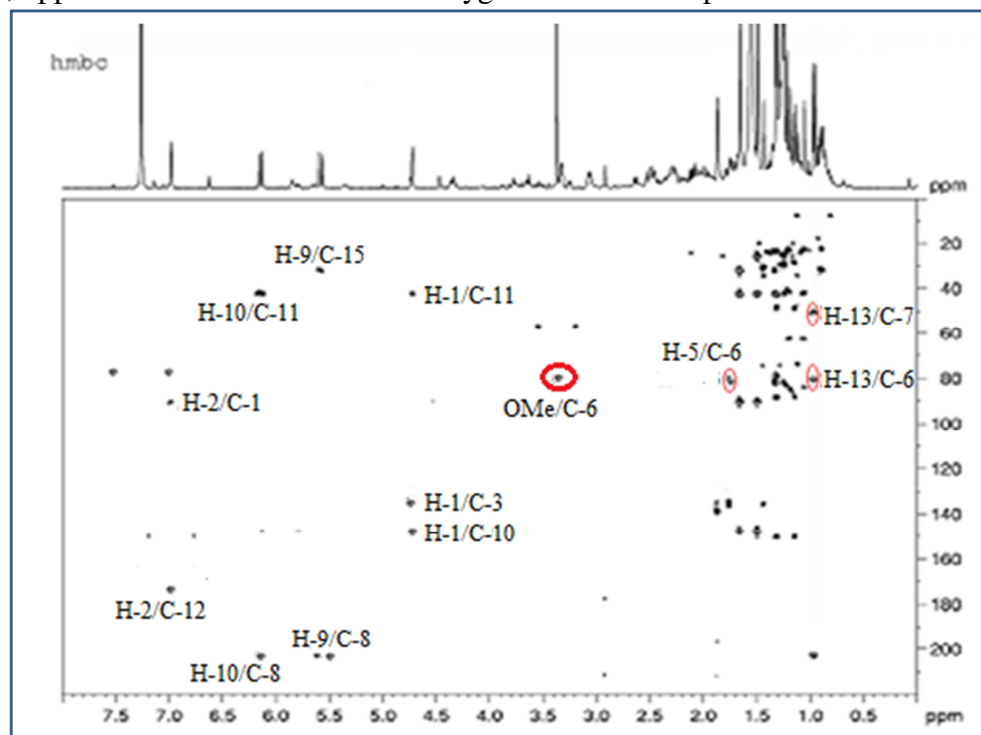


Spectre-80b: Spectre COSY étalé (400 MHz, CDCl₃) du composé F.

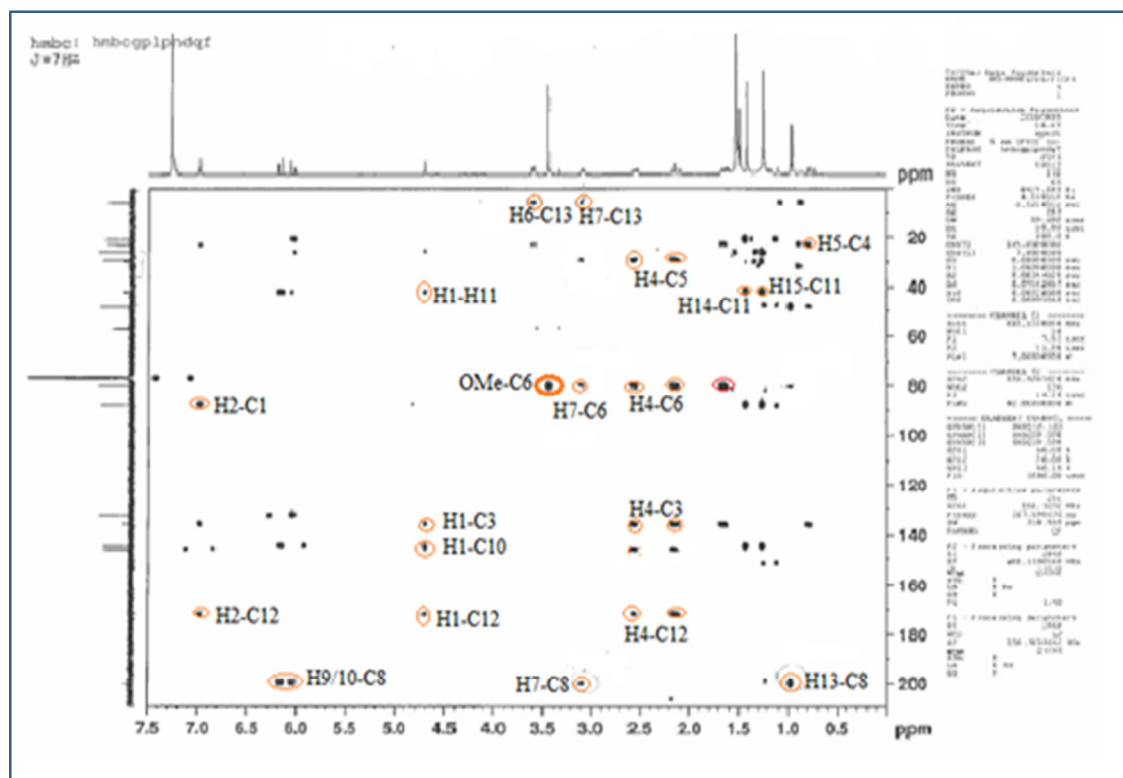


Spectre-81: Spectre COSY (400 MHz, $CDCl_3$) du composé G.

Ainsi, comparé aux astérisculolides A-D, la formule brute des composé F et G établie précédemment ($C_{16}H_{22}O_4$) avec une insaturation en moins et six atomes en plus (1 C, 4H et 1O), est confirmée par la réduction de la double liaison Δ^6 et également la substitution de la position C-6 par un groupement méthoxyle (OMe) qui montre, dans le spectre hétéronucléaire HMBC (spectres-82 et 83), une seule tache de corrélation avec le carbone hybridé sp^3 résonant à $\delta_c = 80,4$ ppm dont la valeur confirme l'oxygénation de cette position C-6.

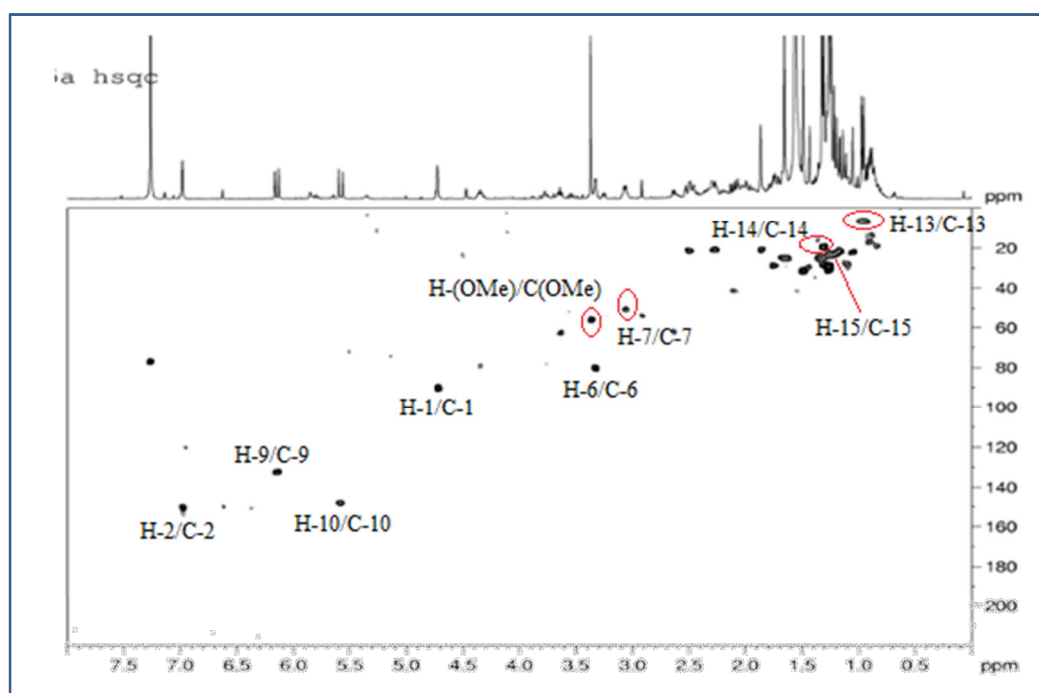


Spectre-82 : Spectre HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) du composé F.

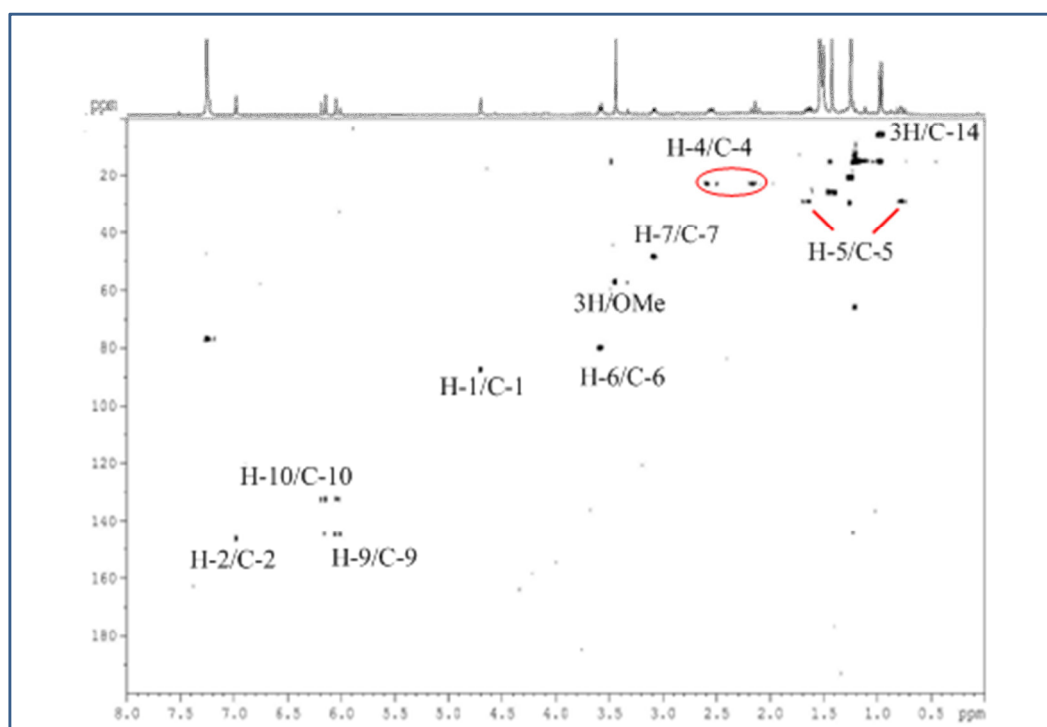


Spectre-83 : Spectre HMBC (400 MHz, $CDCl_3$) du composé G.

Les données de la RMN 1H et ^{13}C (tableau-22) sont en accord avec les deux structures proposées plus haut et les signaux attribués aux noyaux 1H et ^{13}C ont été effectués en combinant les données des spectres HSQC (spectres-84 et 85) et HMBC de chacun des deux composés.

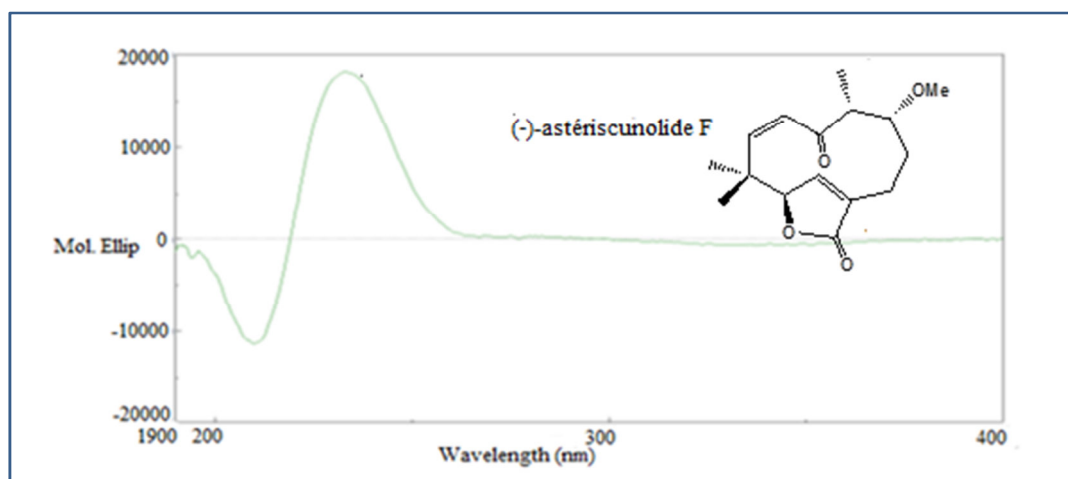


Spectre-84 : Spectre HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) du composé F.

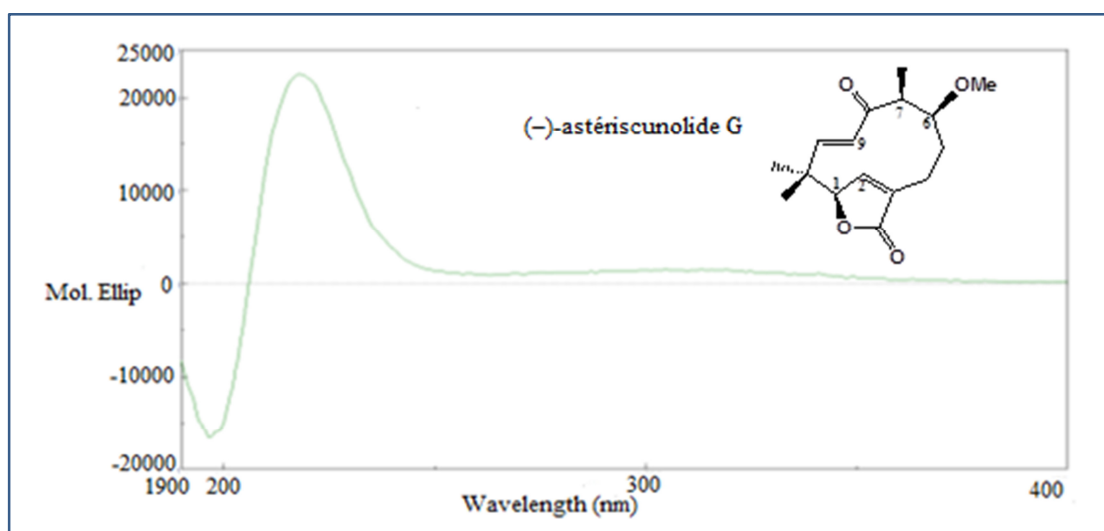


Spectre-85 : Spectre HSQC (400 MHz, CDCl₃) du composé G.

Quant à la configuration absolue du carbone **C^{*}-1** ; l'effet Cotton positif relatif à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ au niveau du chromophore conjugué, voisin de ce carbone asymétrique et qui apparait dans les deux spectres DCE (spectres-86 et 87) à 233 nm pour le composé F et à 218 nm pour le composé G ; indique clairement une configuration absolue *R* de ce centre asymétrique analogue aux astéricunolides A-D. Tandis que la valeur négative du pouvoir rotatoire spécifique de ces deux composés, à savoir : $[\alpha]_D = -312,7$ (C = 0,03 mg/L, CHCl₃) pour le composé F et $[\alpha]_D = -547,7$ (C = 0,03 mg/L, CHCl₃) pour le composé G indiquent que ces deux astéricunolides sont levogyres, contrairement aux astéricunolide A-D qui sont dextrogyres.



Spectre-86 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé F (n-hexane).



Spectre-87 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé G (n-hexane).

Tableau-22 : Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C des composés F et G

Positions	(-)-asteriscunolide F		(-)-asteriscunolide G	
	δ (ppm), J (Hz)			
	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mutli., J	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , mutli., J
1	90,3 (CH)	4,72 <i>s</i>	87,6 (CH)	4,70 <i>sl</i>
2	150,4 (CH)	6,98 <i>s</i>	146,2 (CH)	6,98 <i>sl</i>
3	133,5 (C)	-	136,1 (C)	-
4 a	20,8 (CH ₂)	2,50 <i>m</i>	22,9 (CH ₂)	2,14 <i>dd</i> (13,0 ; 12,4)
4 b	-	2,28 <i>m</i>	-	2,56 <i>ddd</i> (13,0; 6,0 ; 1,0)
5 a	28,8 (CH ₂)	2,01 <i>m</i>	29,1 (CH ₂)	0,78 <i>dddd</i> (15,0; 12,4; 1,0 ; 1,0)
5 b	-	1,72 <i>m</i>	-	1,65 <i>dddd</i> (15,0; 7,7; 6,0 ; 1,0)
6	80,4 (CH)	3,30 <i>m</i>	80,1 (CH)	3,59 <i>ddd</i> (7,7 ; 3,8; 1,0)
7	50,7 (C)	3,06 <i>m</i>	48,4 (CH)	3,09 <i>dq</i> (6,6 ; 3,8)
8	202,3 (C)	-	199,9 (C)	-
9	132,3 (CH)	6,14 <i>d</i> (13,7)	132,4 (CH)	6,17 <i>dd</i> (16,4)
10	147,8 (CH)	5,58 <i>d</i> (13,7)	144,6 (CH)	6,04 <i>dd</i> (16,4)
11	42,2 (C)	-	41,9 (C)	-
12	173,6 (C)	-	173,2 (C)	-
13	6,5 (CH ₃)	0,96 <i>d</i> (6,6)	6,01 (CH ₃)	0,97 <i>d</i> (6,6)
14	25,1 (CH ₃)	1,65 <i>s</i>	20,8 (CH ₃)	1,25 <i>s</i>
15	33,3 (CH ₃)	1,49 <i>s</i>	25,8 (CH ₃)	1,42 <i>s</i>
6-OMe	57,0	3,68	57,2	3,44 <i>s</i>

Concernant les centres chiraux C-6 et C-7, ces deux carbones font partie d'un macrocycle dont la nature flexible empêche d'obtenir des informations sans ambiguïté sur la stéréochimie de ces deux centres en se référant uniquement aux données de l'expérience NOESY. Pour cela, une série d'expériences complémentaires a été réalisée en effectuant le découplage homonucléaire-1D (résolution des couplages ^1H - ^1H) et hétéronucléaire-2D (résolution des couplages ^{13}C - ^1H)

[31-33], dont l'analyse de chacune des données de ces expériences a été effectuée par la méthode de Murata [34], sur le composé le plus abondant à savoir l'astérisculide G.

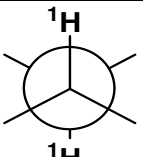
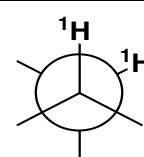
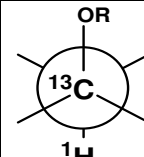
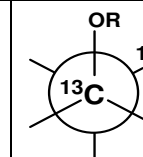
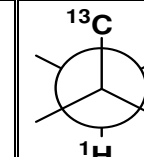
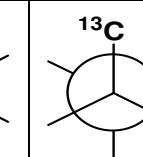
B.IV-a Configuration absolue des carbones C-6 et C-7 du composé G :

La résolution des couplages $^3J(^1\text{H}-^1\text{H})$ dans la RMN homonucléaire du proton et des couplages $^{2,3}J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ dans la RMN hétéronucléaire à longue distance HMBC, du composé G indiquent :

- ✓ Une petite valeur de la constante de couplage : $^3J_{\text{H6-H7}} = 3,8$ Hz, en faveur d'une orientation *gauche* du proton H-6 par rapport à H-7 ;
- ✓ Une grande valeur de la constante de couplage : $^3J_{\text{C13-H6}} = 5,5$ Hz en accord avec l'orientation *anti* du Me-13 par rapport à H-6
- ✓ Une grande valeur de la constante de couplage : $^2J_{\text{C6-H7}} = 7,0$ Hz en accord avec l'orientation *gauche* du groupement méthoxyle 6-OMe par rapport à H-7.

Conformément aux données de la méthode Murata, (tableau-23), l'ensemble de ces informations nous ont permis d'établir la configuration relative *thréo* du composé G d'une part et de déduire l'orientation *syn* des deux groupements Me-7 et OMe-6, d'autre part, dans cette molécule.

Tableau-23 : Constantes de couplages $^3J(^1\text{H}-^1\text{H})$ et $^{2,3}J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$ relatives aux orientations *gauche* et *anti*.

Couplage-vicinal		Couplage-géminal		Couplage-vicinal	
$^3J(^1\text{H}-^1\text{H})$		$^2J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$		$^3J(^{13}\text{C}-^1\text{H})$	
Large	Small	Small	Large	Large	Small
					
Orientations					
<i>anti</i>	<i>gauche</i>	<i>anti</i> ^(a)	<i>gauche</i> ^(a)	<i>anti</i>	<i>gauche</i>

^(a) orientation de la fonction oxygénée, portée par le carbone ^{13}C , par rapport au proton ^1H .

Etant donné qu'il n'y a aucune relation entre les deux conventions suivantes, à savoir : la configuration relative d'une molécule et la configuration absolue de ses carbones asymétriques, le schéma-1 suivant, montre clairement comment de la configuration relative *thréo* de notre molécule, établie avec les données de Murata, on aboutit à la configuration absolue (6*S*,7*S*) de ces carbones asymétriques en effectuant le passage de la projection de Newman vers la projection de Cram d'un fragment de la molécule contenant ces deux centres chiraux.

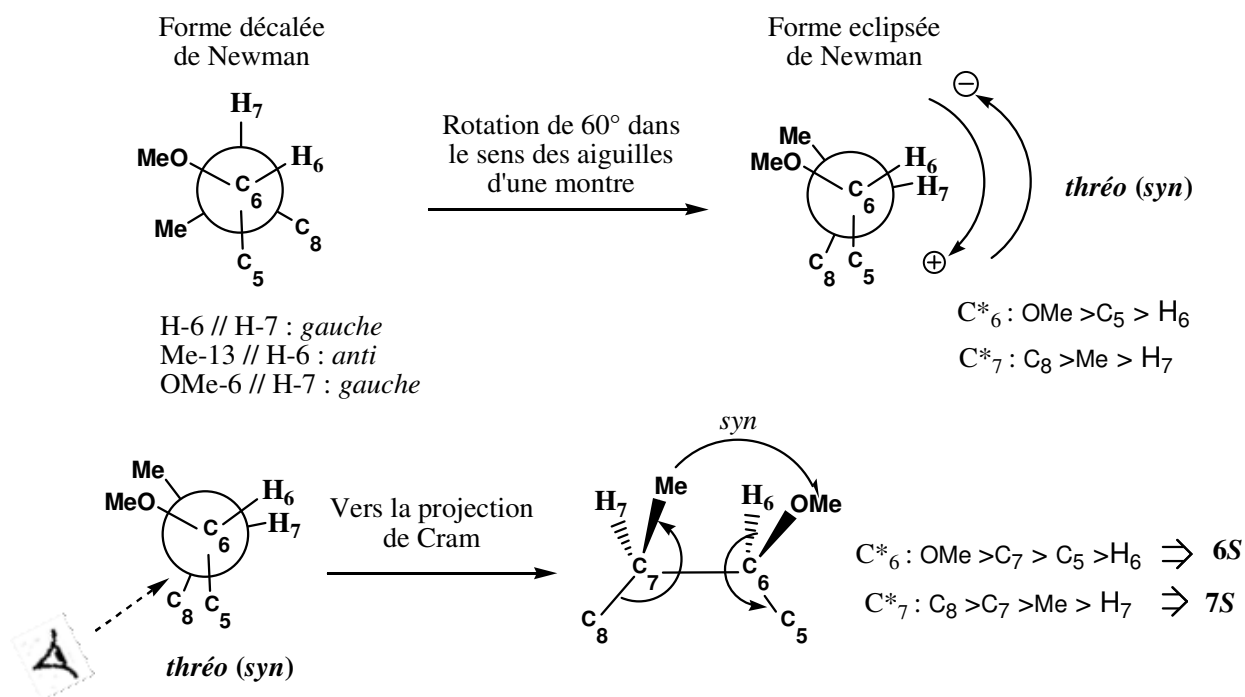


Schéma-1 : Configuration relative et absolue dans un fragment de la molécule G contenant les deux centres chiraux C-6 et C-7.

Sachant que la configuration absolue *R* du centre C-1 et la géométrie *E* de la double liaison Δ^9 sont bien définies ; la configuration absolue (6*S*,7*S*) des carbones asymétriques de cette molécule, établie précédemment, a été confirmée avec le modèle moléculaire de « Dreinding » et surtout avec l'examen du spectre NOESY (spectre-88) qui montre les corrélations des protons dans une proximité spatiale caractéristique suivante :

- ✓ Le proton H-1 d'orientation α bien définie, montre une tache de corrélation avec les protons du Me-14. Ces derniers montrent également deux taches de corrélations l'une avec le proton H-2 et la seconde avec le proton H-9 qui corréle à son tour avec le proton H-6. Ceci confirme sans ambiguïté, la même orientation α du groupement Me-14 et du proton H-6. Par ailleurs étant donné que H-6 et H-7 sont *syn* (voir schéma-1) le proton H-7 ne peut avoir que la même orientation α .
- ✓ Ainsi, de l'orientation α du Me-14 on déduit l'orientation β du méthyl géminé Me-15. Ceci est confirmé par la tache de corrélation qui apparaît dans le spectre NOESY entre les protons de ce groupement et le proton H-10.

