

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

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

N° d'ordre :128/DS/2019
Série :14/CH/2019

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de doctorat en science
Spécialité : Chimie organique

Intitulé

**Étude phytochimique et biologique de deux espèces
de la famille Scrophulariaceae : *Verbascum
atlanticum* Batt. et *Verbascum creticum* Cav.**

Par :
KHENTOUL HALIMA

Sous la direction du Professeur
Pr. BOUMAZA OUAHIBA

Devant le jury

Pr. R. MEKKIOU	Université Constantine 1 (frères Mentouri)	Présidente
Pr. O. BOUMAZA	Université Constantine 1 (frères Mentouri)	Rapporteur
Pr. B. LEGSEIR	Université ANNABA (Baji Mokhtar)	Examineur
Pr. F. ZAIDI	Université SETIF (Ferhat Abbas)	Examineur
Pr. R. SEGHIRI	Université Constantine 1 (frères Mentouri)	Examineur
Dr. N. SEGUENI	Université Constantine 3 (Salah Boubendir)	Examinatrice

Soutenu le 04/07/2019

 DEDICACES 

A ma chère mère, pour ses sacrifices, son amour, sa tendresse, son soutien et ses prières tout au long de mes études.

A et mes chers frères et mes chères sœurs pour leur appui, pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral.

❧ REMERCIEMENTS ❧

La réalisation de ce mémoire était possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je voudrais tout d'abord, exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse, Madame **Ouahiba Boumaza**. Je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.

Je tiens à saisir cette occasion pour adresser mes remerciements aux professeurs **Fadila Benayache** et **Samir Benayache** pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements.

J'adresse mes sincères remerciements aux professeurs **Ratiba Mekkiou** et **Ramdane Seghiri** pour leurs engagements, leurs soutiens et leurs conseils qui ont été d'une grande aide pour moi durant les années de ma recherche.

Mes vifs remerciements vont également aux membres du jury : **Pr. Belgacem Legseir**, **Farouk Zaidi** et **Dr. Narimen Segueni** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant d'examiner ma thèse et de l'enrichir par leurs propositions.

Je tiens à remercier le professeur **Domenico Albanese** pour l'accueil qu'il m'a réservé et le temps qu'il m'a consacré lors de mon stage d'étude au sein de son laboratoire, Université de Milan, Italie.

Je tiens à remercier aussi le professeur **Fernando Reyes** et son équipe: **Jesús Martín Serrano**, **Ignacio Pérez-Victoria**, **Rodney Lacret**, **Frederick Annang**, **José Rubén Tormo**, **Mercedes Pérez Bonilla** pour leur bon accueil et l'aide qu'ils m'ont apportée lors de mon stage d'étude au sein de centre Medina, Grenade, Espagne.

Je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères au corps professionnel du laboratoire de biochimie et de microbiologie du centre CRBT Constantine, spécialement **Chawki Bensouici** et **Abderrahmen Selmania** pour leurs gentillesse et leurs bons conseils.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes amis et collègues de l'unité de recherche VARENBIOMOL qui m'ont apporté tout le soutien moral et intellectuel nécessaire à la bonne marche de mon parcours.

Table Des Matières

• INTRODUCTION GENERALE.....	2
• CHAPITRE I : Rappel bibliographique	
I.1. Les caractéristiques de la famille Scrophulariaceae.....	5
I.2. Les caractéristiques du genre <i>Verbascum</i>	7
I.3. La présentation de l'espèce <i>Verbascum atlanticum</i> Batt.	17
I.4. La présentation de l'espèce <i>Verbascum creticum</i> Cav.	21
• CHAPITRE II : Etude phytochimique : Extraction et séparation	
II.1.1. Screening phytochimique.....	24
II.1.2. Matériel végétal et extraction.....	26
II.1.3. Traitement phytochimique de différents extraits de deux plantes	28
II.1.4. Analyses par LC-MS et HR-ESI-MS.....	34
II.1.5. Séparation et isolement	34
• CHAPITRE III : Etude phytochimique : résultats et discussions	
III.1. Résultats de screening phytochimique	45
III.2. Identifications structurales	47
III.2.1. Les composés du <i>Verbascum atlanticum</i> Batt.	
III.2.1.1 Composé A1	47
III.2.1.2. Composé A2	51
III.2.1.3 Composé A3	54
III.2.1.4. Composés A4 et A5.....	58
III.2.1.5. Composé A6	63
III.2.1.6. Composé A7	65
III.2.1.7. Composés A8,A9 et A10.....	67
III.2.1.8. Composé A11	80
III.2.1.9. Composé A12	85
III.2.1.10. Composé A13	94
III.2.1.11. Composé A14.....	100
III.2.2.2. Les composés du <i>Verbascum creticum</i> Cav.	
III.2.2.1 Composé C1	107
III.2.2.2 Composé C2	111
III.2.2.3 Composé C3	116

III.2.2.4 Composé C4	121
III.2.2.5 Composé C5	129
III.3. Les composés identifiés par HPLC HR-ESI-MS	143
CHAPITRE IV : Activité biologique	
IV.1. Protocoles et méthodes :	
IV.1.1.Détermination du taux des polyphénols et flavonoïdes Totaux.....	149
IV.1.2 Activité Antioxydant	150
IV.1.3. Activité anti cholinestérase	155
IV.5.Test anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	156
IV.6. Activité antisolare (Sun protection factor (SPF)).....	157
IV.7. Activité antibactérienne	158
IV.2. Résultats et discussions.....	160
• CONCLUSION GENERALE	182
• REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	186

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a compté chaque année des milliers et même des millions de décès dus à des maladies non traitées comme le cancer et le sida (940000 personnes en 2017, sont décédées par le virus VIH et 5,5 millions en 2015 par le cancer, (**rapport de l'OMS consulté le 19 juillet 2018**)) ou à d'autres infections, encore plus résistantes telles que la tuberculose. A côté de ces pathologies morbides, l'aggravation de nouvelles maladies telles qu'Alzheimer a compté plus 10 millions nouveaux cas par an. La lutte contre ce fléau devient alors un défi majeur depuis le début du XXI^e siècle. Parmi les causes principales de développer une maladie, on trouve le stress. Le terme stress est utilisé pour la première fois comme une hyperactivité du système hormonal. Aujourd'hui il est principalement considéré comme un facteur pathogène du fait des processus d'oxydoréduction qui jouent un rôle principal dans l'équilibre du métabolisme en résultant la notion du terme stress oxydatif. Ce dernier est défini comme une situation, où la concentration des espèces oxydatives (ROS ou RNS) à l'état d'équilibre est augmentée de manière transitoire ou chronique, perturbant ainsi le métabolisme cellulaire et sa régulation et endommageant les constituants cellulaires. (**M. Breitenbach et P. Eck. 2015**).

Les antioxydants sont des substances chimiques protectrices qui neutralisent le dommage oxydatif causé par les macromolécules cellulaires (c'est-à-dire lipides, protéines, ADN). De nombreux composants sont identifiés pour exercer une efficacité antioxydant (**F. Dehghan Shahreza. 2016**).

Après de nombreuses recherches au milieu du XXI^e siècle, les scientifiques ont découvert que la consommation normale d'antioxydants comme ingrédients dans les compléments alimentaires augmentait la durée de vie des personnes (**E. M. Atta et al. 2017**) et permettait d'éviter plusieurs maladies mortelles telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, ischémie, vieillissement, détresse respiratoire, rhumatisme.

Les plantes sont alors considérées comme les meilleures sources d'antioxydants naturels qui sont utilisées avec succès comme régénérateur et cela pendant plusieurs siècles dans la médecine alternative (**J. Patel Chirag et al. 2013**).

Aujourd'hui la recherche de nouveaux métabolites naturels isolés de plantes et qui ont une efficacité antioxydant et thérapeutique est devenu une approche dans de nombreuses recherches scientifiques.

C'est dans ce contexte que nous entamons une étude phytochimique et biologique de deux espèces du genre *Verbascum* (*Scrophulariaceae*) : l'espèce endémique à l'Algérie *Verbascum atlanticum* Batt. et l'espèce méditerranéenne *Verbascum creticum* Cav.

L'objectif de ce travail est d'évaluer le potentiel antioxydant des différents extraits issus des deux plantes et isoler les substances bioactives.

Ce manuscrit est réparti comme suit :

❖ Un premier chapitre où nous évoquons un rappel bibliographique sur la famille des *Scrophulariaceae* et le genre *Verbascum* et nous présentons aussi une description des deux espèces étudiées : *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav.

❖ Le second chapitre est consacré au travail personnel et expérimental effectué sur les deux espèces étudiées et qui renferme le criblage chimique et les méthodes d'extractions et de purifications utilisées pour l'isolement et l'identification des métabolites bioactifs.

❖ Dans le troisième chapitre nous exposons tous les résultats de l'étude phytochimique à commencer par ceux du screening chimique puis l'identification structurale des composés isolés des deux espèces *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav., en se basant sur les différentes méthodes spectroscopiques (RMN¹H, RMN¹³C, HSQC, HMBC, COSY, NOESY) et les analyses HRESI-MS.

❖ Dans le quatrième chapitre, nous présentons tous les essais biologiques réalisés sur les différents extraits des espèces étudiées afin d'évaluer leur potentiel antioxydant, leur capacité inhibitrice des enzymes acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase, leur potentiel anti inflammatoire, leur capacité protectrice contre les rayonnements solaires UV-B et leur sensibilité contre les deux bactéries : gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *salmonella typhi*), gram positif *Staphylococcus aureus* et la levure *Candida albicans*.

Nous évoquons aussi dans ce chapitre, les tests antioxydants : DPPH, CUPRAC, pouvoir réducteur réalisés sur cinq composés isolés de l'espèce *V. creticum* Cav.

Enfin nous terminons notre manuscrit par une conclusion générale.

CHAPITRE I

RAPPEL

BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction :

Dans ce chapitre nous apportons un petit rappel bibliographique sur les caractéristiques de la famille Scrophulariaceae, le genre *Verbascum* et les deux espèces étudiées : *Verbascum atlanticum* Batt. et *Verbascum creticum* Cav.

I.1. Caractéristiques de La famille Scrophulariaceae :

La famille Scrophulariaceae est considérée comme la plus grande famille des Lamiales, comprenant 306 genres et plus de 5850 espèces (A. Sotoodeh et al. 2015). Elle est dispersée dans un grand nombre de pays, en particulier dans les régions froides et tempérées. Les plantes de la famille des Scrophulariaceae sont annuelles, bisannuelles, ou arbustes d'herbes vivaces. Les feuilles sont alternes, équitantes ou opposées, simples avec des marges dentées ou entières. Les fleurs sont solitaires ou disposées en inflorescences ramifiées ou non ramifiées. Les fleurs ont 4–5 sépales, pétales et étamines et 1 style. Le fruit est principalement une capsule. (F. Jamshidi-Kiaa et al. 2018).

Le concept « Scrophulariae » a existé depuis 1782, mais le nom de la famille est conservé comme Scrophulariaceae *sensu lato* (s.l) (B. Oxelman et al. 2005). Elle se composait en sous-familles: Rhinanthoideae, et Scrophulariaceae *sensu stricto* (s.s.). L'analyse phylogénétique moléculaire récente de la Scrophulariaceae (s.s) a été divisée en plusieurs tribus : Aptosimeae, Buddlejaceae, Hemimerideae, Manuleae, Myoporeae et Scrophularieae (D. C. Tank et al. 2006).

La tribu Aptosimeae, est indiquée comme un groupe représenté par quatre genres (*Anticharis* Endl., *Aptosimum* Burch. ex Benth., *Gerardiopsis* Engl. et *Peliostomum* E. Mey. ex Benth.) en Afrique tropicale et méridionale et en Asie méridionale de la péninsule arabique à la Malaisie, et des espèces sont également présents en Asie du Sud.

La tribu Myoporeae comprend actuellement les genres *Eremophila* R. Br. (plus de 200 espèces en Australie, principalement des régions arides à l'ouest), *Myoporum* Sol. ex G. Forst. (environ 30 espèces, principalement australiennes, certaines s'étendant jusqu'au sud-est de l'Asie, les îles de l'océan Pacifique et Indien), *Bontia* L. (monotypique au Caraïbes), *Pentacoelium* Siebold & Zucc. *Pholidia* R. Br. (le sud du Japon à travers les îles Ryukyu et Taiwan sud-est de la Chine continentale), et trois récemment décrits comme endémiques d'une petite région du sud-ouest en Australie occidentale: *Diocirea* Chinnock (quatre espèces), et monotypique *Calamphoreus* Chinnock et *Glycocystis* Chinnock). (S. L. Mosyakin et al. 2015).

Selon des études récentes, la tribu des Hemimerideae Benth. est la lignée phylogénétique la plus ancienne de ramification de Scrophulariaceae (s.s.). La tribu, comprend les genres *Alonsoa* Ruiz & Pav. (environ 16 espèces, tropicales Amérique et Afrique du Sud), *Colpias* E. Mey. ex. Benth. (Afrique du Sud), *Diascia* Link & Otto (environ 38 espèces en Afrique du sud, *Diqlis* Benth. (dix espèces, tropicale et sud-africaine et Madagascar), *Hemimeris* L. f. (quatre espèces, Afrique du Sud) et *Nemesia* Vent. (environ 65 espèces, Afrique tropicale et méridionale) (S. L. Mosyakin et al. 2017).

Les Buddlejeae comprennent 100 espèces dans cinq genres communément acceptés: *Buddleja*, *Chilianthus*, *Emorya*, *Gomphostigma* et *Nicodémie*. Ces genres sont dispersés dans les Régions tempérées et tropicales d'Afrique, d'Asie et du Nouveau monde (G.P. Coelho et al. 2018)

La tribu Limoselleae contient les anciennes tribus Manuleeae. Elle comprend un large éventail de genres (plus de 24), dont la plupart renferment peu d'espèces et sont endémiques en Afrique australe, mais comprend également *Limosella*, distribué dans le monde entier. (D. C. Tank et al. 2006).

La tribu Scrophularieae est composée de cinq genres: *Scrophularia* L. (environs 350 espèces dans les régions montagneuses, rarement dans les déserts. Cependant, certaines espèces sont en danger d'extinction). (A. Pasdaran et al. 2017), *Anthero thamnus* N.E. Br. (en Afrique du sud), *Oreosolen* Hook. F. avec l'espèce monotypique *O. wattii* occupant des habitats sur des prairies alpines, des pentes de gravier et des éboulis de 3000 à 5300 m de l'Himalaya et sur le plateau Qinghai – Tibétain, *Nathaliella* B. Fedtsch. (en Asie centrale) (C. Chen et al. 2017) et le genre *Verbascum* L. l'un des plus grands genres de la Famille Scrophulariaceae(s.s.).

I.2. Les caractéristiques le genre *Verbascum* L. :

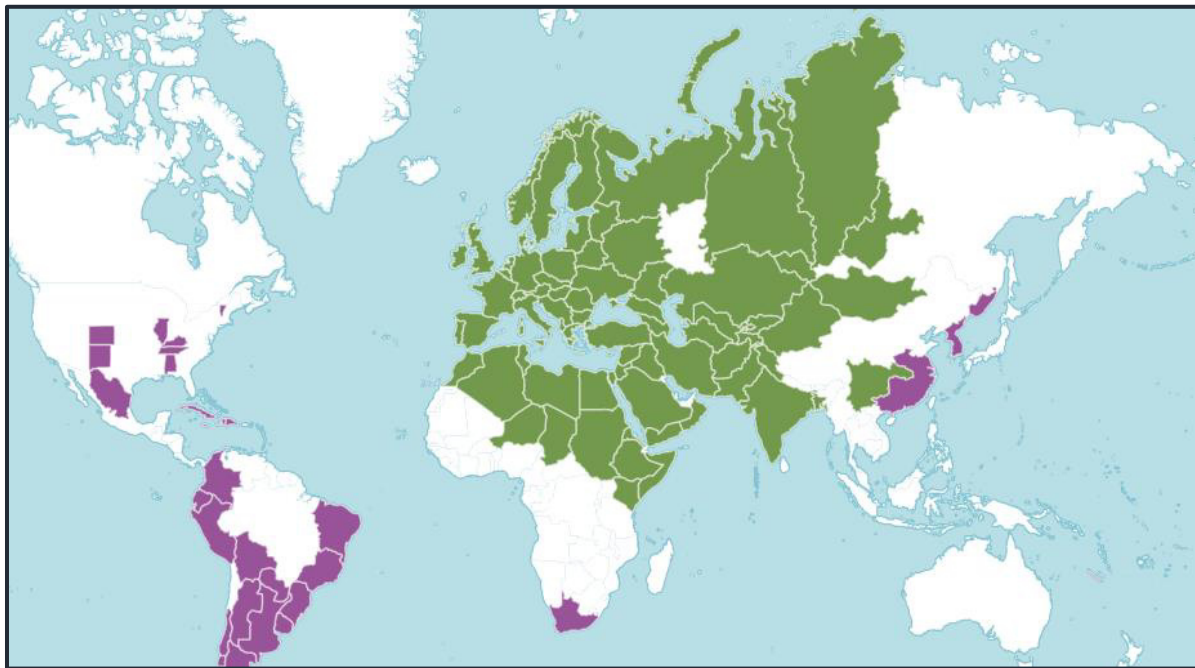
I.2.1. Histoire de la nomenclature :

Le genre *Verbascum* fut considéré comme *Arcturus* par Belli en 1601. Il fut réduit à synonyme de *Blattaria* par Morison en 1715. En 1753, Linneaus nomma des spécimens à 4 étamines : *Celsia* L. et des spécimens à 5 étamines : *Verbascum* L. En 1843, Fischer et Meyer ont séparé *Verbascum natolicum*, qui possède une capsule oblongue-cylindrique, et l'ont publié sous le genre *Staurophragma*. En 1891, les genres *Celsia* et *Staurophragma* ont été combinés sous le genre *Verbascum* par Kuntze. Mais, ils ont été séparés à nouveau comme *Celsia* et *Verbascum* par Murbeck en 1925. Le genre *Staurophragma* a été utilisé de nouveau par Huber-Morath (1971). Cependant, les genres *Celsia* et *Staurophragma* ont été combinés sous *Verbascum* par certains auteurs Murbeck en 1933 et Huber-Morath en 1971.

En 1978, les clés d'identification de *Staurophragma* et *Celsia*, sont acceptés comme des synonymes du genre *Verbascum*L. par Huber-Morath (**F.A. Karaveliogullari et al. 2008**).

I.2.2. La géographie des *Verbascum* L. :

Le genre *Verbascum* est distribué dans toutes les régions tempérées de l'hémisphère nord tel que nord région méditerranéenne (Fig.I.1). Les espèces de ce genre sont adaptés aux différentes conditions écologiques, tels que les habitats secs et ensoleillés, les montagnes, les prairies sèches et clairières, les endroits semi-déserts et rudérales. (**F. Attara et al. 2007**). De nombreuses espèces de *Verbascum* colonisent différents habitats, tels que les endroits sablonneux, les rochers, et les habitats naturels semi-ouverts. Généralement on les trouve dans des environnements perturbés, comme les champs agricoles abandonnés, les marges de champs cultivés, zones brûlées et bords de routes. Le succès de ces espèces à coloniser ces habitats perturbés est très souvent le résultat d'un certain type de perturbation qui réduit la densité de l'existant des espèces végétales. (**S. Catara et al. 2016**).



■ Natif ■ introduit

Fig.I.1 La distribution du genre *Verbascum* dans le monde (<http://powo.science.kew.org>)

I.2.3. Les caractéristiques des plantes de *Verbascum* :

Le genre *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) est composé de 400 espèces dans le monde (Sotoodeh et al. 2018). Les molènes sont des plantes bisannuelles rarement annuelles, avec des racines pivotantes, les tiges sont dressées, les feuilles sont des rosettes basales et dentée, généralement plus grandes. Les fleurs sont solitaires ou fasciculées sous-tendues par une bractée, pédicellées. Les étamines sont 4 ou 5, insérées à la base de la corolle, la corolle est jaune à orange, blanche, violette, crèmeuse ou rose, parfois avec des extrémités pourpre au centre ou teintées de rouge. Le tube est très court, à 5 lobes larges, légèrement inégaux, avec des filaments antérieurs 2 ou 3 barbus. Les capsules symétriques, ovoïde à elliptique-ovoïde, largement elliptique, ovoïde globuleux ou sous-globuleux. Les graines (50–300), sont bronzées ou brunes à orangées, coniques, cylindriques généralement dénoyautées (G. L. Nesom. 2012).

I.2.4. Importance biologique des *Verbascum* :

Les plantes du genre *Verbascum* ont été très utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter ou soulager plusieurs douleurs. Les feuilles et les fleurs de *Verbascum* sont utilisés pour traiter les troubles respiratoires tels que la bronchite, la toux sèche, la tuberculose et

l'asthme, autant que des expectorants, mucolytiques et adoucissants (**I.I. Tatli, Z.S. Akdemir 2006**).

Actuellement plusieurs recherches réalisées sur certaines espèces de genre *Verbascum* ont confirmé la présence des propriétés curatives et thérapeutiques de ce genre.

Les activités antioxydants des espèces du genre *Verbascum* sont prouvées par les tests du pouvoir réducteur ferreux et dosage des polyphénols réalisés sur *V. cheiranthifolium* var. (**A. Dalar et al. 2018**), et par le test DPPH réalisé sur *V. ovalifolium* Donn. ex Sims. (**S.V. Luca et al.2019**).

Les résultats des tests *in vivo* de l'activité antiinflammatoire et antinociceptive des extraits des espèces *V. chionophyllum* Hub. -Mor., *V. cilicicum* Boiss., *V. dudleyanum* (Hub. -Mor.) Hub. Mor., *V. latisepalum* Hub. -Mor., *V. pycnostachyum* Boiss. & Heldr., *V. salviifolium* Boiss., *V. splendidum* ont justifiés l'utilisation des plantes du *Verbascum* pour traiter les hémorroïdes et la douleur rhumatismale (**I.I. Tatli, et al.2008**).

Les effets antibactériens et antifongiques sont justifiés dans les études réalisées sur les espèces *V. densiflorum* Bertol., *V. gnaphalodes* Bieb., *V. lagurus*, *V. phlomoides* L., *V. xanthophoeniceum* Griseb (**B. Sen-Utsukarci et al. 2018**).

La recherche des traitements pour des nouvelles maladies en dehors d'utilisations traditionnelles des *Verbascum* a mené à tester des espèces du genre *Verbascum* comme *V. mucronatum* Lam. (**C. Kahraman et al. 2010**), *V. oocarpum* pour évaluer l'effet anti cholinestérase, anti tyrosinase et cytotoxique (**S. Kanbolat et al.2018**).

I.2.5. Les études phytochimiques sur les *Verbascum* :

Les plantes du genre *Verbascum* sont très étudiées sur la base de leur utilisation médicinale traditionnelle. Les études sont réalisées sur les constituants chimiques et leurs activités biologiques. Les études sur les espèces turques constituent une grande partie de références avec des dizaines de composés isolés. Certaines classes de métabolites constituent des marqueurs taxonomiques de genre tel que les saponines, les iridoïdes glucosides et les phenylpropanoïdes glycosides.

I.2.5.1. Les saponines :

Les structures des saponines sont basées sur des squelettes triterpéniques ou stéroïdiens. Les triterpènes sont des composés à squelette carboné à base de six unités isoprène dérivées de la biosynthèse. Ils ont des structures cycliques relativement complexes à partir de l'hydrocarbure acyclique en C₃₀le squalène, la plupart étant soit des alcools, aldéhydes ou

acides carboxyliques. Les stérols sont des triterpènes basés sur le système cyclique du cyclopentane perhydrophénanthrène.

Les stérols végétaux appelés les "phytostérols" (Fig.I.2) le β -sitostérol (1), le stigmasterol (2) et le campesterol (3) sont très répandus dans les plantes supérieures (A. Ludwiczuk et al. 2017). Il existe plusieurs squelettes principaux de saponines tel que les dammaranes (4), les tirucallanes (5), les lanostanes (6), les cucurbitanes (7), les hopanes (8), les lupanes (9), les oleanes (10), les ursanes (11). Le squelette oléane est le plus commun. Des unités osidiques sont attachées dans des sites particuliers du squelette, en position C-3 ou attachés à la fois au C-3 et C-26 ou C-28 (D. Kregiel et al.2017).

Ces glucides ou groupes oligosaccharides comprennent habituellement: D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, D-apiose, D-fucose et acide D-glucuronique (W. Oleszek et al. 2010).

L'intérêt biologique des saponines est connu depuis longtemps. L'activité antivirale est prouvée par certaines saponines du type oléane et ursane qui peuvent inhiber la synthèse de l'ADN de quelques virus comme l'herpès simplex. L'effet hypoglycémiant de plusieurs saponines est exercé par la diminution de la gluconéogenèse (A. De Paula Barbosa2014). L'activité antifongique, antiparasitaire et antimicrobienne des saponines peuvent être observé par la capacité de détruire la membrane cellulaire des microorganismes pathogènes (S. D. Desai et al. 2009). Des études ont montré que de nombreuses saponines présentent une bonne activité anti tumorale et une inhibition de l'angiogenèse tumorale (Y.C. Zhao et al. 2018). Dans le domaine de la cardio-protection, des études récentes démontrent que les saponines protègent le myocarde de la nécrose en jouant comme un antagoniste du récepteur β adrénergique (D. Singh et al. 2018).

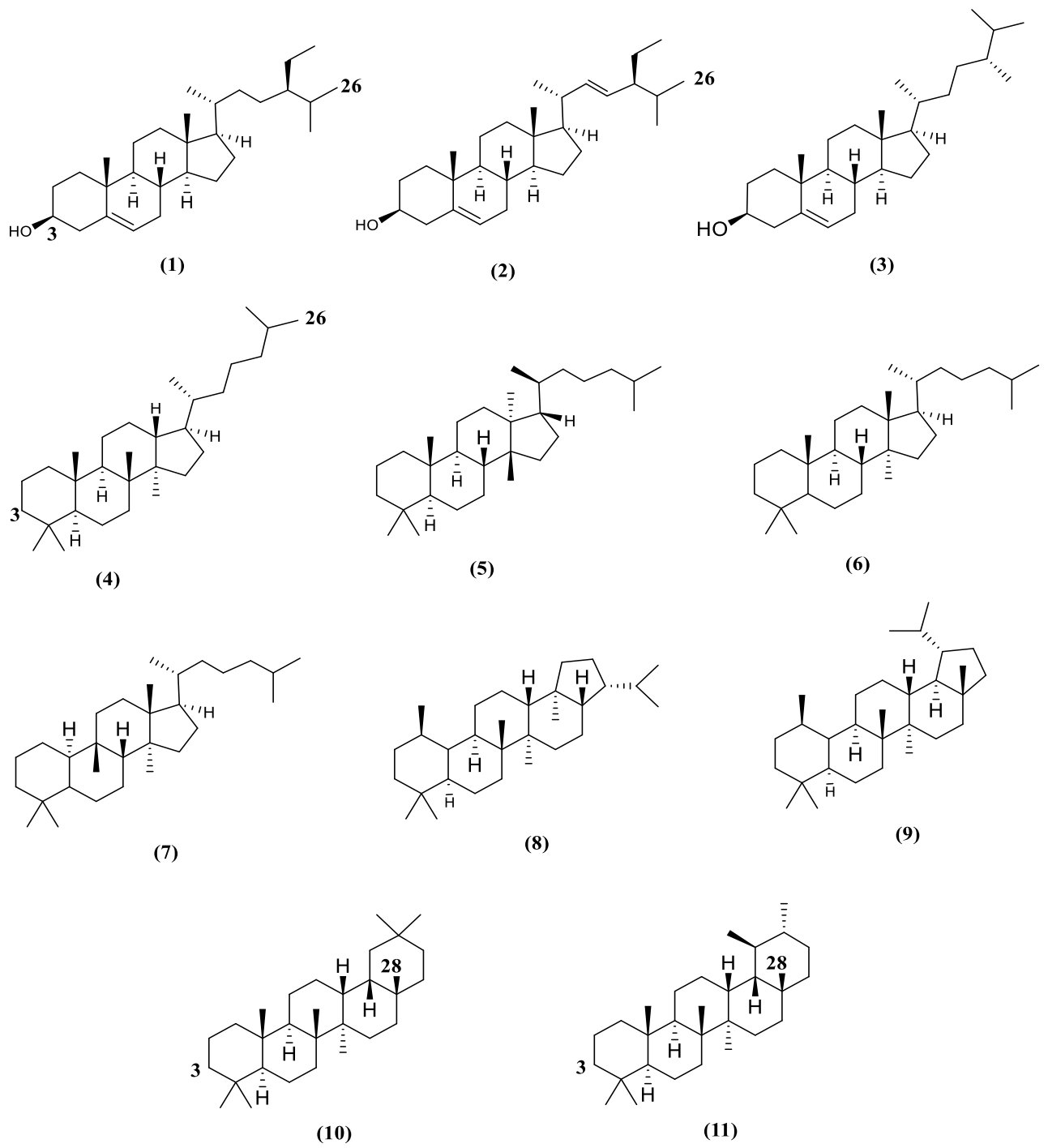


Fig.I.2 Les squelettes de base des saponines

I.2.5.2. Les iridoïdes :

Les iridoïdes appartiennent à la classe des monoterpènes, ce sont des produits naturels du squelette avec 10 atomes de carbone. Un marqueur structural de ces composés est le groupe bicyclique condensé du système cyclopentano-pyranique. Les iridoïdes existent dans la nature sous forme de glucosides, aglycones, sous forme de sécoiridoïdes ou de formes bisiridoïdes (**S. Habtemariam 2017**). Parmi les iridoïdes glucosides (Fig.I.3) les plus connus, les structures catalpol (**12**), ajugol (**13**) et aucubigénine (**14**) sont considérées comme des structures de base d'une large gamme d'autres iridoïdes glucosides.

L'activité biologique des iridoïdes est marquée par l'effet antiinflammatoire dont plusieurs iridoïdes tel que le mussaenoside (**15**), l'acide loganique (**16**), le 8-*epi*-loganine (**17**), la geniposide (**18**) et l'aucubine (**19**) ont donné des meilleurs résultats pour réduire l'œdème inflammatoire *in vivo* (**D. Carrillo-Ocampo et al. 2013**), une autre étude faite sur les iridoïdes a montré que la consommation de sources alimentaires riches en iridoïdes pourrait être une stratégie anti-âge utile (**B. J. West et al. 2014**). Les iridoïdes ont aussi une bonne activité anticancéreuse et antibactérienne (**Y.H. Liu et al. 2017**).

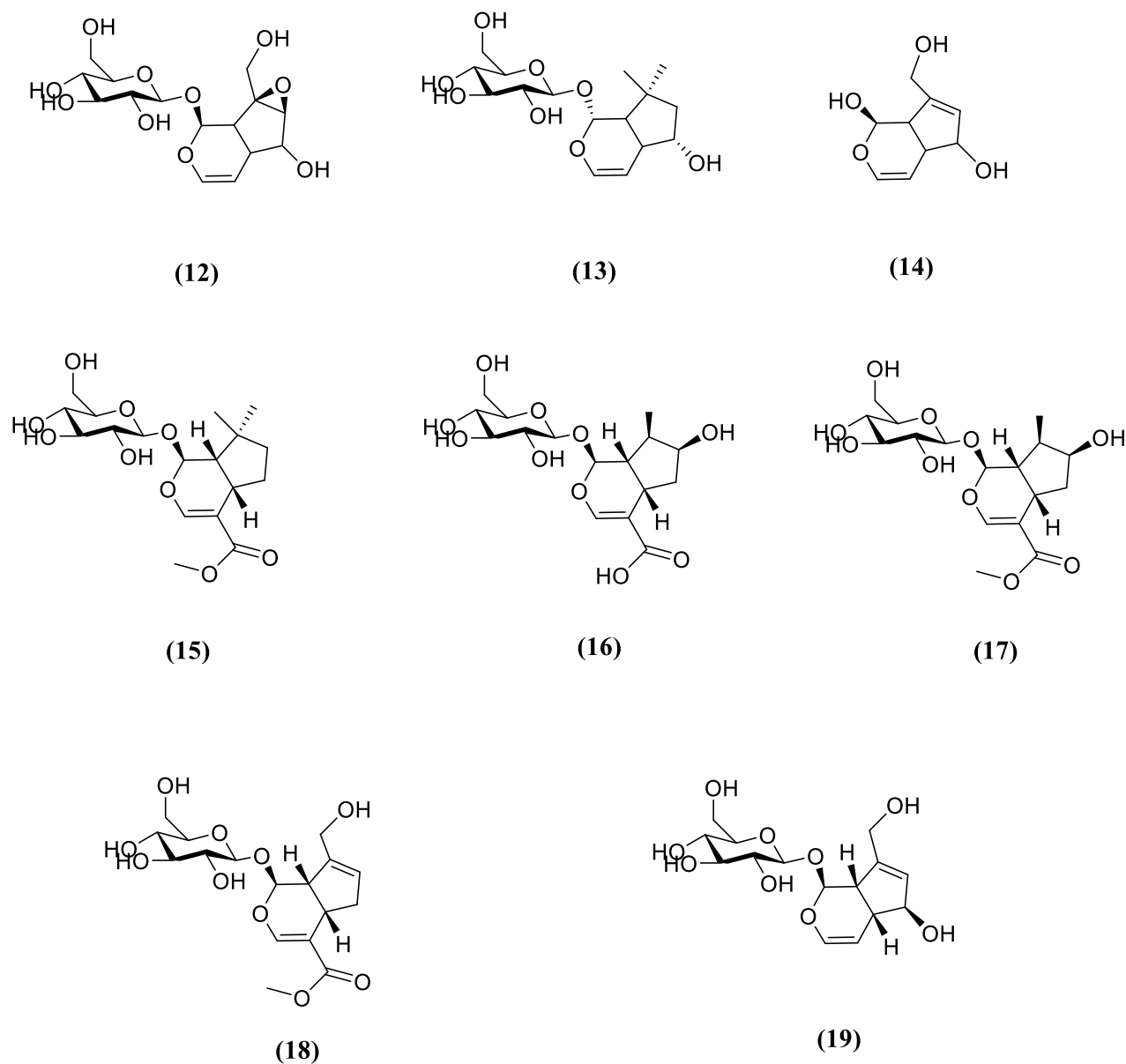


Fig.I.3 quelques structures des iridoïdes

I.2.5.3. Les phénylpropanoïdes :

Les composés phénylpropanoïdes constituent un large éventail de substances possédant de nombreuses fonctions physiologiques. Ils sont synthétisés par des plantes issues des acides aminés phénylalanine par l'enzyme phényl-alanine-ammoniac lyase (PAL) (V G. Dzhavakhiya et al. 2007). Les phénylpropanoïdes sont des composés organiques avec un noyau aromatique et une queue de propène à trois carbones (acide cinnamique (C6 – C3) l'hydroxyphényléthyle (C6-C2) liés à un β -glucopyranose (apiose, galactose, rhamnose, xylose, etc.) (K. Alipieva et al. 2014). Le verbascoside (20) (Fig.I.4) est une structure de

phénylpropanoïde glucoside, qui est très répondeuse comme structure de base pour la plupart des phénylpropanoïdes.

Des études cliniques ont montré que les phénylpropanoïdes possèdent un potentiel thérapeutique qui peut être utilisé au développement de nouveaux médicaments dans le traitement du cancer (A. A. Carvalho et al. 2015). Les résultats d'une étude faite sur le verbascoside a révélé que ce dernier a une bonne action antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli*. (B. S. F. Bazzaz et al. 2018). D'autres recherches réalisées *in vitro* et *in vivo* ont prouvé que les phénylpropanoïdes naturels tel que l'eugénol (21), ont un bon potentiel antioxydant et anti-inflammatoire (J. N. Barboza et al. 2018).

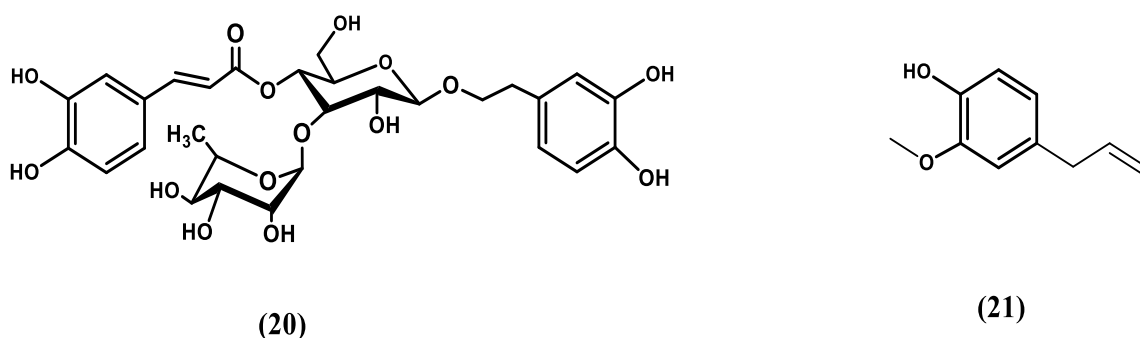


Fig.I.4 structure de verbascoside et eugénol

I.2.5.4. Les polyphénols :

La classe des polyphénols est représentée par les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins mais avec un pourcentage plus au moins considérable dans le genre *Verbascum*.

Les flavonoïdes sont une classe de composés présentes de manière abondante dans la nature.

Les flavonoïdes se retrouvent souvent sous des formes glucosés ou estérifiées, constitués de cycles C6-C3-C6, nommé les cycles A et B liés par un cycle à trois atomes de carbone. Selon les variations du modèle de substitution, les flavonoïdes peuvent ainsi être classés en différentes sous-classes, offrant une gamme extrêmement diversifiée de dérivés (T.Y. Wang et al. 2017).

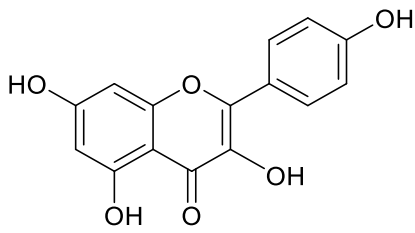
Le kamphérol (22), l'apigénine (23) La lutéoline (24) avec leurs dérivés sont très répondeuses dans le genre *Verbascum*.

Les acides phénoliques (acides phénolcarboxyliques) sont des phénols contenant des substances avec un cycle phénolique et au moins une fonction acide carboxylique organique. En fonction des unités de carbone de la chaîne latérale liées au cycle phénolique, les acides phénoliques peuvent être divisés en composés C6-C3, C6-C2 et C6-C1, le plus important

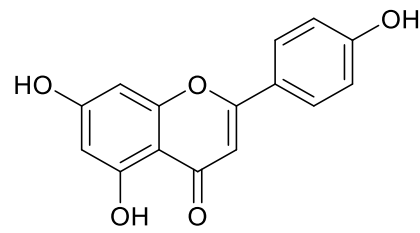
étant C6-C1 (composés à structure *p*-hydroxybenzoïque (25)) et C6-C3 (dérivé de l'acide cinnamique (26)) (Fig.I.5) (M. Goleniowski et al.2013).

L'utilisation de composés phénoliques et de flavonoïdes comme des agents bioactifs est installée depuis des dizaines d'année. Des recherches récentes dans ce domaine ont apporté de nouveaux flavonoïdes comme les antioxydants, les antibactériens, les anticancéreux, les antisolaires, les cardio-protecteurs, les antiinflammatoires pour traiter plusieurs maladies (D. Tungmunnithum et al. 2018).

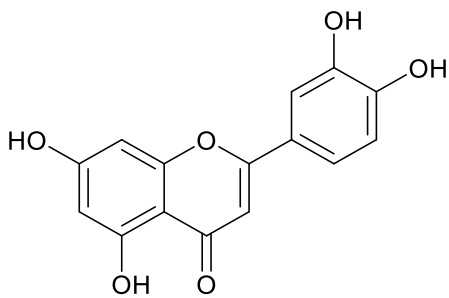
Certains acides phénoliques ont des activités biologiques très remarquables. L'acide coumarique (27) est le composé le plus connu pour ces activités parmi les phénols végétaux. De plus, l'acide rosmarinique (28) a des effets antioxydants, antiinflammatoires et antimicrobiens. Son effet antioxydant est plus fort que la vitamine E. Il empêche les dommages des cellules causés par les radicaux libres et réduit le risque du cancer et d'athérosclérose. Il est utilisé dans le traitement des ulcères d'estomac, de l'arthrite, de la cataracte et d'asthme bronchique. L'acide caféique (29) dépasse de loin les autres antioxydants, car il réduit la production de α -toxine de plus de 95% (B. Kaurinovic et D. Vastag. 2019).



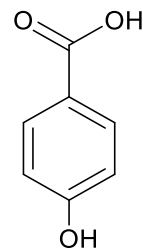
(22)



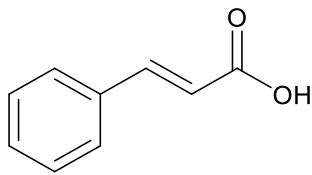
(23)



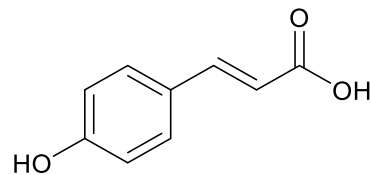
(24)



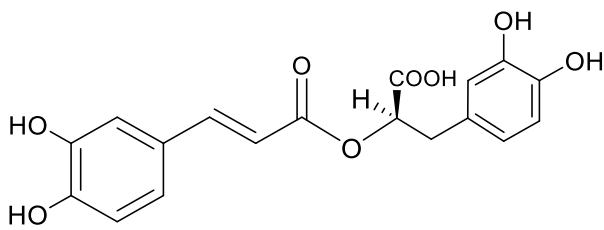
(25)



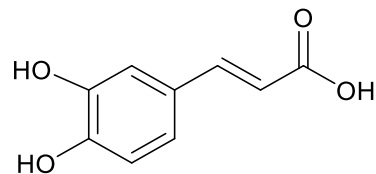
(26)



(27)



(28)



(29)

Fig.I.5. Quelques structures de base des flavonoïdes et acides phénoliques

I.2.6. Les *Verbascum* en Algérie :

La diversité climatique et géographique de l'Algérie explique sa richesse écologique floristique dépendante du littoral composé de plages, de dunes, de rochers ou des falaises, les plaines alluviales des divers champs, des marais ou des lacs, et les montagnes. Comme dans d'autres parties du bassin méditerranéen, l'Algérie est très riche en plantes endémiques et rares (E. Vela et al. 2007). Les plantes du genre *Verbascum* (famille Scrophulariaceae) sont très présentes dans tout le territoire algérien. Ce genre est représenté par *Verbascum atlanticum* Batt. (endémique) (M. Benaïssa et al. 2018), *Verbascum creticum* (L.) Cav., *V. longirostre*, *V. battandieri* Murb., *V. betonicifolium* Desf. Kuntze, *V. ballii* Batt.Hub. -Mor., *V. pinnatisectum* Batt. (endémique), *V. Blattaria* L., *V. dentifolium* Del., *V. rotundifolium* Ten., *V. granatense* boss., *V. simplex* Hoffm. et Link, *V. maurum* Maire et Murb., *V. sinuatum* L., *V. betonicifolium* Desf.Kuntze (endémique), *V. Faurei*, (Dobignard et Chatelain 2013).

Dans ce présent travail, deux espèces collectées de deux régions en Algérie font l'objet d'une recherche phytochimique et biologique pour la première fois, l'identification de ces deux plantes est faite par le docteur Sarri Djamel. Il s'agit de :

- L'espèce endémique *Verbascum atlanticum* Batt.
- L'espèce *Verbascum creticum* Cav.

I.3.La présentation de *Verbascum atlanticum* Batt.



Fig.I.6 *Verbascum atlanticum* batt. en deux périodes de l'année, en mois de mai (gauche) et en mois d'octobre (droite)

I.3.1. Classe dans la systématique :

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermatophyta (Angiospermae)</i>
Classe	<i>Dicotyledoneae</i>
Famille	<i>Scrophulariaceae</i>
Tribu	<i>Scrophularieae</i>
Genre	<i>Verbascum</i>
Espèce	<i>Verbascum atlanticum</i> batt.

I.3.2. Caractéristiques botaniques et distribution

La plante *Verbascum atlanticum* Batt. reste une plante endémique à l'Algérie depuis son identification taxonomique par J. A Battantier jusqu'à présent (**Benaïssa et al.2018**).

L'espèce *Verbascum atlanticum* Batt. est une plante bisannuelle, elle a des étamines antérieures courbées en demi-cercle vers le haut, à anthères oblongues. Étamines médiane ayant tendance à l'avortement et souvent rudimentaire ou même absente (fig.I.7). Style \pm incurvé dans le haut, épaissi au milieu et atténué au sommet. Pédicelles fructifères épais, à peine plus longs, rameux-dendroïdes ou subverticillés. Feuilles Basilaires distinctement pétiolées, à pétiole non ailé, limbe généralement pinnatifidite \pm lyré, à segments libres (**Quezel et Santa S.1963**).

L'espèce *Verbascum atlanticum* Batt. est répartie dans le nord de l'Algérie : dans le sud oranais et à Djebel Aïssa près de Djelfa selon les premiers spécimens, à Constantine, Mila, M'sila, Kala selon les échantillons récoltés.

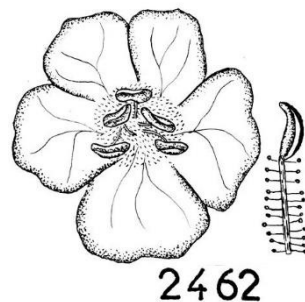


Fig.I.7 Etamine et pétale de *Verbascum atlanticum* Batt. (**Quézel et Santa. 1963**)

I.3.3. Les études antérieures sur l'espèce :

Selon les différentes bases de données de recherche, les études antérieures sur cette espèce ne dépassent pas les données décrites dans les anciens livres botaniques tel que la flore de l'Algérie ainsi que Quezel et Santa. La première étude phytochimique et biologique sur cette plante est effectuée pour la première fois dans le cadre de mon obtention de diplôme de magister dans l'unité de recherche VARENBIOMOL, université de Constantine.

Ce travail antérieur a permis d'effectuer un criblage phytochimique qui a montré que l'espèce est caractérisée par la présence particulière des terpènes, des triterpènes, des stérols et des saponines, ainsi que des flavonoïdes.

En revanche l'étude phytochimique sur l'extrait *n*-butanol issu de la macération hydro alcoolique, a montré la présence réelle des saponines par la formation d'émulsion en contacte d'extrait hydroalcoolique avec le chloroforme.

Les résultats de cette étude a permis d'isoler plusieurs composés, dont trois flavonoïdes identifiés (Fig. I.8).

- Lutéoline 7-*O*- glucoside (**30**)
- 3',4'- dihydroxy 7- méthoxyflavone 5- *O*- glucosyl (**31**)
- Lutéoline 7-*O*- β -glucuronide de méthyle (**32**)

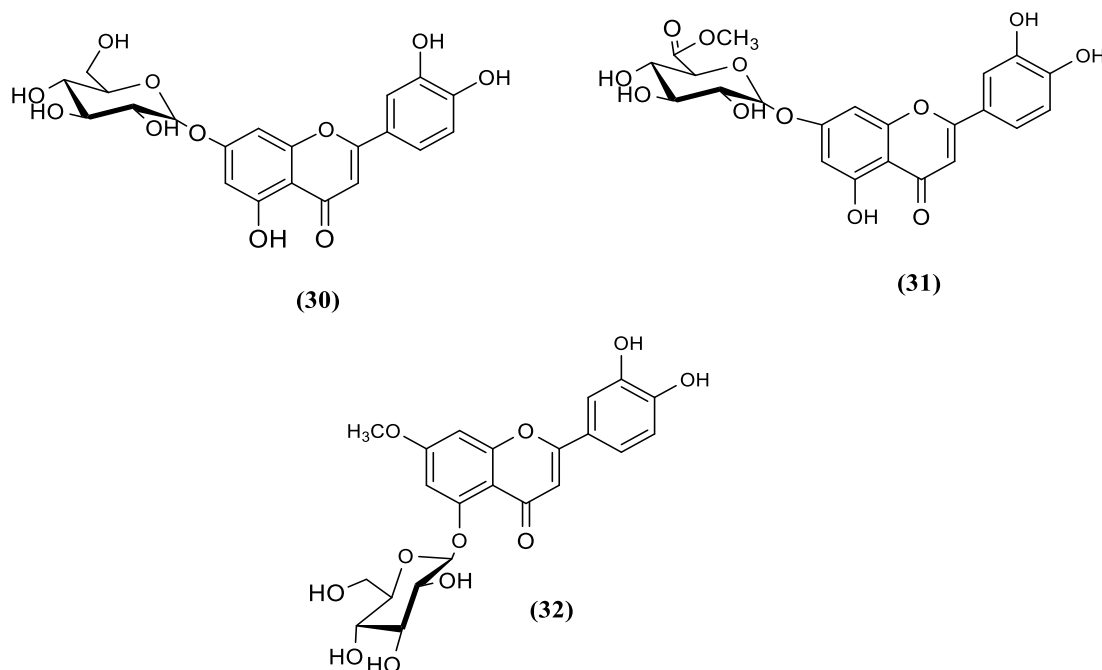


Fig.I.8 Les composés isolés auparavant de l'espèce *Verbascum atalnticum* Batt.

L'évaluations biologique des extraits issus de l'espèce *Verbascum atalnticum* Batt. a été faite sur l'extrait *n*-butanol envers la capacité de piégeage du radical libre DPPH, les résultats ont montré que l'extrait testé a une bonne capacité de piégeage de DPPH (Fig.I.9), qui est traduite par une valeur de $IC_{50} = 29,43 \mu\text{g/ml}$ en comparaison avec l'acide ascorbique pris comme standard avec un $IC_{50} = 5,183 \mu\text{g/ml}$.

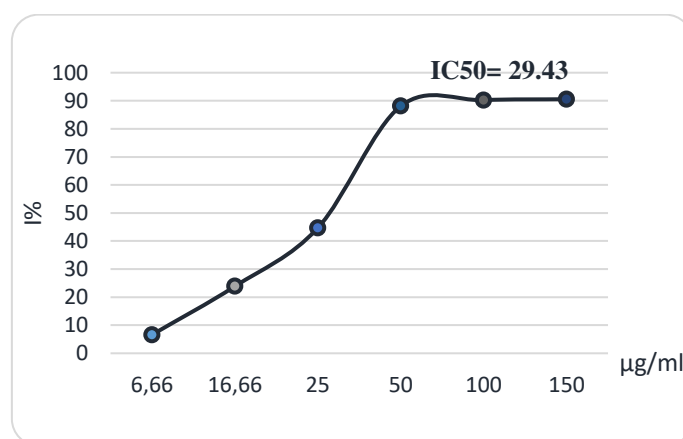


Fig.I.9 Courbe de d'inhibition de DPPH de l'extrait BuOH du *V. atalnticum* Batt.

I.4. La présentation de l'espèce *Verbascum creticum* Cav.



Fig.I.10 *Verbascum creticum* Cav. plante sèche (à gauche), plante dans le champs (à droite)

I.4.1. Classe dans la systématique

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermatophyta (Angiospermae)</i>
Classe	<i>Dicotyledoneae</i>
Famille	<i>Scrophulariaceae</i>
Tribu	<i>Scrophularieae</i>
Genre	<i>Verbascum</i>
Espèce	<i>Verbascum creticum</i>

I.4.2. La nomination de l'espèce :

Cette espèce a été classée en 1774 sous le nom : *Celsia crética* L., en 1797 elle avait pris le nom de *Verbascum lyratum* Lam. En 1803 elle s'appelait *Verbascum creticum* (L.) Cav. En 1891 elle a été classé comme *Verbascum creticum* (L.) Kuntze, après la combinaison des genres *Celsia* et *Verbascum*. Toutes ces nominations sont acceptées comme des synonymes. (C. Benedí. 2002), (Hassler 2019).

I.4.3. Description botanique et distribution :

L'espèce *Verbascum creticum* Cav. (Fig.I.11) est une plante bisannuelle, les tiges atteignent 60– (80) cm de hauteur, avec des poils septés ou villos, les feuilles sont lancéolées, irrégulièrement crénelée. La Corolle est jaune avec des taches pourpres à la base, de 4,5–5,5

cm de diamètre, les étamines sont en nombre de 4; 2 étamines supérieures avec des filaments pourpres-villeux (parfois partiellement blancs); en bas 2 étamines plus longues, glabres et à anthères décurrentes. La capsule est de 8–10 mm de long, globuleuse, presque cachée par le calice. Les graines sont cylindro-coniques à cylindriques-oblongues. (C.J Webb 1988). L'espèce *Verbascum creticum* Cav. vit dans des endroits nitrifiés, un peu quelque chose humide, jusqu'à 300 m, dans l'ouest de la Méditerranée. Elle fleurit en avril et mai (M. P. de Santayana et al. 2018).



Fig.I.11 Illustration du *Verbascum creticum* Cav. (<http://www.photoflora.fr>)

I.4.4. Les études antérieures sur l'espèce: selon les bases de données disponibles il n'y a aucune étude phytochimique, ni biologique faite sur l'espèce *Verbascum creticum* Cav.

Conclusion :

La rareté des études scientifiques sur ces deux espèces nous a incités à les explorer.

CHAPITRE II

Etude phytochimique

Extraction et séparation

Introduction :

L'étude phytochimique réalisée sur les deux espèces du genre *Verbascum* : *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav. est détaillée dans ce chapitre en commençant par le criblage phytochimique réalisé sur les parties aériennes des deux espèces *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav. suivi par les méthodes d'extraction, puis le fractionnement chromatographique des différents extraits (chloroforme, acétate d'éthyle et *n* butanol) et enfin le traitement de quelques fractions obtenues, il faut noter que la majorité des fractions est purifiée le long de notre recherche pratique au laboratoire mais malheureusement la plupart des produits isolés étaient de faible quantité, donc nous n'avons détaillé que la purification des fractions qui a abouti à des composés purs et identifiables.

II.1. Screening phytochimique :

Un criblage phytochimique est effectué à l'aide de procédures standards sur les parties aériennes sèches des deux espèces pour la recherche de la présence des groupes chimiques suivants :

II.1.1. Les alcaloïdes:

Un poids de 5g de poudre végétale est dissous dans 25 ml d'acide sulfurique (10%) pendant 24 heures. Après filtration et dilution, 1ml d'extrait est introduit dans un tube à essai additionné de trois gouttes du réactif Dragendorff. (C. M. Hladiket al. 2000).

II.1.2. Les coumarines:

Une masse de 1g de poudre végétale est mise à macérer pendant 24h dans une solution d'éther di éthylique. Après filtration et séchage, 20 ml d'eau chaude sont ajoutés, à la solution, une petite quantité environ 1ml est mise dans un tube pris comme témoin et visualisée sous UV 366 nm. Une autre quantité de 1ml est mise dans un deuxième tube où une quantité d'ammoniac (25%) est ajoutée et le mélange est à nouveau observé sous UV 366nm, son absorbance est alors comparée au témoin.(B. Benzidia et al. 2018).

II.1.3. Les stérols, triterpènes et terpènes :

Le résidu d'extrait étheré est dissous dans 0,5 ml d'anhydride acétique, puis dans 0,5 ml de chloroforme. On divise la quantité en deux tubes. Dans le premier tube on ajoute 0,5 ml d'acide sulfurique concentré, dans le deuxième tube on rajoute quelques gouttes seulement de l'acide sulfurique concentré au fond du tube. (I. J. Umaru et al. 2018).

II.1.4. Les tanins

Une quantité de 5 g de matériel végétal est infusée dans 50 ml d'eau distillée bouillante pendant 30 minutes. On ajoute 3 gouttes d'une solution diluée de chlorure ferrique à 2ml de cet extrait aqueux. (S. Keo et al. 2017).

II.1.5. Les flavonoïdes

La quantité de 5g de matériel végétal est infusée dans 50 ml d'eau distillée. Le filtrat obtenu est réparti dans 3 tubes d'essai contenant chacun 2 ml. Au 1er tube, on rajoute 1 ml de NaOH, au 2ème tube 1 ml d'eau distillée et au 3ème tube 1 ml d'HCl concentré et de copeaux de magnésium. (T. Aleixo et al. 2018).

II.1.6. Les saponines

Dans un tube à essai on ajoute 5ml d'eau distillée à 0,5g de la plante, La solution est secouée vigoureusement (P. Singh et al. 2018).

II.1.7. Les quinones

Un poids de 5 g de matière végétale sont humidifiés avec quelques gouttes de HCl, et mis en macération dans 10 ml d'éther de pétrole pendant 24 heures, 2 ml de NaOH (10%) sont ajoutés à 2 ml du filtrat, (R. Abdelkebir et al. 2018)

II.1.8. Les anthocyanes:

Un volume de 5 ml de mélange d'acide sulfurique (10%) et 5 ml d'ammoniac (10%) sont ajoutés à 5 ml d'extrait hydraulique de matériel végétal. (A. Kasarkar et al, 2018).

II.2. Matériel végétal et extraction :

II.2.1. L'espèce *Verbascum atlanticum* batt. :

Cette plante est récoltée de la région d'El Kala. Les parties aériennes sont séchées et broyées. Une quantité de 817g de la matière végétale est macérée dans 800ml de chacun des solvants suivants : l'éther du pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol et le butanol successivement. La macération est faite jusqu'à submersion pendant 48 heures dans chaque solvant. Les différents extraits sont obtenus selon le diagramme de la fig.II.1

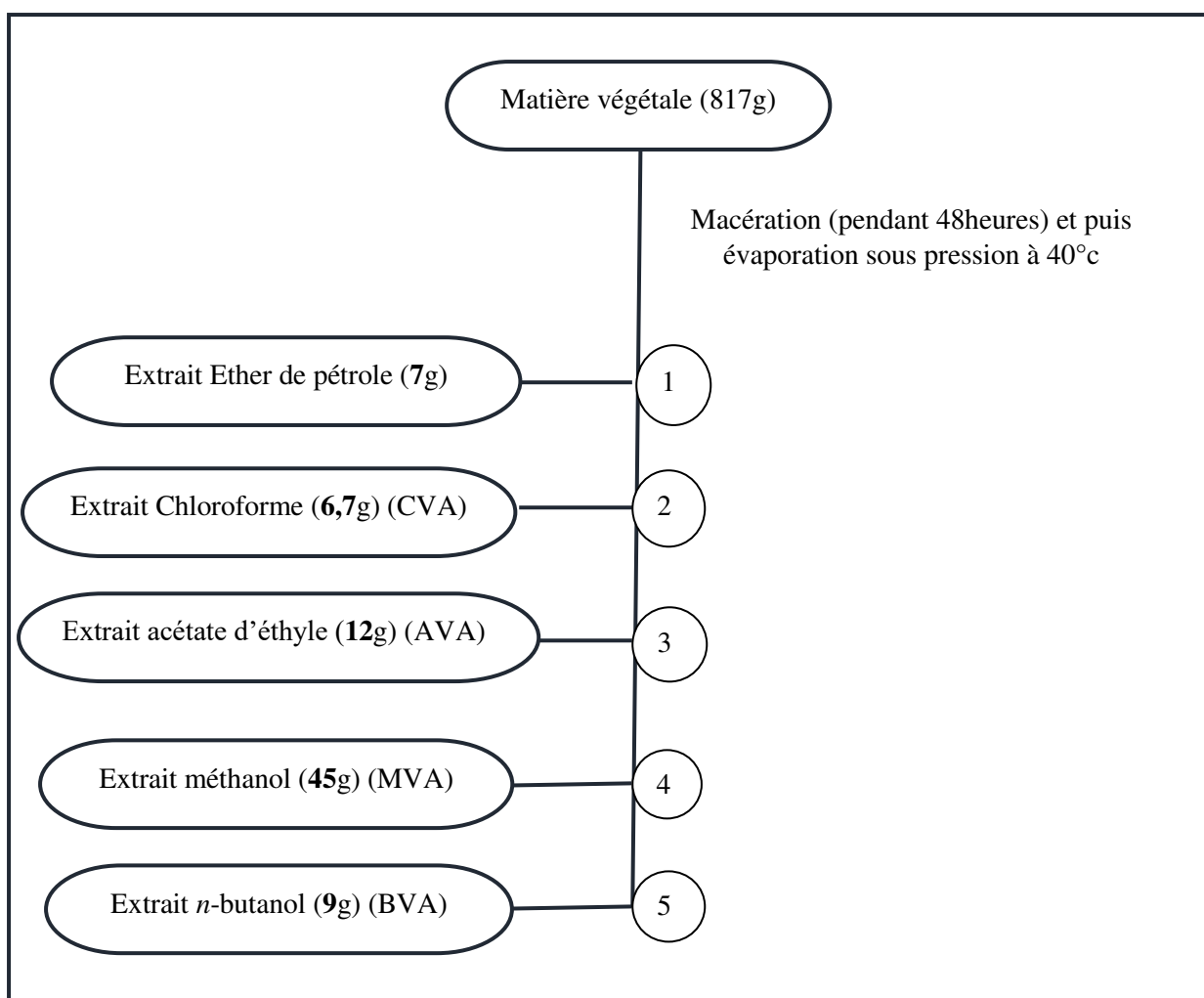


Fig.II.1 Processus d'obtention de différents extraits

II.2.2. L'espèce *Verbascum creticum* Cav. :

Cette espèce est collectée de la région Ibn Ziad, Constantine. Après avoir séché les parties aériennes à l'ombre, les 2kg obtenus sont macérés dans un mélange hydroalcoolique (méthanol/ eau (80 : 20) pendant 48h, trois fois. Le filtrat obtenu est séché sous vide à l'aide

d'un rota -vapeur afin d'obtenir l'extrait brut. Ce dernier est dissout dans 800ml d'eau puis a subi des affrontements par des solvants de polarité croissante (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol). Le schéma ci-dessous(fig.II.2) résume le processus appliqué. Chaque filtrat d'extrait obtenu est évaporé sous pression, cette extraction a permis l'obtention de : 0,5g d'extrait éther pétrole, 1g d'extrait chloroforme, 2g d'extrait acétate d'éthyle et 30g d'extrait butanol.

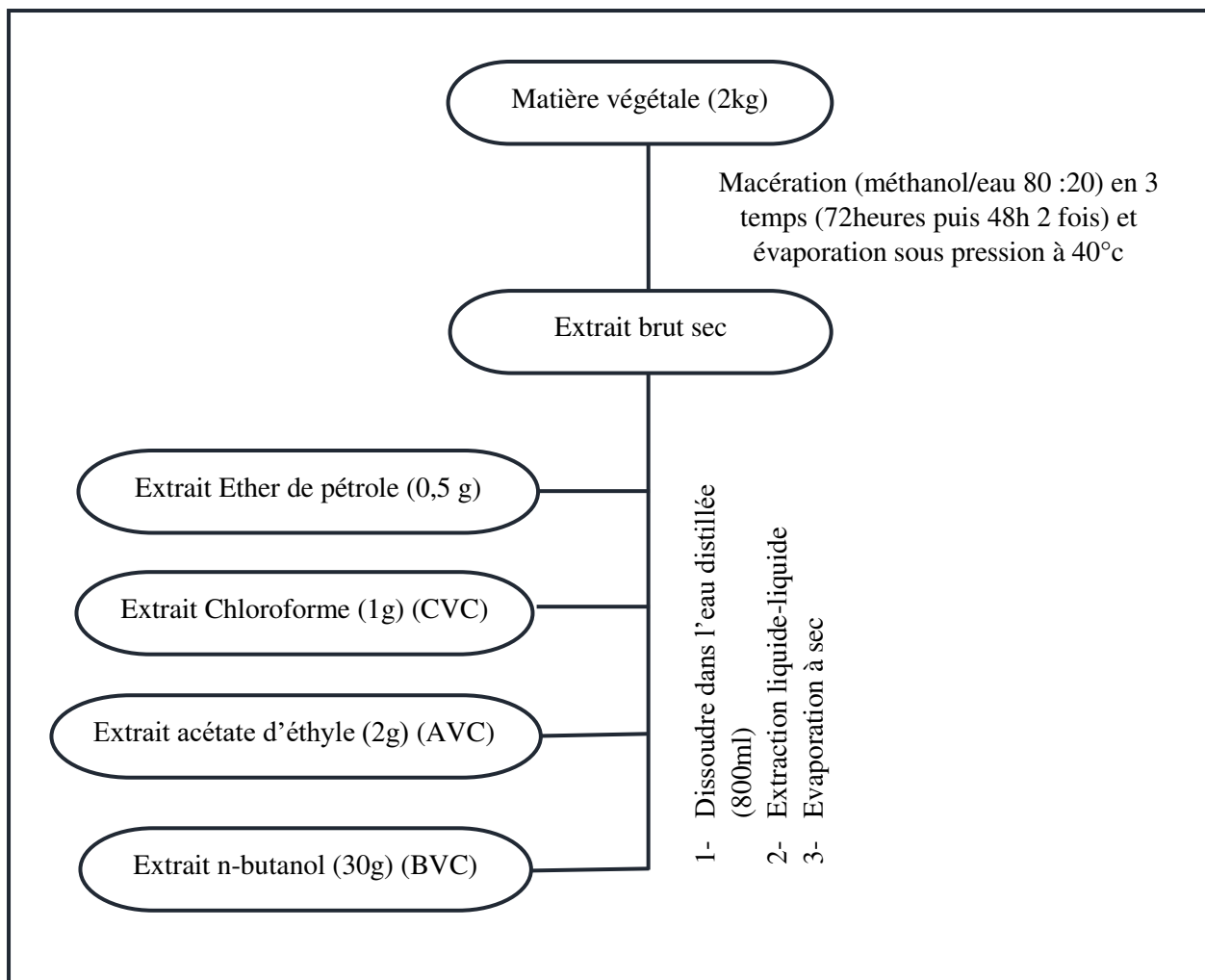


Fig.II.2 Schéma d'obtention de différents extraits du *Verbasicum creticum* Cav.

II.3. Traitement phytochimique des différents extraits des deux plantes :**II.3.1. L'extrait chloroforme de *Verbascum atlanticum* Batt. (CVA) :**

Un poids de 5g de l'extrait chloroforme est passé en colonne ouverte de gel de silice (23cmx3cm) pour une chromatographie réalisée par le système en gradient d'élution : CHCl₃/MeOH, ce qui nous a donné 11 fractions.

Tableau II.1: Fractionnement de la phase chloroforme de *V. atlanticum* Batt. (5g, CHCl₃/MeOH, v= 220ml)

Erlen50ml	Pr % CHCl ₃	Pr % MeOH	Fraction	Masse mg
1-10	100% 6v	0%	CVA1	517,2
11-15	99,9%	0,1%	CVA2	319,3
16-26	99,7%	0,3%	CVA3	216,7
27-39	97%	3%	CVA4	319,5
40-52	95%	5%	CVA5	757,6
53-60	93%	7%	CVA6	251,8
61-70	90%	10%	CVA7	216,7
71-81	80%	20%	CVA8	219,5
82-100	70%	30%	CVA9	297,85
101-110	50%	50%	CVA10	391,8
111-120	0%	100%	CVA11	265,8

II.3.2. L'extrait acétate d'éthyle de *Verbascum atlanticum* Batt. (AVA) :

Une quantité de 10g de cet extrait a été fractionnée dans une colonne de gel de silice (63cm x 4cm) dont le système d'élution est le système en gradient chloroforme/Méthanol, les détails du fractionnement de cette phase sont représentés dans le tableau II.2

Tableau II.2 : Fractionnement de la phase acétate de *V. atlanticum* Batt. (10 g, CHCl₃/MeOH
v= 800ml)

Erlen 50ml	Pr % CHCl ₃	Pr % MeOH	Fraction	Poids mg
1-40	100-99,9%	0-0,1%	AVA1	150,7
41-44	99,8%	0,2%	AVA2	226,7
45-58	99,5%	0,5%	AVA3	391,3
59-69	99 %	1%	AVA4	350,3
70-83	97%	3%	AVA5	338,1
84-93	95%	5%	AVA6	618,7
94-104	93%	7%	AVA7	398
105-120	90%	10%	AVA8	396,3
121-137	88-84%	12%-16%	AVA9	385,8
138-156	82-78%	18%-22%	AVA10	249
157-173	74%	26%	AVA11	313,4
174-190	70%	30%	AVA12	386,2
191-201	65%	35%	AVA13	303
202-220	60-55%	40%-45%	AVA14	527,9
221-228	50%	50%	AVA15	361,2
229-239	45%	55%	AVA16	830,3
240-244	40%	60%	AVA17	873,1
245-249	35%	65%	AVA18	703,5
250-259	30%	70%	AVA19	478,3
260-270	20%	80%	AVA20	346,9
271-273	10%	90%	AVA21	209,6
274-278	0%	100%	AVA22	490,7

II.3.3. L'extrait *n*-butanol de *Verbascum atlanticum* Batt. (BVA)

L'extrait butanol (9g) contient un précipité jaune très vif, après filtration et séchage du filtrat sous pression, 7g du résidu ont chromatographiés sur colonne de gel de silice (25cmx5cm) en gradient du méthanol dans le chloroforme pour aboutir à 17 fractions regroupées par le biais du test CCM.

Tableau.II.3 Fractionnement de la phase *n*-butanol de *V. atlanticum* Batt. (7g, CHCl₃/MeOH, v= 500ml).

Erelen100ml	Pr % CHCl ₃	Pr % MeOH	Fraction	Masse mg
1-21	100%	0%	BVA1	215,1
22-44	99,5-99%	0,5-1%	BVA2	286
45-51	97%	3%	BVA3	172
52-92	93%	7%	BVA4	209,1
93-114	90-88%	10-12%	BVA5	268,6
115-125	85%	15%	BVA6	397,1
126-136	80%	20%	BVA7	215,1
137- 147	75%	25%	BVA8	209,5
148-159	70%	30%	BVA9	555,7
160-170	65%	35%	BVA10	394,4
171-194	60-55%	40-45%	BVA11	1467
195-215	50%	50%	BVA12	924,3
216-226	40%	60%	BVA13	264,1
227-237	30%	70%	BVA14	294,6
238-248	20%	80%	BVA15	328,4
249-259	10%	90%	BVA16	128,6
260-270	0%	100%	BVA17	265,7

II.3.4. L'extrait chloroforme de *Verbascum creticum* Cav. (CVC) :

La phase chloroforme (1g) a subi un fractionnement par chromatographie sur une colonne ouverte (70cmx2cm) en utilisant l'hexane et l'acétate d'éthyle comme éluant en gradient de polarité. Le tableau ci-dessous montre les différentes fractions de cet extrait et leurs poids.

Tableau.II.4 Fractionnement de la phase chloroforme de *Verbascum creticum* Cav. (1g, CHCl₃/MeOH, v= 100ml)

Erlen 50ml	Pr % hexane	Pr % acétate d'éthyle	Fraction	Masse mg
1-5	100% 6v	0%	CVC1	200,1
6	99.9 %	0.1%	CVC2	101,4
7	99%	1%	CVC3	45,3
8	98	2%	CVC4	48
9-11	96	4%	CVC5	150
12-14	93	7%	CVC6	25,6
15-26	90%	10%	CVC7	55,4
27	88 %	12%	CVC8	70,8
28-45	85%	15%	CVC9	11,2
46-63	80 %	20%	CVC10	23,3
64-83	82%	18%	CVC11	55,8
84-94	73%	27%	CVC12	25,8
95-115	65%	35%	CVC13	29,5
116-135	60%	40%	CVC14	15,3
136-157	50%	50%	CVC15	22,7
158-180	0%	100%	CVC16	63,8

II.3.5. L'extrait acétate d'éthyle de *Verbascum creticum* Cav. (AVC)

La phase acétate (2g) est passée en colonne de séphadex LH20 en prenant le méthanol comme éluant. Cette séparation a donné 17 fractions, ces dernières sont regroupées par le test UV sous 254nm et 365nm. La fraction, AVC17 est choisie pour séparation vue son poids et son profil chromatographique.

Tableau.II.5: fractionnement de la phase acétate de *V. creticum* Cav. (2g, sephadex LH20 en MeOH)

Erlen50ml	Fraction	Masse mg
2	AVC1	50,2
3	AVC2	55,4
4	AVC3	42,3
5-7	AVC4	22,9
7-10	AVC5	89,2
11-15	AVC6	74,8
16-18	AVC7	200,4
19	AVC8	27,8
20	AVC9	34,3
21-33	AVC10	98,8
35-36	AVC11	97,8
37-39	AVC12	201,1
40	AVC13	56,8
41	AVC14	58,8
53-60	AVC15	200
61-64	AVC16	185,6
65-67	AVC17	315,5

II.3.6. L'extrait *n*-butanol de *Verbascum creticum* Cav. (BVC)

La phase *n*-butanol est fractionnée dans une colonne en gel de silice par le système en gradient d'éluion CH₂Cl₂/MeOH pour aboutir à 17 fractions de poids différents. Le regroupement de ces fractions est fait selon les tests CCM.

Tableau.II.6 : Fractionnement de la phase *n*-butanol de *V. creticum* Cav. (12g, CH₂Cl₂/MeOH, v= 900ml)

Erlen50ml	Pr % CHCl ₃	Pr % MeOH	Fraction	Masse mg
1-40	100-99,5%	0-0,5%	BVC1	496,5
41-63	99-97%	1-3%	BVC2	536,9
64-80	94%	6%	BVC3	397,9
81-95	93%	7%	BVC4	273,4
96-115	91%	9%	BVC5	459,4
116-122	90%	10%	BVC6	318,3
123-140	88%	12%	BVC7	517,4
141-165	87%	13%	BVC8	376,6
166-188	85%	15%	BVC9	667,3
189-210	83%	17%	BVC10	757,3
211-240	82%	18%	BVC11	632,1
241-270	80%	20%	BVC12	1705
271-350	74%	26%	BVC13	964,1
351-383	72%	28%	BVC14	744,1
384-400	70%	30%	BVC15	504,4
401-425	65%	35%	BVC16	587,4
426-440	60-0%	40-100%	BVC17	340,4

II.4. Analyses par LC-MS et HR-ESI-MS :

Les fractions des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des plantes étudiées sont analysées par deux techniques LC-MS et HR-ESI-MS. L'analyse est réalisée sur un système LC-MS simple quadripôle Agilent 1100, en utilisant une colonne Zorbax SB-C8 (2,1 x 30 mm, 5 µm), maintenue à 40° C et avec un débit de 300µl min⁻¹. Le système binaire d'élution est formé du solvant A qui est constitué de 10% d'acétonitrile et 90% d'eau avec de l'acide trifluoroacétique 1,3mM et formiate d'ammonium et le solvant B est constitué de 90% d'acétonitrile et 10% de l'eau avec de l'acide trifluoroacétique 1,3mM et du formiate d'ammonium. Des balayages UV diodes de 100 à 900 nm. Les spectres de masse sont recueillis par des scans complets de 150m/z à 1500m/z, en modes positif et négatif. Les spectres HR-ESI-MS sont mis au point en utilisant un spectromètre Bruker maXis QTOF couplé au même système HPLC qui est décrit ci-dessus. Le spectromètre de masse fonctionne en mode ESI positif. Au cours de cette analyse, une recherche a été faite dans la base de données stockée dans une bibliothèque de référence de la Fundación MEDINA. Granada. Espagne, en utilisant une application développée où les spectres des échantillons analysés sont comparés aux spectres LC-UV-MS correspondants aux données de métabolites de la bibliothèque sous les mêmes conditions des spectres DAD (UV-vis), temps de rétention et masse positive et négative. (J. Martin et al. 2014).

II.5. Séparation et isolement :

Le choix de fractions à séparer dans les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des deux plantes est fait selon le poids des fractions et la présence des pics majoritaires dans les chromatogrammes LC-UV-MS.

II.5.1. L'espèce *Verbascum atlanticum* Batt.

II.5.1.1. La fraction AVA1 :

Cette fraction d'un aspect huileux est fractionnée par une colonne de gel de silice (150mg, 31cm x 1cm) dans le système hexane/ acétate d'éthyle en 4 sous fractions. La sous fraction AVA1-2 (50mg) obtenue est choisie pour la purification en vue de son profile LC-MS qui montre la présence de 3 composés. La séparation de cette sous fraction est faite par HPLC semi préparative avec une colonne Zorbax RX-C8 (5µm ; 9,4x 250 mm), le système gradient de (5-100% d'acétonitrile) dans l'eau est utilisé pour obtenir les 3 composés **A1** (29mg), **A2** (4,2mg), **A3** (0,8mg) qui sont apparus aux temps de rétention 36,5mn, 37,2mn et 38,8mn respectivement (FigII.3, II.4, II.5).

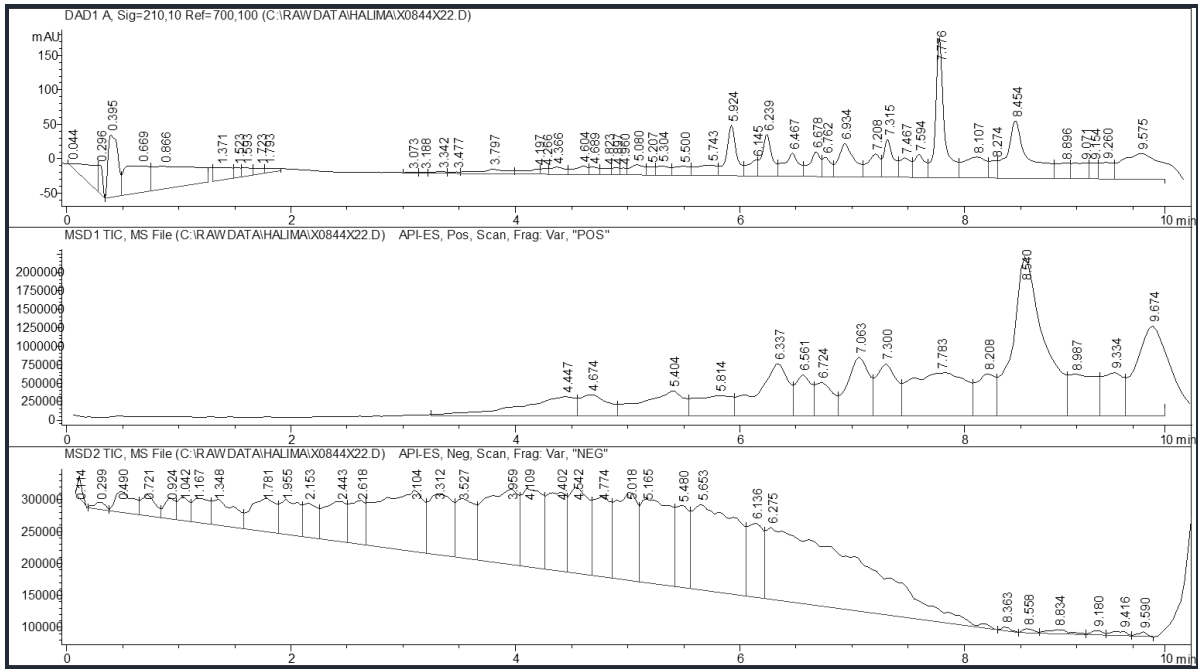


Fig.II.3 Chromatogramme LC-MS de sous fraction AVA1

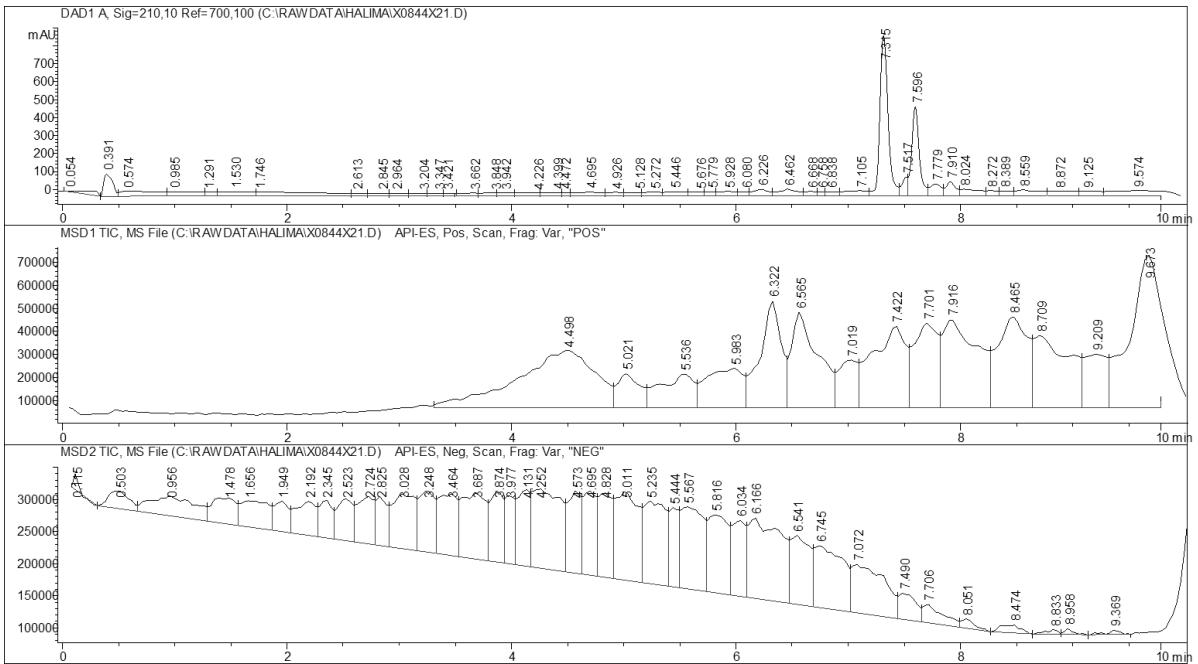


Fig.II.4 Chromatogramme LC-MS de sous fraction AVA1-2

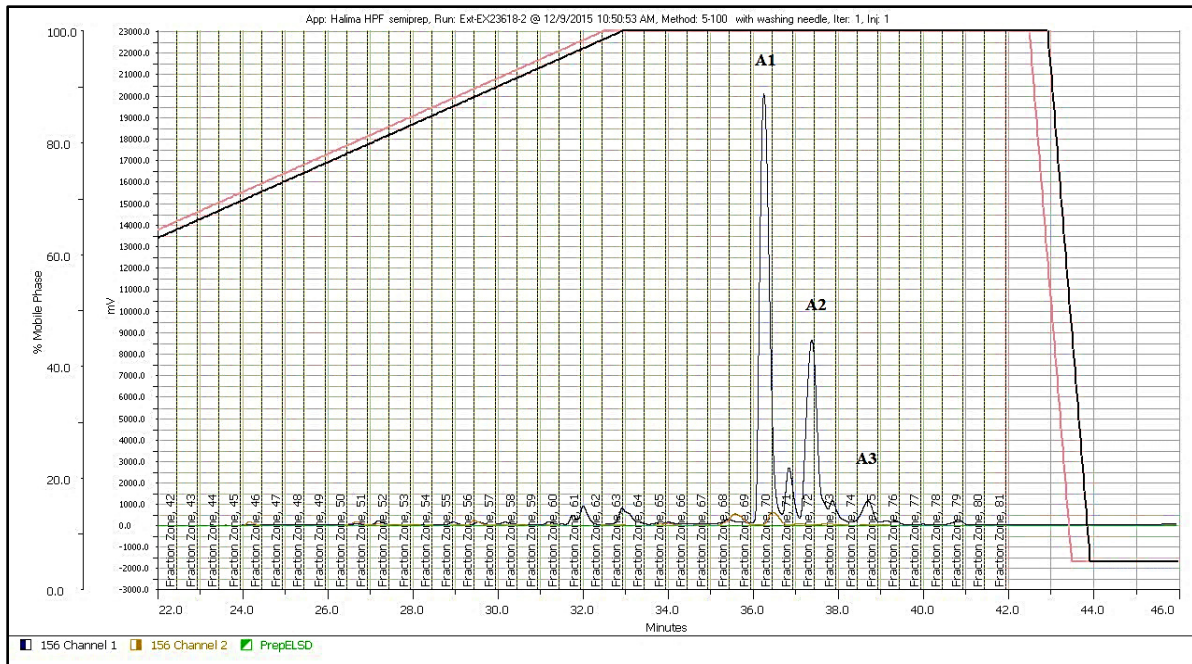


Figure.II.5 Chromatogramme de séparation de composés A1, A2 et A3

II.5.1.2. La fraction AVA2 :

Après le regroupement de différents lots de cette fraction selon les tests de chromatographie sur couche mince CCM ; un précipité AVA2-P sous est apparu au fond. L'obtention de ce précipité se fait par décantation dans le méthanol. Ce précipité de 25mg représente le produit A4

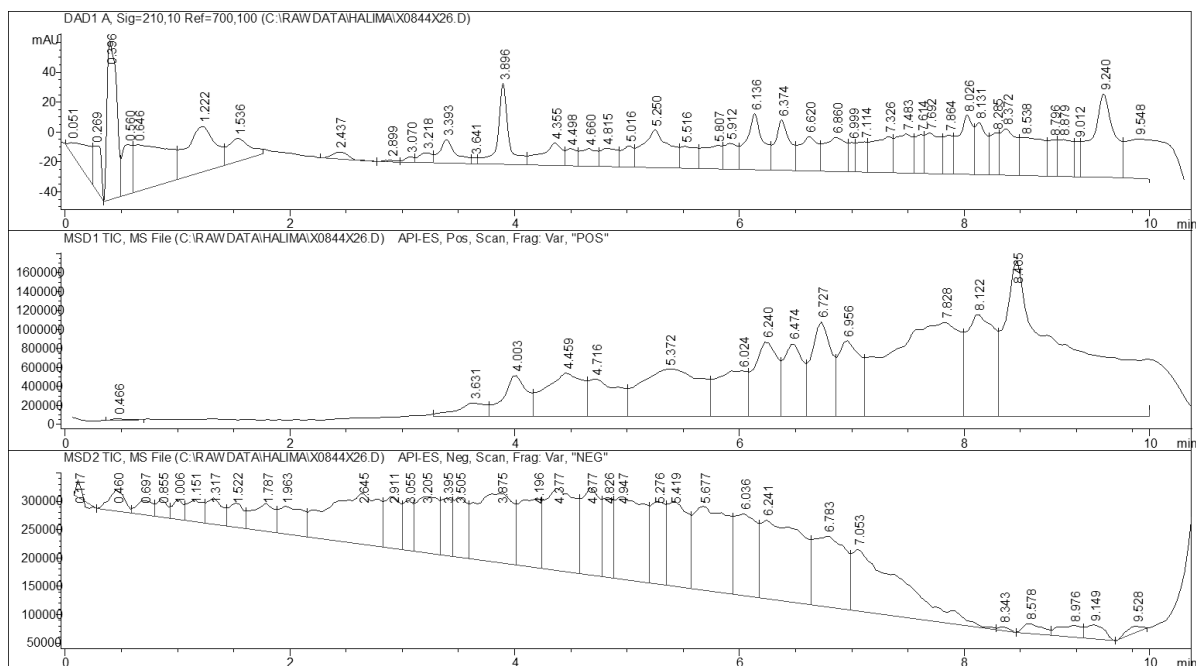


Fig.II.6 Chromatogramme LC-MS de sous fraction AVA2

II.5.1.3. La fraction AVA10

Le chromatogramme HPLC de cette fraction (Fig. II.7) a montré plusieurs pics et le test chromatographique sur couche mince de cette fraction a montré la présence de deux taches majoritaires sous lampe UV 254nm, ce qui nous a incité à purifier cette fraction par CCM de gel de silice éluée par le système chloroforme/ méthanol (9: 1) afin d'obtenir le composé **A6**(1,8mg).

