

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

**UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre : 21/D3C/2020

Série : 05/Ch/2020

**THESE : Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)**

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

INTITULE :

**Etude phytochimique et pharmacologique des espèces *Salvia
buchananii* Hedge (Lamiaceae), *Cistanche phelypaea* (L.)
Coutinho (Orobanchaceae) et *Anarrhinum pedatum* Desf.
(Scrophulariaceae).**

**Par
Khadidja Aya BELADJILA**

Devant le jury :

Pr. Salah AKKAL	U. des frères Mentouri Constantine1	Président
Pr. Djemaa BERREHAL	U. des frères Mentouri Constantine 1	Directeur de thèse
Pr. Alessandra BRACA	U. de Pise- Italie	Co-directeur de thèse
Dr. Naima BOUTAGHANE	U. des frères Mentouri Constantine 1	Examineur
Dr. Assia KHALFALLAH	U. Abdelhafid Boussouf-Mila	Examineur

Soutenue publiquement le 22/06/2020

Remerciements

L'homme n'est rien sans les hommes. En écrivant cette dernière partie du manuscrit, mon cœur est rempli de gratitude envers mon Dieu qui m'a conduit durant ces années de formation loin de ma famille et qui a pris soin de placer sur ma route de nombreuses personnes dont l'aide a permis le bon déroulement de mes travaux et l'aboutissement de cette thèse.

Je tiens d'abord à remercier particulièrement Madame le Professeur **Zahia KABOUCHE** directrice du Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'accueillant au sein du laboratoire et en supervisant mes travaux. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier, tout au long de mon cursus universitaire, de sa grande expérience, de sa rigueur scientifique et de son professionnalisme.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma co-directrice de thèse Madame le Professeur **Alessandra Braca** de l'Université de Pharmacie Pise de m'avoir accueillie dans son laboratoire, et m'ai guidé pour mener à bien ce travail et me permettre de présenter ma thèse aujourd'hui. Je la remercie pour ses conseils, son soutien sa gentillesse, en particulier pour sa patience et sa bienveillance qui m'ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ce travail. Je le remercie vivement de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée pour la réalisation de mes publications scientifiques.

Je remerciais ma directrice de thèse, Madame le professeure **Djemaa Berrahel** de l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et surtout pour toute l'aide qu'elle m'a apportée pour la réalisation de ce travail et la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement le docteur **Marinella De Leo** de l'Université de Pharmacie Pise, pour leur amitié, leur soutien, leur présence et pour les discussions scientifiques pertinentes et enrichissantes que nous avons eues et qui m'ont beaucoup aidé au long de ce travail. Je le remercie aussi qu'elle a été toujours très proche de moi.

Mes remerciements vont également le docteur **Assia Khalfallah** de l'Université de Mila et le docteur **Naima Boutaghane** de l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour

l'intérêt qu'elles ont porté à mes travaux en examinant ce mémoire, pour ses conseils avisés et pour l'honneur qu'elles me font en participant à ce jury.

Je remercie également le Professeur **Salah AKKAL** de l'Université Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir aimablement accepté de se consacrer à la lecture de mon manuscrit et d'en être l'examineur, qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

J'aimerais également citer ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour plusieurs aspects de ce travail. Je remercie le professeur **Nunziatina De Tommasi**, Dr **Roberta Cotugno**, Dr **Carlotta Granchi** (Université de Salerno), la professeur **Felicia D'Andrea** (Université de Pise), la professeur **Maria Paola Germanò** (Université de Messine), Pr **Amal Al-Aboudi** (Université de de Jordani), Pr **Hala Al-Jaber** (Université de de Jordani) et Pr **Khaldoun Bachari** (Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques Algerie), pour la réalisation des nombreux spectres de RMN et GC-MS, et les tests d'activités biologiques.

Je remercie le **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Algérien**, pour la bourse qui m'a été accordée dans le cadre du PNE afin de finaliser ma thèse.

Pour finir, je tiens à remercier mes **PARENTS** pour leur soutien permanent, constant et surtout sans aucune faille ; avec la patience et la confiance que vous avez toujours placée en moi, vous m'avez permis d'avancer en toute quiétude. J'espère qu'ils trouveront en ce modeste travail une récompense de ce qu'ils ont fait pour moi.

Une mention très particulière va à mon **FRERE**, tu as toujours été soucieux de mon parcours, ton soutien constant, tes conseils et tes marques d'encouragement.

Tous mes remerciements à mon, **FIANCE**, pour son soutien quotidien indéfectible, pour son soutien moral ininterrompu et ses nombreux conseils tout le long de ma thèse.

Liste des figures

Partie I : Revue bibliographique

Figure I-1. A. fleurs de <i>Salvia buchananii</i> . B. les parties botaniques de l'espèce <i>Salvia buchananii</i>	4
Figure I-2. A. racines de <i>S. miltiorrhiza</i> . B. tablettes commerciales de Danshen.....	5
Figure I-3. Structure des sesquiterpènes rencontrées dans le genre <i>Salvia</i>	11
Figure I-4. Structures diterpenoïdes rencontrées dans le genre <i>Salvia</i>	14
Figure I-5. Structures triterpéniques du type ursane rencontrées dans le genre <i>Salvia</i>	18
Figure I-6. Structures triterpéniques du type oleanane rencontrées dans le genre <i>Salvia</i>	19
Figure I-7. Structures triterpéniques du type lupane rencontrées dans le genre <i>Salvia</i>	20
Figure I-8. Structures triterpéniques du type dammarane rencontrées dans le genre <i>Salvia</i>	21
Figure I-9. Structures stéroïdiques rencontrées dans le genre <i>Salvia</i>	21
Figure I-10. Structures polyphénoliques rencontrées dans le genre <i>Salvia</i>	26
Figure I-11. Diterpènes clérodane 181-191 isolés des parties aériennes de l'espèce <i>S. buchananii</i>	27
Figure I-12. <i>Cistanche phelypaea</i> au Tassili N'Ajjer, Hoggar, Algérie.	29
Figure I-13. Structures des phényléthanoïdes glycosidés dans le genre <i>Cistanche</i>	37
Figure I-14. Structures iridoïdes dans le genre <i>Cistanche</i>	39
Figure I-15. Structures lignanes dans le genre <i>Cistanche</i>	40
Figure I-16. Structures benzylglycosidés dans le genre <i>Cistanche</i>	41
Figure I-17. Structures d'ACDP-2 dans le genre <i>Cistanche</i>	42
Figure I-18. Structures de SPA dans le genre <i>Cistanche</i>	42
Figure I-19. Structures oligosaccharidés dans le genre <i>Cistanche</i>	42
Figure I-20. Répartition géographique des espèces de la famille Scrophulariaceae.	44
Figure I- 21. A. <i>Anarrhinum pedatum</i> Desf., B. Spécimen <i>Anarrhinum pedatum</i> Desf. vallée du Djebel el Ouach à Constantine et C. Corolle d' <i>Anarrhinum pedatum</i> Desf.	46
Figure I-22. Monoterpènes isolés d' <i>A. orientale</i>	48
Figure I-23. Trois iridoïdes glycosylés isolés d' <i>A. orientale</i>	48
Figure I-24. Iridoïdes glycosylés isolés d' <i>A. orientale</i>	49
Figure I-25. Iridoïdes glycosylés isolés d' <i>A. pubescens</i>	49
Figure I-26. DMAPP et IPP.	51
Figure I-27. Classification des terpènes.	52
Figure I-28. Quelques exemples de monoterpènes.	53
Figure I-29. Structures de quelques lactones sesquiterpènes.	54

Figure I-30. Quelques exemples de diterpènes.....	54
Figure I-31. Structure de squalène.	55
Figure I-32. Les différents squelettes pentacycliques triterpéniques rencontrés.....	55
Figure I-33. Structure du squelette iridane.....	57
Figure I-34. Structure de l'iridodial.	57
Figure I-35. Biosynthèse des iridoïdes.....	58
Figure I-36. Quelques exemples des iridoïdes simples.....	59
Figure I-37. Quelques exemples des iridoïdes glycosides.	60
Figure I-38. Exemples de sécoiridoïdes possédant une chaîne latérale vinylique.	60
Figure I-39. Exemples de sécoiridoïdes possédant un groupement éthylidène.....	61
Figure I-40. Exemple de sécoiridoïde possédant une structure tricyclique.....	61
Figure I-41. Exemples de bisiridoïdes.....	61
Figure I-42. Structure de base des flavonoïdes.	66
Figure I-43. Différentes classes de flavonoïdes.	67
Figure I-44. Différents groupes structuraux fondamentaux des lignanes.	68

Partie II : Matériel et méthodes

Figure II-1. Biotage® Isolera® Spektra.....	71
Figure II- 2. Représentation schématique d'une cellule en mode ascendant et descendant.	72
Figure II- 3. Système de CPCHP.	73
Figure II- 4. Chromatogramme LC-MS en mode positive des extraits SBR _{Hex} et SBR _{CHCl3}	77
Figure II-5. Chromatogramme LC-MS des extraits SBR _{C-M} et SBR _{MeOH}	77
Figure II-6. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait SBR _{CHCl3} effectué.....	79
Figure II-7. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction Sb8.	80
Figure II-8. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction Sb11.....	80
Figure II-9. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait SBR _{C-M}	82
Figure II-10. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction Sbs4.	82
Figure II-11. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction Sbs6.	83
Figure II-12. Chromatogramme LC-MS des extraits CT _{Ep} et CT _{CHCl3}	85
Figure II-13. Chromatogramme LC-MS des extraits CT _{AcOEt} et CT _{n-BuOH}	85
Figure II-14. Profils CCM en phase normale des extraits CT _{Ep} , CT _{CHCl3} , CT _{AcOEt} et CT _{n-BuOH} de la plante <i>C. phelypaea</i>	86
Figure II-15. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait CT _{n-BuOH}	88

Figure II-16. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C2.....	88
Figure II-17. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C3.....	89
Figure II-18. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C4.....	89
Figure II-19. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C5.....	90
Figure II-20. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C7.....	90
Figure II-22. Chromatogramme LC-MS des extraits APD _{Hex} et APD _{CHCl3}	92
Figure II-23. Chromatogramme LC-MS des extraits APD _{C-M} et APD _{n-BuOH}	92
Figure II-21. Profils CCM sur gel de silice normale des extraits de la plante <i>A. pedatum</i>	93
Figure II-24. CCM analytique du fractionnement APD _{n-BuOH} effectué en Séphadex.....	95
Figure II-25. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction B.....	96
Figure II-26. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C.....	96
Figure II-27. Plaques CCM de chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la fraction C.....	99
Figure II-28. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction C3.....	100
Figure II-29. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction C4.....	100
Figure II-30. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction C7.....	100
Figure II-31. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction D.....	101
Figure II-32. Plaques CCM de chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la fraction E.....	103
Figure II-33. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction E2.....	104
Figure II-34. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction E4.....	104
Figure II-35. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction E6.....	104
Figure II-36. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction E8.....	105
Figure II-37. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction G.....	105
Figure II-38. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction I.....	106
Figure II-39. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction M.....	106
Figure II-40. Schéma des plaques 96 puits dans le test MTT.....	111

Figure II-41. Activité de la MonoAcylGlycerol Lipase.....	111
---	-----

Partie III : Résultats et discussion

Figure III-1. Squelettes d'ursane, oleanane et lupane.....	116
Figure III-2. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif et ESI-MS/MS en mode négatif du composé SBR ₁	117
Figure III-3. Spectre de RMN ¹ H, avec un agrandissement des parties (a, b et c) du composé SBR ₁	118
Figure III-4. Spectres de RMN ¹³ C avec un agrandissement de la partie (a) du composé SBR ₁	119
Figure III-5. Corrélations COSY <i>J</i> _{H-H} observée sur les cycles A, C, D et E du composé SBR ₁	120
Figure III-6. Spectre COSY du composé SBR ₁	121
Figure III-7. Corrélations 1D TOCSY observée sur les cycles A, B, C, D et E du composé SBR ₁	121
Figure III-8. Spectre TOCSY du composé SBR ₁	122
Figure III-9. Spectre HSQC du composé SBR ₁	123
Figure III-10. Corrélations HMBC <i>J</i> _{H-C} des cycles B, C, D et E du composé SBR ₁	124
Figure III-11. Corrélations HMBC ^{n>1} <i>J</i> _{H-C} des cycles A et B du composé SBR ₁	125
Figure III-12. Spectre HMBC étalé de δ _H 0.80 à 1.06 ppm du composé SBR ₁	125
Figure III-13. Spectre HMBC étalé de δ _H 1.20 à 2.40 ppm du composé SBR ₁	126
Figure III-14. Spectre HMBC étalé de δ _H 3.0 à 5.0 ppm du composé SBR ₁	126
Figure III-15. Spectre de masse ESI-MS et spectre MS/MS et MS ³ du composé SBR ₂	128
Figure III-16. Spectre RMN ¹ H du composé SBR ₂	129
Figure III-17. Spectre RMN ¹³ C du composé SBR ₂	130
Figure III-18. Spectre COSY du composé SBR ₂	131
Figure III-19. Spectre HSQC du composé SBR ₂	131
Figure III-20. Corrélations HMBC des cycles A, B, C, D et E du composé SBR ₂	132
Figure III-21. Spectre HMBC étalé de δ _H 0.80 à 1.50 ppm du composé SBR ₂	133
Figure III-22. Spectre HMBC étalé de δ _H 0.80 à 2.60 ppm du composé SBR ₂	133
Figure III-23. Spectres HMBC étalés de δ _H 4.0 à 5.50 ppm du composé SBR ₂	134
Figure III-24. Spectre de masse ESI-MS du composé SBR ₃	135
Figure III-25. Spectre de RMN ¹ H du composé SBR ₃	136
Figure III-26. Spectre de masse ESI-MS du composé SBR ₄	137
Figure III-27. Couplages <i>meta</i> et <i>ortho</i> des protons aromatiques.....	138
Figure III-28. Spectre de RMN ¹ H du composé SBR ₄	138
Figure III-29. Spectre de masse ESI-MS du composé SBR ₅	139

Figure III-30. Spectre de RMN ^1H des composés SBR_5 comparé à celui du composé SBR_4	140
Figure III-31. Spectre de masse ESI-MS, MS/MS et MS^3 du composé SBR_6	141
Figure III-32. Spectre de RMN ^1H des composés SBR_6 comparé à celui du composé SBR_4	143
Figure III-33. Spectre RMN ^{13}C du composé SBR_6	143
Figure III-34. Spectre HSQC du composé SBR_6	144
Figure III-35. Spectre COSY étalé du composé SBR_6	145
Figure III-36. Corrélations HMBC du composé SBR_6	146
Figure III-37. Spectre HMBC du composé SBR_6	146
Figure III-38. Spectre de masse HR-ESI-MS et MS/MS du composé CT_1	151
Figure III-39. Spectre de RMN ^1H , avec un agrandissement de la partie osidique (a, b et c) du composé CT_1	153
Figure III-40. Spectre HSQC du composé CT_1	154
Figure III-41. Spectre de RMN ^{13}C , avec un agrandissement de la partie osidique (a, b et c) du composé CT_1	155
Figure III-42. Corrélations COSY du β -D-glucopyranose et α -L-rhamnopyranosyl dans les phényléthanoïdes CT_1 - CT_5	157
Figure III-43. Spectre COSY du composé CT_1	158
Figure III-44. Spectre 1D-TOCSY de la partie osidique du composé CT_1	158
Figure III-45. Corrélations HMBC du composé CT_1	159
Figure III-46. Spectre HMBC étalé de δ_{H} 1.20 à 2.15 ppm du composé CT_1	160
Figure III-47. Spectre HMBC étalé de δ_{H} 3.1 à 4.1 ppm du composé CT_1	160
Figure III-48. Spectre HMBC étalé de δ_{H} 4.42 à 4.86ppm du composé CT_1	161
Figure III-49. Spectre HMBC étalé de δ_{H} 6.65 à 7.05 ppm du composé CT_1	161
Figure III-50. Spectre de masse ESI-MS/MS du composé CT_2	163
Figure III-51. Spectre de RMN ^1H du composé CT_2 comparé à celui du composé CT_1	164
Figure III-52. Spectre de RMN ^{13}C du composé CT_2	164
Figure III-53. Spectre COSY du composé CT_2	165
Figure III-54. Spectre 1D TOCSY du glucose du composé CT_2	165
Figure III-55. Spectre HSQC du composé CT_2	166
Figure III-56. Spectre HMBC étalé de δ_{H} 0.7 à 1.4 et 2.4 à 2.9 ppm du composé CT_2	166
Figure III-57. Spectre HMBC étalé de δ_{H} 3.0 à 4.3 ppm du composé CT_2	167
Figure III-58. Spectre HMBC étalé de δ_{H} 4.5 à 5.4 et 6.5 à 7.2 ppm du composé CT_2	167
Figure III-59. Spectre de masse ESI-MS et les fragmentations ESI-MS/MS et MS^3 du composé $\text{CT}_{3a/3b}$	169

Figure III-60. Spectre de RMN ¹ H avec l'agrandissement des parties osidique (a), les protons anomériques (b) et <i>p</i> -coumaroyl (c) du composé CT _{3a/3b} comparé à celui du composé CT ₁	171
Figure III-61. Spectre de RMN ¹³ C avec l'agrandissement de la partie (a, b) du composé CT _{3a/3b}	172
Figure III-62. Spectre HSQC du composé CT _{3a/3b}	173
Figure III-63. Spectre COSY H-H étale de δ _H 5.7 à 7.8 ppm du composé CT _{3a/3b}	173
Figure III-64. Corrélations HMBC du composé CT _{3a}	174
Figure III-65. Spectre HMBC étalé de δ _H 5.6 à 7.8 ppm du composé CT _{3a/3b}	175
Figure III-66. Spectre de masse HR-ESI-MS et les fragmentations HR-ESI-MS/MS du composé CT _{4a/4b}	177
Figure III-67. Spectre de RMN ¹ H avec l'agrandissement des parties osidique (a, b) du composé CT _{4a/4b} comparé à celui du composé CT _{3a/3b}	178
Figure III-68. Spectre de RMN ¹³ C du composé CT _{4a/4b}	179
Figure III-69. Spectre de COSY du composé CT _{4a/4b}	179
Figure III-70. Spectre de HSQC du composé CT _{4a/4b}	180
Figure III-71. Spectre de HMBC étale de δ _H 0.8 à 5.4 ppm du composé CT _{4a/4b}	180
Figure III-72. Spectre de HMBC étale de δ _H 5.7 à 7.9 ppm du composé CT _{4a/4b}	181
Figure III-73. Spectre de masse ESI -MS du composé CT ₅	182
Figure III-74. Spectre de RMN ¹ H avec du composé CT ₅ comparé à celui du composé CT _{3a/3b}	185
Figure III-75. Spectre de HSQC du composé CT ₅	186
Figure III-76. Spectre de masse ESI-MS du composé CT ₆	187
Figure III-77. Unités aromatiques présentes dans le composé CT ₆	188
Figure III-78. Unités présentes dans le composé CT ₆	189
Figure III-79. Structure partielle du composé CT ₆	189
Figure III-80. Spectre RMN ¹ H du composé CT ₆	190
Figure III-81. Spectre HSQC du composé CT ₆	190
Figure III-82. Spectre de masse ESI-MS du composé CT ₇	192
Figure III-83. Spectre RMN ¹ H du composé CT ₇	193
Figure III-84. Spectre HSQC du composé CT ₇	194
Figure III-85. Corrélations HMBC du β-D-glucopyranose dans les iridoïdes APD ₁ à APD ₁₅	202
Figure III-86. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé APD ₁	204
Figure III-87. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁	205
Figure III-88. Spectres HSQC du composé APD ₁	206
Figure III-89. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₂	207

Figure III-90. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₂ comparé à celui du composé APD ₁	209
Figure III-91. Corrélations COSY au niveau du squelette macfadienoside.....	210
Figure III-92. Spectres COSY du composé APD ₂	211
Figure III-93. Spectres HSQC du composé APD ₂	212
Figure III-94. Corrélations HMBC du groupement foliamenthoyl APD ₂	213
Figure III-95. Corrélations HMBC mettant en évidence la position du foliamenthoyl.....	213
Figure III-96. Spectres HMBC étalés de δ_{H} 1.2 à 2.80 ppm du composé APD ₂	214
Figure III-97. Spectres HMBC étalés de δ_{H} 3.10 à 4.35 ppm du composé APD ₂	214
Figure III-98. Spectre HMBC étalé de δ_{H} 4.5 à 7.3 ppm du composé APD ₂	215
Figure III-99. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD ₃	216
Figure III-100. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₃ comparé à celui du composé APD ₂	217
Figure III-101. Spectre HSQC du composé APD ₃	218
Figure III-102. Spectre HSQC étalé de δ_{H} 2.8 à 5.3 ppm du composé APD ₃	218
Figure III-103. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé APD ₄	219
Figure III-104. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₄ comparé à celui du composé APD ₂	221
Figure III-105. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD ₄	221
Figure III-106. Spectres de HSQC du composé APD ₄	222
Figure III-107. Corrélations HMBC du composé APD ₄	222
Figure III-108. Spectre de HMBC étalé de δ_{H} 1.80 à 4.3 ppm du composé APD ₄	223
Figure III-109. Spectre de HMBC étalé de δ_{H} 4.70 à 6.80 ppm du composé APD ₄	223
Figure III-110. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé APD ₅	224
Figure III-111. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₅ comparé à celui du composé APD ₄	225
Figure III-112. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD ₅	226
Figure III-113. Spectre de COSY du composé APD ₅	226
Figure III-114. Spectre HSQC du composé APD ₅	227
Figure III-115. Corrélations HMBC du composé APD ₅	227
Figure III-116. Spectre de HMBC de δ_{H} 1.80 à 4.5 ppm du composé APD ₅	228
Figure III-117. Spectre de HMBC de δ_{H} 4.5 à 7.0 ppm du composé APD ₅	228
Figure III-118. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₆	230
Figure III-119. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₆ comparé à celui du composé APD ₅	231
Figure III-120. Spectre de COSY du composé APD ₆	233

Figure III-121. Spectre HSQC du composé APD ₆	234
Figure III-122. Groupement menthiafoloyl faisant partie du composé APD ₆	235
Figure III-123. Corrélations HMBC du composé APD ₆	235
Figure III-124. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.15 à 2.50 ppm du composé APD ₆	235
Figure III-125. Spectre de HMBC étalé de δ_H 3.80 à 7.0 ppm du composé APD ₆	236
Figure III-126. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé APD ₇	237
Figure III-127. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₇ comparé à celui du composé APD ₆	238
Figure III-128. Spectres COSY du composé APD ₇	239
Figure III-129. Spectres HSQC du composé APD ₇	239
Figure III-130. Corrélations HMBC du composé APD ₇	240
Figure III-131. Spectres HMBC du composé APD ₇	240
Figure III-132. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₈	242
Figure III-133. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₈ comparé à celui du composé APD ₁	243
Figure III-134. Spectre de RMN ¹³ C du composé APD ₈	244
Figure III-135. Spectre de COSY du composé APD ₈	244
Figure III-136. Spectre de HSQC étalé de δ_H 1.3 à 4.3 ppm du composé APD ₈	245
Figure III-137. Spectre de HSQC étalé de δ_H 4.7 à 7.8 ppm du composé APD ₈	245
Figure III-138. Corrélations HMBC du <i>trans</i> -cinnamoyle du composé APD ₈	246
Figure III-139. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.46 à 3.9 ppm du composé APD ₈	246
Figure III-140. Spectre de HMBC étalé de δ_H 4.6 à 5.8 ppm du composé APD ₈	247
Figure III- 141. Spectre de HMBC étalé de δ_H 6.5 à 7.9 ppm du composé APD ₈	247
Figure III-142. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₉	249
Figure III-143. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₉ comparé à celui du composé APD ₈	250
Figure III-144. Spectre de HSQC du composé APD ₉	251
Figure III- 145. Corrélations HMBC du <i>trans</i> -cinnamoyle du composé APD ₉	251
Figure III-146. Spectre de HMBC du composé APD ₉	252
Figure III-147. Spectre de masse HR-ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD ₁₀	253
Figure III-148. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₀ comparé à celui du composé APD ₉	254
Figure III-149. Spectre HSQC du composé APD ₁₀	255
Figure III-150. Spectre HSQC étalé de δ_H 2.0 à 4.5 et 5.0 à 7.6 ppm du composé APD ₁₀	255

Figure III-151. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD ₁₁	257
Figure III-152. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode négatif du composé APD ₁₁	257
Figure III-153. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₁ comparé à celui du composé APD ₈	259
Figure III-154. Spectre de RMN ¹³ C du composé APD ₁₁	260
Figure III-155. Spectre HSQC du composé APD ₁₁	260
Figure III-156. Spectre HSQC étalé de δ_H 2.0 à 5.2 ppm du composé APD ₁₁	261
Figure III-157. Spectre HSQC étalé de δ_H 5.1 à 8.1 ppm du composé APD ₁₁	261
Figure III-158. Spectre de masse ESI-MS en mode positif du composé APD ₁₂	262
Figure III-159. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₂	263
Figure III-160. Spectre HSQC du composé APD ₁₂	264
Figure III-161. Spectre HSQC de δ_H 0.8 à 4.2 et 4.4 à 5.6 ppm du composé APD ₁₂	265
Figure III-162. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₁₃	266
Figure III-163. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₃ comparé à celui du composé APD ₁₂	267
Figure III-164. Spectre HSQC du composé APD ₁₃	268
Figure III-165. Spectre de COSY du composé APD ₁₃	269
Figure III-166. Spectre de COSY de δ_H 3.5 à 5.5 ppm du composé APD ₁₃	270
Figure III-167. Corrélations HMBC du composé APD ₁₃	271
Figure III-168. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.32 à 2.6 ppm du composé APD ₁₃	271
Figure III-169. Spectre de HMBC de δ_H 3.23 à 7.53 ppm du composé APD ₁₃	272
Figure III-170. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₁₄	273
Figure III-171. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₄ comparé à celui du composé APD ₁₃	274
Figure III-172. Spectre de HSQC étalé de δ_H 0.9 à 4.7 ppm du composé APD ₁₄	275
Figure III-173. Spectre de HSQC étalé de δ_H 4.5 à 7.6 ppm du composé APD ₁₄	276
Figure III-174. Spectre de COSY du composé APD ₁₄	276
Figure III-175. Corrélations HMBC du composé APD ₁₄	277
Figure III-176. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.05 à 2.45 ppm du composé APD ₁₄	277
Figure III-177. Spectre de HMBC étalé de δ_H 3.10 à 4.25 ppm du composé APD ₁₄	278
Figure III-178. Spectre de HMBC étalé de δ_H 4.3 à 8.0 ppm du composé APD ₁₄	278
Figure III-179. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₁₅	280

Figure III-180. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₅ comparé à celui des composés APD ₁₃ et APD ₁₁	281
Figure III-181. Spectres de RMN ¹³ C étalé du composé APD ₁₅	282
Figure III-182. Spectre COSY du composé APD ₁₅	282
Figure III-183. Spectre HSQC du composé APD ₁₅	283
Figure III-184. Corrélations HMBC du composé APD ₁₅	283
Figure III-185. Spectre HMBC du composé APD ₁₅	284
Figure III-186. Spectre de masse et ESI-MS en mode positif et négatif du composé APD ₁₆	285
Figure III-187. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₆ comparé à celui du composé APD ₂	286
Figure III-188. Spectre de RMN ¹³ C du composé APD ₁₆	287
Figure III-189. Spectre HSQC du composé APD ₁₆	287
Figure III-190. Spectre de masse et ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₁₇	288
Figure III-191. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₇ comparé à celui du composé APD ₁₆	290
Figure III-192. Spectre HSQC du composé APD ₁₇	291
Figure III-193. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé APD ₁₈	292
Figure III-194. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₈ comparé à celui du composé APD ₁₇	293
Figure III-195. Spectre COSY du composé APD ₁₈	294
Figure III-196. Spectre COSY étalé de δ _H 2.0 à 5.5 ppm du composé APD ₁₈	294
Figure III-197. Spectre HSQC du composé APD ₁₈	295
Figure III-198. Corrélations HMBC du composé APD ₁₈	295
Figure III-199. Spectre HMBC du composé APD ₁₈	296
Figure III-200. Spectre de masse HR-ESI-MS et ESI-MS/MS ³ en mode positif du composé APD ₁₉	297
Figure III-201. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₁₉ comparé à celui du composé APD ₁₇	298
Figure III-202. Spectre de RMN ¹³ C du composé APD ₁₉	299
Figure III-203. Spectre HSQC du composé APD ₁₉	299
Figure III-204. Corrélations COSY du composé APD ₁₉	300
Figure III-205. Spectre COSY du composé APD ₁₉	300
Figure III-206. Corrélations HMBC du composé APD ₁₉	301
Figure III-207. Spectre HMBC du composé APD ₁₉	302
Figure III-208. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé APD ₂₀	303
Figure III-209. Spectre de RMN ¹ H du composé APD ₂₀ comparé à celui du composé APD ₆	304

Figure III-210. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD ₂₀	305
Figure III-211. Spectre HSQC du composé APD ₂₀	305
Figure III-212. Spectre de masse ESI-MS/MS en mode positif du composé APD ₂₁	306
Figure III-213. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₂₁ comparé à celui du composé APD ₂₀	307
Figure III-214. Spectre HSQC du composé APD ₂₁	308
Figure III-215. Spectre de masse HR-ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD ₂₂	309
Figure III-216. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₂₄	310
Figure III-217. Spectre HSQC du composé APD ₂₄	311
Figure III-218. Spectre HMBC du composé APD ₂₂	312
Figure III-219. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD ₂₃	313
Figure III-220. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₂₃	314
Figure III-221. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD ₂₄	316
Figure III-222. Spectre de RMN ^1H du composé APD ₂₄	317
Figure III-223. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD ₂₄	318
Figure III-224. Effets des composés SBR ₁ et SBR ₂ sur la prolifération des cellules d'HeLa.....	331
Figure III-225. Structure des composés SBR ₁ et SBR ₂	332
Figure III-226. Vue des interactions ligand-récepteur les plus pertinentes du complexe 1- <i>h</i> MAGL.....	334
Figure III-227. Courbe dose-réponse pour le composé CT ₁ , obtenue dans des essais enzymatiques MAGL.....	335
Figure III-228. Activité angiogénique (% vs témoin) des composés APD ₁ à APD ₂₁ (2 μM) dans l'essai de phosphatase alcaline endogène (PAE) sur des embryons de poisson-zèbre.....	337
Figure III-229. Activité angiogénique (% vs témoin) des composés APD ₁ à APD ₂₁ (2 μM) dans l'essai de membrane chorioallantoïque (CAM) RA = acide rétinoïque (3 μM)....	337
Figure III-230. Activité anti-angiogénique des composés <i>A. pedatum</i> (2 μM) dans le test CAM.....	337

Liste des tableaux

Partie I : Revue bibliographique

Tableau I-1. Classification systématique des <i>Lamiaceae</i>	3
Tableau I-2. Les effets pharmacologiques des huiles essentielles des différent espèces du genre <i>Salvia</i>	6
Tableau I- 3. Quelques sesquiterpènes 1-40 isolés du genre <i>Salvia</i>	7
Tableau I-4. Quelques diterpenoides 41-59 isolés du genre <i>Salvia</i>	12
Tableau I-5. Quelques triterpenoids 60-130 isolés du genre <i>Salvia</i>	14
Tableau I-6. Quelques composés polyphénoliques 131-180 isolés du genre <i>Slavia</i>	21
Tableau I-7. Classification systématique APG III (2009) des Orobanchaceae.....	28
Tableau I-8. Le nombre de différentes composées chimiques des espèces <i>Cistanche</i>	33
Tableau I-9. Les analyses GC-MS des composées volatiles du genre <i>Cistanche</i>	34
Tableau I-10. Les glycosides phényléthanoïdes 192-227 isolés du genre <i>Cistanche</i>	34
Tableau I-11. Les iridoïdes 228-247 isolé du genre <i>Cistanche</i>	38
Tableau I-12. Les lignanes 248-253 isolés du <i>Cistanche</i>	40
Tableau I-13. Classification systématique des Scrophulariaceae d’après APG (1998) et Hilliard (1994).....	45
Tableau I-14. Les principaux acides hydroxybenzoïques.	63
Tableau I-15. Les principaux acides hydroxycinnamique.....	64

Partie II : Matériel et méthodes

Tableau II-1. Les différentes tailles des cartouches utilisées pour les colonnes flash avec les débits des solvants adaptés.....	72
Tableau II-2. Fractionnement par chromatographie flash de l’extrait SBR _{CHCl3} des racines de <i>S. buchananii</i>	79
Tableau II-3. Fractionnement par colonne Séphadex de l’extrait SBR _{C-M} des racines de <i>S. buchananii</i> Hedge.	82
Tableau II-4. Fractionnement sur colonne de Séphadex de l’extrait CT _{n-BuOH} de <i>C. phelypaea</i>	87
Tableau II-5. Fractionnement par chromatographie Séphadex® LH20 de l’extrait APD _{n-BuOH}	95
Tableau II-6. Fractionnement en CPC de la fraction C.....	99
Tableau II-7. Fractionnement en CPC de la fraction E.	103

Partie III : Résultats et discussion

Tableau III-1. Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz) de SBR ₁ , SBR ₂ et SBR ₃ dans le CD ₃ OD.	147
Tableau III-2. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (250 MHz) de SBR ₄ , SBR ₅ et SBR ₆ dans le CD ₃ OD.	148
Tableau III-3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia b Buchananii</i> Hedge. ...	149
Tableau III-4. Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz) de CT ₁ à CT ₄ dans le CD ₃ OD.	196
Tableau III-5. Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C (250 MHz) de CT ₅ à CT ₇ dans le CD ₃ OD.	198
Tableau III-6. RMN ^1H et ^{13}C de β -D-glucopyranose des composés APD ₁ à APD ₁₅	203
Tableau III-7. Déplacements chimiques en RMN- ^1H et ^{13}C (250 MHz) d'APD ₁ et APD ₃ , ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) d'APD ₂ dans le CD ₃ OD.	319
Tableau III- 8. Déplacements chimiques en RMN- ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) d'APD ₄ et APD ₅ , ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) d'APD ₆ et APD ₇ dans le CD ₃ OD.	320
Tableau III-9. Déplacements chimiques en RMN- ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) d'APD ₈ et APD ₉ , ^1H et ^{13}C (250 MHz) d'APD ₁₀ et APD ₁₁ dans le CD ₃ OD.	321
Tableau III-10. Déplacements chimiques en RMN- ^1H et ^{13}C (250 MHz) d'APD ₁₂ , ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) d'APD ₁₃ et APD ₁₅ et ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) d'APD ₁₄ dans le CD ₃ OD.	322
Tableau III-11. Déplacements chimiques en RMN- ^1H (250 MHz) et ^{13}C (250 MHz) des composés APD ₁₆ et APD ₁₇ et ^1H (500 MHz) et ^{13}C (500 MHz) d'APD ₁₈ dans le CD ₃ OD.	324
Tableau III-12. Déplacements chimiques en RMN- ^1H (500 MHz) et ^{13}C (500 MHz) du composé APD ₁₉ et ^1H (250 MHz) et ^{13}C (250 MHz) des composés APD ₂₀ et APD ₂₁ dans le CD ₃ OD.	325
Tableau III-13. Déplacements chimiques en RMN- ^1H (250 MHz) et ^{13}C (250 MHz) des composés APD ₂₂ , APD ₂₃ et APD ₂₄ dans le CD ₃ OD.	326
Tableau III-14. Activité antioxydant des huiles essentielles de quelles espèces du genre <i>Slavia</i> selon la méthode de blanchissement du β -carotène.	329
Tableau III-15. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du <i>S. b Buchananii</i>	330
Tableau III-16. Résultats des essais cytotoxiques des molécules SBR ₁ et SBR ₂ pour trois lignées de cellules cancéreuses.	330
Tableau III-17. Puissances d'inhibition <i>h</i> LDH5 et <i>h</i> MAGL. de composés CT ₁ -CT ₇	333

Liste des schémas

Partie I : Revue bibliographique

Schéma I-1. Classification de la famille Scrophulariaceae d'après valdés (1987).	45
--	----

Partie II : Matériel et méthodes

Schéma II- 2. Différentes étapes de l'extraction des racines de la <i>Salvia buchananii</i>	76
Schéma II-3. Fractionnement et purification de l'extrait SBR _{CHCl3}	78
Schéma II-4. Fractionnement et purification de l'extrait SBR _{CHCl3-MeOH}	81
Schéma II-5. Différentes étapes d'extraction des parties aériennes de <i>Cistanche phelypaea</i>	84
Schéma II-6. Fractionnement et purification de l'extrait CT _{n-BuOH}	87
Schéma II-7. Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes d' <i>Anarrhinum pedatum</i>	91
Schéma II-8. Fractionnement et purification de l'extrait APD _{n-BuOH}	94
Schéma II-9. Séparation et purification de la fraction C.	98
Schéma II- 10. Séparation et purification de la fraction E.	102

Liste des abréviations

Plantes :

SBR	<i>Salvia buchananii</i>
CT	<i>Cistanche phelypaea</i>
APD	<i>Anarrhinum pedatum</i>

Solvants et réactifs :

AcOEt	Acétate d'éthyle
BuOH	Butanol
CD ₃ OD	Méthanol Deutééré
CDCl ₃	Chloroforme Deutééré
CHCl ₃	Chloroforme
CH ₃ COOH	Acide Acétique
Ce(SO ₄) ₂	Sulfate de Cerium
Et ₃ N	Triéthylamine
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
MeOH	Méthanol
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NaHCO ₃	Bicarbonate de Sodium
Rp-18	Silice greffée C-18
THF	TétraHydroFurane
<i>p</i> -Tsoh	<i>p</i> -Toluenesulfonic acid

Techniques de chromatographie :

CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
GC	Chromatographie en phase Gazeuse
GC-MS	Chromatographie en phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse
LC-MS	Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

Détermination structurale :

Caff	acide caféique
Coum	<i>p</i> -coumaroyl
Glc	β-D-glucose
Rha	α-L-rhamnose
ax	axial
COSY	COrelated SpectroscopY
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublets
<i>dl</i>	doublet large
<i>dt</i>	doublet de triplets

eq	Equatorial
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Connectivity
J (Hz)	constante de couplage exprimée en Hertz
m	multiplet
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN ^{13}C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN ^1H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
s	singulet
sl	singulet large
t	triplet
td	triplet de doublets
TOCSY	TOal Correlation SpectroscopY
δ	déplacement chimique exprimé en ppm
ESIMS	ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry
HRESIMS	High-resolution ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry
m/z	masse / charge électrique
UV	Ultra-Violet
λ_{max}	longueur d'onde maximale
$[\alpha]_{\text{D}}$	pouvoir rotatoire spécifique

Activité biologique :

ATCC	American type culture collection
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
AChE	Acétylcholinestérase
BChE	Butyrylcholinestérase
LDH	Lactate DesHydrogénase
MAGL	MonoAcylGlycérol Lipase

Unités des grandeurs physiques et chimiques :

Å	Ångström
Hz	Hertz
min	minute
ppm	parties par million
uma	unité de masse atomique
μM	Micromolaire
μg	Microgramme
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
mm	Zone d'inhibition

Table des matières

Liste des figures	i
Liste des tableaux	xii
Liste des schémas	xiv
Liste des abréviations	xv
Introduction générale	1

PARTIE I: Revu bibliographique

Chapitre 1: Aperçu bibliographique sur le genre *Salvia*

I.1.1. Introduction sur la famille des Lamiaceae	3
I.1.2. Généralité du genre <i>Salvia</i> et de l'espèce <i>Salvia buchananii</i> Hedge	3
I.1.3. Propriétés biologiques du genre <i>Salvia</i>	4
I.1.3.1. Utilisations traditionnelles :	4
I.1.3.2. Activités biologiques :	5
I.1.4. Principaux métabolites secondaires du genre <i>Salvia</i>	7
I.1.4.1. Sesquiterpènes :	7
I.1.4.3. Diterpénoides :	11
I.1.4.4. Triterpènes et stéroïdes :	14
I.1.4.5. Polyphénoliques :	21
I.1.4.6. Huiles essentielles :	26
I.1.5. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Salvia buchananii</i>	26

Chapitre 2: Aperçu bibliographique sur le genre *Cistanche*

I.2.1. Introduction de la famille des Orobanchaceae	28
I.2.2. Généralité du genre <i>Cistanche</i> et de l'espèce <i>Cistanche phelypaea</i> (L) Coutinho syn. .	28
I.2.3. Propriétés biologiques du genre <i>Cistanche</i>	29
I.2.3.1. Usage en médecine traditionnelle :	29
I.2.3.2. Quelques activités biologiques reconnues :	30
I.2.4. Composition chimique du genre <i>Cistanche</i>	33
I.2.4.1. Les composants volatiles :	33
I.2.4.2. Glycosides Phényléthanoïdes (PhGs):	34
I.2.4.3. Iridoïdes :	37
I.2.4.4. Lignanes :	39

I.2.4.5. Benzylglycosides :	40
I.2.4.6. Saccharides :	41
I.2.4.7. Métabolites divers :	43
I.2.5. Etude chimique antérieure de l'espèce <i>Cistanche phelypaea</i>	43

Chapitre 3: Aperçu bibliographique sur le genre *Anarrhinum*

I.3.1. Introduction sur la famille des Scrophulariaceae	44
I.3.2. Généralité du genre <i>Anarrhinum</i> et de l'espèce <i>Anarrhinum pedatum</i> Desf.	46
I.3.3. Quelques activités biologiques reconnues du genre <i>Anarrhinum</i>	46
I.3.4. Composition chimique du genre <i>Anarrhinum</i>	47
I.3.4.1. Monoterpènes :	47
I.3.4.2. Iridoïdes :	48
I.3.4.3. Autres composés :	50
I.3.4. Travaux antérieur sur l'espèce <i>Anarrhinum pedatum</i>	50

Chapitre 4: Les métabolites secondaires

I.4.1. Les Terpènes	51
I.4.1.1. Définition :	51
I.4.1.2. Classification :	51
I.4.1.2.1. Les Monoterpènes (C10)	52
I.4.1.2.2. Les Sesquiterpènes (C15)	53
I.4.1.2.3. Les Diterpènes (C20)	54
I.4.1.2.4. Les Triterpènes (C30)	54
I.4.1.2.5. Les tetraterpènes (C40)	56
I.4.1.2.6. Les Polyterpènes	56
I.4.1.2.7. Les iridoïdes	56
I.4.2. Les composés phénoliques	62
I.4.2.1. Les acides phénoliques	63
I.4.2.2. Les phenylethanoïdes glycosides	64
I.4.2.3. Les flavonoïdes	65
I.4.3. Les lignanes	68

PARTIE II: Matériel et méthodes

Chapitre 1: Extraction, séparation et purification des plantes

II.1.1. Matériel végétale	70
II.1.1.1. <i>Salvia buchananii</i> Hedge.....	70
II.1.1.2. <i>Cistanche phelypaea</i> (L.).....	70
II.1.1.3. <i>Anarrhinum pedatum</i> Desf.	70
II.1.2. Techniques chromatographiques	70
II.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	70
II.1.2.2. Chromatographie d'exclusion.....	71
II.1.2.3. Chromatographie sur Colonne Flash (CCF).....	71
II.1.2.4. Chromatographie Centrifuge à haute performance (CPCHP)	72
II.1.2.5. Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (CLHP).....	73
II.1.3. Méthodes physico-chimique.....	73
II.1.3.1. Pouvoir rotatoire	73
II.1.3.2. Spectrométrie Ultra-violette-visible (UV).....	74
II.1.3.3. Spectrométrie de masse (MS).....	74
II.1.3.4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	74
II.1.3.5. Analyse statistique	74
II.1.4. Analyses GC et GC/MS.....	75
II.1.5. Extraction, purification et hydrolyse	75
II.1.5.1. <i>Salvia buchananii</i> Hedge.....	76
II.1.5.1.2. Fractionnement et purification de l'extrait chloroformique (SBR _{CHCl3}) :	78
II.1.5.1.3. Fractionnement et Purification de l'extrait chloroforme-méthanol (SBR _{C-M}) : 81	
II.1.5.2. <i>Cistanche phelypaea</i> (L.).....	83
II.1.5.2.1. Extraction solide-liquide à partir des parties aériennes de <i>C. phelypaea</i> (CT) 83	
II.1.5.2.2. Fractionnement et purification de l'extrait n-buthanolique (CT _{n-BuOH}) :.....	86
II.1.5.3. <i>Anarrhinum pedatum</i> Desf.	90
II.1.5.3.1. Extraction solide-liquide à partir des parties aériennes d' <i>A.pedatum</i> (APD) : 90	
II.1.5.3.2. Fractionnement et purification de l'extrait n-buthanolique APD _{n-BuOH} :	93
II.1.5.3.2.1. Chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la fraction C :	96
II.1.5.3.2.2. Chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la fraction E.....	101
II.1.5.4. Hydrodistillation de l'huile essentielle de <i>Salvia buchananii</i> Hedge.....	106
II.1.5.5. Hydrolyse des composés purs.....	106
II.1.5.6. Préparation du dérivé d'acétonide du composé APD13	107

Chapitre 2: Méthodes expérimentales des activités biologiques

II.2.1. Activité Antioxydante.....	108
------------------------------------	-----

II.2.1.1. Blanchissement du β -carotène de l'huile essentielle de <i>Salvia buchananii</i> :	108
II.2.2. Activité Anticholinestérase.....	108
II.2.3. Activité Antibactérienne.....	109
II.2.4. Activité Antiproliférative	110
II.2.4.1. Test colorimétrique MTT	110
II.2.4.2. Viabilité cellulaire	110
II.2.5. Activité inhibitrice de la MonoAcylGlycerol Lipase (MAGL).....	111
II.2.5.1. La MonoAcylGlycérol Lipase (MAGL) :	111
II.2.5.2. Essais enzymatiques :	112
II.2.5.3. Docking moléculaire :	113
II.2.6. Activité Anti-angiogénique	114
II.2.6.1 Angiogenèse :	114
II.2.6.2. Protocole de traitement, génération et mise en scène d'embryons de poisson zèbre :	114
II.2.6.3. Détermination quantitative de l'activité de la phosphatase alcaline endogène (PAE) :	114
II.2.6.4. Essai Chorioallantoic Membrane (CAM) :	115

PARTIE III: Résultats et discussion

Chapitre 1: Identification des produits isolé de *Salvia buchananii* Hedge

III.1.1. Identification des triterpènes isolés de l'extrait SBR _{CHCl3}	116
III.1.1.1. Détermination structurale du composé SBR ₁	116
III.1.1.2. Détermination structurale du composé SBR ₂	127
III.1.1.3. Détermination structurale du composé SBR ₃	135
III.1.2. Identification des composés isolés de l'extrait SBR _{C-H}	137
III.1.2.1. Détermination structurale du composé SBR ₄	137
III.1.2.2. Détermination structurale du composé SBR ₅	139
III.1.2.3. Détermination structurale du composé SBR ₆	141
III.1.3. Conclusion sur l'étude phytochimique des racines de <i>S. buchananii</i>	148
III.1.4. Analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle des parties aériennes <i>Salvia buchananii</i> Hedge.	149
III.1.4.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>S. buchananii</i>	149

Chapitre 2: Identification des produits isolé de *Cistanche phelypaea* (L)

III.2.1. Identification des phénylétanoïdes glycosidés isolés de l'extrait CT _{n-BuOH}	150
III.2.1.1. Détermination de structure du composé CT1	150

III.2.1.2. Détermination de structure du composé CT ₂	162
III.2.1.3. Détermination de structure du composé CT _{3a/3b}	168
III.2.1.4. Détermination de structure du composé CT _{4a/4b}	176
III.2.1.5. Détermination de structure du composé CT ₅	182
III.2.2. Identification de lignane isolés de l'extrait CT _{n-BuOH}	187
III.2.2.1. Détermination de structure du composé CT ₆	187
III.2.3. Identification de flavonoïde isolés de l'extrait CT _{n-BuOH}	191
III.2.3.1. Détermination de structure du composé CT ₇	191
III.2.4. Conclusion sur l'étude phytochimique des parties aériennes de <i>C. phelypaea</i> (CT). 200	

Chapitre 3: Identification des produits isolé d' *Anarrhinum pedatum* Desf

III.3.1. Identification des iridoïdes isolés de l'extrait APD _{n-BuOH}	201
III.3.1.1. Structure du β -D-glucopyranose :	202
III.3.1.2. Détermination structurale du composé APD ₁	204
III.3.1.3. Détermination structurale du composé APD ₂	207
III.3.1.4. Détermination structurale du composé APD ₃	216
III.3.1.5. Détermination structurale du composé APD ₄	219
III.3.1.6. Détermination structurale du composé APD ₅	224
III.3.1.7. Détermination structurale du composé APD ₆	229
III.3.1.8. Détermination structurale du composé APD ₇	237
III.3.1.9. Détermination structurale du composé APD ₈	241
III.3.1.10. Détermination structurale du composé APD ₉	248
III.3.1.11. Détermination structurale du composé APD ₁₀	253
III.3.1.12. Détermination structurale du composé APD ₁₁	256
III.3.1.13. Détermination structurale du composé APD ₁₂	262
III.3.1.14. Détermination structurale du composé APD ₁₃	266
III.3.1.15. Détermination structurale du composé APD ₁₄	273
III.3.1.16. Détermination structurale du composé APD ₁₅	279
III.3.2. Identification des monoterpènes isolés de l'extrait APD _{n-BuOH}	285
III.3.2.1. Détermination structurale du composé APD ₁₆	285
III.3.2.3. Détermination structurale des composés APD ₁₈	291
III.3.2.4. Détermination structurale des composés APD ₁₉	296
III.3.2.5. Détermination structurale des composés APD ₂₀	302
III.3.2.6. Détermination structurale du composé APD ₂₁	306
III.3.3. Identification des glycosides phényléthanoïdes isolés de l'extrait APD _{n-BuOH}	309

III.3.3.1. Détermination structurale du composé APD ₂₂	309
III.3.3.2. Détermination structurale des composés APD ₂₃	312
III.3.4. Identification d'un flavonoïde isolé de l'extrait APD _{n-BuOH}	315
III.3.4.1. Détermination structurale du composé APD ₂₄	315
III.3.5. Conclusion sur l'étude phytochimique des parties aériennes d' <i>A. pedatum</i> (APD) ..	327

Chapitre 4: Evaluation des activités biologiques

III.4.1. Evaluation des tests biologiques de l'huile essentielle de <i>S. buchananii</i> (SB)	328
III.4.1.1. Activité antioxydante :	328
III.4.1.2. Activité anticholinestérase :	329
III.4.1.3. Activité antibactérienne :	329
III.4.2. Activité antiproliférative de <i>S. buchananii</i> (SBR)	330
III.4.3. Activité de la MonoAcylGlycerol Lipase (MAGL) de <i>C. phelypaea</i> (CT)	332
III.4.4. Activité anti-angiogénique d' <i>A. pedatum</i> (APD).....	335
III.4.5. Conclusion sur l'évaluation des activités biologiques	338

Conclusion générale	340
----------------------------------	-----

Références bibliographiques	344
--	-----

Annexe

Caractéristiques des composés isolés	366
---	-----

Publications scientifiques	379
---	-----

Introduction générale

Introduction générale

Depuis fort longtemps, les plantes ont présenté une source très importante pour l'humanité, vu qu'elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées (sont recherchées en raison de leurs activités biologiques) souvent des activités biologiques potentielles. Elles constituent des merveilleuses usines végétales qui nous donnent la joie de guérir par un geste thérapeutique. On s'en sert traditionnellement pour se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture et aussi conserver les aliments (Schawenberg et Paris., 1977).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 80% de la population africaine ont toujours recours à la médecine traditionnelle pour les soins de santé primaire (Pierangeli et al., 2009), par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. En effet, les substances naturelles d'origine végétale sont douées de plusieurs activités biologiques comme l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antimicrobienne... etc.

L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires (Dobignard et Chatelain, 2010-2013). Cependant, la flore médicinale algérienne reste méconnue jusqu'à nos jours, car sur les quelques milliers d'espèces végétales, seules 146 sont dénombrées comme médicinales (Baba Aissa, 1999).

Plusieurs plantes sahariennes, fréquemment utilisées en médecine traditionnelle, se sont vues reconnaître un effet thérapeutique au cours des siècles. Certaines d'entre elles ont fait l'objet des études phytochimiques et ont abouti à l'isolement et à l'identification des principes actifs.

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme centrales.

Ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux face aux stress variés (attaques de pathogènes d'insectes, sécheresse, lumière UV...).

L'extraction, le fractionnement bioguidé, l'isolement, la purification et la détermination structurale de molécules d'origine naturelle et/ou leur modification par hémi-

synthèse organique, sont autant d'étapes nécessaires à la découverte de nouvelles substances bioactives.

D'un point de vue d'application, ces molécules constituent souvent la base des principes actifs des plantes médicinales. L'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites fait l'objet de nombreuses recherches et amène à l'identification des principaux éléments actifs de la plante. Ainsi, de l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique s'est largement appuyée sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires des végétaux pour le développement de nouveaux médicaments.

Le présent travail s'inscrit donc dans ce domaine d'étude phytochimique et biologique de trois différentes espèces végétales issues de la flore Algérienne, d'une espèce de la famille des Lamiaceae (*Salvia buchananii* Hedge) riche en triterpènes, et d'une espèce de la famille des Orobanchaceae (*Cistanche phelypeae* (L.)) riche en phenylethanoid glycosides ainsi qu'une espèce de la famille des Scrophulariaceae (*Anarrhinum petadum* Desf.) riche en iridoids. Ces trois plantes n'ont encore jamais fait l'objet d'investigation chimique.

Ce manuscrit sera divisé en trois principales parties :

La première partie est consacrée à une présentation bibliographique relative aux trois plantes et leurs familles botaniques respectives et aux genres des espèces étudiées. Elle comprendra aussi l'étude botanique, les travaux phytochimiques et biologiques antérieurs.

La deuxième partie décrit le matériel utilisé et résume les différentes étapes d'extraction et de purification des molécules des trois espèces *S. buchananii*, *C. phelypeae* et *A. petadum*, ainsi que les protocoles suivis pour la détermination des activités biologiques, à savoir, les activités antibactérienne, antioxydante, anticholinestérase, antiproliférative et anti-angiogénique des métabolites secondaires isolés.

La troisième partie concerne l'élucidation structurale des produits isolés de chacune des espèces étudiées par le biais de méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D, UV) conjuguées à la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) ainsi que la discussion des résultats des tests biologiques réalisés sur les composés purs.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

PARTIE I

Revue bibliographique

Chapitre 1

Aperçu bibliographique sur le
genre *Salvia*

I.1.1. Introduction sur la famille des Lamiaceae

Les plantes de la famille des Lamiaceae sont réparties dans le monde entier, comprennent environ 258 genres et 6900 espèces (Botineau., 2010). Les principaux genres sont *Salvia*, *Hyptis*, *Clerodendrum*, *Thymus*, *Plectranthus*, *Scutellaria* et *Stachys*. Les Lamiaceae sont le plus souvent des plantes herbacées, annuelles ou vivaces aromatiques, des sous-arbrisseaux et rarement des arbres ou des lianes, producteur des huiles essentielles (Quezel et Santa., 1963).

Position systématique. Selon la classification phylogénétique APG II (Angiosperm Phylogeny Group) est la suivante (APG, II 2002 ; Bray, 2005). les Lamiacées sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des Lamiales (tableau I-1), ordre qui comprend également les Orobanchaceae et les Scrophulariaceae. Nous traiterons ici ces trois familles qui renferment l'espèce végétale *Salvia buchananii*, *Cistanche phelypaea* et *Anarrinhnum pedatum* que nous avons étudiés.

Tableau I-1. Classification systématique des *Lamiaceae*.

Embranchement :	Spermatophytæ (Plantes à graines)
Sous-embranchement :	Angiospermae (griantes protégées) ou plantes à fleurs
Classe :	Dicotylédonae (Eudicots) ou Dicotylédone vrai
Sous-classe :	Asteropsidae
Groupe :	Euastéridéae
Super-ordre :	Lamianeae
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae

I.1.2. Généralité du genre *Salvia* et de l'espèce *Salvia buchananii* Hedge

Le genre *Salvia* comprend près de 900 espèces largement distribuées dans diverses régions, y compris les zones tempérées et chaudes du monde comme la Méditerranée, l'Asie centrale, les Iles Pacifique, l'Afrique tropicale et l'Amérique (Mohammad hosseini et al., 2008; Guajardo Touche et al., 1997). L'Algérie ne compte que 23 espèces de ce genre (Quezel et Santa, 1963).

Salvia buchananii Hedge, c'est une espèce mexicaine décrite en 1962 par Hedge en Curtis's Botanical Magazine (Hedge, 1963). Cette plante est décrite autrefois par Epling comme un hybride entre *S. gesneriflora* Lindley et Paxton. Récemment l'espèce à été

rapportée pour la première fois dans la nature, dans l'extrême nord-est de Querétaro au Mexique.

S. buchananii également connu sous l'appellation *Buchanan sage* ou *Velvet sage*. C'est une grande plante herbacée vivace atteignant 50 cm de haut, à feuilles pétiolées, spatulées ou ovales-lancéolées et à fleurs rose pourpre, en longs racèmes voyants (figure I-1). (Zamudio et al, 2013). Notre objectif est l'étude phytochimique et pharmacologique des racines de *S. buchananii* et l'huile essentielle des parties aériennes.

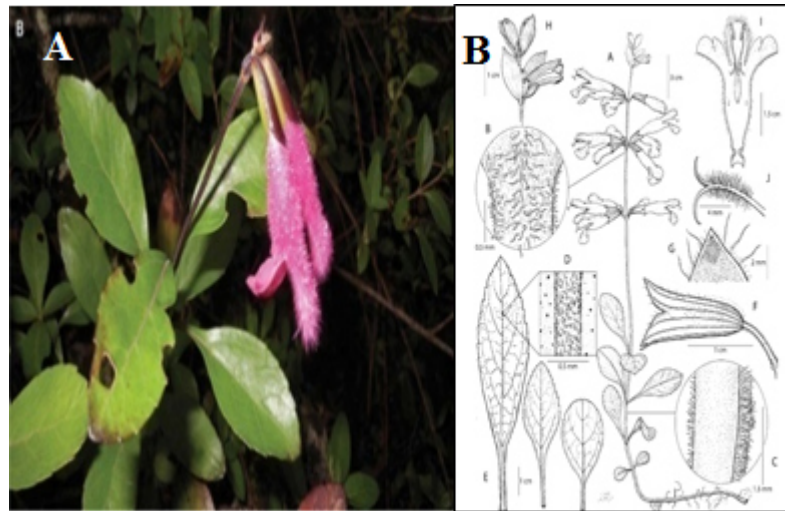


Figure I-1. A. fleurs de *Salvia buchananii*. B. les parties botaniques de l'espèce *Salvia buchananii* (Zamudio et al., 2013).

I.1.3. Propriétés biologiques du genre *Salvia*

I.1.3.1. Utilisations traditionnelles :

Le genre *Salvia*, est important en médecine traditionnelle, certaines espèces ont été utilisées en médecine populaire dans plusieurs pays pour guérir bon nombre de maladies, on citera par exemple :

Les racines séchées de *S. miltiorrhiza* (saugue rouge) sont des remèdes reconnus dans la médecine traditionnelle asiatique comme un traitement intensif des maladies coronariennes, angines de poitrine, infarctus du myocarde, maladies cérébro-vasculaires et divers types d'hépatites, insuffisance rénale chronique, dysménorrhée (Wu et al., 2012).



Figure I-2. A. racines de *S. miltiorrhiza*. **B.** tablettes commerciales de Danshen (Wu et al., 2012)

Les parties aériennes de *S. officinalis* permettraient les traitements antiseptiques, analgésique, asthmatique, un stimulant hormonal pour réguler le cycle menstruel (Chevallier., 1996), et un traitement contre différentes troubles comme la tuberculose et l'eczéma séborrhéiques (Esmaili et al., 2008).

Les graines de *S. aegyptiaca* (la sauge Égyptienne ou Shajarat al ghazal) sont utilisées comme des remèdes contre la diarrhée et les hémorroïdes. La plante entière est employée pour la gonorrhée, les maladies oculaires, les troubles nerveux et les vertiges (Al-Yousuf et al., 2002).

La *S. moorcroftiana*, est utilisée au Pakistan, présente des vertus thérapeutiques contre le ver Guinée, la démangeaison et un cataplasme appliqué sur les plaies (Zahid et al., 2003).

On notera également l'emploi de l'extrait aqueux des racines de *S. parryi*, et les feuilles de *S. fulgens* Cav et *S. microphylla* se mélangent appelé 'mirto', ils sont utilisés dans la médecine traditionnelle mexicaine pour soigner les troubles de l'estomac (Guajardo Touche et al., 1997; Narukawa et al., 2006).

I.1.3.2. Activités biologiques :

Le genre *Salvia* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées. La majorité d'entre elles concernent surtout des effets anti-bactérienne, anti-inflammatoire, cardiovasculaire, antioxydant et antiprolifératifs (anti-tumoral, cytotoxique) (Wu et al., 2012).

Les extraits acétates d'éthyle et chloroformique de *S. santolinifolia* et l'extrait méthanolique de *S. officinali* sont montré une activité antileishmanien contre *Leishmania*

major en comparaison avec un médicament standard amphotericin B (Mehmood et al., 2006; Nikmehr et al., 2014).

L'extrait aqueux de *S. miltiorrhiza* eut des effets profonds sur les cellules d'hépatome HepG2 in vitro. Il a réduit la prolifération de ces cellules, causé des changements dans leur morphologie, et induit la mort cellulaire par apoptose. D'autres études ont signalé parmi les composés isolés de *S. staminea*, la taxodione a montré une activité cytotoxique sur panel lignes cellulaires BC1, LU1, COL2, KB, KB-VI, LNCaP, P388 et A2780, avec CI 50 (1.2, 5.1, 0.7, 3.4, 4.1, 0.7, 0.3, et 9.0 μ g/mL), respectivement (Topçu et al., 2003).

Les ditrepenes isolés de l'espèces *S. sclarea* (Ulubelen et al. 1994), *S. miltiorrhiza* (Yongmoon et al., 2013) et *S. sahendica* (racines) (Jassbi et al., 2006) ont montré une activité antimicrobienne contre *Canadida albicans* (avec une concentration de 100 μ l/ml) et *Blakesleatrispora* (champignon de sol avec une concentration 100 μ l/papier disc).

Les diterpenes néo-clérodanes isolés de *S. dugesii* ont signalé une activité antivirale non toxique contre le virus grippal (FM1) par rapport au virazole a un agent antiviral (Gang et al., 2011). Le composé salvinorin A séparé de *S. divinorum* est un puissant hallucingène naturel et la principale composante psychoactive de cette plante (Saric et al. 2010)

Par conséquent, les huiles essentielles des espèces *Salvia* exercent également de nombreuses activités pharmacologiques, y compris des activités antimicrobiennes, antioxydantes, anticholinestérase, activité antimutagène, anticancéreux, anti-inflammatoire et cholérétique (tableau I-2) (Fu et al., 2013).

Tableau I-2. Les effets pharmacologiques des huiles essentiels des différent espèces du genre *Salvia* (Fu et al., 2013).

Effets pharmacologiques	<i>Salvia</i> huiles essentiels	Activités pharmacologiques	<i>Salvia</i> huiles essentiels
Antimicrobien	<i>S. officinalis</i> , <i>S. chloroleuca</i> , <i>S. przewalskii</i> , <i>S. santolinifolia</i> , <i>S. hydrangea</i> , <i>S. mirzayanii</i> , <i>S. fruticosa</i> , <i>S. tomentosa</i> , <i>S. recognita</i> ,	Antimutagène	<i>S. officinalis</i>

	<i>S. Macrochlamys</i> <i>S. lavandulifolia</i>		
Antioxydant	<i>S.lanigera</i> Poir <i>S. officinalis</i> , <i>S.euphratica</i> , <i>S. fruticosa</i> , <i>S.eremophila</i>	Anticancéreuse	<i>S. officinalis</i> <i>S. libanotica</i> <i>S. leriifolia</i> <i>S. acetabulosa</i>
Anti-cholinestérase	<i>S.lavandulaefolia</i> <i>S. officinalis</i> <i>S. fruticosa</i>	Anti-inflammatoire	<i>S. officinalis</i>
Amélioration de la performance cognitive et de l'humeur	<i>S.officinalis</i> <i>S.lavandulaefolia</i>	Cholérétique	<i>S. desoleana</i>
Diminution du stress	<i>S. sclaria</i>	Propriété toxicologique	<i>S. officinalis</i> <i>S. libanotica</i>

I.1.4. Principaux métabolites secondaires du genre *Salvia*

Les investigations chimiques réalisées sur le genre *Salvia* ont permis l'isolement et l'identification de divers types de métabolites secondaires telle que les sesquiterpénoïdes, les diterpénoïdes, les sesterpénoïdes, les triterpénoïdes, les stéroïdes, les polyphénols et d'autres composés (Wu et al., 2012; Jassbi et al, 2006).

I.1.4.1. Sesquiterpènes :

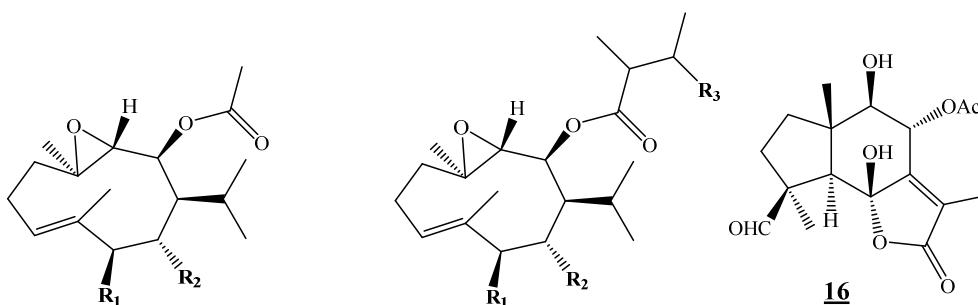
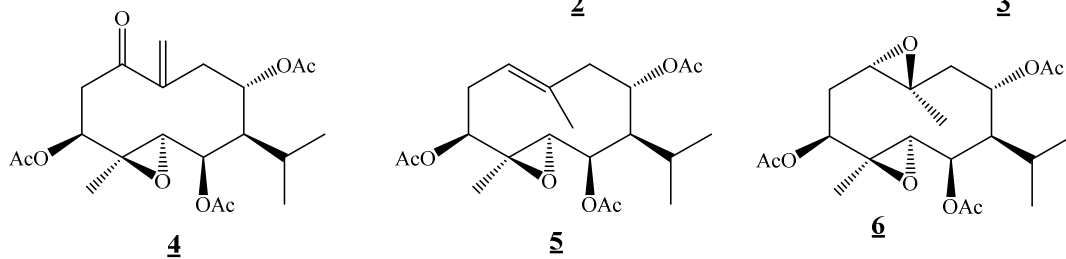
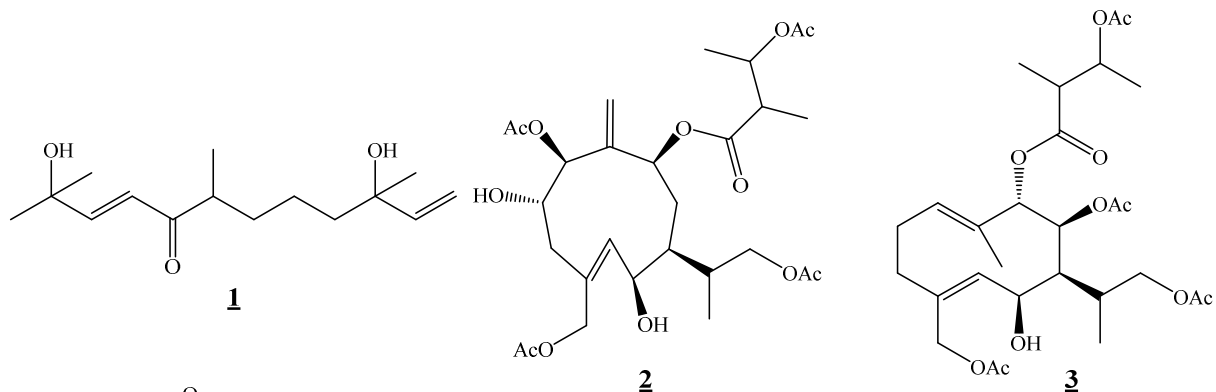
Sont une grande variété de squelettes de 15 carbones dérivés du couplage de trois sous-unités d'isoprène. Le nombre de sesquiterpénoïdes naturels d'espèces *Salvia* est de 46 composés signalés en avril 2010. Ce groupe est distribué en 15 espèces de *Salvia* et divisé en six sous-groupes : sesquiterpènes aliphatiques, sesquiterpènes germacrane, sesquiterpènes carotanes, caryophyllène sesquiterpènes, guaiane sesquiterpènes, et autres sesquiterpènes (Wu et al., 2012). Le tableau suivant résume quelques sesquiterpènes isolés du genre *Salvia*.

Tableau I- 3. Quelques sesquiterpènes 1-40 isolés du genre *Salvia*.

No.	Nom	Plante	Ref
<u>1</u>	salvinine	<i>S. divaricata</i>	Ulubelen et al., 1992; Ahmed et al.,

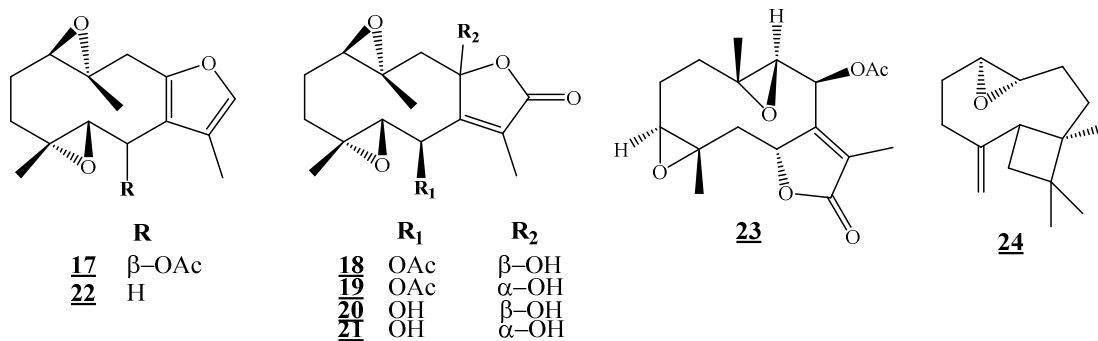
			2004
<u>2</u>	salviadienol A	<i>S. chinensis</i>	Wang et al., 2008
<u>3</u>	salviadienol B		
<u>4</u>	3 β ,6 β ,8a-triacetoxy-4 β ,5 α -epoxy-1-oxogermacr-10(14)-ene	<i>S. roborowski</i>	Li et al., 2003
<u>5</u>	3 β ,6 β ,8a-triacetoxy-4 β ,5 α -epoxygermacr-1(10)E-ene		
<u>6</u>	3 β ,6 β ,8a-triacetoxy-4 β ,5 α :1 α ,10 β -diepoxygermacrane		
<u>7</u>	trijugin A	<i>S. trijuga</i>	Pan et al., 2010
<u>8</u>	trijugin B		
<u>9</u>	trijugin C		
<u>10</u>	trijugin D		
<u>11</u>	trijugin E		
<u>12</u>	trijugin F		
<u>13</u>	trijugin G		
<u>14</u>	trijugin H		
<u>15</u>	trijugin I		
<u>16</u>	4 <i>R</i> *,5 <i>R</i> *,5 <i>aS</i> *,8 <i>S</i> *,8 <i>aR</i> *,8 <i>bR</i> *)-8-formyl-4,5,5 <i>a</i> ,6,7,8,8 <i>a</i> ,8 <i>b</i> -octahydro-5,8 <i>b</i> -dihydroxy-3,5 <i>a</i> ,8-trimethyl-2-oxo-2H-indeno[4,5- <i>b</i>]furan-4-yl acetate (= castanin A)	<i>S. castanea</i>	Xu et al.,2005
<u>17</u>	(1 <i>aS</i> *,6 <i>R</i> *,6 <i>aS</i> *,7 <i>aR</i> *,9 <i>aR</i> *)-1 <i>a</i> ,2,6,6 <i>a</i> ,7 <i>a</i> ,8,9,9 <i>a</i> -octahydro-1 <i>a</i> ,5,7-trimethylbisoxireno[4,5:8,9]cyclodeca[1,2- <i>b</i>]furan-6-yl acetate (= castanin B) 6-acetoxylechomafuran		
<u>18</u>	castanin C	<i>S. castanea</i>	Xu et al.,2008
<u>19</u>	castanin D		
<u>20</u>	castanin E		
<u>21</u>	castanin F		
<u>22</u>	glechomafuran	<i>S. palaefolia</i>	González et al., 1989

<u>23</u>	(3 β ,4 α ,6 α ,8 β ,9 β ,10 α)-8(acetyloxy)-3,4:9,10 diepoxygermacr-7(11)-eno-12,6-lactone	<i>S. roborowski</i>	Liu et al., 2009
<u>24</u>	caryophyllene oxide	<i>S. sclarea</i>	González et al., 1989; Ulubelen et al., 1994
<u>25</u>	nubiol	<i>S. nubicola</i>	Ali et al., 2007
<u>26</u>	bisnubidiol		
<u>27</u>	nubenolide	<i>S. nubicola</i>	Ali et al., 2006
<u>28</u>	nubenolide acetate		
<u>29</u>	bisnubenolide		
<u>30</u>	4,10-epoxy-6 α -hydroxyguaiane (= buchariol)	<i>S. bucharia</i>	Ahmad et al., 1999
<u>31</u>	isopathulenol	<i>S. sclarea</i>	Maurer et al., 1983
<u>32</u>	spathulenol	<i>S. eupatorium</i> <i>S. sclarea</i>	González et al., 1990 Ulubelen et al., 1994
<u>33</u>	β -eudesmol	<i>S. microphylla</i>	Aydoğmus et al., 2006
<u>34</u>	8 α -hydroxy- β -eudesmol		
<u>35</u>	1 α ,9 β -dibenzoyloxy-2 β ,3 β ,4 β - trihydroxydihydro- β -agarofuran	<i>S. palaefola</i>	González et al., 1991
<u>36</u>	1 α -acetoxy-11-hydroxy-2,8-dioxo-eudesman-3-en-12-oic acid methyl ester		
<u>37</u>	11-hydroxy-3,8-dioxo-eudesman-1,4-dien-12-oic acid methyl ester		
<u>38</u>	1 α -acetoxy-2-oxoeudesman-3,7(11)-dien-8 β ,12-olide		
<u>39</u>	1 α -hydroxy-2-oxoeudesman-3,7(11)-dien-8 β ,12-olide		
<u>40</u>	1 α ,8 α -dihydroxy-2-oxoeudesman-3,7(11)-dien-8 β ,12-olide	<i>S. palaefola</i>	González et al., 1990



	R₁	R₂
7	OTig	OH
8	OTig	OAc
9	OH	OTig

	R₁	R₂	R₃
10	OTig	OH	OAc
11	OTig	OAc	OAc
12	OH	OTig	OAc
13	OAc	OTig	OH
14	H	OTig	OH
15	H	OTig	OAc



	R
17	β-OAc
22	H

	R₁	R₂
18	OAc	β-OH
19	OAc	α-OH
20	OH	β-OH
21	OH	α-OH

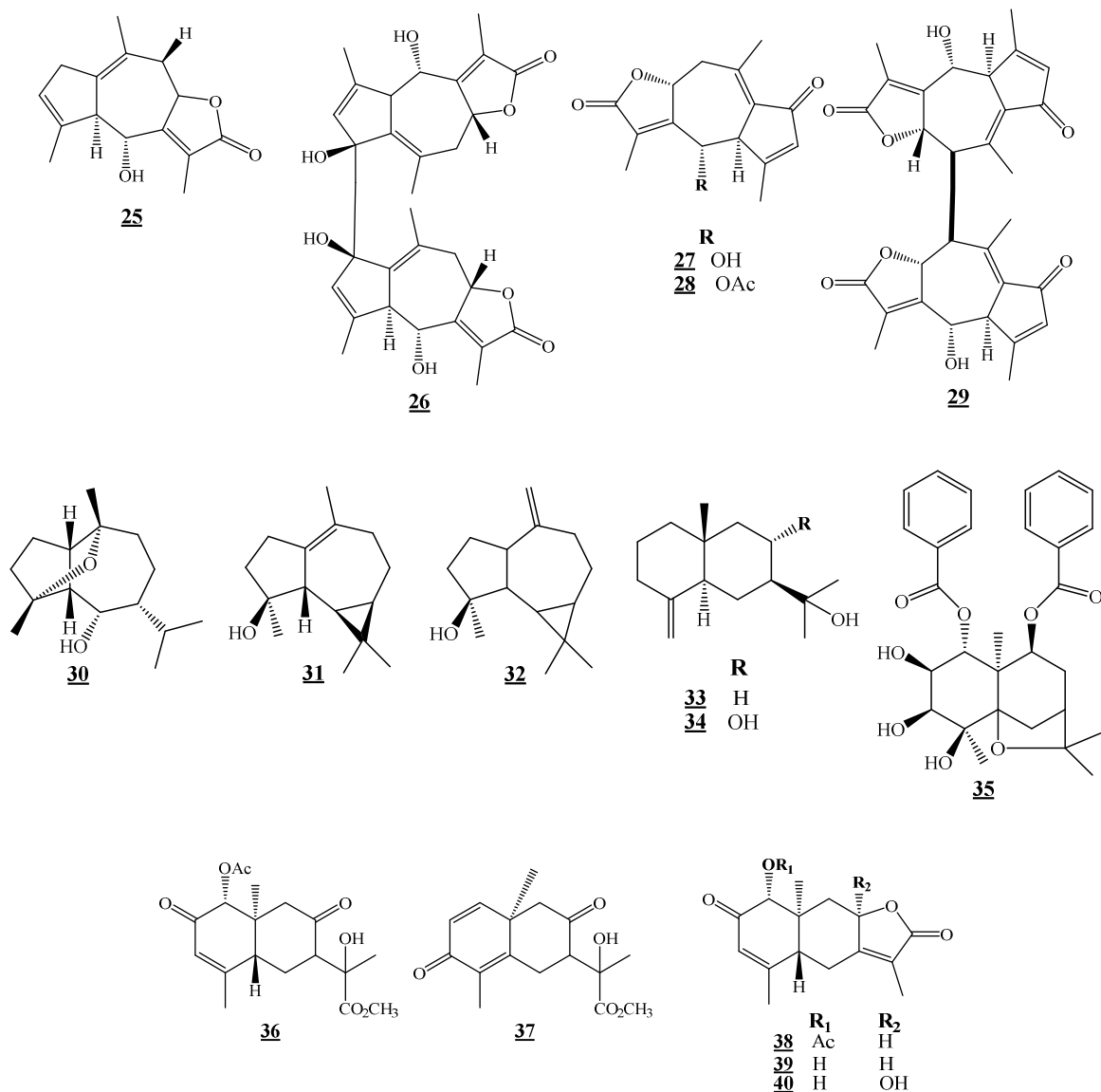


Figure I-3. Structure des sesquiterpènes rencontrées dans le genre *Salvia*.

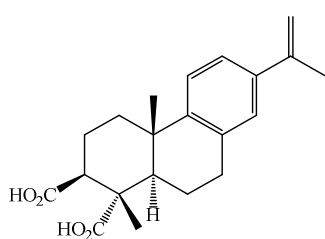
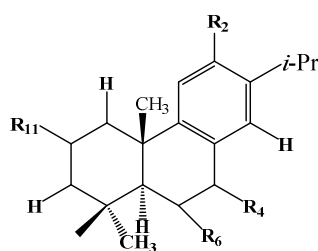
I.1.4.3. Diterpénoides :

Sont une classe de composés naturels qui possèdent un squelette de noyau de 20 carbones. Les diterpènes ont un intérêt, car beaucoup ont été trouvés pour avoir une activité biologique ; par exemple, taxol, cafestol, et kahweol ont des propriétés anticancéreuses. Diterpènes isolés de *Salvia* spp. constituent le groupe le plus important, soit 545 des 791 constituants de *Salvia*, parmi eux sont identifiées dans le tableau I-4. Selon leur structure, ce groupe est classé en 5 sous-groupes : abietane diterpenoids, clerodane diterpenoids, pimarane diterpenoids, labdane diterpenoids, et d'autres diterpenoids (Wu et al., 2012). Le tableau suivant résume quelques diterpénoïdes isolés du genre *Salvia*.

Tableau I-4. Quelques diterpenoïdes 41-59 isolés du genre *Salvia*.

No.	Nom	Plante	Ref
<u>41</u>	3 β -hydroxy-8,11,13(14),15abietatetraen-18-oïc acid	<i>S. tomentosa</i>	Ulubelen et al., 1981
<u>42</u>	ferruginol	<i>S. blepharochlaena</i>	Ulubelen et al., 2001
		<i>S. broussonetii</i>	Fraga et al., 2005
		<i>S. cilicica</i>	Tan et al., 2002
		<i>S. miltiorrhiza</i>	Don et al., 2006
		<i>S. sclarea</i>	Ulubelen et al., 1994
		<i>S. wiedemannii</i>	Topçu et al., 1990
		<i>S. eriophora</i>	Ulubelen et al., 2002
<u>43</u>	iguestol	<i>S. broussonetii</i>	Fraga et al., 2005
<u>44</u>	2 α -hydroxysugiol	<i>S. cardiophylla</i>	González et al., 1988
<u>45</u>	7-oxocarnosic acid diacetate	<i>S. canariensis</i>	González et al., 1987
<u>46</u>	6-oxo-7 α -hydroxycarnosic acid diacetate		
<u>47</u>	horminone	<i>S. blepharochlaena</i>	Ulubelen et al., 2001
		<i>S. anastomosans</i>	Esquivel et al., 2005
		<i>S. barrelieri</i>	Kabouche et al., 2007
		<i>S. pachystachys</i>	Ulubelen et al., 1990
		<i>S. sahendica</i>	Jassbi et al., 2006
		<i>S. verbenaca</i>	Sabri et al., 1989
<u>48</u>	7-acetylhorminone	<i>S. blepharochlaena</i>	Ulubelen et al., 2001
		<i>S. candidissima</i>	Ulubelen et al., 1992
		<i>S. wiedemannii</i>	Topçu et al., 1990
<u>49</u>	royleanone	<i>S. nutans</i> <i>S. tomentosa</i>	Nagy et al., 1999

		<i>S. pratensis</i>	Nagy et al., 1998
50	2 α ,7,11-trihydroxy-7,9(11),13-abietatrien-12-one	<i>S. texana</i>	González et al., 1989
51	2-oxotaxodione		
52	2 α -hydroxytaxodione		
53	6 α -hydroxy-11,12-dioxo-8,13-abieta-diene	<i>S. recognita</i>	Tan et al., 1998
54	11,12,-dioxoabieta-8,13-dien (= miltirone)	<i>S. napifolia</i>	Ulubelen et al., 1995
		<i>S. miltiorrhiza</i>	Wang et al., 1989
55	7 β -hydroxy-8,13-abietadiene-11,12-dione	<i>S. miltiorrhiza</i>	Chang et al., 1990
56	salviphlomone	<i>S. phlomoides</i>	Hueso-Rodríguez et al., 1983
57	isocarnosol	<i>S. lanigera</i>	Al-Hazimi et al., 1984
58	rosmanol	<i>S. canariensis</i>	González et al., 1987
		<i>S. officinalis</i>	Hohmann et al., 2003
		<i>S. pachyphylla</i>	Guerrero et al., 2006
59	conacytone	<i>S. ballotaeflora</i>	Dominguez et al., 1976
		<i>S. candicans</i>	Cárdenas et al., 1995

**41**

	R₁	R₂	R₄	R₆	R₇	R₁₁
42	CH ₃	OH	H	H	H	H
43	CH ₃	OCH ₃	H	α -OH	OH	H
44	CH ₃	OH	O	H	H	OH
45	CO ₂ CH ₃	OAc	O	H	OAc	H
46	CO ₂ CH ₃	OAc	α -OH	O	OAc	H

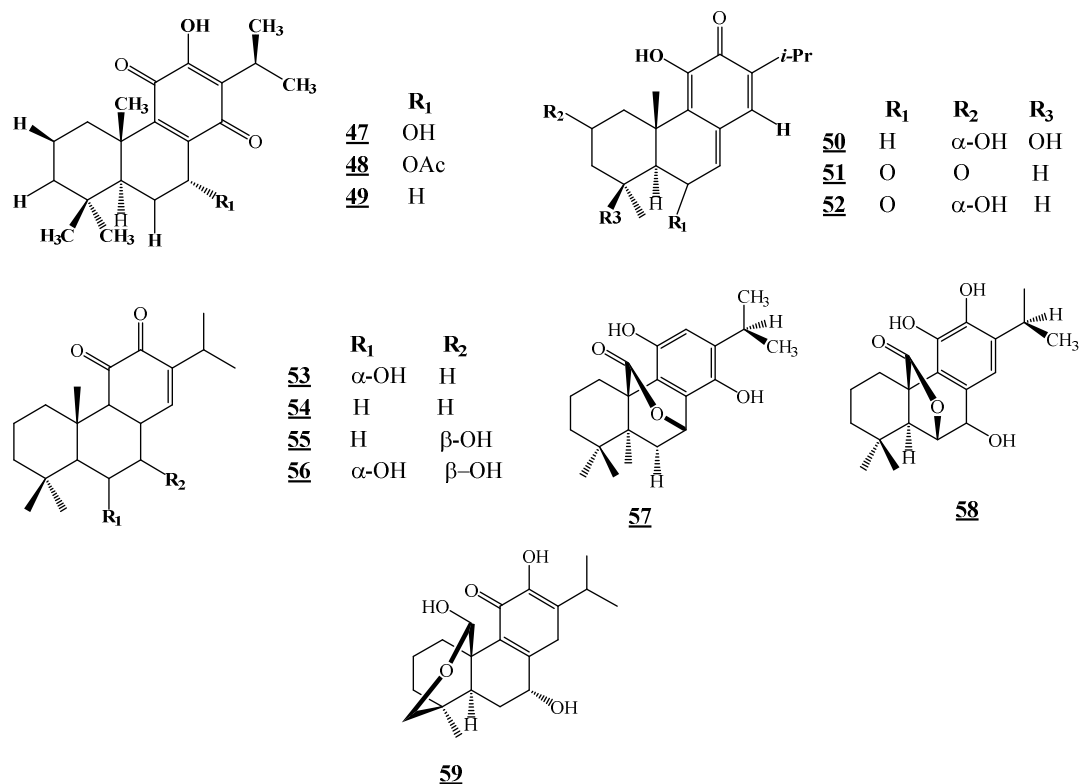


Figure I-4. Structures diterpenoïdes rencontrées dans le genre *Salvia*.

I.1.4.4. Triterpènes et stéroïdes :

Les triterpènes constituent un trait caractéristique dans 113 espèces de la plante *Salvia* réparties en 214 composés. Par rapport à leurs structures ils sont classés en six sous-groupes : triterpénoïdes types ursane (**60-84**) (figure I-5), oleanane (**85-104**) (figure I-6), lupane (**105-121**) (figure I-7), dammarane (**122-127**) (figure I-8), et autres triterpénoïdes. Les stéroïdes brassicasterone (**128**), 1-oxo-7 α -hydrox-ytosterol (**129**), et stigmast-4-en-3-one (**130**) (figure I-9) sont isolés de *S. multicaulis*, *S. glutinosa*, et *S. amplexicaulis* respectivement (Wu et al., 2012). Le tableau I-5 résume les types des quelques tripterpènes isolés dans différentes espèces.

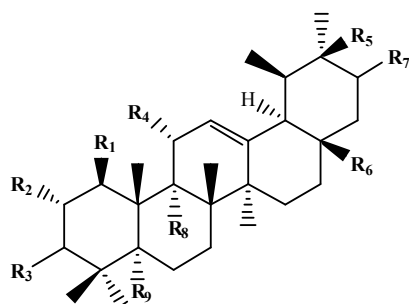
Tableau I-5. Quelques triterpenoïdes **60-130** isolés du genre *Salvia*.

No	Nom	Plante	Ref
60	maslinic acid (2 α -hydroxy oleanolic acid)	<i>S. canariensis</i>	Savona et al., 1983
61	oleic acid	<i>S. officinalis</i>	Horiuchi et al., 2007
		<i>S. amplexicaulis</i>	Ulubelen et al., 1977

		<i>S. longystyla</i>	Delgado et al., 1990
62	3 β ,11 α ,21 α -trihydroxyurs-12-ene (salvistamineol)	<i>S. staminea</i>	Topçu et al., 2003
63	1 β ,2 α -dihydroxy-3 β -acetoxy-11-oxours- 12-ene	<i>S. kronenburgii</i>	Topçu et al., 2004
64	1 β ,2 α ,3 β ,11 α -tetrzhydroxyurs-12-ene	<i>S. kronenburgii</i>	Topçu et al., 1999
65	3 α -acetoxyurs-12-ene-1 β ,11 α -diol		
66	1 β ,3 α ,11 α -trihydroxyurs-12-ene		
67	2 α ,3 β ,11 α -trihydroxyurs-12-ene		
68	3 β -acetoxy-urs-ene-2 α ,11 α -dial	<i>S. argentea</i>	Bruno et al., 1987
69	3 β -acetoxy-urs-ene-1 β ,2 α ,11 α -triol		
70	3 β -acetoxy-urs-ene-1 β ,2 α ,11 α ,20 β -tetraol		
71	3 β -acetoxy-urs-12-ene-1 β ,2 α ,11 α ,20 β - triol		
72	3-oxours-12-ene-1 β ,11 α -diol	<i>S. haenkei</i>	Almanza et al., 1997
73	3-epi-ursolic acid	<i>S. lanata</i>	Mukherjee et al., 1982
74	santolinoic acid	<i>S. santolinifolia</i>	Ahmad et al., 2007
75	2 α ,3 β ,5 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (salvin A)	<i>S. santolinifolia</i>	Mehmood et al., 2006
76	3,11-dioxoursun-12-ene	<i>S. mellifera</i>	Gonzalez et al., 1990
77	urs-12-ene-3 α ,11 α -diol	<i>S. willeana</i>	De la Torre et al., 1990
78	3 α ,24-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid	<i>S. nicolsoniana</i>	Pereda-Miranda et al., 1986
79	3 α ,24-dihydroxyolean-12-en-28,30-dioic acid		
80	2 α -acetoxyurs-5,12-diene-3 β ,11 α -diol	<i>S. kronenburgii</i>	Topçu et al., 1999
81	3-oxo-13(28)-epoxyursan-11-ene	<i>S. mellifera</i>	Gonzalez et al., 1990
82	3 β ,6 α ,23-trihydroxyurs-12,19(29)-dien- 28-oic acid	<i>S. hierosolymitana</i>	De Felice et al., 2006

83	2 α ,3 β ,20 β ,23-tetrahydroxyurs-12,19 (29)-dien-28-oic acid	<i>S. chinensis</i>	Wang et al., 2009
84	23-(<i>trans-p</i> -coumaroyloxy)-3 β ,6 α ,30-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid	<i>S. hierosolymitana</i>	De Felice et al., 2006
85	2 α ,3 β -dihydroxyolean-28-oic acid		
86	1 β ,2 α ,3 β ,11 α -tetrahydroxyolean-12-ene	<i>S. kronenburgii</i>	Topçu et al., 1999
87	3 β -acetoxyolean-12-ene-2 α ,11 α -dial	<i>S. argentea</i>	Bruno et al., 1987
88	3 β -acetoxyolean-12-ene-1 β ,2 α ,11 α -triol		
89	3 β -hydroxy-1-oxoolean-12-en-28-oic acide (acide virgatique)	<i>S. virgata</i>	Ulubelen et al., 1976
90	3 α ,6 α ,24-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid (salvin B)	<i>S. santolinifolia</i>	Mehmood et al., 2006
91	Salvinemorol	<i>S. nemorosa</i>	Ulubelen et al., 1994
92	24-nor-2 α ,3 β -dihydroxyolean-4(23),12-ene	<i>S. hierosolymitana</i>	De Felice et al., 2006
93	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> -dihydroxy-24-nor-4(23),12-oleanadien-28-oic acid	<i>S. carduacea</i>	Ballesta-Acosta et al., 2002
94	2 α ,3 α ,16 α -trihydroxy-24-nor-4(23),12-oleandien-28-oic acid	<i>S. palaestina</i>	Cioffi et al., 2008
95	przewanoic acid B	<i>S. przewalskii</i>	Wang et al., 1988
96	przewanoic acid A		
97	1 β ,11 α -dihydroxygermanicone	<i>S. deserta</i>	Savona et al., 1987
98	23-hydroxygermanicone	<i>S. pomifera</i>	Topçu et al., 1994
99	olean-13(8)-ene-2 α ,3 β ,11 α -triol	<i>S. pinnata</i>	Ulubelen et al., 1984
100	olean-13(8)-ene-2 α ,3 β -diol	<i>S. horminum</i>	Ulubelen et al., 1977
101	3 β -hydroxyoleanan-13 β 28 \rightarrow lactone	<i>S. lanigera</i>	Al-Hazimi et al., 1987
102	2 α ,20 β -dihydroxy-3 β -acetoxyurs-9(11),12-diene	<i>S. kronenburgii</i>	Topçu et al., 2004
103	1 β ,2 α -dihydroxy-3 β -acetoxyurs-9(11),12-diene		

104	deacetyloxysessein-7 α -(3 β -hydroxyolean-12-en-28-oate) (reglin)	<i>S. regal</i>	Ortega et al., 1995
105	lupeol	<i>S. palaestina</i>	Hussein et al., 1997
106	lup-20(29)-ene-2 α ,3 β -diol		
107	lup-20(29)-ene-23 β -diol		
108	2 α -methoxylup-20(29)-en-3 β -ol		
109	palestinol	<i>S. triloba</i>	Firdous et al., 1999
110	7 β -hydroxylup-20(29)-en-3-one	<i>S. pratensis</i>	Anaya et al., 1989
111	1 β ,11 α -dihydroxylup-20(29)-en-3-one	<i>S. deserta</i>	Savona et al., 1987
112	(1 β ,3 β)-lup-20(29)-ene-1,3,30-triol	<i>S. sclareoides</i>	Rauter et al., 2007
113	3 α -O-acetyl-20(29)-lupen-2 α -ol	<i>S. trijuga</i>	Pan et al., 2010
114	1 β ,11 α ,20-trihydroxylupan-3-one	<i>S. deserta</i>	Savona et al., 1987
115	lupane-3 β ,11 α ,20-triol	<i>S. phlomoides</i>	García-Alvarez et al., 1981
116	3 β -acetoxylupane-11 α ,20-diol		
117	3-oxolupane-11 α ,20-diol		
118	monogynol A	<i>S. macrochlamys</i>	Topçu et al., 2007
119	3 α ,hydroxy-20-oxo-30-norlupane	<i>S. nubicola</i>	Ali et al., 2005
120	3 β -O- <i>trans-p</i> -coumaroylmonogynol A	<i>S. montbretii</i>	Ulubelen et al., 1994
121	3 β -O- <i>cis-p</i> -coumaroylmonogynol A		
122	santolin B	<i>S. santolinifolia</i>	Ahmad et al., 2008
123	santolin A		
124	santolin C		
125	20 <i>S</i> ,24 <i>R</i> -epoxydammar-12 β ,25-diol-3-one	<i>S. bicolor</i>	Valverde et al., 1985
126	7 β ,25-dihydroxy-(20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-epoxydammaran-3-one (salvilymitone)	<i>S. hierosolymitana</i>	Pedreros et al., 1990
127	(20 <i>S</i> ,24 <i>R</i>)-epoxydammar-3 β ,7 α ,25-triol (= salvilymitol)		
128	brassicasterone	<i>S. multicaulis</i>	Ulubelen et al., 1998
129	1-oxo-7 α -hydroxysitosterol	<i>S. glutinosa</i>	Topçu et al., 1997
130	stigmast-4-en-3-one	<i>S. amplexicaulis</i>	Kolak et al., 2001



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
<u>60</u>	H	OH	β OH	H	H	CO ₂ H	H	H	H	H
<u>61</u>	H	H	β OH	H	H	CO ₂ H	H	H	H	H
<u>62</u>	H	H	β OH	OH	H	CH ₃	α OH	H	H	H
<u>63</u>	OH	OH	β OAc	O	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>64</u>	OH	OH	β OH	OH	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>65</u>	OH	H	α OAc	OH	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>66</u>	OH	H	α OH	OH	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>67</u>	H	OH	β OH	OH	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>68</u>	H	OH	β OAc	OH	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>69</u>	OH	OH	β OAc	OH	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>70</u>	OH	OH	β OAc	OH	OH	CH ₃	H	H	H	H
<u>71</u>	H	OH	β OAc	OH	OH	CH ₃	H	H	H	H
<u>72</u>	OH	H	O	H	OH	CH ₃	H	H	H	H
<u>73</u>	H	H	α OH	H	H	CO ₂ H	H	H	H	H
<u>74</u>	H	OH	β OH	H	H	CO ₂ H	H	OH	H	H
<u>75</u>	H	OH	β OH	H	H	CO ₂ H	H	H	OH	H
<u>76</u>	H	H	O	O	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>77</u>	H	H	α OH	OH	H	CH ₃	H	H	H	H
<u>78</u>	H	H	α OH	H	H	CO ₂ H	H	H	H	OH
<u>79</u>	H	H	α OH	H	CO ₂ H	CO ₂ H	H	H	H	OH

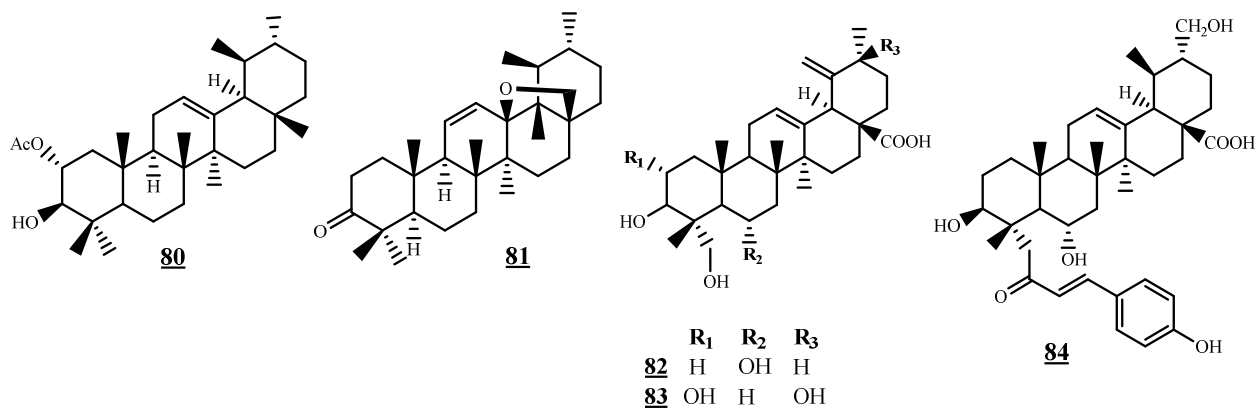
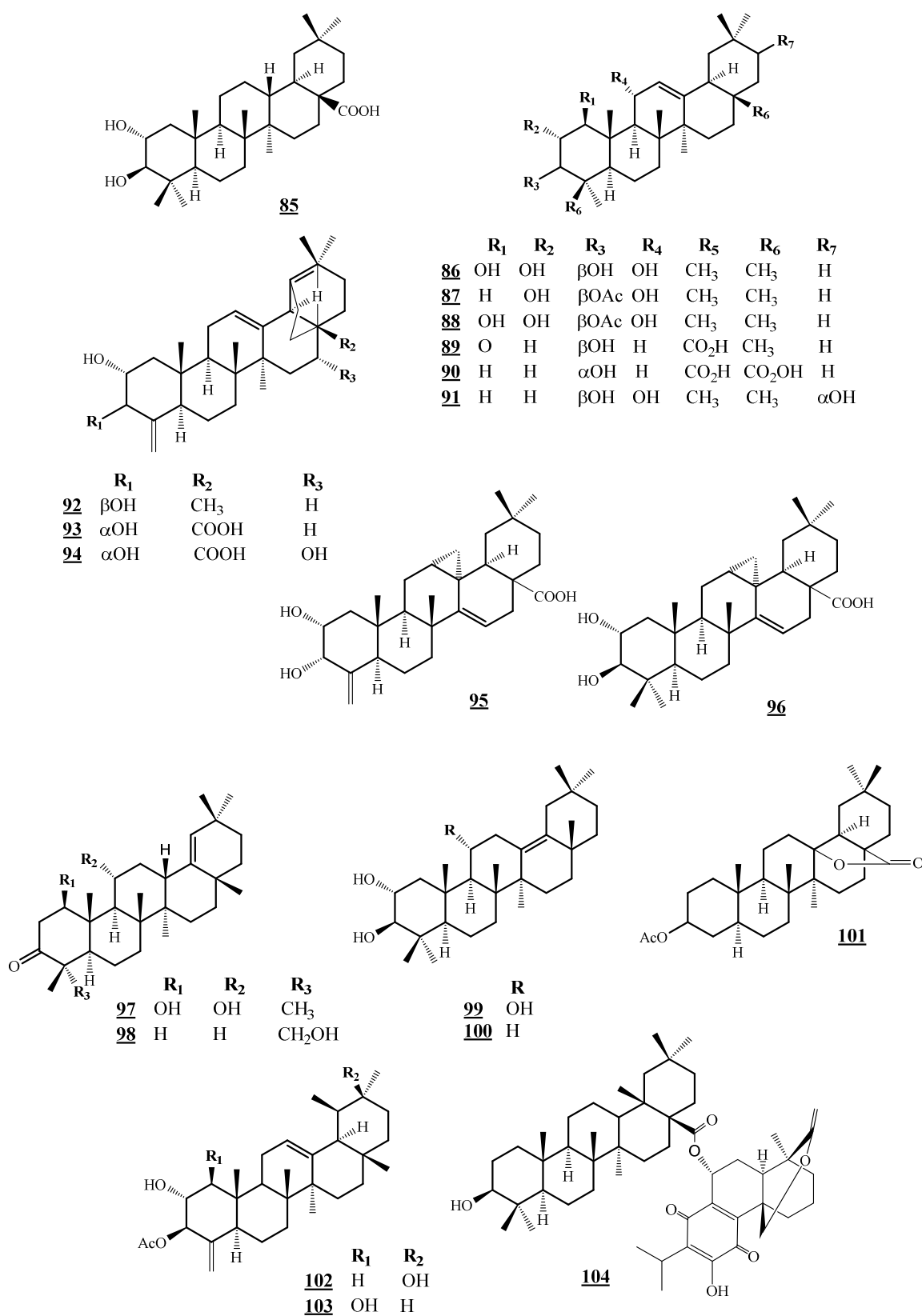


Figure I-5. Structures triterpéniques du type ursane rencontrées dans le genre *Salvia*.

Figure I-6. Structures triterpéniques du type oleanane rencontrées dans le genre *Salvia*.

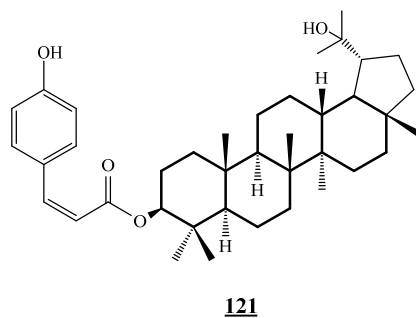
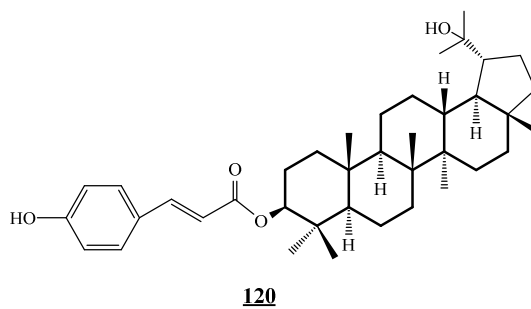
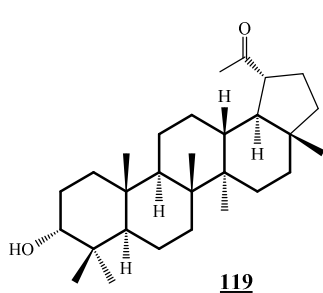
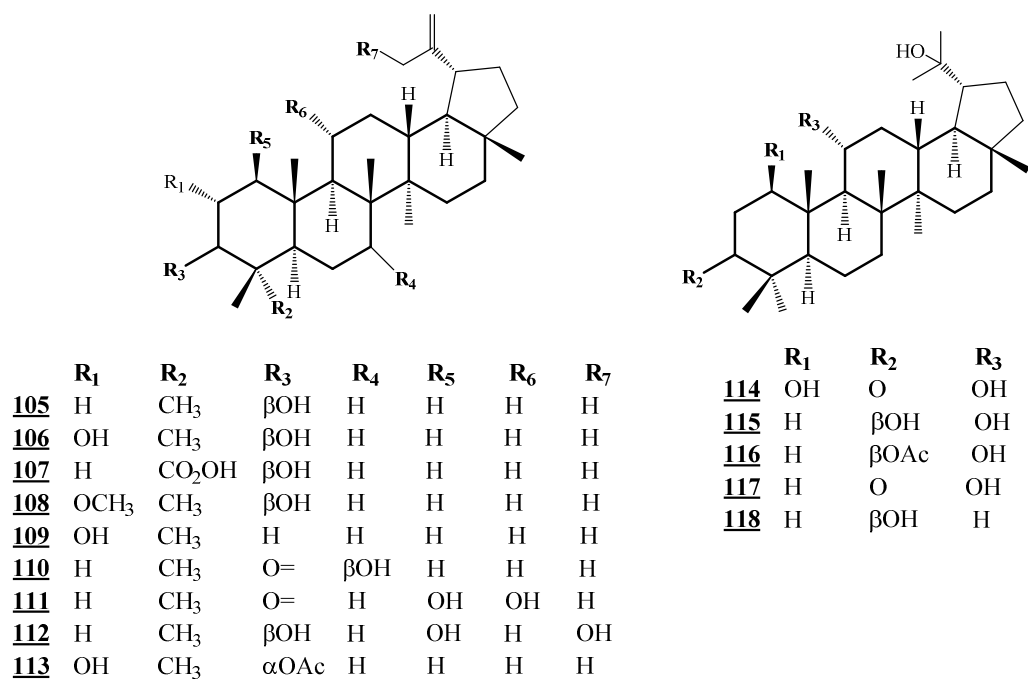
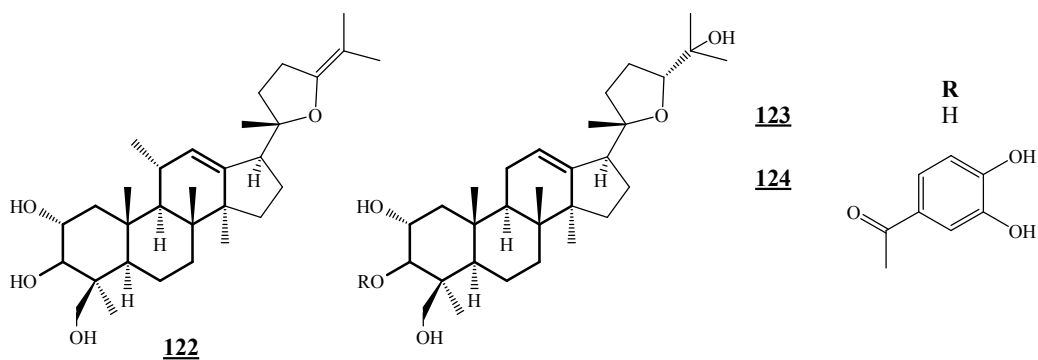


Figure I-7. Structures triterpéniques du type lupane rencontrées dans le genre *Salvia*.



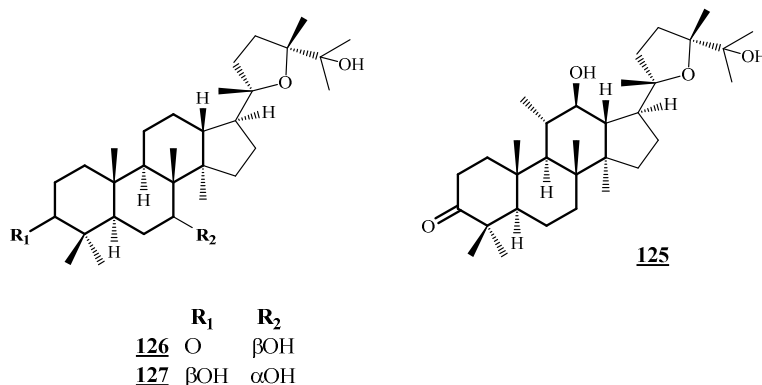


Figure I-8. Structures triterpènes du type dammarane rencontrées dans le genre *Salvia*.

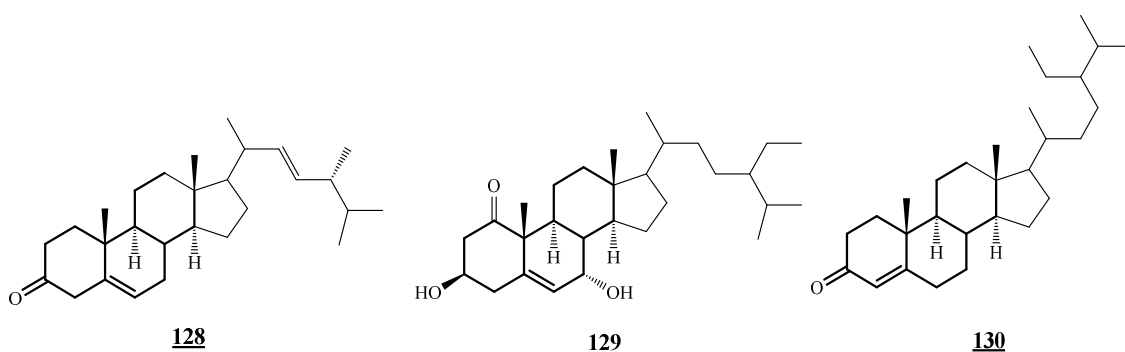


Figure I-9. Structures stéroïdique rencontrées dans le genre *Salvia*.

I.1.4.5. Polyphénoliques :

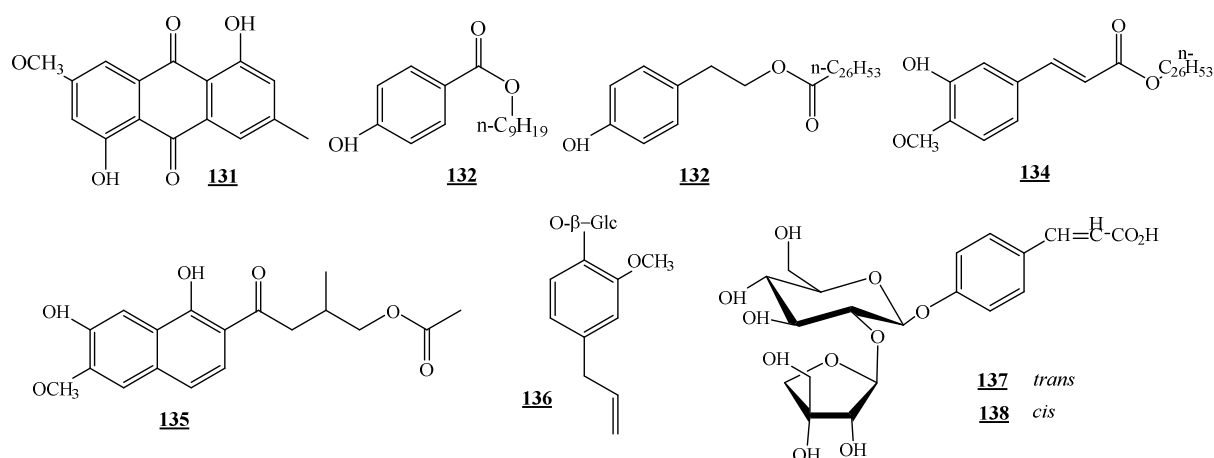
Il existe deux grands groupes de constituants actifs dans *Salvia* : outre les composants lipophiles précédemment mentionnés terpénoïdes, un autre groupe de métabolites sont les polyphénoliques solubles dans l'eau, y compris l'acide salvianolique B, danshensu, protocatchualdéhyde, et ainsi de suite. Selon les structures des polyphénols, ce groupe est classé en deux sous-groupes : les acides phénoliques et les flavonoïdes (Lu et al., 2002). Le tableau suivant résume quelques polyphénoliques isolés de plusieurs espèces du genre *Salvia* (tableau I-6).

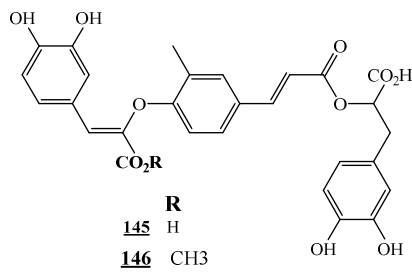
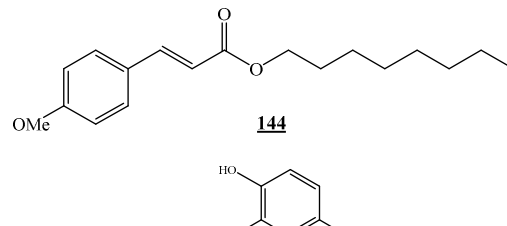
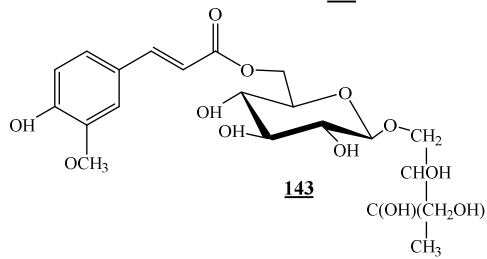
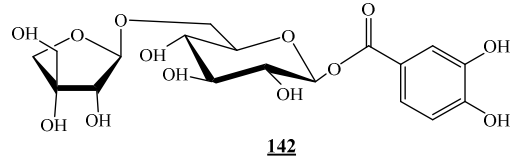
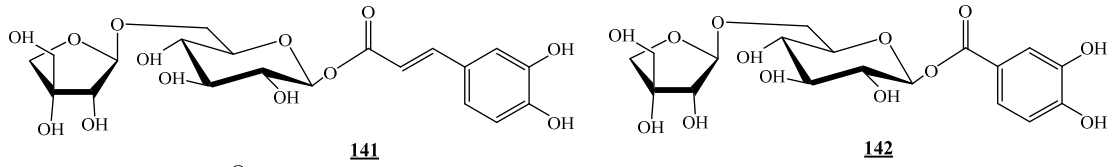
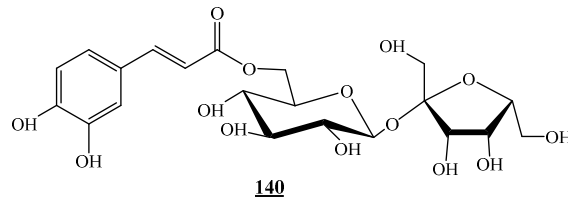
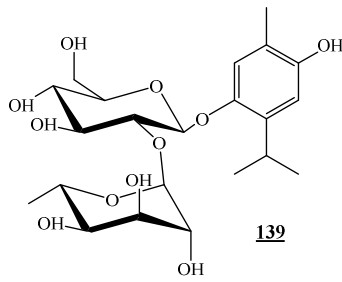
Tableau I-6. Quelques composés polyphénoliques 131-180 isolés du genre *Slavia*.

No.	Nom	Plante	Ref
<u>131</u>	przewalskinone B	<i>S. przewalskii</i>	Lu et al., 1992
<u>132</u>	nonyl 4-hydroxybenzoate	<i>S. moorcroftiana</i>	Zahid et al., 2003
<u>133</u>	eicosaheptanoic acid 2-(p-hydroxyphenyl)ethyl ester	<i>S. microphylla</i>	Aydoğmus et al., 2006

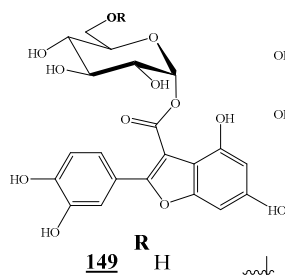
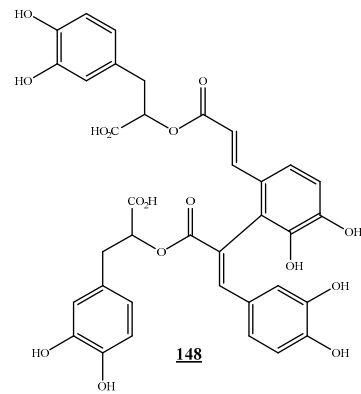
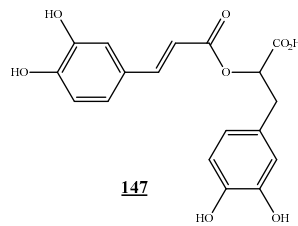
134	hexacosylferulate		
135	4-(1-hydroxy-5-methylnaphthalen-2-yl)-2-methyl-4-oxobutyl acetate (salvianonol)	<i>S. miltiorrhiza</i>	Don et al.,2006
136	Eugenylglucoside	<i>S. officinalis</i>	Wang et al., 1998
137	<i>trans-p</i> -coumaric acid 4- <i>O</i> -(2'- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl)- β -D-glucopyranoside	<i>S. officinalis</i>	El-Sayed et al.,2001
138	<i>cis-p</i> -coumaric acid 4- <i>O</i> -(2'- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl)- β -D-glucopyranoside		
139	4-hydroxyacetophenone 4- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl)- β -D-glucopyranoside		
140	6- <i>O</i> -caffeoyl- β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranoside	<i>S. officinalis</i>	Wang et al., 1999
141	1- <i>O</i> -caffeoyl- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside		
142	1- <i>O-p</i> -hydroxybenzoyl- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside		
143	1- <i>O</i> -(2,3,4-trihydroxy-3-methyl)butyl-6- <i>O</i> -feruloyl- β -D-glucopyranoside	<i>S. officinalis</i>	Wang et al., 2000
144	octanol ester <i>cis-O</i> -methyl caffeic acid dimer	<i>S. forskahlei</i>	Ulubelen et al., 1996
145	salvianolic acid I	<i>S. cavaleriei</i>	Zhang et al.,1994
146	methyl melitrate A	<i>S. officinalis</i>	Lu et al., 1999
147	salvianolic acid D	<i>S. miltiorrhiza</i>	Ai et al.,1992
148	salvianolic acid E		
149	prioniticide A	<i>S. prionitis</i>	Zhao et al., 1996
150	prioniticide B		
151	salvianolicacid J	<i>S. flava</i>	Ai et al.,1994
152	4-{4- <i>O</i> -[6-(4-hydroxybenzoyl)- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl]-3-hydroxyphenyl}butan-2-one (salviaplebeiaside)	<i>S. plebeia</i>	Jin et al., 2009
153	7,8-dihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2-dihydronaphthalene-1,3-dicarboxylic acid di(1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl))ethyl ester (salvianolic acid L)	<i>S. officinalis</i>	Lu et al., 2001
154	lithospermate B	<i>S. miltiorrhiza</i>	Zhang et al.,2004
155	salvianolic acid B	<i>S. miltiorrhiza</i>	Ai et al.,1988
156	dimethyl heptamethyl salvianolate B		
157	salvianolic acid C		
158	yunnaneic acid A	<i>S. yunnanensis</i>	Tanaka et al., 1996
159	yunnaneic acid B		

160	yunnaneic acid C		
161	yunnaneic acid D		
162	sagerinic acid	<i>S. officinalis</i>	Lu et al., 1999
163	Nubatin	<i>S. nubicola</i>	Ali et al., 2005
164	6,8-di-C-glucosylapigenin (= vicenin-2)	<i>S. officinalis</i>	Lu et al., 2000
165	luteolin 7-O-β-D-glucoside	<i>S. officinalis</i>	Lu et al., 2001
		<i>S. triloba</i>	Rustaiyan et al., 1988
166	luteolin 7-O-glucuronide	<i>S. officinalis</i>	Lu et al., 2000;
167	luteolin 3'-O-glucuronide		Lu et al., 2001
168	6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside		
169	6-hydroxyluteolin 7-O-glucuronide	<i>S. officinalis</i>	Lu et al., 2000
170	apigenin 7-O-β-D-glucopyranosyl-(1'''→4'')-β-D-glucopyranoside (apiyenin 7-O-cellobioside)	<i>S. uliginosa</i>	Veitch et al., 1998
171	apigenin 7,4'-O,O-di-β-D-glucopyranoside (apigenin 7,4'-O,O-diglucoside)		
172	genkwanin 4'-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→6)-β-D-galactopyranoside	<i>S. moorcroftiana</i>	Zahid et al., 2002
173	salvionoside A	<i>S. nemorosa</i>	Takeda et al., 1997
174	salvionoside B		
175	salvionoside C		
176	salvianolic acid N	<i>S. yunnanensis</i>	Zhang et al., 2008
177	salvianolic acid A	<i>S. yunnanensis</i>	Zhang et al., 2008
178	methyl salvianolate A		
179	ethyl salvianolate A		
180	lithospermic acid		

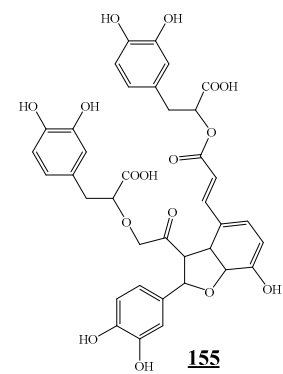
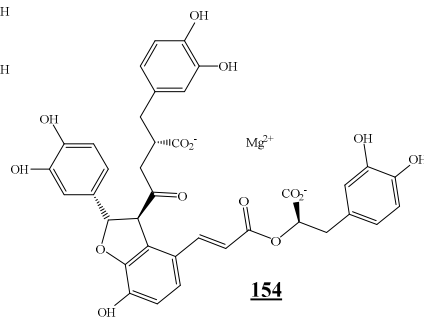
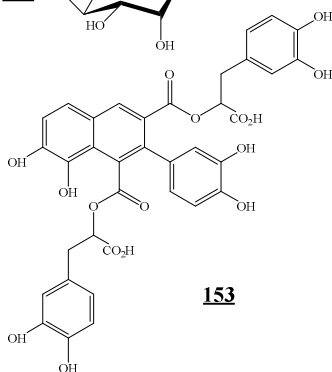
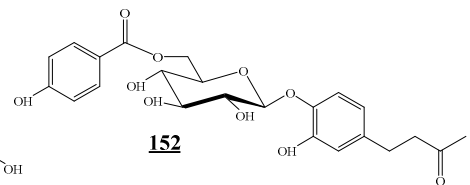
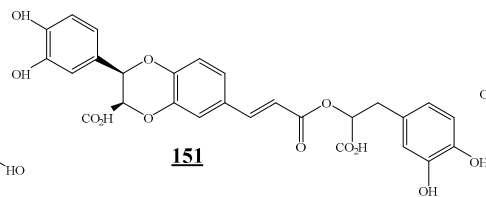


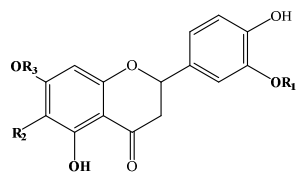
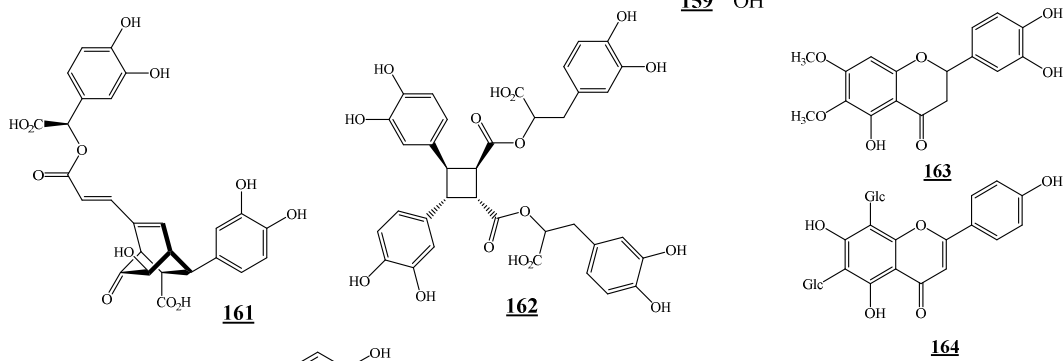
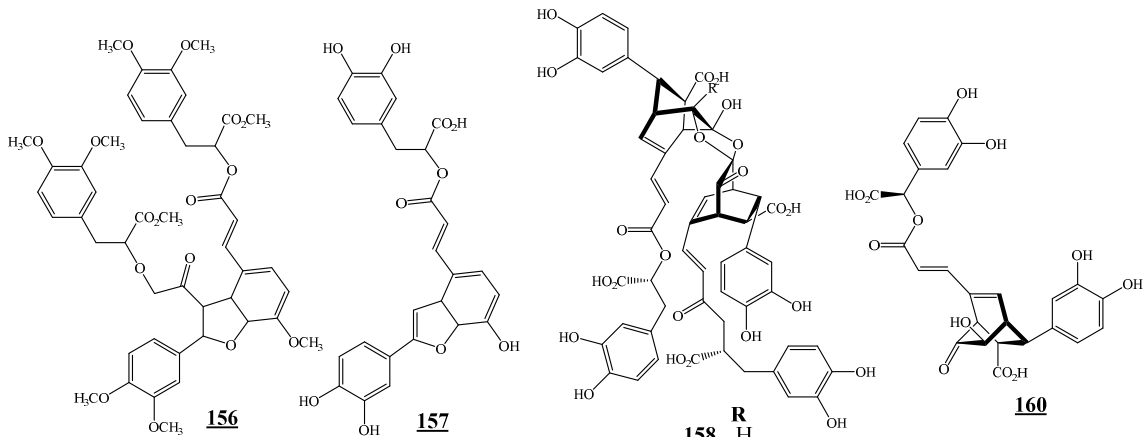


146 CH₃

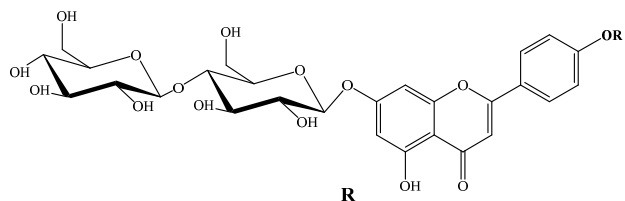


150

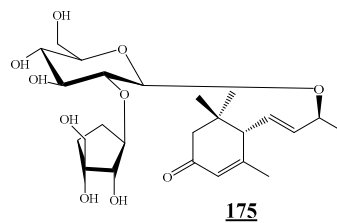
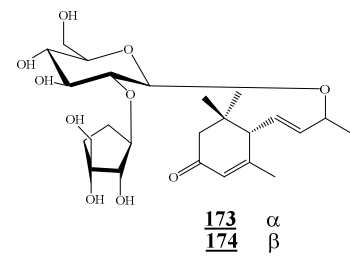
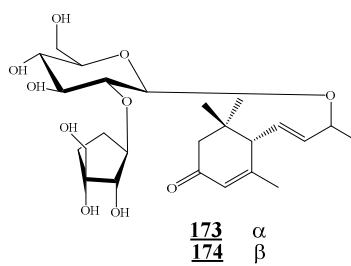
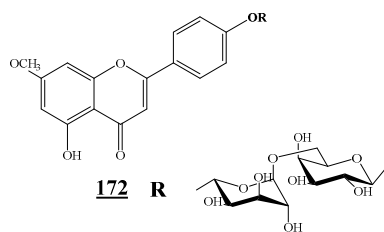




	R ₁	R ₂	R ₃
165	H	H	Glc
166	H	H	Glucu
167	Glucu	H	H
168	H	OH	Glc
169	H	OH	Glucu



170	H
171	β-D-Glc



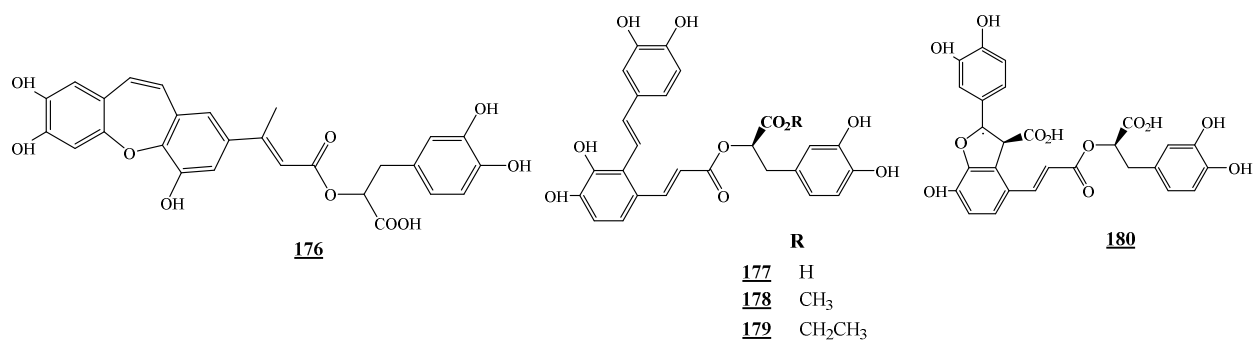


Figure I-10. Structures polyphénoliques rencontrées dans le genre *Salvia*.

I.1.4.6. Huiles essentielles :

Le genre *Salvia* est le plus étudié pour son huile essentielle avec des constituants majoritairement d'hydrocarbures monoterpènes, monoterpènes oxygénés et hydrocarbures sesquiterpènes. Les principaux composants contiennent 1,8-cinéole, α -humulène, camphre, bornéo, β -pinène, α -pinène, camphène, α -Thujène, β -caryophyllène et viridiflorol. En outre, ils sont des sources riches de diterpènes et triterpènes comme l'acide carnosique, l'acide ursolique, le tanshinones et le carnosol, chacun d'eux a ses propres effets pharmacologiques (Lopresti., 2017; Fu et al., 2013).

I.1.5. Travaux antérieurs sur l'espèce *Salvia buchananii*

La recherche bibliographique exhaustive effectuée sur cette espèce à montré que jusqu'à ce jour, elle n'a pas fait l'objet d'aucune étude phytochimique des racines. À ce jour, seule la présence des diterpènes et des composés phénoliques dans les parties aériennes de l'extrait dichlorométhane de la *S. buchananii* mentionnée par Bisio et ses collaborateurs, l'étude a abouti l'identification des 11 composés (**181-191**) (figure I-11) qui sont du type diterpènes clérodane (Bisio et al., 2015) : *ent*-(4R,5R,9S,10R)-15,16-epoxycleroda-1,13(16),14-triene-17,12S;18,19-diolide (**181**), salvimicro-phyllin C (**182**), *ent*-19-O-acetoxy-15,16-epoxy-3,13(16),14-clerodatrien-6,18-diol (**183**), *ent*-(5R,9R)-15,16-epoxy-10S-hydroxycyleroda-3,13(16)14-triene-17,12S;18,19-diolide (**184**), *ent*-19-O-acetoxy-15,16-epoxy-3,13(16),14-clerodatrien-6,8,12-triol (**185**), *ent*-15,16-epoxy-10,6-dihydroxycyleroda 3,7,13(16),14-tetraene-17,12;18,19-diolide (**186**), sepulturin E (**187**), *ent*-19-O-acetoxy-15,16-epoxy-3,13(16),14-clerodatrien-6,8,12-triol (**188**), 7a,12a-dihydroxyhautriwaic acid-19-lactone (**189**), salviarin (**190**), *ent*-19-acetoxy-15,16-epoxy-6-hydroxy-3,13(16), 14-clerodatrien-18-al (**191**), acide oléique et ursolique.

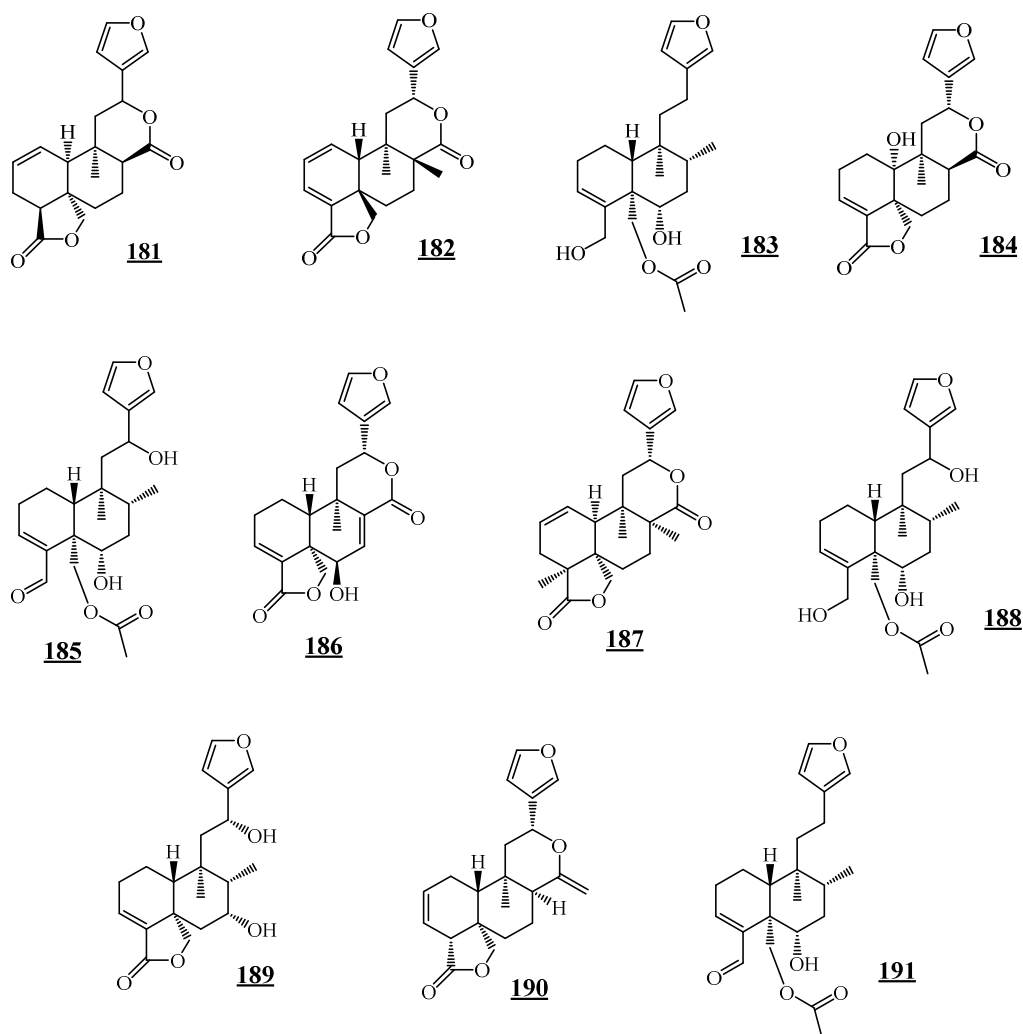


Figure I-11. Diterpènes clérodane **181-191** isolés des parties aériennes de l'espèce *S. buchananii*.

L'extrait dichlorométhane du *S. buchananii* a rapporté un effet antimicrobien contre plusieurs bactéries Gram (+), et aucune activité observée contre Gram (-) (Bisio et al., 2015). Une autre étude a montré une activité antioxydante de la *S. buchananii* de l'extrait exsudat (Giamperi et al., 2012).

Chapitre 2

Aperçu bibliographique sur le
genre *Cistanche*.

I.2.1. Introduction de la famille des Orobanchaceae

Les Orobanchaceae sont des dicotylédones poussent particulièrement dans les zones tempérées à subtropicales des deux Amériques, d'Australie, de Nouvelle-Zélande et d'Afrique tropicale. Cette famille comprenant 90 genres pour environ 2060 espèces jusqu'à l'aube du 21^{ème} siècle. La famille des Orobanchaceae est regroupée que des espèces non photosynthétique (holoparasites) (Ventenat, 1799 ; Beck, 1930), essentiellement les *orobanches* (150 espèces), et quelques genres proches comme les *Cistanches* méditerranéennes et les *Lathrées* (Mcneal et al. 2013).

Description botanique. Les Orobanchaceae sont des herbacées des plantes parasites, qui poussent à partir des racines d'autres plantes. Les Orobanchaceae ont des tiges courtes et comportent des feuilles charnues réduites à l'état de bractées, dépourvues de chlorophylle, les pétales peuvent être blanchâtres, brunâtres, bleuâtres, ou violets. Les fleurs sont hermaphrodites et symétriques en grappe terminale simple ou composée, voisines de celles des Scrophulariaceae. Calice 4-5 mère, mais souvent réduit à 2 lobes. Sépales latéraux plus ou moins divisés. Corolle tubuleuse bilabée. Etamines 4. Ovaires uniloculaires à 2-3 carpelles. Style 1 à stigmate en général bilobé. (Quezel et Santa, 1963; Mcneal et al. 2013).

Position systématique. Selon les classifications phylogénétiques APG III (*Angiosperm Phylogeny Group*) (tableau I-7).

Tableau I-7. Classification systématique APG III (2009) des Orobanchaceae.

Régne :	Plantae
Sous-régne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Asteridae
Ordre :	Lamiales
Famille :	Orobanchaceae

I.2.2. Généralité du genre *Cistanche* et de l'espèce *Cistanche phelypaea* (L) Coutinho syn.

La *Cistanche* est considérée comme l'herbe la plus précieuse de la famille des Orobanchaceae. Il compte 20 espèces principalement distribuées dans les zones arides ou semi-arides à travers l'Europe ibérique Péninsule, Afrique du Nord, Arabie Saoudite, Iran, Afghanistan, Pakistan, Nord Inde, Mongolie et Chine du Nord-Ouest. Les espèces de ce genre

forment un groupe attrayant de parasites racinaires phanérologiques. Le genre *Cistanche* a des conditions environnementales difficiles. (Blatter., 1921; Agrawal, 1984; Musselman., 1984). Ce genre est représenté au Sahara algérienne par trois espèces (Ozenda., 1993) : *C. tubulosa*, commune au Sahara central (Tassili N'Ajjer) ; *C. tinctoria* (Desf.) Beck, qui est un Saharo- espèces méditerranéennes et localement connues sous le nom de Danoun (Hammiche et al. 2006). Le genre *Cistanche* est riche en une large gamme de métabolites secondaires, essentiellement des glycosides phénylétanoïdes, les iridoides, les lignanes (Wang et al., 2012 ; Liu et al., 2013), les polysaccharides et les acides aminés libres, éléments de cendres et minéraux (Ebringerova et al., 1997).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'espèce *Cistanche phelypaea* (L) Coutinho syn. qui est le sujet de notre étude phytochimique et pharmacologique. Elle s'agit d'une plante très puissante, haute de 50-150 cm, Calice de 15-11 mm, Corolle de 4-5 cm, fendue jusqu'au tiers en 5 lobes, à tube étroit brusquement élargis au-dessus du calice. Fleurs jaunes ainsi que toute la plante. *C. phelypaea* se trouve généralement dans les terrains salés (Quezel et al., 1963).



Figure I-12. *Cistanche phelypaea* au Tassili N'Ajjer, Hoggar, Algérie [1].

I.2.3. Propriétés biologiques du genre *Cistanche*

I.2.3.1. Usage en médecine traditionnelle :

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

C. phelypaea (L), la partie inférieure épaisse de la tige est recueillie et utilisée comme poudre séchée, prise par voie orale. Elle est également utilisée comme pâte à mettre sur les abcès. Les parties inférieures des jeunes pousses sont coupées en tranches et séchées pour faire des cataplasmes. *C. Phelypaea* est également utilisé en médecine traditionnelle contre la diarrhée, le diabète, les troubles intestinaux, l'infection (abcès) et comme diurétique (Boulous., 1983).

De nombreuses utilisations comestibles et médicinales sont attribuées à ce genre. La plante de *C. tubulosa* est utilisée médicalement au Pakistan comme remède contre la diarrhée et les plaies (Kobayashi et al., 1987). Les tiges succulentes séchées de *C. deserticola* ont été utilisées pour le traitement de l'insuffisance rénale, infertilité féminine, leucorrhée morbide, neurataxie et la constipation sénile depuis longtemps (Yang et al., 2013).

I.2.3.2. Quelques activités biologiques reconnues :

Les travaux effectués sur les phényléthanoïdes glycosides (glucosile) tels qu'echinacoside (Ech) et acteoside (Act) et les polysaccharides du genre *Cistanche* ont mis en évidence des propriétés pharmacologiques, voici quelques activités :

- Anti-oxydation :

Xiong et al., 1996 ont indiqué que l'echinacoside (Ech) (**202**), contiennene de nombreux hydroxyles phénoliques qui pouvaient se lier aux radicaux libres.

Plusieurs études ont montré que l'Ech pouvait mieux inhiber les radicaux OH et O₂ in vitro. Il pouvait aussi augmenter les activités de glutathion-peroxydase (GSH-Px) et du superoxyde dismutase (SOD), diminuer la teneur en malondialdéhyde (MDA) et inhiber le vieillissement induit par le D-galactose (Lei et Tu, 2004; Liu., 2005).

D'autres études ont montré qu'Ech, acteoside (Act) et isoactoside avaient des activités d'élimination (DPPH·) et antioxydantes (Li et al, 2009; Yang et al, 2009).

- Anti-inflammatoire :

Jia et al., (2014) ont mis en évidence que les PhG pouvaient traiter la colite chez les souris induites par le sulfate de dextrane sodique (DSS), et protéger les cellules épithéliales intestinales contre les lésions inflammatoires en augmentant le facteur de croissance transformant (TGF) -β1.

D'autres études effectuées sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *C. violacea* Desf. a été évalué pour son activité anti-inflammatoire en utilisant la stabilisation de la membrane des globules rouges humains (HRBC) et l'inhibition de la méthode de dénaturation de l'albumine. Les résultats suggèrent que l'extrait acétate d'éthyle a été médiée par l'inhibition de l'activité arthritique, et la libération lysosomique pourrait être considérée comme sous l'influence par l'action synergique des iridoïdes, les PhG et les composés apigéniques. Ces effets pourraient être extrapolés en limitant les réponses inflammatoires, et en laissant entendre que *C. violacea* servirait de source pour la découverte de nouveaux agents anti-inflammatoires (Bougandoura et al., 2016).

- **Effet hépato-protecteur :**

Wu et al., (2007) ont montré que l'injection intraveineuse d'Ech (50 mg/kg) pouvait significativement affaiblir l'hépatotoxicité induite par CCl₄ chez le rat.

Xiong et al., (1996) ont rapporté que quatre glycosides d'alcools phénéthyls (y compris Ech) ont été obtenus à partir des plantes de *Cistanche* Hoffmg. et Link. ont une activité hépato-protectrice.

- **Activité neuroprotectrice et amélioration de la mémoire :**

Une étude récente a indiqué que les PhG avec (44.3% Ech) pourraient améliorer l'apprentissage et la mémoire dans le modèle focal d'ischémie cérébrale reperfusion des souris démente vasculaire, et pourraient également améliorer l'intelligence (Gao et al., 2005; Li., 2011).

Chen et al. (2007) ont évalué, qu'Ech pourrait prévenir une lésion aiguë causée par l'AD extracellulaire striatale du rat 6-OHDA et que sa teneur en métabolites diminuait. Ech pourrait également protéger et traiter la maladie de Parkinson (An et al, 2011).

Min et al (2013) ont révélé qu'Ech pouvait franchir librement la barrière hémato-encéphalique et activer les récepteurs Trk qui étaient essentiels à la survie des neurones, ainsi que ses voies de signalisation en aval, pour induire un effet de neuroprotecteur. Cependant, une autre étude a indiqué qu'Ech protégeait les cellules neuronales par le piégeage des radicaux libres (Kuang et al, 2009).

Liu et al (2011) ont étudié l'effet des PhG de la plante *C. Herba* sur l'altération de l'apprentissage et de la mémoire induite par la scopolamine chez les souris, et ont découvert que les PhG pouvaient augmenter le taux de choline acétylase (ChAT) et de SOD, tout en

diminuant le taux de cholinestérase et le malondialdéhyde (MDA) dans les tissus du cerveau de manière significative, et améliorer la capacité d'apprentissage et de la mémoire.

- **Effet hypoglycémie :**

Morikawa et al. (2010) ont indiqué qu'Extrait et Act du *C. tubulosa* pouvaient non seulement inhiber l'augmentation des taux de glycémie postprandiale, mais aussi améliorer considérablement la tolérance au glucose chez les souris chargées d'amidon. Ces effets pourraient être liés aux activités inhibitrices de PhGs contre la maltase intestinale humaine et l'aldose réductase des lentilles. Ainsi, les PhGs étaient une sorte de composants antihyperglycémiques potentiels.

- **Effet immunomodulateur :**

Zeng et al. (1998; 2002) ont montré que les polysaccharides du *Cistanche*(CPS) pouvaient accroître la réponse proliférative des lymphocytes de la rate et du thymus et avoir un effet synergique avec la concanavalin (Cona) et la phytohémagglutinine. Les CPS peuvent stimuler la prolifération des thymocytes murins et améliorer significativement les lymphocytes T spléniques murins pour sécréter l'interleukine-2 (IL-2). Plusieurs études ont montré que la CPS pourrait favoriser de manière significative la cellule normale prolifération sur les mitogènes (Cona et lipopolysaccharide) lymphocytes activés et non activés, et la sécrétion de IL-2. L'administration de l'IP avec CPS pourrait considérablement améliorer les indices de la rate à la fois normale et immuno- souris compromises (Wang et al., 2009).

- **Autres effets pharmacologiques :**

En outre, *Cistanche Herba* pourrait inverser ou soulager la toxicité pour la reproduction induite par le glycoside de *Tripterygii Radix* et *Rhizoma* en régulant la production de spermatozoïdes normaux, ce qui est utile pour la santé reproductive. *Cistanche Herba* pourrait également atténuer la toxicité des testicules induite par l'hydroxyurea et soulager la dégénérescence de cellules spermatogénétiques. Et cet effet peut être lié à son ectogenicandrogen-like effect (Wang et al., 2015). Cependant, *Cistanche Herba* pourrait prendre une dose dépendante induire la cytotoxicité testiculaire en éliminant les hormones fonction, inhibant la spermatogenèse et endommageant les testicules (San et al., 2012).

Les flavonoïdes et les alcaloïdes en plus de leurs effets pharmacologiques traditionnels n'ont pas été signalés. De plus, l'extrait hydro-alcoolique éthanol-eau et la solution de

lixiviation de l'éthanol du *Cistanche Herba*, pourraient être utilisés pour anesthésier les chiens, les chats et les lapins, et aussi avoir l'effet antihypertensif. *Cistanche Herba* peut stimuler la salive et la paralysie respiratoire. Certaines substances la salive et les glycosides pourraient causer une paralysie respiratoire (Wang et al., 2015).

I.2.4. Composition chimique du genre *Cistanche*

Les investigations phytochimiques des plantes du genre *Cistanche* menées depuis 1980 (Karasawa et al., 1986), ont conduit à la détermination des principaux métabolites secondaires du genre (tableau I-8) et qui sont majoritairement des composés glycosides phényléthanoïdes (PhGs) (Xiong et al., 1996), des iridoïdes (Morikawa et al., 2010), des lignanes, des oligosaccharides et des polysaccharides (Liu et al., 2013).

Tableau I-8. Le nombre de différentes composées chimiques des espèces *Cistanche*.

Espèces	Benzylglycosides	Phényléthanoïdes	Iridoïdes	Lignanes	Autres
<i>C. deserticola</i>	-	17	10	3	39
<i>C. tubulosa</i> (China)	-	9	4	1	7
<i>C. tubulosa</i> (Pakistan)	-	11	2	5	3
<i>C. salsa</i>	3	11	-	-	18
<i>C. sinensis</i>	-	4	2	-	5

I.2.4.1. Les composants volatiles :

Les huiles essentielles de *C. salsa* et de *C. tubulosa* ont été extraites grâce à la distillation à la vapeur, 38 et 21 composants ont été identifier par GC-MS, respectivement (tableau I-9). Les principaux constituants des huiles essentielles de *C. salsa* sont les alcanes, les alcools, les aldéhydes et quelques composés hétérocycliques, ainsi que l'acide palmitique et l'acide linoléique sont deux composés majoritaires l'huile de *C. tubulosa*. Les composés volatils de *C. deserticola* ont été extraits par éther de pétrole, 25 constituants ont été identifiés par CG-SM (Jiang et al., 2009).

Tableau I-9. Les analyses GC-MS des composées volatiles du genre *Cistanche*.

Espèces	Méthode de distillation	Nombre des composés identifiés	Ref
<i>C. salsa</i>	Distillation en courants	38 (70%)	Jiang et al., 2009
<i>C. tubulosa</i>	Distillation en courants	21 (91.44%)	Jiang et al., 2009
<i>C. deserticola</i>	Extraction par éther de pétrole	25 (75.03%)	Jiang et al., 2009
<i>C. deserticola</i>	Simultané	24 (83.60%)	Hui et al., 2003
<i>C. salsa</i>	Distillation-extraction Supercritiques fluide Extraction (SEF)	35	Jiang et al., 2009

I.2.4.2. Glycosides Phényléthanoïdes (PhGs):

Les glycosides phényléthanoïdes sont des constituants abondants des *Cistanche*, on peut citer **34** PhGs comprenant **22** glycosides disaccharidiques, 10 glycosides trisaccharide et 2 glycosides monosaccharide (tableau I-10). Les structures des PhGs dans les plantes *Cistanche* ont les caractéristiques suivantes : les glycosides disaccharides sont constitués de rhamnose et glucose avec une liaison Glc (3 → 1) Rha; le glucose est lié couramment avec l'aglycone dans la position (C4 ou C6) où coumaroyle (Cm) ou caffeoyle (Cf) est généralement situé; quand le PhG est un glycoside trisaccharide, un glucose ou rhamnose supplémentaire appartient en position C6 du glucose intérieur.

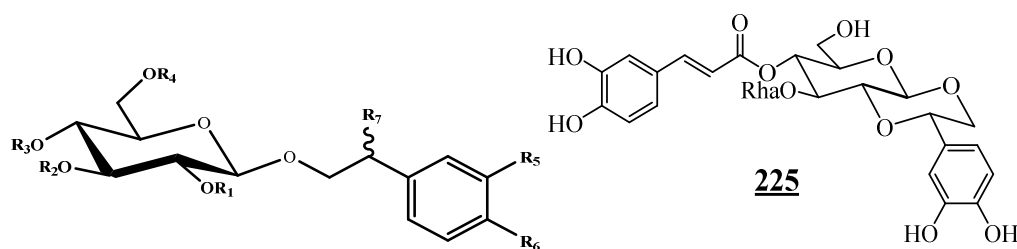
Parmi ces PhG, le crenatoside (**225**) est un cas exceptionnel car un anneau d'éther entre les deux positions, la position β d'aglycone et la liaison C-2 du glucose intérieur (Cheng et al., 1993) :

Tableau I-10. Les glycosides phényléthanoïdes **192-227** isolés du genre *Cistanche*.

No.	Nom	Plantes	Ref
192	2'-acetyl acteoside	<i>C. deserticola</i>	Du Niansheng et al., 1993
		<i>C. tubulosa</i>	Song et al., 2000
		<i>C. phelypaea</i>	Kobayashi et al., 1987
		<i>C. salsa</i>	Lei et al., 2007
193	acteoside	<i>C. deserticola</i>	Du Niansheng et al., 1993
		<i>C. tubulosa</i>	Song et al., 2000

		<i>C. phelypaea</i>	Kobayashi et al., 1987
		<i>C. salsa</i>	Lei et al., 2007
<u>194</u>	cistanoside A	<i>C. deserticola</i>	Du Niansheng et al., 1993
		<i>C. tubulosa</i>	Kobayashi et al., 1987
<u>195</u>	cistanoside B	<i>C. deserticola</i>	Jiang et al., 2009
<u>196</u>	cistanoside C	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1984
		<i>C. salsa</i>	Lei et al., 2007
<u>197</u>	cistanoside D	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1984
		<i>C. salsa</i>	Lei et al., 2007
<u>198</u>	cistanoside E	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1985
<u>199</u>	cistanoside G	<i>C. deserticola</i>	Karasawa et al., 1986
<u>200</u>	cistanoside H	<i>C. deserticola</i>	Karasawa et al., 1986 Jiang et al., 2009
<u>201</u>	decaffeyla cteoside	<i>C. deserticola</i>	Song et al., 2000
		<i>C. tubulosa</i>	Karasawa et al., 1986
<u>202</u>	echinacoside	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1987
		<i>C. tubulosa</i>	Kobayashi et al., 1984
		<i>C. phelypaea</i>	Du Niansheng et al., 1993
		<i>C. salsa</i>	Lei et al., 2007
<u>203</u>	isoacteoside	<i>C. deserticola</i>	Song et al., 2000
		<i>C. tubulosa</i>	Xiong et al., 1996
		<i>C. salsa</i>	Lei et al., 2007
<u>204</u>	isosyringalide-3'- α -L-rhamnopyranoside	<i>C. tubulosa</i>	Yoshizawa et al., 1990
<u>205</u>	osmanthuside B	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1984
		<i>C. herba</i>	Wang et al., 2015

<u>206</u>	salidroside	<i>C. deserticola</i>	Song et al., 2000
		<i>C. tubulosa</i>	Yu et al., 2007
<u>207</u>	syringalide A-3'- α - L-rhamnopyranoside	<i>C. deserticola</i>	Song et al., 2000
		<i>C. tubulosa</i>	Yoshizawa et al., 1990
<u>208</u>	tubuloside A	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1987
		<i>C. phelypaea</i>	Song et al., 2000
		<i>C. tubulosa</i>	Xiong et al., 1996
<u>209</u>	tubuloside B	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1987
		<i>C. tubulosa</i>	Du Niansheng et al., 1993
		<i>C. salsa</i>	Lei et al., 2007
<u>210</u>	tubuloside C	<i>C. tubulosa</i>	Kobayashi et al., 1987
<u>211</u>	tubuloside D	<i>C. tubulosa</i>	Kobayashi et al., 1987
<u>212</u>	tubuloside E	<i>C. phelypaea</i> <i>C. tubulosa</i>	Yoshizawa et al., 1990
<u>213</u>	cistantubuloside A	<i>C. tubulosa</i>	Tu et al., 2006
<u>214</u>	cistantubuloside B ₁ /B ₂		
<u>215</u>	cistansinenside A	<i>C. sinensis</i>	Tu et al., 2007
<u>216</u>	jionoside D		
<u>217</u>	poliumoside		
<u>218</u>	kankanoside F	<i>C. tubulosa</i>	Massayuki et al., 2006
<u>219</u>	kankanoside G		
<u>220</u>	eutigoside A	<i>C. salsa</i>	Yang et al., 2005
<u>221</u>	cistantubuloside C ₁ /C ₂	<i>C. tubulosa</i>	Tu et al., 2006
<u>222</u>	salsaside D	<i>C. salsa</i>	Lei et al., 2007
<u>223</u>	salsaside E		
<u>224</u>	salsaside F		
<u>225</u>	crenatoside	<i>C. tubulosa</i>	Cheng et al. 1993
<u>226</u>	campneoside II	<i>C. herba</i>	Wang et al., 2015
<u>227</u>	campneoside I (Isomère)		



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
<u>192</u>	Ac	Rha	Cf	H	OH	OH	H
<u>193</u>	H	Rha	Cf	H	OH	OH	H
<u>194</u>	H	Rha	Cf	Glc	OMe	OH	H
<u>195</u>	H	Rha	Fr	Glc	OMe	OH	H
<u>196</u>	H	Rha	Cf	H	OMe	OH	H
<u>197</u>	H	Rha	Fr	H	OMe	OH	H
<u>198</u>	H	Rha	H	H	OMe	OH	H
<u>199</u>	H	Rha	H	H	H	OH	H
<u>200</u>	Ac	Rha	H	H	OH	OH	H
<u>201</u>	H	Rha	H	H	OH	OH	H
<u>202</u>	H	Rha	Cf	Glc	OH	OH	H
<u>203</u>	H	Rha	H	Cf	OH	OH	H
<u>204</u>	H	Rha	Cm	H	OH	OH	H
<u>205</u>	H	Rha	Cm	H	H	OH	H
<u>206</u>	H	H	H	H	H	OH	H
<u>207</u>	H	Rha	Cf	H	H	OH	H
<u>208</u>	Ac	Rha	Cf	Glc	OH	OH	H
<u>209</u>	Ac	Rha	H	Cf	OH	OH	H
<u>210</u>	Ac	TA-Rha	Cf	Glc	OH	OH	H
<u>211</u>	Ac	TA-Rha	Cm	Glc	OH	OH	H
<u>212</u>	Ac	TA-Rha	Cm	H	OH	OH	H
<u>213</u>	H	Rha	Cf	Glc	H	OH	H
<u>214</u>	H	Rha	Cm/Cm	Glc	OH	OH	H
<u>215</u>	Ac	Rha	Cf	H	OH	OMe	H
<u>216</u>	H	Rha	Cf	H	OH	OMe	H
<u>217</u>	H	Rha	Cf	Cf	OH	OH	H
<u>218</u>	H	Rha	H	Glc	OH	OH	H
<u>219</u>	H	Rha	H	Cf	H	OH	H
<u>220</u>	H	H	H	Cm	H	OH	H
<u>221</u>	H	Rha	Cf	Glc	OH	OH	OH (S/R)
<u>222</u>	Ac	Rha	Cf	H	H	OH	H
<u>223</u>	Ac	Rha	Cf	H	OMe	OH	H
<u>224</u>	Ac	Rha	H	Cm	OH	OH	H
<u>226</u>	H	Cf	Rha	H		OH	OH (S/R)
<u>227</u>	H	Cf	Rha	H		OH	OH (S/R)

Figure I-13. Structures des phényléthanoïdes glycosides dans le genre *Cistanche*.

I.2.4.3. Iridoïdes :

Cinq iridoïdes aglycones et quinze iridoïdes glycosides ont été isolés du genre *Cistanche* (228-247) (tableau I-11) (Kobayashi et al., 1985; Xie et al., 2006). Les caractéristiques structurales des glycosides iridoïde de ce genre sont résumées comme suit : le glucose situé en position C1 de l'aglycone, avec une configuration β -H en H-5 et H-9;

l'hydroxylation se produit souvent en positions C-8 et C-10; parfois, la déshydratation peut se produire entre les hydroxyles de C-10 avec C-1 ou C-3 pour donner un groupement époxy.

Tableau I-11. Les iridoïdes 228-247 isolé du genre *Cistanche*.

No.	Nom	Plantes	Ref
<u>228</u>	bartsioside	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1985
<u>229</u>	6-deoxycatalpol	<i>C. deserticola</i>	Yoshizawa et al., 1990
		<i>C. phelypaea</i>	Kobayashi et al., 1985
		<i>C. tubulosa</i>	Tu et al., 1994 Tu et al., 1997
<u>230</u>	8-epideoxyloganic acid	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1985
<u>231</u>	8-epiloganic acid	<i>C. deserticola</i>	Karasawa et al., 1983
		<i>C. tubulosa</i>	Cheng et al., 1993 Du et al., 1993 Tu et al., 1994 Song et al., 1999
<u>232</u>	8-epiloganin	<i>C. herba</i>	Wang et al., 2015
<u>233</u>	geniposidic acid	<i>C. deserticola</i>	Karasawa et al., 1983
		<i>C. tubulosa</i>	Song et al., 1999
<u>234</u>	glucoside	<i>C. deserticola</i> <i>C. phelypaea</i>	Kobayashi et al., 1985
<u>235</u>	geniposide	<i>C. herba</i>	Wang et al., 2015
<u>236</u>	leonuride (ajugol)	<i>C. deserticola</i> <i>C. phelypaea</i>	Kobayashi et al., 1985
<u>237</u>	mussaenosidic acid	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1985
		<i>C. tubulosa</i>	Song et al., 1999
<u>238</u>	adoxosidic acid	<i>C. tubulosa</i>	Song et al., 1999
<u>239</u>	phelypaeside	<i>C. phelypaea</i>	Deyama et al., 1995
<u>240</u>	kankanoside A	<i>C. tubulosa</i>	Xie et al., 2006
<u>241</u>	kankanoside B		
<u>242</u>	kankanoside C		
<u>243</u>	kankanoside D		
<u>244</u>	cistachlorin	<i>C. deserticola</i>	Kobayashi et al., 1984

<u>245</u>	cistanin	<i>C. deserticola</i>	Xu et al., 1999 Kobayashi et al., 1984
<u>246</u>	kankanol	<i>C. tubulosa</i>	Xie et al., 2006
<u>247</u>	cistanin-8-methyl-malonate	<i>C. violacea</i>	Bougandoura et al., 2016

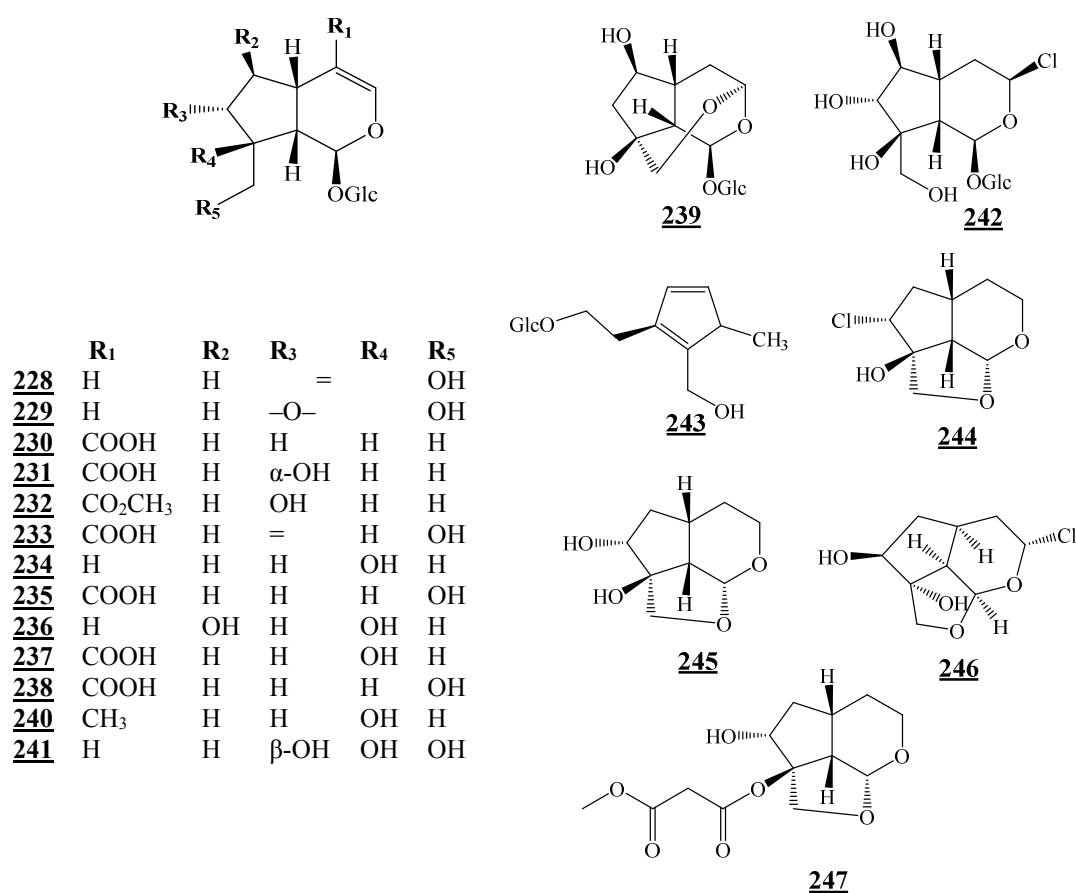


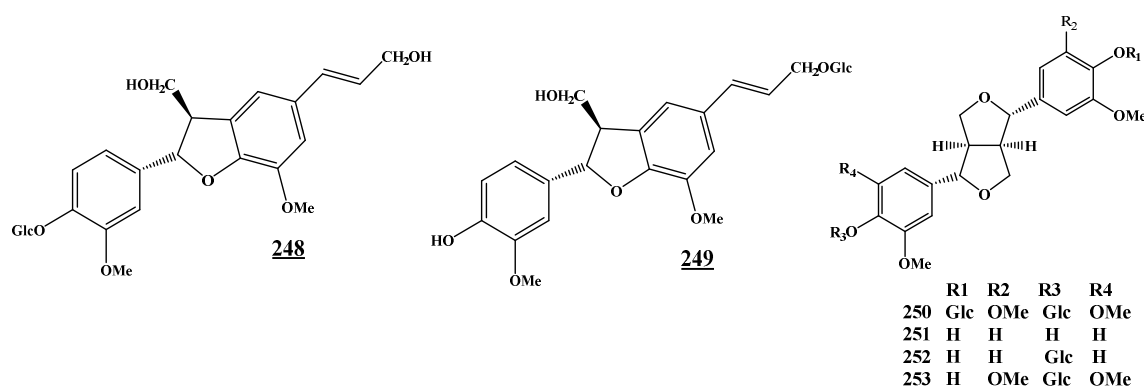
Figure I-14. Structures iridoïdes dans le genre *Cistanche*.

I.2.4.4. Lignanes :

Les lignanes sont des molécules présentes chez la plupart des Orobanchaceae. Celles isolées du genre *Cistanche*, et plus précisément dans les espèces de *C. deserticola* et de *C. tubulosa* (248–253) (tableau I-12). Les squelettes de base de ces composés sont constitués de ditetrahydrofurane et de benzofurane lignanes (Moriya et al., 1995; Moriya et al., 1995).

Tableau I-12. Les lignanes 248-253 isolés du *Cistanche*.

No.	Nom	Plantes	Ref
<u>248</u>	dehydrodiconifery alcohol 4-O- β -D-glucoside	<i>C. tubulosa</i>	Yoshizawa et al., 1990
<u>249</u>	dehydrodiconifery alcohol γ' -O- β -D-glucoside		
<u>250</u>	liriodendrin	<i>C. deserticola</i> <i>C. tubulosa</i>	Jiang et al., 2009 Kobayashi et al., 1985 Yoshizawa et al., 1990 Lei et al., 2001 Li et al., 2008
<u>251</u>	(+)-pinoresinol	<i>C. deserticola</i>	Karasawa et al. 1986
<u>252</u>	(+)-pinoresinol-O- β -D-glucopyranoside	<i>C. tubulosa</i>	Yoshizawa et al., 1990
<u>253</u>	(+)-syringaresinol-O- β -D-glucopyranoside	<i>C. deserticola</i> <i>C. tubulosa</i>	Kobayashi et al., 1985 Yoshizawa et al., 1990 Kobayashi et al., 1985

Figure I-15. Structures lignanes dans le genre *Cistanche*.

I.2.4.5. Benzylglycosides :

Une étude phytochimique réalisée par Lei et al., en 2007 a montré l'isolement et l'élucidation de trois nouveaux benzylglycosides, salsasides A-C (254-256) (figure I-16) à

partir de *C. salsa*. Les caractéristiques structurales de ces glycosides benzyliques sont similaires à celles des phényléthanoïdes isolés de ce genre, sauf que l'alcool benzylique a remplacé le phénéthylol dans l'aglycone.

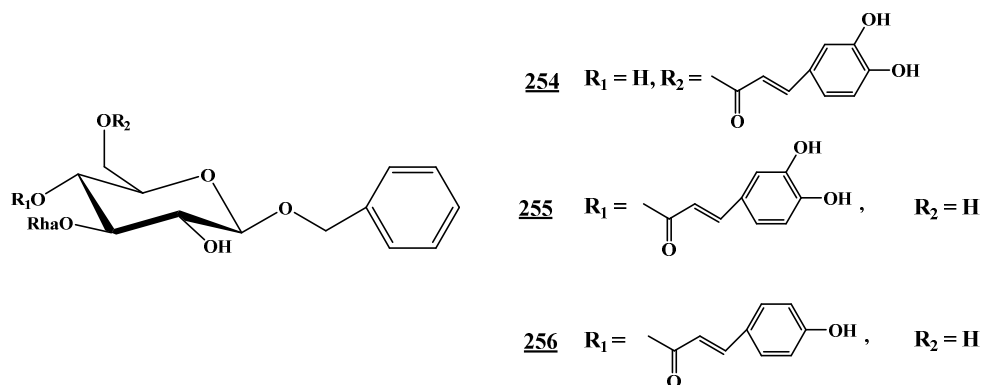


Figure I-16. Structures benzylglycosides dans le genre *Cistanche*.

I.2.4.6. Saccharides :

Occupent une grande proportion des espèces de *Cistanche*, parmi lesquelles les polysaccharides, les oligosaccharides et les galactitols sont les principaux composés bioactifs et font l'objet d'études intensives.

- Polysaccharides (Poly) :

Comprennent principalement le cistan A (Ebringerova et al., 2002), CDA-1A, CDA-3B (Dong et al., 2007), CDP-4, ACDP-2 (Wu et al., 2005) (figure I-17) et SPA (Wang et al., 2015) (figure I-18) sont isolées de *C. deserticola*. La composante glucidique de *Cistanches Herba*, est constituée de plus de dix sucres simples reliés par des liens glycosidiques. La composition du monosaccharide est principalement du : glucose, galactose, rhamnose, arabinose et fructose. Les caractéristiques structurales de Poly, y compris son poids moléculaire, sa répartition du poids moléculaire, ses compositions monosaccharides, ses liens glycosidiques et ses types de liaisons glycosidiques monosaccharidiques, ainsi que les unités de répétition de Poly (Lei et al., 2008).

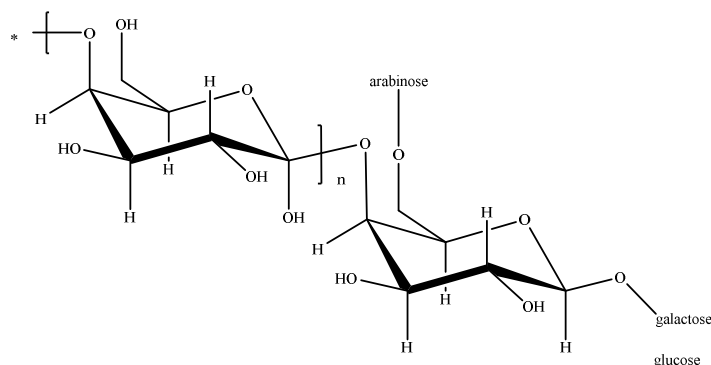


Figure I-17. Structures d'ACDP-2 dans le genre *Cistanche*.

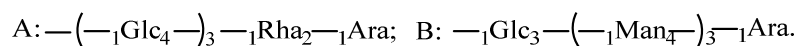
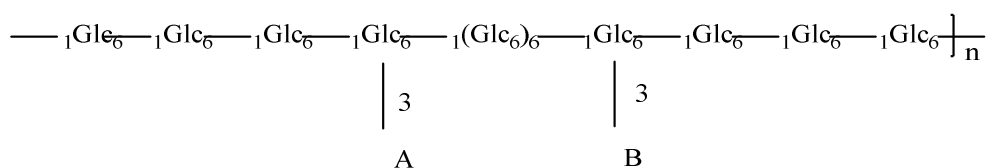


Figure I-18. Structures de SPA dans le genre *Cistanche*.

- Oligosaccharides :

Sont des polymères à chaîne droite ou ramifiée qui sont reliés de deux à dix monosaccharides par liaison glycosidique. Certains dérivés oligosaccharides correspondants sont en fait à des produits PhG après la perte de phénylthol aglycones, y compris cistantubuloses A1/A2 (257), cistansinense A1/A2 (258), cistanoside I (259) et cistanoside F (260) (figure I-19) ont également isolé de *Cistanches Herba* (Karasawa et al., 1986; Xiong et al., 1996; Tu et al., 2007).

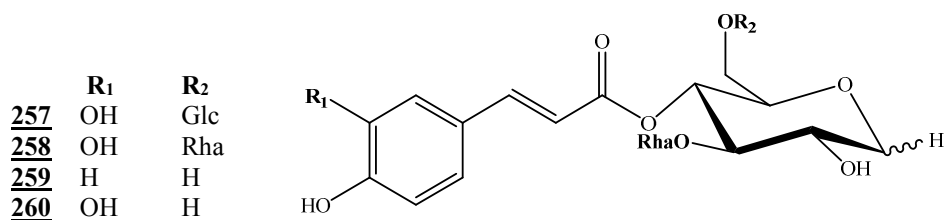


Figure I-19. Structures oligosaccharides dans le genre *Cistanche*.

- Galactitole :

Galactitole est également un indicateur pour évaluer la qualité de *Cistanche Herba* à Hong Kong, en Chine en combinaison avec PhGs. Le galactitol est le produit de réduction du galactose, responsable de la bioactivité laxative (Wang et al., 2015).

I.2.4.7. Métabolites divers :

Les alcaloïdes comme la bétaine, et N,N-diméthyl glycine méthyle ester (Gong et al, 2007), les flavonoïdes (Song, 2013), monoterpénoïdes, acides gras, acides aminés et certains oligo-éléments,... etc. existant dans le genre *Cistanche* (Yoshizawa et al., 1990).

I.2.5. Etude chimique antérieure de l'espèce *Cistanche phelypaea*

Il n'existe aucune étude dans la littérature sur la phytochimie de cette plante à ce jour. Une étude de l'huile extraite de la plante *C. phelypaea* réalisée en 2011 par Ramadan et collaborateur, ont signalé la présence des acides gras, des stérols, hydrocarbure et des tocophérols.

Chapitre 3

Aperçu bibliographique du
genre *Anarrhinum*.

I.3.1. Introduction sur la famille des Scrophulariaceae

Cette famille comprenant environ 220 genres et 2600-4000 espèces sont l'une des plus grandes familles de plantes (Turker et al., 2005). Cette famille est dispersée dans un grand nombre de régions du monde, en particulier dans les régions froides et tempérées de l'hémisphère nord (Figure I-20). Ce sont des plantes herbacées, plus rarement des arbustes ou des arbres (Ozenda., 1958).

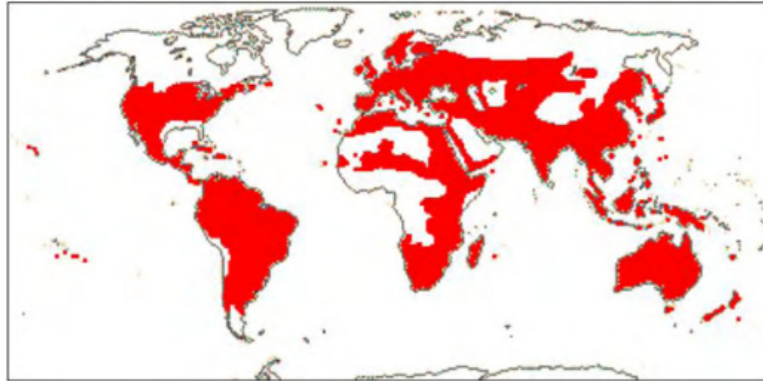


Figure I-20. Répartition géographique des espèces de la famille Scrophulariaceae (Heywood et al., 2007).

I.3.1.1. Classification :

La classification de Valdés (1987) pour cette famille, est très bien représentée avec 99 taxons (à l'exclusion des hybrides) appartenant à 19 genres. Elle est subdivisée en trois sous-familles : Verbascoideae, Scrophularioideae et Rhinanthoideae, qui sont habituellement différenciées par l'estivation des pétales et la disposition des feuilles (Valdés et al., 1987).

Le schéma I-2 présente les différentes sous-familles des Scrophulariaceae.

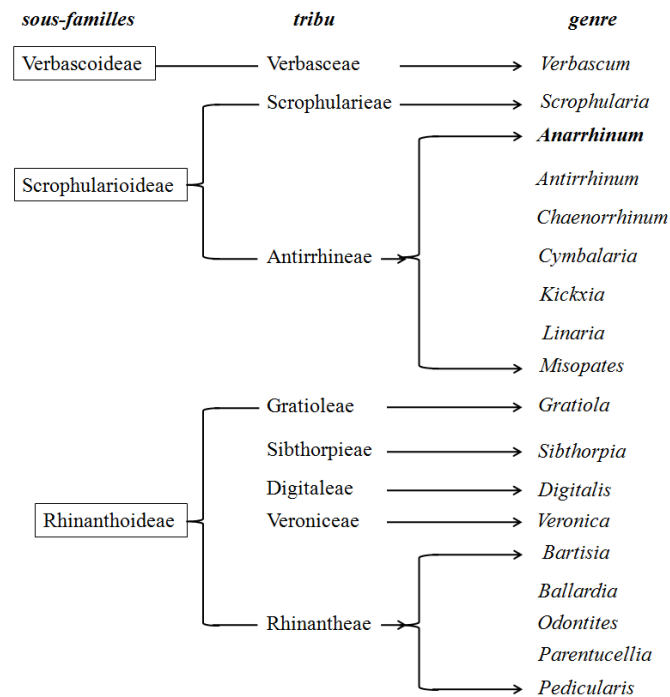


Schéma I-1. Classification de la famille Scrophulariaceae d'après Valdés (1987).

Position systématique : Récemment, un groupe de chercheurs (Angiosperm Phylogeny Group 1998) publiait une nouvelle classification de plantes à fleurs, fondée sur leurs relations phylogénétiques telles que mises en lumière par la génétique (Angiosperm Phylogeny Group.1998). Cette classification attribue 23 tribus à la famille des Scrophulariaceae (Hilliard., 1994). La position systématique des Scrophulariaceae se trouve ainsi représentée par le tableau I-13.

Tableau I-13. Classification systématique des Scrophulariaceae d'après APG (1998) et Hilliard (1994).

Embranchement :	Spermatophyta
Sous-embranchement :	Angiospermae
Classe :	Eudicotyledonae
Sous-classe :	Asteridae
Ordre :	Lamiales
Famille :	Scrophulariaceae
Tribu :	Antirrhinae
Genre :	<i>Anarrhinum</i>

I.3.2. Généralité du genre *Anarrhinum* et de l'espèce *Anarrhinum pedatum* Desf.

Le genre *Anarrhinum* était classé sous la famille Scrophulariaceae, mais actuellement il est considéré comme l'un des Plantaginaceae. Il compte 8 espèces méditerranéennes dont quelques unes en culture ornementale. Corolle prolongée à la base par un éperon grêle, recourbé le long du tube de la corolle. D'après la littérature, le genre *Anarrhinum* est riche en une large gamme de métabolites secondaires, essentiellement des iridoïdes, monoterpènes et de flavonoides (Dawidar et al., 1989 ; Salah El Dine et al., 2011).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'espèce *Anarrhinum pedatum* Desf. qui a été le sujet de notre étude phytochimique et pharmacologique. Il s'agit d'une plante herbacée, à tige florifère unique, corolle éperonnée, à tube allongé, à éperon court, grêle et formant un angle droit avec le tube (figure I-21). Divisions calicinales linéaires aiguës. Bractées linéaires lancéolées plus longues que les fleurs. Feuilles radicales en rosette, oblongues, grossièrement dentées, poilues ; les caulinares subsessiles, profondément palmati-partites à divisions largement linéaires (Quezel et Santa, 1963).

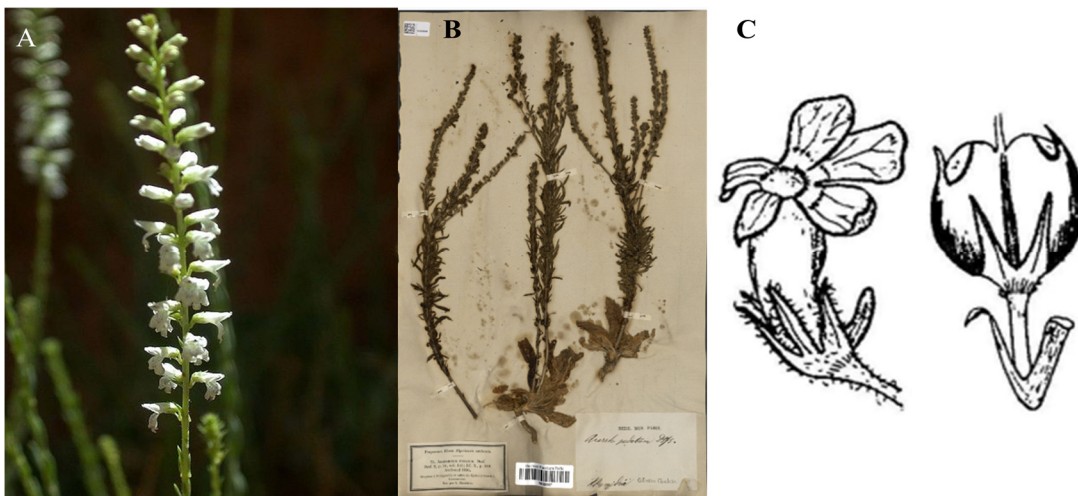


Figure I- 21. A. *Anarrhinum pedatum* Desf. [2], B. Spécimen *Anarrhinum pedatum* Desf. vallée du Djebel el Ouach à Constantine [3] et C. Corolle d'*Anarrhinum pedatum* Desf. (Quezel et Santa, 1963).

I.3.3. Quelques activités biologiques reconnues du genre *Anarrhinum*

Les travaux de Salah El Dine et collaborateurs ont montré que les composés ont été testés pour l'inhibition de la protéase du virus de l'hépatite C (VHC). Les composés 6'-O-cinnamoylmussaenosidic acid (**265**) et 8-O-cinnamoylmussaenosidic acid (**267**) présentaient

une activité modérée, tandis que les composés 6'-*O*-cinnamoyl-8-*O*-(6'''-*O*-cinnamoylglucopyranosyl)mussaenosidic acid (**266**) et 2*E*,6*E*-8-{[(2*E*,6*E*)-8-hydroxy-2,6-dimethylocta-2,6-dienoyl]oxy}-2,6-dimethylocta-2,6-dienoic acid (**261**) présentaient des effets faibles. Aucune activité inhibitrice de la sérine protéase humaine n'a été observée pour l'un de ces composés, ce qui peut inférer la sélectivité vers la protéase virale.

Une étude de calcul de l'arrimage des composés isolés contre la protéase du VHC a été utilisée pour formuler un mécanisme hypothétique de l'activité inhibitrice des composés actifs sur les enzymes testées.

L'espèce *Anarrhinum pubescens* Fresen (Mahran et al., 2018), présente une activité cytotoxique. Les composés 6-*O*-foliamenthoyl-(6'-*O*-cinnamoyl)-antirrhinoside (**268**), pubescensoside (**269**) et antirrhinoside (**270**) ont été soumis à des tests cytotoxiques contre le cancer du poumon humain lignée de cellules oma (A-549); le composé pubescensoside (**269**) a montré une meilleure activité cytotoxique.

I.3.4. Composition chimique du genre *Anarrhinum*

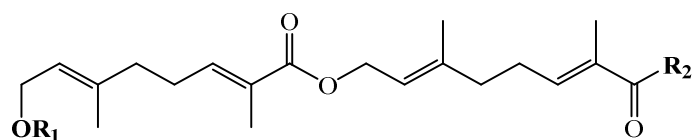
Les espèces du genre *Anarrhinum* ont fait l'objet de peu de recherche phytochimiques, ainsi les principaux constituants en terme de métabolites secondaires du genre *Anarrhinum* essentiellement des monoterpènes et des iridoïdes glycosides (Dawidar et al., 1989; Salah El Dine et al., 2011). Ces substances sont connues pour leurs diverses activités biologiques.

I.3.4.1. Monoterpènes :

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) (Allen et al., 1977).

Les monoterpènes acycliques C₁₀, le géranyl pyrophosphate (GPP), le premier composé issu du mévalonate est le précurseur de cette catégorie de monoterpènes. Dans ce groupe, le géraniol est le plus répandu dans le règne végétal.

L'étude chimique des parties aériennes de l'espèce *Anarrhinum orientale* (Salah El Dine et al, 2011) a permis d'isoler deux monoterpènes acycliques: (2*E*,6*E*)-8-{[(2*E*,6*E*)-8-hydroxy-2,6-dimethylocta-2,6-dienoyl]oxy}-2,6-dimethylocta-2,6-dienoic acid (**261**), et (2*E*,6*E*)-8-{[(2*E*,6*E*)-8-acetoxy-2,6-dimethylocta-2,6-dienoyl]oxy}-2,6-dimethylocta-2,6-dienoic acid (**262**) (figure I-22).



	R ₁	R ₂
261	H	OH
262	COCH ₃	OH

Figure I-22. Monoterpènes isolés d'*A. orientale*.

I.3.4.2. Iridoïdes :

La fonction des iridoïdes dans les plantes a été liée à la plante défense et l'adaptation des insectes ; cependant, ils présentent également une large gamme d'activités pharmacologiques telles que les anti-inflammatoires, antinéoplasiques, antidiabétiques et les effets neuroprotecteurs. Au cours d'une étude continue sur les plantes algériennes, il a été constaté que plusieurs iridoïdes tels que l'asperuloside, l'acide géniposidique et l'iridoïde V1 présentaient une activité antiangiogénique.

Des études phytochimiques réalisées sur *Anarrhinum orientale*. En 1989, Dawidar a fait une recherche chimique des parties aériennes d'*A. orientale*. Cette étude a permis d'identifier deux iridoïdes glycosilés esters, 6-*O*-nerol-8-oyl-antirrinoside (**263**), 6-*O*-nerol-8-oyl-antirrinoside penta-acétate (**263'**) et 6'-*O*-cinnamoyl-antirrinoside (**264**) (Dawidar et al., 1989). Ces derniers produits sont présentés dans la figure suivante (figure I-23).

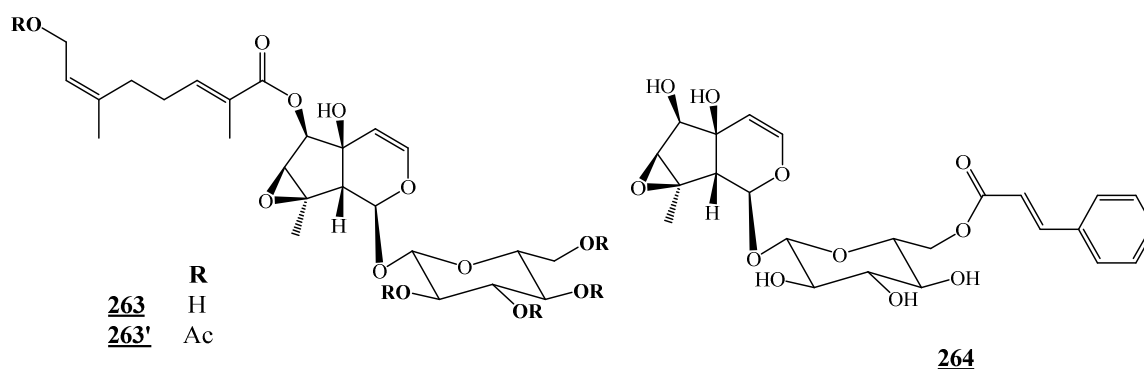


Figure I-23. Trois iridoïdes glycosilés isolés d'*A. orientale*.

Une autre étude supplémentaire réalisée sur le même espèce (Salah El Dine et al, 2011) sur l'extrait méthanolique qui s'avère richement fournie en métabolites secondaires de grande importance, il a séparé et identifié deux nouveaux iridoïdes glycosilés :6'-*O*-

cinnamoylmussaenosidic acid (**265**), 6'-*O*-cinnamoyl-8-*O*-(6'''-*O*-cinnamoylglucopyranosyl)mussaenosidic acid (**266**), ainsi que un connu 8-*O*-cinnamoylmussaenosidic acid (**267**), présenté dans la figure suivante (figure I-24).