Toutes ces observations sont en accord avec les configurations absolues : (1*R*, 6*S*, 7*S*) et les configurations géométriques 2*Z*, 9*E* de la molécule G ; où les protons : H-1, H-6, H-7 et le Me-14 se trouvent dans la même région spatiale (orientation α). Il en est de même pour le proton H-10 et le Me-15 (orientation β).

La figure-28 suivante illustre l'ensemble de ces corrélations.

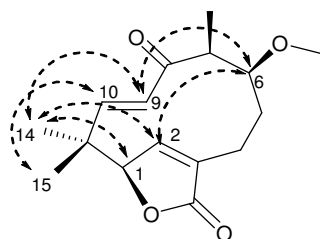
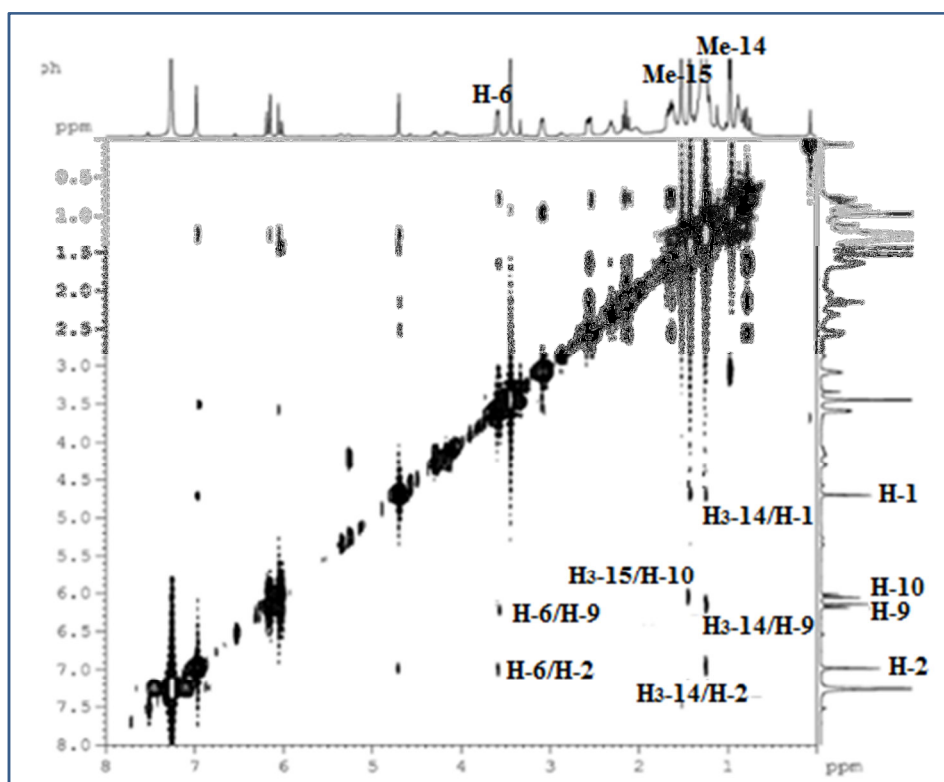
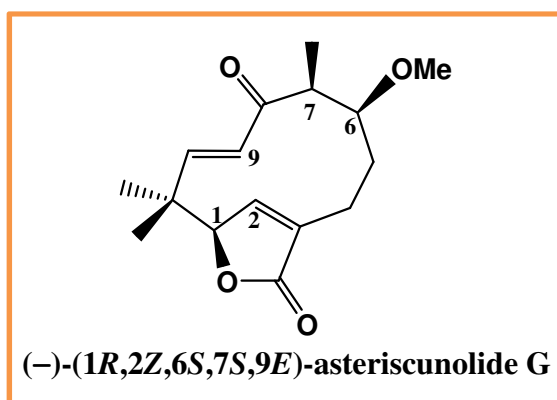


Figure-28 : Corrélations relevées sur le spectre NOESY du composé G.



Spectre-88 : Spectre NOESY ((600 MHz, $CDCl_3$) du composé G.

Cette molécule est décrite pour la première fois dans la littérature et sera nommée : (-)-astérisculide G.

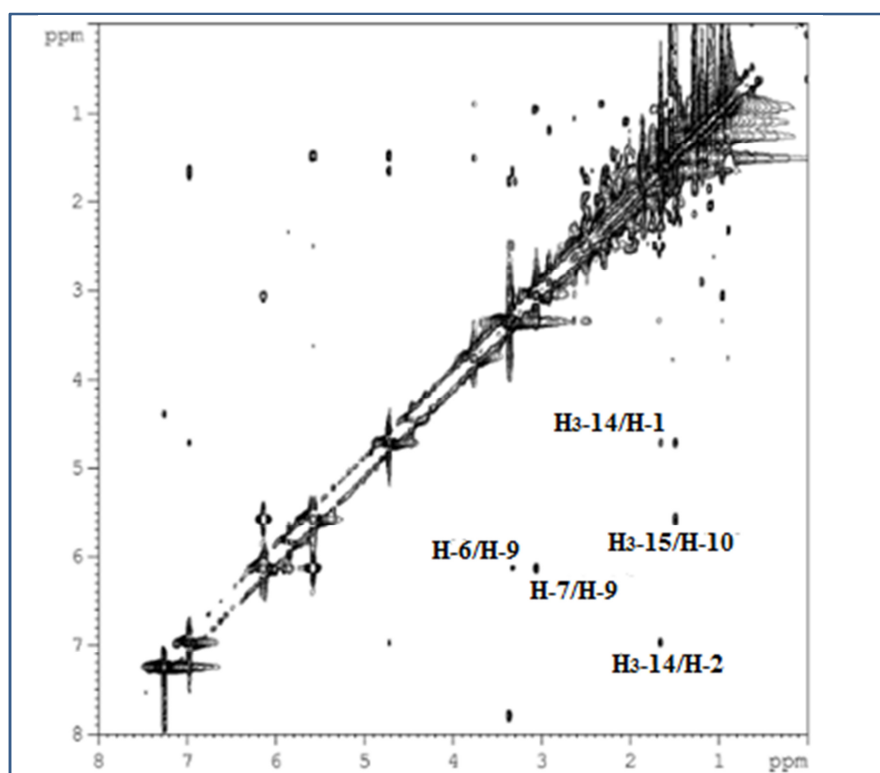


B.IV-b Configuration absolue des carbones C-6 et C-7 du composé F :

L'arrangement stéréochimique de l'asteriscunolide F a été déduit par une analyse détaillée des corrélations relevées sur le spectre NOESY (spectre-89) en s'aidant du modèle moléculaire de « Dreiding ».

De manière analogue à l'asteriscunolide G, les protons H-6 et H-7 ont une orientation *gauche* indiquée par la petite valeur de la constante de couplage ($^3J_{H6-H7} = 2,6$ Hz).

Vu la nature stérique du composé F, celui-ci a engendré les différentes interactions caractéristiques, relevées sur le spectre NOESY, suivant :



Spectre-89 : Spectre NOESY (600 MHz, CDCl₃) du composé F.

- ✓ Une corrélation entre le proton H-1, d'orientation α bien définie, avec les protons du Me-14 qui à leurs tour corrélerent avec le proton H-2. Par ailleurs on relève également une corrélation entre le proton H-10 et ceux du Me-15 ; ceci est en accord avec les orientations α et β , respectifs, des groupements méthyles Me-14 et Me-15 ;
- ✓ Une corrélation du proton H-9 avec les deux protons H-6 et H-7. Sachant que les protons H-9 et H-10 ont la même orientation spatiale de par la configuration Z de la double liaison Δ^9 , la corrélation du proton H-10 avec le Me-15 d'orientation β , nous amène à déduire la même orientation β -*syn* des deux protons H-6 et H-7 qui induit une orientation α -*syn*, des deux groupements Me-13 et 6-OMe.

La figure-29 suivante illustre l'ensemble de ces corrélations

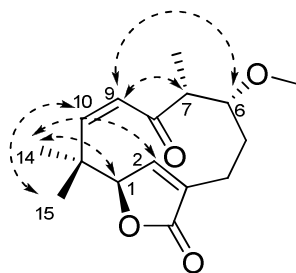
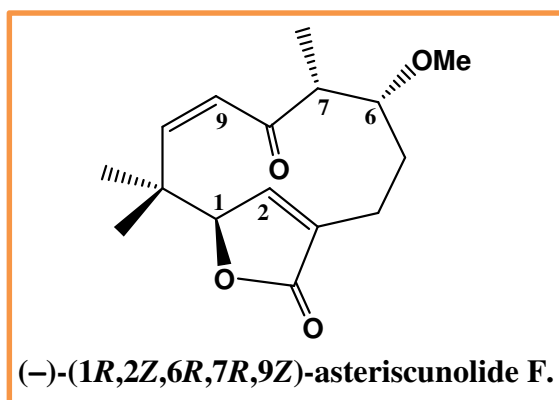


Figure 29 : Corrélations relevées sur le spectre NOESY du composé F

L'ensemble de ces observations, montre que les astérisculolides F et G diffèrent non seulement par la géométrie de leurs double liaison Δ^9 mais aussi par la configuration absolue de leurs centres chiraux C-6 et C-7 ; qui sont opposées.

Tout comme l'astérisculolide G, le composé F est décrit pour la première fois dans la littérature, il lui sera attribué le nom de : (-) astérisculolide F ; sa structure est la suivante :



B.V Identification structurale du composé H :

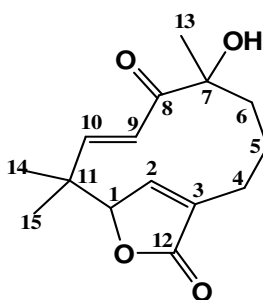
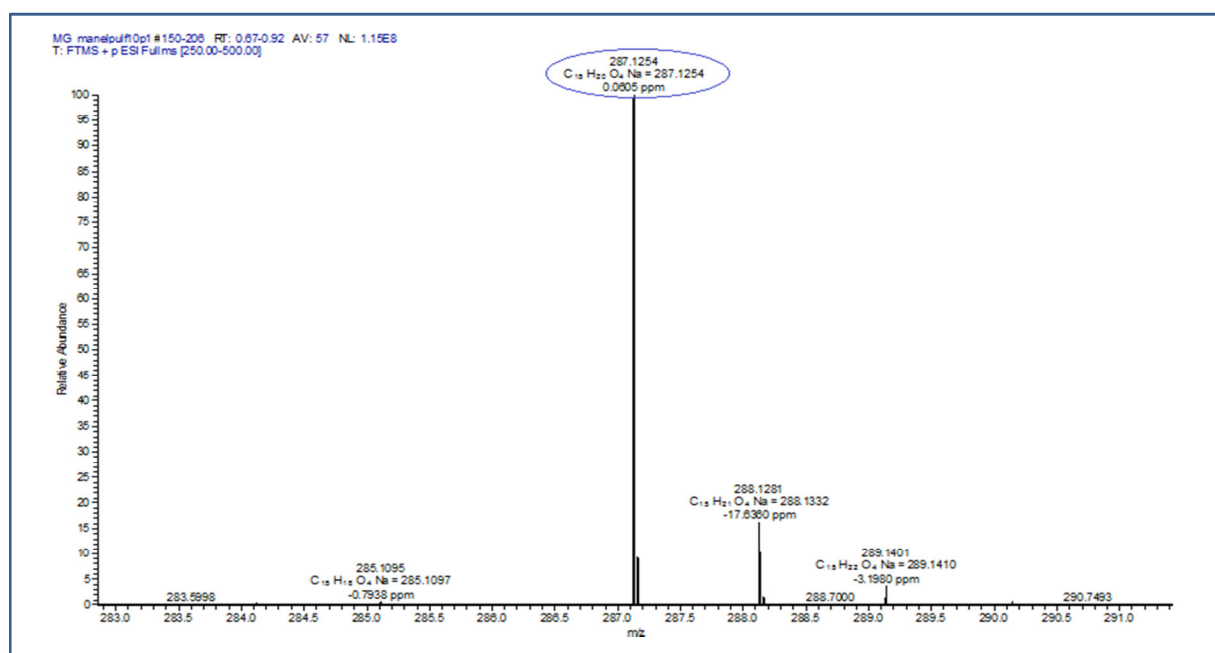


Figure-30 : Le composé H.

Le composé H a la formule moléculaire $C_{15}H_{20}O_4$ déduite du spectre de masse à haute résolution (HRESIMS (+)), (spectre-90), qui affiche un pic quasi-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 287, 1254$ Da; soit une structure de masse de 264 Da comportant six insaturations.

A ce stade du décompte, on relève la présence d'un oxygène supplémentaire comparé au composé E, que l'on peut attribuer dans un premier temps à un groupement OH.



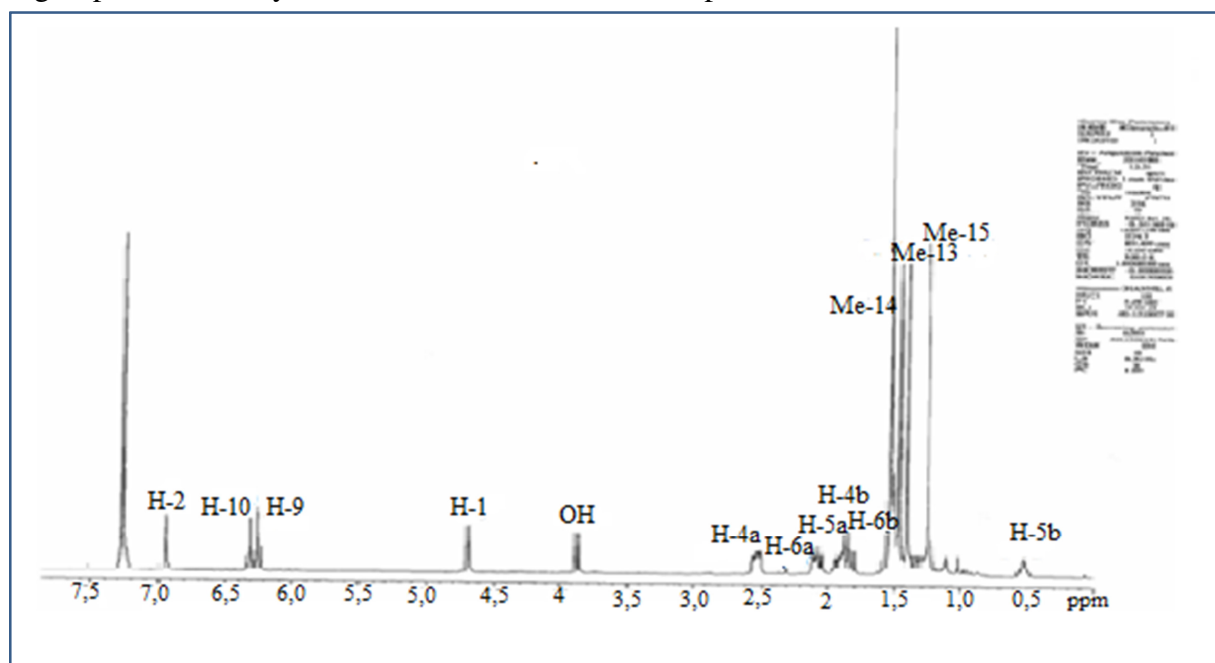
Spectre-90 : Spectre (TOF-HR-ESIMS(+)) du composé H.

En effet le signal de ce groupement OH, apparait sur le spectre RMN 1H (spectre-91) à $\delta_H = 3,86$ ppm.

Une analyse approfondie de ce spectre RMN 1H indique des signaux caractéristiques d'un squelette astérisculolide où la double liaison Δ^6 réduite est analogue à celle de l'asteriscunolide G.

L'ensemble de ces signaux sont attribués aux déplacements des protons suivants :

- ✓ Deux singulets à $\delta_H = 6,94$ ppm et $\delta_H = 4,70$ ppm attribuable respectivement aux protons H-2 et H-1.
- ✓ Des signaux dans la région allant de 0,53 à 2,54 ppm suggérant la présence de trois groupements méthylènes; à savoir :
 - Deux doublets de doublet, l'un à $\delta_H = 2,54$ ppm ($J = 13,0 ; 12,0$ Hz) attribuable à H-4a et le second à $\delta_H = 1,85$ ppm ($J = 13,0 ; 6,5$ Hz) attribuable à H-4b.
 - Un doublet de triplet à $\delta_H = 2,08$ ppm ($J = 14,4 ; 9,3$ Hz); attribuable à H-6a et un multiplet $\delta_H = 1,5$ ppm attribuable à H-6b. Ceci confirme la réduction de la double liaison Δ^6 ;
 - Deux autre multiplets à $\delta_H = 0,53 ; 1,91$ ppm attribuables respectivement à H-5b et H-5a
- ✓ Deux doublets relatif à deux protons éthyléniques : l'un à $\delta_H = 6,32$ ($J = 16,0$ Hz) attribuable à H-10 et le second à $\delta_H = 6,25$ ($J = 16,0$ Hz) attribuable à H-9 ;
- ✓ Trois singulets d'intégrations 3H chacun à $\delta_H = 1,26 ; 1,40$ et $1,46$ ppm en faveur des trois groupements méthyles : Me-15, Me-13 et Me-14 respectivement.

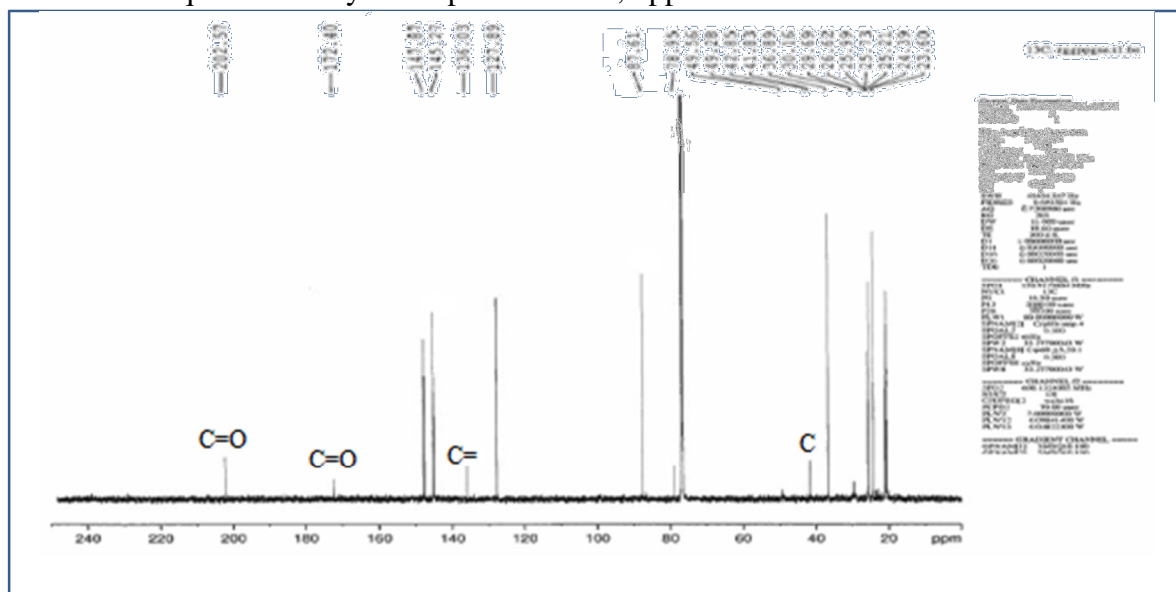


Spectre-91 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) du composé H.

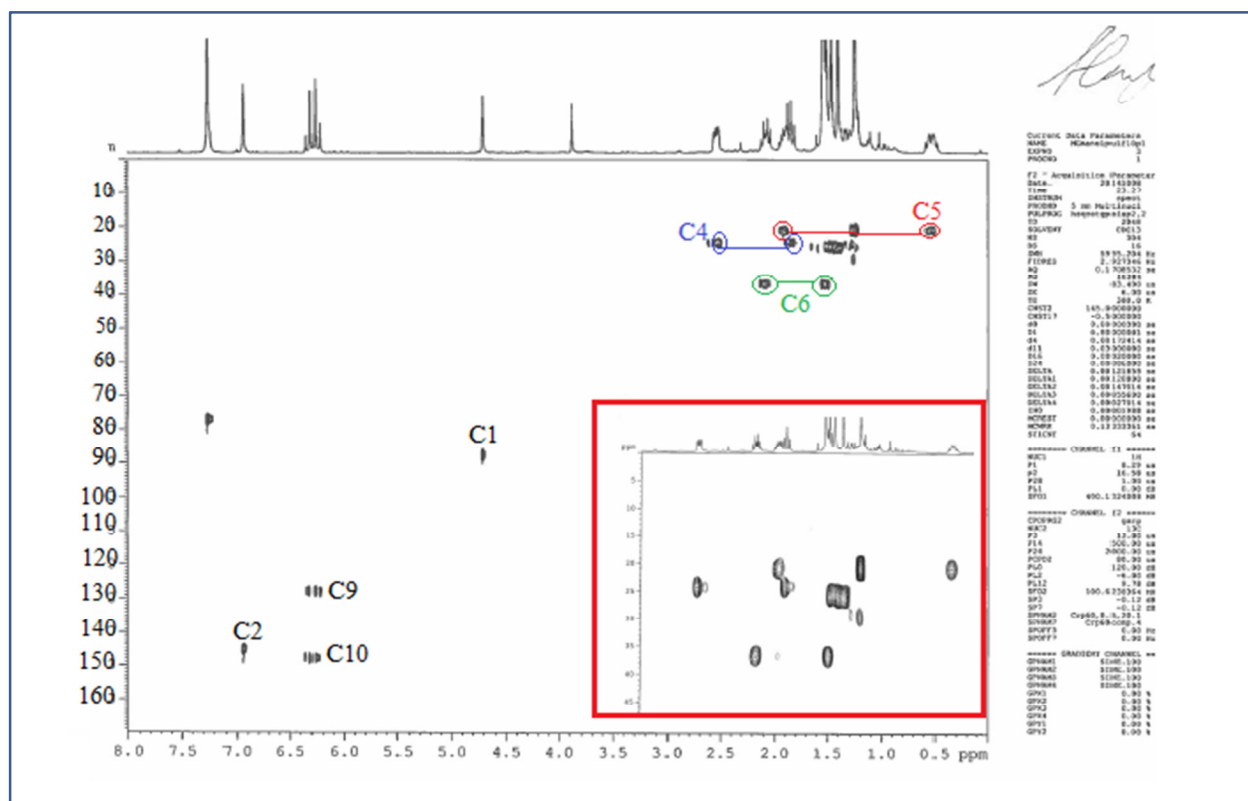
Ce spectre RMN ¹H confronté avec celui du ¹³C (spectre-92) et le spectre hétéronucléaire HSQC (spectre-93) ont permis d'attribuer les déplacements chimiques aux atomes de carbone relatifs à chacun de leurs atomes d'hydrogène respectifs. Ces données sont reportées dans le tableau-24.

Quant aux carbones quaternaires, le spectre-92 montre clairement la présence :

- ✓ D'un carbonyle d'une cétone conjuguée à $\delta_c = 202,6$ ppm et d'un carbonyle caractéristique d'une γ - lactone à $\delta_c = 172,4$ ppm.
- ✓ Deux carbones quaternaires hybridé sp^3 : l'un non oxygéné à $\delta_c = 41,8$ ppm et l'autre oxygéné à $\delta_c = 79,0$ ppm.
- ✓ Un carbone quaternaire hybridé sp^2 à $\delta_c = 136,0$ ppm.