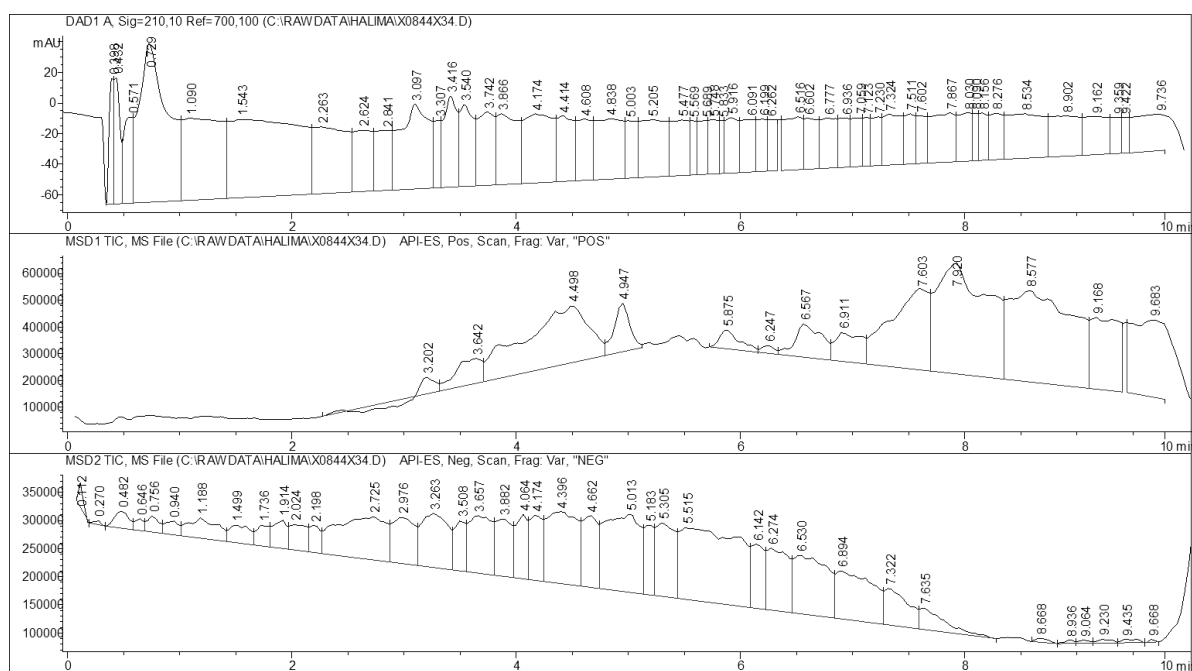


Fig.II.7 Chromatogramme LC-MS de la fraction AVA10

II.5.1.4. Fraction AVA15 :

Cette fraction de masse 361,2mg est chromatographiée sur une colonne de sephadex LH20 éluée dans le méthanol pour donner le composé **A7** (2mg) et la sous fraction AVA15-3 (6,5mg). Cette dernière est séparée par HPLC (colonne Zorbax SB-C18 (5µm ; 9,4 x 250 mm,) dans le système 20-50 % d'acétonitrile dans l'eau ce qui a conduit aux composés **A8** (1mg) à $T_r=17,75$ min, **A9** (0,7mg) à 18,70min et **A10** (0,8mg) à 19,49min (Fig. II.8, II.9).

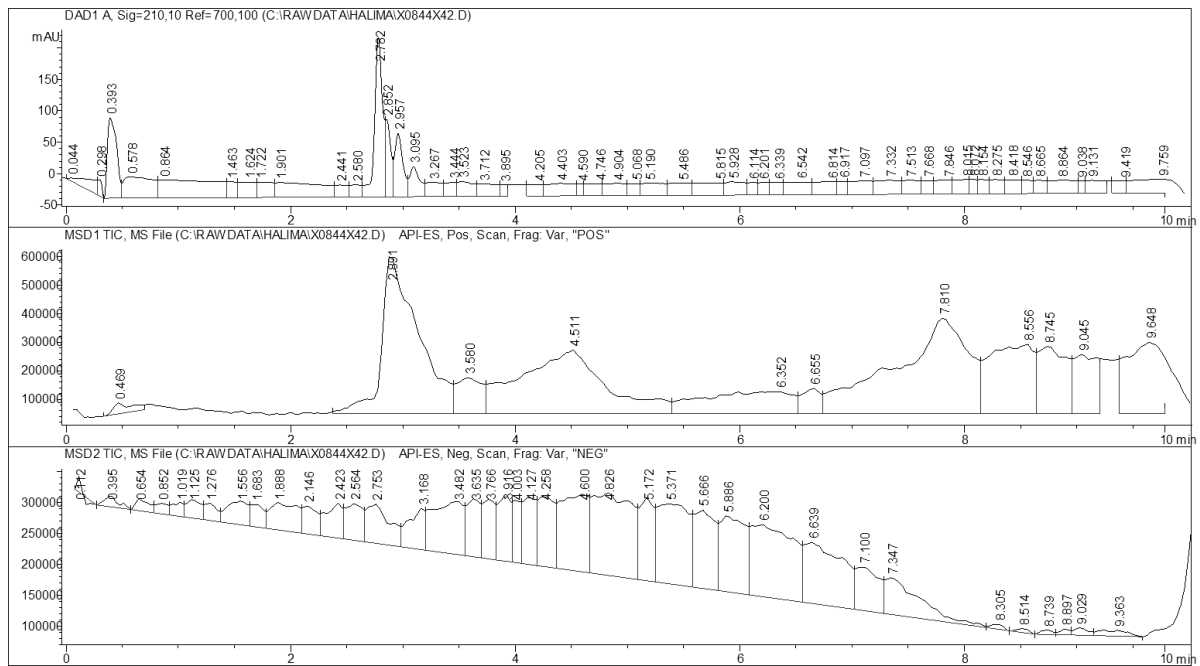


Fig. II.8 Chromatogramme LC-MS de sous fraction AVA15-3

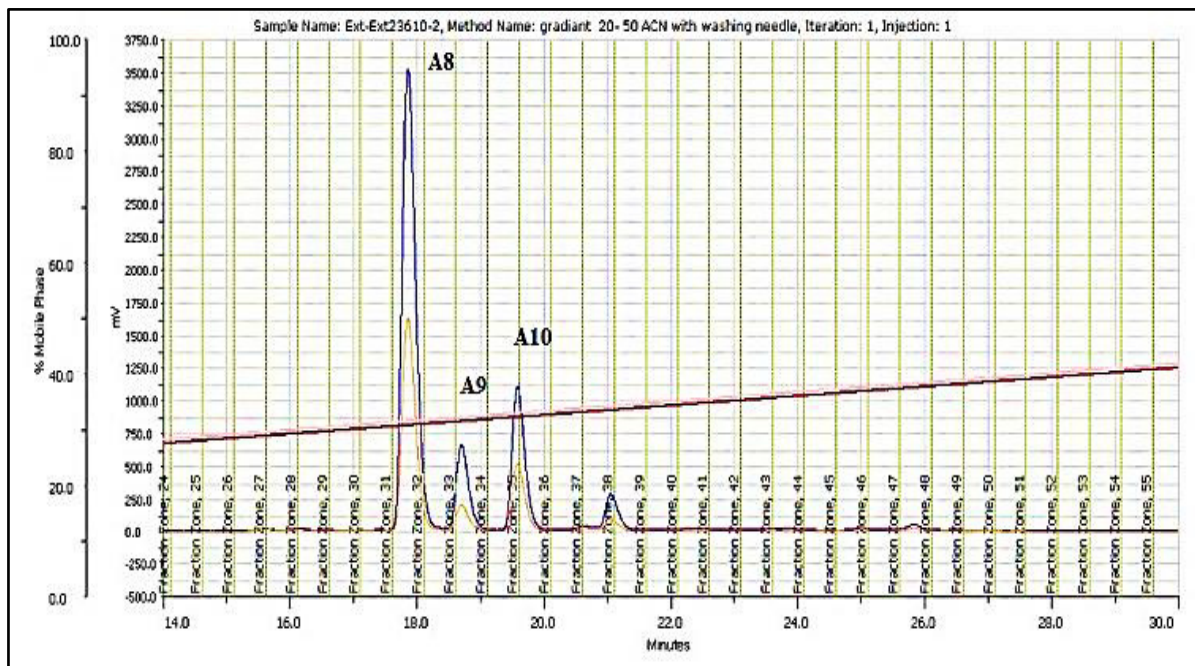


Fig. II.9 Chromatogramme de séparation par HPLC semi-preparative des composés A8, A9 et A10

II.5.1.5. La fraction BVA5 :

Cette fraction dont le chromatogramme est représenté par la figure II.10 est sous forme d'un précipité, qu'on nomme le composé A11 (10mg).

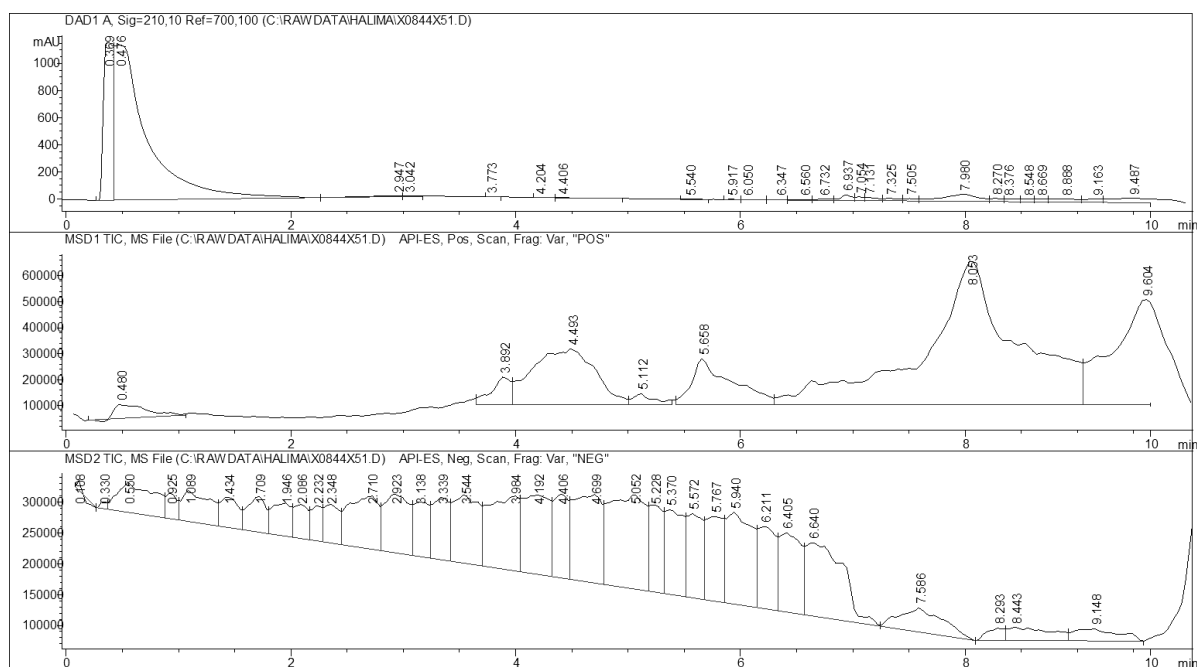


Fig. II.10 Chromatogramme LC-MS de sous fraction BVA5

II.5.1.6. La fraction BVA11 :

Le profil chromatographique de cette fraction contient plusieurs pics dont trois d'entre eux sont majoritaires (Fig. II.11), Pour obtenir une bonne séparation, une chromatographie par HPLC semi préparative Zorbax SB-C18 (5 μ m ; 9,4 x 250 mm) avec le système 10-60% acétonitrile dans l'eau est effectuée sur cette fraction (Fig.II.12). Cette séparation a abouti à l'isolement des composés **A12** (7,5mg) à T_r = 27,50min, **A13** (3,4mg) à T_r =31min, **A14**(1,2mg) à 35,75min.

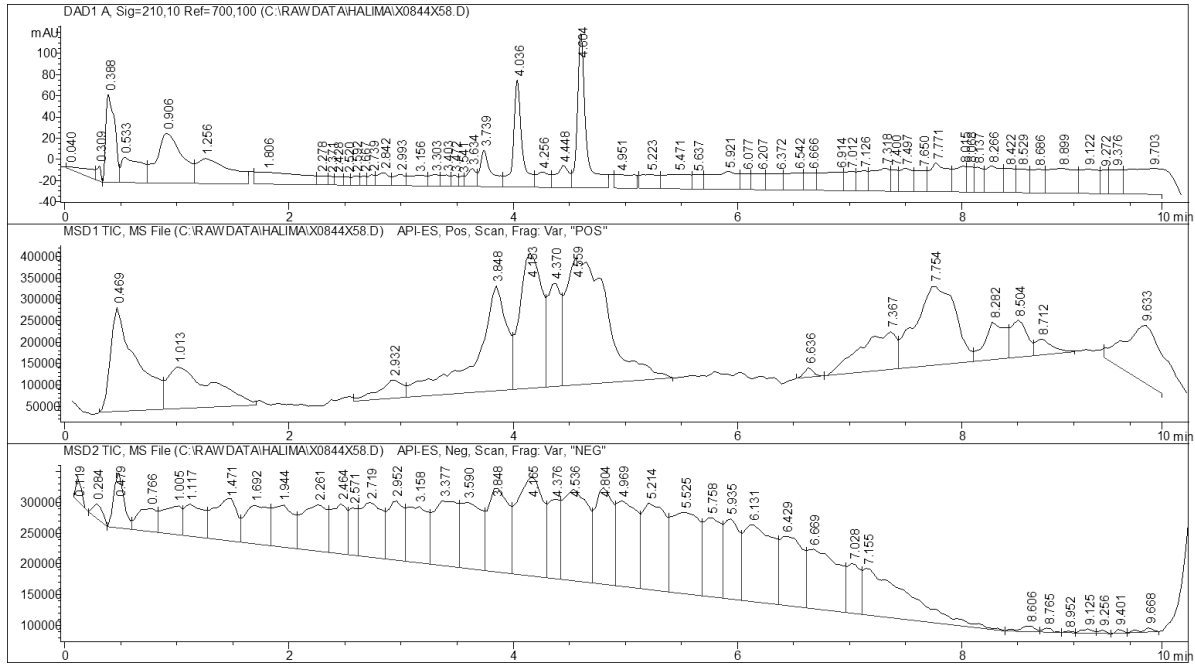


Fig. II.11 Chromatogramme LC-MS de la fraction BVA11

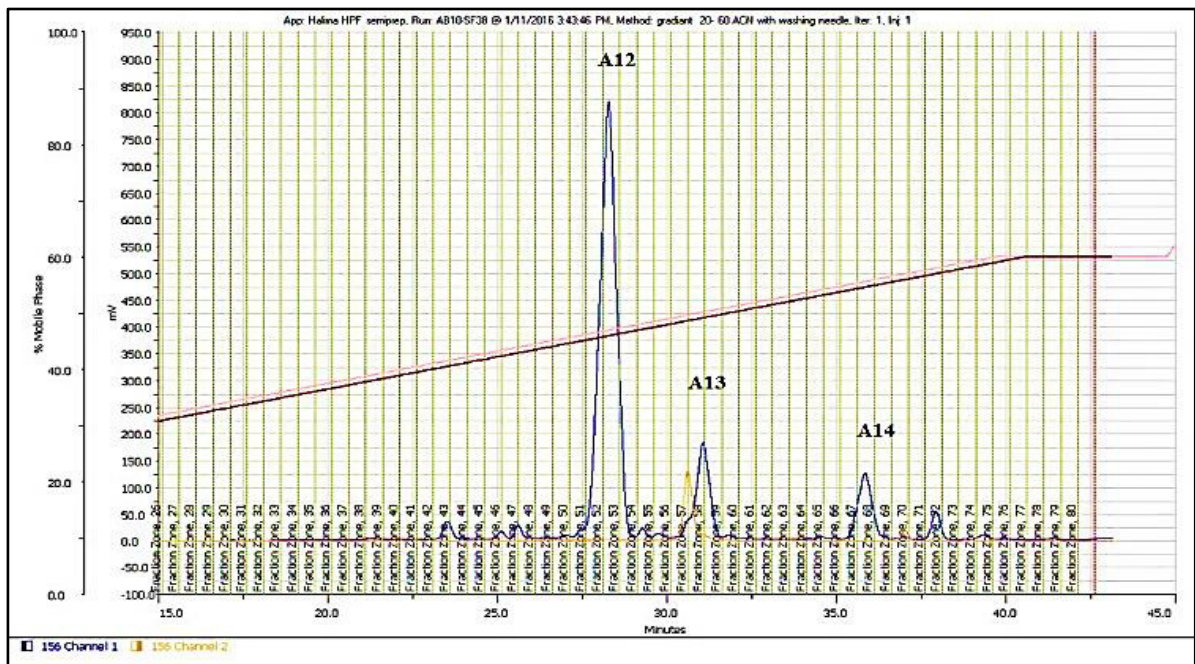


Fig. II.12 Chromatogramme HPLC de BVA11 ; Zobrax BX-C18 (5µm; 9,4x 250 mm), (10-60% d'acétonitrile), H₂O

II.5.2. L'espèce *Verbascum creticum* Cav.

II.5.2.1. La fraction CVC5

Cette fraction est la seule traitée dans l'extrait chloroforme. Elle est séparée sur des plaques de gel de silice dans le système d'élution hexane / acétate d'éthyle (5 :1). Cette séparation a donné le composé **C1**(5,5mg).

II.5.2.2. La fraction AVC17 :

L'analyse HPLC-MS de AVC17 (fig. II.13) montre deux pics dont un est large et l'autre bien défini. Sous lumière de Wood (Fig.II.14), cette fraction montre trois taches de couleur violette. La séparation de ces trois composés sur des plaques CCM en gel de silice éluee dans le mélange chloroforme / méthanol (9 :1) a permis l'obtention de trois produits **C2**(5,5mg), **C3**(3mg) et **C4**(2,1mg).

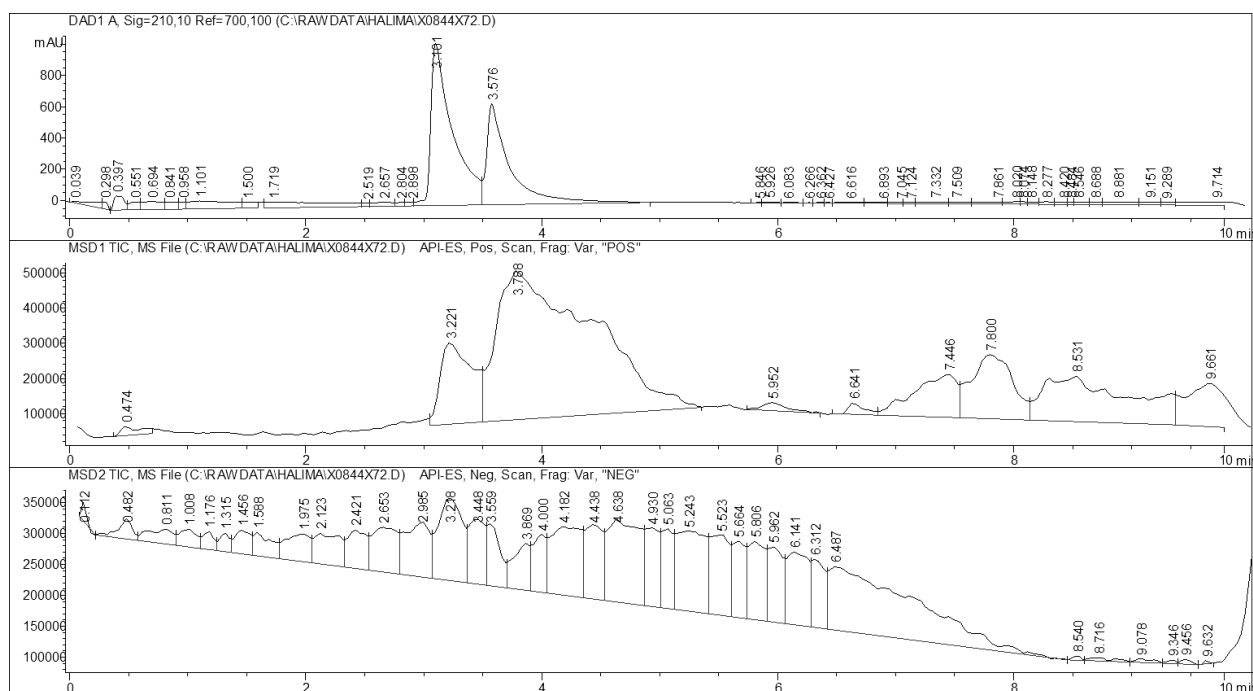


Fig.II.13 Chromatogramme LC-MS de AVC17

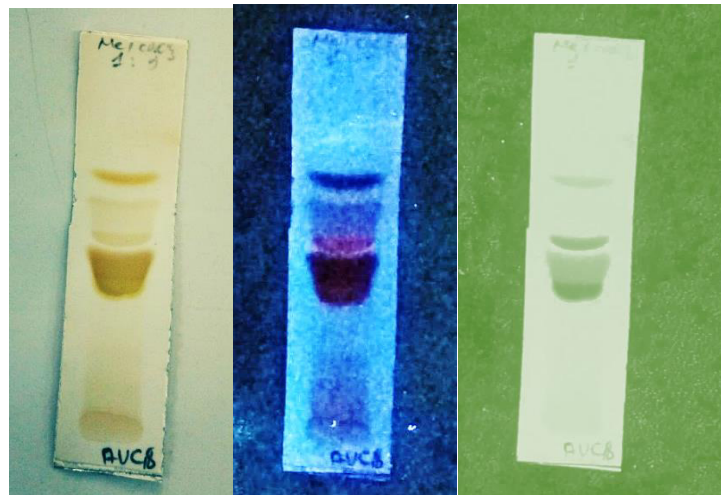


Fig.II.14 Plaque CCM de la fraction AVC17 (chloroforme/ méthanol 9 :1)

II.5.2.3. La fraction BVC12 :

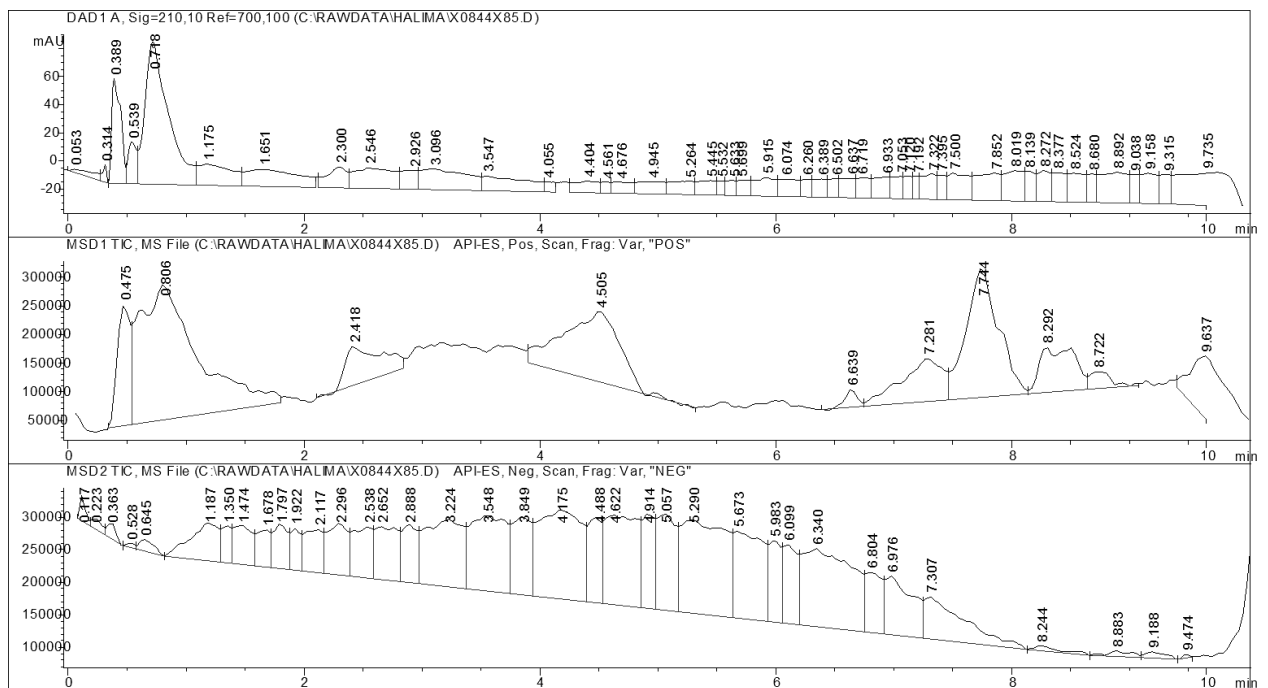


Fig.II.15 Chromatogramme LC-MS de BVC12

Après le séchage de cette fraction, un précipité de couleur blanche s’est déposé sur les parois du tube contenant la fraction. Le test CCM (Fig. II.16), montre que ce précipité contient une tache majoritaire et une autre très minoritaire. Ce que nécessite une purification qui est faite par chromatographie sur couche mince sur des plaques préparatives avec le système $CHCl_3/AcOEt/ MeOH/H_2O$ (1,5 :3 :1,5 :0,2). Cette séparation a permis d’obtenir le composé **C5** (10mg) à l’état pur.

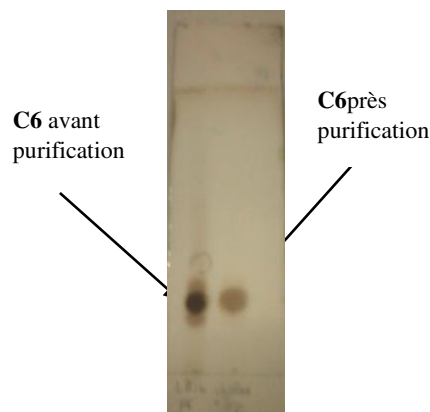


Fig. II.16 Test sur CCM du composé C6 avant et après purification par le système $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1,5 : 3 : 1,5 : 0,2)

Conclusion:

Les différentes méthodes de séparation chromatographiques nous ont permis de traiter les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de deux espèces de *Verbascum*. Dix fractions sont choisies pour séparation : AVA1, AVA2, AVA10, AVA15 de l'extrait acétate d'éthyle et les fractions BVA5 et BVA11 de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *V. atlanticum* Batt. Les fractions séparées de l'espèce *V. creticum* Cav. sont CVC5 de l'extrait chloroforme, AVC17 de l'extrait acétate d'éthyle et BVC12 de l'extrait *n*-butanol. La séparation de toutes ces fractions a abouti à l'isolement de 20 produits. Les composés isolés de l'espèce *V. atlanticum* Batt sont nommés par la lettre **A** et ceux de *V. creticum* Cav. prennent la lettre **C**.

CHAPITRE III

Etude phytochimique

Résultats et discussions

Introduction :

Ce chapitre contient tous les résultats des différentes études élaborées dans le chapitre II à commencer par le criblage phytochimique de l'espèce *V. creticum* et sa comparaison avec celui de l'espèce *V. atlanticum* Batt., ensuite les élucidations structurales des différents composés séparés et purifiés de ces deux espèces et qui seront présentées par ordre de polarités des extraits étudiés, où les structures de l'espèce *V. atlanticum* sont nommées de **A1** à **A14** et celles de *V. creticum* prennent les noms de **C1** à **C5**. Enfin nous évoquons dans ce chapitre, tous les résultats des analyses par HPLC en indiquant les temps de retentions et les fragmentations de la masse en technique ES (HR-ESMS), ainsi que les formules brutes correspondantes et quelques structures déterminées en comparaison avec celles d'une banque de données.

III.1. Résultats de screening

Les résultats du screening ont démontré que les deux espèces renferment la majorité des classes de métabolites secondaires naturels, avec des différences sur l'abondance par l'intensité de la couleur et sa persistance dans des réactions colorimétriques ainsi que la quantité des précipités formés dans le cas de réactions de précipitations (Tab.III.1).

Dans le test de révélation des coumarines, la présence d'une fluorescence intense avec de l'ammoniac indique la présence de coumarines. Les résultats montrent que l'espèce *V. atlanticum* ne contient pas les coumarines par contre l'espèce *V. creticum* présente un résultat positif.

Le test des saponines montre que le temps de la persistance de la mousse formée est très long, on peut même dire qu'il est permanent dans l'espèce *V. atlanticum* par contre chez l'espèce *V. creticum* le temps est très court et la mousse disparaît rapidement. Ces résultats nous font constater que l'espèce *V. atlanticum* est très riche en saponines tandis que l'espèce *V. creticum* en est pauvre.

Les réactions colorimétriques dans la recherche des flavonoïdes et les tanins donnent la coloration jaune rougeâtre, rouge à violet foncé, violet ou bleu et jaune indiquant ainsi la présence des flavonoïdes. L'apparition d'une couleur bleu noirâtre indique la présence de tanins pour les deux espèces mais avec des couleurs très intenses pour l'espèce *V. creticum*.

D'après le test des anthocyanes, ces derniers s'avèrent absents dans les deux espèces.

Pour le test des quinones sont présents dans les deux espèces *V. atlanticum* et *V. creticum*.

La présence des terpènes, triterpènes et stérols prouvés par les réactions liberman-buchrard (**R. W. Burke et al 1974**), où on observe, un anneau rouge brunâtre indiquant la présence de

triterpènes. La couleur bleue rougeâtre indique la présence des stérols, la transformation immédiate de cette couleur en vert intense indique la présence des terpènes. Ces classes de métabolites s'avèrent très remarquables dans l'espèce *V. atlanticum*.

Dans le test des alcaloïdes la formation du précipité de faible quantité, n'empêche pas que le résultat soit positif.

Tableau.III.1 Résultats de criblage phytochimique de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

Groupes chimiques	<i>V. atlanticum</i> Batt.	<i>V. Creticum</i> Cav.
Alcaloïdes	+	+
Coumarines	-	++
Sterols	++	+
Triterpenes	++	+
Terpenes	++	+
Flavonoïdes	+	++
Tannins	+	++
Saponines	++	+
Quinones	+	+
Anthocyanes	-	-

++ : intense ; + : moyenne, - absence

III.2. Identifications structurales :

III.2.1. Les composés isolés de *Verbascum atlanticum* Batt.

III.2.1.1. Elucidation du composé A1 :

La technique de masse haute résolution a révélé un pic quasi moléculaire $m/z = 312,2994$ (Fig. III. 1) correspondant à $[M+NH_4]^+$ de la formule moléculaire $C_{19}H_{34}O_2$ du pic du composé A1 à temps de rétention $T_r = 7,40$ min. Cette molécule comporte trois insaturations.

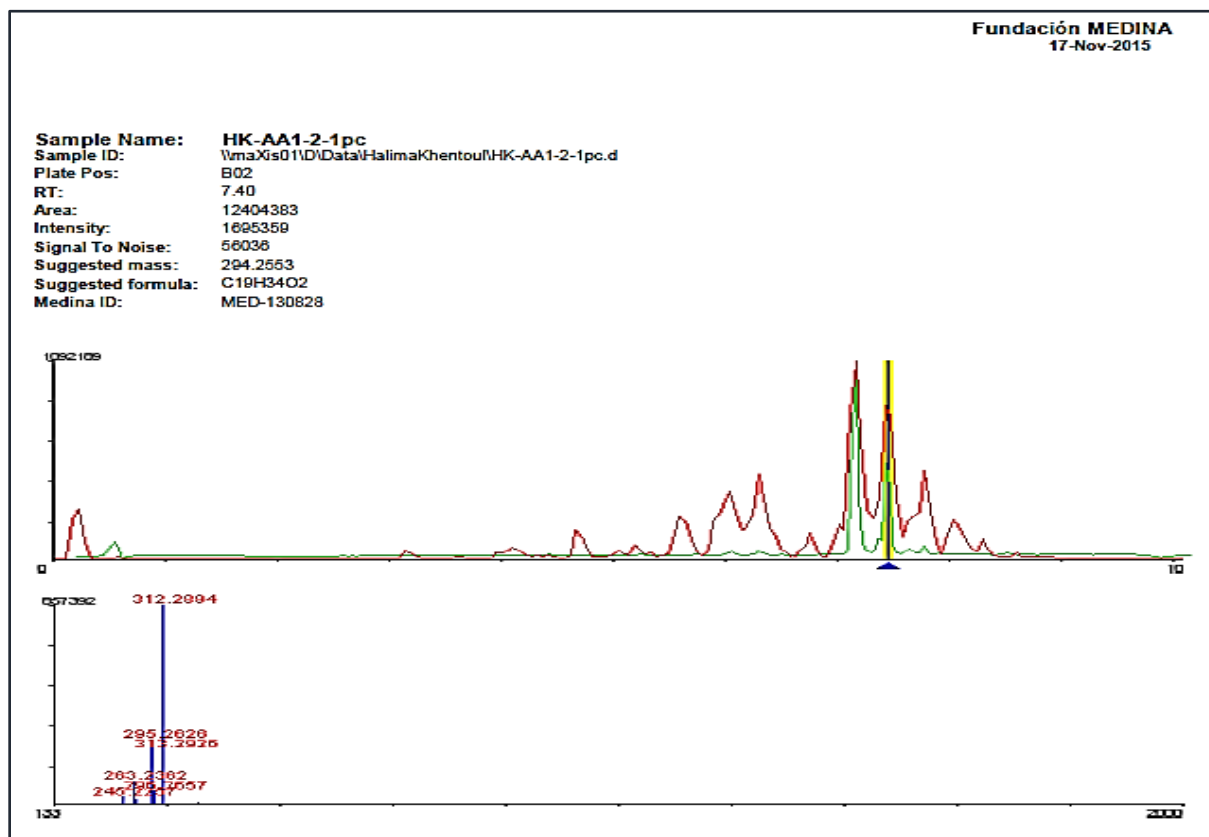


Fig.III.1 Données spectrales du composé A1 par la technique HR-ESI-MS en utilisant l'application Bruker maXis QTOF

Les données des spectres RMN¹H (Fig. III. 2 et III.3) et 2D HSQC (Fig. III. 4) montrent:

- Un ensemble de signaux sous forme de multiplets, d'intégration 4H qui apparaît dans la zone caractéristique des carbones oléfiniques à 5,24ppm où le déplacement de leurs carbones porteurs est de 130 à 127ppm. Cela nous oriente vers la présence de deux doubles liaisons dans la structure de ce composé.
- Un singulet à 3,64ppm d'intégration 3H qu'on peut attribuer à un méthoxyle.
- Le signal à 2,71ppm d'intégration 2H sous forme d'un triplet à $J = 6,6$ Hz est un CH₂ couplé avec deux protons voisins.

- Un autre triplet d'intégration 2H à 2,24ppm ($J= 7,6\text{Hz}$).
- Le signal d'un méthyle à 0,84ppm sous forme d'un triplet ($J= 7\text{Hz}$) et un autre d'un méthylène sous forme d'un quintuplet ($J= 7\text{Hz}$) à 1,55 ppm, indique la possibilité de leur voisinage.
- Deux quadruplets qui ont le même déplacement chimique à 1,98 ppm (2H, q, $J = 6.8 \text{ Hz}$) peuvent nous orienter vers le même voisinage.
- Un ensemble de méthylènes qui apparaissent sous forme de multiplets à 1,24ppm.

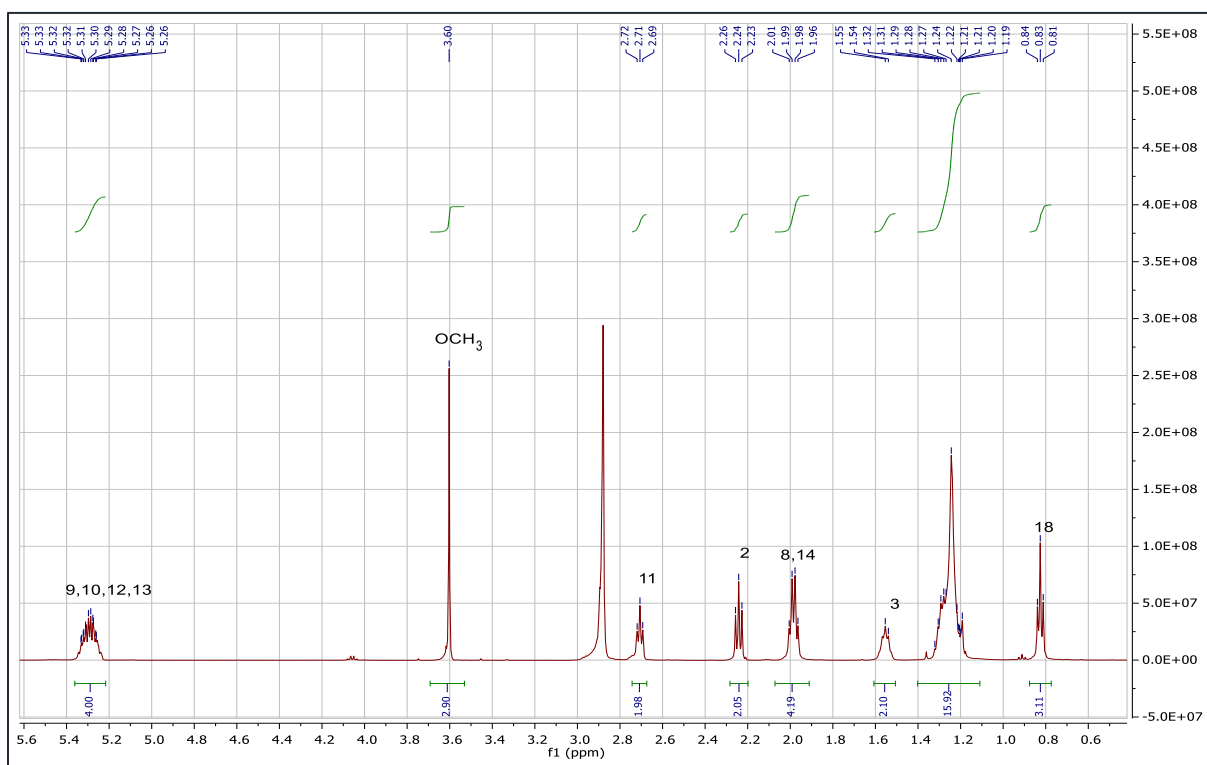


Fig.III.2 Spectre RMN¹H du composé A1 (CD₃OD/CDCl₃, 500MHz)

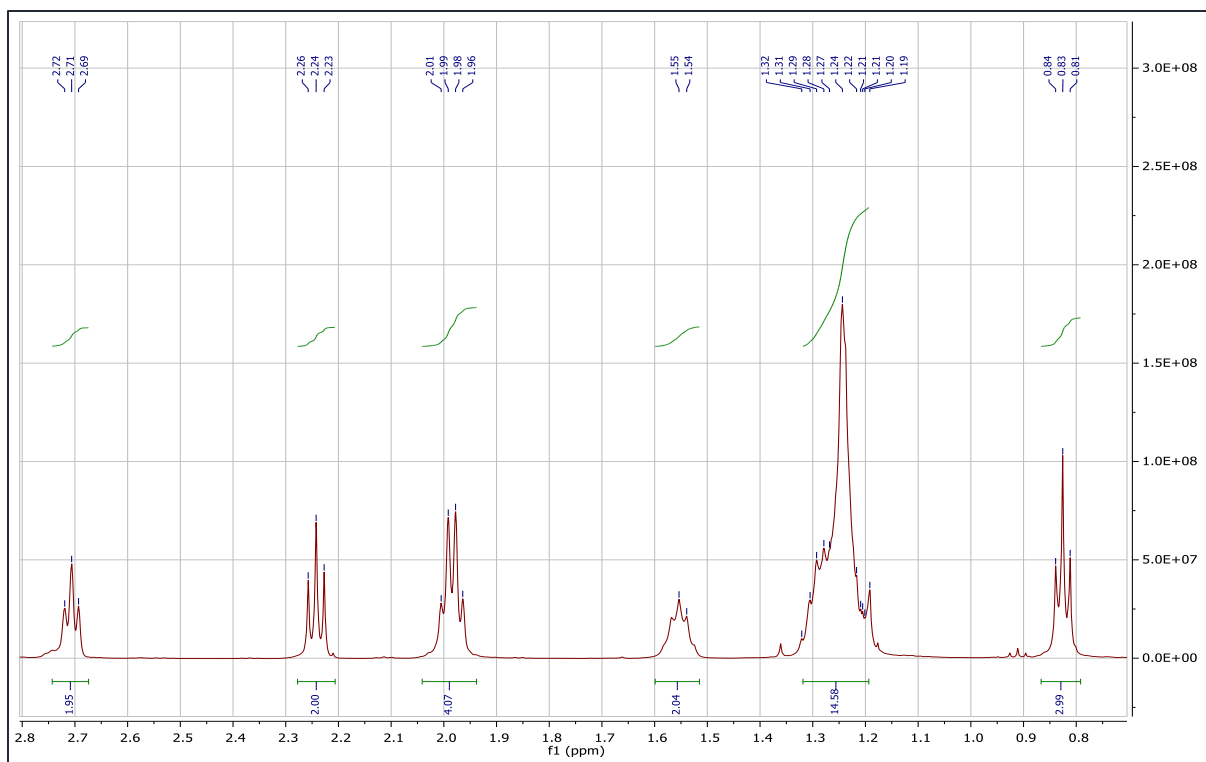


Fig.III.3 Spectre RMN¹H étalé (0,6-2,8 ppm) du composé A1 (CD₃OD/CDCl₃, 500MHz)

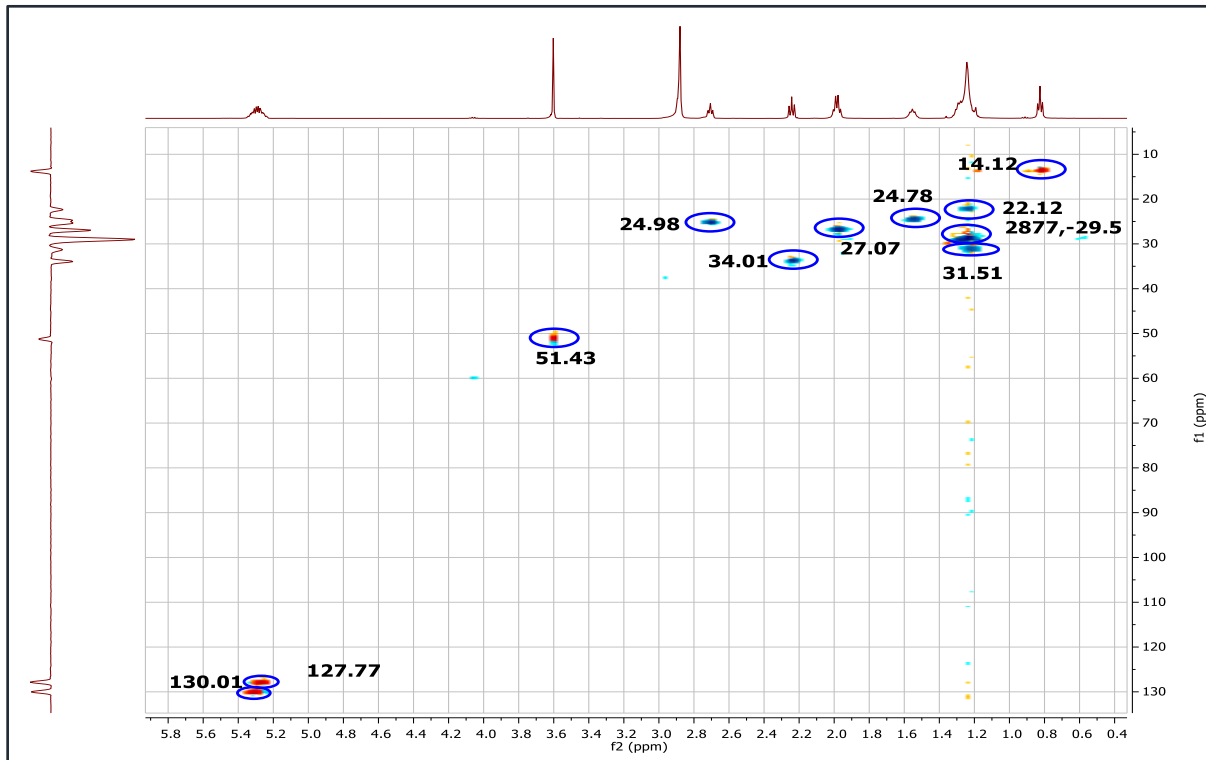
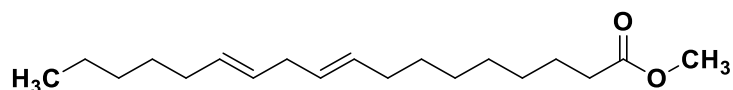


Fig.III.4 Spectre HSQC du composé A1

Ces données spectrales nous ont orienté vers le composé $C_{19}H_{34}O_2$ de $m/z = 294,2553$

La structure finale est celle de : **linoléate de méthyle** (Y.B. Huang et al. 2015), (M. F. Díaz et al. 2007).



Le tableau III.2 représente les déplacements RMN¹H et RMN¹³C du composé isolé **A1** et les déplacements RMN¹H et RMN¹³C de référence.

Tableau.III.2 : Déplacement des signaux de linoléate de méthyle (**A1**) avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H (500MHz,CD ₃ OD/CDCl ₃) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C (125 MHz) δ (ppm)	RMN ¹ HCDCl ₃ δ (ppm), J(Hz), (Y.B.Huang 2015)	RMN ¹³ C CDCl ₃ , δ (ppm) (M. F. Díaz 2007)
1(C)	-	/	-	-
2(CH ₂)	2,24(t, J= 7.6 Hz)	34,0	2,30(t, J= 7.5 Hz)	34,0
3(CH ₂)	1,55 (m)	24,7	1,62 (m)	24,9
4(CH ₂)	1,24(m)	28,7-29,7	1,30(m)	28,77-29,8
5(CH ₂)	1,24(m)	28,7-29,7	1,30(m)	29,0-29,5
6(CH ₂)	1,24(m)	28,7-29,7	1,30(m)	29,0-29,5
7(CH ₂)	1,24(m)	28,7-29,7	1,30(m)	29,0-29,5
8(CH ₂)	1,98(q, J= 6,8 Hz)	27,0	2,07(m)	27,5
9(CH)	5,29(m)	127,7	5,35(m)	127,0
10(CH)	5,29(m)	130,0	5,31(m)	136,0
11(CH ₂)	2,71(t, J= 6,6 Hz)	24,9	2,76(t, J= 6,9 Hz)	25,6
12(CH)	5,29(m)	127,7	5,31m)	127,0
13(CH)	5,29(m)	130,0	5,31(m)	136,0
14(CH ₂)	1,98(q, J= 6,8 Hz)	27,0	2,07(m)	27,1
15(CH ₂)	1,24(m)	28,7-29,7	1,30(m)	29,0-29,5
16(CH ₂)	1,24(m)	31,5	1,30(m)	31,5
17(CH ₂)	1,24(m)	22,4	1,30(m)	22,5
18(CH ₃)	0, 83(t, J= 6,9 Hz).	14,1	0, 87(t, J=7,0 Hz).	14,0
19(OCH ₃)	3,64(s),	51,4	3,66(s),	

Le composé linoléate de méthyl a été isolé de *Verbascum wiedemannianum* (N Y. Iskender et al.2009) et il est considéré comme un analgésique et un anti-inflammatoire (M. Y. Hadi et al. 2016).

III.2.1.2. Elucidation du composé A2 :

Les données de HR-ESI-MS (Fig.III.5) montrent que la formule brute de ce produit est $C_{19}H_{32}O_2$ de masse $m/z = 292,2397$. Cette molécule comporte 4 insaturations.

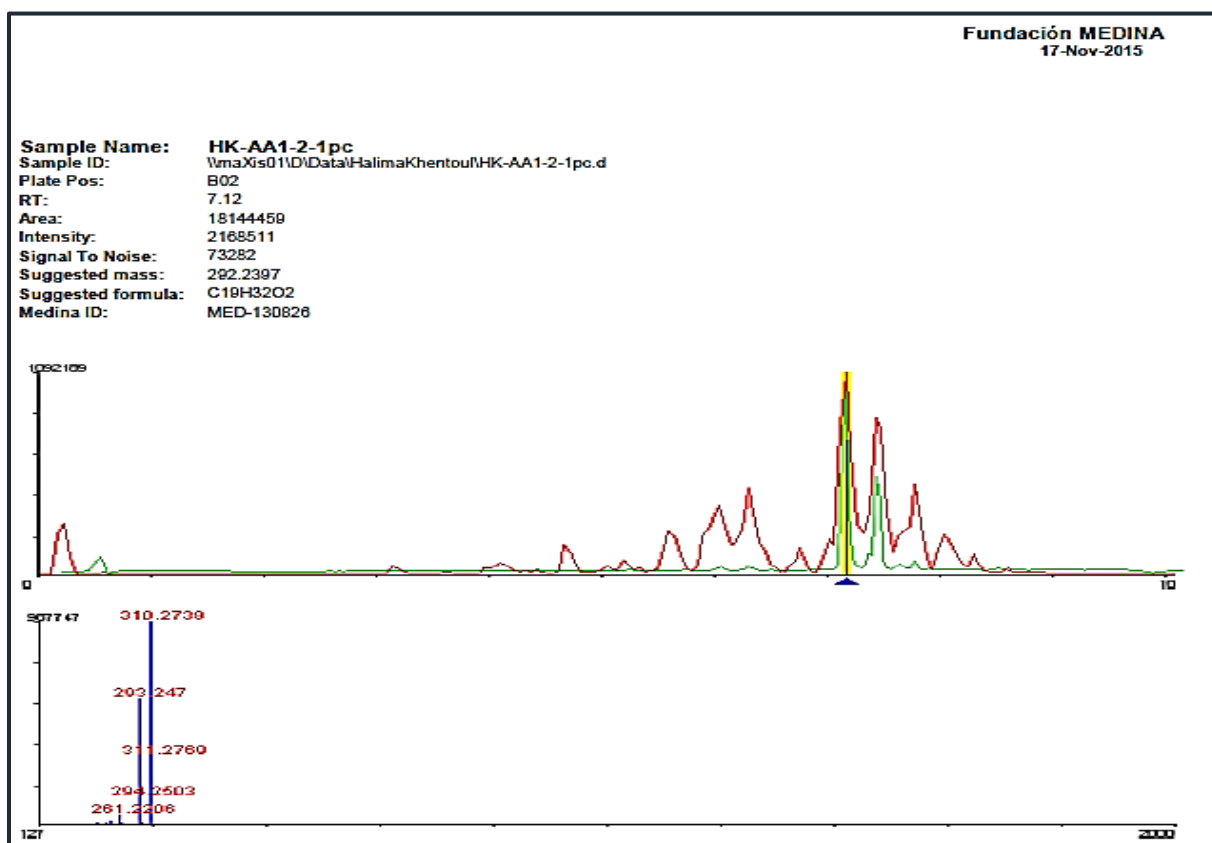


Fig.III.5 Données spectrales du composé A2 par la technique HR-ESI-MS en utilisant l'application maXis QTOF

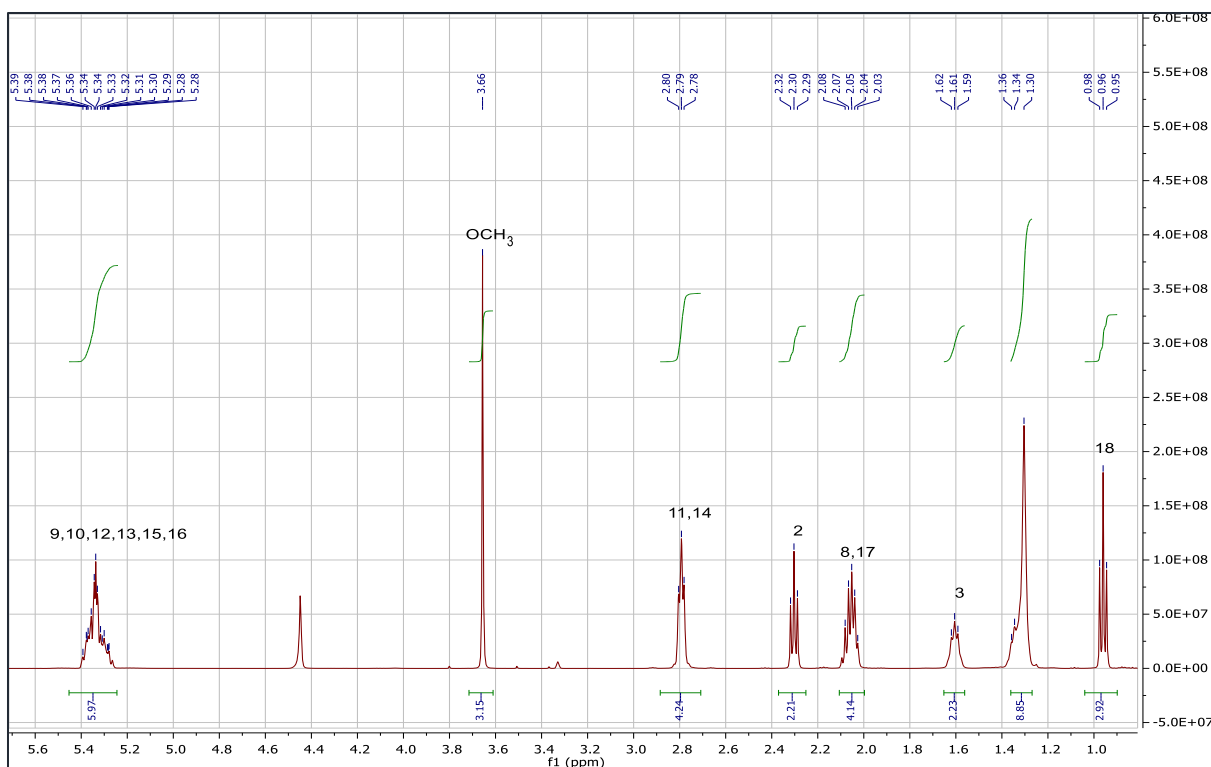


Fig.III.6 Spectre RMN¹H du composé A2 (CD₃OD/CDCl₃, 500MHz)

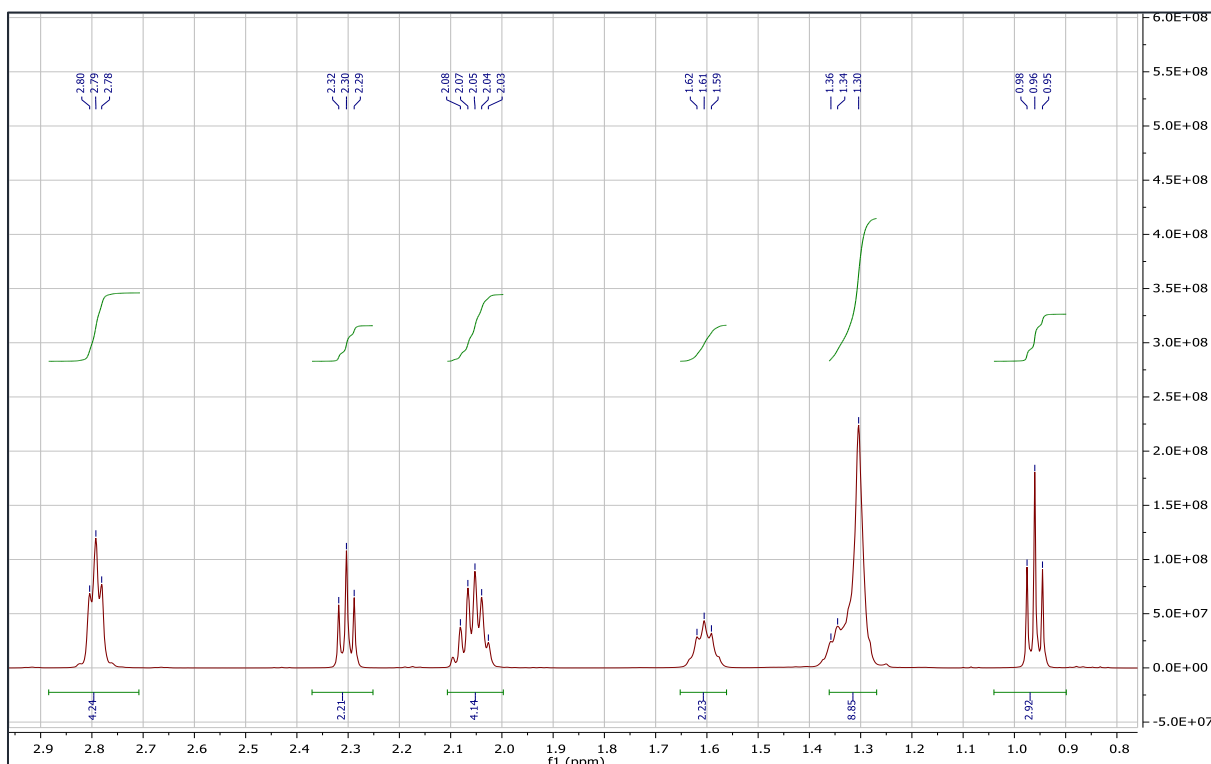


Fig.III.7 Spectre RMN¹H étalé (0,8-2,9ppm) du composé A2 (CD₃OD/CDCl₃, 500MHz)

Le spectre RMN¹H (fig. III.6, 7) de ce composé, présente des signaux identiques à ceux du composé A1 avec une seule différence qui est l'apparition de deux protons oléfiniques en plus. Tout cela nous a orienté vers la structure de : **linoléate de méthyle (Chabert et al. 2006)** dont les déplacements du composé sont présentés dans le tableau III.3 avec ceux de la littérature.

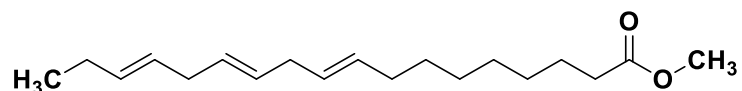


Tableau.III.3: Déplacement des signaux de linoléate de méthyle (A2):

N °	RMN ¹ H(500MHz, CDCl ₃) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹ H(CDC13) δ (ppm), J(Hz) P. Chabert 2006
1(C)	-	
2(CH ₂)	2,30(t, J= 75)	2,32 (t, J= 7,5)
3(CH ₂)	1,61 (m)	1,61 (m)
4(CH ₂)	1,34(m)	1,25sl
5(CH ₂)	1,34(m)	1,25sl
6(CH ₂)	1,34(m)	1,25sl
7(CH ₂)	1,34(m)	1,25sl
8(CH ₂)	2,06(m)	2,07(m)
9(CH)	5,34 (m)	5,34 (m)
10(CH)	5,34(m)	5,34 (m)
11(CH ₂)	2,79(t, J= 5,9)	2,78(dd, J=5,8; 11,2)
12(CH)	5,34(m)	5,34(m)
13(CH)	5,34(m)	5,34(m)
14(CH ₂)	2,79(t, J= 5,9)	2,78(dd J=5,8; 11,2)
15(CH)	5,34(m)	5,34 (m)
16(CH)	5,34(m)	5,34 (m)
17(CH ₂)	2,06 (m)	2,07(m)
18(CH ₃)	0, 96(t, J= 7,5).	0, 97(t, J= 7,5).
19(OCH ₃)	3,66(s)	3,66(s)

Ce composé a été isolé auparavant de plusieurs espèces du genre *Verbascum* tel que *Verbascum undulatum* (E. Melliou et al.2007) et *Verbascum thapsus* L. (K. Morteza-Semnani et al. 2012). Biologiquement, il est considéré comme un antiinflammatoire, un hypocholestérolémiant et joue un rôle dans la prévention du cancer, c'est aussi un hépatoprotecteur, un nématocide, un insectifuge, un antihistaminique, un antiarthritique, un anticoronaire, un antieczémique, un anti acné, un inhibiteur de la 5-Alpha réductase et un anti androgénique (J. A. I. Devi et A.K. Muthu2014).

III.2.1.3. Elucidation du composé A3 :

Les données HR-ESI-MS(Fig.III.8) suggèrent une masse moléculaire $m/z= 295,2447$ $[M-H]^+$

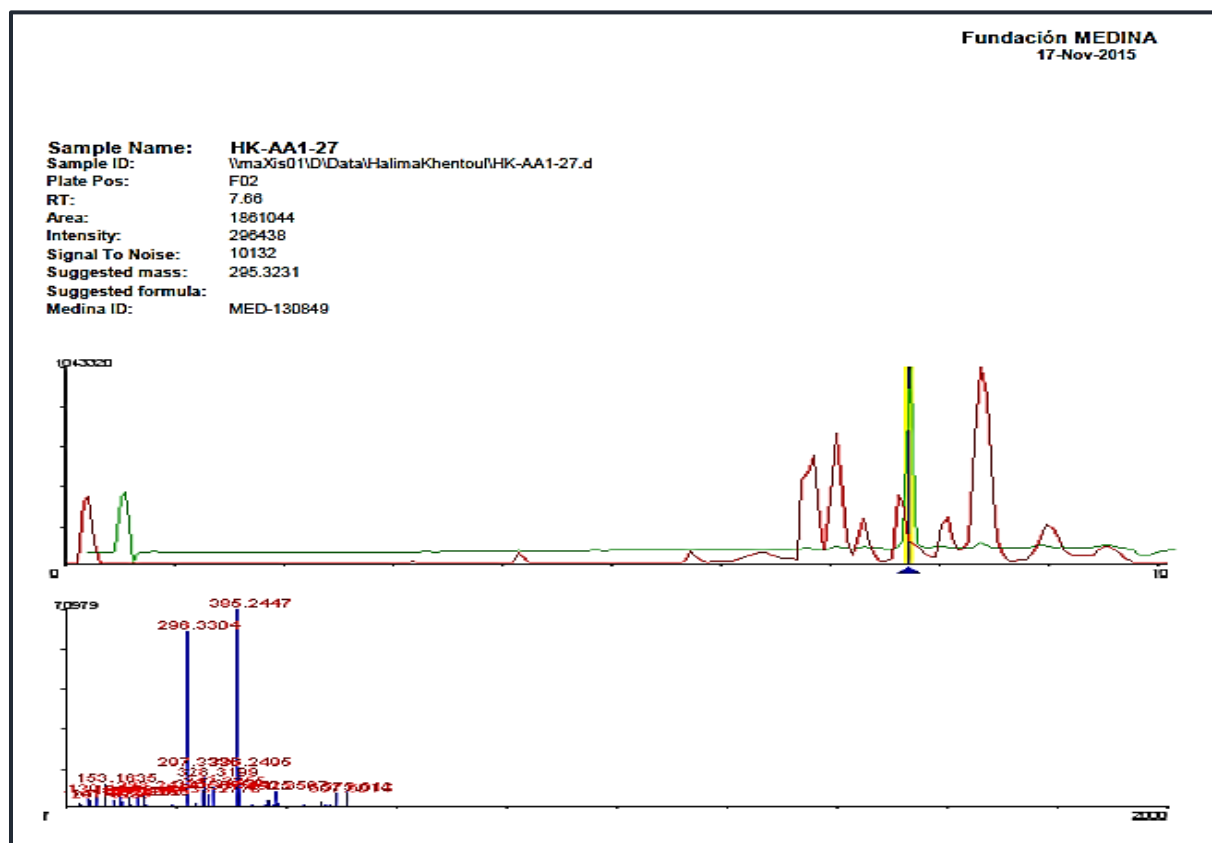


Fig.III.8Données spectrales du composé A3 par la technique HR-ESI-MS en utilisant l'application Bruker maXis QTOF

Dans le spectre RMN¹H (fig.III.9, 10), on constate deux méthyles sous forme de doublets apparaissant à 0,83ppm (d ; $J= 6,4$ Hz) et 0,84ppm (d ; $J=6,4$ Hz) indiquant le voisinage avec un seul proton et deux autres sous forme de doublets (d, $J= 6,7$ Hz) à 0,85 ppm.

On observe aussi un proton oléfinique à 5,34ppm sous forme d'un doublet de triplet ($J = 6,8$; 2,9Hz). Un méthylène sous forme de doublet ($J = 6,8$ Hz) apparaît à 4,09ppm. Ce dernier peut être attaché à un groupement attracteur comme un oxygène vu son déplacement chimique.

On remarque aussi un méthyle sous forme d'un singulet à 1,64ppm qui indique son attachement à un carbone quaternaire. Dans la zone de 1 à 2 ppm, apparaissent des groupements CH_2 sous forme de multiplets.

Ces données nous mènent à une structure aliphatique contenant une double liaison et une fonction alcool. L'examen du spectre HSQC (fig. III. 11) permet la localisation de tous les carbones porteurs de ces protons.

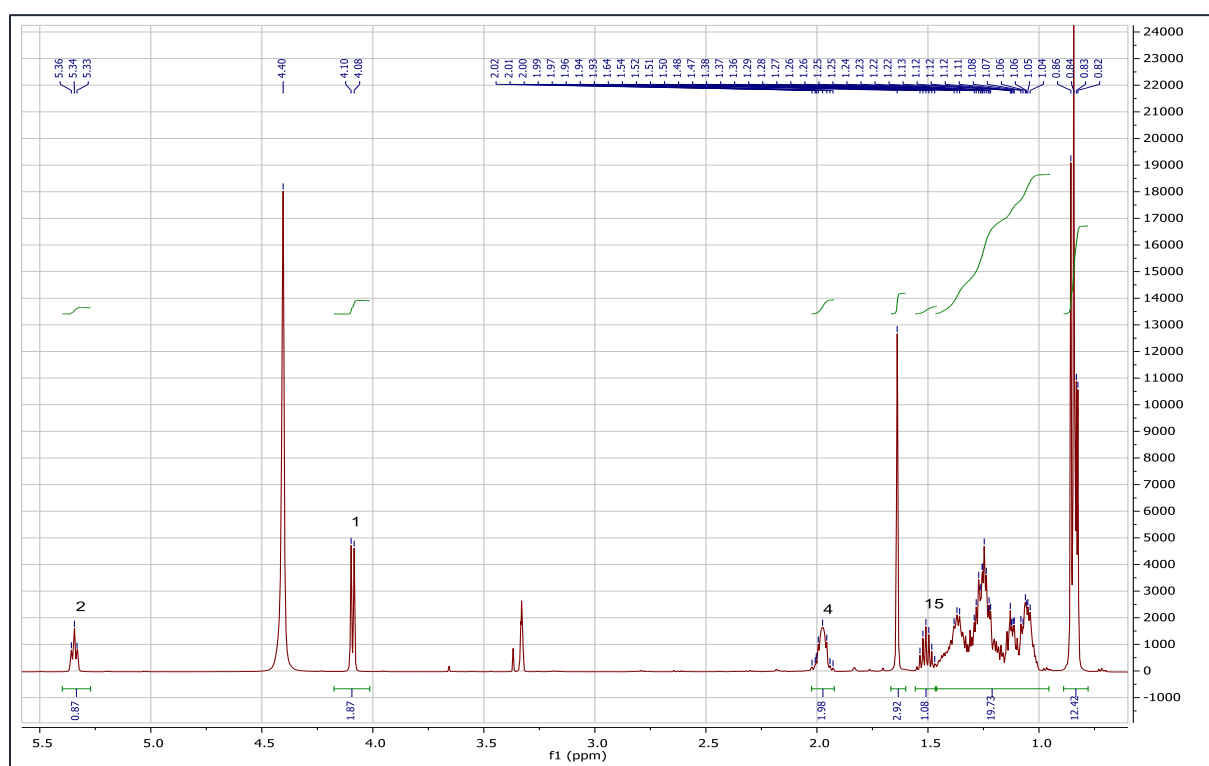


Fig.III.9 Spectre RMN¹H du composé A3 (CDCl₃, 500MHz)

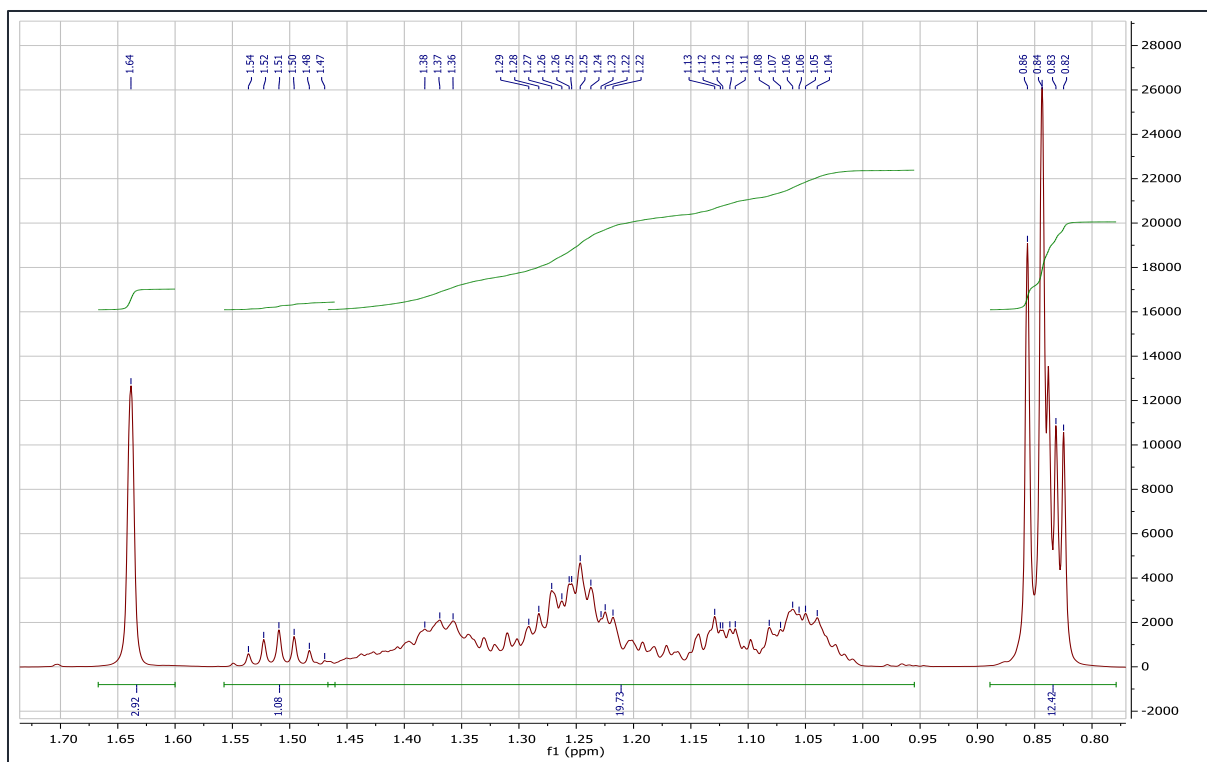


Fig.III.10 Spectre RMN¹H étalé (0,5-1,7 ppm) du composé A3 (CDCl₃, 500MHz)

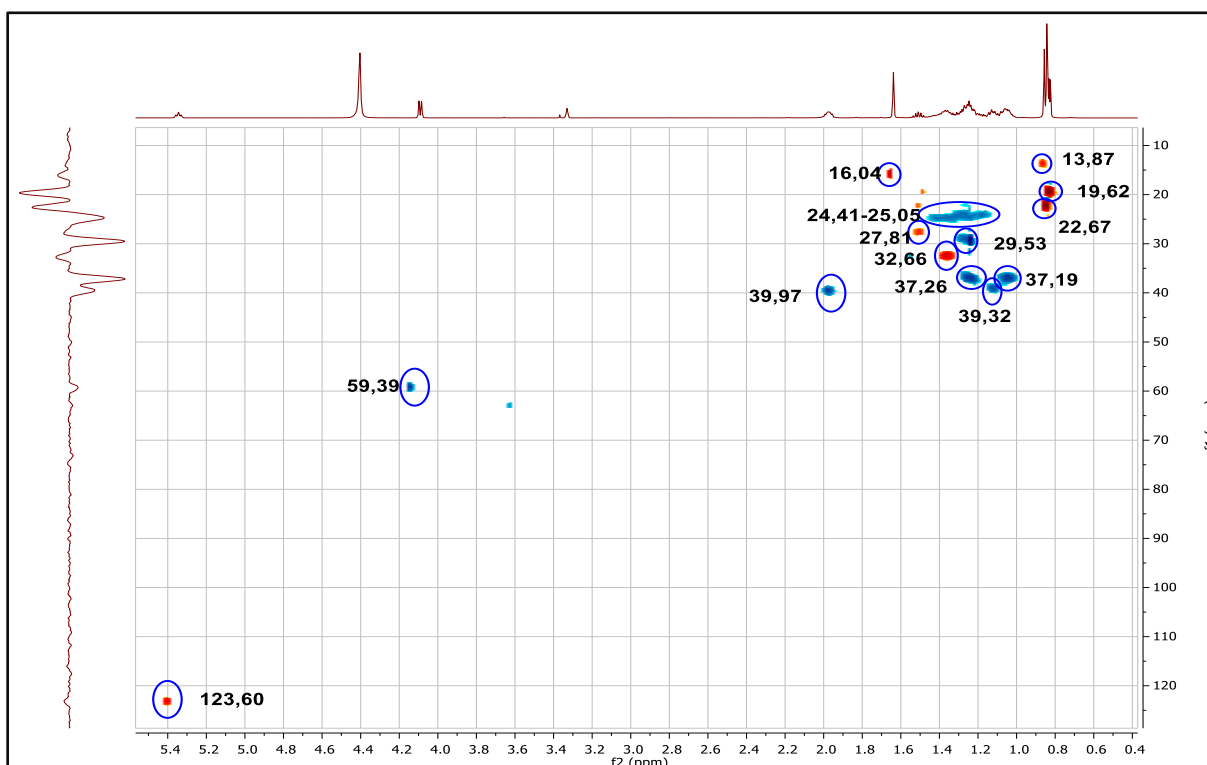
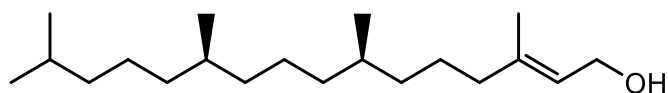


Fig.III.11 Spectre HSQC du composé A3

En prenant compte de la masse molaire et des données spectroscopiques, on peut conclure que la formule brute de ce composé est $C_{20}H_{40}O$ et une insaturation. La comparaison de ces données avec la littérature (Tab.III.4) nous amène à la structure suivante du phytol-1, c'est un diterpène non cyclique. (W.M. Alarif et al. 2010)



Phytol-1

Tableau.III.4 Déplacement des signaux de phytol isolé avec ceux de la référence :

N °	RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C (125 MHz) δ (ppm)	RMN ¹ H(CDCI ₃) δ (ppm), J(Hz) W.M. Alarif 2010	RMN ¹³ C W.M. Alarif 2010
1(CH ₂)	4,09 (d, J= 6,8)	59,3	4,14 (d, J= 6,8)	59,34
2(CH)	5,34(t, J= 6,3)	123,6	5,40(dq, J= 6,8;1,4)	123,11
3(C)	-	/	-	140,38
4(CH ₂)	1,97 (t, J= 9,5)	39,9	1,99(t, J= 7Hz)	39,85
5(CH ₂)	1,12(m)	39,3	1,33(m)	39,34
6(CH ₂)	1,25(m)	29,5	1,25(m)	37,24
7(CH)	1,36 (m)	32,6	1,65 (m)	32,66
8(CH ₂)	1,05-1,42(m)	37,1-37,2	1,25(m)	37,26
9(CH ₂)	1,05-1,42(m)	37,1-37,2	1,25(m)	37,40
10(CH ₂)	1,05-1,42(m)	37,1-37,2	1,25(m)	36,65
11(CH)	1,36 (m)	32,6	1,65 (m)	32,76
12(CH)	1,05-1,42 (m)	24,4-25,0	1,25 (m)	25,12
13(CH)	1,05-1,42 (m)	24,4-25,0	1,25 (m)	24,45
14(CH ₂)	1,05-1,42 (m)	24,4-25,0	1,25(m)	27,95
15(CH)	1,51(m)	27,8	1,65(m)	27,95
16(CH ₃)	0,85(d, J= 6,4)	19,6	0,87 (3H, d, J= 6,3)	19,68
17(CH ₃)	0,84 (d, J=6,4)	13,8	0,87 (d, J=6,3)	16,13
18(CH ₃)	0,84(d, J= 6,7)	19,6	0,85(t, J= 6,1).	19,7
19(CH ₃)	0,83(d, J= 6,7)	22,7	0,84(t, J= 6,3)	22,69
20(CH ₃)	1,65 (s)	16,0	1,66 (s)	22,59

/ : difficile à déterminer

Le phytol est un composé présent dans la plupart des plantes, il a été séparé de *Verbascum speciosum* (H. Vahedi et al. 2012). Il est considéré comme un antimicrobien, un anti-inflammatoire, un diurétique et un anticancéreux (J. A. I. Devi et A.K. Muthu2014).

III.2.1.4. Elucidation de composé A4 :

L'analyse de ce précipité par la technique HPLC (Tab.III.5), montre qu'il contient un mélange de deux composés de masses différentes : 412,3703 et 414,3852, apparaissant à des temps de rétention très proches à 9,15mn et 9,44mn successivement, avec une intensité majeure du pic à la formule brute C₂₉H₄₈O.

Tableau.III.5 Tableau de résultats d'analyse HPLC du précipité AVA2-P

NOM	TR	MASSE	FORMULE BRUTE	R ²	INTENSITE
AVA2-P	8,68	412,369	C ₂₉ H ₄₈ O	442093	65811
AVA2-P	9,15	412,3703	C ₂₉ H ₄₈ O	1328680	227906
AVA2-P	9,26	412,37	C ₂₉ H ₄₈ O	1176232	161595
AVA2-P	9,44	414,3852		880616	78029

Les spectres RMN¹H et RMN¹³C de ce mélange présente des signaux imbriqués, qui peuvent être différenciés à l'aide des expériences 2D tel que COSY et HSQC.