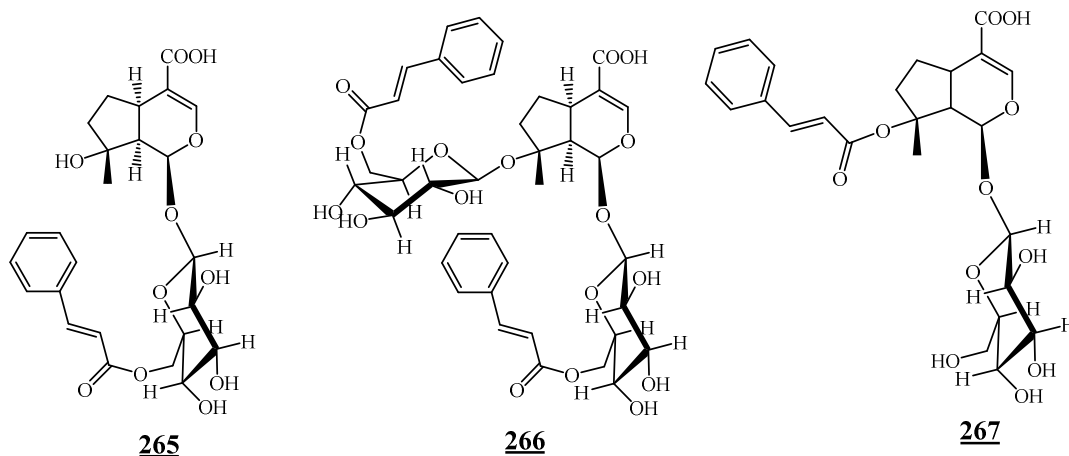


Figure I-24. Iridoïdes glycosylés isolés d'*A. orientale*.

Deux iridoïdes nouveaux appelés 6-*O*-foliamenthoyl-(6'-*O*-cinnamoyl)-antirrhinoside (**268**) et pubescensoside (**269**), ainsi que antirrhinoside (**270**), 6'-*O*-cinnamoyl-antirrhinoside (**271**), 10-hydroxy-antirrhinoside (**272**), ont été isolés de *Anarrhinum pubescens* Fresen, cette plante répondue d'Égypte (Mahran et al., 2018).

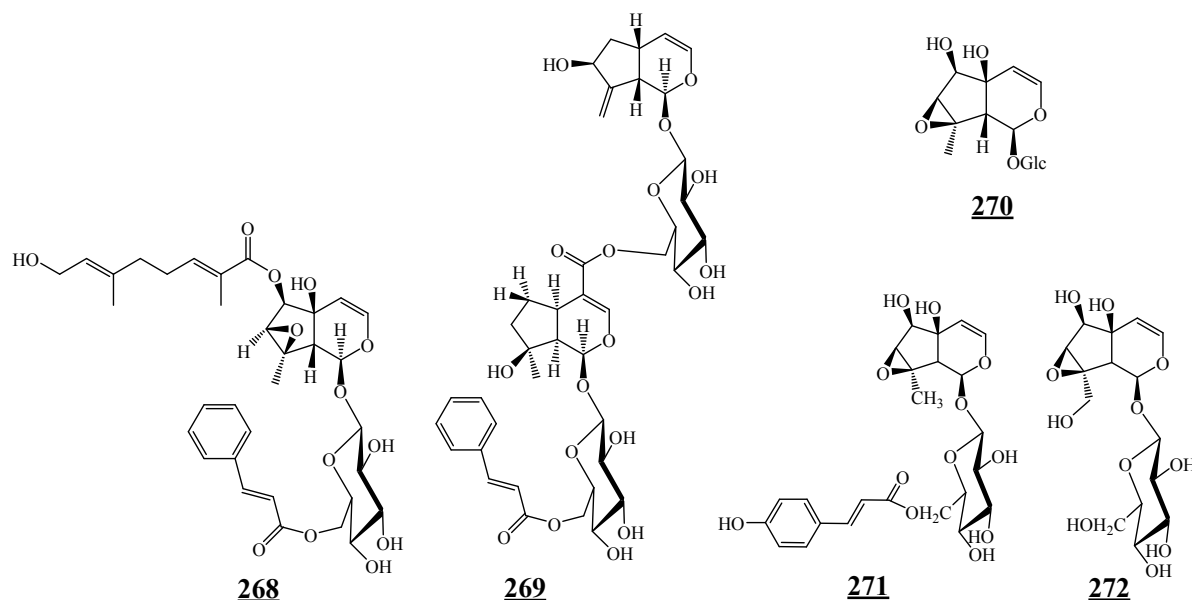
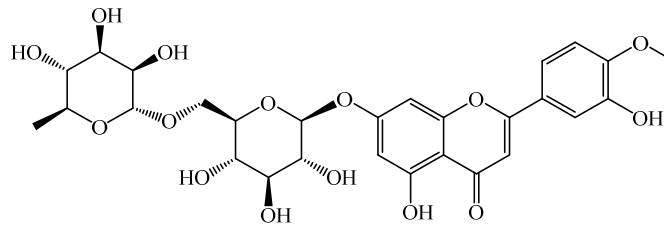


Figure I-25. Iridoïdes glycosylés isolés d'*A. pubescens*.

I.3.3.4.3. Autres composés :

Le composé diosmin (**273**) a été isolé d'*A. pubescens* (Mahran et al., 2018).



273

I.3.4. Travaux antérieur sur l'espèce *Anarrhinum pedatum*

A notre connaissance, il n'existe aucune donnée sur l'espèce *A. pedatum*.

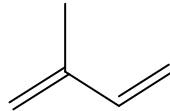
Chapitre 4

Les métabolites secondaires

I.4.1. Les Terpènes

I.4.1.1. Définition :

Ce sont des produits naturels, formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques (Paris et Moysse., 1965).



unités isoprène

I.4.1.2. Classification :

Les terpènes sont tous dérivés de la même entité C5 isoprène, et ils se différencient entre eux par leurs structures.

L'isoprène, qui est un produit naturel, n'est pas invoqué dans le processus biochimique de la formation des terpènes. Deux entités isoprènes biochimiquement actives ont été identifiées : le DMAPP (Diméthylallyl Pyrophosphate ou diméthylallyl diphosphate) et l'IPP (Isopentényl Pyrophosphate ou diphosphate) (figure I-26).

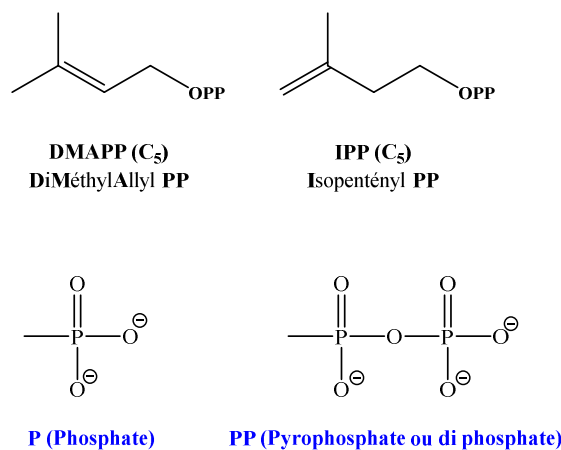


Figure I-26. DMAPP et IPP.

Selon le nombre d'entités C5 isoprènes (C₅H₈)_n, incorporé dans leurs structures, les terpènes sont classés en diverses catégories (figure I-27).

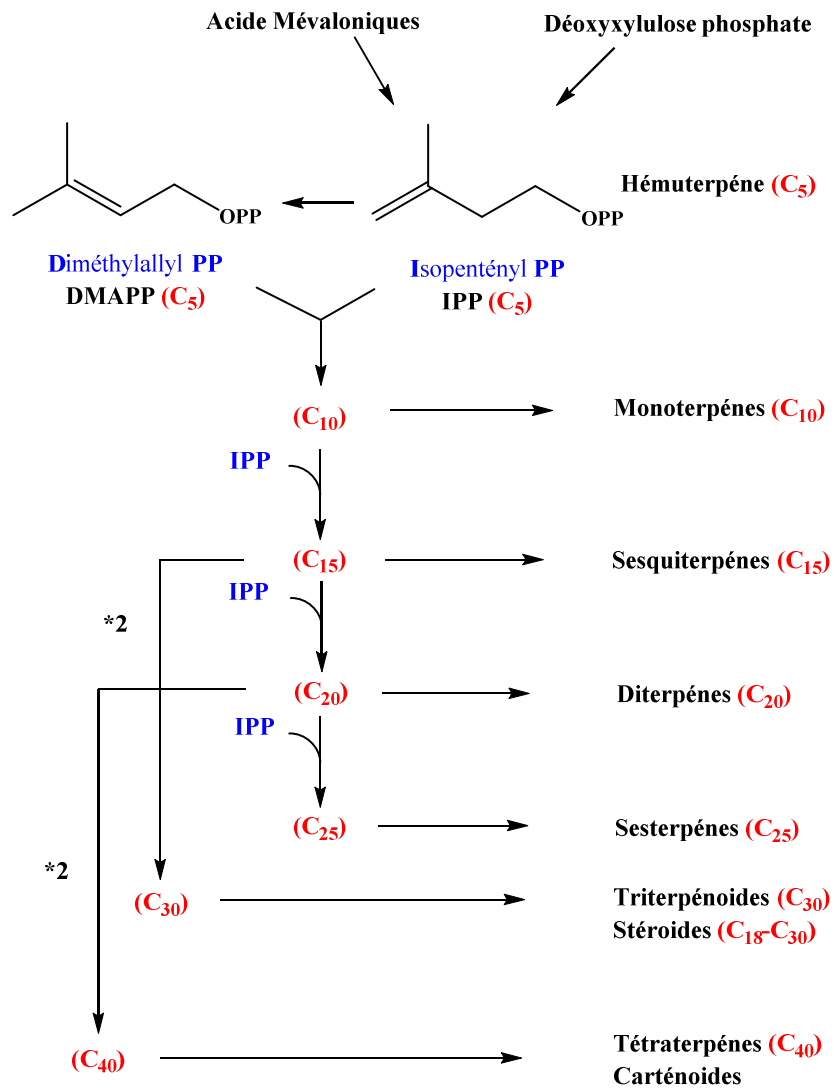


Figure I-27. Classification des terpènes.

I.4.1.2.1. Les Monoterpènes (C₁₀)

Le processus biochimique invoqué lors de la formation du géranyldiphosphat (GPP) est une condensation du DMAPP et de l'IPP la prényl transférase. Ils constituent la majeure partie des huiles essentielles qui sont présentes en quantité chez environ 2000 espèces de 60 familles végétales (Louis., 2004). Cette classe des composées a connu une large extension conduisant ainsi à des systèmes mono/bicyclique. Quelques exemples parmi les plus significatifs de ces systèmes acycliques et cycliques (figure I-28) sont illustrés dans ce qui suit:

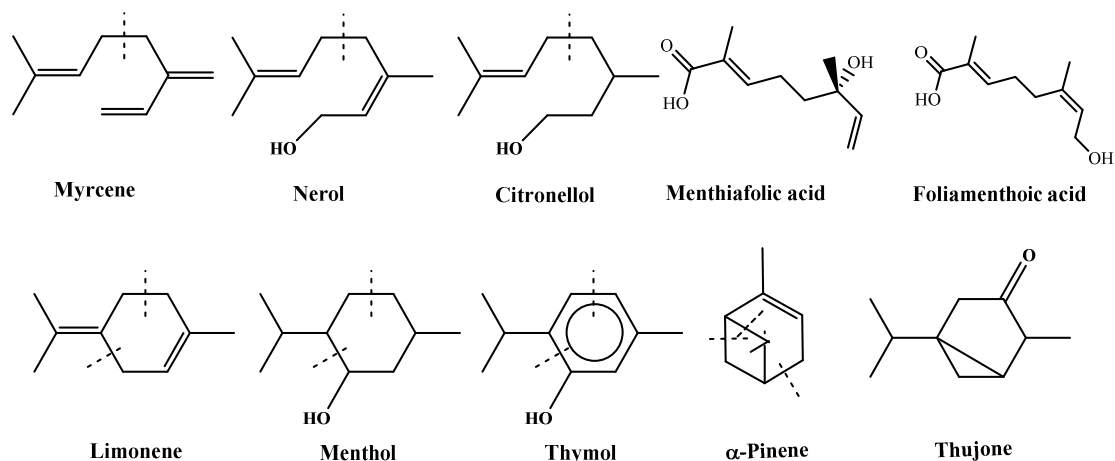


Figure I-28. Quelques exemples de monoterpènes.

I.4.1.2.2. Les Sesquiterpènes (C₁₅)

L'addition d'une unité IPP au géranyl diphosphate conduit via la prényl transférase, au farnésyl diphosphate (FPP), précurseur fondamental des sesquiterpènes. Par rapport à la sous famille des monoterpènes, les sesquiterpènes offrent un plus grand nombre de possibilités de cyclisation, ce qui augmente la diversité structurale de façon considérable.

Ces composés n'ont pas seulement un intérêt de produit chimique et position-points du chemotaxonomique, mais aussi parce que beaucoup d'entre eux possèdent une activité thérapeutique anti-inflammatoire, antitumoral, antimicrobienne, anthelminthique et anti-nourrir (Picman., 1986). Les sesquiterpènes lactones représentent plus de 5000 structures différentes (Fraga., 1998). On les retrouve dans les champignons et autres familles d'angiospermes (ex. Apiaceae) et dans les plantes (ex. Asteraceae, fleurs et feuilles). Dans le règne végétal, les sesquiterpènes lactones appartiennent essentiellement à quatre familles : les Astéracées (ou composées), les Lauracées, les Frullania et les Magnoliacées, et par conséquent dans tous les produits qui en sont dérivés.

Tous les sesquiterpènes lactones présentent en général, une structure commune, un groupement α -méthylène- γ -lactone (figure I-29), qui semble être responsable de leurs activités biologiques.

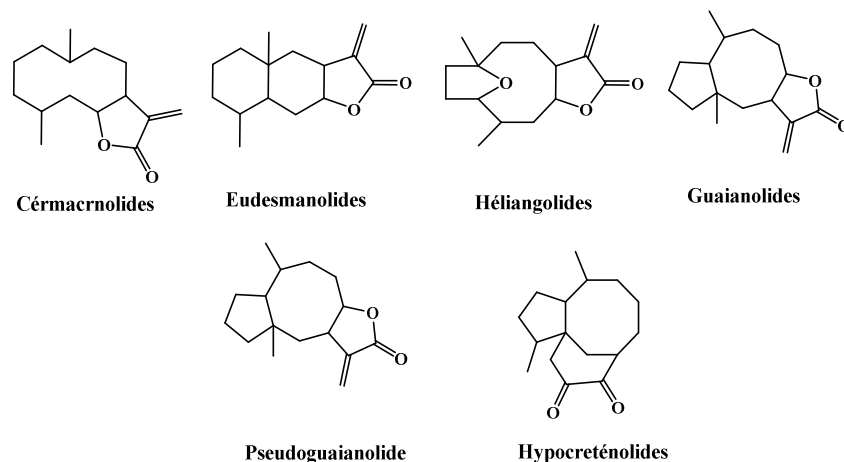


Figure I-29. Structures de quelques lactones sesquiterpènes.

I.4.1.2.3. Les Diterpènes (C20)

Les diterpènes sont surtout répandus chez les végétaux, mais sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins. Ils sont formés par l'union des quatre unités d'isoprènes et sont classés selon leur biogenèse pour formée le Géranylgéranyl diphosphate (GGPP) (Bruneton., 1993). La figure suivante présente quelques structures des diterpenoïdes (figure I-30).

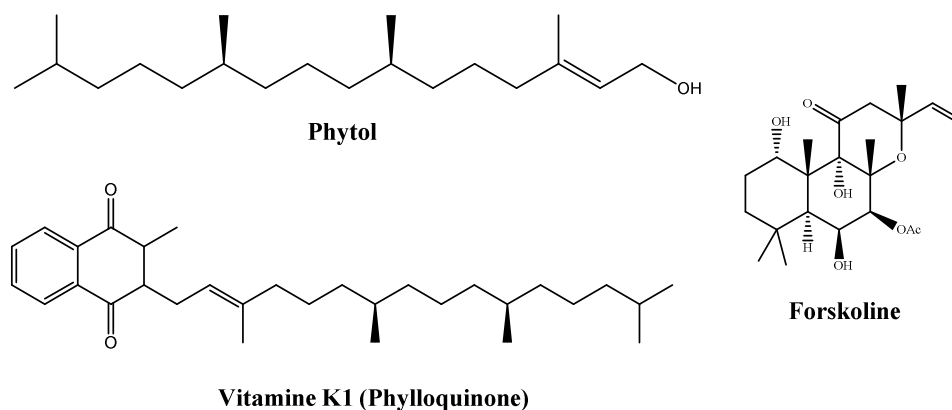


Figure I-30. Quelque exemple de diterpènes.

I.4.1.2.4. Les Triterpènes (C30)

Les triterpènes sont distribués dans le règne végétal et animal, leur formation en C30 provient du simple triterpène le squalène (figure I-31) issu du couplage réductif de deux unités de (FPP) (Bruneton., 1993).

Les triterpènes peuvent être classés en trois groupes : acyclique, tétracyclique, pentacyclique (Bruneton., 199).

I.4.1.2.4.a. Composés aliphatiques (acycliques) :

Tel que le squalène (figure I-31), surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire dans la biogenèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes.

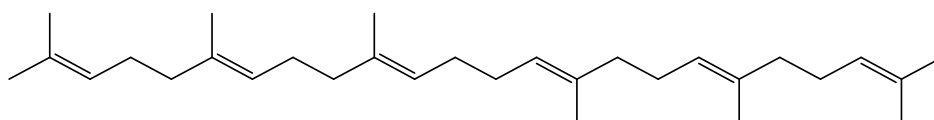


Figure I-31. Structure de squalène.

I.4.1.2.4.b. Composés pentacycliques :

Les sapogénines pentacycliques sont issues des squelettes oléanane, ursane, lupane, friedelane et hopane (figure I-32) (Hostettmann et al, 1995). Ils sont le plus souvent hydroxylés en position 3. Les triterpènes libres très fréquents chez les plantes sont l' α -amyrine et la β -amyrine.

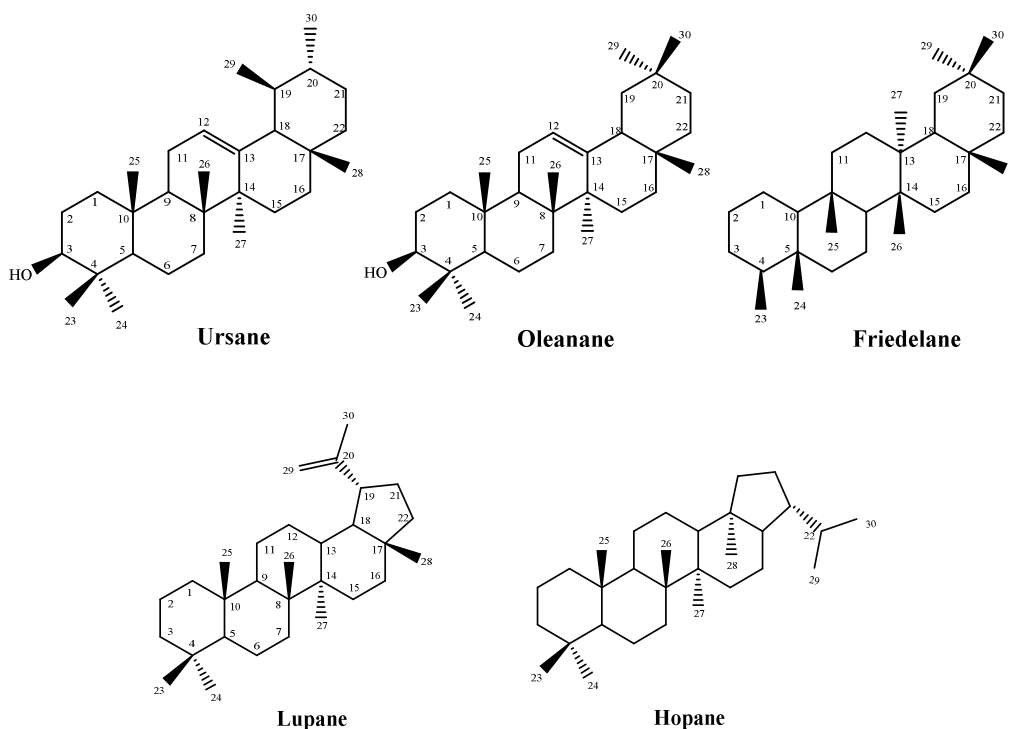
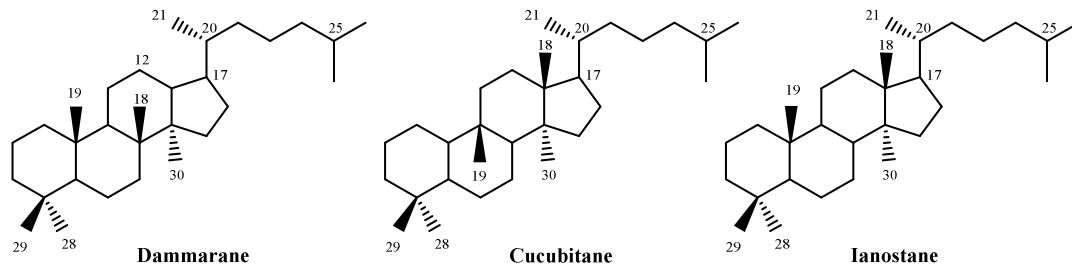


Figure I-32. Les différents squelettes pentacycliques triterpéniques rencontrés.

I.4.1.2.4.c. Composés tétracycliques :

Les tétracycliques dérivent de trois squelettes principaux : dammarane, cucurbitane et lanostane.

**I.4.1.2.5. Les tetraterpènes (C40)**

Ce groupe de composés en C40 (8 unités d'isoprène) est constitué par : Les caroténoïdes, pigments jaunes très répandus chez les animaux et les végétaux, possédant des propriétés particulières. Ces composés jouent un rôle dans la photosynthèse mais en les retrouve également dans des tissus non photosynthétiques de plantes, de champignons et dans les bactéries.

I.4.1.2.6. Les Polyterpènes

Ce sont des macromolécules, composées d'un grand nombre d'unités d'isoprène ; dans le règne végétal ; on trouve :

- Le caoutchouc de poids moléculaire 150 000 environ.
- La gutta, de poids moléculaire 100 000 environ.

I.4.1.2.7. Les iridoïdes**I.4.1.2.7.1. Définition :**

Les iridoïdes sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopenta [C] pyranique à jonction cis, partiellement hydrogéné. Ils ont une fonction éno-éther très caractéristique qui s'ouvre facilement s'il n'y a pas de sucre lié. L'iridodial est un exemple (figure I-34) (Evan., 2002).

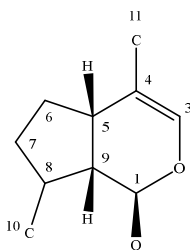


Figure I-33. Structure du squelette iridane.

Les iridoïdes doivent leur nom aux fourmis, *Iridomyrmex*, d'où ont été isolées ces substances en 1956, impliqués dans un mécanisme de défense de ces insectes (Cavilletal., 1956). Le premier iridoïde séparé est l'iridial qui est en équilibre avec la forme lactol (Cavill et al., 1960), représentant la structure de base des iridoïdes.

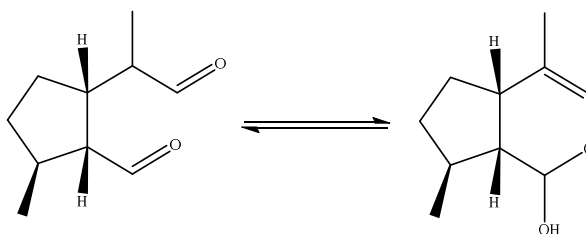


Figure I-34. Structure de l'iridodial.

Malgré que les premiers iridoïdes ont été isolé à partir des fourmis, ce groupe des substances est rare chez les insectes, par contre elles sont particulièrement répandues dans le règne végétal.

Ils sont présents exclusivement dans les dicotylédones part en particulier chez les Asteridae¹ : Dipsacales, Gentianales, Lamiales, Plantaginales, Rubiales, Scrophulariales (Jensen et al., 2002).

I.4.1.2.7.2. Biosynthèse des iridoïdes :

Les iridoïdes, monoterpènes en C₁₀, dérivent du pyrophosphate de géranyl. Nombreuses expériences basées sur le marquage isotopique, ont montré que le 8-hydroxygéraniol préalablement oxydé en dialdéhyde, subit une cyclisation conduisant à l'iridodial ou le 8-épi-iridodial. La glucosylation puis l'oxydation de l'iridodial, donnent le loganoside, précurseur immédiat de la plupart des iridoïdes. Le même processus s'appliquant au 8-épi-iridodial, conduit via le 8-épi-loganoside, aussi bien à l'antirrhinoside qu'à l'aucuboside ou augardénoside (Bruneton., 1999 ; Sampaio-Santosa et al., 2001). Il s'avère

que c'est au niveau du loganoside, que s'opère l'ouverture du cycle (figure I-41), aboutissant aux séco-iridoïdes. Cette ouverture conduit au sécologanoside, précurseur de tous les séco-iridoïdes et de beaucoup d'alcaloïdes, particulièrement les alcaloïdes indoliques (Yamamoto et al., 1999).

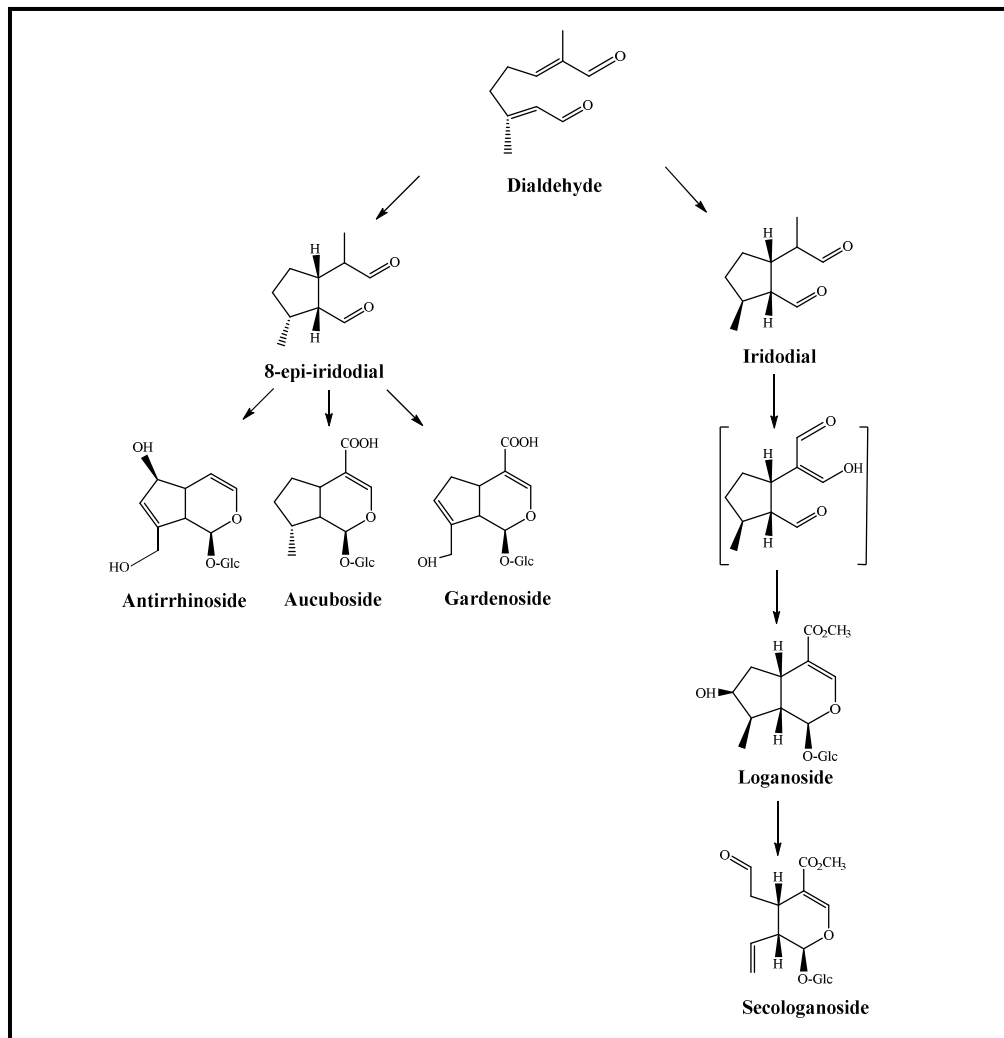


Figure I-35. Biosynthèse des iridoïdes.

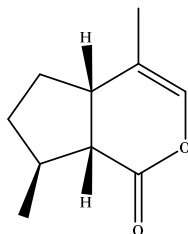
I.4.1.2.7.3. Classification des iridoïdes :

Il y a quatre groupes principaux d'iridoïdes : iridoïdes simples non hétérosidiques et se résumant donc uniquement à la partie génine ou aglycone, iridoïdes glycosides ou glycosilés les plus abondants, séco-iridoïdes et bisiridoïdes.

I.4.1.2.7.3.a. Iridoïdes simples :

Les iridoïdes simples peuvent être alcaloïdiques, polycycliques, esters et éthers internes (Bruneton., 1999). Les structures les plus simples ont été identifiées dans les plantes.

On peut citer l'iridoïde simple appelé népétalactone, constituant odorant majeur d'une plante labiée *Nepeta cataria* L., nommée également herbe à chat en raison de son effet attractif pour les chats (Takeda et al., 1995).



Nepetalactone

Les iridoïdes lactoniques peuvent être subdivisés en deux groupes de types I et II, selon l'orientation régiochimique de la lactone par rapport au noyau cyclopentanique fonctionnalisé (Nangia et al., 1996). Dans le cas des iridoïdes de types I représentés par l'iridomyrmecine et l'isoiridomyrmecine isolés respectivement de *Iridomyrmex humilis* Mayr. Et *Iridomyrmex nitidus* Mayr. (Pavan., 1955 ; Fusc et al., 1955), le groupement carbonyle de la lactone est en position C-3. Dans le cas des iridoïdes de type II comme les composés dihydronepétalactone et isodihydronepétalactone, ce dernier est en position C-1 (Nangia et al., 1996).

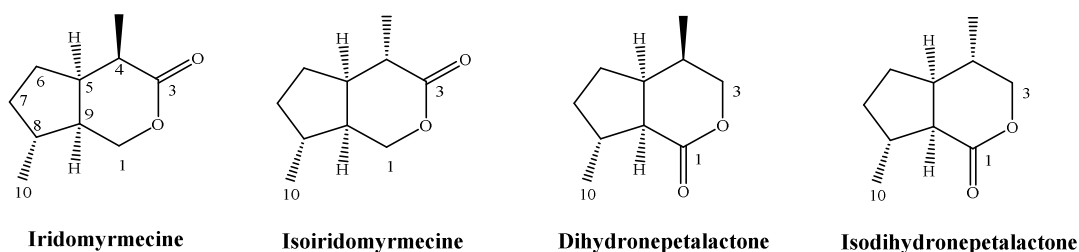
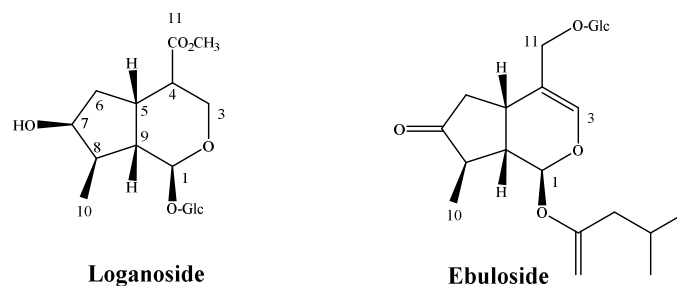


Figure I-36. Quelques exemples des iridoïdes simples.

I.4.1.2.7.3.b. Iridoïdes glycosides :

La majorité des glycosides d'iridoïdes sont des glycosides, la liaison hétérosidique s'établissant entre l'hydroxyle porté par le carbone anomérique du D-glucose et l'hydroxyle en C-1 de la génine, comme dans le loganoside, précurseur immédiat de la plupart des iridoïdes. Cependant mais rarement, la liaison hétérosidique s'établit avec l'hydroxyle en C-11, comme dans le cas de l'ebuloside, iridoïde isolé de la famille Caprifoliaceae (Bruneton., 1999).



Le type de sucre et sa complexité peuvent également varier. Pour l'exemple, le catalpol peut avoir un rhamnopyranosyl porté par le carbone C-6 conduisant au 6-*O*- α -L-rhamnopyranosylcatalpol, isolé de *Scrophularia nodosa* (Philip et al., 2002).

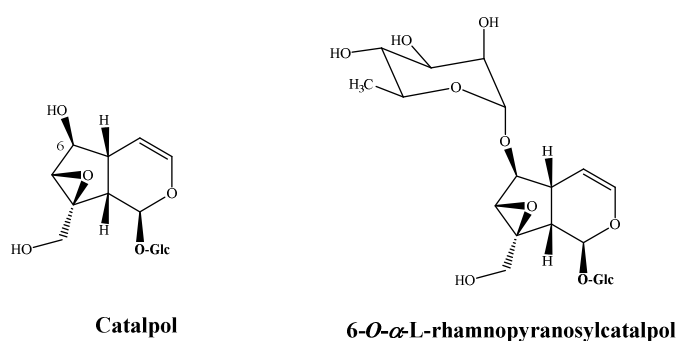


Figure I-37. Quelques exemples des iridoïdes glycosides.

I.4.1.2.7.3.c. Sécoiridoïdes :

Ces composés résultent par l'ouverture oxydante de la liaison C7-C8 de la génine. Les différentes génines se caractérisent par certaines fonctionnalités :

- Présence d'un groupe vinyle en C9 sous forme lactone par exemple le gentiopicroside (Asahina et al., 1936) ou ouverte (sécologanoside) (Battersby et al., 1968 ; Souzu et al., 1996).

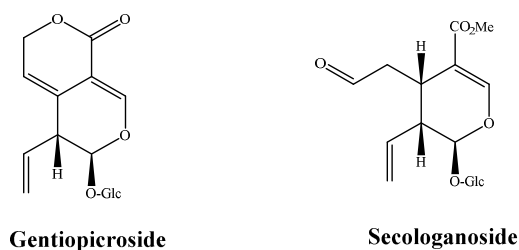


Figure I-38. Exemples de sécoiridoïdes possédant une chaîne latérale vinylique.

- Présence d'un groupement éthylidène (oleoside (Garibold et al., 1968) ou hydroxyéthylidène (10-hydroxyoléoside-11-méthylester (14) (Shen et al., 1990) en C9. Présence d'un acide carboxylique estérifié (oleuropeine (Panizzi et al., 1960) ou non.

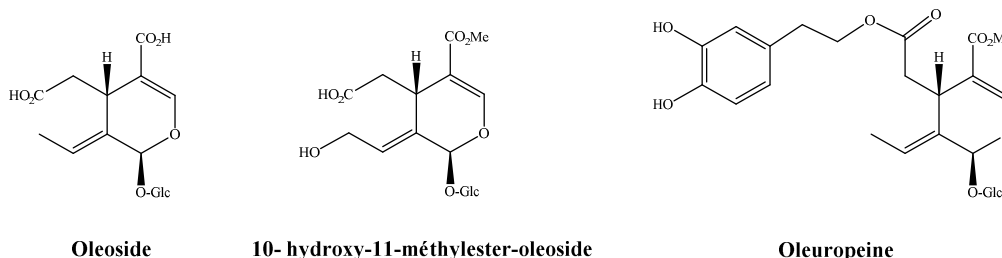


Figure I-39. Exemples de sécoiridoïdes possédant un groupement éthylidène.

- Présence d'une structure tricyclique : par refermeture en C8 via une liaison C–O, comme pour le sécogalioside (Bock et al., 1976) :

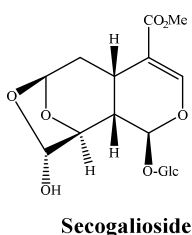


Figure I-40. Exemple de sécoiridoïde possédant une structure tricyclique.

I.4.1.2.7.3.d. Bis-iridoïdes :

Ce type d'iridoïdes est composé de deux molécules iridoïques reliés au minimum par une liaison (généralement une liaison ester). Les deux composés iridoïdes peuvent être liés directement entre eux sylvestroside I (Abdallah et al., 1991) ou par un squelette intermédiaire coelobillardin (Magiatis et al., 2002).

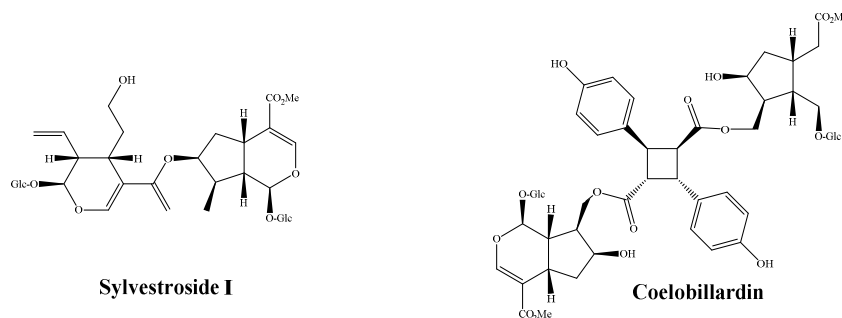


Figure I-41. Exemples de bisiridoïdes.

I.4.1.2.7.4. Activités biologiques des iridoïdes

Les iridoïdes sont souvent présents dans les feuilles de plantes utilisées en phytothérapie et en médecine traditionnelle pour leurs propriétés thérapeutiques antipyrétiques, antitussives, hypotensives et dans le traitement de diverses affections et plaies cutanées.

Certaines plantes à iridoïdes sont enregistrées dans la pharmacopée européenne à titre d'exemple on peut citer :

- L'*Harpagophytum procumbens*, les racines sèches utilisées pour le traitement symptomatique des manifestations articulaires mineures, peuvent contenir jusqu'à 2 % d'harpagoside.
- Les racines sèches de l'espèce *Gentiana lutea* sont utilisées comme stimulant de l'appétit. Elles peuvent contenir jusqu'à 9 % de gentiopicroside.
- Les feuilles sèches de l'olivier (*Olea europaea*, Oleaceae) ont des propriétés hypotensives, hypoglycémiantes et diurétiques. Elles peuvent contenir jusqu'à 9 % d'oleuropéine. Nombreux travaux se sont intéressés aux activités biologiques et pharmacologiques d'iridoïdes et de sécoiridoïdes. Ces travaux ont montré que ces composés possèdent de multiples activités biologiques et plusieurs revues font état d'activités pharmacologiques de type anti-allergique, hypotensif, anti-hépatotoxique, cholérétique, hypoglycémiant, purgatif, anti-inflammatoire, antipasmodique, antitumoral, antiviral et antibiotique (Dinda et al., 2009; Villasenor et al., 2007; Menichini., 2008).

I.4.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal (Dave, 2003), ce sont des métabolites secondaires, caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide (Boizot et al, 2006). L'élément fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique (aromatique), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside.

Ces composés manifestent une grande diversité de structures : quinones, coumarines, acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, stilibénoïdes, lignanes et xanthones. (Jensen., 1991) Ces structures peuvent être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...).

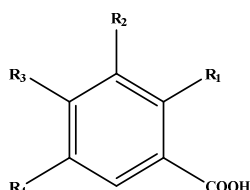
I.4.2.1. Les acides phénoliques

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique.

I.4.2.1.a. Les acides hydrobenzoïques :

Ils sont dérivés par hydroxylation de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1 (tableau I-14) (Sarni et Cheynier, 2006).

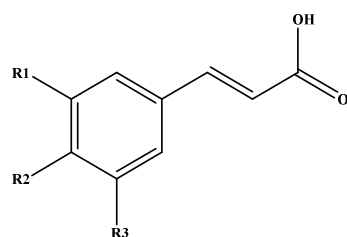
Tableau I-14. Les principaux acides hydroxybenzoïques.



	R₁	R₂	R₃	R₄
benzoicacid (nonphénolique)	H	H	H	H
<i>p</i> -hydroxybenzoicacid	H	H	OH	H
protocatechuicacid	H	OH	OH	H
vanillicacid	H	OCH ₃	OH	H
gallicacid	H	OH	OH	OH
syringicacid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
salicylicacid	OH	H	H	H
gentisicacid	OH	H	H	OH

I.4.2.1.b. Les acides hydroxycinnamiques :

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont l'acide *p*-coumarique (et ses isomères *O*- et *m*-coumariques) et les acides caféique, férulique et sinapique (tableau I-15). Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters ou de glycosides (Sarni et Cheynier, 2006).

Tableau I-15. Les principaux acides hydroxycinnamique.

	R ₁	R ₂	R ₃
cinnamic acid	H	H	H
<i>p</i> -coumaric acid	H	OH	H
caffeic acid	OH	OH	H
ferulic acid	OCH ₃	OH	H
sinapic acid	OCH ₃	OH	OCH ₃
<i>e</i> -anethol	H	OCH ₃	H

I.4.2.1.2. Propriétés thérapeutiques des acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prébiotiques, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est faible. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique, cet acide et l'acide férulique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris (Psotova et al, 2003). L'acide gallique inhibe la formation du cancer oesophagien chez les rats (Hale, 2005) L'acide rosmarinique, est fortement anti-inflammatoire. Les acides phénoliques sont connus aussi pour leurs propriétés antibactériennes (Didry et al, 1982) et antifongiques (Ravn et al, 1988).

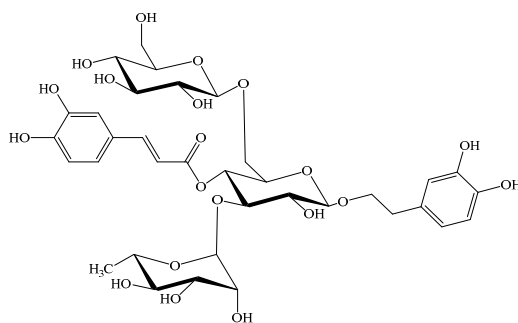
I.4.2.2. Les phenylethanoïdes glycosides

Les composés naturels phenylethanoïdes glycosides (PhGs) ont été un sujet d'intérêt pour les chimistes médicaux donnent leur génial potentiels dans les applications pharmaceutiques et industrielle. Comme leur nom l'indique les structures de base de PhGs sont caractérisées par le fragment hydroxyphénylethyle attachés à un β -glucopyranose par une liaison glycosidique.

Les structures de base sont souvent substituées avec des substituants tels que les acides aromatiques et les divers sucres (ex : rhamnose, xylose, apiose et arabinose) attaché respectivement au résidu de glucose par une liaison ester ou bien par une liaison glucosidique (Fu et al., 2008).

Les phenylethanoïdes glycosides (PhGs) sont solubles dans l'eau, distribués largement dans le règne végétal, la plupart sont isolés à partir de plantes médicinales. Ces composés ne sont pas spécifiques pour un organe et ont été isolé des racines des plantes, écorces, feuilles, parties aériennes (Jiménez et al., 1994).

La majorité des phenylethanoides rapportés à ce jour se trouvent dans les familles : Oleaceae, Plantaginaceae, Lamiaceae et Orobanchaceae (Nazemiyeh et al., 2006). La première référence de la littérature sur les phenylethanoïdes glycosides concerne l'isolement de **Echinacoside** à partir de *Echinacea angustifolia* (Asteraceae) en 1950 (Stoll et al., 1950) mais leurs structures n'ont été déterminées qu'en 1983 (Becker et al., 1982).



Echinacoside

Grace à l'amélioration rapide des technologies de l'isolement, purification et élucidation de la structure presque 200 nouveaux PhGs ont été identifiés jusqu'à 2008 (Fu et al., 2008).

I.4.2.2.1. Activité biologique de PhGs :

Au cours des dix dernières années un grand nombre de PhGs ont été isolés à partir de différentes plantes dont plusieurs ont montré une activité pharmaceutique variée comprenant antibactérienne (Endo et al., 1981; Nishibe et al., 1982; Shoyama et al., 1986; Shoyama et al., 1987; Ravn et al., 1988), neuroprotective, anti-inflammatoire (Fu et al., 2008), antioxydant (Miyase et al., 1991), immunosuppresseur (To et al., 1990), antitumeur, antihypertension, analgésique (Andary et al., 1980; Khan et al., 1992), antivirale (Cheminat et al., 1988), antihépatotoxique (Houghton et al., 1989).

I.4.2.3. Les flavonoïdes

I.4.2.3.1. Généralités :

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, sont convertis en flavonoïdes (Agrawal et al., 1989).

Flavonoïdes (de flavus, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C₆-C₃-C₆). Le pont en C₃ entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (figure I-42).

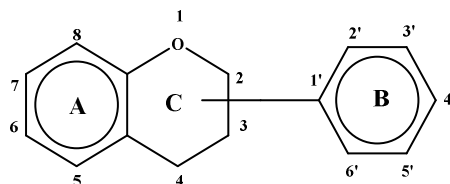


Figure I-42. Structure de base des flavonoïdes.

I.4.2.3.2. Classification :

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (figure I-43), nous citerons les principales : anthocyanes, flavanols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols (Harborne, 1988).

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (Bruneton., 1999).

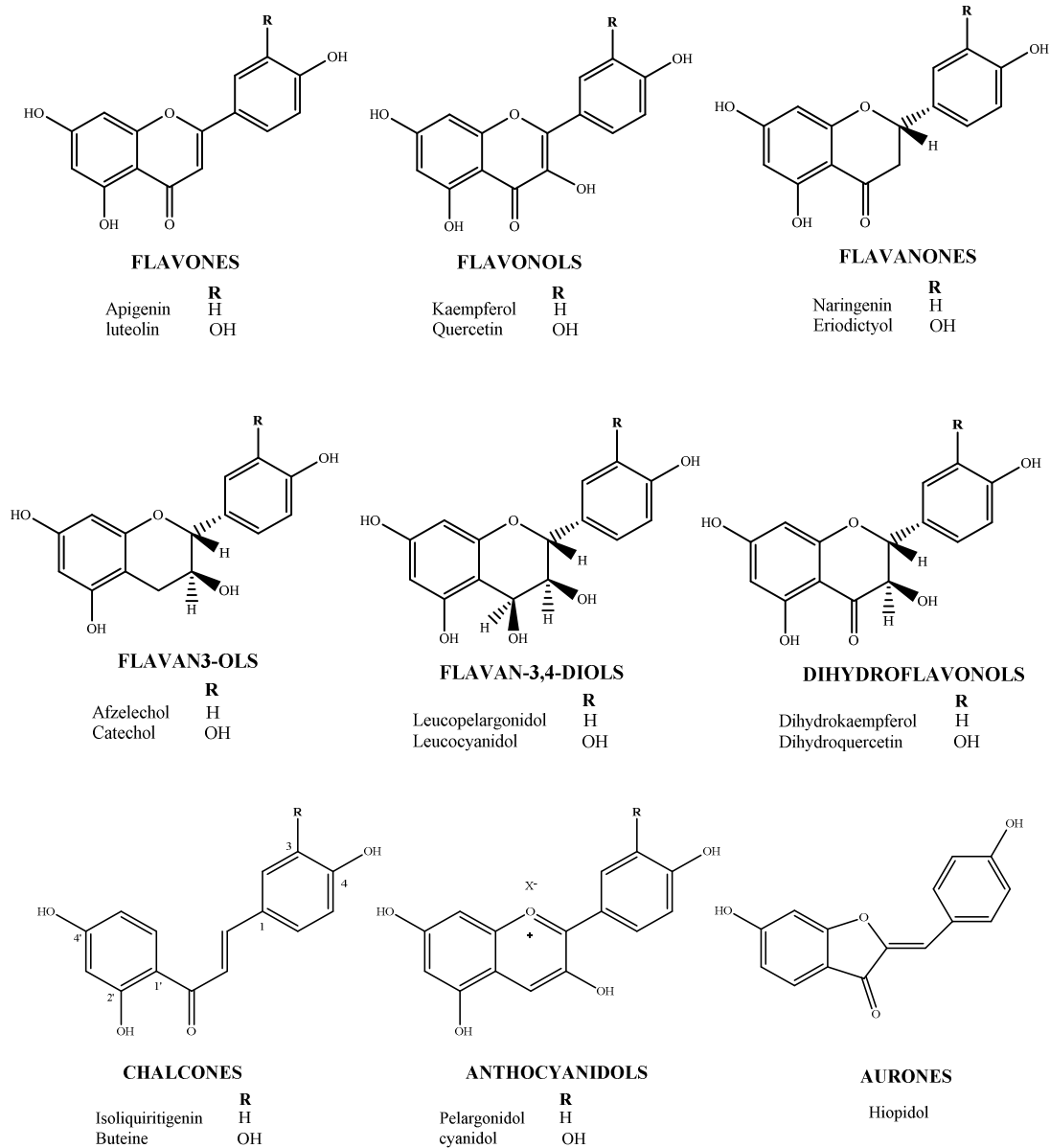


Figure I-43. Différentes classes de flavonoïdes.

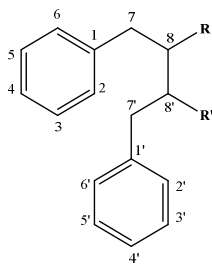
I.4.2.3.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes :

Connus pour leurs multiples rôles, les composés flavoniques ont attirés l'attention d'un grand nombre de chercheurs de différentes disciplines (biologistes, chimistes, pharmaciens et médecins) où on leur reconnaît des activités anti-tumorales (Stavric et al, 1992), anti-carcinogènes (Das et al, 1994), anti-inflammatoires (Bidet et al, 1987), hypotenseurs et diurétiques (Bruneton, 1993), antioxydantes (Aruoma et al, 1995).

I.4.3. Les lignanes

I.4.3.1. Définition :

Le terme Lignane a été inventé par Haworth en 1936 pour décrire une groupe de dimères de phénylpropanoïdes (Umezawa., 2003; Willfor et al., 2006). Les lignanes sont des composés naturels dimères dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phényl propane (liaison C8-C8').



Les lignanes sont des produits du métabolisme secondaire produit par plusieurs plantes pour servir de molécules de défense contre les prédateurs.

I.4.3.2. Diversité structurale des lignanes

Huit groupes structuraux fondamentaux sont distingués, les plus simples sont les composés à squelette dibenzylbutane (liaison 8-8'). Leur éventuelle cyclisation peut conduire à d'autres types de lignanes (Umezawa 1990) (figure I-44).

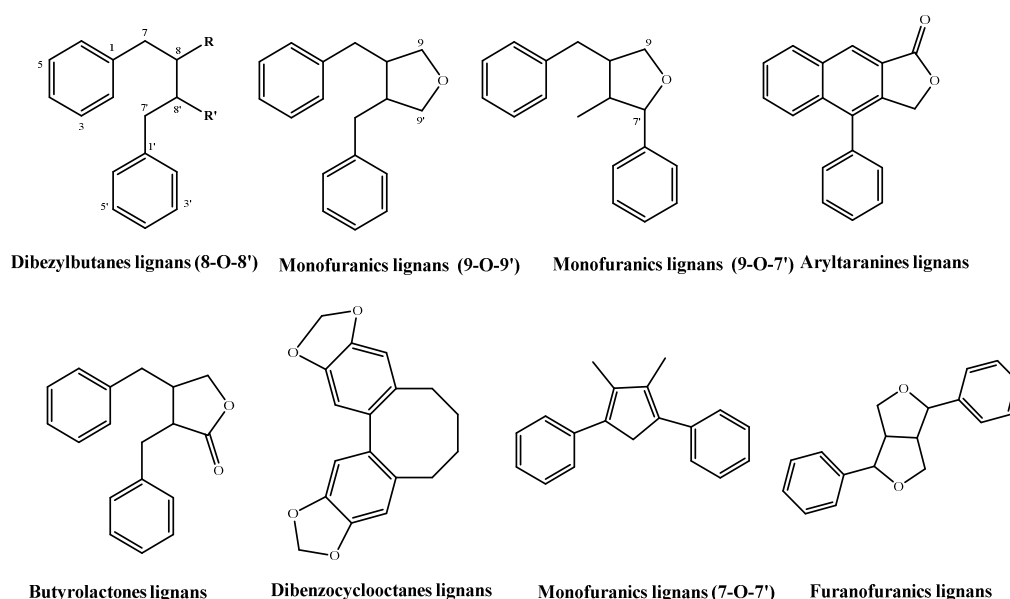


Figure I-44. Différents groupes structuraux fondamentaux des lignanes.

I.4.3.3. Intérêts pharmacologiques des lignanes

Les lignane jouent un grand rôle dans le traitement de plusieurs maladies, les plantes riches en lignanes sont utilisées pour traiter diverses maladies comme le cancer (Pelucchi et al., 2004), l'arthrite, l'ulcère et les douleurs (Chi 2001). Ces composés possèdent une large gamme d'activités biologiques incluant : l'activité antitumorale, anti-oestrogénique, bactéricide, antifongique et anti-inflammatoire (Raffaelli et al., 2002), cytotoxique (Tandon et al., 1976), antivirale (Cos et al., 2008) et antimicrobienne (Saleem et al., 2005).

La recherche scientifique a aussi démontré que les lignanes sont transformés par les bactéries intestinales en composés qui protègent des maladies hormonales. De nombreux composés appartenant à cette famille, font l'objet d'exploitation dans un but thérapeutique, par exemple : La podophyllotoxine est utilisé pour le traitement du condylome.

PARTIE II

Matériel et méthodes

Chapitre 1

Extraction, séparation et
purification des plantes

II.1.1. Matériel végétale

Le matériel végétal étudié a été récolté en Algérie et identifié par Kamel Kabouche et Prof. Gérard De Bélair (Faculté de sciences, Université d'Annaba Algérie). Un échantillon a été déposé au laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST) (SBR.09.15) pour l'espèce *Salvia buchananii*, (CT.03.12) *Cistanche phelypaea* et (APD.05.16) pour l'espèce *Anarrhinum pedatum*.

II.1.1.1. *Salvia buchananii* Hedge.

Les racines de la plante *Salvia buchananii* ont été collectées à Chaabet-Ersas Constantine, en Septembre 2015, après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, 950 g du matériel pulvérisé ont été obtenus.

II.1.1.2. *Cistanche phelypaea* (L.)

La plante entière (tige, feuilles et fleurs) *Cistanche phelypaea* a été collectée au mois de Mars 2012 dans la région de Ghardaia. Après séchage et broyage, la poudre obtenue est pesée pour obtenir 4 kg du broyat.

II.1.1.3. *Anarrhinum pedatum* Desf.

Les parties aériennes de la plante *Anarrhinum pedatum* ont été collectées à Djbel El Ouehch-Constantine, en Mai 2016. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, 2 kg du matériel pulvérisé a été obtenus.

II.1.2. Techniques chromatographiques

II.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale et/ou en phase inverse sur des plaques d'aluminium ou en verre (Merck) : en phase normale, Silicagel 60 F₂₅₄, 0.20 mm thickness) (Merck) ou en phase inverse, RP 18 F_{254S}, 0.20 mm (Merck).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire, tertiaire ou quaternaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Dans notre cas, les systèmes de

solvants utilisés pour les CCM en phase normale sont : *n*-Hexane-CHCl₃, CHCl₃-MeOH, CHCl₃-MeOH-H₂O, *n*-BuOH-CH₃COOH-H₂O, CHCl₃-MeOH-H₂O-*i*-PrOH et en phase inverse MeOH-H₂O.

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant la révélation par un révélateur approprié, le réactif utilisé pour le présent travail est le sulfate de cérium (IV) (une solution composée de 4 g de Ce(SO₄)₂, à 175 mL d'eau distillée).

II.1.2.2. Chromatographie d'exclusion

Les chromatographies d'exclusion ou filtration sur gel ont été réalisées comme étapes de fractionnement visant à éliminer des pigments. Elles ont été effectuées sur Sephadex® LH-20 (40-70 μm, l'élution est réalisée par le méthanol au débit 1.0 mL/min). Les échantillons à séparer ont été introduits sous forme liquide après dissolution dans un volume d'éluant le plus petit possible et éventuellement filtration. Le suivi des séparations et le rassemblement final des fractions ont été faits sur la base d'analyses par CCM. Les fractions ont été récoltées par un collecteur automatique RediFrac (Pharma Biotech).

II.1.2.3. Chromatographie sur Colonne Flash (CCF)

Une certaine séparation a été effectuée avec Biotage® Isolera® Spektra (figure II-1) pour le système de purification par éclair afin d'améliorer les fractions et la pureté des composés avec détection λ et analyse spectrale PDA à 254 et 320 nm. La taille de la cartouche, en fonction de la quantité du mélange chargé, est indiquée au tableau II-1.



Figure II-1. Biotage® Isolera® Spektra.

Tableau II-1. Les différentes tailles des cartouches utilisées pour les colonnes flash avec les débits des solvants adaptés.

Type Colonne flash	Dimensions (mm)	Colonne Volume	Débit prescrit (mL/min)	Cartouches	Débit (mL/min)	Poids silice(g)	Masse de l'échantillon à déposer (mg)
Biotage SNAP Ultra 10 g	21 x 55	17 mL	10-50	SNAP Ultra 10 g	10-20	1.5	100-500
Biotage SNAP Ultra 25 g	30 x 72	45 mL	20-100	SNAP Ultra 25 g	15-40	5.5	250-1250
Biotage SNAP Ultra 50 g	39 x 81	85 mL	30-150	SNAP Ultra 50 g	30-50	14	500-2500
Biotage SNAP Ultra 100 g	39 x 157	164 mL	30-150	SNAP Ultra 100 g	30-50	14	1000-5000
Biotage SNAP Ultra 340g	71 x 168	582 mL	65-325	SNAP Ultra 340g	65-120	57	3400-17000

II.1.2.4. Chromatographie Centrifuge à haute performance (CPCHP)

Basée sur une technique de chromatographie de partage liquide/liquide, la chromatographie de partage centrifuge (CPC) utilise le principe de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles, préparées par mélange de deux ou plusieurs solvants ou solutions. Une phase est maintenue stationnaire par une force centrifuge, l'autre pompée à travers, joue le rôle de phase mobile permettant ainsi des échanges entre les deux phases.

Grâce à la force centrifuge exercée par la rotation du rotor, la phase stationnaire est retenue sur la partie extérieure de la cellule. La pompe permet de faire passer la phase mobile à travers la phase stationnaire, permettant l'échange entre les deux phases. Lorsque la phase inférieure (souvent la phase aqueuse) est la phase stationnaire, la phase mobile (souvent la phase organique) est pompée en mode ascendant dans la cellule. Inversement lorsque la phase supérieure est la phase stationnaire, la phase mobile est pompée en mode descendant. Cela permet de faire varier la phase mobile en fonction des composés à séparer.

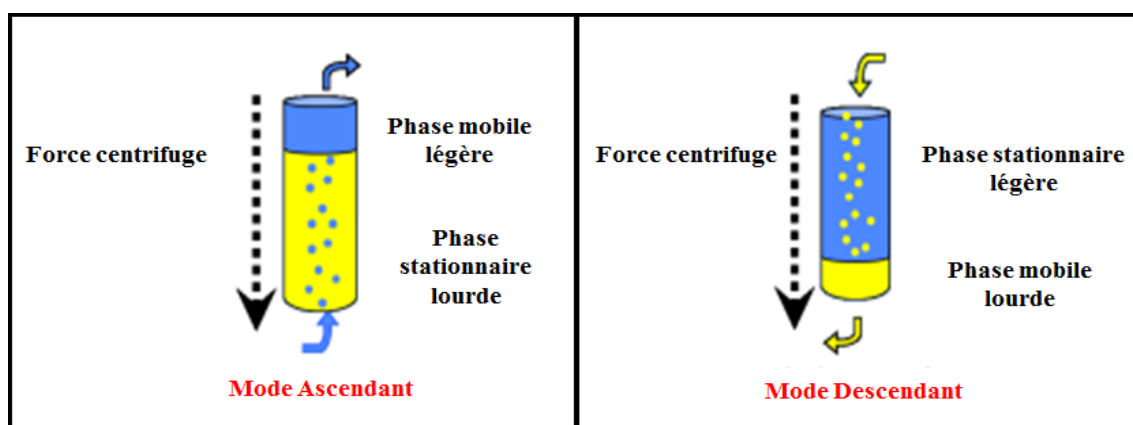


Figure II- 2. Représentation schématique d'une cellule en mode ascendant et descendant.

HPCPC a été effectué sur un appareil CPC240 EverSeiko (Everseiko Co., Japan), équipés de 3136 cellules (ϕ 15 mm et 240 mL), un rotor de 240 mL réglé à la vitesse de rotation de 700 rpm, éluées avec des mélanges de solvants sélectionnés avec précision sur la base de la composition chimique de l'échantillon. Les fractions ont été recueillies par un collecteur automatique RediFrac (Pharma Biotech), et rassemblées selon les résultats des analyses par CCM.



Figure II- 3. Système de CPCHP.

II.1.2.5. Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (CLHP)

Les analyses CLHP ont été effectuées à l'aide d'une chaîne chromatographique Dionex, munie d'une pompe Shimadzu LC-8A, d'un injecteur Shimadzu et d'un détecteur Shimadzu RID-10A. La séparation a été réalisée sur une colonne C18 μ -Bondapak (30 cm x 7,8 mm, 10 μ m Waters débit de 2,0 mL / min). Les mélanges MeOH-H₂O ont été utilisés comme phases mobiles.

II.1.3. Méthodes physico-chimique

II.1.3.1. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des molécules a été mesuré sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda = 589$ nm) dans une cuve de 10 cm à température ambiante. Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$, exprimé en degrés, est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D = 1000 \cdot \alpha / l \cdot c$$

(α : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre, l : longueur, en dm, de la cuve de mesure, c : concentration de la molécule en solution en g/L).

II.1.3.2. Spectrométrie Ultra-violette-visible (UV)

Les spectres UV des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre du type Perkin–Elmer–Lambda, double faisceau permettant des lectures directes contre témoin. Les mesures se font dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm.

II.1.3.3. Spectrométrie de masse (MS)

Les analyses MS et MSⁿ (mode positif et négatif) ont été obtenues à l'aide d'un spectromètre LCQ Advantage (Thermo Finnigan, USA) équipé d'un analyseur de piège ionique et d'un logiciel Xcalibur 3.1. Toutes les molécules analysées ont été solubilisés dans le MeOH puis diluées à 10-20 µm/mL. L'injection se fait grâce à une seringue de 500 µl, avec un débit de 5 µl/min.

HR-ESI-MS a été réalisé à l'aide d'un nanosystème LC-MS/MS, d'un module UPLC nanoAcquity et d'un spectromètre Q-TOF de première qualité équipé d'une source d'ions nanoélectrospray (Waters-Milford, MA, USA) appareil de masse pour effectuer une correction d'étalonnage en temps réel.

II.1.3.4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN- ¹H et ¹³C) ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER Advance 250 et sur BRUKER DRX-500 (¹H à 500 MHz et ¹³C à 125 MHz) et à BRUKER DRX-600 (¹H à 600 MHz et ¹³C à 150 MHz) équipé d'une cryoplateforme.

Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant deutéré CD₃OD. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

Les programmes de séquences impulsionsnelles standard fournies par BRUKER ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles : COSY ¹H-¹H courte distance (²J, ³J), HSQC-*J* modulé ¹H-¹³C direct (¹J), HMBC ¹H-¹³C (longue distance (²J, ³J, ⁴J), NOESY¹H-¹H ou ROESY ¹H-¹H (couplage à travers l'espace).

II.1.3.5. Analyse statistique

Les résultats d'activité cytotoxique on exprimé en moyenne ±SD d'analyse en trois essais. Les valeurs de CI₅₀ (Concentration d'inhibition à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)], les comparaisons

multiples et la détermination des taux de signification sont faits par le test "student's t-test". Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil du $p < 0.05$.

II.1.4. Analyses GC et GC/MS

II.1.4.1. Analyse GC :

L'huile essentielle de l'espèce *Salvia buchananii*, a été analysée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett Packard 6890, équipé du FID et d'une colonne capillaire HP-5MS (5% phénylméthylpolysiloxane) de (30m x 0.25 mm ; épaisseur de film 0.25 μm). La température du four étant programmée de 60–275°C à une vitesse de 4°C/min, avec une température d'injection et détection de 280°C, et un volume injecté de 0,1 mL. Le gaz vecteur étant l'Hélium avec un débit de 2 mL/min. le mode d'injection est un mode split (rapport de fuite : 1/50).

II.1.4.2. Analyse GC/MS :

L'analyse GC/MS a été effectuée sur un appareil Hewlett Packard 6890 muni d'un détecteur masse couplé du type Hewlett Packard 6890, équipé du FID et d'une colonne capillaire du type HP-5MS (5 % méthylphénylpolysiloxane), de (30 m x 0.25 mm. épaisseur de film 0.25 μm). Les conditions opératoires sont les mêmes pour les analyses GC (la colonne, la température du four, le débit et le gaz vecteur). Les paramètres MS étaient :

- Potentiel d'ionisation : 70 ev.
- Résolution : 1000.
- Température de trappe d'ions : 200°C.

II.1.4.3. Identification des composants de l'huile essentielle de *S. buchananii* Hedge.

Les composants de l'huile essentielle de *S. buchananii* ont été identifiés en comparant leurs indices de rétention (IR), relatifs aux n-alcanes C₉ -C₁₇, avec des composés de références dans la littérature, et confirmés par GC-MS en comparant leurs spectres de masse avec ceux des substances de référence (McClafferty et al., 1991, Adams, 2007).

II.1.5. Extraction, purification et hydrolyse

II.1.5.1. *Salvia buchananii* Hedge.

II.1.5.1.1. Extraction solide-liquide à partir des racines de *S. buchananii* (SBR) :

Une extraction préliminaire a été réalisée sur 950 g de poudre des racines par quatre extractions successives à l'aide de solvants de polarité croissante : *n*-hexane, chloroforme, CHCl₃-MeOH (9 : 1 v/v) et méthanol (100 %). Les quatre extraits obtenus sont: 1.76 g (SBR_{Hex}), 4.98 g (SBR_{CHCl₃}), 3.75 g (SBR_{C-M}) et 24.80 g (SBR_{MeOH}). Le protocole d'extraction est récapitulé dans le schéma ci-après :

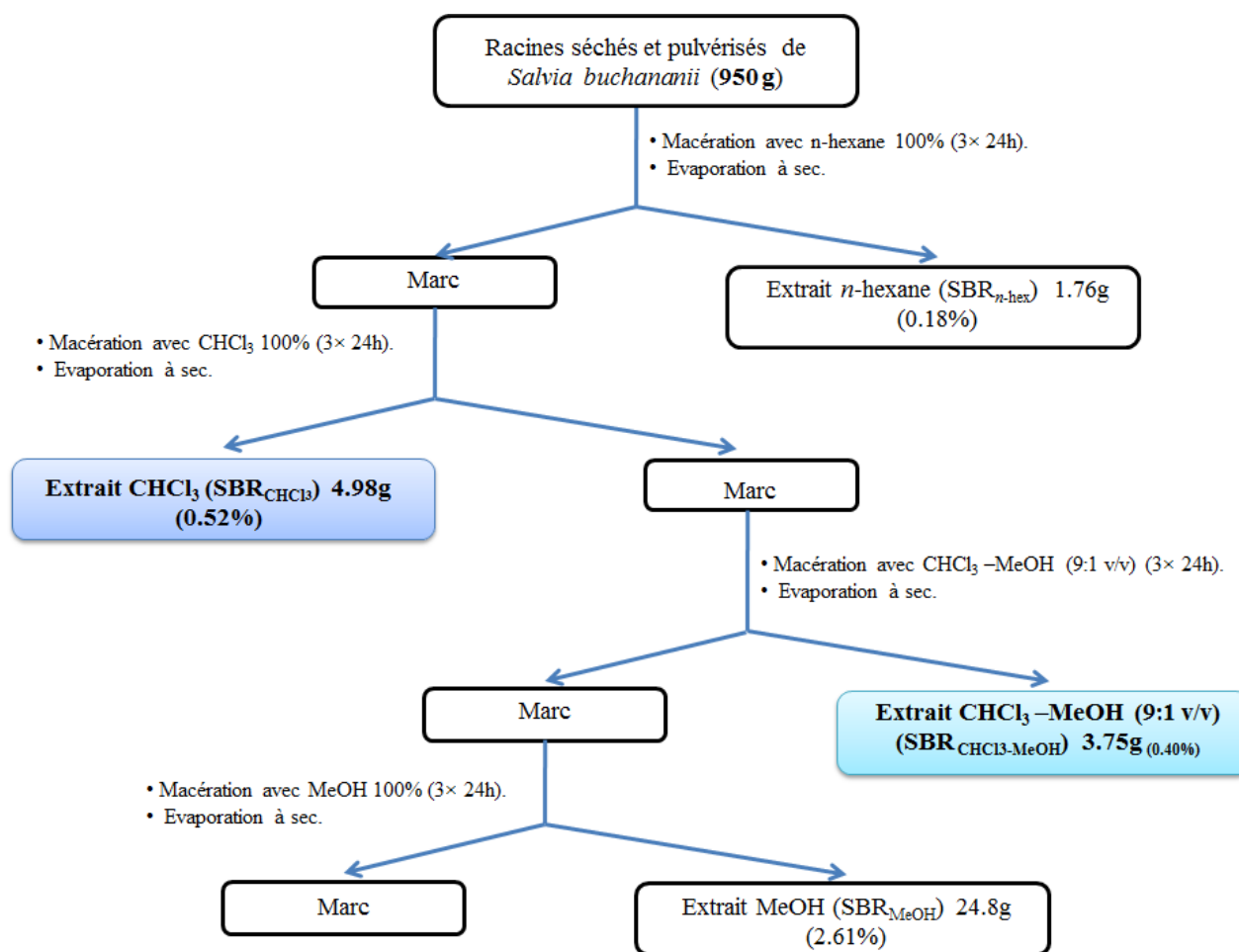


Schéma II- 1. Différentes étapes de l'extraction des racines de la *Salvia buchananii*.

Les extraits résultants sont passés en CLHP couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS), pour déterminer leur richesse (figure II-4 - II-5).

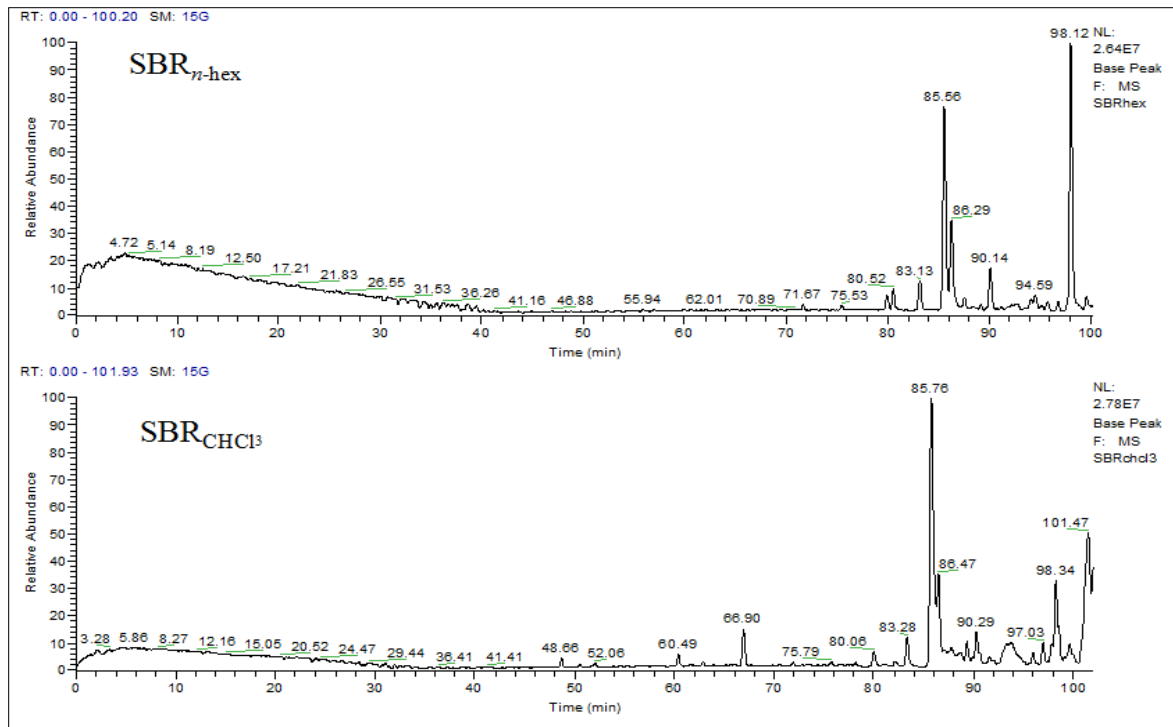


Figure II- 4. Chromatogramme LC-MS en mode positive des extraits SBR_{Hex} et SBR_{CHCl_3} .

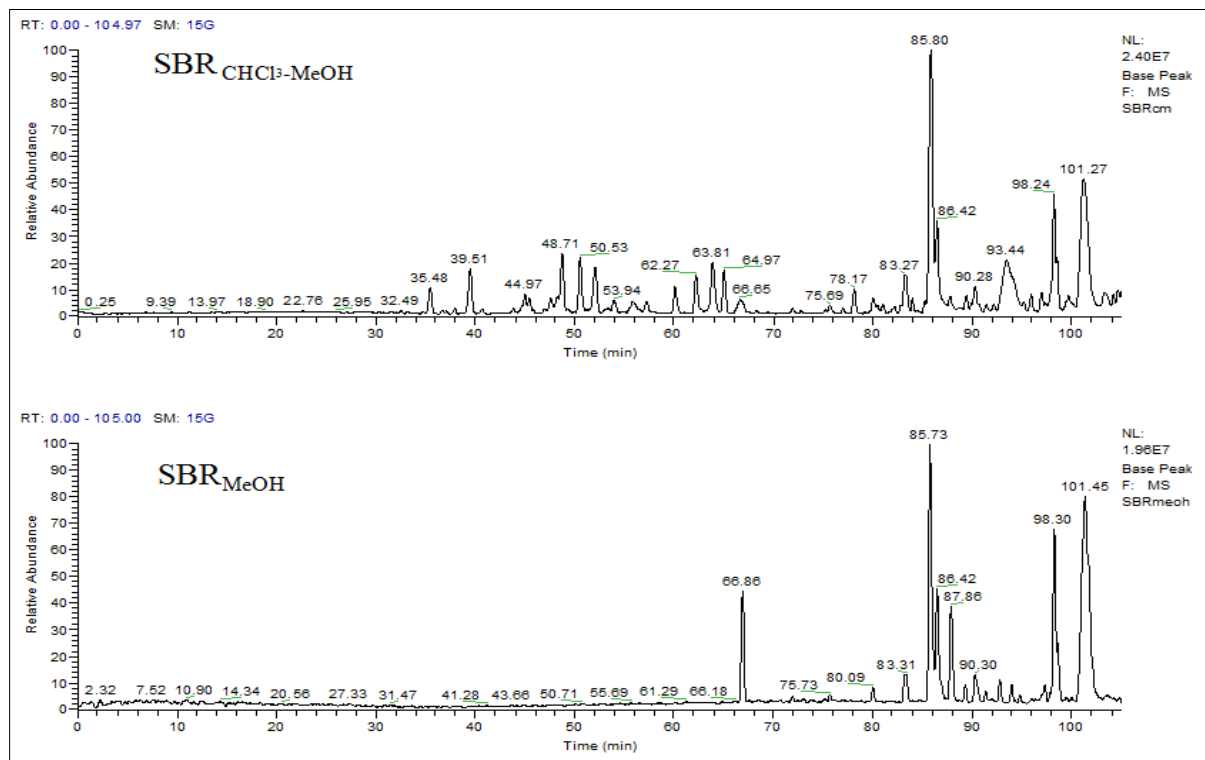


Figure II-5. Chromatogramme LC-MS des extraits SBR_{C-M} et SBR_{MeOH} .

- Une similitude est observée entre le profil LC-MS de l'extrait *n*-hexane (SBR_{Hex}) riche en acides gras et celui d'extrait chloroformique (SBR_{CHCl_3}). Nous avons choisi

d'étudier l'extrait (SBR_{CHCl_3}) car la quantité (4.98 g) est plus importante et son profil LC-MS à montrer une richesse en métabolites.

- Nous avons aussi choisi d'étudier l'extrait chloroforme-méthanol (SBR_{C-M}) car sa quantité est plus importante par rapport à l'extrait méthanol (SBR_{MeOH}).

Avant d'entamer la séparation chromatographique, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice greffée (CCM), afin de choisir la technique convenable pour une meilleure séparation.

II.1.5.1.2. Fractionnement et purification de l'extrait chloroformique (SBR_{CHCl_3}) :

Une cartouche de 340 g de gel de silice en phase normale a été utilisée pour le fractionnement de 4.98 g de l'extrait SBR_{CHCl_3} par flash chromatographie, en utilisant comme système de séparation $CHCl_3$ -MeOH (100 :0 à 0 :100). La détection est principalement effectuée par UV. Des fractions de 27 mL ont été récoltées et regroupées en fonction de leur profil analysés par CCM (phase normale) réalisées avec différents systèmes d'élution mentionnées ci-dessous (tableau II-2). Les plaques sont visualisées sous la lumière UV puis révélées avec le $Ce(SO_4)/H_2SO_4$ et chauffées à 100°C. 14 fractions ont été récoltées après rassemblement des fractions présentent des similitudes (figure II-6).

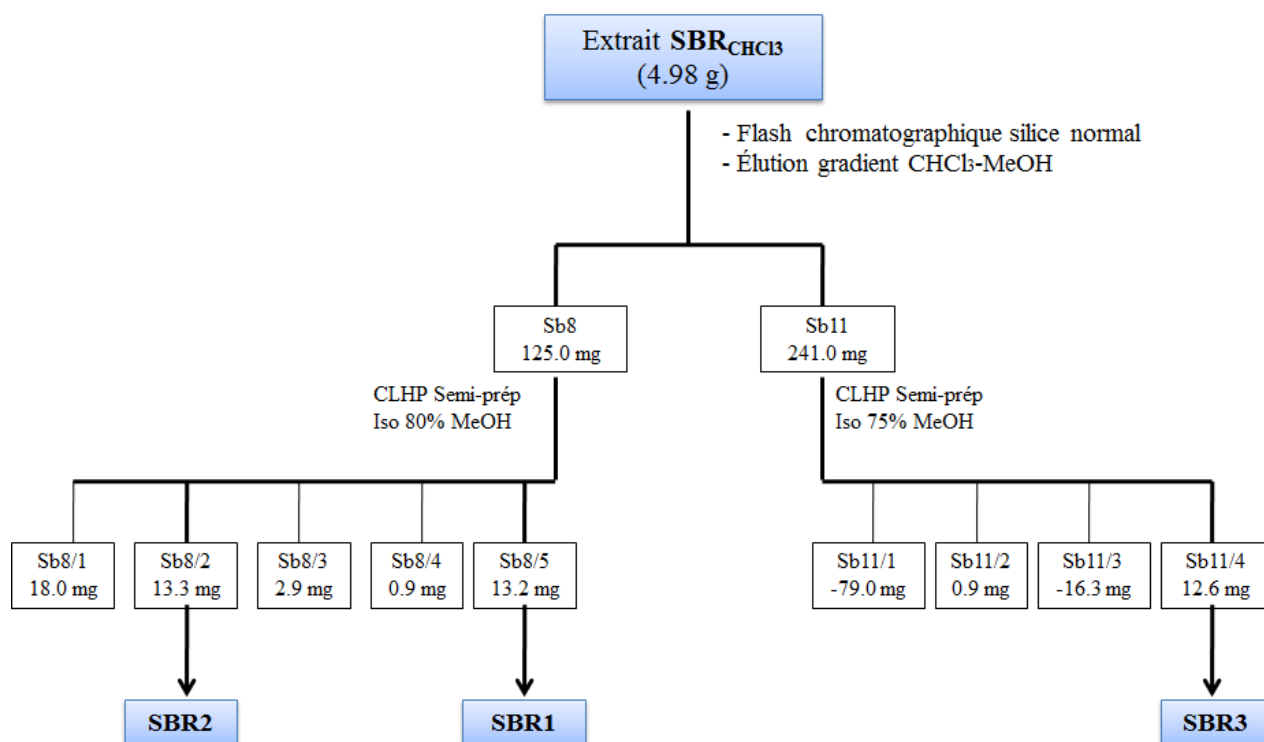


Schéma II-2. Fractionnement et purification de l'extrait SBR_{CHCl_3} .

Tableau II-2. Fractionnement par chromatographie flash de l'extrait SBR_{CHCl_3} des racines de *S. buchananii*.

CHCl ₃ -MeOH	LOTS	Fractions	Masse (mg)	Observations et produits isolés	Eluant des CCM
100 :00 ↓ 95 :5	1-6	Sb1	205.9	Fraction non exploitable (stérol)	CHCl ₃ -MeOH 98 :2
	7-9	Sb2	111.7	Mélange complexe	
	10-12	Sb3	47.7	Faible quantité	
	13-14	Sb4	414.3	Mélange complexe	
	15-16	Sb5	751.5	Mélange complexe	
	17-18	Sb6	19.3	Faible quantité	
	19-22	Sb7	130.2	Mélange complexe (acides gras)	
95 :5 ↓ 0 :100	23	Sb8	125.0	SBR₁&SBR₂	CHCl ₃ -MeOH 97 :3
	24	Sb9	82.9	Mélange complexe	CHCl ₃ -MeOH 95 :5
	25-26	Sb10	195.0		
	27	Sb11	241.0	SBR₃	
	28-30	Sb12	313.1	Mélange complexe	CHCl ₃ -MeOH 9 :1
	31-33	Sb13	86.8	Non exploitable	
	34-37	Sb14	270.1	Mélange complexe	

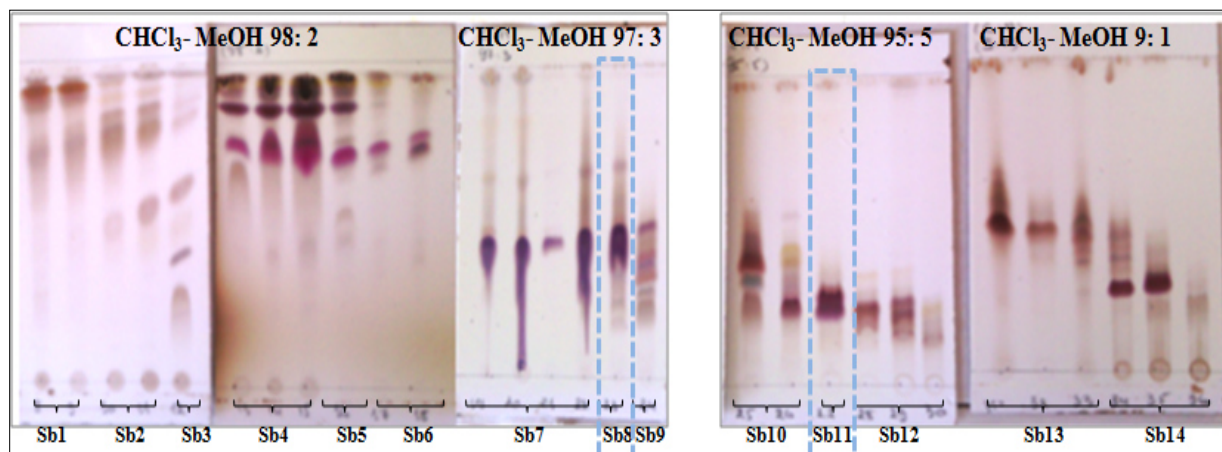


Figure II-6. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait SBR_{CHCl_3} effectué.

- La séparation des fractions **Sb5**, **Sb10**, **Sb12**, et **Sb14** a été effectuée par CLHP semi-préparative en utilisant comme système MeOH-H₂O avec plusieurs proportions, mais cette séparation a été échoué car il y avait plusieurs pics et une mauvaise résolution.

Nous nous sommes intéressés aux fractions **Sb8** et **Sb11**. Ces deux fractions ont été purifiées par CLHP semi-préparative.

- **Fraction Sb8** (125.0 mg) : est séparé en CLHP semi-préparative en utilisant l'éluant MeOH–H₂O (80 : 20), le temps de l'injection 40 min (figure II-7). Les fractions ont été recueillies et réunies selon le profil en CCM en phase normale réalisée dans le CHCl₃–MeOH (95 : 5, v/v) pour donner 6 sous-fractions, permettant ainsi d'obtenir les composés **SBR₁** (13.2 mg, t_r = 21 min) et **SBR₂** (13.3 mg, t_r = 12 min).

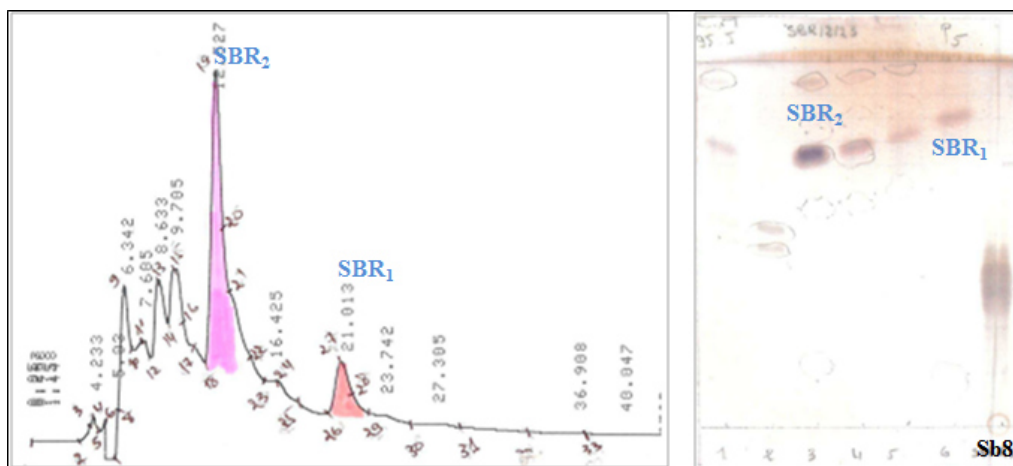


Figure II-7. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction **Sb8**.

- **Fraction Sb11** (241.0 mg) : a séparé par CLHP semi-préparative en utilisant l'éluant MeOH–H₂O (75 : 25) avec 11 injections pendant 35 min (figure II-8). Les sous fractions ont été recueillies et réunies selon le profil en CCM en phase normale réalisée dans le CHCl₃–MeOH (9 : 1) pour donner le composé **SBR₃** (12.6 mg à t_r = 29 min).

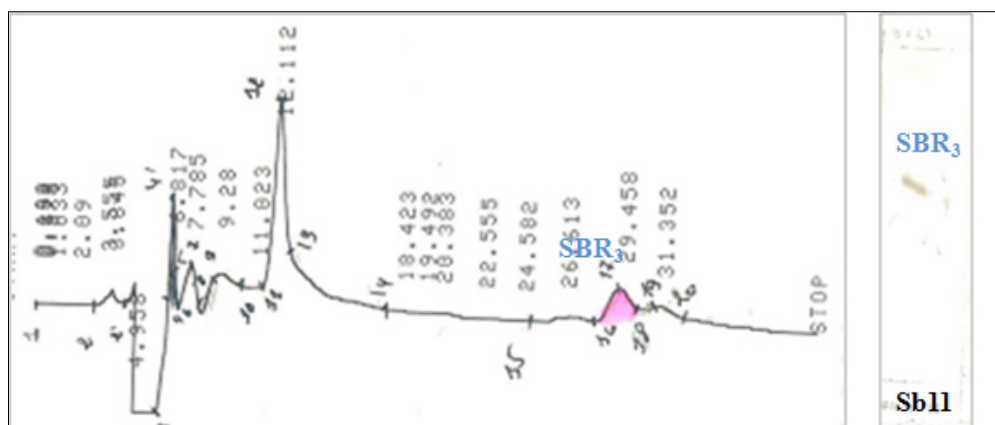


Figure II-8. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction **Sb11**.

II.1.5.1.3. Fractionnement et Purification de l'extrait chloroforme-méthanol (SBR_{C-M}) :

3.75 g de l'extrait SBR_{C-M} a subi une chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Séphadex® LH-20 élué au MeOH. Le fractionnement sur gel de Séphadex® permet de séparer les molécules d'un extrait selon leur poids moléculaire. Des fractions de 10 mL (0.8 μ L/min) sont recueillies et regroupées en fonction de leur profil analysé en CCM sur gel de silice en phase normale sur support verre avec l'éluant $CHCl_3$ -MeOH- H_2O (80 :18 : 2) (tableau II-3).

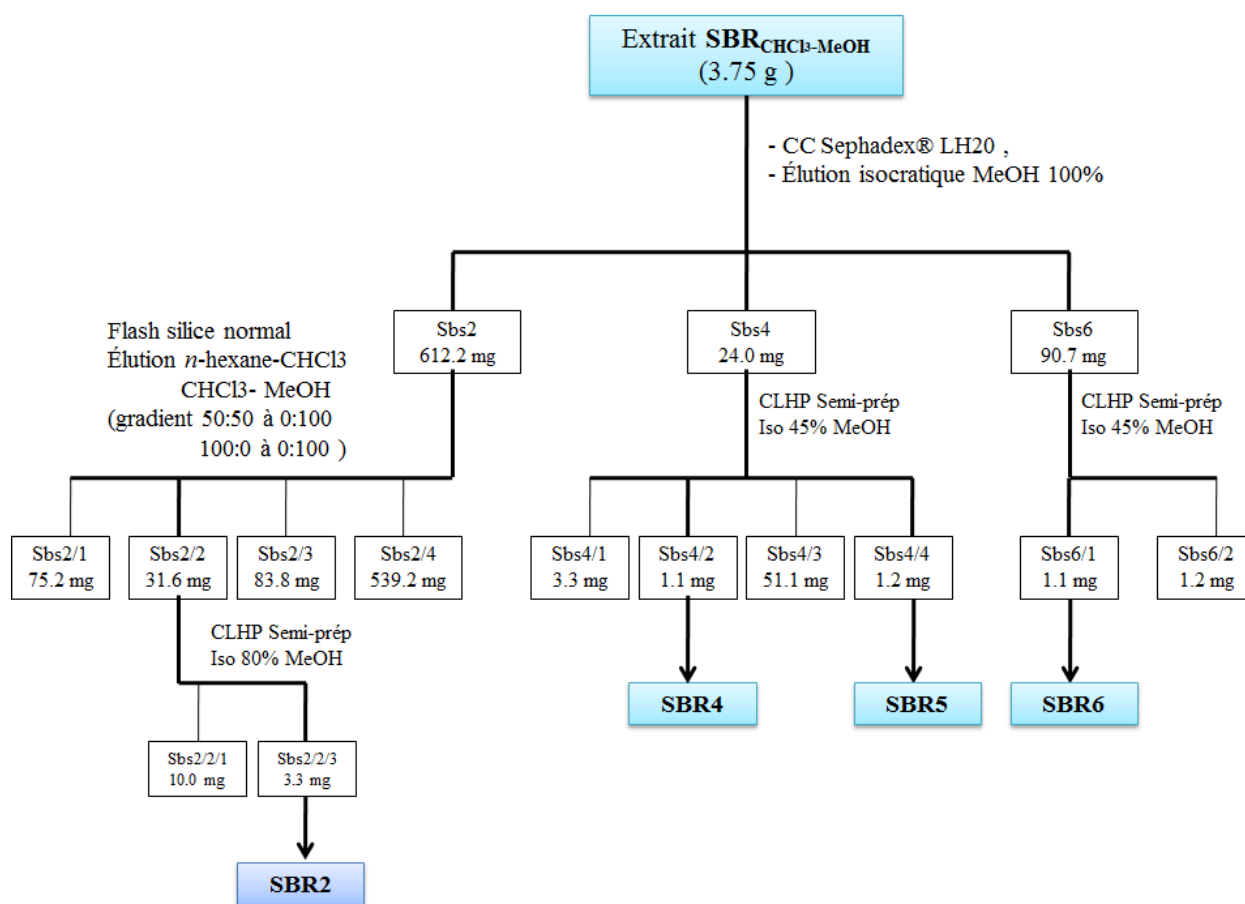


Schéma II-3. Fractionnement et purification de l'extrait SBR_{CHCl_3-MeOH} .

Tableau II-3. Fractionnement par colonne Séphadex de l'extrait **SBR_{C-M}** des racines de *S. buchananii* Hedge.

Système d'élution MeOH 100 %			
LOTS	Fractions	Masse (mg)	Observations et Produits isolés
1-5	Sbs1	876.5	Fraction non exploitable
6-7	Sbs2	612.2	Mélange inséparable
8-10	Sbs3	30.6	Faible quantité
11-13	Sbs4	23.2	SBR₄&SBR₅
14	Sbs5	9.4	Faible quantité
15-17	Sbs6	90.7	SBR₆

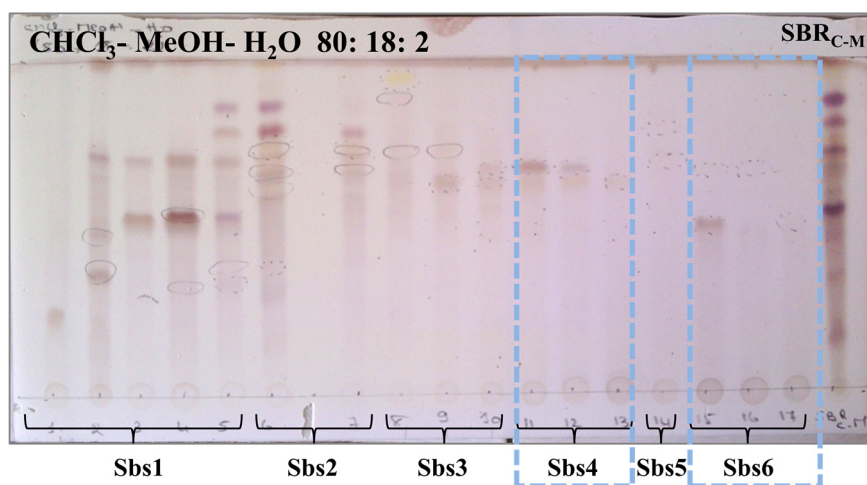


Figure II-9. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait **SBR_{C-M}**

- **Fraction Sbs4** (23.2 mg) : est fractionnée par CLHP semi-préparative en utilisant un système MeOH-H₂O (45 : 65) comme éluant pendant 25 min (figure II-10). Pour fournir les composés **SBR₄** (1.1 mg, $t_r = 6$ min) et **SBR₅** (1.2 mg, $t_r = 15.68$ min).

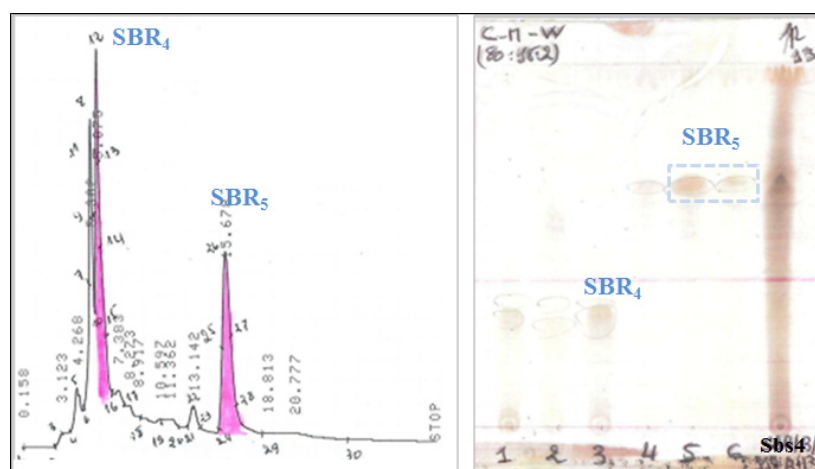


Figure II-10. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction **Sbs4**.

- **Fraction Sbs6** (90.7 mg) : à été purifiée par CLHP semi-préparative en phase inverse C₁₈ en utilisant le système MeOH–H₂O (45 : 55 v/v) en isocratique, pendant 40 min (figure II-11). Pour donner le composé **SBR₆** (1.1 mg, $t_r = 13.40$ min).

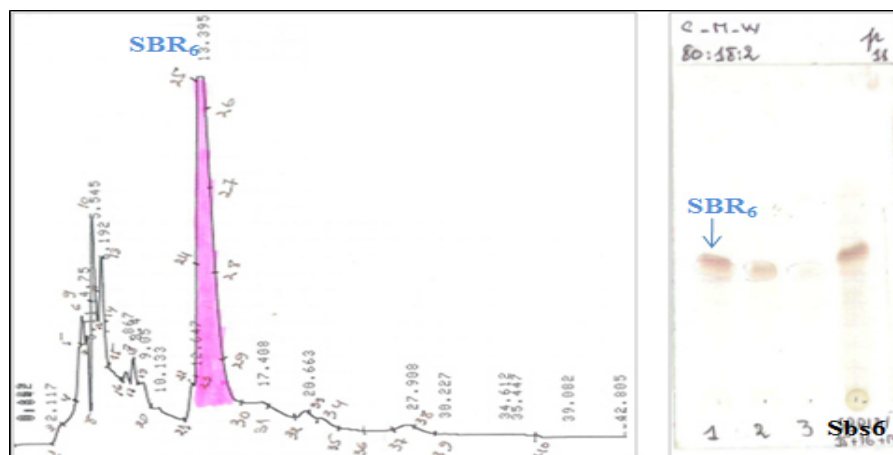


Figure II-11. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction **Sbs6**.

II.1.5.2. *Cistanche phelypaea* (L.)

II.1.5.2.1. Extraction solide-liquide à partir des parties aériennes de *C. phelypaea* (CT)

4 kg des parties aériennes récoltée est séchés, broyées mises à macérer dans un mélange hydro-alcoolique : Éthanol/Eau : (70 : 30 ;(v/v)) pendant 24 heures à température ambiante (cette opération a été répétée trois fois). La phase hydro-alcoolique est concentré sous pression réduite à une température n'excédant pas 40°C, puis dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 mL pour 1 Kg de matière sèche. Une décantation pendant une nuit permet le dépôt des composés hautement lipophiles (la chlorophylle, les cires, les résines, les boues terpéniques, le sable etc...). La solution ainsi dégraissée subit une filtration pour obtenir une solution aqueuse claire. Cette dernière a subi une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole, le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Les extraits obtenus sont nommés **CT_{Ep}** (3.27g), **CT_{CHCl₃}** (4.87 g), **CT_{AcOEt}** (10.96 g) et **CT_{n-BuOH}** (36.86 g) respectivement (schéma II-4).

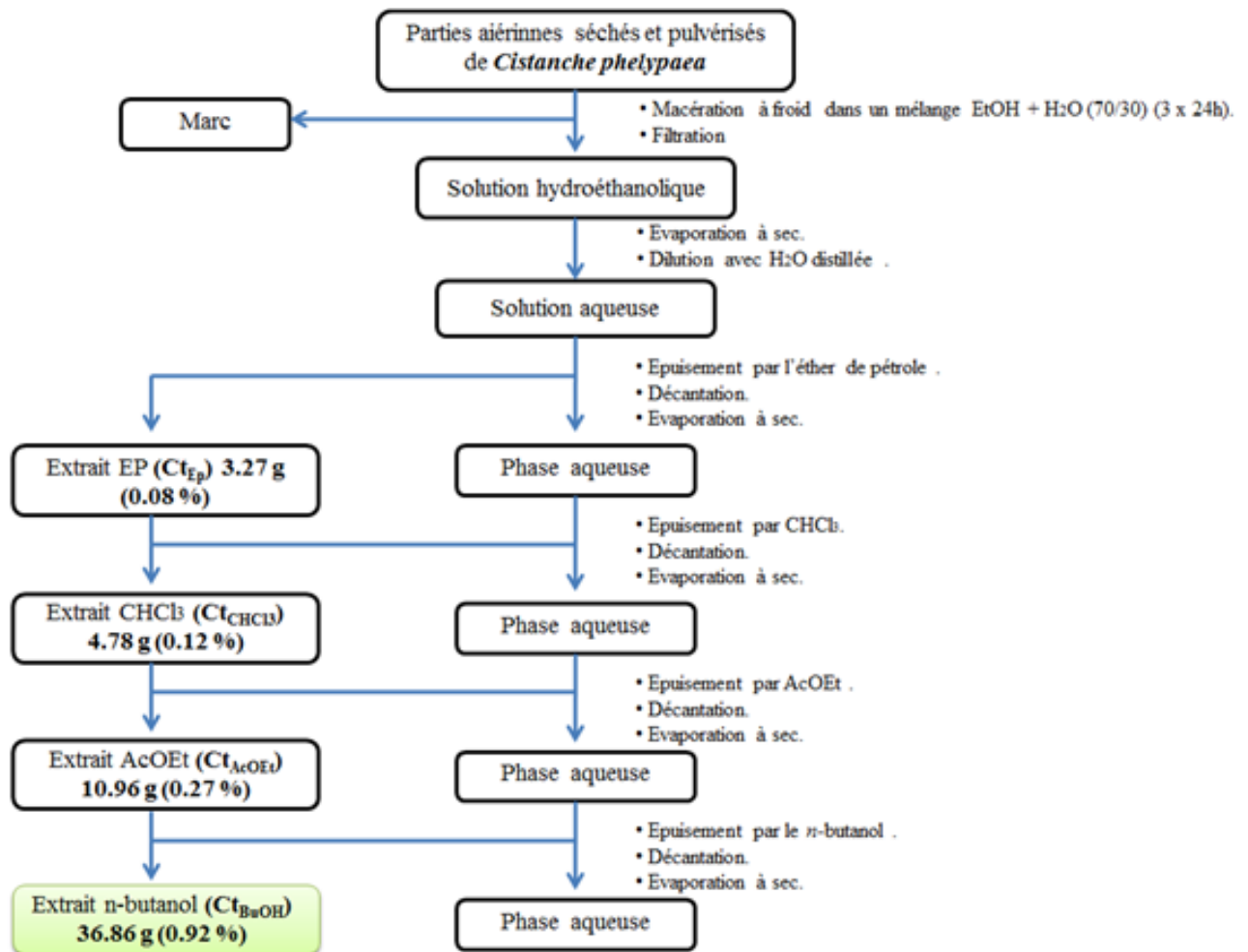
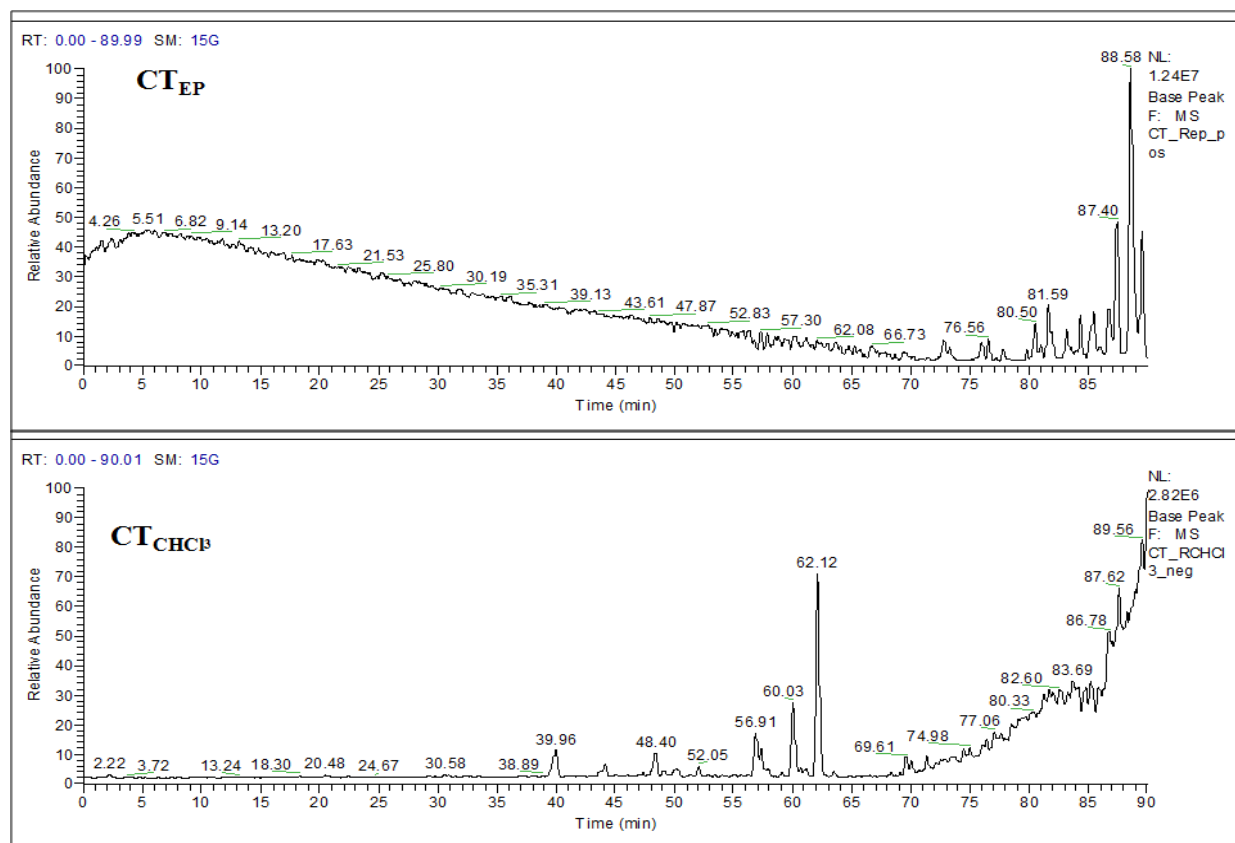
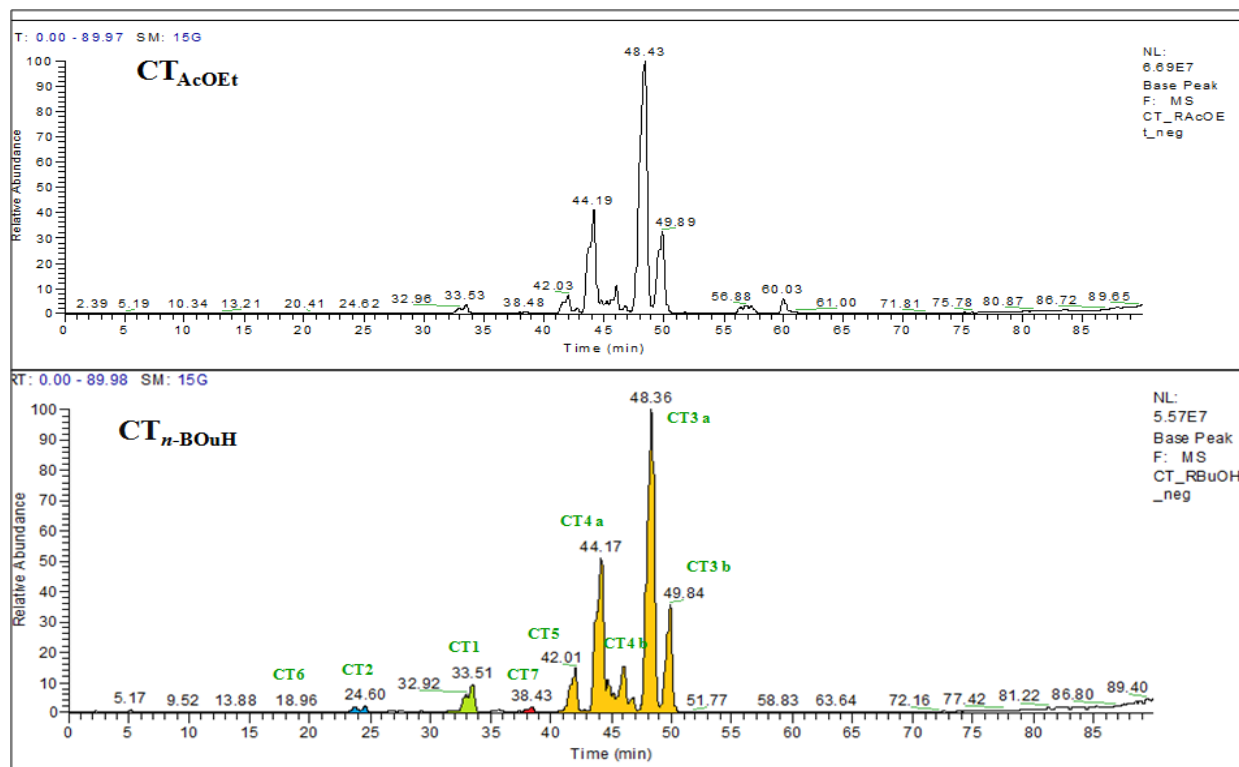


Schéma II-4. Différentes étapes d'extraction des parties aériennes de *Cistanche phelypaea*.

Les extraits résultants sont passés en CLHP couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS), pour déterminer leur richesse en métabolites secondaires (figure II-12- II-13).

Figure II-12. Chromatogramme LC-MS des extraits CT_{EP} et CT_{CHCl₃}.Figure II-13. Chromatogramme LC-MS des extraits CT_{AcOEt} et CT_{n-BuOH}.

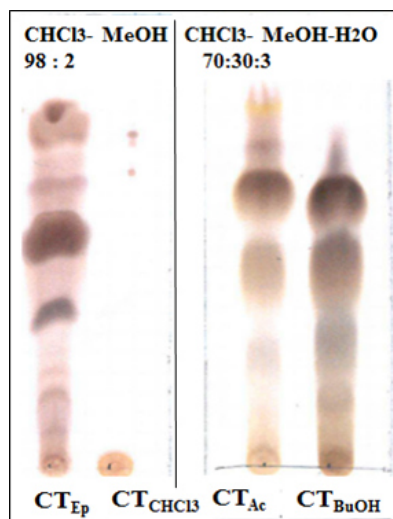


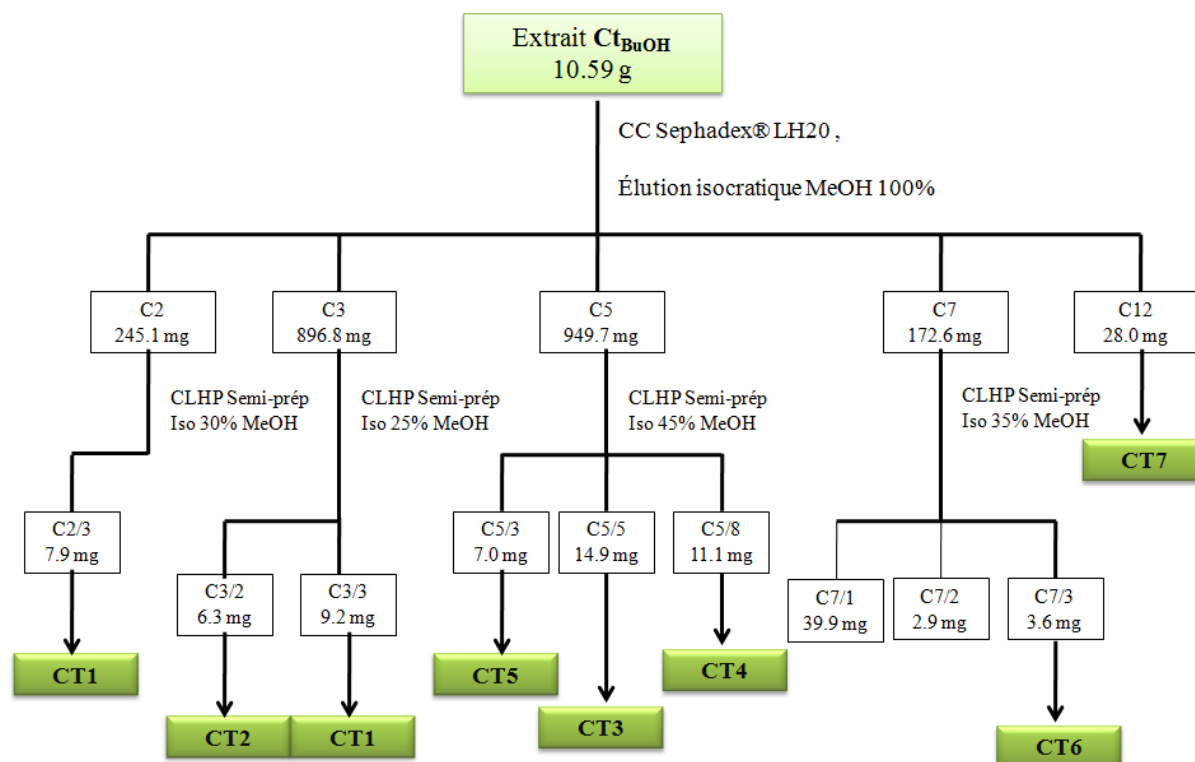
Figure II-14. Profils CCM en phase normale des extraits CT_{Ep} , CT_{CHCl_3} , CT_{AcOEt} et CT_{n-BuOH} de la plante *C. phelypaea*.

- Une grande similitude est observée entre le profil LC-MS de l'extrait CT_{AcOEt} et celui de l'extrait CT_{n-BuOH} . Nous avons choisi d'étudier l'extrait CT_{n-BuOH} car la quantité (36.86 g) est plus importante que les autres extraits et son profil CCM (figure II-14) a montré une richesse en métabolites.

Avant d'entamer la séparation chromatographique, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice normale (CCM), afin de choisir la technique convenable pour une meilleure séparation.

II.1.5.2.2. Fractionnement et purification de l'extrait n-buthanolique (CT_{n-BuOH}) :

10.59 g de l'extrait CT_{n-BuOH} ont été fractionnés par chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex® LH20, l'élution est réalisée par le MeOH. Des fractions de 12 mL ont été recueillies et regroupées en fonction de leurs profils analysés par CCM en phase normale réalisées avec différents systèmes d'élution mentionnées ci-dessous (tableau II-4), fournissant 12 fractions (C1-C12). La fraction C12 contient le composé CT_7 (28.0 mg) et à l'état pur (figure II-15).

Schéma II-5. Fractionnement et purification de l'extrait CT_n -BuOH.Tableau II-4. Fractionnement sur colonne de Séphadex de l'extrait CT_n -BuOH de *C. phelypaea*.

Lots	Fractions	Masse (mg)	Remarques/produits isolés	Eluant des CCM
22-37	C1	1008.3	Fraction non exploitable	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (70 : 30 : 3)
38-39	C2	245.1	CT ₁	
40-43	C3	896.8	CT ₁ &CT ₂	
44-53	C4	5104	Profil identique a celui de la fraction C5	
54-58	C5	499.7	CT ₃ &CT ₄ &CT ₅	
59-64	C6	438.9	Profil identique a celui de la fraction précédente	
65-72	C7	172.6	CT ₆	
73-88	C8	269.1	Mélange complexe	<i>n</i> -butano- CH ₃ COOH-H ₂ O (60 : 5 : 25)
107-119	C9	179.4	Fractions non exploitables	
133-142	C10	51.4		
143-147	C11	29.9		
148-153	C12	28	CT ₇	

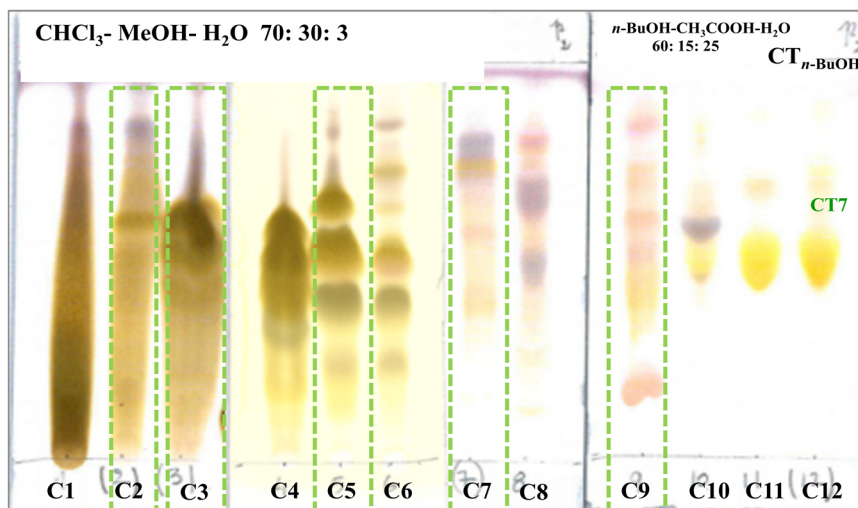


Figure II-15. Profils CCM sur gel de silice normale de l'extrait CT_{n-BuOH} .

- **Fraction C2** (245.1 mg) : a été chromatographiée par CLHP semi-préparative sur RP C_{18} à l'aide d'un système d'éluion isocratique MeOH-H₂O (30 : 70) pendant 30 min (figure II-16) pour donner le composé CT_1 (7.9 mg, $t_r = 21.56$ min).

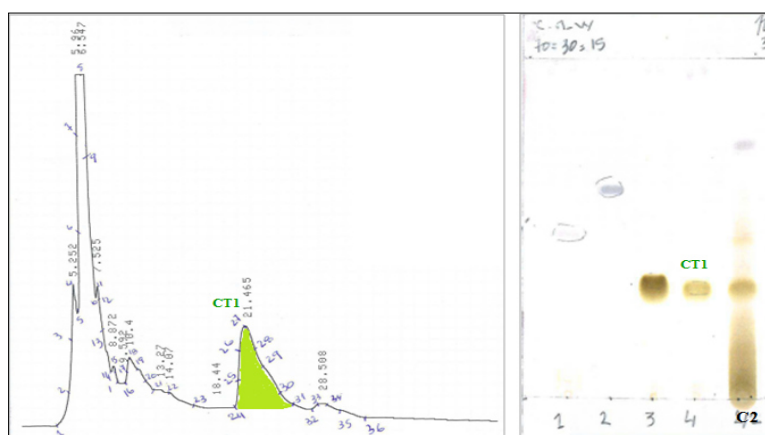


Figure II-16. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction **C2**.

- **Fraction C3** (896.8 mg) : a été purifiée par CLHP semi-préparative sur RP C_{18} à l'aide d'un système d'éluion isocratique MeOH-H₂O (25 : 75) pendant 60 min (figure II-17) a conduit aux composés CT_1 (4.9 mg, $t_r = 42.28$ min) et CT_2 (6.3 mg, $t_r = 14.94$ min).

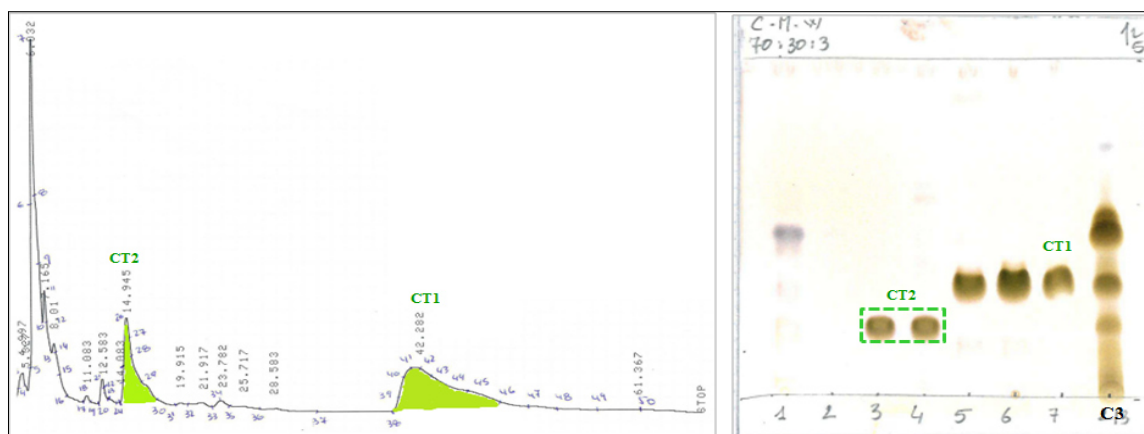


Figure II-17. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C3.

- **Fraction C4** (506.1 mg) : a été chromatographiée par CLHP semi-préparative sur RP C₁₈ à l'aide d'un système d'éluion isocratique MeOH–H₂O (45 : 55) pendant 45 min (figure II-18) pour donner les composé CT₂ (2.0 mg, t_r = 6.44 min), CT₃ (1.0 mg, t_r = 15.46 min), CT₄ (26.1 mg, t_r = 25.74 min) et CT₅ (3.2 mg, t_r = 12.14 min).

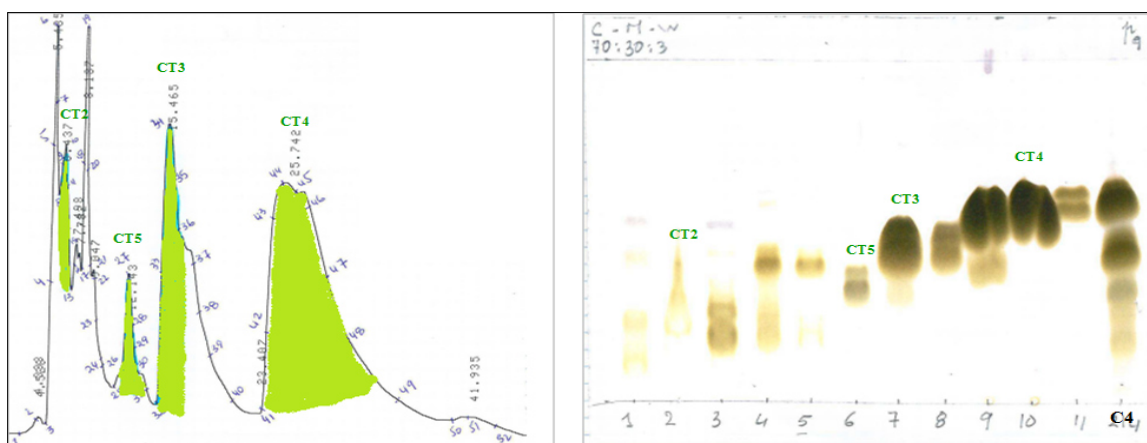


Figure II-18. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C4.

- **Fraction C5** (499.7 mg) : a donné trois composés grâce à une purification par CLHP semi-préparative sur RP C₁₈ à l'aide d'un système d'éluion isocratique MeOH–H₂O (45 : 55) pendant 60 min (figure II-19), renferme les composés purs CT₃ (14.9 mg, t_r = 19.94 min), CT₄ (11.1 mg, t_r = 34.22 min) et CT₅ (7.0 mg, t_r = 15.22 min).

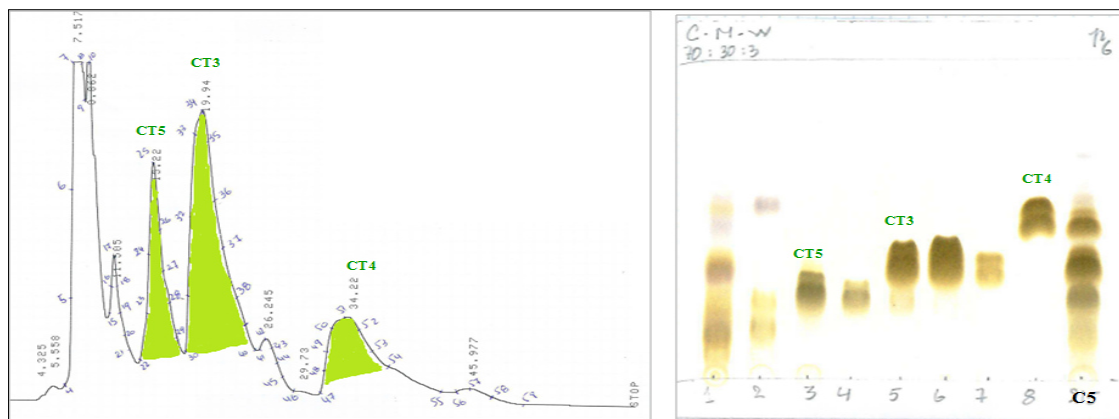


Figure II-19. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C5.

- **Fraction C7** (172.6 mg) : a été soumise à une CLHP semi-préparative à l'aide d'un système d'élution isocratique MeOH–H₂O (35 : 65) pendant 50 min (figure II-20) pour obtenir le composé CT₆ (3.6 mg, t_r = 18.17 min).

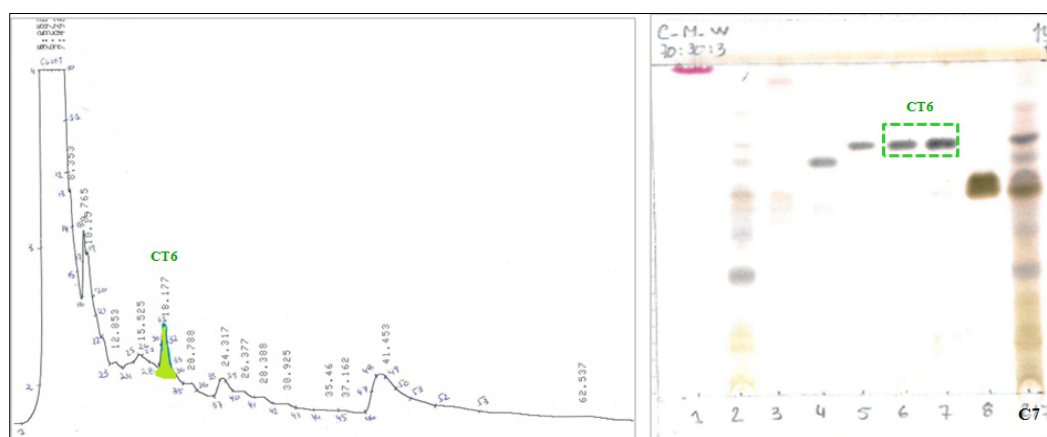


Figure II-20. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C7.

II.1.5.3. *Anarrhinum pedatum* Desf.

II.1.5.3.1. Extraction solide-liquide à partir des parties aériennes d'*A. pedatum* (APD) :

Le matériel végétal, séché et broyé (1 kg) a été extraits successivement à température ambiante pendant 48 h, en utilisant *n*-hexane, CHCl₃, CHCl₃–MeOH (9 : 1, v/v) et MeOH, par macération exhaustive (3 X 2L), pour donner 15.74 g (APD_{Hex}), 30.93 g (APD_{CHCl3}), 74.94 g (APD_{C-M}) et 123.12 g (APD_{MeOH}). 70.75 g de l'extrait méthanolique a été répartie avec le mélange *n*-BuOH–H₂O (50 : 50). Après filtration et concentration, nous avons obtenu l'extrait *n*-buthanolique APD_{*n*-BuOH} (55.96 g) (schéma II-6).

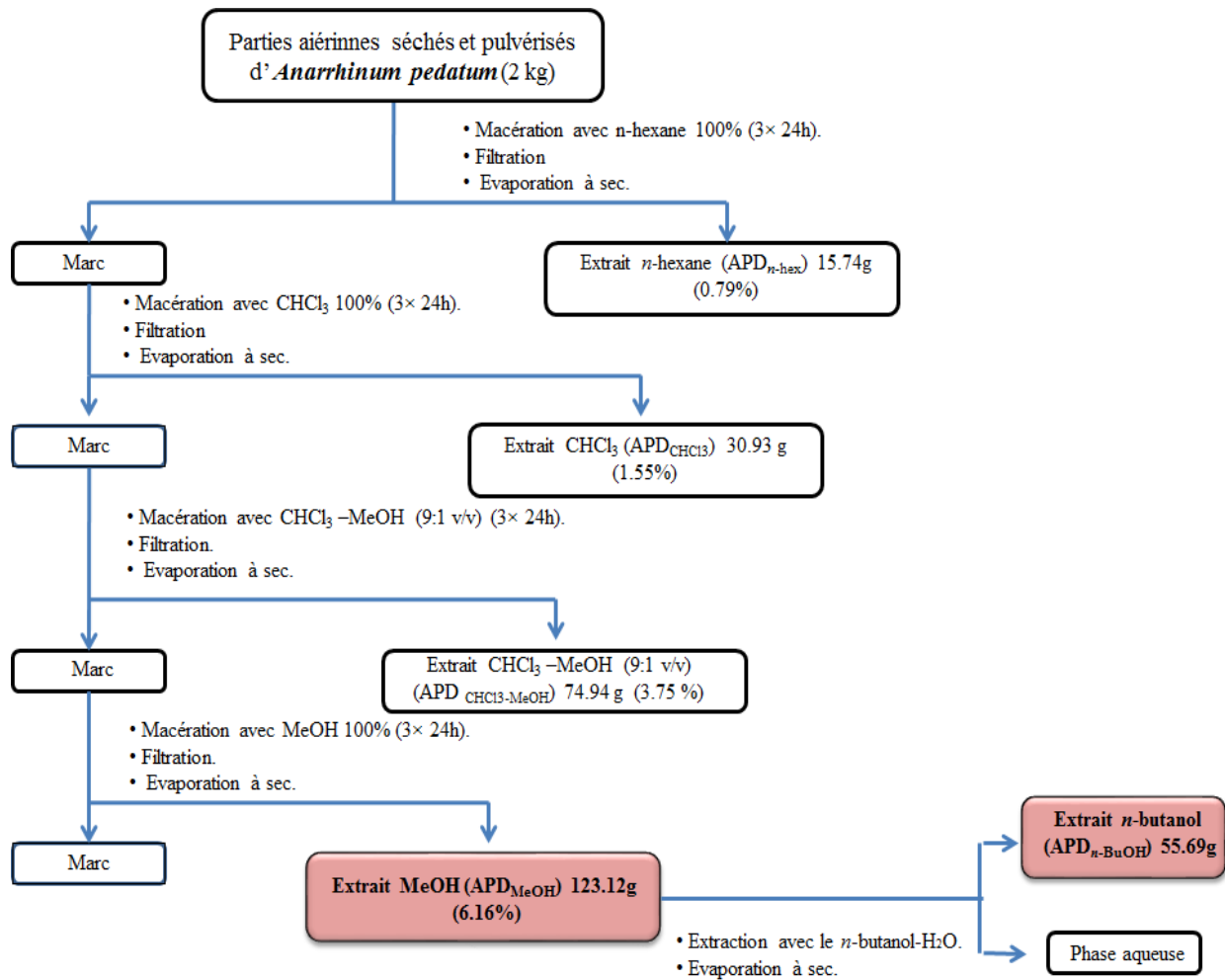


Schéma II-6. Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes d'*Anarrhinum pedatum*.

Les extraits résultants sont passés en CLHP couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS), pour déterminer leur richesse en métabolites secondaires (figure II-22- II-23)

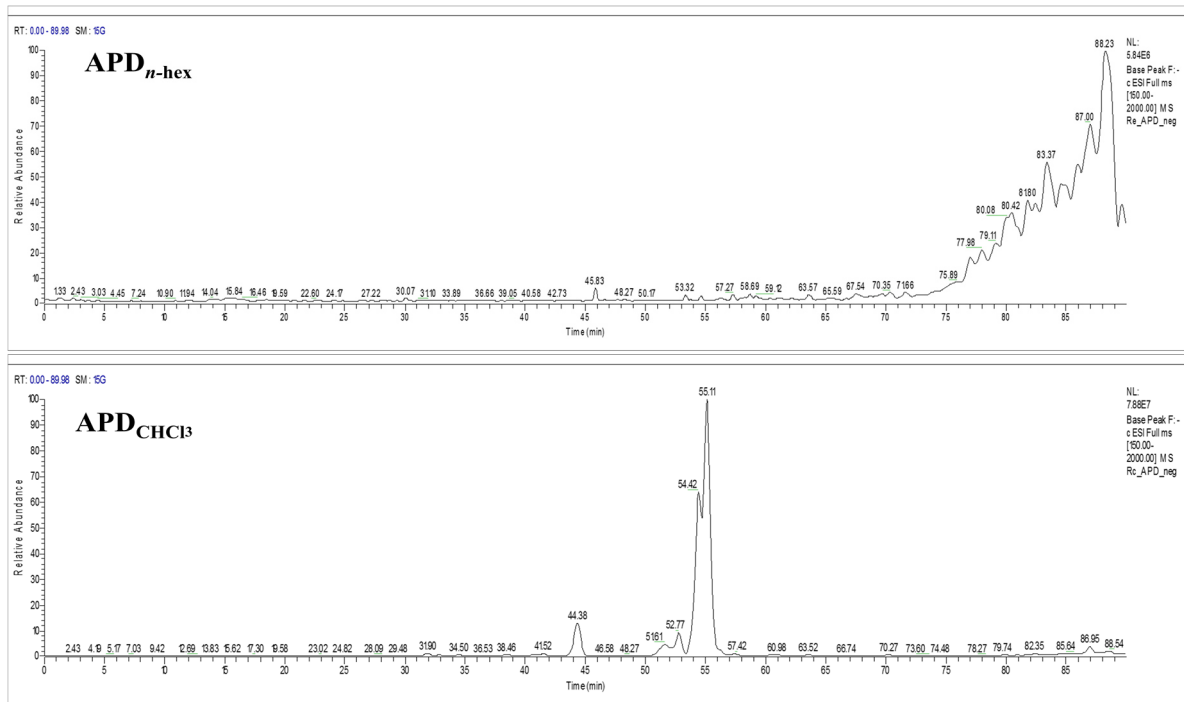


Figure II-21. Chromatogramme LC-MS des extraits APD_{Hex} et APD_{CHCl3}.

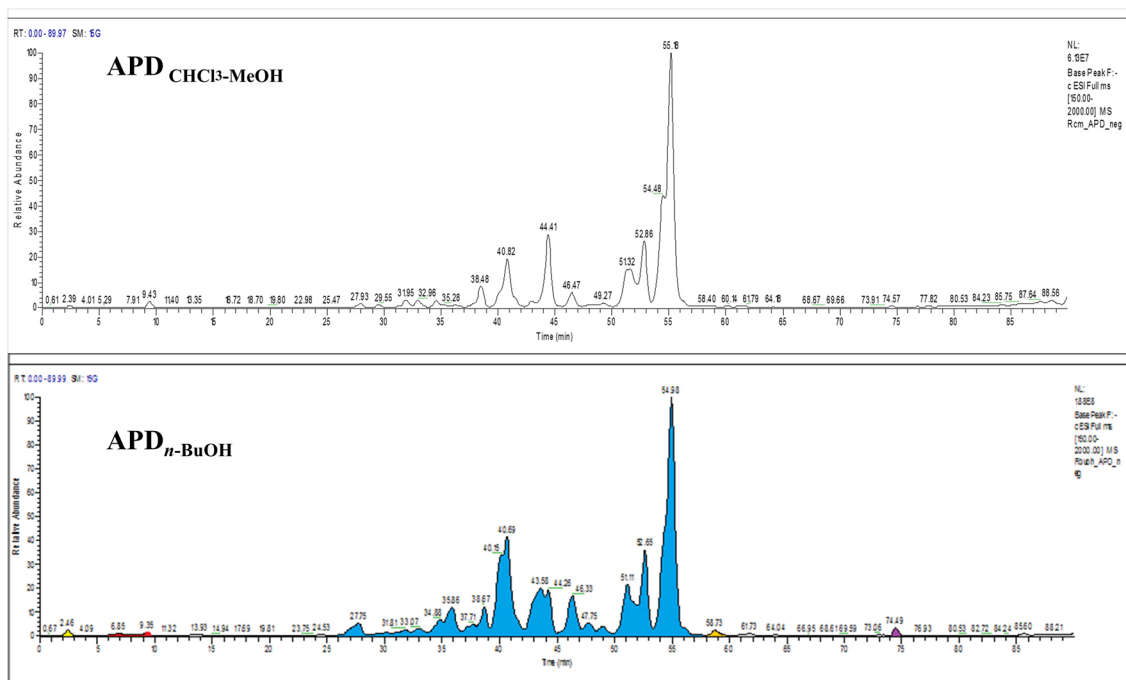


Figure II-22. Chromatogramme LC-MS des extraits APD_{C-M} et APD_n-BuOH.

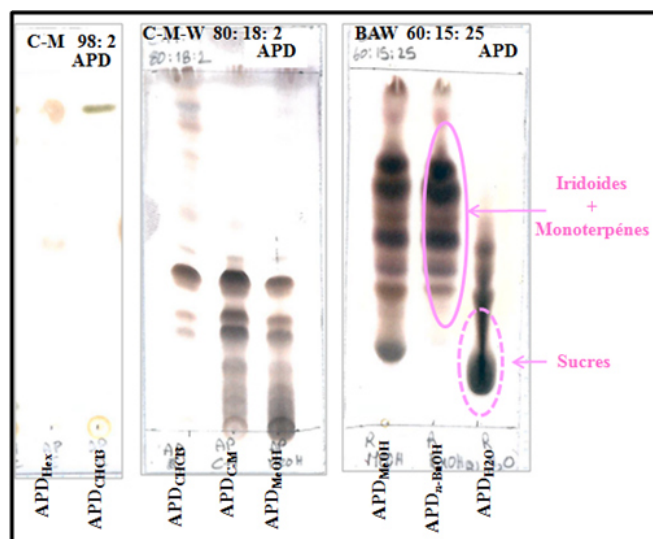


Figure II-23. Profils CCM sur gel de silice normale des extraits de la plante *A. pedatum*.

- Une similitude est observée entre le profil CCM des extraits $\text{APD}_{\text{C-M}}$ et $\text{APD}_{n\text{-BuOH}}$ nous a permis d'étudier l'extrait $\text{APD}_{n\text{-BuOH}}$.
- Nous avons choisi à étudier l'extrait $\text{APD}_{n\text{-BuOH}}$ car il est plus important que les autres extraits et son profil chromatogramme LC-MS et CCM ont montré une richesse en métabolites.

Avant d'entamer la séparation chromatographique, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice normale (CCM) en parallèle, afin de choisir la technique convenable pour une meilleure séparation.

II.1.5.3.2. Fractionnement et purification de l'extrait n-buthanolique $\text{APD}_{n\text{-BuOH}}$:

10.56 g de l'extrait $\text{APD}_{n\text{-BuOH}}$ ont été fractionnés par chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex® LH20, l'élution est réalisée par le MeOH. Des fractions de 10 mL sont collectées, analysées et réunies en fonction de leurs profils chromatographique en CCM pour obtenir 13 fractions (A-M) (tableau II-5) (figureII-24).

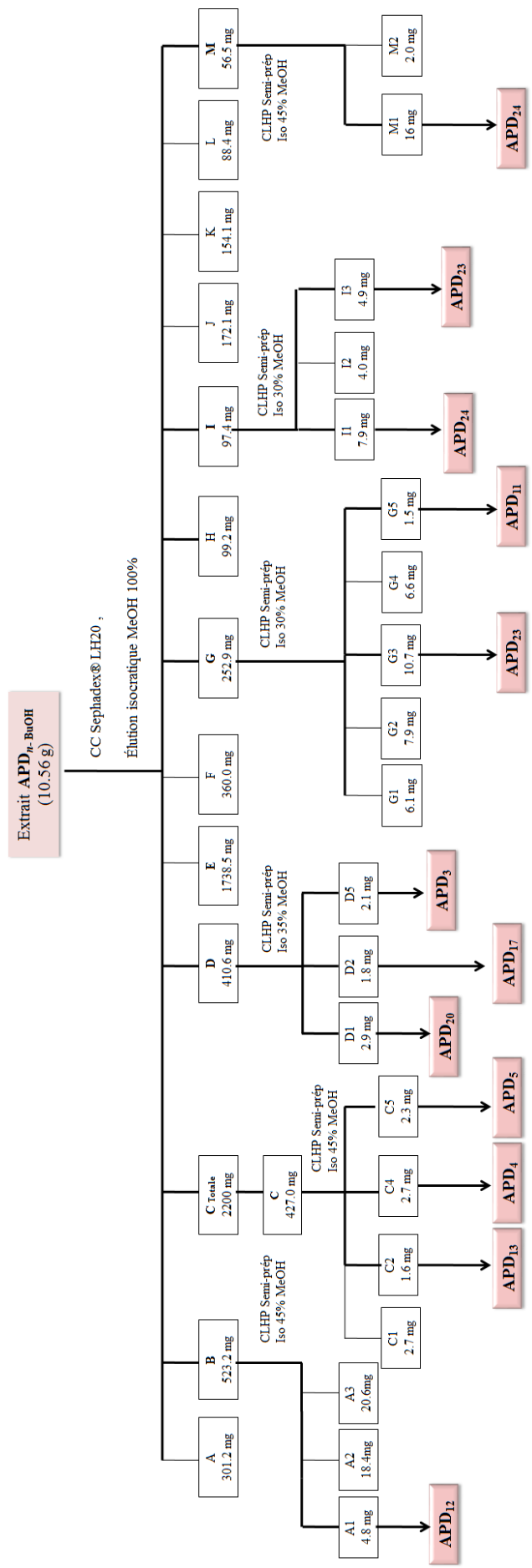


Schéma II-7. Fractionnement et purification de l'extrait APD_n-BuOH.

Tableau II-5. Fractionnement par chromatographie Séphadex® LH20 de l'extrait **APD_n**-BuOH.

Lots	Fractions	Masse (mg)	Observations / Produits isolés	Eluant des CCM
1-2	A	301.2	Fraction non exploitable	<i>n</i> -butano-CH ₃ COOH-H ₂ O (60 : 5 : 25)
3	B	523.2	APD₁₂	
4	C	2200	Mélange séparable APD₁₃& APD₄& APD₅	
5	D	862.0	APD₂₀& APD₁₇& APD₃	
6-8	E	1002.8	Mélange séparable	
9	F	360.0	Profil identique a celui de la fraction G	
10	G	252.9	APD₂₃& APD₁₁	
11	H	99.2	Profil identique a celui de la fraction I	<i>n</i> -butano-CH ₃ COOH-H ₂ O (60 : 5 : 25)
12	I	97.4	APD₂₃	
13	J	172.1	Mélange complexe	
14-19	K	154.1	Mélange complexe des flavonoïdes	
20-21	L	88.4		
22-23	M	56.5	APD₂₂	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (80 : 18 : 2)

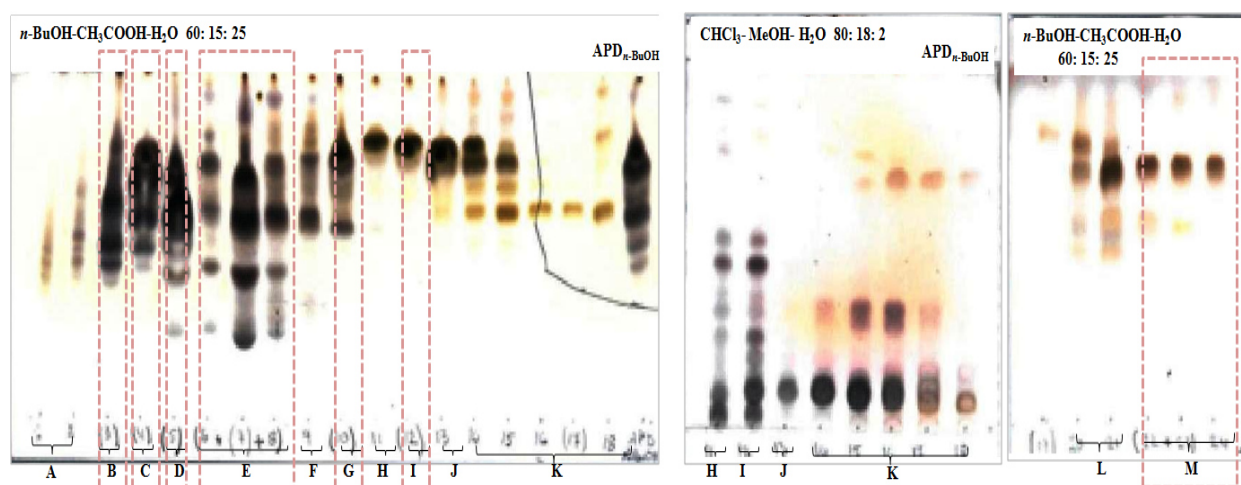


Figure II-24. CCM analytique du fractionnement **APD_n**-BuOH effectué en Séphadex.

Le profil LC-MS a permis de distinguer une grande partie qui est riche en iridoïdes (les fractions **B** à **G**).

- **Fraction B** (523.2 mg) : est purifiée par CLHP semi-préparative à l'aide d'un système d'éluion isocratique MeOH-H₂O (45 : 55) pendant 60 min (figure II-25). Nous avons obtenu le composé **APD₁₂** (4.8 mg, $t_r = 15.03$ min).

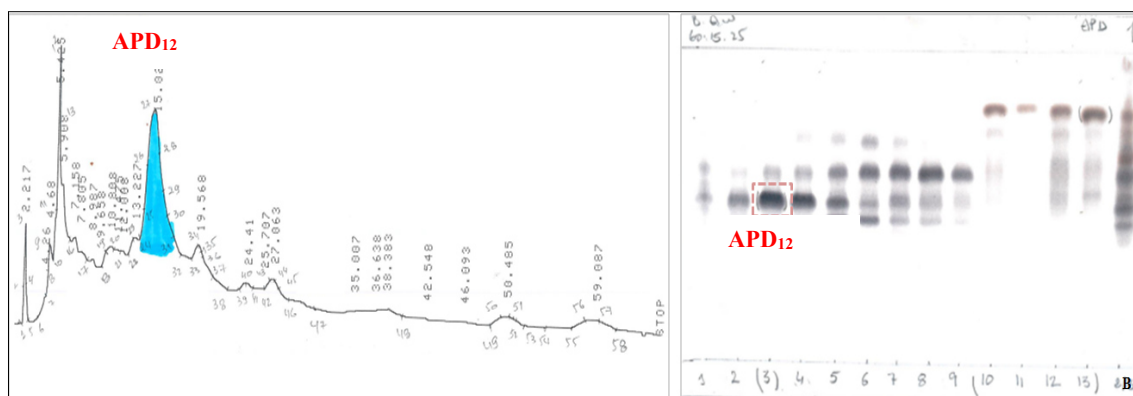


Figure II-25. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction B.

- **Fraction C** (200 mg) : a été purifiée par CLHP semi-préparative à travers une colonne de silice greffée C₁₈ éluée par MeOH–H₂O (45: 55) pendant 70 min (figure II-26) pour donner 1.6 mg de **APD₁₃** (t_r = 12.04 min), 2.7 mg de **APD₄** (t_r = 45.0 min) et 2.3 mg de **APD₅** (t_r = 57.04 min), cette purification n’était pas assez efficace pour faciliter l’accès à d’autres composés purs, nous avons choisi de réaliser un préfractionnement de cette fraction en utilisant une technique chromatographique particulière : la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).

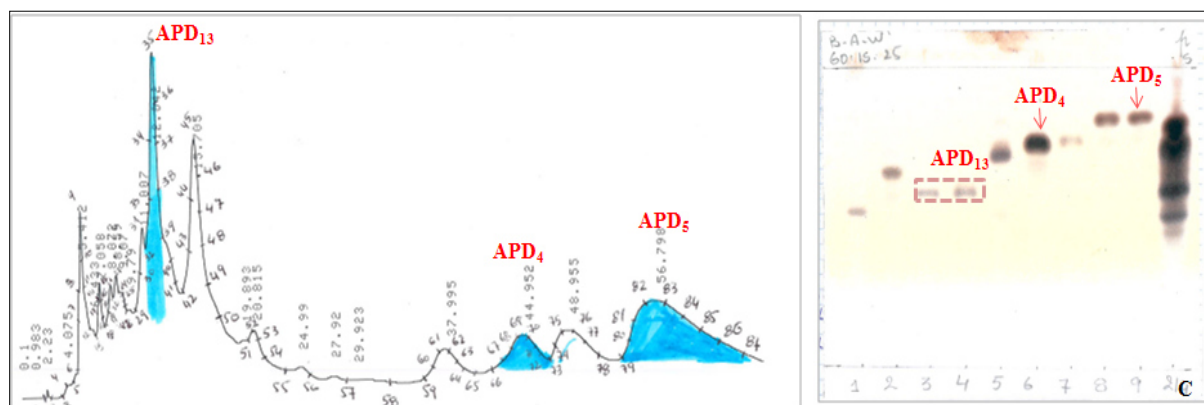


Figure II-26. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction C.

II.1.5.3.2.1. Chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la fraction C :

La Fraction C (2 g), a été soumise séparément à la CPC ; a été dissoute dans 9 mL de la phase mobile du système de solvant biphasique utilisé pour la séparation, ce dernier est constitué du CHCl₃–MeOH–H₂O–*i*-PrOH avec les proportions 9 : 12: 8: 1 (v / v / v). Une colonne de 9 mL a été remplie à l’aide de la phase mobile avec une rotation minimale de rotor avec 700 rpm, ensuite afin de récupérer les produits polaires piégés dans la colonne nous

avons procédé à un dual-mode basé sur l'échange des rôles de deux phases en pompant la phase inférieure en mode descendant pendant 30 minutes. Des fractions de 9 mL ont été recueillies sur toute l'expérience. Toutes les fractions ont été analysées par CCM (figure II-27) puis regroupés en donnant les sous-fractions respectives **C1-C8** sont purifiés par CLHP semi-préparative (tableau II-6).

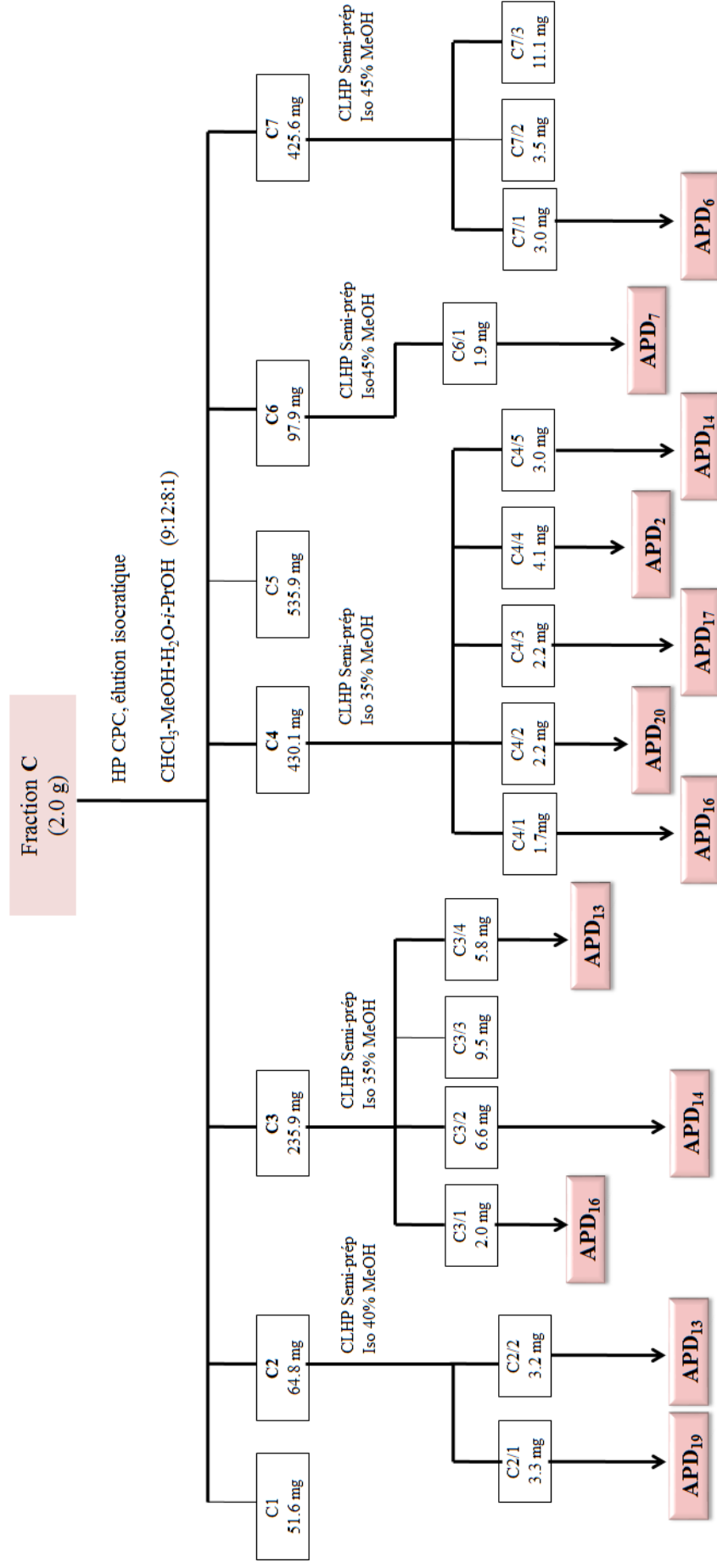


Schéma II-8. Séparation et purification de la fraction C.

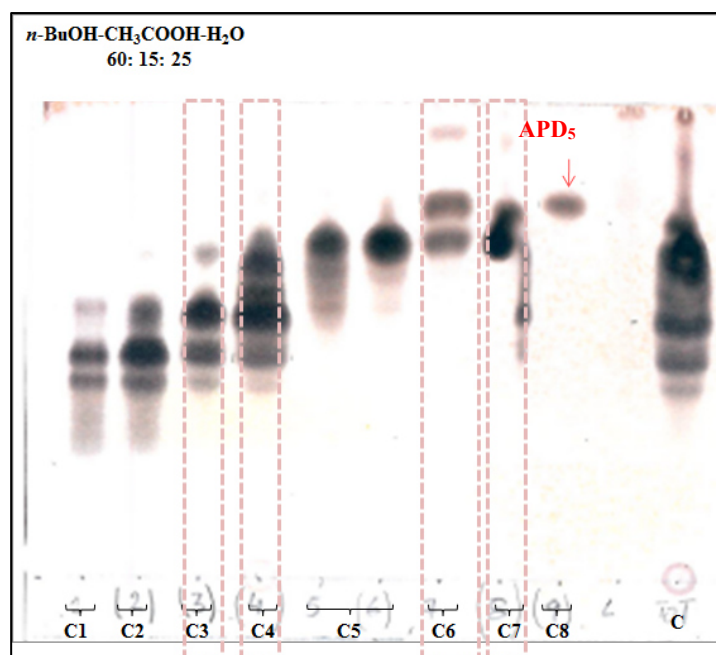


Figure II-27. Plaques CCM de chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la fraction C.

Tableau II-6. Fractionnement en CPC de la fraction C.

Fractions	Masse (mg)	Observations / Produits isolés	Eluant des CCM
C1	51.6	Fraction non exploitable	<i>n</i> -butano- CH ₃ COOH-H ₂ O (60 : 5: 25)
C2	64.8	Mélange contenant des produits déjà isolé	
C3	235.9	APD ₁₆ & APD ₁₄ & APD ₁₃	
C4	430.1	APD ₁₆ &APD ₂₀ & APD ₁₇ & APD ₂ & APD ₁₄ & APD ₁₃	
C5	535.9	Mélange complexe d'APD ₄	
C6	97.9	APD ₇	
C7	425.6	APD ₆	
C8	36.9	Mélange complexe d'APD ₅	

II.1.5.3.2.1.a. Purification des sous-fractions de la fraction C :

○ Les sous-fractions C3 (235.9 mg) et C4 (430.1 mg) ont été purifiées par CLHP semi-préparative à travers une colonne de silice greffée C₁₈ éluée avec MeOH-H₂O (35 : 65) pendant 45 min (figure II-28- II-29), pour donner les composés APD₁₆ (2 mg, t_r = 10.0 min), APD₁₄ (6.6 mg, t_r = 26.0 min) et l'APD₁₃ (10.0 mg, t_r = 30 min) de la sous-fraction C3, et les composé APD₂₀ (2.2 mg, t_r = 11.81 min) APD₁₇ (2.2 mg, t_r = 13.65 min) APD₂ (4.1 mg, t_r = 22.69 min) de la sous-fraction C4 avec les composés APD₁₆ (1.7 mg, t_r = 10.17 min), APD₁₄ (3.0 mg, t_r = 29.86 min) et l'APD₁₃ (3.2 mg, t_r = 32.44 min) déjà obtenu dans la sous fraction C3.

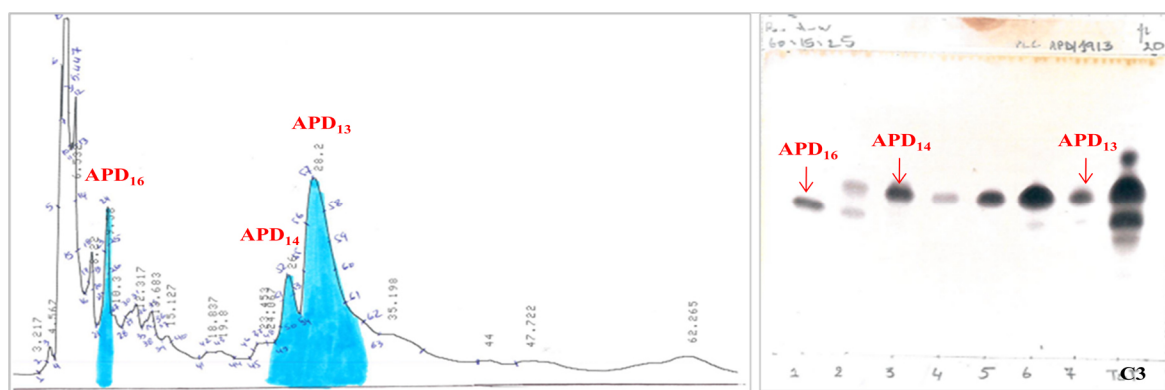


Figure II-28. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction C3.

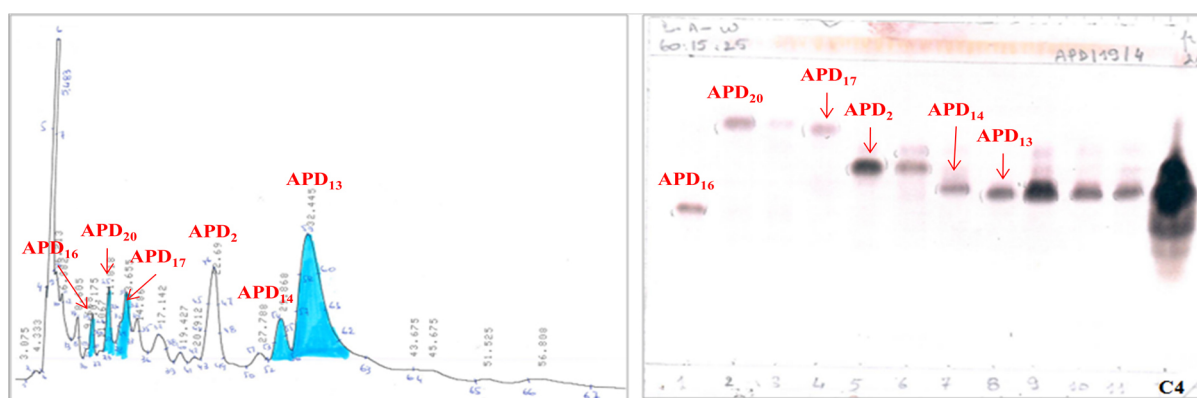


Figure II-29. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction C4.

○ **Les sous-fractions C6 (97.9 mg) et C7 (425.6 mg)** ont subies une purification sur une colonne CLHP de silice greffée C₁₈ éluée avec MeOH–H₂O (45 : 55) pendant 60 min (figure II-30) pour donner le composé APD₇ (1.9 mg, t_r = 34.0 min) et APD₆ (3.0 mg, t_r = 42.0 min) respectivement.

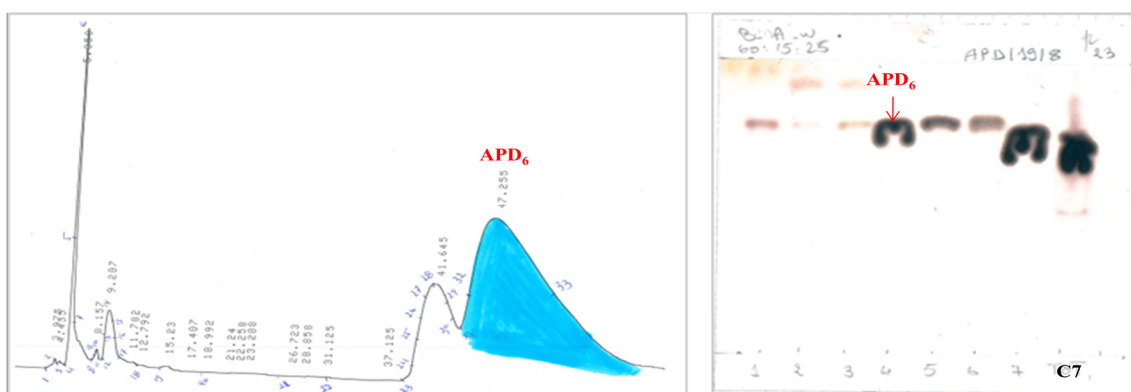


Figure II-30. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction C7.

• **La fraction D (862.0 mg)** : à donné trois composés grâce à une purification par CLHP semi-préparative en utilisant comme éluant MeOH-H₂O (35 : 65) pendant 60 min (figure II-31) pour obtenir les composés **APD₂₀** (2.9 mg, $t_r = 12.0$ min), **APD₁₇** (1.8 mg, $t_r = 13.85$ min) et **APD₃** (2.1 mg, $t_r = 44.61$ min).

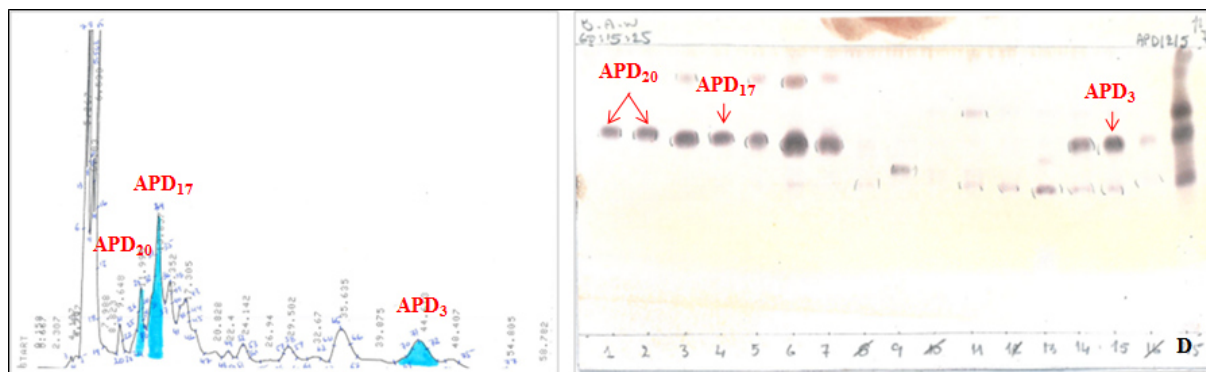


Figure II-31. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction **D**.

II.1.5.3.2.2. Chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la fraction **E**

La fraction **E** (8.29 g), a été soumise la méthode CPC identique de la fraction **C**, à l'exception une colonne de 3 mL a été remplie à l'aide de la phase mobile avec une rotation minimale de rotor avec 700 rpm. Toutes les fractions ont été analysées par CCM (figure II-32) puis regroupés en donnant les sous-fractions respectives **E1-E9** sont purifiés par CLHP semi-préparative (tableau II-7).

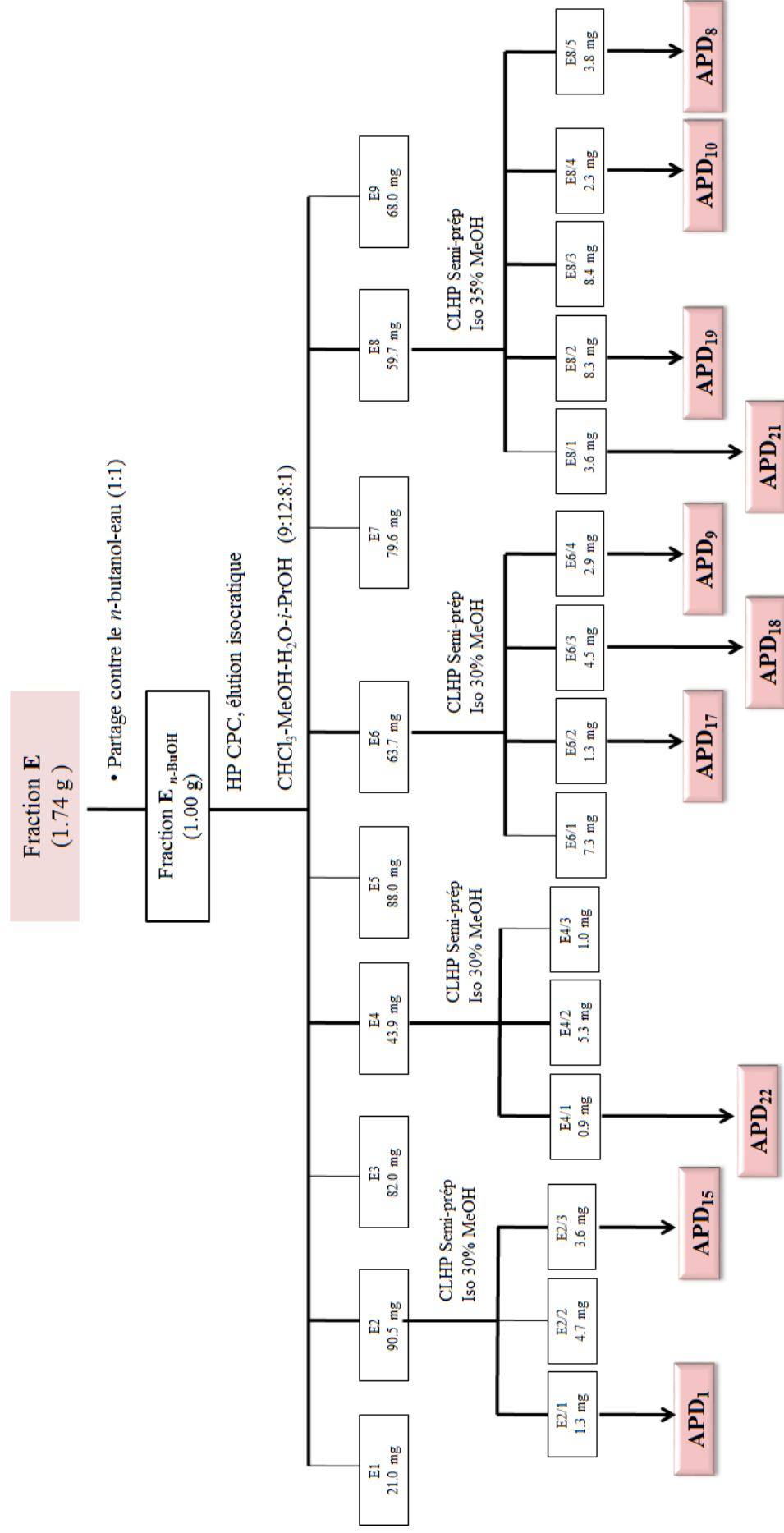


Schéma II-9. Séparation et purification de la fraction E.

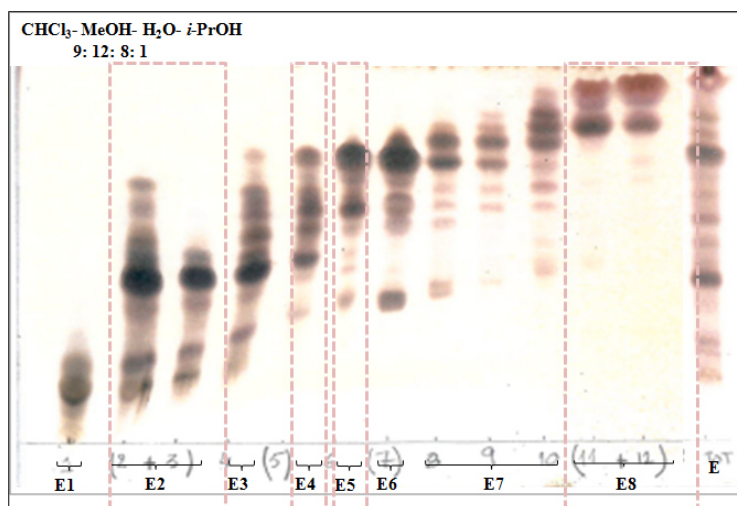


Figure II-32. Plaques CCM de chromatographie de partage centrifuge (CPC) de la fraction E.

Tableau II-7. Fractionnement en CPC de la fraction E.

Fractions	Masse (mg)	Observations / Produits isolés	Eluant des CCM
E1	21.0	Mélange complexe faible quantité	<i>n</i> -butano-CH ₃ COOH -H ₂ O (60 : 5 : 25)
E2	90.5	APD ₁ & APD ₁₅	
E3	82.0	Profil identique a celui de la fraction précédente	
E4	43.9	APD ₂₂ APD ₂₀ & APD ₁₇ & APD ₁₈	
E5	88.0	Mélange complexe	
E6	63.7	APD ₁₇ & APD ₁₈ & APD ₉	
E7	79.6	Mélange complexe	
E8	59.7	APD ₂₁ & APD ₁₉ & APD ₁₀ & APD ₈	
E9	68.0	Mélange complexe	

II.1.5.3.2.2.a. Purification des sous-fractions de la fraction E :

○ Les sous-fractions E2 (90.5 mg), E4 (43.9 mg) et E6 (63.7 mg) ont été purifiées par CLHP semi-préparative sur une colonne de silice greffée C₁₈ en utilisant comme système d'éluant MeOH-H₂O (30 : 70) pendant 45 min (figureII-33- II-34- II-35) pour obtenir les composés APD₁ (1.3 mg, t_r = 5.52 min) et APD₁₅ (3.5 mg, t_r = 30.0 min) à partir de la sous-fraction E2, et le composé APD₂₂ (0.9 mg, t_r = 7.70 min) de la sous-fraction E4, et APD₁₈ (4.5 mg, t_r = 21.36 min), et APD₉ (2.9 mg, t_r = 41.49 min) de la sous-fraction E6.

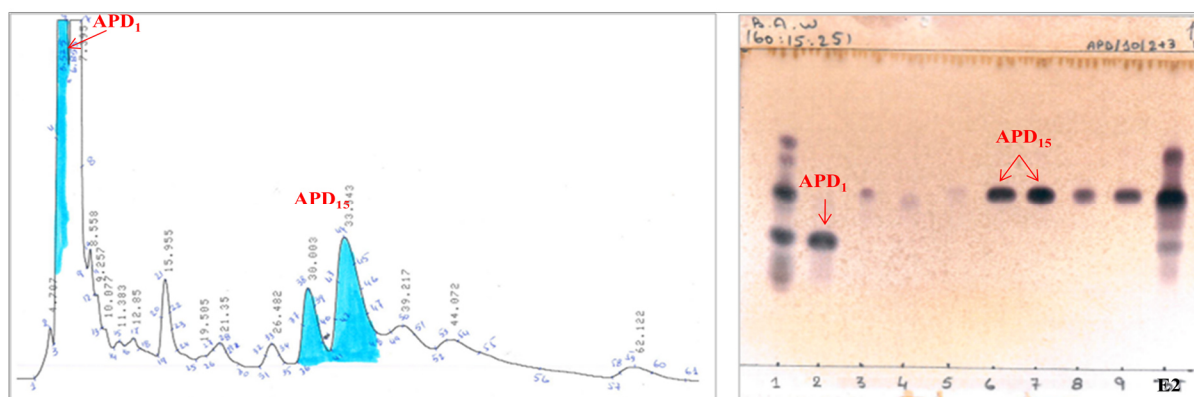


Figure II-33. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction E2.

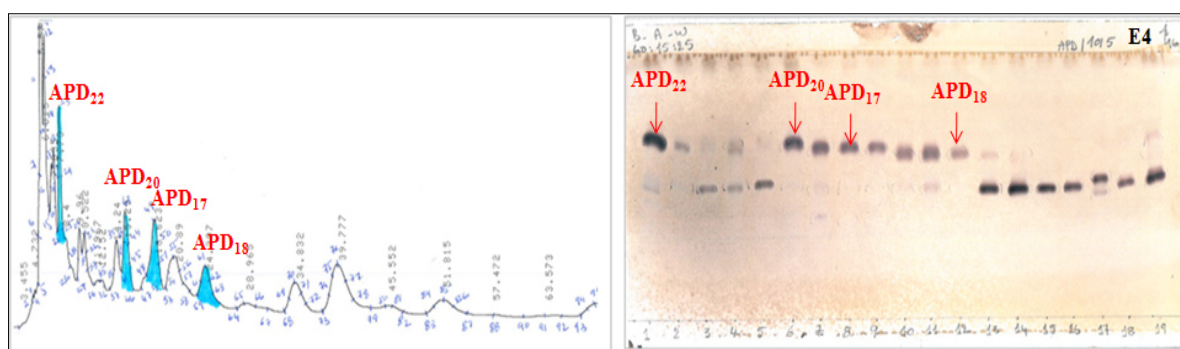


Figure II-34. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction E4.

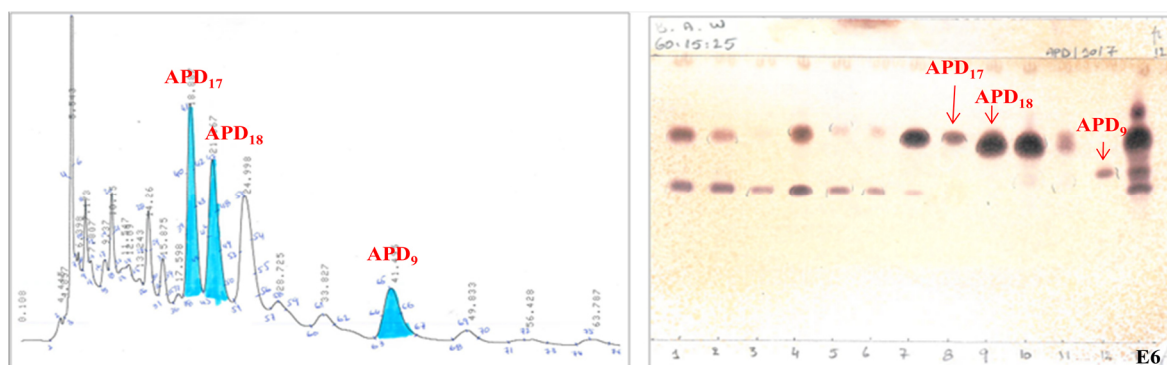


Figure II-35. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction E6.

○ **La sous-fraction E8** (59.7 mg) : nous avons obtenu cinq produits grâce à une chromatographie CLHP semi-préparative sur une colonne de silice greffée C₁₈ en utilisant comme système d'élution MeOH–H₂O (35 : 65) pendant 70 min (figure II-36). Les composés

à offrir sont **APD₂₁** (3.6 mg, $t_r = 25.0$ min), **APD₁₉** (8.3 mg, $t_r = 27.41$ min), **APD₁₀** (2.3 mg, $t_r = 54$ min) et **APD₈** (3.8 mg, $t_r = 62.27$ min).

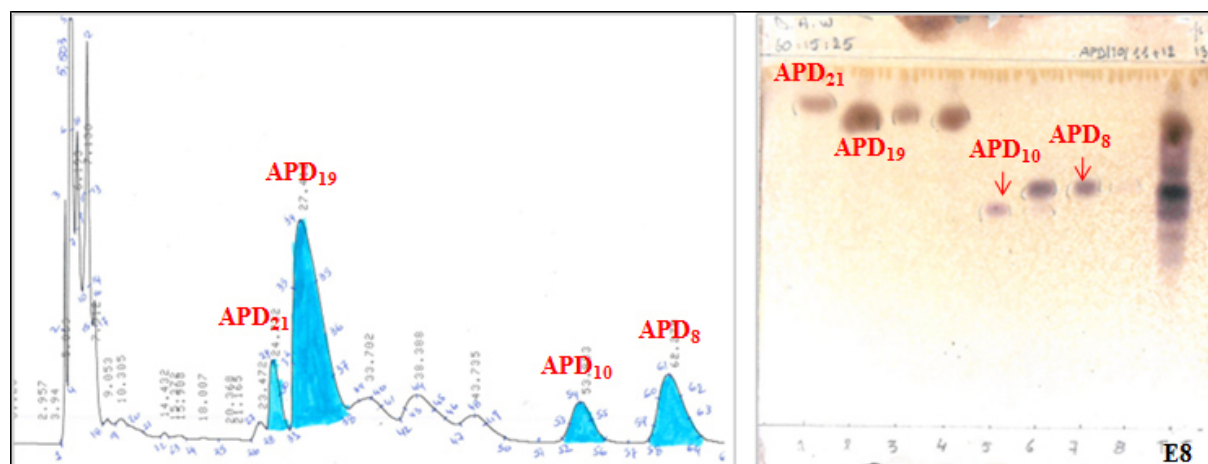


Figure II-36. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la sous-fraction **E8**.

- **Fractions G (252.9 mg) et I (97.4 mg)** : ont subi une purification par CLHP semi-préparative en utilisant système d'élution MeOH–H₂O (30 : 70) pendant 60 min (figure II-37-II-38) pour donner les composés **APD₁₁** (1.5 mg, $t_r = 45.54$ min) et **APD₂₃** (10.7 mg, $t_r = 24.36$ min) de la fraction **G** et le composé **APD₂₃** (4.9 mg, $t_r = 32.18$ min) de la fraction **I** (renferme le composé pur **APD₂₃**).

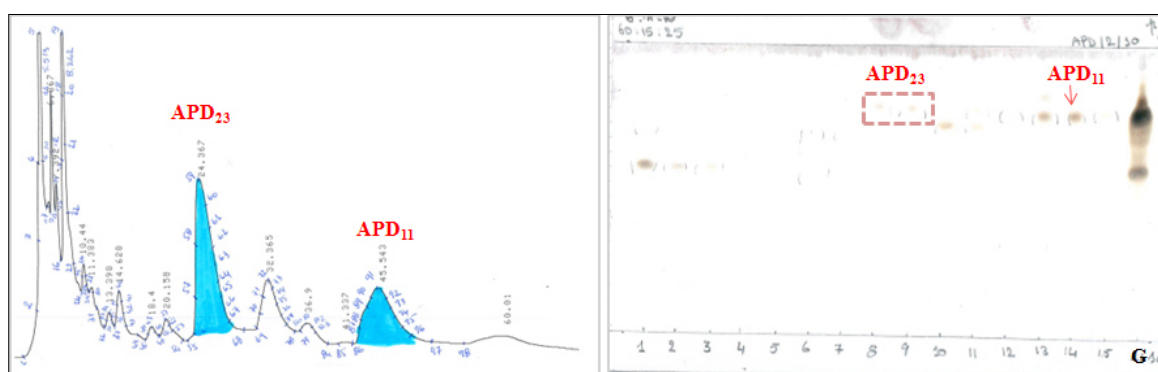


Figure II-37. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction **G**.

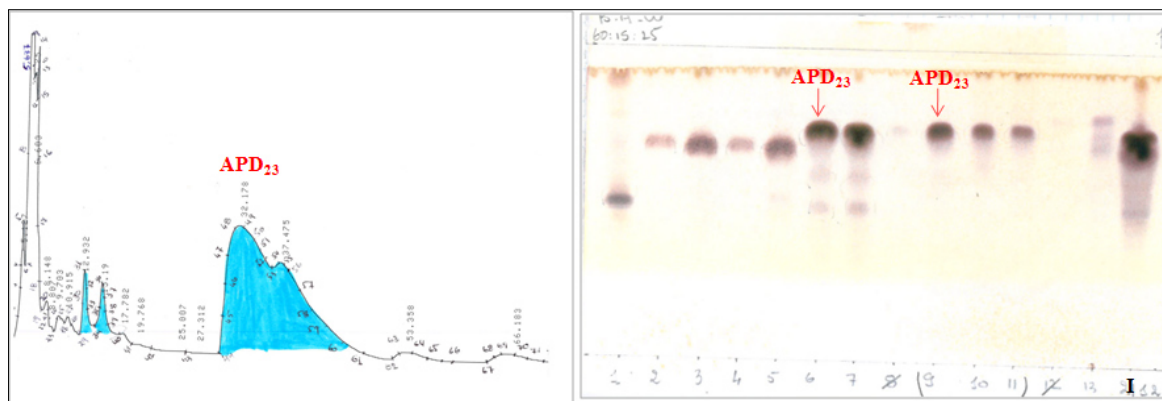


Figure II-38. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction I.

- **Fraction M** (56.5 mg) : a été purifié par une chromatographie CLHP semi-préparative en utilisant comme système d'éluion t MeOH–H₂O (45 : 55) pendant 20 min (figure II-39) pour offrir le composé **APD₂₄** (16.0 mg, $t_r = 13.0$ min).

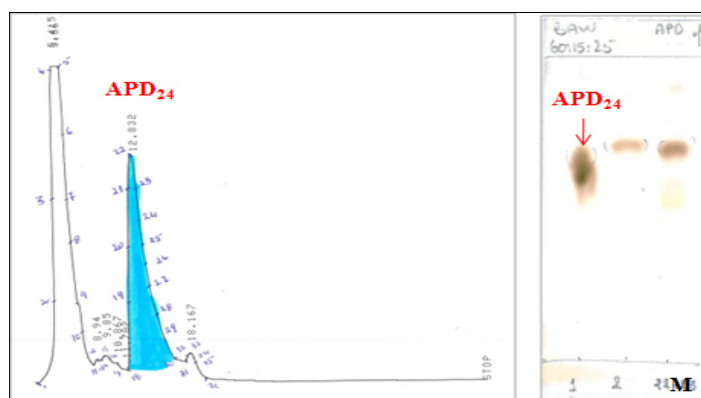


Figure II-39. Chromatogramme CLHP semi-préparative et profil CCM de la fraction M.

II.1.5.4. Hydrodistillation de l'huile essentielle de *Salvia buchananii* Hedge.

Les parties aériennes fraîches (200g) de la *Salvia buchananii* sont hydrodistillées dans un Clevenger, durant 3 heures. L'huile essentielle obtenue est conservée à +4°C jusqu'à son analyse GC et GC/MS.

II.1.5.5. Hydrolyse des composés purs

Une solution de chaque composé (2,0 mg) dans 1 N HCl (1 mL) a été remuée à 80°C dans un flacon de réaction bouché pendant 4 h. Après refroidissement, la solution a été évaporée sous un flux de N₂.

Le résidu a été dissous dans l'imidazole 1-(triméthylsilyl) et la pyridine (0,2 mL), et la solution a été remuée à 60 °C pendant 5 min. Après séchage de la solution, le résidu a été divisé entre H₂O et CHCl₃. La couche du CHCl₃ a été analysée par GC à l'aide d'une colonne L-CP-Chirasil-Val (0,32 mm x 25 m). Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient de 200°C. Un système de gradient de température à partir de 100°C pendant 1 min et jusqu'à 180°C à un taux de 5°C/min a été utilisés au four.

Des pics de l'hydrolyse ont été détectés par comparaison avec les temps de rétention des échantillons authentiques de D-Glucose, D-fructose et L-rhamnose (Sigma–Aldrich) après traitement au 1-(triméthylsilyl) imidazole dans la pyridine.

II.1.5.6. Préparation du dérivé d'acétonide du composé **APD13**

Une suspension du composé **APD13** (6,0 mg) dans le THF (2,0 mL) a été traitée avec du 2,2-diméthoxypropane (1 mL), suivie d'une quantité catalytique de p-Tsoh anhydre à 25 °C. Après 1 h d'agitation, quelques gouttes d'Et₃N ont été ajoutées, et le mélange était concentré sous vide. Le résidu est réparti entre le CHCl₃ et une solution saturée de NaHCO₃ et la partie chloroforme a été concentrée sous vide, ce qui a permis d'obtenir l'acétonide **APD13a** (1,2-*O*-isopropilidene).

Chapitre 2

Méthodes expérimentales des
activités biologiques

II.2.1. Activité Antioxydante

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de l'espèce *Salvia buchananii* a été évaluée par le test de blanchissement du β -carotène (Miller 1971).

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène qui entraîne la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrophotométrie. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, donc, prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène (Kartal *et al.*, 2007).

II.2.1.1. Blanchissement du β -carotène de l'huile essentielle de *Salvia buchananii* :

Cette activité est déterminée selon la méthode de Miller 1971 (Miller 1971). Une masse de 0.5 mg de β -carotène est dissoute dans 1 mL de chloroforme et ajoutée à 25 μ L d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 (mixture émulsifiante). Le chloroforme a été complètement évaporé sous vide. 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène a été ajoutée au mélange précédent, et rigoureusement agitée. 4 mL de cette mixture a été transféré dans différents tubes-test, contenant différentes concentrations de l'huile essentielle. Dès que l'émulsion est ajoutée dans chaque tube, l'absorbance était mesurée à 470 nm au temps zéro, en utilisant un spectrophotomètre. Le système d'émulsion a été incubé 2h de temps à 50°C.

La Vitamine E a été utilisée comme standard. Le taux de blanchissement de β -carotène (**R**) était calculé selon l'équation suivante : **R** = $\ln(a/b) / t$

ln : log naturel

a : l'absorbance au temps 0

b : l'absorbance au temps t (120 mn)

L'activité antioxydant (AA) a été calculée en termes de pourcentage d'inhibition relatif au contrôle, utilisant l'équation suivante : $AA\% = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$

II.2.2. Activité Anticholinestérase

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

Les enzymes AChE de l'anguille électrique et BChE de sérum de cheval ont été utilisés, ainsi que l'iodure d'acétylthiocholine et le chlorure butyrylthiocholine ont été utilisés comme substrats de la réaction (AChE et BChE respectivement) avec l'acide 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoïque (DTNB), pour la mesure de l'activité anticholinestérase. Pour mesurer l'activité inhibitrice AChE, un volume de : 130 μL du tampon de phosphate de sodium (100 mM, pH = 8), 10 μL de l'extrait à différentes concentrations, et 20 μL de l'enzyme AChE (5.32×10^{-3} U), ont été incubés pendant 15 min à 25°C, puis 20 μL de DTNB (0.5 mM) ont été ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'addition de 20 μL d'iodure d'acétylthiocholine (0.71 mM).

L'analyse de l'activité inhibitrice BChE a été déterminée suivant les mêmes étapes de celles de l'AChE, en utilisant l'enzyme BChE (6.85×10^{-3} U) et le substrat chlorure butyrylthiocholine (0.2 mM). L'hydrolyse de ces substrats a été surveillée par spectrophotométrie de la coloration jaune de 5-thio-2-nitrobenzoate formé par la réaction de DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine ou de chlorure de butyrylthiocholine. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 412 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE ou BChE a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH 8) en utilisant la formule : $inhibition \% = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$

Où : $A_{\text{contrôle}}$ est l'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai,

A_{extrait} , est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test.

II.2.3. Activité Antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *S. buchananii* (SB) a été effectuée par la méthode de diffusion sur disque sur les souches bactériennes suivantes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 4330, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* (HS), *Staphylococcus aureus* (HS), *Pseudomonas aeruginosa* (HS), *Klebsiella pneumoniae* (HS), *Salmonella heidelberg* (HS) et *Shigella sonnei* (HS). Les souches de références (ATCC) utilisées proviennent de l'institut Pasteur à Alger et de prélèvements de malades (SH) du CHU (hôpital Benbadis, de Constantine).

Chaque bactérie a été ensemencée sur le milieu de culture Mueller-Hinton. La sensibilité des souches à l'huile essentielle de SB a été évaluée par la méthode de dilution en

gélose ; différentes concentrations des extraits ont été inclus dans des boîtes de gélose Mueller-Hinton (CMI sensible $\leq 32 \mu\text{g/mL}$) sur des disques (6 mm). Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 h, des zones d'inhibition ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle.

II.2.4. Activité Antiproliférative

Il existe plus d'une centaine de variétés de cancer, ou de tumeur maligne, qui peuvent se loger dans différents tissus et organes, et qui menasse la vie humaine, en revanche les produits naturels ont été depuis toujours une source inépuisable des entités curatives sur les quelles repose la majorité des traitements appliqués. C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antiproliférative des deux triterpènes purs (**SBR₁** et **SBR₂**) isolés de la *Salvia buchananii* (**SBR**), en utilisant les lignées cellulaires suivantes :

- Les cellules Jurkat T (leucémie)
- Les cellules Hela (cancer du col de l'utérus)
- Les cellules MCF7 (cancer du sein)

II.2.4.1. Test colorimétrique MTT

La viabilité cellulaire est mise en évidence par un test colorimétrique basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en cristaux de formazan bleu. Ce test fait partie des méthodes fondées sur des perturbations des fonctions mitochondriales des cellules et utilise le sel de tétrazolium MTT qui est un colorant nécessitant une étape de métabolisation une fois avoir pénétré dans les cellules vivantes.