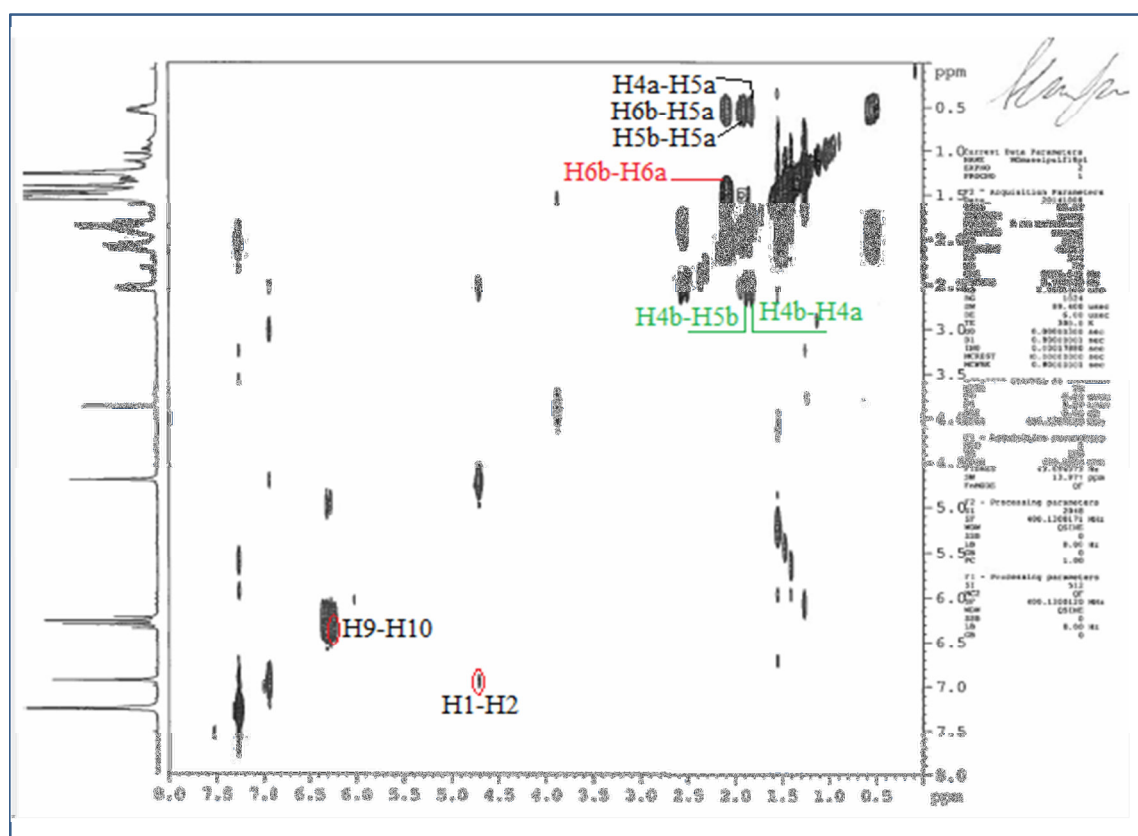
Spectre-92 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) du composé H.



Spectre-93 : Spectre HSQC (400 MHz, $CDCl_3$) du composé H.

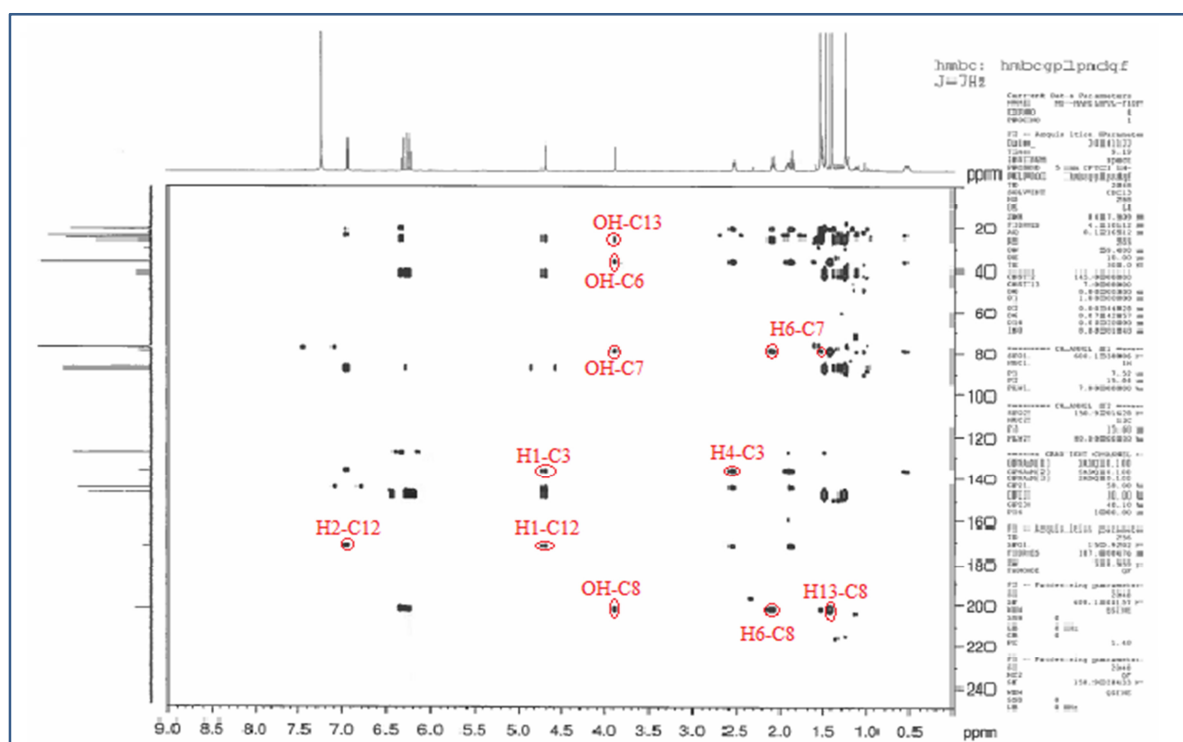
Par ailleurs, la présence des trois groupements méthylènes adjacents suggérés antérieurement en C-4 ($\delta_c = 24,4$ ppm ; $\delta_H = 2,54$ et $1,85$ ppm), en C-5 ($\delta_c = 21,1$ ppm; $\delta_H = 1,91$ et $0,53$ ppm) et en C-6 ($\delta_c = 36,9$ ppm; $\delta_H = 2,08$ et $1,50$ ppm), est confirmée par une analyse 2D du spectre COSY(spectre-94) qui montre les différentes taches de corrélations caractéristiques des protons de ces groupements méthylènes.

Quant au spectre hétéronucléaire HMBC (spectre-95), il montre la présence d'un carbone quaternaire oxygéné en position 7 à $\delta_c = 79,0$ ppm, par ses corrélations d'une part avec les protons des groupements méthylènes CH₂-6 et CH₂-5 et d'autre part, à la fois avec les protons du groupement méthyle Me-13 ($\delta_H = 1,40$ ppm ; $\delta_c = 26,0$ ppm) et le groupement hydroxyle restant. Comme l'exige donc la formule moléculaire, ce carbone C-7 est bien porteur de ces deux groupements.



Spectre-93 : Spectre COSY (400 MHz, CDCl₃) du composé H.

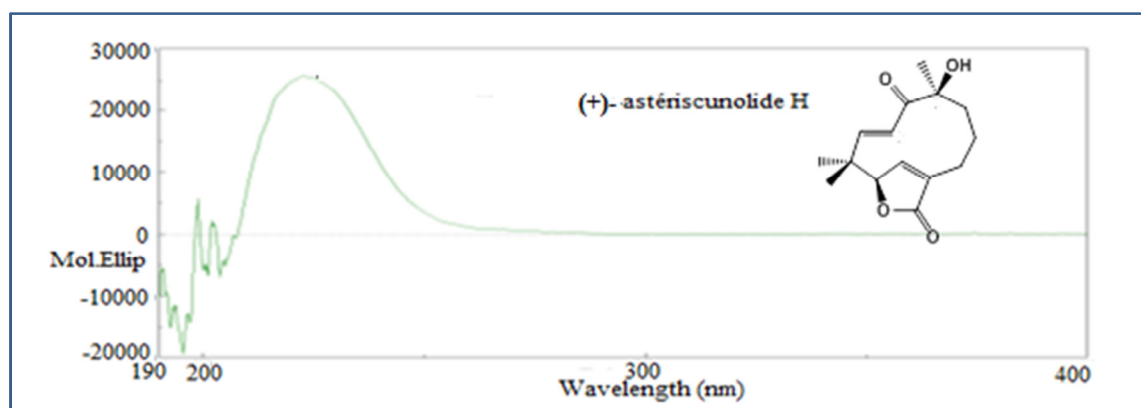
La structure ainsi proposée est en accord avec toutes les valeurs des déplacements chimiques en RMN ¹H et ¹³C, (tableau-24), confirmé à l'aide d'une analyse de l'ensemble des expériences RMN 1D et 2D.



Spectre-94 : Spectre HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) du composé H.

Une étude stéréochimique complémentaire a permis de dégager les données suivantes du composé H :

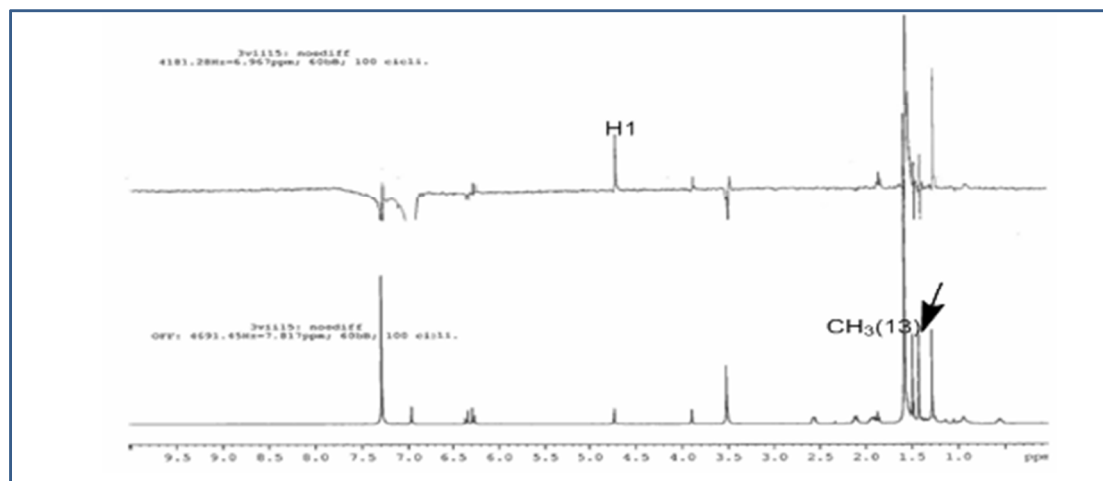
- ✓ La valeur de la constante de couplage $^3J_{H9-H10} = 16,0$ Hz est en faveur d'une géométrie configurationnelle *E* de la double liaison Δ^9 ;
- ✓ Deux données optiques analogues aux asteriscunolides A-D, en effet :
 - Une valeur positive du pouvoir rotatoire spécifique ($[\alpha]_D = + 52,74$; $C = 0,16$ mg/L; $CHCl_3$) ;
 - Un effet Cotton positif du dichroïsme circulaire électronique DCE, associé à la transition $\pi-\pi^*$ de la lactone conjuguée (spectre-95) qui signifie que la configuration absolue du carbone asymétrique C-1 est *R* ; d'où l'orientation α du proton H-1.



Spectre-95 : Profil du dichroïsme circulaire électronique (θ) du composé H (*n*-hexane).

- ✓ Quant à la stéréochimie du centre chiral C-7, elle a été établie grâce à une analyse du spectre «NOE difference » (spectre-96), où l'irradiation du groupement CH₃ en position 13 à $\delta_H = 1,40$ ppm provoque l'augmentation du signal de H-1 (proton de fermeture de la lactone) ayant une orientation α . Par conséquent le groupement Me-13, spatialement voisin du proton H-1, ne peut avoir que la même orientation α , ce qui entraîne une orientation β du groupement OH géminé à ce groupement méthyle.

Ainsi le centre chiral C-7, ne peut être que de configuration absolue S.



Spectre-96 : Spectre «NOE difference » (600 MHz, CDCl₃) du composé H.

L'orientation α du groupement Me-13 et β du groupement OH, ont été confirmées par l'analyse des effets stériques caractéristiques du composé H, qui montrent sur le spectre NOESY (spectre-97) les corrélations dans la même région spatiale (figure-31), suivantes :

- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H-9 et les protons des deux groupements méthyles Me-13 et Me-14 ;
- ✓ Le proton H-1, d'orientation α bien définie, montre deux taches de corrélations l'une avec les protons du groupement méthyle Me-13 et l'autre avec les protons du groupement méthyle Me-14; confirmant ainsi la même orientation α pour l'ensemble de ces groupements.
- ✓ Une tache de corrélation entre le proton H-10 et ceux du groupement Me-15 confirmant l'orientation β de ce groupement.

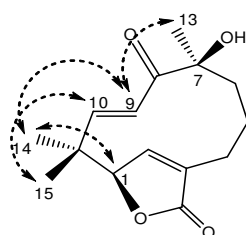
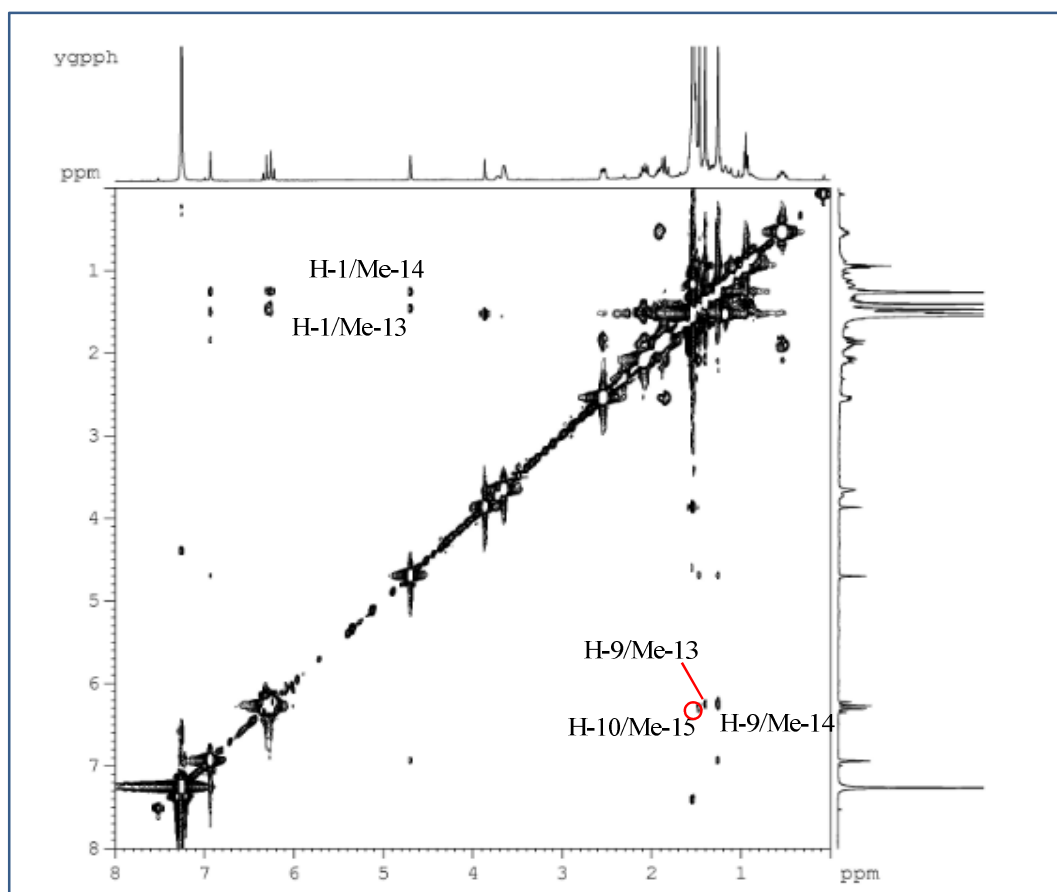


Figure-31 : Corrélations relevées sur le spectre NOESY du composé H.



Spectre-97 : Spectre NOESY (600 MHz, CDCl₃) du composé H.

La stéréochimie du composé H ainsi établie, est représentée dans la structure ci-dessous avec le groupement 7-OH et le cycle γ -lactone orientés sur le même côté de la molécule.

Cette molécule est totalement nouvelle, elle est décrite pour la première fois dans la littérature et nous l'avons nommée **(+)-astérisculide H**.

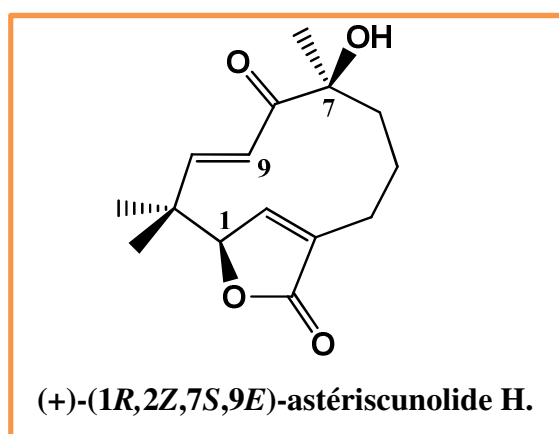


Tableau-24 : Données de la spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C du composé H.

Positions	(+)-(1R,2Z,7S,9E)-astérisculolide H.	
	δ (ppm)	
	δ_{C} , (DEPT)	δ_{H} , multi., J (Hz)
1	87,6 (CH)	4,70 <i>sl</i>
2	145,3 (CH)	6,94 <i>sl</i>
3	136,0 (C)	-
4 a	24,4 (CH ₂)	2,54 <i>ddl</i> (13,0; 6,5)
4 b	-	1,85 <i>ddl</i> (13,0; 12,0)
5 a	21,1 (CH ₂)	1,91 <i>m</i>
5 b	-	0,53 <i>m</i>
6a	36,9 (CH ₂)	2,08 <i>dt</i> (14,4; 9,3)
6b	-	1,50 <i>m</i>
7	79,0 (C)	-
8	202,6 (C)	-
9	127,9 (CH)	6,25 <i>d</i> (16,0)
10	147,9 (CH)	6,32 <i>d</i> (16,0)
11	41,8 (C)	-
12	172,4 (C)	-
13	26,0 (CH ₃)	1,40 <i>s</i>
14	25,7 (CH ₃)	1,46 <i>s</i>
15	20,8 (CH ₃)	1,26 <i>s</i>
7-OH	-	3,86

B.VI. Conclusion sur l'étude structurale des composés issus de l'espèce***Pulicaria undulata* L. :**

A l'issue de l'étude de la composition chimique de l'extrait chloroformique de l'espèce *Pulicaria undulata* L ; dix sesquiterpènes ont été isolés pour la première fois de l'espèce *Pulicaria undulata*, dont :

Un sesquiterpène de type humulène :

- **M** : (-)-(2Z,9E)-méthyle pulicaroate;

Neuf sesquiterpènes lactones de type asteriscunolide :

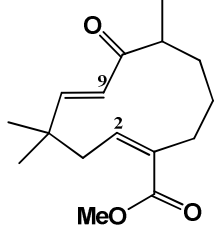
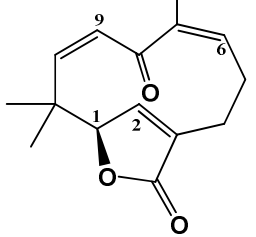
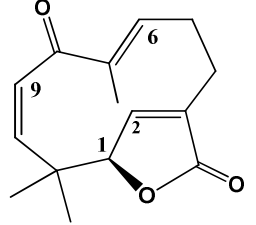
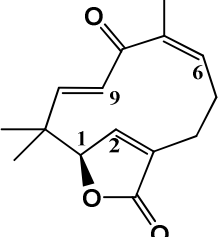
- **A** : (+)-(1R,2Z,6Z,9Z)-astérisculolide A ;
- **B** : (+)-(1R,2Z,6E,9Z)-astérisculolide B ;
- **C** : (+)-(1R,2Z,6Z,9E)-astérisculolides C ;
- **D** : (+)-(1R,2Z,6E,9E)-astérisculolides D ;
- **T** : (+)-(1R,2Z,7R)-6,7,9,10-tétrahydro-astérisculolide ;
- **E** : (+)-(1R,2Z,6Z)-astérisculolide E ;
- **F** : (-)-(1R,2Z,6R,7R,9Z)-astérisculolide F ;
- **G** : (-)-(1R,2Z,6S,7S,9E)-astérisculolide G ;
- **H** : (+)-(1R,2Z,7S,9E)-astérisculolide H.

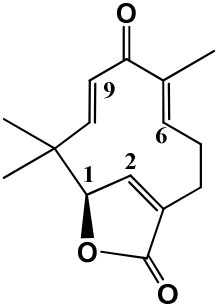
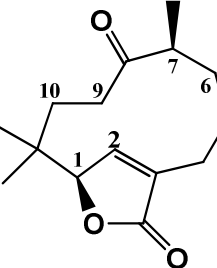
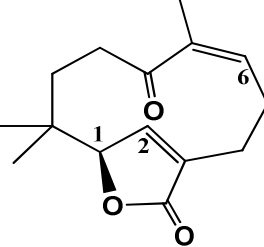
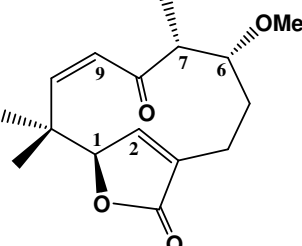
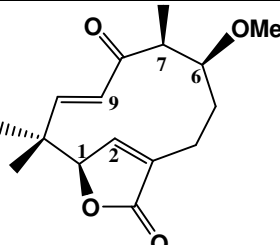
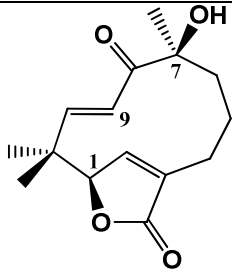
Mise à part le sesquiterpène de type humunlène et les astérisculolide dérivés : T, E et H, les six autres astérisculolides sont reliés par les relations de stéréoisomérisie suivantes :

- Les composés A, B, C et D sont des isomères différents entre eux dans la géométrie configurationnelle de leurs doubles liaisons Δ^6 et/ou Δ^9 ;
- Quant aux composés G et F ; ce sont deux isomères différents entre eux, aussi bien dans la géométrie configurationnelle de leur double liaison Δ^9 que dans la configuration absolue de leurs centres chiraux C-6 et C-7.

Tous ces composés naturels, identifiés pour la première fois dans l'espèce *Pulicaria undulata*. L, ont fait l'objet de la troisième publication internationale de ce travail de recherche. Le tableau-25 suivant, rassemble l'ensemble de ces structures avec leurs données : UV, IR, le pouvoir rotatoire spécifique et le dichroïsme circulaire électronique « ECD ».

Tableau-25 : Les différents composés isolés de l'espèce *Pulicaria undulata*. L.

Composé	Formule Brute	Structure du composé	Données
M	$C_{16}H_{24}O_3$		<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = -8,14$ (c 0,25; $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 215 (3,58); 208 (3,56); 201 (3,58) nm; ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1740, 1710 cm^{-1}.
A	$C_{15}H_{18}O_3$		<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = +62,7$ (c 0,11 ; $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 247 (3,73); 239 (3,79); 218 (3,99); 205 (3,92); 201 (3,91) nm; ✓ ECD (n-hexane; c $8,13 \times 10^{-5}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 345 (-0,12); 268 (+0,81); 226 (+4,70); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1752, 1631 cm^{-1}.
B			<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = +7,4$ (c 0,14; $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 250 (3,62); 225 (3,86); 212 (3,92); 202 (3,96) nm; ✓ ECD (n-hexane; c $1,02 \times 10^{-4}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 345 (-0,34); 245 (+1,92), 223 (-4,25); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1750, 1658 cm^{-1}.
C			<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = +109,2$ (c 0,11; $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 225 (3,51); 220 (3,54); 211 (3,58); 202 (3,57) nm; ✓ ECD (n-hexane, c $2,39 \times 10^{-4}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 351 (+2,90), 260 (-2,37), 224 (+6,50); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1762, 1638 cm^{-1}.

D	$C_{15}H_{18}O_3$		<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = + 37,1$ (c 0,10; $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 216 (3,54); 202 (3,64) nm; ✓ ECD (n-hexane, c $1,45 \times 10^{-5}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 2.68 (-3,10), 229 (+ 6,10); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1757, 1643 cm^{-1}.
T	$C_{15}H_{22}O_3$		<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = + 8,1$ (c 0,25; $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 216 (3,94); 202 (3,95) nm; ✓ ECD (n-hexane, c $7,4 \times 10^{-5}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 225 (+ 4,2); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1751, 1712 cm^{-1}.
E	$C_{15}H_{20}O_3$		<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = + 50,2$ (c 0,02, $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 218 (3,18), 201 (3,45) nm; ✓ ECD (n-hexane, c $7,5 \times 10^{-5}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 226 (+ 6,21); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1768, 1643 cm^{-1}
F	$C_{16}H_{22}O_4$		<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = -312,7$ (c 0,03, $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 215 (3,58); 208 (3,56); 201 (3,58) nm; ✓ ECD (n-hexane, c $1,28 \times 10^{-4}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 233 (+ 5,49); 210 (-3,45); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1756, 1691 cm^{-1}.
G	$C_{16}H_{22}O_4$		<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = -547,7$ (c 0,05, $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 228 (5,28); 218 (3,78); 204 (3,85) nm; ✓ ECD (n-hexane; c $1,2 \times 10^{-4}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 218 (+ 6,79); 196 (-5,03); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1745, 1683 cm^{-1}.
H	$C_{15}H_{20}O_4$		<ul style="list-style-type: none"> ✓ $[\alpha]_D = + 52,7$ (c 0,16; $CHCl_3$); ✓ UV (EtOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 218 (3,23); 214 (3,24); 201 (3,29) nm; ✓ ECD (n-hexane, c $1,5 \times 10^{-4}$) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 223 (+ 7,74); ✓ IR (film liquide) ν_{max} 1736, 1685 cm^{-1}.

Références IV.