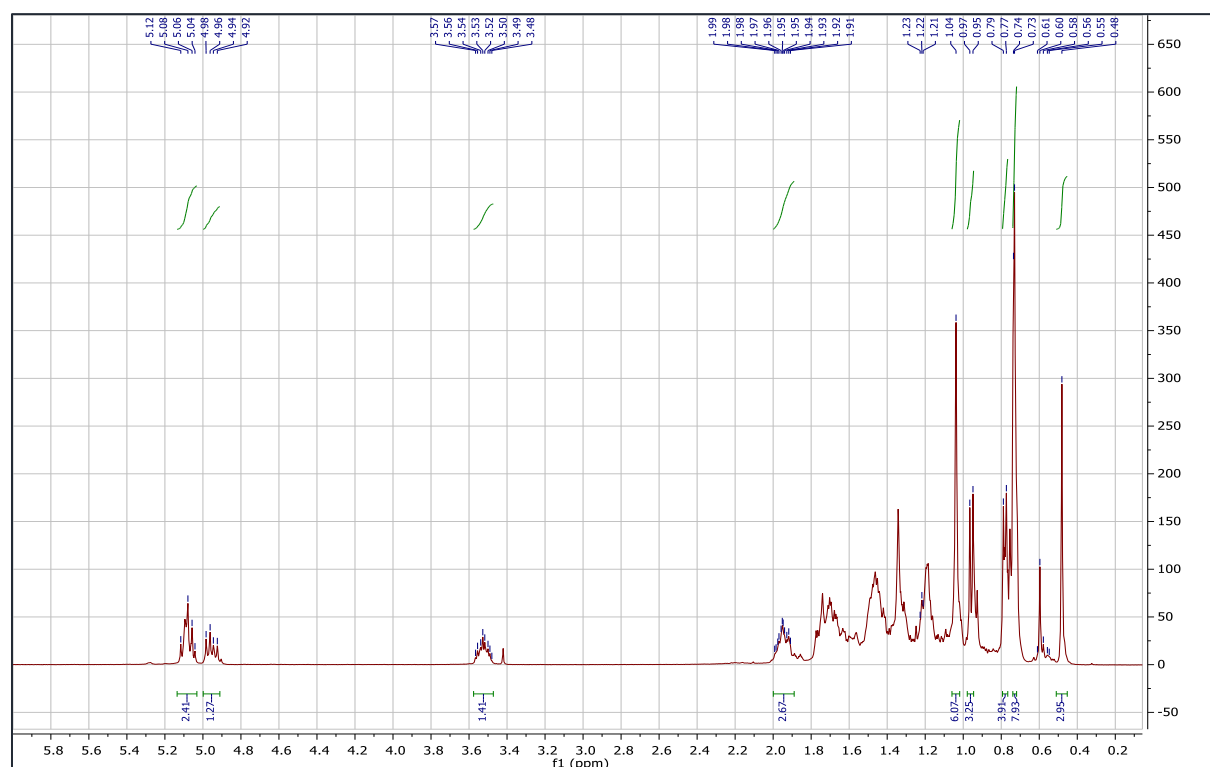


Fig.III.12 Spectre RMN¹H de composés A4 (CDCl₃, 500MHz)

L'ensemble des données des spectres RMN¹H, ¹³C APT, 2D COSY et HSQC (Fig. III. 12 ; III. 13 ; III. 14 ; III.15) respectivement, nous oriente vers une structure triterpénique avec des signaux caractéristiques suivants :

- Des méthyles dans la zone de 0,5 à 1,2ppm.
- Un signal à 3,52ppm sous forme de multiplet d'intégrations 1,41 indique qu'il est porté par un carbone oxygéné à 71,39ppm.
- Un signal d'intégration 1H sous forme de doublet de doublet (1H, dd, $J=15,2$ et $8,4$ Hz) à 4,95ppm, porté par un carbone à 129,39ppm peut être considéré comme un proton oléfinique.
- Deux autres protons oléfiniques sous forme des multiplets à 5,04 et 5,10 ppm portés les carbones à 138,39 ppm et 117,15 respectivement.

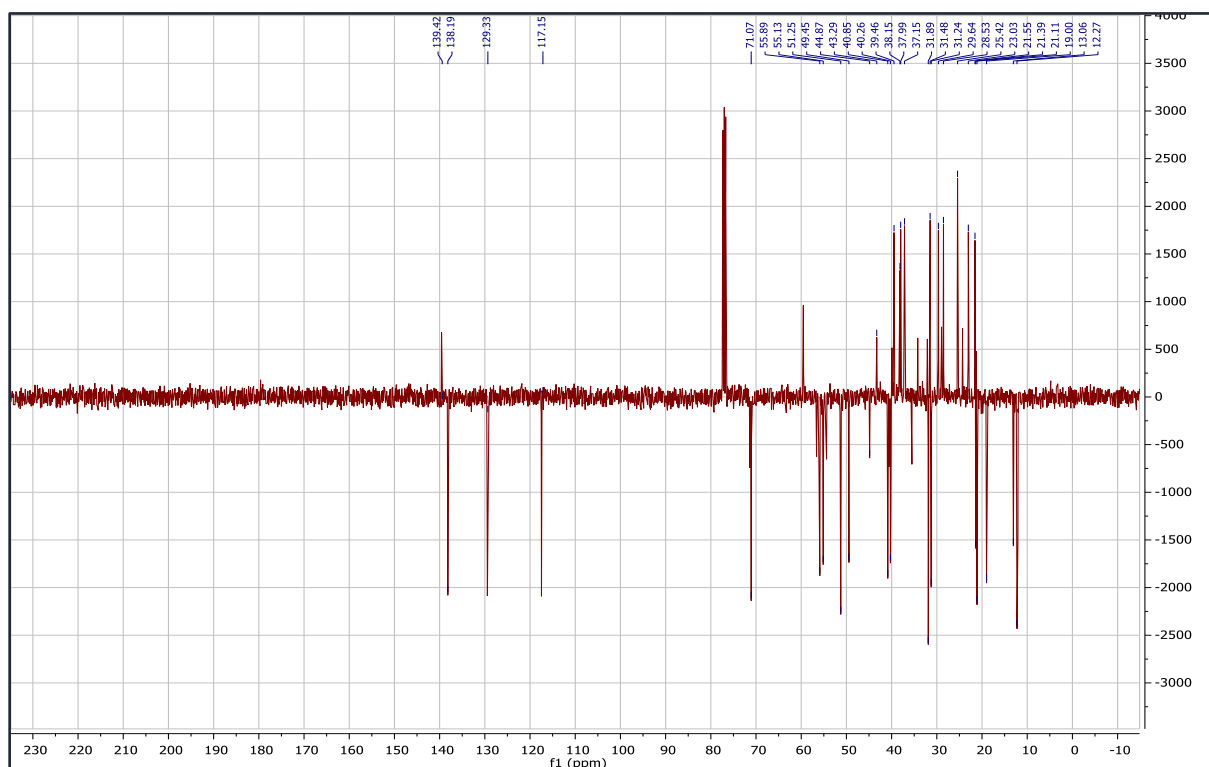


Fig.III.13Spectre ¹³C en APT de composés A4 (CDCl₃, 75 MHz)

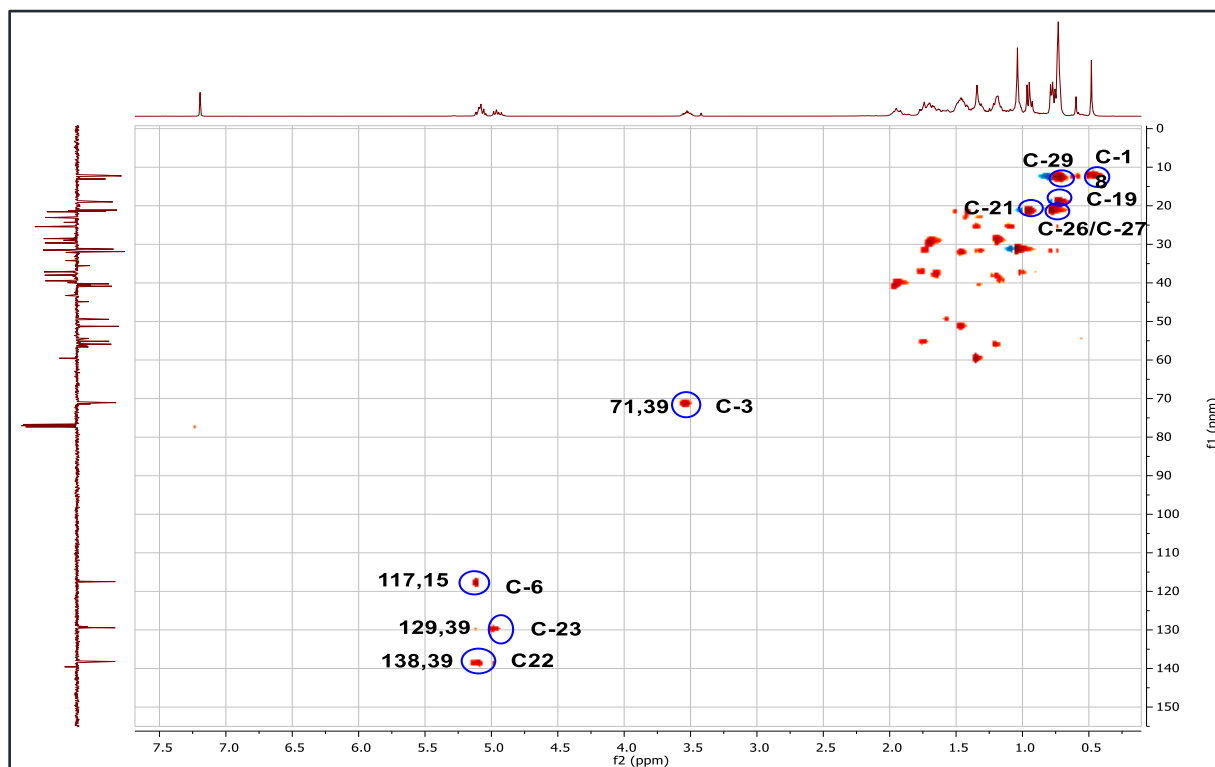


Fig.III.14 Spectre HSQC de composés A4

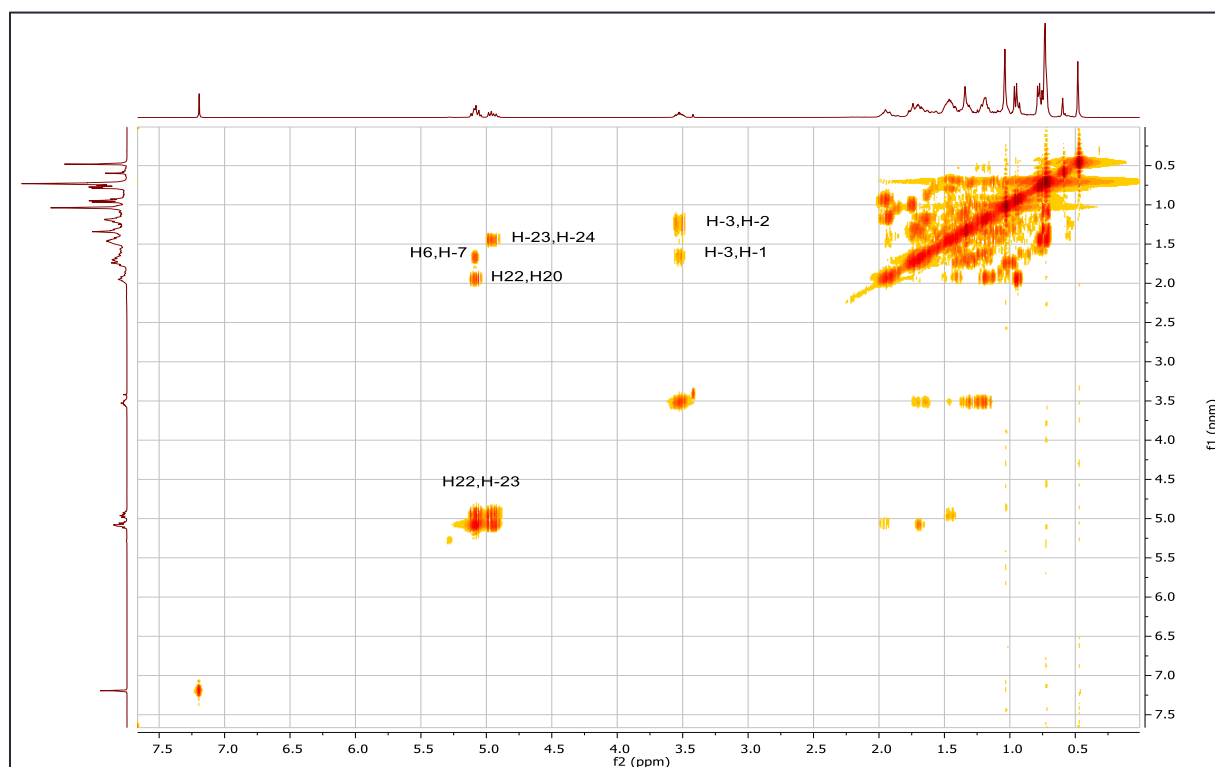


Fig.III.15 Spectre COSY de composés A4

Selon les données de la littérature, cet ensemble de signaux est semblable aux signaux du composé stigmastérol, qui est difficile à isoler à l'état pur, il apparaît toujours sous forme de mélange avec le β -sitostérol **A5** (P. L. Lokadi et M. M. Namboole2015).

Le spectre RMN¹³C (fig. III.13) de ce produit, affiche plus de trente carbones d'une intensité variable. Le spectre RMN¹H (fig. III. 12) donne un signal à 4,95ppm attribuable au proton H-23 du stigmastérol qui a une valeur d'intégrale égale à un proton. Si on divise la valeur d'intégrale de ce proton sur la valeur 1,41 (intégrale du signal à 3,52ppm) attribuable au proton de la position 3 du stigmastérol et aussi bien du β -sitostérol, nous concluons que le pourcentage du stigmastérol dans ce produit est de 70,92%, donc le pourcentage du β -sitostérol peut être calculé par $100\% - 70,92\% = 29,08\%$. Ces données indiquent que le composé A4 est le mélange du stigmastérol **A4** et le β -sitostérol **A5**. Le tableau (Tab.III.6) contient les valeurs des déplacements chimiques de stigmastérol **A4** avec ceux de la littérature (P. L. Lokadi et M. M. Namboole2015). Les déplacements chimiques de β -sitostérol **A5** sont plus difficiles à déterminer.

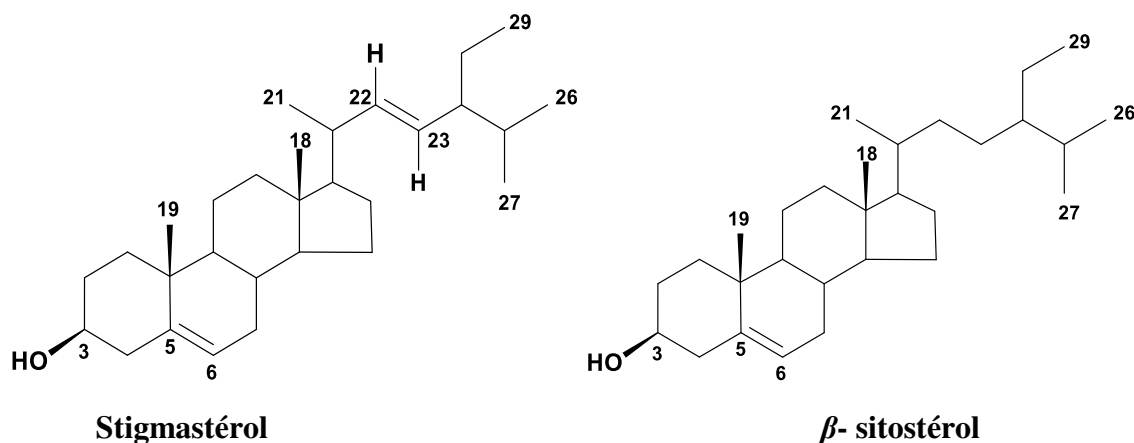


Tableau.III.6: Déplacement des signaux de stigmasterol et β -sitostérol avec leur référence

N °	RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C (125 MHz) δ (ppm)	RMN ¹ H CDCl ₃ , δ (ppm) P. L. Lokadi 2015	RMN ¹³ C δ (ppm) P. L. Lokadi 2015
1(CH ₂)	1,64 (m)	37,8		36,72
2(CH ₂)	1,20 (m)	28,9		29,71
3(CH)	3,55 (m)	71,3	3.51 (tdd, 1H)	71,97
4(CH ₂)	1,17(m)	39,3		42,35
5(CH)	-	139,4	5.31 (t, 1H)	140,94
6(CH)	5,10 (sl)	117,1		121,32
7(CH ₂)	1,67 (m)	32,0		31,71
8(CH)	1,46 (m)	29,5		29,24
9(CH)	1,56(m)	49,4		50,03
10(C)	-	37,1		36,16
11(CH ₂)	1,31(m)	23,1		24,32
12(CH ₂)	1,69 (m)	39,1		39,82
13(CH)	-	43,2		40,45
14(CH)	1,75 (m)	55,3		56,90
15(CH ₂)	1,33(m)	24,3		24,32
16(CH ₂)	1.72(m)	31,6		28,90
17(CH)	1,20 (m)	56,0		56,03
18(CH ₃)	0,48 (s)	13,0	1.03 (s)	12,06
19(CH ₃)	0,71(s)	18,8	0.71 (s)	19,06
20(CH)	1,96 (m)	40,5		39,82
21(CH ₃)	0,96 (d, J = 6,6)	21,4	0.91 (d)	23,12
22(CH)	5,09 (m)	138,3	4.98 (m)	138,40
23(CH)	4, 94 (dd, J =15,2; 8,4)	129,3	5.14 (m)	129,34
24(CH)	1,45(m)	51,3		51,26
25(CH)	1,72 (m)	31,8		34,01
26(CH ₃)	0,78 (d, J= 6,3Hz)	21,1	0.80 (d)	21,12
27(CH ₃)	0,74(sl)	21,1	0.82 (d)	22,82
28(CH ₂)	1,34,1,08(m)	25,4		25,32
29(CH ₃)	0,73 (sl)	12,8	0.83 (t)	12,06

Une recherche récente a démontré que ces deux composés ont des activités antiinflammatoires et antibactériennes (G.M. Corrêa et al. 2014). Le stigmastérol a un effet stabilisateur de membrane cellulaire et le β -sitostérol est considéré comme un antidiabétique (M. A. Zeb et al. 2017). Ces composés sont présents dans les espèces de genre *Verbascum* comme *Verbascum pycnostachyum* (İ. İ. Tatlı et al. 2007)

III.2.1.5. Elucidation du composé A6 :

Les données de la technique HR-ESI-MS haute résolution de la fraction AVA10 indique un signal avec un $T_r = 0,75$ mn (Tab.III.7) et avec un ensemble de fragmentations de masse égale à : 190,1201, 168,1382 et 310,1042. Donc si on prend $190,1201 - 168,1382 = 22 [M+Na]^+$, ce qui nous oriente vers une masse moléculaire de $m/z = 168,1382$

Tableau.III.7 Tableau de résultats d'analyse HR-ESI-MS de AVA10

NOM	T_r	MASSE	R^2	INTENSITE	FRAGMENTS
AVA10	0,58	194,113	242868	27290	194.113,172.1324,167.0974,248.1409,266.136
AVA10	0,65	212,0675	240697	40234	212.0675,190.0856,208.0918,244.0935,239.1365
AVA10	0,75	190,1201	263311	39432	190.1201,288.119,173.0936,168.1382,310.1042
AVA10	0,85	274,0835	174343	22423	274.0835,292.0936,310.1048,270.1116,151.0155
AVA10	0,93	167,0579	90649	12547	167.0579,199.0842,150.0313,182.0577,248.1284
AVA10	1,05	286,1405	42657	6848	286,1405

Le spectre RMN¹H (Fig. III. 16) et son étalement (Fig.III.17) de ce composé montre la présence de quatre signaux :

- Un signal sous forme de singulet à 3,88ppm d'intégration 3H attribuable à un groupement méthoxyle.
- Deux signaux d'intégration 1H chacun, apparaissent respectivement à 6,77ppm (1H, dd, $J = 1,9$ et $8,2$ Hz) et à 7,50 ppm (1H, dd, $J = 8,2$; $1,9$ Hz).
- Un autre singulet large qui apparaît à 7,60 ppm.

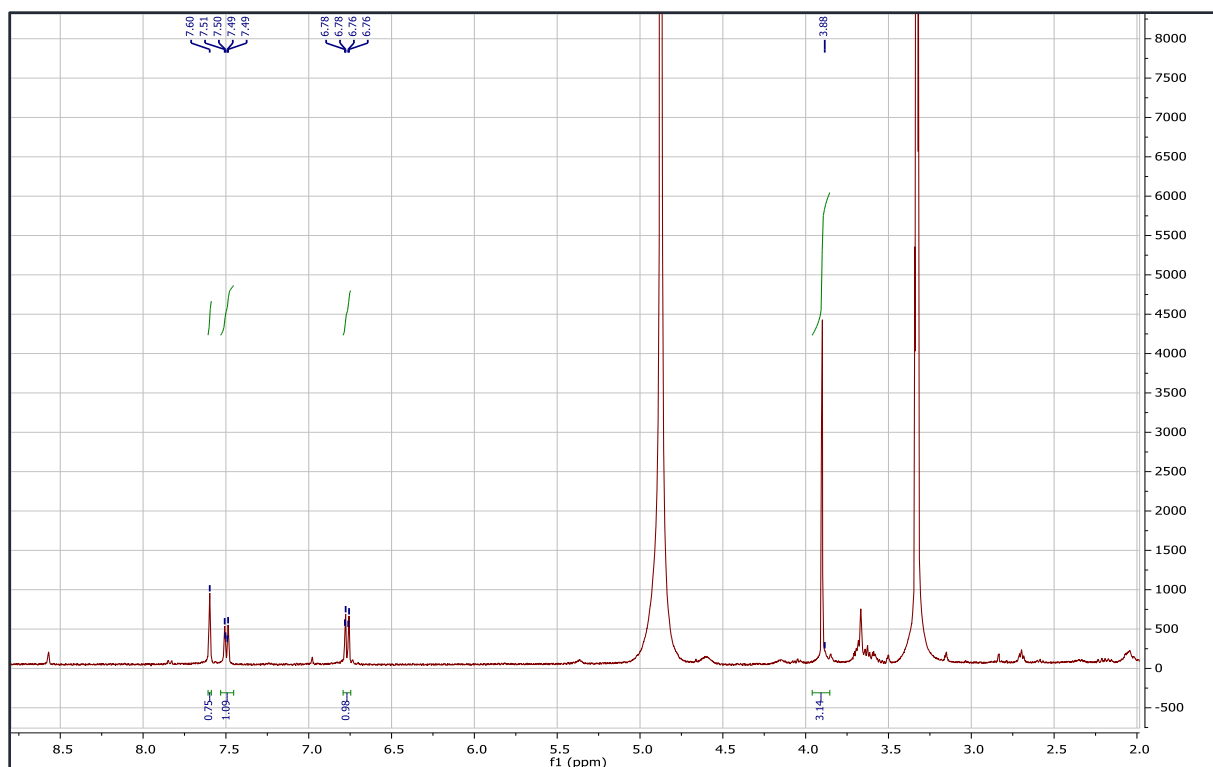


Fig.III.16 Spectre RMN¹H du composé A6 (CD₃OD, 400MHz)

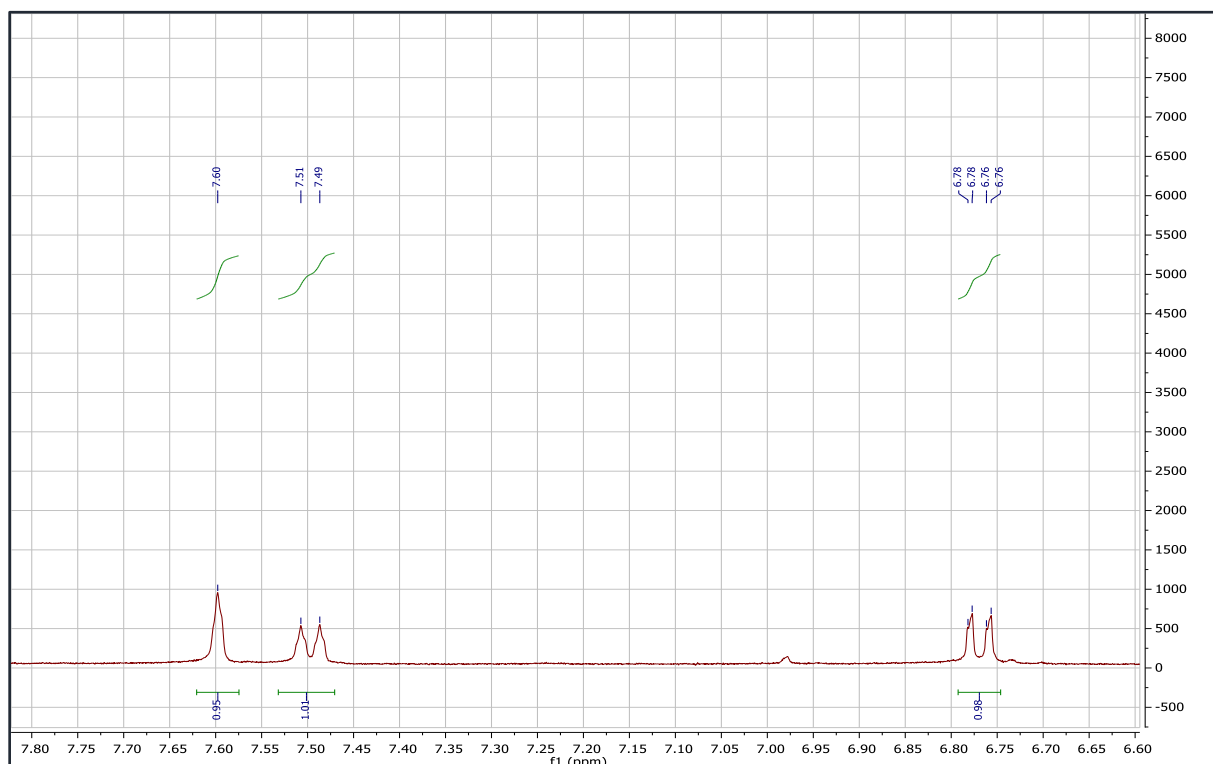
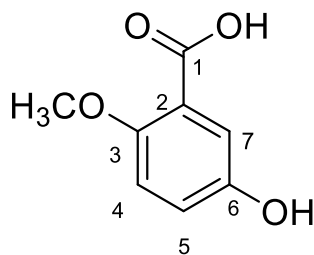


Fig.III.17 Spectre RMN¹H étalé du composé A6 (CD₃OD, 400MHz)

Les données spectrales du proton conduisent à un cycle aromatique tri-substitué. La comparaison des données de la masse à haute résolution avec celle de la littérature confirme la structure de l'acide 6-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (Tab.III.8).



Acide 5-hydroxy-2-méthoxybenzoïque

Tableau.III.8: Déplacement des signaux RMN¹Hd'acide 5-hydroxy-2-méthoxybenzoïque

N°	RMN ¹ H (400MHz,CD ₃ OD) δ (ppm), (J(Hz))
3 (OCH₃)	3,88 (s)
4(CH)	6,77 (dd, J = 8,3 ; 1,9 Hz)
5(CH)	7,50 (dd, J = 8,2 ; 1,9 Hz)
7(CH)	7,60 (sl)

III2.1.6. Elucidation du composé A7 :

La couleur noire-violette de ce composé sous la lampe de Wood et le spectre UV- visible enregistré dans le méthanol nous oriente vers une flavone ou flavonol substitué en position 3, le spectre UV enregistré en addition de NaOH (Fig. III. 18) indique le squelette d'un flavonoïde hydroxylé en position 7 et hydroxylé en position 4', cette idée est confortée par les données du spectre RMN¹H (250MHz, MeOH-*d*₄) (Fig. III. 19) et son étalement (Fig. III. 20) qui montrent très clairement les signaux d'un flavonoïde en l'occurrence la lutéoline. Cette molécule a été séparée auparavant de l'espèce *V. creticum* Cav. où on trouve ci-dessous en détail sa démonstration.

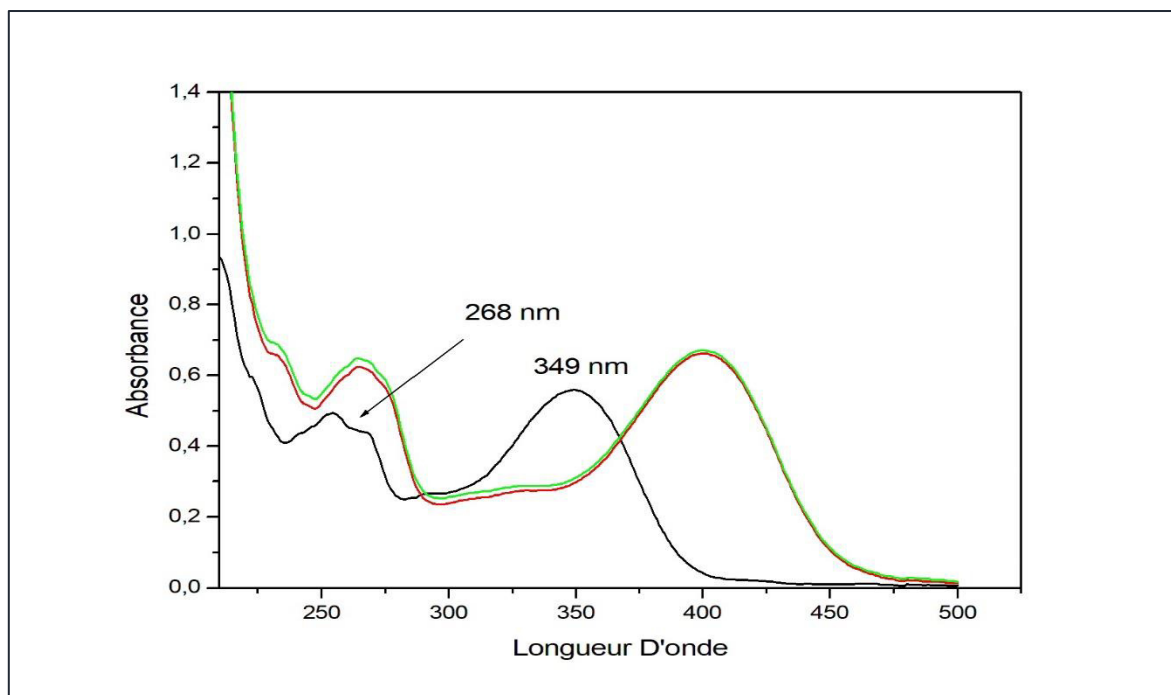


Fig.III.18 Spectre UV en présence de MeOH +NaOH du composé A7

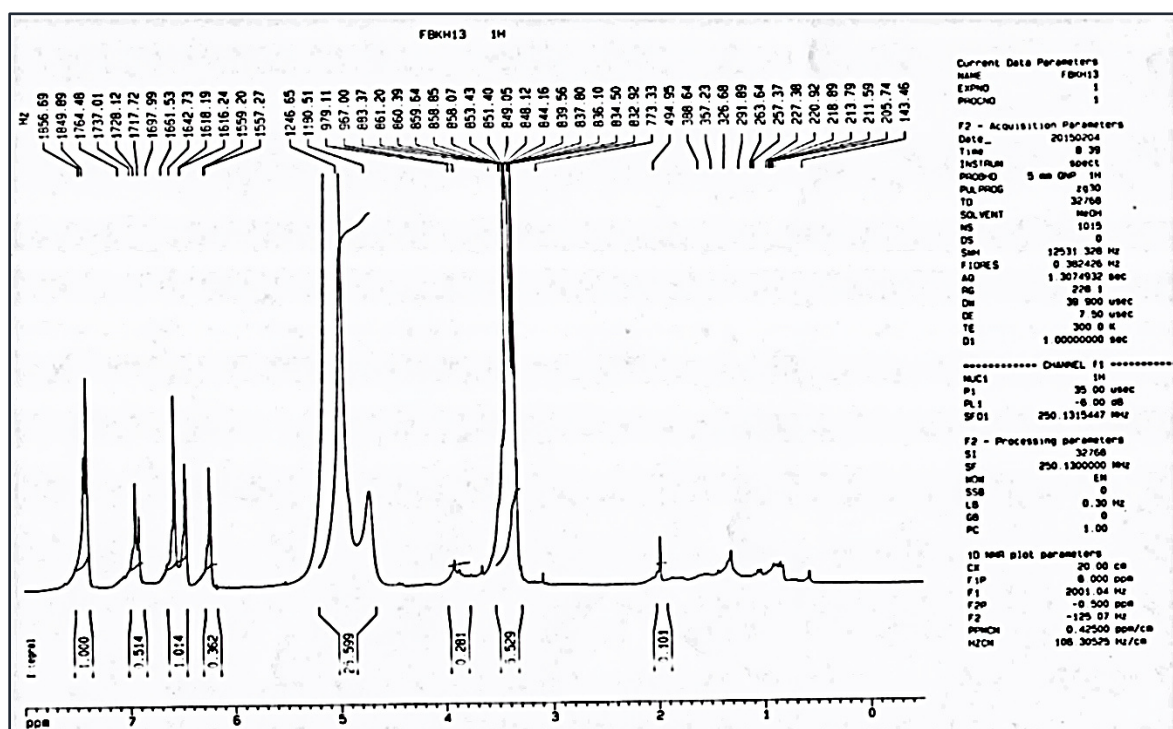
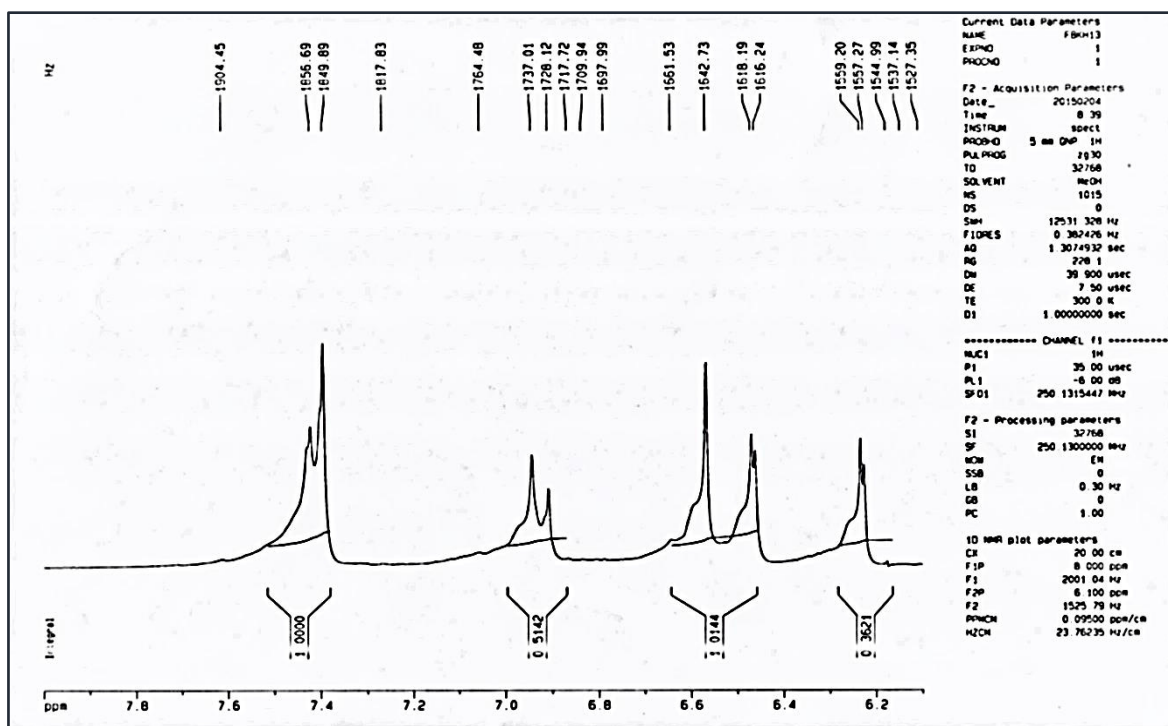


Fig.III.19 Spectre RMN¹H du composé A7 (CD₃OD, 250MHz)

Fig.III.20 Spectre RMN¹H (CD₃OD, 250MHz)

III. 2.1.7. Elucidation des composé A8, A9 et A10 :

Les données de la technique HPLC avec ses deux résolutions basse et haute LC-UV-MS (Fig. III.21 ; III.22 ; III.23) et HR-ESI-MS en technique ES, montrent que ces trois composés ont des spectres UV et de masse quasi similaires (Fig. III. 24, III. 25, III. 26) avec $m/z = 652$ ce qui correspond à la formule brute $C_{31}H_{40}O_{15}$, soit 12 insaturations .

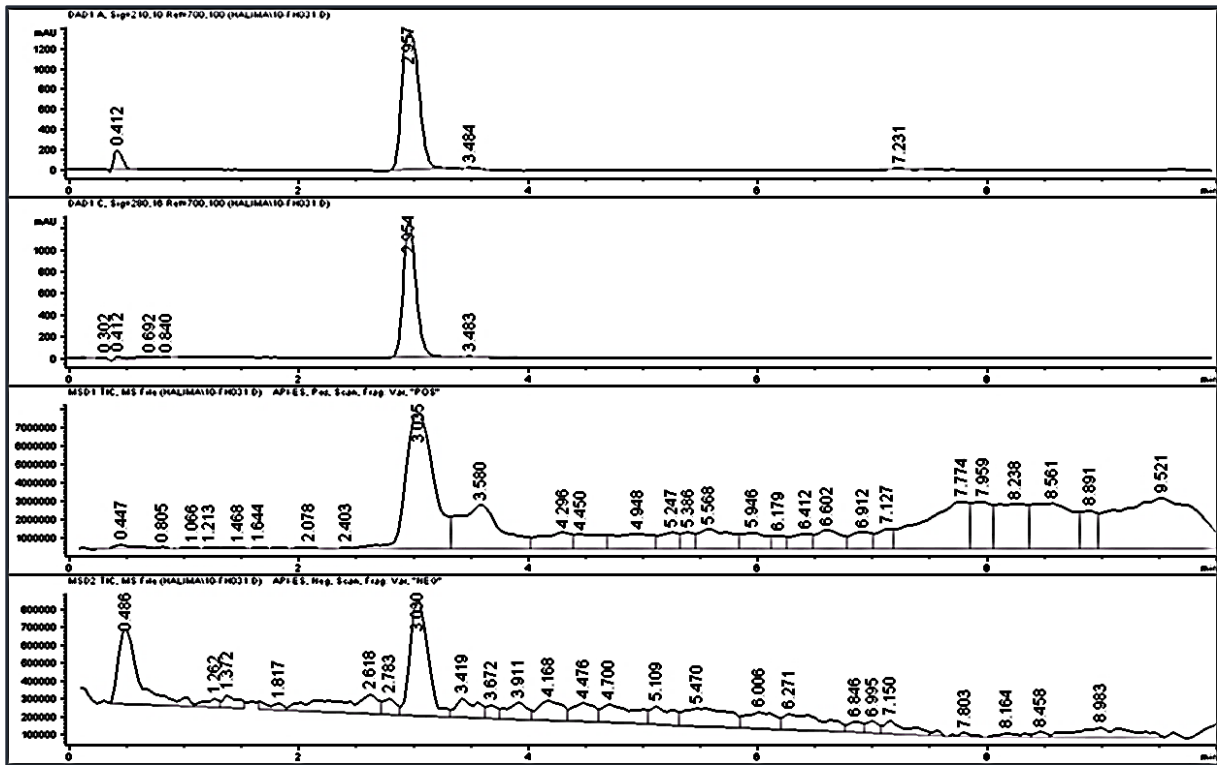


Fig.III.21 Chromatogramme LC-MS du composé A8

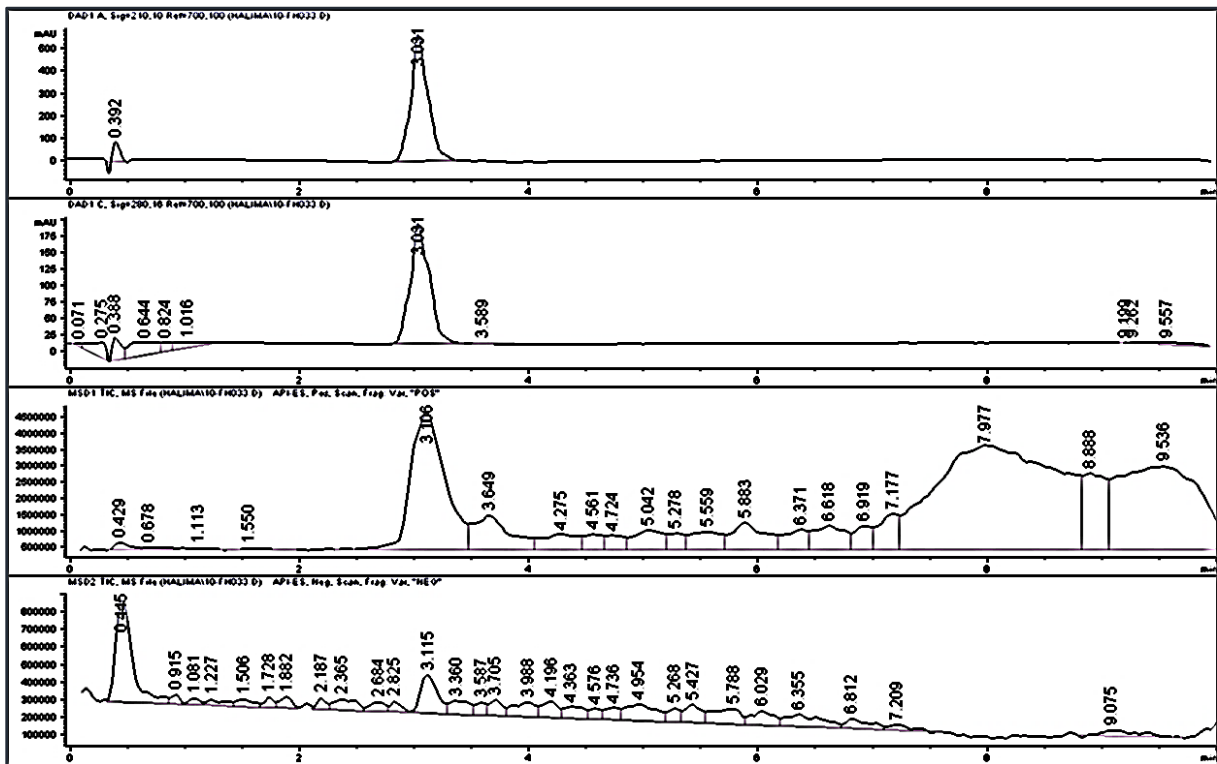


Fig.III.22 Chromatogramme LC-MS du composé A9

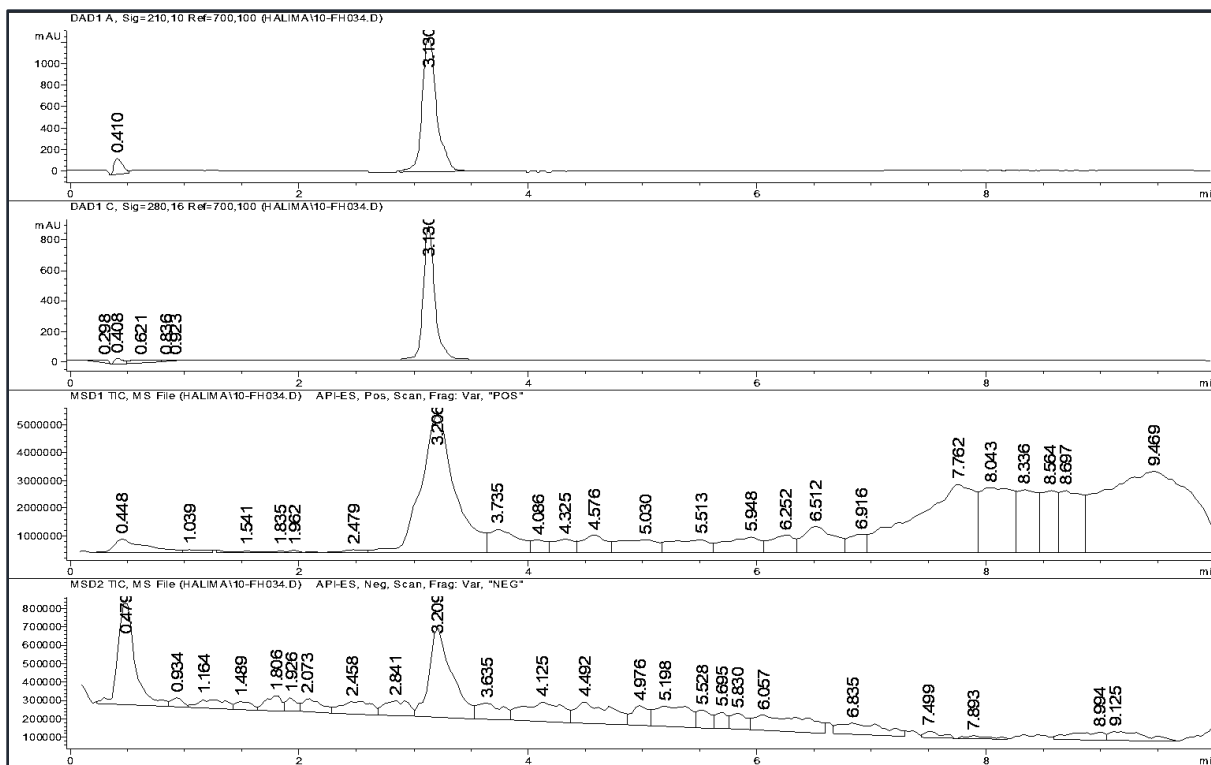


Fig.III.23 Chromatogramme LC-MS du composé A10

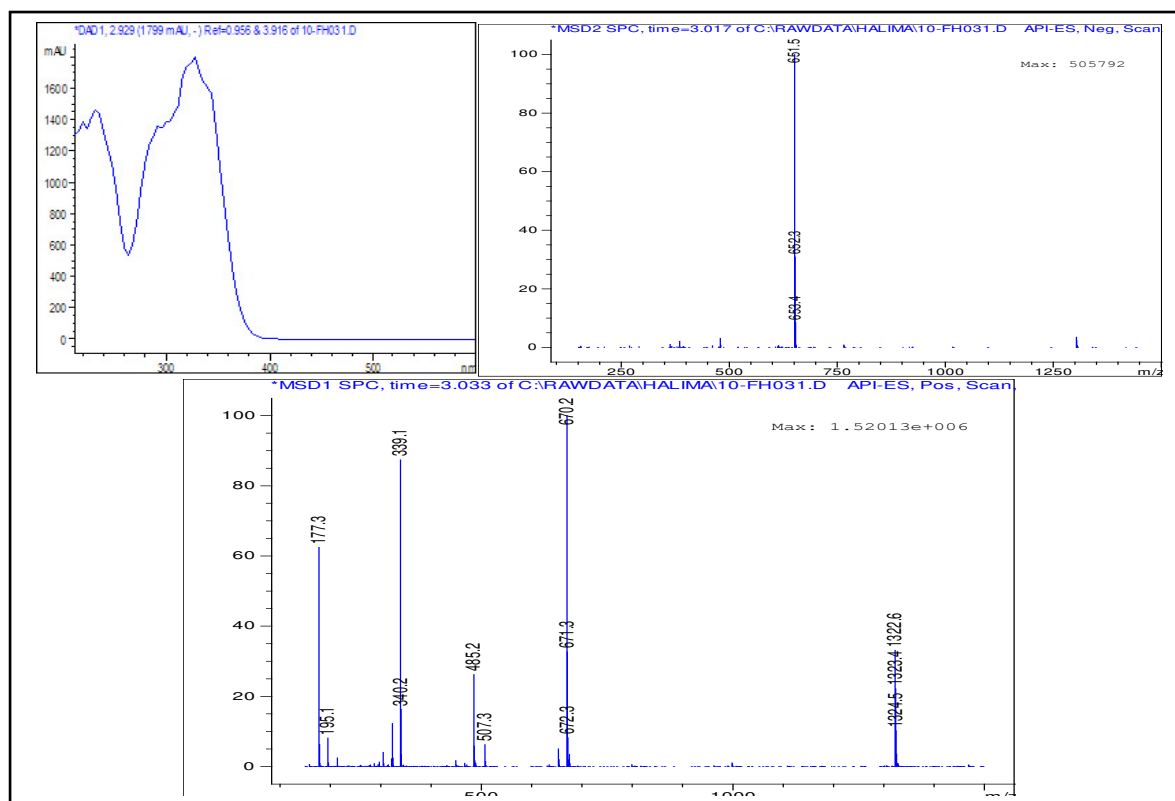


Fig.III.24 Spectre de masse (en mode négatif et positif) et spectre UV du composé A8

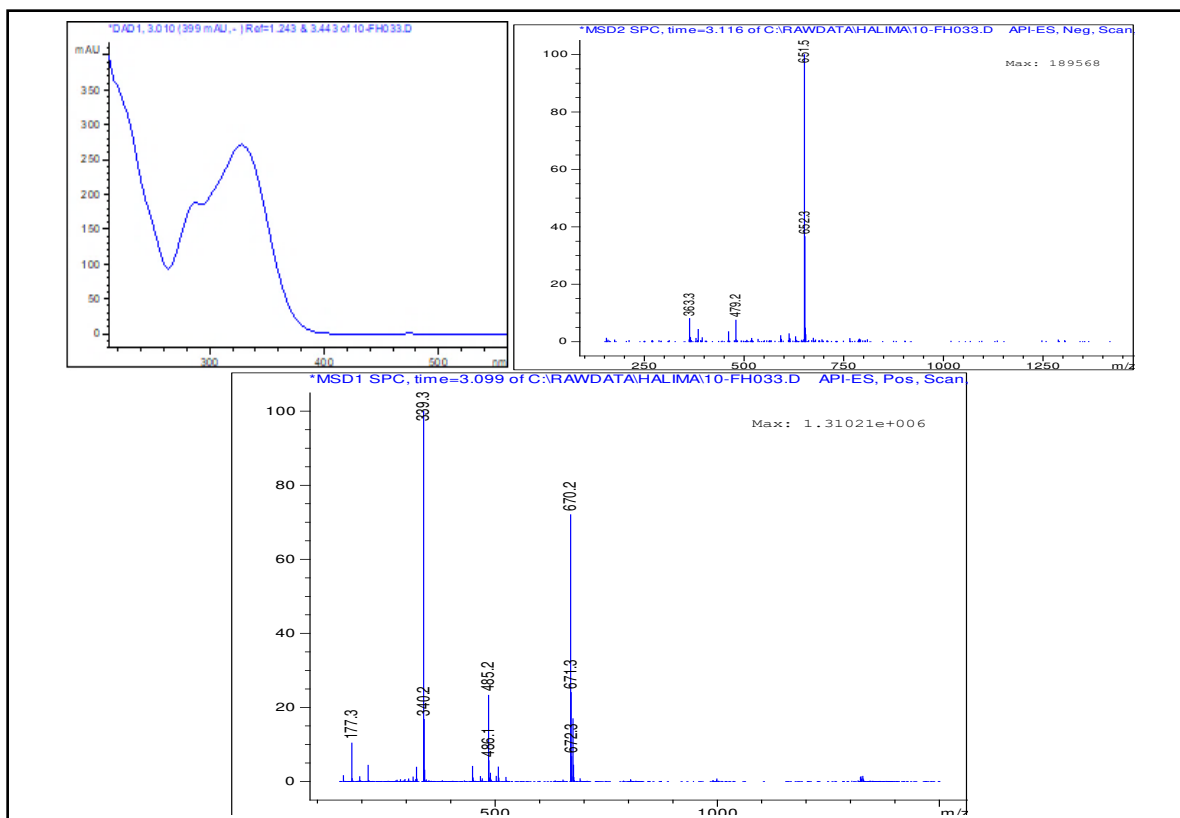


Fig.III.25 Spectre de masse (en mode négatif et positif) et spectre UV du composé A9

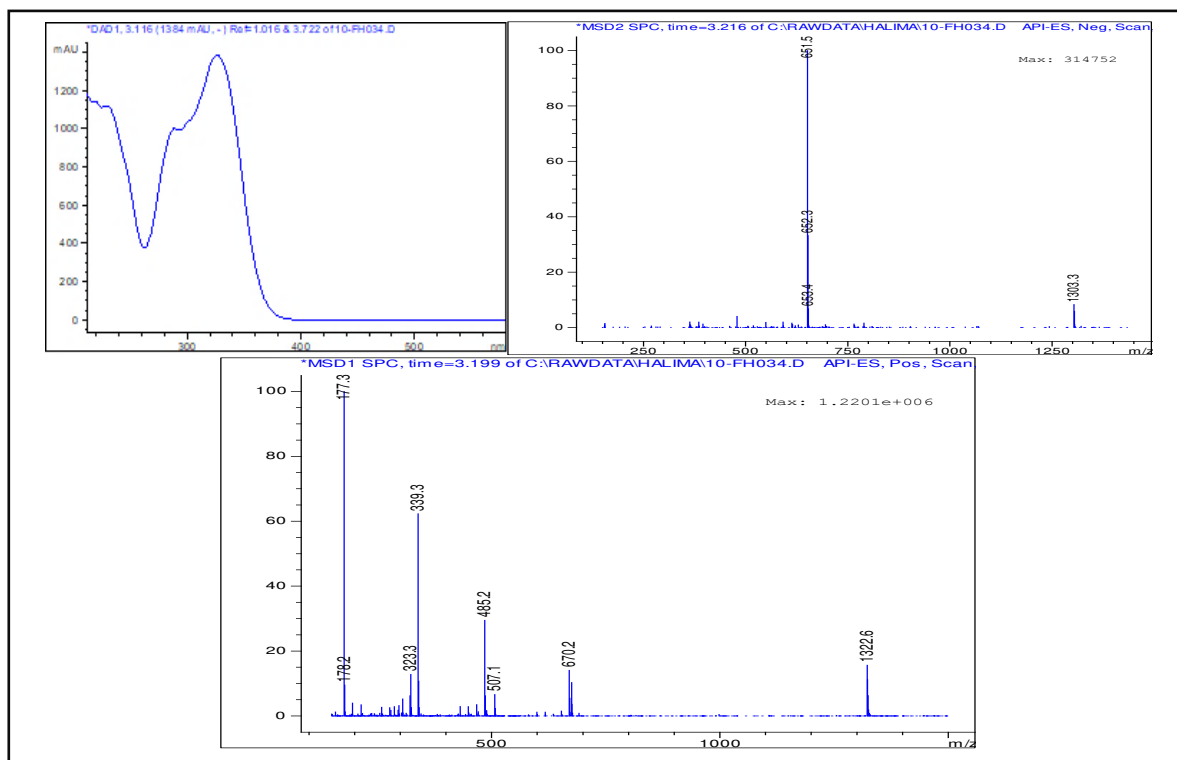


Fig.III.26 Spectre de masse (en mode négatif et positif) et spectre UV du composé A10

- En examinant les spectres RMN¹H de ces composés (Fig III. 27, III. 28, III. 29) , on observe la présence des signaux suivants :
- la présence des signaux aromatiques dans la zone de 6-8 ppm sur les spectres de ces composés.
- Deux signaux sous forme de singulets d'intégration 3H chacun apparaissent dans les trois spectres dans la zone de 3,75 à 3,90ppm qui peuvent bien correspondre à deux méthoxyles.
- On constate aussi des signaux osidiques dans la zone de 3 à 5,22ppm sur les spectres RMN¹H des trois composés **A8**, **A9**, **A10**. Il ya des protons anomères sous forme des doublets à 4,40ppm, 3,35ppm et 4,38ppm avec la constante du couplage ($J=7,9\text{Hz}$) . Cette valeur ainsi que la valeur de la constante de couplage du proton de la position 4 du sucre variant entre 9-11 Hz confirme bien qu'il s'agit du glucose dans les trois composés. un autre anomère sous forme d'un doublet à 5,18 et 5,22ppm sur les spectres des composés **A8 et A10** avec $J= 1,3\text{Hz}$, tandique sur le spectre du composé **A9**, le doublet à 5,20ppm a une constante de couplage $J= 1,2\text{Hz}$. Ces valeurs J avec la présence d'un doublet d'intégration 3H dans les spectres RMN¹H des composés : A8 (1,12 ppm , $J= 6,2\text{ Hz}$) , A9 (1,28ppm, $J= 6,2\text{ Hz}$) et A10 (1,18ppm, $J= 6,2\text{ Hz}$) nous oriente vers la présence d'un α -rhamnose.
- On remarque aussi sur les spectres des composés **A8 et A9** deux doublets dont la valeur de leur constante du couplage $J=15,9\text{Hz}$, indiquant la présence d'une double liaison de configurations *trans*.
- par contre les deux doublets présents dans le spectre du composé **A10** ont une constante de couplage $J= 12,8\text{Hz}$ indiquant ainsi une configuration *cis*.

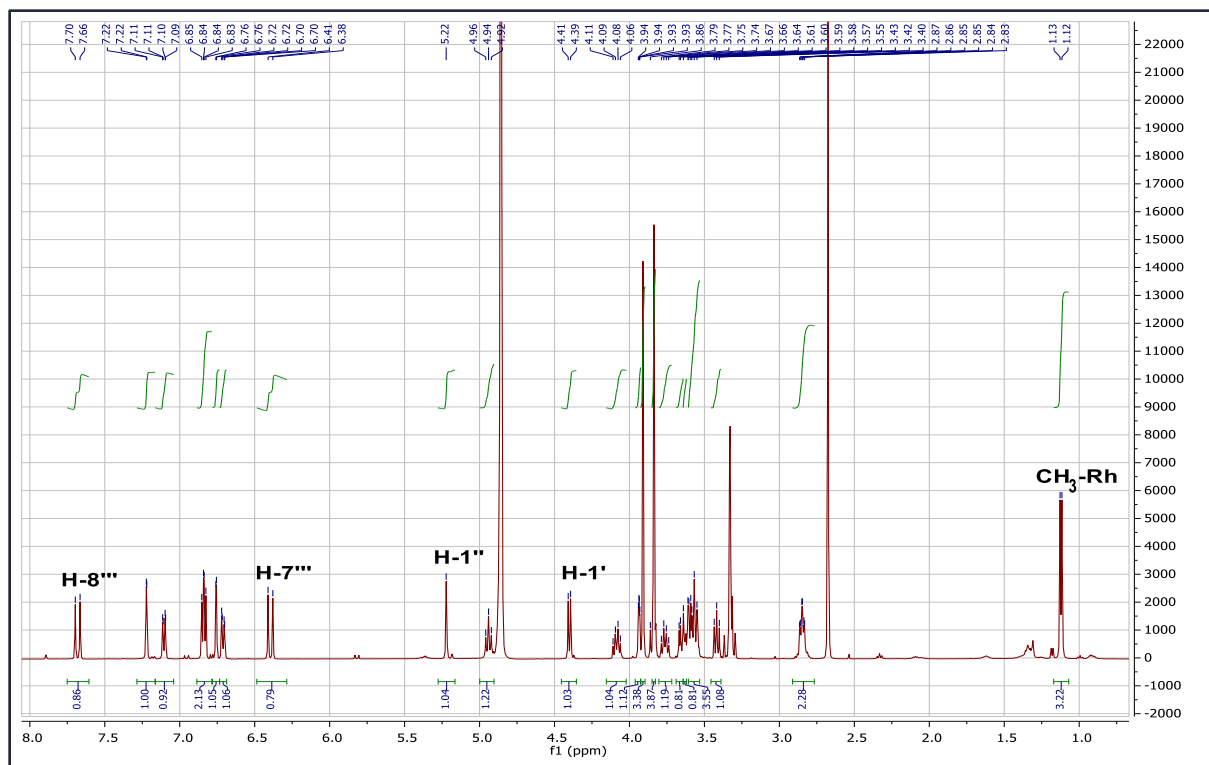


Fig.III.27 Spectre RMN¹H du composé A8 (CD₃OD, 500MHz)

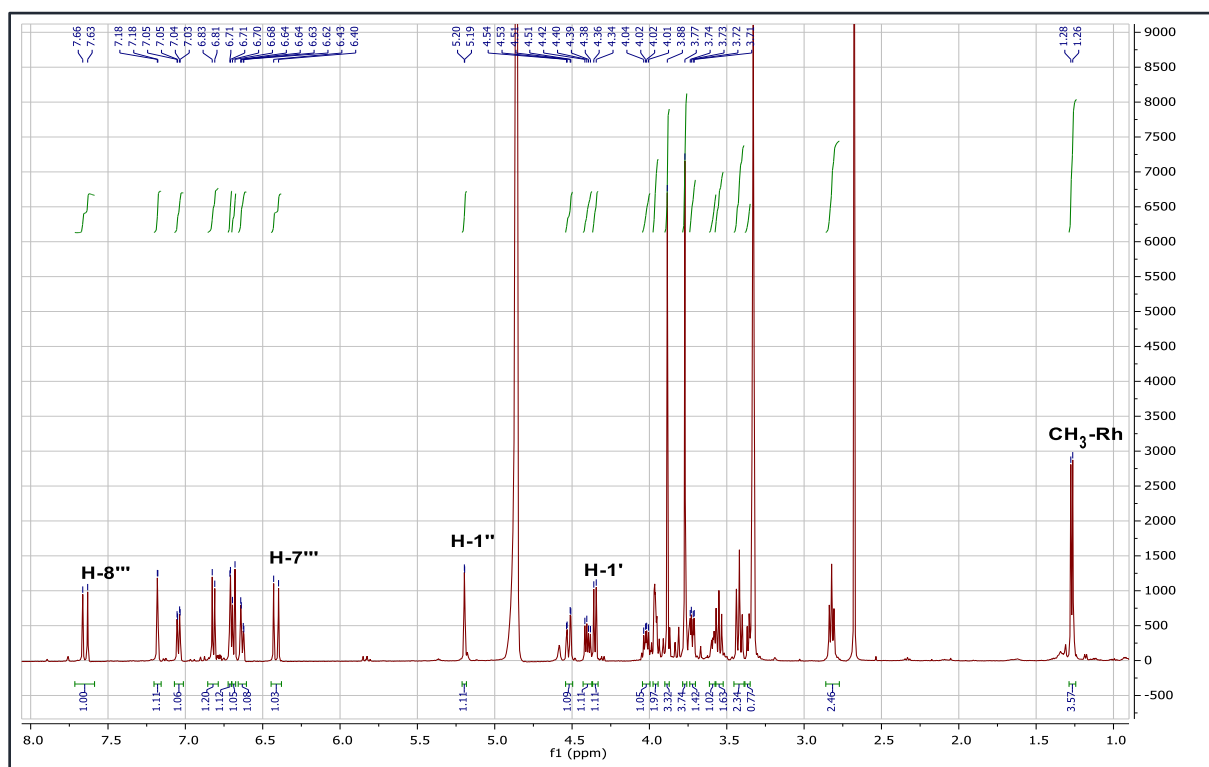


Fig.III.28 Spectre RMN¹H du composé A9 (CD₃OD, 500MHz)

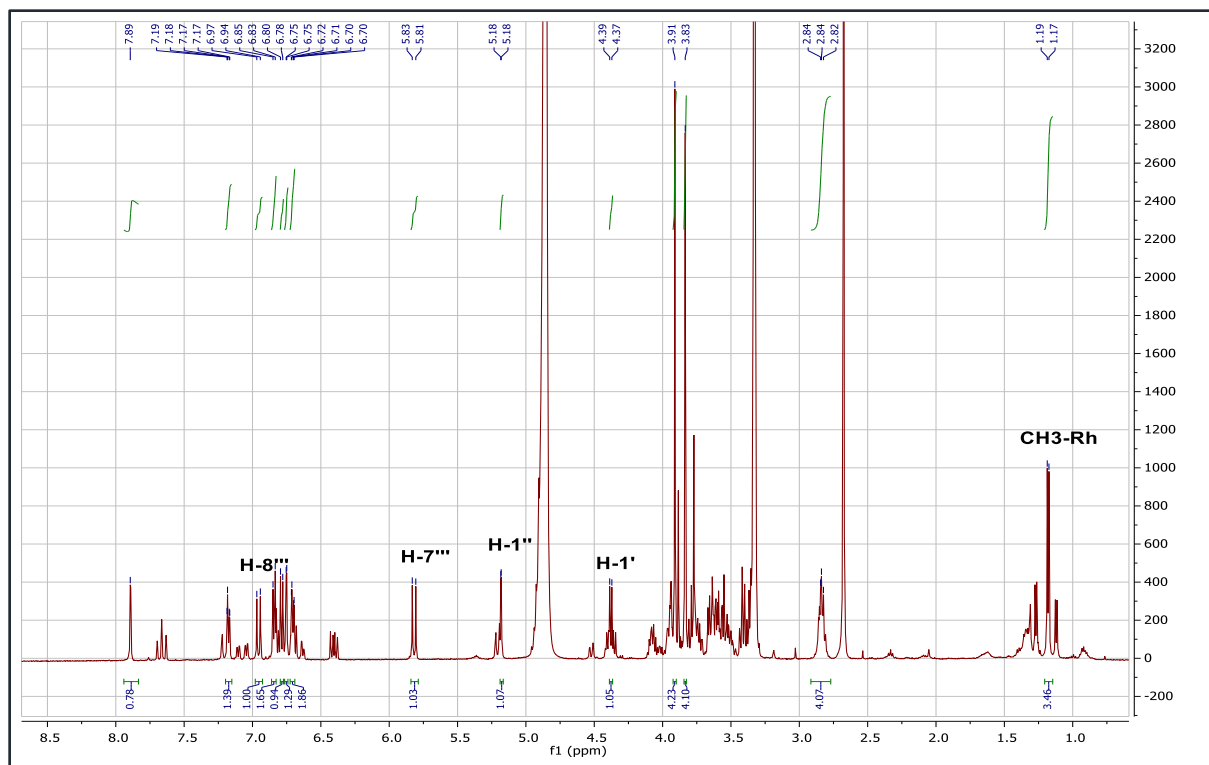


Fig.III.29 Spectre RMN¹H du composé A10 (CD₃OD, 500MHz)

A l'aide des spectres 2D HSQC (Fig. III.30, III. 31, III. 32), nous avons pu attribuer tous les protons à leur carbones correspondants et cela nous a permis de confirmer que ces trois composés sont des isomères.

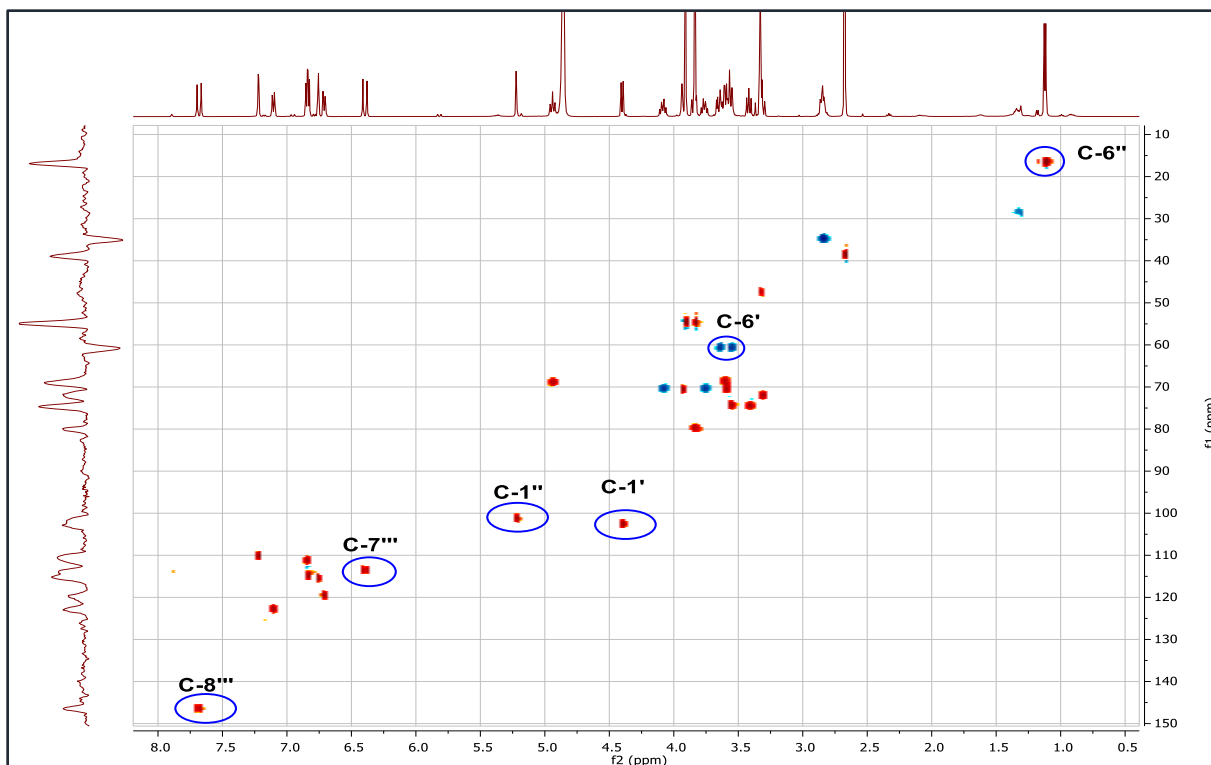


Fig.III.30 Spectre HSQC du composé A8

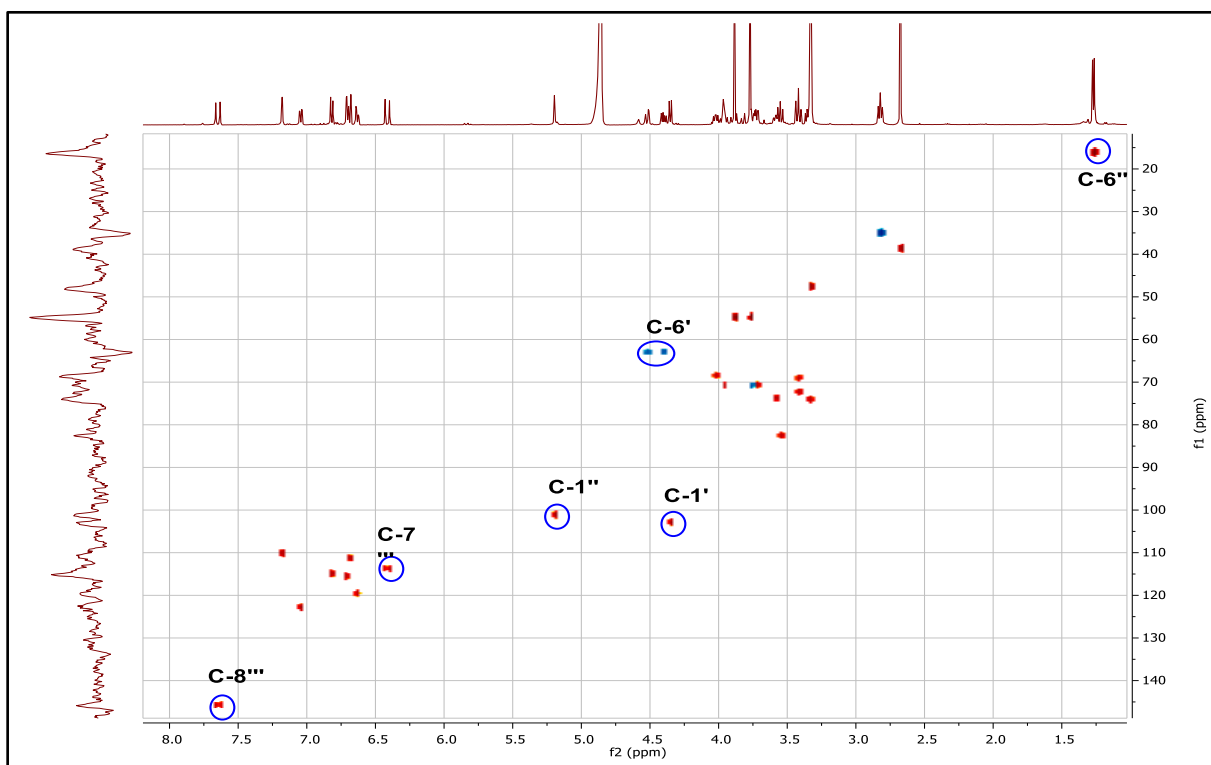


Fig.III.31 Spectre HSQC du composé A9

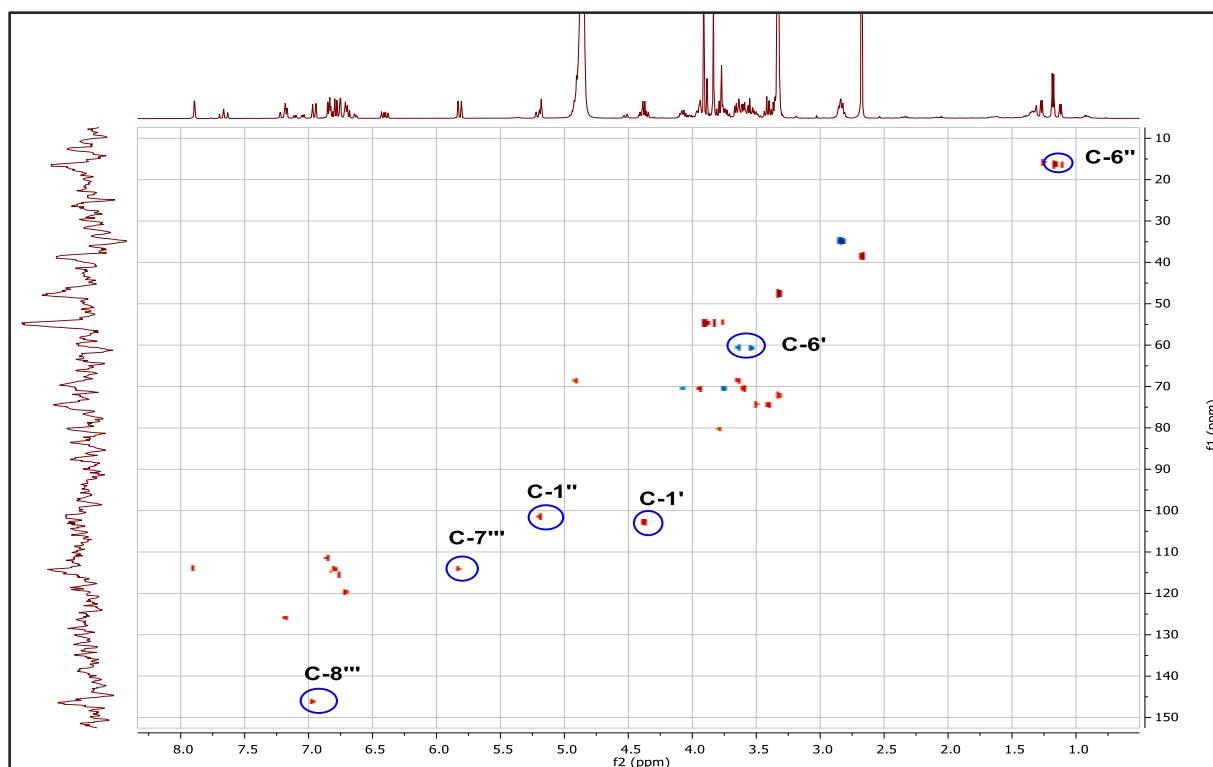
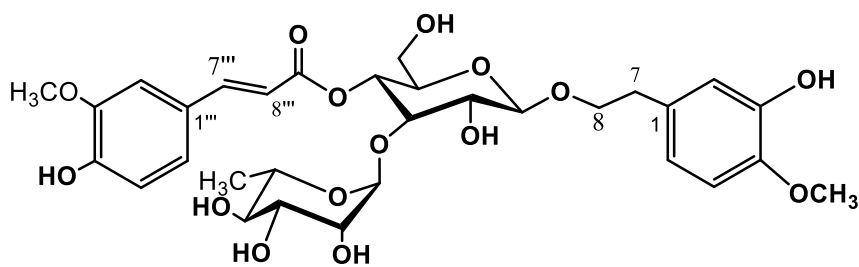


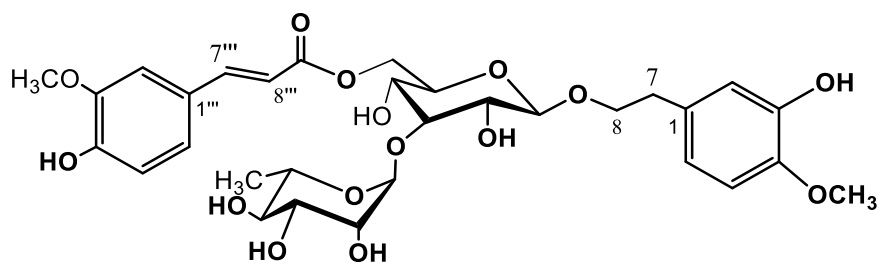
Fig.III.32 Spectre HSQC du composé A10

En comparant les déplacements chimiques des trois composés avec les données de la littérature nous avons pu déterminer qu'il s'agit de : composé **A8** est le martynoside (**L. Khodaie et al. 2019**) (Tab.III.9), le composé **A9** est l'isomartynoside (**I. Calis et al, 1984**) (Tab.III.10) et enfin le composé **A10** est le *cis*-martynoside (**Z. Skrzypek et al, 1999**) (Tab.III.11).



7''' -8''' = *trans*, martynoside A8

7''' -8''' = *cis*, *cis*-martynoside A10



Isomartynoside A9

Le martynoside est un phénylpropanoïde très répandu dans le genre *Verbascum*, tel que *V. macrurum* (N. Aligiannis et al. 2003), *V. salviifolium*, *V. undulatum*, *V. wiedemannianum* (I. Tatli, Z.S. Akdemir 2004) et *V. letourneuxii*, Asch. (S.S. Emam et al. 2010).

Le martynoside a des activités biologiques très remarquables comme antioxydant et antibactérien (I. I. Tatli et al. 2007).

L'isomartynoside est aussi isolé de *Verbascum macrurum* (N. Aligiannis 2003). Les tests biologiques effectués sur ce composé ont montré aussi une activité antioxydant et des effets anti Alzheimer (U. Kolak, 2011).

Le composé *cis*-martynoside est isolé du *Verbascum phlomoides* (L. N. Gvazava and V. S. Kikoladze 2007). Et il a un effet antibactérien (S. M. Zajdela et al. 2013).

Tableau.III.9 Déplacement des signaux de martynoside (A8) avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H (500MHz, CD ₃ OD) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C (125 MHz) δ (ppm) A8	RMN ¹ H (CD ₃ OD) δ (ppm), J(Hz) L. Khodaie 2019	RMN ¹³ C δ (ppm) L. Khodaie 2019
1(C)	-	/		132,93
2(CH)	6,76 (d, J =1,8)	115,3	6.75 (d, J = 1,7)	112,95
3(C)	-	/	-	147,98
4(C)	-	/	-	147,37
5(CH)	6,84 (d, J = 8,0)	114,3	6,82 (d, J = 8,0)	117,19
6(CH)	6,70 (dd, J =1,8; 8,0)	119,4	6,7 (dd, J = 1,7 ;8,0)	122,94
7(CH ₂)	2,84(dt, J =7,4;2,4)	35,1	2,83 (t, J = 7)	35,12
8(CH ₂)	3,75; 4,07 (m)	70,2	3,8- 4,1 sl	72,35
OMe	3,84(s)	54,7	3,82 (s)	53,39
1'(CH)	4,40(d, J =7,9)	102,7	4,38 (d, J = 7,8)	101,58
2'(CH)	3,56(m)	74,8	3,2-3,8	76,24
3'(CH)	3,83(m)	80,0	3,2-3,8	81,65
4'(CH)	4,94(1H, t, J =9,3)	69,1	3,2-3,8	70,74
5'(CH)	3,42(1H, t, J=7,4)	74,2	3,2-3,8	76,04
6'(CH ₂)	3,54,3,63(m)	60,8	3,2-3,8	62,49
1''(CH)	5,22 (d, J =1,3)	101,1	5,16 (d, J=1,7)	102,79
2''(CH)	3,92(m)	70,2	3,2-3,8	72,42
3''(CH)	3,30(m)	72,2	3,2-3,8	72,20
4''(CH)	3,54(m)	74,2	3,2-3,8	73,87
5''(CH)	3,99(m)	68,9	3,2-3,8	70,31
6''(CH ₃)	1,12(d, J =6,2)	16,4	1,08 (d, J = 6)	17,03
1'''(C)	-	/	-	127,71
2'''(CH)	7,22 (d, J=1,6)	109,4	7,2 (d, J = 1,5)	111,91
3'''(C)	-	/	-	149,41
4'''(C)	-	/	-	150,81
5'''(CH)	6,86(d, J =8,2)	111,2	6,79 (d, J = 7,7)	116,66
6'''(CH)	7,10 (d, J =1,6; 8,2)	122,6	7,09 (dd, J =1,5; 8,0)	124,46
7'''(CH)	7,69(d, J =15,9)	146,3	7,66 (d, J = 16)	148,03
8'''(CH)	6,40 (d, J =15,9)	113,4	6,38 (d, J = 16)	115,19
OMe	3,89 (s)	54,77	3,85 (3H, s)	53,49

/ : difficile à déterminer

Tableau.III.10 Déplacement des signaux de l'isomartynoside(A9) avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H (500MHz, CD ₃ OD) δ (ppm),J(Hz)	RMN ¹³ C (125 MHz) δ (ppm) A9	RMN ¹ H CD ₃ OD, δ (ppm), J(Hz) I. Calis 1984	RMN ¹³ Cδ (ppm) I. Calis 1984
1(C)	-	/	-	132,84
2(CH)	6,71 (d, J =1,8)	115,6	6,69 (d, J = 2,1)	112,84
3(C)	-	/	-	147,60
4(C)	-	/	-	147,92
5(CH)	6,69 (d, J = 8,2)	114,9	6,76(d, J = 8,2)	117,07
6(CH)	6,64 (dd, J =1,8; 8,2)	119,8	6,64 (dd, J = 2,1 ;8,2)	121,22
7(CH ₂)	2,82 (t, J=7,6)	35,0	2,80 (t, J=7,6)	36,70
8(CH ₂)	3,72 (dd, J=9,5; 3,4)	70,7	3,29-4,02	72,22
OMe	3,77 (s)	54,8	3,75 (s)	56,23
1'(CH)	4,35(d, J =7,9)	102,9	4,33 (d, J = 7,8)	104,41
2'(CH)	3,40 (m)	74,1	3,29-4,02	75,72
3'(CH)	3,54(m)	82,6	3,29-4,02	84,14
4'(CH)	3,41(m)	69,0	3,29-4,02	70,60
5'(CH)	3.32(m)	74,2	3,29-4,02	75,42
6'(CH ₂)	4,39; 4,52(m)	63,1	4,38; 4,49	64,78
1''(CH)	5,20 (d, J =1,2)	101,2	5,17 (d, J=1,0)	102,79
2''(CH)	3.96(m)	70,8	3,29-4,02	72,40
3''(CH)	3.41(m)	72,0	3,29-4,02	72,40
4''(CH)	3.56 m)	73,7	3,29-4,02	74,07
5''(CH)	4,01(m)	69,9	3,29-4,02	70,13
6''(CH ₃)	1.28(d, J =6.2)	16,2	1,25 (d, J = 5,1)	18,03
1'''(C)	-	/	-	127,72
2'''(CH)	7,18(d, J=1,6)	110,4	7,13 (d, J = 1,7)	111,73
3'''(C)	-	/	-	149,52
4'''(C)	-	/	-	150,80
5'''(CH)	6,81(d, J =8,2)	111,4	6,80 (d, J = 8,3)	116,55
6'''(CH)	7.04(dd, J =1,6; 8,2)	122,8	7,06 (dd, J =1,7; 8,3)	124,35
7'''(CH)	7,65(d, J =15,9)	146,1	7,61 (d, J = 16)	147,17
8'''(CH)	6,40(d, J =15,9)	113,9	6,37 (d, J = 15,9)	115,33
OMe	3,88(s)	54,8	3,86 (3H, s)	56,23

/ : difficile à déterminer

Tableau.III.11Déplacement des signaux de *cis*- martynoside (A10) avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H (500MHz, CD ₃ OD), <i>J</i> (Hz) δ (ppm) A10	RMN ¹³ C (125 MHz) δ (ppm) A10	RMN ¹ H(CD ₃ OD) δ (ppm), <i>J</i> (Hz) Z. Skrzypek 1999
1(C)	-	/	-
2(CH)	6,75 (d, <i>J</i> =2,0)	115,3	6,73 (d, <i>J</i> = 3,0)
3(C)	-	/	-
4(C)	-	/	-
5(CH)	6,79 (d, <i>J</i> = 8,2)	114,3	6,82 (d, <i>J</i> = 8,2)
6(CH)	6,71 (dd, <i>J</i> =2,0; 8,2)	119,4	6,68 (dd, <i>J</i> = 3,0 ;8,2)
7(CH ₂)	2,82 (2H, m)	35,1	2,80 ;2,86 (m)
8(CH ₂)	3,74; 4,06 (m)	70,1	3,70; 4,09 (m)
OMe	3,83(s)	54,7	3,81 (s)
1'(CH)	4,38 (d, <i>J</i> =7,9)	102,7	4,36 (d, <i>J</i> = 7,9)
2'(CH)	3,49(m)	74,8	3,40 (dd, <i>J</i> = 8,0; 9,1)
3'(CH)	3,77(m)	80,0	3,2-3,8
4'(CH)	4.90(m)	69,1	4,89 (t, <i>J</i> =9,6)
5'(CH)	3.39(m)	74,2	
6'(CH ₂)	3,53; 3,62(m)	60,8	
1''(CH)	5,18 (d, <i>J</i> =1,3)	101,1	5,16 (d, <i>J</i> =1,8)
2''(CH)	3,93(m)	70,2	3,92 (dd, <i>J</i> =1,8; 3,4)
3''(CH)	3,58(m)	72,2	3,52-3,71
4''(CH)	3.32 (m)	74,2	3,28- 3,32
5''(CH)	3,62(m)	68,9	3,52-3,71
6''(CH ₃)	1,18 (d, <i>J</i> =6,2)	16,4	1,16 (d, <i>J</i> = 6,2)
1'''(C)	-	/	-
2'''(CH)	7,89 (d, <i>J</i> =1,8)	109,4	7,87 (d, <i>J</i> = 2,0)
3'''(C)	-	/	-
4'''(C)	-	/	-
5'''(CH)	6,84(d, <i>J</i> =8,0)	111,2	6,77 (d, <i>J</i> = 8,4)
6'''(CH)	7,17(dd, <i>J</i> =1,8; 8,0)	122,6	7,16 (dd, <i>J</i> =2,0; 8,5)
7'''(CH)	6,96 (d, <i>J</i> =12,8)	146,3	6,94 (d, <i>J</i> = 13)
8'''(CH)	5,82 (d, <i>J</i> =12,8)	113,4	5,79 (d, <i>J</i> = 13)
OMe	3,83(s)	54,7	3,82 (3H, s)

/ : difficile à déterminer

III.2.1.8. Elucidation du composé A11 :

Lors de l'examen de l'analyse LC-UV-MS (Fig. III.33) de ce composé, une série de fragmentations a été détectée (597, 396, 395, 214).