II.2.4.2. Viabilité cellulaire

Les cellules ont été réparties sur une plaque à 96 puits avec différentes concentrations, Les cellules Jurkat ont étéensemencées à une densité cellulaire de 2×10^4 / puits, tandis que les cellules Hela et MCF7 à 1×10^4 / puits, la veille du traitement. Le nombre des cellules viables a été quantifié par le test MTT qui est une méthode rapide de numération des cellules vivantes, utilise le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) qui forme un précipité dans la mitochondrie des cellules de couleur violette, puis avec un simple dosage de la densité optique à 550 nm par spectroscopie, la

quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement est reconnue. Dans certaines expériences, la viabilité cellulaire a également été vérifiée par le test d'exclusion de trypanblue en utilisant une chambre de comptage Bürker. Les valeurs IC_{50} ont été calculées à partir de la dose de viabilité cellulaire et ont été définies comme la concentration entraînant une inhibition de 50% de la survie cellulaire par rapport aux témoins. L'Etoposide a été utilisé comme témoin positif. Chaque condition expérimentale a été testée une fois par quadruplicité. Les valeurs IC_{50} ont été réalisées avec le logiciel GraphPad.

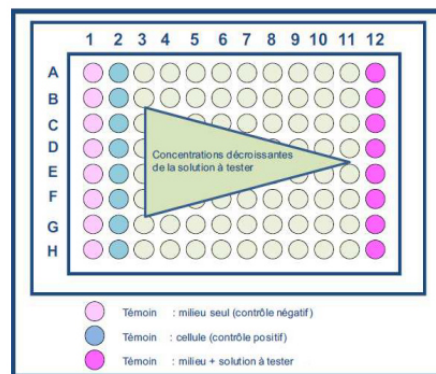


Figure II-40. Schéma des plaques 96 puits dans le test MTT.

II.2.5. Activité inhibitrice de la MonoAcylGlycerol Lipase (MAGL)

II.2.5.1. La MonoAcylGlycérol Lipase (MAGL) :

La MonoAcylGlycérol Lipase fait partie de la super famille des hydrolases à sérine et permet l'hydrolyse des liaisons ester 1 et 2 des monoacylglycérols en un glycérol et en un acide gras libre (figure II-41).

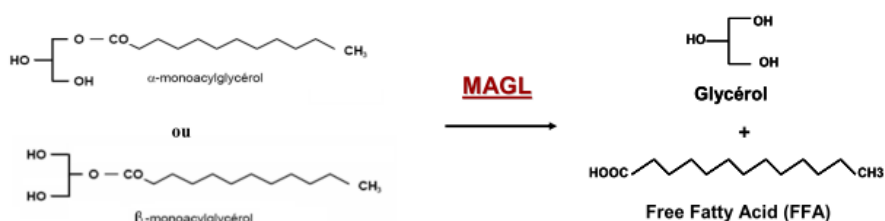


Figure II-41. Activité de la MonoAcylGlycerol Lipase.

MAGL est une protéine soluble et amphiphile de 33 kDa de la famille des α/β sérine hydrolases. La localisation de MAGL dans l'organisme reste peu connue chez l'homme mais

des études chez la souris ont permis de déterminer que cette enzyme était présente dans de nombreux tissus comme le cerveau, l'intestin, le foie, etc... (Karlsson et al., 1997; Karlsson et al., 2001).

II.2.5.2. Essais enzymatiques :

L'inhibiteur synthétique de référence MAGL (4-[4-chlorobenzoyl]piperidin-1-yl)(4-méthoxyphenyl)-methanone (composé "CL6a") (99 % pourcentage de pureté par analyse CLHP), tel qu'indiqué précédemment (Tuccinardi et al., 2014). Les deux essais effectués sur des plaques de 96 puits à température ambiante à un volume final de 200 μ l.

Les composés sont dissous dans des solutions mères de DMSO à la concentration maximale de 625 μ M (la concentration de DMSO n'a pas dépassé 4% au cours des mesures), et cette solution a été diluée à sept concentrations différentes (de 625 à 0,86 μ M, en double pour chaque concentration) qui ont été utilisées pour produire la courbe concentration-réponse. Toutes les valeurs IC_{50} sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Maximaux et minimaux contrôles ont également été inclus dans chaque plaque.

La réaction enzymatique pour les dosages LDH réalisée dans la direction "en avant" (pyruvate à lactate), et la quantité de NADH consommée a été surveillée (340 nm). Des essais effectués dans un tampon de phosphate de 100 mM (pH = 7,4) en présence de pyruvate de 200 μ M et de NADH de 400 μ M. Après 15 min d'incubation, les mesures finales obtenues en utilisant un lecteur de microplaques Victor X3 (PerkinElmer).

La réaction enzymatique pour les essais MAGL a été basée sur la conversion du substrat 4-nitrophénylacéate (4-NPA) en 4-nitrophénol et la quantité de 4-nitrophénol produite a été surveillée (450 nm), comme indiqué précédemment (Granchi et al., 2017). Des essais réalisés dans un tampon de 10 mM Tris (pH = 7,2), contenant 1 mM d'EDTA et 0,1 mg/mL de BSA, en présence de 100 μ M de 4-NPA, après 30 minutes de réaction, les valeurs d'absorbance sont mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaques Victor X3 (PerkinElmer).

Les valeurs d' IC_{50} sont des dérivées de données expérimentales à l'aide de l'ajustement dose-réponse sigmoïde du logiciel GraphPad Prism.

II.2.5.3. Docking moléculaire :

La structure cristalline de *hMAGL* (code pdb 3PE6 (Schalk-Hihi et al., 2011)) provient de la banque de données des protéines (Berman et al., 2000). Nous avons d'abord ajouté des atomes d'hydrogène.

Ensuite, la protéine complexée avec son inhibiteur de référence a été minimisée en utilisant le logiciel Amber 14 (Case et al., 2015), et le champ de force ff14SB à 300K. Le complexe placé dans une boîte à eau rectangulaire parallélépipédique, un modèle de solvant explicite pour l'eau (TIP3R) a été utilisé et le complexe résolu avec un bouchon d'eau de 10 Å. Pour neutraliser le système, des ions de sodium ajoutés comme contre-ions. Puis, deux étapes de minimisation ont été effectuées.

- D'abord, la protéine qui a été maintenue fixe avec une retenue de position de 500 kcal/mol.Å² et seules les positions des molécules d'eau sont minimisées.
- Deuxièmement, l'ensemble du système réduit au minimum jusqu'à ce qu'une convergence de 0.05 kcal/Å.mol soit atteinte. Les ligands ont été construits en utilisant Maestro (Maestro., 2009) et minimisés au moyen de Macromodel (Macromodel., 2009) dans un environnement aquatique, suivant la méthode CG pour obtenir une valeur de convergence de 0,05 kcal/Å.mol, en utilisant le champ de force du MMFF et une distance-constante diélectrique dépendante de 1.0.

L'amarrage automatisés au moyen du programme autodock 4.0 (Morris et al., 1998); autodock Tools (Morris et al., 2009) a été utilisé pour identifier les angles de torsion dans les ligands, ajouter le modèle de solvant, et assigner les charges atomiques Kollman à la protéine. La charge ligande est calculée selon la méthode Gasteiger. En considérant l'inhibiteur de référence du 3-(4-(pyrimidine-2-yl)pipérazine-1-yl)azétidine-1-yl)méthanone comme groupe central, les régions d'intérêt utilisées sont définies par autodock; en particulier une grille de 82, 40, et 30 points dans les directions x, y, et z, centrés sur le noyau de la masse de ces composés qui a été construit.

Pour les calculs de la carte énergétique, on a utilisé un espacement de 0.375 Å et une fonction dépendante de la distance de la constante diélectrique. Avec l'aide du Lamarckian Genetic Algorithm, les composés amarrés sont soumis à 100 passages de la recherche autodock, en utilisant 500 000 étapes d'évaluation d'énergie et les valeurs par défaut des autres paramètres. L'analyse en grappes des résultats effectuée à l'aide d'une tolérance RMS de 2.0 Å.

II.2.6. Activité Anti-angiogénique

II.2.6.1 Angiogenèse :

L'angiogenèse est un processus régulé par une balance entre des molécules favorisant l'angiogenèse, appelées pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, FGF) et des molécules la limitant, appelées anti-angiogéniques (angiostatine, thrombospondine) (Méjean et al., 2008). L'angiogenèse est indispensable à la croissance physiologique et à l'opposé son absence est létale. L'angiogenèse s'applique donc à des phénomènes physiologiques (croissance embryonnaire, formation du placenta, cicatrisation...); à des phénomènes pathologiques (rétinopathie diabétique, dégénérescence maculaire, cicatrisation tissulaire après un phénomène ischémique) et à des phénomènes tumoraux (Folkman ., 1971).

II.2.6.2. Protocole de traitement, génération et mise en scène d'embryons de poisson zèbre :

Les embryons de poisson-zèbre ont été obtenus à partir de poissons sauvages achetés dans une animalerie locale et maintenus en circulation dans les aquariums à 28,5°C sur une photopériode de 14/10 h (clair/foncé). Les embryons générés par l'accouplement naturel décrit par Kimmel et al., 1995 ont été cultivés dans l'eau à 28,5 °C.

Ensuite, des embryons sains et réguliers ont été sélectionnés à 24 heures après la fécondation (hpf), déclassés manuellement avec des forceps, distribués dans 96 microplaques à un seul puits (un embryon par puits) et enfin incubé avec 100 µL d'eau embryonnaire contenant des composés isolés (2 µM) ou 2-méthoxyestradiol (ME, 2 µM), utilisés comme substance anti-angiogénique standard. Le DMSO (0.2 % v/v) a été utilisé pour ces traitements. Le groupe témoin n'a reçu que le DMSO (0.2 % v/v). Tous les embryons traités (10 pour chaque groupe) ont été incubés de 24 hpf à 72 hpf (total de 48 h d'exposition).

II.2.6.3. Détermination quantitative de l'activité de la phosphatase alcaline endogène (PAE) :

La détermination quantitative de l'activité du PAE a été effectuée comme l'ont décrit Germanò et al., 2015. Les embryons traités à 72 hpf sont déshydratés avec des concentrations croissantes d'éthanol, puis ils ont été lavés trois fois avec un tampon de diéthanolamine (1 M, pH 9.8) et incubés avec le substrat contenant 0.5 mg/mL p-phosphate de nitrophényle sel

disodique (Sigma Aldrich) pendant 30 min à température ambiante. NaOH (2 M) a été ajouté pour arrêter la réaction.

La densité optique (DO) du produit final soluble mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Mutiskan GO, Thermo Scientific). La croissance du navire a été exprimée en pourcentage de la formation respectueuse des embryons témoins, considérés à 100 %. Chaque essai a été répété au moins trois fois.

L'importance des différences évaluée sur la base du *t*-test, en tenant compte des différences pour $P < 0.05$ et $P < 0.01$, et finalement calculée par rapport aux embryons témoins.

II.2.6.4. Essai Chorioallantoic Membrane (CAM) :

Le test CAM effectué selon la méthode de Certo et al., 2017. œufs de poulet fécondés ont été incubés à 37 °C, les œufs sont positionnés horizontalement et tournent plusieurs fois.

Après 4 jours d'incubation, une fenêtre de 1 cm² a été soigneusement créée sur le côté large de l'œuf pour évaluer l'étendue des vaisseaux sanguins embryonnaires. Le développement des embryons a été vérifié visuellement, et les embryons morts ou malformés sont exclus.

Ensuite, des composés isolés testés (APD₁ à APD₂₁) à 2 µM (100 µL/œuf). Dix œufs utilisés pour chaque groupe. Le DMSO (0.2 % v/v) dans le tampon de Tris (pH 7.4) a servi de véhicule pour ces traitements. L'acide rétinoïque (3 µM) a été utilisé comme témoin positif.

Après le traitement, les œufs sont réincubés pendant les deux autres jours. À la fin de l'incubation, chaque ovule a été observé sous un stéréomicroscope (série SMZ-171, Motic) pour visualiser la microvascularisation du CAM. Les images de chaque CAM sont acquises par un appareil photo numérique (MoticamMD 5 plus) pour quantifier les effets sur l'angiogenèse dans une zone normalisée à l'aide d'un programme de traitement d'image Java open source. L'activité angiogénique a finalement été exprimée en % respect du contrôle considéré à 100 %, chaque expérience a été répétée trois fois.

Les similitudes ont été évaluée sur la base du *t*-test, en tenant compte des différences pour $P < 0.05$ et $P < 0.01$, et finalement calculée par rapport aux œufs témoins.

PARTIE III

Résultats et discussion

Chapitre 1

Identification des produits isolés
de *Salvia buchananii* Hedge.

Etude phytochimique de *Salvia buchananii* (SBR)

Malgré les nombreux travaux publiés sur les parties aériennes, les feuilles et les racines de la *Salvia* (Wu et al., 2012), à notre connaissance les racines de la plante *Salvia buchananii* ont fait l'objet d'aucune étude chimique. L'objectif de cette étude est d'isoler et d'élucider les composés contenus dans cette plante et ainsi d'identifier de nouveaux métabolites potentiellement biologiquement intéressants.

III.1.1. Identification des triterpènes isolés de l'extrait SBR_{CHCl3}

Les trois triterpènes pentacycliques isolés de l'extrait chloroformique (**SBR₁**-**SBR₃**), ce sont des dérivés du squelette lupane, ursane et oleanane (figure III-1).

Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ¹H, du carbone ¹³C et 1H TOCSY à une dimension, et à séquences multi-impulsionnelles à deux dimensions homonucléaires ¹H-¹H COSY et hétéronucléaires ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC, aussi par spectrométrie de masse haute résolution HR-ESI, par comparaison avec les données de la littérature.

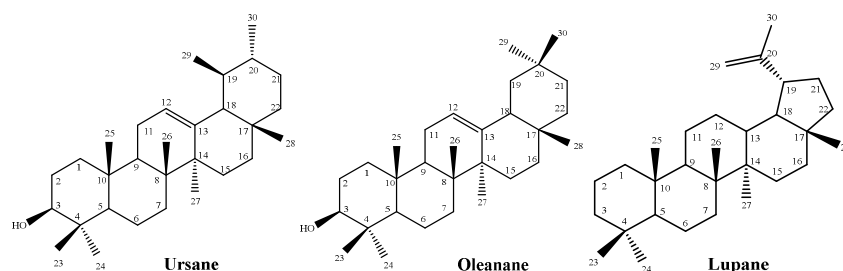


Figure III-1. Squelettes d'ursane, oleanane et lupane.

III.1.1.1. Détermination structurale du composé SBR₁

Le composé **SBR₁** se présente sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans le MeOH. Ce composé prend une coloration violette après révélation en CCM par le sulfate de cérium.

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure III-2), présente en mode positif un ion quasi-moléculaire à m/z 495,3442 $[M+Na]^+$ (calc. 495.3450), et le spectre (ESI-

MS) en mode négatif, un ion quasi-moléculaire à m/z 517 $[M+HCOO]^-$, suggérant une masse moléculaire de 472 *uma* correspondant à une formule brute $C_{30}H_{48}O_4$.

le spectre ESI-MS/MS montre également des ions résultant de la fragmentation de la molécule et notamment l'ion à m/z 499 $[M+HCOO-18]^-$ correspondant à la perte d'une molécule d'eau, qui indique la présence d'un groupement hydroxyle, et un ion fragment à m/z 473 $[M+HCOO-44]^-$ indiquant la présence d'un groupe carboxylique.

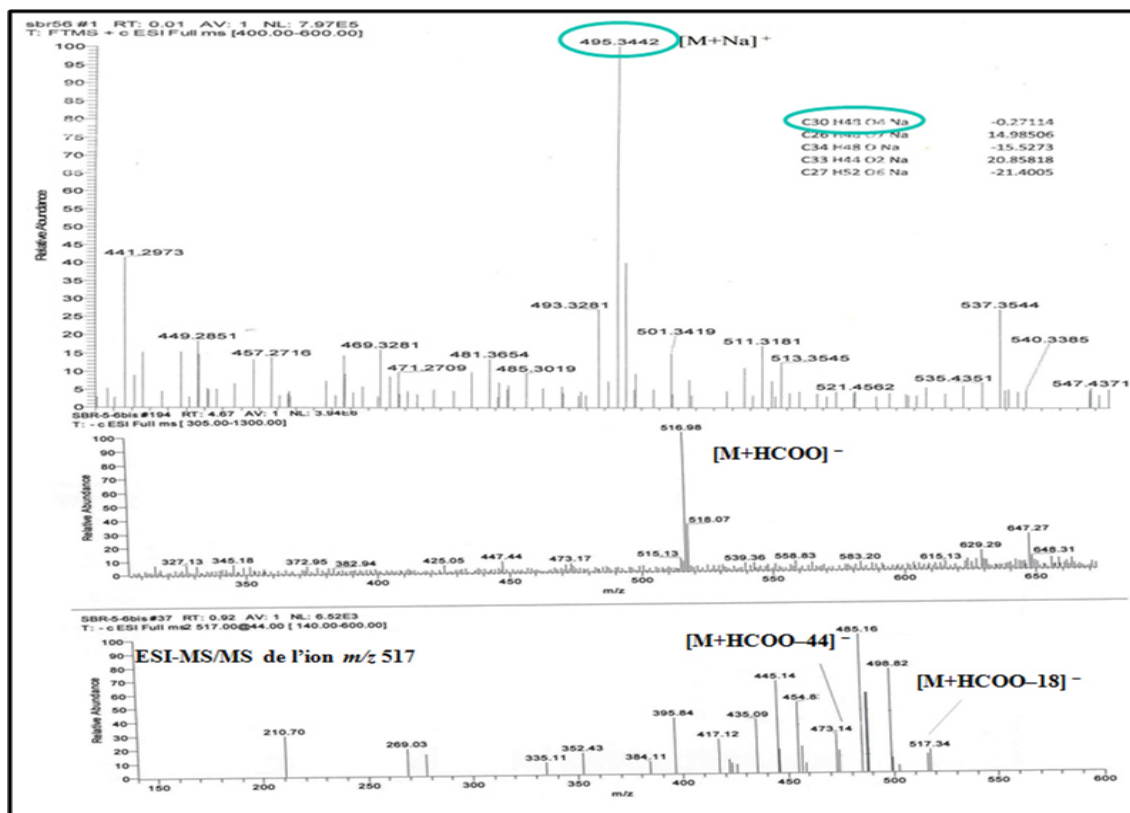


Figure III-2. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif et ESI-MS/MS en mode négatif du composé **SBR₁**.

Spectrométrie RMN :

Le spectre de RMN 1H (figure III-3) révèle clairement la présence de :

- Six fins singulets raisonnant entre δ_H 0.83 et 1.72 intégrant chacun pour trois protons correspondant à six groupes méthyles dont un déblindé vers δ_H 1.72 ppm indiquant un environnement électronique différent.
- Un signal sous forme de doublet de doublets d'intensité 1H à δ_H 2.14 ppm ($J = 13.0 - 1.5$ Hz).

- Trois signaux d'intensité 1H à δ_H 3.04 (*d*, $J = 11.8$ Hz), 3.90 (*d*, $J = 11.8$ Hz) et 5.00 ppm (*dd*, $J = 11.0 - 5.5$ Hz).

En considérant cette observation nous suggérons la présence d'un CH hydroxylé, et d'un ou/et des éléments électronégatifs ou/et une double liaison avoisinant ce proton.

- Un signal sous forme de triplet de doublets d'intégration 1H à δ_H 3.09 ppm ($J = 16.0 - 11.15 - 4.6$ Hz).
- Trois signaux d'intensité 1H à δ_H 1.30 ($J = 9.5 - 4.2$ Hz) et 2.42 ppm ($J = 11.4 - 4.0$ Hz) sous forme de doublet de doublets et d'un doublet large à δ_H 1.65 ($J = 11.5$ Hz).
- Deux multiplets d'intensité 1 H à δ_H 1.93 et 2.28 ppm.
- Deux protons éthyléniques résonants à δ_H 4.71 et 4.90 ppm.

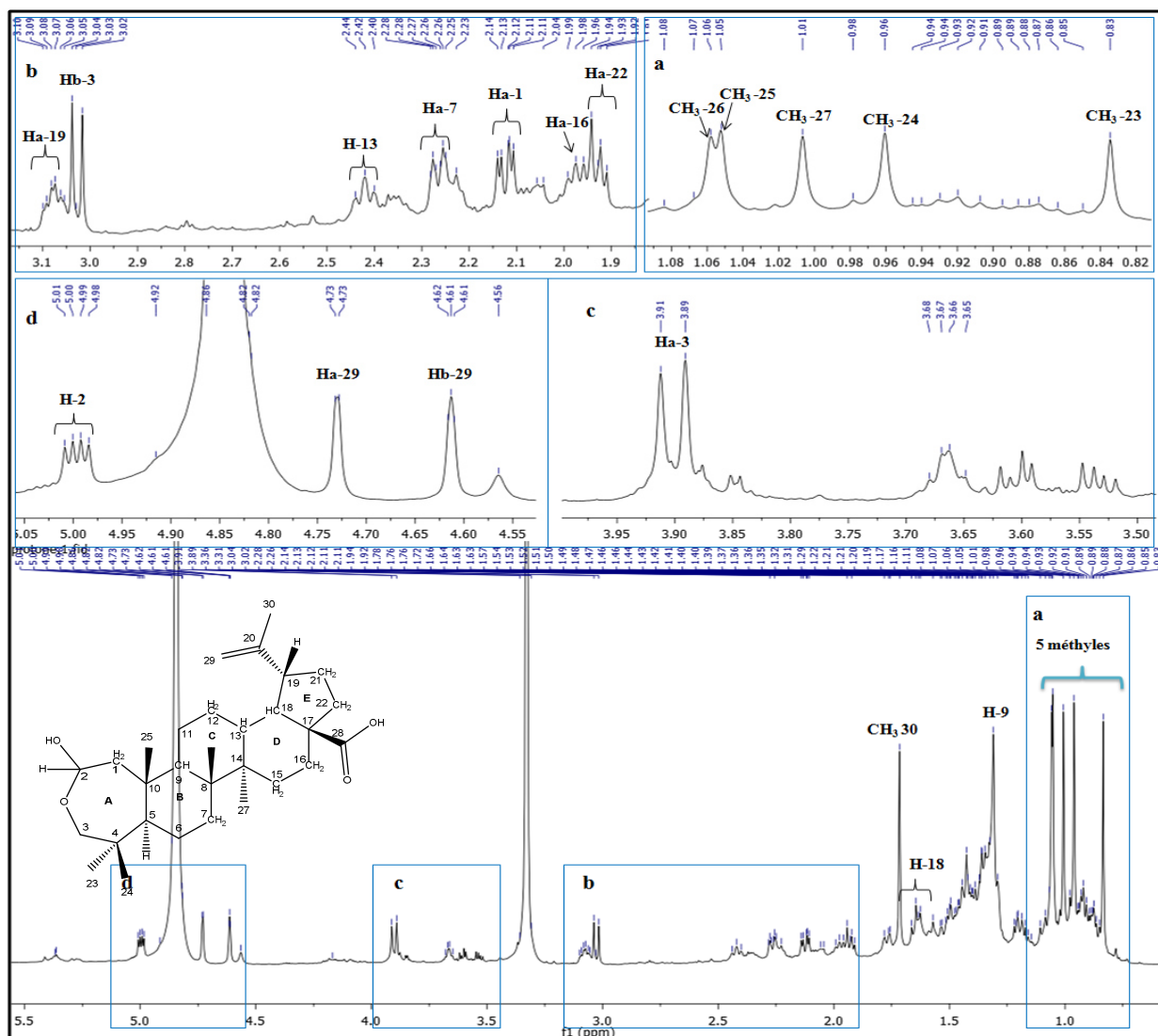


Figure III-3. Spectre de RMN 1H , avec un agrandissement des parties (a, b et c) du composé SBR_1 .

Le spectre RMN ^{13}C (figure III-4) du composé **SBR₁** révèle la présence de 30 carbones parmi lesquels nous pouvons distinguer les carbones caractéristiques suivants :

- Six carbones méthylénique résonants à δ_{C} 14.6, 15.0, 17.0, 19.1, 20.7 et 27.6 ppm.
- Un massif de carbones entre δ_{C} 22.0-57.4 ppm attribuables aux CH_2 et C_q quaternaire.
- Un carbone oxydé apparaisse à δ_{C} 71.6 ppm.
- Un signal repéré à δ_{C} 94.5 ppm indique la présence d'un acétal.
- Les deux carbones éthyléniques détectés, sont un carbone quaternaire situé à δ_{C} 151.8 ppm et un carbone méthylénique à δ_{C} 109.0 ppm.

A ce stade, l'ensemble des données spectrales obtenues nous permet de proposer un squelette triterpénique pentacyclique dérivés du noyau lupane.

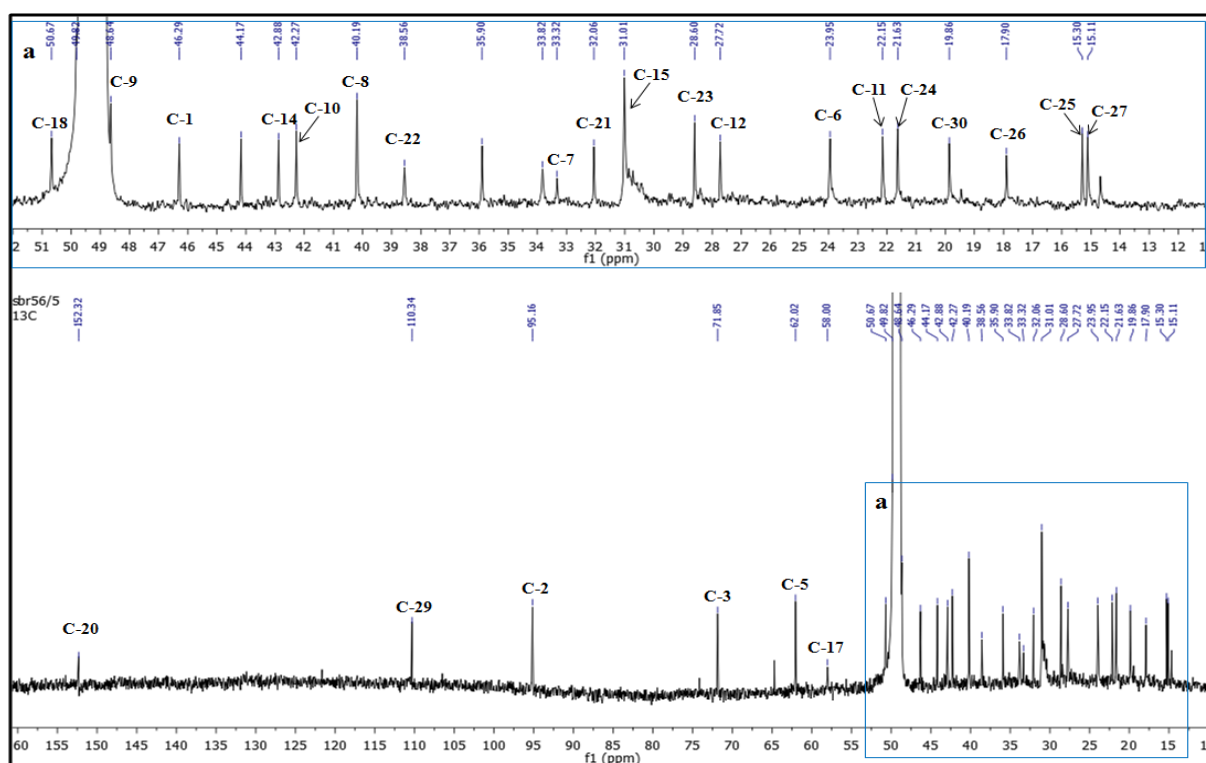


Figure III-4. Spectres de RMN ^{13}C avec un agrandissement de la partie (a) du composé **SBR₁**.

En examinant le spectre COSY (figure III-6) nous pouvons identifier deux types des corrélations spectroscopiques :

- Des corrélations $^4J_{\text{H-H}}$ couplage à longue distance entre :
 - Les deux protons éthyléniques H_a -29 (δ_{H} 4.90 ppm) et H_b -29 (δ_{H} 4.71 ppm) corrèle avec les protons du méthyle CH_3 -30 (δ_{H} 19.1 ppm).

- Des corrélations $^3J_{H-H}$ entre :
 - Le proton H-19 (δ_H 3.09 ppm) présente trois corrélations dont deux avec les deux protons géminés H_a-21 (δ_H 1.98 ppm) et H_b-21 (δ_H 1.38 ppm) et le troisième appartenant au proton vicinal H-18 situé à δ_H 1.65 ppm.
 - Les protons H_a-21 et H_b-21 avec les protons H_a-22 (δ_H 1.93 ppm) et H_b-22 (δ_H 1.46 ppm).
 - Les protons vicinaux H-18 (δ_H 1.65 ppm) et H-13 (δ_H 2.42 ppm).
 - Le proton H-13 corrèle avec les deux protons géminés H_a-12 (δ_H 1.64 ppm) et H_b-12 (δ_H 1.62 ppm).
 - Les protons H_a-3 (δ_H 3.90 ppm) et H_b-3 (δ_H 3.04 ppm) corrélant avec le proton H-2 (δ_H 5.00 ppm).
 - Le proton H-2 couple avec deux protons géminés H_a-1 (δ_H 2.14 ppm) et H_b-1 (δ_H 1.37 ppm). Les déplacements chimiques des protons H-2, H_a-3 et H_b-3 suggèrent la présence d'un groupement époxy à la position C-2/C-3, et que le composé **SBR**₁ est hydroxylé en carbone C-2 (figure III-5).

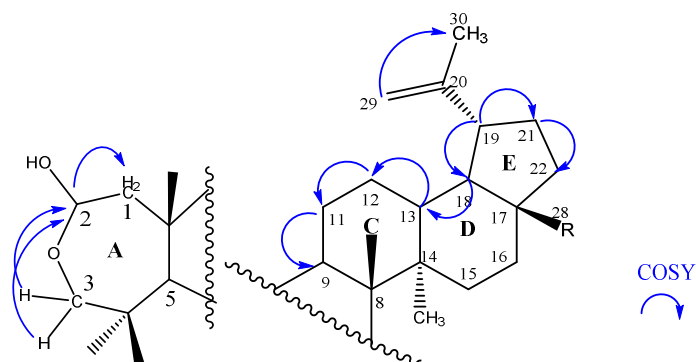


Figure III-5. Corrélations COSY J_{H-H} observée sur les cycles **A**, **C**, **D** et **E** du composé **SBR**₁.

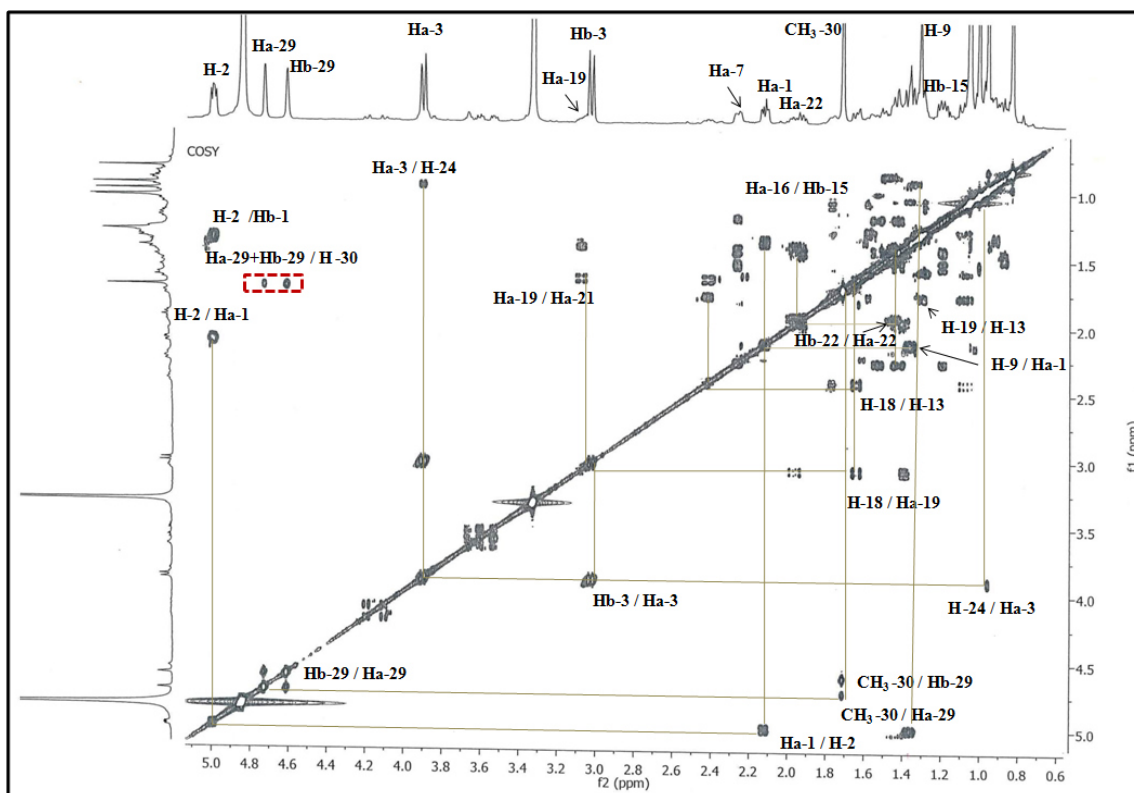


Figure III-6. Spectre COSY du composé **SBR₁**.

L'analyse des spectres RMN 1D réalisée en TOCSY (figure III-8) et RMN 2D COSY (figure III-6) indique les ordres : C-1-C-2, C-5-C-7, C-9-C-13, C-15-C-10 et C-18-C-22 confirmant la présence d'un système pentacyclique.

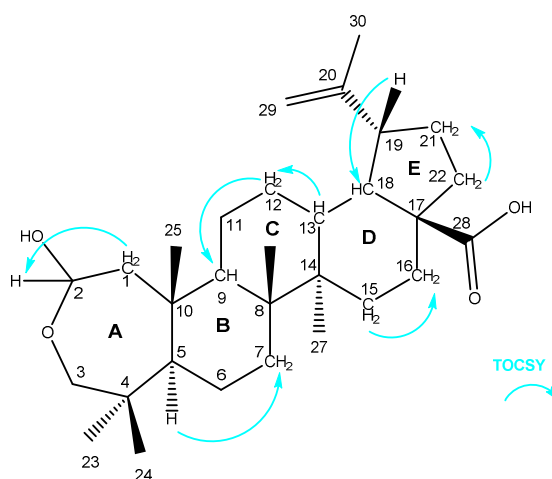


Figure III-7. Corrélations 1D TOCSY observée sur les cycles **A**, **B**, **C**, **D** et **E** du composé **SBR₁**.

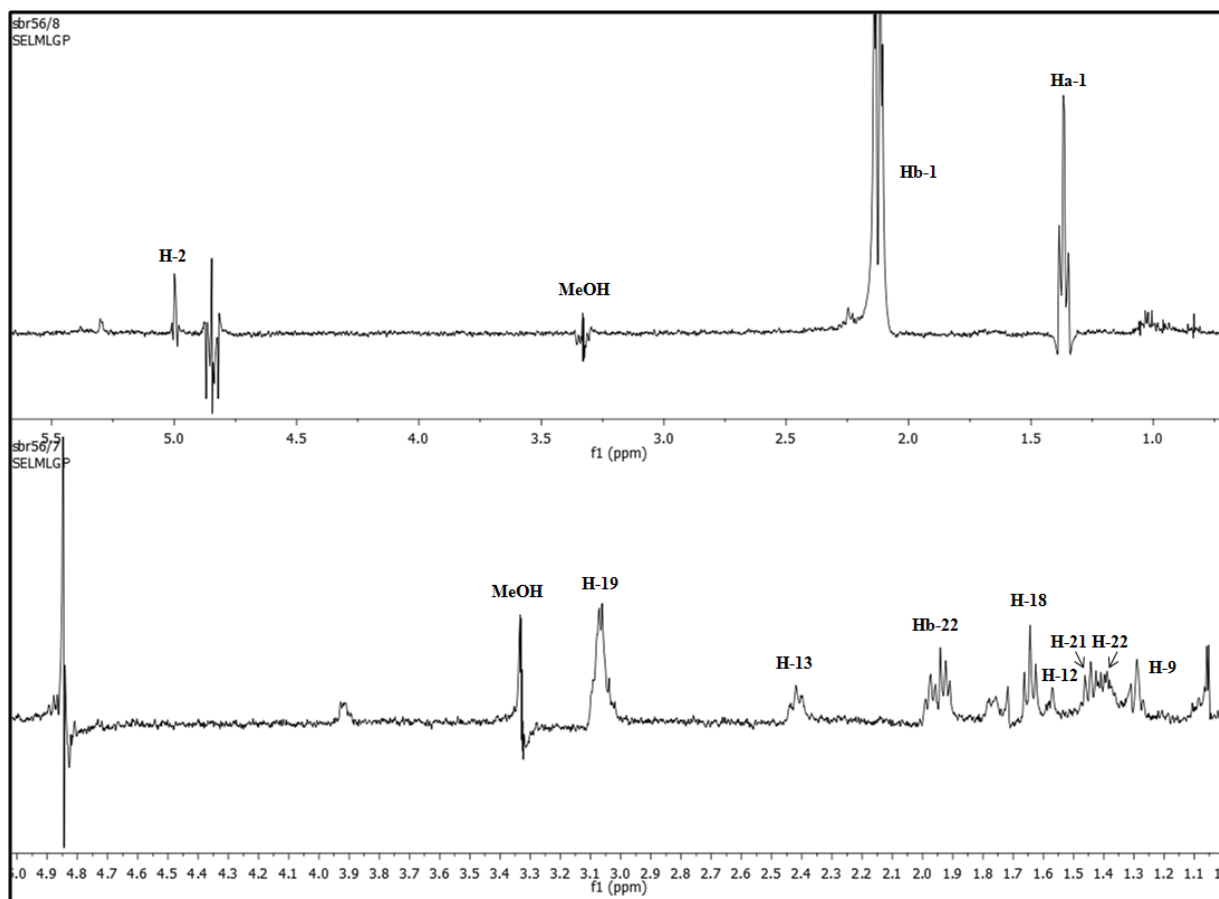


Figure III-8. Spectre TOCSY du composé **SBR₁**.

Grâce à l'analyse des corrélations hétéro-nucléaires directe $^1J_{H-C}$ observées sur le spectre HSQC (figure III-9) nous pouvons dénombrer 6 méthines, 11 méthylènes et 6 méthyles pour le composé **SBR₁**.

L'expérience HSQC permet de mettre en évidence tous les corrélations C-H du composé (tableau III-1), C-1 (δ_C 45.8), C-2 (δ_C 94.5) et C-3 (δ_C 71.6) du cycle A, C-9 (δ_C 48.4), C-11 (δ_C 22.0), C-12 (δ_C 26.8) et C-13 (δ_C 39.6) du cycle C, C-18 (δ_C 50.0), C-19 (δ_C 48.0), C-21 (δ_C 31.1) et C-22 (δ_C 38.0) du cycle E.

Cette analyse (HSQC) nous permet également d'identifier le degré de substitution de la double liaison déduite par le fait que les deux protons éthyléniques sont portés par le même carbone C-29 (δ_C 109.0 ppm) ce qui confirme la présence d'une double liaison exo-cyclique isopropényl (Δ^{20}).

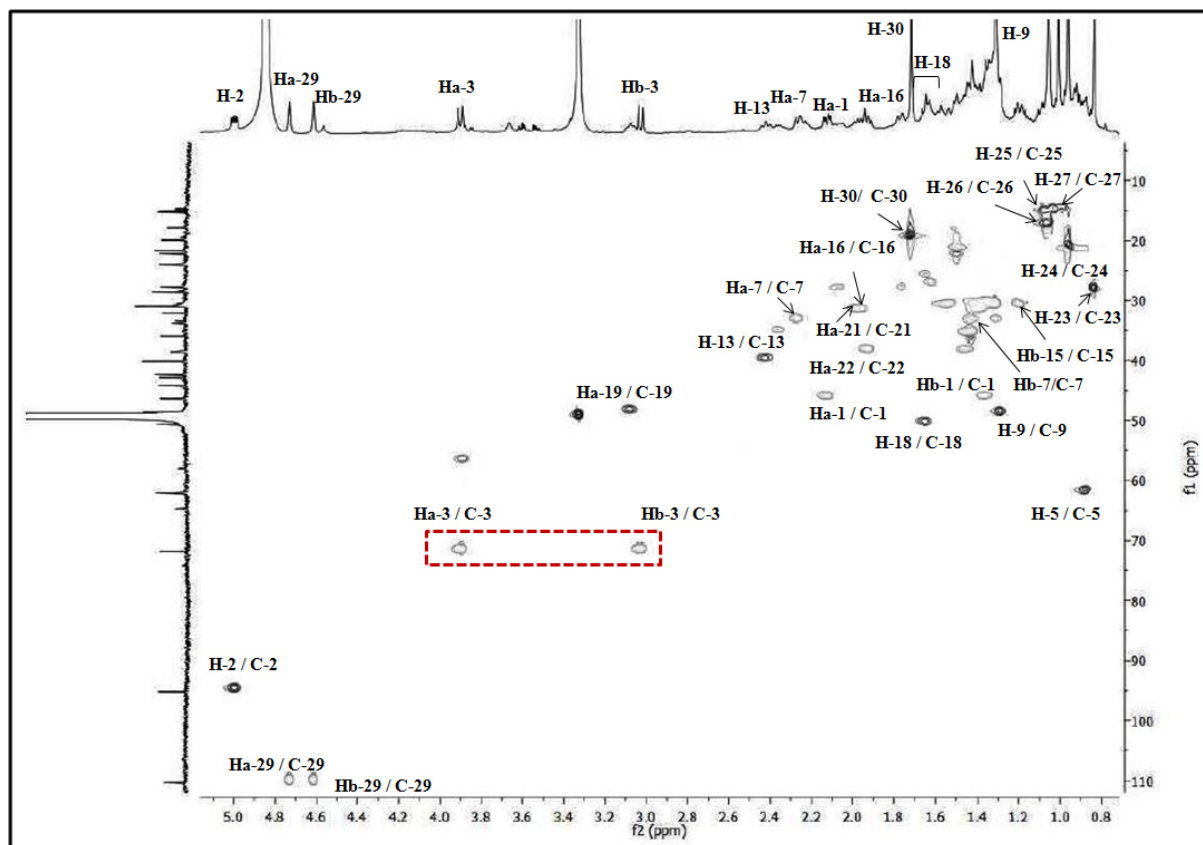


Figure III-9. Spectre HSQC du composé **SBR₁**.

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

Les spectres HMBC (figure III-12- III-14) du composé **SBR₁** montre :

- Les corrélations du cycle E entre :
 - Les protons du méthyle CH₃-30 avec trois carbones, dont un quaternaire C-20 résonant à δ_C 151.8 ppm, un carbone méthylénique C-29 (δ_C 109.0 ppm) et un carbone méthine C-19 (δ_C 48.0 ppm) identifiées à l'aide du spectre HSQC.
 - Le proton H-19 avec les carbones C-18 (δ_C 50.0 ppm), C-20, C-21 (δ_C 31.1 ppm), C-29 et C-30 (δ_C 19.1 ppm).
 - Le proton H-18 (δ_H 1.65 ppm) avec des carbones déjà identifiés C-19, C-20 et C-22, et avec un carbone tertiaire C-13 (δ_C 39.6 ppm), et avec des carbones quaternaires dont un carbonyle C-28 (δ_C 180.7 ppm), et les carbones C-14 (δ_C 43.4 ppm) et C-17 et (δ_C 57.4 ppm).

La distinction entre les deux carbones C-14 et C-17 se fait par la différence du déplacement chimique puisque le C-17 est le plus déblindé (δ_C 57.4 ppm) sous l'effet du groupement carbonyle adjacent.

- Les corrélations du cycle D entre :
 - Les protons H-18, H_a-22 et H_b-22 avec le carbonyle C-28.
 - Les protons du méthyle CH₃-27 (δ_H 1.03 ppm) avec les carbones C-15 (δ_C 30.5 ppm) et C-13 et les carbones quaternaires C-8 (δ_C 39.7 ppm) et C-14.

Les protons géminés H_a-15, H_b-15 et H_a-16, H_b-16 sont attribués par analyse du spectre HSQC et ils corrént entre eux sur le spectre COSY ce qui permet de fermer le cycle D et de confirmer l'enchaînement des cycles C-D-E du noyau lupane (figure III-10).

- Les corrélations du cycle B entre :
 - Les protons du méthyle CH₃-26 (δ_H 1.07 ppm) avec les carbones C-8, C-9 (δ_C 48.4 ppm) et C-14. Ce méthyle nous apporte des informations sur le cycle B par une corrélation HMBC $^3J_{H-C}$ avec le carbone C-7 (δ_C 33.1 ppm) (figure III-10).

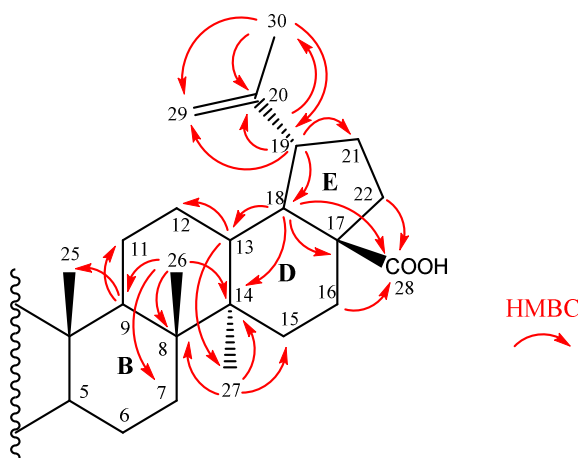


Figure III-10. Corrélations HMBC J_{H-C} des cycles **B**, **C**, **D** et **E** du composé **SBR1**.

- Les corrélations du cycle A entre :
 - Les protons du méthyle CH₃-25 (δ_H 1.05 ppm) avec les carbones méthines C-9 et C-5 (δ_C 61.4 ppm), un carbone quaternaire C-10 (δ_C 41.7 ppm), et avec le carbone C-1 (δ_C 45.8 ppm) (figure III-11).
 - Les protons des deux méthyles CH₃-23 et CH₃-24 (δ_H 0.83 et 0.95 ppm, respectivement) portés par le C-4 sont facilement repérées ayant trois corrélations HMBC identique avec le carbone tertiaire C-5, le carbone quaternaire C-4 (δ_C 39.7

ppm), et le carbone C-3 (δ_C 71.6 ppm), en plus de leurs corrélations mutuelles $^3J_{H_{23}-C_{24}}$ $^3J_{H_{24}-C_{23}}$ (figure III-12).

La distinction des méthyles CH₃-23 et CH₃-24 s'effectue grâce aux valeurs différentes du déplacement chimique des carbones en position α -équatorial CH₃-23 (valeur la plus déblindée de δ_C 27.6 ppm) et β -axiale CH₃-24 (valeur la plus blindée δ_C 20.7 ppm).

- Le proton H_a-1 avec les carbones C-2, C-5, C-9 et C-10, ce qui confirme la présence du groupe hémiacétal porté par le carbone C-2, alors que le proton H_b-1 présente cinq corrélations avec les carbones C-2, C-3, C-5, C-10 et C-25.
- Le proton H-2 quant à lui il corrèle avec les carbones C-1 et C-3.
- Le proton H_a-3 avec les carbones C-2, C-4 et C-5, ce qui repère la localisation du groupement époxy à la position C-2/C-3.

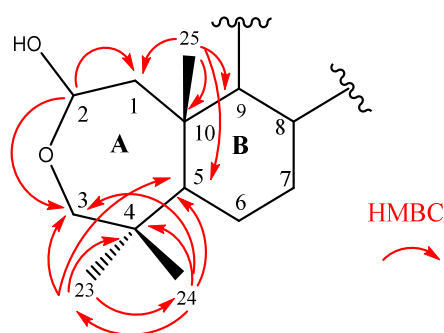


Figure III-11. Corrélations HMBC $^{n>1}J_{H-C}$ des cycles A et B du composé SBR₁.

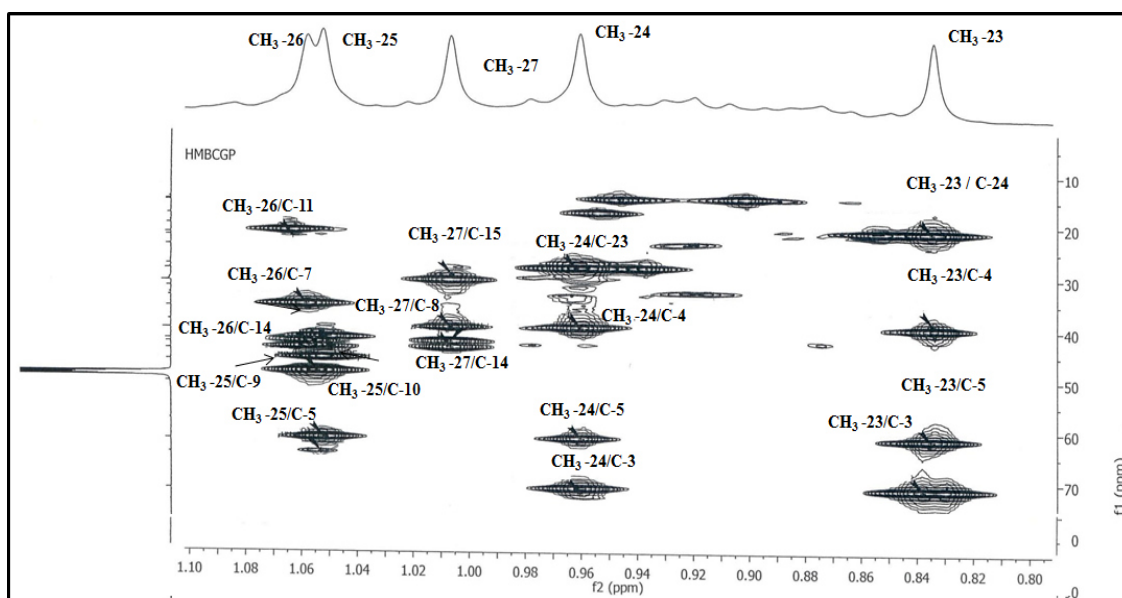


Figure III-12. Spectre HMBC étalé de δ_H 0.80 à 1.06 ppm du composé SBR₁.

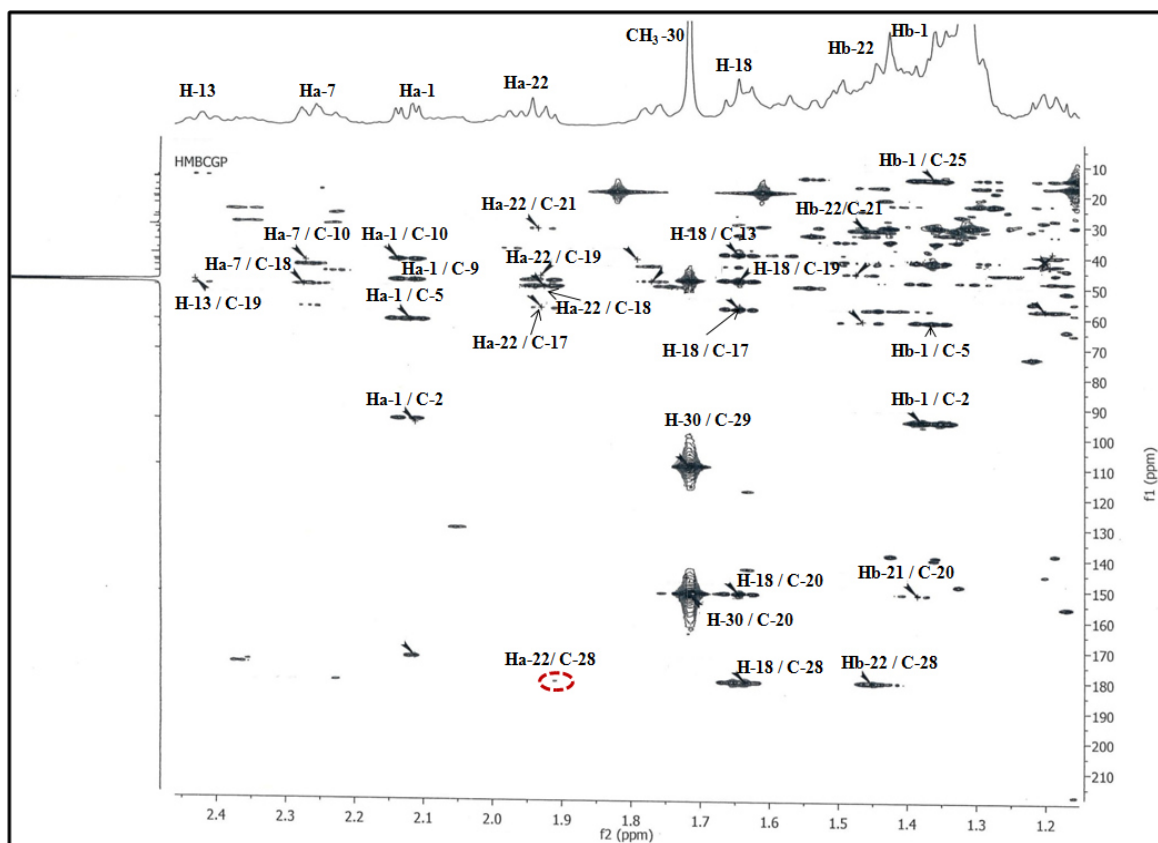


Figure III-13. Spectre HMBC étalé de δ_H 1.20 à 2.40 ppm du composé **SBR**₁.

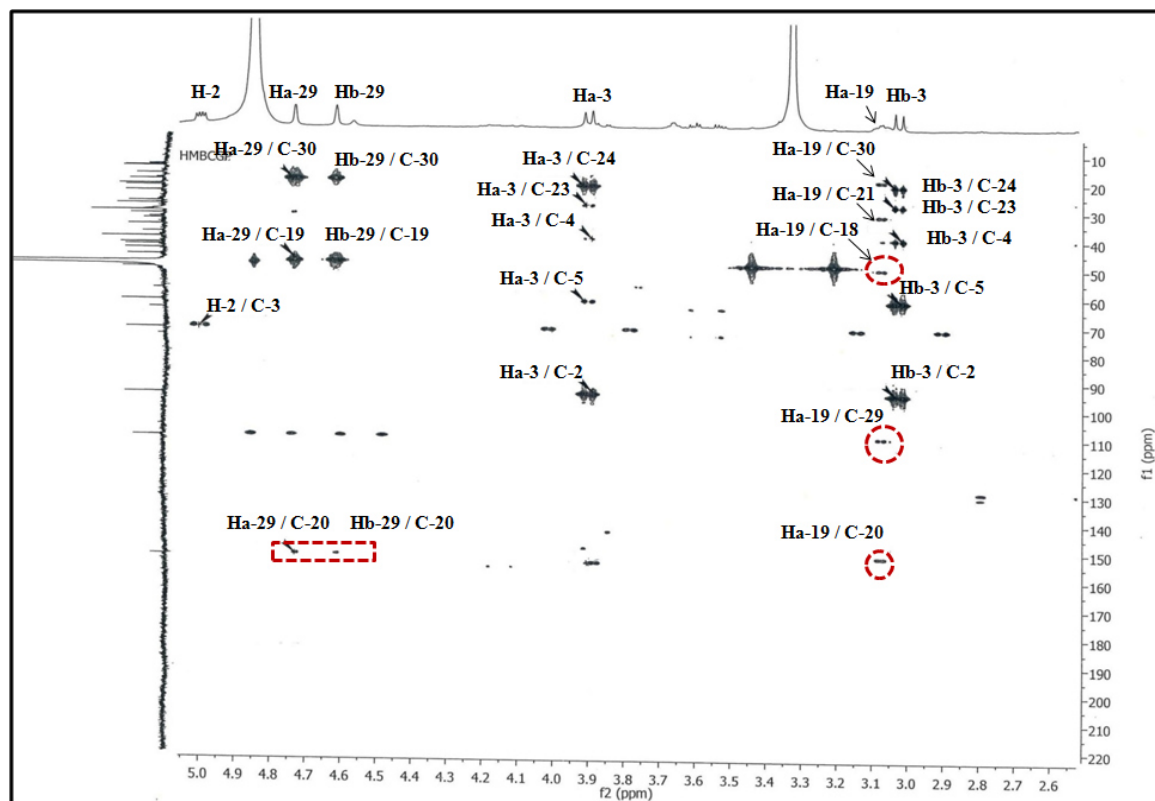
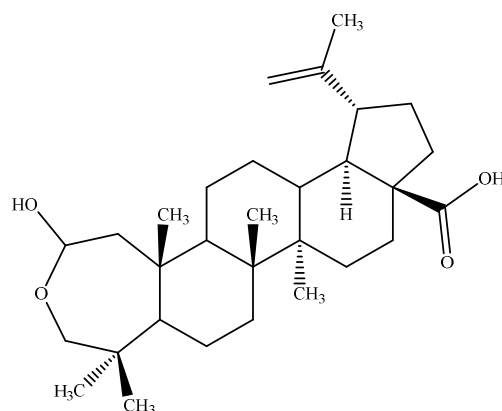


Figure III-14. Spectre HMBC étalé de δ_H 3.0 à 5.0 ppm du composé **SBR**₁.

La stéréochimie finale du composé **SBR₁**, est mise en évidence en comparaison des données et avec celles de la littérature, indique la configuration β à la position C-2 (Gao et al.2015). Cependant la présence de la fonction hémiacétale en C-2 conduit à l'orientation α/β équilibré.

L'ensembles des données ainsi que la mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = +17.0^\circ$, c 0.1 g/mL, MeOH) nous a permis d'établir la structure d'un nouveau triterpène **SBR₁** comme étant: le **2,3-*seco*-2,3-epoxy-2-hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid**, il est nommé **salviabuchanic acid**.



SBR₁: Salviabuchanic acid.

III.1.1.2. Détermination structurale du composé **SBR₂**

Spectrométrie de masse :

Le composé **SBR₂** a une masse 470 *uma*, comme l'atteste sur le spectre ESI-MS enregistré en mode négatif (figure III-15), la présence de l'ion à m/z 469 $[M-H]^-$, donnant la formule brute $C_{30}H_{46}O_4$.

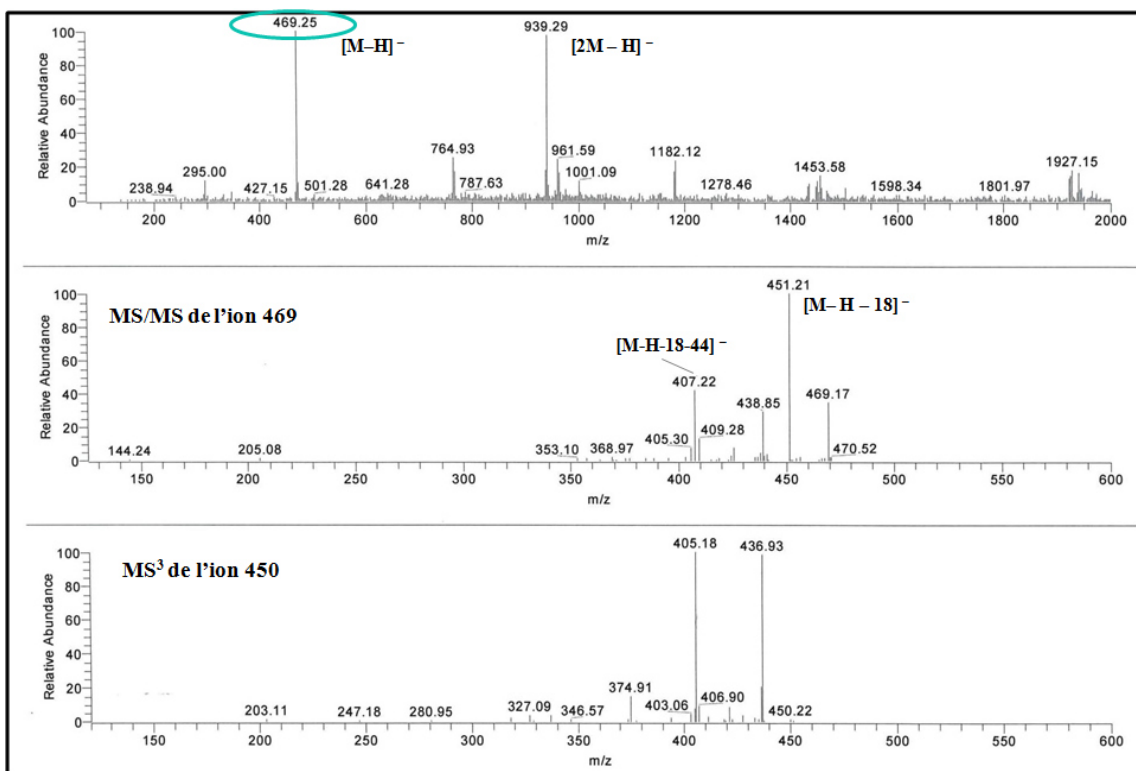


Figure III-15. Spectre de masse ESI-MS et spectre MS/MS et MS³ du composé **SBR₂**.

L'examen du spectre RMN ¹H du composé **SBR₂** (figure III-16) montre la présence des signaux caractéristiques d'un triterpène notamment :

- Sept signaux singulets dans la région blindée entre 0.87 à 1.36 ppm, intégrant pour trois protons chacun, correspondant à des groupements méthyles d'un squelette triterpénique pentacyclique et résonnent à δ_H 0.87 (H-24), 0.96 (H-29), 0.98 (H-24), 1.05 (H-23), 1.17 (H-25), 1.22 (H-30) et 1.36 ppm (H-27).
- Un massif de protons résonnant entre δ_H 1.03 et 5.41 ppm correspondant aux CH et CH₂ des cinq cycles (A, B, C, D et E) dont :
 - Deux protons oléfiniques sous forme de singulet large résonnant à δ_H 5.30 et 5,41 ppm attribuable aux protons H-12 et H-3 respectivement.
 - Deux protons oxyméthylène sous forme de doublets repérés à δ_H 4.11 et 4.20 ppm ($J = 14.9$ Hz) correspondant respectivement aux protons H_b-1 et H_a-1.
 - Trois protons méthine résonnant à δ_H 1.47 ppm ($d, J = 2.0$ Hz), 2.26 ($dd, J = 11.0 - 6.5$ Hz) et 2.53 ppm attribuable aux protons H-5, H-9 et H-18. Le déplacement chimique du proton H-18 est significatif de la présence d'une fonction acide en C-28 (COOH).

- Trois signaux multiplets d'intégration 1H chacun à δ_H 1.52, 1.63, 1.40, 2.25, 2.00 et 1.75 ppm attribuables aux protons H-6, H_a-7, H_b-7, H_a-16, H_b-16, et H-21.

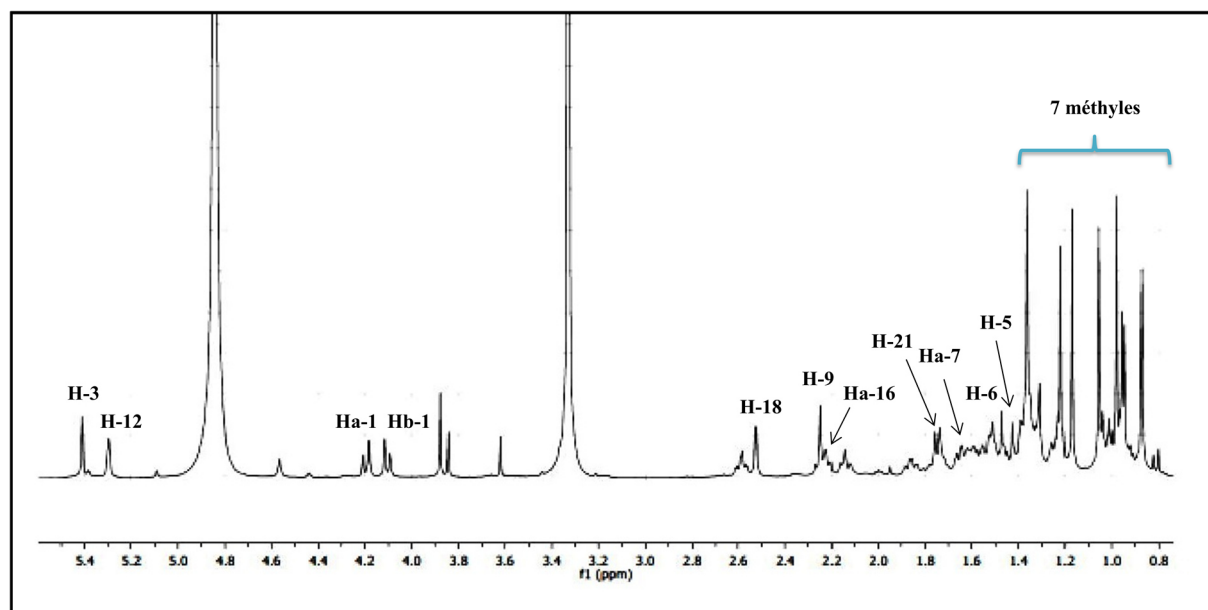


Figure III-16. Spectre RMN ^1H du composé **SBR₂**.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (figure III-17) indique la présence de 23 carbonnes parmi eux :

- Sept carbonnes méthyléniques résonnant entre δ_C 16.0 et 29.0 ppm.
- Un carbone méthylène oxydé ($\text{CH}_2\text{-OH}$) à δ_C 61.1 ppm (C-1).
- Deux carbonnes oléfiniques à δ_C 129.0 ppm (C-12) et 135.0 ppm (C-3).
- Six carbonnes quaternaires à δ_C 43.0 (C-8), 43.1 (C-14), 49.0 (C-17), 72.8 (C-19), 140.0 (C-13) et 155.0 ppm (C-2).
- Trois carbonnes méthynes à δ_C 44.2 (C-9), 64.2 (C-5) et 55.0 ppm (C-18).
- Quatre carbonnes éthyléniques à δ_C 27.0 (C-21), 30.0 (C-15), 35.0 (C-7) et 38.9 ppm (C-22).

Ce premier constat permet de déduire que le composé **SBR₂** est constitué d'un triterpène ayant une structure pentacyclique du type ursane.

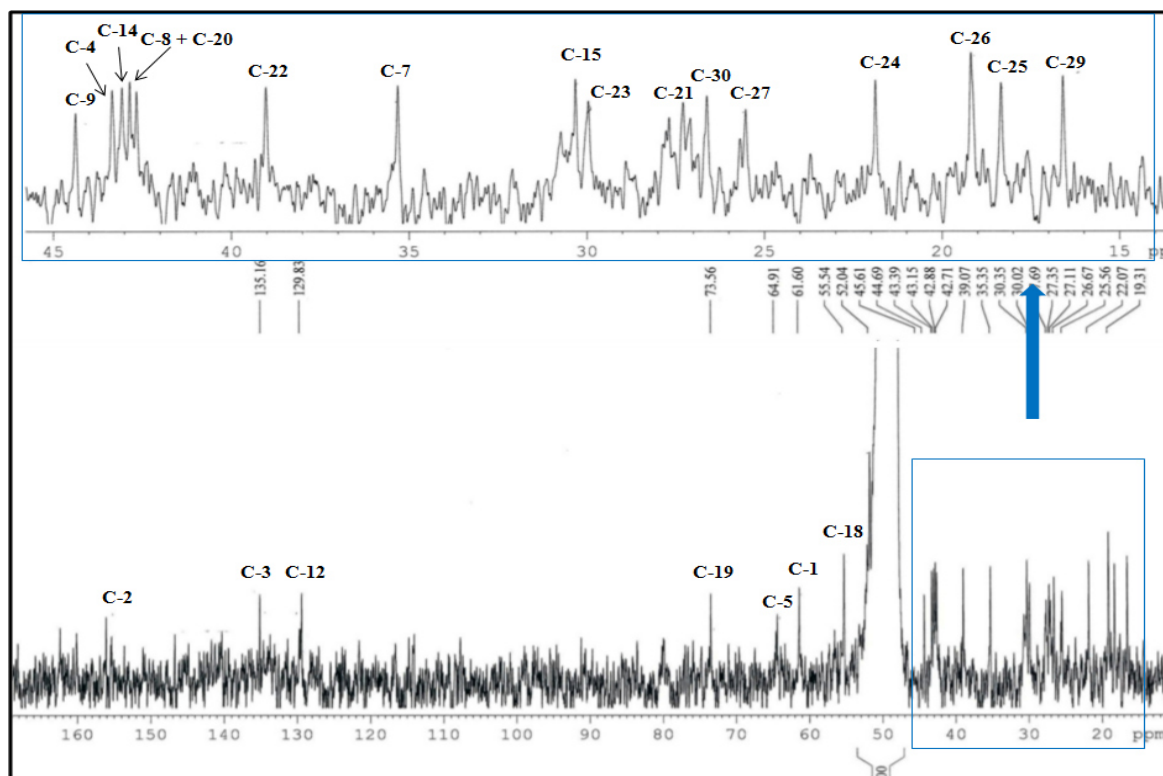


Figure III-17. Spectre RMN ^{13}C du composé **SBR₂**.

Le spectre COSY (figure III-18) du composé **SBR₂** montre les corrélations suivantes :

- Le méthyle H-27 couple avec les protons vicinaux H_a-15 (δ_{H} 1.87 ppm) et H_b-15 (δ_{H} 1.03 ppm).
- Le méthyle H-29 couple avec le proton H-20 à δ_{H} 1.38, lui-même corrèle avec le proton H-21, ce dernier couple avec deux protons géminés H_a-22 (δ_{H} 1.74 ppm) et H_b-22 (δ_{H} 1.65 ppm). Ce dernier corrèle avec le proton H-21.
- Le proton H-3 avec les deux protons vicinaux H_a-1 et H_b-1.
- Le proton H-9 montre deux taches de corrélations avec les protons vicinaux H_a-11 (δ_{H} 1.63 ppm) et H_b-11 (δ_{H} 2.25 ppm).
- Les protons vicinaux H_a-11 et H_b-11 couple avec le proton H-12 à δ_{H} 5.30 ppm.
- Le proton H-12 corrèlent en $^4J_{\text{H-H}}$ avec le proton H-18.

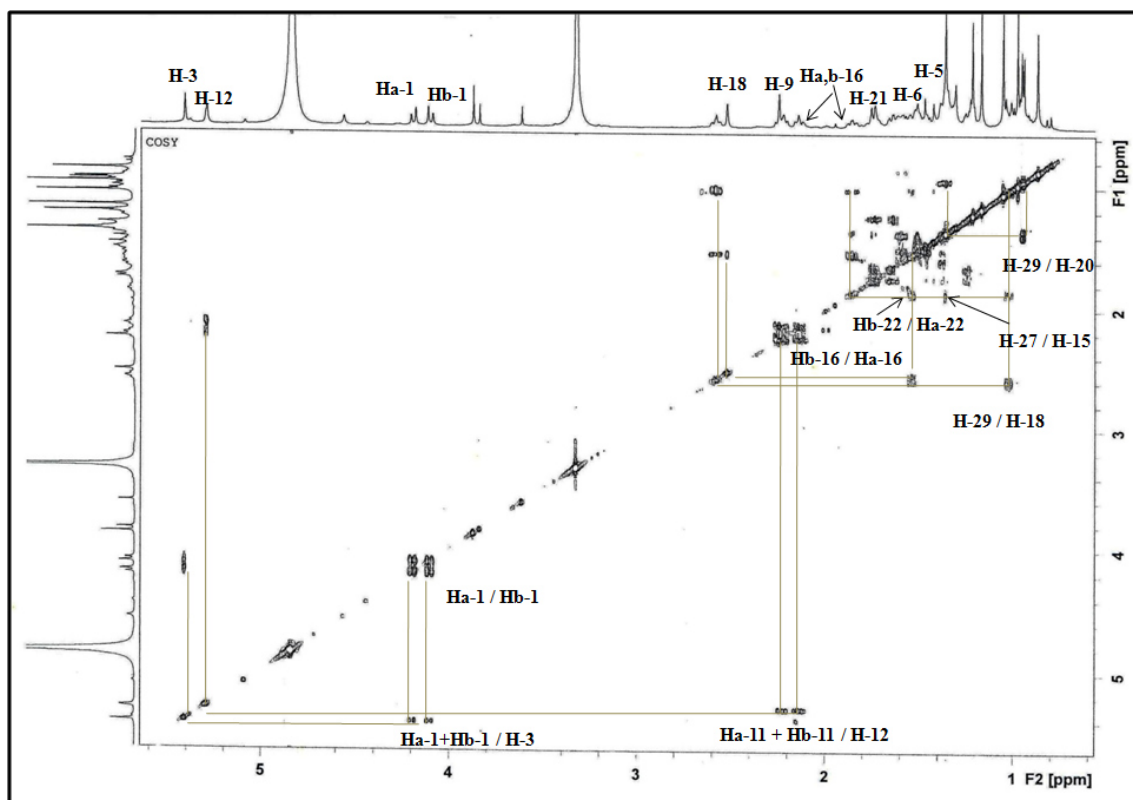


Figure III-18. Spectre COSY du composé **SBR₂**.

L'expérience HSQC (figure III-19) permet de mettre en évidence les corrélations carbone-proton. Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-1.

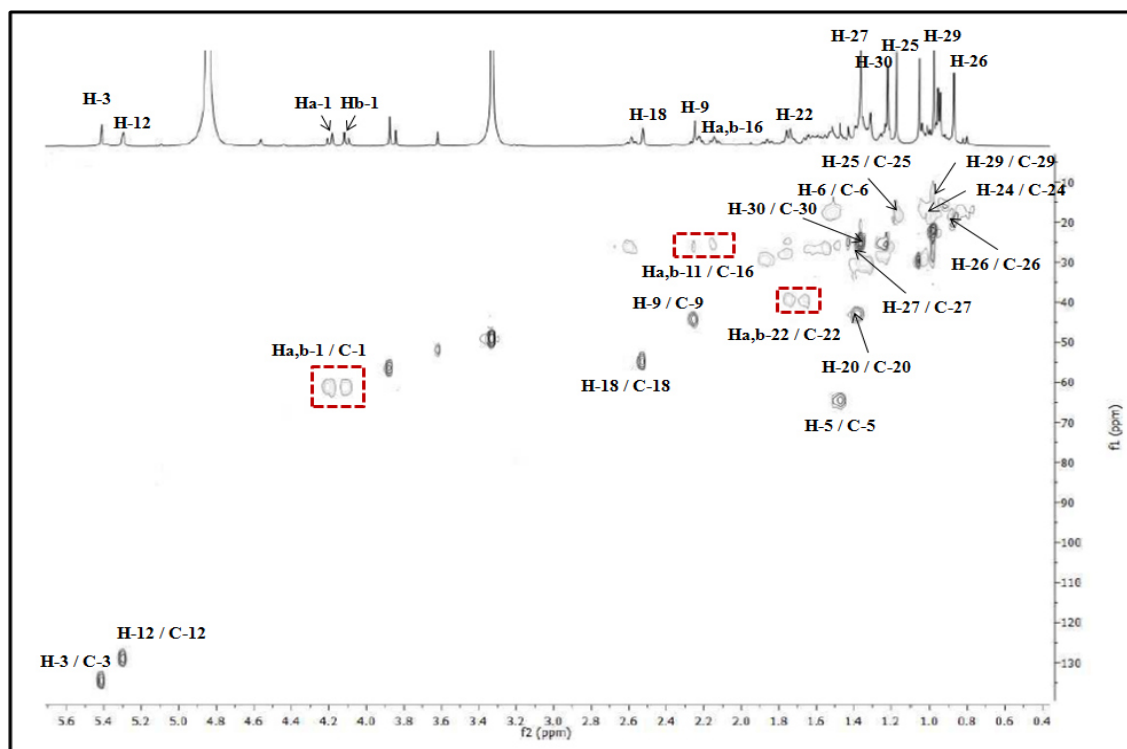


Figure III-19. Spectre HSQC du composé **SBR₂**.

Le spectre HMBC (figure III-21- III-23) met en évidence les corrélations entre :

- Le méthyle CH₃-25 avec les carbones C-2, C-10 (51.7 ppm) et C-9. La corrélation en ³J_{H-C} observée entre le proton H- 9 résonant à et le carbone C-12 permet d'indiquer la localisation de la double liaison en C-12 –C-13.
- Les protons du méthyle CH₃-26 avec les carbones C-7, C-8, et C-9 et C-14.
- Les protons du méthyle CH₃-27 avec les carbones C-8, C-13, et C-15.
- Les protons du méthyle CH₃-29 avec les carbones C-19, C-20 (δ_C 43.0 ppm) et C-21.
- Les protons du méthyle CH₃-30 avec les carbones C-18, C-19 et C-20.
- Le proton H-9 avec les carbones C-11, C-12 et C-13 et avec les carbones quaternaires C-2, C-10 et C-14.
- Le proton H-12 avec le carbone C-18 et avec le carbone quaternaire C-14.
- Le proton H-16 avec un carbone quaternaire fortement déblindé à δ_C 182.5 ppm confirme la présence d'une fonction acide en carbone C-28.
- Le proton H-18 avec les carbones C-30, C-12, C-13 (δ_C140.0 ppm), C-14, C-17 (δ_C 49.0 ppm), C-19 (δ_C 72.8 ppm) et C-28.

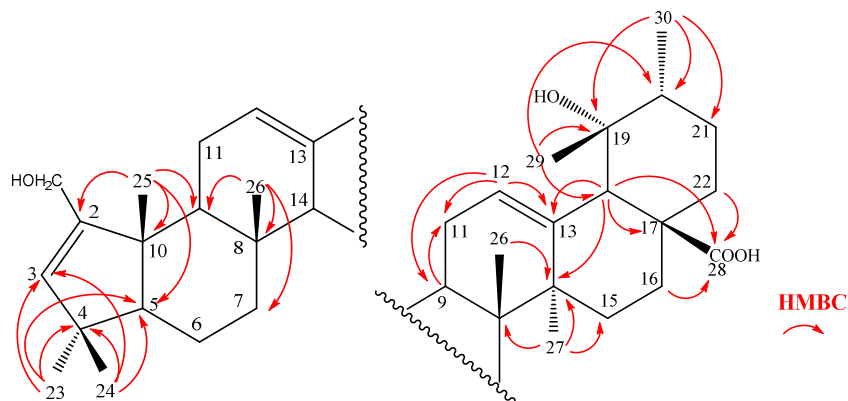


Figure III- 20. Corrélations HMBC des cycles **A**, **B**, **C**, **D** et **E** du composé **SBR₂**.

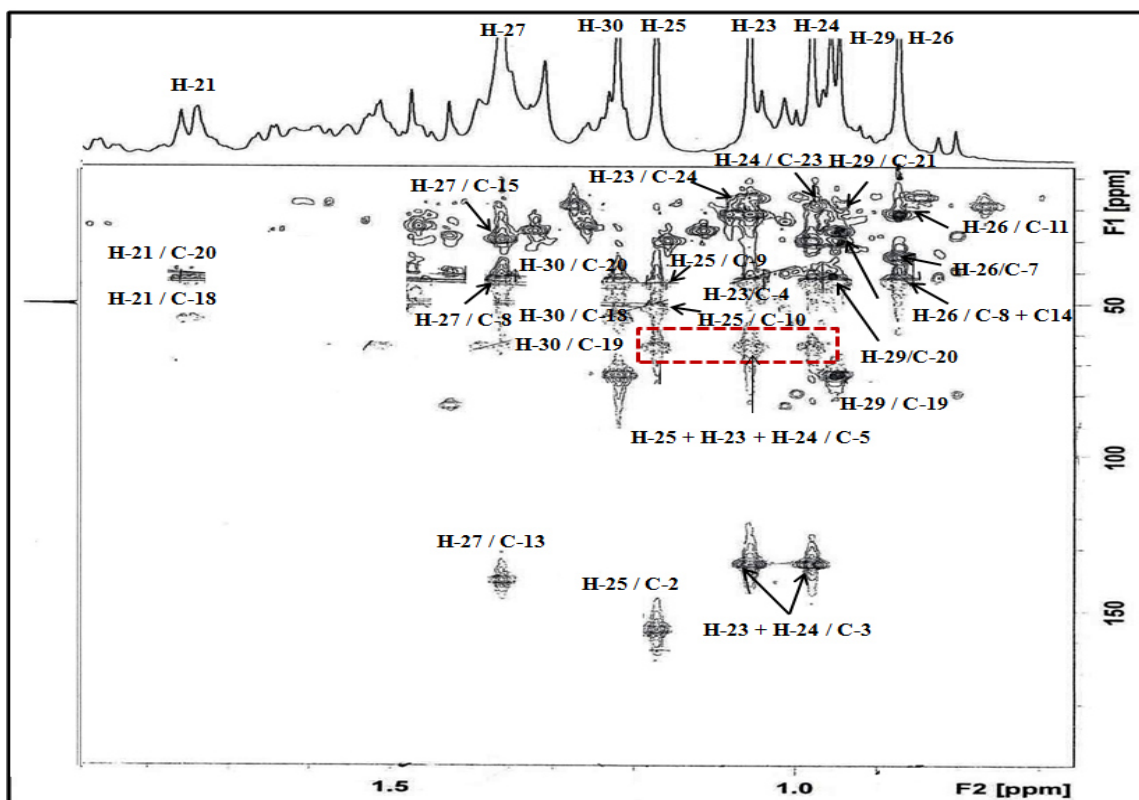


Figure III-21. Spectre HMBC étalé de δ_H 0.80 à 1.50 ppm du composé SBR₂.

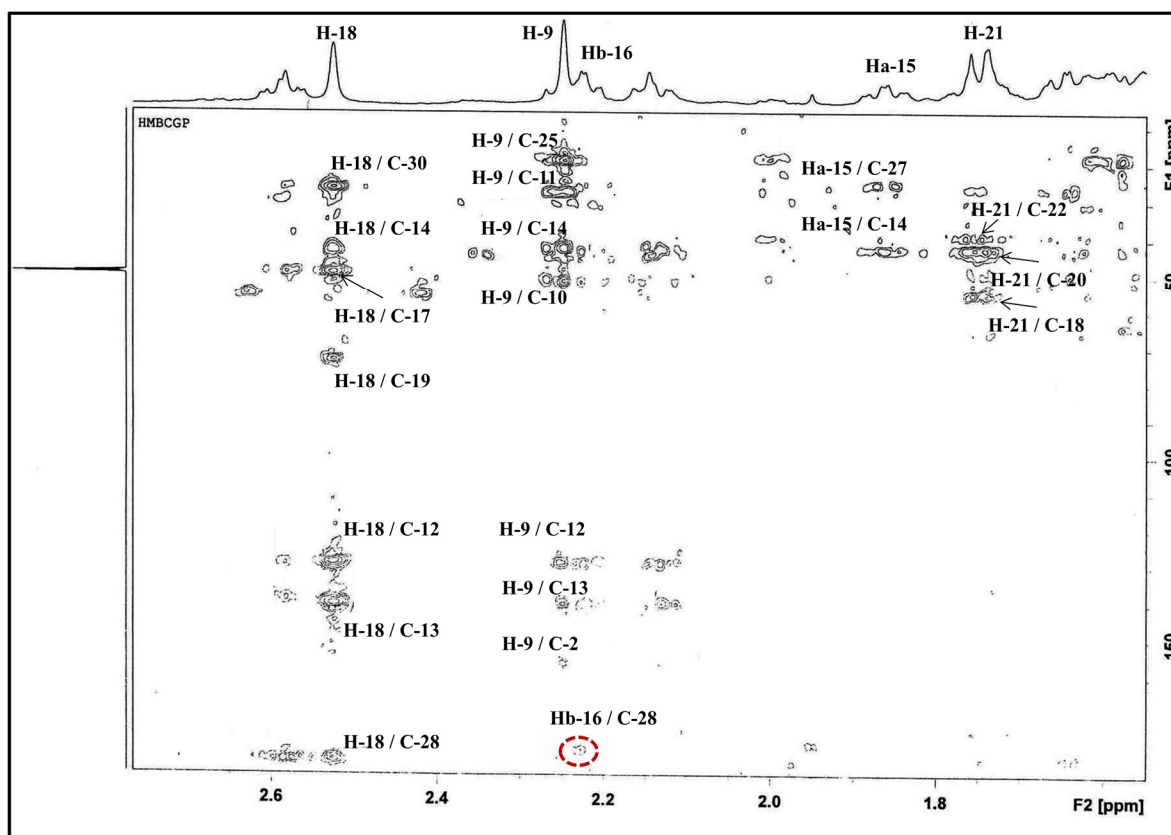


Figure III-22. Spectre HMBC étalé de δ_H 0.80 à 2.60 ppm du composé SBR₂.

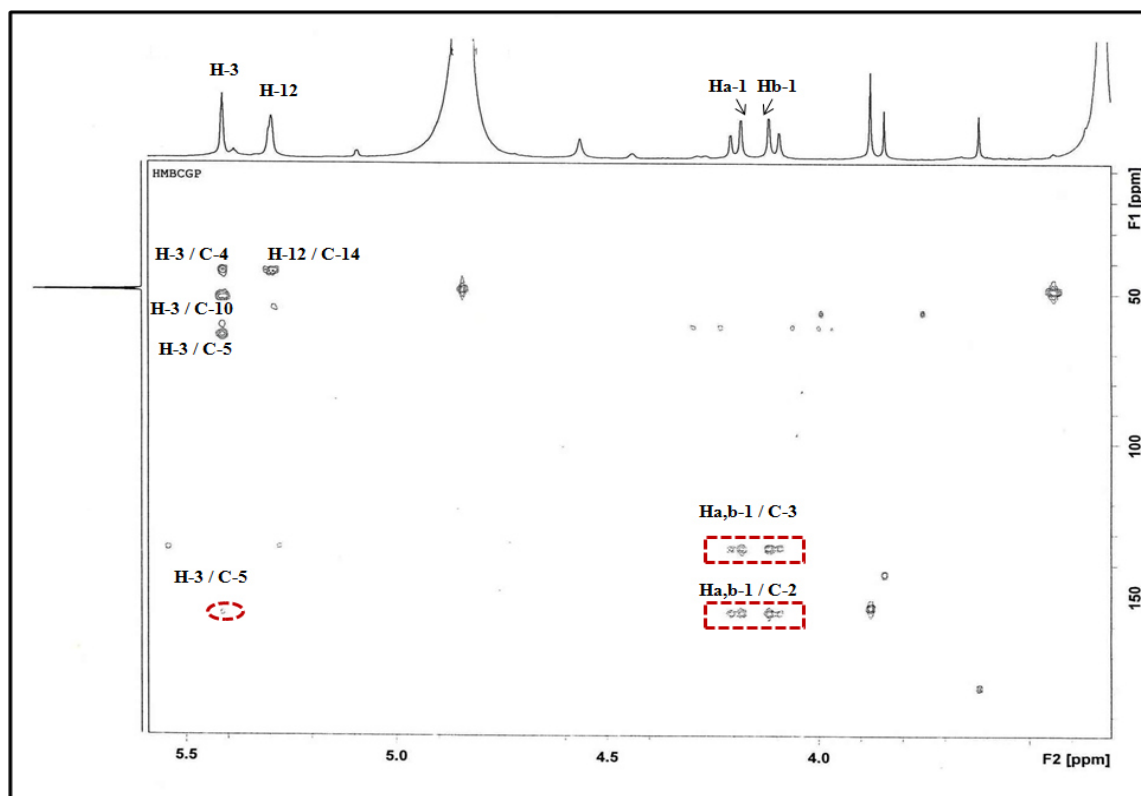
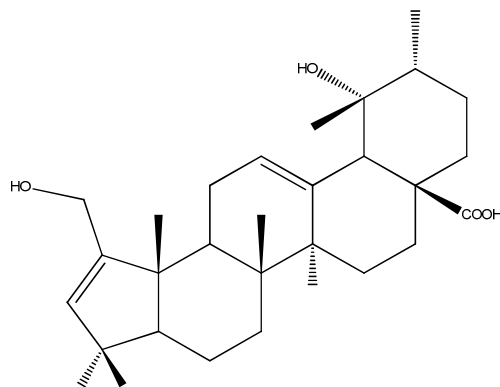


Figure III-23. Spectres HMBC étalés de δ_H 4.0 à 5.50 ppm du composé **SBR₂**.

La structure du composé **SBR₂** a été établie après l'analyse des spectres de RMN et de masse, en comparaison des résultats aux donnés de la littérature (enregistré dans C_5D_5N) (Rao et al., 1990; Wang et al., 2009), nous a permis d'identifier le composé **SBR₂** comme étant : **Heptadienic.acid** isolé précédemment des racines de *Salvia hypoleuca* Benth (Saeidnia et al., 2012), et *Salvia trijuga* (Pan et al., 2010).

Ce triterpène a été connue pour son activité antiproliférative (Beladjila et al., 2017), et anti-inflammatoire (Banno et al., 2004).



SBR₂: Heptadienic acid.

III.1.1.3. Détermination structurale du composé SBR₃

Spectrométrie de masse :

Le composé **SBR₃**, de la formule brute C₃₀H₄₈O₄ a été déduite à partir du spectre de masse ESI-MS enregistré en mode négatif. Il montre en effet un pic d'ions à m/z 471 [M-H]⁻ (figure III-24), correspondant à une masse moléculaire égale à 472 *uma*.

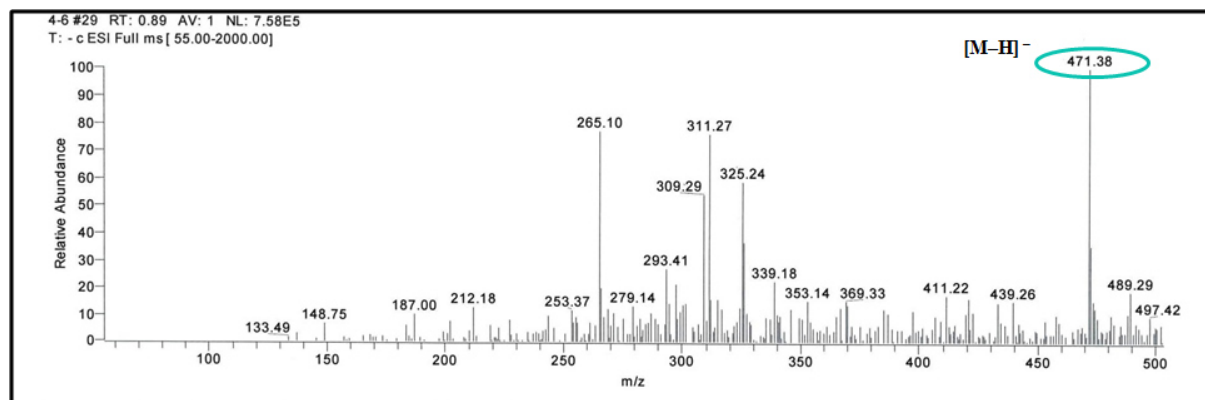


Figure III-24. Spectre de masse ESI-MS du composé SBR₃.

Spectrométrie RMN :

L'analyse du spectre RMN ¹H (figure III-25) montre la présence des signaux caractéristique d'un triterpène pentacyclique de type oléanane. On repère les signaux suivants :

- Les protons H-3, H-12 et H-18 résonant respectivement à δ_H 3.70 (*sl*), 5.38 (*sl*) et 3.24 ppm (*dd*, $J = 4.0 - 13.0$ Hz).
- Un massif de protons observés entre 0.85 à 2.06 ppm, attribuable aux CH et CH₂ des cinq cycles.
- Sept fins singulets correspondant aux sept méthyles résonnant à δ_H 0.87 (H-26), 0.95 (H-25), 0.97 (H-30), 0.98 (H-24), 0.99 (H-29), 1.17 (H-23), et 1.36 ppm (H-27).
- Deux protons oxyméthines à 3.70 ppm (*d*, $J = 3.2$ Hz) et 4.28 (*dd*, $J = 10.6 - 2.8$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-3 et H-2.

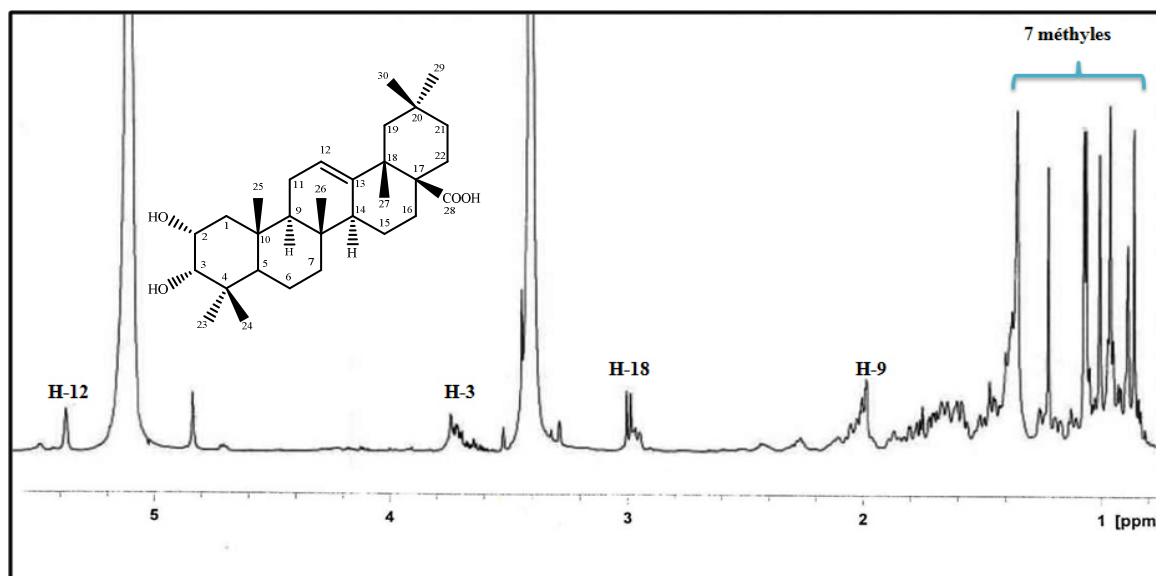
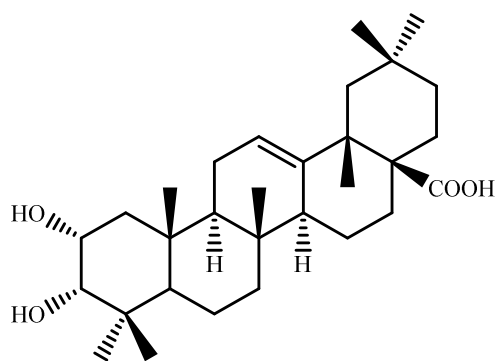


Figure III-25. Spectre de RMN ^1H du composé SBR_3 .

Les déplacements chimiques des protons et carbones (tableau III-1), ont été déterminés par comparaison avec celle de la littérature (enregistrées dans un mélange $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$) (Savona et al., 1983; Amani et al., 2009). Cette analyse spectroscopique permet d'attribuer la structure suivante pour ce composé : **2 α ,3 α -dihydroxy-olean-12-en-28-oic acid** appelé également **maslinic acid**. Il a été isolé de l'espèce *S. trijuga* (Pan et al., 2010) *S. hypoleuca* (racines) (Saeidniaet al., 2012) et *S. canariensis* L (Savona et al., 1983).



SBR_3 : Maslinic acid.

III.1.2. Identification des composés isolés de l'extrait SBR_{C-H}

III.1.2.1. Détermination structurale du composé SBR₄

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse ESI-MS (figure III-26) du composé **SBR₄** obtenu en mode négatif indique un ion quasi-moléculaire à m/z 179 $[M-H]^-$, correspondant à la formule brute $C_9H_8O_4$.

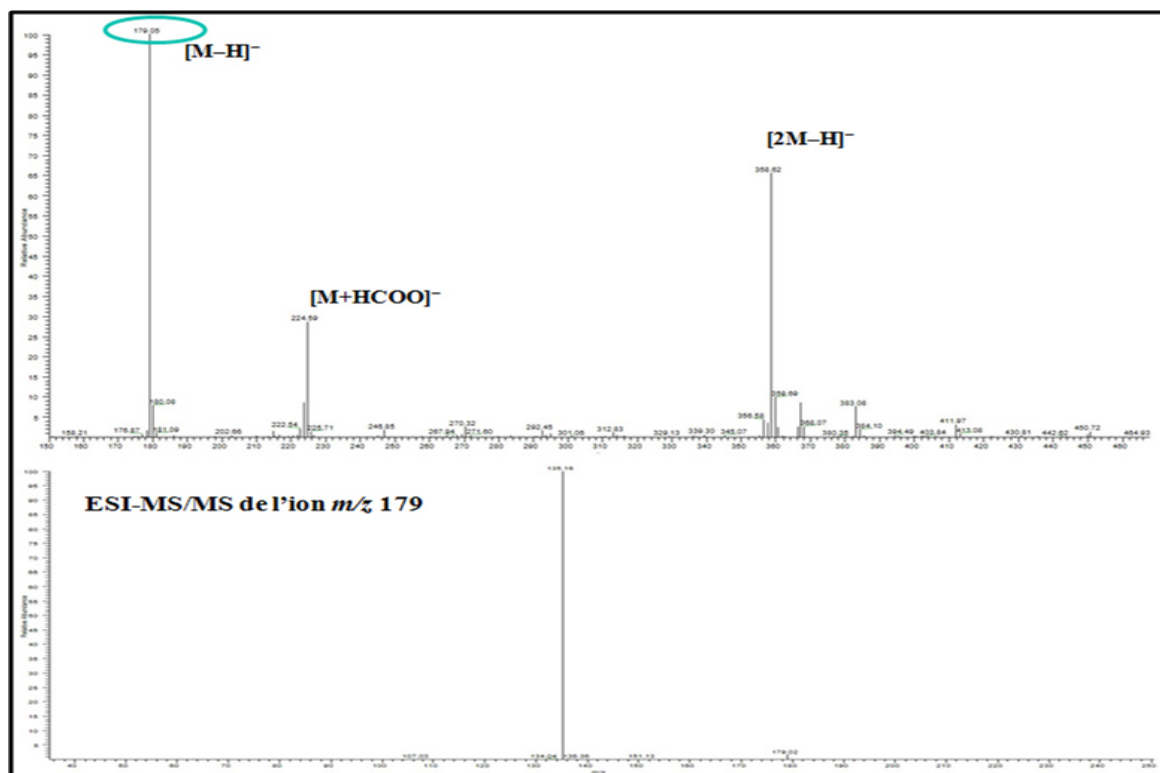


Figure III-26. Spectre de masse ESI-MS du composé **SBR₄**.

Spectrométrie RMN :

L'analyse du spectre RMN 1H (figure III-28) montre :

- Trois protons aromatiques d'intégration 1H chacun, dont deux protons sous forme de doublet résonant à δ_H 6.30 ppm ($J = 8.1$ Hz) et δ_H 7.36 ppm ($J = 1.9$ Hz) et le troisième proton sous forme de doublet de doublets à δ_H 6.90 ppm ($J = 8.1 - 1.9$ Hz), attribuable aux protons H-8, H-5 et H-9 respectivement. Ceci permet de déduire la présence d'un noyau aromatique tri-substitué en 4, 6 et 7.
- Deux protons éthyléniques d'intégration 1H sous forme de doublet repéré à δ_H 6.33 et 7.35 ppm ayant la même constante de couplage $J = 15.9$ Hz, attribuables aux protons

H-2 et H-3 respectivement. Les valeurs du déplacement chimique et celle de la constante de couplage permettent de déduire la présence d'une chaîne éthylénique de configuration *trans* (tableau III-2).

Ces données permettent de déduire la présence d'un acide caféique.

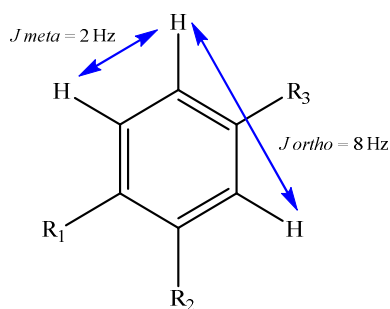


Figure III-27. Couplages *meta* et *ortho* des protons aromatiques.

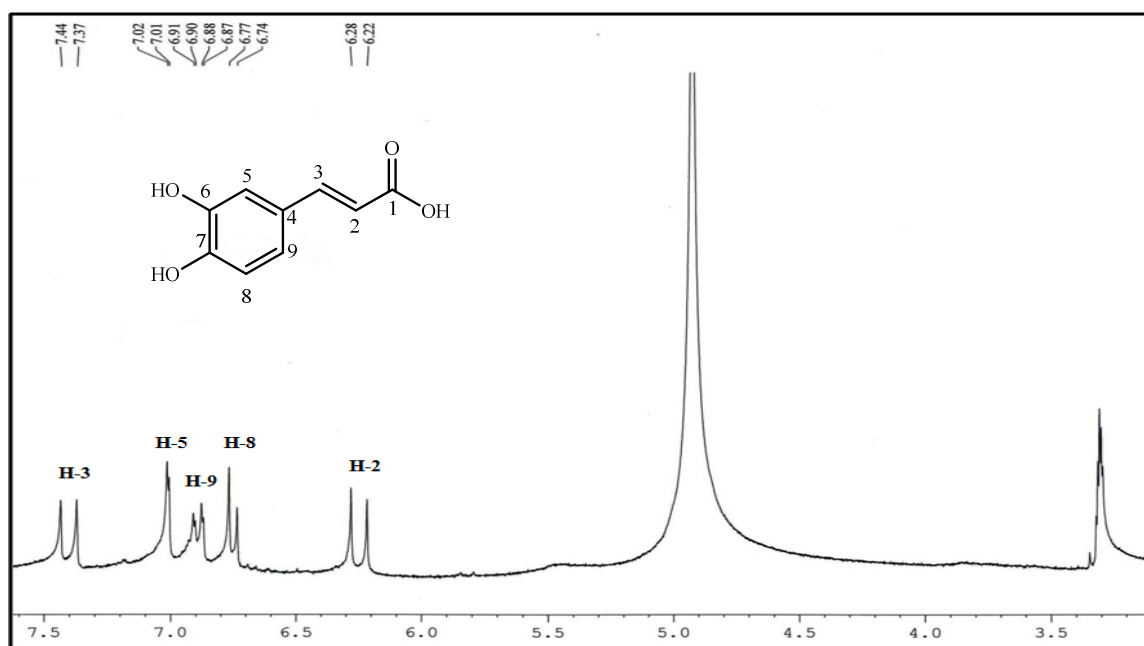
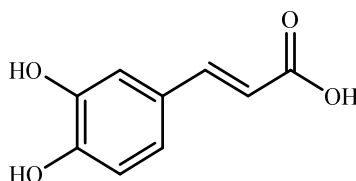


Figure III-28. Spectre de RMN ¹H du composé SBR₄.

Les données spectrales établies et celles trouvées dans la littérature (Saleem et al., 2004) nous ont permis d'identifier le composé SBR₄ comme étant : **Caffeic acid**. Ce composé est très connu, il a été isolé de l'espèce *S. officinalis* (Wang et al., 2000), *S. sonchifolia* (Wu et al., 1999a) et *S. nipponica* (Chan et al., 2011).

SBR₄ : Caffeic acid.

III.1.2.2. Détermination structurale du composé SBR₅

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse ESI-MS (figure III-29) du composé SBR₅ obtenu en mode négatif indique un ion quasi-moléculaire à m/z 193 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute C₁₀H₁₀O₄.

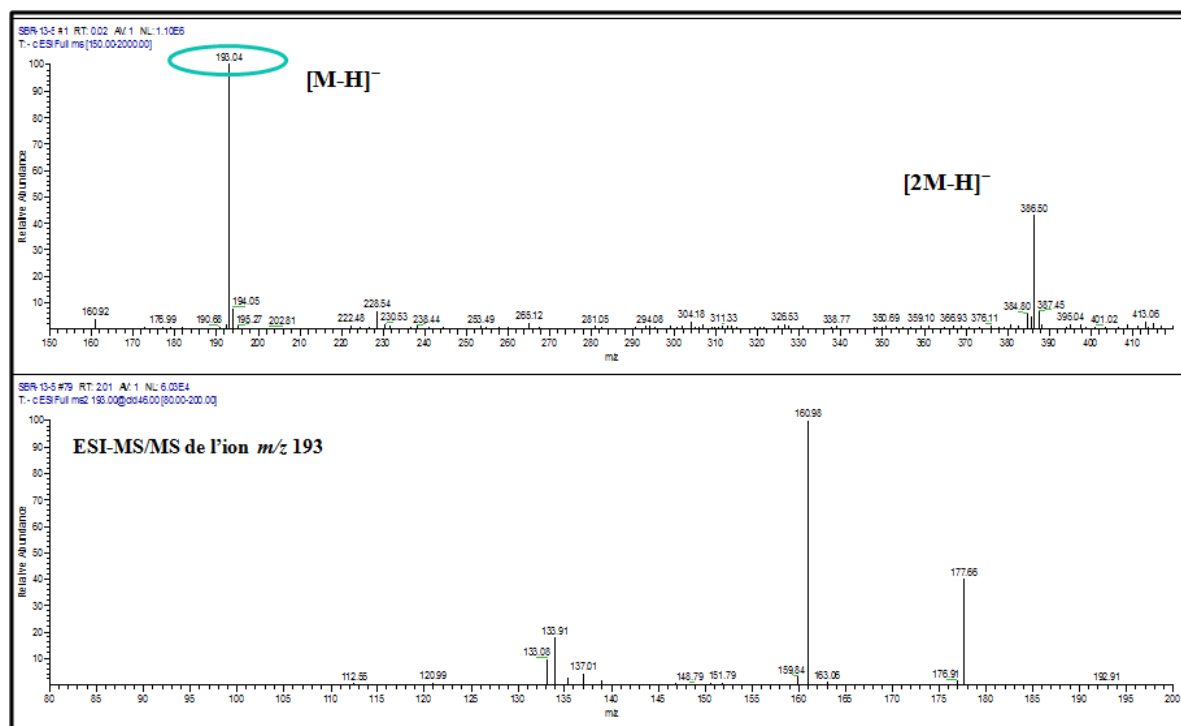


Figure III-29. Spectre de masse ESI-MS du composé SBR₅.

Spectrométrie RMN :

Le spectre RMN ¹H (figure III-30) du composé SBR₅ est très proche de ceux du composé acide caféique (SBR₄) avec tous les signaux caractéristiques. Cependant l'apparition d'un pic à δ_H 3.68 ppm indique la présence d'un groupement méthoxyle (O-CH₃) situé en carbone C-1 (tableau III-2).

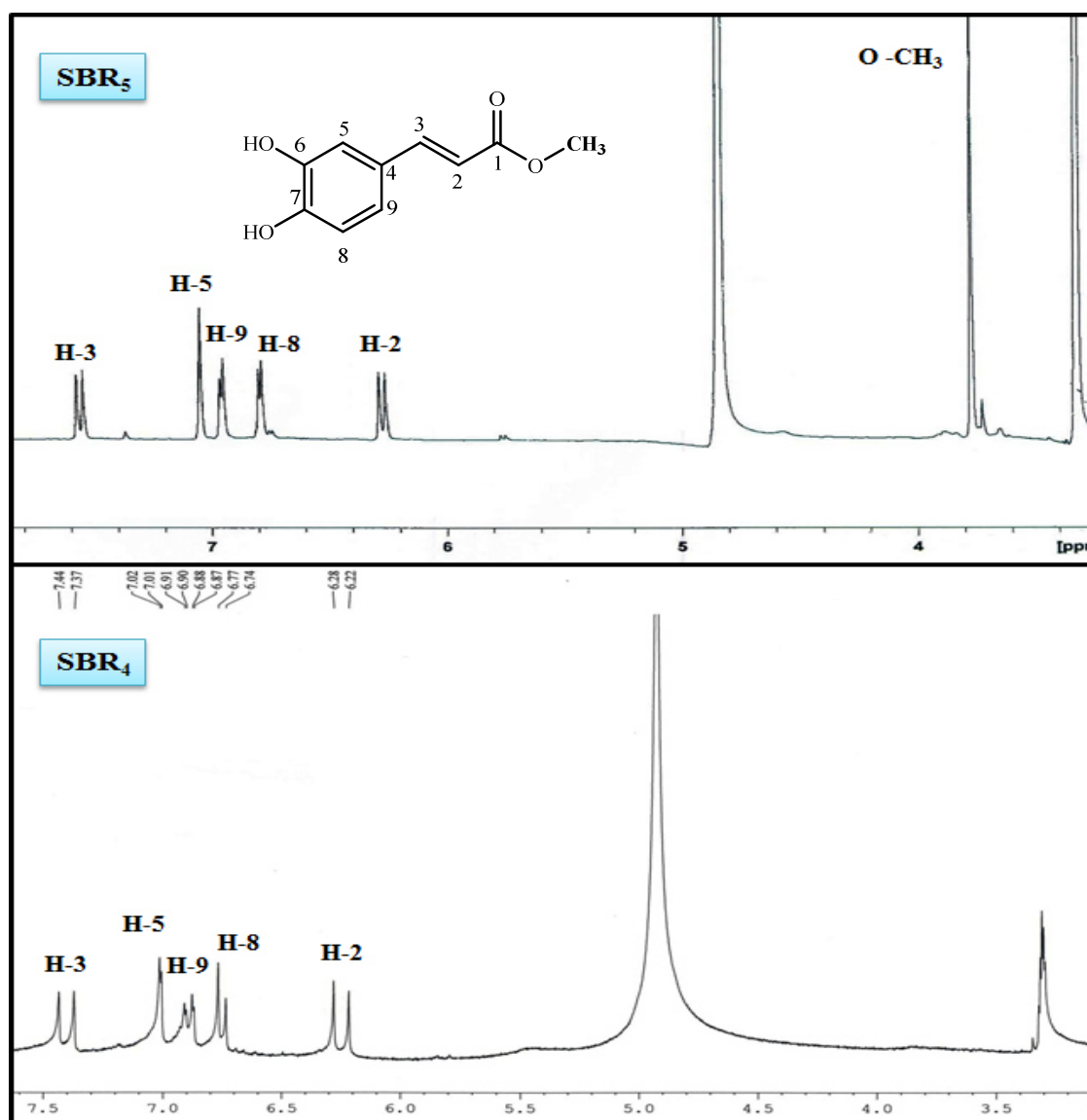
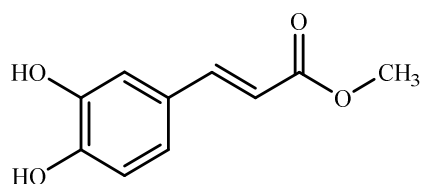


Figure III-30. Spectre de RMN ¹H des composés SBR₅ comparé à celui du composé SBR₄.

Les données spectrales établies et celles trouvées dans la littérature (Saleem et al., 2004) nous ont permis d'identifier le composé SBR₆ comme étant : **Caffeic methyle ester acid**. Il a été isolé de l'espèce *S. officinalis* (Wang et al., 2000) et *S. sonchifolia* (Wu et al., 1999a), *S. nipponica* (Chan et al., 2011).



SBR₅ : Caffeic methyl ester acid.

III.1.2.3. Détermination structurale du composé SBR₆

Spectrométrie de masse :

La masse moléculaire de 314 *uma* a été déterminée par le spectre de masse en ESI-MS du composé **SBR₆** qui présentait un ion quasi-moléculaire à m/z 313 $[M-H]^-$ qui correspond à la formule brute $C_{17}H_{14}O_6$ avec 11 insaturations. De plus, le fragment à m/z 269 $[M-H-44]^-$ démontre la perte d'un groupement carboxylique ($-COO$) (figure III-31).

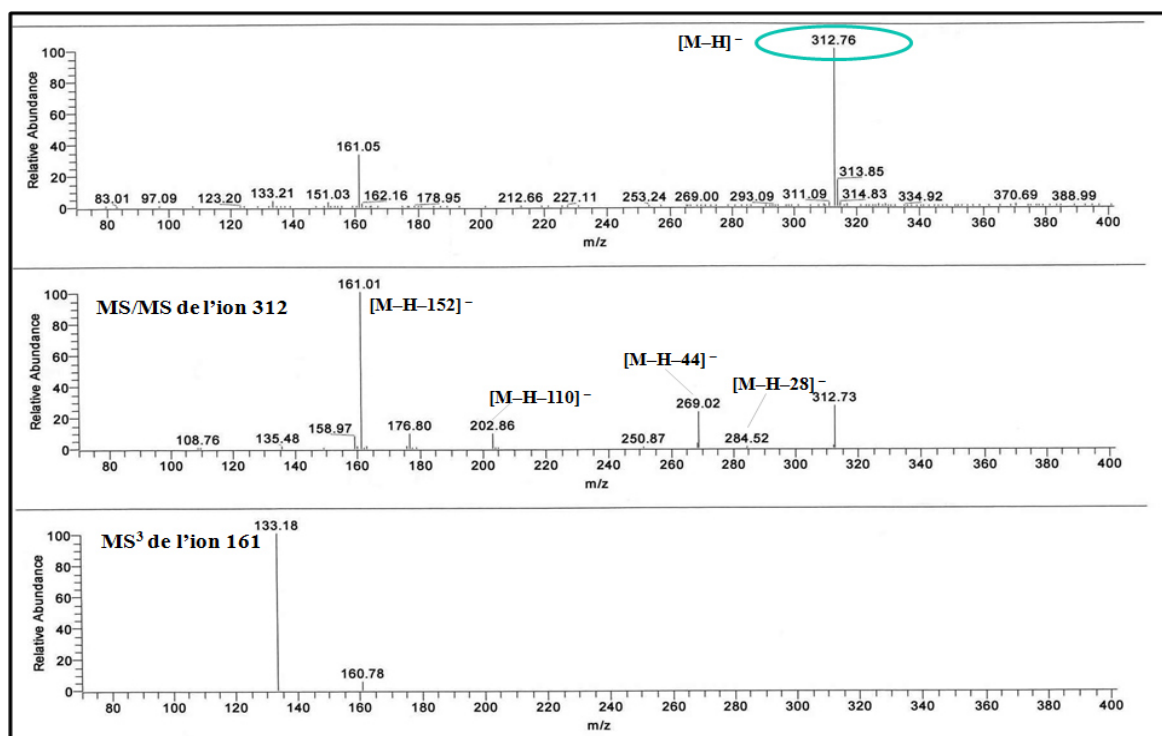


Figure III-31. Spectre de masse ESI-MS, MS/MS et MS³ du composé **SBR₆**.

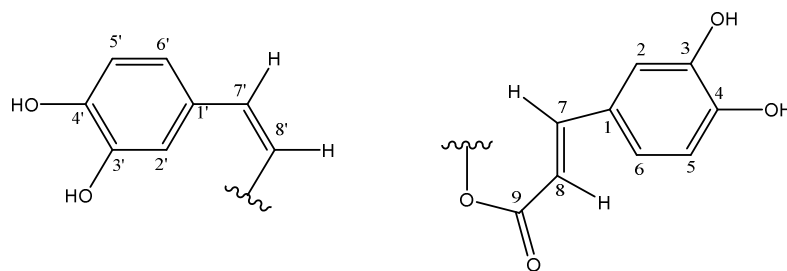
Spectrométrie RMN :

L'analyse des spectres RMN ¹H (figure III-32), ¹³C (figure III-33) et HSQC (figure III-34) du composé **SBR₆** montre une forte similitude avec les spectres du composé acide caféique (**SBR₄**). La différence notable consiste en l'apparition des nouveaux signaux. En effet, on observe :

- Trois protons aromatiques d'intégration 1H chacun, dont deux protons sous forme de doublet résonant à δ_H 6.77 ppm ($J = 8.2$ Hz) et δ_H 7.33 ppm ($J = 2.0$ Hz) et le troisième proton sous forme de doublet de doublets à δ_H 6.92 ppm ($J = 2.0 - 8.2$ Hz), attribuable aux protons H-5', H-2' et H-6', corrélient sur le spectre HSQC avec les carbonnes

résonant à δ_C 116.0, 117.2 et 221.8 ppm respectivement. Ceci permet de déduire la présence d'un deuxième noyau aromatique tri-substitué en 1', 3' et 4'.

- Deux protons éthyléniques d'intégration 1H sous forment de doublet repéré à δ_H 5.65 et 7.27 ppm ayant la même constante de couplage $J = 7.2$ Hz, attribuables aux protons H-7' et H-8', corrèlent sur le spectre HSQC avec les carbones résonants à δ_C 112.5 et 131.3 ppm respectivement. Les valeurs du déplacement chimique et celle de la constante de couplage permettent de déduire la présence d'une chaîne éthylénique de configuration *cis*, et par rapport à leurs déplacements chimiques confirme la présence d'une fonction carboxylique.
- Sept carbones quaternaires dont un carbonyle à δ_C 165.9 ppm (C-9), et quatre carbones hydroxylés à δ_C 145.6 (C-4'), 145.7 (C-3'), 146.9 (C-3) et 149.2 ppm (C-4) et deux carbones à δ_C 127.4 (C-1) et 127.7 ppm (C-1') (tableau III-2).



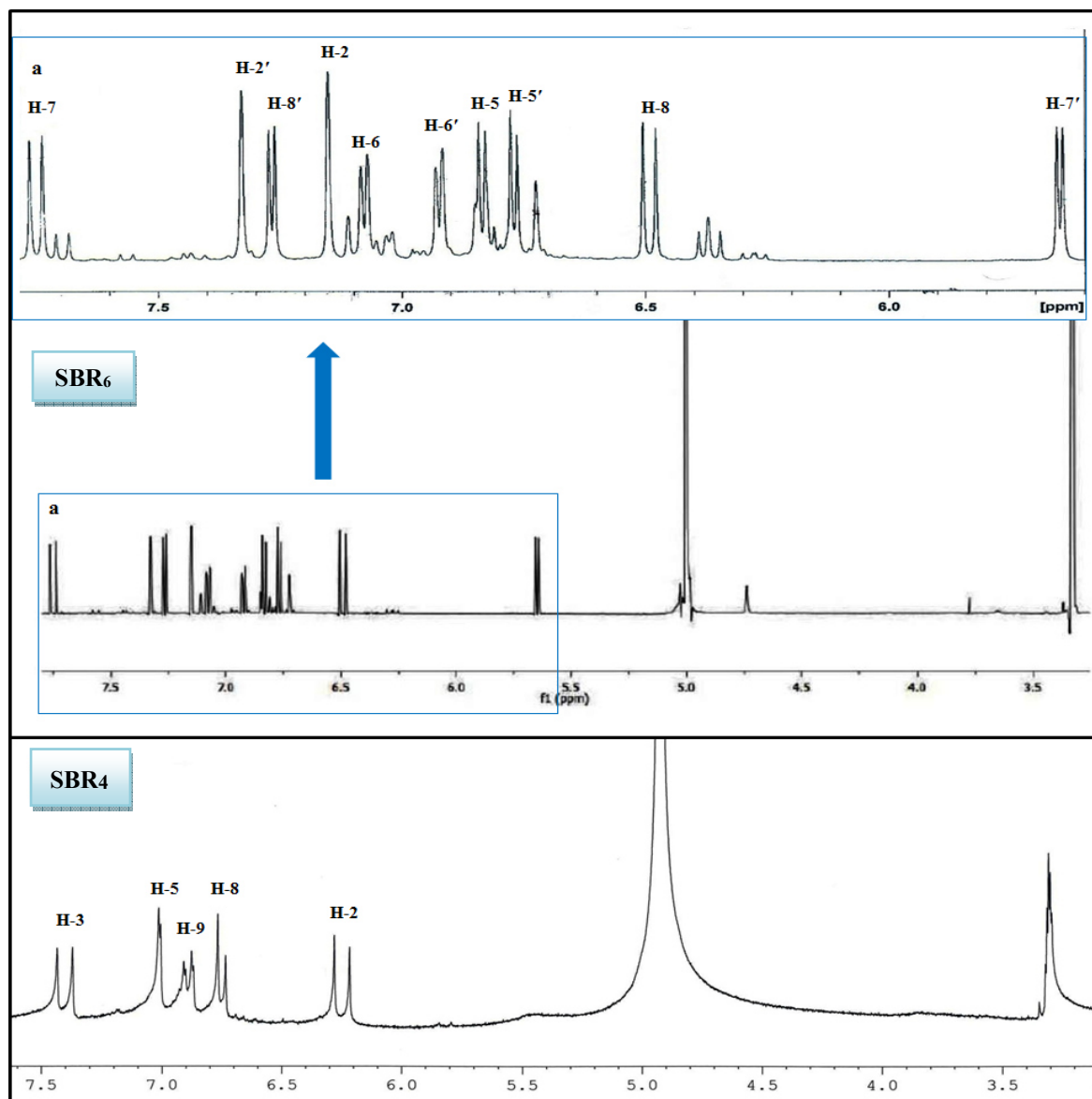


Figure III-32. Spectre de RMN ^1H des composés **SBR₆** comparé à celui du composé **SBR₄**.

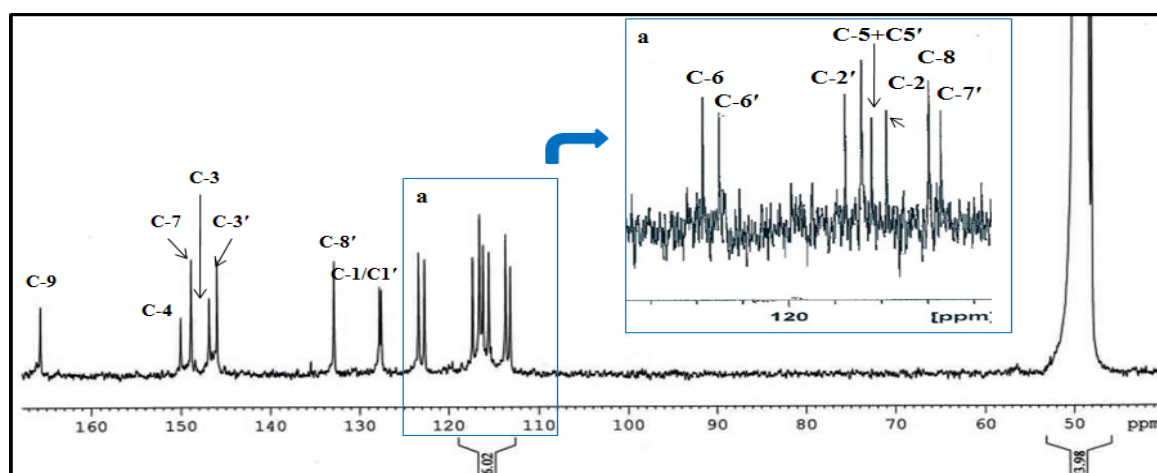


Figure III-33. Spectre RMN ^{13}C du composé **SBR₆**.

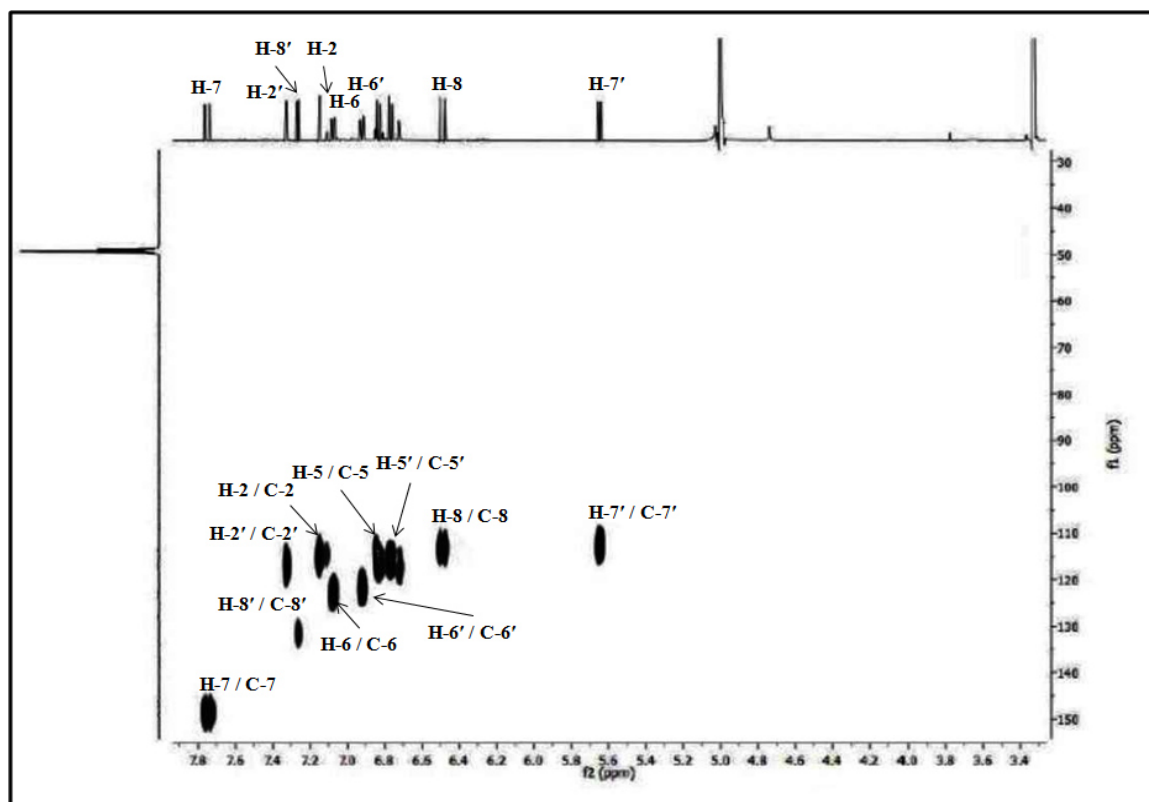


Figure III-34. Spectre HSQC du composé **SBR₆**.

Le spectre COSY (figure III-35) montre bien les taches de corrélations entre :

- Le proton H-6 (δ_H 7.07 ppm) avec le proton H-2 (δ_H 7.15 ppm).
- Le proton H-6' avec le proton H-2'.
- Le proton H-5 (δ_H 6.82 ppm) avec le proton H-6 (δ_H 7.07 ppm).
- Le proton H-5' avec le proton H-6'.
- Le proton H-8 (δ_H 6.49 ppm) avec le proton H-7 (δ_H 7.75 ppm).
- Le proton H-8' avec le proton H-7'.

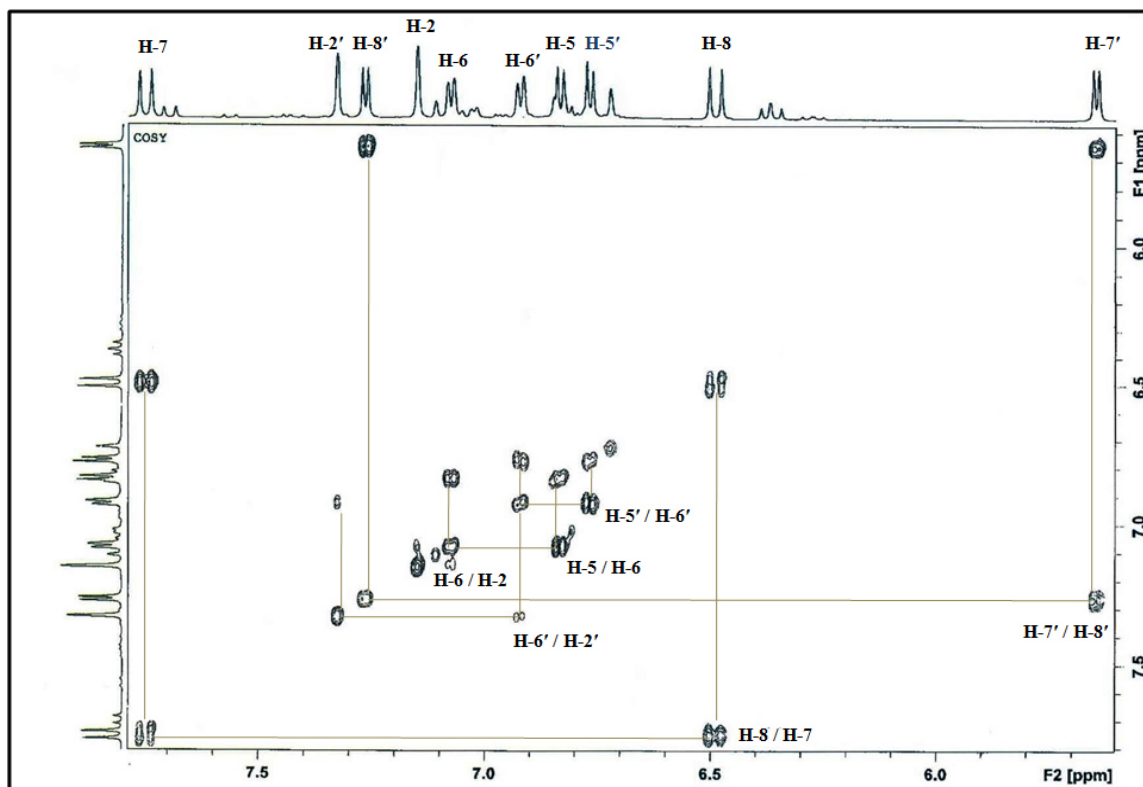
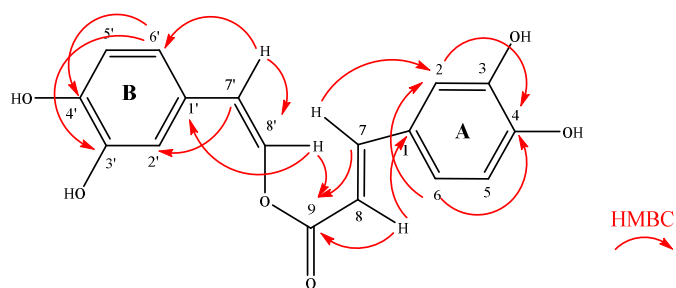
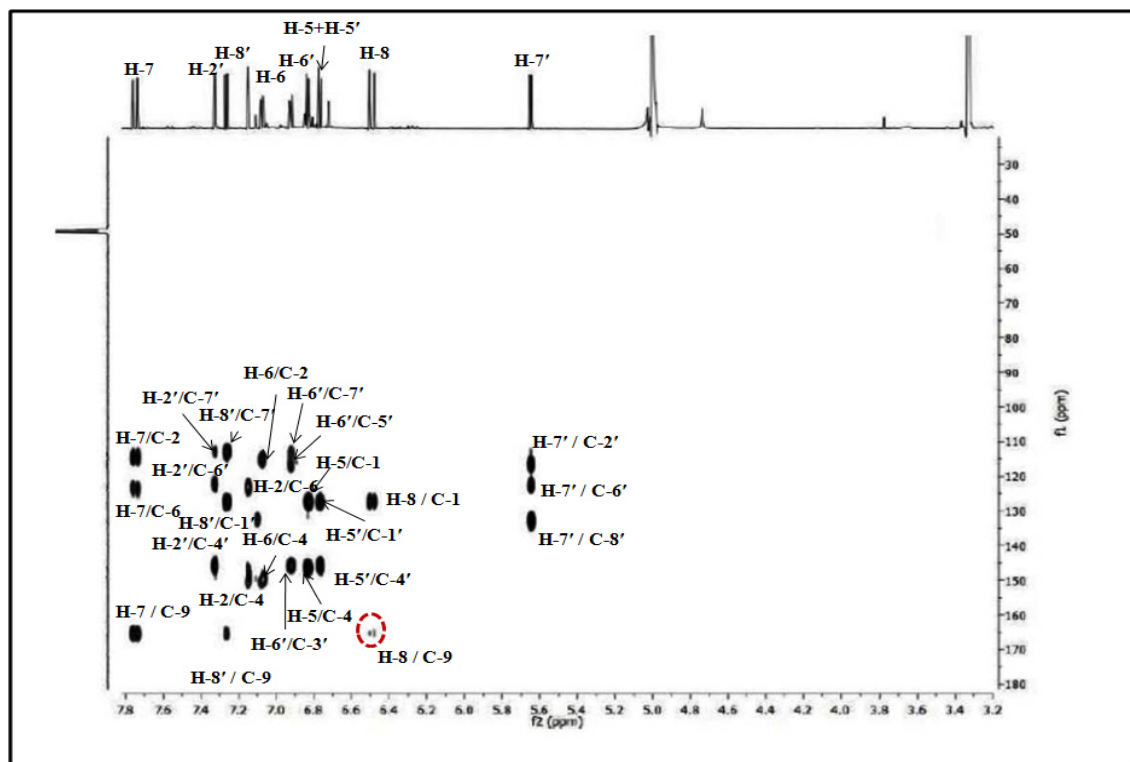


Figure III-35. Spectre COSY étalé du composé **SBR₆**.

Les corrélations ${}^{n>1}J_{H-C}$ observée sur le spectre HMBC (figure III-37) comme suit :

- Les corrélations du groupement acide caféique entre :
 - Le proton H-2 avec les carbones C-4 et C-6
 - Le proton H-5 avec les carbones quaternaires C-1- et C-4.
 - Le proton H-6 avec les carbones quaternaires C-2- et C-4.
 - Le proton H-7 avec les carbones quaternaires C-2, C-6 et le carbonyle C-9.
 - Le proton H-8 avec les carbones C-1 et C-9.
- Les corrélations du groupement 3,4-dihydroxyphénylethylethoxy entre :
 - Le proton H-2' avec les carbones C-4', C-6' et C-7'.
 - Le proton H-5' avec les carbones quaternaires C-1'et C-4'.
 - Le proton H-6' avec les carbones C-3', C-5' et C-7'.
 - Le proton H-7' avec les carbones C-2', C-6' et C-8'.
 - Le proton H-8' avec les carbones C-1', C-7' et C-9. Ce qui indique la jonction du proton H-8' avec le groupement carboxylique en C-9.

Figure III-36. Corrélations HMBC du composé SBR₆.Figure III-37. Spectre HMBC du composé SBR₆.

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au composé SBR₆ : Nepetoidin B ((Z, E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethenyl-ester), isolé précédemment de *Salvia grandifolia* (Zhang et al., 2016).

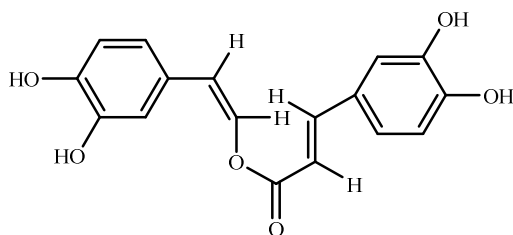
SBR₆ : Nepetoidine B.

Tableau III-1. Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C (600 MHz) de **SBR₁**, **SBR₂** et **SBR₃** dans le CD_3OD .

Position	SBR ₁		SBR ₂		SBR ₃	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, <i>J</i> en Hz)
1a	45.8	2.14 (dd, 13.0-1.5)	61.1	4.20 (d, 14.0)	42.0	1.89 (dl, 12.8)
1b		1.37 ^b		4.11 (d, 14.0)		1.73 (t, 13.7)
2	94.5	5.00 (dd, 11.0-5.5)	155.0	–	66.0	4.28 (dd, 10.6-2.8)
3a	71.6	3.90 (d, 11.8)	135.0	5.41 s	79.0	3.70 (d, 3.2)
3b		3.04 (d, 11.8)				
4	39.7	–	43.4	–	38.6	–
5	61.4	0.88 (dd, 11.8-6.0)	64.2	1.47 (d, 5.0)	48.5	1.62 (dl, 11.5)
6a	23.0	1.57 ^b	18.0	1.52 m	18.3	1.50 m
6b		1.55 ^b				1.31 m
7a	33.1	2.28 m	35.0	1.63 m	33.0	1.52 m
7b		1.44 ^b		1.40 m		1.41 (td, 13.7, 3.2)
8	39.7	–	43.0	–	39.8	–
9	48.4	1.30 (dd, 9.5-4.2)	44.2	2.26 (dd, 11.0-6.5)	47.6	1.97 m
10	41.7	–	51.7	–	38.5	–
11a	22.0	1.55 ^b	26.8	2.25 m	23.6	2.0 m
11b		1.53 ^b		1.63 m		
12a	26.8	1.64 ^b	129.0	5.30 sl	129.1	5.38 sl
12b		1.62 ^b				
13	39.6	2.42 (dd, 11.4-4.0)	140.0	–	140.0	–
14	43.4	–	43.1	–	41.7	–
15a	30.5	1.54 ^b	30.0	1.87 m	28.0	2.14 m
15b		1.21 m		1.03 m		1.22 m
16a	31.0	1.98 ^b	26.2	2.25 m		2.11 m
16b		1.40 ^b		2.00 m	23.2	1.22 (d, 11.5)
17	57.4	–	49.0	–	47.3	–
18	50.0	1.65 (dl, 11.5)	55.0	2.53 s	41.1	3.24 (dd, 13.3, 4.1)
19	48.0	3.09 (td, 16.0-11.5-4.6)	72.8	–	46.5	1.77 (t, 13.3) 1.31 m
20	151.8	–	43.0	1.38 m	30.7	–
21a	31.1	1.98 ^b	27.0	1.75 m	33.8	1.48 m
21b		1.38 ^b				1.22 m
22a	38.0	1.93 m	38.9	1.74 m	32.5	2.05 m
22b		1.46 ^b		1.65 m		1.88 m
23	27.6	0.83 s	29.0	1.05 s	21.6	1.15 s
24	20.7	0.95 s	21.0	0.98 s	22.0	0.87 s
25	15.0	1.05 s	19.0	1.17 s	16.3	0.94 s
26	17.0	1.07 s	19.0	0.87 s	17.3	0.90 s
27	14.6	1.03 s	24.8	1.36 s	26.0	1.25 s
28	180.7	–	182.0	–	181.6	–
29a	109.0	4.90 s	16.0	0.96 s	33.1	0.99 s
29b		4.71 s				
30	19.1	1.72 s	26.0	1.22 s	23.4	0.97 s

Tableau III-2. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (250 MHz) de **SBR₄**, **SBR₅** et **SBR₆** dans le CD_3OD .

Position	SBR ₄		SBR ₅		Position	SBR ₆	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm, <i>J</i> enHz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, <i>J</i> enHz)		δ_{C}	δ_{H} (ppm, <i>J</i> enHz)
1	168.0	–	167.3	–	1	127.4	–
2	117.0	6.33 (d, 15.9)	117.1	6.42 (d, 15.7)	2	114.0	7.15 (d, 2.0)
3	141.0	7.35 (d, 15.9)	141.0	7.68 (d, 15.7)	3	146.9	–
4	127.0	–	127.0	–	4	149.2	–
5	114.0	7.36 (d, 1.9)	114.0	7.24 (d, 1.9)	5	116.0	6.82 (d, 8.2)
6	147.8	–	146.6	–	6	122.0	7.07 (dd, 2.0 - 8.2)
7	145.0	–	145.7	–	7	148.5	7.75 (d, 15.5)
8	115.0	6.30 (d, 8.1)	113.5	6.30 (d, 7.8)	8	113.4	6.49 (d, 15.5)
9	121.0	6.90 (dd, 8.1 – 1.9)	120.0	7.11 (dd, 8.1 – 1.9)	9	165.9	–
O-CH ₃	–	–	51.2	3.68	1'	127.7	–
					2'	117.2	7.33 (d, 2.0)
					3'	145.7	–
					4'	145.6	–
					5'	116.0	6.77 (d, 8.2)
					6'	121.8	6.92 (dd, 2.0-8.2)
					7'	112.5	5.65 (d, 7.2)
					8'	131.3	7.27 (d, 7.2)

III.1.3. Conclusion sur l'étude phytochimique des racines de *S. buchananii*

La séparation des extraits chloroformique et chloroforme-méthanol des racines de *Salvia buchananii*, a été affinée par l'identification et la détermination structurale de 6 composés isolés dont un produit nouveau.

L'extrait chloroformique a conduit à l'isolement de l'acide salvibuchanique **SBR₁** comme une nouvelle structure et deux produits dérivés de la famille d'ursane et oléane, acide hyptadiénique **SBR₂** et acide maslinique **SBR₃**.

De l'extrait chloroforme-méthanol, nous avons isolé 3 composés ils appartiennent aux familles des phénylpropanoïdes et des acides-phénols dont, l'acide caféique et l'acide caféique méthyle ester et nepetoidin B **SBR₄**, **SBR₅** et **SBR₆**.

Le triterpène lupane **SBR₁** et l'acide hyptadiénique **SBR₂** ont été étudiés pour déterminer leur cytotoxicité sur les lignées cellulaires cancéreuses Jurkat, Hela et MCF7 (Etude biologique).

III.1.4. Analyse GC et GC/MS de l'huile essentielle des parties aériennes *Salvia buchananii* Hedge.

III.1.4.1. Composition chimique de l'huile essentielle de *S. buchananii*

La GC et GC/MS de l'huile essentielle a été analysée par chromatographie gazeuse selon la méthode précédemment expliquée. Au total treize composés ont été identifiés, ce qui correspond à un pourcentage de 95.9% par rapport à l'ensemble des constituants. D'après le tableau III-3, on peut observer que l'huile essentielle de *S. buchananii* est principalement constituée de :

- **Éthercyclique** : 1,8-cineole (23.3%)
- **Monoterpène bicyclique** : α -pinene (19.8%), camphene (16.5%) et β -pinene (11.5%)
- **Monoterpène** : bornylacetate (5.5%)

Tableau III-3. Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia buchananii* Hedge.

Composé	RRI ^a	%	Composé	RRI ^a	%
Pentanal	704	0.6	γ -Terpinene	1054	1.6
Isovaleraldehyde	658	1.5	o-Cymene	1022	3.7
α -pinene	939	19.8	Camphor	1141	3.1
Camphene	954	16.5	Bornylacetate	1286	5.5
β -pinene	979	11.5	β -Caryophyllene	1417	4.3
Limonene	1024	2.5	Aromadendrene	1439	2.0
1,8-Cineole	1026	23.3	Total		95.9

RRI^a : relative retention indices

III.1.4.2. Discussion

Dans des études antérieures sur les huiles essentielles du genre, on a constaté que le 1,8-cineole était le principal composant des huiles essentielles de *S. apiana* (71.7%) (Aliet *al.*, 2015), *S. Fruticosa* (47.5%) (Sivropoulou *et al.*, 1997), *S. macrochlamys* (27.0%) (Tabanca *et al.*, 2006), *S. potentillifolia* (19.3%) (Kose *et al.*, 2013). En accord avec la littérature, l'huile actuelle contient des quantités élevées de monoterpènes bicycliques.

Chapitre 2

Identification des produits isolés de

Cistanche phelypaea (L)

Etude phytochimique de *Cistanche phelypaea* (CT)

L'espèce *C. phelypaea* a retenu l'attention en premier lieu pour ses utilisations traditionnelles en Sahara (Algérie) dans le traitement des diarrhées, diabète et également utilisé contre les troubles intestinaux, d'autre part la partie inférieure de la tige est utilisé sous forme d'une pâte pour soigner les abcès (infections) (Boulous et al., 1983), en second lieu, en raison de l'absence de travaux phytochimiques répertoriés sur elle. Le principe de cette étude est d'isoler et d'élucider les composés contenus dans cette plante et ainsi d'identifier de nouveaux métabolites potentiellement biologiquement intéressants.

III.2.1. Identification des phénylétanoïdes glycosidés isolés de l'extrait CT_{n-BuOH}

Les composés CT₁–CT₇, ont été obtenus sous forme de poudre brunâtre amorphe. Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation de la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire. Dans cette description, nous analyserons dans un premier temps la spectrométrie de masse. Celle-ci nous donne des informations sur les masses moléculaires, et permet d'établir la formule brute de chacune des molécules isolées. Cette première étape sera suivie par l'analyse des spectres RMN. Cette dernière analyse permet tout d'abord de déterminer la nature des aglycones et des sucres.

III.2.1.1. Détermination de structure du composé CT₁

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif (figure III-38) du composé CT₁ montre un ion pseudo--moléculaire à m/z 657.2353 [M+Na]⁺ (calc. 657.2371). En plus du pic de l'ion moléculaire, nous observons sur le spectre la présence d'autres fragments importants à m/z 597.2145 [M+Na-60]⁺, m/z 511.1772 [M+Na-146]⁺ et m/z 365.1203 [M+Na-146-146]⁺ indiquent la perte d'un groupement acétyle et deux unités désoxyhexose respectivement. Tous ces éléments laissent supposer pour CT₁ la formule brute C₂₈H₄₂O₁₆.

Son spectre UV (MeOH) présente les bandes d'absorption λ_{\max} nm (log ϵ) 223 (4.20), 280 (3.50), 321 (3.06).

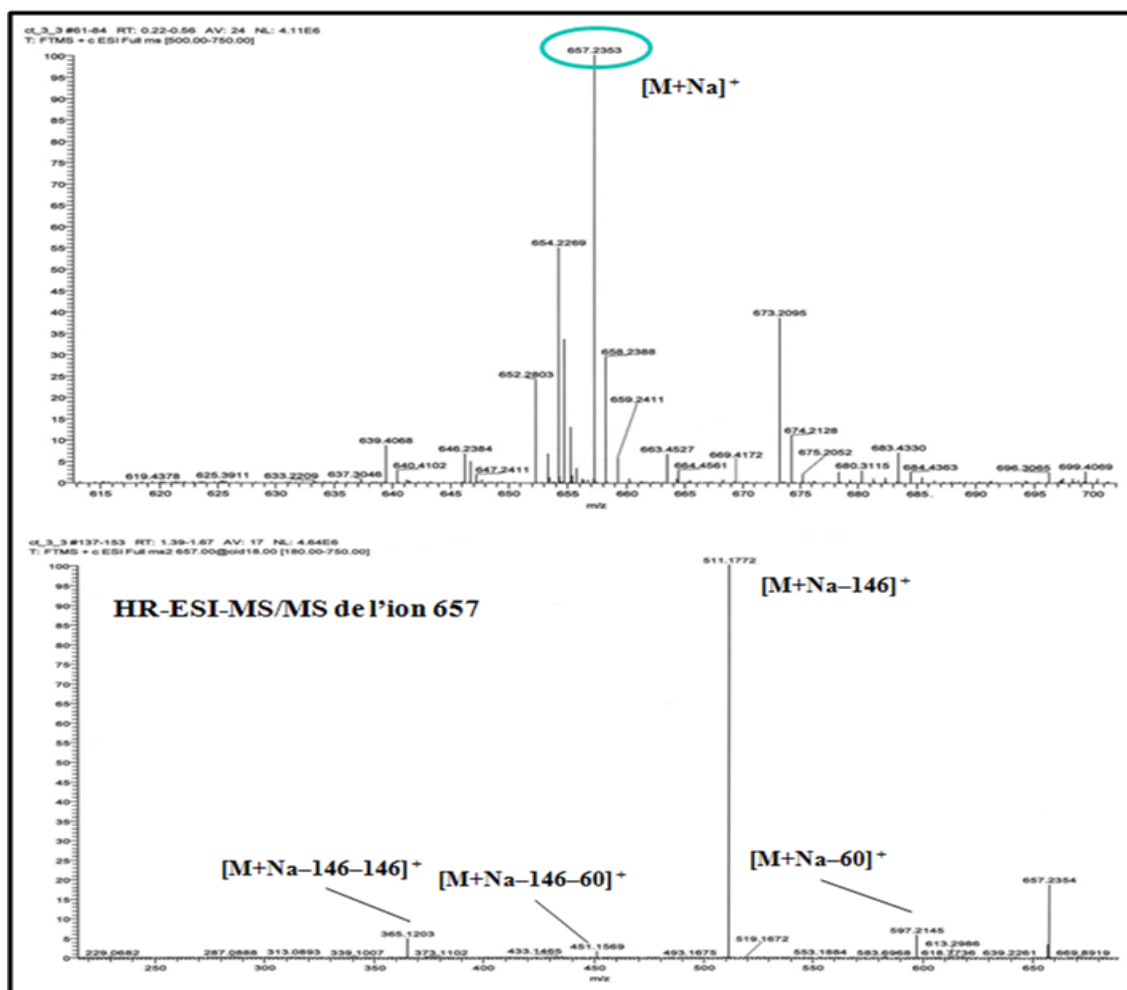


Figure III-38. Spectre de masse HR-ESI-MS et MS/MS du composé CT₁.

Spectrométrie de RMN :

L'analyse simultanée des spectres RMN¹H (figure III-39), COSY (figure III-43) et HSQC (figure III-40) montre :

- Deux signaux caractéristiques à des protons aromatiques d'intégration 2H chacun à δ_H 6.71 et 7.04 ppm de même constante de couplage ($J = 8.0$ Hz) corrént sur le spectre HSQC avec leur carbone à δ_C 116.3 et 131.2 ppm respectivement.

La valeur de la constante de couplage ainsi que celles des déplacements chimiques des deux signaux orientent vers la présence d'un noyau aromatique *para* substitué.

- Deux groupements méthylènes dont :
 - Un signale multiplet à δ_H 2.80 ppm d'intégration 2H corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 36.4 ppm.

- Ce signal montre sur le spectre COSY (figure III-43) deux taches de corrélations avec deux autres signaux, le premier résonne à δ_H 3.62 ppm alors que le deuxième à δ_H 4.04 ppm, ces derniers corréleront sur le spectre HSQC avec le même carbone résonnant à δ_C 72.5 ppm.

Ces observations sont en faveur d'un phényléthyl.

- Un signal singulet d'intégration de trois protons à δ_H 2.00 ppm corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 21.2 ppm, indique la présence d'un groupement acétyle.
- D'autres signaux se trouvant dans la zone caractéristique des protons osidiques, en effet on observe :
 - Un signal sous forme de doublet ($J = 8.0$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 4.44 ppm corréle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 103.2 ppm, caractéristique au proton anomérique appartenant à une unité osidique qui peuvent être le glucose.

Les valeurs des déplacements chimiques orientent vers une jonction *O*-sucre alors que les valeurs des constantes de couplage indiquent une configuration β des liaisons osidiques.

- Deux signaux sous forme de doublets d'intégration 1H à δ_H 4.76 ppm ($J = 1.3$ Hz) et 4.80 ppm ($J = 1.5$ Hz) corréleront sur le spectre HSQC avec les carbones à δ_C 102.1 et 102.5 ppm, caractéristique aux protons anomériques de deux rhamnose (RhaI et RhaII) confirmé par la présence de deux signaux sous forme de doublet d'intégration 3H chacun, le premier à δ_H 1.26 ppm ($J = 6.3$ Hz) et le deuxième 1.27 ppm ($J = 6.5$ Hz) corréleront sur le spectre HSQC avec leurs carbones à δ_C 18.1 et 18.3 ppm typique des groupements méthyles d'un rhamnose. Ceci permet de déduire la présence de deux unités osidiques.
- Un massif de protons résonnant dans une zone entre δ_H 3.40 - 4.00 ppm.

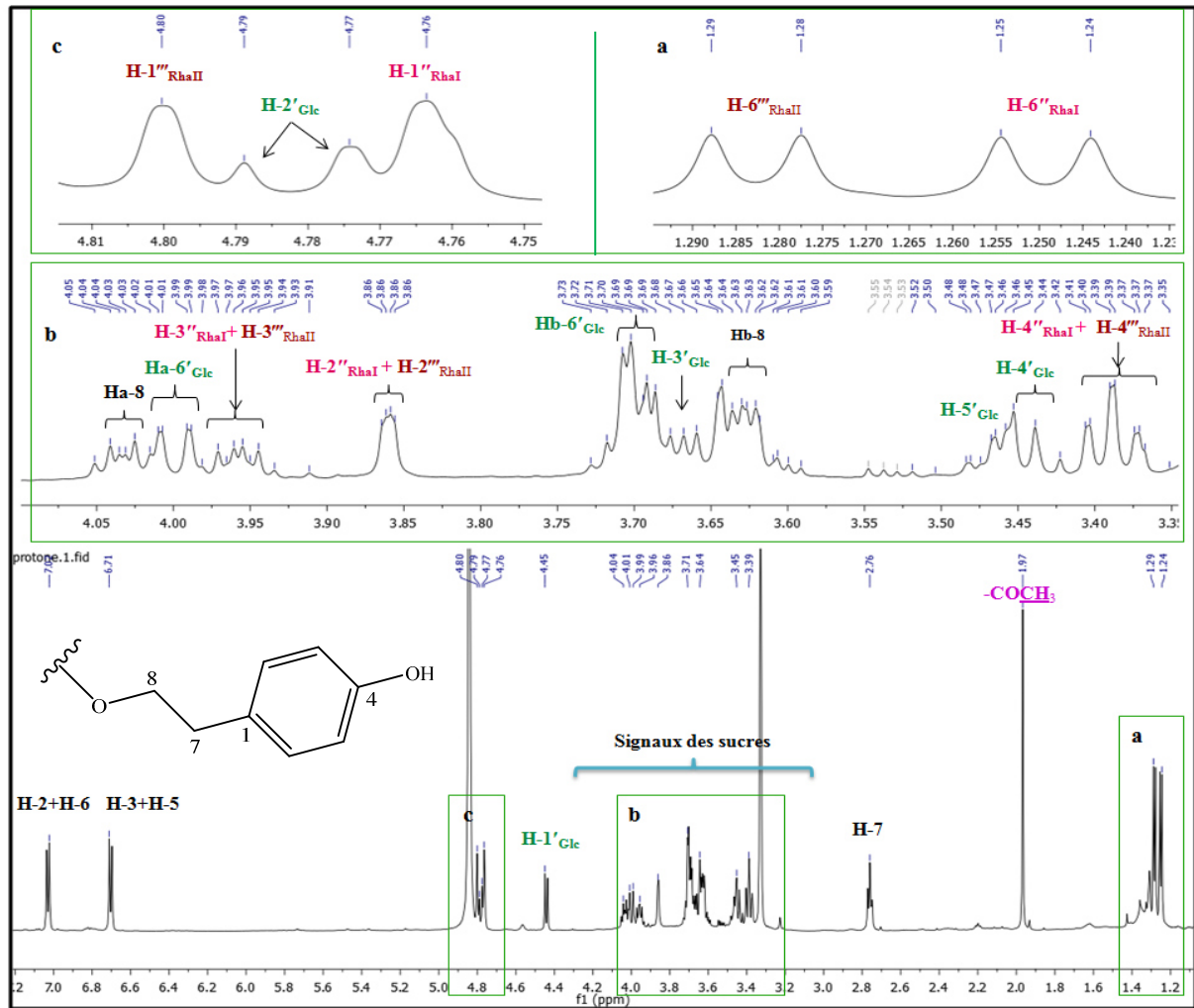


Figure III-39. Spectre de RMN ^1H , avec un agrandissement de la partie osidique (a, b et c) du composé CT_1 .

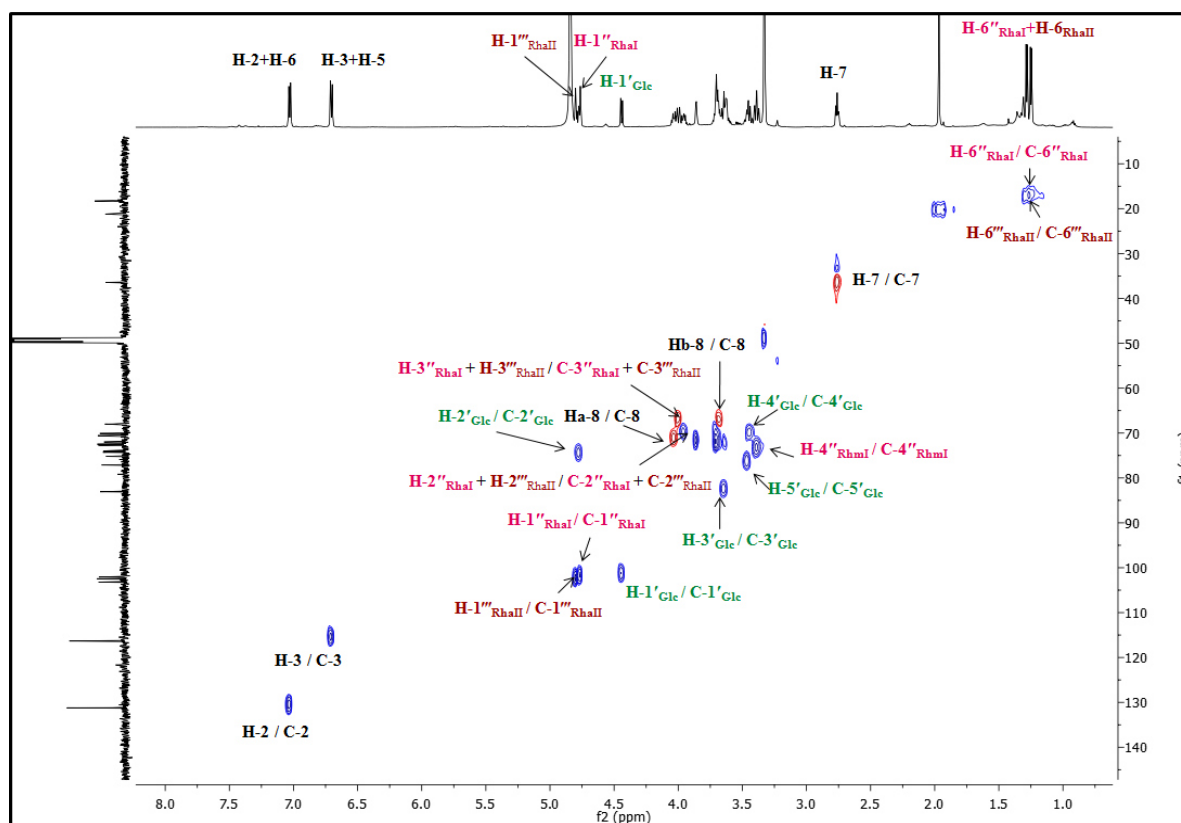


Figure III-40. Spectre HSQC du composé CT₁.

Le spectre RMN ¹³C (figure III-41), confirme la présence de 21 carbones, on distingue aisément les signaux suivants :

- Quatre carbones CH Sp² confirme la présence d'un noyau aromatique *para* substitué, à δ_C 116.3 et 131.2 ppm attribuables aux C-3, C-5 et C-2, C-6 respectivement.
- Un carbone quaternaire Sp² oxygéné à δ_C 157.0 ppm attribuable à C-4.
- Un carbone quaternaire Sp² à δ_C 131.0 ppm attribuable à C-1.
- Deux carbones méthylènes à δ_C 36.4 et 72.5 ppm attribuables aux C-7 et C-8 (CH₂-CH₂-O).
- Trois carbones anomériques à δ_C 103.2, 102.1 et 102.5 ppm attribuables aux C-1'_{Glc}, C-1''_{RhaI} et C-1'''_{RhaII}.
- Un massif de carbone entre δ_C 68.0 et 75.0 ppm attribuables aux des sucres caractéristiques d'un glucose et deux rhamnosés.
- Un carbone quaternaire à δ_C 171.3 ppm confirme la présence d'un groupement acétyle.

L'ensemble de cette première analyse confirme la présence de la partie 4-hydroxyphényléthoxy et trois unités osidiques, et donc déduire la présence d'un phényléthanoïdes.

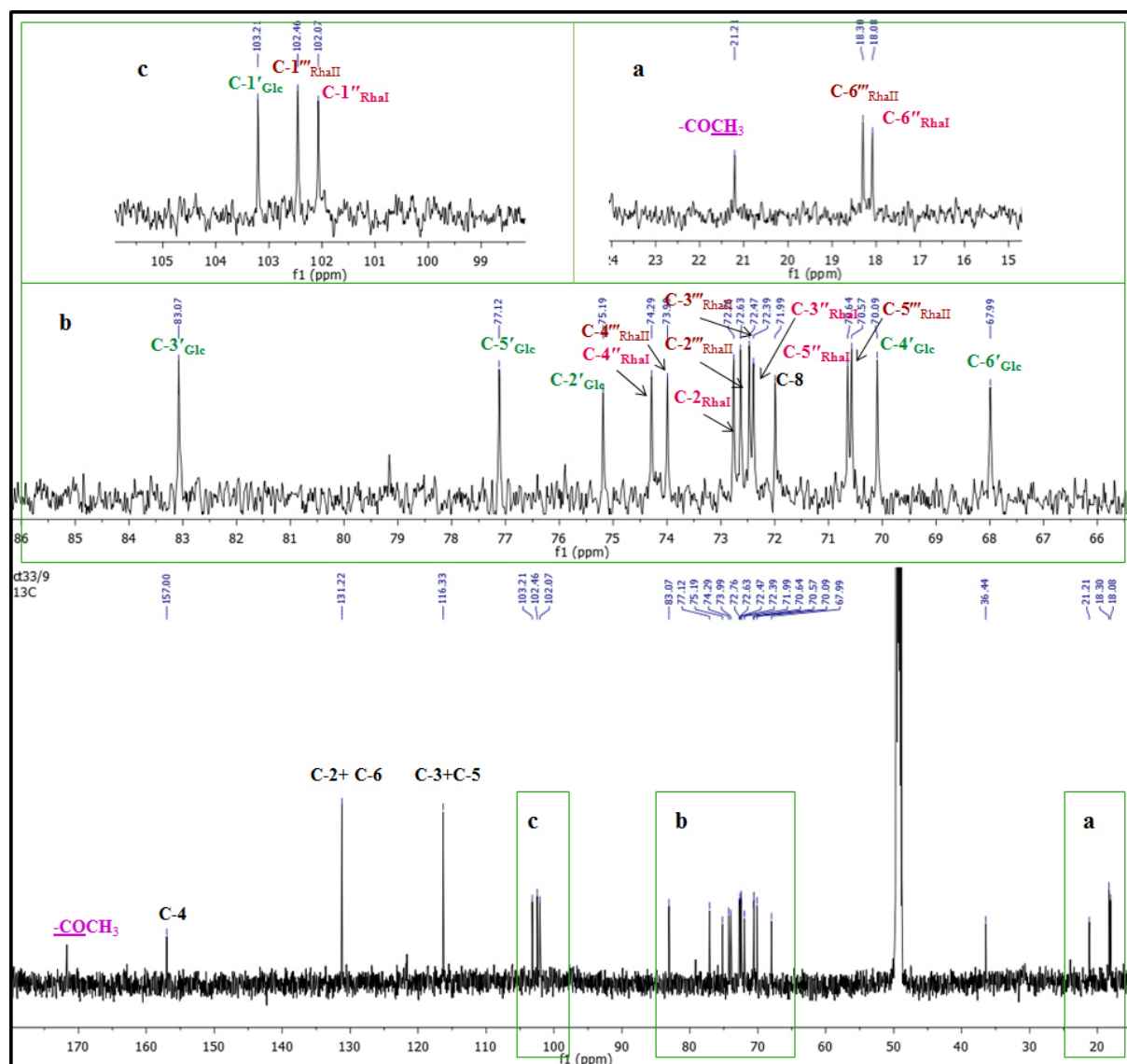
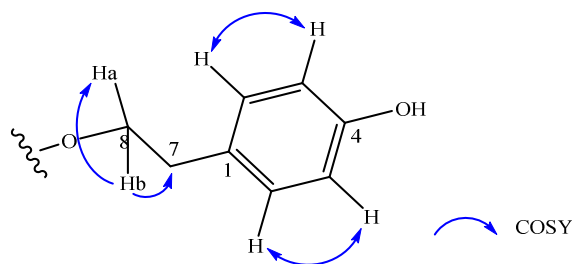


Figure III-41. Spectre de RMN ^{13}C , avec un agrandissement de la partie osidique (**a**, **b** et **c**) du composé **CT₁**.

L'expérience COSY et TOCSY (figure III-43- III-44) nous ont permis d'attribuer les couplages H-H comme suit :

- La partie 4-hydroxyphényléthoxy on observe des taches de corrélation entre :
 - Deux doublets d'intensité 2H (δ_{H} 7.04 et 6.71 ppm) corrélient entre eux attribuables aux protons H-2/H-6 et H-3/H-5.
 - Le proton H-7 (δ_{H} 2.80 ppm) et deux protons sous forme de multiplet H_b-8 et H_a-8 (δ_{H} 3.62 et 4.04 ppm).
 - Le proton H_a-8 et deux protons sous forme de multiplet H_b-8 et H-7.
 - Le proton H_b-8 et les protons H_a-8 et H-7.



- Les protons de trois unités osidiques qui montrent des taches de corrélation entre :
 - Le proton anomérique H-1'_{Glc} (δ_H 4.44 ppm) et le proton résonant à δ_H 4.78 ppm (*dd*, $J = 9.0, 8.0$ Hz) attribuable à H-2'_{Glc}, lui même corrélant avec un proton résonant à δ_H 3.65 ppm (*t*, $J = 9.0$ Hz) correspondant au proton H-3'_{Glc}.
 - Le proton H-3'_{Glc} et un proton résonant sous forme de triplet à δ_H 3.44 ppm ($J = 9.0$ Hz) correspondant au proton H-4'_{Glc}, ce dernier et le proton résonant à δ_H 3.46 ppm attribuable au proton H-5'_{Glc}.
 - Le proton H-5'_{Glc} et un proton résonant à δ_H 3.68 ppm correspondant au proton H_b-6'_{Glc} lui même corrélant avec un proton à δ_H 4.00 ppm attribuable au proton H_a-6'_{Glc}, ces deux derniers protons sont portés par le carbone C-6'_{Glc}.

Les grandes valeurs de constantes de couplage, indiquent que ces protons sont axiaux. Il s'agit donc d'un D-glucose de configuration β au regard de la constante de couplage $J = 9.0$ Hz.

- Le proton H-6"_{RhaI} (δ_H 1.26 ppm) du groupement méthyle et le proton résonant à δ_H 3.68 ppm attribuable à H-5"_{RhaI}, ce dernier avec un proton à δ_H 3.39 ppm (*t*, $J = 9.0$ Hz) correspondant au proton H-4"_{RhaI}.
- Le proton H-4"_{RhaI} et un proton résonant à δ_H 3.96 ppm (*dd*, $J = 9.0 - 3.0$ Hz) attribuable à H-3"_{RhaI}, lequel à son tour corrèle avec le proton à δ_H 3.83 ppm (*dd*, $J = 3.0 - 1.8$ Hz) correspondant au proton H-2"_{RhaI}.
- Le proton H-2"_{RhaI} et le proton à δ_H 4.76 ppm (*d*, $J = 1.3$ Hz) correspondant au proton anomérique H-1"_{RhaI}.

Ces corrélations permettent ainsi d'identifier un déoxyhexose, il s'agit d'un L-rhamnose (RhaI) de configuration α .

- Le proton H-6"_{RhaII} (δ_H 1.27 ppm) du groupement méthyle et le proton résonant à δ_H 3.68 ppm attribuable à H-5"_{RhaII}, ce dernier avec un proton à δ_H 3.39 ppm (*t*, $J = 9.0$ Hz) correspondant au proton H-4"_{RhaII}. Ce proton et le proton résonant à δ_H 3.96 ppm (*dd*, $J = 9.0 - 3.0$ Hz) attribuable à H-3"_{RhaII}, lequel à son tour corrèle avec le

proton à δ_{H} 3.83 ppm (*dd*, $J = 3.0\text{--}1.8$ Hz) correspondant au proton H-2''_{RhaII}. Ce proton et le proton à δ_{H} 4.80 ppm (*d*, $J = 1.5$ Hz) correspondant au proton anomérique H-1''_{RhaII}.

Ces corrélations permettent ainsi d'identifier le L-rhamnose (Rha_{II}) de configuration α .

L'analyse des spectres COSY et TOCSY à partir des protons anomériques nous a permis d'identifier un β -D-glucopyranoside (Glc) et deux α -L-rhamnopyranosyle (Rha_I et Rha_{II}).

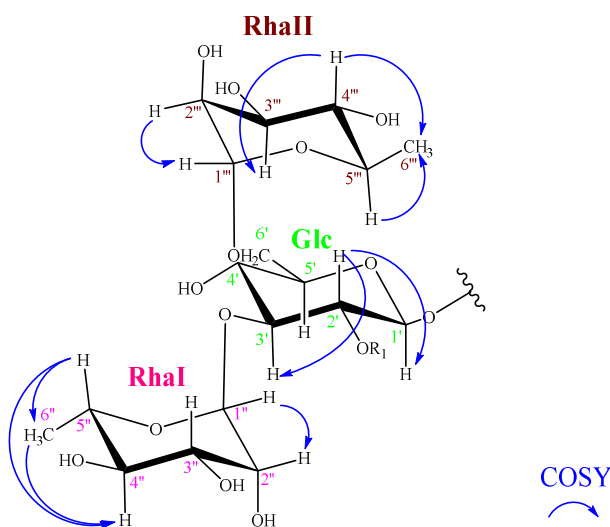
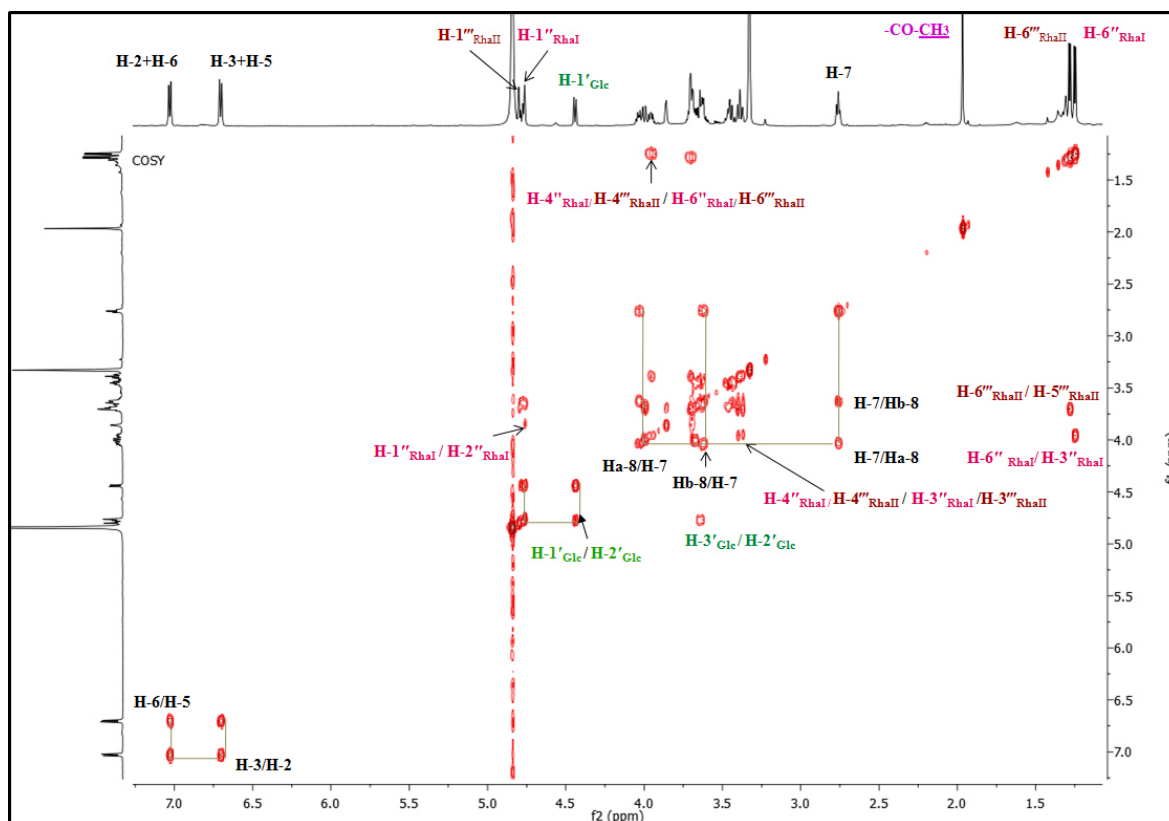
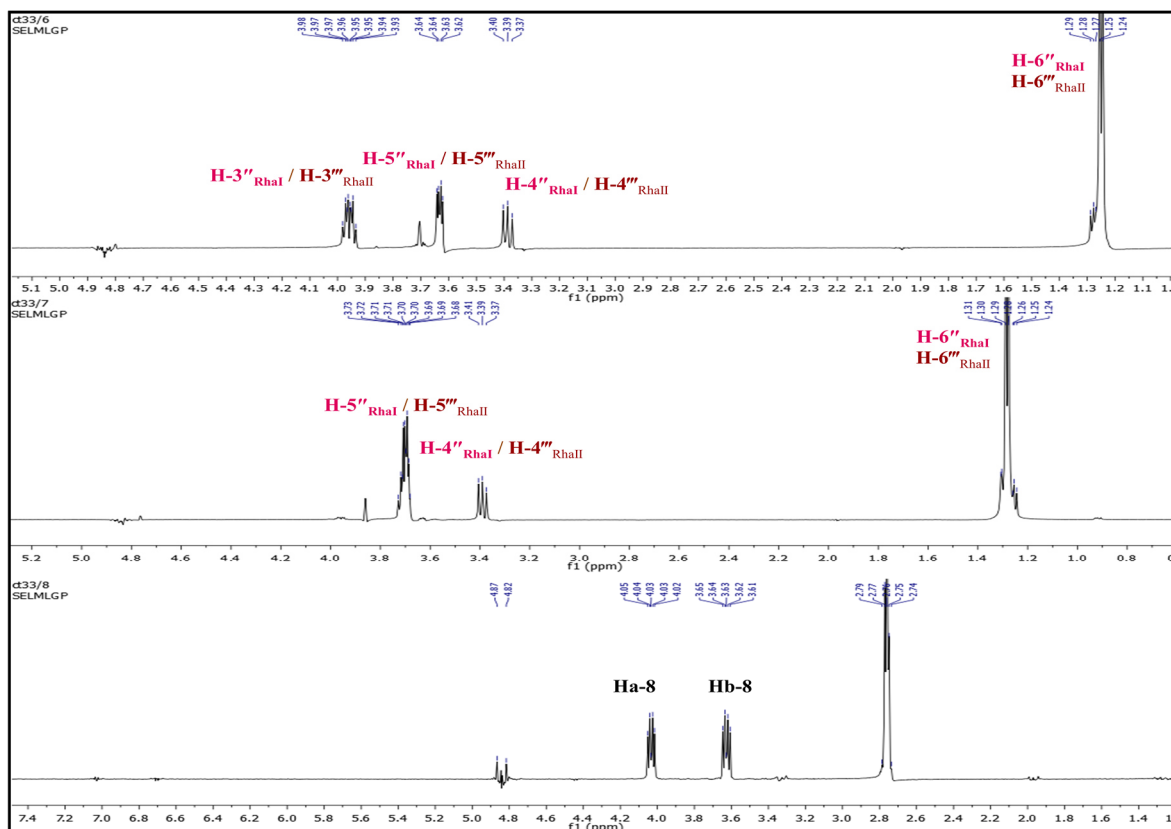


Figure III-42. Corrélations COSY du β -D-glucopyranoside et α -L-rhamnopyranosyl dans les phényléthanoïdes CT₁-CT₅.

Figure III-43. Spectre COSY du composé CT₁.Figure III-44. Spectre 1D-TOCSY de la partie osidique du composé CT₁.

L'observation des spectres HMBC (figure III-46- III-49) montrent des taches de corrélations sont attribuées comme suit :

- Corrélations du 4-hydroxyphényléthoxy entre :
 - Le proton H-2 avec les carbones C-3 et C-6, un carbone méthylène C-7 et deux carbones quaternaires C-4 et C-1. Cette déduction est confirmée par les corrélations observées entre ce dernier carbone et les protons de la chaîne éthane.
 - Le proton H-5 avec les carbones C-1, C-3, C-4 et C-6.
 - Le proton H-6 avec les carbones C-2, C-4 et le carbone de la chaîne éthane C-7.
 - Le proton H-7 avec les carbones C-1 et C-8

Cette observation permet de lier les groupements CH₂-CH₂-O- et OH au cycle aromatique di-substitué en position 1 et 4 respectivement. Ceci confirme aussi une structure de type phényléthanoïde.

- Corrélations des trois unités osidiques entre :
 - Les deux protons de la chaîne éthane H_a-8 et H_b-8 avec le carbone C-1'_{Glc} ce qui permet de déduire que le glucose est lié au groupement phényléthanoïde par une liaison entre le CH₂-O et le carbone anomérique C-1'_{Glc}.
 - Le proton anomérique du rhamnose H-1''_{RhaI} avec le C-3'_{Glc} ce qui permet de déduire que le premier rhamnose est lié au glucose en position C-3'_{Glc}.
 - Les protons H_a-6'_{Glc} et H_b-6'_{Glc} du glucose avec le carbone anomérique C-1'''_{RhaII}, ceci indique que le deuxième rhamnose est lié au glucose en C-6'_{Glc}.
- La corrélation du groupement acétyle entre :
 - Le proton H-2'_{Glc} avec le carbonyle à δ_C 171.3 ppm. Donc le groupement acétyle est lié au glucose en position 2'_{Glc}.

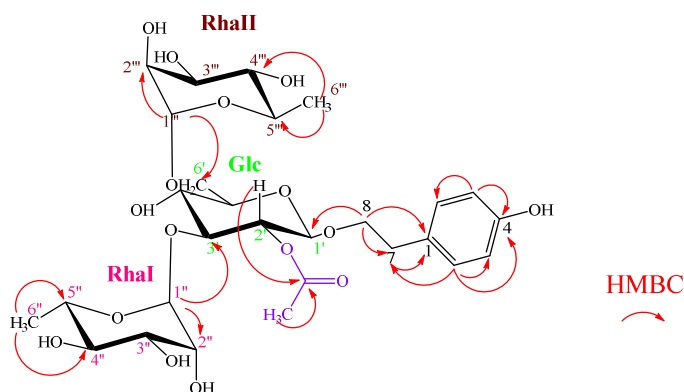


Figure III-45. Corrélations HMBC du composé CT1.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-4.

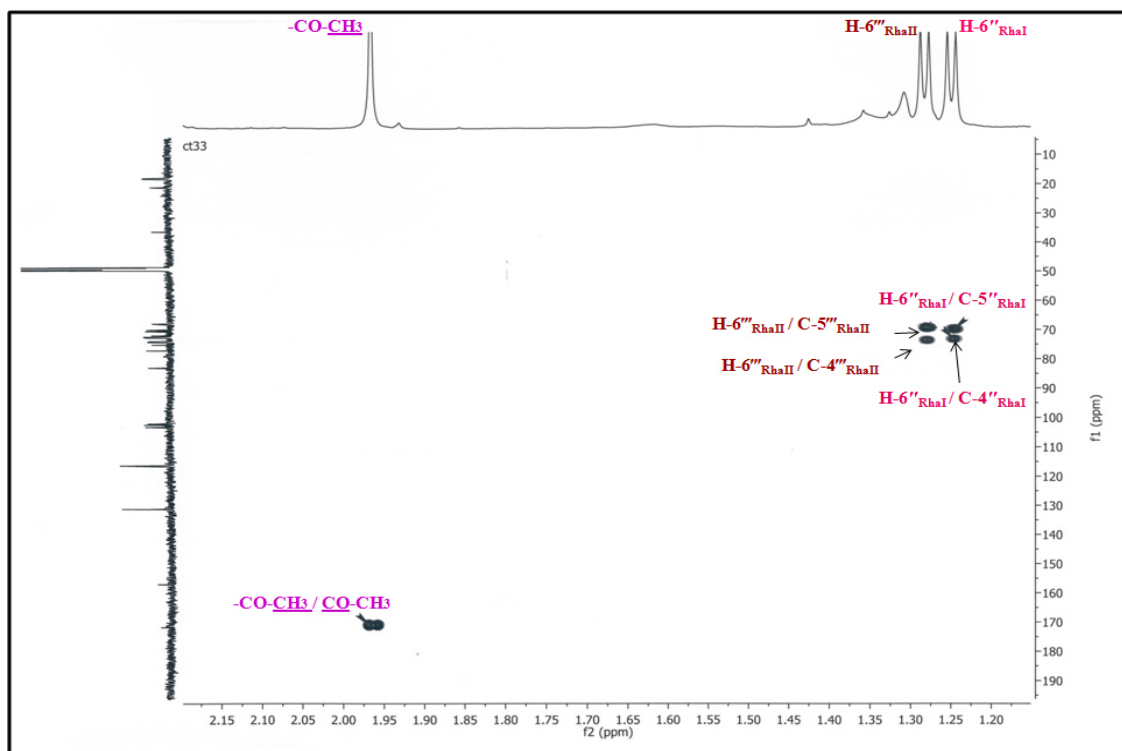


Figure III-46. Spectre HMBC étalé de δ_H 1.20 à 2.15 ppm du composé CT₁.

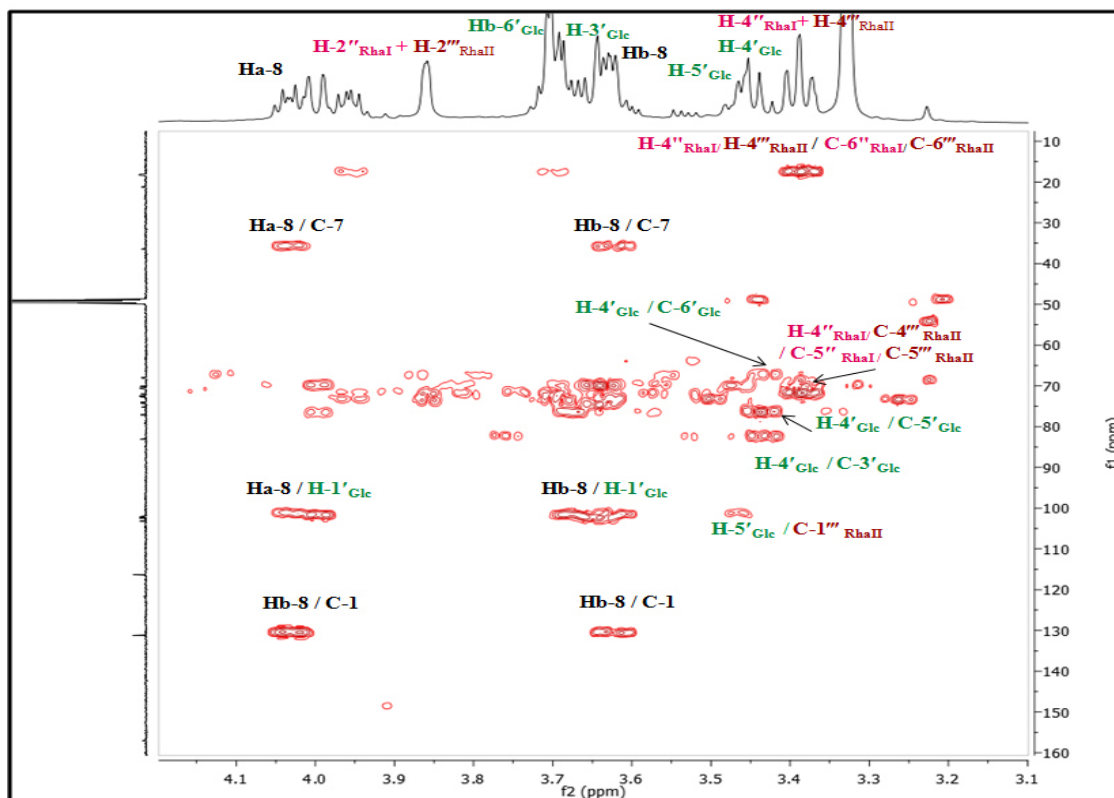


Figure III-47. Spectre HMBC étalé de δ_H 3.1 à 4.1 ppm du composé CT₁.

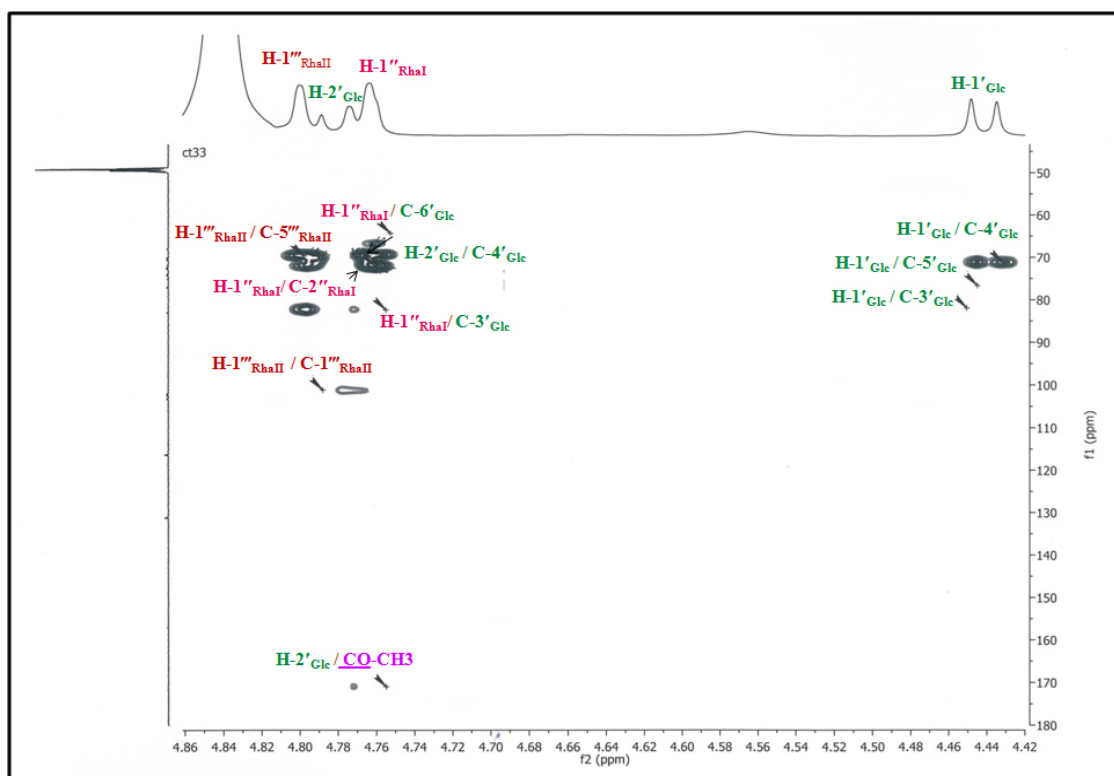


Figure III-48. Spectre HMBC étalé de δ_H 4.42 à 4.86ppm du composé CT₁.