- [1] V. S. Prakash Chaturvedula, I. Prakash. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2013, 5(1), 261-265
- [2] A. Uehara, M. Nakata, J. Kitajima, T. Iwashina. *Biochemical Systematics and Ecology* 2012, 41, 142–149.
- [3] Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L., Bailleul, F. Polyphenols from *Ballota acetabulosa*. *Biochem. Syst. And Ecol* 2002. 30, 601-604.
- [4] Arborne, J.B. *The flavonoids-Advances in research since 1986*, 1994. Editions Chapman & Hall, Cambridge.
- [5] Agrawal, P.K. *Carbone-13NMR of flavonoids*. Editions Elsevier, 1989, New-York,
- [6] M. Aritomi, *Chem. Pharm. Bull.*, 1963, 11, 1225-1228.
- [7] Zhu, X.F.; Zhang, H. X. ; L.R., Three di-O-caffeoylquinic acid derivatives from the heads of *cynara scolymus*. *Natural product Research* 2009, 23, 527-532.
- [8] Carnat, A.; Heitz, A., Fraisse, D.; Carnat, A.P., Lmaison, J.L., Majordicaffeoylquinic acids from *Artemisia vulgaris*. *Fitoterapia* 2000, 71, 587-589.
- [9] Ternai B., Markham K.R. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I: Flavones and flavonols. *Tetrahedron* 1976, 32(5), 565-569.
- [10] Vvedenskaya I.O., Rosen R.T., Guido J.E., Russell D.J., Mills K.A., and Vorsa N. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52(2), 188-195.
- [11] Kong, C.S.; Kim, Y.A.; Kim, M.m., Park, J.S.; Kim, J.A.; Kim, S.K.; Lef, B.J.; Nam, T.J.; Seo, Y., *Toxicol. In Vitro*, Flavonoid glycosides isolated from *Salicornia herbacea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells, (22), 2008, 1742-1748.
- [12] A.G. Ramachandran Nair, S.Mohandoss et Bernard Voirin. L'ultraviolet visible spectroscopy of certain rare flavonoids. *current science*. 1989, 58, 7
- [13] Ulubelen, A. et T. J. Mabry. Flavonoids of *Haplopappus rengifoanus* Remy in Gay. *J. Nat. Prod. (Lloydia)*. 1981, 44, 294.
- [14] Markham, K.R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London.
- [15] Mabry T.J., Markham K.R., and Thomas M.B. (1970) *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag. Berlin.
- [16] Ramachandran AG, Kotiyal JP. Stereolensin- A new flavone glucoside from *Stereospermum suaveolens*. *Indian J Chem* 1979; 18B: 188-189.

- [17] San Feliciano, A., Barrero, A.F., Medarde, M., Miguel del Corral, J.M., Aramburu Aizpiri, A., Sánchez-Ferrando, F., Asteriscunolides A, B, C and D, the first humulanolides; two pairs of conformationally stable stereoisomers. *Tetrahedron*. 1984, 40, 873–878.
- [18] San Feliciano, A., Barrero, A.F., Medarde, M., Miguel del Corral, J.M., Ledesma, E., Sánchez-Ferrando, F., Asteriscunolide A: humulanolide from *Asteriscus aquaticus*. *Tetrahedron Lett.* 1982, 23, 3097–3100.
- [19] San Feliciano, A., Barrero, A.F., Medarde, M., Miguel Del Corral, J.M., Aramburu, A., Perales, A., Fayos, J., Sánchez-Ferrando, F., The stereochemistry of asteriscunolides: an X-ray based correction. *Tetrahedron*. 1985a, 41, 5711–5717.
- [20] El Dahmy, S., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Sarg, T.M. New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron*, 1985, 41, 309–316.
- [21] Jakupovic, J., Lehmann, L., Bohlmann, F., Arroyo Hogdson, A. Nerolidol derivatives from *Asteriscus sericeus*. *Phytochem* , 1987, 26, 2854–2855.
- [22] Bohlmann, F., Pauls, A. Humulane derivatives from *Nauplius intermedius*. *Phytochem*, 1992, 31, 1663–1665.
- [23] Rauter, A.P., Branco I., Bermejo, J., González, A.G., García-Grávalos, M.D., San Feliciano, A., Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii*. *Phytochem*. 2001, 56, 167–171.
- [24] Akssira, M., Mellouki, F., Salhi, A., Alilou, H., Saouf, A., El Hanbali, F., Arteaga, J.F., Barrero, A.F. Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens* subsp. *odorus*. *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 6719–6721.
- [25] Chaari, A., Jannet, H.B., Mighri, Z., Robinot, C., Kunesch, N. Isolation and structure determination of a new sesquiterpene lactone from *Nauplius aquaticus*. *Nat. Prod. Lett.*, 2001, 15, 419–423.
- [26] Trost, B.M., Burns, A.C., Bartlett, M.J., Tautz, T., Weiss, A.H., Thionium ion initiated medium-sized ring formation: the total synthesis of asteriscunolide D. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 1474–1477.
- [27] Fernandes, R.A., Chavan, V.P. A 12-membered to a strained 11-membered ring: first stereoselective total synthesis of (-)-asteriscunolide C. *Chem. Commun.* 2013, 49, 3354–3356.
- [28] Liang, Y.; Jiang, X.; Fu, X.-F.; Ye, S.; Wang, T.; Yuan, J.; Wang, Y.; Yu, Z.-X. *Chem. Asian J.* 2012, 7, 593–604.

- [29] Han, J.C., Li, F., Li, C.C. Collective synthesis of humulanolides using a metathesis cascade reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 13610–13613.
- [30] Triana, J.; Eiroa, J.L.; Morales, M.; Perez, F.J.; Brouard, I.; Quintana, J.; Ruiz-Estévez, M.; Estévez, F.; Leon, F. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 1292–1297.
- [31] Furihata, K.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 6271–6275.
- [32] Furihata, K.; Tashiro, M.; Seto, H. *Magn. Reson. Chem.* 2009, 47, 814–818.
- [33] J-Resolved HMBC experiments have been recorded on a Bruker Avance III HD spectrometer equipped with a CryoProbeTM Prodigy using the phase-sensitive ge-2D HMBC with a two-fold low-pass J-filter (hmbcetgpl2nd) pulse sequence.
- [34] Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana K. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 866–876.

CHAPITRE V

ACTIVITES BIOLOGIQUES

A. Activité antioxydante des extraits CHCl₃, EtOAc et *n*-BuOH de l'espèce *Echinops spinosus* L. :

I. Introduction :

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans produire d'effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent de maintenir la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit. Un antioxydant alimentaire idéal et efficace, doit être soluble dans les graisses et non toxique. A faible dose, l'antioxydant n'entraîne ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable, résistant ainsi aux processus technologiques [1].

II. Mécanisme d'action :

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques, tels les dérivés du phénol. En plus, leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur [2].

III. Évaluation de pouvoir antioxydant :

Des nombreuses méthodes sont utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques purs ou des extraits. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydante sont attribuées en

partie, à la capacité de ces composés naturels a piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyyles (OH^{\bullet}) et superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) [3-4].

Cette étude portera sur la recherche de l'activité antioxydante des extraits : chloroformique ($CHCl_3$), acétate d'éthyle (EtOAc) et butanolique (n -BuOH) ; des parties aériennes de l'*Echinops spinosus*, en utilisant comme référence l'activité des antioxydants synthétiques tels le Trolox et la vitamine C.

Cette étude se traduira par de nouvelles connaissances sur les activités antioxydants de l'espèce Algérienne *Echinops spinosus* L., peu connues dans ce domaine d'étude biologique. Pour ce fait nous avons évalué l'effet (scavenger) en utilisant comme modèles d'essais : le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), le radicale HO^{\bullet} libre et le β -carotène additionné à l'acide linoléique.

IV. Matériels et méthodes :

IV.1 Activité scavenger du radical DPPH :

Le DPPH radical libre relativement stable à température ambiante, est l'un des premiers radicaux employé dans l'étude de la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques purs ou de mélange complexe. Sachant que sa bande d'absorbance est à 517 nm ; la méthodologie consiste à évaluer la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant [5].

Une solution méthanolique de DPPH affiche une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant, la forme réduite DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance.

Le DPPH initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire sur l'atome du pont d'azote s'apparie avec un atome d'hydrogène (figure-1).

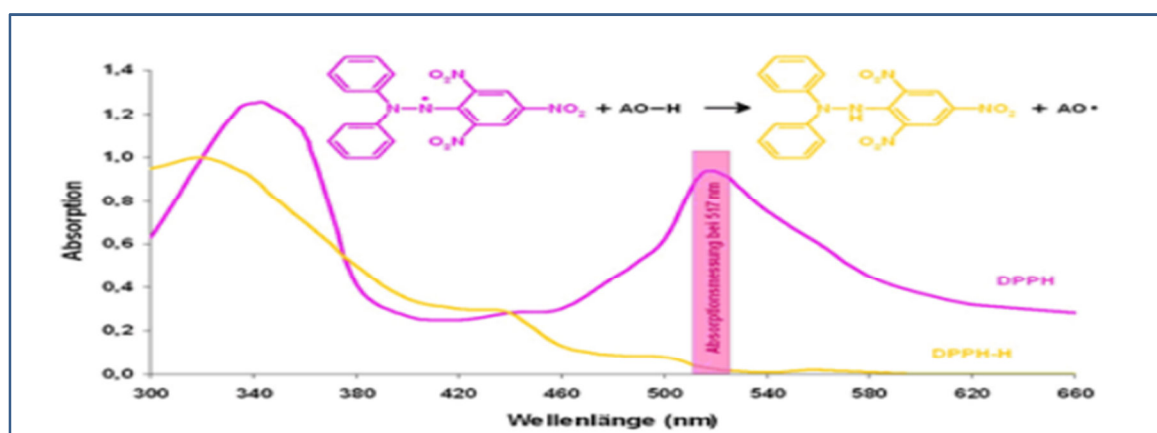


Figure -1 : Principe du test de l'activité antioxydante en présence du DPPH.

Cette décoloration est représentative de la capacité des antioxydants à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique. Ce test nous permet donc d'obtenir des informations sur le pouvoir anti-radicalaire direct de nos extraits.

Afin d'évaluer l'activité scavenger des radicaux libres des différents extraits de l'*Echinops spinosus*, le radical DPPH a été utilisé avec quelques modifications selon les données de la littérature [6].

2 ml d'extrait de plante ont été mélangés avec 1 ml de DPPH (0,5 mM) dans le méthanol. Le mélange ainsi obtenu est agité et laissé au repos dans l'obscurité à température ambiante pendant 15 min.

Le contrôle blanc est préparé avec un mélange de 2 ml d'extrait de plante et 1ml de méthanol. Le mélange de 1 ml de DPPH (0,2 mM) avec 2 ml de méthanol, constituera le contrôle négatif, alors que les deux vitamines C et Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique) seront utilisées comme contrôles positifs.

L'absorbance du mélange a été mesurée par spectrophotométrie à 518 nm contre le blanc et l'inhibition du radical DPPH a été calculée à partir de l'équation (1) suivante :

$$Inhibition (\%) = \left(\frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

A_c : Absorbance du contrôle ;

A_s : Absorbance de l'échantillon à tester.

IV.2 Activité scavenger du radical hydroxyle (OH^\bullet) :

L'activité scavenger du OH^\bullet a été évaluée par un test de dégradation du désoxyribose [7].

Dans cette étude, on a utilisé le mélange formé avec le complexe Fe^{3+} -EDTA, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'acide vitamine C, susceptible de générer des radicaux (OH^\bullet).

L'attaque du désoxyribose par ces radicaux libres (OH^\bullet) va engendrer la cassure du cycle furane et produire ainsi du malondialdéhyde (MDA). Par la suite, le MDA est combiné avec l'acide thiobarbiturique (2-TBA), pour former complexe MDA/TBA qui va générer un chromogène à $\lambda_{max} = 532 (nm)$. Par conséquent, la valeur de cette absorbance reflètera la quantité des radicaux (OH^\bullet).

Trolox et la vitamine C et ont été utilisées comme témoins positifs.

L'effet inhibiteur sur l'activité du radical hydroxyle a été calculé par l'équation (1) précédente.

IV. 3 Teste de blanchissement du mélange β -Carotène/acide linoléique :

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène.

L'oxydation du couple β -carotène /acide linoléique a été déterminée par la méthode décrite par « Chew *et al.* » [8]. L'acide linoléique et le Tween 40 (polysorbate 40) ont été ajoutés à la solution de β -carotène dans du chloroforme (100 $\mu\text{g/ml}$). Une fois le chloroforme évaporé, une eau ultra-pure saturée en oxygène est ajoutée au résidu.

L'émulsion du mélange β -carotène/acide linoléique a été secouée énergiquement, puis des aliquotes de cette émulsion ont été ajoutées aux extraits.

L'absorbance (Abs initiale) est mesurée dès l'ajout de l'émulsion sur l'échantillon à 470 nm, puis une lecture de l'absorbance est effectuée après 2 heures d'incubation dans un bain d'eau à une température de 50°C.

Trolox et la vitamine C ont été utilisés comme témoins positifs et l'activité antioxydante des échantillons a été calculée en utilisant l'équation (2) suivante :

$$I(\%) = \left(\frac{\text{Abs } \beta\text{-carotène après 2 h dosage}}{\text{Abs initial } \beta\text{-carotène}} \right) \times 100 \quad (2)$$

IV.4 Résultats et discussions :

IV.4.1 Activité scavenger du radical ($DPPH^\bullet$) :

Dans l'investigation de l'activité antioxydante, l'un des mécanismes de recherche est l'activité scavenger du radical par un proton (figure-1). Cette étude portera sur la mesure de la capacité antioxydante en utilisant la réaction du $DPPH^\bullet$, où la présence d'antioxydants dans un milieu conduit à la disparition du $DPPH^\bullet$ chromogènes [9].

À 100 $\mu\text{g/mL}$, les deux extraits *n*-BuOH (84,86 %) et AcOEt (65,69 %), de l'espèce *Echinops spinosus* L. ont montrés une puissante activité scavenger du radical DPPH.

En effet, l'extrait *n*-BuOH affiche l'effet scavenger le plus élevé avec une $IC_{50} = 39,51 \pm 3,23$ $\mu\text{g/ml}$ suivie de l'extrait AcOEt avec une $IC_{50} = 56,10 \pm 2,05$ $\mu\text{g/mL}$ et l'extrait $CHCl_3$ avec une $IC_{50} = 60,12 \pm 3,79$ $\mu\text{g/ml}$, comparés aux antioxydants utilisés comme témoins positifs : le Trolox ($IC_{50} = 8,78 \pm 1,06$ $\mu\text{g/ml}$) et la vitamine C ($IC_{50} = 11,70 \pm 0,15$ $\mu\text{g/ml}$).

Les résultats de ce test, apparaissent dans les courbes de la figure-2 ci-après, et illustrent les pourcentages de l'activité anti-radicalaire des extraits CHCl_3 , AcOEt et *n*-butanol de l'espèce *Echinops spinosus* L. vis-à-vis du radical libre DPPH.

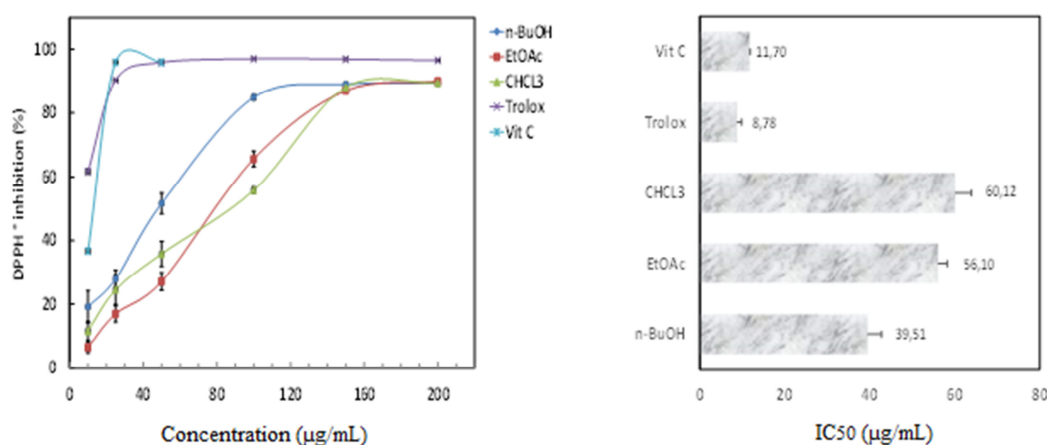


Figure 2: Activité scavenger du radical DPPH de différents extraits et des standards. Chaque valeur représente une moyenne \pm un écart-type ($n = 3$), $P < 0,05$.

IV.4.2 Activité scavenger du radicale hydroxyle (HO^\bullet) :

Comme illustré dans la figure-3, les deux extraits : *n*-BuOH et AcOEt de l'*E. spinosus* L. inhibent efficacement la formation de OH^\bullet , via une concentration dépendante.

À 250 $\mu\text{g/ml}$, l'extrait *n*-BuOH (85,82%) montre l'activité la plus élevée avec une $\text{IC}_{50} = 85,72 \pm 2,81 \mu\text{g/ml}$.

Avec les mêmes concentrations, l'extrait d'AcOEt (66,08 %) indique un potentiel scavenger plus puissant ($\text{IC}_{50} = 169,87 \pm 2,19 \mu\text{g/ml}$) que l'extrait de CHCl_3 (34,95%) avec une $\text{IC}_{50} = 456,37 \pm 8,92 \mu\text{g/mL}$.

Quant aux témoins positifs, ils ont donné le résultat suivant : le Trolox ($\text{IC}_{50} = 26,34 \pm 0,84 \mu\text{g/mL}$) et la vitamine C ($\text{IC}_{50} = 30,43 \pm 1,29 \mu\text{g/ml}$).

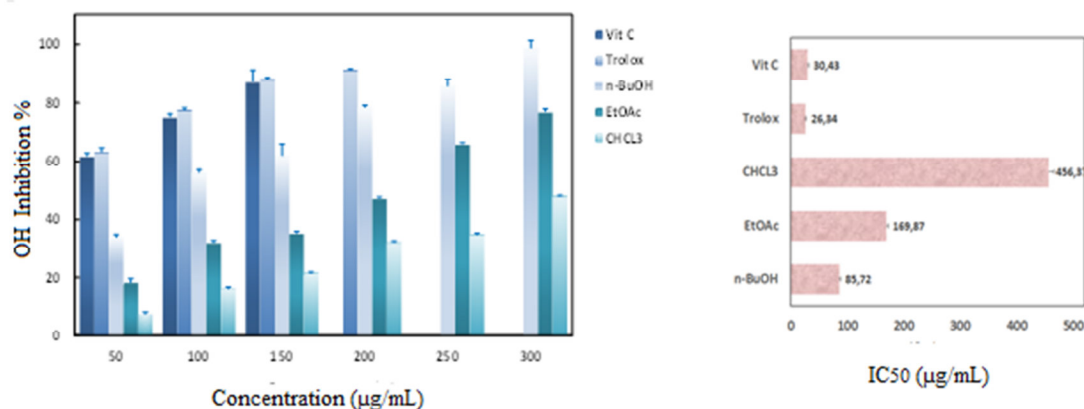


Figure-3 : Activité scavenger des radicaux OH^\bullet des extraits et des standards. Chaque valeur représente une moyenne \pm SD ($n = 3$), $P < 0,05$.

IV.4.3 Test de blanchissement du mélange β -Carotène/acide linoléique :

Dans le test de blanchissement β -carotène / acide linoléique, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux libres dérivés de l'hydroperoxyde qui vont attaquer le chromophore du β -carotène et entraîner, dans la réaction, une décoloration de l'émulsion [8].

A une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ du mélange réactionnel final, les deux extraits *n*-BuOH (79,06%) et l'AcOEt (66,02%) inhibent, de manière efficace, la peroxydation de l'acide linoléique et le blanchiment ultérieur de la β -carotène à des degrés divers. Ces valeurs sont comparables aux deux antioxydants synthétiques : le Trolox (88,68%) et la vitamine C (87,31%) (figure-4a,b).

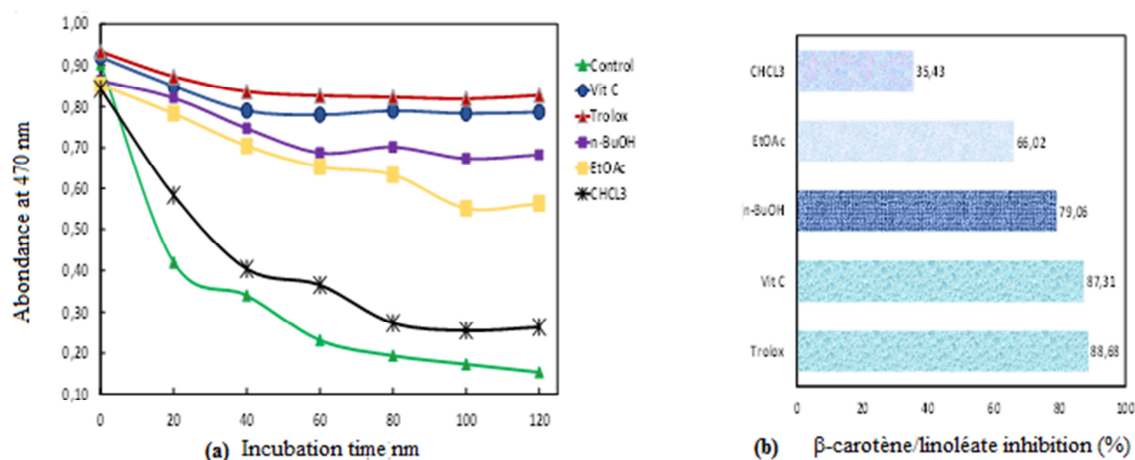


Figure-(4a-b): Inhibition de la β -carotène-linoléate dans les différents extraits en présence des standards. Chaque valeur représente un moyenne \pm écart-type ($n = 3$), $P < 0,05$.

Le radical le plus réactif est l'hydroxyle qui induit de grave dommage à des biomolécules adjacents tels que les protéines, l'ADN et les lipides en causant leurs peroxydations, la carcinogénèse, la mutagénèse et la cytotoxicité [10]. Il a été bien connu que les composés phénoliques sont en mesure de céder un atome d'hydrogène aux radicaux libres stoppant ainsi la propagation des chaînes de réaction durant le processus d'oxydation lipidique [11,12].

La présence de différents antioxydants dans les extraits de l'*Echinops spinosus* L. peut gêner la mesure de blanchissement du β -carotène, en neutralisant le radical libre linoléate et d'autres radicaux libres formés dans le système réactionnelle.

V. Conclusion :

Les activités antioxydantes des composés phénoliques sont principalement dues à leurs propriétés redox qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogènes, piègeurs d'oxygènes singulets, d'ions superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et chélateurs de métaux [13].

Dans notre étude, les trois extraits de l'*Echinops spinosus* L. ont montrés des comportements différents dans les réponses aux différents types de dosages d'antioxydants et ont révélé l'effet scavenger des radicaux le plus élevé de l'extrait *n*-BuOH. Ceci semble être lié à la richesse de l'extrait en polyphénols et flavonoïdes et également à l'effet structure-activité des composés de cet extrait, à savoir : le 3-*O*-glucoside quercétine, le 6-*O*-glucopyranoside scutellaréine, la stéréolensine et la cynarine (acide 1,5-di-*O*-caféoylquinique).

Les différences relevées, dans les réponses, entre les extraits peuvent être expliquées sans doute par la présence de beaucoup plus de substances bioactives dans le *n*-BuOH que ceux trouvés dans les autres extraits. L'effet scavenger des radicaux faible dans l'extrait AcOEt peut être liée à la présence de seulement trois flavonoïdes tels l'apigénine et ses dérivés : le 7-*O*- β -glucopyranosyl apigénine, le 7-*O*- β -*D*-(6''-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)-glucopyranosyl apigénine ce qui n'est pas le cas pour l'extrait chloroformique.

De ces résultats, on peut conclure que les composés phénoliques de l'espèce *Echinops spinosus* L. pourraient être une bonne source phytochimique pour leur activité prometteuse en tant qu'agents antioxydants.

B. L'activité anti-inflammatoire de l'extrait chloroformique et deux composés purs de l'espèce *Pulicaria undulata* :

I. Introduction :

L'étude des propriétés anti-inflammatoires a été effectuée par des expériences *in vitro* et *in vivo* sur l'extrait CHCl₃ et sur une sélection de composés purs de l'humulène. L'extrait a été testé, en particulier, comme inhibiteur dans la dénaturation de l'albumine et également dans le test de l'œdème de la patte induit par le carraghénane (ou la carraghénine).

II. L'inhibition de la dénaturation de l'albumine :

L'inhibition de la dénaturation de l'albumine a été testée en utilisant le procédé de Mizushima et Kobayashi[14]. Le mélange réactionnel se constitue de :

- (50-500 μ g/ml) d'extrait chloroformique de la *P. undulata* ;
- (0,5-10 μ M) du composé (A) : (+) - asteriscunolide A ou du composé (M): l'acide ester méthylique pulicaroiïque ;
- Et d'une solution aqueuse à 1% d'albumine de serum de bovin (ABS).