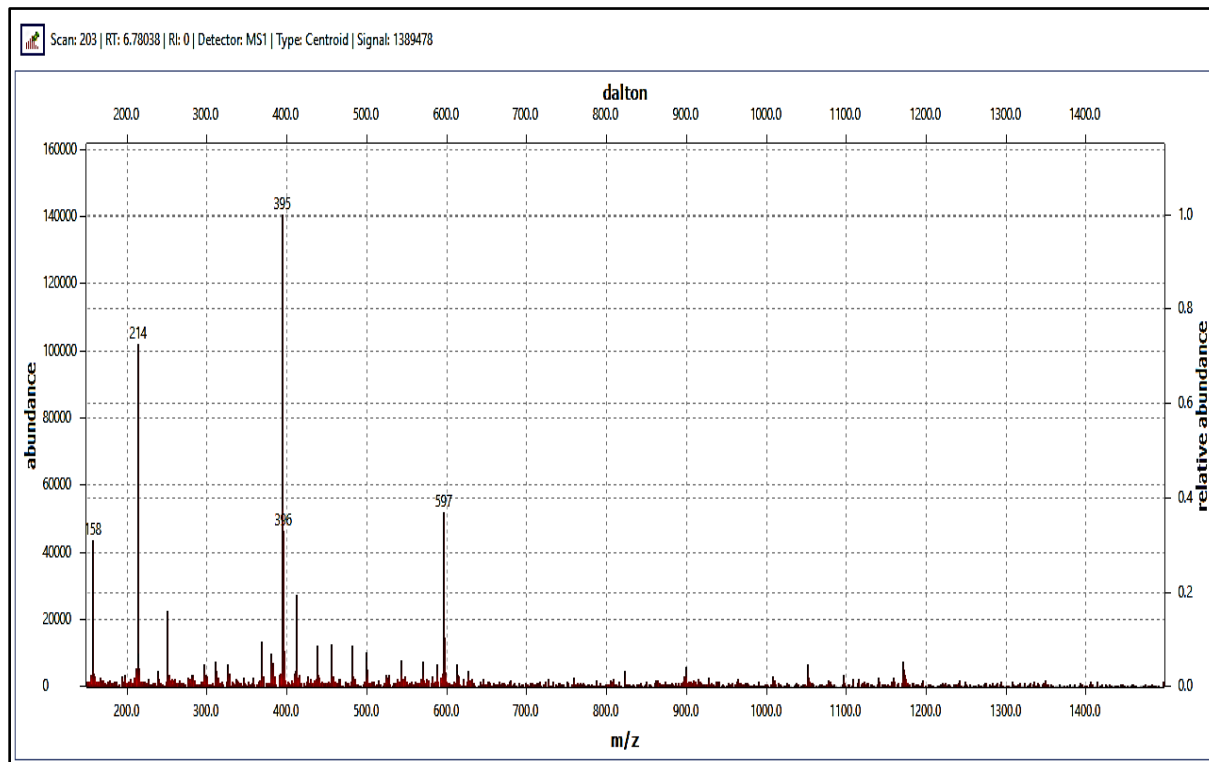


Fig.III.33 Spectre de masse ESI mode positif de A11

Les données du spectre RMN¹³C (Fig. III.35) indique la présence de 35 atomes de carbones dont : un à 104,88ppm caractéristique d'un carbone anomérique avec apparition de 5 signaux, s'étalant dans la zone de 65,60 à 77,57ppm indiquant ainsi la présence d'une unité osidique dans la molécule; quatre autres carbones oléfiniques à 121,21 ; 133,60 ; 142,13 et 143,37ppm respectivement.

L'analyse du spectre RMN¹H de ce composé (Fig. III.34) montre les signaux suivants :

- Des pics d'intégral 3H situés dans le champ fort qui peuvent correspondre aux méthyles d'une structure triterpénique:
 - Un signal à 0,53 ppm sous forme de singulet d'intégration 1H.
 - Un autre proton à 0,79ppm sous forme d'un singulet très large.
 - Un doublet ($J= 6,5$ Hz) portant 6H à 0,83 ppm.
 - Un proton sous forme d'un doublet ($J= 6,5$ Hz) à 1,01 ppm
 - Un pic d'intégration 1 proton sous forme d'un singulet à 1,24 ppm.
- Trois signaux oléfiniques :

- Un doublet de doublet ($J= 15,1$ et $8,7$) à $5,01$ ppm.
- Un doublet de doublet ($J= 15,0$ et $8,7$) à $5,14$ ppm.
- Un singulet large à $5,15$ ppm.
- Des signaux dispersés dans la zone de $0,5$ à 2 ppm. qui peuvent correspondre à des méthylènes.
- Des signaux sous forme des doublets et des multiplets dans la zone de $3,19$ à $3,85$ ppm qui sont caractéristiques des protons osidiques.
- Un doublet d'intégration $1H$ ($J= 7,7$ Hz) à $4,39$ ppm, correspondant au proton anomérique.
- Un signal sous forme d'un multiplet portant un proton à $3,65$ ppm qui peut être attribué au proton 3 d'un stigmastérol.

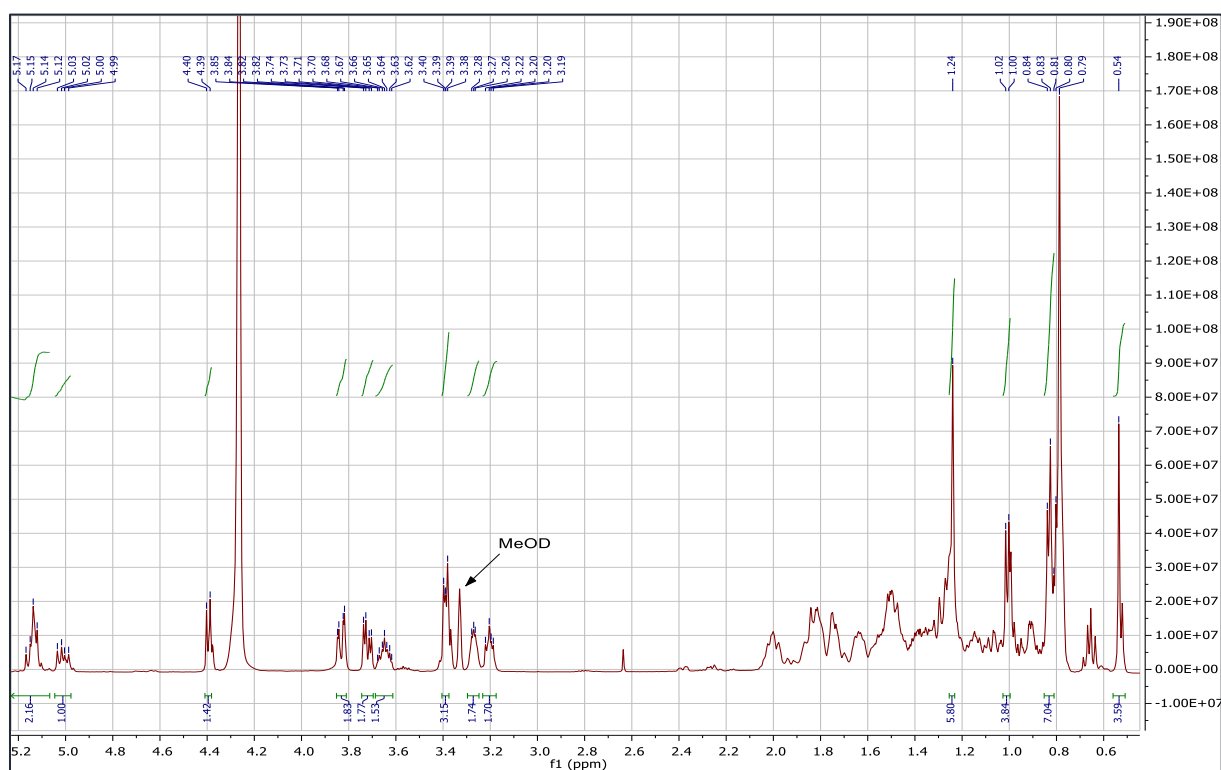


Fig.III.34 Spectre RMN¹H du composé A11 (CD₃OD/ CDCl₃, 500MHz)

Toujours dans spectres RMN¹H, on observe que tous les intégrations des signaux ne sont pas des chiffres entiers, en comparaison avec le signal à $5,01$ ppm correspondant à un proton. On conclue alors que ce composé peut comporter un mélange.

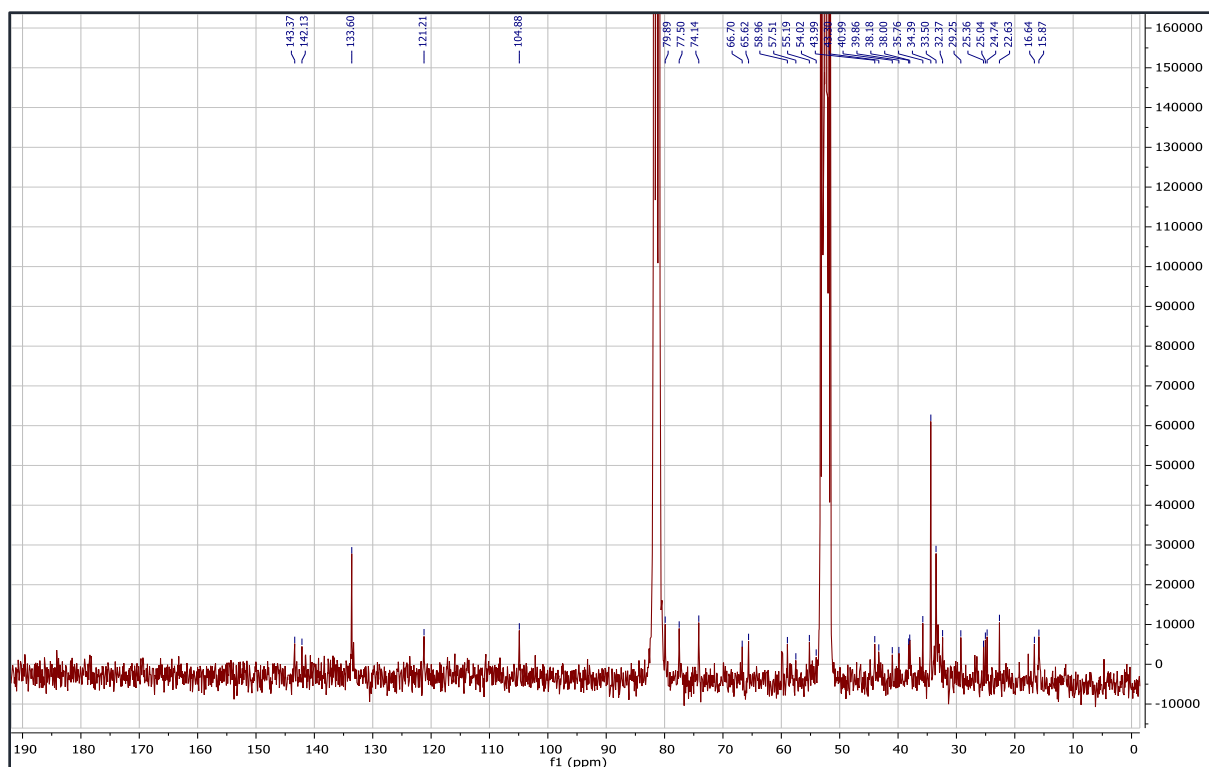
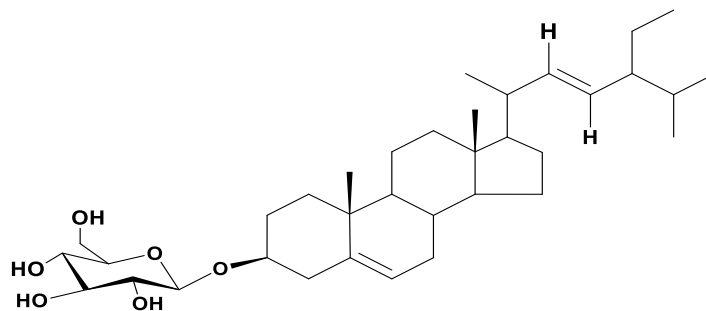
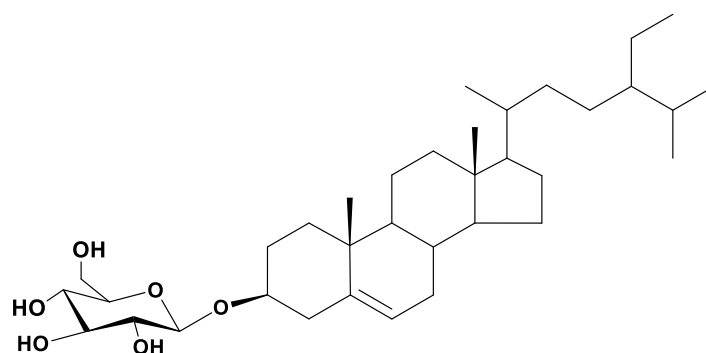


Fig.III.35 Spectre RMN¹³C de A11 (CD₃OD/ CDCl₃, 75 MHz)

La comparaison de l'ensemble des signaux de ce produit avec ceux du spectre RMN¹H du composé A4, nous indique que ce composé contient une génine stigmastérol. Le reste des signaux ressemblent à ceux d'un ose. Le signal sous forme de doublet à 4,39ppm et une constante de couplage $J = 7,7\text{Hz}$ peut nous orienter vers le β -glucose. Le déplacement chimique des autres signaux, en éliminant ceux de la génine sont ceux du sucre. On remarque aussi que le déplacement chimique de H3 du stigmastérol dans le composé A4 et dans la littérature (**P. L. Lokadi et al, 2015**) est vers 3,51 à 3,55ppm, mais dans le cas de ce composé il est apparait à 3.65 ppm donc il est plus déblindé. Ce qui nous emmène à dire qu'il peut être relié à un groupe oxygéné, et qu'il n'est pas juste hydroxylé. Cette constatation nous dirige vers la possibilité de rattachement du sucre en position 3. Cela est confirmé par les déplacements des différents carbones de ce composé (Fig. III.35) et avec les données de la littérature (Tab.III.12) de la structure de Stigmastérol 3-*O*-beta- glucoside. (**S. Saied and S. Begum 2004**), (**M. Khatun et al; 2012**). Comme que le mélange stigmastérol et β -sitostérol sont toujours inséparables, on constate que le composé A11 est bien le Stigmastérol 3-*O*-beta-glucoside et β - sitostérol 3-*O*-beta-glucoside.

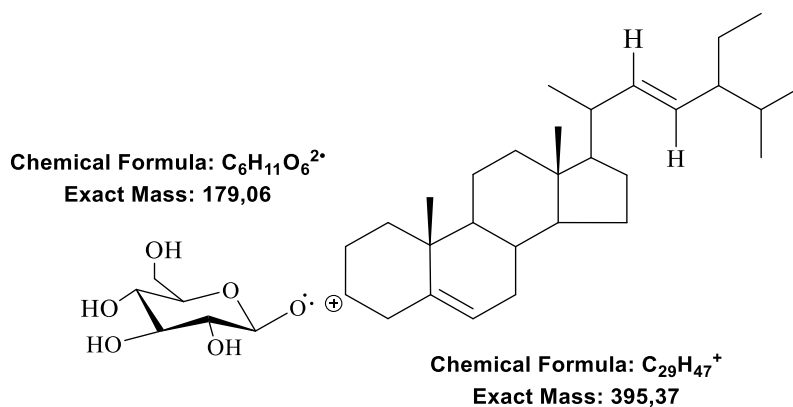


Stigmastérol- 3-O- β-glucoside



β-sitostérol - 3-O- β -glucoside

En admettant cette structure les fragmentations de la ESI-MS sont : $(597 = [C_{35}H_{58}O_6 + H + Na]^+)$, $395 = [C_{29}H_{47}]^+$.



Le composé stigmastérol glucoside est un neurotoxique (N. Kaur et al. 2011) et antibactérien (A. Ridhay et al. 2012).

Tableau.III.12: Déplacement des signaux de stigmasterol glucoside avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H(500MHz, CD ₃ OD/ CDCl ₃), δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C (125 MHz) δ (ppm)	RMN ¹ H (CD ₃ OD/ CDCl ₃), δ (ppm), J(Hz) M. Khatun 2012	RMN ¹³ C δ (ppm) M. Khatun 2012
1(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	38,0	1,15 (m)	37,15
2(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	35,7	1,44 (m)	31,78
3(CH)	3,65 (dt, J = 11,1 ; 6,4)	79,8	3,51 (m)	79,13
4(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	43,8	1,98 (m)	42,24
5(CH)	-	143,3	-	140,14
6(CH)	5,14 (sl)	121,2	5,34 (sl)	122,13
7(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	33,6	1,85 (m)	31,71
8(CH)	0,96-2,00 (m)	34,3	1,42 (m)	31,78
9(CH)	0,96-2,00 (m)	54,0	1,42 (m)	49,84
10(C)	-	39,8	-	36,63
11(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	26,4	1,42 (m)	19,81
12(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	40,9	1,42 (m)	38,65
13(CH)	-	43,9	-	42,24
14(CH)	0,96-2,00 (m)	59,6	1,42 (m)	56,66
15(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	24,3	1,77 (m)	24,19
16(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	31,6	1,77 (m)	28,14
17(CH)	0,96-2,00 (m)	58,9	1,77 (m)	55,96
18(CH ₃)	0,54 (s)	15,8	0,61 (s)	11,74
19(CH ₃)	0,79(s)	22,6	1,02 (s)	18,66
20(CH)	2,00 (m)	38,1	2,19(m)	39,66
21(CH ₃)	1,01 (d, J = 6,6)	24,7	0,84 (d)	20,96
22(CH)	5,12 (m)	142,1	5,08 (dd, J=12; 8)	138,04
23(CH)	5,01 (dd, J =15,2; 8,8)	133,6	4,96 (dd, J=12; 8)	129,30
24(CH)	0,96-2,00 (m)	55,1	2,21 (m)	51,16
25(CH)	0,96-2,00 (m)	33,5	2,16 (m)	31,83
26(CH ₃)	0,83 (d, J= 6,5)	25,3	0,75 (d, J=6,8)	19,21
27(CH ₃)	0,83 (d, J= 6,5)	25,0	0,74 (d, J=6,8)	18,90
28(CH ₂)	0,96-2,00 (m)	29,2	1,18 (m)	24,87
29(CH ₃)	0,79 (sl)	16,6	0,77 (t, J=6.9)	12,26

1'(CH)	4,39 (d, $J=7,7\text{Hz}$)	104,8	4,33 (d, $J=7,8\text{Hz}$)	100,98
2'(CH)	3,20-3,39(m)	74,1	3,31 (m)	74,26
3'(CH)	3,20-3,39(m)	77,5	3,31 (m)	76,91
4'(CH)	3,20-3,39(m)	66,7	3,31 (m)	70,06
5'(CH)	3,20-3,39(m)	77,5	3,39 (m)	76,75
6' (CH ₂)	3,72 ; 3,83 (m)	65,6	2,33 (m)	62,22

III.2.1.9. Elucidation du composé A12 :

L'analyse LC-UV-MS (Fig.III.36,37) du composé **A12** a donné un pic quasi moléculaire de m/z = 1128

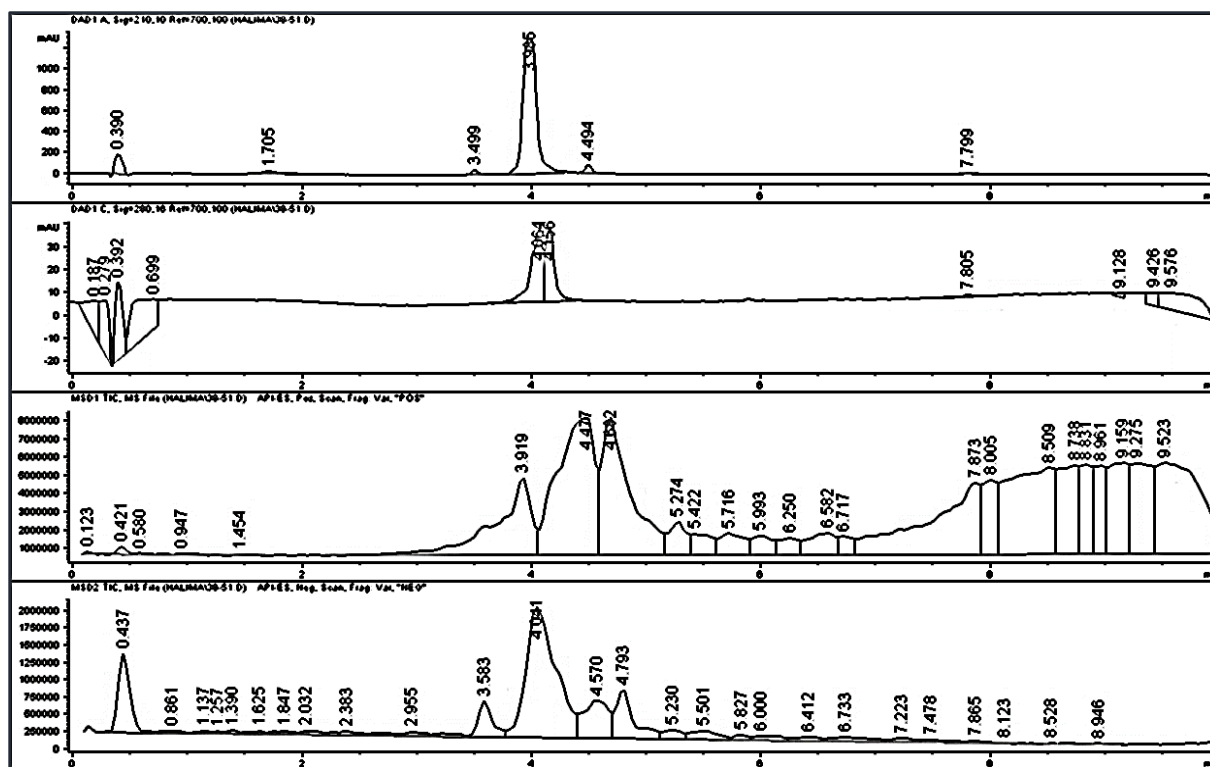


Fig.III.36 Chromatogramme LC-MS du composé A12

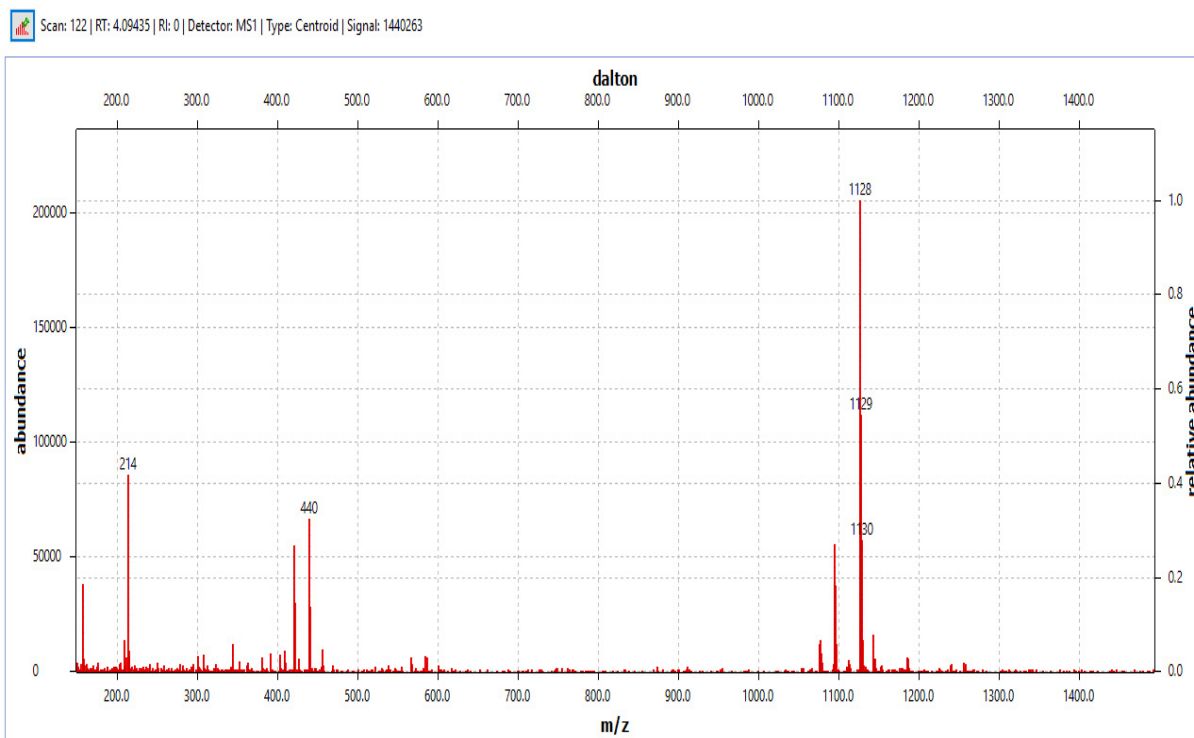


Fig.III.37 Spectre de masse ESI mode positif du composé A12

L'examen du spectre RMN¹H (Fig. III. 38) peut observer que les différents signaux apparus de 0,6 à 5,5ppm ont l'allure d'un triterpène osidique vue les protons caractéristiques suivants :

- Des signaux très remarquables dans la zone de 0,6 -1,2ppm, caractéristiques d'un ensemble de groupes méthyles. D'après l'intégration prise par rapport au signal du proton oléfinique à 5,25ppm (d, $J= 3,5\text{Hz}$, 1H) porté par le carbone à 122 ppm (Fig. III. 35), on peut conclure la présence de 6 groupements méthyles.
- Le proton oléfinique précédent couple avec un proton à 3,74ppm (dd, $J= 3,5\text{Hz}$ et 8,2 Hz, 1H) et corrèle aussi avec un carbone quaternaire à 148ppm, cela peut nous orienter vers un triterpène de type (12- 13) ène.
- La présence de 6 méthyles sous forme de singulets indique que le triterpène est de Type oléane (W. Seebacher et al. 2003).
- Selon cette structure triterpénique, on observe l'absence de deux méthyles, ce qui implique la substitution au niveau de leurs positions.
- Le proton sous forme de multiplet à 3,45ppm peut être attribué à la position 3 du squelette triterpénique, qui est en général substituée par un oxygène.

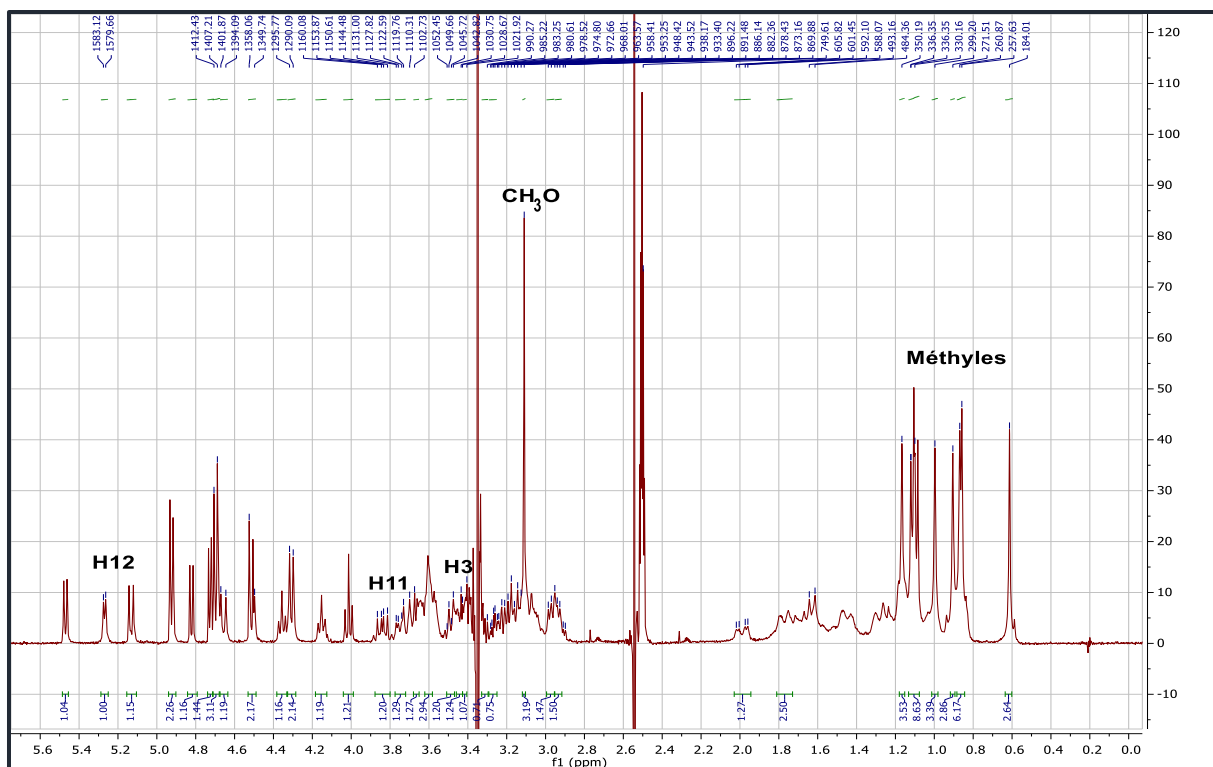


Fig.III.38 Spectre RMN¹H du composé A12 (DMSO-d₆, 300 MHz)

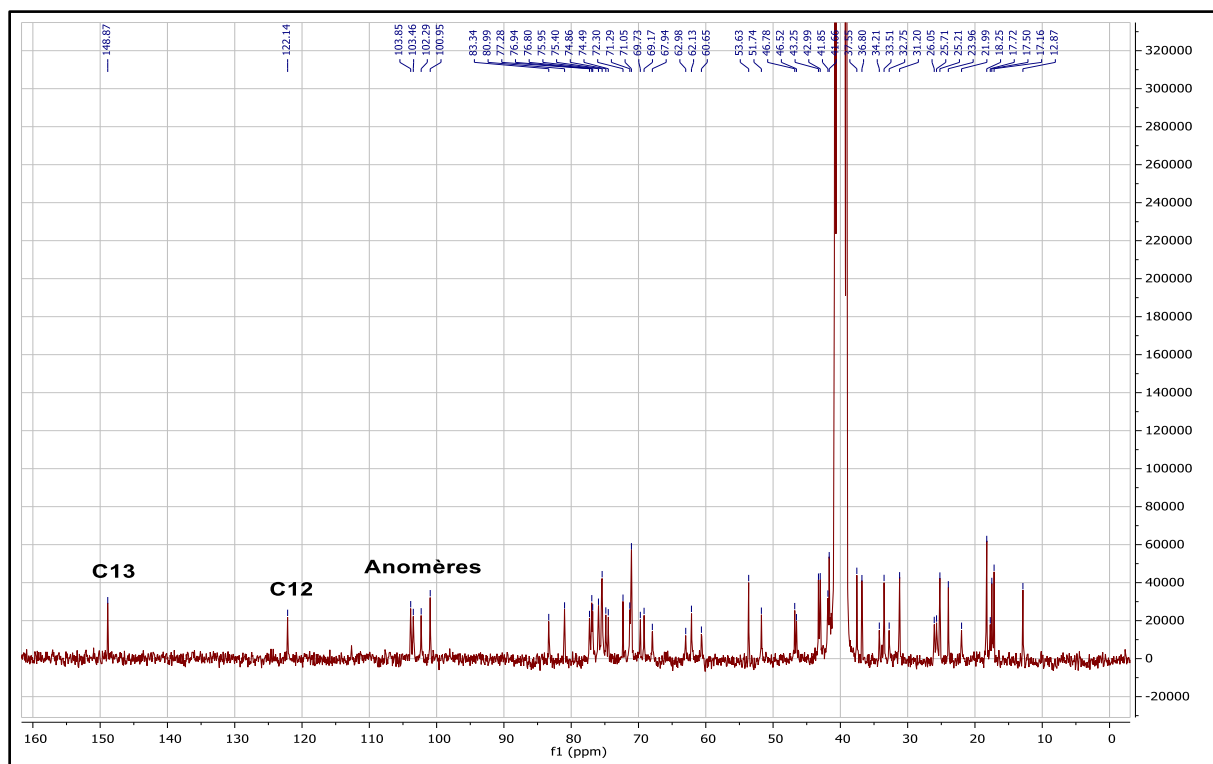


Fig.III.39 Spectre RMN¹³C du composé A12 (DMSO-d₆, 75 MHz)

Dans le spectre carbone 13 (Fig. III. 39), on observe un ensemble de carbones dans la zone de 100 à 104ppm qui peuvent être des carbones portant les protons anomères des entités osidiques. Cela est confirmé par les corrélations du spectre 2D HSQC (Fig. III. 40).

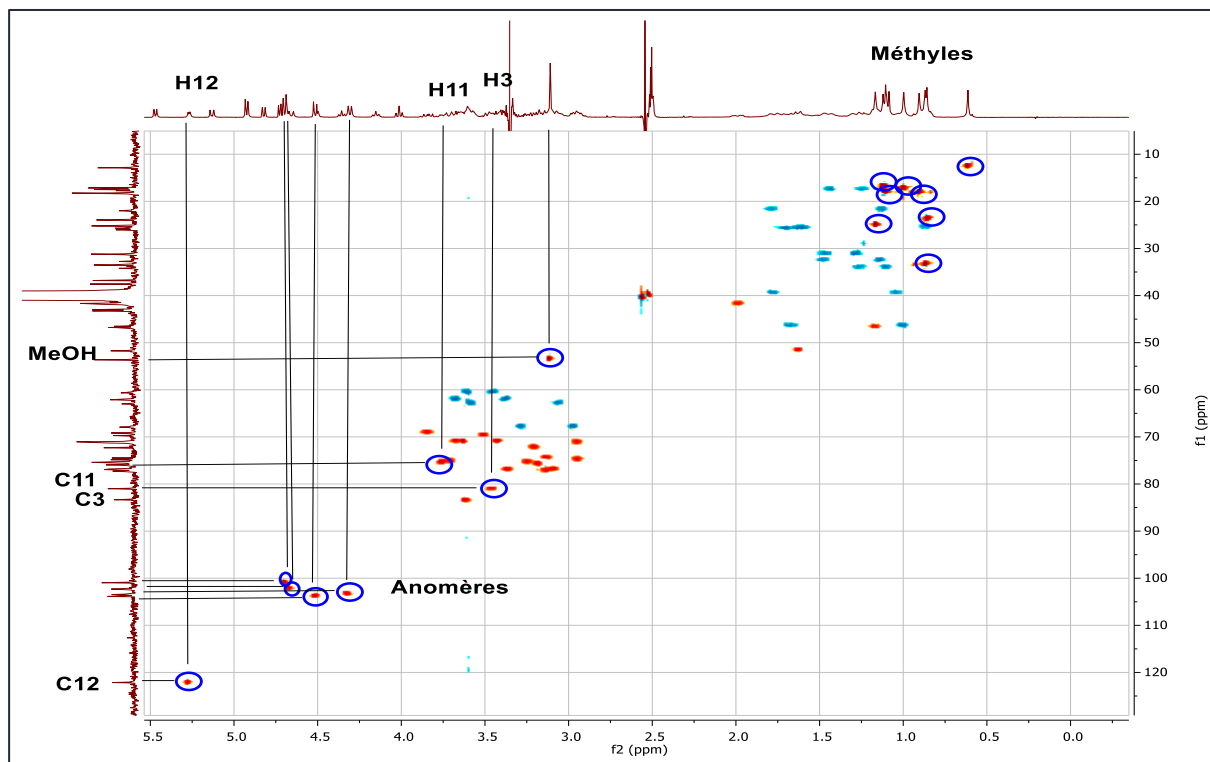


Fig.III.40 Spectre HSQC de composé A12

L'attribution de chaque entité de sucre est réalisée par les spectres 2D COSY, HMBC et HSQC (Fig. III. 41, III.42, III. 43, III. 44, III. 45 et III. 40) respectivement, où on peut constater la présence d'un fucose, deux glucoses et un rhamnose.

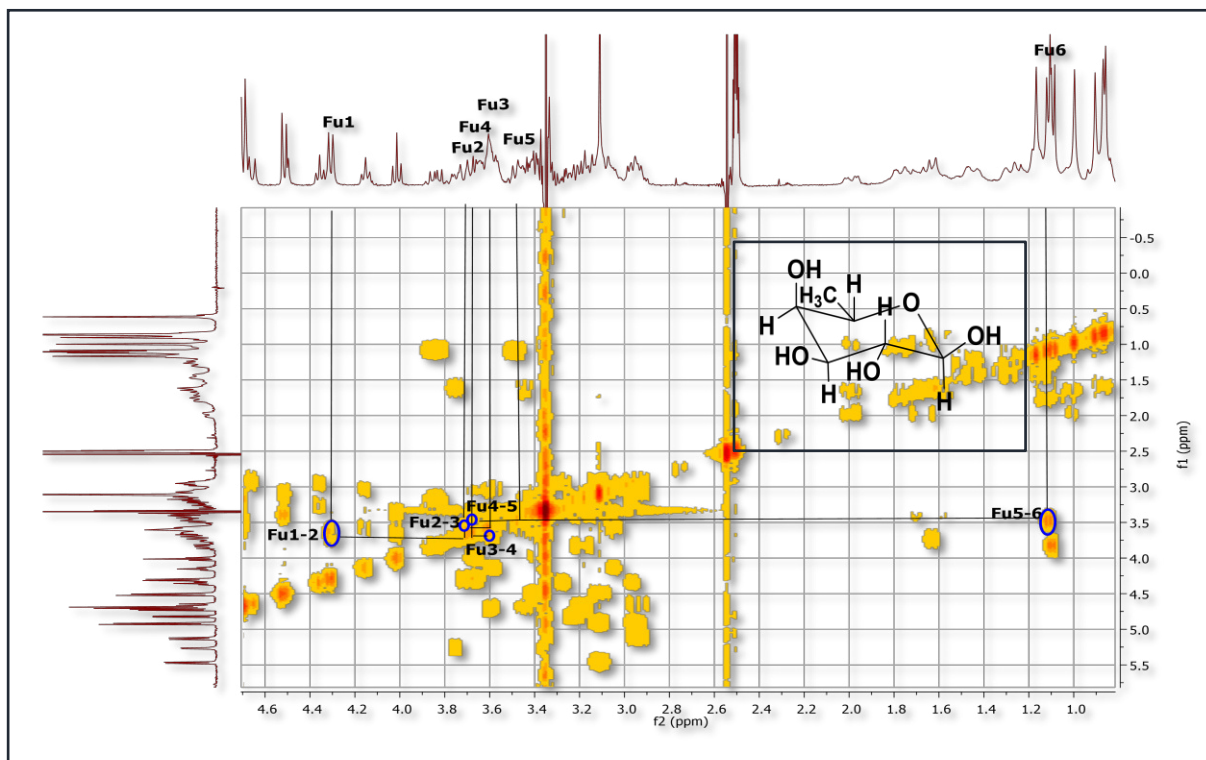


Fig.III.41 Spectre COSY de corrélations du fucose

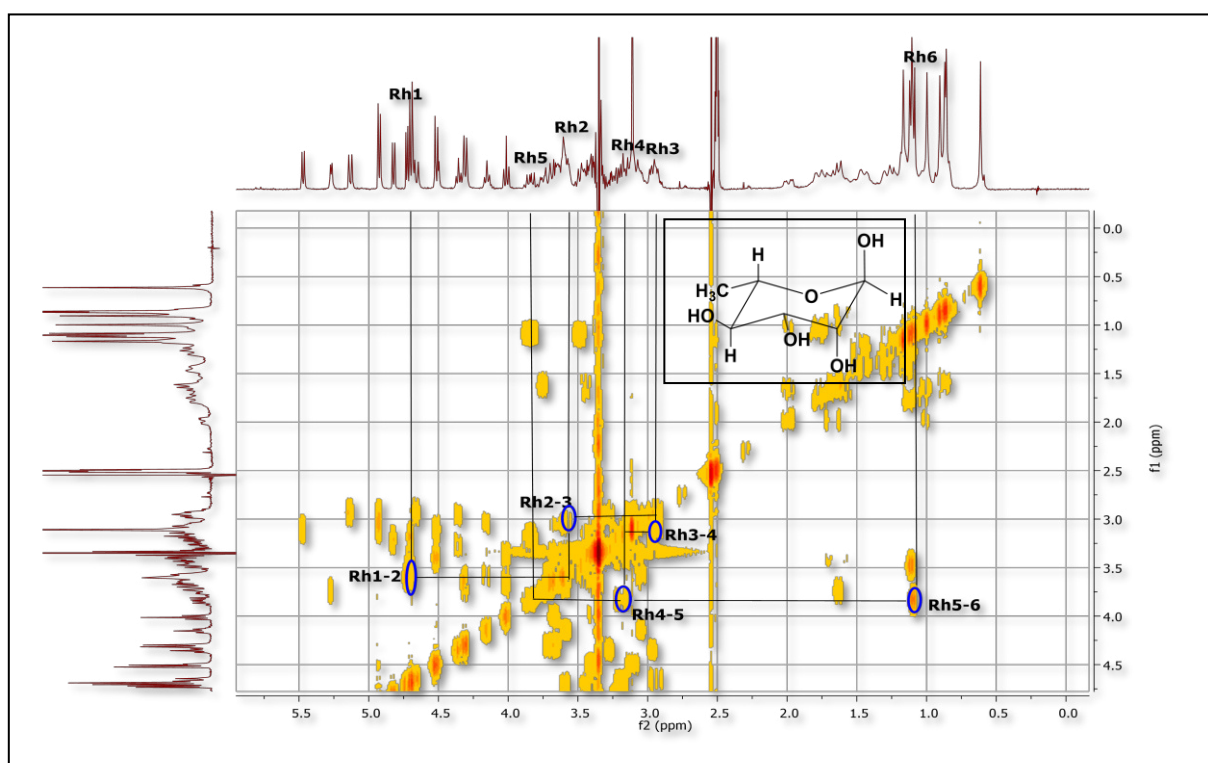


Fig.III.42 Spectre COSY de corrélations du rhamnose

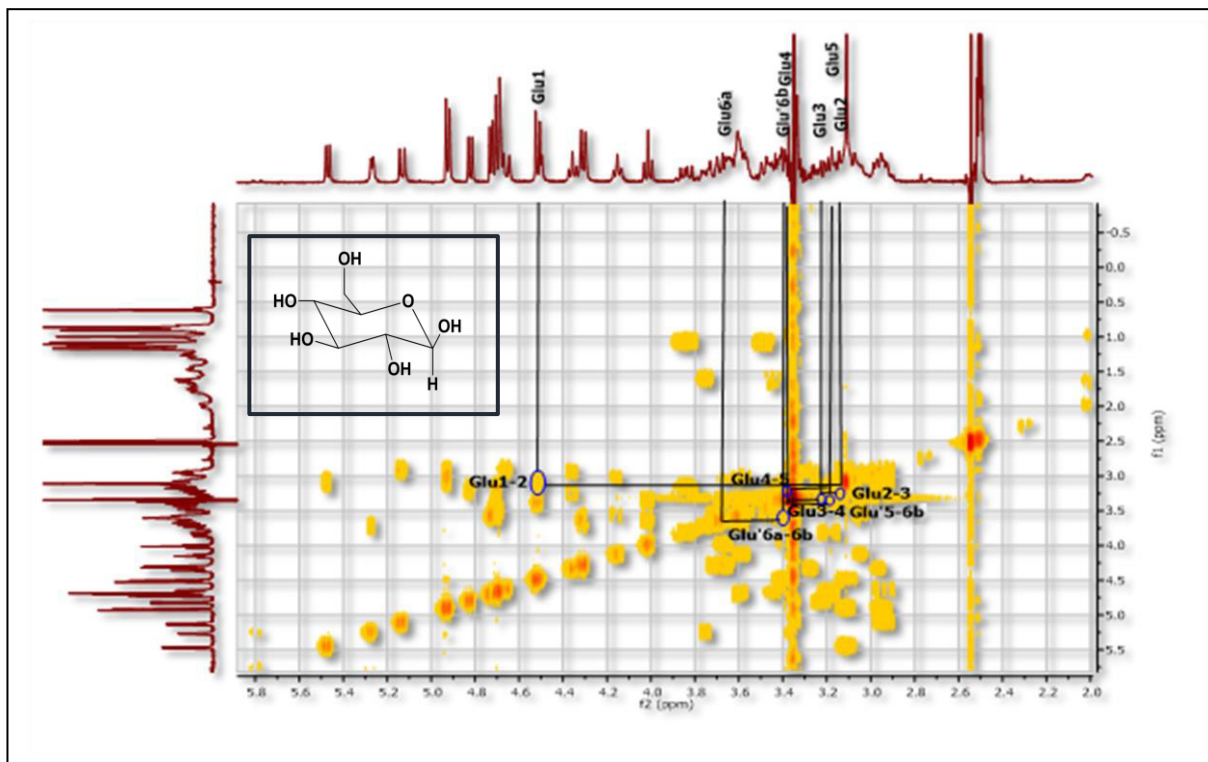


Fig.III.43 Spectre COSY de corrélations du glucose

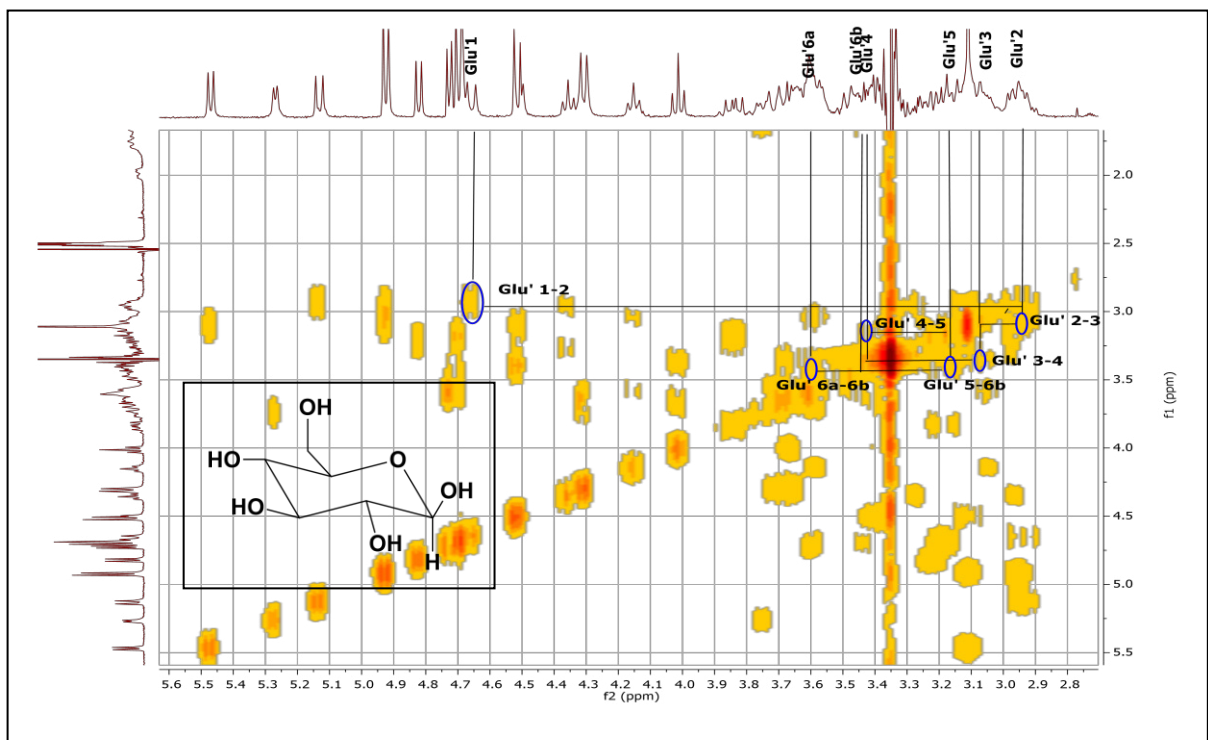


Fig. III.44 Spectre COSY de corrélations du glucose'

Le spectre 2D HMBC (Fig. III. 45) nous aide à retrouver les autres jonctions des quatre sucres par les tâches de corrélations suivantes :

- Une tâche de corrélation entre l'anomérique du fucose à 4,3ppm et le carbone en position 3 de la génine à 81,07ppm ce qui indique la liaison oxygène entre eux.
- Une tâche de corrélation entre le proton anomérique du glucose à 4,51ppm et le carbone 3 du fucose à 83,46 ppm.
- Une autre tâche de corrélation entre l'anomérique du deuxième glucose à 4,64ppm et le deuxième carbone du fucose à 75,33ppm.
- La dernière jonction est justifiée par la tâche de corrélation entre l'anomère du rhamnose à 4,70ppm et le carbone 4 du glucose à 76,93ppm.

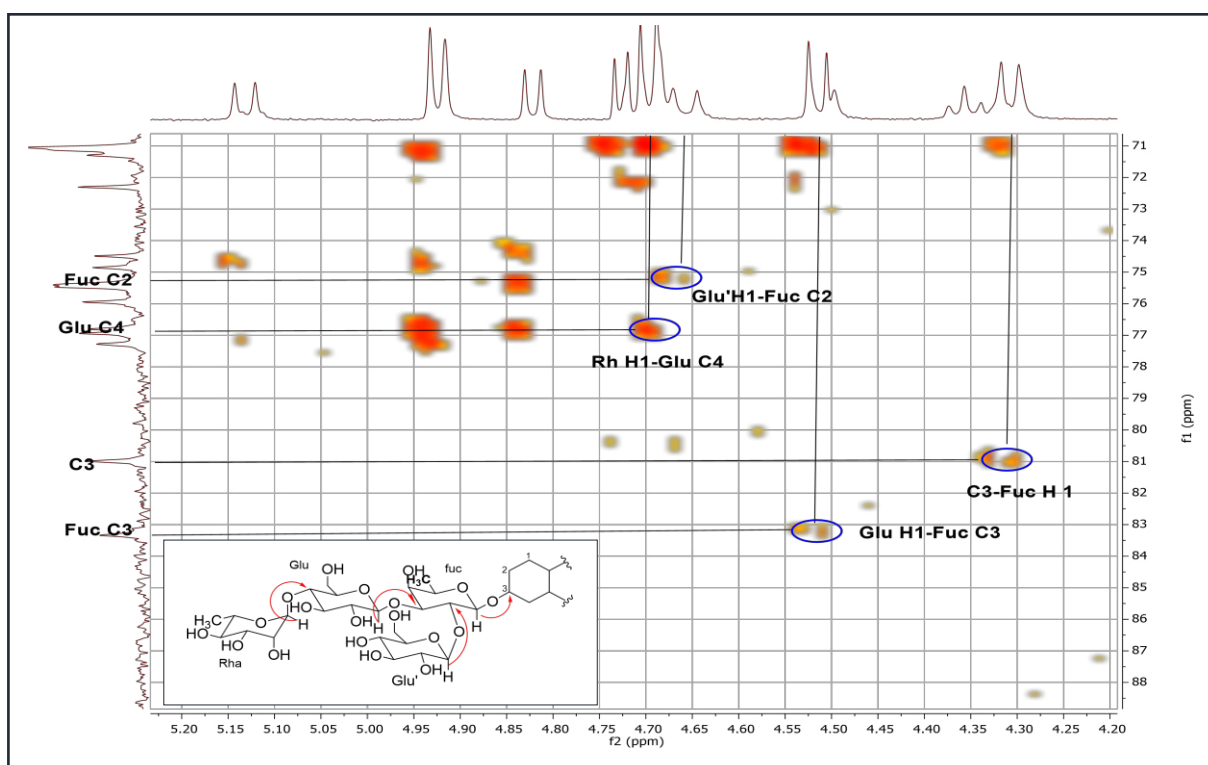
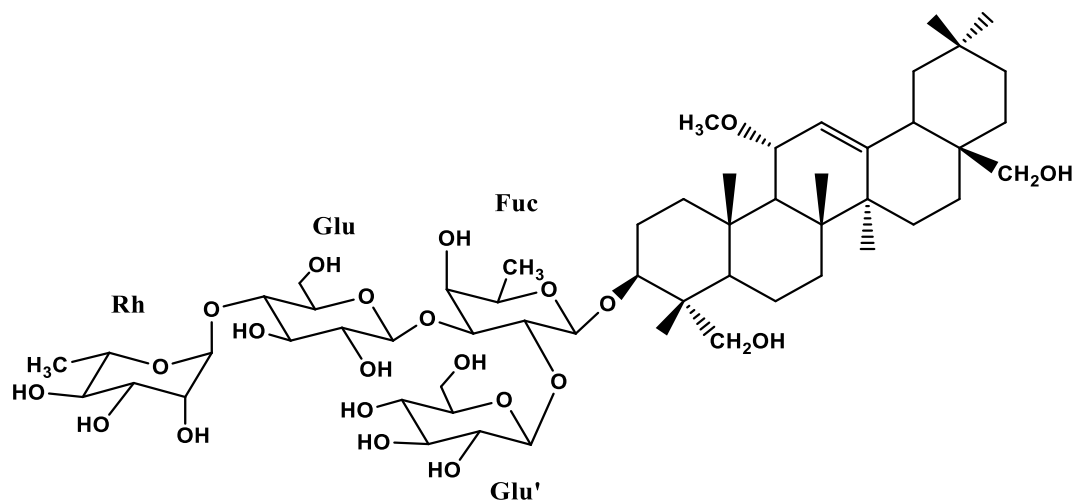


Fig.III.45 Spectre HMBC étalé montre les jonctions entre les entités sucres du composé A12

D'après la combinaison de toutes les données relatives à l'analyse mono et bidimensionnelle de ce composé, et les données de la littérature (I. Caliş et al. 1993)(Tab.III.13), la structure est celle de l'ilwensisaponine C.



3-O- $\{\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3) - [β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)] - β -D-fucopyranosyl} - 11 α -methoxyoléan-12-ène-23,28diol.

Tableau.III.13: Déplacement des signaux de ilwensisaponine Avec la référence

N °	RMN ¹ H(300MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C(75 MHz) δ (ppm)	RMN ¹³ C (CD ₃ OD), δ (ppm) I. Caliş 1993
1(CH ₂)	1,04; 1,76 (m)	39,4	40,8
2(CH ₂)	1,69 (m)	25,6	26,8
3(CH)	3,44 (m)	80,9	85,6
4(C)	-	43,2	44,5
5(CH)	1,16 (m)	46,7	48,8
6(CH ₂)	1,23; 1,42(m)	17,6	18,9
7(CH ₂)	1,46; 1,12(m)	32,5	33,8
8(C)	-	41,6	42,9
9(CH)	1,62(d, J = 8,7 Hz)	51,6	53,4
10(C)	-	37,1	38,0
11(CH)	3,76(dd, J= 3,5; 8,6)	75,3	77,6
12(CH)	5,27 (d, J= 3,5)	122,1	122,9
13(C)	-	148,8	150,6
14(C)	-	43,0	44,4
15(CH ₂)	0,83/1,60(m)	25,6	26,7
16(CH ₂)	1,11/1,79(m)	21,8	22,8
17(CH)	-	37,9	38,8
18(CH)	2,00(dd, J= 13,2; 3,9)	41,7	43,4
19(CH ₂)	0,99; 1,66(m)	46,4	47,7
20(C)	-	31,2	31,9
21(CH ₂)	1,24; 1,09(m)	34,0	35,3
22(CH ₂)	1,45; 1,26(m)	31,1	32,2
23(CH ₂)	3,65; 3,37(m)	62,8	64,7
24(CH ₃)	0,63(s)	12,7	13,2
25(CH ₃)	1,00(s)	17,3	16,9
26(CH ₃)	0,91(s)	18,2	18,8
27(CH ₃)	1,17(s)	25,0	25,7
28(CH ₂)	2,95; 3,27 (m)	67,8	69,8
29(CH ₃)	0,88	33,3	33,7
30(CH ₃)	0,86	23,8	24,0

Entités sucre	RMN ¹ H δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C δ (ppm)	RMN ¹³ C I. Caliş 1993
1(CH) fucose	4,32(d, J=7,9)	103,4	105,1
2(CH)	3,705(m)	75,2	78,3
3(CH)	3,61(m)	83,4	84,3
4(CH)	3,67 (m)	70,9	72,4
5(CH)	3,49 (m)	69,6	71,3
6(CH₃)	1,10 (d, J = 6,1)	18,0	17,8
1(CH) glucose'	4,64 (d, J=7,7)	102,2	103,5
2(CH)	2,94(m)	74,7	76,0
3(CH)	3,09(m)	76,8	78,3
4(CH)	3,42(m)	70,9	72,2
5(CH)	3,13(m)	77,0	76,8
6(CH₂)	3,45/3,60(m)	60,4	61,7
1(CH) glucose	4,51(d, J=7,8)	103,8	104,7
2(CH)	3,13(m)	74,4	75,4
3(CH)	3,24(m)	75,3	76,8
4(CH)	3,37(m)	76,9	79,3
5(CH)	3,18(m)	75,7	76,4
6(CH₂)	3,38 ;3,66(m)	62,0	63,6
1(CH) rhamnose	4,69(d, J=7,3) (m)	100,9	102,9
2(CH)	3,62(m)	70,9	72,7
3(CH)	2,94(m)	71,1	72,3
4(CH)	3,20(m)	72,2	73,7
5(CH)	3,84(dd, J = 9,4 ;6,2)	69,11	70,7
6(CH₃)	1,11(d, J = 6,2)	16,9	17,9
OCH₃	3,11 (s)	53,6	54,3

III.2.1.10. Elucidation du composé A13:

Les données de la chromatographie HR-ESI-MS (Fig.III.46,47) révèle une formule brute : C₅₄H₈₈O₂₁ avec $m/z = 1072, 5828$ affichant 11 insaturations.

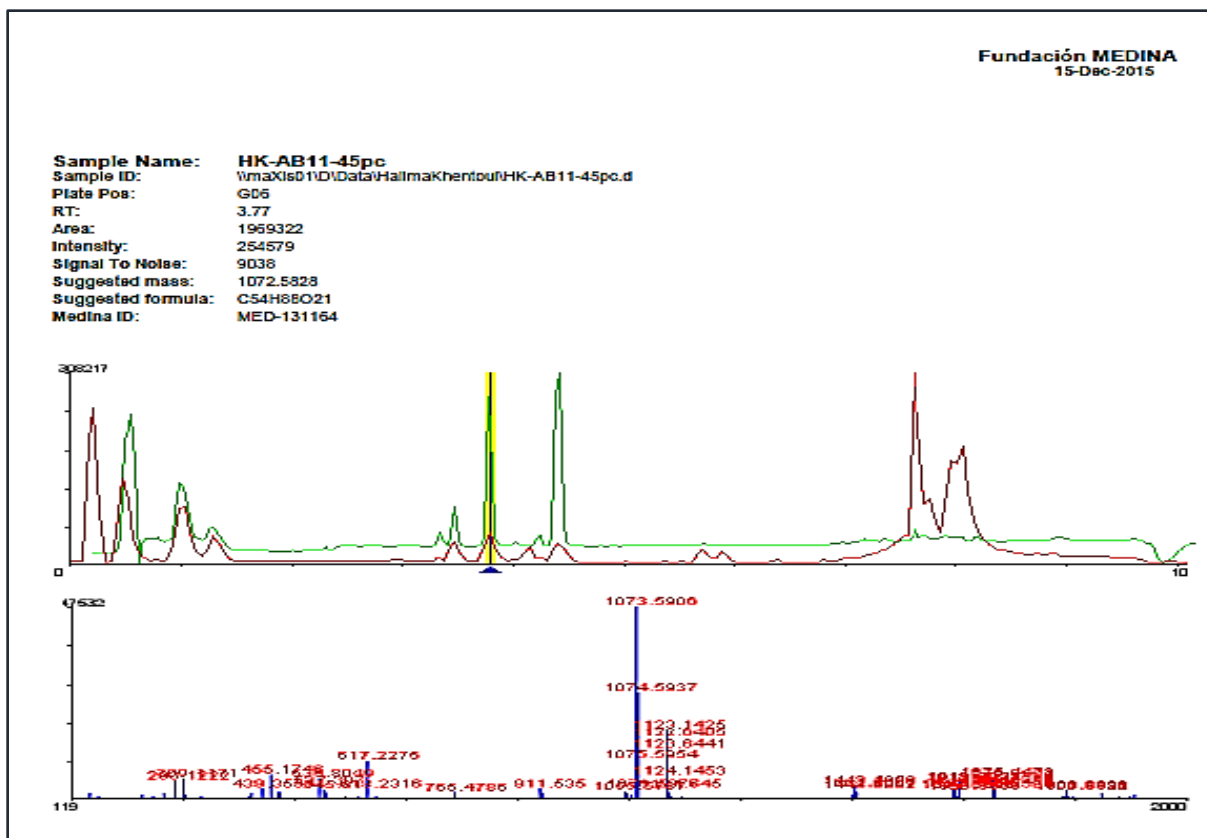


Fig.III.46 Données spectrales du composé A13 par la technique HR-ESI-MS en utilisant l'application Bruker maXis QTOF

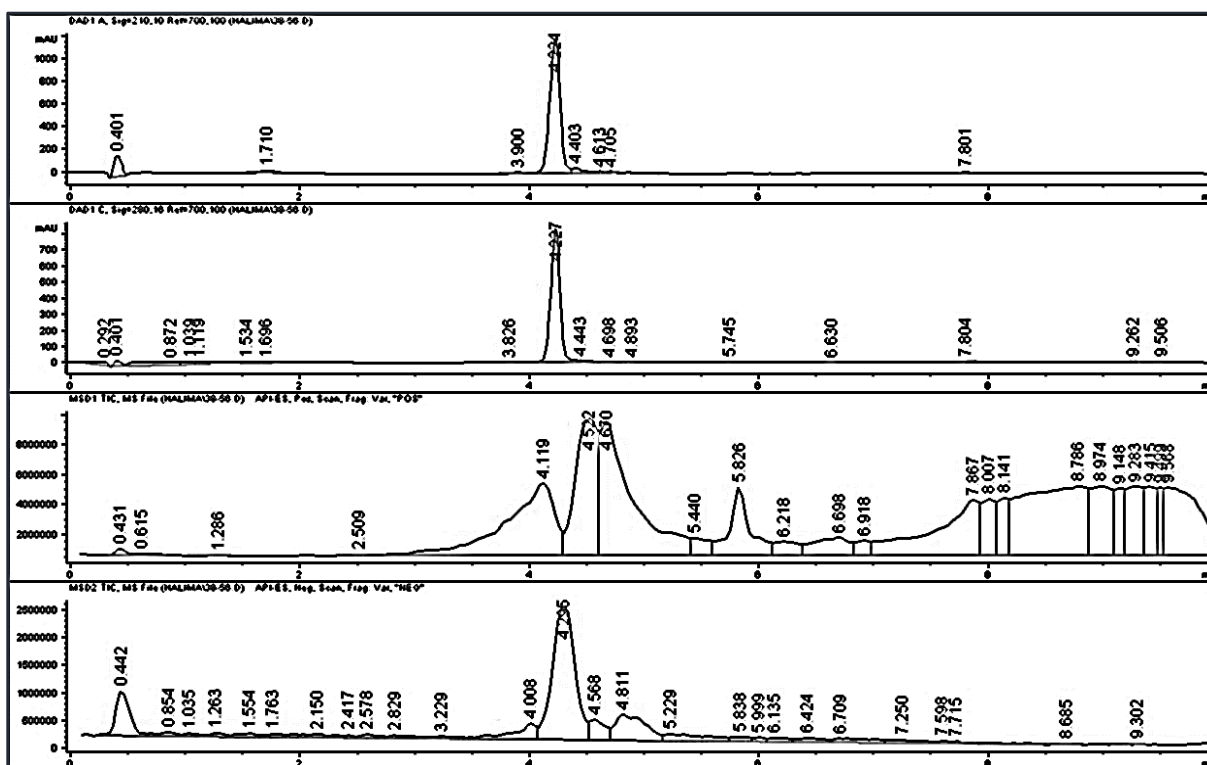


Fig.III.47 Chromatogramme LC-MS du composé A13

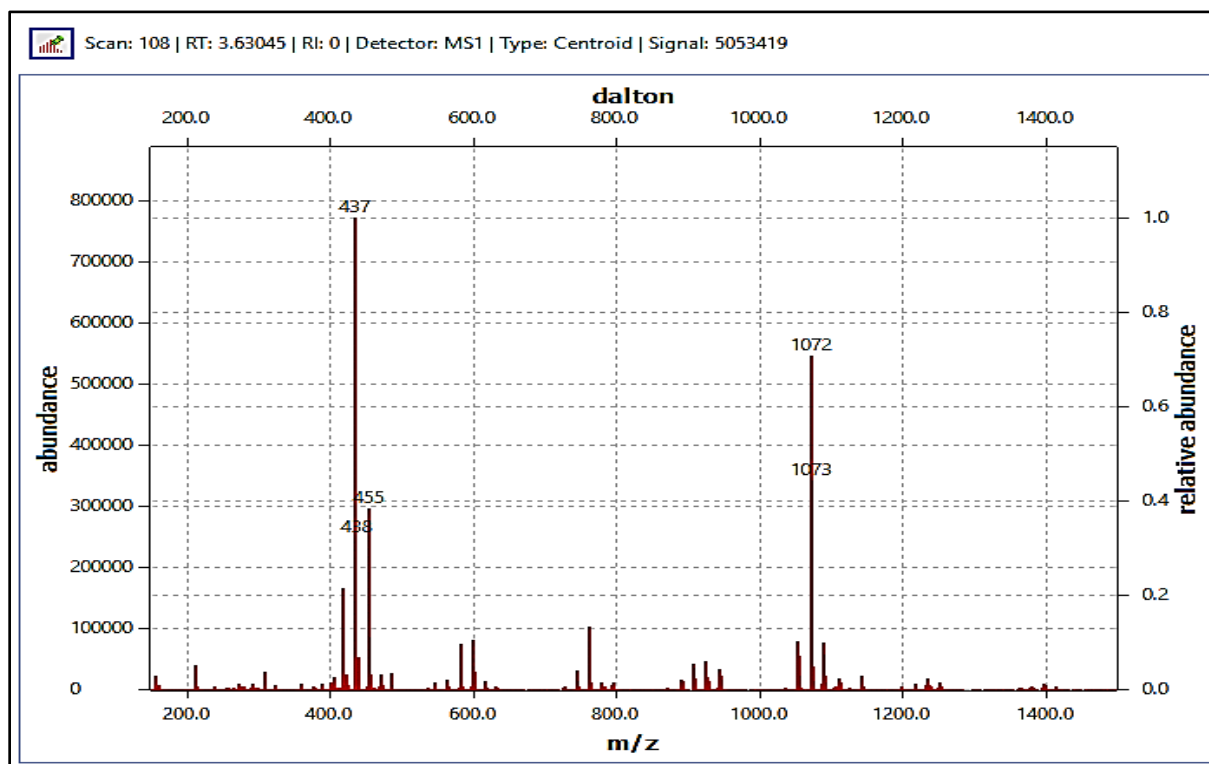


Fig.III.48 Spectre de masse ESI mode positif du composé A13

L'examen du spectre RMN¹H (Fig. III. 49) de ce composé permet d'observer que les différents signaux qui apparaissent de 0,6ppm à 6, 41ppm sont très proches de ceux du spectre RMN¹H du composé **A12** c'est-à-dire de celui d'un triterpène osidique de type Oléane vue les protons caractéristiques suivants :

- Des signaux de méthyles dans la zone de 0,6 à 1,2 ppm.
- Des protons anomériques à 4,47ppm (d, $J= 7,8\text{Hz}$) et 4,61ppm (d, $J=7,7\text{ Hz}$) et un doublet d'intégration 2H (d, $J=7,6\text{ Hz}$) à 4,85ppm.
- Le reste des protons osidiques apparaissent dans la zone de 3-4ppm.

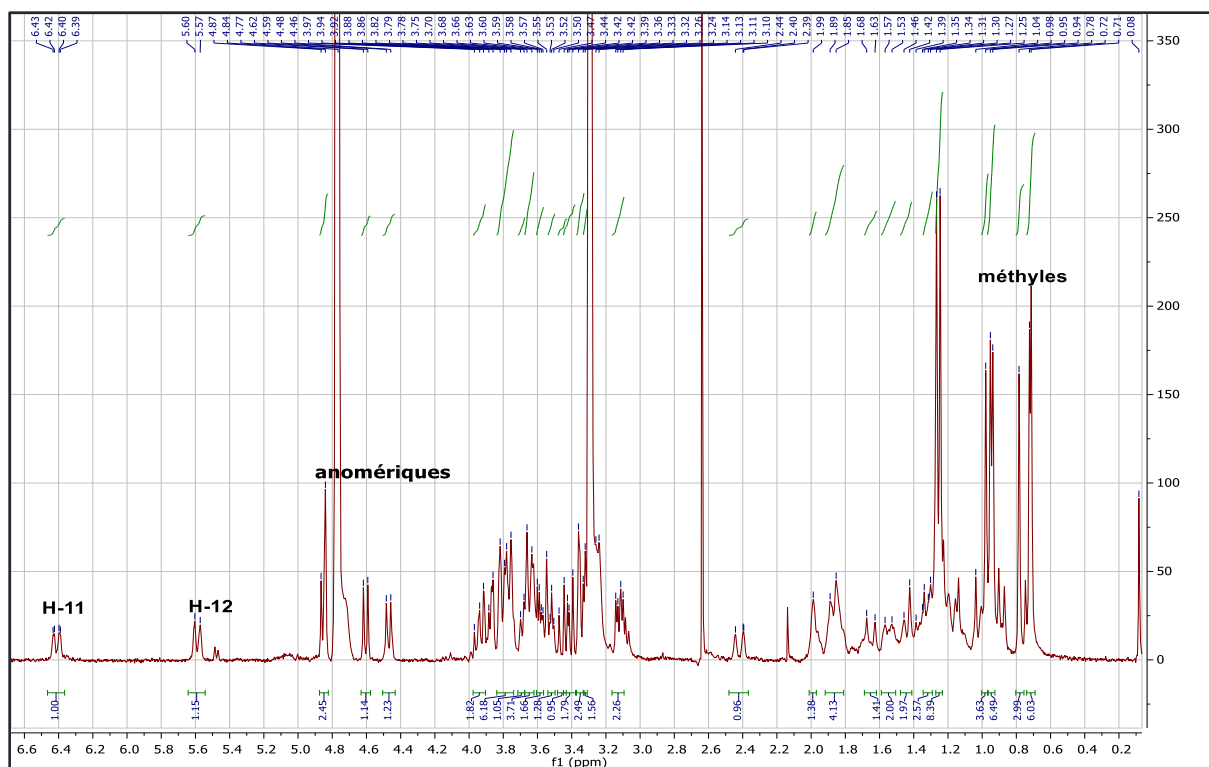


Fig. III.49 Spectre RMN¹Hdu composé A13 (CD₃OD,400MHz)

On observe aussi sur le même spectre, un proton à 5,59ppm (d, $J=10,5\text{Hz}$) et un autre à 6,41ppm (dd, $J=10,5\text{Hz}, 2,3\text{Hz}$). Selon leurs déplacements chimiques et la valeur de leur constante de couplage ($J=10,5\text{ Hz}$), on peut dire qu'il s'agit de deux protons oléfiniques de configuration *cis*.

Le spectre carbone ¹³C (Fig. III. 50) confirme les données du spectre RMN¹H avec:

- les carbones des méthyles à 11,24; 0,72; 0,78; 0,94; 0,95; 0,98 ppm (mettre les carbones 97
- les anomères à 101,45ppm ; 102,08ppm; 103,30ppm et 103,71ppm.
- les carbones liés aux sucres sont présents dans la zone de 60 à 84 ppm.
- les carbones oléfiniques sont à 125,02ppm ; 125,71ppm ; 134,52ppm et 136,18ppm.

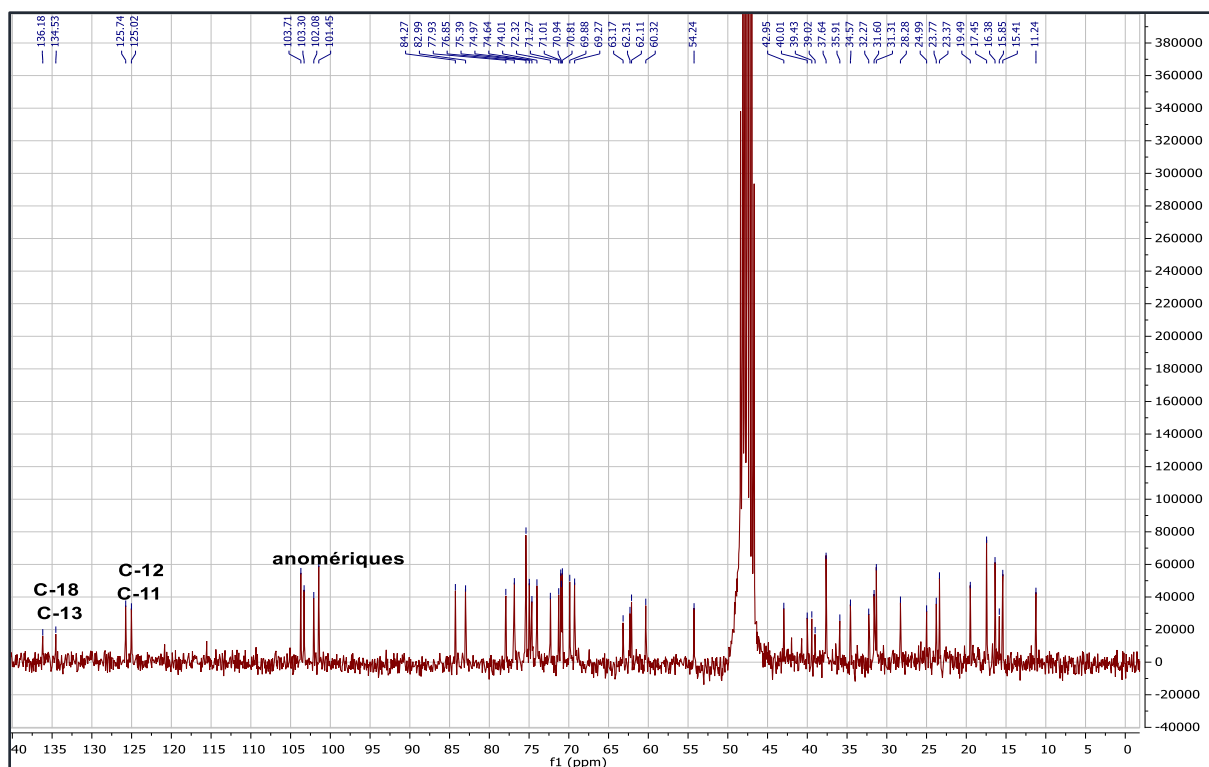
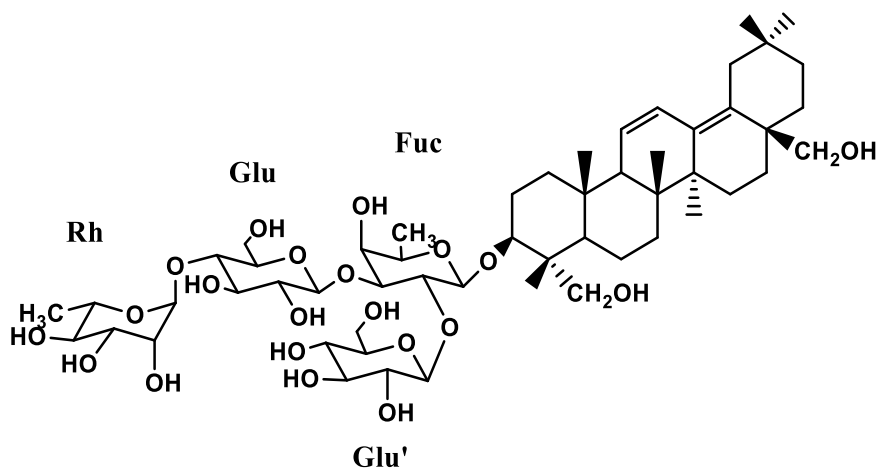


Fig.III.50 Spectre RMN¹³C du composé A13 (CD₃OD, 100 MHz)

En comparant ces données spectrales (Tab. III. 14), avec ceux de la bibliographie (I. Caliş et al. 1993) on peut dire qu'il s'agit de l'ilwensisaponine B, d'où la structure suivante :



3-O- $\{\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3) - [β -Dglucopyranosyl (1 \rightarrow 2)] -
 β -d-fucopyranosyl} -olean-11-13(18) -diène $23\alpha,28$ diol

Tableau.III.14Déplacement des signaux de ilwensiaponine B avec ceux de la référence

N°	RMN ¹ H (400MHz, CD ₃ OD) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C(100 MHz) δ (ppm)	RMN ¹³ C (CD ₃ OD), δ (ppm) I. Caliş 1993
1(CH ₂)	1,2-2,0	39,4	39,1
2(CH ₂)	1,2-2,0	28,2	24,8
3(CH)	3,44 (m)	82,9	85,7
4(CH ₂)	-	41,9	43,4
5(CH)	1,2-2,0	46,6	48,2
6(CH ₂)	1,2-2,0	17,4	18,9
7(CH ₂)	1,2-2,0	32,2	33,0
8(C)	-	40,0	40,8
9(CH)	1,2-2,0	54,2	55,4
10(C)	-	35,9	37,3
11(CH)	6,41(dd, J= 2,7; 10,5)	125,7	127,2
12(CH)	5,59 (d, J= 10,5)	125,0	126,5
13(C)	-	136,1	137,8
14(C)	-	40,9	41,4
15(CH ₂)	1,2-2,0	24,9	33,0
16(CH ₂)	1,2-2,0	23,2	26,3
17(C)	2,4	42,9	44,4
18(C)	-	134,5	135,9
19(CH ₂)	1,2-2,0	39,0	39,1
20(C)	-	31,5	33,7
21(CH ₂)	1,2-2,0	34,5	36,0
22(CH ₂)	1,2-2,0	31,3	29,7
23(CH ₂)	3,2-4,0	62,3	63,7
24(CH ₃)	0,71(s)	11,2	12,7
25(CH ₃)	0,74(s)	16,3	18,9
26(CH ₃)	0,78(s)	19,4	21,0
27(CH ₃)	0,94(s)	15,8	16,9
28(CH ₂)	3,2-4,0	63,1	64,5
29(CH ₃)	0,98(s)	31,6	32,8
30(CH ₃)	0,95(s)	23,7	24,8

Entités sucre	RMN ¹ H δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C δ (ppm)	RMN ¹³ C I. Caliş 1993
1(CH) fucose	4,47(d, J=7,8)	103,3	105,1
2(CH)	3,2-4,0	74,9	78,3
3(CH)	3,2-4,0	84,2	84,4
4(CH)	3,2-4,0	71,0	72,4
5(CH)	3,2-4,0	69,8	71,3
6(CH₃)	1,26 (d, J = 6,3)	17,4	17,8
1(CH) glucose'	4,85 (d, J=7,6)	102,0	103,5
2(CH)	3,2-4,0	74,6	76,1
3(CH)	3,2-4,0	76,8	78,3
4(CH)	3,2-4,0	70,9	72,2
5(CH)	3,2-4,0	77,9	76,8
6(CH₂)	3,2-4,0	60,3	61,7
1(CH) glucose	4,64(d, J=7,7)	103,7	104,7
2(CH)	3,2-4,0	74,0	75,4
3(CH)	3,2-4,0	75,3	76,8
4(CH)	3,2-4,0	76,9	79,3
5(CH)	3,2-4,0	75,7	76,4
6(CH₂)	3,2-4,0	62,1	63,5
1(CH) rhamnose	4,85 (d, J=7,6)	101,4	102,9
2(CH)	3,2-4,0	70,8	72,7
3(CH)	3,2-4,0	71,2	72,3
4(CH)	3,2-4,0	72,3	73,7
5(CH)	3,2-4,0	69,2	70,7
6(CH₃)	1,26(d, J = 6,3)	15,4	17,8

III.2.1.11. Elucidation du composé A14:

Les données LC-UV-MS (Fig.III.51, III.52) nous a suggéré une masse $m/z = 1072$ mais La technique à haute résolution HR-ESI-MS (Fig.III.53) a révélé une masse précise de $m/z = 1072.5823 [M]^+$ et une formule brute de $C_{54}H_{88}O_{21}$ avec 11 insaturations.