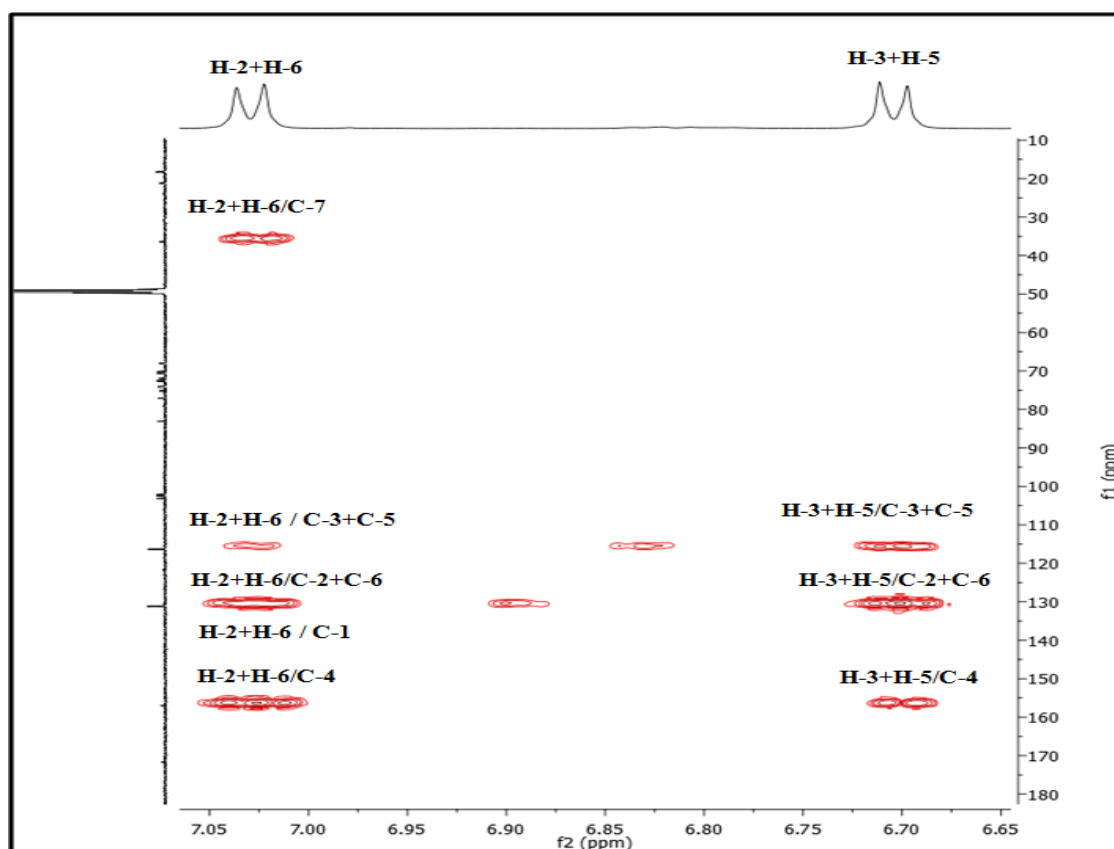
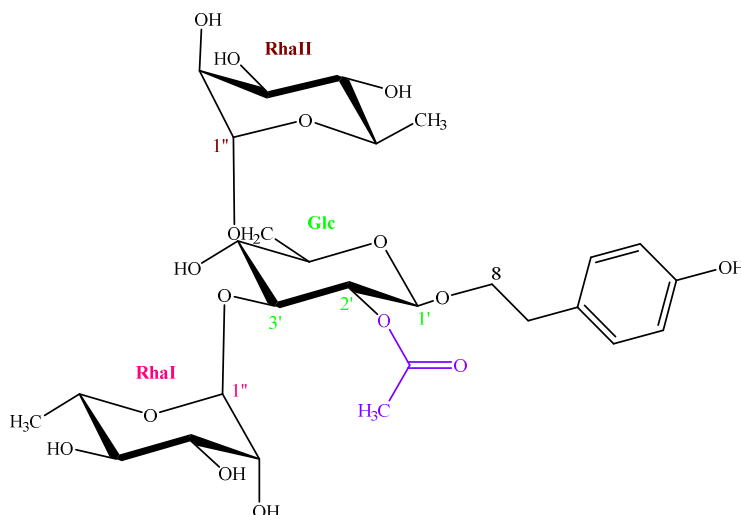


Figure III-49. Spectre HMBC étalé de δ_H 6.65 à 7.05 ppm du composé CT₁.

L'analyse des données de RMN 1D & 2D couplées à celles du spectre de masse ainsi que la mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} = -58.5$, c 0.1, MeOH), confirme l'identification du composé **CT₁** étant : le **1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside**, de structure nouvelle.



CT₁: 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside.

III.2.1.2. Détermination de structure du composé CT₂

Spectrométrie de masse :

L'analyse du spectre de masse ESI-MS en mode négatif (figure III-50) du composé **CT₂** montre un ion pseudo moléculaire à m/z 591.17 $[M-H]^-$, correspondant à la formule brute $C_{26}H_{40}O_{15}$, soit 66 *uma* de moins par rapport au composé **CT₁** correspondant à la perte d'un groupement acétyle.

Son spectre UV (MeOH) présente les bandes d'absorption λ_{max} nm ($\log \epsilon$) 222 (4.09), 280 (3.55), 315 (3.10).

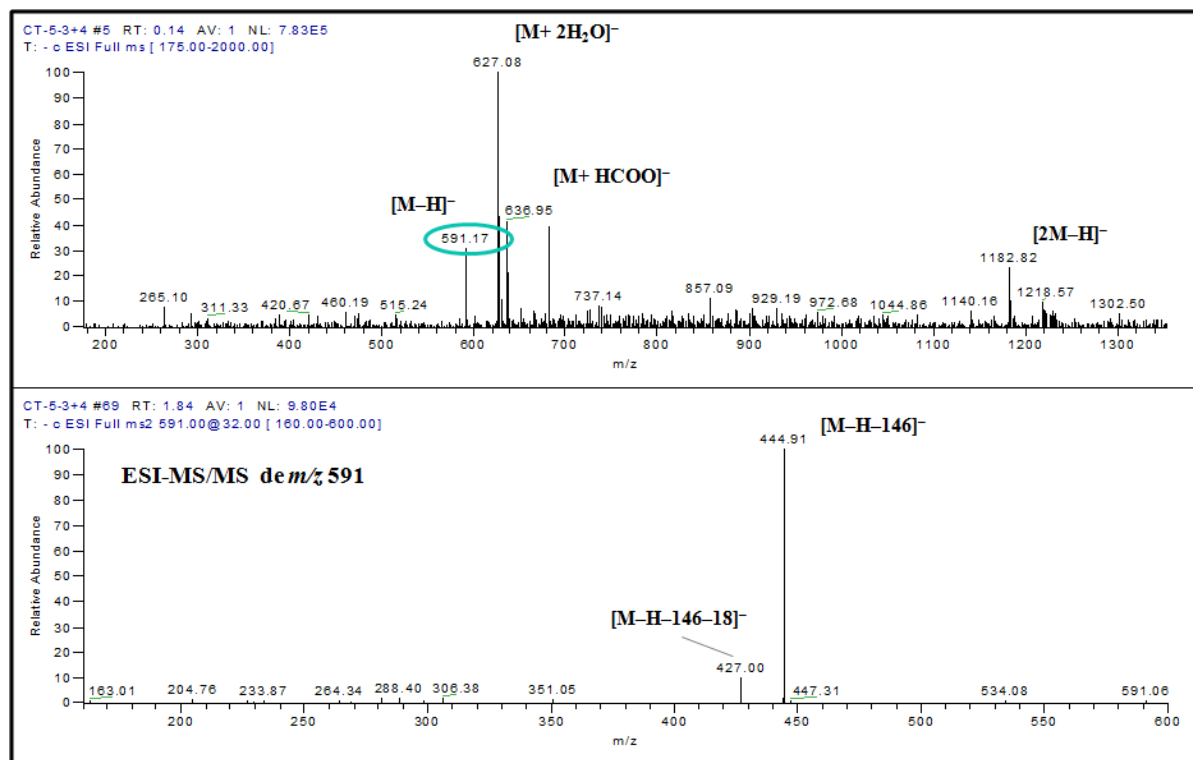


Figure III-50. Spectre de masse ESI-MS/MS du composé CT₂.

Les spectres de RMN 1D & 2D du composé CT₂ (figure III-51- III-58) montrent une grande ressemblance avec le composé CT₁ identifié précédemment, la différence notable est la disparition du signal correspondant au groupement acétyle (-CO-CH₃) en C-2'_{Glc} du glucose pour le composé CT₂.

Les valeurs sont répertoriées dans le tableau III-4.

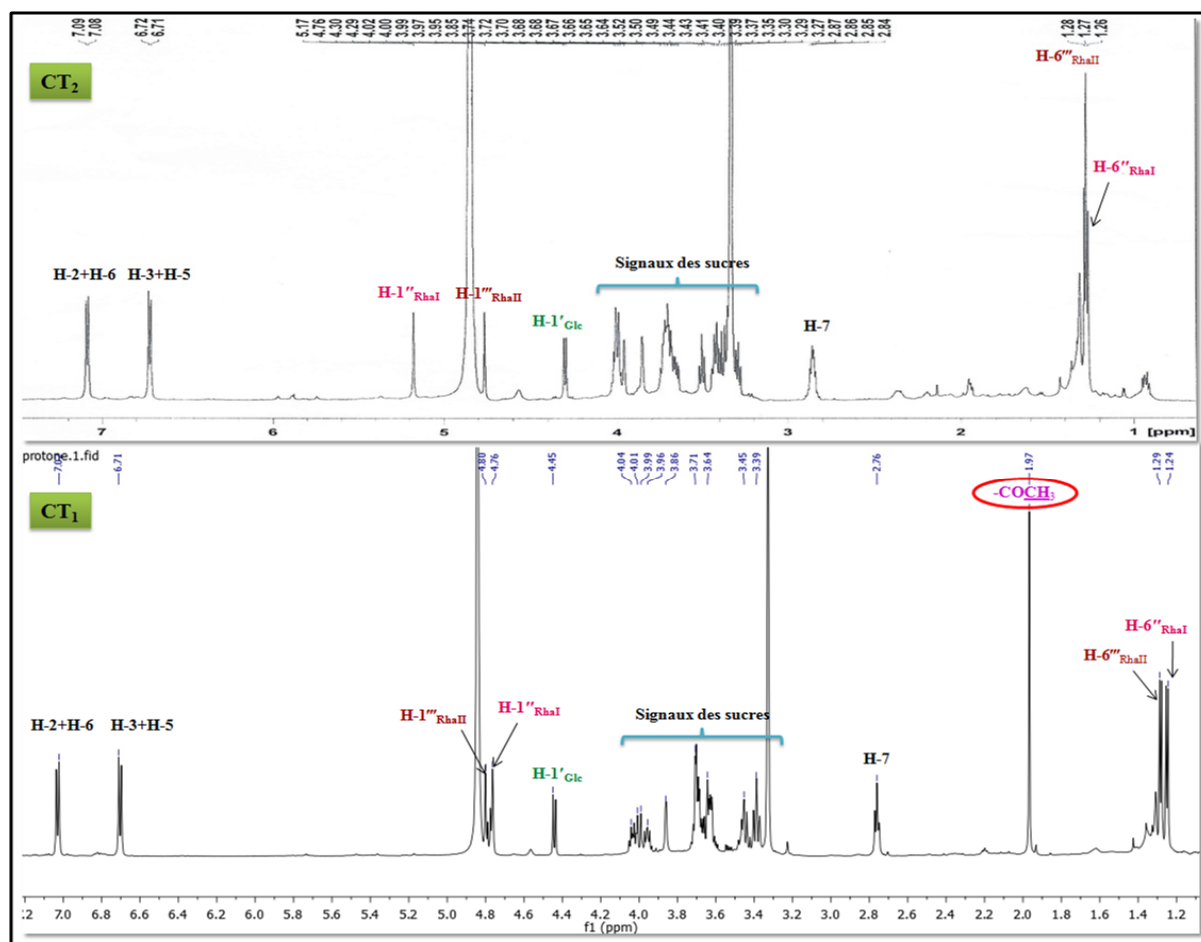


Figure III-51. Spectre de RMN ^1H du composé CT_2 comparé à celui du composé CT_1 .

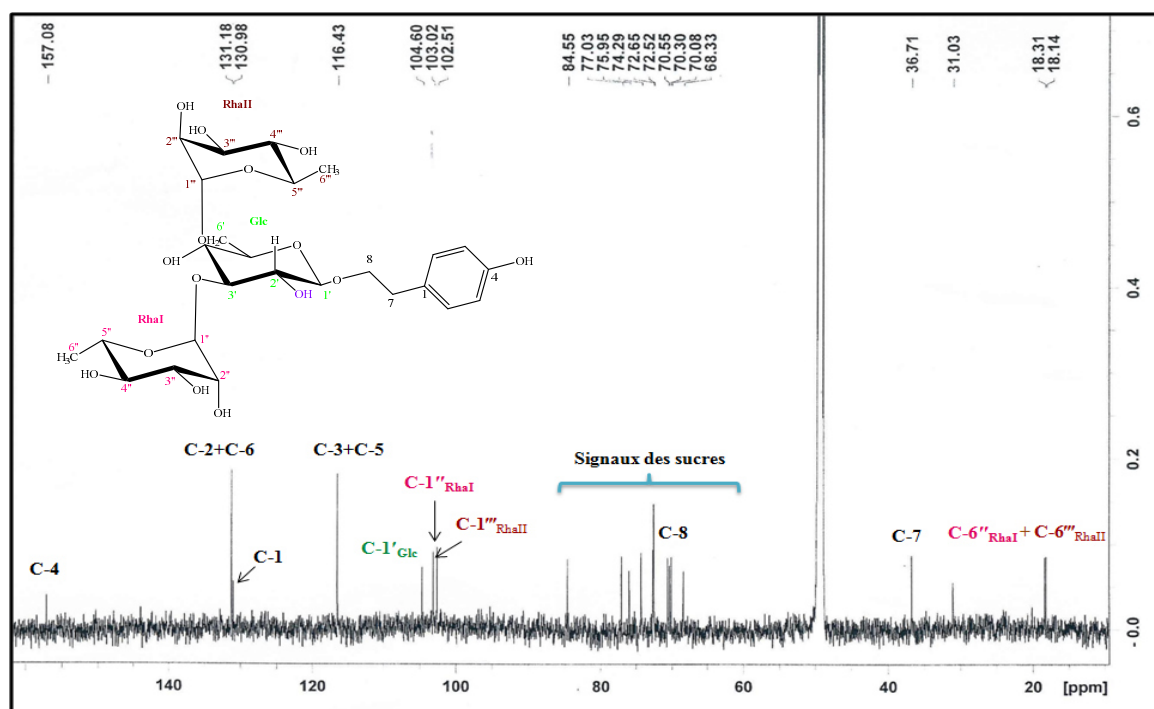
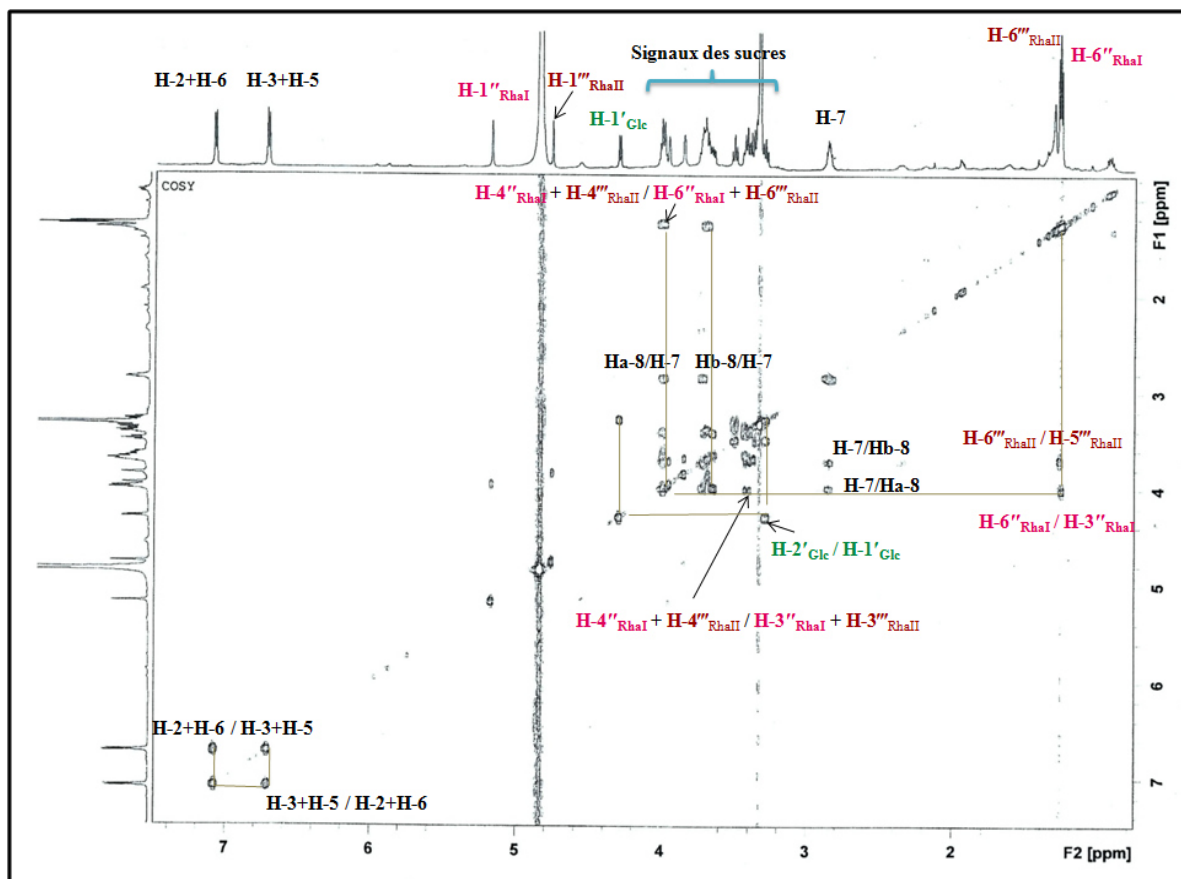
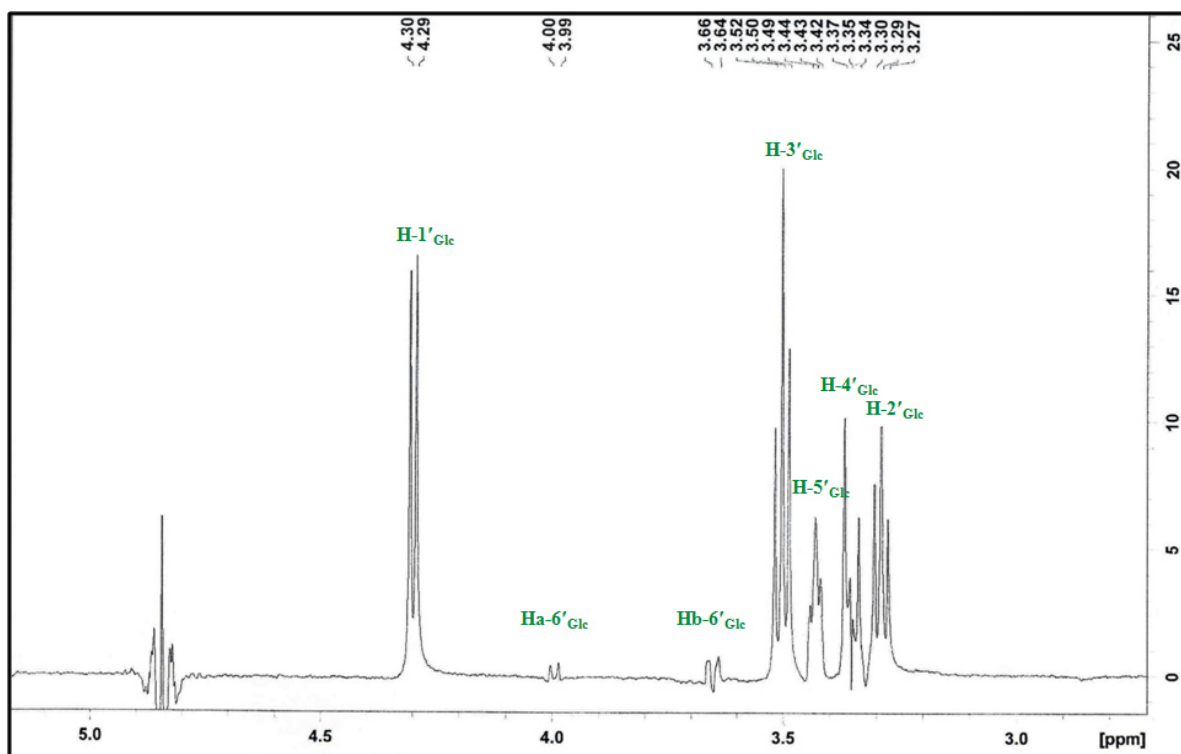


Figure III-52. Spectre de RMN ^{13}C du composé CT_2 .

Figure III-53. Spectre COSY du composé CT₂.Figure III-54. Spectre 1D TOCSY du glucose du composé CT₂.

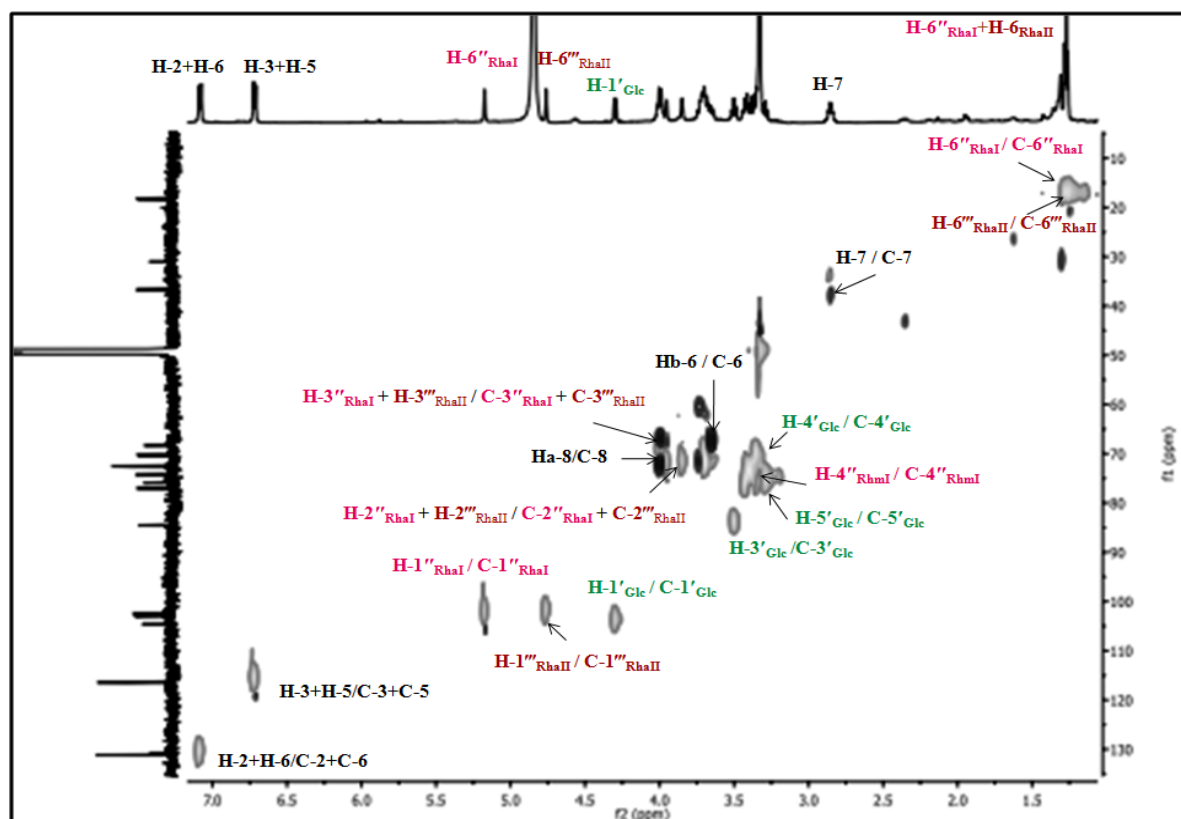
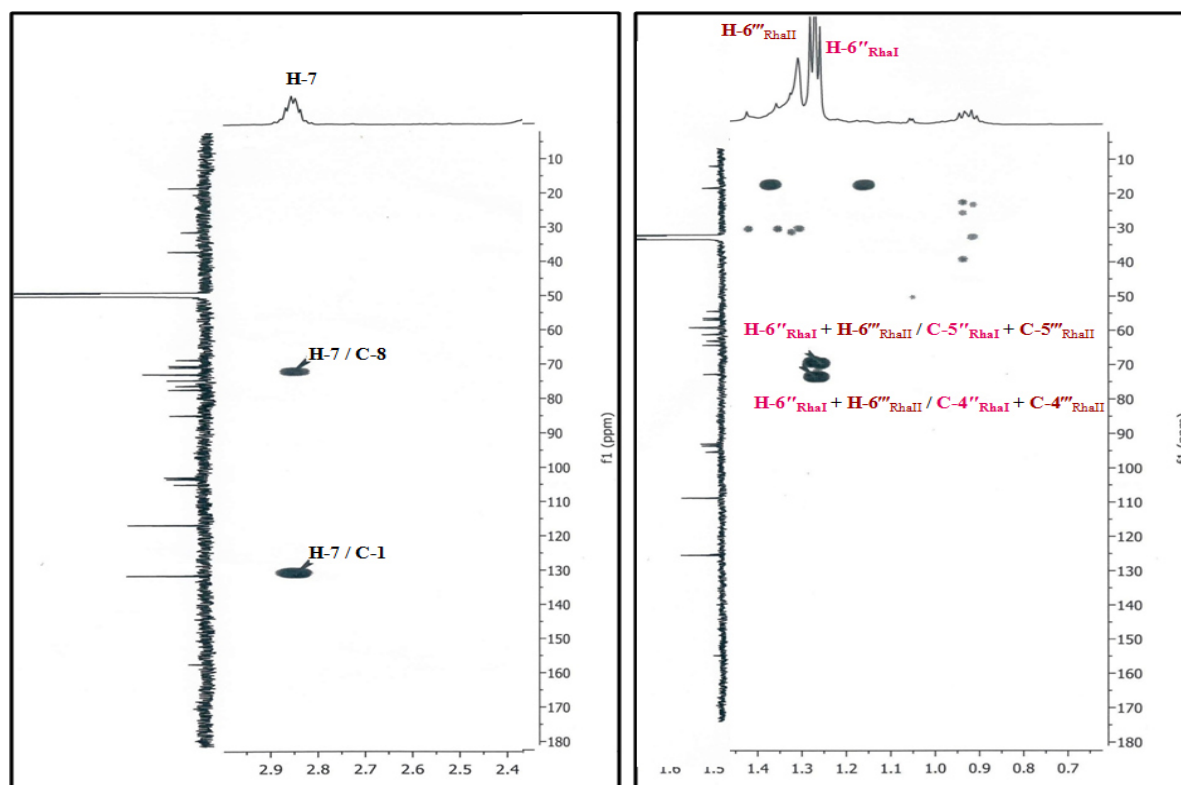
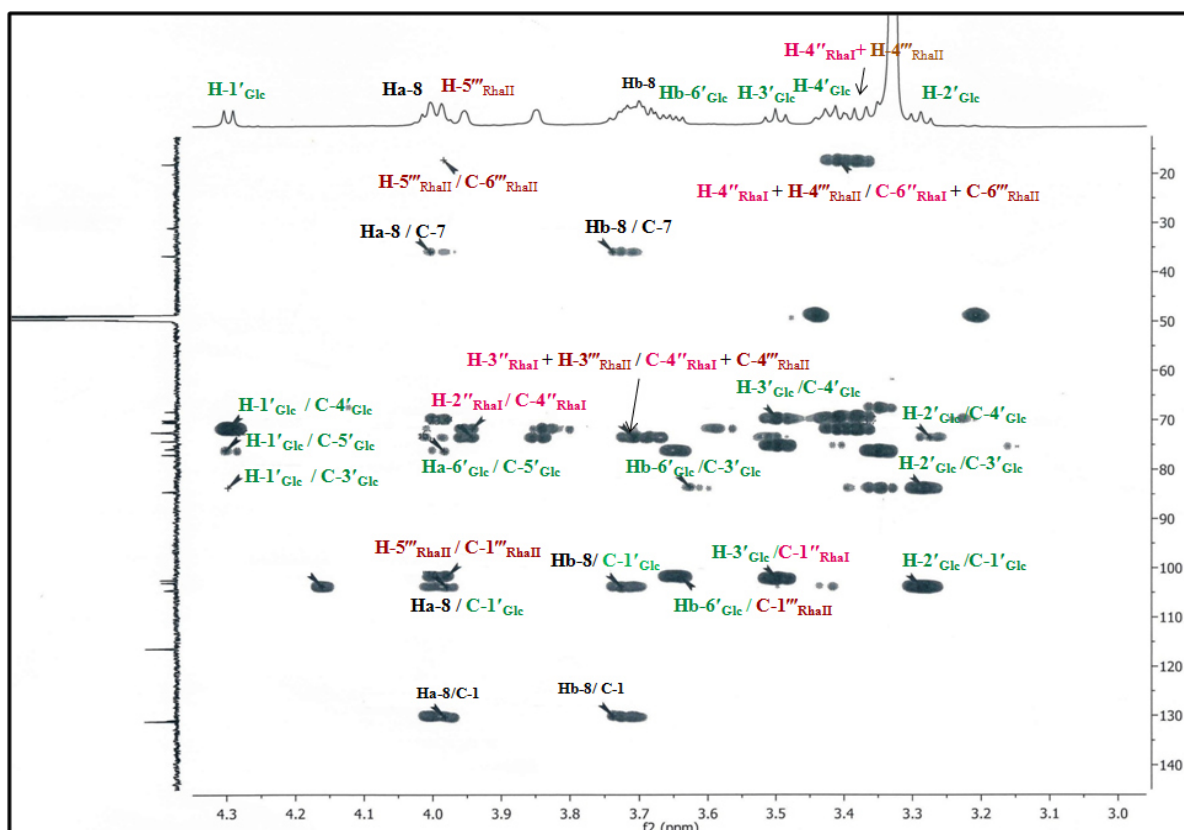
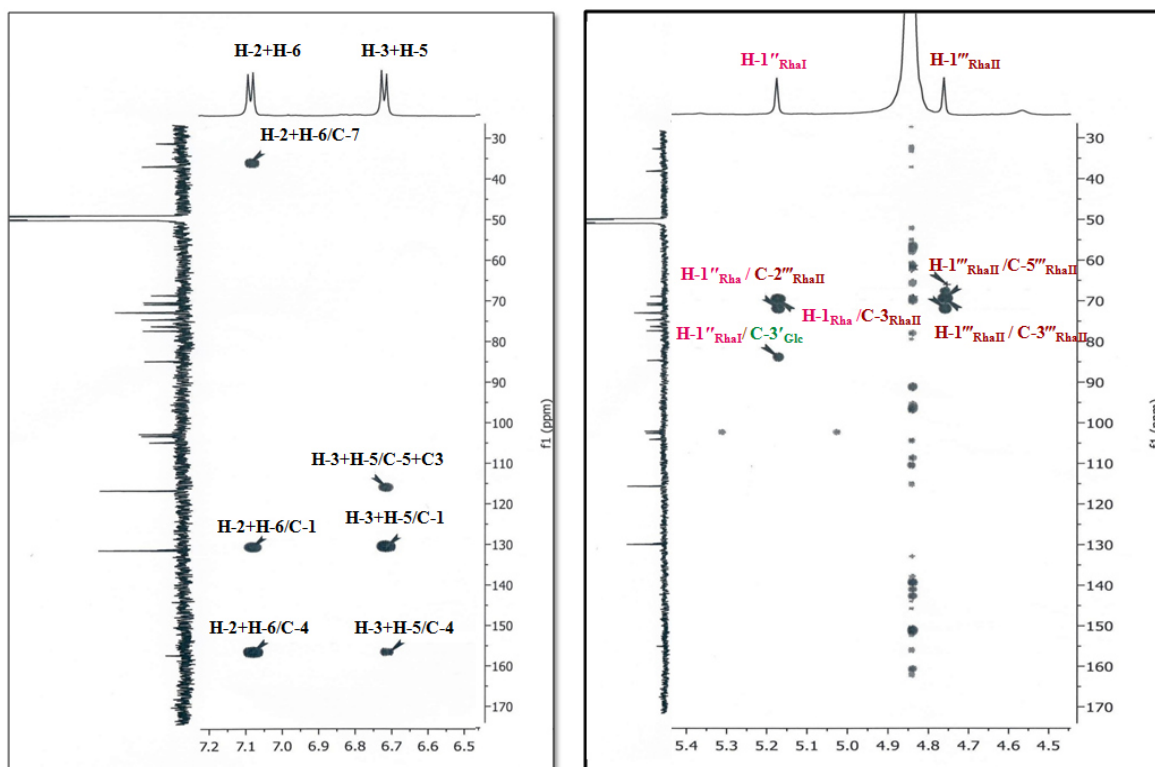
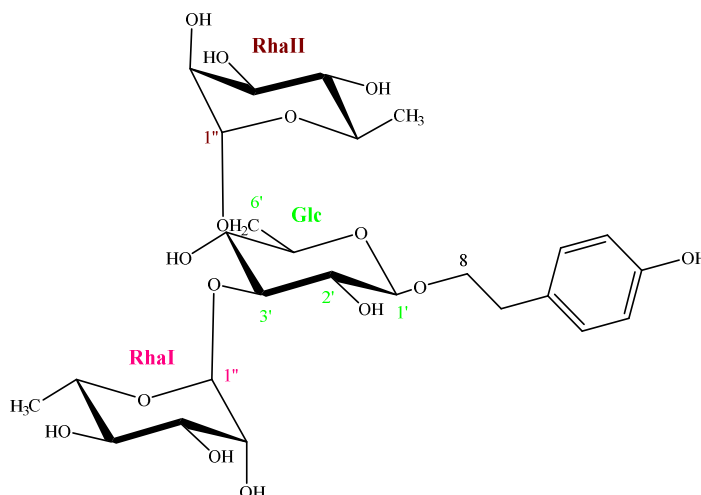


Figure III-55. Spectre HSQC du composé CT2.

Figure III-56. Spectre HMBC étalé de δ_H 0.7 à 1.4 et 2.4 à 2.9 ppm du composé CT2.

Figure III-57. Spectre HMBC étalé de δ_H 3.0 à 4.3 ppm du composé CT2.Figure III-58. Spectre HMBC étalé de δ_H 4.5 à 5.4 et 6.5 à 7.2 ppm du composé CT2.

La structure finale du CT₂ est déterminée comme étant le **1-β-*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di-α-*L*-rhamnopyranosyl-β-*D*-glucopyranoside**, la mesure de pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} = -7.0$, c 0.1, MeOH), identifié pour la première fois.



CT₂: 1-β-*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di-α-*L*-rhamnopyranosyl-β-*D*-glucopyranoside.

III.2.1.3. Détermination de structure du composé CT_{3a/3b}

Spectrométrie de masse :

L'ion pseudo-moléculaire à m/z 803.2715 $[M+Na]^+$ observé sur le spectre de masse obtenus en HR-ESI-MS mode positif (figure III-59) pour le composé CT_{3a/3b}, indique une masse moléculaire égale à 780 *uma* correspondant à la formule brute C₃₇H₄₈O₁₈, soit un gain de 142 *uma*, ce qui suggère la présence d'une substitution supplémentaire par rapport au composé CT₁. Les fragmentations MS² et MS³ de l'ion $[M+Na]^+$ engendrent des ions fragments à m/z 743.12 $[M+Na-60]^+$, 657.11 $[M+Na-146]^+$ et 511.03 $[M+Na-146-146]^+$ correspondant à la perte d'un groupement acétyle et deux unités déoxyhexose respectivement.

Son spectre UV (MeOH) présente les bandes d'absorption λ_{\max} nm (log ϵ) 225 (4.26), 316 (3.87).

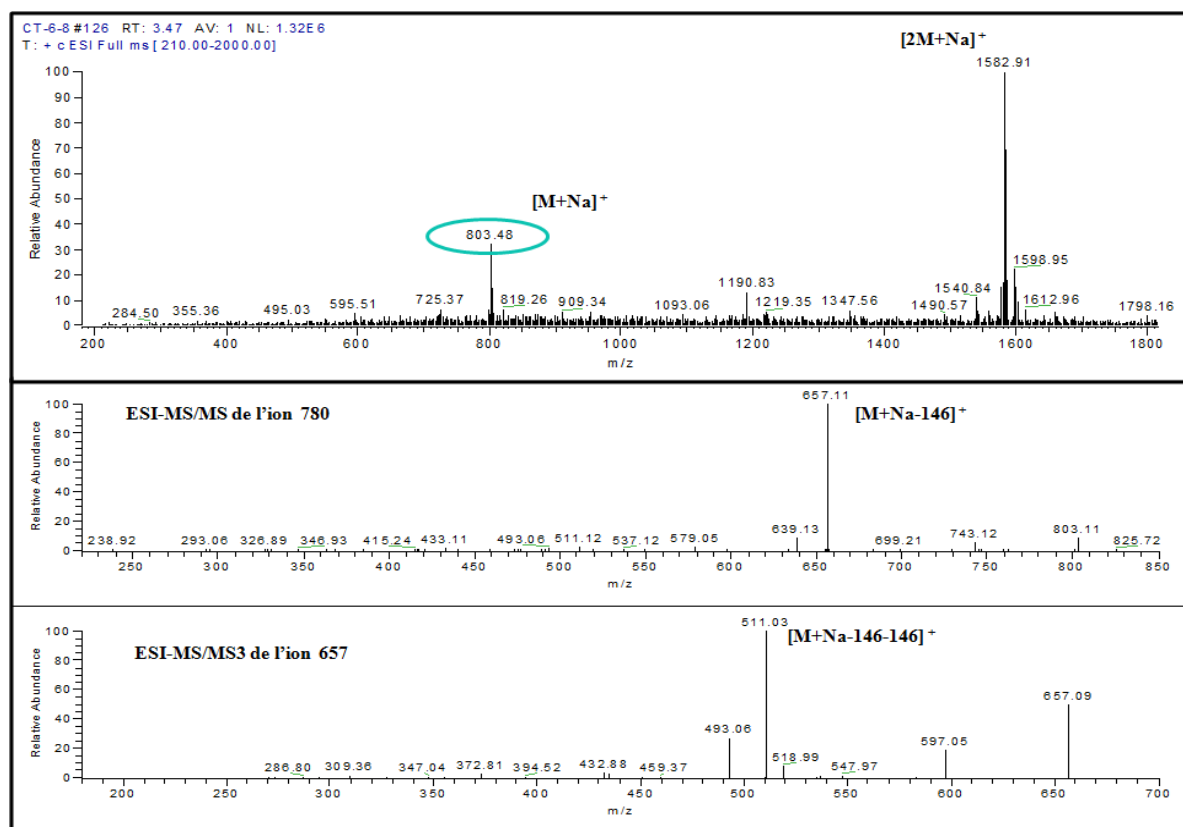


Figure III-59. Spectre de masse ESI-MS et les fragmentations ESI-MS/MS et MS³ du composé CT_{3a/3b}.

Spectrométrie de RMN :

Une analyse approfondie du spectre RMN ¹H et une lecture attentive des valeurs d'intégration d'un certain nombre de protons indiquent clairement un dédoublement des signaux, ce qui prouve que le composé CT₃ est un mélange (7 : 3) inséparable de deux phénylétanoïdes (CT_{3a/3b}).

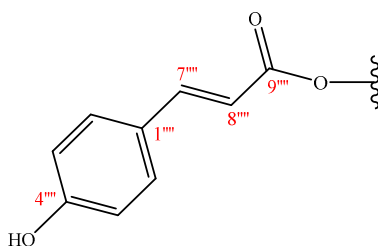
Les spectres RMN 1D et 2D (figure III-60- III-65) du composé majoritaire CT_{3a} présentent une forte similitude avec les spectres du composé 1-β-p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucopyranoside (CT₁). La différence notable consiste en l'apparition des nouveaux signaux. En effet, on observe :

- Les protons aromatiques comme suit :
 - Un signal sous forme de doublet ($J = 8.0$ Hz) caractéristique d'un couplage ortho d'intégration 2H à δ_H 7.44 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 131.3 ppm. Correspondant aux protons H_{trans-2'''}/H_{trans-6'''}.

- Un signal sous forme de doublet de même constante de couplage ($J = 8.0$ Hz) d'intégration 2H à $\delta_{\text{H}} 6.84$ ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à $\delta_{\text{C}} 116.2$ ppm. Correspondant aux protons $\text{H}_{\text{trans-3}''''}/\text{H}_{\text{trans-5}''''}$.
- Les protons oléfiniques dont :
 - Un signal sous forme de doublet ($J = 16.0$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} 7,70$ ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à $\delta_{\text{C}} 148.1$ ppm. Correspondant au proton $\text{H}_{\beta\text{trans-7}''''}$.
 - Un signal sous forme de doublet de même constante de couplage ($J = 16.0$ Hz) d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} 6.37$ ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à $\delta_{\text{C}} 114.9$ ppm. Correspondant au proton $\text{H}_{\alpha\text{trans-8}''''}$.

La valeur de la constante de couplage ($J = 16.0$ Hz) indique une configuration *trans*.

Ces observations permettent déduire la présence d'un groupement *trans-p*-coumaroyl.



***trans-p*-coumaroyl.**

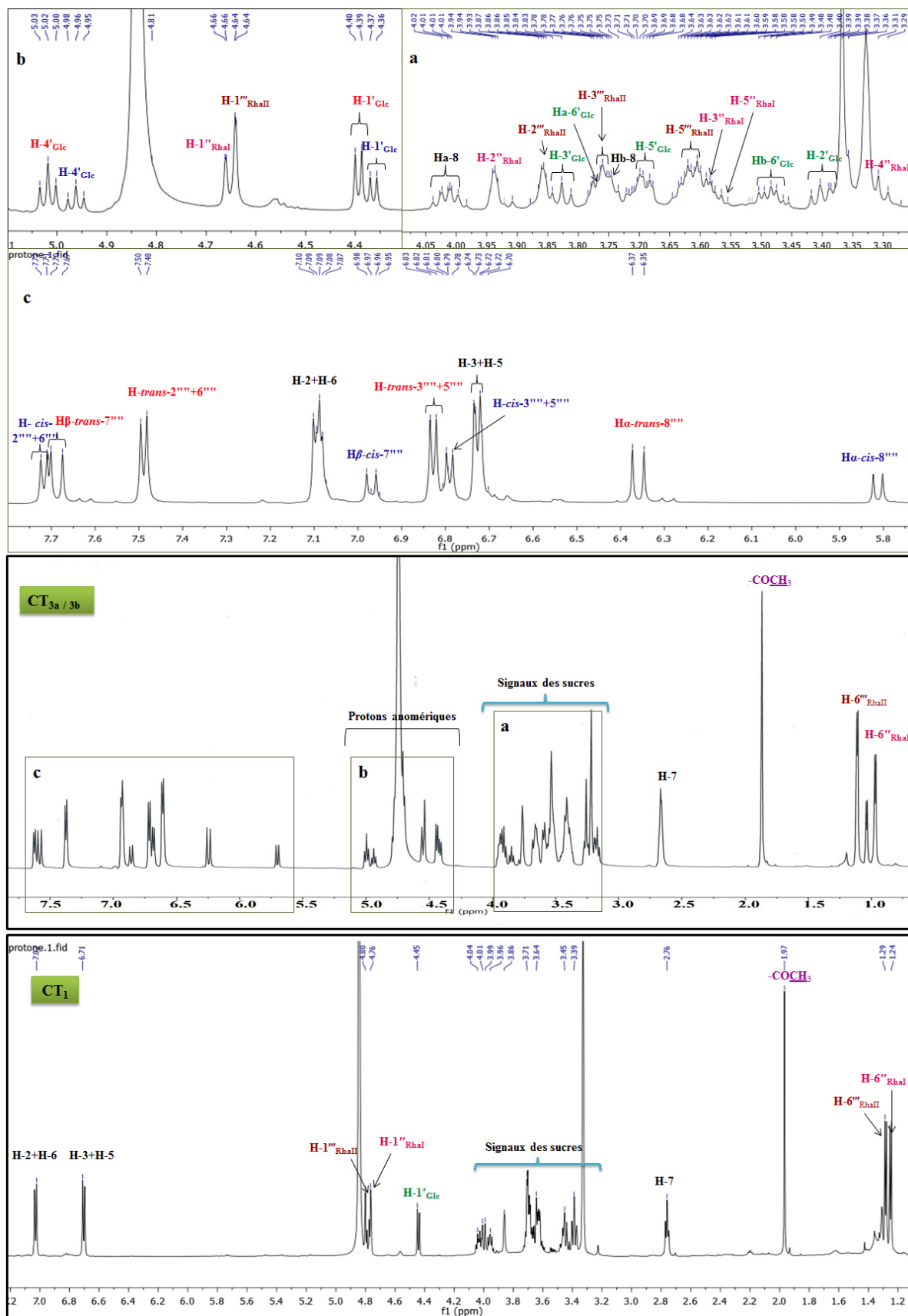


Figure III-60. Spectre de RMN ¹H avec l'agrandissement des parties osidique (a), les protons anomériques (b) et *p*-coumaroyl (c) du composé CT_{3a/3b} comparé à celui du composé CT₁.

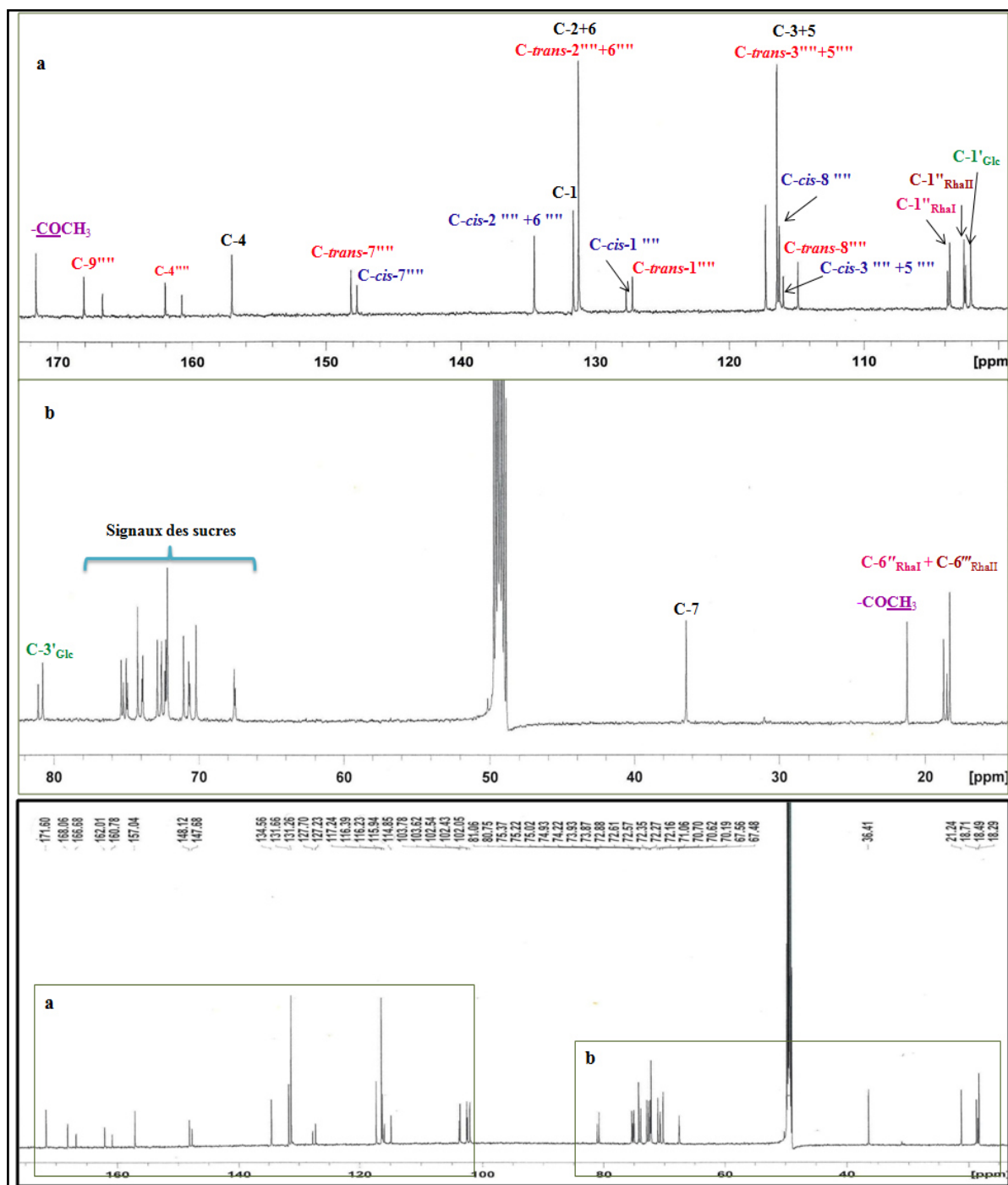


Figure III-61. Spectre de RMN ^{13}C avec l'agrandissement de la partie (a, b) du composé CT_{3a/3b}.

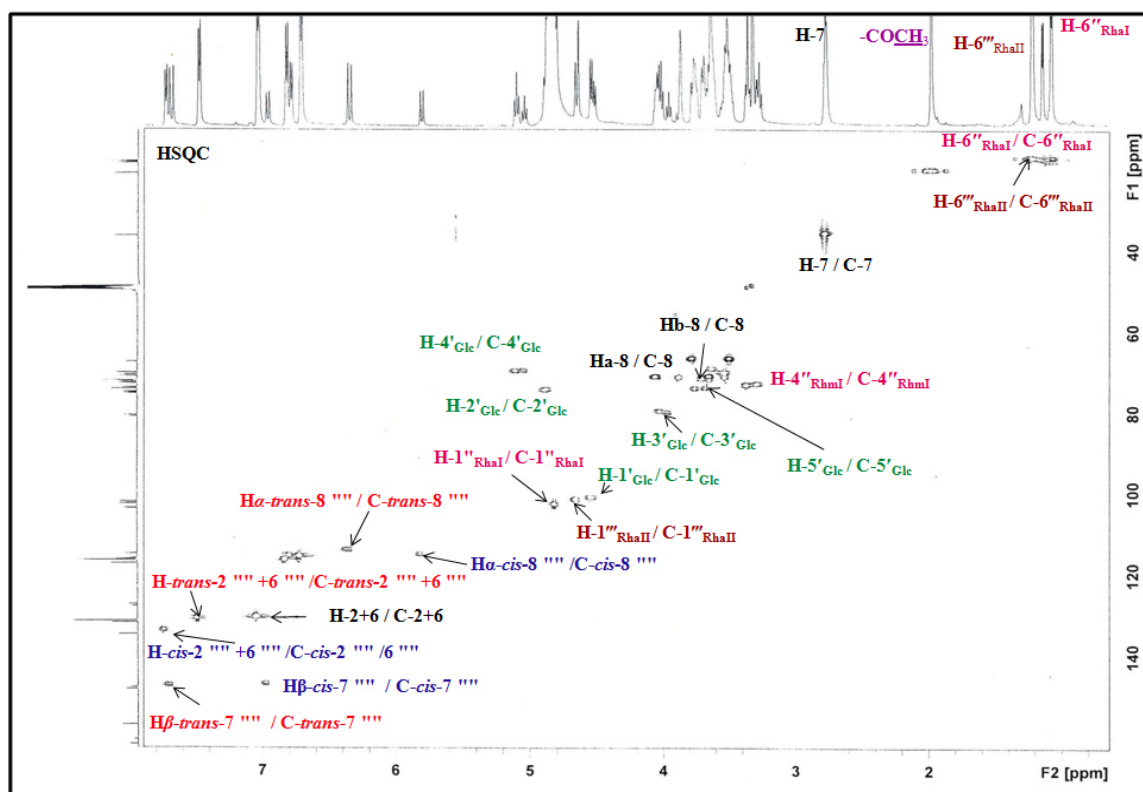


Figure III-62. Spectre HSQC du composé CT_{3a/3b}.

Le spectre COSY (figure III-63) confirme la présence du groupement *p*-coumaroyl et le phényléthanoïde.

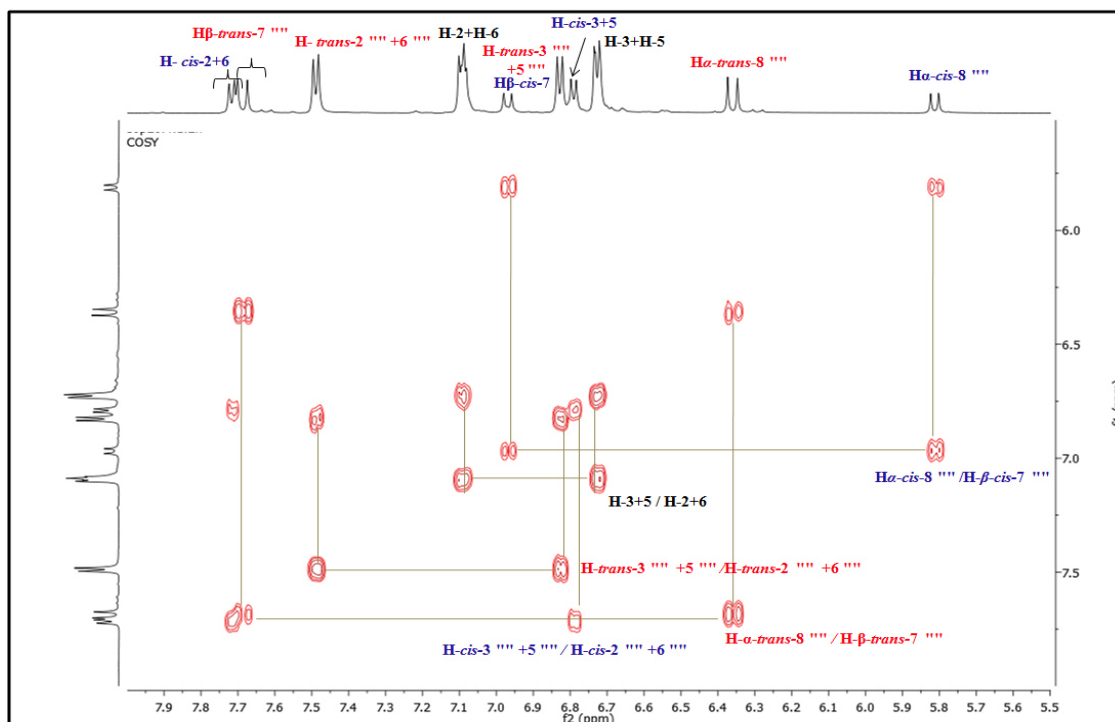


Figure III-63. Spectre COSY H-H étale de δ_H 5.7 à 7.8 ppm du composé CT_{3a/3b}.

L'étude du spectre HMBC (figure III-65) permet de repérer les corrélations suivantes :

- Les protons aromatiques $H_{trans-2''''}/H_{trans-6''''}$ avec le carbone résonant à $\delta_C 127.3$ ppm attribuable au carbone quaternaire aromatique C-1''''.
- Les protons aromatiques $H_{trans-3''''}/H_{trans-5''''}$ avec un carbone quaternaire oxygéné résonnant à $\delta_C 162.0$ ppm correspondant au carbone C-4'''' , et le carbone quaternaire C-1''''.
- Le proton $H_{\alpha trans-8''''}$ montre une tache de corrélation avec un carbone quaternaire à $\delta_C 168.0$ ppm qui ne peut être qu'un carbone d'un carbonyle d'ester.
- Le deuxième proton $H_{\beta trans-7''''}$ de la double liaison avec le carbone C-1''''.
- Le proton $H-4'_{Glc}$ du glucose avec le carbone du carbonyle C-9'''' ($\delta_C 168.0$ ppm). Ceci permet de déduire que le glucose est lié à *p*-coumaroyl par une liaison ($-C_{9''''}-O-$) et le C-4'_{Glc}.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-4.

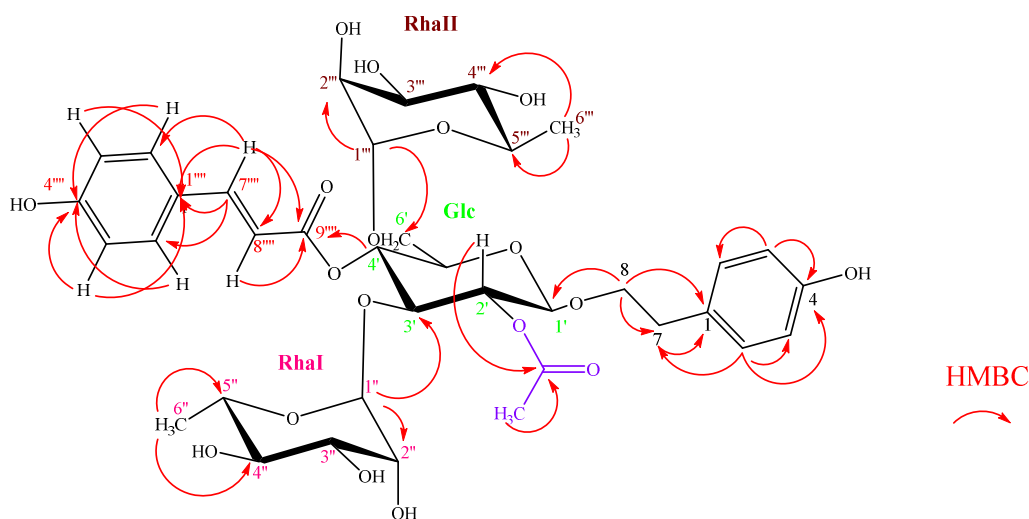


Figure III-64. Corrélations HMBC du composé CT_{3a}.

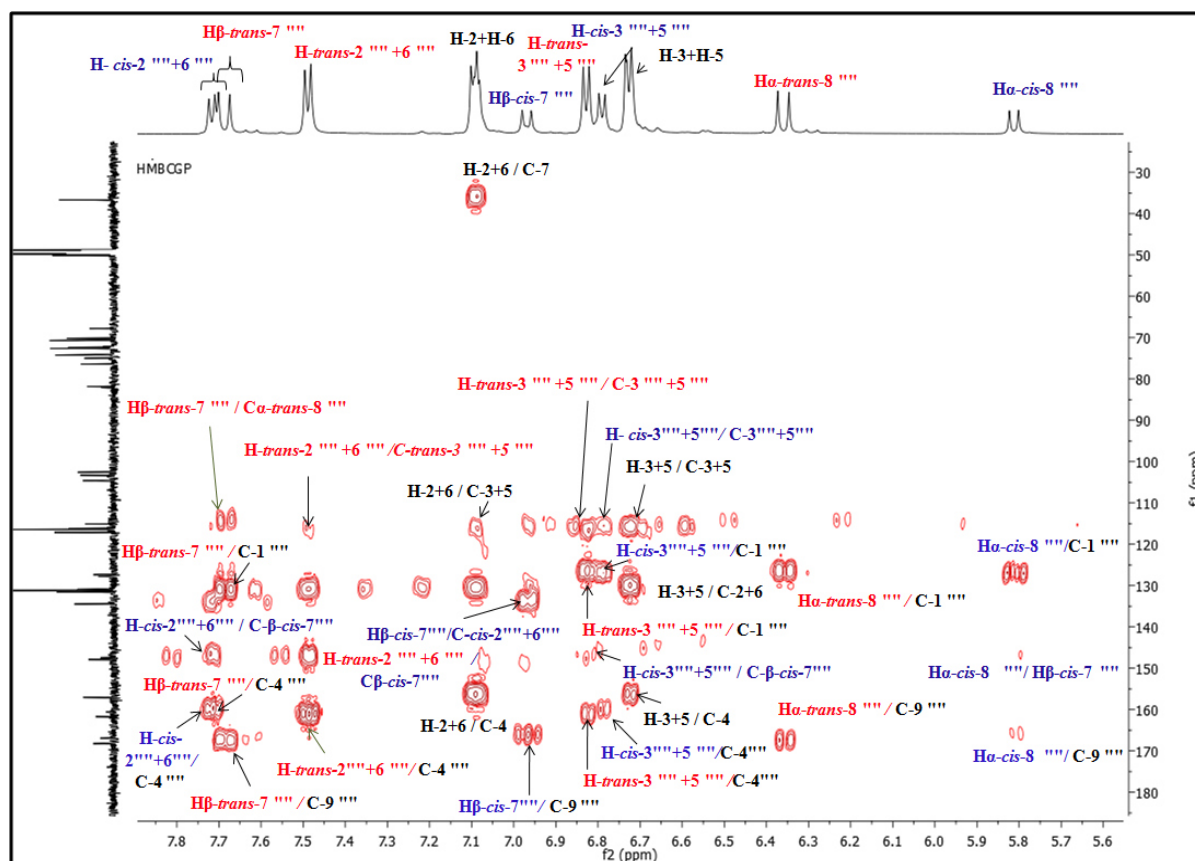
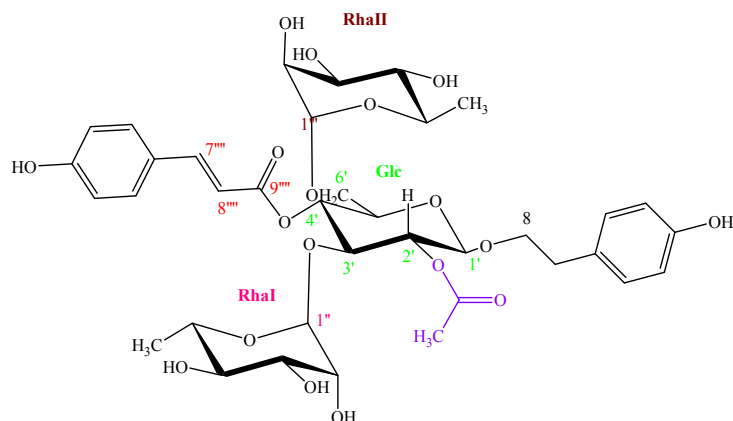


Figure III-65. Spectre HMBC étalé de δ_H 5.6 à 7.8 ppm du composé CT_{3a/3b}.

La structure finale du composé CT_{3a} est identifiée comme étant le **1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-O-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*trans*-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside**, identifié pour la première fois. La mesure de pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} = -96$, c 0.1, MeOH).

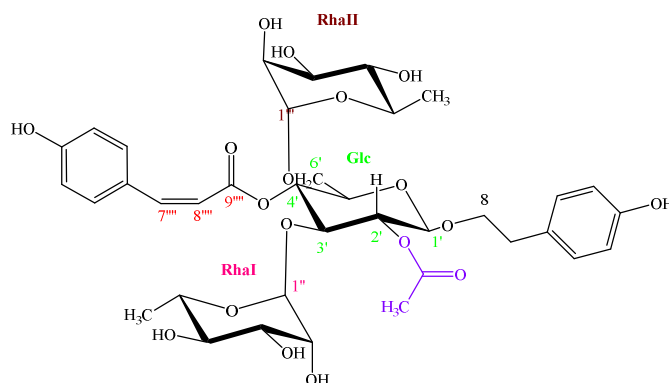


CT_{3a}: 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-O-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*trans*-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside.

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D (figure III-60 - III-65) montrent les signaux du deuxième composé minoritaire **CT_{3b}** appartiennent au groupement *p*-coumaroyl, reconnaissable par :

- Deux signaux sous forme de doublet ($J = 8.0$ Hz) à δ_H 6.80 et 7.75 ppm, chacun caractéristique des protons ($H_{cis-3''''}/H_{cis-5''''}$) et ($H_{cis-2''''}/H_{cis-6''''}$) du cycle aromatique.
- Deux signaux sous forme de doublet ($J = 12.0$ Hz) à δ_H 5.83 et 6.97 ppm caractéristiques des protons $H_{\beta cis-7}$ et $H_{\alpha cis-8}$ indiquant la présence d'une double liaison. La valeur de la constante de couplage indique qu'il s'agit de diastéréoisomère *Cis* du premier composé **CT_{3a}**.

Ces constatations permettent de déduire qu'on est en présence d'un mélange de deux diastéréoisomère *Trans* et *Cis* (7 : 3) en faveur du premier composé **1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*cis*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (CT_{3b})**, identifié pour la première fois.



CT_{3b} : 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*cis*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside.

III.2.1.4. Détermination de structure du composé CT_{4a/4b}

Spectrométrie de masse :

L'analyse du spectre de masse HR-ESI-MS (figure III-66) du composé **CT_{4a/4b}** en mode positif montre un ion pseudo moléculaire à m/z 761.2604 $[M+Na]^+$ soit une masse moléculaire égale à 737 *uma* correspondant à la formule brute $C_{35}H_{46}O_{17}$, soit 43 *uma* de moins par rapport au composé **CT_{3a/3b}** correspondant à la perte d'un groupement acétyle.

Son spectre UV (MeOH) présente les bandes d'absorption λ_{\max} nm (log ϵ) 224 (4.30), 315 (3.85).

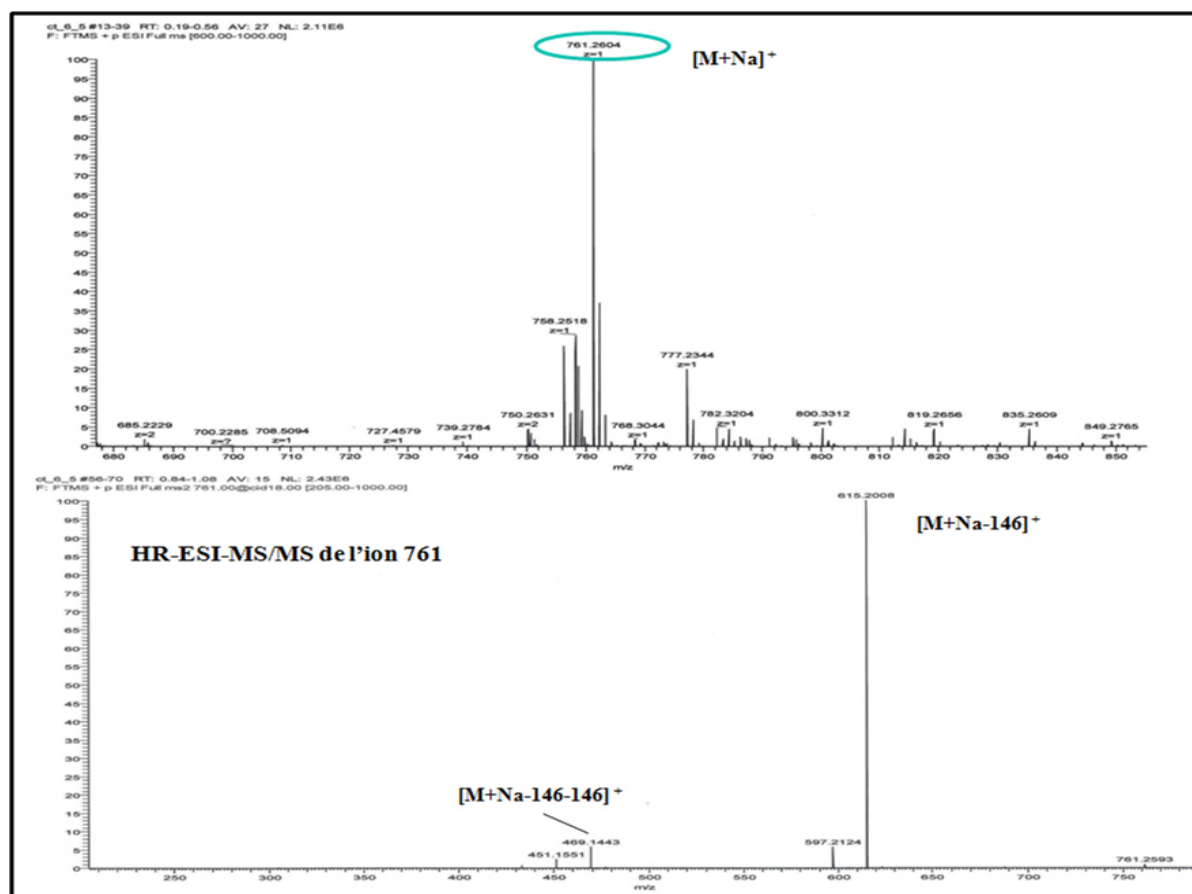


Figure III-66. Spectre de masse HR-ESI-MS et les fragmentations HR-ESI-MS/MS du composé **CT_{4a/4b}**.

Spectrométrie de RMN :

Les spectres de RMN 1D & 2D (figure III-67- III-72) du composé **CT_{4a/4b}** montre une forte similitude avec les spectres du composé **CT_{3a/3b}** indiquant ainsi la présence d'un mélange de deux diastéréoisomère *Trans* et *Cis* (7 : 3) de nature phénylétanoïde. La seule différence est notée au niveau du carbone C-2'_{Glc} par l'absence du signal correspondant au groupement acetyl.

Les déplacements chimiques sont répertoriés dans le tableau III-4.

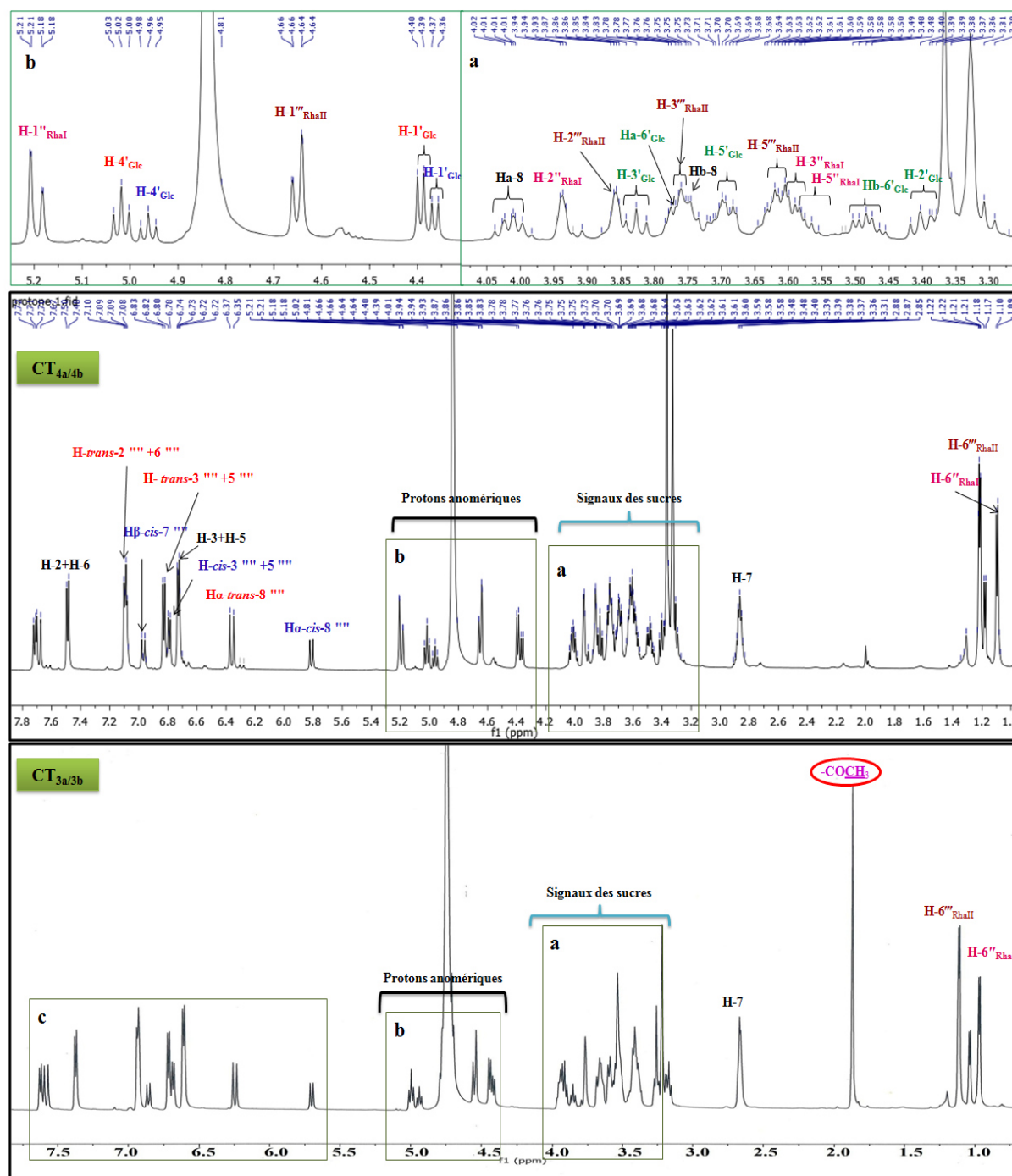
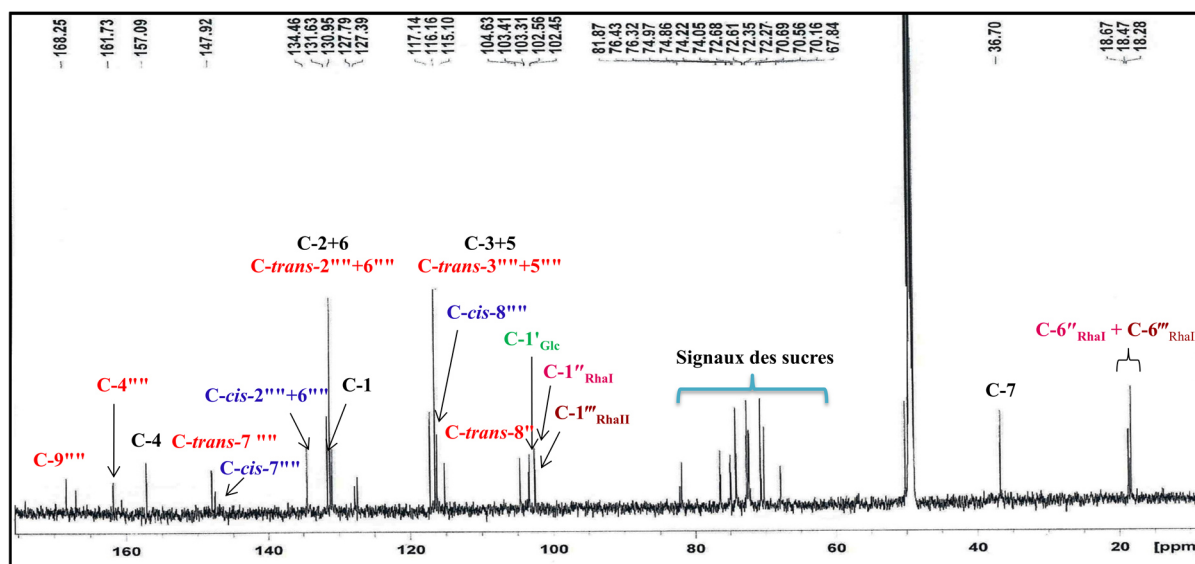
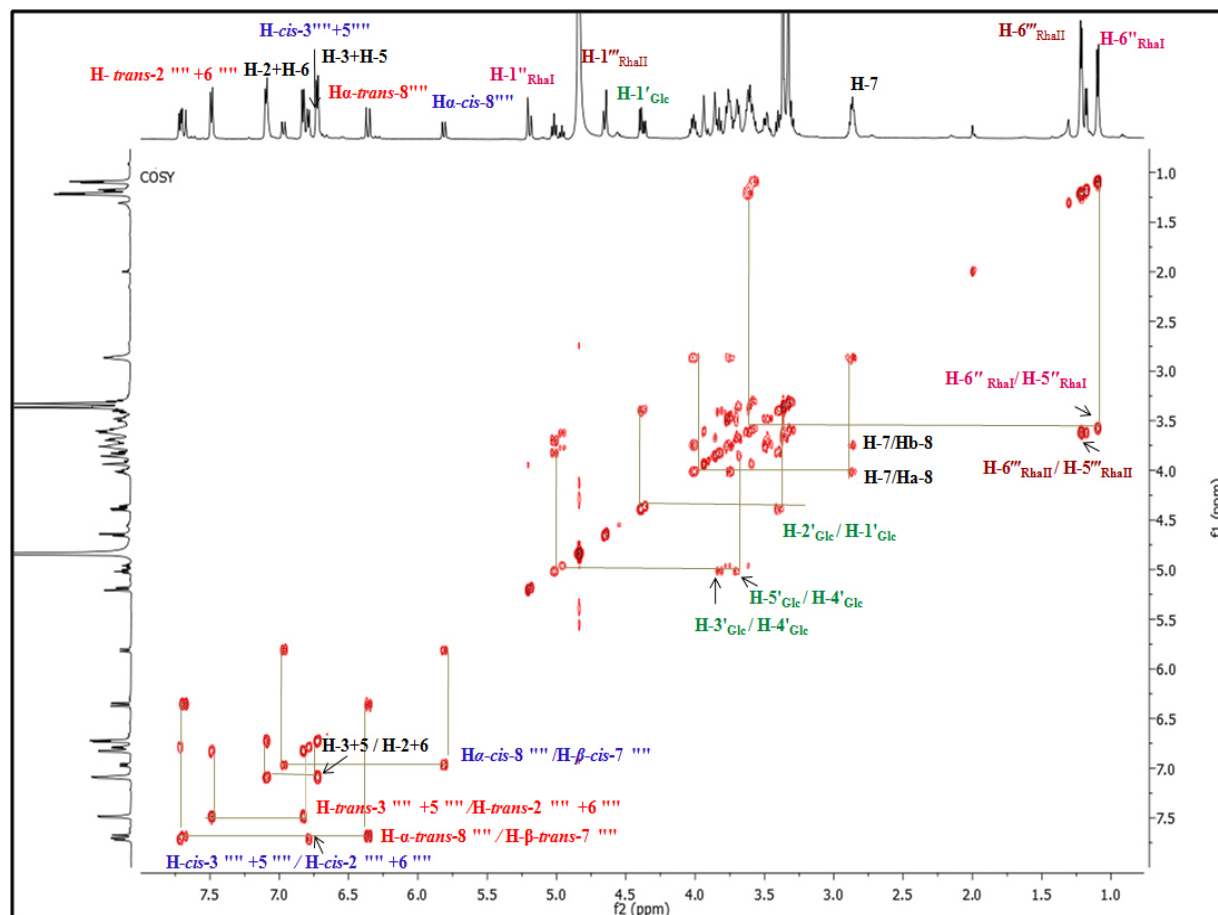
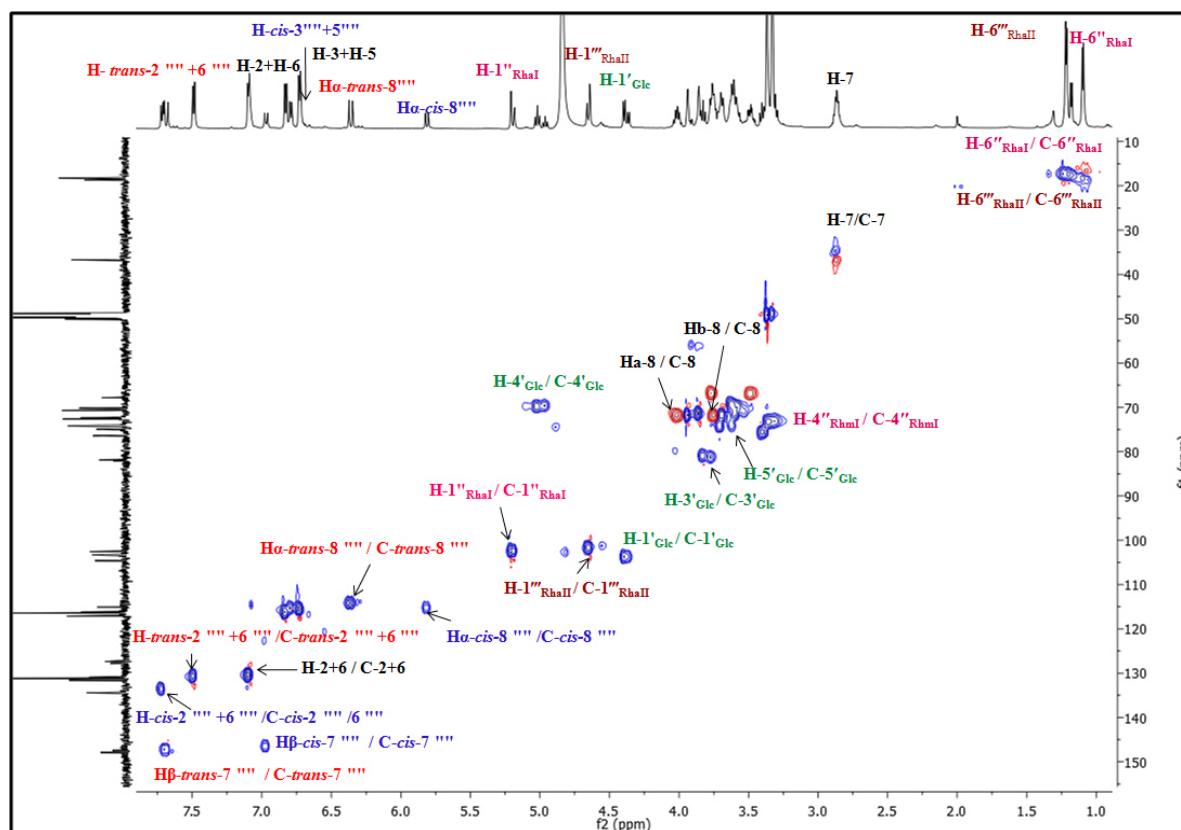
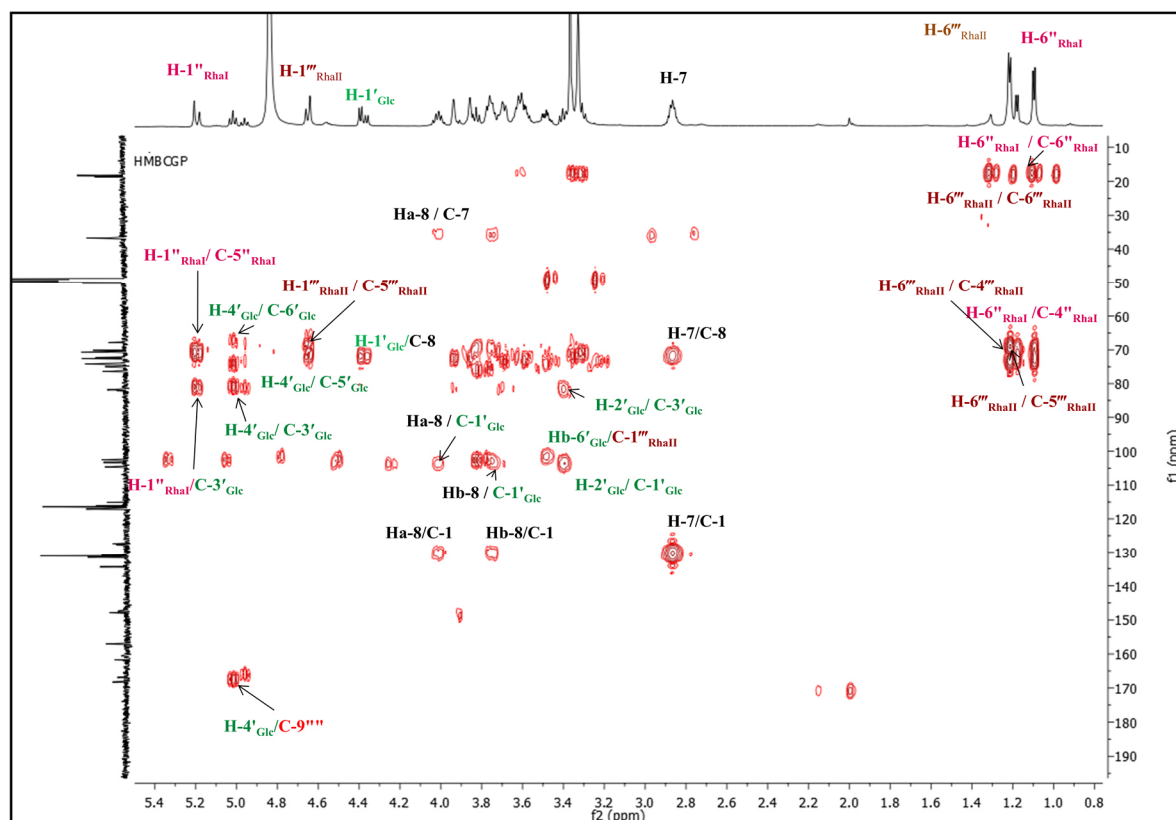


Figure III-67. Spectre de RMN ^1H avec l'agrandissement des parties osidique (a, b) du composé $\text{CT}_{4a/4b}$ comparé à celui du composé $\text{CT}_{3a/3b}$.

Figure III-68. Spectre de RMN ^{13}C du composé CT_{4a/4b}.Figure III-69. Spectre de COSY du composé CT_{4a/4b}.

Figure III-70. Spectre de HSQC du composé CT_{4a/4b}.Figure III-71. Spectre de HMBC étale de δ_H 0.8 à 5.4 ppm du composé CT_{4a/4b}.

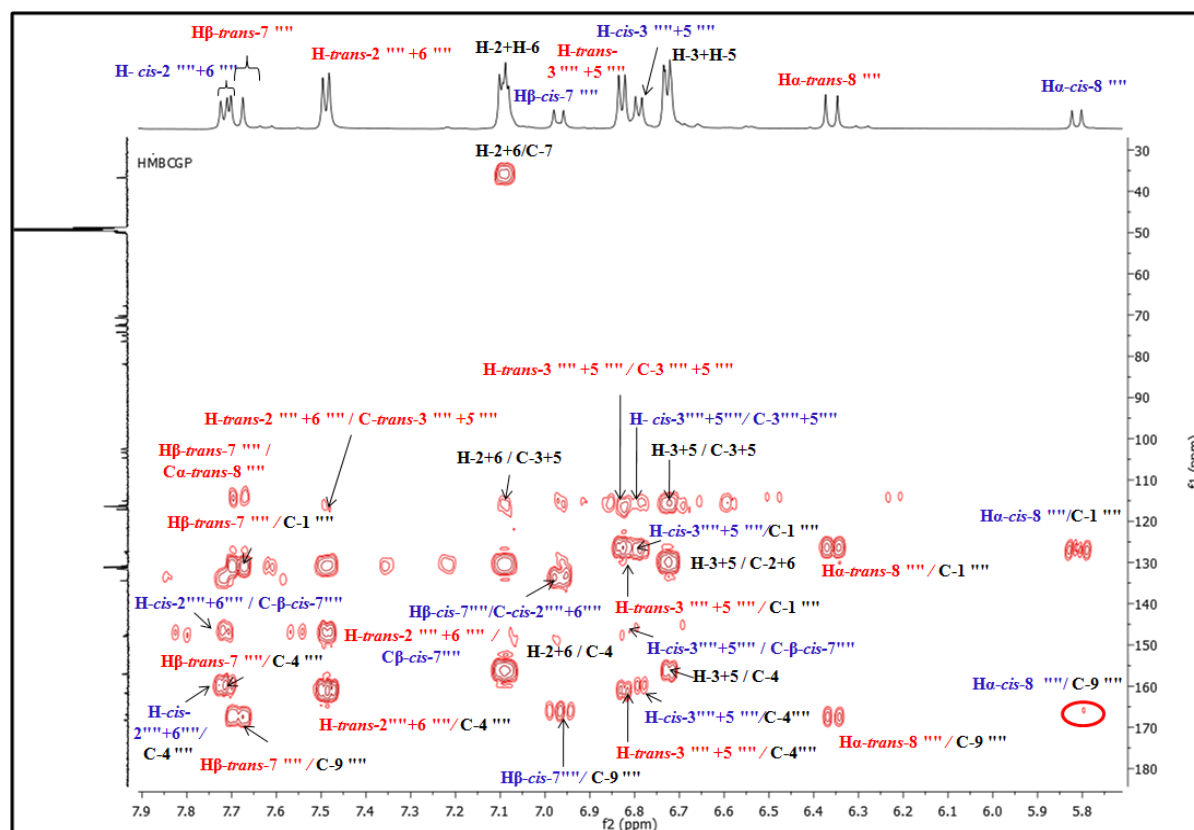
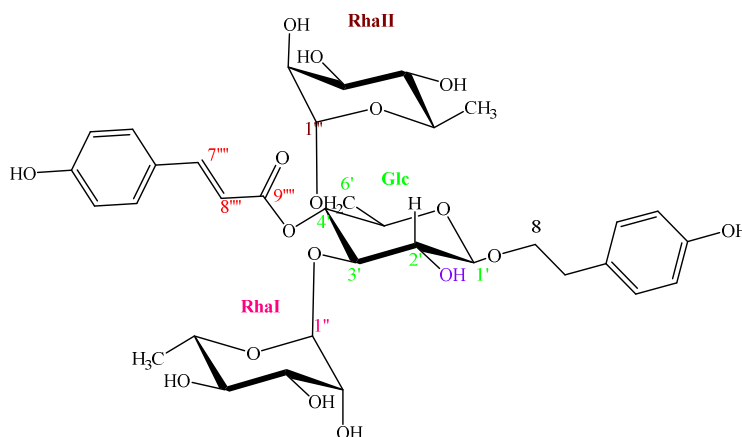
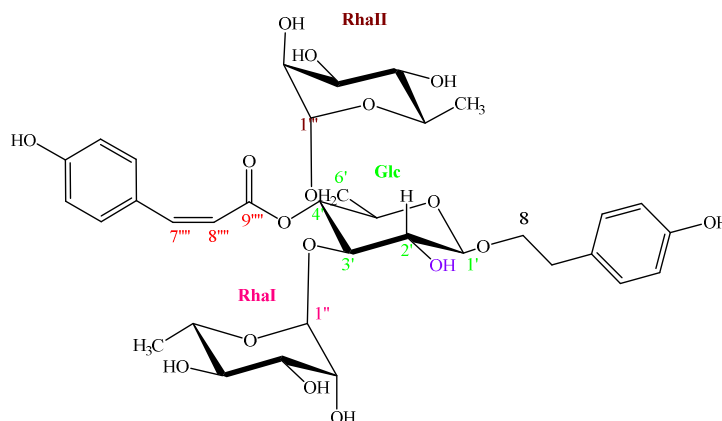


Figure III-72. Spectre de HMBC étale de δ_H 5.7 à 7.9 ppm du composé CT_{4a/4b}.

La structure finale des deux phényléthanoïdes diastéréoisomère CT_{4a/4b} est déterminée comme étant le 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*trans-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (CT_{4a}) et 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*cis-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (CT_{4b}), identifié pour la première fois. La mesure de pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} = -85.5$, c 0.1, MeOH).



CT_{4a} : 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*trans-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside.



CT_{4b} : 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-O-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*cis-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside.

III.2.1.5. Détermination de structure du composé CT₅

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse ESI-MS en mode négatif du composé **CT₅** montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 811.18 $[M-H]^-$ correspondant à la formule brute $C_{37}H_{48}O_{20}$. La présence des fragments ions à m/z 649 $[M-H-162]^-$ et 607 $[M-H-146]^-$ dans le spectre MS^2 indique la perte d'un acide caféique et un hexose respectivement (figure III-73).

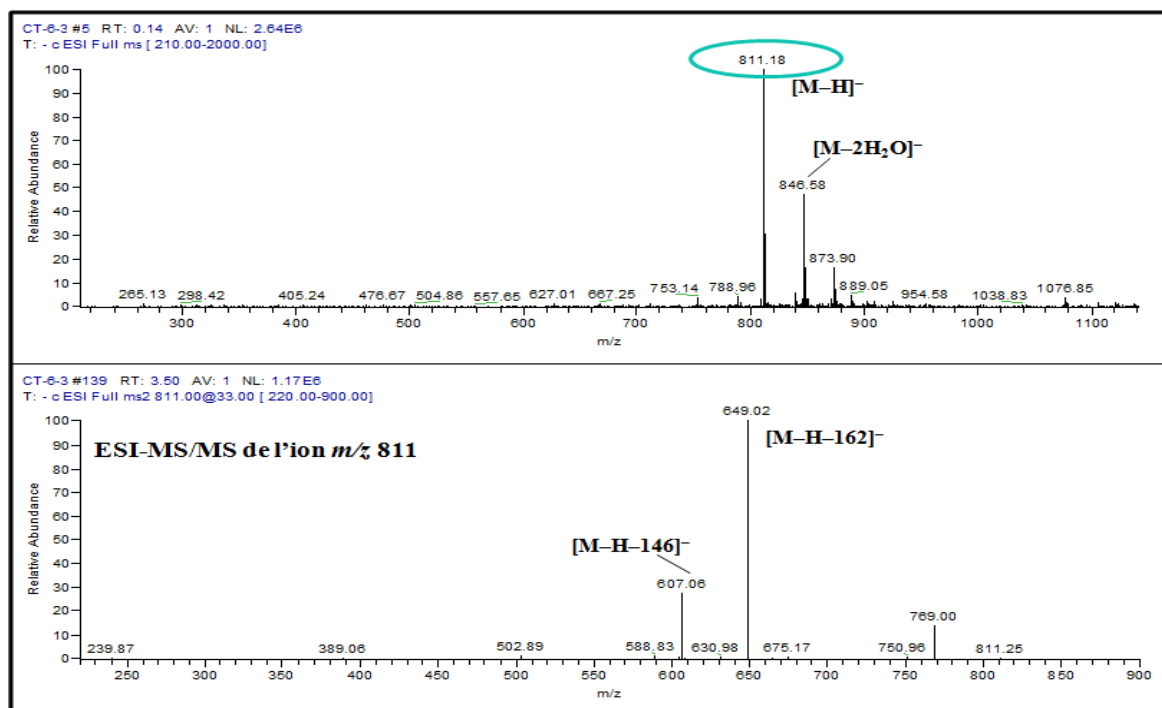


Figure III-73. Spectre de masse ESI -MS du composé **CT₅**.

Spectrométrie de RMN :

L'analyse des spectres RMN ^1H (figure III-74) et HSQC (figure III-75) montre des signaux caractéristiques d'un phényléthanoïde. En effet, on observe :

- Trois protons aromatiques dont :
 - Un signal sous forme de doublet ($J = 2.0$ Hz) à δ_{H} 6.68 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-2. Ce proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_{C} 116.5 ppm.
 - Un signal sous forme de doublet ($J = 8.0$ Hz) à δ_{H} 6.56 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-5, corrélant sur le spectre HSQC avec son carbone résonant à δ_{C} 117.0 ppm.
 - Un signal sous forme de doublet de doublet ($J = 8.0, 2.0$ Hz) à δ_{H} 6.53 ppm d'intégration 1H qui ne peut être que le proton H-6. Ce proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone résonant à δ_{C} 121.0 ppm.
- Deux groupements méthylène dont :
 - Un signal sous forme de doublet de doublet ($J = 11.0, 6.2$ Hz) à δ_{H} 2.72 ppm d'intégration 2H attribuable au proton $\text{H}\beta$ -7 corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone résonant à δ_{C} 36.0 ppm.
 - Deux multiplets d'intégration 1H à δ_{H} 3.84 et 4.10 ppm attribuables respectivement aux protons $\text{H}\alpha_{\text{b}}$ -8 et $\text{H}\alpha_{\text{a}}$ -8. Ces deux signaux corrèlent sur le spectre HSQC avec le même carbone résonant à δ_{C} 71.6 ppm. Cette observation indique que ces deux signaux sont des protons non équivalents et les valeurs de leurs déplacements chimiques sont en faveur d'une oxygénation en cette position d'où la présence d'un groupement $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ dans la molécule.

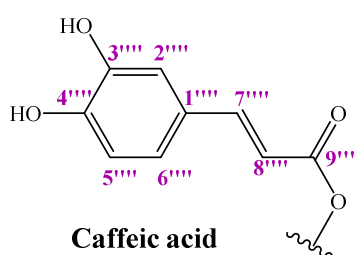
Ceci permet de déduire la présence d'un premier cycle aromatique tri-substitué en 1, 3 et 4 en plus d'une chaîne éthoxy. Ce qui indiquant qu'il s'agit d'une unité 3,4-dihydroxyphényléthoxy comme aglycone.

En plus des signaux de l'unité aglycone, l'analyse des spectres RMN ^1H et HSQC montre également la présence de :

- Trois protons aromatiques dont :

- Un signal sous forme de doublet ($J = 2.0$ Hz) à δ_H 7.06 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-2'''' ce proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_C 115.0 ppm.
 - Un signal sous forme de doublet ($J = 8.0$ Hz) à δ_H 6.80 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H-5'''' , corrélant sur le spectre HSQC avec son carbone résonant à δ_C 116.1 ppm.
 - Un signal sous forme de doublet de doublet ($J = 8.0, 2.0$ Hz) à δ_H 6.97 ppm d'intégration 1H qui ne peut être que le proton H-6'''' . Ce proton corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone résonant à δ_C 123.0 ppm.
- Deux protons oléfiniques dont :
- Un signal sous forme de doublet de même constante de couplage ($J = 15.9$ Hz) à δ_H 7.60 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H α -7'''' corrélant sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_C 114.3 ppm.
 - Un signal sous forme de doublet ($J = 15.9$ Hz) à δ_H 6.29 ppm d'intégration 1H attribuable au proton H β -8'''' corrélant sur le spectre HSQC avec son carbone à δ_C 149.8 ppm. Les valeurs du déplacement chimique et celle de la constante de couplage permettent de déduire la présence d'une chaîne éthylénique de configuration *trans*

Ces données permettent de déduire la présence d'un groupement acide caféique dans ce composé.



Une deuxième analyse simultanée des spectres RMN 1H et HSQC du composé CT₅ permet de repérer l'existence de trois unités osidiques, sont semblables à ceux du composé CT₃. On remarque la présence de :

- trois protons anomériques, dont un doublet à δ_H 4.48 ppm ($J = 8.1$ Hz) correspondent à un proton anomérique H-1'_{Glc} du β -D-glucose en position CH₂-O et deux doublets à δ_H 4.61 et 4.67 ($J = 1.4$ Hz) correspond respectivement à deux protons anomériques H-

$1''_{\text{RhaI}}$ et $H-1'''_{\text{RhaII}}$ des deux α -L-rhamnosés en positions $C-3'_{\text{Glc}}$ et $C-6'_{\text{Glc}}$ respectivement.

- Un signal triplet d'intégration 1H à δ_{H} 5.10 ppm ($J = 8.1$ Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 70.3 ppm, lier d'un groupement acide caféique par la liaison (C–O–).
- Un signal singulet d'intégration de trois protons à δ_{H} 1.98 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_{C} 20.4 ppm, indique la présence d'un groupement acétyle à la position $C-2'_{\text{Glc}}$.

Les valeurs des déplacements chimiques sont répertoriées dans le tableau III-5.

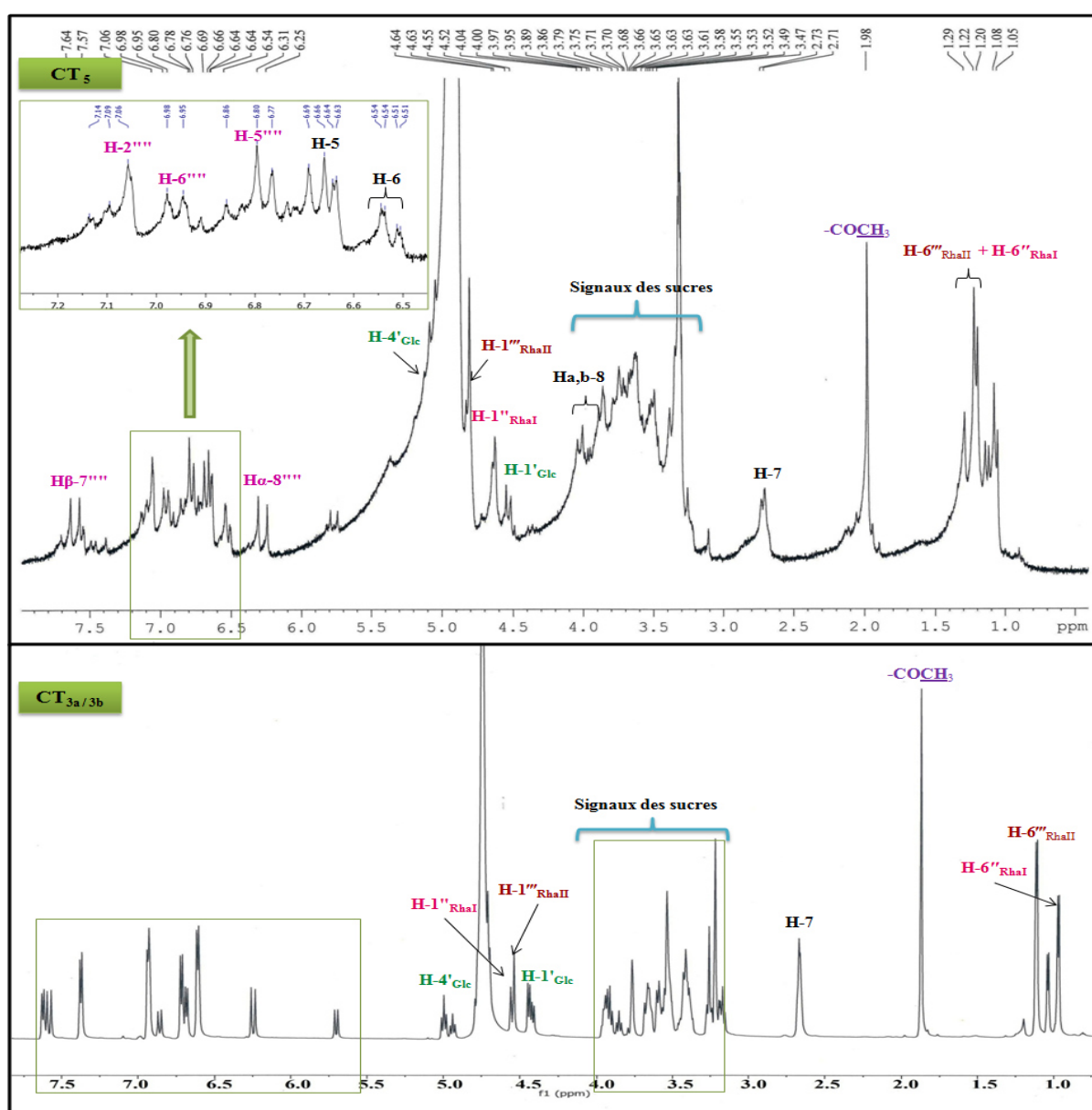


Figure III-74. Spectre de RMN ^1H avec du composé CT_5 comparé à celui du composé $\text{CT}_{3a/3b}$.

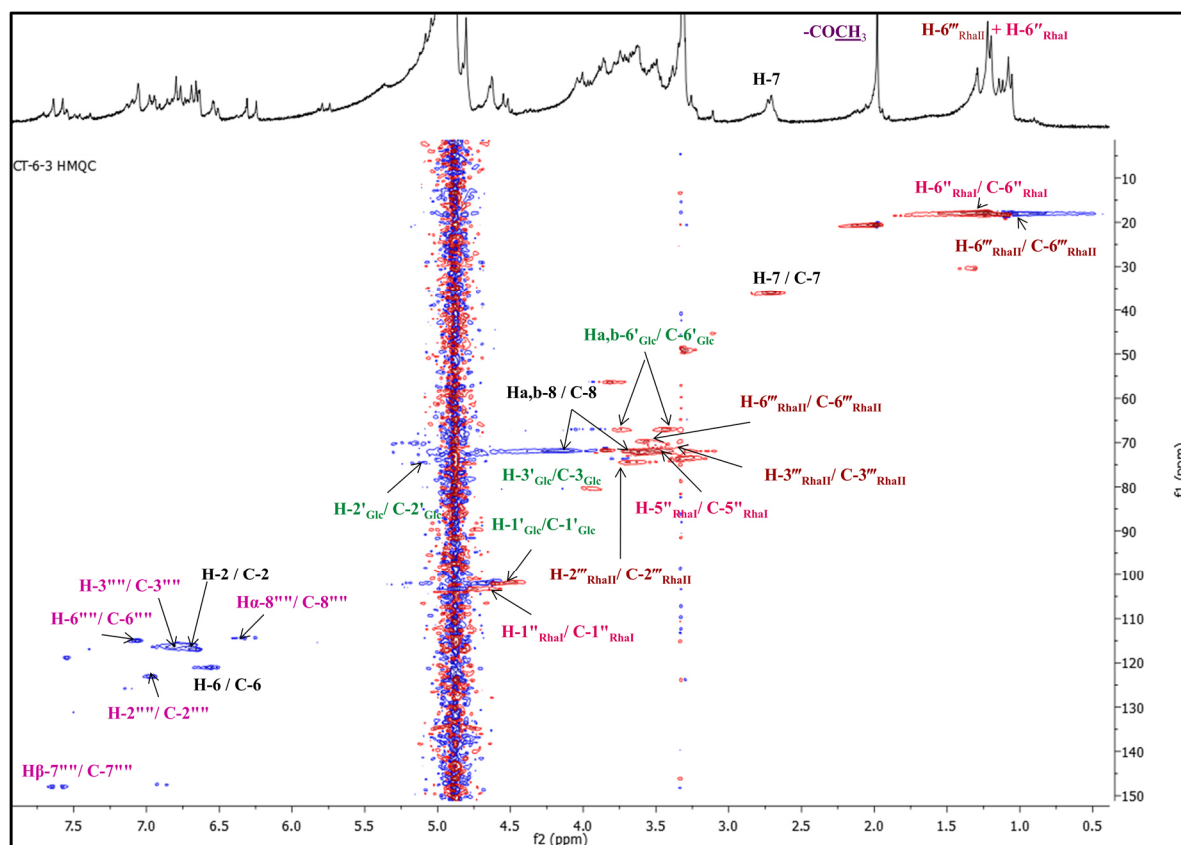
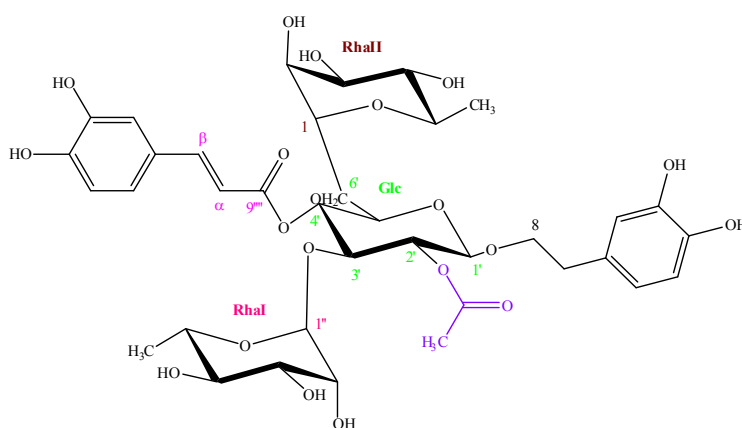


Figure III-75. Spectre de HSQC du composé CT₅.

La structure finale du composé CT₅ est ainsi déterminée comme étant le β -3,4-dihydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*O*-caffeoyl- β -D-glucopyranoside appelé **Brandioside** isolé pour la première fois du genre *Cistanche*.



CT₅ : Brandioside.

III.2.2. Identification de lignane isolés de l'extrait CT_n-BuOH

III.2.2.1. Détermination de structure du composé CT₆

Spectrométrie de masse :

Le composé CT₆ montre dans le spectre de masse ESI-MS en mode négatif un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 518.89 $[M-H]^-$ (figure III-76), soit une masse moléculaire égale de 520 *uma* correspondant à une formule brute C₂₆H₃₂O₁₁ avec 11 degrés d'insaturations. Le spectre montre un ion fragment à m/z 356.80 $[M-H-162]^-$ correspondant à la perte d'un hexose.

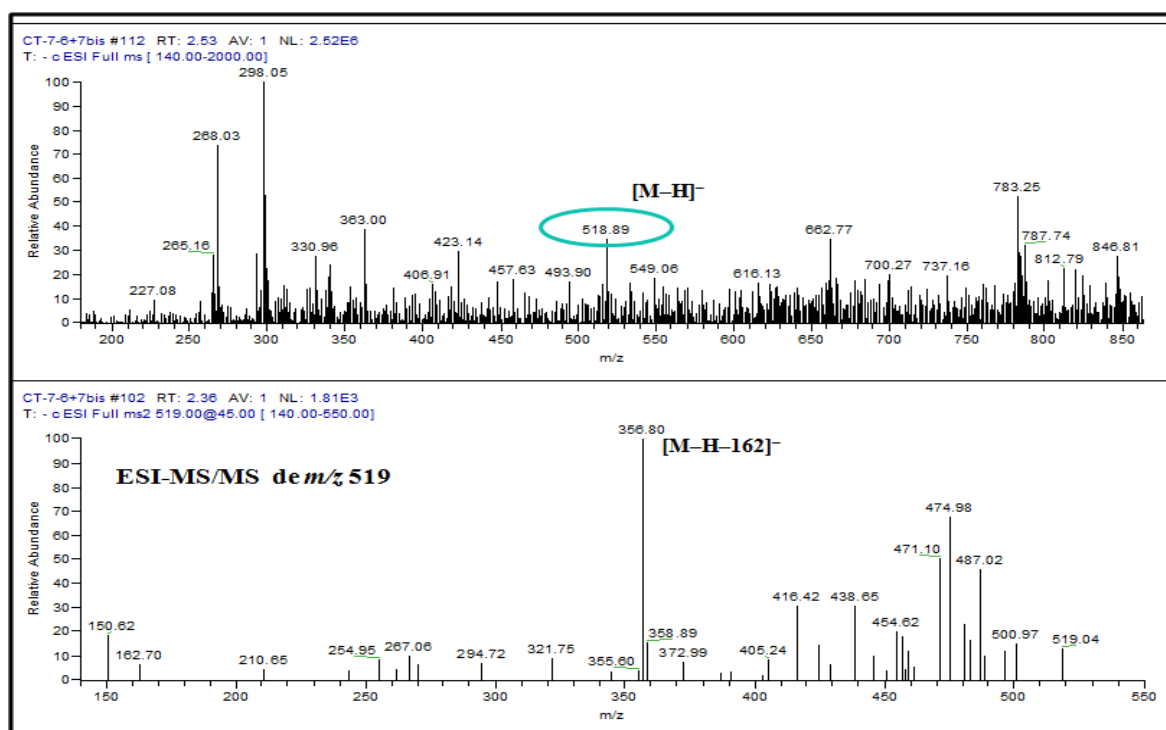


Figure III-76. Spectre de masse ESI-MS du composé CT₆.

Spectrométrie de RMN :

Les spectres de RMN ¹H (figure III-80) et HSQC (figure III-81) du composé CT₆ montre la présence de :

- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H à δ_H 7.03 ppm ($J = 1.9$ Hz) et 6.95 ($J = 1.7$ Hz) ppm, caractéristiques de deux protons aromatiques attribuables aux H-2 et H-2'. Ces deux protons corrélient sur le spectre HSQC avec les carbones résonants à δ_C 111.3 et 110.7 ppm respectivement.

- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H à δ_H 7.15 ppm ($J = 8.5$ Hz) et 6.80 ($J = 8.2$ Hz) ppm, caractéristiques de deux protons aromatiques attribuables aux H-5 et H-5', corrèlent sur le spectre HSQC avec les carbones résonants à δ_C 117.9 et 115.9 ppm respectivement.
- Deux signaux sous forme de doublet de doublet d'intégration 1H à δ_H 6.92 ppm ($J = 1.9, 8.5$ Hz) et 6.80 ($J = 1.7, 8.2$ Hz) ppm, caractéristiques de deux protons aromatiques attribuables aux H-6 et H-6', corrèlent sur le spectre HSQC avec les carbones résonants à δ_C 119.6 et 119.8 ppm respectivement.
- Deux singulet à δ_H 3.86 et 3.87 ppm d'intégration 3H, correspondant à deux groupements méthoxyles. Ces protons corrèlent sur le spectre HSQC avec les carbones résonants à δ_C 56.1 et 56.2 ppm respectivement.

Ceci montre que ces protons forment deux noyaux aromatiques tri-substitué (figure III-77).

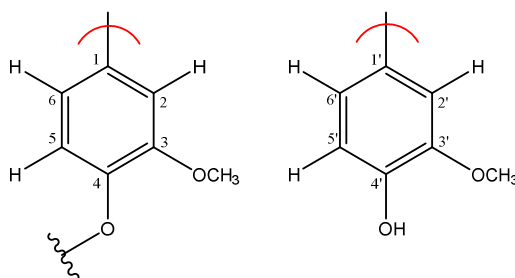


Figure III-77. Unités aromatiques présentes dans le composé CT₆.

Les spectres RMN 1H et HSQC montre un dédoublement des signaux également la présence de :

- Un signal doublet d'intégration 1H chacun à 4.86 ppm ($J = 5$ Hz) correspondant aux protons H-7 et H-7'. Ces deux protons corrèlent sur le spectre HSQC avec les carbones résonants à δ_C 86.9 ppm.
- Deux signaux multiplets d'intégration 1H chacun à δ_H 3.15 ppm aux protons H-8 et H-8'. Ces deux protons corrèlent sur le spectre HSQC avec les carbones résonants à δ_C 55.1 ppm.
- Deux signaux multiplets d'intégration 2H à δ_H 3.87 et 4.25 ppm attribuables respectivement aux protons H_b-9, H_b-9' et H_a-9, H_a-9'. Ces deux signaux corrèlent sur le spectre HSQC avec les carbones C-9 et C-9' résonant à δ_C 72.4 ppm. Cette observation indique que ces deux signaux sont des protons diastéréotopiques.

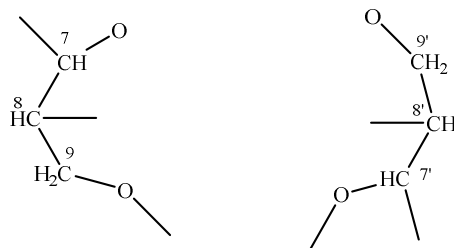


Figure III-78. Unités présentes dans le composé **CT₆**.

- Un signal sous forme de doublet ($J = 8.0$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 4.44 ppm caractéristique du proton anomérique d'un sucre noté H-1''_{Glc}, corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à δ_C 103.0 ppm. La valeur de la constante de couplage en comparaison avec celle de la littérature (Casabuono et al., 1994) permet d'identifier l'hexose comme étant un β -D-glucopyranose.

La formule brute ($C_{26}H_{32}O_{11}$) de ce composé et en comparaison avec la littérature (Casabuono et al., 1994) indique la présence de 32 protons, le proton restant serait probablement dû à la présence d'un groupement hydroxyle qui n'apparaît pas sur le spectre, localisé en position C-4'. Les 11 atomes d'oxygènes, 4 parmi eux sont sur les deux noyaux aromatiques et 5 pour la partie osidique, il n'en reste donc que deux pour les deux unités de la figure III-79, autrement dit ces deux unités sont liées par le biais des deux atomes d'oxygène.

Par ailleurs cette molécule comportant 11 degrés d'insaturation dont huit sont consommés par les deux noyaux aromatiques, il apparaît clairement que ces deux unités doivent former non pas un cycle mais un bicyclic composé de deux cycles furaniques parfaitement symétriques, par ailleurs, sachant qu'un lignane est formé par l'association de deux unités phényle propanoïdes par le biais de la liaison C-8 – C-8' (Casabuono et al., 1994), nous pouvons donc confirmer que nous sommes en présence d'un lignane.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-5.

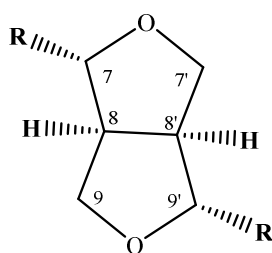
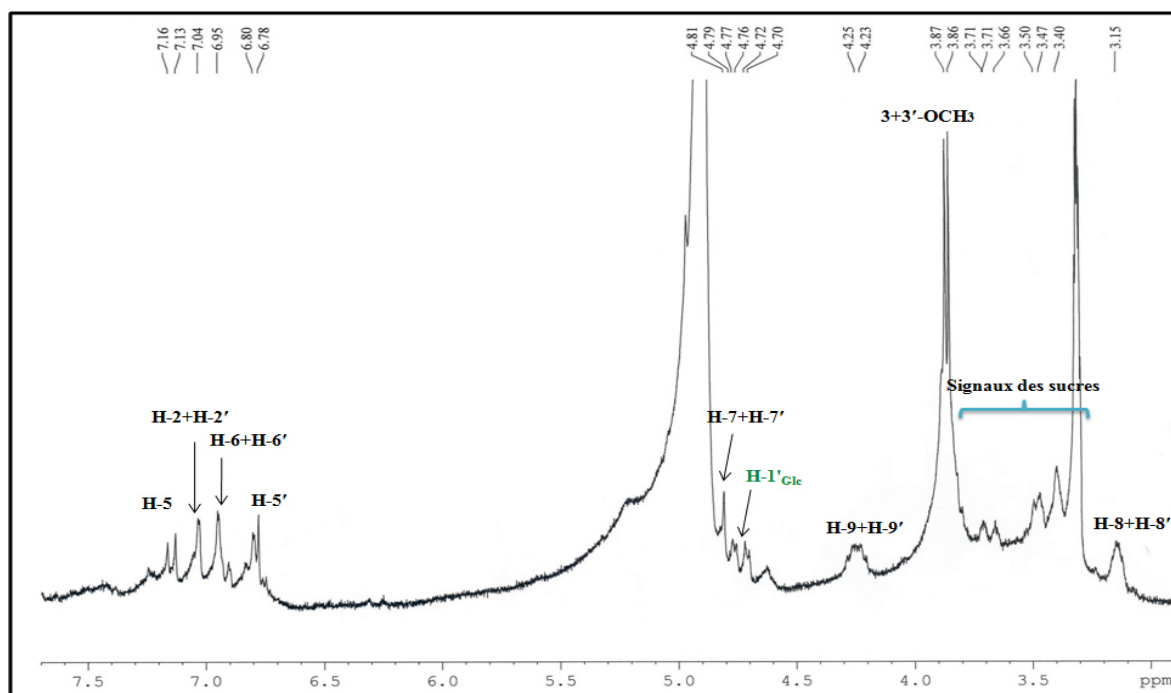
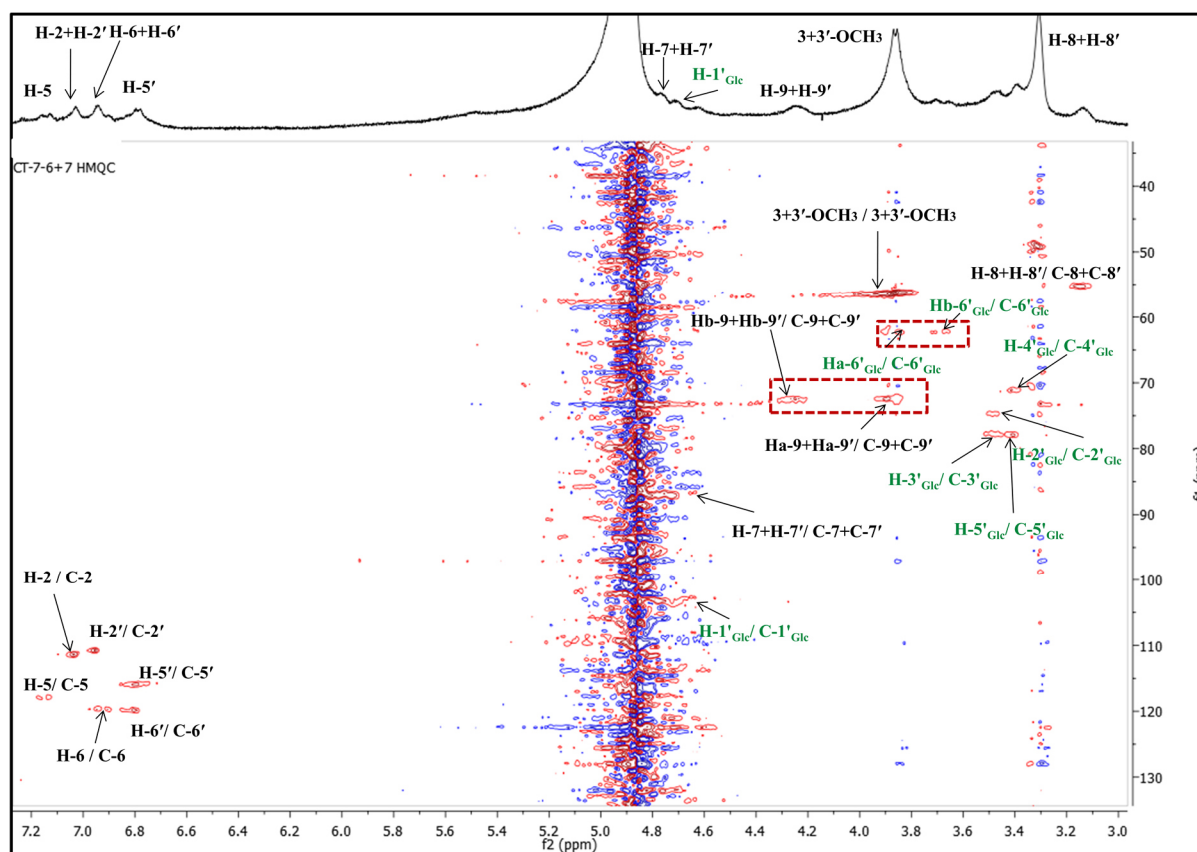
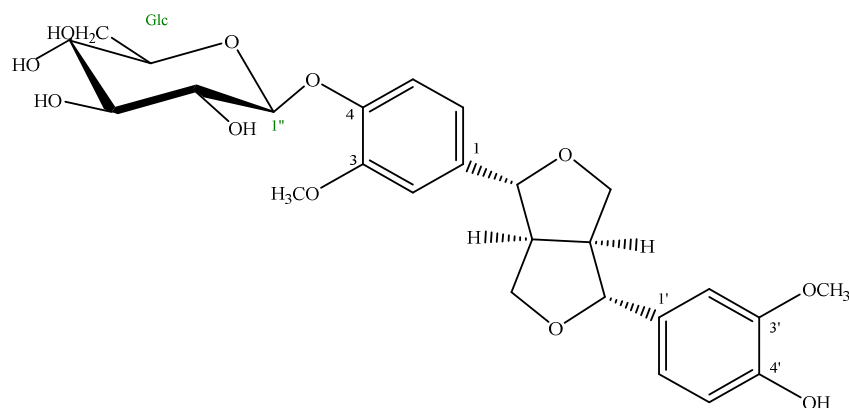


Figure III-79. Structure partielle du composé **CT₆**.

Figure III-80. Spectre RMN ^1H du composé CT₆.Figure III-81. Spectre HSQC du composé CT₆.

L'analyse spectrale combinée (Masse, RMN ^1H , HSQC) du composé **CT₆** qui est en accord avec celle indiquée dans la littérature, mène à la structure du **Pinoresinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside** isolé précédemment de la même espèce de *C. tubulosa* au Pakistan (Yoshizawa et al. 1990) et de *Festuca argentina* (Gramineae) (Casabuono et al., 1994).



CT₆ : Pinoresinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside.

III.2.3. Identification de flavonoïde isolés de l'extrait CT_{n-BuOH}

III.2.3.1. Détermination de structure du composé CT₇

Spectrométrie de masse :

L'étude du spectre de masse ESI-MS effectuée en mode négatif (figure III-82) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 444.88 $[\text{M}-\text{H}]^-$, correspondant à la formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$.

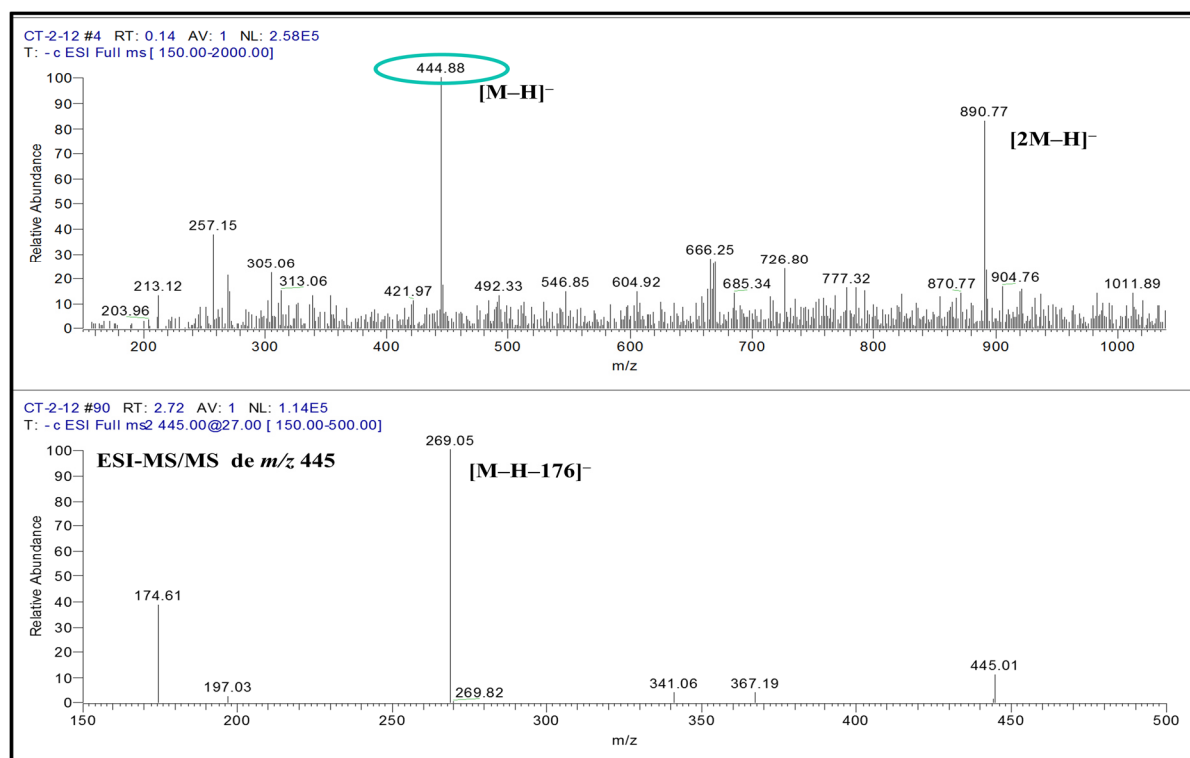


Figure III-82. Spectre de masse ESI-MS du composé CT7.

Spectrométrie de RMN :

L'examen du spectre RMN ¹H (figure III-83) permet d'observer des signaux compatibles avec la structure d'une apigénine dans la région des aromatiques :

- Deux doublets d'intégration 1H à δ_H 6,48 et 6,80 ppm avec une même constante de couplage $J = 2.0$ Hz, chacun attribuable aux protons H-6 et H-8, respectivement.
- Un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à δ_H 6,53 ppm attribuable à H-3. Les résonances à δ_H 6.53 (H-3) et 6.80 ppm (H-8) sont en accord avec la structure d'une flavone dont le cycle A est substitué en positions 5 par un hydroxyle et en 7 par un sucre (Flamini et al., 2001).
- Deux doublets d'intégration 2H couplés avec une forte constante de couplage ($J = 8.0$ Hz) à δ_H 6,73 et 7.78 ppm correspondant aux protons H-3', H-5 et H-2', H-6' respectivement, indiquant une substitution *para* du cycle B.
- L'apparition d'un doublet à δ_H 5.11 ppm ($J = 7,2$ Hz), caractéristique d'un proton anomérique et des signaux entre δ_H 3.40 et δ_H 3.98 ppm, indique la présence d'un sucre lié à l'apigénine par une liaison de configuration β , vu la constante de couplage du proton anomérique (Agrawal et al., 1989).

Les constantes de couplage vicinal mesurées en comparaison à partir du spectre RMN ^1H (figure III-83) et la littérature entre les protons H-1'' et H-2'' (7.0 Hz), H-2'' et H-3'' (8.0 Hz), H-3'' et H-4'' (9.0 Hz) et H-4'' et H-5'' (9.0 Hz) sont toutes supérieures à 7 Hz, ce qui indique qu'ils sont en position *trans* diaxiaux. Ceci est caractéristique d'un β -D-glucuronopyranose (Flamini et al., 2001).

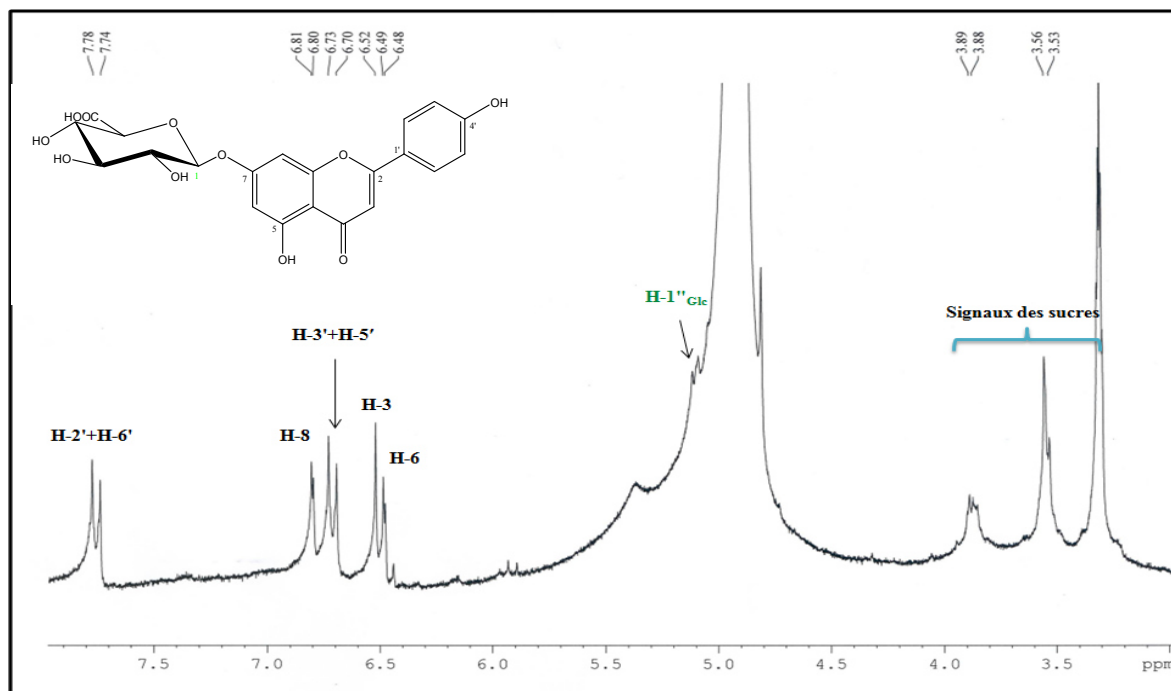


Figure III-83. Spectre RMN ^1H du composé CT7.

L'expérience HSQC (figure III-84) permet l'attribution des signaux des protons aux atomes de carbone correspondants comme suit :

- La corrélation du proton H-3 avec le carbone C-3 montre que ce dernier a un déplacement chimique δ_{C} 101.3 ppm.
- La corrélation du proton H-6 avec le carbone C-6 montre que ce dernier a un déplacement chimique δ_{C} 100.9 ppm.
- La corrélation du proton H-8 avec le carbone C-8 montre que ce dernier a un déplacement chimique δ_{C} 95.8 ppm.
- La corrélation des protons H-2' et H-6' avec les carbones C-2' et C-6' respectivement montre que ces derniers ont un déplacement chimique δ_{C} 129.6 ppm.
- La corrélation des protons H-3' et H-5' avec les carbones C-3' et C-5' respectivement montre que ces derniers ont un déplacement chimique δ_{C} 119.8 ppm.

- La corrélation du proton anomérique H-1''_{Glc} avec le carbone C-1''_{Glc} montre que ce dernier a un déplacement chimique δ_C 101.5 ppm.
- La corrélation du proton H-2''_{Glc} avec le carbone C-2''_{Glc} montre que ce dernier a un déplacement chimique δ_C 74.5 ppm.
- La corrélation du proton H-3''_{Glc} avec le carbone C-3''_{Glc} montre que ce dernier a un déplacement chimique δ_C 77.3 ppm.
- La corrélation du proton H-4''_{Glc} avec le carbone C-4''_{Glc} montre que ce dernier a un déplacement chimique δ_C 73.1 ppm.
- La corrélation du proton H-5''_{Glc} avec le carbone C-5''_{Glc} montre que ce dernier a un déplacement chimique δ_C 76.3 ppm.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-5.

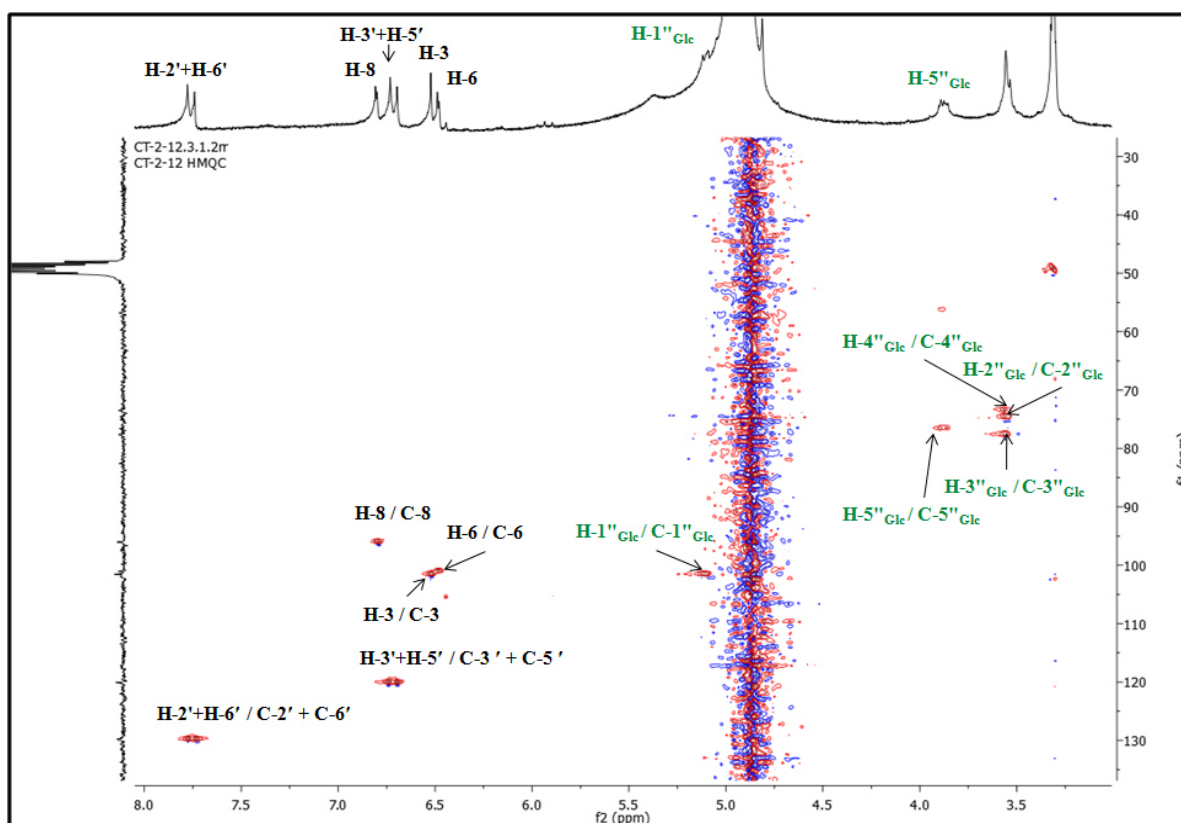
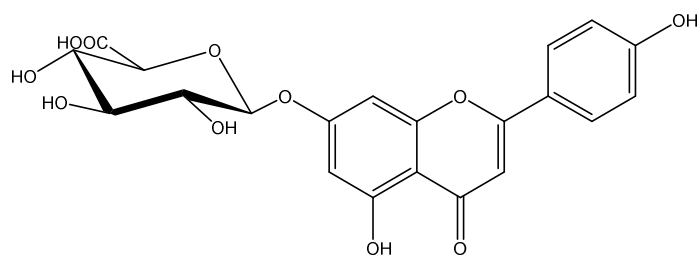


Figure III-84. Spectre HSQC du composé CT7.

L'ensemble des analyses spectrales nous a conduits à identifier le composé CT7 comme étant : **Apigénine 7-O- β -D-glucuronopyranoside**. C'est un flavonoïde très fréquent dans le règne végétal, isolé pour la première fois dans l'espèce *Cistanche*.



CT7: Apigenine 7-O- β -D-glucuronopyranoside.

Tableau III-4. Déplacements chimiques en RMN ¹H et ¹³C (600 MHz) de CT₁ à CT₄ dans le CD₃OD.

Position	CT ₁		CT ₂		CT _{3a/3b}		CT _{4a/4b}	
	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)
1	131.0	—	131.0	—	131.7	—	130.7	—
2/6	131.2	7.04 (d, 8.0)	131.5	7.07 (d, 8.0)	131.3	7.05 (d, 8.0)	130.9	7.10 (d, 8.0)
3/5	116.3	6.71 (d, 8.0)	116.4	6.72 (d, 8.0)	116.2	6.73 (d, 8.0)	116.2	6.73 (d, 8.0)
4	157.0	—	157.1	—	157.0	—	157.1	—
7	36.4	2.80 (m)	37.6	2.85 (m)	36.0	2.78 (m)	36.7	2.86 (m)
8a	72.5	4.04 (m)	72.0	3.99 (m)	72.3	4.06 (m)	72.7	4.02 (m)
8b	—	3.62 (m)	—	3.74 (m)	—	3.68 (m)	—	3.75 (m)
Glc-1'' en C-8								
Glc-1'	103.2	4.44 (d, 8.0)	104.6	4.34 (d, 7.8)	102.1	4.55 (d, 7.8)	104.6	4.40 (d, 8.0)
2'	75.0	4.78 (dd, 9.0-8.0)	75.0	3.29 (dd, 9.5-7.8)	74.3	4.88 (dd, 9.5-7.8)	76.4	3.40 (dd, 9.5-8.0)
3'	83.1	3.65 (t, 9.0)	83.8	3.50 (t, 9.5)	80.8	4.03 (t, 9.5)	81.9	3.83 (t, 9.5)
4'	70.1	3.44 (t, 9.0)	70.0	3.35 ^a	69.3	5.12 (t, 9.5)	70.2	5.00 (t, 9.5)
5'	77.1	3.46 (m)	76.3	3.43 (m)	75.2	3.77 (m)	74.9	3.70 (m)
6'a	68.0	4.00 (dd, 12.0-3.0)	68.0	3.99 (ddd, 12.0-3.0)	67.5	3.79 (dd, 12.0-3.0)	67.8	3.77 (dd, 12.0-3.5)
6'b	—	3.68 (dd, 12.0-4.5)	—	3.65 (dd, 12.0-5.0)	—	3.50 (dd, 12.0-5.0)	—	3.49 (dd, 12.0-4.5)
COCH ₃	171.3	—	—	—	171.6	—	—	—
COCH ₃	21.2	2.00 s	—	—	21.4	1.98 s	—	—
Rhai-1'' en C-3'' Glc								
Rhai-1''	102.1	4.76 (d, 1.3)	100.8	5.21 (d, 2.0)	103.3	4.77 (d, 1.8)	102.7	5.21 (d, 2.0)
2''	72.8	2.83 (dd, 3.0-1.8)	71.6	3.96 (dd, 3.0-2.0)	71.7	3.74 (dd, 3.0-1.8)	72.4	3.94 (dd, 3.0-2.0)
3''	72.0	3.96 (dd, 9.0-3.0)	70.7	3.70 (dd, 9.0-3.0)	72.0	3.54 (dd, 9.0-3.0)	72.7	3.60 (dd, 9.0-3.0)
4''	74.3	3.39 (t, 9.0)	74.3	3.39 (t, 9.0)	73.0	3.29 (t, 9.0)	74.2	3.31 (t, 9.0)
5''	70.7	3.68 (m)	71.2	3.69 (m)	70.2	3.54 (m)	70.6	3.58 (m)
6''	18.1	1.26 (d, 6.3)	18.3	1.26 (d, 6.5)	18.7	1.08 (d, 6.5)	18.3	1.09 (d, 6.0)
Rhai-1''' en C-6' Glc								
Rhai-1'''	102.5	4.80 (d, 1.5)	101.6	4.76 (d, 1.8)	102.5	4.63 (d, 2.0)	101.1	4.65 (d, 2.0)
2'''	72.6	3.83 (dd, 3.0-1.8)	71.5	3.85 (dd, 3.5-1.8)	71.4	3.89 (dd, 3.5-2.0)	72.3	3.86 (dd, 3.5-2.0)
3'''	72.4	3.96 (d, 9.0-3.0)	72.3	3.70 (dd, 9.0-3.5)	72.0	3.70 (dd, 9.0-3.5)	72.6	3.75 (dd, 9.0-3.5)
4'''	74.0	3.39 (t, 9.0)	74.0	3.40 (t, 9.0)	73.2	3.37 (t, 9.0)	74.0	3.34 ^a
5'''	70.6	3.68 (m)	70.0	3.99 (m)	69.3	3.64 (m)	70.7	3.66 (m)
6'''	18.3	1.27 (d, 6.5)	18.1	1.27 (d, 6.5)	18.3	1.22 (d, 6.0)	18.5	1.21 (d, 6.0)
p-coum-1'''' en C-4' Glc								
p-coum-1''''	—	—	—	—	127.3	—	127.4	—
2''''/6'''' <i>trans</i>	—	—	—	—	131.3	7.44 (d, 8.0)	130.9	7.50 (d, 7.8)
2''''/6'''' <i>cis</i>	—	—	—	—	134.6	7.75 (d, 8.0)	133.4	7.72 (d, 7.8)

Identification des produits isolés de *Cistanche phelypaea*

Position	CT _{3H/3b}		CT _{4H/4b}	
	δ_c	δ_H (ppm, J en Hz)	δ_c	δ_H (ppm, J en Hz)
3 ^{'''} /5 ^{'''} <i>trans</i>	116.2	6.84 (d, 8.0)	116.2	6.83 (d, 7.8)
3 ^{'''} /5 ^{'''} <i>cis</i>	115.3	6.80 (d, 8.0)	115.2	6.80 (d, 7.8)
4 ^{'''}	162.0	—	161.7	—
7 ^{'''} β - <i>trans</i>	148.1	7.70 (d, 16.0)	114.0	6.38 (d, 16.0)
7 ^{'''} β - <i>cis</i>	147.7	6.97 (d, 12.0)	115.2	5.83 (d, 12.0)
8 ^{'''} α - <i>trans</i>	114.9	6.37 (d, 16.0)	147.3	7.71 (d, 16.0)
8 ^{'''} α - <i>cis</i>	115.9	5.83 (d, 12.0)	146.4	6.99 (d, 12.0)
COO	168.0	—	168.0	—

Tableau III-5. Déplacements chimiques en RMN ¹H et ¹³C (250 MHz) de CT₅ à CT₇ dans le CD₃OD.

Position	δ_C	CT ₅ δ_H (ppm, J en Hz)	Position	δ_C	CT ₆ δ_H (ppm, J en Hz)	Position	δ_C	CT ₇ δ_H (ppm, J en Hz)
1	131.8	–	1/1'	133.7	–	2	167.0	–
2	116.5	6.68 (d, 2.0)	2	111.3	7.03 (d, 1.9)	3	101.3	6.53 s
3	144.3	–	3	150.0	–	4	182.4	–
4	145.8	–	4/4'	147.4	–	5	161.4	–
5	117.0	6.56 (d, 8.0)	5	117.9	7.15 (d, 8.5)	6	100.9	6.48 (d, 2.1)
6	121.0	6.53 (dd, 8.0 – 2.0)	6	119.6	6.92 (dd, 1.9-8.5)	7	163.0	–
7	36.0	2.72 (dd, 8.0 -2.0)	7/7'	86.9	4.86 (d, 5.0)	8	95.8	6.80 (d, 2.1)
8a	71.6	4.10 m	8/8'	55.1	3.15 m	9	157.5	–
8b		3.84 m	9a/9'a	72.4	4.25 m	10	105.5	–
		Glc-1' en C-8	9b/9'b		3.87 m	1'	115.4	–
Glc-1'	101.6	4.48 (d, 8.1)	2'	110.7	6.95 (d, 1.7)	2'/6'	129.6	7.75 (d, 8.8)
2'	74.5	5.10 (t, 8.1)	3'	149.0	–	3'/5'	119.8	6.71 (d, 8.8)
3'	80.3	3.94 (t, 8.1)	5'	115.9	6.80 (d, 8.2)	4'	161.7	–
4'	70.3	5.10 (t, 8.1)	6'	119.8	6.80 (dd, 1.7-8.2)			Glc-1' en C-7
5'	76.0	3.46 m	O-CH3	56.1	3.86	Glc-1''	101.5	5.11 (8.0)
6'a	67.0	3.72 (dd, 12.0-3.0)			Glc-1'' en C-4	74.5	3.55 (t, 8.1)	
6'b		3.48 (dd, 12.0-4.5)				77.3	3.56 (t, 8.1)	
<u>COCH₃</u>	171.7	–	Glc-1''	103.0	4.44 (d, 8.0)	4''	73.3	3.65 (t, 8.1)
<u>COCH₃</u>	20.4	1.98 s	2''	74.6	3.48 (t, 8.1)	5''	76.3	3.55 m
			3''	77.6	3.44 (t, 8.1)	6''	170.9	–
Rhap-1''		Rhap-1'' en C-3' Glc	4''	71.0	3.41 (t, 8.1)			
2''	102.0	4.61 (d, 1.4)	5''	77.6	3.41 m			
3''	72.2	3.55 (dd, 3.0-1.8)	6'a	62.2	3.80 (dd, 12.0-3.0)			
4''	73.5	3.62 (dd, 9.0-3.0)	6''b		3.69 (dd, 12.0-4.5)			
5''	72.0	3.40 (t, 9.0)						
6''	70.3	3.47 m						
	17.9	1.27 (d, 6.3)						
		Rhap-1'' en C-6' Glc						
Rhap-1''	101.8	4.67 (d, 1.5)						
2''	71.7	3.67 (dd, 3.0-1.8)						
3''	71.9	3.21 (dd, 9.0-3.0)						
4''	74.0	3.63 (t, 9.0)						
5''	69.7	3.58 m						

Position	CT's	
	δ_c	δ_H (ppm, J en Hz)
6"	17.9	1.27 (d, 6.5)
caff-1'''	127.5	—
2'''	115.0	7.06 (d, 2.0)
3'''	149.6	—
4'''	146.6	—
5'''	116.1	6.80 (d, 8.0)
6'''	123.0	6.97 (d, 2.0)
β -7'''	147.8	7.60 (d, 15.9)
α -8'''	114.3	6.29 (d, 15.9)
COO	167.8	—

III.2.4. Conclusion sur l'étude phytochimique des parties aériennes de *C. phelypaea* (CT)

La purification de l'extrait butanolique des parties aériennes de *Cistanche phelypaea* (CT), a été affinée par l'identification et la détermination structurale de 7 composés isolés dont 4 produits nouveaux.

Les composés CT₁, CT₂, CT_{3a/3b} et CT_{4a/4b} sont des structures nouvelles de phényléthanoïde glycosides, les deux derniers composés cités sont des mélanges inséparables de *trans* (3a et 4a) et *cis* (3b et 4b) *p*-coumaroyl. Parmi ces composés nous identifions dont un phényléthanoïde (brandioside), un lignane pinosésinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside (CT₆) déjà isolée des parties aériennes de l'espèce *Cistanche tubulosa*, et un flavonoïde apigénine 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside (CT₇) isolé pour la première fois du genre *Cistanche*.

Une analyse comparative permet de constater que l'originalité des molécules nouvelles est plus liée à leurs aglycones qu'à leurs chaînes oligosaccharide respectives. Les molécules isolées possèdent des aglycones classiques avec un groupement hydroxyle.

Au plan chimiotaxonomique, ces résultats sont conformes à ceux de la littérature, les *Cistanche* étant connues comme source des phényléthanoïdes glycosides

Les composés isolés étant reconnus comme très actifs au plan biologique, nous avons testé leur activité inhibitrice sur deux enzymes impliquées dans le métabolisme glycolytique ou lipidique particulier des cellules cancéreuses, le lactate déshydrogénase humain (LDH) et la monoacylglycérol lipase (MAGL), respectivement (partie biologique).

Chapitre 3

Identification des produits isolés

d'*Anarrhinum pedatum* Desf

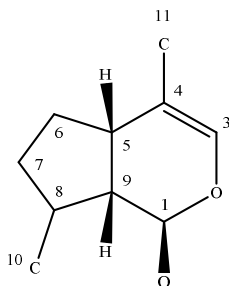
Étude phytochimique d'*Anarrhinum pedatum* (APD)

La plante *A. pedatum* est intéressante à étudier en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, antidiabétique et anticancéreux (Habtemariam., 2018; Avasthi et al., 2013) et d'autre part, cette plante n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique dans la littérature. Le but principal de cette étude est isoler et identifier les nouveaux métabolites secondaires biologiquement intéressants.

III.3.1. Identification des iridoïdes isolés de l'extrait APD_{n-BuOH}

Les iridoïdes sont des métabolites secondaires de la flore et la faune terrestre et marine, et se retrouvent dans de nombreuses familles de végétaux, Ce sont des monoterpènes caractérisés par un squelette cyclopenta[c]pyranique, parfois désigné par le terme d'iridane (*cis*-2-oxabicyclo-[4,3,0]-nonane).

Le système bicyclique β -*cis*-fusionné du cyclopentanopyrane est la structure caractéristique la plus commune dans cette classe de composés :

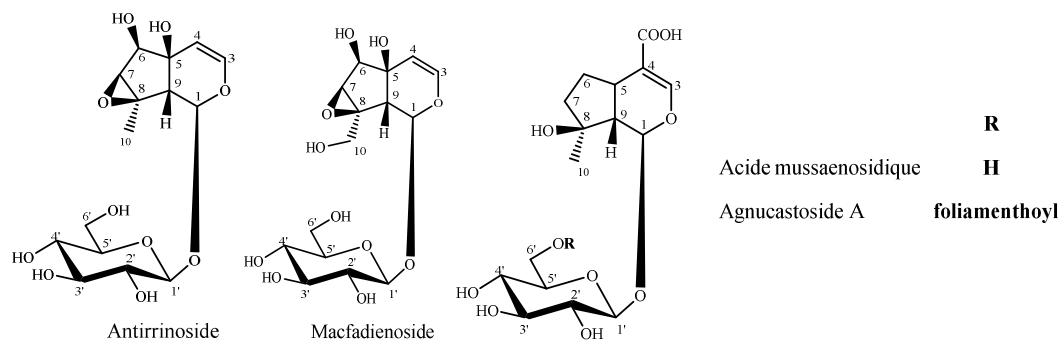


Ils sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques de plusieurs familles : Dipsacaceae, Gentianaceae, Lamiaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Oleaceae, Acanthaceae, Pedaliaceae et Bignoniaceae (Dinda et al., 2007, Balasooriya et al., 1982).

Quinze glycosides d'iridoïdes ont été identifiés dans l'extrait butanolique (APD_{n-BuOH}) dont 10 composés nouveaux.

- 7 d'entre eux : **APD₁**, **APD₃**, **APD₅**, **APD₆**, **APD₈**, **APD₁₀**, et **APD₁₁**, sont des esters antirrinoside,
- Les 4 autres : **APD₂**, **APD₄**, **APD₇**, et **APD₉**, sont des esters macfadinoside,
- Les 4 derniers : **APD₁₂**, **APD₁₃**, **APD₁₄** et **APD₁₅** sont des esters agnucastosite A et acide mussaenosidique.

Les différences structurales des glycosides iridoïdes isolés résident dans la structure chimique du groupement ester en position 5 et 6 de la partie aglycone. Et en position 6'_{Glc} de la partie osidique.



III.3.1.1. Structure du β -D-glucopyranose :

Tous les composés **APD** renferment un β -D-glucopyranose élément constitutif d'antirrinoside, macfadienoside et acide mussaenosidique

L'hydrolyse acide des composés isolés suivie par l'analyse par GC-MS chirale l'hydrolysate confirme la configuration naturelle du D-glucose.

Le spectre RMN ^1H (tableau III-6) montre le doublet du proton anomérique δ_{H} [4.68–4.73 ppm] ($d, J=7.9 \pm 0.1$ Hz, H-1') et un massif entre δ_{H} [3.17–4.55 ppm] pour les 6 autres protons glucosidiques. L'attribution des protons osidiques est réalisée par l'analyse des données spectrales 1D TOCSY et COSY. Le β -D-glucose est lié à la partie monoterpénique en sa position **1** comme l'atteste une corrélation HMBC entre H-1 du monoterpène δ_{H} 5.22–5.57 ppm et le carbone anomérique C-1'_{Glc} à δ_{C} [98.4–100.5 ppm], et inversement entre le proton anomérique H-1'_{Glc} et le C-1 hydroxylé à δ_{C} [99.0–100.5 ppm].

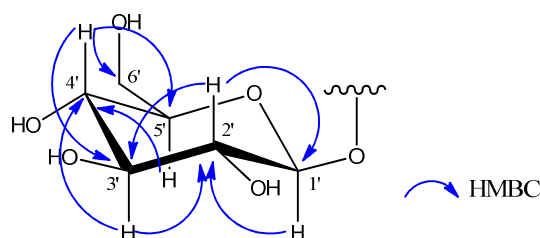


Figure III-85. Corrélations HMBC du β -D-glucopyranose dans les iridoïdes **APD**₁ à **APD**₁₅.

Tableau III-6. RMN ¹H et ¹³C de β-D-glucopyranose des composés APD₁ à APD₁₅.

N	β-D-glucopyranoside											
	APD ₁		APD ₂		APD ₃		APD ₄		APD ₅		APD ₆	
	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)
1'	99.5	4.68 (d, 7.3)	99.3	4.72 d (8.0)	99.4	4.86 (d, 7.8)	100.4	4.70 (d, 8.0)	100.0	4.68 (d, 7.8)		
2'	74.5	3.22 br (t, 9.0)	74.3	3.25 br t (9.0)	74.5	3.18 br (t, 9.0)	73.8	3.22 br (t, 9.0)	74.4	3.23 br (t, 9.0)		
3'	78.0	3.25 (t, 9.5)	78.2	3.34 t (9.0)	77.4	3.36 (t, 9.5)	77.6	3.36 (t, 9.5)	77.7	3.37 (t, 9.5)		
4'	71.4	3.23 (t, 9.5)	71.3	3.28 t (9.5)	71.3	3.18 (t, 9.5)	71.2	3.35 (t, 9.5)	70.9	3.31 (t, 9.5)		
5'	77.6	3.33 m	77.3	3.44 m	78.0	3.27 m	77.4	3.41 m	77.8	3.40 m		
6'a	62.5	3.89 (dd, 11.7-1.8)	62.4	3.93 dd (12.0, 3.0)	62.4	3.92 (dd, 12.0-2.5)	62.0	3.94 (dd, 12.0-3.0)	62.4	3.97 (dd, 12.0-3.0)		
6'b		3.60 (dd, 11.7-6.2)		3.66 dd (12.0, 5.0)		3.55 (dd, 12.0-5.0)		3.73 (dd, 12.0-5.0)		3.71 (dd, 12.0-5.5)		
N		APD ₆		APD ₇		APD ₈		APD ₉		APD ₁₀		
	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)
1'	100.5	4.71 (d, 7.8)	100.4	4.68 d (7.7)	98.4	4.68 d (8.0)	99.0	4.71 d (8.0)	99.5	4.69 (d, 7.8)		
2'	74.6	3.23 br (t, 9.0)	74.0	3.22 br t (9.5)	73.4	3.25 ^b	74.0	3.30 ^b	74.6	3.23 br (t, 9.0)		
3'	77.9	3.37 (t, 9.5)	77.6	3.35 ^b	78.3	3.35 t (9.5)	77.0	3.44 t (9.5)	77.3	3.39 (t, 9.5)		
4'	71.2	3.32 (t, 9.5)	71.1	3.34 ^b	70.4	3.26 ^b	71.1	3.43 t (9.5)	71.0	3.40 (t, 9.5)		
5'	77.9	3.40 m	77.4	3.38 m	76.4	3.43 m	75.0	3.57 ^b	75.5	3.52 m		
6'a	62.4	3.98 (dd, 12.0-2.5)	62.7	3.94 dd (12.0, 2.0)	62.8	3.98 dd (12.0, 2.0)	63.6	4.50 dd (12.0, 2.3)	63.7	4.54 (dd, 12.0-2.5)		
6'b		3.73 (dd, 12.0-5.0)		3.71 dd (12.0, 4.5)		3.60 dd (12.0, 6.0)		4.36 dd (12.0, 5.5)		4.40 (dd, 12.0-5.0)		
N		APD ₁₁		APD ₁₂		APD ₁₃		APD ₁₄		APD ₁₅		
	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)
1'	99.2	4.67 (d, 7.8)	99.4	4.70 d (7.7)	99.0	4.73 d (7.7)	99.3	4.73 d (8.0)	99.0	4.71 d (7.8)/ 4.70 d (7.8)		
2'	74.4	3.17 br (t, 9.0)	74.3	3.23 ^b	74.0	3.23 ^b	74.4	3.24 br t (9.0)	74.2	3.19 ^b		
3'	78.0	3.24 (t, 9.5)	77.1	3.38 t (9.5)	77.0	3.39 t (9.5)	77.5	3.41 t (9.5)	77.0	3.40 t (9.5)		
4'	71.5	3.17 (t, 9.5)	71.5	3.37 t (9.5)	70.5	3.37 t (9.5)	71.3	3.38 t (9.5)	71.0	3.35 ^b		
5'	77.5	3.49 m	75.3	3.48 m	75.0	3.54 m	75.3	3.54 m	75.7	3.56 m/3.53 m		
6'a	62.0	3.97 (dd, 12.0-2.5)	64.6	4.20 dd (12.0, 2.5)	63.3	4.50 dd (12.0, 2.5)	63.8	4.53 dd (12.0, 3.0)	63.6	4.55 dd (11.5, 2.0)/ 4.51 dd (12.0, 2.0)		
6'b		3.57 (dd, 12.0-5.0)		3.96 dd (12.0, 5.0)		4.30 dd (12.0, 5.0)		4.30 dd (12.0, 5.0)		4.39 (12.0, 5.8)/ 4.33 dd (12.5, 6.0)		

III.3.1.2. Détermination structurale du composé APD₁

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (figure III-86) du composé APD₁ montre un ion pseudo-moléculaire à m/z 358.17 $[M+Na]^+$ correspondant à la formule brute C₁₅H₂₂O₁₀. En plus du pic de l'ion moléculaire, nous observons sur le spectre la présence d'autres fragments importants à m/z 367 $[M+Na-18]^+$ et 205 $[M+Na-18-166]^+$, indiquant la perte d'une molécule d'eau et une unité hexose.

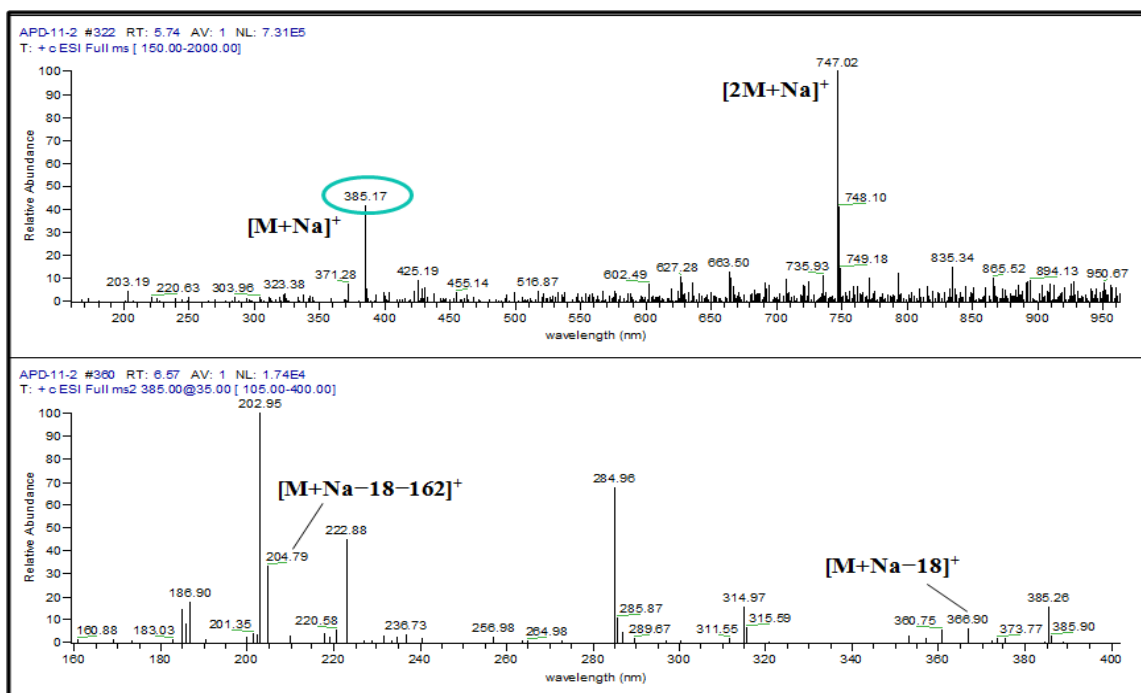


Figure III-86. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé APD₁.

Spectrométrie RMN :

Le spectre RMN ¹H (figure III-87) de ce composé, montre d'emblée les signaux caractéristiques d'un iridoïde. En effet, on observe :

- Deux doublets résonants à δ_H 4.94 et 6.38 ppm ($J = 6.4$ Hz), caractéristique des protons oléfiniques H-4 et H-3. Le signal du proton H-4 est difficilement identifiable car enveloppé par le pic de l'eau.
- Deux signaux doublet à δ_H 2.38 et 5.39 ppm ($J = 7.3$ Hz) caractéristique des protons H-1 et H-9 respectivement.

- Deux protons sous forme de doublet déblindé situé à δ_H 3.60 et 3.96 ppm correspondant aux H-7 et H-6 respectivement avec une constante de couplage $J = 1.6$ Hz.
- Un singulet résonant à δ_H 1.50 ppm et s'intégrant pour trois protons attestant de la présence d'un groupement méthyle (CH₃-10).
- Un doublet à δ_H 4,68 ppm ($J = 7.3$ Hz) caractéristique du proton anomère H-1'_{Glc} du glucose (Tableau III-6), et un massif de protons observé entre δ_H 3.22 à 3.89 ppm correspondant aux protons osidique.

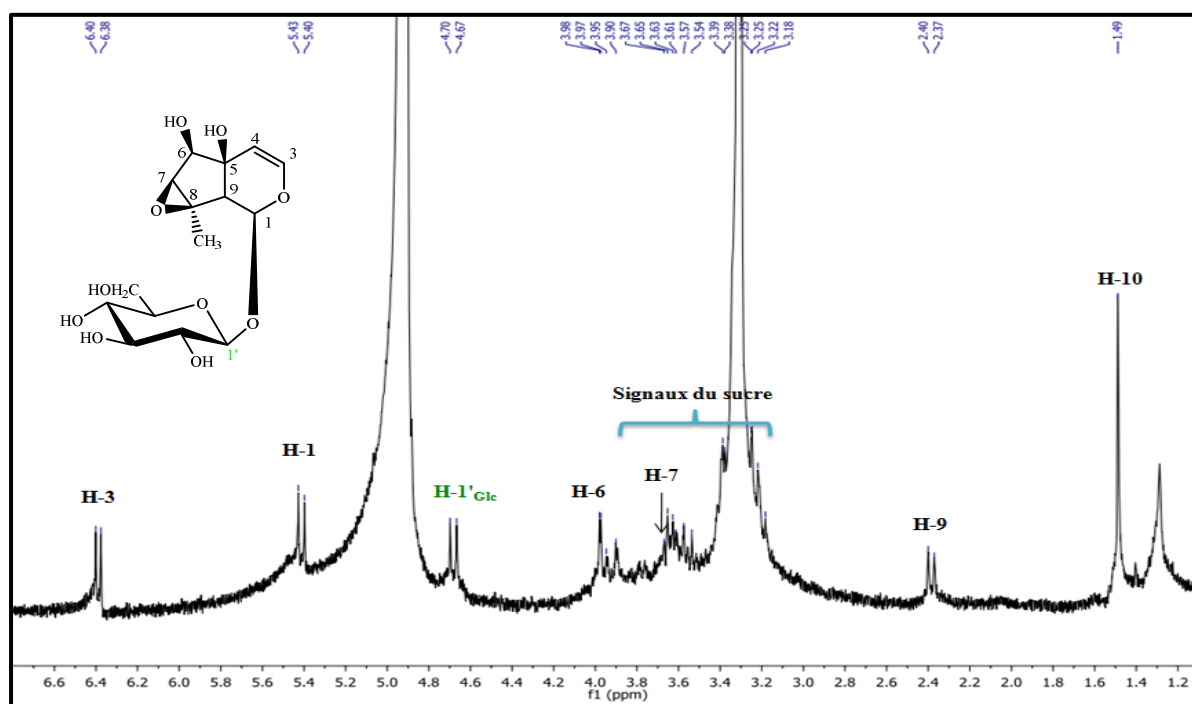


Figure III-87. Spectre de RMN ¹H du composé APD₁.

L'expérience de corrélation directe carbone–proton ou HSQC (figure III-88) montre les couplages entre :

- Le proton H-1 et son carbone C-1 résonant à δ_C 94.9 ppm.
- Le proton H-3 et son carbone C-3 résonant à δ_C 142.4 ppm.
- Le proton H-4 et son carbone C-4 résonant à δ_C 107.0 ppm.
- Le proton H-6 et son carbone C-6 résonant à δ_C 78.0 ppm. Valeur qui confirme bien que ce dernier est porteur d'un groupement OH libre.
- Le proton H-7 et leur carbone C-7 résonant à δ_C 66.2 ppm.
- Le proton H-9 et son carbone C-9 résonant à δ_C 52.9 ppm.
- Les protons H-10 et leur carbone C-10 résonant à δ_C 17.5 ppm.

La présence du cycle époxyde C-7/C-8 est déterminée par comparaison des déplacements chimiques des carbones C-7 et C-8 (entre δ_C 64-66 ppm) qui possèdent un blindage $\Delta\delta_C = -15$ à -20 ppm par rapport au diol (Dinda et al., 2007).

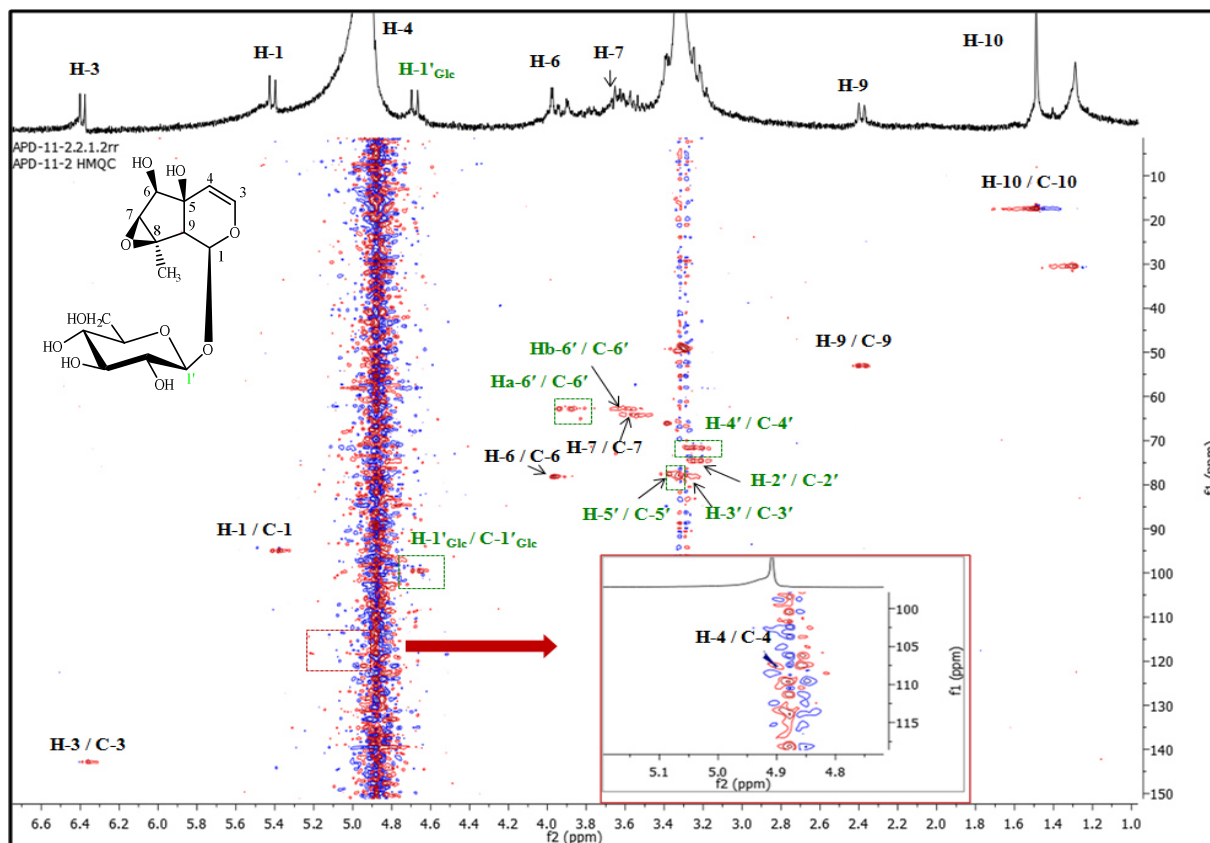
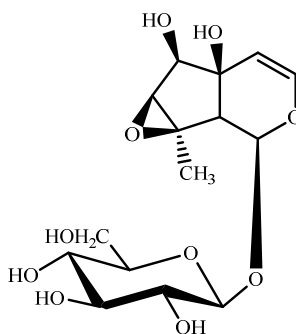


Figure III-88. Spectres HSQC du composé APD₁.

Toutes ces données spectrales a permis d'attribuer la structure du composé APD₁ : **Antirrinoside**, déjà identifier du genre *Kickxia abhaica* (Al-Rehaily et al., 2006), *Maurandya antirrhiniflora* (Borors et al., 1991) et *Linaria vulgaris* (Sticher., 1971).



APD₁ : Antirrinoside.

III.3.1.3. Détermination structurale du composé APD₂

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure III-89), présente un pic pour l'ion pseudo- moléculaire à m/z 567.2023 $[M+Na]^+$ (calculé 567.2054), suggérant une masse moléculaire de 544 *uma* en accord avec la formule brute $C_{25}H_{36}O_{13}$. D'autres ions-fragments importants ont également été observés à m/z 549.1922 $[M+Na-18]^+$, 405.1504 $[M+Na-162]^+$ et 383.0937 $[M+Na-184]^+$ correspondant à la perte d'une molécule d'eau, une unité hexose et une chaîne latérale ester C10.

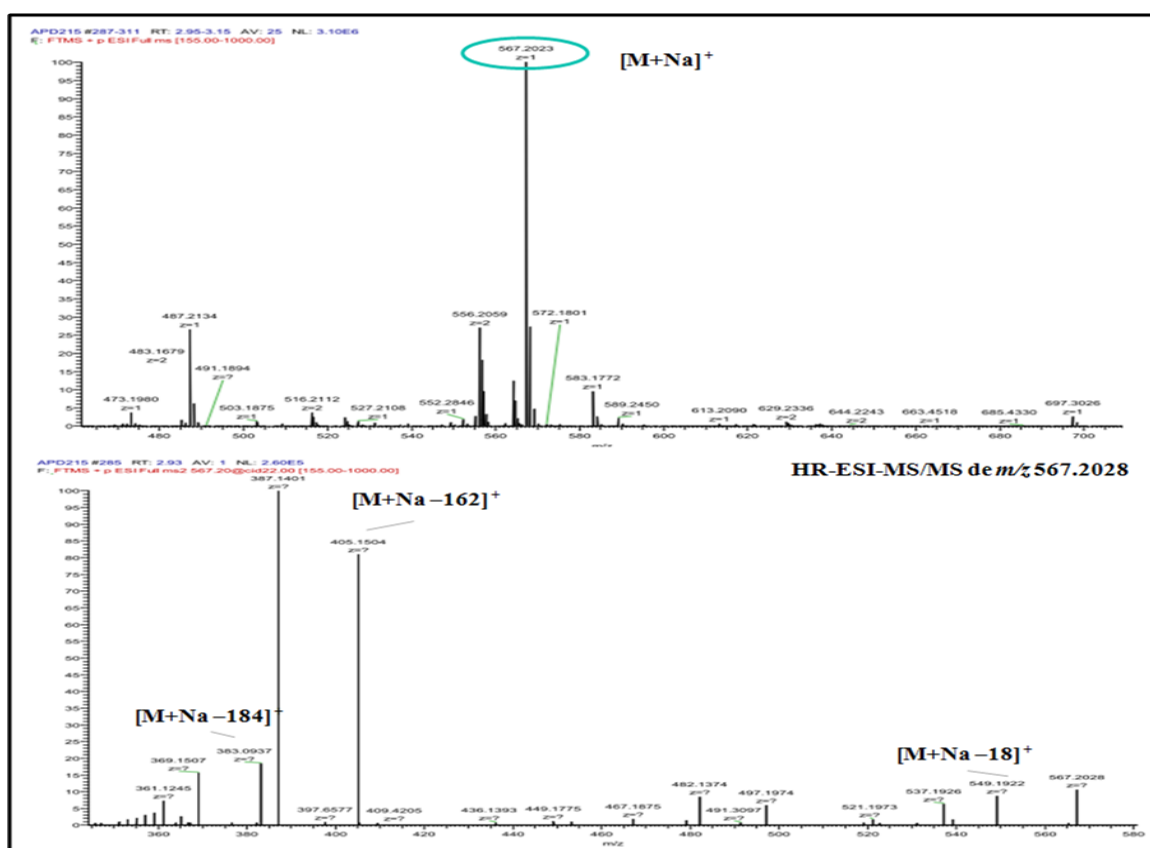


Figure III-89. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₂.

Spectrométrie RMN :

L'observation du spectre RMN 1H (figure III-90) du composé APD₂ permet de confirmer sa nature iridoïdique, par la présence de certains signaux caractéristiques à ceux du composé APD₁. En effet, on observe :

- Les signaux des deux protons oléfiniques H-3 et H-4 résonnant respectivement à δ_H 6,42 ppm ($d, J = 6.0$ Hz) et 4.97 ppm ($d, J = 6.2$ Hz).
- Trois signaux à δ_H 2.63 ($d, J = 7.5$ Hz), 3.72 ($d, J = 2.0$ Hz) et 5.55 ppm ($d, J = 7.5$ Hz) présentant une parenté évidente avec ceux des protons H-9, H-7 et H-1 du noyau antirrinoside (**APD₁**).
- L'absence du signal des protons CH₃-10 à δ_H 1.50 ppm et l'apparition de deux doublets à δ_H 3.71 et 4.15 ppm ($J = 13.5$ Hz) attribuable à un CH₂ hydroxylé, indique que le composé **APD₂** à un noyau macfadinoside (Bianco et al., 1974).

En plus des signaux du noyau macfadinoside, le spectre RMN ¹H montre aussi :

- Deux protons oléfiniques dont un sous forme de triplet à δ_H 6.94 ppm ($J = 7.4$ Hz), et le deuxième de doublet à δ_H 5.43 ppm ($J = 6.4$ Hz).
- Trois groupements méthylène résonnant comme suit :
 - Un doublet à δ_H 4.10 ppm ($J = 6.4$ Hz) qui peuvent être attribué au CH₂-OH.
 - Un triplet à δ_H 2.26 ppm ($J = 7.6$ Hz).
 - Un multiplet d'intégration 2H à δ_H 2.36 ppm attribuable aux deux protons non équivalents H_a et H_b.
- Deux groupements méthyles sous forme d'un singulet d'intégration 3H :
 - Un à δ_H 1.78 ppm, dans le déplacement chimique et déblindé par une liaison éthylénique.
 - Le deuxième à δ_H 1.90 ppm, déblindé par une liaison éthylénique et un groupement attracteur d'électron qui peut être un carbonyle.

Toutes ces données confirment la présence d'une chaîne latérale ester C10.

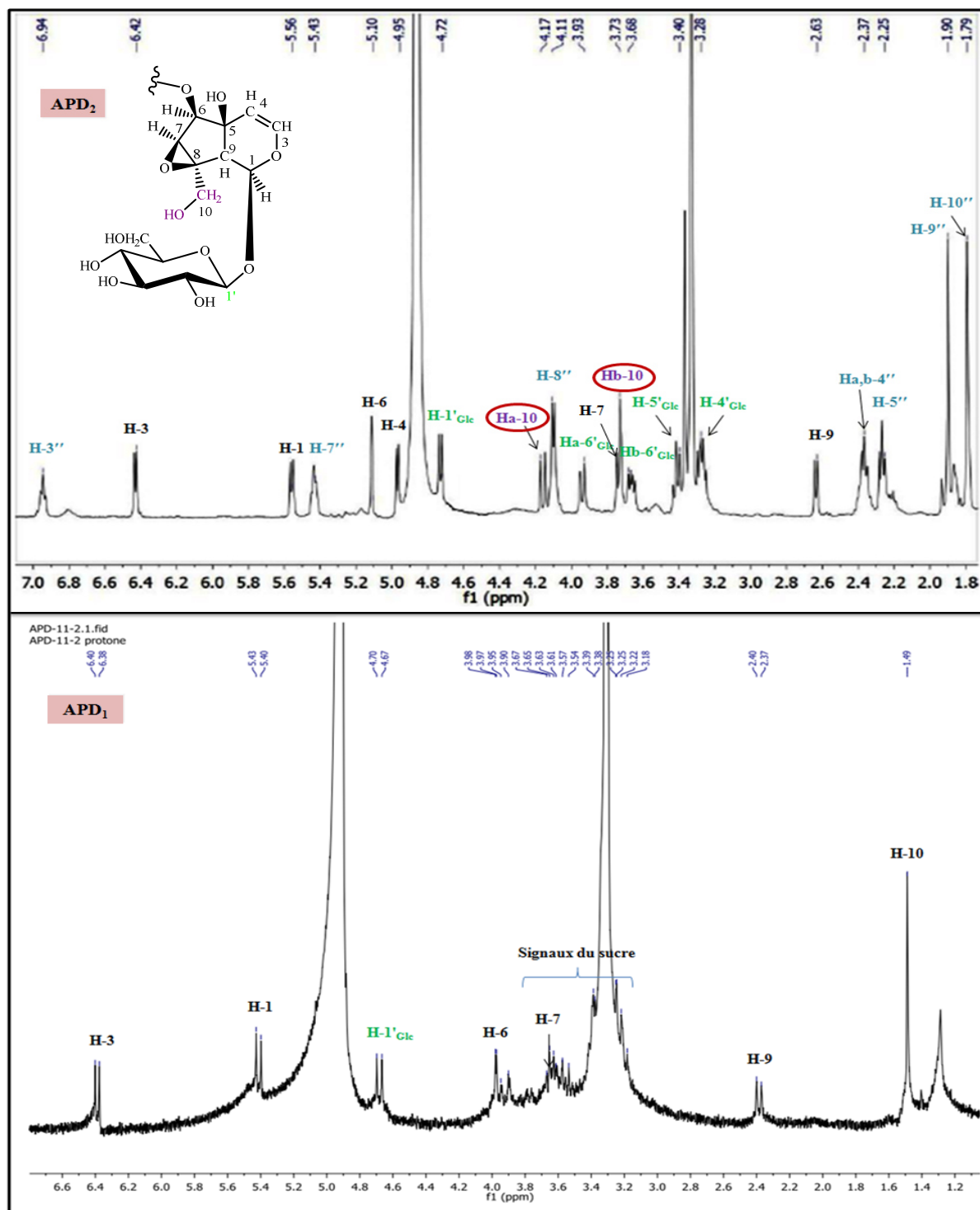


Figure III-90. Spectre de RMN ¹H du composé APD₂ comparé à celui du composé APD₁.

L'expérience COSY H-H (figure III-92) montre les couplages du noyau macfadienoside entre :

- Les protons oléfiniques H-3 et H-4.
- Le proton H-6 et le proton H-7.

- Le proton H-9 et le proton H-1.
- Le proton H_b-10 et le proton H_a-10.

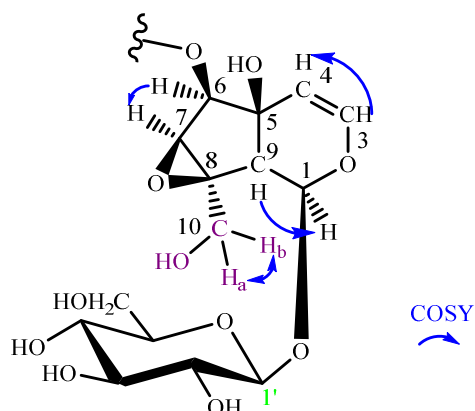
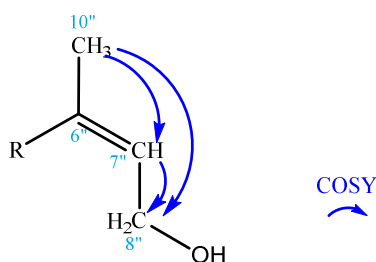


Figure III-91. Corrélations COSY au niveau du squelette macfadienoside.

En plus de ces corrélations, l'examen du spectre COSY (figure III-92) de ce composé, montre aussi des corrélations de la chaîne latérale ester entre :

- le méthyle résonnant à δ_H 1.78 ppm (C-10'') corrèle avec le proton oléfinique CH à δ_H 5.43 ppm et ainsi qu'avec le CH₂ à δ_H 4.10 ppm qui est lié à un hydroxyle (CH₂-OH).
- le proton oléfinique CH (δ_H 5.43 ppm) corrèle avec ce CH₂-OH (δ_H 4.10 ppm) suggère que ces deux atomes de carbones sont voisins.

Toutes ces observations ont permis de suggérer l'existence d'une unité isoprène.



Le même spectre montre des taches de corrélations entre :

- Le méthyle résonnant à δ_H 1.90 ppm corrèle avec le proton oléfinique CH à δ_H 6.94 ppm et ainsi qu'avec le groupement CH₂ à δ_H 2.36 ppm.
- Le proton oléfinique CH (δ_H 6.94 ppm) corrèle avec deux groupements CH₂ à δ_H 2.26 et 2.36 ppm, et avec le méthyle (CH₃) à (δ_H 1.90 ppm), suggérant la présence d'une deuxième unité d'isoprène, d'où la structure

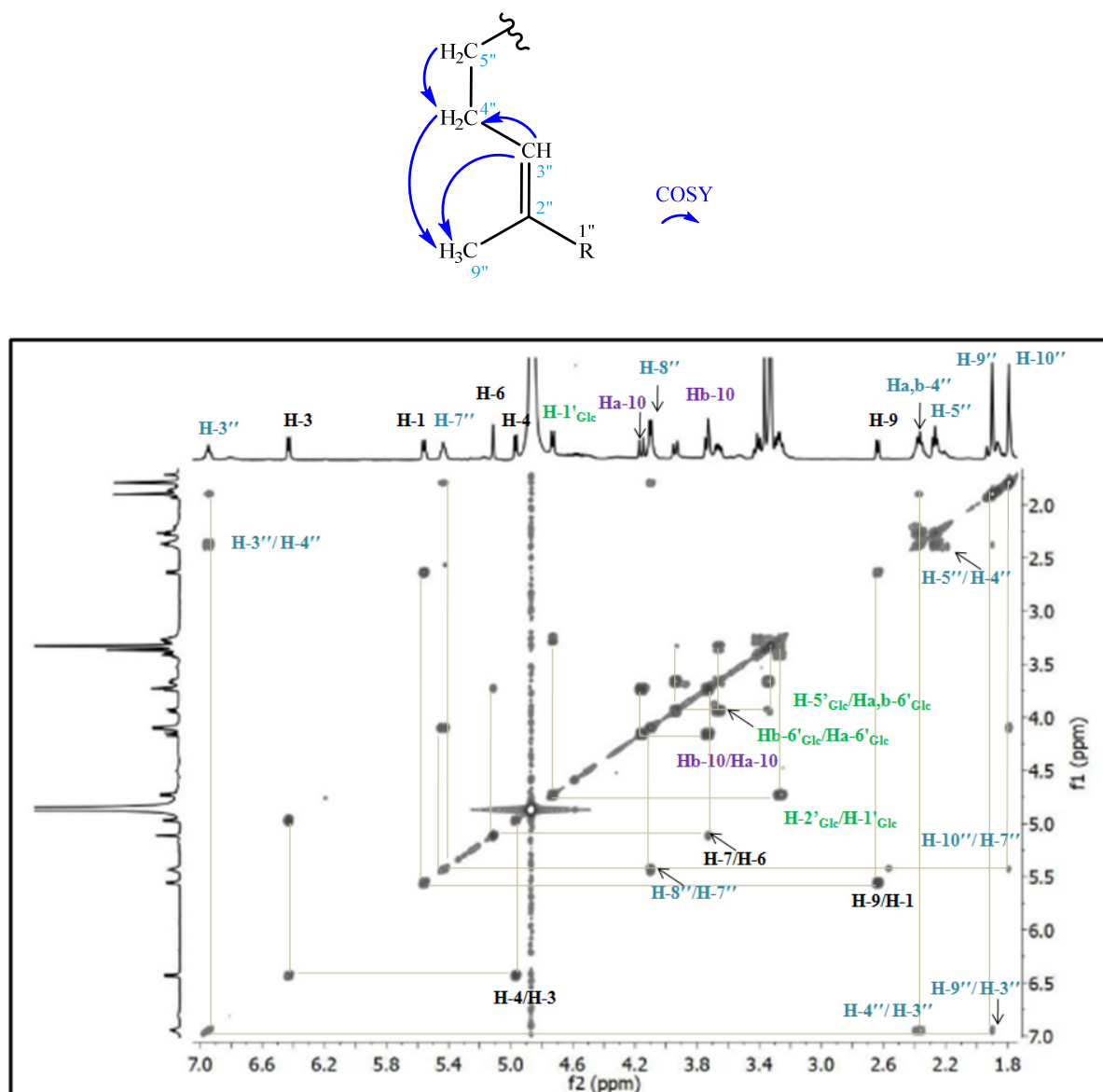


Figure III-92. Spectres COSY du composé **APD₂**.

L'expérience HSQC (figure III-93) permet de mettre en évidence les corrélations carbone-proton du composé **APD₂**. Par ailleurs, ce spectre HSQC montre des corrélations carbones-protons de la chaîne latérale ester :

- Les protons oléfiniques : H-3'' et H-7'' et leurs carbones résonant respectivement à δ_C 143.9 et 126.2 ppm.
- Les protons méthylènes : H-4'', H-5'' et H-8'' et leurs carbones résonants respectivement à δ_C 28.0, 31.1 et 58.8 ppm.
- Les protons méthyliques : H-9'' et H-10'' et leurs carbones C-9'' et C-10'' résonants respectivement à δ_C 12.1 et 23.1 ppm.

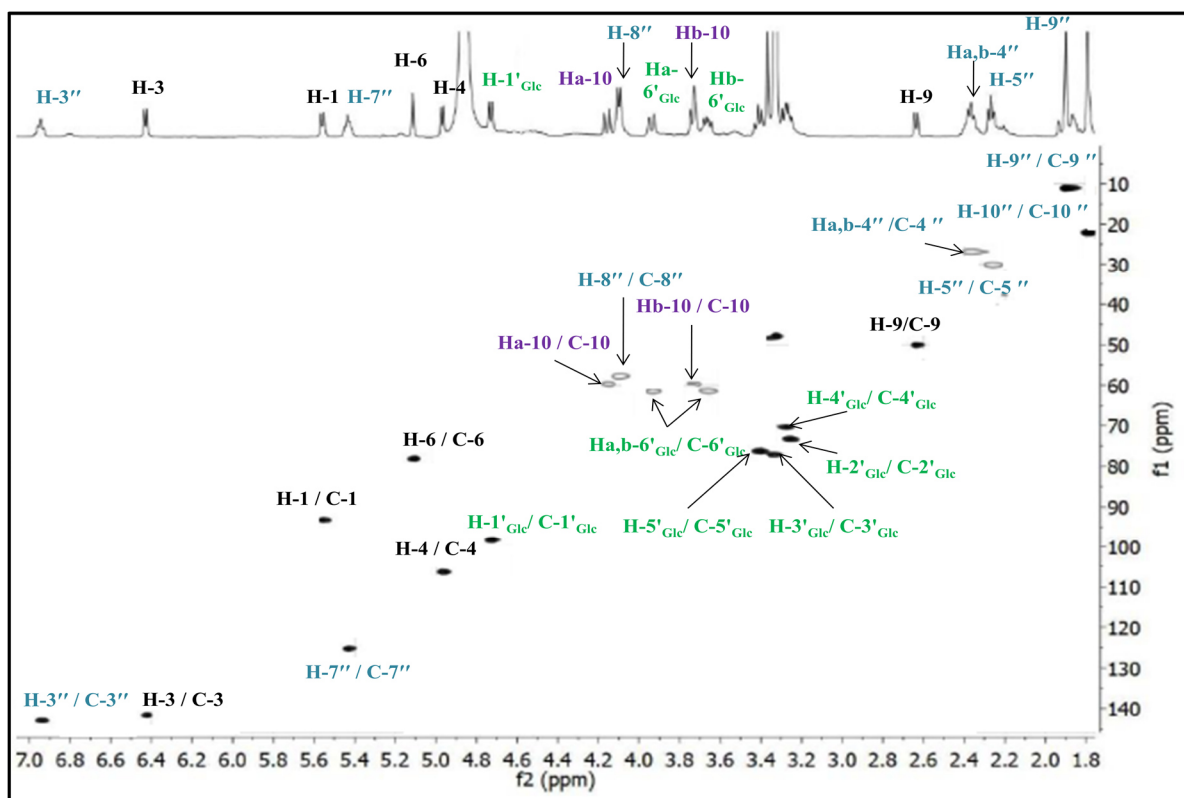


Figure III-93. Spectres HSQC du composé APD₂.