Le pH du mélange réactionnel est ajusté à 6,3 avec HCl (1N) et les échantillons ont été soumis à une incubation à une température de 37°C pendant 20 min, puis chauffé à 51°C

pendant 20 min. Après refroidissement, la turbidité a été mesurée par spectrophotométrie à 660 nm.

Les résultats ont été comparés à un anti-inflammatoire standard le diclofenac sodique à différentes doses (50, 100, 200 µg/ml) et l'inhibition, exprimée en pourcentage, a été calculée selon la formule (3) suivante :

$$Inhibition (\%) = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

A₀ : Absorbance de la réaction témoin ;

A₁ : Absorbance de l'échantillon standard le diclofenac sodique.

III. Œdèmes de la patte chez les souris induit par la carraghénane :

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait CHCl₃ de la *P. Undulata* sur l'œdème de la patte induit par la carraghénane, a été déterminée selon Winter et al. [15].

Les souris dont le poids varie entre (25 et 30 g) ont été divisés en quatre lots de 5 chacun. Le premier lot a été utilisé comme témoin recevant, par voie orale, le véhicule tampon phosphate salin (PBS de l'anglais « phosphate buffered saline ») et le deuxième lot a été utilisé comme référence recevant le diclofenac- sodique (10 mg/kg). Quant aux troisième et quatrième lots, ils ont reçu respectivement par voie orale, 150 et 300 mg/ kg d'extrait CHCl₃.

Une heure plus tard, l'œdème de la patte a été induit par l'injection de 0,1 ml de 1% de la carraghénane dans le tissu plantaire secondaire de la patte arrière gauche des souris.

La progression de l'œdème a été évaluée durant (1, 2, 3 et 4 h) via l'augmentation du volume en (mL) par une mesure pléthysmométrique et le pourcentage d'inhibition de l'inflammation a été calculé à partir de la formule (4) suivante :

$$\% d'inhibition = \left(\frac{D_0 - D_t}{D_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

D₀ : Inflammation moyenne (patte postérieure de l'œdème) du groupe témoin de souris à un moment donné ;

D_t : Inflammation moyenne des souris traitées par la drogue (extrait ou la référence le diclofenac sodique) en même temps.

IV. Résultats et discussion :

IV.1 L'inhibition de la dénaturation de l'albumine :

La figure-5 montre l'effet, sur la dénaturation des protéines, de l'extrait CHCl₃ de l'espèce *P. undulata*, (noté : CEPU) à différentes concentrations allant de 50 à 500 µg/ml, comparée à un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien classique (le sel diclofenac sodique).

La concentration préventive de l'extrait (CEPU) a été observée à 500 µg/ml, avec une valeur de : $IC_{50} = 199,88 \pm 21,96$ µg/ml.

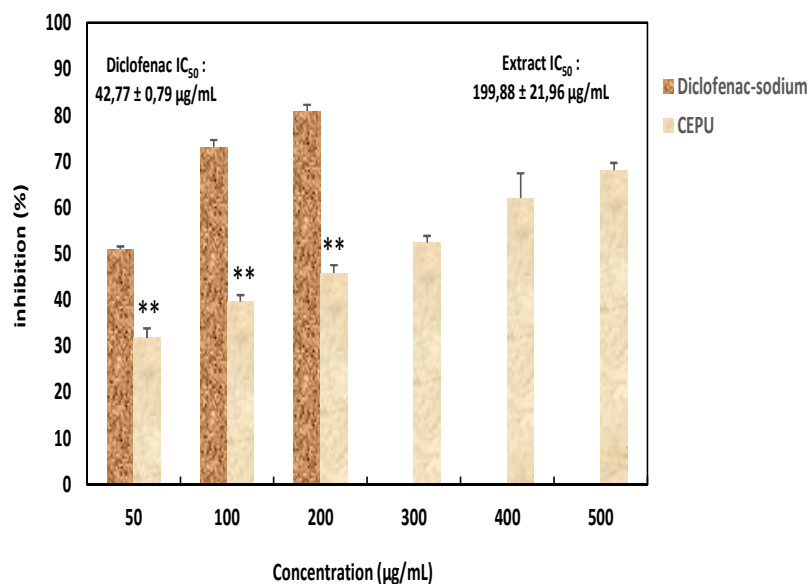


Figure-5 : Effet du CEPU sur la dénaturation des protéines.

Chaque valeur est la moyenne \pm écart type ($n = 3$), ** $p < 0,01$ par rapport au témoin correspondant.

Les principaux composés de type humulène isolés à partir de l'extrait $CHCl_3$ de l'espèce *P. undulata* : (+)-asteriscunolide A et le méthyle pulicarolate, ont également été testés comme inhibiteurs de la dénaturation de l'albumine. Les données rapportées dans le tableau-1, indiquent que l'activité anti-dénaturante modérée de ces deux composés est plus efficace par l'asteriscunolide A (44,44 %, 10 µM).

Tableau 1 : Effets des composés : (+)-asteriscunolide A (A) et du méthyle pulicarolate (M) sur la dénaturation des protéines.

Concentration µM	% Inhibition		
	(A)	(M)	Diclofenac sodique
0	0	0	0
0,5	15,48	8,73	22,62
1	22,62	16,67	31,75
5	32,94	24,60	41,67
10	44,44	-	70,24
IC_{50}	23,76 µM	220,42 µM	4,14 µM

IV.2 Œdème de la patte induit par la carraghénane :

L'effet de l'extrait CHCl_3 de l'espèce *Pulicaria undulata* sur l'œdème de la patte chez la souris, induit par la carraghénane et comparé au sel de diclofénac sodique est rapporté dans le tableau-2. L'injection sous-plantaire de la carraghénane chez la souris conduit à une augmentation significative et dépendante du temps dans le volume de la patte.

Le volume maximal a été atteint au bout de 4 heures. Une réponse ant-inflammatoire significative a été relevée suite à une administration par voie orale du CEPU aux deux doses suivantes : 150 mg/kg et 300 mg/kg. Le tableau-2, résume l'ensemble de ces résultats.

Tableau-2 : Effet du CEPU sur l'œdème de la patte chez la souris, induit par la carraghénane.

Temps	1h	2h	3h	4h
Contrôle	0,55±0,2	0,82±0,1	0,99±0,1	1,7±0,26
Diclofenac sodique (10 mg/kg)	0,19±0,01 (64,94)**	0,23±0,04 (71,54)**	0,26±0,03 (73,65)**	0,36±0,06 (78,63)**
CEPU (150 mg/kg)	0,41±0,03 (25)**††	0,58±0,02 (29,67)**††	0,66±0,02 (33,11)**††	1,03±0,04 (39,16)*††
CEPU (300 mg/kg)	0,31±0,03 (43,9)**††§	0,40±0,04 (51,22)**††§§	0,47±0,06 (52,70)**††§§	0,56±0,07 (66,86)**††§§

Chaque valeur est la moyenne \pm écart type (n = 5) ;

Test "Student" : (*: P < 0,05; **: p < 0,01), * : vs contrôle ;

(†: P < 0,05; ††: p < 0,01) ; † : vs Diclofenac ;

(§: P < 0,05; §§: p < 0,01) § : entre les extraits.

Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

V. Conclusion :

Les résultats obtenus à l'issu des tests anti-inflammatoires montrent que l'extrait Chloroformique des parties aériennes de *Pulicaria undulata*, réduit de façon appréciable l'œdème de la patte chez les souris induit par la carraghénine comparé à celui de diclofénac sodique, et une activité particulière en tant qu'inhibiteurs dans la dénaturation de l'albumine a été observée aussi bien pour l'extrait que les deux composés : (+)-astérisculolide A et le (-)-méthyle pulicarolate.

Références du chapitre-V.

- [1] Pokorny J., Yanishlieva N. et Gordon H., Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Woodhead publishing limited. CRC press. Cambridge Angleterre, 2001.
- [2] Berset C. et Cervelier M.E. Methodes of estimating the degree of lipide oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des aliments*, 1996, 16,219-245.
- [3] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 1995, 22, 375-383.
- [4] Bartosz G.Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments onToxicology*, 2003, 9, 5-21.
- [5] Abdel-Lateff. A; Konig. G. M; Fish.K. M, Holler. U; Jones. P. G; Wright. A. D, New antioxidant Hydroquinone Derivatives from the the Algicolous Marine Fungus *Acremonum Sp.* *Journal of Natural Products*, 2002, 65, 1605-1611.
- [6] Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Anal Chim Acta* 2006; 558, 310-318,.
- [7] Hazra B , Biswas S, Mandal N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2008; 8, 63 doi:10.1186/1472-6882-8-63.
- [8] Chew YL, Lim YY, Omar M, Khoo KS.. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Food Chem* 2008; 41, 1067-1072.
- [9] Parminder N, Ashok K, Sunil S, Jaspreet N. In vitro evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of methanolic extract of *Jasminum humile* Leave. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2011; 804-807.
- [10] Catala, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2006; 38, 1482-1495.
- [11] Catala, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkanals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 2009;157, 1-11.
- [12] Mosquera OM, Correa YM, Buitrago, DC. Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 102, 631-634.

[13] Awah FM, Uzoegwu PN, Oyugi JO, Rutherford J, Ifeonu ., Yao X, Fowke, KR, Eze, M.O. Free radical scavenging activity and immunomodulatory effect of *Stachytarpheta angustifolia* leaf extract. *Food Chem* 2010; 119, 1409-1416.

[14] Mizushima, Y; Kobayashi, M. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1968, 20, 169-73.

[15] Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. *Proc Soc Exp Biol Ther* 1962, 111, 544–547.

Conclusion générale.

A l'issu de ce travail de recherche qui a porté sur une *modeste participation* à la valorisation phytochimique et biologique de deux plantes médicinales : *Echinops spinosus* L. et *Pulicaria undulata* L., la composition chimique d'une huile essentielle a été évaluée ; des composés naturels ont été isolés et identifiés et une relation structure-activité a été également démontrée.

Les composés, isolés des parties aériennes de ces deux plantes, appartiennent à deux catégories de familles, les flavonoïdes et les humulénolides à l'exception de deux composés.

De l'espèce *Echinops spinosus*, les sept molécules isolées dont six décrits pour la première fois, soit dans le genre soit dans l'espèce, sont au nombre de six flavonoïdes et un acide quinique, à savoir :

✓ acide 1,5-di-*O*-caféoylquinique ;

Les flavonoïdes :

✓ apigénine ;

✓ 7-*O*- β -glucopyranosyl apigénine ;

✓ 7-*O*- β -(6''-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)-glucopyranosyl apigénine ;

✓ 3-*O*- β -glucopyranosyl quercétine ;

✓ 6-*O*- β -glucopyranosyl scutelareine ;

✓ stéréolensine.

De l'espèce *Pulicaria undulata*, dix nouvelles molécules de type sesquiterpénique ont été identifiées, dont neuf de la famille des sesquiterpènes lactones astériscunolides et un humulène :

Le sesquiterpène de type humulène :

✓ (-)-(2*Z*,9*E*)-méthyle pulicarolate.

Les sesquiterpènes lactones de type asteriscunolide :

✓ (+)-(1*R*,2*Z*,6*Z*,9*Z*)-astériscunolide A ;

✓ (+)-(1*R*,2*Z*,6*E*,9*Z*)-astériscunolide B ;

✓ (+)-(1*R*,2*Z*,6*Z*,9*E*)-asteriscunolides C ;

✓ (+)-(1*R*,2*Z*,6*E*,9*E*)-asteriscunolides D ;

✓ (+)-(1*R*,2*Z*,7*R*)-6,7,9,10-tétrahydro-astériscunolide ;

✓ (+)-(1*R*,2*Z*,6*Z*)-astériscunolide E ;

✓ (-)-(1*R*,2*Z*,6*R*,7*R*,9*Z*)-asteriscunolide F ;

✓ (-)-(1*R*,2*Z*,6*S*,7*S*,9*E*)-asteriscunolide G ;

✓ (+)-(1*R*,2*Z*,7*S*,9*E*)-astériscunolide H.

L'ensemble de ces structures a été déterminés par une combinaison des différentes méthodes spectroscopique à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN monodimensionnelle : ^1H et ^{13}C avec ses séquences DEPT et bidimensionnelle : COSY, HSQC, HMBC, NOESY, et également la « NOE difference », la spectrométrie de masse à haute résolution HRESI-MS et la spectroscopie chiroptique (Polarimétrie et Dichroïsme circulaire électronique (ECD)).

Quant à l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *P. undulata*, est caractérisée principalement par la présence de : carvotanacetone (14,8%), δ -cadinene (8,2 %), α -cadinol (4,7%), epi- α -cadinol (3,4%) et thujanol (4,7%) ; elle montre que la composition de notre échantillon Algérien diffère de celle rapportée dans la littérature.

Enfin concernant l'étude biologique, deux activités ont été mises en évidence pour ces deux plantes, une activité antioxydante et une anti-inflammatoire.

L'étude de l'activité antioxydante relevée sur les trois extraits CHCl_3 , EtOAc et *n*-BuOH de l'*Echinops spinosus* en utilisant comme modèles de tests : le *DPPH* $^{\bullet}$, OH radical-scavenging et le système β -carotène/acide linoléique, a montré que les extraits *n*-BuOH et EtOAc présentent un effet antioxydant important, avec un potentiel maximal pour l'extrait *n*-BuOH.

Et l'étude de l'activité anti-inflammatoire, a été effectuée par des expériences *in vitro* et *in vivo* sur l'extrait CHCl_3 et sur une sélection de deux composés purs de l'humulène de l'espèce *Pulicaria undulata* L.

Une activité particulière en tant qu'inhibiteurs dans la dénaturation de l'albumine a été observée aussi bien pour l'extrait que les deux composés : (+)-astérisculolide A et (-)-méthyle pulicarolate ; tandis que le test positif de l'œdème de la patte induit par le carraghénane, il a été observé uniquement pour l'extrait chloroformique.

Vu l'importance et la richesse en substances naturelles curatives de ces deux plantes, nous nous proposons de développer encore dans ce travail, pour une nouvelle approche thérapeutique de ces deux espèces.



ISSN 0975-413X
CODEN (USA): PCHHAX

Der Pharma Chemica, 2016, 8(8):158-160
(<http://derpharmachemica.com/archive.html>)

Flavonoids from ethyl acetate extract of *Echinops spinosus* (Asteraceae)

^aManel Boumaraf, ^bSamira Benyahia, ^{a,*}Ratiba Mekkiou, ^aSamir Benayache and ^aFadila Benayache

^aUnité de Recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyse Physico-chimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université des frères Mentouri Constantine, Algérie.

^bLaboratoire de synthèse organique, modélisation et optimisation des procédés. Université Badji Mokhtar de Annaba, Algérie.

ABSTRACT

The aim of the present study was the phytochemical investigation of the ethyl acetate (EtOAc) soluble parts of the aqueous-MeOH extract of the aerial parts of *Echinops spinosus* L. (Asteraceae). This work resulted in the isolation and identification of three known compounds, Apigenin(1), Apigenin-7-O-β-glucopyranoside (cosmosiin) (2) and apigenin-7-β-D-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside (3). The structures of the compounds were determined on the basis of extensive spectroscopic analysis, including UV, 1D and 2D NMR and comparison with the related known compounds. All these compounds are isolated from this species for the first time.

Key words: Apigenin, Apigenin derivatives, *Echinops spinosus*, Asteraceae.

INTRODUCTION

Plants from the Asteraceae family are distributed throughout the world and commonly used in treatment of various diseases [1-2]. The genus *Echinops* (Asteraceae), consisting in about 120 species of perennials, annuals, and biennials [3-4]. Species of this genus are predominately distributed in Eastern and Southern Europe, Tropical and North Africa and Asia [5]. *Echinops* plant was reported to possess variety of compounds belonging to various classes like: alkaloids, flavonoids, terpenoids, lipids, steroids and polyacetylenes [6-8].

Echinops spinosus is a perennial herb growing 1 meter and more and locally named Tassekra. As a medicinal plant, it was frequently employed in folk medicine as an abortifacient and a diuretic and for blood circulation, diabetes, gastric pain, indigestion and spasmolytic problems [9]. *Echinops spinosus* contains quinoleic alkaloid, sesquiterpenoids: echinopine A and B and flavonoids derived from the apigenol and the chrysoeriol [10-11]. The purpose of the present work was the isolation and the structural elucidation of the constituents of ethyl acetate extract of the aerial parts of *Echinops spinosus*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The aerial parts of *Echinops spinosus* L. were collected during the flowering phase in April 2009 in the North East of Algeria. The specimen was further identified by Dr. Gérard De Bélair, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria on the basis of Quezel and Santa [12]. A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the Unit Research VARENBIOMOL of University frères Mentouri, Constantine (ESA04/09).

Extraction and isolation

The air-dried aerial parts of *Echinops spinosus* (1.5 kg) were macerated at room temperature with (MeOH/H₂O; 80:20; v/v) for 48 h. The hydromethanolic extract was concentrated and dissolved in H₂O (800 ml) under magnetic stirring. The resulting solution was filtered and successively extracted with CHCl₃, EtOAc and *n*-butanol. The organic layers were dried with Na₂SO₄, giving after removal of solvents under reduced pressure the following extracts: chloroform (3.0 g), EtOAc (4.0 g) and *n*-butanol (22.0 g). The EtOAc extract (3g) was fractionated by column chromatography (CC) on silica gel (70-230 mesh), eluting with CHCl₃/MeOH in gradient polarity to obtain 16 fractions (F1-F16), by combining the eluates on the basis of TLC analysis. The fractions F1 (14.5mg) and F6 (18mg) obtained as white powder, were washed successively with methanol to give two compounds identified as apigenin (**1**) and apigenin 7-*O*-glucoside (**2**). Fraction F8 (30 mg) was submitted to preparative TLC on silica gel GF254 eluting with (CHCl₃/MeOH, 8:2) to give apigenin-7-β-D-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside (**3**). The structures of compounds were established using UV, 1D and 2D NMR as well as comparison with literature data.

RESULTS AND DISCUSSION

The phytochemical investigation of the EtOAc extract of *Echinops spinosus* led to the isolation of three flavonoids (**1-3**) using chromatographic methods than identified on the basis of their UV and NMR spectral data and comparison with literature data. All compounds were isolated for the first time from the aerial parts of this plant.

Compound (1): UV (λ_{\max} nm, MeOH): 268, 335; +NaOH: 274, 324,392 with hyperchromic effect; +NaOAc: 276, 306, 380; +NaOAc +H₃BO₃: 269, 338; +AlCl₃: 274, 300, 348, 382; +AlCl₃+HCl: 274, 300, 334, 380. ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄, δ /ppm, *J*/Hz): 7.7 (2H, *d*, *J*=8.5, H-2'/H-6'), 6.8 (2H, *d*, *J*=8.5, H-3'/H-5'), 6.4 (1H, *s*, H-3), 6.1 (1H, *brs*, H-8), 5.8 (1H, *brs*, H-6). This compound was identified as **Apigenin** [13].

Compound (2): UV (λ_{\max} nm, MeOH): 269,336; +NaOH: 268, 388 with hyperchromic effect; +NaOAc: 269, 386; +NaOAc+H₃BO₃: 269,340; +AlCl₃: 272, 299, 345, 381; +AlCl₃+HCl: 276, 298, 341, 380. ¹H NMR (500 MHz, MeOH-d₄, δ /ppm, *J*/Hz):7.86 (2H, *d*, *J*=8.6, H-2'/H-6'), 6.88 (2H, *d*, *J*=8.6, H-3'/H-5'), 6.82 (1H, *s*, H-3), 6.63 (1H,*brs*, H-8), 6.50 (1H,*brs*, H-6), 5.08 (1H, *d*, *J*=7.7, anomeric proton of glucosyle), 3.93(1H, *brd*, *J*=12 Hz, H-6''a); 3.72 (1H, *dd*, *J*=11.5; 5.5, H-6''b); 3.66 to 3.38 the other protons of the glucosyle. This compound was identified as **Apigenin 7-O-glucopyranoside** [14].

Compound (3): ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ /ppm, *J*/Hz): flavonoid moiety: 12.99 (1H, *s*, OH-5),7.94 (2H, *d*, *J*=8.8, H-2'/H-6'), 6.93 (2H, *d*, *J*=8.8, H-3'/H-5'), 6.82 (1H, *s*, H-3), 6.81 (1H, *d*, *J*=2.0, H-8), 6.47 (1H, *d*, *J*=2.0, H-6). Glucopyranoside moiety: 5.16 (1H, *d*, *J*=7.5,anomeric proton of glucosyle), 4.46 (1H, *brd*, *J*=10.4, H-6''a), 4.16 (1H, *dd*, *J*=10.4; 6.9,H-6''b), 3.52 to 3.90 the other protons of the glucoside deduced from COSY spectrum; P-(E)-coumaroyl: 7.36 (2H, *d*, *J*=8.6, H-2'''/H-6'''), 7.49 (1H, *d*, *J*=15.9, H-β), 6.67 (2H, *d*, *J*=8.6, H-3'''/H-5'''), 6.33(1H,*d*, *J*=15.9, H-α) deduced from COSY spectrum.¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ_c /ppm): 164.7 (C-2), 103.5 (C-3), 182.4 (C-4), 161.9 (C-5), 99.9 (C-6), 163.1 (C-7), 95.1 (C-8), 157.4 (C-9), 105.8 (C-10), 121.3 (C-1'), 129.0 (C-2'/C-6'), 116.1 (C-3'/C-5'), 161.6 (C-4'), 114.1 (C-α), 145.4 (C-β), 125.3 (C-1'''), 130.6 (C-2'''/C-6'''), 116.2 (C-3'''/C-5''') deduced from HSQC and HMBC spectra.This one was identified as **Apigenin-7-β-D-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside** [15].

CONCLUSION

The present study relates to the phytochemical investigation of the EtOAc extract of the aqueous-methanolic extract obtained from the aerial parts of *Echinops spinosus*. This contribution led to the isolation of three known flavonoids named as *apigenin*, *apigenin7-O-β-glucopyranoside* and *apigenin-7-β-D-O-(6''-O-E-p-coumaroyl)-glucopyranoside*. All compounds are reported for the first time from this plant.

REFERENCES

- [1] I. Jonathan Achika, D. Ebuka Arthur, I. Gerald, A. Adedayo. *IOSR J. Appl. Chem.* **2014**, 7(8), 1-8.
- [2] W. Magdalena, D.S. Helena, J.D. Marcin, K. Magdalena, K. Kamila.*ActaPoloniae Pharm. –Drug Res.* **2012**, 69 (2): 263-268.
- [3] E.G.Bobrov. *Echinops* L. Flora of the USSR . Volume 27, Shishkin BK and Bobrov EG (eds.), Dehra Dun: Bishen Singh, Mahendra Pal Singh and Koelz Scientific Books **1997**.
- [4] A. Susanna, N. Garcia-Jacas. Heidelberg: Springer-Verlag. **2007**; 135-58.
- [5] T. Garnatje., J. Valles, S. Garcia, O. Hidalgo,M. Sanz, M.A.Canela, S. Siljak-Yakovlev. *Biol Cell***2004**, 96(2), 117-24.
- [6] Shukla Y.N. *J Medic Aromat Plant Sci***2003**; 25(3):720-32.

-
- [7] H. M. Abdallah, S.M. Ezzat, El Dine, R. Salah, A.S. Essam, A. B. Abdel-Naim. *Phytochemistry Letters*, **2013**, 6(1), 73-78.
- [8] L. Dong, L. Ning, X. Wan, Z. Peng, M. Zhong-jun, L. Xian. *Shenyang YaokexueXuebao*, **2008**, 25(8), 620-622.
- [9] O. Khedher, Y. Moussaoui, R. Ben Salem. *RJPBCS*, **2014**, 5(2), 66.
- [10] Boullard B. *Plantes médicinales du monde. Croyances et réalités*. ESTEM. **2001**.
- [11] M. Dong, B. Cong, S. H. Yu, F. Sauriol, C. H. Huo, Q. W. Shi, Y. C. Gu, L. O. Zamir, H. Kiyota. *ORGANIC LETTERS*, **2008**, 10(5), 701-704.
- [12] Quezel P and Santa S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris: Editions du CNRS. **1962**; Tome I: 470-475.
- [13] V. S. Prakash Chaturvedula, I. Prakash. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2013**, 5(1), 261-265
- [14] A. Uehara, M. Nakata, J. Kitajima, T. Iwashina. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2012**, 41, 142-149
- [15] M. Aritomi, *Chem. Pharm. Bull.*, **1963**, 11, 1225-1228.

Essential Oil Composition of *Pulicaria undulata* (L.) DC. (Asteraceae) Growing in Algeria

Manel Boumaraf¹, Ratiba Mekkiou^{1*}, Samira Benyahia¹, Jean-claude Chalchat², Pierre Chalard², Fadila Benayache¹, Samir Benayache¹

¹Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université frères Mentouri, Constantine, Route d'Ain El Bey-25000, Constantine, Algérie.

²Laboratoire de Chimie des Hétérocycles et Glucides, Ecole Nationale Supérieure de Chimie, de Clermont-Ferrand, Ensemble Scientifique des Céseaux, BP 187- 63174.