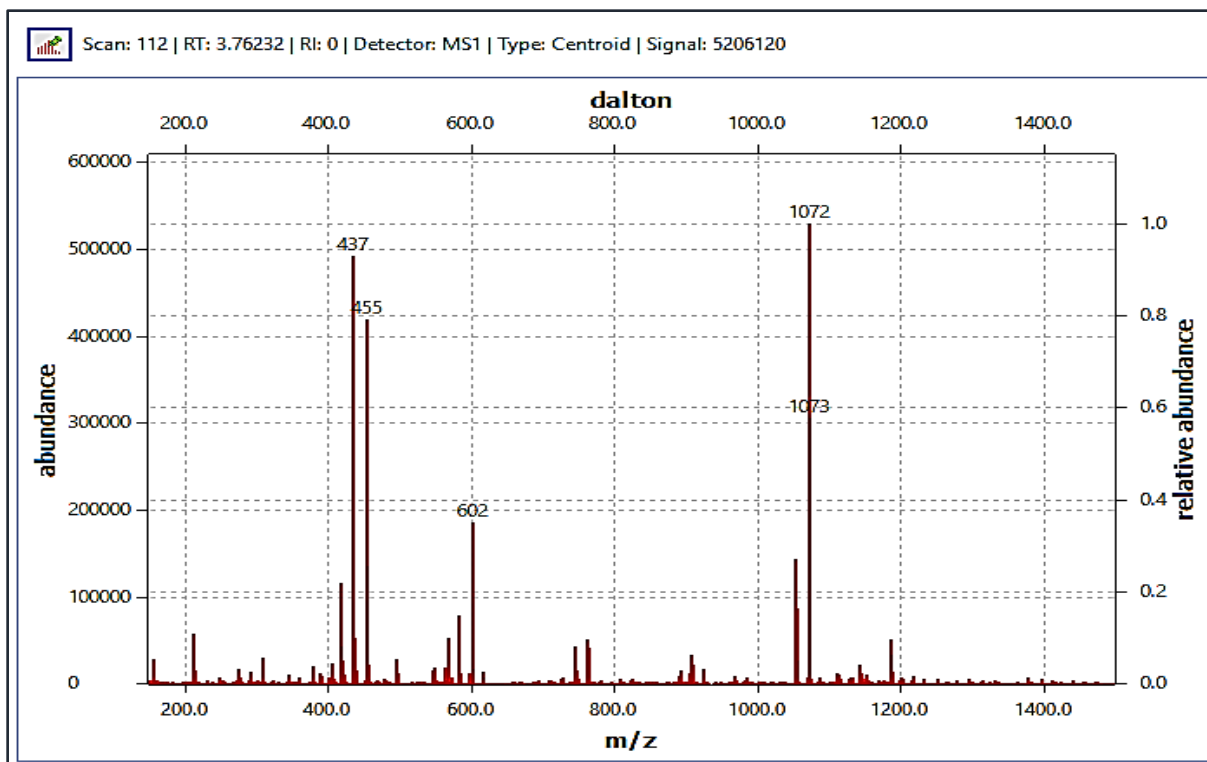


Fig.III.51 Spectre de masse ESI mode positif par LC-UV-MS du composé A14

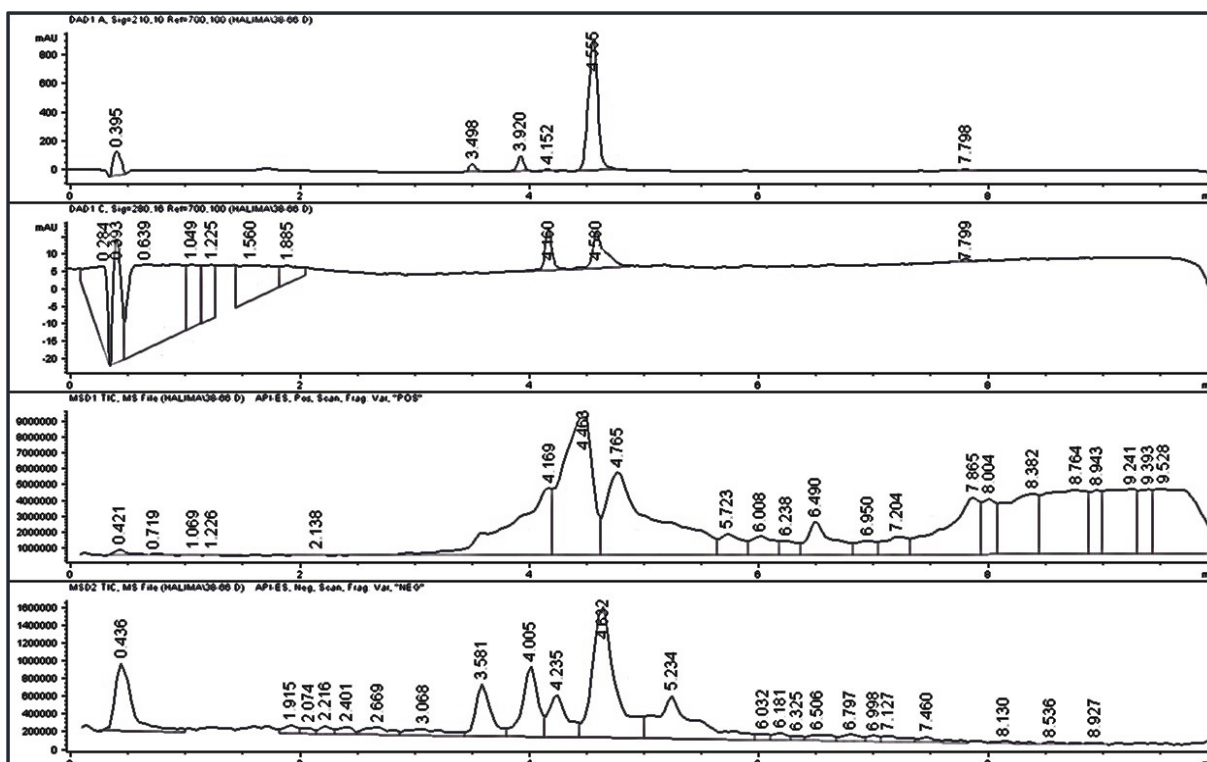


Fig.III.52 Chromatogramme LC-UV-MS du composé A14

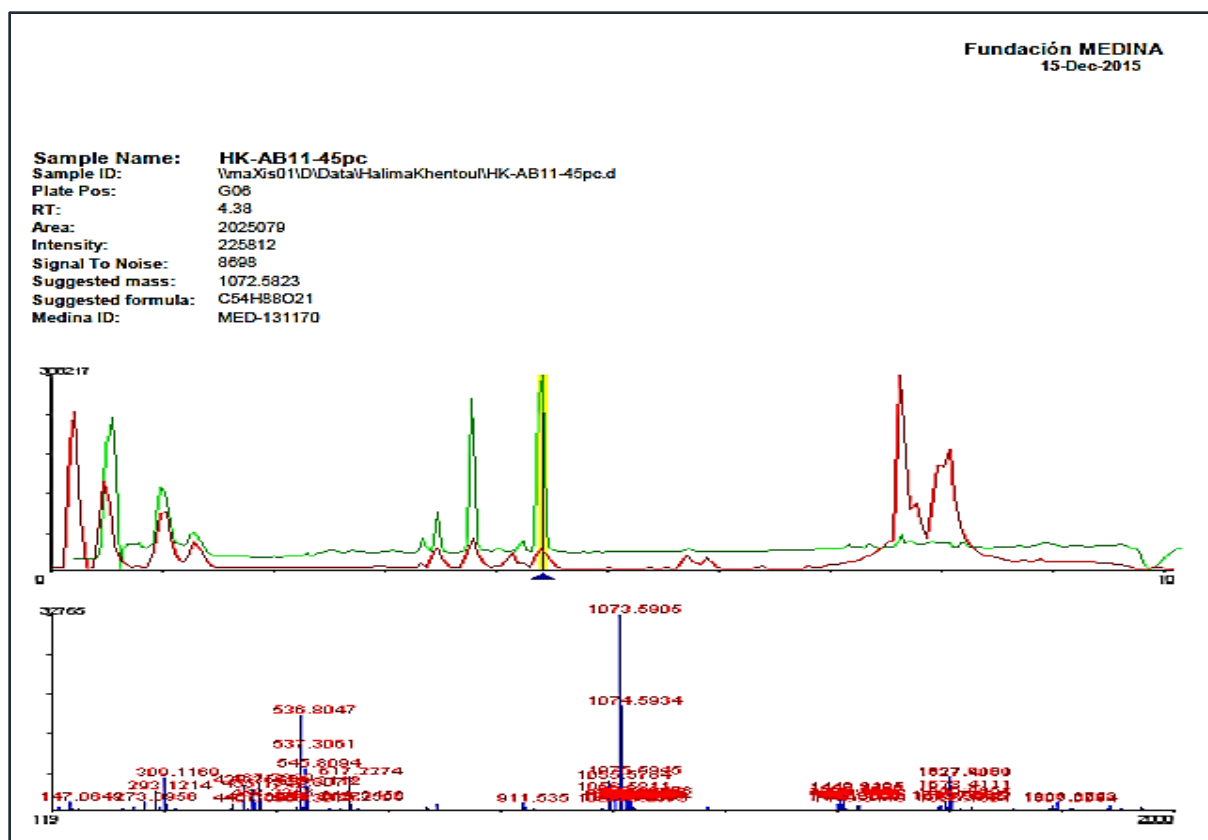


Fig.III.53 Données spectrales du composé A14 par la technique HR-ESI-MS en utilisant l'application Bruker maXis QTOF

L'ensemble des signaux de ce composé sur le spectre RMN¹H et RMN¹³C (Fig. III. 54 et III. 55) est semblable à ceux des signaux des composés **A12** et **A13**, ce qui nous permet de dire qu'il s'agit d'une saponine tritèrpenique de type Oléane. En comparant ces données avec ceux des composés précédents, on remarque la présence de deux carbones oléfiniques à 136,22 et 129,13ppm. La disparition des deux signaux qui apparaissent dans la zone de 59-64 ppm, et l'apparition de deux autres à 53,39 et 87,22ppm. Si on prend en considération les données de la littérature (**I.Calişet al. 1993**), on peut conclure que le composé **A14** est l'**ilwensisaponin A**.

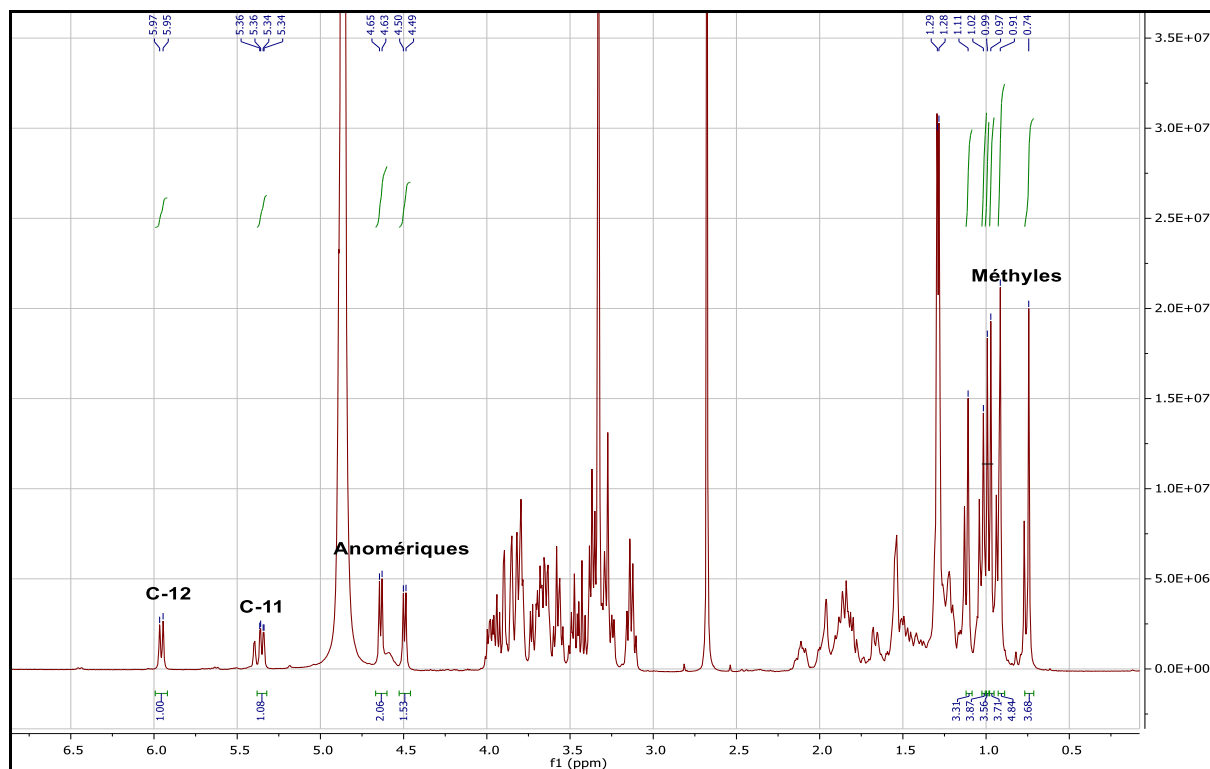


Fig.III.54 Spectre RMN¹H du composé A14 (CD₃OD, 400 MHz)

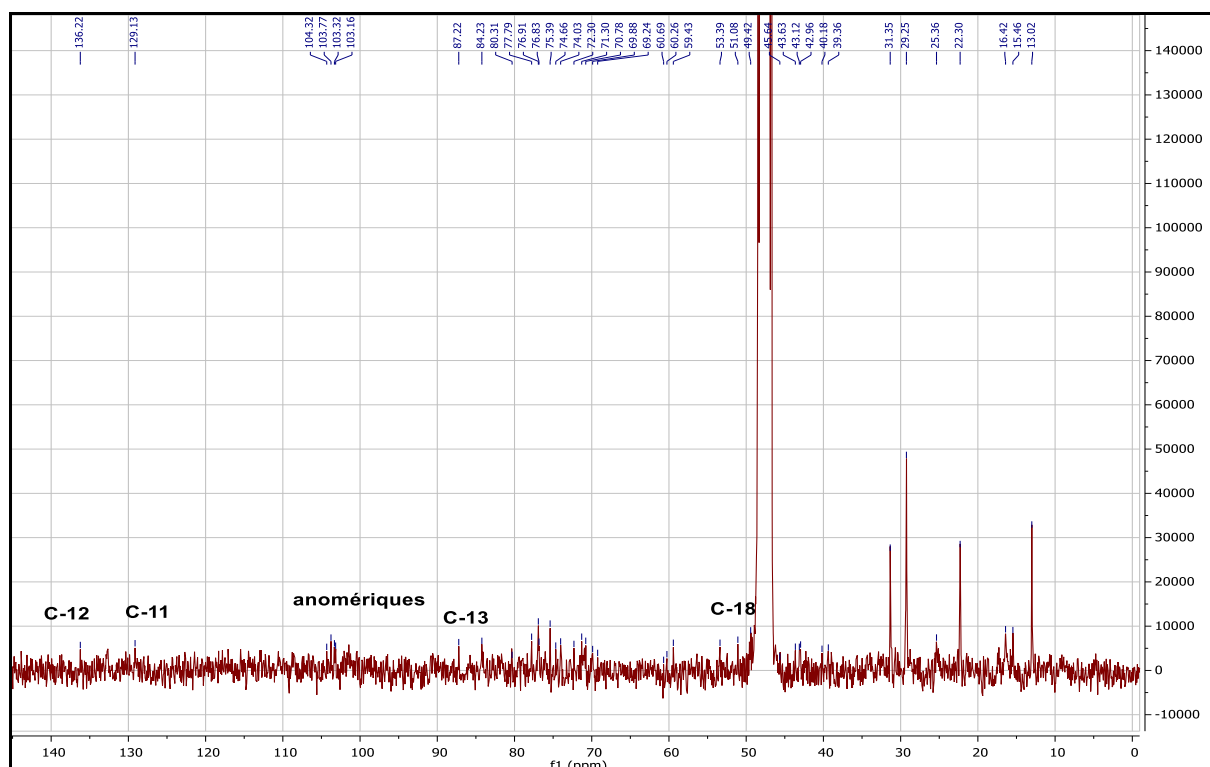
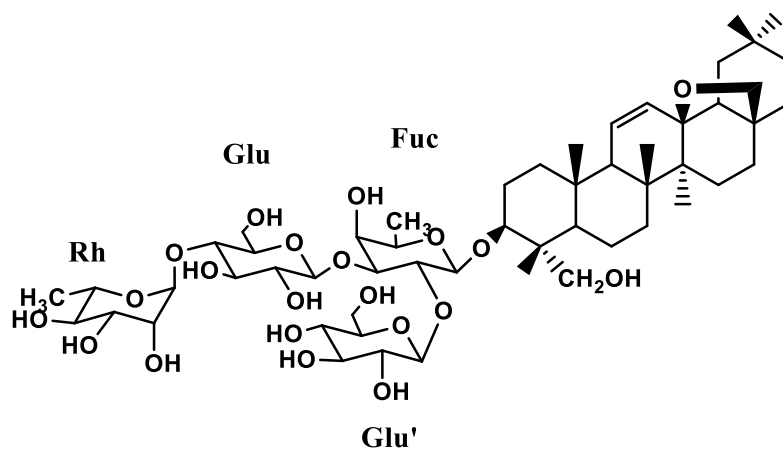


Fig.III.55 Spectre RMN¹³C du composé A14 (CD₃OD, 100 MHz)

La structure du composé A14 est ilwensisaponine A14 (tableau III.15)



3-*O*-{ α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4) - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3) - [β -Dglucopyranosyl (1 \rightarrow 2)] - β -D-fucopyranosyl} -13 β ,28-epoxyolean-11- en-23-ol

Tableau.III.15: Déplacement des signaux de ilwensiaponin Avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H (500MHz, CD ₃ OD) δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C (100 MHz), δ (ppm)	RMN ¹³ C (CD ₃ OD) δ (ppm) I. Caliş 1993
1(CH ₂)	1,2-2,1	43,6	39,3
2(CH ₂)	1,2-2,1	29,2	26,3
3(CH)	3,44 (m)	80,3	85,6
4(C)	-	45,6	42,1
5(CH)	1,2-2,1	49,4	48,0
6(CH ₂)	1,2-2,1	17,4	18,2
7(CH ₂)	1,2-2,1	32,2	32,0
8(C)	-	40,0	42,8
9(CH)	1,2-2,1	53,3	54,6
10(C)	-	35,6	37,1
11(CH)	6,41(dd, J= 2,7; 10,5)	129,1	131,4
12(CH)	5,27 (d, J= 10,5)	136,2	134,0
13(C)	-	87,2	86,8
14(C)	-	40,1	44,4
15(CH ₂)	1,2-2,1	31,3	35,8
16(CH ₂)	1,2-2,1	29,2	26,5
17(C)	-	43,1	45,1
18(CH ₂)	1,2-2,1	51,0	52,5
19(CH ₂)	1,2-2,1	39,3	38,2
20(C)	-	29,2	32,8
21(CH ₂)	1,2-2,1	39,3	35,8
22(CH ₂)	1,2-2,1	29,2	31,8
23(CH ₂)	3,3-4,0	60,6	64,4
24(CH ₃)	0,74(s)	13,0	12,6
25(CH ₃)	0,97(s)	22,3	18,8
26(CH ₃)	1,11(s)	22,3	20,1
27(CH ₃)	0,99(s)	15,4	16,9
28(CH ₂)	3,3-4,0	78,3	77,9
29(CH ₃)	1,02(s)	31,3	34,0
30(CH ₃)	0,91(s)	25,3	23,9

entités sucre	RMN ¹ H δ (ppm), J(Hz)	RMN ¹³ C δ (ppm)	RMN ¹³ C I. Caliş 1993
1(CH) fucose	4,47(d, J=7,8)	104,3	105,1
2(CH)	3,3-4,0	74,7	78,3
3(CH)	3,3-4,0	84,3	83,3
4(CH)	3,3-4,0	71,1	72,4
5(CH)	3,3-4,0	69,8	71,3
6(CH ₃)	1,26(d, J = 6,3)	16,4	17,8
1(CH)glucose ¹	4,85 (d, J=7,6)	103,3	103,5
2(CH)	3,3-4,0	74,6	76,1
3(CH)	3,3-4,0	76,8	78,3
4(CH)	3,3-4,0	70,9	72,2
5(CH)	3,3-4,0	77,7	76,8
6(CH ₂)	3,3-4,0	59,4	61,7
1(CH) glucose	4,64(d, J=7,7)	103,7	100,1
2(CH)	3,3-4,0	74,0	75,4
3(CH)	3,3-4,0	75,3	76,8
4(CH)	3,3-4,0	76,9	79,3
5(CH)	3,3-4,0	75,3	76,4
6(CH ₂)	3,3-4,0	60,2	63,6
1(CH) rhamnose	4,85 (d, J=7,6)	103,1	102,9
2(CH)	3,3-4,0	70,7	72,7
3(CH)	3,3-4,0	71,3	72,4
4(CH)	3,3-4,0	72,3	73,7
5(CH)	3,3-4,0	69,2	70,7
6(CH ₃)	1,26(d, J = 6,3)	15,4	17,8

Les trois saponosides ont été isolés de plusieurs espèces de genre *Verbascum* ; **ilwensisaponin A** de *Verbascum lasianthum* Boiss. ex Bentham (**E. Kupeli et al. 2007**), de *Verbascum pterocalycinum* var. *mutense*, *V. roripifolium*, *V. sinaiticum*, *V. thapsiforme*, *V. nigrum* **Ilensisaponin C** de *V. nigrum* , *V. pterocalycinum* var. *mutense* et **ilensisaponin B** de *V. songaricum* (**I.I Tatli, Zs. Akdemir 2004**). Des études effectuées sur ces trois saponosides ont montré que **l'ilwensisaponin A** et **l'ilensisaponin C** ont des effets antiinflammatoires et antinoceptitifs (**E. K.Akkol et al. 2007**) avec des activités antibactériennes (**Ç. Kahraman et al. 2018**).

III.2.2. Les composés isolés du *Verbascum creticum* Cav.

III.2.2.1. Elucidation du composé C1 :

L'examen du spectre RMN¹H (Fig. III. 56) de **C1**, montre des signaux dans la zone des champs faibles avec deux doublets aromatiques d'intégration 2H chacun à 6,86 et 7,46ppm et une constante de couplage ortho ($J = 8,6\text{Hz}$), ce qui prouve la présence d'un noyau aromatique di-substitué. On constate aussi sur le même spectre, deux autres doublets à 6,33 et 7,66ppm avec une constante de couplage ($J= 16\text{ Hz}$) qui peuvent être des protons éthyléniques sur le noyau aromatique de configuration *trans*. La présence d'un méthoxyle sur le spectre est traduite par un signal à 3.82ppm d'intégration 3H.

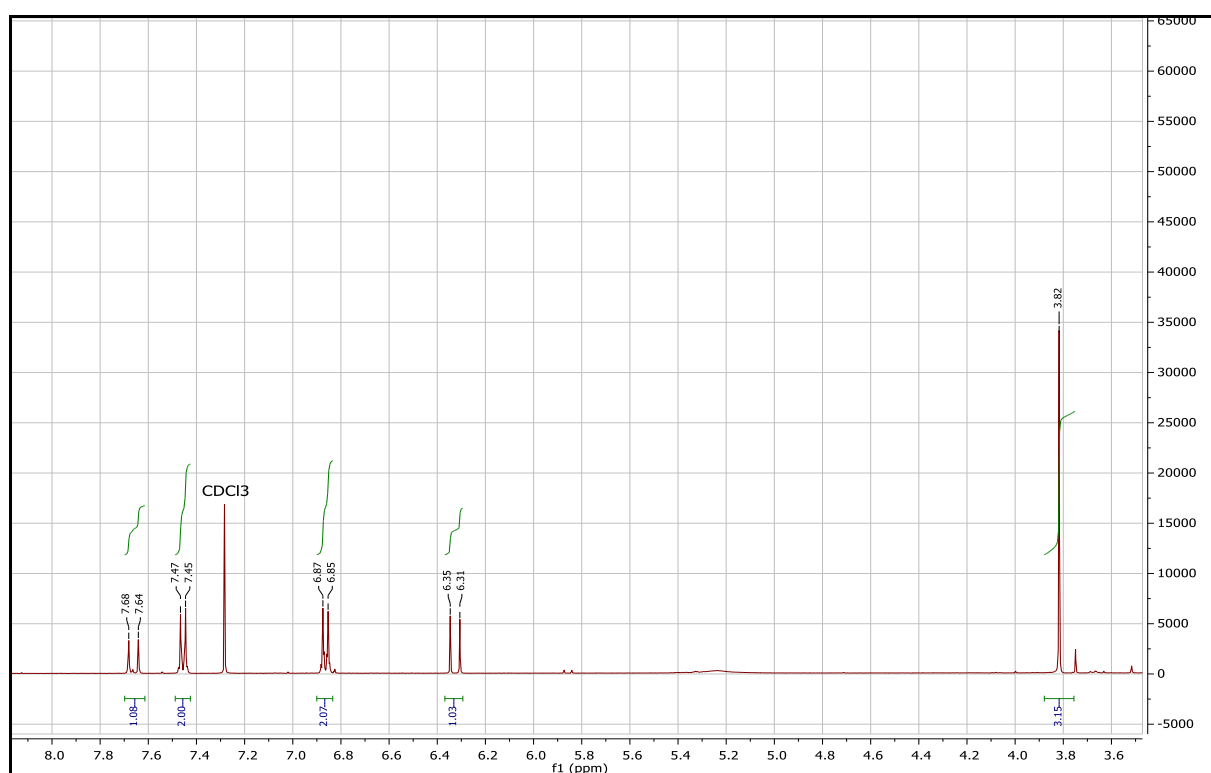


Fig.III.56 Spectre RMN¹H du composé C1 (CDCl₃, 400MHz)

L'expérience HSQC (Fig. III. 57) de ce composé nous permet d'attribuer tous les protons à leurs carbones consécutifs.

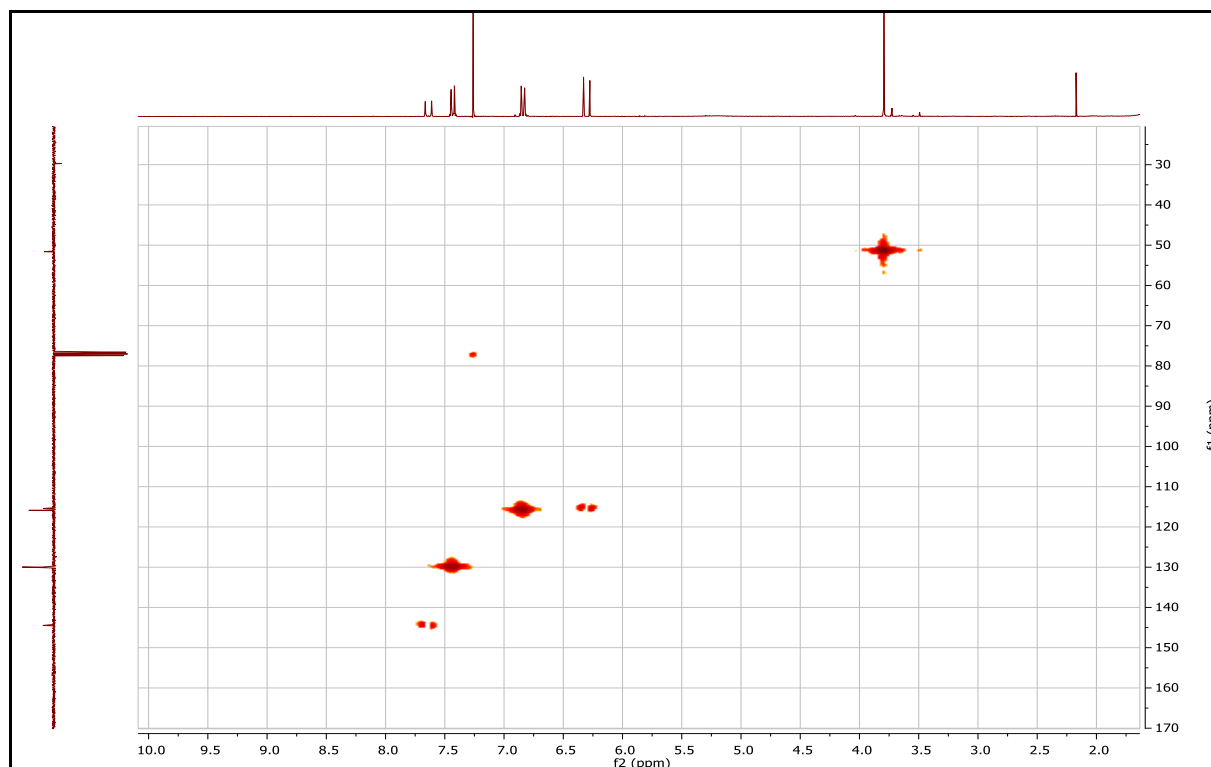


Fig.III.57 Spectre HSQC du composé C1

La comparaison des spectres RMN¹³C et DEPT 135 (Fig. III. 58 et III. 59), montre la présence de trois carbones quaternaires à 127,39ppm ; 157,57ppm correspondant à un carbone phénolique, et un pic à 168,10ppm indiquant la présence d'un ester conjugué dans la molécule.

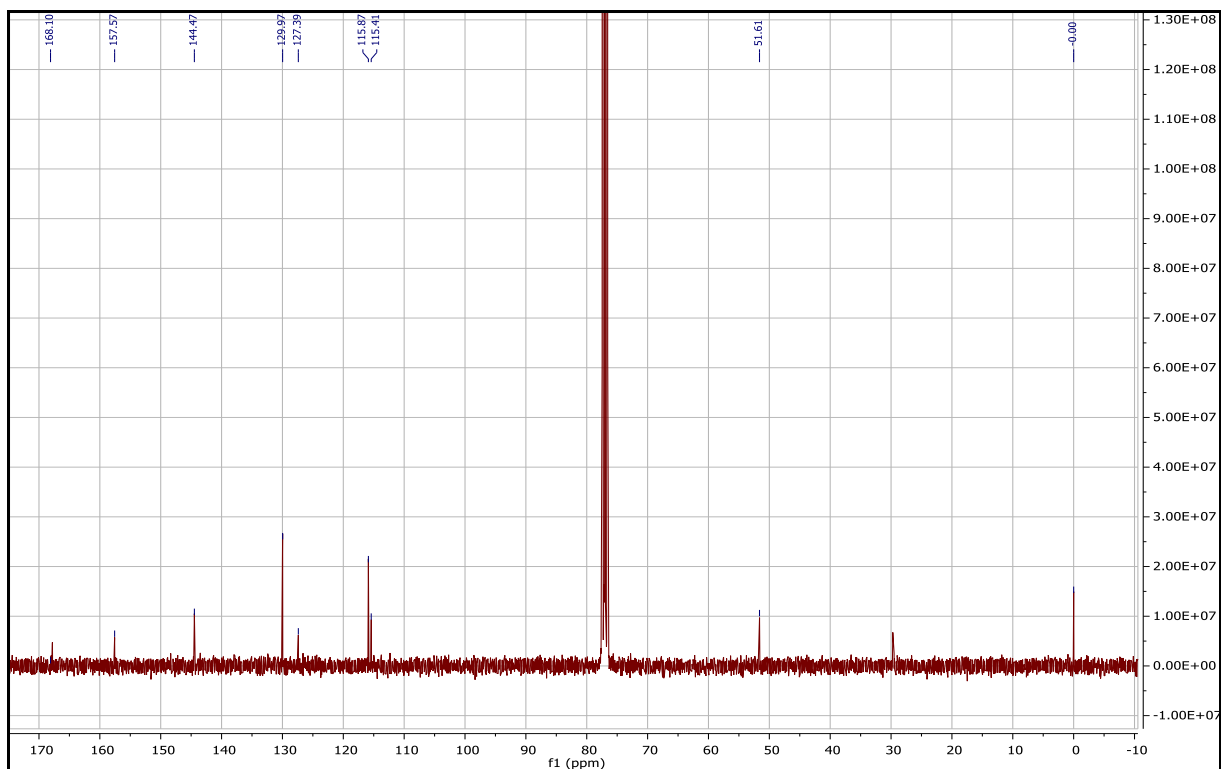


Fig.III.58 Spectre RMN¹³CDu composé C1 (CDCl₃, 100 MHz)

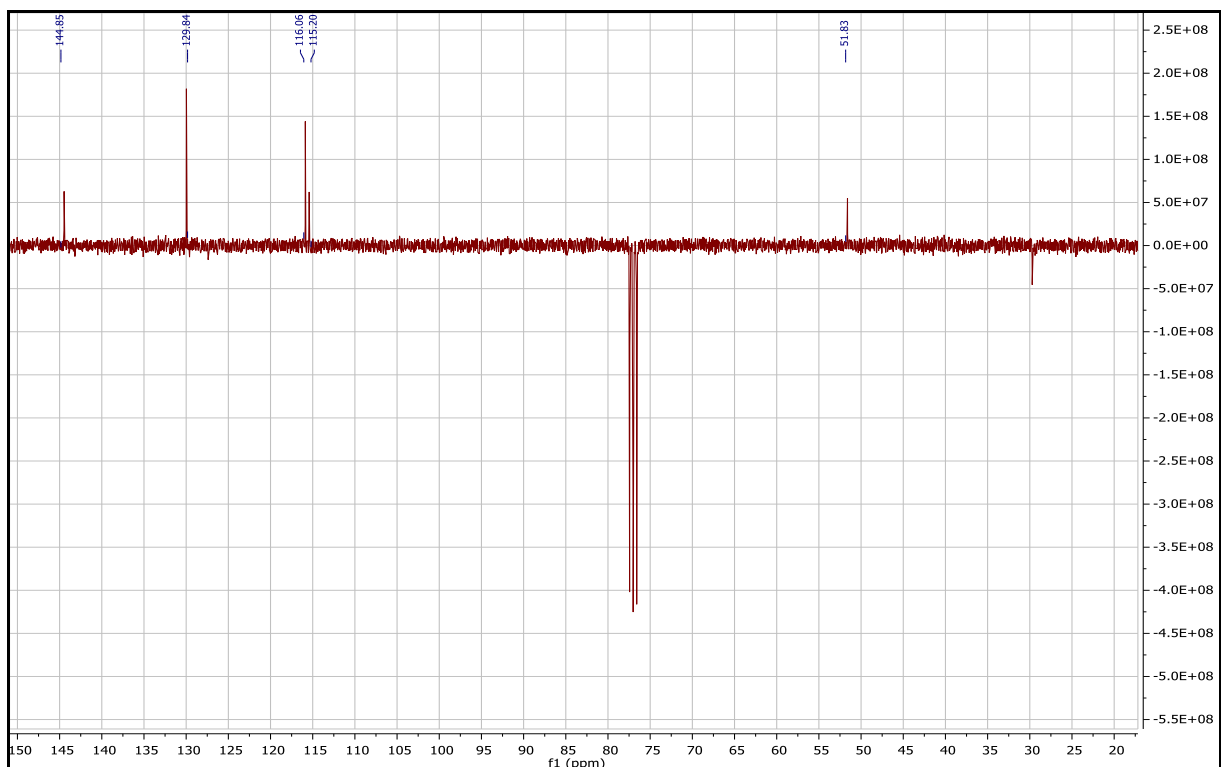
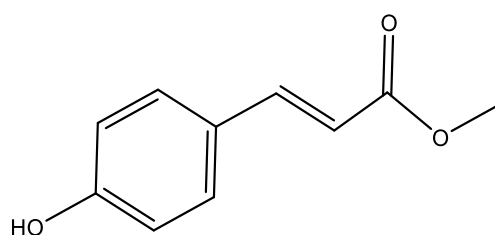
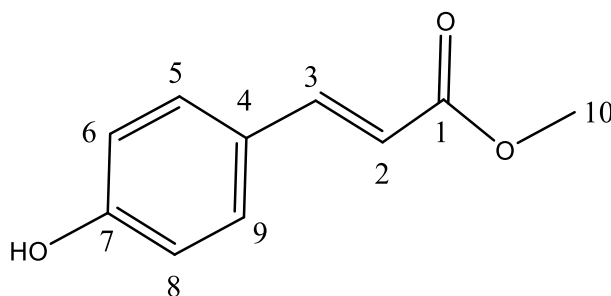


Fig.III.59 Spectre DEPT 135, du composé C1

La combinaison de toutes ces données nous oriente vers la structure de (2E)-3-(4-Hydroxyphényl) acrylate de méthyle (S. Venkateswarlu et al. 2006)(Tab.III.16).



(2E) -3-(4-Hydroxyphényl) acrylate de méthyle

Tableau III.16: Déplacement des signaux de (2E) -3-(4-Hydroxyphényl) acrylate de méthyle avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H(400 MHz, CDCl ₃) δ (ppm), J (Hz)	RMN ¹³ C(75 MHz) δ (ppm)	RMN ¹ H(CDCl ₃) δ (ppm), J (Hz) (S. Venkateswarlu 2006)
1(C)	-	168,1	-
2(CH)	7,66(d, J= 16)	115,4	7,76(d, J= 16)
3(CH)	6,33 (d, J= 16)	144,3	6,43 (d, J= 16)
4(C)	-	127,3	-
6, 8(CH)	6,86 (d, J= 8,6)	115,9	7,01(d, J= 8,4)
5, 9 (CH)	7,46 (d, J= 8,6)	129,9	7,55 (d, J= 8,4)
7(C)	-	157,5	-
10(CH)	3,82(s)	51,6	3,92(s)

Cette molécule a montré une réaction anticancéreuse (Isao Kubo et al, 2004).D'autres études ont montré que ce composé est un antibactérien (Wei-Min Zhang et al.2016).

III.2.2.2. Elucidation du composé C2 :

Les données HPLC (Fig. III.60) montre une masse de 286,0455 avec une formule brute $C_{15}H_{10}O_6$ incérant 11 insaturations et un pic quasi moléculaire de $m/z = 287,0551[M+H]^+$

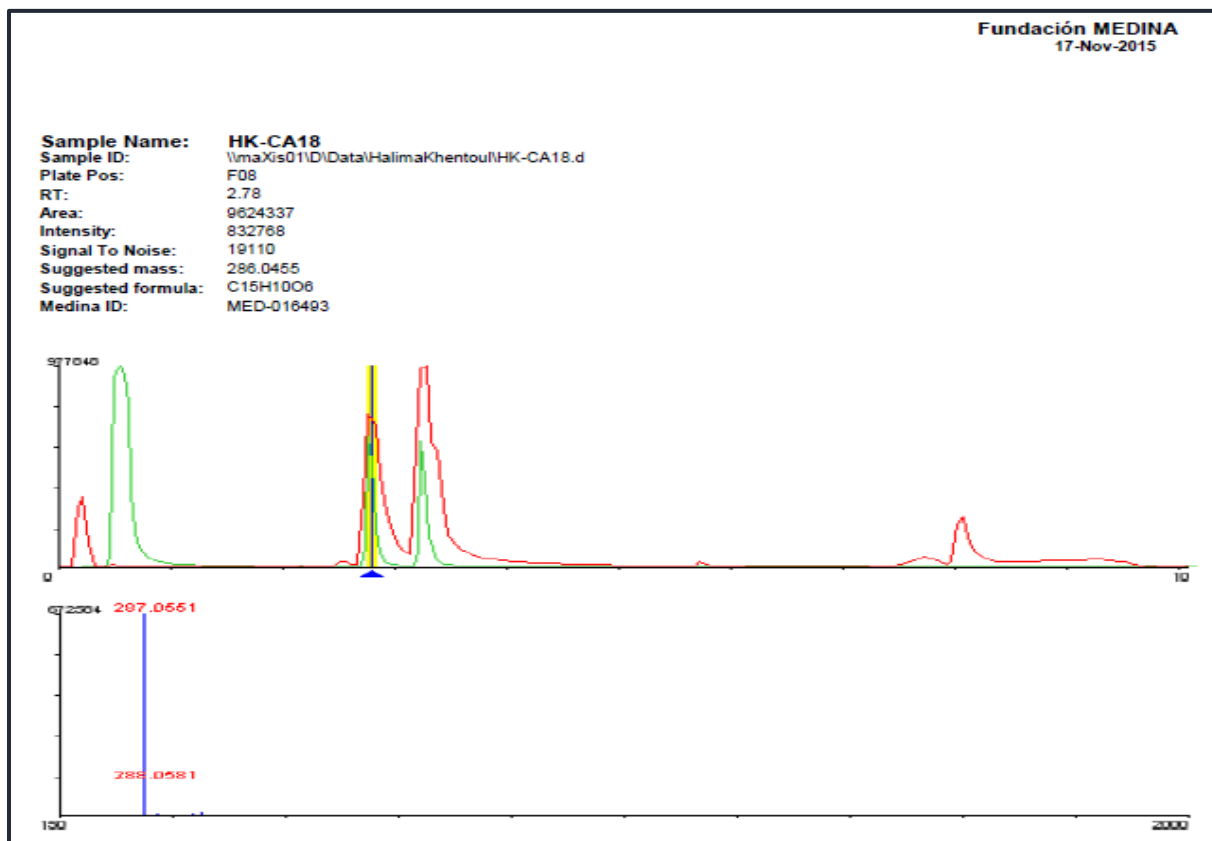


Fig.III.60Données spectrales du composé C2 par la technique HR-ESI-MS en utilisant l'application Bruker maXis QTOF

L'allure du spectre proton et son étalement (Fig. III.61et III. 62), nous oriente vers un composé de type flavonoïde.

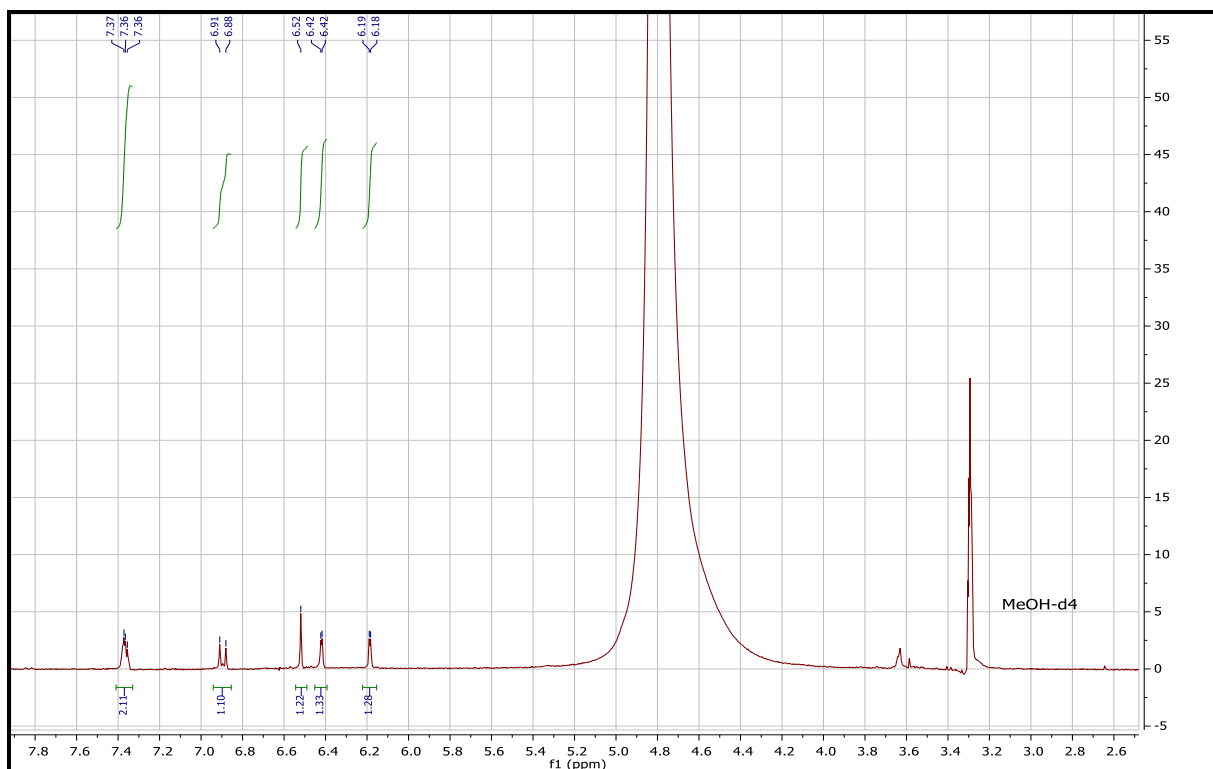


Fig.III.61 Spectre RMN¹H du composé C2 (CD₃OD, 300MHz)

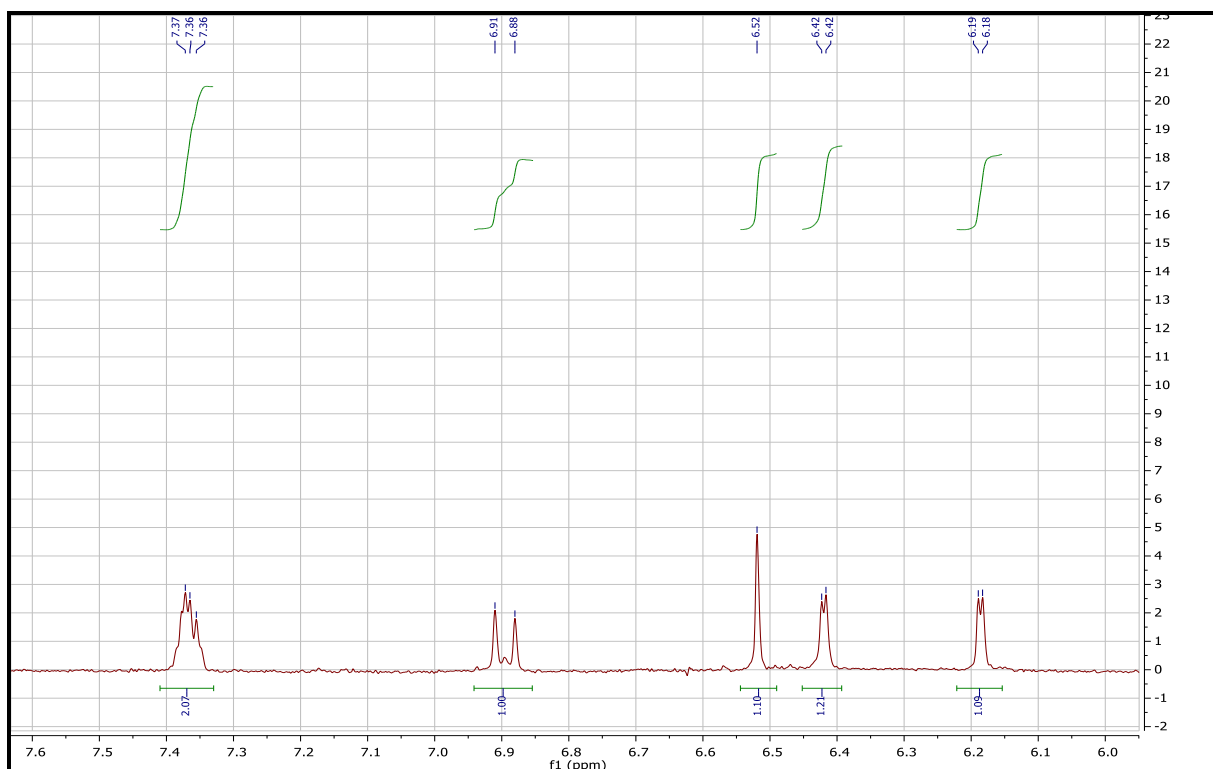


Fig.III.62 Spectre RMN¹H étalé du composé C2 (CD₃OD, 300MHz)

On observe deux doublets avec la même constante de couplage à 6.19ppm (1H, d, J 1,9Hz) et à 6.42ppm (1H, d, J 1,9Hz), qui peuvent correspondre aux protons H6 et H8 d'un flavonoïde. Un proton aromatique sous forme d'un doublet à 6,90ppm (1H, d, J 8,9Hz) et deux autres à 7,36ppm sous forme de multiplet (2H, m). La présence de ces trois protons peut suggérer la di substitution du cycle B du flavonoïde. La présence d'un singulet à 6.52ppm et la couleur noire-violette sous la lampe de Wood nous orientent vers une flavone.

Sur le spectre carbone 13 (Fig. III.63), on retrouve tous les signaux du flavonoïde.

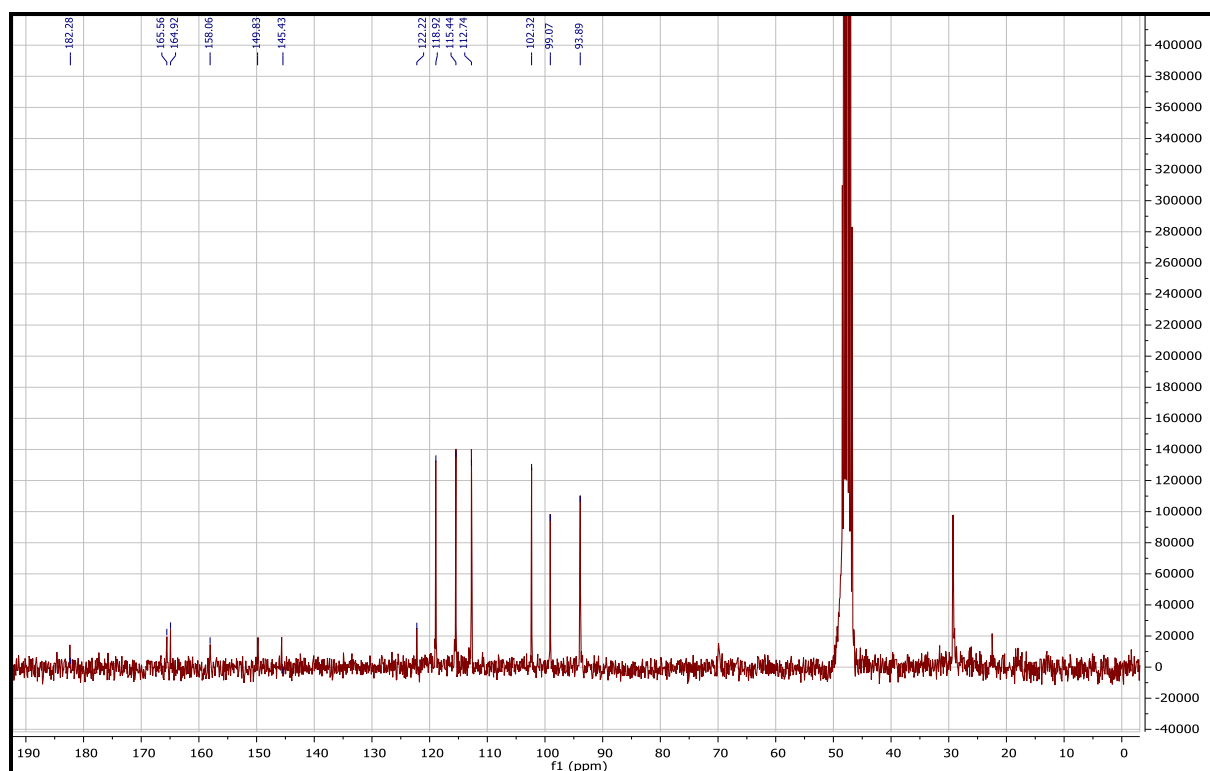


Fig.III.63 Spectre RMN¹³C du composé C2 (CD₃OD, 75MHz)

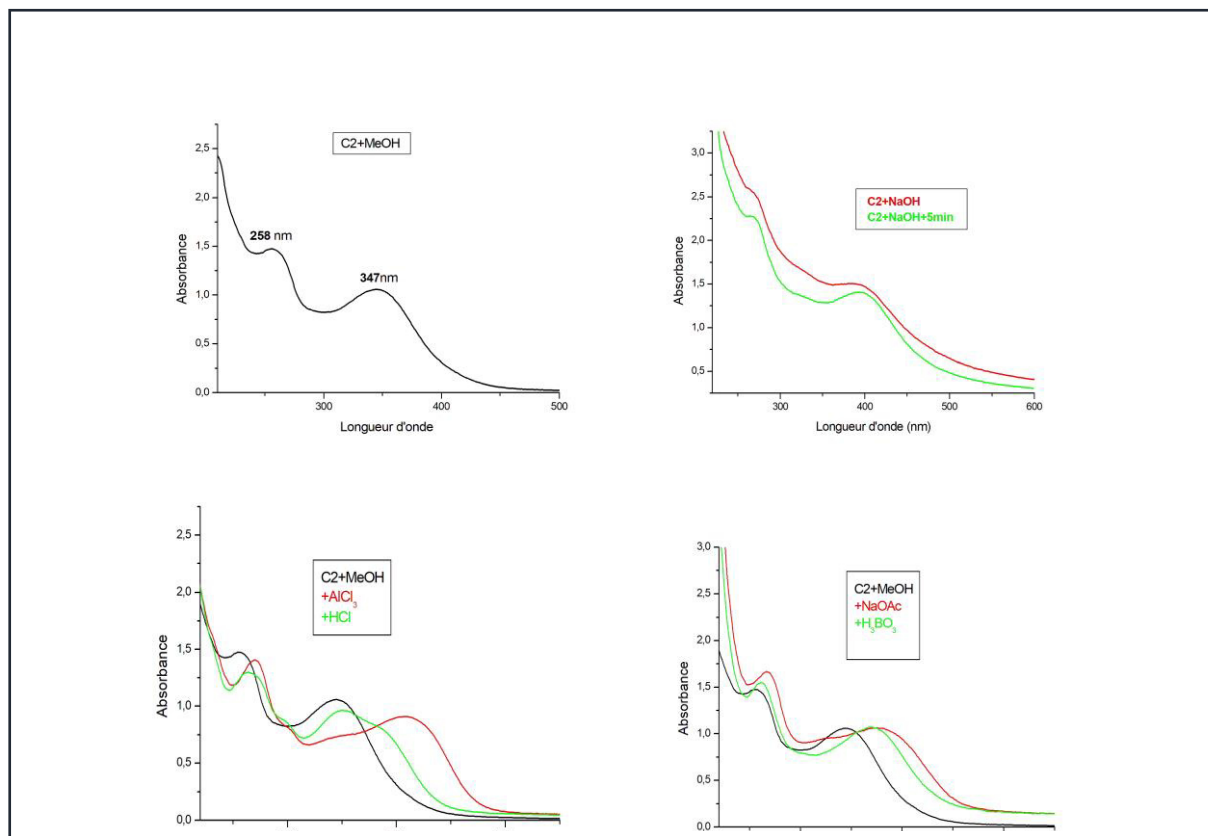


Fig. III.64 La série des courbes spectrales d'UV visible du composé C2

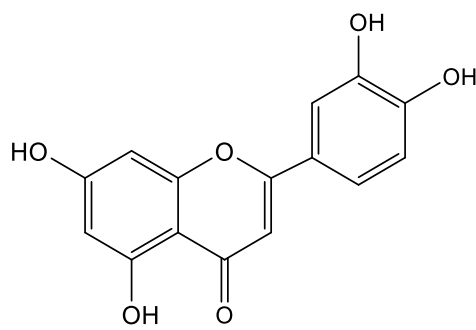
Tableau.III.17 Résultat de la série spectrale UV visible pour le composé C2

Réactif	Bande II	Bande I
Méthanol	258	347
NaOH	269	397
+5mn	270	397
AlCl ₃	266	409
AlCl ₃ +HCl	271	380
NaOAc	262	371
H ₃ BO ₃	267	381

Le spectre UV visible (Fig. III. 64) (Tab.III.17) de ce composé enregistré dans le méthanol donne la valeur de la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande I à 347 nm, confirmant ainsi la structure d'une flavone. L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochrome de la bande I (+ 51nm) avec augmentation de l'intensité lumineuse par rapport au spectre enregistré dans le MeOH ce qui indique la présence d'un OH libre en position 4'.

L'apparition d'une nouvelle bande à 326nm indique l'hydroxylation de la position 7, cela est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II (+ 4 nm) en additionnant le NaOAc. Le spectre enregistré en présence de $AlCl_3$ par rapport à celui enregistré avec $AlCl_3+HCl$ montre un effet hypsochrome ($\Delta\lambda = -19nm$) ce qui laisse prévoir la présence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Toutes ces données spectrales nous conduisent à la structure de la lutéoline (L.C. Lin et al, 2015) (Tab.III.18).



lutéoline.

Tableau.III.18 Déplacement des signaux de lutéoline isolée avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H(300 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm), J (Hz)	RMN ¹³ C (75 MHz) δ (ppm)	RMN ¹ H(CD ₃ OD) δ (ppm), J (Hz) L.C. Lin 2015	RMN ¹³ C (CD ₃ OD), δ (ppm) L.C. Lin 2015
2(C)	-	164,9	-	166,0
3(CH)	6,52(s)	102,3	6,52(s)	103,9
4(C)	-	182,2	-	183,9
5(C)	-	158,4	-	163,2
6(CH)	6,19 (d, J = 1,9)	99,0	6,19 (d, J = 2,0)	100,1
7(C)	-	165,6	-	166,4
8(CH)	6,42 (d, J = 1,9)	93,8	6,42 (d, J = 2,0)	95,0
9(C)	-	158,0	-	159,4
10(C)	-	102,3	-	105,3
1'(C)	-	122,2	-	123,7
2'(CH)	7,36 (m)	112,7	7,36 (m)	114,1
3'(C)	-	145,4	-	147,0
4'(C)	-	149,8	-	151,0
5'(CH)	6,90 (d, J = 8,9)	115,4	6,88 (d, J = 8,5)	116,8
6'(CH)	7,36 (m)	118,9	7,36 (m)	120,3

La lutéoline a été isolée de plus de 9 espèces du genre *Verbascum* tel que : *V. cheiranthifolium*, *V. lychnitis*, *V. fruticosum*, *V. phlomoides*, *V. siniaticum*, *V. songaricum*, *V. thapsiforme*, *V. thapsus*, *V. wiedemannianum*. Cette molécule comporte des activités antioxydants ,anticancéreuses (K. A. Kang 2017) anti-inflammatoires, (López-Lázaro M 2009), anti-cataracte (S. Chirumbolo 2016) antimicrobiennes et antidiabétiques (Hao Dong et al. 2017).

III.2.2.3. Elucidation du composé C3 :

Le spectre de masse de ce composé (Fig.III.65) enregistré sur un spectromètre haute résolution en mode positif HR-ESI-MS montre la présence d'un pic quasi moléculaire à m/z= 271,06 [M+H]⁺ correspondant à la formule brute C₁₅H₁₀O₅ avec 11 insaturations.

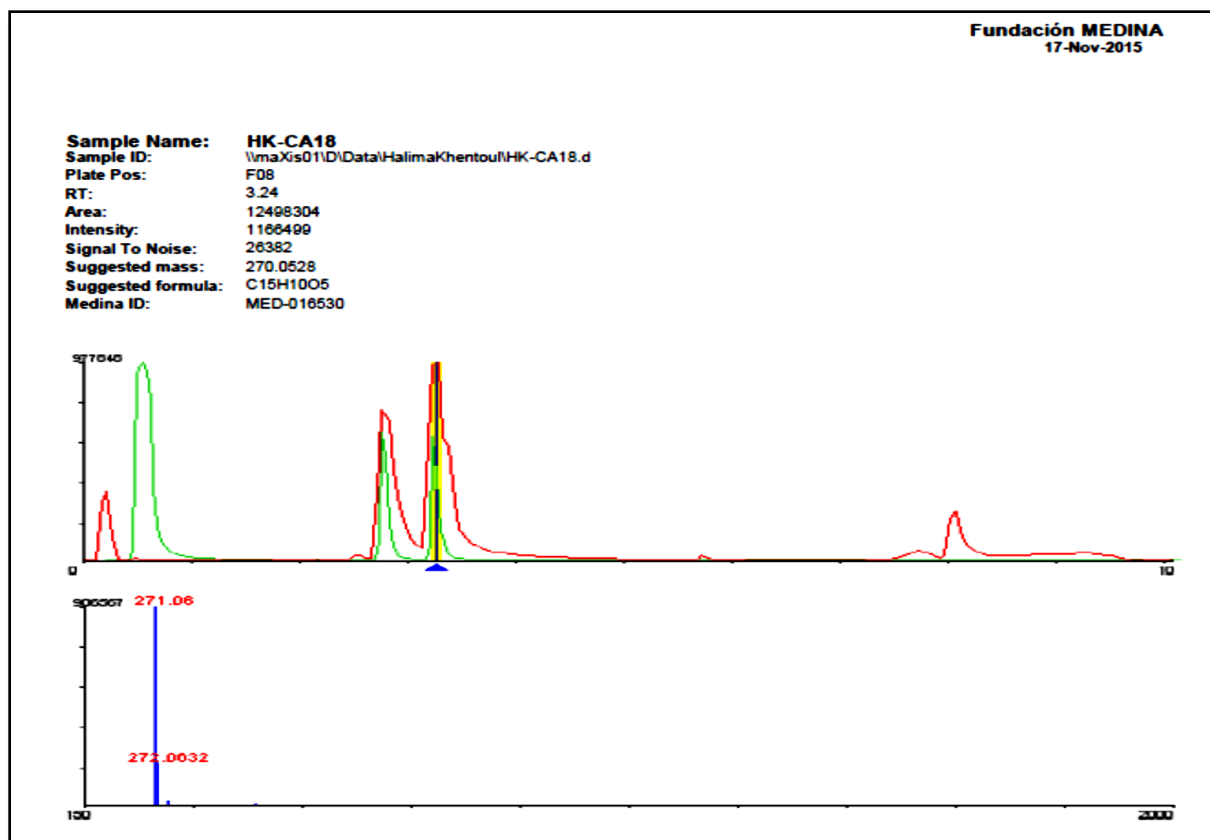


Fig.III.65 Données spectrales du composé C3 par la technique HR-ESI-MS en utilisant l'application Bruker maXis QTOF

On remarque sur le spectre RMN¹H (Fig.III.66,67), les signaux caractéristiques d'un flavonoïde qui s'étale de 6,4 à 8ppm, on peut constater aussi la présence d'un pic sous forme d'un singulet d'intégration 1H apparaissant à 6,47ppm caractéristique habituellement du proton de la position 3 d'un flavonoïde et qui nous oriente vers la structure d'une flavone (ceci est conforté par la couleur noir violet du composé sous la lumière de Wood). Nous remarquons aussi sur le spectre deux signaux à 6,82ppm et 7,74ppm d'intégration 2H chacun et avec la même constante de couplage ($J= 8.8\text{Hz}$), indiquant ainsi la présence d'un système AB fortement couplé sur la partie cinnamoyle du flavonoïde et qui conduit à la mono substitution du cycle B. Deux signaux à 6,07ppm (1H, d, $J= 2,1\text{Hz}$) et à 6,33ppm sous d'un singulet large.

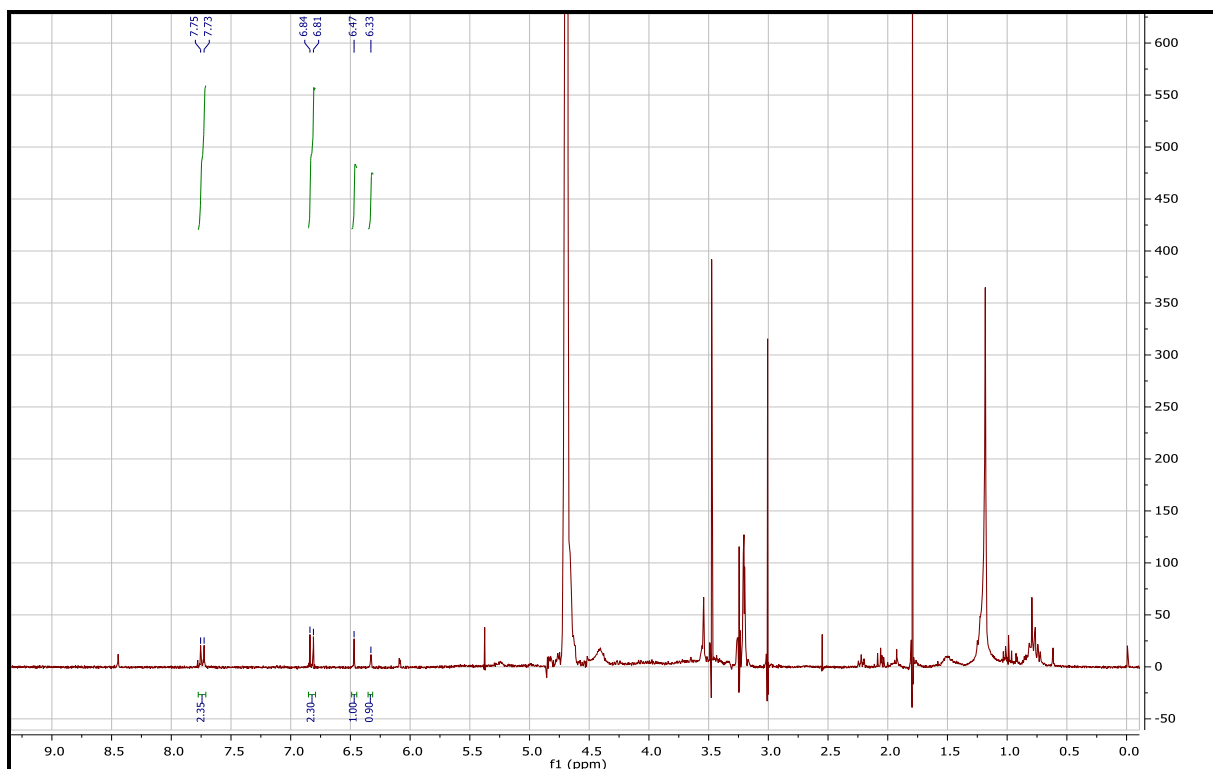


Fig.III.66 Spectre RMN¹H du composé C3 (CD₃OD, 300MHz)

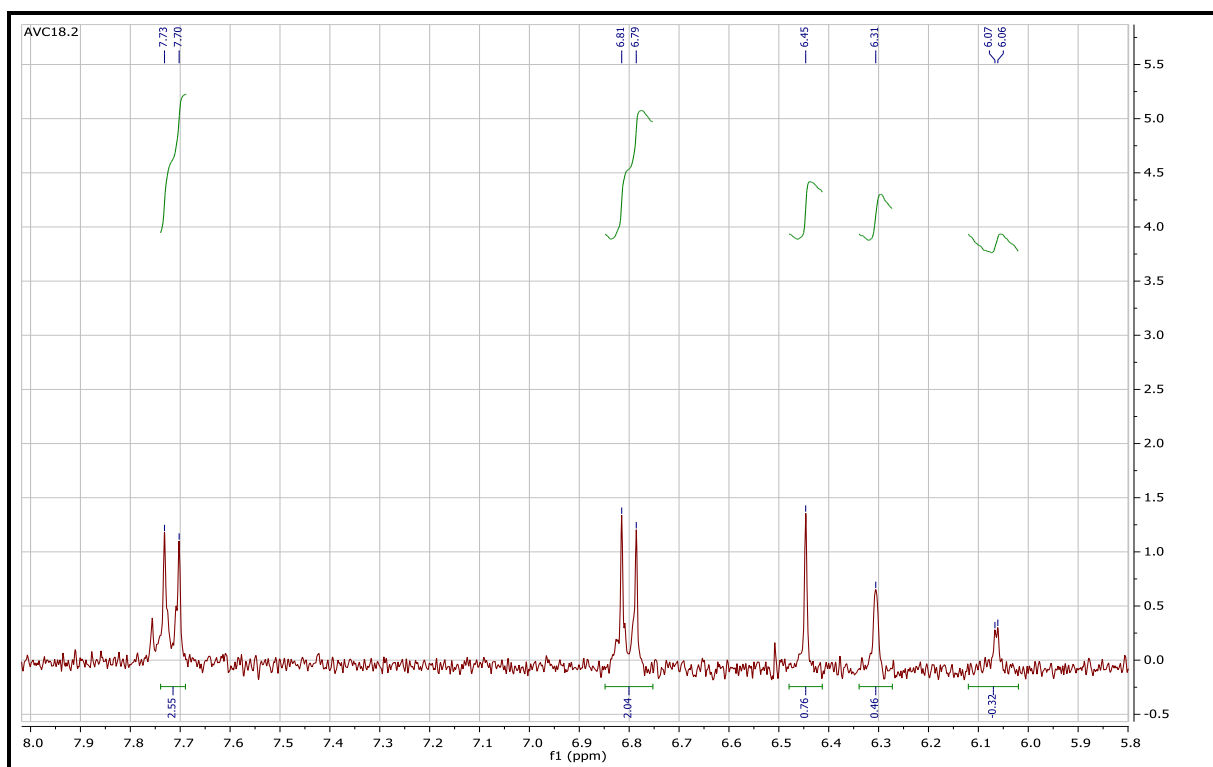


Fig.III.67 Spectre RMN¹H étalé (6,2-8,8ppm) du composé C3 (CD₃OD, 300 MHz)

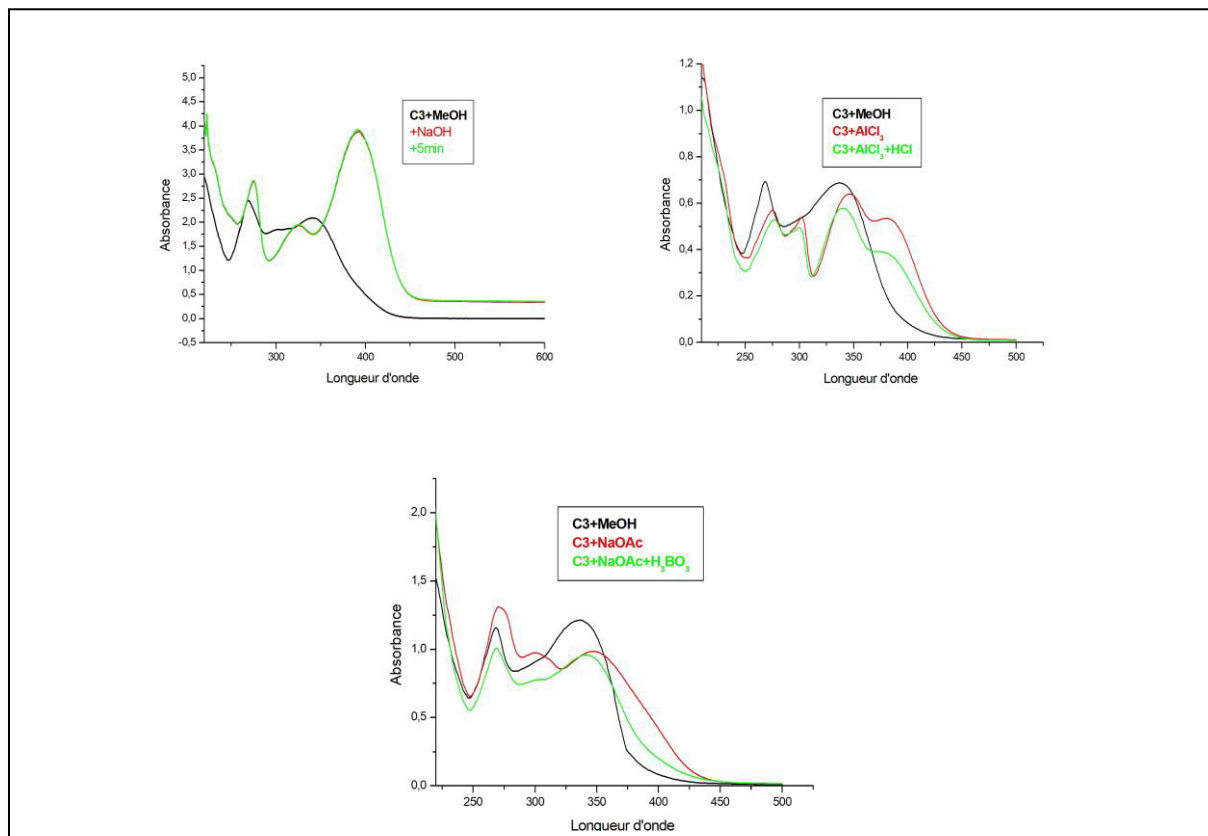


Fig.III.68 La série des spectres d'UV visible du composé C3

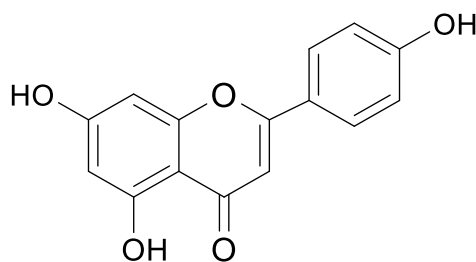
Le spectre UV (Fig. III.68) (Tab.III.19) montre un effet bathochrome ($\Delta\lambda=+52\text{nm}$) de la bande I après addition de NaOH avec une grande augmentation d'intensité indiquant ainsi la présence d'un OH à la position 4'. La présence d'une nouvelle bande à 324nm est significative d'un hydroxyle en position 7, ceci est confirmé par le déplacement ($\Delta\lambda=+6\text{ nm}$) de la bande II en présence de NaOAc par rapport au spectre du méthanol. Le déplacement bathochrome ($\Delta\lambda=+42\text{nm}$) en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ par rapport au méthanol indique la présence d'un OH en position 5.

Le spectre enregistré en présence de AlCl_3 par rapport à celui enregistré avec $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ montre un effet hypsochrome ($\Delta\lambda= -4\text{nm}$) ce qui laisse prévoir l'absence d'un système ortho dihydroxylé sur le cycle B.

Tableau.III.19 Résultat de la série spectrale UV visible pour le composé C3

	Bande II	Bande I
MeOH	267	340
+NaOH	275	392
+5mn	275	392
+AlCl ₃	275, 301	345, 382
+HCl	275, 298	341, 378
+NaOAc	273	347
+H ₃ BO ₃	268	340

La combinaison des données spectrales de l'UV avec celles de RMNH¹ nous emmène à cela la structure de l'apigénine (L. A. Lemos da Silva et al. 2015) (Tab.III.20).

**Apigénine****Tableau.III.20** Déplacement des signaux de l'apigénine avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H(300 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm), J (Hz)	RMN ¹ H(CD ₃ OD),δ (ppm), J (Hz) L. A. Lemos da Silva 2015
2(C)	-	-
3(CH)	6,47(s)	6,60(s)
4(C)	-	-
5(C)	-	-
6(CH)	6,07 (d, J=2,1)	6,21(d, J=2,1)
7(C)	-	-
8(CH)	6,33 (d, J=2,1)	6,46 (d, J=2,1)
9(C)	-	-
10(C)	-	-
1'(C)	-	-
2'(CH)	7,74 (d, J= 8,9)	6,93 (d, J= 8,9)
3'(C)	6,82 (d, J= 8,9)	7,85 (d, J= 8,9)
4'(C)	-	-
5'(CH)	6,82 (d, J= 8,9)	6,93 (d, J= 8,9)
6'(CH)	7,74 (d, J= 8,9)	7,85 (d, J= 8,9)

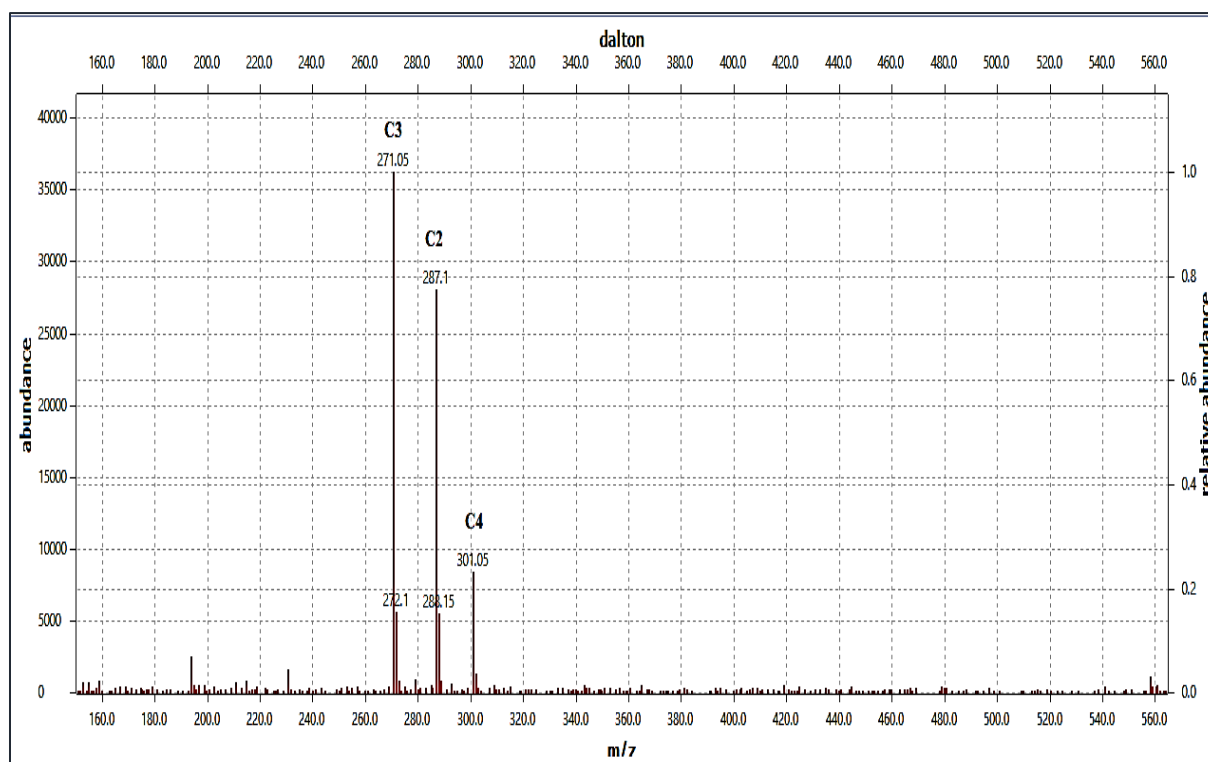
Les données de la littérature montrent que l'apigénine a de nombreux effets bénéfiques. Des effets antitumoraux, protectifs biologiques des organes (cœur, cerveau, foie et poumon), des effets hypotensifs et effets hypoglycémiant, des activités anti-oxydatives et anti-inflammatoires, anti-ostéoporose et régulation immunitaire (X. Zhou et al.2017)

III.2.2.4. Elucidation du composé C4 :

Les analyses HR-ESI-MS et LC-UV-MS de la fraction AVC17 ont révélé un pic d'une formule brute C₁₆H₁₂O₆ et une masse $m/z = 300,0625 [M]^+$ à Tr= 3,34 (Tab.III.21), tandis que le spectre de masse de cette fraction par la technique LC-MS a détecté une masse $m/z = 301,05 [M+H]^+$ (Fig.III.69)

Tab.III.21 : Tableau de résultats d'analyse HR-ESI-MS de AVC17

NON	T _R	MASSE	FORMULE BRUTE	R ²	INTENSITE	FRAGMENTS
AVC17	2,78	286,0467	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	2244592	181606	287.0504,286.0467
AVC17	2,98	286,0467	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	74522	12303	286.0467,264.0647,298.046,30.0731
AVC17	3,03	286,0466	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	202425	27171	286.0466,316.0573,210.1358,294.0753,284.0356
AVC17	3,24	270,0515	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	10784091	1121423	270.0515,248.0702
AVC17	3,34	300,0625	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	8021509	916380	300,0625

**Fig.III.69** spectre de masse ESI mode positif par LC-UV-MS de LA fraction AVC17

Le spectre RMN¹H (Fig. III. 70) de ce composé montre les signaux caractéristiques d'un flavonoïde. On remarque aussi sur le spectre la présence d'un signal à 3,83ppm d'intégration 3H sous forme d'un singulet qui peut être attribuer à un méthoxyle.