Le spectre HMBC (figure III-96 -III-98) met en évidence les corrélations du noyau macfadinoside entre :

- Le proton H-1 et des carbones résonants à δ_C 73.5 et 99.3 ppm, correspondant respectivement aux carbones C-5 et C-1'_{Glc}.
- Le proton H-3 et les carbones C-5, C-1 (δ_C 94.3 ppm) et C-4 (δ_C 107.3 ppm).
- Le proton H-4 corrèle avec les carbones C-3 (δ_C 142.6 ppm), C-5 et C-9 (δ_C 51.1 ppm).
- Les protons H_{a,b}-10 corrèlent avec les carbones C-6, C-7, C-8 et C-9.

L'expérience HMBC montre en plus, les corrélations repérées de la chaîne latérale comme suit :

- Les protons méthylènes montrent les corrélations suivantes :
 - H-4'' corrèle avec les carbones C-3'', C-2'' et C-6'';
 - H-5'' avec C-3'', C-6'' (δ_C 138.1 ppm), C-7'' et avec le carbone méthylénique C-10'';
 - H-8'' corrèle avec les carbones C-7'' et C-6''.
- Les protons oléfiniques montrent les corrélations suivantes :

- H-3'' corrèle avec C-9'' et C-1'' (δ_C 167.8 ppm), ce déplacement chimique confirme que le carbone C-1'' est un carbonyle ;
 - H-7'' corrèle avec les carbones C-10'' et C-5''.
- Les protons méthyléniques montrent les corrélations suivantes :
- H-9'' corrèle avec le carbone C-3'' et les carbones quaternaires C-2'' (δ_C 128.1 ppm) et C-1'';
 - H-10'' avec C-4'', C-7'', avec le carbone quaternaire C-6'' à δ_C 138.1 ppm.

Par ces corrélations, on permet de déduire la chaîne latérale reportée dans la figure III-94 comme étant le **foliamenthoïl** (Dawidar et al., 1989).

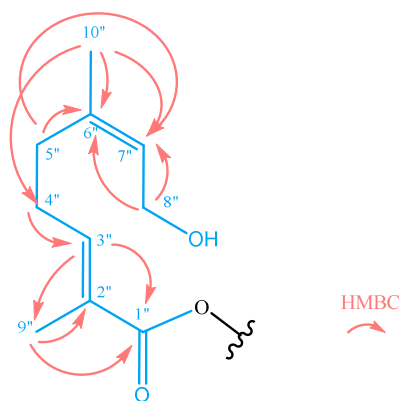


Figure III-94. Corrélations HMBC du groupement foliamenthoïl APD₂.

- La corrélation entre le proton H-6 et le carbonyle C-1'' du groupement foliamenthoïl confirme sa localisation sur le carbone C-6 (figure III-95).

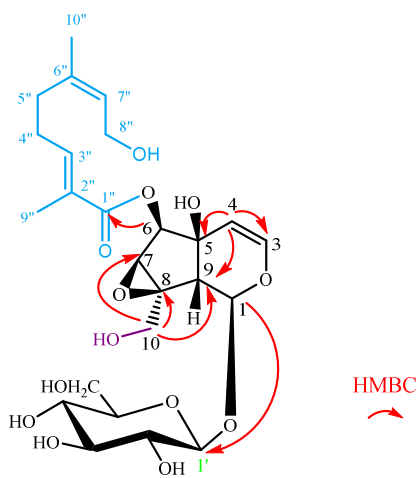


Figure III-95. Corrélations HMBC mettant en évidence la position du foliamenthoïl.

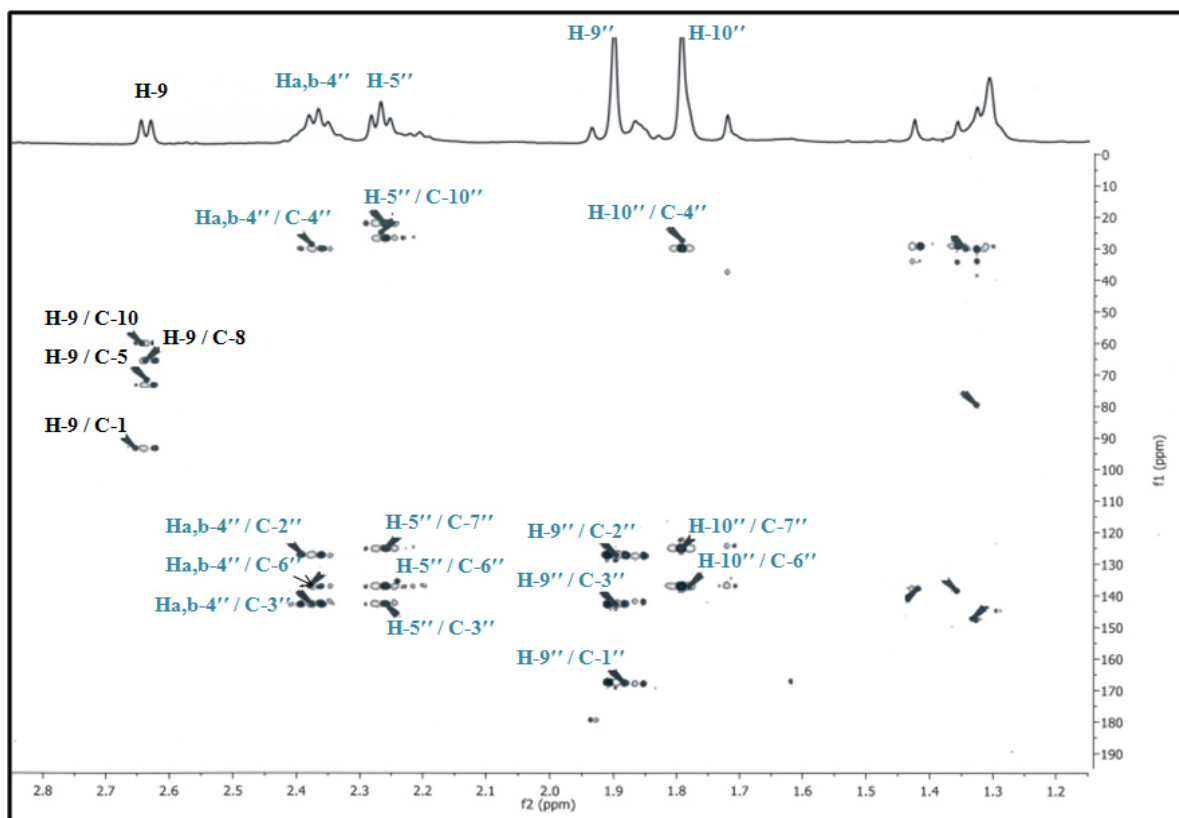


Figure III-96. Spectres HMBC étalés de δ_H 1.2 à 2.80 ppm du composé APD₂.

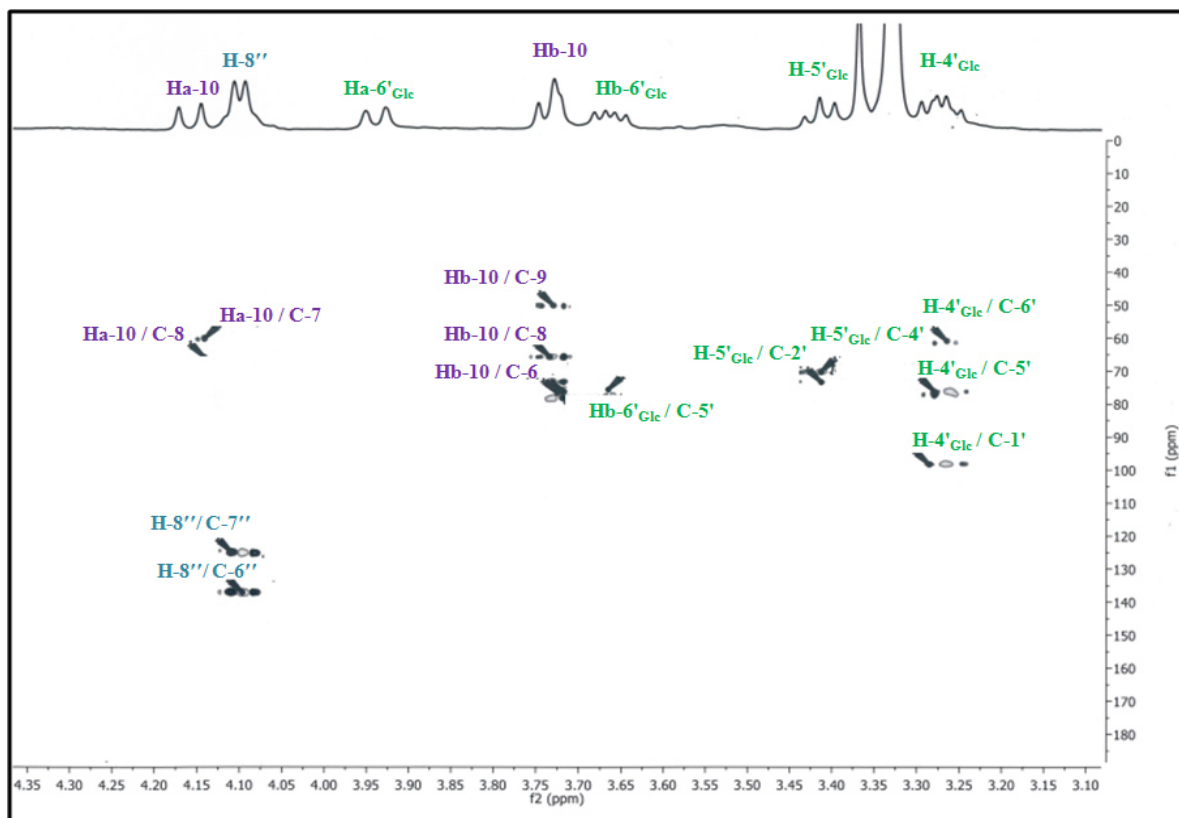


Figure III-97. Spectres HMBC étalés de δ_H 3.10 à 4.35 ppm du composé APD₂.

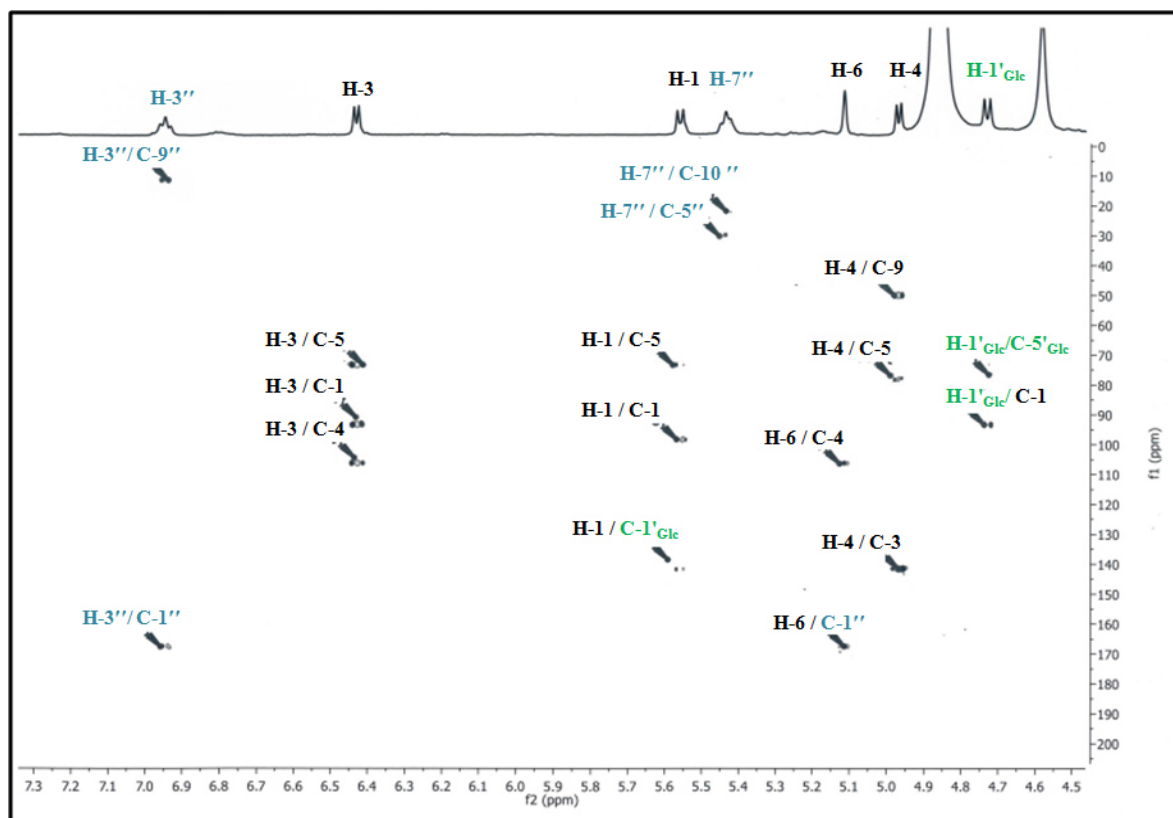
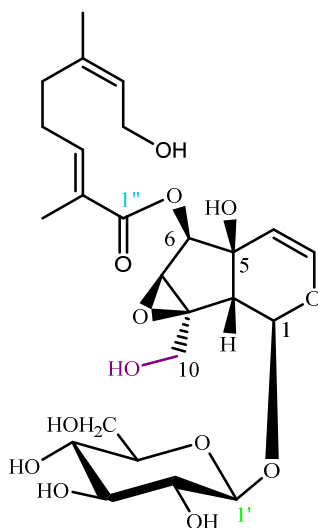


Figure III-98. Spectre HMBC étalé de δ_H 4.5 à 7.3 ppm du composé **APD₂**.

L'ensemble de ces données nous permet ainsi d'identifier le composé **APD₂** comme étant le **6-O-foliamenthoylmacfadienoside**, C'est un nouveau composé naturel. La mesure du pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{25} +25$ (c 0.1, MeOH).



APD₂ : 6-O-foliamenthoylmacfadienoside.

III.3.1.4. Détermination structurale du composé APD₃*Spectrométrie de masse :*

Le spectre de masse ESI-MS en mode positive (figure III-99) de ce composé présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 551.29 $[M+Na]^+$ correspondant à une formule brute en $C_{25}H_{36}O_{12}$. Le spectre MS/MS du pic moléculaire enregistré en mode positif, montre des fragmentations à m/z 388.94 $[M+Na-162]^+$ et 370.99 $[M+Na-162-18]^+$ correspondant à la perte d'un glucose et une molécule d'eau.

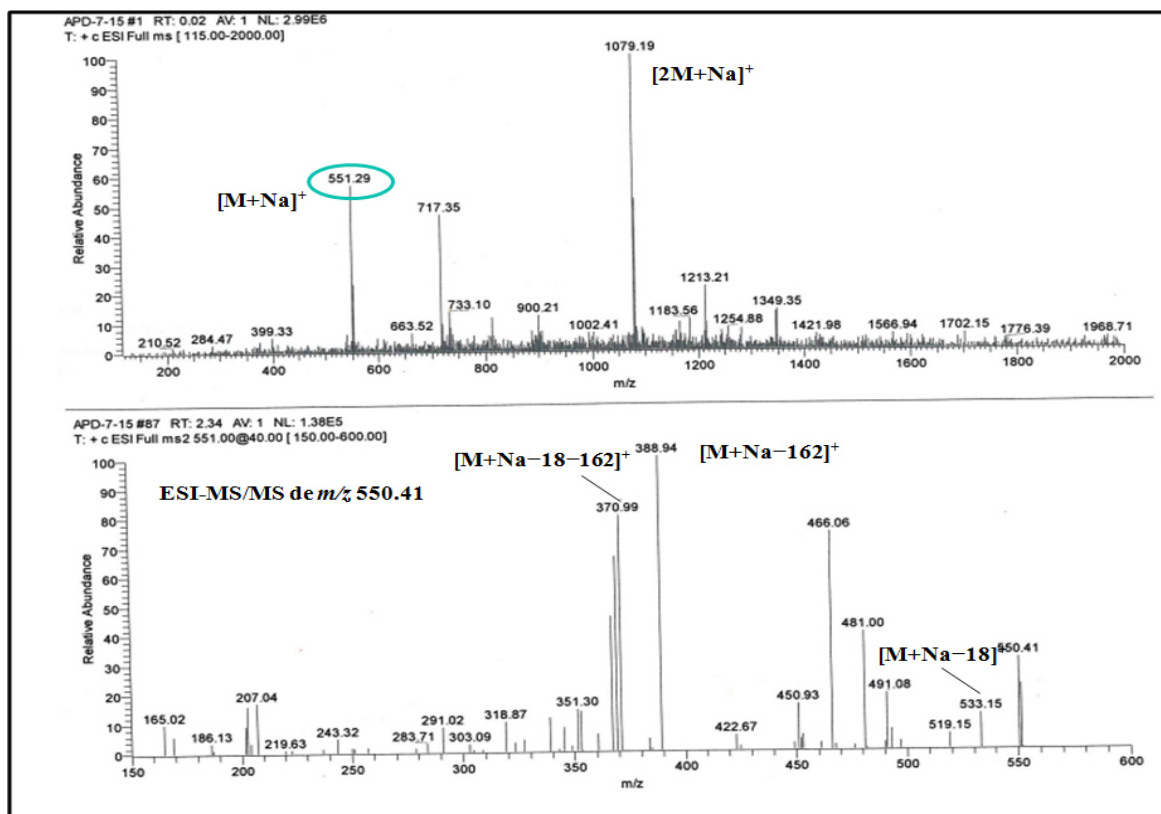


Figure III-99. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD₃.

Spectrométrie RMN :

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D (figure III-100- III-102) du composé APD₃, nous révèle une grande ressemblance avec ceux du composé 6-*O*-foliamenthoylmacfadienoside (APD₂) identifié précédemment avec l'absence du signal correspondant au CH_2-OH et la présence d'un singulet à δ_H 1.51 ppm attribuable au CH_3 pour le composé APD₃, ce qui nous oriente vers un noyau antirrinoside.

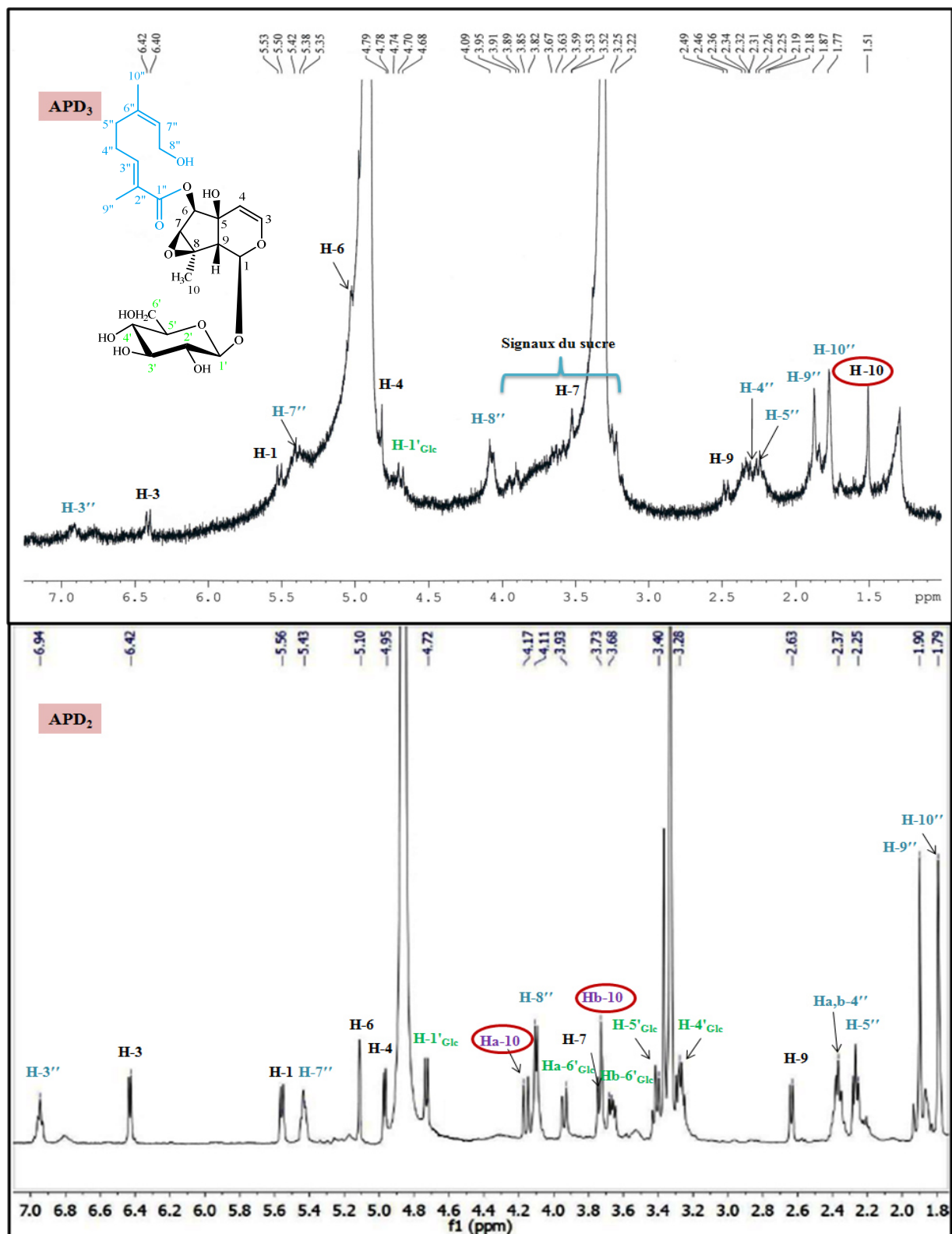
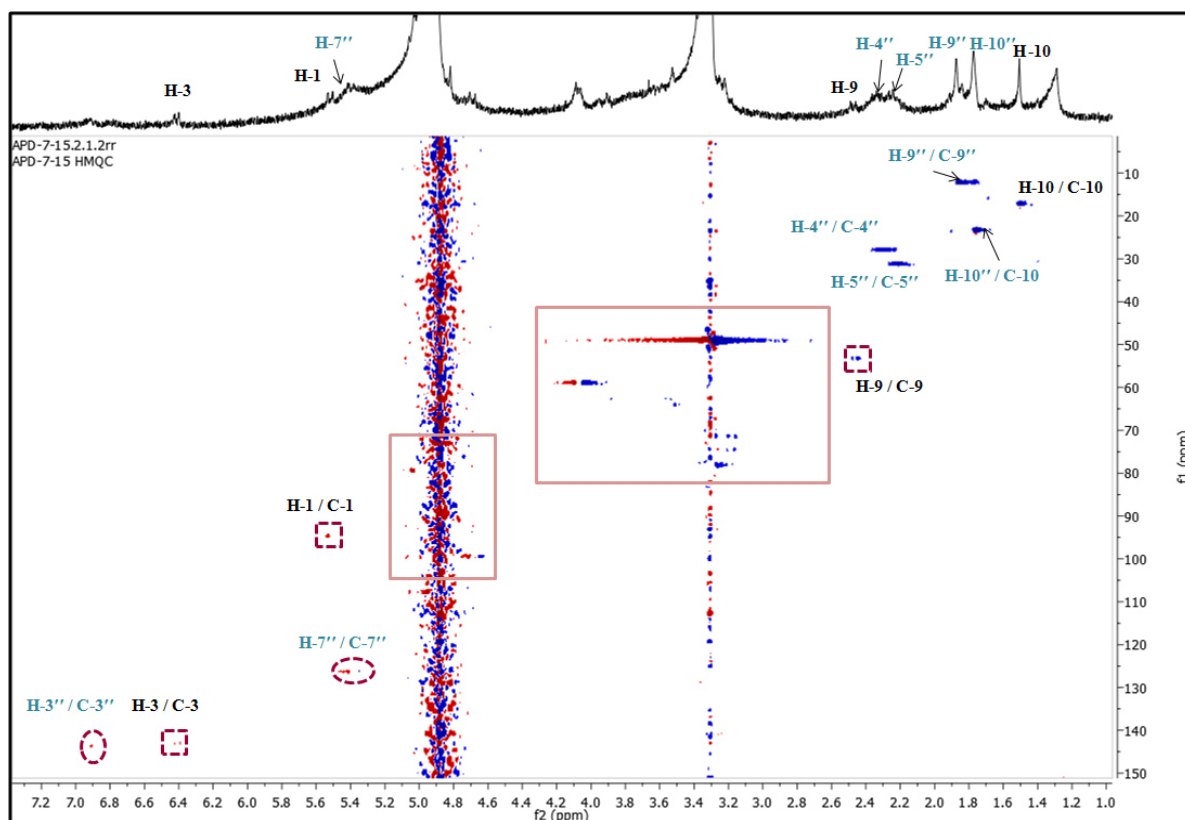
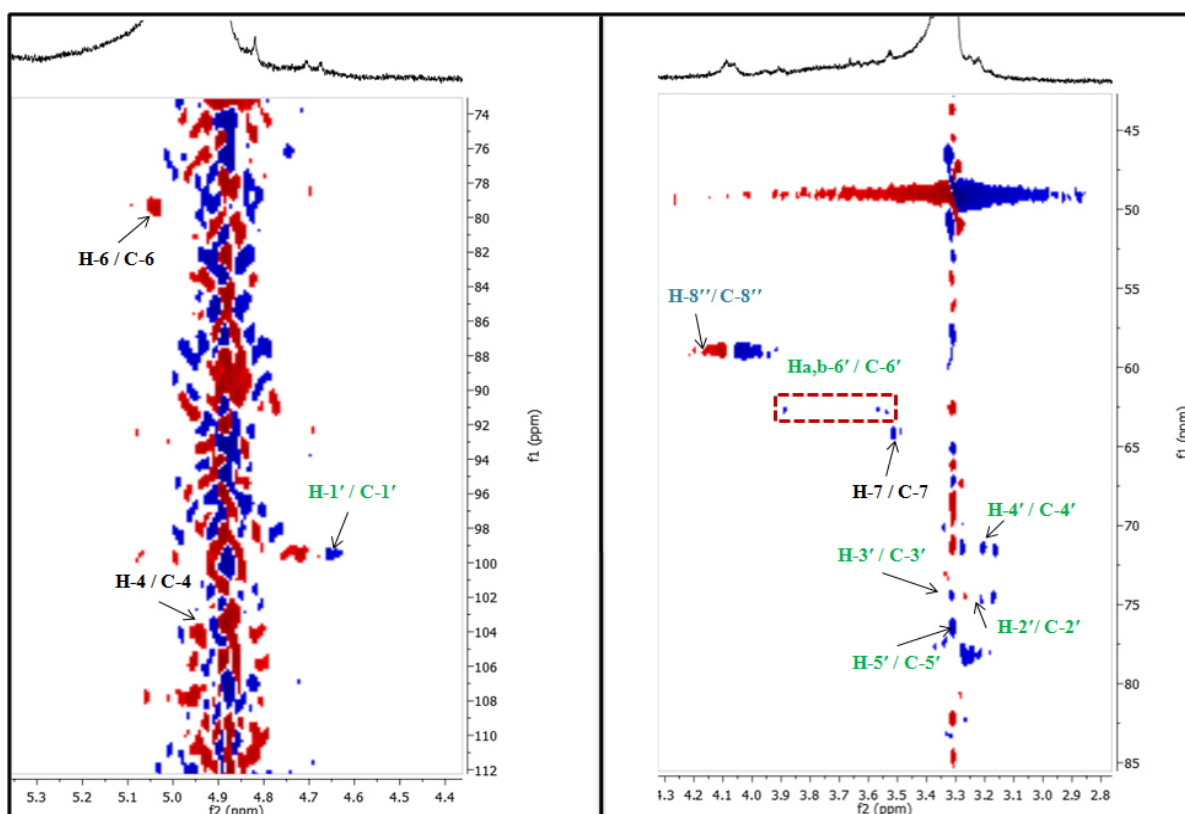
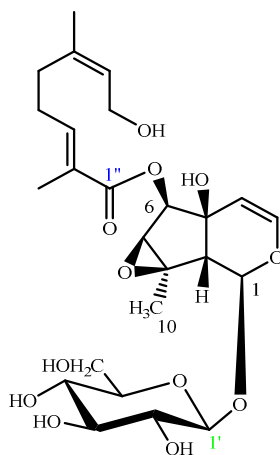


Figure III-100. Spectre de RMN ^1H du composé APD_3 comparé à celui du composé APD_2 .

Figure III-101. Spectre HSQC du composé APD₃.Figure III-102. Spectre HSQC étalé de δ_H 2.8 à 5.3 ppm du composé APD₃.

La structure du composé **APD₃** a pu être établie comme étant : **6-*O*-nerol-8-oyl-antirrinoside**. Il a été isolé des parties aériennes de *Anarrhinum orientale* (Dawidar et al., 1989).



APD₃ : 6-*O*-nerol-8-oyl-antirrinoside.

III.3.1.5. Détermination structurale du composé APD₄

Spectrométrie de masse :

La formule moléculaire brute C₃₅H₅₁O₁₅ du composé **APD₄** a été déduite à partir du spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS en mode positif (figure III-103). Il donne un pic pseudo-moléculaire à m/z 711.3229 [M+H]⁺.

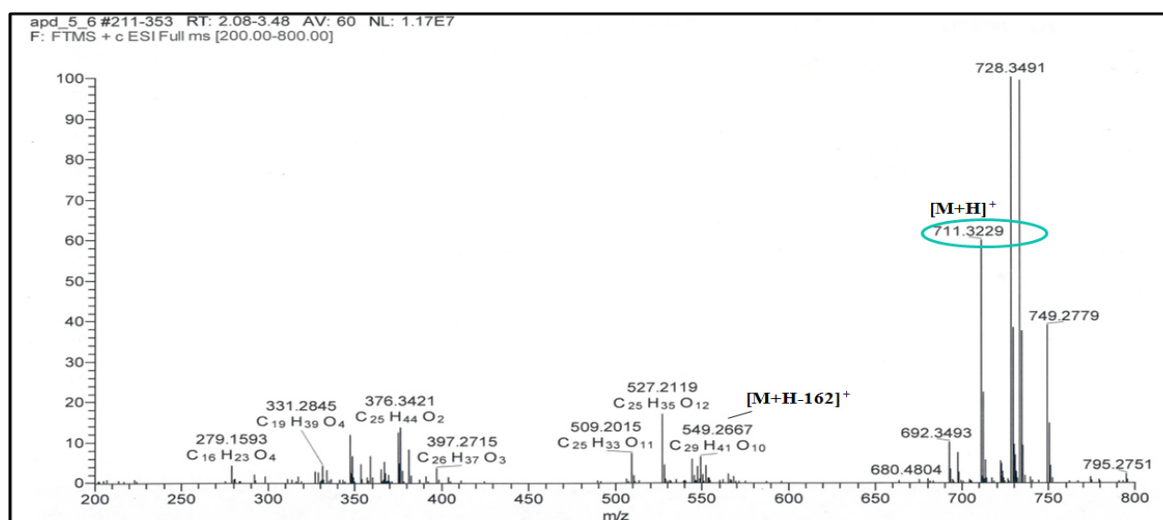


Figure III-103. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé **APD₄**.

Spectrométrie RMN :

Les spectres RMN ^1H (figure III-104), ^{13}C (figure III-105), HSQC (figure III-106) et HMBC (figure III-108- III-109) du composé **APD₄** présentent une forte similitude avec les spectres du composé 6-*O*-foliamenthoylmacfadienoside (**APD₂**). La différence notable consiste en l'apparition des nouveaux signaux d'un deuxième groupement foliamenthoyl. En effet, on observe :

- Deux protons oléfiniques dont un sous forme de triplet à $\delta_{\text{H}} 6.71 / \delta_{\text{C}} 143.4$ ppm ($J = 6.9$ Hz), et le deuxième de doublet à $\delta_{\text{H}} 5.44 / \delta_{\text{C}} 125.2$ ppm ($J = 7.7$ Hz), attribuables respectivement aux H-3''' et H-7'''.
- Trois groupements méthylènes résonnant comme suit :
 - Un doublet à $\delta_{\text{H}} 4.06 / \delta_{\text{C}} 58.6$ ppm.
 - Un multiplet à $\delta_{\text{H}} 2.33 / \delta_{\text{C}} 26.4$ ppm attribué au H-4'''.
 - Un multiplet à $\delta_{\text{H}} 2.22 / \delta_{\text{C}} 30.8$ ppm correspondant au H-5'''.
- Deux groupements méthyles sous forme d'un singulet d'intégration 3H :
 - Un à $\delta_{\text{H}} 1.78 / \delta_{\text{C}} 22.8$ ppm (CH₃-10'''), dans le déplacement chimique et déblindé par une liaison éthylénique.
 - Le deuxième à $\delta_{\text{H}} 1.81 / \delta_{\text{C}} 11.6$ ppm (CH₃-9'''), déblindé par une liaison éthylénique et un groupement attracteur d'électron qui est le carbonyle C-1''' ($\delta_{\text{C}} 167.8$ ppm).
- Trois carbones quaternaires C-1''', C2''' et C-6''' résonnant respectivement à $\delta_{\text{C}} 167.8$, 128.4 et 138.6 ppm.

Le déblindage du carbone C-5 ($\delta_{\text{C}} 80.5$ ppm) comparativement au déplacement chimique ($\delta_{\text{C}} 73.3$ ppm) du même carbone enregistré pour le composé **APD₂**, illustre bien l'absence d'un hydroxyle libre dans cette position ce qui indique la substitution du deuxième groupement foliamenthoyl en C-5.

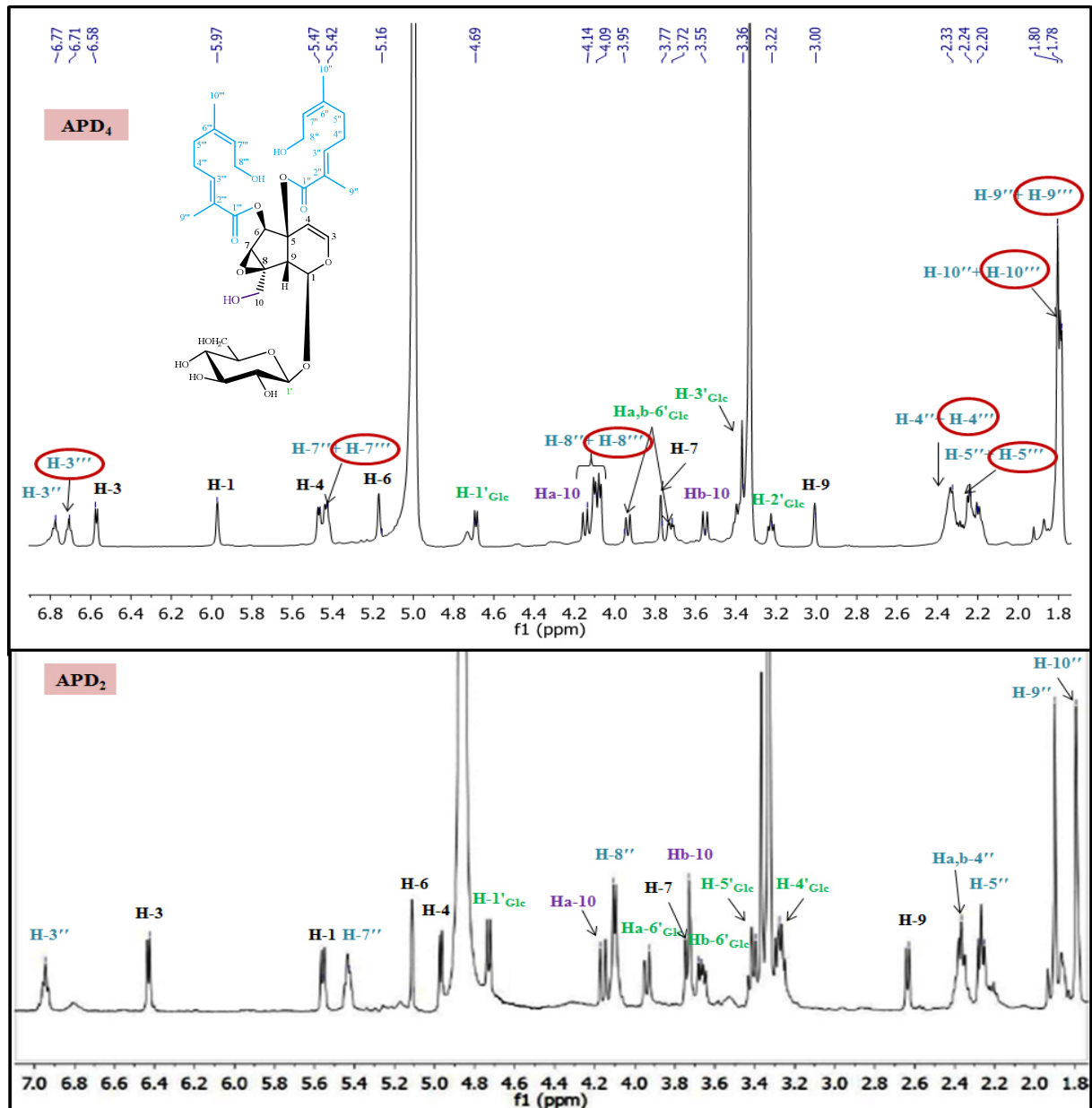


Figure III-104. Spectre de RMN ^1H du composé **APD₄** comparé à celui du composé **APD₂**.

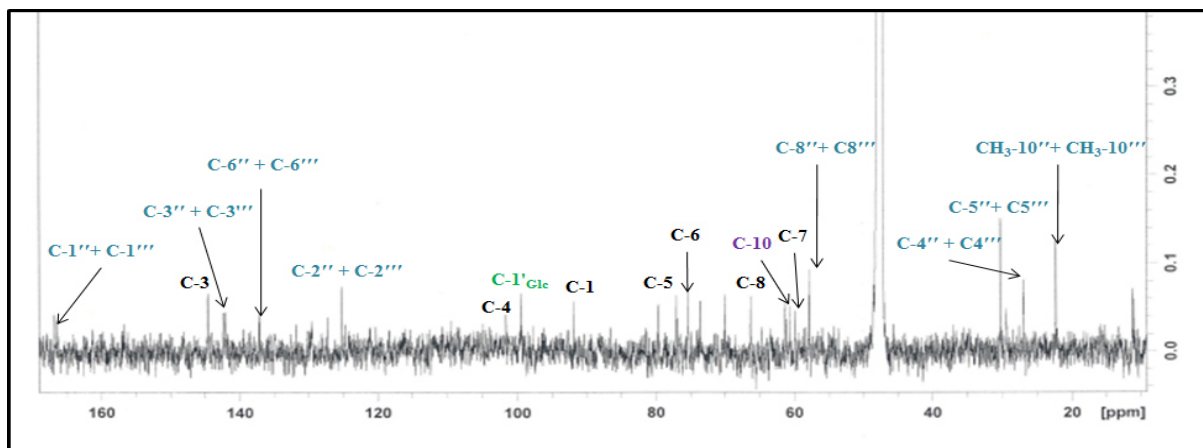
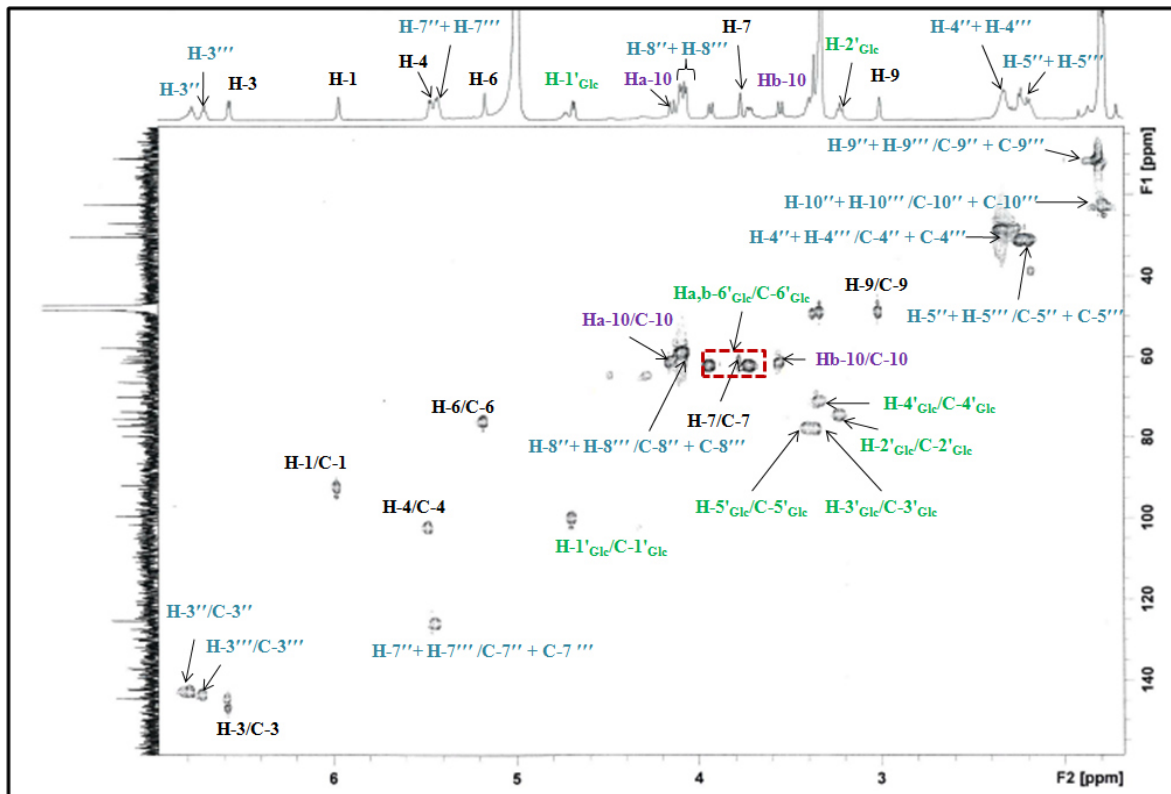
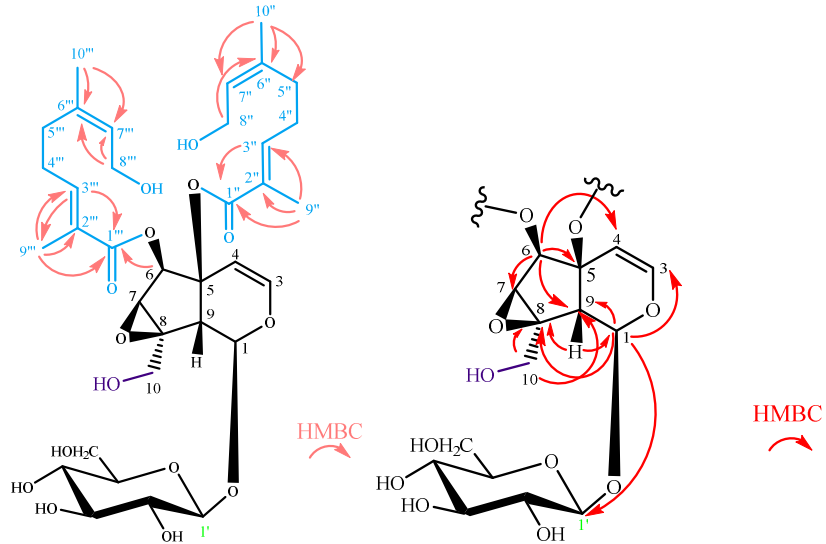
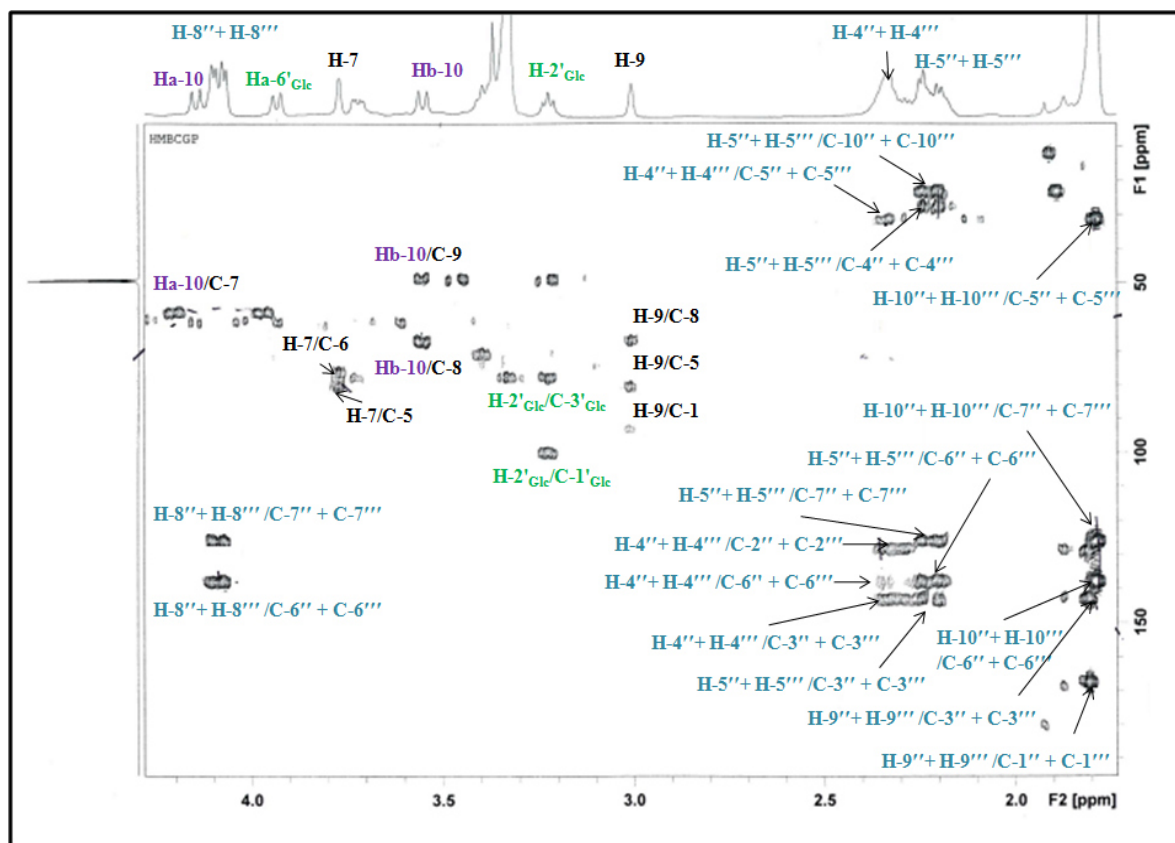
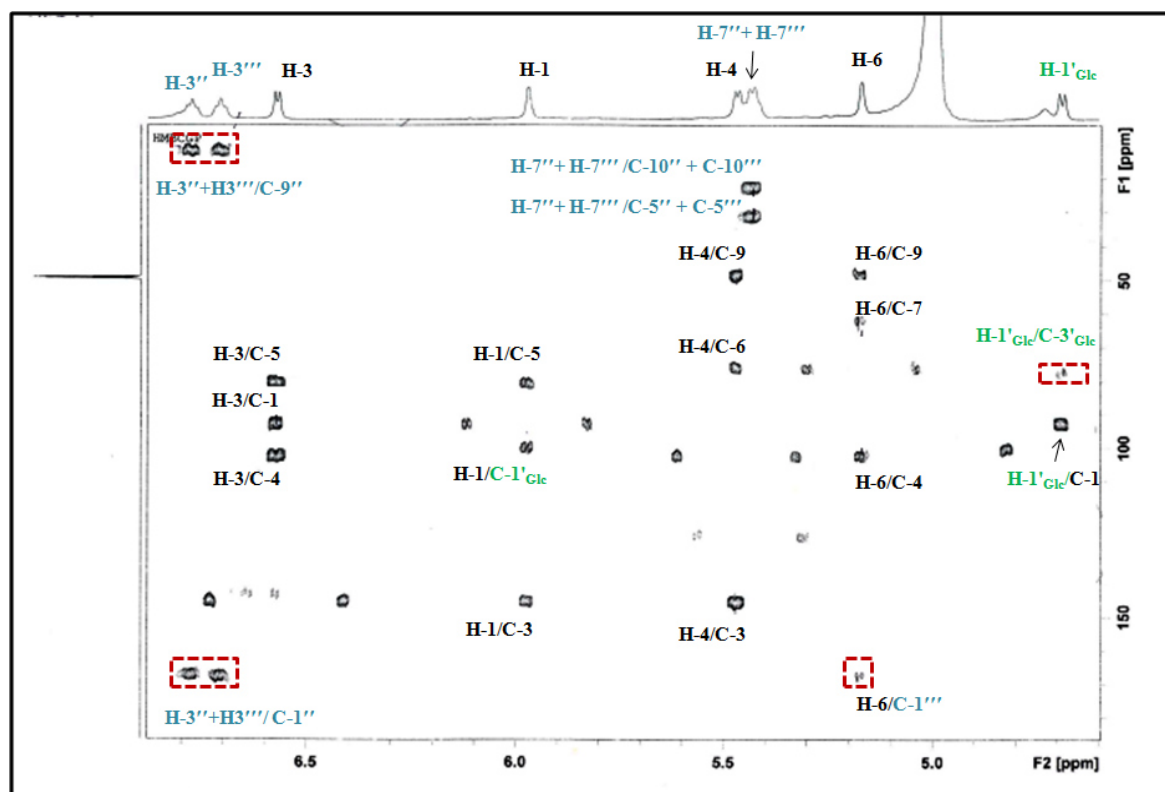
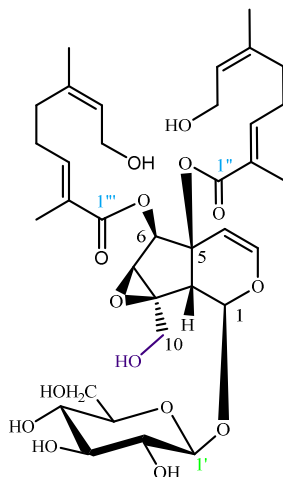


Figure III-105. Spectre de RMN ^{13}C du composé **APD₄**.

Figure III-106. Spectres de HSQC du composé APD₄.Figure III-107. Corrélations HMBC du composé APD₄.

Figure III-108. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.80 à 4.3 ppm du composé APD₄.Figure III-109. Spectre de HMBC étalé de δ_H 4.70 à 6.80 ppm du composé APD₄.

Toutes ces données spectrales ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} +41$, c 0.1, MeOH) permettent d'établir sans ambiguïté la structure du composé **APD₄** le **5,6-O-difoliamenthoylmacfadienoside**, isolé pour la première fois.



APD₄ : 5,6-O-difoliamenthoylmacfadienoside.

III.3.1.6. Détermination structurale du composé APD₅

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS enregistrés en mode positif (figure III-110), montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 717.3090 $[M+Na]^+$ (calc 717.3098) et un pic d'ion protoné à m/z 695.3278, correspondant à une masse moléculaire égale à 694 *uma*, suggérant une formule brute $C_{35}H_{50}O_{14}$. En plus du pic de l'ion moléculaire, nous observons la présence d'autres fragments importants à m/z 699 $[M+Na-18]^+$ et 551 $[M+Na-166]^+$, indiquant la perte d'une molécule d'eau et groupement foliamenthoyl.

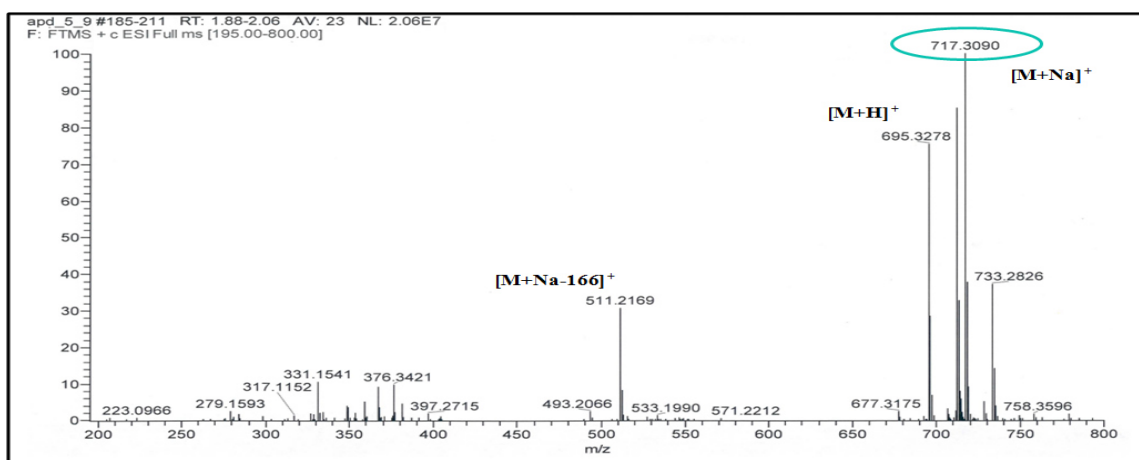


Figure III-110. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé **APD₅**.

Spectrométrie RMN :

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D (figure III-111- III-117) du composé **APD₅** présente les mêmes signaux du composé 5,6-*O*-difoliamenthoylmacfadienoside (**APD₄**) avec l'absence du groupement CH₂-OH (en position 10) et la présence d'un CH₃-10, ce qui indique d'un noyau antirrinoside.

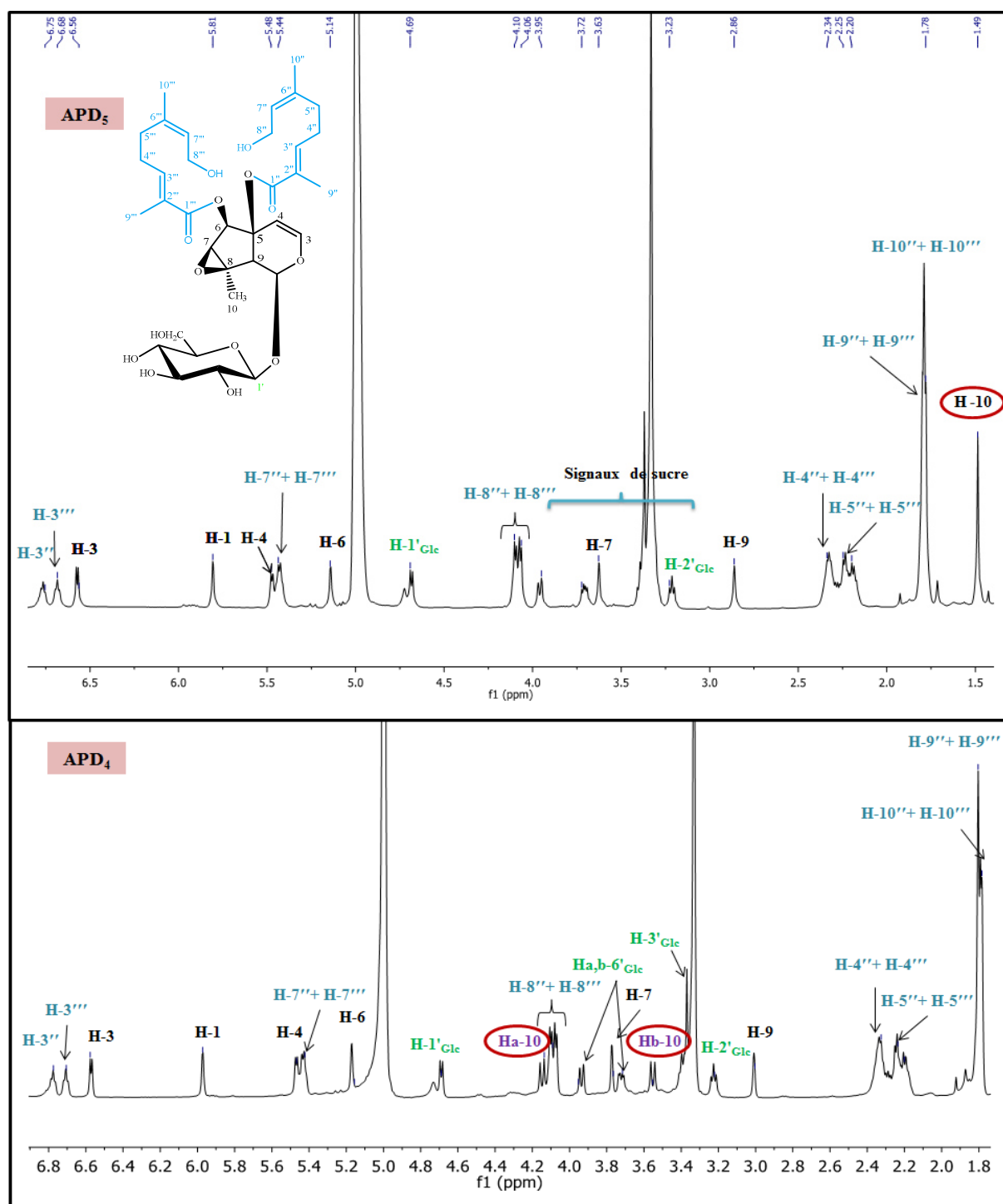
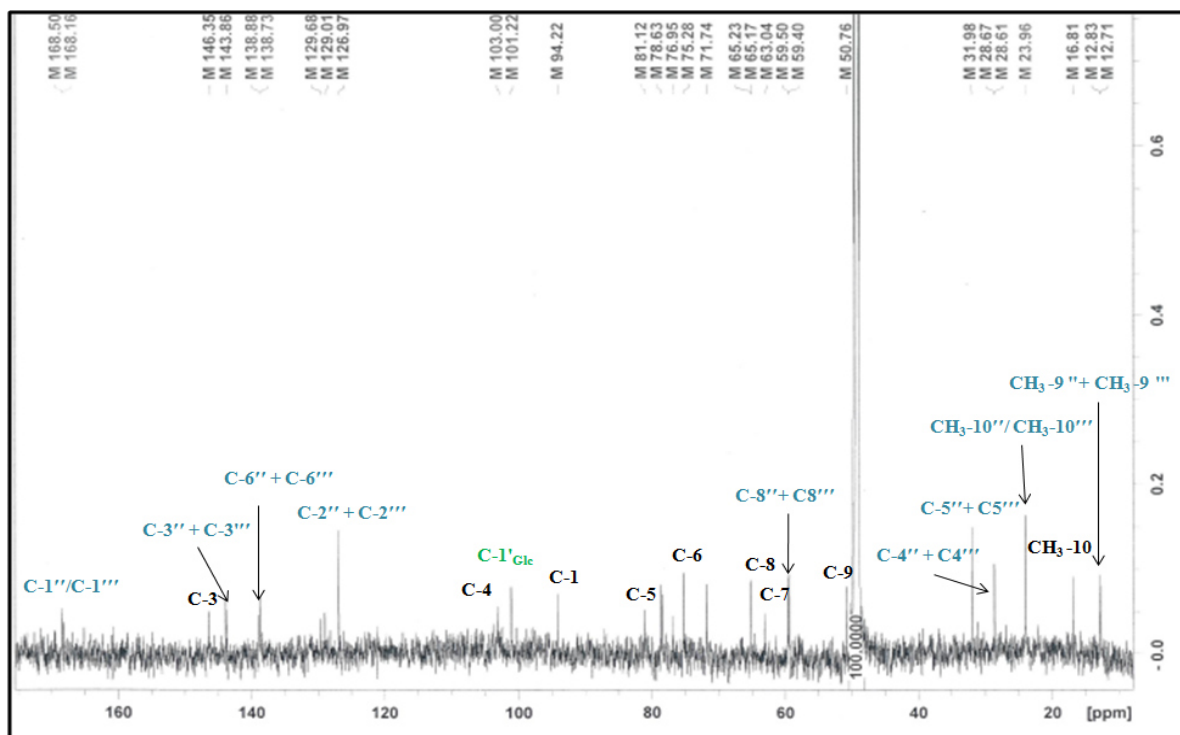
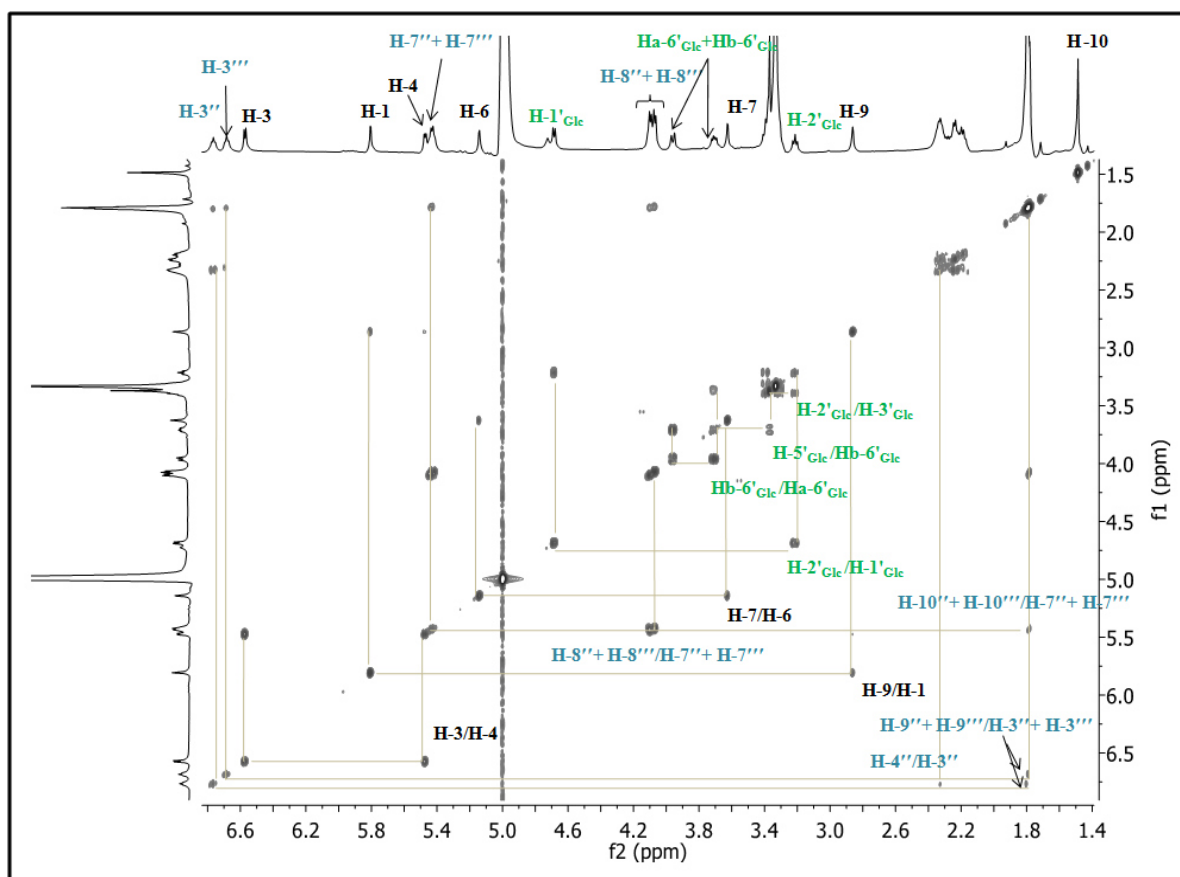
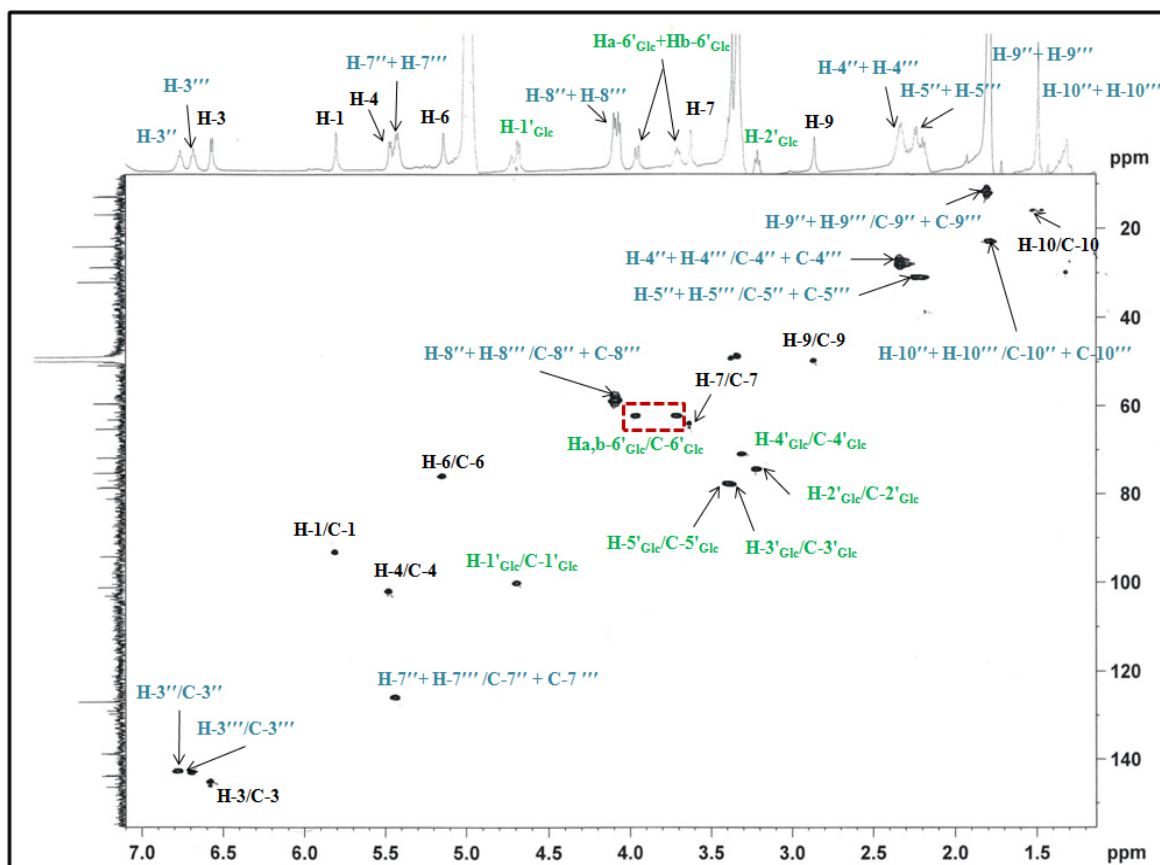
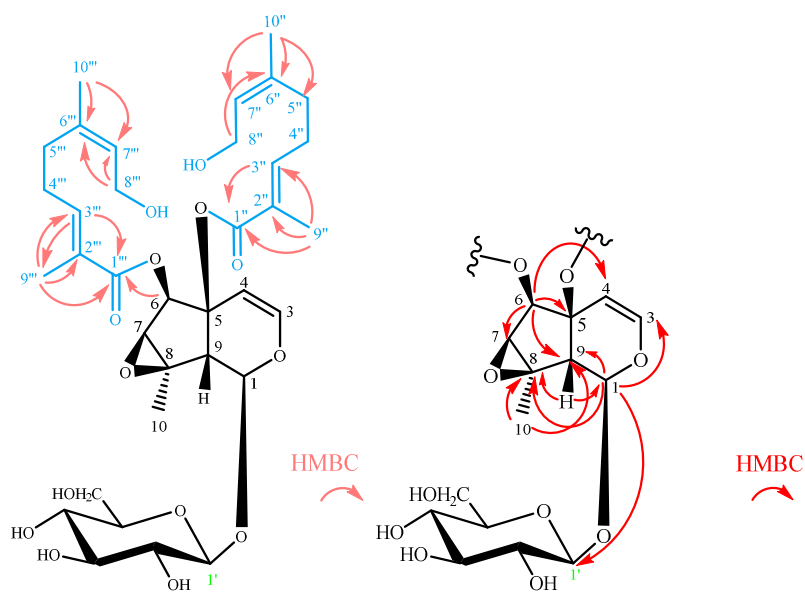


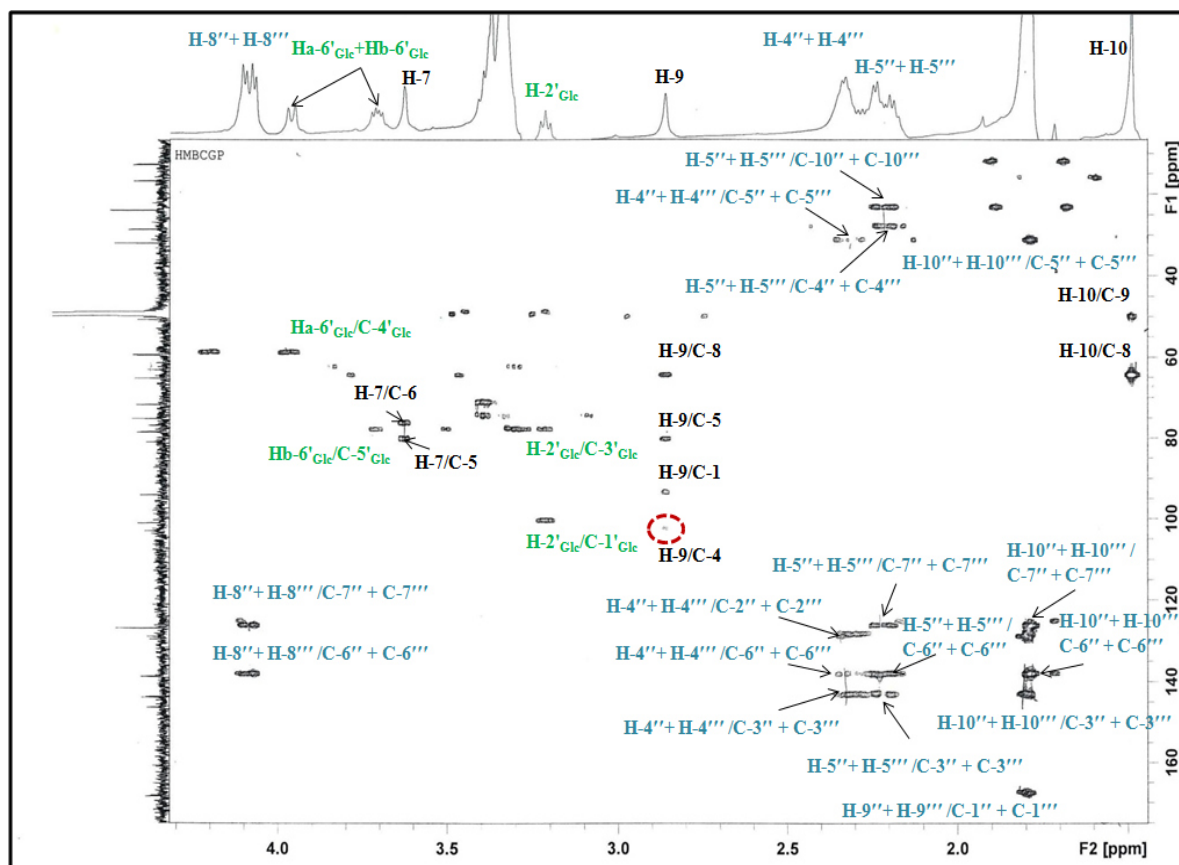
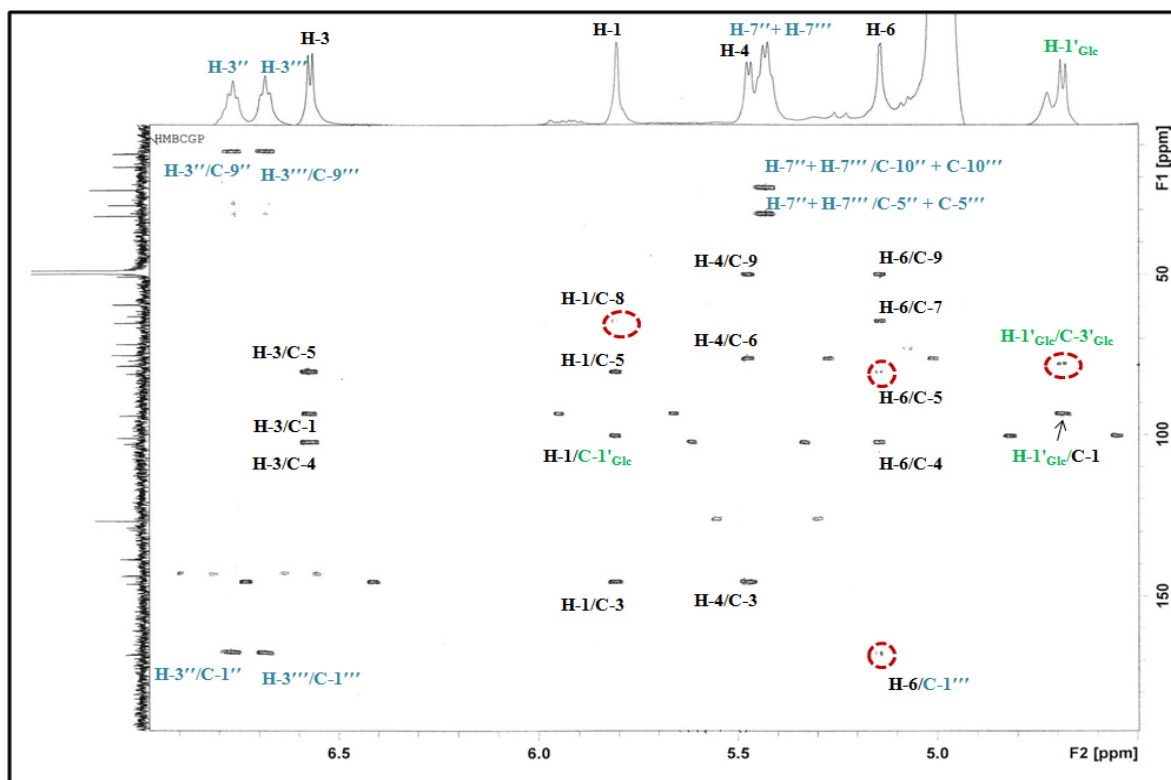
Figure III-111. Spectre de RMN ¹H du composé **APD₅** comparé à celui du composé **APD₄**.

Figure III-112. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD₅.Figure III-113. Spectre de COSY du composé APD₅.

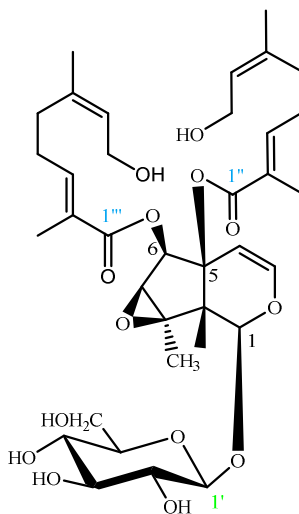
Figure III-114. Spectre HSQC du composé APD₅.

Sur les spectres HMBC (figure III-116- III-117) du produit APD₅, on révèle les mêmes taches de corrélations observées avec le composé APD₄.

Figure III-115. Corrélations HMBC du composé APD₅.

Figure III-116. Spectre de HMBC de δ_H 1.80 à 4.5 ppm du composé APD₅.Figure III-117. Spectre de HMBC de δ_H 4.5 à 7.0 ppm du composé APD₅.

L'ensemble des données nous permet d'identifier la structure d'APD₅ comme **5,6-*O*-difoliamenthoylantirinoside**. La valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25} -70$ (c 0.1, MeOH), c'est un iridoïde naturel nouvellement isolé et décrit.



APD₅ : 5,6-*O*-difoliamenthoylantirinoside.

III.3.1.7. Détermination structurale du composé APD₆

Spectrométrie de masse :

APD₆ présente une formule moléculaire en C₃₅H₅₀O₁₄. Cette formule est déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS obtenu en mode positif qui présente un pic pour l'ion pseudo-moléculaire à m/z 717.3083 [M+Na]⁺ (calc 717.3098) (figure III-118), soit une masse moléculaire égale à 694 *uma*. Deux fragments importants sont également observés à m/z 533.1976 [M+Na-184]⁺ et 349.0883 [M+Na-184-184]⁺, correspondant à l'élimination subséquente de deux chaînes ester C₁₀.

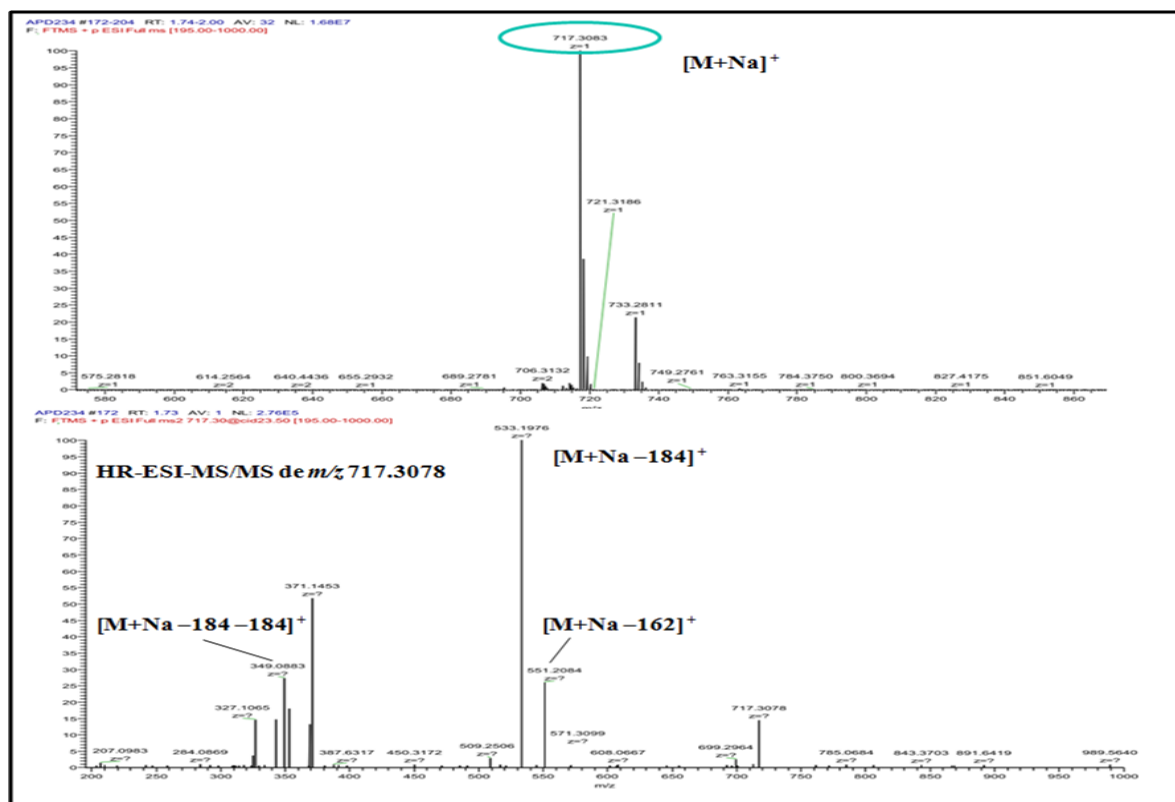


Figure III-118. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₆.

Spectrométrie RMN :

Les spectres RMN ¹H (figure III-119) et HSQC (figure III-121) du composé APD₆ présente de fortes similitudes avec celui du composé 5,6-*O*-difoliamenthoylantirinoside (APD₅), sauf les signaux correspondant au groupement foliamenthoyl situé en C-5 montrent des changements en position C-6'' et C-8''. En effet, on observe :

- Quatre protons oléfiniques dont :
 - Un sous forme de triplet à δ_H 6.71 / δ_C 144.3 ppm ($J = 7.3$ Hz), attribuable au H-3''.
 - Doublet deboulet à δ_H 5.93/ δ_C 145.5 ppm ($J = 16.9, 12.0$ Hz), attribuable au H-7'';
 - Deux doublets à δ_H 5.07 et 5.27 / δ_C 112.1 ppm qui peuvent être attribué respectivement aux protons H_b-8'' et H_a-8''.
- Deux groupements méthylènes résonnant comme suit :
 - Un multiplet à δ_H 2.23 / δ_C 24.1 ppm attribué au H₂-4''.
 - Un triplet à δ_H 1.59 / δ_C 41.5 ppm ($J = 8.2$ Hz) correspondant a H₂-5''.
- Deux groupements méthyles sous forme d'un singulet d'intégration 3H :

- Un à δ_H 1.80 / δ_C 12.0 ppm (CH_3 -9''), déblindé par un groupement attracteur d'électron qui est le carbonyle C-1'' (δ_C 166.0 ppm).
- Le deuxième à δ_H 1.29 / δ_C 27.4 ppm (CH_3 -10''), dans le déplacement chimique est déblindé par un groupement OH.

L'ensemble de ces signaux confirme la présence d'un deuxième groupement C10 ester.

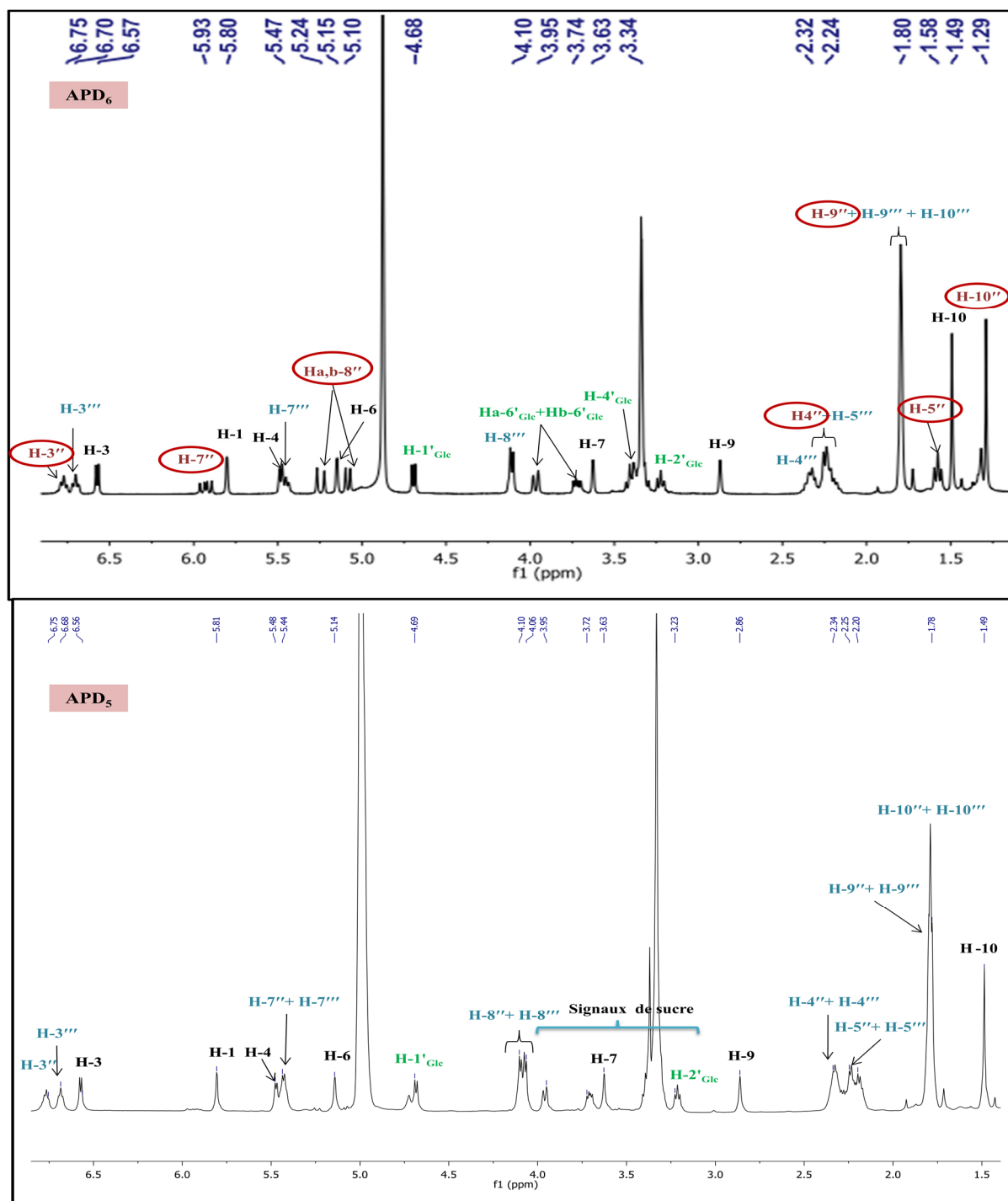


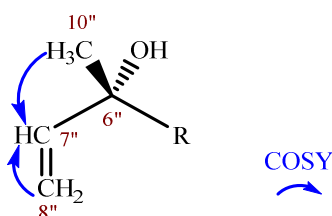
Figure III-119. Spectre de RMN 1H du composé APD₆ comparé à celui du composé APD₅.

Le spectre COSY (figure III-120) du composé **APD₆** montre les mêmes corrélations du spectre COSY (figure III-113) d'antirrinoside et le groupement foliamenthoyl en position C-6 déjà décrit (**APD₅**) et (**APD₂**).

De plus, L'examen du spectre COSY de ce composé, montre aussi des corrélations de la deuxième chaîne latérale ester entre :

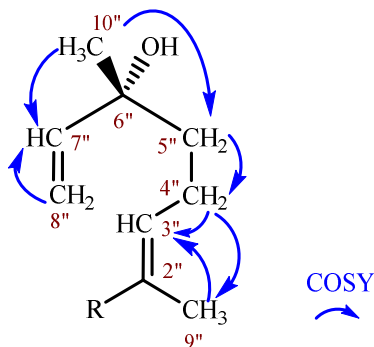
- Le méthyle blindé résonnant à δ_H 1.29 (CH₃-10'') qui est lié à un hydroxyle corrèle avec le proton oléfinique H-7'' résonnant à δ_H 5.93 ppm
- Le proton H-7'' corrèle avec les protons H_b-8'' et H_a-8'' (δ_H 5.07 et 5.27 ppm) suggère que ces deux atomes de carbones sont voisins.

Toutes ces observations ont permis de confirmer l'existence d'un méthylidène en C-8''



Ce même spectre montre des taches de corrélations entre :

- Les protons méthyléniques CH₃-9'' (δ_H 1.80 ppm) et un CH-3'' oléfinique à δ_H 6.71 ppm.
- Les protons des deux groupements CH₂-5'' et CH₂-4'' (δ_H 1.59 et 2.23 ppm) corrélient avec le méthyle (CH₃-9''), suggérant la présence d'une unité isoprène.
- Les protons du groupement méthyle CH₃-10'' (δ_H 1.29) corrélient avec le CH₂-5'' ce qui se permet de proposer la structure du deuxième groupement ester.



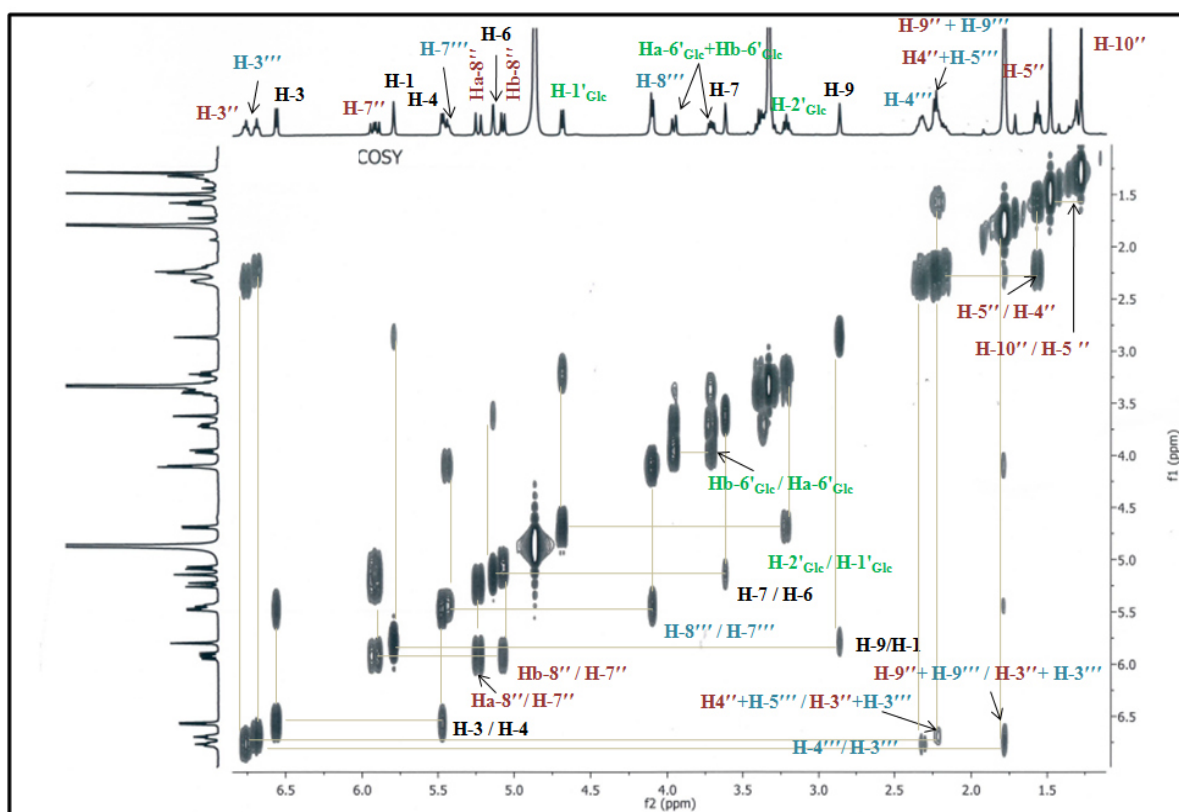


Figure III-120. Spectre de COSY du composé APD₆.

L'expérience HSQC (figure III-121) permet de mettre en évidence les corrélations directes C-H du composé APD₅. Par ailleurs, ce spectre HSQC montre les corrélations C-H du deuxième groupement ester C10 entre :

- Les protons oléfiniques H-7'', H-3'', H_a-8'' et H_b-8'' et leurs carbones résonant respectivement à δ_C 145.0, 144.4 et 112.1 ppm.
- Les protons méthylènes H-4'' et H-5'' et leurs carbones résonant respectivement à δ_C 24.0 et 41.5 ppm.
- Les protons méthyléniques H-9'' et H-10'' et leur carbones résonant respectivement à δ_C 12.0 et 27.4 ppm.

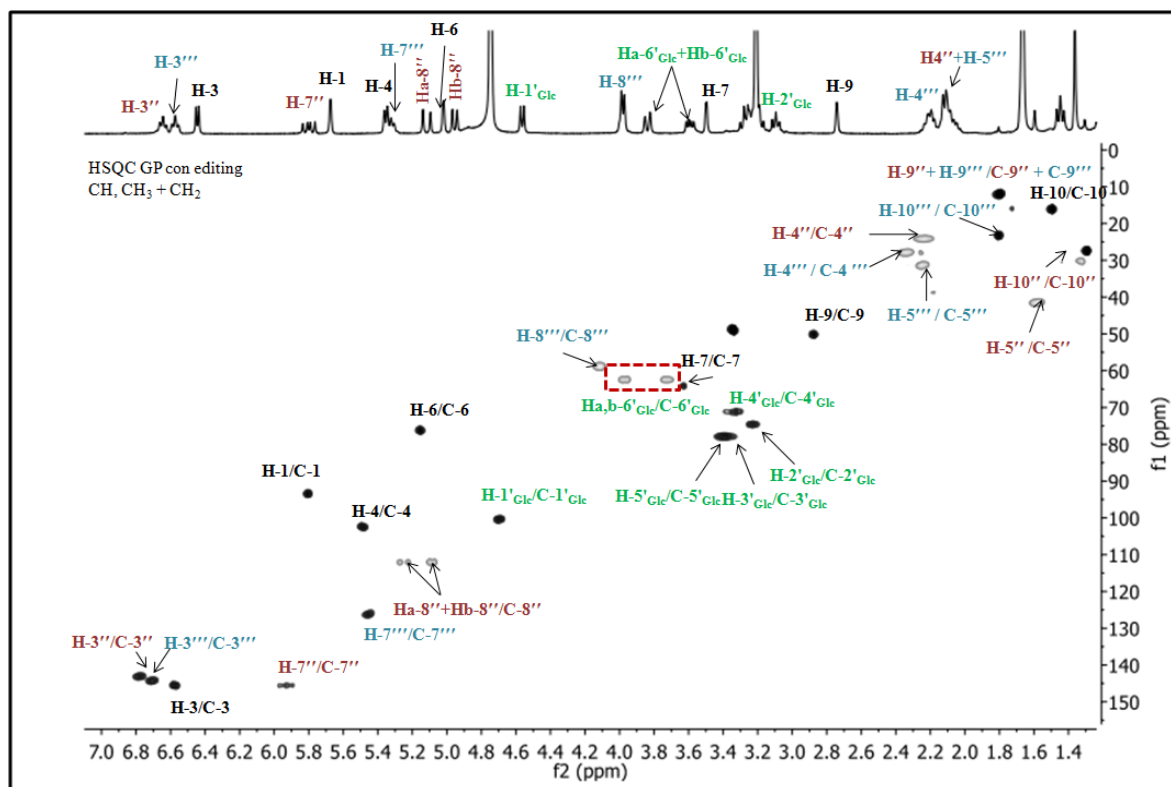


Figure III-121. Spectre HSQC du composé APD₆.

L'analyse des spectres HMBC (figure III-124- III-125) révèle des corrélations similaires avec le composé APD₅ en plus les corrélations intermoléculaires des atomes du deuxième groupement ester C10 :

- Les protons méthylènes montrent les corrélations suivantes :
 - H-4'' corrèle avec les carbones C-2'' et C-3'' ;
 - H-5'' avec C-3'', C-4'', C-6'' et avec le carbone méthylénique C-10'';
- Les protons oléfiniques montrent les corrélations entre :
 - Les protons H_a-8'' et H_b-8'' corrèle avec les carbones C-6'' et C-7'' ;
 - Le proton H-3'' corrèle avec C-9'' et un carbonyle C-1'' (δ_c 166.0 ppm) ;
 - Le proton H-7'' corrèle avec le carbone C-6''.
- Les protons méthyléniques montrent les corrélations suivantes :
 - H-9'' corrèle avec le carbone C-3'', C-4'', C-5'' et le carbone quaternaire C-2'' (δ_c 127.2 ppm);
 - H-10'' avec C-5'', C-7'' et avec le carbone quaternaire C-6'' à δ_c 72.1 ppm.

Ces corrélations, permet de déduire la chaîne latérale reportée dans la figure III-122 comme étant le **menthiafoloyl** situé au carbone C-5.

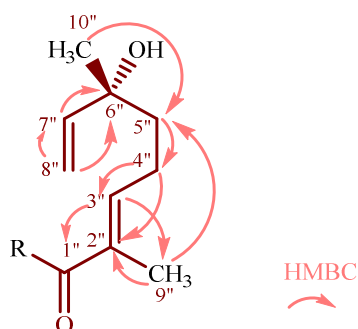


Figure III-122. Groupement menthiafolyl faisant partie du composé APD₆.

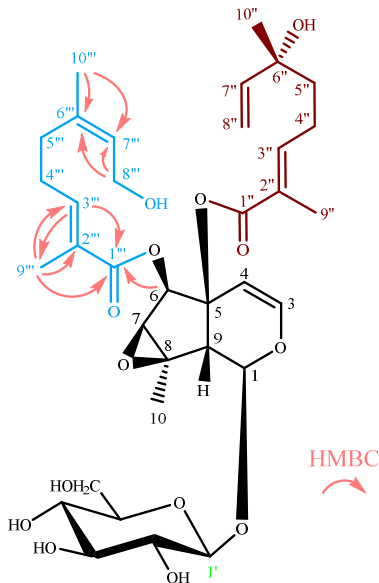


Figure III-123. Corrélations HMBC du composé APD₆.

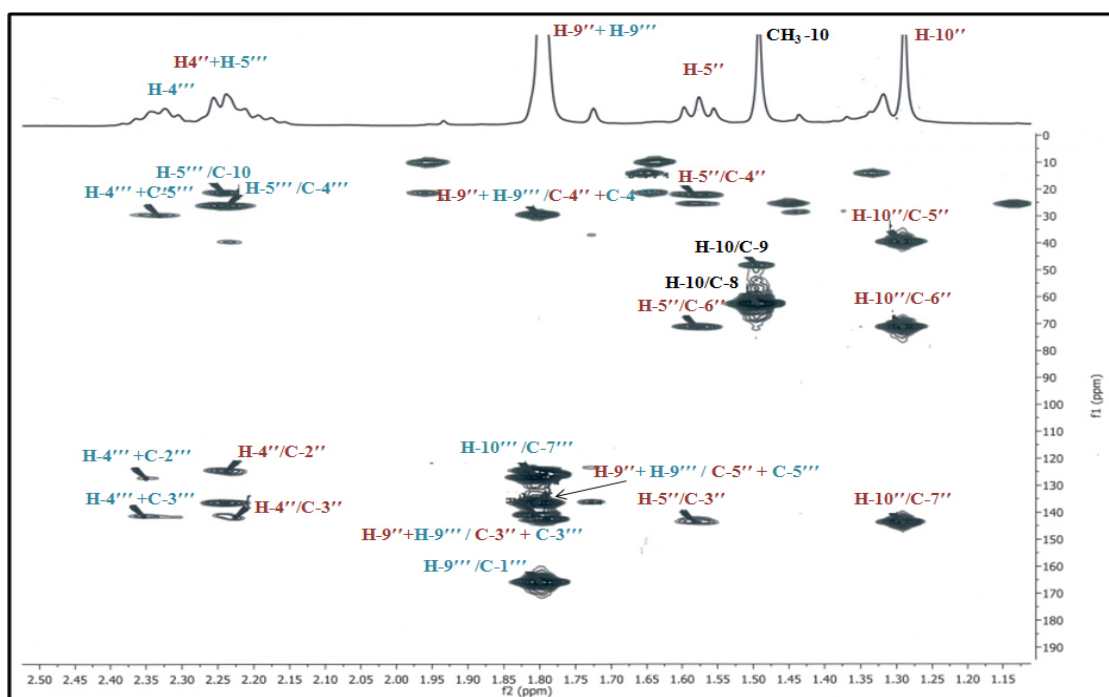


Figure III-124. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.15 à 2.50 ppm du composé APD₆.

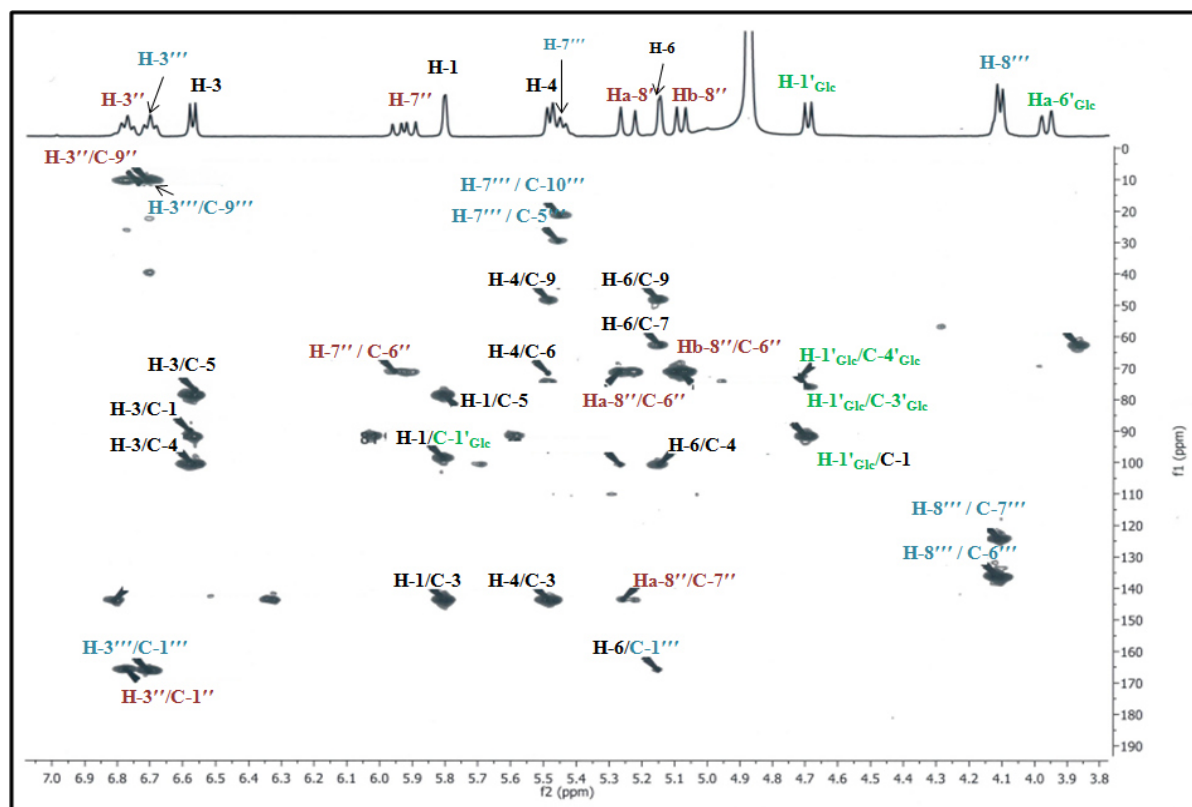
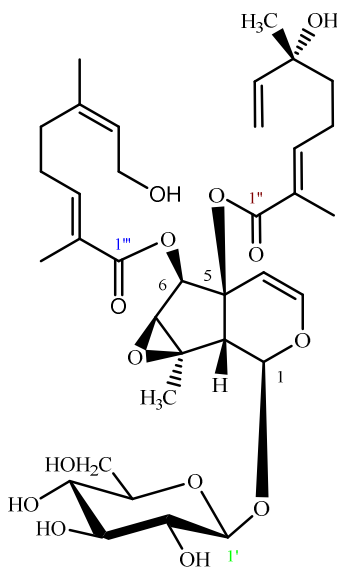


Figure III-125. Spectre de HMBC étalé de δ_H 3.80 à 7.0 ppm du composé **APD₆**.

Sur la base de tous ce qui précède, ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25}$ -45 , c 0.1, MeOH), la structure du composé **APD₆** a été établie comme étant le **5-O-menthiafoloyl-6-O-foliamenthoylantirrinoside**. C'est également un composé nouveau.



APD₆ : 5-O-menthiafoloyl-6-O-foliamenthoylantirrinoside.

III.3.1.8. Détermination structurale du composé **APD₇**

Spectrométrie de masse :

Sur le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure III-126), enregistré en mode positif, nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 733.3040 $[M+Na]^+$ (calc 733.3047), soit une masse moléculaire égale à 710 *uma*, suggérant une formule brute en $C_{35}H_{50}O_{15}$. Un ion-fragment observé à m/z 549.1961 $[M+Na-184]^+$ similaire à celui des composés présents **APD₄** et **APD₆**.

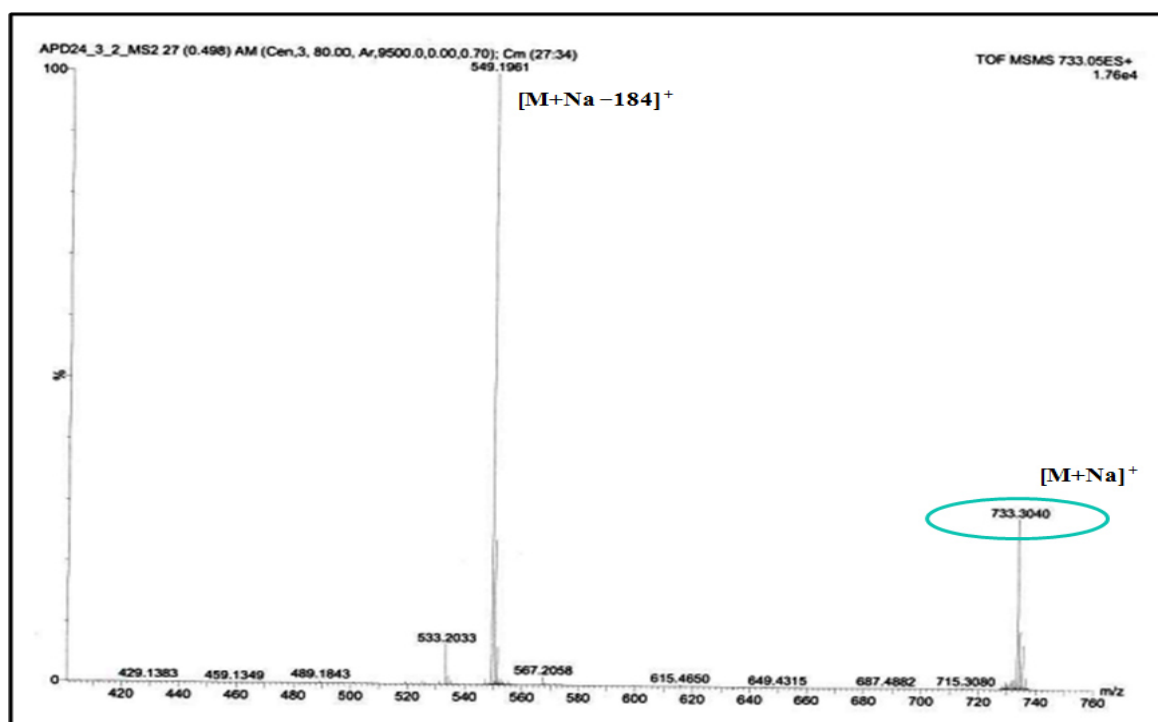


Figure III-126. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé **APD₇**.

Les spectres de RMN 1D et 2D (figure III-127 à III-131) du composé **APD₇** montrent une forte ressemblance avec ceux du composé 5-*O*-menthiafoloyl-6-*O*-foliamenthoylantirrinoside (**APD₆**) identifié précédemment. La seule différence est notée au niveau du carbone C-10, par l'absence du signal CH_3 -10 et la présence de deux signaux sous forme de doublet résonant à δ_H 3.56 (H_b -10) et 4.14 (H_a -10) ppm ($J = 13.0$ Hz) d'un groupement CH_2 -OH, caractéristiques du noyau macfadinoside.

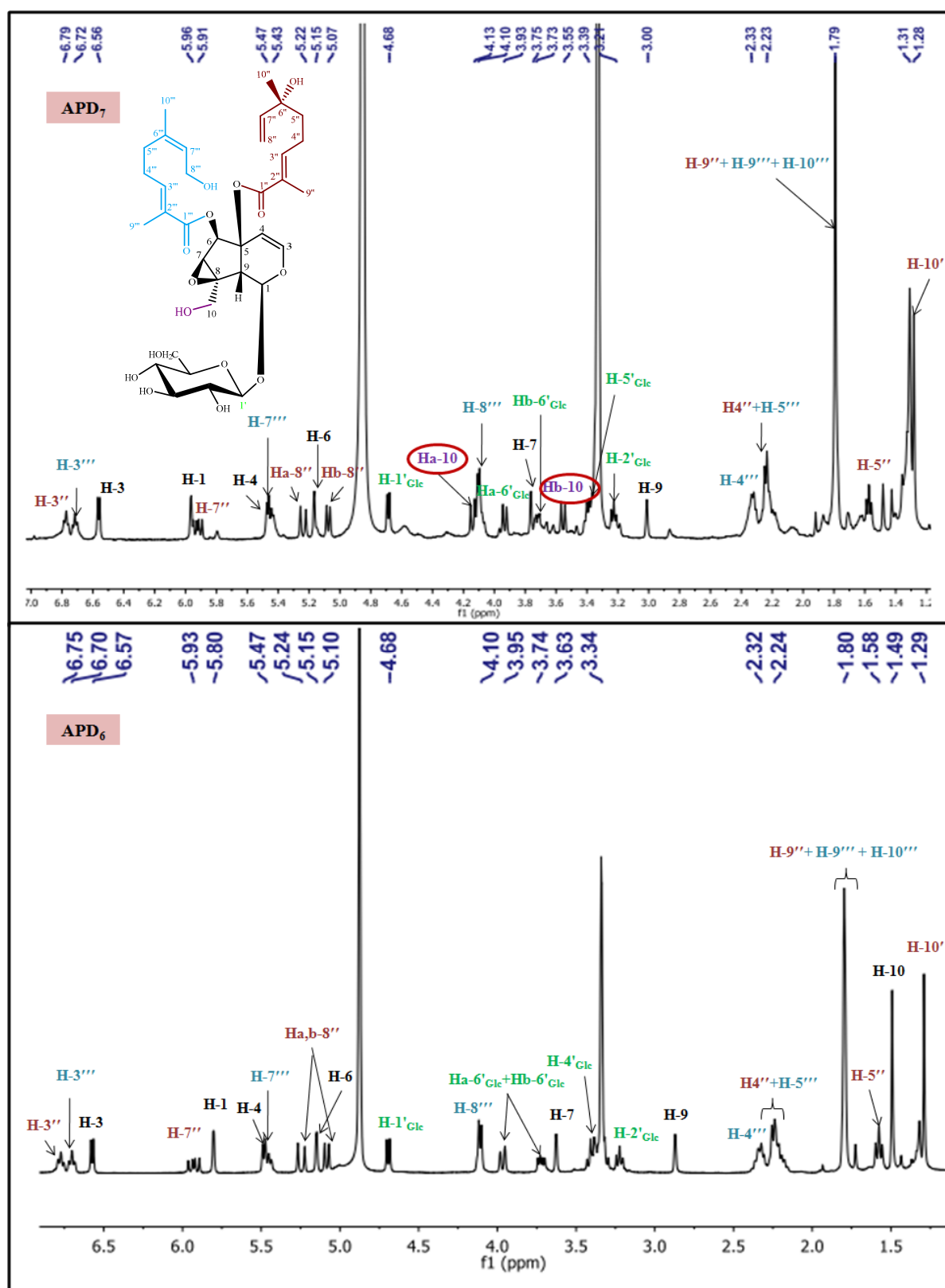
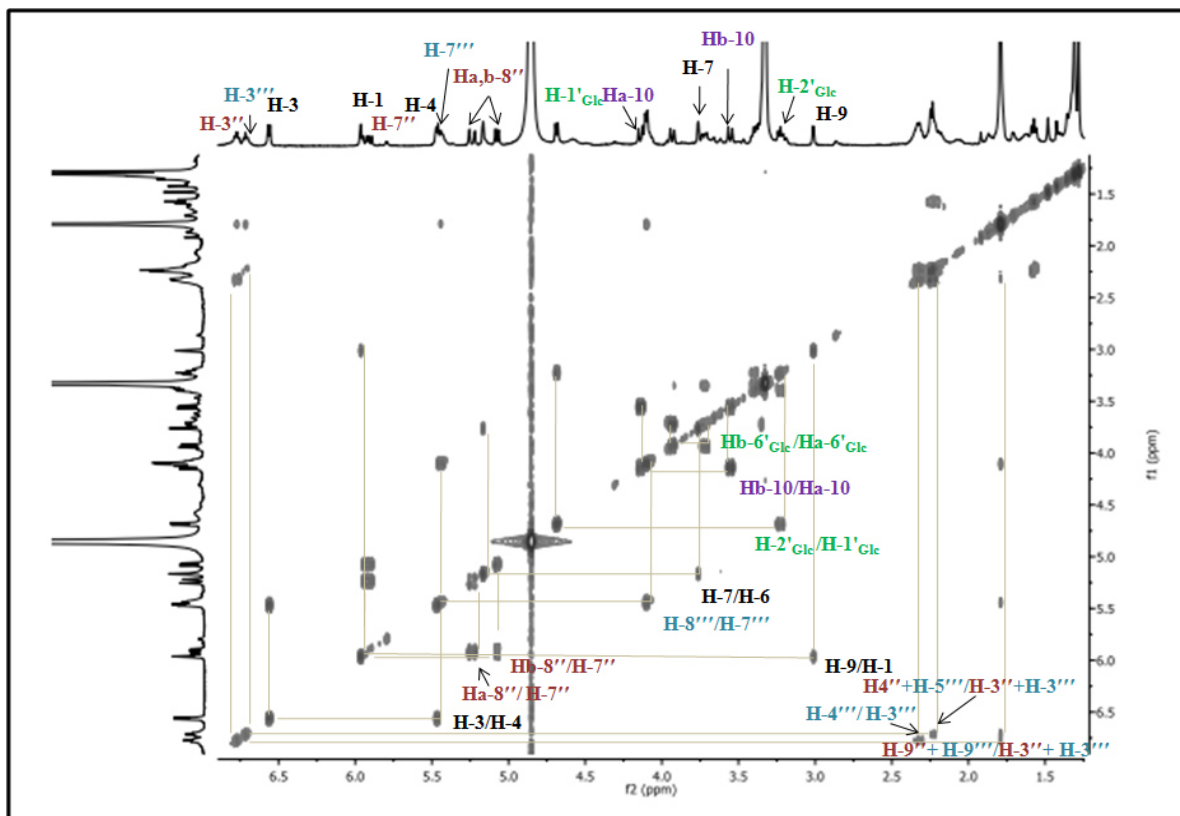
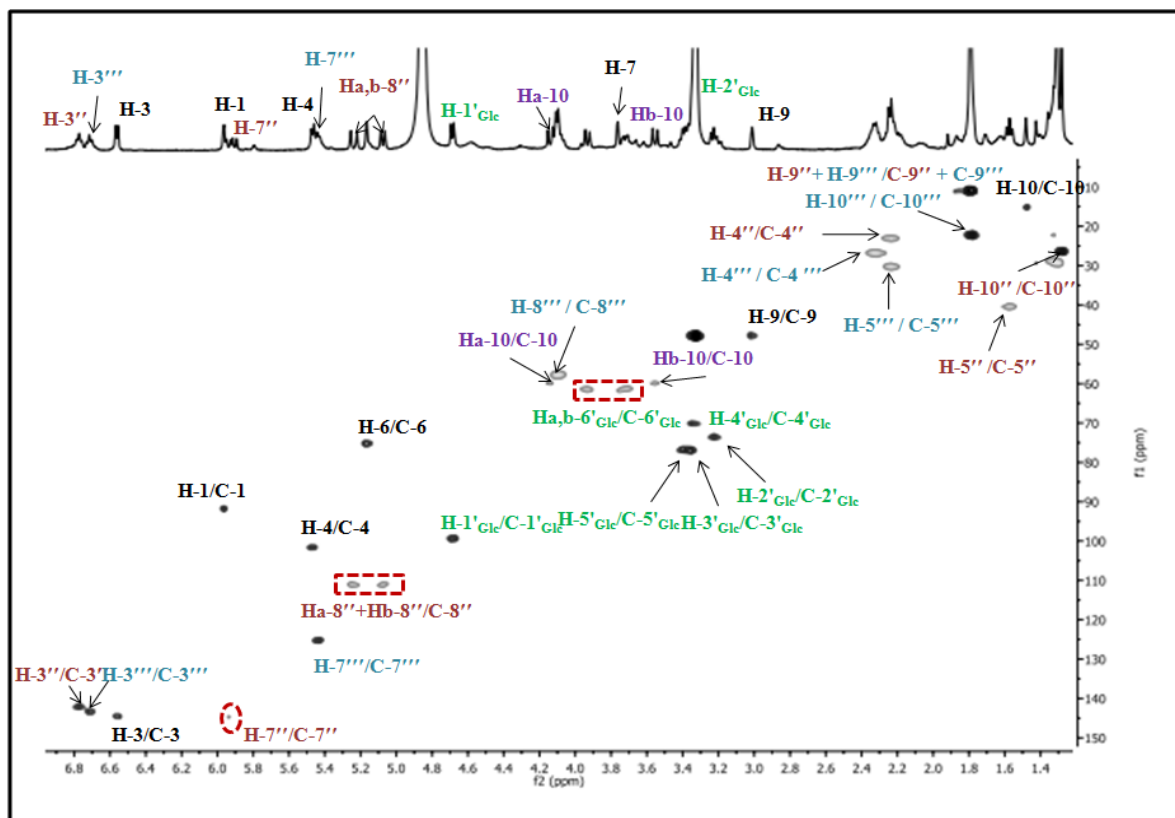


Figure III-127. Spectre de RMN ^1H du composé APD₇ comparé à celui du composé APD₆.

Figure III-128. Spectres COSY du composé APD₇.Figure III-129. Spectres HSQC du composé APD₇.

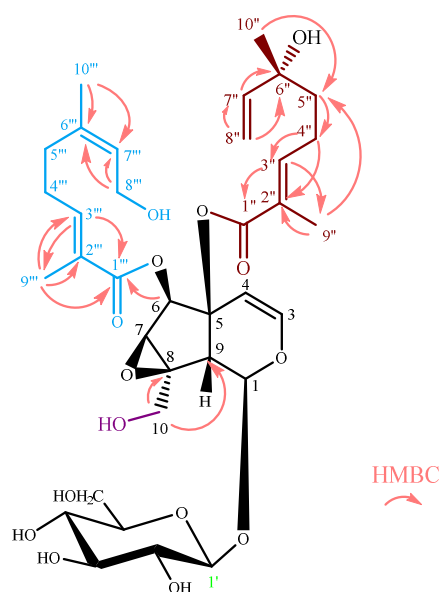


Figure III-130. Corrélations HMBC du composé APD7.

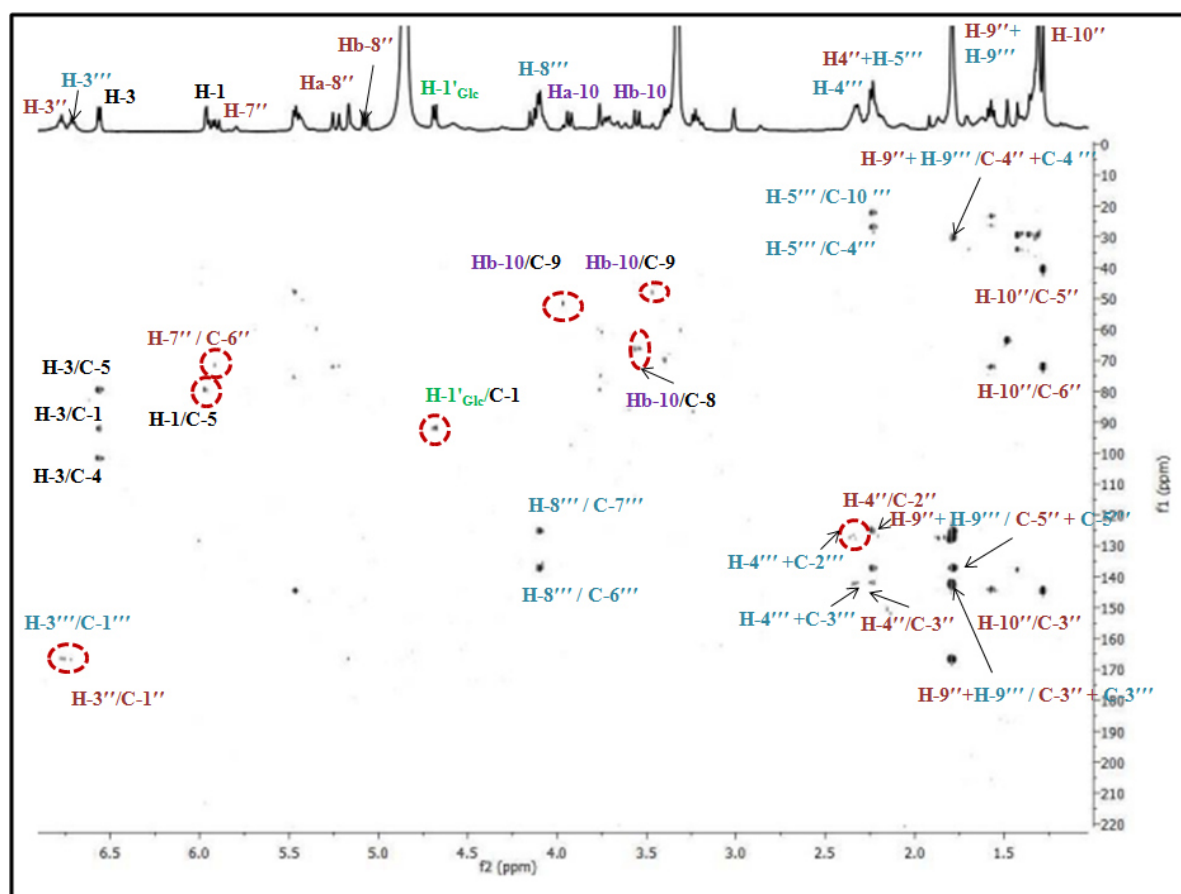
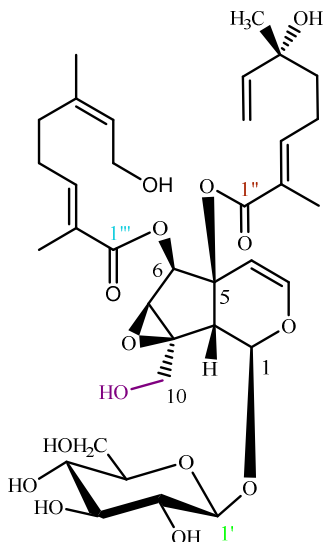


Figure III-131. Spectres HMBC du composé APD7.

La structure finale du composé **APD₇** est le **5-*O*-menthiafoloyl-6-*O*-foliamenthoylmacfadienoside**, isolé pour la première fois. La mesure du pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{25} +70$ (c 0.1, MeOH).



APD₇: 5-*O*-menthiafoloyl-6-*O*-foliamenthoylmacfadienoside.

III.3.1.9. Détermination structurale du composé APD₈

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) donne un pic pour l'ion pseudo-moléculaire à m/z 515.1500 $[M+Na]^+$ (calc 515.1529) correspondant à la formule brute $C_{24}H_{28}O_{11}$. D'autres ions-fragments sont observables à m/z 497.1386 $[M+Na-18]^+$ et 353.0975 $[M+Na-162]^+$ correspondant respectivement à la perte d'une molécule d'eau et un glucose (figure III-132).

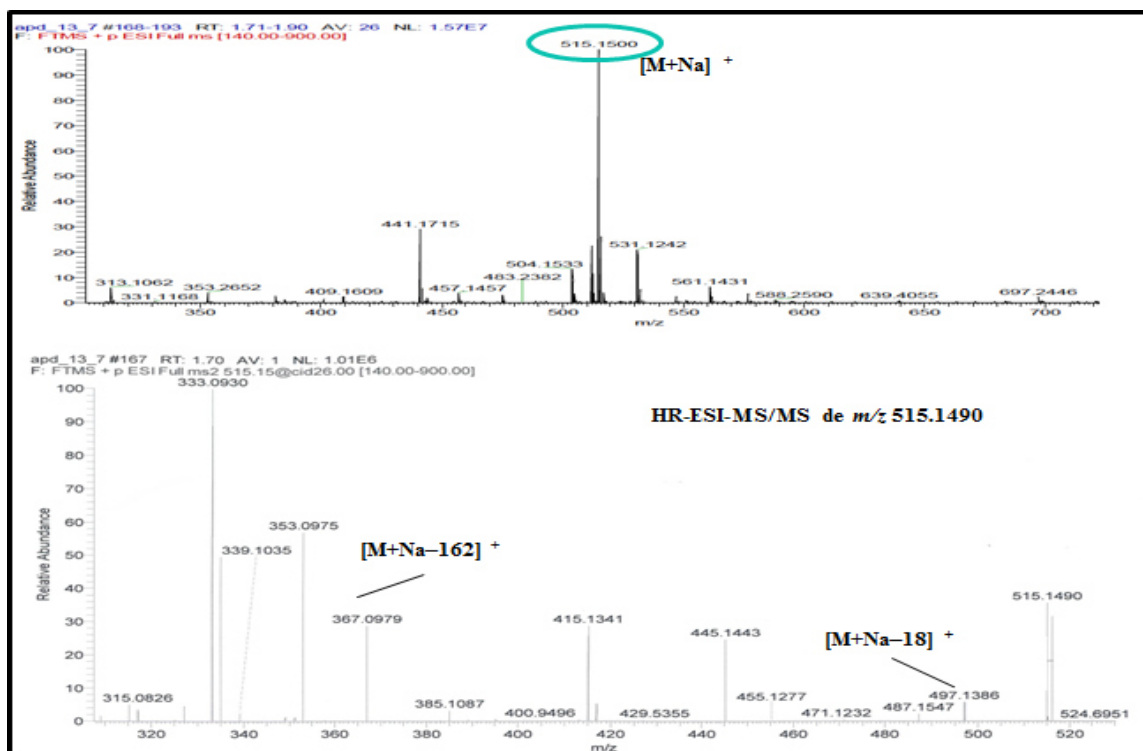


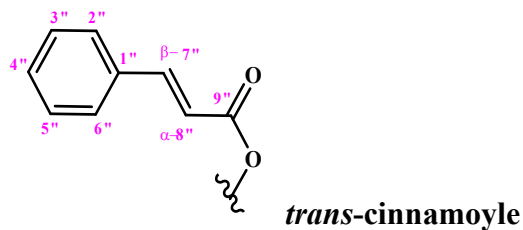
Figure III-132. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₈.

Spectrométrie RMN :

Les spectres de RMN ¹H et ¹³C du composé APD₈ (figure III-133- III-134) montrent les mêmes signaux caractéristiques du noyau antirrinoside (APD₁). Les différences majeures par rapport au composé APD₁, résident en la présence :

- Des signaux à champ faible allant de δ_H 7.40 à 7.65 ppm, s'intégrant pour cinq protons caractéristiques de protons aromatiques.
- Deux doublets ($J = 16.5$ Hz) s'intégrant chacun pour un proton à δ_H 6.63 / δ_C 117.0 ppm et δ_H 7.81 / δ_C 145.6 ppm (H- α et H- β) caractéristiques de protons oléfiniques couplant entre eux. La valeur de la constante de couplage indique qu'ils sont en position *trans*.
- Deux carbones quaternaires C-1" et C-9" (C=O) résonnant respectivement à δ_C 134.3 et 166.6 ppm.

L'observation de ces signaux nous permet de suggérer la présence d'un groupement *trans*-cinnamoyle.



Le déblindage du proton H-6 du composé **APD₈** par rapport au composé **APD₁** indique que la position 6 du noyau antirrinoside est substituée par le groupement *trans*-cinnamoyle.

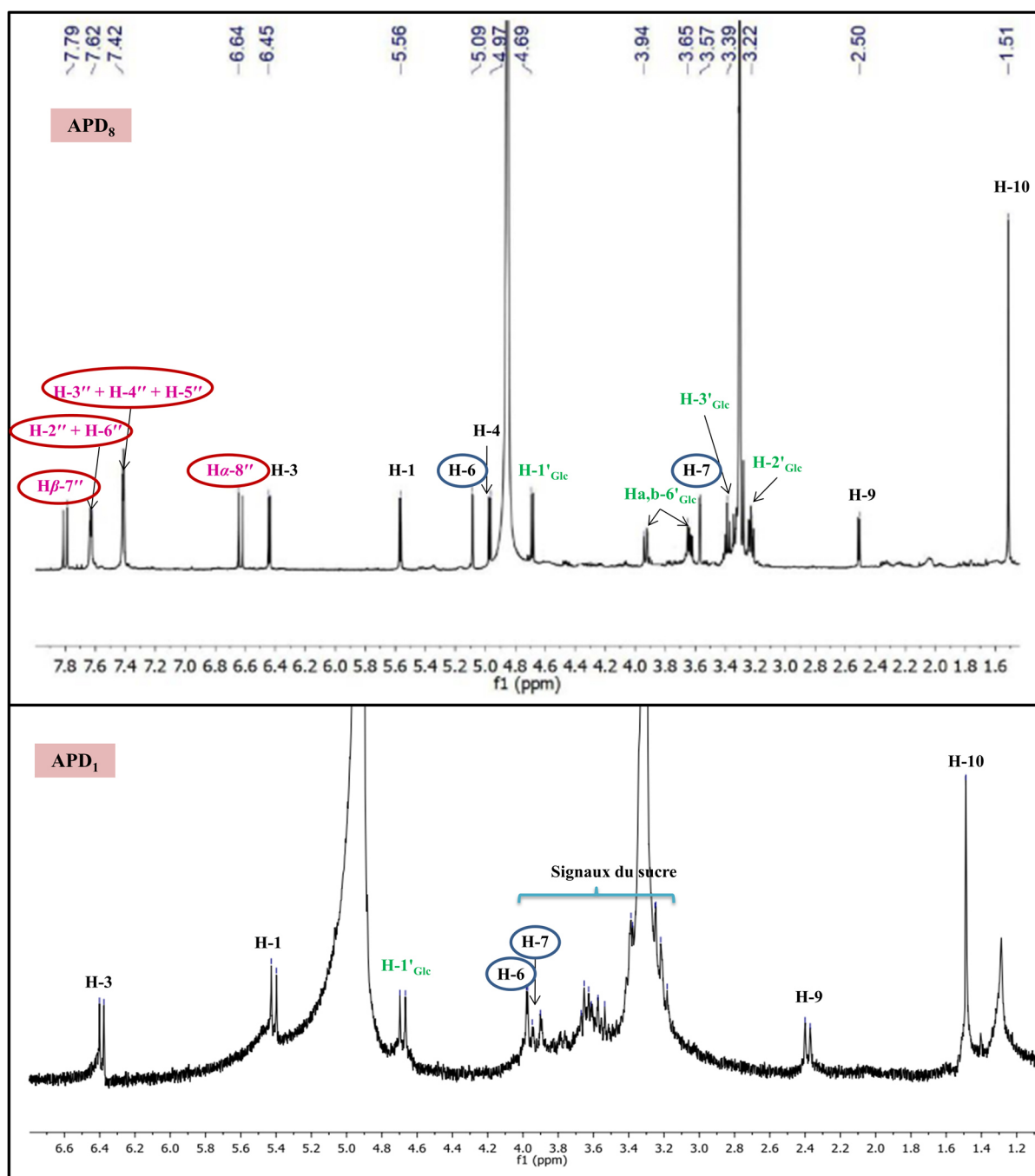


Figure III-133. Spectre de RMN ¹H du composé **APD₈** comparé à celui du composé **APD₁**.

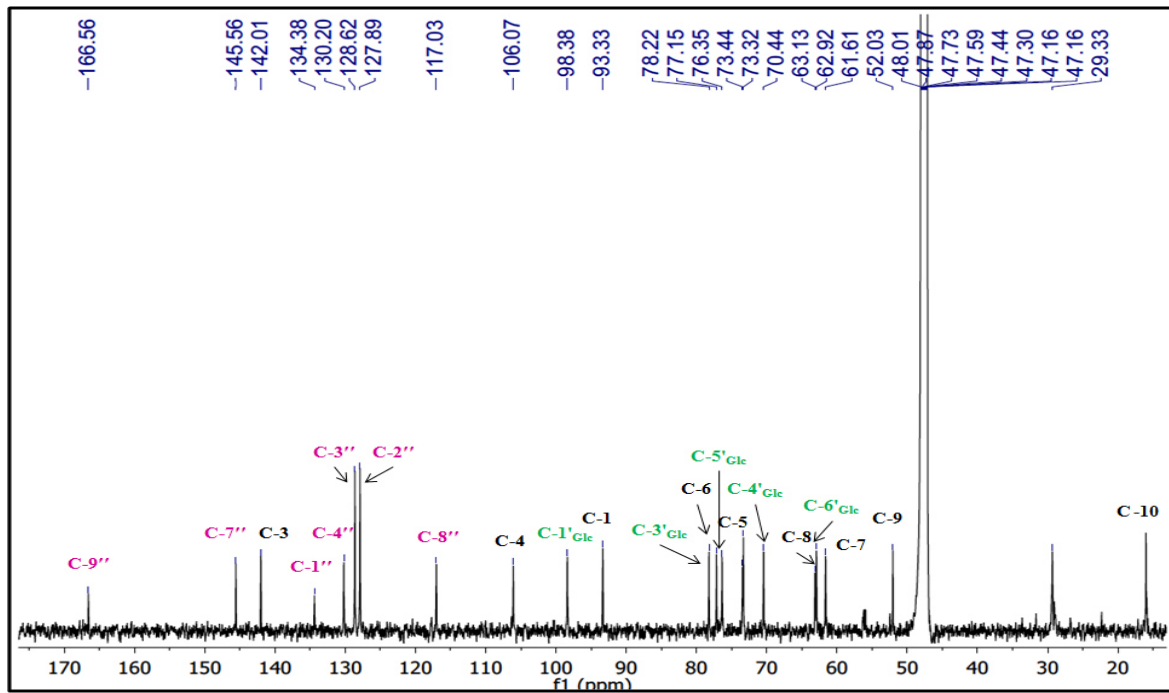


Figure III-134. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD₈.

L'expérience COSY H-H (figure III-135) permet de retrouver toutes les corrélations identifiant le noyau antirinoside. Elle permet aussi d'identifier, les deux protons oléfiniques $\text{H}_{\alpha-8''}$ et $\text{H}_{\beta-7''}$, ainsi les protons aromatiques du groupement *trans*-cinnamoyle.

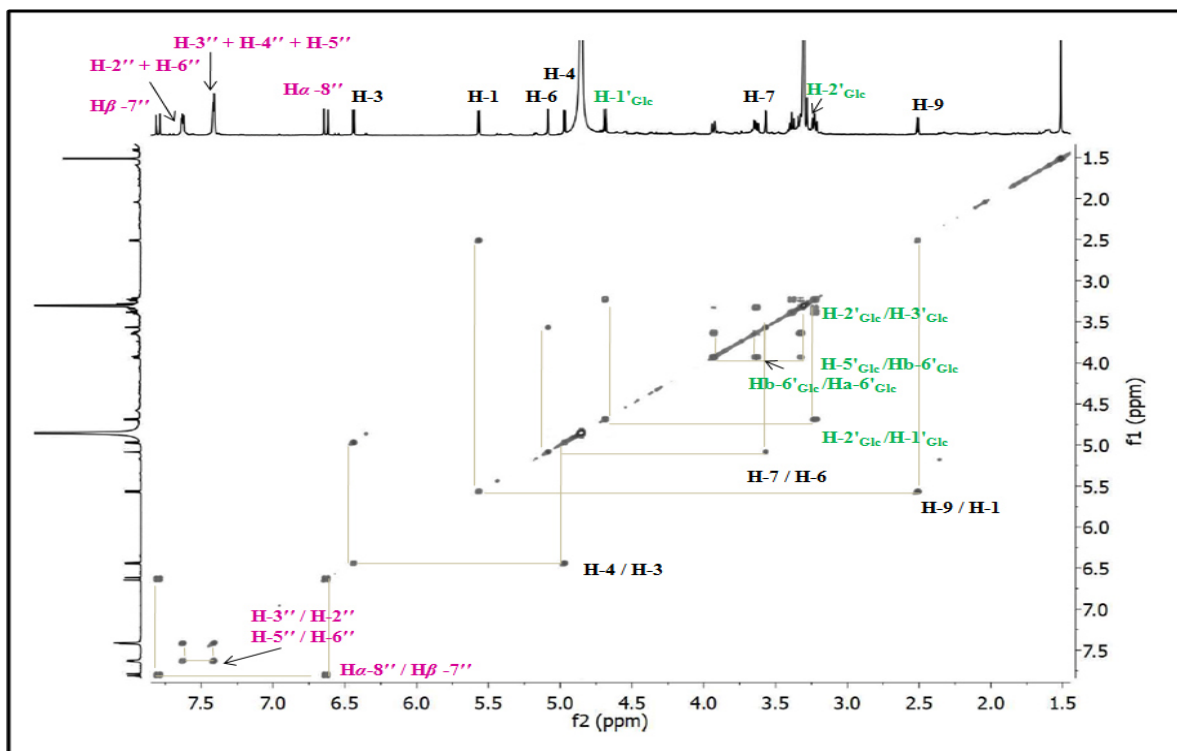


Figure III-135. Spectre de COSY du composé APD₈.

L'analyse HSQC (figure III-136- III-137) permet de mettre en évidence les corrélations directes C-H du composé APD₈.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-9.

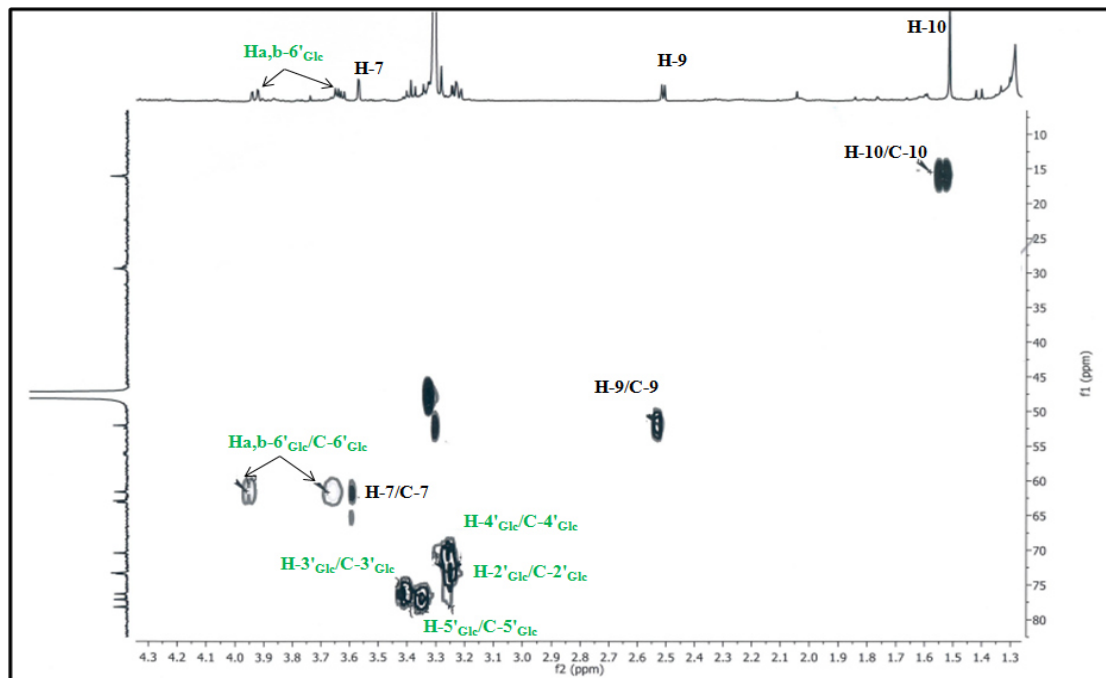


Figure III-136. Spectre de HSQC étalé de δ_H 1.3 à 4.3 ppm du composé APD₈.

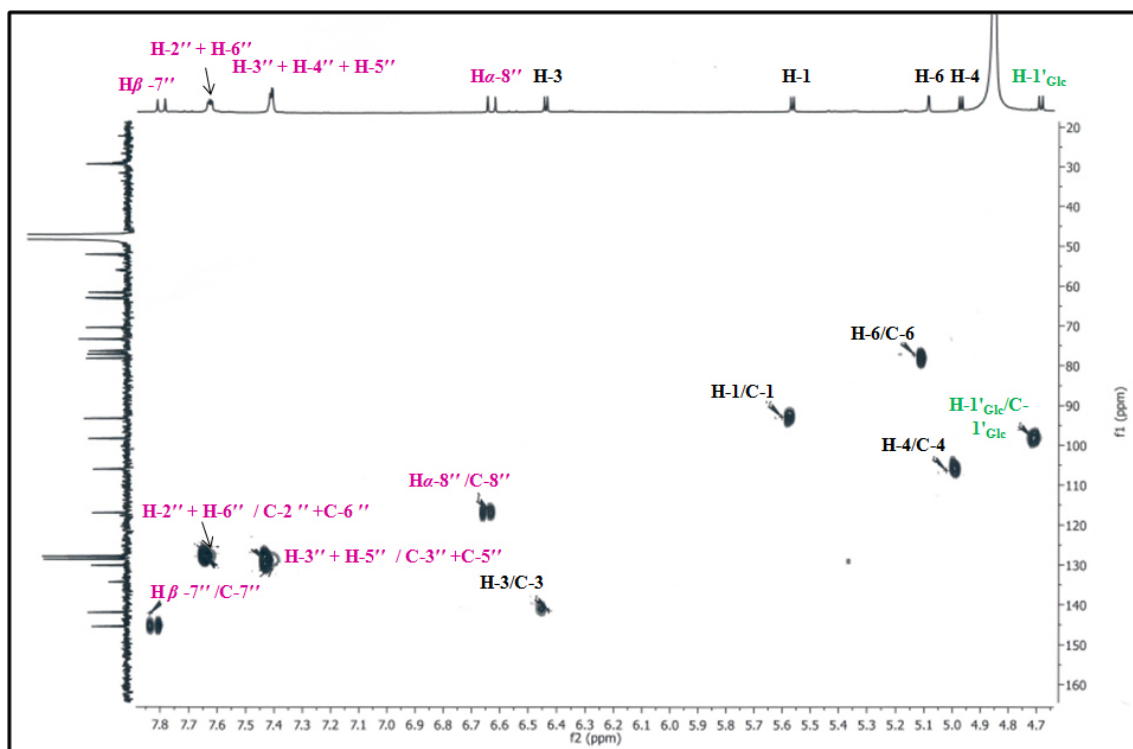


Figure III-137. Spectre de HSQC étalé de δ_H 4.7 à 7.8 ppm du composé APD₈.

L'expérience HMBC (figure III-139) montre clairement la position du groupement *trans*-cinnamoyle sur le noyau antirrinoside, on observe la corrélation entre le proton H-6 du noyau antirrinoside et le carbonyle C-9'' résonant à δ_C 166.8 ppm du groupement *trans*-cinnamoyle (figure III-138).

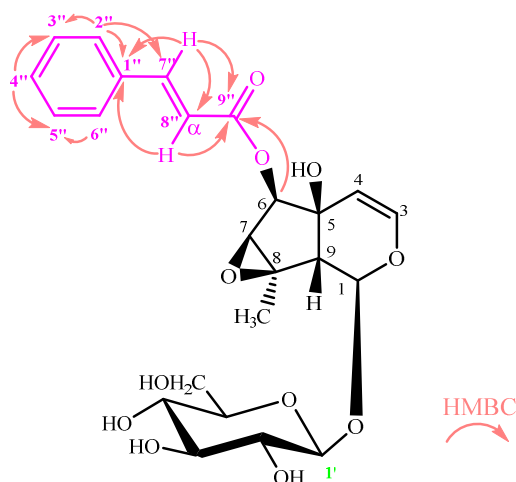


Figure III-138. Corrélations HMBC du *trans*-cinnamoyle du composé APD8.

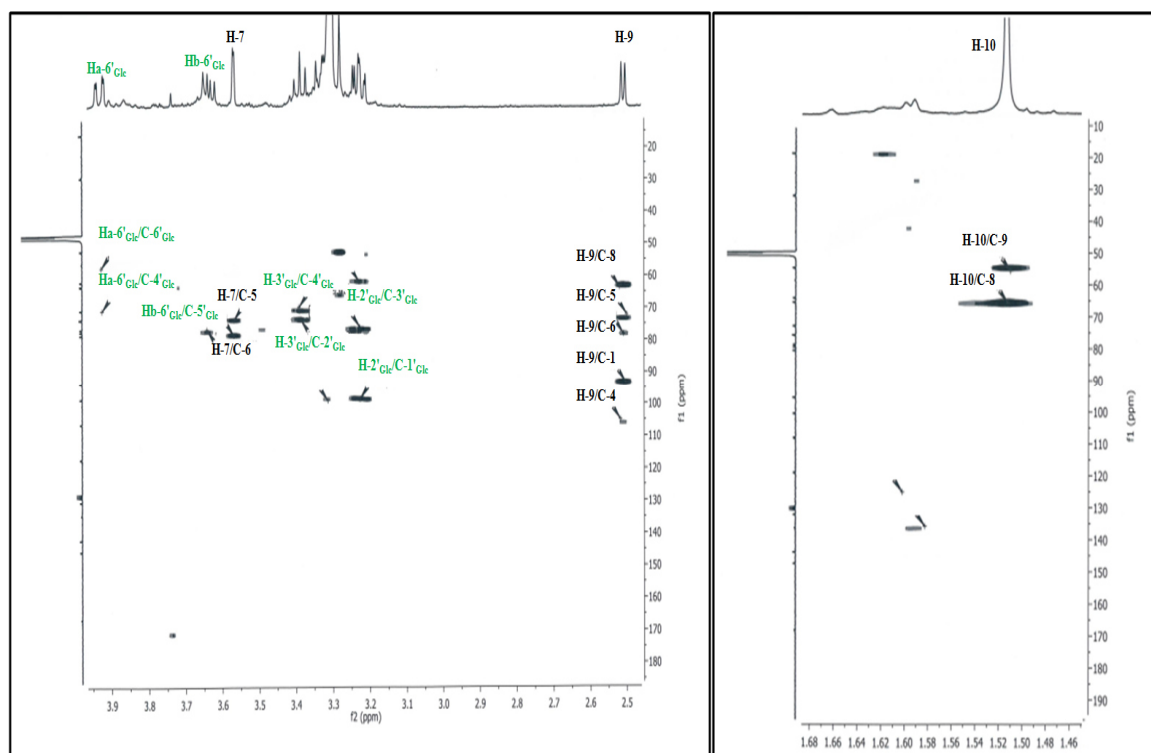


Figure III-139. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.46 à 3.9 ppm du composé APD8

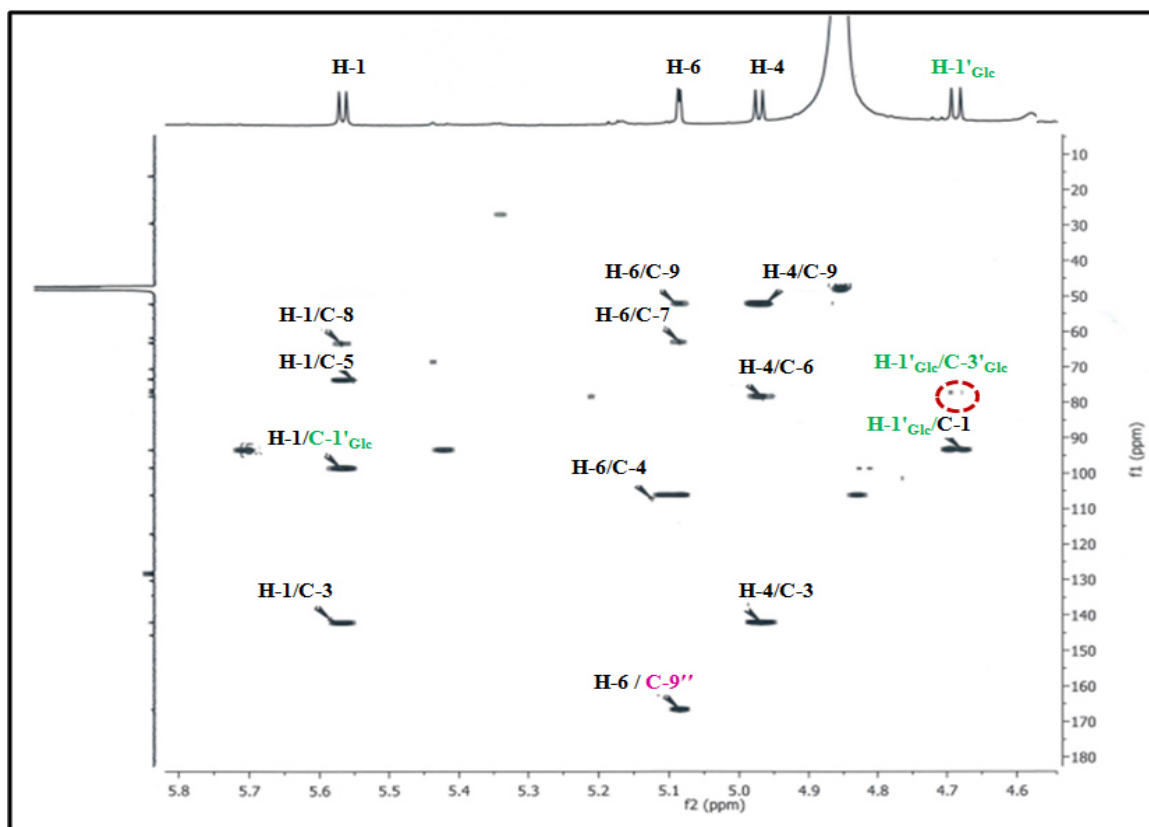


Figure III-140. Spectre de HMBC étalé de δ_H 4.6 à 5.8 ppm du composé APD₈.

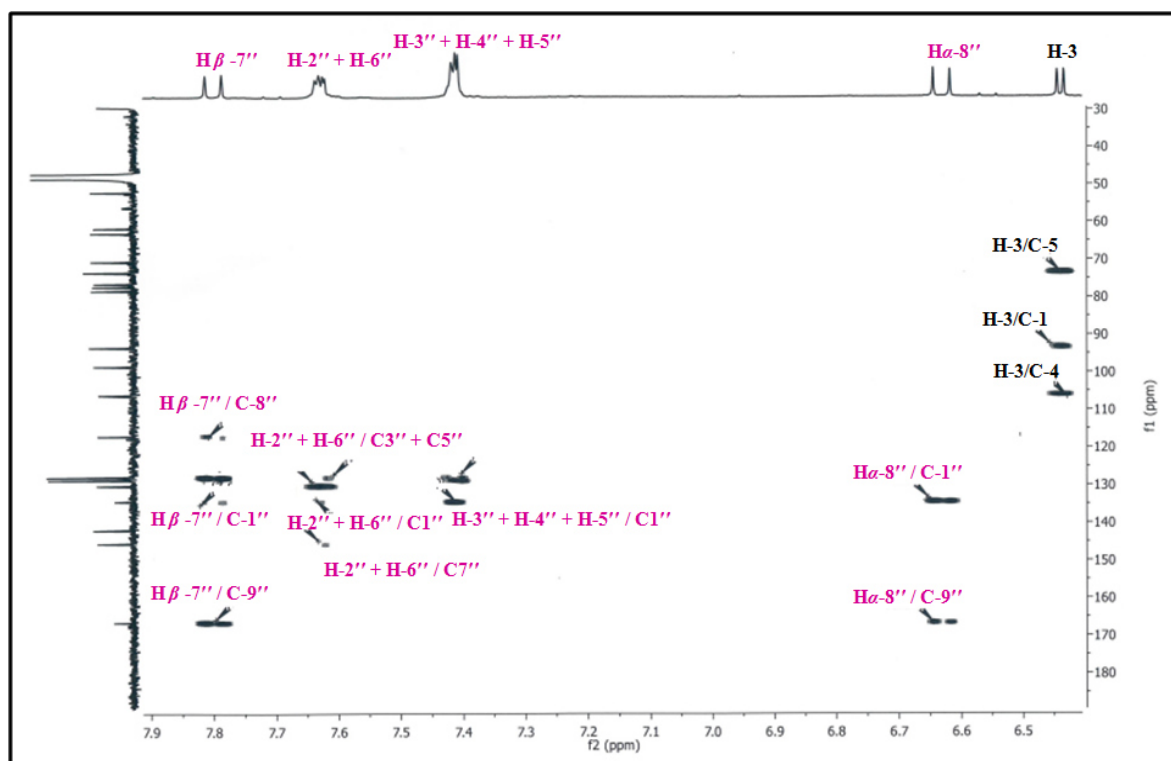
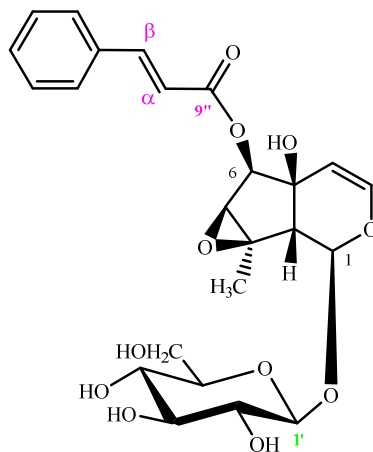


Figure III-141. Spectre de HMBC étalé de δ_H 6.5 à 7.9 ppm du composé APD₈.

Sur la base des observations précédentes, et la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} -120$ (c 0.1, MeOH), la structure du composé **APD₈** est le : **6-*O*-*trans*-cinnamoylantirinoside** isolé pour la première fois.



APD₈ : 6-*O*-*trans*-cinnamoylantirinoside.

III.3.1.10. Détermination structurale du composé **APD₉**

Spectrométrie de masse :

Sur le spectre de masse haut résolution HR-ESI-MS, enregistrés en modes positif (figure III-142), nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 531.1469 $[M+Na]^+$ (calc531.1478), soit une masse moléculaire égale à 508 *uma*, suggérant une formule brute de $C_{24}H_{28}O_{12}$. Autre fragment est également observé à m/z 401.1205 $[M+Na-130]^+$, indiquant la perte d'un groupement cinnamoyle.

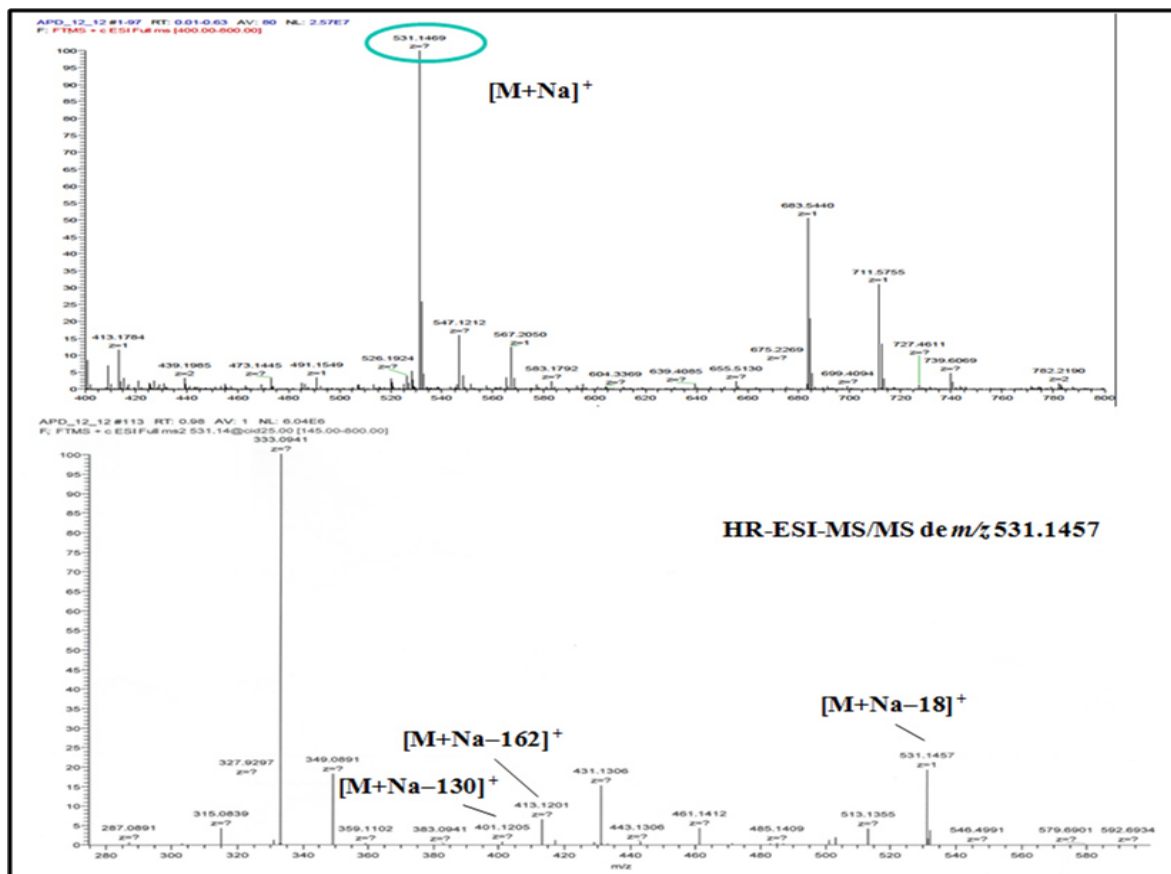


Figure III-142. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₉.

Le spectre RMN ¹H (figure III-143) est très voisin de celui du composé 6-O-trans-cinnamoylantirrinoside (APD₈). Cependant la différence notée par :

- L'absence du méthyle CH₃-10 et la présence d'un groupement CH₂-OH ce qui confirme un noyau macfadinoside.
- Le blindage du proton H-6 à δ_H 3.69 ppm (*d*, $J = 1.7$ Hz) du composé APD₉ par rapport au H-6 (δ_H 5.13 ppm) du composé APD₈ indique que la position en C-6 du noyau macfadinoside est libre.
- Le déblindage des protons H_b-6'_{Glc} et H_a-6'_{Glc} résonant respectivement à δ_H 4.36 et 4.50 ppm du glucose du composé APD₉ comparativement au déplacement chimique (δ_H 3.60 et 3.98 ppm) des mêmes protons enregistrés pour le composé APD₈, ce qui indique que le groupement cinnamoyle est substitué au carbone C-6'_{Glc} du glucose.

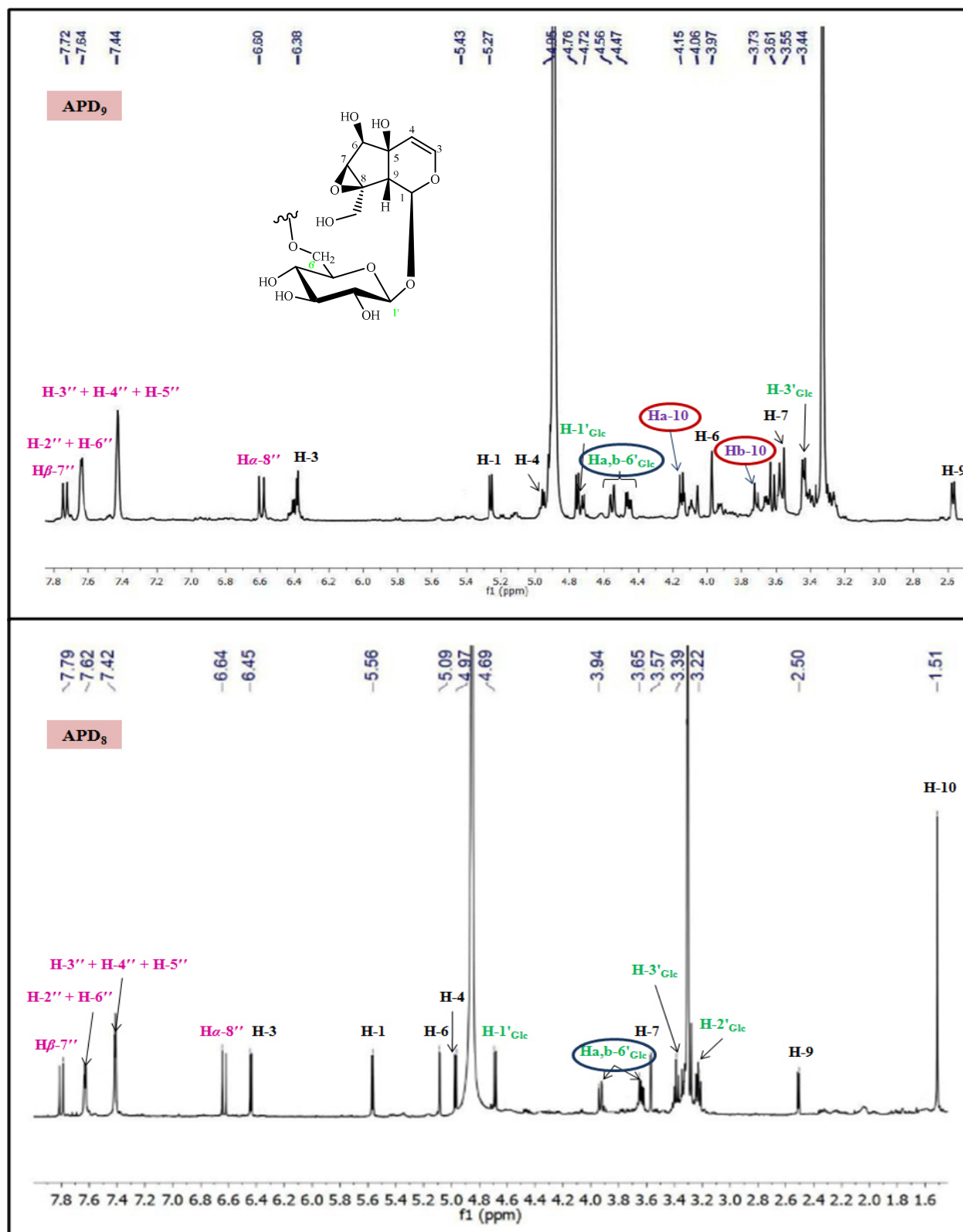


Figure III-143. Spectre de RMN ¹H du composé APD₉ comparé à celui du composé APD₈.

L'analyse HSQC (figure III-144) permet de mettre en évidence les corrélations directes C-H du composé APD₉.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-9.

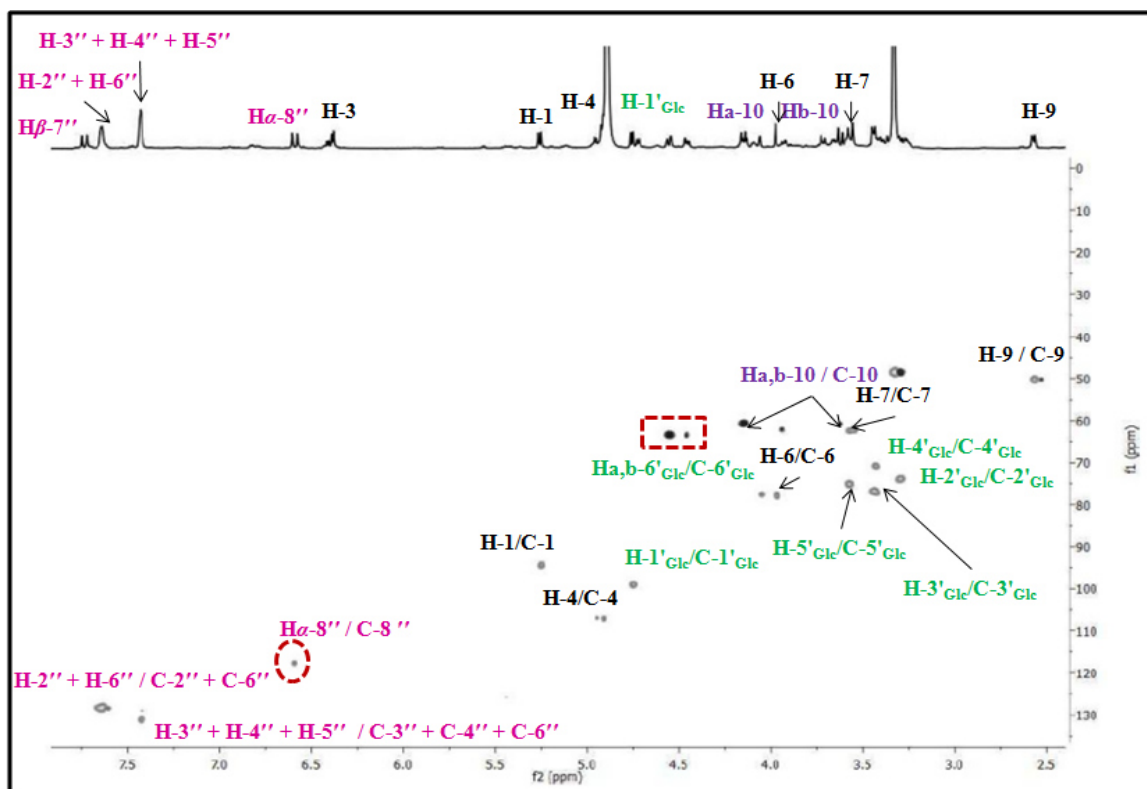


Figure III-144. Spectre de HSQC du composé APD₉.

L'expérience HMBC (figure III-146) confirme la position du groupement *trans*-cinnamoyle sur le noyau macfadinoside, on observe la corrélation entre les protons H_a-6'_{Glc} et H_b-6'_{Glc} du glucose et le carbonyle C-9'' résonnant à δ_C 166.8 ppm du groupement *trans*-cinnamoyle.

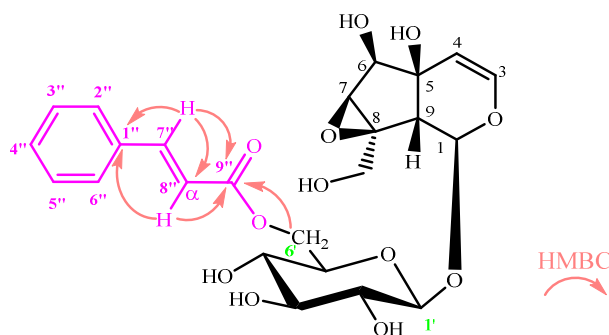


Figure III- 145. Corrélations HMBC du *trans*-cinnamoyle du composé APD₉.

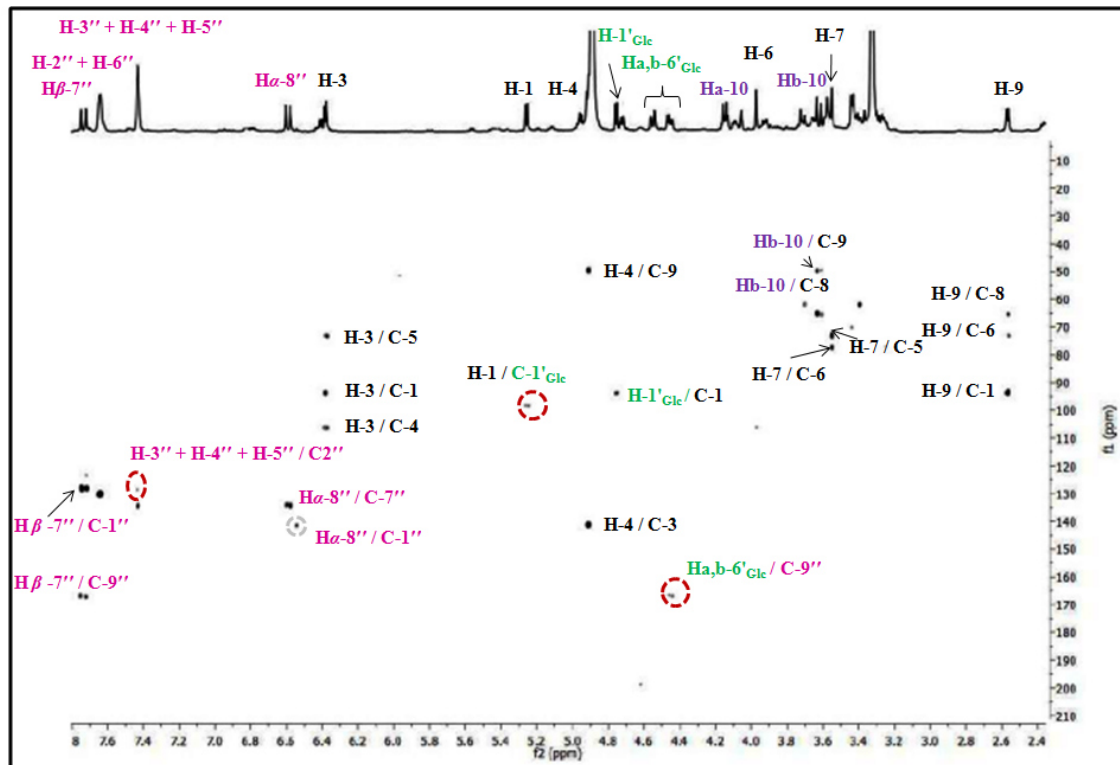
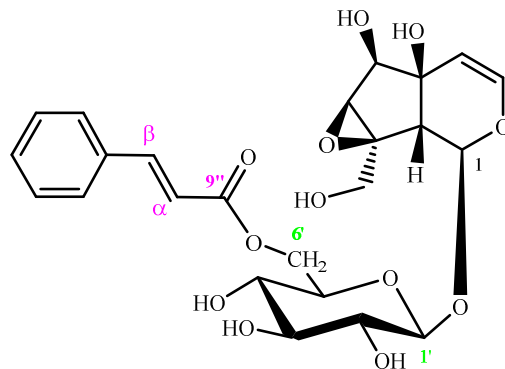


Figure III-146. Spectre de HMBC du composé APD₉.

Sur la base de tous ces résultats, ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} -66$ (c 0.1, MeOH), la structure du composé APD₉ a été établie comme étant le **6'-O-trans-cinnamoyl-macfadienoside**.



APD₉: 6'-O-trans-cinnamoyl-macfadienoside.

III.3.1.11. Détermination structurale du composé **APD₁₀**

Spectrométrie de masse

La formule brute du composé **APD₁₀** a été déterminée sur la base des analyses de spectrométrie de masse. Le spectre de masse HR-ESIMS (figure III-147) de ce composé présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 515.1501 $[M+Na]^+$ soit une formule brute de $C_{24}H_{28}O_{11}$.

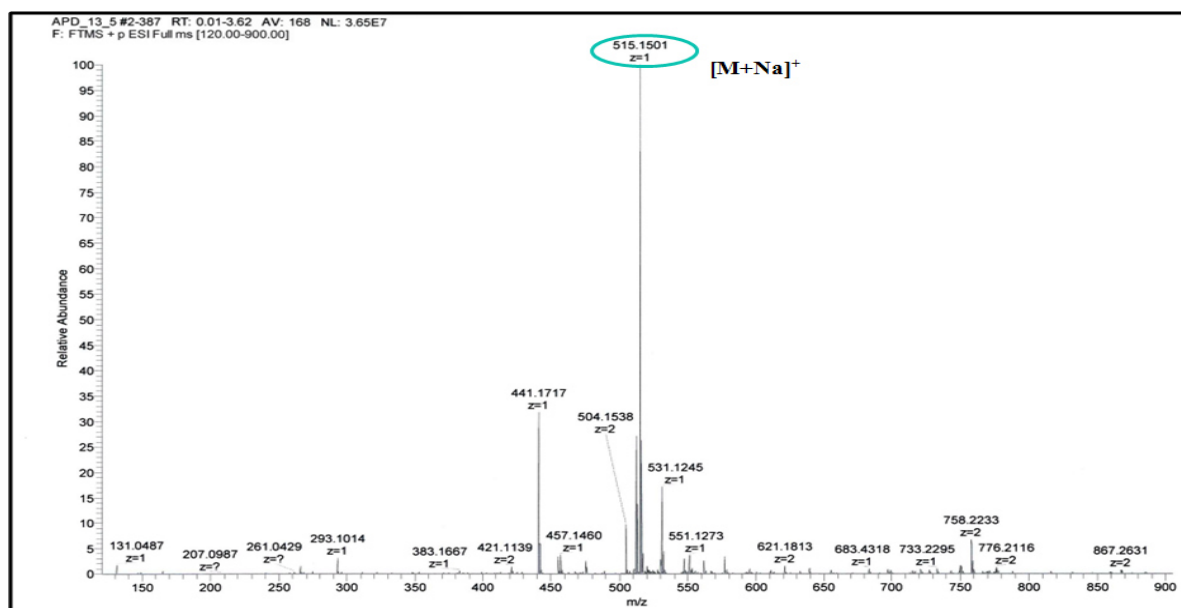


Figure III-147. Spectre de masse HR-ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé **APD₁₀**.

Spectrométrie RMN :

Les spectres RMN 1D et 2D (figure III-148- III-150) du composé **APD₁₀** ressemble en grande majorité au composé 6'-*O-trans*-cinnamoyl-macfadienoside (**APD₉**) identifié précédemment avec l'absence du signal correspondant au CH_2-OH et la présence d'un singulet à δ_H 1.41 ppm attribuable au CH_3 pour le composé **APD₁₀**, ce qui nous oriente vers un noyau antirrinoside.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-9.

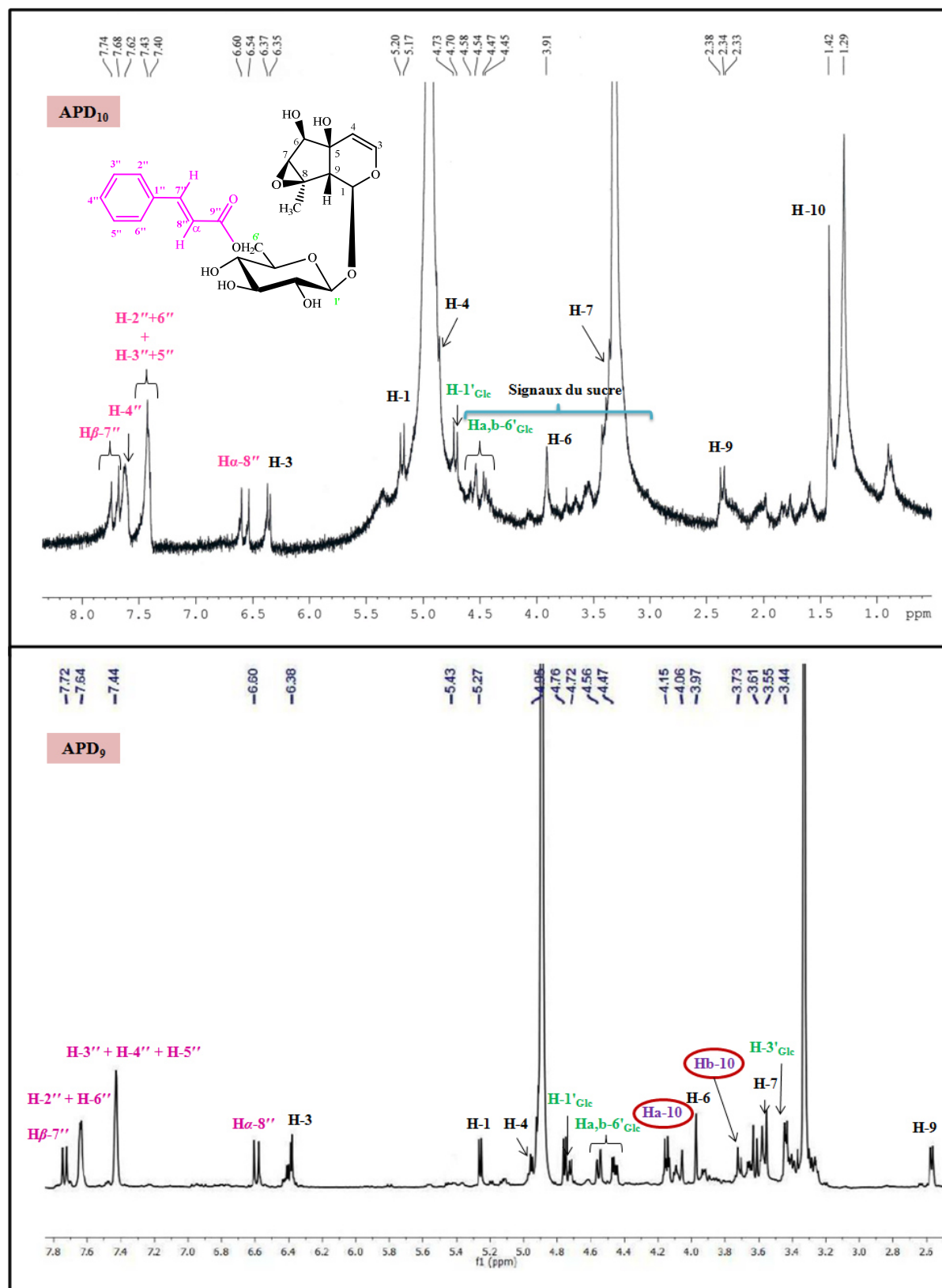
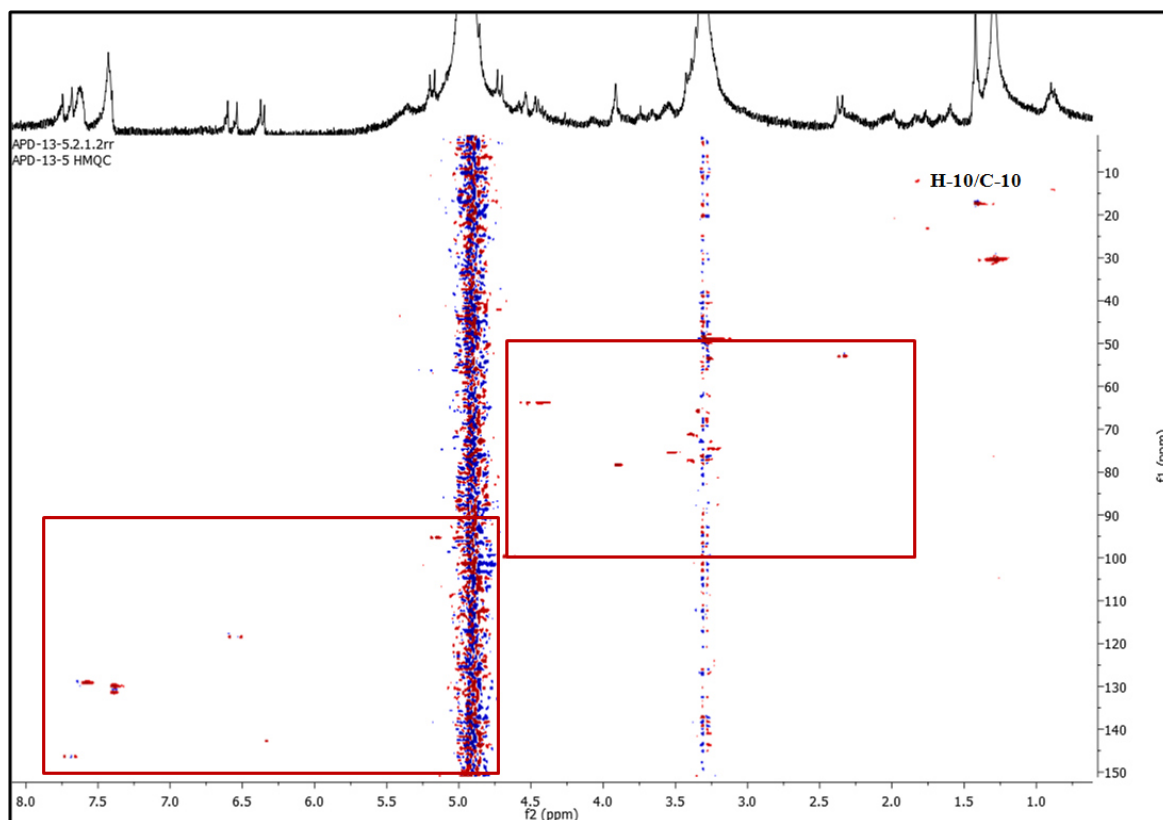
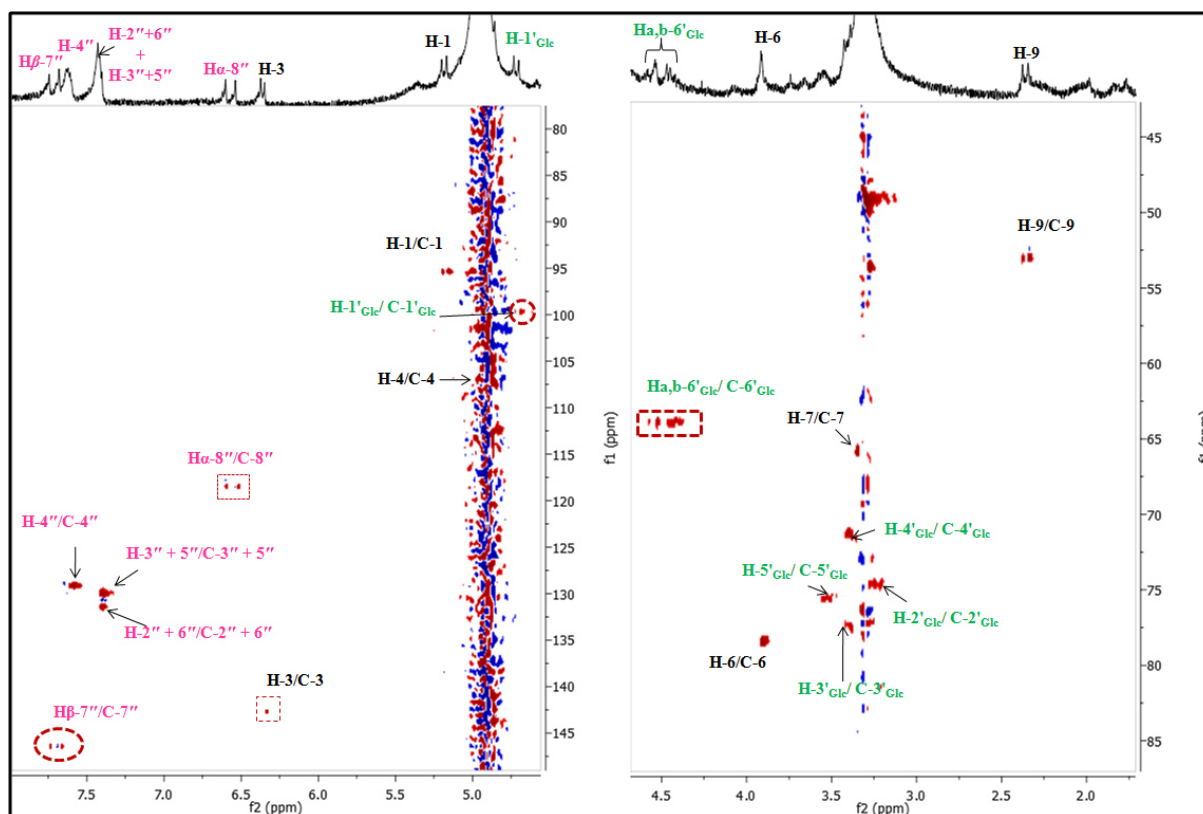
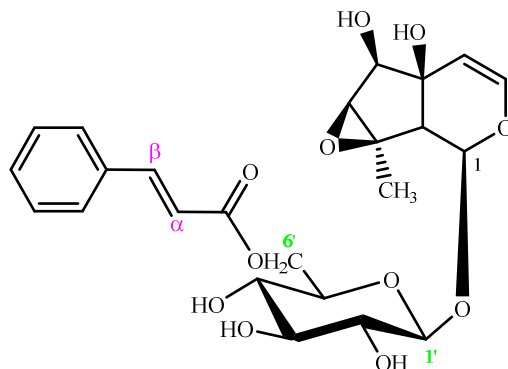


Figure III-148. Spectre de RMN ¹H du composé APD₁₀ comparé à celui du composé APD₉.

Figure III-149. Spectre HSQC du composé APD₁₀.Figure III-150. Spectre HSQC étalé de δ_H 2.0 à 4.5 et 5.0 à 7.6 ppm du composé APD₁₀.

Le composé **APD₁₀** est donc identifié : **6'-*O*-cinnamoylantirrinoside** isolé à partir des parties aériennes *Anarrhinum orientale* (Dawider et al., 1989) et *Anarrhinum pubescens* (Mahran et al., 2018).

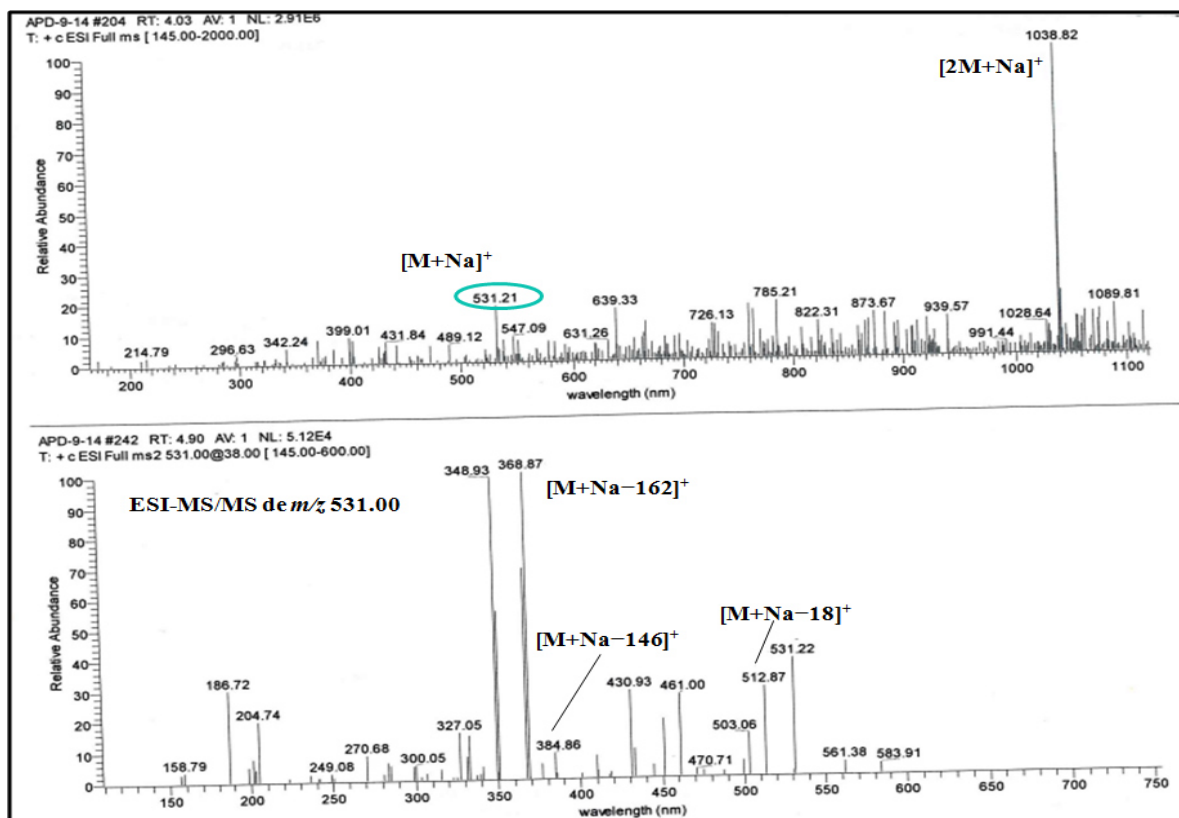
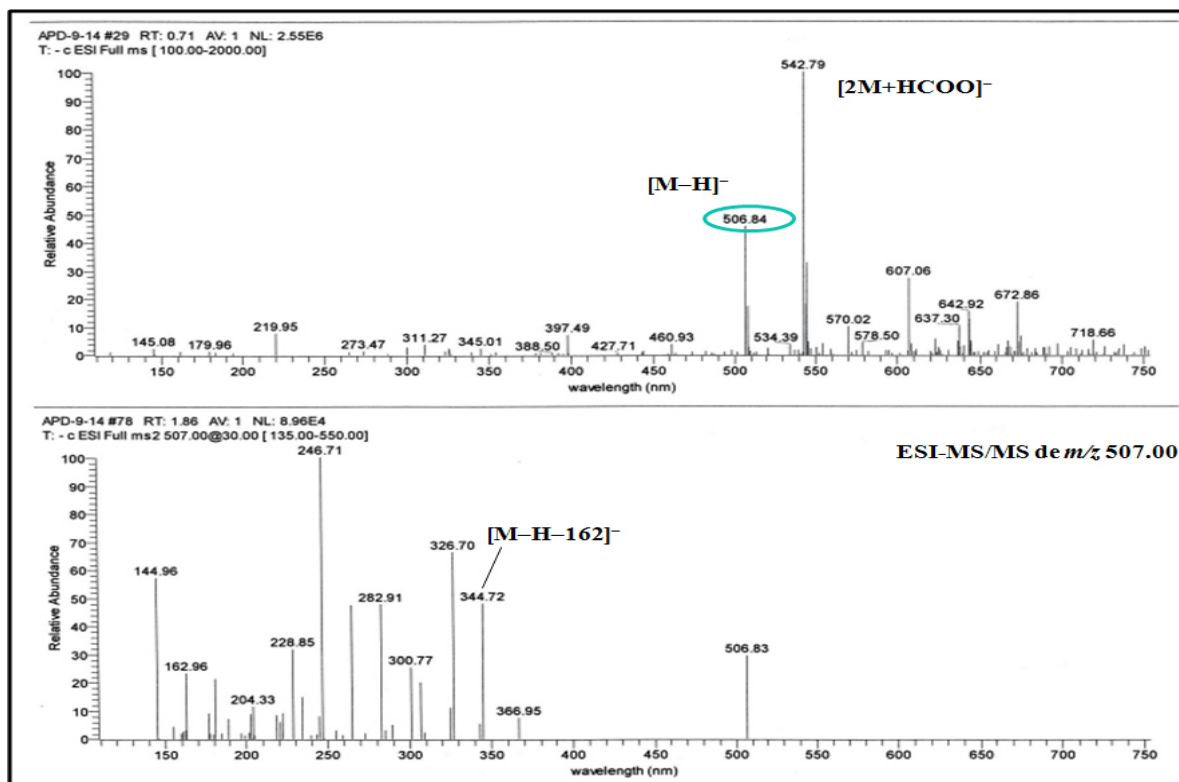


APD₁₀ : 6'-*O*-cinnamoylantirrinoside.