Available Online: 1st May, 2016

ABSTRACT

The essential oil obtained by steam distillation of aerial parts of *Pulicaria undulata* (Asteraceae) was analyzed by GC and GC/MS. 31 compounds were determined among which oxygenated terpenoids represented 74.3% while the non oxygenated fraction represented 22.7%. The major components were carvotanacetone (14.8%), δ -cadinene (8.2%), α -cadinol (4.7%) and thujanol (4.7%). These results differ from the few previous studies reported on this species.

Keywords: *Pulicaria undulata*, Asteraceae, essential oil, carvotanacetone.

INTRODUCTION

The genus *Pulicaria* belonging to the Asteraceae family, is represented by 80 species distributed in Europe, North Africa and Asia¹. In Algeria, the genus *Pulicaria* is represented by 16 species from which four are located in the Sahara^{2,3}. *Pulicaria* species have been used in folk medicine as insect repellents, galactagogues, antiepileptics, and tonics⁴, as well as for the treatment of colds, cough, colic, excessive sweating and as carminative⁵. Chemical investigation of the genus *Pulicaria*, revealed essentially the presence of sesquiterpene lactones^{6,7}, flavonoids^{1,8,9} and caryophyllene derivatives¹⁰⁻¹². *Pulicaria undulata* (L.) DC. (Asteraceae) is one of the valuable medicinal plants used in folk medicine. It is used in the central Sahara to treat chills, diabetes, cardiac disorders, skin diseases and abscesses¹³. In Egypt, it is used to treat inflammation, as insect repellent and as herbal tea¹⁴. The composition of the essential oil of *P. undulata* from different countries has been reported to contain carvotanacetone as major component. For example, essential oil from Yemen and Sudan, showed high concentration of carvotanacetone (91.4 and 55.0% respectively)^{15,16}. The oil showed antibacterial¹⁷, sedative¹⁸ and insecticidal activities¹⁹. In continuation of our studies on *Pulicaria* species²⁰⁻²², we report herein, our results concerning the chemical composition of the essential oil of the aerial parts of *Pulicaria undulata* (L.) DC. collected in the Southwest Algerian Sahara which was different from those reported previously on this species.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The aerial parts of *Pulicaria undulata* were collected on April 2011 from the area of Djanet (Tassili) wilaya of Illizi in Algerian Sahara and authenticated by professor Gérard De Bélair, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria, according to Quezel and Santa (1963). A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the VARENBIOMOL research unit, University Frères Mentouri Constantine.

Extraction of the essential oil

The aerial parts (200g) of *Pulicaria undulata* were subjected to steam distillation in a Kaiser Lang apparatus for three hours. The obtained essential oil was collected and dried over anhydrous sodium sulfate and kept at 4°C until analysis. The yield of the oil was calculated in relation of the dry weight of the plant.

GC and GC-MS analysis

The essential oil was analyzed on an Agilent gas chromatograph (GC-FID) Model 6890, equipped with a HP-5 ms fused silica capillary column having (5%-phenyl) methylpolysiloxane stationary phase (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m), programmed from 50°C (5 mn) to 250 °C at 3°/mn and held for 10 mn. Injector and flame ionization detector temperatures were 280 and 300 °C, respectively. The essential oil was diluted in acetone 3.5% (v/v) and injected in split mode (1/60), hydrogen was used as a carrier gas (1.0 mL/mn). Solutions of standard alkanes (C8-C20) were analyzed under the same conditions to calculate retention indices (RI) with Van delDool and Kratz equation. Mass spectrometry was performed on an Agilent gas chromatograph-mass spectrometer (GCMS) Model 7890/5975, equipped with HP-5 capillary column (25 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m) programmed

Table 1: Retention times, Retention indices and percentage composition of the essential oil of *Pulicaria undulata*

Peak N ^o	RT	^b RI	^a Compound	%
1.	8.753	1099	Linalol	2.4
2.	8.839	1103	Thujol	0.9
3.	9.556	1142	camphor	0.2
4.	10.016	1166	borneol	0.8
5.	10.214	1177	terpinen-4-ol	2.8
6.	10.379	1186	thujanol	4.7
7.	10.491	1192	cis mentan-2-one	0.7
8.	10.626	1199	trans menthan-2-one	0.6
9.	10.805	1209	transpiperitol	1.5
10.	11.546	1252	carvotanacetone	14.8
11.	12.438	1303	carvacrol	3.1
12.	14.082	1404	2,5-dimethoxy-p-cymene	0.8
13.	14.238	1414	β -caryophyllene	0.8
14.	15.111	1472	γ -muurolene	0.9
15.	15.266	1482	amorpha-4,7(11)-diene	1.0
16.	15.345	1487	epi-cubebol	1.1
17.	15.469	1495	α -muurolene	2.1
18.	15.676	1509	γ -cadinene	1.9
19.	15.811	1518	δ -cadinene	8.2
20.	16.103	1539	α -cadinene	0.4
21.	16.204	1546	α -calacorene	0.2
22.	16.561	1570	palustrol	0.3
23.	16.628	1575	epi-globulol	0.7
24.	16.783	1586	caryophyllene oxyde	1.2
25.	17.051	1605	oplopenone	0.8
26.	17.127	1610	Humuleneepoxide II	1.3
27.	17.381	1630	cadina-4,1(10)-diene-7- \square -ol	0.8
28.	17.548	1642	epi- α -cadinol	3.4
29.	17.571	1644	epi- α -muurolol	2.2
30.	17.753	1658	α -cadinol	4.7
31.	19.707	1804	14-hydroxy- α -muurolene	3.1

^aCompounds listed in order of their RI

^bRI (retention index) measured relative to n-alkanes (C8-C20) using HP-5 ms

with the same conditions as for GC-FID. The mass spectrometer (MS) was in electron impact mode at 70 eV and electron multiplier was at 2200 V. Ion source and MS quadrupole temperatures were 230°C and 180°C, respectively. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the m/z range 33-450. The essential oil constituents were identified by matching their mass spectra and retention indices (RI) with those of reference compounds from libraries such as Adams²³ and McLafferty & Stauffer²⁴. The proportions of the identified compounds were calculated by internal normalization.

RESULTS AND DISCUSSION

The steam distillation of the aerial parts of *P. undulata* yielded 1.2 % (w/w) of yellowish oil with a perfumery odor. Thirty one constituents representing about 68.4% of the total essential oil of the plant were identified, among which 74.3% of oxygenated compounds. All the identified compounds are listed in table I in order of their experimental retention times and retention indices. The major constituents were carvotanacetone (14.8%) followed by δ -cadinene (8.2%), α -cadinol (4.7%), thujanol (4.7%), epi- α -cadinene (3.4%), carvacrol (3.14%) and 14-hydroxy α -muurolene (3.1%). A literature survey showed

that carvotanacetone has been reported as major component in *P. undulata* essential oil from South Yemen and Sudan (91.4%, and 55.87% respectively)^{25,26}. This compound is also accumulated as major component in other *Pulicaria* species such as *P. inuloides* and *P. jaubertii* from Yemen (47.3 and 63.9% respectively)^{21,27}, *P. mauritanica* from Morocco (87.3%)²⁸ and *P. jaubertii* from Saudi Arabia (98.6%)²⁹. Our results showed significant differences with previous studies on this genus, since carvotanacetone represented only 14.8% of the total oil composition, while the other main components of our samples were δ -cadinene (8.2%), α -cadinol (4.7%), epi- α -cadinol (3.4%), and thujanol (4.6%). These main oxygenated sesquiterpene components of our sample seem to be specific to the Algerian species and were not detected in previous studies on this genus.

CONCLUSION

The essential oil of *P. undulata*, collected from Djanet region is characterized by the main presence of carvotanacetone (14.8%), δ -cadinene (8.2%), α -cadinol (4.7%), epi- α -cadinol (3.4%), and thujanol (4.6%). We also note that the chemical composition of the Algerian sample differs from those reported in the literature. The

level of carvotanacetone in our sample is not so high as in the case of the other samples previously studied. The other main components of the Algerian species were not detected in the previous studies. These variations may be explained by the different climates, seasons, geographic and soil conditions as well as altitude differences and harvest periods of the plant.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was financially supported by the Algerian Ministry of Higher education and Scientific Research (MESRS).

REFERENCES

- Williams CA, Harborne JB, Greenham JR, Grayer RJ, Kite GG, Eagles J. Variation in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species. *Phytochemistry*. 2003; 64, 275-283.
- Quezel P, Santa S. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. CNRS Paris edn. Vol. II, 1963. p.949.
- Ozenda P. Flore du Sahara Septentrional et Central. CNRS Paris Edn. 1958. p.430.
- Ghazanfar SA. Handbook of Arabian Medicinal Plants; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1994.
- Ibn Sina. EL-Kanoun fil-Tib. Halaby Co., Cairo, Egypte. Vol. 3, 1971.
- Dendougui H, Benayache S, Benayache F, Connolly JD. Sesquiterpene lactones from *Pulicaria crispa*. *Fitoterapia* 2000; 71: 373-378.
- Ghouila H, Beyaoui A, Jannet HB, Hamdi B, Salah AB, Mighri Z. Isolation and structure determination of pulicazine, a new sesquiterpene lactone from the Tunisian *Pulicaria laciniata* (Coss. et Kral.) Thell. *Tetrahedron Lett* 2009; 50: 1563-1565.
- Rizk AM, Ismail SI. Flavonoids of *Francoeuria crispa*. *Planta Medica* 1982; 45(7): 146.
- Mansour RMA, Ahmed AA, Melek FR, Saleh NAM. The flavonoids of *Pulicaria incisa*. *Fitoterapia* 1990; 61(2): 186-187.
- San Feliciano A, Medarde M, Gordaliza M, Del Olmo E, Del Corral MJM. Sesquiterpenoids and phenolics of *Pulicaria paludosa*. *Phytochemistry* 1989; 28(10): 2717-2721.
- Bohlmann F, Zdero C. Caryophyllene derivatives and a hydroxyisocomene from *Pulicaria dysenterica*. *Phytochemistry* 1981; 20(11): 2529-2534.
- Hafez S, Sarg TM, El-Domiaty MM, Ahmed AA, Melek FR, Bohlmann F. Caryophyllene derivatives from *Pulicaria Arabica*. *Phytochemistry* 1987; 26(12): 3356-3358.
- Hammiche V, Maiza K. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacology* 2006; 105: 358-367.
- Hegazy MEF, Matsuda H, Nakamura S, Yabe M, Matsumoto T, Yoshikawa M. Sesquiterpenes from an Egyptian herbal medicine, *Pulicaria undulata*, with inhibitory effects on nitric oxide production in RAW264.7 macrophage cells. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 2012; 60: 363-370.
- Ali NAA, Sharopov FS; Alhaj M, Hill GM, Porzel A, Arnold N, Setzer WN, Schmidt J, Wessjohann L. Chemical composition and biological activity of essential oil from *Pulicaria undulata* from Yemen. *Nat. Prod. Commun.* 2012; 7: 257-260.
- EL-Kamali HH, Yousif MO, Ahmed OI, Sabir SS. Phytochemical analysis of the essential oil from aerial parts of *Pulicaria undulata* (L.) Kostel from Sudan. *Ethnobotanical Leaflets* 2009; 13: 467-471.
- El-Kamali HS, Ahmed AH, Mohammed AS, Yahia AAM, El-Tayeb IH, Ali AA. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. *Fitoterapia* 1998; 69: 77-78.
- Ali NAA, Makboul MA, Assaf MH, Anton R. Essential oil of *Pulicaria undulata* L. growing in Egypt and its effect on animal behavior. *Bull. Pharm. Sci.* 1987; 10: 37-49.
- Elegami AAB, Ishag KE, Mahmoud EN, Abu Alfutuh IM, Karim EIA. Insecticidal activity of *Pulicaria undulata* oil. *Fitoterapia* 1994; 65: 82-83.
- Algabr MN, Mekkiou R, Ameddah S, Menad A, Boumaza O, Seghiri R, Benayache S, Benayache F. Antioxydant activities from the aerial parts of *Pulicaria jaubertii*. *J. Advances in Natural and Applied Sciences* 2010; 4: 63-70.
- Algabr MN, Ameddah S, Menad A, Mekkiou R, Chalchat JC, Benayache S, Benayache F. Essential oil composition of *Pulicaria jaubertii* from Yemen. *Int. J. Med. Aromat. Plants* 2012; 2: 688-690.
- Algabr MN, Hammoud L, Aissaoui H, Mekkiou R, Seghiri R, Boumaza O, Benayache S, Benayache F. Flavonoids from *Pulicaria jaubertii* (Asteraceae) from Yemen. *RJPBCS*, 2015; 6(6): 1237-1240.
- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois. 1995.
- Mc Lafferty FW, Stauffer DB. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. 5th Edition, J. Wiley and Sons, New York, 1991.
- Ali NAA, Sharopov FS, Alhaj M, Hill GM, Porzel A, Arnold N, Setzer WN, Schmidt J, Wessjohann L. Chemical composition and biological activity of essential oil from *Pulicaria undulata* from Yemen. *Nat. Prod. Commun.* 2012; 7: 257-260.
- El-Kamali HH, Yousif MO, Ahmed OI, Sabir SS. Phytochemical analysis of the essential oil from aerial parts of *Pulicaria undulata* (L.) Kostel from Sudan. *Ethnobot. Leaf.* 2009; 13: 467-471
- Al-Hajj NQM, Ma C, Thabit R, Al-alfarga A, Gasmalla MAA, Musa A, Aboshora W, Wang H. Chemical composition of essential oil and mineral contents of *Pulicaria inuloides*. *J. Acad. Indust. Res.* 2014; 2:675-678.
- Cristofaril G, Znini M, Majidi L, Bouyanzer A, Al-Deyab SS, Paolinil J, Hammouti B, Costal J. Chemical Composition and Anti-Corrosive Activity of *Pulicaria Mauritanica* Essential Oil against the Corrosion of

- Mild Steel in 0.5 M H₂SO₄. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2011; 6:6699 – 6717.
29. Fawzy GA, Al Ati HY, El Gamal AA. Chemical composition and biological evaluation of essential oils of *Pulicaria jaubertii*. *Pharmacogn. Mag.* 2013; 9:28–32.

Exploring the Bioactive Terpenoid Content of an Algerian Plant of the Genus *Pulicaria*: The *ent*-Series of Asteriscunolides

Manel Boumaraf,^{†,‡,||} Marianna Carbone,^{†,||} M. Letizia Ciavatta,[†] Samira Benyahia,[§] Souad Ameddah,[⊥] Ahmed Menad,[⊥] Samir Benayache,[‡] Fadila Benayache,[‡] and Margherita Gavagnin^{*,†,⊥}

[†]Istituto di Chimica Biomolecolare, CNR, Via Campi Flegrei 34, 80078 Pozzuoli (Naples), Italy

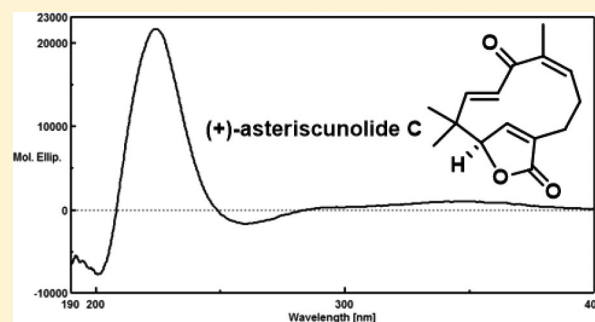
[‡]Unité de Recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université Frères Mentouri, Constantine, Route de Aïn El Bey, 25 000 Constantine, Algérie

[§]Laboratoire de Synthèse Organique, Modélisation et Optimisation des Procédés, Université Badji Mokhtar de Annaba, Annaba, Algérie

[⊥]Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri, Constantine, 25 000 Constantine, Algérie

S Supporting Information

ABSTRACT: Chemical analysis of the chloroform extract of the aerial parts of the Algerian plant *Pulicaria undulata* exhibiting anti-inflammatory activity resulted in the isolation of 10 new humulene sesquiterpenoids, **1–10**, belonging to the asteriscunolide family of compounds. The structure and relative configuration have been defined by NMR data, whereas the absolute configuration has been established by ECD analysis. Compounds **1–10** include enantiomers of the known asteriscunolides A–D and tetrahydroasteriscunolide previously reported from the genera *Asteriscus* and *Nauplius*. Compounds **1** and **10** showed in vitro anti-inflammatory activity by inhibiting heat-induced albumin denaturation with IC₅₀ values of 23.76 and 220.42 μM.



In the course of a chemical investigation of Algerian plants, *Pulicaria undulata* (Linn.) C.A. Mey. (family Asteraceae, tribe Inulae), collected in the southeast of Algerian Sahara, was studied. This plant is an endemic species of desert areas of North Africa but is widely distributed throughout all of the Middle East regions. The plant is used as an insect repellent, galactagogue, antiepileptic, and a tonic in folk medicine.¹ Antibacterial and sedative activities of *P. undulata* have been reported.^{2,3} A number of chemical investigations on this species resulted in the isolation of sesquiterpenes exhibiting either guaiane or eudesmane carbon skeletons and flavonoids.⁴ A few studies refer to the composition of the essential oils of *P. undulata* from distinct North African and Middle East regions.^{2,5–9}

In the present study, the CHCl₃ extract of the aerial parts of Algerian *P. undulata* has been selected for biological activity evaluation and chemical analysis. The extract revealed interesting anti-inflammatory properties, as was evidenced using two models of experimentally induced inflammation such as in vitro heat-induced denaturation of albumin¹⁰ and in vivo carrageenan-induced paw edema in mice.¹¹ The chemical analysis of the extract showed the presence of a series of humulene sesquiterpenoid lactones with an asteriscunolide skeleton. Plant extracts rich in sesquiterpenoid lactones are frequently used in traditional medicine for the treatment of

inflammatory diseases.¹² Since oxygenated humulenes are rare in plants from the Asteraceae family and have never been reported from the *Pulicaria* genus, this pattern appears to be relevant from a taxonomic point of view.

Asteriscunolides are a small group of strained humulenes characterized by a lactone moiety fused to the 11-membered ring. (–)-Asteriscunolides A–D were isolated by San Feliciano and co-workers from *Asteriscus aquaticus*^{13–15} and were later found in different plants of two close genera, *Asteriscus* and *Nauplius*.^{16–21} Tetrahydroasteriscunolide derivatives were also isolated from *Nauplius*²² and *Asteriscus* species,^{19,21} whereas further oxygenated asteriscunolides were recently described in different *Asteriscus* species.²¹ Related humulanolides displaying additional rings in the structure, such as asteriscanolide,^{21,23} 6,7,9,10-tetrahydroasteriscanolide,¹⁶ naupliolide,²⁰ and aquatolide,^{24,25} were also reported. Several humulanolides showed interesting biological properties including significant anticancer activity. For example, asteriscunolide A induces apoptosis in human cancer cell lines,²⁶ whereas asteriscunolide D is more cytotoxic than cisplatin, with a good potency against the HT-29 (human colon carcinoma), A-549 (human lung carcinoma), and MEL-28 (human melanoma) cell lines, selectively.¹⁹ Owing

Received: August 3, 2016

to the challenge of generating the 11-membered ring, a major impediment in synthesis, humulane sesquiterpenoids including asteriscunolides have been the focus of many synthesis studies. In particular, stereospecific total synthesis of several members of the family have been accomplished, and the absolute configuration of naturally occurring asteriscunolides has been defined.^{27–30}

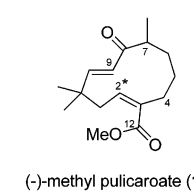
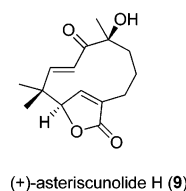
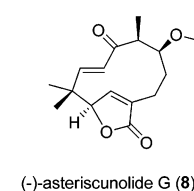
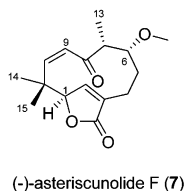
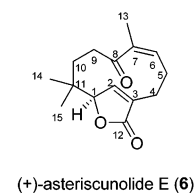
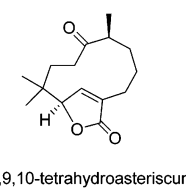
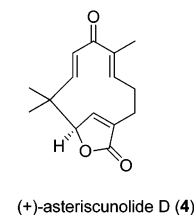
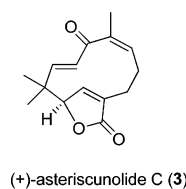
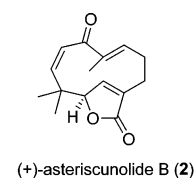
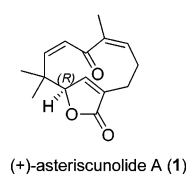
Herein the isolation and structure elucidation of 10 new members of the asteriscunolide group, compounds **1–10**, which include enantiomers of the known (–)-asteriscunolides A–D and (–)-tetrahydroasteriscunolide, are described. These metabolites were the main components of the CHCl₃ extract of the aerial parts of *P. undulata*. The evaluation of the anti-inflammatory properties of the crude CHCl₃ extract and of the pure compounds (+)-asteriscunolide A (**1**) and (–)-methyl pulicarolate (**10**) is also reported.

RESULTS AND DISCUSSION

The plant *P. undulata* was collected in April 2011 during the flowering stage. Air-dried aerial parts (1 kg) were extracted with EtOH/H₂O (80/20, v/v). TLC analysis of the soluble CHCl₃ portion (4 g) of the extract revealed the presence of a group of oxygenated terpene metabolites dominating the extract at *R_f* 0.7–0.2 (petroleum ether/Et₂O, 2:8). An aliquot (334 mg) of this extract was subjected to Si gel column chromatography using a petroleum ether/Et₂O gradient as eluting system. Fractions containing the compounds of interest were analyzed by ¹H NMR spectroscopy and subsequently subjected to further purification by SiO₂ column chromatography, preparative SiO₂ TLC, or RP-HPLC, to give (+)-asteriscunolides A (**1**, 20.0 mg), B (**2**, 2.0 mg), C (**3**, 50.0 mg), and D (**4**, 1.0 mg), (+)-6,7,9,10-tetrahydroasteriscunolide (**5**, 0.5 mg), (+)-asteriscunolide E (**6**, 0.5 mg), (–)-asteriscunolide F (**7**, 0.5 mg), (–)-asteriscunolide G (**8**, 1.5 mg), (+)-asteriscunolide H (**9**, 1.6 mg), and (–)-methyl pulicarolate (**10**, 2.5 mg).

With the exception of the optical properties, spectroscopic data of compounds **1–5** were identical with those reported for (–)-asteriscunolides A–D^{13–15,27–29} and (–)-6,7,9,10-tetrahydroasteriscunolide,^{22,30} respectively. The structure and absolute configuration of all these compounds have been unambiguously established by stereoselective total syntheses.^{27–30} The positive specific rotations and the electronic circular dichroism (ECD) profiles of compounds **1–4** (Figures S3, S8, S12, and S16, Supporting Information), which were opposite those reported for (–)-asteriscunolides A–D,¹⁴ indicated that *Pulicaria* metabolites were enantiomers of asteriscunolides,^{13–15,27–29} and, thus, the (1*R*) absolute configuration was assigned to all the compounds. Accordingly, the tetrahydro derivative **5** was also identified as *ent*-6,7,9,10-tetrahydroasteriscunolide^{22,30} by analysis of the ECD curve of **5** displaying a $\Delta\epsilon$ value associated with the π – π^* electronic transition of the conjugated lactone (~226 nm) merely opposite the reported data.^{22,30}

The structures of asteriscunolides E–H (**6–9**), possessing the same bicyclic carbon framework as the co-occurring metabolites **1–5**, as well as methyl pulicarolate (**10**) were determined by interpretation of the corresponding 1D and 2D NMR spectra. The relative configurations of compounds **6–9** were investigated by analysis of NOESY and NOE difference experiments and by applying the Murata method. The C-1 absolute configuration was suggested to be the same as those of the co-occurring asteriscunolides by biosynthesis considerations and supported by ECD data.