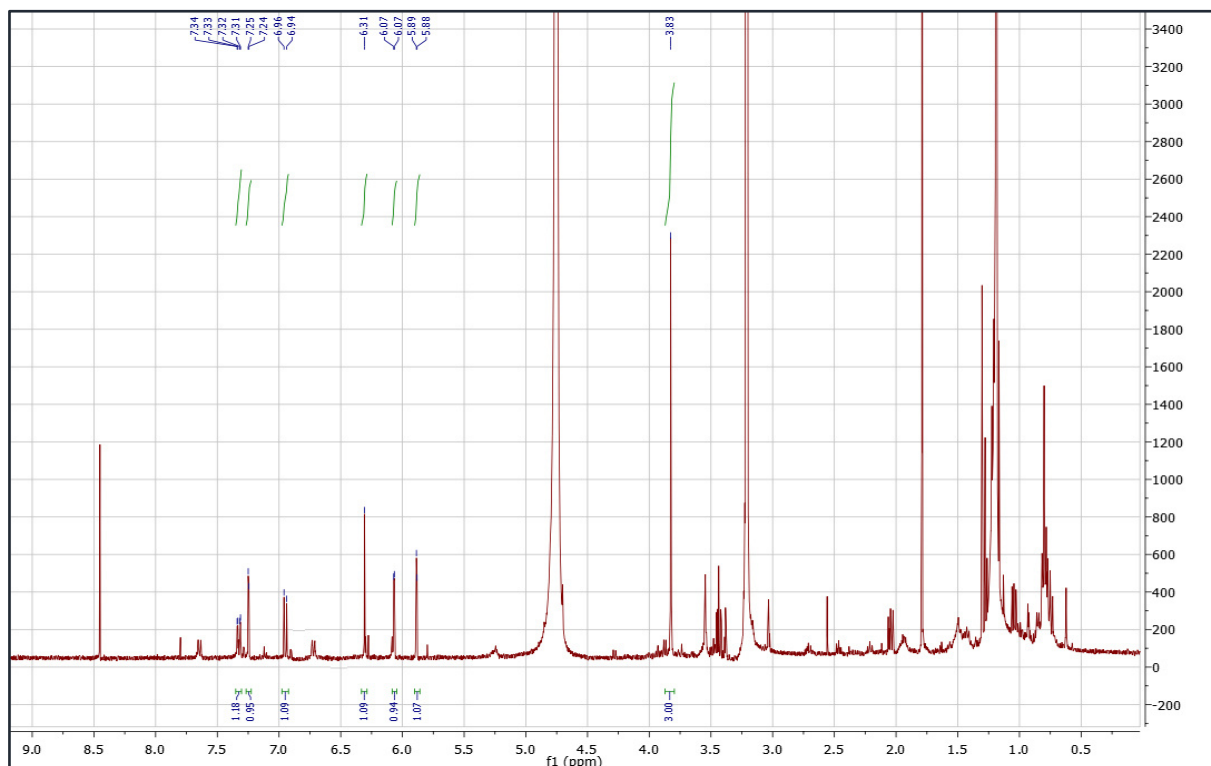


Fig.III.70 Spectre RMN¹H du composé C4 (CD₃OD, 400 MHz)

Sur spectre proton étalé (Fig. III. 71) de 5,8 à 7,5 ppm on a :

- Un signal à 6,31ppm présentant habituellement le proton de la position 3 du squelette flavonoïde de type flavone (couleur noir violette sous lumière de Wood).
- Deux signaux sous forme de doublets couplés en méta sont apparus à 5,88ppm (1H, d, $J=2,1$ Hz) et 6,07ppm ((1H, d, $J=2,1$ Hz), attribuables aux protons 6 et 8 du cycle A du flavonoïde.
- Le signal à 7,33ppm (1H, dd, $J= 8,5$ Hz et 2,3 Hz) couple avec deux protons en positions *ortho* et *méta*, dont un, apparait à 6,95ppm (1H, d, $J= 8,6$ Hz) et l'autre à 7.25ppm (1H, d, $J= 2,3$ Hz) respectivement, ces protons ne peuvent être que les protons de la position 6',5', et 2' du cycle B d'un flavonoïde.

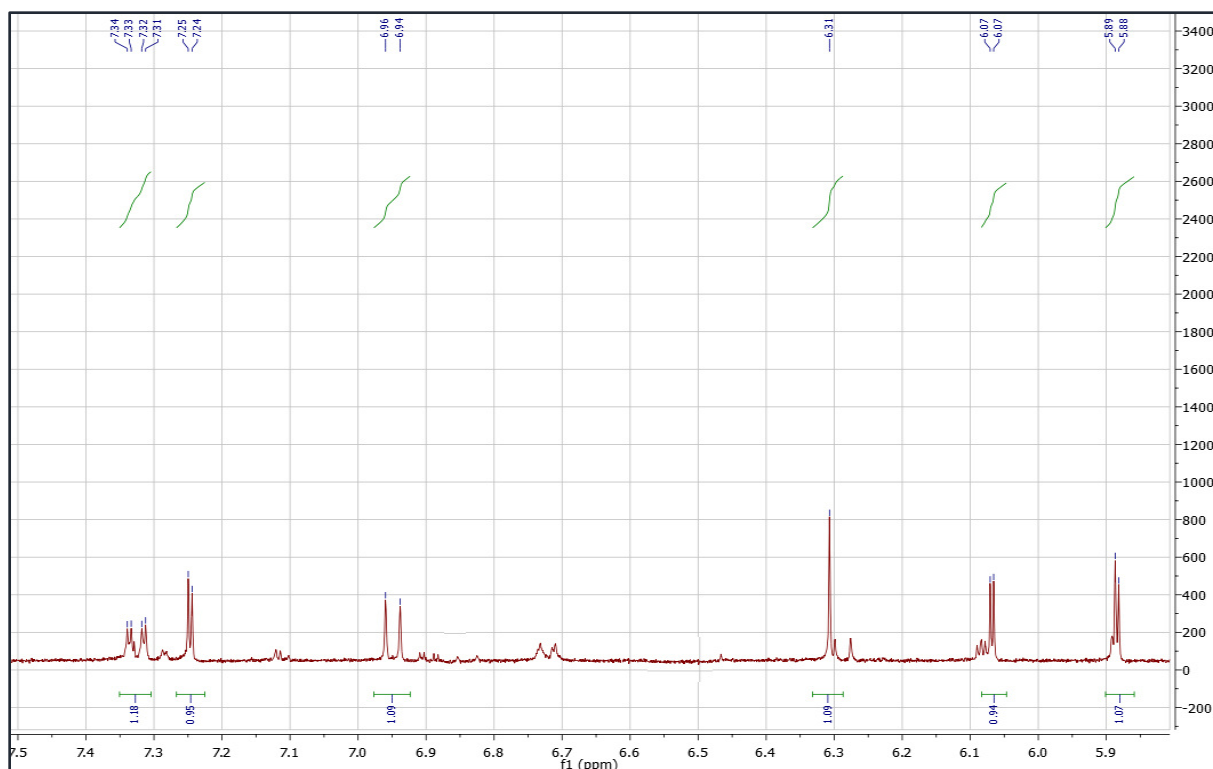


Fig.III.71 Spectre RMN¹H étalé (5,8-7,4 ppm) du composé C4 (CD₃OD, 400 MHz)

Les spectres RMN¹³C et HSQC étalé (fig. III. 72, III. 73 et III. 74) permettent d'attribuer la plupart des carbones de cette molécule (Tab.III.22).

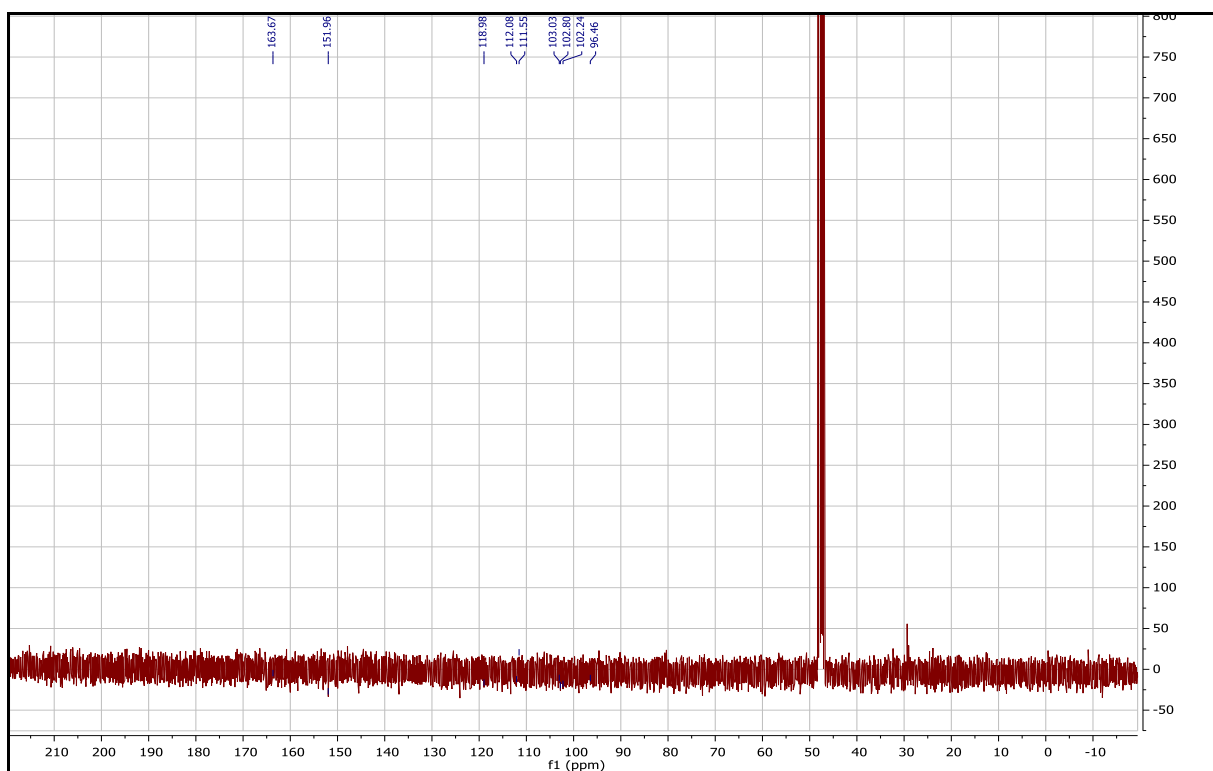


Fig.III.72 Spectre RMN¹³C du composé C4 (CD₃OD, 100 MHz)

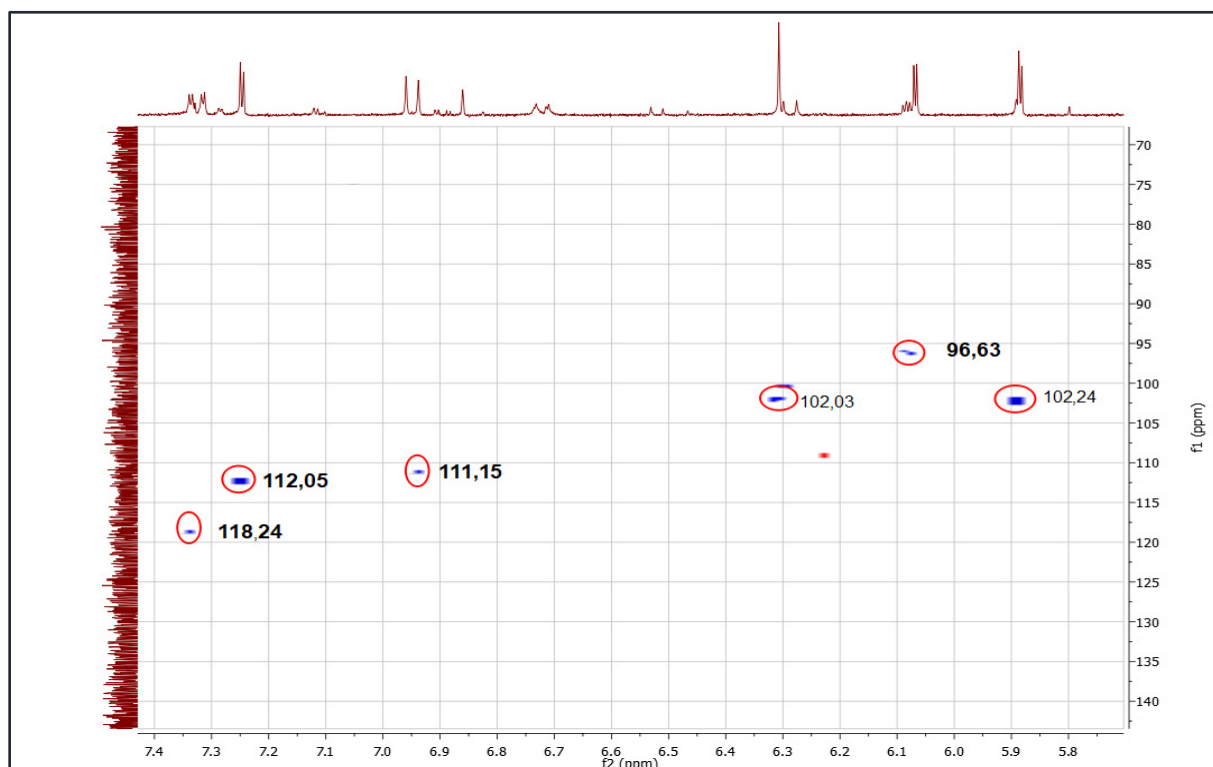


Fig.III.73 Spectre étalé HSQC du composé C4

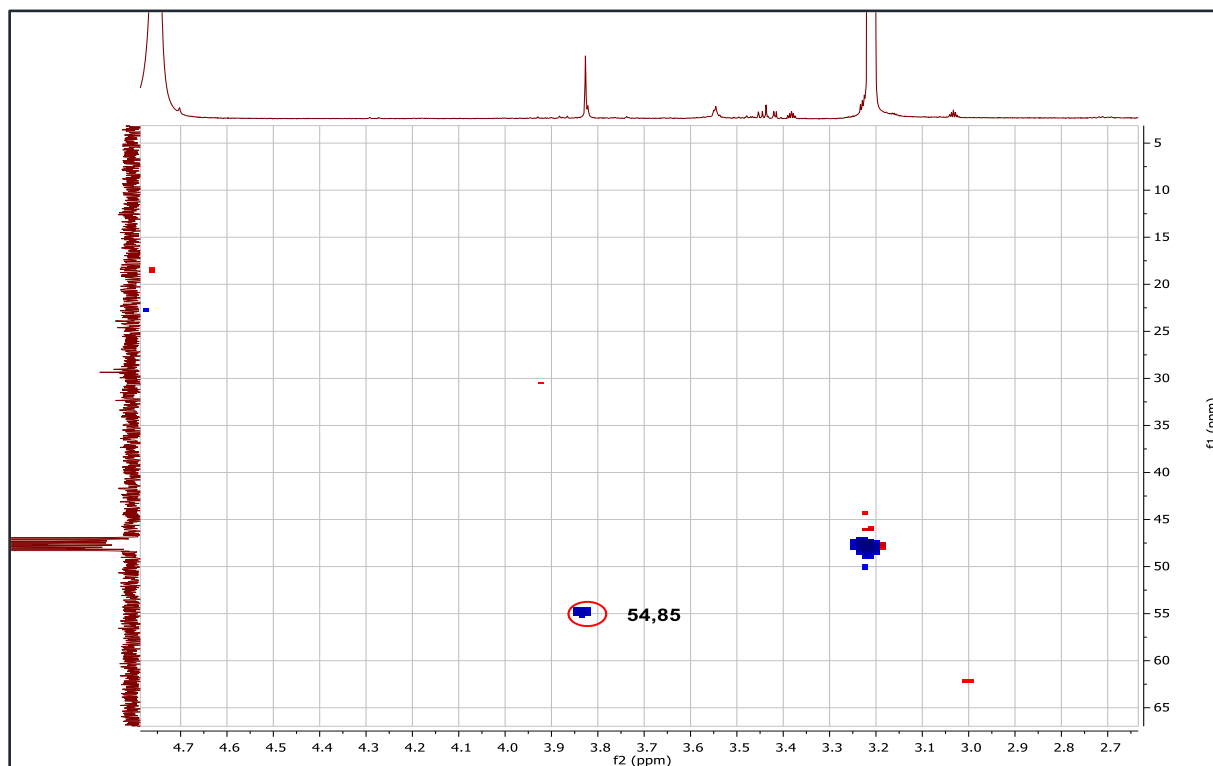


Fig.III.74 Spectre étalé HSQC du composé C4

Le spectre HMBC étalé (Fig. III. 75) montre clairement des taches de corrélations le signal du proton à la position 3 (^1H : 6,31 ppm ; ^{13}C 102,03ppm) avec le carbone (163,73ppm) et entre le méthoxyle à (^1H : 3,83 ppm ; ^{13}C : 54,85ppm) et un carbone quaternaire à 151,96ppm. Selon la littérature les carbones en vers 151ppm et à 163 ppm sont ceux de la position 2 et de la position 4' (Lunesa C. 2011) (Younghee Park et al.2007).

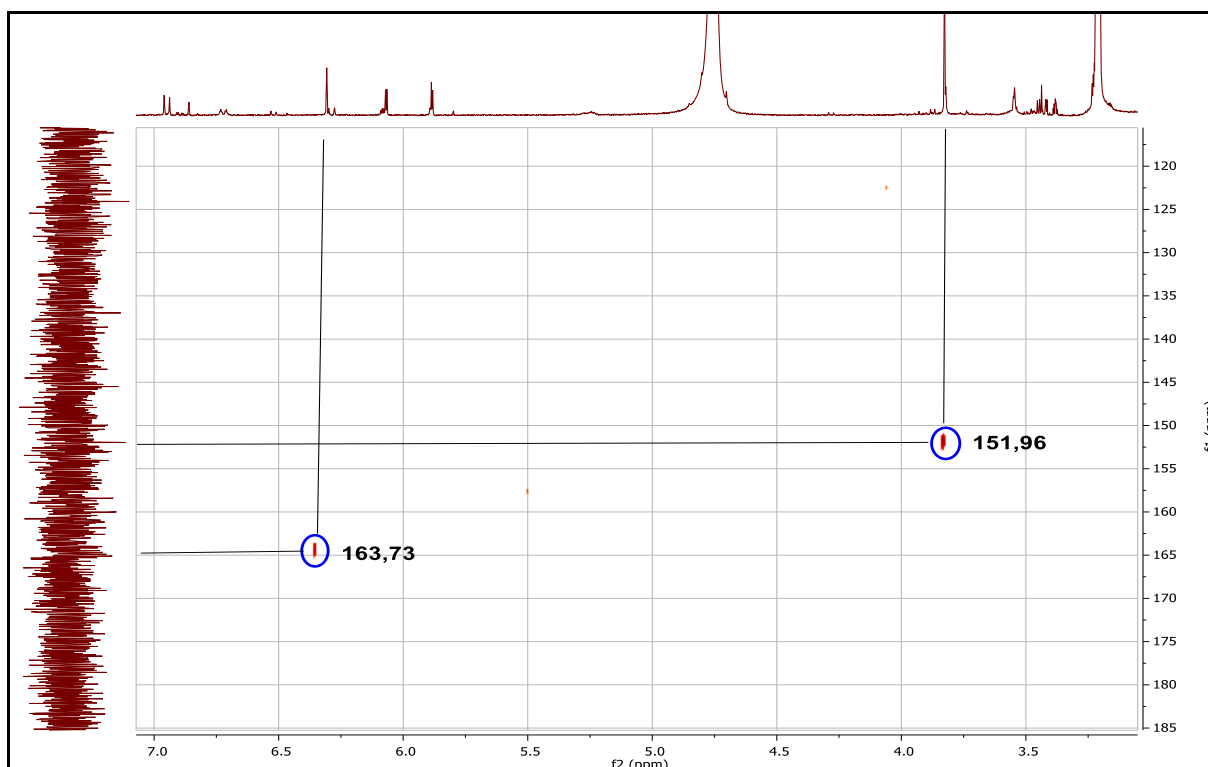


Fig.III.75 Spectre étalé HMBC du composé C4

Le spectre UV (Fig.III.76) (Tab.III.22) enregistré dans le méthanol indique que ce composé est de type flavone (bande I à 341nm). L'addition du réactif NaOH conduit à un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda=+51\text{nm}$) avec diminution de l'intensité, indiquant ainsi la présence d'un OR en position 4'. Le spectre enregistré en présence de NaOAc montre un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda=+7\text{nm}$) de la bande II, indique l'hydroxylation de la position 7. L'addition de H_3BO_3 donne un déplacement très faible ($\Delta\lambda=+6\text{nm}$) en comparaison avec le spectre du méthanol, cela indique l'absence d'un système ortho diOH en position 3' et 4'. Le spectre enregistré dans AlCl_3 par rapport à celui enregistré dans le méthanol donne un déplacement bathochrome ($\Delta\lambda=+46\text{nm}$) de la bande I, ce qui indique la présence d'un hydroxyde en position 5.

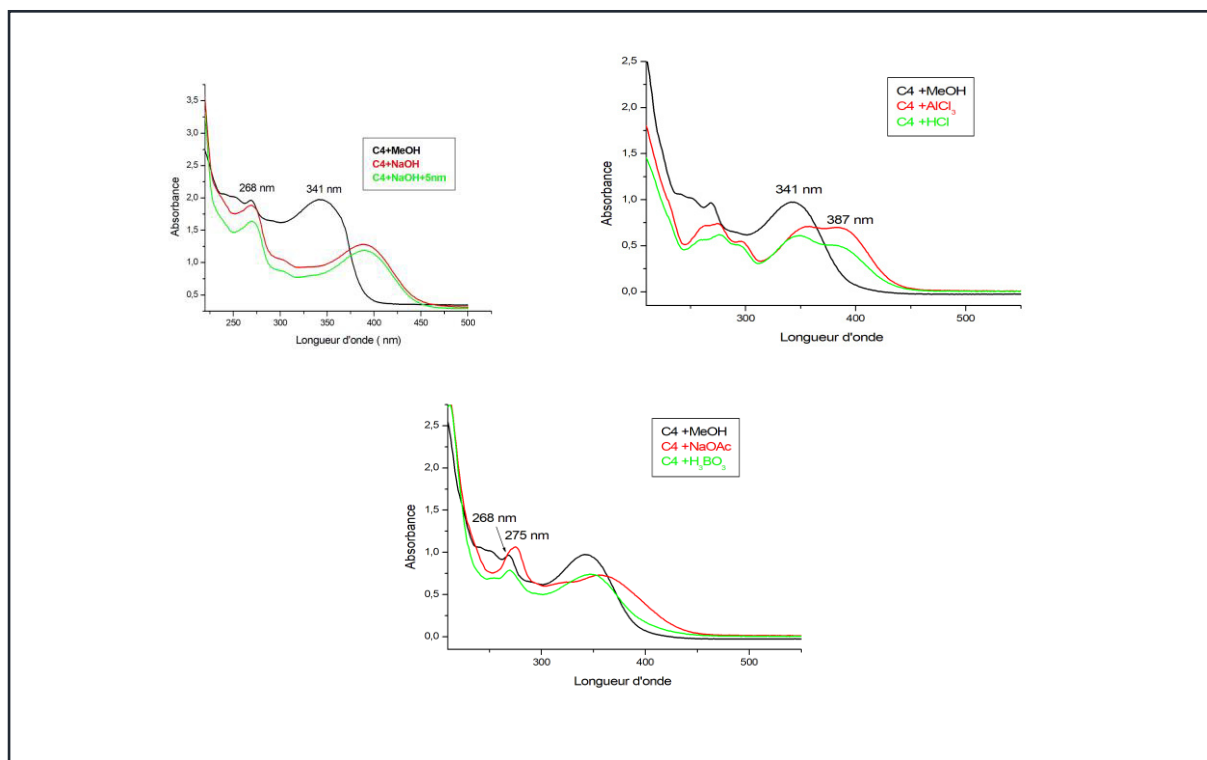
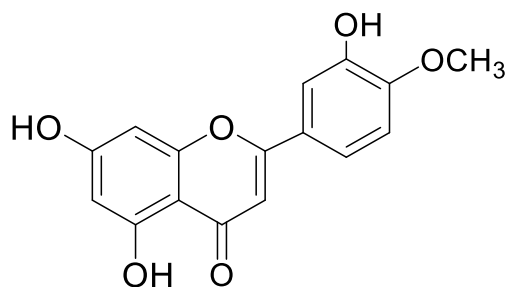


Fig.III.76 La série des courbes spectrales d’UV visible du composé C4

Tableau.III.22 Résultat de la série spectrale UV visible pour le composé C4

	Bande II	Bande I
MeOH	268	341
+NaOH	268	392
+5mm	268	392
+AlCl ₃	275	355,387
+HCl	276	351,387
+NaOAc	275	358
+H ₃ BO ₃	268	346

La combinaison de toutes ces données spectrales conduit à la structure de la diosmétine (Y. Park et al. 2007) (Tab.III.23).



Diosmétine

Tableau.III.23 Déplacement des signaux de diosmétine avec ceux de la référence

N °	RMN ¹ H(400 MHz, CD ₃ OD) δ (ppm), J (Hz)	RMN ¹³ C (100 MHz) δ (ppm)	RMN ¹ H(CD ₃ OD) δ (ppm), J (Hz) Y. Park 2007	RMN ¹³ C δ (ppm) Y. Park 2007
2(C)	-	163,7	-	163,5
3(CH)	6,31(s)	102,0	6,73(s)	103,5
4(C)	-	/	-	181,7
5(C)	-	/	-	161,5
6(CH)	5,88 (d, J=2,1)	102,2	6,19 (d, J=2,1)	98,9
7(C)	-	/	-	164,2
8(CH)	6,07 (d, J=2,1)	96,6	6,46 (d, J=2,1)	93,9
9(C)	-	/	-	157,3
10(C)	-	/	-	103,8
1'(C)	-	/	-	123,0
2'(CH)	7,25 (d, J= 2,3)	112,0	7,41 (d, J= 2,3)	113,0
3'(C)	-	/	-	146,8
4'(C)	-	151,9	-	151,1
5'(CH)	6,95 (d, J= 8,6)	111,1	7,06 (d, J= 8,6)	112,1
6'(CH)	7,33 (dd, J= 8,5;et 2,3)	118,1	7,52 (dd, J= 2,3, 8,6)	118,7
OCH ₃	3,83(s)	54,8	3,83(s)	55,8

/ : difficile à déterminer

La diosmétine a été isolé de l'espèce *Verbascum nigrum* (B. Klimek 1995).

L'évaluation biologique a montré que la diosmétine est un bon anti nociceptif (G. Adamante et al. 2019) ; un anticancéreux (A. Roma et al. 2018) et antioxydant (W.Liao et al. 2014)

III.2.2.6. Elucidation du composé C5 :

Les analyses spectrales par la techniques LC-UV-MS (Fig.III.77) ont donné une masse de $m/z=677,1$ dalton. Tandis que la technique à haute résolution HRESI-MS (Fig.III.78) effectuée sur la fraction CB12 a détecté un pic quasi moléculaire avec un temps de rétention $t_r=0,77$ min, permettant de déduire une formule brute : $C_{30}H_{38}O_{16}$ qui doit comporter 12 degrés d'insaturations et une masse $m/z=654,2155$.

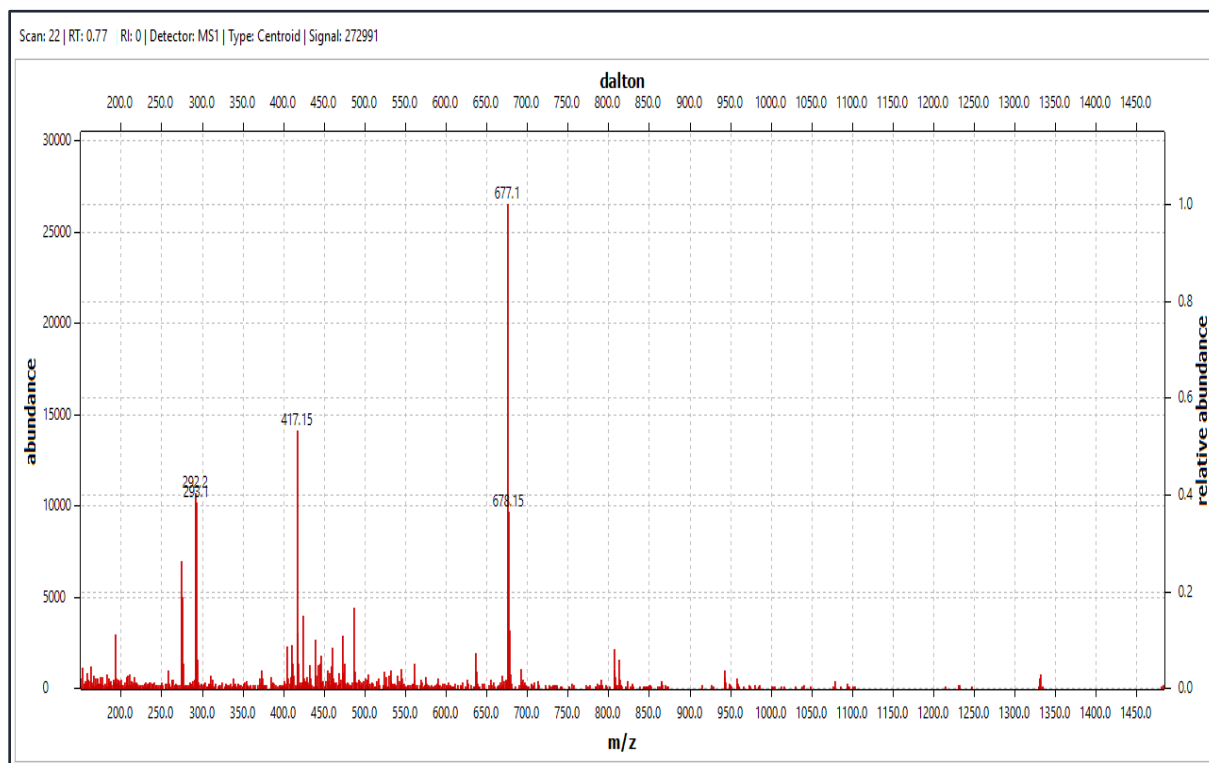


Fig.III.77 Spectre de masse mode positif par LC-UV-MS du composé C5

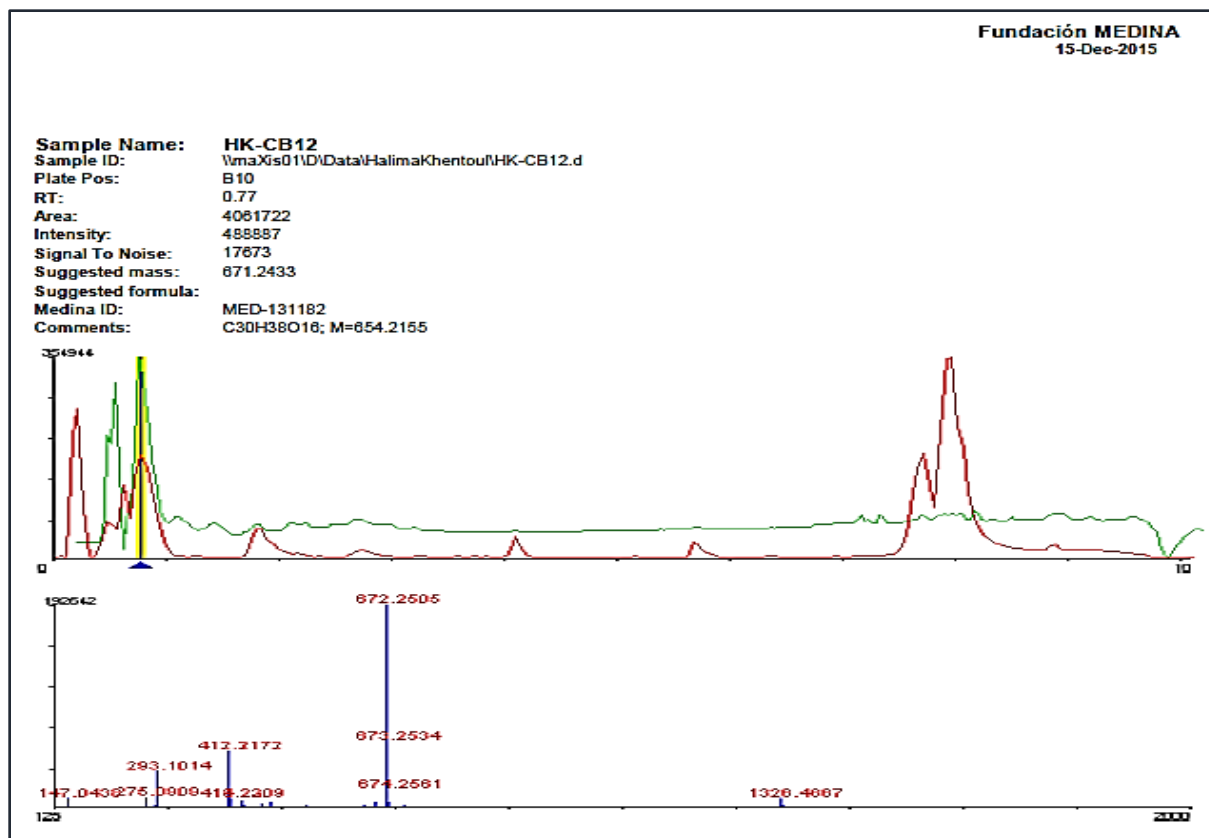


Fig.III.78 Données spectrales du composé C5 par la technique HR-ESI-MS en utilisant l'application Bruker maXis QTOF

Le spectre UV (Fig.III.79) de ce composé, affiche des bandes d'absorption à 210; 221 et 312 caractéristiques du système éther-énol d'un iridoïde et d'un chromophore coumaroylé.

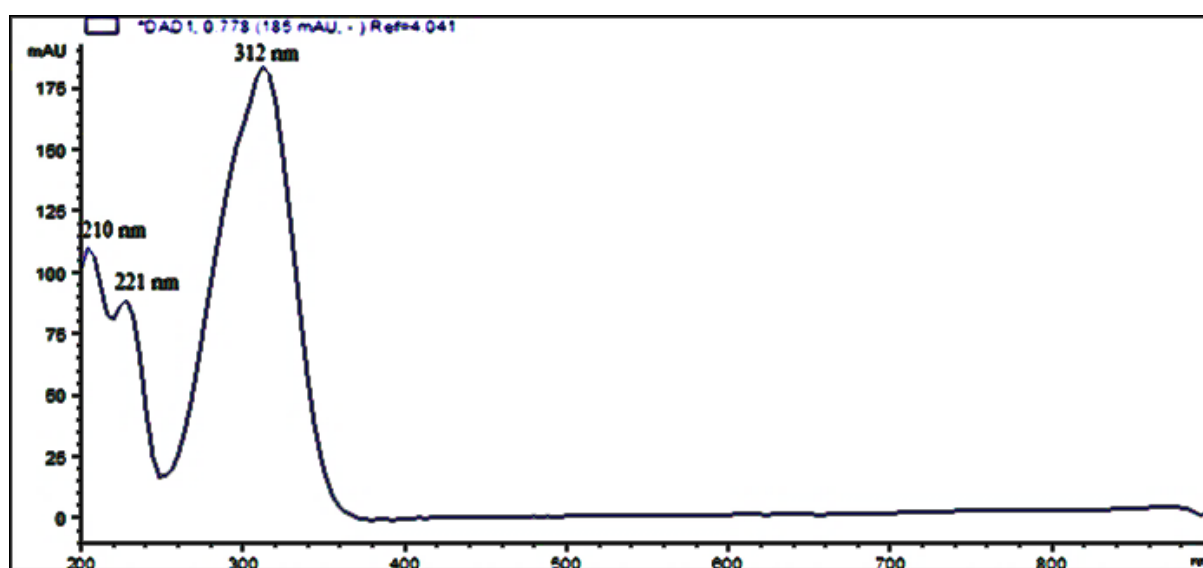


Fig.III.79 Spectre UV-Vis du composé C5

Le spectre ^{13}C en APT (Attached proton test) (Fig.III.80) confirme la présence de 30 atomes de carbones incluant : 4 carbones quaternaires, 23 groupements CH, 2 groupements CH_2 et 1 groupement CH_3 .

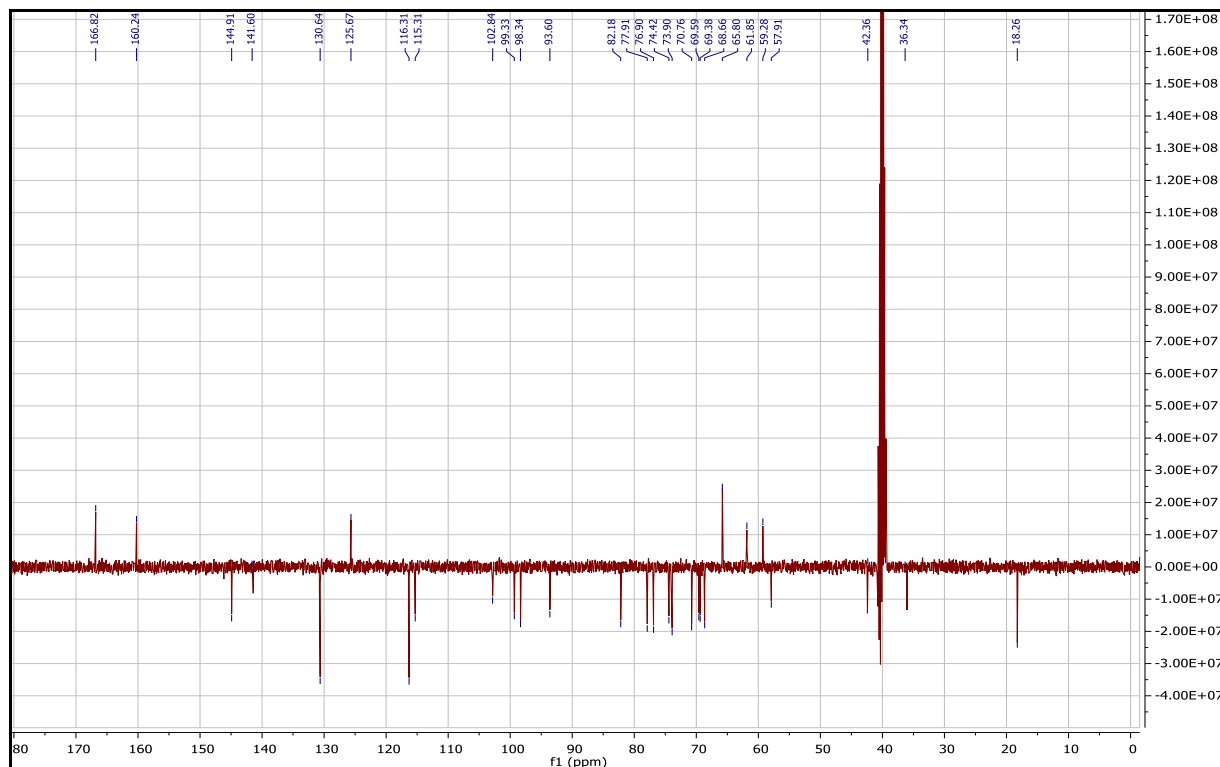


Fig.III.80 Spectre RMN ^{13}C du composé C5 (DMSO- d_6 , 100 MHz,)

L'examen du spectre RMN ^1H (Fig.III.81) enregistré dans le DMSO de ce composé, permet de détecter les signaux caractéristiques d'un iridoïde, on constate :

Un signal à 6,43ppm (dd, $J = 5.9, 1.7$ Hz) caractéristique du proton oléfinique H-3 d'un iridoïde et un autre signal à 5.01ppm (dd, $J = 5.9 ; 2.4$) correspondant au proton oléfinique H-4.

Un signal sous forme de doublet à 4,98ppm ($J = 9,6$ Hz) caractéristique du proton H-1.

Deux signaux résonant respectivement à 2,35ppm(m) et 2,40ppm (dd, $J = 9,4 ; 7,9$ Hz) qui ne peuvent être que les protons H-5 et H-9.

Les autres protons et carbones sont progressivement identifiés par les expériences 2D COSY $\text{H}^1\text{-H}^1$ (Fig.III.82), HSQC (Fig.III.83) et HMBC (Fig.III.84). En effet, le spectre COSY $\text{H}^1\text{-H}^1$ met en évidence les corrélations entre les protons H3-H4, H4-H5 et H5-H9. On constate aussi sur le même spectre une tache de corrélation entre le H-5 et le proton résonant à 3,93ppm (dl, $J = 8,6$ Hz) attribuable à H-6, lui-même corrèle avec un proton à 3,63ppm (sl) qui ne peut être que le proton H-7. La présence d'un seul proton en position 7 de ce squelette iridoïde indique que cet iridoïde n'est pas à noyau ajugol. L'expérience HSQC permet d'attribuer tous les

carbones porteurs de ces signaux, ainsi on peut constater le couplage direct entre le H-6 et le carbone à 82,05ppm permettant de supposer son oxygénation vue son déblindage. En examinant la carte HMBC, le proton H-9 corrèle avec C-1 (93,47ppm), C-6 (82,05ppm), C-8(65,49ppm), C-7(57,70ppm) qui sont tous identifiés par la séquence HSQC. Il reste un carbone quaternaire résonant à 65,49ppm qui ne peut être attribué qu'à C-8. On remarque aussi une tache de corrélation entre le C-7 avec le proton à 3,91ppm attribué à H10a (d, $J=9,9$ Hz) porteur du carbone à 59,10ppm qui correspond bien à un alcool primaire.

Le signal résonant à 4,61ppm (d, $J= 7,8$ Hz) est caractéristique d'un proton anomérique (H-1') d'un sucre probablement le glucose. (Fig. III 85 et 86)

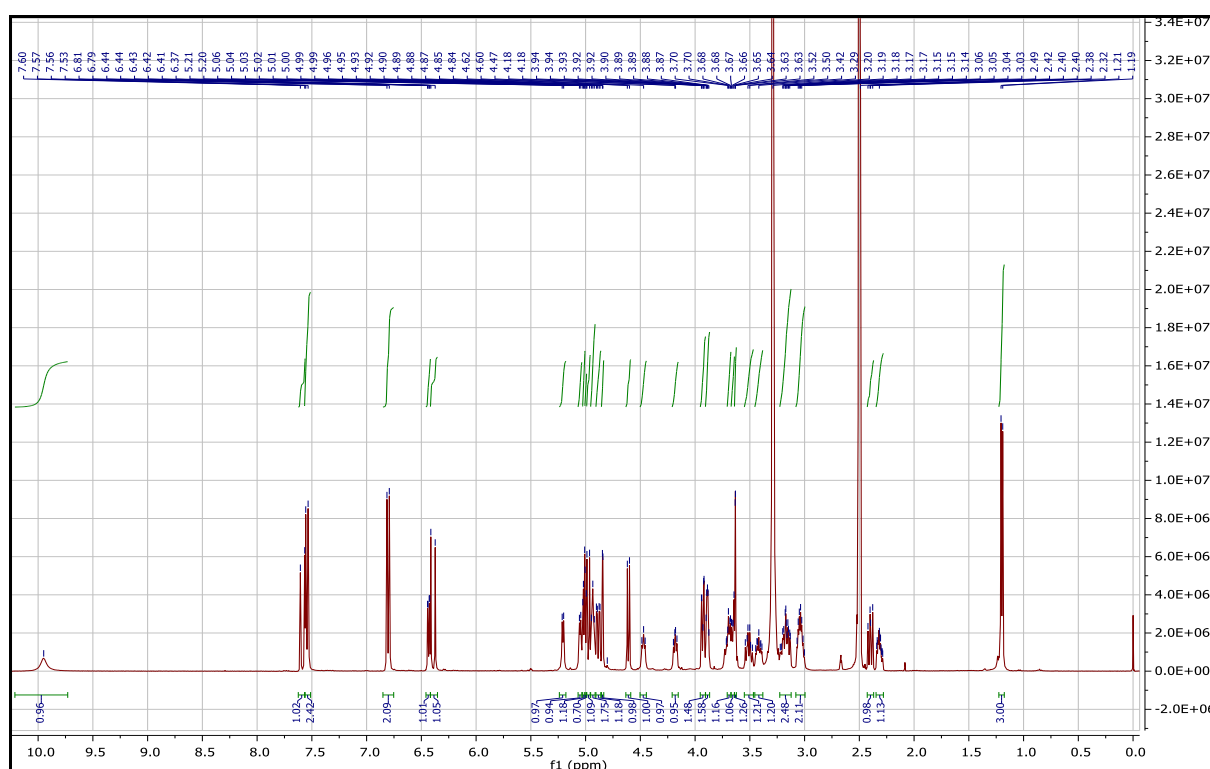


Fig.III.81 Spectre ^1RMN du composé C5 (DMSO- d_6 , 400 MHz,)

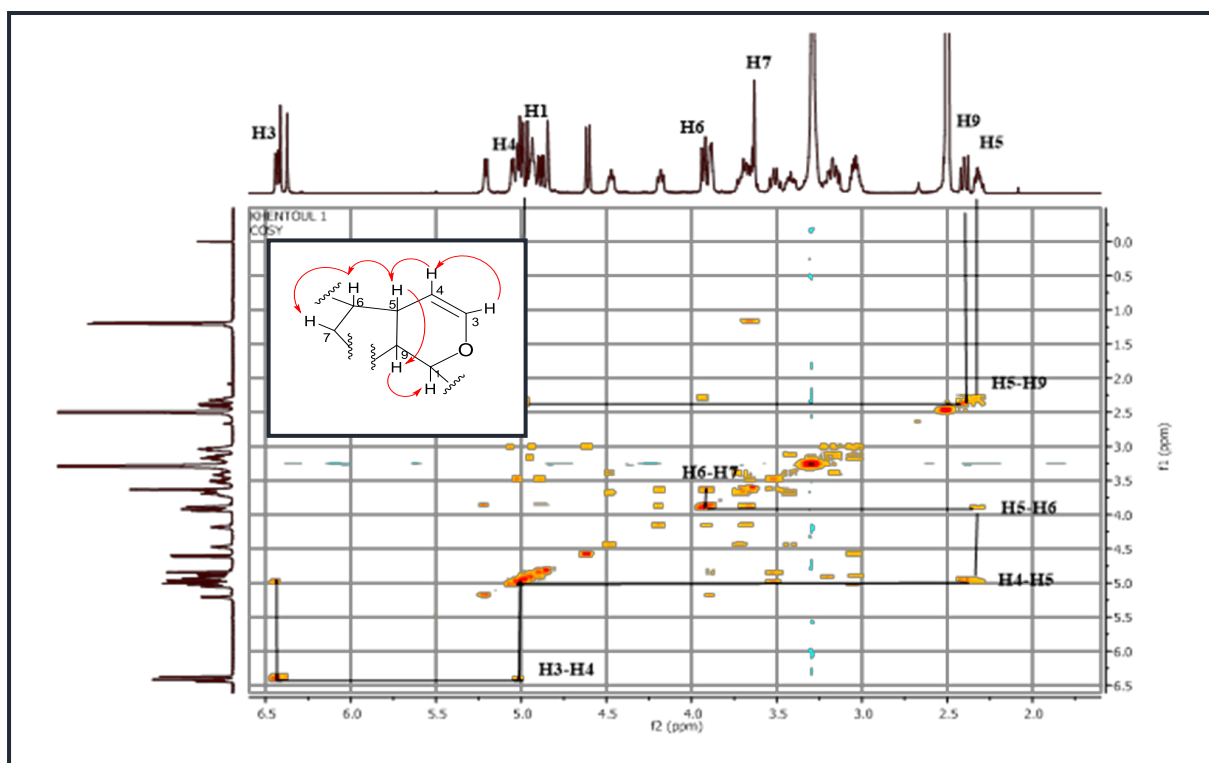


Fig.III.82 Spectre COSY : corrélations d'une partie de la génine du composé C5

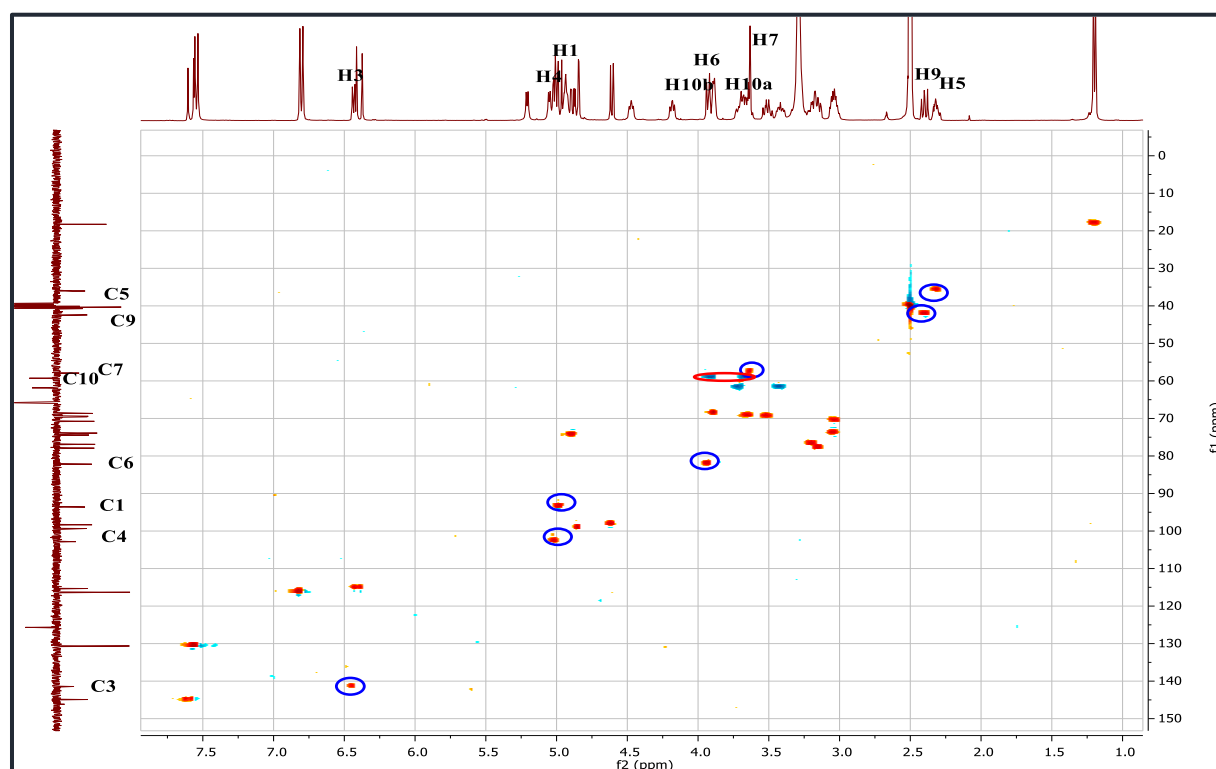


Fig.III.83 Spectre HSQC d'une partie de la génine du composé C5

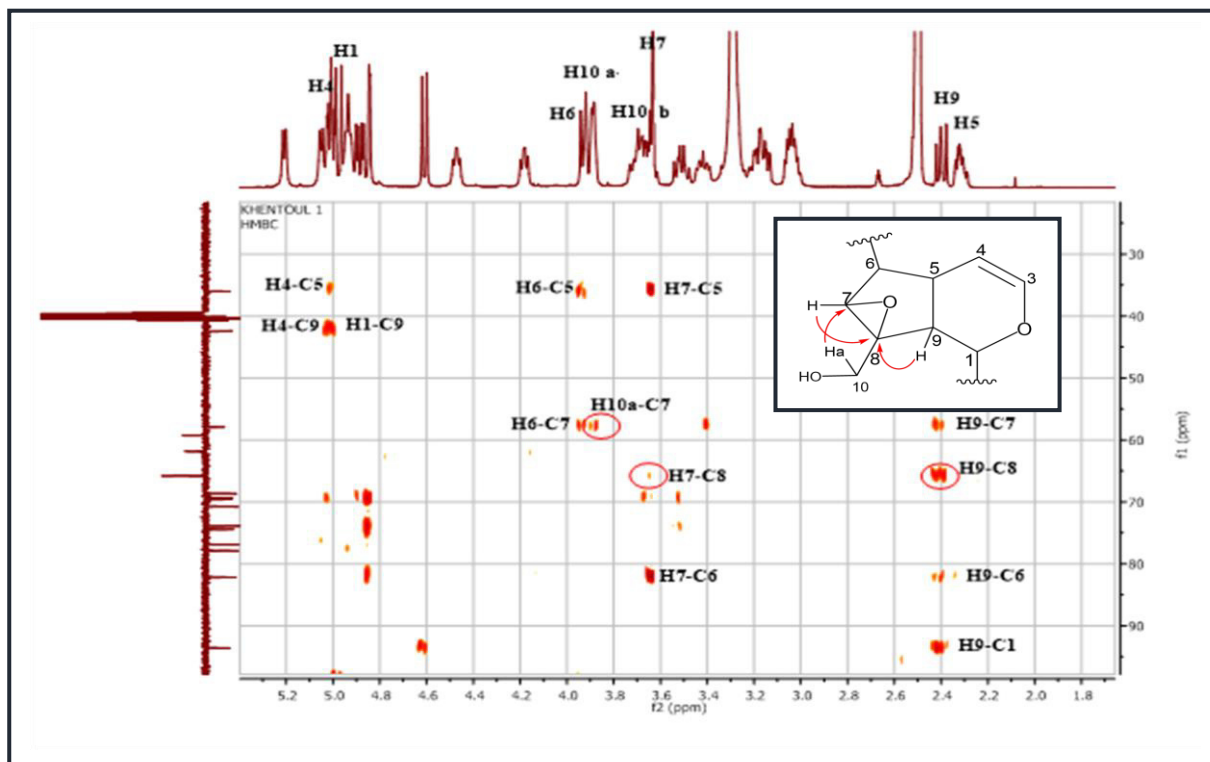


Fig.III.84 Spectre HMBC d'une partie de la génine du composé C5

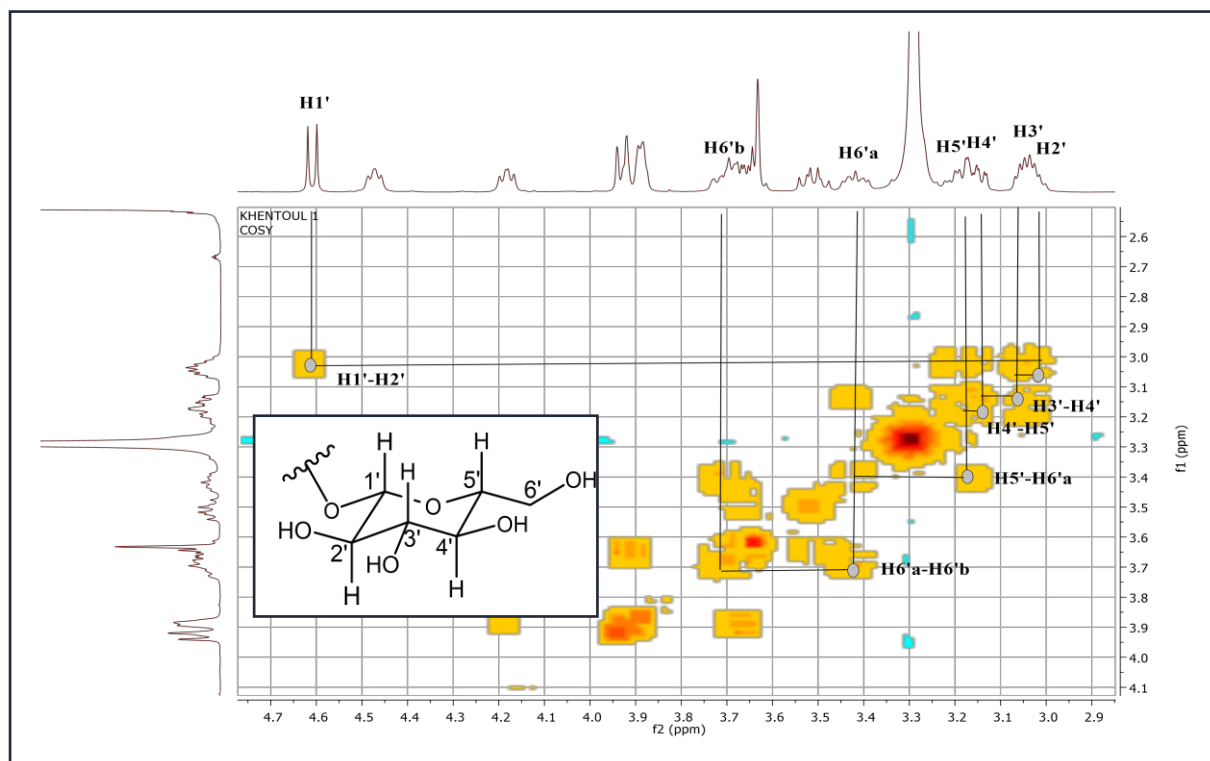


Fig.III.87 Spectre COSY de corrélations du glucose

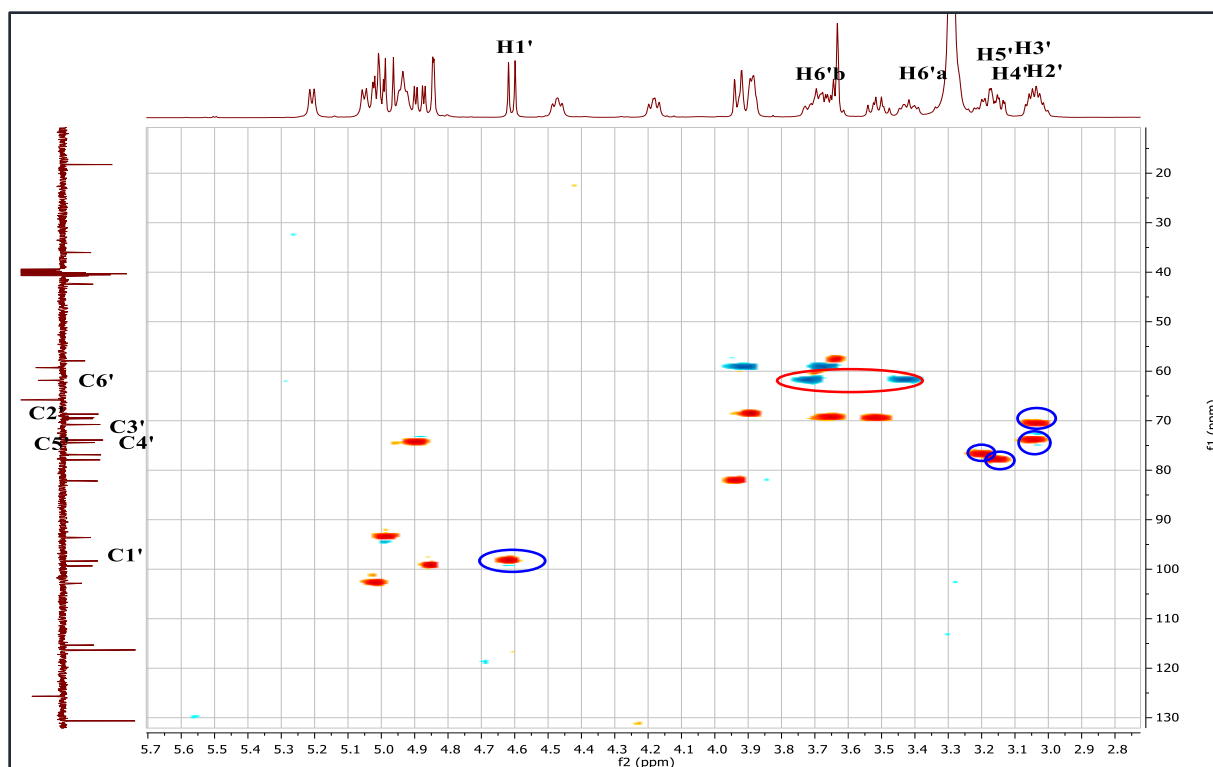


Fig.III.86 Spectre HSQC du glucose

Toujours sur le spectre HMBC (Fig.III.87), la présence d'une corrélation entre le proton anomère du glucose et le C-1 (93,47ppm) confirme le rattachement de ce sucre à la génine par la jonction C1-O-Glu.

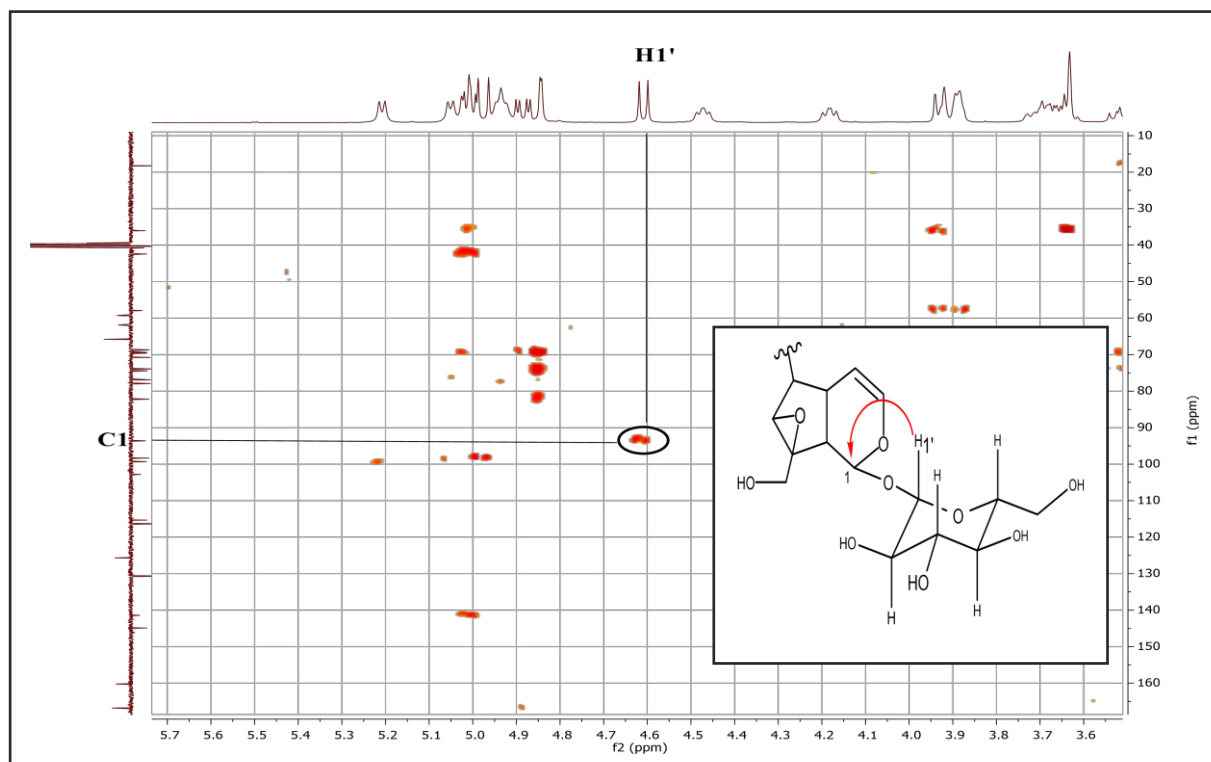
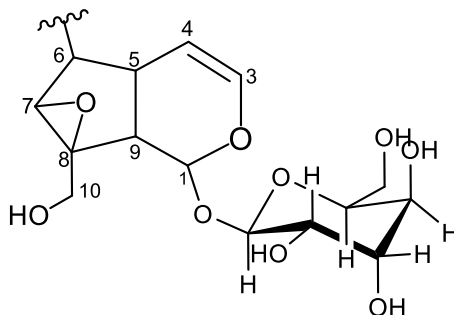


Fig.III.87 Spectre HMBC : corrélation C1-O-Glu.

D'après toutes ces informations, les données spectrales ainsi que les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones, on peut conclure qu'à ce stade, le catalpol constitue bien la génine du composé C5, il s'agit d'un iridoïde avec la structure partielle suivante :



L'observateur peut distinguer sur le spectre RMN¹³C un ensemble de signaux dans la zone qui s'étale de 60 à 100ppm, suggérant ainsi la présence de plus d'un sucre dans le composé, outre le glucose déjà mentionné, on remarque sur le spectre RMN¹H un signal à 1,19ppm (d, $J=6,1$ Hz) correspondant aux protons d'un CH₃ et indiquant ainsi la présence d'un rhamnose, toujours sur le spectre RMN¹H, le proton anomérique à 4, 84ppm (d, $J=1,4$ Hz) confirme l'existence de l'entité rhamnose. Les spectres COSY et HSQC (Fig.III.88, 89) indiquent tous les protons et carbones du rhamnose.

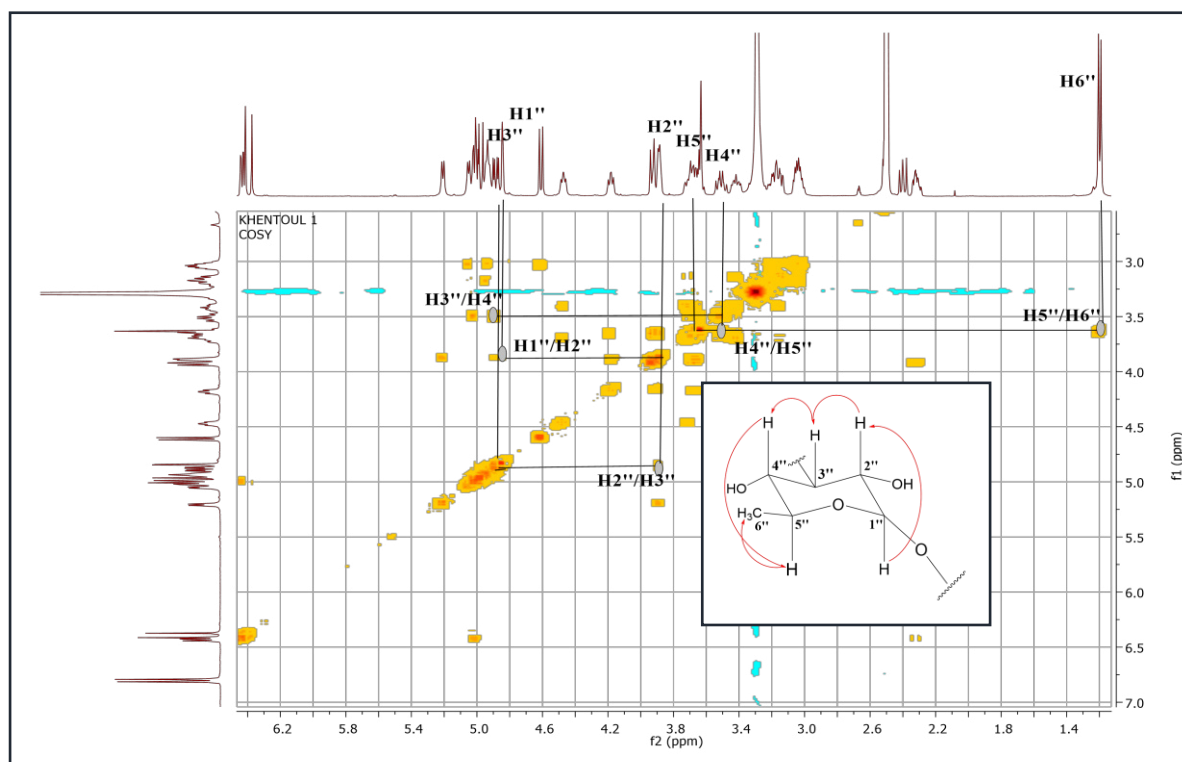


Fig.III.88 Spectre COSY du rhamnose du composé C5

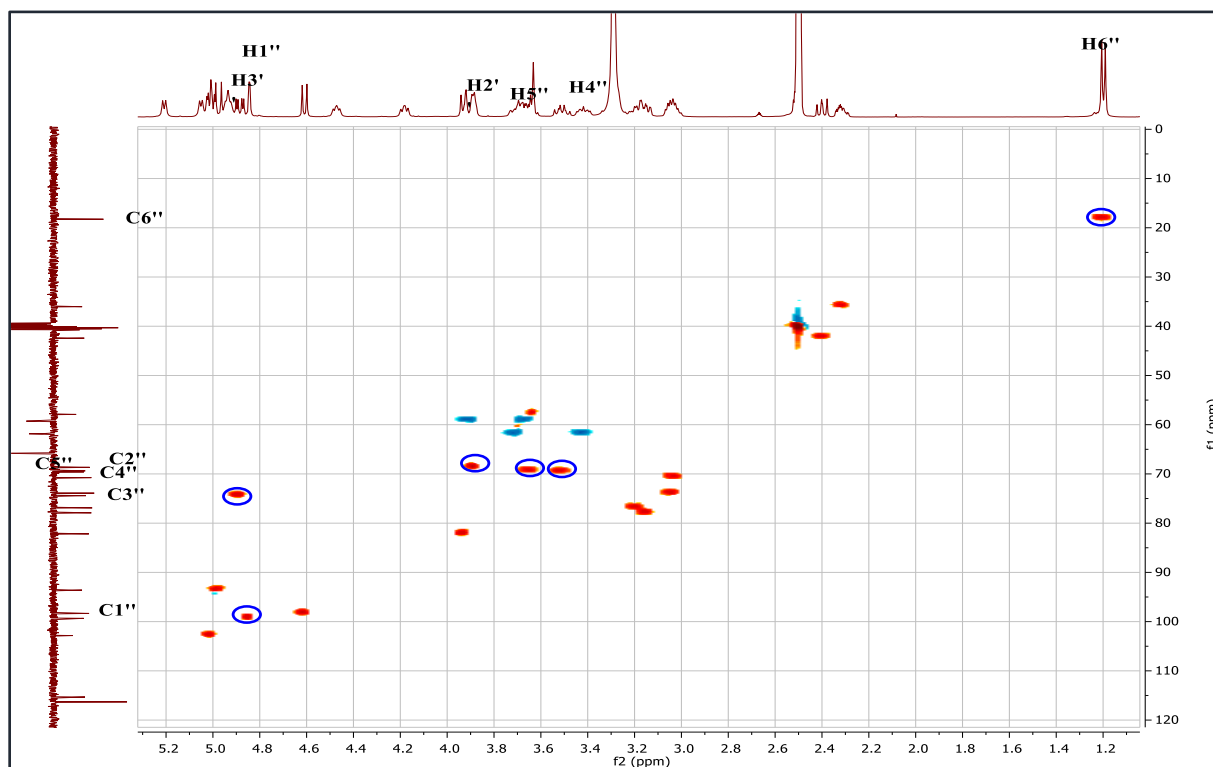


Fig.III.89 Spectre HSQC du rhamnose du composé C5

En retournant vers le spectre HMBC, on remarque que le carbone C-6 (82,05ppm) du catalpol a une tache de corrélation avec le proton anomérique à 4,84 ppm du rhamnose ce qui indique le rattachement de cette entité sur le carbone 6 de la génine par une jonction C6-O-rhamnose (Fig.III.90).

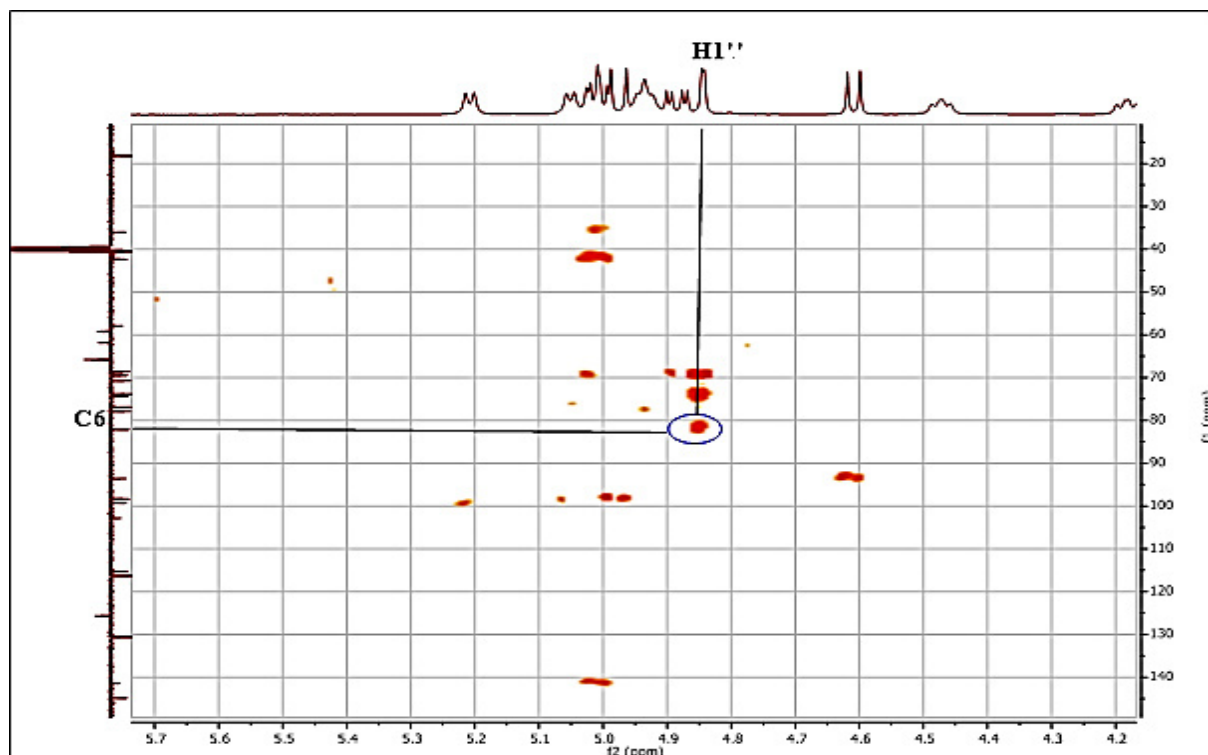


Fig.III.90 Spectre HMBC : Jonction C6-O-rhamnose

Le spectre RMN¹H montre également la présence de deux signaux doublets de proton aromatiques à 7,55ppm (d, $J=8,7\text{Hz}, 2\text{H}$) et 5,27ppm (d, $J=10,5\text{Hz}, 2\text{H}$), ainsi que deux autres d'intégration 1H, résonnant chacun sous forme de doublet ($J=16\text{Hz}$) à 7,59 et 6,39ppm correspondant à deux protons oléfinique de configuration *trans*. Un retour vers le spectre HMBC nous permet de constater une tache de corrélation entre ces protons oléfiniques et un carbone quaternaire à 166,67ppm probablement celui d'un groupement carbonyle. Ce dernier montre une tache de corrélation avec le proton H3'' du rhamnose ce qui nous permet de l'ajoncter en position 3'' (Fig.III.91). Toujours sur le spectre HMBC (Fig.III.92), on remarque que les protons aromatiques couplent avec deux carbones quaternaires résonant à 125.67et 160.24ppm attribués respectivement aux deux carbones C-1''' et C-4'''' du cycle aromatique et vue du déblindage de ce dernier on conclut qu'il est substitué par un groupement hydroxyle et par conséquence, tout ceci nous permet de suggérer la présence d'un groupement (*trans* p-coumaroyl) déjà détecté dans le spectre UV de ce composé.

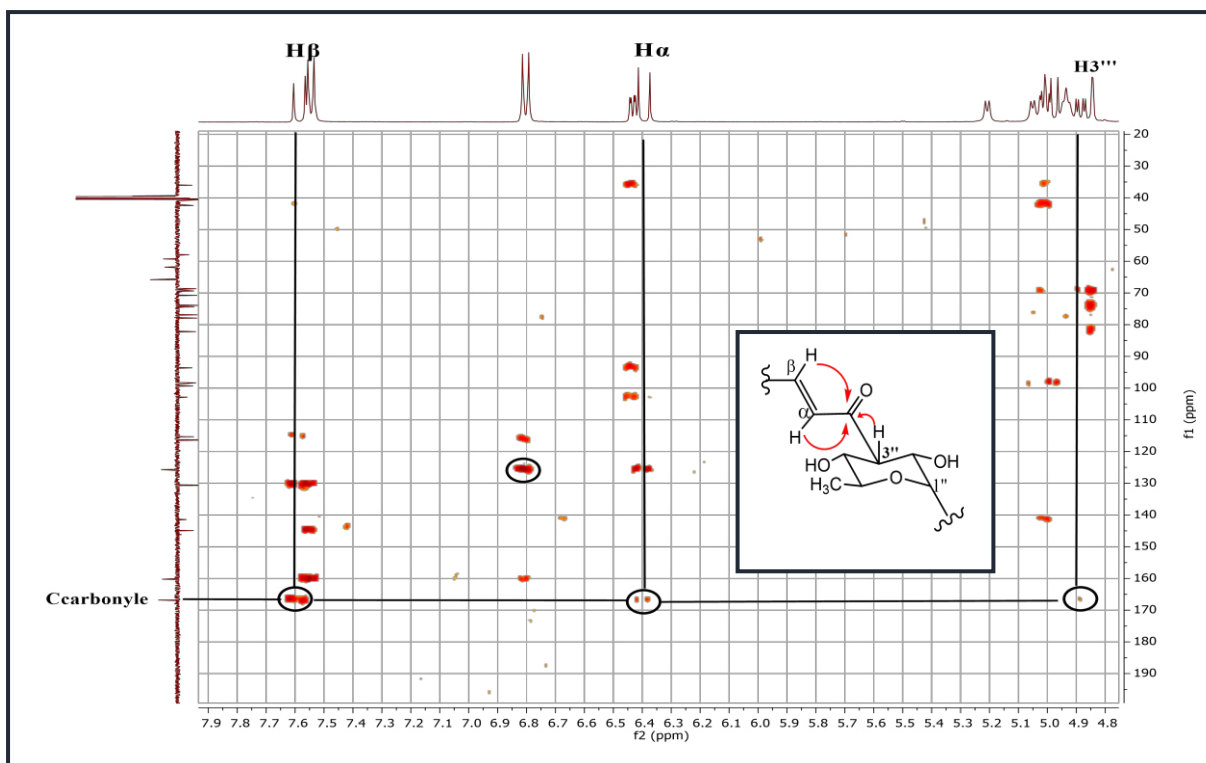


Fig.III.91 Spectre HMBC de jonction rhamnose- coumaroyle de C5

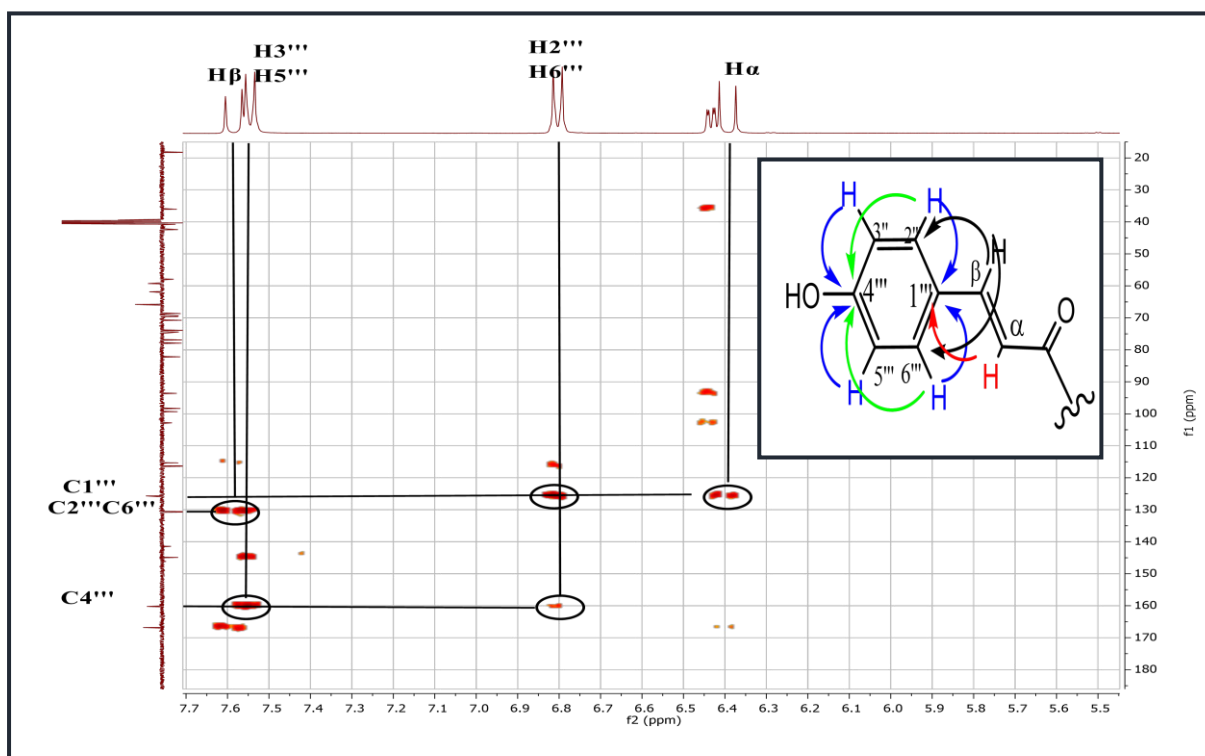
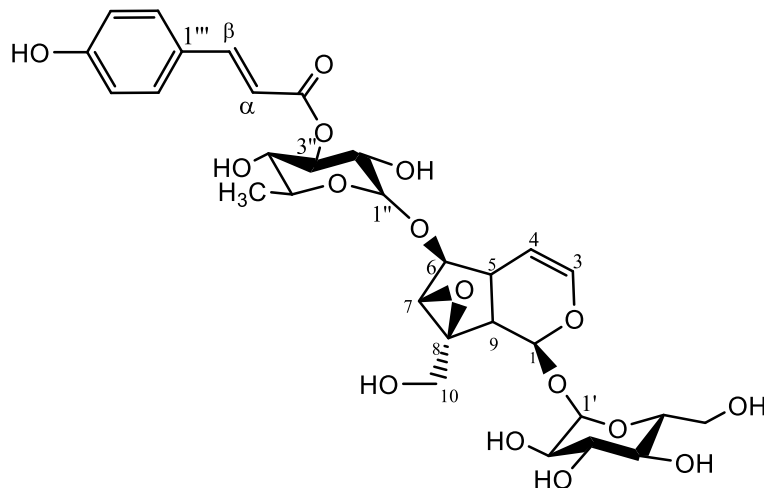


Fig.III.92 Spectre HMBC de P- coumaroyle du composé C5

En arrivant à cette étape et en concluant toutes ces données spectrales, la structure de ce composé est celle de 6-*O*-[(3''-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] –catalpol (Tatli et al.2003).



Maintenant il nous reste à déterminer la stéréochimie de ce composé. Les expériences COSY H-H (Fig. III. 82.) et NOESY (Fig. III. 93) constituent un outil de choix dans la mesure où le spectre COSY permet d'identifier un glucose en position β substituant la génine en position C-1. Ce qui est confirmé par une tache NOE dans le spectre NOESY entre le H-1' du glucose et le H-1 de la génine à 4,98ppm. On observe aussi sur le même spectre une tache NOE entre le proton H-1 et le proton H-9 à 2.40ppm, et entre le proton H-6 à 3.93ppm et le proton H-7 à 3.63ppm, et enfin une tache entre le H-7 et le proton H-1'' du rhamnose.

On constate aussi qu'il n'y a pas de tache NOE entre le H-5 et le H-9.