III.3.1.12. Détermination structurale du composé APD₁₁

Spectrométrie de masse :

Les spectres de masse ESI enregistrés en modes positif (figure III-151) et négatif (figure III-152), présentent respectivement des pics pseudo-moléculaires à m/z 531 $[M+Na]^+$ et 507 $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 508 *uma*, correspondant à une formule brute en $C_{24}H_{28}O_{12}$. Le spectre MS/MS du pic moléculaire enregistré en mode positif, montre des fragmentations à m/z 513 $[M+Na-18]^+$, 385 $[M+Na-146]^+$ et 369 $[M+Na-162]^+$, correspondant à la perte d'une molécule d'eau, un groupement coumaroyl et un glucose respectivement.

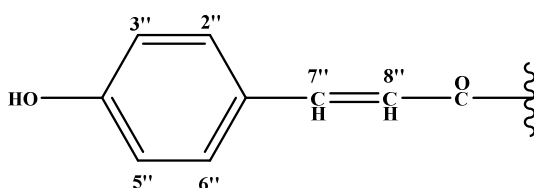
Figure III-151. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD₁₁.Figure III-152. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode négatif du composé APD₁₁.

Spectrométrie RMN :

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C (figure III-153- III-154) du composé **APD₁₁** montrent les signaux caractéristiques du composé 6-*O-trans*-cinnamoylantirinoside (**APD₈**), la différence est notée au niveau du groupement coumaroyl qui révèle un total dédoublement des signaux. En effet, en observent les signaux suivants :

- Deux protons oléfiniques à δ_{H} 6.43 (*d*, $J = 16.0$ Hz, H- α) et 7.77 ppm (*d*, $J = 16.0$ Hz, H- β), correspondant respectivement aux protons H α -8'' et H β -7''. La valeur de la constante du couplage indique qu'il s'agit d'une configuration *trans*.
- Deux protons oléfiniques à 5.90 (H α , $J = 12.6$ Hz) et 6.91 ppm (H β , $J = 12.6$ Hz), correspondant respectivement aux protons H α -8'' et H β -7''. La valeur de la constante du couplage indique qu'il s'agit d'une configuration *cis*.
- Quatre doublets de deux noyaux aromatiques d'intégration 2H chacun à δ_{H} 7.69 et 7.50 ppm ($J = 8.0$ Hz) et δ_{H} 6.75 et 6.81 ppm ($J = 8.0$ Hz) attribuables respectivement aux protons (H $_{\text{cis-2''}}$ /H $_{\text{cis-6''}}$), (H $_{\text{trans-2''}}$ /H $_{\text{trans-6''}}$), (H $_{\text{cis-3''}}$ /H $_{\text{cis-5''}}$) et (H $_{\text{trans-3''}}$ /H $_{\text{trans-5''}}$) indiquant que les noyaux aromatiques sont bi-substitué en *para*.
- Deux carbones quaternaires des deux cycles aromatiques C $_{\text{cis-4''}}$ et C $_{\text{trans-4''}}$ à δ_{C} 160.1 et 160.0 ppm respectivement, ce qui suggère la présence d'un OH libre en C-4''.

L'analyse des spectres RMN ^1H et de masse confirme la présence d'un mélange d'isomère géométrique de deux groupements *p*-coumaroyles, l'un de configuration *trans* et l'autre de configuration *cis*.



***Trans* et *cis* -*p*-coumaroyl.**

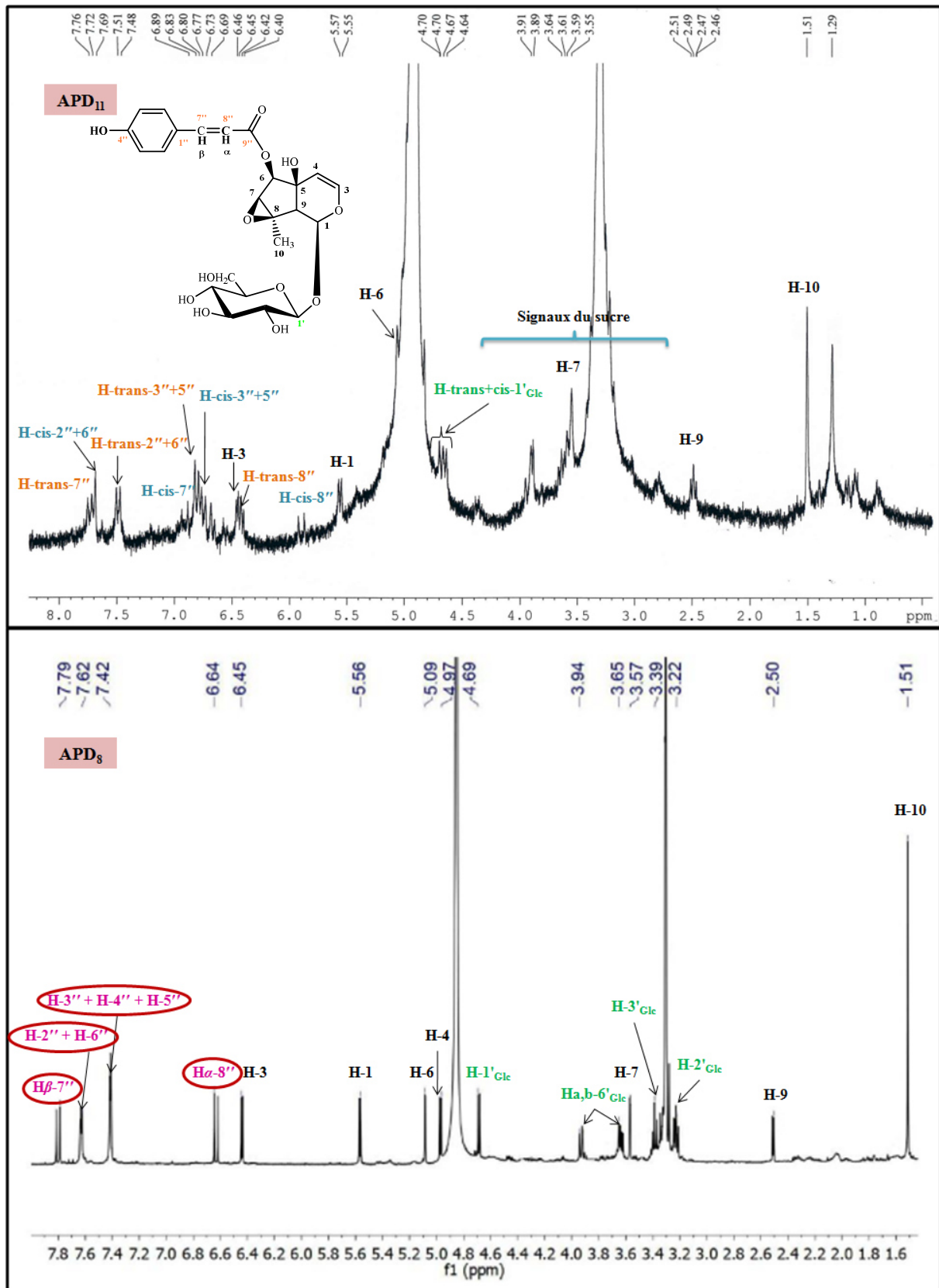


Figure III-153. Spectre de RMN ¹H du composé APD₁₁ comparé à celui du composé APD₈.

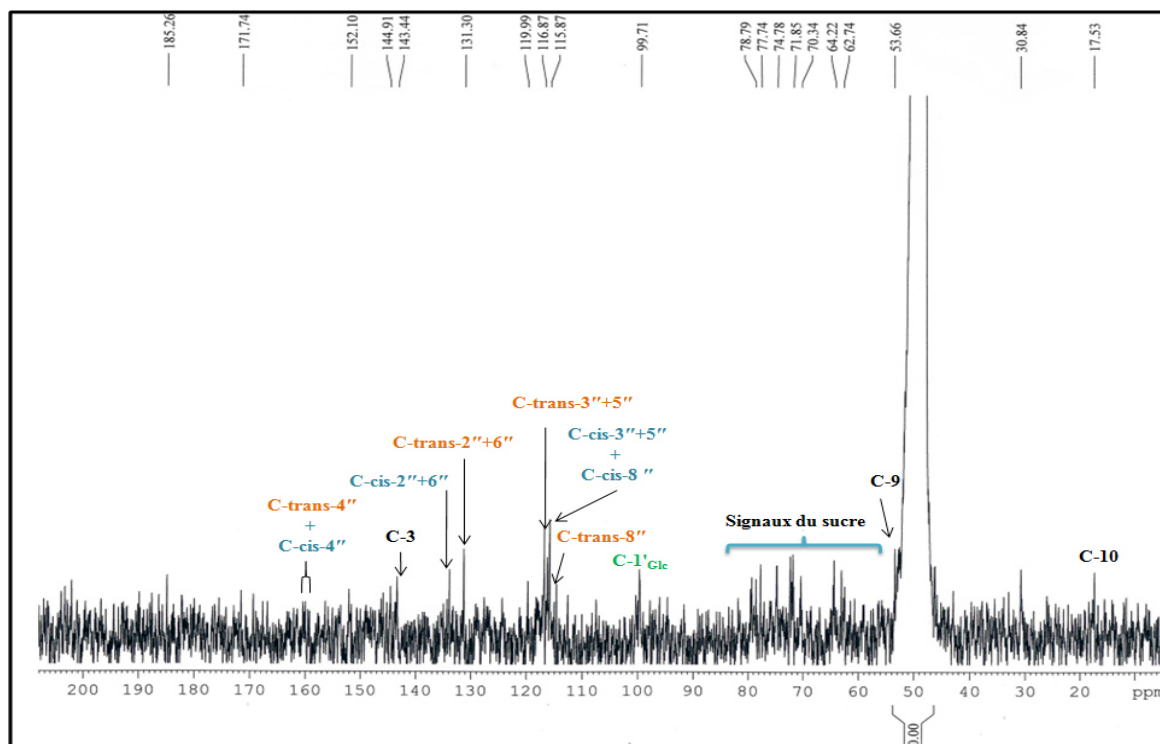


Figure III-154. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD₁₁.

L'expérience HSQC (figures III-155- III-157) permet de mettre en évidence tous les corrélations directes C-H du composé APD₁₁.

Les valeurs sont répertoriées dans le tableau III-9.

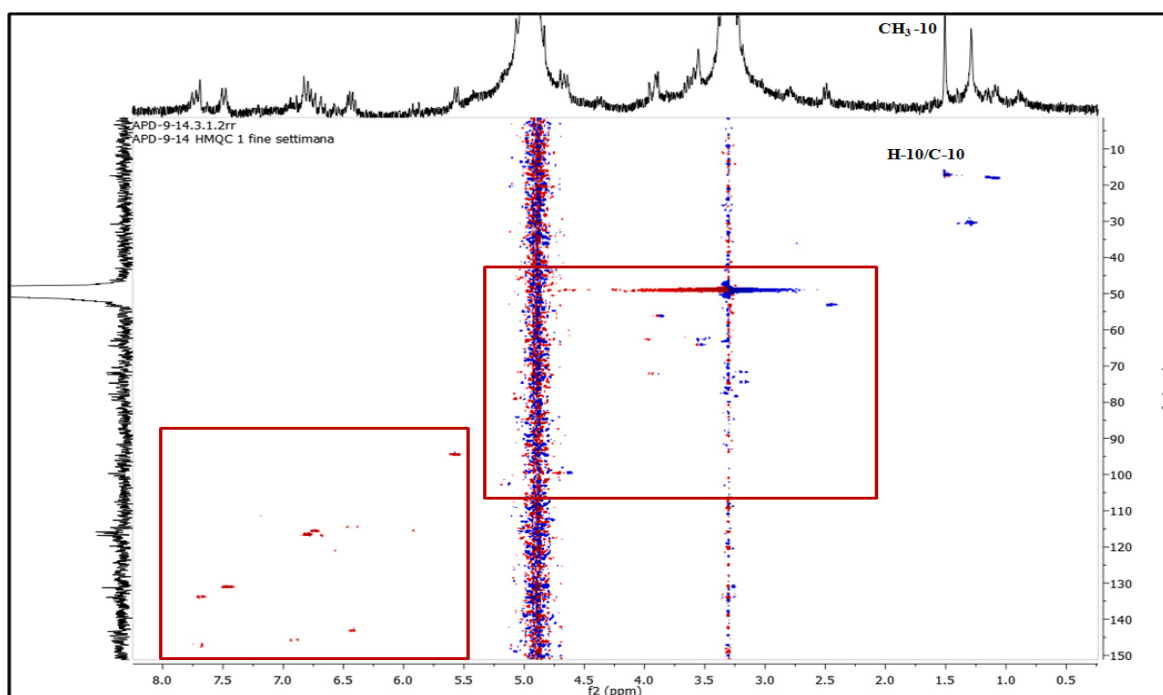


Figure III-155. Spectre HSQC du composé APD₁₁.

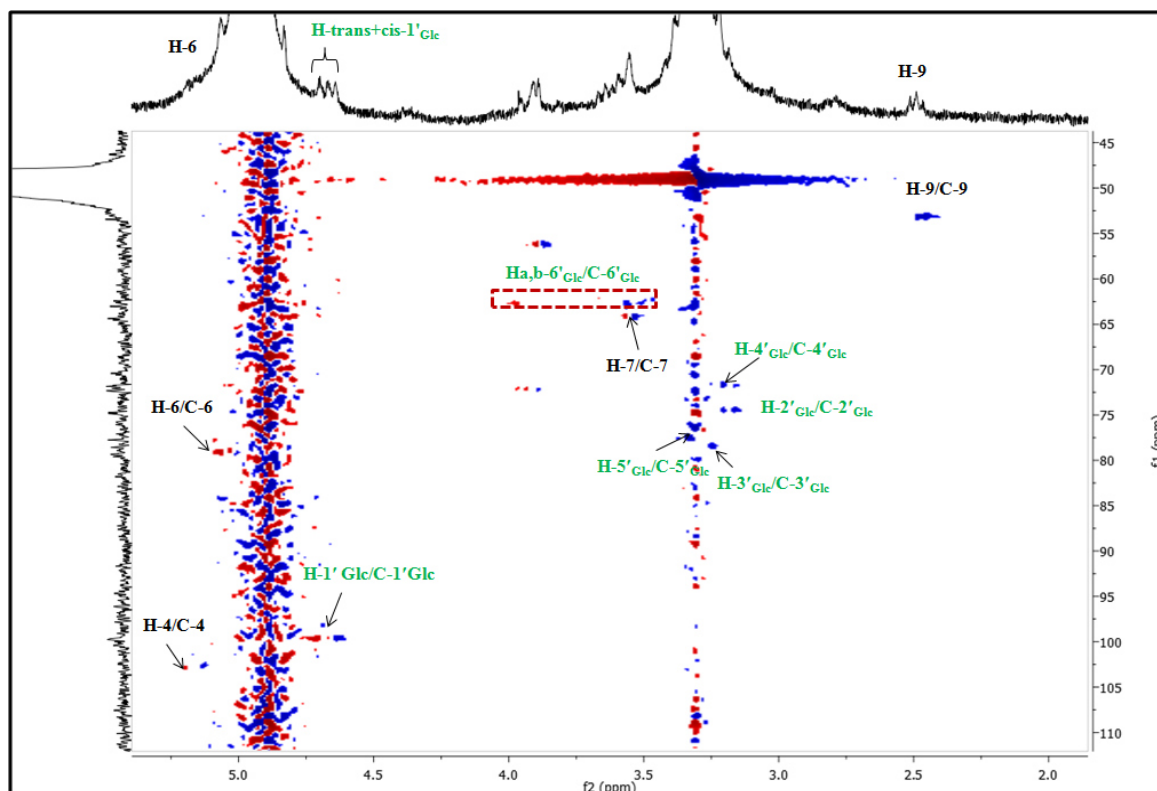


Figure III-156. Spectre HSQC étalé de δ_H 2.0 à 5.2 ppm du composé APD₁₁.

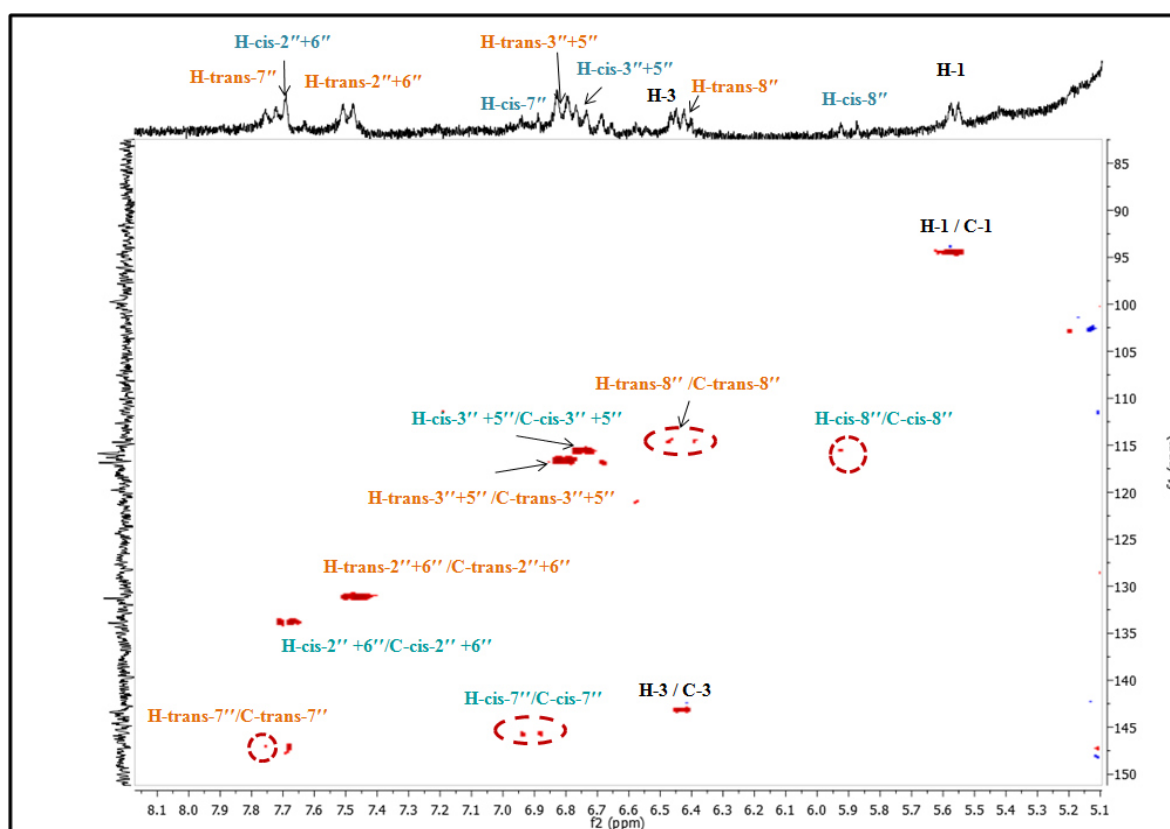
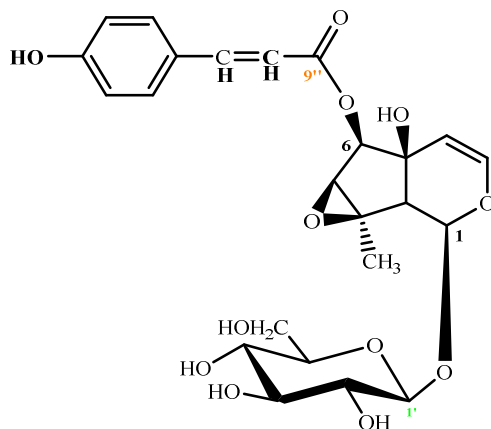


Figure III-157. Spectre HSQC étalé de δ_H 5.1 à 8.1 ppm du composé APD₁₁.

En vertu de cette analyse, le composé **APD₁₁** a été identifié à **6-*O-trans* et *cis-p*-coumaroylantirrinoside**. Ce composé a été isolé des parties aériennes d'une plante Scrophulariaceae, *Linaria vulgaris* (Ilieva et al., 1992) mais c'est la première fois qu'il est isolé du genre.



APD₁₁ : 6-*O-trans* et *cis-p*-coumaroylantirrinoside.

III.3.1.13. Détermination structurale du composé **APD₁₂**

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse obtenu en ESI-MS en mode positif (figure III-158) du produit **APD₁₂**, montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 1085 $[2M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 542 *uma* correspondant à une formule brute en $C_{26}H_{38}O_{12}$.

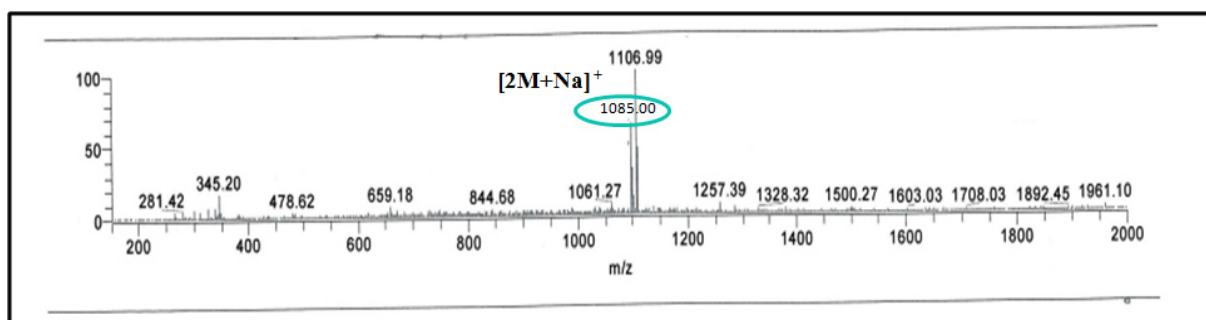


Figure III-158. Spectre de masse ESI-MS en mode positif du composé **APD₁₂**.

Spectrométrie RMN :

Le spectre RMN ^1H du composé **APD**₁₂ (figure III-159) montre un profil relativement simple et permet de mettre en évidence la présence des protons caractéristiques d'un iridoïde. En effet, on observe :

- Un doublet ($J = 6.0$ Hz) à δ_{H} 5.30 ppm, correspondant au proton H-1.
- Un singulet déblindé résonant à δ_{H} 7.46 ppm, caractéristique du proton oléfinique H-3.
- L'absence du deuxième proton oléfinique H-4 indique que le C-4 est un carbone quaternaire.
- Un signal multiplet résonant à δ_{H} 3.26 ppm, attribué au proton H-5.
- L'apparition de deux groupements éthyléniques sous forme de multiplets à δ_{H} 1.44 et 2.23 et 1.71 ppm attribuables aux protons H_b-6, H_a-6 et H-7 respectivement, montre que les positions C-6 et C-7 sont libre. Ce qui indique que le cycle époxyde (C-7/C-8) est ouvert.
- Le signal multiplet du proton H-9 à δ_{H} 2.15 ppm.
- Un signal singulet d'un groupement méthyle (CH₃-10) à δ_{H} 1.32 ppm.
- Le proton anomère H-1'_{Glc} situé à δ_{H} 4.70 ppm.

Outre les signaux ayant permis de caractériser le noyau iridoïde, le spectre RMN ^1H laisse observer des signaux identifier précédemment (**APD**₂) du groupement foliamenthoyl (Kuruüzüm-Uz et al., 2003).

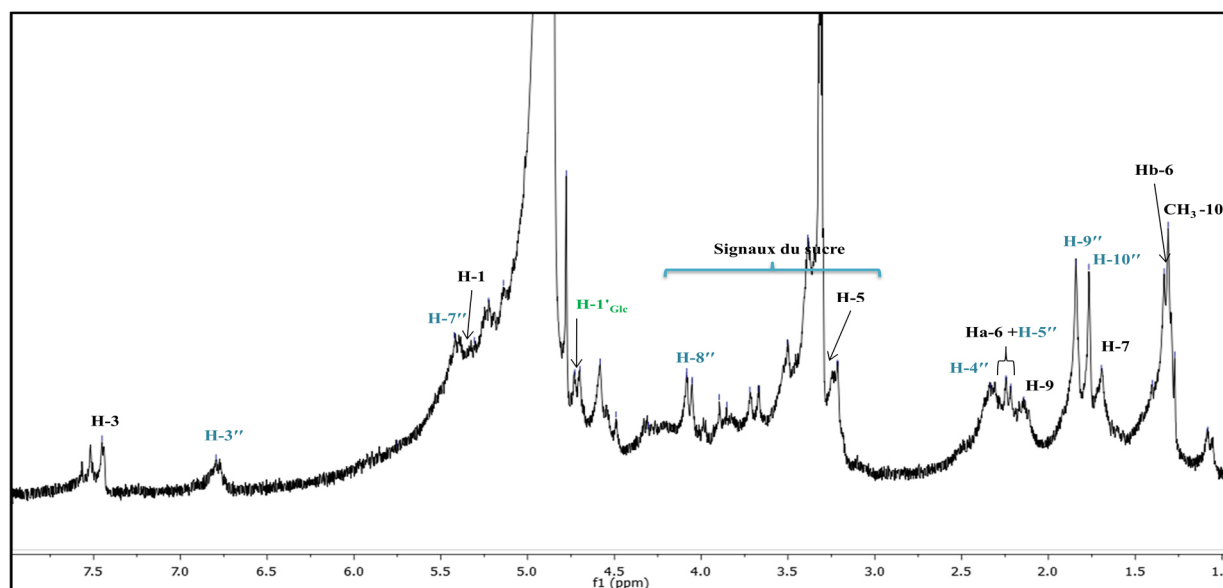


Figure III-159. Spectre de RMN ^1H du composé **APD**₁₂.

L'expérience HSQC (figure III-160- III-161) montre les corrélations entre :

- Le proton H-1 et son carbone C-1 résonant à δ_C 96.2 ppm.
- Le proton H-3 et son carbone C-3 résonant à δ_C 150.0 ppm.
- Le proton H-5 et son carbone C-5 résonant à δ_C 33.0 ppm.
- Les protons H-6 et leur carbone C-6 résonant à δ_C 30.8 ppm.
- Le proton H-7 et son carbone C-7 résonant à δ_C 40.7 ppm. Valeur qui confirme bien que le cycle époxyde (C-7/C-8) est ouvert.
- Le proton H-9 et son carbone C-9 résonant à δ_C 51.7 ppm.
- Les protons H-10 et leur carbone C-10 résonant à δ_C 24.5 ppm.

Selon la formule brute donnée par le spectre de masse en mode positif ($C_{26}H_{38}O_{12}$), on peut déduire que le substituant en position C-4 il ne peut être qu'une fonction acide.

Toutes ces données spectrales et une comparaison avec la littérature nous orientent vers un squelette d'un iridoïdemussaenosidicacid.

Les valeurs déblindées des déplacements chimiques des protons $H_{a-6'_{Glc}}$ (δ_H 4.20) et $H_{b-6'_{Glc}}$ (δ_H 3.96 ppm) du glucose, permettent de suggérer que le groupement foliamenthoyl localisé à la position C-6'_{Glc} (tableau III-10).

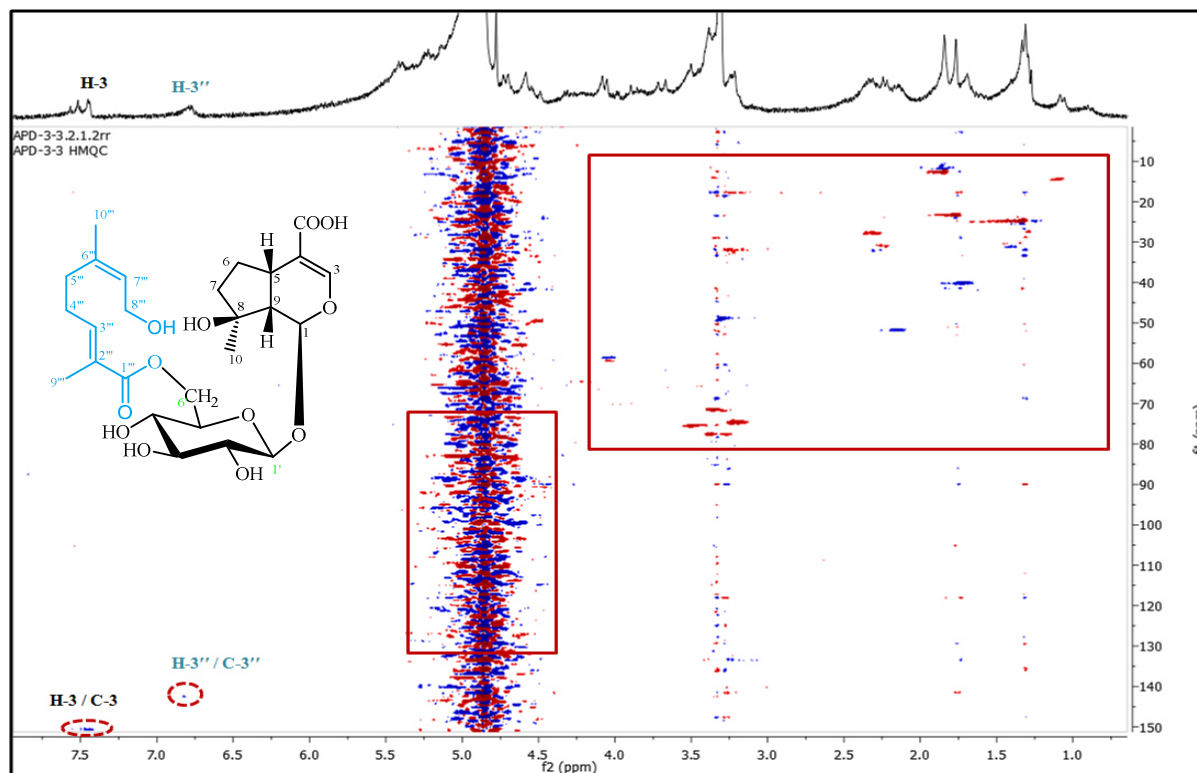


Figure III-160. Spectre HSQC du composé APD12.

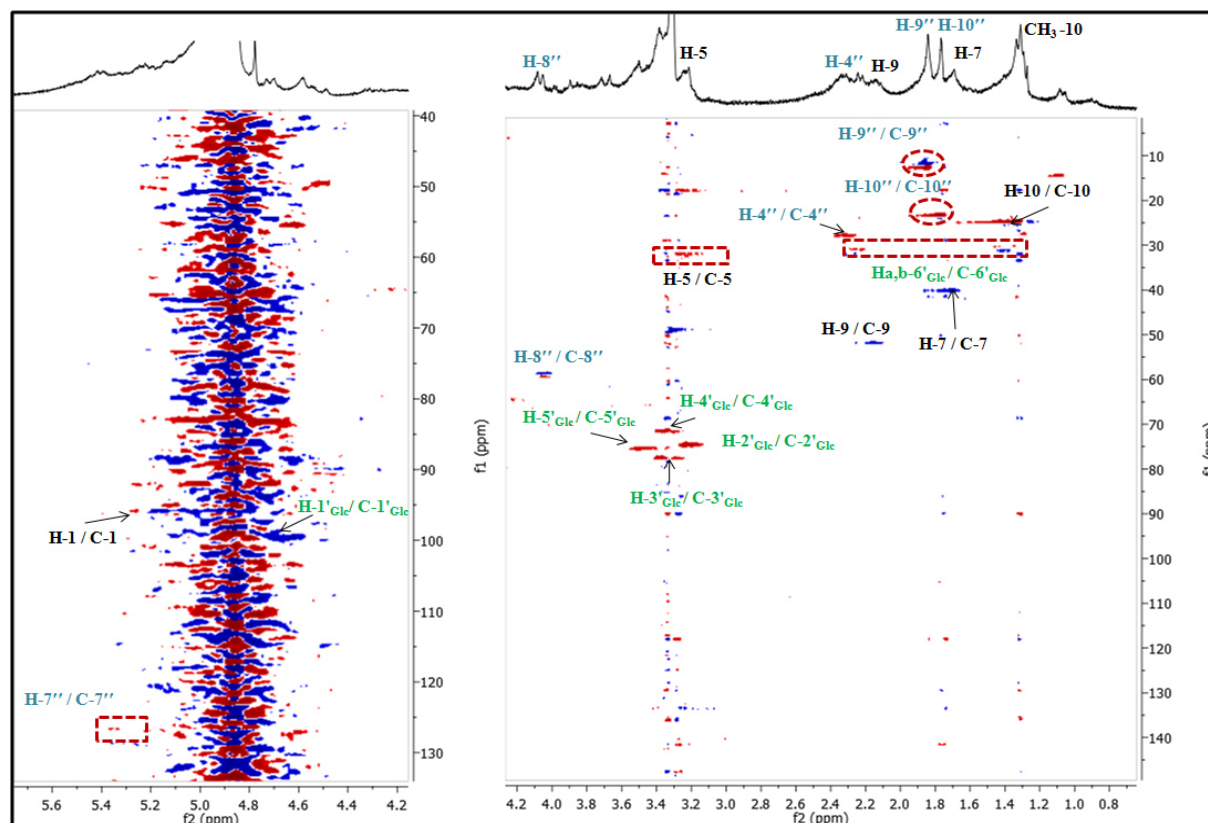
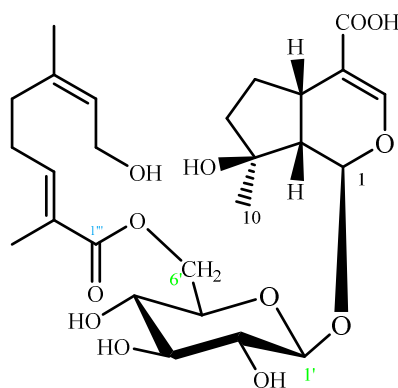


Figure III-161. Spectre HSQC de δ_H 0.8 à 4.2 et 4.4 à 5.6 ppm du composé APD₁₂.

La structure du composé APD₁₂ est : **6'-O-foliamenthoylmussaenosidic acid** nommé également **Agnucastoside A** isolé précédemment de *Vitex agnus-castus* (Kuruüzüm-Uz et al., 2003), mais c'est la première fois qu'il est isolé du genre *Anarrhinum*.



APD₁₂ : Agnucastoside A.

III.3.1.14. Détermination structurale du composé APD₁₃

Spectrométrie de masse :

L'ion pseudo-moléculaire à m/z 727.2787 $[M+Na]^+$ (calc 727.2789) du composé APD₁₃, obtenu en HR-ESI-MS (mode positif), correspond à une formule brute C₃₂H₄₈O₁₇ (figure III-162). D'autres fragments importants ont été observés à m/z à 709.2658 $[M+Na-18]^+$, 547.2139 $[M+Na-18-162]^+$ correspondant à l'élimination successive d'une molécule d'eau et une unité d'hexose.

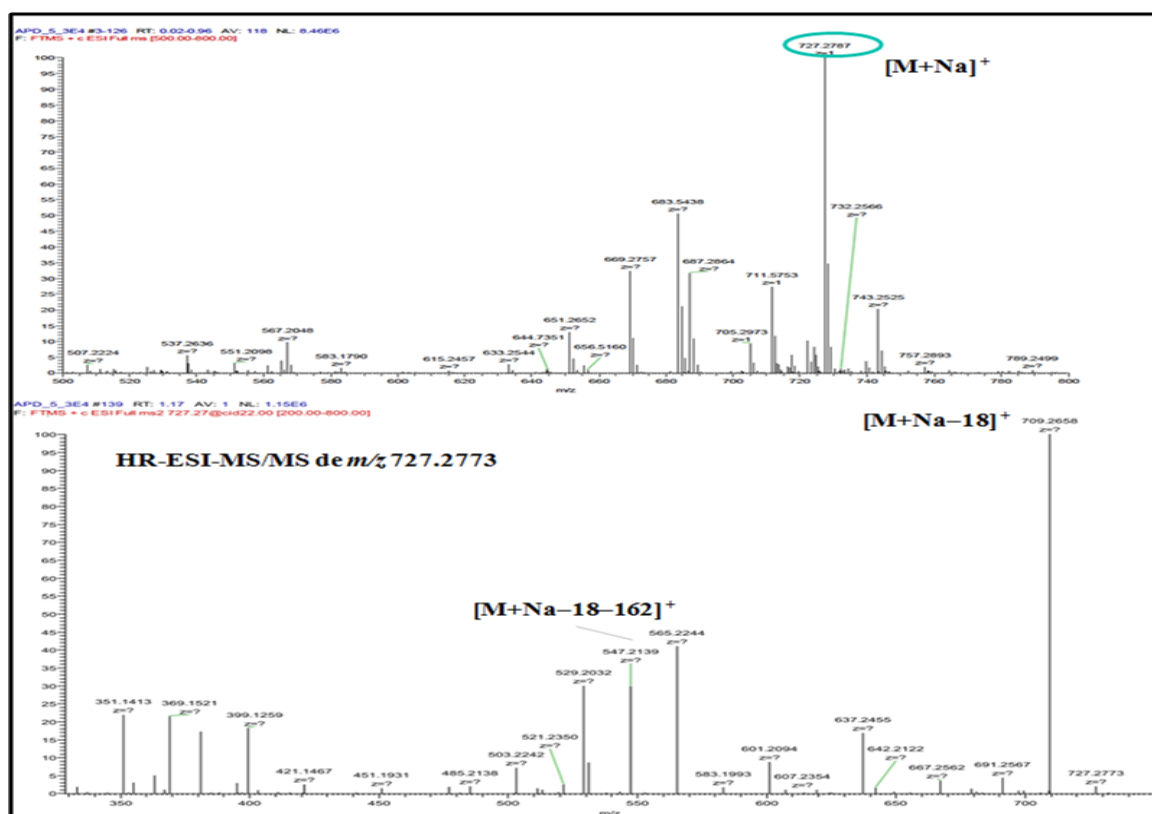


Figure III-162. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₁₃.

Spectrométrie RMN :

Les spectres RMN du ¹H et HSQC (figure III-163- III-164) du composé APD₁₃ présente une forte similitude avec celui du composé agnucastoside A (APD₁₂), avec l'apparition d'un deuxième sucre :

- Un multiplet à δ_H 5.13/ δ_C 72.2 ppm attribuable à un proton anomérique d'un sucre.

- Deux protons sous forme de doublets résonant à δ_H 3.69 ($H_b-1''_{Fru}$) et 4.05 ($H_a-1''_{Fru}$) / δ_C 61.3 ppm ($J = 12.0$ Hz).
- Un doublet à δ_H 3.88 / δ_C 68.0 ppm ($J = 12.0$ Hz), attribué au proton $H-3''_{Fru}$
- Un signal sous forme de doublet de doublet ($J = 10.0, 4.0$ Hz) résonant à δ_H 4.02 / δ_C 69.0 ppm ($H-4''_{Fru}$).
- Deux triplets ($J = 10.0$ Hz) d'intégration 1H à δ_H 3.49 ($H_b-6''_{Fru}$) et 3.70 ($H_a-6''_{Fru}$) / δ_C 65.0 ppm.

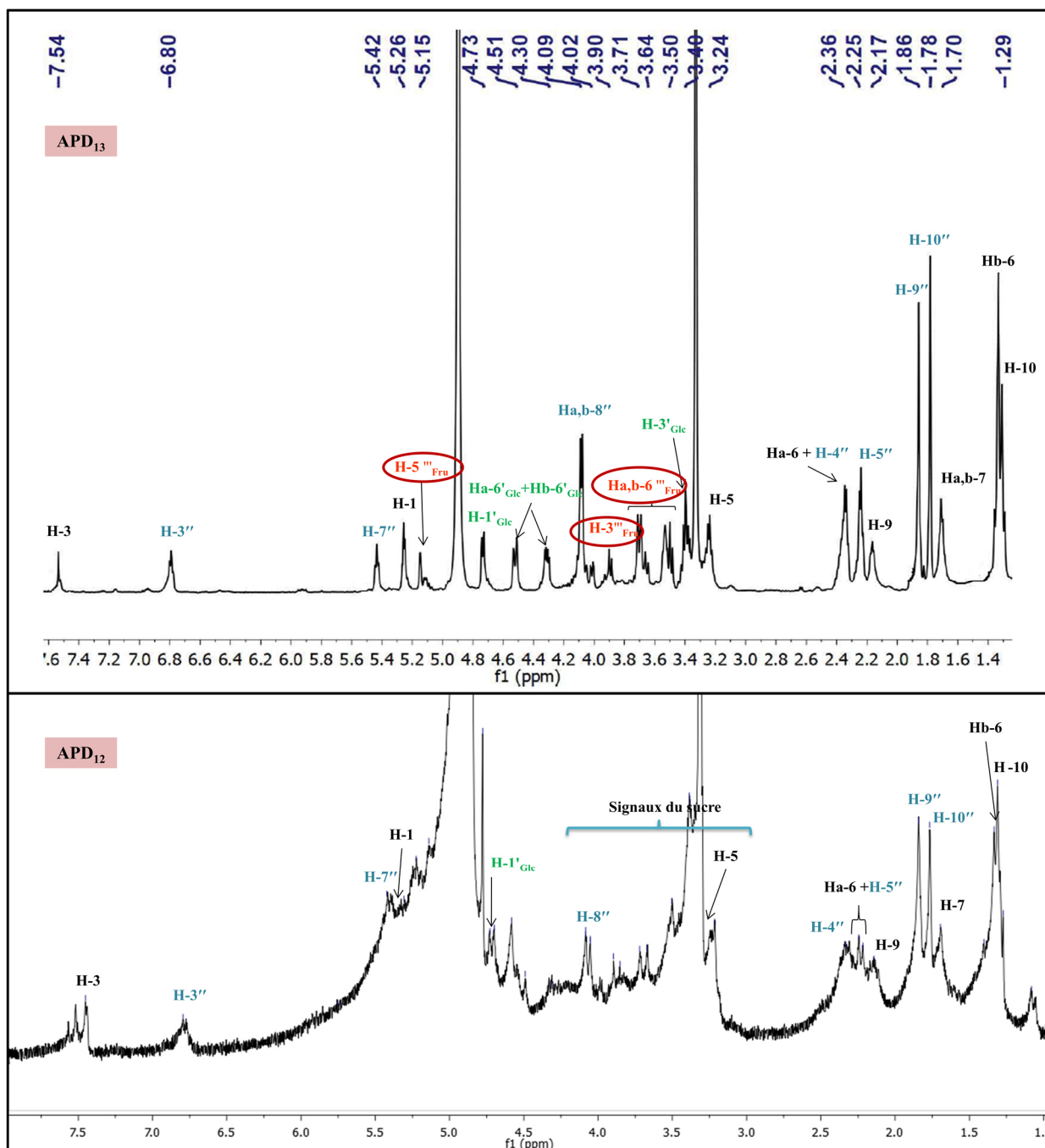


Figure III-163. Spectre de RMN 1H du composé **APD₁₃** comparé à celui du composé **APD₁₂**.

L'analyse de spectre HSQC (figure III-164) révèle des corrélations carbone–proton du noyau agnucastosite A, avec en plus les corrélations des atomes de l'hexose.

Les valeurs sont répertoriées dans le tableau III-10.

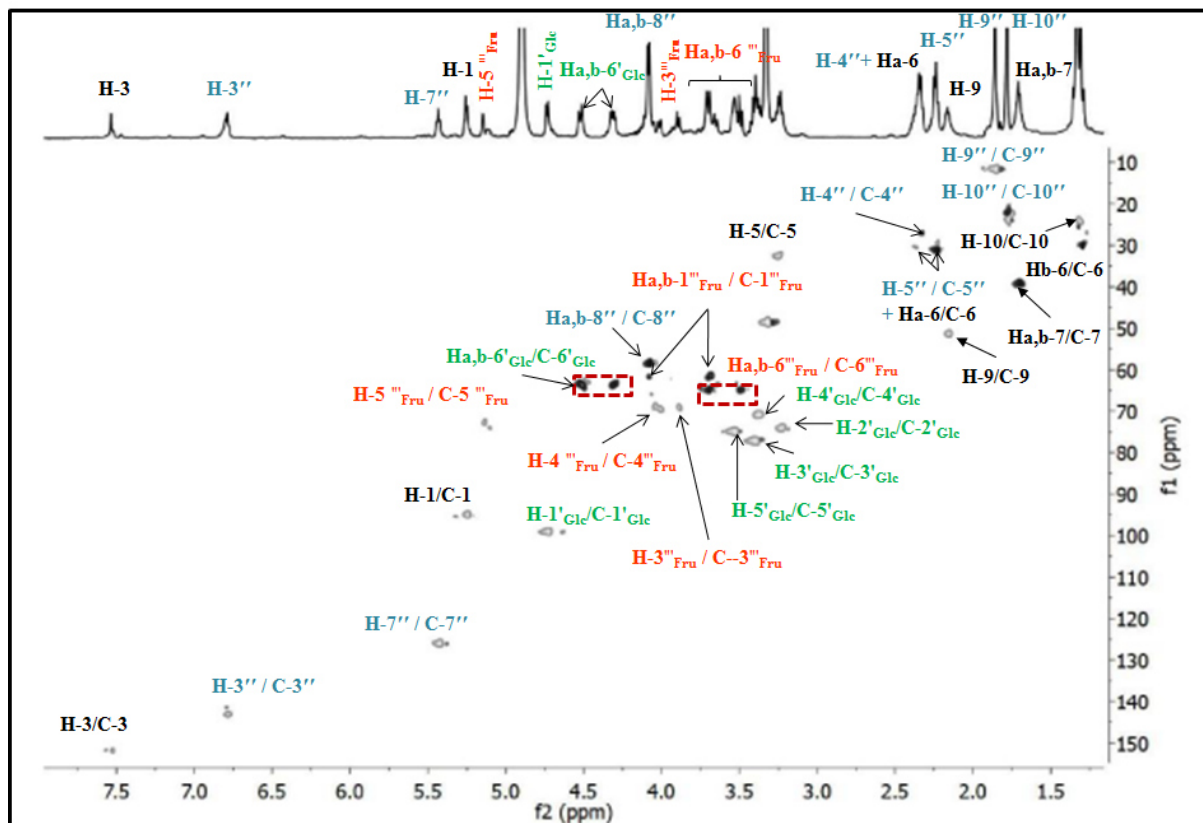


Figure III-164. Spectre HSQC du composé APD₁₃.

Partant du proton anomère d'hexose cité précédemment et résonant à δ_C 5.13 ppm, l'expérience COSY H-H (figure III-165- III-166) du produit APD₁₃ permet d'identifier la nature du sucre. En effet, on observe les corrélations entre :

- Le proton anomère H-5''_{Fru} et le proton H-4''_{Fru} résonant à δ_H 4.02 ppm sous forme de doublet de doublets ($J = 10.0, 4.0$ Hz), lui-même corrélant avec un signal doublet à δ_H 3.88 ppm ($J = 10.0$ Hz) correspondant au proton H-3''_{Fru}.
- Le proton H_b-1''_{Fru} (δ_H 3.69 ppm) et le proton H_a-1''_{Fru} (δ_H 4.05 ppm) sous forme de doublet ($J = 12.0$ Hz).
- Le proton H_a-6''_{Fru} et les protons H_b-6''_{Fru} à δ_H 3.49 ppm sous forme de triplet ($J = 10.0$ Hz) et le proton anomère H-5''_{Fru}. Ces deux protons H_a-6''_{Fru} et H_b-6''_{Fru} constituant la partie AB d'un système ABX d'un hexose.

Les grandes tâches de corrélation traduisant de grandes valeurs de constantes de couplage, indiquent que tous les protons caractérisant l'hexose sont axiaux. Il s'agit donc d'un D-fructose de configuration β (Zhang et al., 1996), l'hydrolyse acide le confirme.

Afin de confirmer la configuration relative du β -fructopyranosyle, le dérivé acétonide **APD_{13a}** a été préparé (partie II expérimentale). ainsi, les déplacements des carbones C-1^{'''}_{Fru} et C-2^{'''}_{Fru} du β -fructopyranosyle résonnant à δ_C 61.3 et 98.0 ppm par rapport au dérivé 1,2-O-isopropylidene **APD_{13a}** à δ_C 73.4 et 107.6 ppm, respectivement, d'une manière entièrement identique à la **1,2-O-isopropylidene- β -D-fructopyranose** et la comparaison de ces données avec celles rapportées dans la littérature (Racine et al., 2016) le confirme.

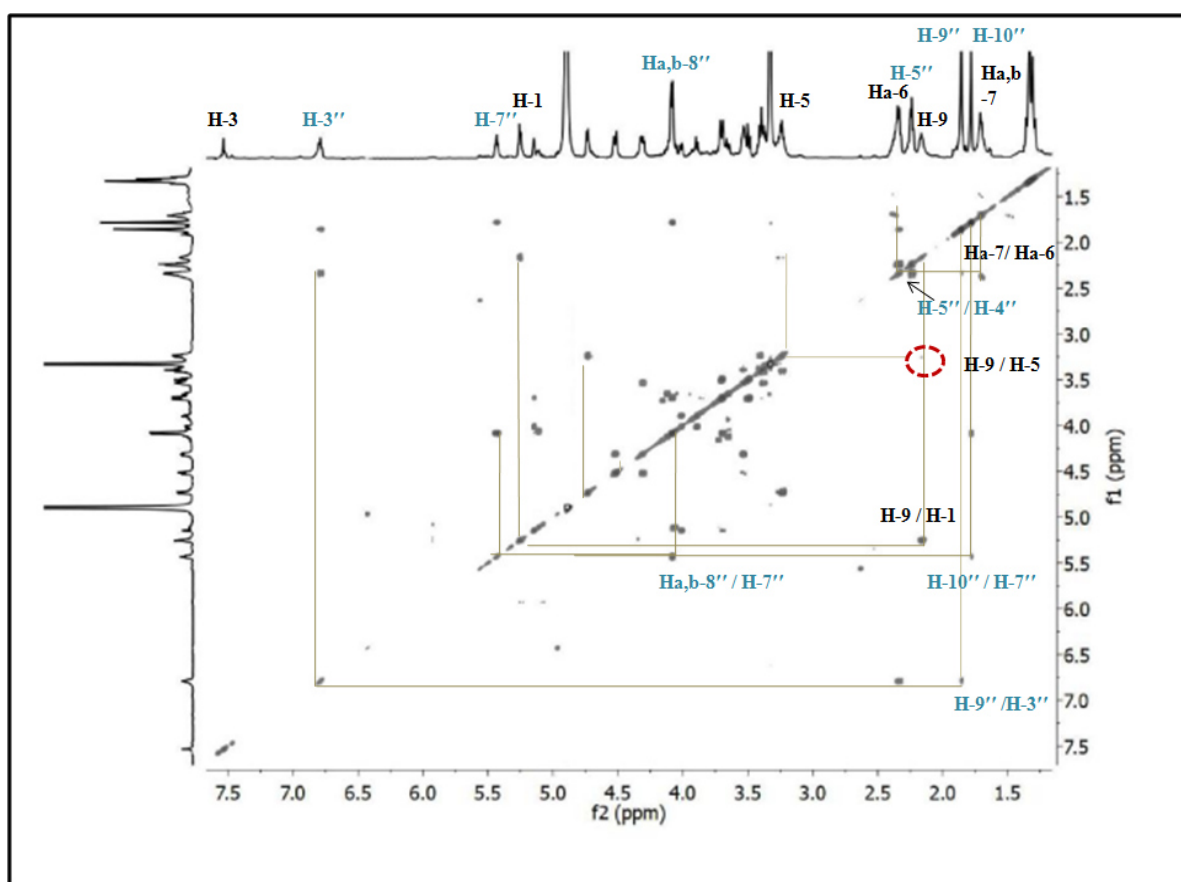


Figure III-165. Spectre de COSY du composé **APD₁₃**.

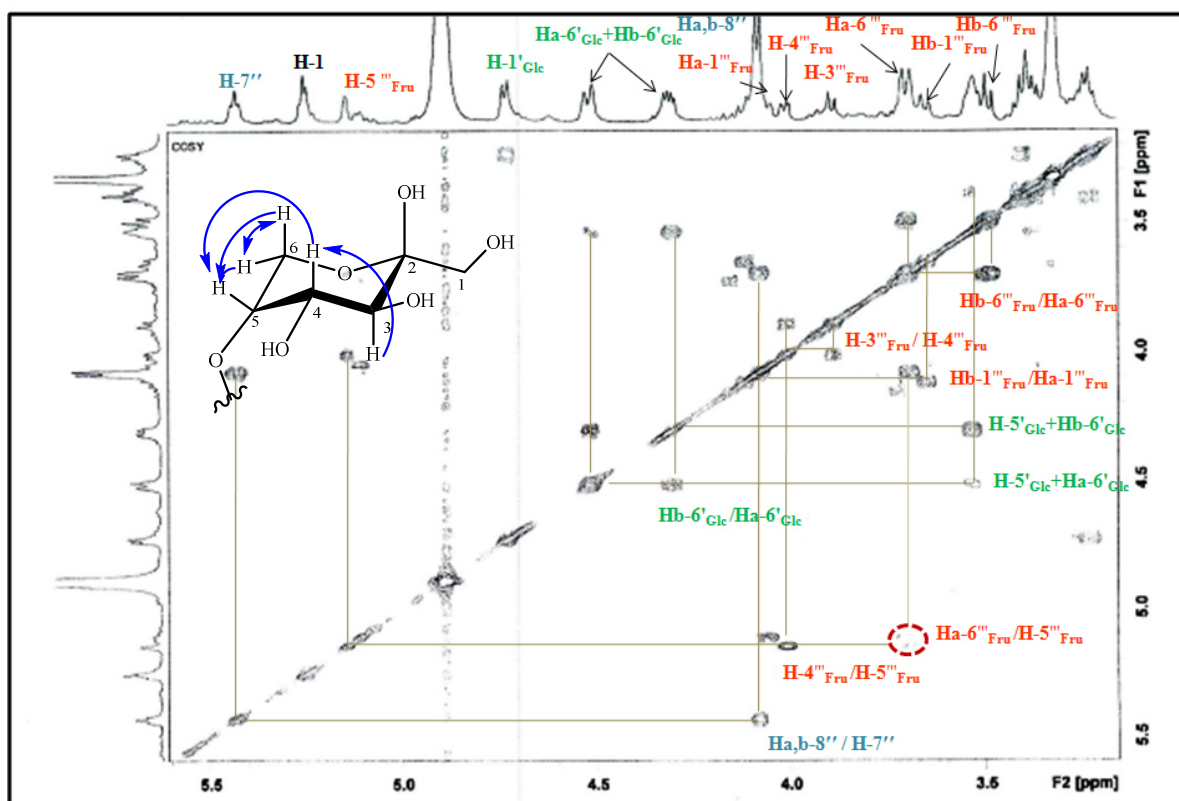


Figure III-166. Spectre de COSY de δ_H 3.5 à 5.5 ppm du composé APD₁₃.

L'expérience HMBC (figure III-168- III-169) constitue un outil de choix pour déterminer ou plutôt confirmer sans ambiguïté la structure du composé APD₁₃. En effet, on observe des corrélations entre :

- Corrélations du noyau agnucastoside A :
 - Le proton H-3 avec les carbones C-1, C-4, C-5 et C-11 ;
 - Le proton H-1 avec C-3, C-5 et C-1'Glc ;
 - Le carbone C-8 présente trois corrélations dont une avec les protons du méthyle CH₃-10, éthylènes H_{a,b}-7 et avec le proton H-9.
- Des taches de corrélations du foliamenthoyl entre les protons :
 - H-3''/ C-1'' et C-9'';
 - H-4''/ C-2'', C-3'', C-5'' et C-6'' ;
 - H-10''/ C-5'', C-6'' et C-7''.
- Les Corrélations du fructose entre :
 - Le proton Hb-1''' Fru / C-2''' Fru, C-4''' Fru et C-5''' Fru;
 - Le proton H-5''' Fru / C-4''' Fru;
 - Le proton H-6''' Fru / C-2''' Fru et C-4''' Fru.

La comparaison des déplacements chimiques (δ_C) du carbone carboxylique C-11 situé à δ_C 167.4 ppm (δ_C 171.3 ppm du composé **APD₁₂**) dans le squelette iridoïde suggère la présence d'une estérification en C-5^m du D- β -fructose avec la fonction carboxylique C-11.

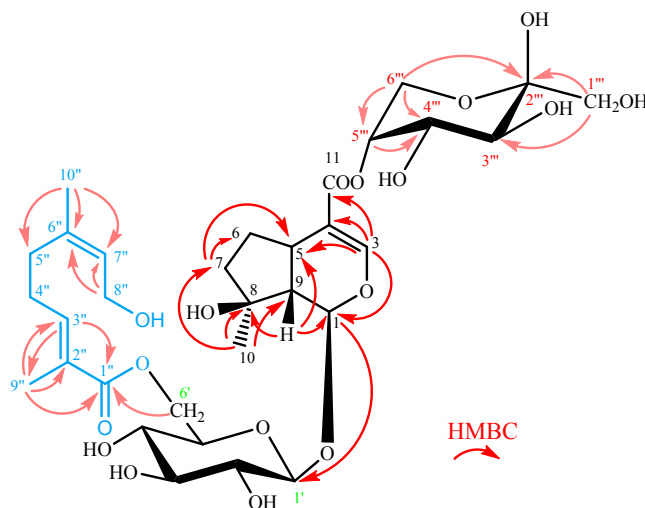


Figure III-167. Corrélations HMBC du composé **APD₁₃**.

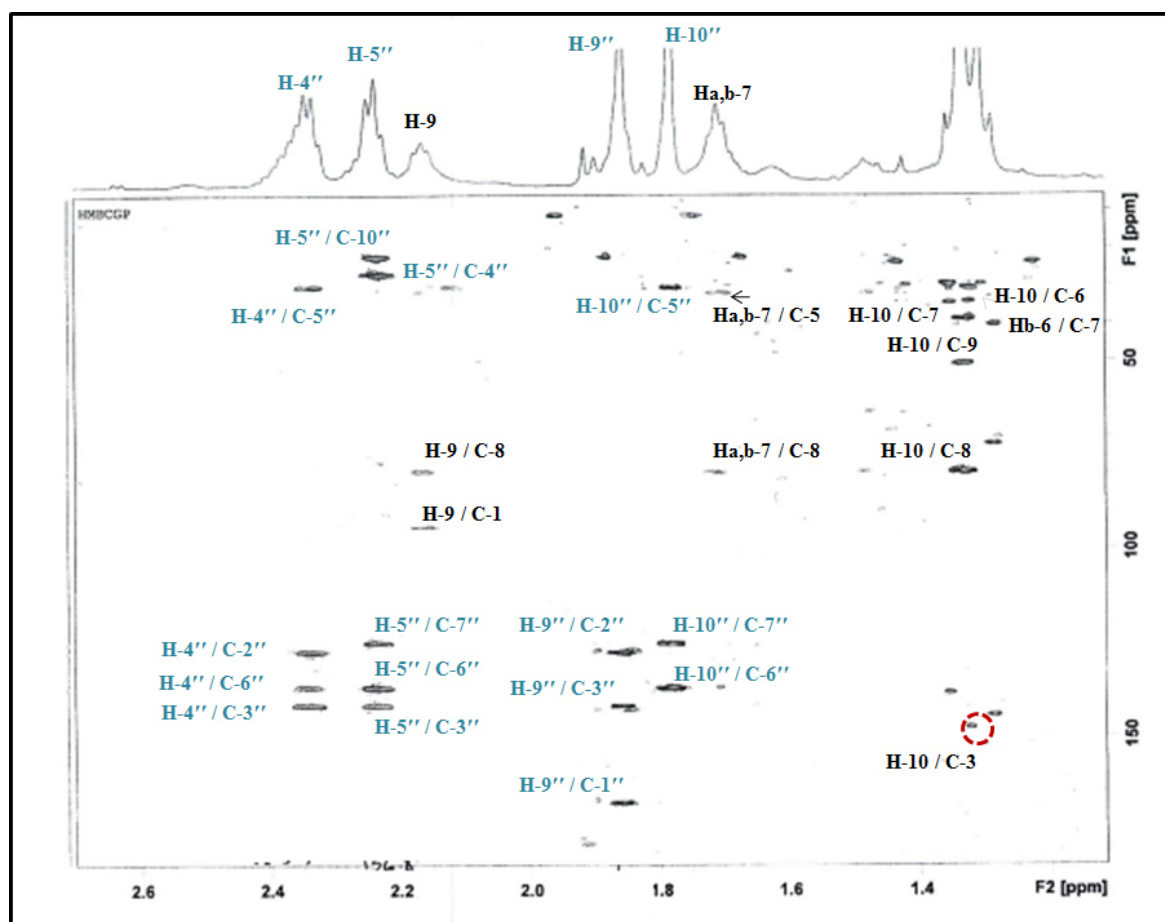


Figure III-168. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.32 à 2.6 ppm du composé **APD₁₃**.

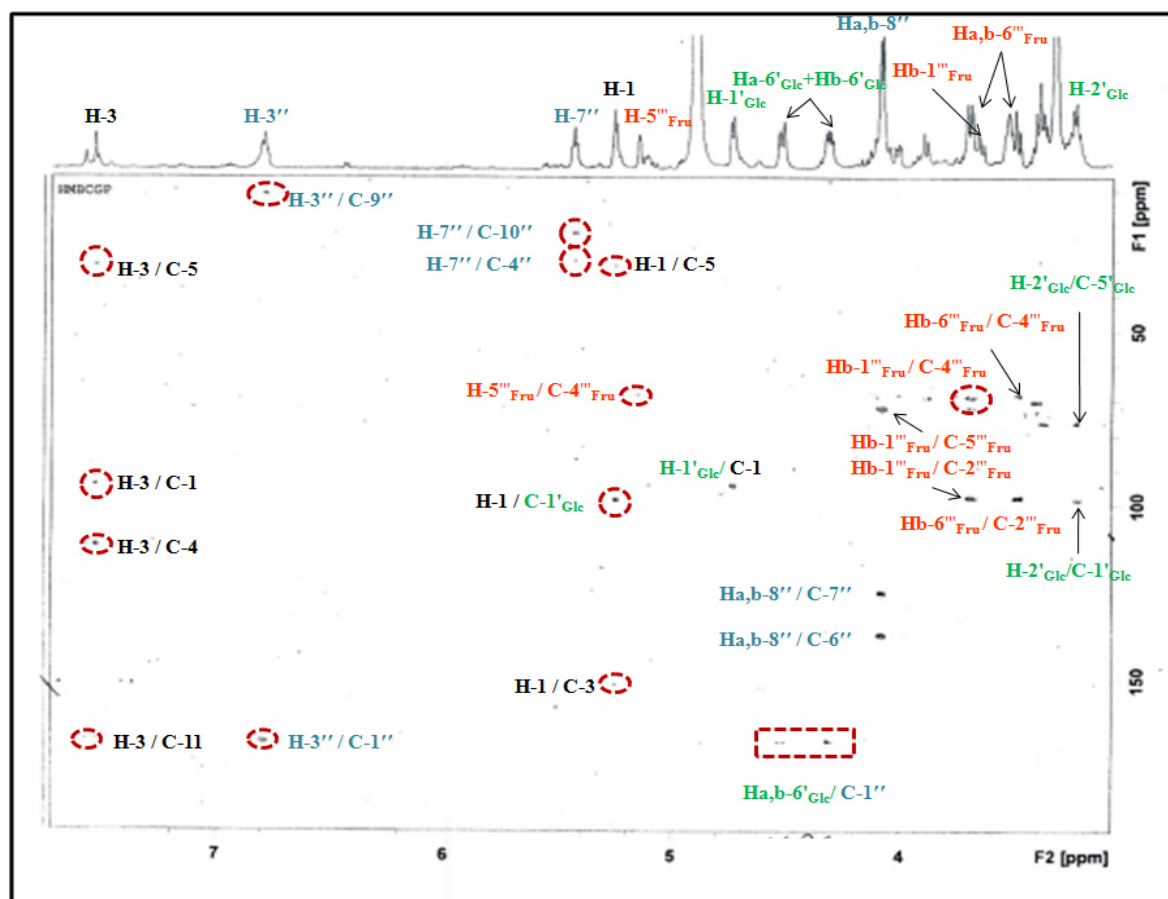
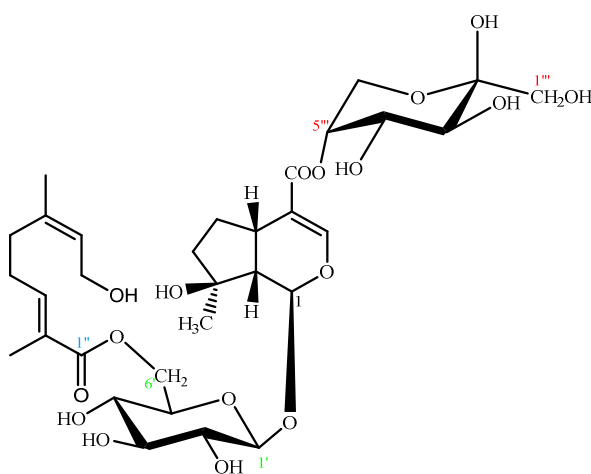


Figure III-169. Spectre de HMBC de δ_H 3.23 à 7.53 ppm du composé APD₁₃.

La structure du composé APD₁₃ a pu être établie comme une structure nouvelle : **agnucastoside A 11-(5-O-β-D-fructopyranosyl) ester**, la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25}$ -168 (c 0.1, MeOH).



APD₁₃ : Agnucastoside A 11-(5-O-β-D-fructopyranosyl) ester.

III.3.1.15. Détermination structurale du composé APD₁₄

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif (figure III-170) d'APD₁₄ montre un ion pseudo-moléculaire à m/z 727.2764 $[M+Na]^+$ (calc 727.2789) correspondant à une formule brute C₃₂H₄₈O₇ et suggérant comme un isomère du composé APD₁₃.

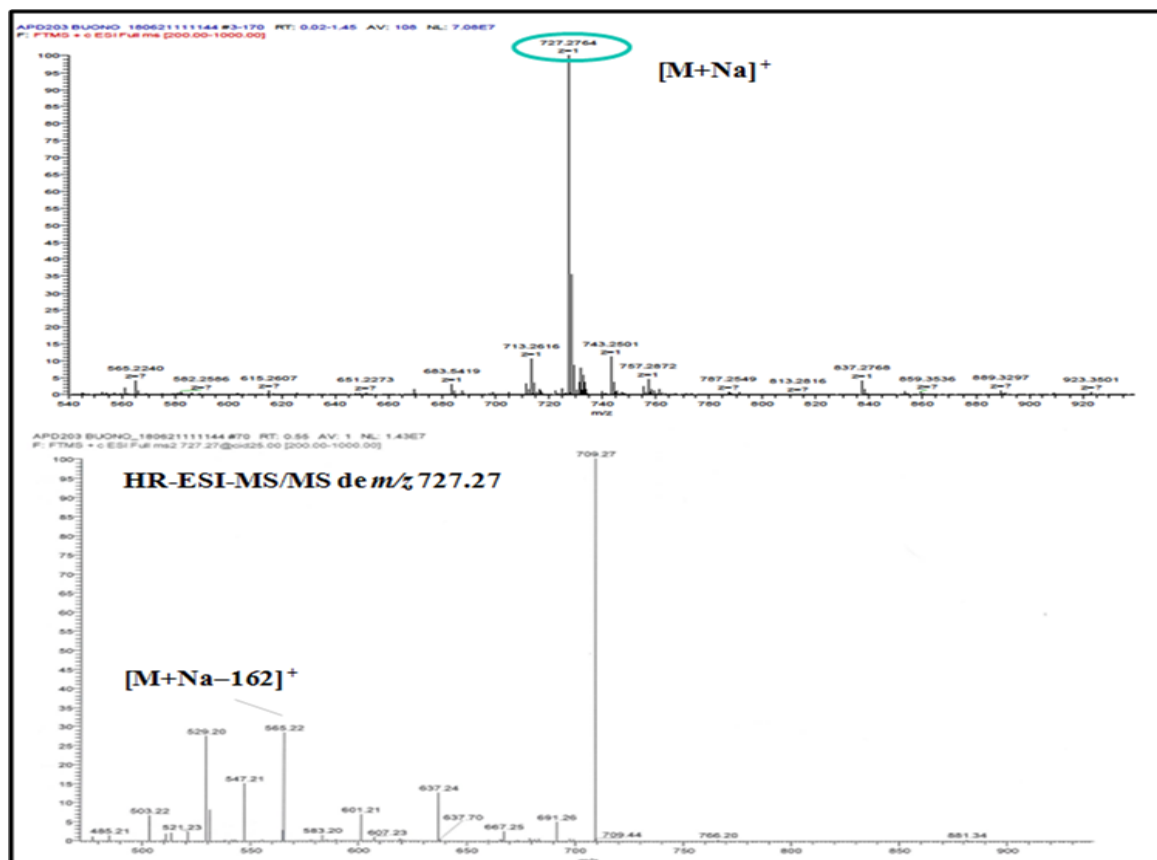


Figure III-170. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₁₄.

Spectrométrie RMN :

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D (figure III-171- III-178) révèle que le composé APD₁₄ diffère du composé agnucastosite A 11-(5-*O*- β -D-fructopyranosyl) ester (APD₁₃) par l'absence des signaux correspondants au groupement foliamenthoyl et la présence des signaux caractéristique du menthiafoloyl substitué au carbone C-6'_{Glc}. Ceci permet de déduire la présence d'un noyau mussaenosidic acid.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-10.

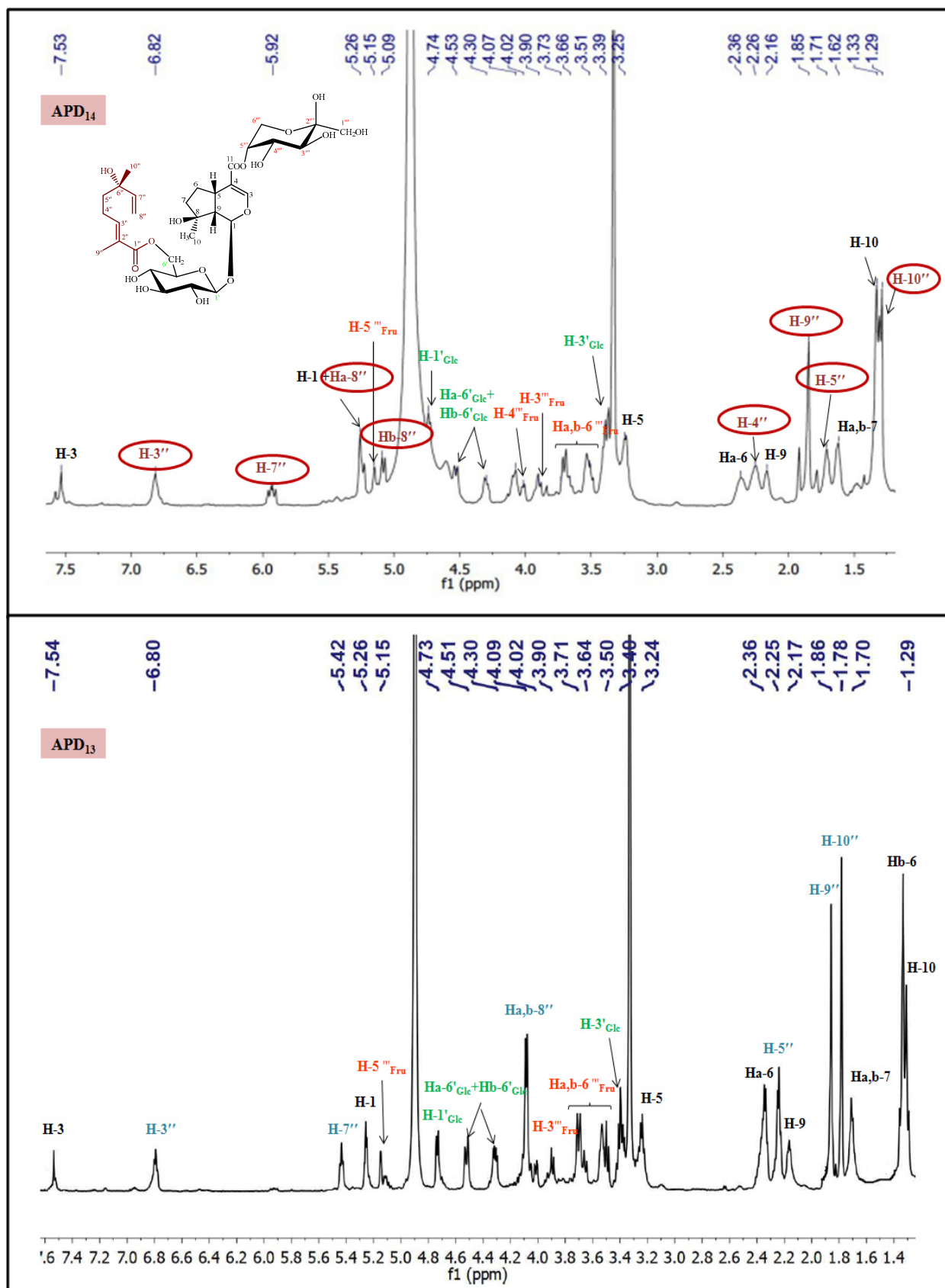


Figure III-171. Spectre de RMN ¹H du composé APD₁₄ comparé à celui du composé APD₁₃.

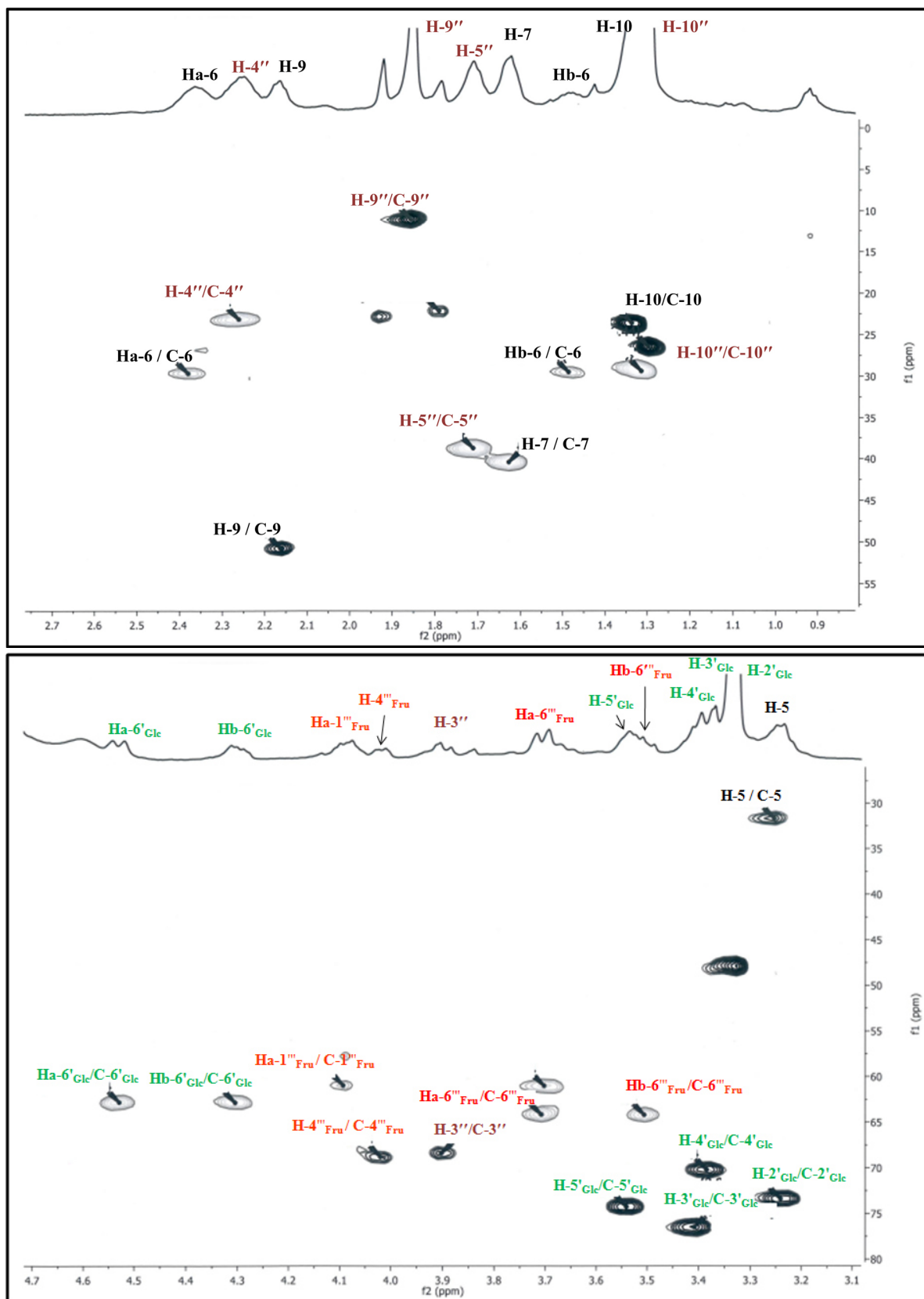


Figure III-172. Spectre de HSQC étalé de δ_H 0.9 à 4.7 ppm du composé APD₁₄.

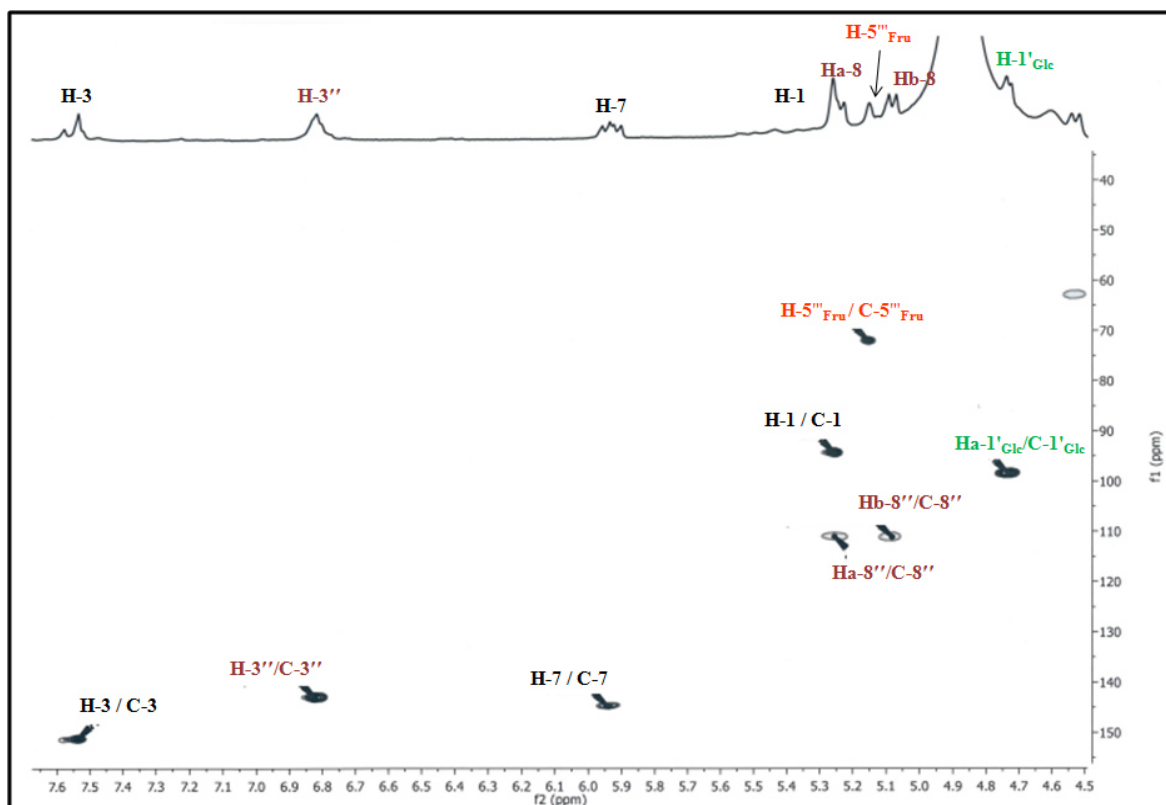


Figure III-173. Spectre de HSQC étalé de δ_H 4.5 à 7.6 ppm du composé APD₁₄.

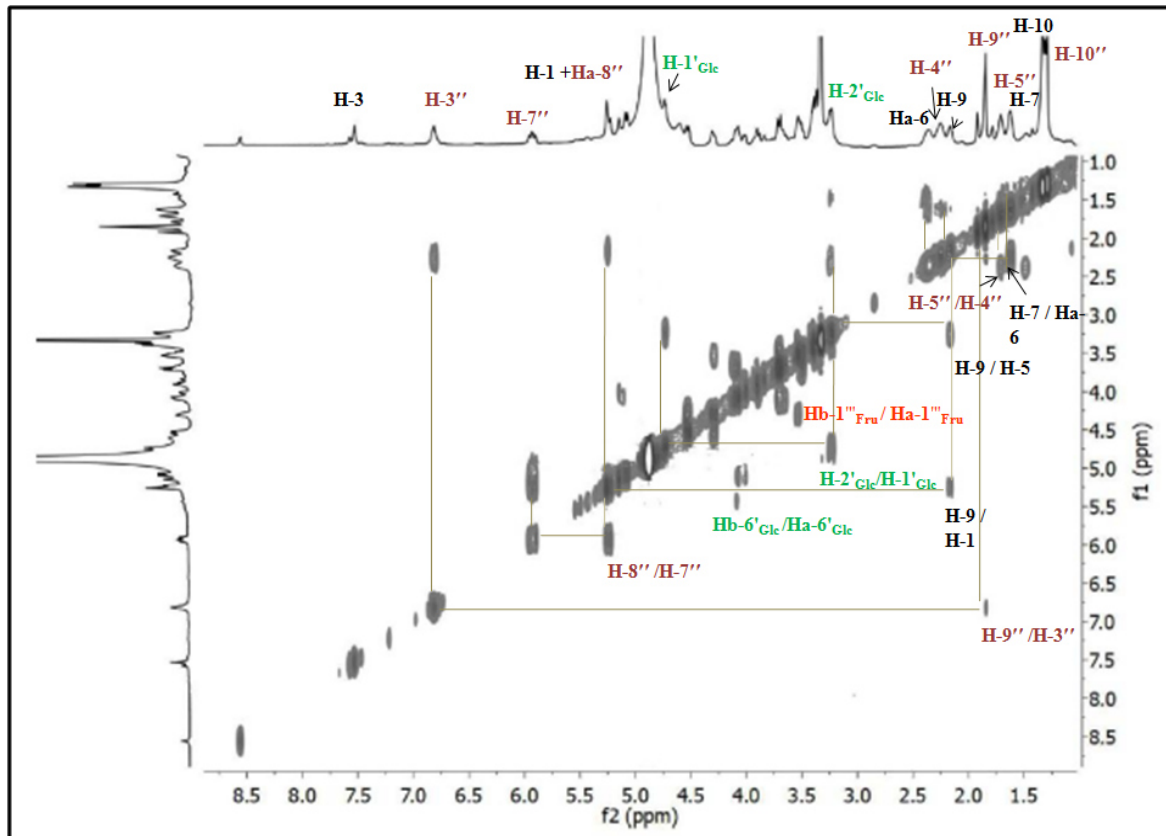


Figure III-174. Spectre de COSY du composé APD₁₄.

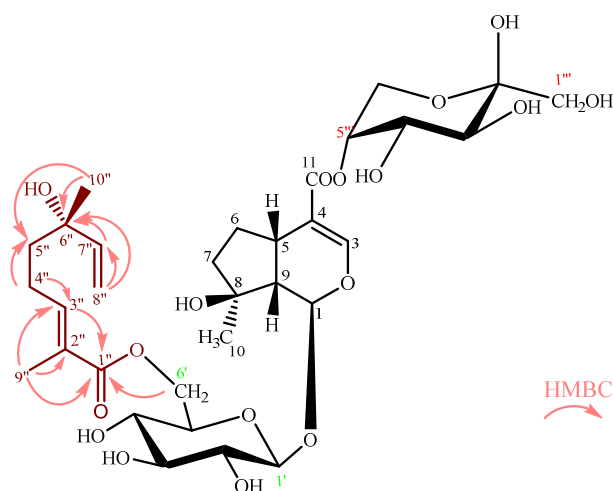
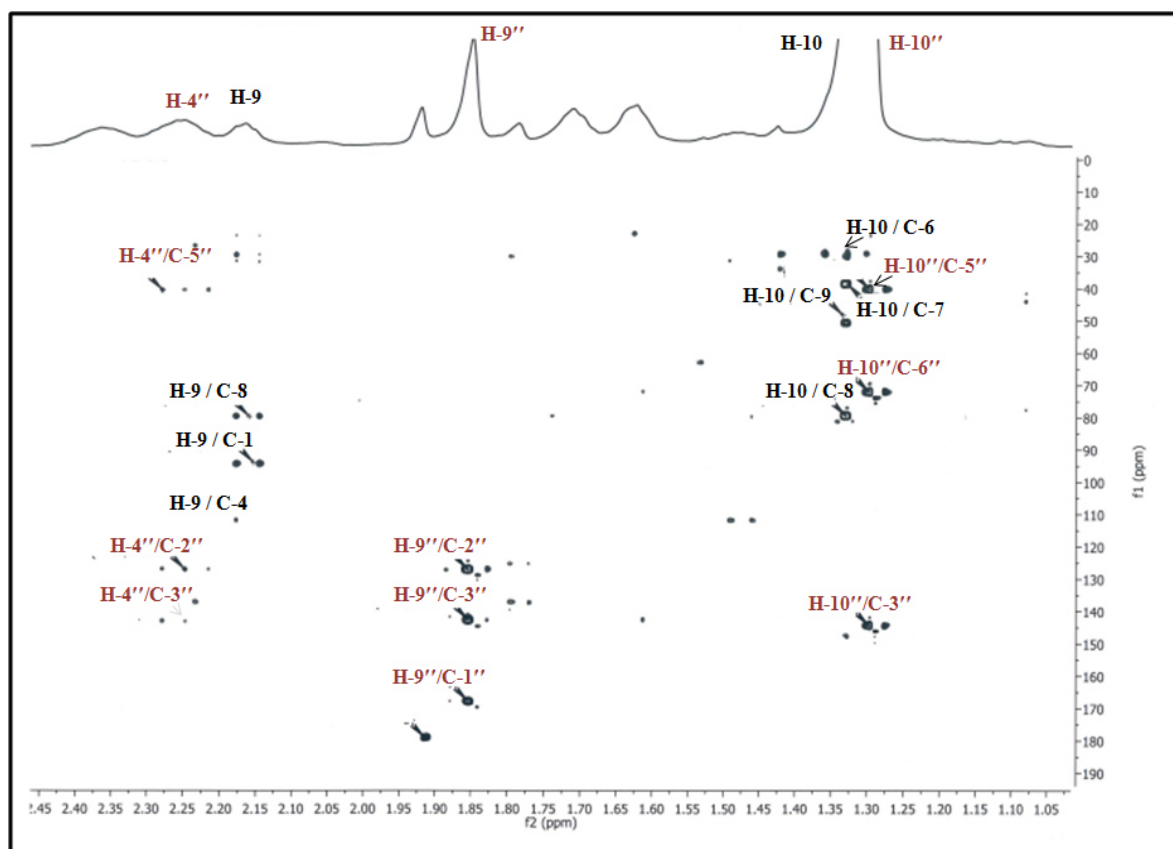


Figure III-175. Corrélations HMBC du composé APD14.

Figure III-176. Spectre de HMBC étalé de δ_H 1.05 à 2.45 ppm du composé APD14.

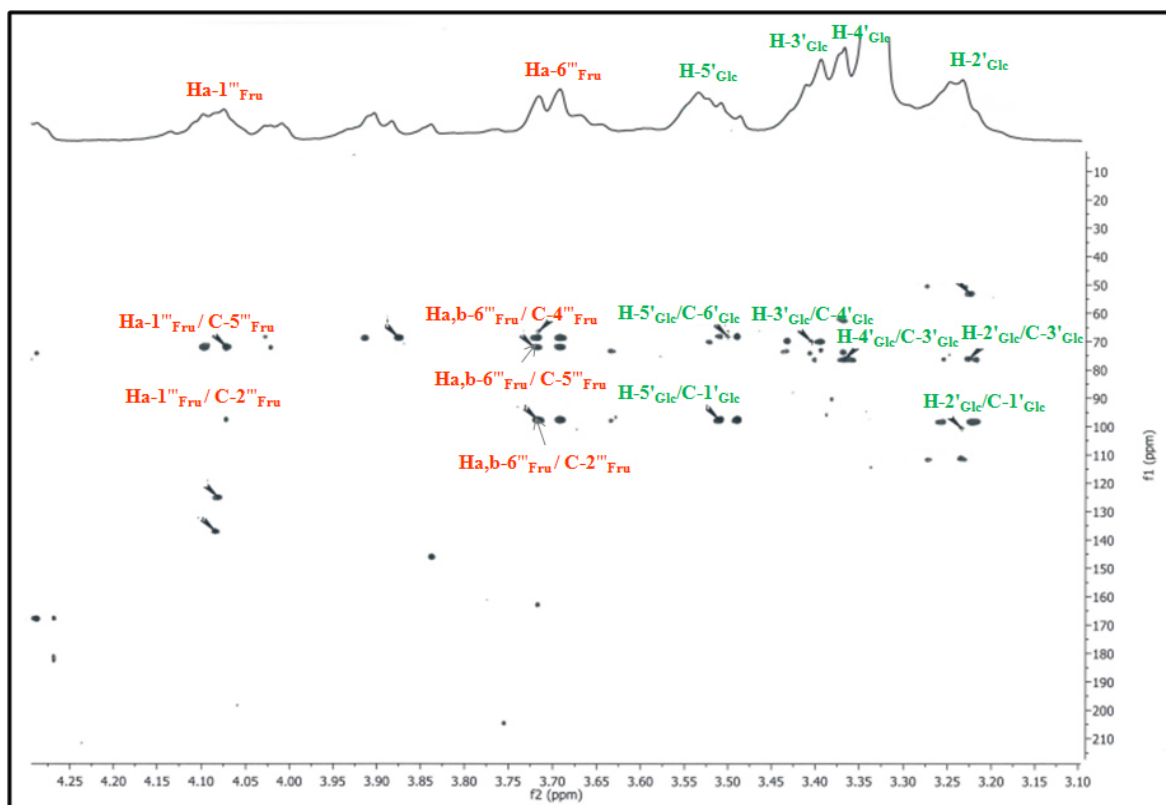


Figure III-177. Spectre de HMBC étalé de δ_H 3.10 à 4.25 ppm du composé APD₁₄.

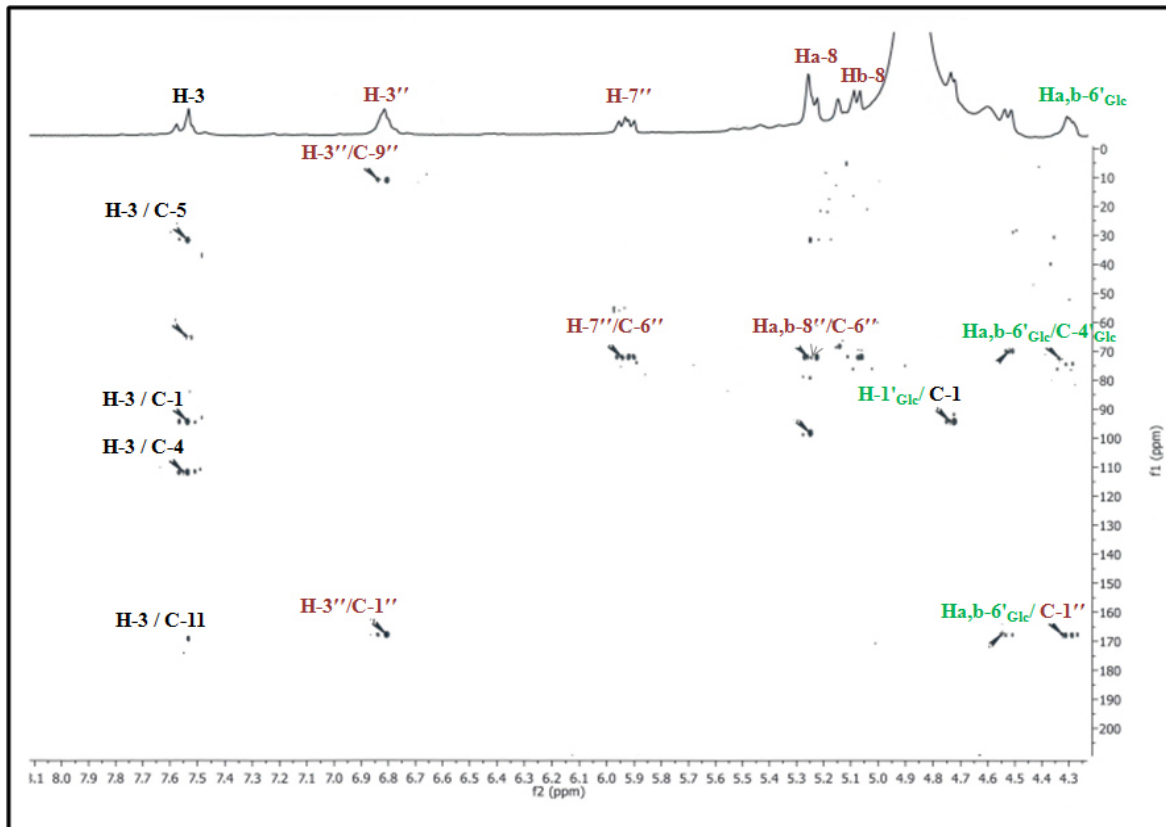
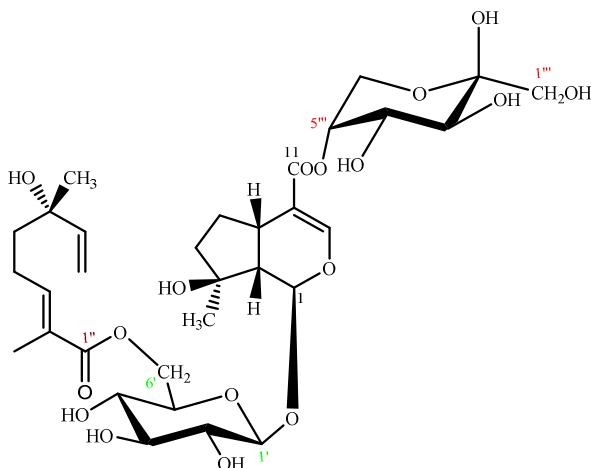


Figure III-178. Spectre de HMBC étalé de δ_H 4.3 à 8.0 ppm du composé APD₁₄.

L'ensemble des analyses spectrales de RMN et de masse et le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} -70$ (c 0.1, MeOH) nous a permis d'identifier le composé **APD₁₄** comme étant le **6'-O-menthiafoloylmussaenosidic acid-11-(5-O-β-D-fructopyranosyl) ester**, isolé pour la première fois.



APD₁₄ : 6'-O-menthiafoloylmussaenosidic acid-11-(5-O-β-D-fructopyranosyl) ester.

III.3.1.16. Détermination structurale du composé **APD₁₅**

Spectrométrie de masse :

Le composé **APD₁₅** présente une formule moléculaire en $C_{31}H_{40}O_{18}$. Une formule déterminée grâce au spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (figure III-179) qui montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 707.2156 $[M+Na]^+$ (calculé 707.2163) correspondant à une masse moléculaire égale à 684 *uma*. D'autres ions-fragments importants ont également été observés à m/z 689.2048 $[M+Na-18]^+$, 545.1620 $[M+Na-162]^+$ et 399.1257 $[M+Na-162-146]^+$ correspondant à la perte d'une molécule d'eau, d'un glucose et un groupement coumaroyle.

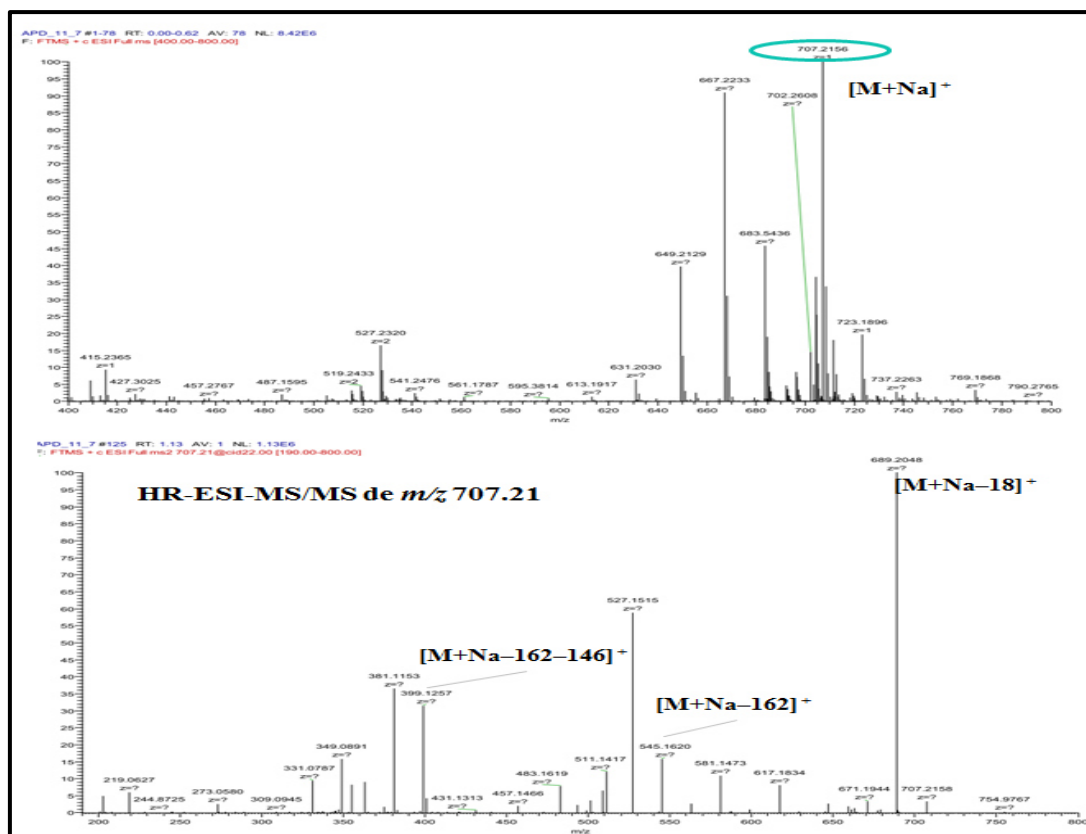


Figure III-179. Spectre de masse HR-ESI-MS et HR-ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₁₅.

Spectrométrie RMN :

Les spectres de RMN 1D et 2D (figure III-180- III-185) du composé APD₁₅ montrent des signaux caractéristiques d'un acidemussaenosidique similaire au composé APD₁₃, et des signaux d'un groupement *trans* et *cis* *p*-coumaroyle ressemble au produit APD₁₁.

La corrélation entre les protons H_{a,b}-6'_{Glc} avec le carbonyle C-9'' du *p*-coumaroyle observée sur le spectre HMBC confirme sa localisation en C-6'_{Glc} du glucose.

Les valeurs sont répertoriées dans le tableau III-10.

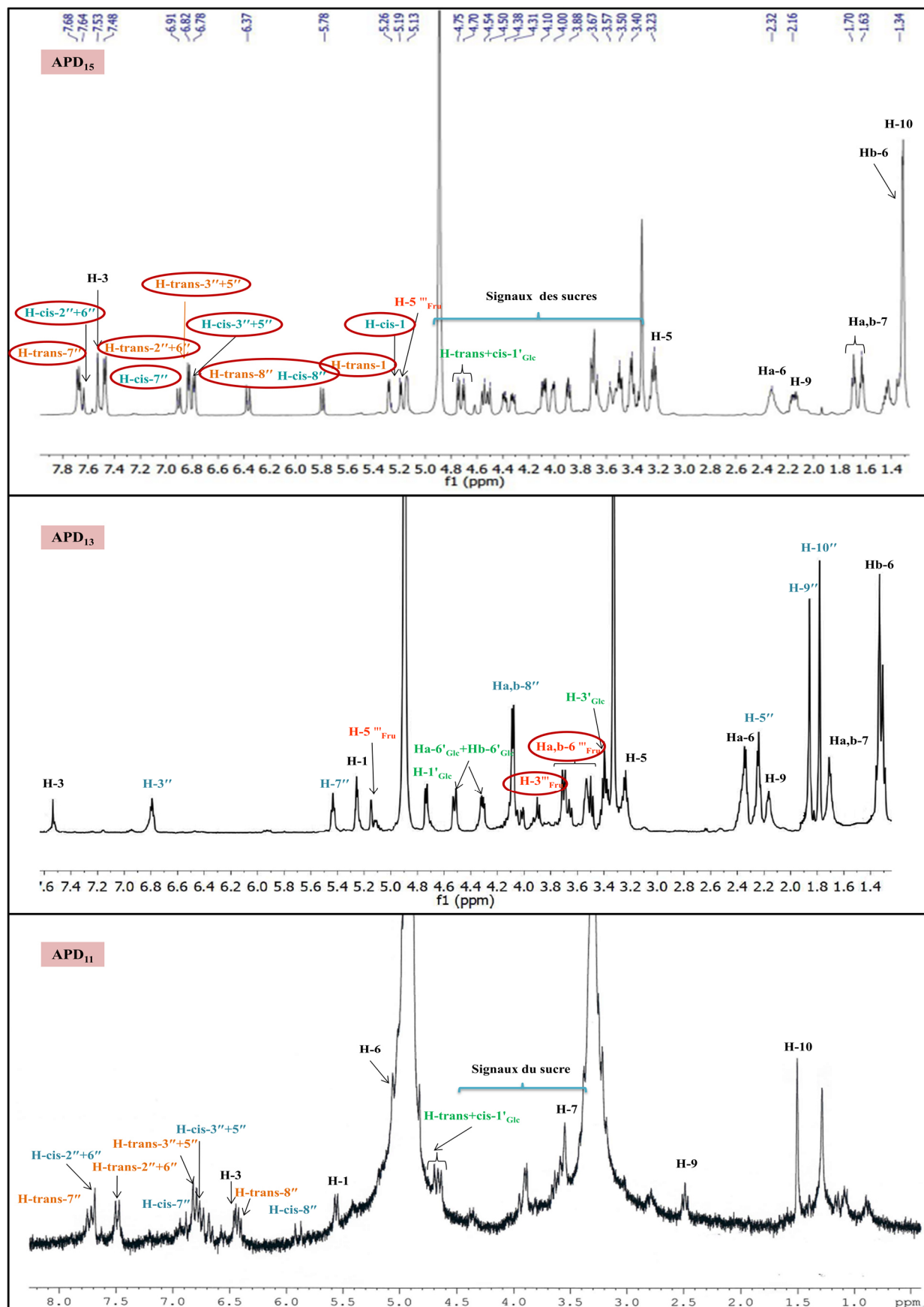


Figure III-180. Spectre de RMN ^1H du composé APD₁₅ comparé à celui des composés APD₁₃ et APD₁₁.

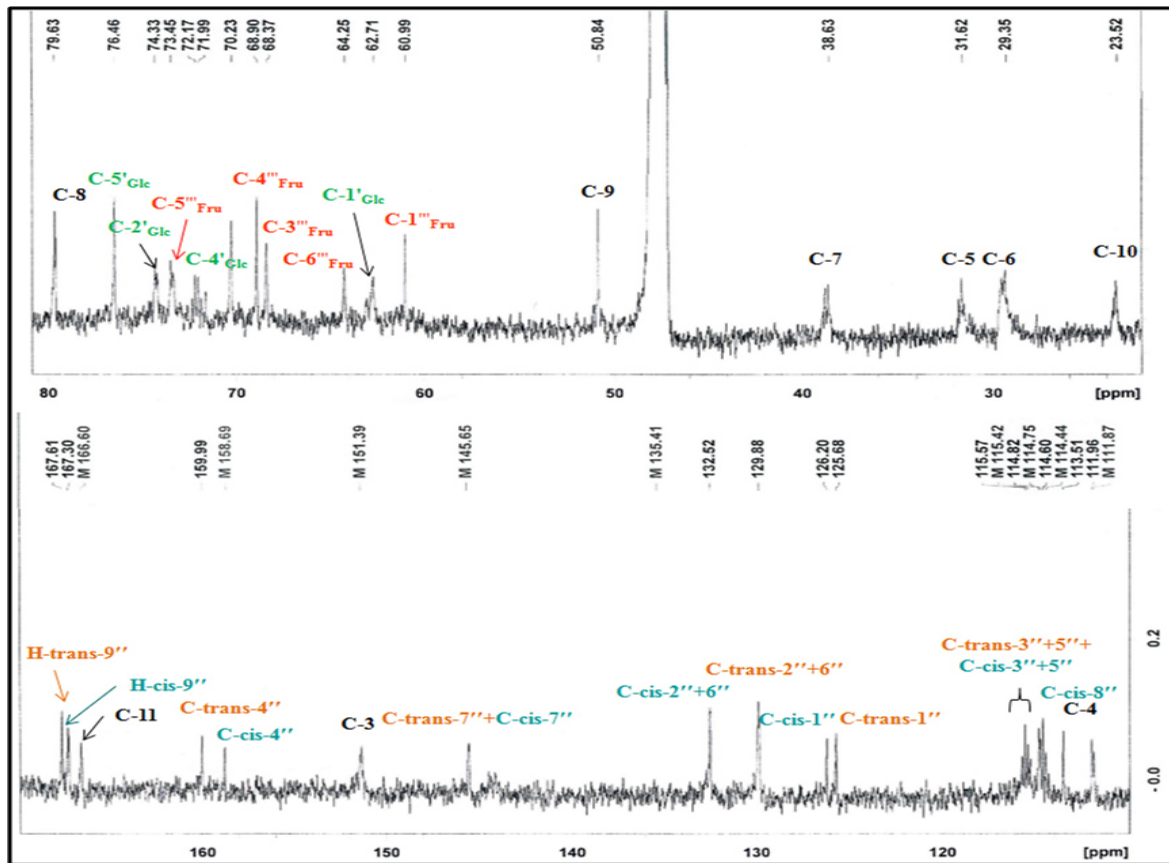
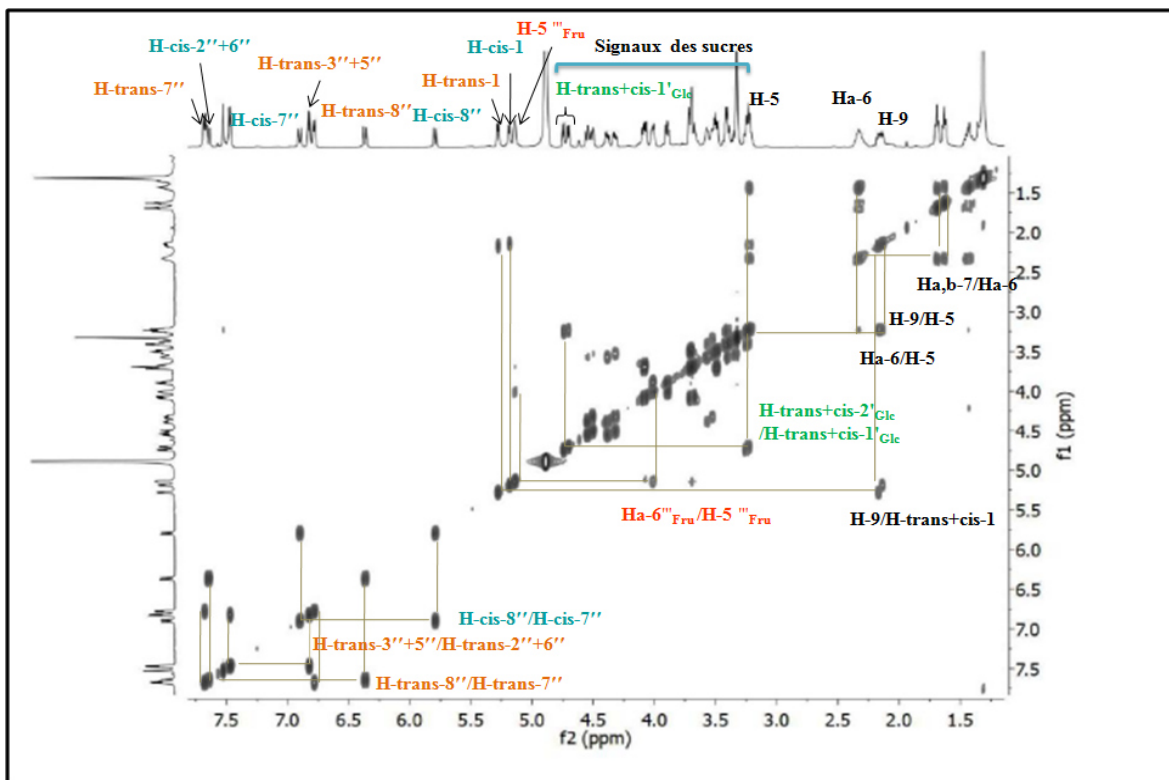
Figure III-181. Spectres de RMN ^{13}C étalé du composé APD15.

Figure III-182. Spectre COSY du composé APD15.

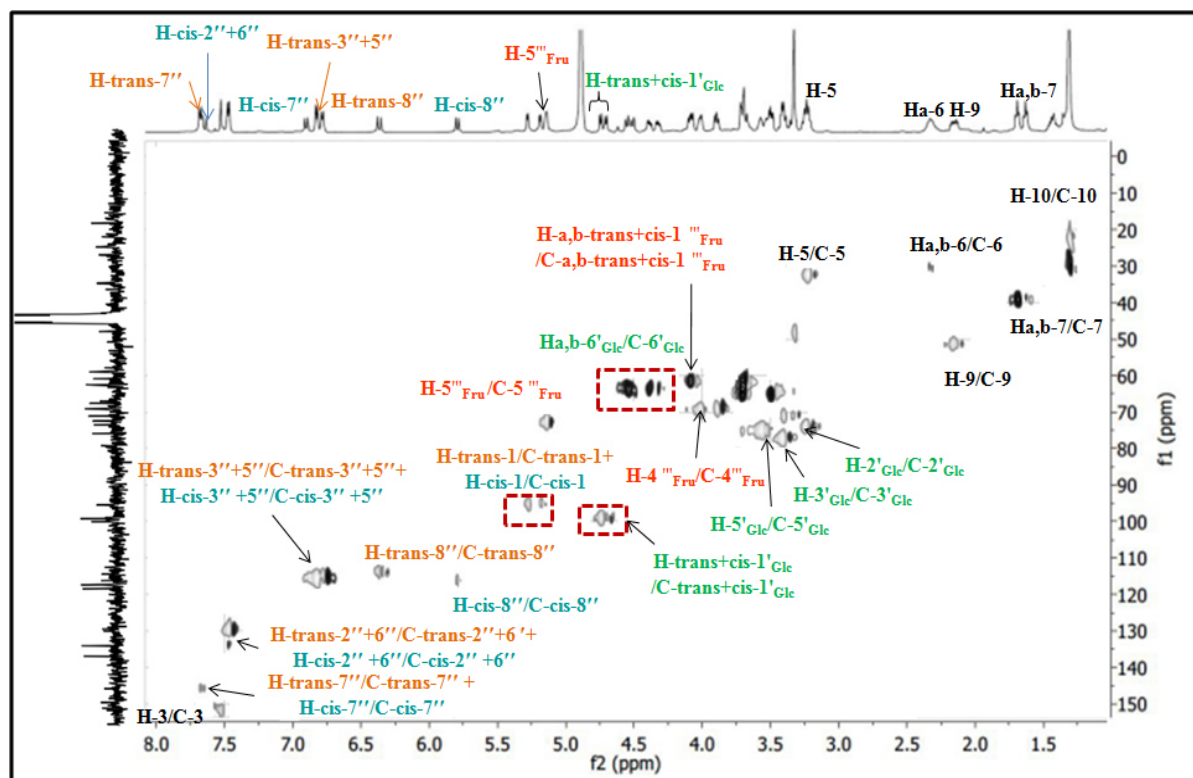


Figure III-183. Spectre HSQC du composé APD15.

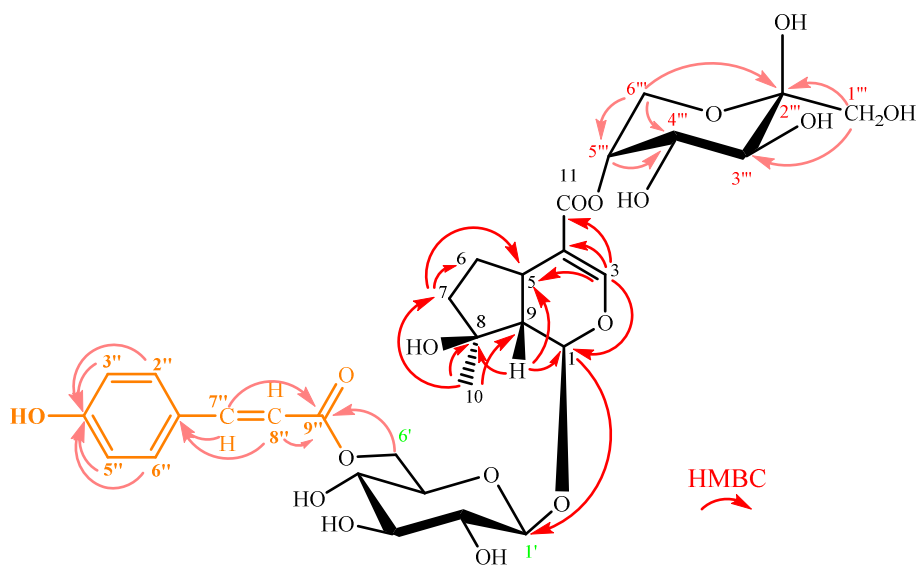


Figure III-184. Corrélatons HMBC du composé APD15.

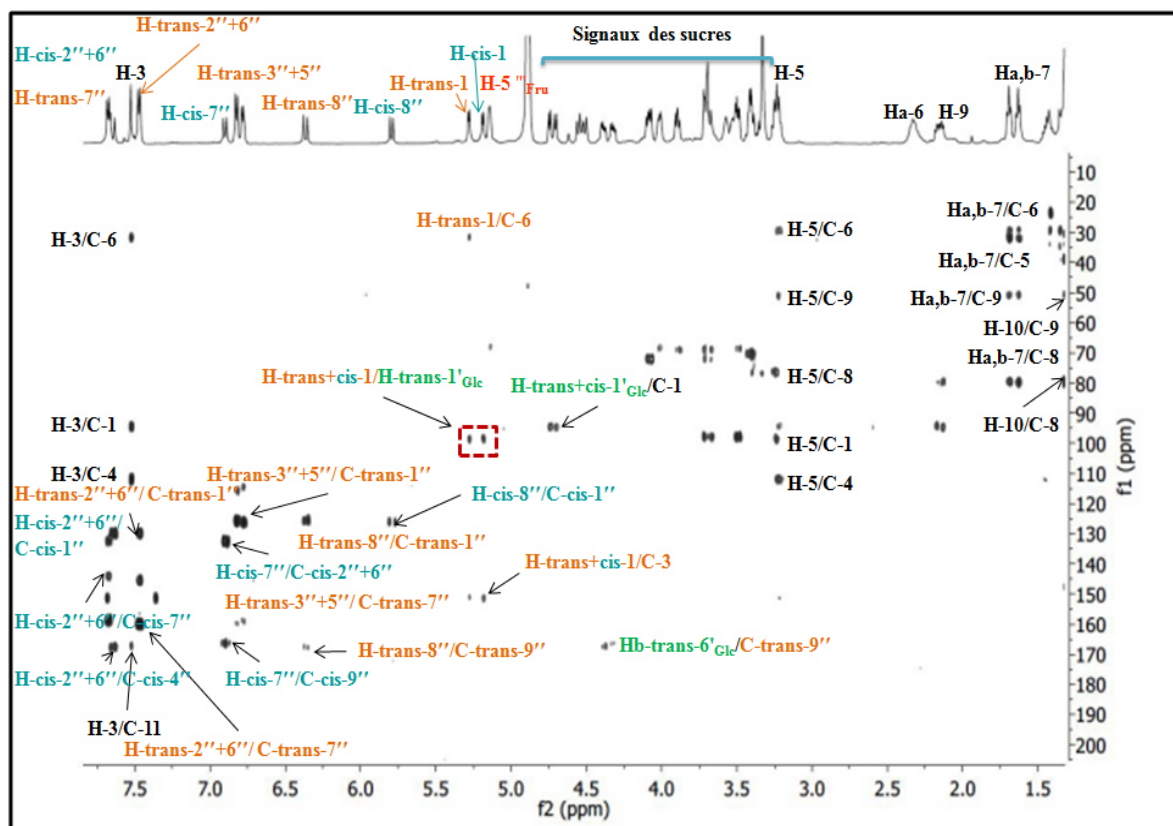
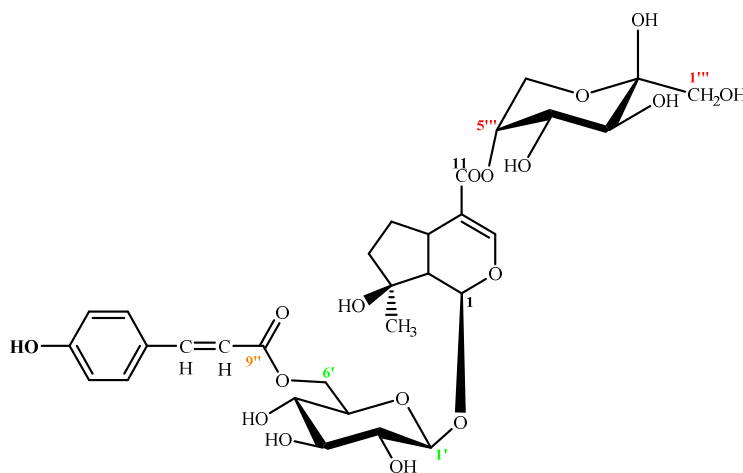


Figure III-185. Spectre HMBC du composé APD₁₅.

La structure finale du composé APD₁₅ est identifiée comme le mélange 6'-O-(*trans*, *cis*-*p*-coumaroyl)mussaenosidic acid-11-(5-O-β-D-fructopyra-nosyl) ester. La mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} -115$ (c 0.1, MeOH). C'est un composé nouveau et à notre recherche est le premier rapport iridoide C10 esters fructopyranosyl.



APD₁₅ : 6'-O-(*trans*, *cis*-*p*-coumaroyl)mussaenosidic acid-11-(5-O-β-D-fructopyra-nosyl) ester.

III.3.2. Identification des monoterpènes isolés de l'extrait APD_n-BuOH

III.3.2.1. Détermination structurale du composé APD₁₆

Spectrométrie de masse :

Le composé APD₁₆ présente une formule moléculaire en C₁₀H₁₆O₃, formule déterminée grâce au spectre de masse ESI-MS (figure III-186) enregistrés en modes positif et négatif, présente respectivement un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 205.58 [M+Na]⁺ et 183.66 [M-H]⁻, correspondant à une masse moléculaire égale à 184 *uma*.

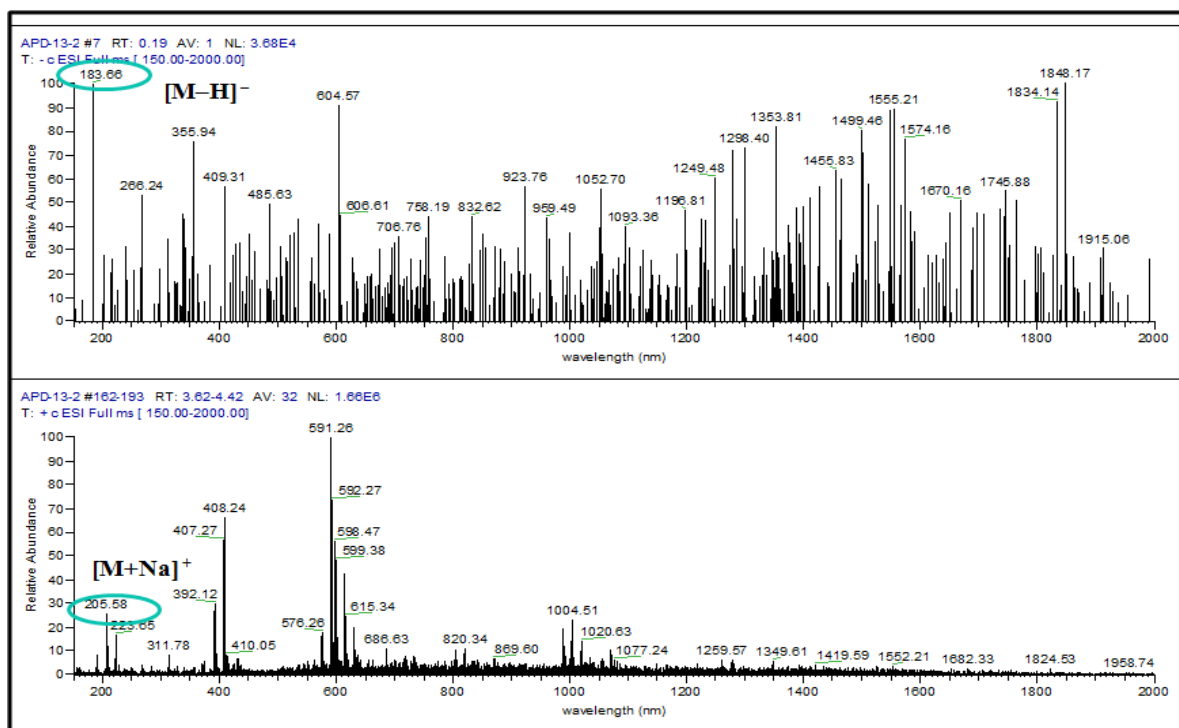


Figure III-186. Spectre de masse et ESI-MS en mode positif et négatif du composé APD₁₆.

Spectrométrie RMN :

L'analyse des spectres RMN ¹H, ¹³C et HSQC (figure III-187- III-188- III-189) révèle que le composé APD₁₆ diffère du composé 6-*O*-foliamenthoylmacfadinoside (APD₂) par l'absence des signaux caractéristiques du noyau iridoïdes macfadinoside et la présence des signaux qui correspondent à l'acide foliamenthonique. Il permet de reconnaître entre autres :

- Deux signaux caractéristiques des carbones oléfiniques à δ_c 142.2 et 125.9 ppm attribuables aux C-3 et C-7 qui corrént, sur le spectre HSQC, avec leurs protons à 6.79 (brt, $J = 6.6$ Hz, H-3) et 5.43 (brd, $J = 6.6$ Hz, H-7) respectivement.

- Trois carbones méthylène à δ_C 28.0, δ_C 31.3 et δ_C 58.3 ppm correspondants aux C-4, C-5 et C-8 qui corrént, sur le spectre HSQC, avec leurs protons respectivement à δ_H 2.32 ppm (*m*, H-4), 2.21 ppm (*m*, H-5), 4.06 ppm (*d*, $J = 6.6$ Hz, H-8).
- Deux groupements méthyléniques à δ_C 12.4 (C-9) et 23.1 ppm (C-10) corrént sur le spectre HSQC avec leurs protons respectifs à δ_H 1.81 et 1.76 ppm
- Trois carbones quaternaires dont deux carbones oléfiniques C-2 (δ_C 131.0 ppm) et C-6 (δ_C 139.1 ppm) et un carbonyle d'une fonction acide C-1 (δ_C 171.7 ppm).

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-11.

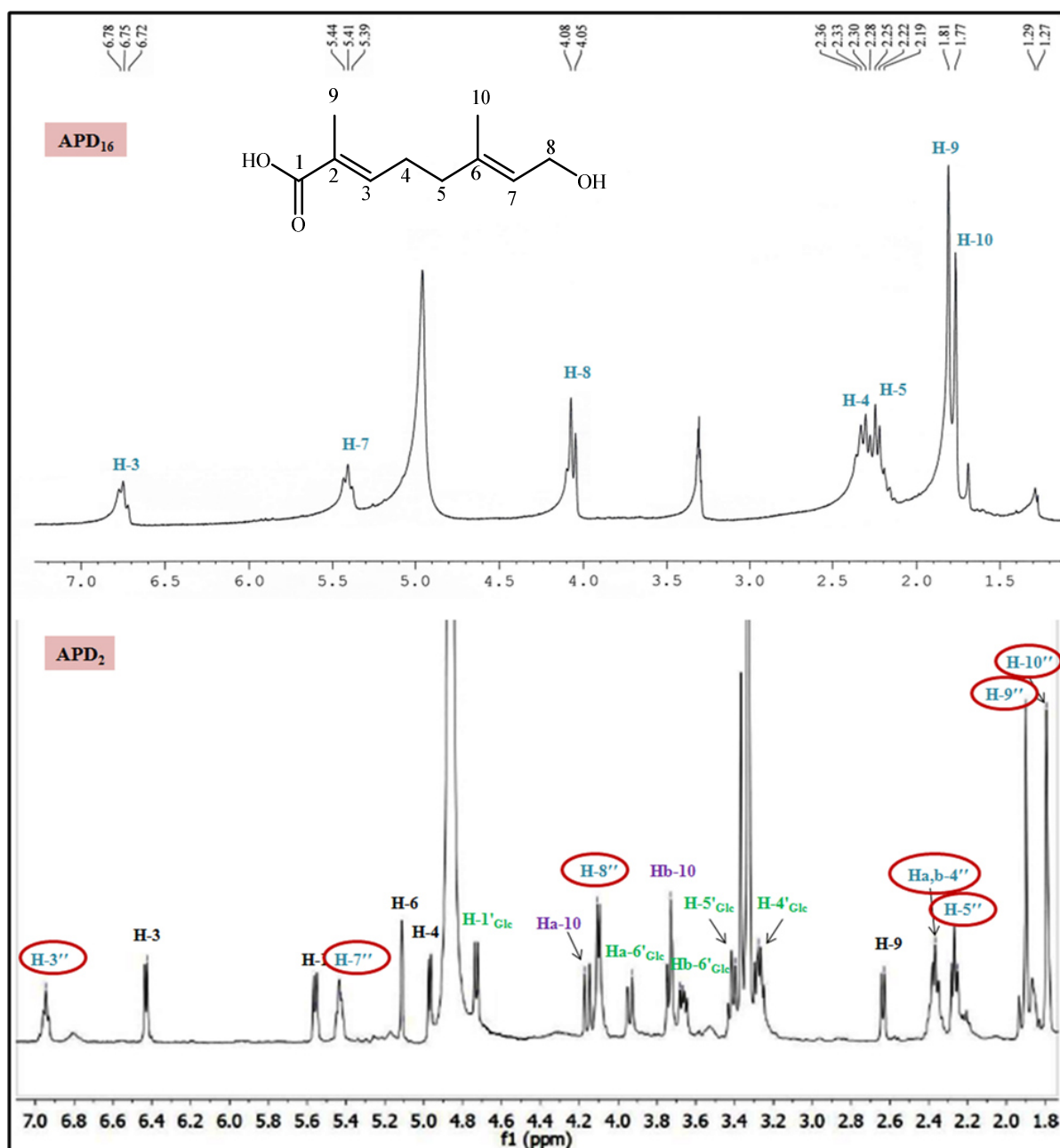


Figure III-187. Spectre de RMN ^1H du composé **APD₁₆** comparé à celui du composé **APD₂**.

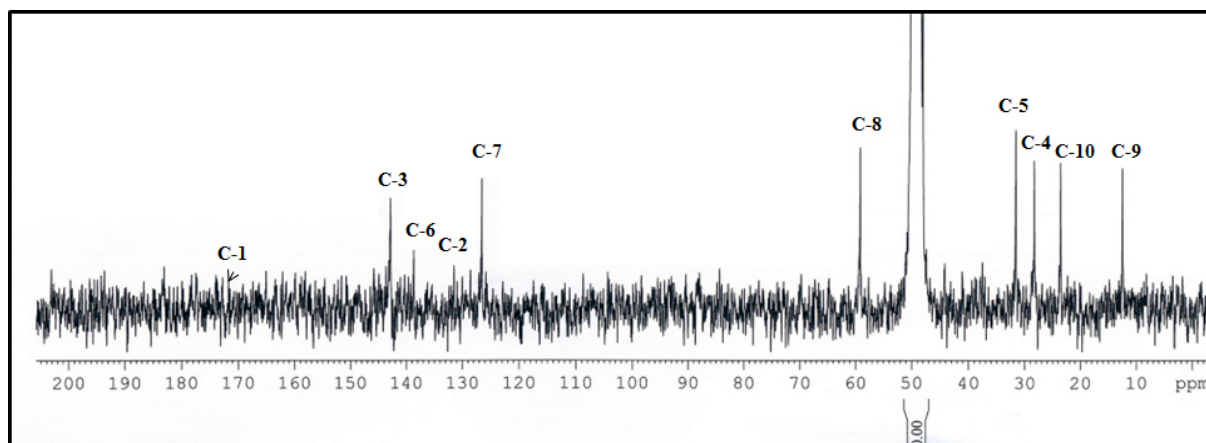


Figure III-188. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD₁₆.

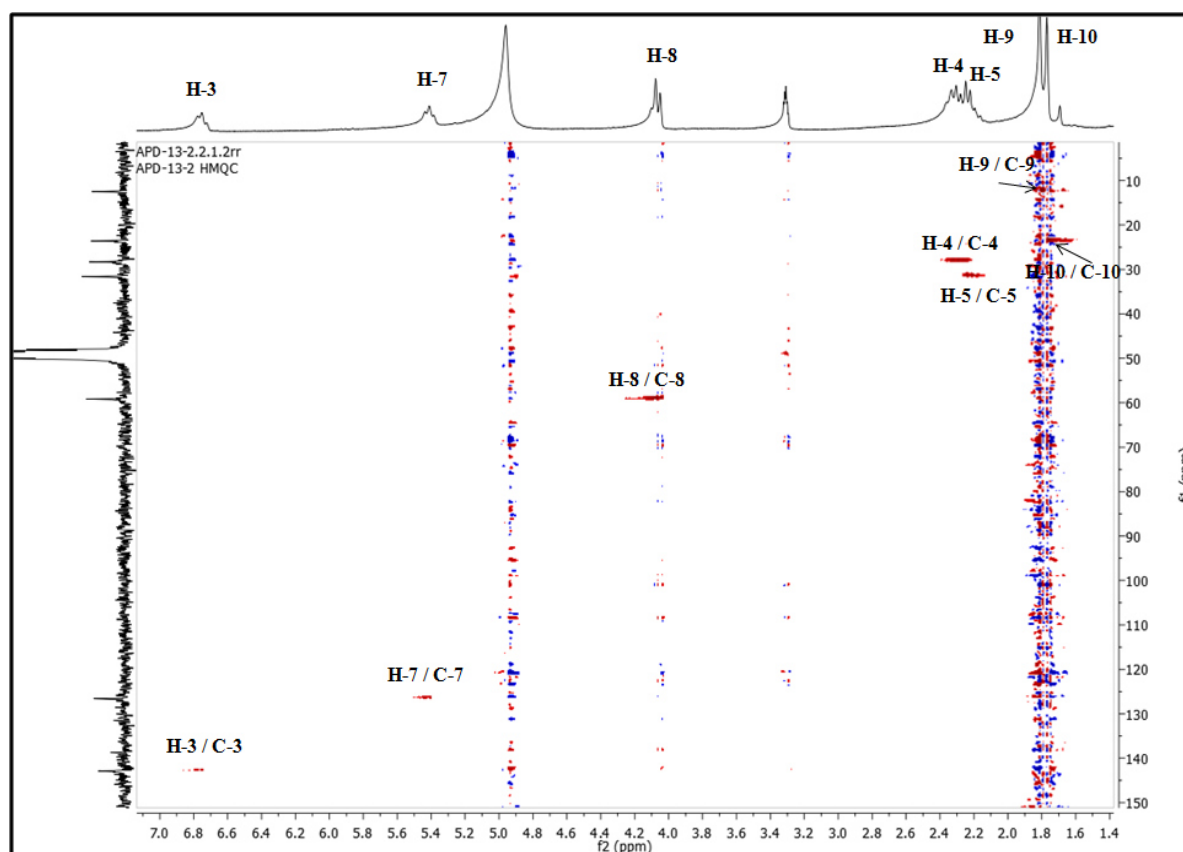
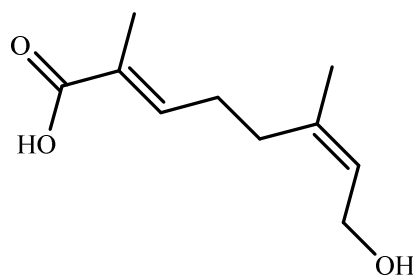


Figure III-189. Spectre HSQC du composé APD₁₆.

L'ensemble des analyses spectrales nous a conduit à identifier le composé APD₁₆ comme étant le **8-hydroxy-2,6-diméthyl-(2*E*, 6*E*)-octadlénoïcacid** appelé **Foliamenthoc acid**.

C'est un monoterpène très fréquent dans le règne végétal isolé par exemple précédemment de *Anarrhinum pubescens* (Mahran et al., 2018) et *Radermacia smca* (Iwagawa et al., 1990).

APD₁₆ : Foliamenthoic acid.

III.3.2.2. Détermination structurale du composé APD₁₇

Spectrométrie de masse

L'ion pseudo-moléculaire à m/z 369.30 $[M+Na]^+$ du composé APD₁₇, obtenu en ESI-MS en mode positif (figure III-190), correspond à une formule brute C₁₆H₂₆O₈. Un ion fragment important ont également été observé sur le spectre ESI-MS/MS à m/z 206.87 $[M+Na-162]^+$ correspondant à la perte d'un hexose.

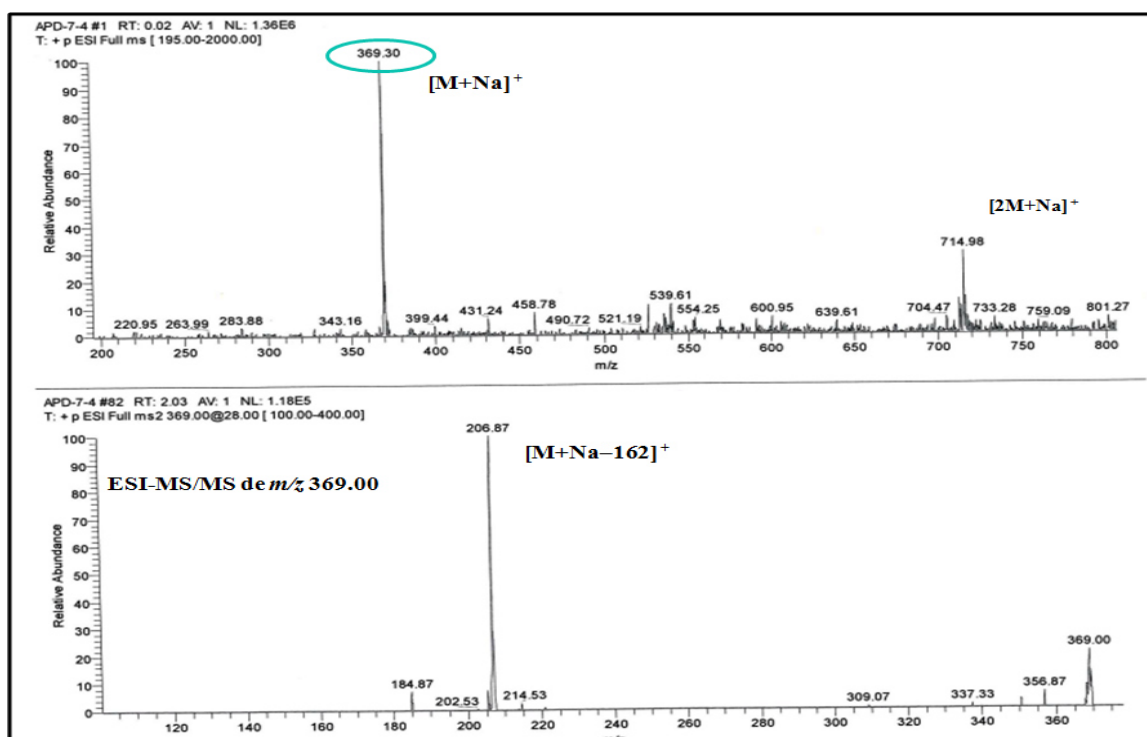


Figure III-190. Spectre de masse et ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₁₇.

Spectrométrie RMN :

L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D (figure III-191- III-192) montrent que le squelette monoterpène acyclique acide foliamenthoïque (**APD₁₆**) est identique point par point au composé **APD₁₇**, la différence réside en l'apparition des signaux suivants :

- Un proton anomérique sous forme d'un doublet situé à δ_H 5.55 ppm (H-1'_{GlcI}) avec une constante de couplage $J = 7.5$ Hz caractéristique d'une β -configuration.
- Un ensemble de protons résonnant entre δ_H 3.20–3.87 ppm correspondant aux déplacements chimiques d'un glucose (Iwagawa et al., 1990).

L'ensemble de ces signaux autorise à suggérer la présence d'un glucose et en comparaison avec la littérature le carbone C-1'_{GlcI} du glucose localisé en C-1 de l'acide foliamenthoïque.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-11.

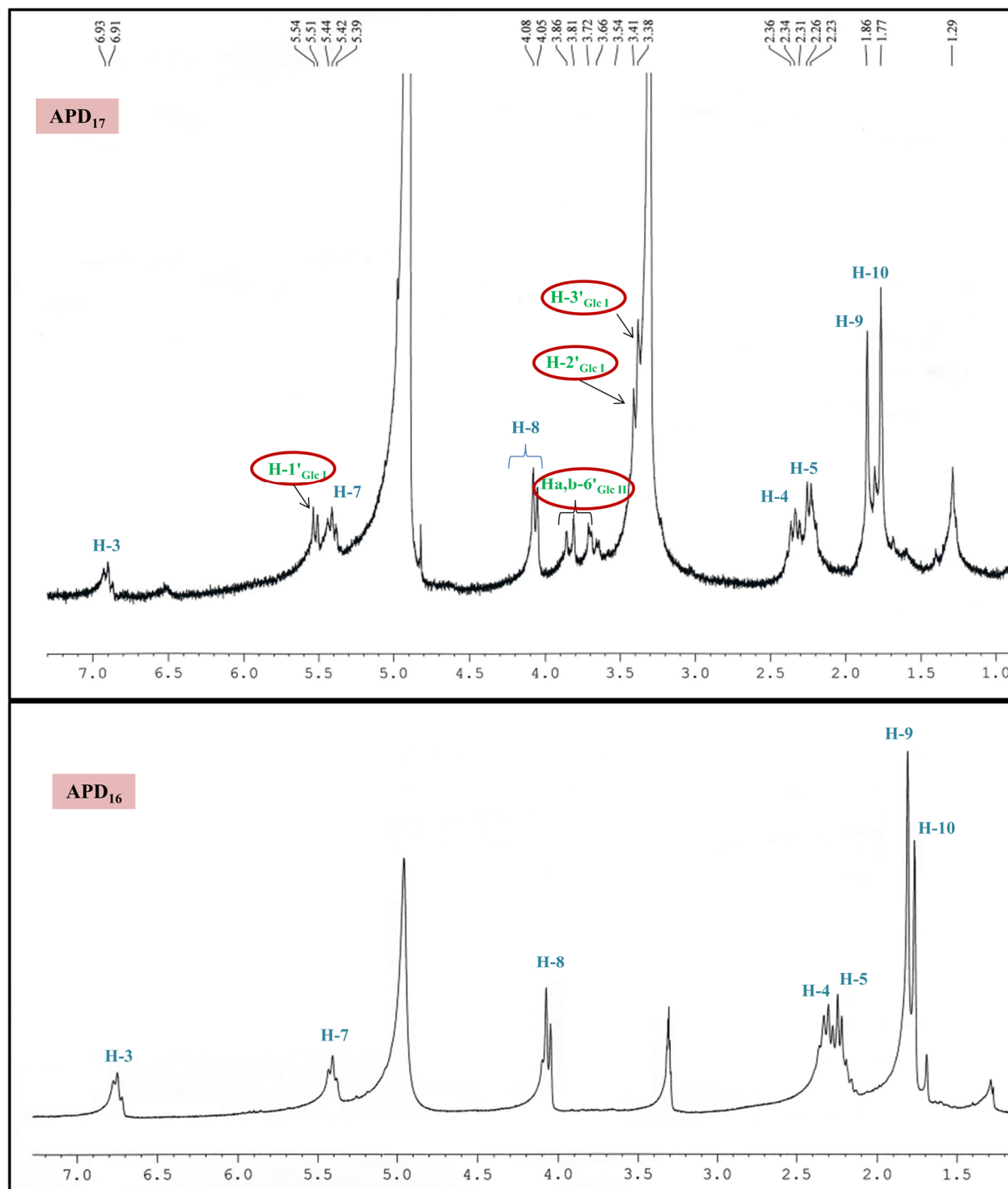


Figure III-191. Spectre de RMN ^1H du composé **APD₁₇** comparé à celui du composé **APD₁₆**.

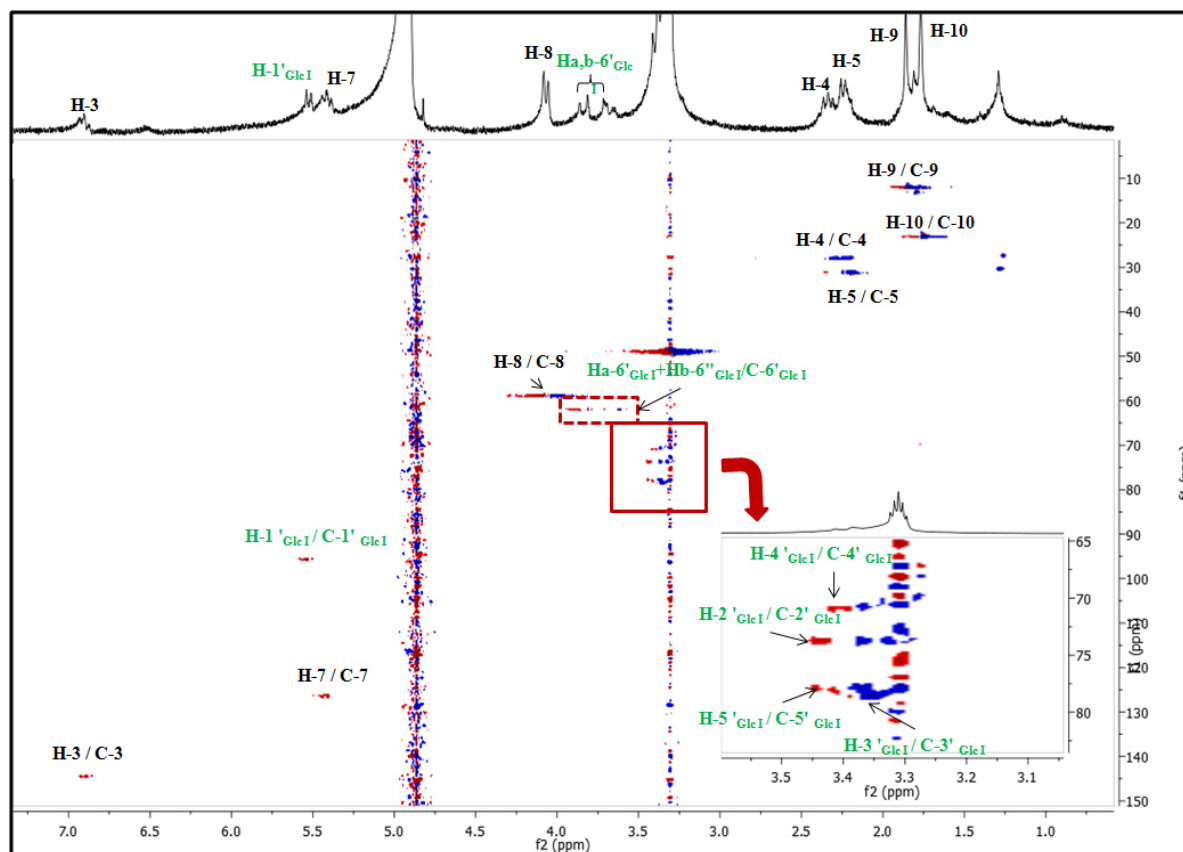
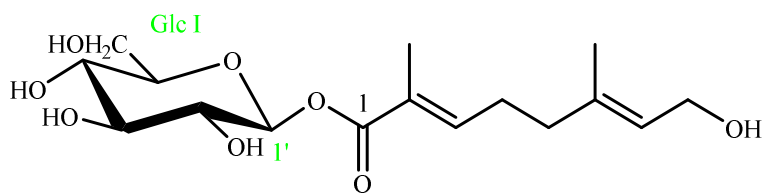


Figure III-192. Spectre HSQC du composé APD₁₇.

La structure du composé APD₁₇ a pu être établie comme étant le **glucosyl 8-hydroxy-2,6-diméthyl-(2E,6E)-octadiénoate** nommé également **foliamenthocacid-1-O-β-D-glucopyranosyl**, isolé à partir des racines et parties aériennes de *Radermacia smca* (Iwagawa et al., 1990), mais c'est la première fois qu'il est isolé du genre *Anarrhinum*.



APD₁₇: Glucosyl 8-hydroxy-2,6-diméthyl-(2E, 6E)-octadiénoate.

III.3.2.3. Détermination structurale des composés APD₁₈

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse en HR-ESI-MS, enregistré en mode positif (figure III-193), un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 369.1594 $[M+Na]^+$ (calc369.1525) est observé, ceci

suggère une masse moléculaire de 346 *uma*, soit une perte de 162 *uma*. La masse du composé **APD₁₈** montre que la structure du composé **APD₁₈** est identique à celle du composé **APD₁₇**.

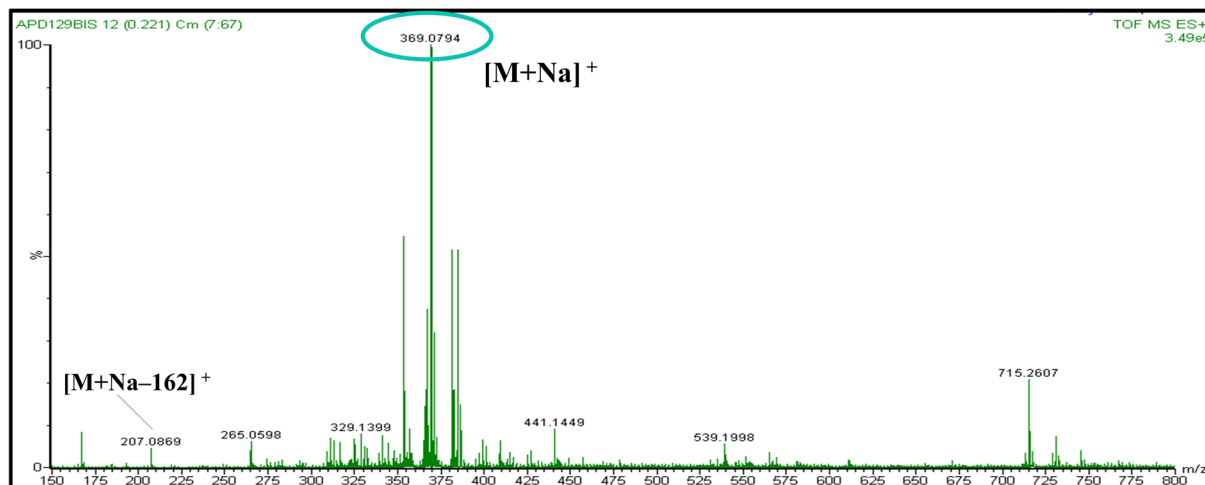


Figure III-193. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé **APD₁₈**.

Spectrométrie RMN :

Les spectres RMN 1D et 2D (figure III-194- III-199) du composé **APD₁₈** montrent une forte ressemblance avec ceux du composé glucosyl 8-hydroxy-2,6-diméthyl-(2*E*, 6*E*)-octadiénoate (**APD₁₇**), la seule différence réside dans un dédoublement des signaux. En effet on observe :

- Deux protons sous forme de doublet dont un à δ_H 4.50 ppm, avec une constante de couplage égale $J = 8.0$ Hz indique la présence d'un proton anomérique de configuration β ($H_{\beta-1'_{Glc}}$), et le dexsième à δ_H 5.10 ppm, avec une constante de couplage égale $J = 3.5$ Hz indique la présence d'un proton anomérique de configuration α ($H_{\alpha-1'_{Glc}}$).
- Un massif des protons entre δ_H 3.16 à 4.46 attribuables aux protons osidiques.

Cette observation nous permet de suggérer la présence d'un mélange mutarotation du α/β D-glucose. Le spectre RMN 1H montre aussi :

- Le blindage du proton anomérique du β -D-glucose (δ_H 4.50 ppm, $H_{\beta-1'_{Glc}}$) par rapport au (δ_H 5.55 ppm, $H_{\beta-1'_{Glc}}$) du composé **APD₁₇**, indique que cette position est libre.
- Le déblindage des protons $H_a-6'_{Glc}$ et $H_b-6'_{Glc}$ (δ_H 4.39 et 4.27 / δ_C 64.1 ppm) indique que le carbone $C-6'_{Glc}$ est substitué. Cette hypothèse est confirmée par la corrélation

observée sur le spectre HMBC (figure III-199) entre le carbone C-1 de l'acide foliamenthonique avec les protons H_a-6'_{Glc} et H_b-6'_{Glc} du glucose.

Les déplacements chimiques sont répertoriés dans le tableau III-11.

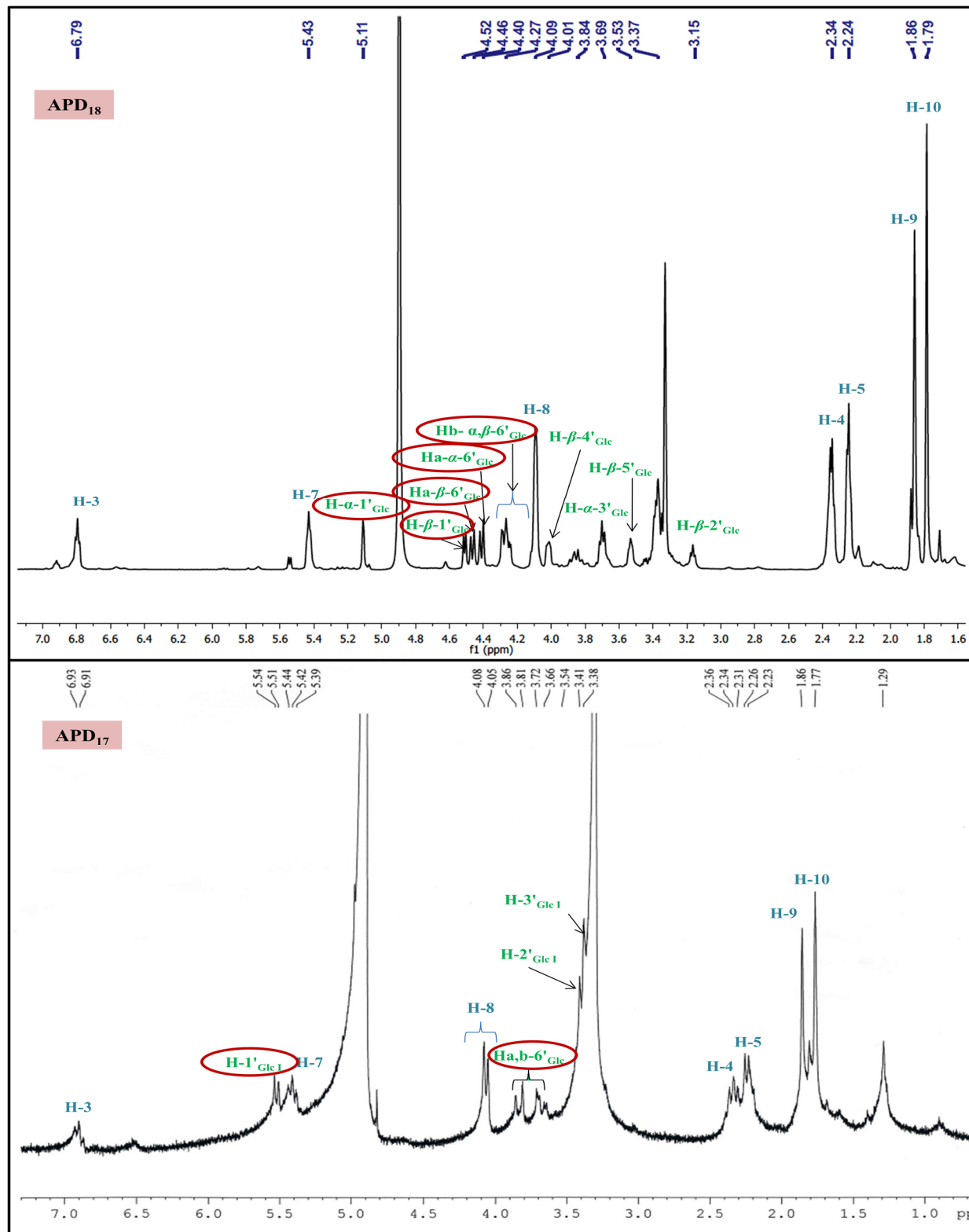


Figure III-194. Spectre de RMN ¹H du composé APD₁₈ comparé à celui du composé APD₁₇.

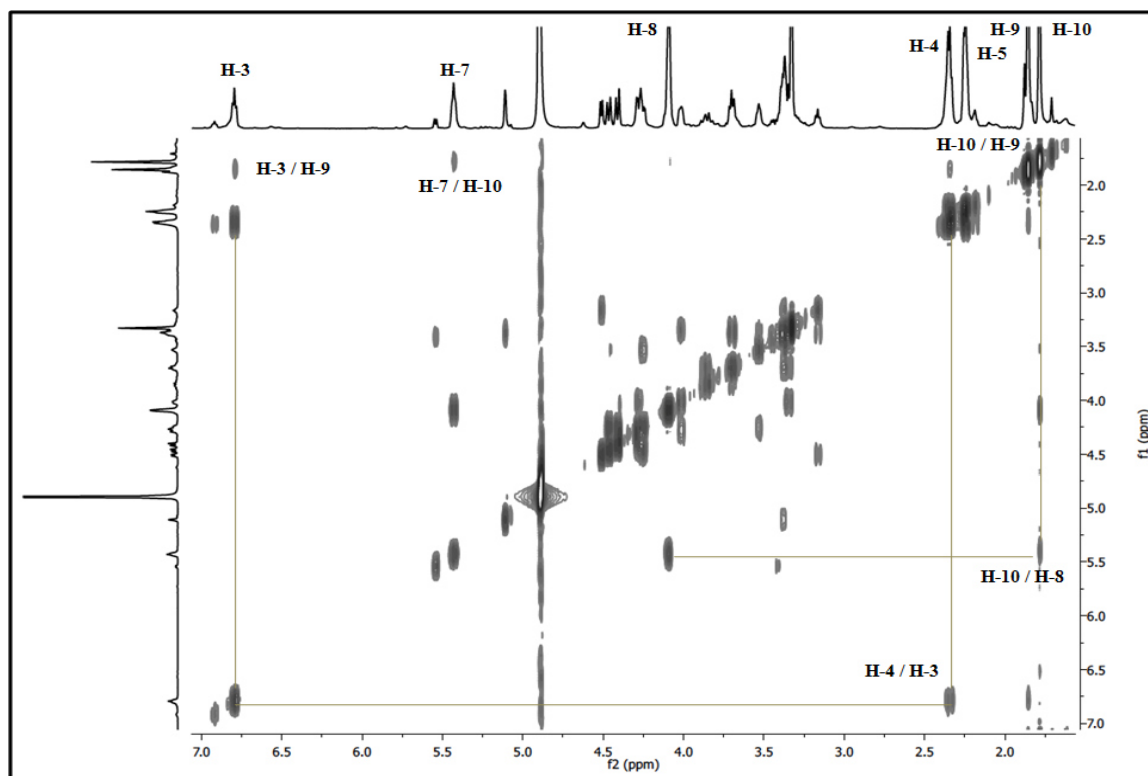
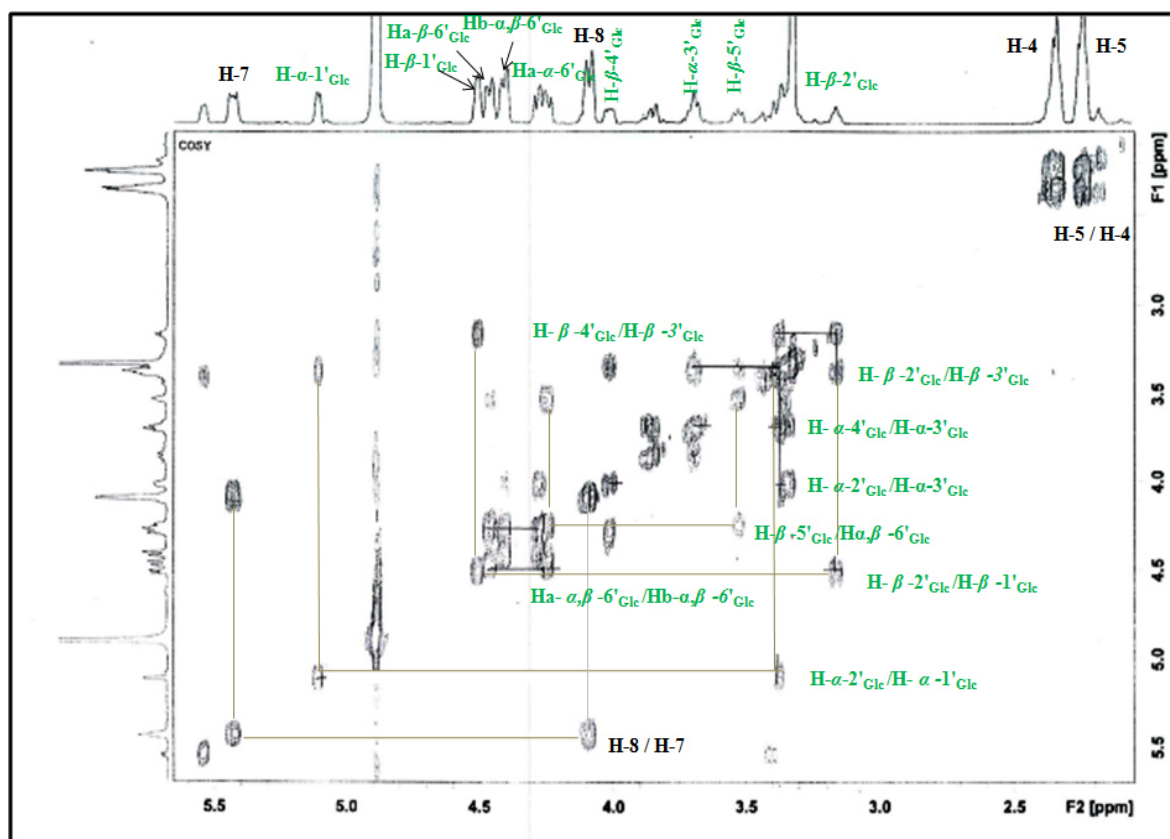
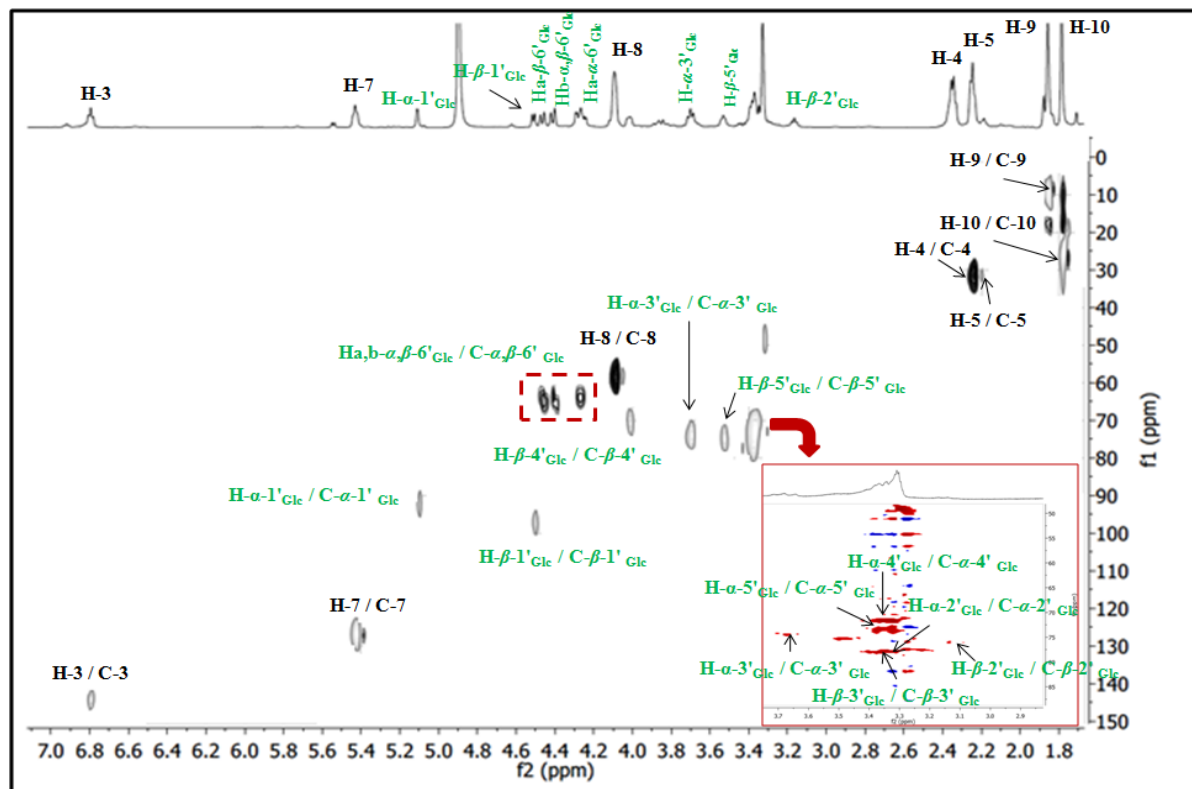
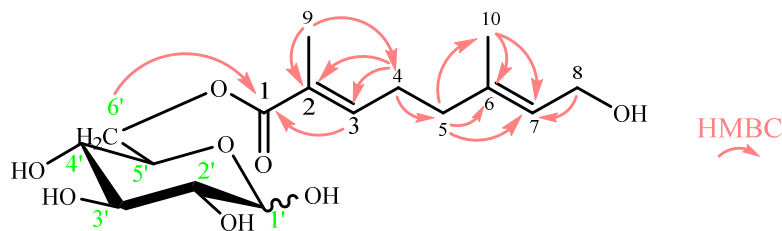


Figure III-195. Spectre COSY du composé APD18.

Figure III-196. Spectre COSY étalé de δ_H 2.0 à 5.5 ppm du composé APD18.

Figure III-197. Spectre HSQC du composé APD₁₈.Figure III-198. Corrélations HMBC du composé APD₁₈.

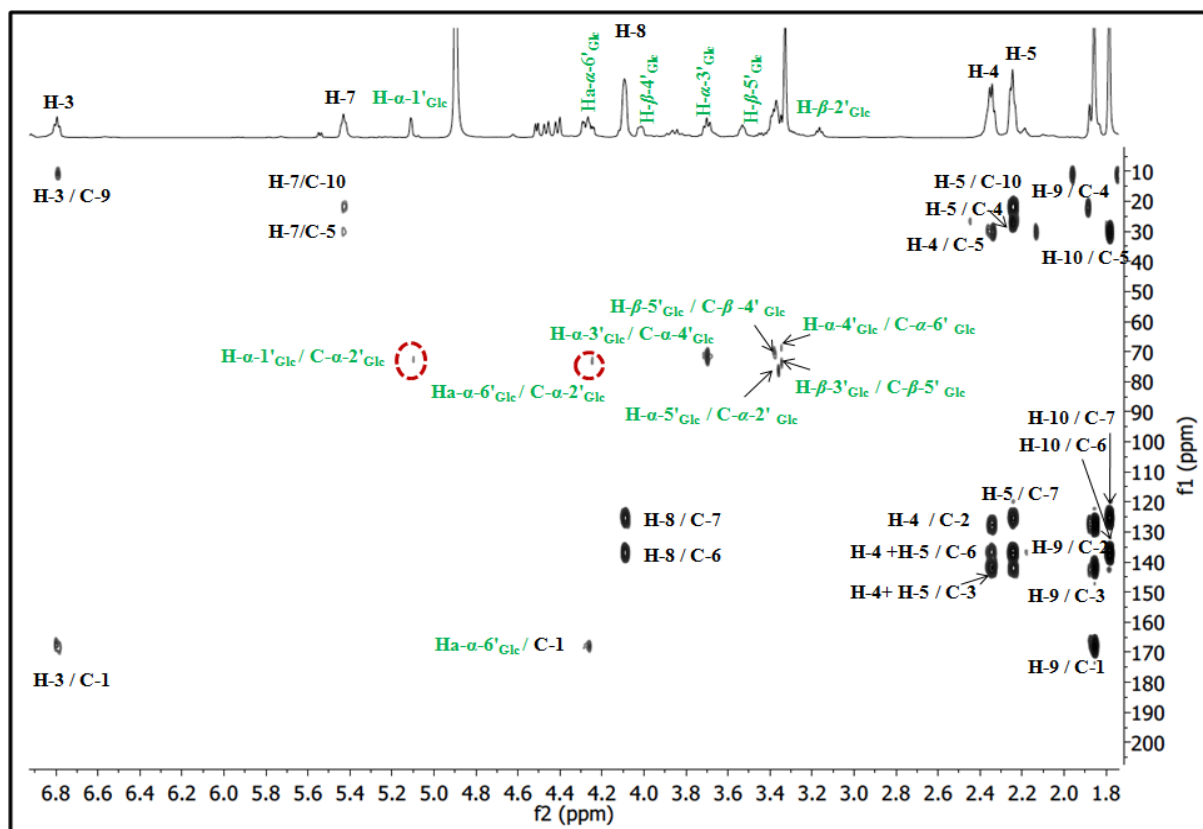
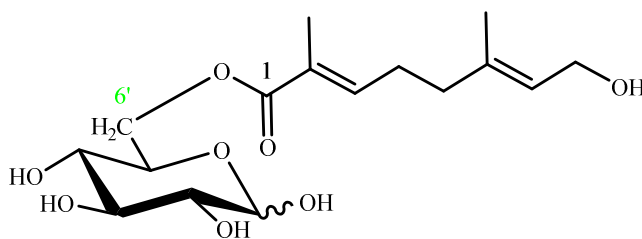


Figure III-199. Spectre HMBC du composé APD₁₈.

Cette analyse spectrale permet d'assigner la structure suivante pour le composé APD₁₈ : 6-*O*-foliamenthoyl- α,β -D-glucopyranose isolé pour la première fois.



APD₁₈ : 6-*O*-foliamenthoyl- α,β -D-glucopyranose.

III.3.2.4. Détermination structurale des composés APD₁₉

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse HR-ESI-MS du composé APD₁₉ (figure III-200) donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 531.2021 $[M+Na]^+$ (calc 531.2054), suggérant une masse moléculaire de 508 *uma*. Cette masse est en accord avec la formule brute C₂₂H₃₆O₁₃. D'autres

ions-fragments importants ont également été observés sur le spectre ESI-MS/MS à m/z 369 $[M+Na-162]^+$ et 207 $[M+Na-162-162]^+$ correspondant à la perte successive de deux hexoses.

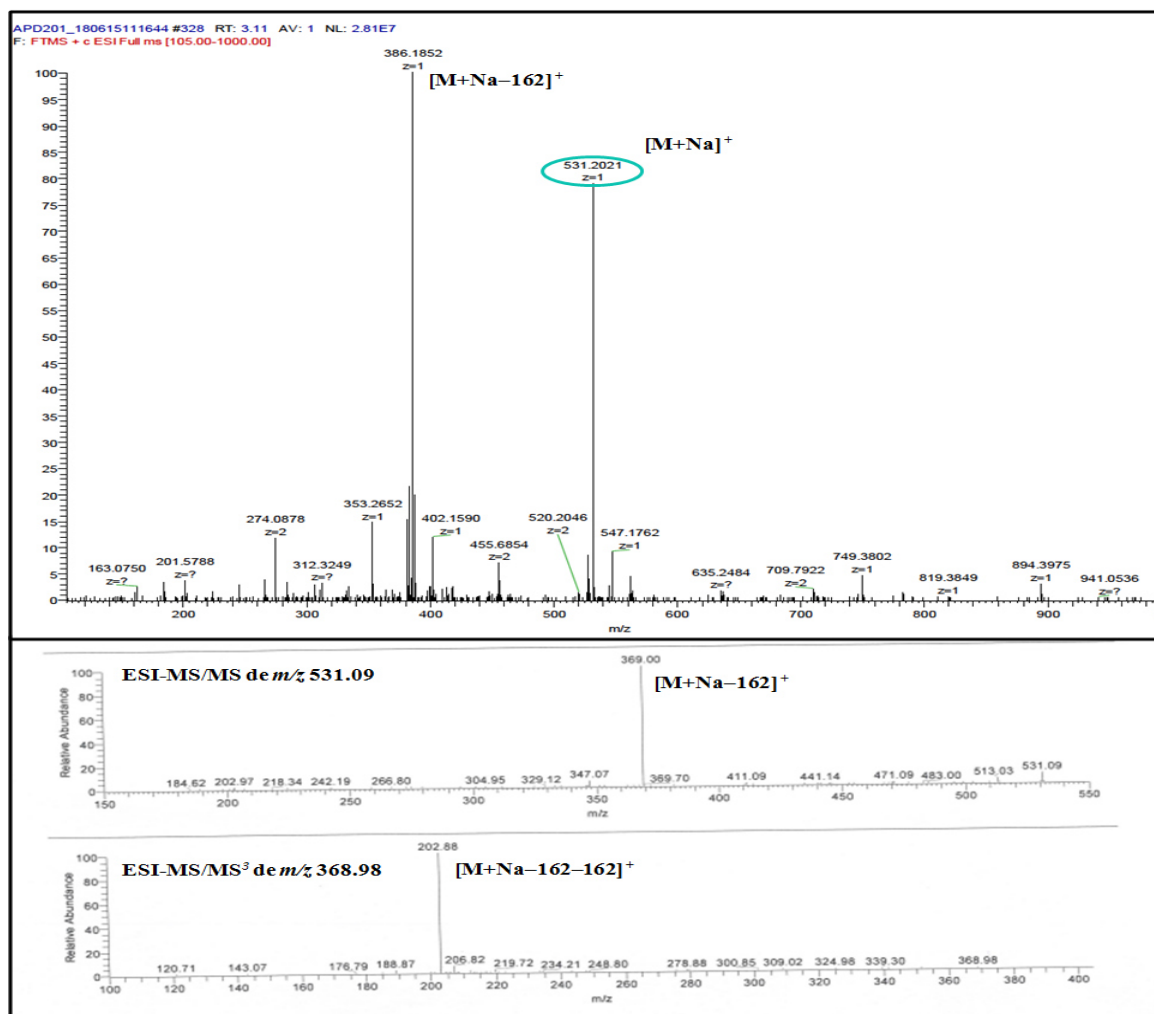


Figure III-200. Spectre de masse HR-ESI-MS et ESI-MS/MS³ en mode positif du composé APD19.

Spectrométrie RMN :

L'analyse des spectres RMN 1D et 2D (figure III-201- III-207) du composé APD19, nous révèle une grande ressemblance avec ceux du composé foliamenthic acid-1-*O*- β -D-glucopyranosyl (APD17), en plus la présence des signaux d'un deuxième glucose (GlcII) comme différence notable. En effet, on observe :

- Un signal sous forme de doublet situé à δ_H 4.30 ppm ($J = 7.5$ Hz) attribuable au deuxième proton anomérique H-1''_{GlcII}.

- Un massif de protons observé entre δ_H 3.20–3.87 ppm correspondant aux protons ositiques du glucose (GlcII).

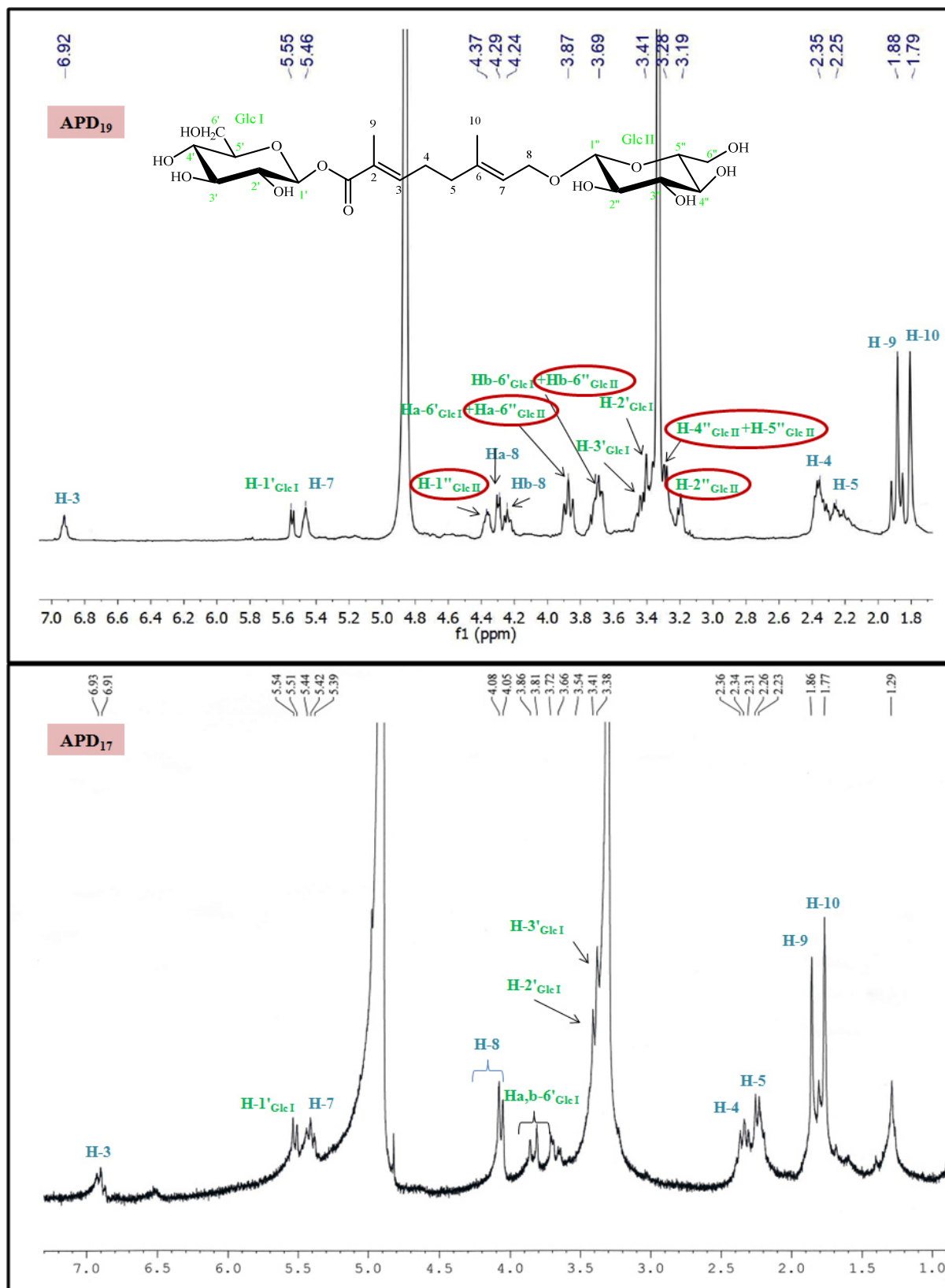
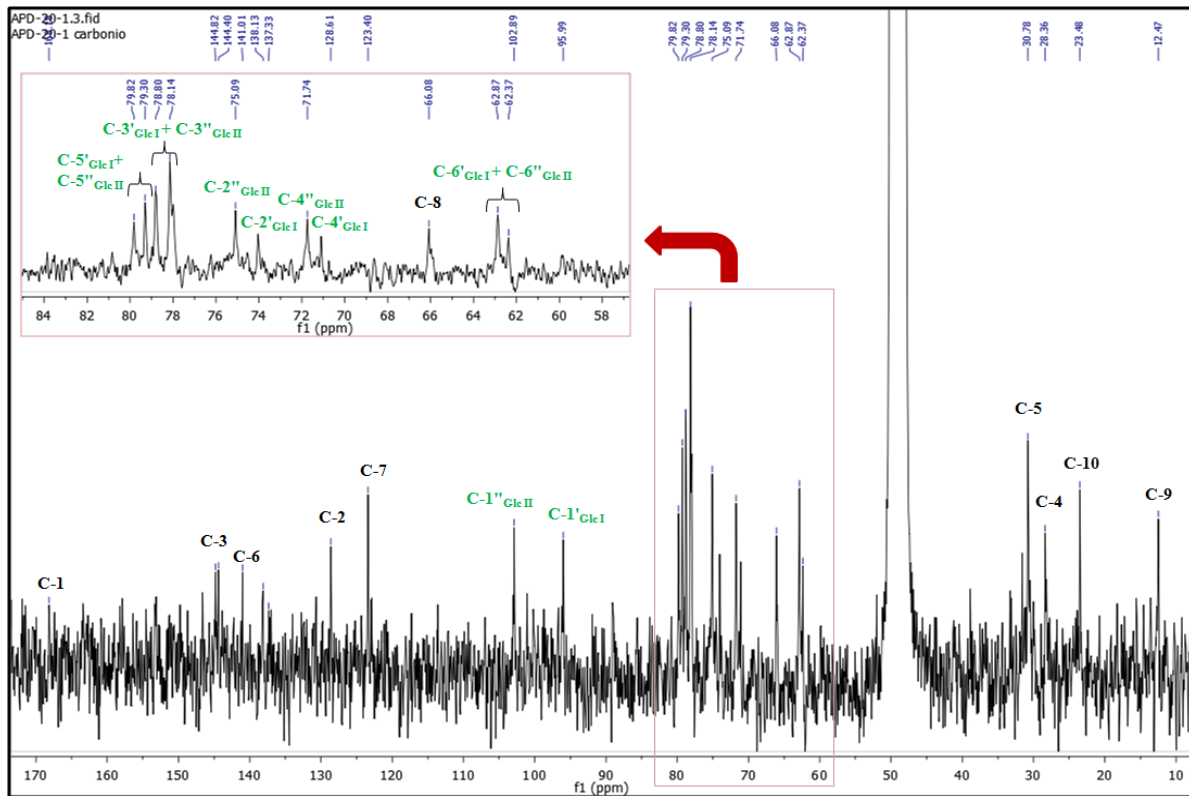
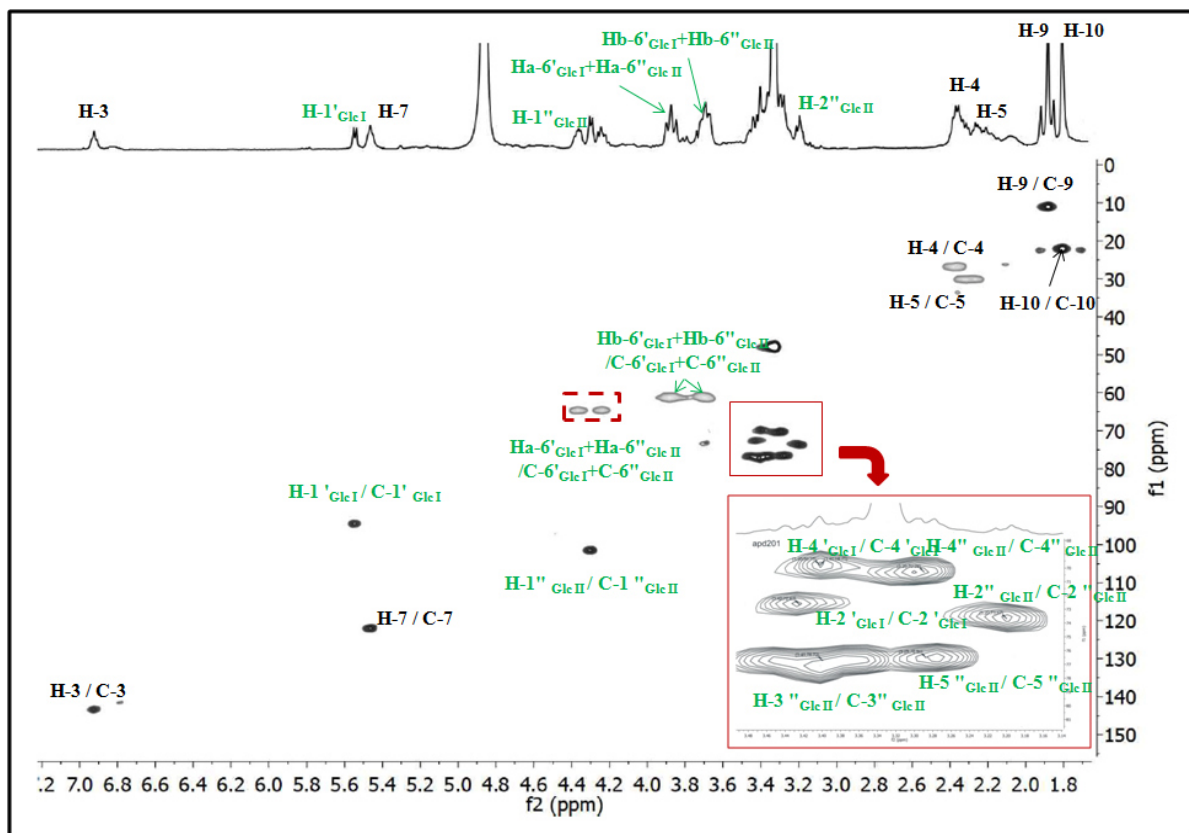


Figure III-201. Spectre de RMN ^1H du composé APD₁₉ comparé à celui du composé APD₁₇.

Figure III-202. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD₁₉.Figure III-203. Spectre HSQC du composé APD₁₉.

L'examen du spectre COSY (figure III-205) montre les corrélations entre :

- Le proton H-4 (δ_H 2.37 ppm) avec le proton oléfinique H-3 (δ_H 6.39 ppm) et le méthyle CH₃-9 (δ_H 1.88 ppm).
- Le proton H-5 (δ_H 2.32 ppm) les protons H-3 et H-4.
- Le méthyle CH₃-10 (δ_H 1.81 ppm) avec le proton oléfinique H-7 (δ_H 5.48 ppm).
- Les protons éthyléniques H_a-8 (δ_H 4.36 ppm) et H_b-8 (δ_H 4.24 ppm) corrèle avec le proton oléfinique H-7 et le proton anomère H-1''_{GlcII} (δ_H 5.55 ppm). Ce qui indique la localisation du glucose (Glc II) en position H-8.

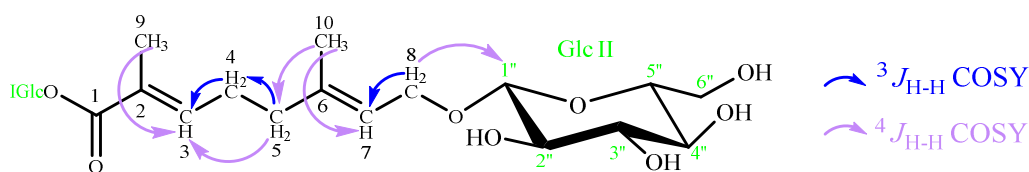


Figure III-204. Corrélations COSY du composé APD19.

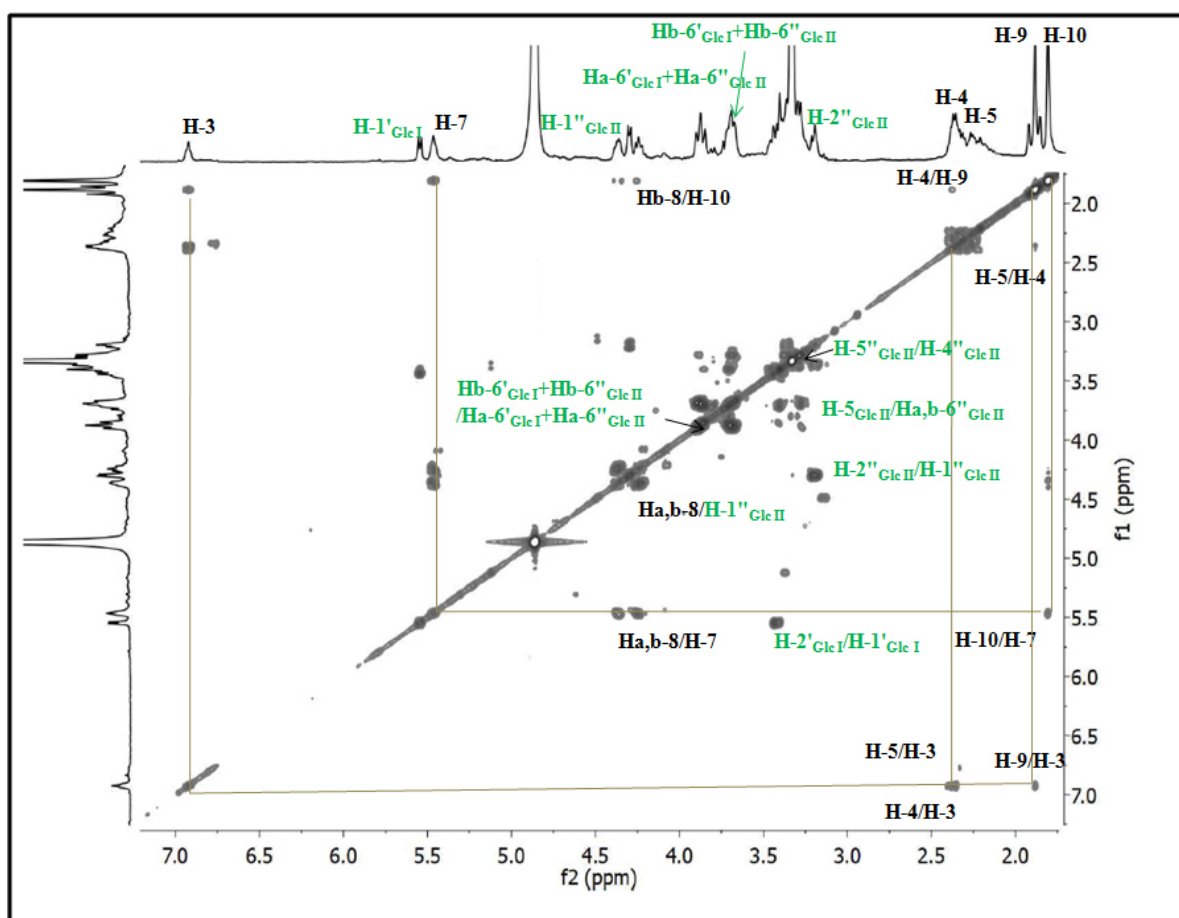


Figure III-205. Spectre COSY du composé APD19.