*according to asteriscunolide numbering

Asteriscunolide E (**6**) was obtained as an amorphous powder. The sodium adduct ion at *m/z* 271.1306 in the HRESIMS spectrum indicated the molecular formula C₁₅H₂₀O₃ with six indices of hydrogen deficiency, one less than asteriscunolides A–D. The IR spectrum showed strong absorption bands at 1768 and 1643 cm^{–1} due to the carbonyl groups of two α,β -unsaturated functions, the fused γ -lactone moiety, and the C-8 carbonyl group, respectively. The ¹H NMR spectrum contained diagnostic signals at δ_{H} 6.99 (1H, s, H-2), 5.59 (1H, brt, *J* = 8.5 Hz, H-6), 4.50 (1H, s, H-1), and 1.89 (3H, s, H₃-13), which were consistent with the presence of the aforementioned α,β -unsaturated systems (Table 1). The geminal methyl groups at C-11 resonated as singlets at δ_{H} 1.09 (3H, s, H₃-14) and 1.22 (3H, s, H₃-15). The spectrum also showed multiplets at δ_{H} 2.84 (1H, m, H₂-5a), 2.53 (1H, m, H₂-4a), 2.46 (1H, ddd, *J* = 17.6, 9.4, and 2.9 Hz, H₂-9a), 2.33 (1H, ddd, *J* = 17.6, 8.7, and 2.6 Hz, H₂-9b), 2.26 (1H, m, H₂-5b), 2.09 (2H, m, H₂-10a and H₂-4b), and 1.29 (1H, m, H₂-10b), which were assigned to the protons of four methylene groups (Table 1). Inspection of the COSY data showed the presence of an isolated CH₂–CH₂ spin system (H₂-9/H₂-10) as well as a sequence including the remaining two methylenes (H₂-4 and H₂-5) along with the vinylic H-6. Comparison of the proton resonances with those of

Table 1. ^1H NMR Data^{a,b} of Compounds 6–10

position	6	7	8	9	10
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
1	4.50, s	4.72, brs	4.70, brs	4.70, brs	2.69, dd (10.0, 12.0) 2.41, dd (8.0, 10.0)
2	6.99, s	6.98, brs	6.98, brs	6.94, brs	5.74, brt (9.0)
4	2.53, m 2.09, m	2.50, m 2.28, m	2.56, ddd (13.0, 6.0, 1.0) 2.14, dd (13.0, 12.4)	2.54, brdd (13.0, 12.0) 1.85, brdd (13.0, 6.5)	2.33, m 2.09, m
5	2.84, m 2.26, m	2.01, m 1.72, m	1.65, dddd (15.0, 7.7, 6.0, 1.0) 0.78, dddd (15.0, 12.4, 1.0, 1.0)	1.91, m 0.53, m	1.45, m 1.37, m
6	5.59, brt (8.5)	3.30, brdd (3.7, 2.6) ^c	3.59, ddd (7.7, 3.8, 1.0) ^c	2.08, dt (14.4, 9.3) 1.50, m	1.53, m
7		3.06, dq (6.6, 2.6) ^c	3.09, dq (6.6, 3.8) ^c		2.62, m
9	2.46, ddd (17.6, 9.4, 2.9) 2.33, ddd (17.6, 8.7, 2.6)	6.14, d (13.7)	6.17, d (16.4)	6.25, d (16.0)	5.98, d (16.5)
10	2.09, m 1.29, m	5.58, d (13.7)	6.04, d (16.4)	6.32, d (16.0)	6.54, d (16.5)
13	1.89, s	0.96, d (6.6)	0.97, d (6.6)	1.40, s	1.03, d (6.6)
14	1.09, s	1.65, s	1.25, s	1.25, s	1.20, s
15	1.22, s	1.49, s	1.42, s	1.46, s	1.22, s
OMe		3.68, s	3.44, s		3.74, s
OH				3.86, s	

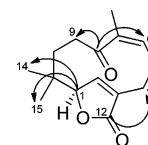
^aThe spectra were recorded in CDCl_3 at 400 and 600 MHz. ^bAssignments aided by COSY, HSQC, and HMBC ($J = 10$ and 7 Hz) experiments. ^cCoupling constants determined by homodecoupling experiments at 12°C .

Table 2. ^{13}C NMR Data^{a,b} of Compounds 6–10

position	6	7	8	9	10
	δ_{C} , type ^c	δ_{C} , type ^c	δ_{C} , type ^c	δ_{C} , type ^c	δ_{C} , type ^c
1	87.7, CH	90.3, CH	87.6, CH	87.6, CH	41.8, CH_2
2	145.9, CH	150.4, CH	146.2, CH	145.3, CH	138.5, CH
3	134.1, C	133.5, C	136.1, C	136.0, C	133.1, C
4	24.2, CH_2	20.8, CH_2	22.9, CH_2	24.4, CH_2	34.4, CH_2
5	24.9, CH_2	28.8, CH_2	29.1, CH_2	21.1, CH_2	24.8, CH_2
6	131.7, CH	80.4, CH	80.1, CH	36.9, CH_2	32.5, CH_2
7	139.8, C	50.7, CH	48.4, CH	79.0, C	46.3, CH
8	205.1, C	202.3, C	199.9, C	202.6, C	205.7, C
9	37.4, CH_2	132.3, CH	132.4, CH	127.9, CH	126.0, CH
10	27.6, CH_2	147.8, CH	144.6, CH	147.9, CH	153.1, CH
11	37.6, C	42.2, C	41.9, C	41.8, C	38.3, C
12	173.3, C	173.6, C	173.2, C	172.4, C	168.1, C
13	20.3, CH_3	6.5, CH_3	6.0, CH_3	26.0, CH_3	13.9, CH_3
14	24.7, CH_3	25.1, CH_3	20.8, CH_3	20.8, CH_3	26.3, CH_3
15	29.3, CH_3	31.3, CH_3	25.8, CH_3	25.7, CH_3	26.3, CH_3
-OMe		57.0, CH_3	57.2, CH_3		51.1, CH_3

^aIndirect detection from HSQC and HMBC ($J = 10$ and 7 Hz) experiments. ^bAssignments aided by COSY, HSQC, and HMBC experiments. ^cDetermined by edited HSQC.

asteriscunolides A–D suggested that asteriscunolide E (**6**) differed from main co-occurring metabolites in the presence of a reduced Δ^9 double bond. The proposed structure was consistent with the ^{13}C NMR signals assigned via analysis of both HSQC and HMBC data (Table 2). Diagnostic HMBC cross-peaks were observed between C-1 and both H_3 -14 and H_3 -15, C-12 and H_2 -4, and C-8 and both H-6 and H_2 -9, indicative of the 9,10-dihydrohumulen-1,12-olide skeleton (Figure 1). The *Z* geometry of the Δ^6 double bond was assigned by the typical chemical shift of C-13 at δ_{C} 20.3 (*Z* isomers: lit. δ_{C} C-13 = 21.1/21.3; *E* isomers: lit. δ_{C} C-13 =

(+)-asteriscunolide E (**6**)Figure 1. Selected HMBC correlations of **6**.

10.9/12.6).¹⁴ The (1*R*) absolute configuration was assumed based upon biosynthesis considerations. The ECD curve of **6**

was comparable with those of 1–5 (Figure S25, Supporting Information). Full NMR assignments of asteriscunolide E (6) are shown in Tables 1 and 2.

A preliminary analysis of the MS and NMR data of asteriscunolides F (7) and G (8) revealed that they were isomers. The same molecular formula, $C_{16}H_{22}O_4$, was indicated by the sodium adduct ion at m/z 301.1411 and 301.1367, respectively, in the HRESIMS spectra. The presence of both α,β -unsaturated carbonyl and γ -lactone moieties in asteriscunolides 7 and 8 was evident by examining the NMR data (Tables 1 and 2). In particular, the 1H NMR spectra showed signals attributable to the Δ^9 double bond conjugated with the C-8 carbonyl group [δ_H 6.14 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, H-9) and 5.58 (1H, d, $J = 13.7$ Hz, H-10) in 7; δ_H 6.17 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-9) and 6.04 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-10) in 8] as well as signals due to the γ -lactone moiety [δ_H 6.98 (1H, brs, H-2) and 4.72 (1H, brs, H-1) in 7; δ_H 6.98 (1H, brs, H-2) and 4.70 (1H, brs, H-1) in 8]. Furthermore, Me-13 resonated as a doublet ($J = 6.6$ Hz) [δ_H 0.96 in 7; 0.97 in 8], and an additional methoxy singlet was observed in both spectra [δ_H 3.68 in 7; 3.44 in 8]. Analysis of the COSY data of 7 and 8 showed the presence of a spin system sequentially connecting $H_{2-4} \rightarrow H_{2-5} \rightarrow H-6 \rightarrow H-7$ (Table 1). It was evident that the two molecules differed only in stereochemical features. The gross structures of asteriscunolides F and G were defined as depicted in formulas 7 and 8 with a reduced Δ^6 double bond and a C-6 methoxy substituent compared to asteriscunolides A–D. The geometry of the Δ^9 double bond was established by the J_{9-10} value as *Z* in 7 ($J = 13.7$ Hz) and *E* in 8 ($J = 16.4$ Hz). Analysis of the HSQC and HMBC spectra confirmed the proposed structure and permitted full NMR assignment (Tables 1 and 2). Assessment of the relative configuration at C-1, C-6, and C-7 in 7 and 8 was not trivial in light of the conformational flexibility of the macrocycle even though the presence of the fused lactone ring would introduce some strain into the humulene cycle. Interpretation of the NOESY and NOE difference experiments aided by conformational analysis using an MM2 force field for energy minimization (Chem3D Ultra 12.0) led to assignment of the relative configuration of the stereogenic centers as shown in formulas 7 and 8. In addition, the Murata method³¹ was also applied to deduce the orientation of substituents at C-6 and C-7 of asteriscunolide G (8).

In asteriscunolide F (7), steric effects were observed between H_{3-14} and H-2 and between H_{3-15} and H-10, consistent with their α - and β -orientations, respectively. Particularly diagnostic were the NOESY correlations between H-9 and both H-6 and H-7, which were *gauche*-oriented in agreement with the small $^3J_{6-7}$ ($= 2.6$ Hz) value. The observed steric interactions suggested that H-6, H-7, and H-9 had to be cofacial, implying the α -*syn* relationship of the substituents at C-6 and C-7 (Figure 2). A related asteriscunolide EtOH adduct exhibiting the same relative configuration as asteriscunolide F (7) was

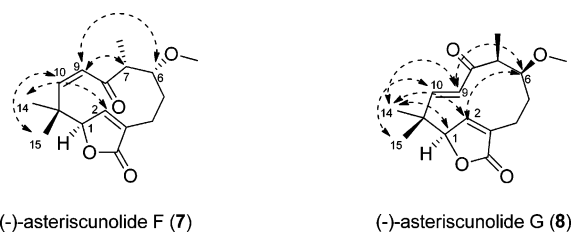


Figure 2. Relevant NOESY correlations of 7 and 8.

recently reported from an *Asteriscus* species.²¹ NMR data of this compound were in good agreement with those of 7, strongly supporting the current assignment. The stereochemical investigation of asteriscunolide G (8) was conducted by applying Murata's method³¹ to the C-6/C-7 moiety in addition to NOE analysis. The $^3J_{H,H}$ values of the protons on relevant carbons were measured by a series of homodecoupling experiments (see Table 1), whereas heteronuclear long-range coupling constants $^2J_{C,H}$ and $^3J_{C,H}$ (absolute values) were determined utilizing the *J*-resolved-HMBC pulse sequence.^{32,33} The small $^3J_{6-7}$ ($= 3.8$ Hz) value indicated that H-6 and H-7 were *gauche* oriented, whereas the large $^3J_{C_{13}-H_6}$ ($= 5.5$ Hz) and $^2J_{C_6-H_7}$ ($= 7.0$ Hz) values were consistent with both the *anti* disposition of C-13 with respect to H-6 and the *gauche* orientation of the C-6 methoxy group and H-7. This implied the assignment of a *syn* relationship between the C-6 methoxy and C-7 methyl groups. The subsequent analysis of NOESY and NOE difference experiments revealed diagnostic correlations between H-6 and both H-2 and H-9, between H_{3-14} and H-1, H-2, and H-9, and between H_{3-15} and H-10 (Figure 2). The observed steric effects suggested that H-1, H-6, and H-7 were α -oriented as depicted in formula 8.

Thus, asteriscunolides F (7) and G (8) differed not only in the geometry of the Δ^9 double bond but also in the opposite configurations at C-6 and C-7.

Analogous with 6, the (1*R*) absolute configuration in both 7 and 8 was assumed to be the same as the co-occurring asteriscunolides, on biosynthesis grounds. The ECD spectra of 7 and 8 (Figures S30 and S35, Supporting Information) supported this assumption.

Asteriscunolide H (9) had the molecular formula $C_{16}H_{22}O_4$, as was inferred by the HRESIMS sodium adduct ion at m/z 287.1254. The NMR data (Tables 1 and 2) were consistent with the asteriscunolide structure containing a reduced Δ^6 double bond analogous to compounds 7 and 8. In fact, the 1H and ^{13}C NMR spectra of 9 showed similar signals to those in 7 and 8 due to the α,β -unsaturated carbonyl and γ -lactone moieties (Tables 1 and 2). Differences were observed in the pattern of the C-4–C-7 moiety that was constituted by three contiguous methylenes, i.e., C-4 (δ_C 24.4, δ_H 2.54 and 1.85), C-5 (δ_C 21.1, δ_H 1.91 and 0.53), and C-6 (δ_C 36.9, δ_H 2.08 and 1.50), and oxygenated tertiary C-7 (δ_C 79.0) carrying both a methyl (δ_H 1.40, δ_C 26.0) and a hydroxy group, as required by the molecular formula. The geometry of the Δ^9 double bond was assigned to be *E* ($^3J_{9-10} = 16.0$ Hz). The proposed structure was in agreement with 1H and ^{13}C NMR resonances that were fully assigned by 2D NMR experiments (Tables 1 and 2). The relative configuration at C-1 and C-7 stereocenters was suggested by NOESY and NOE difference experiments (Figure 3). Steric effects were observed between H_{3-14} and H-1, H-2, and H-9 consistent with their α -orientations as well as between H_{3-15} and H-10, which occupied the opposite molecular face.

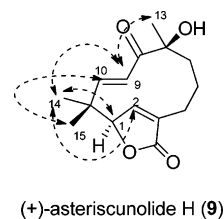


Figure 3. Relevant NOESY correlations of 9.

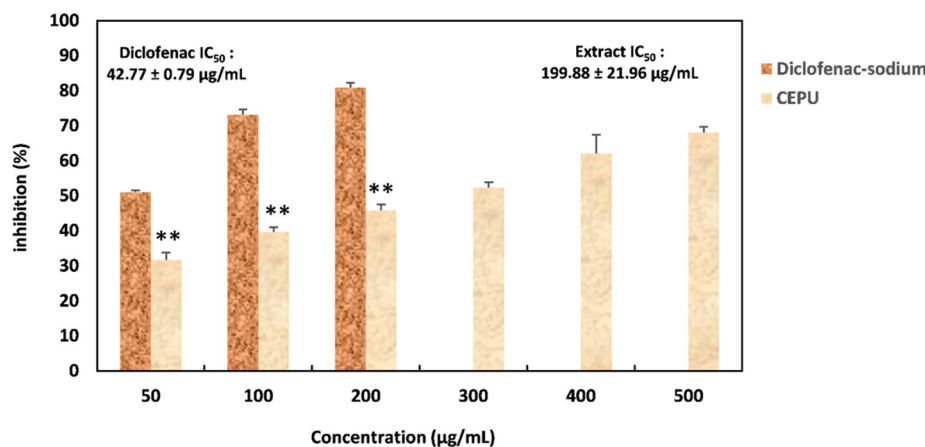


Figure 4. Effect of *P. undulata* CHCl₃ extract (CEPU) on protein denaturation. Each value is the mean \pm SD ($n = 3$); ** $p < 0.01$ compared to corresponding control.

Table 3. Effect of the *P. undulata* CHCl₃ Extract (CEPU) on Carrageenan-Induced Paw Edema in Rats^a

	time			
	1 h	2 h	3 h	4 h
control	0.55 \pm 0.2	0.82 \pm 0.01	0.99 \pm 0.01	1.7 \pm 0.26
diclofenac-sodium, 10 mg/kg	0.19 \pm 0.01 (64.94)**	0.23 \pm 0.04 (71.54)**	0.26 \pm 0.03 (73.65)**	0.36 \pm 0.06 (78.63)**
CEPU, 150 mg/kg	0.41 \pm 0.03 (25)** ††	0.58 \pm 0.02 (29.67)** ††	0.66 \pm 0.02 (33.11)** ††	1.03 \pm 0.04 (39.16)* ††
CEPU, 300 mg/kg	0.31 \pm 0.03 (43.9)** †† §	0.40 \pm 0.04 (51.22)** †† §§	0.47 \pm 0.06 (52.70)** †† §§	0.56 \pm 0.07 (66.86)** † §§

^aEach value is the mean \pm SD ($n = 5$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs control; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs diclofenac; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ between extracts. Student's test. Values given in parentheses represent percentage of inhibition.

In addition, H-9 showed diagnostic NOE interactions with H₃-13, implying that 7-OH and the γ -lactone moiety were on the same side of the molecule, as depicted in structure 9. Similar to compounds 6–8, the absolute configuration of 9 was suggested to be the same as the co-occurring main asteriscunolides based upon biosynthesis considerations and confirmed by ECD analysis (Figure S41, Supporting Information).

Finally, methyl pulicarate (10), the less polar component of the humulanolide fraction, showed a sodium adduct ion at m/z 287.1616 in the HRESIMS spectrum, indicating a molecular formula of C₁₆H₂₄O₃ with five indices of hydrogen deficiency. The IR spectrum showed bands at 1740 and 1710 cm⁻¹ that were due to the carbonyl groups of an α,β -unsaturated carbonyl and ester group, respectively. The ¹H NMR spectrum indicated the presence of three olefinic protons at δ_{H} 6.54 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-10) and 5.98 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, H-9) attributable to the Δ^9 isolated double bond that was conjugated with the C-8 carbonyl carbon and at δ_{H} 5.74 (1H, brt, $J = 9.0$ Hz, H-2) due to a trisubstituted double bond conjugated with a methyl ester function [δ_{H} 3.74 (3H, s); δ_{C} 51.1 (CH₃), 168.1 (CO)]. In addition, the signals due to the γ -lactone system characteristic of the asteriscunolides were absent in both ¹H and ¹³C NMR spectra, suggesting the presence of an ester functionality as depicted in structure 10. The geometry of the Δ^2 double bond was assigned as *Z* on the basis of diagnostic NOE effects between H-2 and H₂-4, whereas the *E* configuration based upon a ³J₉₋₁₀ value of 16.5 Hz was assigned to the Δ^9 double bond. The absolute configuration at C-7 remained undefined.

The anti-inflammatory properties of the CHCl₃ extract and the pure compounds 1 and 10 were investigated by in vitro and in vivo experiments. In particular, the extract was tested as inhibitor in the heat-induced denaturation of albumin as well as in the carrageenan-induced paw edema assay. Figure 4 shows

the effect of the *P. undulata* CHCl₃ extract at different concentrations (from 50 up to 500 $\mu\text{g/mL}$) on protein denaturation compared to the standard nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium salt. The effective concentration of the extract in preventing denaturation of the protein was observed to be 500 $\mu\text{g/mL}$, with an IC₅₀ value of 199.88 \pm 21.96 $\mu\text{g/mL}$.

The effect of the CHCl₃ extract on carrageenan-induced paw edema in mice is shown in Table 3 again compared to the diclofenac sodium salt. Subplantar injection of carrageenan in mice led to a significant and time-dependent increase in paw volume that was maximal at 4 h. The oral administration of the extract at two doses (150 and 300 mg/kg) significantly inhibited inflammatory response in a dose-related manner.

Pure compounds (+)-asteriscunolide A (1) and methyl pulicarate (10) were also assayed as inhibitors of heat-induced denaturation of albumin (data shown in Table 4). Both compounds moderately caused a decrease in antidenaturation activity, asteriscunolide A (1) being the most effective compound (44.44% inhibition at 10 μM concentration).

Table 4. Effects of Compounds 1 and 10 on Protein Denaturation

concentration, μM	% of inhibition		
	1	10	diclofenac sodium
0	0	0	0
0.5	15.48	8.73	22.62
1	22.62	16.67	31.75
5	32.94	24.60	41.67
10	44.44		70.24
IC ₅₀	23.76 μM	220.42 μM	4.14 μM

In summary, 10 new humulene sesquiterpenoids were isolated from the Algerian plant *P. undulata* and chemically characterized. With the exception of methyl pulicarate (10), all compounds possessed the asteriscunolide skeleton. ECD analysis indicated that compounds 1–9 belong to the *ent*-series of asteriscunolides that has not been reported previously. Furthermore, it is noteworthy that this is the first report of humulene sesquiterpenoids from the *Pulicaria* genus. Finally, some anti-inflammatory activity has been observed for the extract and for compounds 1 and 10.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a Jasco DIP 370 digital polarimeter. UV spectra were recorded on a Beckman Coulter DU 730 spectrophotometer. ECD spectra were acquired on a Jasco J-815 spectropolarimeter. FTIR spectra were obtained on KBr pellets using a Spectrum 100 instrument from PerkinElmer fitted with a germanium/KBr beam splitter and a deuterated tryglycine sulfate wideband detector. NMR experiments were recorded at the ICB-NMR Service Centre on a DRX 600 MHz Bruker spectrometer equipped with a TXI CryoProbe and on a Bruker Avance-400 spectrometer using an inverse probe fitted with a gradient along the *z*-axis. The NMR spectra were acquired in CDCl₃, and the chemical shifts were reported in parts per million referred to CHCl₃ (δ 7.26 for proton and δ 77.0 for carbon). *J*-Resolved HMBC experiments were recorded on a Bruker Avance III HD spectrometer equipped with a CryoProbe Prodigy using the phase-sensitive ge-2D HMBC with a 2-fold low-pass *J*-filter (hmbcsetgpl2nd) pulse sequence. ³J_{CH} and ²J_{CH} were obtained as absolute values. HRESIMS data were acquired on a Micromass Q-TOF Micro. HPLC separation was performed using a Shimadzu LC-10AD liquid chromatograph equipped with a UV SPD-10A wavelength detector on an RP-C₈ semipreparative column (Supelco C₈ Discovery Bio Wide Pore column, 250 × 10 mm, 5 μ m). Analytical TLC was performed on precoated silica gel plates (Merck Kieselgel 60 F254, 0.2 mm), with detection provided by UV light (254 nm) and by spraying with CeSO₄ reagent followed by heating (120 °C). Silica gel column chromatography was performed using Merck Kieselgel 60 powder (0.063–0.200 mm).

Biological Material. *P. undulata* plants were collected during April 2011 in the area of Djanet (Tassili) Wilaya of Illizi, in the southeast of the Algerian Sahara. The plant was authenticated by Prof. Gérard De Bélair, Badji Mokhtar University, Algeria, according to Quezel and Santa (1963). A voucher specimen has been deposited in the herbarium of the VARENBIOMOL research unit, University Frères Mentouri, Constantine 1.

Extraction and Isolation. The air-dried aerial parts of *P. undulata* (1 kg) were cut into small pieces and exhaustively extracted with EtOH/H₂O (80/20, v/v). The EtOH(aq) extract was concentrated under vacuum at 35 °C. After dilution with distilled H₂O (400 mL) the solution was successively extracted with CHCl₃, EtOAc, and *n*-BuOH. The organic phases of each extraction were dried with Na₂SO₄, filtered using common filter paper, and concentrated under vacuum at 35 °C to obtain the following extracts: CHCl₃ (4 g), EtOAc (3.6 g), and *n*-BuOH (20 g). The composition of these extracts was analyzed by TLC chromatography (petroleum ether/Et₂O in several ratios) and detecting the spots with CeSO₄.

An aliquot (334 mg) of the CHCl₃ extract was fractionated on a silica gel column eluted with a gradient of Et₂O in petroleum ether (0–100%), affording seven main humulene-containing fractions (A: 17.0 mg; B: 20.9 mg; C: 37.2 mg; D: 63.8 mg; E: 11.0 mg; F: 16.1 mg; G: 17.6 mg) by ¹H NMR analysis. Fractions B and D contained mainly (+)-asteriscunolide A (1) and (+)-asteriscunolide C (3), respectively, whereas the remaining fractions comprised more complex mixtures. Aliquots of fractions A (10.0 mg) and B (5.1 mg), and fraction E were separately purified by preparative TLC (fractions A and E: petroleum ether/Et₂O, 3:7; fraction B: petroleum ether/Et₂O, 1:1) to obtain methyl pulicarate (10, 2.5 mg) from fraction A, (+)-asteriscunolide A

(1, 3.2 mg) from fraction B, and (–)-asteriscunolide F (7, 0.5 mg) from fraction E. A portion of fraction C (20.2 mg) was purified by HPLC on a Supelco C₈ Discovery Bio Wide Pore column (250 × 10 mm, 5 μ m) eluted in isocratic mode (MeOH/H₂O, 4:6; flow 2 mL/min, UV detector at λ = 210 and 254 nm) to give (+)-asteriscunolides B (2, 2.0 mg), C (3, 1.8 mg), and E (6, 0.5 mg) and (+)-6,7,9,10-tetrahydroasteriscunolide (5, 0.5 mg). Fraction F and an aliquot of fraction G (8.0 mg) were purified on a Supelco C₈ Discovery Bio Wide Pore column (250 × 10 mm, 5 μ m) eluted in isocratic mode (MeOH/H₂O, 25:75; flow 2.5 mL/min, UV detector at λ = 210 and 254 nm) to afford (–)-asteriscunolide G (8, 1.5 mg), (+)-asteriscunolide C (3, 2.8 mg), and (+)-asteriscunolide D (4, 1.0 mg) from fraction F and (+)-asteriscunolide H (9, 1.6 mg) from fraction G.