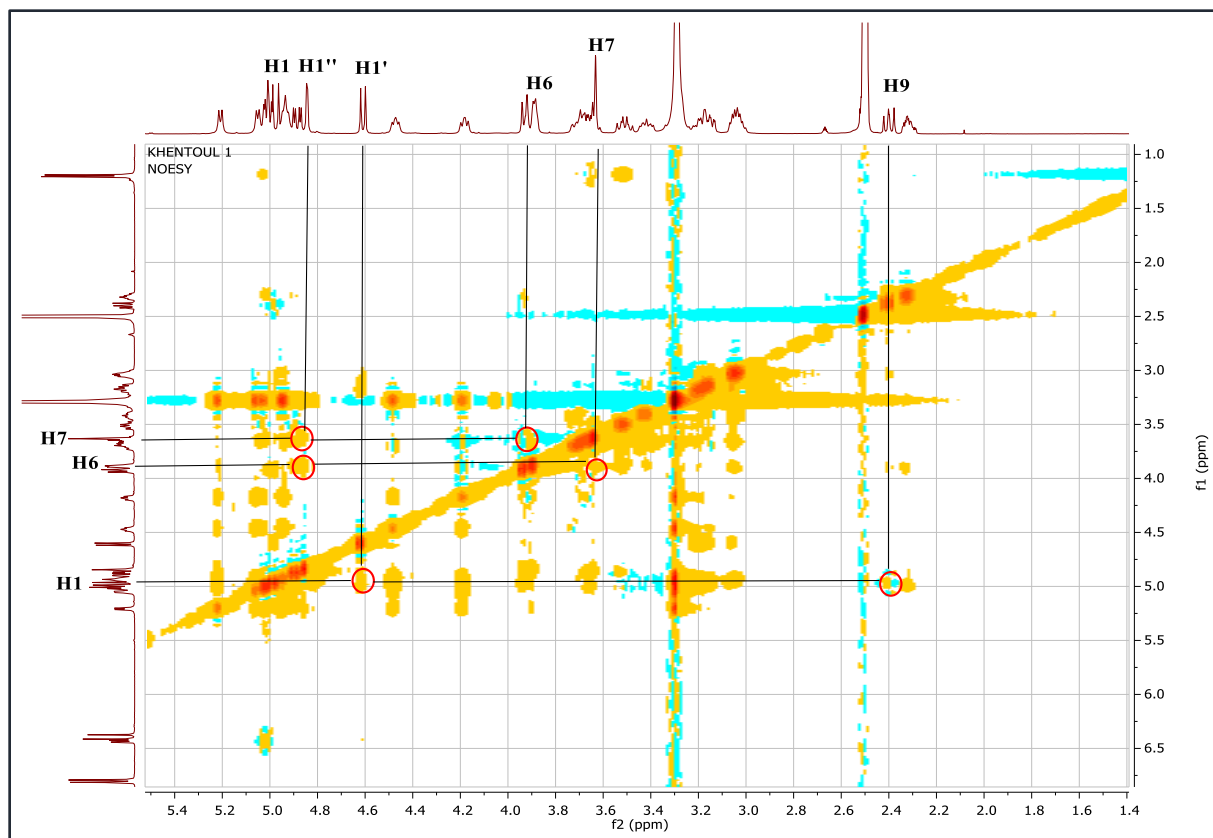
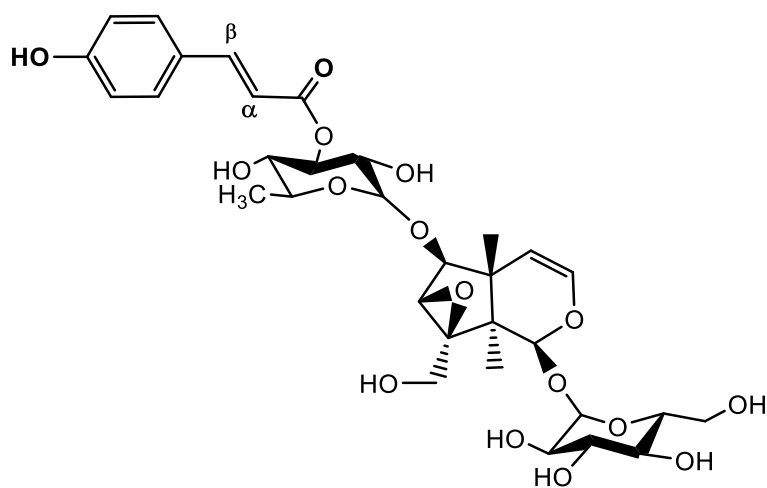


Fig.III.93 Spectre NOESY du composé C6

En regroupant toutes ces données spectrales on aboutit à la structure finale suivante :



6-O-[(3''-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] -catalpol

Cette structure stéréochimique du composé : 6-*O*-[(3"-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] – catalpol est nouvelle dans la littérature.

Les signaux de ce composé sont présentés dans le tableau III.26

Tableau.III.26Déplacement des signaux de (6-*O*-[(3''-*p*-coumaroyl) - α -L rhamnopyranosyl] – catalpol)

N °	RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	RMN ¹³ C (100 MHz) δ (ppm)	Entités sucre	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
1(CH)	4,98 (d, <i>J</i> = 9,6)	93,4	1 (CH) 'glucose	4,61 (d, <i>J</i> = 7,8)	98,19
3(CH)	6,43 (dd, <i>J</i> = 5,9 ; 1,7)	141,2	2'(CH)	3,03(m)	70,59
4(CH)	5,01 (dd, <i>J</i> = 5,9; 2,4)	102,6	3'(CH)	3,04(m)	73,84
5(CH)	2,35(m)	35,8	4'(CH)	3,20(m)	77,80
6(CH)	3,93 (m)	82,0	5'(CH)	3,17 (m)	76,76
7(CH)	3,63 (sl)	57,7	6'(CH)	3,46; 3,72 (m)	61,77
8(C)	-	65,4	1'' (CH) rhamnose	4,84 (d, <i>J</i> = 1,4)	99,14
9(CH)	2.40 (dd, <i>J</i> = 9,4; 7,9)	42,1	2''(CH)	3,89(m)	68,53
10(CH ₂)	3,67(d, <i>J</i> =9,9); 3,91(d, <i>J</i> =9,9)	59,1	3''(CH)	4,88(dd, <i>J</i> =9,8; 3,3)	74,27
	P- Coumaroyle		4''(CH)	3,51 (td, <i>J</i> = 9,6;7,0)	69,45
1'''(C)	-	125,6	5''(CH)	3,66(dd, <i>J</i> = 6,1; 9,6)	69,31
2'''(CH)	7,55 (d, <i>J</i> = 8,7)	130,5	6''(CH ₃)	1,19 (d, <i>J</i> =6,1)	18,08
6'''(CH)					
3'''(CH)	6,80 (d, <i>J</i> = 8,7)	116,1			
5'''(CH)					
4'''(C)	-	160,2			
α (C)	6,39 (d, <i>J</i> = 16,0)	115,1			
β (C)	7,59 (d, <i>J</i> = 16,0)	144,8			
(CO)	-	166,5			

III.3. Molécules identifiées par la technique HR-ESI-MS :

L'étude des différentes fractions des extraits issus des deux plantes *V. atlanticum* et *V. creticum*, par la technique HRESI-MS a donné 96 formules brutes dont certaines d'entre elles sont les mêmes présentes dans les deux espèces étudiées.

Nous avons pu identifier 11 autres composés grâce à cette technique en utilisant la banque des données du centre de recherche MEDINA. Ces résultats sont affichés dans le tableau n° 27

Les 11 composés sont connus comme des molécules bioactives :

L'acide bétulinique est une molécule très connue par ses activités biologiques comme l'activité Anti-VIH, l'Activité Anti malaria, l'activité antibactérienne, l'activité antiinflammatoire et des propriétés anti nociceptive (**M. G. Moghaddam et al. 2012**)

L'érythrodiol a des effets antiprolifératifs, anticancéreux (**M.E. Juan et al. 2008**). L'érythrodiol a un bon effet régulateur du cholestérol sanguin et il peut être utilisé contre la formation de l'athérosclérose. (**L. Wang et al. 2017**).

l'acide maslinique a plusieurs effets thérapeutiques, tels que les propriétés anti tumorales, antidiabétiques, antioxydants, anti-inflammatoires, antiparasitaires et antivirales(**I. Z. Pavel et al.2016**).

Le composé (4*E*) -2-Formyl-3-(2-oxoéthyl) -4-hexénoate a des effets antiinflammatoires (**G. Sindona et al.2012**).

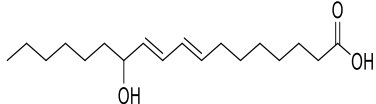
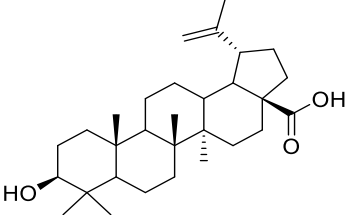
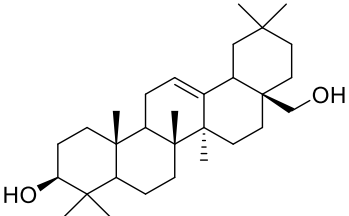
La caféine est une molécule bioactive et connue comme un antimicrobien, un anticancéreux et immunomodulaire (**O. H. Lele et al.2016**).

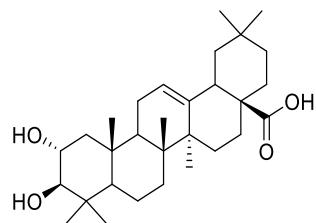
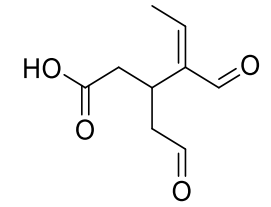
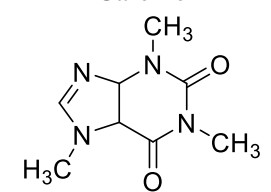
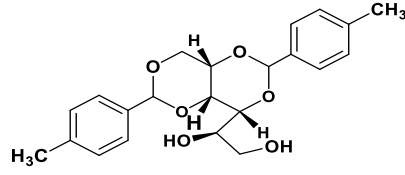
La génistéine possède des activités anticancéreuse et antioxydants et anti VIH (**Popa D.S. et Rusu M. E. 2017**).

Le tréhalose est utilisé comme une source d'énergie et il est consommé dans les aliments.il est utilisé comme additif dans de nombreux aliments, médicaments et produits cosmétiques, car il présente une forte rétention d'eau. Les propriétés biologiques du tréhalose comprennent la suppression de la perte osseuse, des effets antitumoraux et l'atténuation de la résistance à l'insuline (**S.I Wada et al.2014**).

selon une recherche récente la Théobromine a une bonne activité antimicrobienne (**A. Lakshmi et al. 2019**).

L'aloès émodine a un effet antiinflammatoire (**M.Y. Park et al.2009**), antimicrobien et anticancéreux (**M. H. Radha et al. 2015**).

Fraction	Formule	T _r (min)	m/z	Fragments ESI -MS	Composé
AVA3	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	5,8	296,2344	/	<p>Acide (10<i>E</i>,12<i>E</i>) -9-hydroxy-10,12-octadécadiénoïque</p> 
AVA5	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	6,36	456,3589	456.3589,421.3229,432.3613,356.2906,434.3769	<p>Acide bétulinique</p> 
AVC12		6,43	456,3596	456.3596,473.3863,434.3776,308.2341,286.2522	
AVA5	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	6,94	652,29	652.29,442.38,420.3981,460.3906	<p>Erythrodiol</p> 

AVA10		5,54	489,3812	489.3812,472.3537,280.239,258.2572,262.2283,220.1092	Acid maslinique
AVC12	$C_{30}H_{48}O_4$	5,59	472,3528	489.3808,472.3528,190.1352,458.3367	
AVA15-3		0,51	184,0728	184.0728,162.0909,166.0625,206.0551,144.0805	(4E) -2-Formyl-3-(2-oxoéthyl) -4-hexénoate
AVC12	$C_9H_{12}O_4$	0,76	184,0733	184.0733,310.1044,288.1225,270.1117,168.0782	
AVA16	$C_8H_{10}N_4O_2$	0,5	216,0604	216.0604,194.078,276.081,180.0626,162.0524	Caféine 
	$C_{22}H_{26}O_6$	4,7	386,1725	619.3537,602.327,386,1725,292.2019,270.2199, 457.3238	1,3:2,4-Di-O-benzylidene-D-sorbitol. 

BVA8	$C_{15}H_{10}O_5$	3,3	270,0518	270.0518,650.4012,752.3738,328.2237,537.3645	<p>Génistéine</p> 
BVA11	$C_{12}H_{22}O_{11}$	0,48	342,1154	342,1154	<p>Tréhalose</p> 
AVC12	$C_7H_8N_4O_2$	0,48	180,0618	180.0618,218.0782,194.0762,216.0606,199.0341	<p>Théobromine</p> 
AVC17	$C_{15}H_{10}O_5$	4,2	270,0509	274.0728,270.0509,302.073,626.1771,182.0582	<p>Aloès émodine</p> 

CHAPITRE IV

Activité Biologique

Introduction

Dans ce chapitre nous allons exposer toutes les activités biologiques effectuées et leurs résultats sur les différents extraits (extrait chloroforme, extrait acétate d'éthyle, extrait *n*-butanol) des deux espèces *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav., en commençant par la quantification des polyphénols totaux et les flavonoïdes totaux puis l'évaluation du potentiel antioxydant par sept tests différents, ensuite l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire, et enfin le calcul du facteur anti- solaire. Tous ces tests sont évalués par l'analyse spectrophotométrique. La mise en évidence de la capacité antibactérienne et antifongique est aussi présentée dans ce chapitre contre deux bactéries, une de gram- (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*) et une de gram+ (*Staphylococcus aureus*) et la levure *Candida albicans*. Le dernier test biologique effectué sur ces deux espèces est celui du pouvoir inhibiteur du cholinestérase (anti Alzheimer). Les quatre composés séparés des extraits acétate d'éthyle et *n*- butanol de *V. creticum* Cav. sont aussi testés avec les méthodes antioxydants de CUPRAC, DPPH et pouvoir réducteur.

IV.1. Protocoles et méthodes :

IV.1.1. Détermination du taux des polyphénols et flavonoïdes totaux :

IV.1.1.1. Mode opératoire :

La teneur des polyphénols totaux dans les différents extraits des espèces *Verbascum atlanticum* Batt. et *Verbascum creticum* Cav. est déterminée en équivalents d'acide gallique (AG) par la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu sur microplaques (Muller et al. 2010). La courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Fig. IV.5) est préparée à partir d'une solution mère de 200µg /ml avec sept dilutions (175µg/ 150µg / 125µg/ 100µg/ 75µg/ 50µg/ 25µg). Des volumes de 20µl de chaque dilution et les extraits des plantes étudiées (1mg/ml) sont transférés dans une microplaque puis mélangés avec 100µl de FCR 2M dilué (1 :10) + 75 µl de carbonate de sodium (7,5%), le mélange est mis à l'obscurité pendant 2 heures incubation 2heures et La lecture est faite à 765 nm.

La détermination de la teneur totale en flavonoïdes (TFC) est déterminée par la méthode spectrophotométrique de Topçu (G. Topçu et al. 2007). Après la préparation des dilutions pour tracer la courbe d'étalonnage (Fig.IV.6) de la quercétine à partir d'une solution de 200µg. On mélange dans une microplaque de 96 puits, des volumes de 50µl de chaque dilution et les extrait de plantes (1mg/ml), avec 130 µl de méthanol, 10 µl de Potassium

acétate (1 M) et 10 µl de nitrate d'aluminium (10%). Après une durée d'incubation de 40 min dans l'obscurité, on mesure l'absorbance à 415 nm.

IV.1.2. Activité antioxydant :

IV.1.2.1. Test DPPH :

IV.1.2.1.1. Principe de la méthode :

Cette méthode a été développée par Blois (1958) dans le but de déterminer l'activité antioxydant de manière similaire en utilisant un radical libre stable : **α, diphényl-β-picrylhydrazyle**(Fig. IV.1). Le test est basé sur la mesure de la capacité de piégeage des antioxydants à son égard. L'électron impair de l'atome d'azote dans DPPH est réduit en recevant un atome d'hydrogène des antioxydants à l'hydrazine correspondante (S.B. Kedare et al.2011).

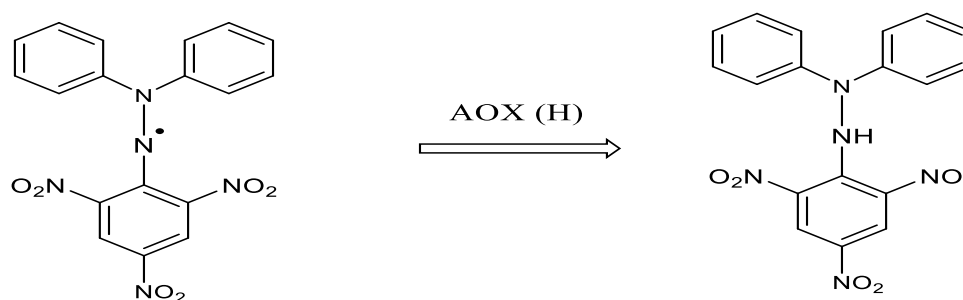


Fig.IV.1 Schéma du principe de réduction du radical DPPH (J. C. Santos Teixeira et al. 2013)

IV.1.2.1.2. Le protocole utilisé :

L'activité de piégeage des radicaux libres est déterminée par le test DPPH (Blois, 1958). Un volume 40 µl de solution de MeOH de l'échantillon à différentes concentrations sont rajoutés à 160 µl de DPPH (0,1 mM). Le mélange est mis dans l'obscurité pendant 20mn, l'absorption du DPPH restant est mesurée à 517 nm. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards antioxydants pour la comparaison de l'activité. Le pourcentage de piégeage (l'inhibition) du radical DPPH est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{capacité de piégeage de DPPH(\%)} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

IV.1.2.2. Test ABTS :**IV.1.2.2.1. Principe de la méthode :**

La formation du radical cationique (ABTS^{•+}) est générée par l'oxydation de l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (fig.IV.2) par le peroxyde d'hydrogène. L'ABTS est utilisé en biochimie pour suivre quelques réactions enzymatiques. En présence de tels antioxydants donneurs d'hydrogène l'inhibition de formation de ce cation radical est un signe de protection du stress oxydatif (B.A. Otieno et al. 2016)

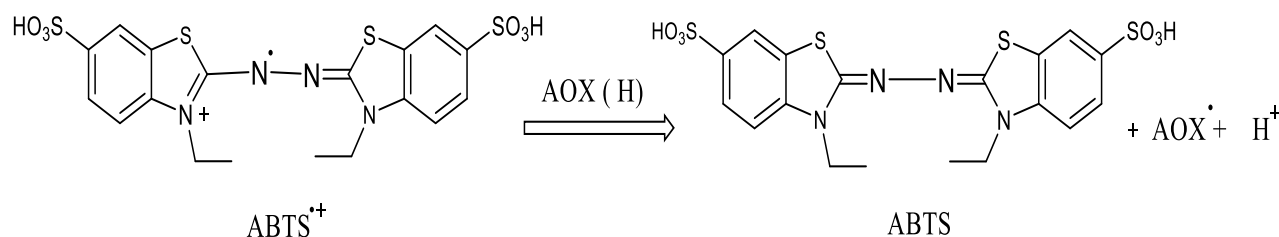


Fig.IV.2 Réduction de l'ABTS^{•+} par les antioxydants AOX (A. Kivrak 2018)

IV.1.2.2.2. Mode opératoire:

La capacité de piégeage du cation ABTS^{•+} par la décoloration de ce dernier est déterminée selon la méthode Re (Re et al. 1999). Après préparation de la solution ABTS^{•+} à partir de l'ABTS et du persulfate de potassium K₂S₂O₈: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12 à 16H ; l'absorbance de la solution est à 734 nm avant l'usage. Un volume de 160 µL de la solution ABTS^{•+} est rajoutés à 40 µl de solution échantillon dans le méthanol à différentes concentrations. Après 10 minutes, l'absorption est encore mesurée à 734 nm. Le méthanol est utilisé comme contrôle. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards antioxydants pour la comparaison de l'activité. Les pourcentages d'inhibitions sont calculés à l'aide de l'équation suivante:

$$\text{capacité de piégeage de ABTS}^{\bullet+} (\%) = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

IV.1.2.3. Activité de réduction de la capacité antioxydant cuivrique (CUPRAC) :**IV.1.2.3.1. Principe de la méthode :**

La méthode CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) est une méthode basée sur la mesure de l'absorbance de Cu(I)-chélate néocuproïne (Nc) formé à la suite d'une réaction

redox des antioxydants avec le complexe CUPRAC (Cu (II) –Nc) par transfert d'électrons (**R. Apak 2016**)(Fig. IV.3).

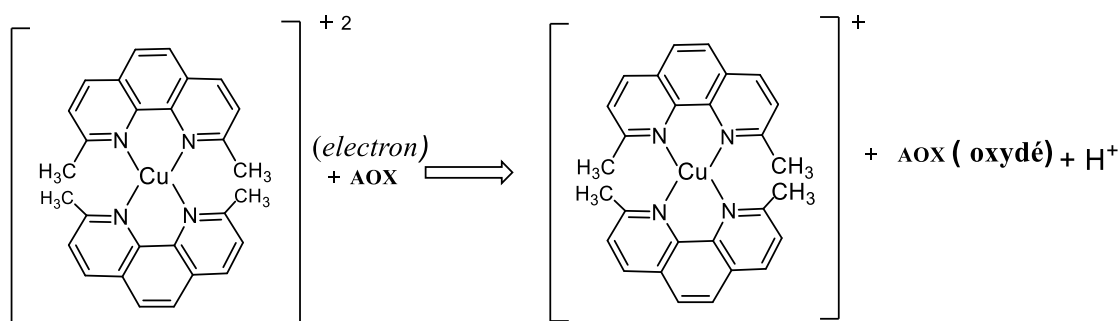


Fig.IV.3le schéma redox entre l'antioxydant AOX et le complexe (Cu (II) –NCR)

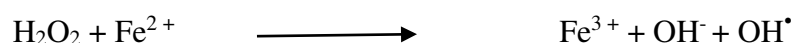
IV.1.2.3.2. Mode opératoire :

La capacité antioxydant réductrice cuivrique est déterminée selon la méthode CUPRAC (**APA et al. 2004**). Dans chaque puits, le mélange réactionnel contenant 40µl de solution d'échantillons et 50µl de solution de chlorure de cuivre (II), on rajoute 50µL de solution alcoolique de néoprène et 60 µl de tampon aqueux d'acétate d'ammonium à pH 7 pour donner un volume final de 200 µl. Après 60 minutes, l'absorbance est mesurée à 450 nm. Les résultats sont enregistrés en termes d'absorbance comparée à l'absorbance de BHA et de BHT, utilisés comme standards antioxydants.

IV.1.2.4. Test de métal chélate :

IV.1.2.4.1. Principe de la méthode :

Les métaux comme le fer sont indispensables dans le corps humain où leur surcharge engendre plusieurs maladies La chélation des ions de fer et cuivre est une approche importante car ces métaux sont impliqués dans la formation de espèces d'oxygène (ROS) tel que le radical super oxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}), qui sont des agents oxydants très puissants (**J. S. Santos 2017**).



La méthode décrite ci-dessous est l'évaluation *in vitro* de la capacité des extraits à chélater ces ions de métaux de transition.

IV.1.2.4.2. Mode opératoire :

L'activité de chélation a été établie conformément à la méthode rapportée (**E. A. Deckeret B. Welch 1990**) avec de légères modifications. Un volume de 80 µl des échantillons dissous dans du méthanol et la solution de dichlorure de fer (40 µl) sont mélangés. Ensuite, 80 µL du réactif ferène fer (0,5 mM) sont ajoutés au mélange pour initier la réaction. Le mélange est incubé pendant 10 min. Une fois l'incubation terminée, l'absorbance est mesurée à 593 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. Chaque analyse pour tous les échantillons est réalisée en 3 fois. Le pourcentage d'inhibition de tous les échantillons est enfin calculé.

IV.1.2.5. Test du pouvoir réducteur :**IV.1.2.5.1. Principe de la méthode :**

La méthode utilisée est pour déterminer la capacité *in vitro* des constituants des extraits de plantes à réduire le complexe du fer (III) en Fe (II) par réaction d'oxydo-réduction dans une méthode colorimétrique à liaison redox, il est possible de surveiller la réduction du complexe en forme ferreuse (de couleur bleue intense) en mesurant le changement d'absorption (**D. Gupta 2015**).

IV.1.2.5.2. Mode opératoire :

L'activité de puissance réductrice des composés testés est déterminée selon la méthode décrite par Bouratoua (**A. Bouratoua et al. 2017**). 10 µl d'échantillon dilué en série sont déposés sur une plaque à fond rond de 96 puits. Ensuite, 40 µl de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 50 µl de ferricyanure de potassium (1%) sont rajoutés à chaque puits, la plaque ainsi est incubée à 50° C pendant 20 min. Ensuite, 50 µl de TCA (10%) et (40 µl) d'eau distillée, enfin, 50 µl de TCA (10%) et d'eau distillée (40 µl) et 10 µl de chlorure ferrique (0,1%) ont été ajoutés dans chaque puits afin de mesurer l'activité de puissance réductrice. Après, l'absorbance a été mesurée dans un lecteur de microplaques à 700 nm. Une absorbance plus élevée du mélange réactionnel indique un plus grand pouvoir réducteur.

IV.1.2.6. La capacité antioxydant contre de blanchiment β -carotène**IV.1.2.6.1. Principe de la méthode :**

La détermination de l'activité antioxydant est évaluée par la capacité des composés à inhiber le blanchiment du β -carotène par l'acide linoléique. À savoir, pendant l'incubation à 50 ° C, l'acide linoléique produit un radical pyroxyde qui devient neutralisé par la présence des

antioxydants, en même temps, on évite l'oxydation du bêta-carotène (c'est-à-dire que le blanchiment au β -carotène est inhibé, ce qui donne une couleur jaune de β -carotène qui persiste dans le système en présence d'antioxydant (A. Aminjafari et al. 2016).

IV.1.2.6.2. Mode opératoire :

Le potentiel protecteur contre le blanchiment du β -carotène de différents extraits est évalué en utilisant le système acide linoléique- β -carotène (G. J. Marco et al.1968). Une solution de β -carotène à l'absorbance ajustée à 0,8-09 nm est préparée selon le Protocole suivi. Des quantités de 160 μ l de cette solution sont ajoutées à 40 μ l de solution des extraits étudiés à différentes concentrations. Le système en émulsion est incubé pendant 2 h à 50° C. L'absorbance est mesurée à 470nm au temps 0 et 120 min.

IV.1.2.7. Test superoxyde alcalin:

IV.1.2.7.1. Principe de la méthode:

En général, le superoxyde est considéré comme jouant un rôle central car il peut être le point de départ de la formation des autres espèces, en particulier du radical hydroxyle hautement réactif. Le test de piégeage des anions superoxyde d'oxygène est confirmé en utilisant la méthode de la génération de superoxyde par addition d'hydroxyde de sodium audiméthylsulfoxyde (DMSO) (K. Lalhminglui et G. C. Jagetia 2018).

IV.1.2.7.2. Mode opératoire:

Le radical superoxyde est généré selon la méthode alcaline DMSO (K. Elizabeth et M.N.A. Rao.1990), la réduction du NBT par un superoxyde est déterminée en présence et en absence d'extraits. Au mélange réactionnel contenant 30 μ l du NBT (solution à 1 mg / ml dans de l'eau distillée) et 40 μ l d'échantillon à différentes concentrations, sont rajouté 130 μ l de DMSO alcalin (1,0ml de DMSO contenant 5mM NaOH dans 0,1 ml d'eau) pour donner un volume final de 200 μ l. L'absorbance est mesurée à 560 nm en utilisant un lecteur de microplaques. La diminution de l'absorption à 560nm avec les antioxydants indique la consommation de superoxyde généré. L'expérience est répétée en triple et le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la même formule.

IV.1.3. Activité anti cholinestérase :

IV.1.3.1. Principe de la méthode :

Les cholinestérases sont des enzymes qui permettent la transmission de l'influx nerveux au niveau central et périphérique. Leur réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation à la fin d'une transmission de l'influx nerveux. On distingue deux enzymes appartenant au groupe des cholinestérases, l'acétylcholinestérase (AChE) qui se présente dans les synapses et la pseudocholinestérase ou la butyrylcholinestérase (BChE) survenant dans le sérum sanguin (**M. Wandhammer 2012**).

La fonction particulière des enzymes reste non découverte mais leur hyperactivité peut entraîner des dommages au niveau des cellules nerveuses (maladie d'Alzheimer) ce qui nécessite leur inhibition. La recherche sur les inhibiteurs naturels (anti cholinestérases) a commencé il y a longtemps (**A. Kostelnik et M. Pohanka 2018**). Dans ce contexte, nous avons effectué des tests *in vitro* sur la capacité des différents extraits des deux espèces *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav. d'inhiber les deux enzymes AChE et BChE.

IV.1.3.2. Mode opératoire :

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinestérase (BChE) (**A.S.M. Ali Reza et al 2018**) est mesurée, par le mélange de 150µl de tampon phosphate de sodium 100mM (pH 8,0), 10µl de solution d'échantillon dissous dans le méthanol à des concentrations variables et 20 µl de solution d'AChE (5,32 x 10⁻³ U) ou de BChE (6,85 x 10⁻³ U). Après une incubation de 15 minutes à 25 ° C, 10µl d'acide DTNB [5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque) 0,5 mM] sont rajoutés. La réaction est ensuite initiée par addition de 10µl d'iodure d'acétylthiocholine (0,71mM) ou de chlorure de butyrylthiocholine (0,2mM). L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde 412 nm, toutes les 5 minutes pendant 15 minutes, en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits dans des expériences en triple exemplaire. La galanthamine est utilisée comme composé de référence. Les résultats sont exprimés en concentration d'inhibition de 50% (IC₅₀) et le pourcentage d'inhibition est mesuré en utilisant la formule suivante :

$$\text{inhibition de AChE or BChE (\%)} = \frac{E - S}{E} \times 100$$

E activité de l'enzyme sans l'échantillon testé, **S** l'activité of enzyme avec l'échantillon.

IV.1.4. Test anti-inflammatoire *in vitro*:**IV.1.4.1. Principe de méthode :**

L'effet Anti-inflammatoire *in-vitro* est déterminé par la méthode Kandikattu (**K. Kandikattu et al. 2013**) avec de légères modifications. Le principe consiste à évaluer la capacité des extraits à inhiber la dénaturation du BSA (bovine serumalbumin) provoquée par la chaleur (72°C).

IV.1.4.2. Préparation des solutions :

Le tampon tris-HCl 6,6 est préparé selon le protocole suivant : (1,2144g sont dissous dans 200 ml de l'eau bi distillée; le PH est ajusté par HCl. Différentes concentrations de l'extrait de plante sont préparées à partir d'une solution mère 4mg/ml. Pour chaque concentration d'extrait de plante un blanc d'extrait est préparé dans lequel 1ml d'extrait est ajouté à 1ml de Tris-Hcl (ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait des résultats obtenus). Un blanc BSA 0,2% (0,2 g de BSA est dissoute dans 100 ml de tampon Tris-Hcl) contenant 1ml de la solution de BSA ajouté à 1ml du solvant utilisé pour les extraits. Le résultat obtenu correspond à la dénaturation totale du BSA en absence de substance inhibitrice).

IV.1.4.3. Mode opératoire :

1 ml de chaque concentration d'extrait ou du standard + 1 ml de solution de BSA 0.2% préparé dans le Tris Hcl PH : 6,6 sont mélangés dans des tubes à essai. Après une incubation à 37 C° pendant 15 min. Les tubes sont mis dans un bain marie à 72°C pendant 5min. Après refroidissement la turbidité est mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre à cuve.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation :

$$\text{l'inhibition de dénaturation (\%)} = \frac{A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{Contrôle}}} \times 100$$

IV.1.5. Activité antisolaires (Sun protection factor (SPF)):**IV.1.5.1. Le principe de la méthode**

Le calcul de facteur de protection solaire (Sun protection factor (SPF)) est déterminée par l'équation de Mansur (**Mansur et al. 1986**). La méthode spectrophotométrique consiste à exposer les différents extraits de *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav. À des différentes longueurs d'ondes de la lumière (UV-B) dans l'intervalle de 290 à 320nm chaque 5 nm (**S. Priyanka et al. 2018**). L'absorbance est mesurée, et la valeur du SPF est calculé par l'application de l'équation mathématique :

$$\text{SPF}_{\text{spectrophotométrique}} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

EE: spectre action érythémateuse (Courbe représentant la distribution des effets érythémateux sur la peau en fonction des longueurs d'onde du rayonnement solaire ou d'un domaine spectral donné.

I: spectre d'intensité lumineuse (un graphique représentant l'intensité lumineuse en fonction de la longueur d'onde).

Abs: absorbance mesurée

CF: facteur de correction (= 10)

EE x I sont des constantes déterminées (**Sayre et al. 1979**) dans le tableau **IV.1**

Tableau.IV.1: Valeur de EE x I fonction de chaque longueur d'onde de UV-B

Longueur d'onde λ (nm)	EE (λ) x I(λ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

IV.1.5.2. Mode opératoire :

2 mg des extraits de deux plantes sont dissous dans 1 ml d'éthanol. Un volume de 200 μ l de chaque extrait est mis dans une microplaque à 96 puits en triplicata. La mesure de l'absorbance est faite par un spectrophotomètre à plaque chaque 5min à des longueurs d'ondes croissantes (290nm, 295 nm, 300 nm, 305 nm, 310 nm, 315 nm, 320 nm).

IV.1.6. Activité antibactérienne :**IV.1.6.1. Le principe de la méthode**

La mise en évidence de la sensibilité des extraits de *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav. contre deux bactéries gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* (hospitalière), *Salmonella thyphi* ATCC13076), une bactérie gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) et la levure humaine (*Candida albicans* ATCC 10231) est déterminé par la méthode de diffusion en milieu gélosé (M. Balouiri et al. 2016).

IV.1.6.2. Mode opératoire :**IV.1.6.2.1. Préparation des milieux gélosés :**

Le Muller-Hinton gélosé est préparé selon les instructions du fabricant destiné aux bactéries. Tandis que le sabouraud gélosé est utilisé préparé pour la levure. Ces milieux sont mis à l'autoclavage pendant 30 minutes à 121°C. Des volumes des milieux gélosés sont coulés en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm pour chaque boîte. Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

IV.1.6.2.2. Préparation des extraits :

Une quantité de 50mg de chaque extrait (chloroforme, acétate d'éthyle, *n*-butanol) des deux plantes est dissoute dans 1ml de DMSO. Ces concentrations de 50mg/ml sont considérées comme des solutions mères, où des concentrations de 50% sont préparées. Tous les échantillons sont conservés au frais.

IV.1.6.2.3. Préparation d'inoculum :

L'obtention des échantillons des trois bactéries et la levure est réalisée selon les protocoles suivis dans le laboratoire de la microbiologie au centre de recherche CRBT, Constantine. L'opération consiste à mettre les microorganismes dans des bouillons de culture pour une période de 24 heures ou plus, afin d'obtenir des colonies microbiennes. Après la multiplication, la concentration de chaque colonie doit répondre aux normes en termes de standardisation selon les protocoles suivis. L'inoculum doit être utilisé dans les 15min qui suivent.

IV.1.6.2.4. Ensemencement :

L'ensemencement est fait par des frottements à l'aide d'un écouvillon stérile sur toute la surface du gélose en orientant l'écouvillon ainsi que la boîte 3 passages décalés de 60° (Fig.IV.4)

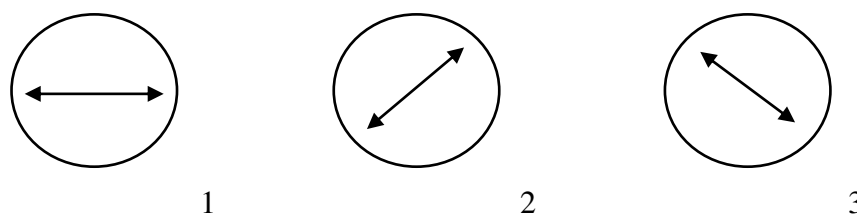


Fig.IV.4 les trois Directions de la boite pour l'ensemencement des colonies bactériennes.

Des disques de 6mm sont placés au centre de chaque boite gélosée, ensuite elles sont imbibées par les solutions 100% et 50% de différents extraits (environs 20 μ l). Les boites doivent se mettre à l'incubation après 15min.

IV.1.6.2.5. Incubation :

La période d'incubation est de 24 heures pour les bactéries testées à 37°C et de 48-72 heures pour *candida albicans* à 25°C.

IV.1.6.2.6. La lecture :

Après la période d'incubation, le diamètre des lots formés autour de disques qui représentent la réaction de solutions testées contre les bactéries et la levure est mesuré en millimètre. Les critères de la sensibilité pour indiquer les points d'arrêt intermédiaires et résistants sont cités dans tableau IV.6 selon les normes.

IV.2. Résultats et discussions :

IV.2.1. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux :

Après évaluation, l'extrait butanol de l'espèce *V. creticum*Cav. a présenté le contenu phénolique le plus élevé (636,84 \pm 5,6 mg d'EAG / g d'extrait) de tous les extraits de plantes étudiées, suivi par l'extrait acétate d'éthyle de *V. creticum*, (464,97 \pm 5,3 mg d'EAG / g d'extrait) puis l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *V.atlanticum*Batt. (390,44 \pm 1,6 mg d'EAG / g d'extrait). Par contre, les extraits du chloroforme de ces deux espèces ont montré la teneur la plus faible en polyphénols (217,50 \pm 0,61 mg d'EAG / g d'extrait) pour le *V. creticum*Cav. et (148,44 mg \pm 3,2 d'EAG / g d'extrait) pour le *V. atlanticum*Batt. La teneur en flavonoïdes dans les extraits des plantes étudiées s'avère moyennement élevés dans les extraits acétate d'éthyle à comparer à celle des polyphénols dans les mêmes extraits étudiés, l'extrait butanol de l'espèce *V. creticum* Cav. a une teneur faible en flavonoïdes (75,74 \pm 5,3 mg d'EQ /g d'extrait) par rapport à celle des polyphénols. Enfin, l'extrait chloroforme de *V. atlanticum*Batt. affiche la plus faible valeur en flavonoïdes (4,35 \pm 0,4 mg d'EQ /g d'extrait).

Ces résultats obtenus montrent que les polyphénols présents dans les deux plantes ont une nature différente aux flavonoïdes. L'extrait méthanol de *V. atlanticum* Batt. a présenté des valeurs moyennes en polyphénols et en flavonoïdes en comparaison avec les autres extraits. (Fig.IV.7).

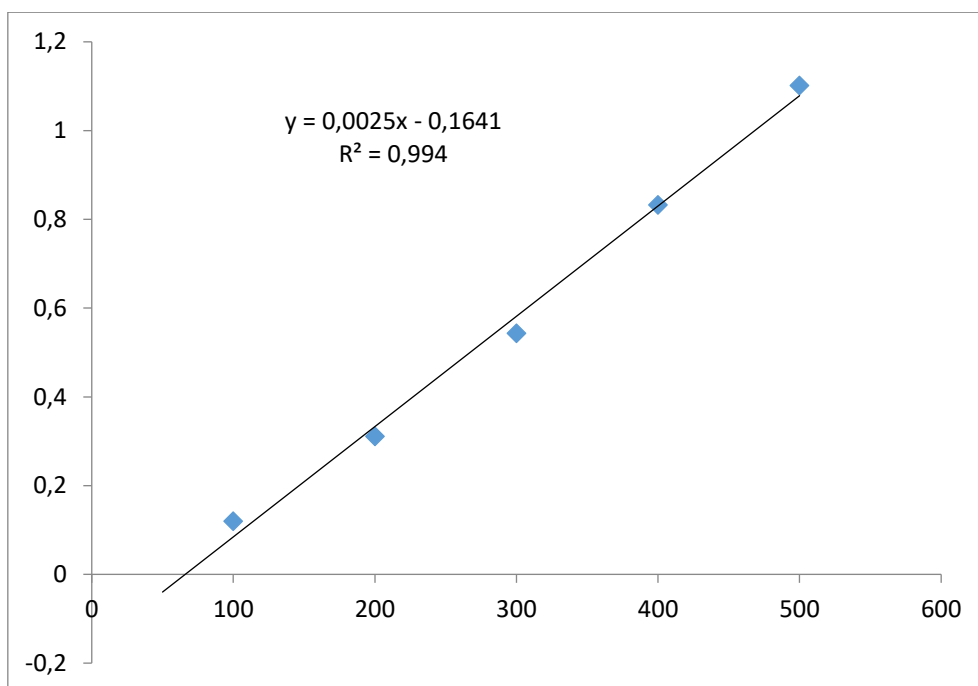


Fig.IV.5 Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

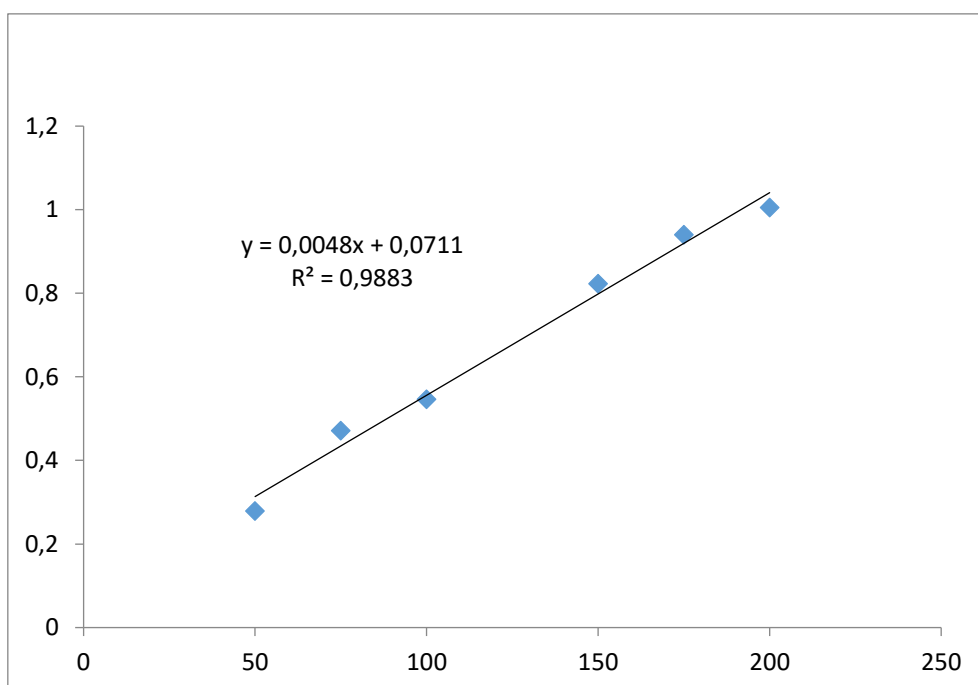


Fig.IV.6 Courbe d'étalonnage de la quercétine

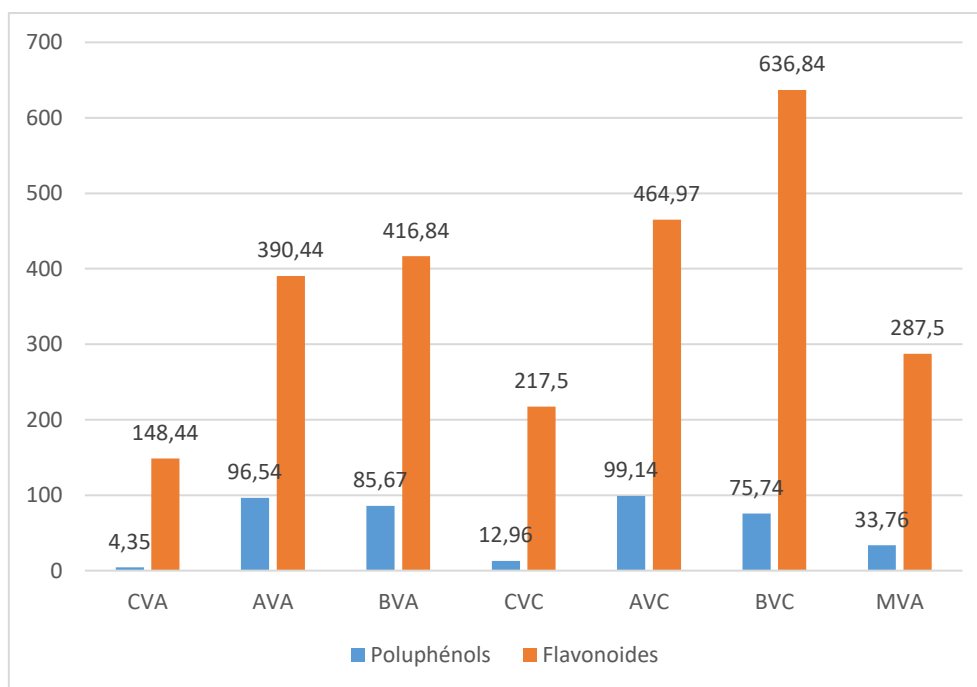


Fig.IV.7 l'histogramme flavonoïdes et polyphénols totaux de *V. atlanticum*Batt. et *V. creticum* Cav.

IV.2.2. Tests antioxydants :

Le Tableau IV.2 montre les valeurs des IC_{50} (la valeur de la concentration correspondante à 50% inhibition) et $A_{0,5}$ (la valeur de la concentration correspondante à l'absorbance 0,5) des tests *in vitro* de l'activité antioxydant étudiée sur les extraits de deux espèces ainsi que sur les composés luteoline, apigénine, diosmétine, et 6-*O*-[(3"-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] -catalpol

Les résultats des mesures de capacité antioxydant effectués par le DPPH (Fig. IV.8) ont montré que l'extrait acétate d'éthyle de *V. atlanticum*Batt. présente l'activité antioxydant la plus élevée avec une valeur de IC_{50} : $19,94 \pm 0,06 \mu\text{g} / \text{ml}$ qui est la valeur la plus proche des IC_{50} des composés de référence suivi de : BHT, α -tocophérol et acide ascorbique (IC_{50} : $12,99 \pm 0,41$, $13,02 \pm 5,17$, $13,94 \pm 2,81 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectivement) (Fig. IV.9). En revanche les deux extraits butanol et l'extrait méthanol de *V. atlanticum* ont des valeurs de IC_{50} très élevées en comparaison avec les extraits acétates des deux plantes (fig. IV.10) celle des références. Mais l'extrait chloroforme de l'espèce *V. atlanticum* a montré aucune activité dans les concentrations étudiées ($>800\mu\text{g} / \text{ml}$).



Fig.IV.8 Microplaque du test (DPPH)

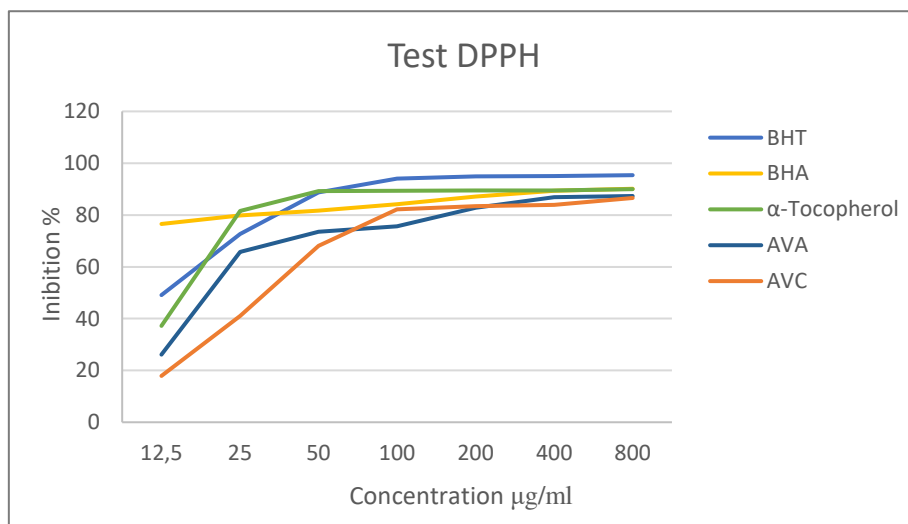


Fig.IV.9 Courbe d'inhibition (DPPH) des deux extraitsacétate d'éthyle avec les standards

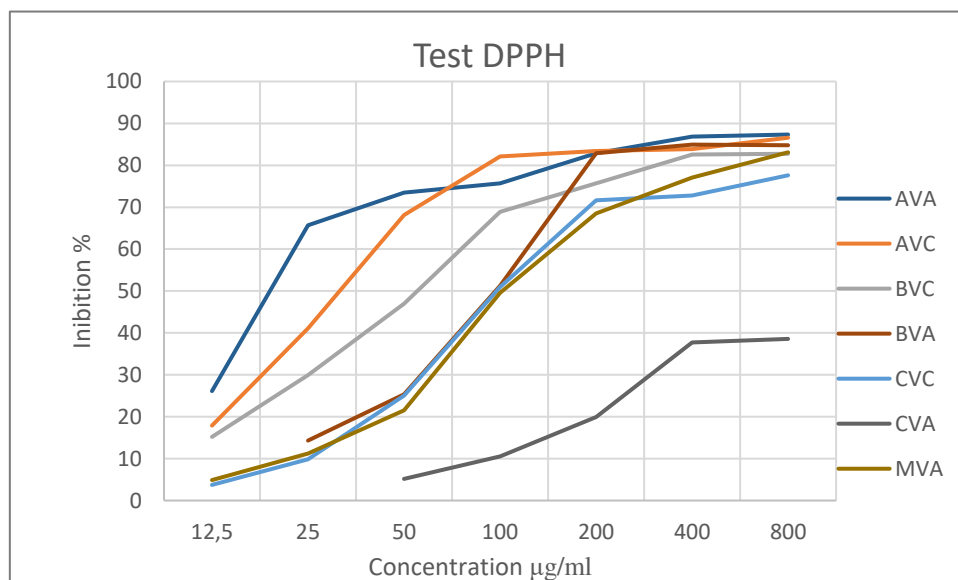


Fig.IV.10 Courbe inhibition (DPPH) des extraits de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

Les résultats obtenus par la méthode ABTS (Fig. IV.11), ont montré que l'extrait acétate d'éthyle de *V. creticum* Cav. a la meilleure capacité de piégeage parmi tous les extraits étudiés ($IC_{50}=5,24\pm 0,07 \mu\text{g} / \text{ml}$). En revanche le même extrait de l'espèce *V. atlanticum* Batt. Indique une $IC_{50} = 9,68 \pm 0,22 \mu\text{g} / \text{ml}$ très proche à celle de l'extrait acétate de l'espèce *V. creticum* Cav., cependant, ces deux extraits précédents présentent une activité modérée par rapport aux références BHT, BHA (CI_{50} : $1,81 \pm 0,10$, $1,29 \pm 0,30$ respectivement) (Fig. IV.12). Tandis que les extraits butanol et chloroforme des deux espèces ainsi que l'extrait méthanol de l'espèce *V. atlanticum* ont des valeurs plus au moins proches entre eux (Fig. IV.13) et élevées par rapport au standards BHT, BHA et l'acide ascorbique.

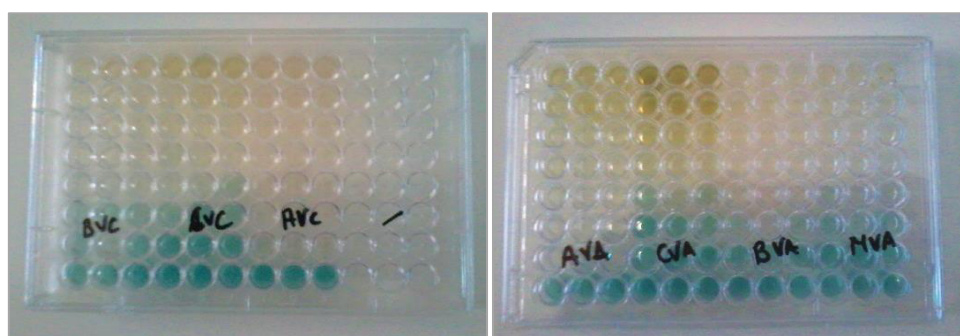


Fig.IV.11 Microplaque du test (ABTS) des extraits testés de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

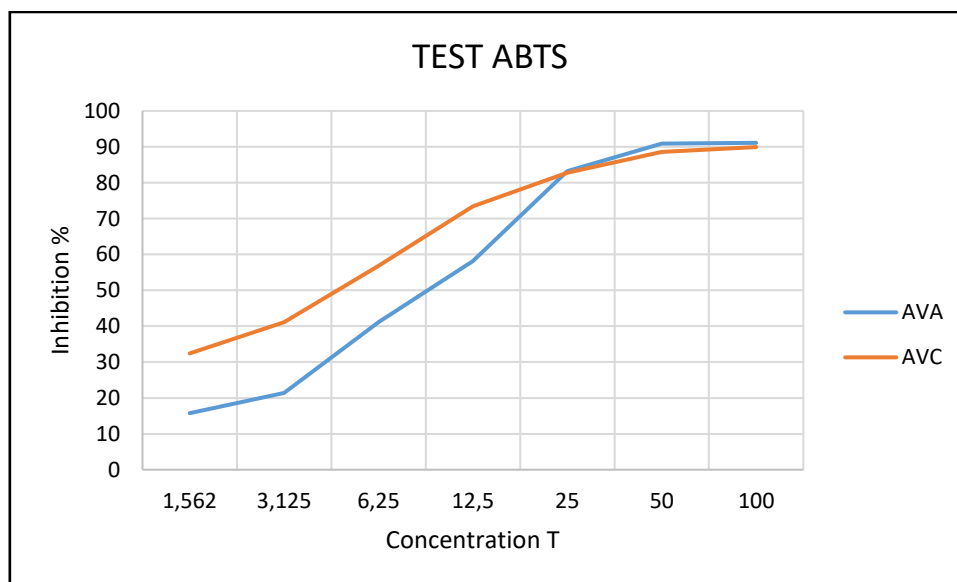


Fig. IV.12 Courbe d'inhibition ABTS de deux extraits acétate d'éthyle de *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav

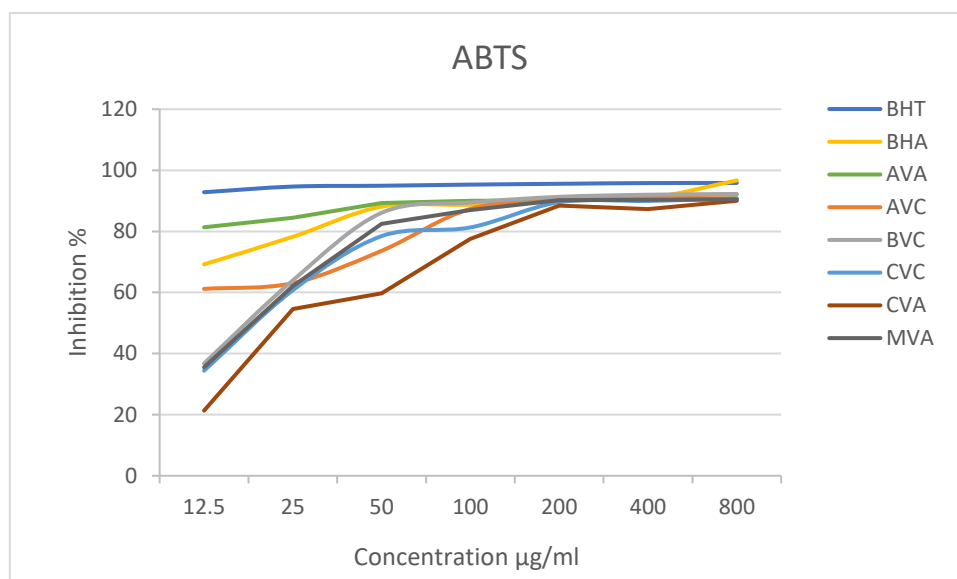


Fig.IV.13 Courbe d'inhibition ABTS des extraits de *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav. avec les standards

La capacité antioxydante réductrice cuivrique (Figure IV.14) du *Verbascum creticum* Cav. et du *Verbascum atlanticum* Batt. a montré que l'extrait acétate d'éthyle de la première espèce présente une activité meilleure que la référence BHT ($A_{0,50} = 9,62 \pm 0,87 \mu\text{g} / \text{ml}$), cette activité est la plus élevée des extraits ($A_{0,50} \text{AVC} = 8,29 \pm 0,95 \mu\text{g} / \text{ml}$), suivie par l'extrait acétate de la deuxième espèce ($A_{0,50} \text{AVA} : 11,90 \pm 0,71 \mu\text{g} / \text{ml}$). L'activité de ces deux extraits s'avère modérée par rapport au BHA ($A_{0,50} : 3,64 \pm 0,19 \mu\text{g} / \text{ml}$) (Figure IV.15). Toutefois, les autres extraits étudiés présentent une activité plus au moins modérée ($A_{0,50} \text{BVA} : 24,68 \pm 0,93 \mu\text{g} / \text{ml}$, $A_{0,50} \text{CVA} : 25,00 \pm 0,00 \mu\text{g} / \text{ml}$, $A_{0,50} \text{BVC} : 39,50 \pm 0,54 \mu\text{g} / \text{ml}$, $A_{0,50} \text{MVA} : 42,53 \pm 1,99 \mu\text{g} / \text{ml}$, $A_{0,50} \text{CVC} : 43,42 \pm 0,88 \mu\text{g} / \text{ml}$) (Figure IV.16).

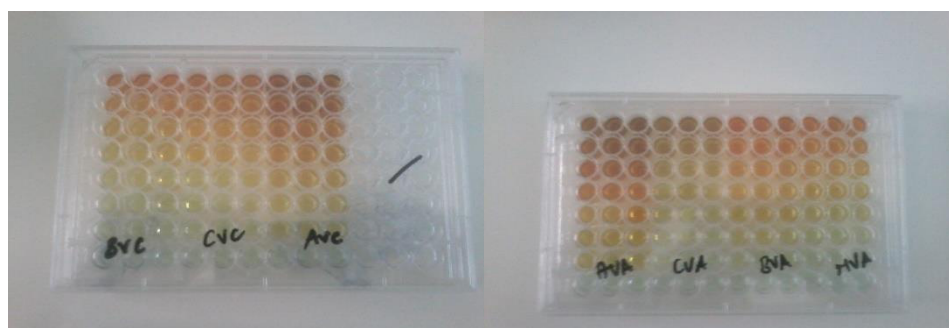


Fig.IV.14 Microplaque du test (CUPRAC) des extraits testés de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

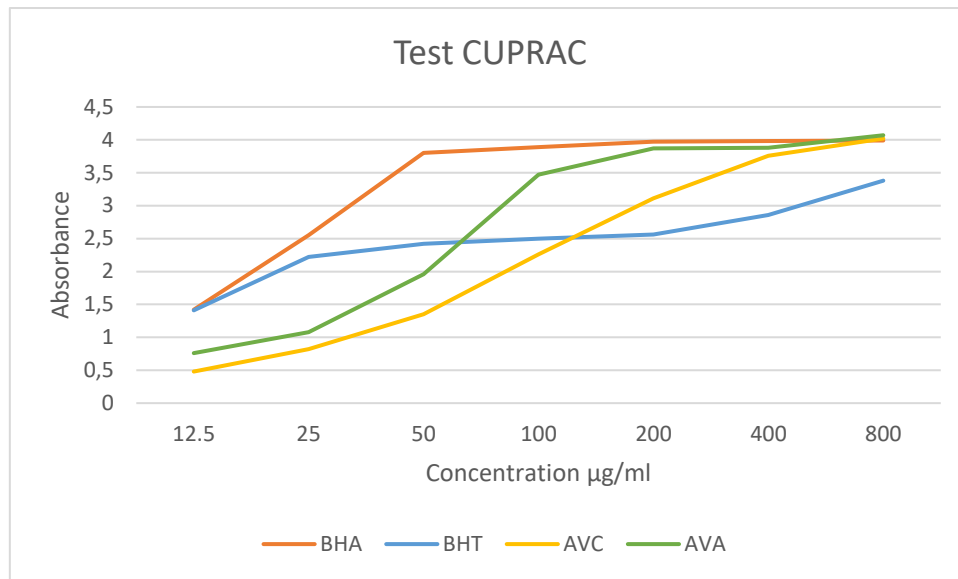


Fig.IV.15 Courbe d'inhibition CUPRAC de deux extraits acétate d'éthyle avec BHT, BHA

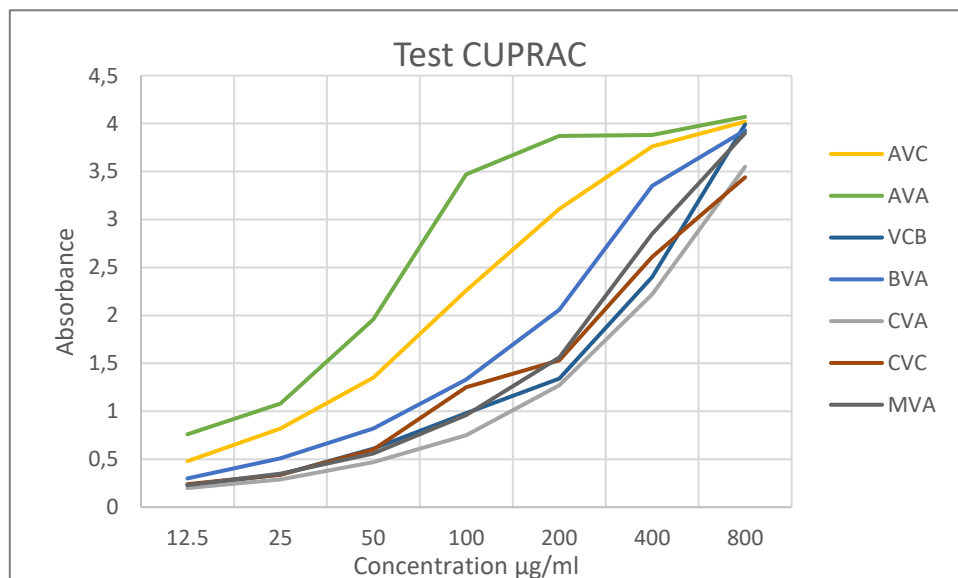


Fig.IV.16 Courbe d'inhibition CUPRAC des extraits de *V. atlanticum* Batt. et *V. creticum* Cav.

Le test des effets chélateurs sur les ions ferreux de tous les extraits des espèces étudiées (Fig. IV.17), comparé à l'EDTA pris comme standard a montré que l'extrait chloroforme de *V. atlanticum* Batt. ($IC_{50}: 220,20 \pm 3,56 \mu\text{g} / \text{ml}$) est le seul actif parmi tous les extraits étudiés mais sa valeur IC_{50} reste faible par rapport au EDTA ($IC_{50}: 8.80 \pm 0.47 \mu\text{g} / \text{ml}$) (Fig. IV.18).

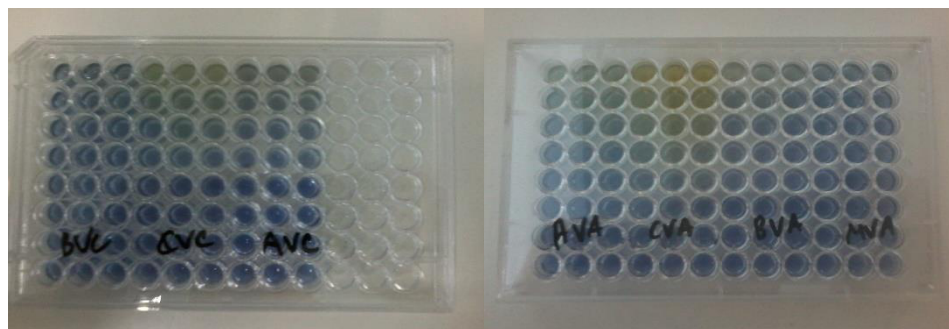


Fig.IV.17 Microplaque du test (métal chélate) des extraits testés de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

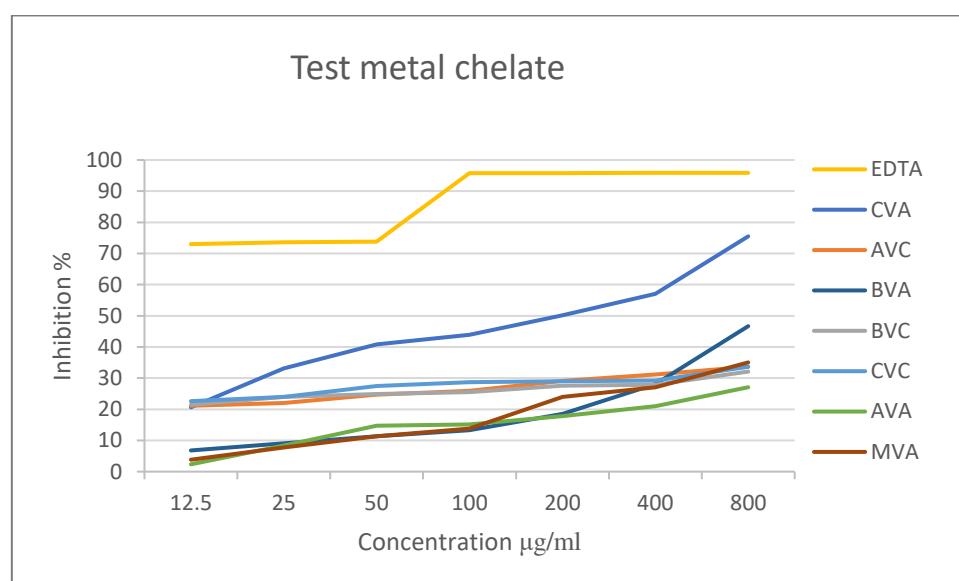


Fig.IV.18 Courbe d'effet chélateur de EDTA des extraits de *V. atlanticum* Batt et *V. creticum* Cav.

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits testés (Fig. IV.19) ont montré que l'extrait acétate d'éthyle de *V. atlanticum* Batt. ($A_{0,50}$: $23,81 \pm 0,16 \mu\text{g} / \text{ml}$) est le meilleur réducteur comparé aux autres extraits étudiés, il est mieux que l' α -tocophérol ($A_{0,50}$: $34,93 \pm 2,38 \mu\text{g} / \text{ml}$) et modéré par rapport l'acide ascorbique ($A_{0,50}$ $6,77 \pm 1,15 \mu\text{g} / \text{ml}$) (Fig. IV.20). Le reste des extraits ont une activité réductrice faible par rapport l'extrait acétate précédent (Fig. IV 21)

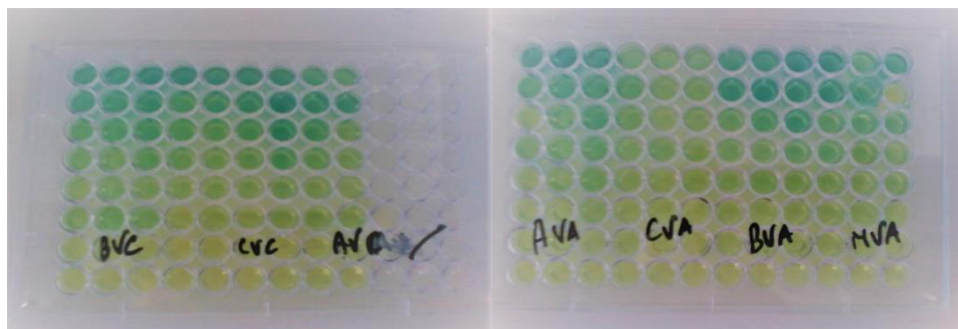


Fig.IV.19 Microplaques du test (pouvoir réducteur) des extraits testés de *V. atlanticum* Batt.,
V. creticum Cav.

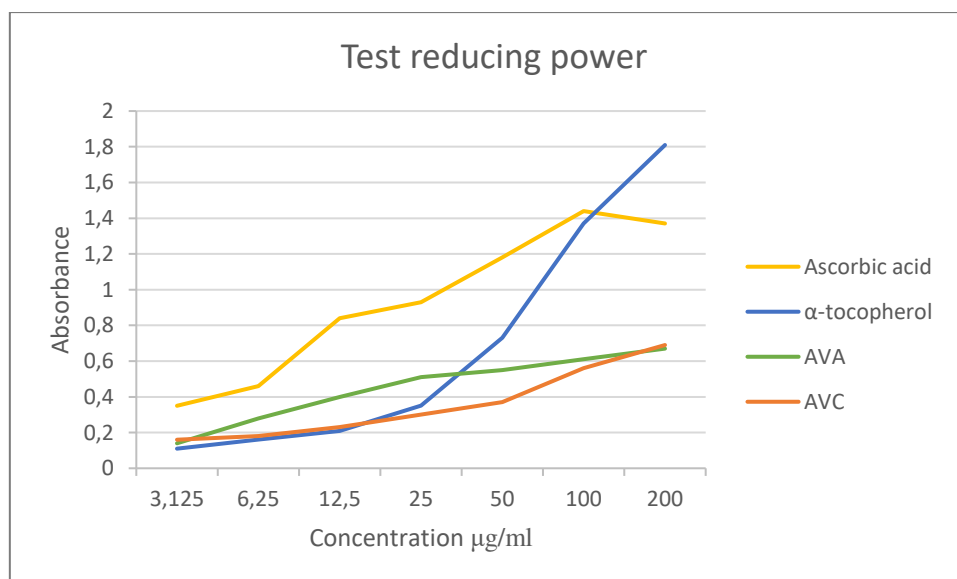


Fig.IV.20 Courbe de pouvoir réducteur de deux extraits acétate d'éthyle avec les standards

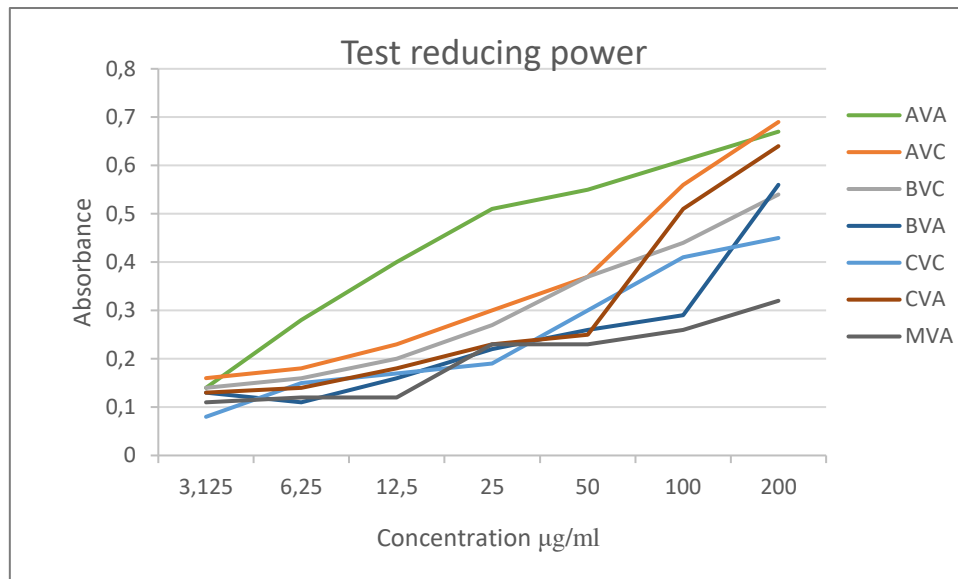


Fig.IV.21 Courbe de pouvoir réducteur des extraits de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

Le procédé de blanchiment au β -carotène révèle le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique. Dans cet essai (Fig. IV. 22), tous les extraits testés ont montré une faible activité protectrice du β -carotène contre le blanchiment par rapport aux standards testés BHT, BHA et α -tocophérol (IC_{50} : $1,05 \pm 0,01$; $0,90 \pm 0,02$; $1,79 \pm 0,03 \mu\text{g} / \text{ml}$, respectivement). (Fig. IV 23, 24).

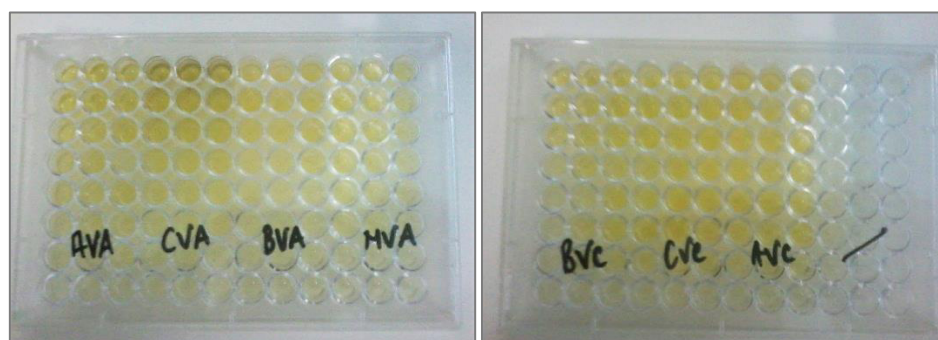


Fig.IV.22 Microplaque du test (blanchiment de β -carotène) des extraits testés de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

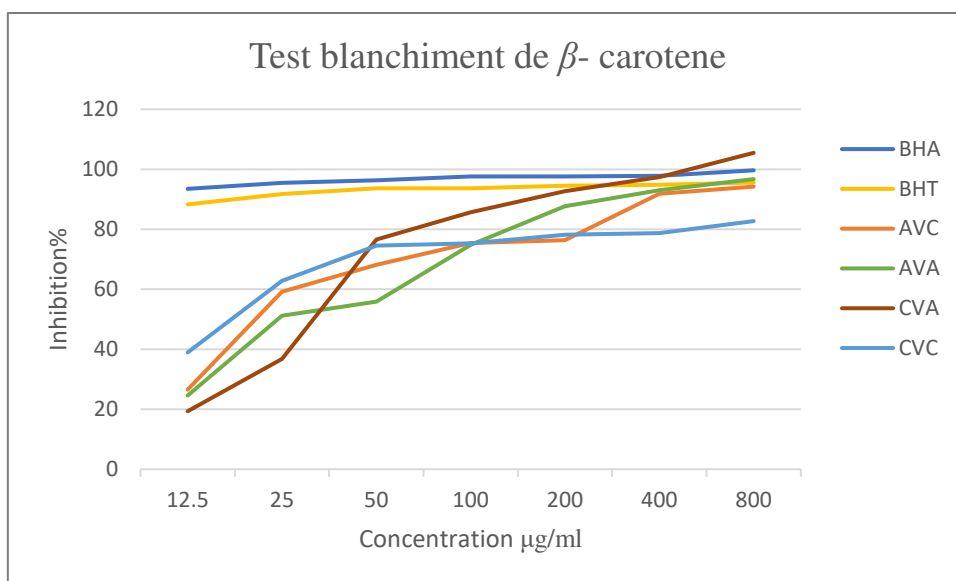


Fig.IV.23 Courbe d’inhibition du blanchiment de β -carotène des extraits actifs et les standards.

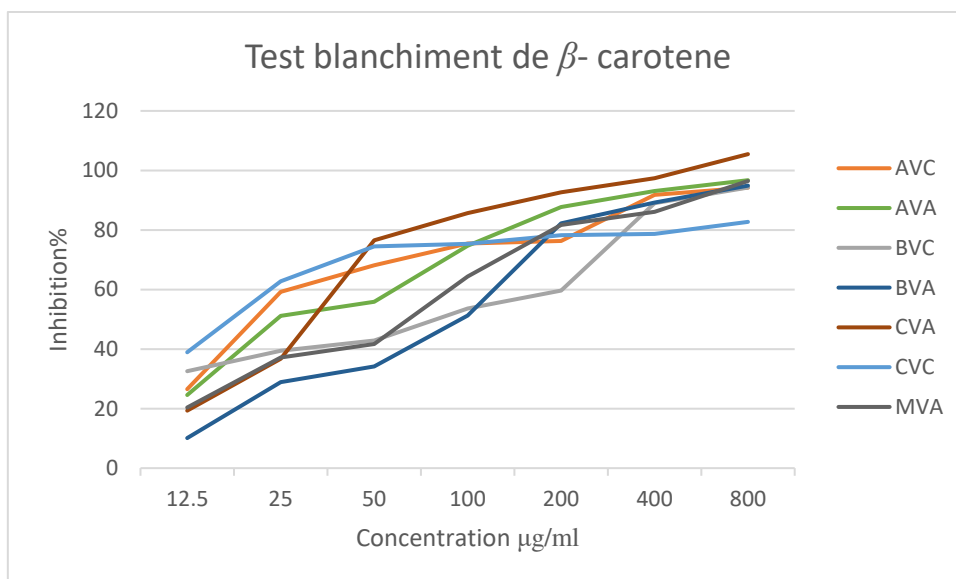


Fig. IV.24 courbe d’inhibition du blanchiment de β -carotène des extraits de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* C av.

Les résultats du test Superoxyde alcalin (fig. IV.25) montrent que les extraits acétate d'éthyle et butanol des deux plantes ($IC_{50_{AVA}}$: $5,04 \pm 0,21 \mu\text{g} / \text{ml}$, $IC_{50_{BVA}}$: $6,46 \pm 0,34 \mu\text{g} / \text{ml}$, $IC_{50_{AVC}}$: $4,07 \pm 0,15 \mu\text{g} / \text{ml}$, $IC_{50_{BVC}}$: $5,74 \pm 1,81 \mu\text{g} / \text{ml}$ respectivement) ont des activités inhibitrices très bonnes en comparant avec les standards acides ascorbique (IC_{50} : $7,59 \pm$

1,16 μg / ml) et le α -tocophérol (IC_{50} : $31,52 \pm 2,22\mu\text{g}$ / ml) (figure IV 26). On remarque aussi que les extraits de chloroforme des deux espèces ont des valeurs de IC_{50} inférieures à celle de l' α -tocophérol et supérieures à celle de l'acide ascorbique. Tandis que l'extrait méthanol de *V. atlanticum* Batt. présente une activité inhibitrice plus au moins faible par rapport aux extraits étudiés et aussi aux standards (figure IV.27).

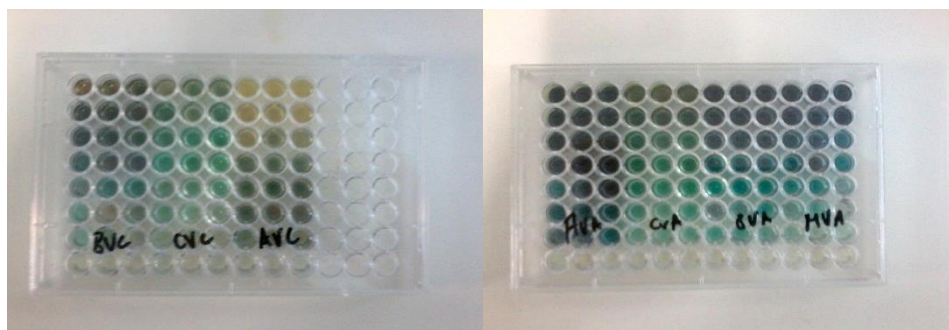


Fig.IV.25 Microplaque du test (superoxyde alcalin) des extraits testés de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

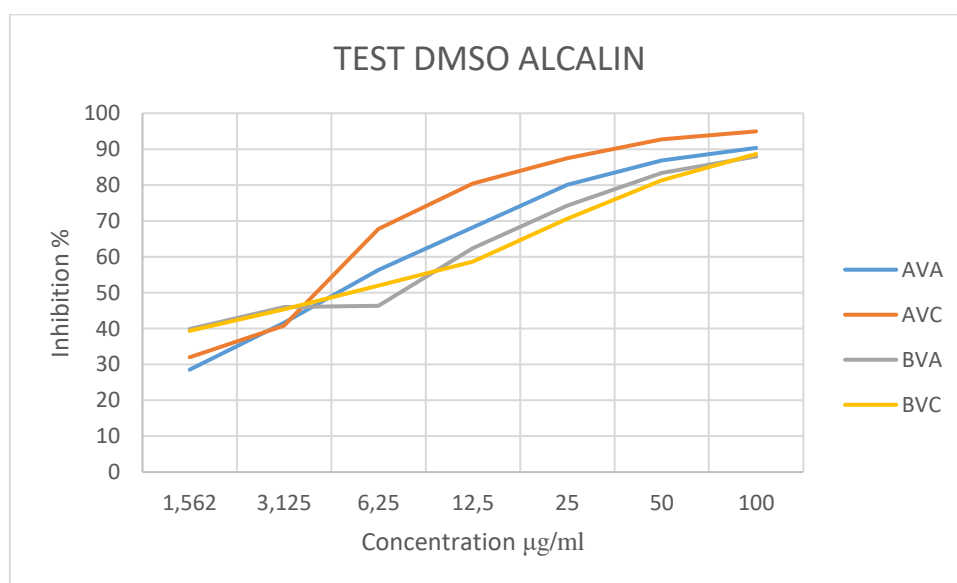


Fig.IV.26 Courbe d'inhibition du superoxydealcalin les AVA, AVC, AVB, BVC

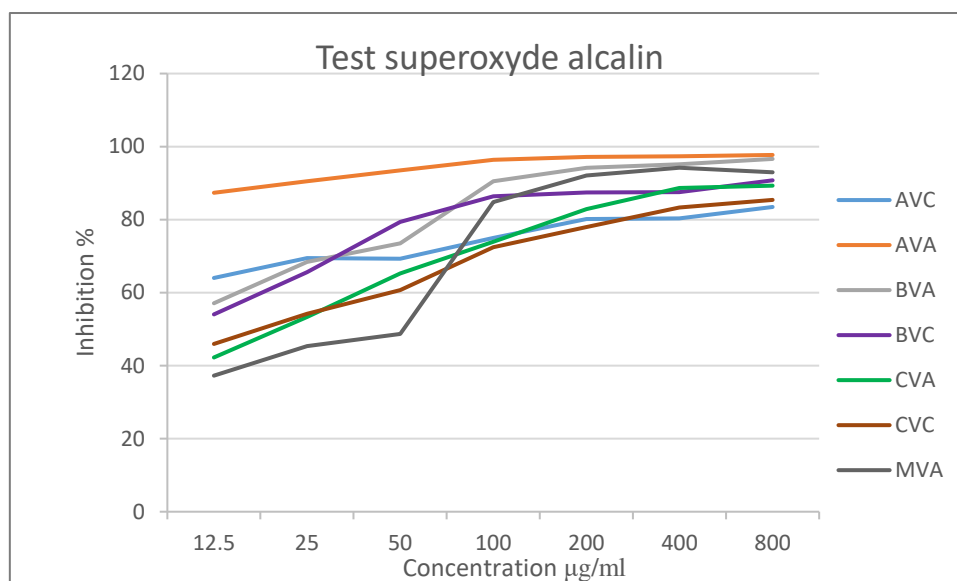


Fig.IV.27 Courbe d'inhibition du superoxyde alcalin des extraits *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

Les composés lutéoline, apigénine, diosmétine, et 6-*O*-[(3"-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] –catalpol, isolée de l'espèce *V. creticum* Cav., sont testés par 3 méthodes antioxydants : CUPRAC, DPPH, pouvoir réducteur.