Le spectre HMBC (figure III-207) confirme toutes ces suggestions, on observe :

- Deux protons oléfiniques montrent des taches de corrélations entre :
 - Le proton H-3 et le méthyle C-9 et le carbonyle C-1 (δ_H 167.6 ppm) ;
 - Le proton H-7 et les carbones C-5 et C-10
- Trois groupements méthylènes montrent les corrélations entre :
 - Les protons H-4 et les carbones C-2, C-3, C-5, C-6, C-7 et C-10 ;
 - Les protons H-5 et les carbones C-3, C-4, C-6, C-7 et C-10 ;
 - Les protons H_a-8 et H_b-8 avec les carbones C-6, C-7 et le carbone anomère C-1''^{GlcII}
- Deux groupements méthyles montrent des taches de corrélations entre :
 - H-9 et les carbones C-2, C-3 et C-1 ;
 - H-10 et les carbones C-5, C-6 et C-7.

Le spectre HMBC montre aussi des taches de corrélations entre :

- Le H-1'^{GlcI} et le carbonyle C-1 ;
- Le H-1''^{GlcII} et les carbones C-6, C-7 et C-8.

Sur la base de ces données on peut déterminer l'enchaînement des deux unités osidiques Glc_I (1' → C-1) et Glc_{II} (1'' → C-8).

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-12.

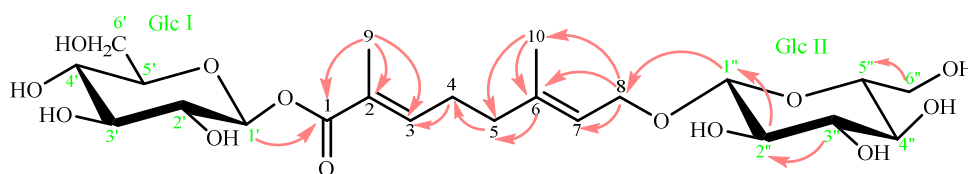


Figure III-206. Corrélations HMBC du composé APD₁₉.

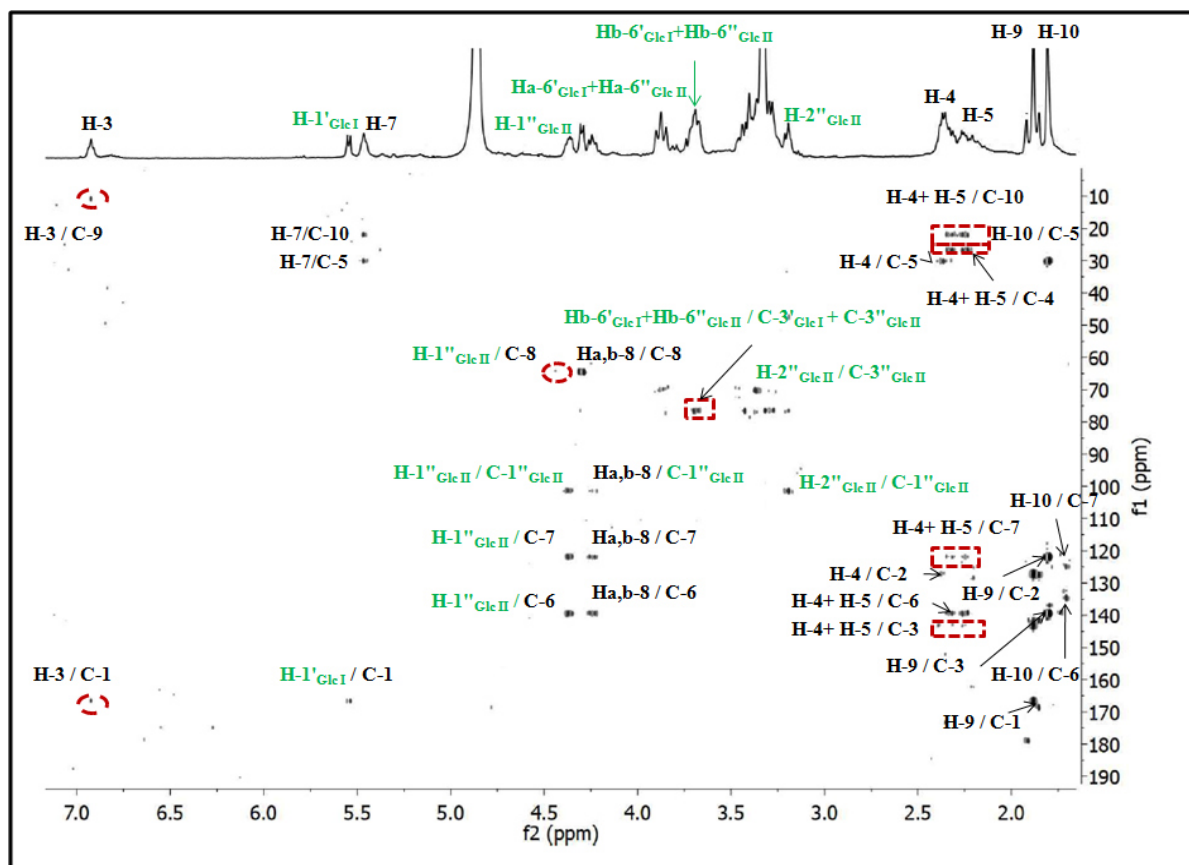
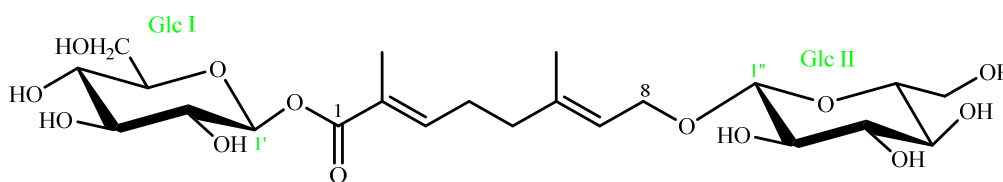


Figure III-207. Spectre HMBC du composé APD₁₉.

Ainsi, toute cette analyse spectrale en plus d'un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} +34$ (c 0.1, MeOH) permet d'attribuer la structure nouvelle suivante au composé APD₁₉ : **foliamenthocacid 1-*O*- β -D-glucopyranosyl ester 8-*O*- β -D-glucopyranoside**.



APD₁₉: foliamenthocacid 1-*O*- β -D-glucopyranosyl ester 8-*O*- β -D-glucopyranoside.

III.3.2.5. Détermination structurale des composés APD₂₀

Spectrométrie de masse :

Le composé APD₂₀ présente une formule moléculaire en C₁₀H₁₆O₃, formule déterminée grâce au spectre de masse HR-ESI-MS (figure III-208) enregistrés en modes

positif, présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 207.0987 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 184 *uma*.

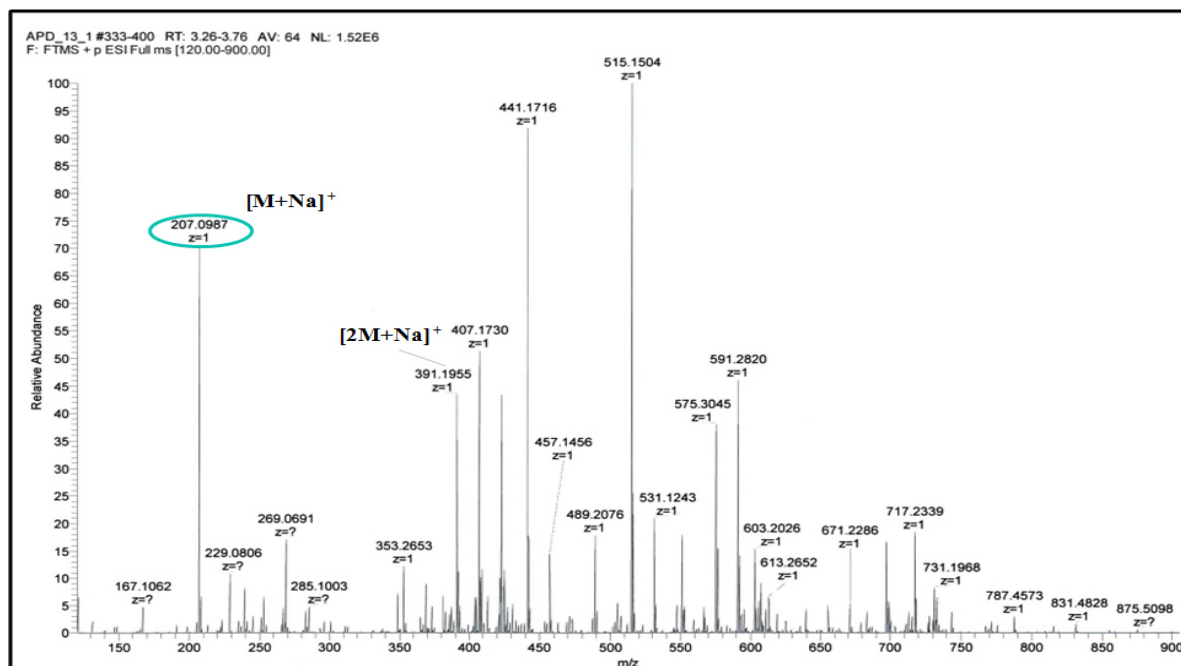


Figure III-208. Spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du composé **APD₂₀**.

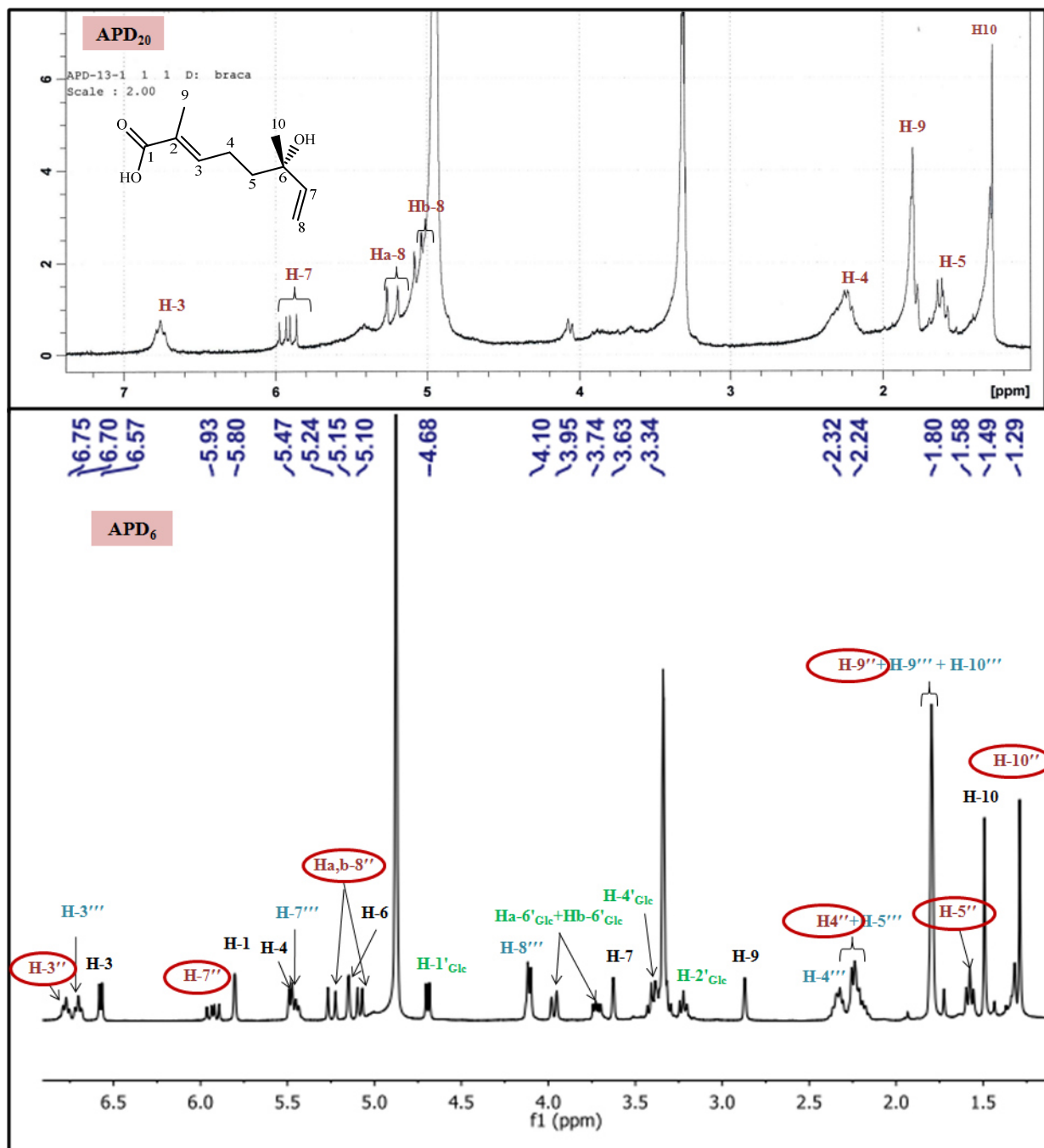
Spectrométrie RMN :

Les spectres de RMN 1H , ^{13}C et HSQC (figure III-209- III-210- III-211) du composé **APD₂₀** sont semblables à ceux d'acide menthiafolique identifié dans le composé **APD₆**, cependant il diffère par l'absence des signaux du noyau iridoïde. En effet, on observe :

- Quatre protons oléfiniques dont :
 - Un multiplet à δ_H 6.71 / δ_C 143.3 ppm attribuable au proton H-3;
 - Doublet de doublets à δ_H 5.91 / δ_C 145.8 ppm ($J = 17.8 - 10.3$ Hz), correspondant au H-7;
 - Deux doublets à δ_H 5.04 et 5.22 / δ_C 112.1 ppm qui peuvent être attribués respectivement aux protons H_b-8 et H_a-8.
- Deux groupements méthylènes résonnant comme suit :
 - Un multiplet à δ_H 2.20 / δ_C 24.1 ppm attribué au H-4.
 - Un triplet à δ_H 1.59 / δ_C 41.5 ppm ($J = 8.3$ Hz) correspondant au H-5.
- Deux groupements méthyles sous forme d'un singulet d'intégration 3H :

- Un à δ_H 1.80 / δ_C 12.2 ppm (CH₃-9), déblindé par un groupement attracteur d'électron qui est le carbonyle C-1 (δ_C 128.0 ppm).
- Le deuxième à δ_H 1.25 / δ_C 27.5 ppm (CH₃-10), dans le déplacement chimique est déblindé par un groupement OH.

L'ensemble de ces signaux confirme la présence d'un acide menthiafolique (Arslanian et al., 1990).



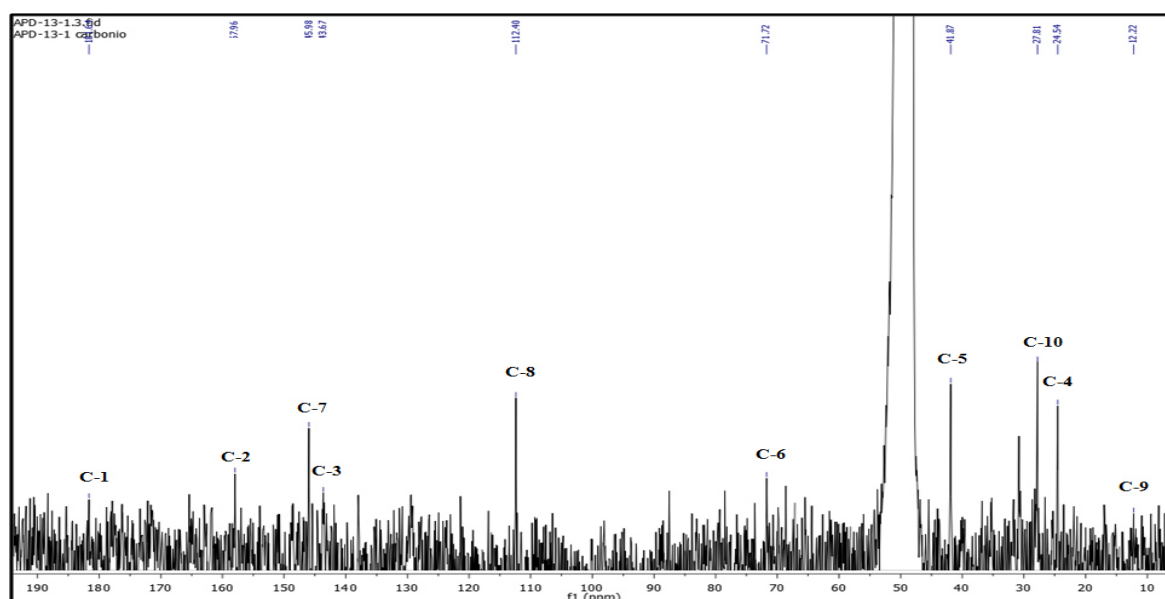


Figure III-210. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD₂₀.

L'analyse des corrélations hétéronucléaires $^1J_{\text{H-C}}$ observés sur le spectre HSQC (figure III-211) permet d'identifier et d'attribuer les déplacements chimiques des carbones portants les protons.

Les valeurs de δ_{C} sont répertoriées dans le tableau III-12.

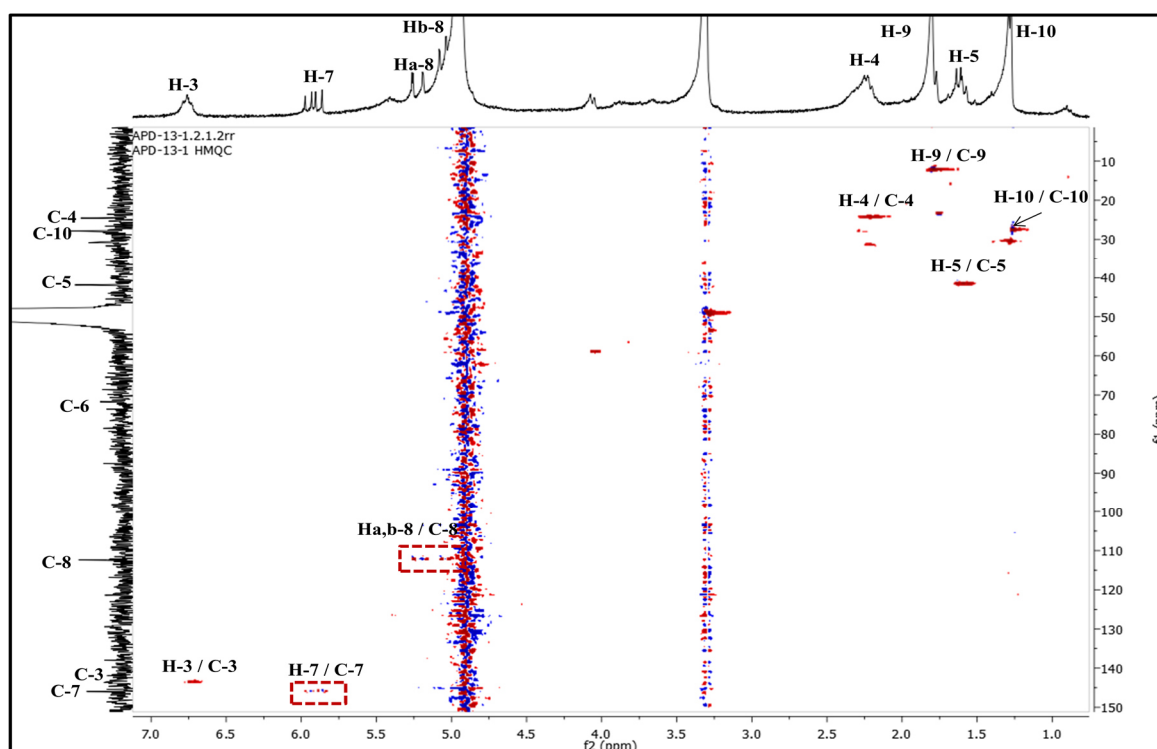
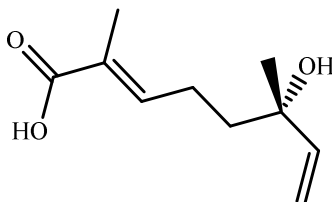


Figure III-211. Spectre HSQC du composé APD₂₀.

Le composé **APD₂₀** a été identifié comme étant : **(2*E*, 6*S*)-6-hydroxy-2,6-diméthyle-2,7-octadioic acid** connue sous le nom **(*S*)-menthiafolic acid**, isolé du *Penstemon ambiguus* Torr. (Scrophulariaceae) (Arslanian et al., 1990) et jamais dans le genre *Anarrhinum*.



APD₂₀ : (*S*)-menthiafolic acid.

III.3.2.6. Détermination structurale du composé APD₂₁

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif (figure III-212), présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 369.00 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 346 *uma* et correspondant à une formule brute en $C_{16}H_{26}O_8$. Un autre fragment est également observé à m/z 207.00 $[M+Na-162]^+$, indiquant la perte d'un hexose.

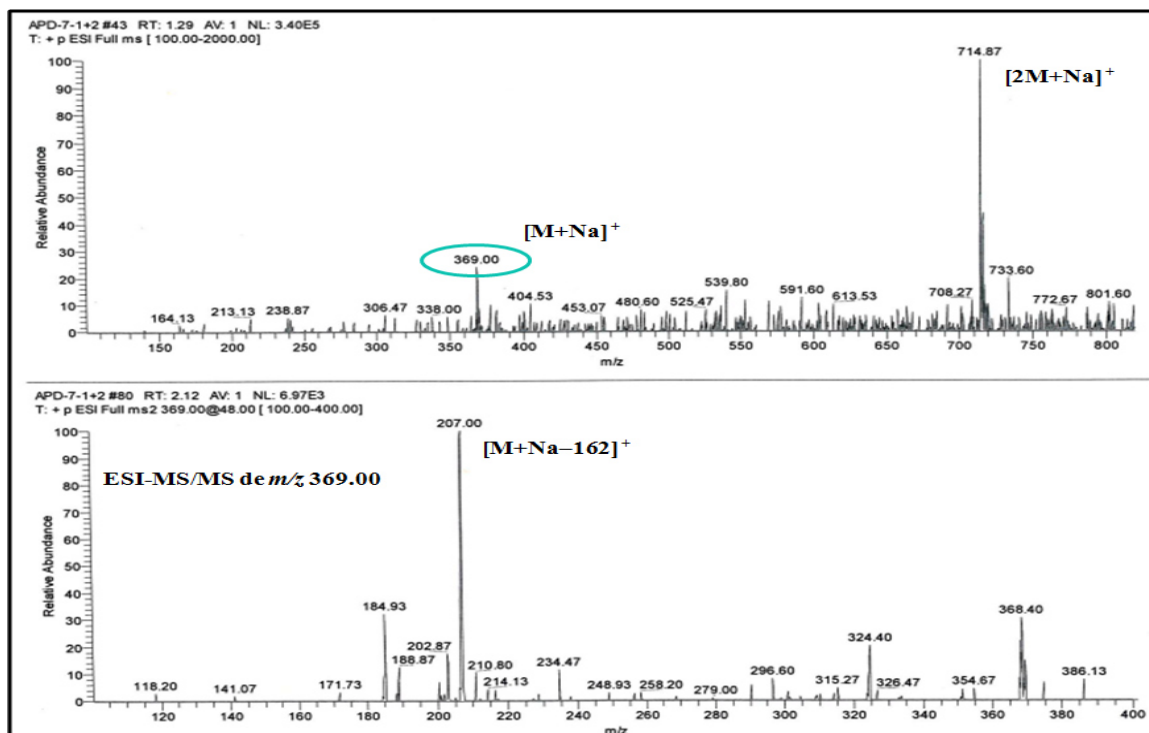


Figure III-212. Spectre de masse ESI-MS/MS en mode positif du composé APD₂₁.

Spectrométrie RMN :

L'analyse des spectres RMN ^1H et HSQC (figure III-213- III-214) du composé **APD₂₁** montrent les mêmes signaux caractéristiques du composé acide menthiafolique (**APD₂₀**) en plus :

- Un proton anomérique localisé à δ_{H} 5.53 ppm (d , $J = 7.8$ Hz). Leur carbone est attribué à l'aide du spectre HSQC à δ_{C} 95.5 ppm, indique la présence du β -glucopyranosyl ester.
- Un massif de protons dans la zone des protons osidiques.

Selon les déplacements chimiques et en comparaison avec la littérature on peut déterminer l'enchaînement de β -D-glucopyranosyl H-1'_{Glcl} lié au carbone C-1 de la fonction acide à δ_{C} 182.0 ppm (Takeda et al., 1998).

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-12.

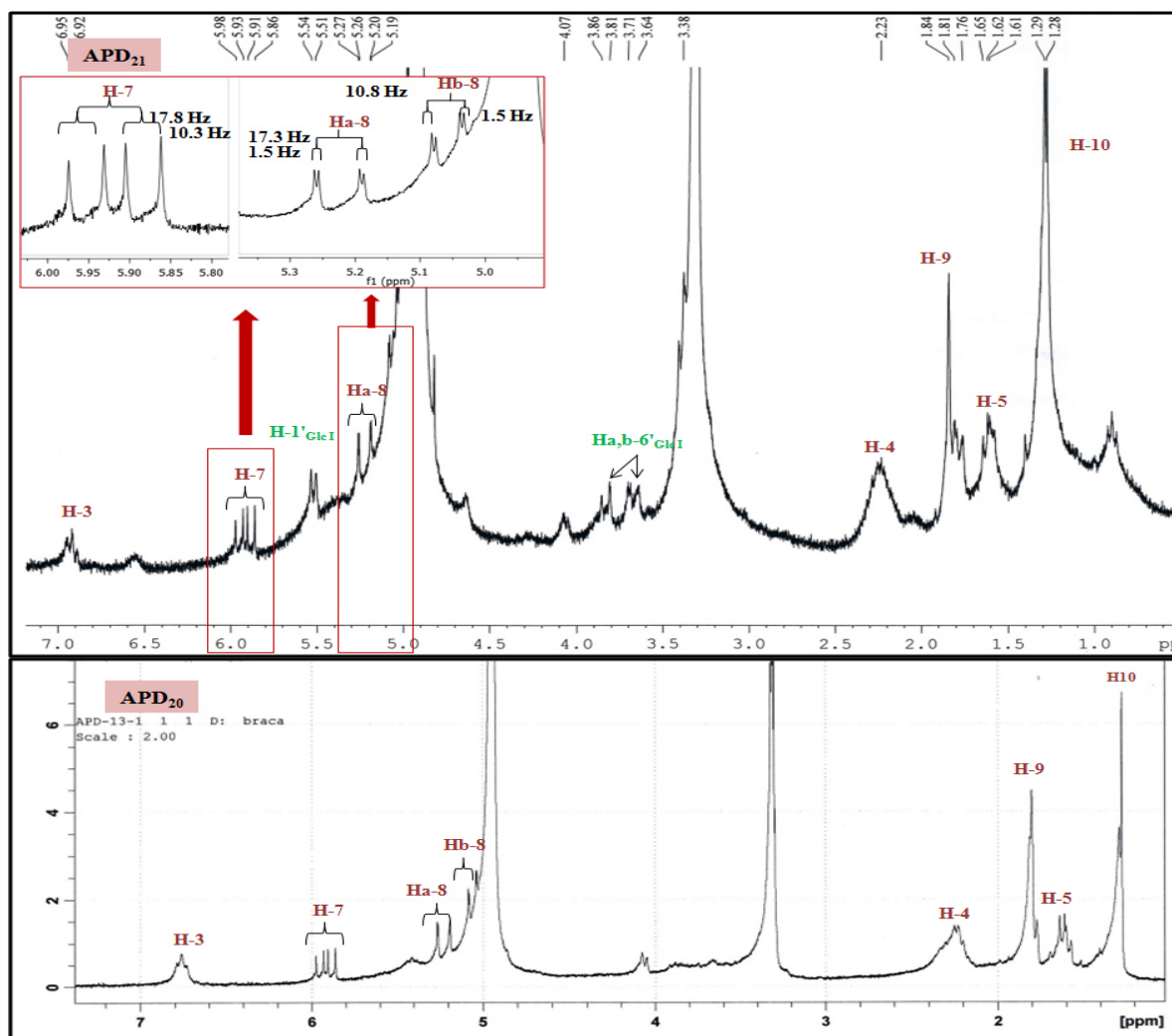


Figure III-213. Spectre de RMN ^1H du composé **APD₂₁** comparé à celui du composé **APD₂₀**.

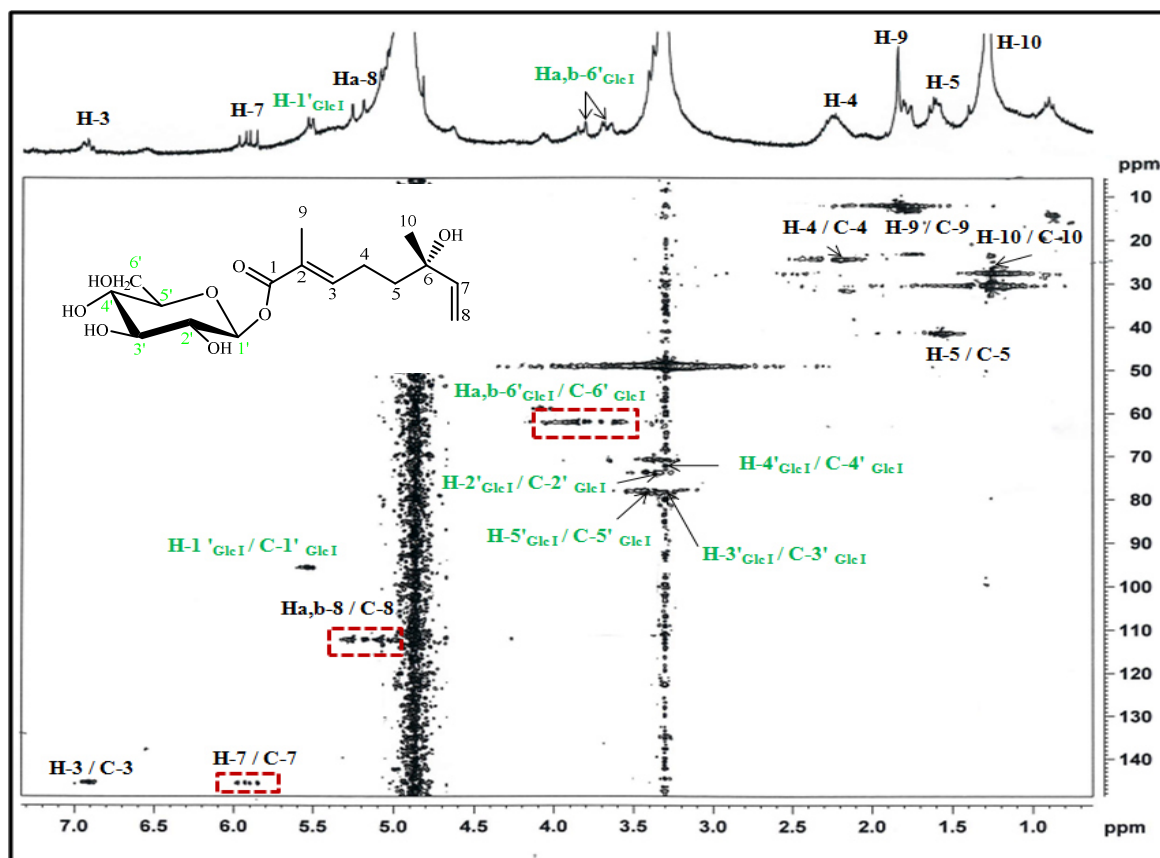
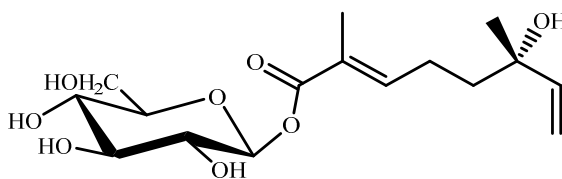


Figure III-214. Spectre HSQC du composé APD₂₁.

Cette analyse spectrale permet d'assigner la structure suivante pour le composé APD₂₁ : (6*S*)-2*E*-2,6-diméthyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid β -glucopyranosyl ester, isolé des feuilles du *Lantana lilacia* (Takeda et al., 1998), mais c'est la première fois qu'il est isolé du genre *Anarrhinum*.



APD₂₁ : (6*S*)-2*E*-2,6-diméthyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid β -glucopyranosyl ester.

III.3.3. Identification des glycosides phényléthanoïdes isolés de l'extrait APD_n-BuOH

III.3.3.1. Détermination structurale du composé APD₂₂

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse HR-ESI-MS en mode positif du **APD₂₂** montre un ion pseudo-moléculaire à m/z 323.1091 $[M+Na]^+$ correspondant à la formule brute C₁₄H₂₀O₇ (figure III-215).

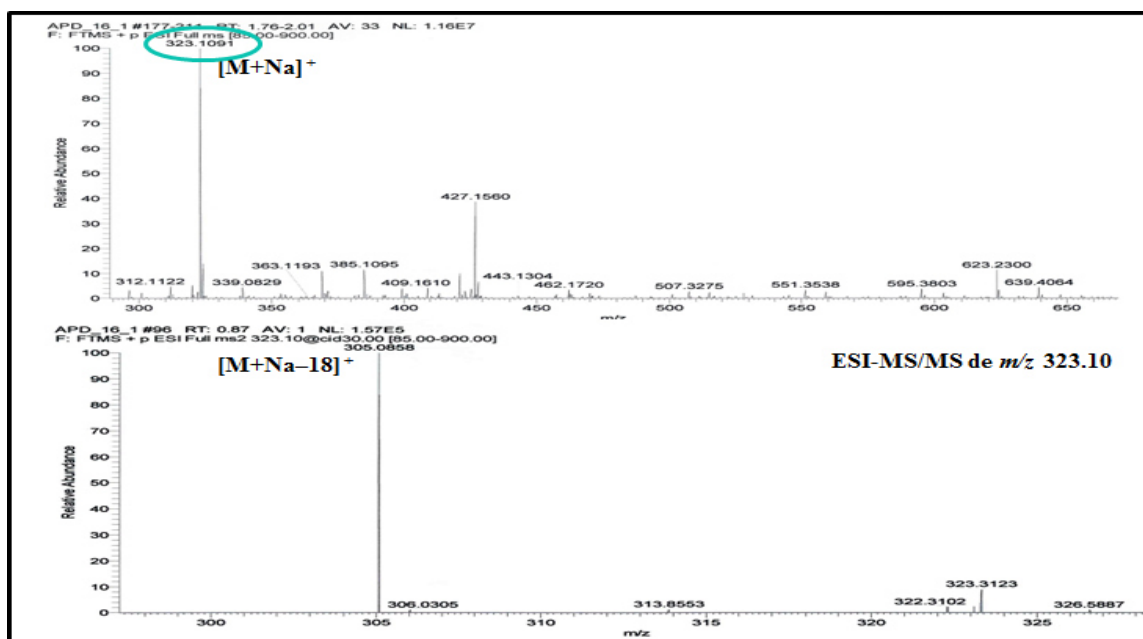


Figure III-215. Spectre de masse HR-ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé **APD₂₂**.

Spectrométrie de RMN :

Le spectre RMN ¹H du composé **APD₂₂** (figure III-216) montre :

- Deux protons aromatiques observés à δ_H 7.06 (2H, *d*, $J = 8.1$ Hz) et 6.69 ppm (2H, *d*, $J = 8.1$ Hz). La constante de couplage indique la position *ortho* de ces protons.
- Deux signaux multiplet d'intensité 2H dont un résonnent à δ_H 2.81 ppm attribuable à un H β -7, le deuxième à δ_H 4.13 (H α_a -8) et 3.62 ppm (H α_b -8) caractéristique d'un CH₂-O.
- Un proton anomérique H-1'_{Glc} sous forme d'un doublet à δ_H 4.28 ppm avec une constante de couplage $J = 7.8$ Hz caractéristique d'un β -glucose (Miyase et al., 1988).

- Un ensemble de protons résonnant entre δ_H 3.19 et 3.82 ppm correspondant aux déplacements chimiques du glucose.

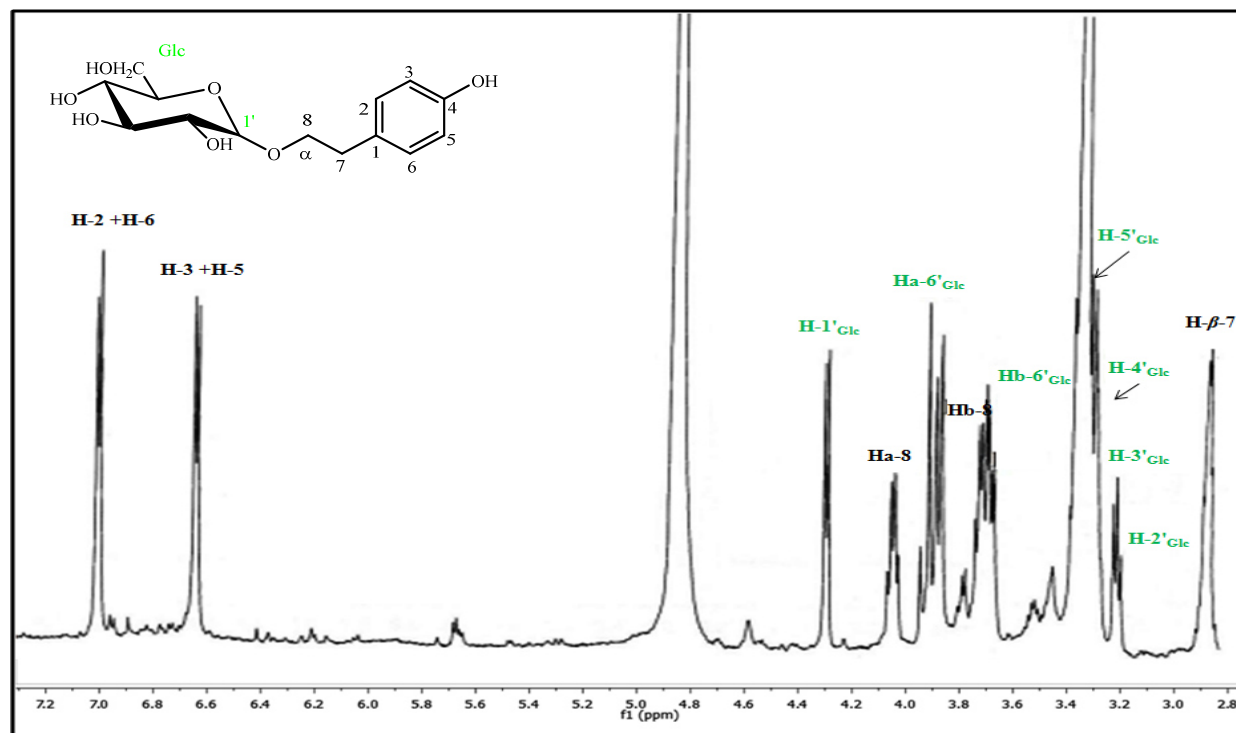


Figure III-216. Spectre de RMN ^1H du composé APD₂₄.

L'analyse des corrélations hétéronucléaire $^1J_{\text{C-H}}$ sur le spectre HSQC (figure III-217) permet d'identifier et attribuer les déplacements chimiques au carbone du glucose et du phényléthanoïde correspondant aux protons déjà identifiés par l'analyse RMN ^1H .

Les valeurs de δ_C sont répertoriées dans le tableau III-13.

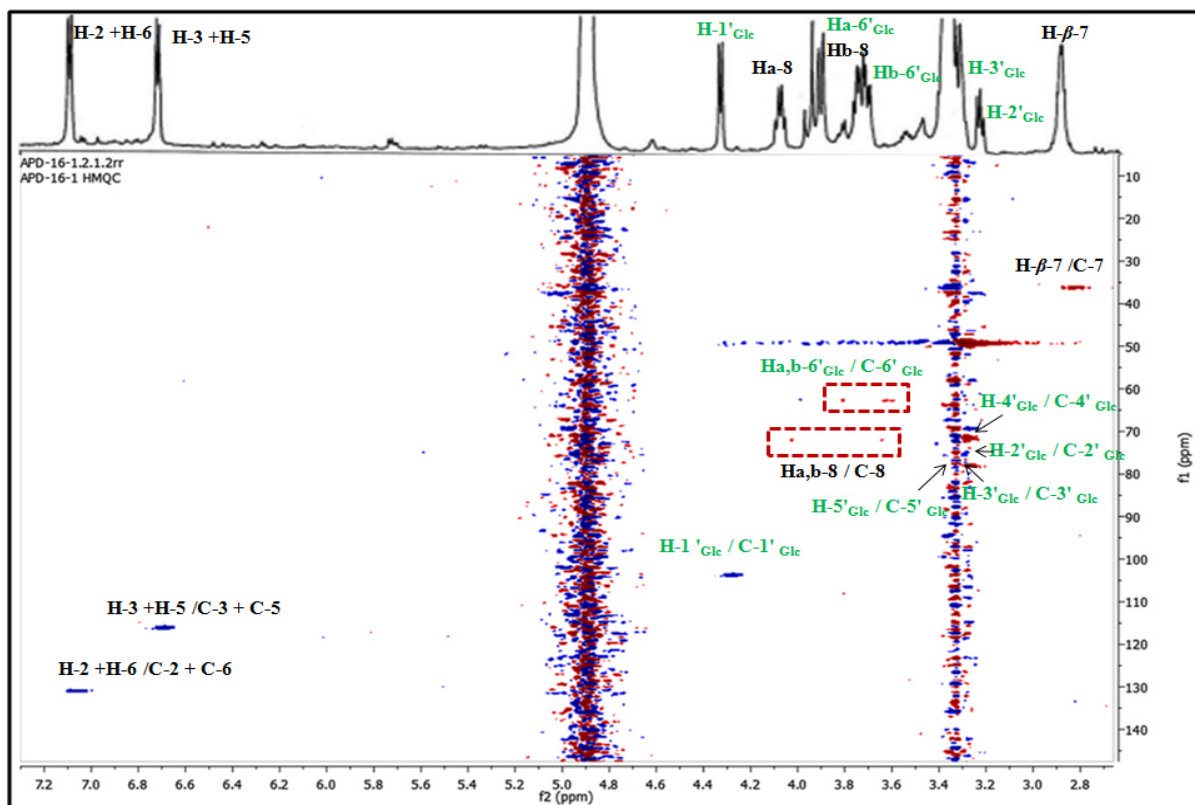


Figure III-217. Spectre HSQC du composé APD₂₄.

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (figure III- 218) sont :

- Corrélation du cycle aromatique :
 - Les protons H-2/H-6 avec les carbones C-1, C-3/C-5, C-4 et C-7 ;
 - Les protons H-3/H-5 avec C-2/C-6, C-4 et C-1.
- Le proton méthylène H_β-7 (δ_H 2.81 ppm) avec les carbones C-1 et C-8. Ce qui confirme la présence d'un phényléthanoïde.
- Le proton anomérique H-1'_{Glc} (δ_H 4.28 ppm) corrèle avec le carbone C-8 indiquant ainsi sa position par rapport à la génine.

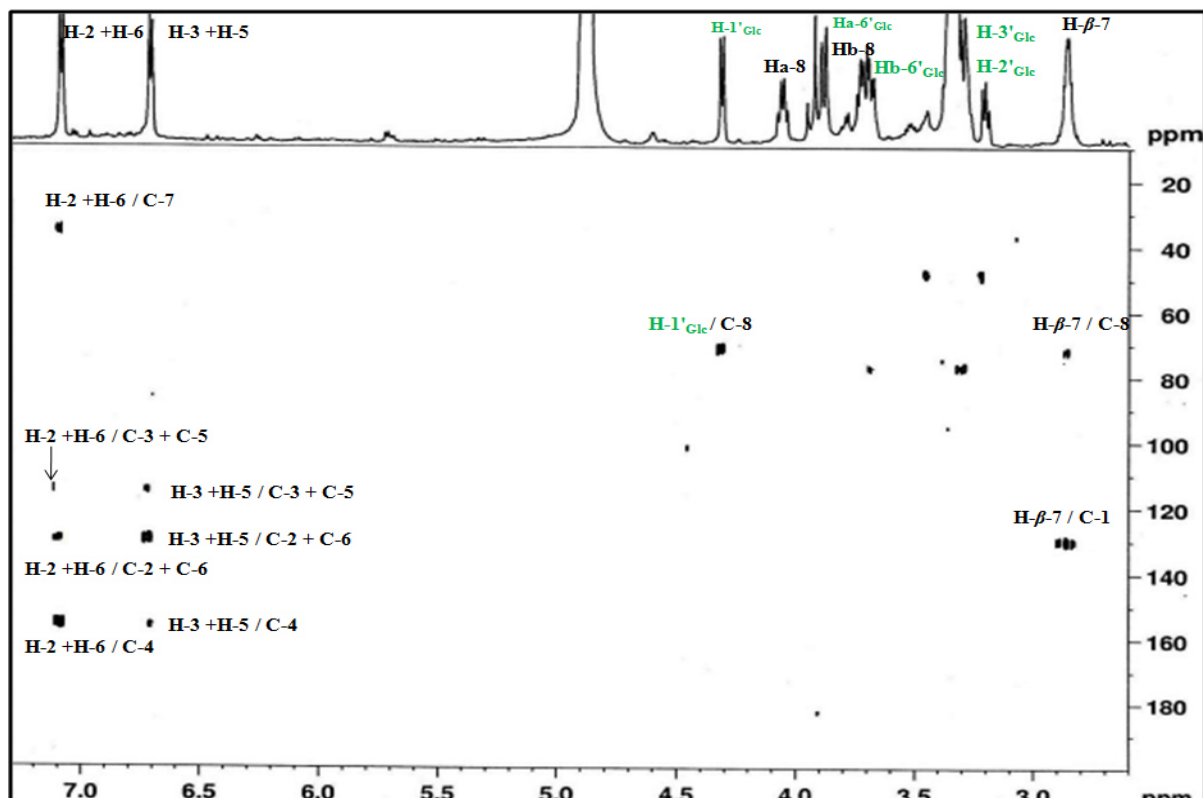
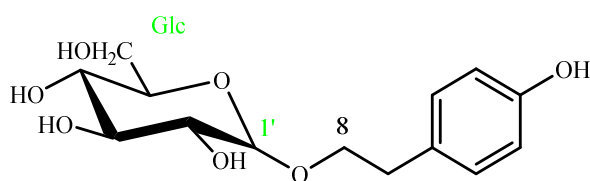


Figure III-218. Spectre HMBC du composé APD₂₂.

Les données RMN confirment la structure du composé APD₂₂ : **2-(4-hydroxyphényl)ethyl β-D-glucopyranoside** appelé **Salidroside** ou **Rhodiolide**. Ce composé a été isolé de *Veronicastrum virginicum* une espèce de la famille des Plantaginaceae (Taskova et al., 2006) et *Epimedium grandiflorum* (Miyase et al., 1988).



APD₂₂ : Salidroside.

III.3.3.2. Détermination structurale des composés APD₂₃

Spectrométrie de masse :

Sur le spectre de masse ESI réalisé en mode négatif (figure III-219), nous observons un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 623 $[M-H]^-$, suggérant une masse atomique de 624 *uma* et une formule brute de $C_{29}H_{36}O_{15}$. Le spectre MS/MS du composé présente également

des ions résultant de la fragmentation de la molécule et notamment l'ion à m/z 461 $[M-H-162]^-$ et à 315 $[M-H-162-146]^-$ indiquant la présence d'un dihydroxy.

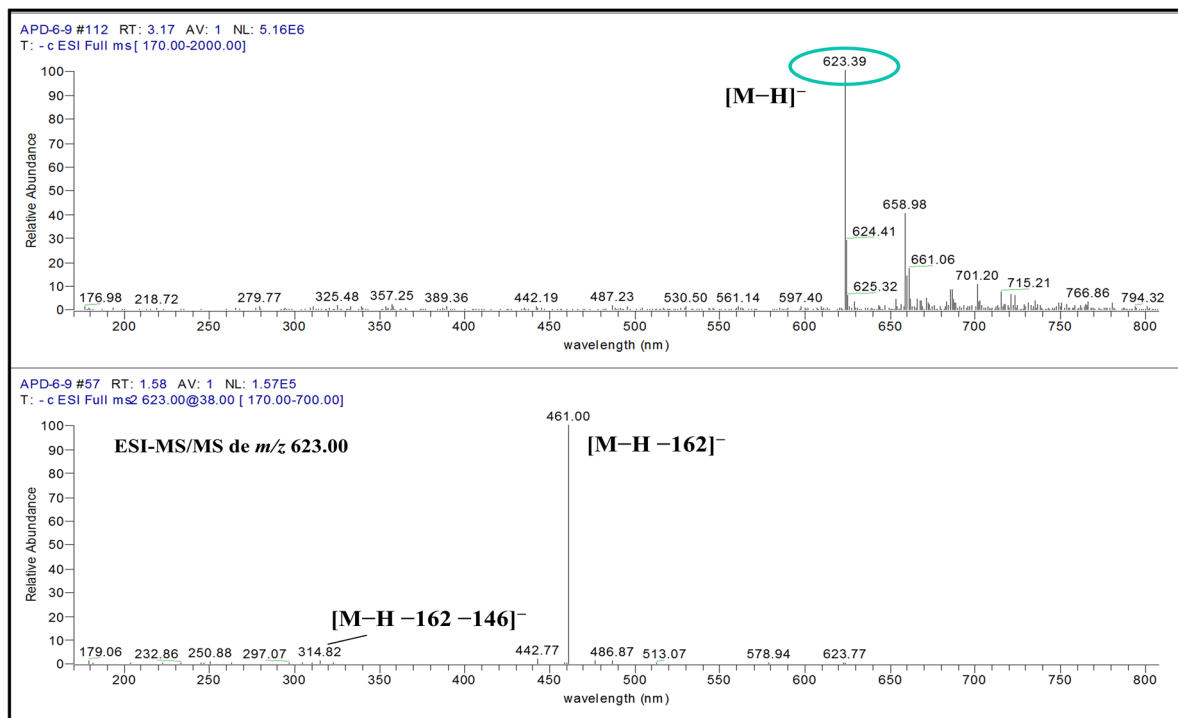


Figure III-219. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD₂₃.

Spectrométrie de RMN :

Le spectre de RMN 1H du composé APD₂₃ (figure III-220) montre la présence d'un phényléthanoïde glycosilé correspondant :

- Un groupement 3,4-dihydroxyphénylethoxy dont :
 - Trois protons aromatiques à δ_H 6.70, 6.67 et 6.58 ppm respectivement attribués aux protons H-2, H-5 et H-6, indiquant que le cycle aromatique est tri-substitué en C-1, C-3 et C-4.
 - Un signal sous forme d'un triplet correspondant à un méthylène (α -CH₂) situé à δ_H 2.82 ppm et deux protons non équivalents (β -CH₂) à δ_H 4.04 (Ha) et 3.91(Hb) ppm de la chaîne latérale du groupement aglycone correspondant respectivement aux H β -7 et H α -8.
- Un groupement caféique dont :
 - Trois protons aromatiques dont un singulet large résonant à δ_H 7.06 ppm, et un doublet de doublets à δ_H 6.77 ppm ($J = 8.2 - 2.0$ Hz) et un doublet δ_H 6.97 ($J = 2.0$

Hz) attribués respectivement aux protons H-2', H-5' et H-6' du noyau aromatique tri-substitué en C-1, C-3 et C-4.

- Deux protons oléfiniques en position *trans* à δ_H 7.61 et 6.27 ppm caractérisés par la même constante de couplage 15,9 Hz attribués aux H β -7' et H α -8'.

La partie osidique est mise en évidence par la présence de :

- Deux protons anomériques dont un à δ_H 5.19 ppm ($J = 1.9$ Hz) correspond d'un rhamnose H-1''' confirmé par la présence d'un doublet à δ_H 1.09 ppm d'intégration 3H ($J = 6.2$ Hz) très caractéristique d'un méthyle en position C-6''', le deuxième proton anomérique à δ_H 4.37 ppm ($J = 7.8$ Hz) correspondent au H-1'' indique un β -glucose.

D'après la littérature le triplet à δ_H 4.71 ppm ($J = 9.7$ Hz) correspond au proton du glucose (H-4''_{Glc}) dont la fonction hydroxyle est estérifiée par l'acide caféique (indique une jonction en C-4' avec le carboxyle de la partie Caféique), ainsi le déplacement chimique du H-3''_{Glc} (δ_H 3.74 ppm) indique que le H-1'''_{Rha} est substitué en C-3'_{Glc} (Liu et al., 1998)

Les déplacements chimiques sont répertoriés dans le tableau III-13.

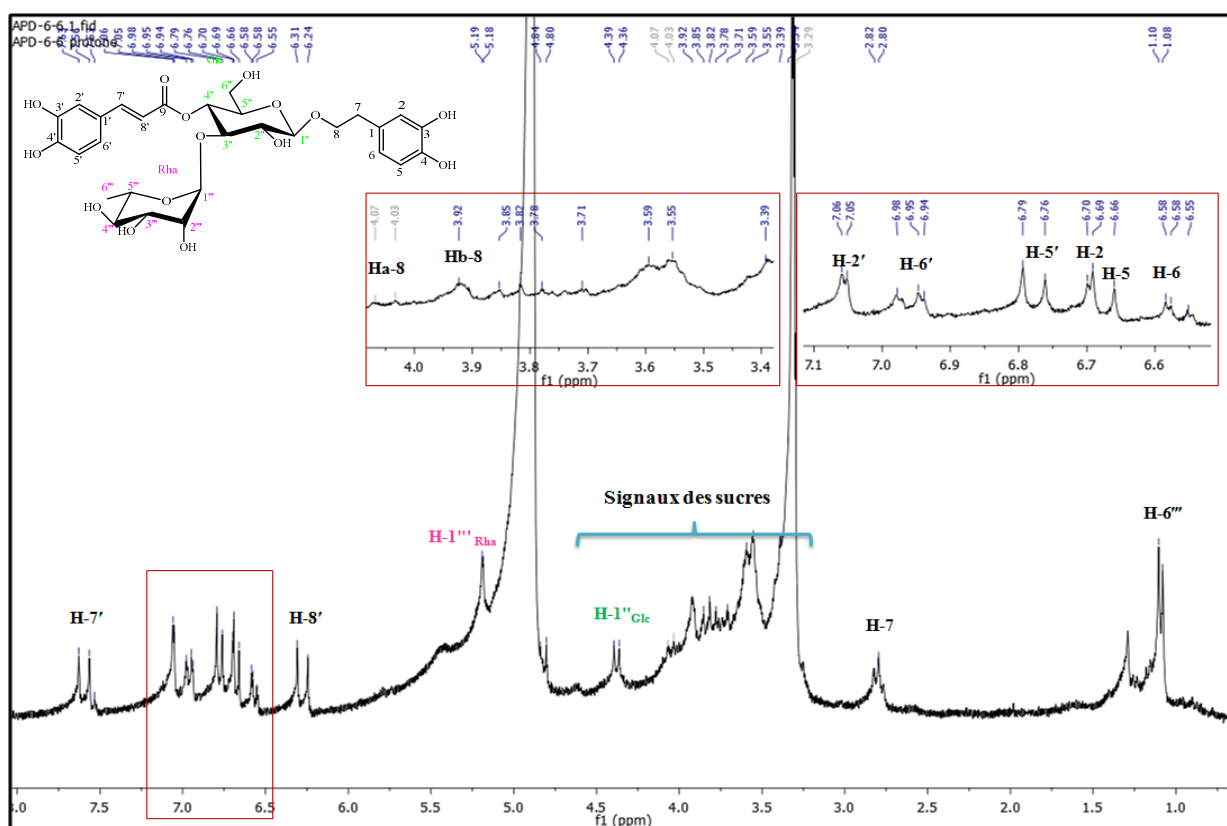
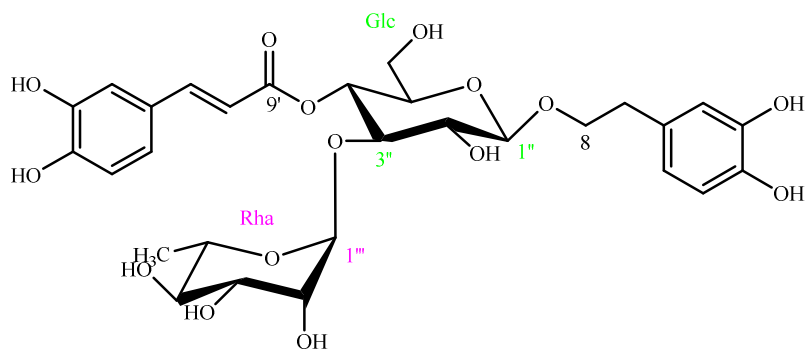


Figure III-220. Spectre de RMN ¹H du composé APD₂₃.

L'ensemble des données précédentes nous permet d'identifier le composé **APD₂₃** comme étant le **verbascoside** déjà isolé des parties aériennes de l'espèce *Camptoloma lyperiiflorum* (Plantaginaceae) (Taskova et al., 2006) et *Lysionotus pauciflorus* (Liu et al., 1998) et pour la première fois dans le genre *Anarrhinum*.



APD₂₃: Verbascoside.

III.3.4. Identification d'un flavonoïde isolé de l'extrait APD_{n-BuOH}

III.3.4.1. Détermination structurale du composé APD₂₄

Spectrométrie de masse :

Le spectre de masse ESI-MS effectué en mode négatif (figure III-221) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 463 $[M-H]^-$ ($[2M-H]^-$ à m/z 925) correspondant à la formule brute en $C_{21}H_{20}O_{12}$. En plus du pic de l'ion moléculaire, nous observons sur le spectre la présence d'un fragment important à m/z 301 $[M-H-162]^-$ indique la présence d'un hexose.

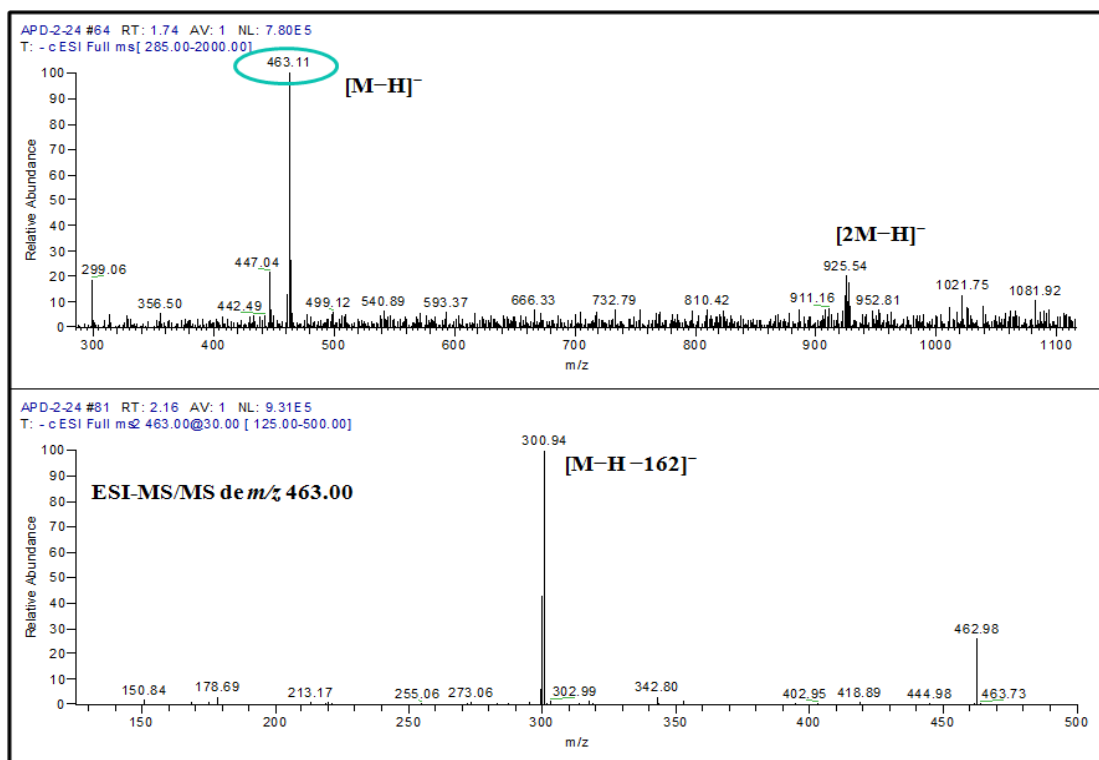


Figure III-221. Spectre de masse ESI-MS et MS/MS en mode positif du composé APD₂₄.

Spectrométrie de RMN :

L'examen des spectres RMN ¹H et ¹³C du composé APD₂₄ (figure III-222- III-223) montre la présence des signaux caractéristiques d'un flavonoïde glycoside de type flavonol qu'on peut identifier par:

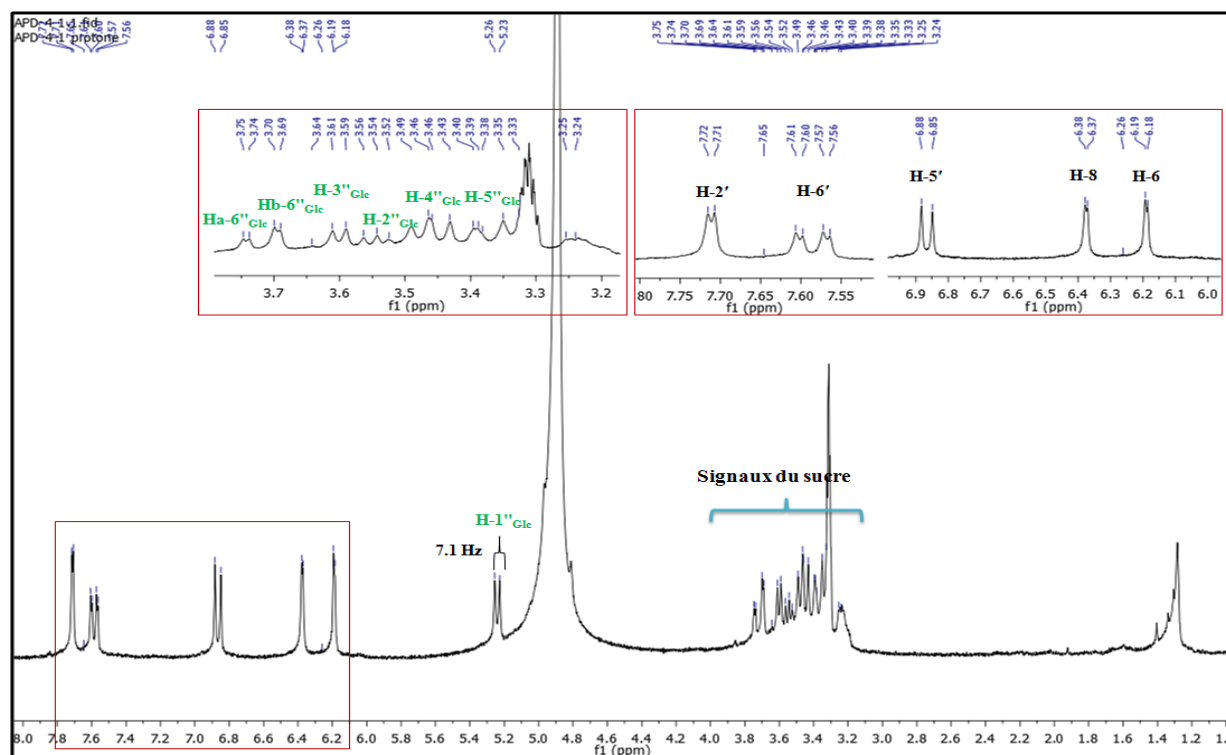
- Les protons aromatiques du cycle A :
 - Deux signaux sous forme de doublets chacun résonnent à δ_H 6.19 / δ_C 100.1 et 6,37 / δ_C 94.8 ppm avec une constante de couplage ($J = 2,1$ Hz), attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8.
- Les protons aromatiques du cycle B :
 - Un signal sous forme de doublet d'intégration 1H à δ_H 7.71 / δ_C 116.0 ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-2' ;
 - Un signal sous forme de doublet qui apparaît à δ_H 6.86 / δ_C 117.5 ppm ($J = 8,5$ Hz), attribuable à H-5' ;
 - Un signal sous forme de doublet dédoublé d'intégration 1H à δ_H 7.58 / δ_C 123.2 ppm ($J=7,1 - 2,2$ Hz) attribuable à H-6'.

Ces signaux confirment que le cycle B est tri-substitué en positions 1', 3' et 4'.

- La présence d'un β -glucose est clairement notée, confirmée notamment avec :
 - Le proton anomérique H-1''_{Glc} à δ_H 5.24 / δ_C 104,4 ppm ($J = 7,0$ Hz) ;
 - Un massif des signaux sont observés entre 3 et 4 ppm.

Ainsi, cette analyse la coloration violette noire sous la lampe UV, confirme un flavonol substitué en position 3.

Les déplacements chimiques sont notés dans le tableau III-13.



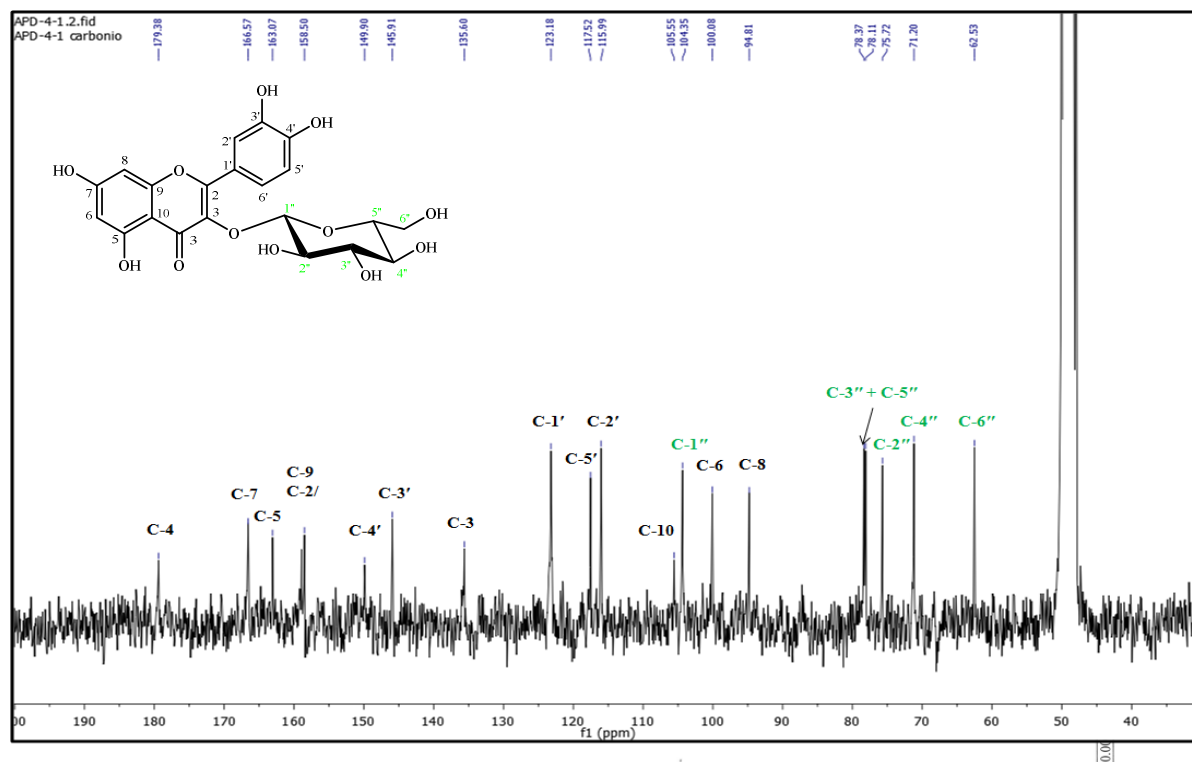
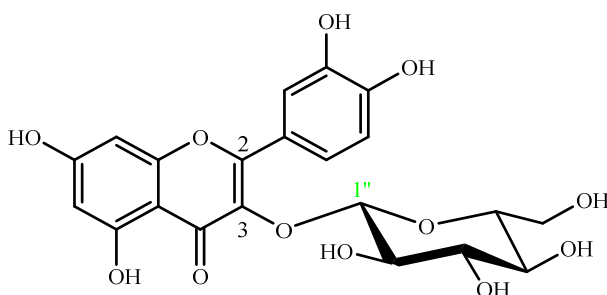


Figure III-223. Spectre de RMN ^{13}C du composé APD₂₄.

L'ensemble des données spectrales de RMN et de masses obtenues avec celle de la littérature (Agrawal., 1989) nous a permis d'identifier le composé APD₂₄ comme étant le **quercetine 3-O- β -D-glucopyranoside**.



APD₂₄ : Quercetine 3-O- β -D-glucopyranoside.

Tableau III-7. Déplacements chimiques en RMN-¹H et ¹³C (250 MHz) d'APD₁ et APD₃, ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) d'APD₂ dans le CD₃OD.

Position	APD ₁		APD ₂		APD ₃	
	δ _C	δ _H (ppm, <i>J</i> en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, <i>J</i> en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, <i>J</i> en Hz)
1	94.9	5.39 d (7.3)	94.3	5.55 d (7.5)	94.5	5.54 d (5.8)
3	142.4	6.38 d (6.4)	142.6	6.42 d (6.0)	143.0	6.41 d (6.0)
4	107.0	4.95 d (6.4)	107.3	4.97 d (6.2)	104.0	4.94 br d (6.2)
5	74.5	–	73.5	–	73.4	–
6	78.0	3.96 d (1.6)	79.2	5.10 br s	79.0	5.06 d (2.0)
7	66.2	3.60 d (1.6)	58.0	3.72 br d (2.0)	64.2	3.50 d (2.0)
8	64.1	–	65.0	–	63.4	–
9	52.9	2.38 br d (7.3)	51.1	2.63 d (7.5)	53.1	2.47 d (5.0)
10a	17.5	1.50 s	60.8	4.15 d (13.5)	17.2	1.51 s
10b				3.71 d (13.5)		
1'' en C-6						
1''			167.8	–	167.6	–
2''			128.1	–	127.1	–
3''			143.9	6.94 br t (7.4)	143.7	6.93 br t (6.9)
H ₂ -4''			28.0	2.36 m ^b	27.6	2.30 m ^b
H ₂ -5''			–	2.36 m ^b	31.0	2.21 m
6''			31.1	2.26 br t (7.6) ^b	142.9	–
7''			138.1	–	126.2	5.42 br d (7.7)
8''a			126.2	5.43 br d (6.4)	58.9	4.12 ^b
8''b			58.8	4.10 d (6.4) ^b	12.0	1.87 s
9''			12.1	1.90 s	23.0	1.76 s
10''			23.1	1.78 s	167.6	–

Tableau III- 8. Déplacements chimiques en RMN-¹H (600 MHz) et ¹³C (150 MHz) d'APD₅, ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) d'APD₆ et APD₇ dans le CD₃OD.

Position	δ _C	APD ₄ δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	APD ₅ δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	APD ₆ δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	APD ₇ δ _H (ppm, J en Hz)
1	92.3	5.98 d (2.2)	93.5	5.82 d (2.2)	93.5	5.81 d (2.0)	92.8	5.96 d (2.7)
3	145.4	6.58 d (6.5)	145.6	6.59 d (6.5)	145.6	6.58 d (6.5)	145.5	6.56 d (6.7)
4	102.4	5.49 d (6.5)	102.4	5.48 d (6.5)	102.4	5.49 d (6.5)	102.6	5.47 d (6.7)
5	80.5	—	80.3	—	79.0	—	80.6	—
6	76.2	5.19 d (2.0)	76.5	5.15 d (2.0)	76.3	5.15 d (2.2)	76.2	5.17 d (2.0)
7	60.9	3.78 d (2.0)	64.0	3.63 d (2.0)	64.3	3.63 d (2.4)	61.4	3.71 d (2.0)
8	66.6	—	64.6	—	64.0	—	66.0	—
9	49.0	3.01 br s	49.4	2.86 br s	50.1	2.88 br s	48.8	3.02 br s
10a	61.1	4.16 d (13.0)	16.0	1.49 s	16.1	1.50 s	61.0	4.14 d (13.0)
10b	—	3.56 d (13.0)	—	—	—	—	—	3.56 d (13.0)
1" en C-5								
1"	167.1	—	167.3	—	166.0	—	166.0	—
2"	128.9	—	128.3	—	125.1	—	127.2	—
3"	143.1	6.79 br t (6.9)	142.6	6.78 br t (6.9)	144.3	6.71 br t (7.3)	144.4	6.71 br t (7.0)
H ₂ -4"	26.4	2.33 ^b m	27.5	2.31 ^b m	24.1	2.23	24.0	2.23 m
H ₂ -5"	30.8	2.22 ^b m	31.1	2.19 ^b m	41.5	1.59 t (8.2)	41.5	1.57 t (8.2)
6"	138.6	—	137.8	—	71.8	—	72.1	—
7"	125.2	5.44 br d (7.7) ^b	126.0	5.43 br d (7.7) ^b	145.5	5.93 dd (16.9, 12.0)	145.0	5.93 dd (17.0, 11.0)
8" ^a	58.6	4.06 ^b	58.6	4.09 ^b	112.1	5.27 br d (17.1)	112.1	5.25 br d (17.0)
8" ^b	—	4.06 ^b	—	4.09 ^b	—	5.07 br d (11.4)	—	5.07 br d (11.0)
9"	12.5	1.81 s	13.0	1.80 ^b s	12.0 ^b	1.80 ^b s	12.0	1.80 s
10"	22.8	1.78 s	23.0	1.79 ^b s	27.4	1.29 s	27.4	1.28 s
1" en C-6								
1"	167.8	—	167.8	—	166.0	—	166.0	—
2"	128.4	—	128.3	—	128.5	—	128.5	—
3"	143.4	6.71 br t (6.9)	143.0	6.69 br t (6.9)	143.3	6.77 br t (7.3)	143.3	6.77 br t (7.3)
H ₂ -4"	26.4	2.33 ^b m	27.5	2.31 ^b m	27.8	2.33 m ^b	27.8	2.33 m ^b
H ₂ -5"	30.8	2.22 ^b m	31.0	2.19 ^b m	31.3	2.23 ^b	31.3	2.23 ^b
6"	138.6	—	137.8	—	137.5	—	137.5	—
7"	125.2	5.44 br d (7.7) ^b	126.0	5.43 br d (7.7) ^b	126.2	5.46 br d (6.5)	126.2	5.46 br d (6.5)
H ₂ -8"	58.6	4.06 ^b	58.6	4.09 ^b	58.8	4.10 d (6.5)	58.8	4.10 d (6.5)
9"	11.6	1.81 s	12.0	1.80 ^b s	12.0	1.79 s	12.0	1.79 s
10"	22.8	1.78 s	23.0	1.79 ^b s	23.2	1.78 s	23.2	1.78 s

Tableau III-9. Déplacements chimiques en RMN-¹H (600 MHz) et ¹³C (150 MHz) d'APD₈ et APD₉, ¹H et ¹³C (250 MHz) d'APD₁₀ et APD₁₁ dans le CD₃OD.

Position	APD ₈		APD ₉		APD ₁₀		APD ₁₁	
	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)	δ _C	δ _H (ppm, J en Hz)
1	93.3	5.57 d (6.4)	95.0	5.24 d (8.5)	95.2	5.17 d (5.8)	94.2	5.57 d (7.3)
3	142.0	6.43 d (6.5)	142.0	6.39 d (6.2)	142.6	6.33 d (6.2)	142.8	6.43 d (6.2)
4	106.0	4.97 d (6.5)	107.0	4.92 d (6.2)	107.0	4.95 d (6.2)	103.0	5.17 d (6.2)
5	73.3	—	73.0	—	73.7	—	73.4	—
6	77.2	5.13 d (2.0)	77.6	3.96 d (1.7)	78.2	3.90 d (2.0)	78.9	5.07 d (2.0)
7	61.6	3.58 d (2.0)	62.2	3.57 ^b	65.6	3.34 d (2.0)	63.4	3.55 d (2.0)
8	63.1	—	65.0	—	64.4	—	63.0	—
9	52.0	2.50 d (6.4)	50.3	2.57 d (8.5)	53.0	2.36 d (5.0)	53.1	2.48 d (5.0)
10a	17.0	1.51 s	60.6	4.11 d (12.8)	17.4	1.41 s	17.2	1.50 s
10b	—	—	—	3.62 d (12.8)	—	—	—	—
Cin-1'' en C-6								
1''	134.3	—	134.0	—	134.3	—	125.8	—
2''	128.0	7.65 dd (7.5, 2.8)	128.2	7.64 dd (7.5, 3.0)	131.4	7.38 dd (7.5, 2.8)	131.0	7.50 d (8.0)
3''	128.6	7.40 ^b	130.0	7.42 ^b	129.8	7.38 ^b	116.5	6.81 d (8.0)
4''	130.0	7.40 ^b	131.2	7.42 ^b	129.0	7.58 ^b	160.0	—
5''	128.6	7.40 ^b	130.0	7.42 ^b	129.8	7.38 ^b	147.0	7.77 d (16.0)
6''	128.0	7.65 dd (7.5, 2.8)	128.2	7.64 dd (7.5, 3.0)	131.4	7.38 dd (7.5, 2.8)	114.6	6.43 d (16.0)
7''	145.6	7.81 d (16.5)	146.4	7.70 d (16.0)	146.4	7.69 d (16.5)	167.1	—
8''	117.0	6.63 d (16.5)	117.5	6.59 d (16.0)	118.4	6.57 d (16.5)	125.8	—
9''	166.6	—	166.8	—	167.2	—	133.9	7.69 d (8.0)
Cin-1'' en C-6'								
p-Cou-1'' en C-6								
1''	134.3	—	134.0	—	134.3	—	125.8	—
2''	128.0	7.65 dd (7.5, 2.8)	128.2	7.64 dd (7.5, 3.0)	131.4	7.38 dd (7.5, 2.8)	131.0	7.50 d (8.0)
3''	128.6	7.40 ^b	130.0	7.42 ^b	129.8	7.38 ^b	116.5	6.81 d (8.0)
4''	130.0	7.40 ^b	131.2	7.42 ^b	129.0	7.58 ^b	160.0	—
5''	128.6	7.40 ^b	130.0	7.42 ^b	129.8	7.38 ^b	147.0	7.77 d (16.0)
6''	128.0	7.65 dd (7.5, 2.8)	128.2	7.64 dd (7.5, 3.0)	131.4	7.38 dd (7.5, 2.8)	114.6	6.43 d (16.0)
7''	145.6	7.81 d (16.5)	146.4	7.70 d (16.0)	146.4	7.69 d (16.5)	167.1	—
8''	117.0	6.63 d (16.5)	117.5	6.59 d (16.0)	118.4	6.57 d (16.5)	125.8	—
9''	166.6	—	166.8	—	167.2	—	133.9	7.69 d (8.0)
cis 1''								
2''/6''	—	—	—	—	—	—	133.9	7.69 d (8.0)
3''/5''	—	—	—	—	—	—	115.3	6.75 d (8.0)
4''	—	—	—	—	—	—	160.1	—
7''	—	—	—	—	—	—	145.7	6.91 d (12.0)
8''	—	—	—	—	—	—	115.4	5.90 d (12.0)
9''	—	—	—	—	—	—	167.1	—

Tableau III-10. Déplacements chimiques en RMN- ^1H et ^{13}C (250 MHz) d'APD $_{12}$, ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) d'APD $_{13}$ et APD $_{15}$ et ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) d'APD $_{14}$ dans le CD $_3\text{OD}$.

Position	APD $_{12}$		APD $_{13}$		APD $_{14}$		APD $_{15}$	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)
1	96.2	5.30 d (6.0)	95.6	5.22 d (5.5)	95.4	5.25 ^b	95.0	5.28 d (5.6) / 5.14 d (5.6)
3	150.0	7.46 s	151.0	7.53 s	151.4	7.54 s	151.7	7.51 s
4	116.4	–	112.0	–	112.0	–	112.1	–
5	33.0	3.26 m	33.0	3.24 ^b	32.0	3.26 m	32.5	3.19 ^b
6a	30.8	2.23 m	30.0	2.36 m	30.6	2.38 m	30.4	2.32 m
6b		1.44 m		1.29 m		1.49		1.40 m
7a	40.7	1.71 m	39.0	1.70 m ^b	41.4	1.63 ^b	39.3	1.68 br t (7.6)
7b		–		1.70 m ^b		1.63 ^b		1.63 br t (7.3)
8	81.1	–	79.9	–	79.6	–	79.6	–
9	51.7	2.15 m	51.0	2.15 dd (5.5, 4.0)	51.7	2.16 m	51.1	2.15 m
10	24.5	1.32 s	24.0	1.32 s	24.5	1.34 s	24.1	1.30 s
11	171.3	–	167.4	–	167.5	–	167.2	–
	1'' en C-6' Glc							
1''	169.3	–	168.0	–	167.9	–		
2''	128.8	–	128.0	–	127.0	–		
3''	142.2	6.82 dt (8.5, 1.5)	142.7	6.78 br t (7.6)	144.0	6.81 br t (7.6)		
H $_2$ -4''	27.8	2.33 m	27.0	2.32 m	24.1	2.26 m		
H $_2$ -5''	30.8	2.23 m	30.7	2.22 br t (7.5)	39.7	1.71 m		
6''	138.3	–	138.0	–	72.2	–		
7''	123.0	5.38 br t (6.5)	125.8	5.44 t (5.5)	145.0	5.94 dd (17.0, 10.0)		
8''a	58.9	4.05 d (6.5)	58.1	4.07 d (7.0) ^b	112.1	5.25 ^b		
8''b		–		4.07 d (7.0) ^b		5.08 br d (10.0)		
9''	12.6	1.85 s	11.5	1.86 s	12.0	1.86 s		
10''	23.2	1.77 s	23.2	1.76 s	27.0	1.30 s		
	p-Cou-1'' en C-6' Glc							
trans 1''							125.2	–
2''/6''							130.9	7.45 d (8.0)
3''/5''							115.5	6.78 d (8.0)

Position	APD ₁₂		APD ₁₃		APD ₁₄		APD ₁₅	
	δ_C	δ_H (ppm, J en Hz)	δ_C	δ_H (ppm, J en Hz)	δ_C	δ_H (ppm, J en Hz)	δ_C	δ_H (ppm, J en Hz)
4"							160.0	–
7"							146.7	7.68 d (16.0)
8"							114.6	6.35 d (16.0)
9"							167.9	–
<i>cis</i> 1"							126.5	–
2"/6"							133.7	7.66 d (8.0)
3"/5"							115.8	6.76 d (8.0)
4"							159.0	–
7"							145.2	6.87 d (12.0)
8"							115.8	5.77 d (12.0)
9"							167.2	–
Fru-5''' en C-11								
Fru-1a'''								
1b'''	61.3	4.05 d (12.0)	61.8	4.07 ^b	61.4	4.09 d (12.0) / 4.07 d (12.0)		
2'''	98.0	3.69 ^b	97.8	3.70 ^b	97.0	3.60		
3'''	68.0	–	68.4	–	68.7	–		
4'''	69.0	3.88 d (10.0)	69.0	3.90 d (10.0)	69.0	3.90 d (9.8) / 3.88 d (10.0)		
5'''	72.2	4.02 dd (10.0, 4.0)	72.0	4.04 ^b	72.6	4.00 m		
6'''a	65.0	5.13 m	65.2	5.15 m	65.0	5.12 m		
6'''b		3.70 ^b		3.71 ^b		3.71 dd (16.0, 12.0) / 3.69 dd (16.0, 12.0)		
		3.49 br t (10.0)		3.51 br t (11.0)		3.46 dd (16.0, 5.0)		

Tableau III-11. Déplacements chimiques en RMN- ^1H (250 MHz) et ^{13}C (250 MHz) des composées **APD16** et **APD17** et **APD18** et ^{13}C (500 MHz) d'**APD18** dans le CD_3OD .

Position	APD16		APD17		APD18	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)
1	171.7	–	168.1	–	167.8	–
2	131.0	–	128.4	–	128.3	–
3	142.2	6.79 br t (6.6)	144.5	6.91 br t (6.6)	143.6	6.92 m
4	28.0	2.32 m	27.9	2.27 m	27.4	2.23 m
5	31.3	2.21 m	31.3	2.20 m	31.8	1.62 br t (8.3)
6	139.1	–	139.5	–	136.5	–
7	125.9	5.43 br d (6.6)	126.2	5.43 br d (6.6)	126.6	5.91 dd (17.8, 10.3)
8a	58.3	4.06 d (6.6)	58.9	4.06 d (6.6)	58.4	5.23 dd (17.3, 1.5)
8b				–		5.06 dd (10.8, 1.5)
9	12.4	1.81 s	12.0	1.80 s	12.0	1.84 s
10a	23.1	1.76 s	23.2	1.25 s	23.2	1.28 s
			Glc I en C-1			Glc α en C-1
Glc I-1'	95.0	5.55 d (7.5)	95.6	5.55 d (8.0)	92.0	5.10 d (3.5)
2'	73.6	3.42 br	73.4	3.40 br	76.0	3.16 br
3'	77.7	3.43 br	78.6	3.36 br	74.1	3.69 m
4'	70.8	3.40 br	77.9	3.40 br	71.0	4.00 m
5'	78.1	3.39 br	76.4	3.42 br	72.0	3.38 br
6'a	62.3	3.87 dd (12.0, 2.5)	62.0	3.85 dd (12.0, 2.5)	64.1	4.39 dd (12.0, 2.0)
6'b		3.70 dd (12.0, 2.5)		3.67 (12.0, 2.5)		4.27 br
			Glc II en C-8			Glc β en C-1
Glc II-1''	102.0	4.30 d (7.5)			97.3	4.50 d (8.0)
2''	74.7	3.20 br t (9.0)			76.0	3.37 br
3''	77.7	3.40 br			77.5	3.37 br
4''	71.3	3.29 br			70.1	3.37 br
5''	77.5	3.29 br			75.1	3.52 m
6''a	62.3	3.87 dd (12.0, 2.5)			64.8	4.46 dd (12.0, 2.0)
6''b		3.70 dd (12.0, 2.5)				4.27 br

Tableau III-12. Déplacements chimiques en RMN- ^1H (500 MHz) et ^{13}C (500 MHz) du composé **APD19** et ^1H (250 MHz) et ^{13}C (250 MHz) des composées **APD20** et **APD21** dans le CD_3OD .

Position	APD19		APD20		APD21	
	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (ppm, J en Hz)
1	167.6	–	182.0	–	128.0	–
2	127.7	–	157.8	–	168.1	–
3	143.4	6.93 br t (6.6)	143.3	6.71 m	145.2	6.92 m
4	27.0	2.37 m	24.1	2.20 m	24.3	2.23 m
5	30.2	2.32 m	41.5	1.59 br t (8.3)	41.3	1.62 br t (8.3)
6	139.5	–	71.7	–	73.6	–
7	123.0	5.48 br d (6.6)	145.8	5.91 dd (17.8, 10.3)	145.5	5.91 dd (17.8, 10.3)
8a	65.6	4.36 dd (11.0, 5.0)	112.1	5.22 dd (17.3, 1.5)	112.1	5.23 dd (17.3, 1.5)
8b		4.24 dd (11.0, 3.0)		5.04 (10.8, 1.5)		5.06 dd (10.8, 1.5)
9	12.0	1.88 s	12.2	1.80 s	12.8	1.84 s
10a	23.0	1.81 s	27.5	1.25 s	27.3	1.28 s
Glc r-1'		Glc r en C-1				Glc α en C-1
2'	95.0	5.55 d (7.5)			95.5	5.53 d (8.0)
3'	73.6	3.42 br			73.7	3.40 br
4'	77.7	3.43 br			78.5	3.38 br
5'	70.8	3.40 br			70.7	3.40 br
6'a	78.1	3.39 br			78.0	3.46 br
6'b	62.3	3.87 dd (12.0, 2.5) 3.70 dd (12.0, 2.5)			62.1	3.86 dd (12.0, 2.5) 3.60 dd (12.0, 2.5)
Glc r-1''		Glc r en C-8				
2''	102.0	4.30 d (7.5)				
3''	74.7	3.20 br t (9.0)				
4''	77.7	3.40 br				
5''	71.3	3.29 br				
6''a	77.5	3.29 br				
6''b	62.3	3.87 dd (12.0, 2.5) 3.70 dd (12.0, 2.5)				

III.3.5. Conclusion sur l'étude phytochimique des parties aériennes d'*A. pedatum* (APD)

Cette étude d'*A. pedatum* est la première étude phytochimique d'une espèce du genre *Anarrhinum*, a été affinée par l'identification et la détermination structurale de 24 composés isolés dont **12** produits nouveaux.

L'étude de l'extrait butanolique des parties aériennes d'*A. pedatum* a conduit à l'isolement et l'identification de quinze iridoïdes dont dix composés nouveaux dérivant d'antirrinoside, macfadinose, et acide mussaenosidique. Ainsi que de six monoterpènes (APD₁₆-APD₂₁) dont **2** sont nouvelles APD₁₈ et APD₁₉.

La purification de l'extrait *n*-butanolique au profil riche en iridoïdes, a exigé l'exploitation d'une nouvelle méthodologie : un fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) suivit d'une purification des fractions par CLHP sur silice greffée C-18.

Malgré le grand écart entre les deux méthodologies CPC et CLHP en termes de plateaux théoriques, la CPC permet un gain de sélectivité pour la classe des composés iridoïdesglucosylés.

Il est important de souligner que les iridoïdes isolées des plantes de la famille de Scrophulariaceae ont fait l'objet de plusieurs études biologiques. De l'inhibition de la protéase du virus de l'hépatite C (VHC) (Salah El Dine et al., 2011) à la cytotoxicité (Mahran et al., 2018) ainsi que l'activité anti-inflammatoire et hepatoprotective (Pasdaran et al., 2017) des résultats satisfaisants ont été obtenus. C'est pourquoi, dans la poursuite de notre étude des composés isolés de la famille des Scrophulariaceae, ont été testés sur deux modèles *in vivo* impliquant des poisson-zèbres embryons et des CAM. Les résultats de ces tests biologiques sont développés dans la partie biologique.

Chapitre 4

Evaluation des activités biologiques

Introduction

Ce chapitre présente les résultats des tests biologiques de quelques molécules que nous avons isolées à partir des trois plantes *S. buchananii* (SBR), *C. phelypaea* (CT) et *A. pedatum* (APD).

III.4.1. Evaluation des tests biologiques de l'huile essentielle de *S. buchananii* (SB)

III.4.1.1. Activité antioxydante :

Dans les plantes de la famille des Lamiaceae, la présence du thymol est généralement accompagnée par son isomère carvacrol, qui sont biologiquement actifs (Menphini et al., 1993). D'après les résultats de l'activité antioxydants obtenus, l'huile essentielle de *S. buchananii* (SB) montre une activité inhibitrice de 50.27% (2 mg/mL), 50.48% (4 mg/mL) et 42.96% (1 mg/mL) qui est supérieure à celle du standard (vitamine E) 73.9% (2 mg/mL) et 80.5% (4 mg/mL) avec le β -carotène/acide linoléique. En comparaison cette valeur avec d'autres huiles de ce genre (tableau III-14) (Mustafa et al, 2008) en remarque que l'activité antioxydante avec la méthode de blanchissement du β -carotène est faible à cause des composés de cette huile essentiel exemple : 1,8-cineole (23.3%), α -pinene (19.8%), camphene (16.5%), β -pinene (11.5%) et de bornylacetate (5.5%).

Comparativement à l'huile de *S. buchananii* l'huiles essentielle du *S. officinalis* poussant en Algérie (Batna) (Lakhal et al., 2013) est caractérisée par la présence de α -thujone (24.52%), camphor (16.86%), 1,8-cineole (15.92%), β -thujone (6.50%) et veridiflorol (6.35%). Cette huile essentielle a présenté une activité antioxydante avec la méthode de blanchissement du β -carotène. Par ailleurs, l'huile essentielle présente une activité antioxydante inhibitrice de (55.46 %) (4 mg/mL). On peut conclure que l'activité antioxydante des huiles essentielles du genre *Salvia* est liée à l'effet des composants majoritaires et a des effets de synergie.

Tableau III-14. Activité antioxydant des huiles essentielles de quelles espèces du genre *Slavia* selon la méthode de blanchissement du β -carotène

Huiles essentielles	β -carotène/acide linoléïque inhibition %
<i>S. buchananii</i> Hedge	50.48
<i>S. officinalis</i> L.	55.46
<i>S. aucheri</i> var. <i>aucheri</i>	87.60
<i>S. aramiensis</i>	92.40
<i>S. pilifera</i>	81.10

III.4.1.2. Activité anticholinestérase :

Le potentiel inhibiteur des composés testés contre l'acétylcholinestérase et les enzymes de la butyrylcholinestérase a été évalué à l'aide d'iodure d'acétylthiocholine et de chlorure de butyrylthiocholine comme substrats, respectivement. Toutes les études d'inhibition étaient effectuées dans des microplaques de 96 puits par la méthode Ellmans (Ellman *et al.*, 1961). La tacrine a été utilisée comme témoin positif.

Par rapport à la tacrine (IC_{50} : 0.00325 ± 0.130 $\mu\text{g/mL}$ et IC_{50} : 0.0018 ± 0.48 $\mu\text{g/mL}$), utilisées comme norme, l'huile essentielle a montré des activités inhibitrices intéressantes avec des valeurs IC_{50} de $74 \pm 0,52$ $\mu\text{g/mL}$ et $37,5 \pm 0,18$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement. D'après la littérature, les huiles essentielles d'autres espèces du genre (*S. officinalis* et *S. sclarea*) ont également montré une inhibition notable du BChE (66,3% et 76,0% d'inhibition, respectivement) (Orhan *et al.*, 2008). Ces résultats peuvent justifier l'utilisation traditionnelle des huiles essentielles de la *Salvia* pour la mémoire défaillante.

III.4.1.3. Activité antibactérienne :

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de disques en utilisant le milieu Muller-Hinton. L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24h d'incubation à la température adéquate pour le développement du germe en question et en concentration minimale d'inhibition (CMI). Les résultats du test de l'effet antibactérien sont résumés dans le tableau III-15.

Tableau III-15. Activité antibactérienne de l'huile essentielle du *S. buchananii*.

Microrganism	Zone inhibition,mm	CMI ^a (µg/mL)	Microrganism	Zone inhibition,mm	CMI ^a (µg/mL)
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^b	21	40	<i>S. sonnei</i> (HS)	16	80
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	22	40	<i>S. heidelberg</i> (HS)	50	80
<i>P. aeruginosa</i> (HS) ^c	20	40	<i>S. aureus</i> ATCC 4330	15	80
<i>K. pneumonia</i> (HS)	16	80	<i>S. aureus</i> (HS)	14	80

^a: Concentration minimale inhibitrice, ^b: Souche hospitalière.

L'huile essentielle du *S. buchananii* est active face à trois souches bactériennes testées, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922, et *Escherichia coli* (HS) à des diamètres de la zone d'inhibition respectivement à 22, 21 et 21 mm. Les valeurs de la CMI varient entre 40 et 80 µg/mL (tableau III-15).

III.4.2. Activité antiproliférative de *S. buchananii* (SBR)

III.4.2.1. Résultats et interprétations du test de cytotoxicité des composés SBR₁ et SBR₂ :

Le teste de cytotoxicité des composés triterpéniques **SBR₁** et **SBR₂** effectués sur les trois lignées cellulaires Jurkat T (leucémie), Hela (cancer du col de l'utérus) et MCF7 (cancer du sein) après une incubation de 48 h ont montré que :

- En particulier, Hela a été légèrement plus sensible que les cellules Jurkat et MCF7. Les cellules ont également été traitées à différentes concentrations d'étoposide, comme témoin positif, et ont montré trois valeurs d'IC₅₀ différentes (tableau III-16).

Tableau III-16. Résultats des essais cytotoxiques des molécules **SBR₁** et **SBR₂** pour trois lignées de cellules cancéreuses.

Composés	IC ₅₀ (µM)		
	Jurkat	HeLa	MCF7
SBR₁	38 ± 0.9	40 ± 2.1	70 ± 3.1
SBR₂	30 ± 13	25 ± 1.5	55 ± 2.3
Etoposide	2.2 ± 0.8	4 ± 1.1	12 ± 2.2

- ^a Valeurs moyennes ± SD de trois expériences effectuées en quadruplicate.

- Les cellules Jurkat étaient les plus sensibles à l'action de l'étoposide, suivies des cellules Hela, tandis que les cellules MCF7 étaient les plus résistantes. De plus, le potentiel cytotoxique des composés **SBR₁** et **SBR₂** a été évalué chez des donneurs sains, choisis comme étant l'équivalent normal de la lignée cellulaire de Jurkat dérivée de la leucémie.
- **SBR₁** et **SBR₂** n'ont pas entraîné de réduction significative du nombre de PBMC non reproductibles fraîchement isolés, du moins dans la plage des doses cytotoxiques dans les cellules leucémiques. Le ou les mécanismes sous-jacents à leurs effets anti-provital ont été étudiés plus en détail dans les cellules Hela. Examiner si les composés **SBR₁** et **SBR₂** réduisent le nombre de cellules en affectant la progression du cycle cellulaire et/ou en induisant la mort cellulaire, les cellules Hela ont été exposées pendant 48 heures à des concentrations proches de leur IC₅₀, 30 et 50 µM pour le composé **SBR₁**, 15 et 35 µM pour le composé **SBR₂**, respectivement ; la teneur en ADN a été évaluée par cytométrie en flux des noyaux tachés à l'iodure de propidium (PI).

Comme le montre la figure III-224(A), le composé **SBR₁** a provoqué une augmentation de la population cellulaire en phase S. De plus, on a observé une augmentation du nombre de cellules ayant une teneur en ADN inférieure à G_0/G_1 , ce qui indique l'apparition d'événements apoptotiques. Le composé **SBR₂** a induit un bloc S robuste et dépendant de la dose sans augmentation significative des cellules hypodiploïdes (figure III-224(B)).

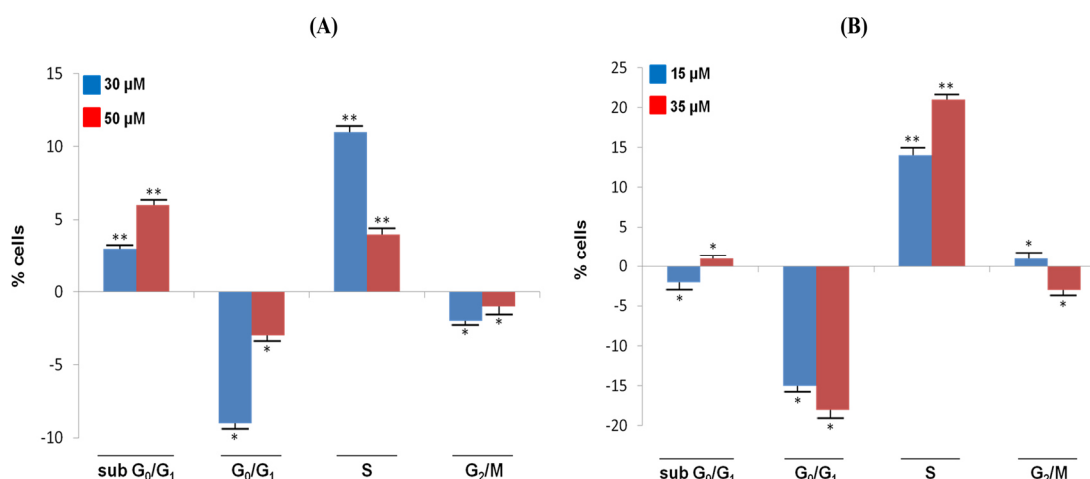


Figure III-224. Effets des composés **SBR₁** et **SBR₂** sur la prolifération des cellules d'Hela. Évaluation cytométrique en flux de la teneur en ADN des cellules Hela exposées pendant 48

heures à 1 et 2 heures ou véhicule seul (témoins). Figure III-224(A) Cellules d'HeLa exposées à 30 et 50 μM composés **SBR₁**; Figure III-224(B) Cellules d'HeLa exposées à 15 et 35 μM composé **SBR₂**. Les données sont présentées comme une diminution d'augmentation des pourcentages de cellules traitées avec une teneur spécifique en ADN, en ce qui concerne les valeurs de contrôle (cellules témoins, sous G₀/G₁, $\leq 2\%$; G₀/G₁, $53 \pm 1,8\%$; S, $37 \pm 2,1\%$; G₂/M, $12 \pm 0,9\%$).

Remarque : Tous les résultats sont des valeurs moyennes sd d'au moins trois expériences réalisées en double (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

En conclusion, l'acide salvibuchanique (**SBR₁**), un triterpène lupane ayant un anneau lactol à sept chaînons inhabituels dans l'anneau A, est signalé l'activité cytotoxique de l'acide salvibuchanique (**SBR₁**) et de l'acide hyptadiénique (**SBR₂**) a été évalué : ces triterpènes pourraient mériter d'autres recherches en tant que médicaments anticancéreux potentiels.

Les composés **SBR₁** et **SBR₂** (figure III-225) ont montré une activité antiproliférative intéressant avec une puissance similaire dans toutes les lignées cellulaires.

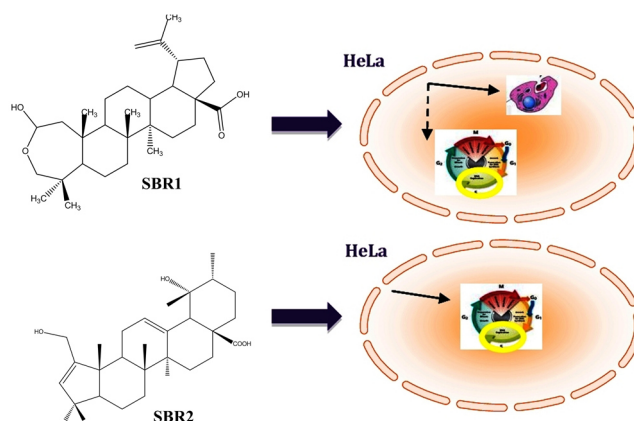


Figure III-225. Structure des composés **SBR₁** et **SBR₂**.

III.4.3. Activité de la MonoAcylGlycerol Lipase (MAGL) de *C. phelypaea* (CT)

III.4.3.1. Résultats et interprétations du test de la MonoAcylGlycerol Lipase (MAGL) des composés isolés de *C. phelypaea* (CT)

Les composés phényléthanoïdes (**CT₁-CT₅**), le pinosésinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside (**CT₆**) et l'apigénine 7-*O*- β -glucuronopyranoside (**CT₇**), ont été testés sur des isoformes purifiés de LDH5 et de MAGL humains afin de déterminer leur pouvoir inhibiteur (tableau III-17), ont montré que :

- Tous les composés étaient inactifs sur *hLDH5*, avec des valeurs de IC_{50} supérieures à 200 μM , ce qui les rendaient moins puissants que les composés de référence galloflavin (Manerba et al., 2012).
- Dans les essais enzymatiques *hMAGL*, seuls deux dérivés [composés **CT_{4a/4b}** (1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-O-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*trans* et *cis-p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside) et **CT₇** (7-O- β -glucuronopyranoside de l'apigénine)] se sont avérés inactifs, tandis que le pinosésinol 4-O- β -D-glucopyranoside (**CT₆**) et le brandioside (**CT₅**) présentaient des valeurs IC_{50} de 130,2 et 156,1 μM , respectivement.
- Le meilleur pouvoir inhibiteur du *hMAGL* a été démontré par le composé **CT₁** (1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside), avec une valeur d' IC_{50} dans la gamme micromolaire basse (88,0 μM), et il s'est avéré sélectif pour le *hMAGL* par rapport à la *hLDH*. Bien que son activité d'inhibition soit inférieure à celle de l'inhibiteur synthétique *MAGL* de référence (4-[4-chlorobenzoyl]piperidine-1-yl)(4-méthoxyphényl)-méthannone (composé "CL6a" (Tuccinardi et al., 2014)), ce composé naturel est le premier phényléthanoïde, portant des unités de sucre β -D-glucopyranosyl et α -L-rhamnopyranosyl, affichant une activité prometteuse sur le *hMAGL*.
- Les produits **CT₂** et **CT_{3a/3b}** ont montré une meilleure activité d'inhibition, avec des valeurs d' IC_{50} similaires de 117,4 et 113,9 μM , respectivement.

Tableau III-17. Puissances d'inhibition *hLDH5* et *hMAGL*. de composés **CT₁-CT₇**.

Composés	IC_{50} (μM)			
	<i>hLDH5</i>	IC (95% n=3)	<i>hMAGL</i>	IC (95% n=3)
CT₁	>200	–	88.0	[60.7, 127.6]
CT₂	>200	–	117.4	[95.0, 145.1]
CT_{3a/3b}	>200	–	113.9	[93.8, 138.4]
CT_{4a/4b}	>200	–	>200	–
CT₅	>200	–	156.1	[151.1, 164.7]
CT₆	>200	–	130.2	[110.2, 153.8]
CT₇	>200	–	>200	–
galloflavin	110.1	[82.9, 146.2]	– ^a	–
CL6a	– ^a	–	12.1	[8.9, 16.3]

IC : confidence intervalle ; ^a non testé

Actuellement, seuls quelques composés dérivés de sources naturelles ont montré une activité inhibitrice de cette enzyme (Scalvivni et al., 2016), mais ils appartiennent à

différentes classes chimiques. Afin de mieux caractériser le mode de liaison du composé **CT₁** en MAGL, son complexe avec la protéine cible a été soumis à des calculs d'amarrage.

En particulier, la pose de liaison putative émergeant de ces études de modélisation a montré que la fraction sucrée se trouve dans la large cavité lipophile des interactions lipophiles formant la protéine avec **L148**, **L213**, **L241**, et **V183**, tandis que le *p*-hydroxyphényl-ethyl, l'anneau éthylique se trouve dans la petite poche du site de liaison et forme des interactions lipophiles avec les résidus **Y194** et **V270** (figure III-226). Un grand nombre de liaisons H stabilise la disposition de liaison du composé **CT₁**: le groupe carbonyle du groupe *O*-acétyl lié au glucopyranoside forme deux liaisons H avec l'azote de base de l'**A51** et du **M123** et le 4-OH de la 3- α -L-rhamnopyranoside forme une liaison H avec la colonne vertébrale d'oxygène de **L241**.

Le composé **CT₁** est également caractérisé par une liaison H intramoléculaire entre l'oxygène étheré du 6- α -L-rhamnopyranoside et le 4-OH de la même portion. En outre, le groupe OH de la partie *p*-hydroxyphényléthyle forme une liaison H avec le résidu **E53**, dans lequel il se comporte comme un donneur de liaison H.

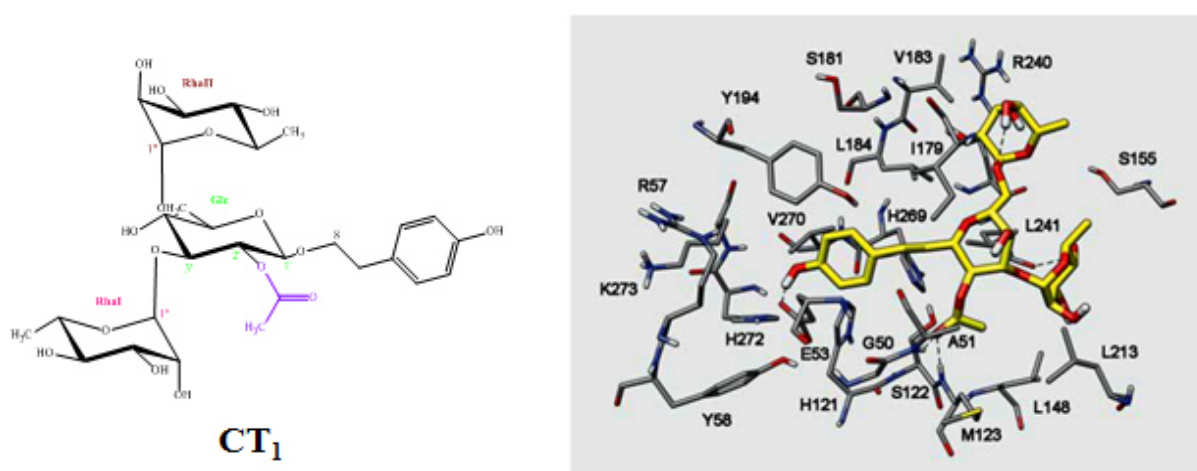


Figure III-226. Vue des interactions ligand-récepteur les plus pertinentes du complexe 1-*h*MAGL. Les liaisons hydrogènes sont répliquées sous forme de lignes pointillées noires.

De plus, à notre connaissance, il s'agit du premier rapport sur la présence naturelle de phénylétanoïde comme inhibiteur de la MAGL.

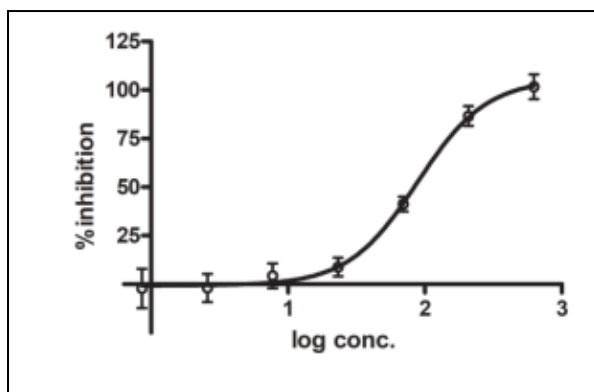


Figure III-227. Courbe dose-réponse pour le composé **CT₁**, obtenue dans des essais enzymatiques MAGL. Sur l'axe des x, il s'agit de la concentration logarithmique (μM), et sur l'axe des y, le pourcentage d'inhibition.

III.4.4. Activité anti-angiogénique d'*A. pedatum* (APD)

III.4.4.1. Résultats et interprétations de l'activité anti-angiogénique des composés isolés d'*Anarrhinum pedatum* (APD)

Les composés isolés **APD₁-APD₂₁** ont été testés par deux modèles *in vivo*, les embryons de poisson-zèbre et le CAM. Le poisson zèbre convient pour l'identification des inhibiteurs de l'angiogenèse, puisque le développement des vaisseaux sanguins dans les embryons précoces est bien caractérisé et facilement surveillé.

L'essai endogène de phosphatase alcaline (EAP) a été utilisé ici pour évaluer l'activité anti-angiogénique des composés isolés d'*A. pedatum*. Comme le montre la figure III-228, les résultats ont montré que parmi les nouveaux produits isolés, le composé **APD₁₄**, présentait la meilleure activité anti-angiogénique réduisant de façon significative ($P < 0,05$) la croissance des vaisseaux sanguins (72,72%) chez les embryons de poisson zèbre par rapport au groupe témoin. Des effets légers ont été observés pour les autres nouveaux composés dans l'ordre suivant : **APD₄** > **APD₆** > **APD₂** > **APD₁₅** > **APD₉** > **APD₇** > **APD₁₃** > **APD₅** > **APD₈** > **APD₁₈** > **APD₁₉**. Inversement, une bonne réponse anti-angiogénique a été observée après le traitement avec les composés isolés connus, **APD₃** (48,33 %, $P < 0,01$), **APD₂₀** (56,98 %, $P < 0,01$), **APD₁₁** (77,38%, $P < 0,05$), **APD₁₇** (79,82%, $P < 0,05$), **APD₁** (81%, $P < 0,05$). Les effets sur l'angiogenèse des composés isolés d'*A. pedatum* ont été comparés à ceux du 2-méthoxyestradiol (52%, $P < 0,01$), un métabolite endogène de 17 β -estradiol ayant des propriétés anti-angiogéniques et antitumoriques connues.

Dans cette étude, le test CAM a également été effectué pour explorer le potentiel anti-angiogénique des composés isolés. Le CAM, formé au 4-5 jour, montre un réseau vasculaire extrêmement dense. Lorsqu'un échantillon angiostatique est testé, les vaisseaux deviennent moins denses et même disparaissent. Dans l'ensemble, il est évident qu'une forte réponse antiangiogénique a été obtenue avec ce modèle expérimental.

Les résultats présentés à la figure III-230, ont montré l'activité antiangiogénique la plus élevée pour les composés **APD₁₄**>**APD₈**>**APD₂₀**>**APD₃**>**APD₁**>**APD₇**. Les effets angiogéniques, exprimés en % par rapport aux œufs témoins, étaient de 21,54%, 23,86%, 28,98%, 29,57%, 29,90%, 31,45%, respectivement. L'acide rétinoïque a été utilisé comme étalon positif (45,01%). Les images d'observations microscopiques représentatives sont présentées à la figure III-230. Après six jours d'incubation, la CAM des œufs témoins a mis en évidence la présence d'un réseau vasculaire riche (figure III-230a). Un effet fortement inhibiteur sur la formation capillaire a été observé avec l'acide rétinoïque (figure III-231b). Dans les cames traitées avec les composés plus actifs **APD₇**, **APD₈**, **APD₁₄**, **APD₃**, **APD₁**, **APD₂₀**, la microvasculature semblait moins dense (figures III-230c-h).

Les effets inhibiteurs (e) sur la croissance des vaisseaux sont particulièrement évidents après le traitement au composé **APD₁₄** (figure III-230e). Notamment, les composés **APD₁₄**, **APD₃** et **APD₂₀** ont montré une activité intéressante dans les deux essais. Nos résultats sont conformes aux rapports précédents qui montraient l'activité anti-angiogénique des dérivés de l'iridoïde (Muñoz-Camero et al., 2018, Koo et al., 2004). Les effets sur l'angiogenèse des composés isolés d'*A. pedatum* ont été comparés avec celui de 2-méthoxyestradiol (52%, $p < 0,01$), un métabolite endogène de 17 β -estradiol ayant connu antiangiogénique et antitumifères propriétés.

En conclusion, la présence d'esters de glycosides iridoïdes dans la plante *A. pedatum* est en accord avec les métabolites secondaires déclarés pour ce genre (Dawidar et al., 1989, Salah El Dine et al., 2001) montrant qu'il est une source riche de ces composés spécialisés.

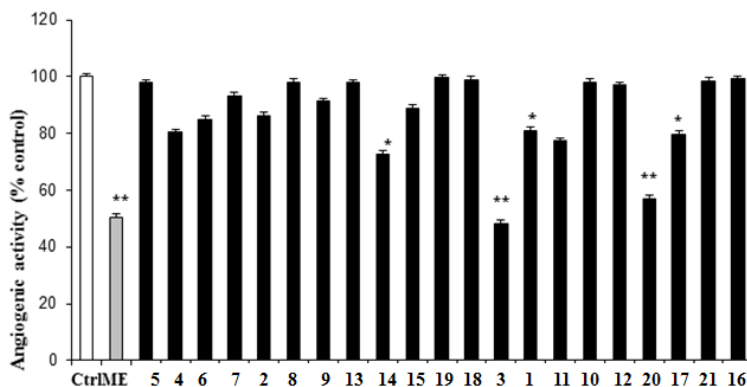


Figure III-228. Activité angiogénique (% vs témoin) des composés APD₁ à APD₂₁ (2 μ M) dans l'essai de phosphatase alcaline endogène (PAE) sur des embryons de poisson-zèbre. ME = 2-méthoxyestradiol (2 μ M). * P < 0,05 et ** P < 0,01 vs témoin : "student's t -test".

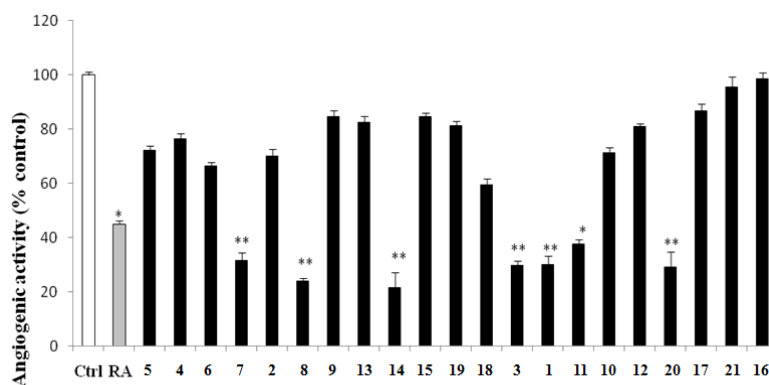


Figure III-229. Activité angiogénique (% vs témoin) des composés APD₁ à APD₂₁ (2 μ M) dans l'essai de membrane chorioallantoïque (CAM) RA = acide rétinoïque (3 μ M). * P < 0.05 and ** P < 0.01 vs témoin: Student's t -test.

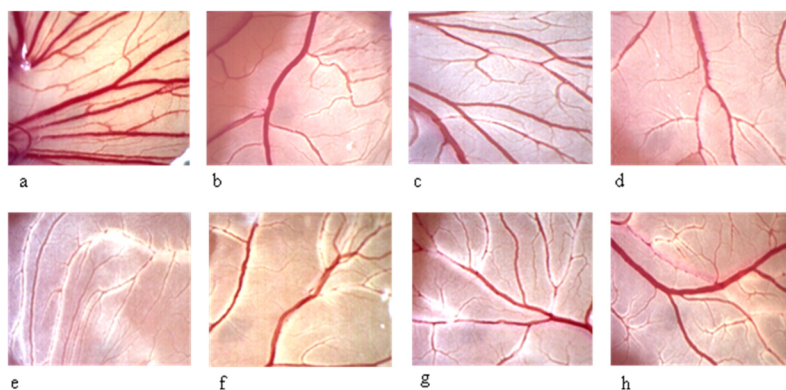


Figure III-230. Activité anti-angiogénique des composés *A. pedatum* (2 μ M) dans le test CAM a = témoin, b = acide rétinoïque (3 μ M), c = APD₇, d = APD₈, e = APD₁₄, f = APD₃, g = APD₁, h = APD₂₀. Les images des caméras ont été prises à l'aide d'un stéréomicroscope (SMZ-171 Series, Motic) équipé d'un appareil photo numérique (Moticam® 5 plus).



TOG Graphique.

III.4.5. Conclusion sur l'évaluation des activités biologiques

L'ensemble des résultats obtenus laisse ressortir que :

- Les triterpènes sont les composés majoritairement responsables des activités cytotoxiques. Le lupane triterpène (**SBR₁**) et l'acide hyptadiénique (**SBR₂**) a fait l'objet d'une étude pour déterminer leur potentiel cytotoxique sur les lignes cellulaires Jurkat, Hela et MCF7. Les deux composés ont montré une activité antiproliférative intéressante avec une puissance similaire dans toutes les lignes cellulaires. Au moyen d'études cytométriques en flux, l'acide hyptadiénique (**SBR₂**) induit dans les cellules Hela un bloc de cycle cellulaire S, tandis que **SBR₁** a provoqué à la fois une cyto-stase et des réponses cytotoxiques.

- Les composés isolés de *C. phelypaea* (**CT**) ont été testés pour leur activité inhibitrice sur deux enzymes impliquées dans le métabolisme glycolytique ou lipidique particulier des cellules cancéreuses humaines : lactate déshydrogénase (LDH) et monoacylglycérol lipase (MAGL) respectivement. Tous les composés affichaient une activité négligeable sur le LDH, tandis que certains d'entre eux affichaient une certaine activité inhibitrice sur le MAGL, en particulier, le composé **CT₁** était le plus actif sur le MAGL, avec une valeur IC_{50} de 88,0 μ M, et les études de modélisation ont rationalisé le mode de liaison supposé de **CT₁** dans le site actif de la MAGL.

- L'activité anti-angiogénique a été analysée par deux modèles *in vivo*, les embryons de poisson-zèbre et la membrane chorioallantoïque du poussin (CAM) sur les produits purs d'*A. pedatum* (**APD**). Les résultats ont montré que, parmi les nouveaux composés, 6'-O-menthiafoloylmussaenosidic acid-11-(5-O-β-D-fructopyranosyl) ester (**APD₁₄**), présentait

l'activité anti-angiogénique la plus élevée sur les embryons de poisson-zèbre et sur les essais du CAM, ce qui réduisait la croissance des vaisseaux sanguins. Une réponse anti-angiogénique intéressante a également été observée pour les composés connus, le 6-*O*-nerol-8-oyl-antirrinoside (**APD**₃), antirrinoside (**APD**₁), 6-*O*-*trans*+*cis*-*p*-coumaroyl antirrinoside (**APD**₁₁), et (6*S*)-2*E*-2,6-dimethyl-6-hydroxy-octa-2,7-dienoic acid β -glucopyranosyl ester (**APD**₂₀).

Conclusion générale

Conclusion générale

Nous avons présenté dans cette thèse les résultats des travaux phytochimiques réalisés sur trois espèces appartenant à trois familles végétales différentes. Il s'agit de *Salvia buchananii* (**Lamiaceae**), l'espèce *Cistanche phelypaea* (**Orobanchaceae**) et enfin *Anarrhinum pedatum* (**Scrophulariaceae**). Ces choix ont été motivés par le fait que ces familles de plantes sont connues pour leur richesse en triterpènes, phénylétanoïdes et les iridoïdes, des composés complexes dont les activités pharmacologiques, notamment dans le domaine de la cancérologie a été démontrées.

L'étude phytochimique a ainsi permis de mettre en évidence, par différentes techniques chromatographiques (CCM, Chromatographie d'exclusion moléculaire, Chromatographie Flash, Chromatographie de Partage Centrifuge, Chromatographie Liquide Haute Performance) et spectroscopiques (Résonance Magnétique Nucléaire et Spectrométrie de Masse), **37** composés naturels, dont **17** nouveaux et **20** connus. Il faut préciser que les molécules isolées de la famille de Lamiaceae sont des triterpènes et acides phénoliques alors que celles isolées des Orobanchaceae et Scrophulariaceae sont des glycosides phénylétanoïdes, et des iridoïdes, monoterpènes et flavonides respectivement. Ces composés se répartissent comme suit :

Famille des Lamiaceae :

De *Salvia buchananii*, **3** triterpènes pentacycliques ont été isolés dont un lupan triterpènes (**SBR₁**) de structure nouvelle ont été identifiées, et **3** acides phénoliques connus.

- Salviabuchanic acid (2,3-*seco*-2,3-epoxy-2-hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid)
- Heptadienic acid
- Maslinic acid
- Caffeic acid
- Caffeic methyl ester acid
- Nepetidine B

Famille des Orobanchaceae :

De *Cistanche phelypaea*, parmi les **5** glycosides phénylétanoïdes isolées, **4** correspondants à des structures nouvellement décrites (**CT₁** à **CT₄**), (dont **2** sont sous forme

de paires de dérivées inséparables de *trans* et 4-*cis* -*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (CT_{3a/3b} et CT_{4a/4b})).

- 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside
- 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside
- 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*trans*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (**3a**) et 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*cis*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (**3b**).
- 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*trans*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (**4a**) et 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*cis*-*p*-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (**4b**).
- Brandioside (sont isolé pour la première fois du genre *Cistanche*)
- Pinoresinol 4-*O*- β -D-glucopyranoside
- Apigénine 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside (sont isolé pour la première fois du genre *Cistanche*)

Famille des Scrophulariaceae :

D'*Anarrhinum pedatum*, **24** molécules ont été isolées et nous avons identifié **15** iridoïdes glucosylés dont **10** de ces molécules ont été reconnues comme nouvelles, et **4** monoterpènes dont **2** originaux, alors que les autres molécules restantes ont déjà été décrites dans la littérature.

- Antirrinoside
- 6-*O*-foliamenthoylmacfadienoside
- 6-*O*-nerol-8-oyl-antirrinoside
- 5,6-*O*-difoliamenthoylmacfadienoside
- 5,6-*O*-difoliamenthoylantirrinoside
- 5-*O*-menthiafoloyl-6-*O*-foliamenthoylantirrinoside
- 5-*O*-menthiafoloyl-6-*O*-foliamenthoylmacfadienoside
- 6-*O*-*trans*-cinnamoylantirrinoside
- 6'-*O*-*trans*-cinnamoyl-macfadienoside.
- 6'-*O*-cinnamoylantirrinoside
- 6-*O*-*trans* et *cis*-*p*-coumaroylantirrinoside

- Agnucastoside A
- Agnucastoside A 11-(5-*O*- β -D-fructopyranosyl) ester
- 6'-*O*-menthiafoloylmussaenosidic acid-11-(5-*O*- β -D-fructopyranosyl) ester
- 6'-*O*-(*trans*, *cis-p*-coumaroyl)mussaenosidic acid-11-(5-*O*- β -D-fructopyranosyl) ester.
- Foliamenthoic acid
- Glucosyl 8-hydroxy-2,6-dimethyl-(2*E*, 6*E*)-octadienoate
- 6-*O*-foliamenthoyl- α,β -D-glucopyranose
- Foliamenthoic acid 1-*O*- β -D-glucopyranosyl ester 8-*O*- β -D-glucopyranoside.
- (*S*)-menthiafolicacid
- (6*S*)-2*E*-2,6-dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid β -glucopyranosyl ester.
- Salidroside
- Verbascoside.
- Quercetine 3-*O*- β -D-glucopyranoside.

L'huile essentielle de l'espèce *Salvia buchananii*, obtenue à partir de l'hydrodistillation des parties aériennes a été caractérisée pour la première fois. 13 composés organiques volatils ont été identifiés et constituent 95.9% de la composition chimique totale de l'huile essentielle.

Cette huile est majoritairement composée de 1,8-cineole (23.3%) α -pinene (19.8%), camphene (16.5%) et de β -pinene (11.5%)

Des tests biologiques préliminaires ont été réalisés sur 30 des 37 molécules isolées. Le choix des molécules testées a été fait sur la base de leur diversité structurale, notamment la nature des aglycones et des sucres, le type de liaison inter glycosidique et le type de la séquence osidique.

Les triterpènes pentacycliques (**SBR₁** et **SBR₂**) ont été testées en vue d'évaluer leurs activités cytotoxiques sur trois lignées cellulaires cancéreuses (Jurkat, HeLa et MCF7).

Nos résultats montrent que les deux composés testés, possèdent une activité antiproliférative intéressante sur les lignes cellulaires cancéreuses, mais ils n'ont pas entraîné de réduction significative du nombre de PBMC. En particulier, HeLa était légèrement plus sensible que les cellules Jurkat et MCF7. Au moyen d'études cytométriques en flux, le composé **SBR₂** a induit dans les cellules HeLa un bloc de cycle cellulaire S, tandis que **SBR₁** a provoqué des réponses cytotostatiques et cytotoxiques.

Ces triterpènes pourraient mériter d'autres recherches en tant que médicaments anticancéreux potentiels.

Les molécules isolées de *C. phelypaea* ont été testées sur des isoformes purifiés de LDH5 et de MAGL humains afin de déterminer leur pouvoir inhibiteur. Les résultats obtenus montrent que tous les composés étaient inactifs sur *h*LDH5 avec des valeurs de IC₅₀ supérieures à 200 µM, alors que le 1-β-p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucopyranoside.(CT₁) est le plus actif sur le MAGL, avec une valeur IC₅₀ de 88,0 µM, est le premier phényléthanoïde, portant des unités de sucre β-D-glucopyranosyl et α-L-rhamnopyranosyl, affichant une activité prometteuse sur le *h*MAGL. Cette étude ouvrira la voie à une future étude sur les petites molécules végétales glycosylées en tant qu'inhibiteurs MAGL potentiels.

L'activité anti-angiogénique des composés (APD₁ à APD₂₁) isolés des parties aériennes d'*A. pedatum* a été évaluée par deux modèles in vivo, les embryons de poisson-zèbre et le CAM et l'essai endogène de phosphatase alcaline (EAP). Les résultats obtenus ont montré que le nouveau iridoïde glucosylé le 6'-*O*-menthiafoloylmussaenosidic acid-11-(5-*O*-β-D-fructopyranosyl) ester (APD₁₄) est le seul à posséder une activité anti-angiogénique meilleur réduisant de façon significative ($P < 0,05$) la croissance des vaisseaux sanguins (72,72%) chez les embryons de poisson zèbre par rapport au groupe témoin. Parmi les molécules connues isolées le 6-*O*-nerol-8-oyl-antirrinoside (APD₃), antirrinoside (APD₁), 6-*O*-*trans*+*cis*-*p*-coumaroyl antirrinoside (APD₁₁), et (6*S*)-2*E*-2,6-dimethyl-6-hydroxy-octa-2,7-dienoic acid β-glucopyranosyl ester (APD₂₀) ont manifesté une bonne réponse anti-angiogénique. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui est dépourvu d'activité anti-angiogénique des dérivés de l'iridoïde dans une étude de la littérature (Muñoz Camero et al., 2018, Kooet al., 2004).

Cette étude a permis de mieux connaître la chimie de quelques plantes endémiques Algériennes. Les sujets d'étude dans ce domaine ne manquent donc pas et chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmacochimiques originales à valoriser.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdallah, O M. 1991. Phenolic glucoside and other constituents of *Dipsacus laciniatus*. *Phytochemistry*, 30, 2805–2806.

Adams, R P., 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass spectromerty*, 4th Ed. Allured Publishing Co. Carlo Stream, Illinois.

Agrawal, K C. 1984. Ecological studies of *Cistanche tubulosa* Wight, in : Parker, C., Musselman, L J., Polhill, R M., Wilson, A K. (Eds.), Proceedings of the 3rd International Symposium of Parasitic Weeds, Aleppo, Syria, 31–39.

Agrawal, P K. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Central Institute of Medical and Aromatic Plants, India. Édition Elsevier, New York.

Ahmed, B., Al-Howiriny, T A., Al-Rehaily, A J., Mossa, J S. 2004. Verbenacine and Salvinine : Two New Diterpenes from *Salvia verbenaca*. *Z. Naturforsch. C.*, 59, 9–14.

Ahmad, Z., Mehmood, S., Ifzal, R., Malik, A., Afza, N., Ashraf, M., Jahan, E. 2007. A New Ursane-type Triterpenoid from *Salvia santolinifolia*. *Turk. J. Chem.*, 31, 495–501.

Ahmad, V U., Zahid, M., Ali, M S., Choudhary, M I., Akhtar, F., Ali, Z., Iqbal, M Z. 1999. Salvadiol : A novel triterpenoid from *Salvia bucharica*. *Tetrahedron Lett.*, 40, 7561–7564.

Ahmad, V U., Zahid, M., Ali, M S., Ali, Z., Jassbi, A R., Abbas, M., Clardy, J., Lobkovsky, E., Tareen, R B., Iqbal, M Z. 1999. Salvadiolones-A and -B: Two Terpenoids Having Novel Carbon Skeleta from *Salvia bucharica*. *J. Org. Chem.*, 64, 8465–8467.

Ahmad, V U., Zahid, M., Ali, M S., Jassbi, A R., Abbas, M., Ali, Z., Iqbal, M Z. 1999. Bucharioside and buchariol from *Salvia bucharica*. *Phytochemistry*, 52, 1319–1322.

Ahmad, Z., Fatima, I., Mehmood, S., Ifzal, R., Malik, A., Afza, N. 2008. New Epoxydammarane triterpenes from *Salvia santolinifolia*. *Helv. Chim. Acta.*, 91, 73–78.

Ai, C B., Li, L. 1992. Salvianolic Acids D and E : Two New Depsides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.*, 58, 197–199.

Ai, C B., Deng, Q H., Song, W Z., Li, L N. 1994. Salvianic acid J, a depside from *Salvia flava*. *Phytochemistry*, 37, 907–908.

Ai, C B., Li, L N. 1988. Stereostructure of Salvianolic Acid B and Isolation of Salvianolic Acid C from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Nat. Prod.*, 51, 145–149.

Ali, A., Tabanca, N., Demirci, B., Blythe, E K., Zulfiqar, A., Husnu Can Baser, K., Khan, I A. 2015. Chemical Composition and Biological Activity of Four *Salvia* Essential Oils and Individual Compounds against Two Species of Mosquitoes. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 447–456.

Ali, M S., Ahmed, S., Ibrahim, S A., Tareen, R B. 2005. Characterization and Bioscreening of a New Triterpenoid and a Flavanone Isolated from *Salvia nubicola*. *Chem. Biodiversity.*, 2, 910–916.

Ali, M S., Ahmed, W., Armstrong, A F., Ibrahim, S A., Ahmed, S., Parvez, M. 2006. Guaianolides from *Salvia nubicola* (Lamiaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 1235–1238.

Ali, M S., Ibrahim, S A., Ahmed, S., Lobkovsky, E. 2007. Guaiane Sesquiterpene Lactones from *Salvia nubicola* (Lamiaceae). *Chem. Biodiversity.*, 4, 98–104.

- Ali, M S., Ahmed, S., Ibrahim, S A., Tareen, R B. 2005. Characterization and bioscreening of a new triterpenoid and a flavanone isolated from *Salvia nubicola*. *Chem. Biodiversity.*, 2, 910–916.
- Al-Hazimi, H. M. G., Deep, M. S., Miana, G. A. 1984. Isocarnosol, a diterpene from *salvia lanigera*. *Phytochemistry*, 23, 919–921.
- Al-Hazimi, H M G., Miana, G A., Deep, M S H. 1987. Terpenoids from *Salvia lanigera*. *Phytochemistry*, 26, 1091–1093.
- Almanza, G., Balderrama Cecilia, L. 1997. Clerodane diterpenoids and an ursane triterpenoid from *Salvia haenkei*. Computer-assisted structural elucidation. *Tetrahedron*, 53, 14719–14728.
- Al-Rehaily, A J., Abdel-Kader, M S., Ahmad, M S., Mossa, J S. 2006. Iridoid glucosides from *Kickxia abhaica* D.A. Sutton from Scrophulariaceae. *Phytochemistry*, 67, 429–432.
- Al-Yousuf, M H., Bashir, A K., Ali, B H., Tanira, M O M, Blunden, G. 2002. Some effects of *Salvia aegyptiaca* L. on the central nervous system in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 81,121–127.
- Amani, M M. 2009. Hepatoprotective Triterpenes from Hairy Root Cultures of *Ocimum basilicum* L. *Z. Naturforsch.*, 64, 201-209.
- An, C N., Zhang, H N., Pu, X P. 2011. Research progress of neuropharmacology of *Cistanches Herba*. *Chin. Pharm. J.*, 46, 887–870.
- Anaya, J., Caballero, M C., Grande, M., Navarro, J J., Tapia, I., Almeida, J F. 1989. A lupeol derivative from *Salvia pratensis*. *Phytochemistry*, 28, 2206–2208.
- Andary, C., Privat, G., Chevallet, P., Orzalesi, H., Serrano, J J., Boucard, M. 1980. Chemical and pharmacodynamic study of heteroside esters of acid cafeic, isolated from *Orobanche rapum genistae*. *Il Farmaco*, Ed Sci, 35, 3–30.
- Angiosperm Phylogeny Group. 1998. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85, 531–553.
- Arslanian, R L., Anderson, T., Stermitz, F R. 1990. Iridoid glucosides of *Penstemon ambiguus*. *J. Nat. Prod.*, 53, 1485–1489.
- Aruoma, O I., Spencer, J P., Butler, J., Halliwell, B. 1995. Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals. *Free radical research.*, 22, 187–190.
- Asahina, Y., Asano, J., Tanase, Y., Ueno, Y. 1936. Über das Gentiopikrin (I. Mitteil.). *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft*, 69, 771–779.
- Aydoğmuş, Z., Yeşilyurt, V., Topçu, G. 2006. Constituents of *Salvia microphylla*. *Nat. Prod. Res.*, 20, 775–781.
- Baba Aissa, F. 1999. *Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb). Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident*, Ed. Edas, 178 p.
- Balasoorya, S J., Sotheeswaran, S., Balasubramaniam, S. 1982. Economically Useful Plants of Sri Lanka. Part IV: Screening of Sri Lanka Palnts for Tannins. *J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka.*, 10, 213–219.
- Ballesta-Acosta, M C., Pascual-Villalobos, M J., Rodríguez, B. 2002. A New 24-nor-Oleanane Triterpenoid from *Salvia carduacea*. *J. Nat. Prod.*, 65, 1513–1515.

- Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Higashihara, H., Ukiya, M., Watanabe, K., Kiumura, Y., Hasegawa, J. I., Nishino, H. 2004. Triterpene acids from leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 85-90.
- Battersby, A R., Burnett, A R., Parsons, P G. 1968. Preparation of secologanin : its conversion into ipecoside and its role in indole alkaloid biosynthesis. *Chemical Communications*, 1280–1281.
- Becker, H., Hsieh, W C., Wylde, R., Laffite, C., Andary, C., Naturforsch, Z. 1982. Structure of echinacoside C. *Journal of biosciences*, 37, 351–353.
- Beck, G. 1930. Orobanchaceae. In A. Engler [ed.], *Das Pflanzenreich*, vol. 4, 261. Engelmann, Leipzig, Germany.
- Beladjila, K A., Cotugno, R., Berrehal, D., Kabouche, Z., De Tommasi, N., Braca, A., De Leo, M. 2018. Cytotoxic triterpenes from *Salvia buchananii* roots. *Nat. Prod. Res.*, 32, 2025–2030.
- Berman, H M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T N., Weissing, H., Shindyalov, I N., Bourne, P E. 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, 28, 235–242.
- Bianco, A., Guiso, M., Iavarone, C., Trogolo, C. 1974. titre *Gazz. Chim. Ital.*, 104, 731–738.
- Bidet, D., Gagnault, J., Girard, P., Trotin, F. 1987. Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*, 89–97.
- Bisio, A., Schito, A M., Parricchi, A., Mele, G., Romussi, G., Malafronte, N., Oliva, P., De Tommasi, N. 2015. Antibacterial activity of constituents from *Salvia buchananii* Hedge. *Phytochem Lett.*, 14, 170–177.
- Blatter, E. 1921. *Flora Arabia III*, Rec. Bot. Surv. India., 8, 351–353.
- Bock, K., Jensen, S R., Nielsen, B J., Johnson, I., Taticchi, A., Anthonsen, T. 1976. Secogalioside, an Iridoid Glucoside from *Galium album* Mill. And ¹³C NMR Spectra of Some Seco-iridoid Glucosides. *Acta. Chemica. Scandinavica.*, 30, 743–748.
- Boizot, N., Charpentier, J P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, 79–82.
- Boros, CA., Stermitz, F R., McFarland, N. 1991. Processing of iridoid glycoside antirrhinoside from *Maurandya antirrhiniflora* (Scrophulariaceae) by *Meris paradoxa* (Geometridae) and *Lepipolys* species (Noctuidae). *J. Chem. Ecol.*, 6, 1123-1133.
- Botineau, M. 2010. *Botanique systématique et appliqué des plantes à fleurs*. Tech. Et Doc (eds): 1021.
- Bougandoura, A., D'Abrosca, B., Ameddah, S., Scognamiglio, M., Mekkiou, R., Fiorentino, A., Benayache, S., Benayache, F. 2016. Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia*, 109, 248–253.
- Boukef, M K. 1986. *Médecine traditionnelle et pharmacopée*. ISBN.

Boulous, L. 1983. Medicinal Plants of North Africa. Michigan: Reference Publication Algonac, 285–286.

Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie et Phytochimie. Plantes médicinales. Lavoisier Techniques Et Documentation, Paris, 2ème édition.

Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3eme édition, éditeur Technique et Documentation, Paris.

Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2nd Edition université de Paris- sud, France., 389–617.

Bruno, M., Savona, G., Hueso-Rodríguez, J A., Pascual, C., Rodríguez, B. 1987. Ursane and oleanane triterpenoids from *Salvia argentea*. *Phytochemistry*, 26, 497–501.

Cárdenas, J., Rodríguez-Hahn, L. 1995. Abietane and icetexanediterpenoids from *Salvia candicans*. *Phytochemistry*, 38, 199–204.

Casabuono, A C., Pomilio, A B. Lignans and a stilbene from *Festuca argentina*. 1994. *Phytochemistry*, 35, 479–483.

Case, D A., Berryman, J T., Betz, R M., Cerutti, D S., Cheatham, T E III., Darden, T A., Duke, R E., Giese, T J., Gohlke, H., Goetz, A W., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P., Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T S., LeGrand, S., Li, P., Lurchko, T., Luo, R., Madje, B., Merz, K M., Monard, G., Needham, P., Nguyen, H., Nguyen, H T., Omelyan, I., Onufriew, A., Roe, D R., Roitberg, A., Salomon-Ferrer, R., Simmerling, C L., Smith, W., Swails, J., Walker, R C., Wang, J., Wolf, R M., Wu, X., York, D M., Kollman, P A. 2015. AMBER, version 14. San Francisco, CA: University of California.

Cavill, G., Ford, D., Locksley, H. 1956. The chemistry of ants. I., Terpenoid constituents of some Australian *Iridomyrmex* species. *Australian Journal of Chemistry*, 9, 288–293.

Cavill, G., Ford, D. 1960. The Chemistry of Ants. III. Structure and Reactions of Iridodia. *Australian Journal of Chemistry*, 13, 296–310.

Certo, G.; Costa, R.; D'Angelo, V.; Russo, M.; Albergamo, A.; Dugo, G.; Germanò, M.P. 2017. Anti-angiogenic activity and phytochemical screening of fruit fractions from *Vitex agnuscastus*. *Nat. Prod. Res.*, 31, 2850–2856.

Chan, H H., Hwang, T L., Su, C R., Reddy, M V B., Wu, T S. 2011. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidative constituents from the roots and the leaves of *Salvia nipponica* Miq. var. *formosana*. *Phytomedicine*, 18, 148–150.

Chang, H M., Cheng, K P., Choang, T F., Chow, H F., Chui, K Y., Hon, P M., Tan, F W L., Yang, Y., Zhong, Z P. 1990. Structure elucidation and total synthesis of new tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen). *J. Org. Chem.*, 55, 3537–3543.

Cheminat, A., Zawatzky, R., Becker, H. Brouillard, R. 1988. Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species : Structures and biological activity. *Phytochemistry*, 27, 2787–2794.

Chen, H., Jing, F C., Li, C L. 2007a. Echinacoside prevents the striatal extracellular levels of monoamine neurotransmitters from diminution in 6-hydroxydopamine lesion rats. *J. Ethnopharmacol.*, 114, 285–289.

Cheng, M H., Liu, F S., Xu, J P. 1993. Zhongguo Zhongyao Zazhi. *China J. Chin. Mater. Med.*, 18, 424–425.

- Chevallier, A. 1996. *The encyclopedia of medicinal plants*. Dorling Kindersley, London.
- Chi, Y., 2001. Thesis Master of Science, atropisomerism and the synthesis of lignans. University of Manitoba Wininpeg, Manitoba, Canada.
- Cioffi, G., Bader, A., Malafronte, A., Dal Piaz, F., De Tommasi, N. 2008. Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia palaestina* Benth. *Phytochemistry*, 69, 1005–1012.
- Coisin, M., Burzo, I., Stefan, M., Rosenhech, E., Zamfirache, M. 2012. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of three *Salvia* species, widespread in Eastern Romania, Sect. II a. *Biol. Veget.*, 58, 51–58.
- Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A., L. Pieters, L., 2008. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection-an update (1998-2007). *Planta Med.*, 74, 1323–1337.
- Damtoft, S. 1983. Biosynthesis of the iridoid saucub inantirrhinoside from 8-*epi*-deoxyloganic acid. *Phytochemistry*, 22, 1929–1930.
- Damtoft, S.; Hansen, S B.; Jacobsen, B.; Jensen, S R.; Nielsen, B J. 1984. Iridoid glucosides from *Melampyrum*. *Phytochemistry*, 23, 2387–2389.
- Damtoft, S., Jensen, S R., Schacht, M. 1995. Last stages in the biosynthesis of antirrhinoside. *Phytochemistry*, 39, 549–551.
- Das, A., Wang, J., Lien, E. 1994. Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids : a structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. In *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques* (133–166) : Springer.
- Dave-Oomah, B. 2003. Bulletin IBP, numéro 1, Canada.
- Dawidar, A M., Esmirly, S T., Al-hajar, A S M., Jakupovic, J., Abdel-mogib, M. 1989. Two iridoid glucoside esters from *Anarrhinum orientale*. *Phytochemistry*, 28, 3227–3229.
- Delgado, G., Ríos, M Y. 1990. Triterpenoids of *Salvia longystyla*. *Planta Med.*, 56, 243.
- De la Torre, M C., Bruno, M., Piozzi, F., Savona, G., Rodriguez, B., Arnold, N A. 1990. Terpenoids from *Salvia willeana* and *S. Virgata*. *Phytochemistry*, 29, 668–670.
- De Felice, A., Bader, A., Leone, A., Sosa, S., Loggia, R D., Tubaro, A., De Tommasi, N. 2006. New Polyhydroxylated Triterpenes and Anti-Inflammatory Activity of *Salvia hierosolymitana*. *Planta Med.*, 72, 643–649.
- Dewick, P M. 2002. *Medicinal natural products A biosynthetic approach*. 2eme Ed. wiley.
- Didry, N., Pinkas, M., Torck, M. 1982. La composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de grindelia. *Pl. Med. Phytother.*, 16, 7–15.
- Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. 2007. Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55 , 159–222.
- Dinda. B., Chowdhury. D. 2009. Naturally Occurring Iridoids, Secoiridoids and Their Bioactivity, An Updated Review, Part 3. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57, 765–796.

- Dobignard, A., Chatelain, C. 2010-2013. Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord (4 vol.), Genève, C.J.B.G.
- Dong, Q., Yao, J., Fang, J N., Ding, K. 2007. Structural characterization and immunological activity of two cold-water extractable polysaccharides from *Cistanche deserticola* Y. C. Ma. *Carbohydr. Res.*, 342, 1343–1349.
- Dominguez, X A., Gonzalez, F H., Aragon, R., Gutierrez, M., Marroquin, J S., Watson, W. 1976. Mexican medicinal plants XXIX three new diterpene quinones from *Salvia Ballotaeflora*. *Planta Med.*, 30, 237–241.
- Don, M J., Shen, C C., Syu, W J., Ding, Y H., Sun, C M. 2006. Cytotoxic and aromatic constituents from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 67, 497–503.
- Du, N W S., Wang, H., Yi, Y H. 1993. Isolation and identification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche Deserticola*. *Nat. Prod. Res. Dev.*, 5, 5.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z., Hribalova, V., Hirsch, J. 2002. An Immunomodulating Pectic Arabinogalactan from Roots of *Cistanche deserticola*. *Chem. Pap.*, 56, 320–325.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z., Machova, E., Naran, R., Hribalova, V. 1997. Isolation and characterization of mitogenic pectic polysaccharides from *Cistanche deserticola* Y.C. Ma, *Chem. Pap.*, 51, 289–294.
- Ellman, G L., Courtney, K D., Andres, V., Featherston, R M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88–95.
- Endo, K., Takahashi, K., Abe, T., Hikino, H. 1981. Structure of forsythoside A, a antibacterial principle of *Forsythia suspense* leaves. *Heterocycles*, 16, 1311–1314.
- El-Sayed, N H., Khalifa, T I., Ibrahim, M T., Mabry, T J. 2001. Constituents from *Salvia triloba*. *Fitoterapia*, 72, 850–853.
- ElSohly, H N., Danner, S., Li, X C., Nimrod, A C., Clark, A M. 1999. New Antimycobacterial Saponin from *Colubrina retusa*. *J. Nat. Prod.*, 62, 1341–1342.
- Esmaeili, A., Rustaiyan, A., Nadimi, M., Larijani, K., Nadjafi, F., Tabrizi, L., Chalabian, F., Amiri, H. 2008. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from leaves, stems and flowers of *Salvia reuterana* Boiss. grown in Iran. *Nat. Prod. Res.*, 22, 516–520.
- Esquivel, B., Sánchez, A A., Vergara, F., Matus, W., Hernandez-Ortega, S., Ramírez-Apan, M T. 2005. Abietane Diterpenoids from the Roots of some Mexican *Salvia* Species (Labiatae) : Chemical Diversity, Phytogeographical Significance, and Cytotoxic Activity. *Chem. Biodiversity.*, 2, 738–747.
- Evan, W C. 2002. Trease and Evan-Pharmacognosy 15 emeed. W.B. Sanders Company Limited.
- Frederiksen, L B., Damtoft, S., Jensen, S R. 1999. Biosynthesis of iridoids lacking C-10 and the chemotaxonomic implications of their distribution. *Phytochemistry*, 52, 1409–1420.
- Firdous, S., Dardass, A K Y., Khan, K M., Usmani, S B., Ahmad, V U. 1999. A new triterpenoid from the leaves of *Salvia triloba*. *Fitoterapia*, 70, 326–327.
- Flamini, G., Antognoli, E., Marelli, I. 2001. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*, 57, 559–564.

- Folkman, J. 1971. Tumorangiogenesis : therapeutic implications. *N Engl J Med.*, 18, 1182-1186.
- Fraga, B. 1998. Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports*, 15, 73–92.
- Fraga, B M., Diaz, C E., Guadano, A., Gonzalez-Coloma, A. 2005. Diterpenes from *Salvia broussonetii* transformed roots and their insecticidal activity. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5200–5206.
- Fu, G M., Pang, H H., Wang, Y H., 2008, Naturally Occurring Phenylethanoid Glycosides : Potential Leads for New Therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 2592–2613.
- Fu, Z., Wang, H., Hu, X., Sun, Z., Han, C. 2013. The Pharmacological Properties of *Salvia* Essential Oils. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 3, 122–127.
- Fusc, R., Trave, R., Vercellone, A. 1955. La struttura dell'iridomirmecina. *Chim. et Ind*, 37, 251.
- Gang, X., Fang, Z., Xian-Wen, Y., Juan, Z., Li-Xin, Y., Shen, X L., Hu, Y J., Zhao, Q S. 2011. neo-Clerodane diterpenoids from *Salvia dugesii* and their bioactive studies. *Nat. Prod Bioprospect.*, 1, 81–86.
- Gao, C., Wang, C S., Wu, G Z. 2005. *Cistanche* total glycosides on the influence of the vascular dementia rats learning and memory and the mechanism research. *Chin Herb Med.*, 36, 1852–1855.
- Gao, P., Mou, X., Liu, X., Jiang, F., Zhao, H., Wang, Y., Zhang, Z. 2015. Triterpene compound with inhibiting activity on acetylcholinesterase and preparation method. *Faming Zhuanli Shenqing* CN 104788525 A 20150722.
- García-Alvarez, M. C., Savonat, G., Rodríguez, B. 1981. Triterpenoids from *Salvia phlomoides*, three new lupane derivatives. *Phytochemistry*, 20, 481–483.
- Garibold, P., Jommi, G. 1986. Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 25, 865–869.
- Gelfand, M., Mavi, S., Drummond, R B., Ndemera, B. 1985. The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe. *Mambo Press*, Gweru.
- Germanò, M P., Certo, G., D'Angelo, V., Sanogo, R., Malafronte, N., De Tommasi, N., Rapisarda, A. 2015. Anti-angiogenic activity of *Entada africana* root. *Nat. Prod. Res.*, 29, 1551–1556.
- Giamperi, L., Bucchini, A., Bisio, A., Giacomelli, E., Romussi, G., Ricci, D. 2012. Total phenolic content and antioxidant activity of *Salvia* spp. exudates. *Nat Prod Commun.*, 7, 201–202.
- Guerrero, I C., Andres, L S., Leon, L G., Machín, R P., Padrón, J M., Luis, J G., Delgadillo, J. 2006. Abietane Diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. clevelandii* with Cytotoxic Activity against Human Cancer Cell Lines. *J. Nat. Prod.*, 69, 1803–1805.
- Gong, L., Cao, Y., Hou, J. 2007. Determination of betaine in Herba *Cistanche* by HPLC/ELSD. *Chin. J. Chromatogr.*, 25, 280–281.
- González, A G., Andres, L S., Ravelo, A G., Luis, J G., Bazzocchi, I L., West, J. 1990. Terpenoids from *Salvia mellifera*. *Phytochemistry*, 29, 1691–1693.

- González, A G., Barrera, J B., Díaz, J G., Pérez, E M R., Yanes, A C., Rauter, P., Pozo, J. 1990. Diterpenes and other constituents of *Eupatorium salvia*. *Phytochemistry*, 29, 321–323.
- González, A G., Grillo, T A., Ravelo, A G., Luis, J G., Calle, J., Rivera, A. 1989. Study of *Salvia palaefolia* : Absolute Configuration of Glechomafuran. *J. Nat. Prod.*, 52, 1307–1310.
- González, A G., Herrera, J R., Luis, J G., Ravelo, A G., Ferro, E A. 1988. Terpenes and flavones of *Salvia cardiophylla*. *Phytochemistry*, 27, 1540–1541.
- González, A G., Luis, J G., Grillo, T A., Vázquez, J T., Calle, J., Rivera, A. 1991. A New β -Agarofuran Sesquiterpene Dibenzoate from *Salvia palaefolia*. *J. Nat. Prod.*, 54, 579–581.
- González, A G., Rodríguez, C M., Luis, J G. 1987. Diterpenes from the flowers of *Salvia canariensis*. *Phytochemistry*, 26, 1471–1474.
- Granchi, C., Roy, L., Del Fiandra, C., Tuccinardi, T., Lanza, M., Betti, L., Giannacchi, G., Lucacchini, A., Martinelli, A., Macchia, M., Minutilo, F. 2001. Triazole substituted N-hydroxyindol-2-carboxylates as inhibitors of isoform 5 of human lactate dehydrogenase (*hLDH5*). *Medchemcomm*, 2, 638–643.
- Granchi, C., Caligiuri, I., Bertelli, E., Poli, G., Rizzolio, F., Macchia, M., Martinelli, A., Minutilo, F., Tuccinardi, T. 2017. Development of terphenyl-2-methyloxazol-5 (4H)-one derivatives as selective reversible MAGL inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, 32, 1240–1252.
- Guajardo Touche, E M., Loprz, E. G., Reyes, A P., Sánchez, H., Honecker, F., Achenbach, H. 1997. Parryin, a diterpene with a tricyclic 6-7-5-ring system from *Salvia parryi*. *Phytochemistry*, 45, 387–390.
- Hale, A L. 2005. Screening potato genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah strains using AFLP and microsatellite marker analysis. Texas A&M University.
- Hammiche, V., Maiza, K. 2006. Traditional medicine in Central Sahara : pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.*, 105, 358–367.
- Handjieva, N., Tersieva, L., Popov, S., Evstatieva, L. 1995. Two iridoid glucosides, 5-O-Menthiafoloylkickxioside and kickxin, from *Kickxia* Dum. species. *Phytochemistry*, 39, 925–927.
- Hayase, F., Kato, M. 1984. Antioxidant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci. Vitaminol*, 30, 37–46.
- Harborne, J B. 1988. The flavonoids, Advances in research since 1980. Chapman & Hall. London.
- He, Z D., YANG, C R. 1991. Brandioside, a phenylpropanoid glycoside from *Brandisza hancei*. *Phytochemistry*, 30, 701–702.
- Hedge, I C. 1963. Tab. 430. *Salvia buchananii*—Labiatae. In: Taylor, G. (Ed.), Curtis's Botanical Magazine. The Royal Horticultural Society, London SW, Vincente Square.
- Heywood, V H., Brummit, R K., Culham, A., Seberg, O. 2007. Flowering Plant Families of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Heywood, V H. *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press, New York, 1993.
- Hilliard, O M. 1994. The Manulae, a tribe of Scrophulariaceae. Edinburgh University Press, Edinburgh, 1–212.
- Hohmann, J., Rédei, D., Máthé, I., Blunden, G. 2003. Phenylpropanoid glycosides and diterpenoids from *Salvia officinalis*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 31, 427–429.
- Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T. 2007. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1147–1149.
- Hostettmann, K., Marston, A. 1995. Chemistry and Pharmacology of Natural Products : Saponins. *Cambridge University Press*, 117.
- Houghton, P J. Hikino, H. 1989. Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja* species. *Planta Medica*, 55, 123–126.
- Hua, H., Cheng, M., Li, X., Pei, Y. 2002. A New Pyrroloquinazoline Alkaloid from *Linaria vulgaris*. *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 1393–1394.
- Hueso-Rodríguez, J A., Jimeno, M L., Rodríguez, B., Savona, G., Bruno, M. 1983. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*. *Phytochemistry*, 22, 2005–2009.
- Hussein, A A., de la Torre, M C., Rodríguez, B., Hammouda, F M., Hussiney, H A. 1997. Modified abietane diterpenoids and a methoxy lupane derivative from *Salvia palaestina*. *Phytochemistry*, 45, 1663–1668.
- Hui, R., Hou, D., Li, T., Guan, C. 2003. Analysis of Volatile Components in *Herba Cistanche*. *Chin. J. Anal. Chem.*, 31, 601–603.
- Ilieva, E I., Handjieva, N V., Popov, S S. 1992. Iridoid glucosides from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry*, 31, 1040–1041.
- Iwagawa, T., Asai, H., Hase, T., Sako, S., Su, R., Hagiwara, N., Kim, M. 1990. Monoterpenoids from *Radermachia sinica*. *Phytochemistry*, 29, 1913–1916.
- Jassbi, A R., Mehrdad, M., Eghtesadi, F., Ebrahimi, S N., Baldwin, I T. 2006. Novel rearranged abietane diterpenoid sfrom the roots of *Salvia sahendica*. *Chem. Biodivers.*, 3, 916–922.
- Jensen, S R. 1991. Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 31, 133–158.
- Jensen, S R., Franzyk, H., Wallander, E. 2002. Chemotaxonomy of the Oleaceae : iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*, 60, 213–231.
- Jia, Y., Guan, Q., Jiang, Y. 2014. Amelioration of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by echinacoside-enriched extract of *Cistanche tubulosa*. *Phytother. Res.*, 28, 110–119.
- Jiang, Y., Tu, P F. 2009. Analysis of chemical constituents in *Cistanche* species. *J. Chromatogr. A.*, 1216, 1970–1979.
- Jiangsu New Medical College, Chinese Medicine Dictionary, Shanghai People's Publishing House, Shanghai, 1977, 286.
- Jiménez, C., Riguera, R. 1994. Phenylethanoid glycosides in plants : structure and biological activity, *Natural Product Reports.*, Issue 6.

- Jin, Q., Han, X H., Hwang, J H., Hong, S S., Park, M E., Lee, C., Lee, C H., Lee, D., Lee, M K., Hwang, B Y. 2009. A New Phenylbutanone Glucoside from *Salvia plebeian*. *Nat. Prod. Sci.*, 15, 106–109.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Öztürk, M., Kolak, U., Topçu, G. 2007. Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chem.*, 102, 1281–1287.
- Karasawa, H., Kobayashi, H., Takizawa, N. 1986. Studies on the Constituents of *Cistanchis Herba*. VIII. *Yakugaku. Zas. Shi.*, 106, 721–724.
- Karasawa, H., Kobayashi, H., Takizawa, N., Miyase, T., Fukushima, S. 1986. Studies on the Constituents of *Cistanchis Herba*. VII. *Yakugaku Zas. Shi.*, 106, 562–566.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B D., Polissiou, M., Sokmen A. 2007. Investigation of the antioxydant properties of Ferulaorientals L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem.*, 100, 584–589.
- Khan, I. A., Erdelmeier, C A J., Sticher, O., Rali, T. 1992. New Phenolic Glucosides from the Leaves of *Eurya Tigang*. *Journal of Natural Products*, 55, 1270–1274.
- Kimmel, C B., Ballard, W W., Kimmel, S R., Wullmann, B., Schilling, T F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Develop. Dynam.*, 203, 253–310.
- Kivrak, I., Duru, M., Ozturk, M N., Mercan, N., Harmandar, M., Topcu, G. 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chem.*, 166, 470–479.
- Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T. 1984. Studies on the Constituents of *Cistanchis Herba*. IV. Isolation and Structures of Two New Phenylpropanoid Glycosides, Cistanosides C and D. *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 3880–3885.
- Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T. 1985. Studies on the Constituents of *Cistanchis Herba*. V. Isolation and Structures of Two New Phenylpropanoid Glycosides, Cistanosides E and F. *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 1452–1457.
- Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T. 1985. Studies on the Constituents of *Cistanchis Herba*. VI. Isolation and Structure of a New Iridoid Glycoside, 6-Deoxycatalpol. *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3645–3650.
- Kobayashi, H., Oguchi, H., Takizawa, N. 1987. New Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche tubulosa* (SCHRENK) HOOK. f. I. *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 3309–3314.
- Kolak, U., Ari, S., Birman, H., Hasancebi, S., Ulubelen, A. 2001. Cardioactive Diterpenoids from the Roots of *Salvia amplexicaulis*. *Planta Med.*, 67, 761–763.
- Koo, H J., Lee, S., Shin, K H., Kim, B C., Lim, C J., Park, E H. 2004. Geniposide, an anti-angiogenic compound from the fruits of *Gardenia jasminoides*. *Planta Med.*, 70, 467–469.
- Kose, E O., Ongut, G., Yanikoglu, A. 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Salvia potentillifolia* Boiss. & Heldr. Ex Benth. From Turkey. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 16, 1489–1495.
- Kuang, R., Sun, Y., Yuan, W. 2009. Protective effects of echinacoside, one of the phenylethanoid glycosides, on H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Planta Med.*, 75, 1499–1504.
- Kuruüzüm-Uz, A., Ströch, K., Demirezer, L Ö., Zeeck, A. 2003. Glucosides from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*, 63, 959–964.

- Lakhal, H., Ghorab, H., Chibani, S., Kabouche, A., Semra, Z., Smati, F., Abuhamdah, S., Kabouche, Z. 2013. Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Salvia officinalis* from Batna (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 3, 310–314.
- Lei, P., Lin, M. 2008. Determination of monosaccharide composition of polysaccharide in *Cistanche Herba* by capillary electrophoresis in association with electrochemical detection. *China. J. Chin. Mater. Med.*, 32, 2073–2075.
- Lei, L., Jiang, Y., Liu, X M., Tu, P F., Wu, L J., Chen, F K. 2007. New Glycosides from *Cistanche salsa*. *Chen, Helv. Chim. Acta.*, 90, 79–85.
- Lei, L., Tu, P F. 2004. Echinacoside anti-aging action mechanism research. *Acta. Biophys. Sin.*, 20, 183–187.
- Li, G. 2011. Study on the improve intelligence activity of phenylethanoid glycosides of *Cistanche deserticola*. *J. Inner. Mongolia. Med. Coll.*, 23, 141–143.
- Li, L., Shi, D F., Liu, C M. 2009. Study on the antioxidant activities of phenylethanoid Glycosides from *Cistanche deserticola*. *J. Anhui. Agri. Sci.*, 37, 15835–15836.
- Li, X C., ElSohly, H N., Nimrod, A C., Clark, A M. 1999. Antifungal jujubogenin saponins from *Colubrina retusa*. *J. Nat. Prod.*, 62, 674–677.
- Li, Y., Wu, Y Q., Du, X., Shi, Y P. 2003. Germacrane sesquiterpene esters from *Salvia roborowskii*. *Planta Med. – Nat. Prod., Med. Plant Res.*, 69, 782–784.
- Liu, C C. 2005. *Cistanche* research progress. *Nat. Prod. Res. Dev.*, 17, 235–240.
- Liu, X M., Li, J., Jiang, Y., Zhao, M B., Tu, P F. 2013. Chemical constituents from *Cistanche sinensis* (Orobanchaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 47, 21–24.
- Liu, H M., Zhao, G J., Chen, Z. 2011. A study on the effect of phenylethanoid glycosides of the *Cistanche deserticola* on scopolamine-induced impairment of learning memory in mice. *J. BaoTou. Medl. Coll.*, 27, 9–14.
- Liu, Y., Li, C., Shi, J. G., Shi, Y. P. 2009. Two New Sesquiterpenes from *Salvia roborowskii* MAXIM. *Helv. Chim. Acta.*, 92, 335–338.
- Liu, Y., WAGNER, H., Bauer, Rudolf. 1998. Phenylpropanoids and flavonoid glycosides from *Lysionotus pauciflorus*. *Phytochemistry*, 48, 339–343.
- Lopresti, A L. 2017. *Salvia* (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs. R & D.*, 17, 53–64.
- Louis, S. 2004. «Diversité Structurale et d'Activité Biologique des Albumines Entomotoxiques de type 1b des Graines de Légumineuses », Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Lu, Y., Yeap Foo, L. 2002. Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry*, 59, 117–140.
- Lu, X Z., Xu, W H., Naoki, H. 1992. Anthraquinones from *Salvia przewalskii*. *Phytochemistry*, 31, 708–709.
- Lu, Y., Foo, L Y. 1999. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 51, 91–94.
- Lu, Y., Foo, L Y. 2001. Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Lett.*, 42, 8223–8225.

- Lu, Y., Foo, L Y., Wong, H.1999. Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 52, 1149–1152.
- Lu, Y., Yeap Foo, L. 2000. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 55, 263–267.
- Macromodel, version 9.7. Portland, OR: Schrodinger Inc.; 2009.
- Maestro, version 9.0. Portland, OR: Schrodinger Inc.; 2009.
- Magiatis, P., Skaltsounis, A L., Tillequin, F., Seguin, E., Cosson, J P. 2002. Coelobillardin, an iridoid glucoside dimer from *Coelospermum billardieri*. *Phytochemistry*, 60,415–418.
- Mahran, E., Hosny, M., El-hela, A, Boroujerdi, A. 2018. New Iridoid Glycosides from *Anarrhinum pubescens*. *Nat. Prod. Res.*,33, 3057–3064.
- Manerba, M., Vettraino, M., Fiume, L., Di Stefano, G., Sartini, A., Giacomini, E., Buonfiglio, R., Roberti, M., Recanatini, M. 2012. Galloflavin (CAS 568-80-9) : a novel inhibitor of lactate dehydrogenase. *Chem. Med. Chem.*, 7, 311–317.
- Massayuki, Y., Hisashi, M., Toshio, M., Haihui, X., Seikou, N., Osamu, M. 2006. Phenylethanoid oligoglycosides and acylated oligosugars with vasorelaxant activity from *Cistanche tubulosa*. *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 7468–7475.
- Maurer, B., Hauser, A. 1983. New Sesquiterpenoids from Clary Sage Oil (*Salvia sclarea* L.). *Helv. Chim. Acta.*, 66, 2223–2235.
- Mclafferty, F W., Stauffer D B. 1991. *The Important Peak Index of the Registry of Mass Spectral Data*, John Wiley & Son, New York, NY.
- Mcneal, J R., Bennett, J R., Wolfe, A D., Mathews S. 2013. PHYlogeny and origins of holoparasitism in Orobanchaceae. *American Journal of Botany*, 100, 971–983.
- Mehmood, S., Riaz, N., Nawaz, S A., Afza, N., Malik, A., Choudhary, M I. 2006. New butyrylcholinesterase inhibitory triterpenes from *Salvia santolinifolia*. *Arch. Pharm. Res.*, 29, 195–198.
- Menichini, F. 2008. Biological and Developments Pharmacological Activities of Iridoids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8, 399–420.
- Méjean, A., Leuret, T. 2008. La cascade métastatique : angiogenèse et nouveaux concepts, *Progress en Urologie*, Suppl. 7, S156–S166.
- Miller, H M. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. OilChem. Soc.*, 45, 91.
- Min, Z., Chuan, Z L., Wen, W L. 2013. Transient exposure to echinacoside is sufficient to activate Trk signaling and protect neuronal cells from rotenone. *J. Neurochem.*, 124, 571–580.
- Miyase, T., Ueno, A., Takizawa, N., Kobayashi, K., Oguchi, H. 1988. Studies on the glucosides of *Epimedium grandiflorum* MORR. Var. thunbergianum (MIQ.) NAKAI. III. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2475–2484.
- Miyase, T., Ishino, M., Akahori, C., Ueno, A., Ohkawa, Y. Tanizawa, H. 1991, Phenylethanoid glycosides from *Plantago asiatica*. *Phytochemistry*, 30, 2015–2018.

- Mohammad hosseini, M., Pazoki, A., Akhlaghi, H. 2008. Chemical composition of the essential oils from flowers, stems, and roots of *Salvia multicaulis* growing wild in Iran. *Chem. Nat. Compd.*, 44, 127–128.
- Morikawa, T., Pan, Y. G., Ninomiya, K. 2010. Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa*. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 1882–1890.
- Morikawa, T., Pan, Y., Ninomiya, K., Imura, K., Yuan, D., Yoshikawa, M., Hayakawa, T., Muraoka, O. 2010. Iridoid and acyclic monoterpene glycosides, kankanoside L, M, N, O, and P from *Cistanche tubulosa*. *Chem. Pharma. Bull.*, 58, 1403–1410.
- Moriya, A., Tu, P. F., Karasawa, D., Arima, H., Deyama, T., Kegasawa, K. 1995. Pharmacognostical studies of *Cistanchis Herba* (I). Comparison of the morphology of *Cistanche* plants. *Nat. Med.*, 49, 383–393.
- Moriya, A., Tu, P. F., Karasawa, D., Arima, H., Deyama, T., Hayashi, K. 1995. Pharmacognostical studies of *Cistanchis Herba* (II): Comparison of the components of *Cistanche* plants. *Nat. Med.*, 49, 394–400.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, 19, 1639–1662.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J. 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4 : automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, 30, 2785–2791
- Mukherjee, K. S., Bhattacharya, M. K., Ghosh, P. K. 1982. A triterpene acid constituent of *Salvia lanata*. *Phytochemistry*, 21, 2416–2417.
- Muñoz Camero, C., Germanò, M. P., Rapisarda, A., D'Angelo, V., Amira, S., Benchikh, F., Braca, A., De Leo, M. 2018. Anti-angiogenic activity of iridoids from *Galium tunetanum*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 28, 374–377.
- Musselman, L. J. 1984. Some parasitic angiosperms of Sudan, Hydnoraceae, Orobanchaceae and *Cuscuta* (Convolvulaceae), Notes. *RBG. Edinb.*, 42, 21–38.
- Mustafa, K., Bektas, T. 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*, 99, 4096–4104.
- Nagy, G., Dobos, Á., Günther, G., Yang, M. H., Blunden, G., Crabb, T. A., Máthé, I. 1998. Abietane Diterpenoids from the Roots of *Salvia pratensis*. *Planta Med.*, 64, 288–289.
- Nagy, G., Günther, G., Máthé, I., Blunden, G., Yang, M., Crabb, T. A. 1999. 12-Deoxy-6,7-dehydroroyleanone, 12-deoxy-6-hydroxy-6,7-dehydroroyleanone and 12-deoxy-7,7-dimethoxy-6-ketoroyleanone from *Salvia nutans* roots. *Phytochemistry*, 51, 809–812.
- Nakanishi, T., Nishi, M., Inada, A., Obata, H., Tanabe, N., Abe, S., Wakashiro, M. 1990. Two new potent inhibitors of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *ChemPharm Bull.*, 38, 1772–1774.
- Nangia, A., Prasuna, G. 1996. Studies on Horner-Wadsworth-Emmons reaction in base sensitive ketones : Synthesis of (–)-mitsugashiwalactone and formal synthesis of (+)-iridomyrmecin, (–)-isoiridomyrmecin and (+)-teucriumlactone. *Tetrahedron*, 52, 3435–3450.
- Narukawa, Y., Fukui, M., Hatano, K., Takeda, T. 2006. Four new diterpenoids from *Salvia fulgens* Cav. *J. Nat. Med.*, 60, 58–63.

- Nazemiyeh, H., Shoeb, M., Kumarasamy, Y., Talebpour, A H., Delazar, A., Nahar, L., Sarke, S. D. 2006. Phenolic compounds and their glycosides from *Stachys schtschegleevii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 721.
- Nikmehr, B., Ghaznavi, H., Rahbar, A., Sadr, S., Mehrzadi, S. 2014. In vitro anti-leishmanial activity of methanolic extracts of *Calendula officinalis* flowers, *Datura stramonium* seeds, and *Salvia officinalis* leaves. *Chin. J. Nat. Med.*, 12,423–427.
- Nishibe, S., Okabe, K., Tsukamoto, H., Sakushima, A., Hisada, S., Baba, H. Akisada, T. 1982. Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus." VI. The structure and antibacterial activity of suspensaside isolated from *Forsythia suspense*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 4548–4553.
- Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., Sener, B. 2008. Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase. *Z Naturforsch C.*, 63, 547–553.
- Ortega, A., Cárdenas, J., Gage, D A., Maldonado, E. 1995. Abietane and clerodane diterpenes from *Salvia regia*. *Phytochemistry*, 39, 931–933.
- Ozenda, P. *Flore et Végétation du Sahara*, Edition Paris, 1993, 388.
- Ozenda, P. *Flore et végétation du Sahara*. Paris : CNRS: 3ème ed. 1991.
- Ozenda, P. CNRS, *Flore du Sahara Septentrional et Central*, 1958, 386.
- Pan, Z H., Wang, Y Y., Li, M M., Xu, G., Peng, L Y., He, J., Zhao, Y., Li, Y., Zhao, Q S. 2010. Terpenoids from *Salvia trijuga*. *J. Nat. Prod.*, 73, 1146–1150.
- Paris, R R., Moyse, H. 1965. Précis de matière médicale, Tome 1, Masson et Cie, Editeurs.
- Panizzi, L., Scarpati, M., Oriente, G. 1960. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazz. Chim. Ital.*, 90, 1449–1485.
- Paul, I., Michel, M., Jean-Pierre, R. 2001. Encyclopédie des plantes médicinales, 2ème ed.
- Pavan, M. 1955. The extraction and crystallization of iridomyrmecin. *Chim. et. Ind.*, 37, 625.
- Pedreras, S., Rodríguez, B., De La Torre, M C., Bruno, M., Savona, G., Perales, A., Torres, M R. 1990. Dammarane triterpenes of *Salvia hierosolymitana*. *Phytochemistry*, 29, 919–922.
- Pelucchi, C., Talamini, R., Galeone, C., Negri, E., Franceschi, S., Dal Maso, L., Montella, M., Conti, E., La Vecchia, C., 2004, Fibre intake and prostate cancer risk. *Int. J. Cancer.*, 109, 278.
- Pereda-Miranda, R., Delgado, G., de Vivar, A R. 1986. New Triterpenoids from *Salvia nicolsoniana*. *J. Nat. Prod.*, 49, 225–230.
- Philcox, D. 1990. Scrophulariaceae Flora *Zambesiaca*, London, 1–33.
- Philip, C S., Monique, S J S., Julia, S., Peter, J H. Peter, G. 2002. Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*. *Phytother. Res.*, 16, 33–35.
- Picman, A K. 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.*, 14, 255–281.

- Pierangeli, G., Vital, G., Windell Revera, L J. 2009. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *Plants Res*, 7, 511–518.
- Potterat, O., Saadou, M., Hostettmann, K. 1991. Iridoid glucosides from *Rogeria adenophylla*. *Phytochemistry*, 30, 889–892.
- Psotová, J., Lasovsky, J., Vicar, J. 2003. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 147, 147–153.
- Quezel, P., Santa, S. 1963. Nouvelle Flore d'Algérie et des régions Désertiques Méridionales. Tome I et II. CNRS.
- Rao, K V R., Rao, L J N., Rao, N S P. 1990. An A-ring contracted triterpenoid from *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*, 29, 1326–1329.
- Racine, E., Burchak, O N., Py, S. 2016. Synthesis of α -Acylloxynitrones and Reactivity towards Samarium Diodide. *Eur. J. Org. Chem.*, 4003–4012.
- Rauter, A., Branco, I., Lopes, R., Justino, J., Silva, F., Noronha, J., Cabrita, E., Brouard, I., Bermejo, J. 2007. A new lupene triterpenetriol and anticholinesterase activity of *Salvia sclareoides*. *Fitoterapia*, 78, 474–481.
- Raffaelli, B., Hoikkala, A., Leppälä, E., Wähälä, K., 2002. Enterolignans. *J. Chromatogr. B.*, 777, 29–43.
- Ravn, H., Andary, C., Kovács, G., Mølgaard, P. 1989. Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 17, 175–184.
- Ravn, H., Brimer, L. 1988. Structure and antibacterial activity of plant amajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subs *major*. *Phytochemistry*, 27, 3433–3437.
- Rustaiyan, A.; Koussari, S. 1988. Further sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*, 27, 1767–1769.
- Sabri, N N., Abou-Donia, A A., Assad, A M., Ghazy, N M., El-Lakany, A M., Tempesta, M. S., Sanson, D R. 1989. Abietane Diterpene Quinones from the Roots of *Salvia verbenaca* and *S. lanigera*. *Planta Med.*, 55, 582.
- Salah El Dine, R., Abdel Monem, A R., El-Halawany, A M., Hattori, M, Abdel-Sattar, E. 2011. HCV-NS3/4A Protease Inhibitory Iridoid Glucosides and Dimeric Foliamenthic Acid Derivatives from *Anarrhinum orientale*. *J. Nat. Prod.*, 74, 943–948.
- Saleem, M., Kim, H.J., Ali, M.S., Lee, Y.S., 2005. An update on bioactive plant Lignans. *Nat. Prod. Rep.*, 22, 696–716.
- Saleem, M., Kim, H J., Jin, C., Lee, Y S. 2004. Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata*. *Arch Pharm Res*. 27, 300–304.
- San, W K., Seung, H Y., Hee, J L. 2012. *Cistanche Herba* induces testis cytotoxicity in male mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 88, 112–117.
- Sampaio-Santosa, M I., Auxiliadora, M., Kaplanb, C. 2001. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. *J. Braz. Chem. Soc.*, 12, 144–153.
- Saric, D., Kalodera, Z., Lackovic, Z. 2010. Psychotropic plant *Salvia divinorum* Epl. & Jativa - the source of the most potent natural hallucinogen. *Farmaceutski Glasnik*, 66, 523–541.

- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed Lavoisier, p2- 10, 2006.
- Savona, G., Bruno, M. 1983. Terpenoids of Cultivated *Salvia canariensis*. *J. Nat. Prod.*, 46, 593–594.
- Savona, G., Bruno, M., Rodríguez, B. 1987. Triterpenoids from *Salvia deserta*. *Phytochemistry*, 26,3305–3308.
- Scalvivni, L., Piomelli, D., Mor, M. 2016, Monoglyceride lipase : structure and inhibitors. *Chem. Phys. Lipids.*, 197, 13–24.
- Schalk-Hihi, C., Schubert, C., Alexandra, R., Bayoumy, S., Clemente, J C., Deckman, I., DesJarlais, R L., Dzordzorme, K C., Flores, C M., Grasberger, B., Kranz, J K., Lewandowski, F., Liu, L., Ma, H., Maguire, D., Macielag, M J., McDonnell, M E., MazzasalmaHaarlander, T., Mille, R., Milligan, C., Reynolds, C., Kuo, L C. 2011. Crystal structure of a soluble form of human monoglyceride lipase in complex with an inhibitor at 1.35 Å resolution. *Protein Sci.*, 20, 670–683.
- Schawenberg, P., Paris, F. 1977. Guide des plantes médicinales. Delachaux et Niestlé
- Shen, Y C, Lin, C Y., Chen, C H. 1990. Secoiridoid glycosides from *Jasminum multiflorum*. *Phytochemistry*, 29, 2905–2912.
- Shoyama, Y., Matsumoto, M., Nishioka, I. 1986. Four caffeoyl glycosides from callus tissue of *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry*, 25, 1633–1636.
- Shoyama, Y., Matsumoto, M., Nishioka, I. 1987. Phenolic glycosides from diseased roots of *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*. *Phytochemistry*, 26, 983–986.
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M. 1997. Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3197–3201.
- Song, Z H., Tu, P F., Zao, Y Y., Zheng, J H. 2000. Phenylethanoid glycosides from *Cistanche tubulosa*. *Chin. Trad. Herb. Drugs.*, 31,808–810.
- Song, Y. 2013. Study of the extraction of flavonoids and antioxidant properties of *Cistanches Herba*. *Liaoning. Chem. Ind.*, 42, 13–15.
- Soodabeh, S., Mitra, G., Ahmad, R G., Alireza, S. 2012. Terpenes From the Root of *Salvia hypoleuca* Benth. *DARU J. Pharm. Sci.*, 20, 66.
- Souzu, I., Mitsushashi, H. 1969. Structures of iridoids from *Lonicera morrowii* A. Gray *Tetrahedron letters*. 10, 2725–2728.
- State Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. 2010. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2010 ed, Vol 1. pp. 126. Medical Science & Technology Press. Beijing.
- Stavric, B., Matula, T. 1992. Flavonoids in foods : their significance for nutrition and health : Birkhäuser Verlag : Basel, Switzerland.
- Sticher, O. 1971. Isolation of antirrinocide from *Linaria vulgaris*. *Phytochemistry*, 10, 1974–1975.
- Stoll., A., Renz, J., Brack, A. 1950. Isolierung und Konstitution des Echinacosids, eines Glykosids aus den Wurzeln von *Echinacea angustifolia* D. C. 6. Mitteilung über antibakterielle Stoffe. *Helv. Chim. Acta.*, 33, 1877–1893.

- Tabanca, N., Demirci, B., Can Baser, K H., Aytac, Z., Ekici, M., Khan, S I., Jacob, M R., Wedge, D E. 2006. Chemical Composition and Antifungal Activity of *Salvia macrochlamys* and *Salvia recognita* Essential Oils. *J. Agric. Food. Chem.*, 54, 6593–6597.
- Takeda, Y., Morimato, Y. et Matsumoto, Y., Honda, G., Tabata, M., Fujita, T., Otsuka, H. 1995. Nepetanudoside, an Iridoid Glucoside with an Unusual Stereostructure from *Nepeta nuda* ssp. *Albiflora*. *J. Nat Prod.*, 58, 1217–1221.
- Takeda, Y., Zhang, H., Matsumoto, T., Otsuka, H., Oosio, Y., Honda, G., Tabata, M., Fujita, T., Sun, H., Sezik, E. 1997. Megastigmane glycosides from *Salvia nemorosa*. *Phytochemistry*, 44, 117–120.
- Tan, N., Kaloga, M., Radtke, O A., Kiderlen, A F., Öksüz, S., Ulubelen, A., Kolodziej, H. 2002. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*, 61, 881–884.
- Tan, N., Topçu, G., Ulubelen, A. 1998. Norabietane diterpenoids and other terpenoids from *salvia recognita*. *Phytochemistry*, 49, 175–178.
- Tanaka, T., Nishimura, A., Kouno, I., Nonaka, G., Young, T J. 1996. Isolation and Characterization of Yunnanenic Acids A–D, Four Novel Caffeic Acid Metabolites from *Salvia yunnanensis*. *J. Nat. Prod.*, 59, 843–849.
- Tandon, S., Rastogi, R.P., 1976. Wikstromol, a new lignan from *Wikstroemia viridiflora*. *Phytochemistry*, 15, 1789–1791.
- Taskova, R M., Gottfredsen, C H., Jensen, S R. 2006. Chemotaxonomy of *Veroniceae* and its allies in the Plantaginaceae. *Phytochemistry*, 67, 286–301.
- The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2003, 141, 399–436.
- Tina, H., Tanya, H., Kate, S., Blanche, S., Daphne, R., Carol, A., Maryann, R. Steve, G. 2001.
- Les plantes médicinales, Encyclopédie pratique, 2 eme ed.
- To, K., Ka, I., Sasaki, H., Komatsu, Y. 1990. Yasuhiro Tsumura, Chemical abstracts, 113, 120, 777.
- Topçu, G., Altiner, E N., Gozcu, S., Halfon, B., Aydogmus, Z., Pezzuto, J M., Zhou, B N., Kingston, D G I. 2003. Studies on di and triterpenoids from *salvia staminea* with cytotoxic activity. *Planta Med.*, 69, 464–467.
- Topçu, G., Ulubelen, A. 1990. Diterpenoids from *Salvia wiedemannii*. *Phytochemistry*, 29, 2346–2348.
- Topçu, G., Altiner, E N., Gozcu, S., Halfon, B., Aydogmus, Z., Pezzuto, J M., Zhou, B N. Kingston, D G I. 2003. Studies on di and triterpenoids from *Salvia staminea* with cytotoxic activity. *Planta Med.*, 69, 464–467.
- Topçu, G., Ertas, A., Kolak, U., Ozturk, M., Ulubelen, A. 2007. Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. *Arkivoc*, 7, 195–208.
- Topçu, G., Tan, N., Kökdil, G., Ulubelen, A. 1997. Terpenoids from *Salvia glutinosa*. *Phytochemistry*, 45, 1293–1294.
- Topçu, G., Türkmen, Z., Ulubelen, A., Schilling, J K., Kingston, D G I. 2004. Highly Hydroxylated Triterpenes from *Salvia kronenburgii*. *J. Nat. Prod.*, 67, 118–121.

- Topçu, G., Ulubelen, A. 1999. Terpenoids from *Salvia kronenburgii*. *J. Nat. Prod.*, 62, 1605–1608.
- Topçu, G., Ulubelen, A., Eriş, C. 1994. Di- and triterpenoids of *Salvia pomifera*. *Phytochemistry*, 36, 743–745.
- Tosun, A., Khan, S., Shik Kim, Y., Calin- Sanchez, A., Hysenaj, X., Carbonell-Barrachina, A. A. 2014. Essential Oil Composition and Anti-Inflammatory Activity of *Salvia officinalis* L (Lamiaceae) in Murin Macrophages. *Trop. J. Pharm. Res.*, 6, 937–942.
- Tu, P F., Song, Z H., Shi, H M., Yong, J., Zhao, Y Y. 2006. Arylethyl (= Phenylethanoid) Glycosides and Oligosaccharide from the Stem of *Cistanche tubulosa*. *Helv. Chim. Acta.*, 89, 927–935.
- Tu, P F., Song, Z H., Yong, J., Zhao, Y Y. 2007. Chemical constituents of *Cistanche sinensis*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 9, 79–84.
- Tuccinardi, T., Granchi, C., Rizzolio, F., Caligiuri, I., Battistello, V., Toffoli, G., Minutolo, F., Macchia, M., Martinelli, A. 2014. Identification and characterization of a new reversible MAGL inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 3285–3291.
- Turker, A.U. and Gurel, E., 2005. Common Mullein (*Verbascum thapsus* L.) : recent advances in research. *Phytother Res.*, 19, 733 – 739.
- Ulubelen, A., Ayanoğlu, E. 1976. Vergaticacid, a new pentacyclic triterpene from *Salvia virgata*. *Phytochemistry*, 15, 309–311.
- Ulubelen, A., Brieskorn, C H. 1977. Chemical study of the herba of *Salvia amplexicaulis*. *Planta Med.*, 31, 80–82.
- Ulubelen, A., Birman, H., Öksüz, S., Topçu, G., Kolak, U., Barla, A., Voelter, W. 2002. Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*. *Planta Med.*, 68, 818–821.
- Ulubelen, A., Brieskorn, C H., Özdemir, N. 1977. Triterpenoids of *Salvia horminum*, constitution of a new diol. *Phytochemistry*, 16, 790–791.
- Ulubelen, A., Miski, M., Mabry, T J. 1981. A New Diterpene Acid From *Salvia tomentosa*. *J. Nat. Prod.*, 44, 119–124.
- Ulubelen, A., Öksüz, S., Kolak, U., Birman, H., Voelter, W. 2000. Cardioactive terpenoids and a new rearranged diterpene from *Salvia syriaca*. *Planta Med.*, 66, 627–629.
- Ulubelen, A., Öksüz, S., Topçu, G., Gören, A C., Voelter, W. 2001. Antibacterial Diterpenes from the Roots of *Salvia blepharochlaena*. *J. Nat. Prod.*, 64, 549–551.
- Ulubelen, A., Sönmez, U., Topçu, G., Johansson, C B. 1996. An abietane diterpene and two phenolics from *Salvia forskahlei*. *Phytochemistry*, 42, 145–147.
- Ulubelen, A., Tan, N., Sönmez, U., Topçu, G. 1998. Diterpenoids and triterpenoids from *Salvia multicaulis*. *Phytochemistry*, 47, 899–901.
- Ulubelen, A., Topçu, G. 1984. Triterpenoids from *Salvia pinnata*. *Phytochemistry*, 23, 133–134.
- Ulubelen, A., Topçu, G. 1994. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, 36, 971–974.
- Ulubelen, A., Topçu, G. 1992. New Abietane Diterpenoids from *Salvia montbretii*. *J. Nat. Prod.*, 55, 441–444.