(+)-Asteriscunolide A (1): [α]_D +63 (*c* 0.1, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 247 (3.73), 239 (3.79), 218 (3.99), 205 (3.92), 201 (3.91) nm; ECD (*n*-hexane, *c* 8.13 × 10^{−5}) λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 345 (−0.12), 268 (+0.81), 226 (+4.70); IR (liquid film) ν_{\max} 1752, 1631 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.00 (1H, s, H-2), 6.16 (1H, d, *J* = 13.9 Hz, H-10), 6.00 (1H, bdd, *J* = 6.4 and 10.0 Hz, H-6), 5.29 (1H, d, *J* = 13.9 Hz, H-9), 4.69 (1H, s, H-1), 2.68 (2H, m, H₂-4a and H₂-5a), 2.37 (1H, m, H₂-5b), 2.16 (1H, m, H₂-4b), 1.95 (3H, brs, H₃-13), 1.41 (3H, s, H₃-15), 1.21 (3H, s, H₃-14); ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 198.4 (C, C-8), 173.3 (C, C-12), 148.2 (CH, C-2), 138.0 (CH, C-6), 137.8 (C, C-3), 136.8 (CH, C-9), 133.6 (C, C-7), 133.3 (CH, C-10), 87.8 (CH, C-1), 41.8 (C, C-11), 29.7 (CH₃, C-15), 29.4 (CH₂, C-5), 24.3 (CH₃, C-14), 22.4 (CH₂, C-4), 20.9 (CH₃, C-13); LRESIMS *m/z* 269 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 269.1140 (calcd for C₁₅H₁₈O₃Na, 269.1148).

(+)-Asteriscunolide B (2): [α]_D +7 (*c* 0.1, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 250 (3.62), 225 (3.86), 212 (3.92), 202 (3.96) nm; ECD (*n*-hexane, *c* 1.02 × 10^{−4}) λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 345 (−0.34), 245 (+1.92), 223 (−4.25); IR (liquid film) ν_{\max} 1750, 1658 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.77 (1H, s, H-2), 6.17 (1H, d, *J* = 14.1 Hz, H-10), 6.15 (1H, m, H-6), 5.49 (1H, d, *J* = 14.1 Hz, H-9), 4.69 (1H, s, H-1), 2.84 (1H, m, H₂-4a), 2.65 (2H, m, H₂-5), 2.56 (1H, m, H₂-4b), 1.80 (3H, brs, H₃-13), 1.37 (3H, s, H₃-14), 1.03 (3H, s, H₃-15); ¹³C NMR (indirect detection from HSQC, and HMBC, CDCl₃, 400 MHz) δ 199.4 (C, C-8), 173.1 (C, C-12), 152.8 (CH, C-6), 151.3 (CH, C-2), 137.9 (C, C-3), 136.6 (CH, C-9), 132.6 (CH, C-10), 88.1 (CH, C-1), 42.1 (C, C-11), 31.1 (CH₃, C-15), 23.8 (CH₃, C-14), 23.4 (CH₂, C-5), 21.9 (CH₂, C-4), 10.6 (CH₃, C-13); LRESIMS *m/z* 269 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 269.1150 (calcd for C₁₅H₁₈O₃Na, 269.1148).

(+)-Asteriscunolide C (3): [α]_D +109 (*c* 0.1, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 225 (3.51), 220 (3.54), 211 (3.58), 202 (3.57) nm; ECD (*n*-hexane, *c* 2.39 × 10^{−4}) λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 351 (+2.90), 260 (−2.37), 224 (+6.50); IR (liquid film) ν_{\max} 1762, 1638 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 6.95 (1H, brs, H-2), 6.27 (1H, d, *J* = 16.8 Hz, H-10), 5.91 (1H, d, *J* = 16.8 Hz, H-9), 5.49 (1H, brd, *J* = 12.2 Hz, H-6), 4.71 (1H, brs, H-1), 2.50 (1H, m, H₂-4a), 2.41 (2H, m, H₂-4b and H₂-5a), 1.86 (3H, brs, H₃-13), 1.85 (1H, m, H₂-5b), 1.36 (3H, s, H₃-14), 1.27 (3H, s, H₃-15); ¹³C NMR (indirect detection from HSQC, and HMBC, CDCl₃, 400 MHz) δ 202.4 (C, C-8), 173.2 (C, C-12), 156.0 (CH, C-10), 149.3 (CH, C-2), 138.0 (C, C-3), 136.7 (C, C-7), 129.6 (CH, C-9), 128.2 (CH, C-6), 85.7 (CH, C-1), 40.2 (C, C-11), 33.5 (CH₂, C-5), 24.3 (CH₃, C-14), 22.7 (CH₂, C-4), 21.2 (CH₃, C-13), 20.9 (CH₃, C-15); LRESIMS *m/z* 269 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 269.1073 (calcd for C₁₅H₁₈O₃Na, 269.1148).

(+)-Asteriscunolide D (4): [α]_D +37 (*c* 0.1, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 216 (3.54), 202 (3.64) nm; ECD (*n*-hexane, *c* 1.45 × 10^{−5}) λ_{\max} ($\Delta\epsilon$) 268 (−3.10), 229 (+6.10); IR (liquid film) ν_{\max} 1757, 1643 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.02 (1H, s, H-2), 6.10 (1H, d, *J* = 16.7 Hz, H-10), 5.74 (1H, d, *J* = 16.7 Hz, H-9), 5.52 (1H, brd, *J* = 9.1 Hz, H-6), 4.71 (1H, brs, H-1), 2.79 (1H, m, H₂-4a), 2.65 (1H, m, H₂-5a), 2.50 (1H, m, H₂-4b), 2.39 (1H, m, H₂-5b), 1.78 (3H, brs, H₃-13), 1.29 (3H, s, H₃-15), 1.28 (3H, s, H₃-14); ¹³C NMR (indirect detection from HSQC, and HMBC, CDCl₃, 400 MHz) δ 203.6 (C, C-8), 172.2 (C, C-12), 155.4 (CH, C-10), 150.2 (CH, C-2), 144.9 (CH, C-6), 139.3 (C, C-3), 129.8 (CH, C-9), 87.2 (CH, C-1), 41.0 (C, C-11), 24.6 (CH₂, C-5), 24.4 (CH₃, C-14), 22.6 (CH₂, C-4),

21.3 (CH₃, C-15), 12.2 (CH₃, C-13); LRESIMS *m/z* 269 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 269.1151 (calcd for C₁₅H₁₈O₃Na, 269.1148).

(+)-6,7,9,10-Tetrahydroasteriscunolide (5): [α]_D +8 (c 0.3, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 216 (3.94), 202 (3.95) nm; ECD (*n*-hexane, c 7.4 × 10⁻⁵) λ_{max} (Δε) 225 (+4.2); IR (liquid film) ν_{max} 1751, 1712 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ 7.00 (1H, brs, H-2), 4.47 (1H, brs, H-1), 2.55 (1H, m, H-7), 2.44 (2H, m, H₂-4a and H₂-9a), 2.20 (1H, m, H₂-9b), 2.19 (1H, m, H₂-10a), 2.07 (1H, m, H₂-4b), 1.86 (1H, m, H₂-6a), 1.81 (1H, m, H₂-5a), 1.62 (1H, m, H₂-5b), 1.43 (1H, m, H₂-6b), 1.20 (3H, s, H₃-15), 1.10 (1H, m, H₂-10b), 1.09 (3H, s, H₃-14), 1.00 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H₃-13); ¹³C NMR (indirect detection from HSQC, and HMBC, CDCl₃, 600 MHz) δ 211.1 (C, C-8), 144.8 (CH, C-2), 86.3 (CH, C-7), 46.6 (CH, C-7), 38.1 (C, C-11), 37.4 (CH₂, C-9), 30.6 (CH₂, C-6), 30.1 (CH₃, C-15), 26.7 (CH₂, C-10), 25.2 (CH₂, C-4), 22.5 (CH₃, C-14), 21.3 (CH₂, C-5), 16.7 (CH₃, C-13); LRESIMS *m/z* 273 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 273.1463 (calcd for C₁₅H₂₂O₃Na, 273.1467).

(+)-Asteriscunolide E (6): [α]_D +50 (c 0.02, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 218 (3.18), 201 (3.45) nm; ECD (*n*-hexane, c 7.5 × 10⁻⁵) λ_{max} (Δε) 226 (+ 6.21); IR (liquid film) ν_{max} 1768, 1643 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR in Tables 1 and 2; LRESIMS *m/z* 271 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 271.1306 (calcd for C₁₅H₂₀O₃Na, 271.1310).

(-)-Asteriscunolide F (7): [α]_D -313 (c 0.03, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 215 (3.58), 208 (3.56), 201 (3.58) nm; ECD (*n*-hexane, c 1.28 × 10⁻⁴) λ_{max} (Δε) 233 (+ 5.49), 210 (-3.45); IR (liquid film) ν_{max} 1756, 1691 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR in Tables 1 and 2; LRESIMS *m/z* 301 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 301.1411 (calcd for C₁₆H₂₂O₄Na, 301.1410).

(-)-Asteriscunolide G (8): [α]_D -548 (c 0.1, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 228 (5.28), 218 (3.78), 204 (3.85) nm; ECD (*n*-hexane, c 1.2 × 10⁻⁴) λ_{max} (Δε) 218 (+ 6.79), 196 (-5.03); IR (liquid film) ν_{max} 1745, 1683 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR in Tables 1 and 2; LRESIMS *m/z* 301 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 301.1367 (calcd for C₁₆H₂₂O₄Na, 301.1410).

(+)-Asteriscunolide H (9): [α]_D +53 (c 0.2, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 218 (3.23), 214 (3.24), 201 (3.29) nm; ECD (*n*-hexane, c 1.5 × 10⁻⁴) λ_{max} (Δε) 223 (+ 7.74); IR (liquid film) ν_{max} 1736, 1685 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR in Tables 1 and 2; LRESIMS *m/z* 287 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 287.1254 (calcd for C₁₅H₂₀O₄Na, 287.1259).

(-)-Methyl pulicarolate (10): [α]_D -8 (c 0.3, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 215 (3.58), 208 (3.56), 201 (3.58) nm; IR (liquid film) ν_{max} 1740, 1710 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR in Tables 1 and 2; LRESIMS *m/z* 287 [M + Na]⁺; HRESIMS *m/z* 287.1616 (calcd for C₁₆H₂₄O₃Na, 287.1623).

Anti-inflammatory Assays. Inhibition of albumin denaturation was assayed using the method of Mizushima and Kobayashi.¹⁰ The reaction mixture comprised 50–500 μg/mL of the CHCl₃ extract of *P. undulata* or 0.5–10 μM (+)-asteriscunolide A (1) or methyl pulicarolate (10) and a 1% aqueous solution of bovine albumin fraction. The pH of the reaction mixture was adjusted to pH 6.3 using 1 N HCl. The samples were incubated at 37 °C for 20 min and heated to 51 °C for 20 min. After cooling the turbidity was measured spectrophotometrically at 660 nm. The results were compared to diclofenac sodium (50, 100, 200 μg/mL). The protein denaturation inhibition was expressed as a percentage and calculated by the following formula: % of inhibition = [(A₀ - A₁)/A₀] × 100, where A₀ is the absorbance of the control reaction and A₁ is the absorbance in the presence of the sample/standard (diclofenac sodium).

The anti-inflammatory activity of the CHCl₃ extract of *P. undulata* on carrageenan-induced paw edema was assessed according to the method of Winter et al.¹¹ A total of 20 adult male albino Wistar mice, weighing 25–30 g, were kept under standard laboratory conditions (25 ± 2 °C, 12 h light/12 h dark cycle) throughout the experimental period. The animals received a balanced diet of commercially available pellet feed and water provided ad libitum. All the experimental procedures were carried out in accordance with the Institutional Animal Ethical Committee of the Department of Animal Biology (University of Frères Mentouri, Constantine, Algeria). Mice were divided into four groups of five each, where group I was used as control, receiving vehicle, phosphate-buffered saline (PBS), group II

was used as reference, receiving orally diclofenac sodium (10 mg/kg), and groups III and IV received orally 150 and 300 mg/kg of *P. undulata* CHCl₃ extract, respectively. One hour later, paw edema was induced by injecting 0.1 mL of 1% carrageenan into subplantar tissue of the left hind paw of the mice. The progression of edema at 1, 2, 3, and 4 h was evaluated by measuring the paw edema by plethysmometer. Edema was expressed as the increase in paw volume in mL after carrageenan injection relative to the preinjection value for each animal. The percentage inhibition of the inflammation was calculated by the following formula: % inhibition = [(D₀ - D_t)/D₀] × 100, where D₀ is the average inflammation (hind paw edema) of the control group of mice at a given time and D_t is the average inflammation of the drug-treated mice (extract or diclofenac sodium reference) at the same time.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00717.

¹H, ¹³C, 2D NMR and ECD spectra of compounds 1–10 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fax (M. Gavagnin): +39 0818041770. E-mail: mgavagnin@icb.cnr.it.

ORCID

Margherita Gavagnin: 0000-0002-9532-4555

Author Contributions

[†]M. Boumaraf and M. Carbone contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by POR Campania FESR 2007-2013 FARMABIONET “Reti integrate per le biotecnologie applicate a molecole ad attività farmacologica” and by the General Directorate for Scientific Research and Technological Development (DGRSDT), Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) of Algeria. The authors are grateful to Prof. G. De Bélair, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria, for the identification of *P. undulata*. The authors also thank Mrs. D. Melck and Mr. E. Mirra of ICB-NMR service for technical assistance and Mrs. D. Ricciardi for laboratory support. The ICB-Mass Spectrometry Service through Dr. A. Cutignano and Mr. M. Zampa is gratefully acknowledged for mass spectral data.

■ REFERENCES

- (1) Ghazanfar, S. A. *Handbook of Arabian Medicinal Plants*; CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1994; p 98.
- (2) Ali, A. A.; Makboul, M. A.; Assaf, M. H.; Anton, R. *Bull. Pharm. Sci., Assiut University* **1987**, *10*, 37–49.
- (3) EL-Kamali, H. H.; Ahmed, A. H.; Mohammed, A. S.; Yahia, A. A. M.; El-Tayeb, I. H.; Ali, A. A. *Fitoterapia* **1998**, *69*, 77–78.
- (4) Liu, L. L.; Yang, J. L.; Shi, Y. P. *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 327–349.
- (5) Mossa, J. S.; Hifnawy, M. S.; Al-Yahya, M. A.; Al-Meshal, I. A.; Mekkawi, A. G. *Int. J. Crude Drug Res.* **1987**, *25*, 113–119.
- (6) EL-Kamali, H. H.; Yousif, M. O.; Ahmed, O. I.; Sabir, S. S. *Ethnobot. Leaflets* **2009**, *13*, 467–471.
- (7) Nematollahi, F.; Rustaiyan, A.; Larijani, K.; Nadimi, K. M.; Masoudi, S. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, *18*, 339–341.

- (8) Awadh Ali, N. A.; Sharopov, F. S.; Alhaj, M.; Hill, G. M.; Porzel, A.; Arnold, N.; Setzer, W. N.; Schmidt, J.; Wessjohann, L. *Nat. Prod. Commun.* **2012**, *7*, 257–260.
- (9) Boumaraf, M.; Mekkiou, R.; Benyahia, S.; Chalchat, J. C.; Chalard, P.; Benayache, F.; Benayache, S. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **2016**, *8*, 746–749.
- (10) Mizushima, Y.; Kobayashi, M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1968**, *20*, 169–173.
- (11) Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G. W. *Exp. Biol. Med.* **1962**, *111*, 544–547.
- (12) Al-Attas, A. A. M.; El-Shaer, N. S.; Mohamed, G. A.; Ibrahim, S. R. M.; Esmat, A. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *176*, 365–374.
- (13) San Feliciano, A.; Barrero, A. F.; Medarde, M.; Miguel del Corral, J. M.; Ledesma, E.; Sánchez-Ferrando, F. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3097–3100.
- (14) San Feliciano, A.; Barrero, A. F.; Medarde, M.; Miguel del Corral, J. M.; Aramburu Aizpiri, A.; Sánchez-Ferrando, F. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 873–878.
- (15) San Feliciano, A.; Barrero, A. F.; Medarde, M.; Miguel Del Corral, J. M.; Aramburu, A.; Perales, A.; Fayos, J.; Sánchez-Ferrando, F. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 5711–5717.
- (16) El Dahmy, S.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Sarg, T. M. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 309–316.
- (17) Jakupovic, J.; Lehmann, L.; Bohlmann, F.; Arroyo Hogdson, A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2854–2855.
- (18) Bohlmann, F.; Pauls, A. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1663–1665.
- (19) Rauter, A. P.; Branco, I.; Bermejo, J.; González, A. G.; García-Grávalos, M. D.; San Feliciano, A. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 167–171.
- (20) Akssira, M.; Mellouki, F.; Salhi, A.; Alilou, H.; Saouf, A.; El Hanbali, F.; Arteaga, J. F.; Barrero, A. F. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6719–6721.
- (21) Triana, J.; Eiroa, J. L.; Morales, M.; Perez, F. J.; Brouard, I.; Quintana, J.; Ruiz-Estévez, M.; Estévez, F.; Leon, F. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1292–1297.
- (22) Chari, A.; Jannet, H. B.; Mighri, Z.; Robinot, C.; Kunesch, N. *Nat. Prod. Lett.* **2001**, *15*, 419–423.
- (23) San Feliciano, A.; Barrero, A. F.; Medarde, M.; Miguel Del Corral, J. M.; Aramburu, A.; Perales, A.; Fayos, J. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2369–2372.
- (24) San Feliciano, A.; Medarde, M.; Miguel Del Corral, J. M.; Aramburu, A.; Gordaliza, M.; Barrero, A. F. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2851–2854.
- (25) Lodewyk, M. W.; Soldi, C.; Jones, P. B.; Olmstead, M. M.; Rita, J.; Shaw, J. T.; Tantillo, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18550–18553.
- (26) Negrín, G.; Eiroa, J. L.; Morales, M.; Triana, J.; Quintana, J.; Estévez, F. *Mol. Carcinog.* **2010**, *49*, 488–499.
- (27) Trost, B. M.; Burns, A. C.; Bartlett, M. J.; Tautz, T.; Weiss, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1474–1477.
- (28) Liang, Y.; Jiang, X.; Fu, X.-F.; Ye, S.; Wang, T.; Yuan, J.; Wang, Y.; Yu, Z.-X. *Chem. - Asian J.* **2012**, *7*, 593–604.
- (29) Fernandes, R. A.; Chavan, V. P. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3354–3356.
- (30) Han, J. C.; Li, F.; Li, C. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13610–13613.
- (31) Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876.
- (32) Furihata, K.; Seto, H. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6271–6275.
- (33) Furihata, K.; Tashiro, M.; Seto, H. *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 814–818.

Résumé.

Dans cette recherche phytochimique on a étudié les parties aériennes de deux plantes de la famille des Astéracées, l'une récoltée près d'Annaba, *Echinops spinosus* L. qui est une espèce répartie dans le monde entier et couramment utilisée dans le traitement de diverses maladies, et la seconde endémique, *Pulicaria undulata* cueillie dans la région de Djanet (Tassili) au Sud-Est Algérien.

Cette étude a débutée par une extraction hydro-alcoolique suivie des diverses méthodes de séparation chromatographique : colonne chromatographiques, CCM préparatifs et HPLC.

La détermination des structures des produits isolés a été effectuée en combinant les différentes méthodes d'analyse spectroscopique : résonance magnétique nucléaire et ces différentes applications (RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY et NOE difference); la spectrométrie de masse à haute résolution, l'UV, IR et la spectroscopie chiroptique (Polarimétrie et Dichroïsme Circulaire Electronique ECD).

Nous avons pu isoler et identifier à partir de l'espèce *Echinops spinosus* sept composés phénoliques (un flavonoïde aglycone, cinq flavonoïdes glycosides et un acide quinique), et pour la première fois à partir de l'espèce *Pulicaria undulata* dix sesquiterpènes (neuf sesquiterpènes lactones de type asteriscunolide et un sesquiterpène de type de humulène).

L'étude biologique comprend l'activité antioxydante des extraits CHCl₃, ACOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Echinops spinosus* et l'activité anti-inflammatoire de l'extrait CHCl₃ de l'espèce *Pulicaria undulata* L, ainsi que celle de ses deux produits isolés.

L'analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle de l'espèce *Pulicaria undulata* L. a permis d'identifier 31 composés où les principaux composants sont : carvotanacetone (14,8%), δ -cadinène (8,2%), α -cadinol (4,7%), epi- α -cadinol (3,4%) et thujanol (4,7%).

Mots clés : *Echinops spinosus*, *Pulicaria undulata*, Asteraceae, huile essentielle, flavonoides glycosylé, sesquiterpène lactone, asteriscunolide, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire,

Abstract

In this thesis, aerial parts of two plants belong to Asteraceae family were studied. The first is *Echinops spinosus*, species distributed around the world and is commonly used in the treatment of various diseases. The second one is *Pulicaria undulata*, species present in desert areas of North Africa and all of the Middle East regions and mainly used in the treatment of various diseases.

For experimental purposes, the *Echinops spinosus* sample plants were collected from the north-eastern part of Algeria in a region near Annaba, whereas the *Pulicaria undulate*, was harvested in the Djanet region (Tassili) in the southeastern part of Algeria.

During the laboratory work, different extraction and separation methods were used as maceration, chromatographic column, TLC and HPLC preparations. Additionally, and in order to determine the structures of the isolated compounds, deferent spectroscopic methods were combined: nuclear magnetic resonance and its different applications ($^1\text{H-NMR}$, ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY and NOE difference) as well as spectrometry of mass high resolution, UV, IR and chiroptical spectroscopy (Polarimetry, Electronic Circular Dichroïsm ECD).

Seven phenolics compounds from *Echinops spinosus* were isolated and identified: One aglycone flavonoid, five glycosids flavonoids and one quinic acid. For the first time, ten sesquiterpenes were obtained from the chloroformic extract of *Pulicaria undulata* (nine sesquiterpenes lactones belong to the Asteriscunolide type and one humulene)

The biological study includes the antioxidant activity of CHCl_3 , AcOEt and *n*-BuOH extracts for *Echnops spinosus* L. and the anti-inflammatory activity of the CHCl_3 extract for *Pulicaria undulata* L., and that of two isolated compounds.

Analysis GC and GC/MS of the essential oil of *Pulicaria undulata* L. identified 31 compounds. The main components are carvotanacetone (14,8%), δ -cadinene (8,2%), α -cadinol (4,7%), epi- α -cadinol (3,4%) and thujanol (4,7%).

Key words: *Echinops spinosus*, *Pulicaria undulata* L., Asteraceae, essential oil, flavonoids glycosids, sesquiterpens lactons, Asteriscunolide, antioxidant activity, anti-inflammatory activity,

المخلص

من خلال هذا البحث قمنا بدراسة فيتوكيميائية للأجزاء الهوائية لنبتتين من العائلة النجمية(المركبة)، جمعت الأولى. *Echinops spinosus* L. من ضواحي عنابة و هي نوع متوزع عبر العالم و عادة ما تستعمل في علاج عدة أمراض ، الثانية مستوطنة (*Pulicaria undulata* (endémique) ، جمعت من منطقة جانت (الطاسيلي) جنوب شرق الجزائر .

بدأت هذه الدراسة بعملية الاستخلاص الكحولي، متبوع بعدة طرق الفصل الكروماتوغرافي (عمود كروماتوغرافي، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM و الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC .

لتحديد بنى المركبات المفصولة استعملنا مختلف طرق التحليل الطيفي : مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ومختلف تطبيقاتها (NOE difference و RMN-1H, RMN-13C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY) مطيافية الكتلة عالية الدقة HRESI-MS، مطيافية الأشعة تحت الحمراء IR، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV ، التحليل الطيفي الكيرالتيقي Spectroscopie chiroptique (قياس الاستقطاب Polarimetrie، ازدواج اللون الدائري الالكترونى Dicroïsme Circulaire Électronique ECD) .

من النبتة *Echinops spinosus*، تمكنا من فصل و تحديد بنى سبع مركبات فينولية (فلافونويد أغليكوني، خمس فلافونيدات غليكوزيدية و حمض كينيك). ولأول مرة من النبتة *Pulicaria undulata* عشر سيسكيتيربينات(تسع سيسكيتيربينات لاكتونية من نوع Asteriscunolide وسيسكيتيربين من نوع Humulène) .

تضم الدراسة البيولوجية ، الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات $CHCl_3$, ACOEt, *n*-ButOH للنبتة *Echinops spinosus* L. و الفعالية المضادة للالتهاب لمستخلص $CHCl_3$ للنبتة *Pulicaria undulata* و كذا لمركبين مفصولين من هذه الاخيرة.

مكننا تحليل الزيت الاساسي للنبتة *Pulicaria undulata* باستعمال كروماتوغرافيا الطور الغازي CG و الطور الغازي بالتزاوج مع مطيافية الكتلة CG/MS من التعرف على 31 مركب ، حيث المركبات الرئيسية هي : δ -cadinene (8,2%), α -cadinol (4,7%), epi- α -cadinol (3,4%) thujanol (4,7%) carvotanacetone(14,8%) .

الكلمات المفتاحية: *Echinops spinosus* ، *Pulicaria undulata*، العائلة المركبة، البيت الاساسية، فلافونيدات غليكوزيدية، سيسكيتيربينات لاكتونية، Asteriscunolide ، فعالية مضادة للاكسدة، فعالية مضادة للالتهاب .