Les résultats montrent que la lutéoline a une bonne activité antioxydant. Dans le test DPPH le composé lutéoline a une valeur IC₅₀ (36,93±0,07µg/ml) proche à celle de l'extrait acétate de cette espèce et un peu élevée par rapport aux standards utilisés précédemment (fig. IV. 28). Dans le test du pouvoir réducteur, la lutéoline est le seul composé qui a réagi avec une valeur IC₅₀ (48,0±1,72µg/ml) meilleure à celles des extraits de l'espèce *V. creticum* Cav. Cette valeur est considérée proche de celle de l' α -tocophérol (fig. IV.29).

Dans le cas du test CUPRAC, la valeur IC₅₀ de la lutéoline (IC₅₀=20,10±0,02µg/ml) est très proche aux standards α -tocophérol et l'acide ascorbique. Par contre l'apigénine et 6-*O*-[(3"-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] –catalpol ont une activité inhibitrice faible par rapport aux standards (fig. IV. 30).

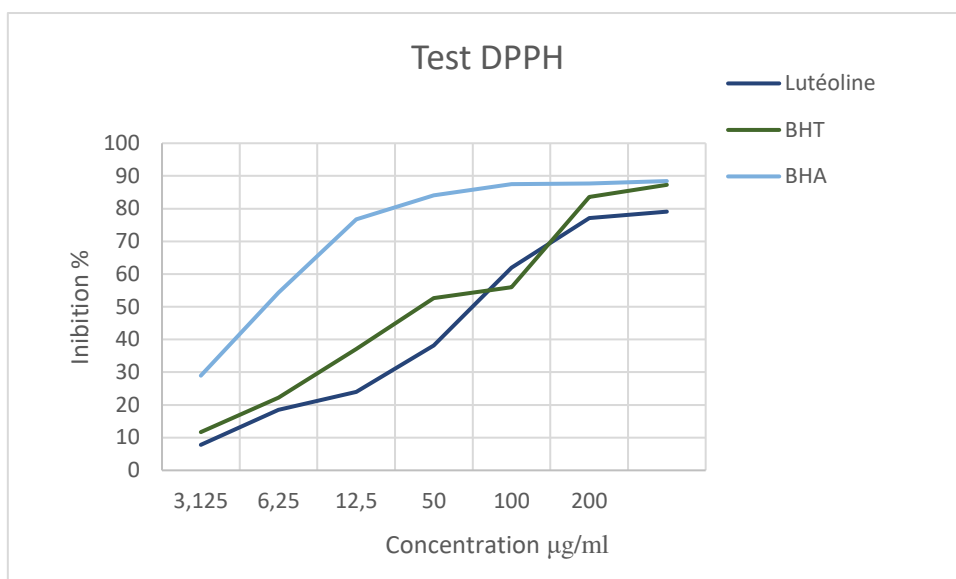


Fig.IV.28 Courbe de DPPH de la lutéoline, BHA, BHT

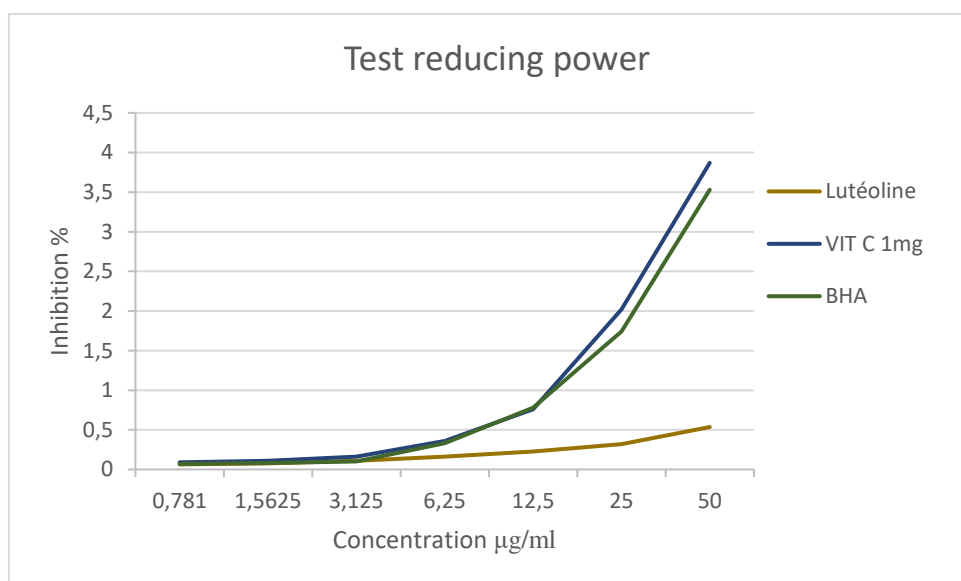


Fig.IV.29 Courbe de pouvoir réducteur de la lutéoline, acide ascorbique et BHA

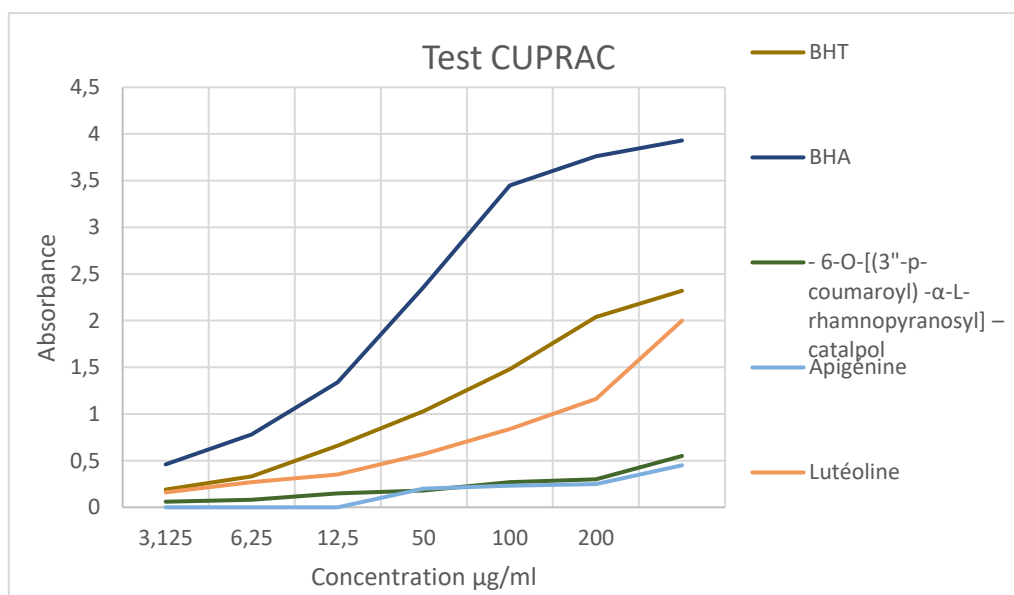


Fig.IV.30 Courbe de CUPRAC de lutéoline, apigénine, 6-O-[(3''-p-coumaroyl)-α-L-rhamnopyranosyl]-catalpol, BHA, BHT

Tableau IV.2 Les valeurs IC₅₀ et A_{0.50} *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits

Extraits	Test DPPH	Test ABTS	Test CUPRAC	Test pouvoir réducteur	Test pouvoir chélateur	Test β-carotène blanchiment	Test DMSO alcalin
	IC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µg/ml	A _{0.50} µg/ml	A _{0.50} µg/ml	IC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µg/ml	IC ₅₀ µg/ml
AVA	19,94±0,06	9,68±0,22	11,90±0,71	23,81±0,16	>800	18,80±0,65	5,04±0,21
BVA	96,20±0,83	13,37±0,11	24,68±0,93	82,57±1,33	>800	97,72±1,12	6,46±0,34
CVA	>800	23,29±0,15	25,00±0,00	177±0,79	220,2±3,56	33,31±0,60	19,70±0,90
MVA	99,83±3,25	20,52±1,92	42,53±1,99	79,73±0,00	>800	61,36 ±1,24	51,77±1,25
AVC	33,31±1,22	5,24±0,07	8,29±0,95	89,40±0,35	>800	21,43±0,01	4,07±0,15
BVC	60,27±0,26	17,37±0,86	39,50±0,54	170,42±0,00	>800	84,57±3,40	5,74±1,81
CVC	116,99±2,45	19,40±0,40	43,42±0,88	>200	>800	18,28±0,42	20,98±2,27
Lutéoline	36,93±0,07	NT	20,10±0,02	48,00±1,72	NT	NT	NT
Diosmétine	>200	NT	>200	>50	NT	NT	NT
Apigénine	>200	NT	185,21±0,18	>50	NT	NT	NT
C5	>200	NT	170,35±1,07	>50	NT	NT	NT
BHT	12,99±0,41	1,81±0,10	9,62±0,87	>200	NA	1,05±0,01	>200
BHA	6,14±0,41	1,29±0,30	3,64±0,19	7,99±0,87	NA	0,90±0,02	>200
α-tocophérol	13,02±5,17	NT	NT	34,93±2,38	NA	NT	31,52±2,22
Acide ascorbique	13,94±2,81	NT	NT	6,77±1,15	NA	NT	7,59±1,16
EDTA	NT	NT	NT	NT	8,80±0,47	NT	NT

NT: n'est pas testé, NA: n'est pas active

IV.2.3. L'effet anti cholinestérase

Le test a montré que l'effet inhibiteur des enzymes acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase a une action avec l'extrait chloroforme de l'espèce *V. atlanticum* (IC₅₀_{antiacétylcholinestérase}: 170,46±7,41 µg/ml),

(IC₅₀_{antibutyrylcholinestérase}: 196,28±4,28 µg/ml) mais cet effet reste très faible par rapport à celui de la galanthamine (IC₅₀: 34,75±1,99 µg/ml ; 6,27±1,15 µg/ml respectivement) prise comme référence. Pour l'espèce *V. creticum* Cav. Les extraits de l'acétate d'éthyle et le chloroforme ont une activité inhibitrice avec une meilleure valeur de IC₅₀ de l'extrait chloroforme dans le test anti-acétylcholinestérase. (IC₅₀: 93,46±0,11 µg/ml) mais elle reste élevée par rapport à celle de la galanthamine (IC₅₀: 6,27±1,15 µg/ml). Par contre l'extrait acétate d'éthyle n'a montré aucune activité inhibitrice envers l'enzyme butyrylcholinestérase (Fig. IV 31, 32).

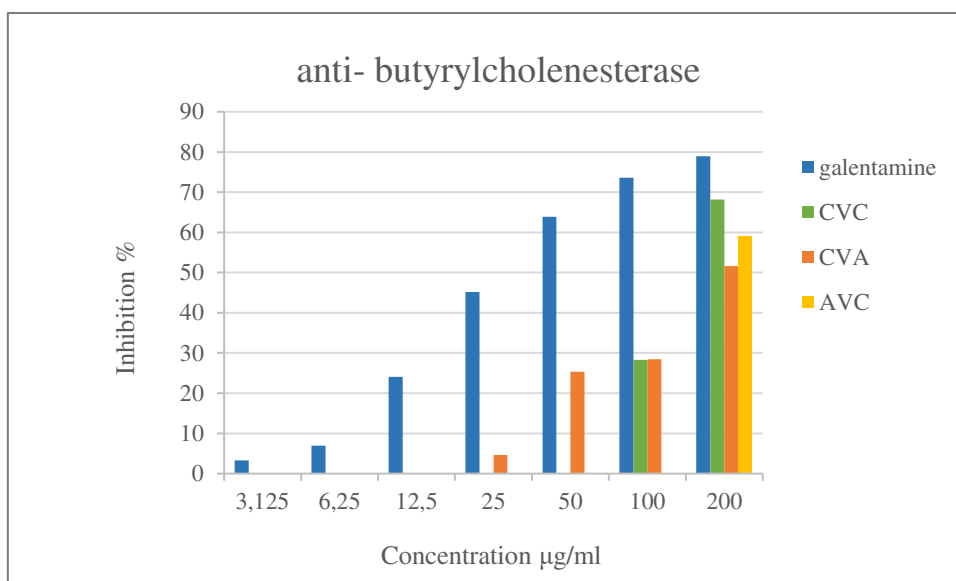


Fig.IV.31 Courbe d’inhibition de butyrylcholinestérase d’extraits CVC, CVA, AVC

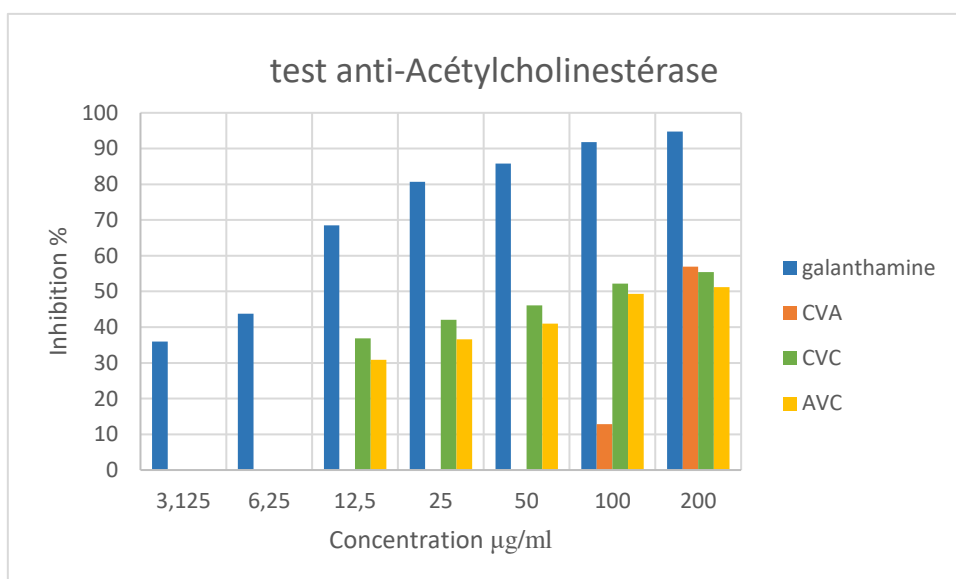


Fig.IV.32 Courbe d’inhibition d’acétylcholinestérase d’extraits CVC, CVA, AVC

Tableau IV.3 Les valeurs IC_{50} *In vitro* de l'activité anti-acétylcholinestérase, anti-butyrylcholinestérase de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

Extraits	Test anti-acétylcholinestérase IC_{50} $\mu\text{g/ml}$	Test anti-butyrylcholinestérase IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
AVA	>200	>200
BVA	>200	>200
CVA	170,46 \pm 2,48	196,28 \pm 4,28
AVC	184,47 \pm 6.15	>200
BVC	>200	>200
CVC	93,46 \pm 0,11	174,96 \pm 4,83
MVA	>200	>200
Galanthamine	6,27 \pm 1.15	34,75 \pm 1.99

IV.2.4. L'effet antiinflammatoire

Selon les courbes d'inhibition de la dénaturation de la protéine (fig. IV 33), l'extrait chloroforme de *V. atlanticum* Batt. a la meilleure activité parmi tous les extraits testés, suivi par l'extrait chloroforme de l'autre espèce *V. creticum* Cav. ($IC_{50_{CVA}}$: 1,03 \pm 0,04 mg/ml) ($IC_{50_{CVC}}$: 1.75 \pm 0,06 mg/ml). Les deux extraits de l'acétate d'éthyle ont des IC_{50} très proches ($IC_{50_{AVA}}$ 1,91 \pm 0,04), ($IC_{50_{AVC}}$ 1,92 \pm 0,05). Par contre l'extrait MVA et les extraits butanol ne présentent aucun effet remarquable. Ces potentiels anti inflammatoires peuvent être dus au teneur des flavonoïdes et triterpènes dans les extraits actifs (Sreena K.2016).

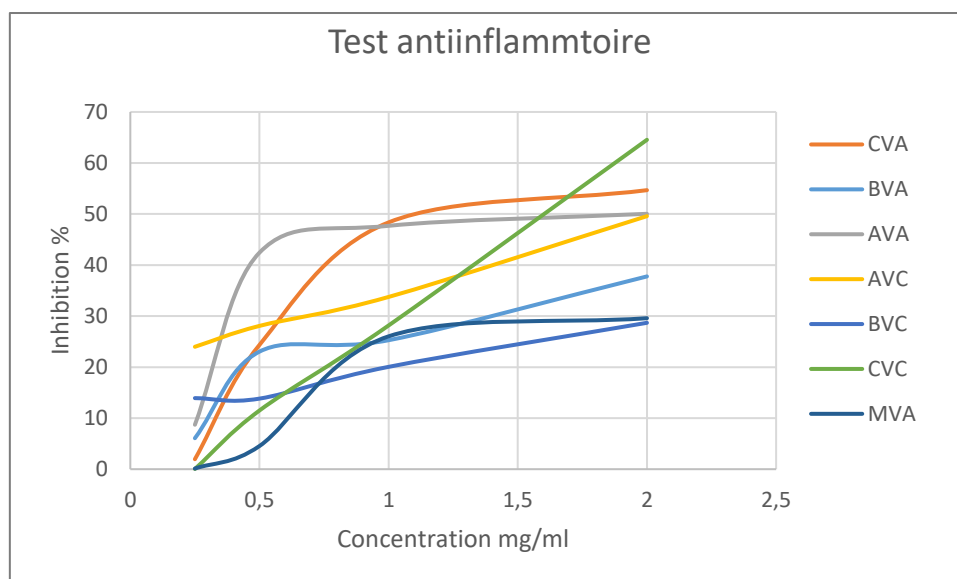


Fig.IV.33 Courbe d'inhibition d'inflammation par les extraits de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

Le tableau IV.4 représente les valeurs IC_{50} de l'activité anti-inflammatoire *In vitro* des espèces étudiées.

Tableau.IV.4 les valeurs IC_{50} de l'activité anti-inflammatoire *In vitro* de *Verbascum atlanticum* Batt., *Verbascum creticum* Cav.

Extraits	Test anti-inflammatoire (IC_{50} mg/ml)
AVA	$1,91 \pm 0,04$
BVA	>2
CVA	$1,03 \pm 0,04$
MVA	>2
AVC	$1,92 \pm 0,05$
BVC	>2
CVC	$1,75 \pm 0,06$

IV.2.5. L'effet antisolaire

Le test antisolaire par le calcul de facteur protecteur solaire (TAB. IV.5 et fig. IV.34) a montré que tous les extraits des deux espèces *Verbascum atlanticum* Batt., *Verbascum creticum* Cav. sont très actifs avec des valeurs SPF très proches des références sur le plan de concentration testés, avec une supériorité des extraits de l'espèce *V. creticum* Cav. sur l'autre

espèce. Cette bonne activité peut être due à la richesse aux polyphénols tels que les phénylpropanoïdes et leurs métabolites glucosés, ainsi que les flavonoïdes aglycones et glucosés (V. Kostyuk, 2017).

Tableau.IV.5: Les SPF de différents extraits de *V. atlanticum* Batt., *V. creticum* Cav.

Extraits	SPF
AVA	41,22± 0,05
AVB	41,03±0,23
CVC	38,39 ± 0,16
MVA	40,99 ±0,18
AVC	49,66 ± 0,78
BVC	45,79± 0,57
CVC	44,77 ± 0,29
Reference commerciale 1	44,22±0,35
Reference commerciale 2	50,11± 0,53

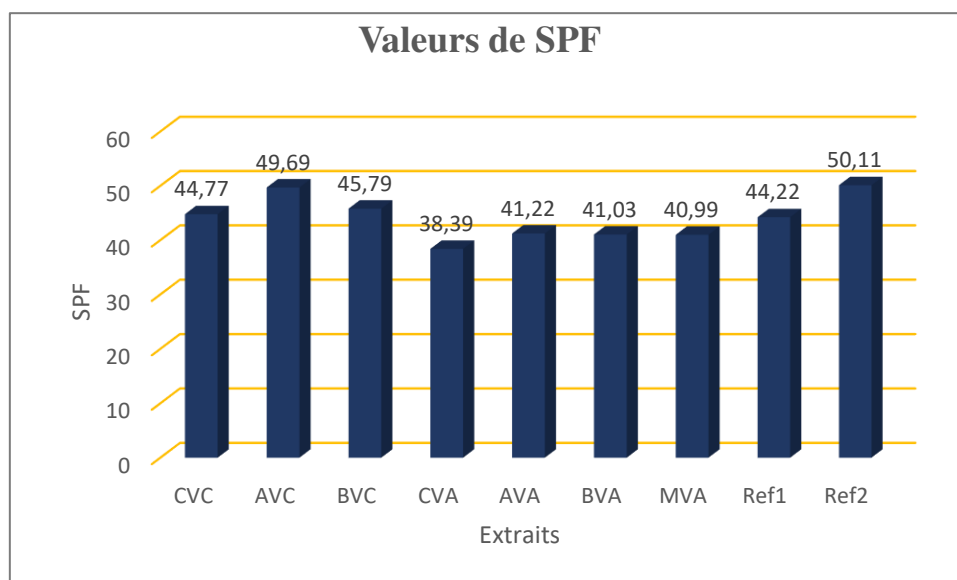


Fig.IV.34 Les valeurs du SPF des extraits de *V. creticum* Cav., *V. atlanticum* Batt.

IV.2.6. L'effet antiinflammatoire

Les résultats de l'activité antibactérienne (Tab.IV.6) des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et butanoldes deux espèces étudiées est déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, a montré que les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonasaeruginosa*, *Salmonella thyphi*) étaient très résistantes ce qui est bien démontré par une absence de la zone d'inhibition pour tous les extraits aux concentrations testées, ce résultats est conforme aux études antérieures sur les espèces *Verbascum* (I.I Tatli et Z.S. Akdemir2006). En revanche l'activité inhibitrice de la bactérie à Gram positif (*staphylococcus aureus*) est bien présente ceci est prouvé par l'augmentation du diamètre des zones d'inhibition avec l'augmentation de la concentration des extraits des deux plantes, mais la bactérie reste comme même résistante. Une activité significative a été montrée dans l'extrait butanol (fig. IV.35) de l'espèce *V. atlanticum*Batt. contre la levure *candida albicans*avec des propriétés de sensibilité ($21,5\text{mm} \pm 0,5$) avec la concentration 50mg/ml, tandis que l'activité est intermédiaire ($17,75 \pm 0,25$) dans le cas de la concentration à 25mg/ml. Cette activité antifongique peut être due à la présence de saponines dans cet extrait qui sont connus pour leur activité antifongique très puissante surtout contre *candida albicans* (L. Yang et al. 2018).

Tableau.IV.6 : Les diamètres de la zone d'inhibition contre les souches testées

Extrait 50mg/ml : 100% 25mg/ml :50%		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella thyphi</i> ATCC13076	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
CVA	100%	-	-	7,5±0,5	11.5±0.5
	50%	-	-	9,5±0,5	8,5±0,5
AVA	100%	-	-	8,0±0,5	9,5±1.5
	50%	-	-	-	7,5±0.5
BVA	100%	-	-	7,5±0,5	21,5±0,5
	50%	-	-	-	17,75±0.25
CVC	100%	-	-	12,5 ±0.5	8,5 ±0.5
	50%	-	-	-	-
AVC	100%	-	-	11±0.25	11,5±1,5
	50%	-	-	-	7,5 ±0.5
BVC	100%	-	-	8,0±0.5	-
	50%	-	-	-	-

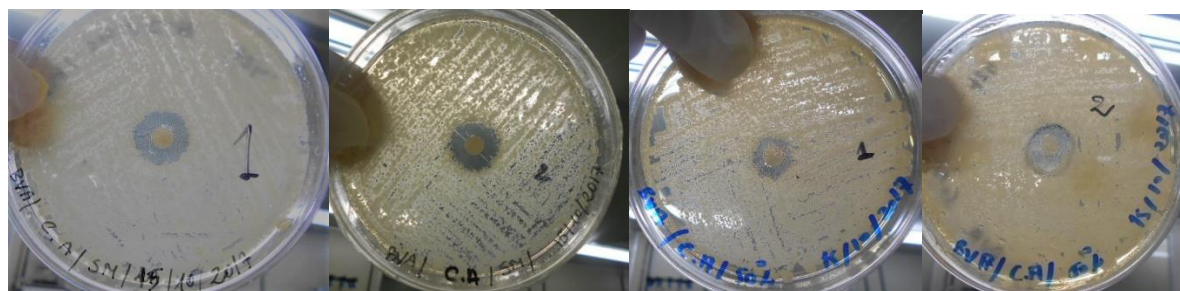


Fig.IV.35 Les zones d'inhibition de l'extrait *n*-butanol de l'espèce *V. atlanticum* Batt. (50mg/ml, 25mg/ml) contre *candidas albicans*.

Conclusion :

Cette étude confirme le potentiel antioxydant *in vitro* des extraits des deux espèces : *Verbascum atlanticum*Batt. et *Verbascum creticum*Cav. avec sept évaluations : DPPH, ABTS, CUPRAC, pouvoir réducteur, pouvoir chélateur, blanchiment de β -carotène et le superoxyde alcalin. On peut conclure que ces deux espèces peuvent être utilisées dans les domaines alimentaire et industriel comme des antioxydants.

Le test de l'activité inhibitrice des deux enzymes acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase responsables de la maladie Alzheimer a montré un potentiel d'inhibition présent des extraits chloroforme et acétate d'éthyle de *Verbascum creticum*Cav. et aussi dans l'extrait chloroforme de l'extrait *Verbascum atlanticum*Batt.

Les extraits testés des deux espèces étudiées pour les essais anti solaire ont montré une activité protectrice au rayonnement UV-B solaire avec des SPF très élevés. Ces résultats encourageant peuvent être développés dans le domaine cosmétique comme une base à des crèmes antisolaires.

En dernier la mise en évidence de l'activité antibactérienne des extraits chloroforme, acétate d'éthyle et butanol de chaque plante a montré que les deux bactéries gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphi*) sont très résistantes aux concentrations testées des extraits. La réaction de tous les extraits contre la bactérie gram positif (*staphylococcus aureus*) reste très faible aux concentrations testées. En revanche l'extrait butanol de *V. atlanticum*Batt. a montré une activité significatrice envers la levure *candidas albicans*.

CONCLUSION GENERALE

Ce présent travail constitue une étude phytochimique et des essais biologiques approfondis pour la première fois sur les différents extraits de deux plantes du genre *Verbascum* (Scrophulariaceae) à savoir l'espèce endémique *Verbascum atlanticum* Batt., et l'espèce *Verbascum creticum* Cav.

L'investigation phytochimique a commencé par un criblage phytochimique qui a révélé la présence de plupart de classes de métabolites dans les deux espèces. L'extraction des parties aériennes des deux plantes est suivie par le fractionnement et la purification chromatographique sur les différents extraits de ces plantes. Des analyses chromatographiques sont effectuées sur les extraits acétate d'éthyle et *n* butanol des deux espèces en réalisant les expériences LC-UV-MS et HR-ESI-MS, ont permis de mettre en évidence la présence de onze composés :

- **Acide (10*E*,12*E*) -9-hydroxy-10,12-octadécadiénoïque**
- **Acide bétulinique**
- **Acide maslinique**
- **(4*E*)-2-Formyl-3-(2-oxoéthyl)-4-hexénoate**
- **Erythrodiol**
- **Caféine**
- **1,3:2,4-Di-*O*-benzylidene-D-sorbitol.**
- **Genistéine**
- **Tréhalose**
- **Théobromine**
- **Aloès émodine**

La chromatographie d'exclusion par sephadex LH20 ainsi que la chromatographie par HPLC semi-préparative et le traitement de précipités des différentes fractions des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *V. atlanticum* Batt. a permis l'isolement de 15 produits naturels qui ont été identifiés par les méthodes spectroscopiques (HRESI-MS, LC-UV-MS, RMN¹H, RMN¹³C et la RMN 2D) :

- **Linoléate de méthyle**
- **Linoléate de méthyle.**
- **Phytol**
- **Le mélange de β -sitostérol et stigmastérol**
- **Acide 6-hydroxy-3-méthoxybenzoïque**
- **Lutéoline**

- **Martynoside**
- **Isomartynoside**
- **Cis-martynoside**
- **Le mélange Stigmastérol 3-O- β -D-glucoside et β -sitostérol3-O- β -D-glucoside**
- **Ilwensisaponine A**
- **Ilwensisaponine B**
- **Ilwensisaponine C**

La chromatographie sur couche mince d'une fraction de l'extrait chloroforme et deux fractions de l'extrait acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *V. creticum* Cav. a permis l'isolement et l'identification de cinq composés :

- **(2E)-3-(4-Hydroxyphényl) acrylate de méthyle**
- **Lutéoline**
- **Apigénine**
- **Diosmétine**
- **6-O-[(3"-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] –catalpol**

Il faut noter que tous les composés mentionnés ci-dessus sont identifiés pour la première fois de deux espèces *Verbascum atlanticum* Batt. et *Verbascum creticum* Cav. dont certains d'entre eux sont nouveaux dans le genre ou la famille et une structure stéréochimique nouvelle du composé 6-O-[(3"-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] –catalpol.

L'étude de l'activité biologique sur les différents extraits de ces deux plantes a montré que tous les extraits ont des variables potentielles biologiques :

- L'évaluation du potentiel antioxydant *in vitro* par les méthodes nommées : DPPH, ABTS, CUPRAC, pouvoir réducteur, l'effet chélateur, blanchiment du β - carotène et superoxyde alcalin indique que l'extrait acétate d'éthyle des deux espèces a une bonne activité antioxydant.
- Le test de l'effet antiinflammatoire *in vitro* réalisé sur les extraits de ces deux espèces en utilisant la méthode de dénaturation de BSA a donné des résultats significatifs pour les extraits chloroforme de ces deux espèces.
- La sensibilité antibactérienne *in vitro* des extraits de ces plantes contre les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphi*, *Staphylococcus aureus* et la levure *Candida albicans*, s'avère absente contre les bactéries Gram⁻ et faible contre la bactérie Gram⁺.

L'extrait *n*-butanol de l'espèce *V. atlanticum* Batt. a donné une bonne sensibilité envers le *candidat albicans*

- Le test de l'effet inhibiteur de l'enzyme acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase a montré que les extraits chloroforme des espèces étudiées ont une inhibition présente aux valeurs testées.
- Le calcul du facteur de protection envers les rayons UV solaires (SPF) a montré que tous les extraits des deux espèces ont une bonne protection avec des SPF élevés. L'évaluation de l'activité antioxydant de cinq composé isolés de l'espèce *V. creticum* Cav.: la lutéoline, l'apigénine, la diosmétine et le 6-O-[(3''-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] –catalpol par les méthodes DPPH, CUPRAC et le pouvoir réducteur a indiqué que la lutéoline a une bonne activité tandis que l'apigénine et le 6-O-[(3''-*p*-coumaroyl) - α -L-rhamnopyranosyl] –catalpol ont une activité modérée.

Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale, deux autres sont en cours de rédaction, et des communications internationales dans des congrès de spécialité.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelkebir R., Najjaa H., Ben Arfa A. and Neffati M. 2018. Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of *Erodium glaucophyllum* (L.) L'hérit. Journal of Biomedical Sciences. 7 (4) :13.
- Adamante G., Almeida A.D., Rigo F., Da Silva Silveira E., Coelho Y., De Prá S., Milioli A., Camponogara C., Casoti R., Bellinaso F., Desideri A., Santos M. Ferreira J., Oliveira S., Trevisan G. 2019. Diosmetin as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive activity in mice. Life Sci. 1216:215-226.
- Akkol E. K., Tatli I., and Akdemir Z. S. 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of saponin and iridoid glycosides from *Verbascum pterocalycinum* Var. Mutense Hub. Mor. Z. Naturforsch. 62: 813- 820.
- Alarif W. M., Ayyads E. N., Al-Lihaibia S. S. 2010. Acyclic diterpenoid from the red alga *Gracilaria foliifera*, Rev. Latinoam. Quím. 38 (1).
- Aleixo T., Calmon J., Falconi A., Souza A., Duarte R., Fagundes L., and Machado R. 2018. Phytochemical screening and investigation of antimicrobial activity from derivatives of Aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.). SOJ Microbiol Infect Dis 6(1):1-7.
- Aligiannis N., Mitaku S., Tsitsa-Tsardis E., Harvala C., Tsaknis I., Lalas S., Haroutounian A. 2003. Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. J. Agric. Food Chem. 51: 7308-7312.
- Alipieva K., Korkina L., Orhan I. E., Georgiev M. I. 2014. Verbascoside - A review of its occurrence, (bio) synthesis and pharmacological significance. Biotechnology Advances. 32 (6): 1065-76.
- Aminjafari A., Miroliaei M., Angelova V. T., Emamzadeh R., Djukic M. M., Djuric A., Saso L. 2016. Antioxidant activity and protective role on protein glycation of synthetic aminocoumarins, electronic journal of biotechnology. 24:43-48.
- Devi J.A. I., Muthu A.K. 2014. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *Saccharum spontaneum* Linn. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 6 Suppl 2,

- Apak R., Özyürek M., Güçlü K., and Çapanoğlu E. 2016. Antioxidant activity/capacity measurement, classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (Et)-Based Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 64(5): 997–1027.
- Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7970–7981.
- Attar F., Keshvari A., Ghahreman A., Zarre S., Aghabeigi F. 2007. Micromorphological studies on *Verbascum (Scrophulariaceae)* In Iran with emphasis on seed surface, capsule ornamentation and trichomes, *Flora* 202 (2): 169–175.
- Atta E. M., Mohamed N. H. and Abdelgawad A.A. M. 2017. Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *Eur. Chem. Bull.* 6(8), 365-375.
- Blois M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 6(2): 71-79.
- Barbosa A.D. 2014. An Overview On The Biological And Pharmacological Activities Of Saponins. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(8) : 47-50.
- Barboza J. N., Da Silva Maia Bezerra Filho C., Silva R. O., Medeiros J.V. R., and de Sousa D. P. 2018. An Overview on the Anti-inflammatory Potential and Antioxidant Profile of Eugenol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Pp 1-9.
- Bazzaz B. S. F., Khameneh B., Ostad M. R. Z., Hosseinzadeh H. 2018. In vitro evaluation of antibacterial activity of verbascoside, lemon verbena extract and caffeine in combination with gentamicin against drug resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* clinical isolates. *Avicenna Journal of Phytomedicine (AJP)*, 8 (3) : 246-253.
- Benaissa M., El Haitoum A., Hadjadj K. 2018. Floristic and medical diversity interest of Djebel Aissa national park (Ksour mountains, Algeria). *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* 14 (2): 303-306.

- Benedí C. 2002. Ajustes en tres endemismos de *Verbascum* L. Anales del jardín botánico de Madrid, 60 (2): 458-461.
- Benzidia B., Barbouchi M., Hammouch H., Belahbib N., Zouarhi M., Erramli H., Ait Daoud N., Badrane N., Hajjaji N. 2018. Chemical composition and antioxidant activity of tannins extract from green rind Of *Aloe vera* L. Burm. F. Journal of King Saud University – Science.
- Bouratoua A., Khalfallah A., Bensouici C., Kabouche Z., Alabdul Magid A., Harakat D., Voutquenne-Nazabadioko L. and Kabouche A. 2017. Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes* Coss. Ex Bonnier and Maury. Nat Prod Res. 32(16):1-8.
- Breitenbach M. and Eckl P. 2015. Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research. Biomolecules. (5): 1169-1177.
- Burke R.W., Diamondstone B. I., Velapoldi R. A., and Menis O. 1974. Mechanisms of the liebermann-burchard and zak color reactions for cholesterol. Clin. Chem. 20/7, 794-801.
- Caliş I., Zor M., and Başaran A. A. 1993. Ilwensisaponins A, B, C, and D: Triterpene saponins from *Scrophularia ilwensis*, Helv. Chim. Acta. 76(3): 1352-1360
- Caliş I., Lahloub M.F., Rogenmoser and E., Sticher O. 1984. Isomartynoside, a phenylpropanoid glycoside from *Galeopsis pubescens*, Phytochemistry, 23(10): 2313-231.
- Carvalho A. A., Andrade L. N., de Sousa E.B.V., and de Sousa D. P. 2015. Antitumor Phenylpropanoids Found in Essential Oils. BioMed Research International. Pp1-21.
- Catara S., Cristaudo A., Gualtieri A., Galesi R., Impelluso C. and Onofri A. 2016. Threshold temperatures for seed germination in nine species of *Verbascum* (Scrophulariaceae), Seed Science Research. 26 (1): 30–46.
- Chabert P., B. Attioua and R. Brouillard. 2006. *Croton lobatus*, an African medicinal plant: Spectroscopic and chemical elucidation of its many constituents. BioFactors. 27: 69–78.

- Chen C., Cai M. Q., Xu B., Jin X. J., Wang R. H., Li P., Zhao Y.P., And Cheng-Xin F. 2017. Systematic position of *Oreosolen* (Tribe Scrophularieae, Scrophulariaceae) Based on nuclear and plastid sequences. *Journal of Systematics and Evolution (Jse)*, (9999): 1–7.
- Chirag P.J., Tyagi S., Halligudi N., Yadav J., Pathak S., Singh S. P., Pandey A., Kamboj D. S., Shankar P. 2013. Antioxidant activity of herbal plants: A recent review. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics* 1 (8): 01-08.
- Chirumbolo S. 2016. Anticataractogenic activity of luteolin. *Chem Biodivers.* 13(3):343-344.
- Coelho G. P. and Miotto S.T. S. 2018. A taxonomic revision of the genus *Buddleja* (Buddlejeae, Scrophulariaceae) in Brazil, *Phytotaxa* 379 (2): 187–226.
- Corrêa G. M., Abreu V. G.D. C., Martins D. A. D. A. 2014. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 (6): 75-81.
- Dalar A., Bengu A. S., Allahverdiyev O. 2018. Analysis of phytochemical composition and biological activities of *Verbascum cheiranthifolium* Var. *Cheiranthifolium* Stem And Flowers, *International Journal Of Secondary Metabolite* 2018, Vol. 5, No. 3, 233-242.
- Decker E. A. and Welch B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 674–677.
- Desai S. D., Desai D. G., Kaur H. 2009. Saponins and their Biological Activities. *Pharma Times* 41 (3): 13-16.
- De Santayana M. P., Morales R., Tardío J., Molina M. 2018. Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales Relativos a la Biodiversidad. Fase II (Tomo 2). Edition: 1^a Chapter: *Verbascum thapsus* L. Publisher Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. Pp 328.
- Díaz M.F., Gavín J. A. 2007. Characterization by NMR of ozonized methyl linoleate. *J. Braz. Chem. Soc.* 18(3): 513-518.

- Dobignard A. and Chatelain C. 2013. Index synonymique de la flore D’Afrique Du Nord. Editions des conservatoire et jardin botaniques Genève. Volume 5.
- Dzhavakhiya, V. G., Ozeretskoykaya O.L., Zinovyeva S.V. 2007. Immune Response, Chapter 10 from comprehensive and molecular phytopathology. Studies in Plant Science .Pp265-314.
- El-Sayed M.M., Abdel-Hameed E.S., Ahmed W.S., El-Wakil E. A. 2008. Non-phenolic antioxidant compounds from *Buddleja asiatica*, Z. Naturforsch. 63: 483-491.
- Goleniowski M., Bonfill M., Cusido R., and Palazon J. 2013. Phenolic Acids, From Natural Products Pp 1952-1973.
- Gupta D. 2015. Methods for determination of antioxidant capacity: A Review. Ijpsr, 6(2): 546-566.
- Gvazava L. N. and Kikoladze V. S. 2007. Verbascoside from *Verbascum phlomoides*. Chemistry of Natural Compounds. 43 (6).
- Habtemariam S. 2018. Iridoids and other monoterpenes in the Alzheimer’s brain: Recent development and future prospects. Molecules 23(1): 117.
- Hadi M.Y., Mohammed G. J., and Hameed I. H. 2016. Analysis of bioactive chemical compounds of *Nigella sativa* using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 8(2):8-24.
- Hassler M. 2019. World Plants: Synonymic checklists of the vascular plants of the world In: Species 2000 & Itis Catalogue Of Life, 2015 Annual Checklist (Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Kunze T., Flann C., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., Dewalt R.E., Decock W., De Wever A., Eds). Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, The Netherlands. Issn 2405-8858.
- Hladik C. M., Simmen B., Ramasiarisoa P.-L., Hladik A. 2000. Rôle des produits secondaires (tannins et alcaloïdes) des espèces forestières de l’Est de Madagascar face aux populations animales. Mémoires de la Société de Biogéographie de Paris, pp.105-114.

- Huang Y.B., Yao M.Y., Xin P.P., Zhou M.C., Yang T., Pan H. 2015. Influence of alkenyl structures on the epoxidation of unsaturated fatty acid methyl esters and vegetable oils, *Rsc Adv.* 5: 74783-74789.
- Iskender N. Y., Yayli N., Yildirim N., Cansu T. B., Terzioglu S. 2009. The volatile constituents of the flower, leaf, and stem of *Verbascum Wiedemannianum* grown in turkey, *J. Oleo Sci.* 58(3): 117-121.
- Jamshidi-Kia F., Lorigooini Z., Asgari (S.) and Saeidi (K.). 2018. Iranian species of *Verbascum*: A review of botany, Phytochemistry and Pharmacological Effects, *Toxin Reviews*.
- Jayakumar K., Muthuraman B. and Rajasekaran S. 2018. Evaluation of phytochemical Screening and traditional value of *Zizyphus xylopyrus* (Retz) Wild. *World New Of Natural Science.* 16: 97-104.
- Juan. M.E., Wenzel U., Daniel H., Planas J.M. 2008. Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Mol Nutr Food Res.* 52(5):595-9
- Kahraman C., Tatli I. I., Kart D., Ekizoğlu M., Akdemir Z. S. 2018. Structure Elucidation and antimicrobial activities of secondary metabolites from the flowery parts of *Verbascum mucronatum* Lam. 15(3):231-237.
- Kahraman C., Tatli I. I., Orhanc I E., and Akdemir Z. S. 2010. Cholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Verbascum mucronatum* Lam. and its secondary metabolites, *Z. Naturforsch.* 65 (11-12):667-74.
- Kanbolat S., Korkmaz N., Sener S O., Badem M., Colak N. U., Abudayyak M., Aliyazicioglu R., Ozgen U., Kandemir A. and Karaoglu S. A. 2018. Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, anticholinesterase, antityrosinase activities and characterisation of volatile compounds of *Verbascum oocarpum* by SPME and GC-FID/MS. *Journal Of Pharmaceutical Research International* 24(4):1-12.
- Kandikattu K. Bharath Rathna Kumar P., Venu Priya R., Sunil Kumar K., Ranjith Rathore S.B. 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*; 1(5): 729-730.

- KangK. A., PiaoM. J., RyuY. S., HyunY. J., ParkJ. E., ShilnikovaK., ZhenA. X., KangH. K., KohY. S., Jeong Y. J.and HyunJ. W.2017. Luteolin induces apoptotic cell death via antioxidant activity in human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*. 51: 1169-1178.
- Karaveliogullari F.A.and Aytaç Z.2008. Revision of the genus *Verbascum* L. (Group A) In Turkey, *Botany Research Journal* (1): 9-32.
- KarthikK., KumarB. R.P., PriyaV.G., SunilkumarK., Rathore R.S.2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research In Pharmacy And Biotechnology*; 1(5): 729-730.
- KasarkarA., Gavali A., KolekarN., Kumbhar S.and WadkarS.2018. Phytochemical screening of *Achyranthes aspera*L., *Amaranthus spinosus*L., *Parthenium hysterophorus*L., *Argemone mexicana*L., *Portulaca oleracea*L. and *Euphorbia Geniculata ortega*. from kolhapur district of Maharashtra. *International Journal of Herbal Medicine*. 6(3): 05-08.
- KaurN., ChaudharyJ., Jain A.and KishoreL.2011.Stigmasterol: A comprehensive review, *Ijpsr*. 2(9): 2259-2265.
- Kaurinovic B. et Vastag D. 2019. Antioxidants,chapter: Flavonoids and phenolic acids as potential natural antioxidants. *Intechopen*. Pp1-20.
- KedareS. B. and SinghR. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay,*J Food Sci Technol*. 48(4): 412–422.
- KeoS., MengC., OeungS., NovV., LonS. A., VichetT., VaT., M. Sourn, S. Chea.2017. Preliminary phytochemical screening of selected medicinal plants of Cambodia, *Asian Journal of Pharmacognosy* 1(4):16-23.
- Khodaie L., Delazar A., Nazemiyeh H. 2019. Biological activities and phytochemical study of *Pedicularis wilhelmsiana* Fisch ex. from Iran, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research (IJPR)*.17(2):685-694.
- Khatun M., Billah M. and Abdul Quader Md. 2012. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Dhaka Univ. J. Sci*. 60(1): 5-10.

- Kim S., Park Y., Shin M., Kim H., Kim M., Lee S., Yun S., Kwon S. 2017. Acacetin inhibits neuronal cell death induced by 6-hydroxydopamine in cellular Parkinson's disease model. *Bioorg Med Chem Lett.* 27(23):5207-5212.
- Kivrak A. Yilmaz C., Konus M., Koca H., IrS. A., OagazJ.A. 2018. Synthesis and biological properties of novel 1-methyl-2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy) benzylidene) hydrazine analogues, *Turk J Chem* 42: 306 – 316.
- Klimek B. 1995. Flavonoid glucuronides from *Verbascum lychnitis* and *V. nigrum*, *Acta Pol. Pharm.* 52(1): 53- 56.
- Kolak U., Boga M., Urusak E. A., Ulubelen A. 2011. Constituents of *Plantago major* Subsp. *intermedia* with antioxidant and anticholinesterase capacities, *Turk J Chem.* 35: 637- 645.
- KostyukV., Potapovich A., Albuhaydar A. R., Mayer W., De Luca C., Korkina L. 2018. Natural substances for prevention of skin photo-ageing: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. *Rejuvenation research.* Volume 21, Number 2.
- Kregiel D., Berlowska J., Witonska I., Antolak H., Proestos C., Babic M., Babic L. and Zhang B..2017. Saponin-based, biological-active surfactants, chapter6 in reza najjar editors. *From application and characterization of surfactants*, Intech. 1st Edition. 184-197.
- Kubo A. I., Niheia K.I. and Tsujimotob K. 2004. Methyl p-coumarate, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12 (20) 5349–5354.
- Kunchandy E. and Rao M.N.A. 1990. Oxygen radical scavenging activity of Curcumin, *Int. J. Phrm.* 58, 237–240.
- Lakshmi A., Vishnurekha C. et Baghkomeh P. N.2019.Effect of theobromine in antimicrobial activity: An *in vitro* study. *Dental Research Journal.* 16(2): 76–80.
- Lalhminghlui K., JagetiaG. C. 2018. Evaluation of the free-radical scavenging and antioxidant activities of chilauni, *Schima wallichii* Korth *in vitro*. *Future Sci. Oa*, 4(2).

- Lele O. H., Maniar J. A., Chakravorty R. L., Vaidya S. P. et Chowdhary A. S. 2016. Assessment of biological activities of caffeine. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5(5): 45-53.
- Lemos da Silva L.A., Faqueti L. G., Reginatto F. H., Conceição dos Santos A. D., Barison A., Biavatti M. W. 2015. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 25: 375–381.
- Liao W., Ning Z., Chen L., Wei Q., Yuan E., Yang J., Ren J. 2014. Intracellular antioxidant detoxifying effects of diosmetin on 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidative stress through inhibition of reactive oxygen species generation. *J. Agric Food Chem*. 62(34):8648-54.
- Lin L.C., Pai Y.F. et Tsai T.H. 2015. Isolation of luteolin and luteolin-7-*O*-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and Their Pharmacokinetics in Rats. *J. Agric. Food Chem*. 63(35):7700-7706.
- Liu Y. H., Wu P. Q., Hu Q. L., Pei Y.J., Qi F. M., Zhang Z. X., Fei D.Q. 2017. Cytotoxic and antibacterial activities of iridoids and sesquiterpenoids from *Valeriana jatamansi*. *Fitoterapia*. 123 : 73–78.
- López-Lázaro M. 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Rev Med Chem*. 9(1):31-59.
- Luca S., Miron A., Aprotosoiaie A., Mihai C., Vochita G., Gherghel D., Ciocarlan N., Skalicka-Woźniak K. 2019. HPLC-Dad-ESI-QToF-Ms/Ms profiling of *Verbascum ovalifolium* Donn Ex Sims and evaluation of its antioxidant and cytogenotoxic activities, *Phytochem Anal*. 30(1):34-45.
- Ludwiczuk A., Skalicka-Woźniak K., Georgiev M. I. 2017. Terpenoids. *Pharmacognosy*. Pp 233–266.
- Lokadi L. P., Munkombwe Namboole M. 2015. Isolation and Characterisation of Stigmasterol and B -Sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae), *JIPBS*, 2 (1): 88-96.

- Marco G.J. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. 4: 594–598.
- Martín J., Crespo G., González-Menéndez V., Moreno G. P., Sánchez-Carrasco P., Pérez-Victoria I., Ruiz-Pérez L. M., González-Pacanowska D., Vicente F., Genilloud O., Bills G. F., Reyes F. 2014. Mdn-0104, an antiplasmodial betaine lipid from *Heterospora chenopodii*, J. Nat. Prod. 77: 2118–2123.
- Juan. M.E., Wenzel U., Daniel H., Planas J.M.
- Melliou E., Kalpoutzakis E., Magiatis P. 2007. Composition of the essential oil of *Verbascum undulatum* from Greece, J. Essent. Oil Res.19, 18-28.
- Moghaddam M. G., Ahmad F. B. H. , A. Samzadeh-Kermani. 2012. Biological Activity of Betulinic Acid: A Review.Pharmacology & Pharmacy, 3 : 119-123.
- Mosyakin S. L. and Tsybalyuk Z. M. 2017. Pollen morphology of the tribe Hemimerideae: possible evidence of ancestral pollen types and parallel evolution in the basalmost clade of Scrophulariaceae S.S. Willdenowia 47: 15 – 27.
- Morteza-Semnani K., Saeedi M. and Akbarzadeh M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Verbascum thapsus* L. 2012. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 15(3): 373 – 379.
- Mosyakin S.L, and Tsybalyuk Z. M. 2015. Pollen morphology of tribes Aptosimeae and Myoporeae supports the phylogenetic pattern in early-branching Scrophulariaceae revealed by molecular studies, Willdenowia, 45(2): 209-222.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., Böhm V.V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. Lwt - Food Science and Technology. 43: 992–999.
- Nesom G. L. 2012. *Verbascum* (Scrophulariaceae). Taxon Eds.: Rabeler & Freeman Vol 17: 2 – 10.

- Ocampo D. C., Gómez S. B., Barbosa J. R. B., Amar R. A. and López V. R. 2013. Anti-Inflammatory Activity of Iridoids and Verbascoside Isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules*, 18: 12109-12118.
- Oleszek W., Hamed A. 2010. Saponin. Based Surfactants. In: Kjellin M, Johansson I Editors. *Surfactants from renewable sources resources*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, Uk. Pp 239-249.
- Otieno B.A., Krause C.E., Rusling J.F. 2016. Bioconjugation of antibodies and enzyme labels onto magnetic beads, *methods in enzymology*. Chapter 7, Vol 571: 135-150.
- Oxelman B., Kornhall P., Olmstead R. G. and Bremer B. 2005. Further disintegration of *Scrophulariaceae*, *taxon*. 54 (2): 411–425.
- Park Y., Moon B.H., Yang H., Lee Y., Lee E. et Lim Y. 2007. Spectral Assignments and Reference Data, Complete assignments of NMR data of 13 hydroxymethoxyflavones. *Magnetic Resonance In Chemistry*. 45: 1072–1075.
- Park M.Y., Kwon H.J. et Sung M.K. 2009. Evaluation of Aloin and Aloe-Emodin as Anti-Inflammatory Agents in Aloe by Using Murine Macrophages, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(4): 828-832.
- Pasdaran A. and Hamedia A. 2017. The Genus *Scrophularia*: A source of iridoids and terpenoids with a diverse biological activity, *Pharmaceutical Biology*. 55(1): 2211–2233.
- Pavel I. Z., Danciu C., Oprean C., Dehelean A. C., Muntean D., Csuk R. et Muntean D. M. 2016. *In Vitro* Evaluation of the Antimicrobial Ability and Cytotoxicity on Two Melanoma Cell Lines of a Benzylamide Derivative of Maslinic Acid. *Analytical Cellular Pathology*. 2016: 2787623.
- Phatangare N.D., Deshmukh K. K., Murade V. D., Hase G. J., Gaje T. R. 2017. Isolation and characterization of phytol from *Justicia gendarussa* burm. F. An anti-inflammatory compound. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 9(6); 864-872.

- Pinzon L. C., Uy M. M., Sze K. H., Wang M. et Chu I. K. 2011. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory and chemopreventive flavones from *Premna odorata* Blanco. *Journal of Medicinal Plants Research* .5(13): 2729-2735.
- Popa D.S. et Rusu M. E. 2017. Isoflavones: Vegetable Sources, Biological Activity, and Analytical Methods for Their Assessment, *Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*, chapter 7. Pp 134-153.
- Powo .2019. Plants of the world online. Facilitated by the royal botanic gardens, Kew. Published on the internet; [Http://Www.Plantsoftheworldonline.Org/](http://www.Plantsoftheworldonline.Org/) Retrieved 25 January 2019.
- Priyanka S., Rani Inala M. S., Nandini H., Kutty A., Kiranmayee P. 2018. A pilot study on sun protection factor of plant extracts: an observational study, *Asian J Pharm Clin Res*, 11(4):67-71.
- Quezel P., Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. p.830.
- Radha M. H., Laxmipriya N.P. 2015 Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 5: 21-26.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231–1237.
- Ren H., Ma J., Si L., Ren B., Chen X., Wang D., Hao W., Tang X., Li D., Zheng Q. 2018. Low dose of acacetin promotes breast cancer mcf-7 cells proliferation through the activation of erk/ pi3k /akt and cyclin signaling pathway. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 13(3):368-377.
- Ridhay A., Noor A., Soekanto N. H., Harlim T., and Altena I. V. 2012. A Stigmasterol glycoside from the root wood of *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf Var. *Degrabrata* K. *Indo. J. Chem.* 12 (1), 100 – 103.
- Roma A., Rota S. G., and Spagnuolo P. A. 2018. Diosmetin induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Mol. Pharmaceutics.* 15(3): 1353–1360.

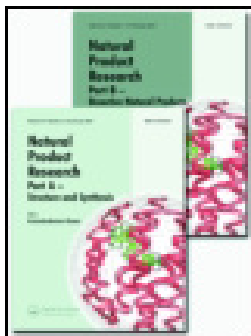
- Saied S. et Begum S. 2004. Phytochemical studies of *Berberis vulgaris*. Chemistry of Natural Compounds, 40 (2).
- Salimi A., Roudkenar M., Sadeghi L., Mohseni A., Seydi E., Pirahmadi N., Pourahmad J. 2016. Selective anticancer activity of acacetin against chronic lymphocytic leukemia using both in vivo and in vitro methods: key role of oxidative stress and cancerous mitochondria. *Nutr Cancer*. 68(8):1404-1416.
- Santos J. S., Alvarenga Brizola V. R. A., Granato D. 2017. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: a proposal and application, *Food Chemistry*. 214: 515–522.
- Sayre R.M., Agin P.P., Levee G.J., Marlowe E. A. 1979. Comparison of in vivo and in vitro testing of sun screening formulas. *Photochemistry and Photobiology*; 29(3): 559-566.
- Seebacher W., Simic N., Weis R., Saf R. et Kunert O. 2003. Complete assignments of ¹H and ¹³C NMR resonances of oleanolic acid, 18a-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem*. 41: 636–638.
- Sen-Utsukarci B., Dosler S., Taskin T., Abudayyak M., Ozhan G., Mat A. 2018. An Evaluation Of Antioxidant, Antimicrobial, Antibiofilm And Cytotoxic Activities Of Five *Verbascum* Species In Turkey, *Farmacia*. 66(6) :1014-1020.
- Shahreza F. D. Oxidative stress, free radicals, kidney disease and plant antioxidants *Immunopathologia Persa*. 3(2):E11.
- Shakeri A.R., Farokh A., 2015. Phytochemical evaluation and antioxidant activity of *Verbascum sublobatum* Murb. leaves, *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)* 2(3):43-47.
- Silva R.O., Sousa F.B., Damasceno S.R., Carvalho N.S., Silva V.G., Oliveira F.R., Sousa D.P., Aragão K.S., Barbosa A.L., Freitas R.M., Medeiros J.V. 2013. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Pharmacology*.

- Sindona G., Caruso A., Cozza A., Fiorentini S., Lorusso B., Marini E., Nardi M., Procopio A. et Zicari S. 2012. Anti-Inflammatory Effect of 3,4-DHPEA-EDA [2-(3,4 - Hydroxyphenyl) ethyl (3S, 4E)- 4-Formyl-3-(2-Oxoethyl)Hex-4-Enoate] on Primary Human Vascular Endothelial Cells. *Current Medicinal Chemistry*, 19 : 4006-4013.
- SinghP., TanwarN., SahaT., Gupta A. and VermaS. 2018. Phytochemical screening and analysis of *Carica papaya*, *Agave americana* and *Piper nigrum*, *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 7(2): 1786-1794.
- Singh D., Chaudhuri P. K. 2018. Structural characteristics, bioavailability and cardioprotective potential of saponins. *Integr Med Res* 7(1): 33–43.
- SkrzypekZ., WysokińskaH., Lucjanswiąte K. and Wróblewski A.E. 1999. Phenylpropanoid glycosides from *Penstemon serrulatus*, *J. Nat. Prod*, 62: 127-129.
- Slinkard K. and Singleton V.L. 1977. Total Phenol Analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic.* 28: 49-55.
- SotoodehA., AttarF., AndaloC., Mirtadzadini M. and CiveyreL. 2018. Focusing on three *Verbascum* L. taxa (Scrophulariaceae) of the flora of Iran. *Adansonia*, Sér. 3, 40 (13): 171-181.
- Sotoodeh A. 2015. Histoire biogéographique et évolutive des genres *verbascum* et *artemisia* en iran a l'aide de la phylogénie moléculaire. PhD thesis, université paul sabatier de Toulouse. p 30.
- Sreena K. and Sujith S. N. 2016. Evaluation of anti-inflammatory activity of the plant extract *Smithia Sensitiva*. *Der Pharmacia Lettre*. 8(4):310-314.
- Tank D. C., Beardsley P. M., Kelchner S. A. and Olmstead R. G. 2006. Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition, *Australian Systematic Botany* 19: 289–307.
- Tatlı I. I., Akko E. K., Yesilada E., and Akdemir Z. S. 2008. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of seven endemic *Verbascum* species growing in Turkey, *Pharmaceutical Biology*. 46(10–11): 781–788.

- TatlıI.I., SchuhlyW., AkdemirZ.S.2007. Secondary metabolites from bioactive methanolic extract of *Verbascum pycnostachyum*Boiss. &Helder flowers, Hacettepe University Journal of The Faculty of Pharmacy. 27(1): 23-32.
- TatlıI.I., AkdemirZ.S. 2006. Traditional uses and biological activities of *Verbascum*Species, Fabad J. Pharm. Sci. 31: 85-96.
- TatlıI.I., AkdemirZ.S. 2004. Chemical Constituents of *Verbascum* L. Species. Fabad J. Pharm. Sci. 29 : 93-107.
- TatlıI. I., AkdemirZ. S., BedirE., KhanI. A. 2003.6-*O*- α -L-Rhamnopyranosylcatalpol Derivative Iridoids from *Verbascum Cilicicum*, Turk J Chem. 27: 765 – 772.
- TopçuG., AyA., BiliciA., SarıkürkcüC.,ÖztürkM., and UlubelenA. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chemistry 103: 816–822.
- Tungmunnithum D., Thongboonyou A.,Pholboon A. andYangsabai A. 2018. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. Medicines. 5 (93):1-16.
- UmaruI. J., BaF., OO O. and AuH. 2018. Phytochemical evaluation and antioxidant properties of three medicinal plants extracts, Medicinal & Analytical Chemistry International Journal. 2(2): 000119.
- Véla E., Benhouhou S. 2007. Évaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le bassin méditerranéen (Afrique Du Nord), C. R. Biologies 330: 589–605.
- VahediH., LariJ., HalimiM.,NasrabadiM.VahediA., 2012. Chemical composition of the n-hexane extract of *Verbascum speciosum* growing wild in Iran, Journal of Essential Oil Bearing Plants. 15(6): 895 – 899.
- Wada S.I., OhbaS.I., Someno T., Hatano M. et Nomoto A. 2014. Structure and biological properties of lentztrehalose: a novel trehalose analog. The Journal of Antibiotics.67 : 319–322.

- Wandhammer M. 2012. Thèse : Etude structurale de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphorés : stratégie de réactivation. Autre. Université de Strasbourg, 2012.
- Wang L., Wesemann S., Krenn L., Ladurner A., Heiss E. H., Dirsch V. M. et Atanasov A. G. 2017. Erythrodiol, an Olive Oil Constituent, Increases the Half-Life of ABCA1 and Enhances Cholesterol Efflux from THP-1-Derived Macrophages. *Frontiers in Pharmacology*. 8 (375) :1-8.
- Wang T.Y., Li Q., Bi K.S. 2018. Bioactive Flavonoids in Medicinal Plants: Structure, Activity and Biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13(1) : 12-23.
- West B. J., Uwaya A., Isami F., Deng S., Nakajima S., and Jensen C. J. 2014. Antiglycation Activity of iridoids and Their Food Sources. *International Journal of Food Science*. Pp1–8.
- Webb C. J., Sykes W.R., Garnock-Jones P.J. 1988. Flora of New Zealand. Naturalised Pteridophytes, Gymnosperms, Dicotyledons. Botany Division Dsir, Christchurch. Volume IV.
- Yang L., Liu X., Zhuang X., Feng X., Zhong L., and Ma T. 2018. Antifungal effects of saponin extract from Rhizomes of *Dioscorea panthaica* Prain ET Burk against *Candida Albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med*. P-13.
- Yang L., Liu X., Zhong L., Sui Y., Quan G., Huang Y., Wang F., and Ma T. 2018. Dioscin inhibits virulence factors of *Candida albicans*, *Biomed Research International*. P 9.
- Zajdel S.M., Graikou K., Sotiroudis G., Głowniak K., Chinou I. 2013. Two new iridoids from selected *Penstemon* species- antimicrobial activity. *Nat. Prod. Res.* 27 (24): 2263-2271.
- Zhou X., Wang F., Zhou R. Song X. Xie M. 2017. Apigenin: A current review on its beneficial biological activities. *J Food Biochem*. Pp : 1-11.
- Zeb M. A., Khan S. U., Rahman T.U., Sajid M., Seloni S. 2017. Isolation and biological activity of β -sitosterol and stigmasterol from the roots of *Indigofera heterantha*. *Pharmacy and Pharmacology International Journal*. 5(5):204–207.

- Zhang W.M., Wang W., Zhang J.J., Wang Z. R., Wang Y., Hao W.J., and Huang W. Y. 2016. Antibacterial constituents of hainan *Morinda citrifolia* (Noni) Leaves, Journal Of Food Science. 81(5): 192-6.
- Zhao Y.C., Xue C.H., Zhang T.T., and Y.M. Wang. 2018. Saponins from sea cucumber and their biological activities. J. Agric. Food Chem. 66: 7222–7237.



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

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


Chemical constituents and HRESI-MS analysis of an Algerian endemic plant - *Verbascum atlanticum* batt. - extracts and their antioxidant activity

Halima Khentoul, Chawki Bensouici, Fernando Reyes, Domenico Albanese, Djamel Sarri, Mekkiou Ratiba, Benayache Fadila, Ramdane Seghiri & Ouahiba Boumaza

To cite this article: Halima Khentoul, Chawki Bensouici, Fernando Reyes, Domenico Albanese, Djamel Sarri, Mekkiou Ratiba, Benayache Fadila, Ramdane Seghiri & Ouahiba Boumaza (2019): Chemical constituents and HRESI-MS analysis of an Algerian endemic plant - *Verbascum atlanticum* batt. - extracts and their antioxidant activity, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2019.1602829](https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602829)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602829>

 View supplementary material 

 Published online: 22 Apr 2019.


 Submit your article to this journal 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



Chemical constituents and HRESI-MS analysis of an Algerian endemic plant - *Verbascum atlanticum* batt. - extracts and their antioxidant activity

Halima Khentoul^a, Chawki Bensouici^b, Fernando Reyes^c ,
Domenico Albanese^d, Djamel Sarri^e, Mekkiou Ratiba^a, Benayache Fadila^a,
Ramdane Seghiri^a and Ouahiba Boumaza^a

^aUnité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université des Frères Mentouri Constantine, Constantine, Algérie; ^bNational Center of Biotechnology Research, Constantine, Algeria; ^cFundación MEDINA, Centro, de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía, Avendadel Conocimiento 34, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada, Spain; ^dDipartimento di Chimica, Università Degli Studi di Milano, Milano, Italia; ^eDépartement de Biologie, Faculté des sciences, Université Mohammed Boudiaf, M'Sila, Algérie

ABSTRACT

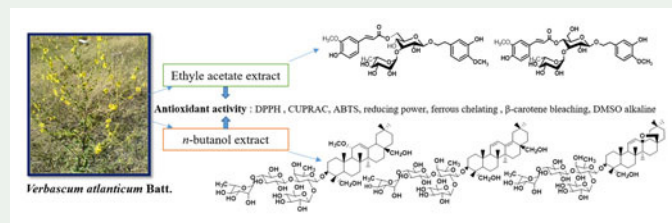
This is the first report on the phytochemistry and antioxidant activity of ethyl acetate and *n*-butanol extracts from an Algerian endemic plant *Verbascum atlanticum* Batt. (Scrophulariaceae). Both extracts were subjected to a phytochemical study by semi-preparative HPLC, which led to the isolation and identification of nine compounds: methyl linolenate (1), methyl linoleate (2), Phytol-1(3), Martynoside (4), Isomartynoside (5), *Cis*-martynoside (6), Ilwensisaponin C (7), Ilwensisaponin B (8), Ilwensisaponin A (9). In addition, the fractions from both extracts were analysed by LC-UV-MS and HRESI-MS. This later revealed the presence of eight other metabolites by using a comparison with known microbial metabolites data. Finally, both extracts were estimated for their phenolic and flavonoid contents as well as the evaluation of their antioxidant activity using five different assays DPPH, CUPRAC, reducing power, β -carotene bleaching and superoxide DMSO alkaline. The results showed that the ethyl acetate extract had the most antioxidant effect.

ARTICLE HISTORY


Received 12 February 2019
Accepted 24 March 2019

KEYWORDS

Verbascum atlanticum;
phenylpropanoid glycosides;
saponin glycosides; HRESI-MS; antioxidant activity



CONTACT Ouahiba Boumaza  ouahibaboumaza@yahoo.fr  Unité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Université des Frères Mentouri Constantine, Constantine, Algérie.

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1602829>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

1. Introduction

In this work, we investigated *Verbascum atlanticum* Batt. an Algerian endemic plant belonging to *Verbascum* genus (Benaïssa et al. 2018). This genus is widely used in folk medicine to treat respiratory problems, eczema, and other types of inflammatory skin (Tatli et al. 2008). In addition, the isolated compounds from plants of this genus have several properties such as antioxidant activity (Ramunno et al. 2006). It is represented by 400 species distributed through the world (Sotoodeh et al. 2018), and it is well known for its variety of iridoids, saponosides and phenyl glycosides (Frezza et al. 2018) which are valuable for the taxonomic evaluation of this genus. In the present study, the ethyl acetate (VAA) and *n*-butanol (VAB) extracts of *V. atlanticum* were subjected to semi-preparative HPLC separation, this step led to the isolation and identification of nine compounds; those compounds are identified by NMR and comparison of spectral values with literature data. LC-UV-MS and HRESI-MS analysis of samples extracts allowed in the identification of eight other compounds from seven fraction where the DAD (UV – Vis) spectra, retention time, and positive and negative mass spectra of the samples are compared to the corresponding UV-LC-MS data of known microbial metabolites stored in the proprietary database library of Fundación MEDINA, Spain (Martín et al. 2014). Finally, both extracts were submitted to quantitative analysis as well as the evaluation of their antioxidant activity using different *in vitro* model assays.

2. Results and discussion

Both (VAA) and (VAB) extracts of *V. atlanticum* were chromatographed on silica gel column to give VAA1, VAA15 and VAB fractions respectively. The semi-preparative HPLC of subfractions VAA1-2, VAA15-3 and fraction VAB11, led to the isolation and identification of nine compounds named: methyl linolenate (1) (Chabert et al. 2006), methyl linoleate (2) (Huang et al. 2015), phytol-1(3) (Alarif et al. 2010), martynoside (4) (Khodaie et al. 2018), isomartynoside (5) (Caliş et al. 1984), *cis*-martynoside (6) (Skrzypek et al. 1999), ilwensisaponin C (7) (Caliş et al. 1993), Ilwensisaponin B (8) (El-Sayed et al. 2008), Ilwensisaponin A (9) (Caliş et al. 1993) (Figure 1). The chromatograms of isolated compounds (Figures S1, S2, and S3) are reported in the Supplementary Material. The spectroscopic data (NMR and MS) of all obtained compounds from our experiments were in good agreement with those reported in literature and are also reported in the Supplementary Material. In addition, all sub fractions obtained from chromatographic separation of both extracts of *V. Atlanticum* were submitted to LC-UV-MS analysis. This step permitted to choose nineteen samples which were injected in HR-ESI-MS. This later allowed to identifying eight other which are reported in (Table S1). These bioactives microbial metabolites were included in the proprietary database library of Fundación MEDINA, Spain (Martín et al. 2014). The identification of phenylpropanoid glycosides (4), (5), (6) and saponin glycosides (7), (8) and (9) which were previously identified in *Verbascum* species is very interesting from the chemotaxonomic aspect of *Verbascum* genus (Frezza et al. 2018). On the other hand, the presence of these compounds is very important under the ethnopharmacological standpoint.

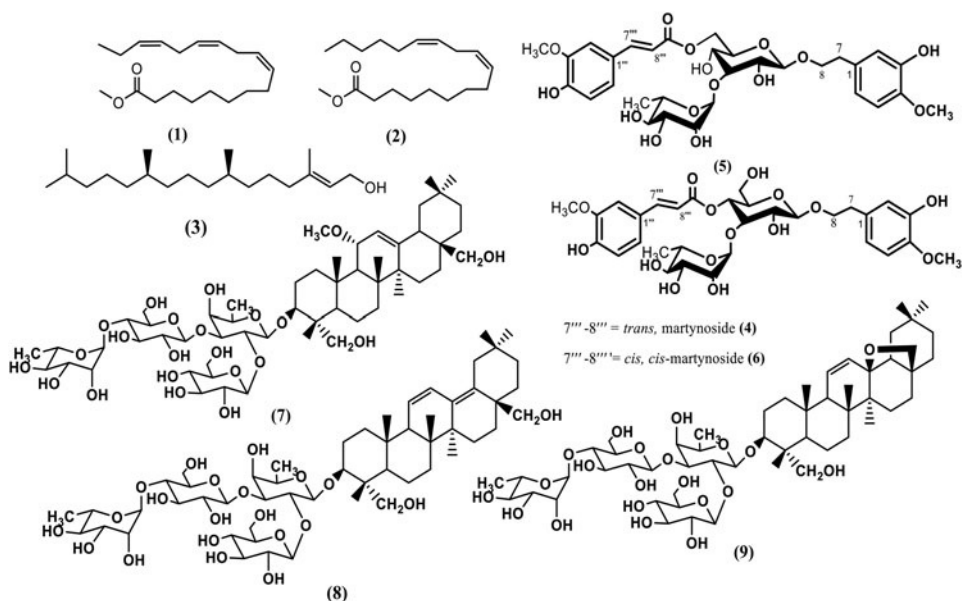


Figure 1. Identified compounds of VAA and VAB extracts.

2.1. Quantitative analysis

Both extracts were rich in phenolic and flavonoid contents. The (VAB) extract exhibited the highest value in polyphenol (416.84 ± 2.0 mg PEs/g extract) while (VAA) presented the highest value in flavonoid content (96.54 ± 3.64 mg QEs/g extract) (Table S2).

2.2. Antioxidant activity

It is suitable to use multiple methods of evaluation of antioxidant activity because of the difference in the mechanisms of action of antioxidants (Huang et al. 2005). The antioxidant potential of (VAA) and (VAB) extracts from the aerial parts of *V. Atlanticum* Batt. was assessed using five methods including radical scavenging assays (DPPH, CUPRAC, Reducing power, β -carotene bleaching as well as Alkaline DMSO assay) and the results are shown in (Table S3). All antioxidant methods used in the present study showed that the (VAA) has the higher activity results in comparison with (VAB) extract. The results of DPPH scavenging capacity showed that the (VAA) extract ($IC_{50}: 19.94 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$) was active compared to standard compounds BHT ($IC_{50}: 12.99 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$), α -tocopherol ($13.02 \pm 5.17 \mu\text{g/mL}$) and ascorbic acid ($13.94 \pm 2.81 \mu\text{g/mL}$). In addition, the (VAA) extract exhibited the highest cupric reducing antioxidant capacity ($IC_{50}: 11.90 \pm 0.71 \mu\text{g/mL}$) in comparison with standards: ascorbic acid and α -tocopherol ($IC_{50}: 12.43 \pm 0.09; 19.92 \pm 1.46 \mu\text{g/mL}$ respectively) and moderate compared with BHA ($IC_{50}: 3.64 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$). However, The (VAA) was found to be the best reducing agent ($A_{0.50}: 23.81 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$) in comparison with the (VAB) extract, better than α -tocopherol ($A_{0.50}: 34.93 \pm 2.38 \mu\text{g/mL}$), moderate compared with BHA and ascorbic acid ($A_{0.50}: 7.99 \pm 0.87; 6.77 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$ respectively). As known, the β -carotene bleaching method reveals the percentage of inhibition of lipid peroxidation. In this assay, the (VAA)

extract (IC_{50} : $18.80 \pm 0.65 \mu\text{g/mL}$), was more active than ascorbic acid (IC_{50} : $52.59 \pm 1.98 \mu\text{g/mL}$), but is lower than BHT, BHA and α -tocopherol (IC_{50} : 1.05 ± 0.01 ; 0.90 ± 0.02 ; $1.79 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ respectively). The results of Superoxide DMSO alkaline assay were also presented in (Table S3). The (VAA) and (VAB) extracts (IC_{50} : 5.04 ± 0.21 , $6.46 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$ respectively) exhibited the highest inhibitory activity, even higher than all antioxidants standards used such as ascorbic acid and α -tocopherol (IC_{50} : 7.59 ± 1.16 ; $31.52 \pm 2.22 \mu\text{g/mL}$ respectively).

3. Conclusion

To our knowledge, this is the first report on the phytochemical study and antioxidant activity of *Verbascum atlanticum* Batt. extracts. From ethyl acetate and *n*-butanol extracts, nine compounds were isolated and identified using semi-preparative HPLC separation and NMR spectroscopic data from which six are known as taxonomic markers of *Verbascum* genus. In addition, eight other compounds were characterized by HRESI-MS analysis. The entire identified compounds are new for this species and known by their several biological activities. The EtOAc extract of *V. Atlanticum* exhibited the highest flavonoid content and the highest antioxidant effect in all tests.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Fernando Reyes  <http://orcid.org/0000-0003-1607-5106>

References

- Alarif WM., Ayyad S-EN, Al-lihaibia SS. 2010. Acyclic diterpenoid from the redalga *Gracilaria foliifera*. *Rev latinoamer Quim.* 38(1).
- Benaissa M, El Haitoum A, Hadjadj K. 2018. Floristic and medical diversity interest of Djebel Aissa national park (Ksour Montains, Algeria). *Mal J Fund Appl Sci.* 14(2):303–306.
- Caliş I, Lahloub MF, Rogenmoserand E, Sticher O. 1984. Isomartynoside, a phenylpropanoid glycoside from *Galeopsis pubescens*. *Phytochemistry.* 23(10):2231–2313.
- Caliş I, Zor M, Başaran A. 1993. Ilwensisaponins A, B, C, and D: Triterpene saponins from *Scrophularia ilwensis*. *HCA.* 76(3):1352–1360.
- Chabert P, Attioua B, Brouillard R. 2006. *Croton lobatus*, an African medicinal plant: Spectroscopic and chemical elucidation of its many constituents. *Bio Factors.* 27:69–78.
- El-Sayed MM, Abdel-Hameed ES, Ahmed WS, El-Wakil EA. 2008. Non-phenolic antioxidant compounds from *Buddleja asiatica*. *Z Naturforsch.* 63c:483D491.
- Frezza C, Biancob A, Serafinia M, Foddaia S, Salustria M, Reverberia M, Gelardic L, Boninac A, Boninac FP. 2018. HPLC and NMR analysis of the phenyl-ethanoid glycosides pattern of *Verbascum Thapsus* L. cultivated in the Etnean area. *Nat Prod Res.* 14:1–7.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 53(6):1841–1856.

- Huang Y-B, Yao M-Y, Xin P-P, Zhou M-C, Yang T, Pan H. 2015. Influence of alkenyl structures on the epoxidation of unsaturated fatty acid methyl esters and vegetable oils. *RSC Adv.* 5(91): 74783.
- Khodaie L, Delazar A, Nazemiyeh H. 2018. Biological activities and phytochemical study of *Pedicularis wilhelmsiana* Fisch Ex. Iran *J Pharm Res.* 17(2):685–694.
- Martín J, Crespo G, González-Menéndez V, Pérez-Moreno G, Sánchez-Carrasco P, Pérez-Victoria I, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanowska D, Vicente F, Genilloud O, et al. 2014. MDN-0104, an antiplasmodial betaine lipid from *Heterospora chenopodii*. *J Nat Prod.* 77(9):2118–2123.
- Ramunno A, Serrilli A. M, Piccioni F, Serafini M, Ballero M. 2006. Taxonomical markers in two endemic plants of sardinia: *Verbascum conocarpum* and *Scrophularia trifoliata*. *Nat Prod Res.* 20(5):511–516.
- Skrzypek Z, Wysokińska H, Swiatek L, Wróblewski AE. 1999. Phenylpropanoid glycosides from *Penstemon serrulatus*. *J Nat Prod.* 62(1):127–129.
- Sotoodeh A, Attar F, Andalo C, Mirtadzadini M, Civeyrel L. 2018. Focusing on three *Verbascum L. taxa (Scrophulariaceae)* of the flora of Iran. *Adansonia Sér.* 40(2):171–181.
- Tatli I, Akkol EK, Yesilada E, Akdemir ZS. 2008. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of seven endemic *Verbascum* species growing in Turkey. *Pharm Biol.* 46(10–11):781–788.

المخلص

بحث الرسالة الحالي كان مكرس لدراسة كيميائية نباتية وبيولوجية لنوعين من جنس البوصير *Verbascum* بنوعيه البوصير الأطلسي *Verbascum atlanticum* Batt. المستوطن في الجزائر والبوصير الكريتي *Verbascum creticum* Cav. الذي لا يوجد أي موضوع دراسة كيميائية نباتية من قبل حوله.

سمح هذا البحث بعزل وتنقية 20 جزيئة بفضل استخدام العديد من التقنيات الكروماتوغرافية (HPLC، TLC، CC)، وتم تحديد المركبات بطرق طيفية مختلفة (تقنية الرنين المغناطيسي NMR)، بواسطة القياس الطيفي للكتلة عالية الدقة (HR-ESI-MS، LC-UV-MS) وبمقارنة بيانات المراجع.

فيما يتعلق بالنشاط البيولوجي، سبعة اختبارات في المختبر لنشاط مضادات الأكسدة وذلك بالتركيز على الفعالية البيولوجية لمستخلصات الكلوروفورم وخلات الاثيل والبيتانول لكلتا النباتين وذلك من خلال عدة اختبارات *in vitro* تمثلت في:

1. الفعالية المضادة للأكسدة باختبارات ارجاع DPPH، ABTS، CUPRAC، قوة ارجاع الحديد الثلاثي الى الحديد الثنائي، فعالية تكبير الحديد، فعالية المضادة لتبييض بيتا كاروتن وفوق الاكسيد القلوي.
2. الفعالية المضادة للالتهاب.
3. فعالية تثبيط انزيم استيل كولين ستراز والبيترييل كولين ستراز.
4. فعالية الوقاية من اشعة الشمس الفوق بنفسجية
5. الفعالية المضادة للبكتيريا

وقد أظهرت نتائج هذه الاختبارات ان المستخلصات المختلفة لهاتين النباتين التي تمت دراستهما أن هذين النوعين لهما فعالية بيولوجية.

الكلمات المفتاحية: البوصير الكريتي، البوصير الأطلسي، HR-ESI-MS، الفعالية المضادة للأكسدة، HPLC

Abstract:

This work is based on a phytochemical and biological study of two species of the genus *Verbascum* namely the endemic species to Algeria *Verbascum atlanticum* Batt. and the species *Verbascum creticum* Cav. which has not been the subject of any phytochemical study before.

This investigation allowed the isolation and the purification of 20 products by using of several chromatographic techniques (CC, TLC, HPLC), the structures were identified by the different spectral methods (NMR1D and 2D), by the spectrometry of high resolution mass (HR-ESI-MS, LC-UV-MS,) and by comparing literature data.

The biological activity is tested by the antioxidant activity on seven tests *in vitro* namely the DPPH inhibition, ABTS, CUPRAC, reducing power, metal chelating effect, anti-bleaching effect of β -carotene, superoxide alkaline. The effect of the acetylcholinesterase inhibition and butrylcholinesterase, the effect of protection against UVB rays and the antibacterial sensitivity test on the different extracts of the plants studied showed that these species have biological efficacy.

Key words: antioxidant activity, *Verbascum atlanticum* Batt., *Verbascum creticum* Cav., HPLC, HR-ESI-MS.

Résumé

Ce travail est consacré à une étude phytochimique et biologique de deux espèces du genre *Verbascum* à savoir l'espèce endémique à l'Algérie *Verbascum atlanticum* Batt. et l'espèce *Verbascum creticum* Cav. qui n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique auparavant.

Cette investigation a permis l'isolement et la purification de 20 produits grâce à l'utilisation de plusieurs techniques chromatographiques (CC, CCM, HPLC), les structures ont été identifiées par les différentes méthodes spectrales (RMN1D et 2D), par la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI-MS, LC-UV-MS,) et par la comparaison des données de la littérature.

Concernant l'activité biologique, sept essais in vitro de l'activité antioxydant à savoir l'inhibition DPPH, ABTS, CUPRAC, pouvoir réducteur, effet chélateur du métal, effet anti blanchiment de β -carotène, superoxyde alcalin ainsi que l'effet de l'inhibition acétylcholinestérase et butrylcholinestérase, l'effet de la protection contre des rayons UVB et le test de la sensibilité antibactérienne sur les différents extraits des plantes étudiées ont montré que ces espèces ont une efficacité biologique.

Mots clés : Activité antioxydant, HPLC, *Verbascum atlanticum* Batt., *Verbascum creticum* Cav., HR-ESI-MS