- Ulubelen, A., Topçu, G., Lotter, H., Wagner, H., Eriş, C. 1994. Triterpenoids from the aerial parts of *Salvia montbretii*. *Phytochemistry*, 36, 413–415.
- Ulubelen, A., Topçu, G., Sönmez, U., Choudhary, M I., Rahman, A U. 1995. Abietane diterpenes from *Salvia napifolia*. *Phytochemistry*, 40, 861–864.
- Ulubelen, A., Topçu, G., Sönmez, U., Eris, C. 1994. Terpenoids from *Salvia nemorosa*. *Phytochemistry*., 35, 1065–1067.
- Ulubelen, A., Tuzlaci, E. 1990. New Diterpenes from *Salvia pachystachys*. *J. Nat. Prod.*, 53, 1597–1599.
- Umezawa, T., 2003. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochem. Rev.*, 2, 371–390.
- Valdés, B., Talavera, S., Fernandez-Galiano, E. 1987. Flora vascular de Andalucia Occidental (Scrophulariaceae), 2. Barcelona: Ketres, 486–547.
- Valverde, S., Escudero, J., CristóbalLópez, J., Ma Rabanal, R. 1985. Two terpenoids from *Salvia bicolor*. *Phytochemistry*, 24, 111–113.
- Venditti, A., Frezza, C., Riccardelli, M., Foddai, S., Nicoletti, M., Serafini, M., Bianco, A. 2016. Secondary metabolites from *Scrophularia canina* L. *Nat. Prod. Res.*, 30, 1665–1669.
- Ventenat, É P. 1799. Orobanchoidae. Tableau du Règne Vegetal, 2, 292.
- Veitch, N C., Grayer, R J., Irwin, J L., Takeda, K. 1998. Flavonoid cellobiosides from *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry*, 48, 389–393.
- Villasenor, I M., Tundis, R., Loizzo, M R., Menichini, F., Statti, G A. 2007. Bioactivities of Iridoids. Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents. *Medicinal Chemistry*, 6, 307–314.
- Wang, F., Li, X M., Liu, J K. 2009. New terpenoids from *Isodon sculponeata*. *Chem Pharm Bull.*, 57, 525–527.
- Wang, L I., Ding, H., Yu, H S., Han, L F., Lai, Q H., Zhang, L J., Song, X B. 2015. *Cistanches Herba* : Chemical Constituents and Pharmacological Effects. *Chinese Herbal Medicines*, 7, 135–142.
- Wang, M., Kikuzaki, H., Zhu, N., Sang, S., Nakatani, N., HoC. T. 2000. Isolation and Structural Elucidation of Two New Glycosides from Sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 48, 235–238.
- Wang, M., Shao, Y., Huang, T C., Wei, G J., Ho, C T. 1998. Isolation and Structural Elucidation of Aroma Constituents Bound as Glycosides from Sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric.Food Chem.*, 46, 2509–2511.
- Wang, M., Shao, Y., Li, J., Zhu, N., Rangarajan, M., LaVoie, E J., Ho, C T. 1999. Antioxidative Phenolic Glycosides from Sage (*Salvia officinalis*). *J. Nat. Prod.*, 62, 454–456.
- Wang, N., Luo, H., Niwa, M., Ji, J. 1989. A New Platelet Aggregation Inhibitor from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.*, 55, 390–391.
- Wang, N., Niwa, M., Luo, H W. 1988. Triterpenoids from *Salvia przewalskii*. *Phytochemistry*, 27, 299–301.
- Wang, T., Zhang, X., Xie, W. 2012. *Cistanche deserticola* Y. C. Ma, desertginseng: areview, *Am. J. Chin. Med.*, 40, 1123–1141.

- Wang, X Y., Qi, Y. 2009. *Cistanche* polysaccharide promoting lymphocyte proliferation. *Acta. Lab. Anim. Sci. Sin.*, 17,425–427.
- Wang, Y., Li, Z., Zhang, H., Sha, Y., Pei, Y., Hua, H. 2008. New germacranese sesquiterpenes from *Salvia chinensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 56, 843–846.
- Wang, Y., Song, D., Li, Z., Yuan, T., Zhang, H., Pei, Y., Jing, Y., Hua, H. 2009. Triterpenoids isolated from the aerial parts of *Salvia chinensis*. *Phytochemistry Lett.*, 2, 81–84.
- Watt, J M., Breyer-Brandwijk, M G. 1962. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. Livingstone, London.
- Willfor, S.M., Smeds, A.I., Holmbom, B.R., 2006. Chromatographic analysis of lignans. *J. Chromatogr. A.*, 1112, 64–77.
- Wu, W Y., Wang, Y P. 2012. Pharmacological actions and therapeutic applications of *Salvia miltiorrhiza* depside salt and its active components. *Acta Pharmacologica Sinica.*, 33, 1119–1130.
- Wu, Y B, Ni, Z Y., Shi, Q W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y C., Cong, B. 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem Rev.*, 112, 5967–6026.
- Wu, Y., Li, L., Wen, T. 2007. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology*, 232, 50–56.
- Wu, X M., Gao, X M., Tsim, K W., Tu, P F. 2005. An arabinogalactan isolated from the stems of *Cistanche deserticola* induces the proliferation of cultured lymphocytes. *Int. J. Biol. Macromol.*, 37, 278–282.
- Wu, Z., Ouyang, M., Yang, C. 1999a. Polyphenolic constituents of *Salvia sonchifolia*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu.*, 21, 393–398. (Chemical Abstracts 132, 205422e).
- Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T. 1996. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1580–1585.
- Xie, H H., Morikawa, T., Matsuda, H S S., Nakamura, S K., Muraoka, O S., Yoshikawa, M S. 2006. Monoterpene Constituents from *Cistanche tubulosa*—Chemical Structures of Kankanosides A—E and Kankanol—. *Chem. Pharm. Bull.*, 54, 669–675.
- Xu, G.; Peng, L. Y.; Li, X. L.; Zhao, Y.; Tu, L.; Zhao, Q. S.; Sun, H. D.; Lu, Y.; Mao, L.; Zheng, Q. T. 2005. New Sesquiterpenoids from *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa*. *Helv. Chim. Acta.*, 88, 2370–2374.
- Xu, G.; Peng, L. Y.; Hou, A. J.; Yang, J.; Han, Q. B.; Xu, H. X.; Zhao, Q. S. 2008. Isolation, structural elucidation, and chemical transformation of interconvertible 8,12-hemiketal germacranolide sesquiterpenoids from *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* *Stib. Tetrahedron*, 64, 9490–9494.
- Xu, G.; Peng, L. Y.; Zhao, Y.; Li, X. L.; Tu, L.; Zhao, Q. S.; Sun, H. D. 2005. Two new icetexane diterpenoids from *Salvia przewalskii*. *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 1575–1576.
- Yamamoto, H., Katano, N., Ooi, A., Inouye, K. 1999. Transformation of loganin and 7-deoxyloganin into secologanin by *Lonicera japonica* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 50, 417–422,
- Yang, Z Y., Lu, D Y., Yao, S., Zhang, R R., Jiang, Z J., Ma, Z G. 2013. Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis of *Cistanche deserticola* by HPLC-DAD-ESI-MS. *J. of Food and Drug Analysis.*, 21, 50–57.

- Yang, J H., Du, N S., Kasimu, R. 2005. Phenylethanoid Glycosides from Cultivated *Cistanche salsa*. *Chin. Pharm. J.*, 14, 242.
- Yang, J H., Hu, J P., Du, N S. 2009. Structure-activity relationships of phenylethanoid Glycosides in plants of *Cistanche salsa* on antioxidative activity. *J. Chin. Med. Mater.*, 32, 1067–1069.
- Yook, C S., Liu, X Q., Chang, S Y., Park, S Y., Nohara, T. 2002. Lupane-triterpene glycosides from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus*. *Chem. Pharm. Bull.*, 50, 1383–1385.
- Yongmoon, H., Lnkjung, J. 2013. Antifungal effect of tanshinone from *Salvia miltiorrhiza* against disseminated candidiasis. *Yakhak Hoeji*, 57, 119–124.
- Yoshizawa, F., Deyama, T., Takizawa, N. 1990. The Constituents of *Cistanche tubulosa* (SCHRENK) HOOK. f. II: Isolation and Structures of a New Phenylethanoid Glycoside and a New Neolignan Glycoside. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1927–1930.
- Yu, P Z., Hu, C Q., Meehan, E J. 2007. X-Ray Crystal Structure and Antioxidant Activity of Salidroside, a Phenylethanoid Glycoside. *Chem. Biodivers.*, 4, 508–513.
- Zahid, M., Saeed, M., Asim, M., Ishrud, O., Wu, S., Ahmad, V U., Pan, Y. 2003. New glycosides from *Salvia moorcroftiana* (Lamiaceae). *Helv. Chim. Acta.*, 86, 2021–2027.
- Zahid, M.; Ishrud, O.; Pan, Y.; Asim, M.; Riaz, M.; Uddin Ahmad, V. 2002. Flavonoid glycosides from *Salvia moorcroftiana* Wall. *Carbohydr. Res.*, 337, 403–407.
- Zamudio, S., Bedolla-García, Y B. 2013. Discovery of *Salvia buchananii* (Lamiaceae) in the wild in Querétaro, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 530–535.
- Zeng, Q L., Mao, J H., Lv, Z L. 1998. Purification of *Cistanche* polysaccharides and its regulation of T cell function research. *J. Zhejiang. Med. Univ.*, 27, 108–111.
- Zeng, Q L., Zheng, Y F., Lv, Z L. 2002. *Cistanche* polysaccharide immune activity and mechanism of action. *J. Zhejiang. Univ. (Med Sci)*, 31, 284–287.
- Zhao, L M., Liang, X T., Li, L N. 1996. Prionitisides A and B, two phenolic glycosides from *Salvia prionitis*. *Phytochemistry*, 42, 899–901.
- Zhang, C Z., Xu, X Z., Li, C. 1996. Fructosides from *Cynomorium songaricum*. *Phytochemistry*, 41, 975–976.
- Zhang, H J., Li, L N. 1994. Salvianolic Acid I : A New Depside from *Salvia cavaleriei*. *Planta Med.*, 60, 70–72.
- Zhang, P., Gao, Z P., Gao, Y J., Xiao, L., Chen, R Y., Kang, J. 2016. Chemical Constituents of *Salvia grandifolia*. *Chinese*, 39, 78-81.
- Zhang, Y., Akao, T., Nakamura, N., Duan, C L., Hattori, M., Yang, X W., Liu, J X. 2004. Extremely Low Bioavailability of Magnesium Lithospermate B, An Active Component from *Salvia miltiorrhiza*, in Rat. *Planta Med.*, 70, 138–142.
- Zhang, Z F., Chen, H S., Peng, Z G., Li, Z R., Jiang, J D. 2008. A potent anti-HIV polyphenol from *Salvia yunnanensis*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 10, 252–255.
- Zhang, Z F., Peng, Z G., Gao, L., Dong, B., Li, J R., Li, Z Y., Chen, H S. 2008. Three new derivatives of anti-HIV-1 polyphenols isolated from *Salvia yunnanensis*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 10, 391–396.

Référence web

- [1]<http://footage.framepool.com/en/shot/870218316-cistanche-desert-plant-algeria-sahara> Vu le 08-05-2019
- [2]<https://www.ville-ge.ch/cjb/flore/html/QSv2-ALL3.htm#Anarrhinum> Vu le 15/05/2019.
- [3]https://science.mnhn.fr/institution/mnhn/collection/p/item/p03882657?lang=fr_FR Vu le 15/05/2019.

Annexes

Caractéristiques des composés isolés

1. Composés isolés à partir des racines de *S. buchananii* (SBR)

SBR₁ : 2,3-*seco*-2,3-epoxy-2-hydroxylup-20(29)-en-28-oic acide (Salvibuchanic acid)
(Nouveau)

Formule brute : C₃₀H₄₈O₄

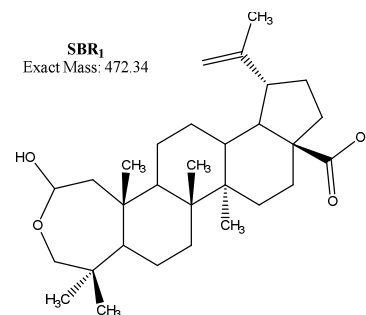
Pouvoir rotatoire : [α]_D +17 (c 0.1, MeOH)

HR-ESI-MS : *m/z* 495.3442 [M+Na]⁺ (calc495.3450),
477.34 [M+Na-18]⁺,

ESI-MS : *m/z* 517 [M+HCOO]⁻, 499 [M+HCOO-18]⁺,
473 [M+HCOO-44]⁻

Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (600 MHz)

(Tableau III-1, page 145)



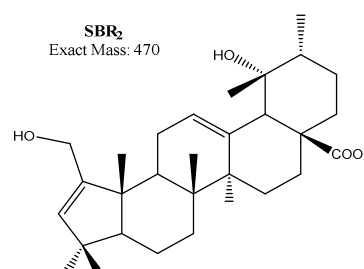
SBR₂ : Heptadienic acid

Formule brute : C₃₀H₄₆O₄

ESI-MS : *m/z* 469.25 [M-H]⁻, 451.21 [M-H-18]⁻,
407.22 [M-H-18-44]⁻

Spectre de RMN : ¹H (600 MHz), ¹³C (600 MHz)

(Tableau III-1, page 145)



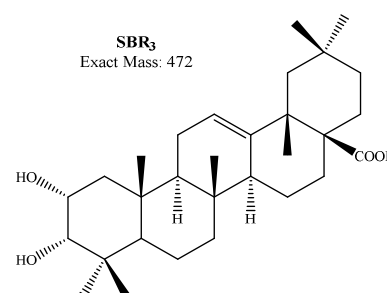
SBR₃ : Maslinic acid

Formule brute : C₃₀H₄₈O₄

ESI-MS : *m/z* 471.38 [M-H]⁻ (mode négatif)

Spectre de RMN : ¹H (600 MHz)

(Tableau III-1, page 145)



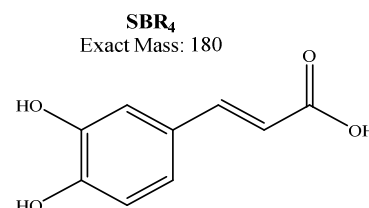
SBR₄ : Caffeic acid

Formule brute : C₉H₈O₄

ESI-MS : *m/z* 179 [M-H]⁻

Spectre de RMN : ¹H (250 MHz)

(Tableau III-2, page 146)



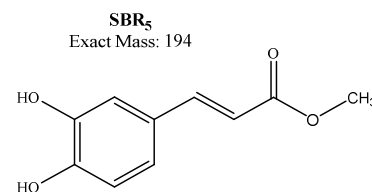
SBR₅ : Caffeicmethylene ester acid

Formule brute : C₁₀H₁₀O₄

ESI-MS : m/z 193 [M-H]⁻

Spectre de RMN : ¹H (600 MHz)

(Tableau III-2, page 146)



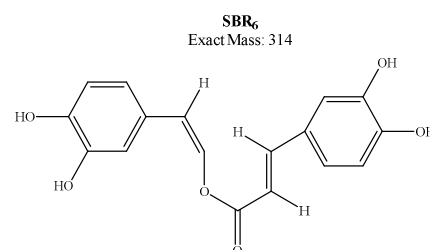
SBR₆ : (Z,E)-2-(3,4)-dihydroxyphenyl)-ethylenyl-ester
(Nepetidine B)

Formule brute : C₁₇H₁₄O₆

ESI-MS : m/z 313.76 [M-H]⁻, 269 [M-H-44]⁻

Spectre de RMN : ¹H (600 MHz) ¹³C (250 MHz)

(Tableau III-2, page 146)



2. Composés isolés à partir des parties aériennes de *C. phelypaea* (CT)

CT₁: 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acethyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside (**Nouveau**)

Formule brute : C₂₈H₄₂O₁₆

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{25}$ -58.5 (c 0.1, MeOH)

UV : MeOH λ_{\max} nm (log ϵ) 223 (4.20), 280 (3.50), 321 (3.06).

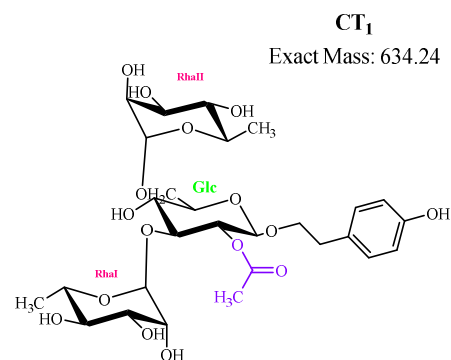
HR-ESI-MS : m/z 657.2353 [M+Na]⁺ (calc. 657.2371),

m/z 597.2145 [M+Na-60]⁺, 511.1772 [M+Na-146]⁺,

365.1203 [M+Na-146-146]⁺

Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (600 MHz)

(Tableau III-4, page 195-196)

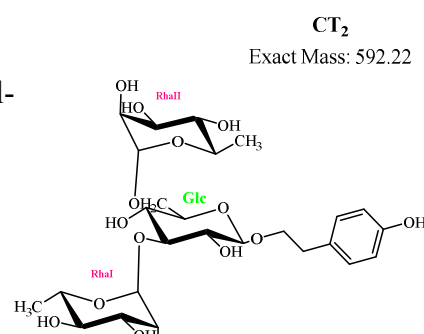


CT₂ : 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside (**Nouveau**)

Formule brute : C₂₆H₄₀O₁₅

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{25}$ -70 (c 0.1, MeOH)

UV : MeOH λ_{\max} nm (log ϵ) 222 (4.09), 280 (3.55),



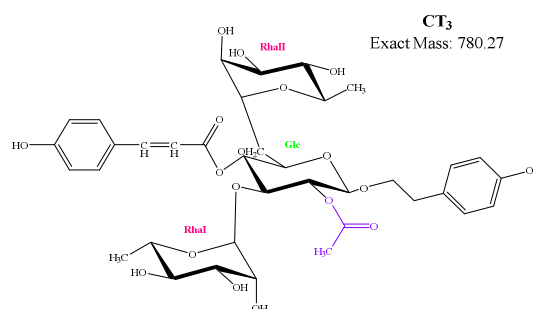
315 (3.10)

HR-ESI-MS : m/z 615.2232 $[M+Na]^+$ (calc. 615.2265), m/z 444.91 $[M-H-146]^-$, 426.00 $[M-H-H_2O]^-$ **Spectre de RMN** : 1H et ^{13}C (600 MHz)

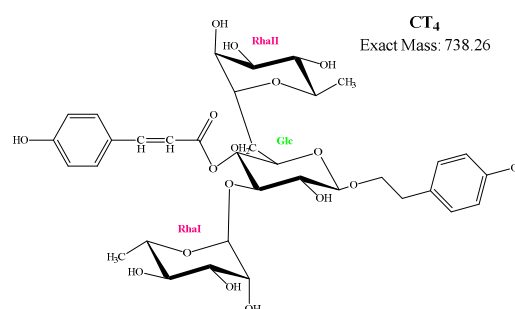
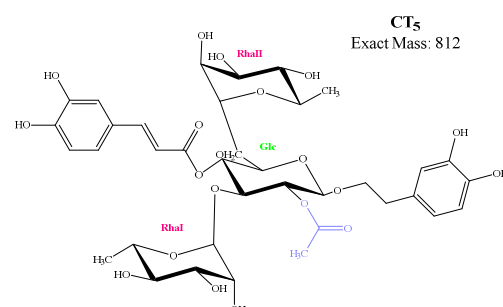
(Tableau III-4, page 195-196)

CT₃ : 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-(*trans* et *cis*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside(**Nouveau**)**Formule brute** : $C_{37}H_{48}O_{18}$ **Pouvoir rotatoire** : $[\alpha]_D^{25} -96$ (c 0.1, MeOH)**UV** : MeOH λ_{max} nm (log ϵ) 225 (4.26), 316 (3.87)**HR-ESI-MS** : m/z 803.2715 $[M+Na]^+$ (calc. 803.2738), m/z 743.12 $[M+Na-60]^+$, 657.11 $[M+Na-146]^+$,511.03 $[M+Na-146-146]^+$ **Spectre de RMN** : 1H et ^{13}C (600 MHz)

(Tableau III-4, page 195-196)

**CT₄** : 1- β -*p*-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-(*trans* et *cis*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (**Nouveau**)**Formule brute** : $C_{37}H_{46}O_{17}$ **Pouvoir rotatoire** : $[\alpha]_D^{25} = -85.5$, (c 0.1, MeOH)**UV** : MeOH λ_{max} nm (log ϵ) 224 (4.30), 315 (3.85)**HR-ESI-MS** : m/z 761.2604 $[M+Na]^+$ (calc. 761.2633),615.2008 $[M+Na-146]^+$, 469.1443 $[M+Na-146-146]^+$ **Spectre de RMN** : 1H et ^{13}C (600 MHz)

(Tableau III-4, page 195-196)

**CT₅** : β -3,4-dihydroxyphenyl-ethyl-2-*O*-acetyl-3,6-*O*-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-*O*-caffeoyl- β -D-glucopyranoside (Brandioside)**Formule brute** : $C_{37}H_{48}O_{20}$ **ESI-MS** : m/z 811.18 $[M-H]^-$, 649 $[M-H-162]^-$,607 $[M-H-146]^-$ **Spectre de RMN** : 1H et ^{13}C (250 MHz)

(Tableau III-5, page 197-198)

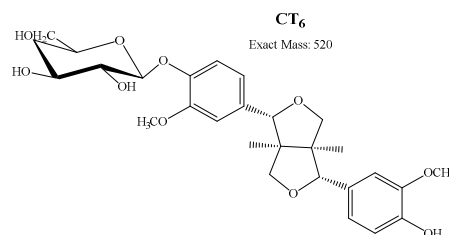
CT₆ : Pinoresinol 4-*O*-β-D-glucopyranoside

Formule brute : C₂₆H₃₂O₁₁

ESI-MS : *m/z* 518.89 [M-H]⁻, 356.80 [M-H-162]⁻

Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (250 MHz)

(Tableau III-5, page 197-198)



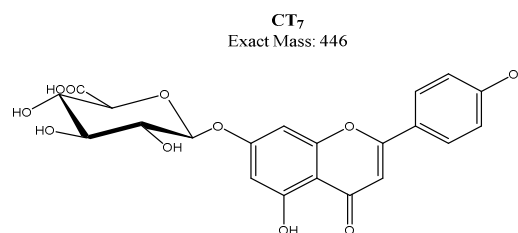
CT₇ : Apigénine 7-*O*-β-D-glucuronopyranoside

Formule brute : C₂₁H₁₈O₁₁

ESI-MS : *m/z* 4454.88 [M-H]⁻, 269.05 [M-H-176]⁻

Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (250 MHz)

(Tableau III-5, page 197-198)



3. Composés isolés à partir des parties aériennes d'*A. pedatum* (APD)

APD₁ : Antirrinoside

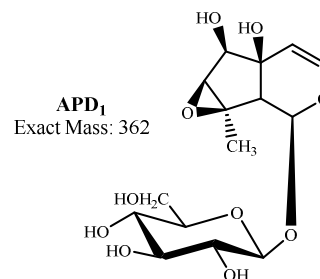
Formule brute : C₁₅H₂₂O₁₀

ESI-MS : *m/z* 382[M+Na]⁺, 367 [M+Na-18]⁺,

285 [M+Na-18-162]⁺

Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (250 MHz)

(Tableau III-7, page 323)



APD₂ : 6-*O*-foliamenthoylmacfadienoside (**Nouveau**)

Formule brute : C₂₅H₃₆O₁₃

Pouvoir rotatoire : [α]_D²⁵ +25 (c 0.1, MeOH)

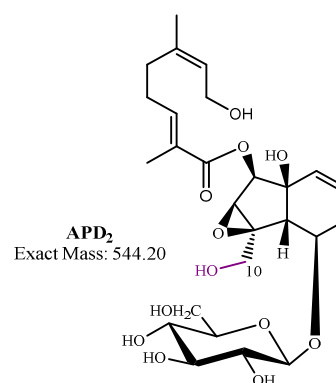
HR-ESI-MS : *m/z* 567.2023 [M+Na]⁺ (calc. 567.2054),

549.1922 [M+Na-18]⁺, 405.1504 [M+Na-162]⁺,

387.1401 [M+Na-162-18]⁺, 383.0937 [M+Na-184]⁺

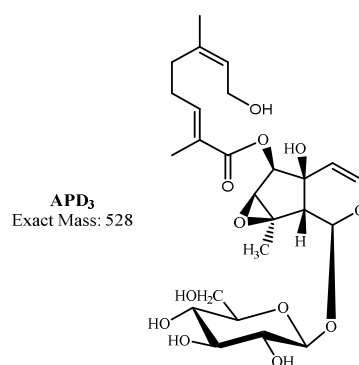
Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (500 MHz)

(Tableau III-7, page 323)

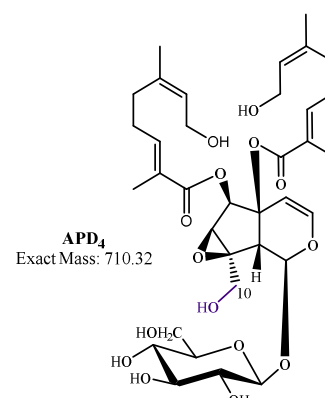


APD₃ : 6-*O*-nerol-8-oyl-antirrinoside**Formule brute :** C₂₅H₃₆O₁₂**ESI-MS :** *m/z* 551 [M+Na]⁺, 389 [M+Na-162]⁺,371 [M+Na-162-18]⁺, 527 [M-H]⁻**Spectre de RMN :** ¹H et ¹³C (250 MHz)

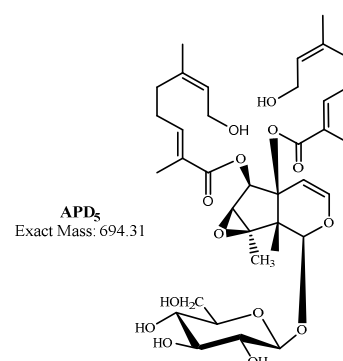
(Tableau III-7, page 323)

**APD₄ : 5,6-*O*-difoliamenthoylmacfadienoside (Nouveau)****Formule brute :** C₃₅H₅₀O₁₅**Pouvoir rotatoire :** [α]_D²⁵ +41 (c 0.1, MeOH)**HR-ESI-MS :** *m/z* 711.3229 [M+H]⁺ (calc. 711.3228),**ESI-MS :** *m/z* 709 [M-H]⁻, 733 [M+Na]⁺**Spectre de RMN :** ¹H et ¹³C (600 MHz)

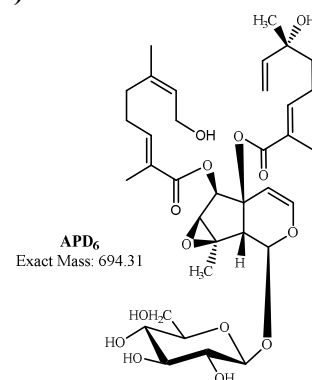
(Tableau III-8, page 324)

**APD₅ : 5,6-*O*-difoliamenthoylantirrinoside (Nouveau)****Formule brute :** C₃₅H₅₀O₁₄**Pouvoir rotatoire :** [α]_D²⁵ -70 (c 0.1, MeOH)**HR-ESI-MS :** *m/z* 717.3090 [M+Na]⁺, 695.3278 [M+H]⁺,(calc. 717.3098), **ESI-MS :** 699 [M+Na-18]⁺,551 [M+Na-166]⁺**Spectre de RMN :** ¹H et ¹³C (600 MHz)

(Tableau III-8, page 324)

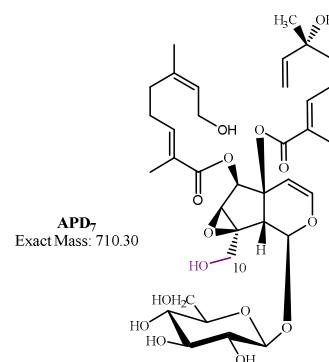
**APD₆ : 5-*O*-menthiafoloyl-6-*O*-foliamenthoylantirrinoside (Nouveau)****Formule brute :** C₃₅H₅₀O₁₄**Pouvoir rotatoire :** [α]_D²⁵ -45 (c 0.1, MeOH)**HR-ESI-MS :** *m/z* 717.3083 [M+Na]⁺ (calc. 717.3098),551.2084 [M+Na-166]⁺, 533.1976 [M+Na-184]⁺,349.0883 [M+Na-184-184]⁺**Spectre de RMN :** ¹H et ¹³C (500 MHz)

(Tableau III-8, page 324)

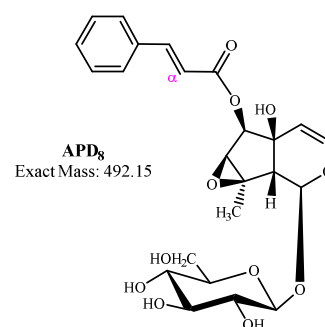


APD₇ : 5-*O*-menthiafoloyl-6-*O*-foliamenthoylmacfadienoside (Nouveau)**Formule brute :** C₃₅H₅₀O₁₅**Pouvoir rotatoire :** $[\alpha]_D^{25} +70$ (c 0.1, MeOH)**HR-ESI-MS :** m/z 733.3040 [M+Na]⁺ (calc. 733.3047),
549.1961 [M+Na-184]⁺,**Spectre de RMN :** ¹H et ¹³C (500 MHz)

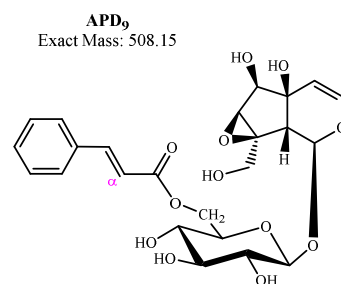
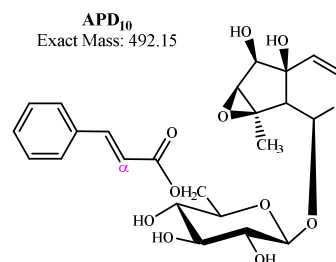
(Tableau III-8, page 324)

**APD₈ : 6-*O*-*trans*-cinnamoylantirrinoside (Nouveau)****Formule brute :** C₂₄H₂₈O₁₁**Pouvoir rotatoire :** $[\alpha]_D^{25} -120$ (c 0.1, MeOH)**HR-ESI-MS :** m/z 515.1500 [M+Na]⁺ (calc. 515.1529),
497.1386 [M+Na-18]⁺, 353.0975 [M+Na-162]⁺,**Spectre de RMN :** ¹H (500 MHz), ¹³C (125 MHz)

(Tableau III-9, page 325)

**APD₉ : 6'-*O*-*trans*-cinnamoylmacfadienoside (Nouveau)****Formule brute :** C₂₄H₂₈O₁₂**Pouvoir rotatoire :** $[\alpha]_D^{25} -66$ (c 0.1, MeOH)**HR-ESI-MS :** m/z 531.1469 [M+Na]⁺ (calc. 531.1478),
513.1355 [M+Na-18]⁺, 401.1205 [M+Na-130]⁺,**ESI-MS :** m/z 531 [M+Na]⁺, 513 [M+Na-18]⁺, 507 [M-H]⁻,
489 [M-H-18]⁻**Spectre de RMN :** ¹H et ¹³C (600 MHz)

(Tableau III-9, page 325)

**APD₁₀ : 6'-*O*-cinnamoylantirrinoside****Formule brute :** C₂₄H₂₈O₁₁**ESI-MS :** m/z 531 [M+Na]⁺, 513 [M+Na-18]⁺,**HR-ESI-MS :** m/z 515.1469 [M+Na]⁺ (calc. 515.1501),
497.1391 [M+Na-18]⁺, 351.1389 [M+Na-18-146]⁺

Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (250 MHz)

(Tableau III-9, page 325)

APD₁₁ : 6-*O-trans* et *cis-p*-coumaroylantirrinoside

Formule brute : $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$

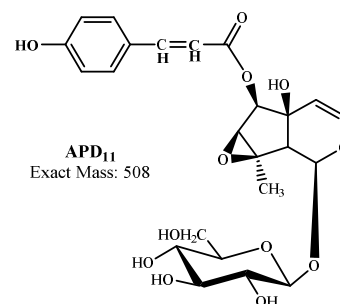
ESI-MS : m/z 531 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 513 $[\text{M}+\text{Na}-18]^+$,

385 $[\text{M}+\text{Na}-18-146]^+$, 369 $[\text{M}+\text{Na}-18-162]^+$,

507 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 345 $[\text{M}-\text{H}-162]^-$

Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (250 MHz)

(Tableau III-9, page 325)



APD₁₂ : Agnucastoside A

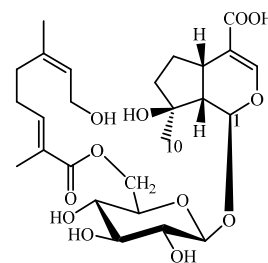
Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_{12}$

ESI-MS : m/z 565 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (250 MHz)

(Tableau III-10, page 326-327)

APD₁₂
Exact Mass: 542



APD₁₃ : Agnucastoside A 11-(5-*O-β*-D-fructopyranosyl) ester (**Nouveau**)

Formule brute : $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_{17}$

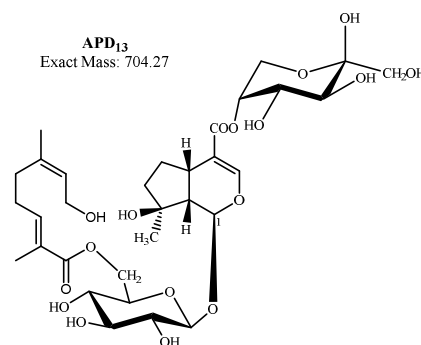
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{25} -168$ (c 0.1, MeOH)

HR-ESI-MS : m/z 727.2787 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. 727.2789),

709.2658 $[\text{M}+\text{Na}-18]^+$, 547.2139 $[\text{M}+\text{Na}-18-162]^+$

Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (600 MHz)

(Tableau III-10, page 326-327)



APD₁₄ : 6'-*O*-menthiafoloylmussaenosidic acid-11-(5-*O-β*-D-fructopyranosyl) ester (**Nouveau**)

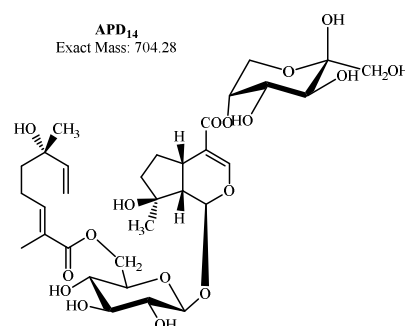
Formule brute : $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_{17}$

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{25} -70$ (c 0.1, MeOH)

HR-ESI-MS : m/z 727.2764 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. 727.2789),

565.2240 $[\text{M}+\text{Na}-162]^+$, **ESI-MS :** m/z 727 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,

565 $[\text{M}+\text{Na}-162]^+$, 703 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 541 $[\text{M}-\text{H}-162]^-$



Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (500 MHz)

(Tableau III-10, page 326-327)

APD₁₅ : 6'-*O*-(trans et cis-*p*-coumaroyl) mussaenosidicacid-11-(5-*O*- β -D-fructopyranosyl) ester (**Nouveau**)

Formule brute : $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{25} -115$ (c 0.1, MeOH)

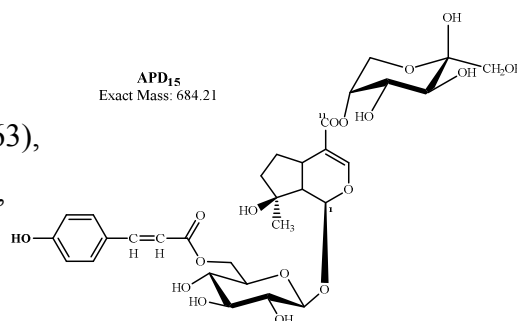
HR-ESI-MS : m/z 707.2156 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. 707.2163),

689.2048 $[\text{M}+\text{Na}-18]^+$, 527.1515 $[\text{M}+\text{Na}-18-162]^+$,

381.1153 $[\text{M}+\text{Na}-18-162-146]^+$

Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (600 MHz)

(Tableau III-10, page 326-327)



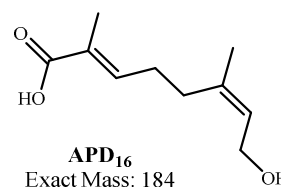
APD₁₆ : Foliamenthic acid

Formule brute : $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3$

ESI-MS : m/z 207 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (250 MHz)

(Tableau III-11, page 328)



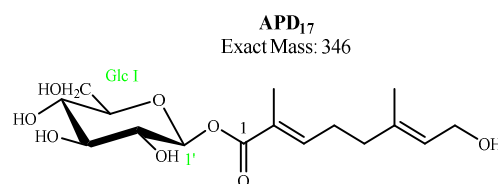
APD₁₇ : Glucosyl 8-hydroxy-2,6-dimethyl-(2*E*,6*E*)-octadienoate

Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_8$

ESI-MS : m/z 369 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 207 $[\text{M}+\text{Na}-162]^+$,

Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (250 MHz)

(Tableau III-11, page 328)



APD₁₈ : 6-*O*-foliamenthoyl- α,β -D-glucopyranose (**Nouveau**)

Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_8$

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{25} +61$ (c 0.1, MeOH)

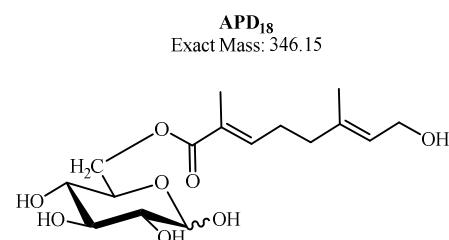
HR-ESI-MS : m/z 369.1594 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calc. 369.1525),

207.0869 $[\text{M}+\text{Na}-162]^+$, **ESI-MS :** m/z 369 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,

351 $[\text{M}+\text{Na}-18]^+$, 207 $[\text{M}+\text{Na}-162]^+$

Spectre de RMN : ^1H et ^{13}C (500 MHz)

(Tableau III-11, page 328)



APD₁₉ : Foliamenthoicacid 1-*O*- β -D-glucopyranosylester
8-*O*- β -D-glucopyranoside (**Nouveau**)

Formule brute : C₂₂H₃₆O₁₃

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D^{25} +34$ (c 0.1, MeOH)

HR-ESI-MS : m/z 531.2021 [M+Na]⁺ (calc. 531.2054),

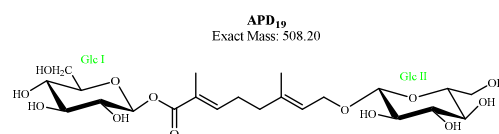
369.1502 [M+Na-162]⁺, **ESI-MS** : m/z 531 [M+Na]⁺,

369 [M+Na-162]⁺, 207 [M+Na-162-162]⁺, 507 [M-H]⁻,

345 [M-H-162]⁻, 183 [M-H-162-162]⁻

Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (500 MHz)

(Tableau III-12, page 329)



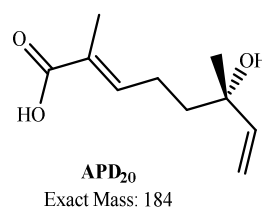
APD₂₀ : (*S*)-menthiafolic acid

Formule brute : C₁₀H₁₆O₃

HR-ESI-MS : m/z 207.0987 [M+Na]⁺ (calc. 207.0987),

Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (250 MHz)

(Tableau III-12, page 329)



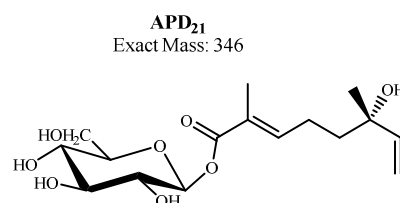
APD₂₁ : (6*S*)-2*E*-2,6-dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic
acid β -glucopyranosyl ester

Formule brute : C₁₆H₂₆O₈

ESI-MS : m/z 369 [M+Na]⁺, 207 [M+Na-162]⁺,

Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (250 MHz)

(Tableau III-12, page 329)



APD₂₂ : Salidroside

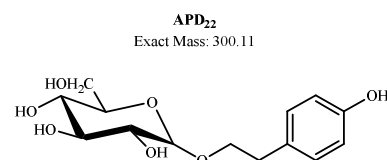
Formule brute : C₁₄H₂₀O₇

HR-ESI-MS : m/z 323.1091 [M+Na]⁺ (calc. 323.1091),

305.0858 [M+Na-18]⁺

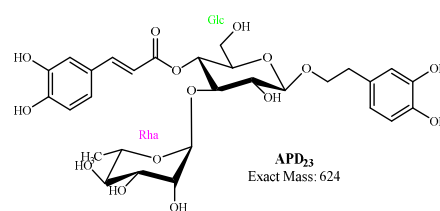
Spectre de RMN : ¹H et ¹³C (250 MHz)

(Tableau III-13, page 330)

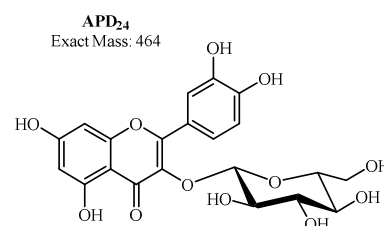


APD₂₃ : Verbascoside**Formule brute** : C₂₉H₃₆O₁₅**ESI-MS** : m/z 623.39 [M-H]⁻, m/z 461.00 [M-H-162]⁻, m/z 315.82 [M-H-162-146]⁻**Spectre de RMN** : ¹H (250 MHz)

(Tableau III-13, page 330)

**APD₂₄** : Quercetine 3-*O*-β-D-glucopyranoside**Formule brute** : C₂₁H₂₀O₁₂**ESI-MS** : m/z 463.11 [M-H]⁻, m/z 301.00 [M-H-162]⁻**Spectre de RMN** : ¹H et ¹³C (250 MHz)

(Tableau III-13, page 330)





Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters


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


Cytotoxic triterpenes from *Salvia buchananii* roots

Khadidja Aya Beladjila, Roberta Cotugno, Djemaa Berrehal, Zahia Kabouche, Nunziatina De Tommasi, Alessandra Braca & Marinella De Leo



To cite this article: Khadidja Aya Beladjila, Roberta Cotugno, Djemaa Berrehal, Zahia Kabouche, Nunziatina De Tommasi, Alessandra Braca & Marinella De Leo (2017): Cytotoxic triterpenes from *Salvia buchananii* roots, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2017.1365072](https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1365072)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1365072>

 View supplementary material 

 Published online: 20 Aug 2017.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 



Cytotoxic triterpenes from *SALVIA BUCHANANII* roots

Khadidja Aya Beladjila^{af}, Roberta Cotugno^{bt}, Djemaa Berrehal^a, Zahia Kabouche^a, Nunziatina De Tommasi^b, Alessandra Braca^c and Marinella De Leo^c

^aLaboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Département de Chimie, Université des Frères Mentouri-Constantine, Constantine, Algeria; ^bDipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Pisa, Italy; ^cDipartimento di Farmacia, Università di Salerno, Fisciano, Italy

ABSTRACT

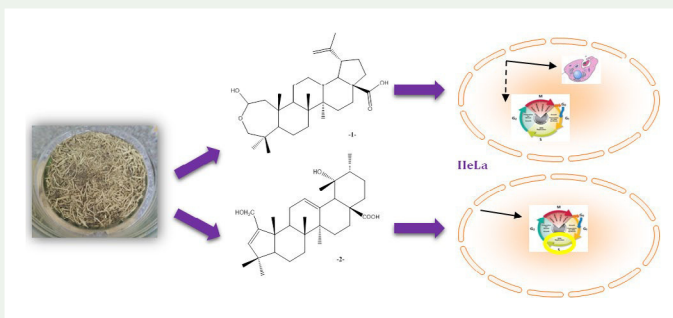
A pentacyclic triterpene, named salvibuchanic acid (**1**), together with five known compounds, were isolated from the roots of *Salvia buchananii* Hedge (Lamiaceae). The structural characterisation of all compounds was performed by spectroscopic analyses, including 1D and 2D NMR and HRESIMS experiments. The lupane triterpene (**1**) and hyptadienic acid (**2**) were investigated for their potential cytotoxic activity on Jurkat, HeLa and MCF7 cell lines. Both compounds showed an interesting antiproliferative activity with similar potency in all cell lines. By means of flow cytometric studies, hyptadienic acid (**2**) induced in HeLa cells a S cell cycle block, while **1** elicited both cytostatic and cytotoxic responses.

ARTICLE HISTORY

Received 7 June 2017
Accepted 31 July 2017

KEYWORDS

SALVIA BUCHANANII;
pentacyclic triterpenes;
salvibuchanic acid; phenolic
derivatives; cytotoxic activity




1. Introduction

Salvia is an important genus of the Lamiaceae family (formerly Labiatae). Over 900 species are widely distributed in different regions around the world, such as the Mediterranean area, Central Asia, Africa, America. Secondary metabolites produced by *Salvia* plants include monoterpenoids, diterpenoids, having mainly an abietane or clerodane skeleton, sesquiterpenoids, triterpenoids, flavonoids and polyphenols (Wu et al. 2012). Aerial parts and roots of *Salvia* genus have been used in traditional medicine for 1000 years in the treatment of different diseases. Diterpenoids and phenolic derivatives isolated from different species

CONTACT Alessandra Braca  alessandra.braca@unipi.it

[†]These authors contributed equally to the work.

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1365072>.

showed antioxidant, anticoagulant, cytoprotective, antihypertensive, anti-brotic, anti-ischaemia-reperfusion injury, antiviral and antitumour activities (Li et al. 2013).

Salvia buchananii Hedge is a herbaceous perennial shrub, up to 50 cm high, with purple flowers and ovate-lanceolate to spatulate leaves. In a previous chemical study of *S. buchananii* aerial parts clerodane diterpenes, ursolic and oleanolic acids were isolated from the surface dichloromethane extract (Bisio et al. 2015). Moreover, the dichloromethane extract of *S. buchananii* fresh aerial parts was also investigated for its antioxidant (Giamperi et al. 2012) and antibacterial activities (Bisio et al. 2015). In the course of our investigation on Algerian *Salvia* species (Kabouche and Kabouche 2008; Lakhal et al. 2014), herein, we report the isolation and the structure characterisation of one triterpene, named salvibuchanic acid (**1**) from *S. buchananii* roots (Figure 1), along with other well known natural compounds. Besides, salvibuchanic acid (**1**) and hyptadienic acid (**2**) have been evaluated for their cytotoxic activities in Jurkat, HeLa and MCF7 cancer cell lines. Both compounds showed an interesting antiproliferative activity with similar potency in all cell lines. Further studies revealed that **2** induced in HeLa cells a S cell cycle block, while **1** elicited both cytostatic and cytotoxic responses.

2. Results and discussion

Chloroform and chloroform-methanol extracts of *S. buchananii* roots, were fractionated by flash column chromatography followed by RP-HPLC, leading to the isolation of one lupane triterpene (**1**) and well known compounds, namely hyptadienic acid (**2**) (Rao et al. 1990; Wang et al. 2009), maslinic acid (Savona et al. 1983), caeleic acid methyl ester, caeleic acid (Saleem et al. 2004) and nepetoidin B (Nakanishi et al. 1990). The structures of all compounds were determined by combination of NMR and MS analyses and comparison of data with those reported in the literature.

Compound **1** was isolated as a white powder. The molecular formula was established to be $C_{30}H_{48}O_4$ by ^{13}C NMR and HRESIMS analyses (m/z 495.3442 $[M + Na]^+$, Calcd 495.3450). The negative ESI-MS spectrum showed an adduct ion peak at m/z 517 $[M + HCOO]^-$, whereas in the MS^2 spectrum a prominent fragment at m/z 499 $[M + HCOO - 18]^-$ was observed, due to the loss of a water molecule. The neutral loss of CO_2 from the parent ion (m/z at 473 $[M + HCOO - 44]^-$) indicated the presence of one carboxyl moiety. The ^{13}C NMR spectrum of **1** (Table S1) exhibited 30 signals, which were assigned to one carbonyl group (δ 180.7),

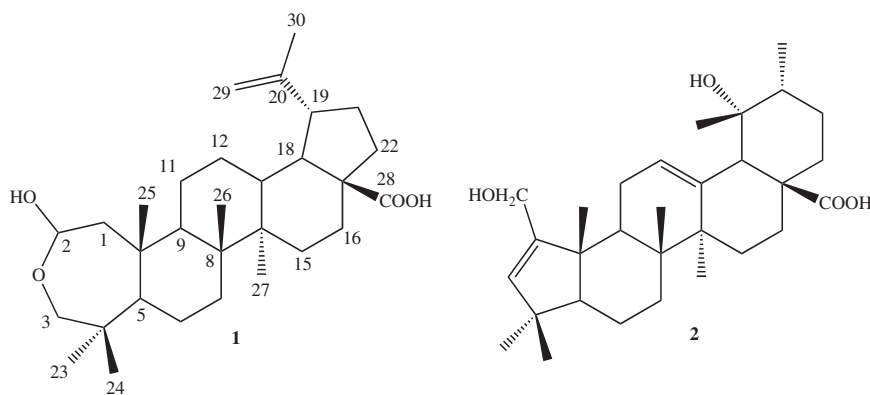


Figure 1. Structures of compounds **1** and **2**.

1,1-disubstituted double bond (δ 109.0 and 151.8), one hemiacetal group (δ 94.5) and one hydroxymethylene (δ 71.6). These evidences suggested the presence of a pentacyclic triterpene, belonging to the lupane series (Yook et al. 2002). The ^1H NMR spectrum of **1** (Table S1) confirmed the presence of a structure with six methyl groups (δ 0.83, 0.95, 1.03, 1.05, 1.07 and 1.72), two olefinic protons at δ 4.71 and 4.90 (each 1H, br s). Assignments of all ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts were ascertained on the basis of 1D total correlation spectroscopy (TOCSY), double-quantum filtered correlated spectroscopy (DQF-COSY) and heteronuclear single quantum coherence (HSQC) analyses. The 1D-TOCSY experiments suggested the sequences: C-1–C-2, C-5–C-7, C-9–C-13, C-15–C-16 and C-18–C-22 confirming the presence of a pentacyclic system. A combination of HSQC and heteronuclear multiple bond coherence (HMBC) data led to establish the location of all substituents. The HMBC correlations between the proton signals at δ 1.72 (H-30) and the carbon resonances at δ 48.0 (C-19), 109.0 (C-29) and 151.8 (C-20); δ 4.71 (H-29b) and 4.90 (H-29a) and δ 48.0 (C-19) and 151.8 (C-20), confirmed the position of the C-20/C-29 double bond. The signal at δ 1.65 (H-18) correlated with carbon resonances at δ 48.0 (C-19), 57.4 (C-17), 151.8 (C-20) and 180.7 (C-28), while the proton signal at δ 1.46 (H-22b) showed long-range correlations between signals at δ 31.1 (C-21), 50.0 (C-18) and 57.4 (C-17), confirming the location of carboxylic group at C-17. The connectivities between the proton signal at δ 2.14 (H-1a) and the carbon resonances at δ 41.7 (C-10), 48.4 (C-9), 61.4 (C-5) and 94.5 (C-2) substantiated the presence of hemiacetal group at C-2. The location of the epoxy group at C-2/C-3 position was verified by HMBC correlations between signal at δ 3.90 (H-3a) and the resonances at δ 39.7 (C-4), 61.4 (C-5) and 94.5 (C-2) (Figure S1). This compound was previously reported in a Chinese patent and its stereochemistry at C-2 was reported as β (Gao et al. 2015). However, the presence of the hemiacetal function at C-2 leads to an α/β equilibrium. Compound **1** was therefore, identified as 2,3-*seco*-2,3-epoxy-2-hydroxylup-20(29)-en-28-oic acid and was named salvibuchanic acid.

In the frame of our project aimed to study the cytotoxic activity of plant terpenes, the antiproliferative activity of compounds **1** and **2** was evaluated in Jurkat, HeLa and MCF7 cancer cell lines. Cells were exposed to increased concentrations of **1** and **2** and cell viability was evaluated at 48 h by MTT assay. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values, obtained from dose-response curves, are shown in Table 1. Compounds **1** and **2** showed an interesting antiproliferative activity with similar potency in all cell lines. In particular, HeLa resulted slightly more susceptible than Jurkat and MCF7 cells. Cells were also treated to different concentrations of etoposide, as a positive control, and showed three different IC_{50} values (Table 1). Jurkat cells were the most sensitive to the action of etoposide, followed by HeLa cells, whereas the MCF7 cells were the most resistant. Furthermore, the cytotoxic potential of compounds **1** and **2** was evaluated in PBMC from healthy donors, chosen as the normal counterpart of leukaemia-derived Jurkat cell line. Compounds **1** and **2** did not cause any significant reduction of the number of freshly isolated non-proliferating PBMC, at least in

Table 1. IC_{50} (μM) values of compounds **1** and **2** against three cancer cell lines.^a

Compounds	Jurkat	HeLa	MCF7
1	38 \pm 0.9	40 \pm 2.1	70 \pm 3.1
2	30 \pm 13	25 \pm 1.5	55 \pm 2.3
Etoposide	2.5 \pm 0.8	4 \pm 1.1	12 \pm 2.2

^aMean values \pm SD from three experiments done in quadruplicate.

the range of cytotoxic doses in leukaemia cells. The mechanism(s) underlying their antiproliferative effect was further investigated in HeLa cells. To investigate whether compounds **1** and **2** reduced cells number by affecting cell cycle progression and/or by inducing cell death, HeLa cells were exposed for 48 h at concentrations close to their IC_{50} value, 30 and 50 μM for compound **1** and 15 and 35 μM for compound **2**, respectively; DNA content was evaluated by flow cytometry analysis of propidium iodide (PI) stained nuclei. As shown in Figure 2(A), compound **1** caused an increase of cell population in Sphase. Moreover, an increase of cells with sub G_0/G_1 DNA content was observed, thus indicating the onset of apoptotic events. Compound **2** induced a robust and dose-dependent Sblock without any significant increase of hypodiploid cells (Figure 2(B)).

In conclusion, salvibuchanic acid (**1**), a lupane triterpene having an unusual seven-membered lactol ring in the A-ring is reported. The cytotoxic activity of salvibuchanic acid (**1**) and hryptadienic acid (**2**) was evaluated: these triterpenes may be worthy of further research as potential anticancer drugs.

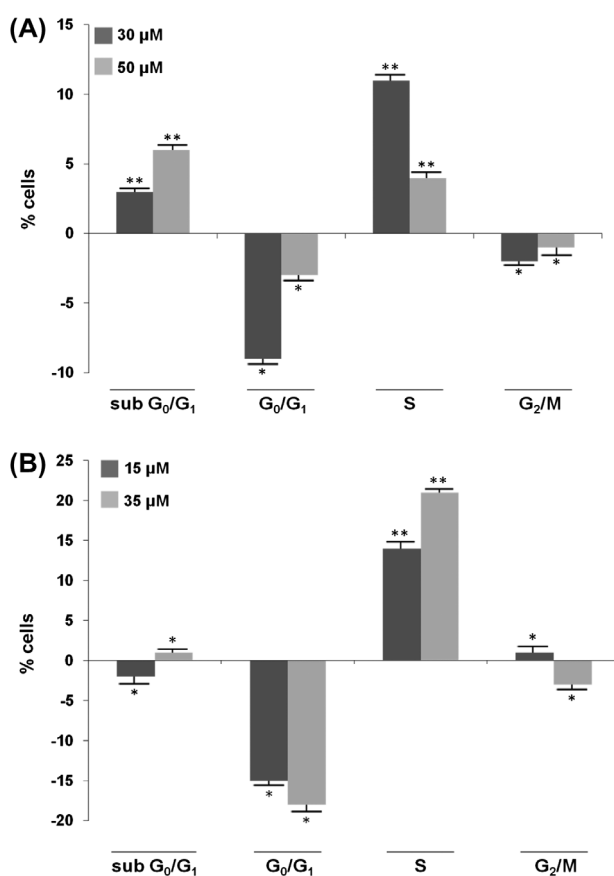


Figure 2. Effect of compounds **1** and **2** on proliferation of HeLa cells. Flow cytometric evaluation of DNA content in HeLa cells exposed for 48 h to **1** and **2** or vehicle alone (controls). (A) HeLa cells exposed to 30 and 50 μM compound **1**; (B) HeLa cells exposed to 15 and 35 μM compound **2**. Data are presented as increase/decrease in percentages of treated cells with a specific DNA content, in respect to control values (control cells, sub G_0/G_1 , $\leq 2\%$; G_0/G_1 , $53 \pm 1.8\%$; S, $37 \pm 2.1\%$; G_2/M , $12 \pm 0.9\%$). Notes: All results are mean values \pm SD from at least three experiments performed in duplicate (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

3. Experimental

Salvibuchanic acid (1). White powder [α]D = +17 (c 0.1, MeOH); HR-ESI-MS: m/z 495.3442 [M + Na]⁺ (Calcd for C₃₀H₄₈O₄Na, 495.3450), 477.34 [M + Na-18]⁺; ESI-MS: m/z 517 [M + HCOO]⁻, 499 [M + HCOO - 18]⁺, 473 [M + HCOO - 44]⁻; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 0.83 (3H, s, Me-23), 0.88 (1H, dd, J = 11.8, 6.0 Hz, H-5), 0.95 (3H, s, Me-24), 1.03 (3H, s, Me-27), 1.05 (3H, s, Me-25), 1.07 (3H, s, Me-26), 1.21 (1H, m, H-15b), 1.30 (1H, dd, J = 9.5, 4.2 Hz, H-9), 1.37 (1H, overlapped, H-1b), 1.38 (1H, overlapped, H-21b), 1.40 (1H, overlapped, H-16b), 1.44 (1H, overlapped, H-7b), 1.46 (1H, overlapped, H-22b), 1.54 (1H, overlapped, H-15a), 1.55 (1H, overlapped, H-6b), 1.57 (1H, overlapped, H-6a), 1.62 (1H, overlapped, H-12b), 1.64 (1H, overlapped, H-12a), 1.65 (1H, br d, J = 11.5 Hz, H-18), 1.72 (1H, s, Me-30), 1.93 (1H, m, H-22a), 1.98 (1H, overlapped, H-21a), 2.14 (1H, dd, J = 13.0, 1.5 Hz, H-1a), 2.28 (1H, m, H-7a), 2.42 (1H, dd, J = 11.4, 4.0 Hz, H-13), 3.04 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-3b), 3.09 (1H, ddd, J = 16.0, 11.5, 4.6 Hz, H-19), 3.90 (1H, d, J = 11.8 Hz, H-3a), 4.71 (1H, br s, H-29b), 4.90 (1H, br s, H-29a), 5.00 (1H, dd, J = 11.0, 5.5 Hz, H-2); ¹³C NMR (600 MHz, CD₃OD) δ : 14.6 (C-27), 15.0 (C-25), 17.0 (C-26), 19.1 (C-30), 20.7 (C-24), 22.0 (C-11), 23.0 (C-6), 26.8 (C-12), 27.6 (C-23), 30.5 (C-15), 31.0 (C-16), 31.1 (C-21), 33.1 (C-7), 38.0 (C-22), 39.6 (C-13), 39.7 (C-4 and C-8), 41.7 (C-10), 43.4 (C-14), 45.8 (C-1), 48.0 (C-19), 48.4 (C-9), 50.0 (C-18), 57.4 (C-17), 61.4 (C-5), 71.6 (C-3), 94.5 (C-2), 109.0 (C-29), 151.8 (C-20), 180.7 (C-28).

Acknowledgements

The authors are grateful to Algerian Ministry of Higher Education and Research (MESR) for the PNE grant to Miss Khadidja Aya Beladjila.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Bisio A, Schito AM, Parricchi A, Mele G, Romussi G, Malafrente N, Oliva P, De Tommasi N. 2015. Antibacterial activity of constituents from *Salvia buchananii* Hedge. *Phytochem Lett.* 14:170–177.
- Gao P, Mou X, Liu X, Jiang F, Zhao H, Wang Y, Zhang Z. 2015. Triterpene compound with inhibiting activity on acetylcholinesterase and preparation method. *Faming Zhuanli Shenqing CN 104788525 A 20150722.*
- Giamperi L, Bucchini A, Bisio A, Giacomelli E, Romussi G, Ricci D. 2012. Total phenolic content and antioxidant activity of *Salvia spp. exudates*. *Nat Prod Commun.* 7:201–202.
- Kabouche A, Kabouche Z. 2008. Bioactives diterpenoids of *Salvia* species. *Nat Prod Chem.* 35:753–833.
- Lakhal H, Kabouche A, Alabdul Magid A, Voutquenne-Nazabadioko L, Harakat D, Kabouche Z. 2014. Triterpenoids from *Salvia argentea* var. *aurasiaca* (Pomel) Batt. & Trab. and their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry.* 102:145–151.
- Li M, Li Q, Zhang C, Zhang N, Cui Z, Huang L, Xiao P. 2013. An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (Lamiaceae) in China. *Acta Pharm Sin B.* 3:273–280.
- Nakanishi T, Nishi M, Inada A, Obata H, Tanabe N, Abe S, Wakashiro M. 1990. Two new potent inhibitors of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Chem Pharm Bull.* 38:1772–1774.
- Rao KVR, Rao LJR, Rao NSP. 1990. An A-ring contracted triterpenoid from *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry.* 29:1326–1329.

- Saleem M, Kim HJ, Jin C, Lee YS. 2004. Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata*. Arch Pharm Res. 27:300–304.
- Savona G, Bruno M. 1983. Terpenoids of cultivated *Salvia canariensis*. J Nat Prod. 46:593–594.
- Wang F, Li XM, Liu JK. 2009. New terpenoids from *Isodon sculponeata*. Chem Pharm Bull. 57:525–527.
- Wu YB, Ni ZY, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, Cong B. 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. Chem Rev. 112:5967–6026.
- Yook CS, Liu XQ, Chang SY, Park SY, Nohara T. 2002. Lupane-triterpene glycosides from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus*. Chem Pharm Bull. 50:1383–1385.

COMPOSITION AND ANTIOXIDANT, ANTICHOLINESTERASE, AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OIL OF *Salvia buchananii* FROM ALGERIA

Khadidja Aya Beladjila,¹ Djemaa Berrehal,¹
Amal Al-Aboudi,² Zahia Semra,^{1,3}
Hala Al-Jaber,⁴ Khaldoun Bachari,⁵
and Zahia Kabouche^{1*}

The genus *Salvia* (Lamiaceae) is represented by more than 900 species distributed worldwide [1]. In Algeria, there are 23 species from which *S. jaminiana*, *S. verbenaca* subsp., *S. clandestina*, *S. barrilieri*, and *S. argentea* subsp. *aurasiaca* were the subject of our studies [2–7]. We present here the first report on the essential oil composition, the antioxidant, anticholinesterase, and the antibacterial activities of the species *Salvia buchananii* Hedge which has been previously investigated for its phytochemicals [8, 9].

Extraction. The hydrodistillation, in a Clenvenger-type apparatus, of fresh aerial parts (200 g) of *Salvia buchananii*, collected at Constantine in August 2015 (Voucher number: LOST Sb08.16), yielded 0.9% of a yellow fragrant essential oil.

GC and GC-MS Analyses. GC analysis was performed on a Hewlett Packard 6890 gas chromatograph equipped with an FID and HP-5MS capillary column. The GC/MS was performed using a Hewlett Packard 6890 gas chromatograph coupled with a Hewlett Packard HP (Agilent technologies) MSD 5973 selective detector, using an HP-INNOWax column (30 m 0.25 mm, film thickness 0.25 μm) [10].

Identification of Components. Essential oil components were identified based on their retention indices (determined with reference to a homologous series of normal alkanes) and by comparison of their mass spectral fragmentation patterns with those reported in the literature [11, 12] and with authentic compounds, especially for major components.

Thirteen components, representing 95.9% of the total oil content, were identified with 1,8-cineole (23.3%), α -pinene (19.8%), camphene (16.5%), β -pinene (11.5%), and bornyl acetate (5.5%) as the major components (Table 1). This is the first report on the essential oil of *S. buchananii*. In previous studies of the essential oils of the genus, 1,8-cineole was found to be the major component of *S. potentillifolia* (19.3%) [13], *S. fruticosa* (47.5%) [14], *S. apiana* (71.7%) [15], and *S. macrochlamys* (27.0%) [16] essential oils. In agreement with the literature, the present oil contains high amounts of bicyclic monoterpenes.

α -Pinene and β -pinene have been found as major components of the essential oil of *S. potentillifolia* (29.3%, 14.8%) [17]. It is noteworthy that β -caryophyllene (16.0%, 24.8%, 19.0%) was mainly present in the essential oils of *S. verticillata*, *S. aethiopis*, and *S. nemorosa* [18]. Moreover, camphene and camphor (8.5%, 43.8%) were mainly identified in the essential oils of *S. officinalis* from Albania [19].

Antioxidant Activity. The antioxidant activity was assessed using the β -carotene-linoleic acid test [20].

The essential oil showed good antioxidant activity, with 50.48% inhibition at 4 mg/mL, 50.27% at 2 mg/mL and 42.96% at 1 mg/mL.

1) Universite des Freres Mentouri Constantine, Departement de Chimie, Laboratoire d'Obtention de Substances Therapeutiques (LOST), 25000, Constantine, Algeria, fax: +21331811100, e-mail: zkabouche@yahoo.com; 2) Department of Chemistry, Faculty of Science, The University of Jordan, Amman, Jordan; 3) CHU Benbadis–Constantine, Service de Bacteriologie, 25000, Constantine, Algeria; 4) Department of Physics and Basic Sciences, Faculty of Engineering Technology Al-Balqa Applied University, Amman, Jordan; 5) Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (C.R.A.P.C), Alger, Algeria. Published in *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, No. 3, May–June, 2018, pp. 494–495. Original article submitted October 4, 2016.

TABLE 1. Chemical Composition of the Essential Oil of *S. buchananii* from Algeria

Compound	RRI ^a	%	Compound	RRI ^a	%
Pentanal	704	0.6	-Terpinene	1054	1.6
Isovaleraldehyde	658	1.5	<i>o</i> -Cymene	1022	3.7
-Pinene	939	19.8	Camphor	1141	3.1
Camphene	954	16.5	Bornyl acetate	1286	5.5
-Pinene	979	11.5	-Caryophyllene	1417	4.3
Limonene	1024	2.5	Aromadendrene	1439	2.0
1,8-Cineole	1026	23.3	Total		95.9

^aRRI: relative retention indices.

TABLE 2. Antibacterial Activity (inhibition zones and MIC) of the Essential Oil of *S. buchananii*

Microorganism	Inhibition zone ^a , mm	MIC ^b , g/mL	Microorganism	Inhibition zone, mm	MIC, g/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ^c	21	40	<i>S. sonnei</i> (HS)	16	80
<i>E. coli</i> (HS)	21	40	<i>S. heidelberg</i> (HS)	20	80
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	22	40	<i>S. aureus</i> ATCC 4330	15	80
<i>P. aeruginosa</i> (HS) ^c	20	40	<i>S. aureus</i> (HS)	14	80
<i>K. pneumonia</i> (HS)	16	80			

^aat concentration of oil: 128 g/mL; ^bMIC: minimum inhibitory concentration; ^cHS: hospital strain.

Anticholinesterase Activity. The inhibitory potential of the tested compounds against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes was evaluated using acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine chloride as substrates, respectively. All the inhibition studies were performed in 96-well Microplates by Ellman s [21] method. Tacrine was used as positive control.

Compared to tacrine (IC₅₀: 0.00325–0.130 g/mL and IC₅₀: 0.0018–0.48 g/mL, respectively), used as a standard, the essential oil has shown interesting AChE and BChE inhibitory activities with IC₅₀ values of 74–0.52 g/mL and 37.5–0.18 g/mL, respectively. From the literature, essential oils of other species from the genus (*S. officinalis* and *S. sclarea*) also exhibited a notable inhibition of BChE (66.3% and 76.0% inhibition, respectively) [22]. These results may justify the traditional use of *Salvia* essential oils for failing memory.

Antibacterial Activity. The antibacterial activity of the essential oil was examined against a range of microorganisms, namely *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* (HS), *Staphylococcus aureus* ATCC 4330, *Staphylococcus aureus* (HS), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* (HS), *Klebsiella pneumoniae* (HS), *Salmonella heidelberg* (HS), and *Shigella sonnei* (HS). The reference strains (ATCC, American type culture collection) were obtained from the Pasteur Institute (Algiers), whereas the others (HS, Hospital strains) were obtained from the laboratory of bacteriology, Benbadis Hospital, Constantine, Algeria using conventional methods (NCCLS) [23, 24].

Table 2 showed that the essential oil exhibited the best antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Escherichia coli* (HS) with 22, 21, and 21 mm inhibition zone diameters, respectively. The MIC values against all bacteria had a range between 40 and 80 g/mL.

REFERENCES

1. F. Senatore, N. A. Arnold, F. Piozzi, and C. Formisano, *J. Chromatogr. A*, **1108**, 276 (2006).
2. Z. Kabouche, N. Benkiki, C. Bruneau, and E. Seguin, *Fitoterapia*, **74** (1–2), 194 (2003).
3. A. Kabouche, Z. Kabouche, M. Ozturk, U. Kolak, and G. Topcu, *Food Chem.*, **102**, 1281 (2007).
4. A. Kabouche and Z. Kabouche, *Studies in Natural Products Chemistry*, edited by Atta-u-Rahman, Elsevier, Vol. 35, 2008, p. 753.

5. A. Kabouche, Z. Kabouche, R. Touzani, and C. Bruneau, *Chem. Nat. Compd.*, **44**, 824 (2008).
6. U. Kolak, A. Kabouche, M. Ozturk, Z. Kabouche, G. Topcu, and A. Ulubelen, *Phytochem. Anal.*, **20**, 320 (2009).
7. H. Lakhali, A. Kabouche, A. Alabdul Magid, L. Voutquenne-Nazabadioko, D. Harakat, and Z. Kabouche, *Phytochemistry*, **102**, 145 (2014).
8. A. Bisio, D. Fraternali, M. Giacomini, E. Giacomelli, S. Pivetti, E. Russo, G. Caviglioli, G. Romussi, D. Ricci, and N. De Tommasi, *Crop Protect.*, **29** (12), 1434 (2010).
9. A. Bisio, A. M. Schito, A. Parricchi, G. Mele, G. Romussi, N. Malafrente, and P. Oliva N. De Tommasi, *Phytochem. Lett.*, **14**, 170 (2015).
10. M. Ferhat, H. Ghorab, S. Laggoune, A. Ghannadi, S. E. Sajjadi, R. Touzani, A. Kabouche, and Z. Kabouche, *Chem. Nat. Compd.*, **50**, 747 (2014).
11. R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Ed. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois, 2007.
12. F. W. McLafferty and D. B. Stauffer, *The Important Peak Index of the Registry of Mass Spectral Data*, John Wiley & Son, New York, 1991.
13. E. O. Kose, G. Ongut, and A. Yanikoglu, *Afr. J. Microbiol. Res.*, **16**, 1489 (2013).
14. A. Sivropoulou, C. Nikolaou, E. Papanikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras, and M. Arsenakis, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3197 (1997).
15. A. Ali, N. Tabanca, B. Demirci, E. K. Blythe, A. Zulfiqar, K. Husnu Can Baser, and I. A. Khan, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 447 (2015).
16. N. Tabanca, B. Demirci, K. H. Can Baser, Z. Aytac, M. Ekici, S. I. Khan, M. R. Jacob, and D. E. Wedge, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 6593 (2006).
17. I. Kivrak, M. Duru, M. Ozturk, N. Mercan, M. Harmandar, and G. Topcu, *Food Chem.*, **166**, 470 (2009).
18. M. Coisin, I. Burzo, M. Stefan, E. Rosenhech, and M. M. Zamfirache, *Sect. II a. Biol. Veget.*, **58**, 51 (2012).
19. A. Tosun, S. Khan, Y. Shik Kim, A. Calin-Sanchez, X. Hysenaj, and A. A. Carbonell-Barrachina, *Trop. J. Pharm. Res.*, **6**, 937 (2014).
20. H. E. Miller, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **48**, 91 (1971).
21. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherston, *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88 (1961).
22. I. Orhan, M. Kartal, Y. Kan, and B. Sener, *Z. Naturforsch.*, **63**, 547 (2008).
23. P. A. Villionova, *Approch Standard NCCLS Publication M2-A5* (1993).
24. W. Tadrent, M. Benteldjoune, S. Laggoune, A. Benmerache, A. Kabouche, Z. Semra, and Z. Kabouche, *Chem. Nat. Compd.*, **50**, 744 (2014).

Complimentary and personal copy for

Khadidja Aya Beladjila, Djemaa Berrehal, Nunziatina De Tommasi, Carlotta Granchi, Giulia Bononi, Alessandra Braca, Marinella De Leo

www.thieme.com

New Phenylethanoid Glycosides from
Cistanche phelypaea and Their Activ-
ity as Inhibitors of Monoacylglycerol
Lipase (MAGL)

DOI 10.1055/s-0044-100187

Planta Med

This electronic reprint is provided for non-commercial and personal use only: this reprint may be forwarded to individual colleagues or may be used on the author's homepage. This reprint is not provided for distribution in repositories, including social and scientific networks and platforms.

Publishing House and Copyright:

© 2018 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 0032 0943

Any further use
only by permission
of the Publishing House

 **Thieme**

New Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche phelypaea* and Their Activity as Inhibitors of Monoacylglycerol Lipase (MAGL)

Authors

Khadidja Aya Beladjila¹, Djemaa Berrehal¹, Nunziatina De Tommasi², Carlotta Granchi³, Giulia Bononi³, Alessandra Braca^{3,4}, Marinella De Leo^{3,4}

Affiliations

- 1 Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Département de Chimie, Université des Frères Mentouri-Constantine, Constantine, Algeria
- 2 Dipartimento di Farmacia, Università di Salerno, Fisciano, Italy
- 3 Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa, Italy
- 4 Centro Interdipartimentale di Ricerca "Nutraceutica e Alimentazione per la Salute", Università di Pisa, Italy

Key words

Cistanche phelypaea, Orobanchaceae, phenylethanoid glycosides, cancer, monoacylglycerol lipase, lactate dehydrogenase

received October 30, 2017

revised December 21, 2017

accepted December 27, 2017

Bibliography

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0044-100187>

Published online | Planta Med © Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York | ISSN 0032 0943

Correspondence

Prof. Alessandra Braca

Dipartimento di Farmacia, Università di Pisa

Via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy

Phone: +39 05 02 21 96 88, Fax: +39 05 02 22 06 80

alessandra.braca@unipi.it

Supporting information available online at
<http://www.thieme-connect.de/products>

ABSTRACT

Four new phenylethanoid glycosides (1–4), 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside (1), 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-O-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside (2), 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (3), and 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (4), together with three known compounds, were isolated from the n-butanol extract of *Cistanche phelypaea* aerial parts. The structural characterization of all compounds was performed by spectroscopic analyses, including 1D and 2D NMR, and HRESIMS experiments. The isolated compounds were assayed for their inhibitory activity on two enzymes involved in the peculiar glycolytic or lipidic metabolism of cancer cells, human lactate dehydrogenase (LDH), and monoacylglycerol lipase (MAGL), respectively. All the compounds showed negligible activity on LDH, whereas some of them displayed a certain inhibition activity on MAGL. In particular, compound 1 was the most active on MAGL, showing an IC₅₀ value of 88.0 μ M, and modeling studies rationalized the supposed binding mode of 1 in the MAGL active site.

Introduction

Cistanche is a genus of Orobanchaceae family including about 20 species, usually holoparasitic desert plants, that lack chlorophyll and obtain their nutrients and water from the roots of host plants that they parasitize. This genus is distributed to certain arid and semiarid regions of Africa, Asia, and the Mediterranean area, including parts of southern Europe [1]. Some *Cistanche* species are used for food application and in the traditional Chinese medicine as tonic for the treatment of kidney deficiency, impotence, infertility, profuse metrorrhagia, and chronic constipation [2]. The secondary metabolites produced by the representatives of the *Cistanche* genus include phenylethanoid glycosides, lignans, iridoids,

and oligosaccharides [3–5] some of which have been shown to possess interesting biological activity such as anti-inflammatory, neuroprotective, immunomodulatory, antioxidative, antibacterial, and antiviral properties [2]. *Cistanche phelypaea* (L.) Coutinho syn. *Cistanche tinctoria* (Desf.) Beck is an erect perennial parasite plant, with numerous yellow flowers and absent roots: the plant attaches itself to its host (*Tamarix gallica* L. [Tamaricaceae], *Calligonum comosum* L'Hér [Polygonaceae], and *Pulicaria* sp. [Asteraceae]) through small tubers. In North Africa traditional medicine, it is used for diarrhea, diabetes, intestinal troubles, infection, and as a diuretic [6]. Previous chemical studies revealed the presence of iridoids and phenylethanoids as main constituents [7, 8].

As a part of our research program for characterization of the biological activity of different classes of natural products [9, 10], herein we report the isolation and the structure characterization of four new phenylethanoid glycosides (1–4) (Fig. 1), along with three known compounds from *C. phelypaea* aerial parts. The isolates were assayed for their lactate dehydrogenase (LDH) and monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibitory activity. In fact, tumor cells exhibit progressive metabolic changes that are correlated with malignancy. In particular, glycolytic and lipidic pathways are reprogrammed in order to support the rapid growth of proliferating cells [11]. These dysregulated metabolic pathways are typical features of cancer, and at the same time, they may offer therapeutic windows for anticancer agents that target them. In this context, LDH and MAGL are two enzymes overexpressed in tumor tissues, which play key roles in the typical glycolytic and lipidic cancer metabolism, respectively [12, 13]. In particular, the human isoform 5 of the enzyme LDH (hLDH5), made of four A subunits, catalyzes the final step of glycolysis, which consists in the reduction of pyruvate to lactate, thus allowing the adenosine triphosphate production in cancer cells that rely on glycolysis for their survival. Glycolytic cancer cells display high glucose uptake and elevated lactate production, and the overexpression of specific enzymes such as LDH is necessary to assure a sufficient energy production. Therefore, the inhibition of this crucial enzyme may be considered a promising strategy to counteract cancer invasiveness, without affecting normal cells, which instead use oxidative phosphorylation for most of their purposes. On the other hand, MAGL is a serine hydrolase that cleaves monoacylglycerols into fatty acids and glycerol. In particular, MAGL is the lipolytic enzyme that is mainly responsible for the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, which is a neurotransmitter and an important intermediate in lipid metabolism involved in many physiological processes. Moreover, the intensified production of fatty acids in cancer cells, generated by MAGL activity, increases the formation of protumorigenic signaling molecules [14]. Therefore, MAGL represents a potential target to treat diverse pathological conditions, including cancer. In the last decades, a great effort has been directed toward the identification of small molecules that are able to inhibit LDH [15, 16] or MAGL [17, 18], and many compounds displaying efficient inhibitory activity on these targets were either discovered from natural sources or obtained by chemical synthesis. Therefore, the search for LDH or MAGL inhibitors represents an attractive goal to find new effective anticancer drugs interfering with the peculiar cancer metabolism and, therefore, has prompted us to carry out the investigation herein reported.

Results and Discussion

The phytochemical study of *C. phelypaea* n-butanol extract, after submission to flash column chromatography followed by RP-HPLC, afforded four new phenylethanoid glycosides (1–4) (Fig. 1) and three known compounds, named brandioside [19], pinoresinol 4-O- β -D-glucopyranoside [20], and apigenin 7-O- β -glucuronopyranoside [21] by comparison of NMR and MS data with those reported in the literature.

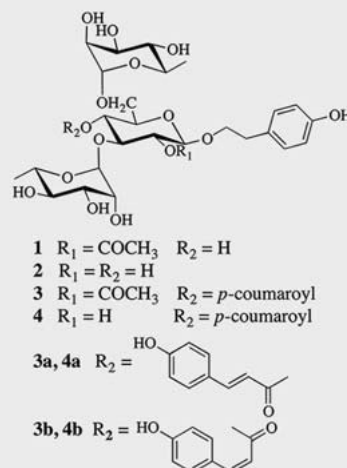


Fig. 1 Chemical structures of compounds 1–4 isolated from *C. phelypaea* aerial parts.

Compound 1 was obtained as a brownish amorphous solid with a molecular formula $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_{16}$, as determined by ^{13}C NMR and HRESIMS analyses (m/z 657.2353 $[\text{M} + \text{Na}]^+$). The positive ESIMS spectrum showed a sodiated molecular ion peak at m/z 657 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, while its fragmentation pattern was characterized by peaks at m/z 597 $[\text{M} + \text{Na} - 60]^+$, 511 $[\text{M} + \text{Na} - 146]^+$, and 365 $[\text{M} + \text{Na} - 146 - 146]^+$, due to the subsequent loss of an acetyl group and two deoxyhexose units, respectively. The ^1H NMR spectra of 1 (Table 1) exhibited characteristic signals of ortho-coupled A_2B_2 type aromatic protons at δ 6.71 (2H, d, $J = 8.0$ Hz) and 7.04 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), three anomeric protons at δ 4.44 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 4.76 (1H, d, $J = 1.3$ Hz), and 4.80 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), an acetyl group at δ 2.00 (3H, s), two methyl groups at δ 1.26 (3H, d, $J = 6.3$ Hz) and 1.27 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), and two methylenes at δ 4.04 (1H, m), 3.62 (1H, m), and 2.80 (2H, m). This evidence suggested the presence of a phenylethanoid residue and three sugar moieties [5]. The observation of ^{13}C NMR spectrum (Table 1) confirmed these findings. The structures of the sugar units were assigned by 1D TOCSY and 2D NMR experiments, indicating the presence of one β -glucopyranoside and two α -rhamnopyranosyl residues. The complete assignments of all protons and carbons were based by the analysis of HSQC, COSY, and HMBC data, indicating that the two rhamnopyranosyl units were terminal units. The relative configuration of the anomeric carbon of the glucose residue was deduced to be β from the coupling constant ($J = 8.0$ Hz) of the anomeric proton. In the case of the rhamnose residue, the α anomeric configuration was derived by comparison of the pertinent ^{13}C NMR data with those reported in literature [9]. The configuration of the sugar units was assigned after hydrolysis of 1 with 1 N HCl. The hydrolyzate was trimethylsilylated, and GC retention times of each sugar were compared with those of authentic samples prepared in the same manner. The HMBC spectrum of 1 displayed the correlations between the proton signal at δ_{H} 4.44 ($\text{H}-1_{\text{glc}}$) and carbon resonance at δ_{C} 72.5 (C-8), confirming that the phenylethanoid moiety was linked to C-1 $_{\text{glc}}$. Simi-

Table 1 ¹H and ¹³C NMR data of compounds 1–4 (CD₃OD, 600 MHz, Jin Hz).

Position	1		2		3a/3b		4a/4b	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		131.0		131.0		131.7		130.7
2/6	7.04 d (8.0)	131.2	7.07 d (8.0)	131.5	7.05 d (8.0)	131.3	7.10 d (8.0)	130.9
3/5	6.71 d (8.0)	116.3	6.72 d (8.0)	116.4	6.73 d (8.0)	116.2	6.73 d (8.0)	116.2
4		157.0		157.1		157.0		157.1
7	2.80 m	36.4	2.85 m	37.6	2.78 m	36.0	2.86 m	36.7
8a	4.04 m	72.5	3.99 m	72.0	4.06 m	72.3	4.02 m	72.7
8b	3.62 m		3.74 m		3.65 m		3.75 m	
glc-1	4.44 d (8.0)	103.2	4.34 d (7.8)	104.6	4.55 d (7.8)	102.1	4.40 d (8.0)	104.6
2	4.78 dd (9.0, 8.0)	75.0	3.29 dd (9.5, 7.8)	75.0	4.88 dd (9.5, 7.8)	74.3	3.40 dd (9.5, 8.0)	76.4
3	3.65 t (9.0)	83.1	3.50 t (9.5)	83.8	4.03 t (9.5)	80.8	3.83 t (9.5)	81.9
4	3.44 t (9.0)	70.1	3.35 ^a	70.0	5.12 t (9.5)	69.3	5.00 t (9.5)	70.2
5	3.46 m	77.1	3.43 m	76.3	3.77 m	75.2	3.70 m	74.9
6a	4.00 dd (12.0, 3.0)	68.0	3.99 dd (12.0, 3.0)	68.0	3.79 dd (12.0, 3.0)	67.5	3.77 dd (12.0, 3.5)	67.8
6b	3.68 dd (12.0, 4.5)		3.65 dd (12.0, 5.0)		3.50 dd (12.0, 5.0)		3.49 dd (12.0, 4.5)	
COCH ₃		171.3				171.6		
COCH ₃	2.00 s	21.2			1.98 s	21.4		
rha _I -1	4.76 d (1.3)	102.1	5.21 d (2.0)	100.8	4.77 d (1.8)	103.3	5.21 d (2.0)	102.7
2	3.83 dd (3.0, 1.8)	72.8	3.96 dd (3.0, 2.0)	71.6	3.74 dd (3.0, 1.8)	71.7	3.94 dd (3.0, 2.0)	72.4
3	3.96 dd (9.0, 3.0)	72.0	3.70 dd (9.0, 3.0)	70.7	3.54 dd (9.0, 3.0)	72.0	3.60 dd (9.0, 3.0)	72.7
4	3.39 t (9.0)	74.3	3.39 t (9.0)	73.4	3.29 t (9.0)	73.0	3.31 t (9.0)	74.2
5	3.68 m	70.7	3.69 m	71.2	3.54 m	70.2	3.58 m	70.6
6	1.26 d (6.3)	18.1	1.26 d (6.5)	18.3	1.08 d (6.5)	18.7	1.09 d (6.0)	18.3
rha _{II} -1	4.80 d (1.5)	102.5	4.76 d (1.8)	101.6	4.63 d (2.0)	102.5	4.65 d (2.0)	101.1
2	3.83 dd (3.0, 1.8)	72.6	3.85 dd (3.5, 1.8)	71.5	3.89 dd (3.5, 2.0)	71.4	3.86 dd (3.5, 2.0)	72.3
3	3.96 dd (9.0, 3.0)	72.4	3.70 dd (9.0, 3.5)	72.3	3.70 dd (9.0, 3.5)	72.0	3.75 dd (9.0, 3.5)	72.6
4	3.39 t (9.0)	74.0	3.40 t (9.0)	74.0	3.37 t (9.0)	73.2	3.34 ^a	74.0
5	3.68 m	70.6	3.99 m	70.0	3.64 m	69.3	3.66 m	70.7
6	1.27 d (6.5)	18.3	1.27 d (6.5)	18.1	1.22 d (6.0)	18.3	1.21 d (6.0)	18.5
p-coum-1						127.3		127.4
2/6 trans					7.44 d (8.0)	131.3	7.50 d (7.8)	130.9
2/6 cis					7.75 d (8.0)	134.6	7.72 d (7.8)	133.4
3/5 trans					6.84 d (8.0)	116.2	6.83 d (7.8)	116.2
3/5 cis					6.80 d (8.0)	115.3	6.80 d (7.8)	115.2
4						162.0		161.7
α -trans					6.37 d (16.0)	114.9	6.38 d (16.0)	114.0
α cis					5.83 d (12.0)	115.9	5.83 d (12.0)	115.2
β -trans					7.70 d (16.0)	148.1	7.71 d (16.0)	147.3
β cis					6.97 d (12.0)	147.7	6.99 d (12.0)	146.4
COO						168.0		168.0

J values are in parentheses and reported in Hz. Chemical shifts are given in ppm. Assignments were confirmed by COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments. Glc: β -D-glucopyranoside; rha: α -L-rhamnopyranosyl; p-coum: p-coumaroyl; ^a overlapped signal.

larly, the correlation between signals at δ_{H} 4.78 (H-2_{glc}) and δ_{C} 171.3 suggested that the acetyl group was linked to C-2_{glc}. Likewise, the long-range correlations between δ_{H} 4.76 (H-1_{rhaI}) and carbon resonance δ_{C} 83.1 (C-3_{glc}), δ_{H} 4.80 (H-1_{rhaII}), and δ_{C} 68.0 (C-6_{glc}) allowed to establish that the two α -L-rhamnopyranosyl moieties were linked at C-3_{glc} and C-6_{glc}, respectively. Thus, the

structure of 1 was established as 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside.

The molecular formula of compound 2, isolated as a brownish amorphous solid, was assigned C₂₆H₄₀O₁₅, as deduced by HRESIMS analyses (*m/z* 615.2232 [M + Na]⁺), as well as from ¹³C NMR data. The ESIMS/MS spectrum displayed two fragments at *m/z* 469 [M + Na - 146]⁺ and 323 [M + Na - 146 - 146]⁺ attributable to the subsequent loss of two deoxyhexose units, respectively. Comparison of ¹H and ¹³C NMR spectra of 2 (Table 1) with those of 1 revealed 2 to differ from 1 only for the absence of the acetyl group at C-2 of glucose unit. Thus, the structure of 2 was determined as 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-O-di- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside.

Compound 3 displayed a molecular formula C₃₇H₄₈O₁₈ by HRESIMS (*m/z* 803.2715 [M + Na]⁺). The ESIMS of 3 showed a sodiated molecular ion peak at *m/z* 803 [M + Na]⁺ and a fragmentation pattern with peaks at *m/z* 743 [M + Na - 60]⁺, 657 [M + Na - 146]⁺, and 511 [M + Na - 146 - 146]⁺, corresponding to the subsequent loss of an acetyl moiety and two deoxyhexose units. Analysis of NMR data of 3 (Table 1), besides chemical shifts similar to those of 1, displayed the presence of two couples of signals attributable to trans-olefinic protons at δ 6.37 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H- α_{trans}) and 7.70 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H- β_{trans}), cis-olefinic protons at δ 5.83 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H- α_{cis}), and 6.97 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H- β_{cis}), and two couples of ortho-coupled A₂B₂ aromatic protons at δ 6.84 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3/H-5_{trans}) and 7.44 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2/H-6_{trans}), and 6.80 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3/H-5_{cis}) and 7.75 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2/H-6_{cis}). Also in this case the assignments of all proton and carbon signals were deduced from a combined analysis of 1D and 2D NMR experiments. Moreover, key correlation peaks in the HMBC spectrum of 3 between the proton signal at δ _H 5.12 (H-4_{glc}) and carbon resonance at δ _C 168.0 (COO), δ _H 4.88 (H-2_{glc}), and δ _C 171.6 (COCH₃) were present, confirming that the p-coumaroyl group was linked to C-4_{glc} while the acetyl group at C-2_{glc}. Thus, compound 3 was identified as an inseparable mixture 7:3 of 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-trans-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (3a) and 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-2-O-acetyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-cis-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (3b).

The HRESIMS of compound 4, a brownish amorphous solid, showed a sodiated molecular ion peak at *m/z* 761.2604 [M + Na]⁺, corresponding to the molecular formula C₃₅H₄₆O₁₇. In the ESIMS/MS fragmentation pattern of *m/z* 761 [M + Na]⁺, peaks at *m/z* 615 [M + Na - 146]⁺ and 469 [M + Na - 146 - 146]⁺, due to the subsequent loss of two deoxyhexose units, respectively, were evident. Comparison of NMR data of 4 (Table 1) with those of 3 showed in 4 the absence of the acetyl group at C-2_{glc}. In the light of these data, compound 4 was established to be an inseparable mixture 7:3 of 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-trans-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (4a) and 1- β -p-hydroxyphenyl-ethyl-3,6-di- α -L-rhamnopyranosyl-4-cis-p-coumaroyl- β -D-glucopyranoside (4b).

Phenylethanoids 1–4, pinoresinol 4-O- β -D-glucopyranoside, brandioside, and apigenin 7-O- β -glucuronopyranoside, were assayed on human LDH5 and MAGL purified isoforms to determine their inhibition potencies (Table 2). All the compounds were inactive on hLDH5, showing IC₅₀ values greater than 200 μ M, thus

Table 2 hLDH5 and hMAGL inhibition potencies.

Compound	IC ₅₀ (μ M)			
	hLDH5	CI (95%, n = 3)	hMAGL	CI (95%, n = 3)
1	> 200	–	88.0	[60.7, 127.6]
2	> 200	–	117.4	[95.0, 145.1]
3a/3b	> 200	–	113.9	[93.8, 138.4]
4a/4b	> 200	–	> 200	–
pinoresinol 4-O- β -D-glucopyranoside	> 200	–	130.2	[110.2, 153.8]
brandioside	> 200	–	156.1	[151.1, 164.7]
apigenin 7-O- β -glucuronopyranoside	> 200	–	> 200	–
galloflavin	110.1	[82.9, 146.2]	– ^a	–
CL6a	– ^a	–	12.1	[8.9, 16.3]

CI: confidence interval; ^a not tested.

being less potent than reference compound galloflavin [22]. In hMAGL enzymatic assays, only two derivatives (compound 4 and apigenin 7-O- β -glucuronopyranoside) proved to be inactive, whereas pinoresinol 4-O- β -D-glucopyranoside and brandioside exhibited IC₅₀ values of 130.2 and 156.1 μ M, respectively. Compounds 2 and 3 showed a better inhibition activity, with similar IC₅₀ values of 117.4 and 113.9 μ M, respectively. The best inhibition potency on hMAGL was demonstrated by compound 1, with an IC₅₀ value in the low micromolar range (88.0 μ M), and it proved to be selective for hMAGL over hLDH. Although its inhibition activity was lower than reference MAGL synthetic inhibitor (4-[4-chlorobenzoyl]piperidin-1-yl)(4-methoxyphenyl)-methanone (compound “CL6a” [17]), this natural compound is the first phenylethanoid, bearing β -D-glucopyranosyl and α -L-rhamnopyranosyl sugar units, displaying a promising activity on hMAGL. Presently, only few compounds derived from natural sources have shown an inhibitory activity on this enzyme [23]; however, they belong to different chemical classes.

In order to better characterize the binding mode of compound 1 into MAGL, its complex with the target protein was subjected to docking calculations. In particular, the putative binding pose emerging from these modeling studies showed that the sugar moiety lies in the wide lipophilic cavity of the protein forming lipophilic interactions with L148, L213, L241, and V183, whereas the p-hydroxyphenyl-ethyl ring lies into the small pocket of the binding site and forms lipophilic interactions with residues Y194 and V270 (Fig. 2). A high number of H-bonds stabilizes the binding disposition of compound 1: the carbonyl group of the O-acetyl group linked to the glucopyranoside forms two H-bonds with the backbone nitrogen of A51 and M123 and the 4-OH of

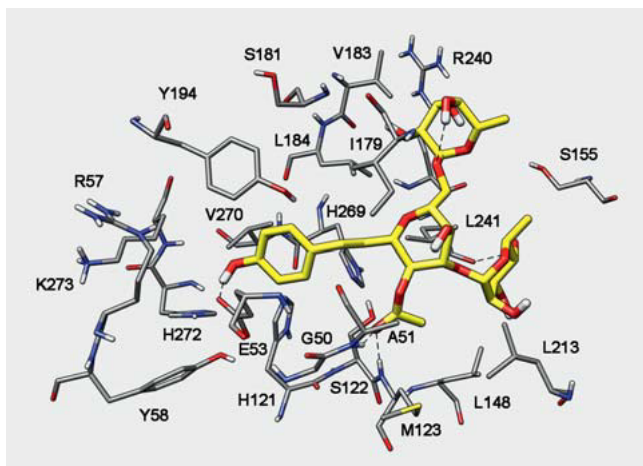


Fig. 2 View of the most relevant ligand-receptor interactions of the 1-hMAGL complex. Hydrogen bonds are represented as black dashed lines.

the 3- α -L-rhamnopyranoside forms an H-bond with the oxygen backbone of L241. Compound 1 is also characterized by an intramolecular H-bond between the ethereal oxygen of the 6- α -L-rhamnopyranoside and the 4-OH of the same portion. Furthermore, the OH group of the *p*-hydroxyphenyl-ethyl portion forms an H-bond with residue E53, in which it behaves as a H-bond donor.

In summary, seven compounds, including four new structures (1–4), were isolated and characterized from the aerial parts of *C. phelypaea*. The isolation and structural characterization of the new phenylethanoids 1–4 and the known compound pinosresinol 4-O- β -D-glucopyranoside are completely in agreement with the available information on the chemical types of secondary metabolites typical of *Cistanche* species [24, 25], while brandioside and apigenin 7-O- β -glucuronopyranoside are reported from this genus for the first time here. Moreover, to our knowledge this is the first report of naturally occurring phenyletanoid as a MAGL inhibitor. This study will open the way for future investigation on plant glycosylated small molecules as potential MAGL inhibitors. HRESIMS and NMR spectra of compounds 1–4 and data for the IC₅₀ determination of compound 1 in MAGL enzymatic assays are available as Supporting Information.

Materials and Methods

General experimental procedures

Optical rotations were measured on an Atago AP-300 digital polarimeter equipped with a sodium lamp (589 nm) and a 1-dm microcell. NMR experiments were recorded at 300 K in CD₃OD on a Bruker DRX-600 spectrometer (Bruker BioSpin GmbH) equipped with a Bruker 5 mm TCI CryoProbe as reported previously [26]. HRESIMS were acquired in the positive ion mode on a LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). ESIMS were obtained from an LCQ Advantage ThermoFinnigan spectrometer (ThermoFinnigan), equipped with a Xcalibur software. Column

chromatography was performed over Sephadex LH-20 (40–70 μ m, Pharmacia) at a flow rate 0.8 mL/min. HPLC separations were conducted on a Shimadzu LC-8A series pumping system equipped with a Shimadzu RID-10A refractive index detector and Shimadzu injector on a C₁₈ μ -Bondapak column (30 cm \times 7.8 mm, 10 μ m Waters, flow rate 2.0 mL/min). TLC analyses were carried out using glass-coated silica gel 60 F₂₅₄ (0.20 mm thickness) plates (Merck) with CHCl₃-MeOH H₂O (70:30:3) as eluent and cerium sulphate as spray reagent. GC analysis was performed using a Dani GC 1000 instrument on a L-CP-Chirasil-Val column (0.32 mm \times 25 m) working with the following temperature program: 100 $^{\circ}$ C for 1 min, ramp of 5 $^{\circ}$ C/min up to 180 $^{\circ}$ C; injector and detector temperature 200 $^{\circ}$ C; carrier gas N₂ (2.0 mL/min); detector dual FID; split ratio 1:30; injection 5 μ L.

Plant material

C. phelypaea aerial parts were collected in March 2012 in the southwest of Algeria. The plant was identified by Prof. Gérard De Bélair, Faculty of Sciences, University of Annaba, Algeria. A voucher specimen (number Ct.03.12) has been deposited in the Herbarium of the Department of Chemistry, Université des Frères Mentouri-Constantine, Constantine, Algeria.

Extraction and isolation

The dried and powdered aerial parts (4 kg) of *C. phelypaea* were extracted with MeOH H₂O (4:1) at room temperature for 48 h. The extraction was repeated three times by changing the solvent. The obtained extract was filtered, concentrated, and successively extracted with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol, to give 3.27, 4.87, 10.96, and 36.86 g of the respective residues. The *n*-butanol extract (10.59 g) was subjected to column chromatography over Sephadex LH-20 in MeOH. Fractions of 12 mL were collected, analyzed by TLC, and grouped to give 11 major fractions (A–K). Fraction K contained pure apigenin 7-O- β -D-glucuronopyranoside (28 mg). Fraction B (245.1 mg) was purified by RP-HPLC with MeOH H₂O (3:7) as eluent to obtain pure compound 1 (7.9 mg, *t*_R 21 min). Fraction C (896.8 mg) was purified by RP-HPLC with MeOH H₂O (25:75) as eluent to afford pure compound 2 (6.3 mg, *t*_R 15 min). Fraction E (638.9 mg) was purified by RP-HPLC with MeOH H₂O (45:55) as eluent to give brandioside (7 mg, *t*_R 15 min) and compounds 4 (14.9 mg, *t*_R 20 min) and 3 (11.1 mg, *t*_R 34 min). Fraction G (172.6 mg) was purified by RP-HPLC with MeOH H₂O (35:65) as eluent to obtain pinosresinol 4-O- β -D-glucopyranoside (3.6 mg, *t*_R 18 min).

Compound 1: brownish amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ –58.5 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 223 (4.20), 280 (3.50), 321 (3.06); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; ESIMS *m/z* 657 [M + Na]⁺, 597 [M + Na – 60]⁺, 511 [M + Na – 146]⁺, 451 [M + Na – 60 – 146]⁺, 365 [M + Na – 146 – 146]⁺; HRESIMS: *m/z* 657.2353 [M + Na]⁺ (calcd. for C₂₈H₄₂NaO₁₆, *m/z* 657.2371).

Compound 2: brownish amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ –7.0 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 222 (4.09), 280 (3.55), 315 (3.10); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; ESIMS *m/z* 615 [M + Na]⁺, 469 [M + Na – 146]⁺, 323 [M + Na – 146 – 146]⁺; HRESIMS: *m/z* 615.2232 [M + Na]⁺ (calcd. for C₂₆H₄₀NaO₁₅, *m/z* 615.2265).

Compound 3: brownish amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ –96 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 225 (4.26), 316 (3.87); ¹H and

^{13}C NMR data, see Table 1; ESIMS m/z 803 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 743 $[\text{M} + \text{Na} - 60]^+$, 657 $[\text{M} + \text{Na} - 146]^+$, 511 $[\text{M} + \text{Na} - 146 - 146]^+$; HRESIMS: m/z 803.2715 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{NaO}_{18}$, m/z 803.2738).

Compound 4: brownish amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -85.5$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 224 (4.30), 315 (3.85); ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; ESIMS m/z 761 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 615 $[\text{M} + \text{Na} - 146]^+$, 469 $[\text{M} + \text{Na} - 146 - 146]^+$; HRESIMS: m/z 761.2604 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{NaO}_{17}$, m/z 761.2633).

Acid hydrolysis of compounds 1–4

A solution of each compound (2.0 mg) in 1 N HCl (1 mL) was stirred at 80 °C in a stoppered reaction vial for 4 h. After cooling, the solution was evaporated under a stream of N_2 . The residue was dissolved in 1-(trimethylsilyl)imidazole and pyridine (0.2 mL, 1 : 1), and the solution was stirred at 60 °C for 5 min. After drying the solution, the residue was partitioned between H_2O and CHCl_3 . The CHCl_3 layer was analyzed by GC using a L-CP-Chirasil-Val column (0.32 mm \times 25 m). Temperatures of both the injector and detector was 200 °C. A temperature gradient system was used for the oven, starting at 100 °C for 1 min and increasing up to 180 °C at a rate of 5 °C/min. Peaks of the hydrolysate were detected by comparison with retention times of authentic samples of D-glucose and L-rhamnose (Sigma-Aldrich) after treatment with 1-(trimethylsilyl)imidazole in pyridine.

Enzymatic assays

All the compounds were assayed against purified hLDH5 (Lee Biosolution Inc.) and hMAGL (Cayman Chemical), as previously reported [15, 17]. The reference MAGL synthetic inhibitor (4-[4-chlorobenzoyl]piperidin-1-yl)(4-methoxyphenyl)-methanone (compound "CL6a") was synthesized in our laboratory (purity percentage 99% by HPLC analysis), as previously reported [17]. Both assays were performed in 96-well plates at room temperature at a final volume of 200 μL . Compounds were dissolved in DMSO stock solutions at the maximum concentration of 625 μM (the concentration of DMSO did not exceed 4% during the measurements), and this solution was diluted to seven different concentrations (from 625 to 0.86 μM , in duplicate for each concentration) that were used to generate the concentration-response curve. All the IC_{50} values are the mean of three independent experiments. Maximum and minimum controls were also included in each plate. The enzymatic reaction for LDH assays was performed in the "forward" direction (pyruvate to lactate), and the amount of consumed NADH was monitored (340 nm). Assays were performed in 100 mM phosphate buffer (pH = 7.4) in the presence of 200 μM pyruvate and 40 μM NADH. After 15 min of incubation, the final measurements were carried out by using a Victor X3 microplate reader (PerkinElmer). IC_{50} values were derived from experimental data using the sigmoidal dose-response fitting of GraphPad Prism software. The enzymatic reaction for MAGL assays was based on the conversion of the substrate 4-nitrophenylacetate (4-NPA) to 4-nitrophenol and the amount of produced 4-nitrophenol was monitored (405 nm), as previously reported [27]. Assays were performed in 10 mM Tris buffer (pH = 7.2), containing 1 mM EDTA and 0.1 mg/mL BSA, in the presence of 100 μM 4-NPA. After the reaction had proceeded for 30 min, absorbance

values were then measured by using a Victor X3 microplate reader (PerkinElmer). IC_{50} values were derived from experimental data using the sigmoidal dose-response fitting of GraphPad Prism software.

Docking studies

The crystal structure of hMAGL (pdb code 3PE6 [28]) was sourced from the Protein Data Bank [29]. First we added hydrogen atoms. Then the protein complexed with its reference inhibitor was minimized using Amber14 software [30] and ff14SB force field at 300 K. The complex was placed in a rectangular parallelepiped water box, an explicit solvent model for water (TIP3P) was used, and the complex was solvated with a 10 Å water cap. To neutralize the system, sodium ions as counterions were added. Then two steps of minimization were carried out. First, the protein was kept fixed with a position restraint of 500 kcal/mol-Å² and only the positions of the water molecules were minimized. Second, the entire system through 5000 steps of steepest descent followed by a CG was minimized until a convergence of 0.05 kcal/Å-mol was reached. The ligands were built using Maestro [31] and minimized by means of MacroModel [32] in a water environment, following the CG method to obtain a convergence value of 0.05 kcal/Å-mol, using the MMFFs force field and a distance-dependent dielectric constant of 1.0. Automated docking was carried out by means of the AutoDock 4.0 program [33]; AutoDock Tools [34] was used to identify the torsion angles in the ligands, add the solvent model, and assign the Kollman atomic charges to the protein. The ligand charge was calculated using the Gasteiger method. By considering the ZYH [(2-cyclohexylbenzo[d]oxazol-6-yl)(3-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)azetidin-1-yl)methanone] reference inhibitor as the central group, the regions of interest used were defined by AutoDock; in particular a grid of 82, 40, and 30 points in the x, y, and z directions, centered on the core of the mass of this compound, was constructed. For the energetic map calculations, a grid spacing of 0.375 Å and a distance-dependent function of the dielectric constant were used. With the aid of the Lamarckian Genetic Algorithm, the docked compounds were subjected to 100 runs of the AutoDock search, using 500 000 steps of energy evaluation and the default values of the other parameters. The cluster analysis on the results was performed using an RMS tolerance of 2.0 Å.

Supporting Information

HRESIMS and NMR spectra of compounds 1–4 and data for the IC_{50} determination of compound 1 in MAGL enzymatic assays are available as Supporting Information.

Acknowledgements

The authors are grateful to Algerian Ministry of Higher Education and Research (MESR) for the PNEgrant to Miss Khadjila Aya Beladjila.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- [1] Fahmy GM, El-Tantawi H, Abd El-Ghani MM. Distribution, host range and biomass of two species of *Cistanche* and *Orobancha cernua* parasitizing the roots of some Egyptian xerophytes. *J Arid Environ* 1996; 34: 263–276
- [2] Wang LI, Ding H, Yu HS, Han LF, Lai QH, Zhang LJ, Song XB. *Cistanche herba*: chemical constituents and pharmacological effects. *Chin Herb Med* 2015; 7: 135–142
- [3] Xiong Q, Kadota S, Tani T, Namba T. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 1580–1585
- [4] Morikawa T, Pan Y, Ninomiya K, Imura K, Yuan D, Yoshikawa M, Hayakawa T, Muraoka O. Iridoid and acyclic monoterpene glycosides, kankanosides L, M, N, O, and P from *Cistanche tubulosa*. *Chem Pharma Bull* 2010; 58: 1403–1410
- [5] Liu XM, Li J, Jang Y, Zhao MB, Tu PF. Chemical constituents from *Cistanche sinensis* (Orobanchaceae). *Biochem Syst Ecol* 2013; 47: 21–24
- [6] Boulous L. *Medicinal Plants of North Africa*. Michigan: Reference Publication Algonc; 1983: 286
- [7] Melek FR, El-Shabrawy OA, El-Gindy M, Miyase T, Hilal SH. Pharmacological activity and composition of the ethyl acetate extract of *Cistanche phelypaea*. *Fitoterapia* 1993; 64: 11–14
- [8] Deyama T, Yahikozawa K, Al-Easa HS, Rizk AM. Constituents of plants growing in Qatar: part XXXVIII. Constituents of *Cistanche phelypaea*. *Qatar University Sci J* 1995; 15: 51–55
- [9] Bader A, Tuccinardi T, Granchi C, Martinelli A, Macchia M, Minutolo F, De Tommasi N, Braca A. Phenylpropanoids and flavonoids from *Phlomis kurdica* as inhibitors of human lactate dehydrogenase. *Phytochemistry* 2015; 116: 262–268
- [10] De Leo M, Peruzzi L, Granchi C, Tuccinardi T, Minutolo F, De Tommasi N, Braca A. Constituents of *Polygala flavescens* ssp. *flavescens* and their activity as inhibitors of human lactate dehydrogenase. *J Nat Prod* 2017; 80: 2077–2087
- [11] Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 54–61
- [12] Nomura DK, Long JZ, Niessen S, Hoover HS, Ng SW, Cravatt BF. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* 2010; 140: 49–61
- [13] Fiume L, Manerba M, Vettraino M, Di Stefano G. Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. *Future Med Chem* 2014; 6: 429–445
- [14] Nomura DK, Lombardi DP, Chang JW, Niessen S, Ward AM, Long JZ, Hoover HH, Cravatt BF. Monoacylglycerol lipase exerts dual control over endocannabinoid and fatty acid pathways to support prostate cancer. *Chem Biol* 2011; 18: 846–856
- [15] Granchi C, Roy S, Del Fiandra C, Tuccinardi T, Lanza M, Betti L, Giannaccini G, Lucacchini A, Martinelli A, Macchia M, Minutolo F. Triazole-substituted N-hydroxyindol-2-carboxylates as inhibitors of isoform 5 of human lactate dehydrogenase (hLDH5). *Medchemcomm* 2011; 2: 638–643
- [16] Purkey HE, Robarge K, Chen J, Chen Z, Corson LB, Ding CZ, DiPasquale AG, Dragovich PS, Eigenbrot C, Evangelista M, Fauber BP, Gao Z, Ge H, Hitz A, Ho Q, Labadie SS, Lai KW, Liu W, Liu Y, Li C, Ma S, Malek S, O'Brien T, Pang J, Peterson D, Salphati L, Sideris S, Ullsch M, Wei B, Yen I, Yue Q, Zhang H, Zhou A. Cell active hydroxylactam inhibitors of human lactate dehydrogenase with oral bioavailability in mice. *ACS Med Chem Lett* 2016; 7: 896–901
- [17] Tuccinardi T, Granchi C, Rizzolio F, Caligiuri I, Battistello V, Toffoli G, Minutolo F, Macchia M, Martinelli A. Identification and characterization of a new reversible MAGL inhibitor. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 3285–3291
- [18] Hernández-Torres G, Cipriano M, Hedén E, Björklund E, Canales Á, Zian D, Feliú A, Mecha M, Guaza C, Fowler CJ, Ortega-Gutiérrez S, López-Rodríguez ML. A reversible and selective inhibitor of monoacylglycerol lipase ameliorates multiple sclerosis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; 53: 13765–13770
- [19] He ZD, Yang CR. Brandioside, a phenylpropanoid glycoside from *Brandisia hancei*. *Phytochemistry* 1991; 30: 701–706
- [20] Casabuono AC, Pomillo AB. Lignans and a stilbene from *Festuca argentina*. *Phytochemistry* 1994; 35: 479–483
- [21] Flamini G, Antognoli E, Marelli I. Two flavonoids and other compounds from aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry* 2001; 57: 559–564
- [22] Manerba M, Vettraino M, Fiume L, Di Stefano G, Sartini A, Giacomini E, Buonfiglio R, Roberti M, Recanatini M. Galloflavin (CAS 568-80-9): a novel inhibitor of lactate dehydrogenase. *ChemMedChem* 2012; 7: 311–317
- [23] Scalvini L, Piomelli D, Mor M. Monoglyceride lipase: structure and inhibitors. *Chem Phys Lipids* 2016; 197: 13–24
- [24] Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T, Fukushima S. Studies on the constituents of *Cistanche herba*. III. Isolation and structures of new phenylpropanoid glycosides, cistanosides A and B. *Chem Pharm Bull* 1984; 32: 3009–3014
- [25] Yoshizawa F, Deyama T, Takizawa N. The constituents of *Cistanche tubulosa* (SCHRENK) HOOK. f. II.: isolation and structures of a new phenylethanoid glycoside and a new neolignan glycoside. *Chem Pharm Bull* 1990; 38: 1927–1930
- [26] Milella L, Milazzo S, De Leo M, Vera Saltos MB, Faraone I, Tuccinardi T, Lapillo M, De Tommasi N, Braca A. α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Arcytophyllum thymifolium*. *J Nat Prod* 2016; 79: 2104–2112
- [27] Granchi C, Caligiuri I, Bertelli E, Poli G, Rizzolio F, Macchia M, Martinelli A, Minutolo F, Tuccinardi T. Development of terphenyl-2-methyloxazol-5(4H)-one derivatives as selective reversible MAGL inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017; 32: 1240–1252
- [28] Schalk-Hihi C, Schubert C, Alexander R, Bayoumy S, Clemente JC, Deckman I, Desjarlais RL, Dzordzorme KC, Flores CM, Grasberger B, Kranz JK, Lewandowski F, Liu L, Ma H, Maguire D, Macielag MJ, McDonnell ME, Mezzasalma Haarlander T, Miller R, Milligan C, Reynolds C, Kuo LC. Crystal structure of a soluble form of human monoglyceride lipase in complex with an inhibitor at 1.35 Å resolution. *Protein Sci* 2011; 20: 670–683
- [29] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 235–242
- [30] Case DA, Berryman JT, Betz RM, Cerutti DS, Cheatham TE III, Darden TA, Duke RE, Giese TJ, Gohlke H, Goetz AW, Homeyer N, Izadi S, Janowski P, Kaus J, Kovalenko A, Lee TS, LeGrand S, Li P, Luchko T, Luo R, Madej B, Merz KM, Monard G, Needham P, Nguyen H, Nguyen HT, Omelyan I, Onufriev A, Roe DR, Roitberg A, Salomon-Ferrer R, Simmerling CL, Smith W, Swails J, Walker RC, Wang J, Wolf RM, Wu X, York DM, Kollman PA. AMBER, version 14. San Francisco, CA: University of California; 2015
- [31] Maestro, version 9.0. Portland, OR: Schrödinger Inc.; 2009
- [32] MacroModel, version 9.7. Portland, OR: Schrödinger Inc.; 2009
- [33] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* 1998; 19: 1639–1662
- [34] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009; 30: 2785–2791

Antiangiogenic Activity of Compounds Isolated from *Anarrhinum pedatum*

Khadidja Aya Beladjila,[†] Djemaa Berrehal,[†] Zahia Kabouche,[†] Maria Paola Germano,[‡] Valeria D'Angelo,[‡] Nunziatina De Tommasi,[§] Felicia D'Andrea,[‡] Alessandra Braca,^{*,‡,||} and Marinella De Leo^{‡,||}

[†]Laboratoire d'Obtention des Substances Therapeutiques (LOST), Departement de Chimie, Universite des Freres Mentouri-Constantine, Route de Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

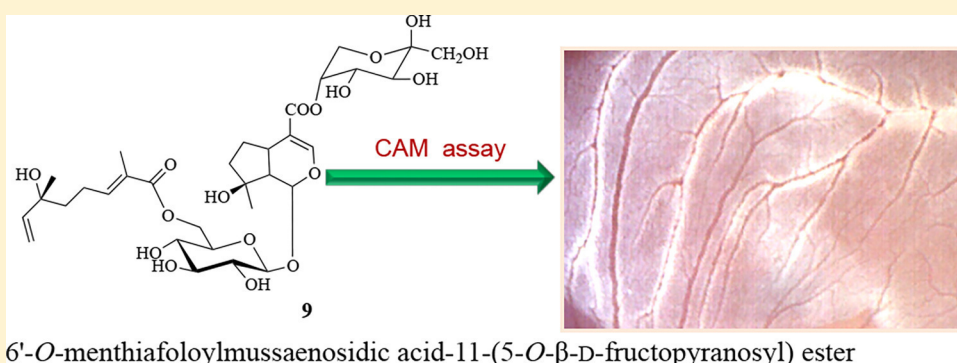
[‡]Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali, Universita degli Studi di Messina, Polo Universitario SS. Annunziata, 98168 Messina, Italy

[§]Dipartimento di Farmacia, Universita degli Studi di Salerno, Via Giovanni Paolo II 132, 84084 Fisciano (SA), Italy

[‡]Dipartimento di Farmacia, Universita di Pisa, Via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy

^{||}Centro Interdipartimentale di Ricerca "Nutraceutica e Alimentazione per la Salute", Universita di Pisa, Via del Borghetto 80, 56124 Pisa, Italy

* Supporting Information



6'-O-menthiafoloylmussaenosidic acid-11-(5-O-β-D-fructopyranosyl) ester

ABSTRACT: Ten new iridoid glycosides (1–10) and two new monoterpenoids (11 and 12), together with nine known compounds (13–21), were isolated from the n-butanol extract of the aerial parts of *Anarrhinum pedatum*. The structural characterization of all compounds was performed by spectroscopic analysis, including 1D and 2D NMR and HRESIMS experiments. The isolates were assayed for their antiangiogenic activity by two in vivo models, using zebra sh embryos and chicken chorioallantoic membranes (CAMs). The results showed that among the new compounds 6'-O-menthiafoloylmussaenosidic acid-11-(5-O-β-D-fructopyranosyl) ester (9) exhibited the most potent antiangiogenic activity in both the zebra sh embryos and CAM assays, reducing the growth of blood vessels. Antiangiogenic effects were also observed for the known compounds 6-O-nerol-8-oyl-antirrinoside (13), antirrinoside (14), 6-O-trans- and cis-p-coumaroyl antirrinoside (15), and (6S)-2E-2,6-dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid β-glucopyranosyl ester (18).

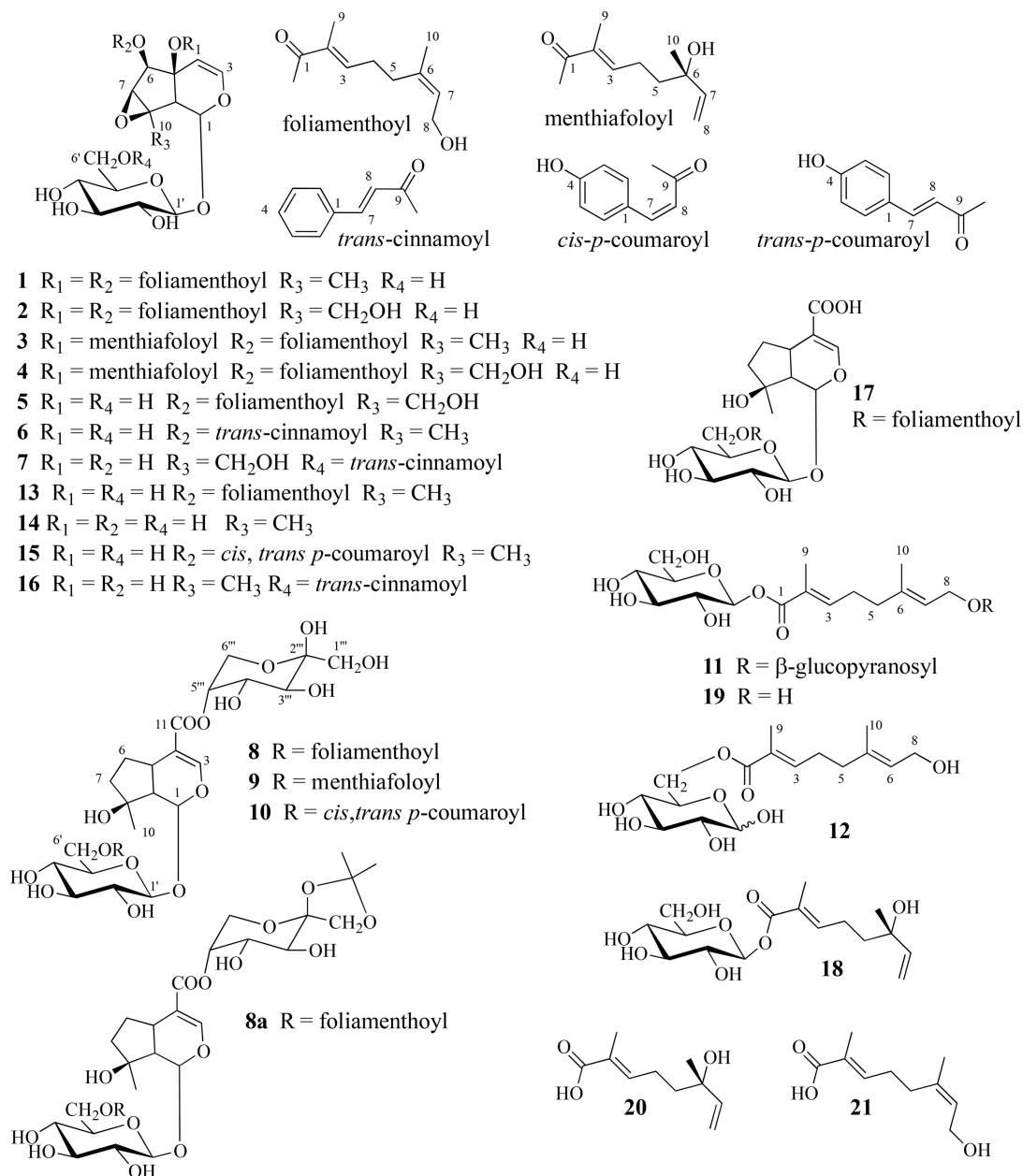
Anarrhinum (family Plantaginaceae, formerly Scrophulariaceae) is a genus of flowering plants that occurs in temperate and subtropical regions.^{1,2} The major secondary metabolites produced by this genus are iridoid glycoside esters,^{3,4} although to date only a few species have been investigated chemically. The function of iridoids in plants has been related to plant defense and insect adaption; however, they also exhibit a wide range of pharmacological activities such as anti-inflammatory, antineoplastic, antidiabetic, and neuroprotective effects.^{5,6} In the course of a continuing study on Algerian plants,^{7,8} it was found that several iridoids such as asperuloside, geniposidic acid, and iridoid VI exhibited antiangiogenic activities.⁹ Angiogenesis is the growth of new blood vessels to ensure wound healing, reproduction, and development of cells, playing an important role in many physiological processes.

However, unregulated angiogenesis is still involved in inflammatory diseases, tumor growth, and metastasis. Thus, the inhibition of angiogenesis is considered a promising strategy against neoplastic growth and for the prevention of inflammatory disorders, and nowadays there is a growing interest in discovering new angiomodulators from natural sources. Accordingly, a phytochemical investigation was conducted of *Anarrhinum pedatum* Desf., a herbaceous plant

Special Issue: Special Issue in Honor of Drs. Rachel Mata and Barbara Timmermann

Received: October 24, 2018

Chart 1



with a over-bearing stalk, as obtained in the northeastern region of Algeria.^{10,11}

In this contribution, we report for the first time a study on the *A. pedatum* aerial parts, leading to the isolation and structural characterization of 12 new compounds, including 10 iridoid glycosides (1–10) and two monoterpenoids (11 and 12), together with nine known compounds (13–21). The isolates were assayed for their inhibitory effects on neo-vascularization by two in vivo models, with zebra fish embryos and chicken chorioallantoic membranes, (CAMs), as to be considered new potential antiangiogenic agents.

RESULTS AND DISCUSSION

The aerial parts of *A. pedatum* were defatted with n-hexane and then extracted with solvents of increasing polarity. The MeOH extract was partitioned between n-BuOH and H₂O to give an n-BuOH residue. This extract was subjected to Sephadex LH-

20, CPC, and RP-HPLC separations to a yield in pure form 12 new (1–12) and nine known compounds (13–21).

The molecular formula of compound 1 was determined as C₃₅H₅₀O₁₄ by HRESIMS, showing a sodiated molecular ion peak at *m/z* 717.3090 for [M + Na]⁺ and a protonated ion peak at *m/z* 695.3278, supported by the NMR spectra. In the ESIMS, fragments obtained in the positive mode, at *m/z* 699 [M + Na – 18]⁺ and 551 [M + Na – 166]⁺, revealed the losses of a water molecule and a C₁₀ ester side chain. The ¹H and ¹³C NMR spectra of compound 1 (Table 1) showed the presence of a group of characteristic signals for a C₉-type iridoid skeleton at δ 1.49 (s, Me-10)/16.0 (C-10), 2.86 (br s, H-9)/49.4 (C-9), 3.63 (d, *J* = 2.0 Hz, H-7)/64.0 (C-7), 5.15 (d, *J* = 2.0 Hz, H-6)/76.5 (C-6), 5.48 (d, *J* = 6.5 Hz, H-4)/102.4 (C-4), 5.82 (d, *J* = 2.2 Hz, H-1)/93.5 (C-1), and 6.59 (d, *J* = 6.5 Hz, H-3)/145.6 (C-3) and of one β -glucopyranose moiety, having an anomeric proton at δ 4.68 (d, *J* = 7.8 Hz). These

Table 1. ¹H and ¹³C NMR Data of Compounds 1–4^a

position	1		2		3		4	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	5.82 d (2.2)	93.5	5.98 d (2.2)	92.3	5.81 d (2.0)	93.5	5.96d (2.7)	92.8
3	6.59 d (6.5)	145.6	6.58 d (6.5)	145.4	6.58 d (6.5)	145.6	6.56 d (6.7)	145.5
4	5.48 d (6.5)	102.4	5.49 d (6.5)	102.4	5.49 d (6.5)	102.4	5.47 d (6.7)	102.6
5		80.3		80.5		79.0		80.6
6	5.15 d (2.0)	76.5	5.19 d (2.0)	76.2	5.15 d (2.2)	76.3	5.17 d (2.0)	76.2
7	3.63 d (2.0)	64.0	3.78 d (2.0)	60.9	3.63 d (2.4)	64.3	3.71 d (2.0)	61.4
8		64.6		66.6		64.0		66.0
9	2.86 br s	49.4	3.01 br s	49.0	2.88 br s	50.1	3.02 br s	48.8
10a	1.49 s	16.0	4.16 d (13.0)	61.1	1.50 s	16.1	4.14 d (13.0)	61.0
10b			3.56 d (13.0)				3.56 d (13.0)	
glc-1'	4.68 d (7.8)	100.0	4.70 d (8.0)	100.4	4.71 d (7.8)	100.5	4.68 d (7.7)	100.4
2'	3.23 br t (9.0)	74.4	3.22 br t (9.0)	73.8	3.23 br t (9.0)	74.6	3.22 br t (9.5)	74.0
3'	3.37 t (9.5)	77.7	3.36 t (9.5)	77.6	3.37 t (9.5)	77.9	3.35 ^b	77.6
4'	3.31 t (9.5)	70.9	3.35 t (9.5)	71.2	3.32 t (9.5)	71.2	3.34 ^b	71.1
5'	3.40 m	77.8	3.41 m	77.4	3.40 m	77.9	3.38 m	77.4
6'a	3.97 dd (12.0, 3.0)	62.4	3.94 dd (12.0, 3.0)	62.0	3.98 dd (12.0, 2.5)	62.4	3.94 dd (12.0, 2.0)	62.7
6'b	3.71 dd (12.0, 5.5)		3.73 dd (12.0, 5.0)		3.73 dd (12.0, 5.0)		3.71 dd (12.0, 4.5)	
1''		167.3		167.1		166.0		166.0
2''		128.3		128.9		125.1		127.2
3''	6.78 br t (6.9)	142.6	6.79 br t (6.9)	143.1	6.71 br t (7.3)	144.3	6.71 br t (7.0)	144.4
H ₂ -4''	2.31 ^b m	27.5	2.33 ^b m	26.4	2.23 m	24.1	2.23 m	24.0
H ₂ -5''	2.19 ^b m	31.1	2.22 ^b m	30.8	1.59 t (8.2)	41.5	1.57 t (8.2)	41.5
6''		137.8		138.6		71.8		72.1
7''	5.43 br d (7.7) ^b	126.0	5.44 br d (7.7) ^b	125.2	5.93 dd (16.9, 12.0)	145.5	5.93 dd (17.0, 11.0)	145.0
8''a	4.09 ^b	58.6	4.06 ^b	58.6	5.27 br d (17.1)	112.1	5.25 br d (17.0)	112.1
8''b	4.09 ^b		4.06 ^b		5.07 br d (11.4)		5.07 br d (11.0)	
9''	1.80 ^b s	13.0	1.81 s	12.5	1.80 ^b s	12.0 ^b	1.80 s	12.0
10''	1.79 ^b s	23.0	1.78 s	22.8	1.29 s	27.4	1.28 s	27.4
1		167.8		167.8		165.7		166.0
2		128.3		128.4		127.0		128.5
3	6.69 br t (6.9)	143.0	6.71 br t (6.9)	143.4	6.78 br t (7.6)	143.1	6.77 br t (7.3)	143.3
H ₂ -4	2.31 ^b m	27.5	2.33 ^b m	26.4	2.34 m ^b	27.8	2.33 m ^b	27.8
H ₂ -5	2.19 ^b m	31.0	2.22 ^b m	30.8	2.25 ^b	31.4	2.23 ^b	31.3
6		137.8		138.6		136.2		137.5
7	5.43 br d (7.7) ^b	126.0	5.44 br d (7.7) ^b	125.2	5.46 br d (7.0)	126.2	5.46 br d (6.5)	126.2
H ₂ -8	4.09 ^b	58.6	4.06 ^b	58.6	4.11 d (6.7)	59.0	4.10 d (6.5)	58.8
9	1.80 ^b s	12.0	1.81 s	11.6	1.80 ^b s	12.0 ^b	1.79 s	12.0
10	1.79 ^b s	23.0	1.78 s	22.8	1.81 s	23.0	1.78 s	23.2

^aSpectra were run in methanol-d₄ at 600 MHz (¹H) and 150 MHz (¹³C) for 1 and 2; at 500 MHz (¹H) and 125 MHz (¹³C) for 3 and 4. J values are in parentheses and reported in Hz; chemical shifts are given in ppm; assignments were confirmed by COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments. ^bOverlapped signal.

data led to the iridoid portion of 1 being identified as antirrininose.^{12,13} The additional NMR signals could be clearly attributed to two foliamenthoyl moieties³ with the help of 1D-TOCSY, DQF-COSY, HSQC, and HMBC experiments, which showed correlation peaks between δ 2.19 (H₂-5'' and H₂-5') and δ 23.0 (C-10'' and C-10'), 126.0 (C-7'' and C-7'), and 137.8 (C-6'' and C-6'); δ 2.31 (H₂-4'' and H₂-4') and δ 128.3 (C-2'' and C-2'), 142.6 (C-3''), and 143.0 (C-3'); δ 4.09 (H₂-8'' and H₂-8') and δ 126.0 (C-7'' and C-7'); δ 6.69 (H-3) and δ 12.0 (C-9) and 167.8 (C-1); and δ 6.78 (H-3'') and δ 13.0 (C-9'') and 167.3 (C-1''). Other HMBC correlations between 4.68 (H-1'_{glc}) and 93.5 (C-1) and 5.15 (H-6) and 167.8 (C-1) indicated the substitution sites of the glucose unit and one of the foliamenthoyl moieties. The other foliamenthoyl unit was located at C-5 of the iridoid skeleton as a result of its downfield shift from 73.4 ppm in 6-O-nerol-8-oylantirrininose (6-foliamenthoylantirrininose)³ or 74.5 ppm

in antirrininose¹³ to 80.3 ppm in 1. The configuration of the sugar unit was assigned after hydrolysis of 1 with 1 N HCl followed by GC analysis of the trimethylsilylated sugars by a chiral column. This procedure was used to determine the absolute configuration of the sugar units of all new compounds. From the above results, compound 1 was identified as 5,6-O-difoliamenthoylantirrininose.

The molecular formula of compound 2 (C₃₅H₅₀O₁₅) was determined by its ¹³C NMR data and HRESIMS ([M + H]⁺ ion at m/z 711.3229), varying from that of 1 by 16 amu. Comparison of the NMR spectroscopic data of 2 with those of 1 (Table 1) showed these compounds to differ only in the iridoid moiety, having in 2 a hydroxymethylene group at C-8 (δ_{H} 3.56 and 4.16, both d, J = 13.0 Hz) instead of a methyl group (δ_{H} 1.49, s). The iridoid glucoside portion of 2 was thus characterized as macfadeninose¹⁴ instead of antirrininose in

Table 2. ¹H and ¹³C NMR Data of Compounds 5–7^a

position	5		6		7	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	5.55 d (7.5)	94.3	5.57 d (6.4)	93.3	5.24 d (8.5)	95.0
3	6.42 d (6.0)	142.6	6.43 d (6.5)	142.0	6.39 d (6.2)	142.0
4	4.97 d (6.2)	107.3	4.97 d (6.5)	106.0	4.92 d (6.2)	107.0
5		73.5		73.3		73.0
6	5.10 br s	79.2	5.13 d (2.0)	77.2	3.96 d (1.7)	77.6
7	3.72 br d (2.0)	58.0	3.58 d (2.0)	61.6	3.57 ^b	62.2
8		65.0		63.1		65.0
9	2.63 d (7.5)	51.1	2.50 d (6.4)	52.0	2.57 d (8.5)	50.3
10a	4.15 d (13.5)	60.8	1.51 s	17.0	4.11 d (12.8)	60.6
10b	3.71 d (13.5)				3.62 d (12.8)	
glc-1'	4.72 d (8.0)	99.3	4.68 d (8.0)	98.4	4.71 d (8.0)	99.0
2'	3.25 br t (9.0)	74.3	3.25 ^b	73.4	3.30 ^b	74.0
3'	3.34 t (9.0)	78.2	3.35 t (9.5)	78.3	3.44 t (9.5)	77.0
4'	3.28 t (9.5)	71.3	3.26 ^b	70.4	3.43 t (9.5)	71.1
5'	3.44 m	77.3	3.43 m	76.4	3.57 ^b	75.0
6'a	3.93 dd (12.0, 3.0)	62.4	3.98 dd (12.0, 2.0)	62.8	4.50 dd (12.0, 2.3)	63.6
6'b	3.66 dd (12.0, 5.0)		3.60 dd (12.0, 6.0)		4.36 dd (12.0, 5.5)	
1''		167.8		134.3		134.0
2''		128.1	7.65 dd (7.5, 2.8)	128.0	7.64 dd (7.5, 3.0)	128.2
3''	6.94 br t (7.4)	143.9	7.40 ^b	128.6	7.42 ^b	130.0
4''a	2.36 m ^b	28.0	7.40 ^b	130.0	7.42 ^b	131.2
4''b	2.36 m ^b					
5''	2.26 br t (7.6) ^b	31.1	7.40 ^b	128.6	7.42 ^b	130.0
6''		138.1	7.65 dd (7.5, 2.8)	128.0	7.64 dd (7.5, 3.0)	128.2
7''	5.43 br d (6.4)	126.2	7.81 d (16.5)	145.6	7.70 d (16.0)	146.4
8''	4.10 d (6.4) ^b	58.8	6.63 d (16.5)	117.0	6.59 d (16.0)	117.5
9''	1.90 s	12.1		166.6		166.8
10''	1.78 s	23.1				

^aSpectra were run in methanol-d₄ at 500 MHz (¹H) and 125 MHz (¹³C) for 5 and 6; at 600 MHz (¹H) and 150 MHz (¹³C) for 7. J values are in parentheses and reported in Hz; chemical shifts are given in ppm; assignments were confirmed by COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments. ^bOverlapped signal.

1.¹² Thus, compound 2 was identified as 5,6-O-difoliamentholylmacfadienoside.

The HRESIMS of compound 3 in the positive-ion mode showed a [M + Na]⁺ sodiated molecular ion peak at m/z 717.3083, corresponding to a molecular formula of C₃₅H₅₀O₁₄, and hence was assigned as an isomer of 1. Two main fragments at m/z 533.1976 [M + Na – 184]⁺ and 349.0883 [M + Na – 184 – 184]⁺, due to the subsequent loss of two C₁₀ ester moieties, were also observed. The signals in the 1D and 2D NMR spectra (Table 1) of 3 were superimposable on those of 1 except for an ester moiety identified as a menthialfolyl unit from signals at δ 1.29 (H-10'')/27.4 (C-10''), 1.80 (H-9'')/12.0 (C-9''), 1.59 (H₂-5'')/41.5 (C-5''), 2.23 (H₂-4'')/24.1 (C-4''), 5.27 (H-8a'')–5.07 (H-8b'')/112.1 (C-8''), 5.93 (H-7'')/145.5 (C-7''), and 6.71 (H-3'')/144.3 (C-3''), 71.8 (C-6''), 125.1 (C-2''), and 166.0 (C-1''),¹⁵ instead of a foliamenthoyl unit. The assignments of all proton and carbon signals were deduced from a combined analysis of 1D and 2D NMR experiments. The HMBC spectrum indicated the substitution site of the menthialfolyl moiety from the cross-peak between δ 5.15 (H-6) and 165.7 (C-1). Unfortunately, no cross-peak was evident that correlated the menthialfolyl moiety with C-5, but again the downfield shift of C-5 (79.0 ppm) clearly indicated that this was the substitution site. From these results, the structure of compound 3 was determined as 5-O-menthialfolyl-6-O-foliamentholylantirrinoside.

Compound 4 (C₃₅H₅₀O₁₅) showed a [M + Na]⁺ peak at m/z 733.3040 in the positive HRESIMS and hence was assigned as an isomer of 2. The HRESIMS/MS displayed a fragment peak at m/z 549.1961 [M + Na – 184]⁺ similar to that of the previous compounds 1–3. The spectroscopic data (Table 1) of the ester and sugar moieties were identical to those of 3, while the iridoid portion was superimposable with that of 2 and characterized as macfadienoside.¹⁴ Consequently, compound 4 was deduced as 5-O-menthialfolyl-6-O-foliamentholylmacfadienoside.

The HRESIMS of compound 5 showed a sodiated molecular ion peak at m/z 567.2023 [M + Na]⁺, consistent with a molecular formula of C₂₅H₃₆O₁₃, 166 amu less than that of 4. Comparison of its NMR spectra (Table 2) with those of 4 showed that 5 differed in the absence of the menthialfolyl unit linked at C-5. Therefore, 5 was identified as 6-O-foliamentholylmacfadienoside.

Compound 6 was assigned a molecular formula of C₂₄H₂₈O₁₁, as deduced from the [M + Na]⁺ ion at m/z 515.1500 in the positive HRESIMS, as well as from the analysis of its ¹³C NMR spectroscopic data (Table 2). The NMR spectra (Table 2) showed the presence of an iridoid glycoside moiety superimposable on that of 1 and an aromatic acyl moiety identified as a trans-cinnamoyl group [δ 6.63 (H-8'')/117.0 (C-8''), 7.40 (H-3''/H-5'')/128.6 (C-3''/C-5''), 7.40 (H-4'')/130.0 (C-4''), 7.65 (H-2''/H-6'')/128.0 (C-2''/C-6''), 7.81 (H-7'')/145.6 (C-7'')].³ The HMBC experiment

Table 3. ¹H and ¹³C NMR Data of Compounds 8–10^a

position	8		9		10	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	5.22 d (5.5)	95.6	5.25 ^b	95.4	5.28 d (5.6)/5.14 d (5.6)	95.0
3	7.53 s	151.0	7.54 s	151.4	7.51 s	151.7
4		112.0		112.0		112.1
5	3.24 ^b	33.0	3.26 m	32.0	3.19 ^b	32.5
6a	2.36 m	30.0	2.38 m	30.6	2.32 m	30.4
6b	1.29 m		1.49		1.40 m	
7a	1.70 m ^b	39.0	1.63 ^b	41.4	1.68 br t (7.6)	39.3
7b	1.70 m ^b		1.63 ^b		1.63 br t (7.3)	
8		79.9		79.6		79.6
9	2.15 dd (5.5, 4.0)	51.0	2.16 m	51.7	2.15 m	51.1
10	1.32 s	24.0	1.34 s	24.5	1.30 s	24.1
11		167.4		167.5		167.2
glc-1'	4.73 d (7.7)	99.0	4.73 d (8.0)	99.3	4.71 d (7.8)/4.70 d (7.8)	99.0
2'	3.23 ^b	74.0	3.24 br t (9.0)	74.4	3.19 ^b	74.2
3'	3.39 t (9.5)	77.0	3.41 t (9.5)	77.5	3.40 t (9.5)	77.0
4'	3.37 t (9.5)	70.5	3.38 t (9.5)	71.3	3.35 ^b	71.0
5'	3.54 m	75.0	3.54 m	75.3	3.56 m/3.53 m	75.7
6'a	4.50 dd (12.0, 2.5)	63.3	4.53 dd (12.0, 3.0)	63.8	4.55 dd (11.5, 2.0)/4.51 dd (12.0, 2.0)	63.6
6'b	4.30 dd (12.0, 5.0)		4.30 dd (12.0, 5.0)		4.39 (12.0, 5.8)/4.33 dd (12.5, 6.0)	
1''		168.0		167.9		
2''		128.0		127.0		
3''	6.78 br t (7.6)	142.7	6.81 br t (7.6)	144.0		
H ₂ -4''	2.32 m	27.0	2.26 m	24.1		
H ₂ -5''	2.22 br t (7.5)	30.7	1.71 m	39.7		
6''		138.0		72.2		
7''	5.44 t (5.5)	125.8	5.94 dd (17.0, 10.0)	145.0		
8''a	4.07 d (7.0) ^b	58.1	5.25 ^b	112.1		
8''b	4.07 d (7.0) ^b		5.08 br d (10.0)			
9''	1.86 s	11.5	1.86 s	12.0		
10''	1.76 s	23.2	1.30 s	27.0		
trans 1''						125.2
2''/6''					7.45 d (8.0)	130.9
3''/5''					6.78 d (8.0)	115.5
4''						160.0
7''					7.68 d (16.0)	146.7
8''					6.35 d (16.0)	114.6
9''						167.9
cis 1''						126.5
2''/6''					7.66 d (8.0)	133.7
3''/5''					6.76 d (8.0)	115.8
4''						159.0
7''					6.87 d (12.0)	145.2
8''					5.77 d (12.0)	115.8
9''						167.2
fru-1a	4.05 d (12.0)	61.3	4.07 ^b	61.8	4.09 d (12.0)/4.07 d (12.0)	61.4
1b	3.69 ^b		3.70 ^b		3.60 ^b	
2		98.0		97.8		97.0
3	3.88 d (10.0)	68.0	3.90 d (10.0)	68.4	3.90 d (9.8)/3.88 d (10.0)	68.7
4	4.02 dd (10.0, 4.0)	69.0	4.04 ^b	69.0	4.00 m	69.0
5	5.13 m	72.2	5.15 m	72.0	5.12 m	72.6
6 a	3.70 ^b	65.0	3.71 ^b	65.2	3.71 dd (16.0, 12.0)/3.69 dd (16.0, 12.0)	65.0
6 b	3.49 br t (10.0)		3.51 br t (11.0)		3.46 dd (16.0, 5.0)	

^aSpectra were run in methanol-d₄ at 600 MHz (¹H) and 150 MHz (¹³C) for 8 and 10; at 500 MHz (¹H) and 125 MHz (¹³C) for 9. J values are in parentheses and reported in Hz; chemical shifts are given in ppm; assignments were confirmed by COSY, 1D-TOCSY, HSQC, and HMBC experiments. ^bOverlapped signal.

supported the location of the ester moiety at C-6, from the correlation peak observed between δ 5.13 (H-6) and 166.6 (C-

9''). Therefore, **6** was identified as 6-O-trans-cinnamoylantirri-noside.

A molecular formula of $C_{24}H_{28}O_{12}$ was assigned to compound 7 as determined by its HRESIMS ($[M + Na]^+$ at m/z 531.1469) and NMR data. In the HRESIMS/MS, a fragment ion at m/z 401.1205 $[M + Na - 130]^+$ was observed, due to the loss of a cinnamoyl residue. Analysis of the NMR data (Table 2) of compound 7 revealed the presence of an iridoid glucoside unit attributable to macfadienoside¹⁴ and a trans-cinnamoyl ester moiety. The position of the ester group at C-6' of the glucose moiety was deduced by the HMBC correlation between δ 4.50 (H-6'_{glc}) and 166.8 ppm (C-9''). Thus, compound 7 was determined as 6'-O-trans-cinnamoyl-macfadienoside.

The HRESIMS of compound 8 exhibited a sodiated molecular ion peak at m/z 727.2787 $[M + Na]^+$, consistent with a molecular formula of $C_{32}H_{48}O_{17}$, as deduced also by its ¹³C NMR data (Table 3). The positive ESIMS/MS showed peaks at m/z 709 $[M + Na - 18]^+$ and 547 $[M + Na - 18 - 162]^-$, due to the subsequent loss of one water molecule and one hexose residue. The analysis of the ¹³C NMR spectrum (Table 3) allowed 16 signals to be attributed to an iridoid glucoside, 10 to an ester chain, and six to another sugar residue consisting of a hexose unit. The spectroscopic data of compound 8 (Table 3) showed the presence of a typical conjugated carboxylic enol-ether system of an iridoid with characteristic signals at δ 1.32 (s, Me-10)/24.0 (C-10), 1.70 (m, H₂-7)/39.0 (C-7), 2.15 (dd, $J = 5.5, 4.0$ Hz, H-9)/51.0 (C-9), 2.36, 1.29 (m, H-6a and H-6b)/30.0 (C-6), 3.24 (overlapped signal, H-5)/33.0 (C-5), 5.22 (d, $J = 5.5$ Hz, H-1)/95.6 (C-1), and 7.53 (s, H-3)/151.0 (C-3), and of one β -glucopyranose moiety, having an anomeric proton at δ 4.73 (d, $J = 7.7$ Hz). The iridoid portion was thus identified as mussaenosidic acid.¹⁶ The presence of a foliamenthoyl ester moiety linked at C-6 of the glucose unit was also clearly evident from the 1D and 2D spectroscopic data, particularly from the HMBC correlations between δ 4.50/4.30 (H-6'a and H-6'b) and 168.0 (C-1''). Thus, a partial structure of agnucastoid A was recognized.¹⁷ An additional hexose moiety, a fructose unit in a pyranosyl form esterified at C-5, was proposed by means of the 1D and 2D NMR spectra.¹⁸ The carbon chemical shift of the carboxylic function at δ 167.4 (C-11) (171.3 ppm in agnucastoid A)¹⁷ in the iridoid skeleton suggested that the fructopyranose sugar moiety is linked in an ester linkage through C-5. In order to confirm the β -fructopyranose relative conformation, the acetonide derivative 8a was prepared (Experimental Section). Thus, C-1 and C-2 of the β -fructopyranose unit were shifted from 61.3 and 98.0 ppm to 73.4 and 107.6 ppm, respectively, in the 1,2-O-isopropylidene derivative 8a, in a manner completely in accordance with 1,2-O-isopropylidene- β -D-fructopyranose reported in the literature.¹⁹ From these data, the structure of 8 was determined as agnucastoid A 11-(5-O- β -D-fructopyranosyl) ester.

Compound 9 showed a molecular formula of $C_{32}H_{48}O_{17}$ by means of HRESIMS (m/z 727.2764 $[M + Na]^+$), suggesting it is an isomer of 8. Analysis of its NMR data (Table 3) and comparison with those of 8 showed that these compounds possess the same iridoid structure, but with a different ester moiety present. Thus, characteristic signals of a menthialfoloyl ester unit were present instead of signals for a foliamenthoyl moiety (δ 1.30 (H-10'')/27.0 (C-10''), 1.71 (H₂-5'')/39.7 (C-5''), 1.86 (H-9'')/12.0 (C-9''), 2.26 (H₂-4'')/24.1 (C-4''), 5.25 (H-8a'')-5.08 (H-8b'')/112.1 (C-8''), 5.94 (H-7'')/145.0 (C-7''), 6.81 (H-3'')/144.0 (C-3''), 72.2 (C-6''), 127.0 (C-2''),

and 167.9 (C-1''). Thus, 9 was elucidated as 6'-O-menthialfoloylmussaenosidic acid-11-(5-O- β -D-fructopyranosyl) ester.

Compound 10 displayed a molecular formula of $C_{31}H_{40}O_{17}$ from its HRESIMS (m/z 707.2156 $[M + Na]^+$) and NMR data. The ESIMS of 10 showed a sodiated molecular ion peak at m/z 707 $[M + Na]^+$ and a fragmentation pattern with peaks at m/z 689 $[M + Na - 18]^+$, 545 $[M + Na - 162]^+$, and 399 $[M + Na - 162 - 146]^+$, corresponding to the subsequent loss of a water molecule, one hexose unit, and one p-coumaroyl moiety. Analysis of the NMR data of 10 (Table 3) showed there were close similarities with those of 8, except for the presence of two coupled signals attributable to trans-olefinic protons at δ 6.35 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-8''trans) and 7.68 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-7''trans), cis-olefinic protons at δ 5.77 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-8''cis) and 6.87 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-7''cis), and two ortho-coupled A₂B₂ aromatic proton signals at δ 6.78 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3''/H-5''trans) and 7.45 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2''/H-6''trans), and 6.76 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3''/H-5''cis) and 7.66 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2''/H-6''cis), instead of signals of the foliamenthoyl ester chain. Thus, compound 10 was identified as an inseparable 1:1 mixture of 6'-O-(trans and cis-p-coumaroyl)mussaenosidic acid-11-(5-O- β -D-fructopyranosyl) ester. To the best of our knowledge this is the first report of C₁₀ iridoid fructopyranosyl esters.

Compound 11 was assigned a molecular formula of $C_{22}H_{36}O_{13}$, as determined by its positive HRESIMS data (m/z 531.2021 $[M + Na]^+$) and ¹³C NMR spectrum. The positive ESIMS/MS showed peaks at m/z 369 $[M + Na - 162]^+$ and 207 $[M + Na - 162 - 162]^-$, due to the subsequent loss of two hexose residues. The ¹H and ¹³C NMR spectra (Experimental Section) revealed the presence of two methyl groups attached to double bonds, two methylene groups, two trisubstituted double bonds, and one hydroxymethylene group. An HSQC experiment was used to establish the association of the protons with the corresponding carbons, leading to the characterization of the acyclic monoterpene part of the molecule as 8-hydroxy-2,6-dimethyl-(2E,6E)-octadienoic acid, or foliamenthic acid.²⁰ Two β -glucopyranosyl units were also evident from the 1D-TOCSY, COSY, and HSQC experiments conducted. The HMBC spectrum indicated the positions of the glucosyl moieties, showing correlations between δ 5.55 (H-1') and 167.6 (C-1) and δ 4.30 (H-1'') and 65.6 (C-8). Thus, compound 11 was determined as foliamenthic acid 1-O- β -D-glucopyranosyl ester 8-O- β -D-glucopyranoside.

The molecular formula of compound 12 was determined by HRESIMS to be $C_{16}H_{26}O_8$ from the sodiated molecular ion peak at m/z 369.1594. The ESIMS/MS showed a prominent fragment at m/z 207 $[M + Na - 162]^+$, due to the loss of a hexose moiety, leading to the inference of the presence of a monoterpene glycoside structure. The monoterpene aglycone moiety was characterized as foliamenthic acid as in 11²⁰ from the 1D and 2D NMR experiments carried out. Two sets of signals were observed for glucose in the ¹H and ¹³C NMR spectra (Experimental Section), indicating that compound 12 is present as a mutarotational mixture of α - and β -anomers. The HMBC correlation of H-6b_{glc α} and H-6b_{glc β} at δ 4.27 with C-1 at δ 167.8 established the position of the glucose moiety. From these data, the structure of 12 was determined as 6-O-foliamenthoyl- α , β -D-glucopyranose.

Compounds 13–21 were characterized as 6-O-nerol-8-oyl-antirrinoside (13),³ antirrinoside (14),¹³ 6-O-trans and cis-p-coumaroyl antirrinoside (15),¹² 6'-O-cinnamoylantirrinoside

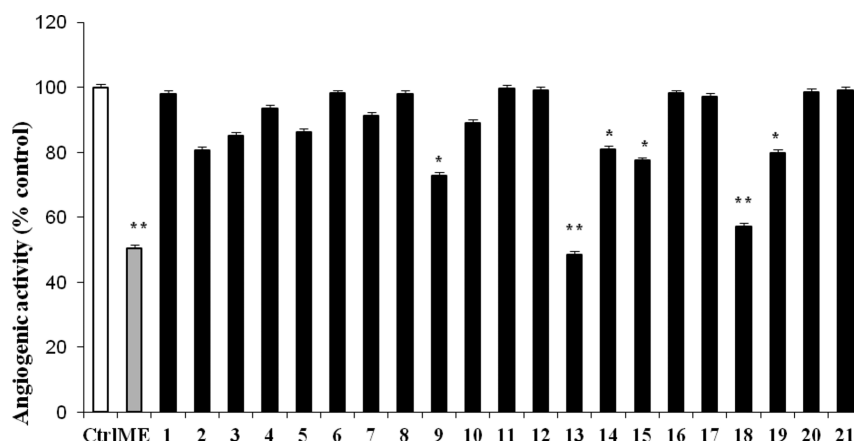


Figure 1. Angiogenic activity (% vs control) of compounds 1–21 (2 μ M) in a zebra sh embryo endogenous alkaline phosphatase assay. ME = 2-methoxyestradiol (2 μ M). *p < 0.05 and **p < 0.01 vs control: Student's t-test.

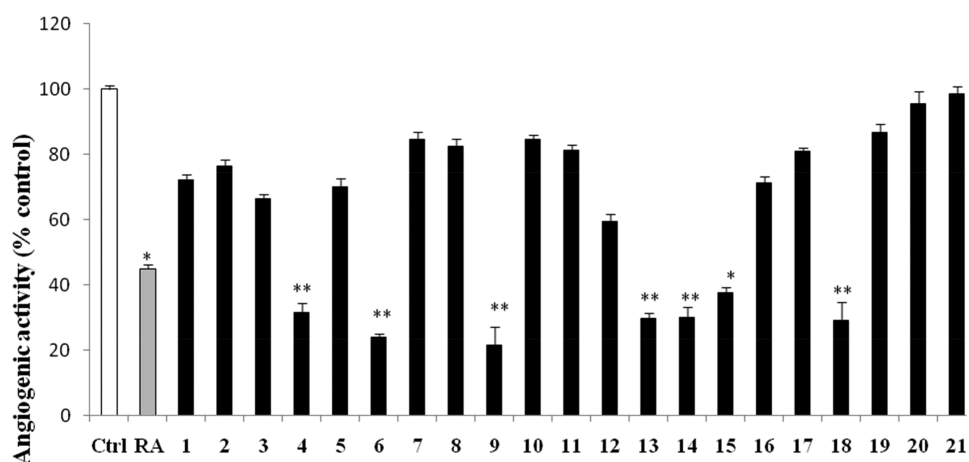


Figure 2. Angiogenic activity (% vs control) of compounds 1–21 (2 μ M) in the CAM assay. RA = retinoic acid (3 μ M). *p < 0.05 and **p < 0.01 vs control: Student's t-test.

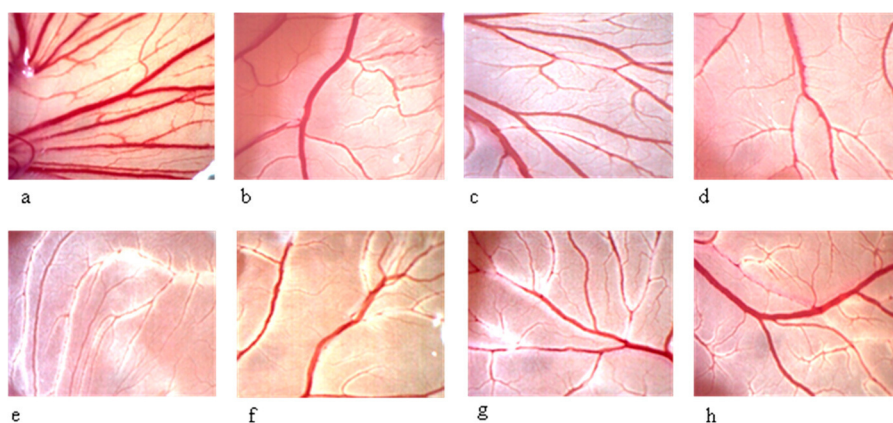


Figure 3. Antiangiogenic activity of *A. pedatum* compounds (2 μ M) in the CAM assay. a = control, b = retinoic acid (3 μ M), c = 4, d = 6, e = 9, f = 13, g = 14, and h = 18. The images of CAMs were captured using a stereomicroscope (SMZ-171 Series, Motic) equipped with a digital camera (Moticam 5 plus).

(16),³ agnucastolide A (17),¹⁷ (6S)-2E-2,6-dimethyl-6-hydroxyocta-2,7-dienoic acid β -glucopyranosyl ester (18),²¹ glucosyl 8-hydroxy-2,6-dimethyl-(2E,6E)-octadienoate (19),²⁰ (S)-menthiafolinic acid (20),²² and foliamenthic acid (21)²⁰ by comparison of their NMR and MS literature data.

All of the isolated compounds (1–21) were assayed by two in vivo models, involving zebra sh embryos and CAMs. The

zebra sh is suitable for identification of angiogenesis inhibitors, since development of blood vessels in early embryos is well characterized and easily monitored. A zebra sh endogenous alkaline phosphatase (EAP) assay was used to evaluate the antiangiogenic activity of the isolated compounds from *A. pedatum*. As shown in Figure 1, the results demonstrated that, among the new isolates, compound 9 exhibited the best

antiangiogenic activity by reducing significantly ($p < 0.05$) the growth of blood vessels (72.72%) in zebra fish embryos as compared to the control used. Weaker effects were observed for the other new isolates in the following order: 2 > 3 > 5 > 10 > 7 > 4 > 8 > 1 > 6 > 12 > 11. In addition, significant antiangiogenic activities were observed after treatment with the known isolated compounds, 13 (48.33%, $p < 0.01$), 18 (56.98%, $p < 0.01$), 15 (77.38%, $p < 0.05$), 19 (79.82%, $p < 0.05$), and 14 (81%, $p < 0.05$). The effects on angiogenesis of *A. pedatum* isolated compounds were compared with that of 2-methoxyestradiol (52%, $p < 0.01$), an endogenous metabolite of 17 β -estradiol having known antiangiogenic and antitumor properties.

In this study, the CAM assay was also performed to explore the antiangiogenic potential of the *A. pedatum* isolates. The CAM, formed on day 4–5 in chicken embryos, shows an extremely dense vascular network. When an angiostatic sample is tested, the vessels become less dense and even disappear. Overall, it is evident that a significant antiangiogenic response was obtained with this experimental model.⁹ The results, as summarized in Figure 2, showed the highest antiangiogenic activities for compounds 9 > 6 > 18 > 13 > 14 > 4. The effects on angiogenesis, expressed as percentages versus control eggs, were 21.54%, 23.86%, 28.98%, 29.57%, 29.90%, and 31.45%, respectively. Retinoic acid was used as positive standard (45.01%). Images of representative microscopic observations are shown in Figure 3. After 6 days of incubation, the CAM of control eggs showed the presence of a rich vascular network (Figure 3a). A significant inhibitory effect on capillary formation was observed with retinoic acid (Figure 3b). In the CAMs treated with the more active compounds (4, 6, 9, 13, 14, 18), the microvasculature appeared less dense (Figure 3c–h). The inhibitory effects on vessel growth were particularly evident after treatment with compound 9 (Figure 3e). Notably, compounds 9, 13, and 18 showed a significant activity in both assays. Our results are in accordance with previous reports that have shown the antiangiogenic activity of iridoid derivatives.^{9,23}

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. An Atago AP-300 digital polarimeter with a sodium lamp (589 nm) and 1 dm microcell was used to measure optical rotations. NMR experiments were recorded on Bruker DRX-600 and DRX-500 spectrometers, acquiring the spectra in methanol- d_4 . Standard pulse sequences and phase cycling were used for TOCSY, HSQC, COSY, and HMBC NMR experiments. HRESIMS were obtained in the positive-ion mode on an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) and Q-TOF Premier spectrometer equipped with a nanospray ion source (Waters Milford, MA, USA). ESIMS were obtained from an LCQ Advantage ThermoFinnigan spectrometer (ThermoFinnigan, USA). Column chromatography was performed over Sephadex LH-20. HPCPC chromatography was carried out on a CPC240 Everseiko chromatographer equipped with 3136 cells (240 mL) (Everseiko Co., Japan). HPLC analysis was performed using a Shimadzu LC-8A series pumping system equipped with a Shimadzu RID-10A refractive index detector and Shimadzu injector on a C₁₈ μ -Bondapak column (30 cm \times 7.8 mm, 10 μ m Waters, flow rate 2.0 mL/min). TLC separations were carried out using silica gel 60 F₂₅₄ (0.20 mm thickness) plates (Merck) with n-BuOH–CH₃COOH–H₂O (60:15:25) as eluent and cerium sulfate as spray reagent. GC analysis was performed using a Dani GC 1000 instrument on a L-CP-Chirasil-Val column (0.32 mm \times 25 m), working with the following temperature program: 100 °C for 1 min, ramp of 5 °C/min up to 180 °C; injector and detector

temperature 200 °C; carrier gas N₂ (2 mL/min); detector dual FID; split ratio 1:30; injection 5 μ L.

Plant Material. The aerial parts of *Anarrhinum pedatum* were collected in May 2016 in Djbel El Ouahch, Constantine, Algeria. The plant was identified by Prof. Kamel Kabouche, Université des Frères Mentouri-Constantine, Constantine, Algeria, where a voucher specimen (number AP.05.16) has been deposited at the Herbarium of the Department of Chemistry.

Extraction and Isolation. The dried and powdered aerial parts (2 kg) of *A. pedatum* were defatted with n-hexane and then extracted successively for 48 h with CHCl₃, CHCl₃–MeOH (9:1), and MeOH, by exhaustive maceration (3 \times 5 L), to give 30.9, 74.9, and 123.1 g of the respective residue. The MeOH extract was partitioned between n-BuOH and H₂O to give 55.96 g of a dried n-BuOH residue. Part of the n-BuOH fraction (10.6 g) was chromatographed on a Sephadex LH-20 column (5 \times 100 cm) using MeOH as eluent at a flow rate of 1.0 mL/min, collecting fractions of 10 mL, which were analyzed by TLC on silica 60 gel-coated glass with n-BuOH–CH₃COOH–H₂O (60:15:25) and grouped into nine major fractions (A–I). Fraction B (523 mg) was subjected to RP-HPLC with MeOH–H₂O (4.5:5.5) to yield agnucastolide A (17) (4.8 mg, t_R 15 min). Fractions C (2 g) and E (829.5 mg) were separately submitted to HPCPC with CHCl₃–MeOH–H₂O–i-PrOH (9:12:8:1), in which the stationary phase consisted of the lower phase (ascending mode, flow rate 3 mL/min), with fractions of 9 and 3 mL collected, respectively. HPCPC fractions C₃ (236 mg) and C₄ (430 mg) were separately purified by RP-HPLC with MeOH–H₂O (3.5:6.5) as eluent to afford compounds 11 (2.0 mg, t_R 9 min), 9 (6.6 mg, t_R 26 min), and 8 (10.0 mg, t_R 30 min) from fraction C₃ and compound 5 (4.1 mg, t_R 23 min) from fraction C₄. HPCPC fractions C₇ (97.9 mg) and C₈ (425.6 mg) were subjected to RP-HPLC with MeOH–H₂O (4.5:5.5) to yield compounds 4 (1.9 mg, t_R 34 min) and 2 (2.8 mg, t_R 39 min) from fraction C₇ and compounds 3 (3.0 mg, t_R 42 min) and 1 (11 mg, t_R 47 min) from fraction C₈. HPCPC fractions E₂ (90.5 mg), E₅ (43.9 mg), and E₆ (63.7 mg) were chromatographed by RP-HPLC with MeOH–H₂O (3:7) to obtain 14 (1.3 mg, t_R 6 min) and compound 10 (7.4 mg, t_R 33 min) from fraction E₂, 18 (2.9 mg, t_R 16 min), 19 (2.1 mg, t_R 18 min), and compound 12 (2.0 mg, t_R 24 min) from fraction E₅, and compounds 12 (4.5 mg, t_R 24 min) and 7 (2.9 mg, t_R 41 min) from fraction E₆. HPCPC fraction E₇ (59 mg) after separation with RP-HPLC with MeOH–H₂O (3.5:6.5) yielded 20 (3.6 mg, t_R 25 min), 21 (8.3 mg, t_R 27 min), 16 (2.3 mg, t_R 54 min), and compound 6 (3.8 mg, t_R 62 min). Fraction D (410.6 mg) was purified by RP-HPLC with MeOH–H₂O (3.5:6.5) as eluent to give 18 (2.9 mg, t_R 12 min), 19 (1.8 mg, t_R 14 min), and 13 (2.0 mg, t_R 45 min). Fraction F (252.9 mg) was chromatographed by RP-HPLC with MeOH–H₂O (3:7) as eluent to obtain 15 (1.5 mg, t_R 45 min).

Compound (1): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –70 (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; ESIMS m/z 693 [M – H][–], 649 [M – H – 44][–], 717 [M + Na]⁺, 699 [M + Na – 18]⁺, 551 [M + Na – 166]⁺; HRESIMS m/z 717.3090 [M + Na]⁺, 695.3278 [M + H]⁺ (calcd for C₃₅H₅₀O₁₄Na 717.3098).

Compound (2): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ +41 (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; ESIMS m/z 709 [M – H][–], 733 [M + Na]⁺; HRESIMS m/z 711.3229 [M + H]⁺ (calcd for C₃₅H₅₁O₁₅ 711.3228).

Compound (3): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –45 (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; HRESIMS m/z 717.3083 [M + Na]⁺, 551.2084 [M + Na – 166]⁺, 533.1976 [M + Na – 184]⁺, 349.0883 [M + Na – 184 – 184]⁺ (calcd for C₃₅H₅₀O₁₄Na 717.3098).

Compound (4): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ +70 (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; HRESIMS m/z 733.3040 [M + Na]⁺, 549.1961 [M + Na – 184]⁺ (calcd for C₃₅H₅₀O₁₅Na 733.3047).

Compound (5): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ +25 (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 2; HRESIMS m/z 567.2023 [M + Na]⁺, 549.1922 [M + Na – 18]⁺, 405.1504 [M + Na – 162]⁺, 387.1401 [M + Na – 162 – 18]⁺, 383.0937 [M + Na – 184]⁺ (calcd for C₂₅H₃₆O₁₃Na 567.2054).

Compound (6): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –120 (c 0.1, MeOH); ¹H and ¹³C NMR, see Table 2; ESIMS m/z 515 [M + Na]⁺;

HRESIMS m/z 515.1500 $[M + Na]^+$, 497.1386 $[M + Na - 18]^+$, 353.0975 $[M + Na - 162]^+$ (calcd for $C_{24}H_{28}O_{11}Na$ 515.1529).

Compound (7): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -66$ (c 0.1, MeOH); 1H and ^{13}C NMR, see Table 2; ESIMS m/z 531 $[M + Na]^+$, 513 $[M + Na - 18]^+$, 507 $[M - H]^-$, 489 $[M - H - 18]^-$; HRESIMS m/z 531.1469 $[M + Na]^+$, 513.1355 $[M + Na - 18]^+$, 401.1205 $[M + Na - 130]^+$ (calcd for $C_{24}H_{28}O_{12}Na$ 531.1478).

Compound (8): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -168$ (c 0.1, MeOH); 1H and ^{13}C NMR, see Table 3; ESIMS m/z 727 $[M + Na]^+$, 709 $[M + Na - 18]^+$, 547 $[M + Na - 18 - 162]^+$; HRESIMS m/z 727.2787 $[M + Na]^+$, 709.2658 $[M + Na - 18]^+$, 547.2139 $[M + Na - 18 - 162]^+$ (calcd for $C_{32}H_{48}O_{17}Na$ 727.2789).

Compound (9): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -70$ (c 0.1, MeOH); 1H and ^{13}C NMR, see Table 3; ESIMS m/z 727 $[M + Na]^+$, 565 $[M + Na - 162]^+$, 703 $[M - H]^-$, 541 $[M - H - 162]^-$; HRESIMS m/z 727.2764 $[M + Na]^+$, 565.2240 $[M + Na - 162]^+$ (calcd for $C_{32}H_{48}O_{17}Na$ 727.2789).

Compound (10): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} -115$ (c 0.1, MeOH); 1H and ^{13}C NMR, see Table 3; ESIMS m/z 707 $[M + Na]^+$, 689 $[M + Na - 18]^+$, 545 $[M + Na - 162]^+$, 527 $[M + Na - 18 - 162]^+$, 399 $[M + Na - 162 - 146]^+$, 683 $[M - H]^-$; HRESIMS m/z 707.2156 $[M + Na]^+$, 689.2048 $[M + Na - 18]^+$, 527.1515 $[M + Na - 18 - 162]^+$, 381.1153 $[M + Na - 18 - 162 - 146]^+$ (calcd for $C_{31}H_{40}O_{17}Na$ 707.2163).

Compound (11): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +34$ (c 0.1, MeOH); 1H NMR data (CD_3OD , 500 MHz) δ 1.81 (3H, s, Me-10), 1.88 (3H, s, Me-9), 2.32 (2H, m, H₂-5), 2.37 (2H, m, H₂-4), 3.20 (1H, br t, J = 9.0 Hz, H-2_{glcII}), 3.29 (2H, overlapped, H-4_{glcII} and H-5_{glcII}), 3.39 (1H, overlapped, H-5_{glcI}), 3.40 (1H, overlapped, H-4_{glcI} and H-3_{glcII}), 3.42 (1H, overlapped, H-2_{glcI}), 3.43 (1H, overlapped, H-3_{glcI}), 3.70 (2H, dd, J = 12.0, 5.0 Hz, H-6b_{glcI} and H-6b_{glcII}), 3.87 (2H, dd, J = 12.0, 2.5 Hz, H-6a_{glcI} and H-6b_{glcII}), 4.24 (1H, dd, J = 11.0, 3.0 Hz, H-8b), 4.36 (1H, dd, J = 11.0, 5.0 Hz, H-8a), 5.48 (1H, br d, J = 6.6 Hz, H-7), 5.55 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1_{glcI}), 6.93 (1H, br t, J = 6.6 Hz, H-3); ^{13}C NMR data (CD_3OD , 125 MHz) δ 12.0 (C-9), 23.0 (C-10), 27.0 (C-4), 30.2 (C-5), 62.3 (C-6_{glcI} and C-6_{glcII}), 65.6 (C-8), 70.8 (C-4_{glcI}), 71.3 (C-4_{glcII}), 73.6 (C-2_{glcI}), 74.7 (C-2_{glcII}), 77.0 (C-3_{glcI} and C-3_{glcII}), 77.5 (C-5_{glcI}), 78.1 (C-5_{glcII}), 95.0 (C-1_{glcI}), 102.0 (C-1_{glcII}), 123.0 (C-7), 127.7 (C-2), 139.5 (C-6), 143.4 (C-3), 167.6 (C-1); ESIMS m/z 531 $[M + Na]^+$, 369 $[M + Na - 162]^+$, 207 $[M + Na - 162 - 162]^+$, 507 $[M - H]^-$, 345 $[M - H - 162]^-$, 183 $[M - H - 162 - 162]^-$; HRESIMS m/z 531.2021 $[M + Na]^+$, 369.1502 $[M + Na - 162]^+$ (calcd for $C_{22}H_{36}O_{13}Na$ 531.2054).

Compound (12): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25} +61$ (c 0.1, MeOH); 1H NMR data (CD_3OD , 600 MHz) δ 1.77 (3H, s, Me-10), 1.81 (3H, s, Me-9), 2.23 (2H, m, H₂-5), 2.40 (2H, m, H₂-4), 3.16 (1H, br t, J = 8.0 Hz, H-2_{glc α}), 3.37 (3H, overlapped, H-2_{glc β} , H-3_{glc β} and H-4_{glc β}), 3.38 (1H, overlapped, H-5_{glc α}), 3.52 (1H, m, H-5_{glc β}), 3.69 (1H, t, J = 9.3 Hz, H-3_{glc α}), 4.00 (1H, m, H-4_{glc α}), 4.27 (2H, overlapped, H-6b_{glc α} and H-6b_{glc β}), 4.39 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6a_{glc α}), 4.46 (1H, dd, J = 12.0, 2.0 Hz, H-6a_{glc β}), 4.50 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1_{glc β}), 4.08 (2H, d, J = 7.2 Hz, H₂-8), 5.10 (1H, d, J = 3.5 Hz, H-1_{glc α}), 5.42 (1H, br d, J = 7.0 Hz, H-7), 6.78 (1H, br t, J = 7.6 Hz, H-3); ^{13}C NMR data (CD_3OD , 150 MHz) δ 12.0 (C-9), 23.2 (C-10), 27.4 (C-4), 31.8 (C-5), 64.1 (C-6_{glc α}), 64.8 (C-6_{glc β}), 58.4 (C-8), 70.1 (C-4_{glc β}), 71.0 (C-4_{glc α}), 72.0 (C-5_{glc α}), 74.0 (C-2_{glc α}), 74.1 (C-3_{glc α}), 75.1 (C-5_{glc β}), 76.0 (C-2_{glc β}), 77.5 (C-3_{glc β}), 92.0 (C-1_{glc α}), 97.3 (C-1_{glc β}), 126.6 (C-7), 128.3 (C-2), 136.5 (C-6), 143.6 (C-3), 167.8 (C-1); ESIMS m/z 369 $[M + Na]^+$, 351 $[M + Na - 18]^+$, 207 $[M + Na - 162]^+$; HRESIMS m/z 369.1594 $[M + Na]^+$, 207.0869 $[M + Na - 162]^+$ (calcd for $C_{16}H_{26}O_8Na$ 369.1525).

Acid Hydrolysis of Compounds 1–12. Acid hydrolysis of compounds 1–12 was carried out as reported in a previous study.²⁴ D-Glucose and D-fructose were identified as the sugar moiety in each case by comparison with the retention times of authentic samples.

Preparation of Acetonide Derivative. A suspension of compound 8 (6.0 mg) in tetrahydrofuran (2.0 mL) was treated with 2,2-dimethoxypropane (1 mL), followed by a catalytic amount of anhydrous p-TsOH at 25 °C. After 1 h of stirring, a few drops of Et₃N

were added, and the mixture was concentrated under a vacuum. The residue was partitioned between CHCl₃ and a saturated solution of NaHCO₃, and the chloroform part was concentrated under a vacuum, affording the acetonide 8a.

Zebra fish Embryo Generation and Staging, Treatment Protocol. Zebra fish (*Danio rerio*) embryos were obtained from wild-type fish bought from a local pet store and maintained in low-through aquaria at 28.5 °C on a 14/10 h (light/dark) photoperiod. Embryos were generated by natural mating as described by Kimmel et al.,²⁵ and they were cultured in water at 28.5 °C. All experiments were performed in compliance with the European Directive 2010/63/EU and the ethical guidelines described in the “National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals”. Then, healthy and regular embryos were selected at 24 h postfertilization (hpf), manually dechorionated with forceps, distributed in 96 single well microplates (one embryo per well), and normally incubated with 100 μ L of embryo water containing isolated compounds (2 μ M) or 2-methoxyestradiol (2 μ M), employed as a standard antiangiogenic substance. DMSO (0.2% v/v) was used as a vehicle for those treatments. The control group received only DMSO (0.2% v/v). All treated embryos (10 for each group) were incubated from 24 hpf to 72 hpf (total of 48 h of exposure).

Quantitative Determination of Endogenous Alkaline Phosphatase Activity. Quantitative determination of EAP activity was performed as described by Germano et al.²⁶ Treated zebra fish embryos at 72 hpf were dehydrated with increasing concentrations of ethanol; then they were washed three times with diethanolamine buffer (1 M, pH 9.8) and incubated with the substrate containing 0.5 mg/mL p-nitrophenyl phosphate disodium salt (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. NaOH (2 M) was added to stop the reaction. The optical density of the soluble end product was measured at 405 nm using a microplate reader (Mutiskan GO, Thermo Scientific). Vessel growth was expressed as a percentage of formation with respect to control embryos, which were considered 100%. Each assay was repeated at least three times. The significance of the differences was assessed on the basis of the t-test, considering the differences for $p < 0.05$ and $p < 0.01$, and normally calculated versus control embryos.

Chorioallantoic Membrane Assay. CAM assay was performed following the method of Certo et al.²⁷ Fertilized chicken eggs were incubated at 37 °C. The eggs were positioned horizontally and rotated several times. After 4 days of incubation, a window (1 cm²) was carefully created on the broad side of the egg to assess the extent of embryonic blood vessels. The development of the embryos was checked by a visual inspection. Malformed or dead embryos were excluded. Then, isolated compounds were tested at 2 μ M (100 μ L/egg). Ten eggs were used for each group. DMSO (0.2% v/v) in Tris buffer (pH 7.4) was used as a vehicle for those treatments. Retinoic acid (3 μ M) was used as positive control. After treatment, the eggs were reincubated for other 2 days. At the end of incubation, each egg was observed under a stereomicroscope (SMZ-171 Series, Motic) to visualize the microvasculature of the CAM. The images of each CAM were acquired by a digital camera (Moticam 5 plus) for quantification of the effects on angiogenesis in a standardized area using an open source Java image-processing program. The angiogenic activity was normally expressed as percentage with respect to control, which was considered 100%. Each experiment was repeated three times. The significance of the differences was assessed on the basis of the t-test, considering the differences for $p < 0.05$ and $p < 0.01$, and normally calculated versus control eggs.

ASSOCIATED CONTENT

* Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00893.

HRESIMS and NMR spectra of compounds 1–12 (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +39-050-2219688. Fax: +39-050-2220680. E-mail: alessandra.braca@unipi.it.

ORCID 

Nunziatina De Tommasi: [0000-0003-1707-4156](https://orcid.org/0000-0003-1707-4156)

Alessandra Braca: [0000-0002-9838-0448](https://orcid.org/0000-0002-9838-0448)

Marinella De Leo: [0000-0002-5544-8457](https://orcid.org/0000-0002-5544-8457)

Notes

The authors declare no competing financial interest.

DEDICATION

Dedicated to Dr. Rachel Mata, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, and Dr. Barbara N. Timmerman, University of Kansas, for their pioneering work on bioactive natural products.

REFERENCES

- (1) Tutin, T. G.; Heywood, V. H.; Burges, N. A.; Valentine, D. H.; Walters, S. M.; Webb, D. A. *Flora Europaea*; Cambridge University Press: Cambridge, U.K., 1972; Vol. III, pp 220–221.
- (2) Dobignard, A.; Chatelain, C. *Index Synonymique de la Flore d'Afrique du Nord*; Conservatoire et Jardin Botaniques: Geneva, 2013; Vol. 5, p 66.
- (3) Dawidar, A. M.; Esmirly, S. T.; Al-hajar, A. S. M.; Jakupovic, J.; Abdel-mogib, M. *Phytochemistry* 1989, 28, 3227–3229.
- (4) Salah El Dine, R.; Abdel Monem, A. R.; El-Halawany, A. M.; Hattori, M.; Abdel-Sattar, E. *J. Nat. Prod.* 2011, 74, 943–948.
- (5) Habtemariam, S. *Molecules* 2018, 23, 117/1–117/23.
- (6) Avasthi, P.; Gupta, N.; Sapra, S.; Dhar, K. L. *Int. J. Pharm. Sci. Lett.* 2013, 3, 183–189.
- (7) Beladjila, K. A.; Cotugno, R.; Berrehal, D.; Kabouche, Z.; De Tommasi, N.; Braca, A.; De Leo, M. *Nat. Prod. Res.* 2018, 32, 2025–2030.
- (8) Beladjila, K. A.; Berrehal, D.; De Tommasi, N.; Granchi, C.; Bononi, G.; Braca, A.; De Leo, M. *Planta Med.* 2018, 84, 710–715.
- (9) Munoz Camero, C.; Germano, M. P.; Rapisarda, A.; D'Angelo, V.; Amira, S.; Benchikh, F.; Braca, A.; De Leo, M. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2018, 28, 374–377.
- (10) Quezel, P.; Santa, S. *Nouvelle Flore de l'Algerie et Des Regions Desestiques Meridionales*; C.N.R.S.: Paris, 1963; p 846.
- (11) Hamel, T.; Seridi, R.; de Belair, G.; Slimani, A.; Babali, B. *Rev. Sci. Technol. Synthese* 2013, 26, 65–74.
- (12) Ilieva, E. I.; Handjieva, N. V.; Popov, S. S. *Phytochemistry* 1992, 31, 1040–1041.
- (13) Ercil, D.; Sakar, M. K.; Del Olmo, E.; San Feliciano, A. *Turk. J. Chem.* 2004, 28, 133–139.
- (14) Bianco, A.; Guiso, M.; Iavarone, C.; Trogolo, C. *Gazz. Chim. Ital.* 1974, 104, 731–738.
- (15) Handjieva, N.; Tersieva, L.; Popov, S.; Evstatieva, L. *Phytochemistry* 1995, 39, 925–927.
- (16) Damtoft, S.; Hansen, S. B.; Jacobsen, B.; Jensen, S. R.; Nielsen, B. *J. Phytochemistry* 1984, 23, 2387–2389.
- (17) Kuruzum-Uz, A.; Stoch, K.; Demirezer, L. O.; Zeeck, A. *Phytochemistry* 2003, 63, 956–964.
- (18) Zhang, C. Z.; Xu, X. Z.; Li, C. *Phytochemistry* 1996, 41, 975–976.
- (19) Racine, E.; Burchak, O. N.; Py, S. *Eur. J. Org. Chem.* 2016, 2016, 4003–4012.
- (20) Iwagawa, T.; Asai, H.; Hase, T.; Sako, S.; Su, R.; Hagiwara, N.; Kim, M. *Phytochemistry* 1990, 29, 1913–1916.
- (21) Takeda, Y.; Takechi, A.; Masuda, T.; Otsuka, H. *Planta Med.* 1998, 64, 78–79.
- (22) Arslanian, R. L.; Anderson, T.; Stermitz, F. R. *J. Nat. Prod.* 1990, 53, 1485–1489.
- (23) Koo, H. J.; Lee, S.; Shin, K. H.; Kim, B. C.; Lim, C. J.; Park, E. *H. Planta Med.* 2004, 70, 467–469.
- (24) Milella, L.; Milazzo, S.; De Leo, M.; Vera Saltos, M. B.; Immacolata, F.; Tuccinardi, T.; Lapillo, M.; De Tommasi, N.; Braca, A. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 2104–2112.
- (25) Kimmel, C. B.; Ballard, W. W.; Kimmel, S. R.; Wullmann, B.; Schilling, T. F. *Dev. Dyn.* 1995, 203, 253–310.
- (26) Germano, M. P.; Certo, G.; D'Angelo, V.; Sanogo, R.; Malafrente, N.; De Tommasi, N.; Rapisarda, A. *Nat. Prod. Res.* 2015, 29, 1551–1556.
- (27) Certo, G.; Costa, R.; D'Angelo, V.; Russo, M.; Albergamo, A.; Dugo, G.; Germano, M. P. *Nat. Prod. Res.* 2017, 31, 2850–2856.

ملخص

خلال هذا العمل قمنا بدراسة فيتوكيميائية لثلاثة أنواع نباتية جزائرية: *Cistanche*, *Salvia buchananii* Hedge، *Anarrhinum pedatum* Desf.، *Phelypeae* (L.)
المملكة النباتية. حيث تم فصل وتنقية المركبات المعزولة باستخدام تقنيات كروماتوغرافية مختلفة، من بينها كروماتوغرافيا
الطرود المركزي (CPC). تنتمي هذه المركبات إلى عائلة التربينات و الأريويدات و الفلافونيدات و فينيل إيثانويدات. تم
تحديد البنى الجزيئية للمركبات النقية بواسطة الطرق الطيفية كالرنين النووي المغناطيسي وتطبيقاته NMR 1D-2D،
مطيافية الكتلة (ESIMS/HRESIMS)، وكذا التدوير الضوئي بالإضافة إلى المقارنة مع المعطيات البيبليوغرافية.
بينت التحاليل باستخدام كروماتوغرافيا الطور الغازي GC و كروماتوغرافيا الطور الغازي المتزاوجة مع
مطيافية الكتلة GC/MS للزيت الطيار للنباتة *Salvia buchananii* بأنه يحتوي على المركبات الأساسية:
β-pinene (11.5%)، *camphene* (16.5%)، *α-pinene* (19.8%)، *1,8-cineole* (23.3%) وقد بين الزيت
الأساسي فعالية مضادة للأكسدة جيدة و هذا بتقنية *β-carotène*.

قمنا كذلك بدراسة الفعالية البيولوجية للمركبات المعزولة النقية، حيث أظهر المركبان (SBR₁ و SBR₂) فعالية
معتبرة على تثبيط النمو والتكاثر على نوع من الخلايا السرطانية HeLa. في حين تبين أن للمركبان (CT₁-CT₇) نشاطا
مثبطا على *HmagI*. و تعتبر هذه الدراسة الأولى من نوعها و التي تبين قدرة المركبات الطبيعية فينيل إيثانويدات على
تثبيط MAGL. من بين المركبات النقية المختبرة من نباتة *Anarrhinum pedatum*، المركب الجديد (APD₁₄) هو
الوحيد الذي أظهر استجابة جيدة *anti-angiogénique*.

الكلمات المفتاحية: نشاطات بيولوجية، الزيوت الطيارة، مطيافية الرنين النووي المغناطيسي، مطيافية الكتلة، التربينات،
الأريويدات، الفلافونيدات، فينيل إيثانويدات، *anti-angiogénique*

Lamiaceae, Orobanchaceae, Scrophulariaceae,

Résumé :

Dans ce travail de thèse, nous avons mené une étude phytochimique sur trois espèces : *Salvia buchananii* Hedge, *Cistanche phelypeae* (L.) Coutinho et *Anarrhinum pedatum* Desf. **37** composés ont été isolés à l'aide de différentes méthodes chromatographiques de séparation et de purification. Parmi ces composés, **17** correspondent à des molécules nouvellement décrites. Les composés isolés peuvent être classés en plusieurs groupes : triterpènes, phénylétanoïdes, iridoïdes, flavonoïdes, acides phénoliques. L'analyse GC et GC/MS d'huile essentielle de l'espèce *S. buchananii*, a montré que cette huile est majoritairement composée : 1,8-cineole (**23.3%**), α -pinène (**19.8%**), camphène (**16.5%**) et de β -pinène (**11.5%**). Cette huile a montré une bonne activité antioxydante avec le test de blanchissement du β -carotène. L'évaluation de l'activité antiproliférative a été effectuée sur deux triterpènes (**SBR₁** et **SBR₂**), possèdent une cytotoxicité intéressante sur les lignées HeLa. De plus, les composés (**CT₁** à **CT₇**) ont manifesté une activité inhibitrice sur *hMAGL*. Il s'agit du premier rapport sur la présence naturelle de phénylétanoïde comme inhibiteur de la MAGL. Parmi les produits purs testés d'*A. pedatum*, le nouveau iridoïde (**APD₁₄**) est le seul à posséder une excellente activité anti-angiogénique.

Mots clés : Lamiaceae, Orobanchaceae, Scrophulariaceae, triterpènes, phénylétanoïdes, iridoïdes, Huile essentielle, activité biologique, RMN et spectroscopie de masse.

Abstract :

In this thesis, we carried out a phytochemical study on three plants : *Salvia buchananii* Hedge, *Cistanche phelypeae* (L.) Coutinho and *Anarrhinum pedatum* Desf. **37** compounds were isolated by the use of different chromatographic methods of separation and purification. Amongst them, **17** were new molecules. The isolated compounds were classified into many groups : triterpenes, phenylethanoid, iridoids, flavonoids, phénylétanoïdes. GC and GC/MS analyses of the essential oil of *S. buchananii* showed that it was mainly represented by : 1,8-cineole (**23.3%**) α -pinene (**19.8%**), camphene (**16.5%**) and the β -pinene (**11.5%**). This oil showed a good antioxidant activity by the bleaching of β -carotene. The cytotoxic activity of the triterpenes **SBR₁** and **SBR₂** showed an interesting antiproliferative activity with similar potency in all cell lines HeLa. In addition, several compounds (**CT₁**-**CT₇**) showed a promising activity on *hMAGL*. This is the first report of naturally occurring phenyletanoid as a MAGL inhibitor. Moreover, the new iridoid compound (**APD₁₄**) the *A. pedatum* exhibited the most potential antiangiogenic activity.

Keywords : Lamiaceae, Orobanchaceae, Scrophulariaceae, triterpènes, phenylethanoid, iridoids, essential oil, biological activities, NMR and mass spectroscopy.